

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Σύνθεση και μελέτη νέων αναστολέων ενδοκυτταρικών
φωσφολιπασών A_2 με πιθανή αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική
δράση»*

ΑΝΝΕΤΑ Π. ΣΜΥΡΝΙΩΤΟΥ

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Βιολέττα Κωνσταντίνου – Κόκοτου

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Σύνθεση και μελέτη νέων αναστολέων ενδοκυτταρικών
φωσφολιπασών A_2 με πιθανή αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική
δράση»*

ΑΝΝΕΤΑ Π. ΣΜΥΡΝΙΩΤΟΥ

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Βιολέττα Κωνσταντίνου – Κόκοτου

ΑΘΗΝΑ 2015

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*«Σύνθεση και μελέτη νέων αναστολέων ενδοκυτταρικών
φωσφολιπασών A_2 με πιθανή αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική
δράση»*

ANNETA Π. ΣΜΥΡΝΙΩΤΟΥ

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Βιολέττα Κωνσταντίνου – Κόκοτου

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Βιολέττα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α. (Επιβλέπουσα)

Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α. (μέλος)

Διονύσιος Βουρλούμης, Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος (μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Βιολέττα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

Διονύσιος Βουρλούμης, Ερευνητής Α' Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος

Μόσχος Πολυσίου, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, Καθηγήτρια Α.Π.Θ.

Παναγιώτα Μουτεβελή-Μηνακάκη, Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α

Βικτώρια Μαγκριώτη, Λέκτορας Ε.Κ.Π.Α.

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



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Σύνθεση και μελέτη νέων αναστολέων ενδοκυτταρικών φωσφολιπασών A₂ με πιθανή αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση»

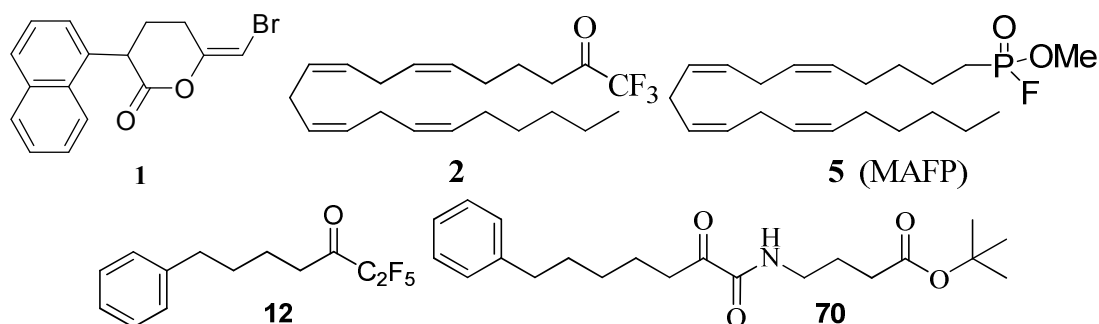
Αννέτα Π. Σμυρνιώτου

Οι φωσφολιπάσες A₂ είναι ένζυμα που υδρολύουν τον εστερικό *sn*-2 δεσμό των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Αποτέλεσμα της υδρόλυσης αυτής είναι η απελευθέρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων και λυσοφωσφολιπιδίων, προϊόντα που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις εικοσανοειδών και άλλων βιοδραστικών μορίων. Τα εικοσανοειδή, δηλαδή τα λευκοτριένια, τα θρομβοξάνια και οι προσταγλανδίνες συμμετέχουν σε πληθώρα φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου μεταξύ των οποίων και η δημιουργία φλεγμονής που σε παθολογικές καταστάσεις συνδέεται με ασθένειες όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι καρδιακές διαταραχές. Τα λυσοφωσφολιπίδια αποτελούν πρόδρομες ενώσεις του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) ο οποίος εμπλέκεται ιδιαίτερα στη φλεγμονή ενώ τα ίδια ενεργοποιούν τα λευκοκύτταρα του αίματος και μπορούν σε υψηλές συγκεντρώσεις να προκαλέσουν ιστικές βλάβες, γαστρικό έλκος, καρκινικό πολλαπλασιασμό και μεταστάσεις. Επομένως, τα ένζυμα αυτά αποτελούν ενδιαφέροντες φαρμακευτικούς στόχους και η σύνθεση νέων ισχυρών αναστολέων τους μπορεί να οδηγήσει σε νέα φάρμακα για την καταπολέμηση ποικίλων σύγχρονων ασθενειών όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας και ο καρκίνος.

Η υπεροικογένεια των φωσφολιπασών αποτελείται από πέντε κύριες ομάδες: τις εκκρινόμενες PLA₂, τις κυτοσολικές, τις ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου, τις ακετυλοϋδρολάσες του PAF και τη λυσοσωμική PLA₂. Η GIVA cPLA₂ και η GVIA iPLA₂ είναι τα περισσότερο μελετημένα ένζυμα της οικογένειας αυτής και έχουν συνδεθεί με την ανάπτυξη και εξέλιξη πληθώρας ασθενειών. Η cPLA₂ είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο βάρους 85 kDa με εξειδίκευση στα φωσφολιπιδικά υποστρώματα που περιέχουν το αραχιδονικό οξύ. Το ενεργό της κέντρο εμπεριέχει την καταλυτική δυάδα Ser/Asp ενώ η δράση της ρυθμίζεται από την παρουσία ιόντων Ca²⁺. Το ένζυμο αυτό έχει βρεθεί να παίζει ρόλο στην παθοφυσιολογία ασθενειών του εγκεφάλου (Πάρκινσον), του νευρικού συστήματος (σκλήρυνση κατά πλάκας) και στον καρκίνο. Από την άλλη πλευρά, η iPLA₂ αποτελείται από 2 κύριες ισομορφές μοριακού βάρους 85-90 kDa και το ενεργό της κέντρο είναι τύπου λιπάσης Gly-X-Ser-X-Gly. Η ρύθμιση του ενζύμου είναι ανεξάρτητη των ιόντων ασβεστίου και πραγματοποιείται είτε μέσω της δράσης του ενζύμου κασπάση-3 ή μέσω της πρόσδεσης ενός μορίου ATP. Η iPLA₂ παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η

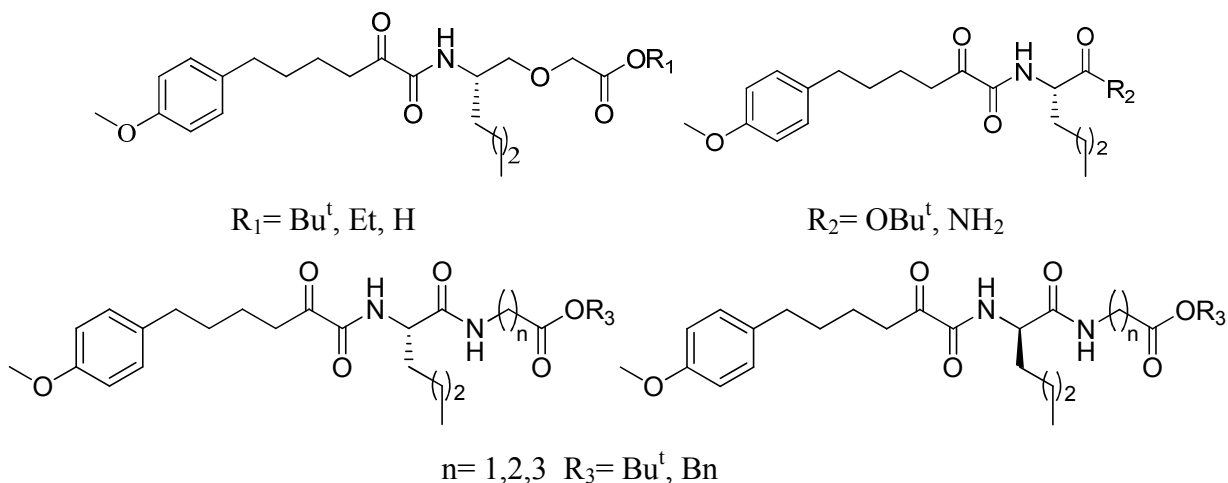
απόπτωση αλλά χαρακτηρίζεται κυρίως από την ιδιότητα να διατηρεί την ομοιόσταση της φωσφολιπιδικής μεμβράνης. Έχει συσχετιστεί με τη παθοφυσιολογία διαφόρων νοσημάτων όπως η σχιζοφρένεια, ο διαβήτης, η γένεση και η εξέλιξη του καρκίνου. Όλα αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη αναστολέων έναντι των ενζύμων αυτών και ιδίως της iPLA₂ αποτελεί σημαντικό ερευνητικό στόχο τόσο για την περαιτέρω διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας του ενζύμου όσο και για την δημιουργία νέων φαρμακευτικών προϊόντων.

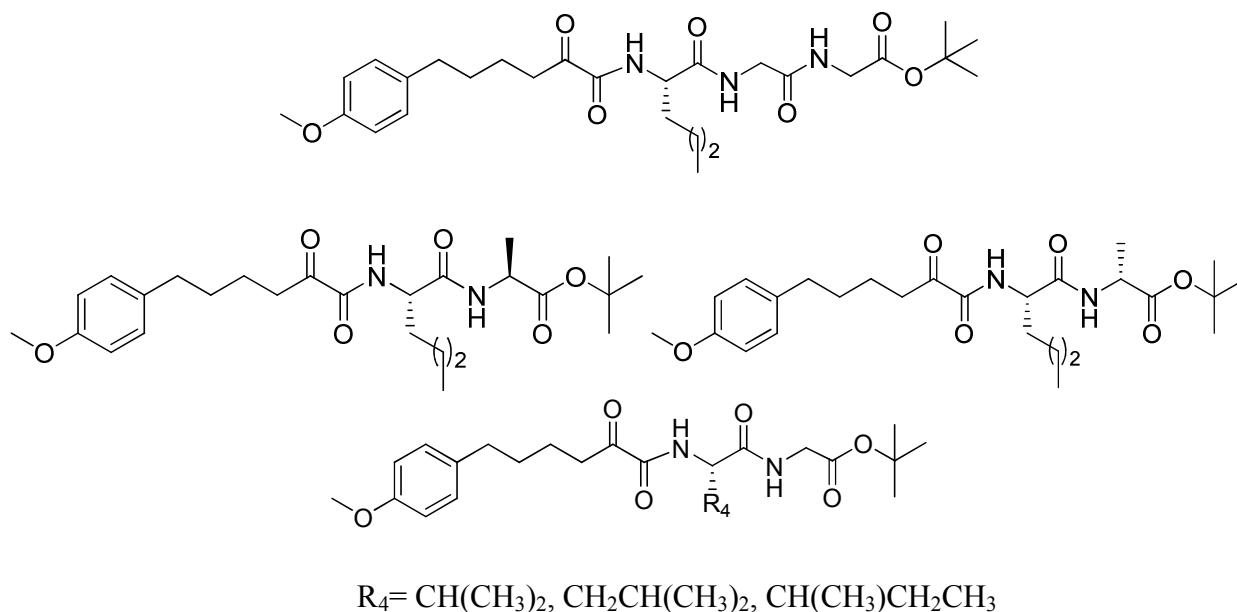
Οπότε, στη βιβλιογραφία αναφέρεται πληθώρα αναστολέων της iPLA₂ με τους σημαντικότερους και ισχυρότερους να είναι η βρωμοενολο-λακτόνη, οι τριφθορομέθυλο κετόνες, οι μέθυλο φθοροφωσφονικοί εστέρες, οι πολυφθοροκετόνες και τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα. Παρακάτω φαίνονται κάποιες χαρακτηριστικές δομές από κάθε κατηγορία αναστολέων.



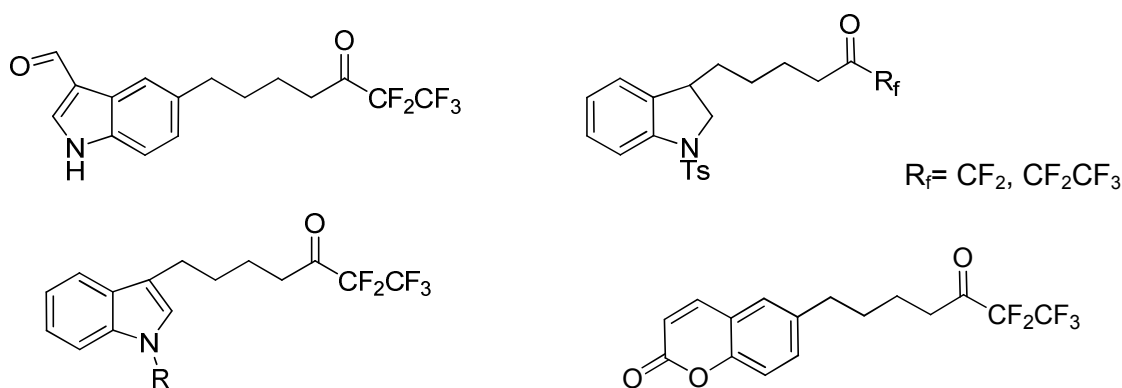
Η μελέτη της δραστηριότητας των γνωστών αναστολέων της βιβλιογραφίας και η σχέση δομής-δράσης τους οδήγησε στο σχεδιασμό και τη σύνθεση 2-οξοαμιδικών παραγώγων και πολυφθοροκετονικών ενώσεων ως πιθανούς αναστολείς της ανεξάρτητης ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάσης A₂. Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν:

1) 2-Οξοαμιδικά παράγωγα που περιλαμβάνουν έναν παρα-μεθόξυ υποκατεστημένο αρωματικό πυρήνα σε απόσταση τεσσάρων ανθρακοατόμων από το ενεργοποιημένο καρβονύλιο ακολουθούμενο από ένα άμινο συστατικό το οποίο διαφοροποιείται σε κάθε παράγωγο.





2) Πολυφθοροκετονικές ενώσεις που περιλαμβάνουν έναν ετεροκυκλικό αρωματικό δακτύλιο, μια αλυσίδα τεσσάρων ανθρακοατόμων και το ενεργοποιημένο καρβονύλιο της πολυφθορομάδας.



Η ενζυμική αποτίμηση των αναστολέων που παρασκευάστηκαν έναντι των φωσφολιπασών GIVA cPLA₂, GVIA iPLA₂ και GV sPLA₂ πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* πειράματα χρησιμοποιώντας την μέθοδο μικτών μικκυλίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πολύ καλή αναστολή και καλή εκλεκτικότητα ως προς την iPLA₂ έδειξαν τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα που περιείχαν το διπεπτίδιο νορλευκίνη – γλυκίνη και *tert*-βουτυλεστέρα ή βενζυλεστέρα και αυτό που περιείχε το διπεπτίδιο λευκίνης – γλυκίνης και *tert*-βουτυλεστέρα ενώ τη μέγιστη αναστολή την παρουσίασε το 2-οξοαμίδιο που περιείχε το διπεπτίδιο γλυκίνης – γ-αμινοβουτυρικού οξέος με τον *tert*-βουτυλεστέρα με 99.9% αναστολή και $X_I(50) = 0.007$. Οι πολυφθοροκετονικές ενώσεις γενικά έδειξαν χαμηλή έως μέτρια αναστολή με την ισχυρότερη αναστολή ως προς την iPLA₂ να την παρουσιάζει η πενταφθοροαιθυλο-κετόνη που περιείχε το μεθυλο-προστατευμένο ινδόλιο και μια αλυσίδα τεσσάρων ανθρακοατόμων με 93%.

ABSTRACT

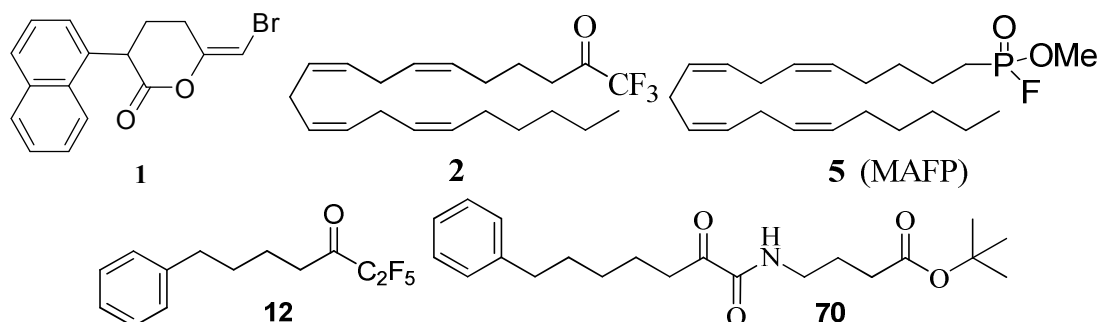
“Synthesis and study of novel inhibitors of intracellular phospholipases A₂ with possible anti-inflammatory and anticancer action”

Anneta P. Smyrniotou

Phospholipases A₂ are enzymes that hydrolyze the *sn*-2 ester bond of the cellular membrane's phospholipids. This hydrolysis has as a result the release of free fatty acids and lysophospholipids, precursors of eicosanoids and other bioactive molecules. Eicosanoids, as are leukotriens, thromboxans and prostaglandins participate in a plethora of normal functions in the cell among which is the creation of inflammation that in pathological conditions is associated to illnesses such as cancer, autoimmune diseases and cardiac disorders. Lysophospholipids are precursors of the platelet-activating factor (PAF) which is involved in inflammation while lysophospholipids themselves activate blood leukocytes and in high concentrations may cause tissue damage, gastric ulcer, tumor proliferation and metastasis. Therefore, these enzymes constitute interesting pharmaceutical targets and synthesis of new potent inhibitors can lead to novel drugs for the cure of contemporary diseases such as multiple sclerosis and cancer.

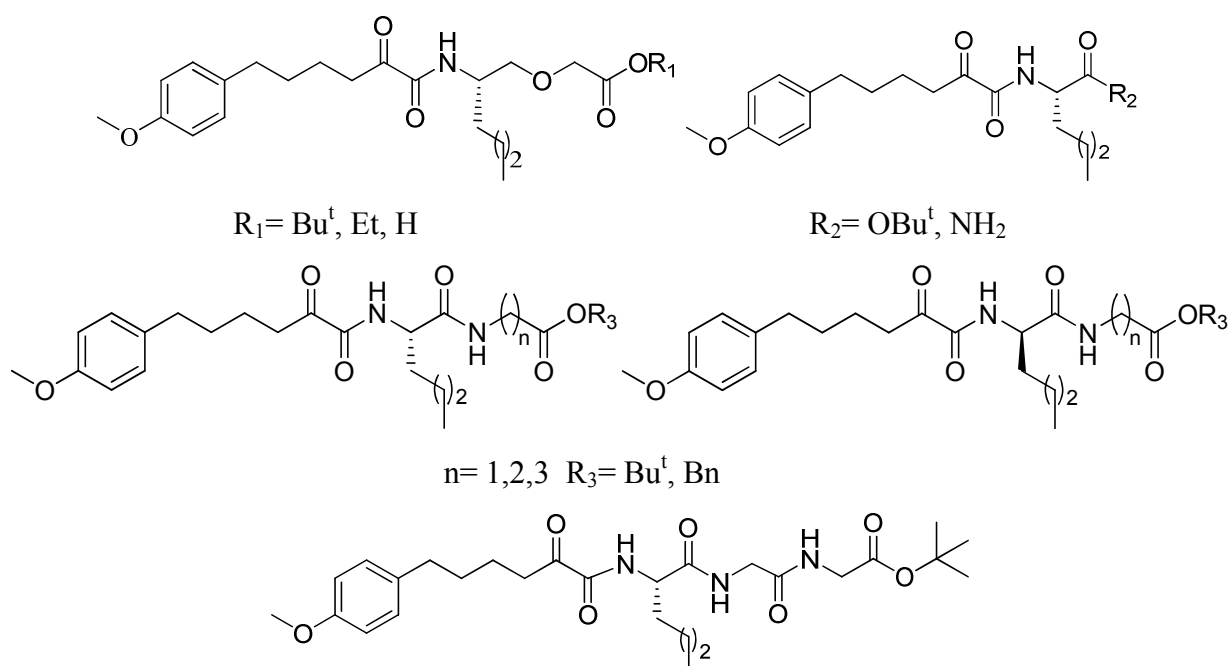
The superfamily of phospholipases consists of five main groups: the secreted PLA₂, the cytosolic, the Ca²⁺-independent, PAF-acetylhydrolases and the lysosomal PLA₂. GIVA cPLA₂ and GVIA iPLA₂ are the most studied enzymes of this family and have been associated with the development and progression of multiple diseases. cPLA₂ is a cytosolic enzyme of 85 kDa with specificity towards phospholipid substrates that contain arachidonic acid. Its active center contains the catalytic dyad Ser/Asp while its action is regulated by the presence of Ca²⁺ ions. This enzyme has been found to play a role in the pathophysiology of brain diseases (Parkinson), disorders of the nervous system (multiple sclerosis) and in cancer. On the other hand, iPLA₂ consists of two isoforms weighted 85-90 kDa and its active center is a lipase type Gly-X-Ser-X-Gly. Regulation of this enzyme is independent of calcium ions and it takes place either through the activity of enzyme caspase-3 or through the attachment of an ATP molecule. iPLA₂ has a great part in many physiological cellular functions as are the growth, the proliferation and the apoptosis but mostly is characterized by its ability to maintain the homeostasis of the phospholipid membrane. It has been associated with the pathophysiology of various diseases such as schizophrenia, diabetes, genesis and progression of cancer. All these data suggest that the development of inhibitors of these enzymes and mostly of iPLA₂ is an important research target for both further investigation of the structure and function of the enzyme and the creation of new medicines.

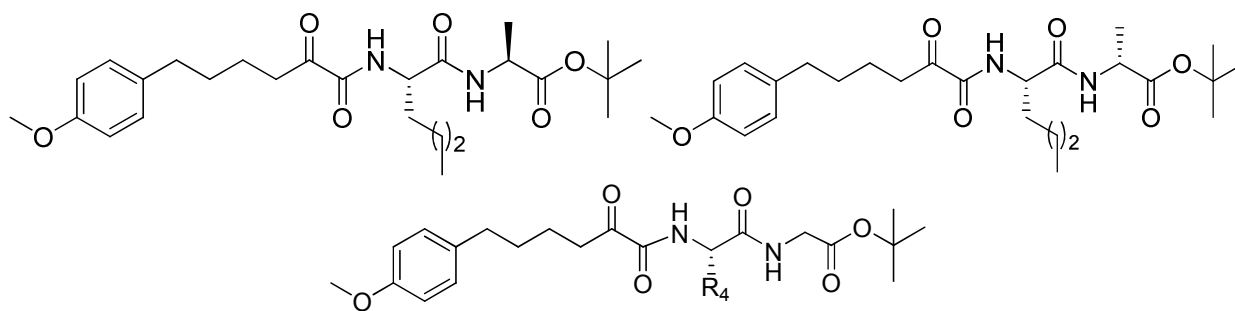
Thus, a plethora of inhibitors of iPLA₂ is reported in the literature and the most important and potent are bromoenol-lactone, trifluoromethyl ketones, methyl fluorophosphonic esters, polyfluoroketones and 2-oxoamides. Below some typical structures of each category of inhibitors are shown.



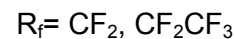
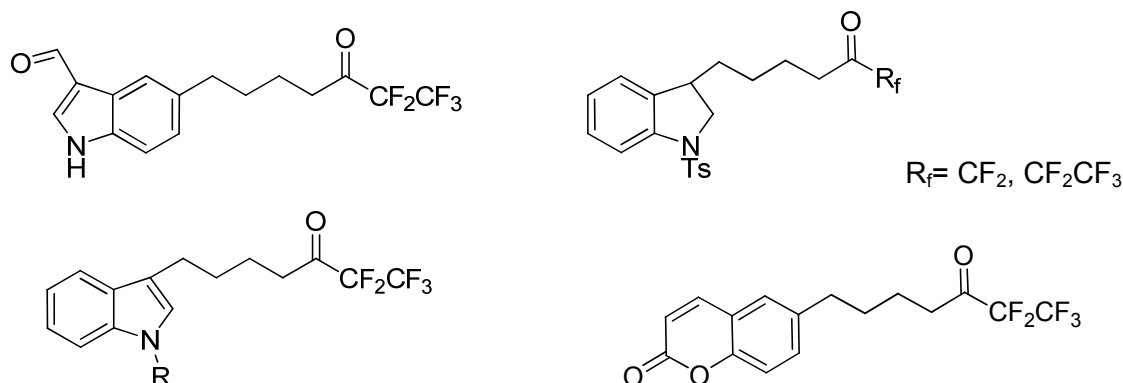
Studying of the activity of known inhibitors in the literature and their structure-activity relationship led to the design and synthesis of 2-oxoamide derivatives and polyfluoroketone compounds as possible inhibitors of the Ca²⁺-independent phospholipase A₂. In the present work the following were synthesized:

1) 2-Oxoamide derivatives that contain a para-methoxy substituted aromatic core in a distance of four carbon atoms from the activated carbonyl followed by an amino component which differentiates in each derivative.





2) Polyfluoroketone compounds that contain a heterocyclic aromatic ring, a chain of four carbon atoms and the activated carbonyl of the polyfluorogroup.



The enzymatic assays of the inhibitors prepared against phospholipases GIVA cPLA₂, GVIA iPLA₂ and GV sPLA₂ were performed in *in vitro* experiments using the method of mixed micelles. The results showed that 2-oxoamides which presented very good inhibition and good selectivity are those that contained dipeptide norleukine – glycine and a *tert*-butylester or a benzylester and the one which contained dipeptide leukine – glycine and a *tert*-butylester which the greatest inhibition showed the 2-oxoamide that contained dipeptide glycine – γ -aminobutyric acid with the *tert*-butylester by 99.9% and $X_I(50) = 0.007$. Generally, polyfluoroketones showed low to medium inhibition towards iPLA₂. Pentafluoroethyl-ketone containing a methyl-protected indole and a four-carbon chain presented the highest inhibition of 93%.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο χρονικό διάστημα από Φεβρουάριο 2011 έως Ιανουάριο 2015 υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κ. Βιολέττας Κωνσταντίνου – Κόκοτου. Το θέμα της διατριβής εντάσσεται στο ευρύτερο πλαίσιο έρευνας που αφορά το σχεδιασμό, τη σύνθεση και τη μελέτη νέων ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων φωσφολιπασών A_2 με πιθανή βιολογική δράση. Η διδακτορική αυτή έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα υποτροφιών «Ηράκλειτος ΙΙ» στα πλαίσια του ΕΣΠΑ με τη συμβολή της Ευρωπαϊκής Ένωσης και της Ελλάδας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Βιολέττα Κωνσταντίνου – Κόκοτου για την ανάθεση του θέματος και την παρακολούθηση όλης της πορείας της διδακτορικής μου έρευνας καθώς και για την επιστημονική και όχι μόνο καθοδήγησή της στη διάρκεια αυτής. Επίσης, ευχαριστώ τον καθηγητή ΕΚΠΑ κ. Γεώργιο Κόκοτο για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγησή του και για την παροχή της χρήσης ορισμένων απαραίτητων για την έρευνα οργάνων του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας. Ευχαριστώ τον κ. Διονύση Βουρλούμη, ερευνητή Α' του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος για τις συμβουλές του και τις πολύτιμες διορθώσεις του. Ακόμα, ευχαριστώ τον καθηγητή Edward A. Dennis του τμήματος Χημείας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνιας για τις μελέτες αναστολής που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τις Δρ. Lucyna Lekawska, Δρ. Ειρήνη Αναστασάκη, τους υποψήφιους διδάκτορες Λευτέρη Πετράκη και Άννα Αποστόλου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών για τη φιλία τους και την ευχάριστη παρέα τους εντός και εκτός του εργαστηρίου και για τη στήριξη που έδειξαν όταν οι στιγμές ήταν δύσκολες. Περισσότερα ευχαριστώ αξίζουν στον Λευτέρη Πετράκη που θυσιάσε το Σάββατό του για να λάβει τα δικά μου φάσματα IR, αναγκαία για τη δική μου έρευνα. Γενικά ευχαριστώ όλο το προσωπικό και τους φοιτητές του εργαστηρίου Χημείας γιατί όλοι συμμετείχαν λίγο ως πολύ στην εμπειρία ζωής που έλαβα κατά τη διάρκεια αυτού του διδακτορικού.

Από τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημείας στο Πανεπιστήμιο Αθηνών θα ήθελα να ευχαριστήσω τους λέκτορες Βικτώρια Μαγκριώτη και Χριστόφορο Κόκοτο για τη βοήθειά τους σε διάφορα θέματα του πειραματικού μέρους του διδακτορικού μου όπως και τη Δρ. Ευφροσύνη Μπαρμπαγιάννη για τη βοήθεια που μου πρόσφερε χωρίς δεύτερη σκέψη και την ευχάριστη παρέα της. Ακόμη ένα ευχαριστώ ανήκει σε όλους τους υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς φοιτητές, λέκτορες, καθηγητές κ.τ.λ. του εργαστηρίου αυτού για τη βοήθεια και την υπομονή τους όσον αφορά τη χρήση των οργάνων

του εργαστηρίου. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τη Δρ. Εσθήρ Σακκή για τη λήψη των φασμάτων μάζας καθόλη τη διάρκεια του διδακτορικού και τη Δρ. Μαρούλα Κόκοτου για τη λήψη των φασμάτων μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους γονείς μου και την οικογένειά μου οι οποίοι είναι πάντα εκεί, είτε το ζητήσω ή όχι, και με στηρίζουν συνεχώς τόσο υλικά όσο και συναισθηματικά. Ευχαριστώ τον Γιώργο που σχεδόν 10 χρόνια τώρα βρίσκεται στο πλευρό μου και όσους με περιβάλλουν με την αγάπη τους. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον ένα και μοναδικό Θεό μας, τον πανταχού παρόντα και τα πάντα πληρόντα, που μου παρέχει τα πάντα στη ζωή και που με έχει οδηγήσει στον Δάσκαλο αυτής.

Αννέτα Σμυρνιώτου

Φεβρουάριος 2015

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA: αραχιδονικό οξύ
AACOCF₃: τριφθορομέθυλο κετόνη του αραχιδονικού οξέος
AcNH-Tempo: 4-ακεταμιδο-2,2,6,6-τετραμεθυλο-1-πιπεριδινυλόξυ
ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη
BEL: βρωμοενολο-λακτόνη
Bn: βένζυλο
Cbz: καρβοβενζόξυ
cPLA₂: κυτοσολική φωσφολιπάση A₂
DCC: *N,N*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο
DIBAL-H: υδρίδιο του δισοβουτυλο-αργιλίου
DMAP: 4-διμεθυλαμινο-πυριδίνη
DMF: διμεθυλοφορμαμίδιο
EAE: πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα
EGF: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
ER: ενδοπλασματικό δίκτυο
HDL: λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
HIV: ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας
HOBt: 1-υδροξυ-βενζοτριαζόλιο
iPLA₂: ανεξάρτητη ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάση A₂
LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
LPA: λυσοφωσφατιδικό οξύ
lysoPC: λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
MAFP: μεθυλοφθοροφωσφονικός εστέρας
MAPK: πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνο
MMP: μεταλλοπρωτεΐνάσες μήτρας
NMM: *N*-μεθυλομορφολίνη
PACOCF₃: τριφθορομεθυλοκετόνη του παλμιτικού οξέος
PAF: παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AH: ακετυλοϋδρολάσες του PAF
PC: φωσφατιδυλοχολίνη
PE: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PIP₂: 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη

PKC: πρωτεϊνική κινάση C
PLA₁: φωσφολιπάση A₁
PLA₂: φωσφολιπάση A₂
PLC: φωσφολιπάση C
sPLA₂: εκκρινόμενη φωσφολιπάση A₂
TFA: τριφθοροξικό οξύ
TFAA: τριφθοροξικός ανυδρίτης
THF: τετραϋδροφουράνιο
TMG: τετραμεθυλογουανιδίνη
Ts: τοσυλο
WSCl: N-αιθυλο-N'-διμεθυλαμινοπροπυλοκαρβοδιμίδιο

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	v
Abstract	viii
Ευχαριστίες	xi
Συντομογραφίες	xiii
Περιεχόμενα	xv

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: Φωσφολιπάσες A₂

1.1	Εισαγωγή	1
1.2	Γενικά για τις φωσφολιπάσες	3
1.3	Λειτουργία φωσφολιπασών A ₂	4
1.4	Κατηγοριοποίηση φωσφολιπασών A ₂	5
1.4.1	Εκκρινόμενες PLA ₂ (sPLA ₂)	6
1.4.2	PAF ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AH)	9
1.4.3	Λυσοσωμικές PLA ₂	12
1.4.4	Κυτοσολικές PLA ₂ (cPLA ₂)	13
1.4.5	Ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου PLA ₂ (iPLA ₂)	15
1.5	Η ομάδα GIVA cPLA ₂	18
1.5.1	Δομή και δραστηριότητα της GIVA cPLA ₂	18
1.5.2	Βιολογικός ρόλος της GIVA cPLA ₂	22
1.6	Η ομάδα GVIA iPLA ₂	25
1.6.1	Δομή και δραστηριότητα της GVIA iPLA ₂	25
1.6.2	Βιολογικός ρόλος της GVIA iPLA ₂	28

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: Αναστολείς της iPLA₂

2.1	Εισαγωγή	33
2.2	Η βρωμοενολο-λακτόνη	33
2.3	Τριφθορομέθυλο κετόνες και μέθυλο φθοροφωσφονικοί εστέρες	35
2.4	Πολυφθοροκετόνες	36
2.5	2-Οξοαμιδικά παράγωγα	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Σκοπός της διατριβής

53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: Σχεδιασμός, σύνθεση και μελέτη αναστολέων της iPLA₂

A. 2-οξοαμιδικά παράγωγα	55
1. Σχεδιασμός των 2-οξοαμιδικών παραγώγων	55
2. Σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων	57
2.1 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης	57
2.2 Σύνθεση του 2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξανοϊκού οξέος	61
2.3 Σύνθεση των 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν αιθερικό ψευδοδιπεπτίδιο (Ομάδα I)	
2.3.1 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)tert-βουτυλεστέρα	63
2.3.2 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)οξικού-αιθυλεστέρα	64
2.3.3 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)οξικού οξέος	65
2.4 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων – παραγώγων της L-νορλευκίνης (Ομάδα II)	
2.4.1 Σύνθεση του (S)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξανοϊκού tert-βουτυλεστέρα	65
2.4.2 Σύνθεση του (S)-N-(1-αμινο-1-οξοεξαν-2-υλ)-6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδίου	66
2.5 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν διπεπτίδιο με την L- ή D-νορλευκίνη (Ομάδα III)	
2.5.1 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικού tert-βουτυλεστέρα	66
2.5.2 Σύνθεση του (S)-3-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκού tert-βουτυλεστέρα	67
2.5.3 Σύνθεση του (S)-4-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)βουτανοϊκού tert-βουτυλεστέρα	68
2.5.4 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικού βενζυλεστέρα	69
2.5.5 Σύνθεση του (R)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικού tert-βουτυλεστέρα	69
2.6 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν ένα τριπεπτίδιο (Ομάδα IV)	
2.6.1 Σύνθεση του (S)-2-(2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)-ακεταμιδο)οξικού tert-βουτυλεστέρα	70

2.7	Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν ένα διπεπτίδιο L-νορλευκίνης-αλανίνης (L-ή D-) (Ομάδα V)	
2.7.1	Σύνθεση του (S)-2-((S)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο) προπανοϊκού <i>tert</i> -βουτυλεστέρα	71
2.7.2	Σύνθεση του (R)-2-((S)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-εξαναμιδο)-προπανοϊκού <i>tert</i> -βουτυλεστέρα	72
2.8	Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν ένα διπεπτίδιο της γλυκίνης (Ομάδα VI)	
2.8.1	Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-3-μεθυλβουταναμιδο)οξικού <i>tert</i> -βουτυλεστέρα	72
2.8.2	Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-4-μεθυλπενταναμιδο)οξικού <i>tert</i> -βουτυλεστέρα	73
2.8.3	Σύνθεση του 2-((2S,3R)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-3-μεθυλπενταναμιδο)οξικού <i>tert</i> -βουτυλεστέρα	74
3.	Επιλεγμένα φασματοσκοπικά δεδομένα 2-οξοαμιδίων	75
B.	Φθοροκετονικά παράγωγα	91
1.	Σχεδιασμός των φθοροκετονικών ενώσεων	91
2.	Σύνθεση των τριφθορομεθυλο- και πενταφθοροαιθυλο-κετονών	92
2.1	Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης φθοροκετονικών ενώσεων	92
2.2	Σύνθεση της φθοροκετονικής ένωσης της ομάδας I	
2.2.1	Σύνθεση της 5-(6,6,7,7,7-πενταφθορο-5-οξοεπτυλ)-1H-3-καρβαλδεΐδης του ινδολίου	94
2.3	Σύνθεση των φθοροκετονικών παραγώγων της ομάδας II	
2.3.1	Σύνθεση της 1,1,1-τριφθορο-6-(1-τοσυλινδολιν-3-υλ)εξανόνης-2	95
2.3.2	Σύνθεση της 1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-{1-[(4-μεθυλφαινυλ)σουλφονυλ-2,3-διϋδρο-1H-ινδολ-3-υλ]επτανόνης-3	98
2.4	Σύνθεση των φθοροκετονικών ενώσεων της ομάδας III	
2.4.1	Σύνθεση της 1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-(1-τοσυλ-1H-ινδολ-3-υλ)-επτανόνης-3	98
2.4.2	Σύνθεση της 1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ)-επτανόνης-3	99
2.5	Σύνθεση της φθοροκετονικής ένωσης της ομάδας IV	
2.5.1	Σύνθεση της 6-(6,6,7,7,7-πενταφθορο-5-οξοεπτυλ)-2H-χρωμενόνης-2	99
3.	Επιλεγμένα φασματοσκοπικά δεδομένα φθοροκετονών	100
Γ.	Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων έναντι της iPLA₂	107

Δ. Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των ενώσεων	113
--	------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο: Πειραματικές μέθοδοι – χαρακτηρισμοί ενώσεων

5.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος	114
5.1.1 Αντιδραστήρια	114
5.1.2 Χρωματογραφικός έλεγχος αντιδράσεων	114
5.1.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός ενώσεων	115
5.1.4 Χαρακτηρισμός ενώσεων	115
5.2 Συνθετικές Μέθοδοι - Χαρακτηρισμοί Ενώσεων	116
Βιβλιογραφία	178

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A₂

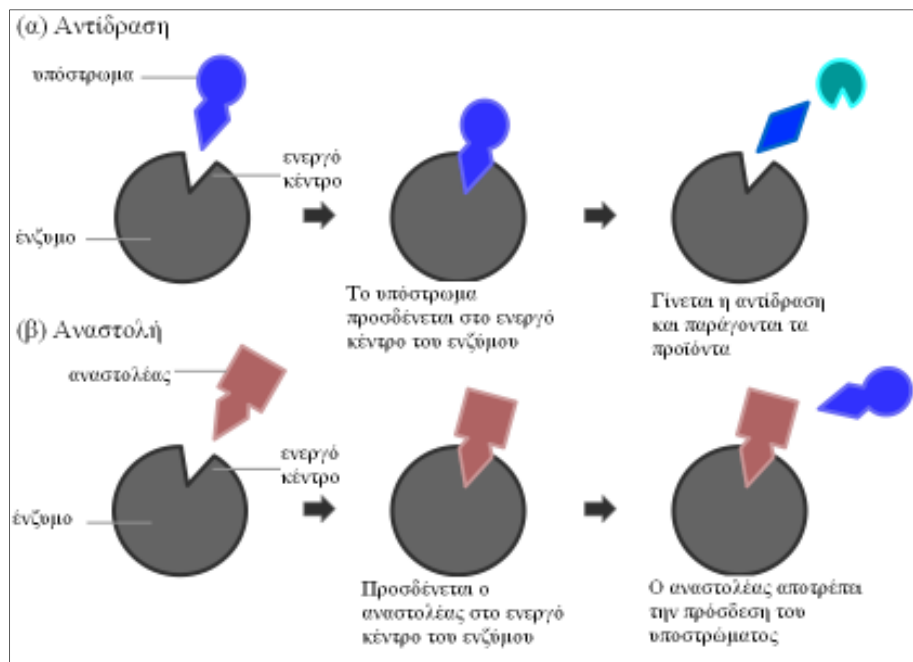
1.1 Εισαγωγή

Τα **ένζυμα** είναι καταλύτες που ενυπάρχουν στα έμβια όντα, έχουν πρωτεϊνική σύσταση και κυρίαρχος ρόλος τους είναι να επιταχύνουν διάφορες βιολογικές αντιδράσεις απαραίτητες για την ύπαρξη και τη λειτουργία του έμβιου οργανισμού. Γενικά, κάθε ένζυμο δρα σε συγκεκριμένη ένωση ή ομάδα ενώσεων, τα οποία ονομάζονται υποστρώματα, και σχηματίζει συγκεκριμένο προϊόν ή προϊόντα.¹ Οπότε τα ένζυμα ως πρωτεΐνες διέπονται από όλες τις ιδιότητές τους, δηλαδή επηρεάζονται από τη θερμοκρασία, το pH και άλλους παράγοντες ενώ η δραστηρότητά τους οφείλεται στην τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους. Η δομή αυτή, η οποία προσδίδει τη διαμόρφωση του ενζύμου στο χώρο, σχηματίζει και το **ενεργό κέντρο** ή ενεργή περιοχή του ενζύμου όπου πραγματοποιείται η αντίδραση.²

Ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα των ενζύμων είναι ότι επιδρούν μόνο στην ταχύτητα της αντίδρασης και όχι στη δομή ή στη σύνθεση των αντιδρώντων και των προϊόντων ενώ το ένζυμο αναγεννάται μετά από κάθε αντίδραση και μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί μέχρι να καταστραφεί ή να απενεργοποιηθεί με κάποιο τρόπο. Το εκάστοτε υπόστρωμα προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals και όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση το προϊόν ή τα προϊόντα απελευθερώνονται, για να δεσμευθεί άλλο ένα υπόστρωμα. Με τον τρόπο αυτό το ένζυμο οδηγεί την αντίδραση μέσω μιας πορείας με μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης από ότι χωρίς αυτό και αυξάνει την ταχύτητά της.³

Η δραστηρότητα ενός ενζύμου ή η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το pH και η θερμοκρασία αλλά και από ειδικές ενώσεις που έχουν την ιδιότητα να παρεμποδίζουν την καταλυτική δράση ενός ενζύμου. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται **αναστολείς** και δεσμεύονται στο ένζυμο για να παρεμποδίσουν τη δράση του. Ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, οι αναστολείς διακρίνονται στους αντιστρεπτούς και τους μη αντιστρεπτούς. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς συνδέονται με ασθενείς δυνάμεις με το ένζυμο ώστε να αναστέλλουν παροδικά τη δράση του ενώ οι μη αντιστρεπτοί συνδέονται με πιο ισχυρές δυνάμεις και έτσι το ένζυμο μπορεί να αδρανοποιείται μόνιμα.¹

Καθώς τα ένζυμα συμμετέχουν σε πληθώρα παθοφυσιολογικών πορειών, η αναστολή τους βρίσκει ιατρική εφαρμογή για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών ή των συμπτωμάτων τους. Επιπλέον, οι αναστολείς συχνά χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων και του μηχανισμού δράσης τους.²

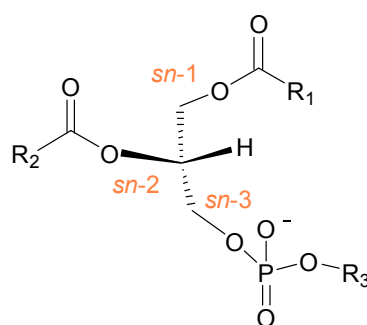


Εικόνα 1.1 Τρόπος δράσης συναγωνιστικού αναστολέα.

Το πιο κοινό είδος αντιστρεπτής αναστολής είναι η συναγωνιστική αναστολή όπου ο αναστολέας προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και εμποδίζει με αυτόν τον τρόπο την πρόσδεση του υποστρώματος (Εικόνα 1.1). Για να επιτευχθεί αυτό, ο αναστολέας και το υπόστρωμα πρέπει να εμφανίζουν κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά.⁴ Πάνω σε αυτό το δεδομένο βασίζεται η λογική για το σχεδιασμό και τη σύνθεση αναστολέων ενζύμων που παρουσιάζουν φαρμακολογικό ή άλλου είδους ενδιαφέρον. Έπειτα, στη μη-συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας προσδένεται σε μέρος του μορίου πέραν του ενεργού κέντρου, επηρεάζοντας τη δομή της ενεργού περιοχής με αποτέλεσμα να προσδένεται πιθανόν το υπόστρωμα αλλά να μην παράγονται τα προϊόντα. Τέλος, στην ανταγωνιστική αναστολή ο αναστολέας προσδένεται απευθείας στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος αποτρέποντας την αντίδραση να πραγματοποιηθεί.² Οι δύο τελευταίες περιπτώσεις αναστολής χρησιμοποιούνται λιγότερο ως προς την φαρμακευτική εφαρμογή των αναστολέων.

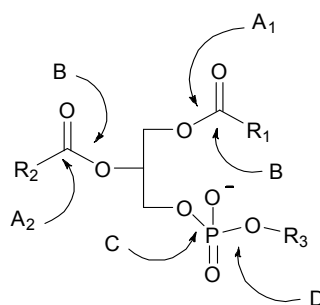
1.2 Γενικά για τις φωσφολιπάσες

Στους έμβιους οργανισμούς τα κύτταρα οριοθετούνται από βιολογικές μεμβράνες οι οποίες αποτελούνται κυρίως από λιπίδια και πρωτεΐνες. Τα μεμβρανικά λιπίδια έχουν μια υδρόφοβη και μια υδρόφιλη ομάδα και διακρίνονται στις εξής τρεις κύριες κατηγορίες: τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια και τη χοληστερόλη. Στην κατηγορία των φωσφολιπιδίων κυριαρχούν τα φωσφογλυκερίδια τα οποία αποτελούνται από έναν κορμό γλυκερόλης στον οποίο προσδένονται δύο λιπαρά οξέα (θέσεις *sn*-1, *sn*-2) και μια φωσφορική ομάδα (θέση *sn*-3). Η γενική δομή ενός φωσφογλυκεριδίου φαίνεται στο σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1 Γενική δομή του φωσφογλυκεριδίου.

Οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων, R_1 και R_2 , περιέχουν από 14 έως 24 άτομα άνθρακα και μπορεί να είναι κορεσμένες ή ακόρεστες. Οι **φωσφολιπάσες** είναι υδρολυτικά ένζυμα που διασπούν το φωσφογλυκερίδιο προκαλώντας την απελευθέρωση των οξέων καθώς και των φωσφορικών εστέρων. Συγκεκριμένα, οι φωσφολιπάσες A (A_1 και A_2) και B είναι εστεράσες καρβοξυλικών εστέρων, ενώ οι φωσφολιπάσες C και D είναι φωσφοδιεστεράσες. Κάθε ομάδα φωσφολιπασών δρα σε διαφορετικό μέρος του μορίου του φωσφογλυκεριδίου, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.2.⁵

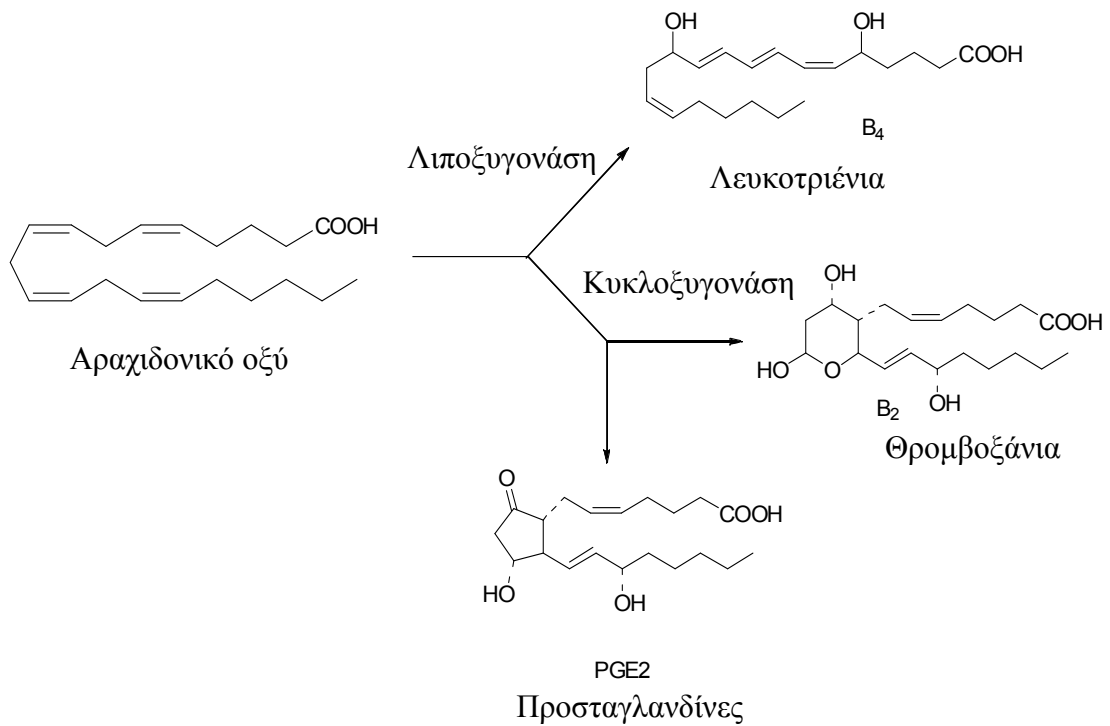


Σχήμα 1.2 Θέσεις δράσης των φωσφολιπασών.

1.3 Λειτουργία φωσφολιπιδίων A₂

Οι φωσφολιπίδες A₂ καταλύουν την υδρόλυση των φωσφογλυκεριδίων διασπώντας τον εστερικό δεσμό του μορίου στη θέση *sn*-2 όπου τα προϊόντα αυτής της υδρόλυσης είναι ελεύθερα λιπαρά οξέα και λυσοφωσφολιπίδια. Τα προϊόντα αυτά, με τη βοήθεια κι άλλων ενζύμων, μετατρέπονται σε πλήθος διαφορετικών ενώσεων οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του κυττάρου.^{6,7} Για παράδειγμα, το πιο σημαντικό ελεύθερο λιπαρό οξύ που απελευθερώνεται, το αραχιδονικό οξύ (arachidonic acid, AA) μετατρέπεται με τη βοήθεια μεταβολικών ενζύμων σε πλήθος βιοδραστικών λιπιδικών ενώσεων που ονομάζονται εικοσανοειδή. Μερικά από τα ένζυμα που συμμετέχουν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις μετατροπής του AA, είναι η κυκλοξυγονάση και λιποξυγονάση, οι οποίες παράγουν τα λευκοτριένια και τα θρομβοξάνια και τις προσταγλανδίνες, αντίστοιχα (Σχήμα 1.3).⁸

Τα εικοσανοειδή συμμετέχουν σε πολλές σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου αλλά και ολόκληρου του οργανισμού, όπως είναι η ρύθμιση της ροής του αίματος, η μετανάστευση, η έκκριση και η απόπτωση των κυττάρων. Καθώς τα εικοσανοειδή μετέχουν στη διαδικασία της φλεγμονής, αποτελούν ιατρικό στόχο αφού συνδέονται με τη παθοφυσιολογία διάφορων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, τα αυτοάνοσα νοσήματα και οι καρδιακές διαταραχές.⁹ Τα λυσοφωσφολιπίδια με κυρίαρχα το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) είναι ναί μεν βιοδραστικές ουσίες αλλά είναι και πρόδρομες ενώσεις του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) ο οποίος εμπλέκεται ιδιαίτερα στη δημιουργία της φλεγμονής.¹⁰ Επιπλέον, τα λυσοφωσφολιπίδια ενεργοποιούν τα λευκοκύτταρα του αίματος και μπορούν σε υψηλές συγκεντρώσεις να προκαλέσουν ιστικές βλάβες, γαστρικό έλκος, καρκινικό πολλαπλασιασμό και μεταστάσεις.¹¹



Σχήμα 1.3 Προϊόντα που προκύπτουν από το μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος.

1.4 Κατηγοριοποίηση φωσφολιπασών A₂

Μέχρι σήμερα πάνω από τριάντα διαφορετικές φωσφολιπάσες έχουν απομονωθεί, χαρακτηριστεί, κλωνοποιηθεί και ταξινομηθεί σε ομάδες βάσει των κύριων χαρακτηριστικών τους, όπως το μοριακό βάρος, η αλληλουχία των αμινοξέων ή η εξάρτηση της δράσης τους από την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Οι κυριότερες κατηγορίες είναι οι ακόλουθες:

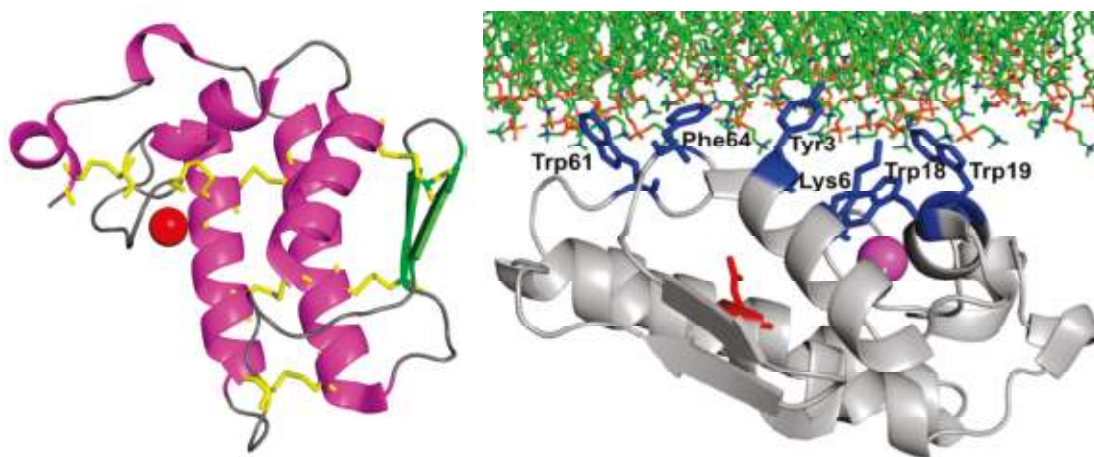
- i. Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες sPLA₂ με μικρό μοριακό βάρος,
- ii. Οι κυτοσολικές φωσφολιπάσες cPLA₂ με μεγαλύτερο μοριακό βάρος και δράση που εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου,
- iii. Οι κυτοσολικές φωσφολιπάσες iPLA₂ των οποίων η δραστητικότητα είναι ανεξάρτητη των ιόντων ασβεστίου,
- iv. Οι ακετυλοϋδρολάσες του PAF (PAF-AH) και
- v. Η λυσοσωμική PLA₂.^{7,12}

1.4.1 Εκκρινόμενες PLA₂ (sPLA₂)

Οι πρώτες sPLA₂ ανακαλύφθηκαν στο δηλητήριο της κόμπρας και άλλων φιδιών και παρόλο που η χρήση των δηλητηρίων μελετώνταν από τα τέλη του 1890, το ένζυμο άρχισε να ερευνάται στις αρχές της δεκαετίας του 1940. Μάλιστα, το αρχικό σύστημα αρίθμησης δημιουργήθηκε βάσει του είδους του φιδιού από το οποίο είχε απομονωθεί το ένζυμο.¹² Οι φωσφολιπάσες sPLA₂ έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 13 έως 19 kDa και περιέχουν συνήθως 5-8 δισουλφιδικούς δεσμούς στο μόριό τους. Η δραστηότητά τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου στο περιβάλλον ενώ στο ενεργό κέντρο τους υφίσταται η χαρακτηριστική καταλυτική δυάδα των αμινοξέων ιστιδίνης και ασπαραγινικού οξέος.

Γενικά, οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση στα λιπαρά οξέα που συνδέονται στα φωσφογλυκερίδια, οπότε δρουν το ίδιο αποτελεσματικά στα φωσφατιδυλογλυκερόλη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοσερίνη, με μια μικρή προτίμηση στη φωσφατιδυλοχολίνη. Υδροφόβα αμινοξικά κατάλοιπα κοντά στο α-ελικοειδές N-τελικό άκρο των sPLA₂ υποστηρίζεται ότι συμβάλλουν στη διεπιφανειακή σύνδεσή τους με τα κυστίδια φωσφολιπιδίων ενώ η παρουσία τρυπτοφάνης στο κυστίδιο θεωρείται σημαντική για τη διείσδυση του ενζύμου στο κυστίδιο.¹³

Η υδρολυτική ικανότητα της sPLA₂ σε βιοδραστικά λιπίδια παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών σημάτων. Όμως, η ίδια ικανότητα περιέχει και ένα παθολογικό ρόλο όπου η απελευθέρωση βιοενεργών λιπαρών οξέων και λυσοφωσφολιπιδίων οδηγεί τελικά σε μια σειρά προ-φλεγμονωδών αντιδράσεων. Οι sPLA₂ εκφράζονται και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από τα ανθρώπινα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως είναι τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα, τα T κύτταρα κ.α. Έτσι, η sPLA₂ εμπλέκεται σε φλεγμονώδη και αυτοάνοσα νοσήματα¹⁴, όπως επίσης και σε μεταβολικά, όπως η αθηροσκλήρωση¹⁵, η υπερλιπιδαιμία, ο διαβήτης και η παχυσαρκία¹⁶ ακόμα και σε φλεγμονώδη νοσήματα του δέρματος.¹⁷



Εικόνα 1.2 A) Δομή της GIA sPLA₂. Οι έλικες είναι σε ροζ χρώμα, τα β-πτυχωτά φύλλα σε πράσινο, η κόκκινη σφαίρα αντιπροσωπεύει το ασβέστιο ενώ με κίτρινο συμβολίζονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί. B) Μοντέλο της GIA sPLA₂ όπως προσδένεται στη λιπιδική μεμβράνη. Χαρακτηριστικά είναι τα κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr), τρυπτοφάνης (Trp) και φαινυλαλανίνης (Phe) που συμβολίζονται με μπλε χρώμα.

Η sPLA₂-IB θεωρείται βασικό ένζυμο της πέψης των λιπιδίων, αλλά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι δεν παρουσιάζονται προβλήματα στην λιπιδική πέψη όταν το ένζυμο είναι απόν. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη άλλων φωσφολιπασών ή λιπασών που παρουσιάζουν παρόμοια δράση.¹³ Ωστόσο, όταν αναστέλλονται τόσο η IB όσο και η X, μειώνονται οι πιθανότητες εμφάνισης κάποιου μεταβολικού νοσήματος, όπως η παχυσαρκία ή η αντίσταση στην ινσουλίνη.²⁰ Η GX-sPLA₂ έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην παθολογία του άσθματος μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την απελευθέρωση της λυσοPC ως την αρχή μιας αλυσιδωτής απελευθέρωσης φλεγμονωδών ενώσεων στους πνεύμονες.²⁰

Οι εκκρινόμενες φωσφολιπάσες συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις όχι μόνο μέσα από την υδρολυτική τους ικανότητα αλλά και με τη δυνατότητα που έχουν να ενεργοποιούν την παραγωγή προφλεγμονωδών ενώσεων από τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα κ.τ.λ. χωρίς να είναι απαραίτητη η ενζυμική δραστηριότητα, π.χ. στην περίπτωση του άσθματος και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας.¹⁸ Επίσης, οι ομάδες GIB, GIIA, GV, και GX των sPLA₂ επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών ανεξάρτητα από την υδρολυτική τους δραστηριότητα ενώ η GIIA και η GIII sPLA₂ παρουσιάζουν την ικανότητα της ρύθμισης διάφορων μορίων στην επιφάνεια φλεγμονωδών κυττάρων.¹⁹

Η αντιμικροβιακή ικανότητα της ομάδας IIA sPLA₂ θεωρείται πλέον δεδομένη ως φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου. Σε συνεργασία με άλλα αντιβακτηριακά πεπτιδία και

πρωτεΐνες, η sPLA₂ προσδένεται στις κυτταρικές μεμβράνες των Gram- θετικών ή αρνητικών βακτηριδίων και τα οδηγεί σε θάνατο μέσα από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων τους. Για αυτό το λόγο, η sPLA₂ μπορεί να θεωρηθεί ως μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού.¹³ Παρόλα αυτά, η ίδια ομάδα του ενζύμου έχει βρεθεί υπερεκφρασμένη σε διάφορους τύπους καρκίνου π.χ., του προστάτη, του παγκρέατος, του μαστού και του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη λιπιδικών προ-φαρμάκων για την απόδοση των καρκινικών φαρμάκων στοχευμένα στους όγκους, όπου η υδρολυτική ικανότητα της sPLA₂ απελευθερώνει το φάρμακο στους όγκους μειώνοντας έτσι την τοξικότητά του.¹⁵ Επιπλέον, η ομάδα αυτή λόγω του ενδεχόμενου ρόλου της στις καρδιαγγειακές νόσους μπορεί να αποτελέσει έναν πολύ χρήσιμο και συγκεκριμένο βιολογικό δείκτη ορού για αυτές τις νόσους.²⁰

Εκτός της ΙΑ, αντιμικροβιακή ικανότητα παρουσιάζει και η V-sPLA₂ όπως και αντιφλεγμονώδη με ιδιαίτερα προστατευτική δράση στην περίπτωση αρθρίτιδας. Ακόμα, πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια έδειξαν ότι οι ομάδες ΙΙΙ και Χ της εκκρινόμενης φωσφολιπάσης Α₂ παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση και την ενεργοποίηση του σπέρματος άρα και στη γονιμότητα. Αυτό διότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που εκκρίνονται από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων είναι απαραίτητα για τις διεργασίες που περιλαμβάνονται στη δημιουργία του σπέρματος. Οι δράσεις αυτές, όπως και πληθώρα άλλων που ακόμα δεν έχουν ανακαλυφθεί, υποστηρίζουν το γεγονός ότι κάποιες φωσφολιπάσες μπορεί να αποτελούν βιοενεργά και θεραπευτικά μόρια και δεν πρέπει να αναστέλλονται αλλά ίσως σε κάποιες περιπτώσεις, να διεγείρεται η παραγωγή τους.²⁰ Για αυτό το λόγο, η έρευνα πάνω στους αναστολείς των εκκρινόμενων φωσφολιπασών Α₂ θα πρέπει να εξειδικεύεται στη στόχευση μιας ισομορφής και σε ένα συγκεκριμένο ιστό για να υπάρχει το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Πίνακας 1.1 Εκκρινόμενες φωσφολιπάσες Α₂ (sPLA₂) και οι ομάδες τους.

Ομάδα	Συνήθεις Πηγές	Μοριακή Μάζα (kDa)	Δισουλφιδικοί Δεσμοί
IA	Κόμπρα/ Βούγγαρος	13-15	7
IB	Πάγκρεας ανθρώπου/χοίρου	13-15	7
IIA	Κροταλίας/ ανθρώπινο σάλιο	13-15	7
IIB	Δηλητήριο οχιάς	13-15	6
IIC	Όρχεις ποντικού/αρουραίου	15	8
IID	Πάγκρεας/ σπλήνα ανθρώπου/ποντικού	14-15	7

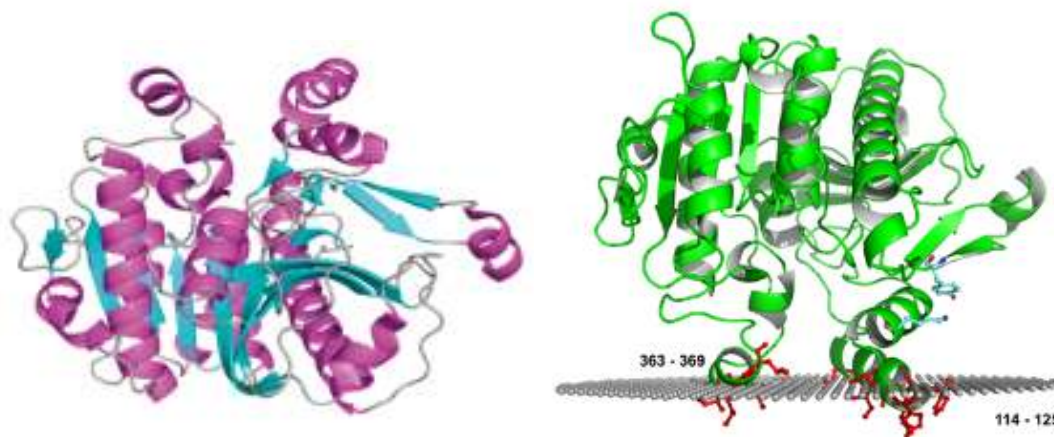
<i>II E</i>	Εγκέφαλος/καρδιά/μήτρα ανθρώπου/ποντικού	14-15	7
<i>II F</i>	Όρχεις/έμβρυο ανθρώπου/ποντικού	16-17	6
<i>III</i>	Άνθρωπος/ποντικός/σαύρα/μέλισσα	15-18 55(άνθρωπος/ποντικός)	8
<i>V</i>	Καρδιά/πνεύμονες θηλαστικών/μακροφάγα	14	6
<i>IX</i>	Δηλητήριο σαλιγκαριού	14	6
<i>X</i>	Σπλήνα/θύμος αδένας/λευκοκύτταρα ανθρώπου	14	8
<i>XIA</i>	Εκβλαστήσεις πράσινου ρυζιού (PLA ₂ -I)	12,4	6
<i>XIB</i>	Εκβλαστήσεις πράσινου ρυζιού (PLA ₂ -II)	12,9	6
<i>XII</i>	Άνθρωπος/ποντικός	19	7
<i>XIII</i>	Μικροϊός DNA	<10	0
<i>XIV</i>	Συμβιωτικοί μύκητες/βακτήρια	13-19	2

1.4.2 PAF ακετυλοϋδρολάσες (PAF-AH)

Η ομάδα των PAF ακετυλοϋδρολασών της υπεροικογένειας των φωσφολιπασών είναι η πιο πρόσφατη που απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και παρουσιάζει μοναδική εξειδίκευση στο υπόστρωμα το οποίο την ξεχωρίζει από τις άλλες φωσφολιπάσες A₂. Όπως είναι φανερό και από το όνομά τους, το υπόστρωμα στο οποίο ειδικεύονται είναι ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων ή αλλιώς PAF. Οι ακετυλοϋδρολάσες καταλύουν την υδρόλυση του *sn*-2 εστερικού δεσμού του PAF, παράγοντας lyso-PAF και οξικό οξύ, μέσα από την καταλυτική τριάδα σερίνης, ιστιδίνης και ασπαραγινικού οξέος που διαθέτουν στο ενεργό τους κέντρο ενώ η δραστηριότητά τους δεν εξαρτάται από τα ιόντα Ca²⁺.^{13,21} Ο PAF ο οποίος ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1980 αποτελεί έναν πολύ ισχυρό ενεργοποιητή και μεσολαβητή πολλών λειτουργιών των λευκών αιμοσφαιρίων. Μερικές από τις

πολλαπλές λειτουργίες του είναι η συγκόλληση των αιμοπεταλίων, η διαστολή των αιμοφόρων αγγείων ενώ συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη αλλεργιών και άσθματος.^{2,22}

Οι ακετυλοϋδρολάσες του PAF διακρίνονται σε δύο ομάδες, την VII και την VIII και η κάθε μια σε δύο υποομάδες (Πίνακας 1.2). Η GVIIA PLA₂ είναι ένα εκκρινόμενο ένζυμο πλάσματος με μοριακό βάρος 45 kDa το οποίο συσχετίζεται με τις λιποπρωτεΐνες υψηλής και χαμηλής πυκνότητας οπότε ονομάζεται και Lp-PLA₂ (HDL και LDL). Η GVIIIB PLA₂ παρουσιάζει 43% όμοια αμινοξική αλληλουχία με τη Lp-PLA₂ συνεπώς και παρόμοια ποικίλλα υποστρώματα. Είναι μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 40 kDa, αναφέρεται επίσης ως PAF-AH II και έχει ένα N-τελικό ενεργό άκρο. Η GVIII PLA₂ είναι ένα ολοένζυμο που συναντάται στον εγκεφαλικό ιστό, αποτελείται από δύο καταλυτικές υπομονάδες των 26 kDa και μια ρυθμιστική υπομονάδα των 45 kDa, ενώ είναι γνωστό και ως PAF-AH Ib. Η σύνθεση της υπομονάδας του ενζύμου φαίνεται να παίζει ρόλο στην επιλογή του υποστρώματος προς υδρόλυση από τη φωσφολιπάση.^{19,23}



Εικόνα 1.3 A) Δομή της Lp-PLA₂. Με ροζ αποτυπώνονται οι α-έλικες, με γαλάζιο τα β-πτυχωτά φύλλα και με γκρι οι θηλιές. B) Μοντέλο πρόσδεσης του ενζύμου σε κυτταρική μεμβράνη. Με κόκκινο συμβολίζονται τα αμινοξέα των δύο έλικων που αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη (αμινοξέα 363-369 και 114-125).

Η αποδόμηση του PAF και κάποιων οξειδωμένων φωσφολιπιδίων (π.χ. λυσοφωσφατιδυλοχολίνη) στα οποία παρουσιάζει εξειδίκευση η φωσφολιπάση αυτή, δρα προστατευτικά στον ανθρώπινο οργανισμό αφού τελικά απενεργοποιεί αυτά τα βιοδραστικά φωσφολιπίδια, μειώνοντας έτσι τη δημιουργία φλεγμονής σε ασθένειες όπως το άσθμα.¹⁵ Επιπλέον, η Lp-PLA₂ η οποία συνδέεται με την απολιποπρωτεΐνη της LDL απομακρύνει την

βλαβερή οξειδωμένη PC από τα μόριά της, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τις βλαβερές επιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης και τις πιθανότητες για εμφάνιση αθηροσκλήρωσης.²⁴

Η ομάδα GVIB ή αλλιώς PAF-AH-II των ακετυλοϋδρολασών παρουσιάζει κυρίως αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα, πέρα από την υδρολυτική ικανότητα ως προς τον PAF, αφού κύτταρα στα οποία το ένζυμο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι ανθεκτικά στο οξειδωτικό στρες και στην απόπτωση που προκαλείται από αυτό. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει ότι η PAF-AH-II έχει ενδοκυτταρικό προστατευτικό ρόλο ενάντια στην οξειδωτική βλάβη ο οποίος εκδηλώνεται πιθανόν μέσα από την αποδόμηση των οξειδωμένων φωσφολιπιδίων της μεμβράνης.¹³ Ακόμα, παρόμοια δράση έχει αποδειχθεί στους νευρώνες όπου η υπερέκφραση του ενζύμου μπορεί να προστατεύει το κεντρικό νευρικό σύστημα από ισχαιμική βλάβη μέσω της υδρολυτικής δράσης του στον PAF, σε λιπίδια με παρόμοια δομή και οξειδωμένα φωσφολιπίδια.¹⁹ Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ο PAF παίζει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων, χωρίς να έχει διαλευκανθεί ακόμα ο μηχανισμός στον οποίο εμπλέκεται. Συνεπώς, η υπερέκφραση των ακετυλοϋδρολασών του εμποδίζει την αποπτωτική διαδικασία μέσα από την υδρόλυση φωσφολιπιδίων που σηματοδοτούν την έναρξη της απόπτωσης. Γενικά, έχει αποδειχτεί ότι τα ένζυμα αυτά έχουν προστατευτικό ρόλο αποτρέποντας τον κυτταρικό θάνατο που μπορεί να προκαλείται από οξειδωτικό στρες, ιδιαίτερα σε ευαίσθητα όργανα όπως το ήπαρ.²⁵

Πίνακας 1.2 Ακετυλοϋδρολάσες του PAF (PAF-AH).

Ομάδα	Συνήθεις Πηγές	Μοριακή Μάζα (kDa)	Εναλλακτική ονομασία
VIIA	Άνθρωπος/ποντικός χοίρος/βόδι	45	Lp-PLA ₂ Πλάσμα PAF-AH
VIIIB	Άνθρωπος/βόδι	40	PAF-AH II
VIIIA	Άνθρωπος	26	PAF-AH Ib (α1 υπομονάδα)
VIIIB	Άνθρωπος	26	PAF-AH Ib (α2 υπομονάδα)

1.4.3 Λυσοσωμικές PLA₂

Η λυσοσωμική PLA₂ είναι ένα ένζυμο 45 kDa της οποίας η δραστικότητα δεν εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου ενώ δρα σε μέγιστη απόδοση σε pH 4.5. Όπως φαίνεται και από το όνομά της, η φωσφολιπάση αυτή ανευρίσκεται στα λυσοσώματα και έχει τη δυνατότητα να εστεροποιεί μια ακυλο-ομάδα με μια υδροξυλομάδα στην C-1 θέση κηραμιδίου (ceramide) χρησιμοποιώντας φωσφολιπίδια ως δότες ακυλο-ομάδων. Επίσης, είναι μια υδατοδιαλυτή γλυκοπρωτεΐνη η οποία εμφανίζει δράση φωσφολιπάσης A₁ και ιδιότητες τρανσακυλάσης ενώ παρουσιάζει μια μεγαλύτερη εξειδίκευση στην *sn*-1 θέση υδρόλυσης των φωσφολιπιδίων από ότι στην *sn*-2.¹⁹

Η LPLA₂ ή αλλιώς GXV PLA₂ επιλέγει για κύρια υποστρώματα υδρόλυσης τη φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) ενώ εκκρίνεται και μετακινείται από τα μακροφάγα κύτταρα του οργανισμού.⁵ Η λυσοσωμική PLA₂ εκφράζουν την καταλυτική τους δράση μέσα από την καταλυτική τριάδα Ser-His-Asp και τεσσάρων κυστεϊνών στην ενεργή περιοχή. Επιπλέον, περιέχει μια N-τελική ακολουθία σημάτων και διάφορες N-συνδεδεμένες περιοχές γλυκοζυλίωσης.²⁶ Η LPLA₂ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση των λιπιδίων ενδοκυτταρικά καθώς ποντίκια με απενεργοποιημένο αυτό το ένζυμο παρουσιάζουν φωσφολιπιδίωση και άλλα προβλήματα από συσσώρευση λιπιδίων στα όργανα.²⁷ Τέλος, έχει προταθεί ότι το ένζυμο αυτό συμμετέχει με κάποιο τρόπο στη δημιουργία των αθηρωματικών πλακών.²⁸

Πρόσφατη έρευνα προτείνει ότι η LPLA₂ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης διάγνωσης για την αυτοάνοση ασθένεια του ερυθρηματώδη λύκου. Σύμφωνα με αυτήν την έρευνα, μείωση της δραστικότητας του ενζύμου υποδεικνύει την έναρξη της ασθένειας καθώς αυτό συμμετέχει σε μια ανοσολογική διαδικασία που λανθασμένα εκφράζεται. Για αυτό το λόγο, το ένζυμο αυτό μπορεί να έχει και θεραπευτική προοπτική.²⁹

Πίνακας 1.3 Λυσοσωμικές φωσφολιπάσες A_2 ομάδας XV.

Ομάδα	Συνήθεις Πηγές	Μοριακή Μάζα (kDa)	Εναλλακτική ονομασία
XV	Άνθρωπος/ποντικός/βόδι	45 (απογλυκοζυλιωμένη)	ACS, LPLA ₂ , LLPL

1.4.4 Κυτοσολικές PLA₂ (cPLA₂)

Οι κυτοσολικές φωσφολιπάσες A_2 είναι ένζυμα μεγάλου μοριακού βάρους το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 64-115 kDa και χρησιμοποιούν μια καταλυτική σερίνη. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 6 ισομορφές του ενζύμου αυτού με κοινό χαρακτηριστικό ότι η δράση τους εξαρτάται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου και ρυθμίζεται από το τμήμα C2 της N-τελικής περιοχής του μορίου, με μοναδική εξαίρεση την ισομορφή γ ή αλλιώς την GIVC cPLA₂.³⁰ Η πλέον μελετημένη ισομορφή και η πρώτη από τις κυτοσολικές που βρέθηκε είναι η GIVA cPLA₂ η οποία είναι και η μοναδική από τις φωσφολιπάσες που παρουσιάζει εξειδίκευση σε υποστρώματα φωσφολιπιδίων που περιέχουν αραχιδονικό οξύ. Ο καταλυτικός μηχανισμός των GIVA PLA₂ περιλαμβάνει μια δυάδα Ser/Asp αντί για την συνήθη καταλυτική τριάδα αμινοξέων.⁵

Η GIVB cPLA₂ είναι το μεγαλύτερο ένζυμο της ομάδας αυτής με μοριακό βάρος 115 kDa καθώς διαθέτει μια παραπανίσια N-τελική προέκταση που καλείται και JimC περιοχή. Η ισομορφή αυτή παρουσιάζει και έντονη δράση φωσφολιπάσης A_1 ιδιαίτερα όταν το υπόστρωμα είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, αλλά δεν παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς το λιπαρό οξύ.⁵ Γενικά, η β -ισομορφή της cPLA₂ ανευρίσκεται σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος αλλά συγκεκριμένα εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στο πάγκρεας, τον εγκέφαλο, την καρδιά και το ήπαρ.¹³

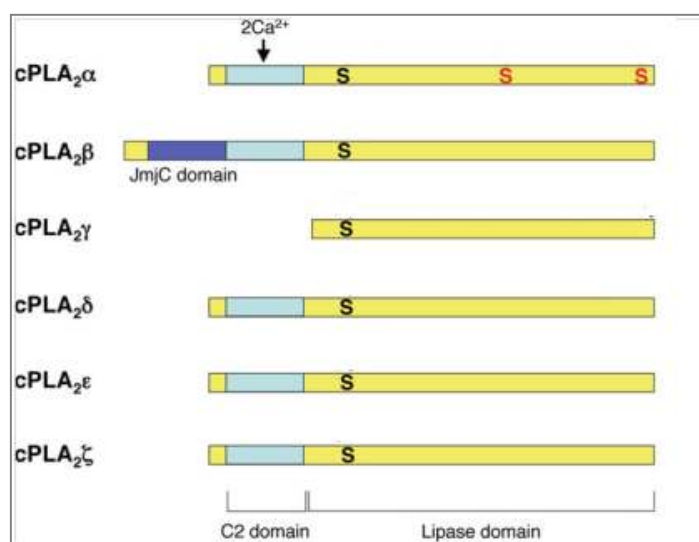
Πίνακας 1.4 Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A_2 (cPLA₂) ομάδας VI.

Ομάδα	Συνήθεις Πηγές	Μοριακή Μάζα (kDa)	Εναλλακτική Ονομασία
IVA	Άνθρωπος/ποντικός	85	cPLA ₂ α
IVB	Άνθρωπος	115	cPLA ₂ β
IVC	Άνθρωπος	64	cPLA ₂ γ
IVD	Άνθρωπος/ποντικός	92-93	cPLA ₂ δ

<i>IVE</i>	Άνθρωπος	100	cPLA _{2ε}
<i>IVF</i>	Άνθρωπος	96	cPLA _{2ζ}

Η ανθρώπινη GIVC cPLA₂ περιέχει λιπαρή ακυλ-αλυσίδα και C-τελική πρενυλομάδα με τη βοήθεια των οποίων προσδένεται στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων ή του ενδοπλασματικού δικτύου. Επίσης, παρουσιάζει δράση λυσοφωσφολιπάσης και τρανσακυλάσης το οποίο υποδεικνύει ότι το ένζυμο μπορεί να συμμετέχει στην ανακατανομή των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων.⁵ Παρόλα αυτά, η ισομορφή αυτή παρουσιάζει μια μικρή προτίμηση στα λιπίδια που περιέχουν αραχιδονικό οξύ, αλλά όχι τόσο ισχυρή όσο η α-ισομορφή ενώ φαίνεται να εμφανίζει και PLA₁ δραστηριότητα.¹³ Στον ανθρώπινο οργανισμό, αν και πανταχού παρούσα, η ισομορφή αυτή συναντάται σε μεγάλες ποσότητες στην καρδιά και στους σκελετικούς μύες.³⁰

Η GIVD PLA₂ έδειξε ότι υδρολύει εξίσου το αραχιδονικό και το ολεϊκό οξύ από την sn-2 θέση των φωσφολιπιδίων αλλά η δράση του είναι 6 φορές ισχυρότερη ως προς το λινολεϊκό οξύ.³¹ Επιπλέον, φαίνεται να εμφανίζει ισχυρή PLA₁ δραστηριότητα όπως παρουσιάζεται σε πρόσφατη έρευνα.³² Η ισομορφή με τη χαμηλότερη δραστηριότητα θεωρείται η ε ή αλλιώς GIVE cPLA₂ η οποία αλληλεπιδρά με τις λυσοσωμικές μεμβράνες και εκφράζεται κυρίως στο θυρεοειδή αδένα, την καρδιά και τους σκελετικούς μύες.⁵



Εικόνα 1.4 Δομικές μονάδες των cPLA₂. Το μαύρο S συμβολίζει την καταλυτική σερίνη ενώ το κόκκινο στην α-ισομορφή τις θέσεις φωσφορυλίωσης.

Η τελευταία ισομορφή των κυτοσολικών φωσφολιπασών A₂, η GIVF cPLA₂ βρίσκεται στα υψηλότερα επίπεδα στο θυρεοειδή και παρουσιάζει εξειδίκευση σε υποστρώματα

φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης χωρίς ιδιαίτερη προτίμηση στο λιπαρό οξύ. Ακόμα, το ένζυμο αυτό παρουσιάζει εξίσου τις δραστηριότητες των PLA₁ και PLA₂ ενώ εμφανίζει ευαισθησία στους αναστολείς της GIVA cPLA₂.⁵

1.4.5 Ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου PLA₂ (iPLA₂)

Η κατηγορία αυτή των φωσφολιπασών έχει ως κύριο χαρακτηριστικό, όπως αποτυπώνεται και στο όνομά της, ότι η δράση της δεν εξαρτάται καθόλου από την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Το πρώτο μέλος της οικογένειας των iPLA₂, η GVIA ή iPLA₂β, ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του '80 και απομονώθηκε το 1994 από την ομάδα του Dennis.³³ Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί συνολικά 6 ισομορφές του ενζύμου οι οποίες δρουν μέσω μιας καταλυτικής σερίνης στο ενεργό κέντρο και μιας περιοχής α/β-υδρολάσης που ομοιάζει με την πατατίνη. Μάλιστα, λόγω του ότι η ομολογία των ενζύμων αυτών είναι πολύ όμοια με αυτήν της πατατίνης, οι ισομορφές κατατάσσονται και στην οικογένεια των πρωτεϊνών-όμοιων της πατατίνης με την αντίστοιχη ονομασία PNPLA (Πίνακας 1.5).³⁴

Γενικά, οι ανεξάρτητες ιόντων Ca²⁺ φωσφολιπάσες A₂ δεν εμφανίζουν κάποια εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα των φωσφολιπιδίων που υδρολύουν αλλά ενίοτε παρουσιάζουν δράση λυσοφωσφολιπάσης και τρανσακυλάσης.⁵ Η iPLA₂β είναι ένα ένζυμο 85-90 kDa, το πλέον μελετημένο από αυτήν την οικογένεια, το οποίο έχει 2 κύριες παραλλαγές την GVIA-1 και την GVIA-2, η οποία ενεργοποιείται από το ATP. Η N-τελική περιοχή του ενζύμου περιέχει 7-8 αγκυρίνες και η ενεργή περιοχή το μοτίβο τύπου λιπάσης Gly-X-Ser-X-Gly.¹⁹ Το ένζυμο αυτό ανευρίσκεται καθολικά σε όλους τους ιστούς του σώματος και θεωρείται ότι κατέχει κάποιο ρόλο στην ομοιοστατική ανακατανομή των φωσφολιπιδίων όπως και σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου, ήτοι τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.⁵

Η iPLA₂γ έχει παρόμοια καταλυτική περιοχή με τη β, αλλά διαφέρει στη N-τελική περιοχή. Ενδοκυτταρικά, το ένζυμο αυτό ανευρίσκεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξεισώματα ενώ παρουσιάζει και δράση φωσφολιπάσης A₁ χωρίς ιδιαίτερη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα.⁵ Έρευνες έχουν υποδείξει ότι το ένζυμο αυτό πιθανόν να παίζει ρόλο στην ομοιοστάση των φωσφολιπιδίων της καρδιάς, στη λειτουργία των μιτοχονδρίων καθώς και στην αναδιαμόρφωση της καρδιολιπίνης στα μιτοχόνδρια.³⁵ Επιπλέον, η iPLA₂γ έχει συνδεθεί με την παθολογική ανάπτυξη ενός μεταβολικού συνδρόμου, μέσα από τη συμμετοχή της στην αλυσίδα μεταφοράς και παραγωγής ενέργειας του κυττάρου.⁵

Πίνακας 1.5 Φωσφολιπάσες A_2 ανεξάρτητες ιόντων ασβεστίου (*iPLA₂*).

Ομάδα	Συνήθεις Πηγές	Μοριακή μάζα (kDa)	Εναλλακτική ονομασία
VIA-1	Άνθρωπος/ποντικός	84-85	iPLA ₂ , PNPLA9
VIA-2	Άνθρωπος/ποντικός	88-90	iPLA _{2β} , PNPLA9
VIB	Άνθρωπος/ποντικός	88-91	iPLA _{2γ} , PNPLA8
VIC	Άνθρωπος/ποντικός	146	iPLA _{2δ} , NTE, PNPLA6
VID	Άνθρωπος	53	iPLA _{2ε} , Adiponutrin, PNPLA3
VIE	Άνθρωπος	57	iPLA _{2ζ} , TTS-2.2, ATGL, PNPLA2
VIF	Άνθρωπος	28	iPLA _{2η} , GS2, PNPLA4

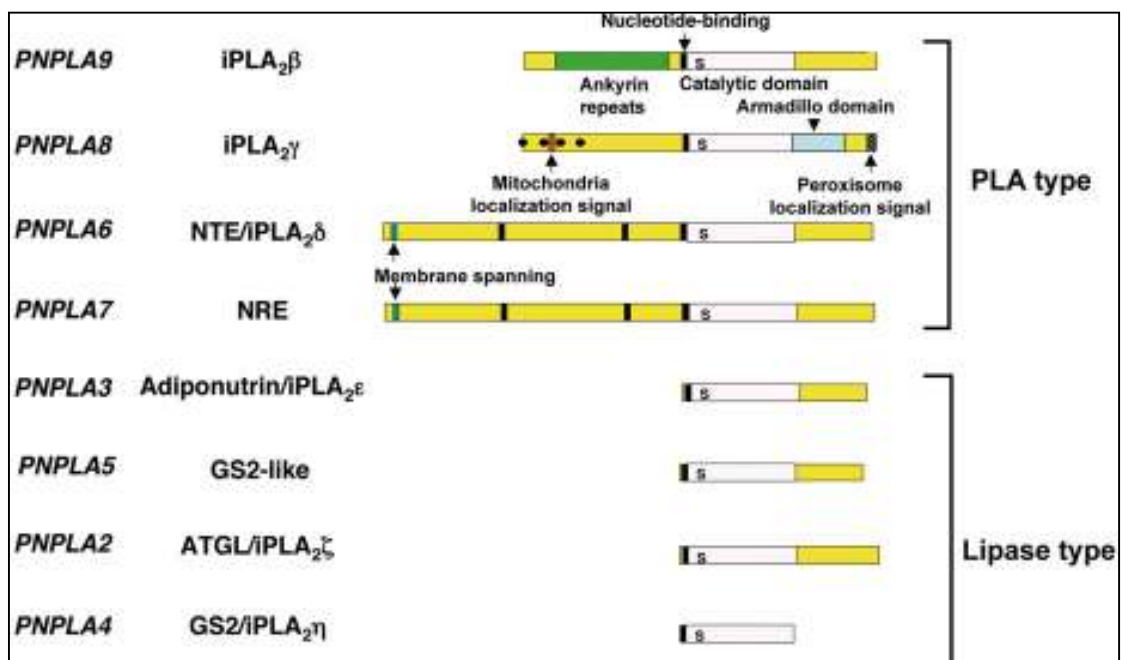
Η ομάδα VIC PLA₂ είναι ευρέως γνωστή και ως εστεράση που προσβάλλεται κατά την νευροπάθεια καθώς έτσι ονομάστηκε όταν ανακαλύφθηκε το 2002. Το ένζυμο αυτό εκφράζεται κυρίως στους νευρώνες και εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο δίκτυο Golgi. Ως ενζυμική δραστηριότητα η iPLA_{2δ} παρουσιάζει αυτή της εστεράσης, της λυσοφωσφολιπάσης και της ανεξάρτητης ιόντων ασβεστίου φωσφολιπάσης.³⁶ Απώλεια του ενζύμου ή μετάλλαξη του κοντά στην ενεργή περιοχή μπορεί να προκαλέσει σοβαρή νόσο στους κινητικούς νευρώνες που χαρακτηρίζεται με προοδευτική σπαστική παραπληγία και μυϊκή εξασθένηση.³⁷

Η PNPLA3, που ονομάζεται επίσης αντιγονεκτίνη (adiponutrin) ή iPLA_{2ε}, αρχικά βρέθηκε στα λιποκύτταρα, στα οποία εκκρίνεται αρκετά κατά τη διάρκεια της αδιπογένεσης (δημιουργία νέων κυττάρων του λιπώδους ιστού) ενώ μειώνεται κατά τη διάρκεια της νηστείας. Μια πλούσια σε υδατάνθρακες διατροφή μπορεί να αυξήσει την έκφραση του ενζύμου αυτού στο ήπαρ μέχρι 100 φορές σε αντίθεση με την PNPLA2 η οποία μειώνεται με την παραγωγή ινσουλίνης και αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νηστείας. Η ισομορφή iPLA_{2ε} παρουσιάζει δράση λιπάσης τριγλυκεριδίων, τρανσακυλάσης και λιγότερη φωσφολιπάσης A_2 .⁵ Το γονίδιο της αντιγονεκτίνης έχει συσχετισθεί με διάφορες ασθένειες κυρίως του ήπατος^{38,39} αλλά και με την παχυσαρκία.⁴⁰

Το επόμενο μέλος της ομάδας αυτής, η PNPLA2, απομονώθηκε το 2004 και έχει λάβει τα εξής ονόματα: λιπάση λιπαρών τριγλυκεριδίων (ATGL), iPLA_{2ζ} και GVIE PLA₂ λόγω των διαφόρων λειτουργιών της και της ομολογίας με τις φωσφολιπάσες A_2 ανεξάρτητες ιόντων Ca²⁺.

Το ένζυμο αυτό εκφράζεται κυρίως στα λευκά και καφέ λιποκύτταρα και εμφανίζει δραστικότητα λιπάσης τριγλυκεριδίων, τρανσακυλάσης, και φωσφολιπάσης A_2 .¹⁹ Μεταλλάξεις στο ανθρώπινο γονίδιο του ενζύμου PNPLA2 μπορούν να προκαλέσουν μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση των τριγλυκεριδίων σε πληθώρα ιστών και σχετίζεται με την απόθηκευση των ουδέτερων λιπιδίων. Επιπλέον, διάφοροι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου που έχουν βρεθεί στο ανθρώπινο γονίδιο του PNPLA2 συσχετίζονται με μειωμένα επίπεδα λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων, αυξημένα επίπεδα γλυκόζης νηστείας, και ένα αυξημένο κίνδυνο για διαβήτη τύπου 2.⁵

Το μικρότερο και τελευταίο μέλος της ομάδας των ανεξάρτητων ιόντων ασβεστίου φωσφολιπασών A_2 είναι η PNPLA4 ή αλλιώς $iPLA_2\eta$ ή GS2, όπως ονομάστηκε το 1994 όταν πρωτοανακαλύφθηκε. Η πρωτεΐνη 27 kDa παρουσιάζει δραστικότητα και ιδιότητες υδρολάσης ρετινόλης, τρανσακυλάσης ακυλγλεκρόλης και ρετινόλης, υδρολάσης τριγλυκεριδίων και φωσφολιπάσης A_2 .¹⁹



Εικόνα 1.5 Δομικές μονάδες των $iPLA_2$.

1.5 Η ομάδα GIVA cPLA₂

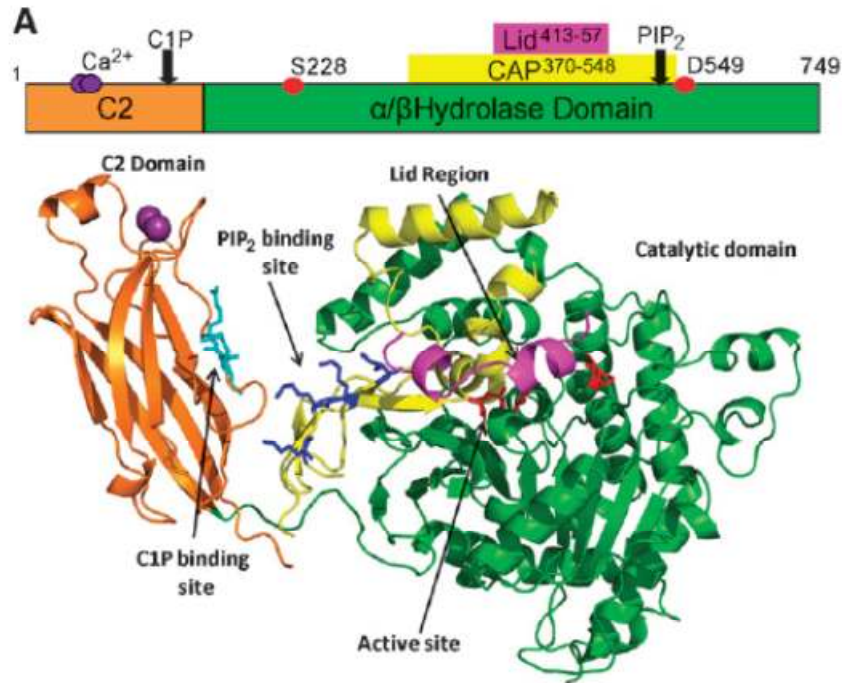
1.5.1 Δομή και δραστηριότητα της GIVA cPLA₂

Η κρυσταλλική δομή της cPLA₂ διαλευκάνθηκε το 1999 από την ομάδα της Dessen και αποτελείται από δύο μονομερή, το καθένα από τα οποία διαθέτει δύο ελλειψοειδή τμήματα με διαστάσεις 100Å x 55Å x 45Å περίπου.⁴¹ Η N-τελική περιοχή του ενζύμου (αμινοξέα 16-138) ανήκει στην κατηγορία των C2 περιοχών και αποτελείται από 8 αντιπαράλληλες β-πτυχώσεις που αλληλοσυνδέονται με 6 βρόγχους, σχηματίζοντας β-σάντουιτς. Όταν η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου αυξηθεί ενδοκυτταρικά, τότε το ένζυμο ενεργοποιείται και χρησιμοποιεί τη C2 περιοχή του για να προσδεθεί στην κυτταρική μεμβράνη και να ξεκινήσει την υδρόλυση. Δύο ιόντα Ca²⁺ με μεταξύ τους απόσταση 4Å, προσδένονται στη μια άκρη της C2 περιοχής μέσω ενός σχηματισμού των αμινοξέων ασπαραγίνης και ασπαραγινικού οξέος για να εξουδετερώσουν τα αρνητικά φορτία της περιοχής. Ένα μικρό πεπτίδιο αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ της C2 περιοχής και της καταλυτικής περιοχής (Εικόνα 1.6).

Η καταλυτική περιοχή του ενζύμου απαρτίζεται από 14 β-πτυχώσεις και 13 α-έλικες και ομοιάζει με περιοχή α/β υδρολάσης. Ο κεντρικός πυρήνας της συμπεριλαμβάνει ένα β-φύλλο 10 κλώνων και 9 α-έλικες. Οι πρώτοι 8 β-κλώνοι είναι συνεχόμενοι αλλά στον β9 εμφανίζεται μια μεγάλη απόκλιση από τον κεντρικό α/β πυρήνα, που συνιστάται από 180 αμινοξέα και αποτελεί το λεγόμενο «κάλυμμα» (cap) της καταλυτικής περιοχής. Αν και το κάλυμμα στην cPLA₂ (αμινοξέα 370-548) είναι μέρος της καταλυτικής περιοχής, δεν συμπεριλαμβάνεται στον α/β πυρήνα αλλά δημιουργεί ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης.⁴¹

Η περιοχή του ενεργού κέντρου είναι η πιο ενδιαφέρουσα καθώς αποτελείται από ένα «χωνί», το οποίο αν και στην κορυφή είναι αρκετά φαρδύ, έπειτα στενεύει σε διάμετρο 7Å περίπου οδηγώντας στο ενεργό κέντρο. Απαρτίζεται από υδρόφοβα αμινοξέα και σχηματίζει ένα λίκνο στο οποίο συνδέονται οι λιπαρές αλυσίδες των φωσφολιπιδίων. Στο ενεργό κέντρο βρίσκεται η Ser228 και το Asp549 που αποτελούν την καταλυτική δυάδα του ενζύμου, όπως προαναφέρθηκε. Η απόσταση 8Å μεταξύ του οξυγόνου της Ser228 και του στομίου της σχισμής του ενεργού κέντρου είναι αρκετή για να φιλοξενήσει μέχρι και τον πρώτο cis διπλό δεσμό ενός αραχιδόνυλο- υποστρώματος ακόμα και στην πιο εκτεταμένη του μορφή.⁴¹ Έχει προταθεί ότι σημαντικό ρόλο στην καταλυτική δράση του ενζύμου παίζει και η Arg200 μιας και πειράματα Φωσφολιπάσες A₂

με cPLA₂ που είχαν έλλειψη αυτού του αμινοξέος έδειξαν πολύ χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου⁴². Όμως, σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή της φωσφολιπάσης η Arg200 είναι πολύ μακριά για να ανήκει στην καταλυτική τριάδα οπότε πιθανόν, ο ρόλος της να είναι στην πρόσδεση των φορτισμένων κεφαλών του φωσφολιπιδικού υποστρώματος.⁴¹

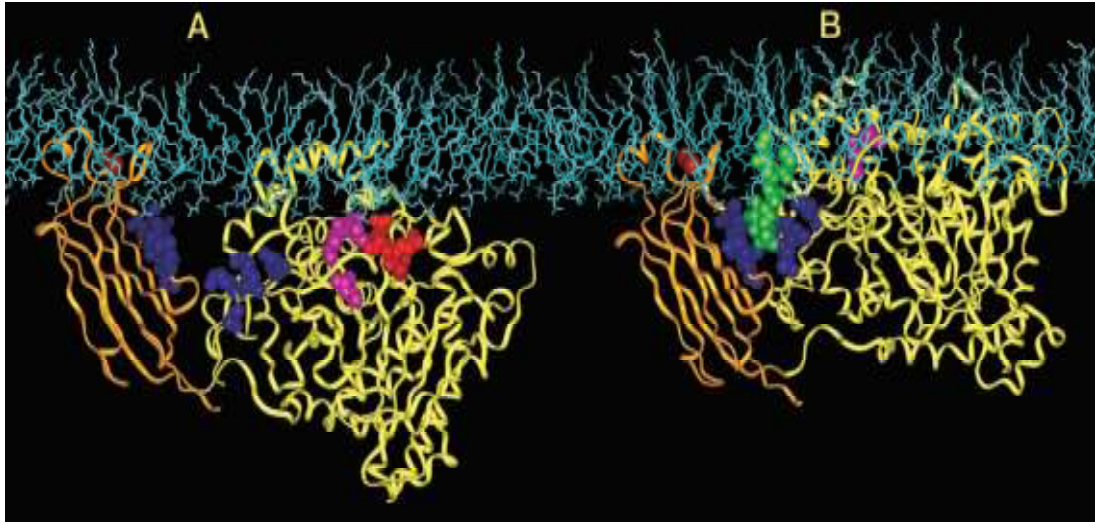


Εικόνα 1.6 Η κρυσταλλική δομή της GIVA cPLA₂. Η C2 περιοχή εμφανίζεται με πορτοκαλί χρώμα με δύο ιόντα Ca²⁺ σε μωβ χρώμα. Η καταλυτική περιοχή φαίνεται στα δεξιά, με το κάλυμμα σε κίτρινο χρώμα και το βλέφαρο σε ροζ. Με κόκκινο χρώμα τονίζονται τα καταλυτικά αμινοξέα Ser228, Asp549, Arg200. Τα σημεία πρόσδεσης της CIP και PIP₂ τονίζονται με γαλάζιο και σκούρο μπλε, αντίστοιχα.

Έπειτα, ακολουθούν τα αμινοξέα 413-457 που συνιστούν το λεγόμενο «βλέφαρο», μια ευκίνητη περιοχή η οποία μετακινείται κατά την ενεργοποίηση του ενζύμου. Η περιοχή του βλεφάρου είναι αμφιπαθής: η εκτεθειμένη του πλευρά προς το περιβάλλον του κυττάρου αποτελείται κυρίως από πολικά αμινοξέα, ενώ η εσωτερική του πλευρά έχει υδροφοβικά αμινοξέα. Επομένως, όταν μετακινείται αυτή η περιοχή αποκαλύπτει το ενεργό κέντρο της cPLA₂ και μια υδροφοβική επιφάνεια η οποία μπορεί να αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη. Τέλος, η cPLA₂ χρησιμοποιεί μια οπή οξυανιόντος για την υποβοήθηση της καταλυτικής σερίνης όταν αυτή πραγματοποιεί την πυρηνόφιλη προσβολή στο υπόστρωμα. Η οπή αποτελείται από τις Gly197 και Gly198 σε cis προσανατολισμό περίπου, ώστε τα αμιδικά τους πρωτόνια να σταθεροποιούν το αρνητικό φορτίο σε συνεργασία με την αμιδική ομάδα της Gly229.⁴¹

Το 2002 οι Das και Cho πρότειναν ένα μοντέλο μηχανισμού δράσης του ενζύμου βάσει πειραμάτων γενετικής μετάλλαξης του ενζύμου αλλά και πρόσδεσης του μορίου 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP₂)⁴³, το οποίο έπειτα από έξι χρόνια επιβεβαιώθηκε και από την ομάδα του Dennis με πειράματα φασματομετρίας μάζας ανταλλαγής δευτερίου.⁴⁴ Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η cPLA₂ στην κατάσταση ηρεμίας βρίσκεται σε ανενεργή διαμόρφωση εξαιτίας του βλεφάρου που καλύπτει το ενεργό κέντρο αλλά και των ηλεκτροστατικών απωθήσεων μεταξύ κατιονικών αμινοξέων στη C2 και στην καταλυτική περιοχή. Καθώς η συγκέντρωση ιόντων Ca²⁺ αυξάνεται, η C2 περιοχή κατευθύνει το ένζυμο προς τη λιπιδική μεμβράνη.⁴³ Η διατήρηση της αύξησης των ιόντων ασβεστίου έχει ως συνέπεια τον συνεχή εντοπισμό του ενζύμου στη μεμβράνη και την πλήρη ενεργοποίησή του ενώ ακόμα και όταν η συγκέντρωση των Ca²⁺ αρχίζει να μειώνεται, το ένζυμο παραμένει για λίγη ώρα συνδεδεμένο.⁴⁵ Η αρχική πρόσδεση περιλαμβάνει τη διείσδυση αλειφατικών και αρωματικών αμινοξέων των βρόγχων της C2 περιοχής που υφίστανται τα ιόντα ασβεστίου, και την αλληλεπίδραση κατιονικών αμινοξέων της καταλυτικής περιοχής με ανιονικά φωσφολιπίδια (Εικόνα 1.7A). Η πρόσδεση αυτή, όμως, τοποθετεί τα ανιονικά αμινοξέα του βλεφάρου κοντά σε αυτά της μεμβράνης και η ηλεκτροστατική απώθηση που αναπτύσσεται μεταξύ τους ωθεί τη μετακίνηση του βλεφάρου και την αποκάλυψη του ενεργού κέντρου.⁴³

Παρόλα αυτά, το ένζυμο βρίσκεται ακόμα στην ανενεργή του διαμόρφωση και δεν εκφράζει την καταλυτική του δράση. Μόνον εφόσον ένα μόριο PIP₂ αλληλεπιδράσει με μια ομάδα κατιονικών αμινοξέων της καταλυτικής περιοχής, το ενεργό κέντρο της cPLA₂ αντιπαραβάλλεται προς τη μεμβράνη (Εικόνα 1.7B). Οι δύο αυτές αλλαγές διαμόρφωσης, δηλαδή η απομάκρυνση του βλεφάρου και η εσωτερική πρόσδεση της PIP₂, εκθέτουν υδροφοβικά αμινοξέα στο χείλος του ενεργού κέντρου τα οποία διεισδύουν μερικώς στον υδροφοβικό πυρήνα της μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο, ένα μόριο υποστρώματος εισέρχεται στο ενεργό κέντρο και υφίσταται μετατροπή.⁴³ Εκτός από αυτόν τον τρόπο φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης, η cPLA₂ φωσφορυλιώνεται και με τη δράση τριών ακόμα ενζύμων που επιδρούν σε τρία διαφορετικά κατάλοιπα σερίνης του ενζύμου. Οι πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνο (MAPK) φωσφορυλιώνουν τη σερίνη 505, η πρωτεϊνική κινάση II εξαρτώμενη από Ca²⁺ /καλμοντουλίνη επιδρά στη σερίνη 515 ενώ η κινάση Mnk 1 στη σερίνη 727. Η φωσφορυλίωση της cPLA₂ σε αυτές τις σερίνες αυξάνει την ενζυμική δραστηριότητά της 2-3 φορές περισσότερο σε μελέτες που έχουν γίνει *in vitro*. Ενδοκυτταρικά το ένζυμο μετατοπίζεται για να δράσει από το κυτοσόλιο στην περιπυρηνική περιοχή, η οποία περιλαμβάνει το σύμπλεγμα Golgi, το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), και τον πυρηνικό φάκελο. Εντούτοις, σε ορισμένες εξαιρέσεις η cPLA₂ μπορεί να ανευρίσκεται στο πυρηνόπλασμα, στις διακυτταρικές συνδέσεις ή στην πλασματική μεμβράνη.⁴⁵



Εικόνα 1.7 Μοντέλο διαμεμβρανικής πρόσδεσης της cPLA₂. Α. Ιόντα Ca²⁺ (καφέ) κατευθύνουν τη μετατόπιση της C2 περιοχής (πορτοκαλί), ανιονικά αμινοξέα (κόκκινο) αλληλεπιδρούν με την ανιονική επιφάνεια της μεμβράνης. Η ηλεκτροστατική απόθεση μετακινεί το βλέφαρο και αποκαλύπτεται το ενεργό κέντρο. Β. Ένα μόριο PIP₂ (πράσινο) εισέρχεται στο βρόγχο και αλληλεπιδρά με τα κατιονικά αμινοξέα (μπλε) στη C2 και στην καταλυτική περιοχή. Ως αποτέλεσμα αυτού, το ενεργό κέντρο πλησιάζει αρκετά στη μεμβράνη για να δράσει.

Γενικά, η cPLA₂ μέσα στο κύτταρο αλληλεπιδρά και με άλλες πρωτεΐνες ή ένζυμα τα οποία είτε ενεργοποιούν τη δράση της ή την αναστέλλουν. Η βιμεντίνη, κύρια πρωτεΐνη των ενδιάμεσων ινιδίων, βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην περιπυρηνική περιοχή και προσδένεται στην C2 περιοχή του ενζύμου παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η ένωση των δύο πρωτεϊνών έχει δείξει ότι αυξάνει την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος το οποίο υποδηλώνει ότι η βιμεντίνη βοηθά στην σταθεροποίηση της πρόσδεσης του ενζύμου στη μεμβράνη. Επίσης, μια πρωτεΐνη παραλλαγή της Tip60, η PLIP αλληλεπιδρά με την cPLA₂ στην N-τελική περιοχή του ενζύμου. Συγκεκριμένα σε νεφρικά κύτταρα η πρωτεΐνη αυτή μετατοπίζεται μαζί με την cPLA₂ στον πυρήνα του κυττάρου και η υπερέκφρασή της έχει συνδεθεί με υψηλή παραγωγή προσταγλανδινών και απόπτωση του κυττάρου που προκαλείται από στέρηση ορού.⁴⁵

Όσον αφορά την αναστολή της δράσης του ενζύμου από άλλα βιομόρια, η p11/καλπακτίνη, οι ανεξίνες I και V και οι κασπάσες-3 και -8 παίζουν αυτόν τον ρόλο. Η p11/καλπακτίνη μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών S100 αλληλεπιδρά άμεσα με την C-τελική περιοχή της cPLA₂ αναστέλλοντας τη δράση της το οποίο έχει παρατηρηθεί σε βρογχικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές. Η ανεξίνη I αλληλεπιδρά με την cPLA₂ μέσω της C-τελικής

περιοχής της η οποία προσδένεται στη C2 περιοχή του ενζύμου ενώ η ανεξίτη V καταστρέφει το υπόστρωμα του ενζύμου. Οι κασπάσες, από την άλλη, απενεργοποιούν το ένζυμο διασπώντας το στο κατάλοιπο Asp522.⁴⁵

1.5.2 Βιολογικός ρόλος της GIVA cPLA₂

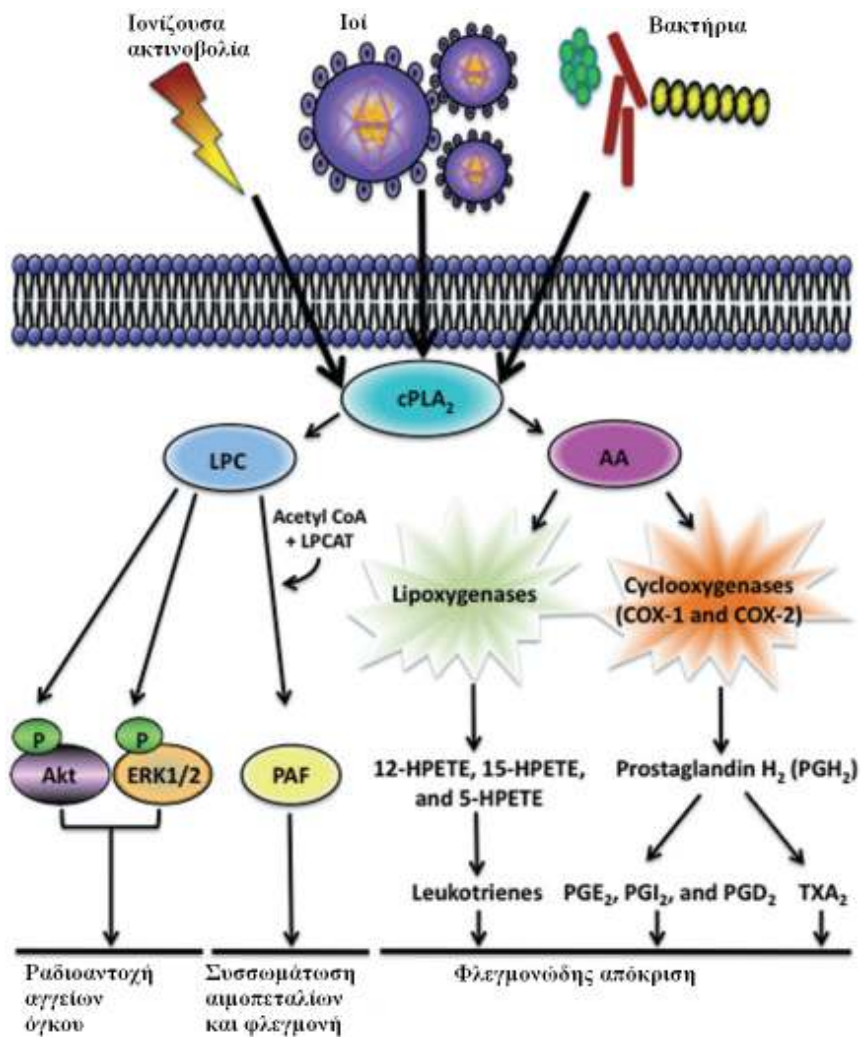
Η κυτοσολική φωσφολιπάση A₂, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, συμμετέχει στη διαδικασία πρόκλησης της φλεγμονής όταν ενεργοποιείται από τους εκάστοτε παράγοντες. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη συστολή των αεραγωγών έπειτα από αλλεργιογόνο πρόκληση και ιδιαίτερα η παραγωγή των εικοσανοειδών και του PAF που προκαλεί. Ποντίκια με έλλειψη του ενζύμου παρουσίασαν μειωμένη αναφυλακτική ανταπόκριση ενώ σε αυτά δεν παρουσιάστηκε η αντίστοιχη μείωση του αυλού των βρόγχων και η πάχυνση των κυψελίδων όπως στα ποντίκια κοντρόλ.¹³ Η GIVA cPLA₂ φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στη φυσιολογία της εγκυμοσύνης καθώς σε πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια, αυτά που είχαν έλλειψη του ενζύμου εμφάνισαν δυσκολίες κατά τον τοκετό και χρειάστηκαν είτε καισαρική τομή ή αγωγή με ανταγωνιστές προγεστερόνης. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στην έλλειψη παραγωγής της προσταγλανδίνης F_{2a} ενώ τα ίδια ποντίκια γέννησαν και λιγότερα παιδιά από τα κανονικά.⁴⁵

Πολλές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μαρτυρούν τη συμμετοχή του ενζύμου αυτού στη φυσιολογία του εγκεφάλου. Για παράδειγμα, σε περιπτώσεις ποντικών όπου έχει εφαρμοστεί το μοντέλο μονομερούς απόφραξης μέσης εγκεφαλικής αρτηρίας το οποίο προκαλεί εγκεφαλική ισχαιμία και επαναιμάτωση, τα ποντίκια με έλλειψη του ενζύμου παρουσίασαν μειωμένο όγκο του εγκεφαλικού εμφράγματος. Παράλληλα, σε ποντίκια χωρίς cPLA₂ που έλαβαν τη νευροτοξίνη που προκαλεί σύνδρομο τύπου Πάρκινσον εμφάνισαν μικρότερη εξάντληση της ντοπαμίνης του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου το οποίο σημαίνει ότι το ένζυμο αυτό συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στις διαδικασίες εκφύλισης του εγκεφάλου.¹³ Επίσης, σε μελέτη που αφορούσε την εκφύλιση τύπου Wallerian τα ισχιακά νεύρα ποντικών με έλλειψη της cPLA₂ εμφάνισαν 40% μείωση στη διάσπαση της μυελίνης ενώ έπειτα από τραυματισμό των νεύρων η αναγέννηση των νευραξόνων ήταν λιγότερη κατά 30% από ότι στα φυσιολογικά ποντίκια. Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι το ένζυμο αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη διάσπαση της μυελίνης και τον αξονικό εκφυλισμό έπειτα από τραυματισμό των ισχαιμικών νεύρων όπως

και στη δράση των φαγοκυττάρων στα περιφερειακά νεύρα κατά την εκφύλιση τύπου Wallerian.⁴⁶

Μελέτες έχουν συσχετίσει την κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 με την εξέλιξη των νόσων που προέρχονται από βακτηριακή ή ιϊκή προσβολή. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι σε κάποιες περιπτώσεις η ενεργοποίηση του ενζύμου και η παραγωγή των εικοσανοειδών μπορεί να οδηγήσει στην προστασία των ιστών από την περαιτέρω μόλυνση και να βοηθήσει στην εξόντωση του βακτηρίου. Ωστόσο, σε άλλες περιπτώσεις η υπερβολική φλεγμονή μπορεί να επιφέρει καταστροφή των υγιών ιστών ακόμη και ανάπτυξη καρκινικού ιστού και να βοηθήσει στην εξάπλωση της μόλυνσης. Συνεπώς, η συμβολή της cPLA₂ στην ανάπτυξη της νόσου φαίνεται να είναι ανάλογη και ειδική σε κάθε παθογόνο.⁴⁷

Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια αυτοάνοση εκφυλιστική απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος η οποία οδηγεί σε κινητικά και αισθητικά προβλήματα. Η σχέση της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 με την ασθένεια αυτή έχει μελετηθεί πάνω στο πειραματικό ζωικό της μοντέλο που ονομάζεται πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE). Η φαρμακολογική αναστολή της cPLA₂ φαίνεται να οδηγεί σε σημαντική μείωση στην εμφάνιση και εξέλιξη της προκληθείσας EAE μέσω της γλυκοπρωτεΐνης των ολιγοδενδροκυττάρων ενώ ποντίκια με έλλειψη του ενζύμου είναι λιγότερο ευαίσθητα στις φάσεις εκκίνησης και εξέλιξης της EAE από τα φυσιολογικά ποντίκια.^{48,49} Όμως, η cPLA₂ φαίνεται να συμμετέχει στην παθοφυσιολογία και άλλων αυτοάνοσων ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Παρομοίως, χρησιμοποιώντας το πειραματικό μοντέλο της νόσου αυτής, την παραγόμενη με κολλαγόνο αρθρίτιδα τα ποντίκια με έλλειψη του ενζύμου παρουσίασαν χαμηλότερους βαθμούς σοβαρότητας της ασθένειας καθώς και μειωμένη εμφάνισή της. Πολύ σημαντικό είναι ότι ο σχηματισμός φλεγμονώδη ιστού (πάννου), η αρθρική μαρμαρυγή και η αγκύλωση είναι όλα δραματικά μειωμένα στα ποντίκια με έλλειψη του ενζύμου συγκριτικά με τα φυσιολογικά το οποίο υποδεικνύει ότι η cPLA₂ κατέχει κρίσιμο ρόλο στην παθογένεση της νόσου.⁵⁰



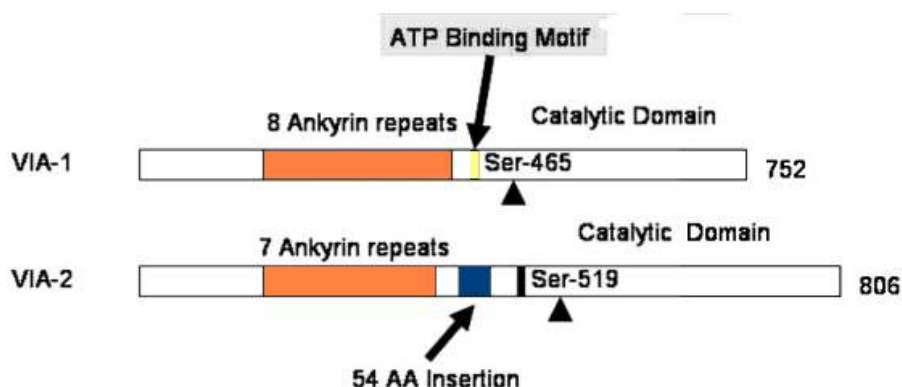
Εικόνα 1.8 Απόκριση του κυττάρου σε παθολογικές προσβολές ή ιονίζουσα ακτινοβολία μέσω της ενεργοποίησης της *cPLA*₂.

Η GIVA *PLA*₂ έχει συσχετιστεί και με την παθογένεση του καρκίνου καθώς σε πολλές μελέτες έχουν καταγραφεί μεταβολές στα επίπεδα και στη λειτουργική δραστηριότητά της όταν υφίσταται καρκίνος. Για παράδειγμα, σε καρκίνο του μαστού παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο ενεργοποιείται κατά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων που εξαρτάται από τα επίπεδα οιστρογόνων.⁵¹ Επίσης, η GIVA *PLA*₂ φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εντερική ογκογένεση καθώς σε ποντίκια που τους χορηγήθηκε το καρκινογόνο αζοξυμεθάνιο, αυτά με έλλειψη του ενζύμου παρουσίασαν αυξημένο σχηματισμό όγκων συγκριτικά με τα φυσιολογικά.⁵² Αντιθέτως, μετά από έκθεση στο καρκινογόνο ουρεθάνη (καρβαμικός εστέρας) τα ποντίκια με έλλειψη της GIVA *PLA*₂ εμφάνισαν 43% λιγότερη ανάπτυξη των όγκων στους πνεύμονες από ότι τα φυσιολογικά.⁵³ Τέλος, σε ανάλυση όγκων αδενοκαρκινώματος στο 18% των ασθενών με οισοφάγο Barrett ανιχνεύθηκε η έκφραση της GIVA *PLA*₂ η οποία σχετιζόταν αντιστρόφως ανάλογα με το βάθος της παρείσφρησης του όγκου.⁵⁴

1.6 Η ομάδα GVIA iPLA₂

1.6.1 Δομή και δραστηριότητα της GVIA iPLA₂

Όπως έχει προαναφερθεί η GVIA iPLA₂ συναντάται σε δύο κύριες ισομορφές οι οποίες έχουν μικρές διαφορές μεταξύ τους. Η GVIA-1 iPLA₂ έχει 752 αμινοξέα τα οποία κατανέμονται σε μια N-τελική περιοχή, 8 επαναλαμβανόμενες αγκυρίνες και μια καταλυτική περιοχή που περιλαμβάνει την καταλυτική σερίνη. Αντίστοιχα, η GVIA-2 iPLA₂ περιέχει 806 αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν μια N-τελική περιοχή, 7 επαναλαμβανόμενες αγκυρίνες, μια περιοχή πρόσδεσης και την καταλυτική περιοχή. Το ενεργό κέντρο της σερίνης και στις δύο ισομορφές υφίσταται σε μια αλληλουχία τύπου λιπάσης Gly-X-Ser-X-Gly.⁶ Κατά τη μετάφραση του RNA η GVIA-1 iPLA₂ χάνει ένα εξόνιο το οποίο διατηρούν οι άλλες ισομορφές. Στην GVIA-2 το εξόνιο αυτό μεταφράζεται ως παραπάνω 54 αμινοξέα ανάμεσα στην καταλυτική περιοχή και στο μοτίβο των αγκυρίνων στα οποία οφείλεται η αλληλεπίδραση του μορίου με τη μεμβράνη.⁵⁵



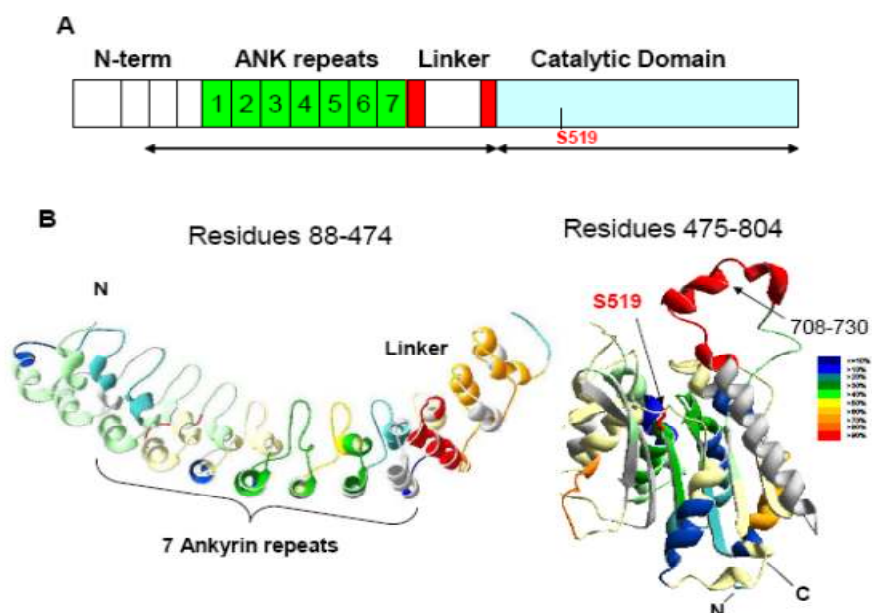
Σχήμα 1.4 Σύγκριση περιοχών των GVIA-1 και GVIA-2 iPLA₂. Στις δύο ισομορφές φαίνεται η καταλυτική σερίνη.

Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη της δομής της GVIA-2 iPLA₂ από τις ομάδες των Woods και Dennis⁵⁶ τα αμινοξέα 1-151 του ενζύμου ανήκουν στη N-τελική περιοχή, τα αμινοξέα 152-382 σχηματίζουν 7 επαναλαμβανόμενες αγκυρίνες, τα αμινοξέα 383-474 μια περιοχή πρόσδεσης και τα αμινοξέα 475-806 αποτελούν τα αμινοξέα κατάλυσης συμπεριλαμβάνοντας την καταλυτική Ser-519. Παρόλο που δεν έχει υπάρξει μέχρι σήμερα κρυσταλλική δομή του ενζύμου ή των αγκυρίνων οι εντοπισμένες αγκυρίνες φαίνεται να

σχηματίζουν πτυχές με παρόμοιο τρόπο. Οι επαναλαμβανόμενες αγκυρίνες στοιβάζονται η μία δίπλα στην άλλη και σχηματίζουν μια κυρτή δομή.

Παράλληλα, η περιοχή 708-730 φαίνεται να συμμετέχει στη διαδικασία πρόσδεσης αφού έδειξε μεγάλη αλλαγή συμπεριφοράς κατά την αλληλεπίδραση με φωσφολιπίδια, ενώ γνωρίζουμε ότι περιέχει υδροφοβικά αμινοξέα που παίζουν ρόλο στη διείσδυση της μεμβράνης. Επίσης, τα δεδομένα έδειξαν ότι η πρόσδεση στα φωσφολιπίδια αλλάζει τη θέση μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αγκυρίνων και της καταλυτικής περιοχής, ενώ η περιοχή πρόσδεσης αποδεικνύεται να μην είναι τόσο συνεπτυγμένη, όπως είναι οι επαναλαμβανόμενες αγκυρίνες και να είναι μια ιδιαίτερα εύκαμπτη περιοχή.

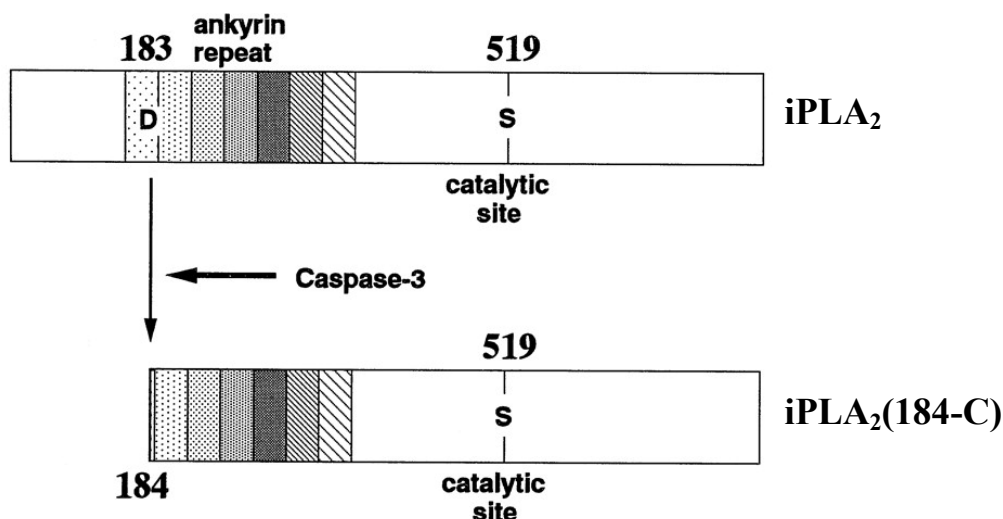
Ακόμα, η περιοχή 773-778 αποτελείται από μια α -έλικα που είναι μέρος του καταλυτικού πυρήνα ενώ δεν έχει υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις αλλά πιθανόν ηλεκτροστατικές μεταξύ της φορτισμένης μεμβράνης και των αμινοξέων Asp-771, Glu-772 και Asp-775. Η καταλυτική σερίνη βρίσκεται στην κορυφή της καταλυτικής περιοχής εν μέσω μιας συνεχόμενης αλληλουχίας λιπάσης (Gly-X-Ser519-X-Gly) και είναι αρκετά εκτεθειμένη στον διαλύτη σε αντίθεση με της cPLA₂ που βρίσκεται προστατευμένη κάτω από το κάλυμμα. Επίσης, βρέθηκε ότι η GVIA iPLA₂ περιέχει και το αμινοξικό κατάλοιπο Asp-652 κοντά στο ενεργό κέντρο το οποίο υποδεικνύει ότι πιθανόν η iPLA₂ δρα μέσω της καταλυτικής δυάδας Ser519/Asp652 όπως και η πατατίνη και η cPLA₂.



Σχήμα 1.5 A) Σχηματική αναπαράσταση της GVIA-2 iPLA₂. B) Ο χάρτης ανταλλαγής δευτερίου της GVIA-2 iPLA₂ μετά από 3000 sec από την έναρξη. Στο πλάι φαίνεται το ποσοστό της ανταλλαγής H/D.

Τέλος, οι περιοχές 631-655 και 658-664 είναι πολύ κοντά στο ενεργό κέντρο της Ser-519 και είναι από την ίδια πλευρά του ενζύμου, όπως η περιοχή 708-730, όμως μάλλον αλληλεπιδρούν με ηλεκτροστατικές δυνάμεις και όχι διεισδύοντας σε αυτήν. Τα αποτελέσματα αυτά προήλθαν από πειράματα φασματομετρίας μάζας ανταλλαγής δευτερίου και στο σχήμα 1.5 φαίνεται μια σχηματική αναπαράσταση της GVIA-2 iPLA₂.⁵⁶

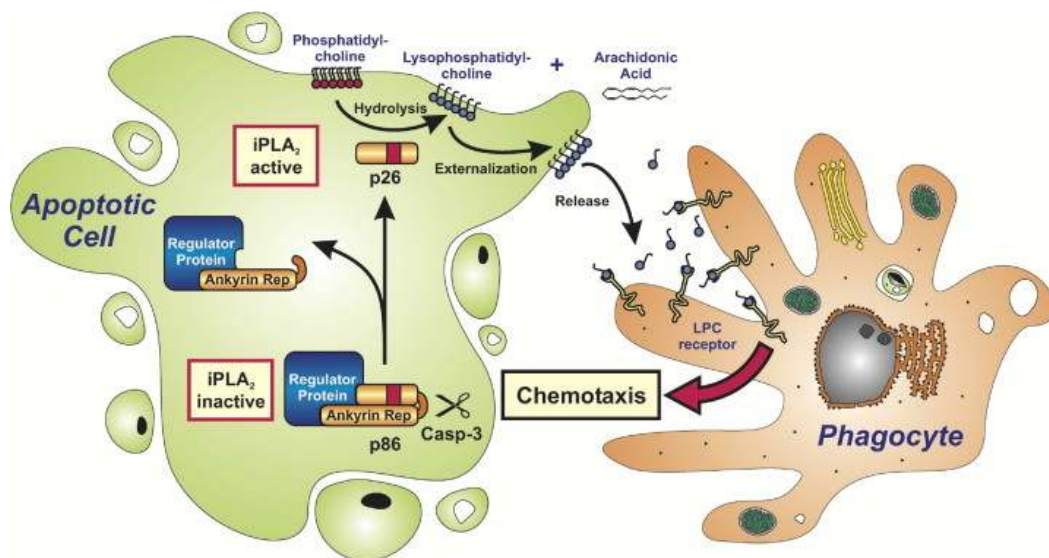
Η δραστηριότητα της iPLA₂ έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζεται με δύο τρόπους. Ο ένας είναι μέσω της κασπάσης-3 η οποία δρα στη N-τελική περιοχή του ενζύμου τροποποιώντας και ενεργοποιώντας έτσι το ένζυμο. Η κασπάση-3 διασπά την 1η επαναλαμβανόμενη αγκυρίνη στο κατάλοιπο της Asp183 δίνοντας ως προϊόν ένα τροποποιημένο ένζυμο την iPLA₂(184-C) (Σχήμα 1.6). Το παραγόμενο θραύσμα έχει αυξημένη δραστηριότητα από την αυτούσια iPLA₂ μόνο μέσα στα κύτταρα και όχι *in vitro* και αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός τρίτου μορίου που επηρεάζει τη δράση κάποιου εκ των δύο iPLA₂. Είτε ενεργοποιώντας το θραύσμα, είτε αδρανοποιώντας το αυτούσιο ένζυμο.⁵⁷ Μέχρι στιγμής έχουν ανευρεθεί τρεις δομές προϊόντων της iPLA₂ έπειτα από τη δράση της κασπάσης οι οποίες έχουν μοριακές μάζες 70, 26 και 32 kDa.⁵⁸ Ο δεύτερος πιθανός τρόπος ενεργοποίησης του ενζύμου είναι μέσω πρόσδεσης ενός μορίου ATP στην αλληλουχία G⁴⁸⁵XGXXG⁴¹ χωρίς όμως το ATP να αποτελεί υπόστρωμα ή συμπ παράγοντα του ενζύμου (Σχήμα 1.4). Η πρόσδεση αυτή είτε σταθεροποιεί τη δομή του ενζύμου ή με κάποιο τρόπο το ενεργοποιεί. Η ενεργοποίηση αυτή πιθανόν να οφείλεται σε κάποιου είδους δομική αλλαγή στο ένζυμο ενώ έχει αποδειχθεί ότι το ATP αποτρέπει την απώλεια της δραστηριότητας της GVIA iPLA₂.⁵⁹



Σχήμα 1.6 Η διάσπαση της iPLA₂ από την κασπάση-3 στην Asp183 και η παραγωγή του ενεργού θραύσματος της.

1.6.2 Βιολογικός ρόλος της iPLA₂

Η GVIA iPLA₂ γενικά έχει δειχθεί ότι συμμετέχει πολύ σε βασικές και σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου και η απόπτωση.¹⁹ Ωστόσο, είναι περισσότερο γνωστή ως ένζυμο που διατηρεί την ομοιόσταση της φωσφολιπιδικής μεμβράνης μέσω ενσωμάτωσης ξανά του αραχιδονικού οξέος σε λυσοφωσφολιπιδικούς υποδοχείς, κατά κύριο λόγο τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC). Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως μακροφάγα περιτοναίου⁶⁰, ανθρώπινα πολύμορφα λευκοκύτταρα⁶¹ και μακροφάγα τύπου P388D₁^{62,63}, έχει δειχθεί ότι η ενσωμάτωση του AA στα φωσφολιπίδια δεν απαιτεί ιόντα Ca²⁺ άρα πραγματοποιείται μέσω ενζύμων ανεξάρτητων των ιόντων αυτών. Παρόλα αυτά, έχει βρεθεί ότι και κάποιος άλλος τύπος iPLA₂ εκτός της GVIA iPLA₂ εμπλέκεται σε αυτήν την διαδικασία καθώς όταν αναστέλλεται η GVIA iPLA₂ η ανάπλαση της μεμβράνης συνεχίζεται.⁶⁴

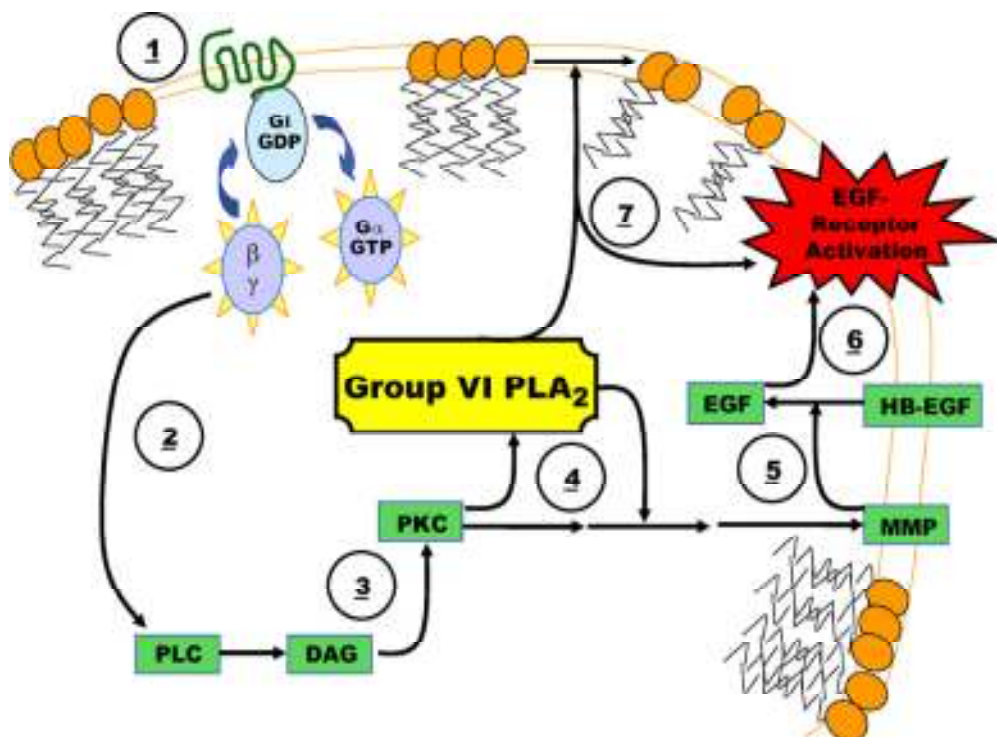


Εικόνα 1.9 Πιθανό μοντέλο προσέλκυσης φαγοκυττάρων από τη lysoPC και το αραχιδονικό οξύ, σηματοδοτικά μόρια που παράγει η iPLA₂ και το θραύσμα iPLA₂(184-C).

Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης η iPLA₂ συνεισφέρει με δύο τρόπους, σύμφωνα με την ομάδα του Balsinde: α) φθείροντας τη κυτταρική μεμβράνη με επιπλέον υδρολυτική δράση μέσω του θραύσματος iPLA₂(184-C) και β) παράγοντας τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (lysoPC) η οποία δρα ως σηματοδοτικό μόριο στη διαδικασία της φαγοκύτωσης.⁵⁸ Η lysoPC χρησιμοποιείται από τα κύτταρα εκπέμποντας το σήμα στα μακροφάγα για ανεύρεση και εγκόλπωση των νεκρών κυττάρων (Εικόνα 1.9). Επίσης, η υψηλή συγκέντρωση του

αραχιδονικού οξέος μέσα στα κύτταρα προκαλεί την απόπτωσή τους αλλά επηρεάζεται και από άλλες μορφές των PLA₂ εκτός της ανεξάρτητης ιόντων ασβεστίου.⁶⁵

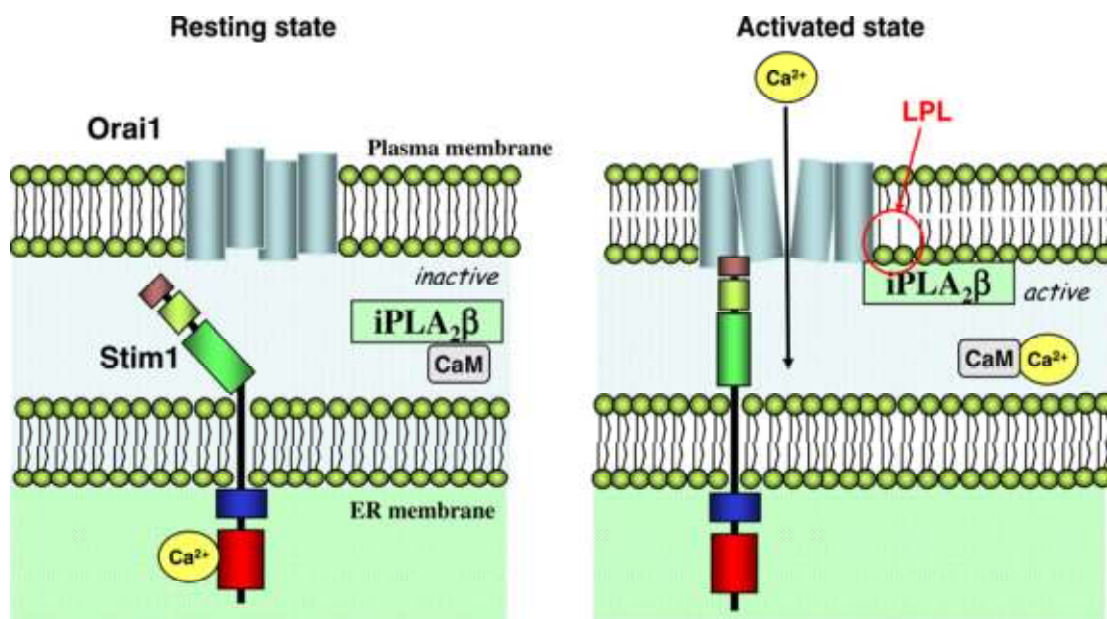
Σε πρόσφατο άρθρο ανασκόπησης⁶⁶ τονίστηκε ιδιαίτερα ο ρόλος της iPLA₂ στην ανάπτυξη των κυττάρων. Ένα προτεινόμενο σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει η φωσφολιπάση φαίνεται στην εικόνα 1.10. Στο πρώτο βήμα η GVI iPLA₂ μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών είτε τροποποιώντας το υπόστρωμα για τους υποδοχείς τους ή τη δραστηριότητα των στόχων τους. Η ενεργοποίηση αυτή οδηγεί στην απελευθέρωση των υπομονάδων Ga και βγ, οι οποίες ξεκινούν κι άλλες σηματοδοτικές πορείες που συμπεριλαμβάνουν τη φωσφολιπάση C. Η PLC παράγει τη διακυλογλυκερόλη και ενεργοποιεί τη πρωτεϊνική κινάση C (PKC). Αλληλεπιδράσεις μεταξύ PKC και GVI iPLA₂ μπορεί να μεταβάλλουν την ενεργοποίηση πολλών μορίων που έχουν ρόλους σηματοδότησης όπως οι μεταλλοπρωτεάσες μήτρας (MMP). Αλλαγή στη δραστηριότητα των MMP διεγείρει τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF). Εναλλακτικά, όλες αυτές οι πρωτεΐνες και τα μόρια σηματοδότησης σχετίζονται με τη δομή της φωσφολιπιδικής μεμβράνης την οποία μεταβάλλουν τα ένζυμα της ομάδας VI iPLA₂.



Εικόνα 1.10 Προτεινόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η iPLA₂ κατά την ανάπτυξη του κυττάρου.

Παρόλο που η δράση της GVIA iPLA₂ δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων Ca²⁺ το ένζυμο φαίνεται να συμμετέχει στη ρύθμιση της ομοιόστασης των ιόντων και της αποθήκης του ασβεστίου μέσα στο κύτταρο.⁵ Ο προτεινόμενος μηχανισμός περιλαμβάνει την Φωσφολιπάσες A₂

καλμοντουλίνη η οποία προσδένεται στη C-τελική περιοχή του ενζύμου απουσία Ca^{2+} αναστρέψιμα και αποτρέπει τη δραστηριότητά του. Όταν μέσα στο κύτταρο εξαντλούνται τα αποθέματα ασβεστίου τότε ενεργοποιείται ο παράγοντας εισροής ο οποίος ανοίγει τα κανάλια ασβεστίου και έπειτα εκτοπίζει την ανασταλτική καλμοντουλίνη από τη φωσφολιπάση. Έτσι, το ένζυμο μετακινείται στη μεμβράνη και παράγει λυσοφωσφολιπίδια τα οποία επιτρέπουν τον πλήρες άνοιγμα του καναλιού ώστε να ανεφοδιαστεί το κύτταρο με ιόντα ασβεστίου. Μετά την αναπλήρωση των αποθεμάτων σταματά η παραγωγή του παράγοντα εισροής, η καλμοντουλίνη επαναπροσδένεται στο ένζυμο και το κανάλι κλείνει (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11 Τρόπος ρύθμισης της χωρητικότητας ιόντων Ca^{2+} μέσω του συμπλόκου $iPLA_2$ και καλμοντουλίνης.

Όσον αφορά ασθένειες του εγκεφάλου, έρευνες που έχουν γίνει στον εγκέφαλο ασθενών με σχιζοφρένεια έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα της $iPLA_2$ καθώς και αυξημένα επίπεδα lysoPC, ενώ τα επίπεδα της φωσφατιδυλοχολίνης και φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης είναι χαμηλά.^{67,68} Αντιθέτως, η δράση της $cPLA_2$ μειώνεται δραματικά. Η αιτία της αυξημένης δραστηριότητας της $iPLA_2$ δεν είναι γνωστή. Παρόλα αυτά, η διαταραχή στο μεταβολισμό της ντοπαμίνης και των ρετινοειδών μαζί με τις διαφοροποιήσεις στις κυτοκίνες στους σχιζοφρενείς ασθενείς μπορεί να ευθύνονται για την ενεργοποίηση ισομορφών PLA_2 .^{69,70}

Έχει προταθεί ότι η $iPLA_2$ εμπλέκεται σε περιπτώσεις καρδιομυοπάθειας φορέων του ιού ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, HIV, μέσω ενός έμμεσου σηματοδοτικού μονοπατιού.⁷¹ Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της p38 MAP κινάσης, την ενεργοποίηση της $iPLA_2$ και την φωσφορυλίωση της τροπονίνης I. Η ανάπτυξη μιας καρδιομυοπάθειας έχει αναγνωριστεί ως μια επιπλοκή της μόλυνσης από HIV και φαίνεται να

συνεισφέρει στη χειρότερη πρόγνωση για τους ασθενείς αυτούς.⁷² Δεν είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η iPLA₂ να σχετίζεται με το σημαντικό όργανο της καρδιάς. Το 2002, η ομάδα του Gottlieb έδειξε ότι το ένζυμο παίζει σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των κυττάρων του μυοκαρδίου μετά από ισχαιμικό επεισόδιο. Πειράματα που έγιναν σε κουνέλια έδειξαν ότι αν γίνει αναστολή του ενζύμου πριν την έναρξη του επεισοδίου τότε η ζημιά που επιφέρει έπειτα η καρδιά είναι πολύ μικρότερη. Αντίθετα, αν η αναστολή γίνει αφού επέλθει το επεισόδιο ή ανασταλεί μόνο η cPLA₂ τότε δεν υπάρχει αλλαγή από το κοντρόλ δείγμα.⁷³

Η GVIA PLA₂ έχει συνδεθεί με την παθοφυσιολογία του διαβήτη μέσω της συμμετοχής του στην απόπτωση των β-κυττάρων, την παραγωγή των υπεροξειδίων και στην ενεργοποίηση της επαγόμενης από γλυκόζη κινάση των RhoA/Rho. Η συμβολή του ενζύμου στην απόπτωση των β-κυττάρων έχει υποδειχθεί μέσα από μελέτες σε γενετικά μεταλλαγμένα ποντίκια και σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Η απόπτωση των β-κυττάρων και η παραγωγή του κηραμιδίου μπορεί να σχετίζονται με την απώλεια μάζας β-κυττάρων που ευθύνεται για την έναρξη και την εξέλιξη του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 2.⁷⁴ Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε κύτταρα με ανεπάρκεια GVIA PLA₂ και με χρήση αναστολέων έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η iPLA₂ συμμετέχει ενεργά στο μονοπάτι ενεργοποίησης της επαγόμενης από γλυκόζη κινάση των RhoA/Rho/CPI-17 το οποίο σχετίζεται με την υπερσυσταλτικότητα των αγγειακών λείων μυών που προκαλείται από τον διαβήτη.⁷⁵

Η GVIA PLA₂ έχει συσχετιστεί αρκετά και με την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η ογκογένεση και ο σχηματισμός ασκίτη κατά τον καρκίνο των ωοθηκών μειώνονται περισσότερο από 50% σε αυτά με έλλειψη του ενζύμου από ότι στα κοντρόλ όπως επίσης και τα επίπεδα LysoPC και λυσοφωσφατιδικού οξέος στο μικροπεριβάλλον του όγκου.⁷⁶ Επίσης σε μια πρόσφατη μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών βρέθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης και δραστηριότητας της iPLA₂ σε καρκινικούς ιστούς και σε ασκίτες. Μάλιστα οι συγγραφείς προτείνουν ότι το ένζυμο αυτό αλλά και η cPLA₂ θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες για την ανεύρεση του καρκίνου καθώς και για την εξέλιξη της ασθένειας.⁷⁷

Πειράματα για τον καρκίνο του στήθους και τις μεταστάσεις του σε ποντίκια έδειξαν ότι δεν υπήρχε ουσιαστική διαφορά ανάμεσα σε αυτά με έλλειψη της GVIA PLA₂ και στα άγριου τύπου όσον αφορά την ανάπτυξη των όγκων του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, πολύ σημαντικό εύρημα της έρευνας αυτής ήταν ότι τα ποντίκια με έλλειψη του ενζύμου εμφάνισαν 11 φορές λιγότερα καρκινικά κύτταρα στους πνεύμονες από ότι τα άγριου τύπου ενώ ενδοθηλιακά κύτταρα των πνευμόνων τους παρουσίασαν πολύ υψηλά επίπεδα PAF. Αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου με τη χρήση της βρωμοενολο-λακτόνης, ενός ισχυρού και

εκλεκτικού αναστολέα της $iPLA_2$ τα επίπεδα του PAF έπεσαν αρκετά. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η δράση της $iPLA_2$ παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση του καρκίνου μέσω πιθανόν της παραγωγής του PAF.⁷⁸

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

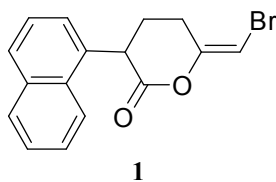
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ iPLA₂

2.1 Εισαγωγή

Τα δεδομένα του κεφαλαίου 1 υποδεικνύουν ότι οι φωσφολιπάσες A₂ αποτελούν ενδιαφέροντες φαρμακευτικούς στόχους αφού η δράση τους εκτείνεται στην παθολογία πληθώρας ασθενειών. Επομένως, η εκλεκτική αναστολή των ενζύμων αυτών μπορεί να συνεισφέρει στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων για διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η σκλήρυνση κατά πλάκας καθώς και για τον καρκίνο. Επίσης, η χρήση των εκλεκτικών αναστολέων συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην κατανόηση της λειτουργίας, της ενδοκυτταρικής δραστηριότητάς τους ακόμη και της δομής συγκεκριμένων ομάδων PLA₂. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα συζητηθούν ειδικότερα οι αναστολείς της iPLA₂.

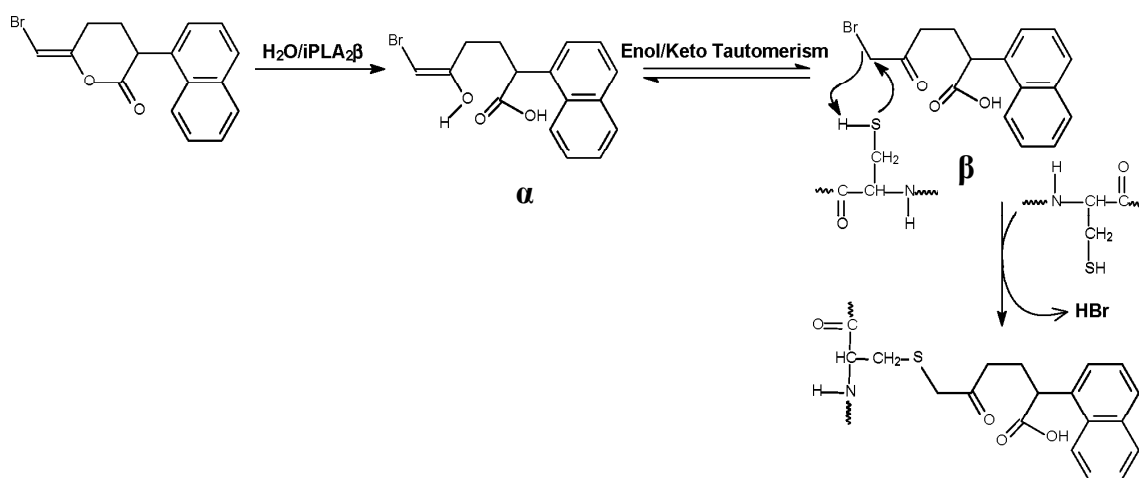
2.2 Η βρωμοενολο-λακτόνη

Αμέσως μετά την ανακάλυψη της iPLA₂ η ομάδα του Dennis ξεκίνησε την αναζήτηση για αναστολείς της όταν το 1995 ανακάλυψε ότι η (E)-6(βρωμομεθυλενο)τετραϋδρο-3-(1-ναφθαλενυλ)-2H-πυραν-2-όνη ή αλλιώς βρωμοενολο-λακτόνη (BEL) (Σχήμα 2.1), την αναστέλλει και μάλιστα εκλεκτικά σε σύγκριση με τις cPLA₂ και sPLA₂.⁷⁹ Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι η BEL αναστέλλει ισχυρά και μη αντιστρεπτά την iPLA₂ με IC₅₀ 50 nM αφού, ακόμα και σε αραιώση 1500 φορές σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα το σύμπλοκο ενζύμου- BEL παρέμεινε σταθερό και μετά από 4 ώρες.



Σχήμα 2.1 Η δομή της BEL.

Σε πειράματα που έγιναν με φασματομετρία μάζας για την διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης της BEL ως μη αντιστρεπτού αναστολέα έναντι της GVIA iPLA₂, διαπιστώθηκε ότι η απενεργοποίηση του ενζύμου οφείλεται στο ότι η κυστεΐνη του ενεργού κέντρου αλκυλιώνεται προς θειαιθέρα από την BEL.⁸⁰ Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.8, η iPLA₂ αρχικά καταλύει την υδρόλυση της BEL προς το σχηματισμό του βρωμο-ενολικού οξέος **α**, το οποίο με ταυτομερείωση ενόλης/κετόνης σχηματίζει τη βρωμομέθυλο κετόνη του οξέος **β**, που με τη σειρά της προσβάλλεται από τη θειόλη της κυστεΐνης του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Η αλκυλίωση της Cys-651 του ενζύμου οδηγεί στην τροποποίηση του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του.

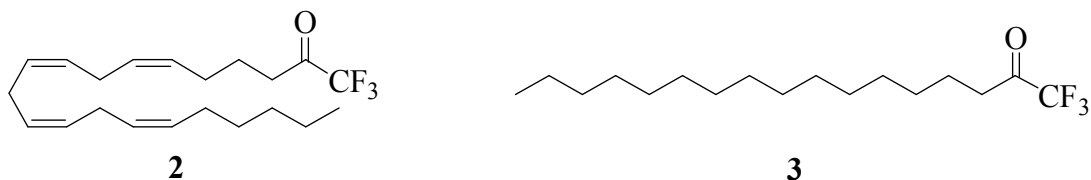


Σχήμα 2.2 Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης της BEL για την απενεργοποίηση της GVIA iPLA₂.

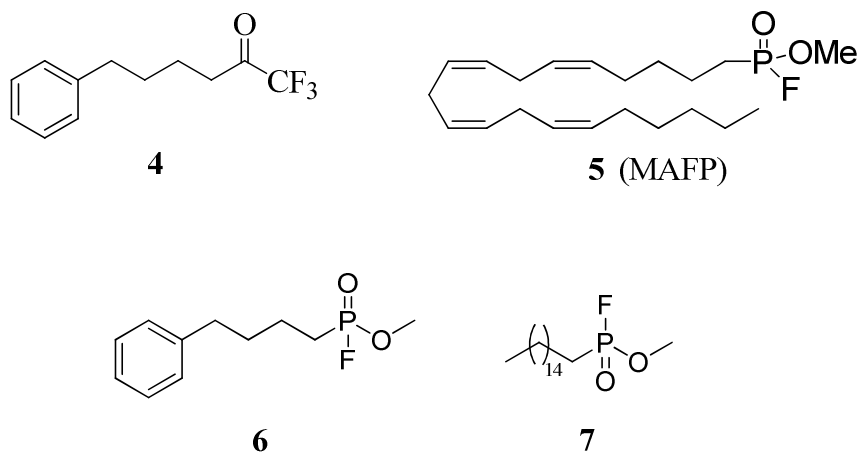
Η ιδιότητα της BEL να αναστέλλει τόσο ισχυρά και εκλεκτικά την iPLA₂ συγκριτικά με τις άλλες φωσφολιπάσες την έχει μετατρέψει σε ένα πολύ χρήσιμο μόριο για πειράματα σε κυτταρικά συστήματα με σκοπό την ανακάλυψη των βιολογικών ρόλων του ενζύμου και την ακριβή λειτουργία του. Έτσι, η BEL έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δράσης της iPLA₂ στον εγκέφαλο και το νευρικό σύστημα⁸¹, στον οφθαλμό⁸², στην καρδιά⁸³ ενώ η αναστολή της iPLA₂ από την BEL οδήγησε σε μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη καρκίνου του προστάτη⁸⁴. Παρόλα αυτά, η BEL αναστέλλει και άλλα κυτταρικά ένζυμα, όπως η Mg²⁺-εξαρτώμενη φωσφοϋδρολάση⁸⁵, με αποτέλεσμα τα πειραματικά δεδομένα να είναι πολλές φορές ασαφή και να χρειάζεται επιβεβαίωση με περισσότερα πειράματα.

2.3 Τριφθορομέθυλο κετόνες και μέθυλο φθοροφωσφονικοί εστέρες

Η τριφθορομέθυλο κετόνη του αραχιδονικού οξέος (AACOCF₃ **2**) αρχικά βρέθηκε ότι αναστέλλει ισχυρά και εκλεκτικά την cPLA₂⁸⁶ αλλά έπειτα δοκιμάστηκε και στην iPLA₂ μαζί με τον πρώτο αναστολέα που συντέθηκε ειδικά για την iPLA₂, την τριφθορομέθυλο κετόνη του παλμιτικού οξέος (PACOCF₃ **3**)⁷⁹. Η λειτουργία της GVIA iPLA₂ αναστέλλεται και από τις δυο τριφθορομέθυλο κετόνες με τρόπο εξαρτώμενο της συγκέντρωσής τους ενώ το ένζυμο παρουσιάζει προτίμηση στην κορεσμένη λιπιδική αλυσίδα του παλμιτικού παραγώγου σε αντίθεση με τη cPLA₂. Αυτό διότι ο αναστολέας **3** βρέθηκε να είναι 4 φορές ισχυρότερος από τον **2** με IC₅₀ 3.8 μM και 15 μM αντίστοιχα (με μοριακό κλάσμα 0.028).



Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δεδομένα συντέθηκε ο ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας για την iPLA₂ **4**, απλά μεταβάλλοντας την ανθρακική αλυσίδα σε κοντύτερη και προσθέτοντας έναν αρωματικό δακτύλιο.⁸⁷ Ο αναστολέας αυτός παρουσιάζει τιμή X_I(50) ίση με 0.0043, 10 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή για την cPLA₂. Αυτό υποδεικνύει ότι το αρωματικό σύστημα αυξάνει την ισχύ του αναστολέα και ειδικά όταν μεταξύ αυτού και του καρβονυλίου υπάρχει απόσταση τεσσάρων ανθρακοατόμων. Αντίθετα, μείωση της απόστασης αυτής κατά ένα άτομο αποδείχθηκε ότι μειώνει δραματικά την ανασταλτική δράση του μορίου.



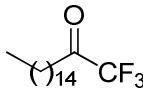
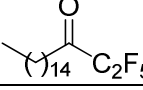
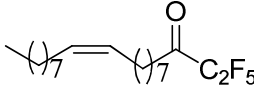
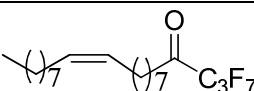
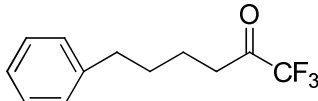
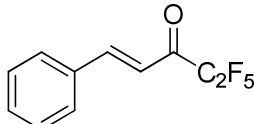
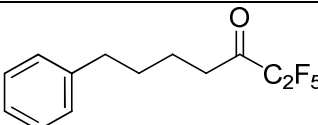
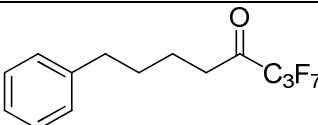
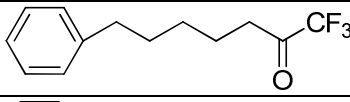
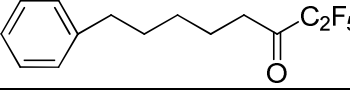
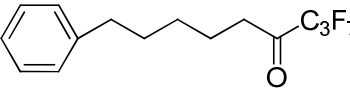
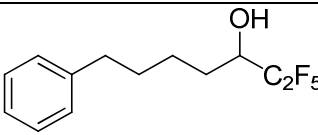
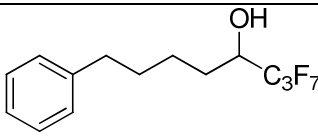
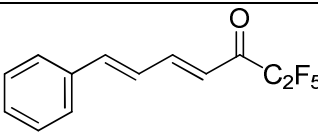
Το λιπιδικό ανάλογο **5** 20:4-PO(OMe)F ή αλλιώς MAFP, είναι επίσης ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας της GVIA iPLA₂ που δρα πιθανώς φωσφορυλιώνοντας τη σερίνη.⁸⁷ Οι μέθυλο φθοροφωσφονικοί εστέρες **6** και **7** παρουσιάζουν παρόμοια δράση έναντι της iPLA₂ εμφανίζοντας τιμές ανασταλτικής δράσης σαφώς υψηλότερες από αυτήν της MAFP.⁸⁷

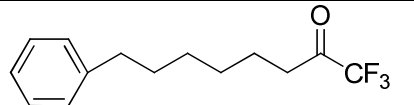
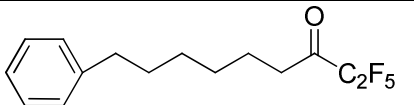
2.4 Πολυφθοροκετόνες

Το 2008 η ερευνητική ομάδα του Κόκοτου παρουσίασε μια σειρά πολυφθοριωμένων κετονών ως αναστολείς της GVIA iPLA₂^{88,89} (Πίνακες 2.1 και 2.2). Σε αυτήν την εργασία, μετρήθηκε ξανά η αναστολή που προκαλεί η PACOCF₃ (**3**) και βρέθηκε να είναι καλή και για την GV sPLA₂. Όμως, η αντίστοιχη πενταφθοροαίθυλο κετόνη παρουσίασε μικρή αναστολή σε όλες τις φωσφολιπάσες. Γενικά τα αποτελέσματα των δράσεων των νέων αναστολέων ήταν πολύ ενδιαφέροντα και παρείχαν αρκετές πληροφορίες όσον αφορά τη δομή που προτιμά για υπόστρωμα το ένζυμο και ιδιαίτερα σε σύγκριση με τις άλλες φωσφολιπάσες. Μέσα από αυτή την εργασία εμφανίστηκαν αρκετοί αναστολείς για τις φωσφολιπάσες με διαφορετικές εκλεκτικότητες και δράσεις.

Αρχικά, λαμβάνοντας υπόψη την ανασταλτική δράση που παρουσιάζει το παράγωγο του αραχιδονικού οξέος, συντέθηκαν κάποιοι αναστολείς βάσει των δομών άλλων φυσικών λιπαρών οξέων όπως αυτή του ελαϊκού (αναστολείς **9**, **10**). Έτσι, η πενταφθοροαίθυλο κετόνη εμφάνισε εκλεκτικότητα και σχετικά ισχυρή δράση έναντι της iPLA₂ αλλά η δομή με τα επτά φθόρια εμφάνισε χαμηλότερη εκλεκτικότητα και δράση. Κατά την εισαγωγή ενός αρωματικού συστήματος στη γενική δομή των αναστολέων συντέθηκε ο αναστολέας **12** ο οποίος έδειξε ισχυρότερη και εκλεκτικότερη αναστολή από τους προηγούμενους με 99.4% δράση και $X_1(50)=0.0014$. Παραλλαγές του **12** είτε με προσθήκη περισσότερων ανθρακοατόμων στην απόσταση μεταξύ του ενεργοποιημένου καρβονυλίου και του αρωματικού δακτυλίου, είτε με την ύπαρξη διπλού δεσμού ή ακόμα και την ύπαρξη αλκοόλης αντί για κετόνη, έδειξαν μείωση τόσο στην εκλεκτικότητα όσο και στη δράση έναντι της iPLA₂. Η ένωση αυτή ονομάστηκε FK GK11 και μετέπειτα αποδείχθηκε ένα πολύ χρήσιμο μόριο για τη διερεύνηση της βιολογικής δράσης του ενζύμου.

Πίνακας 2.1 Αναστολή των PLA_2 από πολυφθοροκετόνες

No	Δομή	GVIA iPLA ₂		GIVA cPLA ₂		GV sPLA ₂
		% αναστολή	X _I (50)	% αναστολή	X _I (50)	% αναστολή
3		92 ± 2	0.0195 ± 0.0053	96 ± 2	0.0223 ± 0.0023	79 ± 9
8		50 ± 13		N.D		43 ± 8
9		95.5 ± 0.4	0.0192 ± 0.0007	49.1 ± 2.1		67.0 ± 6.4
10		80.6 ± 2.5	0.0574 ± 0.0030	90.3 ± 2.4		33.9 ± 18.4
4		96 ± 3	0.0096 ± 0.0008	38 ± 2		N.D
11		96.4 ± 0.6	0.0066 ± 0.0005	N.D		76.9 ± 5.3
12		99.4 ± 0.1	0.0014 ± 0.0001	N.D		28 ± 1
13		99.4 ± 0.0	0.0022 ± 0.0001	32.6 ± 4.0		61.8 ± 6.7
14		96 ± 6	0.0025 ± 0.0003	62 ± 5		48 ± 6
15		98 ± 5	0.0065 ± 0.001	56 ± 4		46 ± 8
16		98.4 ± 0.3	0.0030 ± 0.002	N.D		N.D
17		94.3 ± 1.5	0.0390 ± 0.0024	44.8 ± 3.7		67.3 ± 7.7
18		97.0 ± 1.3	0.0258 ± 0.0016	82.0 ± 1.2		65.8 ± 1.8
19		96.0 ± 0.8	0.0313 ± 0.0025	59.0 ± 3.6		N.D.

20		99 ± 1	0.0018 ± 0.0005	68 ± 6		53 ± 14
21		98 ± 4	0.0065 ± 0.0008	65 ± 12		75 ± 10

Με την τοποθέτηση μιας ομάδας εξυλόξυ ή δεκυλόξυ στην πάρα θέση του βενζολικού δακτυλίου προέκυψαν ενώσεις οι οποίες αναστέλλουν εξίσου καλά τις τρεις φωσφολιπάσες με μικρές διαφορές στις τιμές % αναστολής και του $X_1(50)$. Επομένως, μπορούμε να πούμε ότι οι αναστολείς **22-27** και **29** είναι γενικοί για τις ομάδες GVIA iPLA₂, GIVA cPLA₂, και GV sPLA₂. Ωστόσο, η προσθήκη μιας βενζυλόξυ ομάδας στην ίδια θέση του βενζολικού δακτυλίου δίνει έναν ασθενή αναστολέα (**28**) και για τις τρεις ομάδες φωσφολιπασών. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στην α' θέση ως προς το καρβονύλιο της μακριάς ανθρακικής αλυσίδας της PACOCF₃ έδωσε έναν επίσης γενικό και ισχυρό αναστολέα (**30**) των GVIA iPLA₂ και GIVA cPLA₂. Εντούτοις, τα αποτελέσματα των ενώσεων **31** και **32** δείχνουν ότι η GVIA iPLA₂ προτιμά το αρωματικό σύστημα από ότι τη μακριά ανθρακική αλυσίδα σε αντίθεση με τη GIVA cPLA₂ η οποία αναστέλλεται λιγότερο από ότι με την **30**.

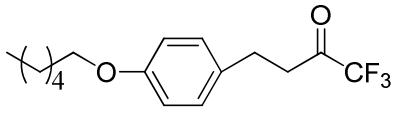
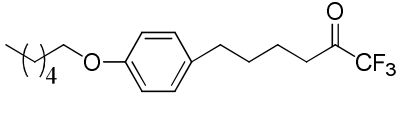
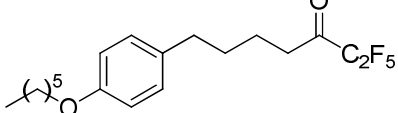
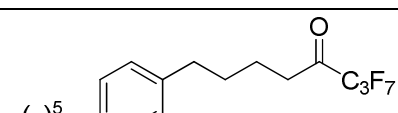
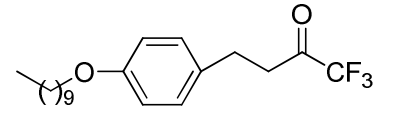
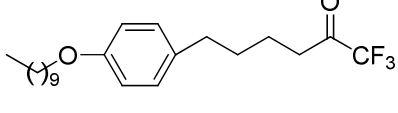
Η πενταφθοροαιθύλο κετόνη **33** και η επταφθοροπρόπυλο κετόνη **34** παρουσίασαν πολύ ισχυρή αναστολή της iPLA₂ και με μεγάλη απόκλιση από τις τιμές για τις δυο άλλες φωσφολιπάσες. Αυτό υποδεικνύει την προτίμηση της GVIA iPLA₂ για ομάδες με πολλά άτομα φθορίου. Η αντικατάσταση ενός ατόμου άνθρακα στην αλυσίδα από ένα ετεροάτομο, π.χ. οξυγόνο, οδηγεί σε ακόμα έναν ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα για την iPLA₂ (ένωση **35**). Ωστόσο, αν πάλι προσθέσουμε μακριά ανθρακική αλυσίδα στο μόριο (ένωση **36**), η εκλεκτικότητα χάνεται και αναστέλλεται και η cPLA₂ ισχυρά. Η φουρυλο-ομάδα στην ένωση **41** προσδίδει μικρή εκλεκτικότητα στο μόριο αλλά χάνεται η ισχύς του ως προς την iPLA₂.

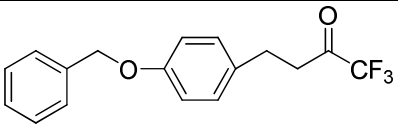
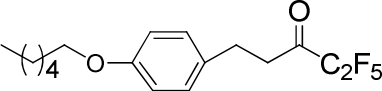
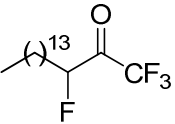
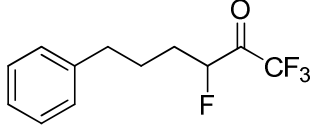
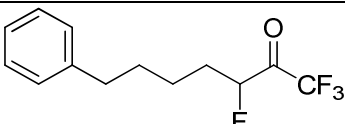
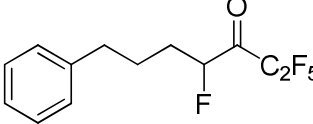
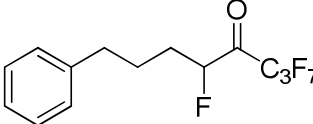
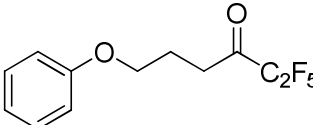
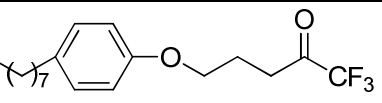
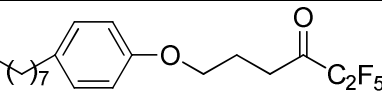
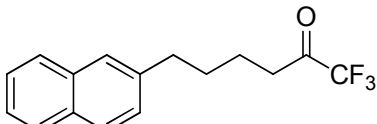
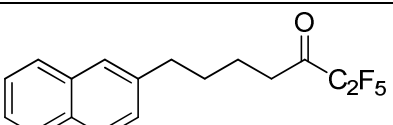
Η τριφθορομέθυλο κετόνη **38** παρουσίασε την πιο ισχυρή αναστολή της iPLA₂ από αυτήν τη σειρά ενώσεων αφού ανέστηλε την iPLA₂ σχεδόν 100%, με $X_1(50) = 0.0002$ σε 0.091 μοριακό κλάσμα ενώ τη cPLA₂ μόνο 81% και με $X_1(50) = 0.039$. Αυτό σημαίνει ότι η ένωση **5** είναι 195 φορές πιο ισχυρός αναστολέας για την iPLA₂ από ότι για την κυτοσολική, ενώ για την sPLA₂ είναι ασθενής αναστολέας με μόνο 37% αναστολή. Πιστεύεται ότι σε αυτό παίζει σημαντικότατο ρόλο το εκτεταμένο αρωματικό σύστημα της ναφθυλενικής ομάδας. Όπως ήταν αναμενόμενο, προσθήκη περισσότερων ατόμων φθορίου στην κετονομάδα αυξάνει την εκλεκτικότητα των αναστολέων ως προς την GVIA iPLA₂ και δεν μειώνει σε σημαντικό ποσοστό την ισχύ του μορίου (ενώσεις **39** και **40**).

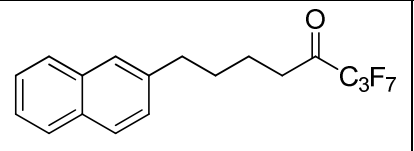
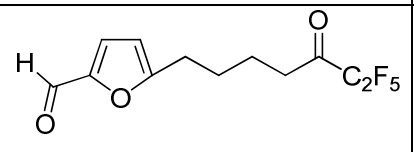
Μέσα από αυτά τα αποτελέσματα βγήκαν τα εξής συμπεράσματα:

- ♦ η παρουσία ενός αρωματικού συστήματος ευνοεί περισσότερο τη δημιουργία συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα από ότι οι μακριές ανθρακικές αλυσίδες, κορεσμένες ή ακόρεστες,
- ♦ το αρωματικό σύστημα πιθανόν να εισέρχεται σε κάποια περιοχή του ενζύμου ικανή να δημιουργεί π-π αλληλεπιδράσεις,
- ♦ το αρωματικό σύστημα πρέπει να έχει 4 άτομα άνθρακα απόσταση από το καρβονύλιο,
- ♦ τα άτομα φθορίου μπορεί να συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση του μορίου με κάποια περιοχή του ενζύμου που είναι φιλική προς το φθόριο,
- ♦ αυτή η φιλική προς το φθόριο περιοχή θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη ώστε να χωράει ακόμα και την επταφθοροπρότυλο ομάδα.

Πίνακας 2.2 Αναστολή των PLA_2 από πολυφθοροκετόνες.

No	Δομή	GVIA iPLA ₂		GIVA cPLA ₂		GV sPLA ₂
		% αναστολή	X _i (50)	% αναστολή	X _i (50)	% αναστολή
22		85 ± 4	0.0328 ± 0.0035	91 ± 2	0.0199 ± 0.0025	82 ± 8
23		91 ± 4	0.0169 ± 0.0021	92 ± 3	0.0098 ± 0.0006	86 ± 2
24		98.3 ± 0.2	0.0084 ± 0.0006	74.9 ± 2.3		71.7 ± 3.6
25		95.8 ± 1.3	0.0136 ± 0.0006	70.3 ± 1.5		76.9 ± 2.2
26		94 ± 8	0.0208 ± 0.0032	96 ± 2	0.0156 ± 0.0019	80 ± 6
27		94 ± 8	0.0166 ± 0.0022	95 ± 2	0.0116 ± 0.0012	84 ± 7

28		71 ± 14		88 ± 1		49 ± 12
29		95 ± 5	0.0075 ± 0.0011	73 ± 4		86 ± 4
30		93 ± 4	0.0011 ± 0.0002	94 ± 2	0.0167 ± 0.0018	86 ± 10
31		97.6 ± 0.2	0.0025 ± 0.0001	71.5 ± 3.0		N. D.
32		98.8 ± 0.2	0.0013 ± 0.0000	84.6 ± 0.8		N. D.
33		100 ± 0.1	0.0005 ± 0.0000	82.0 ± 1.1		39.1 ± 12.6
34		100.0 ± 0.1	0.0005 ± 0.0000	92.3 ± 1.3	0.038 ± 0.002	36.1 ± 8.2
35		99.1 ± 0.5	0.0036 ± 0.0001	N. D.		N. D.
36		99.4 ± 0.1	0.0029 ± 0.0001	95.5 ± 0.9	0.022 ± 0.001	61.4 ± 5.3
37		99.4 ± 0.1	0.0024 ± 0.0001	84.8 ± 0.6		63.0 ± 6.2
38		99.9 ± 0.1	0.0002 ± 0.0000	93.1 ± 0.6	0.039 ± 0.001	36.8 ± 7.9
39		99.8 ± 0.0	0.0006 ± 0.0000	84.7 ± 1.4		58.4 ± 5.7

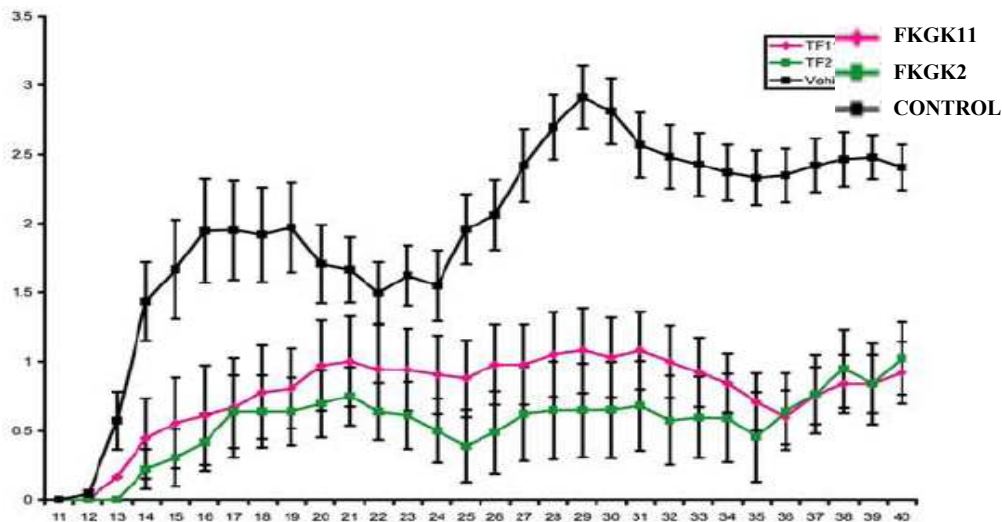
40		99.7 ± 0.2	0.0010 ± 0.0001	N. D.		46.3 ± 10.0
41		84.4 ± 2.1	0.0262 ± 0.0006	N. D.		41.9 ± 4.4

Οι εξαιρετικές αυτές *in vitro* τιμές καθώς και η αναγνώριση της GVIA iPLA₂ ως σημαντικό στόχο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μοντέλων οδήγησαν στην εξερεύνηση του ρόλου του ενζύμου σε σημαντικές νευρολογικές ασθένειες.

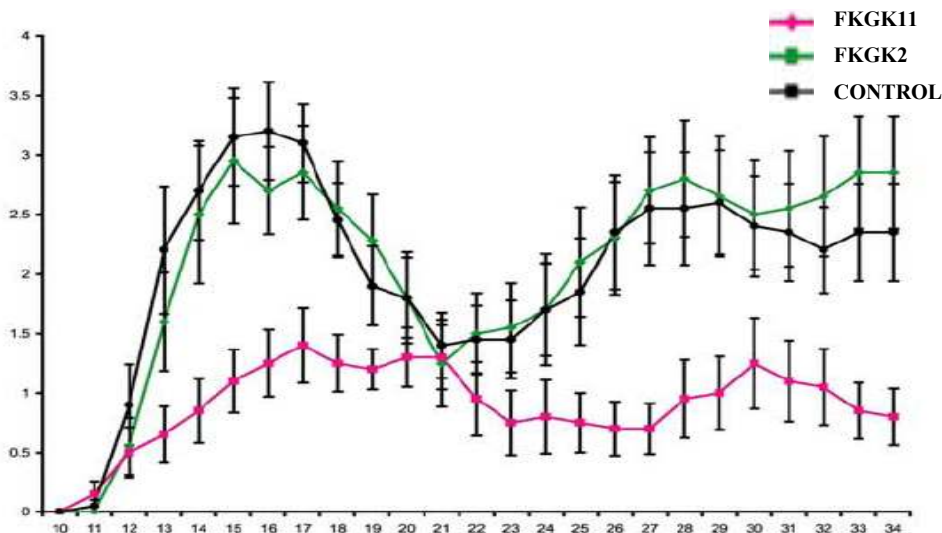
Για παράδειγμα, το 2008 μελετήθηκε η επίδραση που μπορεί να έχει η αναστολή της iPLA₂ σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε εκφύλιση τύπου Wallerian έπειτα από τραυματισμό νευρώνων.⁴⁶ Η εκφύλιση τύπου Wallerian είναι μια διαδικασία που ξεκινάει όταν μια νευρική ίνα τραυματιστεί, στην οποία μέρος του νευρικού άξονα εκφυλίζεται. Μετά την εκφύλιση του άξονα ακολουθεί σταδιακή καταστροφή του μυελινικού ελύτρου και έπειτα διήθησή του από μακροφάγα κύτταρα. Για την αναστολή της iPLA₂ χρησιμοποιήθηκε η πενταφθοροαίθυλο κετόνη **12**, ή αλλιώς FK GK11, και επίσης χρησιμοποιήθηκαν και ποντίκια γενετικώς μεταλλαγμένα με έλλειψη της GIVA cPLA₂ ως μέτρο σύγκρισης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ισχιαδικοί νευρώνες ποντικών που είτε είχαν έλλειψη της cPLA₂ ή τους είχε χορηγηθεί ο FK GK11, παρουσίασαν αργή καταστροφή της μυελίνης και περιείχαν λιγότερα φαγοκύτταρα (40% και 30% μείωση αντίστοιχα). Επίσης, ο αριθμός των άθικτων ιών που είχαν ακόμα ατόφια μυελινικά έλυτρα ήταν περίπου 7.5 και 13 φορές μεγαλύτερος στα ποντίκια με έλλειψη cPLA₂ και σε αυτά με αναστολή της iPLA₂, αντίστοιχα.

Οι ενώσεις **12** και **23** χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), το πειραματικό μοντέλο της σκλήρυνσης κατά πλάκας για μύες.⁹⁰ Η σκλήρυνση κατά πλάκας μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία συμπτωμάτων όπως, αλλαγές στην αφή, προβλήματα στην όραση, μυϊκή ατροφία, κατάθλιψη, προβλήματα στον προσανατολισμό και την ομιλία, εξάντληση, προβλήματα με την ισορροπία ακόμα και αναπηρία σε πολύ σοβαρές περιπτώσεις. Η ένωση **12**, ή αλλιώς FK GK11 ως εκλεκτικός αναστολέας της iPLA₂, και η ένωση **23**, ή αλλιώς FK GK2 ως γενικός αναστολέας των τριών κυρίων ομάδων φωσφολιπασών, παρουσίασαν πολύ καλά αποτελέσματα ως προς τη μείωση των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Όταν οι αναστολείς χορηγήθηκαν στα ποντίκια την 5η μέρα, δηλαδή πριν φανούν τα συμπτώματα της ασθένειας, μέχρι και την 24η μέρα, τα συμπτώματα των ποντικιών αυτών μειώθηκαν αισθητά σε σύγκριση με την ομάδα ποντικιών που δεν είχαν λάβει κανέναν αναστολέα (Σχήμα 2.3). Πιο σημαντικά αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν οι αναστολείς χορηγήθηκαν την ημέρα έναρξης των συμπτωμάτων και για 2 εβδομάδες, ο εκλεκτικός αναστολέας ως προς την $iPLA_2$ παρουσίασε αξιοσημείωτη μείωση στη πρόοδο της ασθένειας ενώ η επίδραση αυτή διήρκεσε και μετά το τέλος της θεραπείας (Σχήμα 2.4).



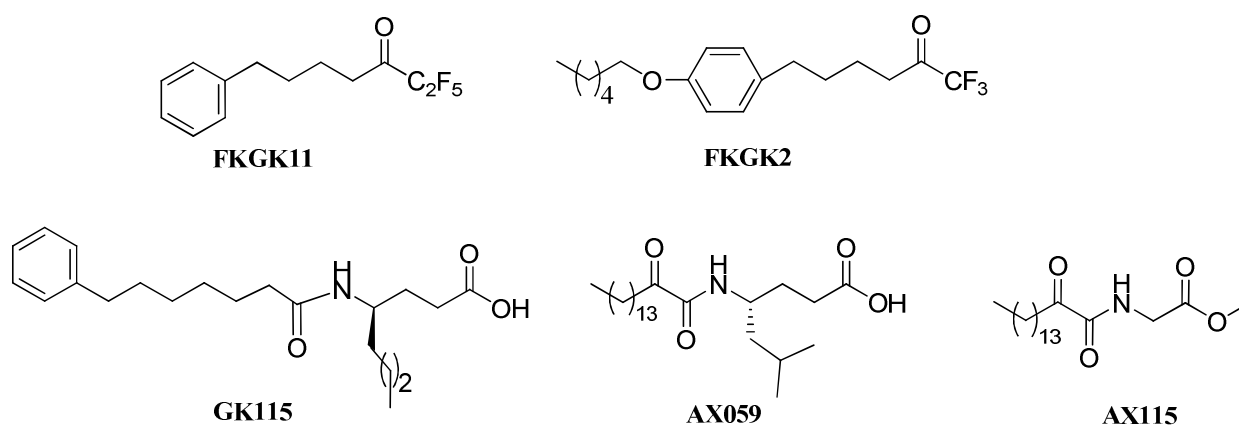
Σχήμα 2.3 Κλινική πορεία ποντικιών με EAE. Παρατηρείται αισθητή μείωση στην εξέλιξη της ασθένειας τις κρίσιμες μέρες 14 έως 40.



Σχήμα 2.4 Πορεία των ποντικιών με EAE όταν οι αναστολείς χορηγήθηκαν την 11η μέρα όπου φάνηκαν τα συμπτώματα της ασθένειας. Ο εκλεκτικός αναστολέας της $iPLA_2$ είχε την καλύτερη δράση στην πρόοδο της ασθένειας (ημέρες 13-19 και 23-35) η οποία διήρκεσε και μετά το τέλος της θεραπείας.

Με αυτόν τον τρόπο αποδεικνύεται η σημαντική εμπλοκή της $iPLA_2$ τόσο κατά την έναρξη της ασθένειας, όσο και κατά την πρόοδό της. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η συνέχιση της επιστημονικής έρευνας για σύνθεση νέων αναστολέων για την $iPLA_2$, οι οποίοι θα μπορούν να αξιοποιηθούν ως φάρμακα για ασθένειες που μαστίζουν την εποχή μας, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας. Πρόσφατα σε μια μελέτη για τη διερεύνηση των ρόλων των φωσφολιπασών A_2 μετά από κάκωση νωτιαίου μυελού χρησιμοποιήθηκαν οι φθοροκετονικοί αναστολείς FK GK11, FK GK2 και τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα AX059 και AX115 (Σχήμα 2.5).⁹¹ Η κάκωση νωτιαίου μυελού μπορεί να προέλθει από τραυματισμό και μπορεί να προκαλέσει μόνιμα κινητικά προβλήματα λόγω της διαταραχής των νευρικών οδών της σπονδυλικής στήλης και το θάνατο νευρώνων και κυτταρικών γλοιών. Πολλά από τα οποία προέρχονται από δευτερογενή τραυματισμό εξαιτίας της φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού.

Ο αναστολέας AX059 είναι ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας της GIVA $cPLA_2$ και όταν χρησιμοποιήθηκε στα ποντίκια μετά από την κάκωση νωτιαίου μυελού παρατηρήθηκε μεγαλύτερη απώλεια νευρώνων και μυελίνης όπως και επιδεινωμένη κινητικότητα το οποίο υποδεικνύει ότι η φωσφολιπάση αυτή έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της κάκωσης. Από την άλλη, όταν χρησιμοποιήθηκε ο FK GK11 που είναι εκλεκτικός και ισχυρός αναστολέας ως προς την GVIA $iPLA_2$ τότε αν και η κινητικότητα των ποντικών βελτιώθηκε αμυδρά, η μυελίνη ελαττώθηκε πολύ λιγότερο απ'ότι στα άγριου τύπου ποντίκια το οποίο δείχνει ότι το ένζυμο αυτό παίζει ένα μικρό ρόλο στην επιδείνωση της ασθένειας. Ο GK115 παρουσίασε ενδιαφέρουσα δράση αφού όντας εκλεκτικός αναστολέας της GIIA $sPLA_2$ βελτίωσε πολύ την κινητικότητα των ποντικών και συνέβαλε στην προστασία των ιστών, των νευρώνων και της μυελίνης. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η $sPLA_2$ έχει καθαρά ζημιογόνο ρόλο στην εξέλιξη της κάκωσης.



Σχήμα 2.5 Δομές των αναστολέων που μελετήθηκαν για τη δράση τους στην κάκωση νωτιαίου μυελού.

Στην περίπτωση του AX115 που είναι ένας καθολικός αναστολέας των φωσφολιπασών αλλά μέτριος σε δραστικότητα, υπήρξε βελτίωση σε όλους τους παράγοντες – κινητικότητα, ιστοί, μυελίνη και νευρώνες – μεγαλύτερη από όλους τους προηγούμενους αναστολείς. Αντιθέτως, η χρήση του FKGGK2 που είναι καθολικός και πολύ ισχυρός αναστολέας των φωσφολιπασών τα αποτελέσματα ήταν πολύ χειρότερα από ότι η μη χρήση οποιουδήποτε άλλου αναστολέα. Έτσι, οι συγγραφείς καταλήγουν ότι ο πιο ωφέλιμος αναστολέας ήταν ο AX115 αφού αναστέλλει τη δράση των iPLA₂ και sPLA₂ και παρόλο που αναστέλλει και την cPLA₂ παράλληλα ενεργοποιεί την έκφρασή της το οποίο συμβάλλει θετικά στην ανάρρωση από κάκωση του νωτιαίου μυελού.

Ο Li και οι συνεργάτες του διερεύνησαν κατά πόσο η αναστολή της δράσης της iPLA₂ μπορεί να συμβάλλει στη θεραπεία ασθενών με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών.⁹² Στη μελέτη αυτή χρησιμοποίησαν ποντίκια με μοντέλο αυτού του καρκίνου και τους αναστολείς BEL, FKGGK11 καθώς και τα γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα που χορηγούνται συνήθως, το cisplatin και το paclitaxel. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η BEL ανέστειλε τη μετάσταση και την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων ενώ σε συνδυασμό με το paclitaxel πολλά από τα ποντίκια δεν ανέπτυξαν καθόλου όγκους και ασκίτες ενώ τα υπόλοιπα μικρότερους από ότι αυτά στα οποία δεν χορηγήθηκε τίποτα. Από την άλλη η BEL σε συνδυασμό με το cisplatin είχε λιγότερο καλύτερα αποτελέσματα. Όταν χορηγήθηκε ο αναστολέας FKGGK11 κάποια από τα ποντίκια δεν ανέπτυξαν καθόλου όγκους και ασκίτες και τα υπόλοιπα ανέπτυξαν μικρότερους ή/και λιγότερους. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση των συγγραφέων ήταν ότι στα ποντίκια ελέγχου και σε αυτά που έλαβαν τη BEL βρέθηκαν ενεργά καρκινικά κύτταρα στους ασκίτες και στην περιτονιακή περιοχή τους υποδεικνύοντας ότι η BEL και πιθανόν ο FKGGK11 προλαμβάνουν την κυτταρική προσκόλληση, εισβολή και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Τελικά οι συγγραφείς προτείνουν ότι η iPLA₂ παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων και ο συνδυασμός BEL και paclitaxel, σε χαμηλές μάλιστα δόσεις, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δραστικό φάρμακο για τον καρκίνο των ωοθηκών.

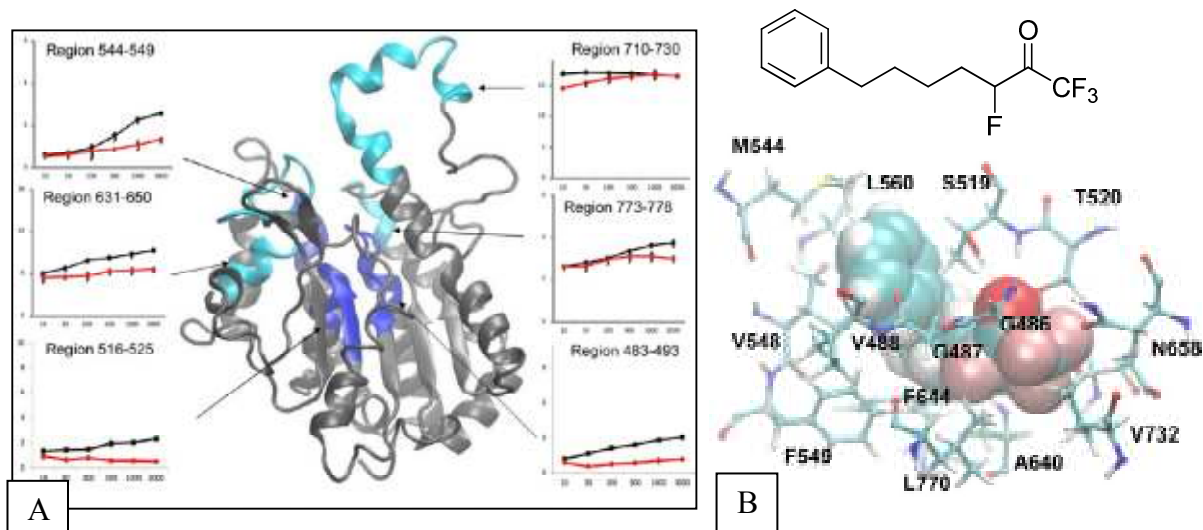
Ακόμα, ο αναστολέας FKGGK18 (**38**) μελετήθηκε πρόσφατα ως ένα υποψήφιο φάρμακο για τον διαβήτη.⁹³ Ο Ali και η ομάδα του μελέτησαν αρχικά την εκλεκτικότητα του αναστολέα αυτού ως προς τη συγκεκριμένη ομάδα της iPLA₂ τη GVIA σε σύγκριση με τη GVIB και την συνέκριναν με τη δράση της BEL. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όντως η φθοροκετόνη FKGGK18 είναι εκλεκτικός και ισχυρός αναστολέας της GVIA iPLA₂ αλλά όχι μη αναστρέψιμος όπως η BEL το οποίο σημαίνει ότι μειώνεται η πιθανή τοξικότητά του και μπορεί πιο εύκολα να χρησιμοποιηθεί ως πιθανό φάρμακο σε κλινική μελέτη. Έπειτα, διερεύνησαν με ποιο τρόπο θα μπορούσε να συμμετέχει ο αναστολέας αυτός στους διάφορους μηχανισμούς του διαβήτη αφού έχει

αποδειχθεί ότι η iPLA₂ εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα β-κύτταρα των παγκρεατικών νησίδων και ότι συμβάλει στην έκκριση ινσουλίνης που διεγείρεται από γλυκόζη.⁹⁴

Επομένως, με τη χορήγηση 20 γραμμαρίων γλυκόζης και την παρουσία του FKGGK18 η έκκριση της ινσουλίνης όπως και της προσταγλανδίνης PGE₂ μειώθηκαν δραματικά. Όμως, όταν ο αναστολέας δόθηκε 30 λεπτά νωρίτερα από τη γλυκόζη τότε τα επίπεδα ινσουλίνης και προσταγλανδίνης παρέμειναν τα ίδια υποστηρίζοντας ακόμα περισσότερα την αναστρέψιμη φύση της φθοροκετόνης. Επίσης, ο FKGGK18 μείωσε με έναν τρόπο εξαρτώμενο της συγκέντρωσης την έκφραση της σφιγγομυελινάσης 2 που προκαλείται από στρες του ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και την απόπτωση των β-κυττάρων. Έτσι, οι συγγραφείς καταλήγουν ότι ο αναστολέας αυτός είναι πολύ χρήσιμος για μελέτες *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη ή καθυστέρηση ανωμαλιών σε ασθένειες όπως ο διαβήτης, η φλεγμονή, νευροεκφυλιστικές και μυοκαρδιακές παθήσεις.

Οι αναστολείς αυτοί εκτός από μελέτες σε διάφορες ασθένειες έχουν χρησιμοποιηθεί και για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας και της δομής του ενζύμου. Για παράδειγμα, η ομάδα του Hsu χρησιμοποίησε φθοροκετόνες σε ένα μοντέλο ανταλλαγής υδρογόνου σε συνδυασμό με υπολογιστικές μεθόδους προκειμένου να διερευνήσει την αλληλεπίδραση των αναστολέων με το ένζυμο GVIA iPLA₂.⁹⁵ Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας **32** ο οποίος είναι ισχυρός για αυτό το ένζυμο αλλά όχι εκλεκτικός αρκετά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όταν προσδέθηκε στην ενεργή περιοχή ο αναστολέας, οι περιοχές αμινοξέων που περιλαμβάνουν την καταλυτική δυάδα Ser519 (κατάλοιπα 516-525) και Asp652 (κατάλοιπα 632-655) παρουσίασαν μείωση της ανταλλαγής H/D κατά 18% και 11% αντίστοιχα. Επίσης, η απόσταση μεταξύ των Ser519 H και Asp652 O μειώθηκε από 3.7 Å σε 1.6 Å σχηματίζοντας έναν δεσμό υδρογόνου μεταξύ των δύο αμινοξέων. Στις υπόλοιπες περιοχές του ενζύμου δεν υπήρξε ουσιαστική μεταβολή στις τιμές ανταλλαγής παρά μόνο μια μικρή στην περιοχή 710-730 υποδεικνύοντας ότι κάποια μικρής τάξης δομική αλλαγή πραγματοποιείται κατά την πρόσδεση του υποστρώματος στο ένζυμο.

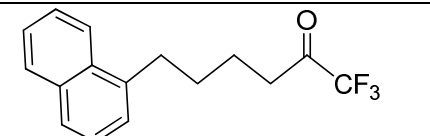
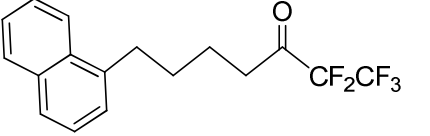
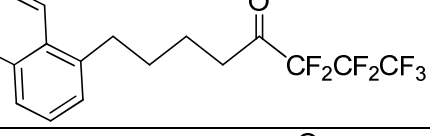
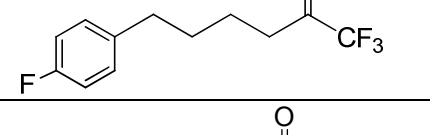
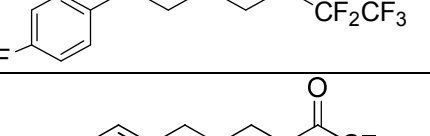
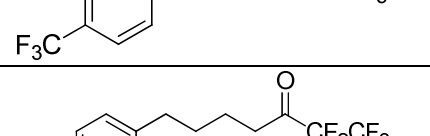
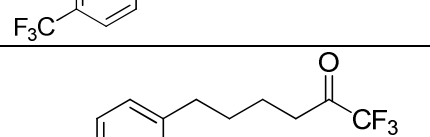
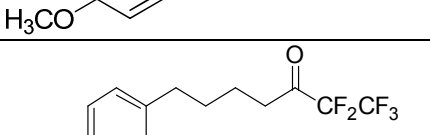
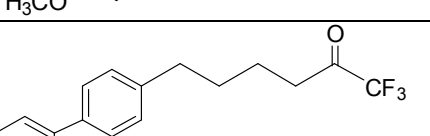
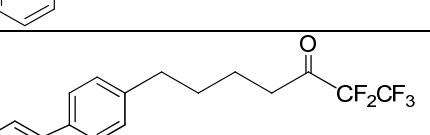

Έτσι οι συγγραφείς προτείνουν ότι η πρόσδεση της φθοροκετόνης γίνεται στο ενεργό κέντρο αφού οι αναστολείς μιμούνται τον τρόπο πρόσδεσης των φυσικών υποστρωμάτων. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του αναστολέα μπορούν να εξηγήσουν την υψηλή συγγένεια της φθοροκετόνης. Η φθοροαλκυλομάδα των συγκεκριμένων αναστολέων μπορεί να αντικαθιστά την κεφαλή των φωσφολιπιδίων καθώς εισάγονται σε μια φθοροφιλική περιοχή του ενζύμου. Τέλος, η οπή οξυανιόντος στην περιοχή των τριών γλυκινών μπορεί να σταθεροποιεί την καρβονυλική ομάδα της φθοροκετόνης μέσω ισχυρών δεσμών υδρογόνου.

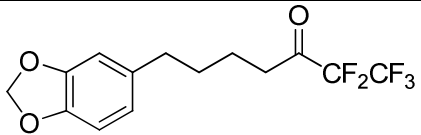
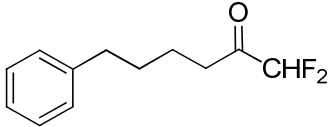


Εικόνα 2.1 A) Περιοχές της *iPLA*₂ που επηρεάστηκαν περισσότερο από τη δέσμευση της φθοροκετόνης **32** και οι αλλαγές τους στα επίπεδα ανταλλαγής H/D. B) Μοντέλο περιοχής πρόσδεσης του αναστολέα και η δομή του.

Λαμβάνοντας υπόψη την προτίμηση που δείχνει η GVIA *iPLA*₂ στις δομές των αναστολέων FKGGK11 και FKGGK18 συντέθηκαν και μελετήθηκαν ως προς τη δραστηριότητά τους μια σειρά αναστολέων με δομή πολυφθοροκετόνης (Πίνακας 2.3).⁹⁶ Η σειρά αυτή παρουσιάζει την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της GVIA *iPLA*₂ που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία. Από τις πολυφθοροκετόνες αυτές οι πιο εκλεκτικοί αναστολείς είναι οι **45**, **46**, **50** και **53** αλλά ειδικά ο **50** παρουσιάζει την πλέον ισχυρή και εξειδικευμένη δράση προς την *iPLA*₂ με 99.8% αναστολή, $X_I(50) = 0.0001 \pm 0.0000$ σε κλάσμα 0.091, 32.8% ως προς την GV *sPLA*₂ και <25% για την GIVA *cPLA*₂. Η ανακάλυψη αυτών των ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω μελέτη του ενζύμου και των λειτουργιών του σε διάφορες ασθένειες και να αποτελέσει μέθοδο για ανακάλυψη φαρμακευτικών προϊόντων.

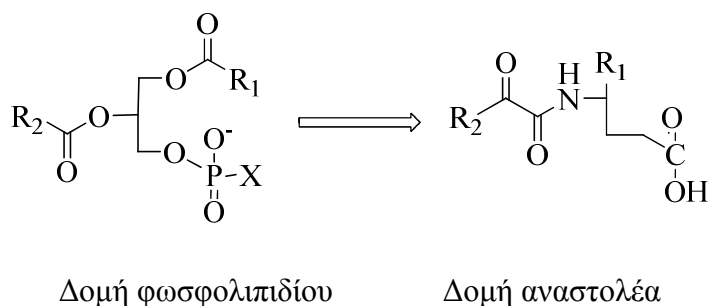
Πίνακας 2.3 Αναστολή των PLA₂ από πολυθροκετόνες.

No	Δομή	GVIA iPLA ₂		GIVA cPLA ₂	GV sPLA ₂
		% αναστολή	X _i (50)	% αναστολή	% αναστολή
42		98.7	0.0018 ± 0.0002	77.4	31.9
43		96.4	0.0034 ± 0.0002	64.0	29.4
44		76.7		60.4	57.8
45		98.5	0.0002 ± 0.0000	41.4	N.D.
46		98.2	0.0003 ± 0.0001	N.D.	29.3
47		99.9	0.0002 ± 0.0000	83.9	30.4
48		98.9	0.0003 ± 0.0001	62.5	36.9
49		99.8	0.0001 ± 0.0000	54.3	N.D.
50		99.8	0.0001 ± 0.0000	N.D.	32.8
51		97.9	0.0189 ± 0.0045	96.5 X _i (50)= 0.0074 ± 0.0003	40.5
52		94.6	0.0134 ± 0.0017	72.6	38.3

53		99.5	0.0019 ± 0.0003	38.3	29.4
54		87.4	-	N.D.	N.D.

2.5 2-Οξοαμιδικά παράγωγα

Ενώσεις με δομή 2-οξοαμιδίου συντέθηκαν και δοκιμάστηκαν αρχικά ως πιθανοί αναστολείς της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 . Όμως, κατά τη διάρκεια αυτών των μελετών παρατηρήθηκε σε κάποιες ενώσεις προτίμηση της $iPLA_2$. Ο ορθολογικός σχεδιασμός των 2-οξοαμιδικών παραγώγων βασίστηκε στην αντικατάσταση της εστερικής ομάδας του φωσφολιπιδίου στην $sn-2$ θέση από την 2-οξοαμιδική (Σχήμα 2.6).



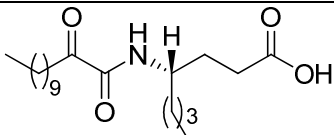
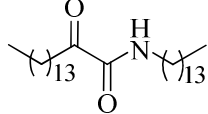
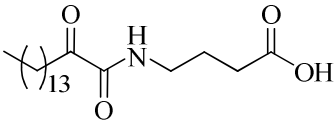
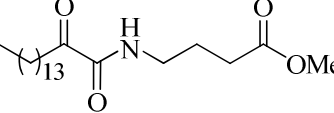
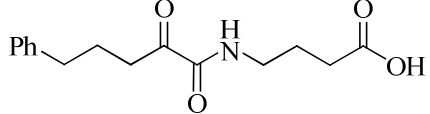
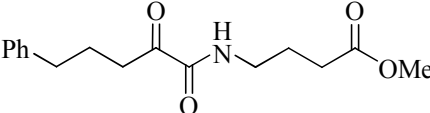
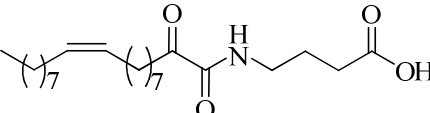
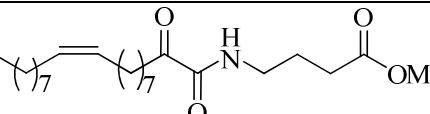
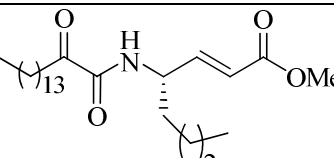
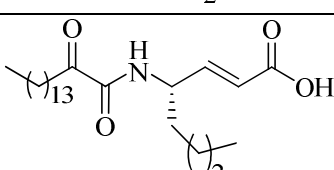
Σχήμα 2.6 Ορθολογικός σχεδιασμός των 2-οξοαμιδικών αναστολέων

Πράγματι, τα 2-οξοαμίδια αποδείχθηκαν να είναι πολύ καλοί αναστολείς της $cPLA_2$ ^{97,98} (Πίνακας 2.4 και 2.5). Για παράδειγμα, το παράγωγο οξοαμιδίου **55** με χειραλικότητα στη δομή του παρουσίασε ισχυρή αναστολή της $cPLA_2$ $X_i(50) = 0.009 \pm 0.004$. Προσθήκη ενός βενζολικού δακτυλίου ύστερα από τέσσερα ανθρακόατομα από την ομάδα του οξοαμιδίου, δεν προσέδωσε στο μόριο καμία ανασταλτική ιδιότητα για καμία από τις δύο φωσφολιπάσες (ενώσεις **59** και **60**). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν μη αναμενόμενο καθώς από τους προηγούμενους αναστολείς παρατηρήθηκε η προτίμηση της $iPLA_2$ σε δομές με αρωματικό σύστημα, αλυσίδα τεσσάρων ανθρακοατόμων και ενεργοποιημένου καρβονυλίου.

Παρόλα αυτά, ο διπλός δεσμός στην ένωση **62** φαίνεται να αυξάνει την αναστολή και των δύο φωσφολιπασών αλλά μόνο στην περίπτωση του μεθυλεστέρα. Στην περίπτωση του ελεύθερου οξέος **61**, το 2-οξοαμιδικό παράγωγο είναι εκλεκτικός αναστολέας της $cPLA_2$. Παρομοίως, η ένωση **64** η οποία έχει μια πλευρική αλυσίδα νορλευκίνης, διπλό δεσμό και είναι ελεύθερο οξύ

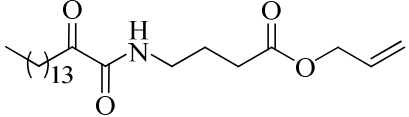
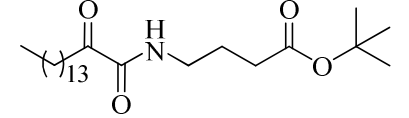
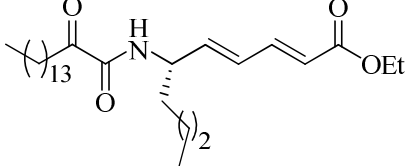
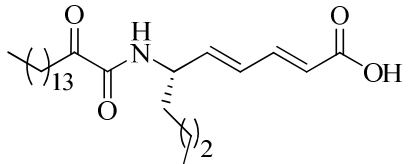
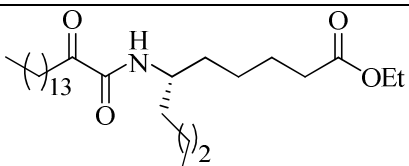
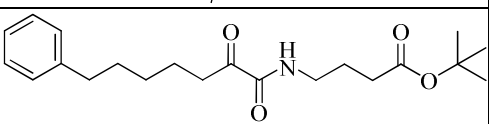
αναστέλλει εκλεκτικά και ισχυρά την $cPLA_2$ ενώ δεν παρουσιάζει καμία αναστολή για την $iPLA_2$.

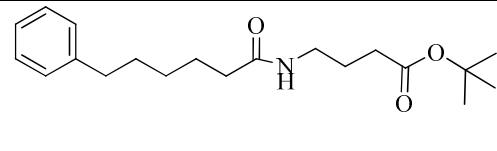
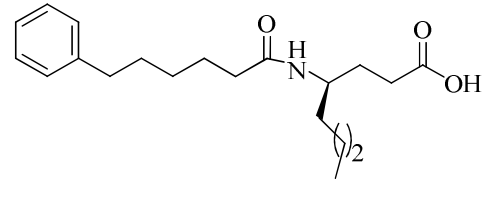
Πίνακας 2.4 Αναστολή των $iPLA_2$, $cPLA_2$ από 2-οξοαμιδικά παράγωγα.

No	Δομή	Αναστολή της GVIA $iPLA_2$	Αναστολή της GVIA $cPLA_2$
55		Δεν μετρήθηκε	0.009 ± 0.004
56		<50%	<25%
57		<25%	$X_I(50) = 0.017 \pm 0.009$
58		<50%	<25%
59		<25%	<25%
60		<25%	<25%
61		<25%	$X_I(50) = 0.011 \pm 0.003$
62		$X_I(50) = 0.067 \pm 0.003$	$X_I(50) = 0.012 \pm 0.014$
63		$X_I(50) = 0.032 \pm 0.010$	$X_I(50) = 0.018 \pm 0.010$
64		<25%	$X_I(50) = 0.003 \pm 0.001$

Σε περαιτέρω σύνθεση 2-οξοαμιδικών αναστολέων⁹⁹, ο αλλυλεστέρας **65** έδειξε να είναι μέτριος αναστολέας των GVIA iPLA₂, GIVA cPLA₂ και GV sPLA₂ με μικρή εκλεκτικότητα προς την iPLA₂ (63% αναστολή του ενζύμου, έναντι 53% για την cPLA₂ και 38% για την sPLA₂). Ενδιαφέρουσα ανασταλτική δράση παρουσίασε ο ακόρεστος αιθυλεστέρας με πλευρική αλυσίδα νορλευκίνης **67** ο οποίος έδειξε μια πιο σημαντική διαφοροποίηση στα ποσοστά αναστολής με μικρή εκλεκτικότητα ως προς την iPLA₂. Αντιθέτως, το αντίστοιχο ελεύθερο οξύ **68** είναι ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας της cPLA₂, παρουσιάζοντας μηδαμινή αναστολή στις άλλες δυο φωσφολιπάσες. Δοκιμάζοντας πάλι την εισαγωγή του βενζολικού δακτυλίου στα 2-οξοαμιδικά παράγωγα αλλά με μεγαλύτερη αλυσίδα ανθρακοατόμων, τα αποτελέσματα ήταν θετικότερα. Η ένωση **70** έδειξε καλή αναστολή των φωσφολιπασών αλλά καμία εκλεκτικότητα. Το αμίδιο **71** έχασε μέρος της ανασταλτικής του ιδιότητας και ειδικότερα προς την cPLA₂ σε σχέση με το αντίστοιχο οξοαμίδιο, ενώ ο αναστολέας **72** αποδείχθηκε εκλεκτικός και ισχυρός για την GV sPLA₂ με $X_1(50) = 0.003 \pm 0.0004$.

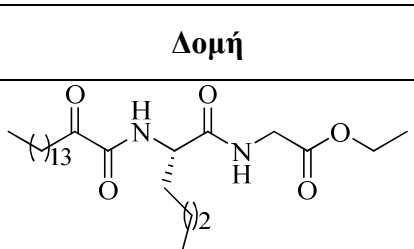
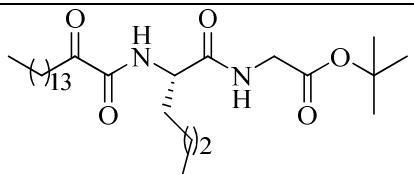
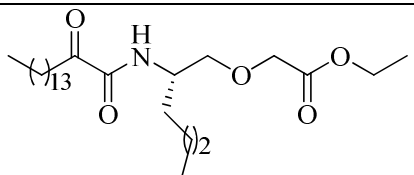
Πίνακας 2.5 Αναστολή των PLA₂ από 2-οξοαμιδικά και αμιδικά παράγωγα

No	Δομή	% αναστολή της GIVA cPLA ₂	% αναστολή της GVIA iPLA ₂	% αναστολή της GV sPLA ₂
65		53 ± 2	63 ± 5	38 ± 8
66		74 ± 2	62 ± 13	72 ± 10
67		64 ± 4	74 ± 5	52 ± 7
68		85 ± 4	<25	<25
69		62 ± 12	66 ± 5	<25
70		82 ± 9	81 ± 10	69 ± 9

71		36 ± 3	57 ± 12	66 ± 9
72		<25	<25	95 $X_1(50)=$ 0.003 ± 0.0004

Κάποια εκλεκτικότητα ως προς την iPLA₂ άρχισε να παρουσιάζεται από την επόμενη σειρά 2-οξοαμιδικών παραγόντων και τις ενώσεις **73**, **74**, **75** (Πίνακας 2.6).¹⁰⁰ Η δομή των αναστολέων **73** και **74** περιλαμβάνει έναν εστέρα του διπεπτιδίου γλυκίνης-(L)-νορλευκίνης και μια μακριά ανθρακική αλυσίδα. Οι τιμές $X_1(50)$ που εμφάνισαν για την iPLA₂ είναι αντίστοιχα 0.020 ± 0.002 και 0.011 ± 0.001 αλλά με αντίστοιχη αναστολή για την cPLA₂ 73% και 72%. Επίσης, φαίνεται ότι ο *tert*-βουτυλεστέρας έχει πιο ισχυρή δράση από τον αντίστοιχο αιθυλεστέρα. Ωστόσο, το παράγωγο **75** που αποτελείται από τον αιθυλεστέρα ενός ψευδοδιπεπτιδίου και την ίδια μακριά ανθρακική αλυσίδα, εμφανίζει χαμηλή αναστολή για την cPLA₂ (52%) αλλά για την iPLA₂ $X_1(50)= 0.017 \pm 0.002$. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα οξέα **76** και **77** είναι ισχυροί και εκλεκτικοί αναστολείς για την cPLA₂ με τιμές $X_1(50)= 0.035 \pm 0.014$ και 0.017 ± 0.002 , αντίστοιχα. Και στις δυο περιπτώσεις το παράγωγο που περιέχει το ψευδοδιπεπτίδιο φαίνεται να είναι πιο ισχυρός αναστολέας από τα διπεπτίδια.

Πίνακας 2.6 Αναστολή των PLA₂ από 2-οξοαμιδικά παράγωγα

No	Δομή	Αναστολή της GVIA cPLA ₂	Αναστολή της GVIA iPLA ₂	Αναστολή της GV sPLA ₂
73		73 %	$X_1(50)= 0.020 \pm 0.002$	63 %
74		72 %	$X_1(50)= 0.011 \pm 0.001$	59 %
75		52 %	$X_1(50)= 0.017 \pm 0.002$	81 %

76		$X_1(50) = 0.035 \pm 0.014$	<25 %	<25 %
77		$X_1(50) = 0.017 \pm 0.002$	<25 %	<25 %

Μέσα από τα παραπάνω δεδομένα μπορούμε να αναφέρουμε τα εξής συμπεράσματα:

- ♦ για την αναστολή της iPLA₂ είναι σημαντικό να υφίσταται στη δομή του 2-οξοαμιδικού παραγώγου εστέρας, κατά προτίμηση *tert*-βουτυλεστέρας,
- ♦ η πλευρική αλυσίδα της νορλευκίνης προσδίδει ανασταλτική δράση και εκλεκτικότητα,
- ♦ παρομοίως η αιθερική ομάδα του ψευδοδιπεπτιδίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

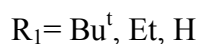
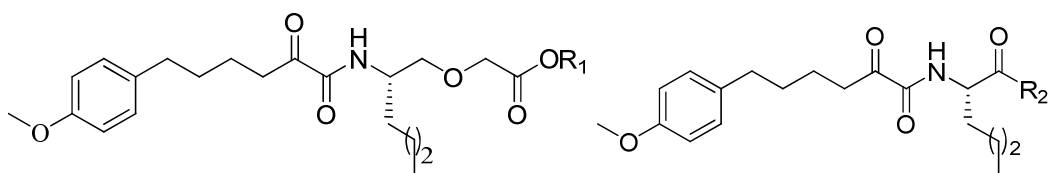
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

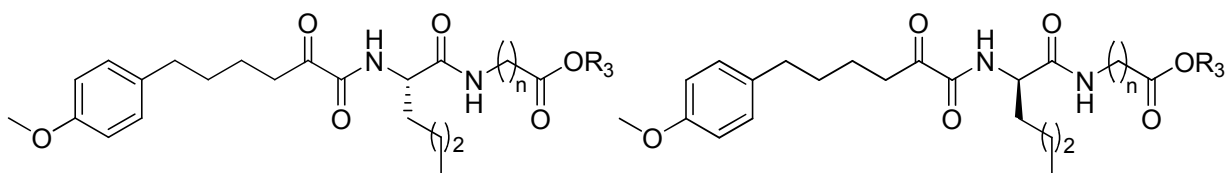
Οι φωσφολιπάσες A_2 είναι ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία της παραγωγής φλεγμονής μέσα από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων στον *sn*-2 εστερικό δεσμό που καταλύουν. Η υδρόλυση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση λυσοφωσφολιπιδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων εκ των οποίων ο σημαντικότερος εκπρόσωπος είναι το αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ αποτελεί υπόστρωμα για διάφορα ένζυμα τα οποία το μετατρέπουν σε εικοσανοειδή (π.χ. προσταγλανδίνες και λευκοτριένια) ενώ τα λυσοφωσφολιπίδια είναι πρόδρομες ενώσεις του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF). Όλες αυτές οι ενώσεις και τα παράγωγά τους αποτελούν ενεργούς παράγοντες στη δημιουργία της φλεγμονής και σχετίζονται με πολλές παθολογικές καταστάσεις. Συνεπώς, οι φωσφολιπάσες A_2 συνιστούν σημαντικούς στόχους για την ανάπτυξη αναστολέων.

Ειδικότερα, η ανεξάρτητη ιόντων φωσφολιπάση A_2 , $iPLA_2$, όπως αναπτύχθηκε και στο κεφάλαιο 1, φαίνεται να συμμετέχει και να παίζει σημαντικό ρόλο σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις του εγκεφάλου, του κεντρικού νευρικού συστήματος, της καρδιάς και του παγκρέατος ενώ έχει συσχετιστεί αρκετά με την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου. Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι η ανθρώπινη $GVIA$ $iPLA_2$ συμμετέχει στη ρύθμιση βασικών λειτουργιών του κυττάρου όπως η ανάπλαση των φωσφολιπιδίων και η απόπτωση. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι το ένζυμο αυτό μπορεί να αποτελεί έναν σημαντικό, νέο φαρμακευτικό στόχο.

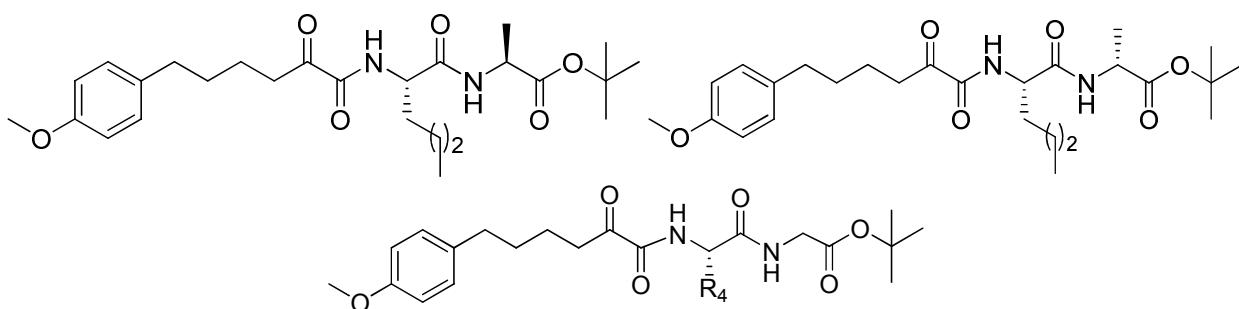
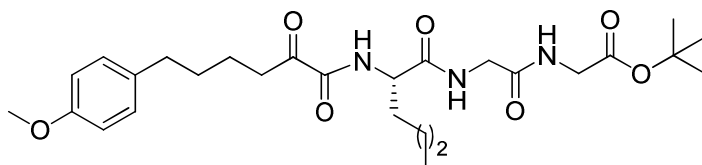
Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η μελέτη νέων αναστολέων της $iPLA_2$ με δομή πολυφθοροκετόνης ή 2-οξοαμιδίου, σε συνέχεια της έρευνας που πραγματοποιείται βάσει αυτών των δομών, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 2. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της παρούσας διατριβής ήταν:

- Η σύνθεση 2-οξοαμιδικών παραγώγων με τις παρακάτω δομές:



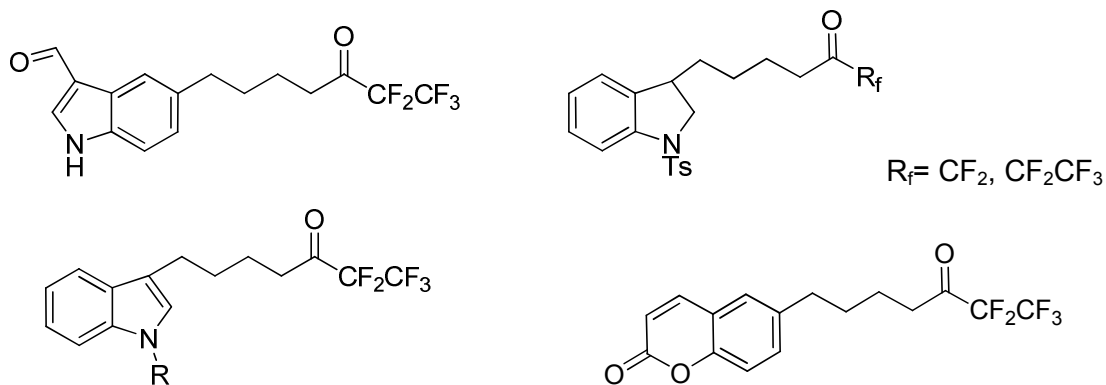


$n = 1, 2, 3$ $R_3 = Bu^t, Bn$



$R_4 = CH(CH_3)_2, CH_2CH(CH_3)_2, CH(CH_3)CH_2CH_3$

- Η σύνθεση πολυφθοροκετονικών παραγώγων με τις εξής δομές:

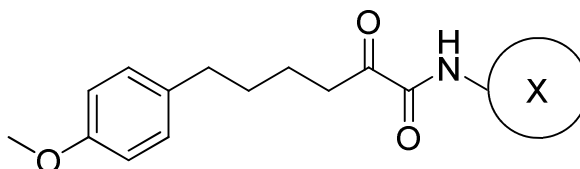


- Η μελέτη της ανασταλτικής δράσης των παραπάνω ενώσεων έναντι των τριών κύριων ομάδων φωσφολιπασών cPLA₂, iPLA₂ και sPLA₂.

A. 2-οξοαμιδικά παράγωγα

1. Σχεδιασμός των 2-οξοαμιδικών παραγώγων

Λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα που αναπτύχθηκαν στο Κεφάλαιο 2 για τη δράση των 2-οξοαμιδικών αναστολέων αποφασίσαμε να συνθέσουμε μόρια που αφενός να περιέχουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που φαίνεται να είναι απαραίτητα για την αναστολή του ενζύμου και αφετέρου να διερευνήσουμε το τμήμα X του γενικού μορίου που φαίνεται παρακάτω ώστε να μεγιστοποιείται η βιολογική δραστηριότητα του προϊόντος. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που διατηρήθηκαν ίδια σε όλα τα παράγωγα περιλαμβάνουν τον παρα-μεθόξυ υποκατεστημένο αρωματικό πυρήνα σε απόσταση τεσσάρων ανθρακοατόμων από το ενεργοποιημένο καρβονύλιο ακολουθούμενο από ένα άμινο συστατικό. Αναλόγως τη σύσταση του άμινο συστατικού, τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: (I) αυτά που περιέχουν ένα αιθερικό ψευδοδιπεπτίδιο, (II) αυτά που βασίζονται σε ένα παράγωγο της L-νορλευκίνης, (III) αυτά που περιέχουν ένα διπεπτίδιο με την L- ή την D-νορλευκίνη, (IV) αυτά που περιέχουν ένα τριπεπτίδιο της L-νορλευκίνης, (V) αυτά που περιέχουν το διπεπτίδιο L-νορλευκίνης με την L- ή τη D-αλανίνη και (VI) αυτά που περιέχουν ένα διπεπτίδιο της γλυκίνης. Οι γενικοί τύποι των 2-οξοαμιδίων που σχεδιάστηκαν φαίνονται στον πίνακα 4.1.



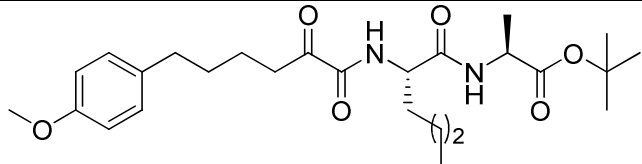
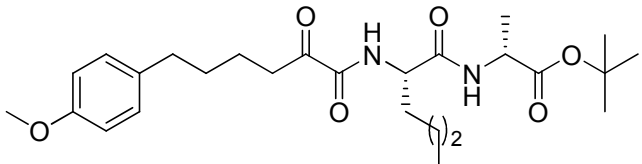
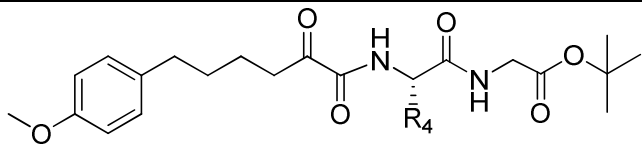
Γενική μορφή 2-οξοαμιδικών παραγώγων

Γενικά επιλέχθηκε η νορλευκίνη ως βασικό αμινοξύ στα περισσότερα παράγωγα καθώς από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται ότι βελτιώνει την ανασταλτική δράση των ενώσεων που την περιέχουν και ενίοτε την εκλεκτικότητά τους ως προς την iPLA₂. Ειδικότερα, στην περίπτωση της ομάδας (I), τα παράγωγα περιέχουν αιθερικά ψευδοδιπεπτίδια της

νορλευκίνης και η διαφοροποίηση γίνεται στο τελικό μέρος του μορίου όπου καταλήγει σε *tert*-βουτυλεστέρα, αιθυλεστέρα ή οξύ. Γνωρίζοντας ότι ο *tert*-βουτυλεστέρας παρουσιάζει μια εκλεκτικότητα και καλή δραστικότητα ως προς την iPLA₂, θέλαμε να ερευνήσουμε πόσο και αν επηρεάζονται όταν αντικατασταθεί ο *tert*-βουτυλεστέρας από την ομάδα του αιθυλεστέρα ή του οξέος. Έπειτα, οι ενώσεις της ομάδας (II) σχεδιάστηκαν ώστε να μελετηθεί αν κάποιες παραλλαγές του αμινοξέος της νορλευκίνης θα εμφανίσουν υψηλή δραστικότητα ή εκλεκτικότητα ως προς το εξεταζόμενο ένζυμο. Από εκεί και πέρα, στην ομάδα (III) εισάγεται στο μόριο ένα διπεπτίδιο όπου διατηρείται το αμινοξύ της νορλευκίνης (L- ή D-) και αλλάζει το δεύτερο αμινοξύ του διπεπτιδίου ώστε να διερευνηθεί αν το μέγεθος της ανθρακικής αλυσίδας του δεύτερου αμινοξέος παίζει ρόλο στην ανασταλτική δράση του μορίου. Για τον ίδιο λόγο, σχεδιάστηκε το τριπεπτίδιο της L-νορλευκίνης που αποτελεί την ομάδα (IV) ενώ στην ομάδα (V) θελήσαμε να διερευνήσουμε αν μπορεί να βελτιωθεί η αναστολή του ενζύμου από ενώσεις που περιέχουν περισσότερα του ενός στερεογονικά κέντρα, εισάγοντας την L- ή τη D-αλανίνη στο διπεπτίδιο της L-νορλευκίνης. Τέλος, τα διπεπτίδια που περιέχουν οι ενώσεις της ομάδας (VI) αποτελούνται από το αμινοξύ της γλυκίνης και από L-αμινοξέα παρόμοιου μεγέθους με τη νορλευκίνη με σκοπό να συγκρίνουμε τις ανασταλτικές δράσεις των παραγώγων αυτών.

Πίνακας 4.1 Γενικές δομές των 2-οξοαμιδικών παραγώγων.

Ομάδα	Γενική δομή ενώσεων	n	R	No
I		-	Bu ^t	90
		-	Et	95
		-	H	96
II		-	OBu ^t	99
		-	NH ₂	102
III		1	Bu ^t (L-)	105
		2	Bu ^t (L-)	111
		3	Bu ^t (L-)	117
		1	Bn	120
		1	Bu ^t (D-)	125
IV		-	-	130

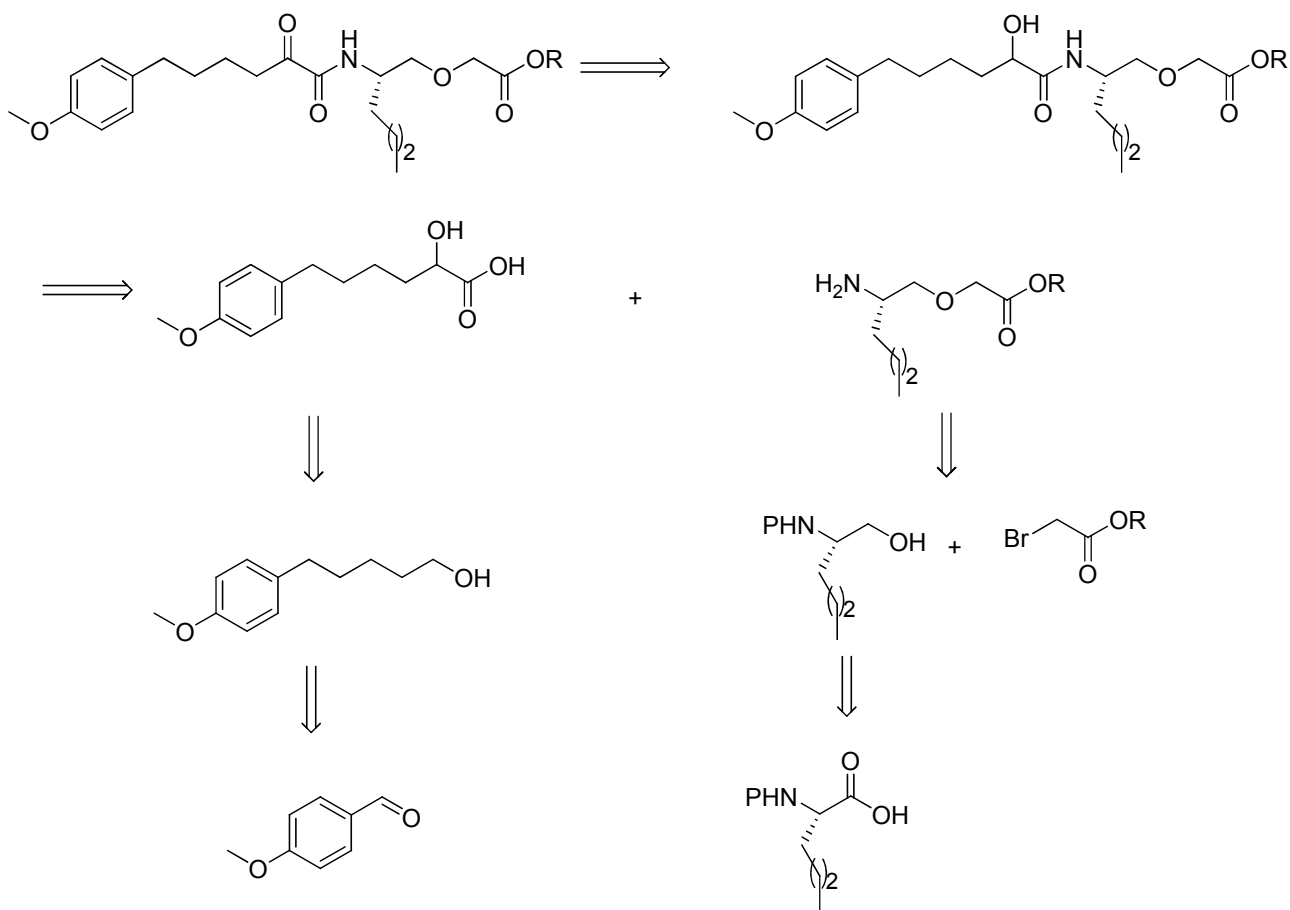
V		-	-	134 (L-)
		-	-	140 (D-)
VI		-	CH(CH ₃) ₂	145
		-	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	150
		-	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	155

2. Σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων

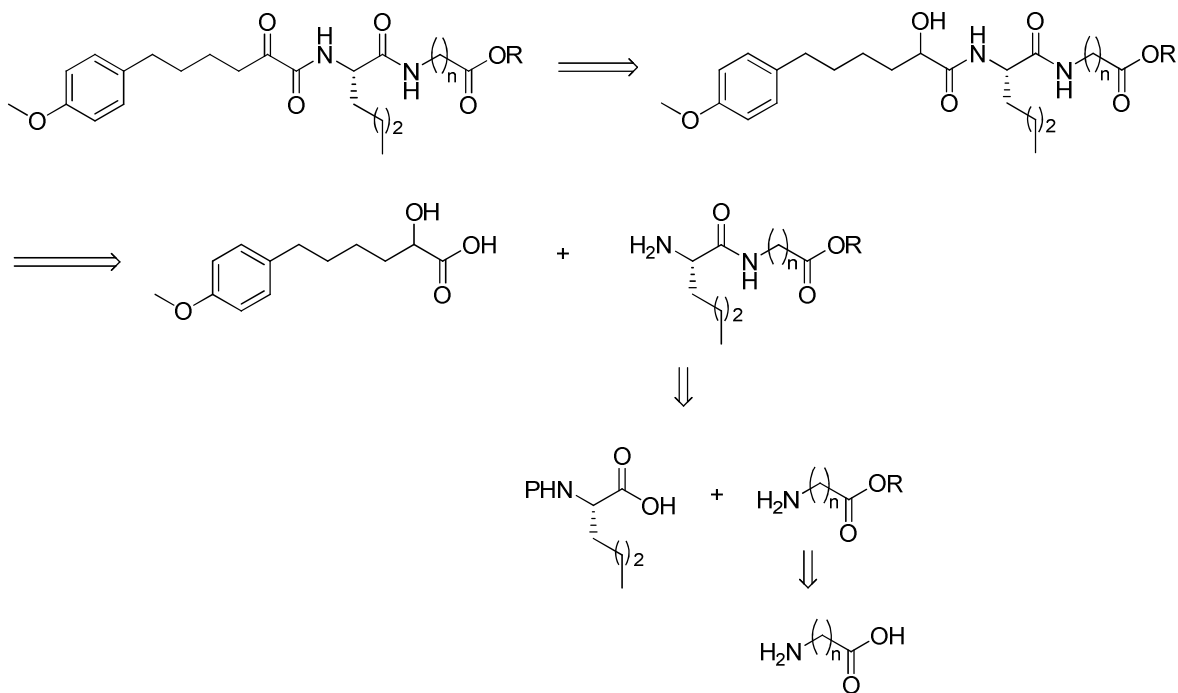
2.1 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης

Τα 2-οξοαμίδια της ομάδας I που περιέχουν το αιθερικό ψευδοδιπεπτιδίο, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.1, θα μπορούσαν να προκύψουν από την οξείδωση του αντίστοιχου 2-υδροξυ-αμιδίου το οποίο θα μπορούσε να προέλθει από τη σύζευξη του 2-υδροξυ-οξέος και του κατάλληλου αμινο συστατικού. Το αμινο συστατικό θα μπορούσε να παρασκευασθεί από τη σύζευξη της νορλευκινόλης με τον βρωμοοξικό εστέρα, ενώ η νορλευκινόλη από απλή αναγωγή της νορλευκίνης. Αντίστοιχα, το υδροξυ-οξύ θα μπορούσε να προκύψει από την αντίστοιχη αλκοόλη η οποία θα μπορούσε να παραληφθεί από την παρα-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη με επιμήκυνση της ανθρακικής της αλυσίδας κατά τέσσερα ανθρακοάτομα.

Παρομοίως τα 2-οξοαμίδια της ομάδας II όπου στο διπεπτιδικό τμήμα περιέχεται το αμινοξύ της νορλευκίνης, μπορούν να προκύψουν από την οξείδωση του αντίστοιχου 2-υδροξυ-αμιδίου το οποίο θα μπορούσε να προκύψει από τη σύζευξη του 2-υδροξυ-οξέος και του αντίστοιχου διπεπτιδίου της νορλευκίνης (Σχήμα 4.2). Το διπεπτιδίο μπορεί να προκύψει από τη σύζευξη της αμινο-προστατευμένης νορλευκίνης και του εστέρα του δεύτερου αμινοξέος ο οποίος, αν δεν είναι εμπορικά διαθέσιμος, μπορεί να παραχθεί από την εστεροποίηση του αντίστοιχου ελεύθερου αμινοξέος (Σχήμα 4.2).

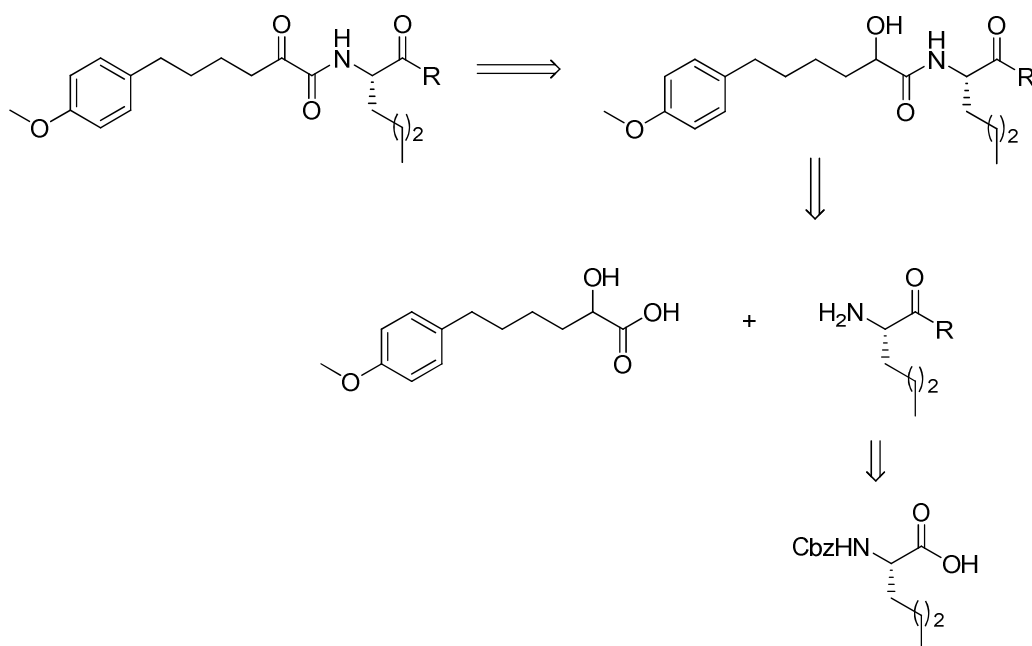


Σχήμα 4.1 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης 2-οξοαμιδικών ψευδοδιπεπτιδικών ενώσεων (ομάδα I) και του 2-υδροξυ-οξέος.



Σχήμα 4.2 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης 2-οξοαμιδίων που βασίζονται σε διπεπίδια της νορλευκίνης (L- ή D-) και ανήκουν στην ομάδα II.

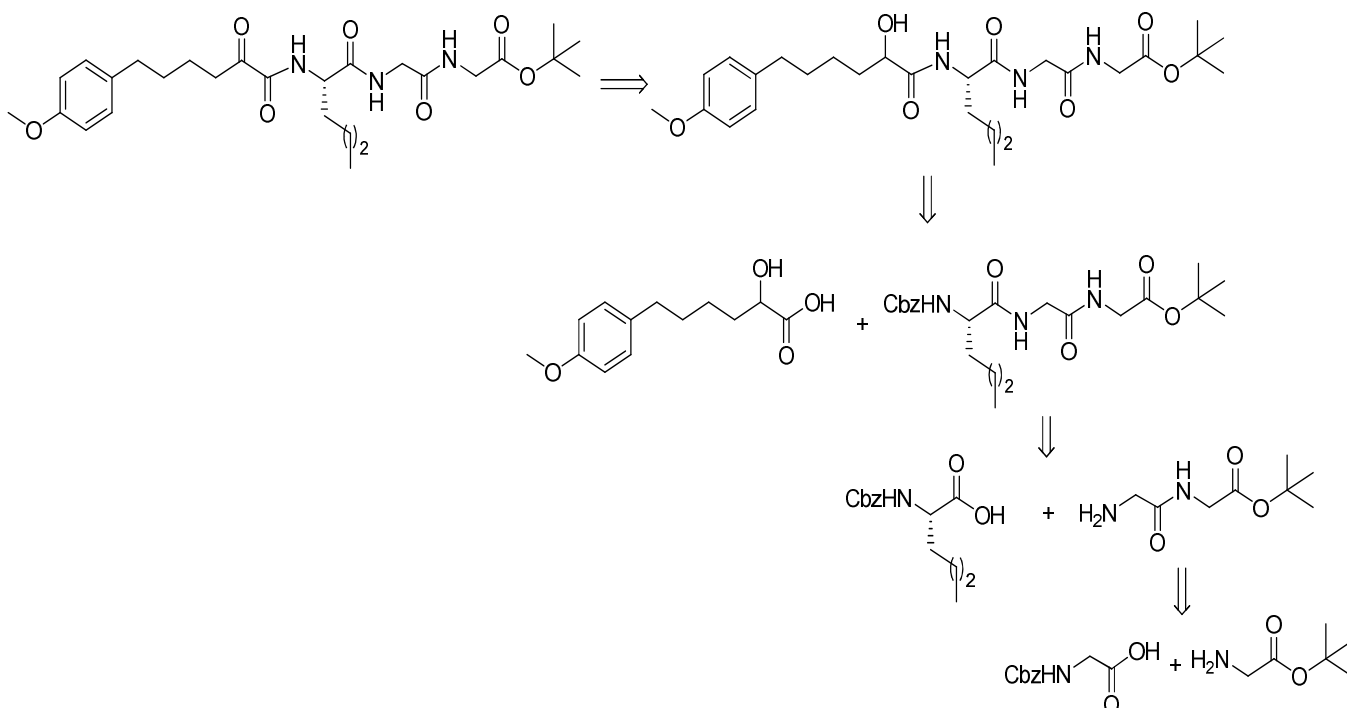
Όπως φαίνεται στο σχήμα 4.3, τα 2-οξοαμίδια που βασίζονται σε παράγωγο της L-νορλευκίνης μπορούν να προκύψουν από την οξείδωση του αντίστοιχου 2-υδροξυ-αμιδίου, το οποίο θα μπορούσε να παραχθεί από τη σύζευξη του 2-υδροξυ-οξέος και του άμινο συστατικού. Το άμινο συστατικό μπορεί να προκύψει είτε από τη σύζευξη της νορλευκίνης με την *tert*-βουτανόλη ή με την επίδραση υδατικής αμμωνίας, ανάλογα το παράγωγο.



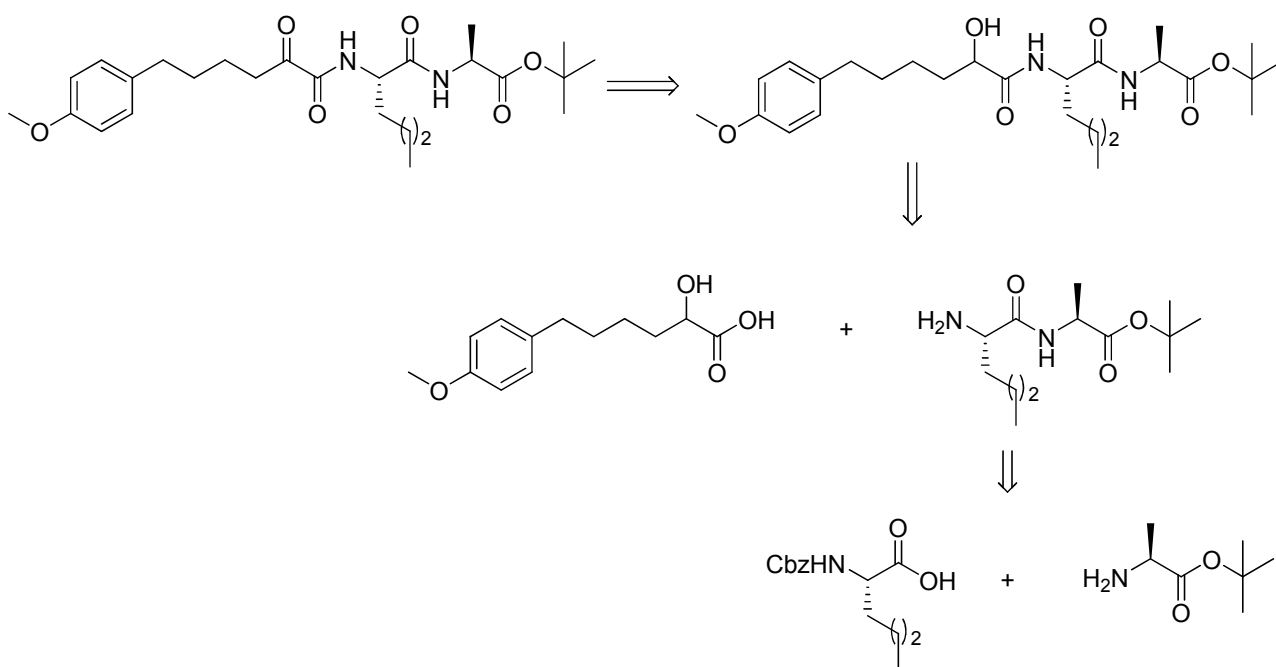
Σχήμα 4.3 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης 2-οξοαμιδικών παραγώγων L-νορλευκίνης (ομάδα III).

Στο σχήμα 4.4 απεικονίζεται η αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης ενός οξοαμιδίου με βάση ένα τριπεπτιδίο, όπου το 2-οξοαμίδιο μπορεί να προκύψει από το αντίστοιχο 2-υδροξυ-αμίδιο, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να προκύψει από τη σύζευξη του 2-υδροξυ-οξέος και του τριπεπτιδίου. Το τριπεπτιδίο μπορεί να προκύψει από τη σύζευξη των αντίστοιχων καταλλήλως προστατευμένων αμινοξέων με την κατάλληλη αλληλουχία αντιδράσεων (Σχήμα 4.4).

Τα 2-οξοαμίδια που βασίζονται στην L ή D-αλανίνη μπορούν να προκύψουν από τα αντίστοιχα 2-υδροξυ-αμίδια με οξείδωση. Τα 2-υδροξυ-αμίδια μπορούν να προκύψουν με σύζευξη του 2-υδροξυ-οξέος και του αντίστοιχου διπεπτιδίου, το οποίο με τη σειρά του προκύπτει από τη σύζευξη των 2 αμινοξέων (Σχήμα 4.5).



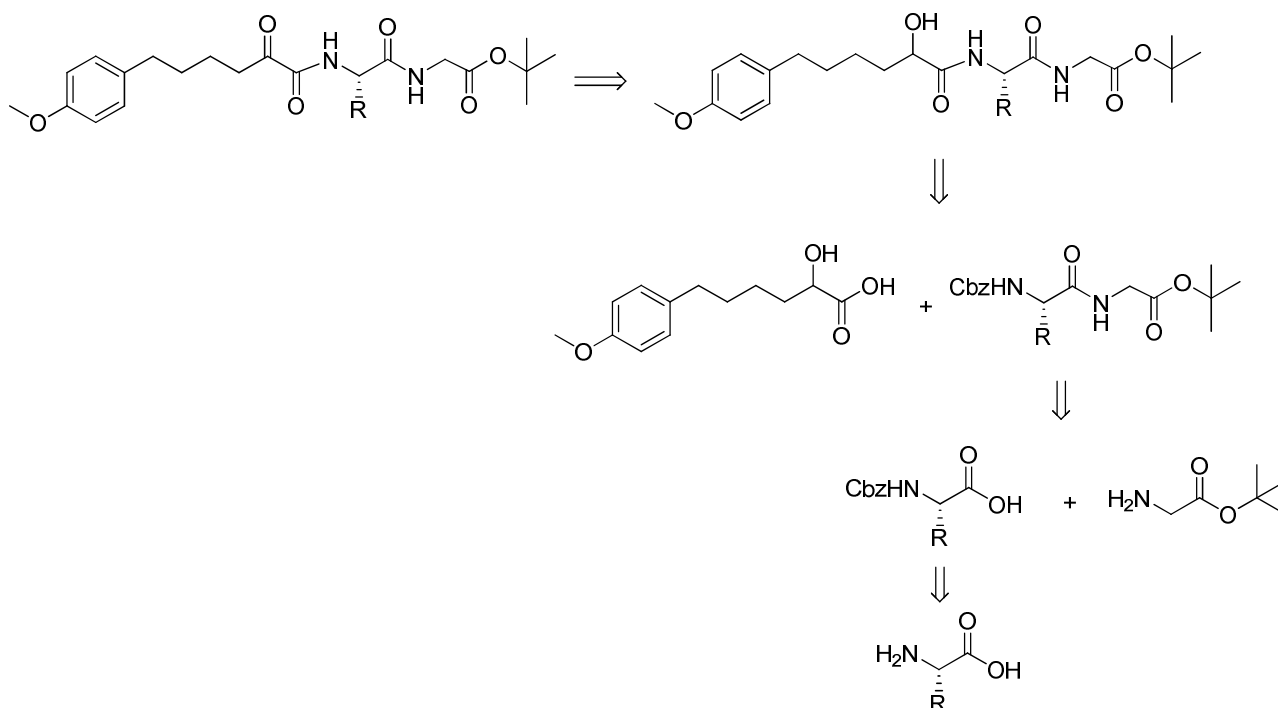
Σχήμα 4.4 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης 2-οξοαμίδιου με βάση ένα τριπεπτίδιο της L-νορλευκίνης (ομάδα IV).



Σχήμα 4.5 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης 2-οξοαμίδιων που βασίζονται σε διπεπτίδια L-νορλευκίνης – αλανίνης (L- ή D-) και ανήκουν στην ομάδα V.

Όπως και με τα υπόλοιπα 2-οξοαμίδια, έτσι και τα παράγωγα της γλυκίνης μπορούν να προκύψουν από τα αντίστοιχα 2-υδροξυ-αμίδια, τα οποία θα μπορούσαν να προκύψουν από τη σύζευξη του 2-υδροξυ-οξέος και του αντίστοιχου διπεπτιδίου (Σχήμα 4.6). Τα διπεπτίδια θα

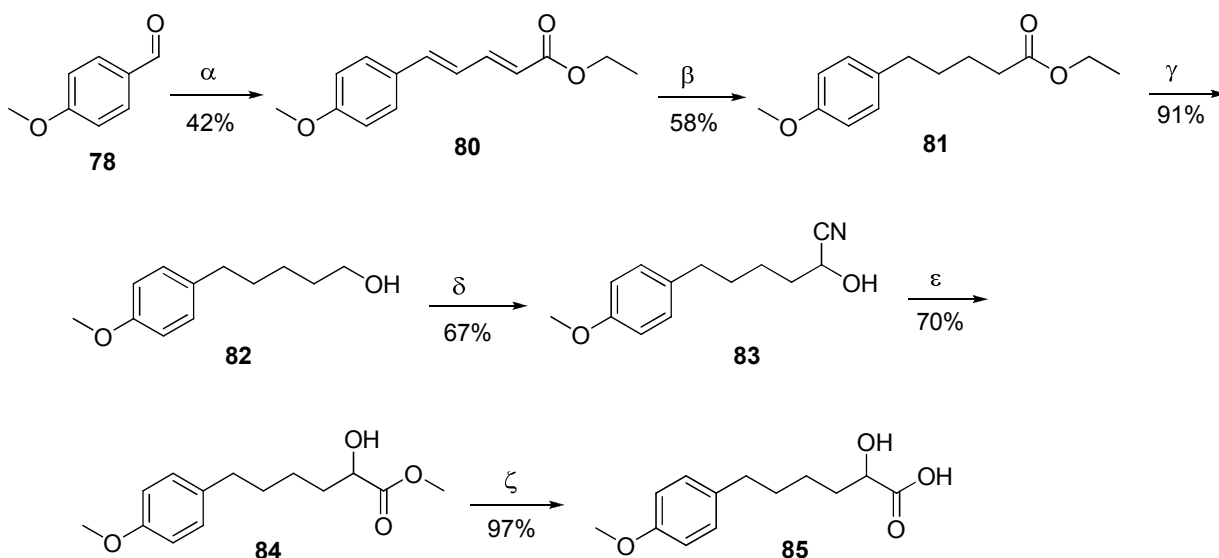
μπορούσαν να παραληφθούν από τη σύζευξη των καταλλήλως προστατευμένων αμινοξέων, που είναι είτε εμπορικά διαθέσιμα ή παρασκευάζονται στο εργαστήριο (Σχήμα 4.6).



Σχήμα 4.6 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης 2-οξοαμιδίων που βασίζονται σε διπεπτίδια της γλυκίνης (ομάδα VI).

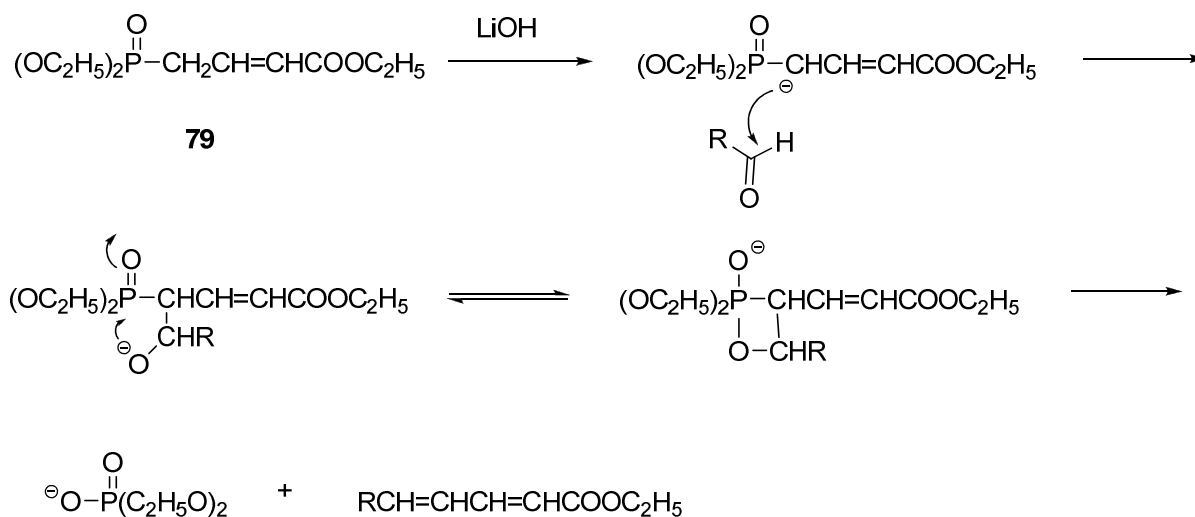
2.2 Σύνθεση του 2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξανοϊκού οξέος

Στο σχεδιασμό και στη σύνθεση των 2-οξοαμιδικών παραγώγων το μεγαλύτερο κομμάτι του κοινού τμήματός τους προέρχεται από το 2-υδροξυ-οξύ **85**. Για τη σύνθεση του οξέος **85** χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 4-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη, η οποία υπέστη αντίδραση ολεφίνοποίησης Horner – Wadsworth – Emmons με τη χρήση του LiOH.H₂O παρουσία του αντίστοιχου υλιδίου που επιτρέπει την επιμήκυνση της ανθρακικής αλυσίδας κατά τέσσερα ανθρακοάτομα (Σχήμα 4.7). Καταλυτική υδρογόνωση παρουσία 10% Pd/C έδωσε τον αντίστοιχο κορεσμένο εστέρα (**81**) και η αναγωγή του με το αντιδραστήριο DIBAL-H παρήγαγε την αντίστοιχη αλκοόλη (**82**). Η αλκοόλη οξειδώθηκε προς αλδεΐδη με τη μέθοδο του AcNH-Templo και με κυανιδρινική σύνθεση και υδρόλυση της κυανομάδας έδωσε τον α-υδροξυ-μεθυλεστέρα (**84**). Σαπωνοποίηση του μεθυλεστέρα οδήγησε στο επιθυμητό υδροξυ-οξύ **85** (Σχήμα 4.7).



Σχήμα 4.7 α) $C_2H_5OOCH=CHCH_2P(=O)(OC_2H_5)_2$ (79), $LiOH$, THF , β) H_2 , Pd/C , CH_3CH_2OH , γ) $DIBAL-H$, άνυδρος Et_2O , δ) i) $NaBr$, $NaOCl$, H_2O , $NaHCO_3$, τολουόλιο, $AcNH-Tempo$, $AcOEt$, ii) $NaHSO_3$, KCN , CH_2Cl_2 , H_2O , ε) $3N HCl/CH_3OH$, ζ) $NaOH$ $1N$, CH_3OH .

Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για την αντίδραση του $C_2H_5OOCH=CHCH_2P(=O)(OC_2H_5)_2$ με τις αλδεύδες φαίνεται στο σχήμα 4.8. Το $LiOH$ αποσπά ένα πρωτόνιο από τον φωσφονοκροτονικό διεστέρα και το ανιόν που προκύπτει προσβάλλει την αλδεύδη. Μέσω σχηματισμού ενός κυκλικού ενδιάμεσου τύπου Wittig παράγεται ο ακόρεστος αιθυλεστέρας.

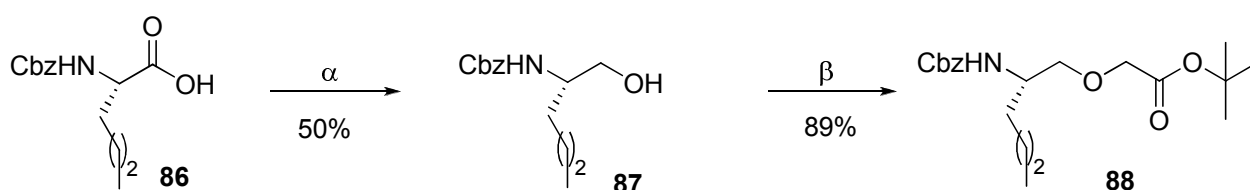


Σχήμα 4.8

2.3 Σύνθεση των 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν αιθερικό ψευδοδιπεπτίδιο (Ομάδα I)

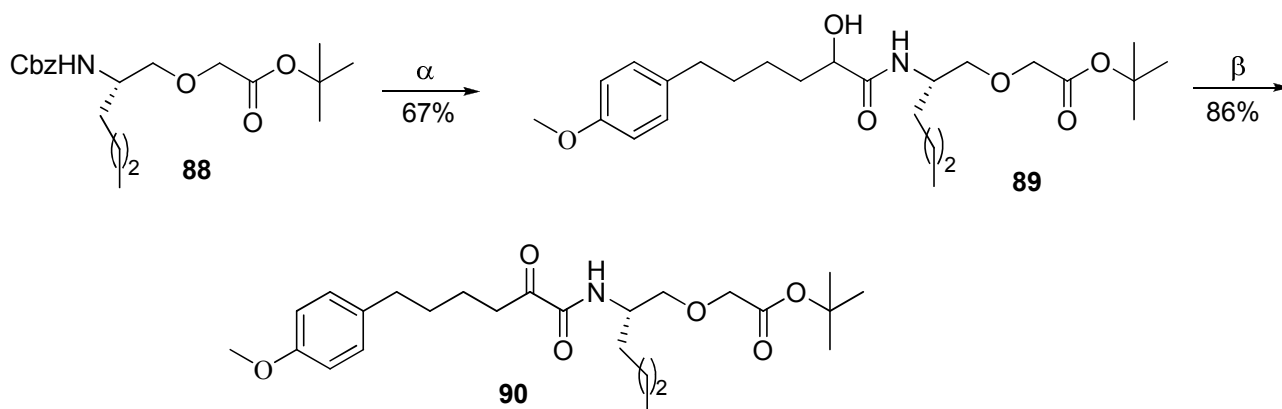
2.3.1 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)tert-βουτυλεστέρα

Η Z-προστατευμένη L-νορλευκίνη ανήχθηκε στην αντίστοιχη νορλευκινόλη η οποία αντέδρασε έπειτα με τον βρωμοοξικό tert-βουτυλεστέρα και έδωσε τον άμινο προστατευμένο tert-βουτυλεστέρα του ψευδοδιπεπτιδίου **88** (Σχήμα 4.9).



Σχήμα 4.9 α) NMM, ClCOOEt, NaBH₄, CH₃OH, άνυδρο THF, β) BrCH₂COOBu^t, 50% NaOH, Bu₄NHSO₄, βενζόλιο.

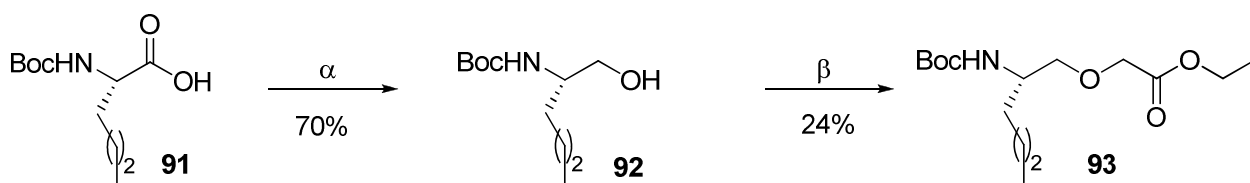
Εν συνεχεία, η ένωση **88** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση παρουσία 10% Pd/C και συζεύχθηκε με το υδροξυ-οξύ **85** με τη χρήση του υδατοδιαλυτού καρβοδιμιδίου WSCI παρουσία HOBt. Το παραγόμενο υδροξυ-αμίδιο (**89**) οξειδώθηκε προς το 2-οξοαμίδιο **90** με τη χρήση του αντιδραστήριου Dess-Martin (Σχήμα 4.10).



Σχήμα 4.10 α) i) H₂, Pd/C, ii) **85**, Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂, β) Αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂.

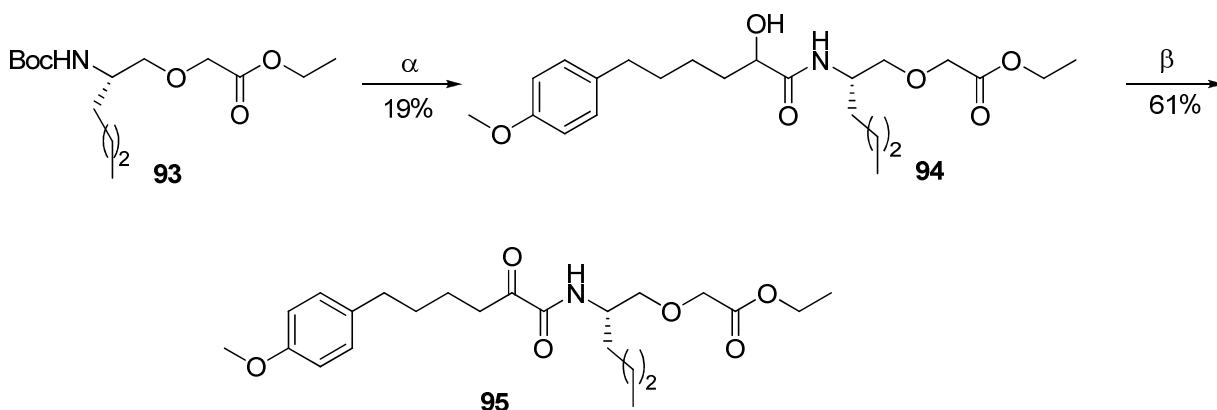
2.3.2 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)-οξικού αιθυλεστέρα

Για τη συγκεκριμένη σύνθεση προτιμήθηκε η Boc-L-νορλευκίνη η οποία ανήχθηκε προς την αντίστοιχη αλκοόλη (**92**) με τη χρήση του βοροϋδριδίου του νατρίου παρουσία μεθανόλης. Έπειτα η παραγόμενη αλκοόλη συζεύχθηκε με τον βρωμοοξικό αιθυλεστέρα υπό την επίδραση υδριδίου του νατρίου και παρουσία του 18-crown-6 για να δώσει τον άμινο προστατευμένο αιθυλεστέρα του ψευδοδιπεπτιδίου **93** (Σχήμα 4.11).



Σχήμα 4.11 α) *NMM, ClCOOEt, NaBH₄, CH₃OH, άνυδρο THF*, β) *BrCH₂COOEt, 60% NaH, 18-crown-6, άνυδρο THF*.

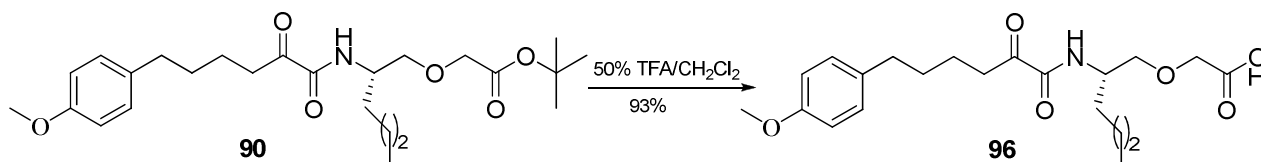
Η Boc-προστατευτική ομάδα του ψευδοδιπεπτιδίου **93** απομακρύνθηκε με τη χρήση διαλύματος TFA/CH₂Cl₂ και το προκύπτον τριφθοροξικό άλας της αμίνης συζεύχθηκε με το υδροξυ-οξύ **85** δίνοντας το υδροξυ-αμίδιο **94** το οποίο οξειδώθηκε προς το αντίστοιχο 2-οξοαμίδιο **95** (Σχήμα 4.12).



Σχήμα 4.12 α) *i) TFA, άνυδρο CH₂Cl₂, ii) 85, Et₃N, WSCI, HOBT, CH₂Cl₂*, β) *Αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂*.

2.3.3 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)-οξικού οξέος

Το οξύ **96** παραλήφθηκε μετά την απομάκρυνση της ομάδας του *tert*-βουτυλεστέρα του οξοαμιδίου **90** με την επίδραση διαλύματος 50% TFA/CH₂Cl₂ για 1 ώρα (Σχήμα 4.13).

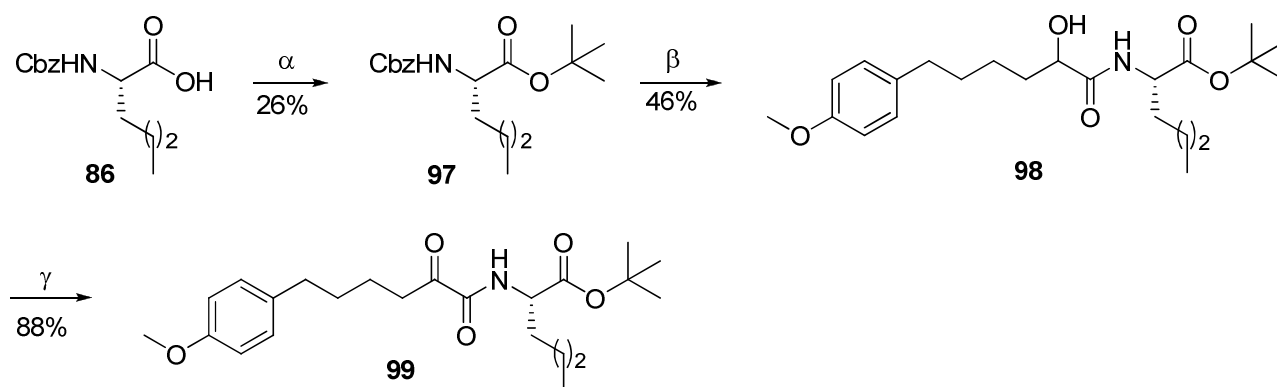


Σχήμα 4.13

2.4 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων – παραγώγων της L-νορλευκίνης (Ομάδα II)

2.4.1 Σύνθεση του (S)- 2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα

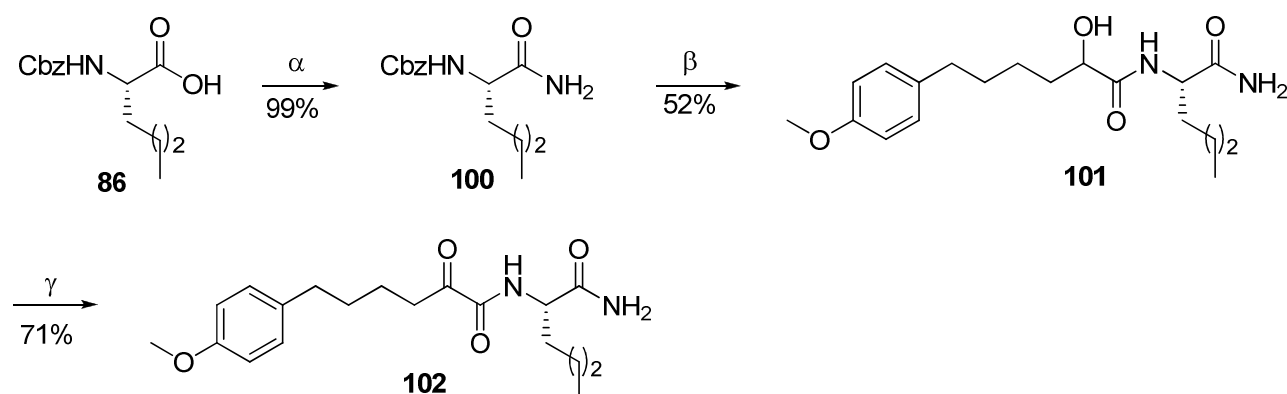
Η Z-προστατευμένη L-νορλευκίνη συζεύχθηκε με την *tert*-βουτανόλη παρουσία DMAP/DCC για να δώσει τον αντίστοιχο αμινο-προστατευμένο *tert*-βουτυλεστέρα **97** (Σχήμα 4.14). Η ένωση **97** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση υπό 10% Pd/C και έπειτα σύζευξη με το υδροξυ-οξύ **85** οπότε και παραλήφθηκε το 2-υδροξυ-αμίδιο **98**. Κατόπιν, το υδροξυ-αμίδιο **98** οξειδώθηκε προς το 2-οξοαμίδιο **99** με τη χρήση του αντιδραστήριου Dess-Martin.



Σχήμα 4.14 α) DMAP, DCC, Bu^tOH, CH₂Cl₂, β) i) H₂, 10% Pd/C, THF, ii) **85**, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂, γ) Αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂.

2.4.2 Σύνθεση του (S)-N-(1-αμινο-1-οξοεξαν-2-υλ)-6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδίου

Το αμίδιο της νορλευκίνης, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.15, προέκυψε από την κατεργασία της Z-νορλευκίνης με τριαιθυλαμίνη, χλωροφορμικό αιθυλεστέρα και υδατική αμμωνία 25%. Η ένωση **100** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση παρουσία Pd/C, συζεύχθηκε με το υδροξυ-οξύ **85** και το παραγόμενο 2-υδροξυ-αμίδιο οξειδώθηκε προς το αντίστοιχο 2-οξοαμίδιο **102**.

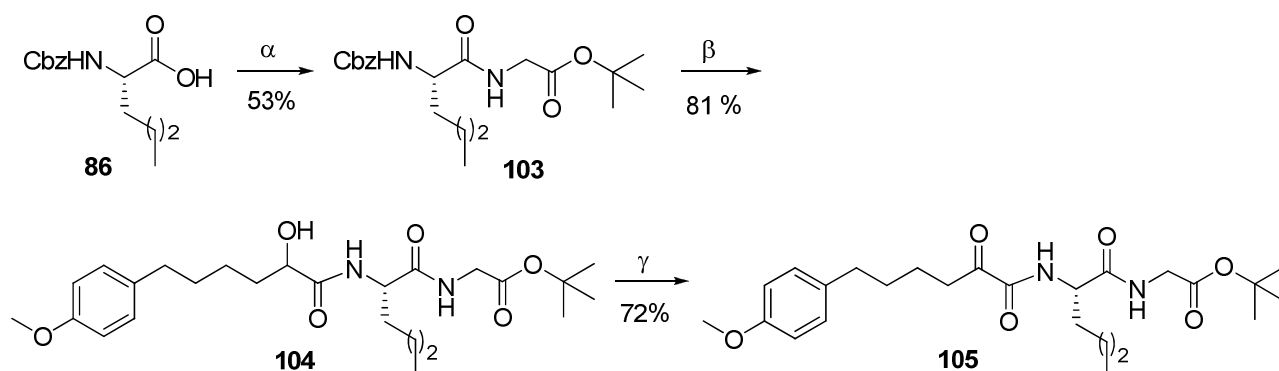


Σχήμα 4.15 α) Et₃N, ECF, aq. NH₃ 25%, THF, β) i) H₂, 10% Pd/C, THF, ii) **85**, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂, γ) Αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂.

2.5 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν διπεπτίδιο με την L- ή D-νορλευκίνη (Ομάδα III)

2.5.1 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικού *tert*-βουτυλεστέρα

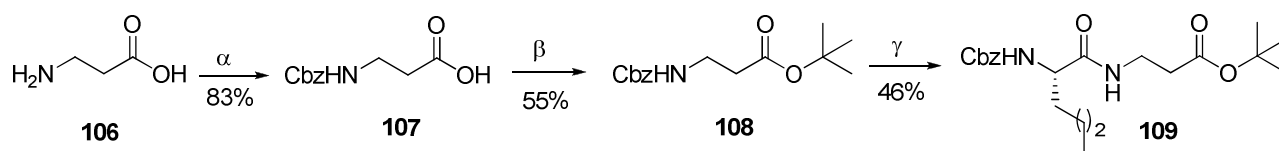
Η Z-προστατευμένη L-νορλευκίνη συζεύχθηκε με το υδροχλωρικό άλας του *tert*-βουτυλεστέρα της γλυκίνης σχηματίζοντας το διπεπτίδιο **103** το οποίο έπειτα από καταλυτική υδρογόνωση για απομάκρυνση της Z-προστασίας, συζεύχθηκε με το 2-υδροξυ-οξύ **85** με τη χρήση των συζευκτικών αντιδραστηρίων WSCI/HOBt προς το 2-υδροξυ-αμίδιο **104**. Με την επίδραση του αντιδραστηρίου Dess-Martin στην ένωση **104** παραλήφθηκε το 2-υδροξυ-οξύ **105** (Σχήμα 4.16).



Σχήμα 4.16 α) *GlyOBU^t.HCl*, Et_3N , *WSCl*, *HOBT*, CH_2Cl_2 , β) i) H_2 , 10% *Pd/C*, *THF*, ii) **85**, Et_3N , *WSCl*, *HOBT*, CH_2Cl_2 , γ) αντιδραστήριο *Dess-Martin*, CH_2Cl_2 .

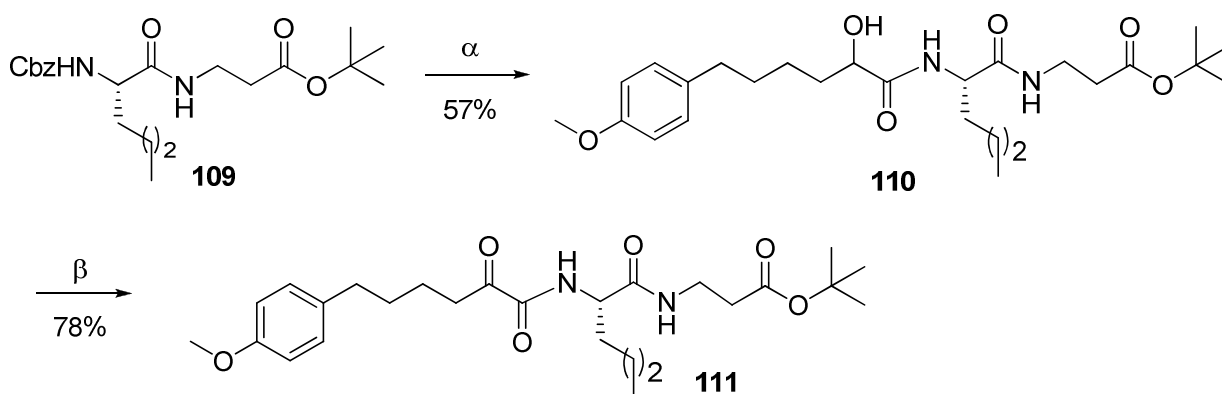
2.5.2 Σύνθεση του (S)-3-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα

Η εμπορικά διαθέσιμη β-αλανίνη (**106**) προστατεύτηκε με την Z-ομάδα χρησιμοποιώντας το *Cbz-Cl* σε βασικό περιβάλλον (Σχήμα 4.17) και έπειτα μετατράπηκε στον αντίστοιχο *tert*-βουτυλεστέρα **108** με την επίδραση της *tert*-βουτανόλης και τα αντιδραστήρια *DCC/DMAP*. Η ένωση **108** αφού απομακρύνθηκε η Z-προστασία με καταλυτική υδρογόνωση, συζεύχθηκε με την Z-νορλευκίνη δίνοντας το διπεπτιδίο **109** (Σχήμα 4.17).



Σχήμα 4.17 α) *Cbz-Cl*, $NaOH$ 3*N*, β) *DMAP*, *DCC*, *t-BuOH*, CH_2Cl_2 , γ) i) H_2 , 10 % *Pd/C*, *THF*, ii) *Z-Nle* (**86**), Et_3N , *WSCl*, *HOBT*, CH_2Cl_2 .

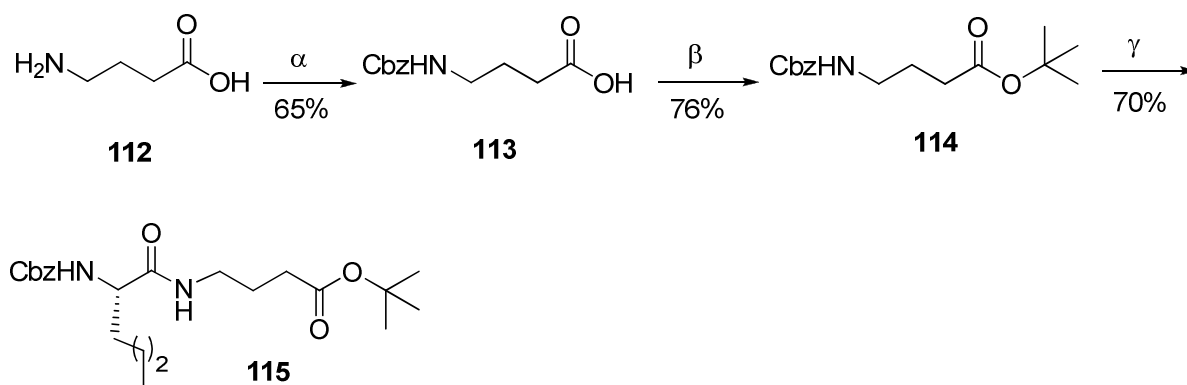
Έπειτα, το διπεπτιδίο **109** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση και σύζευξη με το υδροξυ-οξύ **100** με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων *WSCl/HOBT*, προς το 2-υδροξυ-αμίδιο **110**, το οποίο οξειδώθηκε προς το 2-οξοαμίδιο **111** με τη χρήση του αντιδραστηρίου *Dess-Martin* (Σχήμα 4.18).



Σχήμα 4.18 α) *i) H₂, 10% Pd/C, THF, ii) 85, Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂*, β) αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂.

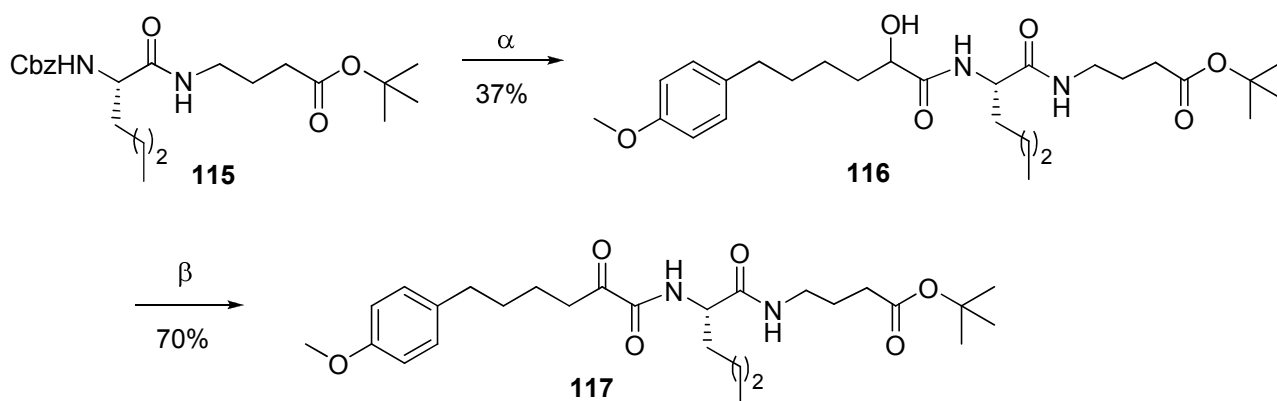
2.5.3 Σύνθεση του (S)-4-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμίδιο)εξαναμίδιο)βουτανοϊκού *tert*-βουτυλεστέρα

Για το 2-οξοαμιδικό παράγωγο αυτό, η σύνθεση ξεκίνησε από το εμπορικά διαθέσιμο γ-άμινο βουτυρικό οξύ **112** (Σχήμα 4.19) το οποίο προστατεύτηκε με την Z-ομάδα και εστεροποιήθηκε με την *tert*-βουτανόλη. Ο παραγόμενος *tert*-βουτυλεστέρας **114** αφού υπέστη καταλυτική υδρογόνωση συζεύχθηκε με την L-νορλευκίνη και έδωσε το διπεπτίδιο **115** (Σχήμα 4.19).



Σχήμα 4.19 α) *Cbz-Cl, NaOH 3N*, β) *DMAP, DCC, t-BuOH, CH₂Cl₂*, γ) *i) H₂, 10 % Pd/C, THF, ii) Z-Nle (86), Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂*.

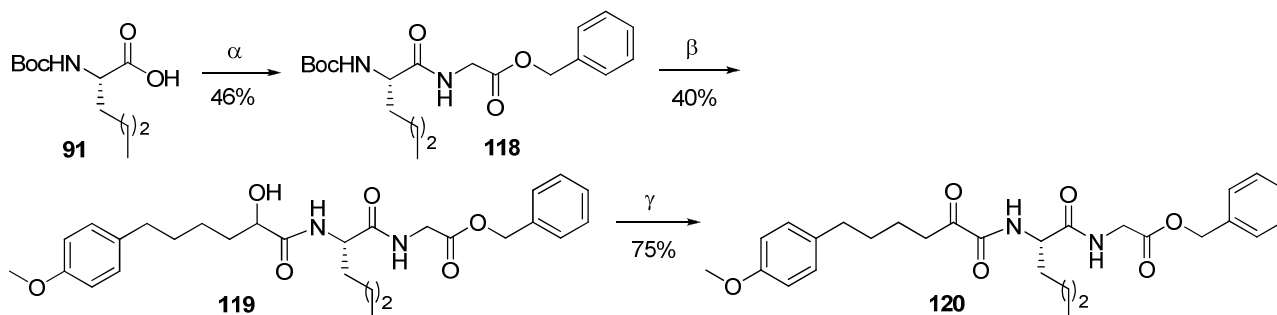
Έπειτα, το διπεπτίδιο **115** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση και σύζευξη με το υδροξυ-οξύ **85** με τη βοήθεια των αντιδραστηρίων WSCI/HOBt, προς το 2-υδροξυ-αμίδιο **116**, το οποίο οξειδώθηκε προς το 2-οξοαμίδιο **117** με τη χρήση του αντιδραστηρίου Dess-Martin (Σχήμα 4.20).



Σχήμα 4.20 α) *i) H₂, 10% Pd/C, THF, ii) 85, Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂*, β) αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂.

2.5.4 Σύνθεση του (*S*)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικού βενζυλεστέρα

Η Boc-προστατευμένη L-νορλευκίνη (**91**) συζεύχθηκε με τον βενζυλεστέρα της γλυκίνης (Σχήμα 4.21) δίνοντας το διπεπτιδίιο **118**. Το διπεπτιδίιο αυτό αποπροστατεύτηκε με τη χρήση διαλύματος HCl/Et₂O και έπειτα συζεύχθηκε με τη συνήθη μέθοδο με το 2-υδροξυ-οξύ **85**. Το παραγόμενο 2-υδροξυ-αμιδίιο **119** οξειδώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Dess-Martin οπότε και παραλήφθηκε το επιθυμητό 2-οξοαμιδίιο **120** (Σχήμα 4.21).

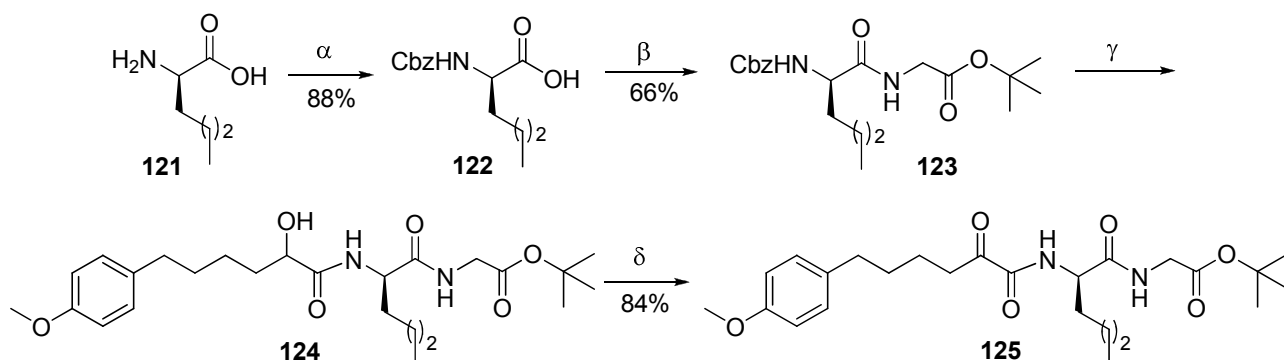


Σχήμα 4.21 α) *GlyOBn.HCl, Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂*, β) *i) HCl/Et₂O, ii) 85, Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂*, γ) αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂.

2.5.5 Σύνθεση του (*R*)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικού *tert*-βουτυλεστέρα

Αρχικά, η εμπορικά διαθέσιμη D-νορλευκίνη προστατεύτηκε με το Cbz-Cl και η αμινοπροστατευμένη νορλευκίνη συζεύχθηκε με τον *tert*-βουτυλεστέρα της γλυκίνης δίνοντας το διπεπτιδίιο **123** (Σχήμα 4.22). Έπειτα, το διπεπτιδίιο υπέστη καταλυτική υδρογόνωση με 10%

Pd/C και αμέσως σύζευξη με το υδροξυ-οξύ **85**. Το παραγόμενο 2-υδροξυ-αμίδιο **124** οξειδώθηκε με τη συνήθη μέθοδο προς το 2-οξοαμίδιο **125** (Σχήμα 4.22).

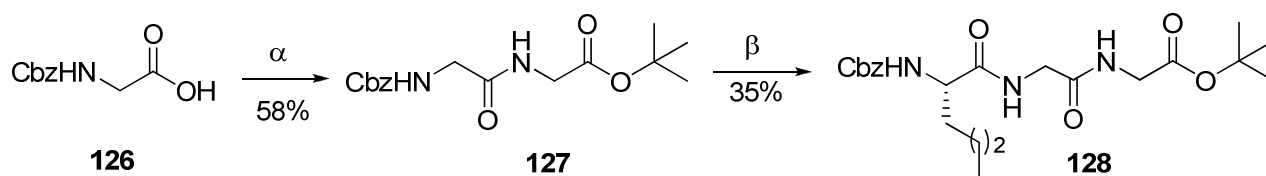


Σχήμα 4.22 α) *Cbz-Cl*, *NaOH* 3*N*, β) *GlyOBU^t.HCl*, *Et₃N*, *WSCl*, *HOBT*, *CH₂Cl₂*, γ) i) *H₂*, 10% *Pd/C*, *THF*, ii) **85**, *Et₃N*, *WSCl*, *HOBT*, *CH₂Cl₂*, δ) αντιδραστήριο *Dess-Martin*, *CH₂Cl₂*.

2.6 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν ένα τριπεπτίδιο (Ομάδα IV)

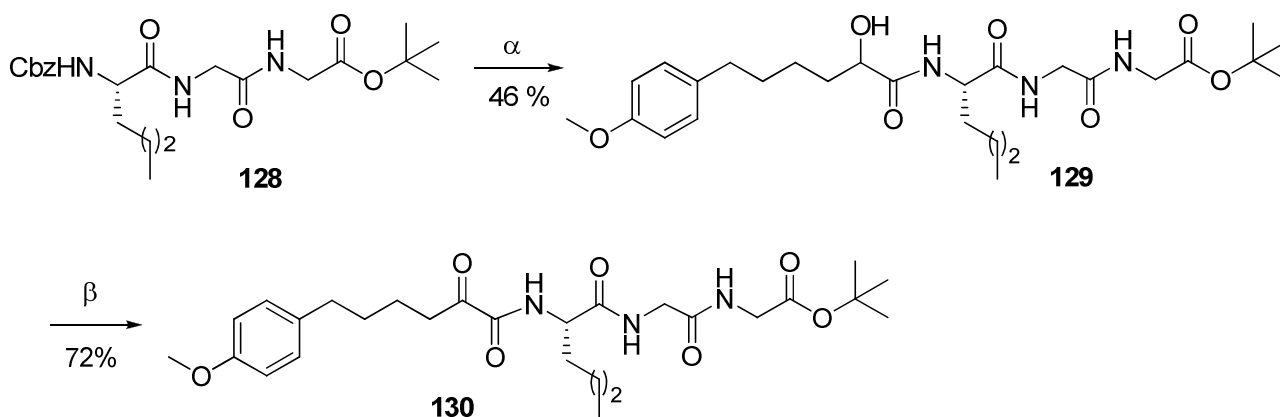
2.6.1 Σύνθεση του (*S*)-2-(2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)-ακεταμιδο)οξικού *tert*-βουτυλεστέρα

Η *Z*-προστατευμένη γλυκίνη **126** συζεύχθηκε με τον *tert*-βουτυλεστέρα της γλυκίνης με τη χρήση των αντιδραστηρίων *WSCl*/*HOBT* παράγοντας το διπεπτίδιο **127**, το οποίο μετά από καταλυτική υδρογόνωση συζεύχθηκε με παρόμοιο τρόπο με τη *Z*-νορλευκίνη δίνοντας το τριπεπτίδιο **128** (Σχήμα 4.23).



Σχήμα 4.23 α) *GlyOBU^t.HCl*, *Et₃N*, *WSCl*, *HOBT*, *CH₂Cl₂*, β) i) *H₂*, 10% *Pd/C*, *THF*, ii) *Z-Nle* (**86**), *Et₃N*, *WSCl*, *HOBT*, *CH₂Cl₂*.

Έπειτα, το τριπεπτίδιο **128** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση με 10% *Pd/C* και συζεύχθηκε με το 2-υδροξυ-οξύ **85** ενώ το παραγόμενο 2-υδροξυ-αμίδιο **129** οξειδώθηκε προς το αντίστοιχο 2-οξοαμίδιο **130** με τη χρήση του αντιδραστηρίου *Dess-Martin* (Σχήμα 4.24).

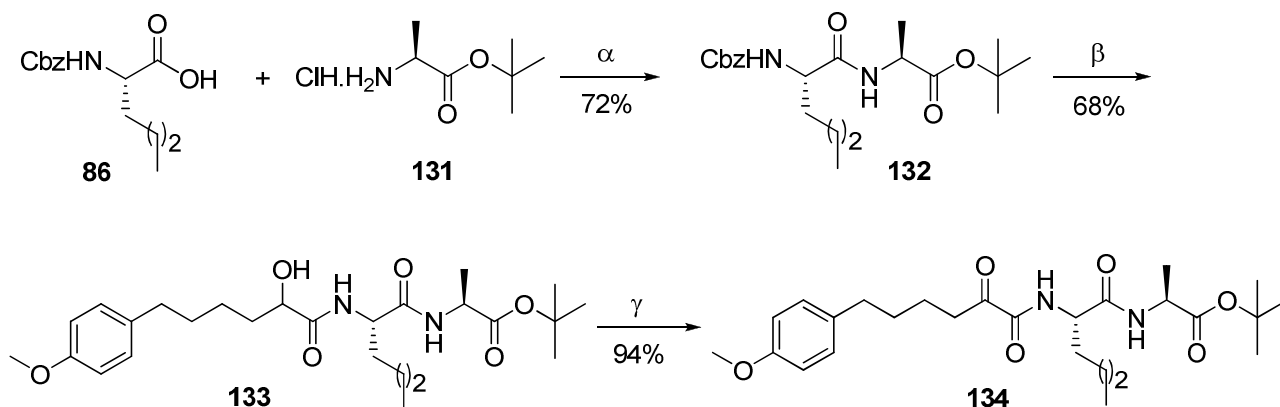


Σχήμα 4.24 α) i) H_2 , 10% Pd/C, THF, ii) **85**, Et_3N , WSCI, HOBT, CH_2Cl_2 , β) αντιδραστήριο Dess-Martin, CH_2Cl_2 .

2.7 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν ένα διπεπτίδιο L-νορλευκίνης-αλανίνης (L- ή D-) (Ομάδα V)

2.7.1 Σύνθεση του (S)-2-((S)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκού tert-βουτυλεστέρα

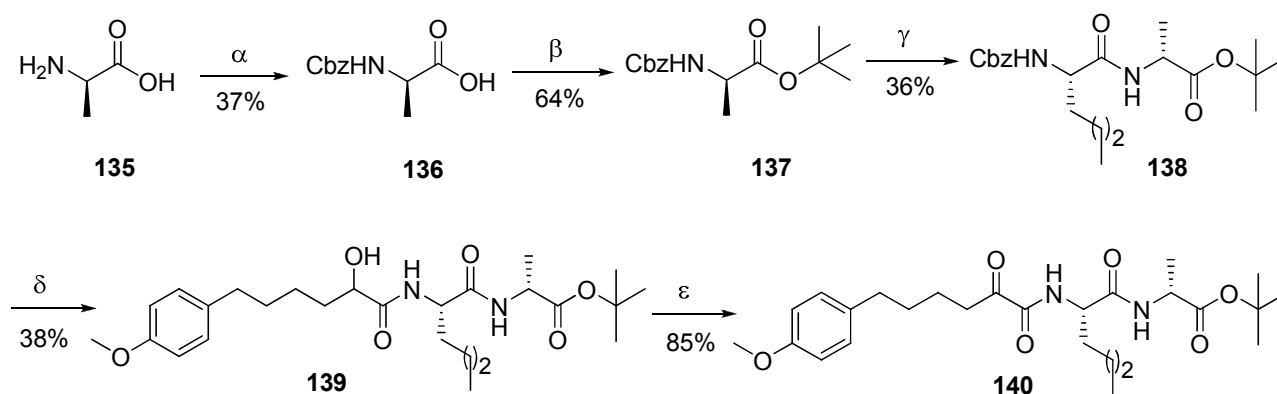
Η σύνθεση ξεκίνησε με τη σύζευξη της αμινο-προστατευμένης L-νορλευκίνης **86** με τον tert-βουτυλεστέρα της L-αλανίνης με τη χρήση των αντιδραστηρίων WSCI/HOBT παράγοντας το διπεπτίδιο **132** (Σχήμα 4.25). Έπειτα από καταλυτική υδρογόνωση προς απομάκρυνση της Z-προστασίας, το διπεπτίδιο συζεύχθηκε με το 2-υδροξυ-οξύ **85** και το παραγόμενο 2-υδροξυ-αμίδιο **133** οξειδώθηκε προς το αντίστοιχο 2-οξοαμίδιο **134** (Σχήμα 4.25).



Σχήμα 4.25 α) Et_3N , WSCI, HOBT, CH_2Cl_2 , β) i) H_2 , 10% Pd/C, THF, ii) **85**, Et_3N , WSCI, HOBT, CH_2Cl_2 , γ) αντιδραστήριο Dess-Martin, CH_2Cl_2 .

2.7.2 Σύνθεση του (R)-2-((S)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-εξαναμιδο)-προπανοϊκού tert-βουτυλεστέρα

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε αρχικά η D-αλανίνη η οποία προστατεύτηκε με την καρβοβενζόξυ ομάδα και έπειτα εστεροποιήθηκε προς τον αντίστοιχο tert-βουτυλεστέρα **137**, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.26. Μετά από καταλυτική υδρογόνωση για απομάκρυνση της Cbz-ομάδας, η προκύπτουσα αμίνη συζεύχθηκε με την Z-L-νορλευκίνη για να δώσει το διπεπτίδιο **138**. Όπως και με τα προηγούμενα 2-υδροξυ-αμίδια, το διπεπτίδιο υπέστη καταλυτική υδρογόνωση και μετά σύζευξη με το 2-υδροξυ-οξύ **85**. Τέλος, ακολούθησε οξείδωση του 2-υδροξυ-αμιδίου προς το αντίστοιχο 2-οξοαμίδιο **140** χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Dess-Martin (Σχήμα 4.26).



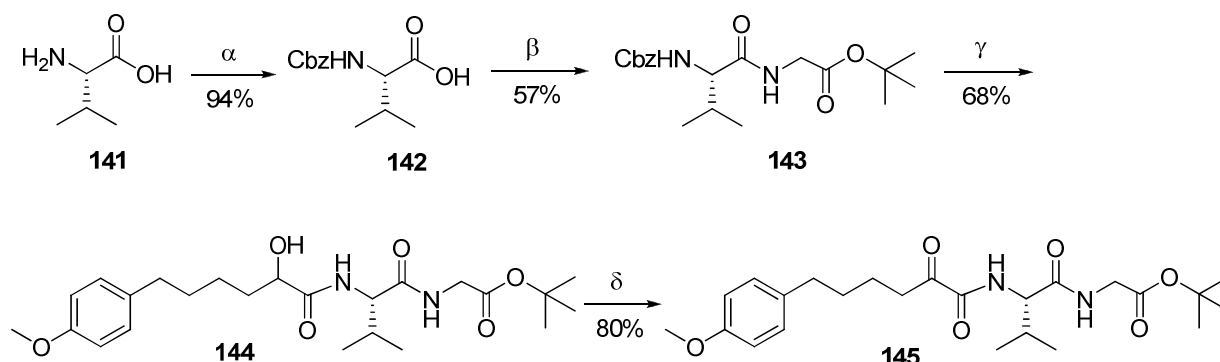
Σχήμα 4.26 α) Cbz-Cl, NaOH 3N, β) DMAP, DCC, Bu^tOH, CH₂Cl₂, γ) i) H₂, 10% Pd/C, THF, ii) Z-Nle (**86**), Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂, δ) i) H₂, 10% Pd/C, THF, ii) **85**, Et₃N, WSCI, HOBt, CH₂Cl₂, ε) αντιδραστήριο Dess-Martin, CH₂Cl₂.

2.8 Σύνθεση 2-οξοαμιδικών ενώσεων που περιέχουν ένα διπεπτίδιο της γλυκίνης (Ομάδα VI)

2.8.1 Σύνθεση του (S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-3-μεθυλβουταναμιδο)οξικού tert-βουτυλεστέρα

Η L-βαλίνη **141** χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση αυτού του οξοαμιδίου. Πρώτα το ελεύθερο αμινοξύ προστατεύτηκε με την καρβοβενζόξυ-ομάδα με την επίδραση καυστικού νατρίου, έπειτα συζεύχθηκε με τον tert-βουτυλεστέρα της γλυκίνης δίνοντας το διπεπτίδιο **143**. Το διπεπτίδιο αυτό υπέστη καταλυτική υδρογόνωση και η προκύπτουσα ελεύθερη αμίνη

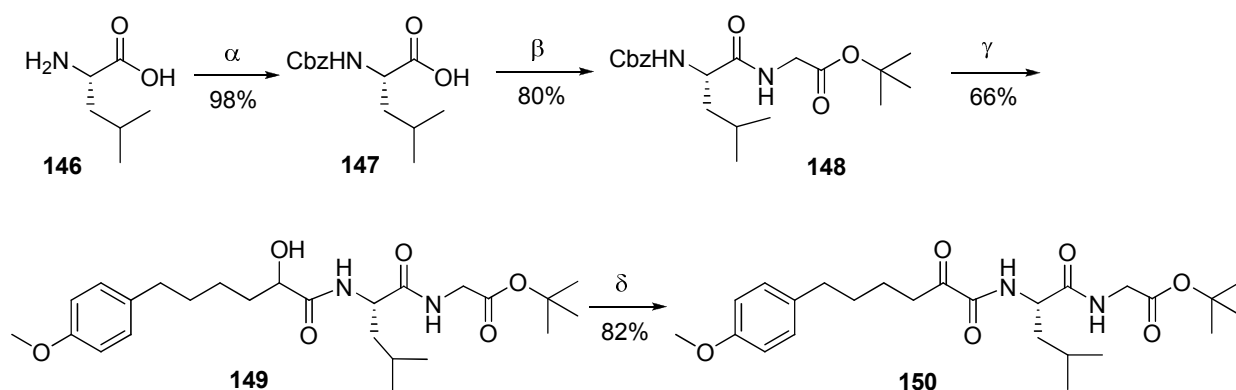
συζεύχθηκε με το 2-υδροξυ-οξύ **85** παράγοντας το 2-υδροξυ-αμίδιο **144**, το οποίο με την επίδραση του αντιδραστήριου Dess-Martin οξειδώθηκε προς το αντίστοιχο 2-οξοαμίδιο (Σχήμα 4.27).



Σχήμα 4.27 α) *Cbz-Cl*, *NaOH* 3*N*, β) *GlyOtBu*¹.*HCl*, *Et*₃*N*, *WSCI*, *HOBt*, *CH*₂*Cl*₂, γ) i) *H*₂, 10% *Pd/C*, *THF*, ii) **85**, *Et*₃*N*, *WSCI*, *HOBt*, *CH*₂*Cl*₂, δ) αντιδραστήριο *Dess-Martin*, *CH*₂*Cl*₂.

2.8.2 Σύνθεση του (*S*)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-4-μεθυλπενταναμιδο)οξικού *tert*-βουτυλεστέρα

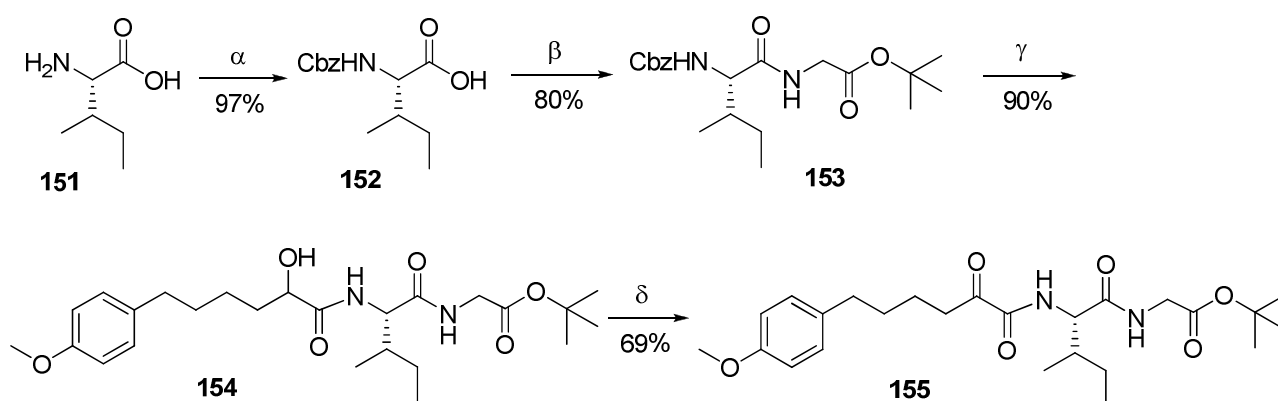
Για τη συγκεκριμένη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η *L*-λευκίνη **146**, η οποία προστατεύτηκε με την καρβοβενζοξυ-ομάδα υπό την επίδραση του καυστικού νατρίου ενώ το παραγόμενο προστατευμένο αμινοξύ συζεύχθηκε με τον *tert*-βουτυλεστέρα της γλυκίνης δίνοντας το διπεπτίδιο **148**. Για να πραγματοποιηθεί η σύζευξη του 2-υδροξυ-οξέος **85** με το διπεπτίδιο αυτό, προηγήθηκε καταλυτική υδρογόνωσή του για απομάκρυνση της καρβοβενζοξυ προστατευτικής ομάδας. Το προκύπτον 2-υδροξυ-αμίδιο **149** οξειδώθηκε με τη χρήση του *Dess-Martin periodinane* όπου παραλήφθηκε το τελικό προϊόν **150** (Σχήμα 4.28).



Σχήμα 4.28 α) *Cbz-Cl*, *NaOH* 3*N*, β) *GlyOtBu*¹.*HCl*, *Et*₃*N*, *WSCI*, *HOBt*, *CH*₂*Cl*₂, γ) i) *H*₂, 10% *Pd/C*, *THF*, ii) **85**, *Et*₃*N*, *WSCI*, *HOBt*, *CH*₂*Cl*₂, δ) αντιδραστήριο *Dess-Martin*, *CH*₂*Cl*₂.

2.8.3 Σύνθεση του 2-((2*S*,3*R*)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμίδιο)-3-μεθυλπενταναμίδιο)οξικού *tert*-βουτυλεστέρα

Η L-ισολευκίνη **151** υπήρξε η πρώτη ύλη της σύνθεσης του 2-οξοαμιδίου **155**. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι παρόμοια με τις προηγούμενες δύο συνθέσεις. Πρώτα, πραγματοποιήθηκε προστασία του ελεύθερου αμινοξέος της ισολευκίνης και έπειτα σύζευξή του με τον εστέρα της γλυκίνης. Το προκύπτον διπεπτίδιο **153** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση και συζεύχθηκε με το 2-υδροξυ-οξύ **85** δίνοντας το αντίστοιχο 2-υδροξυ-αμίδιο **154**, το οποίο οξειδώθηκε προς το επιθυμητό προϊόν με τη γνωστή μέθοδο των Dess και Martin (Σχήμα 4.29).

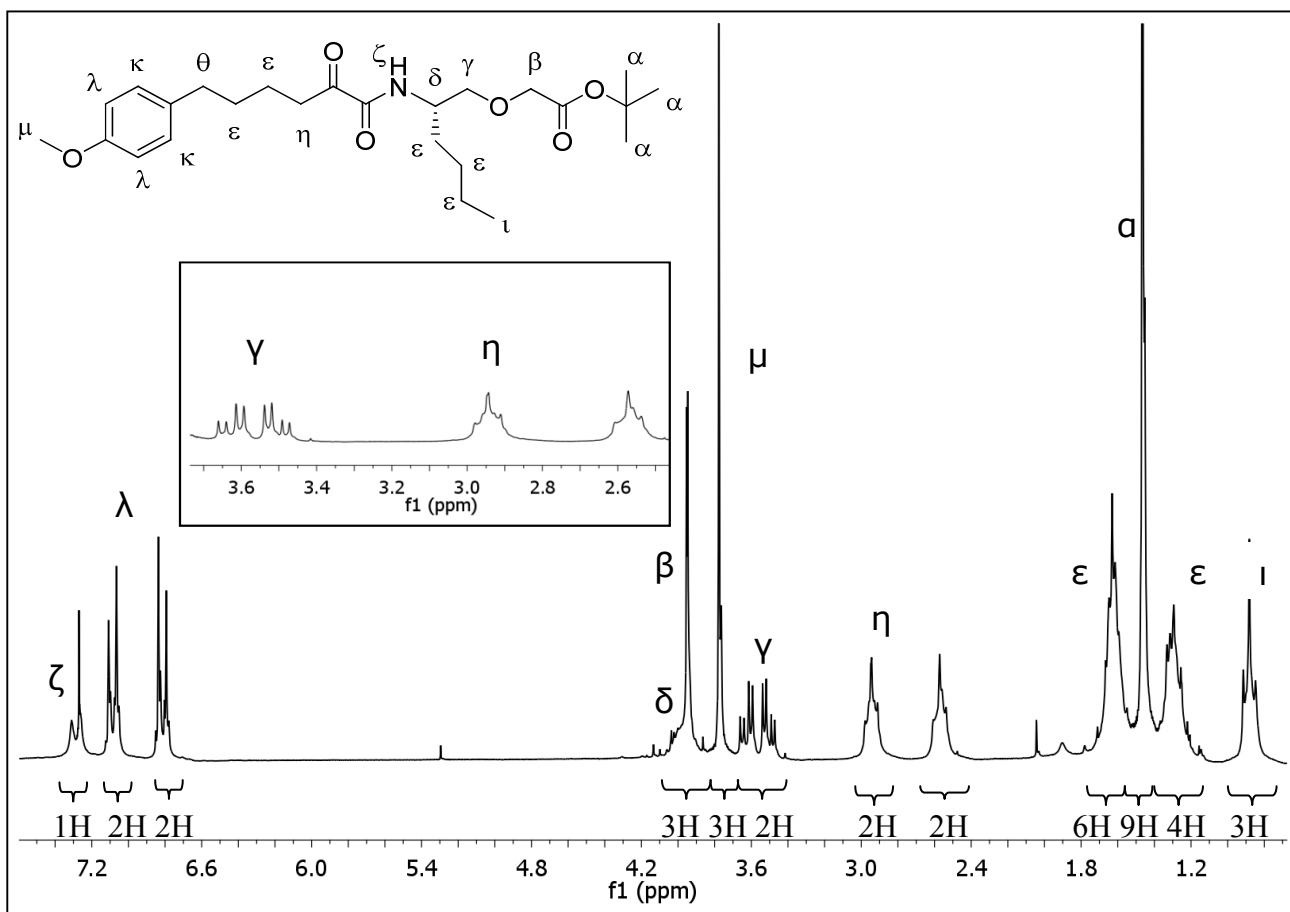


Σχήμα 4.29 α) *Cbz-Cl*, *NaOH* 3*N*, β) *GlyOBU^t.HCl*, *Et₃N*, *WSCI*, *HOBt*, *CH₂Cl₂*, γ) i) *H₂*, 10% *Pd/C*, *THF*, ii) **85**, *Et₃N*, *WSCI*, *HOBt*, *CH₂Cl₂*, δ) αντιδραστήριο Dess-Martin, *CH₂Cl₂*.

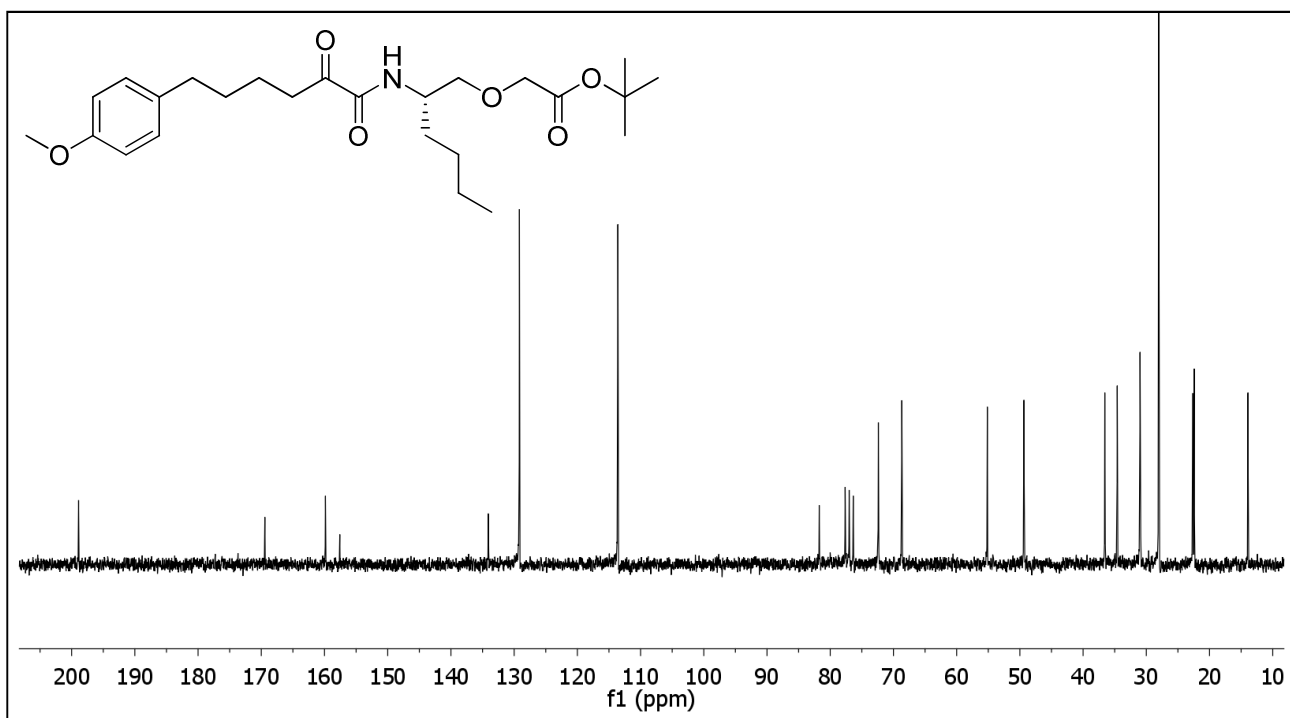
3. Επιλεγμένα φασματοσκοπικά δεδομένα 2-οξοαμιδίων

Στη συνέχεια παρατίθενται φάσματα μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού, φασματομετρίας μάζας υψηλής ευκρίνειας και απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας των 2-οξοαμιδικών παραγώγων **90**, **102**, **120**, **130**, **134** και **150**. Στο σχήμα 4.30 φαίνεται το φάσμα ^1H NMR της ένωσης **90**, όπου παρατηρείται το αμιδικό πρωτόνιο ως διπλή κορυφή στα 7.31 ppm ενώ τα αρωματικά πρωτόνια του παρα-υποκατεστημένου δακτυλίου εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 7.09 και 6.81 ppm με σταθερά σύζευξης 8.6 Hz. Το CH πρωτόνιο φαίνεται ως πολλαπλή κορυφή στα 4.05 – 3.93 ppm ενώ στην ίδια περιοχή μετατοπίζονται τα μεθυλενικά πρωτόνια OCH_2COO ως μια απλή κορυφή. Η μεθόξυ ομάδα εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 3.78 ppm ενώ τα διαστερεοτοπικά πρωτόνια της μεθυλενικής ομάδας CHCH_2O μετατοπίζονται στα 3.63 και 3.50 ppm με πολλαπλότητα διπλή διπλών και αντίστοιχες συζεύξεις $J_1= 9.4$ Hz, $J_2= 4.2$ Hz και $J_1= 9.4$ Hz, $J_2= 3.8$ Hz. Δύο ζεύγη μεθυλενικών πρωτονίων δίνουν δύο τριπλές κορυφές στα 2.94 και 2.57 ppm ενώ τα υπόλοιπα εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές στις περιοχές 1.70 – 1.56 και 1.36 – 1.23 ppm. Τέλος, τα μεθύλια του *tert*-βουτυλεστέρα εμφανίζονται στα 1.47 ppm ως μια απλή κορυφή ενώ αυτό της νορλευκίνης στα 0.88 ppm με πολλαπλότητα τριπλή.

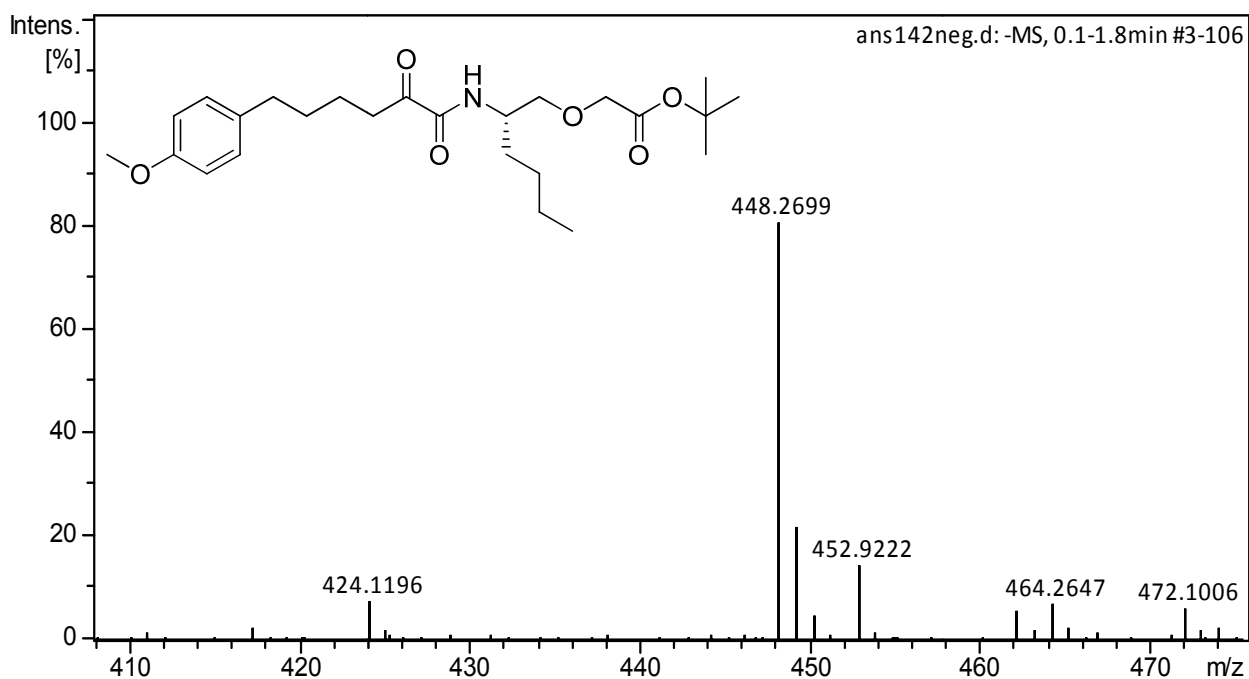
Το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **90** (Σχήμα 4.31) δείχνει τις μετατοπίσεις των τριών καρβονυλικών ανθράκων στα 198.9, 169.4 και 159.9 ppm. Οι δύο τεταρτοταγείς αρωματικοί άνθρακες μετατοπίζονται στα 157.6 και 134.1 ppm ενώ οι υπόλοιποι στα 129.2 και 113.6 ppm. Ο τεταρτοταγής άνθρακας του *tert*-βουτυλεστέρα εμφανίζεται στα 81.7 ppm ενώ οι μεθυλενικοί άνθρακες της αιθερικής ομάδας μετατοπίζονται στα 72.4 και 68.7 ppm, αντίστοιχα. Το μεθύλιο της 4-μεθόξυ ομάδας εμφανίζεται στα 55.2 ppm και ο μεθινικός άνθρακας στα 49.4 ppm. Οι υπόλοιποι μεθυλενικοί άνθρακες εμφανίζονται στα 36.6, 34.6, 31.0, 22.6 και 22.4 ppm, τα μεθύλια του βουτυλεστέρα εμφανίζονται στα 28.0 ppm και το μεθύλιο της νορλευκίνης στα 13.9 ppm. Στο σχήμα 4.32 παρουσιάζεται το φάσμα HRMS (αρνητικών ιόντων) του 2-οξοαμιδίου, όπου η τιμή της μάζας που μετρήθηκε ήταν 448.2699 και αντιστοιχεί στο $[\text{M}-\text{H}]^-$ ενώ η θεωρητική τιμή είναι 448.2705. Τέλος, στο φάσμα IR της ένωσης **90** (Σχήμα 4.33) αποτυπώνονται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των δονήσεων N-H στα 3403 cm^{-1} και των C=O στα $1746, 1682\text{ cm}^{-1}$.



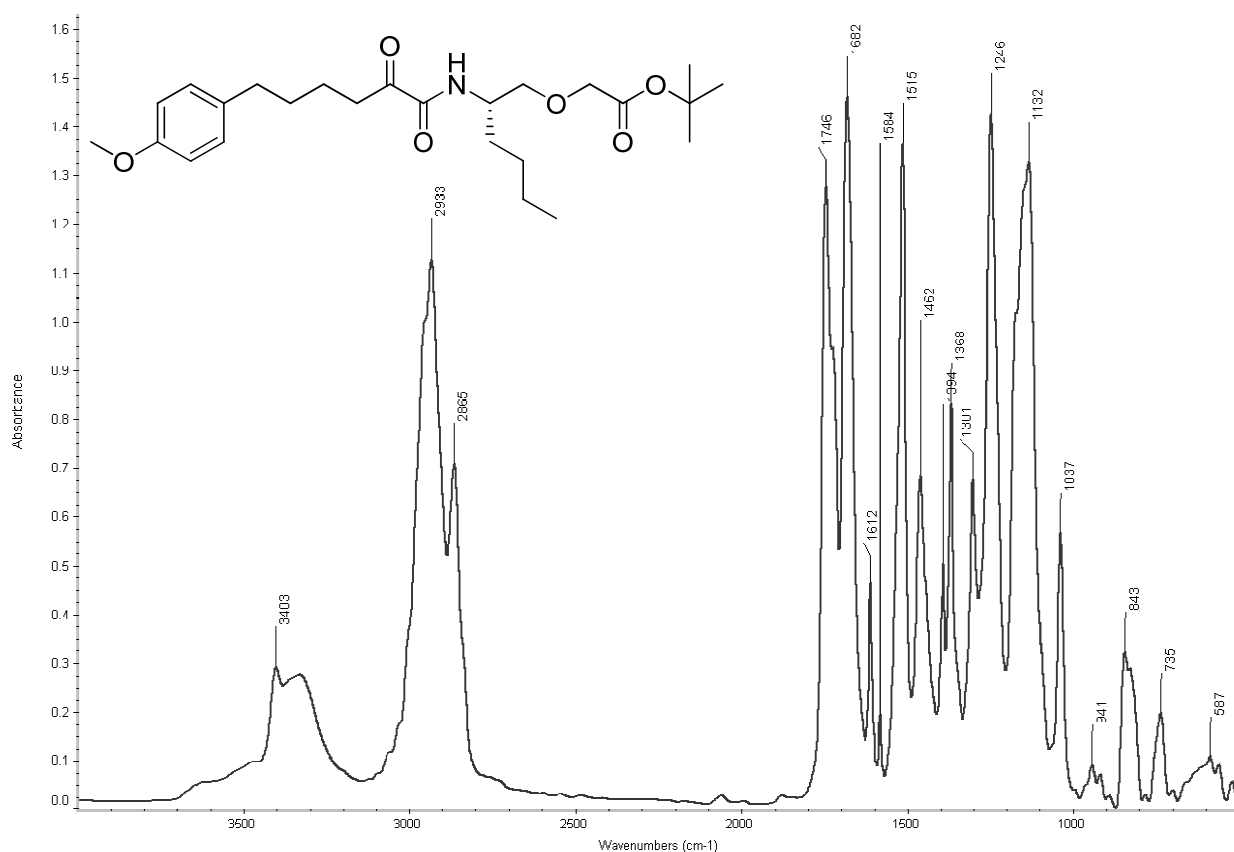
Σχήμα 4.30 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **90** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.31 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **90** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.32 Φάσμα HRMS της ένωσης **90**.

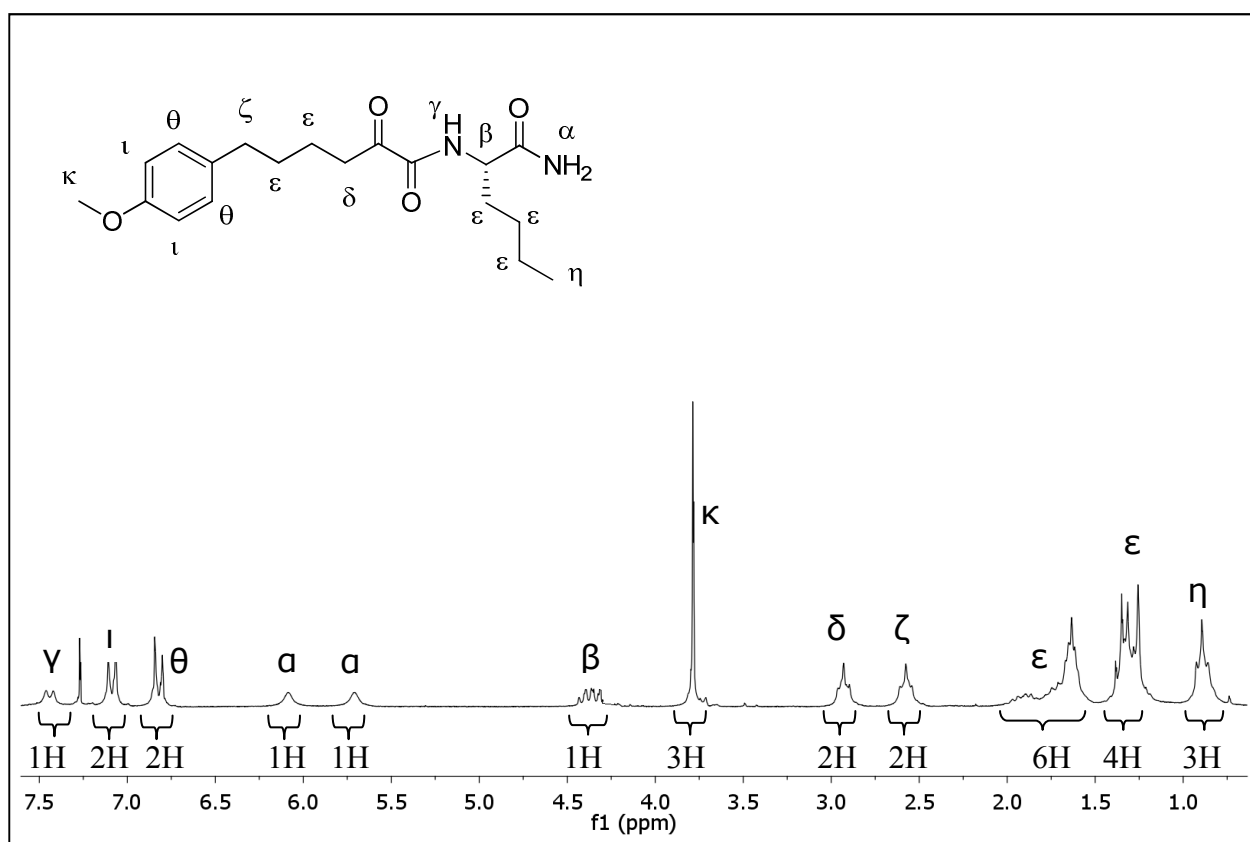


Σχήμα 4.33 Φάσμα IR της ένωσης **90**.

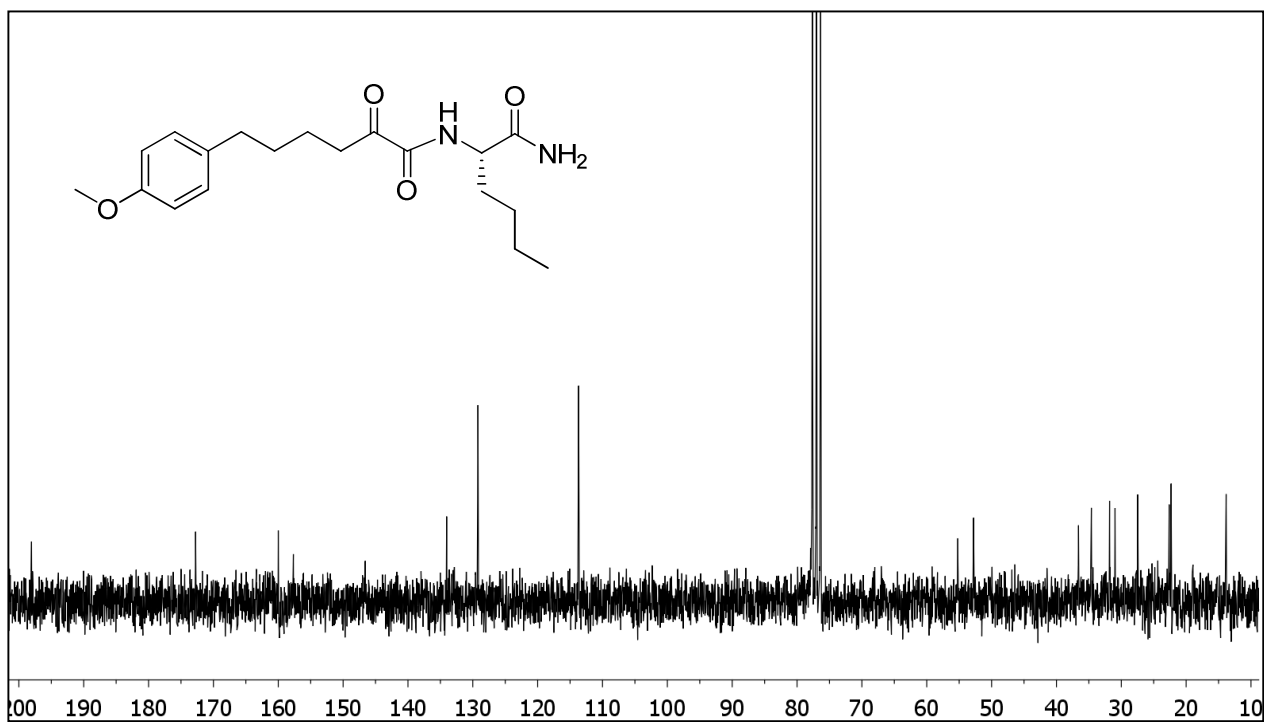
Το φάσμα ¹H NMR του αμιδίου **102** φαίνεται στο σχήμα 4.34 όπου το NH εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στα 7.44 ppm ενώ το NH₂ μετατοπίζεται ως δύο ευρείες απλές κορυφές στα 6.09 και 5.71 ppm. Τα αρωματικά πρωτόνια του παρα-υποκατεστημένου δακτυλίου εμφανίζονται ως δύο

διπλές κορυφές στα 7.09 και 6.82 ppm με σταθερά σύζευξης $J= 8.6$ Hz, το CH μετατοπίζεται σε πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 4.46 – 4.31 ppm και το μεθύλιο της μεθόξυ ομάδας δίνει μια απλή κορυφή στα 3.79 ppm. Δύο μεθυλένια δίνουν δύο τριπλές κορυφές στα 2.93 και 2.58 ppm ενώ τα υπόλοιπα εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές στις περιοχές 1.99 – 1.76, 1.70 – 1.57 και 1.39 – 1.30 ppm. Τέλος, το μεθύλιο της νορλευκίνης δίνει μια τριπλή κορυφή στα 0.89 ppm με σταθερά σύζευξης $J= 7.0$ Hz.

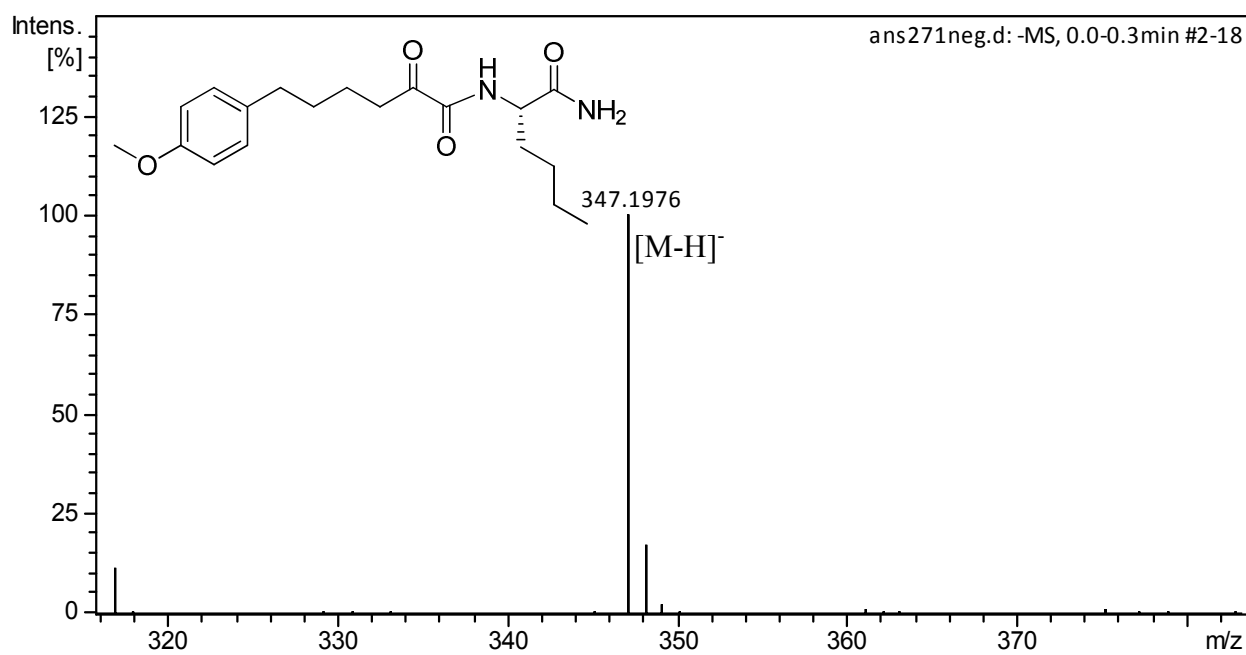
Στο σχήμα 4.35 απεικονίζεται το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **102** στο οποίο οι καρβονυλικοί άνθρακες μετατοπίζονται στα 198.1, 172.8 και 160.0 ppm. Οι τεταρτοταγείς αρωματικοί άνθρακες εμφανίζονται στα 157.7 και 134.0 ppm ενώ οι υπόλοιποι αρωματικοί στα 129.2 και 113.7 ppm. Το μεθύλιο της μεθόξυ ομάδας και ο CH μετατοπίζονται στα 55.2 και 52.8 ppm αντίστοιχα. Οι μεθυλενικοί άνθρακες εμφανίζονται στα 36.6, 34.6, 31.8, 31.0, 27.5, 22.6 και 22.3 ppm ενώ το μεθύλιο της νορλευκίνης στα 13.8 ppm. Επιπλέον, στο σχήμα 4.36 φαίνεται το φάσμα HRMS (αρνητικών ιόντων) του αμιδίου **102** όπου η θεωρητική και μετρήσιμη τιμή του ιόντος συμπίπτουν στα 347.1796 και αντιστοιχεί στο $[\text{M}-\text{H}]^-$. Τέλος, στο σχήμα 4.37 απεικονίζεται το φάσμα IR του αμιδίου αυτού όπου φαίνονται οι ευρείες χαρακτηριστικές απορροφήσεις των N-H στα 3334 και 3200 cm^{-1} και των C=O στα 1670 και 1612 cm^{-1} .



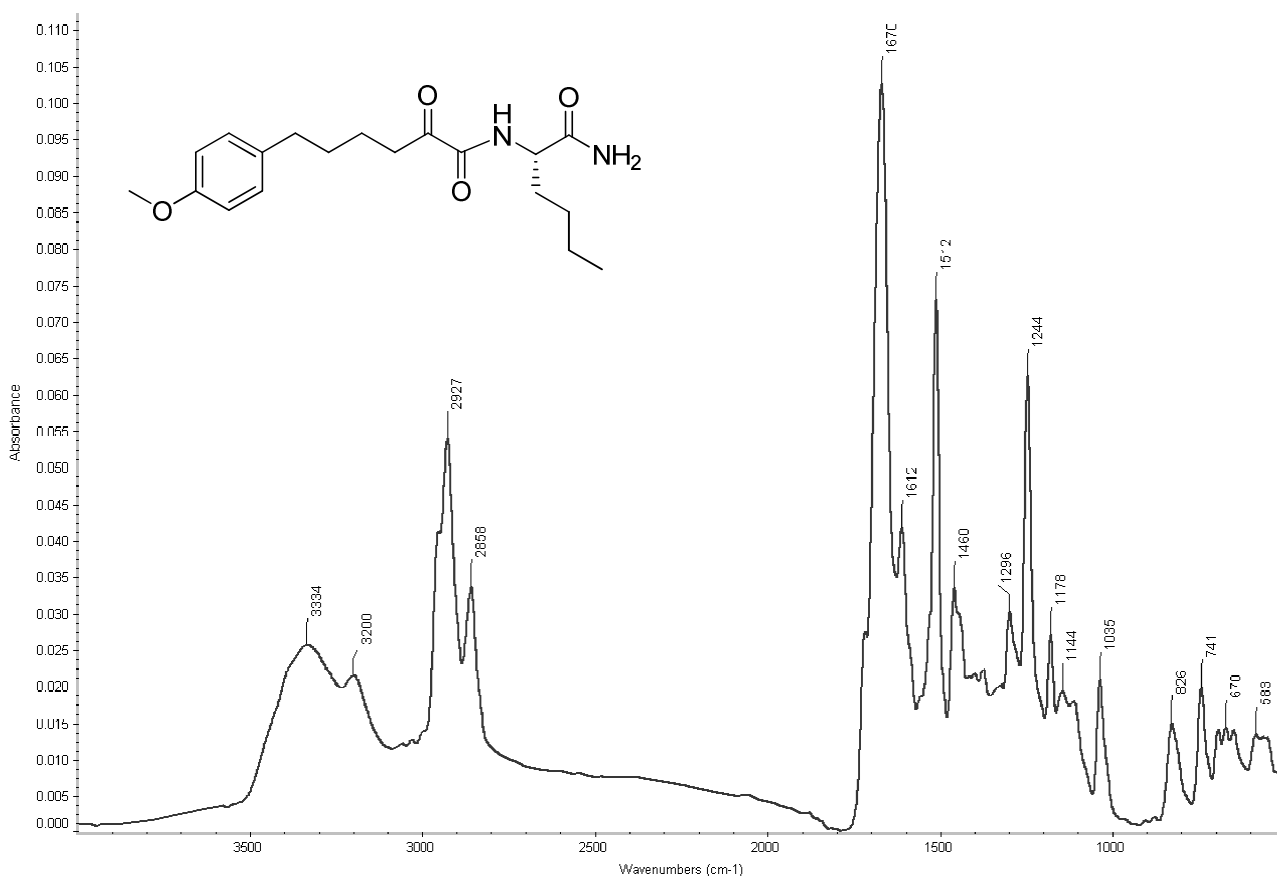
Σχήμα 4.34 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **102** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.35 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **102** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.36 Φάσμα HRMS της ένωσης **102**.

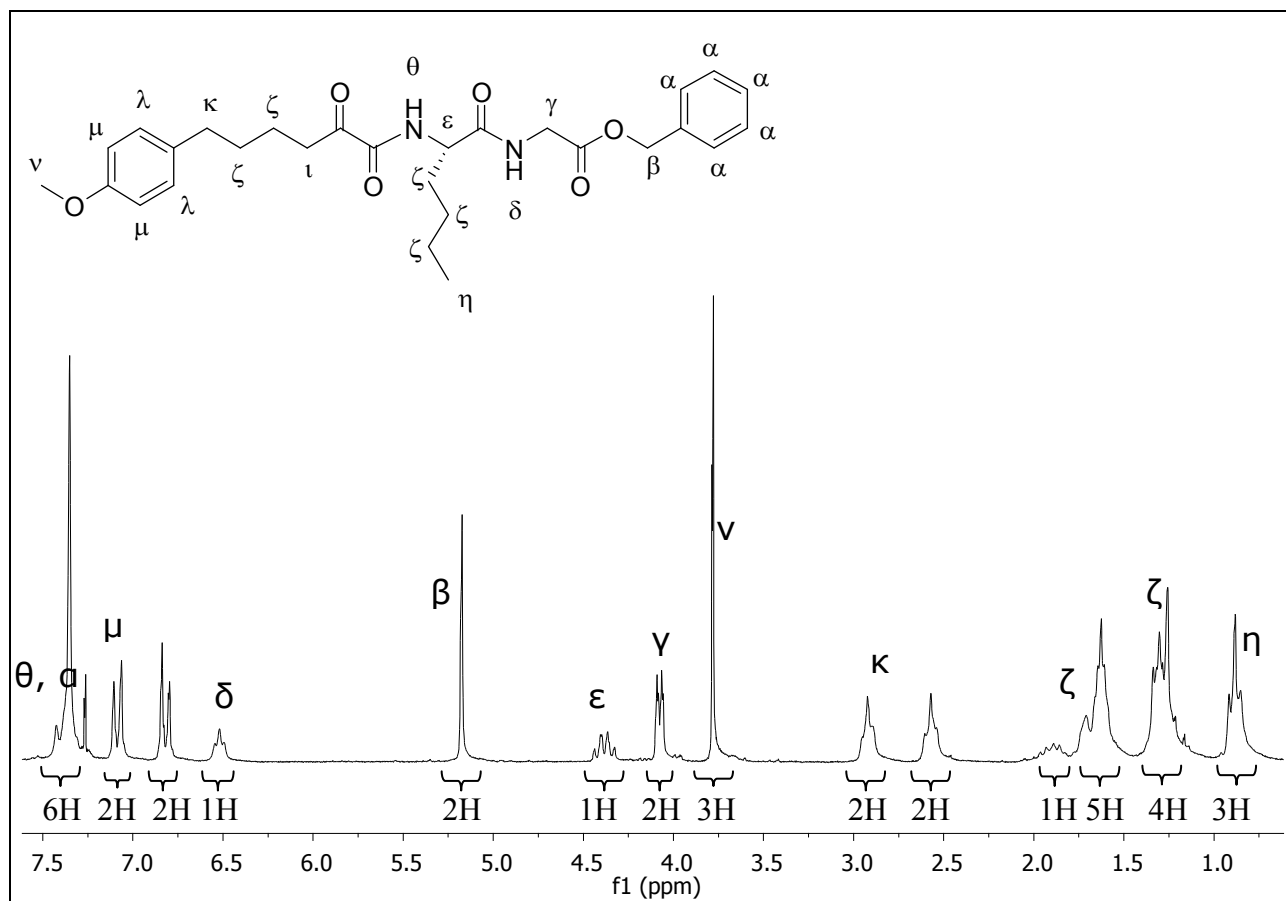


Σχήμα 4.37 Φάσμα IR της ένωσης **102**.

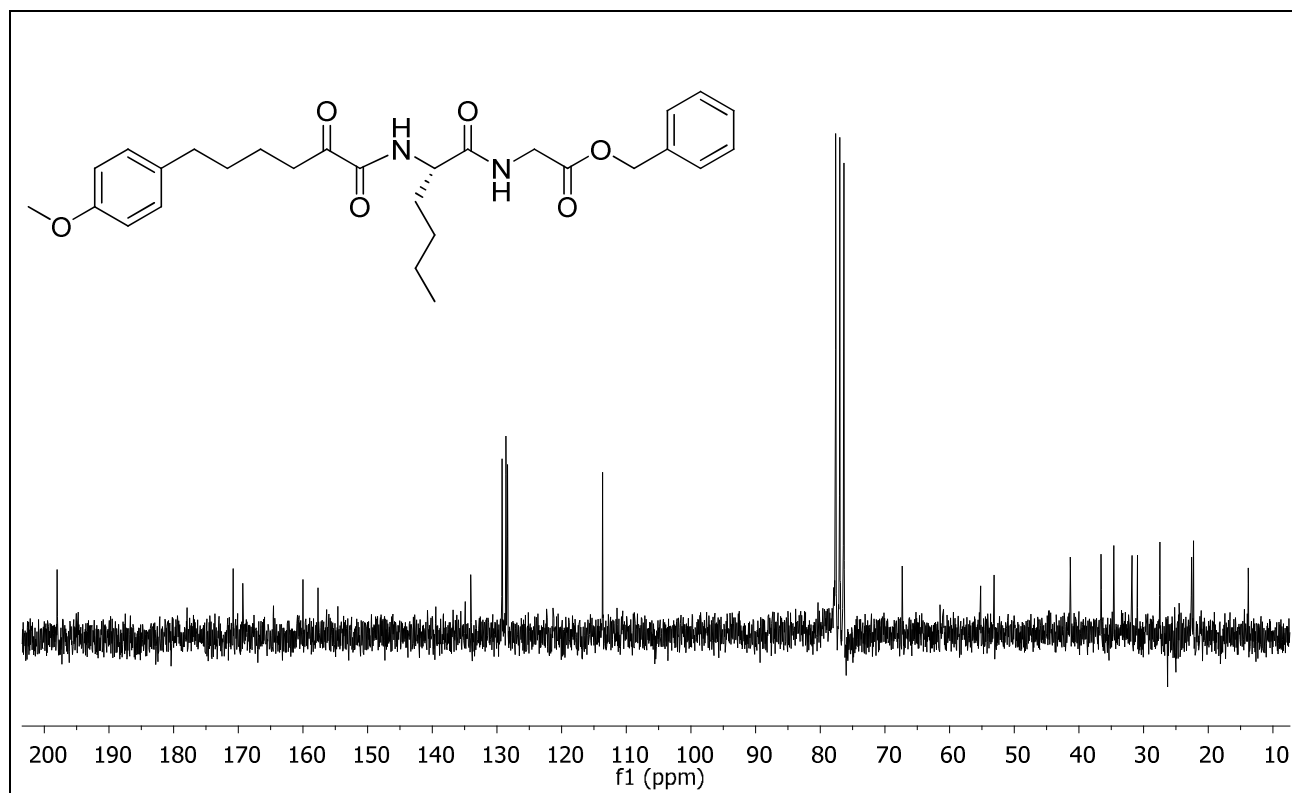
Στο σχήμα 4.38 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR του 2-οξοαμιδίου **120**, όπου τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου της βενζυλομάδας μαζί με το αμίδιο COCONH εμφανίζονται στην περιοχή 7.48 – 7.28 ppm. Έπειτα, τα αρωματικά πρωτόνια του παρα-υποκατεστημένου δακτυλίου εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 7.08 και 6.82 ppm με σταθερές σύζευξης 8.4 Hz και $J = 8.6$ Hz, αντίστοιχα. Το άλλο αμιδικό πρωτόνιο σχάζεται ως τριπλή κορυφή στα 6.52 ppm με $J = 5.2$ Hz) ενώ η απλή κορυφή των 5.17 ppm ανήκει στη μεθυλένιο της βενζυλομάδας. Το CH μετατοπίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 4.47 – 4.27 ppm ενώ η διπλή κορυφή στα 4.08 αντιπροσωπεύει το μεθυλένιο NHCH₂ με $J = 5.2$ Hz. Η χαρακτηριστική απλή κορυφή της μεθοξυ-ομάδας βρίσκεται στα 3.78 ppm και οι δύο τριπλές στα 2.92 και 2.57 ppm ανήκουν σε δύο μεθυλένια. Τα υπόλοιπα μεθυλένια μετατοπίζονται ως πολλαπλές κορυφές στην περιοχή από 2.01 ppm έως 1.20 ppm και τέλος στα 0.88 ppm σχάζεται στην χαρακτηριστική τριπλή κορυφή το μεθύλιο της νορλευκίνης με $J = 6.6$ Hz.

Το φάσμα ^{13}C NMR του οξοαμιδίου **120** φαίνεται στο σχήμα 4.39 όπου οι καρβονυλικοί άνθρακες του μορίου μετατοπίζονται στα 198.0, 170.8, 169.3 και 160.0 ppm, ενώ οι τρεις τεταρτοταγείς στα 157.7, 134.9 και 134.1 ppm. Οι υπόλοιποι αρωματικοί άνθρακες εμφανίζονται στα 129.2 και 113.7 ppm. Ο μεθυλενικός άνθρακας της βενζυλομάδας εμφανίζεται στα 67.3 ppm και ο άνθρακας της μεθοξυ-ομάδας στα 55.2. Στα 53.1 ppm μετατοπίζεται ο CH

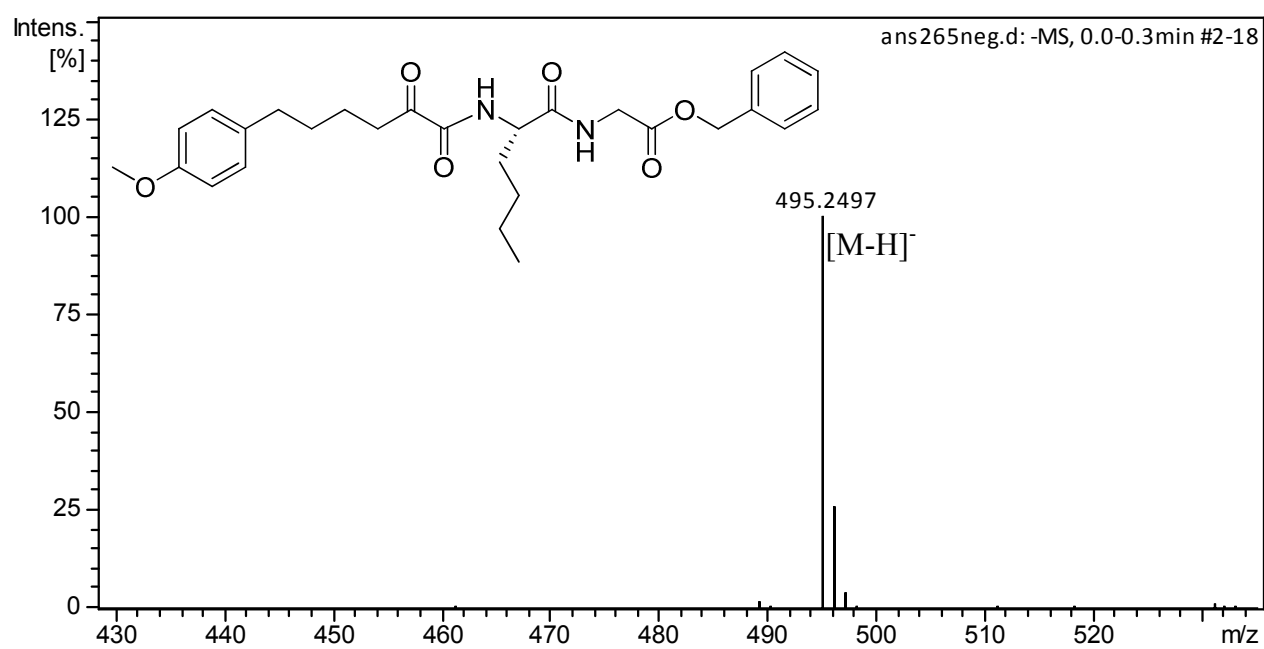
και στα 41.3 ppm παρουσιάζεται ο μεθυλενικός άνθρακας πλησίον του αμιδίου. Οι κορυφές στα 36.6, 34.6, 31.8, 31.0, 27.5, 22.6 και 22.3 ppm ανήκουν στους υπόλοιπους μεθυλενικούς άνθρακες και αυτός του μεθυλίου της νορλευκίνης εμφανίζεται στα 13.8 ppm. Επίσης, στο σχήμα 4.40 αποτυπώνεται το φάσμα HRMS (αρνητικών ιόντων) της ένωσης όπου η θεωρητική τιμή του ιόντος είναι 495.2501 ενώ αυτή που μετρήθηκε ήταν 495.2497 και αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$. Στο σχήμα 4.41 παρουσιάζεται το φάσμα IR της ένωσης **120** όπου απεικονίζονται οι δονήσεις των N-H σε μια ευρεία περιοχή στα 3324 cm^{-1} και των C=O στα $1749, 1666\text{ cm}^{-1}$.



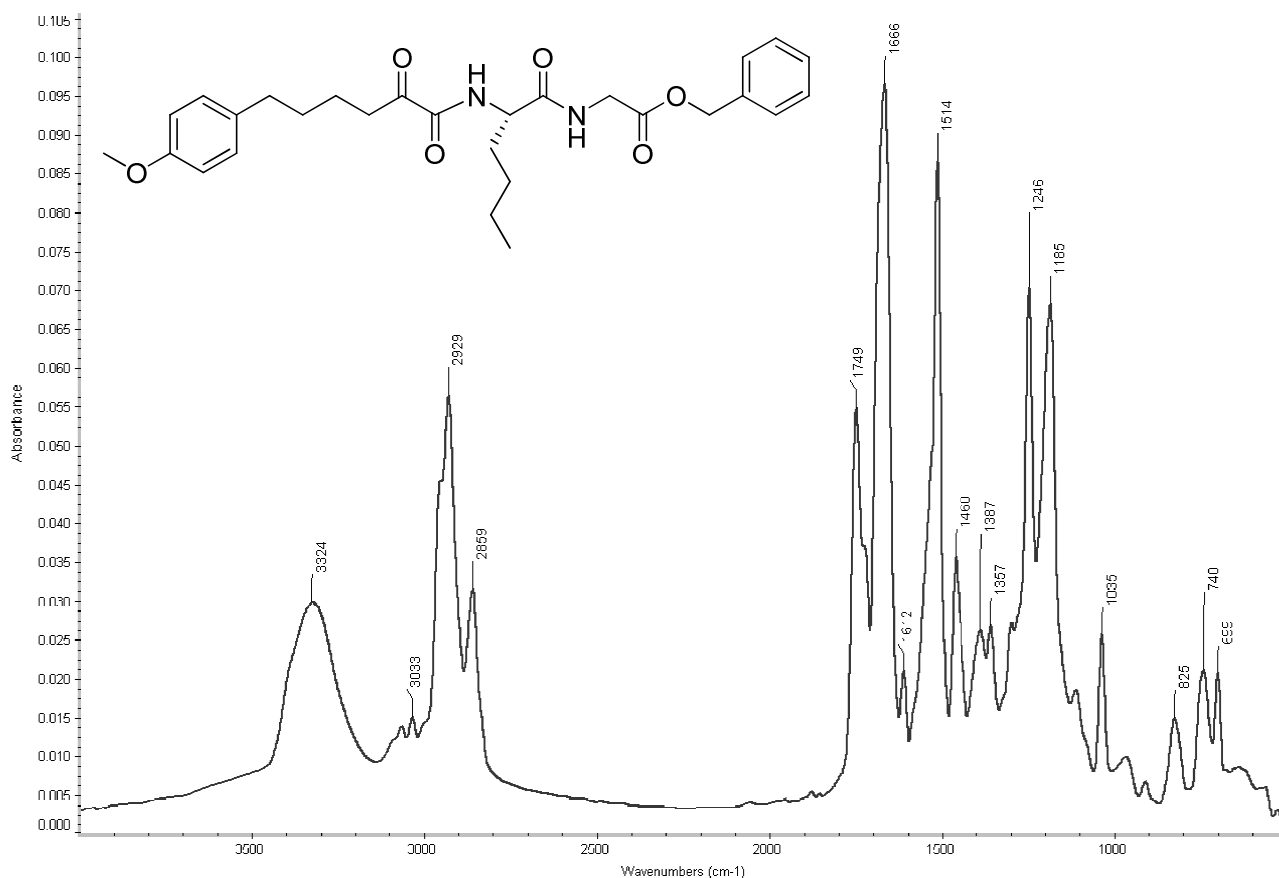
Σχήμα 4.38 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **120** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.39 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 120 σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.40 Φάσμα HRMS της ένωσης 120.

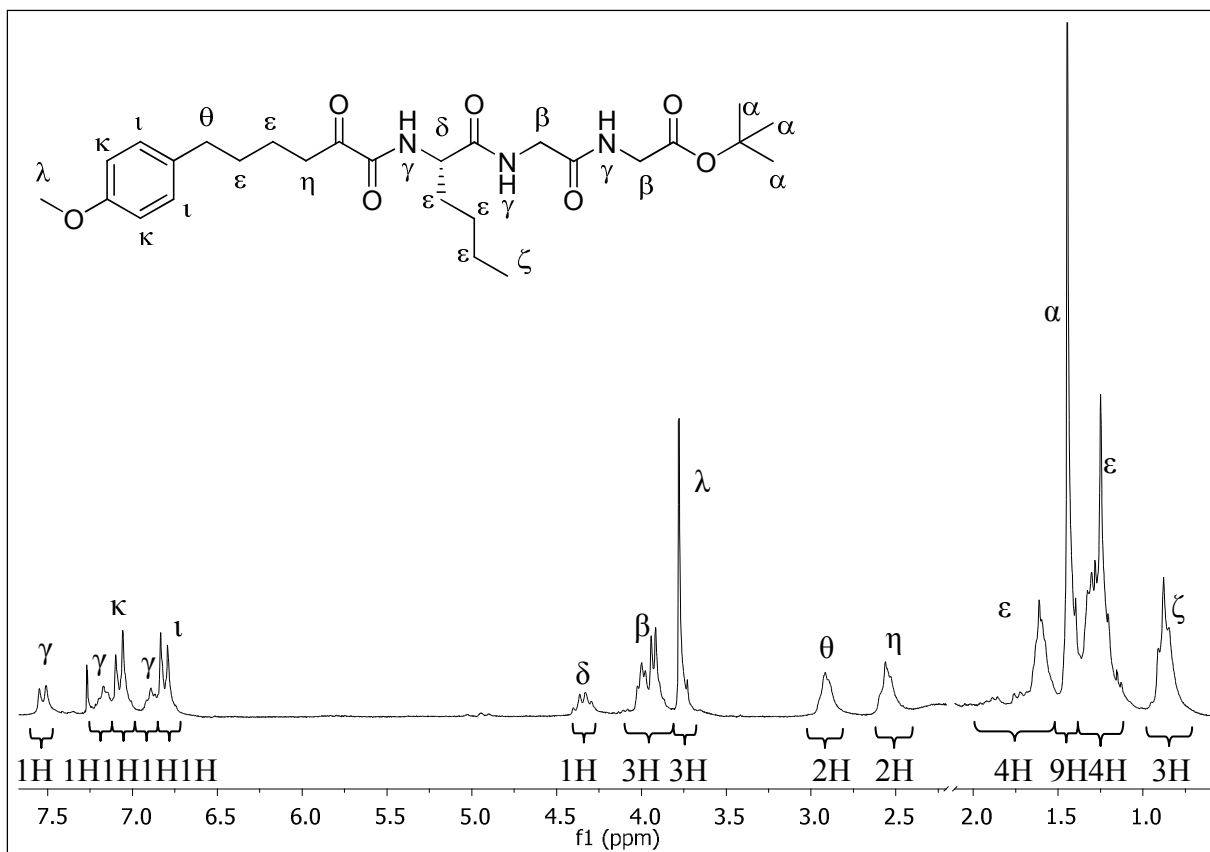


Σχήμα 4.41 Φάσμα IR της ένωσης **120**.

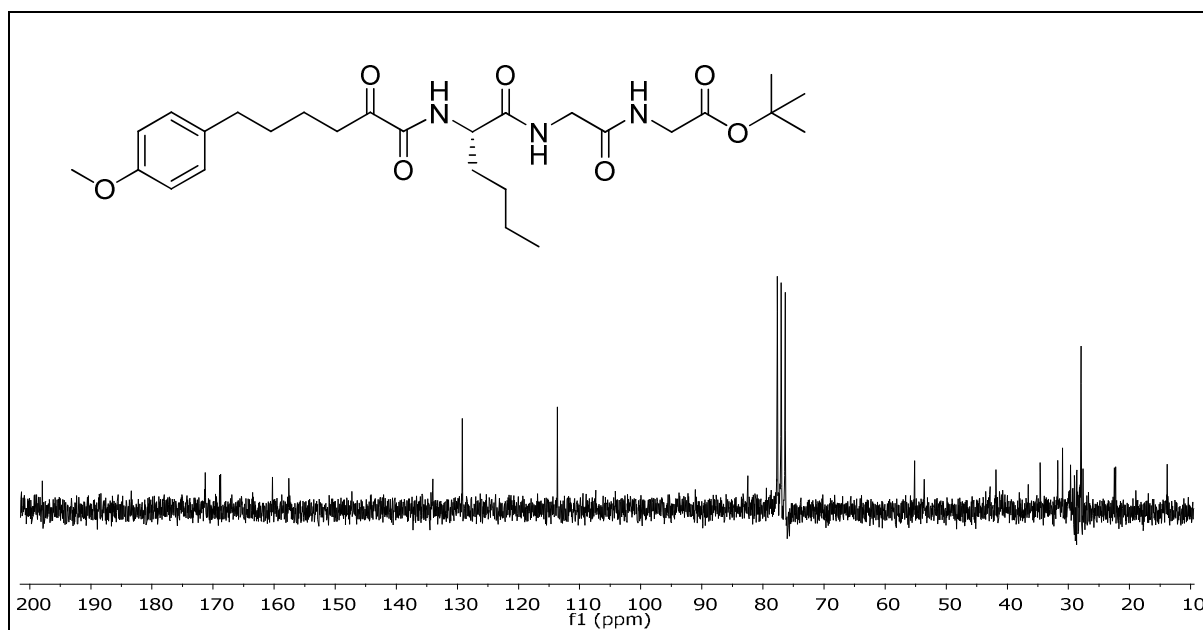
Στο σχήμα 4.42 φαίνεται το φάσμα ^1H NMR του 2-οξοαμιδίου **130** όπου τα αμιδικά πρωτόνια εμφανίζονται ως δύο ευρείες κορυφές στα 7.17 και 6.90 ppm. Τα αρωματικά πρωτόνια σχάζονται σε δύο διπλές κορυφές στα 7.53 και 7.08 ppm ενώ το CH εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 4.40 – 4.20 ppm. Τα δύο μεθυλένια NHCH_2CO εμφανίζονται ως μια πολλαπλή στα 4.04 – 3.97 ppm και μια διπλή κορυφή στα 3.94 ppm με $J = 5.2$ Hz. Στα 3.78 ppm εμφανίζεται η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο μεθύλιο της μεθόξυ ομάδας ενώ τα ζεύγη των μεθυλενίων μετατοπίζονται ως πολλαπλές κορυφές στις περιοχές 2.99 – 2.83, 2.61 – 2.50, 1.97 – 1.52 και 1.36 – 1.28 ppm. Η χαρακτηριστική κορυφή των μεθυλίων του *tert*-βουτυλεστέρα εμφανίζεται στα 1.44 ppm και του μεθυλίου της νορλευκίνης στα 0.88 ppm ως τριπλή με σχάση $J = 6.2$ Hz.

Το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **130**, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.43, αποτυπώνει τις μετατοπίσεις των καρβονυλικών ανθράκων στα 197.9, 171.3, 168.9, 168.8 και 160.3 ppm, των τεταρτοταγών αρωματικών ανθράκων στα 157.6, 134.0 ppm και των υπόλοιπων αρωματικών στα 129.2 και 113.6 ppm. Ο τεταρτοταγής άνθρακας του *tert*-βουτυλεστέρα μετατοπίζεται στα 82.5 ppm και στα 55.2 ppm ο άνθρακας της μεθόξυ ομάδας. Στα 53.6 ppm εμφανίζεται ο CH ενώ οι μεθυλενικοί άνθρακες στα 41.9, 36.6, 34.6, 31.7, 31.0, 29.7, 27.6, 22.5 και 22.3 ppm. Τα μεθύλια του βουτυλεστέρα δίνουν μετατόπιση στα 27.9 ppm και αυτό της νορλευκίνης στα 13.8 ppm. Στο σχήμα 4.44 αποτυπώνεται το HRMS φάσμα (αρνητικών ιόντων) του οξοαμιδικού

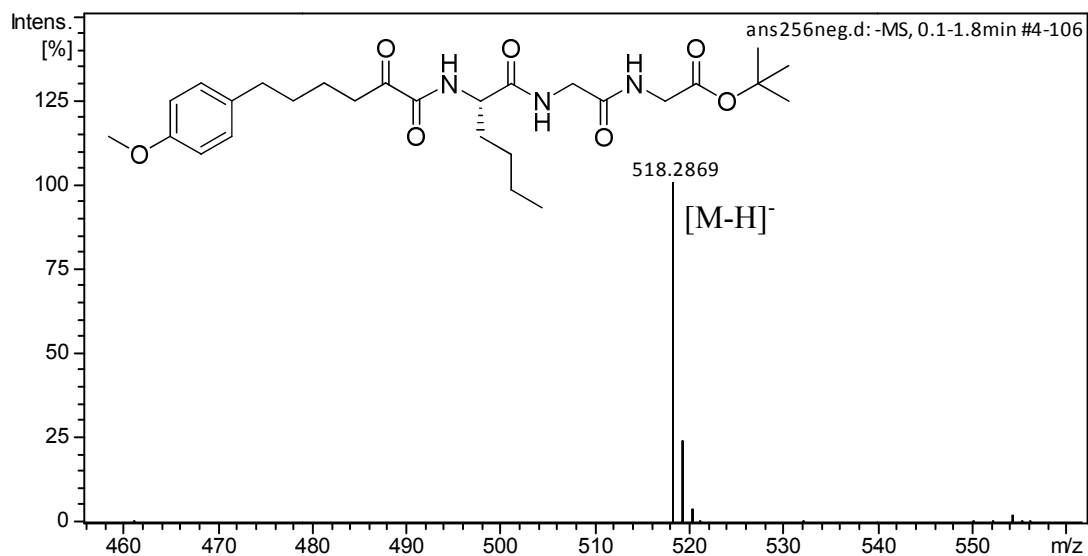
παραγώγου **130** όπου η θεωρητική τιμή του ιόντος είναι 518.2872 και αυτή που παρατηρήθηκε και αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ ήταν 518.2869. Το φάσμα IR της εν λόγω ένωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 4.45 όπου η ευρεία κορυφή στα 3313 cm^{-1} αντιστοιχεί στην απορρόφηση του N-H και οι $1740, 1662\text{ cm}^{-1}$ στα C=O.



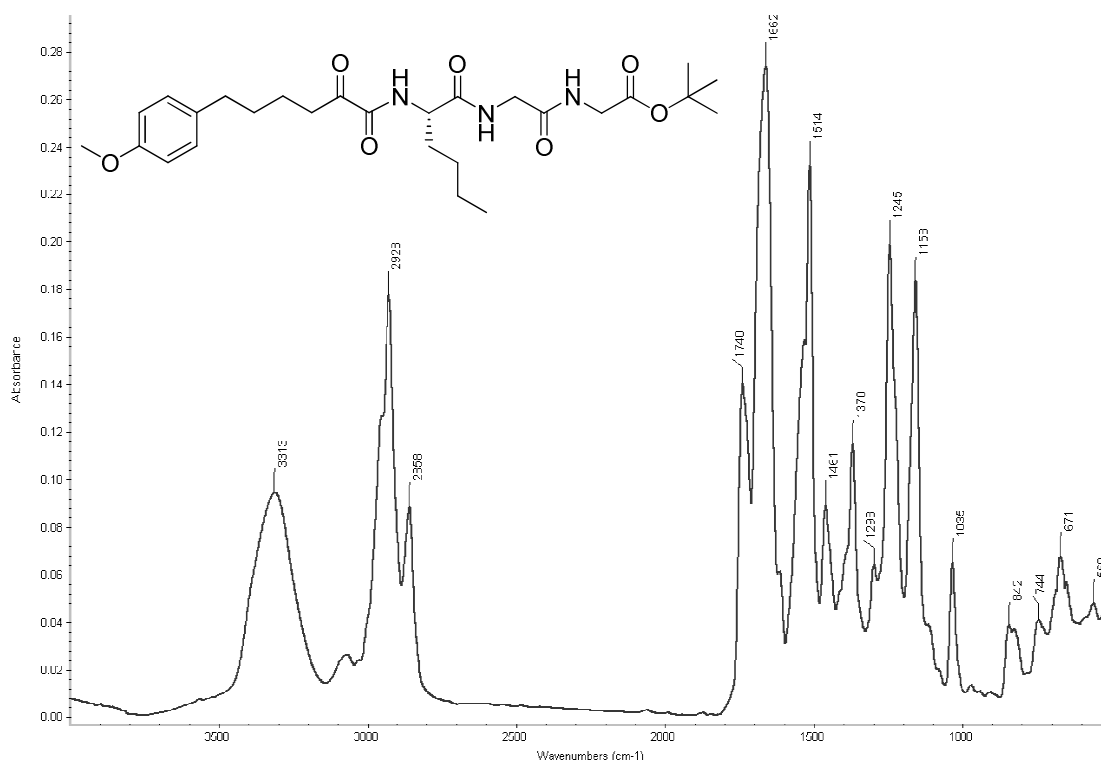
Σχήμα 4.42 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **130** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.43 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **130** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.44 Φάσμα HRMS της ένωσης **130**.

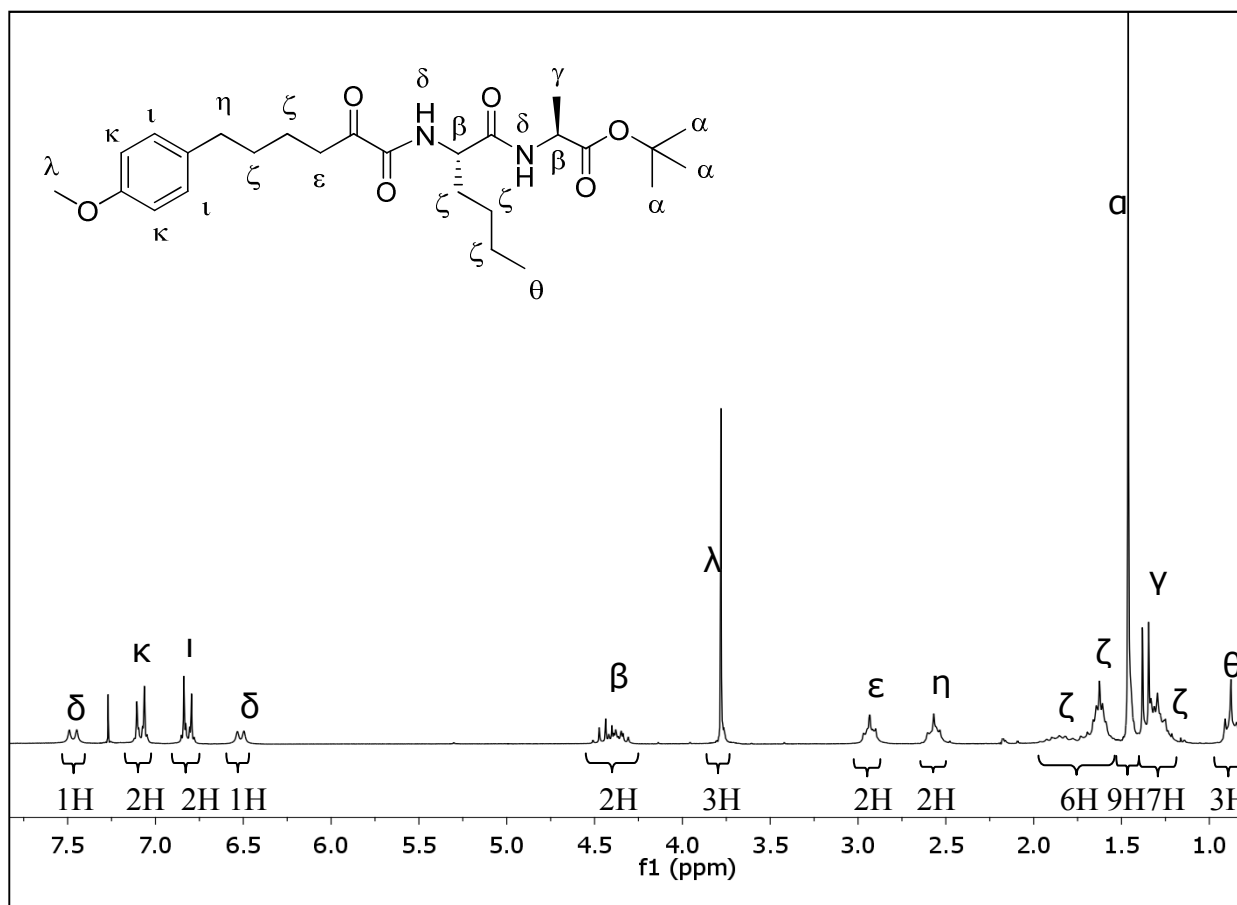


Σχήμα 4.45 Φάσμα IR της ένωσης **130**.

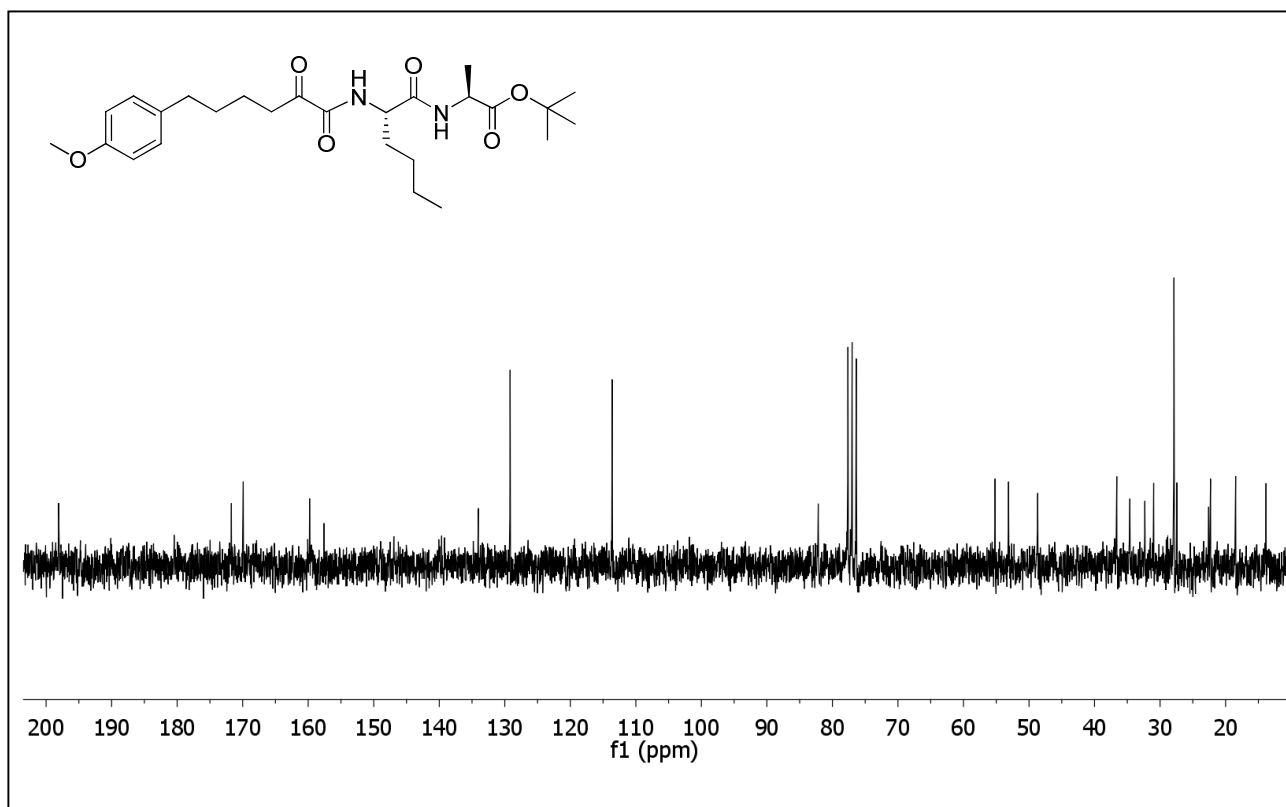
Το φάσμα ^1H NMR του 2-οξοαμιδίου **134** φαίνεται στο σχήμα 4.46 όπου τα δύο αμιδικά πρωτόνια σχάζονται σε δύο διπλές κορυφές στα 7.47 και 6.51 ppm με σταθερές σύζευξης $J= 8.6$ Hz και $J= 7.4$ Hz, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 7.08 και 6.82 ppm ενώ τα δύο CH εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές στην περιοχή 4.53 – 4.30 ppm. Έπειτα, δύο από τα ζεύγη των μεθυλενίων μετατοπίζονται στα 2.93 και 2.57 ppm σε δύο τριπλές κορυφές με $J= 7.0$ Hz ενώ τα υπόλοιπα εμφανίζονται σε πολλαπλές κορυφές στις περιοχές 1.97 – 1.72, 1.68 – 1.56 και 1.34 – 1.21 ppm. Στα 1.46 ppm

εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή τα μεθύλια του *tert*-βουτυλεστέρα, στα 1.36 ppm εμφανίζεται το μεθύλιο της αλανίνης ως διπλή κορυφή με $J = 7.2$ Hz και το μεθύλιο της νορλευκίνης μετατοπίζεται στα 0.88 ppm με πολλαπλότητα τριπλή.

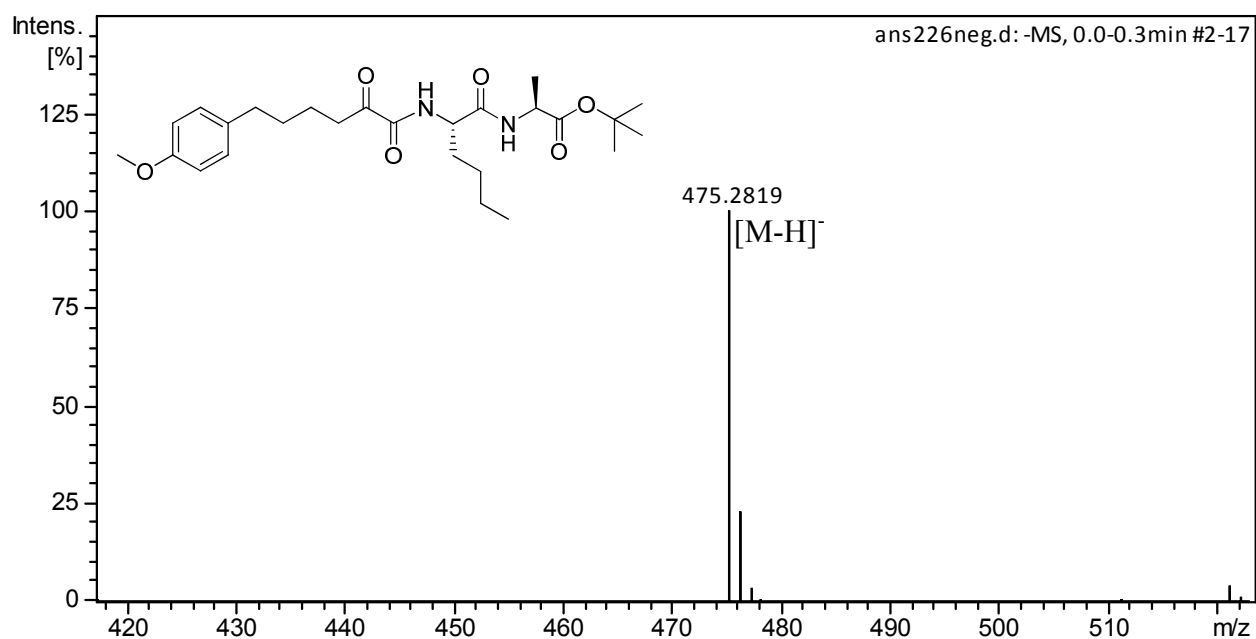
Το φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **134** μας δείχνει τις μετατοπίσεις των καρβονυλικών ανθράκων στα 198.1, 171.7, 170.0 και 159.9 ppm ενώ των τεταρτοταγών αρωματικών στα 157.7 και 134.1 ppm και των άλλων αρωματικών στα 129.2 και 113.7 ppm (Σχήμα 4.47). Στα 82.2 ppm εμφανίζεται ο τεταρτοταγής άνθρακας του βουτυλεστέρα και στα 55.2 ppm ο άνθρακας της μεθόξυ ομάδας. Τα δύο CH μετατοπίζονται στα 53.2 και 48.7 ενώ οι μεθυλενικοί άνθρακες στα 36.6, 34.6, 32.3, 31.0, 27.9, 27.5, 22.6 και 22.3 ppm. Τέλος, τα μεθύλια της αλανίνης και της νορλευκίνης εμφανίζονται στα 18.5 και 13.8 ppm, αντίστοιχα. Στο σχήμα 4.48 αποτυπώνεται το HRMS φάσμα (αρνητικών ιόντων) του οξοαμιδικού παραγώγου όπου η θεωρητική τιμή του ιόντος είναι 475.2814 και αυτή που παρατηρήθηκε και αντιστοιχεί στο $[\text{M}-\text{H}]^-$ ήταν 475.2819. Το φάσμα IR της εν λόγω ένωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 4.49 όπου η ευρεία κορυφή στα 3318 cm^{-1} αντιστοιχεί στην απορρόφηση του N-H και οι $1733, 1661\text{ cm}^{-1}$ στα C=O.



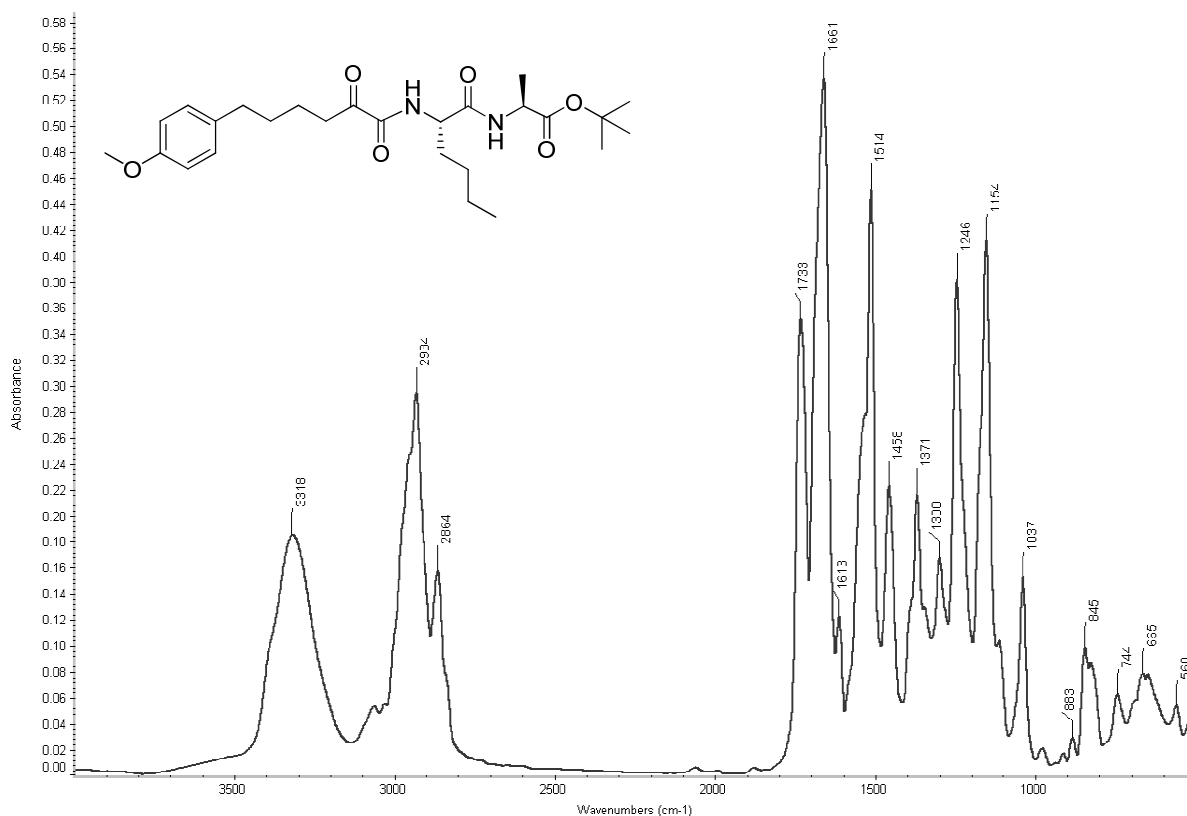
Σχήμα 4.46 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **134** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.47 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **134** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.48 Φάσμα HRMS της ένωσης **134**.

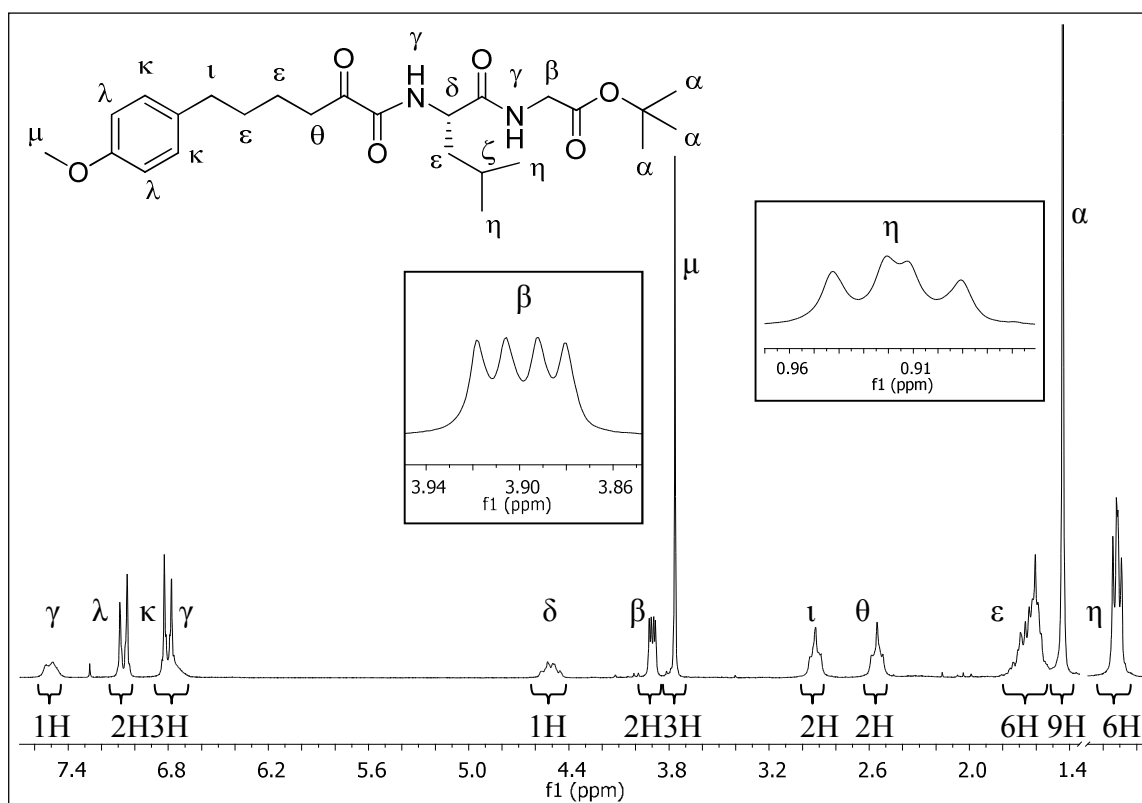


Σχήμα 4.49 Φάσμα IR της ένωσης **134**.

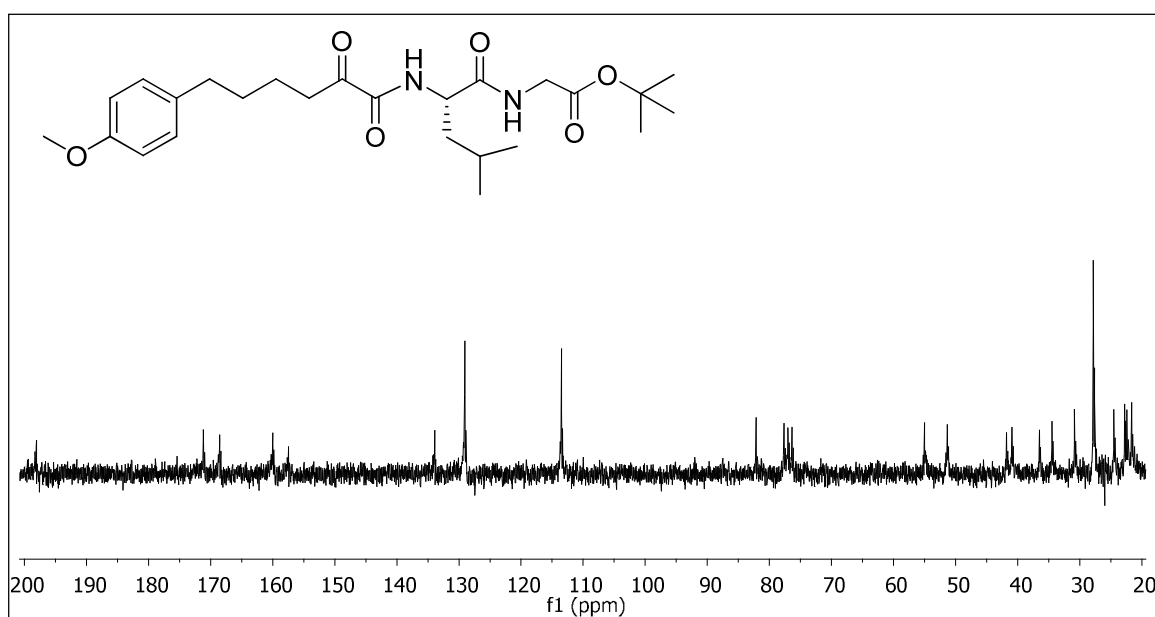
Στο σχήμα 4.50 φαίνεται το φάσμα ^1H NMR του 2-οξοαμιδικού παραγώγου **150** όπου το ένα NH σχάζεται σε διπλή κορυφή στα 7.51 ppm με $J= 9.2$ Hz ενώ το άλλο εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 6.78 – 6.67 ppm. Οι δύο διπλές κορυφές στα 7.07 και 6.80 ppm αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια ενώ το CH μετατοπίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 4.57 – 4.44 ppm. Τα μεθυλενικά πρωτόνια NHCH_2 σχάζονται σε μια κορυφή διπλή διπλών στα 3.90 ppm σχάσεις $J_1= 2.4$ Hz και $J_2= 5.2$ Hz. Η χαρακτηριστική απλή κορυφή του μεθυλίου της μεθόξυ ομάδας δίνεται στα 3.76 ppm ενώ αυτή των μεθυλίων του βουτυλεστέρα στα 1.44 ppm. Δύο από τα ζεύγη των μεθυλενίων σχάζονται σε δύο τριπλές κορυφές στα 2.92 και 2.55 ppm με $J= 6.4$ Hz και $J= 7.0$ Hz, αντίστοιχα ενώ τα υπόλοιπα μεθυλένια εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές στην περιοχή 1.74 – 1.55 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια των μεθυλίων της λευκίνης μετατοπίζονται σε δύο διπλές κορυφές στα 0.93 και 0.90 ppm με $J= 4.2$ Hz.

Στο φάσμα ^{13}C NMR όπως αυτό φαίνεται στο σχήμα 4.51, αποτυπώνονται οι μετατοπίσεις των καρβονυλικών ανθράκων στα 198.1, 171.2, 168.5 και 160.0 ppm. Οι αρωματικοί τεταρτοταγείς άνθρακες μετατοπίζονται 157.5 και 133.9 ppm ενώ οι άλλοι αρωματικοί στα 129.0 και 113.5 ppm. Ο τεταρτοταγής άνθρακας του βουτυλεστέρα δίνει την κορυφή στα 82.1 ppm ενώ αυτός της μεθόξυ ομάδας στα 55.0 ppm. Οι δύο CH μετατοπίζονται στα 51.3 και στα 24.5 ppm ενώ οι μεθυλενικοί άνθρακες στα 41.8, 40.9, 36.5, 34.5, 30.8 και 22.8 ppm. Τέλος, τα μεθύλια του βουτυλεστέρα εμφανίζονται στα 27.8 ppm και της λευκίνης στα 22.4 και 21.6 ppm. Στο σχήμα

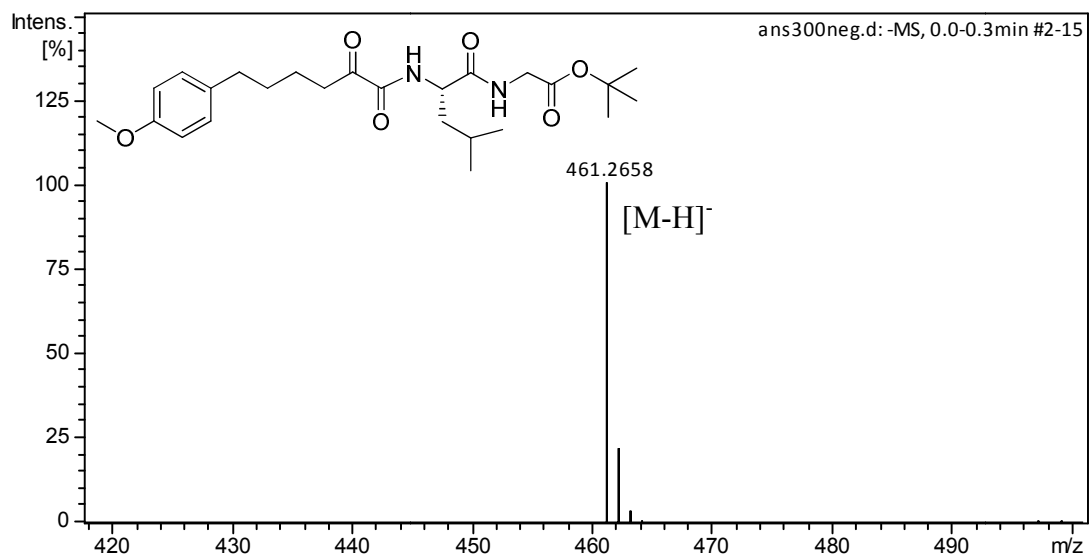
4.52 φαίνεται το HRMS φάσμα (αρνητικών ιόντων) του οξοαμιδικού παραγώγου **150** όπου η θεωρητική τιμή του ιόντος είναι 461.2657 και αυτή που παρατηρήθηκε και αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$ ήταν 461.2658. Το φάσμα IR του 2-οξοαμιδίου αυτού παρουσιάζεται στο σχήμα 4.53 όπου η ευρεία κορυφή στα 3318 cm^{-1} αντιστοιχεί στην απορρόφηση του N-H και οι $1742, 1665\text{ cm}^{-1}$ στα C=O.



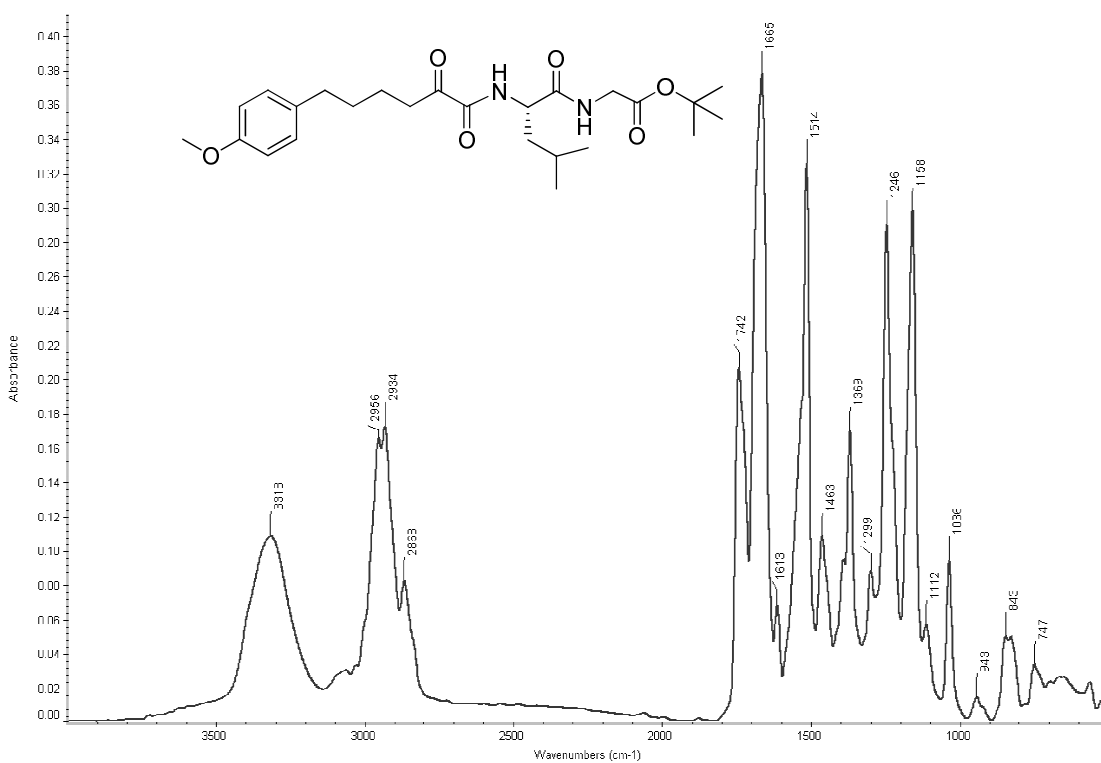
Σχήμα 4.50 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **150** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.51 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **150** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.52 Φάσμα HRMS της ένωσης **150**.

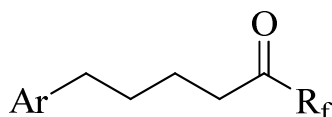


Σχήμα 4.53 Φάσμα IR της ένωσης **150**.

B. Φθοροκετονικά παράγωγα

1. Σχεδιασμός των φθοροκετονικών ενώσεων

Οι τριφθορομεθυλο- και οι πενταφθοροαιθυλο- κετόνες έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν ισχυρή αναστολή ως προς τις φωσφολιπάσες A₂. Συγκεκριμένα, αυτές που διαθέτουν έναν αρωματικό δακτύλιο και αλυσίδα τεσσάρων ανθρακοατόμων μεταξύ του δακτυλίου και της κετόνης έχουν ισχυρή και πολλές φορές εκλεκτική δράση ως προς την iPLA₂. Καθώς απλά φαινορικά συστήματα, υποκατεστημένα ή όχι, έχουν μελετηθεί εκτενώς, σκεφτήκαμε ότι βενζολικοί δακτύλιοι που περιέχουν ένα ετεροάτομο θα ήταν μια ενδιαφέρουσα τροποποίηση στη γενική δομή των μορίων. Γι' αυτό αποφασίσαμε να συνθέσουμε φθοροκετόνες, η δομή των οποίων θα περιέχει έναν ετεροκυκλικό αρωματικό δακτύλιο, μια αλυσίδα τεσσάρων ανθρακοατόμων και ένα ενεργοποιημένο καρβονύλιο από μια πολυφθορομάδα. Η γενική δομή των φθοροκετονικών ενώσεων φαίνεται παρακάτω, ενώ στον πίνακα 4.2 φαίνονται αναλυτικά οι δομές των μορίων.



Γενική δομή φθοροκετονικών ενώσεων.

Πίνακας 4.2 Γενικές δομές φθοροκετονικών ενώσεων.

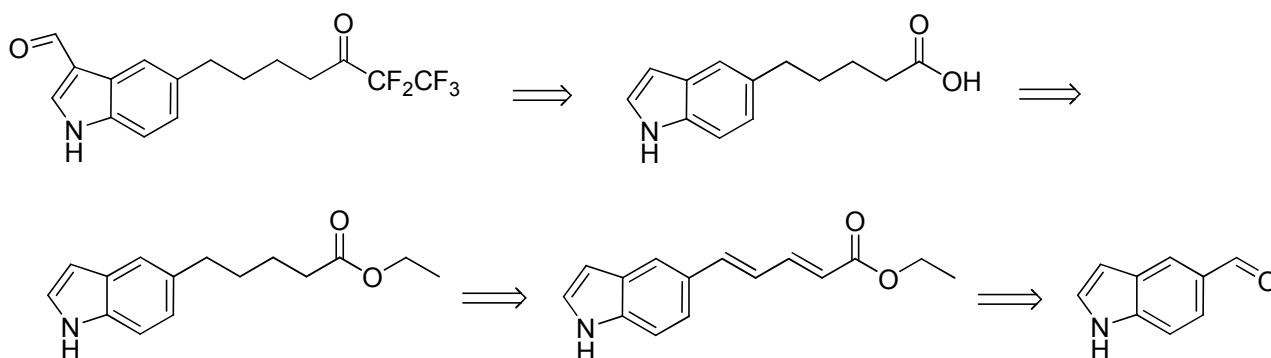
Ομάδα	Χημικές δομές φθοροκετονών	R	R _f	No
I		-	-	159
II		-	CF ₃	166
		-	CF ₂ CF ₃	167
III		Tosyl	-	170
		Me	-	175
IV		-	-	180

Η ομάδα I των φθοροκετονικών παραγώγων περιλαμβάνει την πενταφθοροαιθυλο-κετόνη της οποίας ο αρωματικός δακτύλιος είναι το ινδόλιο υποκατεστημένο με μια αλδεϋδομάδα στην 3' θέση ενώ η ανθρακική αλυσίδα συνδέεται στην 5' θέση του ινδολίου. Στην ομάδα II περιέχονται οι φθοροκετονικές ενώσεις στις οποίες η ανθρακική αλυσίδα συνδέεται στην 3' θέση του υδρογονομένου δακτυλίου του ινδολίου, ο οποίος μάλιστα είναι και προστατευμένος με την τοσυλομάδα. Η προστασία του άζωτου του ινδολίου προέκυψε καθώς ήταν αδύνατη η επιμήκυνση της ανθρακικής αλυσίδας σε άλλη περίπτωση. Διατηρώντας τον ινδολικό δακτύλιο ανέπαφο και προστατεύοντας το άζωτο με τη μεθυλο- ή την τοσυλ-ομάδα προέκυψαν οι ενώσεις της ομάδας III. Τέλος, η ομάδα IV περιλαμβάνει την πενταφθοροαιθυλοκετόνη που περιέχει τον δακτύλιο της κουμαρίνης και συνδέεται με την ανθρακική αλυσίδα στην 6' θέση.

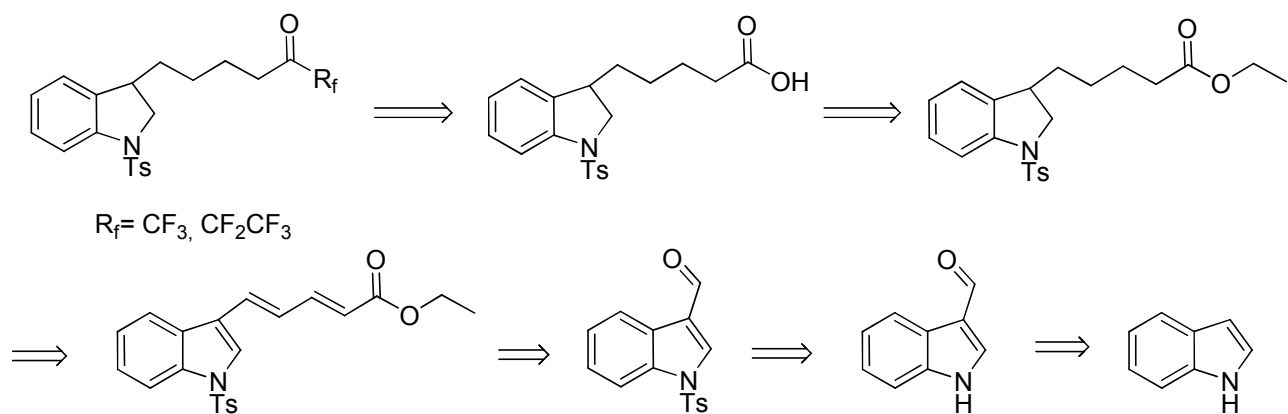
2. Σύνθεση των τριφθορομεθυλο- και πενταφθοροαιθυλο-κετονών

2.1 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης φθοροκετονικών ενώσεων

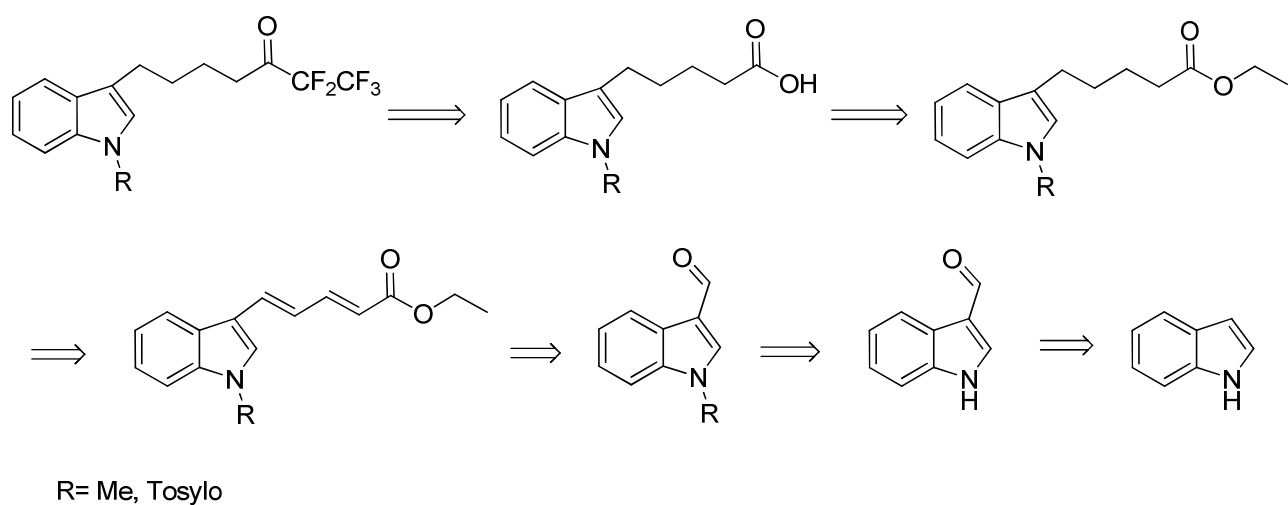
Οι ενώσεις στόχοι μπορούν να προκύψουν από την επίδραση του κατάλληλου φθοροκετονικού ανυδρίτη στο αντίστοιχο οξύ, το οποίο μπορεί να προκύψει από την σαπωνοποίηση του αιθυλεστέρα. Ο εστέρας μπορεί να προκύψει από την καταλυτική υδρογόνωση του ακόρεστου αιθυλεστέρα ο οποίος θα μπορούσε να προέλθει από την αντίστοιχη προστατευμένη ή μη, αρωματική αλδεϋδη. Η αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης όλων των ενώσεων περιγράφεται στα σχήματα 4.54 έως 4.57.



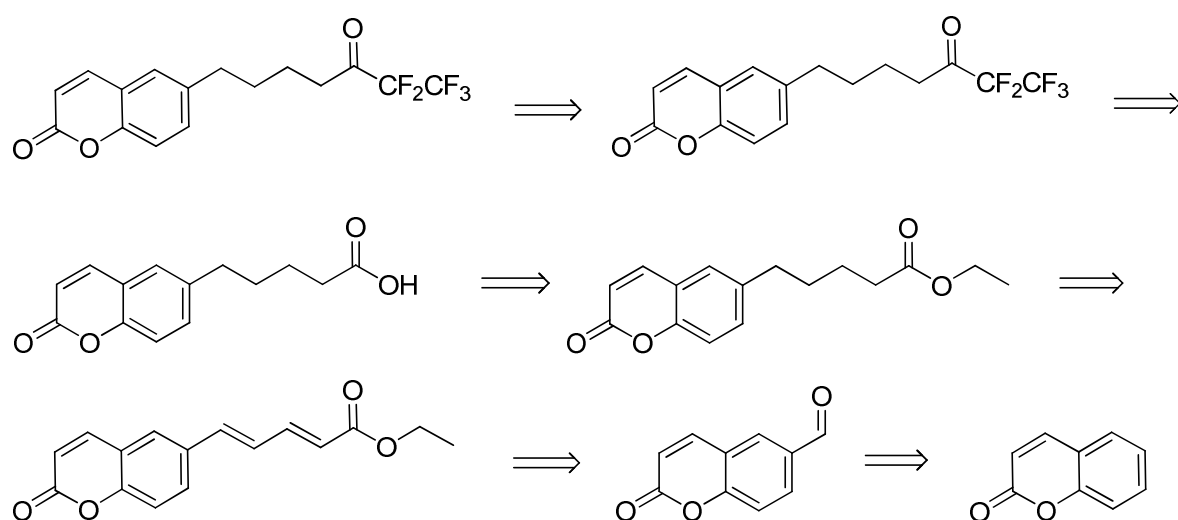
Σχήμα 4.54 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης της πενταφθοροαιθυλο-κετόνης που περιέχει αλδεϋδη στον πυρήνα του ινδολίου (Ομάδα I).



Σχήμα 4.55 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης της τριφθορομεθυλο- και πενταφθοροαιθυλο-κετόνης που φέρουν υδρογονωμένο και προστατευμένο με την τοσυλομάδα πυρήνα ινδολίου (Ομάδα II).



Σχήμα 4.56 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης των πενταφθοροαιθυλο-κετονών που περιέχουν προστατευμένο πυρήνα του ινδολίου (Ομάδα III).

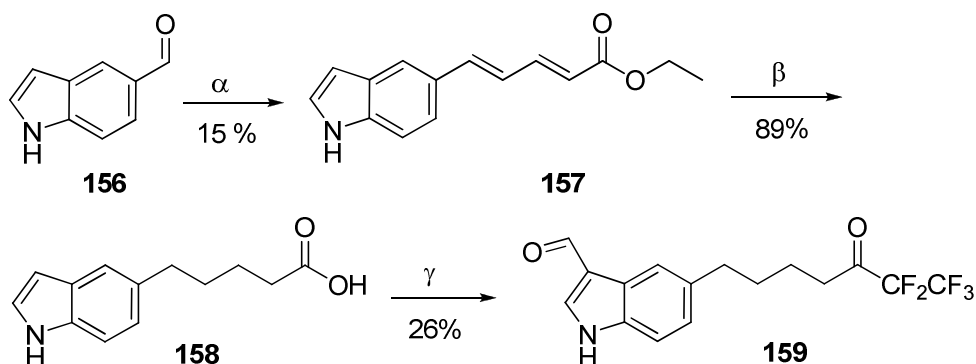


Σχήμα 4.57 Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης πενταφθοροαιθυλο-κετόνης που περιέχει πυρήνα κουμαρίνης (Ομάδα IV).

2.2 Σύνθεση της φθοροκετονικής ένωσης της ομάδας I

2.2.1 Σύνθεση της 5-(6,6,7,7,7-πενταφθορο-5-οξοεπυλ)-1H-3-καρβαλδεΐδης του ινδολίου

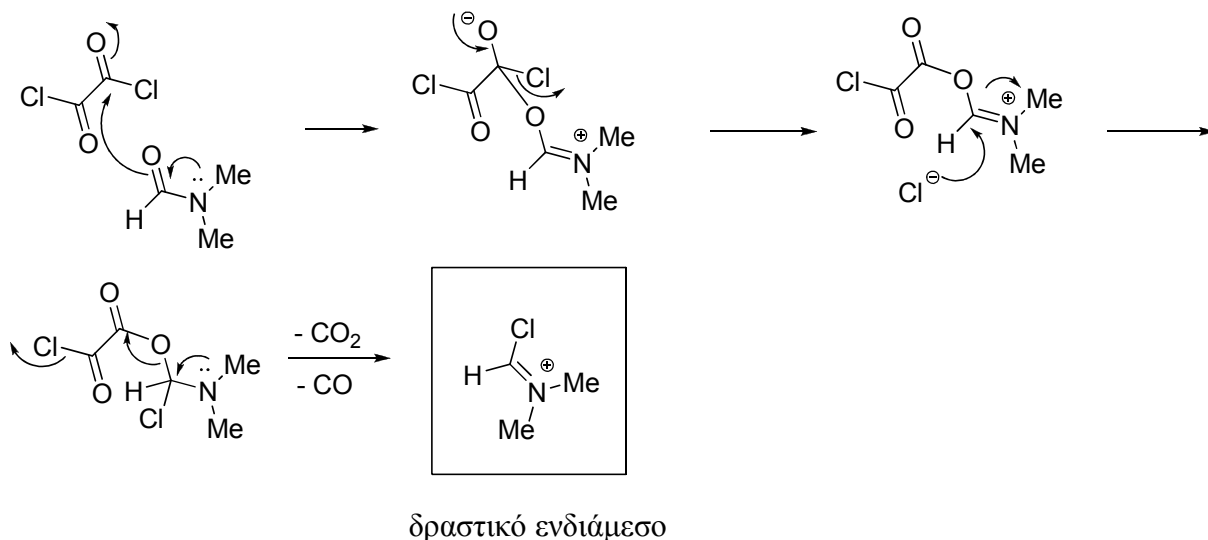
Ξεκινώντας με πρώτη ύλη την εμπορικά διαθέσιμη αλδεΐδη του ινδολίου **156** πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ολεφινοποίησης Horner – Wadsworth – Emmons με την επίδραση της τετραμεθυλογουανιδίνης (TMG) στον τριαιθυλο-4-φωσφοнокροτονικό διεστέρα **79** λαμβάνοντας έτσι την ένωση **157** (Σχήμα 4.58). Στην περίπτωση της σύνθεσης αυτής δεν χρησιμοποιήθηκε η βάση LiOH που είναι η συνήθης βάση για αυτού του είδους την επιμήκυνση καθώς η αντίδραση δεν παρουσίαζε κανένα προϊόν. Παρόμοια ισχύει και για το υδρίδιο του νατρίου, το οποίο δοκιμάστηκε ως εναλλακτική βάση. Συνεπώς, με καταλυτική υδρογόνωση με 10% Pd/C στον ακόρεστο εστέρα **157** και σαπωνοποίηση παραλήφθηκε το κορεσμένο οξύ **158**. Για να ληφθεί το τελικό προϊόν **159**, το οξύ **158** μετατράπηκε σε άκυλο χλωρίδιο με τη χρήση του οξάλυλο χλωριδίου και DMF σε CH₂Cl₂ και στη συνέχεια κατεργάστηκε με πυριδίνη και πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη (Σχήμα 4.58).



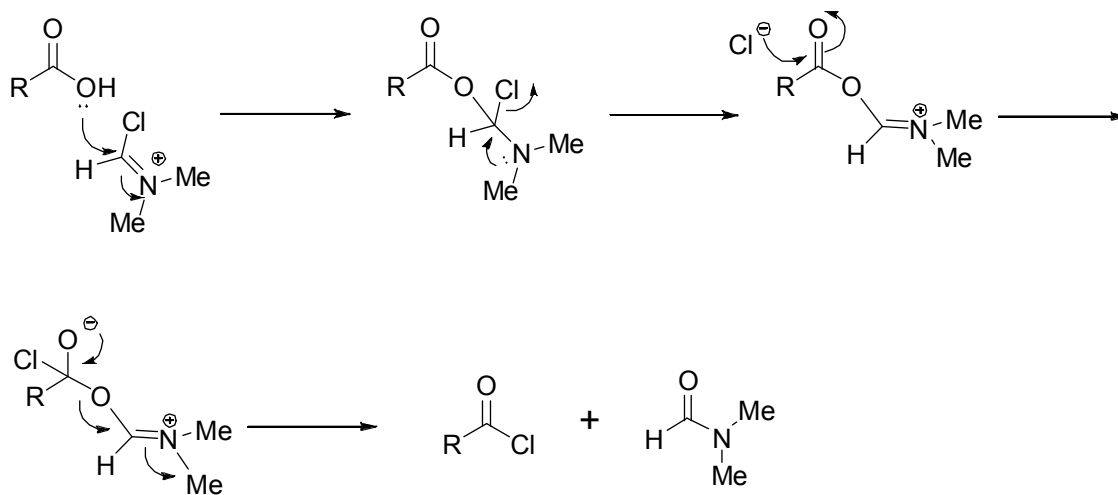
Σχήμα 4.58 α) C₂H₅COOCH=CHCH₂P(=O)(OC₂H₅)₂ (**79**), TMG, THF, β) i) H₂, 10% Pd/C, CH₃CH₂OH, ii) NaOH 1N, CH₃CH₂OH, γ) i) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, ii) πυριδίνη, (CF₃CF₂CO)₂O.

Η παρουσία του αλδεϋδικού ανθρακοατόμου στην ένωση **159** οφείλεται στην αντίδραση Vilsmeier – Haack που πραγματοποιείται σε αρωματικούς δακτυλίους με ετεροάτομα με την επίδραση του οξάλυλο χλωριδίου παρουσία DMF. Η ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη της αλδεϋδομάδας στην 3' θέση του αρωματικού δακτυλίου, αντί για οποιαδήποτε άλλη θέση του μορίου, προκαλείται λόγω του αζώτου και των ηλεκτρονίων του βάσει του μηχανισμού που φαίνεται παρακάτω στο σχήμα 4.62.

Η παρασκευή της φθοροκετόνης από το αντίστοιχο οξύ οφείλεται στην μετατροπή του οξέος στο ενδιάμεσο άκυλο χλωρίδιο με τον μηχανισμό που παρουσιάζεται στα σχήματα 4.59 και 4.60. Στην προκειμένη περίπτωση το DMF πραγματοποιεί πυρηνόφιλη προσβολή στο $(\text{COCl})_2$ η οποία έχει ως προϊόν ένα δραστικό ενδιάμεσο θετικά φορτισμένο (Σχήμα 4.59). Στη συνέχεια, το καρβοξυλικό οξύ προσβάλλει το δραστικό αυτό ενδιάμεσο και μετά από μια σειρά ενδιάμεσων σταδίων σχηματίζεται το άκυλο χλωρίδιο και αναγεννάται το DMF (Σχήμα 4.60).



Σχήμα 4.59

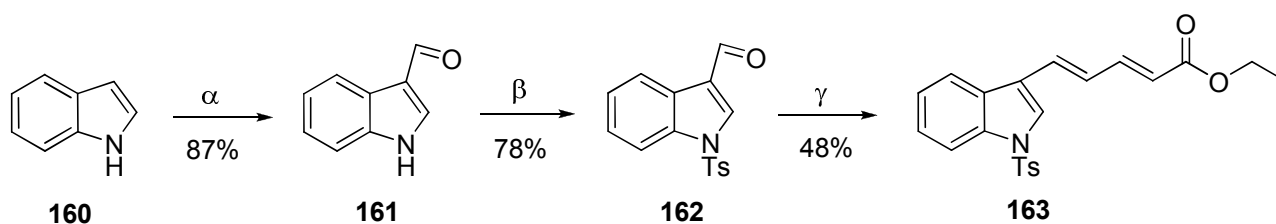


Σχήμα 4.60

2.3 Σύνθεση των φθοροκετονικών παραγώγων της ομάδας II

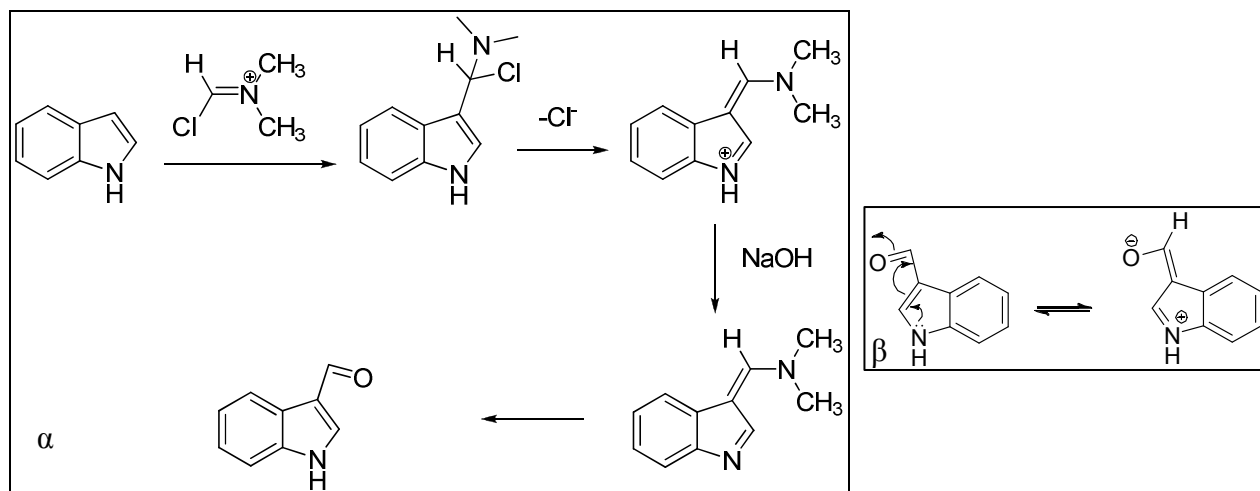
2.3.1 Σύνθεση της 1,1,1-τριφθορο-6-(1-τοσυλινδολιν-3-υλ)εξανόνης-2

Χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ινδόλιο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση φορμυλίωσης Vilsmeier – Haack με την επίδραση του οξάλυλο χλωριδίου και DMF σε βασικό περιβάλλον (Σχήμα 4.61). Η προστασία του αζώτου έλαβε χώρα καθώς ήταν αδύνατο να συνεχιστεί η συνθετική πορεία με ελεύθερη την αμίνη, αφού δοκιμάστηκε η συνήθης αντίδραση επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας με διάφορες παραλλαγές αλλά χωρίς να παραληφθεί το επιθυμητό προϊόν. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο συντονισμό μεταξύ του αρωματικού χαρακτήρα του δακτυλίου και της αλδεΐδης, όπως αποτυπώνεται στο σχήμα 4.62β. Συνεπώς, η παραγόμενη αλδεΐδη **161** προστατεύτηκε με την τοσυλομάδα και έπειτα αυξήθηκε η ανθρακική αλυσίδα με την αντίδραση ολεφίνοποίησης Horner – Wadsworth – Emmons και τη χρήση της βάσης TMG, η οποία αποδείχτηκε η πιο αποτελεσματική για τις αλδεΐδες του ινδολίου (Σχήμα 4.61).



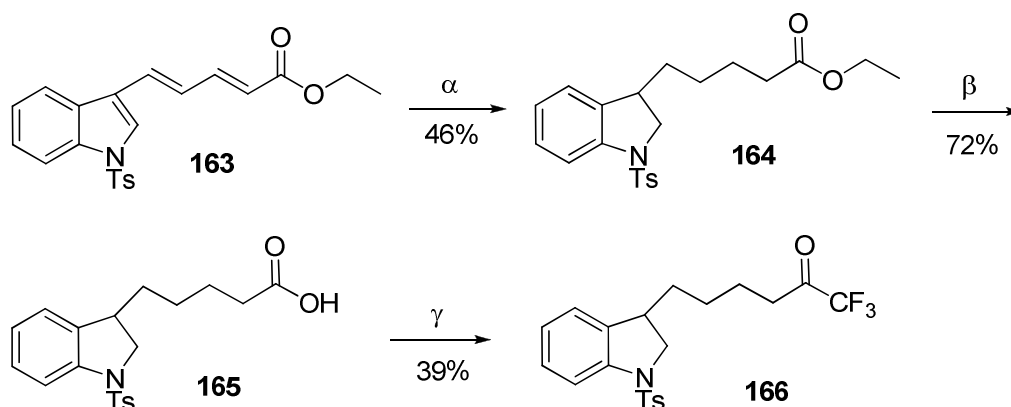
Σχήμα 4.61 α) $(\text{COCl})_2$, DMF, NaOH 9N, H_2O , β) TsCl, NaOH, CH_2Cl_2 , γ) $\text{C}_2\text{H}_5\text{COOCH}=\text{CHCH}_2\text{P}(=\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ (**79**), TMG, THF.

Ο μηχανισμός κατά τον οποίο προστίθεται η αλδεϋδομάδα στην 3' θέση του αρωματικού δακτυλίου του ινδολίου παρουσιάζεται στο σχήμα 4.62α και έχει σαν αρχικό στάδιο την παρασκευή του ίδιο δραστικού ενδιάμεσου με αυτόν του σχήματος 4.59 για την παραλαβή της φθοροκετόνης. Έπειτα, αφού γίνεται ηλεκτρονιόφιλη προσθήκη του ενδιάμεσου στον αρωματικό δακτύλιο στη θέση 3', με την επίδραση του καυστικού νατρίου σχηματίζεται η αλδεΐδη.



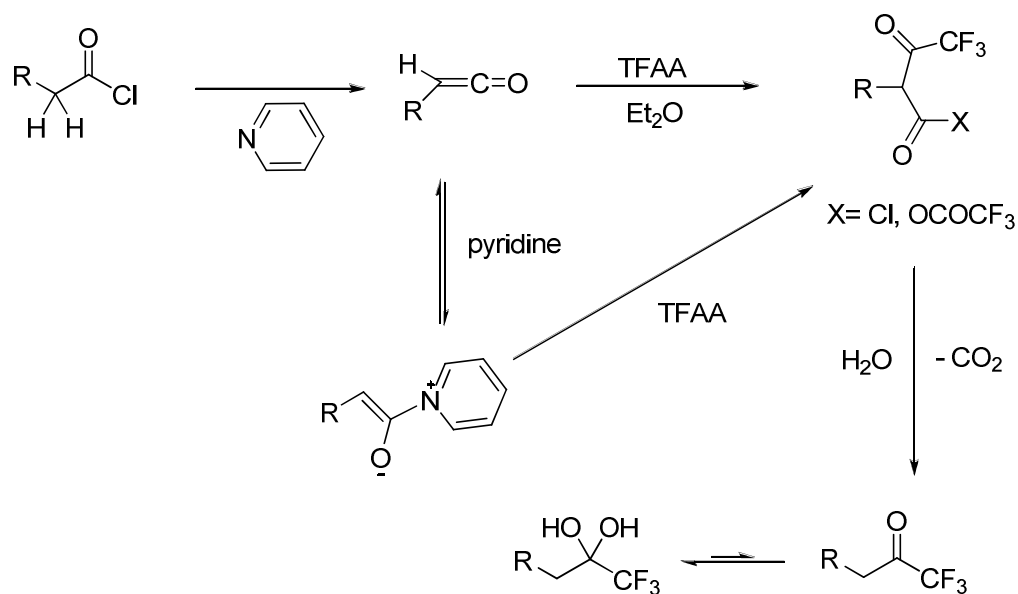
Σχήμα 4.62

Στη συνέχεια της συνθετικής πορείας ο ακόρεστος εστέρας **163** υπέστη καταλυτική υδρογόνωση παρουσία 10% Pd/C για 40 ώρες και ο παραγόμενος κορεσμένος αιθυλεστέρας **164** με σαπωνοποίηση μετατράπηκε στο αντίστοιχο οξύ **165**. Το οξύ αφού πρώτα μετατράπηκε σε άκυλο χλωρίδιο με (COCl)₂, DMF σε CH₂Cl₂ έπειτα κατεργάστηκε με πυριδίνη και τριφθοροξικό ανυδρίτη και τελικά έδωσε τη τριφθορομέθυλο κετόνη **166** (Σχήμα 4.63).



Σχήμα 4.63 α) H₂, 10% Pd/C, CH₃CH₂OH, 40 hrs, β) NaOH 1N, CH₃CH₂OH, γ) i) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, ii) πυριδίνη, (CF₃CO)₂O.

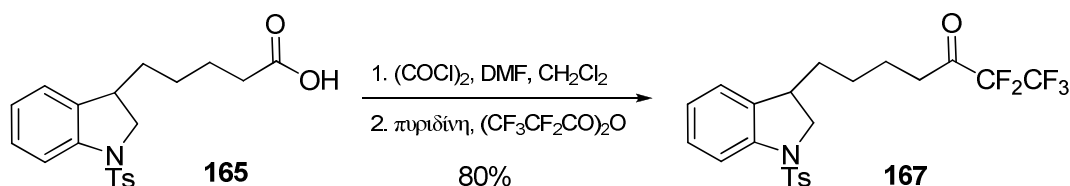
Ο προτεινόμενος μηχανισμός για τη σύνθεση των τριφθορομέθυλο κετονών από τα αντίστοιχα άκυλο χλωρίδια περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός κετενικού ενδιάμεσου που δημιουργείται από τη δράση της πυριδίνης (Σχήμα 4.64). Έπειτα, επιδρά σε αυτό ο τριφθοροξικός ανυδρίτης και με την προσθήκη νερού λαμβάνει χώρα αποκαρβοξυλίωση και σχηματίζεται το τελικό προϊόν. Σε υδατικά διαλύματα οι κετόνες βρίσκονται σε ισορροπία με τη μορφή του υδρίτη τους.



Σχήμα 4.64

2.3.2 Σύνθεση της 1,1,1,2,2-πενταφθορο-7- $\{1-[(4-μεθυλφαινυλ)σουλφονυλ-2,3-διϋδρο-1H-ινδολ-3-υλ]επτανόνης-3$

Το καρβοξυλικό οξύ **165** της προηγούμενης συνθετικής πορείας χρησιμοποιήθηκε και για τη σύνθεση της πενταφθοροαιθυλο-κετόνης **167** και υπέστη κατεργασία με οξάλυλο χλωρίδιο και DMF και εν συνεχεία προσθήκη πυριδίνης και πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη (Σχήμα 4.65).

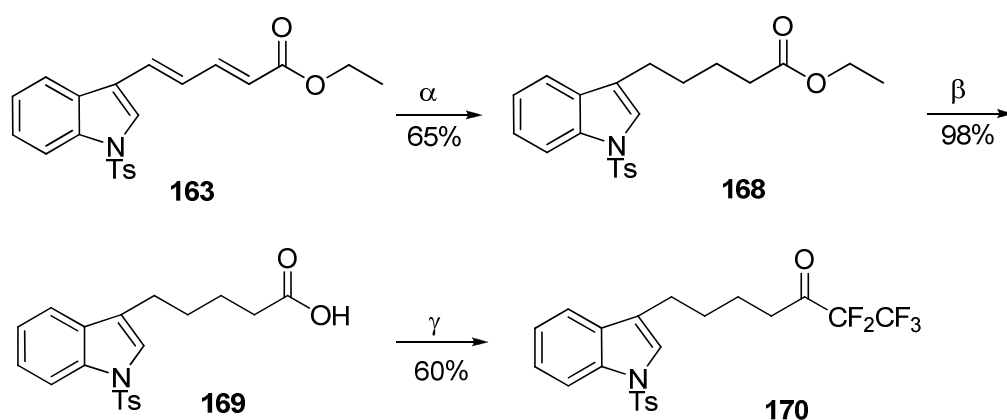


Σχήμα 4.65

2.4 Σύνθεση των φθοροκετονικών ενώσεων της ομάδας III

2.4.1 Σύνθεση της 1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-(1-τοσυλ-1H-ινδολ-3-υλ)επτανόνης-3

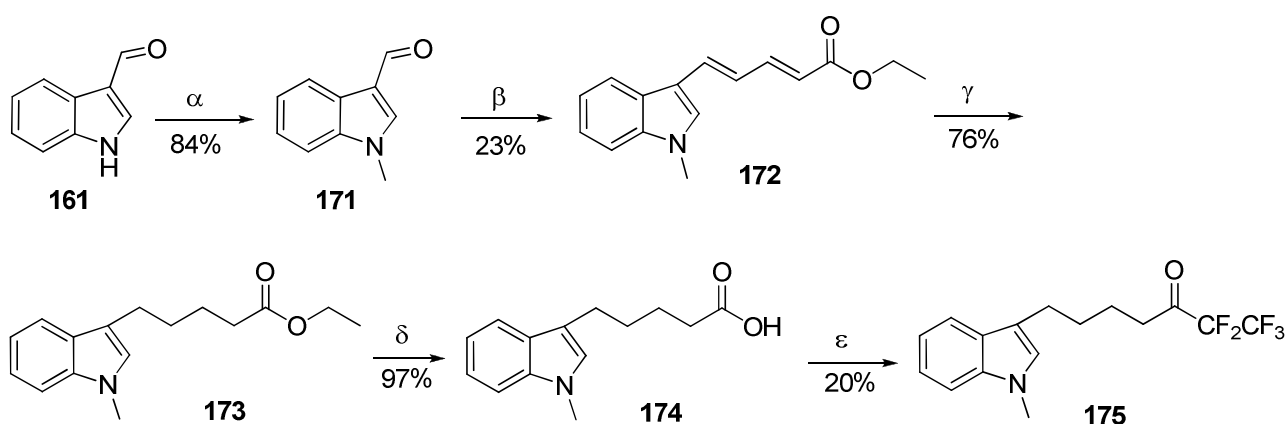
Για τη σύνθεση της πενταφθοροαιθυλο-κετόνης **170** χρησιμοποιήθηκε ο ακόρεστος αιθυλεστέρας **163** από την συνθετική πορεία 2.3.1, ο οποίος με καταλυτική υδρογόνωση διάρκειας 18 ωρών μας έδωσε τον αιθυλεστέρα **168**. Ακολούθησε σαπωνοποίηση και κατεργασία του παραγόμενου οξέος **169** με $(COCl)_2$, DMF σε CH_2Cl_2 και εν συνεχεία η επίδραση πυριδίνης και πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη έδωσε το τελικό προϊόν **170** (Σχήμα 4.66).



Σχήμα 4.66 α) H_2 , 10% Pd/C, CH_3CH_2OH , 18 hrs, β) NaOH 1N, CH_3CH_2OH , γ) i) $(COCl)_2$, DMF, CH_2Cl_2 , ii) πυριδίνη, $(CF_3CF_2CO)_2O$.

2.4.2 Σύνθεση της 1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ)επτανόνης-3

Η αλδεΐδη του ινδολίου που παρασκευάσαμε στην πορεία 2.3.1 προστατεύτηκε στη θέση του αζώτου με τη μεθυλομάδα και ακολούθησε αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας με τη μέθοδο Horner – Wadsworth – Emmons δίνοντας τον εστέρα **172** (Σχήμα 4.67). Η ένωση **172** υποβλήθηκε σε καταλυτική υδρογόνωση και σαπωνοποίηση για να δώσει το κορεσμένο οξύ **174** το οποίο κατεργάστηκε με $(\text{COCl})_2$, DMF σε CH_2Cl_2 . Η in situ επίδραση πυριδίνης και πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη στο παραγόμενο άκυλο χλωρίδιο παρήγαγε το τελικό προϊόν **175** (Σχήμα 4.67).

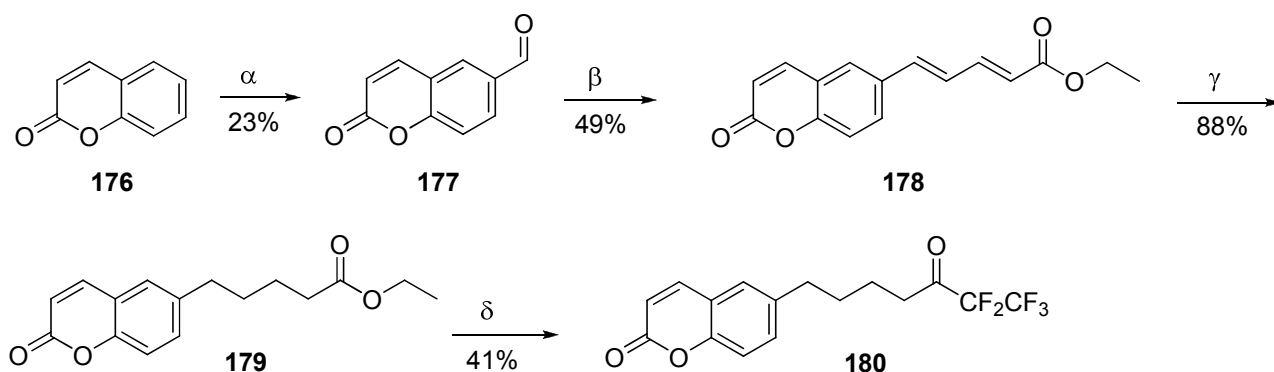


Σχήμα 4.67 α) NaH , CH_3I , THF , β) **79**, $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, THF , γ) H_2 , 10% Pd/C , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, δ) NaOH 1N, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, ϵ) i) $(\text{COCl})_2$, DMF, CH_2Cl_2 , ii) πυριδίνη, $(\text{CF}_3\text{CF}_2\text{CO})_2\text{O}$.

2.5 Σύνθεση της φθοροκετονικής ένωσης της ομάδας IV

2.5.1 Σύνθεση της 6-(6,6,7,7,7-πενταφθορο-5-οξοεπτυλ)-2H-χρωμενόνης-2

Πρώτη ύλη για αυτήν την πορεία υπήρξε η κουμαρίνη η οποία με την αντίδραση Reimer – Tiemann όπου η επίδραση χλωροφορμίου και μιας ισχυρής βάσης (KOH) έδωσε την αλδεΐδη **177** (Σχήμα 4.68). Οι αντιδράσεις που ακολούθησαν για την παραλαβή του τελικού προϊόντος **180** είναι παρόμοιες με τις προηγούμενες συνθετικές πορείες και είναι κατά σειρά οι εξής: αντίδραση ολεφινοποίησης Horner – Wadsworth – Emmons, καταλυτική υδρογόνωση, σαπωνοποίηση, κατεργασία με οξάλυλο χλωρίδιο, πυριδίνη και πενταφθοροπροπιονικό ανυδρίτη (Σχήμα 4.68).



Σχήμα 4.68 α) 30% KOH, CHCl₃, β) 79, NaH, THF, γ) i) H₂, 10% Pd/C, CH₃CH₂OH, ii) NaOH 1N, CH₃CH₂OH, δ) i) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, ii) πυριδίνη, (CF₃CF₂CO)₂O.

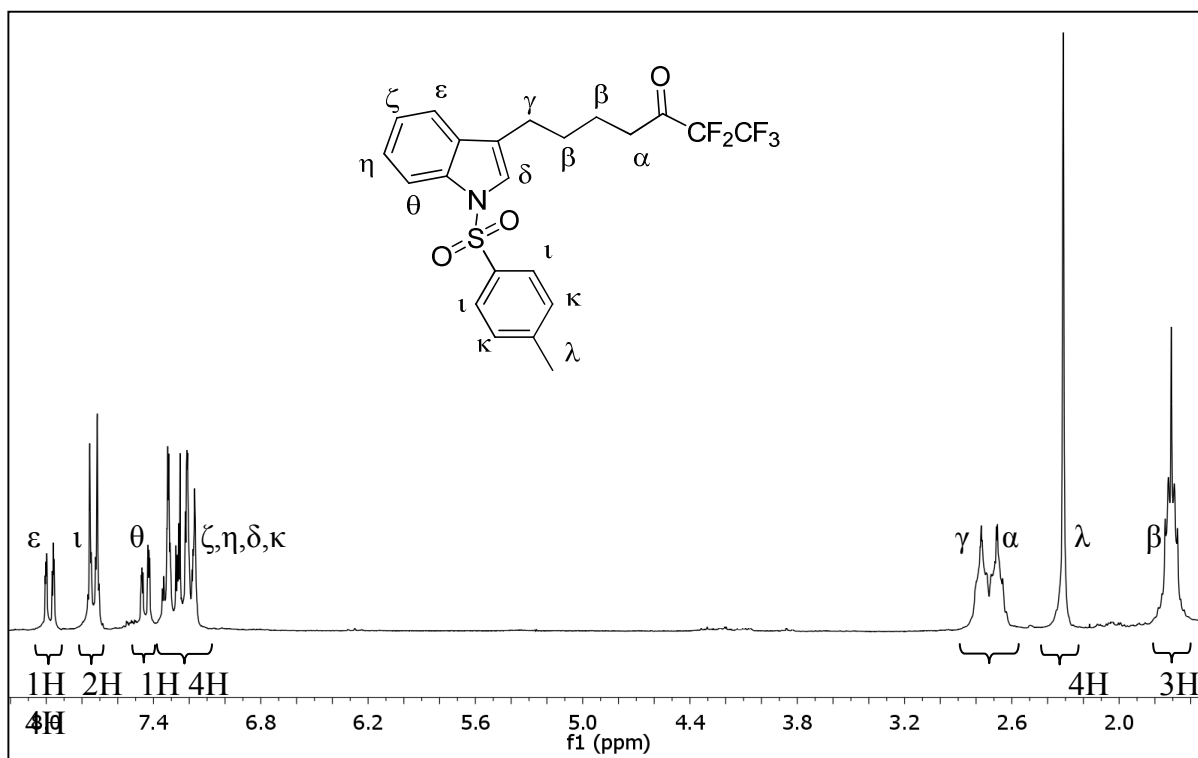
3. Επιλεγμένα φασματοσκοπικά δεδομένα φθοροκετονών

Σύμφωνα με το σχήμα 4.69 όπου φαίνεται το φάσμα ¹H NMR της ένωσης **170**, τα αρωματικά πρωτόνια ϵ και θ του ινδολίου εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 7.98 και 7.45 ppm με σταθερές σύζευξης $J = 7.4$ Hz και 6.6 Hz, αντίστοιχα. Ανάμεσά τους στα 7.74 ppm μετατοπίζονται σε διπλή κορυφή δύο αρωματικά πρωτόνια της τοσυλο-ομάδας και τα υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια του μορίου εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές στα 7.36 – 7.14 ppm. Τα δύο ζεύγη μεθυλενικών πρωτονίων εμφανίζονται ως πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 2.82 – 2.61 ppm και τα άλλα δύο ζεύγη πάλι ως πολλαπλή στα 1.78 – 1.64 ppm. Τέλος, το μεθύλιο της τοσυλομάδας δίνει μια απλή κορυφή στα 2.31 ppm.

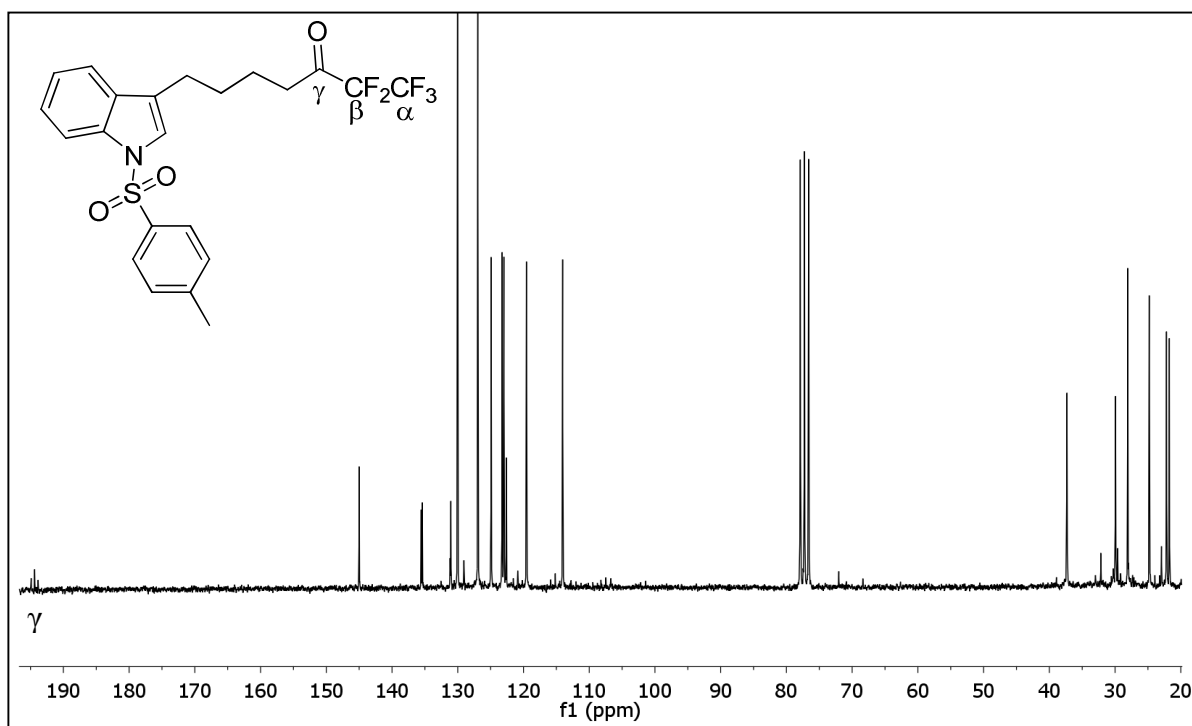
Στο φάσμα ¹³C NMR που φαίνεται στο σχήμα 4.70 διακρίνουμε την τριπλή κορυφή του καρβονυλίου της κετόνης στα 194.1 ppm, η οποία διασχίζεται λόγω της ύπαρξης φθορίου στον διπλανό άνθρακα με $J = 26.1$ Hz. Έπειτα, διακρίνονται οι μετατοπίσεις των αρωματικών ανθράκων στα 144.7, 135.3, 135.2, 130.8, 129.8, 128.8, 126.7, 124.7, 123.0, 122.7, 122.4, 119.3 και 113.8 ppm. Στην περιοχή 125.0 – 110.0 ppm παρατηρείται μια κορυφή τετραπλή τριπλών με μέσο στα 117.8 ppm που ανήκει στον CF₃ και οι σταθερές σύζευξής της είναι $J_{C-F} = 34.1$ Hz, $J_{C-C-F} = 285.3$ Hz. Επίσης, στην ίδια περιοχή εμφανίζεται μια τριπλή τετραπλών με μέσο στα 106.8 ppm του CF₂ με $J_{C-F} = 37.9$ Hz, $J_{C-C-F} = 265.2$ Hz. Οι διασχίσεις αυτών των κορυφών οφείλονται στα φθόρια του ίδιου και του διπλανού άνθρακα και αποτυπώνονται καθαρότερα στο σχήμα 4.71 που αποτελεί μεγέθυνση της περιοχής αυτής.

Στο σχήμα 4.72, φαίνονται και οι μετατοπίσεις των φθορίων της ένωσης **170** στο φάσμα ¹⁹F NMR, οι οποίες είναι – 82.3 ppm για το CF₃ και – 123.7 ppm για το CF₂. Επίσης, το σχήμα 4.73

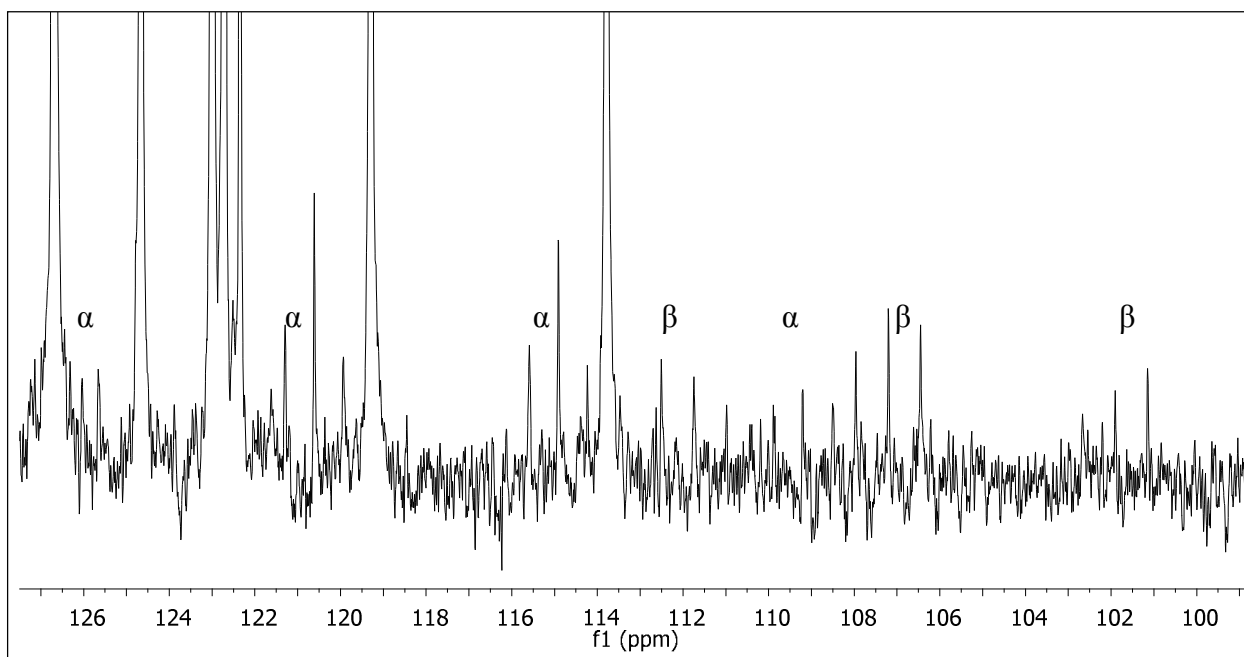
αποτελεί το φάσμα HRMS (αρνητικών ιόντων) της φθοροκετόνης αυτής όπου η θεωρητική τιμή του ιόντος υπολογίστηκε 472.1011 και μετρήθηκε 472.1016 που αντιστοιχεί στο $[M-H]^-$. Στο φάσμα IR της φθοροκετόνης **170** που απεικονίζεται στο σχήμα 4.74 φαίνεται η χαρακτηριστική απορρόφηση του C=O στα 1754 cm^{-1} .



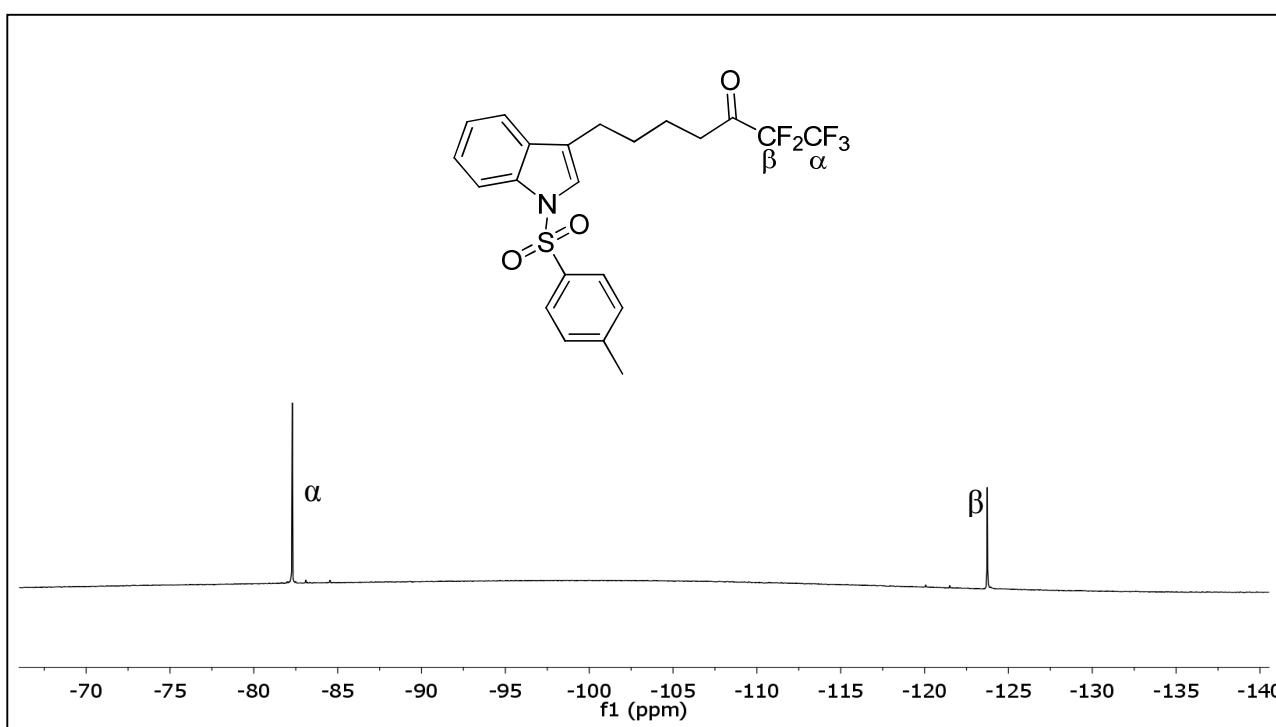
Σχήμα 4.69 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **170** σε CDCl_3 .



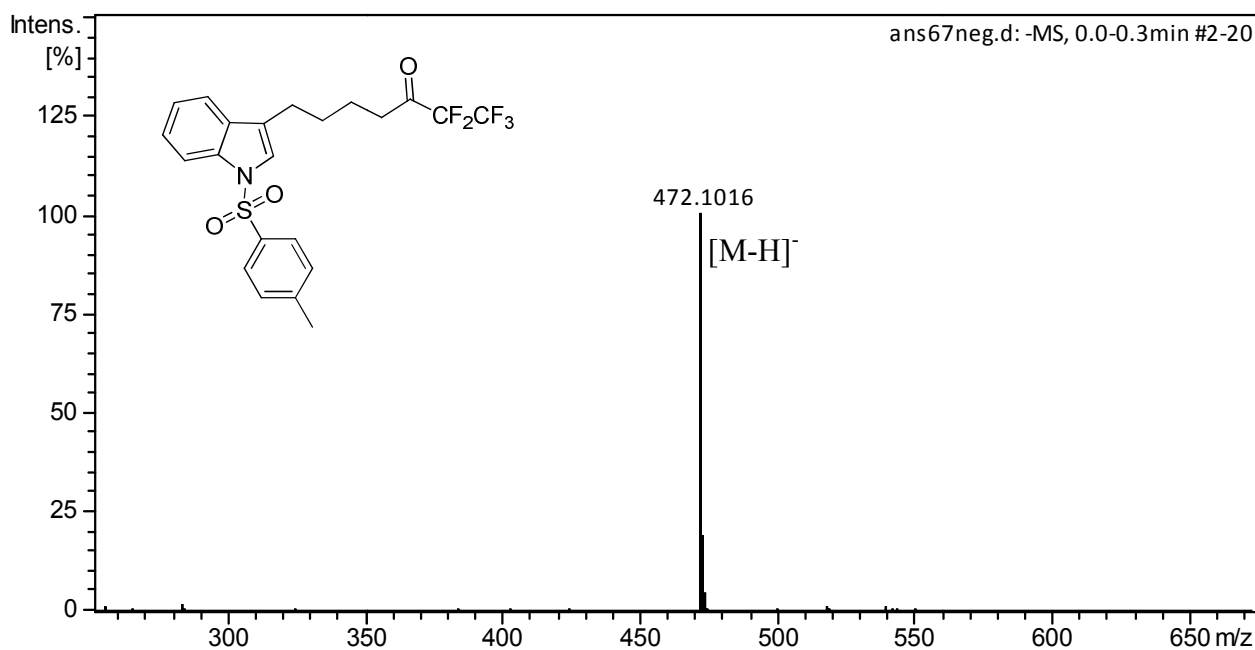
Σχήμα 4.70 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **170** σε CDCl_3 .



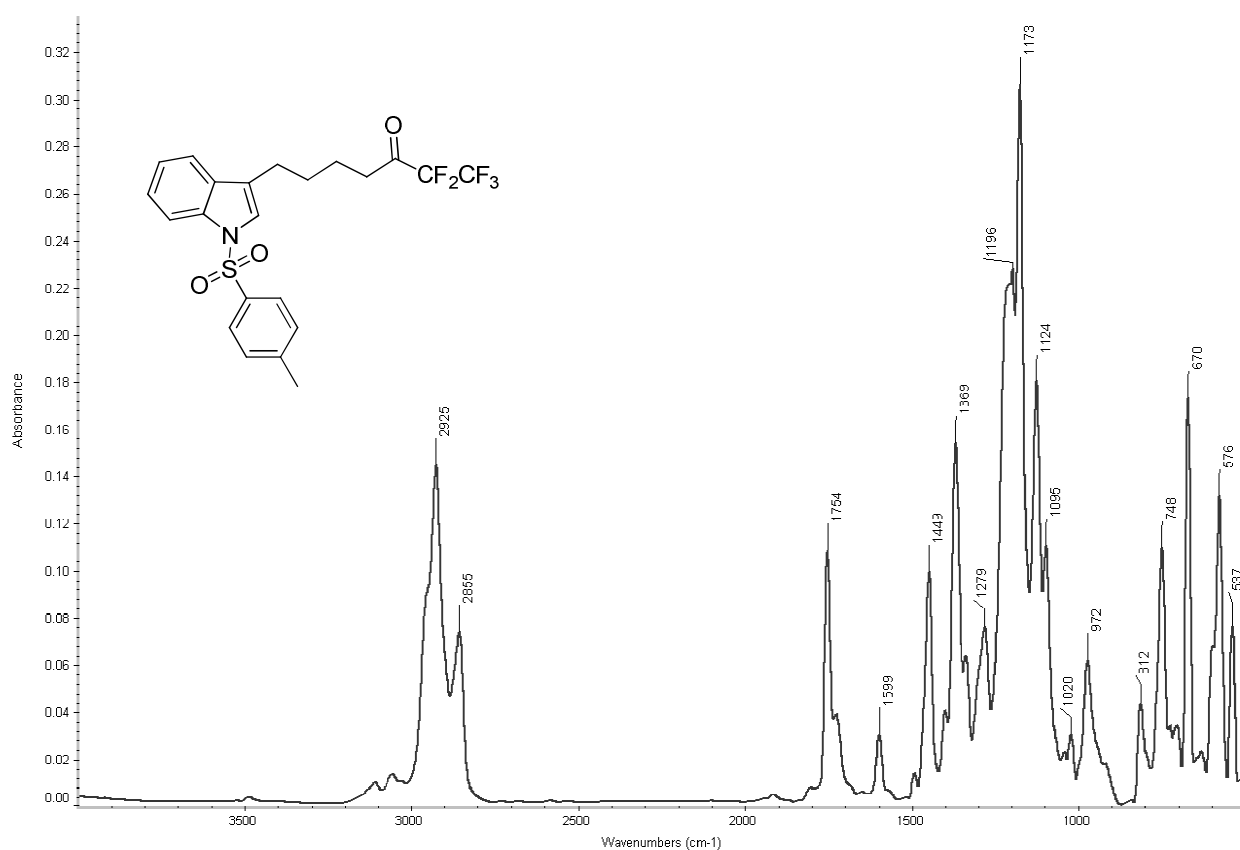
Σχήμα 4.71 Μεγέθυνση της περιοχής 130-100 ppm του φάσματος ^{13}C NMR της ένωσης **170** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.72 Φάσμα ^{19}F NMR της ένωσης **170** σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.73 Φάσμα HRMS της ένωσης 170.



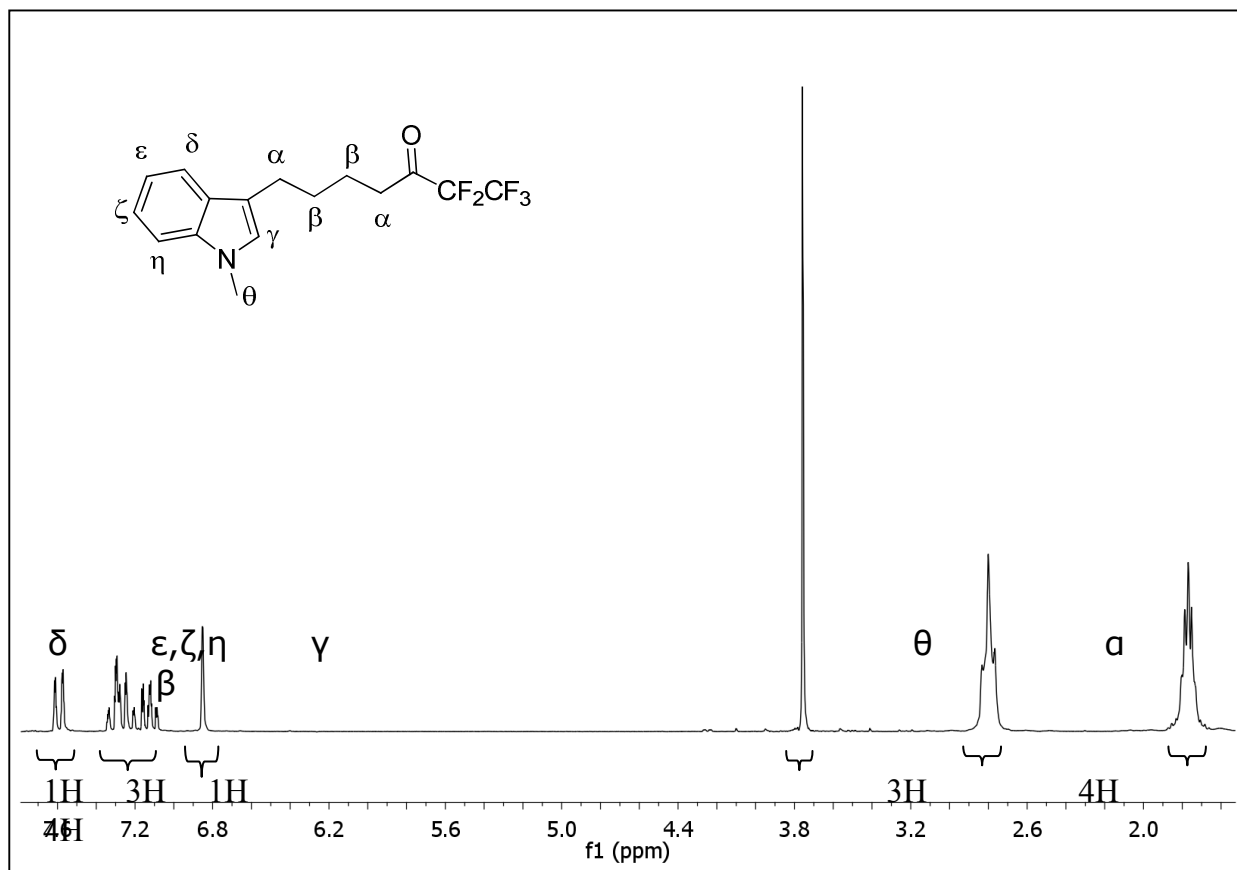
Σχήμα 4.74 Φάσμα IR της ένωσης 170.

Στο σχήμα 4.75 φαίνεται το φάσμα ¹H NMR της πενταφθοροαιθύλο κετόνης **175**, όπου διακρίνεται η μετατόπιση ενός αρωματικού πρωτονίου ως διπλή κορυφή στα 7.59 ppm με $J = 7.8$ Hz και ενός ως απλή κορυφή στα 6.85 ppm ενώ τα υπόλοιπα αρωματικά μετατοπίζονται ως

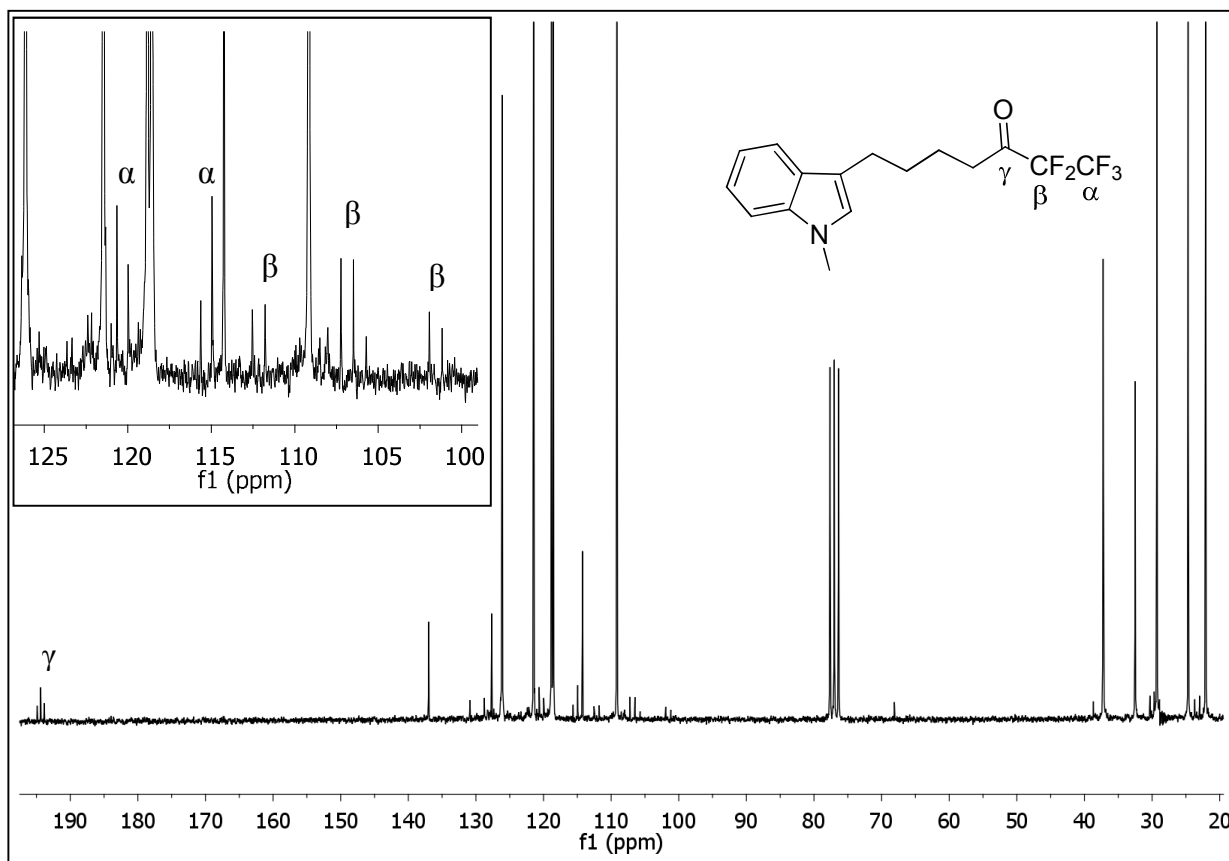
πολλαπλές κορυφές στην περιοχή 7.36 – 7.06 ppm. Έπειτα, φαίνεται η μετατόπιση του μεθυλίου ως απλή κορυφή στα 3.76 ppm και τα ζεύγη των μεθυλενίων μετατοπίζονται ως δύο πολλαπλές κορυφές στις περιοχές 2.88 – 2.71 και 1.84 – 1.70 ppm.

Στο φάσμα ^{13}C NMR της εν λόγω ένωσης που φαίνεται στο σχήμα 4.76 διακρίνουμε την τριπλή κορυφή του καρβονυλίου της κετόνης στα 194.4 ppm, η οποία διασχίζεται λόγω της ύπαρξης φθορίου στον διπλανό άνθρακα με $J = 26.3$ Hz. Οι αρωματικοί άνθρακες μετατοπίζονται στα 137.0, 127.7, 126.1, 121.5, 118.8, 118.6, 115.6 και 109.1 ppm ενώ στην περιοχή 125.0 – 100.0 ppm φαίνονται οι μετατοπίσεις των CF_2 , CF_3 ως εξής: μια τετραπλή τριπλών με μέσο τα 117.8 ppm για το CF_3 και $J_{\text{C-F}} = 34.0$ Hz, $J_{\text{C-C-F}} = 285.2$ Hz, και μια τριπλή τετραπλών στα 106.9 ppm για το CF_2 με $J_{\text{C-F}} = 37.7$ Hz, $J_{\text{C-C-F}} = 265.2$ Hz.

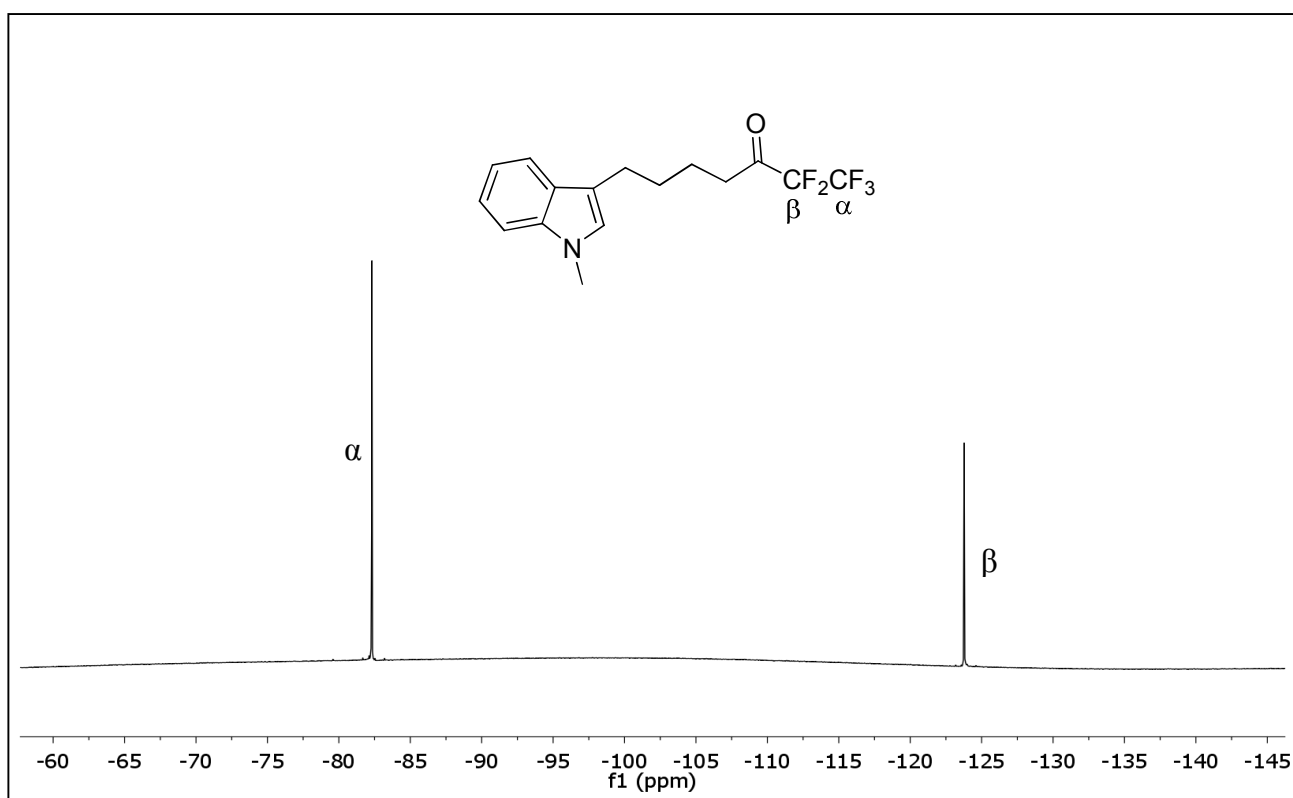
Έπειτα, στο φάσμα ^{19}F NMR του σχήματος 4.77, αποτυπώνονται οι μετατοπίσεις των φθορίων οι οποίες είναι – 82.3 ppm για το CF_3 και – 123.8 ppm για το CF_2 . Το φάσμα HRMS (αρνητικών ιόντων) του φθοροκετονικού παραγώγου **175** παρουσιάζεται στο σχήμα 4.78 όπου το ιόν της μάζας που μετρήθηκε ήταν 332.1086 και αντιστοιχεί στο $[\text{M-H}]^-$ ενώ η θεωρητική τιμή ήταν 332.1079. Στο σχήμα 4.79 παρουσιάζεται το φάσμα IR της ένωσης αυτής όπου στα 3054 cm^{-1} παρατηρείται η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ του διπλού δεσμού ενώ ο δεσμός $\text{C}=\text{O}$ απορροφά στα 1754 cm^{-1} .



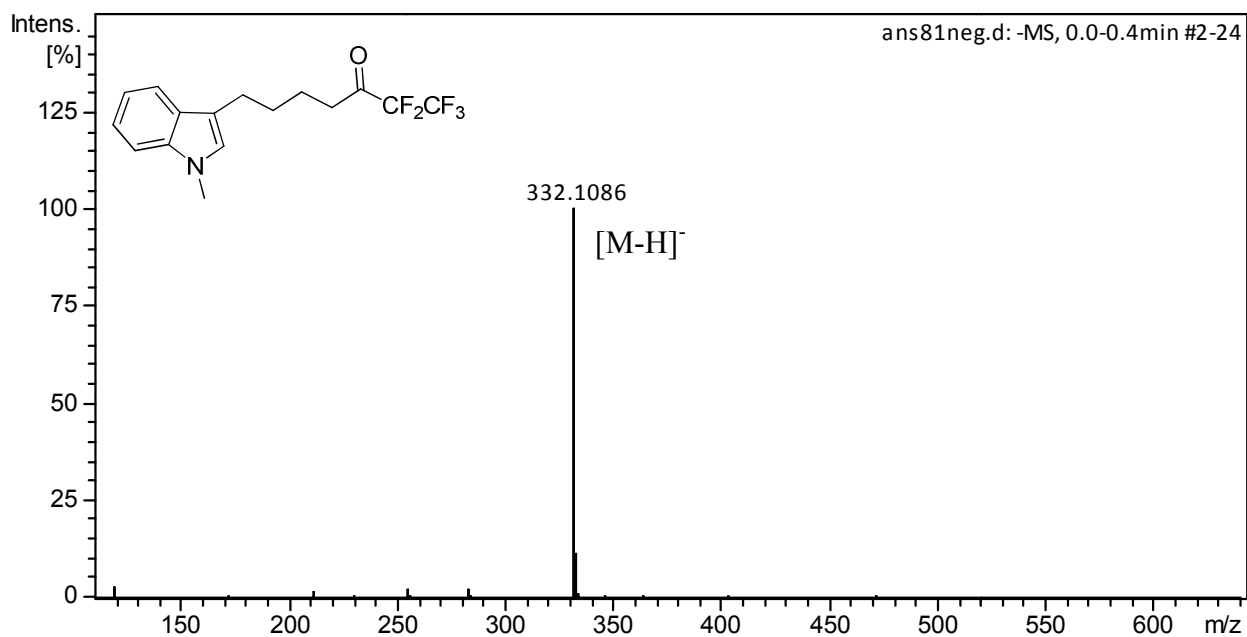
Σχήμα 4.75 Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **175** σε CDCl_3 .



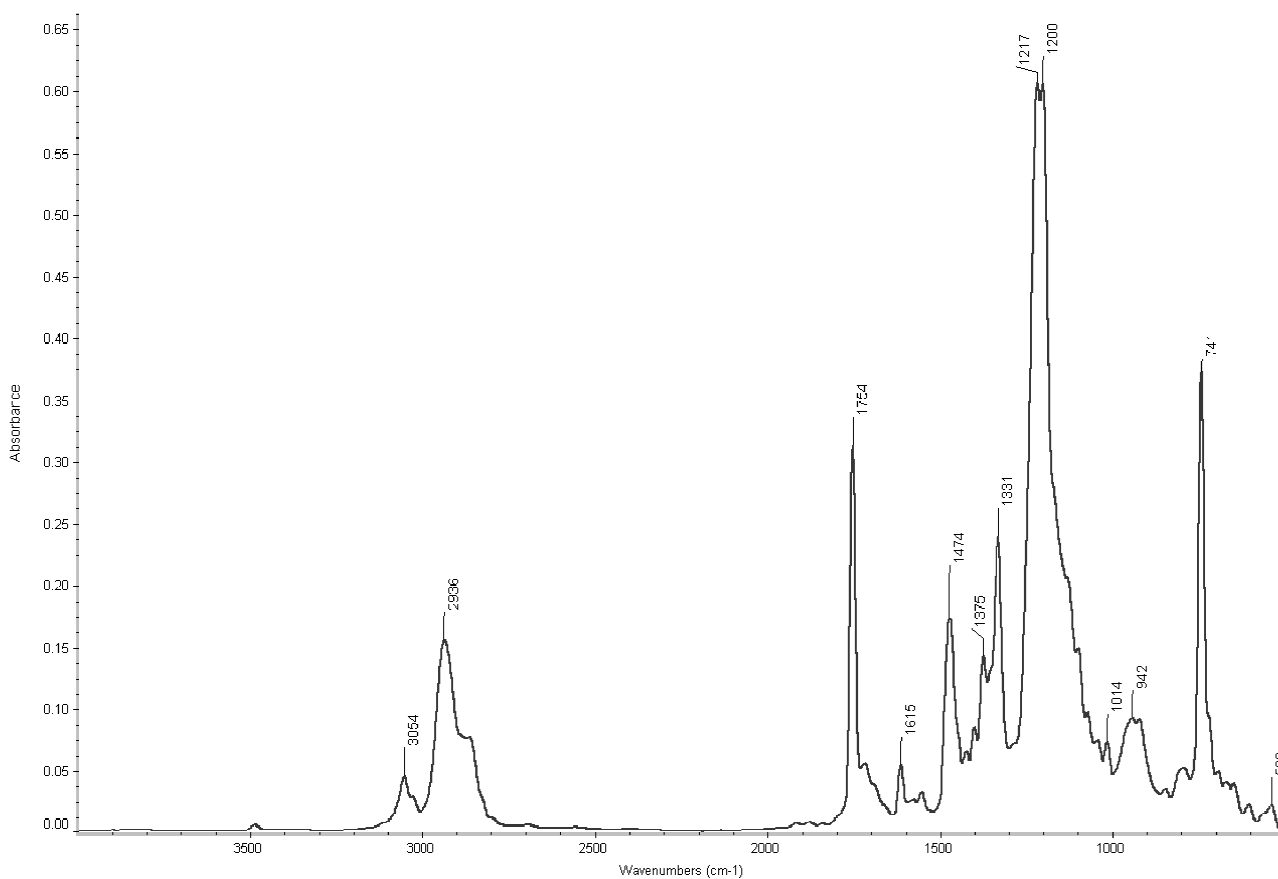
Σχήμα 4.76 Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 175 σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.77 Φάσμα ^{19}F NMR της ένωσης 175 σε CDCl_3 .



Σχήμα 4.78 Φάσμα HRMS της ένωσης 175.

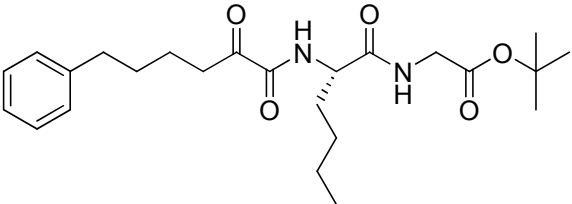
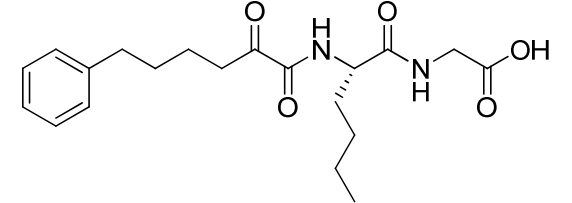
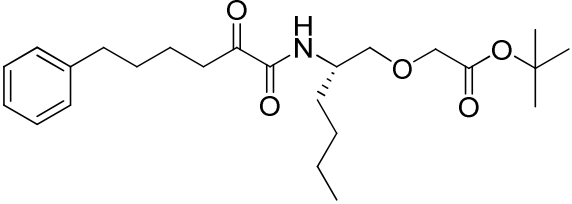
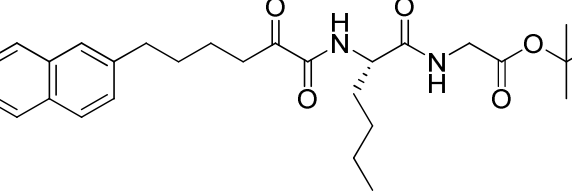


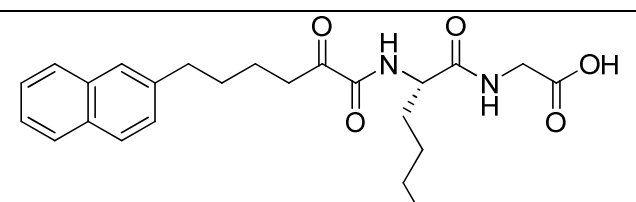
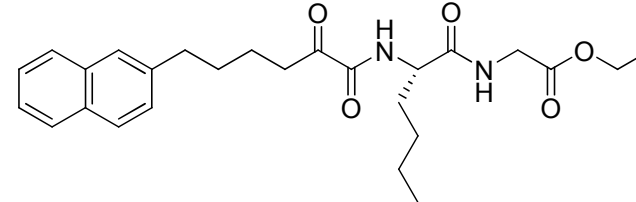
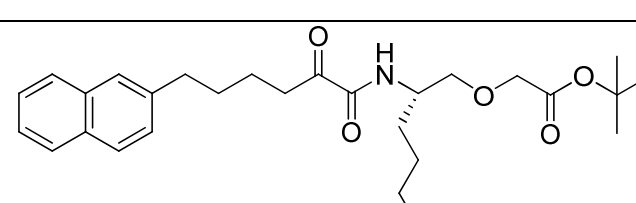
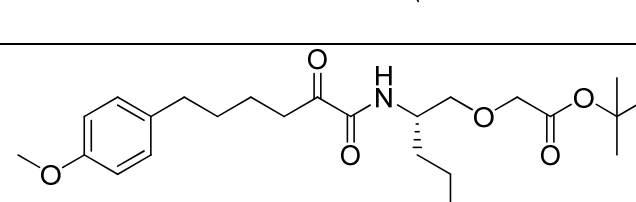
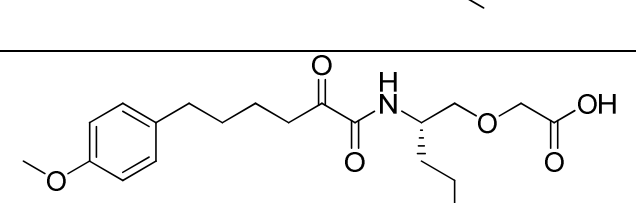
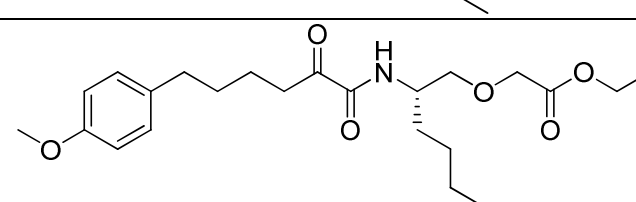
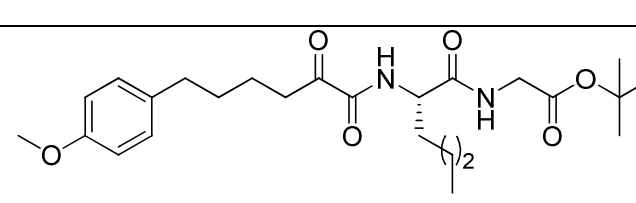
Σχήμα 4.79 Φάσμα IR της ένωσης 175.

Γ. Μελέτη της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων έναντι της iPLA₂

Τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα και οι φθοροκετονικές ενώσεις που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή δοκιμάστηκαν σε *in vitro* πειράματα για τον προσδιορισμό της αναστολής τους ως προς τις ανθρώπινες ενδοκυτταρικές φωσφολιπάσες A₂. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δράση των ενώσεων ως προς τις GIVA cPLA₂, GVIA iPLA₂ και GV sPLA₂ με τη μέθοδο των μικτών μικκυλίων όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία⁹⁸. Για τη μελέτη αυτή υπολογίστηκε αρχικά η αναστολή που προκαλούν οι ενώσεις σε μοριακό κλάσμα 0,091 και για όσες παρουσίασαν ποσοστό αναστολής >95% υπολογίστηκε και το X_I (50). Η μελέτη αυτή έγινε στο Εργαστήριο του Καθηγητή Edward A. Dennis (Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, San Diego). Στους πίνακες 4.3 και 4.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των 2-οξοαμιδικών παραγώγων.

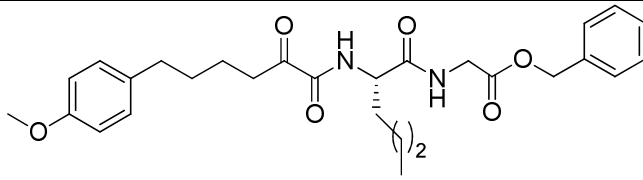
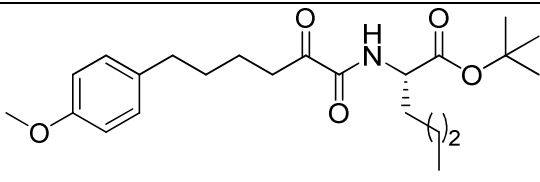
Πίνακας 4.3 Αποτελέσματα αναστολής των PLA₂ από τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα. Το ποσοστό αναστολής έχει υπολογιστεί σε μοριακό κλάσμα 0.091. Το N.D. αντιπροσωπεύει ενώσεις με ποσοστό αναστολής λιγότερο από 25% (ή μη ανιχνευθείσα αναστολή).

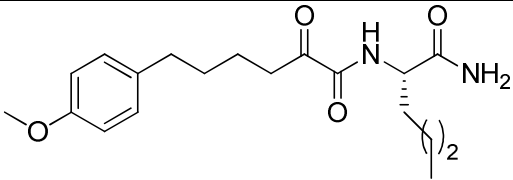
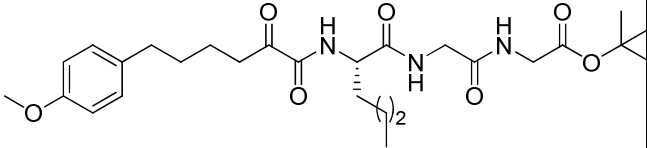
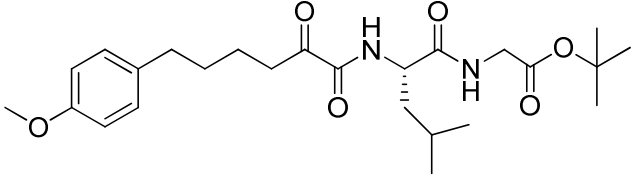
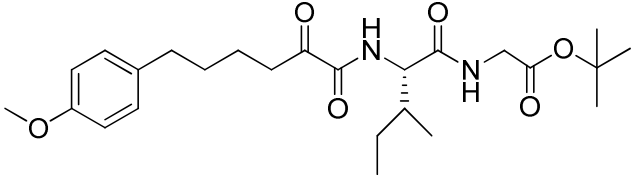
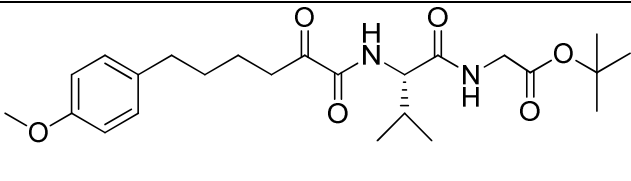
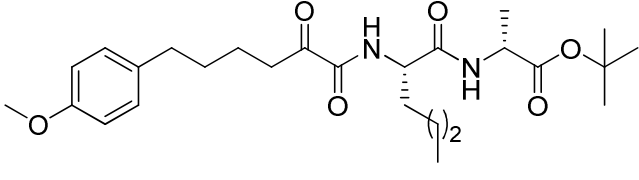
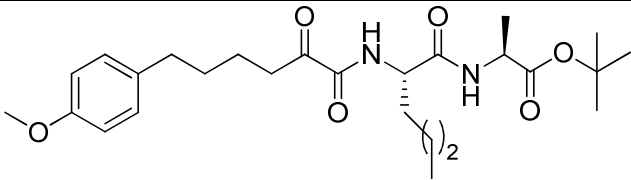
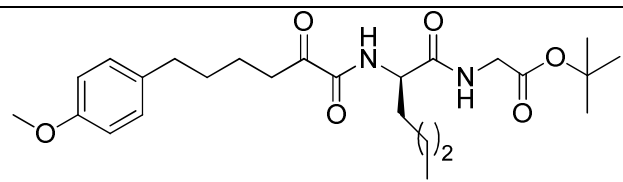
No	Δομή	GVIA	GIVA	GV
		iPLA ₂	cPLA ₂	sPLA ₂
		% αναστολή	% αναστολή	% αναστολή
GK218		91.1	46.9	43.4
GK223		N.D.	N.D.	N.D.
GK219		76.0	82.3	57.5
GK221		89.1	57.5	44.8

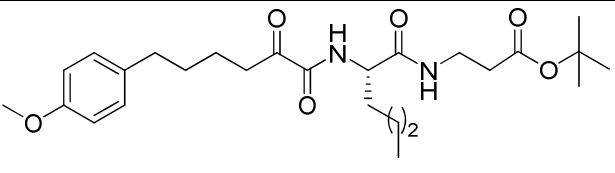
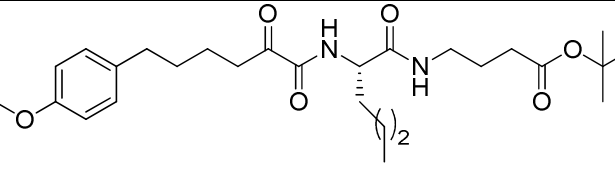
GK225		N.D.	43.1	N.D.
GK220		77.1	70.5	54.4
GK222		88.4	85.5	63.9
90, GK273		93.6		
96, GK274		N.D.		
95, GK275		75.2		
105, GK293		96.5 $X_I(50) = 0.012 \pm 0.002$	40.2	45.3

Τα αρχικά αποτελέσματα έδειξαν ότι τα 2-οξοαμιδικά παράγωγα που περιέχουν καρβοξυλικό οξύ (**GK223**, **GK225**, **GK274**) δεν αναστέλλουν τη φωσφολιπάση iPLA₂ καθόλου οπότε δεν είναι προτιμητέες δομές. Έπειτα, οι δομές που περιέχουν το διπεπτίδιο νορλευκίνης – γλυκίνης και έναν αρωματικό δακτύλιο φαίνεται να αποτελούν καλούς αναστολείς για την iPLA₂ ειδικά όταν περιλαμβάνουν *tert*-βουτυλεστέρα έναντι του αιθυλεστέρα. Έτσι, οι ενώσεις **GK218**, **GK221** και **GK293** παρουσιάζουν την μεγαλύτερη εκλεκτικότητα έναντι της iPLA₂ εκ των οποίων ο **GK293** να είναι ο ισχυρότερος αναστολέας με 96.5% αναστολή και X_I(50)= 0.012. Οι αντίστοιχες δομές των ψευδοδιπεπτιδίων (**GK219**, **GK222**, **GK273**, **GK275**) παρουσίασαν μέτρια προς καλή αναστολή και για τις τρεις κύριες φωσφολιπάσες με αποτέλεσμα να μην υπάρχει εκλεκτικότητα. Η δράση του αναστολέα **GK293** μας έδειξε ότι το ένζυμο προτιμά τον συνδυασμό του διπεπτιδίου νορλευκίνη – γλυκίνη, του *tert*-βουτυλεστέρα και την παρουσία του παρα-υποκατεστημένου αρωματικού πυρήνα σε απόσταση τεσσάρων ανθρακοατόμων από το οξοαμιδικό κέντρο. Έτσι, η μετέπειτα έρευνα βασίστηκε στη σύνθεση αναλόγων αυτού του αναστολέα.

Πίνακας 4.4 Αποτελέσματα αναστολής PLA₂ από 2-οξοαμιδικά παράγωγα. Το ποσοστό αναστολής έχει υπολογιστεί σε μοριακό κλάσμα 0.091. Το N.D. αντιπροσωπεύει ενώσεις με ποσοστό αναστολής λιγότερο από 25% (ή μη ανιχνευθείσα αναστολή).

No	Δομή	GVA iPLA ₂	GVA cPLA ₂	GV sPLA ₂
		% αναστολή	% αναστολή	% αναστολή
120, GK315		98.6 ± 1.3 X _I (50)= 0.026 ± 0.008	52.3 ± 1.2	N.D.
99, GK291		60.0	85.7	60.6

102, GK316		66.2 ± 4.0	29.3 ± 2.5	31.1 ± 3.1
130, GK294		66.5	27.1	N.D.
150, GK320		98.5 ± 1.8 $X_I(50) = 0.024 \pm 0.06$	51.6 ± 4.2	40.8 ± 5.2
155, GK321		81.8 ± 4.6	57.3 ± 3.3	48.2 ± 9.3
145, GK322		85.7 ± 1.7	35.4 ± 4.4	47.1 ± 4.0
140, GK290		87.1	73.4	49.9
134, GK319		87.5 ± 1.9	57.4 ± 3.1	46.6 ± 6.6
125, GK318		97.5 ± 1.2 $X_I(50) = 0.04 \pm 0.01$	68.0 ± 0.4	39.3 ± 4.6

111, GK292		83.1	37.8	32.5
117, GK317		99.9 ± 0.3 $X_I(50) =$ 0.007 ± 0.001	52.6 ± 2.5	44.8 ± 4.5

Τα αποτελέσματα από την μελέτη της *in vitro* αναστολής των ενώσεων του πίνακα 4.4 έδειξαν ότι η μείωση του μήκους του πεπτιδικού μέρους του αναλόγου όπως και η αλλαγή σε ελεύθερη αμινομάδα και όχι εστέρα, μειώνουν την ανασταλτική δράση έναντι των ενζύμων με βάση τη δράση των ενώσεων **GK291** και **GK316**. Το παράγωγο **GK294** είναι το πρώτο που περιέχει τριπεπτιδική ομάδα αντί για διπεπτιδική αλλά η αύξηση αυτή των πεπτιδίων τελικά μείωσε την ανασταλτική δράση του παραγώγου προς όλες τις φωσφολιπάσες A_2 . Από την άλλη αποδεικνύεται ξανά η προτίμηση που δείχνει το ένζυμο της $iPLA_2$ στα αρωματικά συστήματα από τη δράση του **GK315** όπου πρώτη φορά δοκιμάζεται η ομάδα του βενζυλεστέρα και παρουσιάζει πολύ καλά αποτελέσματα τόσο στην ισχυρή ανασταλτική δράση με 98.6% και $X_I(50) = 0.026$ όσο και στην εκλεκτικότητα έναντι των άλλων δύο κύριων ομάδων φωσφολιπασών A_2 . Παρόμοια δράση παρουσιάζει και το παράγωγο **GK320** το οποίο περιέχει το διπεπτίδιο λευκίνης – γλυκίνης με τον *tert*-βουτυλεστέρα με 98.5% και $X_I(50) = 0.024$, αλλά όταν η λευκίνη αντικαθίσταται από την ισολευκίνη (**GK321**) ή τη βαλίνη (**GK322**) η δραστηριότητα μειώνεται αρκετά το οποίο μας δείχνει ότι παίζει ρόλο το μήκος της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος αφού το ένζυμο προτιμά το μεγαλύτερο μήκος της λευκίνης και της νορλευκίνης. Η προσθήκη μικρής πλευρικής αλυσίδας της αλανίνης στη θέση της γλυκίνης είτε αυτή είχε διάταξη D- ή L- μειώνει τη δραστηριότητα του παραγώγου παρόλο που διατηρείτε το αμινοξύ της νορλευκίνης και ο *tert*-βουτυλεστέρας (ενώσεις **GK290** και **GK319**).

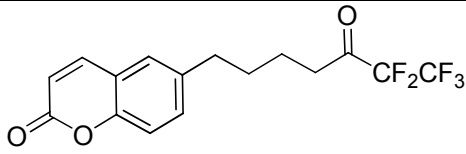
Εφόσον το διπεπτίδιο L-νορλευκίνης – γλυκίνης έχει αποδείξει ότι έχει υψηλή δραστηριότητα, διερευνήσαμε κατά πόσο παίζει ρόλο η διάταξη του στερεογονικού κέντρου μελετώντας στο ίδιο παράγωγο πώς δρα η D-νορλευκίνη (**GK318**). Το αποτέλεσμα ήταν μικρή αύξηση της ανασταλτικής δράσης του αναλόγου έναντι της $iPLA_2$ κατά 1% και τιμή $X_I(50) = 0.04$ αλλά μικρή μείωση της εκλεκτικότητας αφού το ανάλογο αναστέλλει και τη $cPLA_2$ κατά 68%. Παρόλο που η αντικατάσταση της γλυκίνης με την β-αλανίνη επέφερε μείωση της δραστηριότητας του παραγώγου (**GK292**), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ στη θέση της γλυκίνης έδειξε την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση από όλα τα παράγωγα. Έτσι, το 2-οξοαμιδικό

παράγωγο **GK317** παρουσίασε 99.9 % αναστολή της iPLA₂ με X_I (50)= 0.007 και υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τις άλλες δύο κύριες ομάδες φωσφολιπασών A₂.

Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι το ένζυμο της iPLA₂ εμφανίζει προτίμηση στους αναστολείς που η δομή τους περιλαμβάνει τον παρα-μεθόξυ υποκατεστημένο βενζολικό δακτύλιο, σε απόσταση αλυσίδας τεσσάρων μεθυλενίων την 2-οξοαμιδική ομάδα, ένα διπεπτίδιο και την προστατευτική ομάδα του *tert*-βουτυλεστέρα ή του βενζυλεστέρα. Τα διπεπτίδια που παρουσίασαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση είναι της L-νορλευκίνης-γλυκίνης, L-λευκίνης-γλυκίνης, D-νορλευκίνης-γλυκίνης και το καλύτερο παράγωγο προέκυψε από το διπεπτίδιο L-νορλευκίνης-γ-αμινοβουτυρικού οξέος.

Πίνακας 4.5 Αποτελέσματα αναστολής PLA₂ από πολυφθοροκετονικές ενώσεις. Το ποσοστό αναστολής έχει υπολογιστεί σε μοριακό κλάσμα 0,091. Το N.D. αντιπροσωπεύει ενώσεις με ποσοστό αναστολής λιγότερο από 25% (ή μη ανιχνευθείσα αναστολή).

No	Δομή	GVA	GVA	GVA
		iPLA ₂	cPLA ₂	sPLA ₂
		%	%	%
		αναστολή	αναστολή	αναστολή
159, GK252		46.5 ± 7.2	8.9 ± 6.0	3.0 ± 1.1
166, GK253		44.2 ± 6.5	46.2 ± 2.7	4.2 ± 3.2
167, GK254		86.4 ± 2.5	21.9 ± 2.2	15.0 ± 6.4
170, GK255		85.0 ± 3.2	19.3 ± 2.2	23.2 ± 7.1
175, GK271		93.0 ± 0.8	-	-

180, GK272		65.1 ± 4.8	-	-
---------------	---	---------------	---	---

Από τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα 4.5 παρατηρείται ότι καμία από τις πολυφθοροκετόνες δεν παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση ως προς την iPLA₂. Σχετικά καλή δράση της τάξης του 93% παρουσιάζει μόνο η πενταφθοροκετόνη **GK271** στην οποία ο δακτύλιος του ινδολίου είναι προστατευμένος με την μέθυλο ομάδα. Η πενταφθοροκετόνη με την ελεύθερη αλδεϋδομάδα και μη προστατευμένο τον δακτύλιο του ινδολίου (**GK252**) εμφάνισε πολύ χαμηλή δραστηριότητα, όπως και η τριφθοροκετόνη **GK253**. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι αλλάζοντας μόνο το τμήμα του μορίου που περιέχει τα φθόρια στην ένωση **GK253**, η ένωση **GK254** έδειξε αύξηση στην δραστηριότητα ως προς την iPLA₂ ανεβάζοντας το ποσοστό αναστολής από 44% στο 86% αλλά και σχετική εκλεκτικότητα. Το κορεσμένο τμήμα του ινδολίου δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στη δράση του μορίου αφού οι φθοροκετόνες **GK254** και **GK255** εμφανίζουν πολύ παρόμοια δραστηριότητα. Τέλος, ο δακτύλιος της κουμαρίνης στην ένωση **GK272** δεν φαίνεται να προσδίδει στη δράση του αναστολέα.

Δ. Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των ενώσεων

Ορισμένα πολυφθοροκετονικά παράγωγα δοκιμάστηκαν σε συγκεκριμένες καρκινικές σειρές παρουσιάζοντας ελάχιστη και όχι αξιοσημείωτη δράση. Έτσι, αποφασίστηκε τα αντικαρκινικά πειράματα να μην συνεχιστούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ- ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΙ ΕΝΩΣΕΩΝ

5.1 Γενικό Πειραματικό Μέρος

5.1.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ενώσεων που περιγράφονται σε αυτήν την εργασία ήταν εμπορικά προϊόντα των εταιριών Sigma-Aldrich, Fluka, Merck, Alfa. Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων ήταν 98% και άνω και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

5.1.2 Χρωματογραφικός έλεγχος αντιδράσεων

Για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography, TLC). Οι χρωματογραφικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες αλουμινίου πάχους 0.25 mm επιστρωμένες με silica gel και φθορίζον υλικό που απορροφά στα 254 nm της εταιρίας Merck (silica gel 60 F₂₅₄).

Για το χρωματογραφικό χαρακτηρισμό των ενώσεων μετρήθηκαν οι συντελεστές ανάσχεσης (R_f) σε διαφορετικά συστήματα ανάπτυξης. Τα συστήματα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1.	πετρελαϊκός αιθέρας / αιθέρας	(PE/Et ₂ O)	8/2
2.	πετρελαϊκός αιθέρας / αιθέρας	(PE/ Et ₂ O)	6/4
3.	πετρελαϊκός αιθέρας / αιθέρας	(PE/ Et ₂ O)	5/5
4.	πετρελαϊκός αιθέρας / αιθέρας	(PE/ Et ₂ O)	4/6
5.	πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας	(PE/AcOEt)	9/1
6.	πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας	(PE/AcOEt)	8/2
7.	πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας	(PE/AcOEt)	7/3
8.	πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας	(PE/AcOEt)	6/4
9.	πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας	(PE/AcOEt)	4/6
10.	πετρελαϊκός αιθέρας / οξικός αιθυλεστέρας	(PE/AcOEt)	3/7
11.	χλωροφόρμιο	(CHCl ₃)	10/0

12.	χλωροφόρμιο/ μεθανόλη	(CHCl ₃ /MeOH)	99/1
13.	χλωροφόρμιο/ μεθανόλη	(CHCl ₃ /MeOH)	98/2
14.	χλωροφόρμιο / μεθανόλη	(CHCl ₃ /MeOH)	95/5
15.	χλωροφόρμιο / μεθανόλη	(CHCl ₃ /MeOH)	9/1

Για την εμφάνιση των χρωματογραφιών χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι:

α) Υπεριώδης ακτινοβολία (254nm)

β) Ψεκασμός με διάλυμα νινυδρίνης 0,5 % σε αιθανόλη και θέρμανση

γ) Εμβάπτιση σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος 7,5 % σε αιθανόλη και θέρμανση.

5.1.3 Χρωματογραφικός καθαρισμός ενώσεων

Οι ενώσεις που περιγράφονται σε αυτήν την εργασία καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης Silica gel 60 (230-400 mesh) της εταιρίας Merck. Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους για κάθε ένωση ξεχωριστά.

5.1.4 Χαρακτηρισμός ενώσεων

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Οι βασικές ενώσεις που συνετέθησαν στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία NMR. Τα φάσματα ελήφθησαν σε όργανο Varian τύπου Mercury 200 MHz, 50 MHz και 188 MHz για φάσματα ¹H, ¹³C, και ¹⁹F, αντίστοιχα. Τα φάσματα ¹³C είναι αποσυζευγμένα (proton decoupled).

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν CDCl₃ της εταιρίας Aldrich, εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά. Η κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα ¹H και ¹³C NMR είναι βαθμονομημένη σύμφωνα με την χημική μετατόπιση του πρωτονιωμένου συστατικού που βρίσκεται ως πρόσμιξη στον δευτεριωμένο διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε. Οι τιμές αυτές ορίστηκαν βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων⁸¹ και είναι 7.27 ppm και 77.0 ppm για το CDCl₃ αντίστοιχα ως χημικές μετατοπίσεις της πρόσμιξης CHCl₃. Η βαθμονόμηση της κλίμακας στα φάσματα ¹⁹F έγινε βάση εξωτερικού προτύπου CHF₃, όπου η χημική μετατόπισή του ορίζεται κατά σύμβαση να βρίσκεται στην αρχή της κλίμακας (δ = 0.00 ppm). Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Φασματομετρία μάζας: Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε όργανο φασματομετρίας μαζών Finnigan, Surveyor PSQ Plus με την τεχνική του ιονισμού μέσω ηλεκτροψεκασμού (electron spray ionization, ESI-MS). Τα φάσματα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) ελήφθησαν σε Bruker Maxis Impact QTOF, με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) και δίδονται ως: προσδιορισθείσα τιμή, (θεωρητική τιμή). Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Υπέρυθρη φασματοσκοπία: Τα φάσματα FT-IR λήφθηκαν σε φασματόμετρο Nicolet 6700 (Thermo Scientific), έπειτα από διάλυση των ουσιών σε ακετόνη και τοποθέτηση μικρού όγκου σε στρογγυλά παράθυρα ZnSe (13 mm), όπου ακολούθως σχηματίστηκε λεπτό φιλμ. Το φάσμα του καθαρού δισκίου ZnSe χρησιμοποιήθηκε ως υπόβαθρο (background). Για τη λήψη κάθε φάσματος πραγματοποιήθηκαν 100 διαδοχικές σαρώσεις (scans), με τη διαχωριστική ικανότητα του οργάνου να είναι στα 4 cm^{-1} . Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού Omnic v. 8.2 (Thermo Scientific), περιλαμβάνοντας την εξομάλυνση του σήματος (smoothing) και τη διόρθωση της βασικής γραμμής. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στο εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

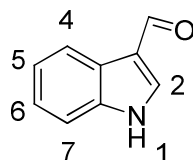
Σημείο τήξεως: Τα σημεία τήξεως των ενώσεων που περιγράφονται στην παρούσα εργασία μετρήθηκαν σε συσκευή Buchi 530 και δεν δίνονται διορθωμένα.

Στροφοική ικανότητα: Η οπτική στροφοική ικανότητα μετρήθηκε σε ηλεκτρονικό πολωσίμετρο Perkin- Elmer 141 χρησιμοποιώντας κυψελίδα 10 cm και σε θερμοκρασία δωματίου. Η συγκέντρωση του διαλύματος και ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται ξεχωριστά σε κάθε ένωση. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ανήκει στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

5.2 Συνθετικές Μέθοδοι - Χαρακτηρισμοί Ενώσεων

⊗ Σύνθεση αλδεϋδών του ινδολίου

1H-3-καρβαλδεΐδη του ινδολίου (161)¹⁰¹



3.1 ml DMF τοποθετούνται σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη εφοδιασμένη με σωλήνα CaCl₂, και ψύχονται στους -15 °C για 15 min. Διατηρώντας χαμηλή τη θερμοκρασία προστίθεται σταδιακά το (COCl)₂ (13.5 mmol, 6.75 ml) μέσα σε 10 min. Στη συνέχεια προστίθεται σταδιακά διάλυμα ινδολίου (1.05 g, 9 mmol) σε 1.1ml DMF προσέχοντας η θερμοκρασία να μην ανέβει πάνω από 10°C. Μετά από 10 λεπτά το μίγμα θερμαίνεται στους 35-40 °C και αναδεύεται για 1 ώρα. Έπειτα, προστίθενται 2g τριμμένου πάγου και 1ml νερού. Με σταγονομετρικό χωνί γίνεται προσθήκη διαλύματος NaOH 9M (11 ml). Με το τέλος της προσθήκης το μίγμα φέρεται γρήγορα στο σημείο ζέσεως (~55°C) και αφήνεται να ηρεμήσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν εκχυλίσσεις με οξικό αιθυλέστερα, έκπλυση των οργανικών στιβάδων με κορεσμένο διάλυμα NaCl και ξήρανση με Na₂SO₄. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα/ πετρελαϊκό αιθέρα 6/4 και αναλογία ουσίας /silica 1:40.

M.T.: C₉H₇NO

M.B.: 145.16 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 87% (1.13 g)

Σ.Τ.: 196 – 198 °C (Βιβλ. 196 – 197 °C)¹⁰¹

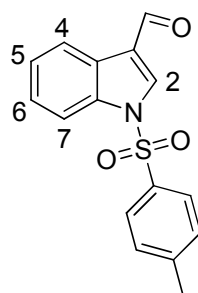
R_f(8): 0.45

¹H NMR (CD₃OD): δ 9.91 (s, 1H, CHO), 8.25 – 8.19 (m, 1H, H₄), 8.17 – 8.05 (m, H, H₂), 7.55 – 7.45 (m, 1H, H₇), 7.40 – 7.15 (m, 2H, H₅, H₆).

¹³C NMR (CD₃OD): δ 187.4, 139.6, 125.0, 123.6, 122.4, 113.1.

MS (ESI) m/z (%): 146 ([M+H]⁺, 100).

1-τοσυλ-1*H*-3-καρβαλδεΐδη του ινδολίου (162)¹⁰²



Σε σφαιρική φιάλη των 100ml διαλύεται η αρχική αλδεΐδη **6** (6.9 mmol, 1.0g) σε 34.5 ml CH₂Cl₂. Προστίθεται NaOH (17.25 mmol, 690mg) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Έπειτα, προστίθεται το TsCl (20.7 mmol, 3.95 g), το μίγμα φέρεται στους 35°C για 2 ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Ακολουθούν εκχυλίσσεις με νερό,

κορεσμένο διάλυμα NaCl και συμπύκνωση. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ οξικό αιθυλεστέρα 7:3.

M.T.: C₁₆H₁₃NO₃S

M.B.: 229.34 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 78% (1.23g)

Σ.Τ.: 142 – 146 °C (Βιβλ. 146 – 147°C)¹⁰²

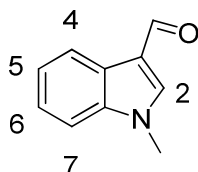
R_f(7): 0.56

¹H NMR: δ 10.11 (d, 1H, CHO, *J*= 3.2 Hz), 8.30 – 8.20 (m, 1H, H₄), 8.00 – 7.80 (m, 3H, Tosyl, H₂), 7.50 – 7.25 (m, 5H, H₅, H₆, H₇, Tosyl), 2.37 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR: δ 185.3, 136.2, 130.3, 127.2, 126.3, 125.0, 122.6, 113.2, 21.6.

MS (ESI) m/z (%): 300 ([M+H]⁺, 100).

1-μεθυλ-1*H*-3-καρβαλδεΰδη του ινδολίου (171)¹⁰³



Σε σφαιρική φιάλη των 250 ml διαλύεται η αρχική αλδεΰδη (600mg, 4.13mmol) σε 59ml άνυδρου THF, προστίθεται το NaH (60% in oil, 316.9 mg, 8.27 mmol) και το μίγμα φέρεται στους 0°C και σε αδρανή ατμόσφαιρα N₂. Έπειτα από 10 min προστίθεται το CH₃I (1.17 g, 8.27 mmol) και το μίγμα αναδεύεται στις ίδιες συνθήκες για 1 ώρα και σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Το μίγμα αποχύνεται σε 30 ml παγωμένου νερού, ακολουθούν εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα και οι οργανικές στιβάδες με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Η ένωση καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε συστήματα έκλουσης διχλωρομεθάνιο, διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 98:2.

M.T.: C₁₀H₉NO

M.B.: 159.18 mg/mmol

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 84% (0.55g) (Βιβλ. 83%)¹⁰³

Σ.Τ.: 68 – 70 °C (Βιβλ. 69.9 – 70.8°C)¹⁰³

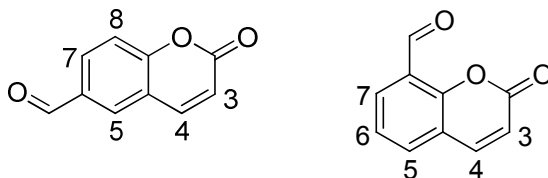
R_f(13): 0.71

¹H NMR: δ 9.92 (s, 1H, CHO), 8.35 – 8.25 (m, 1H, H₄), 7.60 (s, 1H, H₂), 7.40 – 7.25 (m, 3H, H₅, H₆, H₇), 3.80 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR: δ 184.4, 145.5, 139.4, 127.3, 123.9, 122.8, 121.9, 117.8, 109.8, 33.6.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 160 ($[M+H]^+$, 100).

∞ **Σύνθεση της 2-οξο-2*H*-χρωμεν-6-καρβαλδεΐδης και της 2-οξο-2*H*-χρωμεν-8-καρβαλδεΐδης (177)¹⁰⁴**



Σε σφαιρική φιάλη των 100ml αναμιγνύεται η κουμαρίνη (234 mg, 1.6 mmol) με 25 ml υδατικού διαλύματος 30% KOH και τίθεται υπό αναρροή για 5½ ώρες. Έπειτα, στο μίγμα προστίθενται 5 ml νερού για τη μείωση του pH και 30ml CHCl₃ και αναδεύεται υπό αναρροή για ακόμα 5½ ώρες. Ακολουθεί οξίνιση της υδατικής στιβάδας μέχρι pH~2 και εκπλύσεις με CHCl₃ ενώ συλλέγονται οι οργανικές στιβάδες, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το μίγμα των αλδεϋδών καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ αιθέρα 5:5 αλλά δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους.

M.T.: C₁₀H₆O₃

M.B.: 174.15 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 23% (63.4 mg) (Βιβλ. 52%)¹⁰⁴

Σ.Τ.: 118 – 120 °C

R_f(3): 0.22

¹H NMR (2-οξο-2*H*-χρωμεν-8-καρβαλδεΐδη): δ 10.70 (s, 1H, CHO), 8.08 (d, 1H, H₇, *J*= 5.6 Hz), 7.77 (d, 1H, H₄, *J*= 5.2 Hz), 7.72 (d, 1H, H₅, *J*= 1.4 Hz), 7.26 (s, 1H, H₆), 6.51 (d, 1H, H₃, *J*= 9.6 Hz).

¹H NMR (2-οξο-2*H*-χρωμεν-6-καρβαλδεΐδη): δ 10.02 (s, 1H, CHO), 8.06 (d, 1H, H₇, *J*= 5.6 Hz), 8.03 (s, 1H, H₅), 7.81 (d, 1H, H₄, *J*= 5.2 Hz), 7.46 (d, 1H, H₈, *J*= 9.4 Hz), 6.51 (d, 1H, H₃, *J*= 9.6 Hz).

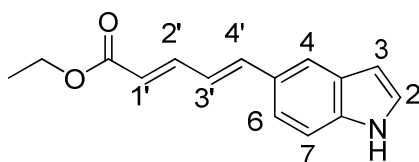
¹³C NMR: δ 189.9, 187.1, 162.1, 161.0, 157.3, 143.0, 142.8, 133.7, 132.4, 130.4, 130.0, 124.4, 117.9, 117.3.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 175 ($[M+H]^+$, 35), 189 (100).

∞ **Γενική μέθοδος ολεφινοποίησης Horner- Wadsworth- Emmons**

Σε αναδευόμενο διάλυμα του τριαιθυλο-4-φωσφοнокροτονικού αιθυλεστέρα (2mmol, 500.5mg) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (1.25 ml), προστίθενται μοριακά κόσκινα (1.5 g/mmol αλδεϋδης) και υπό ατμόσφαιρα N₂ ψύχεται στους -30°C, όπου γίνεται και η προσθήκη της 1,1,3,3-τετραμεθυλο-γουανιδίνης (2 mmol, 230.4 mg). Έπειτα από μισή ώρα και διατήρηση της θερμοκρασίας στους -25°C προστίθεται η αλδεϋδη του ινδολίου (1 mmol). Η αντίδραση συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 64 ώρες. Ακολουθούν εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα, έκπλυση των οργανικών στιβάδων με κορεσμένο διάλυμα NaCl και ξήρανση με Na₂SO₄. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ οξικό αιθυλεστέρα 8/2 και αναλογία ουσίας /silica 1:40.

**(2E,4E)- 5-(1H-ινδολ-5-υλ)πεντα-2,4-διενοϊκός αιθυλεστέρας
και (2E,4Z)- 5-(1H-ινδολ-5-υλ)πεντα-2,4-διενοϊκός αιθυλεστέρας (157)**



M.T. : C₁₅H₁₅NO₂

M.B.: 241.29 mg/mmol

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 16% (75.8 mg)

Σ.Τ.: 99-101 °C

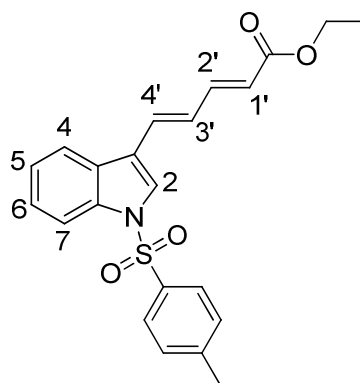
R_f(7): 0.53

¹H NMR: δ 8.08 (br s, 1H, NH), 7.47 (s, 1H, H₄), 7.24 (dd, 1H, H₂, J₁= 10.6 Hz, J₂= 15.2 Hz), 7.15 – 7.04 (m, 2H, H₆, H₇), 6.97 – 6.89 (m, 1H, H₂), 6.70 (dd, 1H, H₃, J₁= 15.4 Hz, J₂= 31.8 Hz), 6.56 (d, 1H, H₄, J= 10.8 Hz), 6.35 – 6.24 (m, 1H, H₃), 5.69 (d, 1H, H₁, J= 15.2 Hz), 3.98 (q, 2H, OCH₂, J= 7.2 Hz), 1.07 (t, 3H, CH₃, J= 7.2 Hz).

¹³C NMR: δ 167.5, 145.6, 142.4, 139.5, 136.3, 128.2, 125.1, 123.6, 122.0, 121.0, 120.9, 119.3, 103.3, 60.2, 14.3.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 242 ([M+H]⁺, 30), 196 (100%).

(2E,4E)-5-(1-τοσυλ-1H-ινδολ-3-υλ)πεντα-2,4-διενοϊκός αιθυλεστέρας (163)



M.T.: C₂₂H₂₁NO₄S

M.B.: 395.47 mg/mmol

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 48% (759.3 mg).

Σ.Τ.: 78- 81 °C

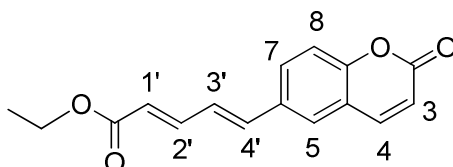
R_f (7): 0.69

¹H NMR: δ 8.00 – 7.95 (m, 1H, H₄), 7.85 – 7.65 (m, 4H, H₃', H₄', Tosyl), 7.50 – 7.20 (m, 6H, H₅, H₆, H₇, H₂, Tosyl), 6.95 (m, 1H, H₄'), 5.96 (d, 1H, H₁', J= 14.0 Hz), 4.21 (q, 2H, OCH₂, J= 6.0 Hz), 2.32 (s, 3H, CH₃), 1.30 (t, 3H, OCH₂CH₃, J= 6.0 Hz).

¹³C NMR: δ 167.1, 144.8, 130.9, 130.0, 127.0, 126.9, 125.8, 125.3, 123.8, 120.8, 120.4, 119.7, 113.8, 60.4, 21.6, 14.3.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 396 ([M+H]⁺, 100).

**(2E,4E)-5-(2-οξο-2H-χρωμεν-6-υλ)πεντα-2,4-διενοϊκός αιθυλεστέρας και
(2E,4Z)-5-(2-οξο-2H-χρωμεν-6-υλ)πεντα-2,4-διενοϊκός αιθυλεστέρας (178)**



M.T.: C₁₆H₁₄O₄

M.B.: 270.28 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 49 % (146.5 mg)

Σ.Τ.: 107 – 110 °C

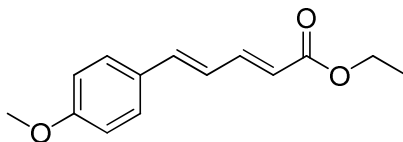
R_f(2): 0.30

¹H NMR: δ 7.80 – 7.00 (m, 6H, H₂', H₄', H₄, H₅, H₇, H₈), 6.88 – 6.82 (m, 1H, H₃'), 6.41 (d, 1H, H₃, J= 9.6 Hz), 6.00 (dd, 1H, H₁', J₁ = 4.4 Hz, J₂ = 15.4 Hz), 4.20 (q, 2H, CH₂, J= 7.2 Hz), 1.29 (t, 3H, CH₃, J= 6.8 Hz).

^{13}C NMR: δ 166.7, 160.2, 154.0, 143.6, 143.0, 137.9, 132.6, 131.7, 130.0, 124.5, 124.2, 118.9, 117.3, 116.7, 60.4, 14.2.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 271 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 60), 225 (100).

(2E,4E)-5-(4-μεθοξυφαινυλ)πεντα-2,4- διενοϊκός αιθυλεστέρας (80)⁹⁶



M.T.: $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_3$

M.B.: 232.28 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 42% (2.25 g) (Βιβλ. 72%)⁹⁶

Σ.Τ.: 51 – 53 °C (Βιβλ. 52 – 53 °C)⁹⁶

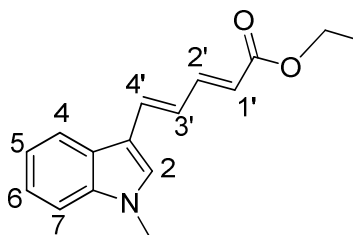
R_f (1): 0.46

^1H NMR: δ 7.45 – 7.35 (m, 3H, arom, 2xCH), 6.95 – 6.75 (m, 4H, arom, CH), 5.94 (d, 1H, CH, $J= 15.2$ Hz), 4.22 (q, 2H, CH_2 , $J= 7.2$ Hz), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 1.31 (t, 3H, CH_3 , $J= 7.2$ Hz).

^{13}C NMR: δ 167.2, 160.3, 144.9, 140.1, 131.9, 128.6, 124.1, 120.0, 114.2, 60.2, 55.3, 14.3.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 233 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100).

∞ Σύνθεση του (2E,4E)-5-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ)πεντα-2,4-διενοϊκού αιθυλεστέρα και του (2E,4E)-5-(2-οξο-2H-χρωμεν-6-υλ)πεντα-2,4-διενοϊκού αιθυλεστέρα (172)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml αναμιγνύεται NaH (60% in oil, 2.23 mmol, 85.5 mg) σε 8 ml άνυδρου THF. Το μίγμα φέρεται στους 0°C και σε αδρανή ατμόσφαιρα N_2 . Διάλυμα $\text{C}_2\text{H}_5\text{OOCCH}=\text{CHCH}_2\text{P}(=\text{O})(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ (500.5 mg, 2 mmol) σε 3 ml άνυδρου THF προστίθεται αργά σε διάστημα 20 λεπτών. Το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για 1 ώρα και έπειτα προστίθεται σταδιακά διάλυμα της αλδεϋδης (1 mmol) σε 1.5 ml άνυδρου THF. Το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για 1 ώρα και σε θερμοκρασία δωματίου για 44 ώρες. Γίνεται προσθήκη 15ml νερού, εκχυλίσσεις με οξικό αιθυλεστέρα και έκπλυση των οργανικών στιβάδων με κορεσμένο διάλυμα

NaCl. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ διαιθυλαιθέρα 6:4.

M.T.: C₁₆H₁₇NO₂

M.B.: 255.31 mg/mmol

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 78% (199.0 mg).

Σ.Τ.: 94 - 96°C

R_f(2): 0.36

¹H NMR: δ 7.95 – 7.85 (m, 1H, H₄), 7.49 (dd, 1H, H₂, J₁= 11.0 Hz, J₂= 15.2 Hz), 7.35 – 7.15 (m, 4H, H₅, H₆, H₇, H₂), 7.10 (d, 1H, H₄, J= 13.6 Hz), 6.86 (dd, 1H, H₃, J₁= 10.8 Hz, J₂= 15.6 Hz), 5.89 (d, 1H, H₁, J= 14.0 Hz), 4.23 (q, 2H, CH₂, J= 8.0 Hz), 3.77 (s, 3H, NCH₃), 1.32 (t, 3H, CH₃, J= 8.0Hz).

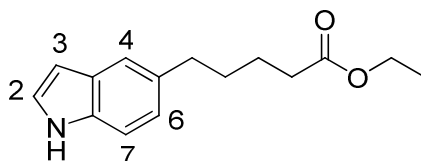
¹³C NMR: δ 167.7, 146.6, 137.8, 134.1, 130.8, 125.9, 122.7, 122.1, 120.8, 120.2, 117.2, 113.3, 109.8, 60.0, 33.0, 14.4.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 256 ([M+H]⁺, 100), 278 ([M+Na]⁺, 10).

∞ Γενική μέθοδος καταλυτικής υδρογόνωσης

Σε διάλυμα της ακόρεστης ένωσης (1 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (10 ml) προστίθεται καταλύτης Pd/C 10% και υπό ατμόσφαιρα H₂, αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ακολουθεί διήθηση υπό celite, συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση και καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/οξικό αιθυλεστέρα 9/1.

5-(1H-ινδολ-5-υλ)πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (158)



M.T.: C₁₅H₁₉NO₂

M.B. 245.32 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 82% (178 mg).

R_f(8): 0.58

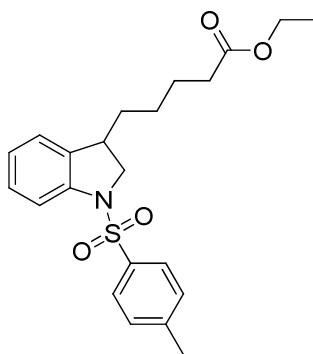
¹H NMR: δ 8.14 (br s, 1H, NH), 7.45 (s, 1H, H₄), 7.32 (d, 1H, H₇, J= 8.4 Hz), 7.18 (t, 1H, H₂, J= 4.0 Hz), 7.03 (d, 1H, H₆, J= 8.6 Hz), 6.52 – 6.48 (m, 1H, H₃), 4.14 (q, 2H, OCH₂, J= 8.0 Hz),

2.74 (t, 2H, CH₂, *J*= 6.0 Hz), 2.35 (t, 2H, CH₂, *J*= 6.0 Hz), 1.80 – 1.65 (m, 4H, 2xCH₂), 1.26 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.0 Hz).

¹³C NMR: δ 173.8, 134.3, 133.5, 128.0, 124.3, 122.9, 119.8, 110.7, 102.2, 60.2, 35.6, 34.3, 31.7, 24.6, 14.2.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 246 ([M+H]⁺, 100), 263 ([M+NH₄]⁺, 62).

5-(1-τοσυλινδολιν-3-υλ)πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (164)



M.T.: C₂₂H₂₇NO₄S

M.B.: 401.52 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 50% (340.8 mg).

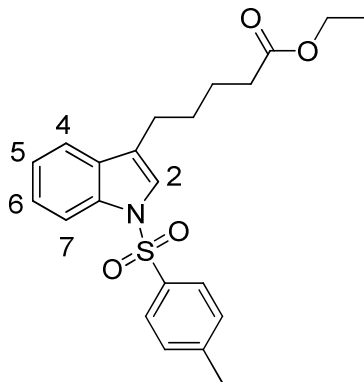
R_f(5): 0.28

¹H NMR: δ 7.72 – 7.60 (m, 3H, arom), 7.28 – 7.05 (m, 3H, arom), 7.10 – 6.95 (m, 2H, arom), 4.11 (q, 2H, OCH₂, *J*= 8.0 Hz), 3.98 (dd, 1H, NCHH, *J*₁= 9.0 Hz, *J*₂= 10.6 Hz), 3.54 (dd, 1H, NCHH, *J*₁= 6.0 Hz, *J*₂= 10.6 Hz), 3.15 – 3.00 (m, 1H, CH), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.23 (t, 2H, CH₂CO, *J*= 8.0 Hz), 1.65 – 1.45 (m, 4H, 2xCH₂), 1.35 – 1.15 (m, 2H, CH₂), 1.24 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J*= 8.0 Hz).

¹³C NMR: δ 173.4, 144.0, 141.6, 135.4, 133.9, 129.6, 128.0, 127.3, 124.3, 123.6, 114.8, 60.3, 55.4, 39.8, 34.5, 34.0, 26.3, 24.8, 21.5, 14.2.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 402 ([M+H]⁺, 100).

5-(1-τοσουλ-1H-ινδολ-3-υλ)πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (168)



M.T.: C₂₂H₂₅NO₄S

M.B.: 399.50 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 65% (250.4 mg).

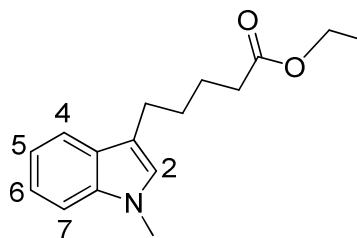
R_f(5): 0.33

¹H NMR: δ 7.98 (d, 1H, H₄, J= 7.4 Hz), 7.75 (d, 2H, Tosyl, J= 8.4 Hz), 7.46 (d, 1H, H₇, J= 7.8 Hz), 7.36 – 7.30 (m, 2H, H₅, H₆), 7.27 (s, 1H, H₂), 7.20 (d, 2H, Tosyl, J= 7.8 Hz), 4.14 (q, 2H, OCH₂, J= 6.0 Hz), 2.72 – 2.63 (m, 2H, CH₂), 2.40 – 2.30 (m, 2H, CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.77 – 1.67 (m, 4H, CH₂CH₂), 1.26 (t, 3H, OCH₂CH₃, J= 6.0 Hz).

¹³C NMR: δ 173.5, 144.6, 135.2, 131.0, 129.7, 126.7, 124.5, 122.9, 122.6, 119.4, 113.7, 60.3, 34.0, 28.3, 24.6, 21.5, 14.2.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 400 ([M+H]⁺, 30), 417 ([M+NH₄]⁺, 100).

5-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ)πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (173)



M.T: C₁₆H₂₁NO₂

M.B.: 259.34 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 55% (123.3 mg)

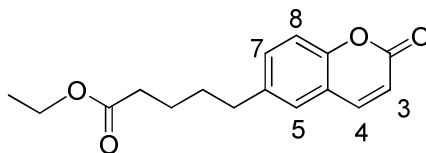
R_f(6): 0.79

¹H NMR: δ 7.58 (d, 1H, H₄, J= 7.6 Hz), 7.35 – 7.00 (m, 3H, H₅, H₆, H₇), 6.84 (s, 1H, H₂), 4.12 (q, 2H, OCH₂, J= 7.0 Hz), 3.74 (s, 3H, NCH₃), 2.85 – 2.70 (m, 2H, CH₂), 2.40 – 2.25 (m, 2H, CH₂), 1.85 – 1.60 (m, 4H, 2xCH₂), 1.25 (t, 3H, CH₃, J= 7.0 Hz).

^{13}C NMR: δ 173.9, 141.6, 136.9, 126.1, 121.4, 119.0, 118.5, 114.8, 109.1, 60.2, 34.2, 32.6, 29.8, 24.8, 24.7, 14.2.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 260 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100).

5-(2-οξο-2H-χρωμεν-6-υλ)πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (179)



M.T.: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$

M.B.: 274.31 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 84% (137.4 mg)

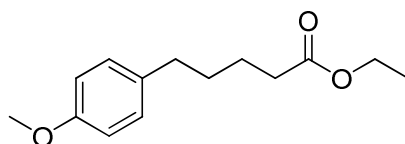
$R_f(4)$: 0.59

^1H NMR: δ 7.69 (d, 1H, H_4 , $J = 9.6$ Hz), 7.45 – 7.15 (m, 3H, H_5 , H_7 , H_8), 6.40 (d, 1H, H_3 , $J = 9.6$ Hz), 4.11 (q, 2H, COOCH_2 , $J = 7.2$ Hz), 2.75 – 2.60 (m, 2H, CH_2), 2.40 – 2.25 (m, 2H, CH_2), 1.80 – 1.55 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.25 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Hz).

^{13}C NMR: δ 173.9, 163.3, 156.9, 128.0, 127.8, 121.8, 116.7, 113.5, 60.3, 34.8, 34.1, 30.9, 29.3, 14.2.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 275 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100).

5-(4-μεθοξυφαινυλο)πεντανοϊκός αιθυλεστέρας (81)⁹⁶



M.T.: $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$

M.B.: 236.31 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 58% (1.30 g) (Βιβλ. 42%)⁹⁶

$R_f(1)$: 0.6

^1H NMR: δ 7.10 (d, 2H, arom, $J = 8.4$ Hz), 6.84 (d, 2H, arom, $J = 8.8$ Hz), 4.13 (q, 2H, OCH_2 , $J = 7.2$ Hz), 3.79 (s, 3H, CH_3O), 2.58 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz), 2.33 (t, 2H, CH_2 , $J = 7.0$ Hz), 1.75 – 1.55 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1.26 (t, 3H, CH_3 , $J = 7.2$ Hz).

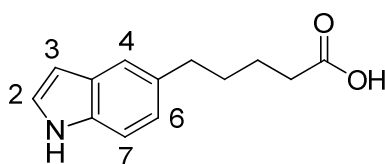
^{13}C NMR: δ 173.5, 157.6, 134.1, 129.1, 113.6, 60.1, 55.1, 34.5, 34.1, 31.0, 24.4, 14.2.

MS ESI m/z (%): 237 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 10), 254 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100), 259 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 10).

∞ Γενική μέθοδος σαπωνοποίησης

Σε αναδευόμενο διάλυμα του εστέρα (1 mmol) σε αιθανόλη (10 ml) προστίθεται διάλυμα NaOH 1N (1.5 mmol) και αφήνεται το μίγμα υπό ανάδευση για 24h. Ακολουθεί συμπύκνωση της αιθανόλης υπό ελαττωμένη πίεση, προσθήκη 10 ml νερού, οξίνιση με διάλυμα HCl 1N μέχρι pH~2. Έπειτα, η υδατική φάση εκχυλίζεται 3 φορές με AcOEt, συλλέγονται οι οργανικές φάσεις, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Τέλος, συμπυκνώνεται ο οργανικός διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση.

5-(1H-ινδολ-5-υλ)πεντανοϊκό οξύ (158)



M.T.: C₁₃H₁₅NO₂

M.B.: 217.26 mg/mmol

Καφέ στερεό. Απόδοση 96% (136.0 mg).

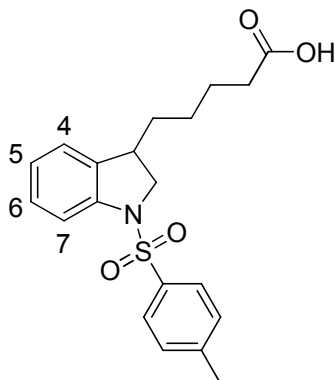
R_f(10): 0.60

¹H NMR: δ 8.08 (br s, 1H, NH), 7.44 (s, 1H, H₄), 7.32 (d, 1H, H₇, J= 8.4 Hz), 7.21 – 7.15 (m, 1H, H₂), 7.03 (d, 1H, H₆, J= 8.2 Hz), 6.55 – 6.45 (m, 1H, H₃), 2.74 (t, 2H, CH₂, J= 6.8 Hz), 2.39 (t, 2H, CH₂, J= 7.0 Hz), 1.80 – 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 179.2, 134.3, 133.4, 128.7, 124.3, 122.9, 119.8, 110.8, 102.3, 35.6, 33.8, 31.5, 24.3.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 218 ([M+H]⁺, 100), 235 ([M+NH₄]⁺, 55).

5-(1-τοσυλ-1H-ινδολ-3-υλ)πεντανοϊκό οξύ (165)



M.T.: C₂₀H₂₃NO₄S

M.B.: 373.47 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 90% (243.1 mg).

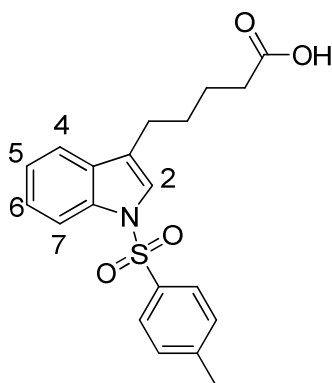
R_f (10): 0.30

¹H NMR: δ 9.49 (br s, 1H, OH), 7.75 – 7.60 (m, 3H, H₄, Tosyl), 7.30 – 7.15 (m, 3H, H₇, Tosyl), 7.10 – 6.90 (m, 2H, H₅, H₆), 3.98 (dd, 1H, CHH, *J*₁= 9.2 Hz, *J*₂= 10.6 Hz), 3.56 (dd, 1H, CHH, *J*₁= 6.0 Hz, *J*₂= 10.6 Hz), 3.20 – 3.00 (m, 1H, CH), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.30 (t, 2H, CH₂COOH, *J*= 7.2 Hz), 1.70 – 1.45 (m, 2H, CH₂), 1.40 – 1.10 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 179.6, 144.1, 141.5, 135.4, 133.8, 129.6, 127.9, 127.2, 124.3, 123.6, 114.8, 55.4, 39.8, 34.4, 33.9, 26.2, 24.5, 21.5.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 372 ([M-H]⁻, 100).

5-(1-τοσυλ-1H-ινδολ-3-υλ)πεντανοϊκό οξύ (169)



M.T.: C₂₀H₂₁NO₄S

M.B.: 371.45 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 98% (220.4 mg).

Σ.Τ.: 135 - 137°C

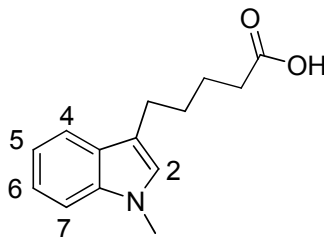
R_f (6): 0.17

¹H NMR: δ 9.04 (br s, 1H, OH), 7.97 (d, 1H, H₄, *J*= 8.2 Hz), 7.80 – 7.65 (m, 2H, Tosyl), 7.45 (d, 1H, H₇, *J*= 7.2 Hz), 7.35 – 7.10 (m, 5H, Tosyl, H₅, H₆, H₂), 2.67 (t, 2H, CH₂, *J*=6.0 Hz), 2.39 (t, 2H, CH₂, *J*= 6.2 Hz), 2.30 (s, 3H, CH₃), 1.80 – 1.60 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 179.7, 144.7, 135.3, 135.2, 130.9, 129.8, 126.7, 124.6, 122.9, 122.7, 119.4, 113.7, 33.7, 28.1, 24.5, 24.3, 21.5.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 370 ([M-H]⁻, 100).

5-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ)πεντανοϊκό οξύ (174)¹⁰⁵



M.T.: C₁₄H₁₇NO₂

M.B.: 231.29 mg/mmol

Ανοιχτό καφέ στερεό. Απόδοση 97% (89.8 mg).

Σ.Τ.: 62 – 65 °C (Βιβλ. 88 °C)¹⁰⁵

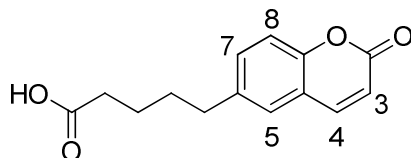
R_f (6): 0.13

¹H NMR: δ 10.76 (br s, 1H, OH), 7.62 (d, 1H, H₄, *J*= 8.2 Hz), 7.35 – 7.05 (m, 3H, H₅, H₆, H₇), 6.86 (s, 1H, H₂), 3.76 (s, 3H, NCH₃), 2.90 – 2.70 (m, 2H, CH₂), 2.50 – 2.35 (m, 2H, CH₂), 1.90 – 1.70 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 180.4, 136.9, 127.7, 126.0, 121.4, 118.9, 118.5, 114.6, 109.1, 34.0, 32.5, 29.6, 24.6, 24.4.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 232 ([M+H]⁺, 100).

5-(2-οξο-2H-χρωμεν-6-υλ)πεντανοϊκό οξύ (179)



M.T.: C₁₄H₁₄O₄

M.B.: 246.26 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 92% (131 mg)

Σ.Τ.: 119-122°C

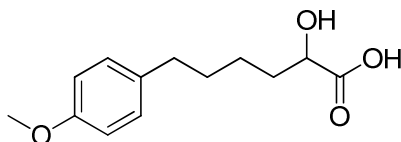
R_f (4): 0.21

¹H NMR: δ 7.75 – 7.60 (m, 1H, H₄), 7.40 – 7.25 (m, 3H, H₅, H₇, H₈), 6.40 (d, 1H, H₃, *J*= 9.6 Hz), 2.90 – 2.80, 2.80 – 2.60 (m, 2H, CH₂), 2.45 – 2.30 (m, 2H, CH₂), 1.80 – 1.60 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 179.1, 163.3, 156.8, 143.5, 138.3, 132.1, 127.1, 125.9, 124.1, 116.7, 34.7, 31.0, 30.6, 29.0, 24.0.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 245 ([M+H]⁻, 100).

2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξανοϊκό οξύ (85)



M.T.: C₁₃H₁₈O₄

M.B.: 238.28 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 96% (171.3 mg)

Σ.Τ.: 94-96°C

R_f (15): 0.30

¹H NMR: δ 7.10 (d, 2H, arom, J= 8.4 Hz), 6.83 (d, 2H, arom, J= 8.8 Hz), 4.35 – 4.20 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 5.65 – 2.50 (m, 2H, CH₂CH), 2.00 – 1.40 (m, 7H, 3xCH₂, OH).

¹³C NMR: δ 179.8, 157.6, 134.4, 129.2, 113.7, 70.1, 55.2, 34.7, 33.9, 31.3, 24.4.

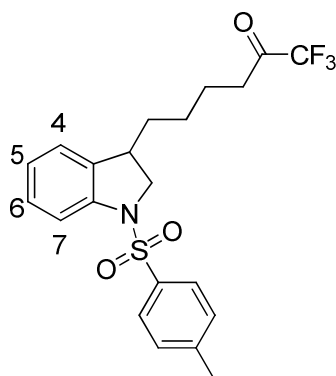
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 237 ([M-H]⁻, 100), ([M+NH₄]⁺, 10).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 256 ([M+NH₄]⁺, 100), 261 ([M+Na]⁺, 28).

∞ Γενική μέθοδος σύνθεσης των τριφθορομέθυλο κετονών από τα αντίστοιχα οξέα

Σε αναδευόμενο διάλυμα του οξέος (1 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (40 ml) και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται άνυδρο DMF (40 μL) και (COCl)₂ (3 mmol). Ακολουθεί ανάδευση για 3 ώρες ώστε να σχηματιστεί το άκυλο χλωρίδιο και στη συνέχεια συμπίκνωση υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση της περίσσειας του οξάλυλο χλωριδίου. Το χλωρίδιο του οξέος διαλύεται σε άνυδρο CH₂Cl₂ (10 ml) και ακολουθεί στάγδην προσθήκη πυριδίνης (0.64 ml, 8 mmol) και τριφθοροξικού ανυδρίτη TFAA (0.85 ml, 6 mmol) στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα Ar. Έπειτα από 3h ανάδευση η αντίδραση ψύχεται ξανά στους 0 °C και διακόπτεται με την προσθήκη νερού (2 ml) ακολουθούμενη από επιπλέον ανάδευση για 30 min. Προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NaCl, η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται 2 φορές με CH₂Cl₂. Οι οργανικές φάσεις συγκεντρώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ οξικό αιθυλεστέρα 7/3.

1,1,1-τριφθορο-6-(1-τοσυλινδολιν-3-υλ)εξανόνη-2 (166)



M.T.: C₂₁H₂₂F₃NO₃S

M.B.: 425.46 mg/mmol

Αχρωμο λάδι. Απόδοση 39% (45mg).

R_f (8): 0.65

¹H NMR: δ 7.80 – 7.60 (m, 3H, H₄, Tosyl), 7.35 – 7.15 (m, 3H, H₇, Tosyl), 7.10 – 6.95 (m, 2H, H₅, H₆), 3.99 (dd, 1H, CHH, J₁= 9.0 Hz, J₂= 10.4 Hz), 3.57 (dd, 1H, CHH, J₁= 5.6 Hz, J₂= 10.6 Hz), 3.20 – 3.00 (m, 1H, CH), 2.69 (t, 2H, CH₂, J=7.0 Hz), 2.38 (s, 3H, CH₃), 1.75 – 1.45 (m, 2H, CH₂), 1.40 – 1.15 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 202.2 (q, CO, J= 35.0 Hz), 144.1, 141.6, 135.1, 133.8, 129.6, 128.1, 127.3, 124.3, 123.6, 115.5 (q, CF₃, J= 291.0 Hz), 114.8, 55.3, 39.7, 36.0, 34.5, 25.9, 22.2, 21.5.

¹⁹F NMR: δ – 79.70 (CF₃).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 424 ([M-H]⁻, 100).

HRMS m/z: 424.1207 (424.1200) [M-H]⁻.

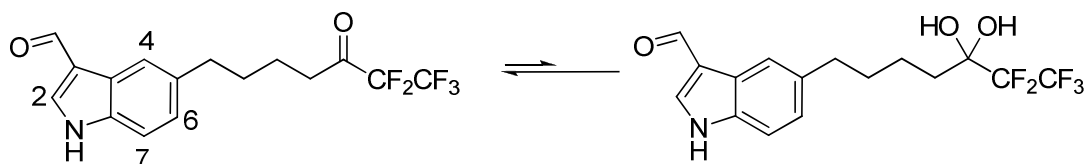
IR (cm⁻¹): 3471, 2929, 2858, 1761, 1717, 1599, 1477, 1457, 1399, 1354, 1208, 1166, 1096, 1033, 976, 815, 756, 666, 581, 544.

∞ Γενική μέθοδος σύνθεσης των πενταφθοροαιθύλο κετονών από τα αντίστοιχα οξέα

Σε αναδευόμενο διάλυμα του οξέος (1 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (40 ml) και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται άνυδρο DMF (40 μL) και (COCl)₂ (3 mmol). Ακολουθεί ανάδευση για 3 ώρες ώστε να σχηματιστεί το άκυλο χλωρίδιο και στη συνέχεια συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση της περίσσειας του οξάλυλο χλωριδίου. Το χλωρίδιο του οξέος διαλύεται σε άνυδρο CH₂Cl₂ (10 ml) και ακολουθεί στάγδην προσθήκη πυριδίνης (0.64 ml, 8 mmol) και πενταφθοροπροπιονικού ανυδρίτη, PFPA (1.17 ml, 6 mmol) στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα Ar. Έπειτα από 3h ανάδευση η αντίδραση ψύχεται ξανά

στους 0 °C και διακόπτεται με την προσθήκη νερού (2 ml) ακολουθούμενη από επιπλέον ανάδευση για 30 min. Προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NaCl, η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική εκχυλίζεται 2 φορές με CH₂Cl₂. Οι οργανικές φάσεις συγκεντρώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλυσης πετρελαϊκό αιθέρα/οξικό αιθυλεστέρα 8/2.

5-(6,6,7,7,7-πενταφθορο-5-οξοεπτυλ)-1H-3-καρβαλδεΐδη του ινδολίου (159)



M.T.: C₁₆H₁₄F₅NO₂

M.B.: 347.28 mg/mmol

Καφέ στερεό. Απόδοση 26% (19.6mg).

Σ.Τ.: 60 - 62°C

R_f(9): 0.71

¹H NMR: δ 10.00 (s, 1H, CHO), 9.16 (br s, 1H, NH), 8.12 (s, 1H, H₄), 7.86 (d, 1H, H₂, *J*= 1.8 Hz), 7.38 (d, 1H, H₇, *J*= 5.6 Hz), 7.16 (d, 1H, H₆, *J*= 5.6 Hz), 4.51 (br s, 2H, 2xOH), 2.90 – 2.70 (m, 4H, 2xCH₂), 1.80 – 1.65 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 194.4 (t, CO, *J*=23.6 Hz), 185.5 (CHO), 136.8, 136.3, 135.4, 125.3, 124.6, 122.00 – 100.00 (CF₂, CF₃), 121.1, 119.2, 111.5, 37.2, 35.6, 31.0, 21.9.

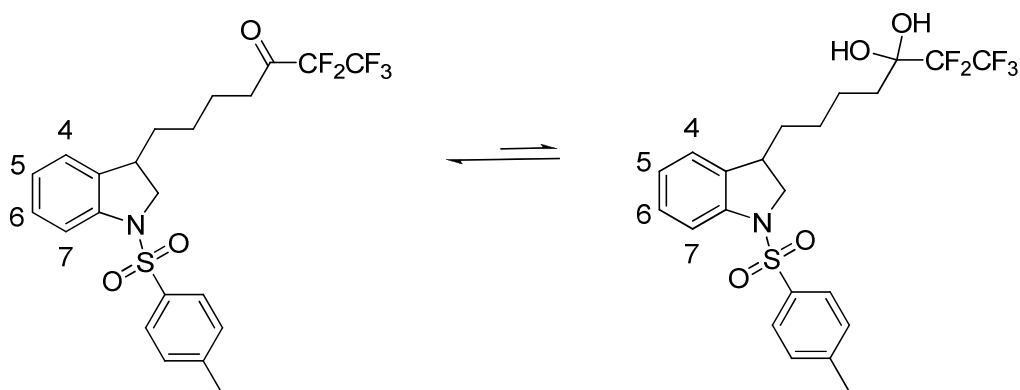
¹⁹F NMR: δ -81.93 (CF₃), [-82.99 (CF₃), -121.95 (CF₂)], -123.36 (CF₂).

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 348 ([M+H]⁺, 100), 365 ([M+NH₄]⁺, 70).

HRMS *m/z*: 346.0876 (346.0872) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3251, 3052, 2925, 2858, 2741, 1573, 1644, 1586, 1526, 1467, 1435, 1393, 1335, 1199, 1141, 946, 916, 789, 722, 650, 617.

1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-{1-[(4-μεθυλφαινυλ)σουλφονυλ-2,3-διϋδρο-1*H*-ινδολ-3-υλ]επτανόνη-3 (167)



M.T.: C₂₂H₂₂F₅NO₃S

M.B.: 475.47 mg/mmol

Πορτοκαλόχρουν στερεό. Απόδοση 80% (102.7 mg).

Σ.Τ.: 70 – 72°C

R_f (10): 0.85

¹H NMR: δ 7.75 – 7.60 (m, 3H, H₄, Tosyl), 7.30 – 7.15 (m, 3H, H₇, Tosyl), 7.10 – 6.90 (m, 2H, H₅, H₆), 3.91 (dd, 1H, CHH, *J*₁= 9.2 Hz, *J*₂= 10.0 Hz), 3.54 (dd, 1H, CHH, *J*₁= 5.8 Hz, *J*₂= 10.4 Hz), 3.20 – 3.00 (m, 1H, CH), 2.70 (t, 2H, CH₂, *J*= 7.0 Hz), 2.36 (s, 3H, CH₃), 1.77 (br s, 2H, 2xOH), 1.70 – 1.45 (m, 2H, CH₂), 1.35 – 1.10 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 201.3, 144.1, 142.2, 138.3, 134.5, 129.6, 128.1, 127.3, 124.3, 123.6, 122.0 – 110.0 (CF₂, CF₃), 114.8, 55.3, 39.7, 35.9, 34.5, 25.9, 22.2, 21.5.

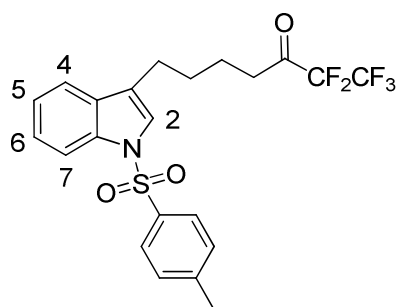
¹⁹F NMR: δ -82.27 (CF₃), -123.77 (CF₂).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 474 ([M-H]⁻, 99).

HRMS m/z: 474.1169 (474.1168) [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): 3351, 2923, 2855, 1752, 1714, 1655, 1600, 1523, 1458, 1401, 1356, 1217, 1167, 1116, 1042, 938, 814, 754, 668, 580, 543.

1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-(1-τοσυλ-1*H*-ινδολ-3-υλ)επτανόνη-3 (170)



M.T.: C₂₂H₂₀F₅NO₃S

M.B.: 473.46 mg/mmol

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 60% (77.6 mg)

Σ.Τ.: 81-85°C

R_f(7): 0.76

¹H NMR: δ 7.98 (d, 1H, H₄, *J*= 7.4 Hz), 7.74 (d, 2H, Tosyl, *J*= 8.4 Hz), 7.45 (d, 1H, H₇, *J*= 6.6 Hz), 7.36 – 7.14 (m, 5H, H₂, H₅, H₆, Tosyl), 2.82 – 2.61 (m, 4H, 2xCH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.78 – 1.64 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 194.1 (t, CO, *J*= 26.1 Hz), 144.7, 135.3, 135.2, 130.8, 129.8, 128.8, 126.7, 124.7, 123.0, 122.7, 122.4, 119.3, 117.8 (qt, CF₃, *J*_{C-F}= 34.1 Hz, *J*_{C-C-F}= 285.3 Hz), 113.8, 106.8 (tq, CF₂, *J*_{C-F}= 37.9 Hz, *J*_{C-C-F}= 265.2 Hz), 37.1, 29.7, 27.8, 24.5, 21.5.

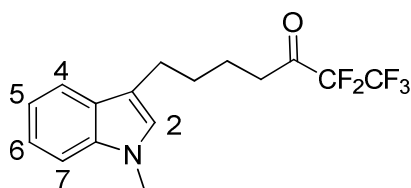
¹⁹F NMR: δ -82.29 (CF₃), -123.74 (CF₂).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 472 ([M-H]⁻, 97).

HRMS m/z: 472.1016 (472.1011) [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): 2925, 2855, 1754, 1599, 1449, 1369, 1279, 1196, 1173, 1124, 1095, 1020, 972, 812, 748, 670, 576, 537.

1,1,1,2,2-πενταφθορο-7-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ)επτανόνη-3 (175)



M.T.: C₁₆H₁₆F₅NO

M.B.: 333.30 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 20% (38.0 mg)

R_f(1): 0.61

¹H NMR: δ 7.59 (d, 1H, H₄, *J*= 7.8 Hz), 7.36 – 7.06 (m, 3H, H₅, H₆, H₇), 6.85 (s, 1H, H₂), 3.76 (s, 3H, CH₃), 2.88 – 2.71 (m, 4H, 2xCH₂), 1.84 – 1.70 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 194.4 (t, CO, *J*= 26.3 Hz), 137.0, 127.7, 126.1, 121.5, 118.8, 118.6, 117.8 (qt, CF₃, *J*_{C-F}= 34.0 Hz, *J*_{C-C-F}= 285.2 Hz), 115.6, 109.1, 106.9 (tq, CF₂, *J*_{C-F}= 37.7 Hz, *J*_{C-C-F}= 265.2 Hz), 37.2, 32.5, 29.3, 24.7, 22.1.

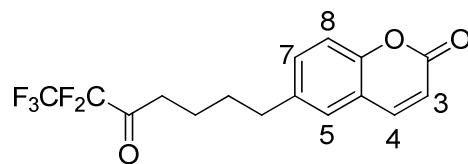
¹⁹F NMR: δ -82.31 (CF₃), -123.78 (CF₂).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 334 ([M+H]⁺, 100).

HRMS m/z: 332.1086 (332.1079) [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): 3054, 2936, 2861, 1754, 1615, 1474, 1375, 1331, 1217, 1200, 1014, 942, 741.

6-(6,6,7,7,7-πενταφθορο-5-οξοεπτυλ)-2H-χρωμενόνη-2 (180)



M.T. : C₁₆H₁₃F₅O₃

M.B.: 348.26 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 41% (45.4 mg)

R_f(8): 0.70

¹H NMR: δ 7.79 (dd, 1H, H₄, *J* = 9.6 Hz), 7.55 – 7.30 (m, 3H, H₅, H₇, H₈), 6.51 (d, 1H, H₃, *J* = 9.6 Hz), 3.05 – 2.70 (m, 4H, 2xCH₂), 1.95 – 1.70 (m, 4H, 2xCH₂).

¹³C NMR: δ 194.4 (t, CO, *J* = 26.1 Hz), 161.2 (OCO), 152.7, (144.2), 143.6, 138.1, (132.6), 127.3, 126.3, 124.4, 118.0 (qt, CF₃, *J*_{C-F} = 33.9 Hz, *J*_{C-C-F} = 285.0 Hz), 117.1, (116.2), 107.1 (tq, CF₃, *J*_{C-F} = 37.7 Hz, *J*_{C-C-F} = 264.4 Hz), 37.3, 34.9, 30.5, 22.2.

¹⁹F NMR: δ -82.33(CF₃), -123.80 (CF₂).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 349 ([M+H]⁺, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 347 ([M-H]⁻, 100).

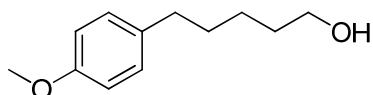
HRMS m/z: 347.0724 (347.0712) [M-H]⁻.

IR (cm⁻¹): 2933, 2865, 1731, 1625, 1603, 1574, 1448, 1402, 1335, 1198, 1101, 915, 830, 752, 720 608.

∞ Γενική μέθοδος αναγωγής εστέρων σε πρωτοταγείς αλκοόλες

Σε αναδεδόμενο διάλυμα του εστέρα (1 mmol) σε Et₂O (10 ml) υπό ατμόσφαιρα Ar, προστίθεται στάγδην το αναγωγικό αντιδραστήριο DIBAL-H (διάλυμα 1M σε εξάνια, 2.3 mmol, 2.3 ml). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 2 ώρες. Ακολούθως, προστίθενται 20 ml νερού και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά ακόμα. Απομονώνεται η οργανική στιβάδα και γίνονται εκχυλίσεις της υδατικής στιβάδας 3 φορές με 50 ml Et₂O. Οι οργανικές φάσεις συγκεντρώνονται, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ διαιθυλαιθέρα 8/2.

5-(4-μεθοξυφαινυλ)πεντανόλη-1 (82)



M.T. : C₁₂H₁₈O₂

M.B.: 194.27 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 91% (954.6 mg)

R_f(1): 0.10

¹H NMR: δ 7.10 (d, 2H, arom, *J*= 8.4 Hz), 6.84 (d, 2H, arom, *J*= 8.0 Hz), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.63 (t, 2H, CH₂OH, *J*= 6.4 Hz), 2.58 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.4 Hz), 1.78 (br s, 1H, OH), 1.75 – 1.55 (m, 4H, 2xCH₂), 1.50 – 1.30 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR: δ 157.5, 134.6, 129.2, 113.6, 62.8, 55.2, 34.9, 32.6, 31.4, 25.3.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 212 ([M+NH₄]⁺, 100).

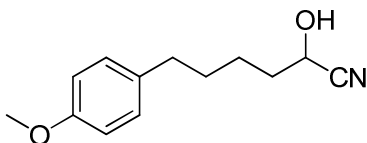
∞ Γενική μέθοδος οξείδωσης πρωτοταγών αλκοολών σε αλδεΐδες και ακολούθως σε κυανυδρίνες

Σε αναδευόμενο διάλυμα της αλκοόλης (1mmol) σε τολουόλιο και οξικό αιθυλεστέρα (1:1, 6 ml) προστίθενται H₂O (0.5 ml) και NaBr (0.11 g, 1.1 mmol). Το μίγμα ψύχεται στους -5°C και υπό έντονη ανάδευση γίνεται προσθήκη του AcNH-TEMPO (0.21 mg, 0.01 mmol). Ακολουθεί, μέσα σε διάστημα μίας ώρας και πάντα στους -5°C, προσθήκη υδατικού διαλύματος 0.5 M σε NaOCl (2.2 ml, 1.1 mmol), NaHCO₃ (0.24 g, 3 mmol) και H₂O. Αποχωρίζεται η υδατική φάση από την οργανική και η οργανική εκχυλίζεται, κατά σειρά, με τα εξής υδατικά διαλύματα: 5% KI σε 1% κιτρικό οξύ, 10% Na₂S₂O₃ και κορεσμένο διάλυμα NaCl. Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής και συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν χρησιμοποιείται απευθείας στην επόμενη αντίδραση.

Σε διάλυμα της ακατέργαστης αλδεΐδης (1 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (1.3 ml) προστίθενται υδατικό διάλυμα NaHSO₃ (0.25 ml, 6 M) προς σχηματισμό λευκού στερεού άλατος. Συνεχίζεται η ανάδευση του διαλύματος για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη και προσθήκη νερού (1 ml). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και υπό έντονη ανάδευση γίνεται στάγδην προσθήκη υδατικού διαλύματος KCN 6 M (0.25 ml, 15 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 18 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια προστίθεται διχλωρομεθάνιο για την παραλαβή του προϊόντος και η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνεται και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται

υπό ελαττωμένη πίεση. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ οξικό αιθυλεστέρα 8/2.

2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξανονιτρίλιο (83)



M.T. : C₁₃H₁₇NO₂

M.B.: 219.28 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 67% (433.2 mg)

R_f(2): 0.30

¹H NMR: δ 7.11 (d, 2H, arom, *J*= 8.2 Hz), 6.85 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 4.43 (q, 1H, CH, *J*= 6.6 Hz), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.58 (d, 1H, OH, *J*= 6.6 Hz), 2.60 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.0 Hz), 1.95 – 1.80 (m, 2H, CH₂), 1.75 – 1.45 (m, 4H, 2xCH₂).

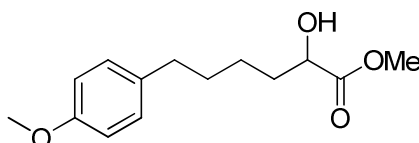
¹³C NMR: δ 157.5, 134.0, 129.2, 120.0, 113.7, 61.0, 55.2, 34.8, 34.5, 30.8, 24.0.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 237 ([M+NH₄]⁺, 100).

∞ Γενική μέθοδος μεθανόλυσης κυανυδρινών

Διάλυμα της κυανυδρίνης (1 mmol) σε άνυδρο HCl/CH₃OH 6 N (0.33 ml) αναδεύονται για 18 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη και προσθήκη H₂O (1 ml) και K₂CO₃, για εξουδετέρωση του pH. Το προϊόν παραλαμβάνεται με εκχύλιση με AcOEt (3x15 ml), ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄ και συμπύκνωση του διαλύτη. Τέλος, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ διαιθυλαιθέρα 8/2.

2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξανοϊκός μεθυλεστέρας (84)



M.T.: C₁₄H₂₀O₃

M.B.: 252.31 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 70% (207.3 mg)

R_f(7): 0.51

^1H NMR: δ 7.09 (d, 1H, arom, $J= 8.4$ Hz), 6.83 (d, 1H, arom, $J= 8.8$ Hz), 4.19 (q, 1H, CH, $J= 5.2$ Hz), 3.79 (s, 3H, PhOCH_3), 3.77 (s, 3H, COOCH_3), 2.77 (d, 1H, OH, $J= 5.6$ Hz), 2.57 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 7.2$ Hz), 1.90 – 1.40 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$).

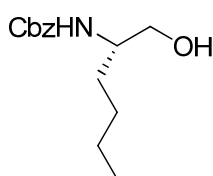
^{13}C NMR: δ 175.7, 157.6, 134.4, 129.2, 113.6, 70.3, 55.2, 52.5, 34.8, 34.2, 31.4, 24.4.

MS (ESI) m/z (%): 253 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 12), 270 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100), 275 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 40).

∞ Γενική μέθοδος αναγωγής αμινοξέων της νορλευκίνης

Διάλυμα της προστατευμένης L-νορλευκίνης (1 mmol) σε άνυδρο THF (5 ml) φέρεται στους -10°C και προστίθεται σε αυτό κατά σειρά η N-μεθυλο-μορφολίνη (1 mmol, 0.11 ml), ο ClCOOEt (1 mmol, 0.10 ml) και μετά από 10 min το NaBH_4 (3 mmol, 113.5 mg). Έπειτα, με τη χρήση σταγονομετρικού χωνιού προστίθεται σταδιακά και πάντα στους -10°C η μεθανόλη (10 ml). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα και μετά προστίθενται 10 ml H_2O και 5% κιτρικό οξύ μέχρι $\text{pH}\sim 7$. Γίνονται εκχυλίσεις 3×20 ml AcOEt , οι οργανικές φάσεις εκπλένονται με 50 ml κορεσμένο διάλυμα NaCl , ξηραίνονται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται. Το τελικό προϊόν στην περίπτωση της Z- προστατευμένης αλκοόλης καταβυθίζεται με παγωμένο πετρελαϊκό αιθέρα ενώ η Boc- προστατευμένη αλκοόλη καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο/ μεθανόλη 98/2.

Z-L-νορλευκινόλη (87)¹⁰⁶



M.T.: $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_3$

M.B.: 251.32 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 50% (1.18 g)

Σ.T.: $89 - 91^\circ\text{C}$ (Βιβλ. $93 - 94^\circ\text{C}$ tetrahydrofuran /hexane)¹⁰⁶

$[\alpha]_{\text{D}} = -22.0$ (c 1, CHCl_3) [Βιβλ. -19.5 (c 1, CHCl_3)]¹⁰⁶

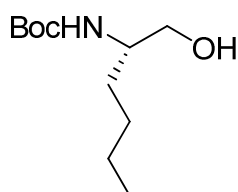
$R_f(13)$: 0.36

^1H NMR: δ 7.40 – 7.30 (m, 5H, arom), 5.11 (s, 2H, PhCH_2), 4.93 (br s, 1H, OCONH), 3.75 – 3.50 (m, 3H, CH, CH_2OH), 2.47 (br s, 1H, OH), 1.60 – 1.25 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 0.90 (t, 3H, CH_3 , $J = 6.6$ Hz).

^{13}C NMR: δ 156.7, 136.3, 128.4, 128.0, 66.7, 65.4, 53.2, 31.0, 28.0, 22.4, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 252 ([M+H]⁺, 100), 274 ([M+Na]⁺, 19).

Boc-L-νορλευκινόλη (92)¹⁰⁷



M.T.: C₁₁H₂₃NO₃

M.B.: 217.30 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 70% (682.9 mg)

Σ.Τ.: 44 – 46°C (Βιβλ. 42 - 44 °C)¹⁰⁷

[α]_D = -20.9 (c 1, CHCl₃)

R_f (14): 0.54

¹H NMR: δ 4.67 (br s, 1H, OCONH), 3.75 – 3.45 (m, 3H, CH₂OH, CH), 2.54 – 2.48 (br s, 1H, OH), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.55 – 1.25 (m, 6H, 3xCH₂), 0.90 (t, 3H, CH₃, J= 6.4 Hz).

¹³C NMR: δ 156.6, 79.5, 65.7, 52.8, 31.2, 28.3, 28.1, 22.5, 13.9.

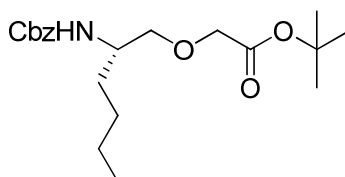
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 218 ([M+H]⁺, 90), 240 ([M+Na]⁺, 74).

∞ Γενική μέθοδος σύνθεσης ψευδοδιπεπτιδίων

1. Με πρώτη ύλη την Z-L-νορλευκινόλη

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της Z-L-νορλευκινόλης (1.6 mmol, 402.1 mg) σε βενζόλιο (1.6 ml) προστίθεται ο *tert*-βουτυλεστέρας (4.8 mmol, 0.71 ml) και υδατικό διάλυμα 50% NaOH (1.6 ml). Έπειτα, προστίθεται ο καταλύτης μεταφοράς φάσης Bu₄NHSO₄ (0.4 mmol, 135.8 mg) και το διφασικό σύστημα παραμένει υπό έντονη ανάδευση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 ώρες. Στη συνέχεια προστίθενται 20 ml AcOEt και 20 ml H₂O, διαχωρίζονται οι δύο φάσεις και η υδατική εκπλένεται 2 φορές με 20 ml AcOEt. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, εκπλένονται με 50 ml κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης πετρελαϊκό αιθέρα/ οξικό αιθυλεστέρα 9/1.

(S)-2-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξυλοξυ)-*tert*-βουτυλεστέρας (88)¹⁰⁰



M.T.: C₂₀H₃₁NO₅

M.B.: 365.46 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 89% (649.6 mg)

[α]_D = -12.4 (c 0.5, CHCl₃) [βιβλ. [α]_D = -12.2 (c 1, CHCl₃)]¹⁰⁰

R_f (5): 0.70

¹H NMR: δ 7.35 – 7.25 (m, 5H, arom), 5.36 (d, 1H, NH, *J* = 7.4 Hz), 5.07 (s, 2H, PhCH₂), 3.91 (s, 2H, OCH₂), 3.80 – 3.65 (m, 1H, CH), 3.55 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁ = 9.2 Hz, *J*₂ = 3.8 Hz), 3.46 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁ = 9.2 Hz, *J*₂ = 4.0 Hz), 1.65 – 1.50 (m, 2H, CH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.35 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.86 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.6 Hz).

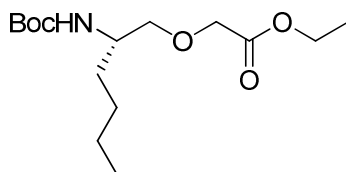
¹³C NMR: δ 169.4, 156.0, 136.6, 128.2, 127.7, 81.4, 73.0, 68.6, 66.2, 50.8, 31.3, 27.9, 27.8, 22.3, 13.8.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 366 ([M+H]⁺, 60), 383 ([M+NH₄]⁺, 100).

2. Με πρώτη ύλη την Boc-L-νορλευκινόλη

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της Boc-L-νορλευκινόλης (1.15 mmol, 250 mg) σε 5ml ξηρού THF και υπό ατμόσφαιρα N₂, προστίθενται το NaH (60% in oil, 1.73 mmol, 69 mg) και το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για 1 ώρα. Έπειτα, προστίθενται ο 18-crown-6 (1.73 mmol, 455.6 mg) διαλυμένος σε 3.5 ml THF. Ύστερα από 10 λεπτά ανάδευσης του μίγματος στους 0°C προστίθεται σταδιακά ο βρωμοξικός αιθυλεστέρας (2.3 mmol, 0.26 ml) διαλυμένος σε 3 ml THF και το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 0°C και για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, συμπυκνώνεται το THF και προστίθενται 10 ml νερό και 30 ml CHCl₃. Διαχωρίζεται η υδατική από την οργανική και εκπλένεται άλλες δύο φορές με 30 ml CHCl₃. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, εκπλένονται με 30 ml κορεσμένο διάλυμα NaCl και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλυσης πετρελαϊκό αιθέρα/ οξικό αιθυλεστέρα 9/1.

(*S*)-2-(2-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλαμινο)εξυλοξυ)αιθυλεστέρας (**93**)¹⁰⁰



M.T.: C₁₅H₂₉NO₅

M.B.: 303.39 mg/mmol

Αχρωμο λάδι. Απόδοση 24% (85.2 mg)

$[\alpha]_D = -14.0$ (c 1, CHCl₃) [βιβλ. $[\alpha]_D = -13.9$ (c 1, CHCl₃)]¹⁰⁰

R_f (5): 0.82

¹H NMR: δ 4.91 (d, 1H, OCONH, *J*= 8.2 Hz), 4.19 (q, 2H, OCH₂CH₃, *J*= 7.0 Hz), 4.05 (s, 2H, OCH₂CO), 3.64 – 3.57 (m, 1H, CH), 3.56 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁= 9.0 Hz, *J*₂= 3.8 Hz), 3.47 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁= 9.2 Hz, *J*₂= 4.0 Hz), 1.60 – 1.42 (m, 2H, CH₂), 1.28 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.39 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 1.19 (t, 3H, OCH₂CH₃, *J*= 7.0 Hz), 0.86 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.8 Hz).

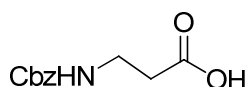
¹³C NMR: δ 170.4, 155.6, 78.9, 73.3, 68.4, 60.8, 50.2, 31.5, 28.3, 28.1, 22.5, 14.1, 14.0.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 304 ([M+H]⁺, 100), 321 ([M+NH₄]⁺, 47).

∞ Γενική μέθοδος προσθήκης της Cbz- προστατευτικής ομάδας σε ελεύθερα αμινοξέα

Διάλυμα του ελεύθερου αμινοξέος (1 mmol) σε NaOH 3N (4 mmol, 1.33 ml) φέρεται στους 0°C και προστίθεται στάγδην το Cbz-Cl (benzyl chloroformate, 1.1 mmol, 0.16 ml). Το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 0°C και σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Προστίθενται 10 ml νερό και 25 ml Et₂O. Διαχωρίζεται η υδατική από την οργανική στιβάδα και εκπλένεται άλλες δύο φορές με 25 ml Et₂O. Η υδατική στιβάδα οξινίζεται με HCl 1N σε pH~2 και εκπλένεται τρεις φορές με 25 ml AcOEt. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, εκπλένονται με 25 ml κορεσμένου διαλύματος NaCl και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται καθαρό με τη συμπύκνωση των οργανικών φάσεων.

4-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)προπανοϊκό οξύ (107)¹⁰⁸



M.T.: C₁₁H₁₃NO₄

M.B.: 223.23 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 83% (744.7 mg)

Σ.T.: 97 – 100 °C (βιβλ. 103 °C)¹⁰⁸

R_f (15): 0.64

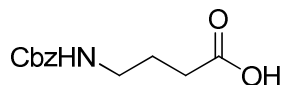
¹H NMR: δ 10.34 (br s, 1H, OH), 7.28 – 7.40 (m, 5H, arom), 5.42 (br s, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, CH₂OCO), 3.35 – 3.55 (m, 2H, NHCH₂), 2.59 (t, 2H, CH₂COOH, *J*= 5.8 Hz).

¹³C NMR: δ 177.2, 156.4, 136.2, 128.5, 128.2, 128.1, 66.8, 36.3, 34.2.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 224 ([M+H]⁺, 100), 241 ([M+NH₄]⁺, 25).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 222 ([M-H]⁻, 100).

4-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)βουτυρικό οξύ (113)¹⁰⁹



M.T.: C₁₂H₁₅NO₄

M.B.: 237.25 mg/mmol

Γκρι στερεό. Απόδοση 65% (1.049 g)

Σ.Τ.: 61 – 63 °C (Βιβλ. 61 – 62 °C)¹⁰⁹

R_f (15): 0.51

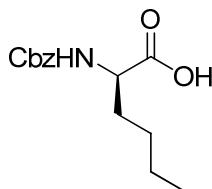
¹H NMR: δ 9.96 (br s, 1H, OH), 7.30 – 7.40 (m, 5H, arom), 5.10 (s, 2H, CH₂OCO), 4.99 (br s, 1H, NH), 3.35 – 3.15 (m, 2H, NHCH₂), 2.40 (t, 2H, CH₂COOH, *J*= 7.2 Hz), 1.84 (quint, 2H, CH₂CH₂COOH, *J*= 7.0 Hz).

¹³C NMR: δ 178.5, 156.5, 136.3, 128.5, 128.1, 66.8, 40.2, 31.1, 24.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 236 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 238 ([M+H]⁺, 100), 255 ([M+NH₄]⁺, 30), 260 ([M+Na]⁺, 16).

(R)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξανοϊκό οξύ (122)¹¹⁰



M.T.: C₁₄H₁₉NO₄

M.B.: 265.30 mg/mmol

Καφέ-λευκό στερεό. Απόδοση 88% (448.9 mg)

Σ.Τ.: 49 – 51 °C (Βιβλ. 51 – 52 °C)¹¹⁰

[α]_D = +1.4 (c 1, CHCl₃) [Βιβλ. [α]_D = +8.2 (c 1, MeOH)]¹¹⁰

R_f (15): 0.46

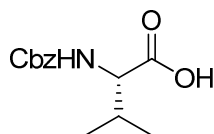
¹H NMR: δ 10.76 (br s, 1H, OH), 7.45 – 7.20 (m, 5H, arom), 5.39 (d, 1H, OCONH, *J*= 8.2 Hz), 5.11 (s, 2H, CH₂OCO), 4.50 – 4.18 (m, 1H, CH), 1.97 – 1.55 (m, 2H, CHCH₂), 1.47 – 1.13 (m, 4H, 2xCH₂), 1.01 – 0.69 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR: δ 177.6, 156.0, 136.0, 128.5, 128.2, 128.1, 67.1, 53.7, 32.0, 27.2, 22.2, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 264 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 266 ([M+H]⁺, 66), 283 ([M+NH₄]⁺, 100), 288 ([M+Na]⁺, 58).

(S)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)-3-μεθυλβουτανοϊκό οξύ (142)



M.T.: C₁₃H₁₇NO₄

M.B.: 251.28 mg/mmol

Καφέ σιρόπι. Απόδοση 94% (452.7 mg)

R_f (15): 0.47

[α]_D = +3.5 (c 1, CHCl₃)

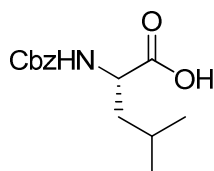
¹H NMR: δ 10.85 (br s, 1H, OH), 7.45 – 7.20 (m, 5H, arom), 5.52 (d, 1H, OCONH, *J*= 9.0 Hz), 5.15 (s, 2H, CH₂OCO), 4.38 (dd, 1H, CHCOOH, *J*₁= 4.4 Hz, *J*₂= 9.0 Hz), 2.35 – 2.10 (m, 1H, CH), 1.00 (d, 3H, CH₃, *J*= 6.8 Hz), 0.92 (d, 3H, CH₃, *J*= 6.8 Hz).

¹³C NMR: δ 176.6, 156.4, 135.9, 128.4, 128.1, 128.0, 67.1, 58.7, 30.9, 18.9, 17.2.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 250 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 252 ([M+H]⁺, 57), 269 ([M+NH₄]⁺, 100), 274 ([M+Na]⁺, 31).

(S)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)-4-μεθυλπεντανοϊκό οξύ (147)¹¹¹



M.T.: C₁₄H₁₉NO₄

M.B.: 265.30 mg/mmol

Ελαφρώς καφέ λάδι. Απόδοση 98% (498.2 mg)

R_f (15): 0.49

[α]_D = -12.8 (c 1, CHCl₃) [Βιβλ. [α]_D = -14.9 (c=1, EtOH)]¹¹¹

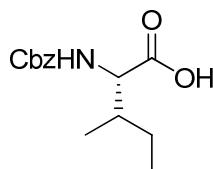
¹H NMR: δ 10.97 (br s, 1H, OH), 7.45 – 7.20 (m, 5H, arom), 5.45 (d, 1H, NH, *J*= 8.6 Hz), 5.12 (s, 2H, CH₂OCO), 4.50 – 4.20 (m, 1H, CHCOOH), 1.80 – 1.45 (m, 3H, CH, CH₂), 1.01 – 0.82 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR: δ 178.0, 156.2, 135.9, 128.4, 128.1, 128.0, 67.1, 52.3, 41.2, 24.6, 22.8, 21.5.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 264 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 266 ([M+H]⁺, 52), 283 ([M+NH₄]⁺, 100), 288 ([M+Na]⁺, 31).

(2*S*,3*R*)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)-3-μεθυλπεντανοϊκό οξύ (152)¹¹²



M.T.: C₁₄H₁₉NO₄

M.B.: 265.30 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 97% (493.9 mg)

R_f (15): 0.45

[α]_D = +9.5 (c 1, CHCl₃)

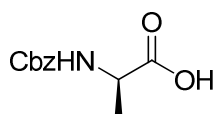
¹H NMR: δ 11.11 (br s, 1H, OH), 7.47 – 7.22 (m, 5H, arom), 5.56 (d, 1H, OCONH, *J* = 8.8 Hz), 5.13 (s, 2H, CH₂OCO), 4.42 (dd, 1H, CHCOOH, *J*₁ = 4.6 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz), 2.04 – 1.80 (m, 1H, CH), 1.57 – 1.37 (m, 1H, CHH), 1.33 – 1.08 (m, 1H, CHH), 1.05 – 0.78 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR: δ 176.6, 156.3, 135.9, 128.4, 128.1, 128.0, 67.1, 58.2, 37.6, 24.6, 15.3, 11.5.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 264 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 266 ([M+H]⁺, 64), 283 ([M+NH₄]⁺, 100), 288 ([M+Na]⁺, 42).

(*R*)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)προπανοϊκό οξύ (136)¹¹³



M.T.: C₁₁H₁₃NO₄

M.B.: 223.23 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 37% (187.0 mg)

Σ.Τ.: 81 – 83 °C (Βιβλ. 71 – 73 °C σε H₂O)¹¹³

R_f (15): 0.26

[α]_D = +5.2 (c 1, CHCl₃) [Βιβλ. [α]_D = +12.1 (c 0.9, CHCl₃)]¹¹³

¹H NMR: δ 7.79 (br s, 1H, OH), 7.45 – 7.26 (m, 5H, arom), 5.36 (d, 1H, OCONH, *J* = 7.4 Hz), 5.13 (s, 2H, CH₂OCO), 4.51 – 4.28 (m, 1H, CH), 1.47 (d, 3H, CH₃, *J* = 7.2 Hz).

¹³C NMR: δ 178.0, 156.7, 136.0, 128.5, 128.1, 67.0, 56.2, 18.3.

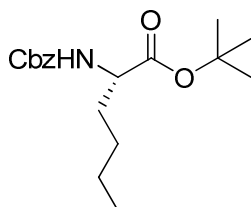
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 222 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 224 ([M+H]⁺, 82), 241 ([M+NH₄]⁺, 100).

∞ Γενική μέθοδος εστεροποίησης αμινο-προστατευμένων αμινοξέων

Διάλυμα του αμινο-προστατευμένου αμινοξέος (1 mmol) σε ξηρό CH₂Cl₂ (2.0 ml) φέρεται στους 0 °C και προστίθεται σε αυτό κατά σειρά το DMAP (0.1 mmol, 12.2 mg), η *tert*-βουτανόλη (3 mmol, 0.29 ml) και το DCC (1.2 mmol, 247.6 mg). Το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα στους 0 °C και για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ο οργανικός διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθενται 20 ml AcOEt. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα NaCl, 5% κιτρικό οξύ, κορεσμένο διάλυμα NaCl, 5% NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με στήλη χρωματογραφίας silica gel και σύστημα έκλυσης διαφορετικό για κάθε προϊόν.

(S)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (97)



M.T.: C₁₈H₂₇NO₄

M.B.: 321.41 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 26% (68.1 mg)

[α]_D = -10.2 (c 0.5, CHCl₃)

R_f (11): 0.42

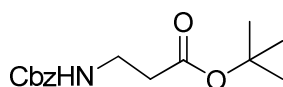
¹H NMR: δ 7.40 – 7.28 (m, 5H, arom), 5.38 (d, 1H, OCONH, *J* = 8.0 Hz), 5.11 (s, 2H, PhCH₂O), 4.35 – 4.20 (m, 1H, CH), 1.90 – 1.55 (m, 2H, CHCH₂), 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.38 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.90 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.6 Hz).

¹³C NMR: δ 171.7, 155.7, 136.3, 128.4, 128.0, 81.7, 66.7, 54.2, 32.4, 27.9, 27.0, 22.2, 13.8.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 322 ([M+H]⁺, 100), 344 ([M+Na]⁺, 15).

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (-): 320 ([M-H]⁻, 34).

3-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (108)¹¹⁴



M.T.: C₁₅H₂₁NO₄

M.B.: 279.33 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 55% (326.4 mg)

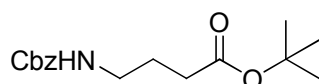
R_f (11): 0.58

¹H NMR: δ 7.40 – 7.28 (m, 5H, arom), 5.45 (br s, 1H, OCONH), 5.08 (s, 2H, PhCH₂), 3.48 – 3.33 (m, 2H, NHCH₂), 2.43 (t, 2H, CH₂COOBu^t, *J*= 6.2 Hz), 1.43 [s, 9H, C(CH₃)₃].

¹³C NMR: δ 171.4, 156.1, 136.4, 128.3, 127.9, 80.8, 66.4, 36.6, 35.3, 27.9.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 280 ([M+H]⁺, 25), 297 ([M+NH₄]⁺, 100).

4-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (114)¹¹⁵



M.T.: C₁₆H₂₃NO₄

M.B.: 293.36 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 76% (282.7 mg)

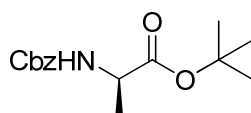
R_f (8): 0.25

¹H NMR: δ 7.40 – 7.28 (m, 5H, arom), 5.08 (s, 2H, PhCH₂O), 4.99 (br s, 1H, OCONH), 3.30 – 3.15 (m, 2H, NHCH₂), 2.26 (t, 2H, CH₂COOBu^t, *J*= 7.2 Hz), 1.78 (quint, 2H, CH₂CH₂BOOBu^t, *J*= 7.0 Hz), 1.43 [s, 9H, C(CH₃)₃].

¹³C NMR: δ 172.5, 156.3, 136.5, 128.4, 128.0, 80.4, 66.5, 40.3, 32.7, 28.0, 25.1.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 294 ([M+H]⁺, 25), 311 ([M+NH₄]⁺, 100).

(*R*)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (137)



M.T.: C₁₅H₂₁NO₄

M.B.: 279.33 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 64% (119.8 mg)

R_f (12): 0.66

¹H NMR: δ 7.45 – 7.29 (m, 5H, arom), 5.36 (d, 1H, OCONH, *J*= 7.4 Hz), 5.12 (s, 2H, PhCH₂), 4.37 – 4.16 (m, 1H, CH), 1.47 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.39 (d, 3H, CH₃, *J*= 7.2 Hz).

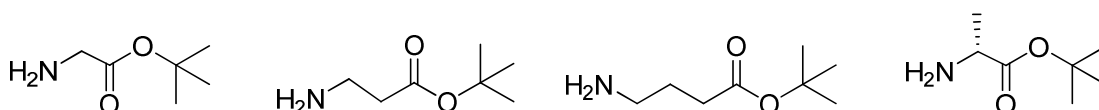
¹³C NMR: δ 172.2, 155.5, 136.3, 128.5, 128.1, 81.9, 66.8, 50.1, 27.9, 18.9.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (-): 278 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 280 ([M+H]⁺, 26), 297 ([M+NH₄]⁺, 100).

∞ Γενική μέθοδος απομάκρυνσης της Cbz- προστατευτικής ομάδας

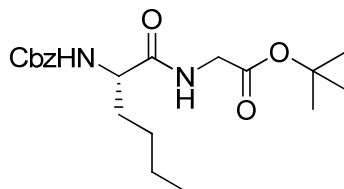
Σε διάλυμα της Cbz- προστατευμένης ένωσης (1 mmol) σε THF (10 ml) προστίθεται ο καταλύτης Pd/C 10%. Το μίγμα αναδευέται υπό ατμόσφαιρα H₂, σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Έπειτα, γίνεται διήθηση υπό celite και συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Οι αμίνες χρησιμοποιούνται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό για τις επόμενες αντιδράσεις σύζευξης.



∞ Γενική μέθοδος σύνθεσης διπεπτιδίων

Σε διάλυμα του αμινο-προστατευμένου αμινοξέος (1 mmol) και του καρβοξυ-προστατευμένου αμινοξέος (1 mmol) ή του υδροχλωρικού άλατος αυτού (1 mmol) σε CH₂Cl₂ (10 ml) στους 0 °C προστίθενται κατά σειρά Et₃N (1.1 mmol, 0.16 ml ή 2.2 mmol, 0.31 ml), υδατοδιαλυτό καρβοδιιμίδιο WSCI.HCl (1.1 mmol, 210.9 mg) και 1-υδρόξυ βενζοτριαζόλιο HOBt (1 mmol, 135.1 mg). Το μίγμα αναδευέται στους 0 °C για 1 ώρα και ολονυκτίς σε θερμοκρασία δωματίου. Ο οργανικός διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθενται 20 ml AcOEt. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα NaCl, 5% κιτρικό οξύ, κορεσμένο διάλυμα NaCl, 5% NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με στήλη χρωματογραφίας silica gel και σύστημα έκλουσης διαφορετικό για κάθε προϊόν.

(S)-2-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξαναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (103)¹⁰⁰



M.T.: C₂₀H₃₀N₂O₅

M.B.: 378.46 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 53% (300.0 mg)

R_f (13): 0.55

Σ.T.: 84.5 – 86 °C (Βιβλ. 80–82 °C)¹⁰⁰

[α]_D = -5.3 (c 1, CHCl₃) [Βιβλ. [α]_D = -8.4 (c 0.5 CHCl₃)]¹⁰⁰

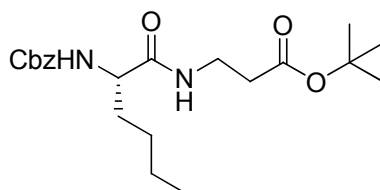
$^1\text{H NMR}$: δ 7.40 – 7.28 (m, 5H, arom), 6.63 (br s, 1H, NHCO), 5.47 (d, 1H, OCONH, $J= 8.0$ Hz), 5.11 (s, 2H, PhCH₂), 4.30 – 4.13 (m, 1H, CH), 3.91 (d, 2H, CH₂COOBu^t, $J= 5.0$ Hz), 1.95 – 1.55 (m, 2H, CHCH₂), 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.40 – 1.23 (m, 4H, 2xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, $J= 6.4$ Hz).

$^{13}\text{C NMR}$: δ 171.9, 168.7, 156.2, 136.1, 128.5, 128.1, 128.0, 82.3, 67.0, 54.9, 41.9, 32.4, 28.0, 27.5, 22.3, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 377 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 379 ([M+H]⁺, 90), 396 ([M+NH₄]⁺, 100).

(S)- 3-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξαναμιδο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (109)



M.T.: C₂₁H₃₂N₂O₅

M.B.: 392.49 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 46% (104.0 mg)

R_f (11): 0.88

[α]_D = -7.2 (c 1, CHCl₃)

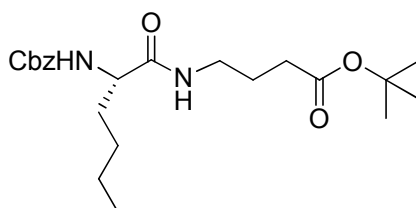
$^1\text{H NMR}$: δ 7.41 – 7.28 (m, 5H, arom), 6.65 – 6.45 (m, 1H, NHCO), 5.39 (d, 1H, OCONH, $J= 7.4$ Hz), 5.10 (s, 2H, PhCH₂), 4.20 – 4.00 (m, 1H, CH), 3.57 – 3.38 (m, 2H, NHCH₂), 2.43 (t, 2H, CH₂COOBu^t, $J= 6.0$ Hz), 1.80 – 1.50 (m, 2H, CHCH₂), 1.45 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.35 – 1.22 (m, 4H, 2xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, $J= 6.6$ Hz).

$^{13}\text{C NMR}$: δ 171.7, 171.6, 156.0, 136.2, 128.5, 128.1, 128.0, 81.1, 66.9, 55.0, 35.0, 34.9, 32.6, 28.1, 27.4, 22.4, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 391 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 393 ([M+H]⁺, 100), 410 ([M+NH₄]⁺, 65), 415 ([M+Na]⁺, 24).

(S)-4-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξαναμιδο)βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (115)



M.T.: C₂₂H₃₄N₂O₅

M.B.: 406.52 mg/mmol

Καφέ-ροζ στερεό. Απόδοση 70% (209.2 mg)

R_f (8): 0.74

[α]_D = -2.9 (c 1, CHCl₃)

Σ.Τ.: 57 – 59 °C

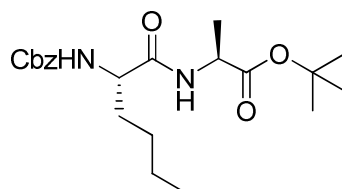
¹H NMR: δ 7.35 – 7.28 (m, 5H, arom), 6.75 (br s, 1H, NHCO), 5.69 (d, 1H, OCONH, *J* = 8.4 Hz), 5.07 (s, 2H, PhCH₂), 4.20 – 4.10 (m, 1H, CH), 3.32 – 3.15 (m, 2H, NHCH₂), 2.23 (t, 2H, CH₂COOBu^t, *J* = 7.2 Hz), 1.83 – 1.55 (m, 4H, CH₂CH₂COOBu^t, CHCH₂), 1.41 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.35 – 1.24 (m, 4H, 2xCH₂), 0.85 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.4 Hz).

¹³C NMR: δ 172.9, 172.2, 156.4, 136.5, 128.7, 128.3, 128.2, 80.8, 67.1, 55.3, 39.1, 33.0, 32.9, 28.3, 27.8, 24.8, 22.6, 14.1.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 407 ([M+H]⁺, 100), 424 ([M+NH₄]⁺, 25).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 405 ([M-H]⁻, 100).

(S)-2-((S)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξαναμιδο)προπανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (132)



M.T.: C₂₁H₃₂N₂O₅

M.B.: 392.49 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 72% (568.5 mg)

R_f (11): 0.79

Σ.Τ.: 91 – 93 °C

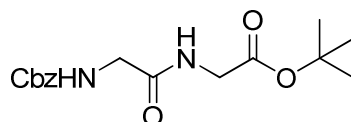
¹H NMR: δ 7.42 – 7.28 (m, 5H, arom), 6.50 (d, 1H, NHCO, *J* = 7.2 Hz), 5.36 (d, 1H, OCONH, *J* = 7.8 Hz), 5.12 (s, 2H, PhCH₂), 4.55 – 4.35 (m, 1H, CHCOOBu^t), 4.25 – 4.06 (m, 1H, CH), 1.95 – 1.22 [m, 18H, 3xCH₂, C(CH₃)₃, CHCH₃], 0.89 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.6 Hz).

¹³C NMR: δ 171.8, 171.1, 128.5, 128.1, 128.0, 82.1, 66.9, 54.9, 48.6, 32.6, 27.9, 27.4, 22.4, 18.5, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 393 ([M+H]⁺, 80).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 391 ([M-H]⁻, 25).

2-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)ακεταμιδο)οξικός tert-βουτυλεστέρας (127)¹¹⁶



M.T.: C₁₆H₂₂N₂O₅

M.B.: 322.36 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 58% (373.5 mg)

R_f (12): 0.24

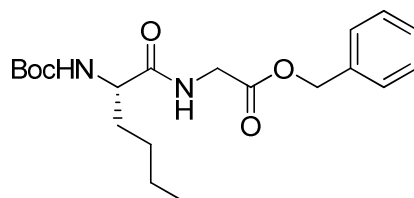
¹H NMR: δ 7.39 – 7.28 (m, 5H, arom), 6.68 (br s, 1H, NHCO), 5.66 (br s, 1H, OCONH), 5.13 (s, 2H, PhCH₂), 3.98 – 3.85 (m, 4H, 2xNHCH₂CO), 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃].

¹³C NMR: δ 169.3, 168.8, 156.6, 136.0, 128.4, 128.1, 127.9, 82.3, 67.0, 44.2, 41.7, 27.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 321 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 323 ([M+H]⁺, 49), 340 ([M+NH₄]⁺, 100).

(S)-2-(2-(tert-βουτοξυκαρβονυλαμινο)εξαναμιδο)οξικός βενζυλεστέρας (118)¹¹⁷



M.T.: C₂₀H₃₀N₂O₅

M.B.: 378.46 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 46% (91.8 mg)

R_f (7): 0.50

Σ.Τ.: 78 – 80 °C (Βιβλ. 86 – 87 °C)¹¹⁷

[α]_D²⁰ = -12.5 (c 1, CHCl₃)

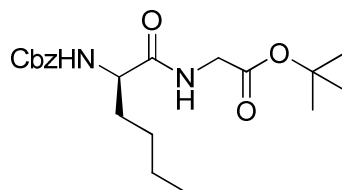
¹H NMR: δ 7.39 – 7.30 (m, 5H, arom), 6.38 (br s, 1H, NHCO), 5.17 (s, 2H, PhCH₂), 5.11 (br s, 1H, OCONH), 4.23 – 4.05 [(m, 1H, CH), 4.07 (d, 2H, NHCH₂CO, J = 5.4 Hz), 1.92 – 1.70 (m, 1H, CHHCH), 1.67 – 1.48 (m, 1H, CHHCH), 1.43 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.37 – 1.27 (m, 4H, 2xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, J = 6.0 Hz).

¹³C NMR: δ 172.7, 169.6, 155.7, 135.1, 128.6, 128.5, 128.3, 80.1, 67.2, 54.4, 41.2, 32.2, 28.2, 27.6, 22.3, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 377 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 379 ([M+H]⁺, 73), 396 ([M+NH₄]⁺, 100).

(R)-2-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξαναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (123)



M.T.: C₂₀H₃₀N₂O₅

M.B.: 378.46 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 66% (217.0 mg)

R_f (12): 0.44

Σ.Τ.: 84 – 85 °C

[α]_D = +9.2 (c 1, CHCl₃)

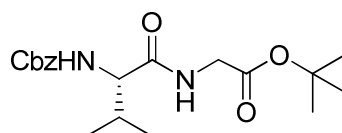
¹H NMR: δ 7.40 – 7.20 (m, 5H, arom), 6.75 (br s, 1H, NHCO), 5.60 (d, 1H, OCONH, *J* = 8.2 Hz), 5.17 – 5.00 (m, 2H, PhCH₂), 4.30 – 4.13 (m, 1H, CH), 3.89 (d, 2H, CH₂COOBu^t, *J* = 5.0 Hz), 1.93 – 1.47 (m, 2H, CHCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.35 – 1.17 (m, 4H, 2xCH₂), 0.86 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.8 Hz).

¹³C NMR: δ 172.0, 168.7, 156.1, 136.1, 128.4, 128.1, 128.0, 82.2, 66.9, 54.8, 41.8, 32.4, 27.9, 27.5, 22.3, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 377 ([M-H]⁻, 57).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 379 ([M+H]⁺, 78), 396 ([M+NH₄]⁺, 100).

(S)-2-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)-3-μεθυλβουταναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (143)



M.T.: C₁₉H₂₈N₂O₅

M.B.: 364.44 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 57% (209.3 mg)

R_f (12): 0.60

Σ.Τ.: 145 – 148 °C

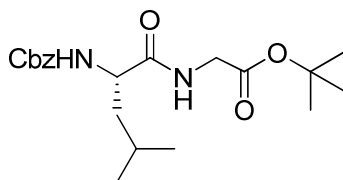
[α]_D = -5.3 (c 1, CHCl₃)

¹H NMR: δ 7.44 – 7.20 (m, 5H, arom), 6.82 (br s, 1H, NHCO), 5.69 (d, 1H, OCONH, *J* = 9.0 Hz), 5.17 – 5.00 (m, 2H, PhCH₂), 4.19 – 4.05 (m, 1H, CH), 3.91 (dd, 2H, CH₂COOBu^t, *J*₁ = 5.4 Hz, *J*₂ = 13.2 Hz), 2.21 – 2.03 (m, 1H, CH), 1.45 [s, 9H, C(CH₃)₃], 0.97 (d, 3H, CH₃, *J* = 6.8 Hz), 0.93 (d, 3H, CH₃, *J* = 6.8 Hz).

^{13}C NMR: δ 171.4, 169.6, 156.4, 136.1, 128.4, 128.0, 127.9, 82.2, 66.9, 60.1, 41.8, 31.0, 27.9, 19.2, 17.7.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 365 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 382 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 60), 387 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 25).

(S)-2-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)-4-μεθυλπενταναμιδο)οξικός tert-βουτυλεστέρας (148)



M.T.: $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$

M.B.: 378.46 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 80% (286.2 mg)

R_f (8): 0.47

$[\alpha]_D = -16.1$ (c 1, CHCl_3)

^1H NMR: δ 7.32 – 7.18 (m, 5H, arom), 7.13 (t, 1H, NHCO , $J=5.0$ Hz), 5.97 (d, 1H, OCONH , $J=8.6$ Hz), 5.01 (q, 2H, PhCH_2 , $J=8.4$ Hz), 4.39 – 4.22 (m, 1H, CH), 3.82 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{COOBu}^t$, $J_1=2.6$ Hz, $J_2=5.2$ Hz), 1.70 – 1.47 (m, 3H, CHCH_2), 0.86 (d, 6H, $2\times\text{CH}_3$, $J=5.8$ Hz).

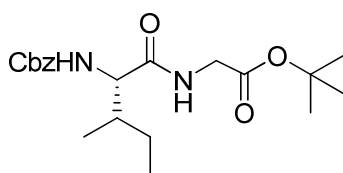
^{13}C NMR: δ 172.7, 168.7, 156.2, 136.0, 128.2, 127.8, 127.7, 81.8, 66.6, 41.6, 41.2, 27.7, 24.3, 22.8, 21.5.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 377 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 13).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 379 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 396 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 96).

2-((2S,3R)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)-3-μεθυλπενταναμιδο)οξικός tert-βουτυλεστέρας

(153)



M.T.: $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$

M.B.: 378.46 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 78% (279.1 mg)

R_f (13): 0.50

Σ.Τ.: 133 – 135 °C

$[\alpha]_D = -2.5$ (c 1, CHCl_3)

^1H NMR: δ 7.41 – 7.23 (m, 5H, arom), 6.76 (t, 1H, NHCO , $J=4.6$ Hz), 5.65 (d, 1H, OCONH , $J=9.0$ Hz), 5.16 – 4.98 (m, 2H, PhCH_2), 4.19 – 4.08 (m, 1H, CH), 3.91 (dd, 2H, $\text{CH}_2\text{COOBu}^t$, $J_1=$

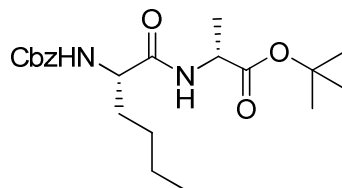
5.0 Hz, $J_2=8.6$ Hz), 1.97 – 1.76 (m, 1H, CH), 1.45 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.30 – 0.99 (m, 2H, CH₂), 0.95 – 0.79 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR: δ 171.4, 168.6, 156.3, 136.1, 128.4, 128.0, 127.9, 82.2, 66.9, 59.5, 41.9, 37.3, 27.9, 24.6, 15.4, 11.3.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 377 ([M-H]⁻, 40).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 379 ([M+H]⁺, 100), 396 ([M+NH₄]⁺, 93).

(R)-2-((S)-2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)εξαναμιδο)προπανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (138)



M.T.: C₂₁H₃₂N₂O₅

M.B.: 392.49 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 36% (51.0 mg)

R_f (7): 0.51

Σ.Τ.: 80 – 82 °C

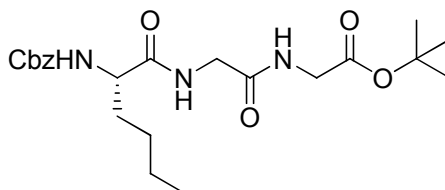
¹H NMR: δ 7.40 – 7.22 (m, 5H, arom), 6.76 (d, 1H, NHCO, $J=5.2$ Hz), 5.56 (d, 1H, OCONH, $J=6.6$ Hz), 5.09 (s, 2H, PhCH₂), 4.53 – 4.34 (m, 1H, CHCOOBu^t), 4.30 – 4.09 (m, 1H, CH), 1.95 – 1.52 (m, 2H, CH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.32 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.86 (t, 3H, CH₃, $J=6.2$ Hz).

¹³C NMR: δ 171.9, 171.1, 156.1, 136.1, 128.4, 128.0, 127.9, 82.0, 66.8, 54.8, 48.5, 32.4, 27.8, 27.4, 22.3, 18.4, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 393 ([M+H]⁺, 75), 410 ([M+NH₄]⁺, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 391 ([M-H]⁻, 16).

∞ Σύνθεση του (S)-5-βουτυλ-3,6,9-τριοξο-1-φαινυλ-2-οξα-4,7,10-τριαζαδωδεκαν-12 tert-βουτυλεστέρας (128)



Σε διάλυμα του 2-(2-(βενζυλοξυκαρβονυλαμινο)ακεταμιδο)οξικού tert-βουτυλεστέρας (1.0 mmol) σε ξηρό THF (10 ml) προστίθεται ο καταλύτης Pd/C 10% (32.4 mg). Το διάλυμα

αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα H₂ σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Γίνεται διήθηση υπό celite και συμπύκνωση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Η αμίνη διαλύεται σε 10 ml ξηρού CH₂Cl₂, φέρεται στους 0°C και προστίθενται κατά σειρά Et₃N (1.1 mmol, 0.16 ml), υδατοδιαλυτό καρβοδιμίδιο WSCI.HCl (1.1 mmol, 210.9 mg), 1-υδρόξυ βενζοτρίαζόλιο HOBt (1 mmol, 135.1 mg) και η Z-νορλευκίνη (1.0 mmol, 265.3 mg). Το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για 1 ώρα και ολονυκτίς σε θερμοκρασία δωματίου. Ο οργανικός διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθενται 20 ml AcOEt. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα NaCl, 5% κιτρικό οξύ, κορεσμένο διάλυμα NaCl, 5% NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με στήλη χρωματογραφίας silica gel και σύστημα έκλουσης CHCl₃ και CHCl₃/CH₃OH 99/1.

M.T.: C₂₂H₃₃N₃O₆

M.B.: 435.51 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 35% (154.2 mg)

R_f (12): 0.16

[α]_D = -1.4 (c 0.5, CHCl₃)

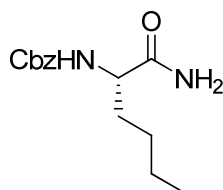
¹H NMR: δ 7.74 – 7.28 (m, 6H, arom, NHCO), 7.22 (br s, 1H, NHCO), 5.90 (br s, 1H, OCONH), 5.23 – 4.98 (m, 2H, PhCH₂), 4.31 – 4.10 (m, 1H, CH), 4.09 – 3.95 (m, 2H, NHCH₂CO), 3.95 – 3.83 (m, 2H, NHCH₂CO), 1.93 – 1.53 (m, 2H, CHCH₂), 1.43 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.39 – 1.21 (m, 4H, 2xCH₂), 0.86 (t, 3H, CH₃, J = 6.4 Hz).

¹³C NMR: δ 172.8, 169.1, 168.9, 156.4, 136.1, 128.4, 128.1, 127.9, 82.2, 66.9, 55.2, 42.9, 41.8, 32.2, 27.9, 27.6, 22.3, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 434 ([M-H]⁻, 60).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 436 ([M+H]⁺, 32), 453 ([M+NH₄]⁺, 63), 458 ([M+Na]⁺, 100).

∞ Σύνθεση του (S)-βενζυλ 1-αμινο-1-οξοεξαν-2-υλκαρβαμιδίου (100)



Διάλυμα της Z-νορλευκίνης (0.41 mmol, 109.7 mg) φέρεται στους 0 °C, προστίθεται η Et₃N (0.41 mmol, 0.06 ml) και αναδεύεται για 15 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην ο ethyl chloroformate (0.412 mmol, 0.04 ml) και αφού το διάλυμα αναδευτεί για 30 λεπτά στους 0 °C

τότε προστίθεται η aq. NH₃ 25% (0.15 ml). Το μίγμα αναδεύεται για άλλα 30 λεπτά ενώ σχηματίζεται λευκό στερεό. Ακολουθεί προσθήκη 20 ml νερού, γίνονται εκπλύσεις της υδατικής στιβάδας 2 φορές με 40 ml Et₂O, συλλέγονται οι οργανικές φάσεις, εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού.

M.T.: C₁₄H₂₀N₂O₃

M.B.: 264.32 mg/mmol

Λευκό στερεό. Απόδοση 99% (106.9 mg)

R_f (15): 0.69

[α]_D = -5.3 (c 1, CHCl₃)

¹H NMR: δ 7.40 – 7.28 (m, 5H, arom), 6.24 (br s, 1H, NHH), 5.87 (br s, 1H, NHH), 5.51 (d, 1H, OCONH, *J* = 7.8 Hz), 5.10 (s, 2H, PhCH₂), 4.29 – 4.10 (m, 1H, CH), 1.92 – 1.73 (m, 1H, CHH), 1.72 – 1.48 (m, 1H, CHH), 1.44 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.89 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.4 Hz).

¹³C NMR: δ 174.3, 156.2, 136.1, 128.5, 128.2, 128.0, 67.1, 54.5, 32.2, 27.5, 22.3, 13.9.

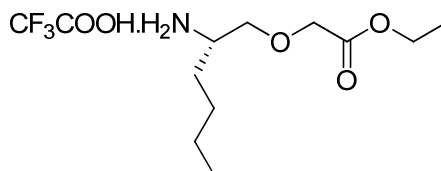
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 263 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 265 ([M+H]⁺, 73), 282 ([M+NH₄]⁺, 61), 287 ([M+Na]⁺, 100).

∞ Γενική μέθοδος απομάκρυνσης της Boc- προστατευτικής ομάδας

1. Με τριφθοροξικό οξύ

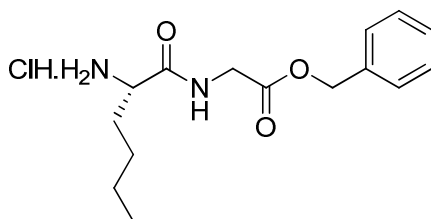
Σε διάλυμα της Boc-προστατευμένης ένωσης (1 mmol) σε ξηρό CH₂Cl₂ (5 ml) προστίθεται τριφθοροξικό οξύ (1.25 ml) και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και έπειτα προστίθενται 3 φορές από 20 ml CH₂Cl₂ και ξανασυμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το τριφθοροξικό άλας της αμίνης χρησιμοποιείται απευθείας για την αντίδραση σύζευξης.



2. Με HCl/Et₂O

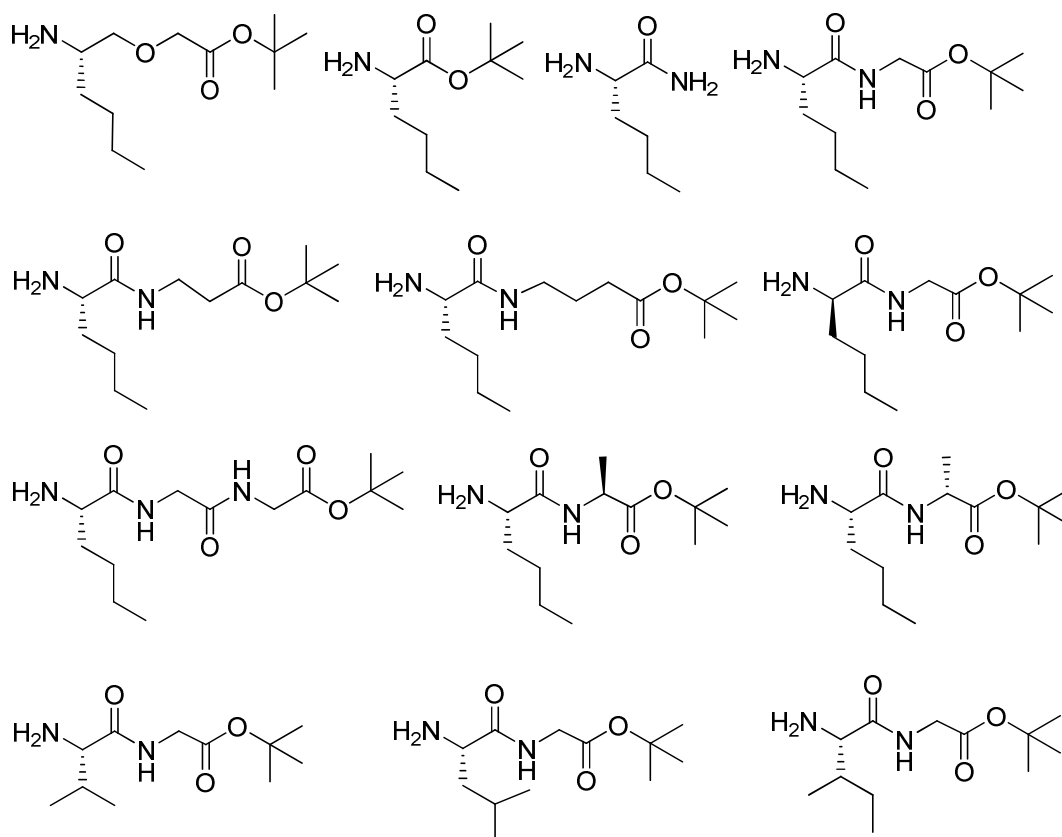
Σε διάλυμα της Boc-προστατευμένης ένωσης (1 mmol) σε ξηρό Et₂O (3.33 ml) προστίθεται 5N HCl/Et₂O (11 ml) και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 3 ½ ώρες. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και έπειτα προστίθενται 3 φορές από 20 ml Et₂O και

ξανασυμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υδροχλωρικό άλας της αμίνης χρησιμοποιείται απευθείας για την αντίδραση σύζευξης.



80 Γενική μέθοδος σύζευξης 2-υδρόξυ οξέος και άμινο συστατικού

Γίνεται απομάκρυνση της Cbz-προστατευτικής ομάδας στο αμινοξύ, το ψευδοδιπεπτίδιο, τα διπεπτίδια, το τριπεπτίδιο και το αμίδιο όπως περιγράφεται παραπάνω και οι ελεύθερες αμίνες χρησιμοποιούνται για την παρακάτω σύζευξη.

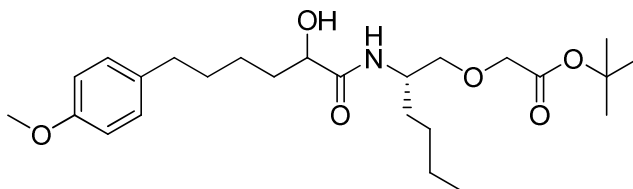


Σε διάλυμα του άμινο συστατικού (1 mmol) και του 2-υδρόξυ οξέος (1 mmol) σε CH_2Cl_2 (10 ml) στους 0°C προστίθενται κατά σειρά Et_3N (2.2 mmol, 0.31 ml), υδατοδιαλυτό καρβοδιμίδιο $\text{WSCl}\cdot\text{HCl}$ (1.1 mmol, 210.9 mg) και 1-υδρόξυ βενζοτριάζολιο HOBT (1 mmol, 135.1 mg). Το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για 1 ώρα και ολονυκτίς σε θερμοκρασία δωματίου. Ο οργανικός διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και προστίθενται 20 ml AcOEt . Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα NaCl , 5% κιτρικό οξύ, κορεσμένο διάλυμα

NaCl, 5% NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το τελικό προϊόν καθαρίζεται με στήλη χρωματογραφίας silica gel και σύστημα έκλουσης διαφορετικό για κάθε προϊόν.

2-((2S)-2-(2-υδροξύ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξυλοξύ)tert-βουτυλεστέρας (89)

(Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₅H₄₁NO₆

M.B.: 451.60 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 67% (253.7 mg)

R_f (3): 0.15

¹H NMR: δ 7.15 – 7.04 (m, 1H, NH), 7.06 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.79 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 4.20 – 3.95 (m, 2H, 2xCH), 3.93 (s, 2H, OCH₂CO), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 3.60 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁= 9.6 Hz, *J*₂= 3.6 Hz), 3.50 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁= 10.8 Hz, *J*₂= 4.0 Hz), 2.54 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.2 Hz), 2.44 (br s, 1H, OH), 1.95 – 1.50 (m, 6H, 3xCH₂), 1.45 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.40 – 1.20 (m, 6H, 3xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.2 Hz).

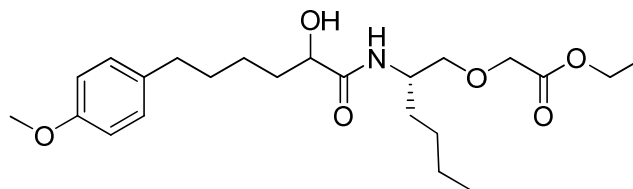
¹³C NMR: δ (174.1, 173.9), (170.1, 170.0), 157.4, (134.6, 134.5), 129.1, 125.4, 113.5, (82.1, 82.0), 73.0, (72.0, 71.6), (68.5, 68.3), 55.1, (48.8, 48.5), (34.8, 34.5), (30.1, 29.6), 31.5, 30.9, (29.5, 28.1), 28.0, 24.6, 24.4, 22.4, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 452 ([M+H]⁺, 100), 474 ([M+Na]⁺, 40).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 450 ([M-H]⁻, 100).

2-((2S)-2-(2-υδροξύ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξυλοξύ)αιθυλεστέρας (94)

(Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₃H₃₇NO₆

M.B.: 423.54 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 19% (54 mg)

R_f (4): 0.20

^1H NMR: δ 7.09 (d, 2H, arom, $J= 8.4\text{Hz}$), 6.91 (d, 1H, NH, $J= 8.6\text{ Hz}$), 6.82 (d, 2H, arom, $J= 8.0\text{ Hz}$), 4.20 (q, 2H, OCH_2CH_3 , $J= 6.6\text{ Hz}$), 4.15 – 3.95 (m, 4H, 2xCH, OCH_2CO), 3.78 (s, 3H, CH_3O), 3.65 (dd, 1H, CHHO , $J_1= 9.2\text{ Hz}$, $J_2= 3.4\text{ Hz}$), 3.46 (dd, CHHO , $J_1= 10.4\text{ Hz}$, $J_2= 3.4\text{ Hz}$), 2.56 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 7.2\text{ Hz}$), 1.82 – 1.75 (br s, 1H, OH), 1.70 – 1.48 (m, 6H, 3x CH_2), 1.21 (t, 3H, OCH_2CH_3), 1.48 – 1.10 (m, 6H, 3x CH_2).

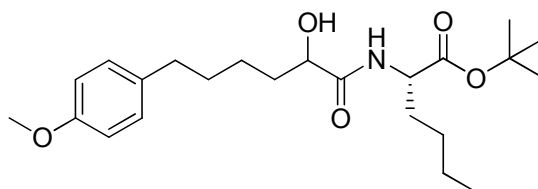
^{13}C NMR: δ 173.6, 170.9, 157.6, 134.5, 129.2, 113.6, 73.1, 71.7, 68.1, 61.0, 55.2, 49.0, (34.9, 34.8), (31.5, 31.1), (30.3, 29.7), 28.2, 24.5, 22.5, 14.1, 14.0.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 424 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 422 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

(2S)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (98)

(Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{NO}_5$

M.B.: 407.54 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 46% (37.3 mg)

R_f (4): 0.25

^1H NMR: δ 7.08 (d, 2H, arom, $J= 8.8\text{ Hz}$), 6.98 (d, 1H, NH, $J= 8.2\text{ Hz}$), 6.82 (d, 2H, arom, $J= 8.6\text{ Hz}$), 4.57 – 4.40 (m, 1H, CH), 4.18 – 4.07 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, CH_3O), 3.09 (br s, $\frac{1}{2}\text{H}$, OH), 2.90 (br s, $\frac{1}{2}\text{H}$, OH), 2.56 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 7.2\text{ Hz}$), 1.93 – 1.53 (m, 6H, 3x CH_2), 1.47 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.41 – 1.16 (m, 6H, 3x CH_2), 0.90 (t, 3H, CH_3 , $J= 6.6\text{ Hz}$).

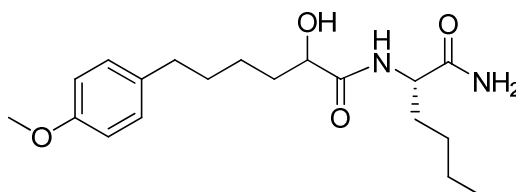
^{13}C NMR: δ (173.5, 171.8), 157.6, 134.5, 129.2, 113.7, 82.1, 72.0, 55.2, 52.3, 34.8, 34.7, 32.2, 31.4, 28.0, 27.1, 24.6, 22.3, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 408 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 430 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 35).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 406 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

N-((S)-1-αμινο-1-οξοεξαν-2-υλ)-2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμίδιο (101)

(Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₁₉H₃₀N₂O₄

M.B.: 350.45 mg/mmol

Κίτρινο σιρόπι. Απόδοση 52% (34.4 mg)

R_f (14): 0.29

¹H NMR: δ 7.26 – 7.16 (m, 1H, NH), 7.07 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.81 (d, 2H, arom, *J*= 8.8 Hz), 6.76 (br s, ½H, NH₂), 6.54 (br s, ½H, NH₂), 6.19 (br s, ½H, NH₂), 5.91 (br s, ½H, NH₂), 4.47 – 4.28 (m, 1H, CH), 4.17 – 4.03 (m, 1H, CH), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 2.55 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.0 Hz), 1.94 – 1.20 (m, 13H, 6xCH₂, OH), 0.89 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.2 Hz).

¹³C NMR: δ 175.2, 174.4, 157.6, 134.5, 129.2, 113.7, 72.0, 55.2, 52.6, 34.9, 33.9, 31.7, 31.5, 29.8, 27.6, 24.7, 22.3, 13.9.

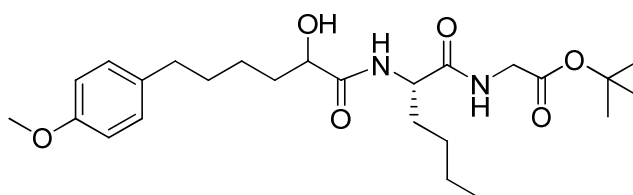
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 349 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 351 ([M+H]⁺, 100), 368 ([M+NH₄]⁺, 88), 373 ([M+Na]⁺, 10).

2-((2*S*)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας

(104)

(Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₅H₄₀N₂O₆

M.B.: 464.59 mg/mmol

Αχρωμο λάδι. Απόδοση 81% (79.4 mg)

R_f (12): 0.29

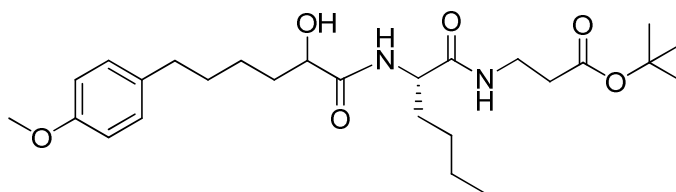
¹H NMR: δ 7.26 – 7.13 (m, 1H, NH), 7.07 (d, 2H, arom, *J*= 8.4 Hz), 6.95 – 6.85 (m, 1H, NH), 6.81 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 4.57 – 4.41 (m, 1H, CH), 4.19 – 4.05 (m, 1H, CH), 4.00 – 3.93 (m, 1H, OH), 3.89 (d, 2H, CH₂COOBu^t, *J*= 5.2 Hz), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 2.55 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.6 Hz), 1.95 – 1.49 (m, 6H, 3xCH₂), 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.39 – 1.21 (m, 6H, 3xCH₂), 0.89 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.2 Hz).

¹³C NMR: δ 174.6, 174.3, 172.2, 171.9, 168.7, 168.6, 157.6, 134.5, 129.2, 113.6, 82.4, 72.1, 55.2, 52.7, 52.6, 42.0, 34.7, 34.6, 32.0, 31.4, 28.0, 27.6, 24.7, 22.3, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 463 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 465 ([M+H]⁺, 40), 482 ([M+NH₄]⁺, 100).

3-((2S)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (110) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₆H₄₂N₂O₆

M.B.: 478.62 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 57% (54.4 mg)

R_f (12): 0.24

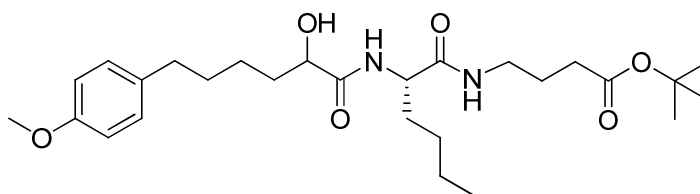
¹H NMR: δ 7.21 – 7.12 (m, 1H, NH), 7.07 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.81 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 4.45 – 4.28 (m, 1H, CH), 4.17 – 4.04 (m, 1H, CH), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 3.52 – 3.35 (m, 2H, NHCH₂), 2.55 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.4 Hz), 2.43 (t, 2H, CH₂COOBu^t, *J*= 6.4 Hz), 1.91 – 1.48 (m, 6H, 3xCH₂), 1.45 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.36 – 1.16 (m, 6H, 3xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.2 Hz).

¹³C NMR: δ 174.3, 174.1, 171.7, 171.5, 157.6, 134.5, 129.2, 113.6, 81.3, 71.9, 55.2, 52.7, 35.1, 34.8, 34.5, 32.3, 31.4, 29.7, 28.1, 27.5, 24.7, 22.3, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 477 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 479 ([M+H]⁺, 96), 496 ([M+NH₄]⁺, 100).

4-((2S)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)βουτανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (116) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₇H₄₄N₂O₆

M.B.: 492.65 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 37% (34.4 mg)

R_f (10): 0.38

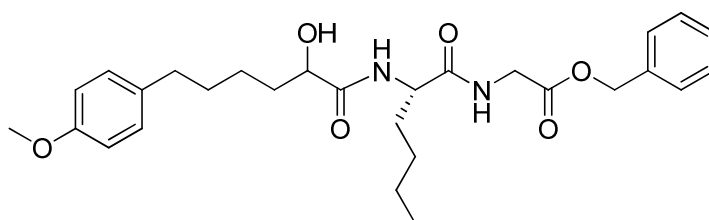
¹H NMR: δ 7.26 – 7.16 (m, 1H, NH), 7.07 (d, 2H, arom, *J*= 8.2 Hz), 6.99 – 6.87 (m, 1H, NH), 6.81 (d, 2H, arom, *J*= 8.4 Hz), 4.49 – 4.29 (m, 1H, CH), 4.17 – 4.03 (m, 1H, CH), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 3.36 – 3.11 (m, 2H, NHCH₂), 2.55 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.6 Hz), 2.25 (t, 2H, CH₂COOBu^t, *J*= 7.2 Hz), 1.90 – 1.47 (m, 8H, 4xCH₂), 1.43 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.35 – 1.18 (m, 6H, 3xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.2 Hz).

^{13}C NMR: δ (174.6, 174.3), (173.0, 172.7), (172.0, 171.7), 157.6, 134.4, 129.2, 113.6, 80.7, 71.9, 55.2, 52.9, 39.0, 34.8, 32.9, 32.1, 31.5, 29.7, 28.0, 27.7, 25.9, 24.7, 22.4, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 493 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 491 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

2-((2*S*)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικός βενζυλεστέρας (119)
(Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_6$

M.B.: 498.61 mg/mmol

Λευκό λάδι. Απόδοση 40% (26.2 mg)

R_f (10): 0.33

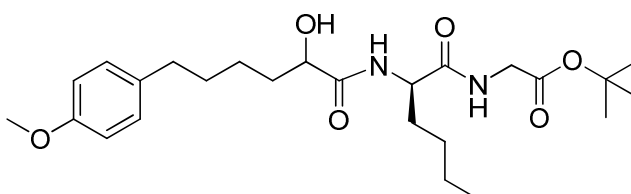
^1H NMR: δ 7.42 – 7.28 (m, 5H, arom), 7.21 – 7.02 [(m, 3H, NH, 2xarom), 7.01 – 6.87 (m, 1H, NH), 6.81 (d, 2H, arom, $J=8.2$ Hz), 5.15 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.56 – 4.36 (m, 1H, CH), 4.19 – 3.95 (m, 3H, CH, NHCH_2), 3.77 (s, 3H, CH_3O), 3.55 (br s, $\frac{1}{2}\text{H}$, OH), 3.15 (br s, $\frac{1}{2}\text{H}$, OH), 2.55 (t, 2H, PhCH_2 , $J=7.6$ Hz), 2.06 – 1.14 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$), 0.89 (t, 3H, CH_3 , $J=5.8$ Hz).

^{13}C NMR: δ 174.6, 174.3, 172.3, 172.0, 169.4, 157.6, 135.0, 134.4, 129.2, 128.6, 128.5, 128.4, 113.6, 71.9, 67.2, 55.2, 52.7, 41.3, 34.8, 31.8, 31.4, 29.7, 27.6, 24.6, 22.4, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 497 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 499 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 53), 516 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100).

2-((2*R*)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (124) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$

M.B.: 464.59 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 79% (117.4 mg)

R_f (12): 0.10

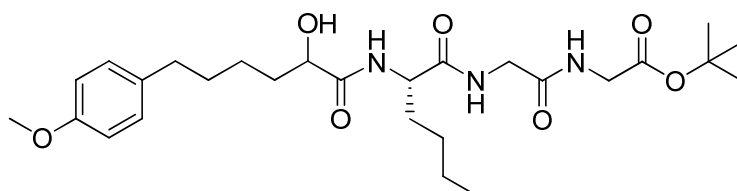
^1H NMR: δ 7.38 (d, 1H, NHCO, $J=8.4$ Hz), 7.25 – 7.12 (m, 1H, NHCO), 7.06 (d, 2H, arom, $J=8.4$ Hz), 6.79 (d, 2H, arom, $J=8.4$ Hz), 4.60 – 4.45 (m, 1H, CH), 4.14 – 4.06 (m, 1H, CH), 3.94 – 3.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{COOBu}^t$), 3.76 (s, 3H, CH_3O), 2.53 (t, 2H, PhCH_2 , $J=7.0$ Hz), 1.90 – 1.48 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.44 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.36 – 1.21 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 0.95 – 0.77 (m, 3H, CH_3).

^{13}C NMR: δ 174.8, 174.5, 172.4, 172.1, 168.7, 168.6, 157.4, 134.4, 129.1, 113.5, 82.2, 71.8, 55.1, 52.6, 41.9, 34.8, 32.1, 31.5, 27.9, 27.6, 24.6, 22.3, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ίόντων (-) : 463 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ίόντων (+) : 465 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 482 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 25), 487 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 15).

2-(2-((2S)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)ακεταμιδο)οξικός tert-βουτυλεστέρας (129) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$

M.B.: 521.65 mg/mmol

Αχρωμο λάδι. Απόδοση 46% (52.8 mg)

R_f (14): 0.25

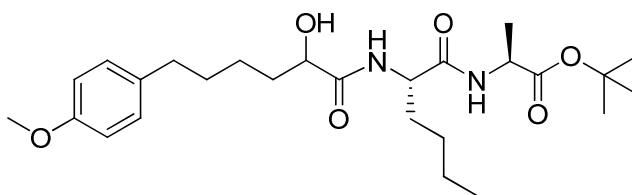
^1H NMR: δ 7.61 – 7.40 (m, 2H, $2\times\text{NHCO}$), 7.20 (t, 1H, NHCO, $J=5.2$ Hz), 7.07 (d, 2H, arom, $J=8.4$ Hz), 6.81 (d, 2H, arom, $J=8.8$ Hz), 4.51 – 4.31 (m, 1H, CH), 4.13 – 3.83 (m, 5H, CH, $2\times\text{NHCH}_2$), 3.78 (s, 3H, CH_3O), 3.16 – 3.01 (m, 1H, OH), 2.55 (t, 2H, PhCH_2 , $J=7.6$ Hz), 1.98 – 1.48 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.45 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.38 – 1.20 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 0.89 (t, 3H, CH_3 , $J=6.4$ Hz).

^{13}C NMR: δ 175.8, 175.2, 172.5, 169.4, 169.2, 157.5, 134.4, 129.2, 113.6, 82.7, 82.5, 72.0, 70.4, 55.2, 53.6, 42.9, 41.9, 34.8, 34.4, 31.4, 28.8, 28.0, 24.9, 22.6, 22.3, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ίόντων (-) : 520 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ίόντων (+) : 522 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 51), 539 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100).

(2S)-2-((2S)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (133) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₆H₄₂N₂O₆

M.B.: 478.62 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 68% (63.5 mg)

R_f(12): 0.53

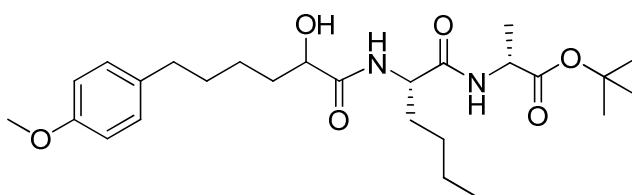
¹H NMR: δ 7.18 (d, 1H, NHCO, *J*= 8.4 Hz), 7.06 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.85 – 6.70 [(m, 3H, 2xarom, NHCO)], 4.49 – 4.29 (m, 2H, 2xCH), 4.16 – 4.04 (m, 1H, CH), 3.83 (br s, 1H, OH), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 2.53 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.6 Hz), 1.90 – 1.48 (m, 6H, 3xCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.39 – 1.19 (m, 6H, 3xCH₂), 1.33 [d, 3H, CH(CH₃), *J*= 7.2 Hz], 0.87 (t, 3H, CH₃, *J*= 7.0 Hz).

¹³C NMR: δ 174.0, 171.7, 171.1, 157.6, 134.4, 129.2, 113.6, 82.1, 71.9, 55.2, 52.8, 48.7, 34.8, 32.3, 31.5, 27.9, 27.5, 24.6, 22.4, 18.4, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 477 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 479 ([M+H]⁺, 100), 496([M+NH₄]⁺, 27).

(2R)-2-((2S)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (139) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₆H₄₂N₂O₆

M.B.: 478.62 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 38% (21.7 mg)

R_f(13): 0.39

¹H NMR: δ 7.09 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 7.03 – 6.88 (m, 1H, NHCO), 6.82 (d, 2H, arom, *J*= 8.8 Hz), 6.63 (t, 1H, NHCO, *J*= 6.8 Hz), 4.52 – 4.33 (m, 2H, 2xCH), 4.26 – 4.19 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, CH₃O), 3.20 (br s, ½H, OH), 2.83 (br s, ½H, OH), 2.56 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.6 Hz),

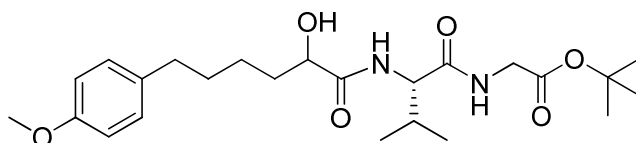
1.98 – 1.52 (m, 6H, 3xCH₂), 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.40 – 1.25 (m, 6H, 3xCH₂), 1.37 (d, 3H, CH(CH₃), *J*= 7.2 Hz), 0.89 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.6 Hz).

¹³C NMR: δ 174.5, 174.1, 172.1, 171.8, 171.3, 171.0, 157.5, 134.5, 129.2, 113.6, 82.3, 82.2, 72.1, 71.9, 55.2, 52.7, 52.4, 48.7, 34.8, 34.4, 31.9, 31.5, 27.9, 26.0, 24.7, 22.3, 18.4, 18.3, 13.9.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (-): 477 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 479 ([M+H]⁺, 100), 496 ([M+NH₄]⁺, 18).

2-((2*S*)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)-3-μεθυλβουταναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (144) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₄H₃₈N₂O₆

M.B.: 450.57 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 68% (97.7 mg)

R_f (13): 0.16

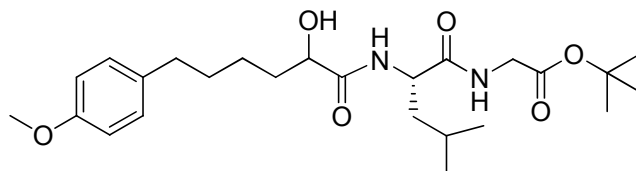
¹H NMR: δ 7.52 – 7.28 (m, 2H, 2xNHCO), 7.05 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.79 (d, 2H, arom, *J*= 8.4 Hz), 4.45 – 4.32 (m, 1H, CH), 4.17 – 4.06 (m, 1H, CH), 4.06 – 3.78 (m, 2H, CH₂COOBu^t), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 2.84 (br s, 1H, OH), 2.52 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.0 Hz), 1.96 – 1.26 (m, 6H, 3xCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.04 – 0.80 (m, 6H, 2xCH₃).

¹³C NMR: δ 174.8, 174.7, 171.8, 171.6, 168.5, 157.4, 134.5, 129.1, 113.5, 82.1, 71.8, 57.9, 57.7, 55.1, 41.9, 34.8, 31.5, 30.9, 27.9, 24.6, 19.2, 18.1.

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (-): 449 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 451 ([M+H]⁺, 100), 468 ([M+NH₄]⁺, 94).

2-((2*S*)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)-4-μεθυλπενταναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (149) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: C₂₅H₄₀N₂O₆

M.B.: 464.59 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 66% (98.3 mg)

R_f (13): 0.24

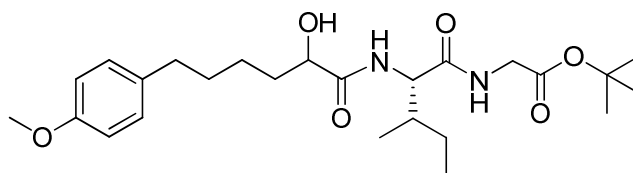
^1H NMR: δ 7.33 (d, 1H, NHCO, $J= 8.8$ Hz), 7.18 (t, 1H, NHCO, $J= 5.2$ Hz), 7.06 (d, 2H, arom, $J= 8.6$ Hz), 6.80 (d, 2H, arom, $J= 8.4$ Hz), 4.64 – 4.49 (m, 1H, CH), 4.16 – 4.05 (m, 1H, CH), 3.87 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{COOBu}^t$, $J= 4.8$ Hz), 3.77 (s, 3H, CH_3O), 2.77 (br s, 1H, OH), 2.53 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 7.6$ Hz), 1.98 – 1.35 (m, 9H, $4\times\text{CH}_2$, CH), 1.44 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 0.91 (t, 6H, $2\times\text{CH}_3$, $J= 5.6$ Hz).

^{13}C NMR: δ 174.8, 174.6, 172.7, 172.4, 168.8, 168.6, 157.4, 134.4, 129.1, 113.5, 82.3, 55.1, 51.1, 41.9, 40.9, 34.8, 31.5, 27.9, 24.6, 22.9, 21.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 463 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 465 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 482 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 30).

2-((2*S*,3*R*)-2-(2-υδροξυ-6-(4-μεθοξυφαινυλ)εξαναμιδο)-3-μεθυλπενταναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (154) (Μίγμα διαστερεομερών)



M.T.: $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$

M.B.: 464.59 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 90% (135.1 mg)

$R_f(13)$: 0.14

^1H NMR: δ 7.43 (dd, 1H, NHCO, $J_1=3.4$ Hz, $J_2= 9.2$ Hz), 7.19 (t, 1H, NHCO, $J= 5.0$ Hz), 7.06 (d, 2H, arom, $J= 8.6$ Hz), 6.79 (d, 2H, arom, $J= 8.2$ Hz), 4.67 (br s, $\frac{1}{2}\text{H}$, OH), 4.47 – 4.35 (m, 1H, CH), 4.27 (br s, $\frac{1}{2}\text{H}$, OH), 4.17 – 4.07 (m, 1H, CH), 4.05 – 3.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{COOBu}^t$, $J= 4.8$ Hz), 3.76 (s, 3H, CH_3O), 2.53 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 7.4$ Hz), 1.98 – 1.46 (m, 6H, $3\times\text{CH}_2$), 1.44 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.28 – 1.01 (m, 2H, CH_2), 0.98 – 0.79 (m, 6H, $2\times\text{CH}_3$).

^{13}C NMR: δ 174.7, 174.5, 171.8, 171.5, 168.5, 157.4, 134.5, 129.1, 113.5, 82.2, 72.0, 57.2, 55.1, 41.9, 36.9, 34.8, 34.6, 31.5, 27.9, 24.6, 15.4, 15.3, 11.1.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 463 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

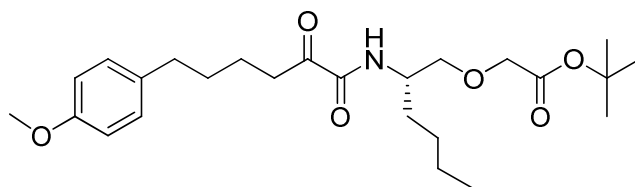
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 465 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 482 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 55).

∞ Γενική μέθοδος οξείδωσης 2-υδροξυ-αμιδίων

Σε διάλυμα του 2-υδροξυ-αμιδίου (1 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (10 ml) και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται το οξειδωτικό αντιδραστήριο Dess-Martin periodinane (1.5 mmol, 636.2 mg) και το μίγμα αναδεύεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί έκπλυση με

5% NaHCO₃ και ξήρανση με Na₂SO₄. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης διαφορετικό για κάθε ένωση.

(S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)tert-βουτυλεστέρας (90)



M.T.: C₂₅H₃₉NO₆

M.B.: 449.58 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 86% (208 mg)

[α]_D = -7.0 (c 1, CHCl₃)

R_f(7): 0.66

¹H NMR: δ 7.29 (d, 1H, NH, *J*= 9.2 Hz), 7.09 (d, 2H, arom, *J*= 8.8 Hz), 6.81 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 4.05 – 3.97 (m, 1H, CH), 3.95 (s, 2H, OCH₂CO), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 3.63 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁= 9.4 Hz, *J*₂= 4.2 Hz), 3.50 (dd, 1H, CHCHHO, *J*₁= 9.4 Hz, *J*₂= 3.8 Hz), 2.94 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 6.4 Hz), 2.57 (t, 2H, CH₂COCO, *J*= 7.0 Hz), 1.75 – 1.55 (m, 6H, 3xCH₂), 1.47 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.40 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.4 Hz).

¹³C NMR: δ 198.9, 169.4, 159.9, 157.6, 134.1, 129.2, 113.6, 81.7, 72.4, 68.7, 55.2, 49.4, 36.6, 34.6, 31.0, 30.9, 28.0, 22.6, 22.4, 13.9.

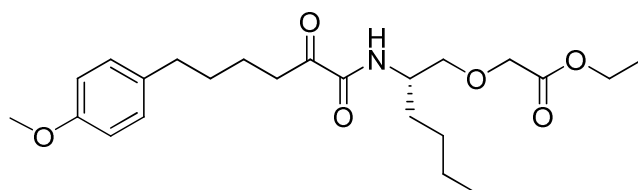
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 448 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 450 ([M+H]⁺, 65), 467 ([M+NH₄]⁺).

HRMS m/z: 448.2699 (448.2705) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3403, 2933, 2865, 1746, 1682, 1612, 1584, 1515, 1462, 1394, 1368, 1301, 1246, 1132, 1037, 941, 843, 735, 587.

(S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)αιθυλεστέρας (95)



M.T.: C₂₃H₃₅NO₆

M.B.: 421.53 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 61% (30.7 mg)

$[\alpha]_D = -4.9$ (c 1, CHCl_3)

$^1\text{H NMR}$: δ 7.32 (d, 1H, NH, $J = 9.0$ Hz), 7.09 (d, 2H, arom, $J = 8.6$ Hz), 6.82 (d, 2H, arom, $J = 8.6$ Hz), 4.22 (q, 2H, OCH_2CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 4.07 (s, 2H, OCH_2CO), 4.05 – 3.90 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, CH_3O), 3.65 (dd, 1H, CHCHHO , $J_1 = 9.4$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz), 3.53 (dd, 1H, CHCHHO , $J_1 = 9.4$ Hz, $J_2 = 3.8$ Hz), 2.95 (t, 2H, PhCH_2 , $J = 6.8$ Hz), 2.58 (t, 2H, CH_2COCO , $J = 6.8$ Hz), 1.70 – 1.55 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$), 1.35 – 1.20 (m, 7H, $2 \times \text{CH}_2$, OCH_2CH_3), 0.89 (t, 3H, CH_3 , $J = 6.4$ Hz).

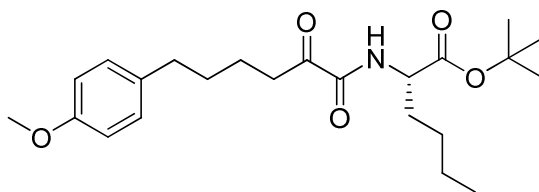
$^{13}\text{C NMR}$: δ 199.0, 170.4, 159.9, 134.1, 129.2, 113.6, 72.5, 68.2, 61.0, 55.2, 49.4, 36.6, 34.6, 31.0, 30.9, 28.0, 22.7, 22.5, 14.2, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 422 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100), 444 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 15).

HRMS m/z : 420.2389 (420.2392) $[\text{M}-\text{H}]^-$

IR (cm^{-1}): 3352, 2931, 2862, 1750, 1679, 1612, 1514, 1463, 1377, 1297, 1246, 1209, 1177, 1131, 1034, 825, 728, 672, 562.

(S)- 2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξανοϊκός tert-βουτυλεστέρας (99)



M.T.: $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_5$

M.B.: 405.53 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 88% (28 mg)

$[\alpha]_D = -8.7$ (c 1, CHCl_3)

$R_f(2)$: 0.65

$^1\text{H NMR}$: δ 7.38 (d, 1H, NH, $J = 8.2$ Hz), 7.09 (d, 2H, arom, $J = 8.6$ Hz), 6.83 (d, 2H, arom, $J = 8.8$ Hz), 4.53 – 4.34 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, CH_3O), 2.94 (t, 2H, PhCH_2 , $J = 7.0$ Hz), 2.58 (t, 2H, CH_2COCO , $J = 6.8$ Hz), 1.95 – 1.72 (m, 1H, CHCHH), 1.72 – 1.55 (m, 5H, $2 \times \text{CH}_2$, CHCHH), 1.48 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.39 – 1.19 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 0.90 (t, 3H, CH_3 , $J = 6.8$ Hz).

$^{13}\text{C NMR}$: δ 198.4, 170.6, 159.6, 157.7, 134.1, 129.2, 113.7, 82.3, 55.2, 52.7, 36.5, 34.6, 32.1, 31.0, 28.0, 27.1, 22.7, 22.3, 13.8.

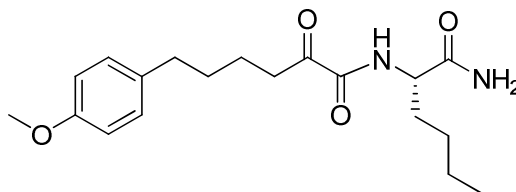
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 404 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 406 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 20), 423 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100).

HRMS m/z : 404.2442 (404.2442) $[\text{M}-\text{H}]^-$

IR (cm⁻¹): 3397, 2930, 2862, 1734, 1687, 1612, 1583, 1513, 1461, 1368, 1296, 1247, 1152, 1037, 842, 738, 672, 559.

(S)-N-(1-αμινο-1-οξοεξαν-2-υλ)-6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμίδιο (102)



M.T.: C₁₉H₂₈N₂O₄

M.B.: 348.44 mg/mmol

Κίτρινο λάδι. Απόδοση 71% (14.2 mg)

[α]_D = -16.6 (c 0.5, CHCl₃)

R_f (13): 0.32

¹H NMR: δ 7.44 (d, 1H, NH, *J* = 7.8 Hz), 7.09 (d, 2H, arom, *J* = 8.6 Hz), 6.82 (d, 2H, arom, *J* = 8.6 Hz), 6.09, 5.71 (2xbr s, 2H, NH₂), 4.46 – 4.31 (m, 1H, CH), 3.79 (s, 3H, CH₃O), 2.93 (t, 2H, PhCH₂, *J* = 6.4 Hz), 2.58 (t, 2H, CH₂COCO, *J* = 6.8 Hz), 1.99 – 1.76 (m, 2H, CH₂), 1.70 – 1.57 (m, 4H, 2xCH₂), 1.39 – 1.30 (m, 4H, 2xCH₂), 0.89 (t, 3H, CH₃, *J* = 7.0 Hz).

¹³C NMR: δ 198.1, 172.8, 160.0, 157.7, 134.0, 129.2, 113.7, 55.2, 52.8, 36.6, 34.6, 31.8, 31.0, 27.5, 22.6, 22.3, 13.8.

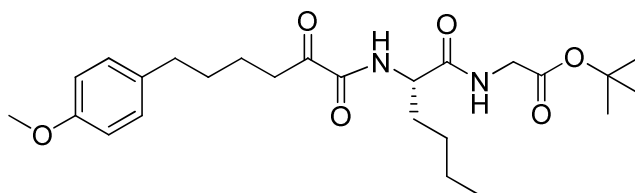
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 347 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 349 ([M+H]⁺, 83), 366 ([M+NH₄]⁺, 63), 371 ([M+Na]⁺, 100).

HRMS m/z: 347.1976 (347.1976) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3334, 3200, 2927, 2858, 1670, 1612, 1512, 1460, 1296, 1244, 1178, 1144, 1035, 826, 741, 670, 583.

(S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμίδιο)εξαναμίδιο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (105)



M.T.: C₂₅H₃₈N₂O₆

M.B.: 462.58 mg/mmol

Αχρωμο λάδι. Απόδοση 72% (46.6 mg)

[α]_D = -16.6 (c 1, CHCl₃)

R_f (7): 0.39

^1H NMR: δ 7.49 (d, 1H, NH, $J= 8.6$ Hz), 7.08 (d, 2H, arom, $J= 8.6$ Hz), 6.81 (d, 2H, arom, $J= 8.8$ Hz), 6.60 (t, 1H, NH, $J= 5.0$ Hz), 4.48 – 4.34 (m, 1H, CH), 3.91 (dd, 2H, NHCH_2 , $J_1= 2.2$ Hz, $J_2= 5.2$ Hz), 3.78 (s, 3H, CH_3O), 2.93 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 6.4$ Hz), 2.57 (t, 2H, CH_2COCO , $J= 7.0$ Hz), 1.99 – 1.75 (m, 2H, CH_2), 1.69 – 1.55 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.46 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.40 – 1.27 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 0.88 (t, 3H, CH_3 , $J= 7.6$ Hz).

^{13}C NMR: δ 198.0, 170.7, 168.6, 160.0, 157.6, 134.1, 129.2, 113.6, 82.5, 55.2, 53.1, 42.0, 36.6, 34.6, 32.0, 31.0, 27.9, 27.5, 22.6, 22.3, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 461 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

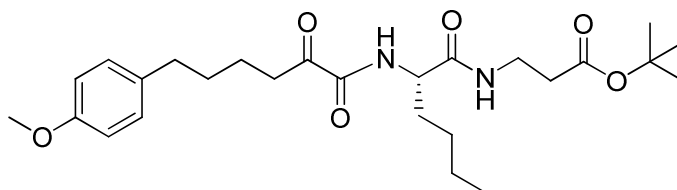
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 463 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 43), 480 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100).

HRMS m/z : 461.2654 (461.2657) $[\text{M}-\text{H}]^-$

IR (cm^{-1}): 3325, 2932, 2863, 1742, 1665, 1612, 1514, 1461, 1369, 1299, 1246, 1158, 1036, 943, 842, 747, 670.

(S)-3-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(111)



M.T.: $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_6$

M.B.: 476.61 mg/mmol

Υποκίτρινο λάδι. Απόδοση 78% (29.8 mg)

$[\alpha]_D = -8.6$ (c 1, CHCl_3)

$R_f(7)$: 0.41

^1H NMR: δ 7.45 (d, 1H, NH, $J= 8.6$ Hz), 7.09 (d, 2H, arom, $J= 8.6$ Hz), 6.82 (d, 2H, arom, $J= 8.6$ Hz), 6.53 (br t, 1H, NH), 4.33 – 4.20 (m, 1H, CH), 3.78 (s, 3H, CH_3O), 3.55 – 3.37 (m, 2H, NHCH_2), 2.93 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 6.8$ Hz), 2.57 (t, 2H, CH_2COCO , $J= 6.8$ Hz), 2.44 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{COOBu}^t$, $J= 6.2$ Hz), 1.96 – 1.69 (m, 2H, CH_2), 1.69 – 1.54 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.44 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.37 – 1.22 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 0.88 (t, 3H, CH_3 , $J= 7.0$ Hz).

^{13}C NMR: δ 198.1, 171.8, 170.4, 159.9, 157.7, 134.1, 129.2, 113.7, 81.3, 55.2, 53.3, 36.6, 35.1, 34.6, 32.2, 31.0, 29.7, 28.0, 27.5, 22.6, 22.3, 13.8.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 475 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

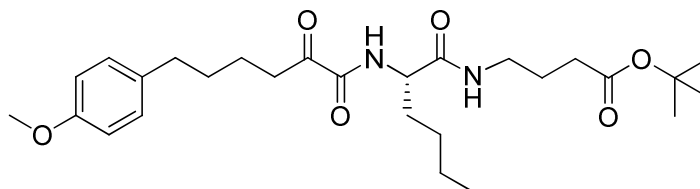
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 477 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 42), 494 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100).

HRMS m/z : 475.2820 (475.2814) $[\text{M}-\text{H}]^-$

IR (cm⁻¹): 3323, 2932, 2863, 1726, 1662, 1614, 1514, 1460, 1368, 1247, 1156, 1037, 838, 748, 671, 560.

(S)-4-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)βουτανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας

(117)



M.T.: C₂₇H₄₂N₂O₆

M.B.: 490.63 mg/mmol

Κίτρινο στερεό. Απόδοση 70% (19.7 mg)

[α]_D = -9.3 (c 1, CHCl₃)

Σ.Τ.: 50 – 52 °C

R_f(7): 0.25

¹H NMR: δ 7.42 (d, 1H, NH, *J* = 8.2 Hz), 7.09 (d, 2H, arom, *J* = 8.8 Hz), 6.82 (d, 2H, arom, *J* = 8.6 Hz), 6.39 (br t, 1H, NHCH₂), 4.36 – 4.17 (m, 1H, CH), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 3.36 – 3.17 (m, 2H, NHCH₂), 3.00 – 2.83 (m, 2H, PhCH₂), 2.64 – 2.50 (m, 2H, CH₂COCO), 2.27 (t, 2H, CH₂COOBu^t, *J* = 7.2 Hz), 1.89 – 1.68 (m, 4H, 2xCH₂), 1.68 – 1.56 (m, 4H, 2xCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.38 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.89 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.8 Hz).

¹³C NMR: δ 198.1, 172.8, 170.5, 159.9, 157.7, 134.1, 129.2, 113.7, 80.8, 55.2, 53.4, 39.2, 36.6, 34.6, 33.0, 32.1, 31.0, 28.0, 27.6, 24.4, 22.6, 22.3, 13.8.

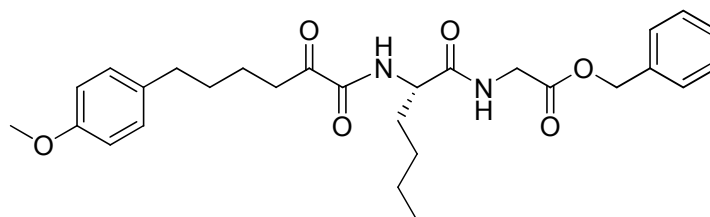
MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (-): 489 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 491 ([M+H]⁺, 100), 508 ([M+NH₄]⁺, 32).

HRMS *m/z*: 489.2970 (489.2970) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3314, 2930, 2862, 1727, 1660, 1614, 1514, 1460, 1368, 1297, 1247, 1155, 1037, 825, 737.

(S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικός βενζυλεστέρας (120)



M.T.: C₂₈H₃₆N₂O₆

M.B.: 496.60 mg/mmol

Υποκίτρινο στερεό. Απόδοση 75% (14.8 mg)

$[\alpha]_D = -17.5$ (c 1, CHCl₃)

Σ.Τ.: 69 -73 °C

R_f(7): 0.25

¹H NMR: δ 7.48 – 7.28 (m, 6H, NH, arom), 7.08 (d, 2H, arom, *J*= 8.4 Hz), 6.82 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.52 (t, 1H, NHCH₂, *J*= 5.2 Hz), 5.17 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.47 – 4.27 (m, 1H, CH), 4.08 (d, 2H, NHCH₂, *J*= 5.2 Hz), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 2.92 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 6.6 Hz), 2.57 (t, 2H, CH₂COCO, *J*= 7.0 Hz), 2.01 – 1.77 (m, 1H, CHCHH), 1.77 – 1.54 (m, 5H, 2xCH₂, CHCHH), 1.38 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.6 Hz).

¹³C NMR: δ 198.0, 170.8, 169.3, 160.0, 157.7, 134.9, 134.1, 129.2, 113.7, 67.3, 55.2, 53.1, 41.3, 36.6, 34.6, 31.8, 31.0, 27.5, 22.6, 22.3, 13.8.

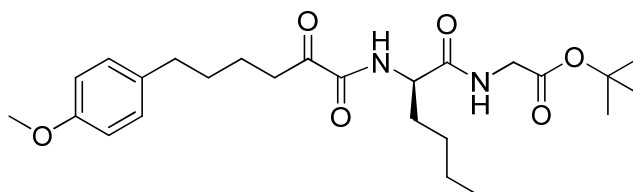
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 495 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 497 ([M+H]⁺, 58), 514 ([M+NH₄]⁺, 100).

HRMS m/z: 495.2497 (495.2501) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3324, 3033, 2929, 2859, 1749, 1666, 1612, 1514, 1460, 1387, 1357, 1246, 1185, 1035, 825, 740, 699.

(R)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)οξικός tert-βουτυλεστέρας (125)



M.T.: C₂₅H₃₈N₂O₆

M.B.: 462.58 mg/mmol

Αχρωμο λάδι. Απόδοση 84% (81.5 mg)

$[\alpha]_D = +16.0$ (c 0.5, CHCl₃)

R_f(7): 0.28

¹H NMR: δ 7.54 (d, 1H, NH, *J*= 8.4 Hz), 7.05 (d, 2H, arom, *J*= 8.4 Hz), 6.79 (d, 2H, arom, *J*= 8.4 Hz), 6.75 – 6.66 (m, 1H, NH), 4.53 – 4.30 (m, 1H, CH), 3.90 (dd, 2H, NHCH₂, *J*₁= 1.6 Hz, *J*₂= 5.0 Hz), 3.75 (s, 3H, CH₃O), 2.91 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 6.4 Hz), 2.54 (t, 2H, CH₂COCO, *J*= 6.8 Hz), 1.94 – 1.51 (m, 6H, 3xCH₂), 1.43 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.32 – 1.19 (m, 4H, 2xCH₂), 0.85 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.4 Hz).

¹³C NMR: δ 198.0, 170.7, 168.5, 159.9, 157.6, 134.0, 129.1, 113.6, 82.3, 55.1, 53.0, 41.9, 36.5, 34.5, 32.0, 30.9, 27.9, 27.5, 22.5, 22.2, 13.8.

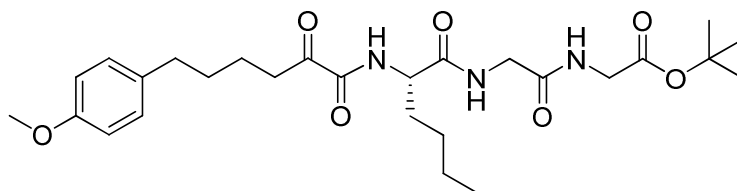
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 461 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 463 ([M+H]⁺, 100), 480 ([M+NH₄]⁺, 88).

HRMS m/z: 461.2660 (461.2657) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3324, 2933, 2863, 1742, 1666, 1612, 1514, 1461, 1369, 1299, 1246, 1158, 1036, 843, 747, 669.

**(S)-2-(2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)ακεταμιδο)οξικός
tert-βουτυλεστέρας (130)**



M.T.: C₂₇H₄₁N₃O₇

M.B.: 519.63 mg/mmol

Καφέ σιρόπι. Απόδοση 72% (29.3 mg)

[α]_D = -10.8 (c 1, CHCl₃)

R_f(10): 0.36

¹H NMR: δ 7.53 (d, 1H, NH, *J* = 8.0 Hz), 7.17 (br s, 1H, NH), 7.08 (d, 2H, arom, *J* = 8.4 Hz), 6.90 (br s, 1H, NH), 6.81 (d, 2H, arom, *J* = 8.2 Hz), 4.40 – 4.20 (m, 1H, CH), 4.04 – 3.97 (m, 2H, NHCH₂CO), 3.94 (d, 2H, NHCH₂CO, *J* = 5.2 Hz), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 2.99 – 2.83 (m, 2H, PhCH₂), 2.61 – 2.50 (m, 2H, CH₂COCO), 1.97 – 1.52 (m, 4H, 2xCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.36 – 1.28 (m, 4H, 2xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, *J* = 6.2 Hz).

¹³C NMR: δ 197.9, 171.3, 168.9, 168.8, 160.3, 157.6, 134.0, 129.2, 113.6, 82.5, 55.2, 53.6, 41.9, 36.6, 34.6, 31.7, 31.0, 29.7, 27.6, 27.9, 22.5, 22.3, 13.8.

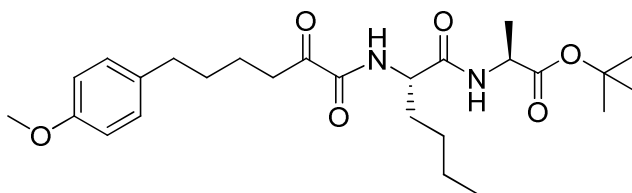
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 518 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 520 ([M+H]⁺, 80), 537 ([M+NH₄]⁺, 100).

HRMS m/z: 518.2869 (518.2872) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3313, 2928, 2858, 1740, 1662, 1514, 1461, 1370, 1298, 1245, 1158, 1035, 842, 744, 671, 560.

(S)-2-((S)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (134)



M.T.: C₂₆H₄₀N₂O₆

M.B.: 476.61 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 94% (52.9 mg)

R_f(4): 0.56

¹H NMR: δ 7.47 (d, 1H, NH, *J*= 8.6 Hz), 7.08 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.82 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.51 (d, 1H, NH, *J*= 7.4 Hz), 4.53 – 4.30 (m, 2H, 2xCH), 3.78 (s, 3H, CH₃O), 2.93 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 7.0 Hz), 2.57 (t, 2H, CH₂COCO, *J*= 7.0 Hz), 1.97 – 1.72 (m, 2H, CH₂), 1.68 – 1.56 (m, 4H, 2xCH₂), 1.46 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.36 (d, 3H, CH₃, *J*= 7.2 Hz), 1.34 – 1.21 (m, 4H, 2xCH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃, *J*= 6.6 Hz).

¹³C NMR: δ 198.1, 171.7, 170.0, 159.9, 157.7, 134.1, 129.2, 113.7, 82.2, 55.2, 53.2, 48.7, 36.6, 34.6, 32.1, 31.0, 27.9, 27.5, 22.6, 22.3, 18.5, 13.8.

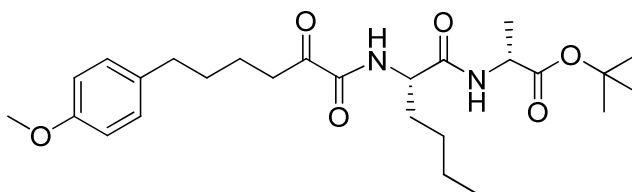
MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (-): 475 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) *m/z* (%) ιόντων (+): 477 ([M+H]⁺, 93), 494 ([M+NH₄]⁺, 100).

HRMS *m/z*: 475.2819 (475.2814) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3318, 2934, 2864, 1733, 1661, 1613, 1514, 1458, 1371, 1300, 1246, 1154, 1037, 883, 845, 744, 665, 560.

(R)-2-((S)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξαναμιδο)προπανοϊκός *tert*-βουτυλεστέρας (140)



M.T.: C₂₆H₄₀N₂O₆

M.B.: 476.61 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 85% (15.3 mg)

R_f(7): 0.33

^1H NMR: δ 7.42 (d, 1H, NH, J = 8.4 Hz), 7.08 (d, 2H, arom, J = 8.4 Hz), 6.80 (d, 2H, arom, J = 8.6 Hz), 6.49 (d, 1H, NH, J = 6.8 Hz), 4.54 – 4.23 (m, 2H, 2xCH), 3.77 (s, 3H, CH₃O), 2.93 (t, 2H, PhCH₂, J = 6.6 Hz), 2.56 (t, 2H, CH₂COCO, J = 6.8 Hz), 1.98 – 1.53 (m, 6H, 3xCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.37 (d, 3H, CH₃, J = 7.0 Hz), 1.33 – 1.19 (m, 4H, 2xCH₂), 0.87 (t, 3H, CH₃, J = 7.0 Hz).

^{13}C NMR: δ 198.1, 171.8, 169.8, 159.9, 157.6, 134.1, 128.2, 113.7, 82.3, 55.2, 53.1, 48.7, 36.6, 34.6, 32.1, 31.0, 27.9, 27.5, 22.6, 22.3, 18.5, 13.9.

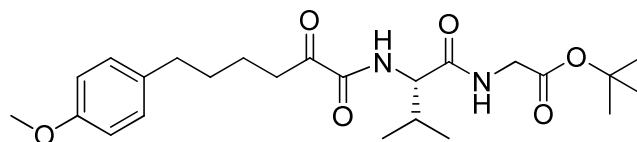
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 475 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 477 ([M+H]⁺, 100), 494 ([M+NH₄]⁺, 88).

HRMS m/z : 475.2820 (475.2814) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3319, 2932, 2863, 1732, 1664, 1614, 1514, 1458, 1371, 1301, 1246, 1154, 1037, 844, 743, 673.

(S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-3-μεθυλβουταναμιδο)οξικός *tert*-βουτυλεστέρας (145)



M.T.: C₂₄H₃₆N₂O₆

M.B.: 448.55 mg/mmol

Αχρωμο λάδι. Απόδοση 80% (72.2 mg)

$[\alpha]_{\text{D}} = -13.1$ (c 1, CHCl₃)

R_f(7): 0.24

^1H NMR: δ 7.60 (d, 1H, NH, J = 9.2 Hz), 7.06 (d, 2H, arom, J = 8.6 Hz), 6.97 – 6.85 (m, 1H, NH), 6.79 (d, 2H, arom, J = 8.6 Hz), 4.32 (dd, 1H, CHCO, J_1 = 7.0 Hz, J_2 = 9.0 Hz), 3.92 (dd, 2H, NHCH₂, J_1 = 5.4 Hz, J_2 = 18.8 Hz), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 2.92 (t, 2H, PhCH₂, J = 5.0 Hz), 2.55 (t, 2H, CH₂COCO, J = 6.8 Hz), 2.29 – 2.08 (m, 1H, CH), 1.68 – 1.54 (m, 4H, 2xCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 1.03 – 0.87 (m, 6H, 2xCH₃).

^{13}C NMR: δ 197.9, 170.2, 168.5, 160.0, 157.5, 133.9, 129.1, 113.5, 82.2, 58.3, 55.0, 41.8, 36.5, 34.5, 31.1, 30.9, 27.8, 22.4, 19.1, 18.0.

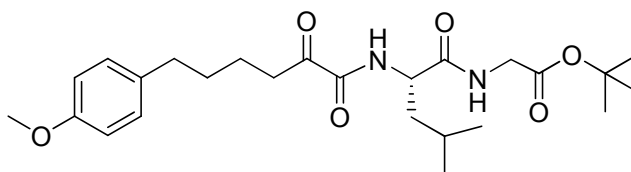
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 447 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 449 ([M+H]⁺, 26), 466 ([M+NH₄]⁺, 100).

HRMS m/z : 447.2509 (447.2501) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3326, 2968, 2934, 2867, 1742, 1664, 1613, 1514, 1463, 1369, 1299, 1246, 1158, 1114, 1036, 942, 844, 747, 650.

(S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-4-μεθυλπενταναμιδο)οξικός tert-βουτυλεστέρας (150)



M.T.: C₂₅H₃₈N₂O₆

M.B.: 462.58 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 82% (71.8 mg)

[α]_D = -21.4 (c 1, CHCl₃)

R_f(7): 0.39

¹H NMR: δ 7.51 (d, 1H, NH, *J*= 8.0 Hz), 7.07 (d, 2H, arom, *J*= 8.8 Hz), 6.80 (d, 2H, arom, *J*= 8.6 Hz), 6.78 – 6.67 (m, 1H, NH), 4.57 – 4.44 (m, 1H, CH), 3.90 (dd, 2H, NHCH₂, *J*₁= 2.4 Hz, *J*₂= 5.2 Hz), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 2.92 (t, 2H, PhCH₂, *J*= 6.4 Hz), 2.55 (t, 2H, CH₂COCO, *J*= 7.0 Hz), 1.74 – 1.55 (m, 6H, 3xCH₂), 1.44 [s, 9H, C(CH₃)₃], 0.93 (d, 3H, CH₃, *J*= 4.2 Hz), 0.90 (d, 3H, CH₃, *J*= 4.2 Hz).

¹³C NMR: δ 198.1, 171.2, 168.5, 160.0, 157.5, 133.9, 129.0, 113.5, 82.1, 55.0, 51.3, 41.8, 40.9, 36.5, 34.5, 30.8, 27.8, 24.5, 22.8, 22.4, 21.6.

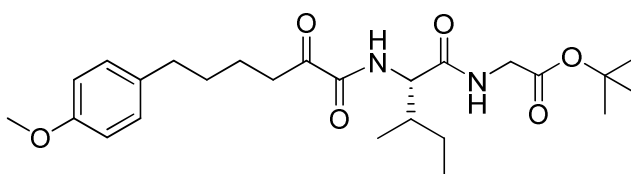
MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 461 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 463 ([M+H]⁺, 93), 480 ([M+NH₄]⁺, 100).

HRMS m/z: 461.2658 (461.2657) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3318, 1956, 1934, 1868, 1742, 1665, 1613, 1514, 1463, 1369, 1299, 1246, 1158, 1112, 1036, 943, 843, 747.

2-((2S,3R)-2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)-3-μεθυλπενταναμιδο)οξικός tert-βουτυλεστέρας (155)



M.T.: C₂₅H₃₈N₂O₆

M.B.: 462.58 mg/mmol

Άχρωμο λάδι. Απόδοση 69% (82.4 mg)

[α]_D = -17.0 (c 0.5, CHCl₃)

R_f(7): 0.30

^1H NMR: δ 7.56 (d, 1H, NH, $J= 9.0$ Hz), 7.07 (d, 2H, arom, $J= 8.2$ Hz), 6.80 (d, 2H, arom, $J= 8.4$ Hz), 6.77 – 6.67 (m, 1H, NH), 4.38 – 4.27 (m, 1H, CH), 3.92 (dd, 2H, NHCH_2 , $J_1= 5.2$ Hz, $J_2= 14.4$ Hz), 3.76 (s, 3H, CH_3O), 2.92 (t, 2H, PhCH_2 , $J= 6.4$ Hz), 2.55 (t, 2H, CH_2COCO , $J= 6.6$ Hz), 2.04 – 1.85 (m, 1H, CH), 1.65 – 1.53 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1.44 [s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$], 1.32 – 1.03 (m, 2H, CH_2), 0.99 – 0.81 (m, 6H, $2\times\text{CH}_3$).

^{13}C NMR: δ 197.9, 170.3, 168.4, 159.9, 157.5, 133.9, 129.0, 113.5, 82.1, 57.5, 55.0, 41.8, 37.1, 36.5, 34.5, 30.8, 27.8, 24.7, 22.4, 15.2, 11.0.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 461 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 463 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 16), 480 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 100).

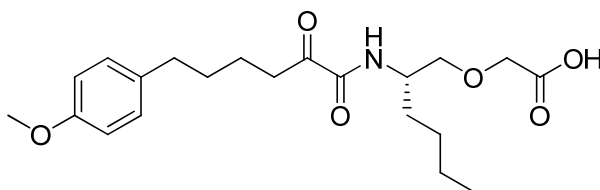
HRMS m/z : 461.2662 (461.2657) $[\text{M}-\text{H}]^-$

IR (cm^{-1}): 3320, 2968, 2933, 2876, 1743, 1662, 1613, 1514, 1461, 1369, 1299, 1246, 1157, 1115, 1036, 843, 747, 646, 562, 522.

∞ Γενική μέθοδος απομάκρυνσης της προστατευτικής ομάδας του *tert*-βουτυλεστέρα

Διάλυμα του *tert*-βουτυλεστέρα (1 mmol) σε 50% TFA/ CH_2Cl_2 (10ml) τίθεται υπό ανάδευση για 1 ώρα. Έπειτα, συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση ο διαλύτης και η περίσσεια του τριφθοροξικού οξέος. Το προϊόν ανακρυσταλλώνεται από αιθέρα/ πετρελαϊκό αιθέρα.

(S)-2-(2-(6-(4-μεθοξυφαινυλ)-2-οξοεξαναμιδο)εξυλοξυ)οξικό οξύ (96)



M.T.: $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_6$

M.B.: 393.47 mg/mmol

Καφέ στερεό. Απόδοση 93% (95.2 mg)

Σ.Τ.: 52 – 55 °C

$[\alpha]_{\text{D}} = - 5.3$ (c 1, CHCl_3)

$R_f(7)$: 0.15

^1H NMR: δ 7.63 (br s, 1H, NH), 7.12 (d, 2H, arom, $J= 8.4$ Hz), 6.82 (d, 2H, arom, $J= 8.6$ Hz), 4.21 – 3.91 (m, 3H, CH, OCH_2COOH), 3.75 (s, 3H, CH_3O), 3.70 – 3.50 (m, 2H, CH_2O), 2.97 –

2.81 (m, 2H, PhCH₂), 2.65 – 2.48 (m, 2H, CH₂COCO), 1.74 – 1.48 (m, 6H, 3xCH₂), 1.40 – 1.20 (m, 4H, 2xCH₂), 0.93 – 0.80 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR: δ 198.9, 160.1, 157.6, 134.1, 129.2, 113.6, 55.2, 49.5, 36.6, 34.6, 30.9, 30.7, 29.6, 28.0, 22.6, 22.4, 13.9.

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (-): 392 ([M-H]⁻, 100).

MS (ESI) m/z (%) ιόντων (+): 394 ([M+H]⁺, 99), 411 ([M+NH₄]⁺, 100).

HRMS m/z: 392.2084 (392.2079) [M-H]⁻

IR (cm⁻¹): 3359, 2931, 2863, 1724, 1676, 1612, 1513, 1462, 1375, 1300, 1245, 1178, 1129, 1035, 825, 730, 671, 559.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Κλώνης, Ι. «Ενζυμολογία», Αθήνα: Εκδόσεις Έμβρυο, **2007**.
2. Δημόπουλος, Κ.Α., Αντωνοπούλου, Σ. «Βασική Βιοχημεία», Αθήνα: Ιδίω, **2000**.
3. Καψάλης, Α., Μπουρμπουχάκης, Ι.Ε., Περάκη, Β., Σαλαμαστράκης Σ. «Βιολογία γενικής παιδείας», Αθήνα: Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων, **2010**.
4. Γεωργάτσος, Ι.Γ., Γιουσάνης, Τ.Α., Κυριακίδης Δ.Α. «Ενζυμολογία», Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη, **2001**.
5. Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., Yamamoto, K. “Recent progress in phospholipase A₂ research: From cells to animals to humans”, *Progress in Lipid Research*, **2011**, 50, 152–192.
6. Six, D.A., Dennis, E.A. “The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization”, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1488, 1-19.
7. Schaloske, R.H., Dennis, E.A. “The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system” *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1761, 1246-1259.
8. Funk, C.D. “Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology” *Science*, **2001**, 294, 1871-1875.
9. Prescott, S.M. “A Thematic Series on Phospholipases”, *J.Biol.Chem.*, **1997**, 272, 15043.
10. Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M. “Platelet-Activating Factor and Related Lipid Mediators”, *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, 69, 419-445.
11. Goetzl, E.J., Dolezalova, H., Gong, Y., Hu, E.L., Jaffe, R.B., Kalli, K.R., Conover, C.A. “Distinctive Expression and Functions of the Type 4 Endothelial Differentiation Gene-encoded G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid in Ovarian Cancer”, *Cancer Res.*, **1999**, 59, 5370-5375.
12. Burke, E.J., Dennis, E.A., “Phospholipase A₂ Biochemistry”, *Cardiovasc Drugs Ther.*, **2009**, 23, 49-59.
13. Kudo, I., Murakami, M., “Phospholipase A₂ enzymes”, *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **2002**, 68–69, 3–58.
14. Triggiani, M., Granata, F., Frattini, A., Marone, G. “Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A₂”, *Biochim Biophys Acta*, **2006**, 1761, 1289-1300.
15. Rosenson, R.S., Hurt-Camejo, E. “Phospholipase A₂ enzymes and the risk of atherosclerosis”, *European Heart Journal*, **2012**, 33, 2899–2909.
16. Arouri, A., Hansen, A.H., Rasmussen T.E., Mouritsen O.G. “Lipases, liposomes and lipid-prodrugs”, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **2013**, 18, 419–431.

17. Dan, P., Rosenblat, G., Yedgar, S., “Phospholipase A₂ activities in skin physiology and pathology”, *European Journal of Pharmacology*, **2012**, 691, 1–8.
18. Pniewska, E., Pawliczak, R., “The involvement of phospholipases A₂ in asthma and chronic obstructive pulmonary disease”, *Hindawi Publishing Corporation, Mediators of Inflammation*, **2013**, Article ID 793505, 12 pages.
19. Dennis, E.A., Cao, J., Hsu, Y-H., Magrioti, V., Kokotos, G., “Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention”, *Chem. Rev.*, **2011**, 111, 6130–6185.
20. Murakami, M., Lambeau, G., “Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: An update”, *Biochimie*, **2013**, 95, 43-50.
21. Tjoelker, L.W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H.L., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., “Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A₂ with a catalytic triad.”, *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 25481-25487.
22. Pinckard, R.N., McManus, L.M., Demopoulos, C.A., Halonen, M., Clark, P.O., Shaw, J.O., Kniker, W.T., Hanahan, D.J. “Molecular pathobiology of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine: evidence for the structural and functional identity with platelet-activating factor”, *J Reticuloendothel Soc.*, **1980**, 28 (Suppl), 95s-103s.
23. Manya, H., Aoki, J., Kato, H., Ishii, J., Hino, S., Arai, H., Inoue, K. “Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase” *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 31827-31832.
24. Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. “Platelet-activating factor acetylhydrolases”, *J Biol Chem*, **1997**, 272, 17895-17898.
25. McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Stafforini, D.M. “The emerging roles of PAF acetylhydrolase” *J. Lipid. Res.*, **2009**, 50, S255-S259.
26. Hiraoka, M., Abe, A., Shayman, J.A. “Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A₂, 1-O-acylceramide synthase.” *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 10090-10099.
27. Abe, A., Hiraoka, M., Shayman, J.A. “A role for lysosomal phospholipase A₂ in drug induced phospholipidosis”, *Drug Metab. Lett.*, **2007**, 1, 49-53.
28. Taniyama, Y., Fuse, H., Satomi, T., Tozawa, R., Yasuhara, Y., Shimakawa, K., Shibata, S., Hattori, M., Nakata, M., Taketomi, S. “Loss of lysophospholipase 3 increases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, 330, 104-110.
29. Shayman, J.A., Abe, A., Kelly, R., Kollmeyer, J., Lu, Y., “Lysosomal phospholipase A₂ (LPLA₂) activity as a diagnostic and therapeutic target for identifying and treating systemic lupus erythematosus”, **2011**, US 8,052,970 B2.

30. Underwood, K.W., Song, C., Chang, X.J., Knopf, J.L., Kriz, R.W., Lin, L.L., “A novel calcium-independent phospholipase A₂, cPLA₂-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA₂.” *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 21926-21932.
31. Chiba, H., Michibata, H., Wakomoto, K., Seishima, M., Kawasaki, S., Okubo, K., Mitsui, H., Torii, H., Imai, Y. “Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂delta, induced in psoriatic skin.” *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 12890-12897.
32. Ghomashchi, F., Naika, G.S., Bollinger, J.G., Aloulou, A., Lehr, M., Leslie, C.C., Gelb, M.H. “Interfacial kinetic and binding properties of mammalian group IVB phospholipase A₂ (cPLA₂beta) and comparison with the other cPLA₂ isoforms.” *J Biol Chem.*, **2010**, 285, 36100–36111.
33. Ackermann, E.J., Kempner, E.S., Dennis, E.A. “Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A₂ from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 9227-9233.
34. A) Kienesberg, P.C., Oberer, M., Lass, A., Zechner R., “Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions.” *J Lipid Res.*, **2009**, Suppl:S63-8. B) Saarela, J., Jung, G., Hermann, M., Nimpf, J., Schneider, W. J. “The patatin-like lipase family in *Gallus gallus*.” *BMC Genomics*, **2008**, 9, 281.
35. Mancuso, D.J., Sims, H.F., Han, X., Jenkins, C.M., Guan, S.P., Yang, K., Moon, S.H., Pietka, T., Abumrad, N.A., Schlesinger, P.H., Gross, R.W. “Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A₂ gamma leads to alterations in mitochondrial lipid metabolism and function resulting in a deficient mitochondrial bioenergetic phenotype.” *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 34611-34622.
36. van Tienhoven, M., Atkins, J., Li, Y., Glynn, P. “Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids.” *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 20942-20948.
37. Li, Y., Dinsdale, D., Glynn, P. “Protein domains, catalytic activity, and subcellular distribution of neuropathy target esterase in Mammalian cells.” *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 8820–8825.
38. Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L.A., Boerwinkle, E., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. “Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease.” *Nat Genet.*, **2008**, 40, 1461-1465.
39. Yuan, X., Waterworth, D., Perry, J.R., Lim, N., Song, K., Chambers, J.C., Zhang, W., Vollenweider, P., Stirnadel, H., Johnson, T., Bergmann, S., Beckmann, N.D., Li, Y., Ferrucci, L., Melzer, D., Hernandez, D., Singleton, A., Scott, J., Elliott, P., Waeber, G.,

- Cardon, L., Frayling, T.M., Kooner, J.S., Mooser, V. "Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes." *Am J Hum Genet.* **2008** 83, 520-528.
40. Johansson, L.E., Lindblad, U., Larsson, C.A., Råstam, L., Ridderstråle, M. "Polymorphisms in the adiponutrin gene are associated with increased insulin secretion and obesity." *Eur J Endocrinol.* **2008**, 159, 577-583.
41. Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D., Seehra, J., Somers, W.S. "Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism". *Cell*, **1999**, 97, 349-360.
42. Pickard, R.T., Chiou, X.G., Striffler, B.A., DeFelippis, M.R., Hyslop, P.A., Tebbe, A.L., et al. "Identification of essential residues for the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A₂ Probing the role of histidine, aspartic acid, cysteine, and arginine." *J Biol Chem*, **1996**, 271, 19225–19231.
43. Das, S., Cho, W. "Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A₂." *J Biol Chem*, **2002**, 277 (26), 23838-23846.
44. Hsu, Y.H., Burke, J.E., Stephens, D.L., Deems, R.A., Li, S., Asmus, K.M., Woods, V.L. Jr, Dennis, E.A. "Calcium binding rigidifies the C2 domain and the intradomain interaction of GIVA phospholipase A₂ as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry." *J Biol Chem.* **2008**, 283 (15), 9820-9827.
45. Hirabayashi, T., Murayama, T., Shimizu, T. "Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂" *Biol Pharm Bull*, **2004**, 27 (8), 1168-1173.
46. López-Vales, R., Navarro, X., Shimizu, T., Baskakis, C., Kokotos, G., Constantinou-Kokotou, V., Stephens, D., Dennis, E.A., David, S. "Intracellular phospholipase A₂ group IVA and group VIA play important roles in Wallerian degeneration and axon regeneration after peripheral nerve injury", *Brain*, **2008**, 131, 2620-2631.
47. Linkous, A., Yazlovitskaya, E. "Cytosolic phospholipase A₂ as a mediator of disease pathogenesis", *Cellular Microbiology*, **2010**, 12 (10), 1369-1377.
48. Kalyvas, A., David, S. "Cytosolic phospholipase A₂ plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease." *Neuron*, **2004**, 41 (3), 323-335.
49. Marusic, S., Leach, M.W., Pelker, J.W., Azoitei, M.L., Uozumi, N., Cui, J., Shen, M.W., DeClercq, C.M., Miyashiro, J.S., Carito, B.A., Thakker, P., Simmons, D.L., Leonard, J.P., Shimizu, T., Clark, J.D. "Cytosolic phospholipase A₂ alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med.*, **2005**, 202 (6), 841-851.

50. Hegen, M., Sun, L., Uozumi, N., Kume, K., Goad, M.E., Nickerson-Nutter, C.L., Shimizu, T., Clark, J.D. "Cytosolic phospholipase A2alpha-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis", *J Exp Med.*, **2003**, 197 (10), 1297-1302.
51. Caiazza, F., Harvey, B.J., Thomas, W. "Cytosolic phospholipase A2 activation correlates with HER2 overexpression and mediates estrogen-dependent breast cancer cell growth." *Mol Endocrinol.*, **2010**, 24 (5), 953-968.
52. Ilsley, J.N., Nakanishi, M., Flynn, C., Belinsky, G.S., De Guise, S., Adib, J.N., Dobrowsky, R.T., Bonventre, J.V., Rosenberg, D.W. "Cytoplasmic phospholipase A2 deletion enhances colon tumorigenesis." *Cancer Res.*, **2005**, 65 (7), 2636-2643.
53. Meyer, A.M., Dwyer-Nield, L.D., Hurteau, G.J., Keith, R.L., O'Leary, E., You, M., Bonventre, J.V., Nemenoff, R.A., Malkinson, A.M. "Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2." *Carcinogenesis*, **2004**, 25 (8), 1517-1524.
54. Lagorce-Pagès, C., Paraf, F., Wendum, D., Martin, A., Fléjou, J.F. "Expression of inflammatory secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in premalignant and malignant Barrett's oesophagus." *Virchows Arch.*, **2004**, 444 (5), 426-435.
55. Larsson, P.K., Claesson, H.E., Kennedy, B.P. "Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A2 and their effect on enzyme activity." *J Biol Chem.*, **1998**, 273 (1), 207-214.
56. Hsu, Y.H., Burke, J.E., Li, S., Woods, V.L. Jr, Dennis, E.A. "Localizing the membrane binding region of Group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A2 using peptide amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry." *J Biol Chem.*, **2009**, 284 (35), 23652-23661.
57. Atsumi G1, Murakami M, Kojima K, Hadano A, Tajima M, Kudo I. "Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release." *J Biol Chem.*, **2000**, 275 (24), 18248-18258.
58. Balsinde, J., Pérez, R., Balboa, M.A. "Calcium-independent phospholipase A2 and apoptosis." *Biochim Biophys Acta*, **2006**, 1761 (11), 1344-1350.
59. Lio YC1, Dennis EA. "Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2." *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1392 (2-3), 320-332.

60. Balsinde, J., Fernández, B., Solís-Herruzo, J.A. "Increased incorporation of arachidonic acid into phospholipids in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages." *Eur J Biochem*, **1994**, 221 (3), 1013-1018.
61. Daniele, J.J., Fidelio, G.D., Bianco, I.D. "Calcium dependency of arachidonic acid incorporation into cellular phospholipids of different cell types." *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **1999**, 57 (5-6), 341-350.
62. Balsinde, J., Balboa, M.A., Dennis, E.A. "Antisense inhibition of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages." *J Biol Chem*, **1997**, 272 (46), 29317-29321.
63. Balsinde, J., Balboa, M.A., Dennis, E.A. "Inflammatory activation of arachidonic acid signaling in murine P388D1 macrophages via sphingomyelin synthesis." *J Biol Chem*, **1997**, 272 (33), 20373-20377.
64. Balsinde J. "Roles of various phospholipases A2 in providing lysophospholipid acceptors for fatty acid phospholipid incorporation and remodelling." *Biochem J*, **2002**, 364 (Pt 3), 695-702.
65. Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M., Wesselborg, S. "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses" *Molecular Cell*, **2004**, 14, 277-287.
66. Magrioti, V., Kokotos, G. "Synthetic inhibitors of group IVA and group VIA phospholipase A2" *Anti-inflammatory Anti-allergy Agents Med. Chem.*, **2006**, 5, 189-203.
67. Ross, B.M., Hudson, C., Erlich, J., Warsh, J.J., Kish, S.J. "Increased phospholipid breakdown in schizophrenia. Evidence for the involvement of a calcium-independent phospholipase A2." *Arch Gen Psychiatry*, **1997**, 54 (5), 487-494.
68. Ross, B.M., Turenne, S., Moszczynska, A., Warsh, J.J., Kish, S.J. "Differential alteration of phospholipase A2 activities in brain of patients with schizophrenia." *Brain Res*, **1999**, 821 (2), 407-413.
69. Yao, J.K., van Kammen, D.P. "Membrane phospholipids and cytokine interaction in schizophrenia." *Int Rev Neurobiol*, **2004**, 59, 297-326.
70. Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., Innis, R. "Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases." *Biol Psychiatry*, **1999**, 46 (1), 56-72.
71. Kan, H., Xie, Z., Finkel, M.S. "iPLA2 inhibitor blocks negative inotropic effect of HIV gp120 on cardiac myocytes." *J Mol Cell Cardiol*, **2006**, 40 (1), 131-137.
72. Lipshultz, S.E., Easley, K.A., Orav, E.J., Kaplan, S., Starc, T.J., Bricker, J.T., Lai, W.W., Moodie, D.S., Sopko, G., Colan, S.D. "Cardiac dysfunction and mortality in HIV-infected children: The Prospective P2C2 HIV Multicenter Study. Pediatric Pulmonary and Cardiac

Complications of Vertically Transmitted HIV Infection (P2C2 HIV) Study Group.” *Circulation*, **2000**, 102 (13), 1542-1548.

73. Williams, S.D., Gottlieb, R.A. “Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective” *Biochem. J.*, **2002**, 362, 23–32.
74. Lei, X., Barbour, S.E., Ramanadham, S. “Group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂β) and its role in β-cell programmed cell death” *Biochimie*, **2010**, 92, 627-637.
75. Ayilavarapu, S., Kantarci, A., Fredman, G., Turkoglu, O., Omori, K., Liu, H., Iwata, T., Yagi, M., Hasturk, H., Van Dyke, T.E. “Diabetes-induced oxidative stress is mediated by Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in neutrophils.” *J Immunol*, **2010**, 184 (3), 1507-1515.
76. Li, H., Zhao, Z., Wei, G., Yan, L., Wang, D., Zhang, H., Sandusky, G.E., Turk, J., Xu, Y. “Group VIA phospholipase A₂ in both host and tumor cells is involved in ovarian cancer development.” *FASEB J*, **2010**, 24 (10), 4103-4116.
77. Cai, Q., Zhao, Z., Antalis, C., Yan, L., Del Priore, G., Hamed, A.H., et al. “Elevated and secreted phospholipase A₂ activities as new potential therapeutic targets in human epithelial ovarian cancer”, *FASEB J*, **2012**, 26, 3306–3320.
78. McHowat J, Gullickson G, Hoover RG, Sharma J, Turk J, Kornbluth J. “Platelet-activating factor and metastasis: calcium-independent phospholipase A₂β deficiency protects against breast cancer metastasis to the lung.” *Am J Physiol Cell Physiol*, **2011**, 300, C825–C832.
79. Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., Dennis, E.A. “Inhibition of macrophage Ca²⁺-independent phospholipase A₂ by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones.” *J Biol Chem*, **1995**, 270 (1), 445-450.
80. Song, H., Ramanadham, S., Bao, S., Hsu, F.F., Turk, J. “A bromoenol lactone suicide substrate inactivates group VIA phospholipase A₂ by generating a diffusible bromomethyl keto acid that alkylates cysteine thiols.” *Biochemistry*, **2006**, 45 (3), 1061-1073.
81. Farooqui, A.A., Ong, W-Y., Horrocks, L.A. “Inhibitors of brain phospholipase A₂ activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders” *Pharmacological Reviews*, **2006**, 58, 591-620.
82. Kolko, M., Vohra, R., van der Burght, B.W., Poulsen, K., Nissen, M.H. “Calcium-independent phospholipase A₂, group VIA, is critical for RPE cell survival” *Molecular Vision*, **2014**, 20, 511-521.
83. Williams, S.D., Gottlieb, R.A. “Inhibition of mitochondrial calcium-independent phospholipase A₂ (iPLA₂) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective” *Biochem J*, **2002**, 362, 23-32.

84. Sun, B., Zhang, X., Talathi, S., Cummings, B.S. "Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A2 decreases prostate cancer cell growth by p53-dependent and independent mechanisms." *J Pharmacol Exp Ther.*, **2008**, 326 (1), 59-68.
85. Balsinde, J., Dennis, E.A. "Bromo-enol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages." *J Biol Chem.*, **1996**, 271 (50), 31937-31941.
86. Street, I.P., Lin, H.K., Laliberte, F., Ghomashchi, F., Wang Z., et al. "Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A2", *Biochemistry*, **1993**, 32 (23), 5935-5940.
87. Ghomashchi, F., Loo, R., Balsinde, J., Bartoli, F., Aritz-Castro, R., Clark, J.D., Dennis, E.A., Gelb, M.H. "Trifluoromethyl ketones and methyl fluorophosphonates as inhibitors of group IV and VI phospholipases A2: structure-function studies with vesicle, micelle and membrane assays" *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1420, 45-56.
88. Baskakis, C., Magrioti, V., Cotton, N., Stephens, D., Constantinou-Kokotou, V., Dennis, E.A., Kokotos, G. "Synthesis of polyfluoro ketones for selective inhibition of human phospholipase A2 enzymes." *J Med Chem.*, **2008**, 51 (24), 8027-8037.
89. Kokotos, G., Hsu, Y.H., Burke, J.E., Baskakis, C., Kokotos, C.G., Magrioti, V., Dennis, E.A. "Potent and selective fluoroketone inhibitors of group VIA calcium-independent phospholipase A2." *J Med Chem.*, **2010**, 53 (9), 3602-3610.
90. Kalyvas, A., Baskakis, C., Magrioti, V., Constantinou-Kokotou, V., Stephens, D., López-Vales, R., Lu, J.Q., Yong, V.W., Dennis, E.A., Kokotos, G., David, S. "Differing roles for members of the phospholipase A2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Brain.*, **2009**, 132 (Pt 5), 1221-1235.
91. López-Vales, R., Ghasemlou, N., Redensek, A., et al. "Phospholipase A₂ superfamily members play divergent roles after spinal cord injury", *FASEB J.*, **2011**, 25, 4240-4252.
92. Li, H., Zhao, Z., Antalis, C., Zhao, Z., et al. "Combination therapy of an inhibitor of group VIA phospholipase A₂ with paclitaxel is highly effective in blocking ovarian cancer development" *Am J Pathology*, **2011**, 179, 452-461.
93. Ali, T., Kokotos, G., Magrioti, V., Bone, R.N., Mobley, J.A. et al. "Characterization of FKGK18 as inhibitor of group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A₂ (iPLA₂β): candidate drug for preventing beta-cell apoptosis and diabetes." *PLoS ONE*, **2013**, 8 (8), e71748.
94. Gross, R.W., Ramanandham, Kruzka, K.K., Han, X., Turk, J. "Rat and human pancreatic islet cells contain a calcium ion independent phospholipase A₂ activity selective for hydrolysis of arachidonate which is stimulated by adenosine triphosphate and is specifically localized to islet beta-cells." *Biochemistry*, **1993**, 32, 327-336.

95. Hsu, Y-H., Busher, D., Cao, J., Li, S., Yang, S-W., Kokotos G., et al. "Fluoroketone inhibition of Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 through binding pocket association defined by hydrogen/deuterium exchange and molecular dynamics", *J Am Chem Soc*, **2013**, 135, 1330-1337.
96. Magrioti, V., Nikolaou, A., Smyrniotou A., Shah, I., Constantinou-Kokotou, V., Dennis, E.A., Kokotos, G. "New potent and selective polyfluoroalkyl ketone inhibitors of GVIA calcium-independent phospholipase A_2 ", *Bioorg Med Chem*, **2013**, 21, 5823-5829.
97. Kokotos, G., Kotsovolou, S., Six, D.A., Constantinou-Kokotou, V., Beltzner, C.C., Dennis, E.A. "Novel 2-oxoamide inhibitors of human group IVA phospholipase $\text{A}(2)$." *J Med Chem.*, **2002**, 45 (14), 2891-2893.
98. Stephens, D., Barbayianni, E., Constantinou-Kokotou, V., Peristeraki, A., Six, D.A., Cooper, J., Harkewicz, R., Deems, R.A., Dennis, E.A., Kokotos, G. "Differential inhibition of group IVA and group VIA phospholipases A_2 by 2-oxoamides." *J Med Chem.*, **2006**, 49 (9), 2821-2828.
99. Antonopoulou, G., Barbayianni, E., Magrioti, V., Cotton, N., Stephens, D., Constantinou-Kokotou, V., Dennis, E.A., Kokotos, G. "Structure-activity relationships of natural and non-natural amino acid-based amide and 2-oxoamide inhibitors of human phospholipase $\text{A}(2)$ enzymes." *Bioorg Med Chem.*, **2008**, 16 (24), 10257-10269.
100. Barbayianni, E., Stephens, D., Grkovich, A., Magrioti, V., Hsu, Y.H., Dolatzas, P., Kalogiannidis, D., Dennis, E.A., Kokotos, G. "2-Oxoamide inhibitors of phospholipase A_2 activity and cellular arachidonate release based on dipeptides and pseudodipeptides." *Bioorg Med Chem.*, **2009**, 17 (13), 4833-4843.
101. a) James, P.N & Snyder, H.R. "Indole-3-aldehyde", *Organic Syntheses*, **1963**, Coll.Vol.4, p.536; **1959**, 39, 30. b) Jin, H., Zhang, P., Bijian, K., Ren, S., Wan, S., et al. "Total synthesis and biological activity of marine alkaloid eudistomins Y_1 - Y_7 and their analogues", *Mar. Drugs*, **2013**, 11, 1427-1439.
102. Ohsawa, K., Yoshida, M., Doi, T. "A direct and mild formylation method for substituted benzenes utilizing dichloromethyl methyl ether-silver trifluoromethanesulfonate" *J. Org. Chem*, **2013**, 78, 3438-3444.
103. Nakao, Y., Kanyiva, K.S., Oda, S., Hiyama, T. "Hydroheteroarylation of alkynes under mild nickel-catalysis", *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 8146-8147.
104. Bhumia, S.C., Patra, G.C., Pal, S.C. "Reimer-Tiemann reaction of coumarins" *Synthetic Communications*, **2011**, 41, 3678-3682.
105. Ishizumi, K., Shioiri, T., Yamada, S. "Studies in the indole series II. A general synthesis of cycloalkan[b]indolones" *Chem. Pharm. Bull.*, **1967**, 15 (6), 863-872.

106. Yakahata, H., Takehara, H., Ohkubo, N., Momose, T. “An efficient route to chiral *trans*-2,5-dialkylpyrrolidines via stereoselective intramolecular amidomercuration”, *Tetrahedron Asymmetry*, **1990**, 1 (8), 561-566.
107. Shinozuka, T., Shimada, K., Matsui, S., Yamane, T., Ama, M. et al. “Potent and selective cathepsin K inhibitors” *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 6789-6806.
108. Schmuck, C., Rehm, T., Geiger, L., Schafer, M. “Synthesis and self-association properties of flexible guanidiniocarbonylpyrrole-carboxylate zwitterions in DMSO: intra-versus intermolecular ion pairing”, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 6162-6170.
109. Blair, A., Stevenson, L., Sutherland, A. “Synthesis of the isoquinoline alkaloid, crispine C”, *Tetrahedron Letters*, **2012**, 53, 4084-4086.
110. Moody, C.J., Gallagher, P.T., Lighfoot, A.P., Slawin, A.M.Z. “Chiral oxime ethers in asymmetric synthesis. 3.¹ Asymmetric Synthesis of (*R*)-*N*-Protected α -Amino Acids by the Addition of Organometallic Reagents to the ROPHy Oxime of Cinnamaldehyde”, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4419-4425.
111. Volket, M., Koul, S., Muller, G.H., Lehnig, M., Waldmann, H. “Phenylhydrazide as an Enzyme-Labile Protecting Group in Peptide Synthesis”, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6902-6910.
112. Lovric, M., Cepanec, I., Litvic, M., Bartolincinc A., Vinkovic, V. “Scope and Limitations of Sodium and Potassium Trimethylsilanolate as Reagents for Conversion of Esters to Carboxylic Acids”, *Croat. Chem. Acta.*, **2007**, 80 (1), 109-115.
113. Harding, C.I., Dixon, D.J., Le, S.V. “The preparation and alkylation of a butanedione-derived chiral glycine equivalent and its use for the synthesis of α -amino acids and α,α -disubstituted amino acids”, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7679–7692.
114. Katritzky, A.R., Kirichenko, K., Elsayed, A.M., Ji, Y., Fang, Y. “Convenient preparation of *tert*-butyl β -(protected amino)esters”, *J. Org. Chem. Notes*, **2002**, 67, 4957-4959.
115. Riva, R., Banfi, L., Basso, A., Zito, P. “A new diversity oriented and metal-free approach to highly functionalized 3*H*-pyrimidin-4-ones”, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 2107-2122.
116. Bjelakovic, M., Todorovic, N., Milic, D. “An approach to nanobioparticles – synthesis and characterization of fulleropeptides”, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 5291-5300.
117. Holladay, M.W., Bennett, M.J., Tufano, M.D., Lin, C.W., Asin, K.E., et al. “Synthesis and biological activity of CCK heptapeptide analogues. Effects of conformational constraints and standard modifications on receptor subtype selectivity, functional activity in vitro and appetite suppression in vivo”, *J. Med. Chem.*, **1992**, 35 (16), 2919-2928.



«κόσμον τόνδε, τὸν αὐτὸν ἀπάντων,
οὔτε τις θεῶν οὔτε ἀνθρώπων ἐποίησεν,
ἀλλ' ἦν ἀεὶ καὶ ἔστιν καὶ ἔσται πῦρ
αἰείζων ἀπτόμενον μέτρα καὶ
ἀποσβεννύμενον μέτρα.»

Τον κόσμο αυτό δεν τον έπλασε κανείς,
ούτε Θεός ούτε άνθρωπος, αλλά υπήρχε,
υπάρχει και θα υπάρχει πάντα: είναι μια
φωτιά αέναη, ζωντανή που ανάβει και
σβήνει με μέτρο.

Ηράκλειτος, ο Εφέσιος, 544-484 π.Χ.