



Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 6: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΗΣ (ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ)

Εφαρμογή φυσικών προϊόντων και παραγώγων τους σε μοντέλα νευροεκφυλιστικών νόσων

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

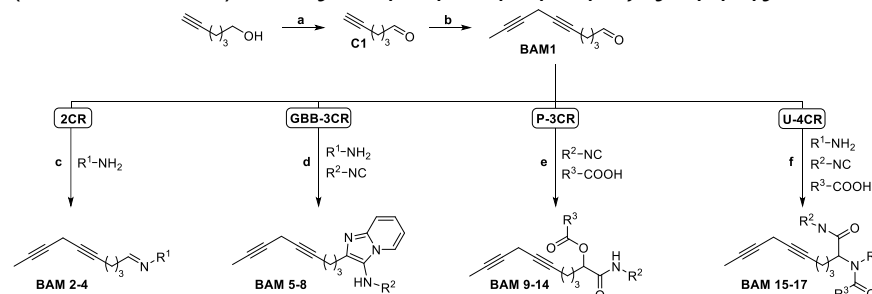
Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες απαιτούν νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις. Ένας σημαντικός μηχανισμός που αναγνωρίστηκε πρόσφατα είναι η φερρόπτωση, μια σιδηροεξαρτώμενη απόπτωση που συνδέεται με τη συσσώρευση φλεγμονωδών λιπιδικών υπεροξειδίων και την υπερλειτουργία της ανθρώπινης 15-λιποξυγενάσης-1 (15-LOX-1). Αυτό το ένζυμο παίζει κρίσιμο ρόλο σε ασθένειες όπως η νόσος του Parkinson. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στην ανάπτυξη ειδικών ανιχνευτών ενζυμικής δραστηριότητας (activity-based probes) για την παρακολούθηση της δράσης του ενζύμου και την αξιολόγηση αναστολέων σε βιολογικά συστήματα. Οι ανιχνευτές βασίζονται στη στοχευμένη, μη αναστρέψιμη πρόσδεση μικρών μορίων στα ένζυμα, ενώ έχουν σχεδιαστεί ώστε να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Σε πρόσφατη μελέτη διαπιστώσαμε ότι τα διύνια (bis-alkynes ή BA) μιμούνται τα φυσικά υποστρώματα της 15-LOX-1 όπου προσδένονται ομοιοπολικά, πιθανώς μέσω ενός ριζικού αλλενικού ενδιάμεσου. Βασιζόμενοι σε αυτό, αναπτύξαμε μια ευέλικτη στρατηγική για να εξερευνήσουμε την αποτελεσματική σύνθεση ποικίλων μικρών ρυθμιστικών μορίων. Το βασικό στοιχείο αυτής της στρατηγικής έγκειται στη σύνθεση ενός αρχικού μορίου το οποίο αποτελείται από ένα ομοιοπολικό τμήμα (BA) και μία λειτουργική ομάδα (αλδεΐδη) η οποία επιτρέπει την περαιτέρω παραγωγοποίηση του μορίου, μέσω της ενσωμάτωσης διάφορων βιοδραστικών ενώσεων με τη χρήση αντιδράσεων δύο (2CR) ή περισσότερων συστατικών (MCRs). Η προσέγγισή μας αξιοποιεί τα οφέλη της χημείας MCR, συμπεριλαμβανομένων των αντιδράσεων Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB-3CR), Passerini (P-3CR) και Ugi (U-4CR), για την εισαγωγή ενός ευρέος φάσματος λειτουργικών ομάδων και δομικών μοτίβων. Η στρατηγική αυτή διευκολύνει την ταχεία σύνθεση πολύπλοκων σκελετών με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες, επιτρέποντας τη δυναμική παραγωγή μιας τεράστιας σειράς ενώσεων με ποικίλα σχήματα, μοριακά βάρη και λιποφιλικότητες.

Για την ανάπτυξη των ρυθμιστικών μορίων στηριχθήκαμε σε μία βάση δεδομένων με γνωστούς αναστολείς της 15-LOX-1 (>6.100) που κατασκευάσαμε. Αυτή η βάση δεδομένων επιτρέπει τη διερεύνηση των βασικών δομικών στοιχείων και του δυναμικού κάθε ένωσης με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα μοριακά χαρακτηριστικά. Η ανάλυσή μας αποκάλυψε ότι το ένζυμο έχει την τάση να προσδένεται ισχυρά ($IC_{50} < 5 \mu M$) σε λιπόφιλα, γραμμικά μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος και πολική επιφάνεια ($clogP > 5$, $MW > 500 Da$, $tPSA > 100$). Επιπλέον, προκειμένου να αξιοποιήσουμε τα πιο δραστικά συστατικά στις MCR, διερευνήσαμε χωριστά την ανασταλτική δράση διάφορων αμινών, καρβοξυλικών οξέων και ισονιτριλίων έναντι της 15-LOX-1. Από τη βάση δεδομένων εντοπίσαμε τα πιο ισχυρά τμήματα αμινών και καρβοξυλικών οξέων ($MW < 200 Da$), αποκαλύπτοντας ποικίλα φαρμακοφόρα μοντέλα, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε στις συνθέσεις μας. Δεδομένου ότι τα ισονιτρίλια δεν έχουν αναφερθεί προηγουμένως ως αναστολείς της 15-LOX-1 και, ως εκ τούτου, δεν καλύπτονταν από τη βάση δεδομένων μας, ελέγξαμε μια μικρή βιβλιοθήκη έναντι της 15-LOX-1, εντοπίζοντας κάποια σχετικά δραστικά θραύσματα ισονιτριλίων ($IC_{50} < 50 \mu M$).

Ξεκινήσαμε την σύνθεση της αρχικής μας ένωσης BAM1 από την εμπορικά διαθέσιμη 5-εξυν-1-όλη, η οποία οξειδώθηκε με χρήση PCC για να παραχθεί η 5-εξυνάλη (C1) (**Εικόνα 27**). Στη συνέχεια, η επιθυμητή ένωση BAM1 συντέθηκε αποτελεσματικά μέσω μιας αντίδρασης σύζευξης C-C τύπου Sonogashira με το 1-βρωμο-2-βουτίνιο. Η ένωση BAM1 διαθέτει μια λειτουργική ομάδα αλδεΐδης στο ένα άκρο της μοριακής αλυσίδας που μπορεί εύκολα να εμπλακεί περαιτέρω σε αντιδράσεις. Η απευθείας κατεργασία της με πρωτοταγείς αμίνες οδηγεί άμεσα στον σχηματισμό των αντίστοιχων ιμινών. Προκειμένου να εξασφαλίσουμε το επιθυμητό γραμμικό σχήμα και έπειτα από βελτιστοποίηση των συνθηκών των αντιδράσεων καταφέραμε να συνθέσουμε τρεις ιμίνες (BAM2-4). Για να συνθέσουμε πιο πολύπλοκα μόρια με τις κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες και να εισάγουμε λειτουργικά τμήματα χρησιμοποιήσαμε τη χημεία MCR. Για το σκοπό αυτό, συνθέσαμε αρχικά μία σειρά ισονιτριλίων ξεκινώντας από τις αντίστοιχες αμίνες. Ως πρώτο βήμα σχηματίστηκαν τα αντίστοιχα φορμαμίδια και έπειτα με αφυδάτωση προέκυψαν τα επιθυμητά ισονιτρίλια. Ακόμη, μετατρέψαμε τις ενώσεις φλουορεσίνη, κουμαρίνη και βενζοφαινόνη στα αντίστοιχα ισονιτρίλια. Συνθέσαμε το φορμαμίδιο της υδροξυτροπυλαμίνης και με ταυτόχρονη αφυδάτωση του και προστασία της υδροξυλομάδας με χρήση τοσυλοχλωριδίου και τριαιθυλαμίνης απομονώσαμε το ισονιτρίλιο. Στη συνέχεια, μέσω αντίδρασης Williamson με την φλουορεσίνη, κουμαρίνη και βενζοφαινόνη σχηματίσαμε τα τελικά ισονιτρίλια.

Χρησιμοποιώντας την αντίδραση GBB-3CR, συντέθηκαν ιμιδαζο[1,2-α]πυριδίνες σε ένα μόνο βήμα. Σε αυτή την αντίδραση 3 συστατικών, χρησιμοποιήσαμε την BAM1, 2-αμινοπυριδίνη και τα εκάστοτε ισονιτρίλια, από όπου προέκυψαν τα αντίστοιχα προϊόντα BAM5-8 (**Εικόνα 27**). Στη συνέχεια, η P-3CR αξιοποιήθηκε ως εναλλακτική αντίδραση 3 συστατικών. Περιλαμβάνει μια καρβονυλική ένωση, ένα καρβοξυλικό οξύ και ένα ισονιτρίλιο και αποδίδει προϊόντα που χαρακτηρίζονται από έναν πιο συμπαγή και λιγότερο περίπλοκο κορμό. Σε όλες τις περιπτώσεις η BAM1 αντέδρασε με οξικό οξύ και διάφορα ισονιτρίλια για να δώσει τις ενώσεις BAM9-11, 13, 14. Τέλος, για να διερευνήσουμε περαιτέρω το εύρος και τους περιορισμούς των νέων ενώσεων BAM, επιχειρήσαμε να συνθέσουμε ενώσεις με αυξημένη πολυπλοκότητα. Πραγματοποιήθηκε η αντίδραση U-4CR μεταξύ της BAM1, του οξικού οξέος, και διαφορετικών αμινών και ισονιτριλίων προς τον σχηματισμό των ενώσεων BAM15-17. Όλες οι συντιθέμενες ενώσεις BAM απομονώθηκαν σε καλές έως εξαιρετικές αποδόσεις έπειτα από χρωματογραφία στήλης, και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (^1H και ^{13}C NMR) καθώς και φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS).



Εικόνα 27. Συνθετική πορεία των ενώσεων BAM.

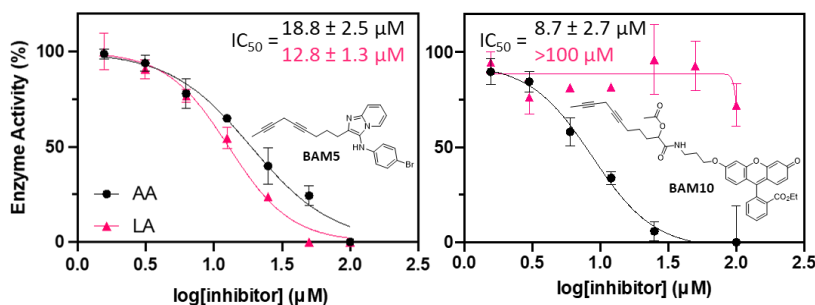
Όλες οι ενώσεις μελετήθηκαν σε πειράματα αναστολής όπου κάποιες εμφάνισαν χαμηλές τιμές IC_{50} , αποδεικνύοντας την ισχύ τους ως μη αναστρέψιμοι αναστολείς της 15-LOX-1 (**Εικόνα 28**). Οι γραμμικές και λιπόφιλες ενώσεις παρουσίασαν ισχυρή δραστηριότητα, όπως παρατηρήθηκε με

την BAM3 ($IC_{50}=0,15\mu M$). Επιπλέον, οι ενώσεις οι οποίες περιέχουν δομικά στοιχεία τα οποία εμφανιζόταν ως πιθανά φαρμακοφόρα στη βάση δεδομένων φαίνεται τελικά να συμβάλλουν θετικά στην ανασταλτική δράση των ενώσεων, όπως οι BAM5 και BAM11. Αντίθετα, οι διακλαδισμένες και ογκώδεις ενώσεις επέδειξαν χαμηλότερη δραστηριότητα, όπως παρατηρήθηκε στις BAM9 και BAM18. Ακόμη, βρέθηκε ότι η αναστολή είναι χρονοεξαρτώμενη, υποδεικνύοντας ομοιοπολική δέσμευση μέσω του τμήματος BA. Η φασματομετρία μάζας (MS) προσδιόρισε βασικά κατάλοιπα (Y395, T396, L397) κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ως σημεία ομοιοπολικής πρόσδεσης.

Compound	IC_{50} value (μM) (LA)	
	10 min	20 min
BAM2	64.4 ± 9.1	20.9 ± 5.6
BAM3	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.01
BAM4	7.2 ± 1.4	3.7 ± 0.6
BAM5	12.8 ± 1.3	8.4 ± 0.7
BAM6	>100	
BAM7	70.0 ± 11.3	52.5 ± 18.9
BAM8	>100	
BAM9	78.2 ± 28.2	48.9 ± 12.9
BAM10	>100	
BAM11	36.6 ± 7.0	34.1 ± 5.9
BAM14	56.7 ± 9.2	26.1 ± 6.4
BAM15	26.0 ± 3.3	11.6 ± 2.7
BAM16	>100	
BAM17	49.2 ± 9.0	38.5 ± 4.4

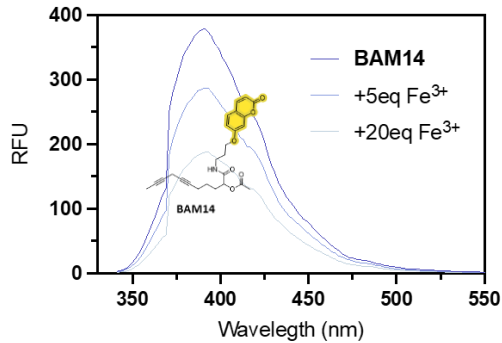
Εικόνα 28. Τιμές IC_{50} των ενώσεων BAM σε δέκα και είκοσι λεπτά επώασης.

Είναι ενδιαφέρον ότι οι ενώσεις BAM παρουσίασαν εκλεκτικότητα στην αναστολή αναλόγως το υπόστρωμα. Για παράδειγμα, η BAM5 δείχνει μεγαλύτερη αναστολή όταν χρησιμοποιείται λινολεϊκό οξύ (LA) ως υπόστρωμα. Αντιθέτως, η BAM10 ανέστειλε τη δραστηριότητα της 15-LOX-1 παρουσία του αραχιδονικού οξέος (AA), ενώ παρουσία LA ήταν ανενεργή. Η BAM3 επέδειξε επίσης εκλεκτικότητα για την ανθρώπινη 15-LOX-1 έναντι των φυτικών ισοενζύμων, ενισχύοντας τη χρησιμότητά της σε θεραπευτικές εφαρμογές.



Εικόνα 29. Διαγράμματα IC_{50} των ενώσεων BAM5 και BAM10 παρουσία λινολεϊκού και αραχιδονικού οξέος.

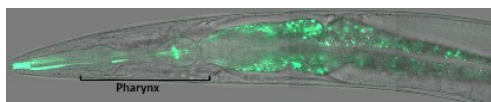
Οι ενώσεις BAM10 και BAM14 που φέρουν φθοροφόρα μόρια βρέθηκε ότι αποτελούν τα βέλτιστα παραδείγματα ανιχνευτών της 15-LOX-1. Η BAM14 έχει την ικανότητα να ανιχνεύει Fe^{3+} , αναδεικνύοντας τη δυνατότητά της ως προηγμένου μοριακού χημειοαισθητήρα για τη φερρόπτωση. Παρουσία μεγάλης ποσότητας σιδήρου, η απορρόφηση της BAM14 αυξήθηκε, ενώ ταυτόχρονα ο φθορισμός της μειώθηκε αντίστοιχα λόγω της ειδικής απόσβεσης.



Εικόνα 30. Φάσμα εκπομπής της ένωσης BAM14 παρουσία 5 και 10 ισοδυνάμων Fe^{3+} .

Πειράματα σε μακροφάγα κύτταρα RAW 264.7 έδειξαν ότι η BAM10 παρουσιάζει εξαιρετική κυτταρική διαπερατότητα και επιτυγχάνει πλήρη φθορισμό μέσα σε λίγα λεπτά. Συναγωνιστικά πειράματα με αναστολείς επιβεβαίωσαν την εκλεκτική πρόσδεση στη 15-LOX-1, με την ένταση του φθορισμού να μειώνεται δόσοεξαρτώμενα. Ο φθορισμός της παρέμεινε σταθερός ακόμη και μετά από αρκετές εκπλύσεις, υποδεικνύοντας ομοιοπολική πρόσδεση. Η BAM13, που διαθέτει μια ομάδα βενζοφαινόνης, λειτούργησε ως μέσο φωτοενεργοποιούμενης σύζευξης, σχηματίζοντας ομοιοπολικούς δεσμούς με τη 15-LOX-1 και άλλες πρωτεϊνικές οντότητες έπειτα από UV ακτινοβολία. Η ιδιότητα αυτή διευκολύνει τη διερεύνηση του ολιγομερισμού του ενζύμου και της χαρτογράφησης της αλληλεπίδρασής του σε βιολογικά συστήματα.

Τέλος, η BAM10 δοκιμάστηκε περαιτέρω σε *Caenorhabditis elegans* για να διερευνηθεί κατά πόσο μπορεί να εντοπίσει λιποξυγενάσες. Η ένωση προσλήφθηκε αποτελεσματικά από τα σκουλήκια, παρουσιάζοντας αυξημένο φθορισμό στο φάρυγγα και το έντερο χωρίς να παρεμποδίζεται η ανάπτυξή τους. Συναγωνιστικά πειράματα επιβεβαίωσαν την εκλεκτική πρόσδεση. Η ανάλυση αλληλουχίας εντόπισε ομόλογα γονίδια λιποξυγενάσης στο *C. elegans*, υποδεικνύοντας πιθανούς ενζυμικούς στόχους. Η έλλειψη αναπτυξιακής τοξικότητας της BAM10 υπογραμμίζει την καταλληλότητά του για *in vivo* μελέτες.

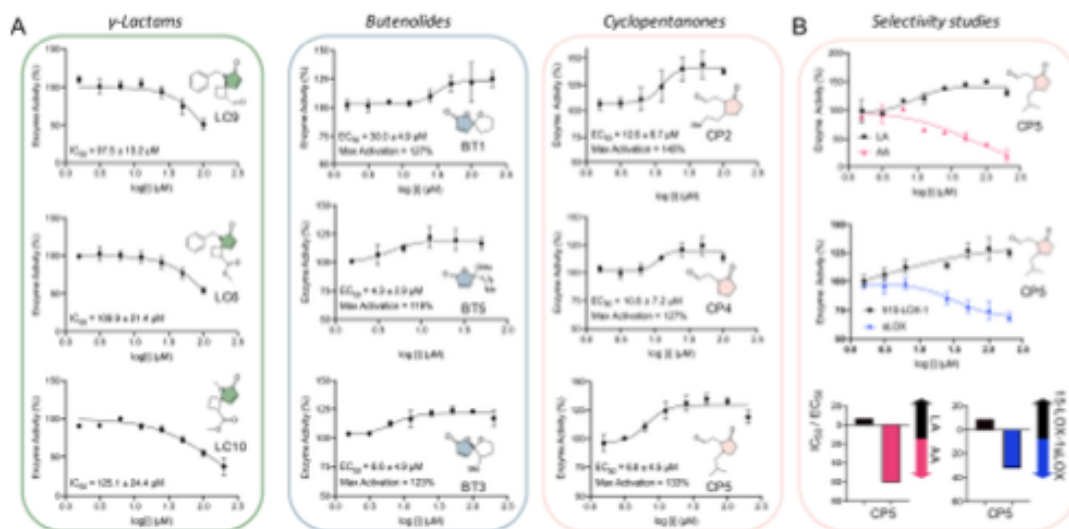


Εικόνα 31. Επάση των *C. elegans* με την BAM10 οδηγεί σε υψηλή ένταση φθορισμού στο φάρυγγα και το έντερο.

Πέραν της ανάπτυξης ομοιοπολικών αναστολέων και ανιχνευτών δραστηριότητας, στο πλαίσιο του έργου διερευνήσαμε και εναλλακτικές στρατηγικές για τη ρύθμιση της 15-LOX-1 μέσω μη αρωματικών, sr3-πλούσιων σκελετών μικρών μορίων. Συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε σε πενταμελείς ετεροκυκλικούς και καρβονυλικούς δακτυλίους, με στόχο τη χαρτογράφηση της σχέσης δομής-δραστηριότητας (SAR) και την ταυτοποίηση τόσο αναστολέων όσο και ενεργοποιητών του ενζύμου.

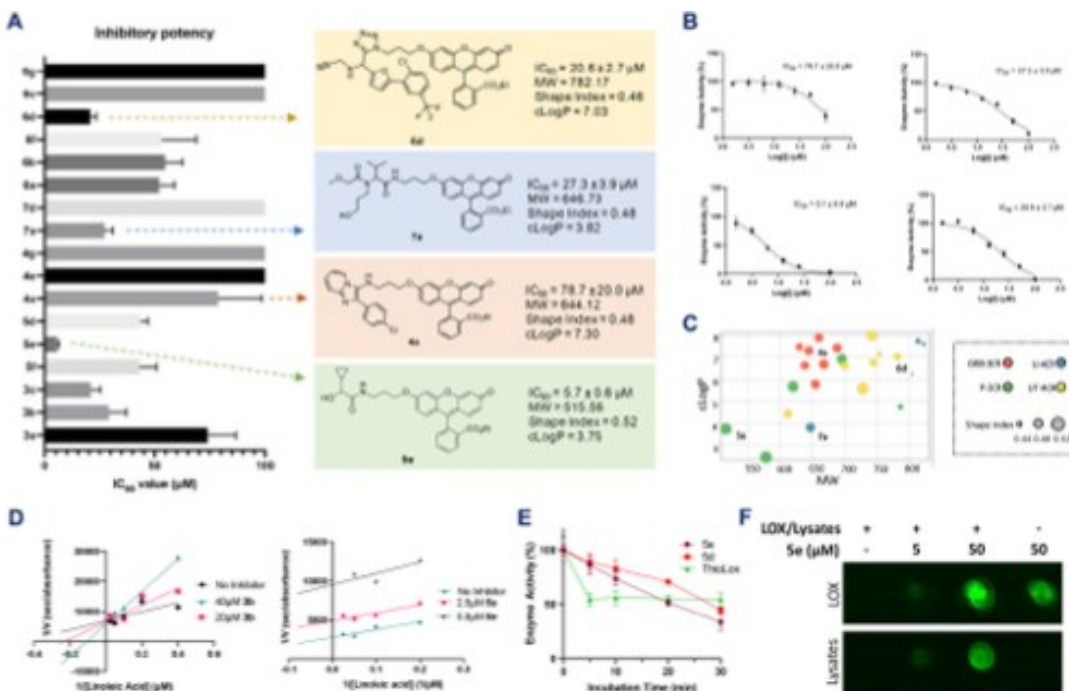
Η συστηματική ανάλυση SAR αποκάλυψε ότι τα παράγωγα γ-λακτάμης λειτουργούν ως αναστολείς της 15-LOX-1, ενώ τα παράγωγα βουτενολίδης και κυκλοπεντανόνης εμφανίζουν ιδιότητες ενεργοποίησης του ενζύμου (**Εικόνα 32**). Κρίσιμοι παράγοντες για τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας αποδείχθηκαν η φύση του ατόμου στη β-θέση και οι υποκαταστάτες στη γ-θέση σε σχέση με την καρβονυλική ομάδα του δακτυλίου. Οι ενώσεις αυτές παρουσίασαν

ενζυμική και υποστρωματο-εξαρτώμενη εκλεκτικότητα, επιβεβαιώνοντας ότι λεπτές δομικές μεταβολές μπορούν να μετατοπίσουν την ισορροπία μεταξύ αναστολής και ενεργοποίησης. Κινητικές μελέτες ενζύμου κατέδειξαν ανταγωνιστικό μηχανισμό τόσο για την αναστολή όσο και για την ενεργοποίηση, ενώ μοριακή μοντελοποίηση ανέδειξε κρίσιμες αλληλεπιδράσεις με το σίδηρο του ενεργού κέντρου και γειτονικά αμινοξικά κατάλοιπα. Τα αποτελέσματα αυτά διευρύνουν σημαντικά τον χημικό χώρο ρύθμισης της 15-LOX-1 και παρέχουν νέες βάσεις για τον σχεδιασμό εκλεκτικών ρυθμιστών.



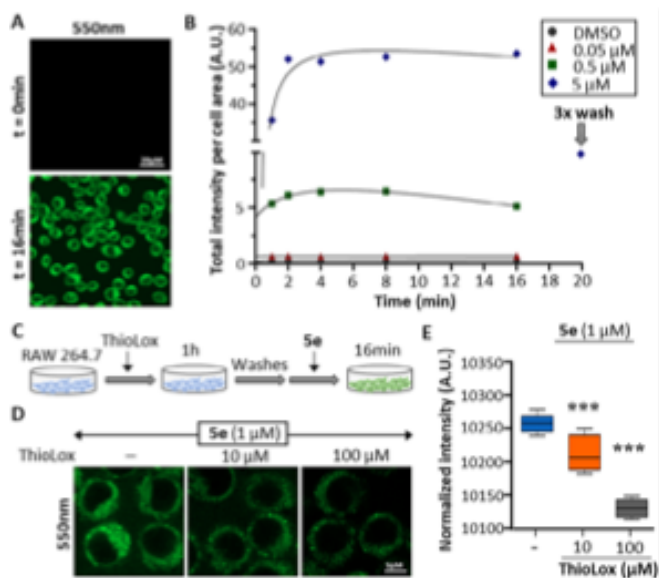
Εικόνα 32. (Α) Χημικές δομές των πιο δραστικών παραγώγων από τις τρεις οικογένειες ενώσεων, μαζί με τις αντίστοιχες τιμές IC₅₀ (αναστολείς) ή EC₅₀ (ενεργοποιητές) έναντι της ανθρώπινης 15-LOX-1. Για κάθε ένωση αναφέρεται επίσης το μέγιστο ποσοστό ενεργοποίησης του ενζύμου. (Β) Προφίλ εκλεκτικότητας της ένωσης CP5. Πάνω: Εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, με σύγκριση της ενζυμικής δραστηριότητας παρουσία λινολεϊκού οξέος (μαύρο, EC₅₀) έναντι αραχιδονικού οξέος (ροζ, IC₅₀). Κάτω: Εκλεκτικότητα ως προς το ένζυμο, με σύγκριση της δραστηριότητας μεταξύ ανθρώπινης 15-LOX-1 (μαύρο, EC₅₀) και λιποξυγενάσης σόγιας (sLOX, μπλε, IC₅₀). Τα ραβδογράμματα απεικονίζουν τη σχετική ισχύ της CP5 σε διαφορετικούς συνδυασμούς υποστρώματος και ενζύμου. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τριπλά (n = 3) και αναφέρεται το τυπικό σφάλμα.

Σε συμπληρωματική κατεύθυνση, αναπτύχθηκε μια καινοτόμος στρατηγική για τη χημική εξέλιξη φθορίζοντων απεικονιστικών παραγόντων σε ισχυρούς θεραπευτικούς αναστολείς με διατηρημένες και ενισχυμένες διαγνωστικές ιδιότητες. Χρησιμοποιώντας τη 15-LOX-1 ως πρότυπο σύστημα, αξιοποιήθηκε η υπάρχουσα γνώση για τους αναστολείς του ενζύμου, ώστε να πραγματοποιηθεί στοχευμένη λειτουργικοποίηση της φλουορεσείνης. Η προσέγγιση αυτή επέτρεψε τη σύνθεση περισσότερων από 20 παραγώγων, βασισμένων σε τέσσερις διαφορετικούς σκελετούς, με υψηλή συνθετική αποδοτικότητα (**Εικόνα 33**).



Εικόνα 33. (Α) Ραβδογράμματα των τιμών IC₅₀ των συντιθέμενων παραγώγων έναντι της ανθρώπινης 15-LOX-1. Παρουσιάζεται η πιο δραστήρια ένωση για κάθε διαφορετικό σκελετό MCR, μαζί με τις υπολογισμένες φυσικοχημικές της ιδιότητες (MW: μοριακό βάρος, δείκτης σχήματος, cLogP). (Β) Διαγράμματα IC₅₀ για τις ενώσεις 6d, 7a, 4a και 5e. (C) Δισδιάστατο διάγραμμα διασποράς όλων των συντιθέμενων ενώσεων με βάση τη λιποφιλικότητα (cLogP) και το μοριακό βάρος (MW). Το μέγεθος και το χρώμα κάθε σημείου αντιπροσωπεύουν τον δείκτη σχήματος και τη διαφορετική ομάδα σκελετού MCR, αντίστοιχα. (D) Κινητικός χαρακτηρισμός σταθερής κατάστασης της ανθρώπινης 15-LOX-1 παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των ενώσεων 3b και 5e με απεικόνιση Lineweaver–Burk. (E) Δοκιμασία χρονοεξαρτώμενης αναστολής παρουσία των ενώσεων 5e, 5d και ThioLox. (F) Dot-blot (φθορισμός) δειγμάτων που έχουν υποβληθεί σε κατεργασία με 5e (5 και 50 μM) (καθαρή 15-LOX-1 και κυτταρικό λύμα). Παρουσιάζονται επίσης πειράματα ελέγχου απουσία της 5e. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τριπλά (n = 3) και αναφέρεται το τυπικό σφάλμα.

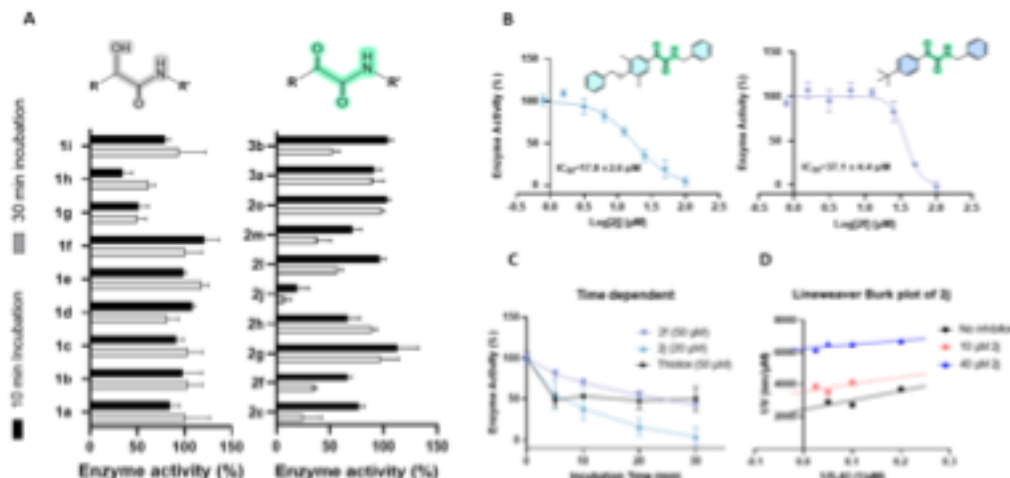
Η βελτιστοποίηση των δομών οδήγησε στην ανάπτυξη ενός ισχυρού, κυτταρικά διαπερατού αναστολέα, ο οποίος προσδένεται αποτελεσματικά στον στόχο του σε ζωντανά κύτταρα και επιτρέπει την απεικόνιση της ενζυμικής δραστηριότητας σε πραγματικό χρόνο (**Εικόνα 34**). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη βιωσιμότητα της στρατηγικής για τον σχεδιασμό μικρομοριακών διαγνωστικών-θεραπευτικών (theranostic) ρυθμιστών και αναδεικνύουν τη δυνατότητα γενίκευσής της και σε άλλους ενζυμικούς στόχους σχετικούς με νευροεκφυλιστικές και φλεγμονώδεις παθήσεις.



Εικόνα 34. (Α) Δοκιμασία κυτταρικής διαπερατότητας βασισμένη σε απεικόνιση με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου. Κύτταρα RAW 264.7 που είχαν επιστρωθεί σε πλάκες με γυάλινο πυθμένα κατεργάστηκαν *in situ* με την 5e και απεικονίστηκαν άμεσα. Η επάνω σειρά απεικονίζει τα κύτταρα πριν από την κατεργασία για τον προσδιορισμό του υποβάθρου φθορισμού. Η κάτω σειρά απεικονίζει τα κύτταρα 16 λεπτά μετά την προσθήκη της 5e σε συγκέντρωση 5 μΜ. (Β) Ποσοτικοποίηση της έντασης της 5e σε διάφορα χρονικά σημεία, η οποία καταδεικνύει ταχεία πρόσληψη της 5e, με επίτευξη κορεσμού εντός 8 λεπτών. (C) Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμασίας συναγωνιστικής απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα των (D), (E) και του Σχήματος S11. Η προ-επώαση με ThioLox πραγματοποιήθηκε στους 37 °C, ενώ η επισήμανση με 5e σε θερμοκρασία δωματίου. (D) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ζωντανών κυττάρων που προ-κατεργάστηκαν είτε με DMSO (αριστερά) είτε με ThioLox (10 ή 100 μΜ, μέση και δεξιά εικόνα, αντίστοιχα) και στη συνέχεια επισήμανθηκαν με 1 μΜ 5e. (E) Box-plot της ποσοτικοποιημένης έντασης ανά επιφάνεια κυττάρου από πειράματα με χρήση 1 μΜ 5e με ή χωρίς συναγωνισμό από ThioLox. Η ένταση της 5e μειώνεται δόσοεξαρτώμενα σε κύτταρα που είχαν προ-κατεργαστεί με ThioLox. Το κουτί αντιπροσωπεύει το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (25ο–75ο εκατοστημόριο), η γραμμή εντός του κουτιού τη διάμεσο, και οι «μουστάκες» τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές. Τα δεδομένα προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα (n = 3). Η στατιστική σημαντικότητα αξιολογήθηκε με μονοπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (one-way ANOVA) με πολλαπλή σύγκριση Dunnett. Η σημαντικότητα υποδεικνύεται με αστερίσκους (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

Παράλληλα, αναπτύχθηκε μια κλιμακούμενη συνθετική μέθοδος βασισμένη στην αντίδραση Passerini για την παρασκευή α-κετοαμιδίων, τα οποία αποτελούν σημαντικά δομικά μοτίβα στη φαρμακευτική χημεία. Η μέθοδος αξιοποιεί p-υδροξυβενζοϊκό οξύ και αιθανόλη, όπου η αναδιάταξη Mumm διακόπτεται σκόπιμα ώστε να απομονωθούν α-υδροξυαμίδια, τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται σε ένα μόνο στάδιο (one-pot) προς τα αντίστοιχα α-κετοαμίδια.

Η προσέγγιση αυτή εμφανίζει ευρεία ανοχή σε υποστρώματα, επιτρέπει τη σύνθεση σε γραμμαριακή κλίμακα και παρέχει πρόσβαση σε νέες ενώσεις με βιολογική δραστικότητα έναντι της ανθρώπινης 15-LOX-1 (**Εικόνα 35**). Η επιτυχής εφαρμογή της μεθόδου για την παραγωγή λειτουργικών αναστολέων υπογραμμίζει τόσο τη συνθετική της αξία όσο και τη βιολογική της σημασία, ενισχύοντας το συνολικό οπλοστάσιο χημικών εργαλείων για τη μελέτη και ρύθμιση της 15-LOX-1.



Εικόνα 35. (Α) Το αριστερό ραβδόγραμμα απεικονίζει την κανονικοποιημένη ενζυμική δραστηριότητα της 15-LOX-1 έναντι των α -υδροξυαμιδίων (50 μ M) με επώαση 10 λεπτών (μαύρο) και 30 λεπτών (γκρι). Το δεξί ραβδόγραμμα απεικονίζει την κανονικοποιημένη ενζυμική δραστηριότητα της 15-LOX-1 έναντι των α -κετοαμιδίων με επώαση 10 λεπτών (μαύρο) και 30 λεπτών (γκρι). (Β) Διαγράμματα IC₅₀ των ενώσεων 2j (αριστερά) και 2f (δεξιά). (C) Πείραμα ελέγχου (screening) των ενώσεων 2j, 2f και ThioLox σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (50 μ M). (D) Διάγραμμα Lineweaver–Burk της ένωσης 2j.

Η συνδυαστική ανάπτυξη ομοιοπολικών ανιχνευτών, μη ομοιοπολικών ρυθμιστών, theranostic παραγόντων και νέων συνθετικών μεθοδολογιών παρέχει ένα ολοκληρωμένο πλαίσιο για τη μελλοντική αξιοποίηση των αποτελεσμάτων σε βασική έρευνα, προκλινικά μοντέλα και, δυνητικά, σε μεταφραστικές εφαρμογές σχετικές με τη φερρόπτωση και τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.