

Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής

EPITHEORESE KLINIKES FARMAKOLOGIAS KAI FARMAKOKINETIKES
REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΤΟΜΟΣ 26, 2008 ☼ No 1

Τεύχος Αφιερωμένο σε Περιλήψεις Διαλέξεων
και Αναρτημένων Ανακοινώσεων στο

*8^ο Διεθνές Συνέδριο Ιατρικής Χημείας:
Σχεδιασμός και Ανάπτυξη
Φαρμακευτικών Προϊόντων*

Τμήματα Χημείας και Φαρμακευτικής
του Πανεπιστημίου Πατρών, Ελλάς
15-17 Μαρτίου 2007, Πάτρα, Ελλάς

Issue Devoted to Papers Presented at the
*8^o International Conference of
Medicinal Chemistry:
Drug Discovery and Design*

Departments of Chemistry and Pharmacy
of the University of Patras, Hellas
March 15-17, 2007, Patra, Hellas

ISSN 1011-6575

Παχυσαρκία και Κυτταρίτιδα

Ιατρός ΣΤΑΥΡΟΣ Τ. ΠΛΕΣΣΑΣ
Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών

Καθηγήτρια Δρ ΕΛΕΝΗ ΚΙΝΤΖΙΟΥ
Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας

Παχυσαρκία

- **Παχυσαρκία**
- **Λιπώδης ιστός**
- **Λιποκύτταρο**
- **Διαιτητική ή Υγιεινή Διαιτητική**
- **Αντιμετώπιση της Παχυσαρκίας:** Δίαιτα, Άσκηση, Χειρουργική αντιμετώπιση, Κινησιολογία

Κυτταρίτιδα

- **Εισαγωγή:** Γενική θεώρηση, Ιστορική αναδρομή
- **Δέρμα:** Ανατομία, Ανοσολογικό Σύστημα, Απορρόφηση καλλυντικών και φαρμάκων
- **Κυτταρίτιδα:** Εισαγωγή, Καθορισμός, Κυτταρίτιδα και ηλικία
- **Αιτιολογία της κυτταρίτιδας:** Αίτια, εκλυτικοί ή επιδεινωτικοί παράγοντες
- **Αντιμετώπιση της κυτταρίτιδας:** Αγγειακή κατάπτωση, Στρες και άγχος, Δίαιτα, Μάλαξη, Ιστική-λεμφική παροχέτευση, Μεσοθεραπεία, Πιεσοθεραπεία, Ενδερμολογία, Ηλεκτροδιέγερση, Ηλεκτρολιπόλυση, Καλλυντικά και άλλες δραστικές ουσίες, Λουτροθεραπεία, Θαλασσοθεραπεία, Φυτοθεραπεία, Ολιγοθεραπεία, Κυτταρολιποφόρηση, Twin Slim, Υπέρηχοι, Σμίλευση, Τεχνική του περισσότερα, Θέρμανση μυός, Ρεφλεξολογία, Θερμο-υδατοθεραπεία, Κρυοθεραπεία, Ομοιοπαθητική, Κινητικότητα εντέρου, Ψυχολογική ένταση και χαλάρωση, Φαρμακολογική αντιμετώπιση, Άσκηση, Εκγύμναση, Βάρος λίπους σώματος, Κατανάλωση ενεργείας, Μυϊκός κάματος και μυϊκή προσπάθεια, Άσκηση και μάλαξη, Δοκιμασία ruffier, Κινησιολογία,, Διάταση μυών

Σελίδες 240

Βιβλιοπωλεία διάθεσης: ΕΛΕΥΘΕΡΟΥΔΑΚΗΣ, ΙΑΝΟΣ, ΕΝΤΟΣ

SBN 978-960-89845-0-9

ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΟΝ – ΤΥΠΟΣ : Ελένη Πλέσσα και Σία Ε.Ε., Μιχαλακοπούλου 145, 11527 ΑΘΗΝΑ. Τηλ.-Φαξ 210-7784700, 6932203802, Email: stpllessas@hotmail.com

ΑΘΗΝΑ ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2007

ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΦΑΡΜΑΚΟΝ – ΤΥΠΟΣ

Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής

ΕΠΙΘΕΟΡΕΣΕ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΕΣ
REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ

ΤΟΜΟΣ 26, 2008 ❁ No 1

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: Καθηγ. ΣΤΑΥΡΟΣ Τ. ΠΛΕΣΣΑΣ και Δρ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Τ. ΠΛΕΣΣΑΣ
ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- | | |
|---|---|
| Καθ. ΑΓΛΑΪΑ ΑΘΑΝΑΣΙΑΔΟΥ (Πάτρα) | Επ. Καθ. ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΑΝΩΛΟΠΟΥΛΟΣ (Αλεξανδρούπο- |
| Δρ ΜΙΧΑΛΗΣ ΑΛΕΞΗΣ (Αθήνα) | λις |
| Καθ. ΙΩΑΝΝΗΣ ΑΝΔΡΟΥΛΑΚΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΜΙΧΑΛΗΣ ΜΑΡΑΓΚΟΥΔΑΚΙΣ (Πάτρα) |
| Καθ. ΦΡΑΓΚΙΣΚΗ ΑΝΘΟΥΛΗ-ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΜΑΡΙΟΣ ΜΑΡΣΕΛΟΣ (Ιωάννινα) |
| Δρ ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ (Αθήνα) | Καθ. ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ (Πάτρα) |
| Αν. Καθ. ΕΥΤΥΧΙΑ ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ (Λάρισα) | Καθ. ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΜΠΕΝΑΚΗΣ (Λάρισα) |
| Δρ ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΑΥΓΕΡΙΝΟΣ (Αθήνα) | Δρ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ Ε. ΝΤΟΥΝΗΣ (Αθήνα) |
| Αν. Καθ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΒΑΛΑΒΑΝΙΔΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΖΩΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ-ΝΤΑΙΦΩΤΗ (Αθήνα) |
| Αν. Καθ. ΑΝΔΡΕΑΣ ΓΙΑΚΟΥΜΕΤΤΗΣ (Αλεξανδρούπολις) | Δρ ΝΙΚΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΑΚΟΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΕΛΕΝΗ ΓΙΑΜΑΡΕΛΛΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΛΛΗΚΑΡΑΚΗΣ (Πάτρα) |
| Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΙΟΦΤΣΟΣ (Λαμία) | Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΗΣ (Πάτρα) |
| Καθ. ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΡΑΒΑΝΗΣ (Ηράκλειο) | Δρ ΝΙΚΗ ΓΕΩΡΓΑΤΟΥ-ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ (Αθήνα) |
| Επ. Καθ. ANNA ΔΕΛΤΣΙΔΟΥ (Λαμία) | Καθ. ΚΩΣΤΑΣ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ (Θεσσαλονίκη) |
| Επ. Καθ. ΕΛΕΝΗ ΘΕΟΔΟΣΟΠΟΥΛΟΥ (Αθήνα) | Αν. Καθ. ΑΝΔΡΕΑΣ ΠΑΠΑΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΣ (Πάτρα) |
| Αν. Καθ. ΧΑΡΙΣ ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ (Αθήνα) | Επ. Καθ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΠΛΕΣΣΑΣ (ΗΠΑ) |
| Καθ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΑΚΟΣ (Αθήνα) | Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΟΛΥΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΚΑΡΑΚΙΟΥΛΑΚΗΣ (Θεσσαλονίκη) | Καθ. ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΠΡΩΤΟΠΑΠΑ (Αθήνα) |
| Επ. Καθ. ΘΕΟΦΑΝΗΣ ΚΑΤΟΣΤΑΡΑΣ (Αθήνα) | Καθ. ΝΙΚΟΣ ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ (Λάρισα) |
| Καθ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΕΦΑΛΑ (Αθήνα) | Καθ. ΚΩΣΤΑΣ ΣΕΚΕΡΗΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΕΛΕΝΗ ΚΙΝΤΖΙΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΣΚΑΛΚΕΑΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΚΟΚΚΑΣ (Θεσσαλονίκη) | Καθ. ΜΕΛΠΟΜΕΝΗ ΣΤΟΪΚΙΔΟΥ (Αθήνα) |
| Αν. Καθ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΥ-ΚΟΥΒΑΡΗ (Αθήνα) | Αν. Καθ. ΜΑΡΙΑ ΜΥΡΩΝΙΔΟΥ-ΤΖΟΥΒΕΛΕΚΗ (Θεσσαλονί- |
| Αν. Καθ. ΕΡΙΕΤΤΑ ΚΟΥΡΤΗ (Αθήνα) | κη) |
| Καθ. ΧΑΡΙΛΑΟΣ ΚΟΥΤΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΟΛΗΣ (Αθήνα) |
| Δρ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΚΡΗΤΙΚΟΥ (Αθήνα) | Καθ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΤΡΙΧΟΠΟΥΛΟΣ (Αθήνα) |
| Αν. Καθ. ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΑΣΤΕΡΙΟΣ ΤΣΙΦΤΣΟΓΛΟΥ (Θεσσαλονίκη) |
| Καθ. ΑΛΚΙΒΙΑΔΗΣ ΚΩΣΤΑΚΗΣ (Αθήνα) | Καθ. ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΜΗΡΤΣΟΥ-ΦΙΔΑΝΗ (Θεσσαλονίκη) |
| Επ. Καθ. ΧΑΡΙΣ ΛΙΑΠΗ (Αθήνα) | Καθ. ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΣ ΦΛΩΡΔΕΛΛΗΣ (Πάτρα) |
| Επ. Καθ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΛΛΙΟΣ (Αθήνα) | Καθ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΧΟΥΛΗΣ (Αθήνα) |
| Καθ. ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΑΝΤΑΣ (Αθήνα) | |

Articles published in this Journal are **Indexed** or **Abstracted** in:

• **Chemical Abstracts** • **Elsevier' Bibliographic Databases: Scopus, EMBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, Compendex, GEOBASE, FLUIDEX, TEXTILES**

Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής
EPITHEORESE KLINIKES FARMAKOLOGIAS KAI FARMAKOKINETIKES
REVIEW OF CLINICAL PHARMACOLOGY AND PHARMACOKINETICS
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ – GREEK EDITION

Ιατροφαρμακευτική Έκδοση
Εφηρμοσμένης Φαρμακολογίας, Φαρμακοκινητικής και Θεραπευτικής
Journal of Applied Pharmacology and Current Therapeutics Reviews,
Review Articles on Drugs and Drugs Therapy, Original Papers and
Practical Therapeutics Articles

Ιδιοκτήτης-Υπεύθυνος κατά το Νόμο: Ελένη Πλέσσα και ΣΙΑ Ε.Ε.
Μιχαλακοπούλου 145, 11527 Αθήνα, Ελλάδα, Τηλ.-Fax (0030)2107784700
Email: stplessas@gmail.com
Published by PHARMAKON-Press
145 Michalakopoulou str., 115 27 Athens, GREECE
Tel.-Fax (0030)2107784700; Email:stplessas@gmail.com

Άρθρα δημοσιευμένα στο Περιοδικό αυτό ευρετηριάζονται ή αποδελτιώνονται στις βάσεις βιβλιογραφικών δεδομένων: • Chemical Abstracts • Elsevier' Bibliographic Databases: Scopus, EMBASE, EMBiology, Elsevier BIOBASE, Compendex, GEOBASE, FLUIDEX, TEXTILES



EDITORS-IN-CHIEF: Prof. STAVROS T. PLESSAS MD and Dr CHARALAMPOS T. PLESSAS

EDITORIAL BOARD

Dr MICHAEL ALEXIS (Athens)	Assoc. Prof. MICHAEL KYRIAKIDES (Athens)
Prof. FRAGISKI ANTHOULI-ANAGNOSTOPOULOU (Athens)	Assist. Prof. CHARIS LIAPI (Athens)
Prof. JOHN ANDROULAKIS (Athens)	Assist. Prof. CONSTANTINE MALLIOS (Athens)
Dr GEORGE ASIMAKOPOULOS (Athens)	Assist. Prof. EVANGELOS MANOLOPOULOS (Alexandroupolis)
Prof. AGLAIA ATHANASIADOU (Patra)	Prof. JOHN MANTAS (Athens)
Assoc. Prof. EUTYCHIA ASPRODINI (Larissa)	Prof. MICHAEL MARAGOUDAKIS (Patra)
Dr ANTHONY AVGERINOS (Athens)	Prof. MARIOS MARSELOS (Ioannina)
Prof. ACHILLES BENAKIS (Larissa)	Prof. JOHN MATSOUKAS (Patra)
Assoc. Prof. HARIS CARAGEORGIU (Athens)	Dr NIKOS OIKONOMAKOS (Athens)
Prof. NICOLAS CHOULIS (Athens)	Prof. NIKOLAS PALLIKARAKIS (Patra)
Prof. ZOE PAPADOPOULOU-DAIFOTI (Athens)	Prof. GEORGE PANAYIOTAKIS (Patra)
Assist. Prof. ANNA DELTSIDOU (Lamia)	Prof. KOSTAS PAPADOPOULOS (Thessaloniki)
Dr ELEFTERIOS DOUNIS (Athens)	Dr NIKI GEORGATOU-PAPAGEORGIU (Athens)
Prof. VASSILIKI MIRTSSOU-FIDANI (Thessaloniki)	Assoc. Prof. ANDREAS PAPAPETROPOULOS (Patra)
Prof. CHRISTODOULOS FLORDELLIS (Patra)	Assist. Prof. PANAYOTIS PLESSAS (USA)
Assoc. Prof. PANAGIOTA GALANOPOULOU-KOUVARI (Athens)	Prof. GEORGE POLICHRONOPOULOS (Athens)
Prof. HELEN GIAMARELLOU (Athens)	Prof. EVANGELIA PROTOPAPA (Athens)
Prof. GEORGE GIOFTSOS (Lamia)	Prof. NIKOS SAKELLARIDIS (Larissa)
Prof. ACHILLEAS GRAVANIS (Heraklion)	Prof. CONSTANTINE SEKERIS (Athens)
Prof. KARAKIULAKIS (Thessaloniki)	Prof. GREGORY SKALKEAS (Athens)
Prof. PANAYOTIS KARAYANNAKOS (Athens)	Prof. MELPOMENE STOIKIDOU (Athens)
Assist. Prof. THEOFANIS KATOSTARAS (Athens)	Assist. Prof. HENEN THEODOSOPOULOU (Athens)
Prof. VASSILIKI KEFALA (Athens)	Prof. GEORGE TOLIS (Athens)
Prof. HELEN KINTZIOU (Athens)	Prof. DIMITRIOS TRICHOPOULOS (Athens)
Prof. BASILE KOKKAS (Thessaloniki)	Prof. ASTERIOS TSIFTSOGLOU (Thessaloniki)
Prof. ALKIVIADES KOSTAKIS (Athens)	Assoc. Prof. MARIA MIRONIDOU-TZOUVELEKI (Thessaloniki)
Assoc. Prof. ERIETTA KOURTI (Athens)	Assoc. Prof. ATHANASIOS VALAVANIDIS (Athens)
Prof. CHARILAOS KOYTIS (Athens)	Assoc. Prof. ANDREAS YIACOUMETTIS (Alexandroupolis)
Dr PANAGIOTA KRITIKOU (Athens)	

ΤΟΜΟΣ 26, 2008 ❁ No 1

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψεις Διαλέξεων

K.C. NICOLAOU.....11	<i>Rόλος της λεπτίνης στη ρευματοειδή αρθρίτιδα (PA)</i>
<i>Chemistry, Biology and Medicine of Natural Products</i>	J.A. PLATTS, A. ROBERTAZZI, M.P. WALLER, K. GKIONIS.....27
A. GIANNIS.....12	Transition metals as anti-cancer agents: Importance of hydrogen bonding and π-stacking interactions
<i>Small molecules as tools for epigenetics and cancer</i>	A.G. TZAKOS, N. LOCKER, L. ELANTAK, L. EASTON, P. LUKAVSKY.....28
M. ΜΑΤΖΙΑΡΗ, Δ. ΓΕΩΡΓΙΑΔΗΣ, Μ. ΝΑΣΟΠΟΥΛΟΥ, V. DIVE, Α. ΓΙΩΤΑΚΗΣ.....12	<i>Moving messages in brain: Dendritic targeting of BC1 RNA</i>
<i>Νέες συνθετικές μέθοδοι για την ανάπτυξη ισχυρών και εκλεκτικών φωσφινικών αναστολέων ματριξινών</i>	K. ΠΟΤΑΜΙΤΗΣ, Μ. ΖΕΡΒΟΥ, S. GOLIC GRDADOLNIK, I. ΚΥΡΙΚΟΥ, Β. ΚΑΤΣΙΑΡΑΣ, Π. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ, Δ. ΑΡΓΥΡΟΠΟΥΛΟΣ, Γ. ΒΑΤΟΥΓΙΑ, Σ. ΝΙΚΟΛΑΡΟΠΟΥΛΟΣ, Θ. ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ.....28
M. ΧΑΤΖΗΜΑΡΙΝΑΚΗ, Μ. ΡΟΥΜΠΕΛΑΚΗΣ, Μ. ΤΖΙΡΑΚΗΣ, Μ. ΟΡΦΑΝΟΠΟΥΛΟΣ.....13	<i>Αντιϋπερτασικό φάρμακο Valsartan: Διαμορφωτική ανάλυση και διερεύνηση του ενεργειακού φράγματος λόγω παρεμποδισμένης περιστροφής γύρω από τον αμιδικό δέσμο με χρήση δυναμικής φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Συγκριτική υπέρθεση με τον πρότυπο AT₁ ανταγωνιστή Losartan και θεωρητική μελέτη πρόσδεσης στον AT₁ υποδοχέα</i>
<i>Η τρίτη αλλοτροπική μορφή του άνθρακα</i>	S. DURDAGI, K. ΚΟΥΚΟΥΛΙΤΣΑ, Α. ΚΑΠΟΥ, Θ. ΚΟΥΡΟΥΛΗ, Θ. ΑΝΔΡΕΟΥ, Σ. ΝΙΚΑΣ, Β. ΝΑΧΜΙΑ, Δ. ΠΑΠΑΧΑΤΖΗΣ, Μ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΚΑΙ Θ. ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ.....29
H.A. ΚΟΥΛΑΔΟΥΡΟΣ.....14	<i>Εφαρμογές τρισδιάστατων σχέσεων δομής δράσης (3D-QSAR) και φαρμακοκινητικές μελέτες καινοτόμων κανναβινοειδών προσδετών υποκαταστημένων στη C1' θέση της αλκυλικής αλυσίδας</i>
<i>Χημική σύνθεση βιοδραστικών φυσικών προϊόντων, πρώτα βήματα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων</i>	Γ.Α. ΔΑΛΚΑΣ, Α. ΠΑΠΑΚΥΡΙΑΚΟΥ, Α. ΒΛΑΜΗΣ-ΓΑΡΔΙΚΑΣ, Γ.Α. ΣΠΥΡΟΥΛΙΑΣ.....30
E.N. ΠΙΤΣΙΝΟΣ, Α. CRUZ, Β. ΜΟΥΤΣΟΣ, Ο. ΒΑΓΓΕΛΗ, Α. GIANNIS, V. WASCHOLOWSKI, Γ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ, Ι. ΚΑΛΟΜΕΝΙΔΗΣ.....15	<i>Μελέτη της αλληλεπίδρασης του θανατηφόρου παράγοντα του άνθρακα με πεπτιδικά υποστρώματα: Συμπεράσματα για τον σχεδιασμό βιοδραστικών ενώσεων</i>
<i>Από τη σκυφοστατίνη στην κοτυλοστατίνη: Χημεία και Βιολογία νέων παρεμποδιστών της ουδέτερης σφιγγομυελινάσης</i>	A.Γ. ΤΖΑΚΟΣ, Ν. ΝΑΦΙ, Κ. ΚΟΜΠΟΡΟΖΟΣ, Ρ. ΠΙΕΡΑΤΤΕΛΛΙ, Β. ΘΕΟΔΩΡΟΥ, Α. HUSAIN, Ι.Π. ΓΕΡΟΘΑΝΑΣΗΣ.....31
I. ΣΜΟΝΟΥ, Δ. ΚΑΛΑΪΤΖΑΚΗΣ.....15	<i>Μοριακή βάση της επιλεκτικότητας της cis και trans διαμόρφωσης του αναστολέα Cartorpiil από το μετατροπικό ένζυμο της αγγιοτενσίνης I</i>
<i>Βιοκαταλυτικές ασύμμετρες αναγωγές για την σύνθεση πολύτιμων χειρομόρφων ενδιάμεσων</i>	Ε. ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗ, Χ. ΓΑΒΡΑΣ.....32
H.L.S. ΜΑΙΑ.....16	<i>Νεώτερα δεδομένα για το ρόλο του συστήματος Ρενίνης-Αγγιοτενσίνης-Αλδοστερόνης</i>
<i>A novel strategy for the synthesis of peptides with α,α-dialkyl and N,α,α-trialkyl glycines</i>	Φ. ΚΟΛΟΚΑΘΗΣ, Δ. ΚΡΕΜΑΣΤΙΝΟΣ.....33
V. ΑΡΟΣΤΟΛΟΡΟΥΛΟΣ.....17	<i>Εξελίξεις στη μελέτη του γενετικού υποστρώματος της διαταπικής μυοκαρδιοπάθειας</i>
<i>Cancer immunotherapy: what have we learnt in the last 15 year</i>	Κ. ΚΥΠΡΕΟΥ, Π. ΚΑΡΑΜΕΣΙΝΗΣ, Μ. ΠΕΡΟΥΛΗΣ, Α. ΑΛΜΠΕΡΤΗ, Α. ΧΑΡΩΝΗΣ.....34
Σ. ΒΑΣΙΛΑΡΟΣ, Α. ΤΣΙΜΠΑΝΗΣ, Α. ΤΣΙΚΚΙΝΗΣ, Ε. ΔΡΑΚΑΚΗ, Ι. ΜΚΚΕΝΖΙΕ, Β. ΑΠΟΣΤΟΛΟΠΟΥΛΟΥ.....18	<i>Μεταβολές στην έκφραση της καλρεκουλίνης κατά τη νεφρική ίνωση</i>
<i>Δέκα χρόνια παρακολούθησης ασθενών πιλοτικής μελέτης φάσης III ανοσοθεραπείας με Mmp1n-MUC1, σε πρώιμο στάδιο καρκίνου μαστού</i>	Δ. ΒΛΑΧΑΚΟΣ, Ν. ΑΡΚΑΔΟΠΟΥΛΟΣ, Σ. ΣΙΑΣΑΚΟΥ, Γ. ΚΩΣΤΟΠΑΝΑΓΙΩΤΟΥ, Λ. ΚΑΚΛΑΜΑΝΗΣ, Β. ΣΜΥΡΝΙΩΤΗΣ.....35
Π.Δ. ΓΡΙΒΑΣ, Χ.Π. ΚΑΛΟΦΩΝΟΣ.....19	<i>Έγχυση δεσφεροξαμίμης (DF) μειώνει την παραγωγή IL-6 και το οξειδωτικό stress, προστατεύοντας τα πει-</i>
<i>Μονοκλωνικά αντισώματα στη στοχευμένη θεραπεία του ορθοκολικού καρκίνου</i>	
A. ΚΟΥΜΑΡΙΑΝΟΥ, Π. ΓΚΟΥΒΕΡΗΣ, Θ. ΟΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ.....20	
<i>Εμβόλια στην αντιμετώπιση των νεοπλασιών: Το παράδειγμα των λεμφωμάτων non Hodgkin</i>	
A. ΓΡΑΒΑΝΗΣ.....21	
<i>Συνθετικά νευροστεροειδή με αντι-αποπτωτική, νευροπροστατευτική δράση</i>	
A.I. ΛΟΥΡΜΠΟΠΟΥΛΟΣ.....23	
<i>Η χρήση της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας ως μοντέλο εφαρμογής νέων πεπτιδικών θεραπειών για την πολλαπλή σκλήρυνση</i>	
K. ΧΑΤΖΑΝΤΩΝΗ, Μ. ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΥ, Ν. ΜΕΪΜΑΡΗΣ, Μ. ΛΕΟΤΣΙΝΙΔΗΣ, Γ. ΘΕΟΔΩΡΟΥ, Τ. ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, Μ. ΚΑΡΑΚΑΝΤΖΑ, Α. ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΣ, Α. ΜΟΥΖΑΚΗ.....25	

ραματόζωα με οξεία ηπατική ισχαιμία από πολυοργανική ανεπάρκεια και SIRS

Κ. ΠΑΝΤΟΣ, Ι. ΜΟΥΡΟΥΖΗΣ, Χ. ΞΥΝΑΡΗΣ, Α. ΚΟΚΚΙΝΟΣ, Δ.Β. ΚΟΚΚΙΝΟΣ.....36

Πυρηνικός υποδοχέας της θυρεοειδικής ορμόνης A1: Νέος φαρμακολογικός στόχος για καρδιοπροστασία και έλεγχο του σωματικού βάρους

A.G. COUTSOLELOS, P.N. ΤΡΟΗΟΠΟΥΛΟΣ.....38
Metallomacrocycles as photosensitizers for photodynamic therapy (PDT) medicinal purposes

V. TSEVELEKI, R. RUBIO, A. AHUMADA, E. ΤΑΟΥΦΙΚ, N. SIMOS, J. QUACKENBUSH, L. PROBERT...38
Gene expression profiling of CNS diseases in mouse models for discovery of pathogenic pathways and tissue defence responses

A. ΒΡΟΝΤΕΛΗ, Κ.Ε. ΛΙΤΙΝΑΣ, Θ. ΣΥΜΕΩΝΙΔΗΣ, Κ.Κ. ΦΥΛΑΚΤΑΚΙΔΟΥ, Δ.Ι. ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ-ΛΙΤΙΝΑ.....39
Σύνθεση [7,8]συμπυκνωμένων κουμαρινικών παραγώγων και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

A.E. ΠΑΠΑΛΟΗΣ.....40
Ερευνητικό – Πειραματικό Τμήμα ELPEN Φαρμακευτικής Βιομηχανίας: Παρουσίαση δραστηριοτήτων και στατιστικών από τον Μάιο του 1996 έως το Δεκέμβριο του 2006

M. ΚΑΤΣΑΡΑ, Γ. ΔΕΡΑΟΣ, Θ. ΤΣΕΛΙΟΣ, Ι. ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ, Β. ΑΠΟΣΤΟΛΟΠΟΥΛΟΥ.....41
Ανσολογικές αποκρίσεις πεπτιδικών αναλόγων του επιτόπου της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης Mbp₈₃₋₉₉ (γραμμικά και κυκλικά) σε SJL/J ποντίκια

I. BERTINI, I.C. FELLI, L. GONNELLI, R. PIERATELLI, Z. ΣΠΥΡΑΝΤΗ, Γ.Α. ΣΠΥΡΟΥΛΙΑΣ.....42
Μελέτη της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με χρήση φασματοσκοπίας ¹³C-NMR

I. ΒΟΥΛΔΗΣ, Κ. ΜΠΑΡΛΟΣ.....43
Σύνθεση επιλεγμένων τμημάτων σε στερεά φάση της pro-Ghrelin

Αναρτημένες Ανακοινώσεις

Κ. ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ, Β. ΖΑΧΑΡΑΚΗ, Π. ΤΣΕΛΙΟΥ.....44
Συχνότητα μετάδοσης της ηπατίτιδας Β σε αιμοδοτικό πληθυσμό του Ν. Αχαΐας κατά τα Έτη 2002-2005

Κ. ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ, Π. ΤΣΕΛΙΟΥ.....44
Αξιολόγηση της μοριακής τεχνικής NAT για τον έλεγχο της ηπατίτιδας Β

Χ. ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΣ, Ι. ΣΑΡΗΓΙΑΝΝΗΣ, Γ. ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ, Μ. ΛΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ-ΚΥΡΙΑΚΙΔΟΥ.....45
Σχεδιασμός και σύνθεση αναλόγων της αλληλουχίας 558-565 της A2 υπομονάδας του παράγοντα πήξης του αίματος FVIIIa

Z. ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ, Δ. ΓΑΤΟΣ, Κ. ΜΠΑΡΛΟΣ.....46
Συνδυασμός τμηματικών μεθόδων και χημικής σύνδεσης για τη σύνθεση του διμερούς του RING τομέα της MDM2 πρωτεΐνης

Σ. ΒΟΥΤΣΑΔΑΚΗ, Ε. ΡΟΥΣΑΚΗΣ, Χ. Ε. ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ.....46
Δικαρβοξυλικά και αζα-μακροκυκλικά ανάλογα κουμαρινών με δυνατότητα προσδιορισμού συγκεντρώσεων ιόντων Ψευδαργύρου

Π. ΓΚΛΕΖΑΚΟΣ, Π. ΒΑΚΑΛΟΠΟΥΛΟΥ, Γ. ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΣ.....47

Σύνθεση πεπτιδομιμητών βασισμένων σε C-τελικά τμήματα της Substance P

M.I. ΔΑΚΑΝΑΛΗ, Β.Π. ΒΙΔΑΛΗ, Η.Α. ΚΟΥΛΑΔΟΥΡΟΣ.....48

Ανάπτυξη μιας γενικής μεθοδολογίας για τη σύνθεση πολυπρενυλιωμένων ακυλοφλορογλυκινών

Π. ΖΑΝΙΑ, Σ. ΚΡΙΤΙΚΟΥ, Χ. Σ. ΦΛΩΡΔΕΛΛΗΣ, Μ.Ε. ΜΑΡΑΓΚΟΥΔΑΚΙΣ, Ν.Ε. ΤΣΟΠΑΝΟΓΛΟΥ.....49

Ο υποδοχέας της θρομβίνης, PAR-1, ως φαρμακολογικός στόχος για την ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων

W.-Q. JIANG, F.C.S.C. PINTO, C. VENTURA, L. ALBUQUERQUE, S.M.M.A. PEREIRA-LIMA, R. GONÇALVES-MAIA, H.L.S. MAIA.....50

Mechanistic investigation of the acidolysis of the C-terminal amide bond of N-acyl-N,α,α-trialkyl glycine amides

E. ΚΑΡΑΚΩΣΤΑ, Α. ΕΥΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ, Σ. ΠΕΤΡΑΚΗ, Β. ΜΑΓΚΑΦΑ, Γ. ΠΑΙΡΑΣ, Λ. ΒΟΡΟΝΙΪΚΟΝΑ, J. SLANINOVA, Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ.....51

Σύνθεση και βιολογική μελέτη αναλόγων της κυκτοκίνης περιεχόντων μη φυσικά αμινοξέα στις θέσεις 3 & 9

Γ. ΚΑΡΚΟΥΛΙΑΣ, Π. ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, Χ. ΦΛΩΡΔΕΛΛΗΣ.....52

Οι α₂-αδρενεργικοί υποδοχείς ενεργοποιούν τον CREB μέσω μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος και διέγερσης της PKA στα κύτταρα PC12

Γ. ΚΑΡΚΟΥΛΙΑΣ, Α. ΠΑΠΑΣΤΡΑΤΑΚΟΣ, Σ. ΤΑΡΑΒΗΡΑΣ, Ο. ΜΑΣΤΡΟΓΙΑΝΝΗ, Π. ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ, Χ. ΦΛΩΡΔΕΛΛΗΣ.....52

Η ενεργοποίηση του CREB εμπλέκεται στην σηματοδότηση από α₂-αδρενεργικούς υποδοχείς στα PC12 κύτταρα

Θ. ΚΑΡΡΑ, Κ. ΜΠΑΡΛΟΣ.....53

Σύνθεση νέων πεπτιδικών νανοδομών

B. ΚΑΤΣΙΑΡΑΣ, Κ. ΠΟΤΑΜΙΤΗΣ, Π. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ, Σ. ΝΙΚΟΛΑΡΟΠΟΥΛΟΣ, Θ. ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ.....54

Θεωρητική μελέτη πρόσδεσης του αντιπυρετασικού φαρμάκου Valsartan στο ενεργό κέντρο του AT₁ υποδοχέα

Θ. ΚΑΤΣΙΛΑ, Ζ. ΣΟΦΙΑΝΟΣ, Θ. ΤΣΕΛΙΟΣ, Ι. ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ, Κ. ΤΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ.....55

Υγρή χρωματογραφία φασματομετρίας μάζας (HPLC-MS/MS): Ποσοτικός προσδιορισμός βιοενεργών πεπτιδίων για την καταπολέμηση του καρκίνου

A.-M. ΚΑΤΣΩΡΗ, Ν. ΚΟΥΡΤΗ, Δ. ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ-ΛΙΤΙΝΑ.....56

Σύνθεση και φαρμακοχημική μελέτη ετεροκυκλικών ενώσεων (χαλκόνων και παραγώγων) με πιθανή αντιφλεγμονώδη, αντισοξειδωτική, αντικαρκινική δράση

Κ. ΚΕΛΑΪΔΩΝΗΣ, Α. ΡΕΣΒΑΝΗ, Κ. ΠΡΟΥΣΑΛΗΣ, Θ. ΤΣΕΛΙΟΣ, Ι. ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ, Θ. ΤΣΕΓΕΝΙΔΗΣ.....57

Σύνθεση αναλόγων γλυκοπεπτιδίων σε στερεή φάση

Π. ΚΕΠΠΑ, Μ.-Ε. ΑΝΔΡΟΥΤΣΟΥ, Θ. ΤΣΕΛΙΟΣ, Ι. ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ.....57

<i>Σύνθεση πρωτοτύπων μη πεπτιδικών μιμητών του PAR-1 υποδοχέα της θρομβίνης με δυο ή τρεις φαρμακοφόρες ομάδες</i>	
Χ.Α. ΚΟΝΤΟΓΙΩΡΓΗΣ, Υ. ΧΥ, Δ. ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ-ΛΙΤΙΝΑ, Υ. ΛΥΟ.....	58
<i>Κοιμαρινικά παράγωγα που δρουν ως δεσμευτές υπεροξειδίου του υδρογόνου και η πιθανή τους εμπλοκή στην ασθένεια Alzheimer</i>	
Κ. ΚΟΥΚΟΥΛΙΤΣΑ, Π. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ, Α. ΡΕΣΒΑΝΗ, Ι. ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ, Θ. ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ.....	59
<i>In silico μελέτες ADME ιδιοτήτων AT1 ανταγωνιστών</i>	
Α.Ε. ΚΟΥΜΠΗΣ, Σ.Σ. ΚΩΤΟΥΛΑΣ, Ι.Κ. ΓΑΛΛΟΣ.....	60
<i>Ολική σύνθεση του 4-φωσφορικού εστέρα της 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (MEP) και ισοτοπομερών της 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης</i>	
Μ. ΚΟΥΣΚΟΥΡΑ, Δ. ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ-ΛΙΤΙΝΑ....	61
<i>Σύνθεση και φαρμακοχημική μελέτη χαλκονών</i>	
Ν. ΚΥΡΙΤΣΗΣ, Σ. ΖΑΧΑΡΙΑΔΟΥ, Ε. ΠΕΤΡΙΔΟΥ, Γ.Μ. ΤΣΙΒΓΟΥΛΗΣ.....	62
<i>Υπερμοριακά βιομιμητικά συστήματα</i>	
Δ. ΛΑΙΜΟΥ, Ε. ΦΡΥΛΙΓΓΟΥ, Α. ΤΡΟΓΚΑΝΗΣ, Θ. ΤΣΕΛΙΟΣ.....	63
<i>Διαμορφωτική μελέτη αναλόγων του Leuprolide που εμπλέκονται στη θεραπεία του καρκίνου</i>	
Σ. ΜΑΝΤΑ, Γ. ΑΓΓΕΛΗΣ, Ε. ΤΣΟΥΚΑΛΑ, Ν. ΤΖΙΟΥΜΑΚΗ, Δ. ΚΟΜΙΩΤΗΣ.....	64
<i>Ακόρεστα φθορο-κετοπυρανοσυλο-νουκλεοσίδια: Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση των 3-φθορο-4-κετο-β-D-γλυκοκυρανοσυλο-παραγώγων της N⁴-βενζοϋλο-κυτοσίνης και N⁶-βενζοϋλο-αδενίνης</i>	
Α.Γ. ΜΑΡΑΝΤΗ, Ε.Α. ΜΠΟΥΖΑΣ, Η.Α. ΚΟΥΛΑΔΟΥΡΟΣ.....	65
<i>Μελέτες κυκλοποίησης μέσω μετάθεσης ενόνης-ολεφίνης: Ολική σύνθεση της μονοκιλίνης II</i>	
Μ. ΜΗΛΙΤΣΟΠΟΥΛΟΥ, Κ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ, Δ. ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ.....	65
<i>Μελέτες με στόχο την ανάπτυξη πρωτοτύπων συζευγμάτων και υβριδίων ψωραλενίων και ασιπρετίνης ως πιθανών αντιψωριακικών παραγόντων</i>	
Σ. ΜΠΑΡΙΑΜΗΣ, Κ. ΑΘΑΝΑΣΟΠΟΥΛΟΣ, Δ. ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ.....	66
<i>Μελέτες με στόχο την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθοδολογιών ολικής σύνθεσης αναλόγων της ασιπρετίνης με μεταβολή στο λιπόφιλο τμήμα της</i>	
Ν.-Π. ΜΠΕΝΕΤΗΣ.....	67
<i>Χρήση νέας μεθόδου προσομοίωσης διευρυμένων φασμάτων NMR φωσφόρου-31 διασταυρούμενης πάλωσης στη μελέτη της αλληλεπίδρασης μοντέλων μεμβρανών με βιοδραστικά πεπτιδία και πεπτιδομιμητικούς AT1 ανταγωνιστές</i>	
Α. ΝΤΑΗΣ, Ε. ΦΡΥΛΙΓΓΟΥ, Θ. ΤΣΕΛΙΟΣ, Ι. ΜΑΤΣΟΥΚΑΣ, Δ. ΓΑΤΟΣ.....	69
<i>Σύνθεση πεπτιδικών δένδριμερών σε στερεά και υγρή φάση με χρήση της 2-χλωροτριτυλο-χλωριδίου ρητίνης (CLTR-Cl)</i>	
F.C.S.C. PINTO, S.M.M.A. PEREIRA-LIMA, H.L.S. MAIA.....	69
<i>Synthesis of peptides of α,α-dialkyl glycines by a Ugi-Passerini reaction</i>	
M.A.C. PRETO, A. MELO, L. RODRIGUES, M.J. RAMOS, H.L.S. MAIA.....	70
<i>Conformational studies and synthesis of angiotensin II analogs containing dialkylglycines</i>	
Μ. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, Ε.ΔΙ CERA, Χ.Σ. ΦΛΩΡΔΕΛΛΗΣ, Μ.Ε. ΜΑΡΑΓΚΟΥΔΑΚΙΣ, Ν.Ε. ΤΣΟΠΑΝΟΓΛΟΥ.....	70
<i>Η θρομβίνη λειτουργεί ως υπόστρωμα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της μοναδικής RGD αλληλουχίας στο μόριό της</i>	
Χ.Κ. ΠΕΤΡΟΥ, Ν. ΑΣΗΜΟΜΥΤΗΣ, Α. ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ, Β. ΜΑΓΚΑΦΑ, Β. ΝΟΚΚ, Θ. ΜΑΙΝΑ, Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ.....	71
<i>Ανάπτυξη και αξιολόγηση πεπτιδικών αναλόγων της σωματοστατίνης με αυξημένη πολικότητα</i>	
Ε. ΠΟΝΤΙΚΗ, Δ. ΧΑΤΖΗΠΑΥΛΟΥ-ΛΙΤΙΝΑ.....	72
<i>Σχεδιασμός και ανάπτυξη α,β-ακόρεστων καρβοξυλικών αναστολέων της λιποξυγονάσης με πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση</i>	
Χ. ΠΡΑΤΣΙΝΗΣ, Δ. ΚΛΕΤΣΑΣ, Ε.Α. ΜΠΟΥΖΑΣ, Α. ΜΙΧΑΗΛΑΚΗΣ, Α.Θ. ΣΤΡΟΓΓΥΛΟΣ, Η.Α. ΚΟΥΛΑΔΟΥΡΟΣ.....	73
<i>Σύνθεση και in vitro βιολογική δραστηριότητα παραγώγων της σικαλκίνης</i>	
Κ. ΠΡΟΥΣΑΛΗΣ, Γ.Μ. ΤΣΙΒΓΟΥΛΗΣ, Θ. ΤΣΕΓΕΝΙΔΗΣ.....	74
<i>Παραγωγή και απομόνωση αντισωμάτων IgY από κρόκους αυγών ανοσοποιημένων ορνίθων, τα οποία δεσμεύουν φαινυλο-N-μεθυλο-καρβαμικά εντομοκτόνα</i>	
Κ.Ε. ΣΕΚΕΡΗΣ.....	75
<i>Μιτοχόνδριο: Άμεσος στόχος δράσεως στεροειδών και θυρεοειδών ορμονών</i>	
Μ. ΣΚΙΑΔΑ, Ε.Β. ΠΑΠΠΑ, Β. ΜΑΓΚΑΦΑ, Γ. ΠΑΙΡΑΣ, Δ. ΒΑΧΛΙΩΤΗΣ, Λ. ΒΟΡΟΝΙΣΚΟΒΑ, J. SLANINOVA, Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ.....	76
<i>Σύνθεση και μελέτη της βιολογικής δράσης νέων αναλόγων της αργινυλο-βασοπρεσίνης (AVP)</i>	
Δ.Κ. ΣΚΟΡΔΑ, Μ.Γ. ΟΡΚΟΥΛΑ, Χ.Γ. ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗΣ.....	77
<i>Προσδιορισμός πολυμόρφου ενεργού φαρμακευτικού συστατικού σε δισκία olanzapine</i>	
Δ.Κ. ΣΚΟΡΔΑ, Μ.Γ. ΟΡΚΟΥΛΑ, Χ.Γ. ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗΣ.....	78
<i>Ποσοτικός προσδιορισμός της δραστικής ουσίας atorvastatin calcium σε δισκία</i>	
Α. ΣΤΡΟΥΜΠΟΥ, Κ. ΠΟΥΛΟΣ.....	78
<i>Σύνθεση αναλόγων της αλατοστατίνης AST4 (ή VII) της Diptera Punctata</i>	
Α. ΤΑΤΣΗ, Ε.Β. ΠΑΠΠΑ, Α.Α. ΖΩΜΠΡΑ, Β. ΜΑΓΚΑΦΑ, Φ.Ν. ΛΑΜΑΡΗ, Ν.Κ. ΚΑΡΑΜΑΝΟΣ, Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ.....	79
<i>Νέα συνθετικά ανάλογα του λεουπρολιδίου περιέχοντα μη φυσικά αμινοξέα στις θέσεις 3 και 6</i>	
Δ.Γ. ΧΡΥΣΑΝΘΗ, Φ.Ν. ΛΑΜΑΡΗ, Γ. ΙΑΤΡΟΥ, Α. ΠΥΛΑΡΑ, Ν.Κ. ΚΑΡΑΜΑΝΟΣ, Π. ΚΟΡΔΟΠΑΤΗΣ.....	80
<i>Συστατικά των στύλων διάφορων ειδών Crocus αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του μαστού</i>	
Γ. ΠΑΣΙΑΡΔΗΣ.....	80

Σύνθεση αναλόγων της νικοτίνης μέσω ενδομοριακής κυκλοπροσθήκης 3+2 και με χρήση μικροκυμάτων
Γ. ΝΑΣΙΟΥΛΑΣ.....81

Μοριακή ανάλυση για την ταυτοποίηση του κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου στον Ελληνικό Πληθυσμό

VOLUME 26, 2008 ❁ No 1 CONTENTS

Abstracts Lectures

K.C. NICOLAOU.....11	11
<i>Chemistry, Biology and Medicine of Natural Products</i>	
A. GIANNIS.....12	12
<i>Small molecules as tools for epigenetics and cancer</i>	
M. MATZIARI, D. GEORGIADIS, M. NASOPOULOU, V. DIVE, A. YIOTAKIS.....12	12
<i>Novel synthetic methods for the development of potent and selective phosphinic inhibitors of matrix metalloproteinases</i>	
M. HATZIMARINAKI, M. ROUBELAKIS, M. TZIRAKIS, M. ORFANOPOULOS.....13	13
<i>Fullerenes: The Chemistry of the third allotropic form of carbon</i>	
E.A. COULADOUROU.....14	14
<i>Chemical synthesis of bioactive natural products; early steps in the discovery of new drugs</i>	
E.N. PITSINOS, A. CRUZ, V. MOUTSOS, O. VAGELI, A. GIANNIS, V. WASCHOLOWSKI, G. STATHOPOULOS, J. KALOMENIDIS.....15	15
<i>From scyphostatin to kotylostatin: Chemistry and Biology of new inhibitors of neutral sphingomyelinases</i>	
I. SMONOU, D. KALAITZAKIS.....15	15
<i>Biocatalytic asymmetric reductions for the synthesis of valuable chiral intermediates</i>	
H.L.S. MAIA.....16	16
<i>A novel strategy for the synthesis of peptides with α,α-dialkyl and N,α,α-trialkyl glycines</i>	
V. APOSTOLOPOULOS.....17	17
<i>Cancer immunotherapy: what have we learnt in the last 15 years</i>	
S. VASSILAROS, A. TSIBANIS, A. TSIKKINIS, E. DRAKAKI, I. MCKENZIE, V. APOSTOLOPOULOS.....18	18
<i>Follow-up of patients with early stage breast cancer of pilot phase III immunotherapy study</i>	
P.D. GRIVAS, H.P. KALOFONOS.....19	19
<i>Monoclonal antibodies in the targeted therapy of colorectal cancer</i>	
A. KOUMARIANOU, P. GOVERIS, T. ECONOMOPOULOS.....20	20
<i>Tumor vaccination strategies: The paradigm of non Hodgkin Lymphoma</i>	
A. GRAVANIS.....21	21
<i>Synthetic neurosteroids with antiapoptotic and neuroprotective properties</i>	
A.I. LOURBOPOULOS.....23	23
<i>Testing peptide therapies for MS using the model of experimental autoimmune encephalomyelitis</i>	

K. CHATZANTONI, M. THEODOROPOULOU, N. MEIMARIS, M. LEOTSINIDIS, G.L. THEODOROU, T. GEORGAKOPOULOS, M. KARAKANTZA, A. ANDONOPOULOS, A. MOUZAKI.....25	25
<i>Role of leptin in rheumatoid arthritis (RA)</i>	
J.A. PLATTS, A. ROBERTAZZI, M.P. WALLER, K. GKI-ONIS.....27	27
<i>Transition metals as anti-cancer agents: Importance of hydrogen bonding and π-stacking interactions</i>	
A.G. TZAKOS, N. LOCKER, L. ELANTAK, L. EASTON, P. LUKAVSKY.....28	28
<i>Moving messages in brain: Dendritic targeting of BC1 RNA</i>	
C. POTAMITIS, M. ZERVOU, S. GOLIC GRDADOLNIK, I. KYRIKOU, V. KATSIARAS, P. ZOUMPOULAKIS, D. ARGYROPOULOS, G. VATOUGIA, S. NIKOLAROPOULOS, T. MAVROMOUSTAKOS.....28	28
<i>Antihypertensive drug valsartan: conformational analysis and determination of the amide rotational barrier using dynamic NMR spectroscopy. Comparative superimposition and docking studies with the prototype AT₁ antagonist Losartan</i>	
S. DURDAGI, C. KOUKOULITSA, A. KAPOU, T. KOUROULI, T. ANDREOU, S.P. NIKAS, V.R. NAHMIA, D.P. PAPAHTJIS, M.G. PAPAPOPOULOS, T. MAVROMOUSTAKOS.....29	29
<i>The applications of 3D-QSAR and pharmacokinetic studies for the novel cannabinoid ligands substituted at the C1' position of the alkyl side chain</i>	
G.A. DALKAS, A. PAPAKYRIAKOU, A. VLAMIS-GARDIKAS, G.A. SPYROULIAS.....30	30
<i>Study of anthrax lethal factor – peptide substrate interaction: Implications for structure-guided design of bioactive molecules</i>	
A.G. TZAKOS, N. NAQVI, K. COMPOROZOS, R. PIERRATELLI, V. THEODOROU, A. HUSAIN, I.P. GEROTHANASSIS.....31	31
<i>The molecular basis for the selection of Captopril cis and trans conformations by angiotensin I converting enzyme</i>	
H. TRIANTAFYLIDIS, H. GAVRAS.....32	32
<i>New developments regarding Renin-Angiotensin-Aldosterone system</i>	
F. KOLOKATHIS, D. KREMASTINOS.....33	33
<i>Developments in genetics of dilated cardiomyopathy</i>	
K.P. KYPREOU, P. KARAMESSINIS, M. PEROULIS, A. ALBERTI, A.S. CHARONIS.....34	34
<i>Differential expression of calreticulin during renal fibrosis</i>	

D. VLAHAKOS, N. ARKADOPOULOS, S. SIASIAKOU, G. KOSTOPANAGIOTOU, L. KAKLAMANIS, V. SMYRNIOTIS.....35	P. GLEZAKOS, P. VAKALOPOULOU, G. STAVROPOULOS.....47
<i>Deferoxamine infusion attenuates Il-6 production and SIRS in a swine model of multiorgan failure after acute hepatic ischemia</i>	<i>Synthesis of peptidomimetics based on C-terminal substance P fragments</i>
C. PANTOS, I. MOUROUZIS, C. XINARIS, A. KOKKINOS, D.V. COKKINOS.....36	M.I. DAKANALI, V.P. VIDALI, E.A. COULADOUROS.....48
<i>Thyroid hormone receptor A1: A new pharmacological target for cardioprotection and body weight control</i>	<i>Ανάπτυξη μιας γενικής μεθοδολογίας για τη σύνθεση πολυπρενυλιωμένων ακυλοφλορογλυκινών</i>
A.G. COUSOLELOS, P.N. TROHOPOULOS.....38	P. ZANIA, S. KRITIKOU, C.S. FLORELLIS, M.E. MARA-GOUDAKIS, N.E. TSOPANOGLU.....49
<i>Metallomacrocycles as photosensitizers for photodynamic therapy (PDT) medicinal purposes</i>	<i>Validation of protease-activated receptor-1 as a target for developing anti-angiogenic agents</i>
V. TSEVELEKI, R. RUBIO, A. AHUMADA, E. TAOUFIK, N. SIMOS, J. QUACKENBUSH, L. PROBERT...38	W.-Q. JIANG, F.C.S.C. PINTO, C. VENTURA, L. ALBUQUERQUE, S.M.M.A. PEREIRA-LIMA, R. GONÇALVES-MAIA, H.L.S. MAIA.....50
<i>Gene expression profiling of CNS diseases in mouse models for discovery of pathogenic pathways and tissue defence responses</i>	<i>Mechanistic investigation of the acidolysis of the C-terminal amide bond of N-acyl-N,α,α-trialkyl glycine amides</i>
A. VRONTELI, K. E. LITINAS, TH. SYMEONIDES, K. K. FYLAKTAKIDOU, D.J. HADJIPAVLOU-LITINA.....39	E. KARAKOSTA, A. EVANGELOPOULOU, S. PETRAKI, V. MAGAFA, G. PAIRAS, L. BOROVÍČKOVÁ2, J. SLANINOVA, P. CORDOPATIS.....51
<i>Synthesis and biological evaluation of [7,8]-fused coumarin derivatives</i>	<i>Synthesis and biological evaluation of oxytocin analogues containing non natural amino acids in positions 3 or 9</i>
A.E. PAPALOIS.....40	G. KARKOULIAS, P. ASIMAKOPOULOS, C. FLORELLIS.....52
<i>Experimental - Research Department ELPEN Pharmaceuticals: Presentation of activities and statistics from May 1996 to December 2006</i>	<i>α₂-Adrenergic receptors activate creb through a pathway involving arachidonic acid metabolism and PKA in PC12 cells</i>
M. KATSARA, G. DERAOS, J. MATSOUKAS, V. APOSTOLOPOULOS.....41	G. KARKOULIAS, A. PAPASTRATAKOS, S. TARAVIRAS, O. MASTROGIANNI, P. PAPATHANASOPOULOS, C. FLORELLIS.....52
<i>Immune responses to rationally altered peptide ligands of myelin basic protein (linear and cyclic) in SJL/J mice</i>	<i>α₂-AR signaling is mediated by activation of transcriptional factor CREB in transfected PC12 cells</i>
I. BERTINI, I.C. FELLI, L. GONNELLI, R. PIERATTELLI, Z. SPYRANTI, G.A. SPYROULIAS.....42	T. KARRA, K. BARLOS.....53
<i>Protonless ¹³C-NMR for the study of protein-protein interaction</i>	<i>Synthesis of new peptide nanosomes</i>
I. VOULDIS, K. BARLOS.....43	V. KATSIARAS, C. POTAMITIS, P. ZOUMPOULAKIS, S. NIKOLAROPOULOS, T. MAVROMOUSTAKOS....54
<i>Synthesis of selected fragments on solid phase of the pro-Ghrelin</i>	<i>Docking studies of the antihypertensive drug valsartan at the active site of the AT₁ receptor</i>
Abstracts Posters	
K. ALEXOPOULOS, V. ZAXARAKI, P. TSELIU.....44	T. KATSILA, Z. SOFIANOS, T. TSELIOS, J. MATSOUKAS, C. TAMVAKOPOULOS.....55
<i>Frequency of transmission of hepatitis B in a population of the Achaia Region for the Years 2002-2005</i>	<i>High Liquid Pressure Chromatography (HPLC-MS/MS): Quantitative analysis of bioactive peptides for the treatment of cancer</i>
K. ALEXOPOULOS, P. TSELIU.....44	A.-M. KATSORI, N. KOURTI, D. HADJIPAVLOU-LITINA.....56
<i>Evaluation of the molecular method of the nucleic acid testing for the diagnosis of hepatitis B</i>	<i>Synthesis and pharmacochemical study of heterocyclic compounds (chalcones and derivatives) with possible anti-inflammatory, antioxidant, anticancer activity</i>
CH. ANASTASOPOULOS, Y. SARIGIANNIS, G. STAVROPOULOS, M. LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES.....45	K. KELAIDONIS, A. RESVANI, K. PROUSALIS, T. TSELIOS, J. MATSOUKAS, T. TSEGENIDIS.....57
<i>Design and synthesis analogues of sequence 558-565 loop of A2 subunit of factor VIIIa blood coagulation</i>	<i>Solid phase synthesis of glycopeptide analogues</i>
Z. VASILEIOU, D. GATOS, K. BARLOS.....46	P. KEPPE, M.-E. ANDROUTSOU, T. TSELIOS, J. MATSOUKAS.....57
<i>Combination of convergent methods and native chemical ligation for the synthesis of the MDM2 ring domain dimer</i>	<i>Synthesis of novel non-peptide mimetic of PAR-1 thrombin receptor with two or three pharmacophoric groups</i>
S. VOUTSADAKI, E. ROUSSAKIS, H.E. KATERINOPOULOS.....46	C.A. KONTOGIORGIS, Y. XU, D. HADJIPAVLOU-LITINA, Y. LUO.....58
<i>Coumarin-type dicarboxylate and aza-macrocyclic fluorescent indicators as potential Zinc ion concentration probes</i>	

Coumarin derivatives acting as hydrogen peroxide scavengers and their possible implication in Alzheimer disease

C. KOUKOULITSA P. ZOUMPOULAKIS, A. RESVANI, J. MATSOUKAS, T. MAVROMOUSTAKOS.....59
In silico studies of ADME properties of AT1 receptor antagonists

A.E. KOUMBIS, S.S. KOTOULAS, J.K. GALLOS.....60
Total synthesis of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) and isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol

M. KOUSKOURA, D. HADJIPAVLOU-LITINA.....61
Synthesis and pharmacochemical study of chalcones

N. KYRITSIS, S. ZACHARIADOU, E. PETRIDOU, G.M. TSIVGOULIS.....62

Supramolecular biomimetic systems

D. LAIMOU, I. FRILIGOU, A. TROGANIS, T. TSELIOS.....63

Conformational analysis of leuprolide analogues that are involved in the treatment of cancer

S. MANTA, G. AGELIS, E. TSOUKALA, N. TZIOUMAKI, D. KOMIOTIS.....64

Unsaturated fluoro-ketopyranosyl nucleosides: Synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-4-keto-β-D-glucopyranosyl derivatives of N⁴-benzoyl cytosine and N⁶-benzoyl adenine

A.G. MARANTI, E.A. BOUZAS, E.A. COULADOUROS.....65

Studies of enone-ene ring closing metathesis. Total synthesis of monocillin II

M. MILITSOPOULOU, C. ATHANASSOPOULOS, D. PAPAIOANNOU.....65

Studies towards the development of novel psoralen-acitretin conjugates and hybrids as potential antipsoriatic agents

S. BARIAMIS, C. ATHANASSOPOULOS, D. PAPAIOANNOU.....66

Studies towards the development of alternative methodologies for the total synthesis of acitretin analogues incorporating changes in the lipophilic part

N.P. BENETIS.....67

Novel CP P-31 NMR broadline spectral simulations used in the study of the interaction of model membranes with bioactive peptides and peptidomimetic AT1 antagonists

A. DAIS, I. FRILIGOU, T. TSELIOS, J. MATSOUKAS, D. GATOS.....69

Synthesis of peptide dendrimers in solid and liquid phase utilizing the 2-chlorotriyl chloride resin (CLTR-Cl)

F.C.S.C. PINTO, S.M.M.A. PEREIRA-LIMA and H.L.S. MAIA.....69

Synthesis of peptides of α,α-dialkyl glycines by a Ugi-Passerini reaction

M.A.C. PRETO, A. MELO, L. RODRIGUES, M.J. RAMOS, H.L.S. MAIA.....70

Conformational studies and synthesis of angiotensin II analogs containing dialkylglycines

M. PAPACONSTANTINOY, E.DI CERA, C.S. FLORDELLIS, M.E. MARAGOUAKIS, N.E. TSOPANOGLIOU.....70

Thrombin is a New Substrate for endothelial cells: Functions through its RGD sequence in a non-canonical conformation

CH.C. PETROU, N. ASSIMOMYTIS, A. NICOLOPOULOU, V. MAGAFA, B. NOCK, TH. MAINA, P. CORDOPATIS.....71

Development and evaluation of somatostatin analogues with increased polarity

E. PONTIKI, D. HADJIPAVLOU-LITINA.....72

Design and synthesis of aryl-acetic-acids inhibitors of lipoxygenase with anti-oxidant and anti-inflammatory activity

H. PRATSINIS, D. KLETSAS, E.A. BOUZAS, A. MECHAEALAKIS, A.T. STRONGILOS, E.A. COULADOUROS.....73

Synthesis and in vitro activity of shikalkin derivatives

K. PROUSALIS, G.M. TSIVGOULIS, T. TSEGENIDIS.....74

Production and isolation of IgY antibodies from egg yolks of immunized laying hens, binding phenyl-N-methylcarbamate insecticides

C.E. SEKERIS.....75

The Mitochondrion as a direct site of action of steroid and thyroid hormones

M. SKIADA, E.V. PAPPA, V. MAGAFA, G. PAIRAS, D. VACHLIOTIS, L. BOROVIČKOVÁ, J. SLANINOVA, P. CORDOPATIS.....76

Synthesis and biological evaluation of new arginine vasopressin (AVP) analogues

D.K. SKORDA, M.G. ORKOULA, C.G. KONTOYANNIS.....77

Identification of active pharmaceutical ingredient polymorph in olanzapine tablets

D.K. SKORDA, M.G. ORKOULA, C.G. KONTOYANNIS.....78

Quantitative determination of atorvastatin calcium in tablets

A. STROUBOU, C. POULOS.....79

*Synthesis of allatostanis AST4(VII) analogues of *Diploptera punctata**

A. TATSI, E.V. PAPPA, A.A. ZOMPRA, V. MAGAFA, F.N. LAMARI, N.K. KARAMANOS, P. CORDOPATIS.....79

New synthetic analogues of leuprolide containing conformationally restricted amino acids in positions 3 and 6

D.G. CHRYSSANTHI, F.N. LAMARI, G. IATROU, A. PYLARA, N.K. KARAMANOS, P. CORDOPATIS.....80

Style constituents of different crocus species inhibit breast cancer cell proliferation

G. PASHIARDES.....81

Synthesis of nicotine analogues using intramolecular [3+2] cycloaddition

G. NASIOULAS.....81

Μοριακή ανάλυση για την ταυτοποίηση του κληρονομούμενου καρκίνου του μαστού και του παχέος εντέρου στον Ελληνικό Πληθυσμό

*Σχεδιασμός και Ανάπτυξη
Φαρμακευτικών Προϊόντων*

Φιλοξενούμενος Εκδότης

Καθ. Ιωάννης Μ. Ματσούκας

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πάτρας

26500 Πάτρα, Ελλάς

Επικεφαλής Διατμηματικού Μεταπτυχιακού
Πρόγραμματος

*Ιατρική Χημεία: Σχεδιασμός και Ανάπτυξη
Φαρμακευτικών Προϊόντων*

Drug Discovery and Design

Guest Editor

Prof. Jonh M. Matsoukas

Department of Chemistry, University of Patras

26500 Patras, Greece

Head of Medicinal Chemistry Postgraduate Program

Medicinal Chemistry: Drug Discovery and Design

Letter from Guest Editor

This issue contains Abstracts of research work presented by specialists at the Eighth Medicinal Chemistry Conference held at the University of Patras, 15-17, March 2007. This Conference was organized by the Postgraduate EPEAEK Program *Medicinal Chemistry: Drug Discovery and Design* initiated and sponsored by the Ministry of National Education and Religion.

This Program is offered by the Departments of Chemistry and Pharmacy of the University of Patras, to selected graduate students from Departments of Chemistry, Pharmacy, Biology and Medicine. In particular, this issue contains articles, which are the results of novel work carried out by the researchers of the program and their graduate students, who take the post graduate program leading to Master of Science and PhD degrees. Abstracts cite in summary research findings from a broad area of Biomedical Fields, including Organic Synthesis, Biochemistry, Biomedical Analysis, Molecular Modeling, Pharmacology and Drug Design Methods. The articles of the book are written by specialists in their field, who participated at the Conference and provide a global understanding of the recent activities in the field of Drug Discovery and Design in Greece and Abroad.

The Guest Editor, on behalf of the Postgraduate Program Committee, wishes to express his deep appreciation to all contributors in this book. We also thank the Editorial Board of *Review of Clinical Pharmacology and Pharmacokinetics* in particular Journal Editors S. Plessas and C. Plessas for invitation and for providing the suitable and high-standard forum through which important findings of this research will become available to the scientific community.

The Guest Editor

John Matsoukas

Professor in Chemistry
University of Patras, Greece
Head of Medicinal Chemistry Postgraduate Program
Medicinal Chemistry: Drug Discovery and Design

Περίληψεις Διαλέξεων - Abstracts Lectures

Chemistry, Biology and Medicine of Natural Products

K.C. Nicolaou, Ph.D.

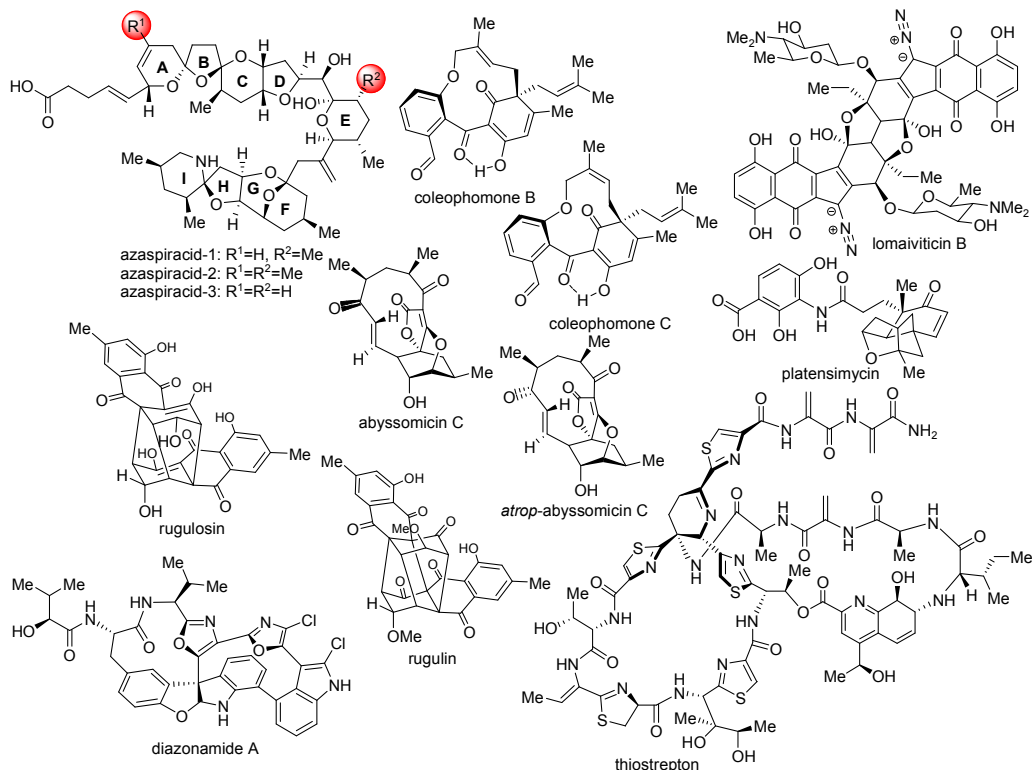
Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, 10550 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 and The Department of Chemistry and Biochemistry University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093
kcn@scripps.edu

Key words: Natural products, Chemistry, Biology, Medicine

Natural products have historically provided synthetic chemists with fertile platforms for discovery and development in the area of chemical synthesis, chemical biology and medicinal chemistry. Such opportunities continue to fascinate and deliver new science as new structures come under scrutiny by synthetic chemists. In this lecture, a number of total synthesis endeavors will be discussed with emphasis on inventions in chemistry, biology and medicine.

REFERENCES

- Nicolaou K.C.: Joys of Molecules. 1. Campaigns in total synthesis. *J. Org. Chem.* 70: 7007 (2005)
Nicolaou K.C.: Joys of Molecules. 2. Endeavors in Chemical Biology and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 48: 5613 (2005)
Nicolaou K.C., Bulger P.G., Sarlah D.: Metathesis reactions in total synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 4490-4527 (2005)
Nicolaou K.C., Bulger P.G., Edmonds D.: Cascade reactions in total synthesis: *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 7134-7186 (2006)



Small Molecules as Tools for Epigenetics and Cancer

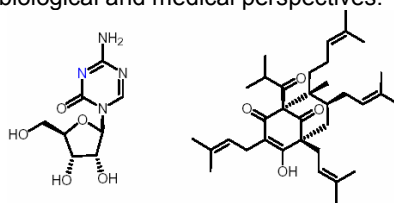
Prof. Dr Athanassios Giannis

Institut für Organische Chemie, Universität Leipzig, Johannisallee 29, D-04103 Leipzig, Deutschland, E-mail: giannis@uni-leipzig.de

Key words: Epigenetics, cancer

The treatment of cancer through the development of new therapies is one of the most important challenges of our time. The decoding of the human genome has yielded important insights into the molecular basis of physical disorders, and in most cases a connection between failures in specific genes and the resulting clinical symptoms can be made. The modulation of epigenetic mechanisms enables, by definition, the alteration of cellular phenotype without altering the genotype. The information content of a single gene can be crucial or harmful, but the prerequisite for a cellular effect is active gene transcription. Epigenetic mechanisms play a very important role, and the transcription of a given gene is directly influenced by the modification pattern of the surrounding histone proteins. Such modifications include the acetylation of specific lysine residues by histone acetyltransferases (HATs), the methylation of lysine and arginine residues by histone methyltransferases (HMTs), and the phosphorylation of specific serine groups by histone kinases (HKs). Additional modifications include the methylation pattern of the DNA. Furthermore, enzymes responsible for the cleavage of some

histone modifications, such as histone deacetylases (HDACs), and histone demethylases have already been identified. These modifications mutually affect each other in many cases to generate specific, well-regulated patterns called the *epigenetic code*. These processes are effected by different enzymes which can be directly influenced through the development of specific modulators. In my talk I will discuss the development of some inhibitors and I will also shortly discuss biological and medical perspectives.



REFERENCES

Biel M., Wascholowski V., Giannis A.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 3186-3216 (2005); *Angew. Chem.* 117: 3248-3280 (2005). Epigenetics - an epicenter of gene regulation: Histones and histone-modifying enzymes



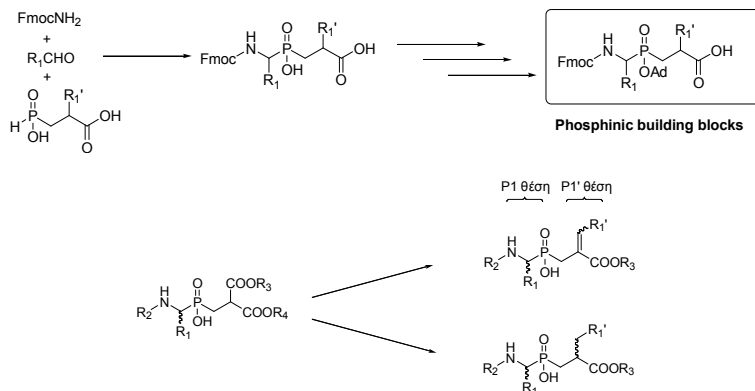
Νέες Συνθετικές Μέθοδοι για την Ανάπτυξη Ισχυρών και Εκλεκτικών Φωσφινικών Αναστολέων Ματριξινών

M. Ματζιάρη¹, Δ. Γεωργιάδης¹, Μ. Νασοπούλου¹, V. Dive², Α. Γιωτάκης¹

¹Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Πανεπιστημιούπολη Ζωγράφου, Αθήνα, Ελλάς. ²CEA, Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, Bat 152, Saclay, Gif-sur-Yvette F-91191 France

Τα τελευταία χρόνια αναπτύξαμε μερικές νέες μεθόδους σύνθεσης και διαφοροποίησης φωσφινικών ψευδοδιπεπτιδικών κορμών, οι οποίες αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για την ανάπτυξη ισχυρών αναστολέων πλήθους μεταλλοπρωτεϊνών ψευδαργύρου. Η πρώτη μέθοδος χρησιμοποιεί την αντίδραση συμπύκνωσης 3 συστατικών, τύπου Ugi, όπως φαίνεται παρακάτω. Η μέθοδος βελτιώθηκε περαιτέρω με χημειοεκλεκτική προστασία του φωσφινικού υδροξυλίου από την αδαμαντυλοομάδα. Επιπλέον, αναπτύχθηκαν απλές, ταχείες και αξιόπιστες μέθοδοι διαφοροποίησης

της P1' θέσης των φωσφινικών πεπτιδίων, με χρήση αντιδράσεων αλκυλίωσης και συμπύκνωσης τύπου Knoevenagel σε φωσφινικές ενώσεις ενεργού μεθυλενίου, οδηγώντας έτσι σε πλήθος διαφοροποιημένων φωσφινικών και δευδροφωσφινικών πεπτιδίων. Με βάση αυτές τις μεθόδους και με τη χρήση συνδυασμικής χημείας ανευρέθησαν ισχυροί και εκλεκτικοί φωσφινικοί αναστολείς έναντι διαφόρων Zn-μεταλλοπρωτεϊνών, όπως π.χ. Ματριξινών.



Novel Synthetic Methods for the Development of Potent and Selective Phosphinic Inhibitors of Matrix Metalloproteinases

M. Matziari¹, D. Georgiadis¹, M. Nasopoulou¹, V. Dive², A. Yiotakis

¹Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, Athens, Greece; ²CEA, Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, Bat 152, Saclay, Gif-sur-Yvette F-91191, France

Key words: Zn-metalloproteinases, phosphinic inhibitors, potent and selective, synthetic methods

During the last years we have developed a number of new synthetic methodologies for the preparation and diversification of phosphinic building blocks,

which are precursors for inhibitors' development of various Zinc Metalloproteinases. The first method applies an Ugi-type three-component condensation reaction shown below. This method has been further improved by chemo-selective protection of the phosphinic group by adamantyl. Additionally, simple, rapid and efficient methods for P1' diversification of phosphinic peptides have been developed, employing alkylation and Knoevenagel-type condensation reactions with active methylene phosphinic scaffolds, thus leading to a wide variety of diversified phosphinic and dehydrophosphinic peptides. Based on these methods and by using combinatorial chemistry, several potent and selective phosphinic inhibitors of many Zn-metalloproteinases were identified, e.g. MMPs.



Φουλλερένια: Η Τρίτη Αλλοτροπική Μορφή του Άνθρακα

M. Χατζημαρινάκη, M. Ρουμπελάκης, M. Τζιράκης και M. Ορφανόπουλος

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο 71003, Κρήτη

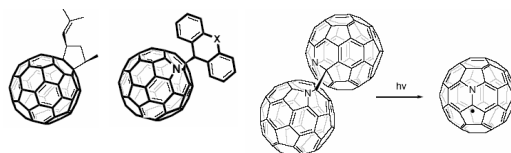
Η τυχαία ανακάλυψη του φουλλερενίου C₆₀, άνοιξε νέους δρόμους ερευνητικής δραστηριότητας στα πεδία της Φυσικής, της Χημείας και των Υλικών. Η ανακάλυψη αυτή επιβραβεύτηκε με το Νόμπελ Χημείας το 1996. Την τελευταία δεκαετία η χημεία και φωτοχημεία των σφαιρικών αυτών μορίων έχει εκτενέστατα μελετηθεί (1). Πιθανές εφαρμογές στην κατασκευή υπεραγωγίων και υψηλής αντοχής υλικών, καθώς και οπτοηλεκτρονικών συσκευών και νανοσωληνών, ευρίσκονται υπό εξέλιξη. Επίσης μελετάται η παρασκευή βιοσυμβατών φαρμάκων βασισμένων στην ιδιότητα του φουλλερενίου C₆₀ να παγιδεύει ελεύθερες ρίζες. Στην ομιλία αυτή θα γίνει μια σύντομη ανασκόπηση της χημείας και φωτοχημείας των φουλλερενίων με σύντομες αναφορές στην συνεισφορά του εργαστηρίου μας στο πεδίο αυτό (2-5).

Fullerenes: The Chemistry of the Third Allotropic Form of Carbon

M. Hatzimarinaki, M. Roubelakis, M. Tzirakis and M. Orfanopoulos

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklion 710 03, Crete, Greece

Key words: Fullerenes, Chemistry of allotropic carbon



The rich chemical and physical properties of all carbon fullerene C₆₀ molecules made them the most studied compounds since their isolation in large quantities at early 90's. A remarkable array of their

chemical reactions has been explored over the last 15 years (1). Many thermal and photochemical reactions for the functionalization of [60]fullerene (1) have been developed on the basis of the electron-deficient behavior of $^3\text{C}_{60}$. In this talk, we present a brief overview of recent advances of fullerene chemistry and photochemistry and particularly the contribution to this field from our laboratory (2-5).

1. Hirsch A., Brettreich M.: Fullerenes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005
2. Vougioukalakis G.C., Orfanopoulos M.: *J. Am. Chem. Soc.* 126: 15956 (2004)
3. Hatzimarinaki M., Roumbelakis M., Orfanopoulos M.: *J. Am. Chem. Soc.* 127: 14182 (2005)
4. Vougioukalakis G.C., Lykakis I.N., Hatzimarinaki M., Orfanopoulos M.: *J. Org. Chem.* 71: 829 (2006)
5. Hatzimarinaki M., Orfanopoulos M.: *Org. Lett.* 8: 1775 (2006)

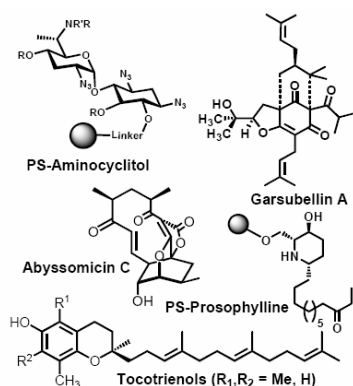


Χημική Σύνθεση Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων, Πρώτα Βήματα για την Ανακάλυψη Νέων Φαρμάκων

Η.Α. Κουλαδούρος

Εργαστήριο Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55 και Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας, Ινστιτούτο Φυτικοχημείας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Ταχ. Θυρ. 60228, 153 10 Αγ. Παρασκευή, Ελλάς

Η χημική σύνθεση είναι ένα από τα σημαντικότερα στάδια στη διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων, τη μεγαλύτερη δε πρόκληση αποτελούν τα βιοδραστικά φυσικά προϊόντα με πολύπλοκη δομή. Εκτός από το καθαρά ακαδημαϊκό ενδιαφέρον, τέτοιες συνθέσεις συχνά οδηγούν στην ανακάλυψη νέων μεθόδων χρήσιμων για την παρασκευή ομάδων σχεδιασμένων αναλόγων συντείνοντας στην αξιοποίηση του φυσικού προϊόντος. Για το σκοπό αυτό απαιτούνται κατάλληλα υποκατεστημένα υποστρώματα για εφαρμογή σε στερεή φάση και συνθετικές πορείες με μεγάλη δυνατότητα παραλλαγών. Θα παρουσιασθούν νέες συνθετικές μεθοδολογίες με εφαρμογή σε πέντε κατηγορίες φυσικών προϊόντων.



Chemical synthesis of bioactive natural products; early steps in the discovery of new drugs

E. A. Couladouros

Chemical Labs, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, 118 55 and Lab. of Natural

Products Synthesis & Bioorganic Chemistry, Inst. of Physical Chemistry, NCSR Demokritos, POBox 60228, 15310 Ag. Paraskevi, Greece

Key words: PS-aminocyclitol, garsubellin A, abyssomicin C, PS-prosophylline, tocotrienols

Chemical synthesis is one out of the most important steps both for the discovery of a new pharmaceutical and for its exploitation to become a drug. Bioactive natural products of complicated structure are the utmost challenge in this field. Apart from the purely academic interest, such endeavours may lead to the development of general and convergent routes for the preparation of designed and diversified libraries, thus facilitating their further exploitation. In this respect, short reaction sequences having a high degree of diversification and a suitable handle for solid phase application are most desirable. New synthetic methodologies applied on five families of natural products will be presented: a) A newly developed approach for the asymmetric synthesis of all naturally occurring tocotrienols (1), b) Novel solid supported synthesis of *unnatural aminocyclitols*, c) A short asymmetric synthesis of the highly potent antibiotic abyssomicin C (3), d) Recent progress towards the development of a general method for the synthesis of polyprenylated phloroglucinol derivatives (4), e) The application of the *polymorphic scaffold* approach (2) in the synthesis of deoxy-aza-sugars

REFERENCES

1. (a) Couladouros E.A. Papas M.A., Moutsos V.I, Lampropoulou M : Patent Number: US 2005124688, 2005; b) Couladouros E.A. Papas M.A., Moutsos V.I, Lampropoulou M Patent Number: US2005124688, 2005
2. Couladouros E.A., Strongilos A.T.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 41: 3677-3680 (2002)
3. Couladouros E.A., Bouzas E.A., Magos A.D.: *Tetrahedron* 62: 5272-5279 (2006)

4. For recent efforts by other groups see: a) Siegel D.R. and Danishefsky S.J.: *J. Am. Chem. Soc.* 127: 14200-14201 (2005) b) Kuramochi A., Usuda H., Yamatsuu K.,

Kanai M., Shibasaki M.: *J. Am. Chem. Soc.* 128: 1048-1049 (2006)



Από τη Σκυφοστατίνη στην Κοτυλοστατίνη: Χημεία και Βιολογία Νέων Παρεμποδιστών της Ουδέτερης Σφιγγομυελινάσης

E.N. Πιτσινός¹, A. Cruz¹, B. Μούτσος¹, O. Βαγγέλη¹, A. Giannis², V. Wascholowski², Γ. Σταθόπουλος³, I. Καλομενίδης³

¹Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοανόργανης Χημείας, Ινστιτούτο Φυσικοχημείας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Αγία Παρασκευή, Αθήνα, Ελλάδα. ²Institute of Organic Chemistry, University of Leipzig, Germany. ³ΚΕΒΕΕ Μαριάνθη Σίμου, Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

Οι σφιγγομυελινάσες είναι εξειδικευμένα ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση της σφιγγομυελίνης προς κηραμίδιο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεμβρανόδετη ουδέτερη ισομορφή (N-SMase), η οποία θεωρείται ελπιδοφόρος στόχος για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος Alzheimer. Το φυσικό προϊόν σκυφοστατίνη είναι ισχυρός και εκλεκτικός παρεμποδιστής ($IC_{50} = 1 \mu M$) της N-SMase, αλλά χαρακτηρίζεται από μικρή χημική σταθερότητα, η οποία έχει αποδοθεί στην πολυακόρεστη λιπόφιλη αλυσίδα. Με στόχο την ολική σύνθεση της σκυφοστατίνης, αλλά και την ανακάλυψη νέων παρεμποδιστών της N-SMase, αναπτύξαμε μια σύντομη, ευέλικτη και εναντιοεκλεκτική συνθετική οδό προς το φαρμακοφορικό πολικό τμήμα της. Η κοτυλοστατίνη ήταν το πλέον δραστικό από μια σειρά αναλόγων του φυσικού προϊόντος και χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο σε μια μελέτη της κακοήθους πλευρικής έκχυσης (Malignant Pleural Effusion, MPE).

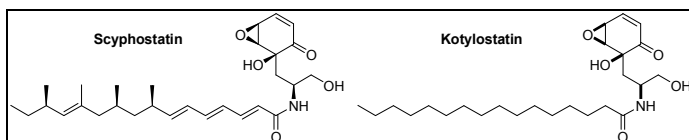
¹Natural Products and Bioorganic Chemistry Laboratory, NCSR Demokritos, Agia Paraskevi, Athens, Hellas; ²Institute of Organic Chemistry, University of Leipzig, Germany; ³Clinical Intensive Therapy, Medical School, University of Athens, Athens, Hellas

Key words: Scyphostatin, kotylostatin, sphingomyelinases

Sphingomyelinases are enzymes that, in response to specific stimuli, catalyse the hydrolysis of sphingomyelin to ceramide. Of the various isotypes described to date, the plasma membrane-located neutral sphingomyelinase (N-SMase) is of particular interest as a target for the development of new drugs for the treatment of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease. The natural product scyphostatin is a potent and selective inhibitor ($IC_{50} = 1 \mu M$) of N-SMase. However, its chemical stability is limited due to the lipophilic poly-unsaturated side chain. Aiming at the total synthesis of scyphostatin and the discovery of new inhibitors, we have developed a short, efficient and enantio-controlled synthetic route towards its pharmacophoric polar core. Kotylostatin was found to be the most potent of a series of analogues prepared and was used as a probe in a study of Malignant Pleural Effusion (MPE).

From Scyphostatin to Kotylostatin: Chemistry and Biology of New Inhibitors of Neutral Sphingomyelinases

E.N. Pitsinos¹, A. Cruz¹, V. Moutsos¹, O. Vageli¹, A. Giannis², V. Wascholowski², G. Stathopoulos³, J. Kalomenidis³

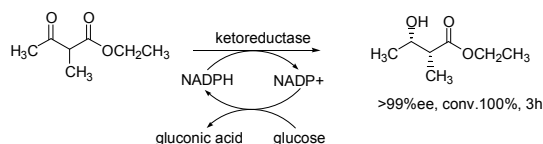


Βιοκαταλυτικές Ασύμμετρες Αναγωγές για την Σύνθεση Πολύτιμων Χειρομόρφων Ενδιάμεσων

Ιουλία Σμόνου, Δημήτρης Καλαϊτζάκης

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο 71003, Κρήτη

Η ασύμμετρη αναγωγή κετονών αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και θεμελιώδεις αντιδράσεις για την παραγωγή μη ρακεμικών χειρόμορφων αλκοολών, οι οποίες μπορούν να μετασχηματιστούν σε ποικίλες λειτουργικές ομάδες για τη σύνθεση χρήσιμων βιομηχανικά ενώσεων, όπως φαρμακευτικών, αγροχημικών ενώσεων και διάφορων άλλων φυσικών προϊόντων. Η βιοκαταλυτική αναγωγή (1) α -αλκυλο-1,3-δικετονών και α -αλκυλο- β -κετο-εστέρων με χρήση απομονωμένων NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών αποδείχθηκε εξαιρετική μέθοδος παρασκευής οπτικά καθαρών κετο-αλκοολών ή υδρόξυ εστέρων (2,3). Αυτές οι ενώσεις είναι πολύ χρήσιμα συνθετικά ενδιάμεσα για σύνθεση πολυκετιδίων, στατινών, αναστολέων πρωτεάσης και άλλων σημαντικών φαρμακευτικών ενώσεων. Η δυνατότητα σύνθεσης διαφορετικών διαστερομερών της ίδιας ένωσης είναι απαραίτητη, όταν δημιουργούνται βιβλιοθήκες φαρμακευτικών ενώσεων με πιθανή βιολογική δραστικότητα.



Biocatalytic Asymmetric Reductions for the Synthesis of Valuable Chiral Intermediates

Ioulia Smonou, Dimitris Kalaitzakis

Department of Chemistry, University of Crete, Iraklio 71003, Crete, Greece

The asymmetric reduction of ketones is one of the most important, fundamental and practical reactions for producing non-racemic chiral alcohols, which can be transformed into various functionalities, without racemization, to synthesize industrially important chemicals such as pharmaceuticals, agrochemicals and natural products. Biocatalytic reduction (1) of α -alkyl-1,3-di-ketones and α -alkyl- β -keto esters employing isolated NADPH-dependent ketoreductases proved to be a highly efficient method for the preparation of optically pure keto-alcohols or hydroxy esters (2,3). These compounds are very important in asymmetric organic synthesis, where they are used as building blocks for synthesis of polyketides, statins, protease inhibitors, and other important pharmaceuticals. The ability to synthesize various single diastereomers of the same compound, is desirable when libraries of pharmaceutical compounds are synthesized and tested for biological activity.

REFERENCES

1. Faber K.: *Biotransformations in Organic Chemistry*. Pp.160-206, Springer-Verlag, Berlin, 1997
2. Kalaitzakis D., Rozzell J.D., Kambourakis S., Smonou I.: *Org. Lett.* 7: 4799 (2005)
3. Kalaitzakis D., Rozzell J.D., Kambourakis S., Smonou I.: *Adv. Synth. Catal.* 348: 1958 (2006)



A Novel Strategy for the Synthesis of Peptides with α,α -Dialkyl and N,α,α -Trialkyl Glycines

Hernâni L.S. Maia

Centre of Chemistry, School of Science, University of Minho, Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

Key words: Peptido mimetics peptides, glycines N,α,α -trialkyl, α,α -dialkyl

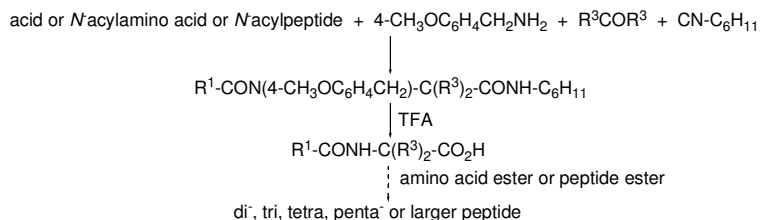
For more than three decades efforts have been made to synthesise, by conventional methods, peptides incorporating one or more α,α -dialkyl glycine residues, as one may take advantage of the conformational restriction typical of these moieties to produce interesting peptido mimetics (1). However, this conformational restriction is related to steric crowding and hindrance, which results in increased difficulties when such methods are used, thus leading usually to very low yields or even no product. Although for the same reason the amino acids are themselves difficult to obtain, in the past we have devised a facile and efficient synthesis based on a Ugi-Passerini reaction. This method could also be used to make peptides, but the products would bear an alkyl

group at the N-terminus of the α,α -dialkyl glycine residue, which could not be removed (2). When trying to find conditions to cleave this group, we found that the C-terminus of the Ugi-Passerini product, an N -acyl- N,α,α -trialkyl glycine amide is labile to acid. This prompted us to carry out a thorough investigation of the mechanism of cleavage and the conditions for selective cleavage in good yields (3). The results obtained showed that the above product can be converted either into an N -acyl- N,α,α -trialkyl glycine or into an N -acyl- α,α -16dialkyl glycine, in both cases ready for further elongation by coupling with a C-protected amino acid or peptide (4). Owing to serious steric crowding, the former are difficult to handle and to couple, but the latter can be

coupled by conventional methods at least in fair yields.

REFERENCES

1. Maia H.L., Ridge B., Rydon H.N.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*: 98 (1973)
2. Maia, H.L.S.: *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinet. (Int. Ed.)* 9: 79-82 (1995)
3. Jiang W.-Q., Costa S.P.G., Maia H.L.S.: *Org. Biomol. Chem.* 1: 3804-3810 (2003)
4. Costa S.P.G., Pereira-Lima S.M.M.A., Maia H.L.S.: *Org. Biomol. Chem.* 1: 1475-147 (2003)



Cancer Immunotherapy: What Have we Learnt in the last 15 Years

Vasso Apostolopoulos

Burnet Institute at Austin, Studley Road, Heidelberg, VIC 3084 Australia. Phone: +613-9287-0666; Fax: +613-9287-0600; E-mail: vasso@burnet.edu.au

Key words: Cancer immunotherapy, last 15 years

Cancer Immunotherapy. The immune system responds efficiently to bacteria, viruses and other agents however, the immune response to cancers is not as effective. In most cases other than specific genetic rearrangements leading to non-self proteins such as in leukemia and idiotypes in lymphoma, tumour associated proteins are self proteins and are not recognised by the immune system to prevent malignancy. In most cancers, patients develop antibodies and/or CTL-precursors to tumour associated antigens but are not effective in generating a therapeutic immune response. Adjuvants have been used with either whole tumours, subunits or peptides with the aim of increasing their immunity. Whole tumour antigens have certain advantages associated with it, such as ready availability as recombinant proteins, potential epitopes that can be presented by a number of MHC class I/II alleles and antibody development. The methods of identification of CD8 and CD4 epitopes either by use of epitope prediction algorithms or use of transgenic mice has made the use of defined synthetic peptides more attractive. The possibility to synthesise long peptides and introduce multiple epitopes (CD4 or CD8) from single or multiple antigens makes peptide a viable alternative to whole proteins. As an alternative to totally synthetic peptide constructs or polymers, polytopes have been generated by genetic engineering methods. In addition, to deliver immunogens to and to activate DC, receptor-mediated delivery of peptides using anti-

bodies, cytokines and carbohydrates have been used. We have used various strategies, preclinical and clinical applications in designing peptide-based vaccines for cancer.

What have we learnt: In both mice and humans the MUC1 glyco-protein is over-expressed 40-80 times and is found in >90% of human breast cancers and is a target for immunotherapy. Studies in mice indicated the MUC1 tandem repeat is highly immunogenic for antibody production; CTLs are not so easily produced by immunising with peptides. However, in pre-clinical studies we have demonstrated that: (a) immunising with oxidised mannan MUC1 led to high frequency of CTLs, accompanied by tumour protection and little antibody; (b) these responses were clearly of the T1 cytokine profile and not T2 (which were obtained by using reduced material); (c) the peptide epitopes binding to mice and human HLA molecules indicated that, in contrast to the rules for peptide binding, that low affinity and non-canonical peptides could bind; (d) short peptides – even down to 5mers could present MUC1; (e) crystallisation studies demonstrated that the *rules for peptide binding to MHC Class I molecules* are not immutable and alternative modes of peptide binding is possible. In addition, we were the first to identify a peptide mimic for cancer immunotherapy. Based on these pre-clinical studies, 3 lines of research were performed: (i) immunising with self-mucin: this was done in mice, monkeys and humans - where both antibodies and T cells

were produced, (ii) clinical studies (Phase I, II and pilot Phase III) in >400 humans have indicated that mannan MUC1 is entirely non-toxic, and gives rise to antibodies, T cells and some clinical responses (a total of 13 clinical trials have been completed), and (iii) the use of other breast cancer antigens conjugated to mannan to induce effective immunity in mice and ultimately in humans. The antibody response of humans was shown to be partly due to a cross reaction with natural anti-gal antibodies - this could be overcome by *ex vivo* immunisation (in the absence of

antibodies). On the basis of these findings an *ex vivo* DC targeted Phase IIb clinical trial is in progress. Mannan-MUC1 cancer immunotherapy in humans is feasible and results of further clinical trials will ultimately lead to an effective vaccine for cancer in humans. Recently, we have designed new improved delivery methods of antigens into antigen presenting cells for T cell activation. These methods include the use of cell penetrating peptides, totally synthetic peptide vaccines and targeting new and novel receptors on dendritic cells, all of which will be presented.



Δέκα Χρόνια Παρακολούθησης Ασθενών Πιλοτικής Μελέτης Φάσης III Ανοσοθεραπείας με Mannan-MUC1, σε Πρώιμο Στάδιο Καρκίνο Μαστού

Σ. Βασίλαρος¹, Α. Τσίμπανης¹, Α. Τσιγκίνης¹, Ε. Δρακάκη¹, Ι. McKenzie², Β. Αποστολοπούλου

¹Πρόληψις, Διαγνωστικό Κέντρο Μαστού, Αθήνα, Ελλάς και ²Immunology and Vaccine Laboratory, Burnet Institute at Austin, Heidelberg, Victoria, Australia

Διανύοντας τα δέκα χρόνια παρακολούθησης των ασθενών που εντάχθηκαν στην πιλοτική διπλάτυπλη μελέτη Φάσης III ανοσοθεραπείας σε στάδιο II καρκίνο του μαστού χρησιμοποιώντας οξειδωμένο mannan-MUC1, παρουσιάζονται τα ακόλουθα αποτελέσματα: Εισ την ομάδα των 15 ασθενών, όπου παράλληλα με την κανονική τους θεραπεία εμβολιάζονταν με placebo αντί του κανονικού εμβολίου, η νόσος υποτροπίασε σε 6 ασθενείς. Αντιθέτως εις την ομάδα των 16 ασθενών όπου οι ασθενείς, παράλληλα με την κανονική τους θεραπεία, εμβολιάζονταν με το πραγματικό εμβόλιο mannan-MUC1, είχαμε μόνο μία καθυστερημένη υποτροπή. Παρόλο το μικρό αριθμό των ασθενών, τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται στατιστικώς σημαντικά ($p=0,0292$). Συμπερασματικά θα πρέπει να αποδεχθούμε ότι: (α) οι ασθενείς με καρκίνο μαστού σταδίου II ευεργετήθηκαν από την ανοσοθεραπεία με mannan-MUC1, (β) είναι ανάγκη να ολοκληρωθεί μία νέα μελέτη Φάσης III με ικανοποιητικό αριθμό ασθενών προκειμένου να έχουμε τελικά συμπεράσματα. Θα πρέπει να προβληματίσει όλους εκείνους οι οποίοι διέκοψαν τότε την πιλοτική αυτή μελέτη και να κάνουν αυτοκριτική.

Follow-up of Patients with early Stage Breast Cancer of Pilot Phase III Immunotherapy Study

S. Vassilaros¹, A. Tsibanis¹, A. Tsikkinis¹, E. Drakaki¹, I. McKenzie², V. Apostolopoulos²

¹Prolipsis, Diagnostic Breast Center, Athens, Greece; ²Immunology and Vaccine Laboratory, Burnet Institute at Austin, Heidelberg, Victoria, Australia

Key words: Breast cancer, patients with early stage, immunotherapy, vaccine mannan-MUC1, pilot phase III study, ten years follow-up

Running ten years follow-up of the pilot phase III study in early breast cancer patients, using mannan-MUC1, the following results are presented: In the group of 15 patients who were vaccinated, in parallel to their recommended therapy, with placebo instead of the real vaccine, the disease was relapsed in 6 patients. In the other group of 16 patients who were vaccinated, in parallel to their recommended therapy, with the real mannan-MUC1 vaccine, only in one patient we had a late recurrence. Regardless the small number of patients, the above results were considered statistically significant ($p=0.0292$). In conclusion, the above results suggest that (a) in early breast cancer MUC1 immunotherapy is beneficial, (a) a large phase III study should be undertaken, (c) all persons responsible for the dis-continuation of this pilot study should undergo self-criticism.



Μονοκλωνικά Αντισώματα στη Στοχευμένη Θεραπεία του Ορθοκολικού Καρκίνου

Πέτρος Δ. Γρίβας¹, Χαράλαμπος Π. Καλόφωνος²

Ογκολογικό Τμήμα και Εργαστήριο Κλινικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πάτρας, Πάτρα, Ελλάδα

¹Υποψήφιος Διδάκτωρ Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πάτρας, ²Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πάτρας

Η εν τω βάθει κατανόηση των πολύπλοκων διατιδράσεων ανάμεσα στις συνιστώσες της ανοσολογικής απόκρισης οδήγησε στην ανάπτυξη της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο. Εξελίξεις στην απομόνωση, τον καθορισμό και στη μέτρηση μορίων-κλειδιών, που διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου, έχουν οδηγήσει στην παραγωγή αντισωμάτων εναντίον τέτοιων μοριακών στόχων. Το cetuximab, το bevacizumab και το ranitumumab αποτελούν μονοκλωνικά αντισώματα που έχουν πάρει έγκριση για τη θεραπεία του ορθοκολικού καρκίνου. Το *Cetuximab* είναι χμιαϊκό μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τον EGFR σε σχέση με ενδογενείς προσδέτες, αναστέλλοντας την πρόσδεσή τους. Εκτός από τη δυνατότητα αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αυτό αναστέλλει επίσης την κυτταρική κινητικότητα, τη διήθηση και τη μετάσταση, ενώ προάγει την απόπτωση (2). Επιπρόσθετα, το *Cetuximab* εμποδίζει την επιδιόρθωση του DNA και παρουσιάζει αντιαγγειογενετικές ιδιότητες (3,4). Το *Bevacizumab* είναι ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναστέλλει τις βιολογικές ιδιότητες του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα του στο αγγειακό ενδοθήλιο (5). Ο VEGF παράγεται από ποικίλους όγκους με σκοπό την επαγωγή της νεοαγγειογένεσης, διαδικασίας σημαντικής τόσο στην πρωτογενή ανάπτυξη του όγκου όσο και στο μεταστατικό του δυναμικό (6). Το *Panitumumab* είναι ανασυνδυασμένο ανθρώπινο IgG2 μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο συνδέεται ειδικά στον EGFR. Αυτή η πρόσδεση εμποδίζει την αυτοφωσφορύλωση του υποδοχέα και την επακόλουθη ενεργοποίηση υπομεμβρανικών κινασών, με συνέπεια την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, την επαγωγή της απόπτωσης, τη μειωμένη έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών και VEGF και την εσωτερίκευση του EGFR (7). Συνδυαστικές θεραπευτικές προσεγγίσεις βασίζονται σε συνεργιστικές δράσεις που παρατηρούνται με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Συνδυασμοί με άλλους βιολογικούς παράγοντες, όπως

με μικρά μόρια-αναστολείς αντίστοιχων μεταγωγικών μονοπατιών, αποτελούν στόχο νέων θεραπευτικών σχημάτων. Στο μέλλον, ορθότερη επιλογή υποομάδων ασθενών, που εκφράζουν ειδικούς για τον όγκο κλινικούς βιοδείκτες, θα οδηγήσει στην αυξημένη αποτελεσματικότητα και επιλεκτικότητα της θεραπείας βασισμένης σε μονοκλωνικά αντισώματα.

Monoclonal Antibodies in the Targeted Therapy of Colorectal Cancer

Petros D. Grivas¹, Haralabos P. Kalofonos²

Division of Oncology and Clinical Oncology Laboratory, Department of Medicine, Patras Medical School, Rion 26504, Greece

¹Ph.D Candidate, School of Medicine, ²Associate Professor of Internal Medicine – Medical Oncology, School of Medicine, University of Patras

Key words: Immune-mediated anti-cancer therapy, monoclonal antibodies, cetuximab, bevacizumab, panitumumab

Thorough understanding of the complex interactions between components of immunological response has led to the arousal of the concept of immune-mediated anti-cancer therapy (1). Advances in isolating, defining and measuring key - molecules that play a major role in tumor development have led to the production of antibodies against such molecular targets. Cetuximab, bevacizumab and panitumumab are monoclonal antibodies that have become FDA approved for the treatment of colorectal cancer. *Cetuximab* is a murine - chimeric monoclonal antibody, which binds specifically to epidermal growth factor receptor (EGFR). It shows higher affinity compared with natural ligands, thus inhibiting endogenous ligand binding. In addition to inhibiting cell proliferation, it also inhibits angiogenesis, cell motility, invasiveness, metastasis and promotes apoptosis (2). Furthermore, it impairs DNA repair and exhibits anti-angiogenetic properties (3,4). *Bevacizumab* is a humanized monoclonal antibody that inhibits the biological activities of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and blocks binding of VEGF to its receptor on vascular endothelium (5). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is produced by many tumors to stimulate the development of new blood vessels, a process which is crucial for

both the primary tumor growth and its metastatic potential (6). *Panitumumab* is a recombinant, human IgG2 monoclonal antibody that binds specifically to EGFR. That binding prevents ligand-induced receptor autophosphorylation and activation of receptor-associated kinases resulting in inhibition of cell growth, induction of apoptosis, decreased pro-inflammatory cytokine and VEGF production as well as internalization of EGFR (7). Multimodality approaches are based on synergistic effects observed with the combination of antibodies with chemotherapeutic drugs. Combinations with other biologic agents, such as small-molecule inhibitors of the same pathway would be really useful. In the future, better selection of patient subpopulations with tumors overexpressing disease-related clinical biomarkers could result in an increase in both efficacy and specificity of antibody-based treatment.

REFERENCES

1. Kalofonos H.P., Grivas P.D.: Monoclonal antibodies in the management of solid tumors. *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 1687-1705 (2006)
2. Mendelsohn J.: The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer* 8: 3-9 (2001)
3. Bandyopadhyay D., Mandal M., Adam L., Mendelsohn J., Kumar R.: Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 273: 1568-1573 (1998)
4. Ciardiello F., Bianco R., Damiano V., De Lorenzo S., Pepe S., De Placido S., Fan Z., Mendelsohn J., Bianco A.R., Tortora G.: Anti-tumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin. Cancer Res.* 5: 909-916 (1999)
5. Margolin K., Gordon M.S., Holmgren E., Gaudreault J., Novotny W., Fyfe G., Adelman D., Stalter S., Breed J.: Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J. Clin. Oncol.* 19: 851-856 (2001)
6. Weidner N.: Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J. Pathol.* 184: 119-122 (1988)
7. Saif M.W., Cohenuram M.: Role of panitumumab in the management of metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 6: 118-124 (2006)



Εμβόλια στην Αντιμετώπιση των Νεοπλασιών: Το Παράδειγμα των Λεμφωμάτων non Hodgkin

Άννα Κουμαριανού, Παναγιώτης Γκούβερης, Θεοφάνης Οικονομόπουλος

B' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική, Ογκολογική Μονάδα, Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αττικών, Ρίμινη 1, 12462, Αθήνα, Ελλάδα

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετές νέες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση των νεοπλασιών. Μια από τις πιο πολλά υποσχόμενες στρατηγικές εμπλέκουν τη χρήση καρκινικών αντιγόνων προκειμένου να ενισχυθούν οι ανοσολογικές αποκρίσεις των ασθενών εναντίον του όγκου τους. Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα παραδείγματα αφορά την ανοσοσφαιρίνη που εκφράζεται από το Λέμφωμα Non Hodgkin B κυτταρικής σειράς. Τα κύτταρα του νεοπλασματος αυτού προέρχονται από ένα μοναδικό κυτταρικό κλώνο και στην επιφάνειά τους εκφράζουν το ίδιο καρκινικό αντιγόνο (ιδιουπτική ανοσοσφαιρίνη, Id) που δεν απαντιέται σε άλλα κύτταρα του οργανισμού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν στόχος για ανοσοθεραπεία με εμβόλιο. Όταν ένα καρκινικό αντιγόνο χρησιμοποιείται σαν εμβόλιο, προάγει την ανάπτυξη αντισωμάτων και T κυτταρικών αποκρίσεων και επάγει ισχυρή αντινεοπλασματική δράση που οδηγεί στην απόρριψη του όγκου. Η πρώτη κλινική μελέτη εμβολιασμού ασθενών με Λέμφωμα πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο του Stanford, ΗΠΑ το 1988. Νεοπλασματικά λεμφικά κύτταρα απομονώθηκαν από παθολογικούς λεμφαδένες και μέσω της τε-

χνολογίας των υβριδωμάτων χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο για τη παραγωγή μεγάλης ποσότητας ιδιουπτικής ανοσοσφαιρίνης. Η ανοσοσφαιρίνη αυτή, μετά από συγκεκριμένη επεξεργασία και σύνδεσή της με ειδικούς ανοσοτροποποιητές, χρησιμοποιήθηκε σαν εμβόλιο. Η χορήγηση αυτού του εμβολίου σε 32 ασθενείς με λεμφώματα από B-κύτταρα, σε ύφεση μετά από πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία, είχε σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντι-ιδιουπτικής αντίδρασης στους μισούς (14/32). Η ανάπτυξη αυτού του τύπου ανοσίας στους ασθενείς είχε σαν επακόλουθο την βελτίωση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών. Ακολούθως, τα ολοένα αυξανόμενα αποτελέσματα κλινικών μελετών ήταν ενθαρρυντικά και αποτέλεσαν τη βάση για σχεδιασμό περισσότερων προκλινικών και κλινικών μελετών. Ο σχεδιασμός εμβολίων για την αντιμετώπιση των νεοπλασματικών νοσημάτων αποτελεί πλέον πεδίο εντατικής και πολλά υποσχόμενης έρευνας στη θεραπευτική των κακοήθων νεοπλασματικών παθήσεων.

Tumor Vaccination Strategies: The Paradigm of non *Hodgkin Lymphoma*

Anna Koumariou, Panagiotis Gouveris, Theophanis Economopoulos

Second Department of Internal Medicine Prope-
daeutic, Medical Oncology Unit, Attikon General
Hospital, Athens University, Rimini 1, 12462,
Athens, Greece

Key words: Tumor vaccination, non-Hodgkin's lym-
phomas

Recent years have witnessed the development of a variety of promising immunotherapies for treating patients with malignancies. One of the most exciting approaches is vaccination with tumor associated antigens. One such paradigm is that of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. Each B lymphocyte expresses an immunoglobulin molecule that is the product of a unique combination of gene segments. B cell malignancy arises from one original B lymphocyte, and therefore all the members of a given lymphoma tumor population have the same unique immunoglobulin, which can serve as a target for immune therapy. When the idiotype (Id), or unique portion, of each immunoglobulin is used as a vaccine, antibodies and T cells can be induced and each can cause rejection of the tumor by the host. This special opportunity for tumor specificity is accompanied by the challenge of constructing a different vaccine for each patient. The first clinical trial of Id vaccina-

tion for lymphoma was initiated at Stanford University in 1988. Tumor cells obtained from lymph node sampling were fused with a myeloma cell line to generate a *hybridoma* producing large quantities of idiotype protein. Purified Id protein was then chemically coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and emulsified in an *oil-in-water* type immunologic adjuvant. The initial trial included patients with low-grade, follicular lymphoma, in first remission following chemotherapy. Among the first 32 vaccinated patients, roughly half (14/32) developed anti-Id immune responses. These were principally humoral responses rather than cellular responses. Long-term follow-up of these 32 patients has revealed that the development of an immune response is strongly correlated with pro-longed freedom from disease progression interval and overall survival. Further trials have confirmed significant clinical benefit following Id vaccination. There is reason for excitement about the prospects for effective vaccine therapies for lymphoma as randomized Id vaccine trials commence and newer cell-based vaccine trials enter the clinic. As the clinical activity of lymphoma vaccines becomes established, it will be important to determine how to best integrate active vaccination approaches with standard therapeutic approaches.



Συνθετικά Νευροστεροειδή με Αντι-αποπτωτική, Νευροπροστατευτική Δράση Αχιλλέας Γραβάνης

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο 71110, Ελλάδα

Το νευροστεροειδές Δευδροεπιανδροστερόνη (DHEA) και ο θειικός της εστέρας DHEAS παράγονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, εκτός της βασικής θέσης παραγωγής τους στη περιφέρεια, το φλοιό των επινεφριδίων. Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχουν αποδώσει στα ανωτέρω νευροστεροειδή νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Αυτά πράγματι, προστατεύουν από την ισχαιμία και το νευροτοξικό γλουταμινικό οξύ νευρώνες ιππόκαμπου και φλοιού επίμους. Δείξαμε πρόσφατα ότι οι DHEA και DHEAS προστατεύουν επίσης από την κυτταρική απόπτωση τα συμπαθοεπινεφριδιακά κύτταρα PC12 σε καλλιέργεια (1). Οι ανωτέρω δράσεις είναι ισχυρές και δόσο-εξαρτώμενες με EC₅₀ 1.8, και 1.1 nM αντίστοιχα. Η προ-επιβιωτική, νευροπροστατευτική δράση της DHEA διαμεσολαβείται από εξειδικευμένο μεμβρανικό υποδοχέα, συνδεδεμένο με τις G-πρωτεΐνες, διάφορο των γνωστών NMDA και GABAA υποδοχέων και ενέχει την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων NFκB και CREB, καθώς και την ακόλουθη παραγωγή των αντι-αποπτωτικών

πρωτεϊνών Bcl-2 (2). Επιπλέον, η νευροπροστατευτική δράση της DHEA προϋποθέτει την ενεργοποίηση των προ-επιβιωτικών κινασών PKCα/β, Src, MEK/ERK και PI3K/Akt. Η DHEAS έχει τη δυνατότητα όδωσης εντός λεπτών της έκκρισης των κατεχολαμινών με την άμεση ενεργοποίηση του μηχανισμού αποπολυμερισμού της υπομεμβρανικής ακτίνης και τη συνεπαγόμενη αποδιάταξη του κυτταροσκελετού της, η οποία διευκολύνει την εξωκυττάρωση των νευροεκκριτικών κοκκίων των κατεχολαμινών (3). Τέλος, η DHEAS επάγει την έκφραση του γονιδίου της Υδροξυλάσης της Τυροσίνης και τη *de novo* παραγωγή κατεχολαμινών. Τα ανωτέρω πειραματικά ευρήματα υπονοούν ότι τα νευροστεροειδή έχουν πιθανή θεραπευτική χρησιμότητα στην αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών διαδικασιών, όπως οι νόσοι του Parkinson και Alzheimer, αλλά και το εγκεφαλικό τραύμα και ισχαιμία, διαδικασίες στις οποίες παρηρείται έντονη αποπτωτική απώλεια νευρώνων. Εν τούτοις, η *in vivo* βιομετατροπή τους σε οιστρογόνα και ανδρογόνα καθιστά την κλινική

τους χρήση προβληματική. Βασιζόμενοι στα ανωτέρω και προκειμένου να μελετήσουμε τη σχέση δομής-δράσης των νευροστεροειδών ως αντι-αποπτωτικών και νευροπροστατευτικών παραγόντων, προσδιορίσαμε την αντι-αποπτωτική δράση μίας πληθώρας συνθετικών και ενδογενών αναλόγων της DHEA. Η ανωτέρω μελέτη απέδωσε τα εξής συμπεράσματα: (α) τα 3α-OH, 3β-Cl, 3-κετο, 11-κετο, 16-κετο, 16-Br, Δ⁵-ανδροστένια (διπλός δεσμός στον C5-C6) ήταν ανενεργά (5-ανδροστεν-3α-ολ-17-όνη, 5-ανδρο-στεν-3β-χλωρο-17-όνη, 5-ανδροστεν-3,17-διόνη, 5-ανδροστεν-3β-ολ-11,17-διόνη, 5-ανδροστεν-3β-ολ-16-όνη, 5-ανδροστεν-16α-βρωμο-3β-ολ-17-όνη. Επιπλέον, η τεστοστερόνη η μεγαλομοριακή τεστοστερόνη-BSA και η 4-ανδροστεν-3β-ολ-17-όνη, δεν παρουσίαζαν αξιοσημείωτη αντι-αποπτωτική δράση, (β) η υδροξυλίωση στον C7 (7α-υδροξυ-DHEA, 7β-υδροξυ-DHEA), στον C11 (5-ανδροστεν-3β,11β-διολ-17-όνη), στο C16 (5-ανδροστεν-3β,16α-διολ-17-όνη) ή στο C17 (ερμαφροδιόλη, 5-ανδροστεν-17α-μεθυλ-3β,17β-διόλη, 5-ανδροστεν-17α-εθυλ-3β,17β-διόλη) οδήγησε σε απώλεια της αντι-αποπτωτικής δράσης, (γ) τα συνθετικά υποκατάστατα της DHEA 17-CMO (5-ανδροστεν-3β-ολ-17-όνη 17-O-CMO), 17-NH₂ (5-ανδροστεν-17β-αμινο-3β-όλη) και 17-όνη αιθυλενοκετάλη (5-ανδροστεν-3β-ολ-17-όνη αιθυλενοκετάλη) ήταν επίσης ανενεργά, ενώ (δ) τα Δ¹⁶ (διπλός δεσμός στους C16-C17) ανδροστένια (5,16-ανδροστεν-3β-όλη) και 17-καρβοξυλ-ανδροστένια ήταν δραστικά. Από τα συνθετικά ανάλογα των νευροστεροειδών που συντέθηκαν από την ομάδα μας, 3 έδειξαν ισχυρή αντι-αποπτωτική δράση *in vitro* σε καλλιέργειες νευρικών κυττάρων, συγκεκριμένα τα A6S, A10S and TC50, με EC₅₀ 0.172 μM, 0.23 μM και 0.087 nM αντίστοιχα. Τα ανωτέρω μόρια ήταν επίσης αποτελεσματικά στην επαγωγή των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2. Επιπλέον τα A6S, A10S και TC50 εμφάνισαν ισχυρή χημική συγγένεια για τις μεμβρανικές θέσεις της DHEA, με K_D 12.45 nM, 331.8 pM and 16.4 pM αντίστοιχα. Τα δεδομένα μας αυτά αναδεικνύουν το συνθετικό νευροστεροειδές TC50 ως πιθανή πρότυπη δομή για τη σύνθεση νέων δραστικών αντι-αποπτωτικών νευροπροστατευτικών νευροστεροειδών.

Synthetic Neurosteroids with Antiapoptotic and Neuroprotective Properties

A. Gravanis

Dept. of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion 71110, Greece

Key words: Neuroactive steroids, dehydroepiandrosterone (DHEA), allopregnanolone, anti-apoptotic

and neuroprotective properties, newly synthesized DHEA analogs

The neuroactive steroids dehydroepiandrosterone (DHEA), its sulfate ester DHEAS and allopregnanolone (Allo), produced by the central nervous system and the adrenals, appear to exert a protective effects in various neuronal cell types, including hippocampal and cortical neuron ischemia- and excitotoxicity-induced injury. Recent experimental findings have shown that DHEA, DHEAS and Allo protect rat sympathoadrenal PC12 cells, an established model for the study of neuronal cell apoptosis and survival, against serum deprivation-induced apoptosis. Their effects are time- and dose-dependent with EC₅₀ 1.8, 1.1 and 1.5 nM respectively (1). The prosurvival effect of DHEA(S) is mediated by a specific G-protein coupled membrane receptor (2). It involves the anti-apoptotic Bcl-2 proteins, their role being sine-qua-non for their action since Bcl-2 antisense oligonucleotides reverse their effects. Furthermore, DHEA(S) and Allo activate transcription factors CREB and NF-κB, up-stream effectors of the anti-apoptotic Bcl-2 gene expression. The neuroprotective effect of neurosteroids also involve the most prominent pathways of pro-survival kinases, such as PKCα/β, MEK/ERK and PI3K/Akt. Additionally, DHEAS and Allo directly stimulate neuroprotective catecholamine production via transcriptional activation of Tyrosine Hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization dynamics (3).

To assess the structure-activity relationships for DHEA, a host of structurally related compounds were screened for their anti-apoptotic effect. Structure-activity analysis revealed the following data; (a) 3α-OH, 3β-Cl, 3-keto, 11-keto, 16-keto, 16-Br, Δ⁵-androstenes (double bond at C5-C6) were inactive. Thus, 5-androsten-3α-ol-17-one, 5-androsten-3β-chloro-17-one, 5-androsten-3,17-dione, 5-androsten-3β-ol-11,17-dione, 5-androsten-3β-ol-16-one, 5-androsten-16α-bromo-3β-ol-17-one. In addition, testosterone, testosterone-BSA and 4-androsten-3β-ol-17-one, did not have any antiapoptotic activity in serum-starved cells; (b) hydroxylation at C7 (7α-hydroxy-DHEA, 7β-hydroxy-DHEA), at C11 (5-androsten-3β,11β-diol-17-one), at C16 (5-androsten-3β,16α-diol-17-one) or at C17 (hermaphrodiol, 5-androsten-17α-methyl-3β,17β-diol, 5-androsten-17α-ethyl-3β,17β-diol) resulted in loss of antiapoptotic activity; (c) DHEA derivatives 17-CMO (5-androsten-3β-ol-17-one 17-O-CMO), 17-NH₂ (5-androsten-17β-amino-3β-ol) and 17-one ethyleneacetal (5-androsten-3β-ol-17-one ethyleneacetal) were inactive; while (d) the Δ¹⁶ (double bond at C16-C17) androstene (5,16-androsten-3β-ol) and 17-carboxylic acid (5-androsten-3β-ol-17β-carboxylic acid) were active.

In addition to the commercially available compounds, a number of homemade, newly synthesized analogs (TCs) were tested. Collectively, quantitative apoptosis assays detected the following active

molecules; A6S, A10S and TC50. The EC₅₀ values for the above three androstenes were 0.172 μM, 0.23 μM and 0.087 nM respectively. To explore the mechanism by which A6S, A10S and TC50 prevented apoptosis of serum-deprived PC12 cells, we tested their effects on the expression of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. PC12 cells were cultured for 8 h either with complete media or with serum-free media containing 10⁻⁸ M steroids under investigation. Cellular extracts containing total proteins, were collected and the levels of Bcl-2 and Bcl-xL proteins were measured by Western Blot, and normalized versus actin protein. Similarly to DHEA, its active analogs prevented the serum deprivation-induced decrease of Bcl-2 and Bcl-xL protein levels, with varied potency.

Synthetic steroids which were found to mimic the anti-apoptotic effects of DHEA, i.e. A6S, A10S and TC50, were tested for their ability to bind to specific DHEA membrane binding sites. All three compounds competed for [³H]DHEA binding on isolated PC12 cell membranes at concentrations ranging from 1 pM to 1 μM, whereas a number of inactive steroids tested under similar conditions, did not. A6S, A10S and TC50 K_D values for the specific DHEA membrane binding sites were 12.45 nM, 331.8 pM and 16.4 pM respectively.

In conclusion, our findings show that specific substitutions in DHEA result to molecules which retain the anti-apoptotic effect of DHEA in serum deprived PC12 cells. Most of the conformations examined were inactive, thus suggesting that the neuropro-

TECTIVE effect of DHEA and synthetic analogs is strictly structure-specific. Furthermore, we were able to synthesize a novel analog (TC50) with potent neuroprotective action. This compound lacks the classical androgenic or estrogenic effects, since it is not subjective to metabolism by the enzymes 3β- and 17β-hydroxysteroid dehydrogenases. PC12 cells are devoid of functional NMDA and GABA_A receptors whose expression in the central nervous system is regulated by DHEA. Thus, in our experimental model the effects of DHEA analogs should be independent of these receptor systems. Indeed, we show here that active analogs, i.e. A6S, A10S and TC50, displace [³H]DHEA from its specific membrane binding sites which have been recently described by our group. In particular, TC50 binds with high affinity to the aforementioned binding sites (K_D at picomolar concentration). Our results suggest that TC50 might prove a lead molecule for the synthesis of novel neuroprotective compounds.

REFERENCES

1. Charalampopoulos I., Tsatsanis C., Dermizaki E., Alexaki I., Castanas E., Margioris A.N., Gravanis A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8209-8214 (2004)
2. Charalampopoulos I., Alexaki I.V., Lasaridis I., Dermizaki E., Avlonitis N., Tsatsanis C., Calogeropoulou T., Margioris A., Castanas E., Gravanis A.: *FASEB J.* 20: 577-579 (2006)
3. Charalampopoulos I., Dermizaki E., Vardoulis L., Tsatsanis C., Stoumaras C., Margioris A., Gravanis A.: *Endocrinology* 146: 3309-3318 (2005)



Η Χρήση της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας ως Μοντέλο Εφαρμογής Νέων Πεπτιδιακών Θεραπειών για την Πολλαπλή Σκλήρυνση

Α.Ι. Λουρμπόπουλος

Εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας, Β' Παν/κή Νευρολογική κλινική, Γ.Π.Ν.Θ. ΑΧΕΠΑ, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) θεωρείται ως μία χρόνια αυτοάνοση φλεγμονώδης νόσος του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), που προκαλεί το σχηματισμό εστιακών πλακών απομυελίνωσης στον εγκέφαλο και νωτιαίο μυελό με συνοδό ποικίλου βαθμού βλάβη των νευραξόνων. Η νόσος θεωρείται πως ξεκινά από εξειδικευμένα CD4⁺ Th1-λεμφοκύτταρα (τα οποία εκκρίνουν INF-γ, IL-2, TNF-α και λεμφοτοξίνη), ύστερα από ενεργοποίησή τους από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα φέροντα το MHC-II σύμπλεγμα και διατηρείται κυρίως από πληθυσμούς μονοκυττάρων και CD4⁺ και CD8⁺ T-λεμφοκυττάρων (1,2). Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο πειραματικό μοντέλο για την *in vivo* δοκιμή νέων θεραπευτικών παραγόντων για την ΠΣ είναι αυτό της ΠΑΕ (Πει-

ραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα) στα τρωκτικά (1). Η ΠΑΕ μπορεί να επαχθεί στα μύες ή επίμυες με χρήση διαφόρων αντιγόνων του ΚΝΣ (πεπτιδία των πρωτεϊνών MBP, MOG, PLP, GFAP, S-100 και ομογενοποίηση νωτιαίου μυελού) οπότε παράγεται κλινική νόσος στα πειραματόζωα ακολουθώντας την πορεία της οξείας μονοφασικής ΠΑΕ, της χρόνιας προϊούσας ΠΑΕ ή της χρόνιας ΠΑΕ με εξάρσεις-υφέσεις (3-5). Τα μοντέλα αυτά, αν και δεν αποτελούν το ιδανικό πειραματικό πρότυπο της, ΠΣ, είναι τα μόνα διαθέσιμα προς το παρόν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για τη μελέτη των βασικών παθολογοανατομικών χαρακτηριστικών της νόσου (φλεγμονή, απομυελίνωση και αξονοπάθεια) (6-8). Η φλεγμονή θεωρείται ως η βασική αιτία για

τις βλάβες στην ΠΑΕ και κάθε προσπάθεια ανοσορρύθμισης ή ελάττωσης του αριθμού των αυτοαντιδρώντων λεμφοκυττάρων θα μπορούσε να αποτελεί θεραπευτική παρέμβαση. Η φλεγμονώδης διαδικασία στην ΠΑΕ θεωρείται ως CD4+ Th1 απάντηση, η οποία ξεκινά μετά από την επιτυχή σύνδεση του τριμοριακού συμπλέγματος MHC_{II}-Αντιγόνο-TCR και την ακόλουθη ενεργοποίηση των συνδιεγερτικών μορίων μέσα στο T-λεμφοκύτταρο. Κάθε παρέκκλιση από αυτή τη διαδικασία μπορεί να οδηγήσει σε ανεργία των T-λεμφοκυττάρων, κυτταρικό θάνατό τους ή ανοσοανοχή μέσω ανοσορρυθμιστικών μηχανισμών (CD4+/CD25+ κατασταλτικά κύτταρα, στροφή προς Th2 ανοσιακή απάντηση, έκκριση BDNF). Το επιθυμητό αποτέλεσμα από μία τέτοια παρέκκλιση θα ήταν είτε μία ελαττωμένη ή μία *ωφέλιμη* φλεγμονώδης διαδικασία με δευτερογενή ελάττωση της απομυελίνωσης και της αξονοπάθειας εντός του ΚΝΣ (9-10). Μεταξύ των πειραματικών θεραπειών που δοκιμάζονται σε ερευνητικό επίπεδο, αυτές που χρησιμοποιούν πεπτιδία APL (Altered Peptide Ligand) μοιάζουν πολλά υποσχόμενες παρά το γεγονός ότι η *in vivo* πρωτεολυτική τους διάσπαση θα μπορούσε να μειώσει τη δραστηριότητά τους. Αρκετά συνθετικά ή αυτόχθονα πεπτιδία έχουν δοκιμαστεί μέχρι σήμερα (11-13) και από αυτά το οξεικό glatiramer έχει ήδη ενταχθεί στην κλινική πράξη της ΠΣ (4). Για όλα αυτά τα πεπτιδία, η ΠΑΕ προσφέρει την *in vivo* πλατφόρμα για να δοκιμαστούν οι οδοί χορήγησης, η φαρμακοκινητική, η ασφάλεια χορήγησης, οι ενδεχόμενες ανοσοτροποποιητικές δράσεις και μηχανισμοί, οι πιθανές άμεσα νευροπροστατευτικές ιδιότητες και η συνιστάμενη δράση του εκάστοτε πεπτιδίου στις δύο βασικές παθολογιοανατομικές βλάβες της ΠΑΕ στο ΚΝΣ, δηλαδή την απομυελίνωση και την αξονοπάθεια (4).

Testing Peptide Therapies for MS Using the Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

A.I. Lourbopoulos

Laboratory of Experimental Neurology and Neuroimmunology, B' Dept. of Neurology, AHEPA University Hospital, Thessaloniki, Greece

Key words: Multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, rodents

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic autoimmune inflammatory disease of the Central Nervous System (CNS), resulting in the formation of focal plaques of demyelination in the brain and spinal cord that are accompanied with several degrees of axonal pathology. The disease is believed to be initiated by MHC-II re-stricted CD4+ Th1-cells (producing INF- γ , IL-2,

TNF- α and lymphotoxin) and mediated mainly by populations of CD8+ T-cells, CD4+ T-cells and monocytes (1,2). The experimental model that is most commonly used to test *in vivo* new therapeutic agents for MS is that of EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) in rodents (1). EAE can be induced using various CNS antigens (MBP, MOG, PLP, whole spinal cord homo-genate, GFAP, S-100) in mice or rats, producing clinical disease patterns of acute-monophasic EAE, chronic progressive EAE or chronic relapsing-remitting EAE (3-5). These models do not constitute the ideal model of MS but they can be successfully used to study the major pathological aspects of the disease (inflammation, demyelination and axonal pathology) (6-8). Inflammation is considered to be the driving cause of the pathology seen in the EAE models and any strategy that could immunomodulate or reduce the number of autoreactive lymphocytic cells could be therapeutic. EAE inflammatory process is considered to be a CD4+ Th1 response that is initiated after the successful *matching* of the trimolecular complex (MHC_{II}-Antigen-TCR) and entailed activation of the costimulatory molecules within the T-cell. Any deviation from this would result in anergy of the T-cells, death of the T-cells or tolerance through immune regulatory mechanisms (CD4+/CD25+ suppressive cells, Th2 shift, BDNF secretion). The desired effect from such a deviation should be either a reduced or a beneficial inflammatory process with reduced demyelination and axonal pathology within the CNS tissue (9,10). Among these experimental treatments currently under research, those that use APL (Altered Peptide Ligand) peptides seem promising despite the fact that proteolytic peptide degradation could reduce their effectiveness. Many synthetic or native peptides have been tested so far (11-13) and among them glatiramer acetate is currently used in clinical practice of MS (4). For these peptide treatments EAE models offer the *in vivo* platform to test the routes of administration, the peptide pharmacokinetics, the safety profile, the possible immunomodulatory responses and mechanisms, possible direct neuroprotective properties of the peptide and its final effect on the two basic pathological outcome measures of EAE within the CNS, i.e. the demyelination and axonopathy (4).

REFERENCES

1. Lassmann H., Ransohoff R.M.: The cd4-th1 model for multiple sclerosis: A critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol.* 25: 132-137 (2004)
2. Noseworthy J.H., Lucchinetti C., Rodriguez M., Weinshenker B.G.: Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 343: 938-952 (2000)
3. Gijbels K., Engelborghs S., De Deyn P.: Experimental autoimmune encephalomyelitis: An animal model. *Neurosci. Res. Comm.* 26: 193-206 (2000)
4. Grigoriadis N., Tselios T., Deraos S., Orolagos A., Deraos G., Matsoukas J., Mavromatis I., Milonas I.: Animal models of central nervous system immune-mediated di-

seases: Therapeutic interventions with bioactive peptides and mimetics. *Curr. Med. Chem.* 12: 1513-1519 (2005)

5. Berger T., Weerth S., Kojima K., Linington C., Wekerle H., Lassmann H.: Experimental autoimmune encephalomyelitis: The antigen specificity of T lymphocytes determines the topography of lesions in the central and peripheral nervous system. *Lab. Invest.* 76: 355-364 (1997)

6. Hart B.A., Amor S.: The use of animal models to investigate the pathogenesis of neuroinflammatory disorders of the central nervous system. *Curr. Opin. Neurol.* 16: 375-383 (2003)

7. Skundric D.S.: Experimental models of relapsing-remitting multiple sclerosis: Current concepts and perspective. *Curr. Neurovasc. Res.* 2: 349-362 (2005)

8. Grigoriadis N., Ben-Hur T., Karussis D., Milonas I.: Axonal damage in multiple sclerosis: A complex issue in a complex disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 106: 211-217 (2004)

9. Lanzavecchia A., Lezzi G., Viola A.: From TCR engagement to T cell activation: A kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96: 1-4 (1999)

10. Chavarria A., Alcocer-Varela J.: Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun. Rev.* 3: 251-260 (2004)

11. Tselios T., Probert L., Daliani I., Matsoukas E., Troganis A., Gerothanassis I.P., Mavromoustakos T., Moore G.J., Matsoukas J.M.: Design and synthesis of a potent cyclic analogue of the myelin basic protein epitope mbp72-85: Importance of the ala81 carboxyl group and of a cyclic conformation for induction of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Med. Chem.* 42: 1170-1177 (1999)

12. Tselios T., Daliani I., Probert L., Deraos S., Matsoukas E., Roy S., Pires J., Moore G., Matsoukas J.: Treatment of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) induced by guinea pig myelin basic protein epitope 72-85 with a human mbp(87-99) analogue and effects of cyclic peptides. *Bioorg. Med. Chem.* 8: 1903-1909 (2000)

13. Fontoura P., Garren H., Steinman L.: Antigen-specific therapies in multiple sclerosis: Going beyond proteins and peptides. *Int Rev Immunol.* 24: 415-446 (2005)



Ρόλος της Λεπτίνης στη Ρευματοειδή Αρθρίτιδα (ΡΑ)

Κοκώνα Χατζαντώνη¹, Μαρία Θεοδωροπούλου¹, Νικόλαος Μείμαρης², Μιχάλης Λεοτσινίδης³, Γεώργιος Θεοδώρου¹, Τάσος Γεωργακόπουλος¹, Μαρίνα Καρακάντζα¹, Ανδρέας Αντωνόπουλος² και Αθανασία Μουζάκη¹

Τμήματα ¹Αιματολογίας και ²Ρευματολογίας, ^{1,2}Παθολογική Κλινική, ³Εργ/ο Υγιεινής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα, Ελλάς

Η ΡΑ είναι χρόνια αυτοάνοση νόσος που κυρίως προσβάλλει τον συνδετικό ιστό. Η έκβαση της ΡΑ έχει συνδεθεί με τα γονίδια του συστήματος ΜΗC τάξης II που κωδικοποιούν τις β αλυσίδες των HLA-DR μορίων και την υψηλή έκφραση πρωτεϊνών θερμικής καταπληξίας (heat shock proteins). Στην οξεία ΡΑ, τα CD4 T-κύτταρα ενεργοποιούνται στην περιφέρεια και μεταναστεύουν στις αρθρώσεις όπου επανενεργοποιούνται από αυτοαντιγόνα, πολλαπλασιάζονται δημιουργώντας κλώνους και προκαλούν φλεγμονή. Η έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, κυρίως IFN-γ, από τους αυτοαντιδρώντες T-κυτταρικούς κλώνους, ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, τα οποία, μαζί με τους ινοβλάστες, παράγουν TNF-α και IL-1 στην αρθρική κοιλότητα πυροδοτώντας την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών και οστεοκλαστών. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν προοδευτικά σε μόνιμη βλάβη των μαλακών μορίων και σε βλάβη του οστού. Η λεπτίνη κωδικοποιείται από το ob γονίδιο και είναι ορμόνη των 16 kD με ελικοειδή κυτταροκινική δομή παρόμοια της IL-2. Παράγεται από τα λιπώδη κύτταρα για τον έλεγχο της όρεξης και του ενεργειακού ισοζυγίου. Επίσης, συμμετέχει στη ρύθμιση ενδοκρινικών λειτουργιών, του μεταβολισμού των οστών, καθώς και ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων. Ο υποδοχέας της λεπτίνης (OB-R) ανή-

κει στην οικογένεια των κυτταροκινικών υποδοχέων τάξης I που περιλαμβάνει την gp-130, τον κοινό παράγοντα μεταγωγής σήματος για την οικογένεια κυτταροκινών σχετιζόμενων με την IL-6 που περιλαμβάνει την IL-11, την IL-12, τον ανασταλτικό παράγοντα της λευχαιμίας, τον G-CSF, την ογκοστατίνη M. Οι υποδοχείς της λεπτίνης εντοπίζονται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα καθώς και σε ιστούς του αναπαραγωγικού, αιμοποιητικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Πρόσφατα ευρήματα υποδεικνύουν ένα σημαντικό ρόλο της λεπτίνης στην ανοσολογική απόκριση. Ποντίκια ανεπαρκή σε λεπτίνη έχουν ελάχιστη παραγωγή IFN-γ και αδυνατούν να γειύρουν μια Th1 απόκριση, ενώ έχουν ενισχυμένο Th2 φαινότυπο. Στους ανθρώπους, οι υποδοχείς της λεπτίνης εκφράζονται στα T και B κύτταρα καθώς και στα μονοκύτταρα. Πολλές δημοσιεύσεις υποστηρίζουν ότι η λεπτίνη συμβάλλει στην παθογένεση των μηχανισμών αυτοανοσίας και φλεγμονής ενώ άλλες υποστηρίζουν το αντίθετο. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο ρόλος της λεπτίνης στη ΡΑ. Μετρήθηκαν τα επίπεδα της λεπτίνης και του διαλυτού της υποδοχέα στον ορό 103 ασθενών με ΡΑ και 100 υγιών δωτών με αντίστοιχους δείκτες σωματικής μάζας (BMI) και μελετήθηκε κατά πόσο τα επίπεδα της λεπτίνης συσχετίζονται με την οξυτήτα της νόσου και το χορηγούμενο θερα-

πυετικό σχήμα. Μελετήθηκε επιπλέον και η επίδραση της λεπτίνης στον τρόπο έκφρασης γονιδίων προ- και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος ασθενών και υγιών δοτών. Τα επίπεδα της λεπτίνης και του διαλυτού της υποδοχέα στον ορό των ασθενών με PA ήταν σημαντικά υψηλότερα (Μ.Ο. 30.78 ng/ml) σε σύγκριση με αυτά των υγιών δωτών (Μ.Ο. 8.52 ng/ml) χωρίς αυτό να συσχετίζεται με την ηλικία, την οξύτητα της νόσου ή το ακολουθούμενο θεραπευτικό σχήμα. Όταν η λεπτίνη χορηγήθηκε σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερι-

κού αίματος ασθενών με PA ενίσχυσε ελαφρώς την έκφραση των γονιδίων των IL-1 β , IL-6 και TNF- α , ενώ ενίσχυσε σημαντικά την έκφραση του γονιδίου της IL-10. Παρόλα αυτά απέτυχε να ενισχύσει την έκφραση γονιδίων Th1 ή Th2 κυτταροκινών. Απομόνωση των κυτταρικών τύπων έδειξε ότι τα μονοκύτταρα ήταν αποκλειστικά υπεύθυνα για την εμφάνιση ενεργοποίησης του γονιδίου της IL-10 (Σχήμα 1). Συμπεραίνεται ότι η λεπτίνη μπορεί να μετριάσει την οξύτητα της νόσου στη PA ενισχύοντας την έκκριση της IL-10 από τα μονοκύτταρα.

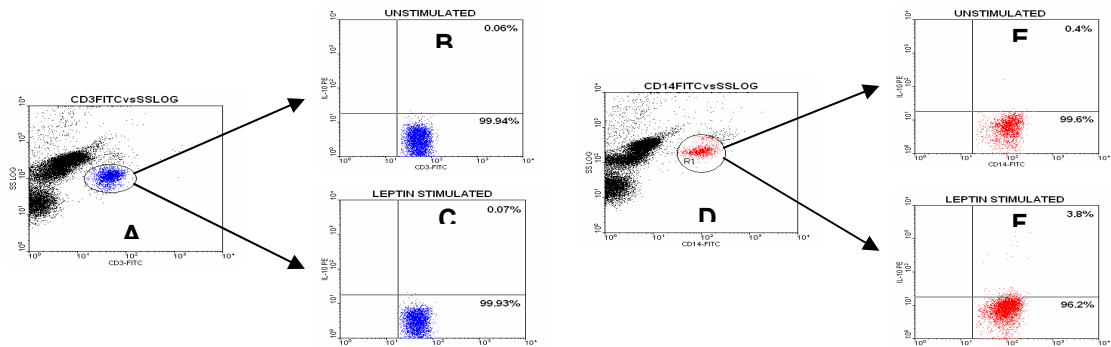


Figure 1. PBMC were cultured with recombinant leptin and subjected to phenotypic analysis by FACS that gave the percentages of cells that were T (CD3+) and monocytes (CD14+) and were expressing intracytoplasmic IL-10. A, B, C cells from healthy control; D, E, F cells from RA patient

Role of Leptin in Rheumatoid Arthritis (RA)

Kokona Chatzantoni¹, Maria Theodoropoulou¹, Nikolaos Meimaris², Michael Leotsinidis³, Georgios L. Theodorou¹, Tassos Georgakopoulos¹, Marina Karakantza¹, Andreas Andonopoulos², Athanasia Mouzaki¹

Divisions of ¹Hematology and ²Rheumatology, ^{1,2}Dpt. of Internal Medicine, ³Laboratory of Public Health, Medical School and University Hospital, University of Patras, Patras, Greece

Key words: Rheumatoid arthritis, leptin, leptin's receptor

RA is a chronic autoimmune disease that primarily targets synovial tissues. Susceptibility to RA is linked to MHC class II genes encoding β chains of HLA-DR molecules and high expression of heat shock proteins. In acute RA, CD4 T-cells are activated in the periphery and migrate to the joints where they get reactivated by self-antigens, expand clonally and induce inflammation. Secretion of pro-inflammatory cytokines, mainly IFN- γ , by the autoreactive T-cell clones results in recruitment and activation of monocytes and macrophages which, along with fibroblasts, produce TNF- α and IL-1 in the synovial cavity, triggering, in turn, the production of matrix metalloproteinases and osteoclasts. These

events lead progressively to permanent soft tissue and bone damage. Leptin is encoded by the ob gene, and is a 16 kD hormone that adopts a helical cytokine structure similar to IL-2. Leptin is produced by adipocytes to control food intake, energy acquisition and utilization. Leptin also modulates various endocrine axes, bone metabolism and various immune and inflammatory responses. Leptin's receptor (OB-R) is a member of the class I cytokine receptor family which includes gp-130, the common signal transducing component for the IL-6 related family of cytokines that include IL-11, IL-12, leukemia inhibitory factor, G-CSF, ciliary neurotrophic factor and oncostatin M. OB-Rs are distributed in the central nervous system and in tissues of the reproductive, hematopoietic and immune systems. Recent evidence suggests that leptin may have a critical role in the immune response. Leptin deficient mice have minimal IFN- γ production and are unable to generate a Th1 response, whereas they have an enhanced Th2 phenotype. In humans, OB-Rs are expressed on T-cells, B-cells and monocytes. Several published reports support the hypothesis that leptin is pathogenic in autoimmunity and inflammation whereas others support the opposite. We investigated the role of leptin in RA. We measured leptin and soluble OB-R levels in the sera of 103 RA patients and 100 healthy Body Mass Index (BMI)-matched controls, and studied whether leptin levels

correlate with disease activity and type of treatment. Furthermore, we studied the effect of leptin on pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression patterns on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from RA patients and controls. Serum leptin and OB-Rs levels were found to be significantly higher in RA patients (mean 30.78 ng/ml) compared to controls (mean 8.52 ng/ml) regardless of age, disease activity and type of treatment. When

leptin was added directly to the patients PBMC, it slightly induced IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene expression, whereas it resulted on a very strong IL-10 gene expression, but failed to induce a Th1 or Th2 cytokine gene expression. Purification of cells showed that monocytes were exclusively responsible for IL-10 gene induction (Figure 1). We conclude that leptin may attenuate disease activity in RA by promoting IL-10 secretion by monocytes.



Transition Metals as Anti-cancer Agents: Importance of Hydrogen Bonding and π -Stacking Interactions

James A. Platts¹, Arturo Robertazzi¹, Mark P. Waller², Konstantinos Gkionis¹

¹School of Chemistry, Cardiff University, Park Place, Cardiff CF10 3AT, UK

²Faculty of Pharmacy, University of Sydney, NSW 2006, Australia

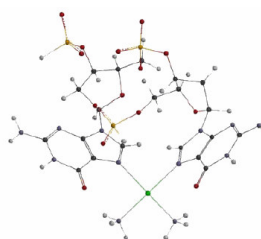
Key words: Anti-cancer agents, transition metals, hydrogen bonding, π -stacking interactions

Transition metal complexes are in many ways ideal candidates for DNA-active drugs; they attach to DNA chains through a variety of sites, while rigid coordination geometry offers the possibility of stereochemical control over complexation. Cisplatin, cis-[PtCl₂(NH₃)₂], is the archetypal metal-based DNA drug, with more than \$500M annual worldwide sales. It forms covalent and hydrogen bonds to guanine, and rigid square-planar geometry leads to intra-strand complexation to a second guanine, leading to distortion of DNA structure and ultimately cell death. Despite the success of cisplatin, problems such as toxicity and resistance mean that the search for new metal-based cancer drugs is intense (1). Theoretical calculations can be used to gain deeper insight into the complex interplay of metal-ligand binding, hydrogen bonding and π -stacking that determines how particular metal complexes bind to DNA. We have used density functional theory (DFT) and hybrid QM/MM methods to study the binding of a wide variety of metal-DNA com-

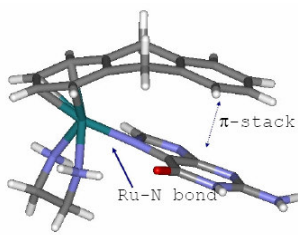
plexes (2), ranging from simple complexes with individual bases to large segments of DNA, in which the effect of metal drugs on the helical structure can be observed. The importance of hydrogen bonding in cisplatin complexes is clearly evident, as is the disruption of the regular π -stacked structure induced by this drug (3). Other metals studied in detail include ruthenium arene complexes designed by Sadler (4) which employ hydrogen bonding and π -stacking to generate a clear preference for guanine over other possible sites of attack.

REFERENCES

1. Wong E., Giandomenico C.M.: *Chem. Rev.* 99: 2451 (1999)
2. Waller M.P., Robertazzi A., Platts J.A., Hibbs D.E., Williams P.A.: *J. Comput. Chem.* 27: 491 (2006)
3. a) Robertazzi A., Platts J.A.: *Chem. Eur. J.* 12: 5747 (2006); b) Robertazzi A., Platts J.A.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 10: 854 (2005)
4. Chen H., Parkinson J.A., Parsons S., Coxall R.A., Gould R.O., Sadler P.J.: *J. Am. Chem. Soc.* 124: 3064 (2002)



Cisplatin-GpG complex



Ru(en)(arene)-G complex



Moving Messages in Brain: Dendritic Targeting of BC1 RNA

Andreas G. Tzakos, Nicolas Locker, Latifa Elantak, Laura Easton, Peter Lukavsky

Medicinal Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK

Key words: Dendritic targeting elements, brain

In eukaryotes, the interlaced pathways of RNA transport and local translational regulation are key determinants in the spatio-temporal distinction of gene expression. Localized RNAs typically contain codes, expressed within *cis*-acting elements, called dendritic targeting elements (DTEs) that specify subcellular targeting. Such codes are recognized by *trans*-acting factors, adaptors that mediate translocation along cytoskeletal elements by molecular motors. Although more than 400 DTEs have been discovered in brain, there is no three-dimensional structure available that could reveal RNA structural motifs that are recognized and decoded by the neuronal localization machinery. Brain Cytoplasmic 1 (BC1) RNA, contains a 25 kDa DTE that is responsible for distal dendritic delivery. In order to solve the solution structure of this large RNA by NMR, a novel,

generic approach has been developed for the synthesis of Complementary Segmental Labeling of Large RNAs (CSLLR) (1,2). The structure of this first DTE, in addition to the identification of the spatial BC1-DTE decoder factors that we achieved, could serve as the first step towards the understanding of the mechanism of local control of protein synthesis in neurons (3).

Acknowledgements: A.G.T. is grateful for an EMBO long-term fellow-ship.

REFERENCES

1. Tzakos, A. G., Grace, C. R., Lukavsky, P. J., and Riek, R. (2006). NMR techniques for very large proteins and mas in solution. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35, 319-342.
2. Tzakos, A. G., Easton, L. E., and Lukavsky, P. J. (2006). Complementary segmental labeling of large RNAs: economic preparation and simplified NMR spectra for measurement of more RDCs. *J Am Chem Soc* 128, 13344-13345.



Αντιϋπερτασικό Φάρμακο Valsartan: Διαμορφωτική Ανάλυση και Διερεύνηση του Ενεργειακού Φράγματος λόγω Παρεμποδισμένης Περιστροφής γύρω από τον Αμιδικό Δέσμο με Χρήση Δυναμικής Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Συγκριτική Υπέρθωση με τον Πρότυπο ΑΤ₁ Ανταγωνιστή Losartan και Θεωρητική Μελέτη Πρόσδεσης στον ΑΤ₁ Υποδοχέα

Κ. Ποταμίτης¹, Μ. Ζερβού¹, S. Golic Grdadolnik², Ι. Κυρίκου¹, Β. Κασιάρας^{1,3}, Π. Ζουμπουλάκης¹, Δ. Αργυρόπουλος⁴, Γ. Βατούγια¹, Σ. Νικολαρόπουλος³, Θ. Μαυρομούστακος¹

¹Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 11635 Αθήνα, Ελλάδα. ²National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19 P.O. Box 30 SI-1115, Ljubljana Slovenia. ³Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πάτρας, 26500 Ρίο, Ελλάδα. ⁴Varian Deutschland GmbH, D-64289 Darmstadt, Germany

Πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική ανάλυση του αντιϋπερτασικού φαρμάκου Valsartan σε διάλυμα με συνδυαστική χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και Μοριακής Μοντελοποίησης. Πειράματα 1D NMR (¹H και ¹³C) κατέδειξαν την ύπαρξη δύο διακριτών διαμορφώσεων σε θερμοκρασία δωματίου οι οποίες συγχωνεύονται σε θερμοκρασία μεταξύ 55-60 °C. Με εφαρμογή Δυναμικής Φασματοσκοπίας 2D EXSY μελετήθηκαν οι θερμοδυναμικές και κινητικές παράμετροι για την αλληλομετατροπή της κύριας διαμόρφωσης στη δευτερεύουσα και υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια ενεργοποίησης κατά

Gibbs σε θερμοκρασιακό εύρος 20-30 °C. Προσομοίωση των φασμάτων ¹³C NMR επιβεβαίωσαν τα ενεργειακά δεδομένα, ενώ επιπλέον έδειξαν ότι η αναλογία πληθυσμών στις δύο διαμορφώσεις παραμένει σταθερή με τη θερμοκρασία και ίση προς 1:0.7 (κύρια: δευτερεύουσα). Θεωρητική μελέτη της πρόσδεσης του valsartan στον ΑΤ₁ υποδοχέα έδειξε ότι αμφότερες οι διαμορφώσεις προσδένουν στην ίδια θήκη όπως έχει προκύψει και από προηγούμενες μελέτες για τον ΑΤ₁ ανταγωνιστή losartan. Επιπλέον, η κύρια διαμόρφωση υιοθετεί ευνοϊκότερες αλληλεπιδράσεις με κρίσιμα αμινοξέα σε σχέση με τη δευτερεύουσα.

Antihypertensive Drug Valsartan: Conformational Analysis and Determination of the Amide Rotational Barrier Using Dynamic NMR Spectroscopy. Comparative Superimposition and Docking Studies with the Prototype AT₁ Antagonist Losartan

C. Potamitis¹, M. Zervou¹, S. Golic Grdadolnik², I. Kyriku¹, V. Katsiaras^{1,3}, P. Zoumpoulakis¹, D. Argyropoulos⁴, G. Vatougia¹, S. Nikolaropoulos³, T. Mavromoustakos¹

¹Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic, Research Foundation, Vas. Constantinou 48, 11635, Athens, Greece; ²National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19 P.O. Box 30 SI-1115, Ljubljana Slovenia; ³Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras, 26500 Rio, Greece; ⁴Varian Deutschland GmbH, D-64289 Darmstadt, Germany

Key words: Valsartan, conformational analysis, AT₁ receptor

Conformational analysis of valsartan in solution was performed using a combination of NMR spectroscopy and molecular modeling. 1D ¹H and ¹³C NMR experiments showed the existence of two distinct conformations at ambient temperature, which coalesce at temperature between 55-60 °C. The thermodynamic and kinetic parameters for the interconversion between the two conformations were studied using 2D EXSY spectroscopy. Use of ¹³C NMR spectra line shape analysis confirmed the activation energy data and showed that the population ratio remains practically constant and equals 1:0.7 (major: minor). Docking experiments showed that the major and minor conformations of valsartan were positioned at the same pocket of the AT₁ receptor as the prototype antagonist losartan.



Εφαρμογές Τρισδιάστατων Σχέσεων Δομής Δράσης (3D-QSAR) και Φαρμακοκινητικές Μελέτες Καινοτόμων Κανναβινοειδών Προσδετών Υποκαταστημένων στη C1' Θέση της Αλκυλικής Αλυσίδας

S. Durdagi^{1,2} K. Κουκουλίτσα¹ A. Κάπου¹ Θ. Κουρουλή¹ Θ. Ανδρέου¹ S. Νίκας³, B. Ναχμιά¹, Δ. Παπαχατζής¹, M. Παπαδόπουλος¹ και Θ. Μαυρομούστακος¹

¹Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 11635 Αθήνα, Ελλάς. ²Department of Biology, Chemistry and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Takustr. 3, 14195 Berlin, Germany. ³Center for Drug Discovery, Northeastern University, 116 Mugar Hall, 360 Huntington Avenue, Boston, Massachusetts 02115

Σε σύνολο 30 καινοτόμων παραγώγων της Δ⁸-τετραύδροκανναβινόλης (Δ⁸-THC) και κανναβινοδιόλης πραγματοποιήθηκε ανάλυση 3D-QSAR με χρήση της Συγκριτικής Ανάλυσης Μοριακών Πεδίων (Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA) και της Συγκριτικής Ανάλυσης Δεικτών Μοριακής Ομοιότητας (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis, CoMSIA). Με συνδυασμό τεχνικών Μοριακής Μοντελοποίησης και Φασματοσκοπίας NMR προσδιορίστηκε η πρότυπη βιοδραστική διαμόρφωση του πιο ισχυρού αγωνιστή AMG 3 η οποία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως βάση για την ανάπτυξη φαρμακοφόρων μοντέλων CB1 και CB2. Τα μοντέλα αυτά δομήθηκαν με χρήση πειραματικών τιμών ικανότητας σύνδεσης και έδωσαν πολύ υψηλό συντελεστή συσχέτισμού. Με χρήση ισούψων χαρτών των μοντέλων στους CB1 και CB2 υποδοχείς προέκυψε ότι η στεreoχημική παρεμπόδιση της πλευρικής αλυσίδας καθορίζει κυρίως την ικανότητα σύνδεσης. Η ανάλυση COMFA και COMSIA επέτρεψε τον προσδιορισμό των πιθανών ευνοϊ-

κότερων θέσεων σύνδεσης με τους CB1 και CB2 υποδοχείς. Τα παραγόμενα μοντέλα θα χρησιμοποιηθούν ως οδηγό για την κατανόηση των στεreo-ηλεκτρονικών χαρακτηριστικών των κανναβινοειδών στις θέσεις σύνδεσης των CB1 και CB2 υποδοχέων και θα βοηθήσουν στο σχεδιασμό νέων ανάλογων κανναβινοειδών με υψηλότερη βιοδραστική δράση και βελτιωμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος μελετήθηκε το φαρμακοκινητικό προφίλ των ενώσεων. Με τη βοήθεια του προγράμματος VolSurf εξήχθησαν φυσικοχημικές παράμετροι που στη συνέχεια συσχετίστηκαν με τις τιμές ικανότητας σύνδεσης των ενώσεων μέσω της στατιστικής ανάλυσης PLS (Principal Least Squares). Η ανάλυση έδωσε ένα μοντέλο δύο κύριων συνιστωσών για τους υποδοχείς CB1 και CB2 με ικανοποιητικά στατιστικά αποτελέσματα τόσο σε γραμμική διευθέτηση όσο και σε προβλεπτική ικανότητα. Τα μόρια στη συνέχεια προβλήθηκαν στα προεπιλεγμένα ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) μοντέλα του προγράμμα-

τος τα οποία αφορούν: τη διαπερατότητα από τα κύτταρα Caco-2 του στομάχου, τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, τη σύνδεση με την αλβουμίνη του πλάσματος και την υδατοδιαλυτότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα υπό μελέτη μόρια διαπερνούν την μεμβράνη των κυττάρων Caco-2, διαπερνούν το φραγμό του αιματοεγκεφάλου, έχουν χαμηλή σύνδεση με την αλβουμίνη και η υδατοδιαλυτότητά τους είναι χαμηλή.

The Applications of 3D-QSAR and Pharmacokinetic Studies for the Novel Cannabinoid Ligands Substituted at the C1' Position of the Alkyl Side Chain

S. Durdagi^{1,2}, C. Koukoulitsa¹, A. Kapou¹, T. Kourouli¹, T. Andreou¹, S.P. Nikas³, V.R. Nahmias¹, D.P. Papahatjis¹, M.G. Papadopoulos¹ and T. Mavromoustakos

¹Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, The National Hellenic Research Foundation, 48 Vas. Constantinou Ave., 11635 Athens, Greece; ²Department of Biology, Chemistry and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Takustr. 3, 14195 Berlin, Germany; ³Center for Drug Discovery, Northeastern University, 116 Mugar Hall, 360 Huntington Ave., Boston, Massachusetts 02115, USA

Key words: Novel cannabinoid ligands substituted, 3D-QSAR, pharmacokinetic studies

A set of 30 novel Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC) and cannabidiol analogs were subjected to 3D-QSAR studies using the comparative molecular field analysis (CoMFA), and comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) approaches. Us-

ing combinations of molecular modeling techniques and NMR spectroscopy, the putative bioactive conformation of the most potent ligand AMG3 in the training set was used as template and CB1 and CB2 pharmacophore models were developed. These were fitted with experimental binding data with very high correlation coefficient. Contour maps of CB1 and CB2 models of CoMFA and CoMSIA show that the steric effects dominantly determine the binding affinities. CoMFA and CoMSIA analyses based on binding affinity data of CB ligands for the CB1 and CB2 receptors allowed us to deduce the possible optimal binding positions with CB1 and CB2 receptors. The created models will serve as guides for understanding the binding stereo electronic characteristics of cannabinoids at the CB1 and CB2 receptor binding sites and aid in the design of new cannabinoid analogs with enhanced activity and other tailored properties. The pharmacokinetic profile of these compounds was also analyzed using VolSurf approach to shed light on the physicochemical properties important for the design of novel agents possessing optimum activity at CB1 and CB2 receptors. The PLS analysis yielded a two component model for CB1 and CB2. The obtained models show satisfactory statistical results both in fitting and predicting validation. The molecules were then projected on the following precalculated ADME models: blood-brain barrier (BBB) permeation, Caco-2 cell permeability, plasma-protein affinity and thermodynamic solubility. Results show that the studied molecules can cross to the BBB, can be transported across the intestinal epithelium, they have low plasma-protein affinity and low aqueous solubility.



Μελέτη της Αλληλεπίδρασης του Θανατηφόρου Παράγοντα του Άνθρακα με Πεπτιδικά Υποστρώματα: Συμπεράσματα για τον Σχεδιασμό Βιοδραστικών Ενώσεων

Γ.Α. Δάλκας¹, Α. Παπακυριακού¹, Α. Βλάμης-Γαρδίκας², Γ.Α. Σπυρούλιας¹

¹Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26504. ²Εργαστήριο Βιοχημείας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, Σωρανού Εφεσίου 4, Αθήνα 11527, Ελλάς

Η τοξίνη του άνθρακα (AT), η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα του βακτηρίου *Bacillus Anthracis*, παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της ασθένειας του Άνθραξ. Αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, μια εκ των οποίων είναι ο *θανατηφόρος παράγοντας του άνθρακα* (LF) (1), μία μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου (~90 kDa). Ο LF εμφανίζει εξαιρετική εξειδίκευση στην πρωτεολυτική του δράση καθώς, διασπάζει συγκεκριμένες κινάσες (mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK), κοντά στο αμινο-τελικό τους άκρο με αποτέλεσμα την αναστολή διαδικασιών μεταγωγής σήματος (2). Επειδή δεν υπάρχουν επαρκή

βιβλιογραφικά δεδομένα για τις αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου LF-MAPKK σε μοριακό επίπεδο, εφαρμόσαμε τεχνικές Μοριακής Δυναμικής προκειμένου να μελετήσουμε αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Δομικές πληροφορίες αντλήθηκαν και με τεχνικές τμηματικού κατευθυνόμενου σχεδιασμού, μελετώντας τους υποκαταστάτες οι οποίοι εμφάνισαν υψηλή συγγένεια δέσμευσης στο καταλυτικό κέντρο του LF, χρησιμοποιώντας *in silico* πρωτόκολλα προσομοίωσης πρόσδεσης (docking simulations). Τα δεδομένα αυτά αξιοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν με υψηλής συγγένειας δέσμευσης υποκαταστάτες διπεπτιδίων και τριπε-

πτιδίων εικονικών πεπτιδικών βιβλιοθηκών, οι οποίοι προέκυψαν μέσω *virtual screening* τεχνικών.

Study of Anthrax Lethal Factor – Peptide Substrate Interaction: Implications for Structure-Guided Design of Bioactive Molecules

G.A. Dalkas¹, A. Papakyriakou¹, A. Vlamis-Gardikas², G.A. Spyroulias¹

¹Department of Pharmacy, University of Patras, Patras, 26504, Greece, e-mail: G.A.Spyroulias@upatras.gr;

²Laboratory of Biochemistry, Foundation for Biomedical Research, Academy of Athens, Soranou Efessiou 4, Athens, 11527, Greece

Key words: Anthrax toxin, lethal factor, structure-guided design of bioactive molecules

Anthrax toxin (AT), which is one of the major virulence factors of the bacterium *Bacillus Anthracis*, possesses a key role to the Anthrax disease. It consists of three proteins, one of which is the anthrax lethal factor (LF), a gluzincin Zn-dependent highly specific metalloprotease (~90 kDa). LF cleaves most

isoforms of the mitogen-activated protein kinase (MAPKK) family close to their amino termini, leading to the inhibition of one or more signaling pathways. Since there is no data available on the enzyme-substrate interactions available so far, we applied Molecular Dynamics Simulations in order to study the factors govern the complex LF-substrate interactions at atomic level. Structural information exploited in fragment-based design of high affinity peptide-ligands towards the catalytic site of LF metallo-peptidase using docking protocols. Results are analyzed and compared with high binding affinity dipeptide and tripeptide ligands extracted from virtual peptides libraries through virtual screening methods.

REFERENCES

1. Pannifer A.D., Wong T.Y., Schwarzenbacher R., Rensus M., Petosa C., Bienkowska J., Lacy D.B., Collier R.J., Park S., Leppla S.H., Hanna P., Liddington R.C.: *Nature* 414: 229 (2001)
2. Duesbery N.S., Webb C.P., Leppla S.H., Gordon V.M., Klimpel K.R., Copeland T.D., Ahn N.G., Oskarsson M.K., Fukasawa K., Paull K.D., Vande Woude G.F.: *Science* 280: 734 (1998)



Μοριακή Βάση της Επιλεκτικότητας της *cis* και *trans* Διαμόρφωσης του Αναστολέα Captopril από το Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτενσίνης I

Ανδρέας Γ. Τζάκος¹, Nawazish Naqvi², Κωνσταντίνος Κομπορόζος³, Roberta Pierattelli⁴, Βασιλική Θεοδώρου³, Ahsan Husain², Ιωάννης Π. Γεροθανάσης³

¹MRC, LMB, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, England; ²Centre for Heart Failure Research, University of Alabama, 901, Birmingham, USA; ³Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ελλάδα; ⁴Department of Chemistry and CERM, University of Florence, Via Sacconi 6, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

Η αναγνώριση και συνεπώς η δέσμευση του αναστολέα από το ένζυμο θεωρείται ως θεμελιώδης αρχή, όσον αφορά την ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Όμως, σε πολλές περιπτώσεις, ο μοριακός μηχανισμός αναγνώρισης δεν έχει διερευνηθεί πλήρως. Στην παρούσα έρευνα γίνεται προσπάθεια να διεκρινιστεί ο μηχανισμός μοριακής αναγνώρισης του αναστολέα captopril από το ανθρώπινο Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτενσίνης I (hACE) με τη χρήση των ακόλουθων συνδυαστικών προσεγγίσεων: (α) φασματοσκοπίας NMR σε διάλυμα, (β) μοριακών υπολογισμών πρόσδεσης (flexible docking calculations), (γ) μεταλλάξεων, και (δ) ενζυματικών μελετών. Διαπιστώθηκε ότι σε φυσιολογικά διαλύματα οι δύο διαμορφώσεις *cis* και *trans* του αναστολέα υφίστανται σε περίπου ισομοριακή αναλογία, όμως το ένζυμο επιλέγει μόνο την *trans* διαμόρφωση, που παρουσιάζει συμπληρωματικότητα ως προς την περιοχή πρόσδεσης με το υπόστρωμα. Η έρευνα χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα *Ηράκλειτος*

από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα για την εκπαίδευση και την αρχική επαγγελματική κατάρτιση του Ελληνικού Υπουργείου Παιδείας από το 3^ο Κοινοτικό Πλαίσιο στήριξης και το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο.

The Molecular Basis for the Selection of Captopril *cis* and *trans* Conformations by Angiotensin I Converting Enzyme

Andreas G. Tzakos¹, Nawazish Naqvi², Konstantinos Comporozos³, Roberta Pierattelli⁴, Vassiliki Theodorou³, Ahsan Husain², Ioannis P. Gerothanassis³

¹MRC, LMB, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, England; ²Centre for Heart Failure Research, University of Alabama, 901, Birmingham, USA; ³Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Ioannina, Ioannina, GR 45110, Greece; ⁴Department of Chemistry and CERM, University of Florence, Via Sacconi 6, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

Key words: Captopril, selection *cis* and *trans* conformations, angiotensin I converting enzyme, molecular basis

Enzyme-inhibitor recognition is considered one of the most fundamental aspects in the area of drug discovery. However, the molecular mechanism of this recognition process (induced fit or prebinding and adaptive selection among multiple conformers) in several cases remains unexplored. In order to shed light toward this step of the recognition process in the case of human angiotensin I converting enzyme (hACE) and its inhibitor captopril, we have established a novel combinatorial approach exploiting solution NMR, flexible docking calculations, mutagenesis, and enzymatic studies. We provide evidence that an equimolar ratio of the *cis* and *trans*

states of captopril exists in solution and that the enzyme selects only the *trans* state of the inhibitor that presents architectural and stereoelectronic complementarity with its substrate binding groove.

Acknowledgements. This research was funded by the program *Heraklitos* of the Operational Program for Education and Initial Vocational Training of the Hellenic Ministry of Education under the 3rd Community Support Framework and the European Social Fund.

Tzakos A.G., Naqvi N., Comporozos K., Pierattelli R., Theodorou V., Husain A. and Gerothanassis I.P.: The molecular basis for the selection of captopril *cis* and *trans* conformations by angiotensin I converting enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 5084-5087 (2006)



Νεώτερα Δεδομένα για το Ρόλο του Συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης-Αλδοστερόνης

Ελένη Τριανταφυλλίδη, Χαράλαμπος Γαβράς

Β΄ Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή Αθηνών, Νοσοκομείο Αττικών, Αθήνα, Ελλάδα και Hypertension and Atherosclerosis Section, Department of Medicine, Boston University, Boston USA

Η υπερδραστηριότητα του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, η οποία οδηγεί σε αρτηριακή υπέρταση και διαταραχή του μεταβολισμού του νατρίου, αποτελεί έναν από τους τροποποιήσιμους καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου. Η αγγειοτενσίνη (Ang) δρα ως κυκλοφορούσα ορμόνη αλλά και με τοπική παρακρινική δράση. Στις ανεπιθύμητες ενέργειες της Ang στην καρδιά περιλαμβάνονται η αυξημένη αντίσταση στη λειτουργία της καρδιάς ως μηχανική αντλία λόγω αύξησης του μεταφορτίου, αλλά και οι νευρο-ορμονικές επιδράσεις σε ποικίλες καρδιακές δομές. Η ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης οδηγεί σε ποικίλες καταστάσεις με σημαντικές αιμοδυναμικές συνέπειες, όπως το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, οι αρρυθμίες, η διαταραχή της ισορροπίας πήξης-ινωδόλυσης, το αυξημένο οξειδωτικό stress, αλλά και η ενεργοποίηση προφλεγμονωδών παραγόντων. Ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, τόσο η οξεία ισχαιμική βλάβη όσο και η χρόνια διαταραχή της ενεργειακής ισορροπίας στα πλαίσια της μηχανικής (αθηρωματική ή/και θρομβωτική) ή λειτουργικής (σπασμός) απόφραξης των αγγείων θα οδηγήσει σε σημαντική βλάβη του μυοκαρδίου.

New Developments Regarding Renin-Angiotensin-Aldosterone System

Helen Triantafyllidi, Harry Gavras

2nd Department of Cardiology, Medical School, University of Athens, Attikon Hospital, Athens, Greece and Hypertension and Atherosclerosis Section, Department of Medicine, Boston University, Boston USA

Key words: Renin-angiotensin-aldosterone system, new developments

A renin-angiotensin level that is inappropriately high for the systemic blood pressure and the state of sodium balance is now recognized to be one of the modifiable cardiovascular risk factors. Angiotensin acts both as a circulating hormone and as a locally acting para-crine/autocrine/intracrine factor. The adverse effects of angiotensin on the heart include the mechanical results of elevated resistance to the pumping function of the myocardium, as well as the effects of neurohumoral abnormalities on various cardiac structures. In addition, cardiac damage follows acute ischaemic injury or chronic energy starvation due to coronary artery disease, attributable to either mechanical obstruction (atherosclerotic and/or thrombotic) or functional stenosis (vasospasm). Activation of the renin-angiotensin system has several haemodynamic and humoral consequences, all of which may damage the myocardium. These include acute myocardial ischaemia, left-ventricular hyper-

trophy, arrhythmias, alterations in the coagulation-fibrinolysis equilibrium, increased oxidative stress, and pro-inflammatory activity. A brief review of some

of the mechanisms by which activation of the renin-angiotensin system can inflict damage on the heart is presented.



Εξελίξεις στη Μελέτη του Γενετικού Υποστρώματος της Διατακτικής Μυοκαρδιοπάθειας

Φ. Κολοκάθης, Δ. Κρεμαστινός

Αττικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, Αθήνα, Ελλάς

Η διατακτική μυοκαρδιοπάθεια θεωρείται γενετική νόσος και μία σειρά μεταλλάξεων έχει βρεθεί να συνδέονται με την παθογένειά της. Η φωσφολαμβάνη αποτελεί μυοκαρδιακή πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου και οι μεταλλάξεις L39 stop και R14del του γονιδίου της φωσφολαμβάνης βρέθηκαν πρόσφατα να ευθύνονται για την εκδήλωση δυο διαφορετικών φαινοτύπων διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας. Η μετάλλαξη L39 stop εντοπίστηκε σε 2 Έλληνες ασθενείς (1 ετεροζυγώτης και 1 ομοζυγώτης) με οικογενή διατακτική μυοκαρδιοπάθεια και η μετάλλαξη R14del εντοπίστηκε σε 1 άλλο Έλληνα ασθενή με οικογενή διατακτική μυοκαρδιοπάθεια. Δύο ακόμη μέλη του οικογενειακού δέντρου του L39 stop ετεροζυγώτης ασθενούς εμφάνιζαν τη νόσο. Οι 2 αυτοί ασθενείς βρέθηκαν επίσης ετεροζυγώτες για την L39 stop μετάλλαξη. Ένα ακόμη μέλος του οικογενειακού δέντρου του L39 stop ομοζυγώτη ασθενούς εμφάνιζε τη νόσο και βρέθηκε επίσης ομοζυγώτης για τη μετάλλαξη. Η μελέτη του οικογενειακού δέντρου του R14del ετεροζυγώτη ασθενούς έδειξε ότι 5 ακόμη μέλη εμφάνιζαν τη νόσο. Όλοι οι πάσχοντες βρέθηκαν επίσης ετεροζυγώτες για την R14del μετάλλαξη. Σε δύο από τους R14del ετεροζυγώτες ασθενείς είχε εμφυτευτεί απινιδωτής μετά από επεισόδια εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας και ένας ακόμη R14del ετεροζυγώτης ασθενής είχε εμφανίσει επεισόδιο μη εμμένουσας κοιλιακής ταχυκαρδίας. Κατά την ηχωκαρδιογραφική μελέτη βρέθηκε ότι οι R14del ετεροζυγώτες ασθενείς εμφάνιζαν μετρίου βαθμού διάταση (LVEDD: 55 ± 2 mm) και μετρίου βαθμού ελάττωση (LVEF: $42 \pm 10\%$) της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας. Αντίθετα οι ασθενείς με τη μετάλλαξη L39 stop εμφάνιζαν σοβαρού βαθμού διάταση (LVEDD: 65 ± 2 mm $p:0,01$) και σοβαρού βαθμού ελάττωση της συστολικής λειτουργίας (LVEF: $28 \pm 5\%$ $p:0,001$) της αριστερής κοιλίας, ενώ κανείς από αυτούς δεν είχε εμφανίσει επεισόδια κοιλιακής ταχυκαρδίας. Συμπερασματικά, η διατακτική μυοκαρδιοπάθεια σε ασθενείς με τη R14del μετάλλαξη χαρακτηρίζεται κυρίως από επεισόδια κοιλιακής ταχυκαρδίας, ενώ σε ασθενείς με τη L39 stop μετάλλαξη της

φωσφολαμβάνης χαρακτηρίζεται από σοβαρού βαθμού διάταση και σοβαρού βαθμού ελάττωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας χωρίς επεισόδια κοιλιακής ταχυκαρδίας. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν ότι οι φαινοτυπικές εκδηλώσεις διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας καθορίζονται από τον υπεύθυνο για τη νόσο γονότυπο.

Developments in Genetics of Dilated Cardiomyopathy

F. Kolokathis, D. Kremastinos

Attikon University Hospital, Athens, Greece

Key words: Dilated cardiomyopathy, genetic developments, phospholamban

Dilated cardiomyopathy is considered as a genetic disease and a number of mutations have been found to be involved in the disease pathogenesis. Phospholamban is a myocardial protein that regulates cardiac contractility and the L39 stop and R14del mutations of Phospholamban gene have been recently found to be causative for 2 different dilated cardiomyopathy's phenotypes. The L39 stop mutation was identified in 2 Greek patients (1 heterozygous and 1 homozygous) with familiar dilated cardiomyopathy and the R14del mutation was identified in 1 other Greek patient with also familiar dilated cardiomyopathy. Two other members of the L39 stop heterozygous patient's pedigree presented the disease. Both diseased members were found heterozygous for the L39 stop mutation. One other member of the L39 stop homozygous patient's pedigree presented the disease that was also found homozygous for the mutation. Pedigree analysis of the R14del heterozygous patient revealed that 5 other members presented the disease. All diseased members were found also heterozygous for the R14del mutation. Two R14del heterozygous patients had fitted an AICD after sustained ventricular tachycardia episodes and one other R14del heterozygous patient had presented non sustain ventricular tachycardia episodes during holter ECG. Echo study revealed that R14del heterozygous patients presented mild left ventricular dilatation (LVEDD: 55 ± 2 mm) and mild left ventricular systolic dysfunction (LVEF: $42 \pm 10\%$). On the contrary L39 stop mutation pa-

tients presented severe left ventricular dilatation (LVEDD: 65 ± 2 mm $p:0,01$) as also as severe left ventricular systolic dysfunction (LVEF: $28 \pm 5\%$ $p:0,001$) while none of them had presented Ventricular tachycardia episodes. In conclusion Phospholamban R14del dilated cardiomyopathy mainly characterized by ventricular arrhythmias while L39 stop

dilated cardiomyopathy that is characterized by severe left ventricular dilatation and systolic dysfunction without ventricular tachycardia episodes. These findings reveal that the dilated cardiomyopathy phenotype is determined by the causative genotype.



Μεταβολές στην Έκφραση της Καλρετικουλίνης κατά τη Νεφρική Ίνωση

Κ. Κυπρέου, Π. Καραμεσίνης, Μ. Περούλης, Α. Αλμπέρτη, Α. Χαρώνης

Κέντρα Βασικής Έρευνας και Πειραματικής Χειρουργικής, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Ίνωση ορίζεται η άθροιση εξωκυττάριας ουσίας, που οδηγεί σε δομικές και λειτουργικές αλλαγές σε πολλά όργανα. Η ίνωση μπορεί να είναι ειδική για το πάσχον όργανο και ειδική για το προκαλούν αίτιο. Κατά τη νεφρική ίνωση, παρατηρείται άθροιση εξωκυττάριας ουσίας και υπερκυττάρωση, όπου οι ινοβλάστες του συνδετικού ιστού είναι τα βασικά κύτταρα που συνδέονται με την παθολογία. Στην περίπτωση αυτή υπάρχουν ενδείξεις ότι προέρχονται εν μέρει από επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάβαση, διαδικασία κατά την οποία τα νεφρικά σωληναριακά κύτταρα χάνουν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο και αποκτούν χαρακτηριστικά μεσεγγυματικών κυττάρων. Είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε σε μοριακό επίπεδο τη διαδικασία της ανάπτυξης της νεφρικής ίνωσης, ώστε να μπορέσουμε να εντοπίσουμε νέους και πλέον ειδικούς στόχους φαρμακολογικής παρέμβασης. Χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο της μονόπλευρης ουρητηρικής απόφραξης, μοντέλο χρησιμοποιούμενο για τη μελέτη ανάπτυξης ίνωσης που οφείλεται σε αύξησης πίεσης. Αρουραίοι τύπου Wistar υπέστησαν απολίνωση του δεξιού ουρητήρα, ενώ σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ζώα όπου η επέμβαση έγινε χωρίς τη διενέργεια απόφραξης. Τα ζώα θυσιάστηκαν στις 0, 2 και 8 ημέρες μετά την επέμβαση. Η ανάπτυξη της ίνωσης αξιολογήθηκε στο φωτομικροσκόπιο με χρώση Sirius Red. Υλικό από το νεφρικό φλοιό χρησιμοποιήθηκε για πρωτεομική ανάλυση. Πηκτώματα δύο διατάσεων χρώστηκαν με Coomassie Brilliant Blue και κηλίδες που έδειχναν ποιοτικές/ποσοτικές διαφορές μελετήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με MALDI-TOF-TOF MS. Μεταξύ των πρωτεϊνών που έδειχναν σταθερά υπερέκφραση κατά την ινωτική διαδικασία, μελετήθηκε περαιτέρω η καλρετικουλίνη. Για να επιβεβαιωθεί η διαφορική έκφραση της καλρετικουλίνης, νεφρικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν με ανάλυση κατά Western. Ποσοτικοποίηση της έκφρασης έδειξε ότι η καλρετικουλίνη είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμη στα ζώα-μάρτυρες, ενώ υπερεκφράζεται μετά από 2 ημέ-

ρες ουρητηρικής απολίνωσης και η έκφραση της αυξάνει ακόμα περισσότερο μετά από 8 ημέρες ουρητηρικής απολίνωσης. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν μετά από ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Σε τομές από ζώα μάρτυρες υπήρχε χαμηλό επίπεδο έκφρασης της καλρετικουλίνης, ενώ σε τομές από ζώα μετά από απολίνωση 2 και 8 ημερών η έκφραση ήταν σαφώς αυξημένη, κυρίως στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα. Τα κύτταρα των νεφρικών σπειραμάτων δεν έδειξαν καμία μεταβολή στην έκφραση της καλρετικουλίνης. Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη αναφορά που συνδέει τα αρχικά στάδια της νεφρικής ίνωσης με την έκφραση της καλρετικουλίνης. Η καλρετικουλίνη, μία ασβεστίο-συνδεόμενη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 kD, αποτελεί σημαντικό παράγοντα του Ενδοπλασματικού Δικτύου. Έχει παρατηρηθεί ότι η καλρετικουλίνη σε αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα προάγει την αποδιάταξη των εστιακών συνδέσεων, μέσω αλληλεπιδράσεων με τη θρομβοσπονδίνη. Αυτή η ιδιότητα πιθανόν να παίζει ρόλο κατά τη διαδικασία της νεφρικής ίνωσης, όπου επιθηλιακά κύτταρα υφίστανται επιθηλιο-μεσεγγυματική μετάβαση. Επομένως η καλρετικουλίνη μπορεί να αποτελεί πιθανό σημαντικό παράγοντα στα πρώτα στάδια της ίνωσης.

Differential Expression of Calreticulin during Renal Fibrosis

K.P. Kypreou, P. Karamessinis, M. Peroulis, A. Alberti, A.S. Charonis

Centers of Basic Research and Experimental Surgery, Foundation for Biomedical Research of the Academy of Athens, Greece

Key words: Renal fibrosis, calreticulin, differential expression

Fibrosis is defined as the accumulation of extracellular matrix, leading to structural and functional alterations of several organs. Fibrosis may be organ-

specific and stimulus-specific. Renal fibrosis is characterized by the development of fibrotic lesions where accumulation of extracellular matrix is followed by hypercellularity, where interstitial fibroblasts are principal effector cells. There is strong evidence that interstitial fibroblasts come from epithelial mesenchymal transition, a process in which renal tubular cells lose their epithelial phenotype and acquire new characteristic features of mesenchymal cells. It is important to decipher in detail at the molecular level the process of renal fibrosis, in order to discover novel targets ideal for specific pharmaceutical intervention. We have used the model of Unilateral Ureteric Obstruction, a well established model for pressure-mediated renal fibrosis. Wistar rats were either sham-operated or ligated and were sacrificed at 0, 2 and 8 days after right ureteric ligation. The development of fibrosis was evaluated by light microscopy using Sirius Red staining. Cortical material was excised and used for proteomic analysis. 2D gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue. Gels were scanned, and spots that demonstrated quantitative and/or qualitative differences were detected, excised and destained. Following destaining the spots were trypsinised. Tryptic digests were extracted and identified with MALDI-TOF-TOF MS. Among the proteins that were consistently up-regulated during the development of fibrosis was calreticulin. In order to verify this differential expression of calreticulin, kidney extracts from all groups

were analyzed by western blot. Quantification of these results showed that calreticulin is practically undetectable by western blot in control and sham operated animals for both time intervals, whereas it is distinctly expressed 2 days after ligation; the expression at 8 days after ligation is even more pronounced. These results were further supported by immunohistochemical analysis; control sections exhibited a mild staining for calreticulin, whereas at 2 days and 8 days there was a distinct upregulation of the expression in most tubular epithelial cells. However, glomerular cells did not show any increase in calreticulin expression. This is the first report demonstrating a correlation between early stages of renal fibrosis and calreticulin. Calreticulin, a 60-kD Ca²⁺ binding protein, is a major component of the endoplasmic reticulum. It is interesting that, calreticulin has been found, in aortic endothelial cells, to promote focal adhesion disassembly through interactions with thrombospondin. This process might also play a role in renal tissues during the fibrotic process, where epithelial cells may undergo epithelial-mesenchymal transition. Although the precise mechanism is not known yet, calreticulin could be a candidate molecule that might be involved in alteration in adhesion of epithelial cells to basement membrane which may occur in the early stages of fibrosis.

(Supported by funds from IIBEA and GGET EPAN YB/18)



Έγχυση Δεσφεροξαμίνης (DF) Μειώνει την Παραγωγή IL-6 και το Οξειδωτικό Stress, Προστατεύοντας τα Πειραματόζωα με Οξεία Ηπατική Ισχαιμία από Πολυοργανική Ανεπάρκεια και SIRS

Δ. Βλαχάκος¹, Ν. Αρκαδόπουλος², Σ. Σιασάκου², Γ. Κωστοπαναγιώτου¹, Λ. Κακλαμάνης³, Β. Σμυρνιώτης²

¹Αττικόν Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο, ²Αρεταίειο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο και ^{**}Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο, Αθήνα, Ελλάς

Εισαγωγή: Έχουμε ήδη δείξει, πως η ηλικιακή ουσία DF χορηγούμενη περιεγχειρητικά σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη προστάτευσε το μυοκάρδιο και επιτάχυνε την ανάνηψή του μετά την εξωσωματική κυκλοφορία. Θελήσαμε να επεκτείνουμε αυτές τις παρατηρήσεις σε άλλες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως είναι η πολυοργανική ανεπάρκεια (ΠΑ) και η συστηματική φλεγμονώδης αντίδραση (ΣΦΑ), που συνοδεύει την οξεία ηπατική ισχαιμία και ανεπάρκεια. **Μέθοδος:** 14 χοίροι (20-25 kg) αναισθητοποιήθηκαν, διασωληνώθηκαν και μπήκαν σε μηχανικό αερισμό, όπου και διατηρήθηκαν για 24 ώρες. Οξεία ηπατική ισχαιμία και ανεπάρκεια προκλήθηκε με την περιίδεση του ηπατοδωδεκαδακτυλικού συνδέσμου και την τελικοπλάγια ανα-

στόμωση της πυλαίας με την κάτω κοίλη φλέβα. Μετά το χειρουργείο τα ζώα ενυδατώνονταν με κολοειδή και κρυσταλλικά διαλύματα (5 ml/kg/ώρα) και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: την ομάδα δεσφεροξαμίνης (Ομάδα DF, n=7), που έλαβε έγχυση 3 g DF σε φυσιολογικό ορό και την ομάδα ελέγχου (Ομάδα E, n=7), που έλαβε φυσιολογικό ορό. Μετεγχειρητικά ελέγχονταν αιμοδυναμικές, αιματολογικές και βιοχημικές παράμετροι, οι κυττοκίνες IL-6, IL-8, IL-1, IL-10, TNFα, καθώς και το MDA, που αποτελεί δείκτη του οξειδωτικού stress. Τα αποτελέσματα εκφάζονται σαν μέση τιμή ± SD. **Αποτελέσματα:** Ενώ αρχικά και οι δύο ομάδες εξελίσσονταν παράλληλα και όμοια, μετά τις 12-18 ώρες τα πειραματόζωα στην Ομάδα E εμφάνιζαν ευρήματα ΣΦΑ και ΠΑ, ενώ τα ζώα

στην Ομάδα DF ήταν σχετικά προστατευμένα. Συγκεκριμένα, στις 18 ώρες μετά το χειρουργείο η Ομάδα DF, σε σύγκριση με την Ομάδα E, είχε υψηλότερη μέση πίεση (98,0±15,9 vs 69,9±15,8 mmHg*, p<0,004), χαμηλότερη ενδοκράνια πίεση (18.1±8.6 vs 32.7±13.4 mmHg*, p<0,032), υψηλότερη πίεση διήθησης στον εγκέφαλο (76,4±16,4 vs 37,1±25,6 mmHg*, p<0,006), χαμηλότερα επίπεδα αμμωνίας (114±34 vs 715±218, p<0,01), μικρότερη λευκοκυττάρωση (17428±2423 vs 22320±1724, p<0,05) και λιγότερη θρομβοπενία (357571±54234 vs 237400±44793, p<0,05). Το MDA της Ομάδας DF αυξήθηκε λιγότερο από ό,τι στην Ομάδα E (16% vs 74%, p<0,05) και τα επίπεδα IL-6 παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα μόνο στην Ομάδα DF (στη 12η ώρα 33.23±29 vs 520±298 pg/ml*, p<0.003 και στην 24η ώρα 13.07±22.08 vs 464±374 pg/ml*, p<0,015). Οι άλλες κυττοκίνες δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των Ομάδων. Η βιοψία ήπατος έδειξε παρόμοια ολόκληρωτική νέκρωση και στις δύο Ομάδες, ενώ η βιοψία νεφρού έδειξε οξεία σωληναριακή νέκρωση στην Ομάδα E, αλλά τέλεια προστασία στην Ομάδα DF. Συμπέρασμα: Η έγχυση DF σε πειραματόζωα με οξεία ηπατική ισχαιμία, μειώνει την παραγωγή της προφλεγμονώδους κυττοκίνης IL-6, μειώνει το οξειδωτικό stress και προστατεύει τα ζώα από την ΣΦΑ και την ΠΑ, που κατά κανόνα συνοδεύουν την οξεία ηπατική ανεπάρκεια.

Deferoxamine Infusion Attenuates IL-6 Production and SIRS in a Swine Model of Multiorgan Failure after Acute Hepatic Ischemia

D. Vlahakos¹, N. Arkadopoulos², S. Siasiakou², G. Kostopanagiotou¹, L. Kaklamanis³, V. Smyrniotis²

¹Attikon University Hospital, ²Aretaieion University Hospital and ³Onassis Cardiac Surgery Center, Athens, Greece

Key words: Deferoxamine, infusion, cytokine IL-6, Production, Systemic Inflammatory Response Syndrome, swine model, multiorgan failure, acute hepatic ischemia

Introduction: In a previous study we have demonstrated enhanced myocardial protection and better post-ischemic recovery in patients undergoing CABG using a perioperative infusion of the iron chelator deferoxamine (DF). To expand this observation to other inflammatory processes we tested if DF infusion protects pigs from Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and multiorgan failure (MOF) after acute hepatic ischemia. **Methods:** 14 pigs (20-25 kg) were anesthetized, cannulated and mechanically ventilated. Acute liver failure (ALF) was introduced by complete ligation of the hepato-duodenal ligament and an end-to-side portacaval anastomosis. Postoperatively, animals were kept on continuous IV hydration (5 mL/kg/hr) and were randomized in two groups. The study group (Group DF, n=7) received infusion of 3 g DF in normal saline. The control group (Group C, n=7) received an infusion of normal saline. Postoperative monitoring included measurements of hemodynamic, hematological and biochemical parameters. Serum IL-6, IL-8, IL-1, IL-10, TNFα and malondialdehyde (MDA) were measured every 6 h. All animals were euthanized after 24 h and biopsies were taken from liver and kidney. Data are reported as mean ± SD. **Results:** At 18 hrs postoperatively, animals in Group DF had higher mean arterial pressure (98.0±15.9 vs. 69.9±15.8 mmHg*, p<0.004), lower intracranial pressure (18.1±8.6 vs. 32.7±13.4 mmHg*, p<0.032), higher cerebral perfusion pressure (76.4±16.4 vs. 37.1±25.6 mmHg*, p<0.006), lower ammonia levels (114±34 vs 715±218, p<0.01), lower WBC (17428±2423 vs 22320±1724, p<0.05) and higher PLT's count (357571±54234 vs 237400±44793, p<0.05) compared to controls. In Group DF serum malondialdehyde values increased less compared to controls (16% vs. 74%, p<0.05), while serum IL-6 values remained lower both at 12 (33.23±29 vs. 520±298 pg/ml*, p<0.003) and 24 hrs (13.07±22.08 vs. 464±374 pg/ml*, p<0.015). Other cytokines did not differ significantly between the groups. Liver biopsies showed complete hepatic necrosis in both groups. Kidney biopsies showed acute tubular necrosis in Group C, but complete protection in Group DF. **Conclusion:** DF infusion ameliorates IL-6 and oxygen free radical production and protects pigs with acute hepatic ischemia from SIRS and MOF.



Πυρηνικός Υποδοχέας της Θυρεοειδικής Ορμόνης A1: Νέος Φαρμακολογικός Στόχος για Καρδιοπροστασία και Έλεγχο του Σωματικού Βάρους

Κ. Πάντος, Ι. Μουρούζης, Χ. Ξυναρής, Α. Κόκκινος, Δ.Β. Κόκκινος

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Αθηνών και 1^η Καρδιολογική Κλινική, Ωνάσειο Καρδιοχειρουργικό Κέντρο, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Διαφορετικές λειτουργίες των υποδοχέων της θυρεοειδικής ορμόνης α (TRα) και β (TRβ) έχουν

αναγνωριστεί τελευταία και αποδίδονται είτε σε διαφορική ιστική εντόπιση ή σε πραγματικές λει-

τουργικές διαφορές των δύο ισομορφών. Οι TRs συνδέονται με τη μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων και μεσολαβούν διαφορετικές φυσιολογικές λειτουργίες. Διερευνήσαμε τις πιθανές φυσιολογικές συνέπειες της εκλεκτικής αναστολής του $\alpha 1$ υποδοχέα της θυρεοειδικής ορμόνης στο καρδιαγγειακό και το μεταβολισμό με στόχο την ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών στόχων για τις καρδιακές παθήσεις. *Δρονεδρόνη*, ένα παράγωγο της αμιοδαρόνης με ιδιότητες εκλεκτικού ανταγωνιστή του TR $\alpha 1$ (90 mg/kg, μια φορά την ημέρα) χορηγήθηκε για 2 εβδομάδες σε επίμυες Wistar (DRON), ενώ επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε 0,6% μεθυλοσελλουλόζη χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (CONT). Υποθυρεοειδισμός (HYPO) προκλήθηκε με χορήγηση προπυλθειουρακίλης (0,05%). Απομονωθείσες καρδιές των ομάδων DRON και CONT διαποτίστηκαν κατά Langendorff και υποβλήθηκαν σε 20 min ολική ισχαιμία μηδενικής ροής (I) και 45 min επαναϊμάτωση (R). Τα επίπεδα της T₃ ήταν παρόμοια στις ομάδες CONT και DRON. Η α -μυοσίνη βαρείας αλυσου (α -MHC) μειώθηκε στη DRON ομάδα, $p < 0,05$ ενώ η β -μυοσίνη βαρείας αλυσου (β -MHC) και η Ca²⁺-ATPase (SERCA) ήταν παρόμοιες με την CONT ομάδα. Στην HYPO ομάδα, η α -MHC και η SERCA μειώθηκαν ενώ η β -MHC αυξήθηκε, $p < 0,05$. Στην ομάδα DRON η καρδιακή συχνότητα, η μεθισχαιμική τελοδιαστολική πίεση της αριστεράς κοιλίας και η απελευθέρωση LDH ήταν σημαντικά μειωμένες. Η ισχαιμική σύσπαση ήταν ανεσταλμένη, ενώ η βασική συσταλτικότητα παρουσίασε μικρή μείωση. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η αναστολή του TR $\alpha 1$ υποδοχέα οδηγεί σε καρδιοπροστασία προκαλώντας εκλεκτικό ιστικό υποθυρεοειδισμό, χωρίς σημαντική αρνητική ινότροπη δράση. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές τόσο στην πρόσληψη φαγητού όσο και σωματικού βάρους. Και οι δύο αυτοί παράμετροι μειώθηκαν σημαντικά με την αναστολή του TR $\alpha 1$, ενώ η χορήγηση δρονεδρόνης μαζί με θυροξίνη ανέστειλε την αύξηση της όρεξης και της καρδιακής συχνότητας που προκαλεί η τελευταία. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την εκσεσημασμένη μείωση του σωματικού βάρους. *Συμπερασματικά*, η σηματοδοτική οδός της θυρεοειδικής ορμόνης μπορεί να ρυθμιστεί εκλεκτικά στο επίπεδο των θυρεοειδικών υποδοχών με σημαντικές φυσιολογικές και θεραπευτικές προεκτάσεις. Θυρεοειδικά ανάλογα έχουν δημιουργηθεί και κλινικές μελέτες βρίσκονται ήδη σε εξέλιξη.

Thyroid Hormone Receptor A1: A New Pharmacological Target for Cardioprotection and Body Weight Control

C. Pantos, I. Mourouzis, Ch. Xinaris, A. Kokkinos, D.V. Cokkinos

Dept of Pharmacology, Mediacal School of Athens, and Onassis Cardiac Surgery Center

Key words: Thyroid hormone receptor α , cardioprotection, body weight control, Dronedarone, Wistar rats

A differential function for thyroid hormone receptor α (TR α) and β (TR β) is now recognized and depends on isoform tissue localization or on true isoform functional differences. TRs couple to the transcription of different genes and ultimately mediate different physiological functions. We have recently investigated whether pharmacological blockade of the receptor $\alpha 1$ (TR $\alpha 1$) has possible physiological consequences on the cardiovascular system and metabolism in the hope of developing new pharmacological treatments for heart diseases. Dronedarone, an amiodarone-like compound which has been shown to preferentially antagonize thyroid hormone binding to thyroid hormone receptor $\alpha 1$ (TR $\alpha 1$), was given in Wistar rats (90 mg/kg, once daily (od) for 2 weeks) (DRON), while untreated animals served as controls (CONT). Hypothyroidism (HYPO) was induced by propylthiouracil administration. Isolated rat hearts were perfused in Langendorff mode and subjected to 20 minutes of zero-flow global ischemia (I) followed by 45 minutes of reperfusion (R). 3,5,3-triiodothyronine in plasma remained unchanged. α -myosin heavy chain (α -MHC) decreased in DRON while β -myosin heavy chain (β -MHC) and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase (ATPase) expression (SERCA) was similar to CONT. In HYPO, α -MHC and SERCA were decreased while β -MHC was increased. Myocardial glycogen content was increased in both DRON and HYPO. In DRON, resting heart rate, postischemic left ventricular enddiastolic pressure and lactate dehydrogenase release (IU/L min) after I/R were reduced and ischemic contracture was significantly suppressed, while baseline contractility was slightly affected. These data indicate that TR $\alpha 1$ blockade leads to selective hypothyroidism and protects the heart from ischemic injury without significant negative inotropic effects as this observed in hypothyroidism. Furthermore, important changes in food intake and body weight gain were observed. They were both found to be significantly decreased after TR $\alpha 1$ blockade, while coadministration of dronedarone and thyroid hormone prevented the increase in food intake and heart rate caused by thyroid hormone alone. This resulted in a marked reduction in body weight. Thus, thyroid hormone signalling can be selectively manipulated with important physiological and therapeutic consequences. Thyroid analogs have now been developed and clinical trials are underway.

Metallomacrocycles as Photosensitizers for Photodynamic Therapy (PDT) Medicinal Purposes

A.G. Coutsolelos¹, P.N. Trohopoulos M.D.²

¹Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Chemistry Department, University of Crete, PO Box 2208, Voutes Campus, 71003 Heraklion, Crete, Greece, email:coutsole@chemistry.uoc.gr;

²Cardiologist, 77 Tsimiski str., 54622 Thessaloniki, Greece, E-mail: trohopoulos@yahoo.com

Key words: Photodynamic therapy, metallomacrocycles, photosensitizers

Οι χημικοί παράγοντες που μπορούν να βελτιώσουν ή να ενδυναμώσουν την αποτελεσματικότητα των διαφόρων θεραπειών αποτελούν σημαντικό τομέα ενδιαφέροντος τόσο για τους ιατρικούς χημικούς όσο και για τους ιατρούς (1). Τέτοιοι παράγοντες όχι μόνο μπορούν να καταστήσουν τις υπάρχουσες μορφές θεραπείας αποτελεσματικότερες και τις διάφορες πειραματικές θεραπείες βιώσιμες, αλλά μπορούν επίσης, υπό γενικευμένη έννοια, να παρέχουν τις πληροφορίες για τον τρόπο δράσης των διάφορων θεραπειών των οποίων χημική ή βιολογική βάση δράσης παραμένει ανεπαρκώς κατανοητή. Σε αυτά τα σχόλια, η κλάση των μεταλομακροκυκλικών, φαινομενικά ισχυρών παραγόντων, συζητείται (2-5). Αυτά τα συστήματα, τώρα σε προχωρημένα στάδια κλινικών δοκιμών σε διάφορες ασθένειες, υπόσχονται τη βελτίωση της ακτινοθεραπείας του καρκίνου, ενώ επιτρέπουν, ή ακόμα και ενισχύουν, τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου, της αθηροσκλήρωσης, των ασθενειών του αμφιβληστροειδή και αλλού.

Chemical agents that can improve or potentiate the efficacy of various therapies constitute an important area of interest to medicinal chemists and medical doctors alike (1). Such agents not only can make existing treatment modalities more effective and render various experimental therapies viable, they can also, in a more generalized sense, provide in-

sights into the mode of action of various treatments whose chemical or biological basis for action remains poorly understood. In this commentary, the class of metallomacrocycles of seemingly powerful agents is discussed (2-5). These systems, now in advanced stages of clinical testing in various diseases, show promise in making radiation-based cancer therapy more effective, while enabling, or even enhancing, photodynamic treatment methods of cancer, atherosclerosis, retinal diseases and elsewhere.

REFERENCES

1. Mody T.D., Sessler J.L.: Porphyrin- and expanded porphyrin-based diagnostic and therapeutic agents. In: *Supramolecular Technology* (Reinholdt D. ed.). Pp. 245-299, Wiley, Chichester, 1999
2. Sessler J.L., Hemmi G., Mody T.D., Murai T., Burrell A., Young S.W.: Texaphyrins: Synthesis and applications. *Acc. Chem. Res.* 27: 43-50 (1994)
3. Young S.W., Qing F., Harriman A., Sessler J.L., Dow W.C., Mody T.D., Hemmi G.W., Hao Y., Miller R.A.: Gadolinium(III) texaphyrin: A tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6610-6615 (1996)
4. Young S.W., Woodburn K.W., Wright M., Mody T.D., Fan Q., Sessler J.L., Dow W.C., Miller R.A.: Lutetium texaphyrin (PCI-0123): A near-infrared water-soluble photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* 63: 892-897 (1996)
5. Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J.: Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy, *J. Med. Chem.* 47(16): (2004)



Gene Expression Profiling of CNS diseases in Mouse Models for Gene Expression Profiling of CNS Diseases in Mouse Models for Discovery of Pathogenic Pathways and Tissue Defence Responses

Vivian Tseveleki¹, Renee Rubio², Adriana Ahumada², Era Taoufik¹, Nikos Simos¹, John Quackenbush² and Lesley Probert¹

¹Laboratory of Molecular Genetics, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece; ²Laboratory of Computational Biology and Functional Genomics, Dana-Farber Cancer Institute and Harvard School of Public Health, Boston, USA

Key words: Gene expression, CNS diseases, mouse models, pathogenic pathways, tissue defence

With the objective of linking molecular profiles to biology, and specifically to identify pathways in-

involved in disease pathogenesis, tissue defence and repair during the development of neuroin-

flammation and neurodegeneration diseases in the CNS, our aim is to apply bioinformatics tools to organize gene expression data from different mouse disease models and to identify genes specific for individual diseases as well as commonly expressed genes that are likely to be involved in brain defence and repair. Four different mouse models of neuroinflammation and neurodegeneration were used (MOG₃₅₋₅₅ induced EAE for MS, Tg6074 TNF transgenics for MS, TgAPP23 transgenics for Alzheimer's disease, and wild-type control mice, all on the C57BL/6 genetic background. A 27K element cDNA microarray re-

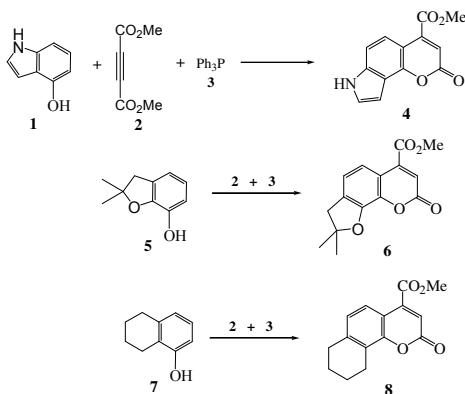
presenting a significant fraction of the genes encoded in the mouse genome was used to analyse gene expression at different time-points across the progression of each disease. Functional annotation and categorization of the genes that are differentially expressed in each disease compared to normal tissue was performed as well as 2-way, 3-way and 4-way comparisons between diseases to reveal overlapping as well as uniquely expressed genes. We aim to use this data to define the mechanisms of disease pathogenesis and to identify novel therapeutic targets and to proceed with *in vivo* testing their efficacy in halting disease progression.



Σύνθεση [7,8]Συμπυκνωμένων Κουμαρινικών Παραγώγων και Μελέτη της Βιολογικής τους Δράσης

A. Βροντελή¹, Κ.Ε. Λίτινας¹, Θ. Συμεωνίδης¹, Κ.Κ. Φυλακτακίδου² και Δ.Ι. Χατζηπαύλου-Λίτινα³

¹Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, ²Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γεννητικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Αλεξανδρούπολη 68100, Ελλάδα, ³Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα



Στα πλαίσια του ενδιαφέροντος μας για τη σύνθεση συμπυκνωμένων κουμαρινικών παραγώγων και τη μελέτη αντιφλεγμονώδους και αντι-οξειδωτικής τους δράσης, μελετήθηκαν αντιδράσεις των 4-υδροξυινδολίου (1), 2,3-διυδρο-2,2-διμεθυλ-7-βενζοφουρανόλης (5) και 5,6,7,8-тетра-υδρο-1-ναφθόλης (7) με DMAD (2) παρουσία Ph_3P (3), που οδήγησαν στη σύνθεση των κουμαρινικών παραγώγων 4, 6 και 8 αντίστοιχα. Επίσης παρασκευάστηκαν παράγωγά τους υποκατεστημένα στον βενζολικό δακτύλιο. Οι νέες ενώσεις δοκιμάστηκαν για την *in vitro* ικανότητά τους i) να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλο-πικρυδραζυλίου (DPPH), ii) να αναστέλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, iii) να

δεσμεύουν το υπεροξειδικό ανιόν, iv) να αναστέλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης και v) για την *in vivo* ικανότητά τους να αναστέλουν το οίδημα του άκρου ποδός επίμυα, που επάγεται από ενδοδερμική χορήγηση καρραγενίνης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ: Είμαστε ευγνώμονες για τη χρηματοδότηση της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας από το πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II στα πλαίσια του ΕΠΕΑΕΚ II.

Synthesis and Biological Evaluation of [7,8]-Fused Coumarin Derivatives

A. Vronteli¹, K. E. Litinas¹, Th. Symeonides¹, K. K. Fylaktakidou² and D. J. Hadjipavliou-Litina³

¹Laboratory of Organic Chemistry, Chemistry Department, Aristotle University, Thessaloniki 54124, Greece, e-mail: klitinas@chem.auth.gr; ²Molecular Biology and Genetics Department, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, 68100, Greece; ³Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: Fused coumarin derivatives, synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activities

As a part of our interest concerning the synthesis of fused coumarin derivatives and the study of their anti-inflammatory and antioxidant activities we studied reactions of 4-hydroxyindole (1), 2,3-dihydro-

2,2-dimethyl-7-benzofuranol (5) and 5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthol (7) with DMAD (2) in the presence of Ph_3P (3). From these reactions we received the coumarin derivatives 4, 6 and 8. It has been also prepared derivatives of 4, 6 and 8 substituted in the benzene ring. The new compounds were tested *in*

vitro for their ability: i) to interact with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) stable free radical, ii) to inhibit lipid peroxidation, iii) to scavenge the superoxide anion, iv) to inhibit the activity of soybean lipoxygenase and v) to inhibit *in vivo* the carragenin induced rat paw edema.



Ερευνητικό – Πειραματικό Τμήμα ELPEN Φαρμακευτικής Βιομηχανίας: Παρουσίαση Δραστηριοτήτων και Στατιστικών από τον Μάιο του 1996 έως τον Δεκέμβριο του 2006

Απόστολος Ε. Παπαλόης

Διευθυντής, Ερευνητικού – Πειραματικού Τμήματος ELPEN A.E., Αναπληρωτής Καθηγητής (407/80) Τμήματος Επιστήμης των Υλικών, Πανεπιστημίου Πατρών

Το Ερευνητικό - Πειραματικό Τμήμα της ELPEN ιδρύθηκε τον Μάιο του 1996. Ως Τμήμα έχει αναπτύξει ποικίλες δραστηριότητες ερευνητικού και εκπαιδευτικού χαρακτήρα. Διαθέτει εγκαταστάσεις και εξοπλισμό για την πραγματοποίηση βιοιατρικής και προ-κλινικής φαρμακευτικής έρευνας καθώς και για την υλοποίηση εκπαιδευτικών προγραμμάτων. **Δραστηριότητες:** (α) Επιστημονική – ερευνητική συνεργασία με Κλινικές των Ιατρικών Σχολών των Ελληνικών Πανεπιστημιακών Ιδρυμάτων, καθώς και με Κλινικές του Εθνικού Συστήματος Υγείας, αλλά και του ιδιωτικού τομέα. (β) Οργάνωση και υλοποίηση εκπαιδευτικών προγραμμάτων για ειδικευόμενους και ειδικευμένους ιατρούς. (γ) Υλοποίηση πειραματικού μέρους προγραμμάτων στα οποία συμμετέχει η ELPEN και που προέρχονται από επιχορηγήσεις της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (δ) Προκλινικές (*in vivo*) πειραματικές δοκιμές νέων μορίων όπου η Εταιρεία έχει τα αποκλειστικά δικαιώματα χρήσεώς τους (πατέντες). (ε) Επιστημονική και αναλυτική ενημέρωση Κλινικών, ιατρών και άλλων επιστημόνων, όπως και Φορέων, για το εργοστάσιο της Εταιρείας και τους κανόνες λειτουργίας του. **Στατιστικά:** Από τον Μάιο του 1996 έως και τον Δεκέμβριο του 2006, έχουν πραγματοποιηθεί >10.000 πειράματα. Αναλυτικά: (α) πειράματα με τη χρήση χοίρων ως ζωικών προτύπων ~19%, (β) πειράματα με τη χρήση κόνικλων ως ζωικών προτύπων ~39%, (γ) πειράματα με τη χρήση αρουραίων ως ζωικών προτύπων ~42%. **Αποτελέσματα:** Τα πειράματα αυτά αφορούσαν στην υλοποίηση περισσότερων των 100 πρωτοκόλλων τα οποία με τη σειρά τους ήταν ερευνητικά προγράμματα ή υπό εκπόνηση διδακτορικές διατριβές. Τα εκπαιδευτικά μας προγράμματα (Advanced Pediatric Life Support, τα διεθνή Σεμινάρια Λαπαροσκοπικής Χειρουργικής με το Πανεπιστήμιο Αθηνών και την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Λα-

παροσκοπικής Χειρουργικής, το Ουρολογικό, το Γυναικολογικό, το Πλαστικής Χειρουργικής κ.ά.) κατέχουν το 25% των πειραμάτων με χρήση χοίρων ως ζωικών προτύπων. Οι κόνικλοι και οι αρουραίοι χρησιμοποιήθηκαν για τα βασικά και τα προχωρημένα σεμινάρια Μικροχειρουργικής. Από το 1996 έχουν εκπονηθεί περισσότερες από 90 διδακτορικές διατριβές και 9 Masters. Το Τμήμα έχει τιμηθεί με 35 βραβεία σε ελληνικά και διεθνή συνέδρια. Επίσης, το 2005 έλαβε το Βραβείο Έρευνας και Τεχνολογικής Ανάπτυξης του Εμπορικού και Βιομηχανικού Επιμελητηρίου Αθηνών, το οποίο για πρώτη φορά απονεμήθηκε σε Ερευνητικό Τμήμα φαρμακευτικής Εταιρείας στην Ελλάδα. Το Ερευνητικό - Πειραματικό Τμήμα είναι μέλος του International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Από τον Ιανουάριο του 2007, το Τμήμα βρίσκεται στις νέες του εγκαταστάσεις 1.000 τ.μ. με πολλά νέα εργαστήρια και δυνατότητες. Το Ερευνητικό – Πειραματικό Τμήμα της ELPEN αποτελεί ένα επιτυχές πρότυπο ερευνητικής και εκπαιδευτικής δραστηριότητας στον ιδιωτικό τομέα και ειδικότερα στην παραγωγική βιομηχανία. Η εργασία μας στηρίζεται στα ευρωπαϊκά πρότυπα και στις αντίστοιχες θεσμοθετημένες αρχές και κανόνες λειτουργίας.

Experimental - Research Department *ELPEN Pharmaceuticals*. Presentation of Activities and Statistics from May 1996 to December 2006

Apostolos E. Papalouis

Experimental-Research Department ELPEN Pharmaceuticals; Associate Professor (407/80) Department of Materials Science, University of Patras

Key words: *Elpen Pharmaceuticals, research, activities, statistics, results*

The Experimental – Research Department of Elpen Pharmaceuticals was established in 1996. It has developed a great progress and activities since 1996 with lab facilities and equipment for biomedical and

pharmaceutical research as well as for training projects with other Institutions. *Activities:* (i) Scientific cooperations with Clinics of Hellenic Universities and National Health System, (ii) training for skilled and trainee doctors, (iii) Experimental performances of programs concerning Elpen S.A. projects' with the General Secretariat of Research and Technology and the European Union; (iv) Preclinical (*in vivo*) experimental research on new molecules where Elpen also keeps exclusive rights; (v) Scientific information about Clinics, doctors and other scientists concerning the proper industrial operations of Elpen S.A. *Statistics – Results:* From May 1996 to December 2006, there has been accomplished >10.000 experiments. The analytical scale of these experiments is the following below: (i) experiments with the use of pigs as animal model keep ~19%; (ii) experiments with the use of rabbits as animal model keep ~39%; (iii) experiments with the use of rats as animal model keep ~42%. *Results:* The results constitute a significant part of more than 100 protocols which has to do with research projects, scientific programs and

elaboration of PhD Thesis. The training workshops (Advanced Pediatric Life Support, Laparoscopic Surgery with the University of Athens and the European Association of Endoscopic Surgery, Urology, Gynecology and other medical specialties) keep ~25% of the total amount of pigs that have been used. Rabbits and rats were used for the Basic and Advanced Seminars of Microsurgery. Since 1996, more than 90 PhD Thesis and Master Degrees have been carried out or are still to be proceeded. Furthermore, the Lab of Elpen S.A. has been awarded with 35 prizes in Hellenic and International Scientific Congresses as well as from the Athens Chamber of Commerce and Industry. The Department is member of ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science). The Experimental – Research Department of the Elpen S.A. is a successful model of private industry with high participation in scientific projects. This eligible job model is based on the European Union's Principles and Regulations for scientific research and training.



Ανοσολογικές Αποκρίσεις Πεπτιδικών Αναλόγων του Επιτόπου της Βασικής Πρωτεΐνης της Μυελίνης Μbp₈₃₋₉₉ (Γραμμικά και Κυκλικά) σε SJL/J Ποντίκια

Μαρία Κατσάρα^{1,2}, Γεώργιος Δεράσος², Θεόδωρος Τσέλιος², Ιωάννης Ματσούκας² και Βάσω Αποστολοπούλου²

¹Burnet Institute at Austin, Immunology and Vaccine Laboratory, Studley Road, Heidelberg, VIC, 3084, Australia. ²Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάς

Η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ), είναι χρόνια ασθένεια του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, που χαρακτηρίζεται από τοπικά διηθήματα μακροφάγων και Τ κυττάρων, απομυελινοποίηση και απώλεια της νευρολογικής λειτουργίας. Έχει επικρατήσει η αντίληψη ότι πρόκειται για αυτοάνοση ασθένεια, που πυροδοτείται από CD4+ Τ λεμφοκύτταρα αντιγονοειδικά για το ΚΝΣ. Υποψήφια αυτοαντιγόνα περιλαμβάνουν συστατικά της Μυελίνης (Myelin Basic Protein, MBP) και η Πρωτεολιπιδική Πρωτεΐνη (Proteolipid Protein, PLP). Σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις της ΣΚΠ περιλαμβάνουν το σχεδιασμό και τη χρήση πεπτιδικών αναλόγων που σχετίζονται με την ασθένεια, ώστε να χρησιμοποιηθούν τελικά ως ανοσορρυθμιστικά φάρμακα. Στην παρούσα μελέτη, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν πεπτιδικά ανάλογα του Επιτόπου της Βασικής Πρωτεΐνης της Μυελίνης, MBP₈₃₋₉₉ με αλλαγές σε θέσεις κλειδιά, με σκοπό να επιτευχθεί καλύτερη σύνδεση με το τριμοριακό σύμπλοκο. Τα ανάλογα αυτά i) αναμείχθηκαν με Complete Freund's Adjuvant (CFA) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) και τα ποντίκια ενέθηκαν μια φορά ii) τα πεπτιδικά

ανάλογα συζεύχθηκαν με ανηγμένη μαννάνη μέσω KLH linker και τα ποντίκια ενέθηκαν δύο φορές (ημέρες 0, 14). Θηλυκά SJL/J ποντίκια ενέθηκαν υποδόρια στη βάση της ουράς. Την 28^η ημέρα τα ποντίκια θανατώθηκαν και Τ λεμφοκύτταρα απομονώθηκαν από τα σπληνοκύτταρα, με σκοπό να εξεταστεί η παραγωγή κυτταροκινών (Th1/Th2). Η έκκριση IFN-γ και IL-4 μετρήθηκε με ELISpot πείραμα και η παραγωγή αντισωμάτων με ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφνητική μέθοδο, ELISA. Παρατηρήσαμε ότι η χρήση CFA για ανοσοποίηση παράγει χαμηλά επίπεδα IFN-γ και IL-4, σε αντίθεση η χρήση πεπτιδικών αναλόγων (altered peptide ligands) συζεύχμενα με ανηγμένη μαννάνη παράγουν υψηλά επίπεδα IL-4 και καθόλου IFN-γ. Επίσης, η παραγωγή αντισωμάτων (IgG total, IgG1, Ig2a και IgM) έναντι των όλων των πεπτιδικών αναλόγων μελετήθηκε. Όλα τα ανάλογα εξετάζονται στο πειραματικό μοντέλο ΕΑΕ και σε πειράματα ανταγωνισμού *in vivo* και *in vitro*.

Immune Responses to Rational Altered Peptide Ligands of Myelin Basic Protein (Linear and Cyclic) in SJL/J Mice

Maria Katsara¹, George Deraos², John Matsoukas² and Vasso Apostolopoulos^{1*}

¹Burnet Institute at Austin, Immunology and Vaccine Laboratory, Studley Road, Heidelberg, VIC, 3084, Australia; ²Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry, Biochemistry, and Natural Products, University of Patras, 26500 Patra, Greece

Key words: Multiple Sclerosis, myelin basic protein, altered peptide ligands, SJL/J mice

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic disabling inflammatory-demyelinating disease of the central nervous system. It is believed that MS is mediated by CD4+ T cells of Th1 subset. Myelin Basic Protein (MBP), Proteolipid Protein and Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, have been demonstrated to be encephalito-genic in humans and rodents. Modern approaches toward the therapeutic management of MS involve the design and use of peptide analogues of disease-associated myelin

epitopes to induce peripheral T-cell tolerance. We designed and synthesized a number of altered peptide ligands by mutating principal TCR contact residues based on MBP₈₃₋₉₉ epitope. Peptides were either, (i) emulsified in equal volume of Complete Freund's Adjuvant (CFA) and PBS and injected once or (ii) conjugated to reduced mannan via a KLH linker and injected twice on days 0 and 14; all mice were injected intradermally (i.d) at the base of tail. T cells were isolated from spleen and examined for their cytokine production profile (Th1/Th2). IFN-γ and IL-4 were measured using a capture ELISpot method and antibody responses were measured by ELISA. We noted that the use of CFA for immunization induced low levels of IFN-γ and IL-4 when the altered peptide ligands were used. In contrast, high levels of IL-4 were secreted by T cells when mice were immunized with reduced mannan-KLH conjugated to antagonist peptides. Antibody responses to agonist, altered peptide ligands, linear and cyclic peptides and whole protein have also been determined. We are currently determining the effectiveness of the peptides in EAE models and in antagonism experiments, all of which will be discussed.



Μελέτη της Αλληλεπίδρασης Πρωτεϊνών με Χρήση Φασματοσκοπίας ¹³C-NMR

Ivano Bertini¹, Isabella C. Felli¹, Leonardo Gonnelli¹, Roberta Pierattelli¹, Ζηνοβία Σπυράντη², Γεώργιος Α. Σπυρούλιας²

¹CERM and Department of Chemistry, University of Florence, Sesto Fiorentino (FI), Italy.

²Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα. e-mail: G.A.Spyroulias@upatras.gr

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών αποτελούν τη βάση πολλών βιολογικών διεργασιών. Ο μηχανισμός της μοριακής αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης των μακρομορίων μπορεί να μελετηθεί μόνο μέσω της παρασφήνισης των τρισδιάστατων δομών των σχηματιζόμενων συμπλόκων και η φασματοσκοπία NMR είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τον καθορισμό της δομής σε διάλυμα. Ο χαλκός, όπως όλα τα μεταλλικά ιόντα, χρειάζεται τις μεταλλοεξαρτώμενες συνοδούς πρωτεΐνες στο μονοπάτι μεταφοράς του στο κυτταρόπλασμα. Στο ζυμομήκυτα *Saccharomyces cerevisiae*, η πρωτεΐνη Atx1 παραδίδει το Cu(I) στη διαλυτή περιοχή της, ATPάσης, Ccc2. Η δομή του συμπλόκου Atx1:Ccc2 με δύο ισοδύναμα Cu προσδιορίστηκε σε διάλυμα και προσδιορίστηκε το μοντέλο της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών. Ένα καινούργιο σύνολο πειραμάτων συσχέτισης πυρήνων άνθρακα (¹³C), όπως C_α, C_β, CO, N, καθώς και των πυρήνων άνθρακα των πλευρικών αλυσίδων εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της δομής των απο-πρωτεϊνών και του πρωτεϊνικού συμπλόκου με και χωρίς μέταλλο. Το

σύνολο των πληροφοριών που προκύπτουν, αποδεικνύουν την ικανότητα των ετεροπυρηνικών *direct-detected* πειραμάτων στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών και της κατανόησης μεταφοράς του χαλκού.

Protonless NMR for the Study of Protein-Protein Interaction

Ivano Bertini¹, Isabella C. Felli¹, Leonardo Gonnelli¹, Roberta Pierattelli¹, Zinovia Spyraniti², Georgios A. Spyroulias²

¹CERM and Department of Chemistry, University of Florence, Sesto Fiorentino (FI), Italy; ²Department of Pharmacy, University of Patras, Pa-tra, Greece. e-mail: G.A.Spyroulias@upatras.gr

Key words: Protonless NMR, Protein-Protein Interaction

Interactions between proteins are at the basis of many biological processes. The mechanisms of molecular recognition and interaction of macromolecules can only be studied through the elucidation of the three dimensional structure of the formed com-

plexes and NMR spectroscopy is a powerful tool to determine it in solution. Copper, like other metal ions, needs the so-called metallochaperones in its pathways within the cytoplasm. In *Saccharomyces cerevisiae* the copper chaperone Atx1 delivers Cu(I) to the soluble copper domains of Ccc2, an ATPase. Solution structures of the native Cu(I)-bound and the reduced apo-forms of both yeast Atx1 and the first soluble domain of Ccc2 have been solved and models of their interaction have been refined. We

have applied the novel set of experiments that we have developed for correlating N, CO, C α , C β carbon nuclei (^{13}C), as well as new *protonless* sequences specifically designed to assign side-chains nuclei, on the Atx1-Ccc2 complex with and without copper(I). The ensemble of information obtained demonstrates the capability of heteronuclear direct-detected experiments in unrevealing details of the interaction between proteins and metal ion uptake.



Σύνθεση Επιλεγμένων Τμημάτων σε Στερεά Φάση της pro-GHRELIN

I. Βουλδής και K. Μπάρλος

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάδα

Η Ghrelin (Γκρελίνη) είναι μία πεπτιδικής φύσεως ορμόνη η οποία παράγεται κυρίως από τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου. Δρα ως διεγέρτης στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης, καθώς και ως ορεξιογόνο σήμα, συμβάλλοντας στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της αποτελεί η οκτανούλιωση της σερίνης στη θέση τρία της αλληλουχίας της. Το ερευνητικό μας ενδιαφέρον εστιάζεται στη χημική σύνθεση ολόκληρης της pro-Ghrelin. Απαρτίζεται από μία αλυσίδα μήκους 94 αμινοξέων την οποία χωρίσαμε σε επτά επιμέρους τμήματα τα οποία συντέθηκαν σε στερεά φάση με την Fmoc/tBu μέθοδο.

- [1] Fmoc-GHR(77-94)-OCLTR;
- [2] Fmoc-GHR(61-76)-OH;
- [3] Fmoc-GHR(45-60)-O;
- [4] Fmoc-GHR(33-44)-OH;
- [5] Fmoc-GHR(22-32)-OH;
- [6] Fmoc-GHR(8-21)-OH;
- [7] Fmoc-GHR(1-7)-OH

Synthesis of Selected Fragments on Solid Phase of the Pro-Ghrelin

I. Vouldis and K. Barlos

Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Patras, Greece

Key words: Pro-Ghrelin, selected fragments synthesis, solid phase.

Ghrelin is a peptide hormone produced mainly by the epithelial cells in the stomach. It displays growth hormone-releasing activity and a stimulatory effect on food intake having also significant effect on regulation of energy balance. An interesting modification of Ghrelin is that the serine 3 residue is n-octanoylated. We focus on chemical synthesis of the entire pro-Ghrelin peptide. It consists of a 94-residue chain divided into seven fragments. We carried out the synthesis of these fragments on solid phase using the Fmoc/tBu method.

Αναρτημένες Ανακοινώσεις - Abstracts Posters

Συχνότητα Μετάδοσης της Ηπατίτιδας Β σε Αιμοδοτικό Πληθυσμό του Ν. Αχαΐας κατά τα Έτη 2002-2005

Κωνσταντίνος Αλεξόπουλος, Βασιλική Ζαχαράκη, Παρθενόπη Τσέλιου
Κέντρο Αιμοδοσίας Π.Γ.Κ.Ν. Πατρών Ο Άγιος Ανδρέας, Πάτρα, Ελλάς

Σκοπός της εργασίας είναι η διερεύνηση της συχνότητας της ηπατίτιδας Β σε αιμοδοτικό πληθυσμό του νομού Αχαΐας κατά τα έτη 2002-2005. Κατά το διάστημα αυτό έγινε έλεγχος 38441 μονάδων αίματος ως προς το αυστραλιανό αντιγόνο (HbsAg) με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELIZA.

Έτος Year	Αριθμός μονάδων Number of units	Θετικά HbsAg positive HbsAg	% ποσοστό % percentage
2002	9564	45	0,47
2003	9367	39	0,41
2004	9654	32	0,33
2005	9856	21	0,21

Από τον πίνακα αυτό προκύπτει σημαντική κατ' έτος μείωση του ποσοστού των μονάδων αίματος με ηπατίτιδα Β. Η μείωση αυτή έχει να κάνει με τη συνεχή αύξηση της εθελοντικής αιμοδοσίας στο Κέντρο μας, η οποία και συμβάλλει στην καλύτερα δυνατή ποιότητα των μεταγγίσεων.

Frequency of Transmission of Hepatitis B in a Population of the Achaia Region for the Years 2002-2005

Konstantinos Alexopoulos, Vasiliki Zaxaraki, Parthenopi Tseliou

Blood Center, Agios Andeas Hospital, Patras, Greece

Key words: Hepatitis B, blood transfusion, HbsAg

In this work we investigated the incidence of hepatitis B in the state of Achaia for the period 2002-2005. In this period a number of 38441 blood units were tested for the HbsAg, using the immunoenzymatic method ELISA. From the above table it is obvious that there is a significant decrease of blood units with hepatitis B. This is basically due to the increase of the volunteer donation in our blood center, which has as a result the best quality in transfusion.



Αξιολόγηση της Μοριακής Τεχνικής NAT για τον έλεγχο της Ηπατίτιδας Β

Κωνσταντίνος Αλεξόπουλος, Παρθενόπη Τσέλιου

Κέντρο Αιμοδοσίας Π.Γ.Κ.Ν. Πατρών Άγιος Ανδρέας, Πάτρα, Ελλάς

Η μελέτη αφορά τον έλεγχο των ασκών αίματος που συλλέχθηκαν στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Νοσοκομείου Ο Άγιος Ανδρέας από την 1-1-2006 έως τις 30-11-2006 για τον ιό της ηπατίτιδας Β. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί η μοριακή τεχνική ανίχνευσης νουκλεϊνικών οξέων (NAT) για τον ιό της ηπατίτιδας Β συγκριτικά με την εξέταση του Αυστραλιανού αντιγόνου (HbsAg). Για το λόγο αυτό ελέγχθηκαν 9200 μονάδες αίματος για HbsAg με τη μέθοδο ΜΕΙΑ (AXSYM – Abbott) και με την μοριακή τεχνική NAT (CHIRON TMA HIV-1/HCV/HBV Procleix Ul-trio) για τον προσδιορισμό του HBV-DNA. Σε σύνολο 26 αιμοδοτών που βρέθηκαν θετικοί έναντι του HbsAg, οι 22 ήταν HBV-DNA θετικοί, ενώ οι υπόλοιποι 4 βρέθηκαν αρνητικοί με την μέθοδο NAT. Επιπλέον, από τις 28 φιάλες αίματος που βρέθηκαν συνολικά να έχουν θετικό HBV-DNA, μόνο οι 22 είχαν θετικό HbsAg. Το πιο σημαντικό

δε ήταν το γεγονός ότι από αυτές τις 6 φιάλες που βρέθηκαν NAT θετικές και HbsAg αρνητικές όλες είχαν θετικό Anti-CORE και αρνητικό Anti-Hbs. Το γεγονός αυτό δικαιώνει το Κέντρο μας που ελέγχει τους δείκτες Anti-CORE και Anti-Hbs βάσει πρωτοκόλλου πάνω από μια δεκαετία. Έτσι λοιπόν έχοντας πάντα ως γνώμονα την ασφαλή χρήση του αίματος στο Κέντρο Αιμοδοσίας του Νοσοκομείου Ο Άγιος Ανδρέας χρησιμοποιείται παράλληλα με τον ορολογικό έλεγχο (HbsAg, Anti-CORE και Anti-Hbs) και ο μοριακός έλεγχος (NAT), εξασφαλίζοντας την καλύτερα δυνατή ποιότητα αίματος.

Evaluation of the Molecular Method of the Nucleic Acid Testing for the Diagnosis of Hepatitis B

Konstantinos Alexopoulos, Parthenopi Tseliou

Blood Center, *Agios Andeas Hospital*, Patras, Greece

Key words: Virus of hepatitis B, nucleic acid testing, units using, blood transfusion, Achaia Region

In this study we examined the blood units collected in our Blood Center between 1-1-2006 and 30-11-2006 for the virus of hepatitis B. Our purpose is to evaluate the method of nucleic acid testing (NAT) comparative to the HbsAg testing. For this reason we screened 9200 blood units using the CHIRON TMA HIV-1, HCV, HBV Procleix Ultrio assay and the MEIA Abbott AXSYM assay. From the 26 blood donors which were found positive to HbsAg, the 22

were HBV-DNA confirmed positive, while the 4 of them were negative, when tested with the molecular method NAT. Furthermore, from the 28 blood units with positive HBV-DNA only the 22 had positive the HbsAg. Interestingly, these 6 blood units which were found HBV-DNA positive and HbsAg negative were all have Anti-CORE positive and Anti-Hbs negative. This fact has come in an agreement with our protocol for checking Anti-CORE and Anti-Hbs simultaneously with HbsAg. We conclude that the parallel examination (classical and molecular) for the virus of hepatitis B ensures the best quality of blood for transfusion.



Σχεδιασμός και Σύνθεση Αναλόγων της Αλληλουχίας 558-565 της A2 Υπομονάδας του Παράγοντα Πήξης του Αίματος FVIIIa

Χ. Αναστασόπουλος¹, Ι. Σαρηγιάννης¹, Γ. Σταυρόπουλος¹ και Μ. Λιακοπούλου-Κυριακίδου²

¹Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα και ²Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 56004 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

Η πήξη του αίματος είναι σημαντική στην προφύλαξη του οργανισμού από αιμορραγίες και πραγματοποιείται με την παραγόμενη θρομβίνη. Η ενεργοποίηση όμως της διαδικασίας πήξης σε φυσιολογικές συνθήκες περιορίζεται σε τοπικό επίπεδο πάνω στο τραύμα του αγγείου, που αιμορραγεί. Η εκτροπή του ρυθμού παραγωγής θρομβίνης οδηγεί σε επέκταση της δράσης της μέσω μεταφοράς της στη γενική κυκλοφορία του αίματος. Η εκτροπή αυτή της παραγωγής θρομβίνης είναι ανεπιθύμητη. Συνεπώς κάθε προσπάθεια που εμποδίζει το σχηματισμό φλεβικής ή αρτηριακής θρόμβωσης προφυλάσσει από δυνητικά θανατηφόρες επιπλοκές και βελτιώνει τις συνθήκες επιβίωσης. Η παρούσα έρευνα αναφέρεται στη σύνθεση βιολογικής ενεργών πεπτιδίων, τα οποία επιδιώκεται επιλεκτικά να αναστέλλουν την εξαρτώμενη από τον παράγοντα IX (FIX) μεγιστοποίηση της παραγωγής θρομβίνης και κατά συνέπεια την επιπλέον ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Τα πεπτίδια αυτά βασίζονται στις περιοχές που αλληλεπιδρά ο FVIIIa με τον FIX. Ο FVIIIa περιλαμβάνει τις υπομονάδες A1-A2-B-A3-C1-C2 με μια μοριακή μάζα ~300 kDa. Η ύπαρξη αυτή των αλληλουχιών οδηγεί στη δημιουργία μιας βαριάς αλυσίδας (A1-A2-B) και μιας ελαφράς (A3-C1-C2). Η αλληλουχία 558-565 της A2 υπομονάδας είναι η εξής:

⁵⁵⁸ Ser -⁵⁵⁹Val -⁵⁶⁰Asp -⁵⁶¹Gln -⁵⁶²Arg -⁵⁶³Gly -⁵⁶⁴Asn -⁵⁶⁵Gln

Σκοπός της ερευνητικής μας προσπάθειας είναι η σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση γραμμικών και κυκλικών πεπτιδίων, αναλόγων της A2 υπομονά-

δας, με στόχο την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του FVIIIa με τον FIXa, ώστε να αναστέλλεται η πρόοδος της ενεργοποίησης της πήξης και της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων στο αίμα. Τα αναλόγια που παρασκευάστηκαν καθαρίζονται (RP-HPLC), ταυτοποιούνται (ESI-MS) και αξιολογούνται ως προς την βιολογική τους δραστηριότητα έναντι του παράγοντα πήξης του αίματος FVIIIa.

Design and Synthesis Analogues of Sequence 558-565 Loop of A2 Subunit of Factor VIIIa Blood Coagulation

Ch. Anastasopoulos¹, Y. Sarigiannis¹, G. Stavropoulos¹, M. Liakopoulou-Kyriakides²

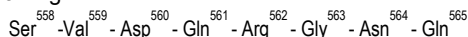
¹Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Patra; ²Department of Chemistry, Aristotelian University, 56004 Thessalonica, Greece

Key words: Blood coagulation, factor VIIIa, loop of A2, interaction of FVIIIa with FIXa, synthesis peptides analogues of subunit sequence 558-565

The coagulation of blood is important for the precaution of an organism from bleedings and takes place through a process where thrombin is produced. However, the activation process of coagulation in physiological conditions is limited in local level at the lesion of the bleeding vessel. The irregular and increased production of thrombin leads in undesirable actions through its transportation to the general blood circulation. Consequently, any effort that prevents the causing venous or arterial thrombosis and protects from potentially lethal complica-

tions it obviously improves and the conditions of survival. The present research reports in the synthesis of biologically active peptides, which are expected to inhibit selectively the maximisation of thrombin production depended on factor IX (FIX) and accordingly the additional activation of platelets. These peptides are based on the regions in which the factor VIIIa interacts with the factor IX. Both FVIII and FIX are essential for normal coagulation and deficiency of either is associated with the bleeding diathesis. The FVIIIa includes the subunits A1-A2-B-A3-C1-C2 with a molecular mass ~300 kDa. The existence of this sequence leads to the creation of a heavy (A1-A2-B) and a light (A3-C1-C2) peptide

chain. The sequence 558-565 of A2 subunit is the following:



The present research work covers the synthesis and biological evaluation of linear and cyclic peptides, analogues of the A2 subunit, aiming at the inhibition of interaction of FVIIIa with FIXa. Thus the process of activation of coagulation is suspended and the aggregation of platelets is avoided. All the synthesized analogues are purified (RP-HPLC), identified (ESI-MS) and are under investigation for their biological activity against the FVIIIa factor of blood coagulation.



Συνδυασμός Τμηματικών Μεθόδων και Χημικής Σύνδεσης για τη Σύνθεση του Διμερούς του RING Τομέα της MDM2 Πρωτεΐνης

Z. Βασιλείου, Δ. Γάτος και Κ. Μπάρλος

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η χημική σύνδεση σε συνδυασμό με τμηματικές μεθόδους έχει εξελιχθεί σε ισχυρό εργαλείο για τη σύνθεση πεπτιδίων και μικρών πρωτεϊνών. Σε προηγούμενη μελέτη μας η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τη σύνθεση του 48-μερούς RING τομέα της Mdm2 πρωτεΐνης (1,2). Με σκοπό να επεκτείνουμε τις τεχνικές της χημικής σύνδεσης πέρα από τους περιορισμούς του μεγέθους, που συχνά επιβάλλονται από την κλασσική μεθοδολογία σε στερεά φάση, στην παρούσα εργασία αναφέρουμε τη σύνθεση του διμερούς του RING τομέα της Mdm2. Τόσο ο CT-πεπτιδικός θειοεστέρας όσο και το NT-κυστεΐνυλο-πεπτιδικό τμήμα, που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της σύνδεσης, παρασκευάστηκαν με τεχνικές τμηματικής συμπύκνωσης σε στερεή και υγρή φάση. Όλα τα προστατευμένα πεπτιδικά τμήματα που χρησιμοποιήθηκαν συντέθηκαν στη 2-χλωροτριτυλο χλωρίδιο ρητίνη με την Fmoc/ ^tBu μέθοδο.

Combination of Convergent Methods and Native Chemical Ligation for the Synthesis of the MDM2 Ring Domain Dimer

Z. Vasileiou, D. Gatos and K. Barlos

Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Patra, Greece

Key words: Mdm2 protein, 93-residue RING domain dimer, synthesis

Over the last two decades, native chemical ligation together with convergent methods has been proved to be a powerful tool for the synthesis of peptides and small proteins. In our previous work the method has been efficiently applied for the synthesis of the 48-residue RING domain of Mdm2 protein (1,2). In order to extend NCL techniques beyond the size limitations often established by the traditional solid phase methodology, here we report the synthesis of the Mdm2 RING domain 93-residue dimer. Both the CT-peptide thioester and the NT-Cys peptide segment, used for the ligation reaction, were prepared by convergent techniques on solid and liquid phase. All protected peptide fragments utilised were synthesised on 2-chlorotriptyl chloride resin using the Fmoc/ ^tBu method.

REFERENCES

1. Markos S., Vasileiou Z., Gatos D., Barlos K.: Orthogonal thioester ligation of selected peptide fragments on solid and liquor phase. *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinet.* 21: 143 (2007)
2. Vasileiou Z., Gatos D., Barlos K.: 29th European Peptide Symposium (2006), Th087



Δικαρβοξυλικά και Αζα-μακροκυκλικά Ανάλογα Κουμαρινών με Δυνατότητα Προσδιορισμού Συγκεντρώσεων Ιόντων Ψευδαργύρου

Σ. Βουτσαδάκη, Ε. Ρουσάκης, Χ. Ε. Κατερινόπουλος

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 71003 Ηράκλειο, Ελλάδα

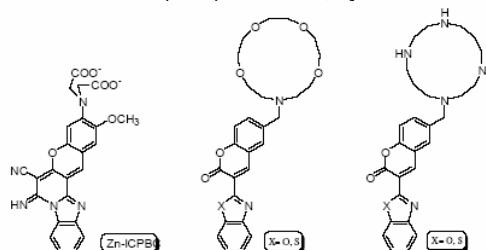
Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η σύνθεση σειράς κουμαρινικού τύπου φθορίζοντων δεικτών Zn^{2+} και η μελέτη του φασματοσκοπικού προφίλ των ελεύθερων καθώς και των δεσμευμένων με Zn^{2+} μορφών τους. Οι χρωμοφόρες ομάδες των δεικτών που παρασκευάστηκαν περιλαμβάνουν κουμαρίνες υποκατεστημένες στη 3-θέση με βενζοθειαζόλυλο- και βενζοξαζόλυλο-ομάδες. Επέκταση του συζυγιακού συστήματος της κουμαρίνης στο χρωμενο[3,2':3,4]πυριδο[1,2a][1,3]βενζιμιδαζόλιο είχε ως αποτέλεσμα την παρασκευή του δείκτη εκπομπής ερυθρού Zn -ICPBC. Ο τελευταίος δείκτης ανήκει στην κατηγορία των δικαρβοξυλικών δεικτών, ενώ στους υπόλοιπους δείκτες χρησιμοποιήθηκαν ως συμπλοκοποιητές αζα-μακροκυκλικά ανάλογα. Οι παραπάνω ενώσεις διεγείρονται με ακτινοβολία ορατού και οι σταθερές διάστασής τους για τον Zn^{2+} κυμαίνονται από nM έως μ M. Μετρήσεις φθορισμού του δείκτη Zn -ICPBC παρουσιάζουν καθαρή μετατόπιση μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής με δέσμευση Zn^{2+} , καθώς ανήκει στους δείκτες Φωτοεπαγόμενης Μεταφοράς Φορτίου (PCT). Το δεδομένο αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων Zn^{2+} προκαλεί αλλαγές στην ένταση φθορισμού του δείκτη, επιτρέπει τη χρήση του Zn -ICPBC ως δείκτη λόγου εντάσεων φθορισμού. Οι υπόλοιπες ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των δεικτών Φωτοεπαγόμενης Μεταφοράς Ηλεκτρονίου (PET). Αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων Zn^{2+} δεν προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου μήκους κύματος διέγερσης/εκπομπής στους δείκτες αυτής της κατηγορίας. Παρουσιάζεται όμως διακριτή διαφοροποίηση στις εντάσεις φθορισμού των δεσμευμένων με Zn^{2+} μορφών τους, γεγονός που επιτρέπει τη χρήση τους ως δείκτες που διεγείρονται με ακτινοβολία ορατού.

Coumarin-type Dicarboxylate and Aza-macrocyclic Fluorescent Indicators as Potential Zinc Ion Concentration Probes

S. Voutsadaki, E. Roussakis, H.E. Katerinopoulos

Organic Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete, 71003 Heraklion, Greece

Key words: Zinc ion fluorescent indicators, concentration probes, coumarin-base, Photo-induced Electron Transfer (PET) indicators, synthesis



A series of coumarin-based fluorescent Zn^{2+} indicators were synthesized and the spectral profiles of their free and Zn^{2+} bound forms were studied. The newly synthesized zinc indicators incorporate as chromophores coumarins substituted with benzothiazolyl and benzoxazolyl groups at the 3-position. Extension of the coumarin moiety to the chromeno[3,2':3,4]pyrido[1,2a][1,3]benzimidazole chromophore yielded the red-emitting probe Zn -ICPBC. The later probe belongs to the di-carboxylate-type of zinc probes, whereas aza-macrocyclics were used as ion chelators in the rest of the probes. These compounds are excited with visible light and their Zn^{2+} dissociation constants range from nM to μ M. Fluorescence spectra studies of Zn -ICPBC indicated a clear shift in its emission wavelength maxima upon Zn^{2+} binding, as it belongs to the class of Photo-induced Charge Transfer (PCT) indicators, along with changes in fluorescence intensity that enable the compound to be used as ratiometric, visible-excitabile probe. The rest of the probes belong to the class of Photo-induced Electron Transfer (PET) indicators. Their fluorescence spectra do not exhibit a shift in the excitation/emission maxima. However, they show distinct changes in fluorescence intensity upon Zn^{2+} binding, a fact that enables them to be used as visible-excitabile probes.



Σύνθεση Πεπτιδομιμητών Βασισμένων σε C-τελικά Τμήματα της Substance P

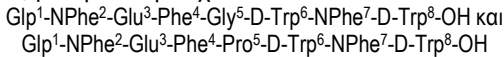
Π. Γκλεζάκος, Π. Βακαλοπούλου και Γ. Σταυρόπουλος

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάς

Είναι γενικά γνωστό ότι πολλά συνθετικά πεπτιδια εκδηλώνουν κυτταροστατική δράση. Ιδιαίτερα για την SP έχει αποδειχτεί ότι ολόκληρη η ορμόνη όσο και C-τελικά τμήματά της διεγείρουν την έκκριση του ογκονεκρωτικού παράγοντα α (TNF- α)

και κυτταροκινών (IL-6, IL-10) από μονοκύτταρα και μακροφάγα σε συνέργεια ή όχι με λιποπολυσακχαρίτες. Ανάλογα της SP και των C-τελικών τμημάτων της δρουν ως παρεμποδιστές της αύξησης των όγκων ή του πολλαπλασιασμού δια-

φόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Στα πλαίσια της ερευνητικής μας προσπάθειας προχωρούμε στη σύνθεση σε στερεά φάση, peptoid-peptide αναλόγων του C-τελικού τμήματος της SP, με την αλληλουχία:



Συντέθηκαν επίσης ανάλογα του C-τελικού εξαπεπτιδίου της SP, που εκτός από το κατάλοιπο [N(Bzl)-CH₂-CO-] περιέχεται και το [-N(Me)-CH₂-CO-], καθώς και το συνθετικό αμινοξύ Tic. Η ενσωμάτωση N-υποκατεστημένων αναλόγων αμινοξέων και αμινοξέων D-διαμόρφωσης καθιστά το μόριο ανθεκτικότερο στην ενζυμική αποικοδόμηση. Παράλληλα η αντικατάσταση του καταλοίπου D-Trp⁶ από το Tic σκοπεύει στην αλλαγή της γεωμετρίας του μορίου και στο σχηματισμό αναλόγων μεγαλύτερης δραστηριότητας. Όλα τα ανάλογα καθαρίζονται (RP-HPLC), ταυτοποιούνται (ESI-MS) και αξιολογούνται ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες και τη δραστηριότητά τους έναντι του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυτταρικών σειρών.

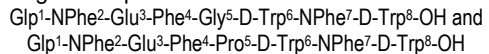
Synthesis of Peptidomimetics Based on C-terminal Substance P Fragments

P. Glezakos, P. Vakalopoulou, G. Stavropoulos
Department of Chemistry, University of Patras, 265-00 Patra, Greece

Key words: Hormone substance P C-terminal fragments, TNF- α , IL-6, IL-10, peptidomimetics, synthesis

The literature reports that many synthetic peptides prevent the proliferation of several cancer cell lines. Particularly it has been proved that the hormone

Substance P alone or in a synergistic fashion with lipopolysaccharides as well as analogs of its C-terminal fragments increase the secretion of tumor necrosis factor α (TNF- α) and cytokines (IL-6, IL-10) from monocytes and macrophages. On the other hand incorporation of D-configuration amino acids and N-substituted glycine [-N(Bzl)-CH₂-CO-] in the peptide sequence afforded peptoid-peptide hybrids with sufficient antiproliferative activity against cancer cell lines PC-3 (prostate cancer), T47D and SK-BR-3 (human breast cancer). Based on these results we proceeded to the synthesis of peptido-mimetics, analogs of the C-terminal fragment of substance P having the sequence:



Also, analogs of the C-terminal hexapeptide of substance P have been synthesized incorporating the residue [-N(Me)-CH₂-CO-] and the non natural amino acid Tic, the latter expecting to change the geometry of the molecule and increase its activity. The incorporation in the sequence of N-substituted analogs of amino acids as well as D-configuration amino acids has been proved to increase their stability against proteases. All the synthesized analogs were purified (RP-HPLC), identified (ESI-MS) and are under investigation for their activity against cancer cells proliferation.

REFERECES

1. Ho W.Z., Stavropoulos G., Lai J.P., Hu B.F., Magafa V., Anagnostides S., Douglas S.D.: *J. Neuroimmunology* 82: 126 (1998)
2. Zuckermann R., Kerr J., Kent S., Moos W.: *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10646 (1992)
3. Woll P., Rozenfurt E.: *Cancer Res.* 50: 3968 (1990)
4. Vakalopoulou P., Makrodouli H., Stavropoulos G.: *J. Pept. Sci. Suppl.* 10: 264 (2004)



Ανάπτυξη Γενικής Μεθοδολογίας για τη Σύνθεση Πολυπρενυλιωμένων Ακυλοφλορογλυκινών

M.I. Δακανάλη, Β.Π. Βιδάλη, Η.Α. Κουλαδούρος*

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Χημείας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55 και Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας, Ινστιτούτο Φυτικοχημείας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Ταχ. Θυρ. 60228, 153 10 Αγ. Παρασκευή, Ελλάς

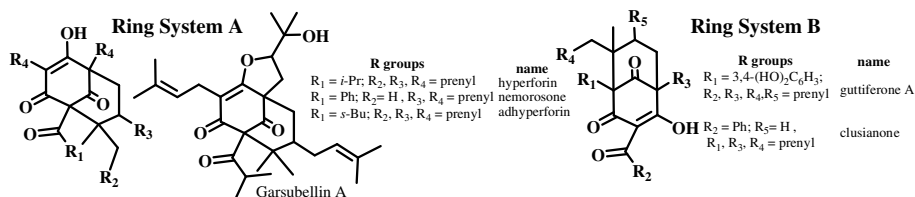
Οι Πολυκυκλικές Πολυπρενυλιωμένες Ακυλοφλορογλυκινόλες αποτελούν μια τάξη ενώσεων με ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα δομή. Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη θέση της άκυλο ομάδας, καθώς και του ασύμμετρου κέντρου της γέφυρας (σχήμα 1) (1). Η Υπερφορίνη, ένα από τα γνωστότερα μέλη αυτών των ενώσεων, ευθύνεται πιθανότατα για την αντικαταθλιπτική δράση του *Hypericum perforatum* (2) που χρησιμοποιείται στη θεραπεία ήπιας κατάθλιψης, άγχους και

σχιζοφρένειας. Όλες οι πρόσφατα δημοσιευμένες εργασίες, εκτός της ολικής σύνθεσης της Garsubellin A (3,4) και της Clusianone (5) αφορούν κυρίως στη σύνθεση του δικυκλικού συστήματος χωρίς όμως την κατάλληλη υποκατάσταση που θα επέτρεπε τη σύνθεση διαφόρων μελών της οικογένειας των ακυλοφλορογλυκινών. Οι προσπάθειές μας, που παρουσιάζονται εδώ, στοχεύουν στην ανάπτυξη μεθόδου κατάλληλη για τη σύνθεση και των δύο δικυκλικών συστημάτων Α και Β.

M.I. Dakanali, V.P. Vidali, E.A. Couladouros*
Chemistry Laboratories, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, 118 55 and Laboratory of Natural Products Synthesis and Bioorganic Chemistry, NCSR *Demokritos*, 15310 Ag. Paraskevi, Attiki, Greece e-mail: ecoula@chem.demokritos.gr

Key words: Acylphloroglucinols polycyclic polyprenylated, hyperforin, synthesis

Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols constitute a class of compounds of fascinating architecture and a broad spectrum of bioactivity, including antioxidant, antiviral, and anticancer. They can be grouped into two major classes according to the location of the acyl group and the quaternary center on the bridge (scheme 1) (1). Hyperforin, the most known member, is now thought to be responsible for much of the antidepressant activity of *Hypericum*



Scheme 1: Representative examples of Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols



Ο Υποδοχέας της Θρομβίνης, PAR-1, ως Φαρμακολογικός Στόχος για την Ανάπτυξη Αντι-αγγειογενετικών Φαρμάκων

Π. Ζανιά, Σ. Κριτικού, Χ. Σ. Φλωρδέλλης, Μ.Ε. Μαραγκουδάκης, Ν.Ε. Τσοπάνογλου

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάδα

Πολλές είναι οι μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που στηρίζουν την υπόθεση ότι ο υποδοχέας της θρομβίνης PAR-1 (protease-activated receptor-1), διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Ωστόσο, πειραματικά δεδομένα, που να συσχετίζουν άμεσα αυτή την υπόθεση, δεν είναι διαθέσιμα. Αυτό οφείλεται κυρίως στη γενικότερη έλλειψη ειδικών και ισχυρών ανταγωνιστών του PAR-1. Στην παρούσα μελέτη μελετήσαμε την επίδραση δύο ανταγωνιστών του PAR-1, που πρόσφατα ανακαλύφθηκαν και έγιναν διαθέσιμοι στην επιστημονική κοινότητα, στην αγγειογένεση. Αρχικά οι PAR-1 ανταγωνιστές εξετάστηκαν στο *in vivo* μοντέλο αγγειογένεσης της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης εμβρύου κοτόπουλου (CAM) και στο *in vitro* μοντέλο του Matrigel. Σε αυτά τα συστήματα οι ανταγωνιστές ανέστειλαν με τρόπο εξαρτώμενο της δόσης και τη βασική αγγειογένεση και την απαγόμενη από θρομβίνη ή άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες. Σε *in vitro* πειράματα με πρωτογενή ενδοθηλιακά κύτ-

perforatum (2) and is used for the treatment of mild depression, anxiety and schizophrenia. Currently, all other synthetic efforts published, with the exception of the total synthesis of Garsubellin A (3,4) and the synthesis of Clusianone (5), aim at the construction of the bicyclic core without any functionalization that would allow the synthesis of a wide range of members of this family. Our efforts, presented here, target the development of a general method for the synthesis of both ring systems A and B.

REFERENCES

1. Cuesta-Rubio O. et al.: *Phytochemistry* 57: 279 (2001)
2. Mennini T. et al.: *Lift Sci.* 75 : 1021 (2004)
3. Shibasaki et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 127: 14200 (2005)
4. Danishefsky S.J. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 128: 1048 (2006)
5. Simpkins N.S. et al.: *Org. Lett.* 8: 5283 (2006)

τα, οι δύο ανταγωνιστές κατέστειλαν την ικανότητα των κυττάρων να συνθέτουν DNA και να πολλαπλασιάζονται. Αντίθετα, προκάλεσαν τον αποπτωτικό θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε πλήρη συμφωνία με πειράματα κυτταρικού κύκλου και διπλής χρώσης Anpexin V/propidium iodide, που έγιναν με τη τεχνική της κυτταρομετρίας ροής. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν άμεσες ενδείξεις για την εμπλοκή του PAR-1 στην αγγειογένεση και προτείνουν ότι οι ανταγωνιστές του PAR-1 έχουν τη δυναμική για θεραπευτική εφαρμογή σε ασθένειες που σχετίζονται με την αγγειογένεση, όπως είναι ο καρκίνος.

Validation of Protease-activated Receptor-1 as a Target for Developing Anti-angiogenic Agents

P. Zania, S. Kritikou, C.S. Flordellis, M.E. Maragoudakis, N.E. Tsopanoglou

Σύνθεση και Βιολογική Μελέτη Αναλόγων της Ωκυτοκίνης Περιεχόντων μη Φυσικά Αμινοξέα στις Θέσεις 3 & 9

Ε. Καρακώστα¹, Α. Ευαγγελοπούλου¹, Σ. Πετράκη¹, Β. Μαγκαφά¹, Γ. Πάιρας¹, Λ. Βορονιτσκόβα², J. Slaninova² και Π. Κορδοπάτης¹

¹Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, GR-26500, Πάτρα, ²Department of Biological Chemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences Flemingovo Square 2, Prague 6, CZ-166 10, Czech Republic

Η Ωκυτοκίνη (ΟΤ) είναι κυκλικό εννεαπεπτιδίο του υποθαλάμου το οποίο απελευθερώνεται στην γενική κυκλοφορία από τον οπίσθιο λοβό της υπόφυσης προκαλώντας συσπάσεις της μήτρας και γαλακτόρροια κατά το θηλασμό. Η ευρεία κατανομή των υποδοχέων της ωκυτοκίνης στον εγκέφαλο έχουν καθιερώσει την ΟΤ ως κεντρικό νευροδιαβιβαστή με ρόλο στην αναπαραγωγική και κοινωνική συμπεριφορά. Ο ρόλος της ωκυτοκίνης στην πρόκληση του πρόωρου τοκετού οδήγησε στην ανάπτυξη πεπτιδικών ανταγωνιστών της ΟΤ ως ενδεχόμενους τοκολυτικούς παράγοντες στην πρόληψη πρόωρων γεννήσεων. Από τους πολλούς ανταγωνιστές της ωκυτοκίνης που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, μόνο το Atosiban έχει εγκριθεί (στην Ευρώπη) με το εμπορικό όνομα Tractocile για τη θεραπεία του πρόωρου τοκετού. Η σχεδίαση ανταγωνιστών της ΟΤ στηρίζεται σε πληροφορίες από μελέτες των σχέσεων δομής-δράσης. Το C-τελικό τριπεπτιδίο και συγκεκριμένα ο κατάλληλος προσανατολισμός του C-τελικού καρβοξαμιδίου της γλυκίνης είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την παραλαβή αναλόγων της ωκυτοκίνης με μεγάλη δραστηριότητα, ενώ η ανταγωνιστική δράση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την διαμόρφωση και την υδροφοβικότητα του αμινοξέος στη θέση 2. Επιπλέον η θέση 3 είναι σημαντική για την αναγνώριση και τη σύνδεση των αναλόγων με τον υποδοχέα. Βασισμένοι σε αυτά τα ευρήματα συνθέσαμε νέα ανάλογα της ωκυτοκίνης που περιέχουν μη φυσικά αμινοξέα στις θέσεις 3 ή 9, σε συνδυασμό με Mpa¹, D-Tyr(Et)², D-Nal(1)² τροποποιήσεις. Για τη σύνθεση χρησιμοποιήσαμε την Fmoc/tBu μέθοδο επί στερεάς φάσεως χρησιμοποιώντας ως στερεό υπόστρωμα την Rink Amide MBHA ρητίνη. Τα ανάλογα δοκιμάστηκαν για ωκυτόκειο δράση *in vitro*, σε απομονωμένο ιστό μήτρας επίμυος, για δράση επί της πίεσεως σε επίμυες και όσον αφορά τη συγγένεια τους με τον ανθρώπινο ωκυτόκειο υποδοχέα σε ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα (HEK).

Synthesis and Biological Evaluation of Oxytocin Analogues Containing non Natural Amino Acids in Positions 3 or 9

E. Karakosta¹, A. Evangelopoulou¹, S. Petraki¹, V. Magafa¹, G. Pairas¹, L. Borovitskova², J. Slaninova² and P. Cordopatis¹

¹Department of Pharmacy, University of Patras, GR-26500, Patras, Hellas; ²Department of Peptide Biochemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czech Republic, Flemingovo square 2, Prague 6, CZ-166-10, Czech Republic

Key words: Oxytocin, antagonists, atosiban, synthesis, biological evaluation

Oxytocin (OT) is a hypothalamic cyclic nonapeptide that is released into the general circulation from the neural lobe of the pituitary, inducing uterine contractions during parturition and milk ejection during lactation. The wide-spread distribution of OT receptors in the brain and the specific behavioral effects of centrally applied OT have firmly established OT as a central neurotransmitter with roles in reproductive and social behaviors. Specifically, a role in mediating maternal behavior, sexual receptivity and partnership bonding has been proposed. The role of oxytocin in triggering preterm labor led to the design of synthetic peptide and non-peptide OT antagonists as potential tocolytic agents for the prevention of preterm births. Of the many OT antagonists reported to date, only one, Atosiban, has been approved (in Europe) under the Trade name Tractocile for the treatment of preterm labor. The design of OT antagonists is based on data from structure-activity studies. The C-terminal tri-peptide and especially the proper orientation of the C-terminal glycine carboxamide are crucial for obtaining oxytocin analogues with high potency. Antagonistic activity also depends from the configuration and the hydrophobicity of the amino acid at position 2. Based on these findings and in an attempt to investigate the role of amino acid in position 3 we synthesized new oxytocin analogues containing non natural amino acids in positions 3 or 9. Basic modification at positions 3 or 9 was combined with Mpa¹, D-Tyr(Et)², D-Nal(1)² modifications. For the synthesis we use the Fmoc/tBu solid phase methodology utilizing as solid support the Rink Amide MBHA resin to provide the peptide amide. Electrospray MS was in agreement with the expected results. The analogues were tested for rat uterotonic activity *in vitro*, in the rat pressor assay and for binding affinity to human OTR.

Οι α_2 -αδρενεργικοί Υποδοχείς Ενεργοποιούν τον CREB μέσω Μεταβολισμού του Αραχιδονικού Οξέος και Διέγερσης της PKA στα Κύτταρα PC12

Γεώργιος Καρκούλιας, Παναγιώτης Ασημακόπουλος και Χριστόδουλος Φλωρδέλλης
Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάς

Οι α_2 -αδρενεργικοί υποδοχείς ανήκουν στην υπερικογένεια των υποδοχέων που είναι διασυνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες (GPCRs). Διαμεσολαβούν τη δράση των ενδογενών κατεχολαμινών, επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογία του νευρικού συστήματος. Προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας έδειξαν ότι η διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων επάγει τη μορφολογική και μοριακή νευρωνική διαφοροποίηση PC12 κυττάρων, διαμολυσμένων με α_2 -αδρενεργικούς υποτύπους (1,2). Ο σηματοδοτικός μηχανισμός που διαμεσολαβεί τη δράση αυτή των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων δεν έχει διευκρινισθεί. Ωστόσο, διάφορες εκφάνσεις της ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένης της νευρωνικής διαφοροποίησης, ρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα CREB (3). Στην παρούσα μελέτη, πειράματα μέτρησης ενεργότητας λουσιφεράσης έδειξαν ότι η διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση του CREB. Η ενεργοποίηση του CREB από την επινεφρίνη αναστάλη παρουσία αναστολέα της εποξυγενάσης, αλλά όχι παρουσία αναστολέα της κυκλοοξυγενάσης ή της λιποξυγενάσης. Επιπλέον, αναστολή της ενζυμικής ενεργότητας της PKA παρεμπόδισε την δράση της επινεφρίνης στον CREB. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ένα σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου οι α_2 -αδρενεργικοί υποδοχείς επάγουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση του CREB στα PC12 κύτταρα, το οποίο περιλαμβάνει τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος από την P450-εξαρτώμενη εποξυγενάση και την πιθανά διαδοχική ενεργοποίηση της PKA.

α_2 -Adrenergic Receptors Activate Creb through a Pathway Involving Arachidonic Acid Metabolism and PKA in PC12 Cells

Georgios Karkoulias, Panagiotis Asimakopoulou-los and Christodoulos Flordellis

Department of Pharmacology, Medical School, University of Patras, Patra, Greece

Key words: α_2 -Adrenergic receptors, transcription factor CREB, arachidonic acid metabolism, PKA, PC12 cells

The α_2 -adrenergic receptors (α_2 -ARs) are members of the G-Protein coupled receptor (GPCR) super family. They mediate physiological responses to the endogenous catecholamines, epinephrine and norepinephrine and have fundamental functions in neuronal physiology. Previous study carried out on PC12 cells expressing α_2 -adrenergic receptors have shown that stimulation of all three subtypes causes morphological and molecular neuronal differentiation, but the signaling mechanisms that mediate this effect have not been characterized (1,2). Many aspects of development, including neuronal differentiation, are regulated by the transcription factor CREB (3). In the present study, we employed a luciferase assay and we found that stimulated α_2 -ARs induce transcriptional activation of CREB in PC12 cells. Epinephrine-induced activation of CREB was abolished by prior treatment with ketoconazole, an inhibitor of epoxygenase, but not with indomethacin or nordihydroguaiaretic acid, inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase respectively. Furthermore, inhibition of PKA enzymatic activity abolished the effects of epinephrine on CREB, suggesting that PKA activation mediates CREB activation by α_2 -ARs. Our results provide evidence for a putative pathway by which α_2 -ARs induce transcriptional activation of CREB in PC12 cells, involving AA metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase and probably subsequent activation of PKA.

REFERENCES

1. Taraviras, et al., *J. Cell Biol.* (2002) 81, 363-374
2. Karkoulias, et al., *Cell. Signal.* (In press)
3. Lonze, et al., *Neuron* (2002) 35, 605-623



Η Ενεργοποίηση του CREB Εμπλέκεται στην Σηματοδότηση από α_2 -Αδρενεργικούς Υποδοχείς στα PC12 Κύτταρα

Γεώργιος Καρκούλιας¹, Αριστείδης Παπαστρατάκος¹, Σταύρος Ταραβήρας¹, Ορθοδόξια Μαστρογιάννη¹, Παναγιώτης Παπαθανασόπουλος², Χριστόδουλος Φλωρδέλλης¹

¹Τμήμα Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών και ²Νευρολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, Πάτρα, Ελλάς

Οι α_2 -αδρενεργικοί υποδοχείς ανήκουν στην υπερικογένεια των GPCRs (G-Protein Coupled Receptors). Διαμεσολαβούν τις δράσεις που προκαλούνται από τις ενδογενείς κατεχολαμίνες, επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη. Τρία διαφορετικά γονίδια κωδικοποιούν τους α_2 -αδρενεργικούς υποτύπους (α_{2A} , α_{2B} and α_{2C}), που διαφέρουν ως προς τις ιδιότητες δέσμευσης, την ιστική κατανομή, τη χρωμοσωματική θέση και το μονοπάτι μεταγωγής σήματος (1). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η επινεφρίνη επάγει μορφολογική και μοριακή νευρωνική διαφοροποίηση PC12 κυττάρων, που έχουν διαμολυνθεί με α_2 -αδρενεργικούς υποδοχείς (2). Εξ άλλου η νευρωνική λειτουργία, καθώς και πολλές πλευρές της ανάπτυξης, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός πρόδρομων νευρικών κυττάρων, η νευρωνική επιβίωση και διαφοροποίηση ρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα CREB (cAMP-response element-binding protein) (3). Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε τον πιθανό ρόλο του CREB στη σηματοδότηση από α_2 -αδρενεργικούς υποδοχείς. Ειδικότερα, μελετήσαμε τόσο τη φωσφορυλίωση όσο και την μεταγραφική ενεργοποίηση του CREB. Χρησιμοποιήσαμε μια ενζυμική μέθοδο με λουσιφεράση καθώς και ανάλυση με Western blotting και βρήκαμε ενεργοποίηση του CREB από επινεφρίνη. Ο ουσιαστικός ρόλος του CREB στη νευρωνική πλαστικότητα μάς παρακίνησε να ερευνήσουμε το ρόλο του CREB στη νευρωνική διαφοροποίηση από α_2 -ARs σε διαμολυσμένα PC12 κύτταρα εξετάζοντας τη δράση ενός αρνητικά μεταλλαγμένου CREB στην ανάπτυξη νευριτών που προκαλείται από α_2 -ARs σε διαμολυσμένα PC12 κύτταρα.

α_2 -AR Signaling is Mediated by Activation of Transcriptional Factor CREB in Transfected PC12 Cells

Georgios Karkoulas¹, Aristeidis Papastratakos¹, Stavros Taraviras¹ Orthodoxia Mastrogianni¹, Pa-

nagiotis Papathanasopoulos², Christodoulos Floridellis¹

¹Department of Pharmacology, Medical School, University of Patras and ²Department of Neurology, University Hospital of Patras, Patra, Greece

Key words: α_2 -Adrenergic receptors, α_2 -AR signaling activation, transcription factor CREB, transfected PC12 cells

The α_2 -adrenergic receptors belong to the superfamily of G-Protein Coupled Receptors (GPCRs). They mediate effects of the endogenous catecholamines, epinephrine and nor-epinephrine. Three different genes encode the human α_2 -adrenergic subtypes (α_{2A} , α_{2B} and α_{2C}), that differ in their ligand binding properties, tissue distribution, chromosomal location and signaling pathways (1). Recent studies have demonstrated that epinephrine induces morphological and molecular neuronal differentiation of PC12 cells transfected with α_2 -adrenergic receptors (2). Neuronal functioning and many aspects of development, such as precursor proliferation, neuronal survival and differentiation and process outgrowth are regulated by the transcription factor cAMP-response element-binding protein (CREB) (3). In the present study we have investigated the possible involvement of CREB in α_2 -adrenergic receptor signaling. We studied in particular both the phosphorylation and transcriptional activation of CREB. We employed a luciferase assay and Western blotting analysis and we have found activation of CREB by epinephrine. The crucial role of CREB in neuronal plasticity has prompted us to investigate the role of CREB in α_2 -AR-induced neuronal differentiation by testing the effect of a dominant negative mutant of CREB on neurite outgrowth elicited by α_2 -ARs in transfected PC12 cells.

REFERENCES

1. Mc Donald, et al.: *Trends in Pharmacol. Sci.* 18: 211-219 (1997)
2. Taraviras, et al.: *Eur J. Cell Biol.* 81: 363-374 (2002)
3. Lonze, et al.: *Neuron* 35: 605-623 (2002)



Σύνθεση Νέων Πεπτιδικών Νανοδομών

Θ. Καρρά, Κ. Μπάρλος

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάς

Η εγκεφαλίνη συνδέθηκε με PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) και με παλμιτοϋλ-υποκαταστάτες χρησιμοποιώντας τη σύνθεση σε στερεά φάση. Εισάχθηκαν διαφορετικές αναλογίες PEG και παλμιτοϋλ-τμημάτων με στόχο να επιτευχθεί η κατάλληλη αναλογία που οδηγεί στο σχηματισμό των καλύτερων πιθανών λιποσωμάτων. Μετά την απομόνωση των προϊόντων, η μικροσκοπία SEM

έδειξε ότι η εγκεφαλίνη που είναι συνδεδεμένη σε αναλογία παλμιτοϋλ:PEG = 1:3 σχηματίζει τις πιο ικανοποιητικές σφαιρικές νανοδομές. Ο σκοπός ήταν να γίνει συνδυασμός των εξής συστημάτων μεταφοράς των πεπτιδίων που χρησιμοποιούνται περισσότερο σήμερα: λιποσώματα, πεγκυλίωση και λιποπεπτίδια. Οι νανοδομές στην περίπτωση αυτή παρέχουν διπλή προστασία και είναι εξαιρε-

τικής σημασίας στην εύρεση φαρμάκων αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας.

Synthesis of New Peptide Nanosomes

T. Karra, K. Barlos

Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Patras, GR 26500 Patra, Greece

Key words: Enkephalin, polyethylene glycol, palmitoyl residues, peptide nanosomes, synthesis

Enkephalin was placed among PEG (Polyethylene Glycol) and palmitoyl residues by solid phase syn-

thesis. Different ratios of PEG and palmitoyl were introduced in order to achieve the appropriate proportion that leads to the formation of the best possible spherical nanosomes. After purification of the products representative scanning electron microscopy (SEM) micrographs showed that enkephalin that was conjugated with a ratio of palmitoyl: PEG = 1:3 form the most satisfying spherical nanosomes. The desirable peptide nanosomes arise from the combination of other delivery system of peptides that are mostly used today, like liposomes, pegylation and lipopeptides. In this way peptides obtain *double* protection which is very important to overcome many problems before their clinical application.



Θεωρητική Μελέτη Πρόσδεσης του Αντιυπερτασικού Φαρμάκου Valsartan στο Ενεργό Κέντρο του AT₁ Υποδοχέα

B. Κατσιάρας^{1,2}, Κ. Ποταμίτης¹, Π. Ζουμπουλάκης¹, Σ. Νικολαρόπουλος², Θ. Μαυρομούστακος¹

¹Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 11635 Αθήνα και ²Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Παν. Πάτρας, 26500 Ρίο, Ελλάς

Το valsartan είναι αντιυπερτασικό φάρμακο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των ανταγωνιστών της Αγγειοτασίνης II (AII). Τα μόρια αυτά ασκούν τη δράση τους παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του πεπτιδίου AII στο ενεργό κέντρο του AT₁ υποδοχέα. Με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο διακριτών διαμορφώσεων (κύρια και δευτερεύουσα) σε θερμοκρασία δωματίου εξ αιτίας της παρεμποδισμένης περιστροφής γύρω από τον αμιδικό δεσμό του μορίου. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η πρόσδεση (molecular docking) του valsartan στον AT₁ υποδοχέα με χρήση κατάλληλων λογισμικών πρόσδεσης (*in silico study*). Απουσία κρυσταλλογραφικών δεδομένων, το μοντέλο του AT₁ υποδοχέα έχει σχεδιαστεί με βάση την 3D διαμόρφωση του ομόλογου υποδοχέα της ροδοψίνης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων πρόσδεσης κατέδειξαν ότι και οι δύο διαμορφώσεις του valsartan εισέρχονται στο ίδιο ενεργό κέντρο που έχει προταθεί για τον πρότυπο AT₁ ανταγωνιστή losartan. Παράλληλα εμφανίζουν παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με κρίσιμα αμινοξέα της θήκης πρόσδεσης, τα οποία έχουν προκύψει από πειραματικές μελέτες μεταλλάξεων.

Docking Studies of the Antihypertensive Drug Valsartan at the Active Site of the AT₁ Receptor

V. Katsiaras^{1,2}, C. Potamitis¹, P. Zoumpoulakis¹, S. Nikolaropoulos², T. Mavromoustakos¹

¹Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation, Vas. Constantinou 48, 11635 Athens; ²Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras, 26500 Rio, Greece

Key words: Valsartan, AT₁ antagonist, docking studies

Valsartan is an AT₁ antagonist (class of SARTANs) for the regulation of high blood pressure. These molecules exert their action by antagonizing the binding of Angiotensin II in the active site of the AT₁ receptor. NMR spectroscopy showed the existence of two distinct conformations (major and minor) at ambient temperature due to the restricted rotation around the amide bond. *In silico* docking studies are applied in order to investigate ligand:protein interactions. The model of the AT₁ receptor for the docking study, was based on the 3D structure of bovine rhodopsin. Docking results revealed that both conformations of valsartan bind in the same cavity of the receptor as the already proposed for the prototype SARTAN (losartan) favoring interactions with critical aminoacids for AT₁ antagonism.



Υγρή Χρωματογραφία Φασματομετρίας Μάζας (HPLC-MS/MS): Ποσοτικός Προσδιορισμός Βιοενεργών Πεπτιδίων για την Καταπολέμηση του Καρκίνου

Θ. Κασιλά¹, Ζ. Σοφιανός¹, Θ. Τσέλιος², Ι. Ματσούκας² και Κ. Ταμβακόπουλος¹

¹Βασική Έρευνα, Εργαστήριο Φαρμακολογίας – Φαρμακοτεχνολογίας, ΙΙΒΕΑΑ, 115 27, Αθήνα, και ²Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 265 00, Ρίο, Πάτρα, Ελλάδα

Καθίσταται πλέον σαφές πως η μελέτη των φαρμακολογικά βιοενεργών πεπτιδίων είναι καίριας σημασίας για την εν τω βάθει κατανόηση του καρκίνου και επιπρόσθετα, για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Σε αυτήν την προσπάθεια, η ανίχνευση των εν λόγω πεπτιδίων σε βιολογικά υγρά/ιστούς, καθώς και η διερεύνηση της επίδρασής τους σε ενδογενείς παράγοντες (πεπτιδικές ορμόνες) ή μοριακούς δείκτες συνιστά πολύτιμο αρωγό. Εν γένει, ο ποσοτικός προσδιορισμός των πεπτιδίων απαιτεί μεθόδους ανάλυσης με υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα, όπως οι μέθοδοι φασματομετρίας μάζας και οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι. Οι τελευταίες χαρακτηρίζονται από χαμηλά επίπεδα ανίχνευσης, αλλά κάποιες φορές αδυνατούν να διακρίνουν το πεπτίδιο του ενδιαφέροντος από τους μεταβολίτες του ή τις τροποποιημένες μορφές του (cross reactivity). Στον αντίποδα, αν και οι μέθοδοι φασματομετρίας μάζας εμφανίζονται ιδανικές για τον προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων ενός πλήθους διαφορετικών κατηγοριών βιοενεργών μορίων σε βιολογικά υγρά/ιστούς, η ποσοτική φασματομετρία μάζας για τα πεπτίδια/πρωτεΐνες αποτελεί *ερευνητική πρόκληση*. Αναζητώντας καινοτόμες αναλυτικές προσεγγίσεις, επετεύχθη ο ποσοτικός προσδιορισμός του Leuprolide (σε επίπεδα picomolar) στο πλάσμα επίμυα, κάνοντας χρήση μιας νέας πλατφόρμας υγρής χρωματογραφίας φασματογραφίας μάζας (Hybrid Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer), που συνδυάζει τη δυνατότητα του τριπλού τετράπολου (triple quadrupole instruments) με αυτή της παγίδας ιόντων (linear ion trap). Δεδομένης της σημασίας του εν λόγω φαρμάκου στην καταπολέμηση του ορμονο-εξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη, αλλά και των σύγχρονων επιταγών για καινοτόμες βελτιωμένες θεραπείες, έχει ήδη ξεκινήσει η *in vivo* αξιολόγηση και φαρμακοκινητική μελέτη του Leuprolide και των πεπτιδικών αναλόγων του σε προκλινικά μοντέλα.

High Liquid Pressure Chromatography (HPLC-MS/MS): Quantitative Analysis of

Bioactive Peptides for the Treatment of Cancer

T. Katsila¹, Z. Sofianos¹, T. Tselios², J. Matsoukas² and C. Tamvakopoulos¹

¹Basic research, Laboratory of Pharmacology-Pharmacotechnology, ΙΙΒΕΑΑ, 115 27, Athens; ²Department of Chemistry, University of Patras, 265 00, Rion, Patra, Greece

Key words: Treatment of cancer, bioactive peptides, high liquid pressure chromatography (HPLC-MS/MS)

It is well established that the study of pharmacologically active peptides is central for the understanding of cancer and the development of novel therapeutic approaches. In this context, the determination of bioactive peptides in biological fluids/tissues and their effect on endogenous factors (peptide hormones) or molecular markers are of great importance. Current approaches towards peptide quantification in biological fluids include immunoassays and mass spectrometric techniques. Immunoassays are characterised by high sensitivity, but sometimes are incapable of distinguishing the peptide from its metabolites or the modified peptide (cross reactivity). As for the mass spectrometry approaches, even though they are thought to be ideal for the quantification of trace levels of various classes of bioactive compounds in biological fluids/tissues, peptide quantification by mass spectrometry is still a challenge. Hence, looking for novel mass spectrometric approaches, Leuprolide was measured in mouse plasma at picomolar concentrations, using high pressure liquid chromatography (HPLC) coupled to a novel platform (Hybrid Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometer) that combines the potential of triple quadrupole instruments with that of a Linear Ion Trap. Considering the importance of Leuprolide regarding the treatment of hormone dependent prostate cancer as well as the current needs for novel improved therapies, the *in vivo* evaluation and pharmacokinetic analysis of Leuprolide and its peptide analogues in preclinical models is in progress.



Σύνθεση και Φαρμακοχημική Μελέτη Ετεροκυκλικών Ενώσεων (Χαλκόνων και Παραγώγων) με Πιθανή Αντιφλεγμονώδη, Αντιοξειδωτική, Αντικαρκινική Δράση

Άννα-Μαρία Κατσώρη¹, Νέλλη Κούρτη² και Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα¹

¹Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124 Θεσσαλονίκη; ²Εργαστήριο Βιοχημείας του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας Γ. Παπανικολάου, Α.Ο.Ν.Α. Ο Άγιος Σάββας, Αθήνα. e-mail: hadjipav@pharm.auth.gr

Οι χαλκόνες και τα παράγωγά τους παρουσιάζουν μεγάλο αριθμό βιολογικών δράσεων. Μερικές από τις δράσεις αυτές είναι η αντιφλεγμονώδης δράση, η εξουδετέρωση και παγίδευση ελευθέρων ριζών, καθώς και η αναστολή της δράσης διαφόρων ενζύμων που εμπλέκονται στο φαινόμενο της φλεγμονής, αλλά και η αντικαρκινική δράση. Πρόσφατες δημοσιεύσεις επιβεβαιώνουν την άμεση σύνδεση του καρκίνου με το πολύπλοκο φαινόμενο της φλεγμονής. Η μελέτη της βιβλιογραφίας και η εφαρμογή της computer aided drug design οδήγησε στη διεκρίνιση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που διέπουν την αντικαρκινική δράση των χαλκόνων (1). Αξιοποιώντας αυτές τις ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης συνθέσαμε μερικές χαλκόνες και παραγωγά τους και μελετήσαμε προκαταρκτικά την αντικαρκινική τους συμπεριφορά. Οι χαλκόνες και τα παράγωγα τους διαλύονται σε DMSO και μελετώνται στις καρκινικές κυτταρικές σειρές (2) MCF-7 και MDA-MB-231 σε διάφορες συγκεντρώσεις. Προσδιορίζεται η ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων μετά από παρατεταμένη (72 h) έκθεσή τους στην επίδραση των υπό μελέτη ενώσεων. Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιούνται η κερκετίνη και η 4-OH κουμαρίνη. Οι μετρήσεις δείχνουν ότι οι χαλκόνες G5, G6 και θ1 αναστέλλουν ισχυρότερα την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

Synthesis and Pharmacochemical Study of Heterocyclic Compounds (Chalcones and Derivatives) with Possible Anti-inflammatory, Antioxidant, Anticancer Activity

Anna-Maria Katsori¹, Nelli Kourti² and Dimitra Hadjipavlou-Litina¹

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotle University, Thessaloniki, 54124, Greece; ²Laboratory of Biochemistry, Centre

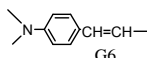
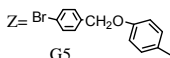
for Anti-cancer Research G. Papanicolaou, A.O.N.A O Agios Savvas, Athens, Greece

Key words: Chalcones and derivatives, synthesis, anti-inflammatory, antioxidant, anticancer activity

Chalcones and their derivatives present an enormous number of important biological activities. Among them are implicated: the anti-inflammatory and the anti-oxidant activity (scavenging, quenching and reducing activities) and the inhibitory activity of several enzymes and mediators of inflammation. Anticancer activity has been also referred (1). Lately a large number of publications referred and verified the correlation of cancer with inflammation. Taking under consideration the literature for chalcones with anticancer activity and using computational chemistry we tried to delineate the physicochemical properties that are significant. The Computer aided drug design help us to design, synthesize and screen a number of chalcones and derivatives as possible anticancer agents. The chalcones and their derivatives were evaluated (2) against the breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. The compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) in various concentrations. Their growth inhibitory activity was determined after 72h of continuous drug exposure for both cell lines. Quercetin and 4-OH coumarin were used as the reference compounds. The measurements showed that the chalcones G5, G6 and θ1 seems to be more potent. The results are discussed in terms of structure-activity relationships

REFERENCES

- Dimmock J., Elias D., Beazely M., Kandepu: *Cur. Med. Chem.* 6: 1125-1149 (1999)
- De Vincenzo R., Ferlini C., Distefano M., Gaggini C., Riva A., Bombardello E., Morazzoni P., Valenti P., Belluti F., Ranelletti F., Mancuso S., Scambia G.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46: 305-312 (2000)



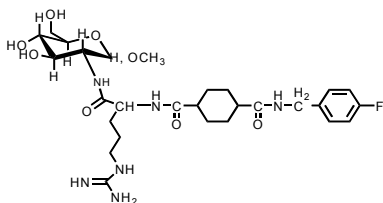
W = o-hydroxy-acetophenone



Σύνθεση Αναλόγων Γλυκοπεπτιδίων σε Στερεή Φάση

Κωνσταντίνος Κελαϊδώνης, Αμαλία Ρεσβάνη, Κωνσταντίνος Προύσαλης, Θεόδωρος Τσέλιος, Ιωάννης Ματσούκας και Θεόδωρος Τσεγενιδής

Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστήμιο Πατρών, 265 00, Πάτρα, Ελλάς



1-MeO-GlcN-DABF5

Τα γλυκοπεπτιδία είναι ιδιαίτερα σημαντικές χημικές ενώσεις λόγω του γεγονότος ότι οι ιδιότητές τους αποτελούν συνδυασμό των ιδιοτήτων των σακχάρων και των πρωτεϊνών ή πεπτιδίων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα. Έως τώρα ορισμένα γλυκοπεπτιδία χρησιμοποιούνταν ως αντιβιοτικά, αντιφλεγμονώδη και αντιβιοτικά, π.χ. *Σιδερομυκίνη*, *Βανκομυκίνη* και *Τειχοπλανίνη*. Στην παρούσα μελέτη συντέθηκε το ανάλογο γλυκοπεπτιδίου 1-MeO-GlcN-DABF5 χρησιμοποιώντας το αμινοσάκχαρο γλυκοζαμίνη, η αμινομάδα του οποίου αρχικά προστατεύτηκε με την ομάδα Fmoc. Ακολούθησε μεθυλίωση του ανωμερούς ατόμου άνθρακα με τη χρήση διαλύματος 1,25 M υδροχλωρίου σε μεθανόλη. Το προϊόν προστέθηκε στην 4-Μεθοξυβενζυδρολο-ρητίνη (MDMR), η Fmoc-ομάδα απομακρύνθηκε με τη χρήση διαλύματος 20% πιπεριδίνης σε DMF και ακολούθησε σύζευξη του προϊόντος με το ανάλογο του υποδοχέα της Θρομβίνης DABF4 παρουσία DIC, HOBT. Μετά την αποσύνδεση του προστατευμένου προϊόντος από τη ρητίνη απομακρύνθηκε η ομάδα Pbf, ώστε να παραχθεί το προϊόν 1-MeO-GlcN-DABF5, το οποίο απομονώθηκε με ημιπαρασκευαστικό RP-HPLC και ταυτοποιήθηκε με Φασματομετρία Μάζας ESI-MS και NMR φασματοσκοπία. Πρόκειται να μελετηθεί η βιολογική δράση του προϊόντος, ώστε να εξακριβωθεί ο ρόλος του στην πρόληψη της αγγειογένεσης.

Solid Phase Synthesis of Glycopeptide Analogues



Σύνθεση Πρωτοτύπων μη Πεπτιδικών Μιμητών του PAR-1 Υποδοχέα της Θρομβίνης με δυο ή τρεις Φαρμακοφόρες Ομάδες

Πασχαλίνα Κέππα, Μαρία-Ελένη Ανδρούτσου, Θεόδωρος Τσέλιος και Ιωάννης Ματσούκας

Τμήμα χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 26500, Ελλάς

K. Kelaidonis, A. Resvani, K. Prousalis, T. Tselios, J. Matsoukas and T. Tseggenidis

Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products, University of Patras, 265 00, Patra, Greece

Key words: Glycopeptide analogues, 1-MeO-GlcN-DABF5 synthesis, solid phase, angiogenesis

Glycopeptides are very important chemical compounds because of the fact that their biological characteristics are a combination of sugar and protein or peptide properties and can be used as drugs. Until now, some synthetic glycopeptides have been used as antibacterial and anti-inflammatory factors as well as antibiotics, such as *Sideromycin*, *Vancomycin* and *Teicoplanin*. In this study, a glycopeptide analogue was synthesized using the aminosugar glucosamine. The amino-group of glucosamine was initially protected with the Fmoc-group. The anomeric carbon atom was then methylated using 1.25 M hydrochloric acid in methanol solution. The methylated aminosugar was coupled on the 4-Methoxybenzhydryl resin (MDMR) and the Fmoc-group was removed using 20% piperidine in DMF solution. The next step was the binding of the Thrombin receptor mimetic DABF4 analogue in the presence of DIC, HOBT. After the cleavage of protected analogue, Pbf-group was removed and the final product 1-MeO-GlcN-DABF5 was further purified by semi-preparative RP-HPLC and identified by Mass Spectrometry (ESI-MS) and NMR Spectroscopy. Biological activity will be studied so as to define its role on prevention of Angiogenesis.

1. El Khadem H.S.: Carbohydrate Chemistry: Monosaccharides and their Oligomers, 1988
2. Koeller K., Wong C.H.: Synthesis and Applications of Biologically Relevant Glycopeptides, 2000
3. Mamoru M.: Trends in Glycoscience and Glycotechnology. Vol.13, No.69, pp.11-30, 2001
4. Alexopoulos K., Fatseas P., Melissari E., Vlahakos D., Smith J., Mavromoustakos T., Saifeddine M., Moore G., Hollenberg M., Matsoukas J.: *Med. Chem.* 7: 1033-1041 (1999)

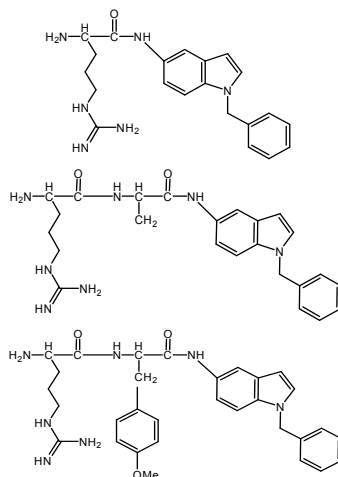
Οι υποδοχείς της θρομβίνης είναι ελκυστικοί στόχοι για τη σύνθεση φαρμάκων διότι διαμεσολαβούν σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες της θρομβίνης, όπως είναι η θρόμβωση, η αιμόσταση και οι φλεγμονώδεις ασθένειες. Η θρομβίνη ενεργοποιεί τον PAR-1 με πρωτεολυτική διάσπαση του N-τελικού άκρου στην εξωκυττάρια περιοχή μεταξύ της Arg⁴¹ και Ser⁴² αποκαλύπτοντας ένα νέο N-τελικό άκρο που περιλαμβάνει το ενεργό μοτίβο SFLLRN, το οποίο λειτουργεί ως προσδεμένος υποκαταστάτης. Πρόσφατες μελέτες δομής-δραστικότητας στο εργαστήριό μας έδειξαν ότι συνδυασμός των δύο φαρμακοφόρων ομάδων (φαινυλίου, γουανιδινομάδας) μαζί με παρακείμενη πρωτοταγή αμινομάδα είναι απαραίτητος για τη μέγιστη βιολογική απόκριση των πεπτιδικών παραγόντων του υποδοχέα της θρομβίνης. Βασιζόμενοι σε αυτήν τη μελέτη σχεδιάσαμε και συνθέσαμε μη πεπτιδικούς μιμητές, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ινδόλιο και δύο ή τρεις φαρμακοφόρες ομάδες (φαινύλιο, γουανιδινομάδα, αμινομάδα και καρβοξύλιο) σκοπεύοντας στη βελτίωση της συγγένειας πρόσδεσης με τον PAR-1 υποδοχέα. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε στερεά φάση, με τη χρήση της CLTR-Cl ρητίνης, και σε οργανικό διάλυμα (σύζευξη του ινδολικού υποστρώματος, γουανιδιλίωση και τελική αποπροστασία). Τα ανάλογα που συντέθηκαν θα ελεγχθούν για την ικανότητά τους να αναστέλουν τη συσσωμάτωση αιμοπεταλίων που επάγει η θρομβίνη και τη χαλάρωση της αορτής σε αρουραίους με δοσοεξαρτώμενο τρόπο.

Synthesis of Novel Non-Peptide Mimetic of PAR-1 Thrombin Receptor with two or three Pharmacophoric Groups

Pasxalina Keppa, Maria-Eleni Androutsou, Theodore Tselios and John Matsoukas

Department of Chemistry, University of Patras, Patra, 26500, Greece

Key words: Thrombin receptors, PAR-1, non-peptide mimetic, synthesis



Thrombin receptors are attractive drug discovery targets because they mediate a variety of cellular actions of thrombin, such as thrombosis, hemostasis and inflammatory diseases. Thrombin activates PAR-1 by proteolytically cleaving the N-terminal extracellular domain between Arg⁴¹ and Ser⁴² to reveal a new N-terminus containing the activation motif SFLLRN, which serves as a *tethered* peptide ligand. Recent structure-activity studies in our laboratory have shown that a cluster of the two pharmacophoric groups (phenyl, guanidine) together with an adjacent primary amino group is important for expression of maximum biological activity by thrombin receptor-derived peptides. In this study we have designed and synthesised, non peptide mimetics using the indole template and two or three pharmacophoric groups (phenyl, guanidine, amino and carboxyl) aiming at improving the binding affinity with the PAR-1 receptor. The synthesis was carried out in solid phase, with the use of CLTR-Cl resin, and in organic solution (coupling of indole template, guanidilation and final deprotection). The synthesised analogues will be tested for their ability to inhibit platelet aggregation induced by thrombin and rat aorte relaxation in concentration dependent manner.



Κουμαρινικά Παράγωγα που Δρουν ως Δεσμευτές Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και η Πιθανή τους Εμπλοκή στην Ασθένεια Alzheimer

Χρήστος Α. Κοντογιώργης^{1,2}, Yanan Xu², Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα¹, Yuan Luo²

¹Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, 54124, Θεσσαλονίκη; ²University of Maryland, Department of Pharmaceutical Sciences, Baltimore, MD21201-1180, USA.

Το οξειδωτικό στρες και ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στην ανάπτυξη της ασθένειας Alzheimer είναι στόχος πολλών σύγχρονων μελετών (1). Ο

ρόλος των ελευθέρων ριζών στην ασθένεια του Alzheimer έχει δείξει ότι σχετίζεται με το Αβ (αμυλοειδής-β), τα οποία πιστεύεται ότι παίζουν το

ρόλο προ-οξειδωτικού. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), μια από τις βασικά ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), είναι υπεύθυνο για τις αλλοιώσεις που σχετίζονται με τα Αβ στα κύτταρα (2). Διάφορα φυσικά προϊόντα θεωρούνται ότι δρουν ως αντιοξειδωτικά, όπως τα φλαβονοειδή, κουμαρινικά παράγωγα και άλλα (3). Μια σειρά από κουμαρινικά παράγωγα έχουν συντεθεί και μελετηθεί στο εργαστήριο μας για την αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική τους δράση (4). Στην παρούσα εργασία ορισμένα από αυτά τα κουμαρινικά παράγωγα μελετήθηκαν ως σαρωτές του υπεροξειδίου του υδρογόνου με τη μέθοδο DCF, χρησιμοποιώντας δύο τύπους κυττάρων: α) *αγρίου τύπου* (N2a) νευροβλαστικά κύτταρα και β) APP/S1 ($\Delta 9$) μεταλλαγμένα κύτταρα (εκφράζοντας τα Αβ). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, κάποια από αυτά βρέθηκαν να είναι δραστικοί δεσμευτές του υπεροξειδίου του υδρογόνου και η δράση τους βρέθηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση και από το χρόνο. Η δράση τους ως σαρωτές ποικίλει ανάμεσα στις δύο διαφορετικές σειρές κυττάρων. Ειδικά στην περίπτωση των $\Delta 9$ μεταλλαγμένων κυττάρων, η αντιοξειδωτική δράση ήταν πιο σημαντική σε σχέση με αυτή που εμφανίστηκε στα *αγρίου τύπου* κύτταρα. Επιπρόσθετα ο προστατευτικός ρόλος των κουμαρινικών ενώσεων στην κυτταρική καταστροφή που προκλήθηκε από το υπεροξειδίο του υδρογόνου μελετήθηκε με τη μέθοδο MTT. Τα παραπάνω αποτελέσματα μας δείχνουν ότι τα υπό μελέτη κουμαρινικά παράγωγα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγό-ενώσεις στην αντιμετώπιση της ασθένειας του Alzheimer.

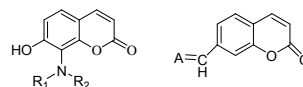
Coumarin Derivatives Acting as Hydrogen Peroxide Scavengers and their Possible Implication in Alzheimer Disease

Christos A. Kontogiorgis^{1,2}, Yanan Xu², Dimitra Hadjipavlou-Litina¹, Yuan Luo²

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotle University, 54124 Thessaloniki, Greece; ²University of Maryland, Department of Pharmaceutical Sciences, Baltimore, MD21201-1180, USA

Key words: Coumarin derivatives, hydrogen peroxide scavengers, Alzheimer disease
Oxidative stress and the role of free radicals in the development of Alzheimer Disease (AD) have been

the target of many recent studies (1). The role of free radicals in AD is thought to be associated with Αβ (amyloid-β), which acts like as a prooxidant. Hydrogen peroxide (H_2O_2), one of the main Reactive Oxygen Species (ROS), is responsible for Αβ-associated damages in cells (2). A number of natural products are thought to act as antioxidants, such as flavonoids, coumarin and others (3). A number of coumarin derivatives have been previously synthesized and tested in our laboratory as anti-inflammatory and antioxidant agents (4). In this study we tested our coumarin derivatives as hydrogen peroxide scavengers with the DCF assay using two types of neuronal cells: a) wild type (N2a) neuroblastoma cells and b) APP/PS1 transgenic ($\Delta 9$) mutant cells (expressing Αβ). According to our results, some coumarin derivatives were found to be active in attenuating hydrogen peroxide, and their activity was found to be concentration and time depended. The scavenging activity was varied between the types of cell cultures. Especially for the $\Delta 9$ mutant cells, the antioxidative effects are more profound than the wild type cells. Furthermore, the protective role of coumarin derivatives on the cell damage induced by hydrogen peroxide was performed using MTT assay. These results suggest that these compounds could be used as a template in the design of new molecules with possible role in Alzheimer Disease.



Acknowledgments: Christos A. Kontogiorgis kindly thanks the National Scholarship's Foundation (I.K.Y.) for the financial support of a part of this research. Dr Yuan Luo kindly thanks the National Institute of Health, USA, for the financial support.

REFERENCES

1. Smith J.V., Luo Y.: *J. Alzheimer's Dis.* 5: 287-300 (2003)
2. Lu L., Hackett S.F., Mincey A., Lai H., Campochiaro P.A.: *J. Cell. Physiol.* 206: 119-125 (2006)
3. Whang W.K., Park H.S., Ham I., Oh M., Namkoong H., Kim H.K., Hwang D.W., Hur S.Y., Kim T.E., Park Y.G., Kim J.R., Kim J.W.: *Exper. Mol. Med.* 37: 436-446 (2005)
4. a) Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D.J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 611-614 (2004); b) Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D.J.: *J. Med. Chem.* 48: 6400-6408 (2005); c) Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D.J.: *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* 21: 21-29 (2005)



In Silico Μελέτες ADME Ιδιοτήτων AT1 Ανταγωνιστών

K. Κουκουλίτσα¹, Π. Ζουμπουλάκης¹, Α. Ρεσβάνη², Ι. Ματσούκας², Θ. Μαυρομούστακος¹

¹Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Βασ. Κωνσταντίνου 48, 11635 Αθήνα και ²Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής, Βιοχημείας και Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστήμιο Πάτρας, 26500 Ρίο, Ελλάς

Η ανάγκη της φαρμακευτικής βιομηχανίας να περιορίσει τον χρόνο και το υψηλό κόστος κατά την πορεία ανάπτυξης νέων φαρμάκων που οφείλεται εν μέρει στο χαμηλό φαρμακοκινητικό τους προφίλ, έδωσε ώθηση στην ανάπτυξη *in silico* μεθόδων για την έγκαιρη αξιολόγηση των ιδιοτήτων που αφορούν τις ιδιότητες απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης (ADME). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ορισμένες σημαντικές φαρμακοκινητικές και μεταβολικές ιδιότητες ανταγωνιστών της Αγγειοτενσίνης II (SARTANs) με την χρήση των λογισμικών VolSurf και MetaSite. Η σειρά δεδομένων περιλαμβάνει μόρια που χορηγούνται ως αντιυπερτασικά φάρμακα, καθώς και άλλα συνθετικά ανάλογα. Συγκεκριμένα, δόθηκε έμφαση στην πρόβλεψη της διαπερατότητας των μορίων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, από τα κύτταρα Caco-2, της συγγένειας με την αλβουμίνη του πλάσματος, της υδατοδιαλυτότητας, τον όγκο κατανομής, καθώς και στην πρόβλεψη της θέσεως μεταβολισμού από τα κυτοχρώματα CYP2C9 και CYP3A4. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν σημαντικές πληροφορίες που μπορεί να οδηγήσουν στη βελτιστοποίηση του φαρμακοκινητικού και μεταβολικού προφίλ των συνθετικών ενώσεων.

In Silico Studies of ADME Properties of AT1 Receptor Antagonists

C. Koukoulitsa¹, P. Zoumpoulakis¹, A. Resvani², J. Matsoukas², T. Mavromoustakos¹

¹Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation, Vas. Constantinou 48, 11635 Athens; ²Division of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products, Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Rio, Greece

Key words: AT1 Receptor antagonists, *in silico* studies, ADME properties (absorption, distribution, metabolism, excretion), pharmaceutical industry

The necessity of the pharmaceutical industry to limit the time and expense of drug development due to the non optimal pharmacokinetic profile of candidate drugs, has initiated the interest in high-throughput screening methods and their *in silico* counterparts for rapid estimation of ADME properties (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion) at the early stages of drug development. In the current study, some relevant pharmacokinetic and metabolic properties are theoretically calculated for AT1 antagonists (SARTANs) using VolSurf and MetaSite software. The dataset is comprised of already marketed anti-hypertensive drugs and other synthetic derivatives. In particular we have focused on aspects of blood-brain barrier penetration, Caco-2 cell absorption, plasmatic proteins binding, aqueous solubility, volume of distribution, and metabolism by CYP2C9 and CYP3A4. The results reveal crucial information that may be useful for structural modifications of the synthetic molecules under study leading to a better pharmacokinetic and metabolic profile.



Ολική Σύνθεση του 4-Φωσφορικού Εστέρα της 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης (MEP) και Ισοτοπομερών της 2-C-μεθυλο-D-ερυθριτόλης

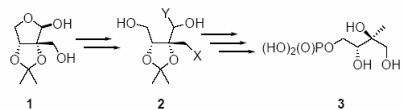
A.E. Κουμπής, Σ.Σ. Κωτούλας, Ι.Κ. Γάλλος

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, Ελλάς

Το φωσφορικό παράγωγο MEP (3) είναι ένα από τα σημαντικά ενδιάμεσα της ανεξάρτητης του μεβαλονικού βιοσυνθετικής οδού των ισοπρενοειδών (MIP). Επιπλέον, το 3 είναι πολύ σημαντικός μεταβολίτης του *Plasmodium falciparum*, του παράσιτου που είναι υπεύθυνο για την ελονοσία. Η MIP υφίσταται μόνο στο μεταβολισμό των βακτηρίων, των χλωροπλάστων των φυτών και των φυκών. Για αυτό το λόγο μια ολοκληρωμένη διερεύνηση και αξιοποίηση της MIP θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τύπων ζιζανιο-

κτόνων και εξειδικευμένων φαρμάκων για παθογενείς μικροοργανισμούς. Ωστόσο, η πλήρης διευκρίνιση της MIP δεν έχει ακόμη επιτευχθεί και κάθε εύκολη παρασκευαστική μέθοδος για τα γνωστά της ενδιάμεσα θα μπορούσε να αποδειχθεί πολύ χρήσιμη. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται εναλλακτική συνθετική προσέγγιση όσον αφορά στο φωσφορικό εστέρα 3 και πολύτιμα για τον προσδιορισμό της βιοσυνθετικής οδού δευτεριωμένα ανάλογα (2b και 2c) της πρόδρομης ένωσης του, το ακετονίδιο της 2-C-μεθυ-

λο-D-ερυθρίτης (2a). Το σχήμα που εφαρμόστηκε χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη το ακετονίδιο της 2-C-υδροξυμεθυλο-D-ερυθρόζης (1) και παράγει, μέσω μιας στρατηγικής μονοπροστασίας, τις ενώσεις στόχους με σύντομο τρόπο και σε υψηλή απόδοση.



a X = Y = H; b X = D, Y = H; c X = H, Y = D

Total Synthesis of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) and Isotopomers of 2-C-methyl-D-erythritol

A.E. Koumbis, S.S. Kotoulas, J.K. Gallos

Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Key words: 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) MEP (3) is a key intermediate of the mevalonate independent pathway (MIP) for the biosynthesis of isoprenoids. Additionally, 3 is a critical metabolite of *Plasmodium falciparum*, the parasite responsible for malaria. MIP is only present in bacteria, plant chloroplast and algae metabolism. For this reason, a thorough investigation and exploitation of MIP could

enable the development of new classes of herbicides and specific drugs against pathogenic microorganisms. Nevertheless, the complete elucidation of MIP has not been achieved yet and each facile preparative method for its known intermediates could be highly useful. Here we present an alternative synthetic approach toward 3 and valuable for the identification of the biosynthetic pathway deuterated analogues (2b and 2c) of its precursor, 2-C-methyl-D-erythritol acetonide (2a). This scheme uses 2-C-hydroxymethyl-D-erythrose acetonide (1) as starting material and delivers, through a mono-protection strategy, the target compounds in a short way and in high yield.

REFERENCES

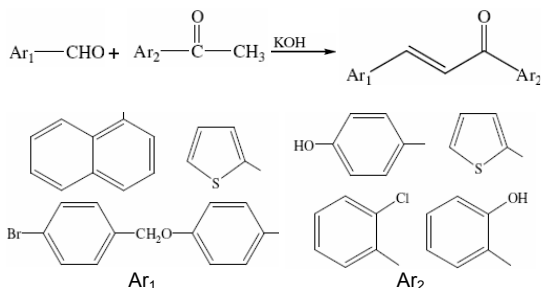
- (a) Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H.: *Biochem. J.* 295: 517-524 (1993); (b) Arigoni D.; Eisenreich W., Latzel C., Sagner S., Radykewicz T., Zenk M. H., Bacher A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 10600-10605 (1997); (c) Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk M.H., Bacher A.: *Chem. Biol.* 5: R221-R233 (1998)
- (a) Flesch G., Rohmer M.: *Eur. J. Biochem.* 175: 405-411 (1988); (b) Rohmer, M.; Sutter B., Sahn H.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 1471-1472 (1989); (c) Eisenreich W., Menhard B., Hylands P.J., Zenk M.H., Bacher A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6431-6436 (1996); (d) Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A., Rohmer M.: *FEBS Lett.* 400: 271-274 (1997); (e) Schwender J., Seeman M., Lichtenthaler H.K., Rohmer M.: *Biochem. J.* 316: 73-80 (1996)



Σύνθεση και Φαρμακοχημική Μελέτη Χαλκονών

Κούσκουρα Μαρία και Χατζηπαύλου-Λίτινα Δήμητρα

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124 Θεσσαλονίκη, e-mail : hadjipav@pharm.auth.gr



Με αξιοποίηση της computer aided drug design γίνεται προσπάθεια σχεδιασμού και σύνθεσης σειράς χαλκονών με, αντι-ιικές, αντικαρκινικές ιδιότητες, πιθανή ανασταλτική δράση επί της λιποξυγονάσης αλλά και με *in vivo* αντιφλεγμονώδη δράση. Πρόσφατες δημοσιεύσεις επιβεβαιώνουν την άμεση σύνδεση του καρκίνου με το πολύπλοκο φαινόμενο της φλεγμονής. Η σύνθεση (1) των χαλκονών ακολουθεί το ανωτέρω σχήμα

και η δομή τους επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπική εξέταση και στοιχειακές αναλύσεις. Παράλληλα, επειδή η λιποφιλικότητα αποτελεί φυσικοχημική ιδιότητα που εμπλέκεται στη βιολογική δράση, προσδιορίζεται πειραματικά και θεωρητικά η λιποφιλικότητα των χαλκονών. Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν για την *in vitro* ικανότητά τους i) να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλο-πικροδραζυλίου (DPPH), ii) να αναστέλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, iii) να δεσμεύουν το υπεροξειδικό ανιόν, iv) να αναστέλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης, v) να αναστέλουν την πρωτεολυτική δράση των σερινοπρωτεασών (θρυψίνη και α-χυμοθρυψίνη) καθώς και vi) την εστερασική δράση των δύο ενζύμων, vii) να αντιδρούν με τη γλουταθειόνη (GSH). Ακόμη μελετώνται και για την *in vivo* ικανότητά τους να αναστέλουν το οίδημα του άκρου ποδός επίμυα που επάγεται από ενδοδερμική χορήγηση καρραγενίνης.

Synthesis and Pharmacochemical Study of Chalcones

Maria Kouskoura and Dimitra Hadjipavlou-Litina
Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotelian University, Thessaloniki 54124, Greece, e-mail: hadjipav@pharm.auth.gr

Key words: Chalcones, synthesis, pharmacochemical study

Employing the computer aided drug design, an attempt has been made in order to design and synthesize a series of new chalcones with possible inhibitory activity on lipoxygenase, antiviral and anti-cancer abilities and anti-inflammatory activity. Recently published researches confirm that cancer is directly related to the complicated phenomenon of inflammation. The synthesis method that has been

used is the above indicated and the structure of the new compounds was verified by spectroscopic methods and their elemental analysis. Since lipophilicity is an important property involved in biological activity, it is theoretically and experimentally determined. The new compounds were tested *in vitro* for their ability: i) to interact with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) stable free radical, ii) to inhibit lipid peroxidation, iii) to scavenge the superoxide anion, iv) to inhibit the activity of sobeyan lipoxygenase, v) to inhibit the proteolytic and esterase activity of serineproteases (trypsin and α -chymotrypsin), vii) to interact with glutathione (GSH) and viii) to inhibit *in vivo* the carragenin induced rat paw edema.

REFERENCES

1. Dimmock J., et al. : J. Med. Chem. 41: 1014-1026 (1998)



Υπερμοριακά Βιομιμητικά Συστήματα

N. Κυρίτσης, Σ. Ζαχαριάδου, Ε. Πετρίδου, Γ. Μ. Τσιβγούλης

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν σχήμα κώνου κι εξαιρετικές συμπλεκτικές ιδιότητες, ως αποτέλεσμα της μοναδικής δομής τους. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη σύνθεση υπερμοριακών συστημάτων. Αρκετά συντιθέμενα παράγωγα κυκλοδεξτρινών έχουν προταθεί ως βιομιμητικά συστήματα, σχετιζόμενα με διεργασίες μεταφοράς ουσιών. Οι αιθέρεις στέμματος, μια άλλη σημαντική κατηγορία υπερμοριακών υποδοχέων, είναι κυκλικοί αιθέρεις με πολύ καλές συμπλεκτικές ιδιότητες κατιόντων. Τέλος, οι φωτοχρωμικές ομάδες μπορούν, αντιστρεπτά, είτε να μεταβαίνουν μεταξύ δύο διαφορετικών διαμορφώσεων (Σχήμα, *trans*- και *cis*- διαμορφώσεις) είτε να διμερίζονται (Σχήμα, δομές I, II). Οι μεταβολές από τη *trans*- στη *cis*- κι από τη μονομερή στη διμερή δομή, επιτυγχάνονται με ακτινοβολήση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, ενώ η επιστροφή στην αρχική κατάσταση πραγματοποιείται μέσω θέρμανσης ή ακτινοβολήσης. Κατάλληλοι συνδυασμοί των παραπάνω αυτών λειτουργικών στοιχείων, μπορούν να οδηγήσουν σε *υπερμοριακούς πολυυποδοχείς-μεταφορείς* που θα χρησιμοποιηθούν ως *βιομιμητικά συστήματα*. Στη παρούσα εργασία παρουσιάζονται οι πορείες σύνθεσης ενός υπερμοριακού μεταφορέα (ένωση 1), ενός *φωτοελεγχόμενου* υπερμοριακού μεταφορέα (ένωση 2) κι ενός *φωτοελεγχόμενου* καναλιού (ένωση 3). Οι ενώσεις 1 και 2 μπορούν να μεταφέρουν αμινοξέα και βενζοϊκά ή πικρικά άλατα, ενώ η ένωση 3 μπορεί

να δράσει ως *φωτοελεγχόμενο* διαμεμβρανικό κανάλι ιόντων νατρίου.

Supramolecular Biomimetic Systems

N. Kyritsis, S. Zachariadou, E. Petridou and G. M. Tsvigoulis

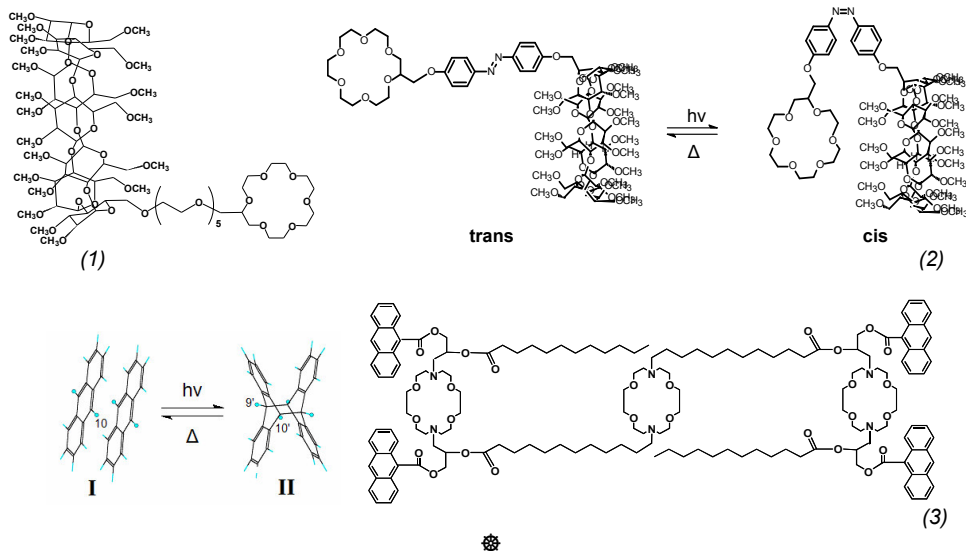
Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Rio, Greece

Key words: Supramolecular biomimetic systems, cyclodextrins, crown ethers, photochromic groups, supramolecular carriers (1), photocontrolled supramolecular carrier (2), photo-controlled channel (3)

Cyclodextrins have toroidal shape and excellent complexation properties, as a result of their unique structure. Thus they have been used extensively in the construction of supramolecular systems. Many cyclodextrin derivatives serve as biomimetic systems, related to transportation of certain substances. Crown ethers, another important category of supramolecular receptors, are cyclic ethers with very good complexation properties for cations. Finally, photochromic groups can, reversibly, change their conformational structure (Figure, *trans*- and *cis*- conformations) or dimerize (structures I, II). The changes from *trans*- to *cis*- or from a monomer to a dimer structure can be achieved by exposure to radiation at certain wavelengths, while the reverse transformation can take place either by heating, or irradiation. Appropriate combinations of the above functional groups, can lead to *supramolecular multireceptors-carriers*, which will be used as *biomimetic*

systems. In the present project, the synthetic pathways for three such systems are presented: a) a supramolecular carrier (compound 1), b) a *photocontrolled* supra-molecular carrier (compound 2) and

c) a photocontrolled channel (compound 3). Compounds 1 and 2 can transport aminoacids and benzoic or picric salts, while compound 3 can serve as a *photocontrolled* so-dium cations channel.



Διαμορφωτική Μελέτη Αναλόγων του Leuprolide που Εμπλέκονται στη Θεραπεία του Καρκίνου

Δέσποινα Λαιμού¹, Ειρήνη Φρυλιγγού¹, Αναστάσιος Τρογκάνης², Θεόδωρος Τσέλιος¹

¹Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500, Πάτρα, Ελλάς και ²Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110, Ιωάννινα, Ελλάς

Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH) είναι ο κυριότερος ρυθμιστής του αναπαραγωγικού συστήματος. Αλληλεπίδραση του δεκαπεπτιδίου της GnRH με υψηλής συγγένειας υποδοχείς οδηγεί στη βιοσύνθεση και απελευθέρωση των γοναδοτροπινών ορμονών LH και FSH, αλλά και άλλες σημαντικές λειτουργίες. Ανάλογά της αγωνιστές, όπως τα Leuprolide, Triptorelin, αλλά και ανταγωνιστές, όπως το Cetrorelix, χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία αναπαραγωγικών δυσλειτουργιών, όπως και κάποιων μορφών καρκίνου. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική μελέτη του Leuprolide, όπως και γραμμικών αναλόγων του τα οποία έχουμε σχεδιάσει στο εργαστήριο με τροποποίηση στη θέση 5 όπου υπάρχει Tyr και αντικατάσταση του H του OH με -CH₃ και στη θέση 9 Aze αντί Pro. Η διαμορφωτική μελέτη πραγματοποιήθηκε με χρήση τεχνικών NMR και μοριακής μοντελοποίησης χρησιμοποιώντας σταθμό εργασίας Silicon Graphics O₂ και το λογισμικό Quanta 2005. Οι υπολογισμοί υλοποιήθηκαν με το πεδίο δυνάμεων CHARMm.

Conformational Analysis of Leuprolide Analogues that are Involved in the Treatment of Cancer

Despina Laimou¹, Irene Friligou¹, Anastasios Troganis², Theodore Tselios¹

¹Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products, University of Patras. 26500, Patra; ²Department of Biological Applications and Technologies, University of Ioannina, GR 45110 Ioannina, Greece

Key words: GnRH, cancer treatment, leuprolide triptorelin, cetrorelix, conformation analysis

Gonadotropin-Releasing hormone (GnRH) is the central regulator of the reproductive system. GnRH is a decapeptide which binds to the receptor with high affinity and leads to the biosynthesis and the release of the gonadotropin hormones LH and FSH. GnRH analogues, as Leuprolide, Triptorelin, (agonists) and Cetrorelix (antagonists), are clinically valuable for the treatment of a variety of reproductive disorders and have therapeutic value in the treat-

ment of cancers. In this project, we tried to accomplish conformational analysis of Leu-prolide and two linear analogues which are designed and synthesized in our laboratory. These analogues has been modified in residues Tyr⁵ and Pro⁹ by Tyr(OMe) and

Aze. The conformational analysis accomplished using NMR and Molecular Modeling techniques. Computer calculations were performed on a Silicon Graphics O2 workstation using Quanta 2005 and CHARMM force field.



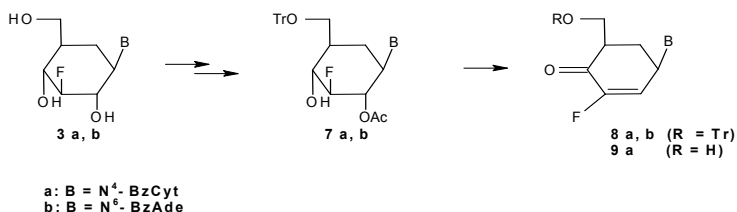
Ακόρεστα Φθορο-κετοπυρανοσυλο-νουκλεοσίδια: Σύνθεση και Βιολογική Αποτίμηση των 3-Φθορο-4-κετο-β-D-γλυκοπυρανοσυλο-παραγώγων της N⁴-Βενζοϋλο-κυτοσίνης και N⁶-Βενζοϋλο-αδενίνης

Στέλλα Μαντά, Γιώργος Αγγελής, Ευαγγελία Τσουκαλά, Νίκη Τζιουμάκη και Δημήτρης Κομιώτης

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάς

Η σύνθεση των νουκλεοσιδίων 1-(2,4,6-τρι-Ο-ακε-τυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοσυλο)-N⁴-βεν-ζοϋλο-κυτοσίνη και 9-(2,4,6-τρι-Ο-ακε-τυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοσυλο)-N⁶-βενζοϋλο-αδενίνη, έγινε με τη σύζευξη του πλήρως ακετυλιωμένου παραγώγου της 3-δεοξυ-3-φθορο-D-γλυκοπυρανόζης με τις σιλυλιωμένες βάσεις N⁴-βενζοϋλο κυτοσίνη και N⁶-βενζοϋλο-αδενίνη, αντιστοίχως. Ακολούθησε πλήρης αποπροστασία των ακετυλομάδων (3*a,b*) και μετά από μια σειρά ακετυλιωμένων βημάτων προστα-

σίας και αποπροστασίας παράχθηκαν τα μερικώς ακετυλιωμένα νουκλεοσίδια κυτοσίνης 7*a* και αδενίνης 7*b*. Τέλος, μετά από οξειδωση της υδροξυλομάδας στη θέση 4' και ταυτόχρονη απόσπαση της β-ακετοξυ ομάδας, συντέθηκαν τα ακόρεστα 3-φθορο-4-κετο-β-D-γλυκοπυρανοσυλο παράγωγα 8*a,b* και 9*a*. Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν για την πιθανή αντιϊκή και αντικαρκινική δράση τους και συγκριτικά με την 5FU, έδειξαν μεγαλύτερη αντιγονοϊκή δραστηριότητα καθώς και αντιϊκή δράση έναντι του rotavirus.



Unsaturated Fluoro-ketopyranosyl Nucleosides: Synthesis and Biological Evaluation of 3-Fluoro-4-keto-β-D-glucopyranosyl Derivatives of N⁴-Benzoyl Cytosine and N⁶-Benzoyl Adenine

Stella Manta, George Agelis, Evangelia Tsoukala, Niki Tzioumaki and Dimitri Komiotis

Department of Biochemistry and Biotechnology, Laboratory of Organic Chemistry, University of Thessaly, Larissa, Greece

Key words: Protected β-nucleosides, 1-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine, 9-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glu-co-pyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine, synthesis, biological evaluation

The protected β-nucleosides 1-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cyto-

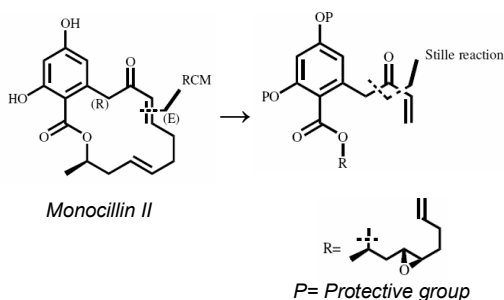
sine and 9-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine, were synthesized by the coupling of peracetylated 3-deoxy-3-fluoro-D-gluco-pyranose with silylated N⁴-benzoyl cytosine and N⁶-benzoyl adenine, respectively. The nucleosides were deacetylated (3*a,b*) and several subsequent protection and deprotection steps afforded the partially acetylated nucleosides of cytosine 7*a* and adenine 7*b*, respectively. Finally, direct oxidation of the free hydroxyl group at 4'-position of 7*a* and 7*b*, and simultaneous elimination reaction of the β-acetoxy group, afforded the desired unsaturated 3-fluoro-4-keto-β-D-glucopyranosyl derivatives 8*a,b* and 9*a*. These newly synthesized compounds were evaluated for their potential antitumor and antiviral activity. Compared to 5FU, the newly synthesized derivatives showed to be more efficient as antitumor growth inhibitors and they exhibited direct antiviral effect toward rotavirus.



Μελέτες Κυκλοποίησης μέσω Μετάθεσης Ενόνης-ολεφίνης. Ολική Μελέτες Κυκλοποίησης μέσω Μετάθεσης Ενόνης-ολεφίνης. Ολική Σύνθεση της Μονοκιλίνης II

Α.Γ. Μαράντη¹, Ε.Α. Μπούζας¹, Η.Α. Κουλαδούρος²

¹Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα και ²Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας, Ινστιτούτο Φυσι-κοχημείας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημοκритος», 15310, Αθήνα, Ελλάς. e-mail: ecoula@chem.demokritos.gr



διενίου I, η αντίδραση RCM πραγματοποιείται με ικανοποιητική απόδοση στο υπόστρωμα αυτό.

Studies of Enone-Ene Ring Closing Metathesis. Total Synthesis of Monocillin II

A.G. Maranti¹, E.A. Bouzas¹, E.A. Couladouros²

¹Chemistry Laboratories, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, Athens, 118 55; ²Laboratory of Natural Product Synthesis & Bioorganic Chemistry, NCSR Demokritos, 15310, Athens, Greece, e-mail: ecoula@chem.demokritos.gr

Key words: *Monocillin II, synthesis, enone-ene ring closing metathesis*

Η *Μονοκιλίνη II*, η οποία απομονώθηκε από καλλιέργειες του μύκητα *Monocillium Nordinii*, ανήκει στην κατηγορία των ρεσορκυλικών μακρολιδίων και εμφανίζει σημαντική βιολογική δράση. Παρουσιάζεται γενική μεθοδολογία για τη σύνθεση της παραπάνω ένωσης χρησιμοποιώντας ως αντίδραση-κλειδί την ολεφινομεταθετική κυκλοποίηση (RCM). Το σχεδιασμένο πρόδρομο διένιο I περιέχει το αρωματικό τμήμα υποκατεστημένο με όλες τις απαραίτητες λειτουργικές ομάδες, καθώς και την αντίστοιχη πλευρική αλυσίδα (R) που οδηγεί στο επιθυμητό φυσικό προϊόν. Η επιλογή της προστατευτικής ομάδας (P) είναι καθοριστική για την ολοκλήρωση της σύνθεσης. Παρά την τάση ενολοποίησης της τελικής ενόνης του

Monocillin II, which was isolated from cultures of the fungus *Monocillium Nordinii*, belongs to the general category of resorcylic macrolides and has an important biological activity. A general methodology for the synthesis of this compound is presented employing Ring Closing Metathesis (RCM) as the key step. The designed diene precursor consists of the fully functionalized, aromatic part and a variable side chain leading to the desired natural product. The choice of the protective group (P) is crucial for the completion of the synthesis. The RCM reaction on substrate gives satisfactory yields, despite the tendency for enolization of the terminal enone .



Μελέτες με Στόχο την Ανάπτυξη Πρωτοτύπων Συζευγμάτων και Υβριδίων Ψωραλενίων και Ασιπρετίνης ως Πιθανών Αντιψωριακών Παραγόντων

Μ. Μηλισοπούλου, Κ. Αθανασόπουλος και Δ. Παπαϊωάννου

Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάς

Ψωραλένια, όπως το τριοξαλένιο (1), σε συνδυασμό με ακτινοβολήση με υπεριώδεις φως Α (PUVA) και η ασιπρετίνη (2), ένα όξινο ρετινοειδές δεύτερης γενιάς, χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως για την αντιμετώπιση αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως είναι για παράδειγμα η ψωρίαση. Καλύτερα αποτελέσματα, όμως, και μάλιστα με λιγότερες ανεπιθύμητες παρενέργειες, επιτυγχάνονται, όταν οι συγκεκριμένοι αντιψωριακοί αυτοί παράγοντες χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό (Re-

PUVA). Στην παρούσα εργασία περιγράφουμε τις προσπάθειές μας να αναπτύξουμε μεθοδολογίες παρασκευής πρωτότυπων συζευγμάτων τριοξαλενίου με ασιπρετίνη τριών τύπων. Στον πρώτο τύπο (3) τα δύο μόρια περιέχονται σε ένα μικτό σύζευγμα με πολυαμίνας, π.χ. τη σπερμίνη (SPM). Στο δεύτερο τύπο (4) οι δύο χημικές οντότητες συνδέονται άμεσα μέσω ενός ευαίσθητου στις κυτταρικές εστεράσες, εστερικού δεσμού. Τέλος, ο τρίτος τύπος (5) αποτελεί υβρίδιο των δύο

ενώσεων. Η σύνθεση των ενώσεων 3-5 έγινε εφικτή μέσω κατάλληλων χημικών τροποποιήσεων του εμπορικά διαθέσιμου τριοξαλενίου.

Studies towards the Development of Novel Psoralen-Acitreten Conjugates and Hybrids as Potential Antipsoriatic Agents

M. Militsopoulou, C. Athanassopoulos and D. Papaioannou

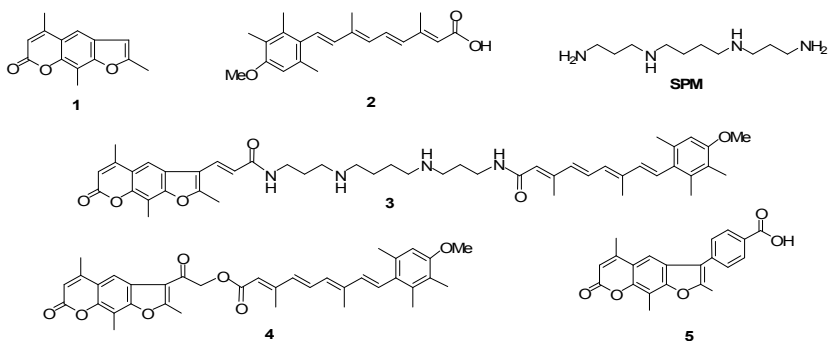
Laboratory of Organic Synthesis, Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Patra, Greece

Key words: Psoralen-acitreten, conjugates, hybrids, antipsoriatic agents, trioxsalen (1), acitreten (2), synthesis

Psoralens, such as trioxsalen (1), in combination with ultraviolet light A radiation (PUVA), and acitreten (2), a second generation acidic retinoid, are widely used to-day for the treatment of autoimmune di-

seases, like psoriasis. Better results with fewer side-effects are however obtained when the two above mentioned antipsoriatic agents are used in combination therapies (RePUVA). In the present work, we describe our efforts to develop methodologies for the preparation of novel trioxsalen-acitreten conjugates of three types. In the first type (3), the two molecules are joined together through a polyamine, such as spermine (SPM). In the second type (4), the two chemical entities are directly joined through an ester bond labile to the cell esterases. Finally, the third type (5) is a hybrid of the two compounds. The synthesis of compounds 3-5 was realized through suitable chemical modifications of the commercially available trioxsalen.

Ευχαριστούμε το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ), Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευση και Αρχική Επαγγελματική Κατάρτιση (ΕΠΕΑΕΚ II) και ειδικότερα το Πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II, για την χρηματοδότηση του ανωτέρω έργου.



Μελέτες με Στόχο την Ανάπτυξη Εναλλακτικών Μεθοδολογιών Ολικής Σύνθεσης Αναλόγων της Ασιτρετίνης με Μεταβολή στο Λιπόφιλο Τμήμα της

Σ. Μπαριάμης, Κ. Αθανασόπουλος και Δ. Παπαϊωάννου

Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα

Η ασιτρετίνη είναι όξινο ρετινοειδές δεύτερης γενιάς που χρησιμοποιείται σήμερα για την αντιμετώπιση σοβαρών περιπτώσεων ψωρίασης και άλλων δερματοπαθειών. Στην παρούσα εργασία περιγράφουμε τις προσπάθειές μας να αναπτύξουμε εναλλακτικές μεθοδολογίες για το κτίσιμο του ρετινοειδικού σκελετού με χρήση των πολύ καλά εδραιωμένων αντιδράσεων Wittig και Horner-Emmons. Οι μεθοδολογίες αυτές θα επιτρέψουν την εύκολη πρόσβαση σε σειρά πρωτότυπων ασιτρετινικών αναλόγων, που θα είναι κατάλληλα για μελέτες σχέσης δομής-βιολογικής δραστηριότητας, όπως είναι τα ρετινοειδή 1-6, με συμπυκνωμένους αρωματικούς ή ετεροαρωματικούς δακτύλιους στο λιπόφιλο τμήμα του μορίου.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ετεροαρωματικά ρετινοειδή, όπως τα 5 και 6, δεν ήταν δυνατόν να παρασκευασθούν με τη γραμμική $C_6C_1+C_5+C_5$ μεθοδολογία, που αναπτύξαμε πρόσφατα στο εργαστήριό μας, σύμφωνα με την οποία κατάλληλες αρωματικές αλδεύδες και ο Ε-φωσφονικός εστέρας 7 χρησιμοποιούνται για την παροχή των απαιτούμενων C_6C_1 και C_5 συνθονίων, αντίστοιχα.

Studies towards the Development of Alternative Methodologies for the Total Synthesis of Acitreten Analogues Incorporating Changes in the Lipophilic Part

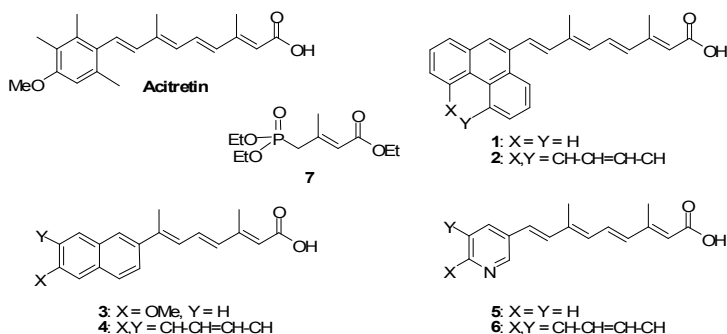
S. Bariamis, C. Athanassopoulos, D. Papaioannou

Laboratory of Organic Synthesis, Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Patras, Greece

Key words: Acitretin analogs, synthesis, lipophilic part

Acitretin is a second generation monoaromatic acidic retinoid currently used in the treatment of severe psoriasis and other dermatoses. In the present work, we describe our efforts towards the development of alternative methodologies for the as-

sembly of the retinoid skeleton using the well-established reactions Wittig and Horner-Emmons. These methodologies will allow ease access to a series of novel acitretin analogs suitable for structure-activity relationship studies, such as the retinoids 1-6, with condensed aromatic or heteroaromatic rings at the lipophilic part. It is worth noting that heteroaromatic retinoids like 5 and 6 could not be obtained by the linear $C_6C_1+C_5+C_5$ methodology, recently developed in our laboratory, whereby appropriate aromatic aldehydes and the *E*-phosphonate ester 7 are used for the provision of the required C_6C_1 and C_5 synthons, respectively.



Χρήση Νέας Μεθόδου Προσομοίωσης Διευρυμένων Φασμάτων NMR Φωσφόρου-31 Διασταυρούμενης Πόλωσης στη Μελέτη της Αλληλεπίδρασης Μοντέλων Μεμβρανών με Βιοδραστικά Πεπτιδία και Πεπτιδομιμητικούς ΑΤ1 Ανταγωνιστές

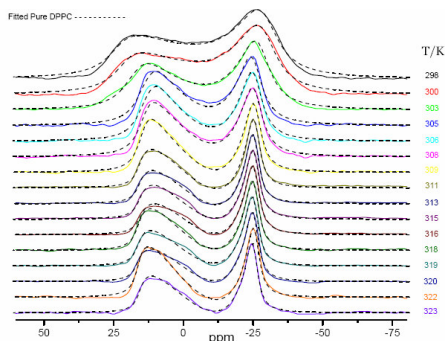
Νικόλαος-Πλούταρχος Μπενέτης

Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης EMA, Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας ΙΟΦΧ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών ΕΙΕ, Βασιλέως Κωνσταντίνου 48, Αθήνα 116 35, Ελλάδα

Ένας νέος αλγόριθμος προσομοίωσης ευρέων φασμάτων NMR φωσφορου-31 αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα στη διερεύνηση της διάταξης στο χώρο και της δυναμικής σε διαστρωματωμένα λιποσώματα με βάση διπλοστοιβάδες DPPC/H₂O (μοντέλο μεμβρανών) και παρόμοια δείγματα στα οποία είχαν προστεθεί ορισμένα βιοδραστικά μόρια. Η μέθοδος δοκιμάστηκε σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες πριν και μετά από τη φόρτιση τους είτε με β-Ala-Tyr ή Glu [1]. Αυτή την περίοδο μελετούμε τα εμπορικά αντιυπερτασικά Losartan και Candesartan Cilexetil (CaCi), όπως και τους μεταβολίτες τους, αντιστοιχώς Exp-3174 και Candesartan Cv (CaCv). Οι προσομοιώσεις των διευρυμένων φασματικών γραμμών Φωσφόρου-31 σε στατικά δείγματα (χωρίς τη χρήση MAS) και σε συνθήκες διασταυρούμενης πόλωσης (CP) από τα γειτονικά πρωτόνια στην περιοχή θερμοκρασιών 25 έως 50 °C αναπαρή-

γαγαν ικανοποιητικά τις πειραματικές φασματικές γραμμές. Οι τιμές των παραμέτρων των προσομοιώσεων υποδεικνύουν ακινητοποιημένες διαστρωματωμένες δομές και σχετικά ταχεία, μονοαξονική περιστροφή των μορίων του DPPC γύρω από τον επιμήκη άξονα των αλκυλικών αλυσίδων. Οι άξονες περιστροφής των λιπιδικών μορίων ήταν κεκλιμένοι ως προς την κάθετο στην επιφάνεια των στρωμάτων και ένα ασθενές δυναμικό προερχόμενο από την ανισότροπη μαγνητική επιδεκτικότητα των διπλοστοιβάδων ευνοούσε την διεύθυνση του πεδίου κατά μήκος της επιφάνειας των διπλοστοιβάδων. Η τοπολογία και των τεσσάρων αντιυπερτασικών μορίων περιορίστηκε στην ανώτερη υδρόφιλη περιοχή των διπλοστοιβάδων (headgroups of DPPC), ενώ το CaCi διατάρασε δραστικά και την υδρόφοβη περιοχή της διπλοστοιβάδας. Η δυναμική των λιπιδικών διπλοστοιβάδων αποδίδεται ποσοτικά από προφίλ

των παραμέτρων στις διάφορες θερμοκρασίες προσομοίωσης όπως στην Εικόνα 2. Η γενική εντύπωση από αυτή τη μελέτη είναι ότι τα δυο αντιπυρετασικά και οι μεταβολίτες τους επηρεάζουν τις διπλοστοιβάδες του DPPC/H₂O κατά διαφορετικούς τρόπους και σε διαφορετικό βαθμό. Για παράδειγμα, το Candesartan CaCi διαταράσσει τις διπλοστοιβάδες περισσότερο από το μεταβολίτη του, CaCv, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με το Losartan του οποίου ο μεταβολίτης EXP-3174 επηρεάζει αισθητά τα διευρυμένα φάσματα του Φωσφόρου. Έτσι οι διπλοστοιβάδες με πρόσμιξη μεταβολίτη Losartan δίνουν το ασθενέστερο σήμα στην παρούσα σειρά, με ευρείς φασματικές γραμμές που με την αύξηση της θερμοκρασίας διέρχονται από ένα στάδιο με μέγιστο ολικό εύρος (εναπομένονσα ανισοτροπία), ιδιότητες που υποδηλώνουν σχηματισμό συσσωματωμάτων.



Εικόνα 1. Spectral simulations of DPPC/water bilayers in the temperature interval 25-50 °C

Novel CP P-31 NMR Broadline Spectral Simulations Used in the Study of the Interaction of Model Membranes with Bioactive Peptides and Peptidomimetic AT1 Antagonists

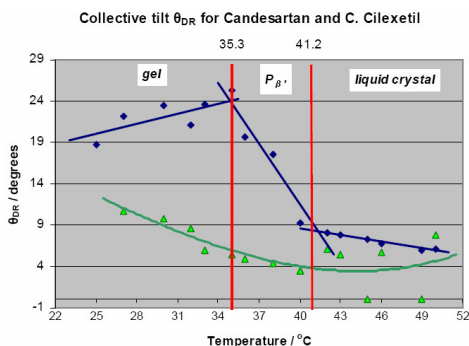
N.P. Benetis

Institute of Organic and Pharmaceutical Chemistry, National Hellenic Research Foundation, Vas. Constantinou 48, 11635 Athens, Greece

Key words: P-31 Cross Polarization NMR broadlines, model membranes, bioactive molecules, Losartan, Candesartan Cilexetil

A new simulation algorithm of P-31 Cross Polarization NMR broadlines was developed and used in order to obtain information about the configuration and the dynamics in multilamellar liposomes based on DPPC/water bilayers (model membranes) and similar preparations loaded with certain bioactive molecules. This method was tested successfully before and after loading the bilayer sample with β -Ala-Tyr or Glu [1]. Currently, the commercial antihypertensive molecules *Losartan* and *Candesartan Cilexetil* (CaCi), as well as their respective

metabolites, EXP-3174 and CV (CaCv), are investigated. The spectral simulations of experimentally obtained broadlines of *static samples* (disabled MAS) under *Cross Polarization* (CP) conditions by neighboring protons in the temperature interval 25 to 50 °C were generally very good in reproducing the experimental lineshapes and the fitted parameters gave reasonably good physicochemical interpretations. They indicated *immobilized lamellar structures* and relatively *fast, uniaxial rotation* of the DPPC molecules about their *long axes*. Furthermore, the simulations showed that the long axes of the lipid molecules were *tilted* with respect to the *lamellar normal* (Director) and that a weak *potential* originating in the *anisotropic magnetic susceptibility* favored the orientation of the bilayers parallel to the field. All four antihypertensive molecules in the loaded bilayer samples interacted strongly with the headgroup and some of them such as CaCi disturbed drastically also the hydrophobic domain of the bilayer. The dynamics in the present method were determined quantitatively by using temperature profiles of the fitted parameters such as the one shown in Fig.2. The general conclusion of this study was that the two antihypertensives and their metabolites affected the bilayer configuration in different ways and to different extends. For example the Candesartan Ci was more drastically disturbing the bilayer packing than its metabolite CaCv, while the bilayer sample loaded with the Losartan metabolite EXP-3174 gave a rather weak and broad ³¹P-NMR CP signal with an overall width (residual anisotropy) that passed through a maximum with temperature indicating formation of aggregates.



Εικόνα 2. Προφίλ θερμοκρασιών από την προσομοίωση των δειγμάτων DPPC/H₂O με πρόσμιξη Candesartan Cilexetil (τρίγωνα) και με το μεταβολίτη Candesartan Cv (ρόμβοι). Οι θερμοκρασίες προμετάβασης (*pretransition*) και κυρίας μετάβασης φάσεως (*main transition*) στους 35.3 και 41.2 °C αντίστοιχα είναι εμφανής στο δείγμα του Candesartan Cv και συμφωνούν με άλλες μεθόδους σε δείγμα DPPC/H₂O χωρίς πρόσμιξη. Αντίθετα στο δείγμα με CaCi η πρόσμιξη επιδρά αισθητά αυξάνοντας την ρευστότητα των διπλοστοιβάδων

Σύνθεση Πεπτιδικών Δενδριμερών σε Στερεά και Υγρή Φάση με Χρήση της 2-Χλωροτριτυλο-χλωριδίου Ρητίνης (CLTR-Cl)

Ανδρέας Νταής, Ειρήνη Φρυλιγγου, Θεόδωρος Τσέλιος, Ιωάννης Ματσούκας και Δημήτριος Γάτος

Τμήμα Χημείας, Τομέας Οργανικής Χημείας, Βιοχημείας, και Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500, Πάτρα, Ελλάς

Τα πεπτιδικά δενδριμερή είναι διακλαδισμένα μακρομόρια τα οποία αποτελούνται από ένα πυρήνα (πεπτιδίο ή αμινοξύ) και από ομοιοπολικά συνδεδεμένες λειτουργικές ομάδες επιφάνειας (πεπτιδία). Η πολυμερής φύση τους καθιστούν τα πεπτιδικά δενδριμερή κατάλληλα σε διάφορες βιοτεχνολογικές και βιοχημικές εφαρμογές. Τα συντιθέμενα πεπτιδικά δενδριμερή αποτελούνται από τρεις δομικές περιοχές: (α) ένα απλό αμινοξύ, όπως γλυκίνη ή β-αλανίνη, ως βασικό δομικό στοιχείο, (β) έναν εσωτερικό πυρήνα λυσίνης και (γ) πολλαπλά αντίγραφα αντιγονικών πεπτιδίων (επίτοποι). Η λυσίνη είναι ένα από τα πιο κοινά αμινοξέα που χρησιμοποιείται στη σύνθεση αυτών των δενδριμερών λόγω της δομής της (N^α και N^ε αμινομάδες). Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η σύνθεση πεπτιδικών δενδριμερών για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό στερεάς (CLTR-Cl ρητίνη) και υγρής φάσης. Στη στερεά φάση, για την προστασία των πλευρικών ομάδων της λυσίνης χρησιμοποιήθηκαν οι προστατευτικές ομάδες Fmoc και Mtt.

Synthesis of Peptide Dendrimers in Solid and Liquid Phase Utilizing the 2-Chloro-trityl Chloride Resin (CLTR-Cl)

Andreas Dais, Irene Friligou, Theodore Tselios, John Matsoukas and Dimitrios Gatos

Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products, University of Patras, 26500 Patra, Greece

Key words: Peptide dendrimers, synthesis, solid-phase (CLTR-Cl resin), liquid-phase, breast cancer

Peptide dendrimers are branched macromolecules consisting of a core (peptide or amino acid) and covalently attached surface functional units (peptides). The multimeric nature of these constructs make peptide dendrimers well suited to various biotechnological and biochemical applications. The synthesized peptide dendrimers are characterized by three structural features: (a) a simple amino acid such as glycine or β-alanine, used as basic standard (b) an inner lysine core and (c) multiple copies of peptide antigens (epitopes). Lysine is one of the most used amino acids due to its structure (N^α and N^ε amino groups). The aim of our project is the synthesis of peptide dendrimers for the treatment of breast cancer. The synthesis was carried out with a combination of the solid-phase (CLTR-Cl resin) and the liquid-phase synthetic methodology. In solid phase, for the protection of the N^α, N^ε-lysine terminal groups we used the Fmoc and Mtt protecting groups.

1. Sadler K., Tam J.P. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *J. Biotechnology* 90: 195-229. (2002)
2. Crespo L., Sanclimens G., Pons M., Giralt E., Royo M., Albericio F.: Peptide and amide bond-containing dendrimers. *Chem. Rev.* 105: 1663-1681 (2005)

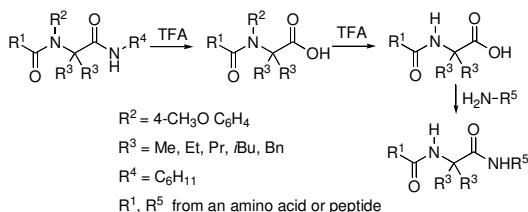


Synthesis of Peptides of α,α-Dialkyl Glycines by a Ugi-Passerini Reaction

Filipa C.S.C. Pinto, Sílvia M.M.A. Pereira-Lima and Hernâni L.S. Maia

Centre of Chemistry and Department of Chemistry, School of Science, University of Minho, Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

Key words: Peptido mimetics, α,α-dialkyl glycines, Ugi-Passerini reaction, synthesis



α,α-Dialkyl glycines are useful moieties for the synthesis of peptido mimetics. However, most of

these amino acids cannot be obtained commercially and, owing to steric crowding, are difficult to synthesise and difficult to use in the synthesis of peptides by conventional methods. This can be overcome by taking advantage of the strategy developed in our laboratory based on the Ugi-Passerini reaction, which, in a two-step synthesis, allowed to obtain N-acyl-α,α-dialkyl glycines ready for further coupling at the C-terminus. These substrates include peptide acids with a C-terminal α,α-dialkyl

glycine residue (1,2). By taking advantage of this strategy, we were able to synthesise, in fair to good yields, a series of these peptide acids having one of the following amino acid residues at their C-terminus (3): dimethyl, diethyl, dipropyl, diisobutyl and dibenzyl glycine. These peptides were further elongated by coupling with a C-protected amino acid or preformed peptide.



Conformational Studies and Synthesis of Angiotensin II Analogs Containing Dialkylglycines

Marco A.C. Preto¹, André Melo², Lígia Rodrigues¹, Maria J. Ramos², Hernâni L.S. Maia¹

¹Departamento de Química, Escola de Ciências, Universidade do Minho, Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal; ²REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 687, 4169-007 Porto, Portugal

Key words: Angiotensin II analogs, dialkylglycines, synthesis, conformational studies

Biological activity tests using conformationally restricted analogues of angiotensin II (AngII – Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) have proved to be invaluable for obtaining information concerning the biologically active conformation of this hormone (1). We have designed and simulated eighteen angiotensin II analogues in order to evaluate structural implications of the inclusion of conformationally restricted α,α -dialkyl-glycine residues; for this purpose, we have used the Amber force field (after development of the necessary parameters) (2). The results thus obtained were compared with previously performed AngII simulations (3) and the structural implication of each substitution was evaluated. Despite the small number of *experiments*, it was possible to obtain some insight into these structural implications.

Preliminary work is now on the way concerning the synthesis of an AngII analogue containing three Aib residues. So far, only classical coupling techniques have been used and some degree of success was attained. However, the sequential strategy adopted is proving troublesome in some of the synthetic steps and, therefore, further optimization is being carried out.

REFERENCES

1. Tzakos A.G., Gerotheranassis I., Anastassios N.T.: *Curr. Top. Med. Chem.* 4: 431-444 (2004)
2. Preto M.A.C., Melo A., Costa S.P.G., Maia H.L.S., Ramos M.J.: *J. Phys. Chem. B* 107: 14556-14562 (2003)
3. Preto M., Melo A., Maia H.L.S., Mavromoustakos T., Ramos M.J.: *J. Phys. Chem. B* 109: 17743-17751 (2005)



Η Θρομβίνη Λειτουργεί ως Υπόστρωμα για τα Ενδοθηλιακά Κύτταρα μέσω της Μοναδικής RGD Αλληλουχίας στο Μόριό της

M. Παπακωνσταντίνου¹, E. Di Cera², X.Σ. Φλωρδέλλης¹, M.E. Μαραγκουδάκης¹, N.E. Τσοπάνογλου¹

¹Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα.

²Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine, St. Louis, 63110 MO, USA

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου δείξαμε ότι η θρομβίνη μπορεί να αλληλεπιδρά με ιντεγκρίνες των ενδοθηλιακών κυττάρων και αυτή η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται μέσω της RGD (αργινίνη-187, γλυκίνη-188, ασπαραγινικό-189) αλληλουχίας στο μόριό της. Όλες οι μέχρι τώρα γνωστές κρυσταλλικές δομές της θρομβίνης, δείχνουν ότι το μεγαλύτερο μέρος από αυτή την αλληλουχία είναι θαμμένο κάτω από την 220-θληϊα

του μορίου της θρομβίνης και επομένως δεν είναι διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με τις ιντεγκρίνες. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένα μόρια θρομβίνης στα αμινοξέα RGD, δείχνουμε ότι η θρομβίνη ως υπόστρωμα (ακίνητοποιημένη) αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες ανβ3 και α5β1 και προάγει την προσκόλληση και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τρόπο που σχετίζεται άμεσα με την RGD αλληλουχία

της. Πρωτεάσες της σερίνης, όπως η θρυψίνη και ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου, που δεν φέρουν την αλληλουχία RGD στο μόριό τους, δεν αποδείχθηκαν ικανές να μιμηθούν τη δράση της θρομβίνης. Ωστόσο, όταν στις πρωτεάσες αυτές προστέθηκε με μεταλλαγή το τμήμα της θρομβίνης που φέρει της RGD αλληλουχία, οι πρωτεάσες απόκτησαν την ικανότητα να προάγουν την προσκόλληση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, ο ισχυρός αναστολέας της θρομβίνης, ιρουδίνη, δεν ήταν ικανός να αναστείλει την επαγόμενη από θρομβίνη προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Όταν, όμως, η ιρουδίνη επωάστηκε με την θρομβίνη σε διάλυμα και στη συνέχεια το σύμπλοκο θρομβίνη-ιρουδίνη επιστρώθηκε σε στερεή επιφάνεια ως υπόστρωμα, η θρομβίνη έχασε την ικανότητα να διεγείρει τις παραπάνω κυτταρικές αποκρίσεις. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η θρομβίνη, όταν είναι ακινητοποιημένη και δρα ως υπόστρωμα, παρουσιάζει διαφορετική διαμόρφωση σε σχέση με αυτή που έχει όταν είναι σε διάλυμα. Με αυτό τον τρόπο φαίνεται ότι η RGD αλληλουχία αποκαλύπτεται, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση της θρομβίνης με τις ιντεγκρίνες των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Thrombin is a New Substrate for Endothelial Cells: Functions through its RGD Sequence in a Non-canonical Conformation

M. Papaconstantinou¹, E. Di Cera², C.S. Floridellis¹, M.E. Maragoudakis¹, N.E. Tsopanoglou¹

¹Dept. of Pharmacology, Medical School, University of Patras, 26500 Patras, Greece; ²Dept. of Biochemistry & Molecular Biophysics, Washington University School of Medicine, Box 8231, St. Louis, Mo 63110, USA

Key words: Thrombin, endothelial cells, non-canonical conformation

In our previous studies, we have presented evidence that thrombin interacts with integrins in endothelial cells and this interaction is mediated through its RGD (Arg-187, Gly-188, Asp-189) sequence. All existing crystal structures of thrombin show that most of this sequence is buried under the 220-loop and therefore interaction implies either a partial unfolding of the enzyme or its proteolytic digestion. In the present study we directly demonstrate that surface-coated thrombin (as substrate) promotes attachment and migration of endothelial cells through interaction with $\alpha\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins. Using site-directed mutants of thrombin we prove that this effect is mediated by the RGD sequence and does not require catalytic activity. The effect is abrogated when any residue of the RGD sequence is mutated to Ala and is not observed with proteases like trypsin and tissue-type plasminogen activator, unless the RGD sequence is introduced at position 187-189. The potent natural inhibitor hirudin is incapable of reversing the thrombin-promoted effect, suggesting that thrombin interacts through its RGD sequence in a non-canonical conformation. These results indicate that thrombin can function through a conformation that exposes its RGD sequence and demonstrate the functional significance of RGD in mediating effects in endothelial cells.



Ανάπτυξη και Αξιολόγηση Πεπτιδικών Αναλόγων της Σωματοστατίνης με Αυξημένη Πολικότητα

Χρ. Κ. Πέτρου¹, Ν. Ασημομύτης¹, Α. Νικολοπούλου², Β. Μαγκαφά¹, Β. Nock², Θ. Μάινα², Π. Κορδοπάτης¹

¹Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα και ²Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων – Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, 15310 Αθήνα, Ελλάδα

Η εφαρμογή ραδιοεπισημασμένων αναλόγων της σωματοστατίνης (SRIF) στη στοχευμένη απεικονιστική διάγνωση και ραδιονουκλιδική θεραπεία νευροενδοκρινικών όγκων έχει ανοίξει νέες προοπτικές αντιμετώπισης του καρκίνου στην πυρηνική Ιατρική και Ογκολογία. Το πρώτο εμπορικό ραδιοδιαγνωστικό σκεύασμα με βάση τη σωματοστατίνη είναι το [¹¹¹In-DTPA]octreotide ([¹¹¹In]-OctreoScan®), το οποίο αποτελεί σήμερα το ραδιοφάρμακο επιλογής για τη σπινθηρογραφική εντόπιση sstr₂-θετικών πρωτογενών και μεταστατικών νεοπλασμάτων (sstr₂=somatostatin receptor subtype

2). Η ευρύτερη εφαρμογή των αναλόγων σωματοστατίνης στη στοχευμένη διάγνωση και ραδιο(ενδο)θεραπεία περιορίζεται από την υψηλή και παρατεταμένη εντόπιση της ακτινοβολίας στους νεφρούς, η οποία οδηγεί σε νεφροτοξικότητα. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, έχουν προταθεί μεταξύ άλλων α) η αύξηση της πολικότητας των πεπτιδίων με σκοπό την αύξηση της υδροφιλικότητάς τους και την ταχύτερη απομάκρυνσή τους προς τα ούρα και β) η μεταβολή του φορτίου ή της κατανομής του στο μόριο ώστε να αποτραπεί η επαναπρόσληψη των ραδιοπεπτι-

δίων από τα νεφρικά σωληνάκια. Με γνώμονα τα ανωτέρω στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση και η προκαταρκτική βιολογική αξιολόγηση α) πεπτιδικών παραγώγων της SRIF τα οποία διαθέτουν δομικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία του [Tyr³]octreotate και β) των συζυγών βιομορίων τα οποία φέρουν στο N-τελικό άκρο τους χημικό υποκαταστάτη τύπου τετραμίνης, ώστε να είναι δυνατή η ραδιοεπισημανση τους με το διαγνωστικό μεταλλικό ραδιονουκλίδιο ^{99m}Tc.

Development and Evaluation of Somatostatin Analogues with Increased Polarity

Ch. C. Petrou¹, N. Assimomytis¹, A. Nicolopoulou², V. Magafa¹, B. Nock², Th. Maina², P. Coropatis¹

¹Department of Pharmacy, University of Patras, 26500 Patra, Greece; ²Institute of Radioisotopes – Radiodiagnostic Products, NCSR Demokritos, 15310 Athens, Greece

Key words: Radiolabeled somatostatin analogs, [¹¹¹In]O-ctreoScan[®], [Tyr³]octreotate, development, evaluation

Radiolabeled somatostatin analogs, such as [¹¹¹In]O-ctreoScan[®], are currently used in nuclear medicine diagnosis and staging of somatostatin receptor (sstr) expressing tumours. The main disadvantage of peptide receptor targeting is the high kidney accumulation of the radioactivity which leads to kidney toxicity. Increment of polarity and changes on the net charge or charge distribution of the molecules is proposed to solve this problem as long as these modifications lead to the faster clearance of the radiopeptides from the kidneys to the urine. According to these, herein we report the synthesis and the biological evaluation of a) structural modified [Tyr³]octreotate analogs and b) the conjugate biomolecules which are functionalised with a tetra-aminic chelator ligand suitable for complexation with the diagnostic metallic radionuclide ^{99m}Tc.



Σχεδιασμός και Ανάπτυξη α,β-Ακόρεστων Καρβοξυλικών Αναστολέων της Λιποξυγονάσης με Πιθανή Αντιοξειδωτική και Αντιφλεγμονώδη Δράση

Ποντίκη Ελένη και Χατζηπαύλου-Λίτινα

Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, 54124 Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, e-mail:hadjipav@pharm.auth.gr

Το αραχιδονικό οξύ με τη δράση δύο ενζυμικών συστημάτων, της κυκλοοξυγονάσης και της λιποξυγονάσης, μετατρέπεται σε ποικίλους μεταβολίτες με διαφορετικό ρόλο στη διεργασία της φλεγμονής (προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες, θρομβοξανίνα, λευκοτριένια κ.α.). Συγκεκριμένα με την χρήση αντιφλεγμονωδών φαρμάκων αναστέλλεται το ένζυμο κυκλοοξυγονάση (COX) και εμποδίζεται ο σχηματισμός των προσταγλανδινών (PG) και θρομβοξανίων (TX), ενώ αναστολή της λιποξυγονάσης (LO) συνεπάγεται αναστολή του σχηματισμού σειράς σημαντικών βιολογικά μεταβολιτών του αραχιδονικού οξέος, των υδροϋπεροξυεικοσιτετρανοϊκών οξέων (HPETE), των υδροξυεικοσιτετρανοϊκών οξέων (HETE') και κυρίως των λευκοτριενίων, που αποτελούν σημαντικούς μεσολαβητές σε πολλές ασθένειες, όπως είναι το άσθμα, η αρθρίτιδα, η ψωρίαση, φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου και άλλες. Οι λιποξυγονάσες (LO) είναι μονομοριακές πρωτεΐνες ευρέως διαδεδομένες στη φύση, που καταλύουν την οξυγόνωση των ελευθέρων και εστεροποιημένων λιπαρών οξέων που περιέχουν ένα (1Z, 4Z)-πέντα-1,4-διενικό σύστημα προς σχηματισμό των αντιστοίχων υδροπεροξυ-παραγώγων. Με μελέτη της βιβλιογραφίας και αξιοποιώντας ποσοτικές σχέ-

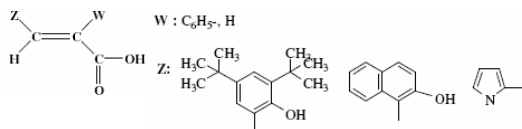
σεις δομής-δράσης συντέθηκαν ορισμένα α,β-ακόρεστα αρυλ-οξικά και υδροξυαμικά οξέα (1,2), με διαφορετικούς υποκαταστάτες, με κύριο στόχο τη βελτίωση της βιολογικής τους δράσης, που επιβεβαιώθηκε με φαρμακοχημική μελέτη. Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν *in vitro* όσον αφορά την ικανότητά τους α) να αναστέλουν τη λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης, β) να αλληλεπιδρούν με τη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλο-πικρυδραζιού (DPPH) σε διάφορες συγκεντρώσεις και μετρούμενα χρονικά διαστήματα, γ) να ανταγωνίζονται το DMSO στη δέσμευση των ριζών HO[•], δ) να αναστέλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, ε) να παγιδεύουν τις ρίζες υπεροξειδικού ανιόντος, στ) να αντιδρούν με την GSH και ζ) *in vivo* να αναστέλουν το οίδημα του άκρου ποδός επίμυα που προκαλείται από την ενδοδερμική χορήγηση καρραγενίνης. Τα αποτελέσματα από τις προκαταρκτικές δοκιμασίες έδειξαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, πολύ καλή αντιφλεγμονώδη δράση ανάλογη της ινδομεθακίνης και πολύ ισχυρή αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάση που είναι αποτέλεσμα των δομικών χαρακτηριστικών των ενώσεων.

Design and Synthesis of Aryl-Acetic-Acids Inhibitors of Lipoxygenase with Anti-oxidant and Anti-Inflammatory Activity

Pontiki Eleni and Hadjipavlou-Litina Dimitra

Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, Aristotelian University, Thessaloniki, 54124, Greece, e-mail: hadjipav@pharm.auth.gr

Key words: Lipoxygenase inhibitors, antioxidant activity, anti-inflammatory activity



Arachidonic acid can be metabolized by two metabolic pathways: the cyclooxygenase and the lipoxygenase. Antiinflammatory drugs inhibit the synthesis of prostaglandins and thromboxanes, whereas lipoxygenase inhibitors the synthesis of hydroperoxyeicosatetraenoic acids (HPETE's), hydroxyeicosatetraenoic acids (HETE's) and especially leukotrienes implicated as important mediators in several diseases including asthma, arthritis, psoriasis and inflammatory bowel disease. Lipoxygenases are monomeric proteins, widely distributed in nature and they cataly-

ze the incorporation of dioxygen into 1,4-cis,cis-pentadiene containing fatty acids (e.g., linoleic and arachidonic acids) to form hydroperoxide products. In order to establish the inhibitory utility of simple hydroxamates several aryl-acetic and aryl-hydroxamic acids were synthesized (1,2). In an attempt to expand and delineate these results we tried to synthesize some more aryl-acetic acids with different subgroups for a further pharmacological study. The compounds are tested *in vitro* on: a) soybean lipoxygenase inhibition, b) interaction with 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) stable free radical, c) the HO[•] mediated oxidation of DMSO, d) inhibition of lipid peroxidation, e) scavenging of superoxide anion radicals, f) interaction with GSH and g) *in vivo* for the inhibition of carrageenin induced rat paw edema. The compounds have shown significant antioxidant activity, very good anti-inflammatory activity comparable to indomethacin and high inhibition of soybean lipoxygenase as a result of their physicochemical features.

REFERENCES

1. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D.: *Arzneim-Forsch./Drug Res.* 53: 780 (2003)
2. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D.: *Med. Chem.* 2: 251 (2006)



Σύνθεση και *in vitro* Βιολογική Δραστικότητα Παραγώγων της Σικαλκίνης

Χ. Πρατσίνης¹, Δ. Κλέτσας¹, Ε.Α. Μπούζας², Α. Μιχαηλάκης², Α.Θ. Στρογγυλός², Η.Α. Κουλαδούρος²

¹Laboratory of Cell Proliferation & Ageing, Inst. of Biology, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Ταχ. Θυρ. 60228, 153 10 Αγ. Παρασκευή και ²Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Χημείας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55 και Εργαστήριο Σύνθεσης Φυσικών Προϊόντων και Βιοοργανικής Χημείας, Ινστιτούτο Φυτικοχημείας, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Ταχ. Θυρ. 60228, 153 10 Αγ. Παρασκευή, Ελλάς, e-mail: ecoula@chem.demokritos.gr

Οι οπτικώς καθαρές ναφθοκινόνες (+)-Σικονίνη και (-)-Αλκαννίνη, καθώς και το ρακεμικό μίγμα (±)-Σικαλκίνη είναι φυσικά προϊόντα με σημαντική επούλωτική δράση, τα οποία αποτελούν τα κύρια δραστικά συστατικά του ήδη διατιθέμενου στην αγορά επούλωτικού σκευάσματος HELIXDERM. Ένα βασικό πρόβλημα είναι το έντονο κόκκινο χρώμα τους το οποίο καθιστά δύσκολη την ευρεία εμπορική εφαρμογή τους. Για τον λόγο αυτό συντέθηκαν επτά παράγωγα της Σικαλκίνης: τα φυσικά, έγχρωμα 1 και 2, και τα μη φυσικά, άχρωμα 3 – 7 (Σχήμα 1). Ακολούθησε αξιολόγηση *in vitro* σε καλλιέργειες φυσιολογικών ανθρωπίνων δερματικών ινοβλαστών, όσον αφορά την κυτταροτοξική και κυτταροστατική τους δράση, την επαγωγή της σύνθεσης κολλαγόνου σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, καθώς και την επίδρασή τους στην παραγωγή από τα κύτταρα, αλλά και την ενεργό-

τητα κολλαγονολυτικών ενζύμων (μεταλλοπρωτεάσες ή MMPs). Η κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση των νέων παραγώγων είναι ασθενέστερη από αυτήν της Σικονίνης, που χρησιμοποιήθηκε ως ένωση ελέγχου. Κανένα από τα παράγωγα αλλά ούτε και η Σικονίνη δεν επέδρασαν στην παραγωγή κολλαγόνου. Παρουσίασαν, όμως, αναστολή της ενεργότητας των παραγομένων από τους ινοβλάστες MMPs, αν και σε μικρότερο ποσοστό από την αναστολή που προκάλεσε η Σικονίνη. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι πρόκειται για ενώσεις που θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν τη Σικονίνη σε πιθανά σκευάσματα με επούλωτική δράση, ιδιαίτερα η 2, η οποία δείχνει συνολικά την ισχυρότερη δραστικότητα στις βιοδοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν.

Synthesis and *in vitro* Activity of Shikalkin Derivatives

H. Pratsinis¹, D. Kletsas¹, E.A. Bouzas², A. Michaelakis², A.T. Strongilos², E.A. Couladouros²

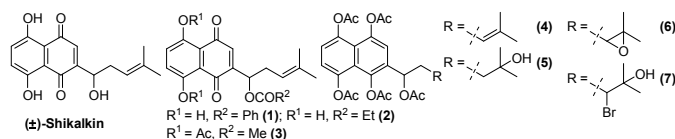
1. Laboratory of Cell Proliferation & Ageing, Inst. of Biology, NCSR *Demokritos*, 153 10 Athens; 2. Chemistry Laboratories, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens; Laboratory of Natural Product Synthesis & Bioorganic Chemistry, NCSR *Demokritos*, 15310, Athens, Greece.
e-mail: ecoula@chem.demokritos.gr

Key words: Shikalkin derivatives, synthesis, *in vitro* activity

The optically pure naphthoquinones (+)-Shikonin and (-)-Alkannin, as well as the racemate (±)-Shikalkin are wound healing natural products, which are already used as active ingredients of the commercially available wound healing ointment HELIXDERM. An important problem of these substances is their deep red color that makes them unattractive for wide commercial application. Therefore, seven derivatives of Shikalkin were synthesized: the colored, natural oc-

curing 1 and 2, as well as the colorless, unnatural ones 3 – 7 (Scheme 1). These derivatives were evaluated *in vitro* using normal human skin fibroblast cultures, regarding their cytotoxic and cytostatic activities, their capacity to induce col-lagen synthesis at the mRNA and the protein levels, as well as their effect on the activity of cell-secreted matrix metallo-proteases (MMPs). The cytotoxic and cytostatic activities of Shikalkin derivatives were weaker than those of Shikonin, which was used as control substance. Neither the derivatives nor Shikonin affected collagen synthesis. On the other hand, they inhibited the fibroblast secreted-MMP activity, although at a lesser extent compared to Shikonin. In conclusion, it seems that these derivatives could be used as substitutes for Shikonin in formulations for the acceleration of wound healing, especially compound 2, which was collectively the most active in all biological assays performed.

This work was supported by the Greek G.S.R.T. (PENED 01ΕΔ76: *Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones and colorless derivatives for application as wound healing agents*).



Παραγωγή και Απομόνωση Αντισωμάτων IgY από Κρόκους Αυγών Ανοσοποιημένων Ορνίθων, τα οποία Δεσμεύουν Φαινυλο-N-μεθυλο-καρβαμιδικά Εντομοκτόνα

Κωνσταντίνος Προύσαλης, Γεράσιμος Μ. Τσιβγούλης, Θεόδωρος Τσεγενίδης

Τομέας Οργανικής Χημείας – Βιοχημείας και Φυσικών Προϊόντων, Πανεπιστήμιο Πάτρας, Πάτρα

Τα φαινυλο-N-μεθυλοκαρβαμιδικά εντομοκτόνα (PNMC) συνιστούν οικογένεια περίπου 30 φυτοπροστατευτικών ουσιών. Ορισμένα από τα μέλη της αποτελούν φυτοφάρμακα ιδιαίτερα μεγάλης εμπορικής σημασίας, αφού χρησιμοποιούνται για την προστασία των φυτών για περισσότερο από 40 χρόνια. Η δράση τους στηρίζεται στην αναστολή του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση με συνέπεια τη συσσώρευση μορίων ακετυλοχολίνης στην περιοχή της σύναψης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση της λειτουργίας του νευρικού συστήματος, την πρόκληση έντονων σπασμών και τελικά το θάνατο. Αρκετά από τα εντομοκτόνα αυτά παρουσιάζουν εκλεκτική δράση, αναστέλλοντας ισχυρότερα την ακετυλοχολινεστεράση των εντόμων από ό,τι των θηλαστικών. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 έως και σήμερα, η παραγωγή και απομόνωση αντισω-

μάτων (IgY) από κρόκους αυγών κατάλληλα ανοσοποιημένων ορνίθων, αποτέλεσε στόχο πολλών ερευνητικών ομάδων. Η παραγωγή αντισωμάτων σε όρνιθες, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της αντίστοιχης διαδικασίας στα θηλαστικά, που χρησιμοποιούνται συνήθως για το σκοπό αυτό (π.χ. κουνέλια και ποντίκια). Η απομόνωση των αντισωμάτων επιτυγχάνεται πολύ εύκολα από τους κρόκους των αυγών, οπότε αποφεύγονται οι επίπονες αφαιμάξεις των πειραματόζων. Επίσης, οι ποσότητες των ανοσοσφαιρινών που μπορούν να ληφθούν από μια όρνιθα, είναι πολύ μεγαλύτερες σε σύγκριση με τα περισσότερα κοινά πειραματόζωα. Τέλος, η συντήρηση των ορνίθων είναι εύκολη και το κόστος της χαμηλό. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή IgY, τα οποία δεσμεύουν PNMCs, μετά από ανοσοποίηση των ορνίθων αυ-

γοπαραγωγής. Αρχικά, συντέθηκε το απτένιο 3-(2,6-διμεθυλο-4-(μεθυλοκαρβαμοϋλο)φαινυλαμινοκαρβονυλο)προπανοϊκό οξύ, το οποίο έφερε τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά των φυτοφαρμάκων αυτών. Κατόπιν συζεύχθηκε με την πρωτεΐνη-φορέα BSA, ώστε να σχηματίσει το αντιγόνο, με το οποίο ανοσοποιήθηκαν οι όρνιθες. Τέλος, τα παραχθέντα ειδικά αντισώματα, απομονώθηκαν και ελέγχθηκε η συγγένεια και η διασταυρούμενη δραστηριότητα τους ως προς αντιπροσωπευτικά PNMCS. Τα αντισώματα αυτά πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για αναλυτικούς σκοπούς.

Production and Isolation of IgY Antibodies from Egg-Yolks of Immunized Laying Hens, Binding Phenyl-N-methylcarbamate Insecticides

Konstantinos Prousalis, Gerasimos M. Tsigoulis, Theodore Tseggenidis

Department of Chemistry, Section of Organic Chemistry, Biochemistry and Natural Products, University of Patras, 26500 Patra, Greece

Key words: IgY antibodies, phenyl-N-methylcarbamates insecticides, production, isolation

Phenyl N-Methylcarbamates (PNMCs) comprise a group of about 30 compounds. They are insecticides of major economic importance, which are used for the last 40 years. They act by reversibly inhibiting the enzyme acetylcholinesterase. Nervous coordination, severe convulsions and death are the results of acetylcholine accumulation across the synapse. Modern PNMCS are fairly selective for insects' acetylcholinesterase. The last fifteen years the production of antibodies (IgYs) in immunized laying hens gained exceptional scientific interest. IgY production has particular advantages over antibody generation in other animals: IgY quantities isolated from the yolk are huge, compared to the amounts of antibodies in the serum of mammals. The unpleasant and painful bleeding procedure of the immunized animal is replaced by harmless egg collection and antibody extraction from their yolks. Moreover, keeping laying hens is easy and of low cost. Our study involves the production of IgYs binding PNMCS. Initially, the hapten 3-(2,6-dimethyl-4-(methylcarbamoyl)phenyl-aminocarbonyl) propanoic acid was synthesized. The antigen used for immunization, was produced by coupling the hapten to the carrier-protein BSA. Finally, avidity and cross-reactivity of the produced specific antibodies to several PNMCS was measured, in order to assess their applicability in pesticide analytical procedures.



Μιτοχόνδριο: Άμεσος Στόχος Δράσεως Στεροειδών και Θυρεοειδών Ορμονών Κωνσταντίνος Ε. Σέκερης

IBEB, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα

Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικά κυτταρικά οργανίδια που προμηθεύουν πάνω από το 90% των ενεργειακών αναγκών του κυτταρού. Επιπλέον, εμπλέκονται σε άλλες κύριες διεργασίες, όπως στην απόπτωση, την ανοσοτροποποίηση και στην παραγωγή δραστηκών ειδών οξυγόνου. Διαταραχές της μιτοχονδριακής λειτουργίας συνδέονται με σημαντικές νευρολογικές παθήσεις (Alzheimer, Parkinson) και τον καρκίνο. Ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων απαιτεί αυστηρή ρύθμιση και συντονισμό των λειτουργιών τους με αυτόν των άλλων κυτταρικών διαμερισμάτων. Οι στεροειδείς και οι θυρεοειδείς ορμόνες παίζουν κύριο ρόλο σε αυτόν τον συντονισμό μέσω των αντιστοιχών υποδοχέων τους, που προκαλούν την έναρξη διεργασιών στον πυρήνα και κυτταρόπλασμα, επιδρώντας δευτερογενώς στις μιτοχονδριακές λειτουργίες. Η ανεύρεση υποδοχέων στεροειδών και θυρεοειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια καθώς και άλλων μεταγραφικών παραγόντων και η διαπίστωση στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα θέσεων προσδέσεως των ρυθμιστικών αυτών μορίων,

υποστηρίζουν, μεταξύ άλλων ευρημάτων, την άμεση δράση των μορίων αυτών στη λειτουργία του οργανιδίου, σε συνέργεια με τις έμμεσες δράσεις που προέρχονται από τον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα. Θα γίνει ανασκόπηση των σχετικών ευρημάτων από το εργαστήριο του συγγραφέως και από εργαστήρια άλλων ερευνητών.

The Mitochondrion as a Direct Site of Action of Steroid and Thyroid Hormones

Constantine E. Sekeris

IBRB, National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Key words: Mitochondria, steroid and thyroid hormones, site of action

Mitochondria are vital cell organelles, providing more than 90 % of the energetic requirements of the cell. In addition, they are involved in other major processes, such as apoptosis, immunomodulation and reactive oxygen species production. Derangements in mitochondrial function are linked to major

neurological disorders (Alzheimer, Parkinson) and to cancer. The central role of mitochondria necessitates tight regulation and coordination of their function with that of other cell compartments. Steroid and thyroid hormones play a major role in this coordination acting by way of cognate receptors, which initiate nuclear or cytoplasmic events secondarily affecting mitochondrial processes. The presence of steroid and thyroid hormone receptors and of other nuclear transcription factors in mitochondria and the detection of binding sites on the mitochondrial genome for these regulatory molecules, among

other findings, support the direct action of these molecules on the organelle's functions, in synergy with the indirect effects emanating from the nucleus or cytoplasm. The relevant findings from the authors and other laboratories will be reviewed.

REFERENCES

- Scheller K., Sekeris C.E.: *Exper. Physiol.* 88: 129-140, (2003) Psarra A-MG
Solakidi S., Sekeris C.E.: *Mol. Cell. Endocrin.* 246: 21-33 (2006)



Σύνθεση και Μελέτη της Βιολογικής Δράσης Νέων Αναλόγων της Αργινυλο-βασοπρεσίνης (AVP)

M. Σκιαδά¹, E.B. Παππά¹, Β. Μαγκαφά¹, Γ. Πάιρας¹, Δ. Βαχλιώτης¹, L. Borovičková², J. Slaninova² και Π. Κορδοπάτης¹

¹Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, GR-26500 Πάτρα, Ελλάς. ²Department of Peptide Biochemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czech Republic, Flemingovo square 2, Prague 6, CZ-166-10, Czech Republic

Η πεπτιδική ορμόνη Αργινυλο-Βασοπρεσίνη (AVP) είναι κυκλικό εννεαπεπτιδίο (H-Cys¹-Tyr²-Phe³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶-Pro⁷-Arg⁸-Gly⁹-NH₂) το οποίο περιέχει δισουλφιδικό δεσμό (μεταξύ της Cys¹ και της Cys⁶). Συντίθεται σε νευρώνες του υποθαλάμου οι οποίοι καταλήγουν στην οπίσθια υπόφυση από όπου η AVP απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Υπάρχουν τρεις ξεχωριστοί υπότυποι του υποδοχέα της AVP (V_{1a}, V₂, V_{1b}), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των συζευγμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων, με σημαντική δομική ομοιότητα μεταξύ τους. Ο κύριος φυσιολογικός ρόλος της AVP αφορά τη ρύθμιση της συσταλτικότητας των λείων μαλακών μυών του καρδιαγγειακού συστήματος, μέσω του V_{1a} υποδοχέα και την αντιδιουρητική δράση στο νεφρό (ρύθμιση της ωσμωτικότητας του αίματος) μέσω του V₂ υπότυπου. Δέσμευση της AVP στον V_{1a} υπότυπο υποδοχέα επίσης ρυθμίζει την γλυκογενόλυση στο ήπαρ και προάγει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, ενεργοποίηση του V_{1b} (αναφέρεται και ως V₃) υποδοχέα προκαλεί απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτρόφου ορμόνης από την εμπρόσθια υπόφυση. Παρατηρήσεις από τη βιβλιογραφία υποδεικνύουν ότι η διαμόρφωση και ο υδρόφοβος χαρακτήρας του αρωματικού αμινοξέος στη θέση 2 έχουν ιδιαίτερη σημασία για την εμφάνιση ανταγωνιστικότητας του μορίου, ενώ απαλοιφή της N-τελικής αμινομάδας παίζει ρόλο στο χρόνο ημίσειας ζωής της AVP. Με βάση τα ανωτέρω σχεδιάσαμε τη σύνθεση νέων αναλόγων της AVP, τα οποία περιέχουν Μερκαπτο-προπιονικό οξύ (Mpa) ή S-Σα-

λικυλικό οξύ (S-Sal) στη θέση 1, D-αιθυλοτυροσίνη [D-Tyr(Et)], L-μεθυλο-τυροσίνη [Tyr(Me)] ή 2-ναφθυλαλανίνη [Nal(2)] στη θέση 2, κιτρουλίνη (Cit) ή αργινίνη (Arg) στη θέση 3 και τριτοταγής-βουτυλο-γλυκίνη [Gly(Bu)] ή β-(2-θειενυλ)-αλανίνη (Thi) στις θέσεις 4 ή 9. Επίσης μελετήσαμε την επίδραση στη βιολογική δραστηριότητα των νέων αναλόγων της τροποποίησης του C-τελικού αμιδίου. Τα ανάλογα συντέθηκαν με μεθοδολογία Fmoc/Bu^t σε στερεά φάση χρησιμοποιώντας ως στερεό υπόστρωμα την ρητίνη Rink Amide MBHA, την ινδολ-αιθυλαμιδο ρητίνη [(3-((Ethyl-Fmoc-amino)-methyl)-1-indol-1-yl)-acetyl] AM] ρητίνη και την 2-χλωροτριπυλο ρητίνη για την παραγωγή αμιδίου, αιθυλ-αμιδίου και C-τελικού καρβοξυλικού οξέος, αντίστοιχα. Τα νέα ανάλογα δοκιμάστηκαν ως προς την επίδραση επί της πίεσης, για την αντιδιουρητική και την κυκλώσειο δράση τους.

Synthesis and Biological Evaluation of New Arginine Vasopressin (AVP) Analogues

M. Skiada¹, E.V. Pappa¹, V. Magafa¹, G. Pai-ras¹, D. Vachliotis¹, L. Borovičková², J. Slaninova² & P. Cordopatis¹

¹Department of Pharmacy, University of Patras, GR-26500, Patras, Hellas; ²Department of Peptide Biochemistry, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czech Republic, Flemingovo square 2, Prague 6, CZ-166-10, Czech Republic

Key words: Arginine⁸-vasopressin analogues, synthesis, biological evaluation

The pituitary hormone Arginine⁹-Vasopressin (AVP) is a cyclic nonapeptide (H-Cys¹-Tyr²-Phe³-Gln⁴-Asn⁵-Cys⁶-Pro⁷-Arg⁸-Gly⁹-NH₂) that incorporate a disulfide bridge (between Cys¹ and Cys⁶). It is synthesized in neurones of the hypothalamus that project to the posterior pituitary from which AVP is released into the circulation. There are three distinct AVP receptor subtypes (V_{1a}, V₂, V_{1b}). All have seven transmembrane spanning domains and all are G protein coupled with significant structural homology to one another. The primary physiological role of AVP involves regulation of cardiovascular smooth muscle, via V_{1a} receptor, and antidiuretic actions on the kidney (blood osmolality regulation), via V₂ receptor. Binding of AVP on the V_{1a} receptor subtype also stimulates glycogenolysis in the liver and promotes platelet aggregation. In addition, activation of the V_{1b} (also known as V₃) receptor causes adrenocorticotrophic hormone release from the anterior pituitary. Observations in bibliography suggest that the configuration and the hydrophobicity of the aro-

matic amino acid in position 2 are important for the antagonistic activity while, elimination of the N-terminal amino group plays an important role on the half-life of the AVP. On the basis of these findings we set out the synthesis of new AVP analogues containing mercapto propionic acid (Mpa) or S-salicylic acid in position 1, D-Tyrosine(Ethyl) [D-Tyr(Et)], L-Tyrosine(Methyl) [Tyr(Me)] or 2-Naph-tylalanine [Nal(2)] in position 2, Citrulline (Cit) or Arginine (Arg) in position 3 and L-α-t-butylglycine [Gly(Bu^t)] or β-(2-thienyl)-alanine (Thi) in positions 4 or 9. We also studied the impact on biological potency of the new AVP analogues modified the C-terminal amide. The analogues were synthesized by Fmoc/Bu^t solid phase methodology utilizing a Rink Amide MBHA, a [3-((Ethyl-Fmoc-amino)-methyl)-1-indol-1-yl]-acetyl AM resin and a 2-chlorotriptyl-chloride resin to provide the C-terminal amide, ethylamide and carboxylic acid, respectively. The new synthesized analogues were tested for their pressor, antidiuretic and uterotonic potency.



Προσδιορισμός Πολυμόρφου Ενεργού Φαρμακευτικού Συστατικού σε Δισκία Olanzapine

Δήμητρα Κ. Σκορδά, Μαλβίνα Γ. Όρκουλα, Χρήστος Γ. Κοντογιάννης

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα

Πολλά φαρμακευτικά ενεργά συστατικά εμφανίζουν πολυμορφισμό. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η ταυτοποίηση της κρυσταλλικής φάσης στο σκεύασμα έχει μεγάλη σημασία καθώς διαφορετικά πολύμορφα παρουσιάζουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Επιπρόσθετα, κάποιες από τις κρυσταλλικές φάσεις προστατεύονται από πατέντες. Η περίθλαση ακτίνων-X κόνεως (XRPD) είναι η πλέον κατάλληλη τεχνική για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής φάσης, ενώ για τον ίδιο σκοπό χρησιμοποιούνται και οι φασματοσκοπίες Raman και IR. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί η κρυσταλλική φάση της olanzapine σε φαρμακευτικό σκεύασμα, καθώς και να ελεγχθεί η σταθερότητά της κατά τη διάρκεια της παρασκευής του σκευάσματος. Η olanzapine είναι δευτέρης γενιάς αντιψυχωτικός παράγοντας και είναι εμπορικά διαθέσιμη σε δισκία. Εμφανίζει μεγάλο αριθμό πολυμορφικών φάσεων και ένυδρων αλάτων. Η ταυτοποίηση στο σκεύασμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία IR και την περίθλαση ακτίνων-X κόνεως (XRPD). Ο μεγάλος αριθμός των πολυμόρφων και των ένυδρων αλάτων και η μεγάλη ομοιότητα των φασμάτων περίθλασης και απορρόφησης υπερέθρου των φάσεων I και IV έκανε δύσκολη την ανάλυση. Η ισχυρή επικάλυψη των κορυφών των πολυμόρφων με αυτές των εκδόχων στα

φάσματα περίθλασης ήταν ένα επιπλέον πρόβλημα. Έγινε, επίσης, προσπάθεια για τον ποσοτικό προσδιορισμό της δραστικής ουσίας στα δισκία με τη χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών IR, Raman και XRPD. Προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης για κάθε τεχνική και συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

Identification of Active Pharmaceutical Ingredient Polymorph in Olanzapine Tablets

Dimitra K. Skorda, Malvina G. Orkoula, Christos G. Kontoyannis

Department of Pharmacy, University of Patras, Patra 26500, Greece

Key words: Active pharmaceutical ingredients, polymorphism, Olanzapine, tablets

Many active pharmaceutical ingredients (API) exhibit polymorphism. In such a case, identification of the crystal phase of the API in the formulation is important since different polymorphs exhibit different physicochemical properties. Furthermore, some of the crystal phases are protected by patents. X-ray powder dif-fraction (XRPD) is the most-suitable method for the identification of polymorphs while Raman and IR spectroscopy can also be used. In the present work, an effort was made to identify the crystal form of Olanzapine in a pharmaceutical

formulation as well as test its stability through the manufacturing process. Olanzapine is a second-generation antipsychotic agent and is commercially available in orodispersible tablets. It exhibits numerous polymorphs and hydrates. Identification of olanzapine in the tablet was attempted using IR spectroscopy and X-Ray powder diffraction (XRPD). In olanzapine tablets the numerous polymorphs and hydrates and the extraordinary similarity of the

XRPD patterns and IR spectra of Phase I and IV is a considerable problem. Another difficulty is stemming from the strong overlap of polymorphic XRPD patterns with the respective patterns of the excipients. Quantitative determination of the API in tablets was also made based on IR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRPD. The detection limits of each technique were determined.



Ποσοτικός Προσδιορισμός της Δραστικής Ουσίας Atorvastatin Calcium σε Δισκία

Δήμητρα Κ. Σκορδά, Μαλβίνα Γ. Όρκουλα, Χρίστος Γ. Κοντογιάννης

Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα 26500, Ελλάδα

Η Atorvastatin Calcium (AC), ένας συνθετικός αντιπυρλιπιδιακός παράγοντας, είναι το δραστικό φαρμακευτικό συστατικό του Lipitor[®], του φαρμάκου με τις περισσότερες πωλήσεις στην Ελλάδα. Έχουν ανιχνευθεί 12 πολύμορφα της AC καθώς και άμορφη φάση. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εισαγωγή στην αγορά γενόσημων φαρμάκων του Lipitor[®] χρησιμοποιώντας διαφορετικές κρυσταλλικές φάσεις της δραστικής ουσίας. Ως εκ τούτου, η ταυτοποίηση και ο διαχωρισμός των πολυμόρφων είναι ενδιαφέρον αναλυτικό πρόβλημα. Η περίθλαση κόνεως ακτίνων Χ (XRPD) είναι η κύρια μέθοδος ταυτοποίησης πολυμόρφων, αλλά οι φασματοσκοπίες Raman και IR έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό. Σε αυτή την εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος μη καταστρεπτικού ποσοτικού προσδιορισμού της AC σε εμπορικά διαθέσιμα δισκία. Χρησιμοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν οι τεχνικές XRPD και οι φασματοσκοπίες Raman και IR. Αποδείχτηκε ότι η πιο κατάλληλη τεχνική για την περίπτωση αυτή είναι η φασματοσκοπία Raman.

Department of Pharmacy, University of Patras, Patra 26500, Greece

Key words: Atorvastatin calcium, Lipitor[®], quantitative determination, tablets

Atorvastatin Calcium (AC) is a synthetic lipid-lowering agent and is available in 12 polymorphic phases as well as in amorphous state. AC is the active pharmaceutical ingredient of Lipitor[®], the best-seller cholesterol-lowering medication in Greece. Though a specific AC polymorph is used in the formulation, exploitation of the remaining polymorphs to produce generic forms of Lipitor[®] is an interesting task for the pharmaceutical industry. Therefore, identification and discrimination between the crystal phases appears as a major analytical problem. X-ray powder diffraction (XRPD) is the most-suitable method for the identification of polymorphs while Raman and IR spectroscopy have also been used. In this work, a methodology was developed for the quantitative non-destructive determination of AC in commercially available tablets. XRPD patterns, Raman and IR spectra of the various polymorphs were evaluated. Raman spectroscopy was proved to be the most suitable technique for the discrimination of the active ingredient in the formulation.

Quantitative Determination of Atorvastatin Calcium in Tablets

Dimitra K. Skorda, Malvina G. Orkoula, Christos G. Kontoyannis



Σύνθεση Αναλόγων της Αλατοστατινης AST4 (ή VII) της *Diploptera Punctata*

Στρούμπου Αμαλία και Κωνσταντίνος Πούλος

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα, Ελλάδα

Οι νεανικές ορμόνες (Juvenile Hormones) των εντόμων είναι κρίσιμες για τον έλεγχο της ανάπτυξης και για την αναπαραγωγή της κατσαρίδας *Diploptera punctata*. Οι ορμόνες αυτές συντίθενται και εκκρίνονται στους ενδοκρινείς αδένες *Corpora*

allata (CA) της κατσαρίδας. Η παραγωγή νεανικών ορμονών από τους αδένες της *Diploptera punctata* καθορίζεται μερικώς από νευροπεπτίδια, τις αλατοστατίνες. Οι αλατοστατίνες αποτελούνται από 8 έως 18 α-αμινοξέα και προέρχο-

νται από κύτταρα του εγκεφάλου της κατσαρίδας. Τα πεπτιδία αυτά αναστέλλουν αντιστρεπτά τη βιοσύνθεση των νεανικών ορμονών, ρυθμίζουν τη μυϊκή σύσπαση *in vitro*, αναστέλλουν την παραγωγή λεκιθίνης από το λιπώδη ιστό και υποκινούν τη δράση των ενζύμων που μεταβολίζουν τους υδατάνθρακες στο μέσο έντερο του εμβρύου. Οι αλατοστατίνες χαρακτηρίζονται από το καρβοξύ τελικό τους άκρο Y/FXFGLαμιδίο, το οποίο φαίνεται να είναι η κρίσιμη αλληλουχία του πεπτιδίου. Αλλαγές στην αμινο τελική περιοχή προκαλούν διαφορά στην ισχύ της δράσης των αλατοστατινών. Μέχρι στιγμής είναι γνωστές 13 αλατοστατίνες της *Diploptera punctata*. Ο σκοπός της εργασίας ήταν η σύνθεση μιας σειράς αναλόγων της αλατοστατίνης AST4 (VII) DGRMYSFGL-NH₂ και η μελέτη της σχέσης δομής-δραστικότητας. Τα επιλεγμένα ανάλογα είναι το DGR-Hse(Me)-YSFGL-NH₂ και το Cyclic-(DGR-Hse(Me)-YSFGL). Η καθαρότητα των αναλόγων εκτιμήθηκε με HPLC και η ταυτοποίηση έγινε με ESI-MS.

Synthesis of Allatostatin AST4(VII) Analogues of *Diploptera punctata*

Amalia Stroubou and Constantine Poulos

Department of Chemistry, University of Patras, 26500 Patra, Greece

Key words: Allatostatin AST4(VII) analogues, synthesis

The juvenile hormones are critical to the control of insect development and reproduction. These hormones are synthesized and secreted from endocrine glands, the corpora allata (CA). The production of the juvenile hormones by the CA of the cockroach *Diploptera punctata* is regulated in part by neuropeptides, termed Allatostatins. Allatostatins range in size from 8 to 18 amino acids and are originated from the brain. These peptides reversibly inhibit the biosynthesis of Juvenile hormones, they have shown to be modulators of muscle contraction *in vitro*, inhibitors of vitellogenin production by fat body and stimulators of the activity of carbohydrate-metabolizing enzymes in midgut. Allatostatins are characterized by the carboxyl terminal sequence Y/FXFGLamide which appears to function as the critical message sequence of the peptide. Variations in the amino terminal address region appear to result in differences in potencies of the allatostatins. To date, thirteen allatostatins of the cockroach *Diploptera punctata* have been described. Our aim was to synthesize a series of AST4(VII) DGRMYSFGL-NH₂ analogues for structure-activity studies. These analogues are DGR-Hse(Me)-YSFGL-NH₂ and Cyclic-(DGR-Hse(Me)-YSFGL). The analogues were purified by HPLC and identified by ESI-MS.



Νέα Συνθετικά Ανάλογα του Λεουπρολιδίου Περιέχοντα μη Φυσικά Αμινοξέα στις Θέσεις 3 και 6

A. Τάτση¹, E.B. Παππά¹, A.A. Ζώμπρα¹, Β. Μαγκαφά¹, Φ.Ν. Λάμαρη¹, Ν.Κ. Καραμάνος² και Π. Κορδοπάτης¹

¹Τμήμα Φαρμακευτικής και ²Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, GR-26500, Πάτρα, Ελλάς

Η Εκλυτική ορμόνη της Ωχρινοτρόπου ορμόνης (LHRH) είναι ένα δεκαπεπτιδίο (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) που εκκρίνεται κατά ώσεις από τον υποθάλαμο και αποτελεί τον βασικό ρυθμιστή της γαμετογένεσης και της στεροειδογένεσης. Η LHRH και συνθετικά της ανάλογα, με σημαντικότερο από αυτά το Λεουπρολιδίο [D-Leu⁶, desGly¹⁰]-LHRH-NHEt) χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη θεραπεία ορμονο-εξαρτώμενων ασθενειών, όπως η ενδομητρίωση, το ινωμίωμα μήτρας, η καλοήγησ υπερπλασία του προστάτη, η πρόωμη εφηβεία, καθώς και ο καρκίνος του προστάτη, των ωοθηκών και του μαστού. Επιπλέον, έχει δείχθει πρόσφατα ότι τα ανάλογα της LHRH αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό διαφόρων καρκινικών κυττάρων. Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης τροποποιήσεων στις θέσεις 3 και 6 του Λεουπρολιδίου συνθέσαμε έξι νέα ανάλογα του. Στη θέση 6 του Λεουπρολιδίου η D-

Leu έχει αντικατασταθεί από τη L-Gly(tBu) και το αμινοξύ Trp³ από τη D-Trp, το D- και L-1,2,3,4,τετραϋδροϊσοκινολινο-3-καρβοξυλικό οξύ (D-, L-Tic) και τη D-2-Ναφθυλαλανίνη [D-Nal (2)]. Συντέθηκαν επίσης ανάλογα στα οποία το αιθυλαμιδο-άκρο του Λεουπρολιδίου έχει τροποποιηθεί σε αμινο-τελικό άκρο. Τα νέα ανάλογα μελετήθηκαν ως προς την επίδρασή τους στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων μαστού.

New Synthetic Analogues of Leuprolide Containing Conformationally Restricted Amino Acids in Positions 3 and 6

A. Tatsi¹, E.V. Pappa¹, A.A. Zompra¹, V. Magafa¹, F.N. Lamari¹, N.K. Karamanos², P. Cordopatis¹

Departments of ¹Pharmacy and ²Chemistry, University of Patras, GR-26500, Patra, Greece

Key words: Leuprolide, analogues, conformationally restricted amino acids in positions 3 and 6, synthesis

The decapeptide Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) is secreted from the hypothalamus in a pulsatile pattern and stimulates sex steroid hormone synthesis and gametogenesis. LHRH and its synthetic analogues, including Leuprolide ([DLeu⁶, desPro⁹]-GnRH-NHEt), are used extensively for the treatment of hormone dependent diseases such as endometriosis, uterine fibroids, benign prostate hyperplasia, fertility disorders, and precocious puberty, as well as prostate, ovarian and breast cancer.

Moreover, lately has been shown that the LHRH analogues inhibit the proliferation of different type cancer cells. In order to study the effect of the modification in positions 3 and 6 of Leuprolide we synthesized six new Leuprolide analogues. D-Leu in position 6 of the Leuprolide was substituted by L-Gly(tBu) and Trp³ was substituted by D-Trp, D- and L-1,2,3,4, tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (Tic) and D-2-Naphtylalanine [D-Nal(2)]. We also synthesized analogues that the C-terminal ethylamide of Leu-prolide was substituted by an amide. All new analogues were studied for their effect on proliferation on breast cancer cells.



Συστατικά των Στύλων Διάφορων Ειδών *Crocus* Αναστέλλουν τον Πολλαπλασιασμό Καρκινικών Κύτταρων του Μαστού

Δ.Γ. Χρυσάνθη¹, Φ.Ν. Λάμαρη¹, Γ. Ιατρού², Α. Πυλαρά², Ν.Κ. Καραμάνος³, Π. Κορδοπάτης

¹Τμήμα Φαρμακευτικής, ²Τμήμα Βιολογίας, ³Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, GR-26500, Πάτρα, Ελλάδα

Οι στύλοι του *C. sativus* αποτελούν το γνωστό άρτυμα κρόκος ή σαφράν, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην Μεσογειακή, την Ινδική καθώς και στην Κινεζική κουζίνα. Οι βαφικές ιδιότητες του κρόκου αποδίδονται στις περιεχόμενες κροκίνες, οι οποίες είναι γλυκοζυλιωμένα παράγωγα του 8,8'-διαπο-καροτενοειδικό οξύ 8,8' (κροκετίνη). Με τις τεχνικές της HPLC και της UV/Vis φασματοσκοπίας, δείχνουμε για πρώτη φορά την ύπαρξη υδρόφιλων καροτενοειδών στους στύλους τριών διαφορετικών ειδών *Crocus*, ενδημικών στην Ελλάδα: του *C. boryi* ssp. *tournefortii*, του *C. boryi* ssp. *boryi* και του *C. niveus*. Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού MCF-7 και MDA-MB-231 επωάστηκαν για 48 h με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων των στυλών των τριών ειδών *Crocus* και παρατηρήθηκε δόσο-εξαρτώμενη ανασταλτική δράση μετά από μέτρηση των κυττάρων με την μέθοδο MTT. Η ανασταλτική επίδραση δεν σχετίζεται με την παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων. Μελέτη της δράσης της *trans*-κροκίνης-4 (κύριο καροτενοειδές συστατικό των στυλών του *C. sativus*, διγεντιοβιοζύλ-εστέρας της κροκετίνης), της κροκετίνης και της σαφρανάλης έδειξε ότι η ανασταλτική επίδραση αποδίδεται στις περιεχόμενες κροκίνες ανεξάρτητα από το βαθμό γλυκοζυλίωσης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά για την περαιτέρω έρευνα της σύστασης και των μηχανισμών δράσης των καροτενοειδών συστατικών με σκοπό να ελεγχθεί το κατά πόσο μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικά μέσα.

Style Constituents of Different *Crocus* Species Inhibit Breast Cancer Cell Proliferation

D.G. Chryssanthi¹, F.N. Lamari¹, G. Iatrou², A. Pylara², N.K. Karamanos³, P. Cordopatis¹

¹Department of Pharmacy, ²Department of Biology, ³Department of Chemistry, University of Patras, GR-26500 Patra, Hellas

Key words: Styles of *Crocus sativus*, crocetin, breast cancer

Styles of *Crocus sativus* constitute the well-known spice saffron, which is widely used in the Mediterranean, Indian and Chinese diet. The dyeing properties of saffron are attributed to the constituent crocins, which are glu-cosylated derivatives of 8,8'-diapocarotene-8,8'-dioic acid (crocetin). With HPLC and UV/Vis spectroscopy, we report for the first time the presence of hydrophilic carotenoids in the styles of three other *Crocus* taxa, endemic in Greece: *C. boryi* ssp. *tournefortii*, *C. boryi* ssp. *boryi* and *C. niveus*. MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells were incubated for 48 h with different concentrations of all four *Crocus* styles extracts and a dose-dependent inhibitory effect on cell proliferation was shown using the MTT assay. The antiproliferative effect was not related to the presence of estrogen receptors. Studies of the effect of *trans*-crocic-4 (main carotenoid constituent of *C. sativus* styles, digentiobiosyl-ester of crocetin), crocetin and safranal showed that the antiproliferative effect is attributed to the constituent crocins irrespective of the degree of glycosylation. These results show that the styles of the various *Crocus* taxa merit further investigation of

their composition and mechanisms of action of their carotenoid constituents in order to establish if they

could be used as chemopreventive or anticancer agents.



Σύνθεση Αναλόγων της Νικοτίνης μέσω Ενδομοριακής Κυκλοπροσθήκης 3+2 και με Χρήση Μικροκυμάτων

Γιώργος Πασιαρδής

Group *Methodology and Synthesis of Biomolecules*, Department of Chemistry, University of Poitiers, 86022 Poitiers, France. gbashiar@univ-poitiers.fr

Η Νικοτίνη και τα ανάλογά της παρουσιάζουν σαφή και ισχυρή βιολογική δράση (1,2) συσχετισμένη με την επίδρασή τους στους υποδοχείς ακετυλοχολίνης. Μεταξύ αυτών των δράσεων, αυτή που αφορά τη νόσο Alzheimer είναι από τις πλέον σημαντικές και είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα κάθε εργασία για την ανακάλυψη νέων ιατρικών αγωγών που αποσκοπούν στην ανακούφιση των πασχόντων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής τους. Ως παράδειγμα, στη Γαλλία περισσότεροι από ένα εκατομμύριο άνθρωποι υποφέρουν από αυτή τη νόσο. Σε αυτή τη μελέτη επινοήσαμε μια καινούργια μεθοδολογία για την παρασκευή κατά βούληση πολλών αναλόγων νικοτινοειδών, κάνοντας χρήση απλών αντιδραστηρίων και απλά πειραματικά βήματα. Η ενδομοριακή κύκλοπροσθήκη 3+2 είναι η σημαντικότερη αντίδραση σε αυτή τη μελέτη, με την οποία δημιουργούνται ταυτόχρονα ο βασικός N-ετεροκυκλικός δακτύλιος και ένας αριθμός ασύμμετρων κέντρων. Η εργασία συμπεριλαμβάνει τη μελέτη των αντιδράσεων σε συνθήκες μικροκυμάτων αλλά και κλασικών θερμικών.

Synthesis of Nicotine Analogues Using Intramolecular [3+2] Cycloaddition

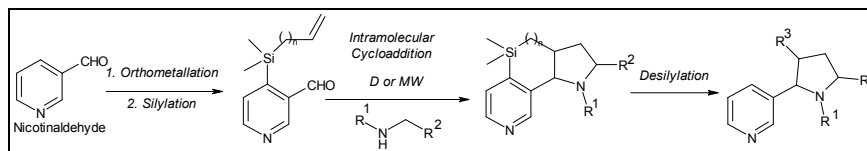
George Pashiarides

Group *Methodology and Synthesis of Biomolecules*, Department of Chemistry, University of Poitiers, 86022 Poitiers, France. gbashiar@univ-poitiers.fr

Key words: Nicotine analogues, intramolecular [3+2] cycloaddition, synthesis

Nicotine and its analogues have been shown to exhibit interesting pharmacological activity [1,2] related to their affinity for acetylcholine receptors. Amongst the activities, Alzheimer's disease is an important target, in order to relieve patients' suffering and to improve their quality of life. Indeed, in France alone, it is estimated that one million people suffer from this ailment. In this study we describe a novel synthesis of such compounds by a short sequence including an important [3+2] cycloaddition step which generates concomitantly the N-heterocycle and several asymmetric centres. Conventional thermal conditions and microwave conditions were explored.

1. N.-H. Lin, G.M. Carrera, Jr., D.J. Anderson: *J. Med. Chem.* 37: 3542-3553 (1994)
2. K.H. Kim, N.-H. Lin, D.J. Anderson: *Bioorg. Med. Chem.* 4: 2211-2217 (1996)



Μοριακή Ανάλυση για την Ταυτοποίηση του Κληρονομούμενου Καρκίνου του Μαστού και του Παχέος Εντέρου στον Ελληνικό Πληθυσμό

Γεώργιος Νασιούλας PhD

Ερευνητικό και Διαγνωστικό Εργαστήριο, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας, Διαγνωστικό & Θεραπευτικό Κέντρο Αθηνών ΑΕ, Διευθυντής Γ. Νασιούλας, PhD

Σήμερα γνωρίζουμε τα απενεργοποιημένα γονίδια στους τρεις πιο σημαντικούς κληρονομούμενους καρκίνους (1-3). Πρόκειται για τα γονίδια BRCA1 και BRCA2 στον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών, το γονίδιο APC στην οικογενή αδενωματώδη πολυποδίαση (Fa-

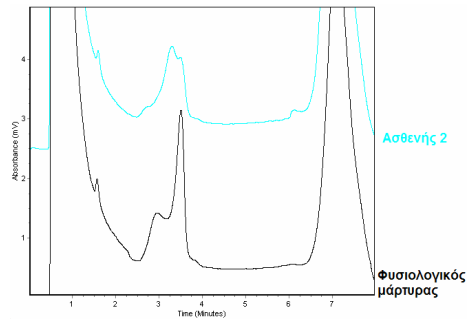
miliar Adenomatous Polyposis – FAP) και τα γονίδια MMR στον κληρονομούμενο μη πολυποδιακό καρκίνο του παχέος εντέρου (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer - HNPCC). Ο καρκίνος του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) αποτελεί το 12% των καρκίνων στο σύνολό τους. Η οικογενής αδενω-

ματώδης πολυποδίαση χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση εκατοντάδων έως και χιλιάδων πολυπόδων στο παχύ έντερο του ασθενούς. Εμφανίζεται νωρίς, από το δέκατο έως το τριακοστό έτος της ηλικίας. Περίπου 80% των ασθενών έχουν κληρονομούμενες μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC, ενώ μικρό ποσοστό οφείλεται σε μεταλλάξεις στο γονίδιο MYH (4-7). Το σύνδρομο του κληρονομούμενου μη πολυποδιακού καρκίνου του παχέος εντέρου σχετίζεται με κληρονομούμενες μεταλλάξεις σε τουλάχιστον πέντε διαφορετικά γονίδια (hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, hPMS2) που κωδικοποιούν επιδιορθωτικά ένζυμα κακώς ζευγαρωμένων βάσεων του DNA. Από τις μέχρι τώρα αναλύσεις σύνδεσης και αναλύσεις μεταλλάξεων προκύπτει ότι τα γονίδια hMSH2 και hMLH1 ευθύνονται για το 60% περίπου των HNPCC περιστατικών. Έρευνες δείχνουν ότι ο καρκίνος του εντέρου εμφανίζεται 20 χρόνια νωρίτερα σε οικογένειες με HNPCC από ό,τι στον γενικό πληθυσμό. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών εμφανίζει για πρώτη φορά καρκίνο σε ηλικία 30-50 ετών (8-9). Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί δύο γονίδια, BRCA1 και BRCA2, στα οποία έχουν ταυτοποιηθεί μεταλλάξεις σε άτομα με καρκίνο του μαστού/ωοθηκών. Στους ασθενείς αυτούς ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται σε νεαρή ηλικία και συχνά συνδέεται και με καρκίνο των ωοθηκών. Ο καρκίνος του μαστού είναι ο πιο κοινός καρκίνος στις γυναίκες με 1:8 πιθανότητα να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Κληρονομούμενες μεταλλάξεις σε γνωστά και άγνωστα γονίδια ευθύνονται για 5-10% των περιπτώσεων (10-12). Όλα τα γονίδια που περιγράφθηκαν είναι μεγάλα και οι παθογόνες μεταλλάξεις είναι συνήθως διάσπαρτες σε όλο το μήκος των γονιδίων. Για το λόγο αυτό η μοριακή διάγνωση συνήθως περιλαμβάνει μία αρχική σάρωση για μεταλλάξεις σε ολόκληρη την κωδική περιοχή των γονιδίων με κάποια οικονομική και ταχύτατη δοκιμασία (Εικόνα 1). Ακολουθεί ταυτοποίηση των ανιχνευθέντων μεταλλάξεων με απευθείας προσδιορισμό της αλληλουχίας (sequencing, Εικόνα 2) για επιβεβαίωση της παθογένειάς τους. Η μοριακή ανάλυση, συνήθως, ξεκινάει από άτομα τα οποία έχουν εμφανίσει τη νόσο (Εικόνα 3). Στη συνέχεια, και εφόσον εντοπιστεί η μετάλλαξη, γίνεται απ'ευθείας έλεγχος των συγγενών του ασθενούς στην ίδια περιοχή, έτσι ώστε να διερευνηθεί πιθανή παρουσία της και σε αυτούς, γεγονός που δηλώνει τη μεταβίβασή της από κάποιον κοινό πρόγονο. Η γενετική δοκιμασία για την ανεύρεση των μεταλλάξεων που απενεργοποιούν το ογκοκατασταλτικό γονίδιο που σχετίζεται με κληρονομούμενα σύνδρομα προδιάθεσης για καρκίνο έχει σημασία σε άτομα με τουλάχιστον έναν συγγενή πρώτου βαθμού με καρκίνο.

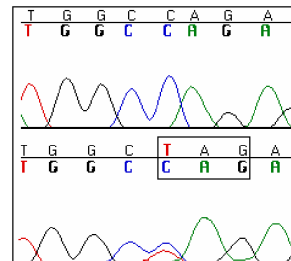
Θετική δοκιμασία, σε ασθενή πρώτου βαθμού συγγενείας, αποτελεί ένδειξη για στενή παρακολούθηση. Αρνητική δοκιμασία εντάσσει τους εξεταζομένους στο βαθμό επικινδυνότητας του υπολοίπου πληθυσμού. Η ακριβής γνώση των μεταλλάξεων που απενεργοποιούν το γονίδιο δίνει στους ασθενείς την ελπίδα για υγιείς απογόνους σε συνδυασμό με την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στις μεθόδους της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

Υλικό και Μέθοδος

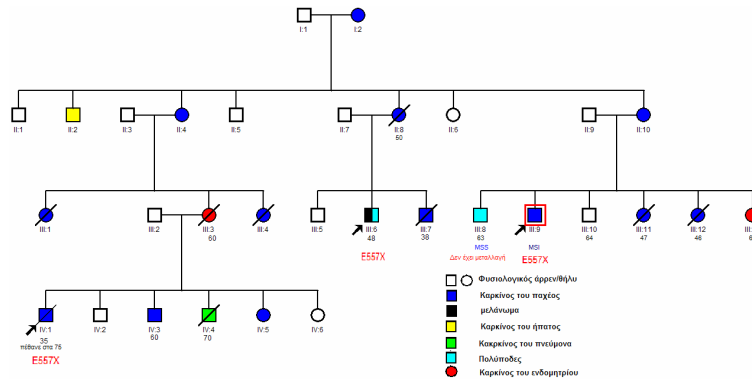
Το DNA απομονώνεται από το αίμα και από μοιμοποιημένο (παραφίνες) ιστό. Η ανίχνευση μεταλλαγών με dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography: dHPLC) στον αναλυτή WAVE DNA Fragment Analysis System (Transgenomic, Inc., USA). Ακολουθεί έλεγχος για την ανίχνευση γενωμικών αναδιατάξεων με τη MLPA. Προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA με τον αυτόματο αναλυτή ABI Prism® 310 και επεξεργασία της για την ταυτοποίηση μεταλλαγών, με λογισμικό H/Y. Long PCR. Στην περίπτωση που με την MLPA ανιχνευθεί αναδιάταξη σε ένα από τα γονίδια, ακολουθεί Long PCR για τον χαρακτηρισμό της. FISH (fluorescent *in situ* hybridization) για τον προσδιορισμό μεγάλων χρωσωμικών ελλειμμάτων.



Εικόνα 1. Σάρωση προϊόντων PCR για μεταλλάξεις με τη μέθοδο dHPLC.



Εικόνα 2. Αλληλούχηση προϊόντων PCR για την ταυτοποίηση μεταλλάξεων



Εικόνα 3. Οικογένεια που εξετάστηκε για κληρονομούμενο μη πολυποδιακό ΚΠΕ. Διαγώνια γραμμή συμβολίζει άτομο που έχει πεθάνει. Τα βέλη δείχνουν τα μέλη της οικογένειας που έχουν εξεταστεί για την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Με κόκκινο κουτί περικλείεται το μέλος της οικογένειας από το οποίο ξεκίνησε η εξέταση. Τα νούμερα κάτω από κάθε άτομο συμβολίζουν την ηλικία που εμφανίστηκε η νόσος

Πίνακας 1. Συνοπτικός πίνακας των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί για το FAP. Στον πίνακα φαίνονται οι οικογένειες στις οποίες έχουν βρεθεί παθογόνες μεταλλάξεις και το αποτέλεσμα αυτών σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Με πλάγια γράμματα παρουσιάζονται οι νέες μεταλλάξεις

A/α	Μετάλλαξη	Αποτέλεσμα	A/α	Μετάλλαξη	Αποτέλεσμα
2959	2767A>T	R923X	7558	3180del4A	V1125X
3441	2601delGA	910X	8919	IVS9+5G>A	skip ex.9
3844	2626A>T	R876X	9665	1973delAG	H672X
4956 & 7416 & 10624	1690C>T	R564X	10602	3212delA	V1125X
4218 & 5977 & 12825 & 13146	3133C>T	Q1045X	11627	2853T>G	Y951X
5346,5743,12580	3926delAAAAG	stop @1309	11649	2748insCA	stop @954
6237	637C>T	R213X	11663	2821G>T	E941X
7400	del. exons 6-15	ελ. Πρωτ.	12379	3199delCAAT	stop@1125
7552	1577insT	S535X	12616	341delC	stop codon

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Συνολικά έχουν εξεταστεί 124 ασθενείς που ανήκουν σε 34 οικογένειες για FAP και έχουν βρεθεί παθογόνες μεταλλάξεις σε 23 από αυτές, δηλαδή σε ποσοστό 67,6%. Ανάμεσα στις μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί, υπάρχουν 9 νέες μεταλλάξεις, οι οποίες δεν έχουν περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία καθώς και μια οικογένεια με μεγάλο γενωμικό έλλειμμα (εξώνια 6-15). Τέλος σε ποσοστό 35% των οικογενειών η παθογόνος μετάλλαξη είναι *de novo*, καθώς ο εξετασθείς ασθενής είναι το πρώτο άτομο της οικογένειας που έχει νοσήσει. Τα συνολικά ευρήματα των παθογόνων μεταλλάξεων συνοψίζονται στον Πίνακα 1. Αντίστοιχα, στο HNPCC έχουν συνολικά εξεταστεί 35 οικογένειες και έχουν βρεθεί παθογόνες μεταλλάξεις σε ποσοστό της τάξεως του 37%. Από αυτές, 42 ασθενείς σε 13 οικογένειες ήταν υψηλού κινδύνου να πάσχουν από HNPCC βάση των κριτηρίων Amsterdam και Bathesda (1). Στις οικογένειες αυτές το ποσοστό ανίχνευσης παθογόνων μεταλλάξεων είναι μεγαλύτερο: 61,5%. Ανάμεσα στις μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί υπάρχουν

4 νέες μεταλλάξεις, οι οποίες δεν έχουν περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία: 1669G>T, 472C>T, 1704>1705del AG και 1076G>T (9). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 2.
BRCA: Συνολικά έχουν εξεταστεί 88 ασθενείς που ανήκουν σε 56 οικογένειες για BRCA1. Από αυτές 51 ασθενείς ανήκουν σε 37 οικογένειες για BRCA1 και BRCA2. Ταυτοποιήθηκαν 9 παθογόνες μεταλλάξεις (ποσοστό 18,81%). Ανάμεσα στις μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί, υπάρχει 1 νέα μετάλλαξη, η οποία δεν έχει περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία καθώς και μια οικογένεια με μεγάλο γενωμικό έλλειμμα (εξώνιο 20). Τα συνολικά ευρήματα των παθογόνων μεταλλάξεων συνοψίζονται στον Πίνακα 3.
Συμπερασματικά, χρησιμοποιώντας μεθόδους μοριακής βιολογίας βρήκαμε σε υψηλού κινδύνου οικογένειες παθογόνες μεταλλαγές στα γονίδια APC, MMR και BRCA1/2. Η έρευνα για τον εντοπισμό παθογόνων μεταλλάξεων στους υπόλοιπους αλλά και σε νέους ασθενείς συνεχίζεται. Είναι φανερό ότι η έγκαιρη διάγνωση με το γενετικό τεστ μπορεί να σώσει τη ζωή αυτών που φέρουν

ένα απενεργοποιημένο γονίδιο. Επιπλέον, στις επιβαρυνμένες οικογένειες θα απαλλάξει όσους έχουν φυσιολογικό γονίδιο από το άγχος της προδιάθεσης και τη συνεχή ιατρική παρακολούθηση. Η ανεύρεση των μεταλλάξεων είναι καθοριστική για τους εξής λόγους: Α) Σε όσους ταυτοποιηθεί παθογόνος μετάλλαξη, που σημαίνει και αυξημένη προδιάθεση για καρκίνο, παρακολουθούνται συστηματικά και θα ληφθούν κατάλληλα

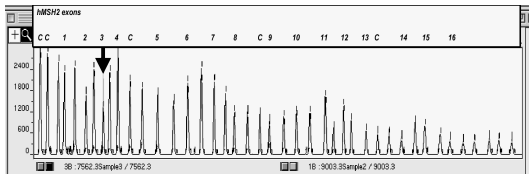
μέτρα για υγιείς απογόνους. Β) Όσοι είναι αρνητικοί σταματούν να ζουν με το φόβο του αυξημένου κινδύνου. Γ) Τέλος, η ακριβής γνώση των μεταλλάξεων που απενεργοποιούν το γονίδιο δίνει στους ασθενείς την ελπίδα για υγιείς απογόνους σε συνδυασμό με την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στις μεθόδους του προγενετικού και προεμφυτευτικού ελέγχου.

Πίνακας 2. Συνοπτικός πίνακας των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί για το HNPCC. Στον πίνακα φαίνονται οι οικογένειες στις οποίες έχουν βρεθεί παθογόνες μεταλλάξεις και το αποτέλεσμα αυτών σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Με πλάγια γράμματα παρουσιάζονται οι νέες μεταλλάξεις

A/a	Κριτήριο	Μετάλλαξη	Αποτέλεσμα	Γονίδιο	Είδη Καρκίνου
3335	Amsterdam	1669G>T	E557X	hMLH1	ΚΠΕ, ενδομήτριο, πνεύμονα, μελάνωμα
5838	Amsterdam	676C>T	R226X	hMLH1	ΚΠΕ, ενδομήτριο, λάρυγγα, στομάχι
7562	Amsterdam	Del 2.2 Kb	Ελ. Πρωτ. 123-215αα	hMSH2	ΚΠΕ, ενδομήτριο
8344	Bethesda	472C>T	Q158X	hMSH2	ΚΠΕ
8902	Amsterdam	2131C>T	R711X	hMSH2	ΚΠΕ, ενδομήτριο, ωθήκες
9663	Amsterdam	1704_1705 delAG	Κωδικ. Τερμ. 570	hMSH2	ΚΠΕ, ενδομήτριο
10107	Amsterdam	1076G>T	R359X	hMSH2	ΚΠΕ, ενδομήτριο, ωθήκες, προστάτης, μαστός, οφθαλμός, ουρ. κύστη

Πίνακας 3. Συνοπτικός πίνακας των μεταλλάξεων που έχουν βρεθεί για το BRCA1 και BRCA2. Στον πίνακα φαίνονται οι οικογένειες στις οποίες έχουν βρεθεί παθογόνες μεταλλάξεις και το αποτέλεσμα αυτών σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο. Με έντονα γράμματα παρουσιάζεται η καινούργια μετάλλαξη

Εχορ BRCA1	Μετάλλαξη	Συχνότητα	Αποτέλεσμα
11	1125delCT	3	Stop 1131
20	5382insC G1738R	3	Stop1829
	Έλλειψη εξωνίου 20	2	Αλλαγή αμινοξέων
		5	Ελλιπής Πρωτεΐνη
23	5586G>A	1	Υπερπρήδηση του εξωνίου 23
Εχορ BRCA2	Μετάλλαξη	Συχνότητα	Αποτέλεσμα
8	886delGT	1	Stop 223
10	2041insA	7	Stop 615



1. Lerman Shields: Genetic testing for cancer susceptibility: the promise and the pitfalls. *NRC 4*: 235-241 (2004)
2. Arnold C.N., Goel A., Blum H.E., Boland C.R.: Molecular pathogenesis of colorectal cancer: Implications for molecular diagnosis. *Cancer 104*: 2035-2047 (2005)
3. Lynch H.T., de la Chapelle A.: Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348: 919-932 (2003)
4. Mihalatos M., Danielides I., Belogianni J., Harokopos E., Papadopoulou E., Kalimanis G., Tsiava M., Triantafyllidis J.K., Kosmidis P.A., Fountzilias G., Basdanis G., Agnantis N.J., Yannoukakos D., Nasioulas G.: Novel mutations of the APC gene in familial adenomatous polyposis in Greek patients. *Cancer Genet. Cytogenetics 141*: 65-70 (2003)
5. Mihalatos M., Apeessos A., Triantafyllidis J.K., Kosmidis P.A., Fountzilias G., Agnantis N.J., Yannoukakos D., Nasioulas G.: Evaluation of dHPLC in mutation screening of the APC gene in a Greek FAP cohort. *Anticancer Res.* 23: 2691-2696 (2003)
6. Mihalatos M., Apeessos A., Dauwerse H., Velissariou V., Psychias A., Koliopanos A., Petropoulos K., Triantafyllidis J.K., Danielides I., Fountzilias G., Agnantis N.J., Nasioulas G.: Rare mutations predisposing to familial adenomatous polyposis in Greek FAP patients. *BMC Cancer 5*: 40 (2005)