



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ"

**Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων εν
δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών
κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος
της Νιλοτινίβης (Nilotinib), για τη θεραπεία
νεοπλασιών**

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Βούλγαρη Πηνελόπη
Χημικός

ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΜΑΙΟΣ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ"

**Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων εν
δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών
κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος
της Νιλοτινίβης (Nilotinib), για τη θεραπεία
νεοπλασιών**

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Βούλγαρη Πηνελόπη
Χημικός

ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΜΑΙΟΣ 2017

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Βούλγαρη Πηνελόπη

A.M.153

Επιβλέπων καθηγητής: Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής

Θεοδώρου Βασιλική, Καθηγήτρια

Σίσκος Μιχαήλ, Καθηγητής

Η πρόεδρος του τμήματος Χημείας

Λέκκα Μαρία- Ελένη, Καθηγήτρια

Η γραμματέας του τμήματος

Βαμβέτσου Ζωή- Βαλεντίνα

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

19/05/2017

Ευχαριστίες

Το παρόν Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης αφορά στο σχεδιασμό, στη σύνθεση, στο χαρακτηρισμό και στον έλεγχο της βιολογικής δράσης αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος της Νιλοτινίβης (Nilotinib), ως εν δυνάμει δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των εν λόγω ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ3-210 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά την περίοδο από τον Οκτώβριο 2015 έως το Μάρτιο 2017, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου.

Η ολοκλήρωση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης ιδιαίτερα στην Οργανική Χημεία, απαιτεί κόπο, γνώσεις, αφοσίωση, επιμονή και υπομονή. Μερικές φορές απογοητεύεσαι, καθώς κατά περιόδους οι αποτυχίες είναι περισσότερες από τις επιτυχίες. Άλλες φορές πάλι νιώθεις χαρούμενος και υπερήφανος για τα αποτελέσματά σου, αφού οι κόποι σου απέδωσαν καρπούς, αφήνοντας έτσι το δικό σου στίγμα στα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα. Σαφώς, ο καθένας μας σε κάθε του προσπάθεια έχει δίπλα του ανθρώπους που τον στηρίζουν, τον βοηθούν και τον εμπυχώνουν να συνεχίσει την προσπάθεια αυτή.

Για όλους τους παραπάνω λόγους, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δάσκαλό μου Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Με καθοδηγούσε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του μεταπτυχιακού, προσφέροντας απλόχερα τις γνώσεις και την εμπειρία του, λύνοντας μου κάθε απορία, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο, και βοηθώντας με σε κάθε δυσκολία. Η συνεργασία μου με ένα Καθηγητή που χαρακτηρίζεται όχι μόνο από πολλές και σε εις βάθος γνώσεις, σε όλους του τομείς, αλλά και από ήθος και ανθρωπιά, με έκανε να προσπαθώ περισσότερο και να ολοκληρώσω με επιτυχία την ερευνητική μου προσπάθεια.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βασιλική Θεοδώρου για τη συνεχή βοήθεια που μου προσέφερε σε καθημερινή βάση, καθώς και να εκφράσω την εκτίμηση που τρέφω στο πρόσωπό της. Ήταν σαν μητέρα μου στο εργαστήριο και

πάντα με το χαμόγελο, την καλοσύνη και την αισιοδοξία της, μου έδινε δύναμη να συνεχίζω να προσπαθώ.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μιχάλη Σίσκο που δέχτηκε ευχαρίστως να είναι στην τριμελή επιτροπή μου, αλλά κυρίως για τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της συγγραφής του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους συναδέλφους και φίλους μου στο ερευνητικό εργαστήριο Βασιλική Πολυχρονίδου, Μιχάλη Αλαγιάννη, Νικολέτα Ντέμου, Αλέξη Μπρέντα, Παρασκευή Φούκα και Μαρίνα Γώγου για την άριστη συνεργασία μας, την ψυχολογική υποστήριξη και τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε καθώς επίσης και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Καθηγητή κ. Βαρβούνη, Αουάντ Άλια και Γεροντίτη Ιωάννη για την καλή μας συνεργασία και στήριξη. Ευχαριστώ επίσης τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Ρένο Βρέττο, Δημήτρη Διαμαντή, Αντώνη Τσιαϊλάνη και Χρήστο Χατζηγιάννη για τη βοήθεια, τις συμβουλές και, φυσικά, τη φιλία τους. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και φίλους μου Παναγιώτη Πανταζή και Γιωργή Μάνθο για τη βοήθεια αλλά κυρίως την ψυχολογική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο κέντρο NMR του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη φασμάτων ^1H NMR και ^{13}C NMR, καθώς και το Κέντρο Μάζας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ιδιαίτερα τον Δρ. Καρκαμπούνα Αθανάσιο για τη λήψη φασμάτων υψηλής ευκρίνειας HRMS.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην οικογένειά μου. Ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου και την αδελφή μου Νίνα για τη στήριξη, οικονομική και ηθική και την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου προσπάθεια, πάντα πρόθυμοι να ακούσουν όλους τους προβληματισμούς και τις ανησυχίες μου. Χωρίς αυτούς, η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής θα ήταν αδύνατη.

*Αφιερώνεται στους γονείς
και την αδελφή μου...*

Περίληψη

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του κυττάρου, συμμετέχοντας σε πολλές σηματοδοτικές οδούς, επάγοντας την φωσφορυλίωση από το ATP. Η απορρυθμισμένη δράση πρωτεϊνικών κινασών και των υποδοχέων τους έχει συσχετιστεί με διάφορες ασθένειες, μεταξύ των οποίων η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία. Η αναστολή αυτών των παθολογικών πρωτεϊνικών κινασών μέσω μορίων μικρού μοριακού βάρους, που ανταγωνίζονται τη θέση πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο της κινάσης, έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι συμβάλλει σημαντικά στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία των νεοπλασιών. Ακριβώς για το λόγο αυτό, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για την ανάπτυξη και παραγωγή νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίοι θα δρουν εκλεκτικά, αναστέλλοντας τη δράση της παθολογικής πρωτεϊνικής κινάσης.

Το Imatinib (Gleevec) είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας, ο οποίος, ως αδενικός μιμητής, ανταγωνίζεται τη θέση πρόσδεσης του ATP στην παθολογική τυροσινική κινάση Bcr-Abl. Το Imatinib σχεδιάστηκε για την αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Το Nilotinib σχεδιάστηκε ως δεύτερης γενιάς εκλεκτικός αναστολέας της Bcr-Abl κινάσης, εμφανίζοντας μεγαλύτερη ανασταλτική-θεραπευτική δράση από το Imatinib.

Στο εργαστήριο, κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος, έγιναν προσπάθειες σύνθεσης νέων ενώσεων, αναλόγων/παραγώγων του Nilotinib, οι οποίες υπήρξαν αποτέλεσμα μοριακής μοντελοποίησης και είναι πιθανόν να δρουν αποτελεσματικότερα στις πρωτεϊνικές κινάσες στόχους, με σκοπό την εκλεκτική αναστολή τους. Οι τροποποιήσεις στις αρχικές φαρμακευτικές ενώσεις ήταν στοχευμένες και αφορούσαν τον τελευταίο κατά σειρά δακτύλιο (D), όπου προσαρτήθηκαν φυσικά και μη αμινοξέα που μπορούν να αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας περισσότερους δεσμούς υδρογόνου. Όλες οι νέες ενώσεις που συντέθηκαν στο εργαστήριο χαρακτηρίστηκαν πλήρως (^1H NMR, ^{13}C NMR, MS).

Abstract

Protein kinases are enzymes that play pivotal role in cell functions regulating many signal pathways by inducing ATP phosphorylation. Dysregulation of protein kinase and their receptors activity has been related to various diseases, including Chronic Myeoid Leukemia. Inhibition of these pathological protein kinases through small molecular weight compounds that compete the ATP binding site in the kinase active core is found to contribute in the treatment of the disease symptoms. For this reason, there is great interest in the scientific community for the synthesis and development of new more potent protein kinase inhibitors, acting selectively in the pathological protein kinase.

Imatinib (Gleevec) is the first selective inhibitor who antagonizes the ATP binding site in the pathological Bcr-Abl tyrosine kinase in the treatment against Chronic Myeloid Leukemia (CML). Nilotinib was designed as a second generation selective Bcr-Abl kinase inhibitor and exhibits greater inhibitory activity compared to Imatinib.

New compounds, Nilotinib analogues/derivatives, were synthesized in the laboratory, as a result of molecular modeling and it is possible to act more effectively on the protein kinases targets, aiming at their selective inhibition. These modifications on the original pharmaceutical compounds were targeted and were about the the last phenyl ring, where natural and non natural amino acids that increase the hydrogen bonds and the aromatic ability were attached. All new compounds were fully characterized (^1H NMR, ^{13}C NMR, MS).

Περιεχόμενα

<i>Ευχαριστίες</i>	5
<i>Περίληψη</i>	8
<i>Abstract</i>	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι.....	16
<i>Εισαγωγή</i>	16
<i>Σκοπός εργασίας</i>	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ	24
<i>Θεωρητικό μέρος</i>	24
<i>2.1 Φωσφορυλίωση</i>	24
<i>2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες</i>	25
<i>2.3 Δομή πρωτεϊνικών κινασών</i>	26
<i>2.4 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών</i>	28
<i>2.4.1 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης</i>	29
<i>2.4.1.1 Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)</i>	30
<i>2.4.1.2 MAP κινάσες (Mitogen-Activated Protein Kinases)</i>	31
<i>2.4.2 Τυροσινικές κινάσες (TKs)</i>	32
<i>2.4.2.1 Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs)</i>	33
<i>2.4.2.2 Μη Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs)</i>	36
<i>2.4.2.2.1 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης c-Src</i>	38
<i>2.4.2.2.2 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης Abl</i>	39
<i>2.4.2.3 TKL(Tyrosinekinase-like) κινάσες</i>	40
<i>2.4.3 Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs)</i>	41
<i>2.5 Οι πρωτεϊνικές κινάσες στη σηματοδοτική οδό των κυττάρων</i>	42
<i>2.6 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών</i>	44
<i>2.6.1 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών</i>	45
<i>2.6.2 Χαρακτηριστικά αδενικών μιμητών</i>	47
<i>2.7 Στοχευμένη θεραπεία</i>	49
<i>2.8 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και καρκίνος</i>	52
<i>2.9 Λευχαιμία</i>	57
<i>2.9.1 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία(CML)</i>	58
<i>2.9.2 Οι φάσεις της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας</i>	58
<i>2.9.3 Το Χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας (Ph)</i>	59
<i>2.9.4 Θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας</i>	61

2.10 <i>Imatinib</i>	61
2.10.1 Το <i>Imatinib</i> κατά της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας	63
2.10.2 Μηχανισμός δράσης του <i>Imatinib</i>	64
2.10.3 Αλληλεπιδράσεις <i>Imatinib</i> με την <i>Abl</i>	65
2.10.4 Σύνθεση του <i>Imatinib</i>	66
2.11 Αντίσταση στο <i>Imatinib</i>	72
2.12 <i>Nilotinib</i>	76
2.12.1 Μηχανισμός δράσης του <i>Nilotinib</i> και αλληλεπιδράσεις με την <i>Abl</i> κινάση	77
2.12.2 Συνθετική πορεία του <i>Nilotinib</i>	80
2.13 Άλλοι σημαντικοί αναστολείς	85
2.13.1 <i>Dasatinib</i>	85
2.13.1.1 Σύνθεση του <i>Dasatinib</i>	87
2.13.2 <i>Ponatinib</i>	89
2.13.2.1 Σύνθεση του <i>Ponatinib</i>	90
2.13.3 <i>Sorafenib</i>	91
2.13.3.1 Σύνθεση του <i>Sorafenib</i>	92
2.13.4 <i>Erlotinib</i>	95
2.13.4.1 Σύνθεση του <i>Erlotinib</i>	96
2.13.5 <i>Gefitinib</i>	96
2.13.5.1 Σύνθεση του <i>Gefitinib</i>	97
2.13.6 <i>Sunitinib</i>	99
2.13.6.1 Σύνθεση του <i>Sunitinib</i>	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ.....	103
Συζήτηση-Αποτελέσματα	103
3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων	103
3.2 Σχεδιασμός νέων αναστολέων	107
3.2.1 Μοριακή μοντελοποίηση της ένωσης <i>Nil01 (AUTODOCKVINA)</i>	108
3.2.2 Μοριακή μοντελοποίηση των ενώσεων <i>Nil02</i> και <i>Nil03 (AUTODOCKVINA)</i>	110
3.2.3 Μοριακή μοντελοποίηση των ενώσεων <i>Nil04</i> και <i>Nil05 (AUTODOCKVINA)</i>	112
3.2.4 Μοριακή μοντελοποίηση της ένωσης <i>Nil06 (AUTODOCKVINA)</i>	115
3.2.5 Θεωρητικά αποτελέσματα	116
3.3 Ολική πορεία σύνθεσης νέων αναστολέων.....	117
3.4 Βελτιστοποιήσεις στη σύνθεση των νέων αναστολέων	118
3.5 Σύνθεση παραγώγων του <i>Nilotinib</i>	121

3.5.1	Σύνθεση β-εναμινόνης της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.....	121
3.5.1.1	Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της β-εναμινόνης	121
3.5.1.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα της β-εναμινόνης, ένωση 1.....	122
3.5.2	Εστεροποίηση.....	124
3.5.2.1	Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 2) - Μηχανισμός	124
3.5.2.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 2.	125
3.5.2.3	Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα, ένωση 3	127
3.5.2.4	Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα, ένωση 3	128
3.5.3	Σύνθεση φαινυλαμινοπυριμιδίνης.....	129
3.5.3.1	Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένος φαινυλογουανιδίνης	129
3.5.3.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος της αρωματικής αμίνης, ένωση 4.....	130
3.5.3.3	Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης γουανιδίνης, ένωσης 5.....	131
3.5.3.4	Κυκλοποίηση του άλατος γουανιδίνης και εναμινόνης προς το σχηματισμό της υποκατεστημένης φαινυλαμινοπυριμιδίνης.....	132
3.5.3.5	Φασματοσκοπικά δεδομένα του προϊόντος κυκλοποίησης με μεθυλεστέρα, ένωση 6 .	134
3.5.3.6	Φασματοσκοπικά δεδομένα του προϊόντος κυκλοποίησης με αιθυλεστέρα, ένωση 7..	136
3.5.3.7	Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων μετεστεροποίησης.....	138
3.5.4	Βασική υδρόλυση του εστέρα.....	139
3.5.4.1	Βασική υδρόλυση του εστέρα προς το καρβοξυλικό οξύ και την αντίστοιχη αλκοόλη σε μη υδατικό περιβάλλον.....	139
3.5.4.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα του οξέος, ένωση 8	140
3.5.5	Σύνθεση τελικών προϊόντων-αναλόγων του Nilotinib με δυο αμιδικούς δεσμούς, με την προσάτηση φυσικών και μη αμινοξέων (Nil01-Nil05)	141
3.5.5.1	Σύνθεση του 1,3 διαμινο-5-τριφθορομεθυλοβενζολίου, ένωση 10.....	143
3.5.5.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα των 1,3 δινιτρο-5-τριφθορο μεθυλοβενζολίου και 1,3 διάμινο-5-τριφθορομεθυλοβενζολίου, ενώσεων 9 και 10 αντίστοιχα	143
3.5.5.3	Σχηματισμός του 1 ^ο αμιδικού δεσμού	145
3.5.5.4	Φασματοσκοπικά δεδομένα του προϊόντος σύζευξης με έναν αμιδικό δεσμό, ένωση 11.	149
3.5.5.5	Σχηματισμός του 2 ^ο αμιδικού δεσμού με τη χρήση N-Boc προστατευμένων φυσικών (L-) και μη αμινοξέων (D-).	152
3.5.5.6	Αποπροστασία της προστατευτικής Boc ομάδας των προϊόντων σύζευξης, ενώσεις 12,13,14,15,16 για το σχηματισμό των τελικών προϊόντων Nil-01-Nil-05.....	166
3.5.5.7	Σχηματισμός του 2 ^ο αμιδικού δεσμού με τη χρήση F-moc προστατευμένων αμινοξέων.	173

3.5.5.8 Αποπροστασία της προστατευτικής F-πoc ομάδας των προϊόντων σύζευξης, ενώσεις 17,18,19,20,21 για το σχηματισμό των τελικών προϊόντων Nil01-Nil05.	183
3.5.6 Σύνθεση παραγώγων-αναλόγων του Nilotinib με έναν αμιδικό δεσμό (Nil06-Nil09) ...	193
3.5.6.1 Σύνθεση του αναλόγου Nil06	193
3.5.6.2 Σύνθεση του αναλόγου Nil07	201
3.5.6.3 Σύνθεση του αναλόγου Nil08	207
3.5.6.4 Σύνθεση του αναλόγου Nil09	213
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV	220
Μεθοδολογία.....	220
4.1 Συσκευές και όργανα.....	220
4.2 Σύνθεση εναμιμόνης (1)	220
4.3 Προστασία του καρβοξυλικού οξέος	221
4.3.1 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (2)	221
4.3.2 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (3).....	222
4.3 Αντιδράσεις σύνθεσης υδροχλωρικών αλάτων	222
4.3.1 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (4)	222
4.3.2 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (4').....	223
4.4 Αντιδράσεις σύνθεσης υδροχλωρικών αλάτων γουανιδίνης	223
4.4.1 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (5).....	223
4.4.1 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (5').....	224
4.5 Αντιδράσεις σύνθεσης των φαινυλ-αμινο-πυριμιδινών.....	225
4.5.1 Προσπάθεια σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (6)	225
4.5.2 Προσπάθεια σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (6)	225
4.5.3 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (6)	226
4.5.4 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (7)	227
4.6 Αντίδραση υδρόλυσης του βενζοϊκού μεθυλεστέρα (6) / αιθυλεστέρα (7) / προπυλεστέρα (6b)	228
4.6.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο) αμινοβενζοϊκού οξέος (8).....	228
4.7 Σύνθεση του 1,3-δινιτρο-5-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου(9).....	228

4.8 Σύνθεση του 1,3-διάμινο-5-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου (10).....	229
4.9 Σύνθεση του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (11).....	229
4.10 Σύνθεση της ένωσης 12.....	232
4.10 Σύνθεση της ένωσης 13.....	234
4.11 Σύνθεση της ένωσης 14.....	235
4.12 Σύνθεση της ένωσης 15.....	236
4.13 Σύνθεση της ένωσης 16.....	237
4.14 Σύνθεση του Nil01.....	237
4.15 Σύνθεση της ένωσης 17.....	239
4.16 Σύνθεση της ένωσης 18.....	240
4.17 Σύνθεση της ένωσης 19.....	241
4.18 Σύνθεση της ένωσης 20.....	242
4.19 Σύνθεση της ένωσης 21.....	243
4.20 Σύνθεση του Nil01.....	244
4.21 Σύνθεση του Nil02.....	245
4.22 Σύνθεση του Nil03.....	246
4.23 Σύνθεση του Nil04.....	247
4.24 Σύνθεση του Nil05.....	247
4.25 Σύνθεση της 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοανιλίνης (24).....	248
4.25.1 Σύνθεση του αντιδραστηρίου επιλεκτικής αναγωγής, NaSH.....	248
4.25.2 Σύνθεση της ένωσης 24.....	248
4.26 Σύνθεση του 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφθοροβενζολίου (25).....	249
4.27 Σύνθεση της ένωσης 26.....	250
4.28 Σύνθεση της ένωσης 27.....	250
4.29 Σύνθεση της ένωσης 29.....	251
4.30 Σύνθεση της ένωσης 30.....	252
4.31 Σύνθεση της ένωσης 31.....	252
4.32 Σύνθεση της ένωσης 32.....	253
4.33 Σύνθεση της ένωσης 33.....	254
4.34 Σύνθεση της ένωσης 34.....	257
4.35 Σύνθεση της ένωσης 35.....	257
4.36 Σύνθεση της ένωσης 38.....	258
4.37 Σύνθεση της ένωσης 39.....	259

4.38 Σύνθεση της ένωσης 40..... 259

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Εισαγωγή

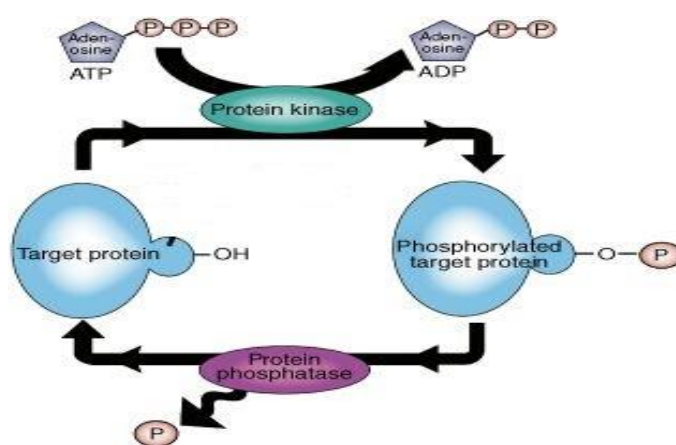
Ο καρκίνος αποτελεί μια από τις πιο μεγάλες και επείγουσες προκλήσεις, που πρέπει να αντιμετωπιστεί, στον τομέα της υγείας τον 21^ο αιώνα. Ο όρος καρκίνος δεν αποδίδεται σε μια και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα στο σώμα μας, τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με ένα αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν καθώς συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα, χωρίς να υπακούουν σε κανένα φυσιολογικό περιορισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νεοπλασιών. Κάθε χρόνο χάνουν τη ζωή τους εκατομμύρια άνθρωποι από καρκίνο του πνεύμονα, του παγκρέατος, του εντέρου, από λευχαιμία και πολλές άλλες μορφές καρκίνου. Για το λόγο αυτό, φαρμακοβιομηχανίες και πολλές ερευνητικές ομάδες ασχολούνται έντονα για την ανάπτυξη φαρμάκων εναντίον αυτής της συχνά εμφανιζόμενης και πολυδιάστατης επάρετης νόσου.

Δεδομένου ότι, πολλές φορές οι συνήθεις τρόποι θεραπείας του καρκίνου επιφέρουν δυσμενή αποτελέσματα, καταστρέφοντας όχι μόνο τα καρκινικά αλλά και τα υγιή κύτταρα, επιτακτική κρίνεται η ανάγκη ανάπτυξης νέων, τροποποιημένων και βελτιωμένων φαρμάκων που στοχεύουν εκλεκτικά σε μοριακό επίπεδο, αυξάνοντας έτσι το προσδόκιμο ζωής. Σήμερα, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου και συγκεκριμένα στη χρήση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες εμφανίζουν εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με απορρυθμισμένα μόρια στόχους, τα οποία ευθύνονται για την εμφάνιση και την εξέλιξη της ασθένειας, αναστέλλοντας τη δράση τους. Ο λογικός σχεδιασμός βιοδραστικών ενώσεων, η γνώση της χημείας και της βιοχημείας μιας ασθένειας και η συμβολή όλων των κλάδων της Χημείας, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

Έρευνες κατέδειξαν ότι η καρκινογένεση οφείλεται σε μοριακές βλάβες που διαταράσσουν τους μηχανισμούς ελέγχου των κυττάρων, οι οποίοι ευθύνονται για τη διαίρεση, την επιβίωση και την απόπτωσή τους. Μεταλλάξεις μορίων που

εμπλέκονται στις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου, όπως είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο, οδηγώντας στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και στην αποφυγή απόπτωσης των κυττάρων.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών και δρουν ως καταλύτες του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, φωσφορυλιώνουν μια υδροξυλομάδα της σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης μιας πρωτεΐνης-στόχου, ενεργοποιώντας την, ρυθμίζοντας έτσι πολλές λειτουργίες του κυττάρου. Η φωσφορική ομάδα προσφέρεται από ένα μόριο ATP (τελική φωσφορική ομάδα αυτού), το οποίο προσδένεται στο ενεργό κέντρο της κινάσης (*Εικόνα 1*).



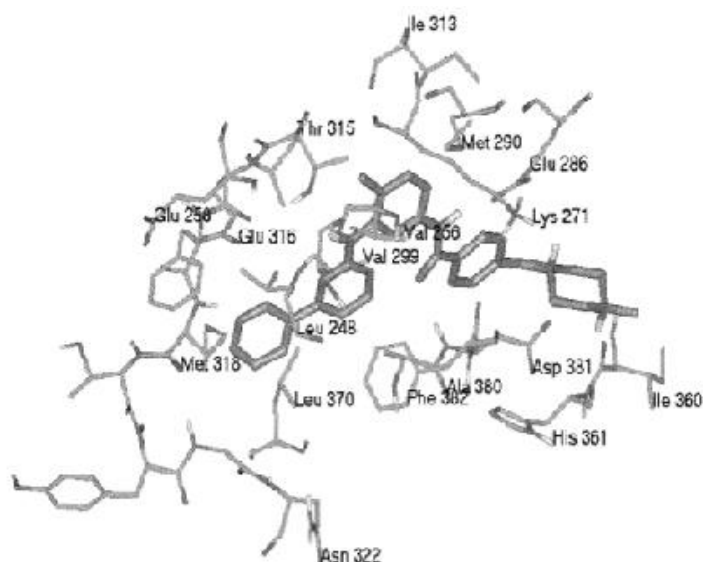
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών

Μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν την ανεξέλεγκτη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών-στόχων θέτοντας σε λειτουργία μη επιθυμητούς μηχανισμούς του κυττάρου με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκινικών όγκων. Συνεπώς, η απορρυθμισμένη λειτουργία των κινασών σχετίζεται με πολλές ασθένειες, αποτελώντας ταυτόχρονα πολύτιμο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών για τη σύνθεση νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων και τη θεραπεία πολλών ασθενειών.

Για το λόγο αυτό, η εκλεκτική αναστολή πρωτεϊνικών κινασών, υπεύθυνων για παθολογικές καταστάσεις, από ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, αποτελεί τον κύριο στόχο πολλών ερευνητικών ομάδων με στόχο την καταστολή της ασθένειας. Οι αναστολείς αυτοί δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης και αναστέλλουν τη λειτουργία της, καταλαμβάνοντας το χώρο του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης, σχηματίζοντας κατά κανόνα ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων. Εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση προς τα μόρια του ATP,

ως μιμητές αυτού, τα οποία πλέον αδυνατούν να προσδεθούν σε ένα ήδη κατειλημμένο χώρο, μη προσφέροντας την πολύτιμη φωσφορική τους ομάδα σε μια πρωτεΐνη προκειμένου να ενεργοποιηθεί.

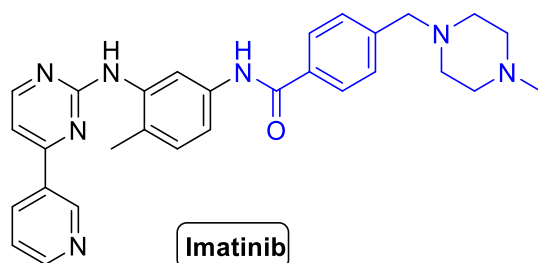
Ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης που χρησιμοποιείται επιτυχώς αρκετά χρόνια ως θεραπεία πρώτης γραμμής κατά της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας είναι ένα παράγωγο φαινυλαμινοπυριμιδίνης, το Imatinib (Glivec). Η επιτυχία του έγκειται στην εκλεκτική του δράση, καθώς δεν αλληλεπιδρά και δεν αναστέλλει τη δράση φυσιολογικών πρωτεϊνικών κινασών. Επιπρόσθετα, από κρυσταλλογραφικές μελέτες φαίνεται ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Abl πρωτεϊνικής κινάσης και του Imatinib συνίστανται σε ένα εκτεταμένο δίκτυο υδρόφοβων, ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Imatinib και της κινάσης Abl

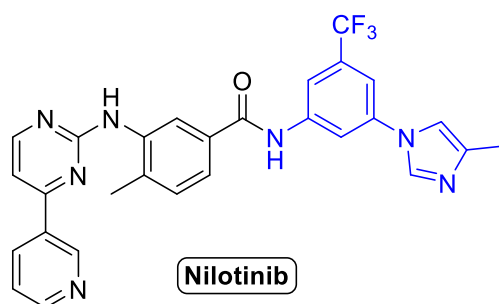
Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρώτη ένωση-αναστολέας που κατέδειξε μια ασθενή ανασταλτική δράση κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) ήταν μια φαινυλαμινοπυριμιδίνη. Στην πορεία βελτιστοποίησης της μοριακής δομής διαπιστώθηκε ότι η προσάρτηση μιας 3-πυριδίνης στην 4-θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου, οδήγησε σε μεγάλη αύξηση της ανασταλτικής δράσης κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C. Στην προσπάθεια αύξησης την ανασταλτικής δράσης, εισήχθη μια μεθυλομάδα στην 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου, γεγονός που κατήργησε εντελώς την ανασταλτική δράση της συγκεκριμένης ένωσης, έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης C. Παρόλα αυτά, η ένωση κατέστη εξαιρετικά δραστική και εκλεκτική κατά της Bcr-Abl πρωτεϊνικής κινάσης. Προφανώς, κάτι που

επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια, η εισαγωγή της μεθυλομάδας στην 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου επέφερε σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση και κατ' επέκταση στις αλληλεπιδράσεις του μορίου εντός του ενεργού κέντρου (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Η δομή του Imatinib

Προκειμένου να αυξηθεί η δράση του φαρμάκου έναντι μεταλλάξεων που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της ασθένειας, κυρίως μετά τη θεραπεία με τον πρώτης γραμμής αναστολέα, το Imatinib, αναπτύχθηκαν αναστολείς 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς, όπως το Nilotinib (Tasigna), (Εικόνα 4) και πολλοί άλλοι.



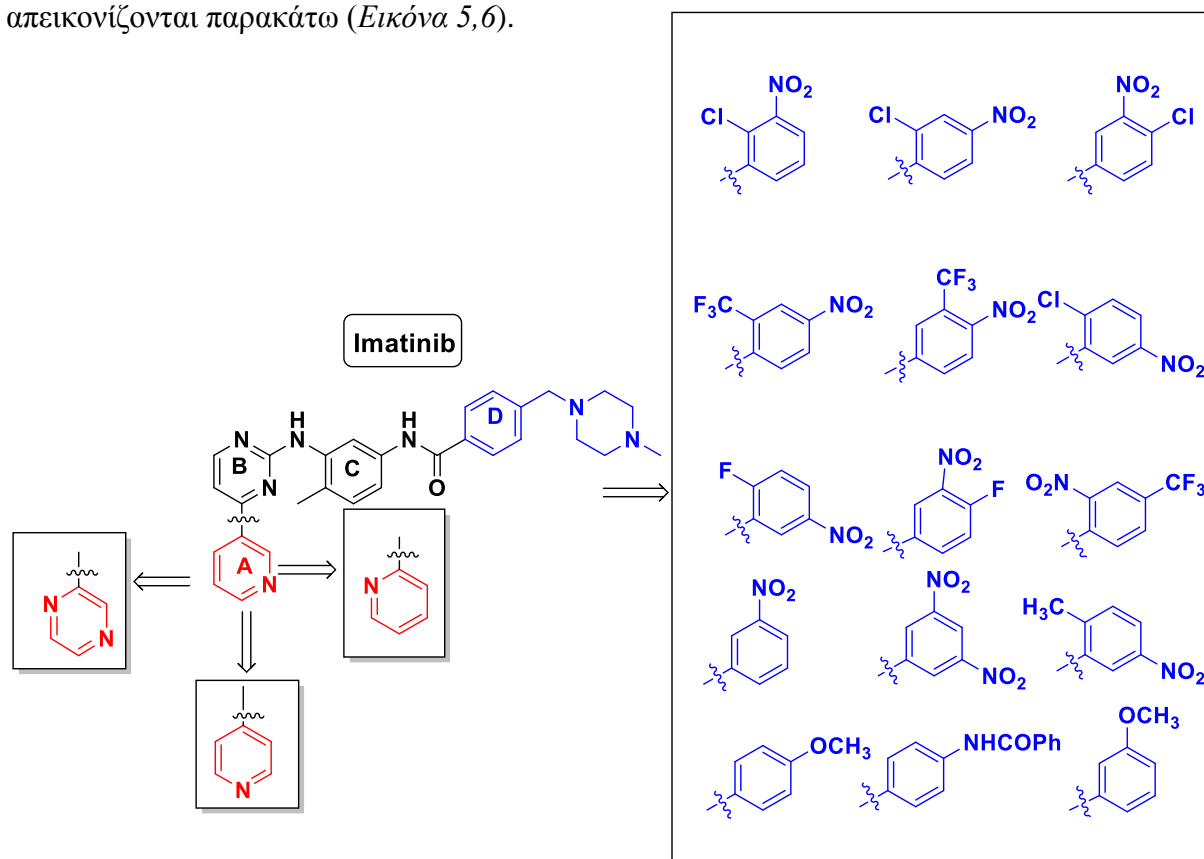
Εικόνα 4: Η δομή του Nilotinib

Είναι φανερό λοιπόν, ότι το κλειδί για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών και για την αύξηση του προσδόκιμου ζωής αυτών, είναι η ανάπτυξη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, περισσότερο αποτελεσματικών.

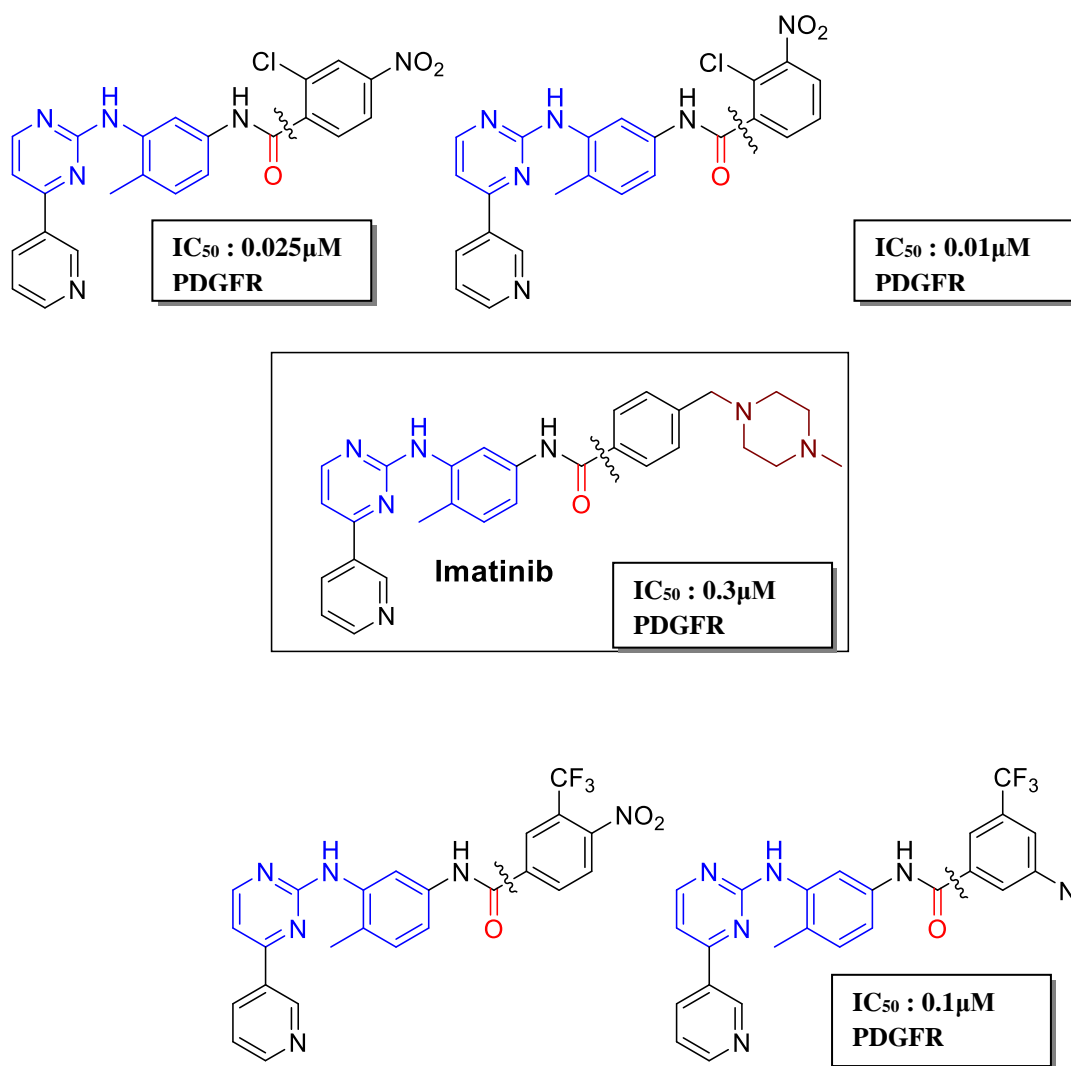
Σκοπός εργασίας

Όπως καταδείχτηκε από την πορεία βελτιστοποίησης της μοριακής δομής του Imatinib, πολύ μικρές, επουσιώδεις τροποποιήσεις στη μοριακή δομή των φαρμακευτικών σκευασμάτων μπορούν να επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στην ανασταλτική τους δράση έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών, ως απόρροια της στερικής συμπληρωματικότητας και των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος του Nilotinib, εισάγοντας μικρές, στοχευμένες τροποποιήσεις στη δομή των υπαρχόντων φαρμάκων.

Στο εργαστήριο έχουν ήδη συντεθεί πολλά ανάλογα του φαρμακευτικού σκευάσματος του Imatinib από την ερευνητική ομάδα, με αρκετά από αυτά να εμφανίζουν βέλτιστη ανασταλτική δράση. Οι περισσότερες τροποποιήσεις έχουν γίνει στους δακτυλίους A και D. Ενδεικτικά, κάποια από αυτά τα παράγωγα απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 5,6).

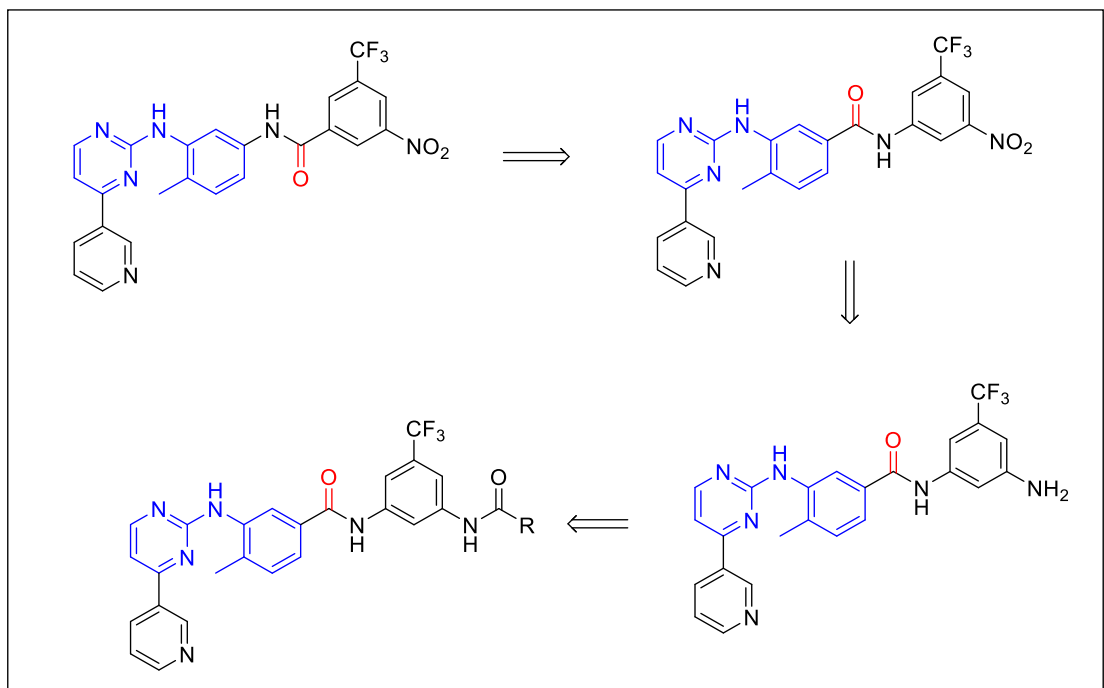


Εικόνα 5: Αλλαγές στη μοριακή δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος του Imatinib, παράγωγα που συντέθηκαν στο εργαστήριο.



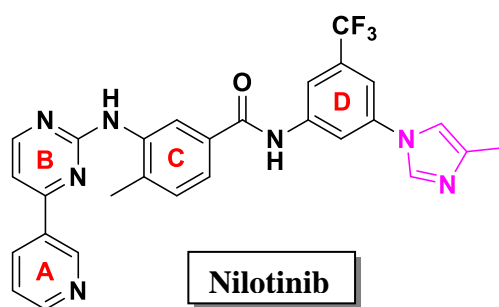
Εικόνα 6: Βέλτιστη ανασταλτική δράση ορισμένων ενώσεων που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο, έναντι του αυξητικού παράγοντα PDGFR.

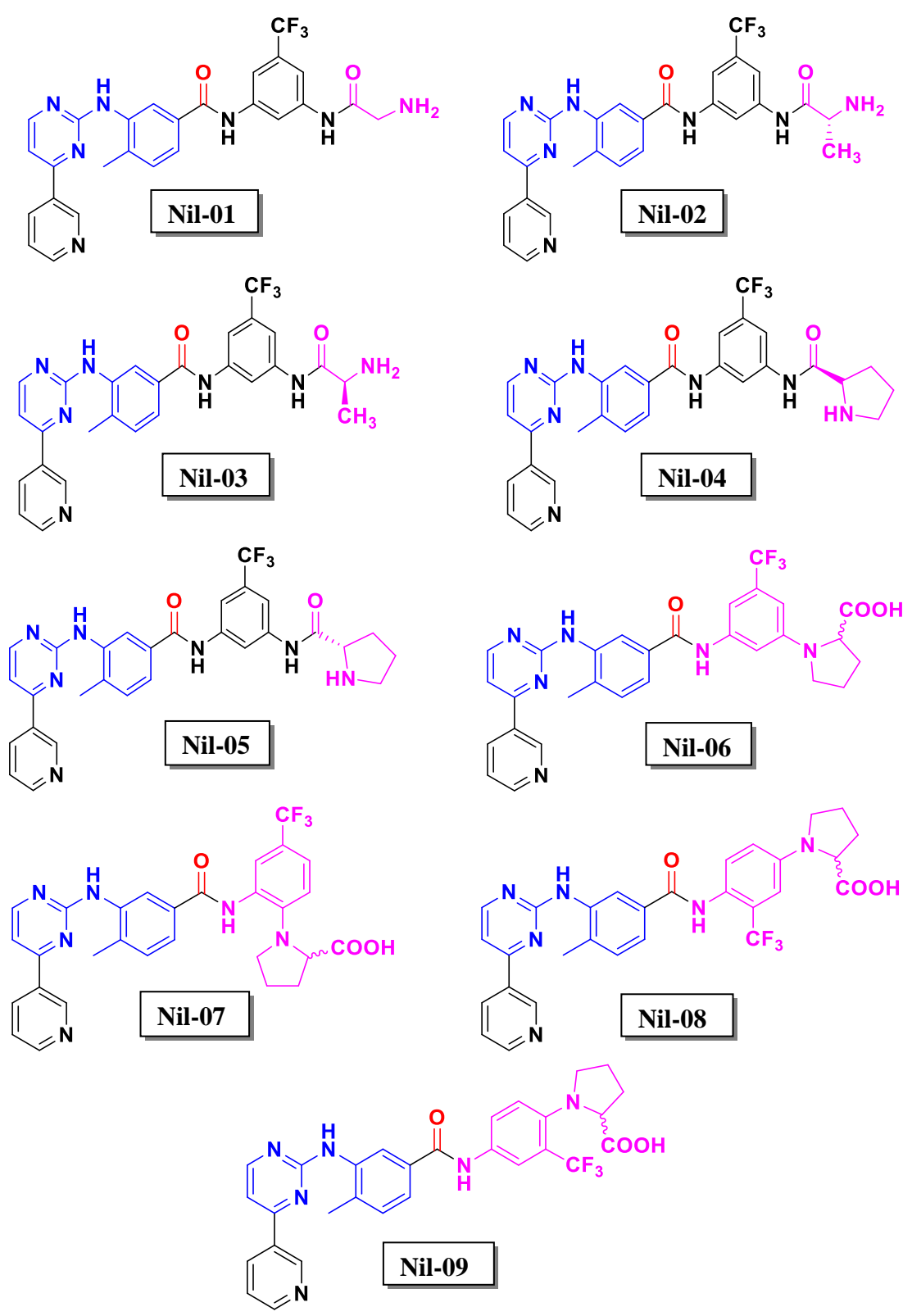
Έχοντας υπ' όψιν, πρώτον, τα βιολογικά αποτελέσματα που κατέδειξαν ορισμένα συνθετικά ανάλογα του φαρμακευτικού σκευάσματος του Imatinib με βέλτιστη ανασταλτική δράση και δεύτερον, καθοδηγούμενοι από τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης που διενεργήθηκαν στο εργαστήριο, προβήκαμε στη σύνθεση, απομόνωση και χαρακτηρισμό νέων φαινυλαμινοπυριμιδινικών παραγώγων, αναλόγων του Nilotinib. Η μοριακή μοντελοποίηση υπέδειξε για την αύξηση της δραστηριότητας, αναστροφή του αμιδικού δεσμού, αντικατάσταση της –NO₂ ομάδας με –NH₂ ομάδα, τη δημιουργία ενός δεύτερου αμιδικού δεσμού (Εικόνα 7), καθώς και την αντικατάσταση του ιμιδαζολικού δακτυλίου του Nilotinib με την εισαγωγή, μέσω μιας N-αρυλίωσης της L- και D- προλίνης (Εικόνα 8, ανάλογα 06-09).



Εικόνα 7 : Τροποποιήσεις που υπέδειξε η μοριακή μοντελοποίηση για τη σύνθεση νέων αναστολέων

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Nilotinib, παρέμειναν ανέπαφοι οι δακτύλιοι A,B,C, οι δε στοχευμένες τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν η προσάρτηση-εισαγωγή φυσικών και μη αμινοξέων στο δακτύλιο D, είτε με το σχηματισμό αμιδικού δεσμού, είτε με την απευθείας προσάρτηση της προλίνης στη θέση του ιμιδαζολικού δακτυλίου του Nilotinib, αντικαθιστώντας τον. Οι μοριακές δομές των αναλόγων που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο απεικονίζονται παρακάτω (Εικόνα 8). Αναμένεται να διενεργηθούν τα βιολογικά πειράματα, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αναμενόμενη ανασταλτική τους δράση.





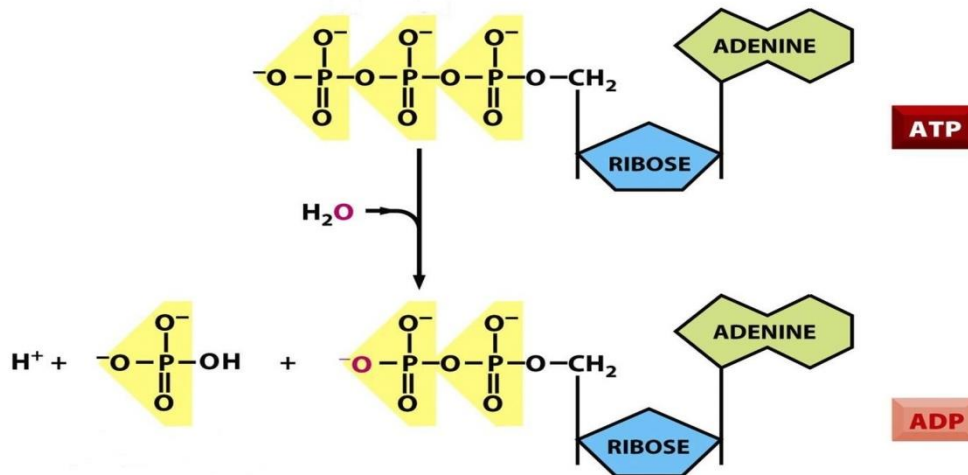
Εικόνα 8 : Ανάλογα- παράγωγα του Nilotinib που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Θεωρητικό μέρος

2.1 Φωσφορυλίωση

Η εμπλοκή φωσφορικής ομάδας στον κυτταρικό μεταβολισμό είναι καθοριστικής σημασίας.^[1] Το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), ένας εστέρας υψηλής ενέργειας, αναγνωρίστηκε ως η κύρια πηγή ελεύθερης ενέργειας για τα κύτταρα σε συγκεντρώσεις από 1 μM έως 5 μM μέσα σε αυτά. Η υδρόλυση του ATP σε ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) και φωσφορική ομάδα, έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στις διεργασίες των κυττάρων^{[2],[3]} (Εικόνα 9).

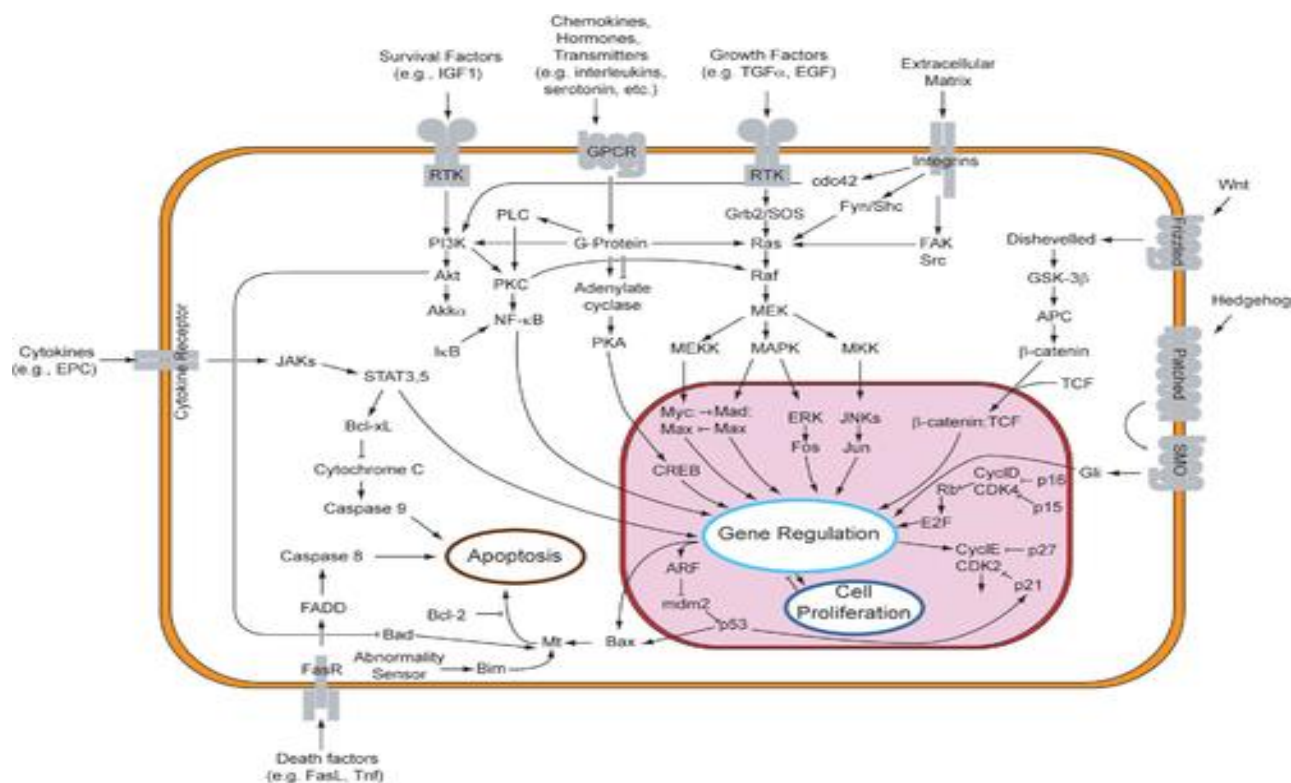


Εικόνα 9: Μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το μόριο του ATP

Οι πρωτεΐνες μπορούν να ενσωματώνουν τη φωσφορική ομάδα στη δομή τους ενώ παράλληλα το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-φωσφόρου είναι ασταθές και γρήγορα αποδιατάσσεται στα ζωντανά κύτταρα.^[4] Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι ένας καθολικός μηχανισμός μεταγωγής σήματος που ρυθμίζει τη δράση όλων των κυτταρικών διεργασιών και καταλύεται από ένζυμα τα οποία καλούνται πρωτεϊνικές κινάσες. Η αντίστροφη αντίδραση, η αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, είναι επίσης μια σημαντική πλευρά του ρυθμιστικού αυτού μηχανισμού και καταλύεται, αντίστοιχα, από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες (Εικόνα 11).

2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ευκαρυωτικά ένζυμα που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο σε πολλές διεργασίες του κυττάρου, όπως στη ρύθμιση και την κατάλυση του μεταβολισμού της γλυκόζης, στη μεταγραφή των γονιδίων, στον κύκλο ανάπτυξης του κυττάρου, στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση τους. Συνεπώς, δεν προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι η ανώμαλη δραστηριότητα των κινασών είναι κοινό χαρακτηριστικό του καρκίνου (Εικόνα 10).

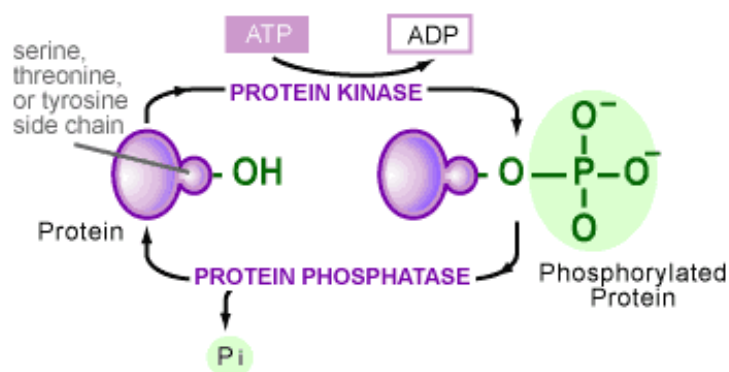


Εικόνα 10 : Σηματοδοτικές οδοί στις οποίες συμμετέχουν οι πρωτεϊνικές κινάσες

Τα ένζυμα, ως βιολογικοί καταλύτες του κυττάρου έχουν την ικανότητα να μπορούν και μεταβάλλουν την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή τους με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η ενεργότητα τους. Το γεγονός αυτό τους δίνει τη δυνατότητα να εναλλάσσονται μεταξύ ενεργής και ανενεργής διαμόρφωσης ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου. Προκειμένου να γίνονται αντιληπτά τα σήματα που λαμβάνει το κύτταρο, η εναλλαγή αυτή πρέπει να είναι ταχύτατη και απλή.^[5]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τροποποιούν άλλες πρωτεΐνες, καταλύοντας τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας (φωσφορυλίωση) του ATP σε υδροξυλομάδες σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης της πρωτεΐνης-στόχου.^[6] Κατ' επέκταση, η ενσωμάτωση μιας πολικής φωσφορικής ομάδας, η οποία φέρει δυο αρνητικά φορτία

προσελκύνοντας έτσι θετικά φορτισμένες ομάδες επιφέρει τροποποίηση στη διαμόρφωση και τη λειτουργία^[7] της πρωτεΐνης-στόχου (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών

Ενώ το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει περίπου 550 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες και αποτελούν περίπου μόλις το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος^[8], περίπου το 30-50% όλων των ανθρωπίνων πρωτεϊνών μπορεί να τροποποιηθεί από τη δράση των κινασών, δεδομένου ότι ρυθμίζουν την πλειονότητα των κυτταρικών οδών, ειδικά εκείνων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος.

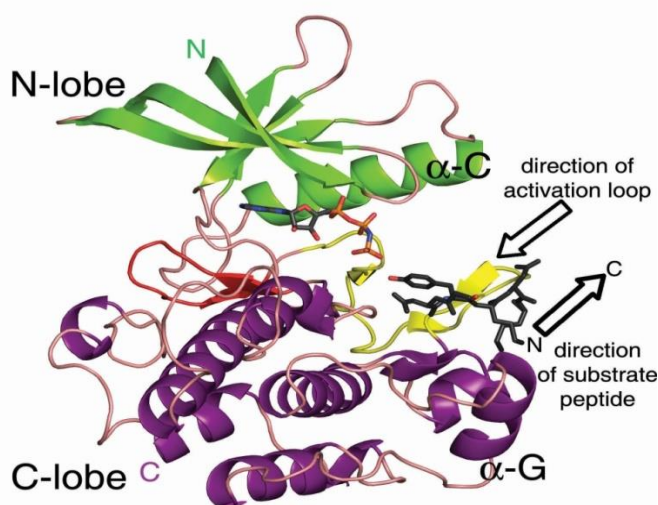
2.3 Δομή πρωτεϊνικών κινασών

Οι περιοχές των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών αποτελούνται από 250-300 κατάλοιπα αμινοξέων και έχουν χαρακτηριστικές περιοχές που έχουν χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσουν τις λειτουργικά σημαντικές περιοχές και για να προσδιορίσουν τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ποικίλων κινασών.^{[9],[10]} Αρχική ανάλυση της αλληλουχίας των κινασών αποκάλυψε την ύπαρξη 12 διατηρημένων υποομάδων, που αναφέρονται με λατινικούς αριθμούς I-XI.

Κρυσταλλογραφικές δομές κατέδειξαν ότι η δομή των πρωτεϊνικών κινασών συνίσταται από δυο δομικά ανόμοιους λοβούς, με τη θέση δέσμευσης του ATP και την καταλυτική περιοχή να βρίσκονται στη διεπιφάνεια των δυο αυτών λοβών. Μεταξύ τους συνδέονται μέσω μιας μικρής πολυπεπτιδικής αλυσίδας (περιοχή άρθρωσης ή hinge περιοχή). Οι I-V υποομάδες αποτελούν τον N-τερματικό λοβό της κινάσης και οι υποομάδες V-XI τον C-τερματικό λοβό. Ο N-τερματικός λοβός αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα, οργανωμένα σε β-πτυχωτά φύλλα και μια τουλάχιστον αC έλικα. Αυτός ο λοβός περιέχει τη θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου,

το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύει το ATP. Δεδομένου ότι όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες χρησιμοποιούν το ATP ως πηγή φωσφορικών, πολλά από τα κατάλοιπα που περιλαμβάνονται στη θέση δέσμευσης διατηρούνται. Ο C-τερματικός λοβός ποικίλει σε μέγεθος, αλληλουχία και τοπολογία, ωστόσο αποτελείται κυρίως από α-έλικες και περιέχει το βρόγχο ενεργοποίησης και καταλυτικά κατάλοιπα^[11] (Εικόνα 12).

Στο μεσοδιάστημα των δύο λοβών ένα πλήθος καταλοίπων σχηματίζουν τη θηλιά πρόσδεσης του ATP και το καταλυτικό κέντρο. Το N-τελικό τμήμα είναι πλούσιο σε γλυκίνη πλησίον της λυσίνης, που φαίνεται να συμμετέχει στην πρόσδεση του ATP. Στο κέντρο της καταλυτικής περιοχής βρίσκεται ένα ασπαρτικό οξύ, σημαντικό για την καταλυτική δράση του ενζύμου. Η αδενοσίνη του ATP σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα στην περιοχή πρόσδεσης. Αυτός ο καταλυτικός πυρήνας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας.^[12]

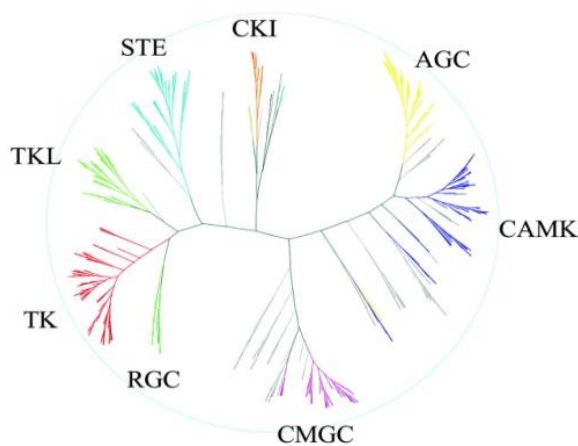


Εικόνα 12: Η δομή των πρωτεϊνικών κινασών

Λόγω του κρίσιμου ρόλου της σύνδεσης και του προσανατολισμού του ATP, συνιστά έκπληξη το γεγονός ότι η διαμόρφωση της "ραχοκοκαλιάς" στην περιοχή πρόσδεσης στην κινάση είναι σχεδόν πανομοιότυπη σε όλες σχεδόν τις γνωστές κινάσες.

2.4 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών

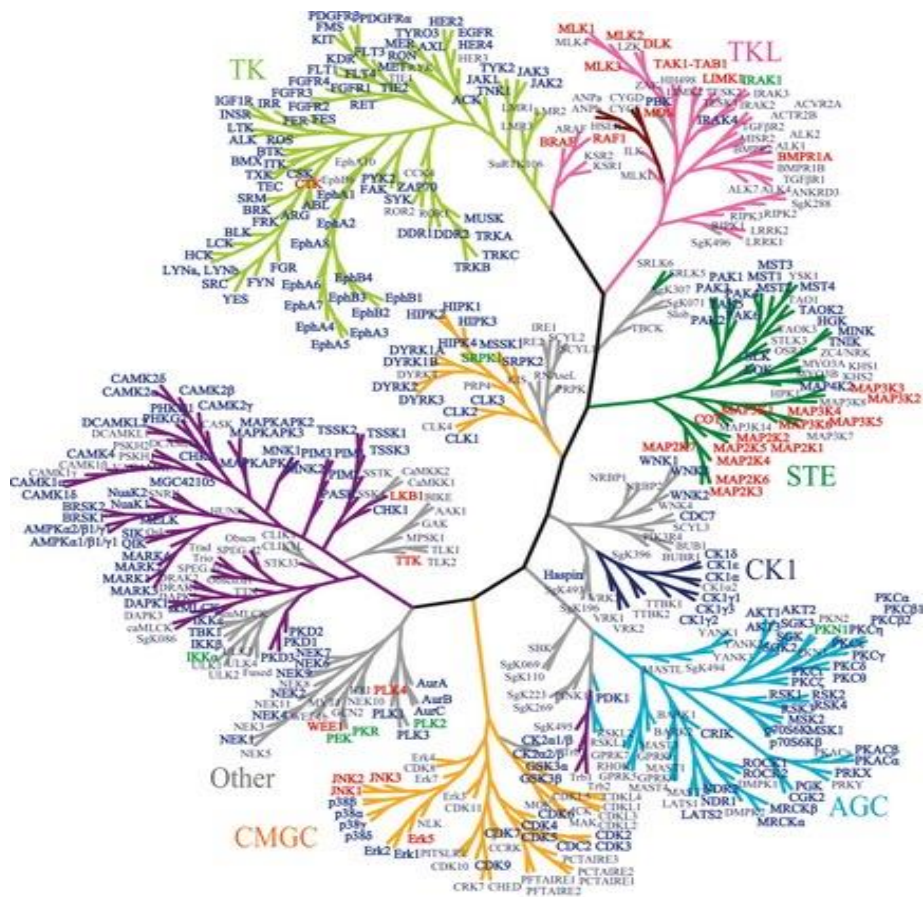
Η ανάλυση του χάρτη του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση περισσότερων των 500 πρωτεϊνικών κινασών, αποτελώντας συνολικά, όπως προαναφέρθηκε, το 2% αυτού. Ανάλογα με τις διεργασίες που πραγματοποιούν μέσα στα κύτταρα, οι πρωτεϊνικές κινάσες κατατάσσονται σε οικογένειες. Κάθε οικογένεια υποδιαιρείται σε κατηγορίες και υποκατηγορίες. Από τους Hanks και Hunter περιγράφηκε για πρώτη φορά ο διαχωρισμός των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών σε δύο μεγάλες ομάδες. Σύμφωνα με την ταξινόμηση τους, η οικογένεια των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών διαχωρίστηκε σε δυο μεγάλες υποοικογένειες : τις τυπικές ePKs κινάσες (478) και τις άτυπες aPKs κινάσες. Οι τυπικές ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) είναι περισσότερες και διαιρούνται σε 8 επιπλέον οικογένειες.^[13] Η ταξινόμηση των κινασών, έγινε με βάση την ομοιότητα που εμφανίζουν στην καταλυτική περιοχή, την ύπαρξη άλλων συμπληρωματικών περιοχών στη δομή τους και τις βιολογικές λειτουργίες αυτών (Εικόνα 13).



Εικόνα 13 : Οικογένειες των ePKs πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες επίσης ταξινομούνται, ανάλογα με το υπόστρωμα προς φωσφορυλίωση^[6], σε πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης και σε πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Οι δυο αυτές οικογένειες υποδιαιρούνται σε μικρότερες, ανάλογα με τη δράση και την τρισδιάστατη δομή του ενεργού κέντρου.

Το δενδρόγραμμα που απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 14), δίνει μια ολοκληρωμένη εικόνα για τον αριθμό των χαρακτηρισμένων πρωτεϊνικών κινασών. Τα χρώματα καθορίζουν το πλήθος των διαφορετικών οικογενειών και ο κάθε κλάδος αποτελεί μια ξεχωριστή υποοικογένεια.



Εικόνα 14 : Δενδρόγραμμα πρωτεϊνικών κινασών

2.4.1 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Serine/ Threoninekinases, STKs) αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ομάδες πρωτεϊνικών κινασών. Είναι ένζυμα με δράση κινάσης, που φωσφορυλιώνουν την –OH ομάδα της σερίνης/θρεονίνης. Δε γίνεται διάκριση μεταξύ σερίνης και θρεονίνης, καθώς τα δυο αυτά αμινοξέα έχουν παρόμοιες πλευρικές αλυσίδες. Τουλάχιστον 125 από τις 500 ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, STKs.^[14]

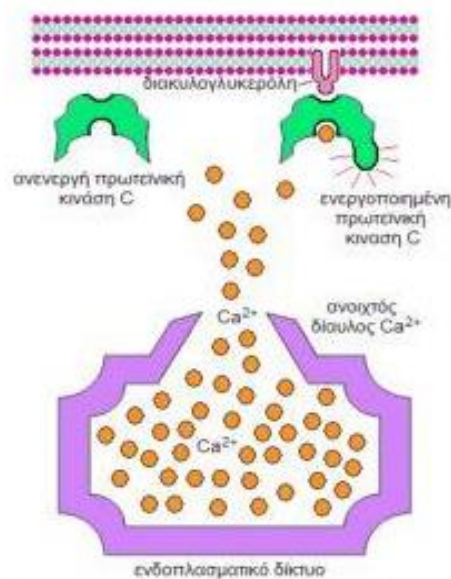
Οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Λόγω του εξαιρετικά συντηρημένου καταλυτικού κέντρου, οι κινάσες δεν είναι εκλεκτικές σε ένα μόνο υποστρώμα, αλλά αντίθετα φωσφορυλιώνουν μία οικογένεια υποστρωμάτων. Όλες αυτού του τύπου οι κινάσες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης στα υποστρώματά τους, κυρίως

όμως επιλέγουν για φωσφορυλίωση συγκεκριμένα κατάλοιπα, βάσει αυτών που βρίσκονται δίπλα στο δέκτη της φωσφορικής ομάδας, αποτελώντας έτσι μια συναινετική αλληλουχία. Οι αλλαγές στην αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κινάσες, συμβάλλουν στην απαραίτητη διαφοροποίηση για την αναγνώριση των διαφορετικών υποστρωμάτων.^[15] Είναι πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι τύποι καρκίνου, όπως ο καρκίνος του προστάτη^[16], σχετίζονται άμεσα με την απορρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης.^[14]

Αν και αυτή η οικογένεια κινασών μετράει μεγάλο αριθμό μελών, θα αναφερθούν μόνο κάποια μέλη της, καθώς δεν αποτελούν τόσο συχνά στόχους για τη θεραπεία τύπων καρκίνου.

2.4.1.1 Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Οι PKC κινάσες είναι μια οικογένεια φωσφοτρανφερασών που παίζουν κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο σε μια πληθώρα ρυθμιστικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης, της ογκογένεσης, της απόπτωσης και της διαμόρφωσης των διαύλων ιόντων.^[17] Οι πρωτεϊνικές κινάσες C συναντώνται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, τελευταίες έρευνες όμως κατέδειξαν την ύπαρξη της και στον κυτταρικό πυρήνα.^[18] Στα θηλαστικά, έχουν ταυτοποιηθεί 11 ισομορφές της PKC, οι οποίες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε τρεις υποομάδες, λόγω διαφοροποίησης της δομής τους ή της εξάρτησης τους από άλλους ενεργοποιητές. Η πρωτεϊνική κινάση C εμπλέκεται στην ογκογένεση, σε καρδιακά νοσήματα, στο διαβήτη, όπως επίσης και στη νόσο του Alzheimer. Για να ενεργοποιηθεί η PKC απαιτείται η πρόσδεση της διακυλογλυκερόλης και ιόντων Ca^{2+} ^[19], όπως απεικονίζεται παρακάτω (*Εικόνα 15*).



Εικόνα 15 : Πρόσδεση ιόντων Ca^{2+} στην πρωτεϊνική κινάση C

2.4.1.2 MAP κινάσες (Mitogen-Activated Protein Kinases)

Η δράση των MAP κινασών περιορίζεται σε ένα πλήθος πρωτεϊνικών φωσφατασών, οι οποίες καταλύουν την απομάκρυνση των φωσφορικών ομάδων που προστίθενται σε ορισμένα σερινικά και θρεονικά κατάλοιπα κινασών. Επίσης, ελέγχουν διαφορετικές ενδοκυττάρειες σηματοδοτικές οδούς για την αντιμετώπιση των μεταβαλλόμενων συνθηκών στο κύτταρο. Οι MAPs εμπλέκονται, καθοδηγώντας κυτταρικές αποκρίσεις σε μια ποικιλία ερεθισμάτων, όπως τα μιτογόνα, το οσμωτικό στρες, το θερμοσόκ, και τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες.^[20]

Οι MAP κινάσες είναι καταλυτικά αδρανείς στη βασική τους δομή. Για να ενεργοποιηθούν απαιτούν πολλαπλές φωσφορυλιώσεις στο βρόγχο ενεργοποίησής τους. Δύο σημαντικοί παράγοντες επηρεάζουν τη δραστηριότητα των MAP κινασών: α) τα σήματα που ενεργοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με αυτούς, β) τα σήματα που απενεργοποιούν τις φωσφατάσες περιορίζοντας τις MAP κινάσες.

Οι περισσότερες MAP κινάσες έχουν κοινά χαρακτηριστικά, καθώς η ενεργοποίησή εξαρτάται από δύο φωσφορυλιώσεις, ένα τριών σταδίων σηματοδοτικό μονοπάτι και παρόμοιες θέσεις αναγνώρισης του υποστρώματος. Αυτές είναι οι κλασσικές MAP κινάσες. Αλλά υπάρχουν και κάποιες αποκλίνουσες περιπτώσεις από

την ομάδα που σκιαγραφήθηκε παραπάνω που δεν έχουν διπλή θέση φωσφορυλίωσης, αποτελούμενες από δύο σηματοδοτικά μονοπάτια, μη έχοντας τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται από άλλες MAP κινάσες για τη δέσμευση του υποστρώματος. Αυτές αναφέρονται ως άτυπες MAP κινάσες.^[21]

Από τις πιο σημαντικές υποομάδες είναι οι ERK κινάσες, οι οποίες συνήθως ενεργοποιούνται από μιτογονικά σήματα, και οι πρωτεϊνικές κινάσες JNK και p38. Το σηματοδοτικό μονοπάτι ERK εμπλέκεται στο φυσιολογικό και παθολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι JNK κινάσες εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη σε παχύσαρκα άτομα,^[22] καθώς, επίσης, λειτουργούν και ως νευροδιαβιβαστές διεγερτοξικότητας μετά από ισχαιμικές συνθήκες.

2.4.2 Τυροσινικές κινάσες (TKs)

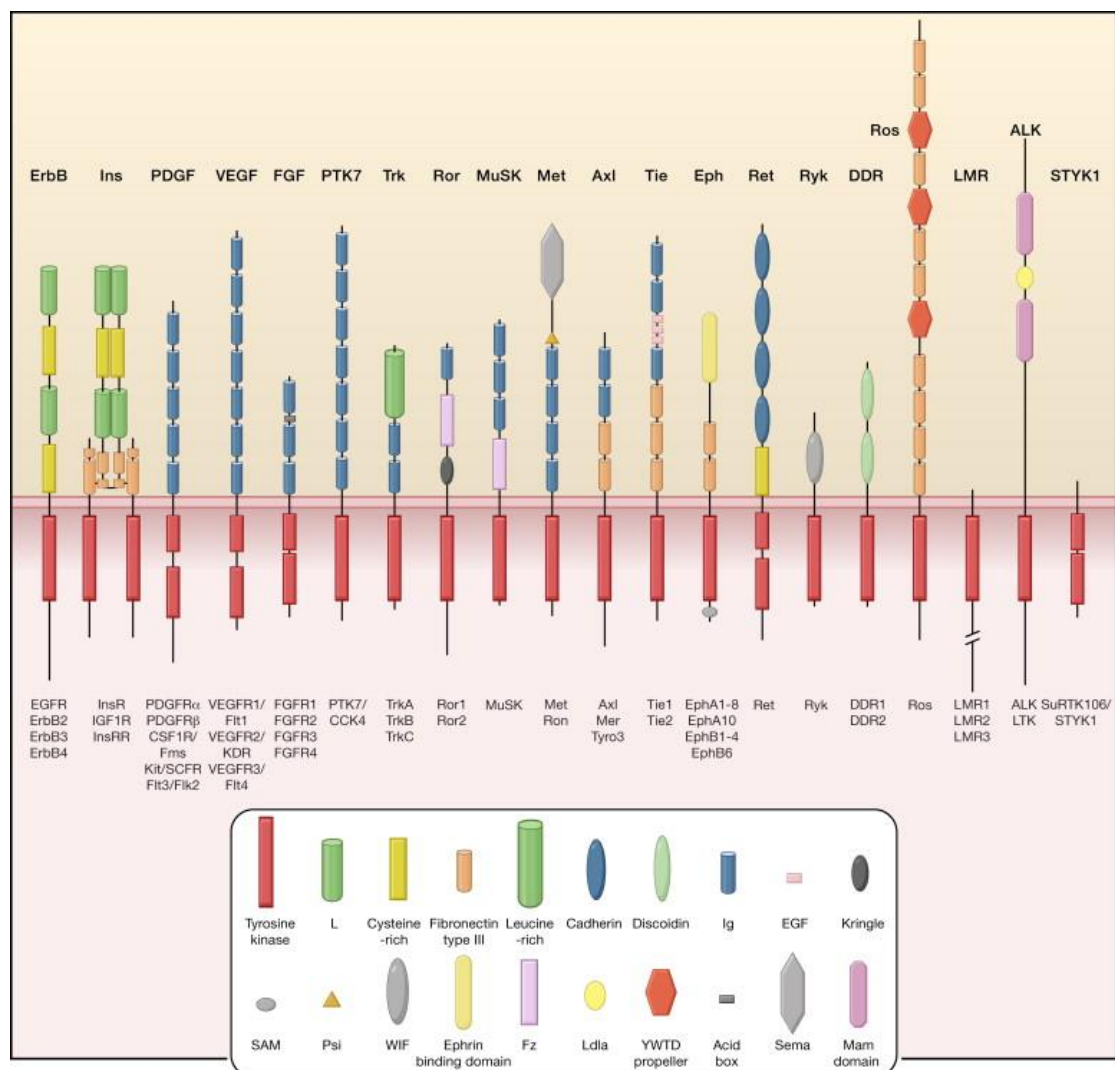
Οι πολυκύτταροι οργανισμοί επιβιώνουν σε ένα πολύπλοκο περιβάλλον, όπου τα μονοπάτια σηματοδότησης παίζουν καθοριστικό ρόλο για την ύπαρξη τους. Οι τυροσινικές κινάσες είναι σημαντικοί μεσολαβητές αυτής της μεταγωγής σήματος, όπου τα εξωκυτταρικά σήματα μεταδίδονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα και συχνά στον πυρήνα, οδηγώντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στη μετανάστευση, στο μεταβολισμό και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων, η οποία καταλύει τη φωσφορυλίωση επιλεγμένων καταλοίπων τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, χρησιμοποιώντας το ATP. Αυτή η ομοιοπολική τροποποίηση είναι ένα καθοριστικό στοιχείο της φυσιολογικής επικοινωνίας των κυττάρων και της διατήρησης της ομοιόστασης.^{[23],[24]} Υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνικών κινασών οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο. Οι τυροσινικές κινάσες (TKs) είναι μια από τις πιο σημαντικές και μελετημένες οικογένειες κινασών σε σχέση με τη βιολογία του καρκίνου.

Στον άνθρωπο υπάρχουν περίπου 90 διακριτές τυροσινικές κινάσες, οι οποίες σε γενικές γραμμές χωρίζονται σε 58 υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) και σε 32 μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs). Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στην διαμεμβρανική σηματοδότηση, ενώ οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στη σηματοδότηση προς τον πυρήνα.

2.4.2.1 Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs)

Οι υποδοχικές τυροσινικές (RTKs) είναι από τις πιο σημαντικές και ευρέως μελετηθείσες υποομάδες των πρωτεϊνικών κινάσων και έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σχετικά με τον καρκίνο. Αυτοί οι υποδοχείς είναι βασικοί αισθητήρες του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, προκαλώντας τη μεταγωγή σημάτων από τους υποκαταστάτες σε διάφορα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά δίκτυα.

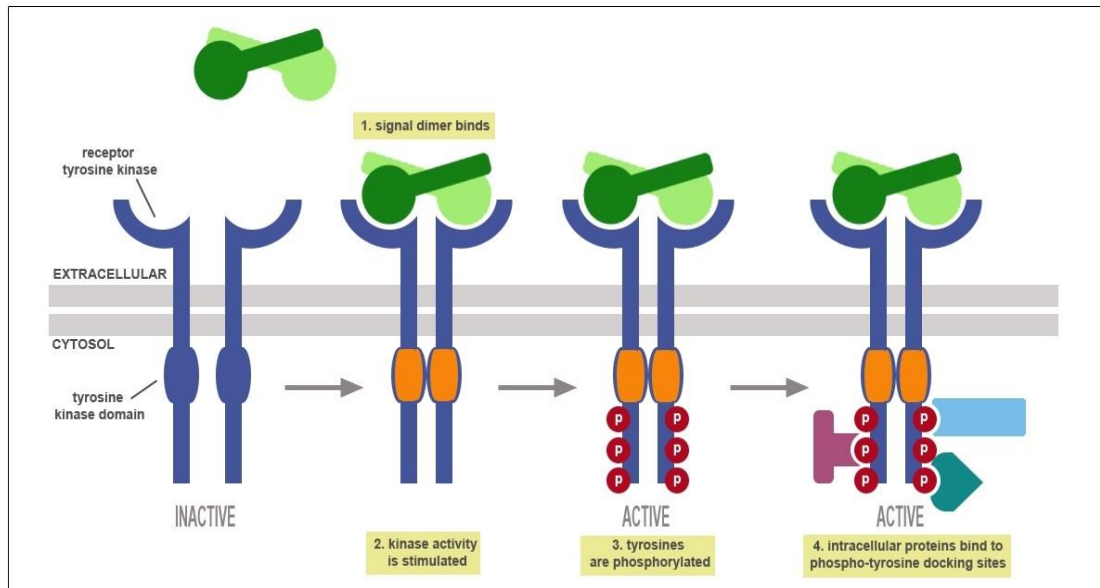
Βάσει της ομόλογης αλληλουχίας και της δομής των εξωκυττάρων περιοχών τους, οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης υποδιαιρούνται σε 20 υπο-οικογένειες^[25] (Εικόνα 16).



Εικόνα 16 : Οικογένειες υποδοχικών τυροσινικών κινάσων. Τα μέλη της οικογένειας αναφέρονται κάτω από κάθε υποδοχέα. Δομικά τμήματα σε εξωκυτταρικές περιοχές επισημαίνονται σύμφωνα με το κλειδί. Οι ενδοκυττάρια περιοχές εμφανίζονται ως κόκκινα ορθογώνια.^[26]

Όλες οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν παρόμοια μοριακή δομή, με θέση πρόσδεσης του υποκαταστάτη στην εξωκυτταρική περιοχή, μια μόνο διαμεμβρανική έλικα και μια κυτταροπλασματική περιοχή που περικλείει την τυροσινική πρωτεϊνική κινάση.^[26] Η περιοχή της κινάσης έχει μια ρυθμιστική αλληλουχία τόσο στο N όσο και στο C τερματικό άκρο.^[27] Το εξωκυττάριο τμήμα μπορεί να αποτελεί ανεξάρτητο τμήμα, το οποίο συνδέεται με τον υπόλοιπο υποδοχέα με δισουλφιδικό δεσμό.

Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες ενεργοποιούνται με τη σύνδεση του υποκαταστάτη στην εξωκυτταρική τους περιοχή. Οι υποκαταστάτες είναι εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια (π.χ. EGF, PDGF, κλπ) που επάγουν το διμερισμό του υποδοχέα (εκτός από τους υποδοχείς της ινσουλίνης). Διαφορετικοί υποκαταστάτες χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές με τις οποίες θα επιτευχθεί η σταθερή διμερής διαμόρφωση.^[27] Ολιγομερισμός του υποδοχέα αυξάνει την τοπική συγκέντρωση των RTKs, που οδηγεί σε αποτελεσματική φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης στο βρόχο ενεργοποίησης του καταλυτικού τομέα. Η πρόσδεση του υποκαταστάτη στην εξωκυτταρική περιοχή προκαλεί μια σειρά από δομικές αναδιατάξεις στις RTKs, που οδηγούν στην ενζυματική ενεργοποίησή τους. Ειδικά, η μετακίνηση ορισμένων τμημάτων της περιοχής της κινάσης δίνει ελεύθερη πρόσβαση στην τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και στο υπόστρωμα να εισέλθουν στο ενεργό κέντρο. Έτσι πυροδοτείται η βιολογική απόκριση του κυττάρου ενεργοποιώντας μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων. Η απόκριση μπορεί να φθάσει μέχρι τον πυρήνα και να ενεργοποιήσει εκεί τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Επίσης, μπορεί να επηρεάσει την αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, τις αντιδράσεις του ενδιάμεσου μεταβολισμού και την κυτταρική διαίρεση (*Εικόνα 17*).



Εικόνα 17 : RTKs pathway

Οι πιο σημαντικοί υποδοχείς τυροσινικών κινασών που βρέθηκε ότι υπάρχουν στα θηλαστικά είναι:

- ❖ Υποδοχέας αυξητικών παραγόντων της ινσουλίνης IGF-1R: Οι αυξητικοί παράγοντες της ινσουλίνης IFG-I και IFG-II ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αιματοποιητικών κυττάρων δια μέσου του υποδοχέα τους IGF-1R, πάνω στα ερυθροκύτταρα και στα Β,Τ λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση των IFG-I και IFG-II με τους υποδοχείς τους διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και στην ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου.^[28]
- ❖ Πρωτεϊνικές κινάσες c-KIT, FLT3, PDGF-Rα, PDGF-Rβ και c-FMS: Εμπλέκονται σε διάφορα είδη καρκίνου όπως στη μυελογενή λευχαιμία. Έχει αποδειχθεί η εμπλοκή της c-KIT στην καρκίνο του στομάχου.^[29]
- ❖ Υποδοχέας αυξητικών επιδερμικών παραγόντων HER-1 ή EFG-R: Οι συνηθέστερες μεταλλάξεις που γίνονται σε αυτούς τους υποδοχείς αφορούν στην εξωκυττάρια περιοχή με αποτέλεσμα την υπερενεργοποίηση της περιοχής πρόσδεσης. Έτσι καταργούνται οι μηχανισμοί απόπτωσης. Μικρής συχνότητας είναι οι μεταλλάξεις στην ενδοκυττάρια περιοχή.^[30]
- ❖ Υποδοχέας των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων FGF-R: Η ενεργοποίησή τους γίνεται με την πρόσδεση των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων FGF στην ενεργό περιοχή τους. Εμπλέκονται σε πολλές

βιολογικές δραστηριότητες, όπως στην αγγειογένεση, την κυτταρική διαφοροποίηση, τη μιτογένεση κ.α.

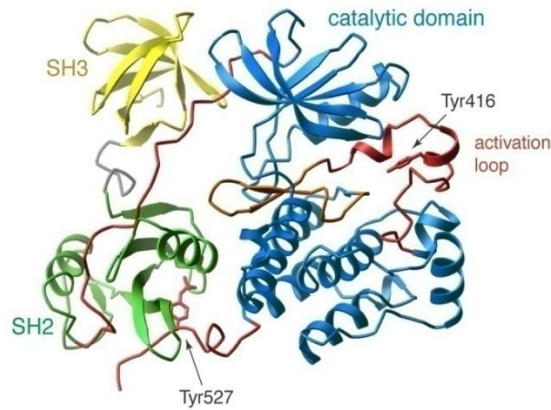
Οι βιολογικές διεργασίες που προκαλούνται από τις RTKs, περιλαμβάνουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη διαφοροποίηση, την κινητικότητα και εκδηλώνονται σε όλους τους τύπους κυττάρων. Συνεπώς, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η κακή ρύθμιση ενός ή περισσότερων από αυτούς τους υποδοχείς εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη σχεδόν όλων των ειδών καρκίνου.

2.4.2.2 Μη Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs)

Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες αποτελούν τη δεύτερη ευρεία κατηγορία των τυροσινικών κινασών. Όπως προαναφέρθηκε, 32 μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες έχουν ταυτοποιηθεί στα ανθρώπινα κύτταρα. Συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της απόπτωσης των κυττάρων και έχουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Απορρύθμιση τους αποτελεί τη βάση για μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασιών. Είναι κυτταροπλασματικά ένζυμα υπεύθυνα για την κατάλυση της μεταφοράς της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε κατάλοιπα τυροσίνης της πρωτεΐνης-στόχου.

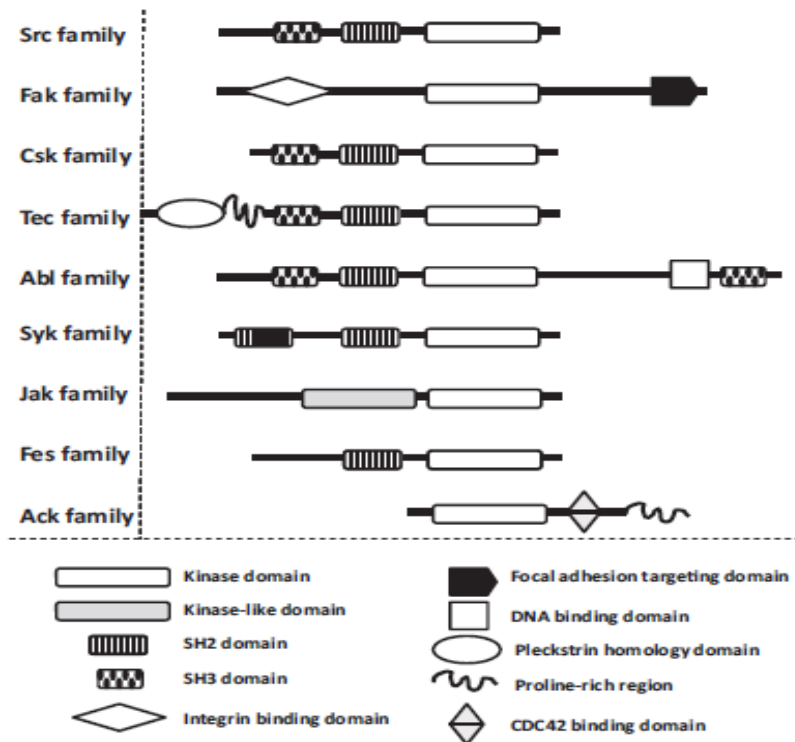
Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες δεν διαθέτουν διαμεμβρανική περιοχή και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Ενεργοποιούνται μέσω ποικίλων ενδομοριακών σημάτων με την απομάκρυνση αναστολέων, την πρόσληψή τους σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς, προκαλώντας ολιγομερισμό, αυτοφωσφορυλίωση και την τρανς-φωσφορυλίωση (trans-phosphorylation) από άλλες κινάσες.^[31] Δομικά, όλες αυτές οι πρωτεΐνες διαθέτουν τομέα της τυροσινικής κινάσης που προηγείται από την SRC ομολογία 2 (SH₂) και την SRC ομολογία 3 (SH₃). Οι SH₂ περιοχές συνδέονται με ένα φωσφορυλιωμένο υπόλειμμα τυροσίνης. Οι περιοχές SH₃ παίζουν ρόλο στη συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλοκών (Εικόνα 18). Κλασικά, οι περιοχές SH₃ δεσμεύονται με πλούσιες σε προλίνη περιοχές.^[32] Ο μηχανισμός ενεργοποίησής τους είναι περίπλοκος καθώς συμπεριλαμβάνει την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η τρανς-φωσφορυλίωση. Στην ανενεργή μορφή, οι

λοβοί των κινασών είναι ευθυγραμμισμένοι, ώστε το ATP να μην μπορεί να εισέλθει στο καταλυτικό κέντρο. Όμως, η αυτοφωσφορυλίωση της θηλιάς ενεργοποίησης μετακινεί τους δύο λοβούς, ανοίγοντας την καταλυτική περιοχή για πρόσδεση του ATP.^[33]



Εικόνα 18 : Δομή τυροσινικών κινασών.

Οι NRTKs υποδιαιρούνται σε εννέα κύριες κατηγορίες βάσει των ομοιοτήτων τους στη δομή, όπως φαίνεται σχηματικά στην *Εικόνα 19*.^[34]

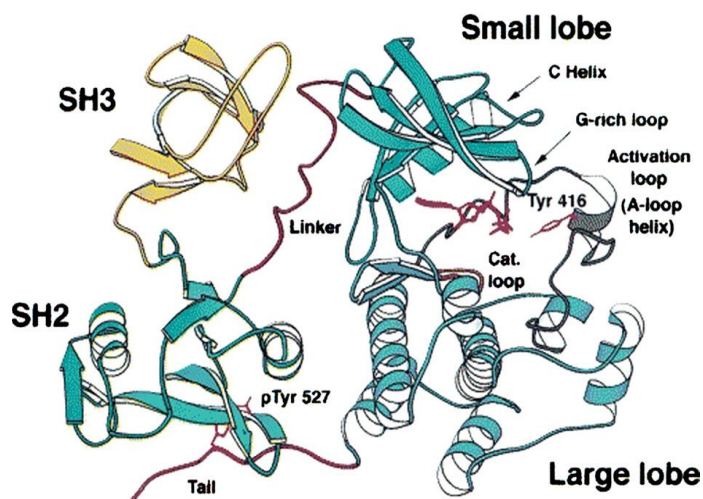


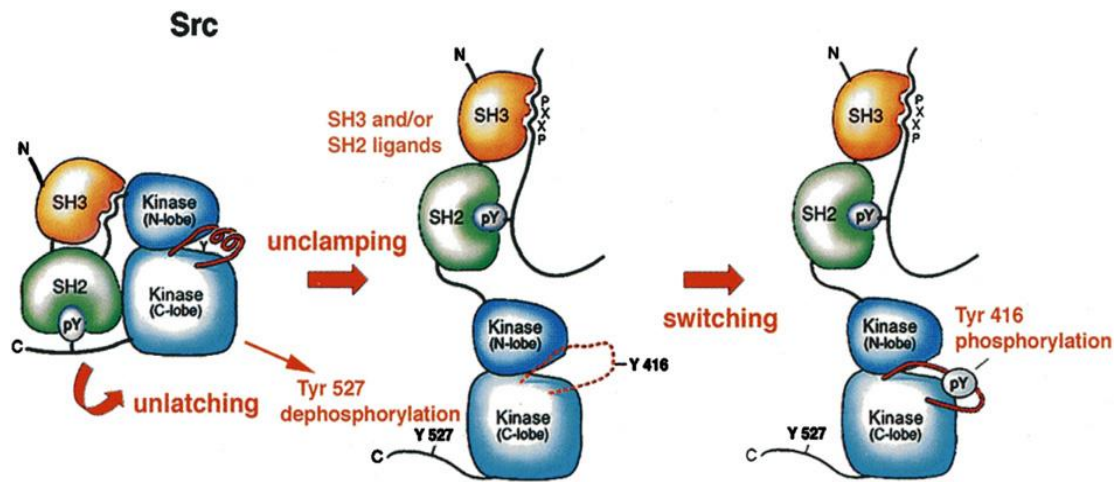
Εικόνα 19 : Κύριες οικογένειες των NRTKs

2.4.2.2.1 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης c-Src

Το πρωτο-ογκονίδιο της τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης Src, γνωστό και ως πρωτο-ογκονίδιο c-Src, ή απλά c-Src, είναι μια μη υποδοχική τυροσινική κινάση, που στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο SRC. Εκφράζεται παντού, όμως στον εγκέφαλο και στα αιμοπετάλια εκφράζεται 5-200 φορές περισσότερο σε σχέση με τα άλλα κύτταρα.^[35] Υπάρχουν 11 μέλη της οικογένειας των Src κινασών στον άνθρωπο. Αυτά είναι: Blk, Brk, Fgr, Frk, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Srm, και Yes.^[36] Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της c-Src έχει παρατηρηθεί στο 50% των όγκων του παχέος εντέρου, του ήπατος, του πνεύμονα, του μαστού και του παγκρέατος.^[37] Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση της c-Src οδηγεί την προώθηση της επιβίωσης, της αγγειογένεσης και του πολλαπλασιασμού, παρατηρείται η ανάπτυξη όγκων. Ένας κοινός μηχανισμός είναι οι γενετικές μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα ή την υπερέκφραση του γονιδίου c-Src που οδηγεί στη συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης.

Η δομή της πρωτεΐνης SRC περιλαμβάνει μία N-τερματική περιοχή που ακολουθείται από μια SH₃ και SH₂ περιοχή, το καταλυτικό κέντρο και μια σημαντική C-τερματική αλληλουχία. Όταν η Src είναι ανενεργή, το φωσφορυλιωμένο τυροσινικό κατάλοιπο στη θέση 527 αλληλεπιδρά με τον SH₂ τομέα, ο οποίος βοηθά τον SH₃ τομέα να αλληλεπιδράσει με τον εύκαμπτο συνδετικό τομέα και, ως εκ τούτου, να διατηρηθεί η ανενεργή μορφή. Η ενεργοποίηση του c-Src προκαλεί την αποφωσφορυλίωση της τυροσίνης 527. Αυτό επάγει την αποσταθεροποίηση της δομής, με τη διάνοιξη της SH₃ και SH₂ περιοχής, καθώς και την φωσφορυλίωση του τυροσινικού υπολείμματος 416.^[38] (Εικόνα 20)



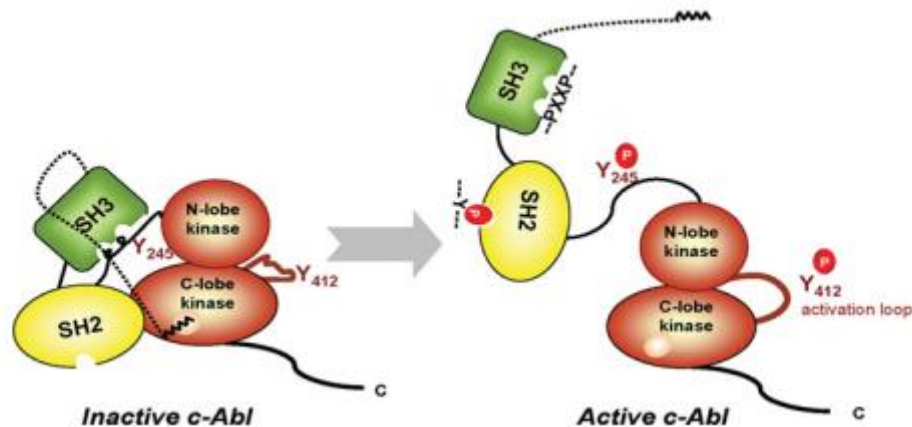


Εικόνα 20: Επάνω, απεικόνιση της δομής της ανθρώπινης Src. Κάτω, Φωσφορύλιωση υποστρωμάτων από τις Src πρωτεϊνικές κινάσες^[36]

2.4.2.2.2 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης Abl

Η οικογένεια Abl, της οποίας οι μεταλλάξεις θα μας απασχολήσουν ιδιαίτερα, μετρά δύο σημαντικά μέλη: την ABL1 ή c-Abl και την ABL2 ή ARG. Η φυσιολογική τυροσινική κινάση Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το Abl γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9.^[39] Η Abl κινάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα του κυττάρου και συμμετέχει στις διαδικασίες της κυτταρικής διαφοροποίησης και διαίρεσης, απόκρισης στο οξειδωτικό στρες, της μεταγωγής ενδογενών και εξωγενών σημάτων και της καταστροφής του DNA.

Δομικά, η c-Abl περιέχει την Src ομολογία, την SH₃, την SH₂ και την περιοχή της τυροσινικής κινάσης. Οι SH₂ και SH₃ ρυθμίζουν την δραστηριότητα της κινάσης. Η λειτουργία της c-Abl ελέγχεται αυστηρά με σκοπό την πρόληψη της ογκογόνου δραστηριότητας. Η c-Abl ρυθμίζεται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που διατηρούν το πεδίο της κινάσης σε μια κλειστή και ανενεργή διαμόρφωση. Η σταθεροποίηση αυτής της διαμόρφωσης οφείλεται στο γεγονός ότι, 1) η Abl έχει ένα N-τερματικό "καπάκι" που φαίνεται να προσδένεται σε διάφορες περιοχές κατά μήκος του μορίου, 2) υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της περιοχής SH₃ και της πλούσιας σε προλίνη αλληλουχίας που υπάρχει στην SH₂. Η διάνοιξη αυτής της διαμόρφωσης με οποιοδήποτε μέσο, επάγει την καταλυτική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης^[40] (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Διαμορφώσεις ανενεργής και ενεργής Abl

Η ογκογενετική ενεργοποίηση της Abl συχνά συσχετίζεται με τη μετακίνηση ενός μέρους της Bcr πρωτεΐνης στο N-τελικό άκρο της Abl, σχηματίζοντας έτσι τη χημιακή πρωτεΐνη Bcr-Abl. Οι ακολουθίες της Bcr οδηγούν στην κατάργηση της αυτοανασταλτικής δυνατότητας της Abl και σε αυξημένη δράση τυροσυλο-κινάσης. Η συγκεκριμένη αυτή μετάλλαξη εμπλέκεται σε μια μορφή κακοήθειας του αίματος, προάγοντας την εμφάνιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML). Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Bcr-Abl αυτοφωσφορυλιώνεται ανεξέλεγκτα με συνέπεια την απελευθέρωση των CML κυττάρων από τον μυελό των οστών. Η πρωτεΐνη ARG, ένα στενά συνδεδεμένο μέλος της οικογένειας ABL, έχει επίσης βρεθεί ως μια πρωτεΐνη σύντηξης σε διάφορα δείγματα λευχαιμίας.

2.4.2.3 TKL (Tyrosinekinase-like) κινάσες

Όπως υποδεικνύεται και από το όνομα, οι TKL κινάσες έχουν ομοιότητα με την οικογένεια των τυροσινικών πρωτεϊνικών κινασών αν και κατά κύριο λόγο είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Από τα πιο εξέχοντα μέλη της ομάδας αυτής είναι η οικογένεια των Raf κινασών, συμπεριλαμβανομένων A-Raf, B-Raf και C-Raf. Οι τρεις Raf πρωτεΐνες δομικά εμφανίζουν πολλές ομοιότητες. Ο τομέας της κινάσης βρίσκεται στο C-τερματικό άκρο της πρωτεΐνης και δυο διατηρημένες αλληλουχίες, CR₁ και CR₂, εντοπίζονται στο N-τερματικό άκρο. Η ρύθμιση της δραστηριότητας των Raf κινασών είναι πολύπλοκη και επιτυγχάνεται τόσο από την ενεργοποίηση και την ανασταλτική φωσφορυλίωση καθώς και από τη σύνδεσή τους με άλλες πρωτεΐνες.

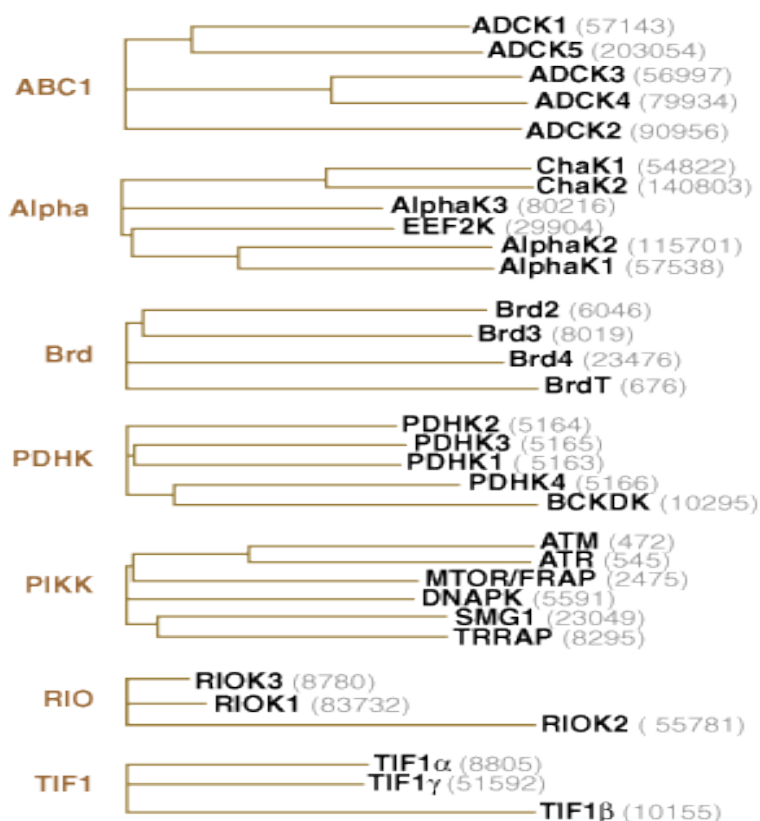
Οι Raf κινάσες παίζουν ρόλους κλειδιά σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες, όπως στον κυτταρικό μεταβολισμό, στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, στον κυτταρικό θάνατο και στις νευρολογικές λειτουργίες.^[41] Σημαντικός παράγοντας στην καρκινογένεση στον άνθρωπο αποτελεί η B-Raf κινάση. Περίπου το 20% όλων των εξεταζόμενων δειγμάτων ανθρώπινων όγκων εμφανίζουν ένα μεταλλαγμένο γονίδιο B-Raf.

2.4.3 Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs)

Οι άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες διαφέρουν αρκετά στην ομόλογη σειρά από κάθε γνωστή ευκαρυωτική πρωτεϊνική κινάση, αλλά, παρόλα αυτά, έρευνες έχουν καταδείξει ότι σε πολλές περιπτώσεις έχουν δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης. Η μεγάλη πλειοψηφία των κλασικά απαντώμενων ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών διαθέτει στην περιοχή δραστηριότητας της κινάσης ένα N-τελικό άκρο που αποτελείται από ένα β-φύλλο, μια έλικα (αC) και ένα C-τερματικό λοβό, που είναι κυρίως ελικοειδής. Σε αντίθεση με τις τυπικές πρωτεϊνικές κινάσες, οι άτυπες πήραν το όνομά τους από αυτή τη διαφοροποίηση.

Έχουν προσδιοριστεί 43 άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες κατατάσσονται σε 13 υποοικογένειες και η καθεμία περιλαμβάνει ένα μικρό αριθμό μελών από 2 έως 6. Η λειτουργία μερικών από αυτές δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη. Από αυτές, η πιο σημαντική υποομάδα, όσον αφορά τη βιολογία του καρκίνου, είναι η οικογένεια PIKK (Εικόνα 22).^[42]

Atypical Protein Kinase Group

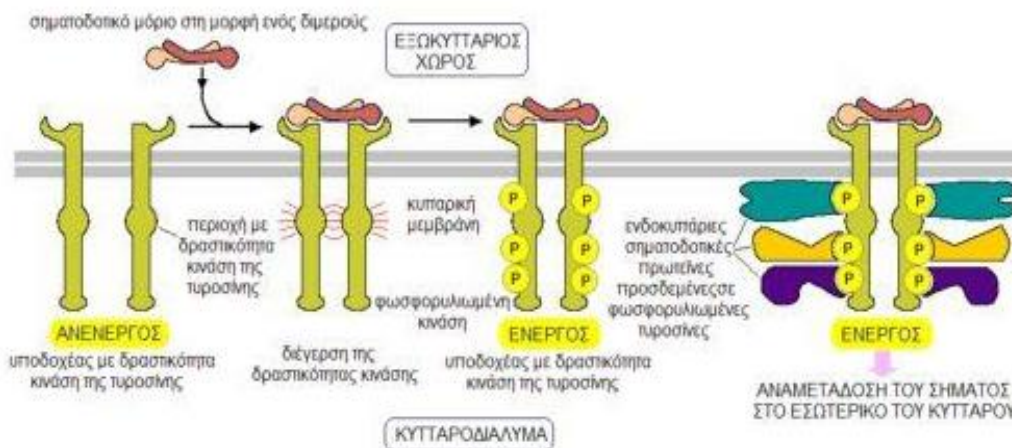


Εικόνα 22 : Ταξινόμηση των άτυπων πρωτεϊνικών κινασών (aPKs) σε υπο-οικογένειες

2.5 Οι πρωτεϊνικές κινάσες στη σηματοδοτική οδό των κυττάρων

Ο κυτταρικός κύκλος διέπεται από αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, η διαταραχή των οποίων προάγει τη δημιουργία κακοήθειας. Προκειμένου να διατηρηθεί η ακρίβεια και να εξασφαλιστεί το τέλειο αποτέλεσμα, πολλαπλά σημεία ελέγχου (check points) βρίσκονται σε διάφορα χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου και βάσει συγκεκριμένων ερεθισμάτων, επιτρέπουν τη συνέχιση και ολοκλήρωση ή την αναστολή του κύκλου. Έτσι σε περίπτωση κάποιας βλάβης, ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιδιόρθωσης και κυτταρικού θανάτου με σκοπό να αποφευχθεί η νεοπλασματική ανάπτυξη. Η κυτταρική σηματοδότηση είναι ένας τρόπος που τα κύτταρα επικοινωνούν μεταξύ τους. Τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών, προκειμένου να αποστείλουν μηνύματα το ένα στο άλλο, χρησιμοποιούν εκατοντάδες είδη εξωκυττάρων μορίων, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα, νουκλεοτίδια κ.ά. Τα κύτταρα λαμβάνουν τις εξωκυττάρια εντολές και εκτελούν τις αντίστοιχες διεργασίες ώστε να απαντήσουν στο ερέθισμα.

Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται, η καθεμιά με το δικό της ρόλο, σε ποικίλες διεργασίες του κυττάρου, όπως στη ρύθμιση και την κατάλυση του μεταβολισμού της γλυκόζης, στη μεταγραφή των γονιδίων, στην αγγειογένεση, στον κύκλο ανάπτυξης του κυττάρου, στη διαφοροποίηση, στην απόπτωση κ.ά. Δεδομένου ότι συναντώνται σε όλες τις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου, χαρακτηρίζονται ως αγγελιοφόροι. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσληψη ενός σήματος στην εξωκυττάρια περιοχή, η διαβίβαση του από την κυτταρική μεμβράνη και η προώθησή του από το κυτταρόπλασμα έως τον πυρήνα πραγματοποιείται με φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών κινασών. Οι πρωτεϊνικές κινάσες που εμπλέκονται στην προώθηση του εξωκυττάρια σήματος, είναι οι διαμεμβρανικές. Αρχικά, το σήμα προσδέεται στην εξωκυττάρια περιοχή τους οδηγώντας στο σχηματισμό ενός διμερούς. Η επαφή των δυο μονομερών πυροδοτεί την έναρξη της φωσφορυλίωσης. Ακολούθως, οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσδέονται στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης των ενδοκυττάρια μελών και ενεργοποιούνται. Αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν νέες πρωτεϊνικές κινάσες και το σήμα διαχέεται σε όλο το κύτταρο. Τέλος, για την απόκριση του σήματος, ενεργοποιούνται αντίστοιχες πρωτεΐνες (Εικόνα 23).^[5]



Εικόνα 23: Σηματοδοτική οδός των κυττάρων

Η σηματοδότηση διακόπτεται με τη δράση των πρωτεϊνικών φωσφατασών, οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν τη διαμεμβρανική πρωτεϊνική κινάση. Συνεπώς, είναι φανερό, ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζουν κάθε κυτταρική διεργασία. Απόρροια αυτού του γεγονότος είναι ότι μεταλλάξεις πρωτεϊνικών κινασών έχουν ως

αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Τα κύτταρα δεν υπακούουν στους μηχανισμούς ελέγχου με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και τη δημιουργία όγκων. Κατ' επέκταση, για την αποκατάσταση της ομαλής λειτουργίας και της επιβίωσης, η ανάπτυξη εκλεκτικών ανασταλτικών παραγόντων κρίνεται επιτακτική.

2.6 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο, οι πορείες μεταγωγής σήματος είναι πολύπλοκες και πολλών σταδίων. Είναι λογικό λοιπόν, να αποτυγχάνουν και να οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες. Ο καρκίνος είναι μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από ανωμαλίες στην κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, και οδών επιβίωσης, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη επέκταση των καρκινικών κυττάρων και το σχηματισμό όγκων. Η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς μεταλλάξεων στις σηματοδοτικές οδούς τους.

Ο κύριος ρόλος στη μεταγωγή σήματος και στη ρύθμιση των περισσότερων κυτταρικών δραστηριοτήτων έχουν καθιερώσει τις κινάσες ως πολλά υποσχόμενους στόχους φαρμάκων για τη θεραπεία διάφορων τύπων ασθενειών συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, φλεγμονωδών ασθενειών, διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος και καρδιαγγειακών παθήσεων.^[43] Λόγω του κεντρικού ρόλου των πρωτεϊνικών κινασών στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης, δεν αποτελεί έκπληξη ότι μεταλλάξεις στην έκφραση και τη λειτουργία τους είναι συχνά υπαίτιες για την ανάπτυξη καρκίνων. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να συμβούν με:

- ❖ Γονιδιακές μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένων χρωμοσωμικών μεταθέσεων που παράγουν πρωτεΐνες σύντηξης οι οποίες φέρουν την καταλυτική περιοχή και τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Αυτή προκαλεί την ενεργοποίησή της ως κινάση, όπως στην περίπτωση της Bcr-Abl στη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία.
- ❖ Μεταλλάξεις που οδηγούν σε μόνιμα ενεργοποιημένη δράση της κινάσης, οι οποίες σχετίζονται με αρκετές κακοήθειες, όπως η Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία και οι γαστρεντερικοί όγκοι.

- ❖ Απορρύθμιση της δραστικότητας της κινάσης από την ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ή την απώλεια ογκοκατασταλτικών παραγόντων.
- ❖ Απορρύθμιση της δραστικότητας της κινάσης λόγω υπερέκφρασης, όπως στην περίπτωση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF-R.

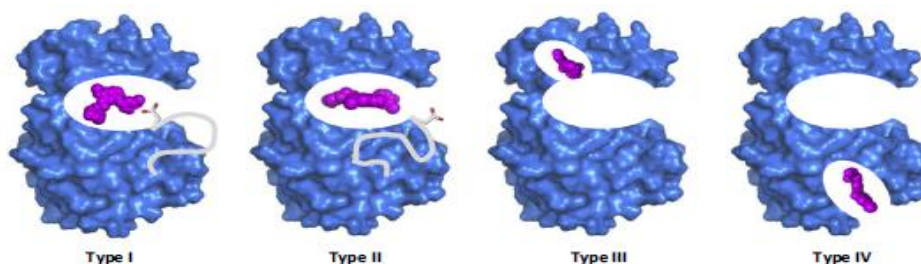
Παράλληλα, η κατανόηση των μονοπατιών σηματοδότησης έχει γίνει η βάση για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων. Ενώσεις, συνήθως μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες μπορούν να αναστέλλουν τη δράση των πρωτεϊνικών κινασών ονομάζονται αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Η έννοια της αναστολής της κινάσης ξεκίνησε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και του 1960, όταν διεξήχθη πρωτοποριακή έρευνα για το χαρακτηρισμό και την αποσαφήνιση του μονοπατιού σηματοδότησης.^[44] Κλινικά, αρκετοί διαφορετικοί μικρού βάρους αναστολείς έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία κακοηθειών και πολλοί ακόμη βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικής αξιολόγησης.

2.6.1 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Έχουν προσδιοριστεί τρεις μηχανισμοί παρεμπόδισης-αναστολής της δραστικότητας της πρωτεϊνικής κινάσης: 1) ένας μηχανισμός ψευδο-υποστρωμάτων, 2) ένας μιμητικός μηχανισμός αδενίνης και 3) ένας μηχανισμός που περιλαμβάνει την παγίδευση του ενζύμου σε μια ανενεργό διαμόρφωση, με τη χρήση επιφανειακών αμινοξέων εκτός του ενεργού κέντρου.

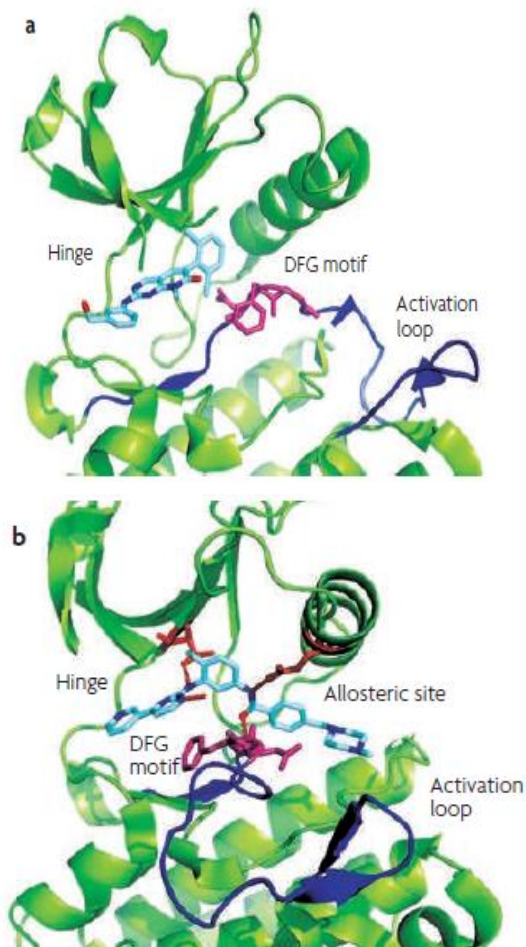
Οι ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες μοιάζουν σε μεγάλο βαθμό στη 3D δομή τους, ειδικά στο καταλυτικό τους κέντρο, όπου βρίσκεται ο θύλακας πρόσδεσης του ATP. Το ATP προσδέεται στη σχισμή που σχηματίζεται μεταξύ του N- και C-λοβού και οι αναστολείς της κινάσης διαταράσσουν τη δέσμευση μέσω αλληλεπιδράσεων με αυτή την περιοχή. Ο εύκαμπτος βρόγχος ενεργοποίησης που ξεκινά με μια διατηρημένη αλληλουχία αμινοξέων Asp-Phe-Gly (DFG) ελέγχει την πρόσβαση στην ενεργή θέση. Η μεγαλύτερη πλειονότητα των αναφερόμενων στη διεθνή βιβλιογραφία αναστολέων είναι αδενινικοί μιμητές, δηλαδή προσδέονται στη θέση δέσμευσης του ATP. Αν και οι ανταγωνιστές του υποστρώματος υπερέχουν από τους αδενινικούς μιμητές, λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης του ATP που θα μπορούσε να δράσει ανταγωνιστικά με τους τελευταίους, η χρησιμότητά τους περιορίζεται εξαιτίας της μεγάλης ιδιαιτερότητας και εκλεκτικότητάς τους.

Ανάλογα με τον τρόπο δέσμευσης τους, οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών ομαδοποιούνται σε δυο κατηγορίες: τους αναστρέψιμους και τους μη αναστρέψιμους. Οι τελευταίοι τείνουν να δεσμεύονται ομοιοπολικά με ένα δραστικό κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση σύνδεσης του ATP με αποτέλεσμα την παγίδευση της θέσης πρόσδεσης και τη μη αναστρέψιμη αναστολή. Οι πρώτοι μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε τέσσερις κύριους τύπους με βάση την διαμόρφωση του θύλακα σύνδεσης και το μοτίβο DFG (Εικόνα 24).^[43]



Εικόνα 24: Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ανάλογα με τη θέση πρόσδεσης^[43]

- ❖ Αναστολείς τύπου I: Δρουν ανταγωνιστικά με το ATP και προσδένονται στην ενεργή μορφή (inconformation) των κινασών, με το ασπαρτικό του DFG μοτίβου να είναι στραμμένο προς τη δραστική μορφή της κινάσης (DFG-in)^[45] (Εικόνα 25).
- ❖ Αναστολείς τύπου II: Προσδένονται στην ανενεργή μορφή των κινασών με το ασπαρτικό του DFG μοτίβου να προεξέχει έξω από τη θέση δέσμευσης του ATP (outconformation). Οι αναστολείς τύπου II πολλές φορές εκμεταλλεύονται συγκεκριμένες θέσεις προσβάσιμες σε μια περιοχή γειτονική προς τη θέση δέσμευσης ATP λόγω της περιστροφής του μοτίβου DFG^[45] (DFG-out). Εικόνα 25)
- ❖ Αναστολείς τύπου III: Δεσμεύονται αποκλειστικά σε μια αλλοστερική θέση δίπλα στη θέση πρόσδεσης του ATP, χωρίς να κάνουν καμία αλληλεπίδραση με αυτήν.^[45]
- ❖ Αναστολείς τύπου IV: Δεσμεύονται σε μια θέση απομακρυσμένη από τη θέση πρόσδεσης του ATP.^[45]

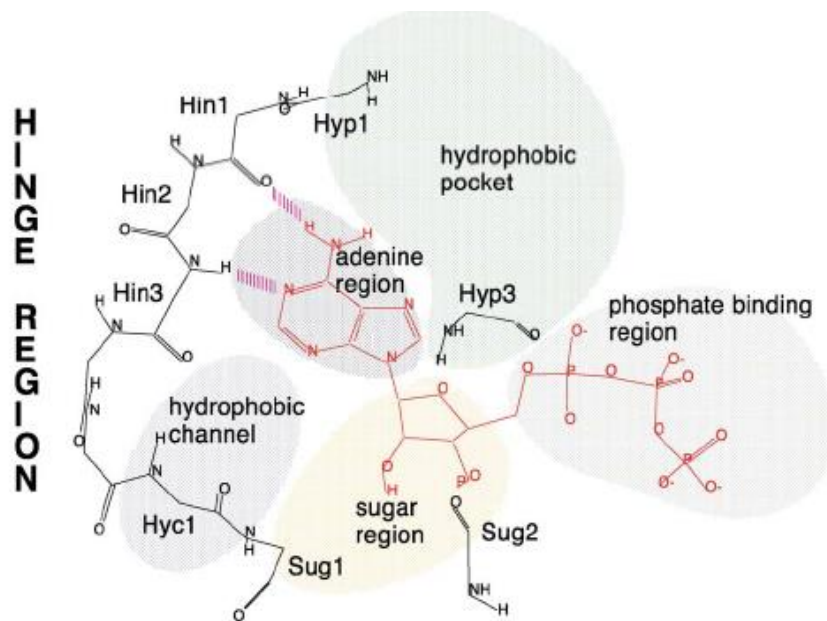


Εικόνα 25 : *a) Η DFG-in διαμόρφωση του ενεργοποιημένου βρόγχου (μπλέ σκούρο χρώμα)*

b) Η DFG-out διαμόρφωση του ενεργοποιημένου βρόγχου (μπλέ σκούρο χρώμα) ^[46]

2.6.2 Χαρακτηριστικά αδενινικών μιμητών

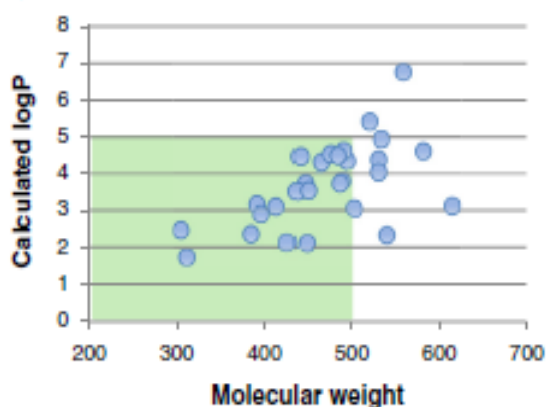
Όπως προαναφέρθηκε, η μεγαλύτερη πλειονότητα των αναφερόμενων στη διεθνή βιβλιογραφία αναστολέων είναι αδενινικοί μιμητές, δηλαδή προσδέονται στη θέση δέσμευσης του ATP. Η περιοχή πρόσδεσης του ATP στις πρωτεϊνικές κινάσες είναι πράγματι ένας ελκυστικός στόχος για το σχεδιασμό φαρμάκων, αποτελώντας έτσι ένα φαρμακοφόρο μοντέλο για τη σύνθεση νέων αναστολέων. Για το λόγο αυτό αξίζει να περιγραφούν τα χαρακτηριστικά αυτής της θέσης πρόσδεσης (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Θέση σύνδεσης του ATP στις πρωτεϊνικές κινάσες. Φαρμακοφόρο μοντέλο της θέσης σύνδεσης του ATP. Το ATP είναι με κόκκινο χρώμα. Sug1, Hyp1 και Hyc1 είναι κατάλοιπα που ορίζουν την περιοχή του σακχάρου, τον υδρόφοβο θύλακα και το υδρόφοβο κανάλι αντίστοιχα. Η hinge είναι η περιοχή άρθρωσης.^[47]

1. Περιοχή αδενίνης: Αυτή η υδρόφοβη περιοχή περιέχει δύο βασικούς δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των αζώτων N-1 και N-6 του δακτυλίου της αδενίνης με τις αμινομάδες και καρβοξυλομάδες της hinge περιοχής της πρωτεϊνικής κινάσης. Πολλοί ισχυροί αναστολείς χρησιμοποιούν τουλάχιστον έναν από αυτούς τους δεσμούς υδρογόνου.^[47]
2. Περιοχή του σακχάρου: Στις περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες η περιοχή αυτή είναι υδρόφιλη εκτός από την EGF-R, γεγονός που έχει αξιοποιηθεί για το σχεδιασμό ισχυρών και εκλεκτικών αναστολέων.^[47]
3. Υδρόφοβος θύλακας: Δε χρησιμοποιείται από ATP, αλλά αξιοποιείται από τους περισσότερους αναστολείς κινασών. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την επιλεκτικότητα του αναστολέα.^[47]
4. Υδρόφοβο κανάλι: Αυτό το κανάλι είναι μια σχισμή που ανοίγει προς το διαλύτη. Δεδομένου ότι δεν χρησιμοποιείται από το ATP, μπορεί να αξιοποιηθεί για να ενισχυθεί η συγγένεια δέσμευσης.^[47]
5. Περιοχή δέσμευσης φωσφορικών: Αυτή η περιοχή φαίνεται να είναι η λιγότερο σημαντική από την άποψη της συγγένειας δέσμευσης λόγω της υψηλής έκθεσης της στο διαλύτη. Ωστόσο, είναι χρήσιμη για τη βελτίωση της επιλεκτικότητας ή για να αυξηθεί η συγγένεια πρόσδεσης.^[47]

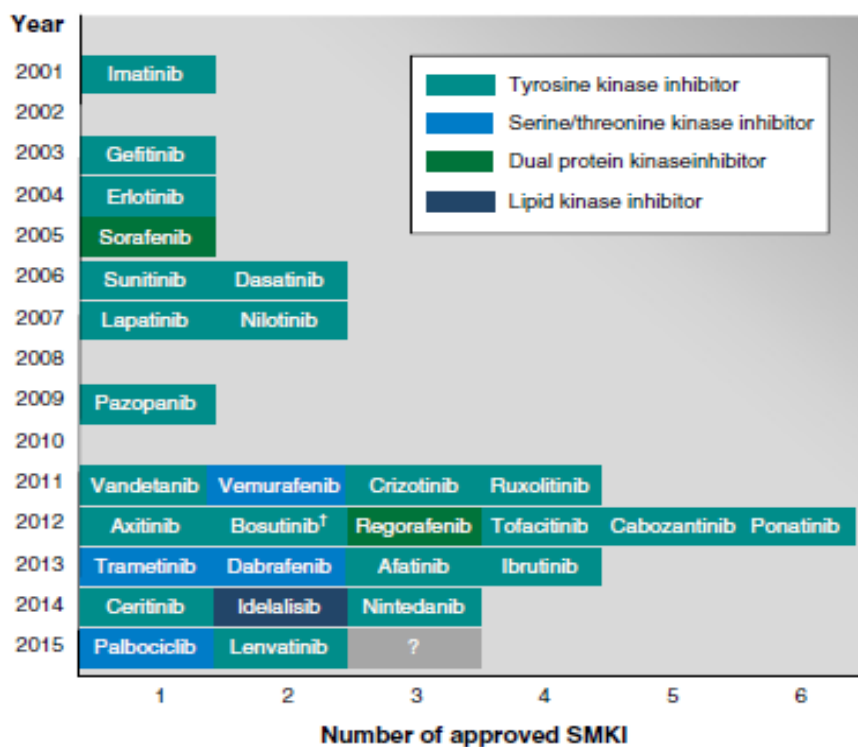
Ένα ακόμη κοινό χαρακτηριστικό των αδενικών μιμητών είναι ότι το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται από 300-700 g/mol (Εικόνα 27), προκειμένου να "χωρούν" στη θέση δέσμευσης του ATP, το οποίο έχει μοριακό βάρος 507.18 g/mol. Αναστολείς πολύ μεγαλύτερου μοριακού βάρους δε θα μπορούσαν να υιοθετήσουν το παραπάνω φαρμακοφόρο μοντέλο.



Εικόνα 27: Μοριακό βάρος και η υπολογισμένη logP, όπου logP ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού.

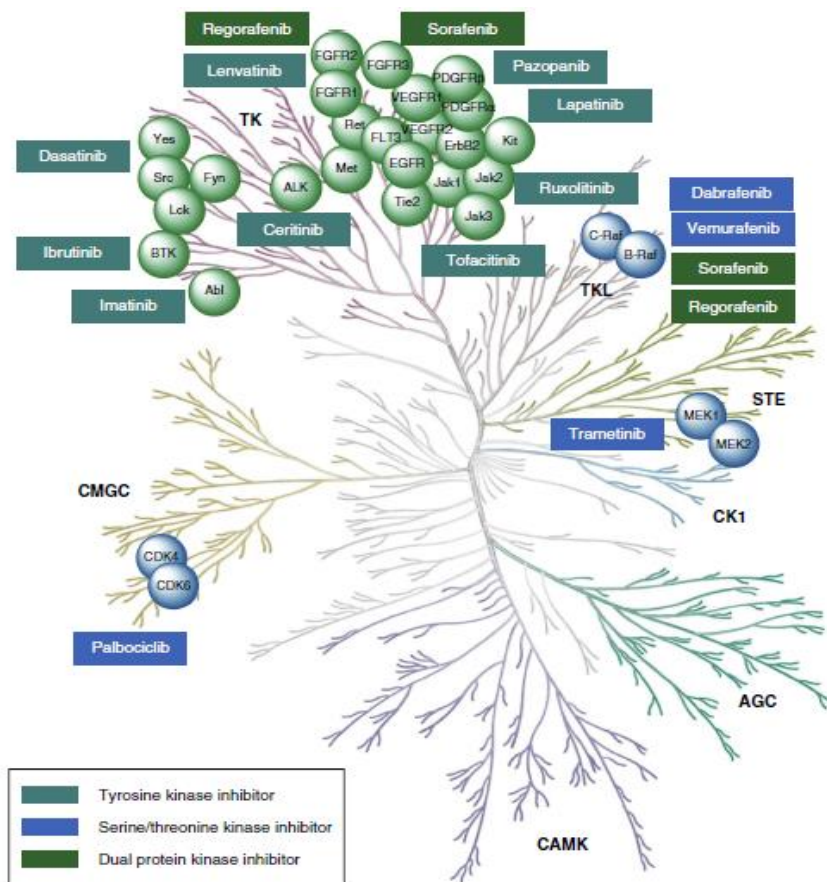
2.7 Στοχευμένη θεραπεία

Οι μικρού μοριακού βάρους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών (SMKIs), 28 από τους οποίους έχουν εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία έναντι πολλών ασθενειών, ιδίως του καρκίνου. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι αναστολείς τύπου II και έχουν τα χαρακτηριστικά του φαρμακοφόρου μοντέλου που προαναφέρθηκαν. Η έγκριση του Imatinib (Gleevec, Novartis) από τον FDA το 2001, για τη θεραπεία ασθενών με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML), δεν ήταν μόνο μια σημαντική ανακάλυψη στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου, αλλά άνοιξε το δρόμο για μελλοντική έρευνα στο πεδίο. Εννέα αναστολείς εγκρίθηκαν από 2001-2010 και ακόμη 19 SMKIs εγκρίθηκαν από το 2011 έως τον Ιούνιο 2015 (Εικόνα 28).^[43]



Εικόνα 28 : Εγκεκριμένοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών από τον FDA από το 2001 έως τον Ιούνιο 2015^[44]

Η παρούσα επιτυχία των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους (SMKIs) στην αγορά επιτεύχθηκε κυρίως με τη στόχευση πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 29).



Εικόνα 29 : Οι κινάσες τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης απεικονίζονται ως πράσινοι και μπλε κύκλοι αντίστοιχα. Μόνο μερικοί αναστολείς τυροσινικής κινάσης παρουσιάζονται στο δενδρόγραμμα.

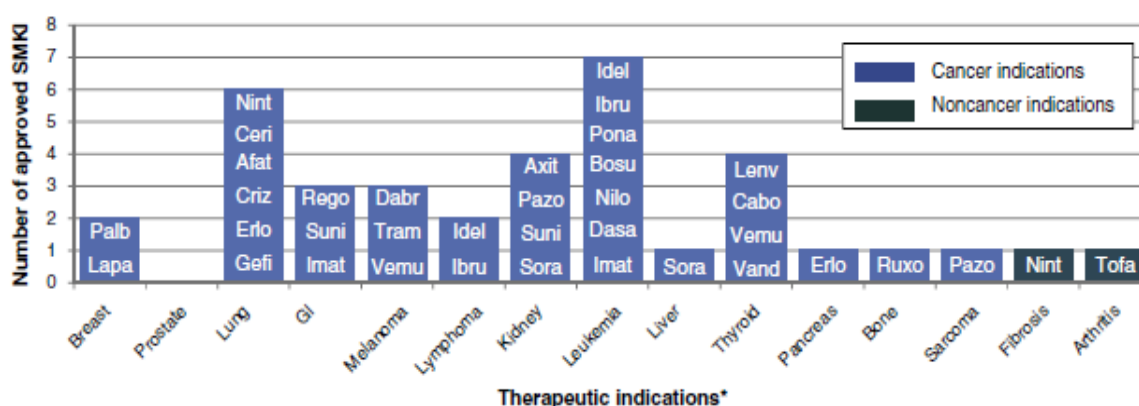
Οι περισσότεροι αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων χαρακτηρίζονται ως αναστολείς τυροσινικών κινάσων. Ωστόσο, έχουν εγκριθεί κι άλλοι αναστολείς, οι καλούμενοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης/θρεονίνης, οι αναστολείς διττής εξειδίκευσης (dual protein kinase inhibitors) και οι αναστολείς λιπιδίων κινάσης (lipid kinase inhibitors). Ο ορισμός της επιλεκτικότητας ενός αναστολέα είναι κατά μια έννοια αμφιλεγόμενος και συχνά χρησιμοποιείται μια απλουστευμένη παραδοχής για να καθοριστούν "εκλεκτικοί αναστολείς" ως οι αναστολείς με ένα μόνο κύριο στόχο ή αναστολείς που στοχεύουν δύο δομικά όμοιες κινάσες που ανήκουν στην ίδια ομάδα. Οι "αναστολείς πολλών στόχων" ή "multitarget inhibitors" στοχεύουν σε 3 έως 9 κινάσες. Τέλος, οι "ετερόκλητοι αναστολείς" ή "promiscuous inhibitors" είναι αυτοί που έχουν όχι λιγότερους από 10 στόχους.

Δεδομένου ότι η συμβατική χημειοθεραπεία δε διακρίνει αποτελεσματικά τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να επιτίθεται και στα φυσιολογικά οδηγώντας σε παρενέργειες που χαρακτηρίζονται από υψηλή τοξικότητα, οι στοχευμένες θεραπείες έχουν υψηλή εξειδίκευση έναντι των

καρκινικών κυττάρων, παρέχουν μια ευρύτερη θεραπευτική λύση με μικρότερη τοξικότητα και αντιπροσωπεύουν μια νέα και πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την θεραπεία του καρκίνου με ευεργετικά κλινικά αποτελέσματα.

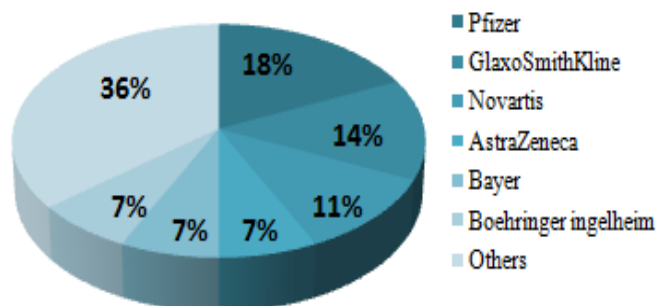
2.8 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και καρκίνος

Σήμερα, μια πληθώρα αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, κυρίως μιμητών του ATP, κυκλοφορούν στο εμπόριο ως αντικαρκινικά φάρμακα. Παρακάτω, απεικονίζονται τα εγκεκριμένα φάρμακα και το είδος του καρκίνου που αναστέλλουν (Εικόνα 30).



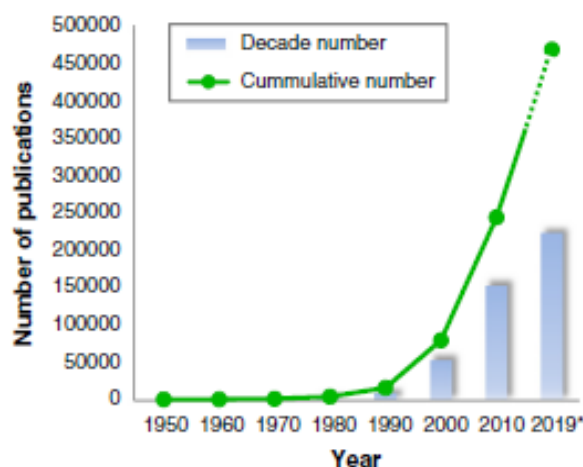
Εικόνα 30: Οι θεραπευτικές ενδείξεις των εγκεκριμένων SMKIs. Μόνο τα τέσσερα πρώτα γράμματα των γενικών ονομάτων των SMKIs παρατίθενται.

Χτυπούν την "Αχίλλειο πτέρνα" των καρκινικών κυττάρων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου του στήθους, του πνεύμονα, του μελανώματος, του νεφρού, του ήπατος, του θυροειδούς, του παγκρέατος, των οστών των γαστροστροφματικών όγκων, της λευχαιμίας και πολλών άλλων μορφών καρκίνου. Είναι λογικό λοιπόν, οι ηγέτιδες φαρμακευτικές εταιρίες (Pfizer, GlaxoSmithKline, Novartis, Astra Zeneca, Bayer Boehringer Ingelheim) να προβαίνουν στη σύνθεση των εγκεκριμένων SMKIs (Εικόνα 31).^[44]



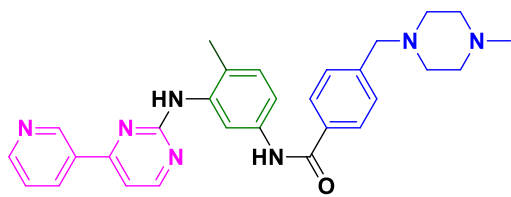
Εικόνα 31: Σύνθεση των SMKIs από φαρμακευτικές εταιρίες

Η επιτακτική ανάγκη για εύρεση εκλεκτικών αναστολέων, καθώς και οι μη επαρκείς πληροφορίες στη δομή των πρωτεϊνικών μορίων σε κυτταρικό περιβάλλον, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον συνθετικών οργανικών χημικών και βιοχημικών για το σχεδιασμό και τη σύνθεση οργανικών ετεροκυκλικών ενώσεων με επιθυμητή και στοχευμένη ανασταλτική δράση. Αυτό, άλλωστε, αποτυπώνεται και από τη ραγδαία αύξηση του αριθμού των δημοσιεύσεων στο ερευνητικό πεδίο από πολλές ερευνητικές ομάδες (Εικόνα32).

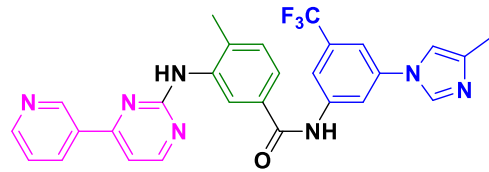


Εικόνα 32: Ο συνολικός αριθμός και ο αριθμός της δεκαετίας των δημοσιεύσεων που σχετίζονται με τους αναστολείς κινάσων από το 1950.

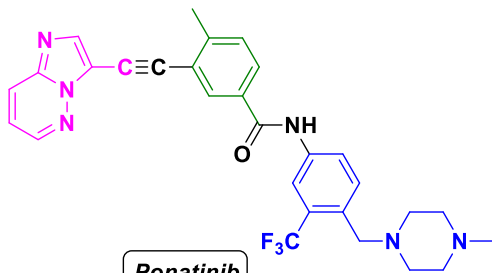
Παρακάτω, παρουσιάζονται οι δομές ορισμένων γνωστών αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων, κυρίως τύπου II, που έχουν συντεθεί τόσο από ερευνητικές ομάδες, όσο και από φαρμακευτικές εταιρίες και διατίθενται για τη θεραπεία νεοπλασιών. Με ροζ χρώμα υποδηλώνεται η περιοχή πρόσδεσης της αδενίνης, με πράσινο ο υδρόφοβος θύλακας, με μπλέ η αλλοστερική περιοχή και σε κάποιες περιπτώσεις με μωβ, η περιοχή που εκτίθεται στο διαλύτη.



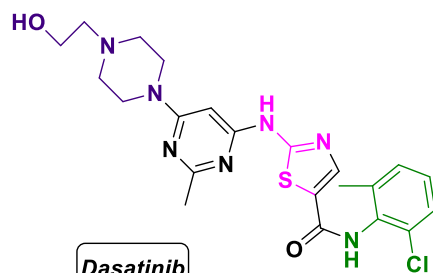
Imatinib



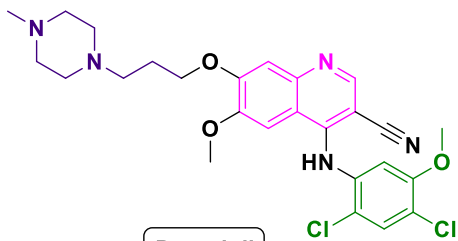
Nilotinib



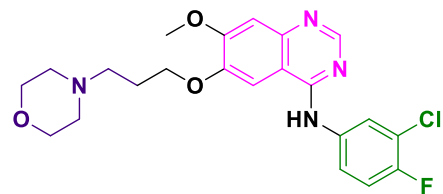
Ponatinib



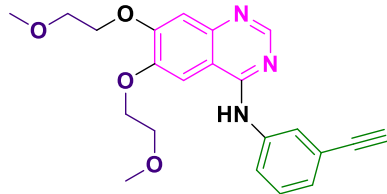
Dasatinib



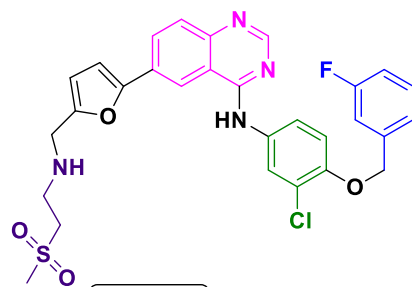
Bosutinib



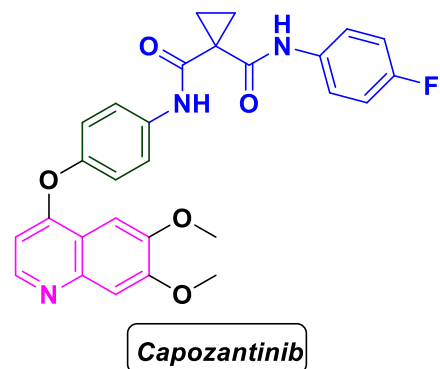
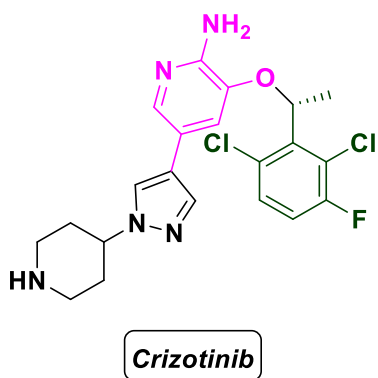
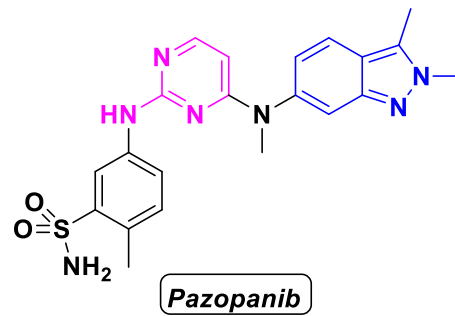
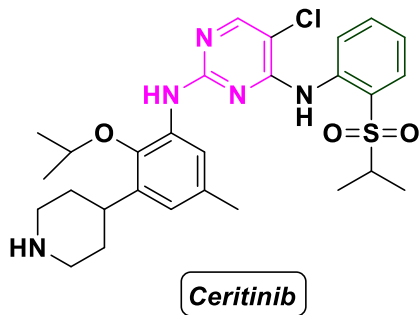
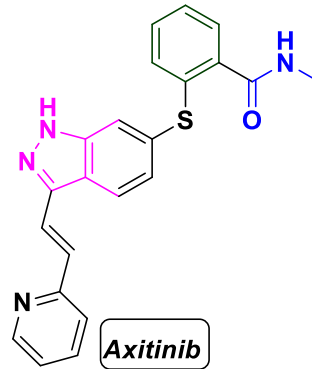
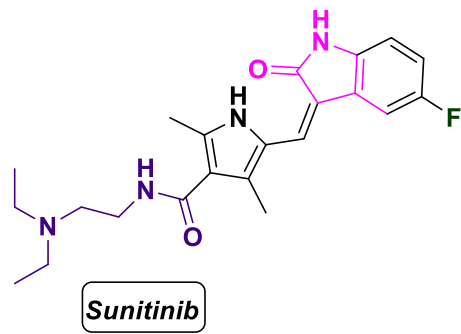
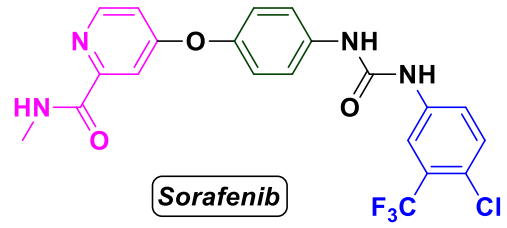
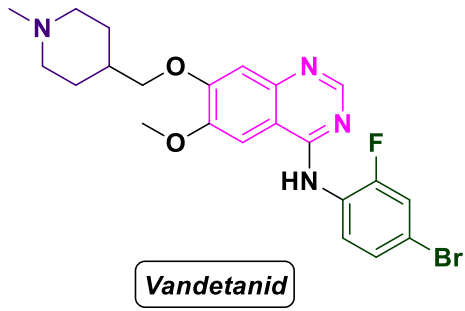
Gefitinib

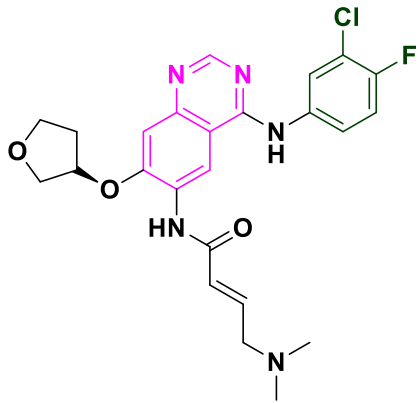


Erlotinib

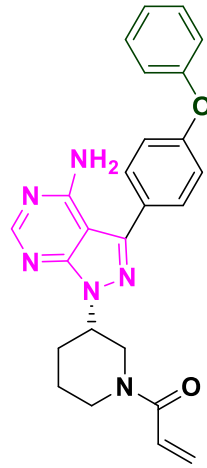


Lapatinib

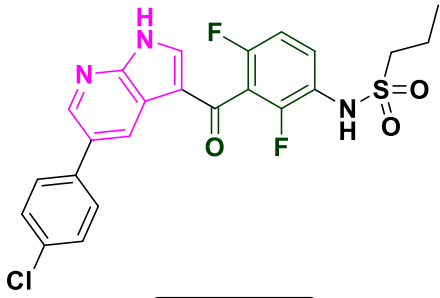




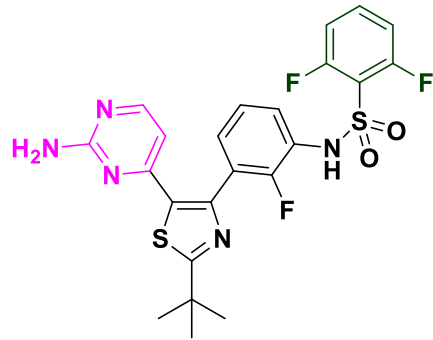
Afatinib



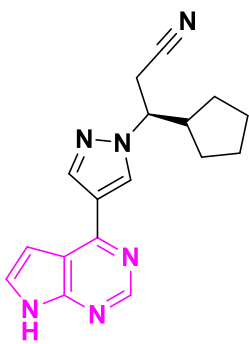
Ibrutinib



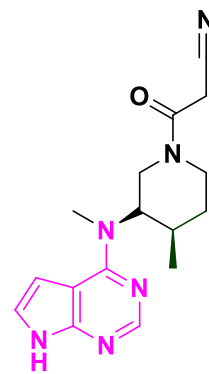
Verumafenib



Dabrafenib



Ruxolitinib



Tofacitinib

2.9 Λευχαιμία

Άλλωστε από τα στοιχεία της *Εικόνας 30*, φαίνεται ότι αρκετοί από τους παραπάνω αναστολείς έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία της λευχαιμίας. Η λευχαιμία αποτελεί την 6^η κατά σειρά συχνότητας αιτία θανάτου από καρκίνο στον οικονομικά ανεπτυγμένο κόσμο.

Η λευχαιμία είναι ένας τύπος καρκίνου του αίματος ή του μυελού των οστών που χαρακτηρίζεται από τη μη φυσιολογική αύξηση ανώριμων και πρόδρομων λευκών αιμοσφαιρίων που ονομάζονται «βλάστες». Η λευχαιμία είναι ένας γενικός όρος που αναφέρεται σε φάσμα ασθενειών. Ουσιαστικά, είναι το σύνολο των ασθενειών που επηρεάζουν το αίμα, το μυελό των οστών και το λεμφικό σύστημα, οι οποίες είναι γνωστές ως νεοπλασίες του αίματος.

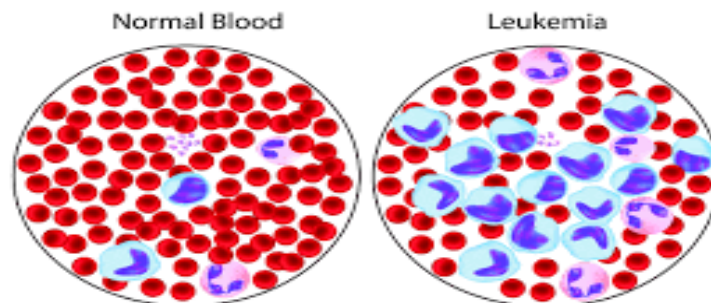
Η λευχαιμία εμφανίζεται σε 2 μορφές: στις οξείες και στις χρόνιες. Τα πιο συνηθισμένα είδη λευχαιμίας είναι η Μυελογενής και η Λεμφοβλαστική, που μπορούν να είναι οξείες ή χρόνιες. Ο όρος μυελογενής ή λεμφοβλαστική καθορίζει τον τύπο των κυττάρων που περιπλέκονται στην κάθε περίπτωση. Έτσι υφίστανται 4 κύρια είδη λευχαιμίας:

- Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία - Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL).
- Χρόνια Λεμφοβλαστική Λευχαιμία - Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL).
- Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία - Acute Myelogenous Leukemia (AML).
- Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία - Chronic Myelogenous Leukemia (CML).

Στην περίπτωση της οξείας μορφής λευχαιμίας, τα λευχαιμικά κύτταρα που είναι ανώριμα και μη λειτουργικά, αναπτύσσονται πολύ γρήγορα. Ο μυελός συχνά δεν μπορεί να παράγει αρκετά φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκά αιμοσφαίρια και αιμοπετάλια. Στη χρόνια μορφή λευχαιμίας, στα πρώτα στάδια, ο μυελός λειτουργεί κανονικά, τα λευχαιμικά κύτταρα αναπτύσσονται πιο αργά, επιτρέποντας έτσι και τη δημιουργία περισσότερων φυσιολογικών κυττάρων. Αυτός είναι και ο λόγος που τα συμπτώματα αργούν να εμφανιστούν, έτσι μπορεί να περάσουν μήνες ή ακόμα και χρόνια μέχρι να γίνει αντιληπτή η ασθένεια και να ληφθούν μέτρα για την αντιμετώπισή της.^[48]

2.9.1 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία(CML)

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) είναι μια από τις τέσσερις πιο συνηθισμένες μορφές λευχαιμίας. Είναι μια αιματολογική κακοήθεια, στην οποία τα λευκά αιμοσφαίρια δεν ωριμάζουν και χαρακτηρίζεται από την αυξημένη παρουσία ενός τύπου λευκών αιμοσφαιρίων που ονομάζονται ουδετερόφιλα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να εμφανίζεται αυξημένος αριθμός ανώριμων λευκοκυττάρων στο αίμα (Εικόνα 33). Αντιπροσωπεύει παγκοσμίως, το 10-15% του συνόλου των περιστατικών λευχαιμίας στους ενήλικες. Η ΧΜΛ συνήθως εμφανίζεται στη μέση ηλικία, στα 45 με 55 έτη κατά μέσο όρο, ενώ περίπου το 2% των περιστατικών είναι παιδιά. Στην Ελλάδα, υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 1.200 ασθενείς με ΧΜΛ.



Εικόνα 33: Μορφολογία κυττάρων στη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία

2.9.2 Οι φάσεις της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Υπάρχουν τρεις φάσεις της ΧΜΛ: η χρόνια, η επιταχυνόμενη και η βλαστική. Η φάση καθορίζεται από την εξέλιξη της νόσου βάσει του αριθμού των βλαστικών κυττάρων.

- ❖ Χρόνια φάση : Οι περισσότεροι ασθενείς διαγιγνώσκονται με ΧΜΛ κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης. Κατά τη διάρκεια της, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται αργά. Αυτή η φάση μπορεί να διαρκέσει επ' αόριστον και τα συμπτώματα είναι πολύ ήπια ή δεν εμφανίζονται καθόλου.
- ❖ Επιταχυνόμενη φάση : Στη φάση αυτή, τα βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται πιο γρήγορα και φαίνεται ότι ο ασθενής σταματά να

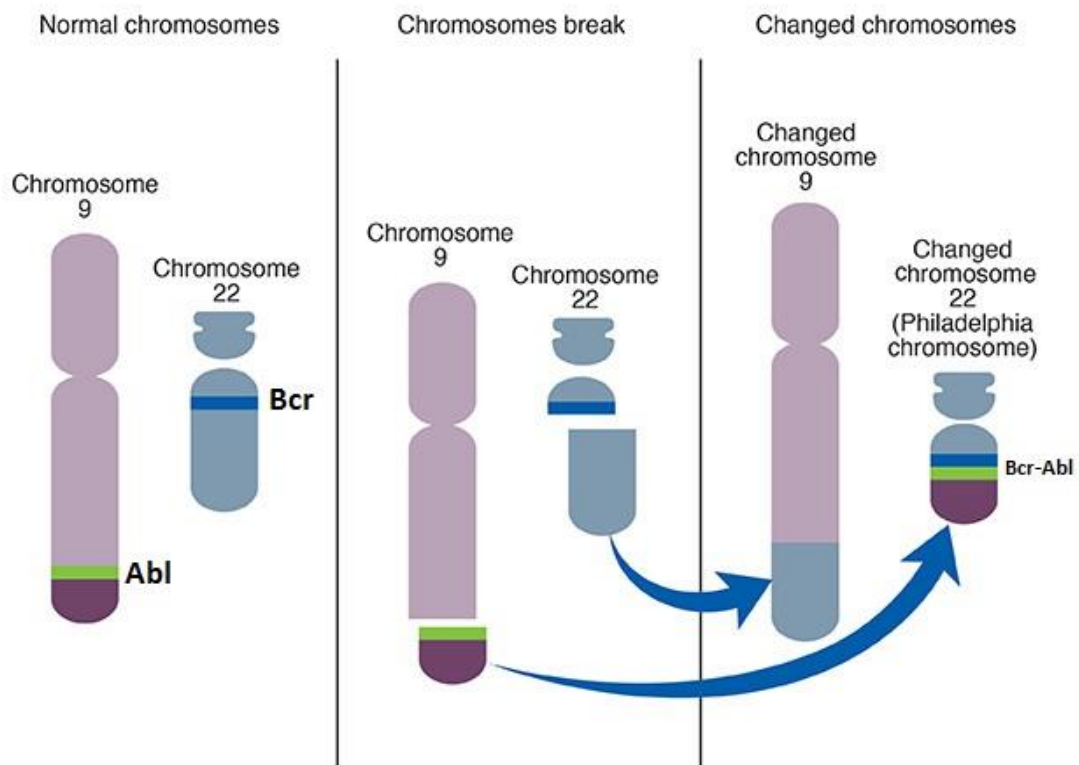
ανταποκρίνεται στη θεραπεία. Παρατηρείται επιδείνωση των συμπτωμάτων και πρόσθετες ανωμαλίες στο αίμα και το μυελό των οστών.

- ❖ Βλαστική φάση ή βλαστική κρίση : Εάν η νόσος αφηθεί χωρίς θεραπεία, τότε προχωρά στην τελευταία φάση της. Στη βλαστική φάση, τα βλαστικά κύτταρα έχουν φτάσει σε κρίσιμα επίπεδα, που πολλές φορές αγγίζουν την τάξη αυτών που πάσχουν από οξεία λευχαιμία. Αυτή η απότομη αύξηση των βλαστικών κυττάρων οδηγεί σε επικίνδυνα χαμηλά επίπεδα ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων. Μερικά από τα συμπτώματα της φάσης αυτής είναι εξανθήματα, αιμορραγία, πόνος στο στομάχι, έντονη κόπωση, δυσκολία στην αναπνοή και απώλεια βάρους.

Συνήθως η πρόοδος από την επιταχυνόμενη στη τελική φάση γίνεται μέσα σε διάστημα 3-18 μηνών. Χωρίς θεραπεία ο μέσος χρόνος επιβίωσης στο τελικό στάδιο είναι περίπου 3 μήνες.

2.9.3 Το Χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας (Ph)

Αποφασιστικής σημασίας στην ανάπτυξη της ΧΜΛ είναι μια κυτταρογενετική βλάβη που ανιχνεύεται εύκολα στα κύτταρα όλων των ασθενών. Πρόκειται για μια χρωμοσωμική ανωμαλία, μια αμοιβαία αντιμετάθεση γενετικού υλικού ανάμεσα στα χρωμοσώματα 9 και 22. Συγκεκριμένα, το τμήμα του χρωμοσώματος 9 που περιέχει το γονίδιο Abl (περιοχή q34) προσδένεται στο γονίδιο Bcr του χρωμοσώματος 22 (περιοχή q11). Με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ένα υβριδικό χρωμόσωμα 22, που "φιλοξενεί" τμήμα του χρωμοσώματος 9. Επειδή η ανακάλυψη του φαινομένου έγινε στην πόλη Φιλαδέλφεια των ΗΠΑ, το βραχύτερο, υβριδικό χρωμόσωμα 22, ονομάζεται χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας (Ph). Στην περιοχή της σύντηξης, το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας φέρει ένα νέο γονίδιο, αποτελούμενο από μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου Bcr (εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22) και μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου Abl (προέρχεται από το χρωμόσωμα 9) (Εικόνα 34).



© MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. ALL RIGHTS RESERVED.

Εικόνα 34 : Η αντιμετάθεση που οδηγεί στο Χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας

Το υβριδικό γονίδιο Bcr-Abl που σχηματίζεται, δίνει την εντολή για τη σύνθεση ενός ενζύμου, γνωστού ως τυροσινική κινάση Bcr-Abl, και σ' αυτό επίσης περιέχεται η γενετική πληροφορία για τη σύνθεση της αντίστοιχης ογκοπρωτεΐνης, με ανεξέλεγκτη δράση πρωτεϊνικής κινάσης. Εξ' αιτίας της μεταβλητότητας της περιοχής διάσπασης του Bcr γονιδίου, έχουν περιγραφεί τρία χμαιρικά γονίδια. Τα γονίδια p210^{Bcr-Abl}, p190^{Bcr-Abl}, p230^{Bcr-Abl} περιέχουν το ίδιο τμήμα της Abi, αλλά διαφορετικό τμήμα της Bcr πρωτεΐνης. Το γονίδιο p210^{Bcr-Abl} είναι αυτό που συνδέεται με τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία, ενώ τα άλλα δυο έχουν αναφερθεί σε άλλες μορφές λευχαιμίας. Η πρωτεΐνη Bcr-Abl είναι μοναδική στα λευχαιμικά κύτταρα, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα και η δράση της ως τυροσινική κινάση είναι ικανή να επάγει λευχαιμία.^[49]

2.9.4 Θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Για το νόσημα αυτό έχει συντελεσθεί μία πραγματική θεραπευτική επανάσταση. Οι θεραπευτικές εξελίξεις της τελευταίας δεκαετίας αφορούν την ανάπτυξη αναστολέων τυροσινικών κινασών (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) που στοχεύουν εκλεκτικά την Bcr-Abl, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή των καρκινικών κυττάρων. Τα φάρμακα αυτά έφεραν την επανάσταση στην αντιμετώπιση αυτής της ασθένειας και επιτρέπουν στους περισσότερους ασθενείς να έχουν καλή ποιότητα ζωής σε σύγκριση με τα προηγουμένως χρησιμοποιούμενα φάρμακα χημειοθεραπείας. Το πρώτο γνωστό από αυτή τη νέα κατηγορία φαρμάκων είναι το Imatinib (Gleevec), το οποίο εγκρίθηκε από την FDA το 2001, δίνοντας στον ασθενή ένα ικανοποιητικό προσδόκιμο ζωής.

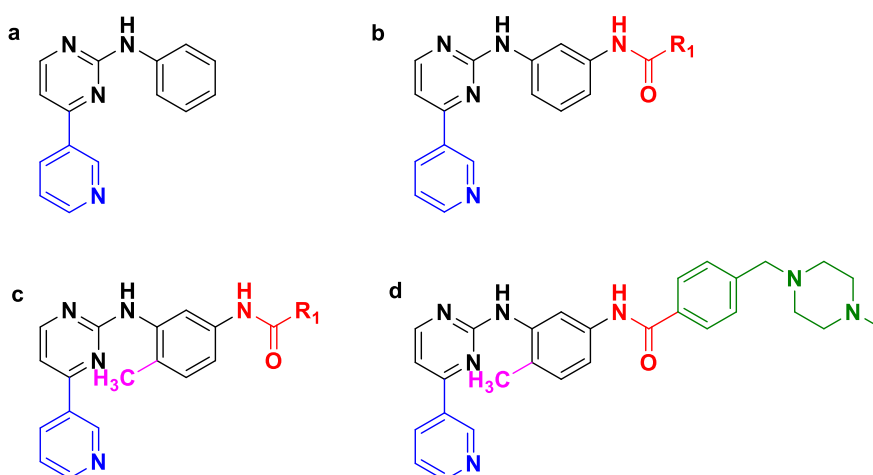
2.10 Imatinib

Το Imatinib, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο ως Gleevec (στον Καναδά, στη Νότιο Αφρική και στις ΗΠΑ) ή Glivec (στην Αυστραλία, στην Ευρώπη και στη Λατινική Αμερική), με ερευνητικό όνομα STI-571, είναι ένας αναστολέας τυροσινικών κινασών. Χρησιμοποιείται για την θεραπεία πολλαπλών καρκίνων, όπως της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML), της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας (ALL), θετικές στο χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph+), πολλών τύπων γαστροστροφωματικών όγκων (GIST) και κατά της συστηματικής μαστοκύτωσης. Αναστέλλει την μεταλλαγμένη Bcr-Abl τυροσινική κινάση (ο σχετικός μηχανισμός θα περιγραφεί παρακάτω), την c-Abl, τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων PDGFR και την πρωτεϊνική κινάση c-Kit.

Τα παράγωγα των φαινυλαμινοπυριμιδινών αρχικά σχεδιάστηκαν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C. Το Imatinib, που είναι και αυτό ένα παράγωγο φαινυλαμινοπυριμιδίνης, σχεδιάστηκε μέσω ορθολογικού σχεδιασμού, αρχικά ως αναστολέας του αυξητικού παράγοντα PDGF.

Η πρώτη ένωση, "ένωση οδηγός", που κατέδειξε μια ανασταλτική δράση επί της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) ήταν μια φαινυλαμινοπυριμιδίνη (μαύρο χρώμα, Σχήμα 1, α). Στην πορεία της ερευνητικής προσπάθειας, για να βελτιστοποιηθεί η μοριακή δομή, παρατηρήθηκε ότι η προσάρτηση μιας 3-πυριδίνης (μπλέ χρώμα), στην 4-θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου οδήγησε σε εντυπωσιακή αύξηση της

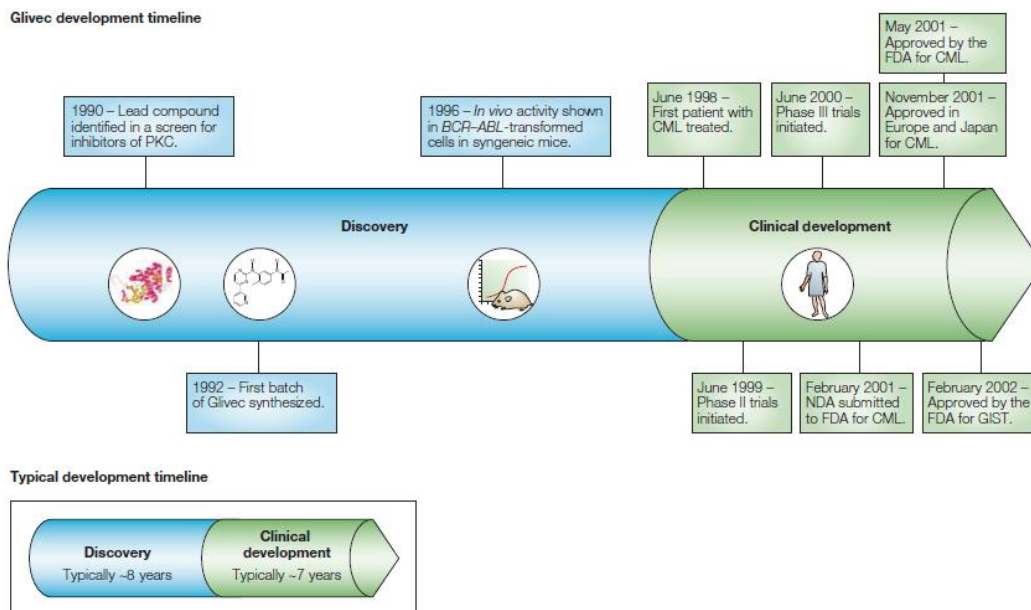
ανασταλτικής δράσης κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C (Σχήμα 1, a). Ακολούθως, η παρουσία ενός αμιδικού δεσμού (κόκκινο χρώμα) στον φαινυλικό δακτύλιο κατέδειξε αναστολή της δράσης των τυροσινικών κινασών, όπως είναι η κινάση Bcr-Abl (Σχήμα 1, b). Σε αυτό το σημείο, μια βασική παρατήρηση από την ανάλυση των σχέσεων δομής-δράσης ήταν ότι μια υποκατάσταση στη 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου κατήργησε εντελώς την ανασταλτική δράση επί της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Πράγματι, μολονότι η εισαγωγή μιας απλής μεθυλομάδας (μωβ χρώμα) οδήγησε στην απώλεια της δραστηριότητας έναντι της PKC, η ένωση κατέστη εξαιρετικά δραστική και εκλεκτική έναντι της Bcr-Abl (Σχήμα 1, c). Ωστόσο, η πρώτη σειρά των εκλεκτικών αναστολέων που παρασκευάστηκε αρχικά έδειξε κακή βιοδιαθεσιμότητα μέσω του στόματος και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Η προσάρτηση μιας ιδιαίτερα πολικής πλευρικής αλυσίδας (μιας N-μεθυλοπιπεραζίνης) βρέθηκε να βελτιώνει αισθητά τόσο τη διαλυτότητα, όσο και την από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα. Για να αποφευχθεί το μεταλλαξιογόνο δυναμικό των τμημάτων της ανιλίνης, ένας συνδέτης (μια μεθυλενομάδα) εισήχθη μεταξύ του τελικού βενζολικού δακτυλίου και του ατόμου του αζώτου. Η καλύτερη ένωση ήταν ένα παράγωγο μεθυλοπιπεραζίνης (πράσινο χρώμα) που ονομάστηκε αρχικά STI-571 (τώρα Imatinib), η οποία επελέγη ως η πιο ελπιδοφόρα για την κλινική ανάπτυξη ^[50] (Σχήμα 1, d).



Σχήμα 1: Απεικόνιση των δομικών σταδίων της χημικής βελτιστοποίησης

2.10.1 Το Imatinib κατά της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας

Στα λευχαιμικά κύτταρα θετικά στο χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, η Bcr-Abl πρωτεΐνη φωσφορυλιώνεται ανεξέλεγκτα. Το Imatinib, που διατίθεται από το 2001 από τη φαρμακευτική εταιρία "Novartis", χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής για την αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Επίσης, ένα χρόνο αργότερα εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία των γαστροστροφματικών όγκων (Εικόνα 35). Είναι ένας αναστολέας πολύ δραστικός και ταυτόχρονα εξαιρετικά εκλεκτικός με ιδανική φαρμακοκινητική.



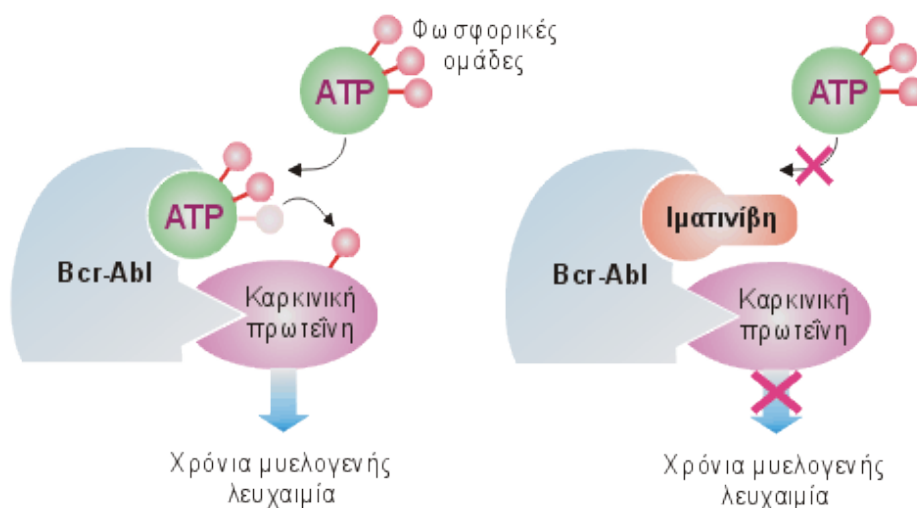
Εικόνα 35: Βασικά σημεία στην πορεία ανακάλυψης του Imatinib. Η κλινική εξέλιξη ήταν ιδιαίτερα γρήγορη, όπως υποδηλώνεται από τη σύγκριση με τους τυπικούς χρόνους ανακάλυψης και ανάπτυξης νέων φαρμάκων στο ένθετο. Η εφαρμογή του Imatinib ως νέο φάρμακο έγινε μόλις δυο χρόνια και εννιά μήνες μετά τη θεραπεία του πρώτου ασθενή με ΧΜΛ και η έγκριση του από τον FDA δόθηκε σε λιγότερο από τρεις μήνες.^[50]

Η λήψη της ημερήσιας δόσης ποικίλει όσον αφορά τον τύπο καρκίνου που χρησιμοποιείται και στη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία ανάλογα τη φάση στην οποία βρίσκεται ο ασθενής. Σε αντίθεση με τα περισσότερα αντικαρκινικά, τα οποία χορηγούνται ενδοφλεβίως, όπως η ιντερφερόνη-α, το Imatinib χορηγείται από το στόμα.^[51] Το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών άγγιζε το 31% πριν τη θεραπεία με Ιματινίβη, ενώ μετά από πενταετή θεραπεία το ποσοστό αυτό ανήλθε στο 89%.

2.10.2 Μηχανισμός δράσης του Imatinib

Η μεγάλη επιτυχία του Imatinib, σε αντίθεση με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα, έγκειται στο γεγονός ότι προσδένεται εκλεκτικά μόνο στο ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης χωρίς να αλληλεπιδρά με φυσιολογικά κύτταρα. Αναστέλλει την ανεξέλεγκτη δράση του Bcr-Abl ενζύμου, με αποτέλεσμα τα λευχαιμικά κύτταρα να σταματούν να αυξάνονται και να οδηγούνται στο φυσιολογικό θάνατο (απόπτωση). Επειδή η τυροσινική κινάση Bcr-Abl υπάρχει μόνο στα καρκινικά κύτταρα και όχι στα υγιή, το Imatinib λειτουργεί ως στοχευμένη θεραπεία. Κατ' επέκταση αποτέλεσε το εφαλτήριο για την ανάπτυξη νέων στοχευμένων καρκινικών θεραπειών.

Το Imatinib είναι ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης τύπου II και δεσμεύεται στην ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης. Ως μιμητής του ATP καταλαμβάνει το χώρο του ενεργού κέντρου της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης, δημιουργώντας αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κ.ά. Δρα ανταγωνιστικά με τα μόρια του ATP, τα οποία ως συνέπεια αυτού αδυνατούν να προσδεθούν σε ένα ήδη κατειλημμένο χώρο, μη προσφέροντας την πολύτιμη φωσφορική τους ομάδα σε μια πρωτεΐνη, προκειμένου να ενεργοποιηθεί. Έτσι, αναστέλλεται η ανεξέλεγκτη λειτουργία της και στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν εξελίσσεται η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (Εικόνα 36).

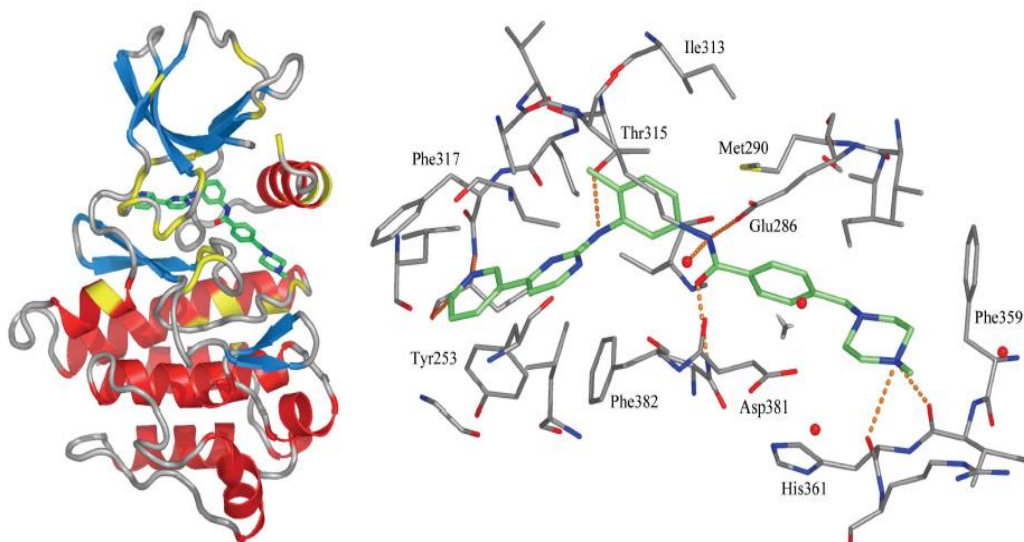


Εικόνα 36 : Μηχανισμός δράσης της Bcr-Abl και της αναστολής της από το Imatinib.

2.10.3 Αλληλεπιδράσεις *Imatinib* με την *Abl*

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία NMR έδωσαν μια υψηλής ανάλυσης (2.4 Å) μοριακή δομή του συμπλόκου *Imatinib*-*Abl*, αποδεικνύοντας ότι το *Imatinib* προσδένεται στη θέση πρόσδεσης του ATP, μέσα στο καταλυτικό κέντρο της SH₁ περιοχής της *Abl* κινάσης, στην οποία διαμόρφωση η θηλιά ενεργοποίησης εμποδίζει την πρόσδεση του ATP (η λεγόμενη DFG-out διαμόρφωση). Αυτή η ασυνήθιστη δέσμευση και αναστολή λειτουργίας είναι το κλειδί για το προφίλ επιλεκτικότητας του *Imatinib*, δεδομένου ότι μόνο αυτές οι κινάσες, για τις οποίες μια τέτοια διαμόρφωση είναι διαθέσιμη, αναστέλλονται.

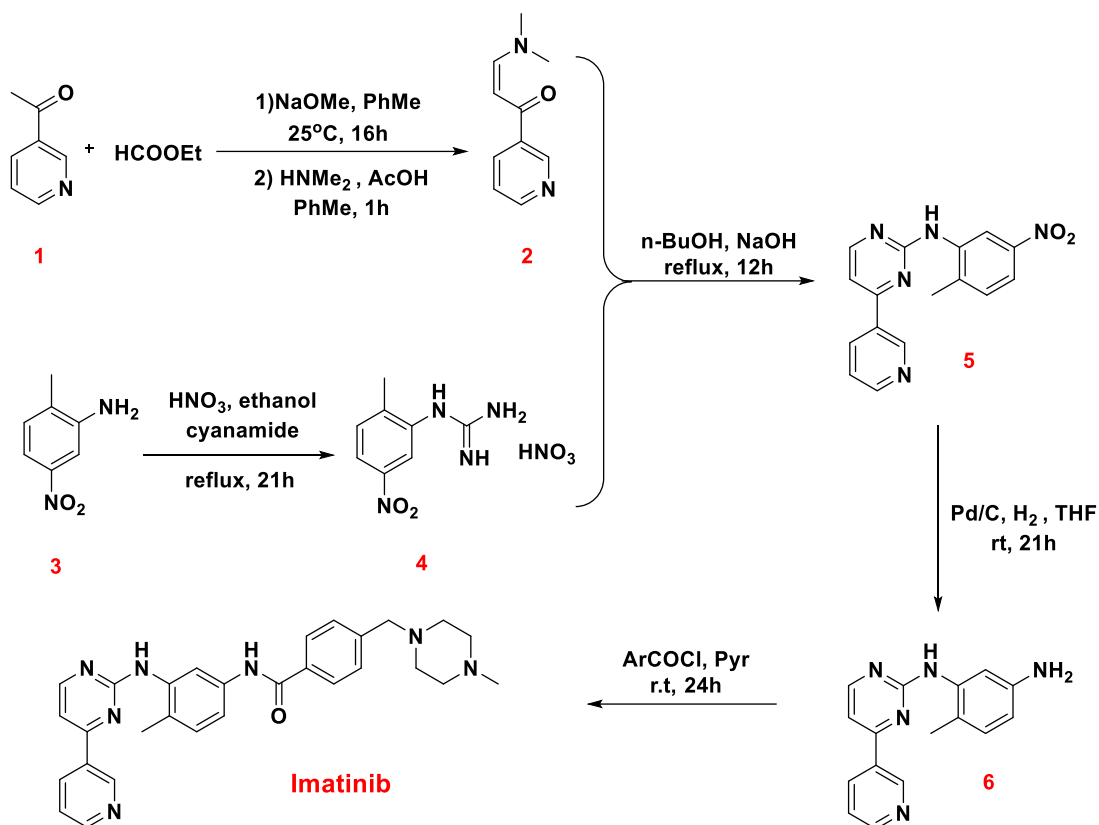
Στο σύμπλοκο *Abl*-*Imatinib* το φάρμακο εισέρχεται μεταξύ των N- και C-λοβών. Οι πυριδινικοί και πυριμιδινικοί δακτύλιοι εισέρχονται στην περιοχή, όπου συνήθως προσδένεται το ATP. Η υπόλοιπη ένωση εισέρχεται περισσότερο στον υδροφοβικό πυρήνα της κινάσης και καταλήγει μεταξύ της θηλιάς ενεργοποίησης και της αC έλικας, "παγιδεύοντας" την κινάση στην ανενεργή διαμόρφωση. Στην κρυσταλλική δομή, το *Imatinib* δεσμεύεται με την c-*Abl* μέσω ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου (6 δεσμοί υδρογόνου) και Van der Waals αλληλεπιδράσεων. Δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ : του N- της πυριδίνης και της NH της "ραχοκοκαλιάς" της Met318, της αμινοπυριμιδίνης και του -OH της πλευρικής αλυσίδας της Thr315, του αμιδικού NH και της καρβοξυλομάδας της πλευρικής αλυσίδας του Glu286, του καρβονυλίου και της NH της "ραχοκοκαλιάς" του Asp381 και της πρωτονιωμένης μεθυλοπιπεραζίνης με τις καρβονυλομάδες της "ραχοκοκαλιάς" της Ile360 και His361. Επίσης, οι Van der Waals λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση. Πιο συγκεκριμένα, ο πυριμιδινικός δακτύλιος εισέρχεται μεταξύ των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων της Val299, Ala269, Val256 και Phe382. Παράλληλα, η πυριδίνη περιβάλλεται από τις μη πολικές πλευρικές αλυσίδες της Leu248, Leu370, Met318 και Phe317 (Εικόνα 37).^{[52], [53]}



Εικόνα 37 : Το σύμπλοκο Abl-Imatinib. Τα κατάλοιπα αμινοξέων της πρωτεΐνης φαίνονται με γκρι χρώμα, οι καρβονυλομάδες με κόκκινο, τα άζωτα με μπλέ, και η δομή του φαρμάκου με πράσινο. Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με διακεκομμένες πορτοκαλί γραμμές.

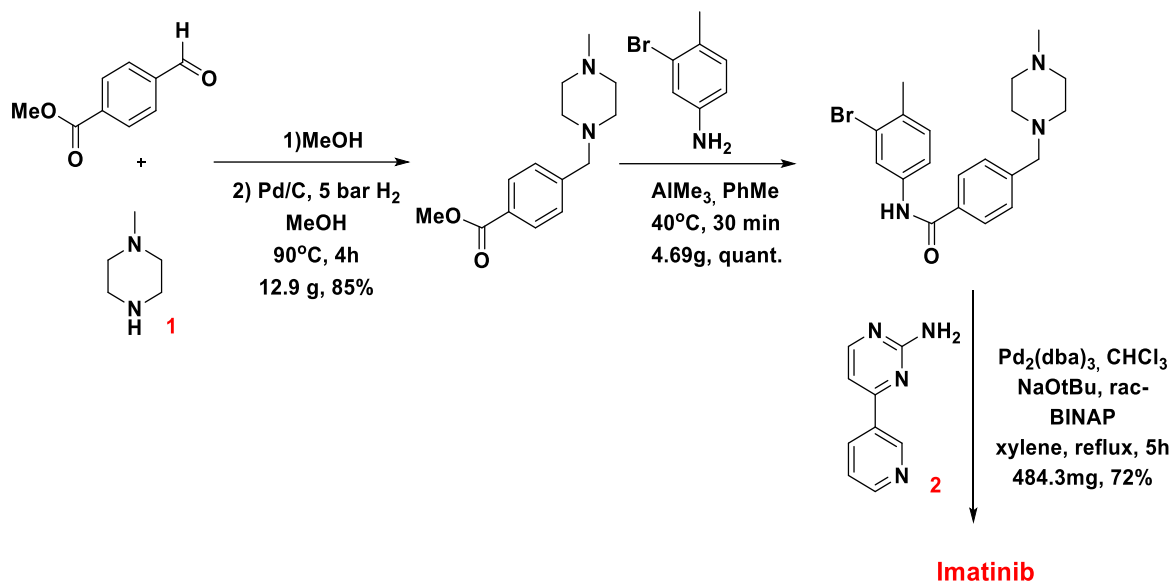
2.10.4 Σύνθεση του Imatinib

Η πρώτη σύνθεση του Imatinib δόθηκε στη δημοσιότητα από τον Zimmermann το 1993 (Σχήμα 2).^{[54][55]} Η ένωση κλειδί είναι μια φαινυλαμινοπυριμιδίνη (**5**) που προέρχεται από τη συμπύκνωση της εναμιμόνης (**2**), της 3-ακετυλοπυριδίνης (**1**) και του άλατος γουανιδίνης (**4**), το οποίο λαμβάνεται από την αντίδραση της 2-μεθυλο-5-νιτροανιλίνης (**3**) με το κυαναμίδιο. Ακολουθεί αναγωγή της (**5**) προς την αντίστοιχη αρυλαμίνη (**6**). Τέλος μετά το σχηματισμό του αμιδίου με το κατάλληλο βενζοϋλο χλωρίδιο, η εισαγωγή της N-μεθυλοπιπεραζίνης επιτεύχθηκε με μια SN_2 υποκατάσταση στο χλωρίδιο του οξέος.



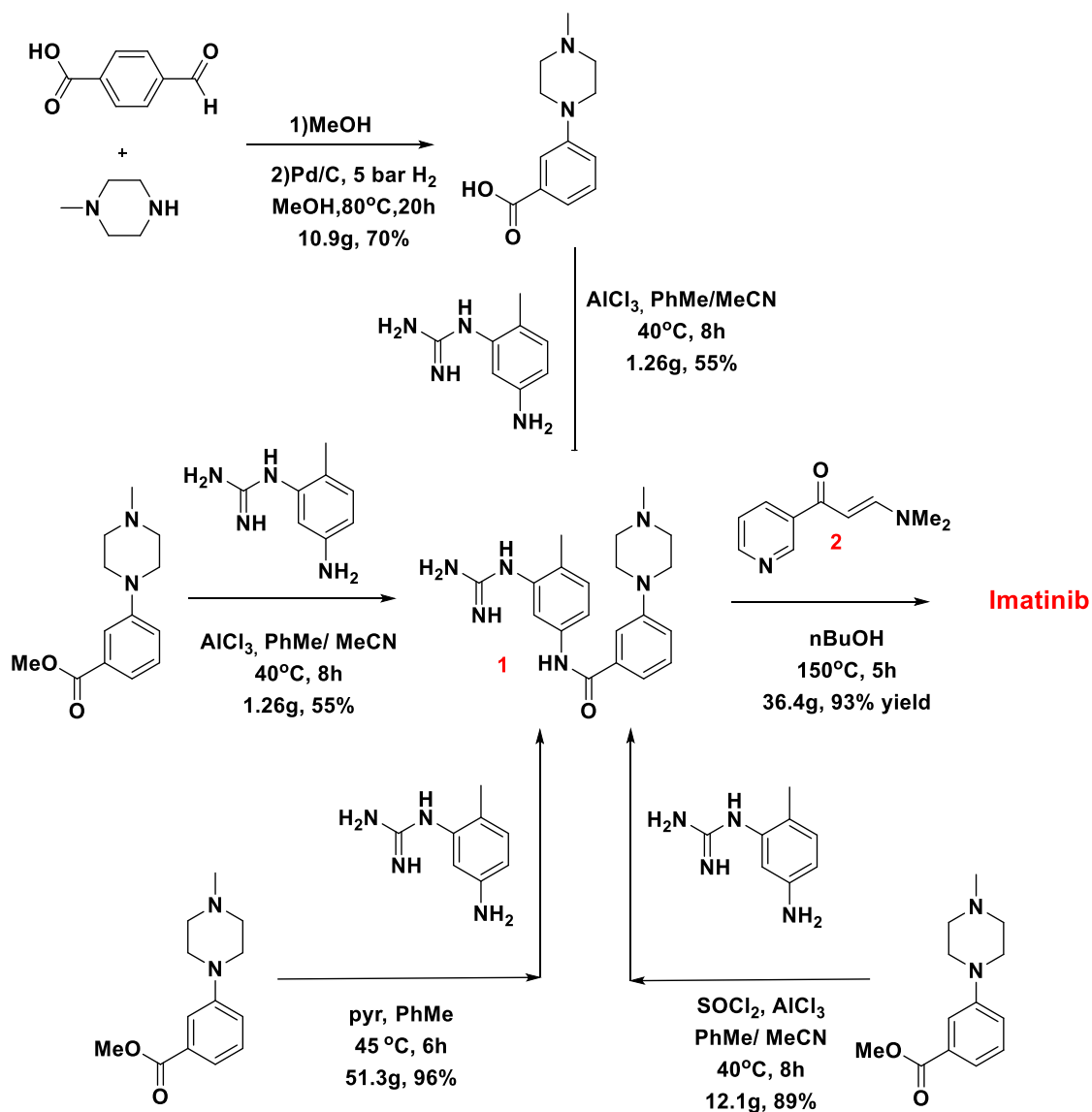
Σχήμα 2 : Σύνθεση του Imatinib κατά Zimmermann

Η φαρμακευτική εταιρία Novartis, βασισμένη στη συνθετική πορεία του Zimmermann, προσπάθησε να κατοχυρώσει μια σειρά εναλλακτικών στρατηγικών για τη σύνθεση του Imatinib. Για παράδειγμα, η N-μεθυλοπιπεραζίνη (**1**) προσαρτήθηκε ωρίς στη σύνθεση χρησιμοποιώντας μια αναγωγική αμίνωση (Σχήμα 3). Το Imatinib στη συνέχεια σχηματίζεται από τη δημιουργία αμιδικού δεσμού, ακολουθούμενη από μια σύζευξη Buchwald-Hartwig με την αμινοπυριμιδίνη (**2**). Παρά την υψηλή απόδοση στην συνθετικής αυτής πορείας (72%), το προϊόν περιείχε απροσδιόριστα ισομερή που για το διαχωρισμό τους απαιτούνταν ανάστροφης φάσης παρασκευαστική HPLC. Συνεπώς, η διαδρομή αυτή δεν ήταν εφαρμόσιμη σε βιομηχανική κλίμακα.^[56]



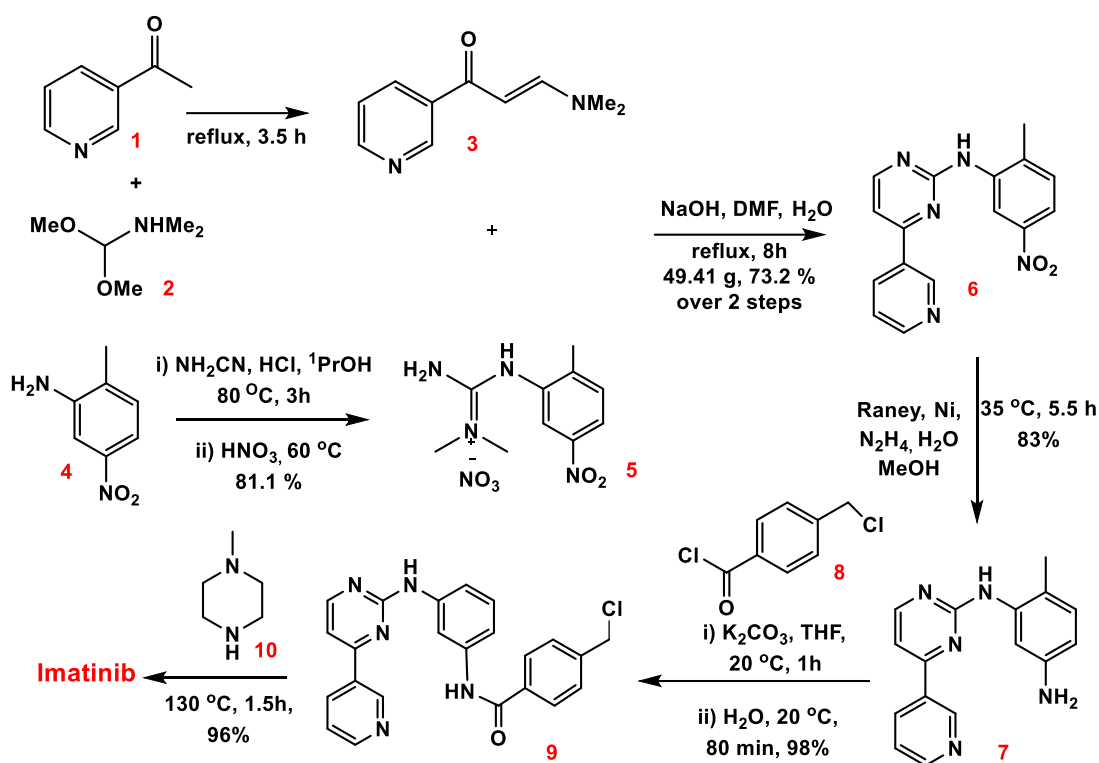
Σχήμα 3: Σύνθεση του Imatinib από τη Novartis χρησιμοποιώντας μια σύζευξη Buchwald-Hartwig με την αμινοπυριμιδίνη (2).

Εναλλακτικές πορείες από τη Novartis χρησιμοποιούν την υποκατεστημένη γουανιδίνη (1) η οποία στη συνέχεια συμπυκνώνεται με την εναμινόνη (2) για να σχηματιστεί το Imatinib. Αυτή η μέθοδος είναι κοινή σε πολλές άλλες εναλλακτικές πορείες και συνιστά έναν απλό τρόπο σχηματισμού του λειτουργικού πυριμιδινικού πυρήνα (Σχήμα 4).^[56]



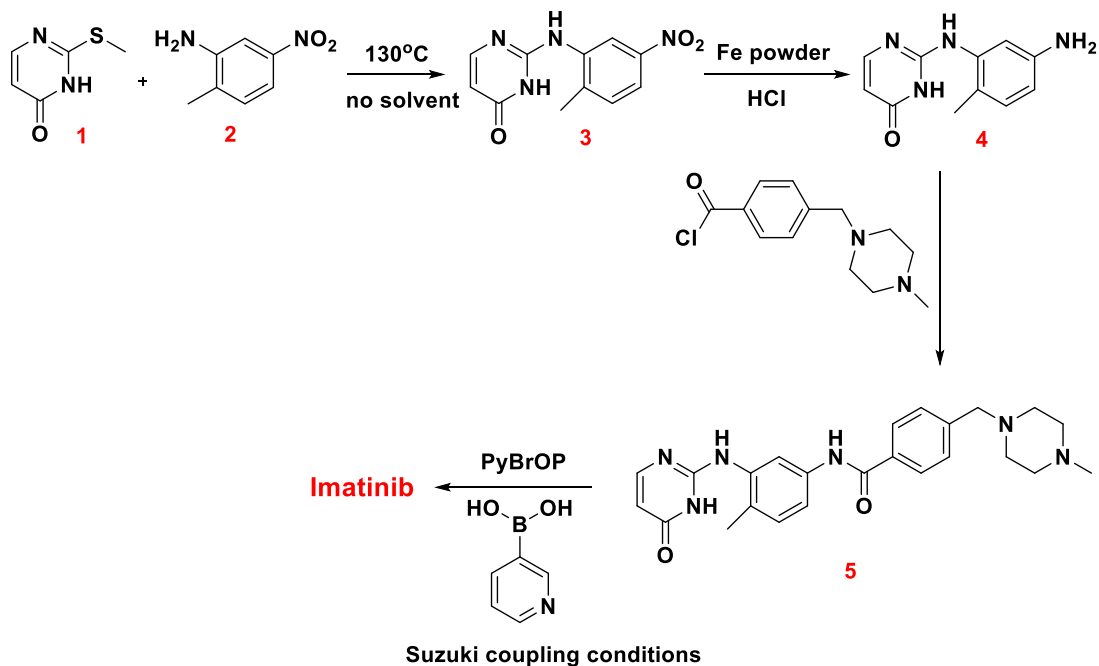
Σχήμα 4: Σύνθεση του Imatinib από τη Novartis χρησιμοποιώντας γουανιδίνη (1)

Σε μία περαιτέρω τροποποίηση για τη σύνθεση του Imatinib (Σχήμα 5), ο Szczerpek και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η ανταλλαγή ιόντων του υδροχλωρικού άλατος του (5) προς το λιγότερο διαλυτό νιτρικό άλας (5), δούλεψε περισσότερο αποτελεσματικά κατά την διάρκεια της αντίδρασης συμπύκνωσης (3 + 5 → 6). Η ενόνη (3) σχηματίστηκε σε ένα μόνο στάδιο, στην περίπτωση αυτή χωρίς διαλύτη. Μια ακόμη εναλλακτική λύση αναγωγής της (6) πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας υδραζίνη πάνω σε καταλύτη Ni. Ακολουθεί ο σχηματισμός αμιδικού δεσμού μεταξύ (7) και (8) και τέλος η προσάρτηση της (10) στην (9).



Σχήμα 5: Σύνθεση του Imatinib κατά Szczepek

Μια σύνθεση, λιγότερο πολύπλοκη και με λιγότερα στάδια έχει κατοχυρωθεί για το Imatinib με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τον Grindek (Σχήμα 6). Αντίδραση μεταξύ της ένωσης (**1**) και της 2-μεθυλ-5-νιτροανιλίνης (**2**) οδήγησε στο παράγωγο νιτρο-πυριμιδινόνης (**3**), το οποίο στη συνέχεια ανάγεται προς την αντίστοιχη αμίνη (**4**). Αντίδραση της τελευταίας με το κατάλληλο ακυλοχλωρίδιο έδωσε την ένωση (**5**), η οποία μετά από ενεργοποίηση με PyBrOP, υποβλήθηκε σε μια σύζευξη Suzuki με 3-πυριδινοβορονικό οξύ δίνοντας το Imatinib.

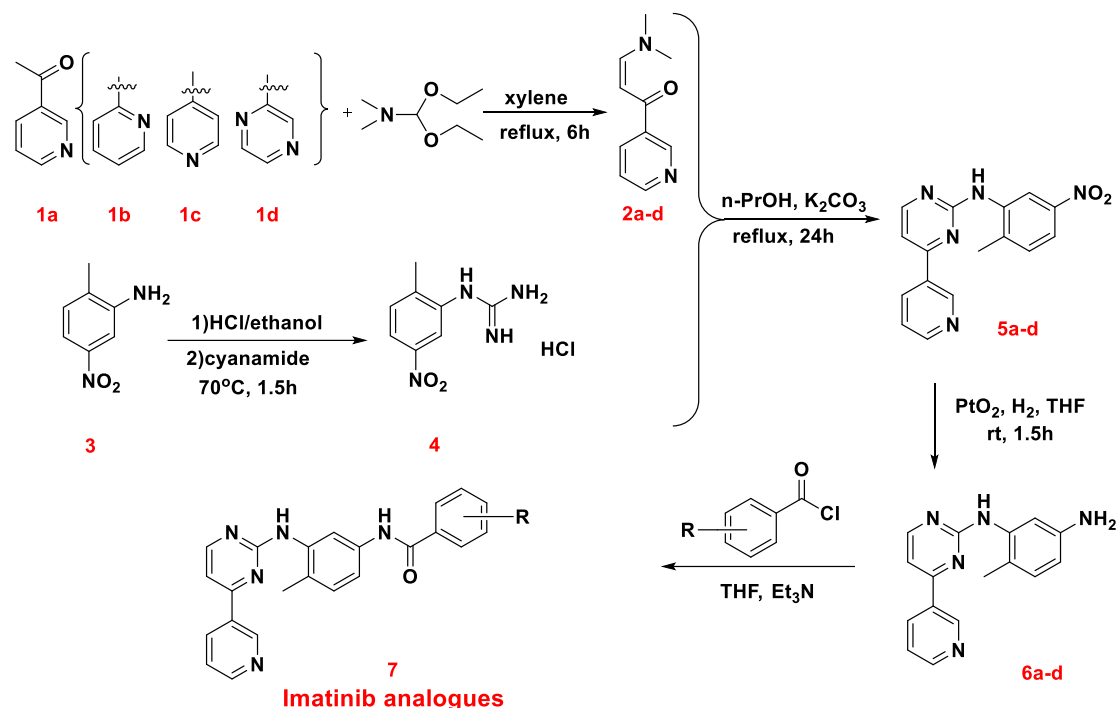


Σχήμα 6: Σύνθεση του Imatinib κατά Grindek

Μια πολύ βελτιστοποιημένη μέθοδος για τη σύνθεση του Imatinib και αναλόγων αυτού σε πολύ υψηλές συνολικές αποδόσεις περιγράφεται από τους SkobridisK., TheodorouV. και συνεργατών. Η συνθετική αυτή πορεία εφαρμόστηκε και στο εργαστήριο μας για τη σύνθεση αναλόγων του Imatinib. Τα πιο κρίσιμα βήματα για τη συνθετική στρατηγική είναι ο σχηματισμός του ενδιάμεσου άλατος γουανιδίνης (**4**) και η καταλυτική αναγωγή της νίτρο ένωσης (**5a-d**) στην πρωτοταγή αρυλαμίνη (**6a-d**). Σε σύγκριση με τη συνθετική πορεία του Zimmerman, όταν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της ένωσης (**4**) χωρίς διαλύτη, με τη χρήση περίσσειας τηγμένου κυαναμιδίου (mp 45°C) το επιθυμητό άλας (**4**) ελήφθη σχεδόν ποσοτικά (98%) σε μόλις 1.5 ώρες, αντί των 20 ωρών, κερδίζοντας μια σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης. Ακολούθησε συμπύκνωση της εναμιμόνης (**2a-d**) με το άλας γουανιδίνης (**4**) με θέρμανση υπό την παρουσία βάσης, για την κατασκευή του πυριμιδινικού δακτυλίου. Η χρήση των K₂CO₃ αντί για NaOH, ως βάση, και σε n-PrOH έδωσε καθαρά προϊόντα (**5a-d**). Χρησιμοποιώντας H₂ και καταλύτη Adams (PtO₂) οι αρυλαμίνες (**6a-d**) ελήφθησαν ποσοτικά από τις αντίστοιχες νίτρο ενώσεις αποφεύγοντας το σχηματισμό νιτροζο- και υδροξυλαμινο-ενδιαμέσων, τα οποία σχηματίζονται όταν εφαρμόζεται η προσέγγιση του Zimmermann. Τέλος, οι πρωτοταγείς αρυλαμίνες (**6a-d**) συζεύχθηκαν με κατάλληλα υποκατεστημένο βενζοϋλοχλωρίδιο, ακολουθώντας την κοινή μέθοδο σχηματισμού αμιδικού δεσμού

που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του Imatinib. Είναι μια σύνθεση 5 σταδίων με υψηλή ολική απόδοση (58-63%), υψηλή αναλυτική καθαρότητα (>99.5%) ενώ παράλληλα εξοικονομείται χρόνος και διαλύτες κατά τον καθαρισμό των ενώσεων.^[58]

(Σχήμα 7)



Σχήμα 7: Σύνθεση Imatinib και αναλόγων αυτού κατά Skobridis K. και Theodorou V.

Εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του Imatinib προτάθηκαν επίσης από τη Natco Pharmaceuticals, τους Cipla, Zhejiang, Leonetti, Liu και πολλούς άλλους χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες, αρχικές ενώσεις, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία, τη σειρά των επιμέρους σταδίων, βελτιώνοντας έτσι την απόδοση και τους χρόνους των αντιδράσεων.^[57]

2.11 Αντίσταση στο Imatinib

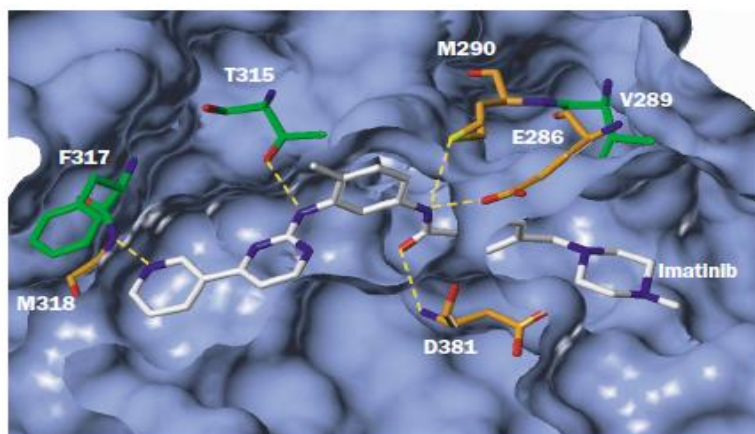
Παρά το γεγονός ότι το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης των στοχευμένων θεραπειών είναι εντυπωσιακό, η ανθεκτικότητα της απόκρισης είναι περιορισμένη λόγω εμφάνισης αντίστασης στα φάρμακα. Ο μηχανισμός της αντίστασης στα φάρμακα μπορεί να είναι είτε ενδογενής (τροποποίηση του αρχικού στόχου) ή εξωγενής (αντισταθμιστική σηματοδότηση μέσω άλλων οδών και φαρμακοκινητικοί παράγοντες που μειώνουν κατά κύριο λόγο τη συγκέντρωση του φαρμάκου στα στοχευόμενα κύτταρα). Οι κοινοί ενδογενείς μηχανισμοί αντίστασης, για να καταργήσουν την αποτελεσματικότητα των αναστολέων-φαρμάκων των κινασών, περιλαμβάνουν ενίσχυση, υπερέκφραση ή επιγενετική ενεργοποίηση του γονιδίου-

στόχου, καθώς και την ανάπτυξη δευτερογενών μεταλλάξεων. Η αντίσταση των φαρμάκων σε σημειακές μεταλλάξεις προκύπτουν συχνά σε περιοχές της πρωτεΐνης, κυρίως εντός του ενεργού κέντρου, που εμπλέκονται είτε σε αλληλεπιδράσεις με φάρμακα είτε στις μεταβάσεις μεταξύ ενεργών και ανενεργών κινασών. Αυτές οι μεταλλάξεις τυπικά αποδυναμώνουν επιλεκτικά τη συγγένεια δέσμευσης του φαρμάκου, αλλά όχι του ATP με τη στοχευμένη κινάση. Ως εκ τούτου οι μεταλλάξεις, που εμφανίζουν ανθεκτικότητα τα φάρμακα, σε διάφορες κινάσες μοιράζονται κάποια κοινά στοιχεία για το μηχανισμό αντίστασης.

Οι μεταλλάξεις του gatekeeper καταλοίπου -ονομάζεται έτσι επειδή το μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος στη θέση αυτή προσδιορίζει τη σχετική προσβασιμότητα ενός υδρόφοβου θύλακα που βρίσκεται δίπλα στη θέση πρόσδεσης του ATP- είναι οι πιο συχνές στις οποίες τα φάρμακα εμφανίζουν ανθεκτικότητα. Η πρόσβαση σε αυτή τη θέση είναι σημαντική για πολλούς αναστολείς κινασών επειδή οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν εκεί είναι ζωτικής σημασίας για τη συγγένεια σύνδεσης του αναστολέα. Αυτές οι μεταλλάξεις σταθεροποιούν κυρίως την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης, οδηγώντας σε αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης του ATP, τροποποιώντας το δυναμικό μεταξύ ενεργών και ανενεργών διαμορφώσεων. Για να ξεπεραστεί η αντίσταση στην gatekeeper μετάλλαξη, πρόσθετες αλληλεπιδράσεις με την ανενεργή κινάση πρέπει να εισαχθούν για να αντισταθμιστεί η αυξανόμενη ενέργεια μετατροπής που απαιτείται κατά τη μετάβαση από την ενεργή στην ανενεργή διαμόρφωση, εάν ο αναστολέας είναι σχεδιασμένος για να στοχεύσει την ανενεργό διαμόρφωση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μοριακού βάρους, υψηλή λιποφιλικότητα και φτωχότερες φαρμακευτικές ιδιότητες. Νέες χημικές ενώσεις που στοχεύουν στη μεταλλαγμένη ενεργή διαμόρφωση θα πρέπει να παρασκευαστούν για να επιτευχθεί αποτελεσματικότερη αναστολή των μεταλλαγμένων ενεργών κινασών.^[59]

Σε κλινικές δοκιμές το Imatinib ήταν ανεκτό από την πλειοψηφία των ασθενών και απορροφάται άμεσα όταν λαμβάνεται από το στόμα. Ωστόσο, ενώ το 85% των ασθενών στην χρόνια φάση έχουν πλήρη απόκριση στο Imatinib, μερικοί ασθενείς υποτροπιάζουν. Η υποτροπή, η οποία είναι πιο συχνή στην επιταχυνόμενη και κρίσιμη φάση της ασθένειας, συμβαίνει συνήθως εξαιτίας της εμφάνισης κλώνων οι οποίοι εκφράζουν μεταλλαγμένες μορφές της Bcr-Abl πρωτεϊνικής κινάσης, όπου υποκατεστημένα αμινοξέα οδηγούν σε μειωμένη ευαισθησία απέναντι στο Imatinib.

Η αντίσταση στο Imatinib συνδέεται με μεταλλάξεις σε όλη την περιοχή της κινάσης, συμπεριλαμβανομένων του βρόγχου ενεργοποίησης, τον P-βρόγχο και τη hinge περιοχή που συνδέει τον C- και N- τερματικό λοβό του πεδίου κινάσης για να σχηματίσουν το θύλακα σύνδεσης του ATP.

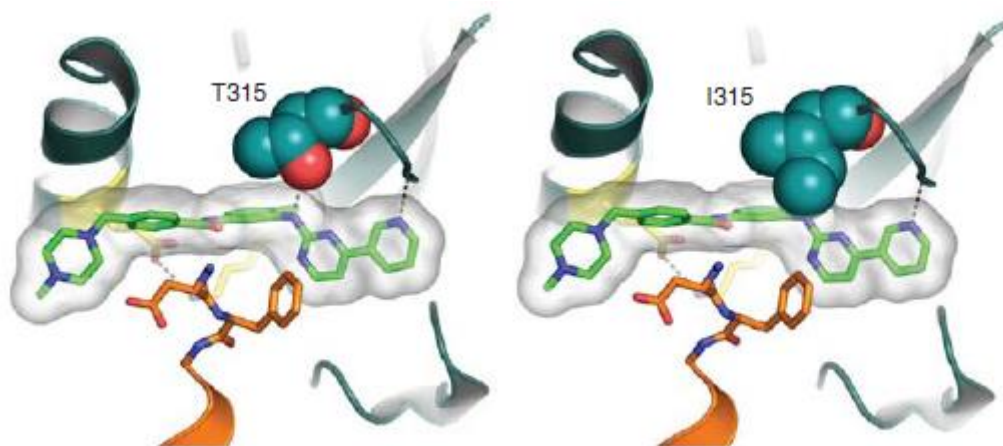


Εικόνα 38: Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν την θέση πρόσδεσης του Imatinib στην Abl. Με πράσινο φαίνονται οι άνθρακες στις θέσεις μεταλλάξεων, το Imatinib με λευκό και τα διατηρημένα αμινοξέα με πορτοκαλί. Η μοριακή επιφάνεια (μπλε) αντιπροσωπεύει τις Van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Imatinib και της πρωτεΐνης. Οι δεσμοί υδρογόνου αντιπροσωπεύονται με διακεκομμένες κίτρινες γραμμές.

Έχουν ταυτοποιηθεί 50 διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις. Ωστόσο πολλές από αυτές είναι σχετικά σπάνιες και οι πιο κοινές που επηρεάζουν τα κατάλοιπα Gly250, Tyr253, Glu255, Thr315, Met351 και Phe359, αντιπροσωπεύουν 60-70% του συνόλου των μεταλλάξεων.^[60] Έχει αποδειχθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X ότι το Imatinib αναστέλλει την Abl και την Bcr-Abl, δεσμευόμενο στην DFG-out διαμόρφωση της κινάσης. Αυτός ο τρόπος δέσμευσης εξηγεί σε κάποιο βαθμό γιατί οι ασθενείς με μεταλλάξεις στον τομέα της κινάσης της Bcr-Abl είναι λιγότερο ευαίσθητοι στο Imatinib.^[47]

- ❖ **Μετάλλαξη T315I :** Το κατάλοιπο Thr315 στην Abl είναι το επονομαζόμενο κατάλοιπο gatekeeper. Όπως προαναφέρθηκε, το μέγεθος του σε αυτήν την θέση στις κινάσες καθορίζει πόσο εύκολα μπορεί να προσεγγιστεί ο υδρόφοβος θύλακας ειδικά στην ενεργό μορφή (DFG-in). Στην περίπτωση της δέσμευσης του Imatinib, η ομάδα υδροξυλίου της Thr 315 σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα μεταξύ της πυριμιδίνης και του φαινυλικού δακτυλίου του Imatinib. Έτσι, μετάλλαξη της θρεονίνης οδηγεί στην απώλεια

αυτού του δεσμού υδρογόνου, ενώ τα μεγαλύτερου μεγέθους κατάλοιπα στη θέση αυτή (ισολευκίνη, ασπαρτικό οξύ, ασπαραγίνη) μπορεί να οδηγήσουν σε στερικές συγκρούσεις, αποτρέποντας την πρόσδεση του Imatinib με μεταλλαγμένες δομές της Abl.^[61] (Εικόνα 39)



Εικόνα 39 : Απώλεια ενός δεσμού υδρογόνου κατά την Thr315Ile μετάλλαξη. Ο επιπλέον μεγαλύτερος όγκος της αιθυλομάδας της Ισολευκίνης οδηγεί σε στερεοχημική σύγκρουση με το φαινυλικό δακτύλιο του Imatinib.

- ❖ **Μεταλλάξεις στον P-βρόγχο :** Ο P-βρόγχος της κινάσης που συνήθως υιοθετεί μια εκτεταμένη διαμόρφωση στις ενεργές κινάσες αλληλεπιδρώντας με τις φωσφορικές ομάδες του ATP, φαίνεται ότι αναδιπλώνεται στο Imatinib γύρω από τις ομάδες πυριδίνης και πυριμιδίνης. Σημειακές μεταλλάξεις στην Abl που αποσταθεροποιούν την ανενεργό διαμόρφωση του P-βρόχου και το μοτίβο DFG σε σχέση με την καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση αυξάνουν την ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου Imatinib-Abl, και ως εκ τούτου μειώνεται η συγγένεια πρόσδεσης του Imatinib. Αυτό οδηγεί σε μια μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ της ανενεργής και ενεργής κατάστασης και στην αποκατάσταση της δραστηριότητας Bcr-Abl κινάσης. Παραδείγματα μεταλλάξεων ανθεκτικών στο Imatinib που αποσταθεροποιούν την ανενεργό διαμόρφωση είναι εκείνες που επηρεάζουν υπολείμματα Glu255, Tyr253 και Gly250 στον P- βρόχο.^[60]

Η απώλεια της ευαισθησίας στο Imatinib σε άλλες μεταλλάξεις, όπως Glu255Lys, είναι αποτέλεσμα απώλειας δεσμών υδρογόνου μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας του γλουταμινικού οξέος και της υδροξυλικής ομάδας της Tyr257 και της αμινομάδας της Lys247, εκ των οποίων και οι δυο εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της Abl στην οποία προσδένεται το Imatinib.^[52]

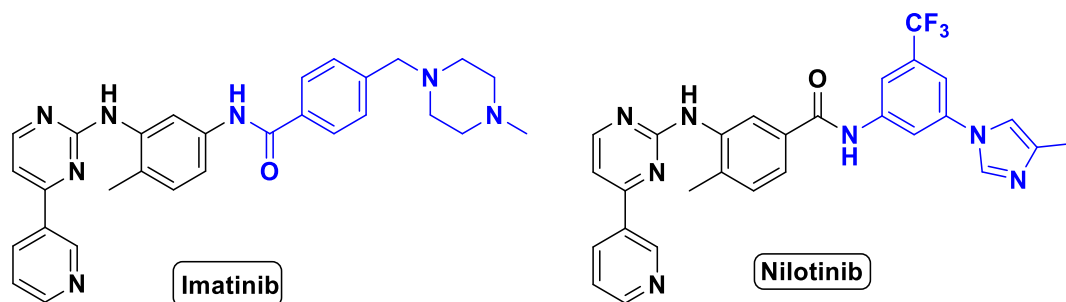
Ένας αριθμός περισσότερων ισχυρών αναστολέων της Abl και της μεταλλαγμένης Bcr-Abl κινάσης, δεύτερης και τρίτης γενιάς, έχουν αναπτυχθεί και έχει επιτευχθεί κλινική επιτυχία σε ασθενείς με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία που εμφάνισαν αντίσταση στο Imatinib, συμπεριλαμβανομένων των Dasatinib (2006), Nilotinib (2007), Bosutinib (2012) και Ponatinib (2012).

2.12 Nilotinib

Το Nilotinib (AMN107, εμπορική ονομασία Tasigna), στη μορφή του υδροχλωρικού άλατος, είναι ένας μικρού μοριακού βάρους αναστολέας τυροσινικών κινασών δεύτερης γενιάς, εγκεκριμένος από τον FDA το 2007 για τη θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, στην περίπτωση που οι ασθενείς κατά τη θεραπεία τους εμφανίζουν αντίσταση στο Imatinib. Χρησιμοποιείται ως θεραπεία πρώτης γραμμής κατά των γαστροστροφματικών όγκων (GISTs). Ερευνάται επίσης η χορήγησή του σε μικρές δόσεις για τη θεραπεία της νόσου του Parkinson, του Alzheimer και του Huntington. Εκτός από την Bcr-Abl πρωτεϊνική κινάση, αναστέλλει ισχυρά την c-Abl, την c-Kit κινάση και τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων PDGFR.^[62]

Είναι ένα παράγωγο της φαινυλαμινο-πυριμιδίνης και λογικά σχεδιασμένο με βάση την κρυσταλλική δομή του Imatinib και την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της δραστηριότητας αυτού σε σχέση με την αναστολή της Bcr-Abl κινάσης. Εξέταση των χωρικών αλλαγών στον τομέα της Abl κινάσης που επιτρέπουν τη δέσμευση του Imatinib οδήγησε τους ερευνητές να υποθέσουν ότι η επιλεκτικότητα και η ισχύς του Imatinib για την Bcr-Abl κινάση θα μπορούσε να βελτιωθεί με την πλήρωση της θέσης σύνδεσης του Imatinib πιο αποτελεσματικά με αξιοποίηση της λιποφιλικότητας του. Βάση αυτής της λογικής, το Nilotinib σχεδιάστηκε διατηρώντας την πρόσδεση στην ανενεργή διαμόρφωση της Abl κινάσης, ενσωματώνοντας παράλληλα εναλλακτικές ομάδες πρόσδεσης προς την

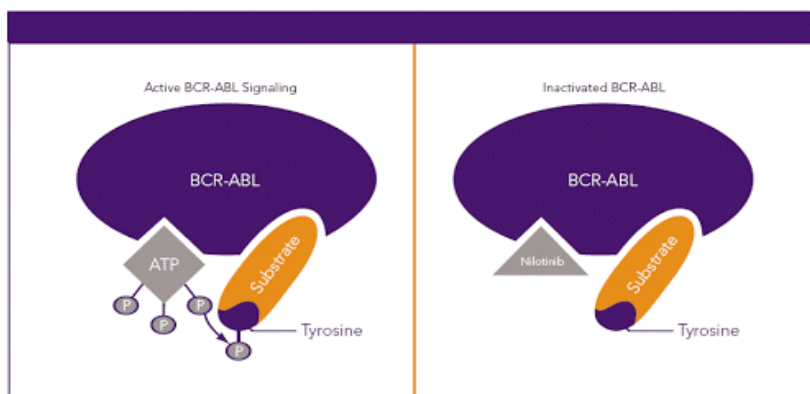
χαρακτηριστική ομάδα της N-μεθυλοπιπεραζίνης του Imatinib και διατηρώντας το φαρμακοφόρο αμίδιο, ανεστραμμένο αυτή τη φορά, ώστε να εξασφαλιστούν οι δεσμοί υδρογόνου με την Glu286 και την Asp381. Η υποκατάσταση της N-μεθυλοπιπεραζίνης του Imatinib με ένα φαινύλιο, που φέρει μια τριφθορομεθυλο-ομάδα και ένα ιμιδαζολικό δακτύλιο στη δομή του Nilotinib, συμβάλλει σημαντικά στη δραστηριότητα του Nilotinib^[64] (Σχήμα 8).



Σχήμα 8 : Οι δομές των Imatinib και Nilotinib. Με μπλέ χρώμα απεικονίζεται η διαφοροποίηση τους.

2.12.1 Μηχανισμός δράσης του Nilotinib και αλληλεπιδράσεις με την Abl κινάση

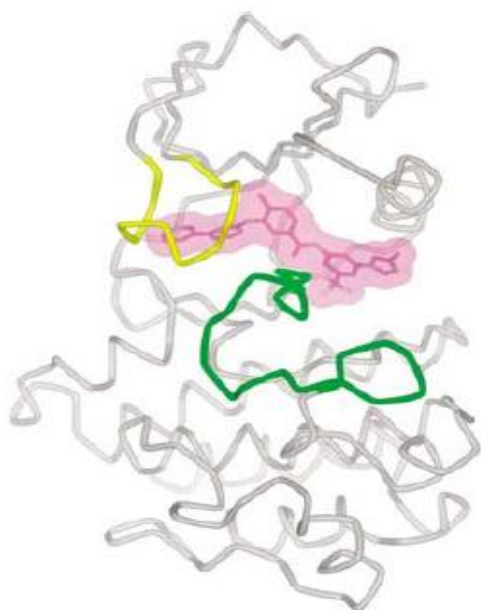
Όπως το Imatinib, έτσι και το Nilotinib είναι ένας αδενινικός μιμητής τύπου II. Δεσμεύεται στην ανενεργή (DFG-out) διαμόρφωση της κινάσης στη θέση πρόσδεσης του ATP αναστέλλοντας την αυτοφωσφορύλιωση της Bcr-Abl (Εικόνα 40). Είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της Bcr-Abl κινάσης ο οποίος παρουσιάζει 10 με 30 φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με το Imatinib στην αναστολή της δραστηριότητας της Bcr-Abl τυροσινικής κινάσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που εκφράζουν την Bcr-Abl.



Εικόνα 40 : Μηχανισμός δράσης του Nilotinib

Εκτός του ότι είναι σχεδιασμένο για να δεσμεύεται πιο σφιχτά στην πρωτεΐνη Bcr-Abl σε μία προσπάθεια να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα, το Nilotinib αποσκοπεί στο να παρακάμψει την αντίσταση που προκαλείται από μεταλλάξεις. Αναστέλλει 32 από τις 33 μεταλλαγμένες μορφές της Bcr-Abl, με μοναδική εξαίρεση τη σημειακή μετάλλαξη T315I.^[60] Όπως και στο Imatinib, η έλλειψη της δραστηριότητας έναντι του μεταλλαγμένου T315I οφείλεται στην απώλεια του υδροξυλίου πλευρικής αλυσίδας της θρεονίνης και η επιπλέον μεθυλομάδα της ισολευκίνης αναστέλλει τη δέσμευση.^[63]

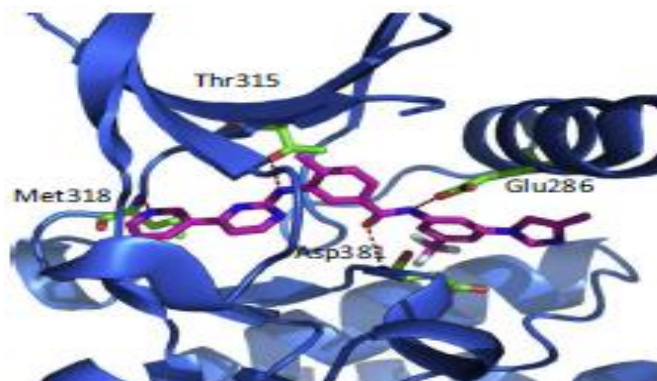
Όπως το Imatinib, το Nilotinib δεσμεύεται με την ανενεργό διαμόρφωση της τυροσινικής κινάσης Abl, με τον P-βρόχο να αναδιπλώνεται πάνω από θέση πρόσδεσης του ATP και τον βρόχο ενεργοποίησης να μπλοκάρει τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος προκειμένου να ανασταλεί η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου (Εικόνα 41).^[63]



Εικόνα 41: Το Nilotinib δεσμευμένο στην ανενεργή μορφή της κινάσης. Ο πλούσιος σε γλυκίνη P-βρόχος απεικονίζεται με κίτρινο χρώμα και ο βρόχος ενεργοποίησης με πράσινο.

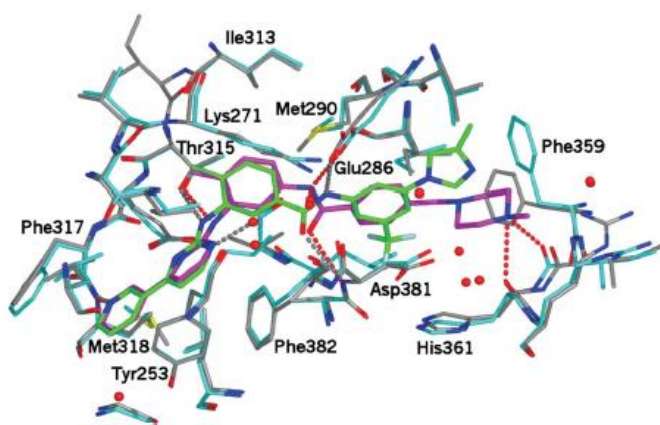
Το Nilotinib σχηματίζει τέσσερις δεσμούς υδρογόνου με τον τομέα της Abl κινάσης. Αυτοί σχηματίζονται μεταξύ: του ατόμου N- της πυριδίνης και της NH της Met318 στη "ραχοκοκαλιά", της ανιλίνο-NH και του -OH της πλευρικής αλυσίδας της Thr315, του αμιδικού NH και της καρβοξυλικής ομάδας της πλευρικής αλυσίδας του Glu286 και του αμιδικού καρβουλίου με τη NH της Asp381 στη "ραχοκοκαλιά", επάγοντας την ανενεργή διαμόρφωση. Ωστόσο, οι λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις είναι επίσης σημαντικές για τη συγγένεια, όπως η ασθενής ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των φθοριών της τριφθορομεθυλο-ομάδας του Nilotinib και της πολωμένης

καρβονυλικής ομάδας της Asp381 στη "ραχοκοκαλιά". Ο ιμιδαζολικός δακτύλιος δε φαίνεται να συμμετέχει στην δραστικότητα της αναστολής της Bcr-Abl, ενώ κρυσταλλογραφικές μελέτες υποδεικνύουν ότι εκτίθεται στο διαλύτη (Εικόνα 42).^[63]



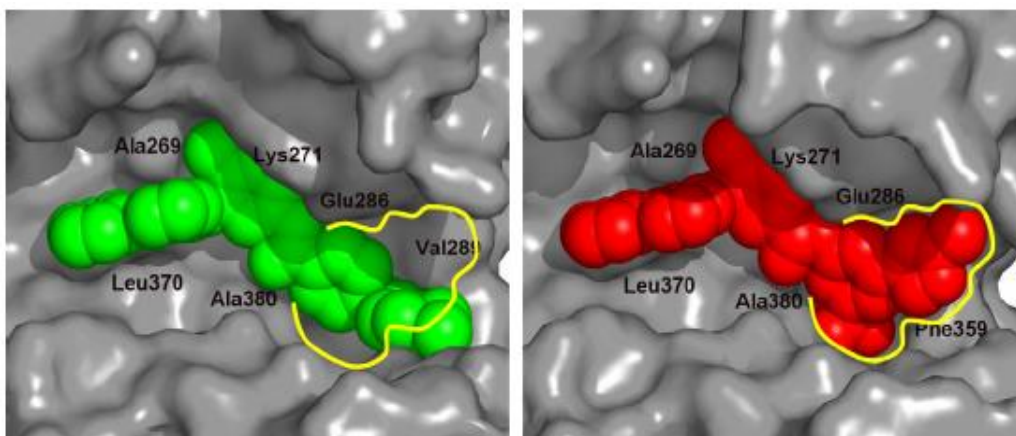
Εικόνα 42: Το σύμπλοκο Nilotinib-Abl. Με μπλέ χρώμα φαίνεται η περιοχή της κινάσης, με μωβ το Nilotinib και με διακεκομμένες κόκκινες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.

Παρά το γεγονός ότι το Imatinib σχηματίζει έξι δεσμούς υδρογόνου με τον τομέα της κινάσης, ενώ το Nilotinib μόλις τέσσερις (Εικόνα 43), κρυσταλλογραφικές μελέτες δείχνουν ότι μικρές διαφορές στον τρόπο σύνδεσης και μια καλύτερη στερική συμπληρωματικότητα στην Abl ευθύνονται για την αυξημένη δραστικότητα του Nilotinib, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 44.



Εικόνα 43:

Συγκρυστάλλωση του Imatinib (μωβ χρώμα) και του Nilotinib (πράσινο) στον τομέα της Abl κινάσης. Οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου φαίνονται με διακεκομμένες γραμμές.



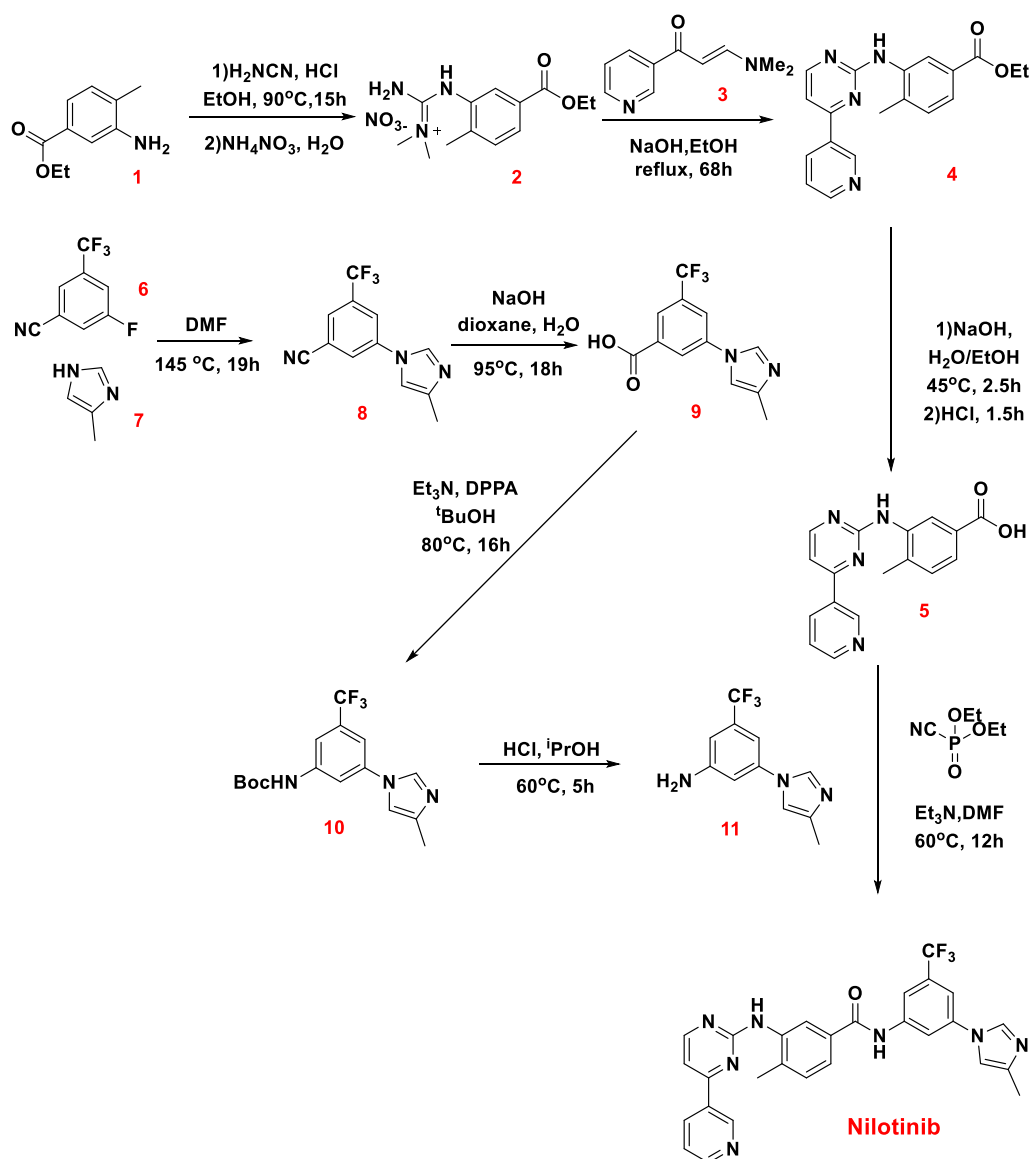
Εικόνα 44 : Τοπολογικό ταίριασμα των δυο φαρμακευτικών σκευασμάτων στην Abl κινάση. Σύγκριση της επιφάνειας δέσμευσης της Abl κινάσης, με δεσμευμένο Imatinib (πράσινο, αριστερά) και Nilotinib (κόκκινο, δεξιά). Η προσιτή επιφάνεια της Abl εμφανίζεται με γκρι χρώμα. Η κίτρινη γραμμή περιγράφει την κοιλότητα που δημιουργείται από τη μετατόπιση του DFG μοτίβου από την DFG-in στην DFG-out διαμόρφωση που απαιτείται για την πρόσδεση του Imatinib ή του Nilotinib. Τα σημαντικά κατάλοιπα υποδεικνύονται με τις ετικέτες^[65]

Λόγω της μεγαλύτερης εκλεκτικότητας του Nilotinib, το 99% των ασθενών που έλαβαν το φάρμακο στη χρόνια φάση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας για 5 χρόνια, δεν προχώρησαν στην επιταχυνόμενη ή βλαστική φάση. Το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς που έλαβαν Imatinib ήταν 95%. Το συνολικό ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με θεραπεία με Nilotinib ανέρχεται σε 89%.

2.12.2 Συνθετική πορεία του Nilotinib

Η αρχική κατοχύρωση για τη σύνθεση του Nilotinib από τη Novartis αποτελείται από επιμέρους στάδια και ποικίλες πειραματικές συνθήκες, χωρίς όμως υψηλή συνολική απόδοση (Σχήμα 9).^[57] Η αρχική γουανιδίνη λήφθηκε σε υψηλή απόδοση παρέχοντας το άλας νιτρικού οξέος (**2**) το οποίο είναι πολύ αδιάλυτο και κατά συνέπεια εύκολα απομονώνεται με διήθηση. Στη συνέχεια, με αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ της εναμιμόνης (**3**) και της γουανιδίνης (**2**), ανάλογη με τις προηγούμενες συνθέσεις του Imatinib, σχηματίστηκε η 2-αμινοπυριμιδίνη (**4**). Ο αιθυλεστέρας της ένωσης (**4**) υδρολύεται για να δώσει το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ (**5**) και να συζευχθεί με την ανιλίνη (**11**), παρέχοντας το επιθυμητό προϊόν. Μια αλληλουχία τεσσάρων σταδίων απαιτείται για να παραχθεί η ανιλίνη (**11**) ξεκινώντας από το εμπορικά διαθέσιμο 3-φθορο-5-τριφθοροβενζονιτρίλιο (**6**). Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση της ένωσης (**7**) για

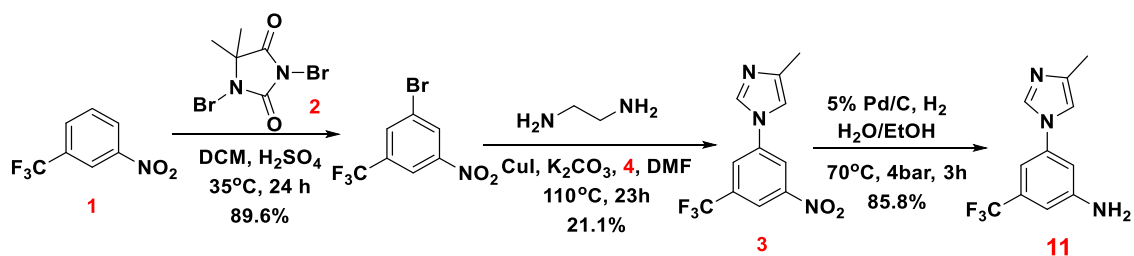
να δώσει το ενδιάμεσο βενζονιτρίλιο (**8**). Η υδρόλυση του νιτριλίου που ακολουθείται από μετάθεση Curtius σε ^tBuOH έδωσε την προστατευμένη Boc ανιλίνη (**10**). Η επιθυμητή ανιλίνη (**11**) ελήφθη μετά από όξινα καταλυόμενη αποπροστασία με HCl.



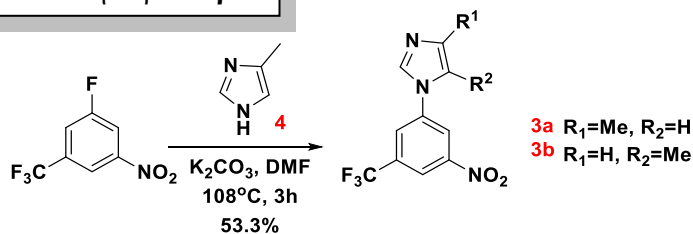
Σχήμα 9 : Η πρώτη κατοχύρωση του Nilotinib από τη Novartis

Το δίπλωμα ευρεσιτεχνίας της Novartisto 2006 περιέγραψε επίσης μια σειρά από τροποποιήσεις στη συνθετική πορεία προκειμένου να ληφθεί το προϊόν σε μεγαλύτερη απόδοση. Περισσότερες βελτιστοποιήσεις έγιναν στη σύνθεση της ενδιάμεσης ανιλίνης (**11**) (ένωση κλειδί). Η κατανομή των ηλεκτρονίων στην ένωση αυτή κάνει τη σύνθεση της πολύ σημαντική, προσελκύοντας το εμπορικό ενδιαφέρον. Οι σχετικές τροποποιήσεις παρουσιάζονται στο Σχήμα 10.^[57]

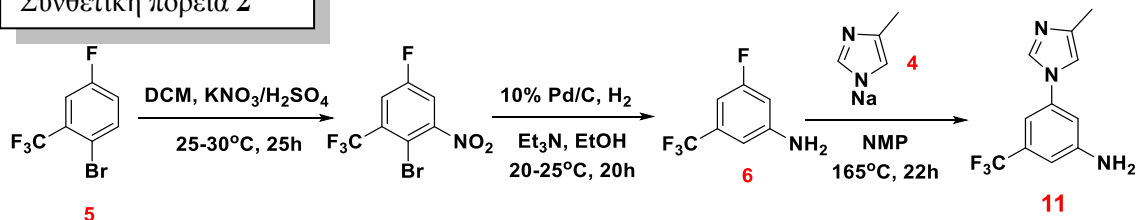
Συνθετική πορεία 1α



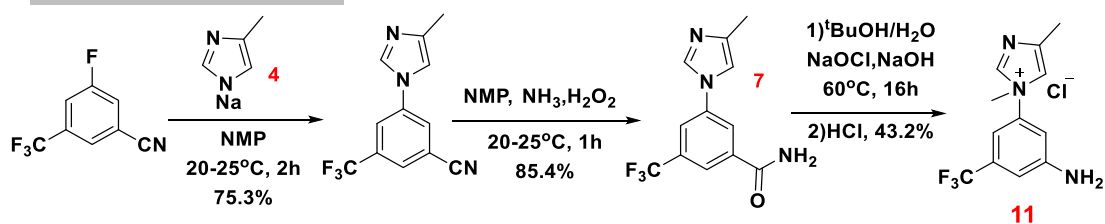
Συνθετική πορεία 1β



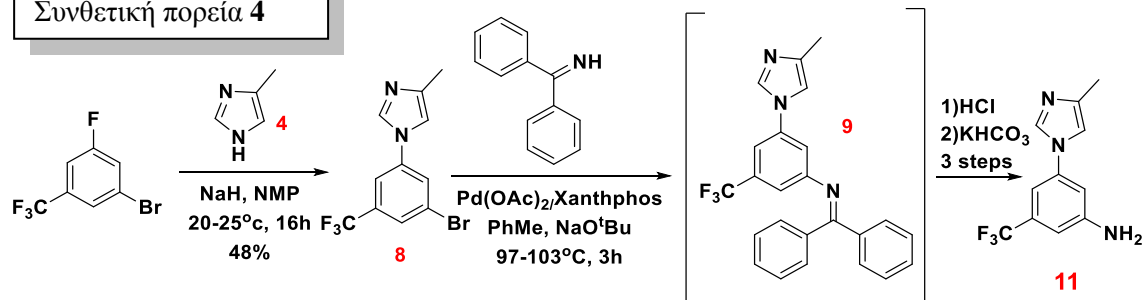
Συνθετική πορεία 2



Συνθετική πορεία 3



Συνθετική πορεία 4



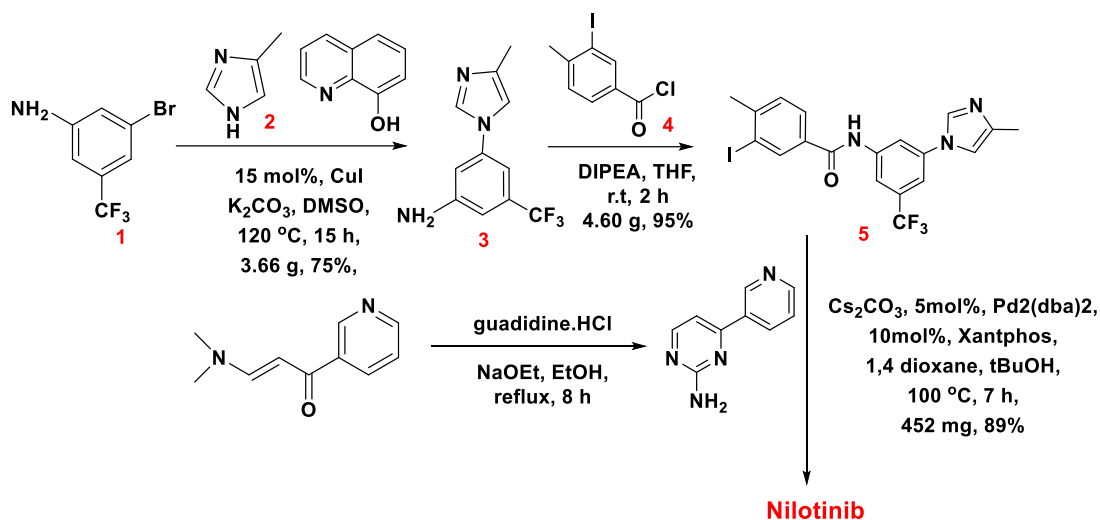
Σχήμα 10: Εναλλακτικές πορείες για τη σύνθεση του ενδιαμέσου 11 από τη Novartis

- ❖ Συνθετική πορεία 1α : Επιλεκτική βρωμίωση της αρωματικής ένωσης (1) χρησιμοποιώντας διβρωμαντίνη (2), δίνει εξαιρετική τοποεκλεκτικότητα και σχετικά υψηλή απόδοση. Ακολούθησε με χαλκό καταλυόμενη υποκατάσταση του νεοεισαχθέντος βρωμίου και

τέλος με αναγωγή υπεράνω παλλαδίου/άνθρακα σχηματίστηκε η ανιλίνη (**11**). Εναλλακτικά, μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με 4-5-μεθυλιμιδαζόλιο (**4**) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόσβαση στη νίτρο αρωματική (**3a**) (Σχήμα 10, Συνθετική πορεία 1β).

- ❖ Συνθετική πορεία 2 : Χρησιμοποιείται μια αργή αντίδραση νίτρωσης σε μέτα θέση της βαριά αλογονωμένης αρχικής ένωσης (**5**). Ταυτόχρονη αναγωγή της ομάδας νίτρο ομάδας και απομάκρυνση του βρωμίου υπό τυπικές συνθήκες υδρογόνωσης έδωσε την (**6**). Ακολούθησε πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση της ομάδας φθορίου με τη χρήση του μετά νατρίου άλατος του 4-5-μεθυλιμιδαζολίου (**4**) σε NMP, υψηλή θερμοκρασία και σε παρατεταμένο χρόνο αντίδρασης.
- ❖ Συνθετική πορεία 3 : Χρησιμοποιείται επίσης μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης S_N . Μερική υδρόλυση προς το αντίστοιχο αμίδιο (**7**) και εκτελώντας μια τροποποιημένη αναδιάταξη Hoffmann έδωσε το υδροχλωρικόάλας του (**11**) σε 28% συνολική απόδοση μετά από όξινη κατεργασία.
- ❖ Συνθετική πορεία 4 : Πραγματοποιείται η υποκατάσταση του φθορίου υπό την παρουσία ενός αρυλοβρωμιδίου από το 4-5-μεθυλιμιδαζόλιο (**4**) για να σχηματιστεί η βρωμοϋποκατεστημένη ένωση (**8**). Μία καταλυόμενη με παλλάδιο αμίνωση κατά Buchwald δημιουργεί το ενδιάμεσο ιμίνης (**9**) το οποίο αμέσως υδρολύεται προς την ανιλίνη (**11**).

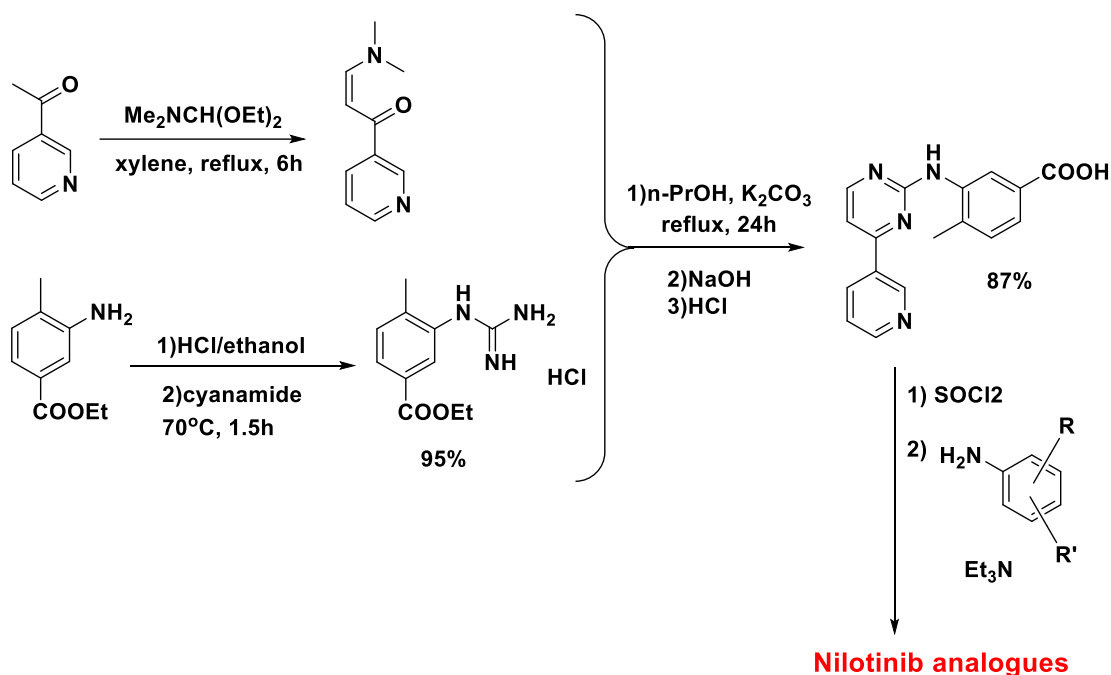
Μια περαιτέρω βελτιωμένη σύνθεση του Nilotinib από την Ariad Pharmaceuticals αρχίζει με ένα αριθμό προηγμένων, διαθέσιμων στο εμπόριο αρχικών ενώσεων (Σχήμα 11).^[57] Η σύνθεση περιλαμβάνει τη σύζευξη του 4-5-μεθυλιμιδαζολίου (**2**) την με 3-βρωμο-5-τριφθορομεθυλανιλίνη (**1**) για το σχηματισμό της ένωσης κλειδί (**3**). Δεύτερη σύζευξη της (**3**) με το εμπορικά διαθέσιμο χλωρίδιο οξέος (**4**) έδωσε το αντίστοιχο αμίδιο (**5**). Η τελική σύζευξη Buchwald επιτεύχθηκε σε απόδοση 89%.



Σχήμα 11 : Σύνθεση του Nilotinib από την Ariad Pharmaceuticals

Νέες πειραματικές πορείες, με πολλές τροποποιήσεις σε κάθε στάδιο, για τη σύνθεση του Nilotinib προτάθηκαν επίσης από τους Chen (2009), Π-Yang Pharmaceuticals, Teva Pharmaceuticals (2010), Buchwald και πολλούς άλλους χημικούς.

Όπως και για το Imatinib, μια πολύ βελτιστοποιημένη μέθοδος για τη σύνθεση αναλόγων του Nilotinib σε πολύ υψηλές συνολικές αποδόσεις περιγράφεται από τους Skobridis K. και Theodorou V. (Σχήμα 12). Η συνθετική αυτή πορεία εφαρμόστηκε και στο εργαστήριό μας για τη σύνθεση αναλόγων του Nilotinib. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ίδια με αυτά που περιγράφηκαν για τη σύνθεση του Imatinib στο Σχήμα 7.^[58]



Σχήμα 12 : Σύνθεση αναλόγων του Nilotinib κατά Skobridis K. και Theodorou V.

2.13 Άλλοι σημαντικοί αναστολείς

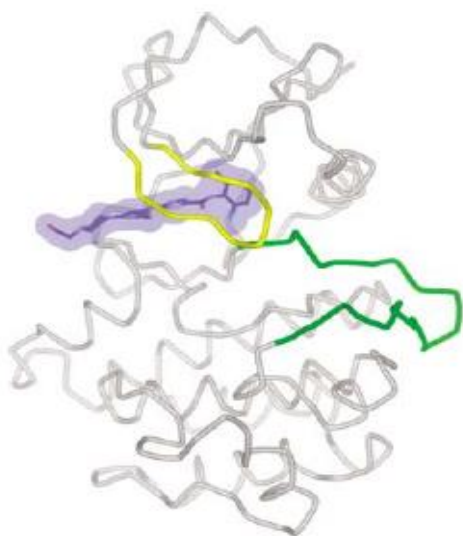
2.13.1 Dasatinib

Το Dasatinib (BMS-354825, εμπορική ονομασία Sprycel) είναι ένας μικρού μοριακού βάρους αναστολέας τυροσινικών κινασών, δεύτερης γενιάς, που εγκρίθηκε το 2006 από τον FDA για τη θεραπεία των ασθενών σε όλες τις φάσεις της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας που εμφανίζουν αντίσταση ή δυσανεξία στο Imatinib. Χορηγείται επίσης για τη θεραπεία της Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας και αξιολογείται η χρήση του σε πολυάριθμες μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του προχωρημένου καρκίνου του προστάτη. Είναι ένας πολύ ισχυρός, από του στόματος δραστικός αναστολέας της Src και της Src-οικογένειας κινασών (FGR, FYN, HCK, LCK, LYN και YES). Αναστέλλει την Bcr-Abl τυροσινική κινάση και έχει πρόσθετη δράση ενάντια της c-Kit κινάσης, του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων PDGFR και των υποδοχέων της εφρίνης.^[60]

Η απόκριση διατηρήθηκε στο 95% των ασθενών στη χρόνια φάση της ΧΜΛ, με μέσο χρόνο παρακολούθησης περίπου 12 μήνες. Στην επιταχυνόμενη φάση της

ΧΜΛ, το 82% των ασθενών παρέμεινε σε ύφεση, με μικρότερο χρόνο παρακολούθησης, μόλις 5 μήνες. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με ΧΜΛ στη βλαστική κρίση υποτροπίασαν εντός 6 μηνών.

Μέσω πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης, προτάθηκε ότι η δραστηριότητα του φαρμάκου μπορεί εν μέρει να εξηγείται από την ικανότητα να δεσμεύεται τόσο στην ενεργή διαμόρφωση (όπως φαίνεται στο συγκρυσταλλική δομή, *Εικόνα 45*) όσο και στην ανενεργή, DFG-out διαμόρφωση. Ωστόσο, NMR μελέτη έδειξε ότι το Dasatinib δεσμεύεται αποκλειστικά στην ενεργή, DFG-in διαμόρφωση.

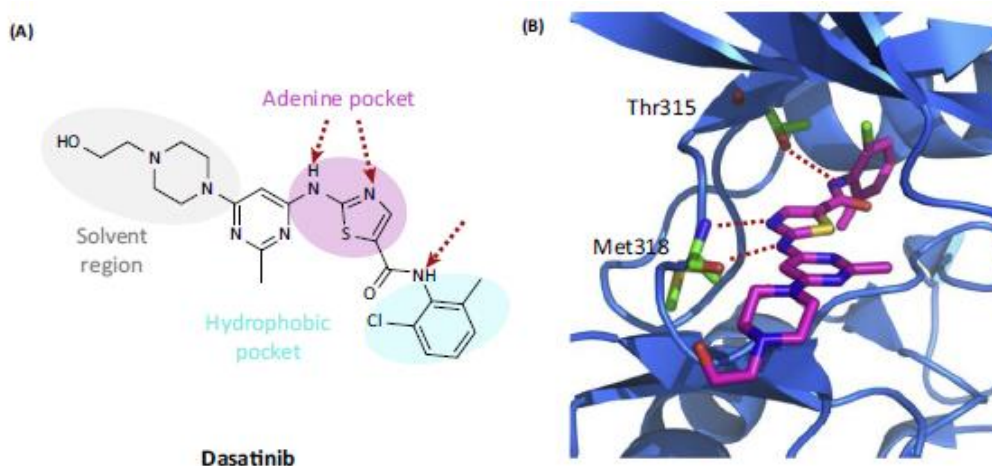


***Εικόνα 45 :** Το Dasatinib (μωβ χρώμα) δεσμευμένο στην ενεργή διαμόρφωση, DFG-in, της Abl κινάσης. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται ο πλούσιος σε γλυκίνη P-βρόγχος και με πράσινο ο βρόγχος ενεργοποίησης.*

Το Dasatinib είναι 325 φορές πιο ισχυρό από το Imatinib κατά κυττάρων που εκφράζουν την Bcr-Abl. Επιπλέον, δεσμεύει την Bcr-Abl με λιγότερο αυστηρές διαμορφωτικές απαιτήσεις σε σχέση με το Imatinib και είναι σε θέση να αναστείλει όλες τις μεταλλάξεις της περιοχής της Bcr-Abl κινάσης που παρατηρούνται σε ασθενείς με υποτροπή με την εξαίρεση της gatekeeper μετάλλαξης T315I. Σε σύγκριση με το Imatinib, εμφανίζει αυξημένη δραστηριότητα αλλά μειωμένη επιλεκτικότητα.^[66] Κατά την εξέταση της δομής του Dasatinib στο σύμπλοκο με την Abl, η απώλεια ισχύος κατά της gatekeeper μετάλλαξης δεν είναι περίεργη, καθώς ο αναστολέας σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με την υδροξυλομάδα της θρεονίνης.^[61]

Για το Dasatinib το φαρμακοφόρο στοιχείο είναι το αμινοθειαζόλιο (ροζ χρώμα αντίστοιχα στο Imatinib η αμινοπυριμιδίνη). Το άζωτο της ομάδας του θειαζολίου και η αμινο ομάδα σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την Met318 της

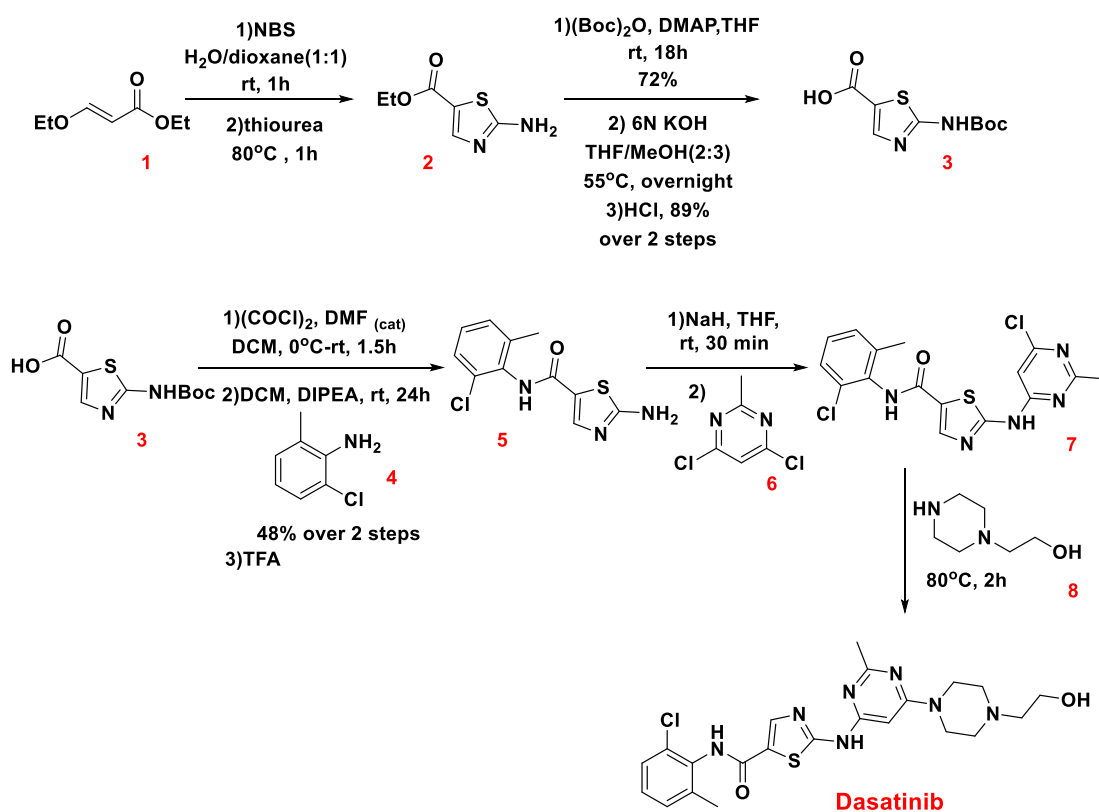
hinge περιοχής. Η υδροξυ-αιθυλο-πιπεραζινική ομάδα εκτίθεται στο διαλύτη (γκρί χρώμα). Η τελική ομάδα τολουιδίνης (γαλάζιο χρώμα) εξέχει προς ένα υδρόφοβο θύλακα κοντά στο gatekeeper κατάλοιπο T315I, το οποίο αλληλεπιδρά με το συνδετικό αμίδιο μέσω δεσμού υδρογόνου (Εικόνα 46). Γι αυτό το λόγο, η T315I μετάλλαξη που σχετίζεται με την αντοχή φαρμάκου εμφανίζεται επίσης σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με Dasatinib.^[43]



Εικόνα 46 : A) Η δομή του Dasatinib B) Η πρόσδεση του στην Abl κινάση. Το φάρμακο παριστάνεται με μωβ χρώμα, τα άτομα αζώτου με μπλέ, τα οξυγόνα με κόκκινο και με κίτρινο του άτομο του θείου. Τα κατάλοιπα αμινοξέων της κινάσης παριστάνονται πράσινα και οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου με διακεκομμένες κόκκινες γραμμές.

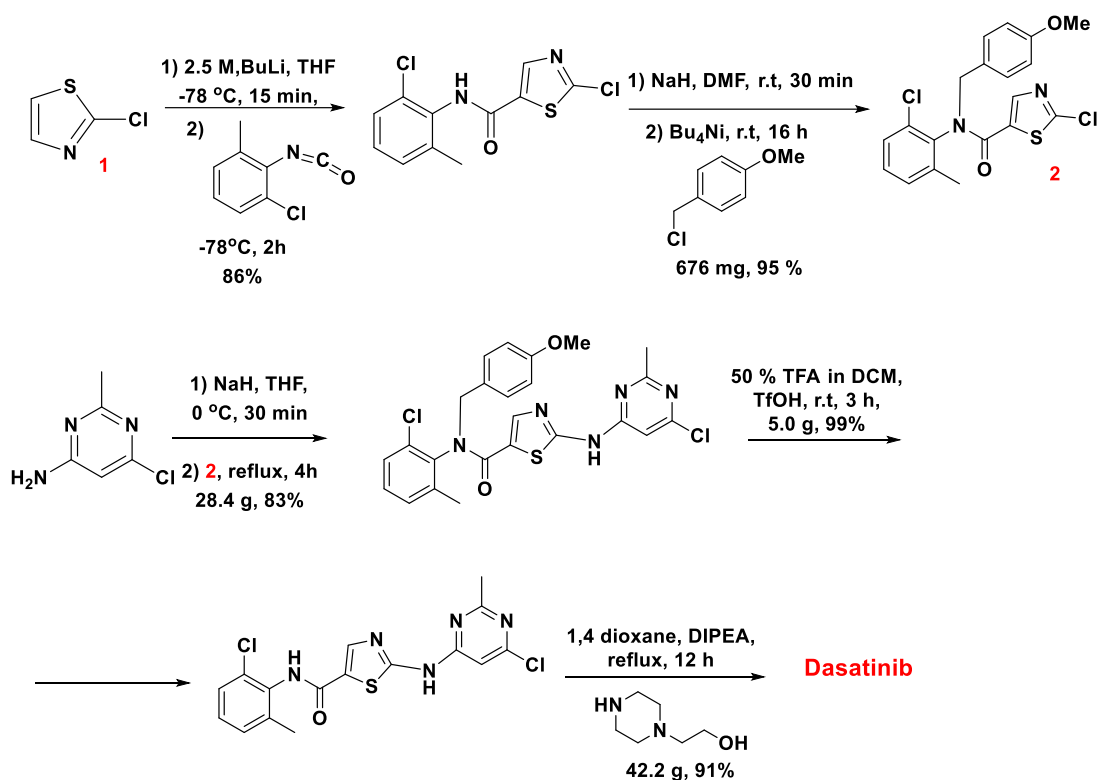
2.13.1.1 Σύνθεση του Dasatinib

Μεγάλος αριθμός διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας περιγράφουν τη σύνθεση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών που κυκλοφορούν από την Bristol-Myers Squibb (BMS) μεταξύ 2000-2005, συμπεριλαμβανομένου και του Dasatinib.^[57] Ένεργοποιώντας την ένωση (3), ως χλωρίδιο οξέος, σε συνδυασμό με την 2-χλωρο-6-μεθυλο ανιλίνη (4), με ακολουθούμενη αποπροστασία λαμβάνεται το προϊόν σύζευξης (5). Η ενδιάμεση ανιλίνη (5) στη συνέχεια κατεργάζεται με περίσσεια υδριδίου του νατρίου για να δώσει την ένωση (7). Κατεργασία αυτής με το παράγωγο πιπεραζίνης (8) έδωσε το Dasatinib.



Σχήμα 13 : Η σύνθεση του Dasatinib

Η BMS ανέφερε τη σύνθεση του Dasatinib σε υψηλή συνολική απόδοση (61%) και σε μεγαλύτερη κλίμακα (scale-up), ξεκινώντας από τοχλωροθειαζόλιο **1**, όπως περιγράφεται στο Σχήμα 14.^[57]



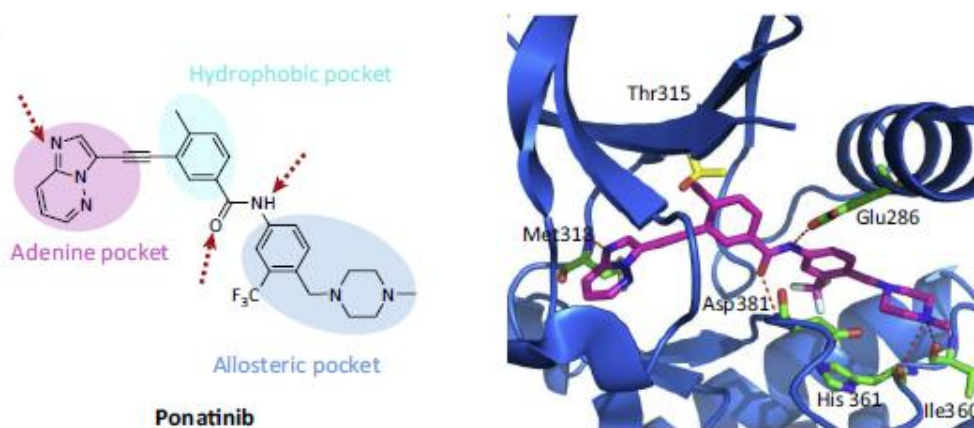
Σχήμα 14 : Η σύνθεση του Dasatinib με τη χρήση του χλωροθειαζολίου I

2.13.2 Ponatinib

Το Ponatinib (AP24534, εμπορική ονομασία Iclusig) είναι ένας αναστολέας τυροσινικών κινασών πολλαπλών στόχων που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας και Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας. Ο FDA ενέκρινε το φάρμακο το 2012, αλλά ανέστειλε προσωρινά τις πωλήσεις του 2013, διότι προκαλούσε θρόμβους αίματος και σοβαρή στένωση των αιμοφόρων αγγείων. Η αναστολή άρθηκε λίγο αργότερα και πλέον έχουν εκδοθεί αναθεωρημένες πληροφορίες συνταγογράφησης. Μελέτη έδειξε ότι το 66% των ασθενών με ΧΜΛ στη χρόνια φάση που έλαβαν θεραπεία με Ponatinib είχαν τη μέγιστη κυτταρογενετική ανταπόκριση. Επίσης, όλοι οι ασθενείς με τη μετάλλαξη T315I αποκρίθηκαν στη θεραπεία.^[67]

Το Ponatinib στοχεύει όχι μόνο τη μητρική Bcr-Abl, αλλά επίσης και ισομορφές του που φέρουν μεταλλάξεις και προσδίδουν αντίσταση στη θεραπεία με τους υπάρχοντες αναστολείς κινάσης τυροσίνης, ειδικά συμπεριλαμβανομένης της μετάλλαξης T315I, για την οποία δεν υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία.^[67] Στην περίπτωση του Ponatinib δεν υπάρχει η ομάδα της αμινοπυριμιδίνης που αλληλεπιδρά

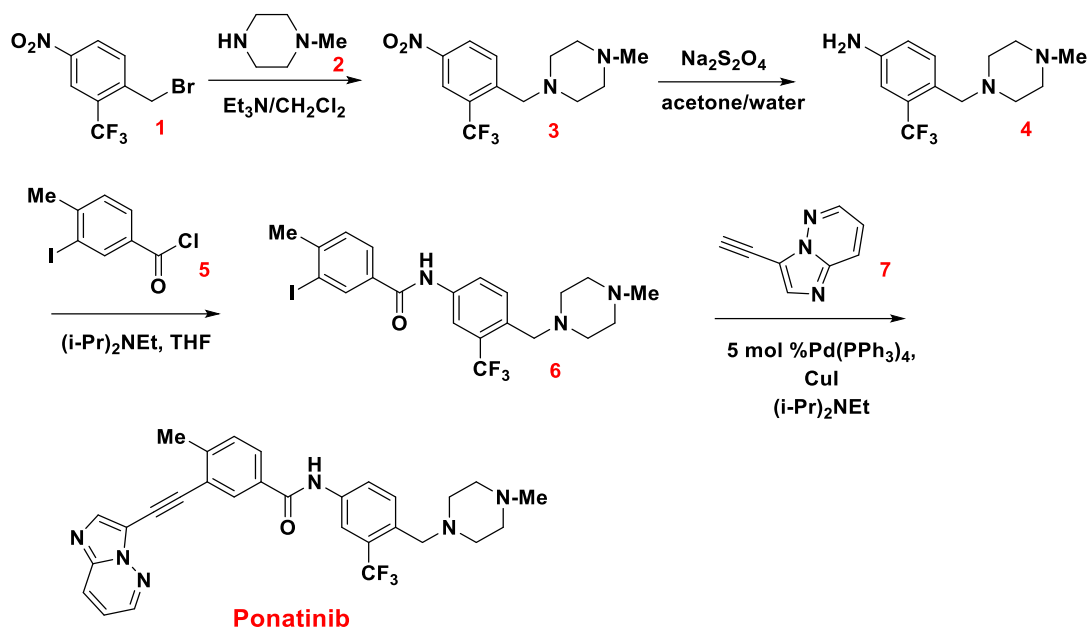
με το gatekeeper κατάλοιπο Thr315, όπως στο Imatinib. Αντί αυτής, έχει ενσωματωθεί ένα αλκύνιο που ξεπερνά στερεοχημική παρεμπόδιση, λόγω μετάλλαξης του gatekeeper καταλοίπου. Επιπλέον, το Ponatinib φέρει την ομάδα φαινυλοπιπεραζίνης του Imatinib και την τριφθορομεθυλο-ομάδα του Nilotinib, με αποτέλεσμα μια πιο συμπαγή αλληλεπίδραση με την αλλοστερική θέση (Εικόνα 47).^[43]



Εικόνα 47 : Αριστερά, η δομή του Ponatinib. Δεξιά, η πρόσδεση του στην κινάση.

2.13.2.1 Σύνθεση του Ponatinib

Ο Huang και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια μεθοδολογία για τη σύνθεση του Ponatinib και αναλόγων αυτού που περιλαμβάνει την καταλυόμενη με Pd(0) αναγωγή ως το στάδιο κλειδί. Η SN₂ αντίδραση της 1-μεθυλοπιπεραζίνης (**2**) με το 4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο) βενζουλο βρωμίδιο (**1**) δίνει την (**3**), της οποίας η αναγωγή, ακολουθούμενη από μια αντίδραση με 3-ιωδο-4-μέθυλο βενζουλο χλωρίδιο (**5**) δίνει την ένωση (**6**). Σύζευξη τύπου Sonogashira της (**6**) με το αλκύνιο (**7**) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δίνει το Ponatinib (Σχήμα 15).

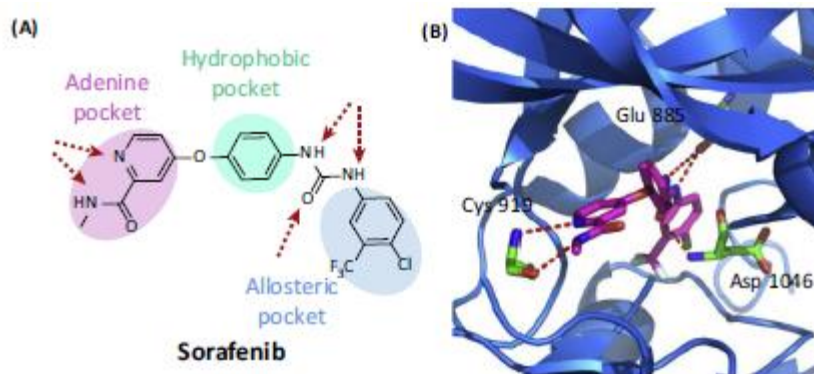


Σχήμα 15 : Η σύνθεση του Ponatinib από την Ariad Pharmaceutical

2.13.3 Sorafenib

Το Sorafenib (εμπορική ονομασία Nexavar) είναι ένας μικρού μοριακού βάρους αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών που έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του καρκίνου των νεφρών, του παγκρέατος και του θυροειδούς.^[68] Αναστέλλει πολλές πρωτεϊνικές, κινάσες όπως τις c-KIT, την οικογένεια των Raf κινασών, τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα αιμοπεταλίων PDGFR και τον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFR.^[69] Ασθενείς που έλαβαν Sorafenib για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου των νεφρών παρουσίασαν μείωση της τάξης του 56% του κινδύνου της εξέλιξης της νόσου ή θανάτου.

Το μοτίβο DFG χρησιμοποιείται από το Sorafenib. Η τερματική 4-χλωρο-3-τριφθορομεθυλοφαινυλ-ομάδα του (μπλέ χρώμα) προσδένεται σε ένα βαθύ υδρόφοβο αλλοστερικό θύλακα και η ομάδα ουρίας που βρίσκεται σε μια αλλοστερική θέση σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο του N-λοβού Glu885 και το κατάλοιπο του βρόγχου ενεργοποίησης Asp1046. Δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση με το διαλύτη^[43] (Εικόνα 48).

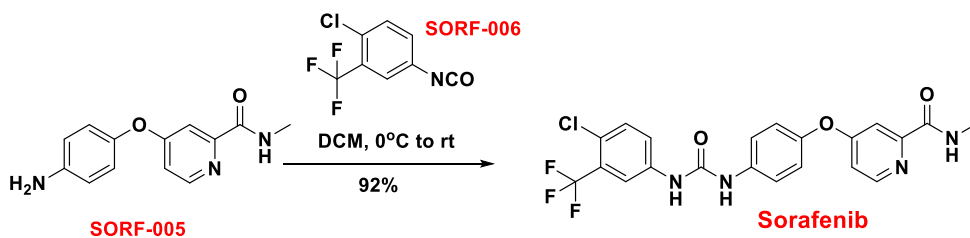
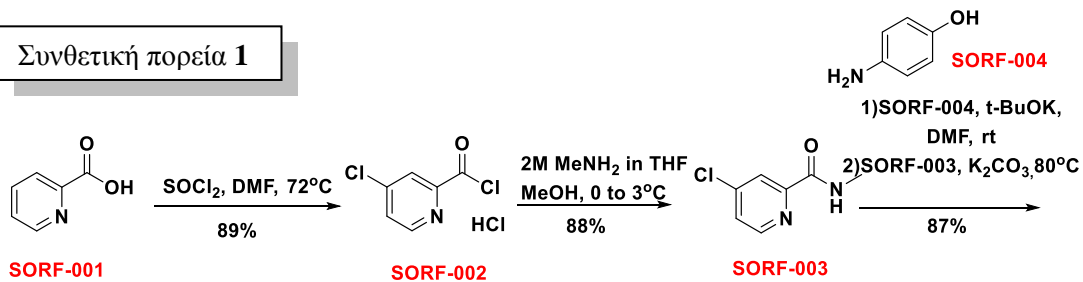


Εικόνα 48 : Α) Η δομή του Sorafenib Β) Η πρόσδεση του στον υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFR

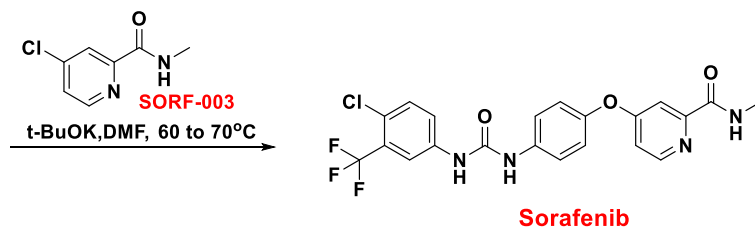
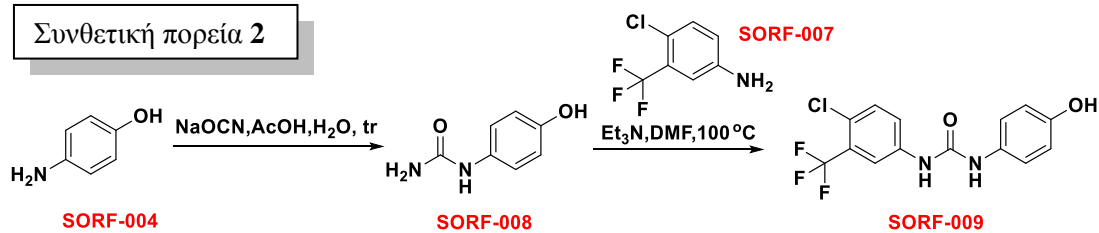
2.13.3.1 Σύνθεση του Sorafenib

Το Sorafenib αναπτύχθηκε από την Onyx Pharmaceuticals σε συνεργασία με τη Bayer. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές πειραματικές πορείες για τη σύνθεση του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος, μερικές από τις οποίες παρουσιάζονται παρακάτω στο Σχήμα 16. Όλες οι παρακάτω πειραματικές πορείες περιλαμβάνουν κυρίως αντιδράσεις σύζευξης με αποτέλεσμα το σχηματισμό αμιδικού δεσμού για την σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος.

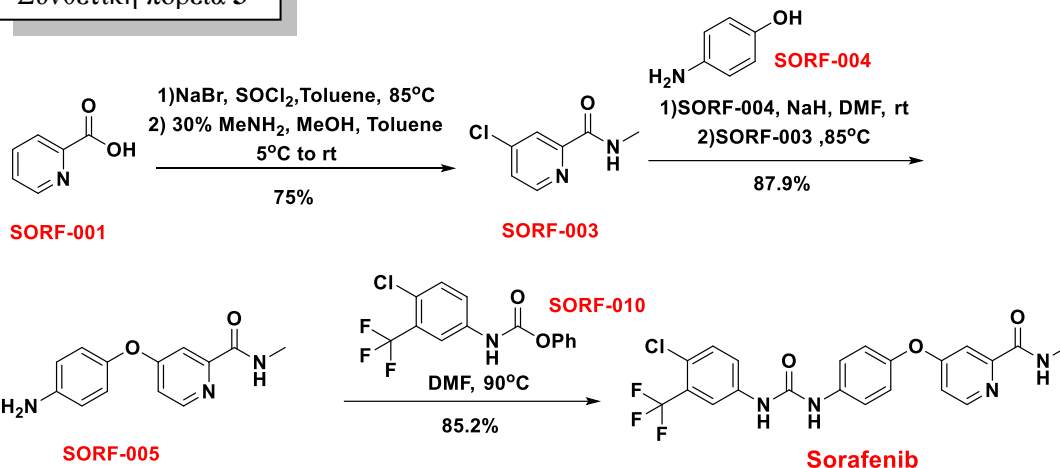
Συνθετική πορεία 1



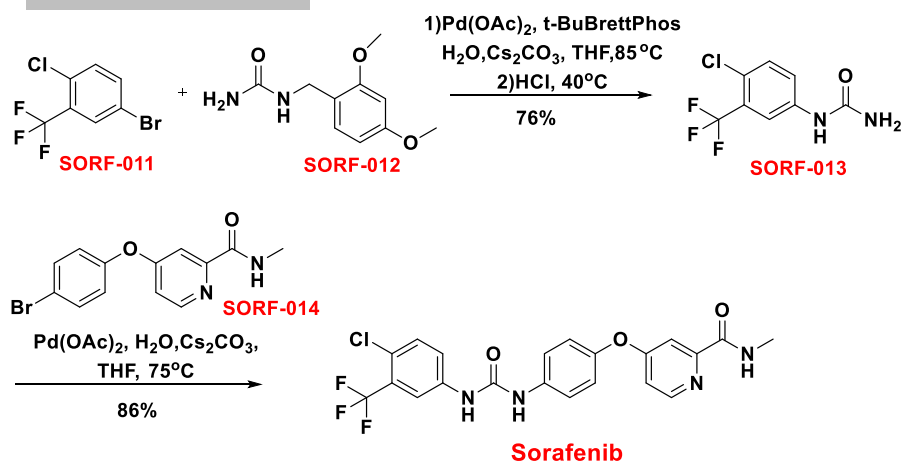
Συνθετική πορεία 2



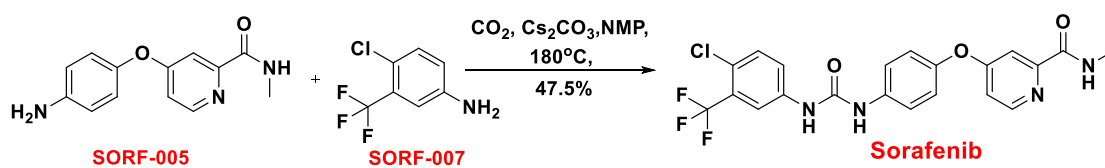
Συνθετική πορεία 3



Συνθετική πορεία 4



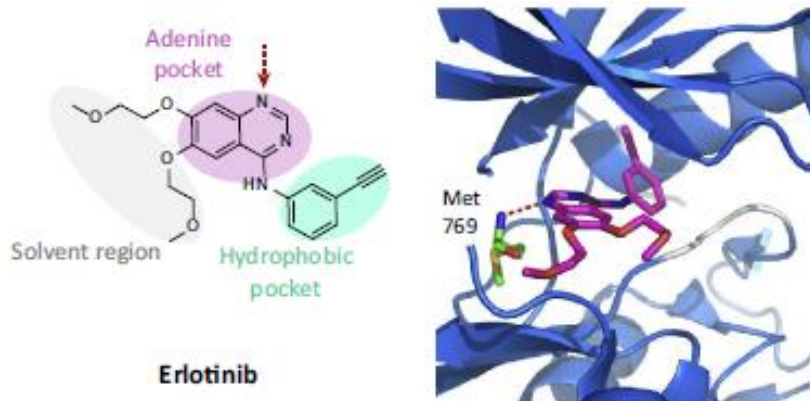
Συνθετική πορεία 5



Σχήμα 16 : Εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του Sorafenib

2.13.4 Erlotinib

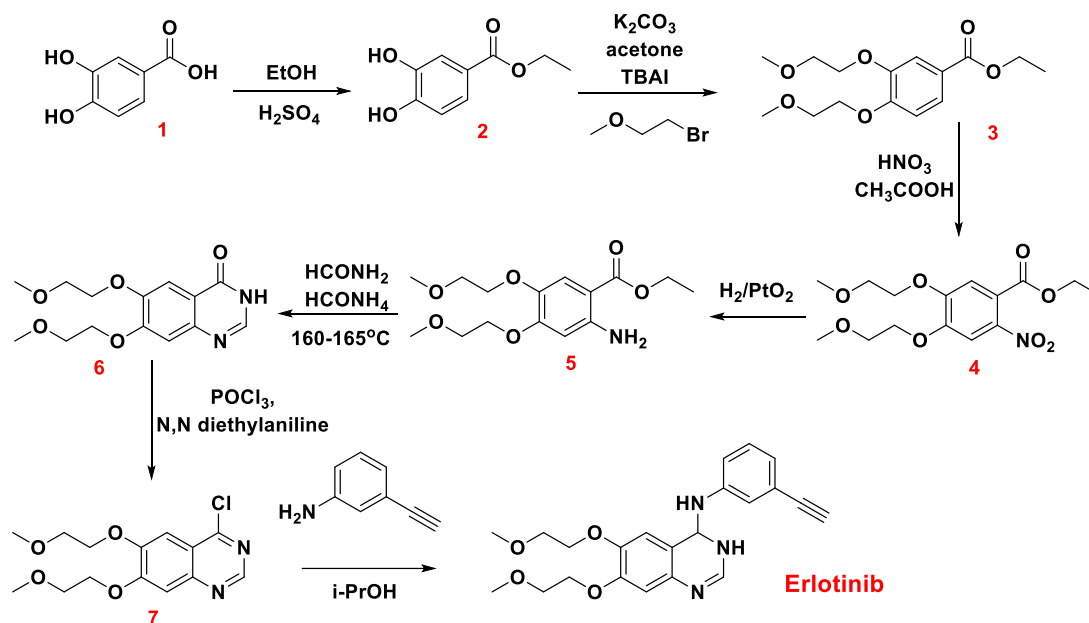
Το Erlotinib (εμπορική ονομασία Tarceva) είναι ένας μικρού μοριακού αναστολέας τυροσινικής κινάσης, ο οποίος αναστέλλει τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του τοπικά προχωρημένου ή μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του παγκρέατος και πολλούς άλλους τύπους καρκίνου. Εγκρίθηκε από τον FDA το 2005 και μελέτες έδειξαν ότι είναι δραστικό σε ασθενείς με ή χωρίς μεταλλάξεις στον EGFR, ωστόσο είναι περισσότερο αποτελεσματικό σε ασθενείς με μεταλλάξεις. Όσο αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα, διαπιστώθηκε ότι όταν το Erlotinib προστέθηκε στη χημειοθεραπεία η συνολική επιβίωση βελτιώθηκε κατά 19%, ενώ παράλληλα βελτιώθηκε το ποσοστό επιβίωσης χωρίς εξέλιξη κατά 29%, σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία μόνη της.^[70] Το Erlotinib συνδέεται αντιστρεπτά στη θέση πρόσδεσης του ATP της κινάσης, στην ανενεργή μορφή του EGFR, και εμποδίζει την σύνδεση δύο μορίων EGFR για να σχηματίσουν ένα διμερές, σταματώντας έτσι τον σηματοδοτικό καταρράκτη.^[71]



Εικόνα 49 : Η δομή και η πρόσδεση του Erlotinib στον EGFR

2.13.4.1 Σύνθεση του Erlotinib

Η σύνθεση της Erlotinib (Σχήμα 17) ξεκινά με την εστεροποίηση του διυδροξυβενζοϊκού οξέος (**1**) και ακολουθεί Ο-ακυλίωση χρησιμοποιώντας είτε 1-χλωρο-2-μεθοξυαιθάνιο ή 1-βρωμο-2-μεθοξυαιθάνιο. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις η απόδοση ήταν > 90%, με την ένωση του χλωρίου ν' απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης. Νίτρωση του (**3**) έδωσε το επιθυμητό τοποϊσομερές και ακολούθησε καταλυτική υδρογόνωση και κυκλοποίηση με φορμαμίδιο. Προτιμώμενο αντιδραστήριο για τη χλωρίωση του (**6**) ήταν φωσφορυλοχλωρίδιο και η N,N-διαιθυλανιλίνη.



Σχήμα 17 : Η σύνθεση του Erlotinib^[72]

2.13.5 Gefitinib

Το Gefitinib (ZD1839, εμπορική ονομασία Iressa) είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της τυροσινικής κινάσης του EGFR και χρησιμοποιείται κατά την χημειοθεραπεία για την θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνων, όπως του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα. Εγκρίθηκε από τον FDA το 2003 για ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR, όπως στις περιπτώσεις του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του καρκίνου του οισοφάγου. Έρευνες έδειξαν ότι το ποσοστό απόκρισης των ασθενών ήταν σημαντικά υψηλότερο στην ομάδα των ασθενών που έλαβαν Gefitinib

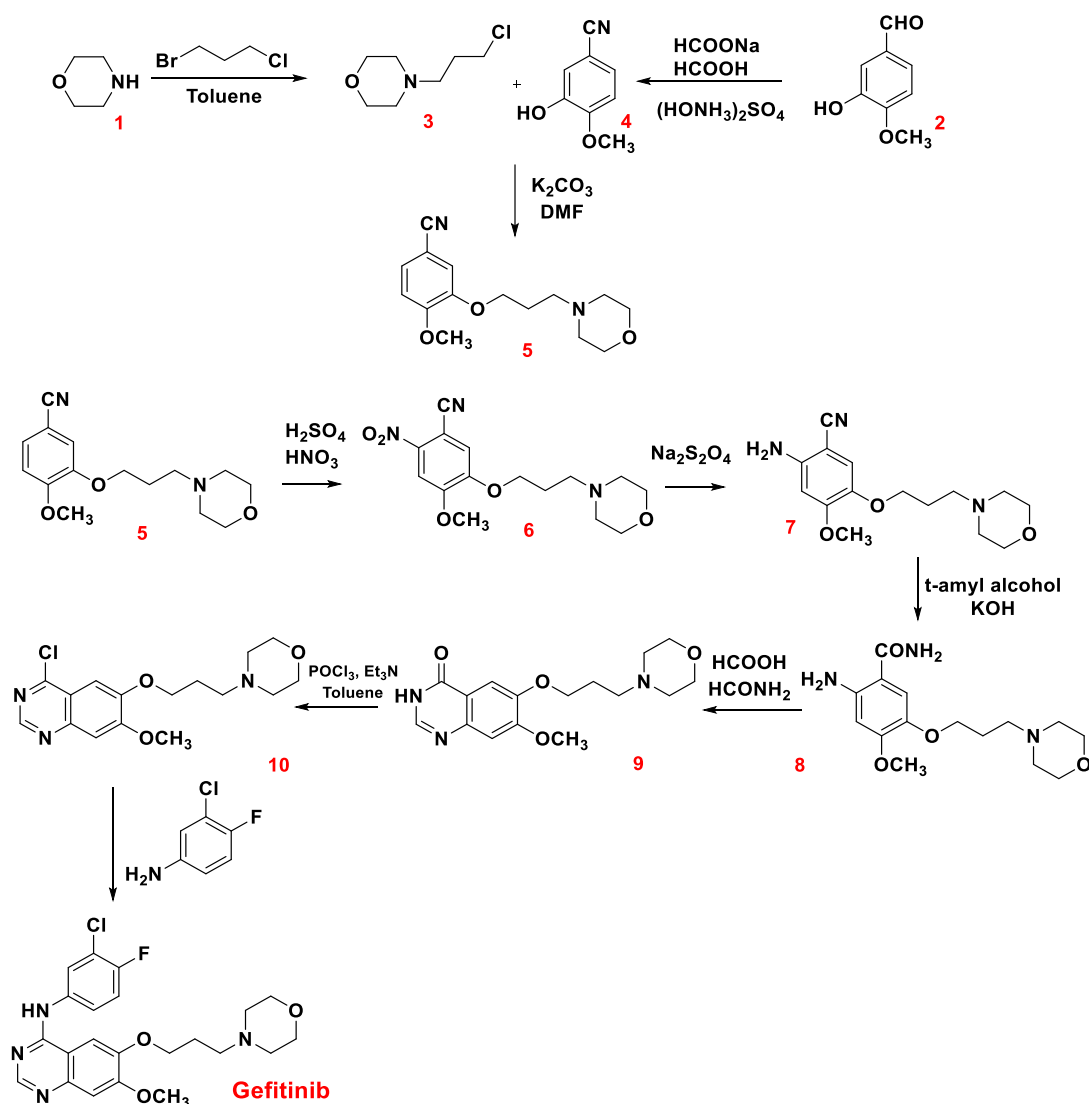
(62,1%) από ό,τι στην ομάδα αυτών που έλαβαν σισπλατίνα ή docetaxel (32,2%) ως θεραπεία. Το ποσοστό ελέγχου της νόσου ήταν επίσης ψηλότερο για το Gefitinib (93,1%) από στην κλασσική χημειοθεραπεία (78%).^[73] Το Gefitinib έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με το Erlotinib, καθώς δεσμεύεται στη θέση πρόσδεσης του ATP.



Εικόνα 50 :
*Κρυσταλλογραφική
δομή του Gefitinib με το
μονομέρες του EGFR*

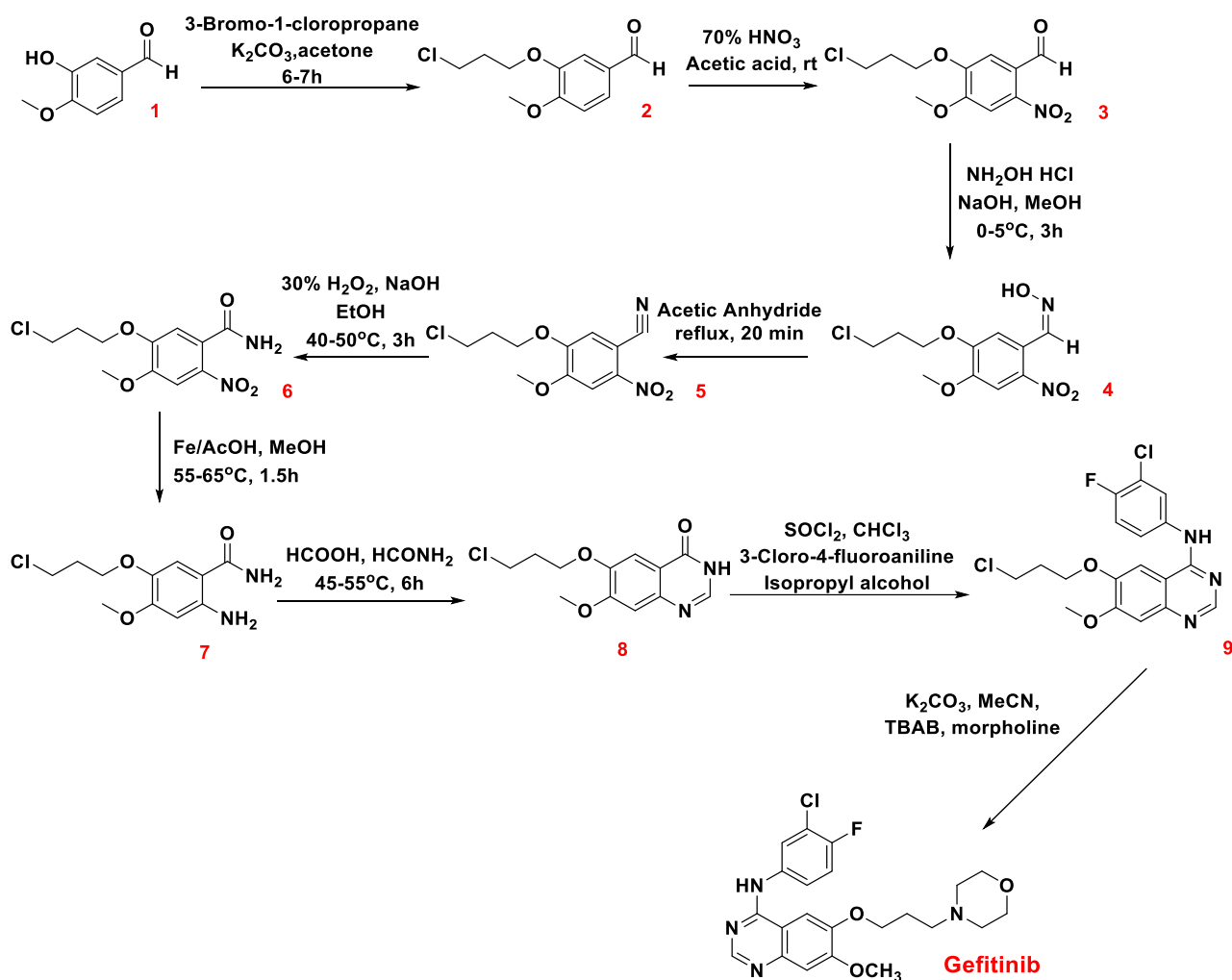
2.13.5.1 Σύνθεση του Gefitinib

Η εμπορικά διαθέσιμη μορφολίνη **(1)** αντέδρασε με 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο για να δώσει N-(3-χλωροπροπυλ) μορφολίνη **(3)**. Η εμπορικά διαθέσιμη 3-υδροξυ-4-μεθοξυβενζαλδεϋδη **(2)** αντέδρασε με μυρμηκικό νάτριο/μυρμηκικό οξύ και θειική υδροξυλαμίνη για να δώσει 3-υδροξυ-4-μεθοξυβενζονιτρίλιο **(4)**. Η αντίδραση αλκυλίωσης των ενώσεων **(3)** και **(4)** έδωσε 4-μεθοξυ-3-(3-μορφολινοπροποξυ)βενζονιτρίλιο **(5)**. Η νίτρωση της ένωσης **(5)** με $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ παρείχε την ένωση **(6)** και η ακόλουθη αντίδραση αναγωγής με $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ παράγει την ένωση **(7)**. Η ένωση **(7)** αντέδρασε με τερτ-αμυλική αλκοόλη για να δώσει την ένωση **(8)**. Η αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης **(8)** με μυρμηκικό οξύ και φορμαμίδιο παρέχει την **(9)** η οποία αντιδρά με οξυχλωριούχο φώσφορο για να δώσει την **(10)**. Η ένωση **(10)** αντιδρά με 3-χλωρο-4-φθοροανιλίνη δίνοντας το Gefitinib (Σχήμα 18).



Σχήμα 18 : Η σύνθεση του Gefitinib^[73]

Μια εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Gefitinib περιλαμβάνει τη χρήση της ισοβανιλίνης ως αρχική ένωση, όπως φαίνεται και παρακάτω στο Σχήμα 19. Αντίδραση της ισοβανιλίνης (**1**) με 3-βρωμο-1-χλωροπροπάνιο έδωσε τη μεθοξυβενζαλδεΐδη (**2**) της οποίας η νίτρωση οδήγησε στη νιτροβενζαλδεΐδη (**3**). Κατεργασία της (**3**) με $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ σχημάτισε την ενδιάμεση οξίμη (**4**) και αυτή με τη σειρά της σε reflux με Ac_2O την (**5**). Αντίδραση της (**5**) με H_2O_2 σχημάτισε την (**6**), εκλεκτική αναγωγή την οποίας οδήγησε στην (**7**). Κυκλοποίηση της τελευταίας με HCOOH, HCONH₂ έδωσε την ένωση (**8**) η οποία αντιδρώντας με SOCl_2 και 3-χλωρο-4-φθοροανιλίνη σε CDCl_3 σχημάτισε την (**9**). Κατεργασία αυτής με μορφολίνη έδωσε το επιθυμητό προϊόν.



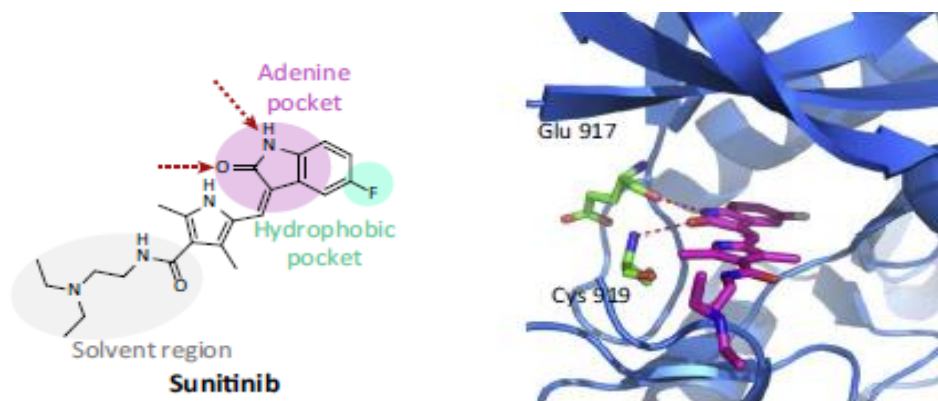
Σχήμα 19 : Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Gefitinib από ισοβανιλίνη **1**^[74]

2.13.6 Sunitinib

Το Sunitinib (SU11248, εμπορική ονομασία Sutent) είναι ένας από του στόματος, μικρού μοριακού βάρους, πολλαπλών στόχων, αναστολέας τυροσινικών κινασών. Αναστέλλει τους υποδοχείς τυροσινικών κινασών που εμπλέκονται στην αύξηση του όγκου, την αγγειογένεση και τη μεταστατική εξέλιξη του καρκίνου και πιο συγκεκριμένα αναστέλλει : τους υποδοχείς του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFRα και PDGFRβ), τους υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR1, VEGFR2 VEGFR3), τον υποδοχέα του παράγοντα αρχέγονων κυττάρων (KIT,) τον υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης αποικιών (CSF-1R) και τον υποδοχέα νευρογλοιακού νευροτροφικού παράγοντα (RET). Το 2006 εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία του ανεγχείρητου ή και μεταστατικού κακοήθου στρωματικού όγκου του γαστρεντερικού μετά από αποτυχία ή μη ανοχή της

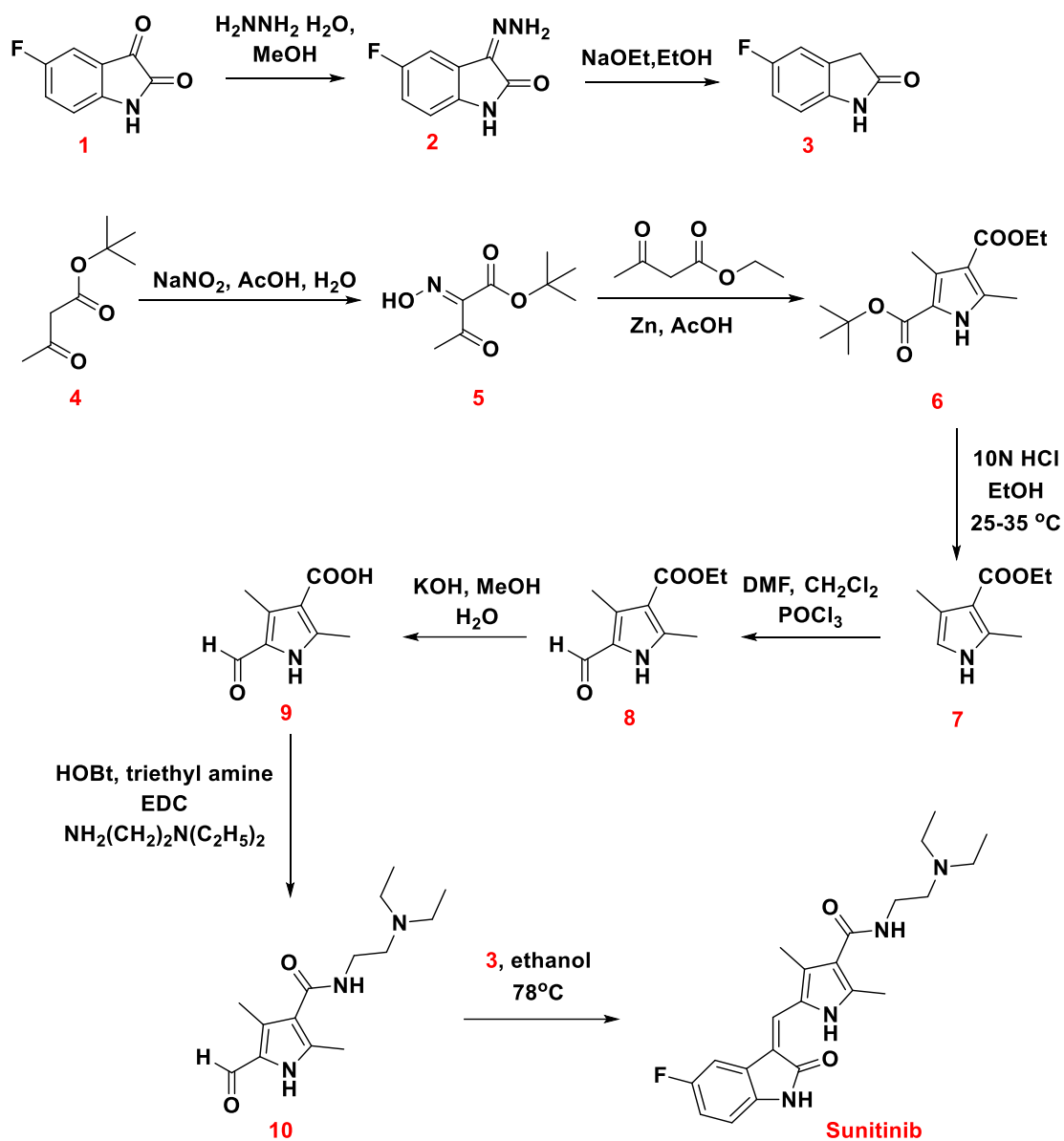
Ιματινίβης, του μεταστατικού καρκίνου του νεφρού και των νευροενδοκρινικών όγκων του παγκρέατος που έχουν εξαπλωθεί ή δεν μπορούν να αφαιρεθούν χειρουργικά.^{[75], [77]}

Το Sunitinib φαίνεται να είναι πολύ αποτελεσματικό στη θεραπεία των γαστρεντερικών στρωματικών όγκων, όταν η θεραπεία με Imatinib έχει αποτύχει. Δείκτης μέτρησης της αποτελεσματικότητας είναι το χρονικό διάστημα επιβίωσης των ασθενών χωρίς επιβίωση των όγκων. Οι ασθενείς επιβίωσαν 27 εβδομάδες μετά τη λήψη του Sunitinib σε σχέση με αυτούς που έλαβαν εικονικό φάρμακο, οι οποίοι επιβίωσαν μόλις 6 εβδομάδες.^[76] Όσο αφορά τη θεραπεία των νευροενδοκρινικών όγκων του παγκρέατος σε ασθενείς όπου η αφαίρεση των όγκων ήταν αδύνατη, τα στοιχεία ήταν 11 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν Sunitinib και έξι μήνες για αυτούς που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Το φαρμακευτικό αυτό σκεύασμα κατέστη εξαιρετικά αποτελεσματικό στη θεραπεία του μεταστατικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος. Οι ασθενείς που έλαβαν Sunitinib επιβίωσαν κατά μέσο όρο 47 εβδομάδες χωρίς επιδείνωση της ασθένειας, σε σύγκριση με τις 22 εβδομάδες για τους ασθενείς που έλαβαν ένα άλλο αντικαρκινικό φάρμακο, την ιντερφερόνη άλφα.^[76] Συνολικά, μετά από 5 χρόνια, το ποσοστό επιβίωσης αγγίζει το 76.9%.



Εικόνα 51 : Η δομή και η πρόσδεση του Sunitinib στον VEGFR. Ο δακτύλιος της ινδολινόνης αλληλεπιδρά με το Glu917 και την Cys919. Η τερματική αλυσίδα εκτίθεται στο διαλύτη.

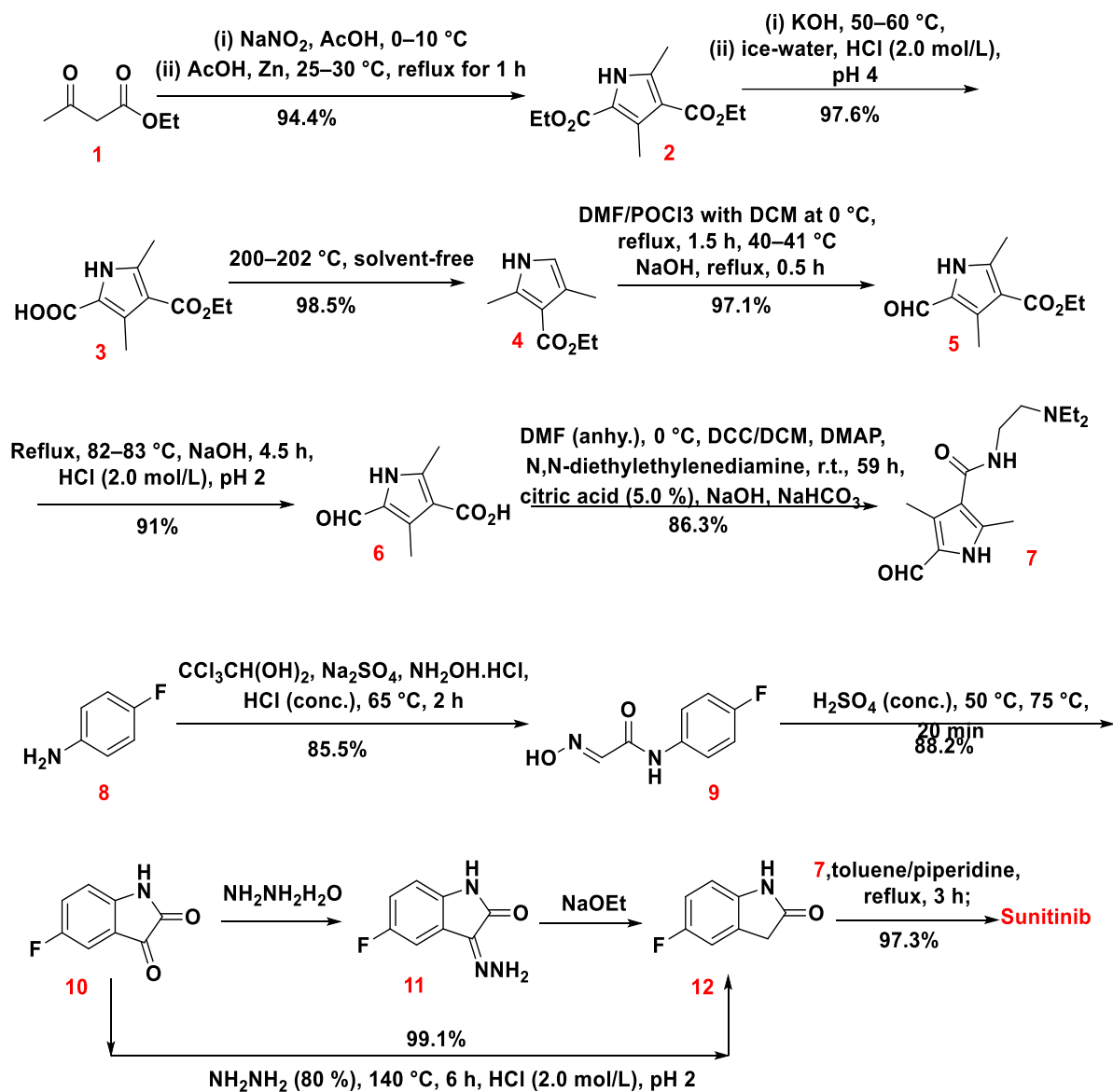
2.13.6.1 Σύνθεση του Sunitinib



Σχήμα 20 : Η σύνθεση του Sunitinib

Μια βελτιωμένη σύνθεση του Sunitinib μέσω μιας διαδικασίας αποκαρβοξυλίωσης χωρίς διαλύτες παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 21).^[78] Τα πιο σημαντικά συνθόνια τη το σχηματισμό του Sunitinib είναι το **(6)** και το **(12)**. Η σύνθεση του **(12)** περιλαμβάνει μια αντίδραση Sandmeyer και Wolff-Kishner. Για τη σύνθεση της ένωσης **(6)** αρχικά πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση Knorr, ακολούθησε εκλεκτική υδρόλυση του **(2)**, αποκαρβοξυλίωση, φορμυλίωση της **(4)**

μέσω μιας αντίδρασης Vilsmeier–Haack σχηματίζοντας την (5) η οποία υδρολύθηκε περαιτέρω προς σχηματισμό της (6) (ένωση κλειδί στην πειραματική πορεία).



Σχήμα 21 : Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Sunitinib με αποκαρβοξυλίωση χωρίς διαλύτες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

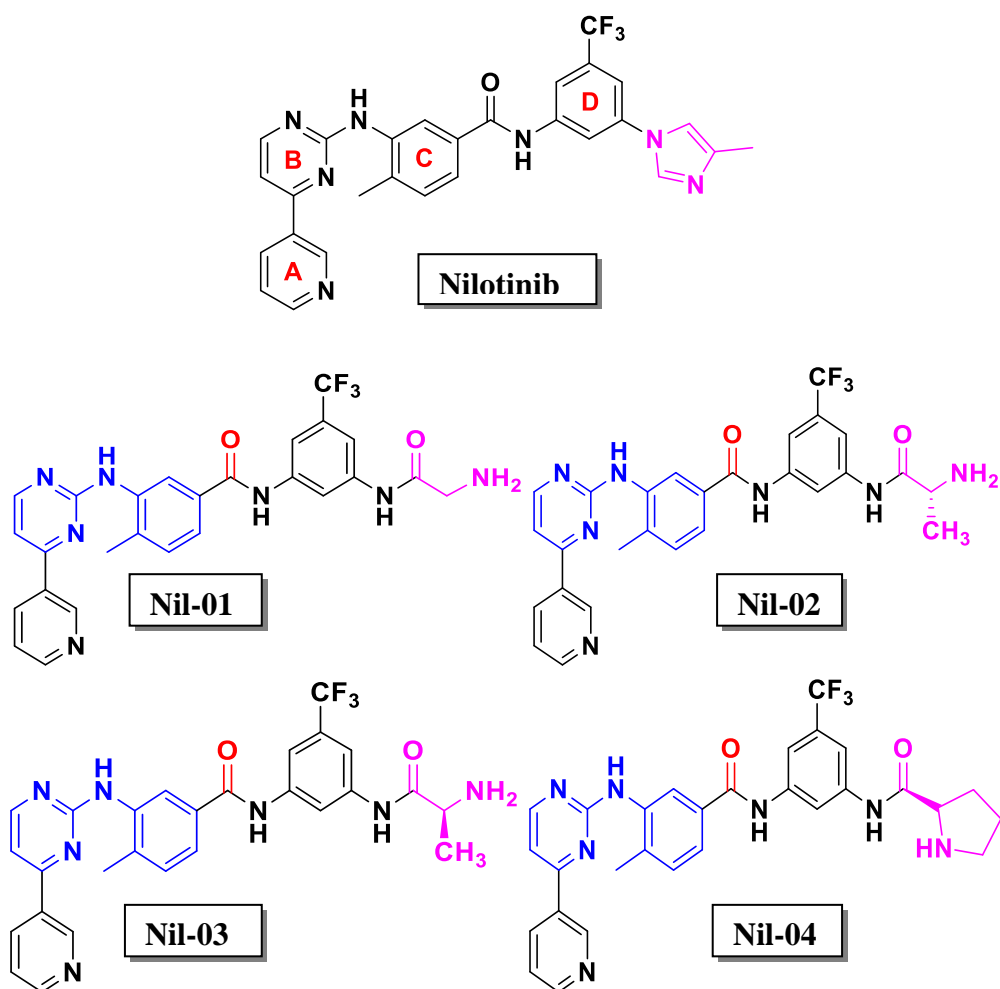
Συζήτηση-Αποτελέσματα

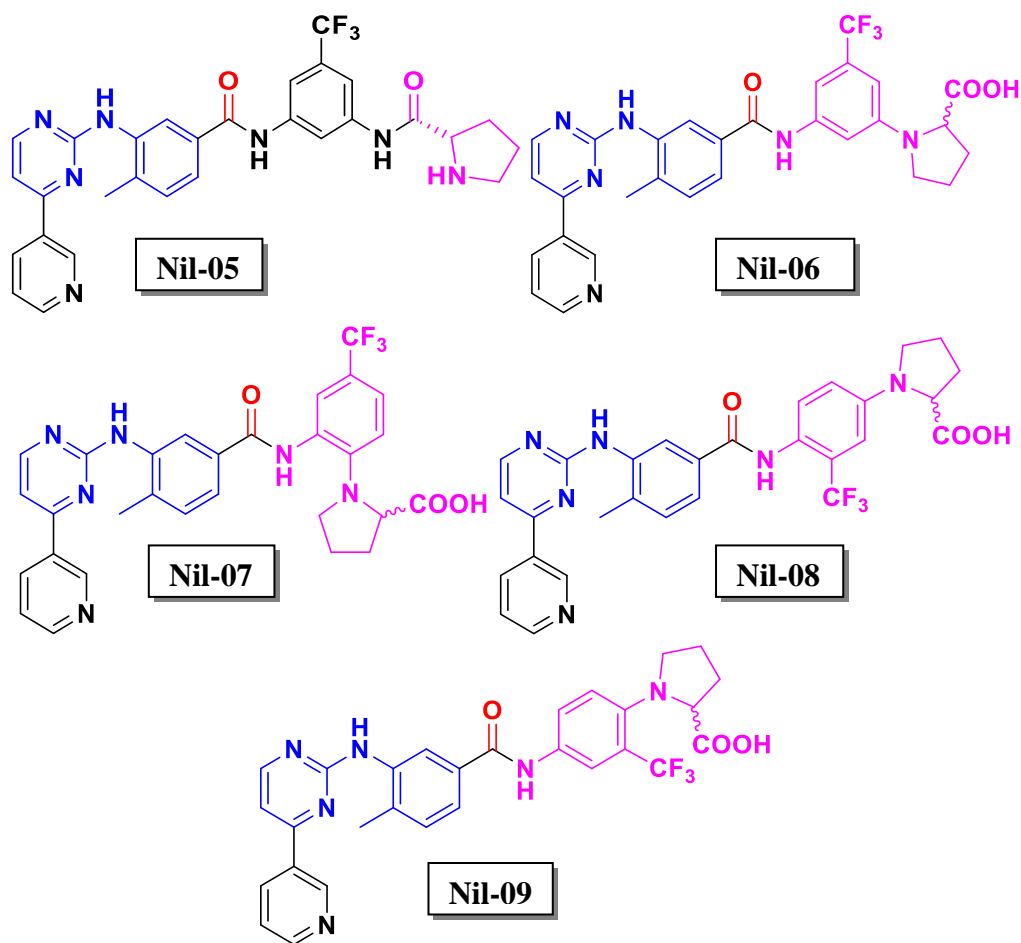
Στο θεωρητικό μέρος έγινε λεπτομερής αναφορά στις πρωτεϊνικές κινάσες, στο ρόλο τους στην κυτταρική σηματοδότηση, στη φυσιολογική και μη δράση τους, στην εμπλοκή τους στην καρκινογένεση, έγινε ακόμη αναφορά στην ανάπτυξη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, καθώς, μετά την επιτυχή σε μεγάλο βαθμό αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, επιβεβαιώθηκε ότι οι κινάσες αυτές αποτελούν την "Αχίλλειο Πτέρνα" των καρκινικών κυττάρων. Η αντίσταση των ασθενών στο Imatinib, τον πρώτο εκλεκτικό αναστολέα έναντι της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, δεύτερης και τρίτης γενιάς, που βρέθηκε στο επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος πολλών ερευνητικών ομάδων. Έχοντας ως γνώμονα την μεταλλαγμένη πρωτεϊνική κινάση Bcr-Abl, τα φαρμακευτικά σκευάσματα Imatinib (Glivec) και Nilotinb (Tasigna), τα βιολογικά αποτελέσματα που κατέδειξαν ορισμένα από τα προηγούμενα προϊόντα της ερευνητικής μας ομάδας, συνθετικά ανάλογα του φαρμακευτικού σκευάσματος του Imatinib, με βέλτιστη ανασταλτική δράση (Εικόνα 5,6), καθώς και τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης που διενεργήθηκαν στο εργαστήριο, προβήκαμε στη σύνθεση νέων φαινυλαμινοπυριμιδινικών παραγώγων, αναλόγων του Nilotinib, που θα μπορούσαν να δράσουν ως εν δυνάμει εκλεκτικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, για τη θεραπεία νεοπλασιών.

3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων

Το πρώτο βήμα για τη σύνθεση νέων οργανικών βιοδραστικών ενώσεων είναι ο σχεδιασμός τους, δίνοντας έμφαση στα βελτιωμένα τους χαρακτηριστικά, τα οποία θα οδηγήσουν σε αυξημένη και στοχευμένη δράση έναντι των μορίων-στόχων. Μικρές, επουσιώδεις όμως αλλαγές στημοριακήδομή των φαρμάκων θα μπορούσαν να οδηγήσουν, πιθανόν, σε ουσιαστική αλλαγή της διαμόρφωσης του εν δυνάμει αναστολέα με πιθανό επιθυμητό αποτέλεσμα την αύξηση της ανασταλτικής του δράσης ή και την αναστολή άλλων παθολογικών κινασών.

Πιο συγκεκριμένα, στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στη δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος Nilotinib. Διατηρήθηκαν ανέπαφοι οι δακτύλιοι A,B,C, οι δε στοχευμένες τροποποιήσεις αφορούσαν την προσάρτηση-εισαγωγή φυσικών και μη αμινοξέων, στο δακτύλιο D, είτε με το σχηματισμό αμιδικού δεσμού, είτε με την απευθείας προσάρτηση της προλίνης στη θέση του ιμιδαζολικού δακτυλίου του Nilotinib. Τα ανάλογα που σχεδιάστηκαν, ως απόρροια της μοριακής μοντελοποίησης, και συντέθηκαν στο εργαστήριο παρουσιάζονται σχηματικά παρακάτω (Εικόνα 8) ενώ οι σχετικές τροποποιήσεις περιγράφονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1). Αναμένεται να διενεργηθούν τα βιολογικά πειράματα, προκειμένου να διαπιστωθεί η ανασταλτική τους δράση.





Εικόνα 8 : Ανάλογα-παράγωγα του Nilotinib, εν δυνάμει αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο.

Πίνακας 1 : Περιγραφή των τροποποιήσεων στα συντεθέντα ανάλογα/παράγωγα του Nilotinib

Nil-01	Ανάλογο του Nilotinib με την προσάρτηση γλοκίνης στο δακτύλιο D, με σχηματισμό αμιδικού δεσμού
Nil-02	Ανάλογο του Nilotinib με την προσάρτηση L-αλανίνης στο δακτύλιο D με σχηματισμό αμιδικού δεσμού
Nil-03	Ανάλογο του Nilotinib με την προσάρτηση D-αλανίνης στο δακτύλιο

D με σχηματισμό αμιδικού δεσμού

Nil-04	Ανάλογο του Nilotinib με την προσάρτηση L-προλίνης στο δακτύλιο D με σχηματισμό αμιδικού δεσμού
Nil-05	Ανάλογο του Nilotinib με την προσάρτηση D-προλίνης στο δακτύλιο D με σχηματισμό αμιδικού δεσμού
Nil-06	Ανάλογο του Nilotinib με απευθείας προσάρτηση της προλίνης στο δακτύλιο D σε meta θέση ως προς την –CF₃ ομάδα
Nil-07	Ανάλογο του Nilotinib με απευθείας προσάρτηση της προλίνης στο δακτύλιο D σε para θέση ως προς την –CF₃ ομάδα
Nil-08	Ανάλογο του Nilotinib με απευθείας προσάρτηση της προλίνης στο δακτύλιο D σε meta θέση ως προς την –CF₃ ομάδα
Nil-09	Ανάλογο του Nilotinib με απευθείας προσάρτηση της προλίνης στο δακτύλιο D σε ortho θέση ως προς την –CF₃ ομάδα

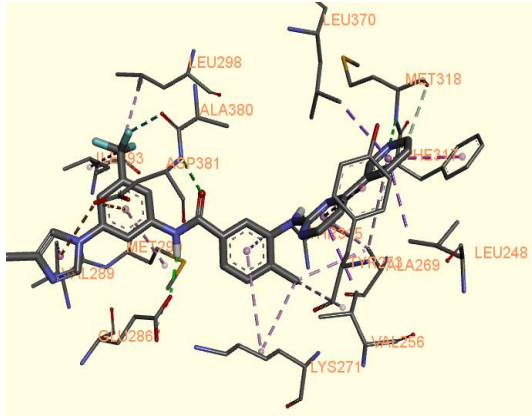
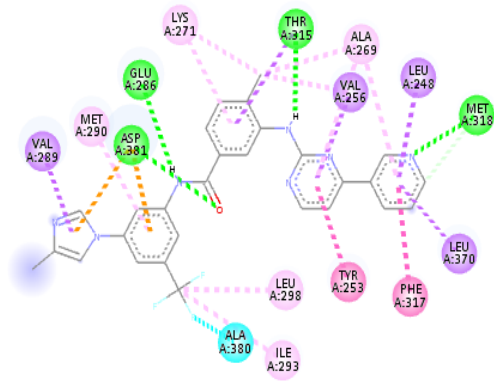
Ο σχεδιασμός όλων των παραπάνω ενώσεων ήταν και αποτέλεσμα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης, τα οποία διενεργήθηκαν στο εργαστήριο.

3.2 Σχεδιασμός νέων αναστολέων

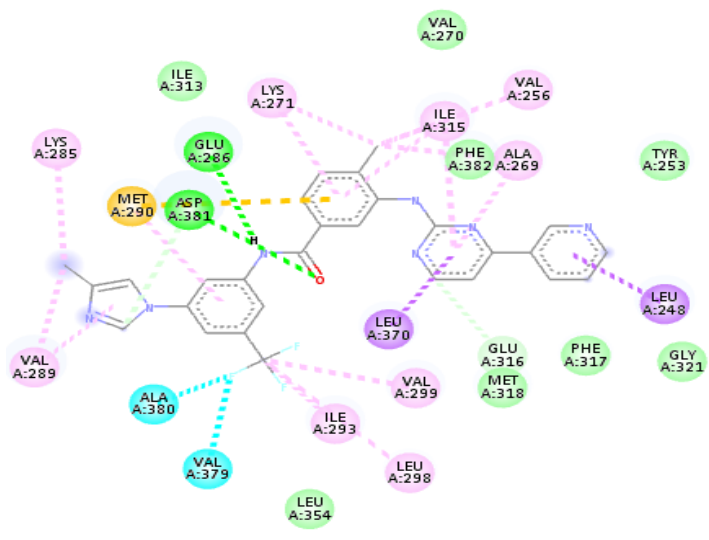
Η μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου κινασών, με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοντελοποίησης και με μοριακούς υπολογισμούς πρόσδεσης του αναστολέα στο ένζυμο, επιτρέπει τη σύγκριση ενώσεων με πιθανή δράση έναντι της κινάσης με γνωστούς αναστολείς. Με αυτό τον τρόπο υποδεικνύονται οι ενώσεις που είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν βιολογική δράση. Επιπρόσθετα, μέσω της συσχέτισης δομής-δράσης των μορίων παρέχεται ένα φαρμακοφόρο μοντέλο για το σχεδιασμό νέων δραστικότερων και εκλεκτικότερων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Τα ανάλογα/παράγωγα του Nilotinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο είναι αναστολείς τύπου II (όπως και το ίδιο το φάρμακο) και προσδένονται στη θέση δέσμευσης του ATP στην τυροσινική κινάση Abl, εκδηλώνοντας παρόμοιες αλληλεπιδράσεις, με αυτές του Nilotinib, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Δεδομένου ότι το Nilotinib είναι δραστικότερος αναστολέας από το Imatinib, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς-οδηγός για τη μοριακή μοντελοποίηση και το σχεδιασμό των νέων παραγώγων. Στόχος ήταν οι νέες ενώσεις να παρουσιάζουν ίδιες ή καλύτερες τιμές πρόσδεσης από το Nilotinib.

Το Nilotinib αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της κινάσης Abl μέσω τεσσάρων δεσμών υδρογόνου, όπως άλλωστε προαναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος. Από την *Εικόνα 52*, η οποία έχει ληφθεί από πειράματαμοριακής μοντελοποίησης με το πρόγραμμα AUTODOCKVINA, φαίνεται ότι δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα) σχηματίζονται μεταξύ του πυριδινυλικού ατόμου αζώτου (δέκτης) με το -H του -NHCO- της Met318 και της αμινικής ομάδας -NH- (δότης) με την υδροξυλική ομάδα της Thr315. Επίσης, το καρβονυλικό οξυγόνο του αμιδικού δεσμού (δέκτης) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το -H του -NHCO- του Asp381 και το αμιδικό -H του -NHCO- (δότης) σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την καρβοξυλική ομάδα του Glu286. Επίσης, υπάρχουν και π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρωματικών δακτυλίων (μώβ χρώμα). Όσον αφορά την αλληλεπίδραση του Nilotinib με τη μεταλλαγμένη Bcr-Abl κινάση, οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου είναι πλέον δύο αντί για τέσσερις, όπως φαίνεται σχηματικά στην *Εικόνα 53*.



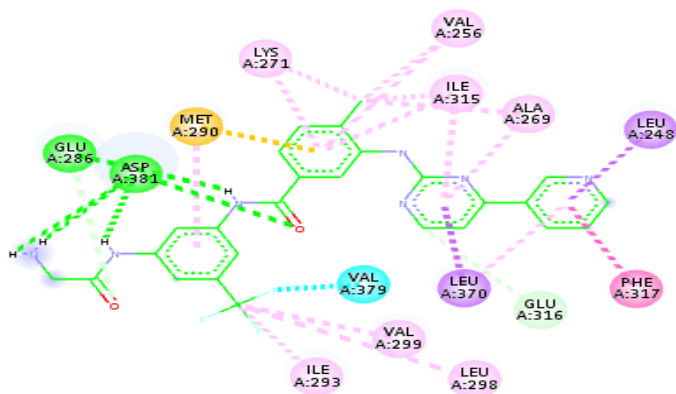
Εικόνα 52: Αριστερά, Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Nilotinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Abl κινάσης. Δεξιά, η 3D δομή του Nilotinib και οι αλληλεπιδάσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Abl κινάσης.



Εικόνα 53: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Nilotinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της μεταλλαγμένης Bcr-Abl κινάσης.

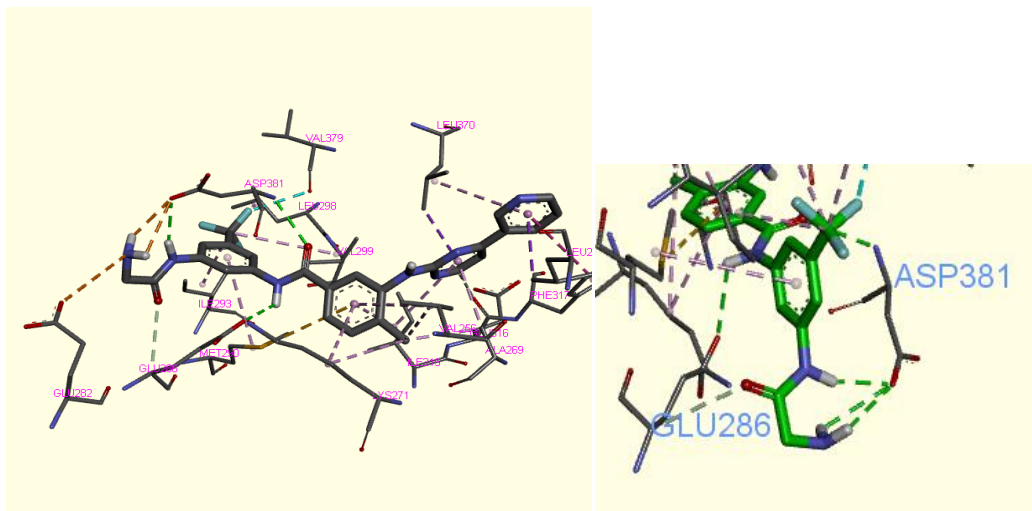
3.2.1 Μοριακή μοντελοποίηση της ένωσης Nil-01 (AUTODOCKVINA)

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 54,55,56) παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις του Nil-01 στην μεταλλαγμένη Bcr-Abl πρωτεϊνική κινάση, καθώς και η συγκρυστάλλωση του με το Nilotinib στο ενεργό κέντρο της κινάσης.

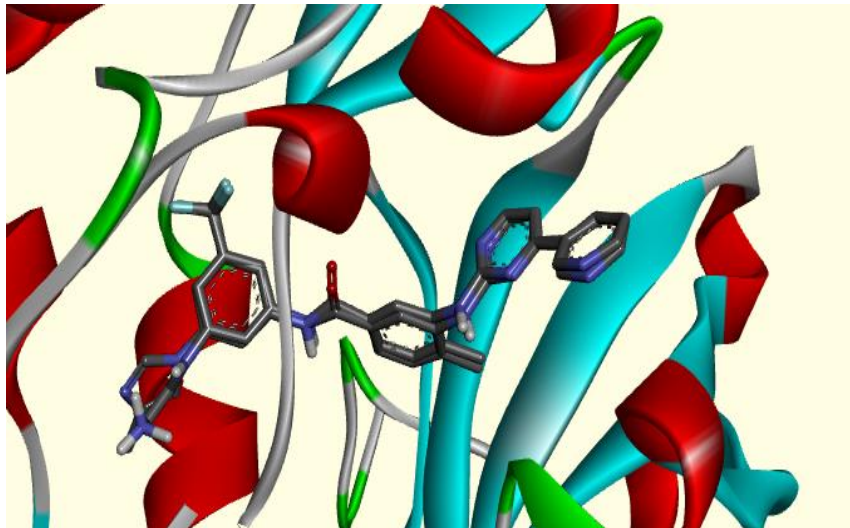


Εικόνα 54 : Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της Nil-01 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcr-Abl.

- Van der Waals
- Pi-Sigma
- Alkyl
- Alogen
- Pi-Sulfur
- Conventional Hydrogen bond
- Pi-Pi stacked



Εικόνα 55 : 3D δομή της Nil-01 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcr-Abl κινάσης.

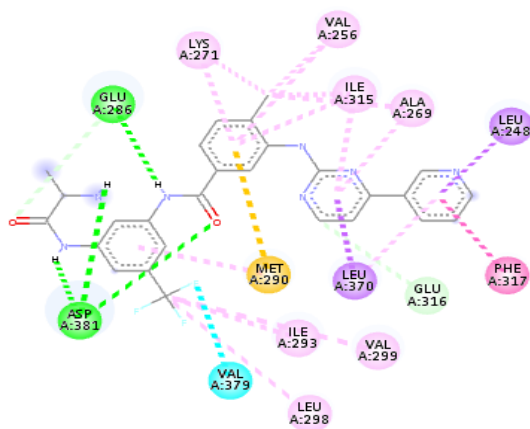


*Εικόνα 56 : Συγκρυστάλλωση
Nil-01 και Nilotinib στον
τομέα της Bcr-Abl κινάσης*

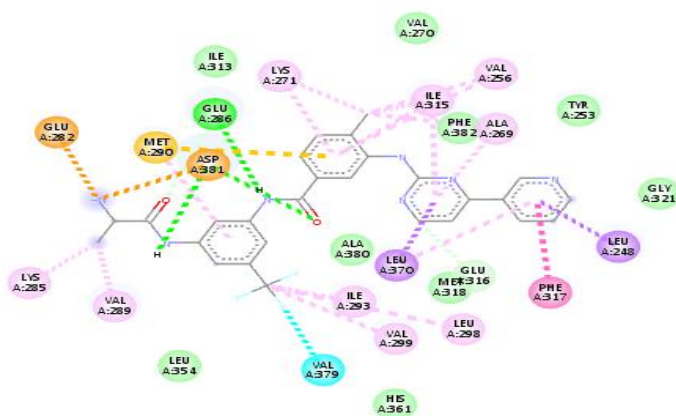
Στο παράγωγο αυτό διαπιστώνεται ότι διατηρήθηκαν οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου με τη Glu286 και τη Asp381, ενώ οι διαφορές ως προς την συγκρυστάλλωση εστιάζονται μόνο στην περιοχή του ιμιδαζολικού δακτυλίου του Nilotinib, καθώς αυτός έχει αντικατασταθεί με τη γλυκίνη (Εικόνα 56).

3.2.2 Μοριακή μοντελοποίηση των ενώσεων Nil-02 και Nil-03 (AUTODOCKVINA)

Οι αλληλεπιδράσεις των αναλόγων **Nil-02** και **Nil-03**, με L-αλανίνη και D-αλανίνη, αντίστοιχα, με την μεταλλαγμένη Bcr-Abl, καθώς και η συγκρυστάλλωσή τους με το Nilotinib στον τομέα της κινάσης παρουσιάζονται παρακάτω.

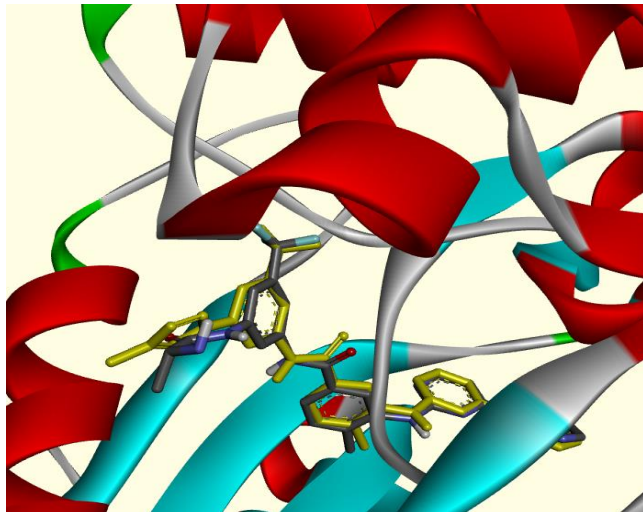


Εικόνα 57: Επάνω, σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της Nil-02 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcr-Abl. Κάτω, σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της Nil-03 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcr-Abl.

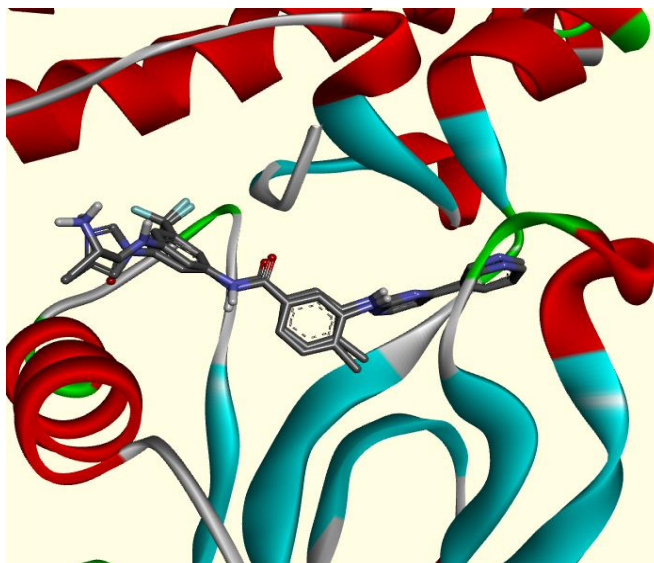


- | | | |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| ■ Van der Waals | ■ Pi-Sigma | ■ Alkyl |
| ■ Alogen | ■ Pi-Sulfur | |
| ■ Conventional Hydrogen bond | ■ Pi-Pi stacked | |

Παρατηρούμε ότι το **Nil-02** σχηματίζει 4 δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Glu286 και Asp381 του ενεργού κέντρου της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης, ενώ το **Nil-03** μόλις 3 δεσμούς υδρογόνου. Και στις δυο περιπτώσεις είναι περισσότεροι από αυτούς που σχηματίζει το Nilotinib.



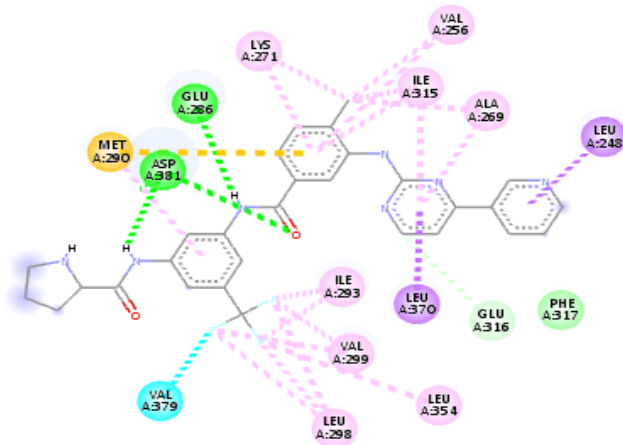
Εικόνα 58 : Επάνω, συγκρυστάλλωση *Nil-02* και *Nilotinib* στον τομέα της *Bcr-Abl* κινάσης. Κάτω, συγκρυστάλλωση *Nil-03* και *Nilotinib* στον τομέα της *Bcr-Abl* κινάσης. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το *Nilotinib* και με γκρι η αντίστοιχη ένωση.



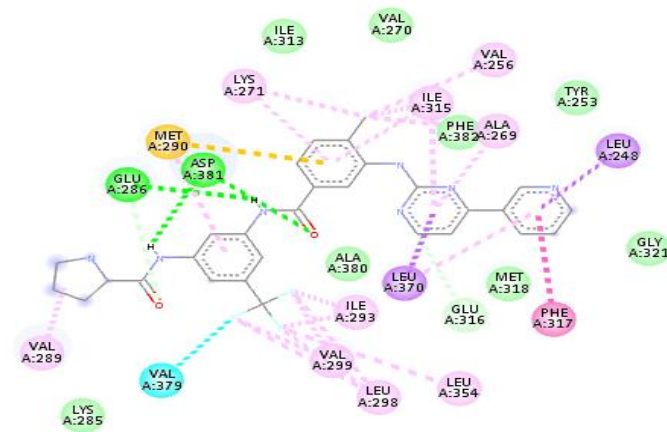
Και στην περίπτωση αυτών των δυο αναλόγων, οι διαφορές εστιάζονται στον τελικό μιδαζολικό δακτύλιο, ο οποίος αντικαθίσταται από L- και D-αλανίνη. Παρατηρείται ταύτιση των μορίων στην υπόλοιπη δομή τους.

3.2.3 Μοριακή μοντελοποίηση των ενώσεων *Nil-04* και *Nil-05* (AUTODOCKVINA)

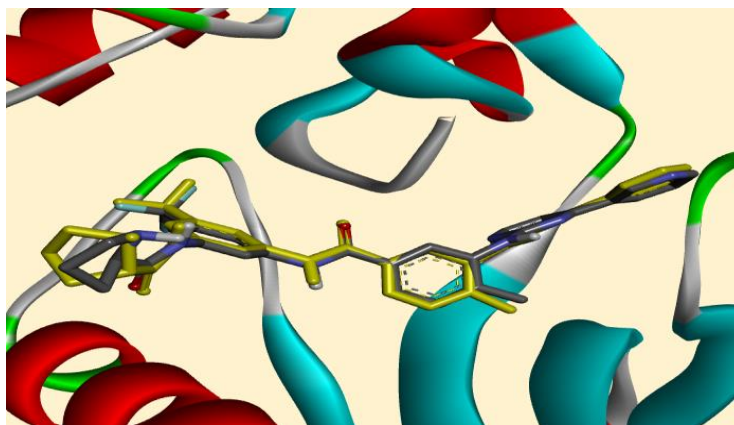
Τα **Nil-04** και **Nil-05**, τα ανάλογα με προσάρτηση L- και D- προλίνης, αντίστοιχα, αλληλεπιδρούν με τη μεταλλαγμένη *Bcr-Abl* κινάση σχηματίζοντας το καθένα από τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα αμινοξέων Glu286 και Asp381 της κινάσης (*Εικόνα 59*).



Εικόνα 59 : Επάνω, σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της Nil-04 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcr-Abl. Κάτω, σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της Nil-05 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Bcr-Abl.

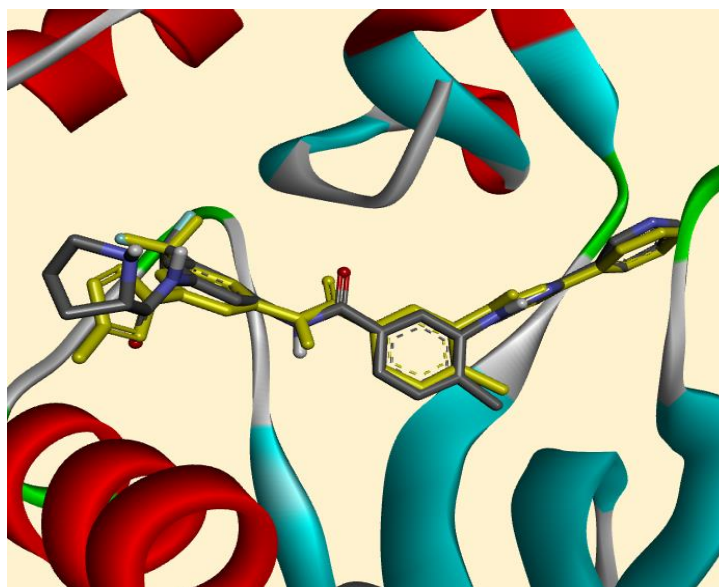
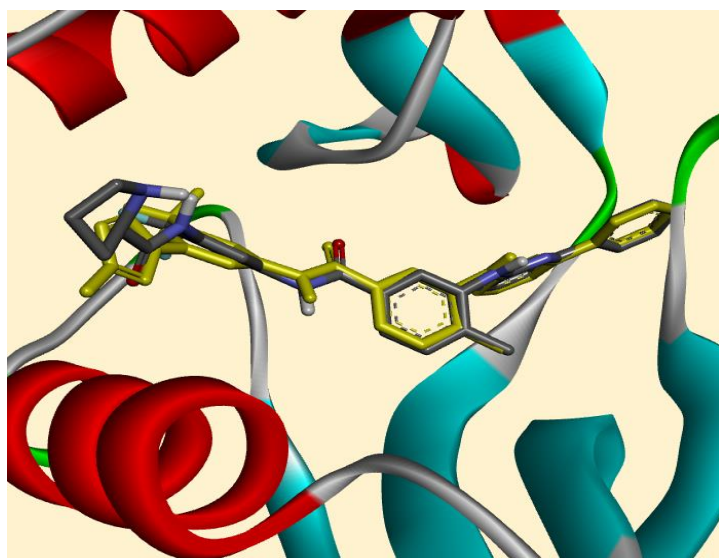


Μέσω πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης προσομοιώσαμε και τη συγκρυστάλλωση των Nil-04 και Nil-05, παρατηρώντας πολύ μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση, μόνο στον τελικό δακτύλιο της προλίνης. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται η Nil-05 και με γκρι η Nil-04 (Εικόνα 60).



Εικόνα 60: Συγκρυστάλλωση των Nil-04 και Nil-05

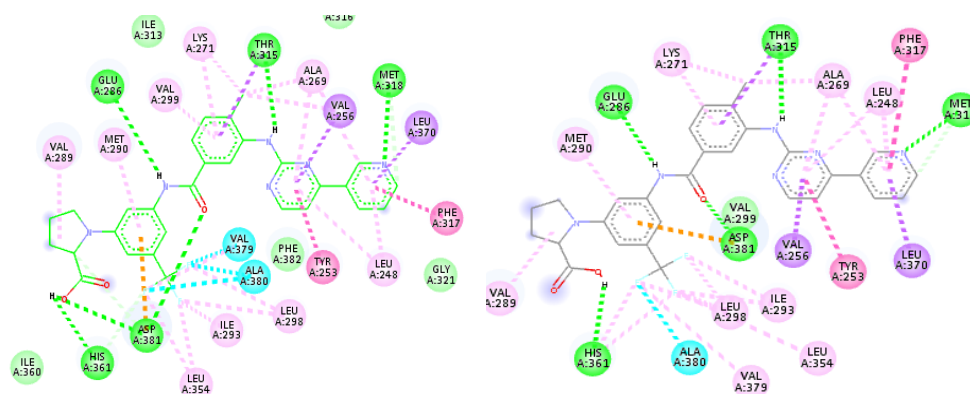
Παρακάτω, απεικονίζεται η συγκρυστάλλωση των **Nil-04** και **Nil-05** με το Nilotinib. Με κίτρινο χρώμα παριστάνεται το ίδιο το φάρμακο, ενώ με γκρι τα παράγωγα **Nil-04** και **Nil-05**. Και σε αυτήν την περίπτωση η μόνη περιοχή που εντοπίζονται διαφοροποιήσεις είναι στον τελικό δακτύλιο, ο οποίος έχει αντικατασταθεί με L- D- προλίνη αντίστοιχα. Η υπόλοιπη περιοχή του μορίου ταυτίζεται με το Nilotinib (*Εικόνα 61*).



Εικόνα 61: : Επάνω, συγκρυστάλλωση Nil-04 και Nilotinib στον τομέα της Bcr-Abl κινάσης. Κάτω, συγκρυστάλλωση Nil-05 και Nilotinib στον τομέα της Bcr-Abl κινάσης.

Για τα δύο αυτά ανάλογα πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης και για την Abl φυσιολογική κινάση. Στην περίπτωση του αναλόγου **Nil-04**, αυτό με προσάρτηση L- προλίνης, σχηματίζονται 6 δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα αμινοξέων στο ενεργό κέντρο της κινάσης, ενώ για το παράγωγο **Nil-05** οι

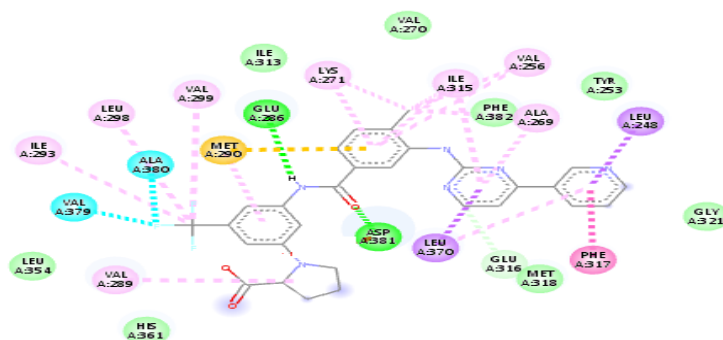
αντίστοιχοι δεσμοί είναι 5 (Εικόνα 62). Και τα δυο αυτά ανάλογα σε σύγκριση με την Εικόνα 52 σχηματίζουν περισσότερους δεσμούς υδρογόνου σε σχέση με το Nilotinib.



Εικόνα 62: Αριστερά, σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του **Nil-04** με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της *Abl*. Δεξιά, σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του **Nil-05** με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της *Abl*.

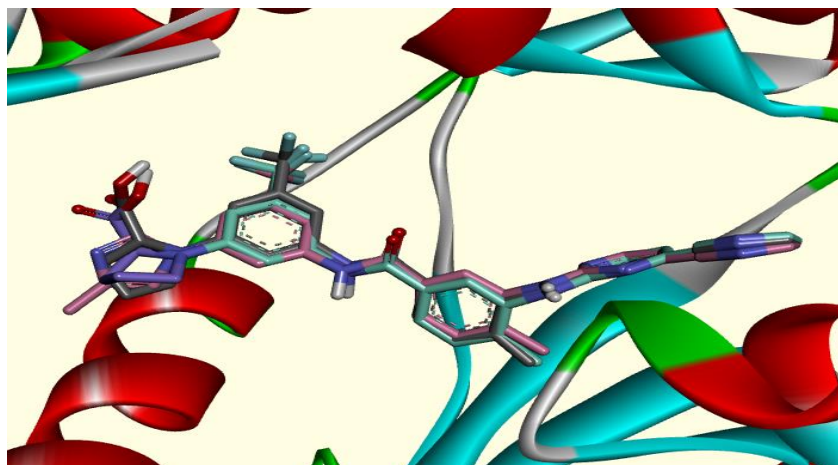
3.2.4 Μοριακή μοντελοποίηση της ένωσης **Nil-06** (AUTODOCKVINA)

Το **Nil-06** αποτελεί ισοστερικό ανάλογο του Nilotinib. Η απουσία της προσάρτησης της προλίνης, χωρίς την παρεμβολή αμιδικού δεσμού, στη θέση του ιμιδαζολικού δακτυλίου του Nilotinib, έχει ως αποτέλεσμα οι δυο αυτές ενώσεις να καταλαμβάνουν τον ίδιο χώρο στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Οι αλληλεπιδράσεις του αναλόγου **Nil-06** με τα κατάλοιπα αμινοξέων της μεταλλαγμένης Bcr-Abl παρουσιάζονται στην Εικόνα 63. Παρατηρούμε ότι οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου είναι μόλις 2 με τα κατάλοιπα Glu286 και Asp381, όπως ακριβώς και στην περίπτωση του Nilotinib.



Εικόνα 63: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της **Nil-06** με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της *Bcr-Abl*

Όπως φαίνεται από την συγκρυστάλλωση της **Nil-06** και του Nilotinib στην παρακάτω εικόνα, οι δυο αυτές ενώσεις είναι όντως ισοστερικές, καθώς τα δυο αυτά μόρια ταυτίζονται σχεδόν πλήρως στον τομέα της μεταλλαγμένης κινάσης. Οι διαφορές τους είναι πολύ μικρές και εστιάζονται στον τελευταίο δακτύλιο.



Εικόνα 64: Συγκρυστάλλωση Nil-06 και Nilotinib στον τομέα της Bcr-Abl κινάσης. Με ροζ χρώμα απεικονίζεται το Nilotinib και με γαλάζιο η Nil-06.

3.2.5 Θεωρητικά αποτελέσματα

Βάσει της Μοριακής μοντελοποίησης λήφθηκαν τα παρακάτω θεωρητικά αποτελέσματα (Πίνακας 2). Έχοντας ως ένωση αναφοράς το Nilotinib και συγκρίνοντας τις ενώσεις **Nil-01-Nil-06** με αυτό, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι περισσότερες ενώσεις και ιδιαίτερα οι **Nil-02** και **Nil-05**, έχοντας τη μικρότερη ενέργεια (score), δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τη δέσμευσή τους στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Η ενέργεια αυτή, εκφράζει την ελεύθερη ενέργεια Gibbs και η αρνητική της τιμή σημαίνει ότι η διεργασία γίνεται αυθόρμητα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης των αναλόγων **Nil-01** έως **Nil-06**, όπως και του ίδιου του Nilotinib, στο ενεργό κέντρο της κινάσης, είναι αρνητικές, γεγονός που υποδεικνύει ότι η πρόσδεση αυτή ευνοείται θερμοδυναμικά. Όσο μικρότερη η ενέργεια, τόσο ισχυρότερα και αποτελεσματικά δεσμεύεται ο αναστολέας στο ενεργό κέντρο, κατά τη θεωρητική πάντα προσέγγιση, ως απόρροια της στερικής συμπληρωματικότητας ως προς το σχήμα και το μέγεθος, καθώς και της συμπληρωματικότητας των αλληλεπιδράσεων (δίπολο/δίπολο, δότης/δέκτης δεσμού υδρογόνου, Van der Waals κ.ά).

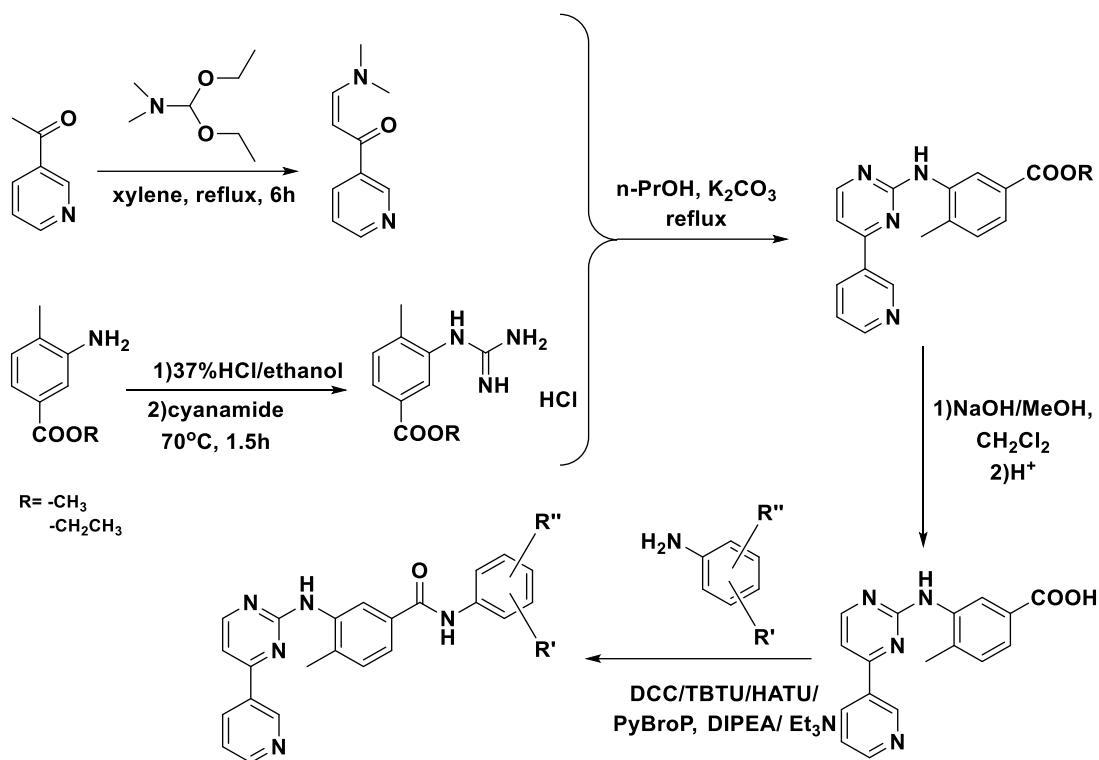
Πίνακας 2: Θεωρητικά αποτελέσματα μοριακής μοντελοποίησης

Ένωση	Score (kcal/mol)
Nilotinib	-11.3
Nil-01	-11.2
Nil-02	-12.2
Nil-03	-11.5
Nil-04	-10.6
Nil-05	-12.1
Nil-06	-12.0

Για τα ανάλογα **Nil-07 –Nil-09** δεν υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια Gibbs, λόγω έλλειψης χρόνου. Υποθέσαμε πως αλλάζοντας τη θέση των υποκαταστατών στον τελικό βενζολικό δακτύλιο, ίσως υπάρξει διαφοροποίηση στη βιολογική δραστικότητα αυτών των ενώσεων. Για το λόγο αυτό προβήκαμε στη σύνθεση τους.

3.3 Ολική πορεία σύνθεσης νέων αναστολέων

Η σύνθεση των αναλόγων του Nilotinib έγινε σύμφωνα με την κλασική μέθοδο σύνθεσης πυριμιδινικών δακτυλίων όπως πρόσφατα δημοσιεύτηκε από την ερευνητική μας ομάδα^[58]. Η *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλη αντιδρά με την 3-ακετυλοπυριδίνη για τη σύνθεση της επιθυμητής εναμινόνης, της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης. Παράλληλα, πραγματοποιείται η σύνθεση της επιθυμητής φαινυλογουανιδίνης με τήξη του κυαναμιδίου και προσθήκη αμινο-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα ή αιθυλεστέρα και ακολουθεί η κυκλοποίηση της εναμινόνης με τη μεθυλο-φαινυλογουανιδίνη. Το κυκλοποιημένο προϊόν υδρολύεται σε βασικές μη υδατικές συνθήκες και το σχηματιζόμενο οξύ δίνει αντιδράσεις σύζευξης με υποκατεστημένες ανιλίνες με τη χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης, οδηγώντας στα επιθυμητά τελικά προϊόντα (Σχήμα 22). Ανάλογη συνθετική πορεία ακολουθείται από την ερευνητική μας ομάδα για τη σύνθεση αναλόγων του Imatinib.



Nilotinib analogues

Σχήμα 22 : Σχηματική ολική συνθετική πορεία αναλόγων του Nilotinib.

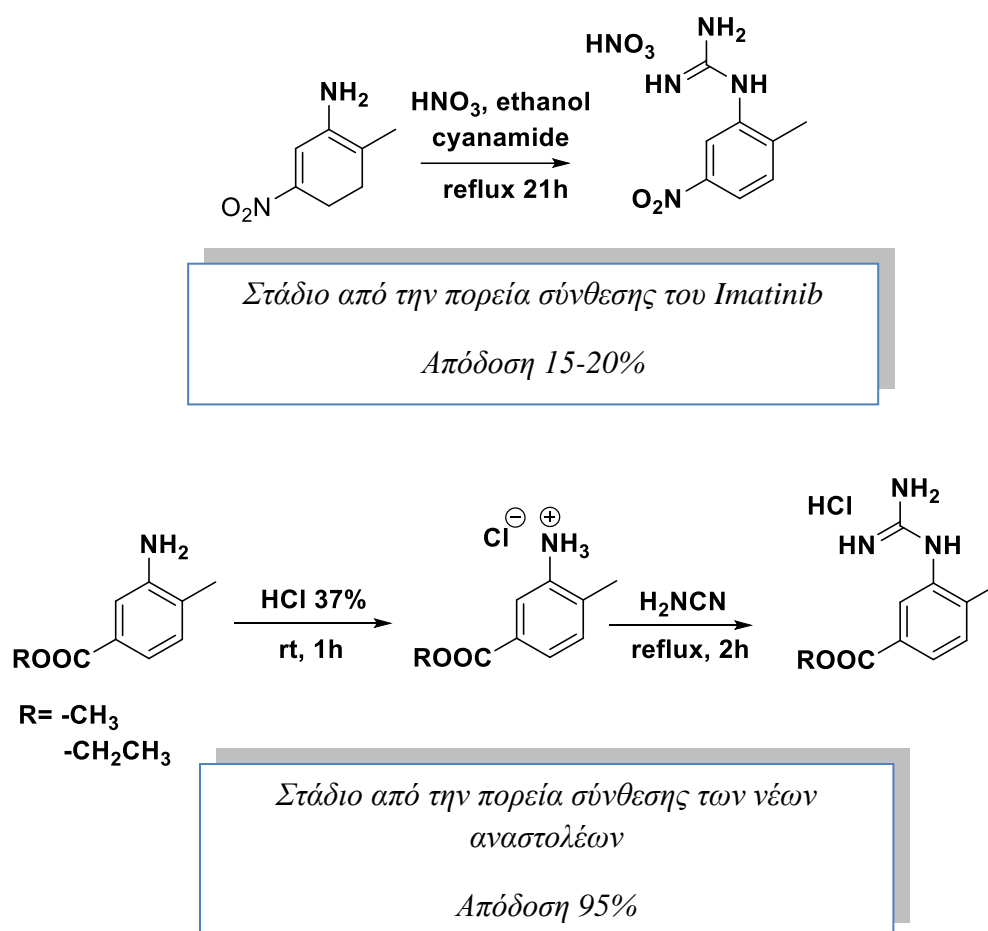
3.4 Βελτιστοποιήσεις στη σύνθεση των νέων αναστολέων

Η συνθετική πορεία που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για τη σύνθεση αναλόγων του Nilotinib είναι διαφοροποιημένη και βελτιωμένη τόσο σε σχέση με αυτή που έχει προταθεί από τον Zimmermann όσο και από αυτή που χρησιμοποιεί η Novartis για τη σύνθεση του φαρμακευτικού σκευάσματος Tasigna. Είναι μια σύνθεση πέντε συνολικά σταδίων που χαρακτηρίζεται από υψηλότερες αποδόσεις των ενδιάμεσων και των τελικών προϊόντων. Οι διαφοροποιήσεις εστιάζονται στα ακόλουθα στάδια:

❖ Στάδιο σύνθεσης υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών

Στο στάδιο αυτό για τη σύνθεση αναλόγων του Nilotinib δε χρησιμοποιήθηκε κάποιος οργανικός διαλύτης. Ως διαλύτης της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το ίδιο το κυαναμίδιο, το οποίο έχει σημείο τήξης 44 °C. Με αυτόν τον τρόπο, σε υψηλότερες θερμοκρασίες το κυαναμίδιο έχει διττό ρόλο, δηλαδή ως μέσο διαλυτοποίησης των υδροχλωρικών αλάτων και ως αντιδρών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα καλύτερη απόδοση (~95%) και μικρότερο χρόνο αντίδρασης καθώς αυτή ολοκληρώθηκε σε

μόλις 2 ώρες. Αντιθέτως, για τη σύνθεση του Imatinib η Novartis χρησιμοποιεί αιθανόλη ως διαλύτη, νιτρικό άλας της επιθυμητής ανιλίνης και κυαναμίδιο ως αντιδρών, ενώ το μίγμα αυτό θερμαίνεται επί 21 ώρες, δίνοντας πολύ χαμηλότερες αποδόσεις (<20%) (Σχήμα 23).

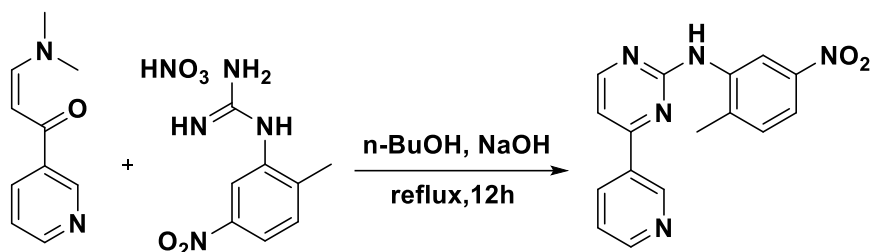


Σχήμα 23 : Διαφοροποιήσεις κατά τη σύνθεση των υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών.

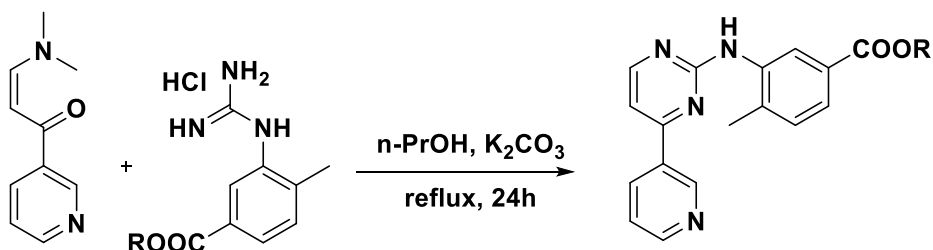
❖ Στάδιο κυκλοποίησης

Στο στάδιο κυκλοποίησης προς αμινοπυριμιδίνη χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης η *n*-προπανόλη αντί της *n*-βουτανόλης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η απόδοση των σχηματιζόμενων προϊόντων. Η χρήση της *n*-βουτανόλης, λόγω του υψηλότερου σημείου βρασμού, προκαλεί εν μέρει μετεστεροποίηση του μεθυλεστέρα ή του αιθυλεστέρα προς βουτυλεστέρα. Ο βουτυλεστέρας στη συνέχεια παρουσίαζε δυσκολίες στην ακολουθούσα υδρόλυση λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης για το

σχηματισμό του αντίστοιχου οξέος. Με τη χρήση της *n*-προπανόλης, το ποσοστό μετεστεροποίησης ήταν μικρότερο και ο σχηματιζόμενος προπυλεστέρας υδρολυόταν ευκολότερα και σε λιγότερο χρόνο. Μία ακόμη σημαντική τροποποίηση αφορά στη χρήση του ανθρακικού καλίου, αντί του καυστικού καλίου. Παρατηρήθηκε ότι η χρήση μιας ήπιας βάσης ελαχιστοποιεί τα παραπροϊόντα, οδηγώντας σε ευκολότερο καθαρισμό του κυκλοποιημένου προϊόντος (Σχήμα 24).



Στάδιο από την πορεία σύνθεσης του Imatinib



R= -CH₃
-CH₂CH₃

Στάδιο από την πορεία σύνθεσης των νέων
αναστολέων

Απόδοση ~87%

Σχήμα 24 : Διαφοροποιήσεις κατά τη σύνθεση του κυκλοποιημένου προϊόντος

Οι παραπάνω συνθήκες επέφεραν συνολικά καλύτερες αποδόσεις, εξοικονόμηση χρόνου και διαλυτών για τη σύνθεση και τον καθαρισμό των προϊόντων.

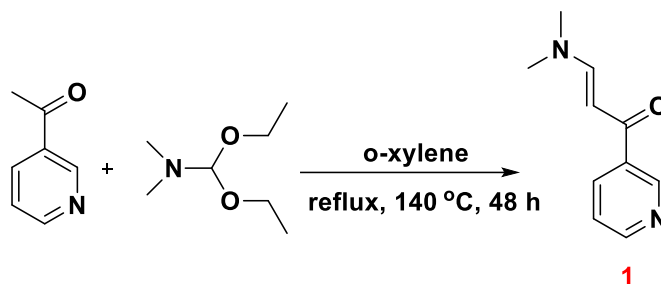
3.5 Σύνθεση παραγώγων του Nilotinib

Αρχικός στόχος είναι ο σχηματισμός της N-υποκατεστημένης-αμινοπυριμιδίνης, η οποία να φέρει τρεις αρωματικούς δακτυλίους. Στο τμήμα αυτό της ένωσης δεν πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις σε σχέση με την αρχική ένωση, το Nilotinib.

3.5.1 Σύνθεση β-εναμινόνης της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης, ένωση (1)

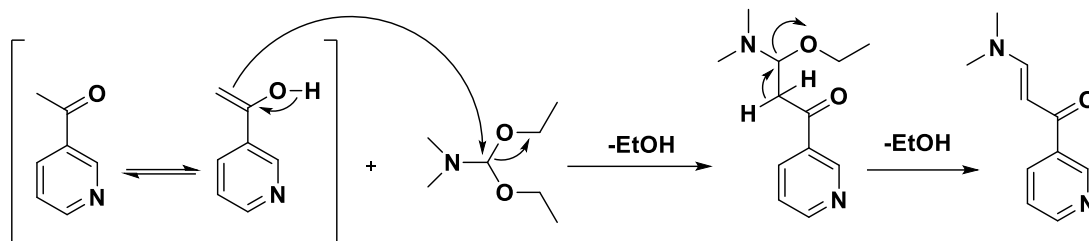
3.5.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της β-εναμινόνης

Για τη σύνθεση της εναμινόνης η οποία φέρει τον πυριδινικό δακτύλιο, χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικά αντιδραστήρια η 3-ακετυλοπυριδίνη και η N,N-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλη. Πρόκειται για μια αντίδραση συμπύκνωσης κατά την οποία η ενολική μορφή της 3-ακετυλοπυριδίνης αντιδρά με την N,N-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλη, σε διαλύτη ο-ξυλόλιο και θερμοκρασία 140 °C, δίνοντας απόδοση ~ 80%.



Σχήμα 25: Αντίδραση σχηματισμού β-εναμινόνης

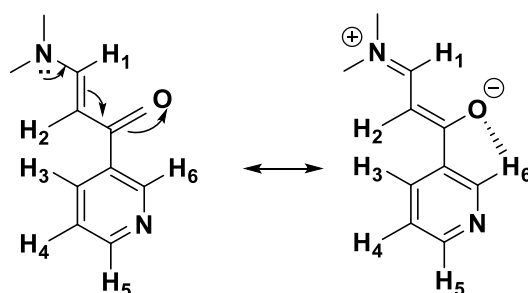
Η N,N-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλη, διαθέτουμε δυο καλές αποχωρούσες αιθοξυ-ομάδες, αντιδρά με την ενολική μορφή της 3-ακετυλοπυριδίνης δίνοντας την εναμινόνη. Συγκεκριμένα, το θερμοδυναμικά ευνοούμενο ενολικό ταυτομερές της 3-ακετυλοπυριδίνης, ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της N,N-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλης, αποβάλλοντας μια αιθοξυ-ομάδα ως αιθανόλη από την N,N-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλη και σχηματίζοντας έτσι μια ενδιάμεση ένωση, η οποία με απόσπαση ενός δευτέρου μορίου αιθανόλης, όπως φαίνεται και στο μηχανισμό του Σχήματος 26, παρέχει την επιθυμητή εναμινόνη.



Σχήμα 26 : Μηχανισμός σύνθεσης της εναμινόνης

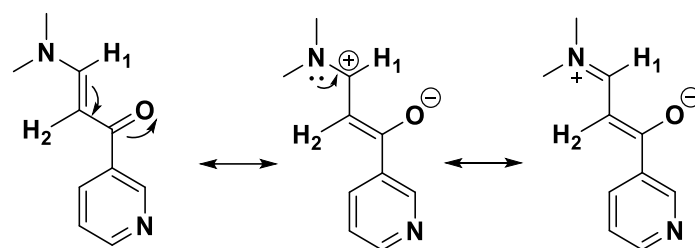
3.5.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της β-εναμινόνης, ένωση (I)

Το πλέον αποπροστατευμένο υδρογόνο είναι το H₆ στα 9.07 ppm, καθώς σχηματίζει ψευδοδεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο, ενώ το άτομο αζώτου της πυριδίνης έλκει ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να αποπροστατεύεται περισσότερο.



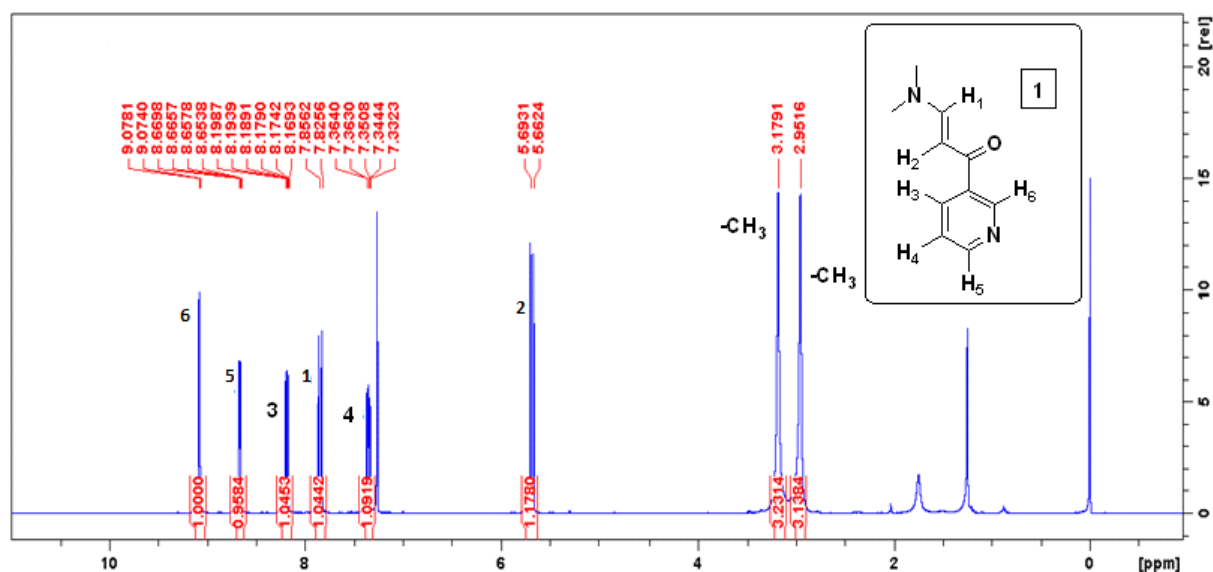
Σχήμα 27 : Ψευδοδεσμός υδρογόνου- Αποπροστασία H₆

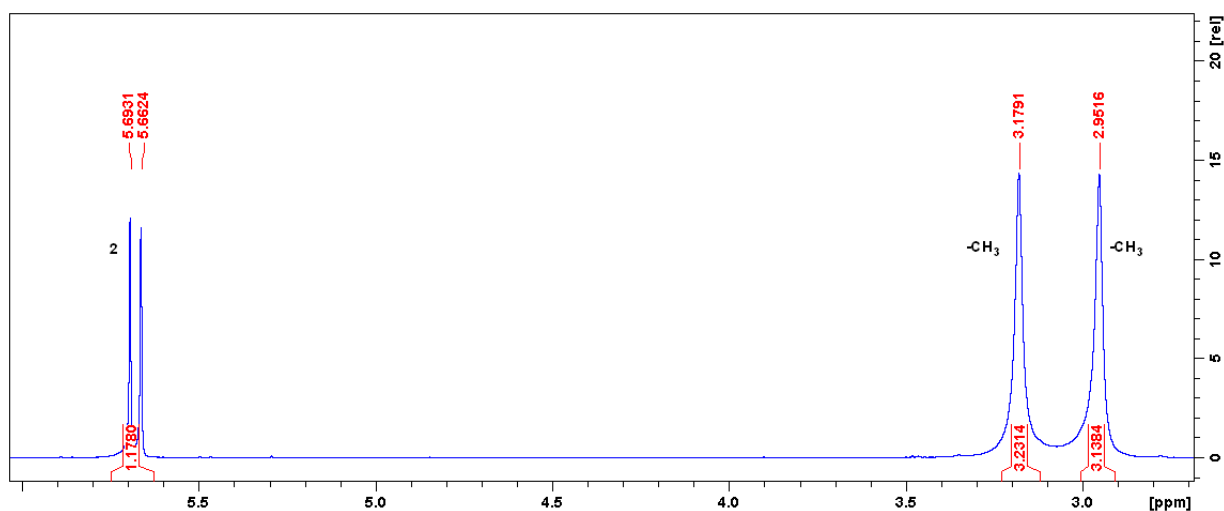
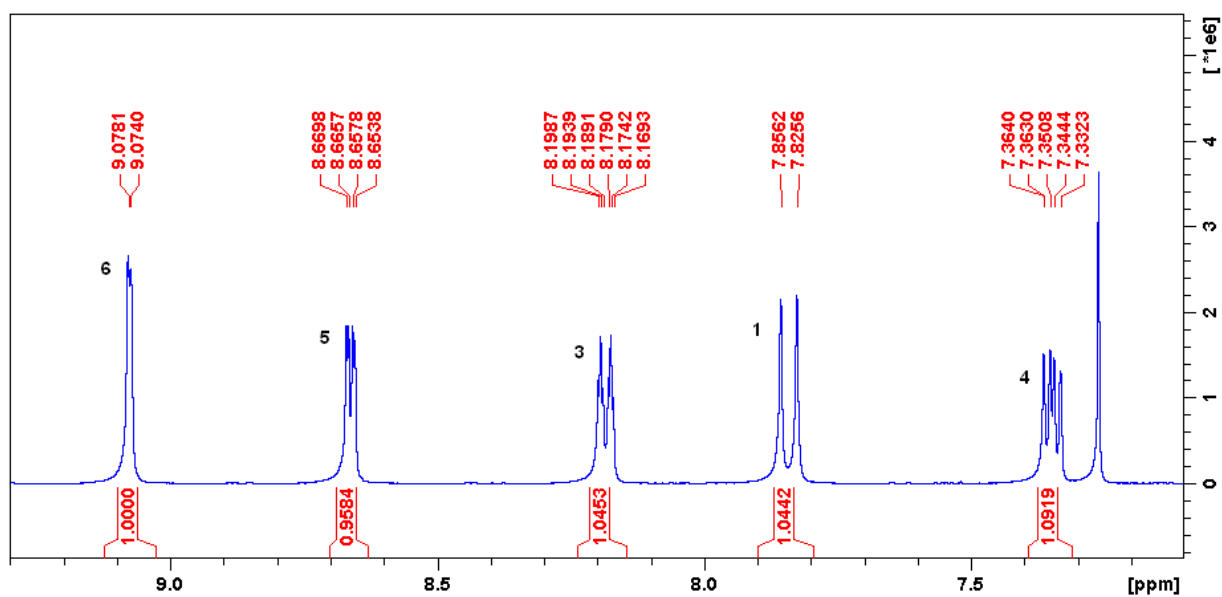
Το επόμενο πιο αποπροστατευμένο υδρογόνο είναι το H₅ στα 8.66 ppm, το οποίο αποπροστατεύεται από το γειτονικό άζωτο, ενώ παρουσιάζει μικρές τιμές σταθεράς σύζευξης $^3J=4.8$ Hz (λόγω του H₄) και $^4J=1.6$ Hz (λόγω του H₆). Το H₄ εμφανίζεται στα 7.34 ppm και σχάζεται από τα γειτονικά H₅ και H₃ με σταθερές σύζευξης $^3J_{H_3-H_4}=7.4$ Hz και $^3J_{H_4-H_5}=4.8$ Hz. Το H₃, ως απομακρυσμένο από το πυριδινικό άζωτο, εμφανίζεται στα 8.18 ppm και σχάζεται λόγω του γειτονικού H₄ με $^3J=7.4$ Hz και λόγω μακράς απόστασης από το H₆ με $^4J = 3.9$ Hz. Τέλος, τα ολεφινικά υδρογόνα H₁ και H₂ με $J=12.2$ Hz εμφανίζουν δύο διπλές χαρακτηριστικές κορυφές στα 7.84 και 5.68 ppm, καθώς το H₁ αποπροστατεύεται από το γειτονικό άζωτο και λόγω της συζυγίας της α,β-ακόρεστης κετόνης. Σύμφωνα με την παρακάτω αναγραφόμενη δομή συζυγίας εξηγούνται οι χημικές μετατοπίσεις των H₁ και H₂. Το H₁ συνδέεται με άνθρακα που φέρει μερικό θετικό φορτίο, επομένως αισθάνεται ηλεκτρονιακή έλλειψη-αποπροστασία.



Σχήμα 28 : Δομές συζυγίας- Αποπροστασία H₁

Επίσης, στο φάσμα ¹H NMR εμφανίζονται δυο σήματα συντονισμού ως δυο απλές κορυφές στα 3.12 και 2.95 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των δυο N-μεθυλομάδων. Θα αναμέναμε μια απλή κορυφή και για τα έξι, όμως αντιλαμβάνονται διαφορετικό χημικό και μαγνητικό περιβάλλον με αποτέλεσμα να συντονίζονται σε διαφορετικά πεδία. Αυτό συμβαίνει καθώς λόγω της εκδηλούμενης συζυγίας δεν υπάρχει ελεύθερη-γρήγορη περιστροφή γύρω από το δεσμό μεταξύ αζώτου και του ολεφινικού άνθρακα και συνεπώς ο δεσμός N-C αποκτά φύση διπλού δεσμού, όπως απεικονίζεται στα δυο παραπάνω σχήματα.





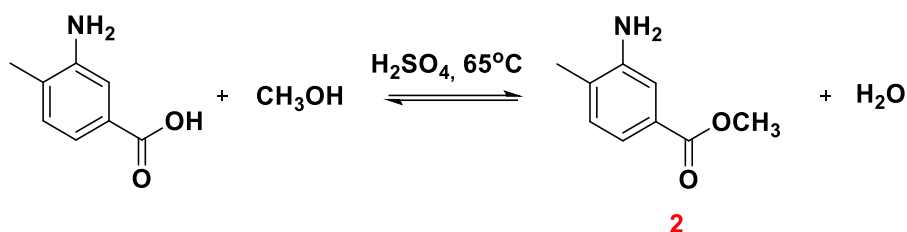
Σχήμα 29 : Φάσμα ^1H NMR της β -εναμινόνης (ένωση 1), 250MHz σε CDCl_3

3.5.2 Εστεροποίηση

3.5.2.1 Σύνθεση του 3-αμινο-4μεθυλο-βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 2) - Μηχανισμός

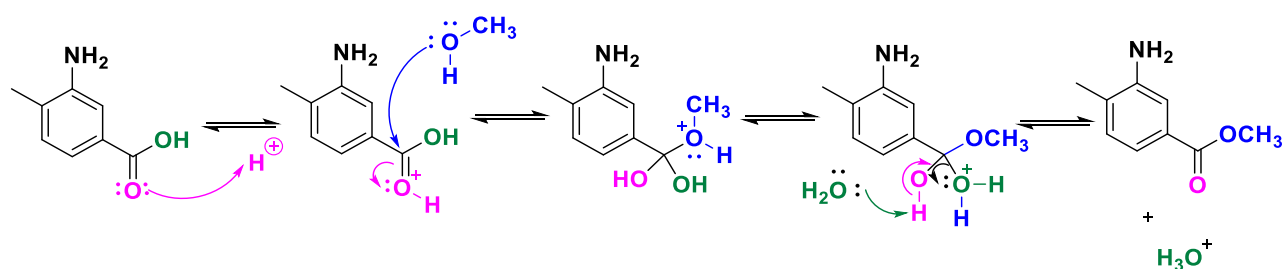
Πριν από τη σύνθεση της υποκατεστημένης γουανιδίνης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος, η οποία θα αντιδράσει με την εναμινόνη, απαιτείται ένα στάδιο προστασίας του καρβοξυλικού οξέος. Αυτό επιτυγχάνεται με την μετατροπή του σε μεθυλεστέρα. Σε διάλυμα απόλυτης μεθανόλης του οξέος προστίθεται πυκνό

H₂SO₄, για να πραγματοποιηθεί η εστεροποίηση του καρβοξυλικού οξέος. Η μεθανόλη λειτουργεί και ως διαλύτης και ως αντιδραστήριο, ενώ το θειικό οξύ δρα ως καταλύτης. Με τη μέθοδο αυτή, η απόδοση της αντίδρασης είναι περίπου 70%.



Σχήμα 30 : Αντίδραση σχηματισμού του 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκού μεθυλεστέρα

Η μεθανόλη δρα ως πυρηνόφιλο, καθώς προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο που με την αποβολή ενός μορίου νερού σχηματίζει το προϊόν εστεροποίησης. Η πρωτονίωση του καρβοξυλικού οξυγόνου ενεργοποιεί το καρβοξυλικό οξύ ως προς την πυρηνόφιλη προσβολή από τη μεθανόλη, οπότε σχηματίζεται ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο. Η μεταφορά ενός πρωτονίου από το ένα άτομο οξυγόνου στο άλλο, οδηγεί στο σχηματισμό ενός δεύτερου τετραεδρικού ενδιαμέσου και μετατρέπει το -OH σε καλή αποχωρούσα ομάδα $-^+OH_2$. Με απώλεια ενός πρωτονίου αναγεννάται ο όξινος καταλύτης και σχηματίζεται ο εστέρας.

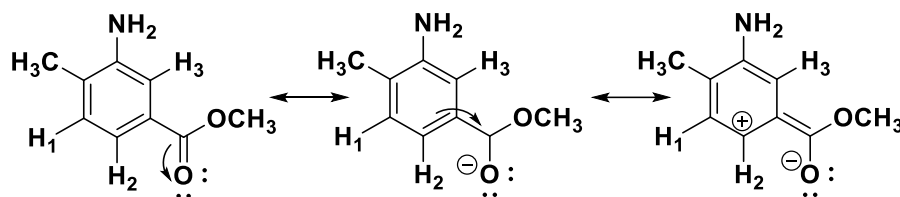


Σχήμα 31 : Μηχανισμός εστεροποίησης κατά Fischer. Η αντίδραση είναι μια πυρηνόφιλη ακυλο υποκατάσταση ενός καρβοξυλικού οξέος που καταλύεται από οξέα.

3.5.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 2

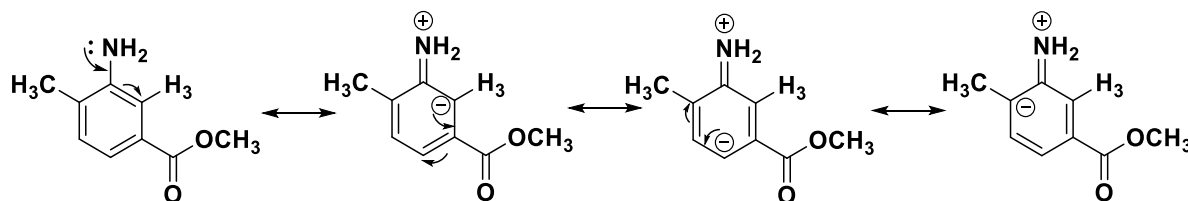
Στο φάσμα ¹H NMR του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα παρατηρούμε ότι σε υψηλότερες τιμές ppm, στα 7.37 ppm, συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 και σχάζεται σε μια διπλή κορυφή, λόγω του H₁ με ³J= 7.9 Hz. Είναι το πλέον αποπροστατευμένο, καθώς σε γειτονική θέση βρίσκεται η καρβονυλική ομάδα που μέσω του συζυγιακού φαινομένου αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το

βενζολικό δακτύλιο, ενώ παράλληλα ο άνθρακας πάνω στον οποίο βρίσκεται φορτίζεται θετικά, όπως φαίνεται σχηματικά παρακάτω.



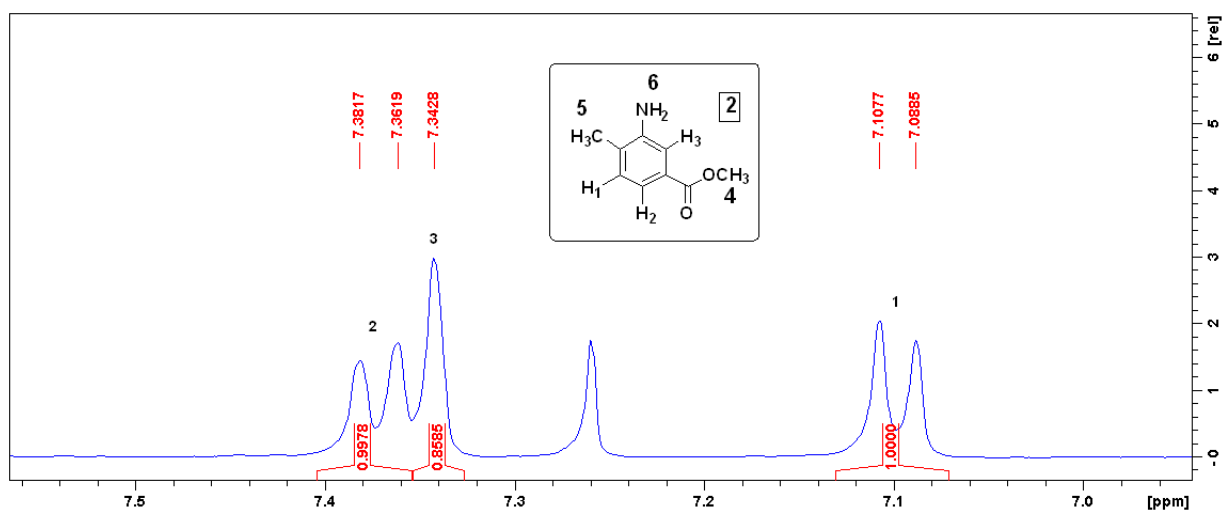
Σχήμα 32 : Ερμηνεία αποπροστασίας του H₂

Το πρωτόνιο H₃ δίνει μια απλή κορυφή στα 7.34 ppm, καθώς δεν έχει καθόλου γειτονικά πρωτόνια. Η σχετική αποπροστασία του αποδίδεται στο ότι σε ορθο-θέση βρίσκεται μια ομάδα που είναι δέκτης ηλεκτρονίων, η εστερική ομάδα, που αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το δακτύλιο (κατ' ανάλογο τρόπο όπως στο Σχήμα 32), αλλά και στο ότι σε ορθο-θέση βρίσκεται η αμινομάδα που του προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω συζυγιακού φαινομένου, καθώς είναι ενεργοποιητής.

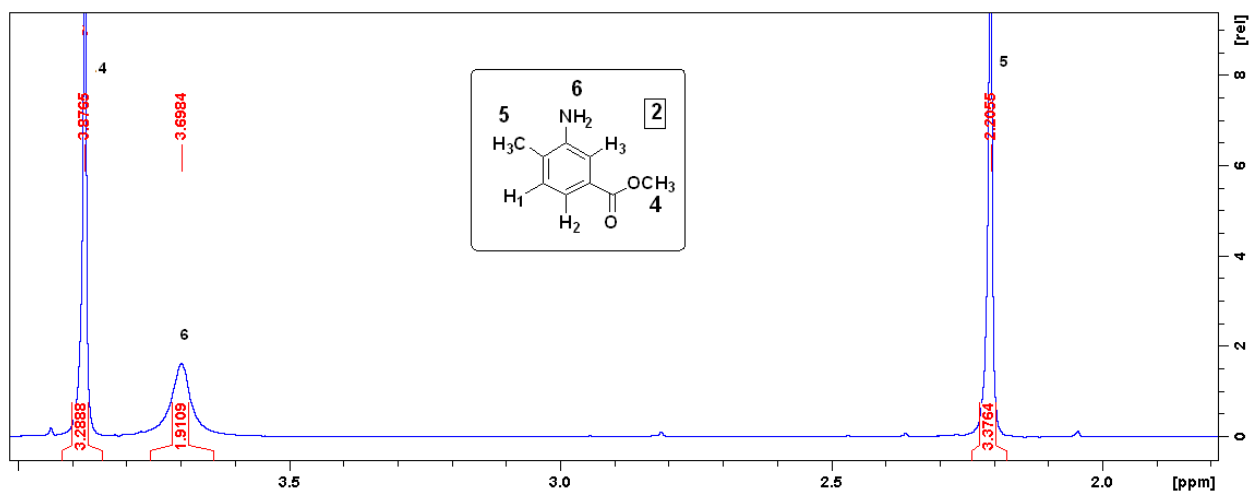


Σχήμα 33 : Ερμηνεία αποπροστασίας του H₃

Το H₁ συντονίζεται στα 7.09 ppm, δίνοντας μια διπλή κορυφή λόγω του H₂ με $^3J=7.6$ Hz. Είναι το περισσότερο προστατευμένο πρωτόνιο στο βενζολικό δακτύλιο, καθώς σε ορθο-θέση ως προς αυτό υφίσταται η μεθυλο-ομάδα που του προσφέρει μέσω επαγωγικού φαινομένου ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται στα 3.87 ppm, ως μια απλή κορυφή. Δεδομένου ότι το ηλεκτραρνητικό οξυγόνο που βρίσκεται δίπλα σε αυτά, αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα, τα συγκεκριμένα πρωτόνια είναι πιο αποπροστατευμένα από τα πρωτόνια του μεθυλίου που βρίσκεται πάνω στο βενζολικό δακτύλιο. Αυτά συντονίζονται στα 2.21 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια της αμινομάδας συντονίζονται στα 3.69 ppm και δίνουν μια χαρακτηριστική απλή ευρεία κορυφή, με ολοκλήρωση δυο.



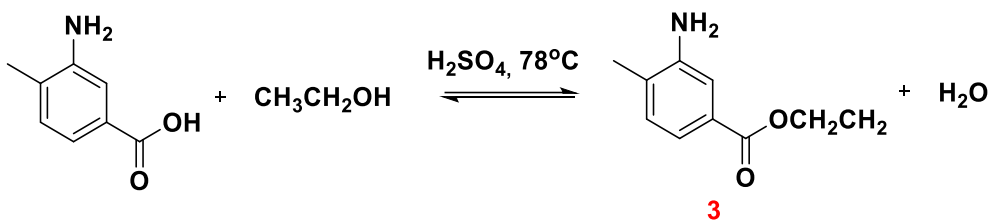
Σχήμα 34: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλέστερα (ένωση 2) στην αρωματική περιοχή σε CDCl_3



Σχήμα 35 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλέστερα (ένωση 2) σε CDCl_3

3.5.2.3 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλο βενζοϊκού αιθυλεστέρα, (ένωση 3)

Εναλλακτικά, δοκιμάστηκε η σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλέστερα από το 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ με επίδραση πυκνού διαλύματος θειικού οξέος σε απόλυτη αιθανόλη στους 78 °C. Δεδομένου ότι η αιθανόλη είναι περισσότερο παρεμποδισμένο αντιδραστήριο σε σχέση με την μεθανόλη, η απόδοση της εστεροποίησης είναι αρκετά μικρότερη, περίπου 40%.

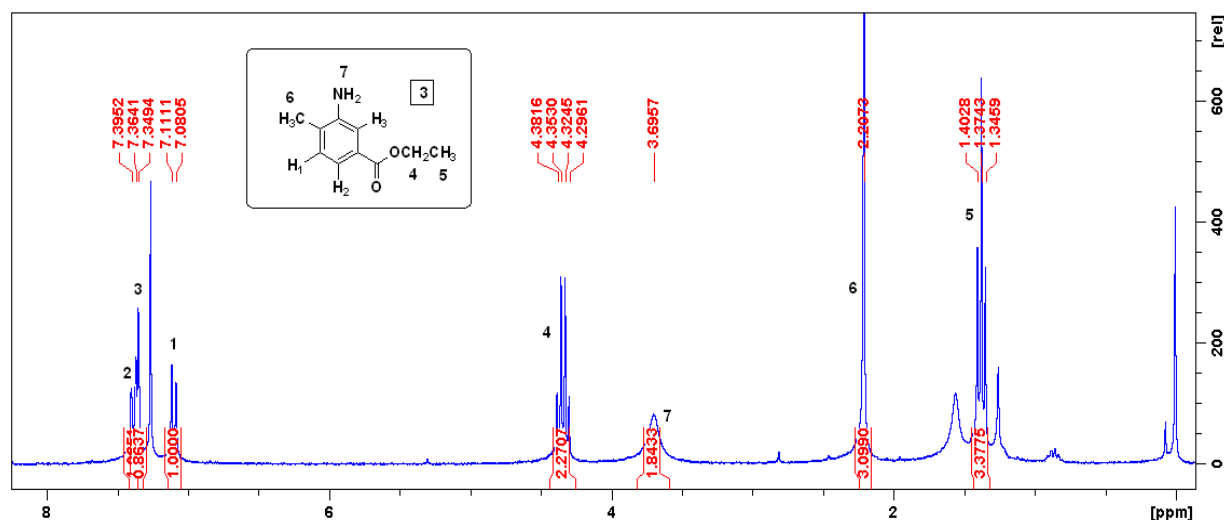


Σχήμα 36 : Αντίδραση σχηματισμού του 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκού αιθυλεστέρα

3.5.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα, ένωση 3

Η εικόνα του φάσματος 1H NMR του 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκού αιθυλεστέρα είναι ανάλογη με αυτή του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλέστερα. Προφανώς, τα αρωματικά πρωτόνια (υπ' αριθμόν 1,2,3) εμφανίζουν τις ίδιες πολλαπλότητες. Πιο συγκεκριμένα το H_2 είναι το πιο αποπροστατευμένο για τους λόγους που προαναφέρθηκαν και συντονίζεται στα 7.38 ppm. Σχάζεται σε μια διπλή κορυφή με $^3J=7.8$ Hz. Το H_3 συντονίζεται ως μια απλή κορυφή στα 7.34 ppm, ενώ το H_1 στα 7.09 ppm ως μια διπλή λόγω του γειτονικού H_2 με $^3J=7.7$ Hz. Τα πρωτόνια της αμινομάδας συντονίζονται στα 3.69 ppm ως μια απλή ευρεία κορυφή.

Τα πρωτόνια της μεθυλομάδας, υπ' αριθμόν 6, συντονίζονται στα 2.20 ppm, δίνοντας μια απλή κορυφή. Χαρακτηριστικές κορυφές που αποδεικνύουν την ύπαρξη της αιθοξυ-ομάδας του βενζοϊκού αιθυλεστέρα είναι η τετραπλή και η τριπλή κορυφή στα 4.34 και στα 1.37 ppm, της μεθυλενομάδας και της μεθυλομάδας, αντίστοιχα.



Σχήμα 37 : Φάσμα 1H NMR (400 MHz) του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα (ένωση 3)

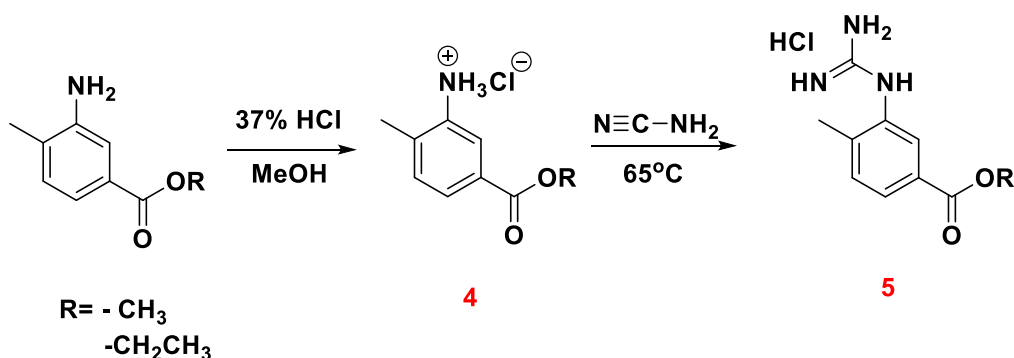
σε $CDCl_3$

3.5.3 Σύνθεση φαινυλαμινοπουριμιδίνης

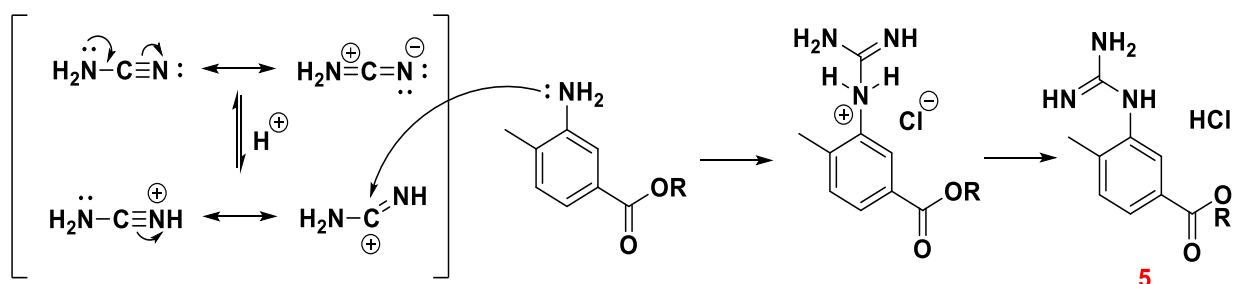
Η σύνθεση της φαινυλαμινοπουριμιδίνης αποτελεί διαδικασία τριών σταδίων, όπου το πρώτο στάδιο είναι η σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του εστέρα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος ακολουθούμενη από την σύνθεση της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης, στο τέλος, στην αντίδραση κυκλοποίησης από αντίδραση φαινυλογουανιδίνης και εναμινόνης.

3.5.3.1 Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης

Για τη σύνθεση των κυκλοποιημένων προϊόντων αρχικά ήταν απαραίτητη η σύνθεση των υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών. Αρχικά συντέθηκε το υδροχλωρικό άλας της ανιλίνης με προσθήκη HCl 37% σε μεθανολικό διάλυμα της αντίστοιχης ανιλίνης. Στη συνέχεια, η διττή φύση του κυαναμιδίου, ως διαλύτη και ως αντιδραστήριου, αξιοποιείται με την τήξη του για τη σύνθεση της φαινυλογουανιδίνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 65 °C, όπου ήδη έχει τακεί το κυαναμίδιο και η απόδοση της ανέρχεται στο 90 %.



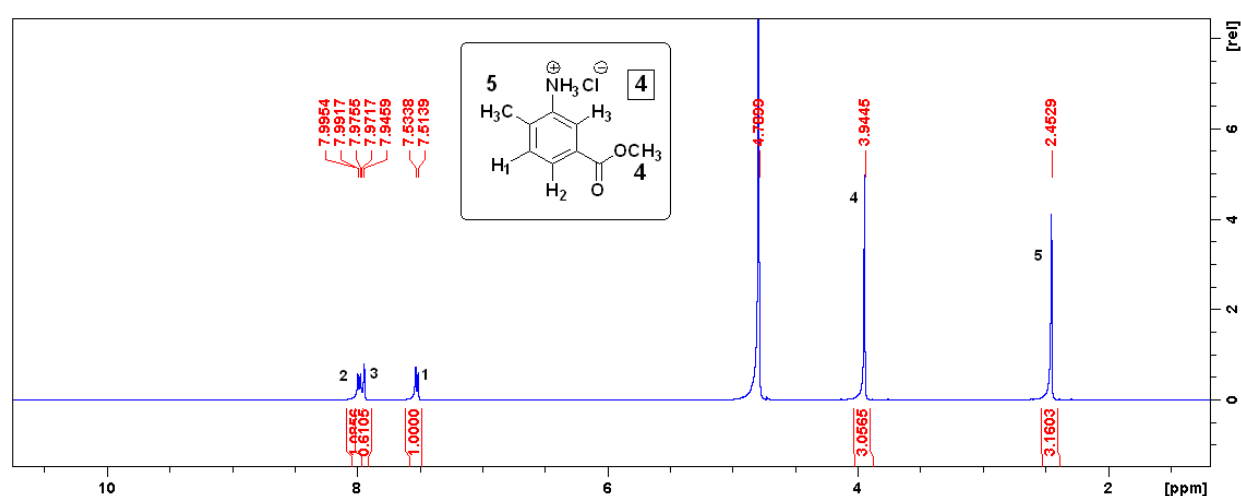
Σχήμα 38 : Αντίδραση σχηματισμού του υδροχλωρικού άλατος της αρωματικής αμίνης 4 και της υποκατεστημένης γουανιδίνης 5



Σχήμα 39: Μηχανισμός σχηματισμού των φαινυλογουανιδινών με κυαναμίδιο και υποκατεστημένες ανιλίνες.

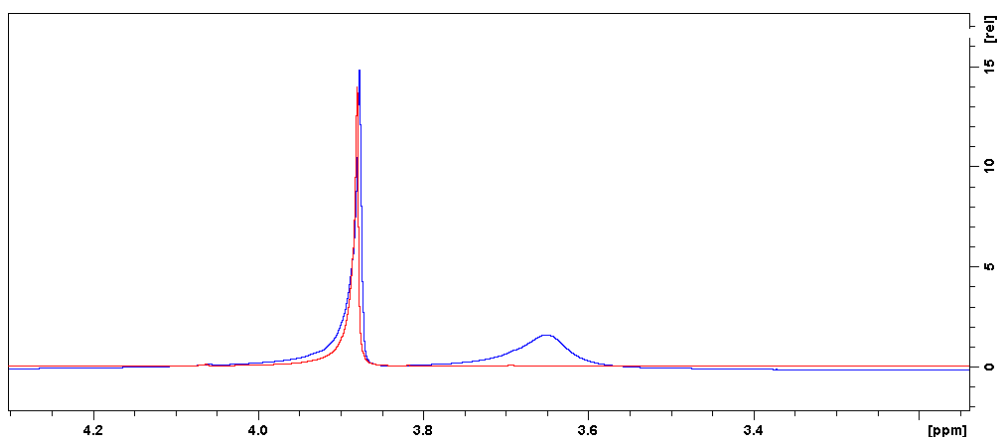
3.5.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος της αρωματικής αμίνης, ένωση 4

Το φάσμα του υδροχλωρικού άλατος της αρωματικής αμίνης **4** με μεθυλεστέρα παρουσιάζεται παρακάτω. Οι χημικές μετατοπίσεις και οι αντίστοιχες σχάσεις των αρωματικών πρωτονίων είναι ανάλογες με αυτές του Σχήματος 34. Εδώ τα H₁, H₂, H₃ συντονίζονται στα 7.52, 7.98 και 7.94 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια υπ αριθμόν 4 της μεθοξυμάδας του εστέρα συντονίζονται στα 3.95 ppm και τα πρωτόνια της μεθυλομάδας που βρίσκεται πάνω στο βενζολικό δακτύλιο συντονίζονται στα 2.45 ppm.



Σχήμα 40 : Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του υδροχλωρικού άλατος της αρωματικής αμίνης (ένωση **4**) με μεθυλεστέρα σε D₂O.

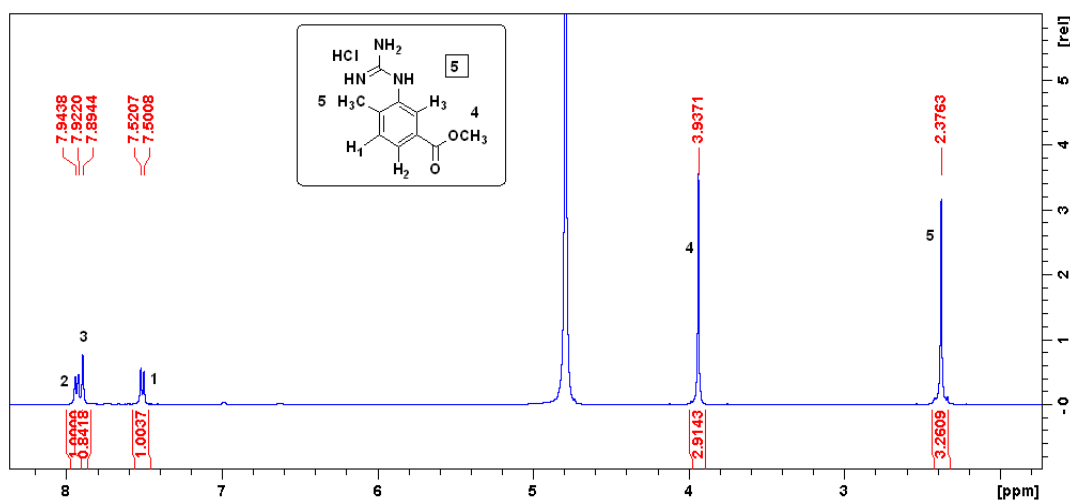
Στο παρακάτω σχήμα βλέπουμε την υπέρθεση των φασμάτων του μεθυλεστέρα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος (μπλέ χρώμα) και του αντίστοιχου υδροχλωρικού άλατος (κόκκινο χρώμα). Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει πλέον η κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της αμινομάδας καθώς αυτή είναι με τη μορφή άλατος. Τα φάσματα είναι στον ίδιο διαλύτη (D₂O) (Σχήμα 41). Με τον τρόπο αυτό συμπεραίνουμε ότι η αντίδραση έγινε έλαβε χώρα με απόδοση ~100%.



Σχήμα 41 : Υπέρθεση των φασμάτων του μεθυλεστέρα του 3-αμινο-4μεθυλοβενζοϊκού οξέος (μπλέ χρώμα) και του αντίστοιχου υδροχλωρικού άλατος (κόκκινο χρώμα).

3.5.3.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης γουανιδίνης, ένωσης 5

Στην περίπτωση αυτή οι χημικές μετατοπίσεις και οι αντίστοιχες σχάσεις των αρωματικών πρωτονίων είναι ανάλογες με αυτές του Σχήματος 40. Τα H₁, H₂, H₃ συντονίζονται στα 7.51, 7.93 και 7.89 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 4 της μεθυλομάδας του εστέρα συντονίζονται στα 3.94 ppm και τα πρωτόνια της μεθυλομάδας που βρίσκεται πάνω στο βενζολικό δακτύλιο συντονίζονται στα 2.38 ppm. Τα πρωτόνια των αμινομάδων δε φαίνονται, καθώς η ένωση αποτελεί υδροχλωρικό άλας και για τη λήψη του έχουμε χρησιμοποιήσει ως διαλύτη D₂O. Αυτό σημαίνει ότι αμινικά πρωτόνια ανταλλάσσονται με δευτέρια από το διαλύτη και δε δίνουν σήματα.

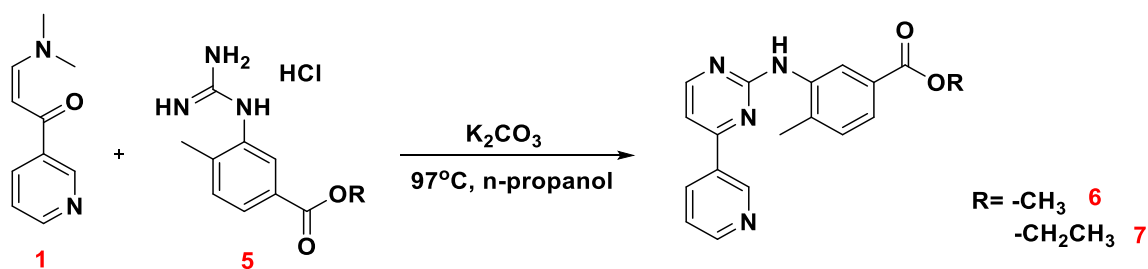


Σχήμα 42 : Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης γουανιδίνης (ένωση 5) με μεθυλεστέρα σε D₂O.

3.5.3.4 Κυκλοποίηση του άλατος γουανιδίνης και εναμιनोंης προς το σχηματισμό της υποκατεστημένης φαινυλαμινοπυριμιδίνης

Το επόμενο στάδιο στη συνθετική πορεία είναι η κυκλοποίηση της εναμιनोंης με το άλας γουανιδίνης για τη σύνθεση των υποκατεστημένων φαινυλαμινοπυριμιδινών. Στο στάδιο αυτό, σχηματίζεται το βασικό δομικό συστατικό των αναστολέων, ο πυριμιδινικός δακτύλιος, βασικό βήμα για τη σύνθεση των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών. Είναι ο δακτύλιος που καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του ATP μέσα στο ένζυμο, του οποίου τα άζωτα δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης του ATP με συγκεκριμένα αμινοξέα της πρωτεϊνικής κινάσης. Ανταγωνίζονται έτσι το ATP και αναστέλλουν την ανεπιθύμητη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης.

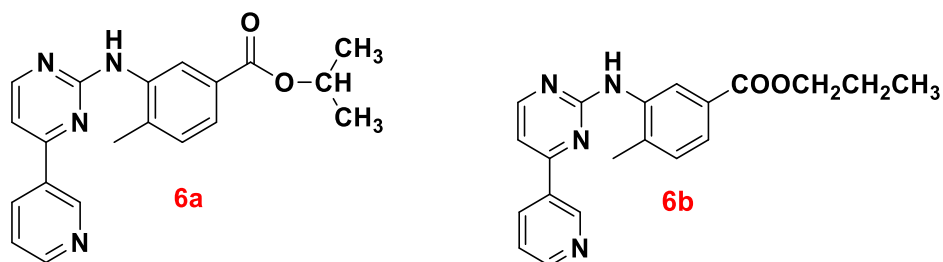
Όπως φαίνεται παρακάτω στο Σχήμα 43, πρόκειται για μια αντίδραση κυκλοποίησης μεταξύ της ένωσης **1** και **5**, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη την *n*-προπανόλη και ως βάση K_2CO_3 . Η ασθενής βάση είναι ικανή να δεσμεύσει-εξουδετερώσει το υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης, ελαχιστοποιώντας το σχηματισμό παραπροϊόντων, λόγω μη επιθυμητών πυρηνόφιλων αρωματικών υποκαταστάσεων, καθώς και πιθανών αντιδράσεων, ως συνέπεια της αποπρωτονίωσης του σχετικά όξινου αμινικού πρωτονίου.



Σχήμα 43: Αντίδραση σχηματισμού *N*-υποκατεστημένης φαινυλαμινοπυριμιδίνης

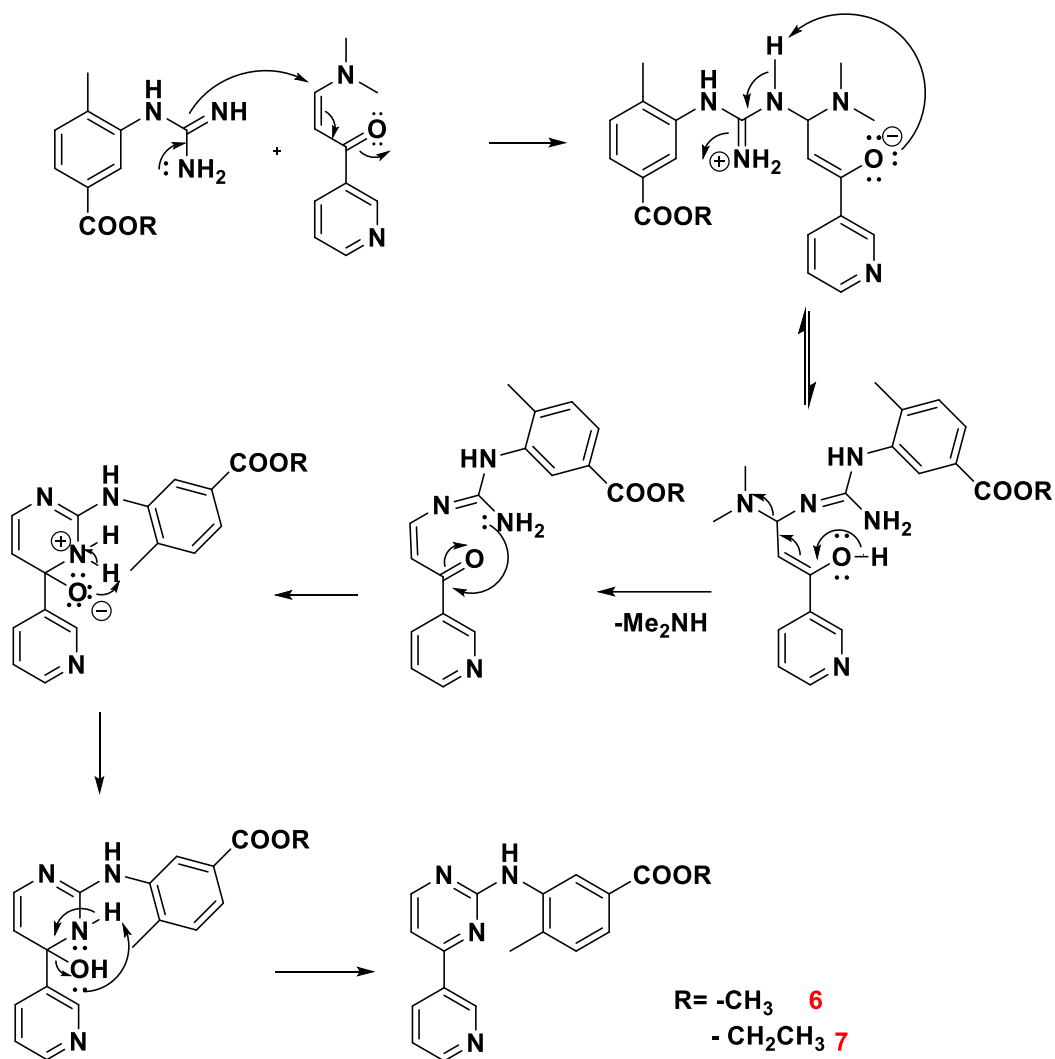
Έγιναν προσπάθειες χρήσης και άλλων διαλυτών, όπως της *i*-προπανόλης, αλλά λόγω της πιο δραστηκής *i*-προπανόλης, συγκριτικά με την *n*-προπανόλη, της παρατεταμένης θέρμανσης και των πυρηνόφιλων προσβολών, έγινε μετεστεροποίηση του μεθυλεστέρα (ή του αιθυλεστέρα) σε *i*-προπυλεστέρα (Σχήμα 44). Ο επιθυμητός εστέρας και ο ισοπροπυλεστέρας ήταν σε αναλογία περίπου 1:1. Αυτό το παραπροϊόν δημιούργησε πρόβλημα κατά την επόμενη αντίδραση υδρόλυσης, καθώς απαιτήθηκε περισσότερος χρόνος για την ολοκλήρωσή της. Επίσης, η απόδοση της αντίδρασης με

τη χρήση *i*-προπανόλης ως διαλύτη είχε πολύ μικρή απόδοση, της τάξης του 20%. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως καταλληλότερος διαλύτης η *n*-προπανόλη αν και σε μερικές περιπτώσεις δεν αποφύγαμε, κυρίως λόγω της παρατεταμένης θέρμανσης, το σχηματισμό προπυλεστέρα από τη χρήση της *n*-προπανόλης, σε μικρότερη όμως αναλογία.



Σχήμα 44 : Δομή των σχηματιζόμενων παραπροϊόντων

Αρχικά, η γουανιδίνη με πυρηνόφιλη προσθήκη προσβάλλει την α,β ακόρεστη β-εναμινόνη και σχηματίζει ένα ενδιάμεσο, που στη συνέχεια, με απόσπαση ενός μορίου διμεθυλαμίνης και, ακολούθως, με δεύτερη πυρηνόφιλη προσβολή μιας αμινομάδας της γουανιδίνης στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου, σχηματίζεται ο εξαμελής δακτύλιος. Τέλος, με απώλεια ενός μορίου νερού, προκύπτει το τελικό προϊόν, ένας σταθερός ετεροαρωματικός δακτύλιος, ο πυριμιδινικός.

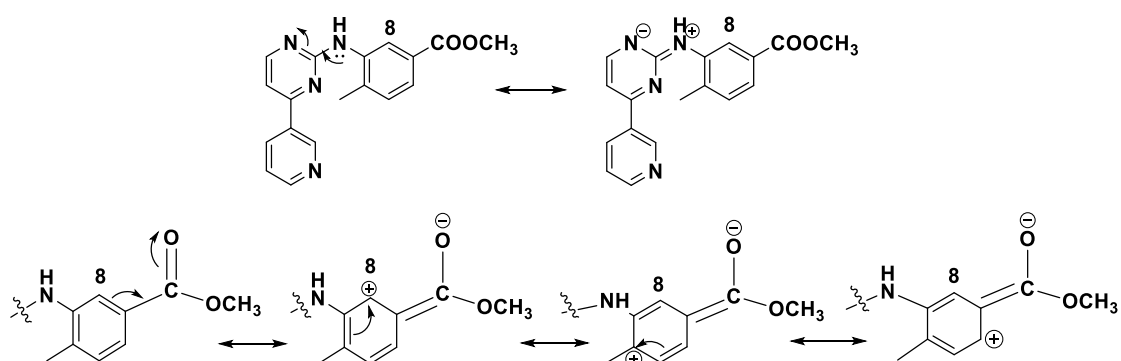


Σχήμα 45 : Μηχανισμός κυκλοποίησης του άλατος γουανιδίνης και εναμιनोंης προς το σχηματισμό της υποκατεστημένης φαινυλαμινοπυριμιδίνης

3.5.3.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα του προϊόντος κυκλοποίησης με μεθυλεστέρα, ένωση 6

Από το φάσμα ¹H NMR του προϊόντος κυκλοποίησης **6**, μπορούμε να αποφανθούμε για το σχηματισμό του πυριμιδινικού δακτυλίου, καθώς φαίνονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές (Σχήματα 47, 48). Πιο συγκεκριμένα, το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H₁ στα 9.30 ppm, το οποίο σχηματίζει ενδομοριακό ψευδοδεσμό υδρογόνου με το πυριμιδινικό άζωτο και αποπροστατεύεται από το γειτονικό πυριδινικό άζωτο. Το επόμενο πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το αμινικό H₇ που συντονίζεται σε ασθενές πεδίο, στα 9.04 ppm ως μια απλή κορυφή, κυρίως λόγω της εκδήλωσης της συζυγίας του ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου προς τον ετεροαρωματικό και το βενζολικό

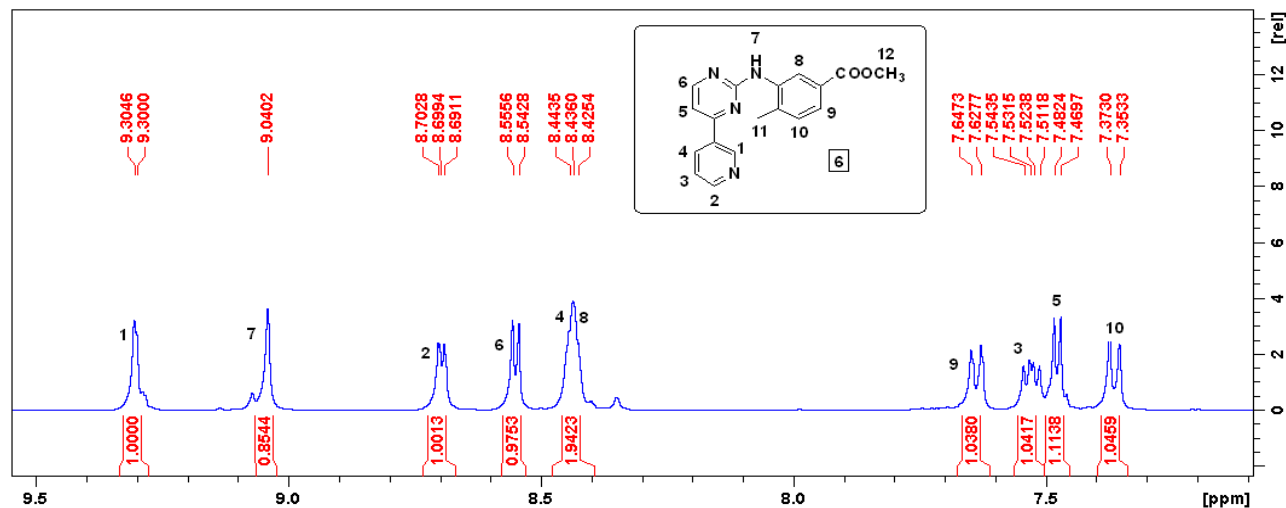
δακτύλιο. Επιπροσθέτως, τα δυο άζωτα της πυριμιδίνης έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα με αποτέλεσμα το H₇ να "απογυμνώνεται" ηλεκτρονιακά και συνεπώς να αποπροστατεύεται ισχυρά. Το H₂ αποπροστατεύεται από το γειτονικό άζωτο, συντονίζεται στα 8.69 ppm ως μια διπλή κορυφή, ενώ η τιμή J=4.5 Hz λόγω της σχάσης με το γειτονικό H₃ είναι ενδεικτική της παρουσίας του σε ετεροκυκλικό δακτύλιο. Τα υδρογόνα H₆ και H₅, εμφανίζουν δύο διπλές κορυφές στα 8.54 και 7.47 ppm, με το H₆ να αποπροστατεύεται περισσότερο, καθώς είναι πιο κοντά στο άζωτο, ενώ οι τιμές J, ως αναμένεται, είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες των ολεφινικών της εναμινόνης, J=5.1 Hz και J=5.08 Hz αντίστοιχα. Το H₃ εμφανίζεται στα 7.53 ppm και σχάζεται από τα γειτονικά H₂ και H₄ σε μια dd κορυφή με ³J_{H3-H4}=7.9 Hz και ³J_{H3-H2}=4.8 Hz. Στα 8.43 ppm παρατηρούμε μια αλληλεπικάλυψη κορυφών που αντιστοιχεί στα πρωτόνια 4 και 8, λόγω της μικρής διαχωριστικής ικανότητας του οργάνου. Κανονικά, θα αναμέναμε διπλή της τριπλής για το πρωτόνιο 4, καθώς βλέπει το H₃ με ³J και το H₂ και το H₁ με ⁴J. Στο H₈ θα αναμέναμε την καταγραφή μιας σχάσης μακράς απόστασης (⁴J) με το H₉ και είναι σχετικά αποπροστατευμένο. Το H₈ βρίσκεται ανάμεσα από την αμινομάδα και την καρβονυλομάδα του βενζοϊκού μεθυλεστέρα και αποπροστατεύεται ισχυρώς, καθώς η καρβονυλική ομάδα έλκει ηλεκτρόνια μέσω του συζυγιακού φαινομένου, ενώ το ελεύθερο ζεύγος της αμινομάδας απεντοπίζεται κυρίως προς την πλευρά του πυριμιδινικού δακτυλίου (Σχήμα 46).



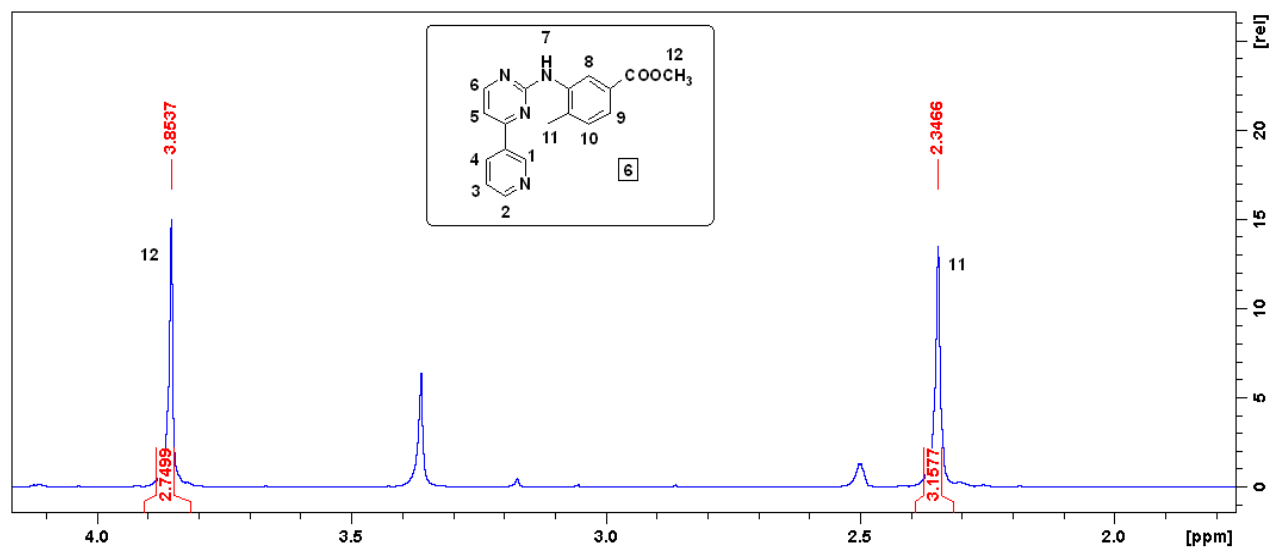
Σχήμα 46 : Αποπροστασία H₈

Τα H₉ και H₁₀ εμφανίζονται ως δυο διπλές κορυφές στα 7.64 και 7.36 ppm, με J=7.8 Hz και J=7.9 Hz, αντίστοιχα. Το H₉ αποπροστατεύεται ισχυρότερα καθώς βρίσκεται σε όρθο θέση ως προς την καρβονυλική ομάδα του εστέρα. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 11 στις μεθυλομάδας του βενζολικού δακτυλίου εμφανίζονται

ως μια απλή κορυφή στα 2.35 ppm και τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 12 του μεθυλεστέρα συντονίζονται στα 3.85 ppm ως μια απλή κορυφή.



Σχήμα 47 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του κυκλοποιημένου προϊόντος (ένωση 6) με μεθυλεστέρα σε DMSO, στην αρωματική περιοχή

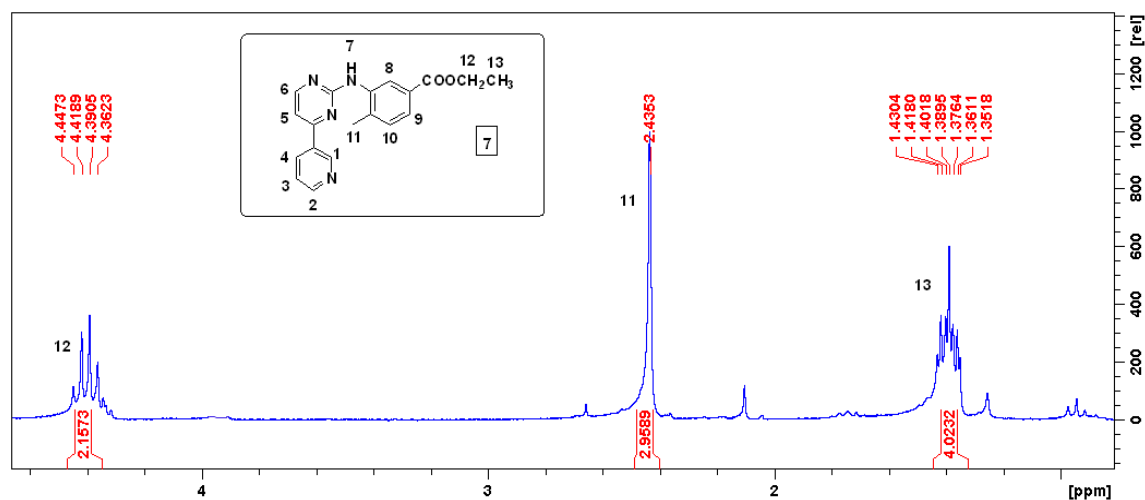


Σχήμα 48 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του κυκλοποιημένου προϊόντος (ένωση 6) με μεθυλεστέρα σε DMSO

3.5.3.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα του προϊόντος κυκλοποίησης με αιθυλεστέρα, ένωση 7

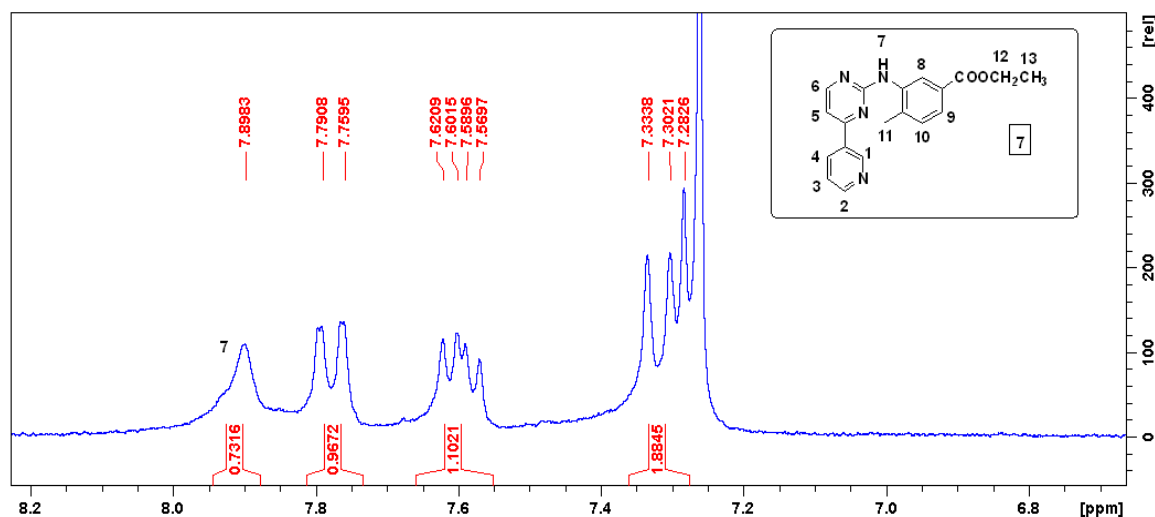
Το φάσμα ^1H NMR σε CDCl_3 της ένωσης 7, του προϊόντος κυκλοποίησης με αιθυλεστέρα είναι ανάλογο με το φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6, του προϊόντος

κυκλοποίησης με μεθυλεστέρα. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 49, υπάρχει μια τετραπλή κορυφή στα 4.40 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια υπ' αριθμόν 12 της μεθυλενικής ομάδας του αιθυλεστέρα. Στα 1.40 ppm καταγράφεται μια τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου υπ' αριθμόν 13 του αιθυλεστέρα. Η τελευταία δε φαίνεται πολύ καθαρά καθώς αλληλεπικαλύπτεται με την κορυφή των πρωτονίων του ύδατος που συντονίζονται στην ίδια περιοχή της κλίμακος ppm.



Σχήμα 49 : Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του κυκλοποιημένου προϊόντος (ένωση 7) με αιθυλεστέρα σε CDCl₃

Άλλη μια διαφορά εντοπίζεται στο αμινικό πρωτόνιο H₇, το οποίο τώρα εντοπίζεται στα 7.89 ppm ως μια ευρεία κορυφή. Δεν αποπροστατεύεται τόσο, όσο στο φάσμα του Σχήματος 47, καθώς η λήψη του φάσματος (Σχήμα 50) έγινε σε διαλύτη CDCl₃. Στην πρώτη περίπτωση το αμινικό H₇ πρωτόνιο σχηματίζει ισχυρούς διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με το DMSO, με αποτέλεσμα να αποπροστατεύεται ενώ τώρα δεν υφίσταται τέτοια αποπροστασία, καθώς το CDCl₃ δεν είναι τόσο πολικός διαλύτης όσο το DMSO.



Σχήμα 50 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του κυκλοποιημένου προϊόντος (ένωση 7) με αιθυλεστέρα σε CDCl_3

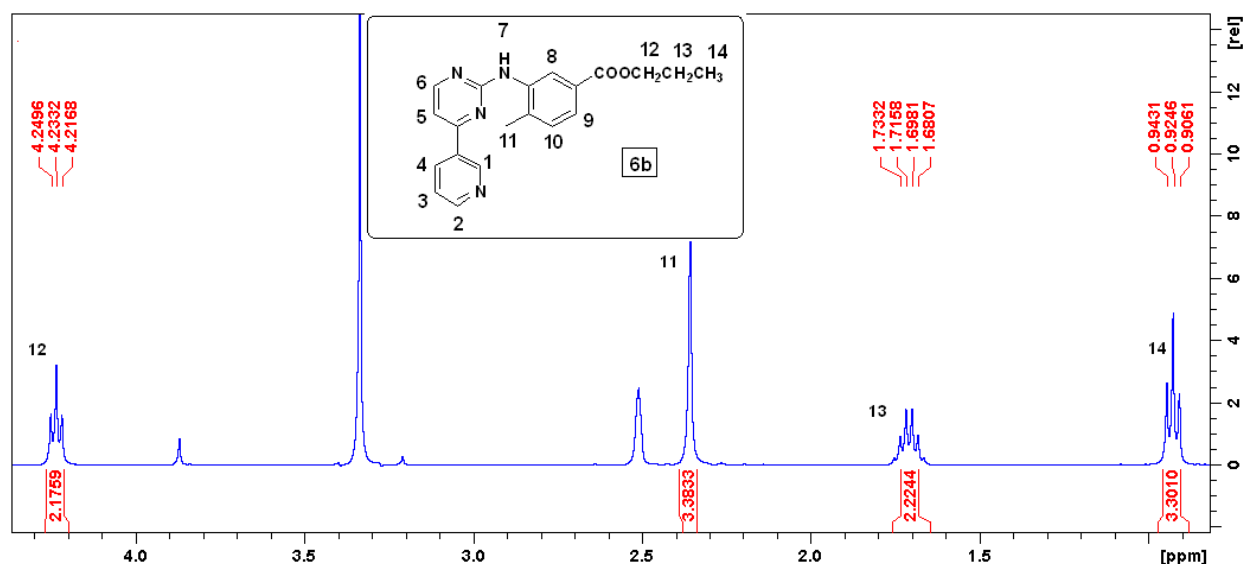
Όλα τα άλλα πρωτόνια έχουν περίπου στις ίδιες χημικές μετατοπίσεις, όπως και στην περίπτωση της ένωσης 6.

3.5.3.7 Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων μετεστεροποίησης

Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 3.5.3.4, κατά την αντίδραση κυκλοποίησης ελήφθησαν και τα προϊόντα μετεστεροποίησης σε *i*-προπυλεστέρα και προπυλεστέρα, ανάλογα με το διαλύτη που χρησιμοποιήσαμε. Φυσικά το γεγονός αυτό δεν εμποδίζει την ακόλουθη συνθετική πορεία, καθώς πάντα στο επόμενο στάδιο διενεργείται η υδρόλυση του εστέρα, όποιος και αν είναι αυτός, στο αντίστοιχο οξύ. Στις περιπτώσεις που έχει συμβεί μετεστεροποίηση απαιτείται περισσότερος χρόνος για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.

Χρησιμοποιώντας ως διαλύτη *n*-προπανόλη, λάβαμε ως παραπροϊόν την ένωση 6b.

Από το φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6b διαπιστώσαμε το σχηματισμό της. Τα πρωτόνια στην αρωματική περιοχή εμφανίζουν τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις, όπως και στο φάσμα του Σχήματος 47, δηλαδή του επιθυμητού προϊόντος. Οι μόνες τροποποιήσεις εντοπίζονται στην περιοχή από 0.8-4.4 ppm, όπως φαίνεται και στο παρακάτω φάσμα.



Σχήμα 51 : Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του προϊόντος μετεστεροποίησης (ένωση **6b**) κατά την κυκλοποίηση με *n*-προπανόλη σε DMSO

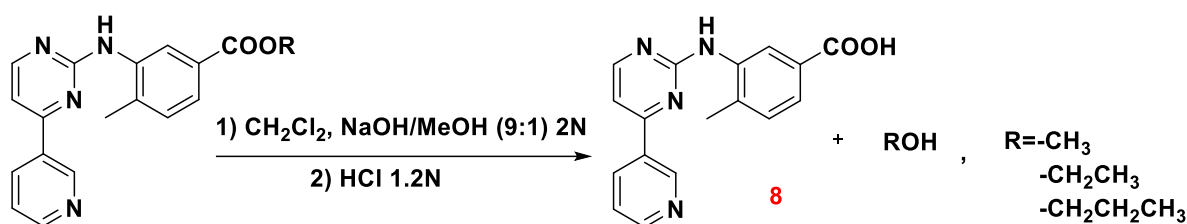
Ειδικότερα, καταγράφεται μια τριπλή κορυφή στα 4.23 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια υπ' αριθμόν 12 του προπυλεστέρα. Είναι σχετικά αποπροστατευμένα γιατί βρίσκονται δίπλα στο οξυγόνο του εστέρα και σχάζονται σε μια τριπλή κορυφή καθώς γειτνιάζουν με τα άλλα δυο πρωτόνια του προπυλεστέρα υπ' αριθμόν 13. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 13 σχάζονται σε μια εξαπλή κορυφή, λόγω των τριών γειτονικών πρωτονίων της μεθυλικής ομάδας του εστέρα, στα 1.70 ppm. Τέλος, η τριπλή κορυφή στα 0.92 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια 14, τα πλέον προστατευμένα, και σχάζεται λόγω των δυο γειτονικών πρωτονίων 13.

3.5.4 Βασική υδρόλυση του εστέρα

3.5.4.1 Βασική υδρόλυση του εστέρα προς το καρβοξυλικό οξύ και την αντίστοιχη αλκοόλη σε μη υδατικό περιβάλλον

Μετά την αντίδραση της κυκλοποίησης και την απομόνωση καθαρού προϊόντος, ακολούθησε η υδρόλυση του εστέρα προς το καρβοξυλικό οξύ, έτσι ώστε στο επόμενο βήμα να σχηματιστεί αμιδικός δεσμός. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μη υδατικό περιβάλλον, συγκεκριμένα σε μεθανολικό διάλυμα καυστικού νατρίου (2N) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο σε αναλογία CH₂Cl₂:MeOH 9:1, ήτοι τελική συγκέντρωση 0.2N. Χρησιμοποιούμε ήπιες βασικές συνθήκες, καθώς τυχόν αποπρωτονίωση του όξινου αμινικού πρωτονίου θα ήταν μη επιθυμητή και θα οδηγούσε σε παραπροϊόντα κυρίως σε δραστικές συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία).

Μετά το πέρας ενός εικοσιτετραώρου, θερμαίνουμε ήπια στο σημείο ζέσεως του διαλύτη (40 °C) για σύντομο χρόνο ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση ποσοτικά προς την κατεύθυνση σχηματισμού του προϊόντος υδρόλυσης. Με τη μέθοδο αυτή που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας, παραλαμβάνεται πολύ εύκολα και ποσοτικά το οξύ από τους αντίστοιχους εστέρες, σε ιδιαίτερα ήπιες συνθήκες : θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς μεγάλη περίσσεια βάσεως. Όπως προαναφέρθηκε, στην περίπτωση υδρόλυσης του προϊόντος κυκλοποίησης με αιθυλεστέρα ή προπυλεστέρα απαιτήθηκε περισσότερος χρόνος για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ενώ η αντίδραση θερμάνθηκε από το πρώτο κιόλας εικοσιτετράωρο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί οξύνιση με 1.2 N HCl σε pH~6, ώστε το προϊόν που βρίσκεται ως μετά νατρίου άλας, να μετατραπεί σε οξύ, αποφεύοντας την πρωτονίωση τόσο της αμινομάδας όσο και των αζώτων των ετεροαρωματικών δακτυλίων (Σχήμα 52).

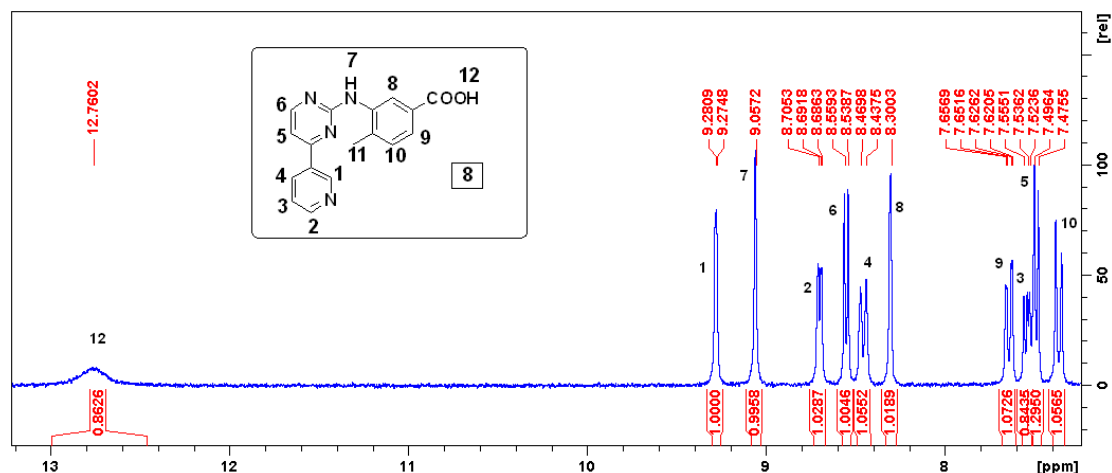


Σχήμα 52 : Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του προϊόντος κυκλοποίησης

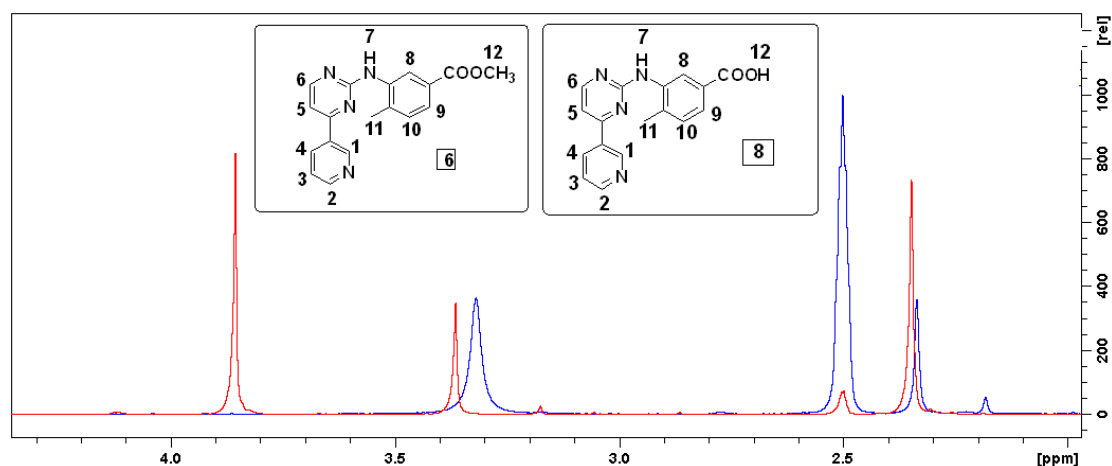
3.5.4.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του οξέος, ένωση 8

Παρατηρώντας το φάσμα ¹H NMR (Σχήμα 53) του οξέος 8 βλέπουμε πως οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων καταγράφονται, ως αναμένεται, σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας τις σχέσεις τους σε ισοδυναμία με τα πρωτόνια του αντίστοιχου μεθυλεστέρα, ένωση 6. Η ευρεία χαρακτηριστική κορυφή που καταγράφεται στα 12.76 ppm είναι χαρακτηριστική και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του οξέος υπ' αριθμόν 12. Δεν θα γίνει εκτενής αναφορά στις σχέσεις και τις πολλαπλότητες των πρωτονίων της αρωματικής περιοχής, καθώς αυτή έγινε στην παράγραφο 3.5.3.5 και ό,τι ισχύει στο φάσμα του μεθυλεστέρα ισχύει και εδώ. Εκτός από τη διαφοροποίηση που προαναφέρθηκε για το πρωτόνιο του οξέος και την εμφάνιση της ευρείας κορυφής που αντιστοιχεί σε αυτό, στο παρόν φάσμα απουσιάζει η κορυφή της μεθυλομάδας του εστέρα (Σχήμα 54, μπλέ χρώμα), η

οποία στο αντίστοιχο φάσμα (Σχήμα 48) εμφανιζόταν στα 3.85 ppm, υποδηλώνοντας ότι η υδρόλυση του εστέρα έγινε ποσοτικά (100%).



Σχήμα 53 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του οξέος (ένωση 8) από τη βασική υδρόλυση, στην αρωματική περιοχή σε DMSO

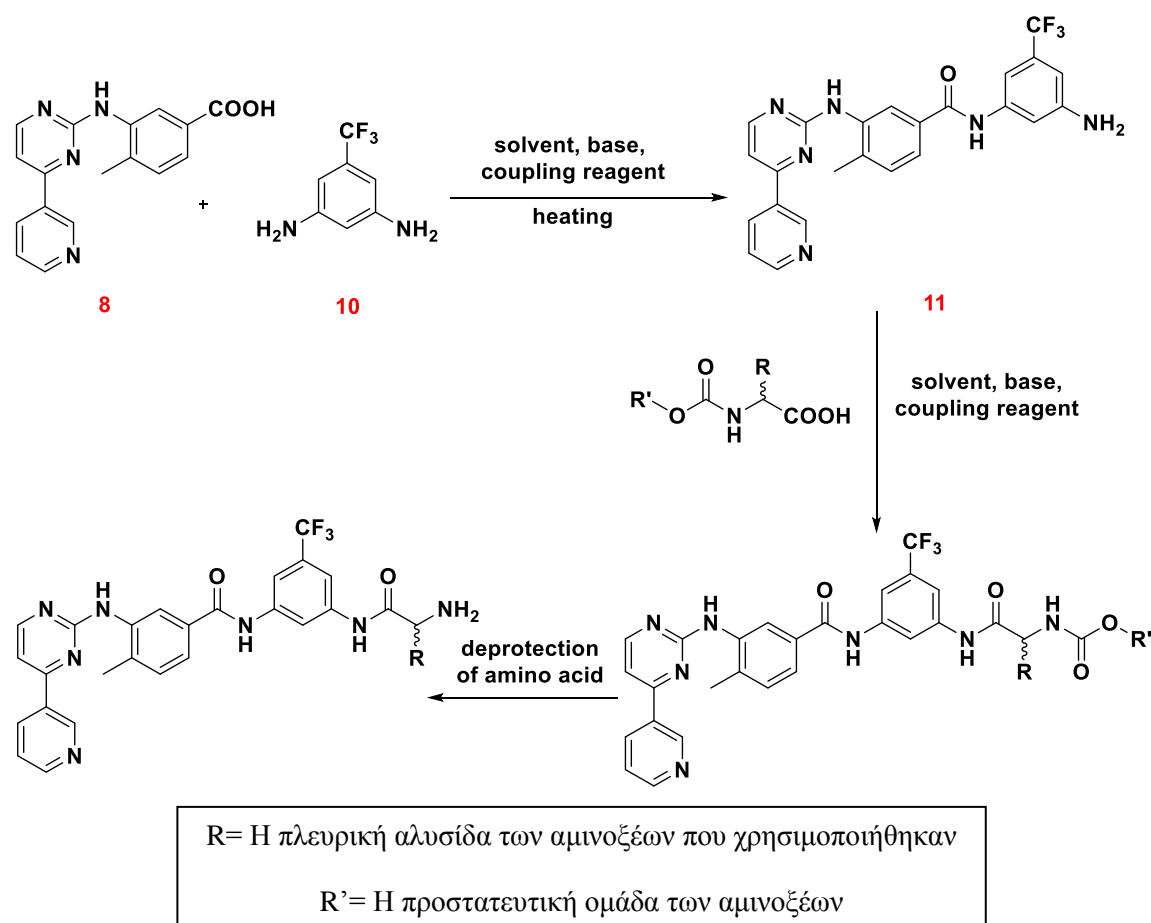


Σχήμα 54: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του οξέος (ένωση 8, μπλέ χρώμα) από τη βασική υδρόλυση σε υπέρθεση με το φάσμα (ένωση 6, κόκκινο χρώμα) σε DMSO. Παρατηρείται η απουσία της οξείας κορυφής με κόκκινο χρώμα στο φάσμα χρώματος μπλέ.

3.5.5 Σύνθεση τελικών προϊόντων-αναλόγων του Nilotinib με δυο αμιδικούς δεσμούς, με την προσάτηση φυσικών και μη αμιωξέων (Nil-01-Nil-05)

Επόμενο βήμα για τη σύνθεση των επιθυμητών αναλόγων-παραγώγων Nil-01 έως Nil-05 ήταν ο σχηματισμός ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ του οξέος (ένωση 8), η σύνθεση του οποίου αναφέρθηκε παραπάνω, με το 1,3-διαμινο-5-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (ένωση 10), δίνοντας την ένωση 11. Ακολούθησε ο σχηματισμός ενός δεύτερου αμιδικού δεσμού μεταξύ της ελεύθερης αμινικής ομάδας

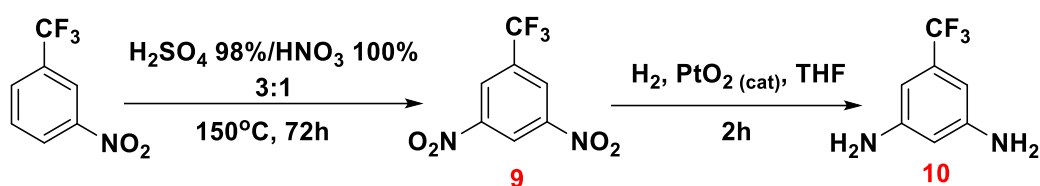
της ένωσης **11** με την ελεύθερη καρβοξυλομάδα φυσικών (L-) και μη αμινοξέων (D-), εισάγοντας παράλληλα την έννοια της χειρομορφίας. Να σημειωθεί, ότι κάθε ένα από τα εναντιομερή μιας χειρόμορφης ένωσης μπορούν να συμπεριφέρονται πολύ διαφορετικά στο βιολογικό περιβάλλον. Με άλλα λόγια, το R-εναντιομερές δε συμπεριφέρεται πάντα με τον ίδιο τρόπο όπως το S-εναντιομερές. Για μια δεδομένη χειρόμορφη ένωση, είναι σκόπιμο να εξεταστούν τα 2 εναντιομερή ξεχωριστά ως διαφορετικές ενώσεις, με διαφορετικές ιδιότητες. Τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται στη σύζευξη αυτή απαιτείται να είναι προστατευμένα στο N-τελικό τους άκρο, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πολυπεπτιδίου. Τελευταίο στάδιο για τη λήψη των επιθυμητών προϊόντων ήταν η αποπροστασία των αμινοξέων, προς ελεύθερη αμινομάδα, η οποία θα μπορούσε να σχηματίσει περισσότερες αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της κινάσης, σύμφωνα με τις θεωρητικές μελέτες, αυξάνοντας έτσι την ανασταλτική δράση της εκάστοτε ένωσης (Σχήμα 55).



Σχήμα 55 : Γενική πορεία σύνθεσης των αναλόγων Nil-01-Nil-05

3.5.5.1 Σύνθεση του 1,3 διαμινο-5- τριφθορομεθυλοβενζολίου, (ένωση 10)

Για τη σύνθεση του 1,3 διαμινο-5-τριφθορομεθυλοβενζολίου αναγκαία καθίσταται η μετατροπή της νιτρομάδας σε αμινομάδα σύμφωνα με την αντίδραση του Σχήματος 56. Η μετατροπή αυτή είναι απαραίτητη για την περαιτέρω σύζευξη της αμινομάδας με το οξύ προς σχηματισμού του αμιδικού δεσμού. Ξεκινήσαμε αρχικά με τη σύνθεση ενός συμμετρικού δινιτρο-υποκατεστημένου βενζολίου (ένωση 9), ακολουθούμενη από αναγωγή και των δύο νιτρομάδων σε διαμινο-υποκατεστημένο βενζόλιο.

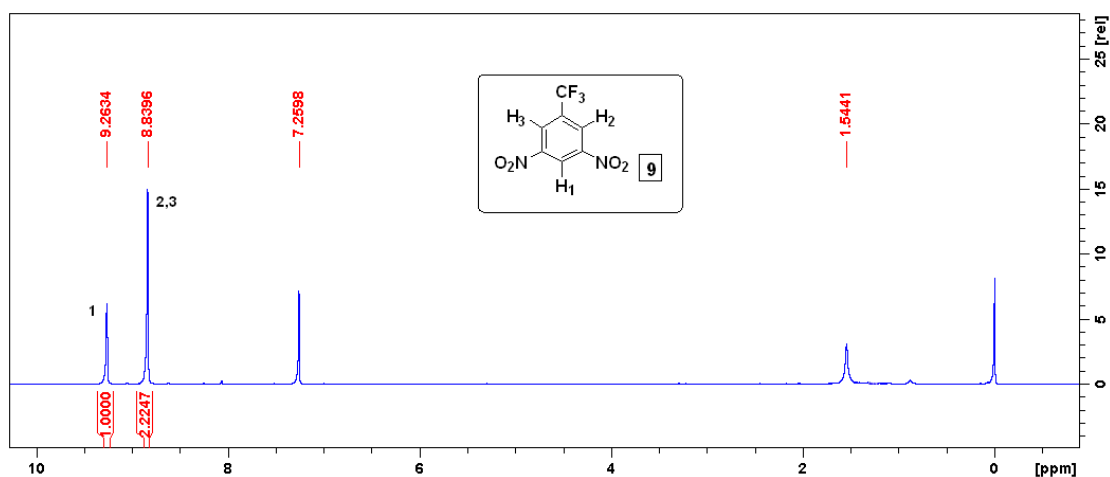


Σχήμα 56: Σύνθεση του 1,3 δινιτρο-5-τριφθορομέθυλοβενζολίου (ένωση 9) και αναγωγή αυτού προς 1,3 διαμινο-5-τριφθορομέθυλοβενζόλιο (ένωση 10)

Η αντίδραση νίτρωσης είχε απόδοση ~50%. Η αντίδραση αναγωγής έγινε σε ατμόσφαιρα H₂ με καταλύτη PtO₂ (καταλύτης Adams) και διαλύτη απόλυτο τετραϋδροφουράνιο (THF) σε απόδοση ~100%.

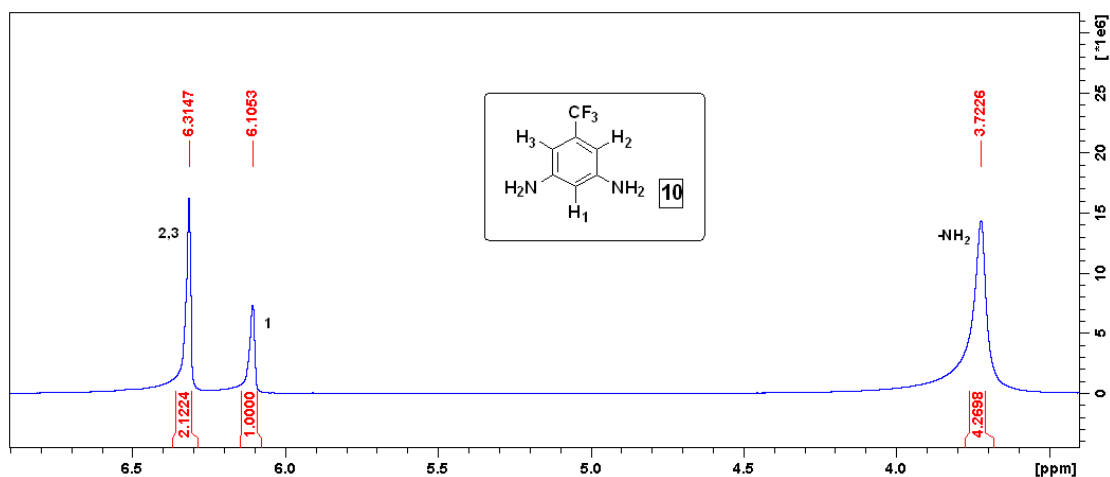
3.5.5.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα των 1,3 δινιτρο-5-τριφθορο μεθυλοβενζολίου και 1,3 διάμινο-5-τριφθορομεθυλοβενζολίου, ενώσεων 9 και 10 αντίστοιχα

Το φάσμα ¹HNMR της ένωσης 9 στο Σχήμα 57, αποδεικνύει το σχηματισμό της. Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H₁, καθώς βρίσκεται ανάμεσα σε δυο ισχυρούς δέκτες ηλεκτρονίων. Συντονίζεται ως μια απλή κορυφή στα 9.26 ppm. Τα πρωτόνια H₂ και H₃ είναι ισοδύναμα μεταξύ καθώς έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον. Εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 8.84 ppm. Είναι επίσης αποπροστατευμένα, όχι όμως τόσο όσο το H₁, καθώς και αυτά βρίσκονται ανάμεσα σε δυο ισχυρούς δέκτες ηλεκτρονίων.



Σχήμα 57: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 1,3 δινιτρο-5-τριφθορομέθυλοβενζολίου (ένωση **9**) σε CDCl_3

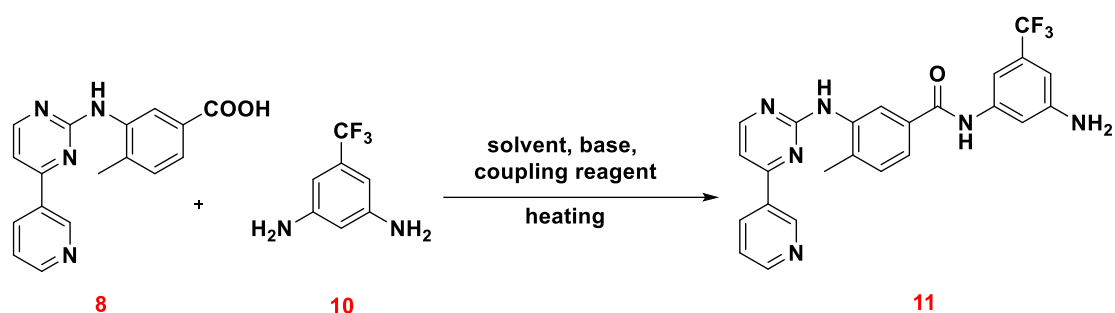
Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης **10**, Σχήμα 58, παρατηρούμε ότι όλα τα πρωτόνια εμφανίζονται σε χαμηλότερες τιμές ppm, ήτοι σε ισχυρό πεδίο λόγω της παρουσίας των δυο αμινομάδων. Το H_1 προστατεύεται ισχυρά, καθώς τώρα βρίσκεται ανάμεσα σε δυο αμινομάδες που αυξάνουν μέσω του εκδηλούμενου συζυγιακού φαινομένου την ηλεκτρονική πυκνότητα και καταγράφεται ως μια απλή κορυφή στα 6.10 ppm. Επιπρόσθετα, τα H_2 και H_3 , δεδομένου ότι είναι ισοδύναμα, εμφανίζονται μαζί, δίνοντας μια απλή κορυφή στα 6.31 ppm. Στο φάσμα, επίσης, παρατηρείται και μια απλή ευρεία κορυφή στα 3.72 ppm, η οποία αντιστοιχεί στα 4 ισοδύναμα πρωτόνια των δυο αμινομάδων.



Σχήμα 58 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 1,3 διάμινο-5-τριφθορομέθυλοβενζολίου (ένωση **10**) σε CDCl_3

3.5.5.3 Σχηματισμός του 1^{ov} αμιδικού δεσμού

Ο πρώτος αμιδικός δεσμός σχηματίστηκε μεταξύ του οξέος (ένωση **8**) με το 1,3 διαμινο-5-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (ένωση **10**). Η αντίδραση σύζευξης, είναι μία αντίδραση πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης μεταξύ της υποκατεστημένης διαμίνης και του οξέος και πραγματοποιείται υπό ατμόσφαιρα αργού, σε απόλυτο διαλύτη. Το οξύ διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη, ακολουθεί η προσθήκη βάσης και τέλος προστίθεται το αντιδραστήριο σύζευξης. Με τον τρόπο αυτό ενεργοποιείται το οξύ, προκειμένου να αντιδράσει ευκολότερα και αποτελεσματικότερα με τη μια αμινομάδα της υποκατεστημένης διαμίνης (Σχήμα 59).



Σχήμα 59: Αντίδραση σύζευξης για το σχηματισμό του πρώτου αμιδικού δεσμού


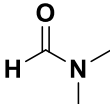
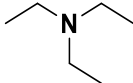
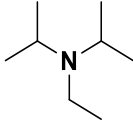
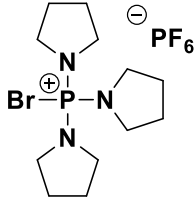
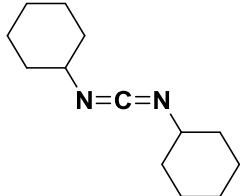
Στην προσπάθεια μας να βρούμε τις κατάλληλες πειραματικές συνθήκες για τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος σε υψηλότερη απόδοση και την αποφυγή παραπροϊόντων πραγματοποιήσαμε ποικιλία αντιδράσεων, με τη χρήση διαφορετικών διαλυτών, αντιδραστηρίων σύζευξης, βάσεων σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Σε όλες μας τις προσπάθειες η αναλογία των αντιδρώντων ήταν 1 οξύ : 1.3 διαμίνη : 1.1 αντιδραστήριο σύζευξης. Οι πειραματικές συνθήκες συνοψίζονται στον Πίνακα 3 και η δομή του κάθε αντιδραστηρίου στον Πίνακα 4.

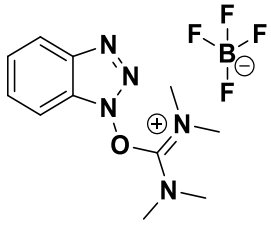
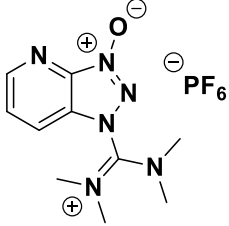
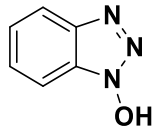
Πίνακας 3 : Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης 11

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο Σύζευξης	Χρόνος και θερμοκρασία σχηματισμού ενεργοποιημένου εστέρα	Χρόνος και θερμοκρασία αντίδρασης	Απόδοση
1	THF	Et ₃ N	PyBroP	20 min, 0 °C 10 min, rt	21 h, rt	~10%
2	THF	Et ₃ N	DCC	30 min, 0 °C	24 h, 30 °C	0%

				10 min, rt		
3	THF	Et ₃ N	TBTU	30 min, 0 °C 10 min, rt	4 days, rt	~20%
4	THF	Et ₃ N	TBTU, HOBt	40 min, 0 °C 10 min, rt	6 days, 40 °C	50%
5	THF	Et ₃ N, DIPEA	TBTU	1 h 30min, -97.6 °C (MeOH) 20 min, rt	4 days, 50 °C	50%
6	DMF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	10 min, rt	48 h, rt	80%

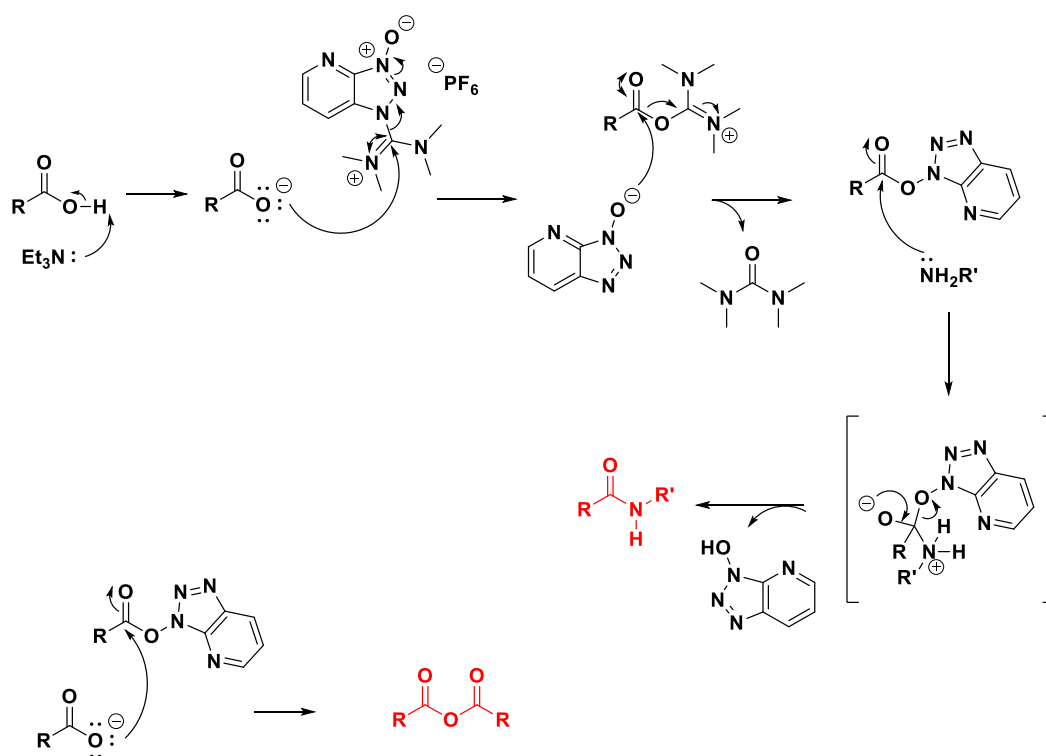
Πίνακας 4 : Διαλύτες, βάσεις και αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήριο	Ονοματολογία	Δομή
THF	Τετραϋδροφουράνιο	
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο	
Et₃N	Τριαιθυλαμίνη	
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine	
PyBroP	Bromo(tri-1-pyrrolidinyl)phosphonium hexafluorophosphate	
DCC	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide	

TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate	
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate	
HOBt	Hydroxybenzotriazole	

Στις περισσότερες προσπάθειες σύνθεσης της ένωσης **11** που δοκιμάστηκαν στο εργαστήριο, με εξαίρεση τις **5** και **6**, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3, ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα έγινε στους 0 °C, προς αποφυγή σχηματισμού του ανυδρίτη του οξέος. Παρόλα αυτά, ο σχηματισμός του ήταν αναπόφευκτος και σε μερικές περιπτώσεις, όπως στη δεύτερη προσπάθεια, αποτέλεσε το κύριο ή και το μοναδικό προϊόν (Σχήμα 60). Προκειμένου να αυξήσουμε την απόδοση της αντίδρασης και να ελαχιστοποιηθεί ο σχηματισμός του ανυδρίτη, δοκιμάσαμε να πραγματοποιήσουμε την ενεργοποίηση του οξέος σε ακόμη χαμηλότερη θερμοκρασία, στους -97.6 °C (Πείραμα 5). Αυτό επιτεύχθηκε τοποθετώντας τη σφαιρική με την αντίδραση σε μεθανόλη ως υγρό λουτρό και προσθέτοντας σε αυτή σταδιακά υγρό άζωτο, μέχρι να φτάσει στο σημείο πήξης της (-97.6 °C). Και στην περίπτωση αυτή όμως σχηματίστηκε σε αρκετά μεγάλο ποσοστό ο ανυδρίτης του οξέος, οπότε η μέθοδος αυτή απορρίφθηκε. Την καλύτερη απόδοση, της τάξης του 80%, λάβαμε όταν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ένα πολικότερο σε σχέση με το THF διαλύτη, το DMF. Η ενεργοποίηση του οξέος έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και σχεδόν αμέσως προστέθηκε η αμίνη. Με αυτόν τον τρόπο, ο ανυδρίτης σχηματίστηκε σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Φυσικά, σε όλες τις παραπάνω αντιδράσεις σχηματίστηκαν και άλλα παραπροϊόντα σε μικρότερο όμως ποσοστό, που όμως δεν ήταν δυνατό να απομονωθούν και στη συνέχεια να ταυτοποιηθούν.

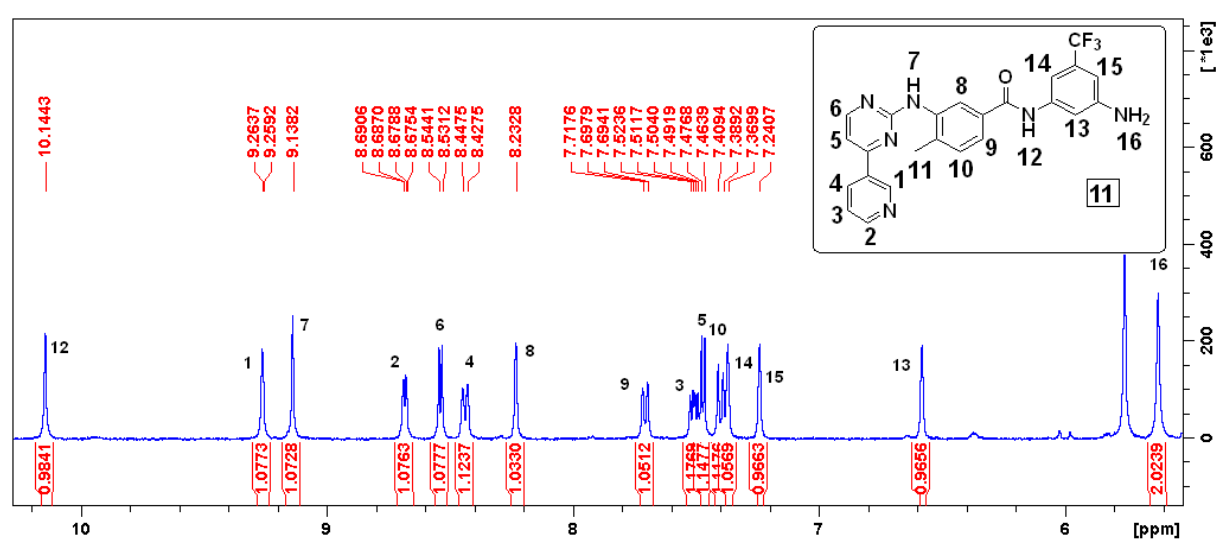
Για τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού απαιτείται η παρουσία βάσης. Η βάση διευκολύνει την απομάκρυνση του πρωτονίου του οξέος, το οποίο στη συνέχεια ως ανιόν (ισχυρότερο πυρηνόφιλο) μπορεί να αντιδράσει με το αντιδραστήριο σύζευξης, αλλά δε θα αντιδρά περαιτέρω με το οξύ (μη πυρηνόφιλο). Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε η Et_3N , ως τριτοταγής αμίνη. Παρακάτω βλέπουμε το γενικό μηχανισμό για την αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού με τη χρήση HATU (Σχήμα 60). Αρχικά, η βάση αποπρωτονιώνει το οξύ και σχηματίζεται το αντίστοιχο ανιόν, το οποίο με τη σειρά του προσβάλλει το αντιδραστήριο σύζευξης, δημιουργώντας τον ενεργοποιημένο εστέρα. Ακολούθως, η πυρηνόφιλη αμίνη προσβάλλει (με το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων) την καρβonyλομάδα του ενεργοποιημένου εστέρα, προκειμένου να σχηματιστεί ο επιθυμητός αμιδικός δεσμός. Παρατηρούμε ότι ο καρβonyλικός άνθρακας του ενεργοποιημένου εστέρα θα μπορούσε να προσβληθεί και από το ανιόν του οξέος σχηματίζοντας έτσι, τον ανεπιθύμητο ανυδρίτη. Παρουσία υγρασίας επανασηματίζεται το οξύ, αφού το H_2O δρα ως πυρηνόφιλο. Για το λόγο αυτό, οι αντιδράσεις σύζευξης πρέπει να πραγματοποιούνται σε άνυδρες συνθήκες.



Σχήμα 60: Αντίδραση και μηχανισμός σχηματισμού αμιδικού δεσμού με τη χρήση HATU, καθώς και του ανεπιθύμητου ανυδρίτη

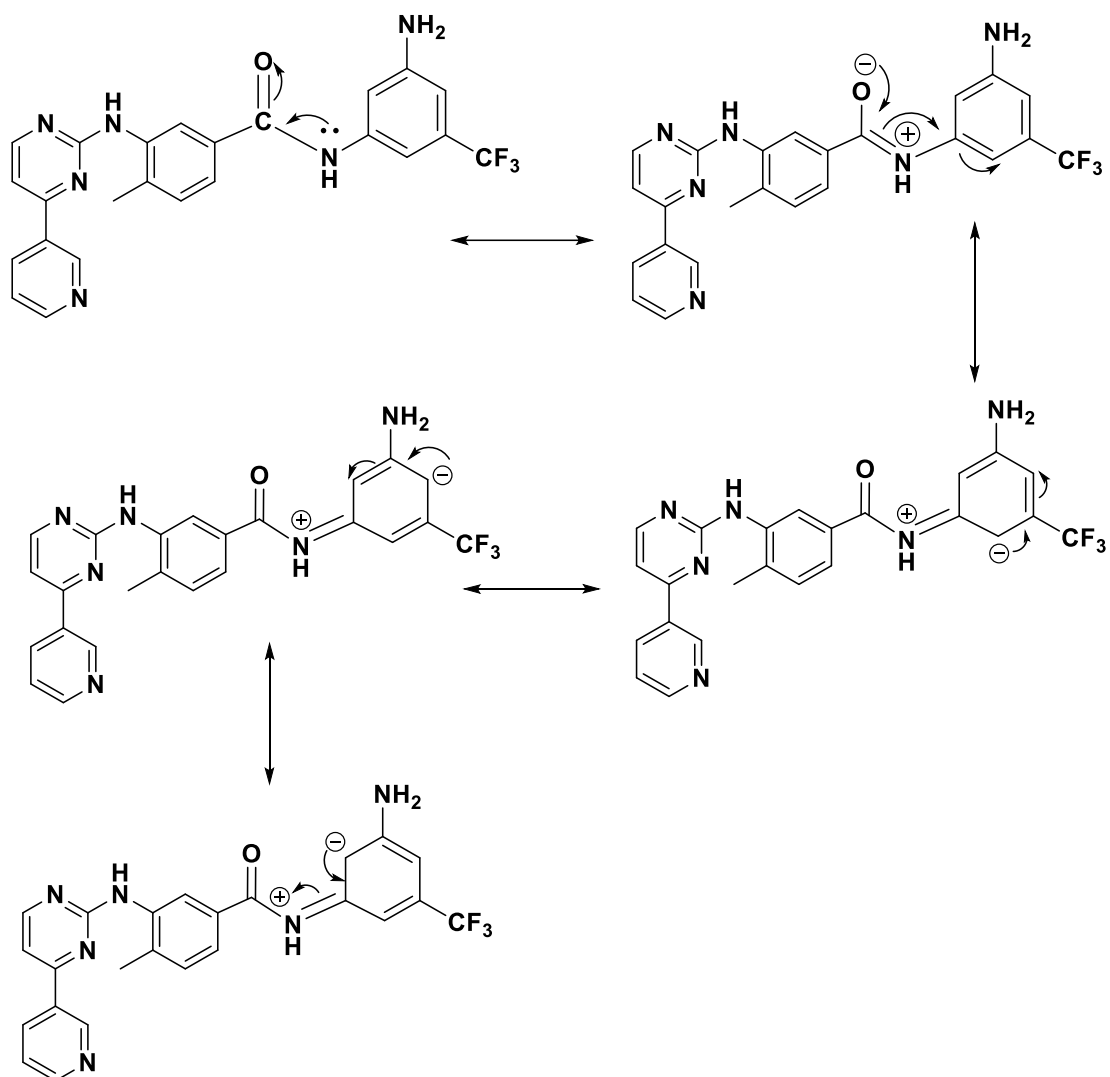
3.5.5.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα του προϊόντος σύζευξης με έναν αμιδικό δεσμό, ένωση 11.

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης **11** (Σχήμα 61) εμφανίζονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια (1-11) του οξέος, δηλαδή της ένωσης **8**. Τα πρωτόνια (1-11) έχουν αριθμηθεί και έχει γίνει η ταυτοποίηση τους με τις αντίστοιχες κορυφές στο φάσμα του Σχήματος 53 και 54. Στο συγκεκριμένο φάσμα χαρακτηριστική είναι η κορυφή στα 10.14 ppm που αντιστοιχεί στο αμιδικό πρωτόνιο H_{12} , το πλέον αποπροστατευμένο, κάτι που υποδηλώνει το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.



Σχήμα 61: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης με έναν αμιδικό δεσμό (ένωση **11**) σε DMSO

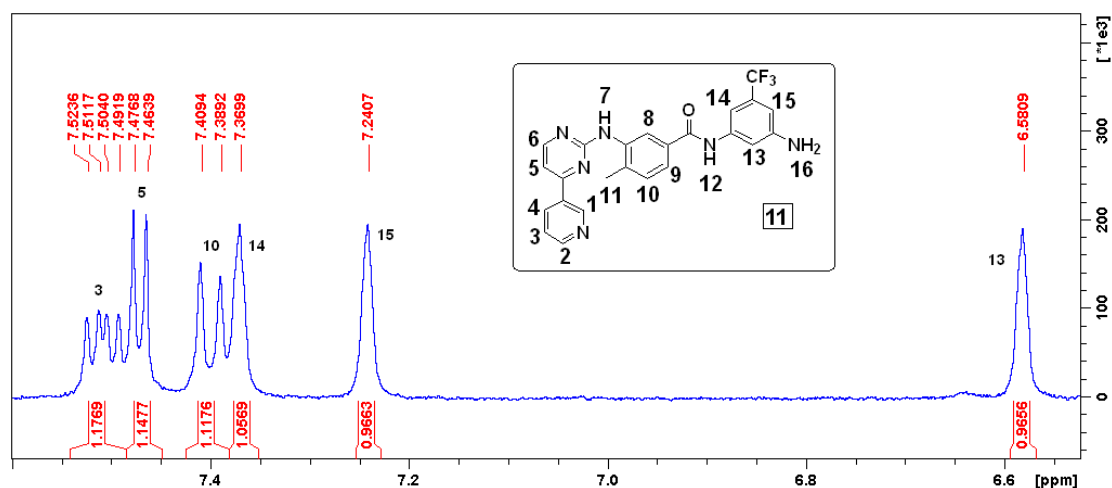
Το H_{12} αποπροστατεύεται τόσο καθώς η καρβονυλική ομάδα λόγω συζυγιακού φαινομένου έλκει το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου και του αφαιρείται ηλεκτρονιακή πυκνότητα (Σχήμα 62).



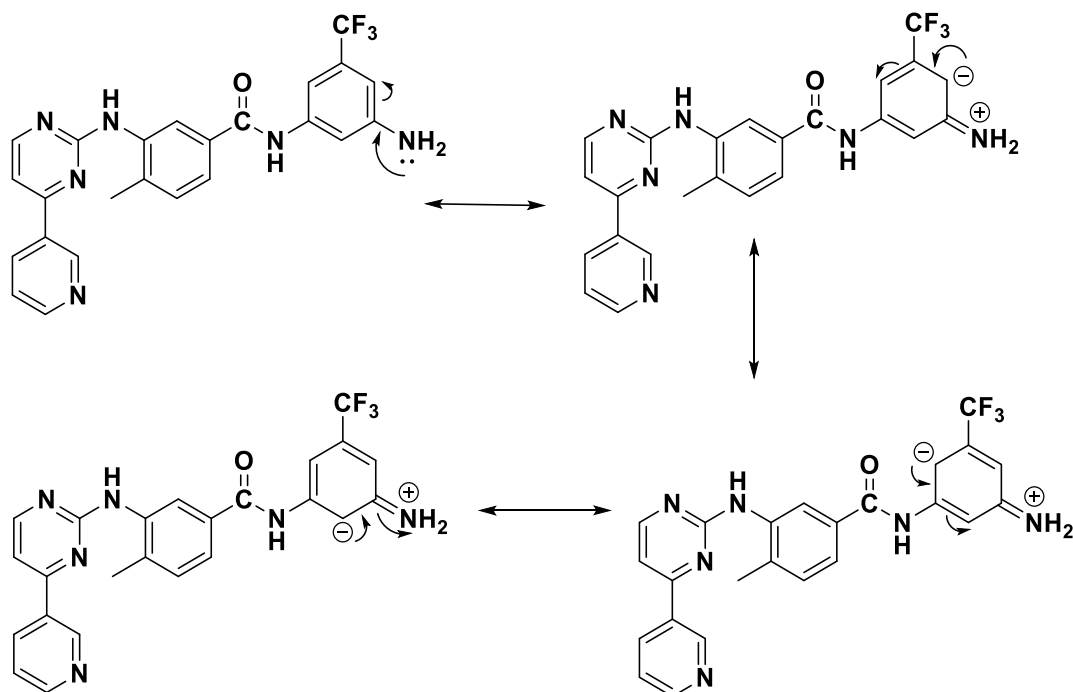
Σχήμα 62 : Δομές συντονισμού για την ερμηνεία της ισχυρής αποπροστασίας του αμιδικού πρωτονίου.

Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 14 εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή στα 7.37 ppm. Η σχετική αποπροστασία του οφείλεται στο ότι βρίσκεται σε γειτονική θέση ως προς την τριφθορομεθυλομάδα, η οποία μέσω του επαγωγικού φαινομένου έλκει ηλεκτρόνια, ενώ η προστασία από το αδεδμικό ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου δεν γίνεται αισθητή, καθώς εκδηλώνεται και προς την κατεύθυνση της καρβonyλομάδος. Το πρωτόνιο 15 συντονίζεται στα 7.24 ppm σε απλή κορυφή και δικαιολογείται η ασθενέστερη αποπροστασία του σε σχέση με το πρωτόνιο 14, καθώς βρίσκεται δίπλα σε αμινομάδα που αυξάνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του βενζολικού δακτυλίου, κυρίως σε ορθο-θέση, προσφέροντας το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου. Το πρωτόνιο 13 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 6.58 ppm και προστατεύεται ισχυρά σε σχέση με τα προαναφερθέντα, καθώς δεν έχει πλησίον του ομάδα ισχυρό

δέκτη ηλεκτρονίων, αλλά αντίθετα, βρίσκεται μεταξύ 2 αμινομάδων, εκ των οποίων η ελεύθερη αμινομάδα αυξάνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα (Σχήμα 64). Τέλος, τα πρωτόνια της αμινομάδας υπ' αριθμόν 16 εμφανίζονται στα 5.62 ppm με μία χαρακτηριστική απλή ευρεία κορυφή και ολοκλήρωση 2 (Σχήμα 63).



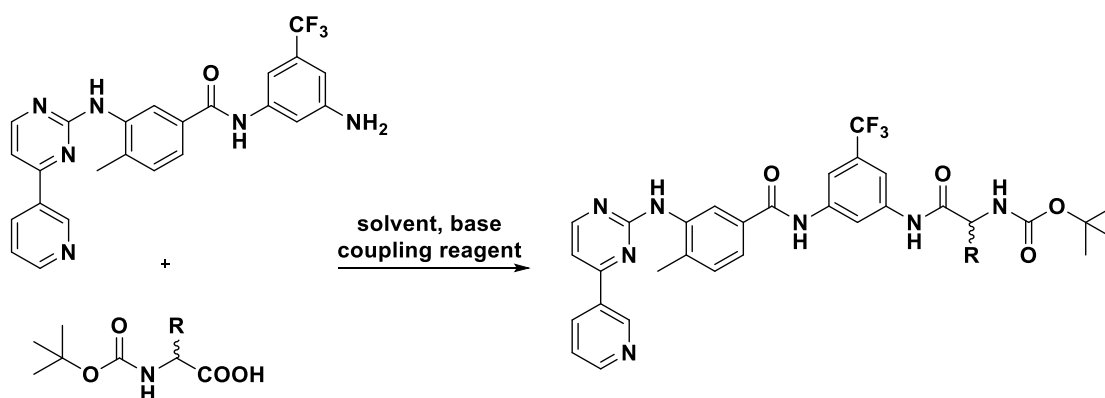
Σχήμα 63: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης με έναν αμιδικό δεσμό (ένωση 11) σε DMSO



Σχήμα 64 : Δομές συντονισμού για την ερμηνεία της προστασίας του H₁₃

3.5.5.5 Σχηματισμός του 2^{ου} αμιδικού δεσμού με τη χρήση N-Boc προστατευμένων φυσικών (L-) και μη αμινοξέων (D-).

Όπως προαναφέρθηκε, για τη σύνθεση των παραγώγων Nil-01 έως Nil-05, μετά το σχηματισμό του πρώτου αμιδικού δεσμού ακολούθησε ο σχηματισμός ενός δεύτερου, μεταξύ της ελεύθερης αμινομάδας της ένωσης **11** και της καρβοξυλικής ομάδας φυσικών και μη αμινοξέων. Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προστατευμένα στο τελικό N- άκρο τους, προκειμένου να αποτραπεί η μεταξύ τους αντίδραση και κατ' επέκταση ο σχηματισμός πολυπεπτιδίου. Ο μηχανισμός της αντίδρασης είναι ανάλογος αυτού που περιγράφηκε στο Σχήμα 60, ενεργοποιώντας τώρα το αμινοξύ. Ξεκινήσαμε τη σύνθεση των αναλόγων χρησιμοποιώντας N-Boc προστατευμένα αμινοξέα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

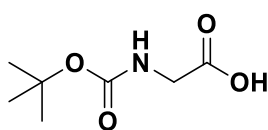


Σχήμα 65 : Γενική αντίδραση σχηματισμού 2^{ου} αμιδικού δεσμού με N-Boc προστατευμένα αμινοξέα, όπου R η πλευρική ομάδα των αμινοξέων.

Τα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκίνη, η L-αλανίνη, η D-αλανίνη, η L-προλίνη και η D-προλίνη, όλα N-Boc προστατευμένα.

❖ Αντίδραση σύζευξης προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και της N-Boc γλυκίνης.

Αρχικά διενεργήθηκε η αντίδραση σύζευξης χρησιμοποιώντας το πιο απλό, προστατευμένο στο τελικό N- άκρο της αμινοξύ που υπάρχει στη φύση, τη γλυκίνη, η δομή της οποίας φαίνεται παρακάτω.



N-Boc glycine

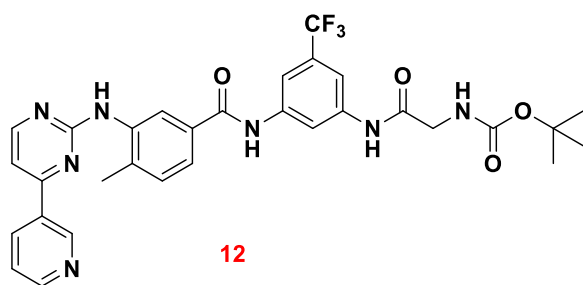
Για την εύρεση των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών με πρωτεύοντα στόχο το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος και στη συνέχεια τη λήψη του σε μεγάλη απόδοση χωρίς το σχηματισμό παραπροϊόντων, προβήκαμε στην πραγματοποίηση πειραμάτων κάνοντας τροποποιήσεις στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη, τη βάση και, κυρίως, στο αντιδραστήριο σύζευξης. Οι τροποποιήσεις- συνθήκες συνοψίζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Πειραματικές συνθήκες για την αντίδραση σύζευξης με N-Boc γλυκίνη

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο Σύζευξης	Χρόνος και θερμοκρασία σχηματισμού του ενεργοποιημένου εστέρα	Χρόνος και θερμοκρασία αντίδρασης	Απόδοση
1	THF	Et ₃ N,	TBTU, HOBt	20 min, 0 °C 20 min, rt	48 h, rt 48 h, 30 °C	~10%
2	THF	Et ₃ N,	TBTU, HOBt	20 min, 0 °C 20 min, rt	48 h, rt 48 h, 50 °C	~10%
3	THF	Et ₃ N	PyBroP	20 min, 0 °C 20 min, rt	1 h, 0 °C 72 h, rt 1 h, 70 °C 48 h, rt	~10%
4	DMF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	10 min, rt	48 h, rt	~95%

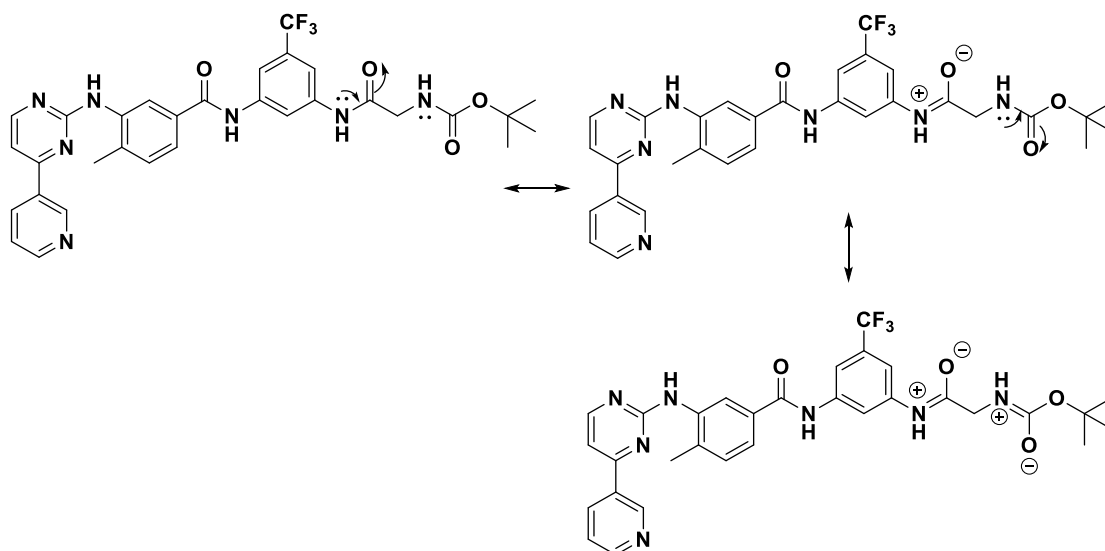
Λαμβάνοντας υπ' όψιν μας τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες που βρήκαμε για το σχηματισμό του 1^{ου} αμιδικού δεσμού (DMF, Et₃N, DIPEA, HATU) τις εφαρμόσαμε και για το σχηματισμό του δεύτερου αμιδικού δεσμού. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν κάτι περισσότερο από ικανοποιητική, όπως άλλωστε φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα. Στις παραπάνω προσπάθειες μεταβάλαμε τις αναλογίες των αντιδρώντων με την καλύτερη από αυτές να είναι 1 ένωση **11** : 1.3 αμινοξύ : 1.1 αντιδραστήριο σύζευξης.

Το προϊόν σύζευξης της ένωσης **11** με την προστατευμένη N-Boc γλυκίνη, η ένωση **12**, της οποίας η δομή φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 66), απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ¹HNMR (Σχήμα 68) και φασματοσκοπία MS.

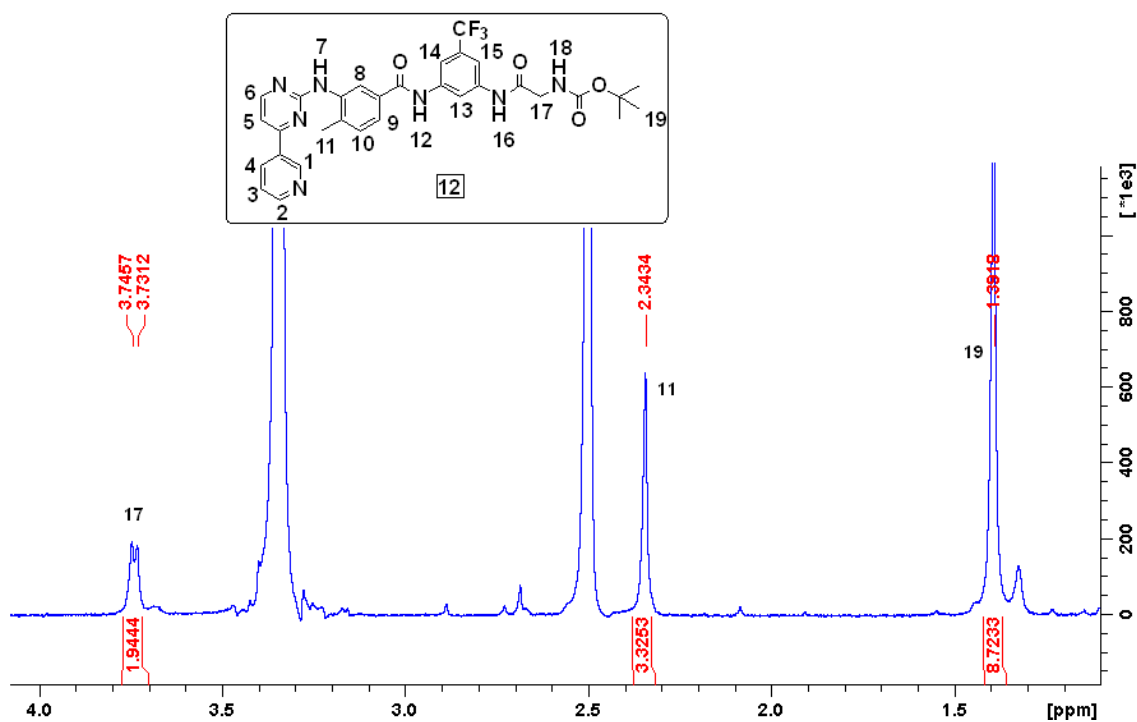
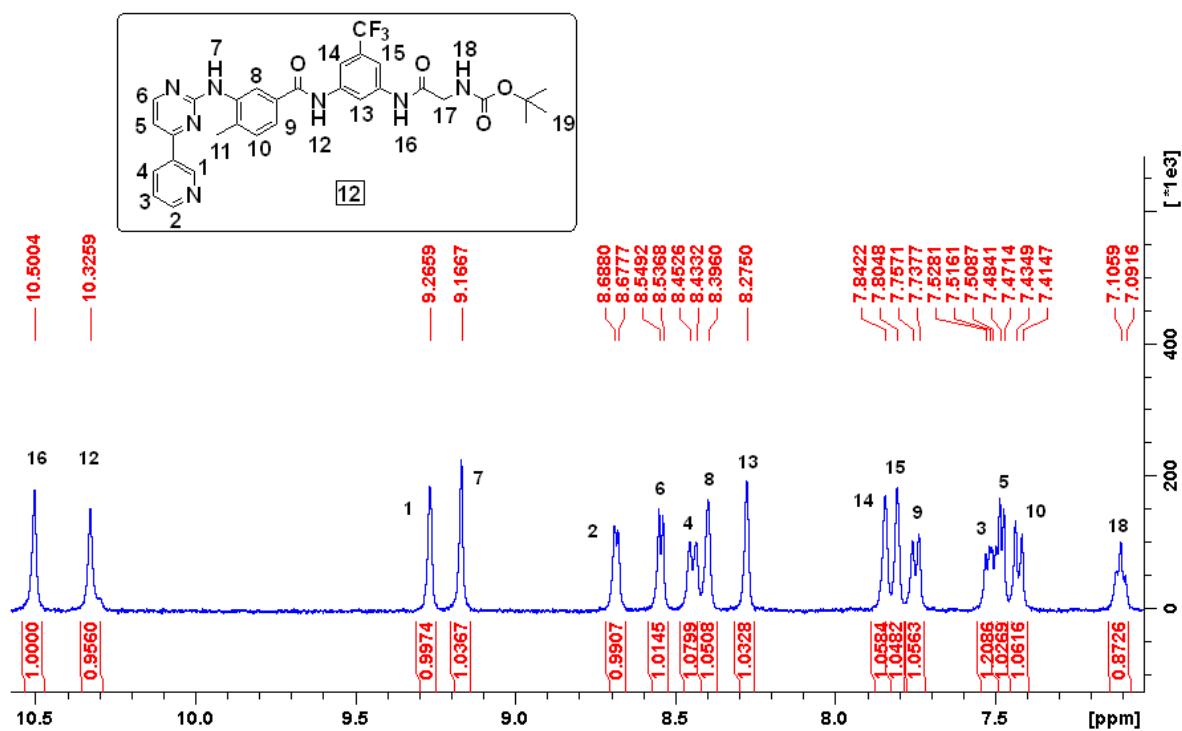


*Σχήμα 66: Δομή του προϊόντος σύζευξης της ένωσης **11** με την N-Boc γλυκίνη, ένωση **12***

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης **12**, τα πρωτόνια 1-11 έχουν περίπου την ίδια χημική μετατόπιση, όπως στο αντίστοιχο φάσμα της ένωσης **11** στο Σχήμα 61. Στο συγκεκριμένο φάσμα, η χαρακτηριστική κορυφή που αποδεικνύει το σχηματισμό της εν λόγω ένωσης είναι αυτή που εμφανίζεται στα 10.50 ppm και αντιστοιχεί στο αμιδικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 16 (Σχήμα 68). Αποπροστατεύεται περισσότερο σε σχέση με το αμιδικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 12, καθώς εκτός του ότι η καρβονυλική ομάδα λόγω συζυγιακού φαινομένου έλκει το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου αφαιρώντας ηλεκτρονιακή πυκνότητα, το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου του αζώτου που συνδέεται με την προστατευτική ομάδα απεντοπίζεται προς την καρβονυλική ομάδα, με συνέπεια την εκδήλωση ισχυρού αρνητικού επαγωγικού φαινομένου, με αποτέλεσμα την ισχυρότερη αποπροστασία, όπως φαίνεται σχηματικά παρακάτω.



Σχήμα 67 : Δομές συντονισμού για την ερμηνεία της αποπροστασίας του αμιδικού πρωτονίου H_{16}



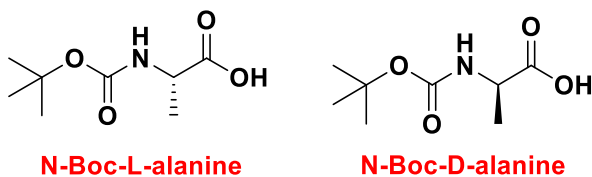
Σχήμα 68: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc γλυκίνη (ένωση **12**) σε DMSO

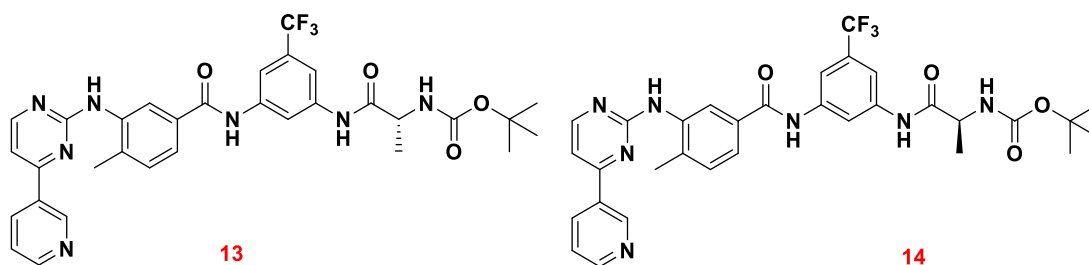
Επιπρόσθετα, τρεις είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές της ένωσης **12**. Η τριπλή στα 7.1 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του αζώτου υπ' αριθμόν 18 και

σγάζεται λόγω των δυο γειτονικών H₁₇, η διπλή στα 3.74 ppm που αντιστοιχεί στα H₁₇ και τέλος η οξεία απλή κορυφή στα 1.39 ppm που αντιστοιχεί στα εννιά ισοδύναμα πρωτόνια της Boc ομάδας (Σχήμα 68). Να σημειωθεί ότι τα πρωτόνια H₁₃, H₁₄, H₁₅, εμφανίζονται λίγο μετατοπισμένα σε υψηλότερες τιμές ppm σε σχέση με αυτές του φάσματος στο Σχήμα 61, ως αναμένεται καθώς η αμινομάδα, ένας ισχυρός δότης ηλεκτρονίων μετατράπηκε σε αμίδιο το οποίο εκδηλώνει ασθενέστερο θετικό συζυγιακό φαινόμενο (+M). Το H₁₃ είναι το πιο αποπροστατευμένο από αυτά τα τρία και εμφανίζεται στα 8.27 ppm, καθώς βρίσκεται σε όρθο-θέση ως προς δυο αμιδικά άζωτα. Τα δυο γειτονικά άζωτα, προσθέτουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω του συζυγιακού (+M), ενώ αφαιρούν μέσω του επαγωγικού φαινομένου. Τέλος, τα H₁₄ και H₁₅ έχουν πολύ παρόμοιο χημικό περιβάλλον και είναι σχετικά δύσκολο να γίνει με βεβαιότητα η αντιστοίχιση με τις κορυφές-συντονισμούς. Αυτό θα μπορούσε να γίνει εύκολα με φασματοσκοπία 2D NMR, όμως δεν κατέστη εφικτή η λήψη των εν λόγω φασμάτων.

❖ **Αντίδραση σύζευξης προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης 11 και των N-Boc-L-αλανίνης και N-Boc-D-αλανίνης.**

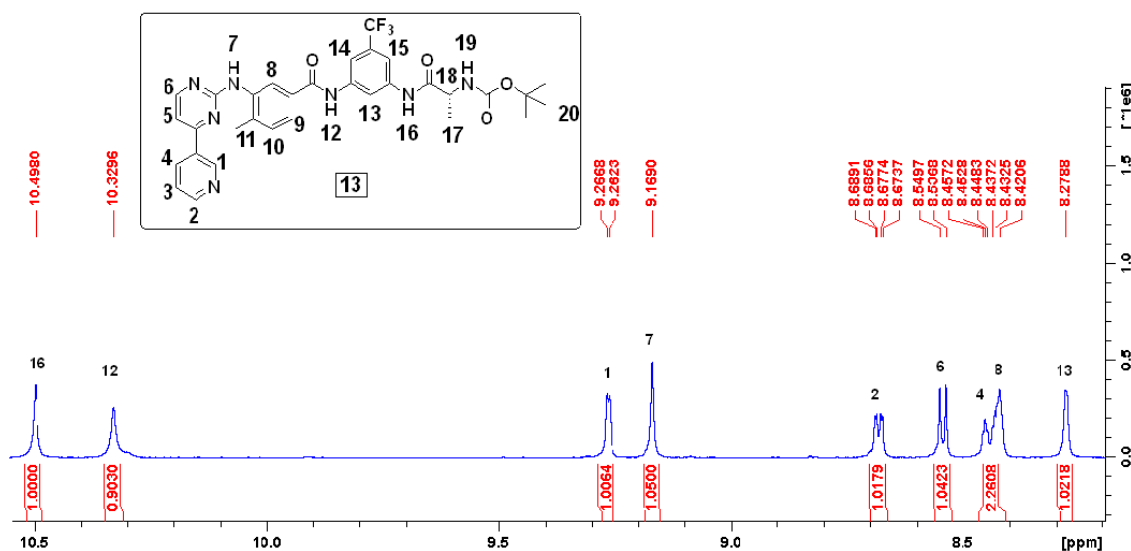
Έχοντας υπ' όψιν μας τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες που βρήκαμε μέσω μιας σειράς πειραμάτων για το σχηματισμό του πρώτου και εν συνεχεία του δεύτερου αμιδικού δεσμού (DMF, Et₃N, DIPEA, HATU), τις χρησιμοποιήσαμε για τη σύνθεση των παραγώγων με προσάρτηση της N-Boc-L-αλανίνης και της N-Boc-D-αλανίνης εισάγοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την έννοια της χειρομορφίας, οπτικής ενεργότητας, επηρεάζοντας πιθανόν και τις βιολογικές ιδιότητες, ήτοι τη δραστηριότητα και την εκλεκτικότητα των εν δυνάμει αναστολέων. Η απόδοση της αντίδρασης σχηματισμού του αμιδικού δεσμού και στις δυο περιπτώσεις ήταν ικανοποιητική της τάξης του 70% και 80% για τα L- και D- ανάλογα, ένωση **13** και ένωση **14** αντίστοιχα (Σχήμα 69).





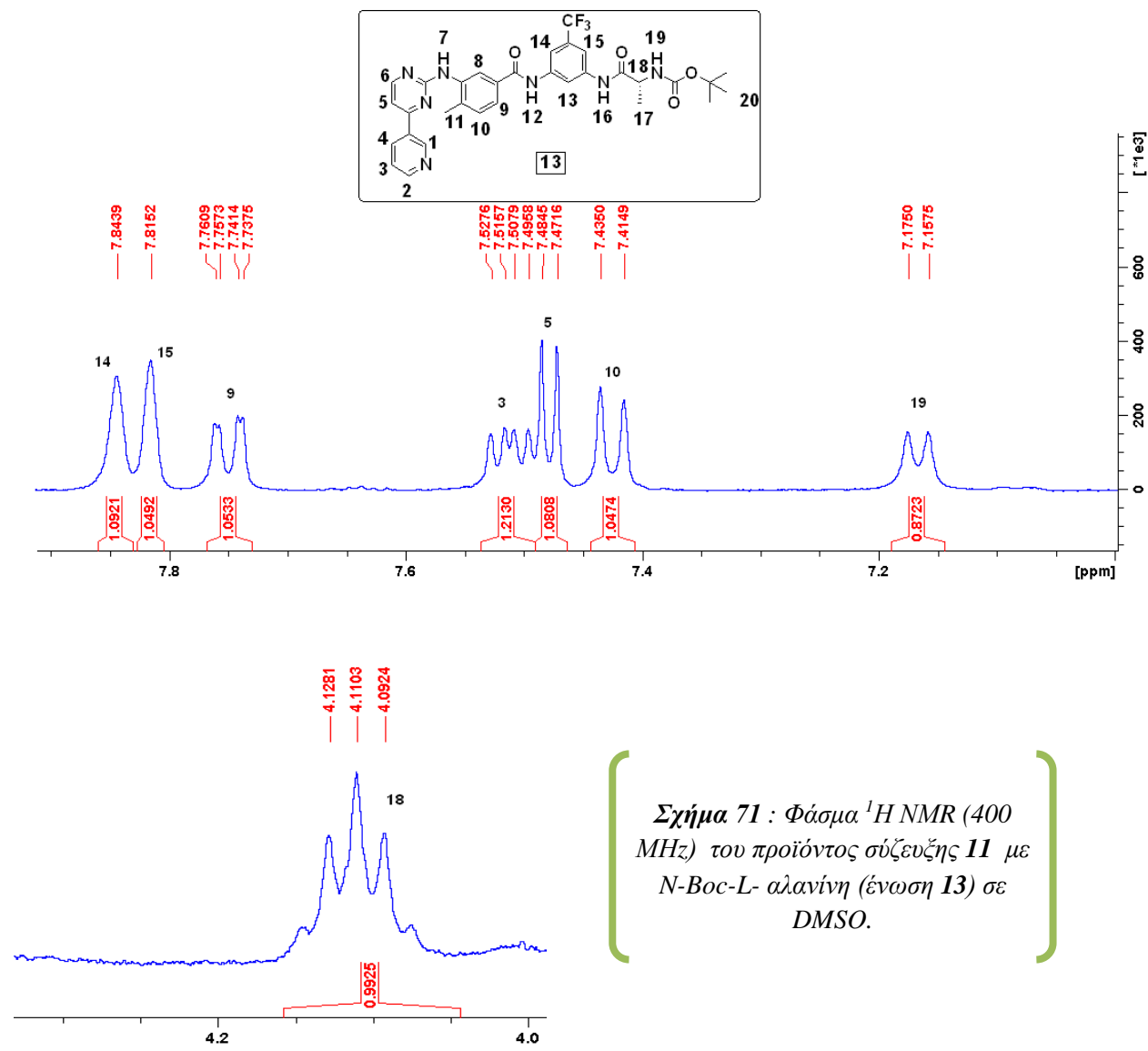
Σχήμα 69: Δομές των προστατευμένων αμινοξέων *N*-Boc-*L*- , *N*-Boc-*D*- αλανίνης και των προϊόντων σύζευξης της ένωσης **11** με τα παραπάνω αμινοξέα, ένωση **13** και ένωση **14** αντίστοιχα.

Η επιτυχής σύνθεση και απομόνωση των παραπάνω ενώσεων **13** και **14** επιβεβαιώθηκε και ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR, όπως φαίνεται παρακάτω. Τα πρωτόνια 1-11 έχουν ήδη ταυτοποιηθεί σε προηγούμενη ενότητα. Το πιο χαρακτηριστικό πρωτόνιο είναι το αμιδικό H_{16} , στα 10.49 ppm, το οποίο επιβεβαιώνει το σχηματισμό του δεύτερου αμιδικού δεσμού (Σχήμα 70).



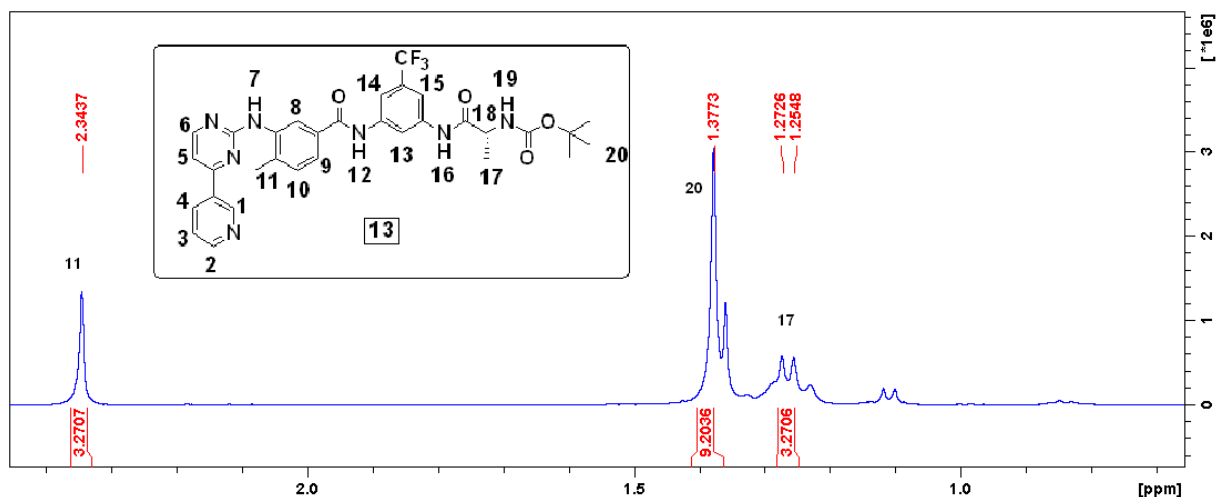
Σχήμα 70 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*L*-αλανίνη (ένωση **13**), στην αρωματική περιοχή σε DMSO

Επιπρόσθετα, η διπλή κορυφή στα 7.16 ppm αντιστοιχεί στο H_{19} της *N*-Boc-*L*- αλανίνης. Σχάζεται λόγω του γειτονικού H_{18} . Αυτό με τη σειρά του εμφανίζεται ως μια πολλαπλή κορυφή στα 4.11 ppm λόγω της σχάσης spin-spin με τα τρία πρωτόνια της γειτονικής μεθυλικής ομάδας και το H_{19} (Σχήμα 71).



Σχήμα 71 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*L*-αλανίνη (ένωση **13**) σε *DMSO*.

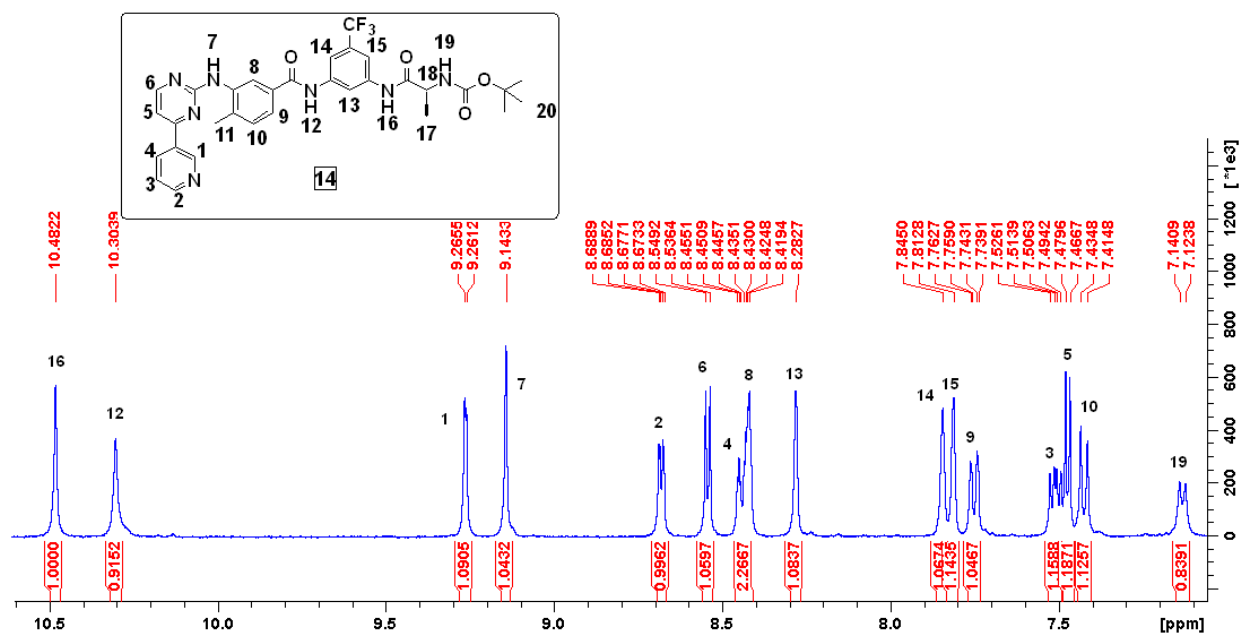
Τέλος, στα 1.37 ppm εμφανίζονται τα 9 πρωτόνια, H_{20} , της *N*-Boc προστατευτικής ομάδας και στα 1.26 ppm τα 3 πρωτόνια της μεθυλομάδας, H_{17} , της *N*-Boc-*L*-αλανίνης (Σχήμα 72).

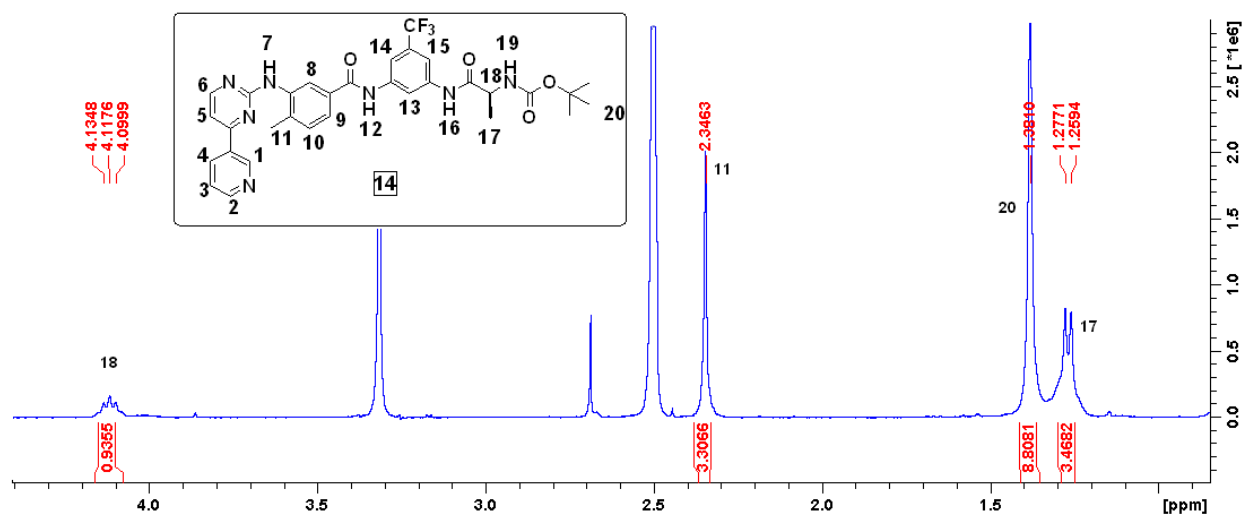


Σχήμα 72 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με N-Boc-L-αλανίνη (ένωση **13**) σε DMSO

Οι σχετικές αποπροστασίες και χημικές μετατοπίσεις όλων των παραπάνω πρωτονίων αιτιολογούνται, όπως ακριβώς και στο φάσμα του προϊόντος σύζευξης **11** με την N-Boc γλυκίνη του Σχήματος 68.

Όσο αφορά το φάσμα ^1H NMR του παραγώγου με προσάρτηση της N-Boc-D-αλανίνης, ένωση **14**, είναι ανάλογο με αυτό της ένωσης **13**, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή της σύνθεσης. Οι δύο ενώσεις δε διαφέρουν δομικά σε τίποτα, παρά μόνο στη στεreoχημεία του ασύμμετρου άνθρακα. Από το Σχήμα 73 παρατηρούμε ότι οι χημικές μετατοπίσεις και οι πολλαπλότητες των πρωτονίων είναι παρόμοιες με αυτές των Σχημάτων 70, 71 και 72.

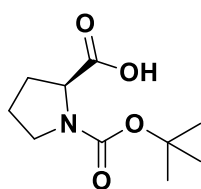




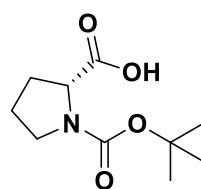
Σχήμα 73: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με N-Boc-D-αλανίνη (ένωση **14**) σε DMSO

❖ Αντίδραση σύζευξης προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και των N-Boc-L-προλίνης και N-Boc-D-προλίνης.

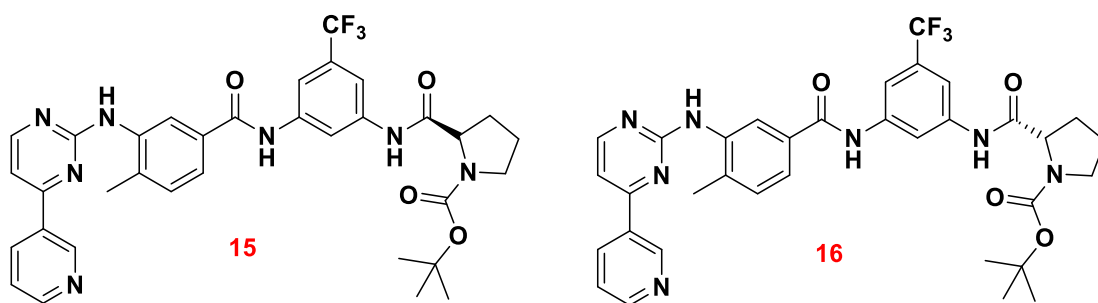
Και στην περίπτωση αυτή για το σχηματισμό του δεύτερου αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και των προστατευμένων στην αμινική ομάδα αμινοξέων N-Boc-L-προλίνης και N-Boc-D-προλίνης χρησιμοποιήσαμε ως διαλύτη DMF, ως βάσεις Et_3N και DIPEA και ως αντιδραστήριο σύζευξης HATU. Λάβαμε τα προϊόντα του παρακάτω σχήματος, ένωση **15** και ένωση **16** αντίστοιχα, σε απόδοση 50% περίπου.



N-Boc- L-proline

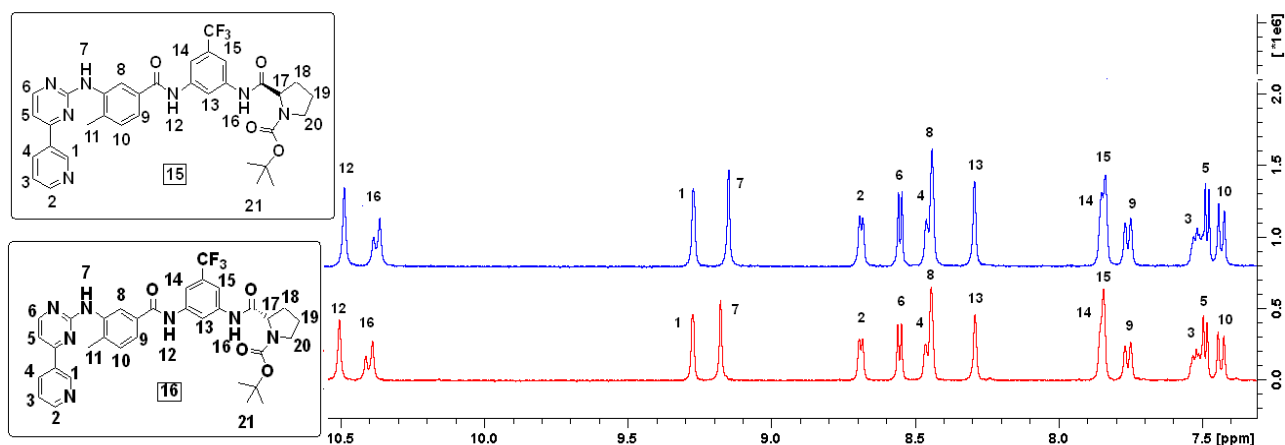


N-Boc-D-proline



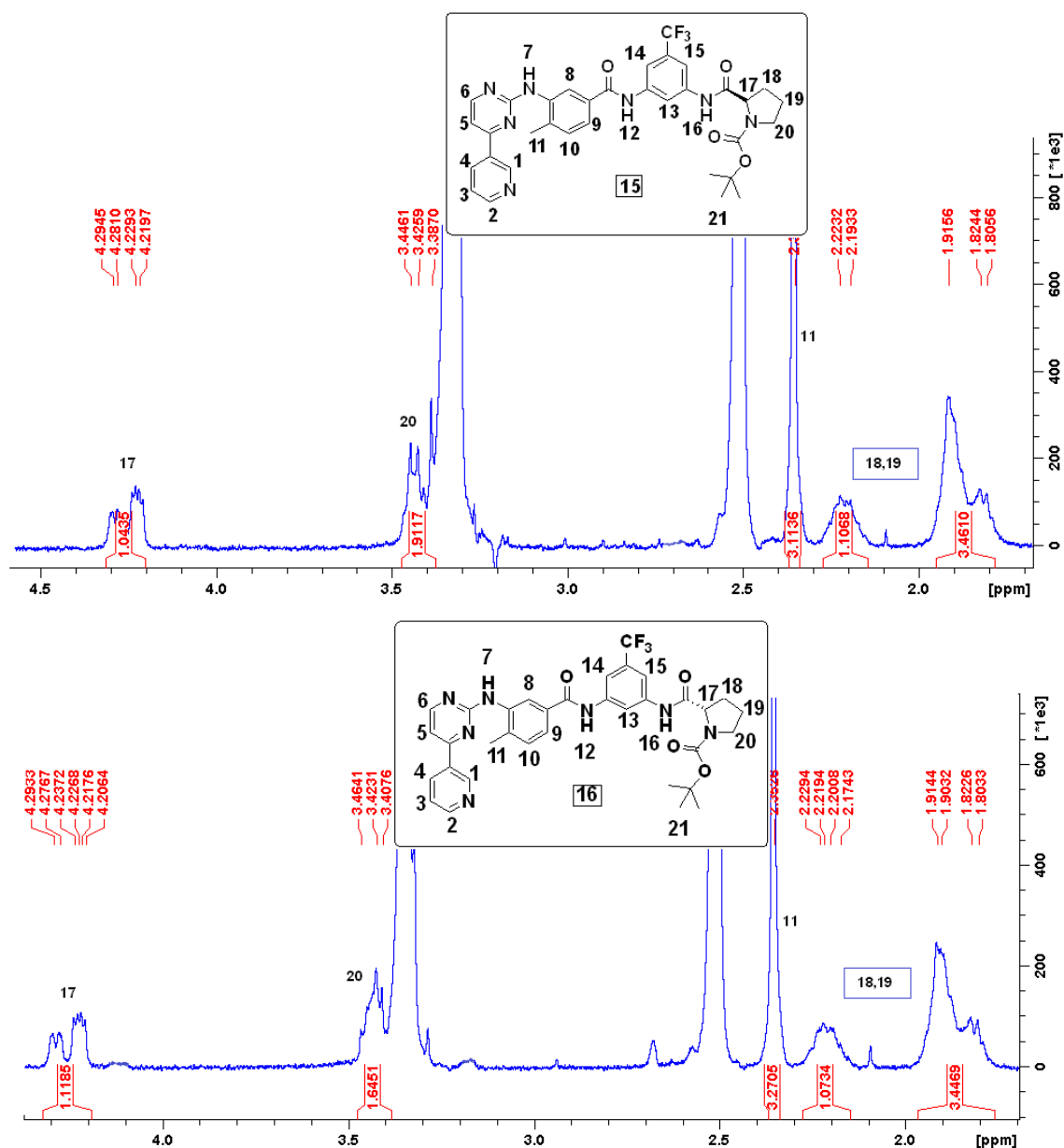
Σχήμα 74 : Δομές των προστατευμένων αμινοξέων *N*-Boc-*L*- , *N*-Boc-*D*- προλίνης και των προϊόντων σύζευξης της ένωσης **11** με τα παραπάνω αμινοξέα, ένωση **15** και ένωση **16** αντίστοιχα.

Από τα φάσματα ^1H NMR επιβεβαιώνεται η επιτυχής τους σύνθεση όπως φαίνεται σχηματικά και παρακάτω (Σχήμα 75). Με μπλέ χρώμα απεικονίζεται το φάσμα της ένωσης **15**, δηλαδή της ένωσης με την προσάρτηση της *N*-Boc-*L*- προλίνης, ενώ με κόκκινο της ένωσης **16**, με προσάρτηση της *N*-Boc-*D*- προλίνης. Παρατηρούμε ότι χαρακτηριστική κορυφή που επιβεβαιώνει το σχηματισμό του δεύτερου αμιδικού δεσμού είναι η κορυφή στα 10.40 ppm. Τα πρωτόνια 1-10 εμφανίζουν τις ίδιες σχάσεις και χημικές μετατοπίσεις και στις δυο ενώσεις. Δεδομένου ότι εξετάστηκαν αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα, δεν θα γίνει εδώ λεπτομερής ανάλυση και επεξήγηση των σχάσεων και των χημικών τους μετατοπίσεων. Εντύπωση προκάλεσε το γεγονός ότι το πρωτόνιο του δεύτερου αμιδικού δεσμού H_{16} , στις δυο αυτές ενώσεις εμφανίζει σχάση, γεγονός που δεν είχε παρατηρηθεί σε κανένα από τα προηγούμενα φάσματα. Υποθέσαμε ότι το H_{16} "βλέπει" δυο διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα λόγω συνύπαρξης των *cis* και *trans* ισομερών της προλίνης. Η αναλογία της κορυφής που αντιστοιχεί στο H_{12} προς την κορυφή που αντιστοιχεί στο H_{16} είναι 2:3 (Σχήμα 75). Η υπόθεση μας μένει να επιβεβαιωθεί πραγματοποιώντας πειράματα ^1H NMR μεταβλητής θερμοκρασίας (Dynamic NMR Spectroscopy).



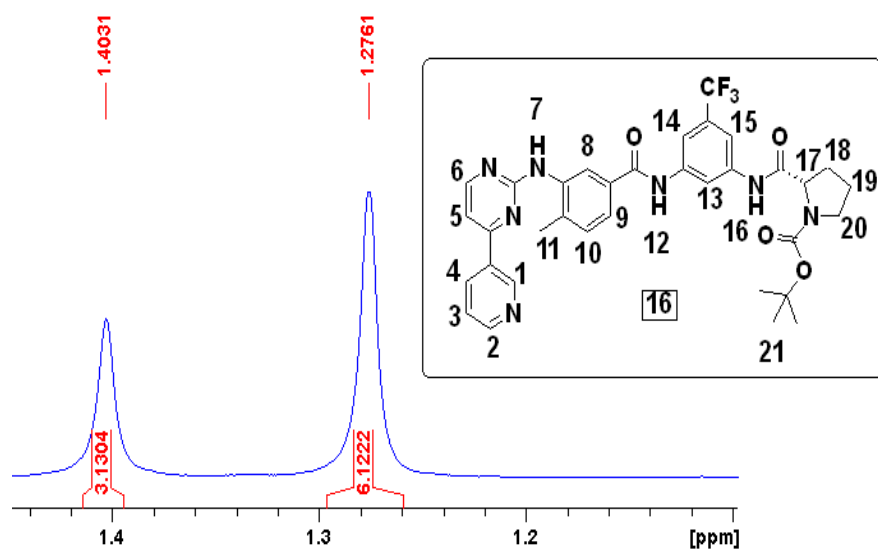
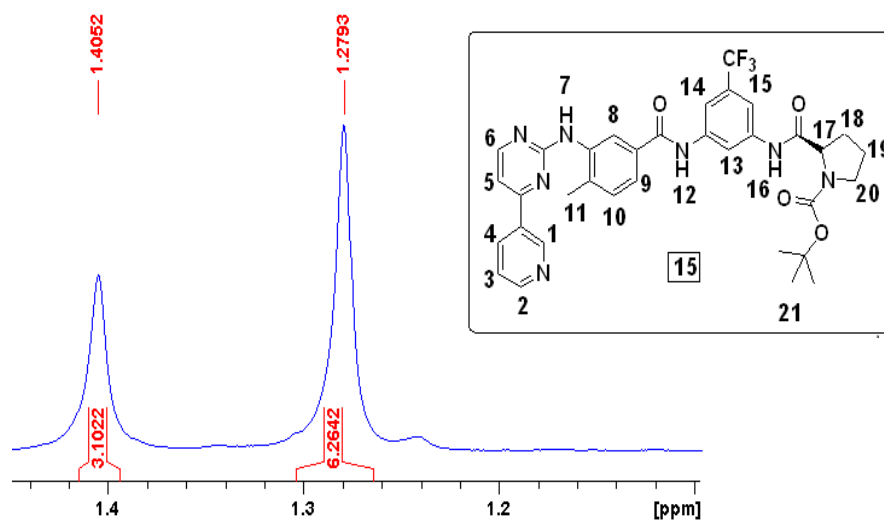
Σχήμα 75: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*L*-προλίνη (ένωση **15**), μπλέ χρώμα, και του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*D*-προλίνη (ένωση **16**), κόκκινο χρώμα σε DMSO

Χαρακτηριστικές είναι και οι κορυφές των πρωτονίων που αντιστοιχούν στο δακτύλιο της προλίνης. Όπως και πριν, για τις δύο ενώσεις τα φάσματα είναι πανομοιότυπα (Σχήμα 76). Το πιο αποπροστατευμένο είναι το πρωτόνιο 17, που εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή λόγω των δυο γειτονικών H_{18} . Αποπροστατεύεται περισσότερο καθώς βρίσκεται δίπλα στο άτομο αζώτου της προλίνης και στο άτομο του οξυγόνου του αμιδικού δεσμού. Ακολουθώντας, τα H_{20} αποπροστατεύονται καθώς και αυτά βρίσκονται σε γειτονική θέση ως προς το άζωτο. Εμφανίζονται και αυτά ως πολλαπλή κορυφή, αφού σχάζονται τόσο μεταξύ τους (^2J), όσο και με τα δυο γειτονικά H_{19} , τα οποία σημειωτέον δεν είναι ισοδύναμα (αξονικό και ισημερινό) (^3J). Τέλος, τα H_{18} και H_{19} εμφανίζονται και αυτά ως πολλαπλές κορυφές, καθώς σχάζονται και μεταξύ τους (^2J) και με τα μη ισοδύναμα γειτονικά (^3J), με χημικές μετατοπίσεις στα περίπου 2.21 και 1.91 ppm, αντίστοιχα.



Σχήμα 76: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*L*-προλίνη (ένωση **15**), επάνω, και του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*D*-προλίνη (ένωση **16**), κάτω, σε DMSO

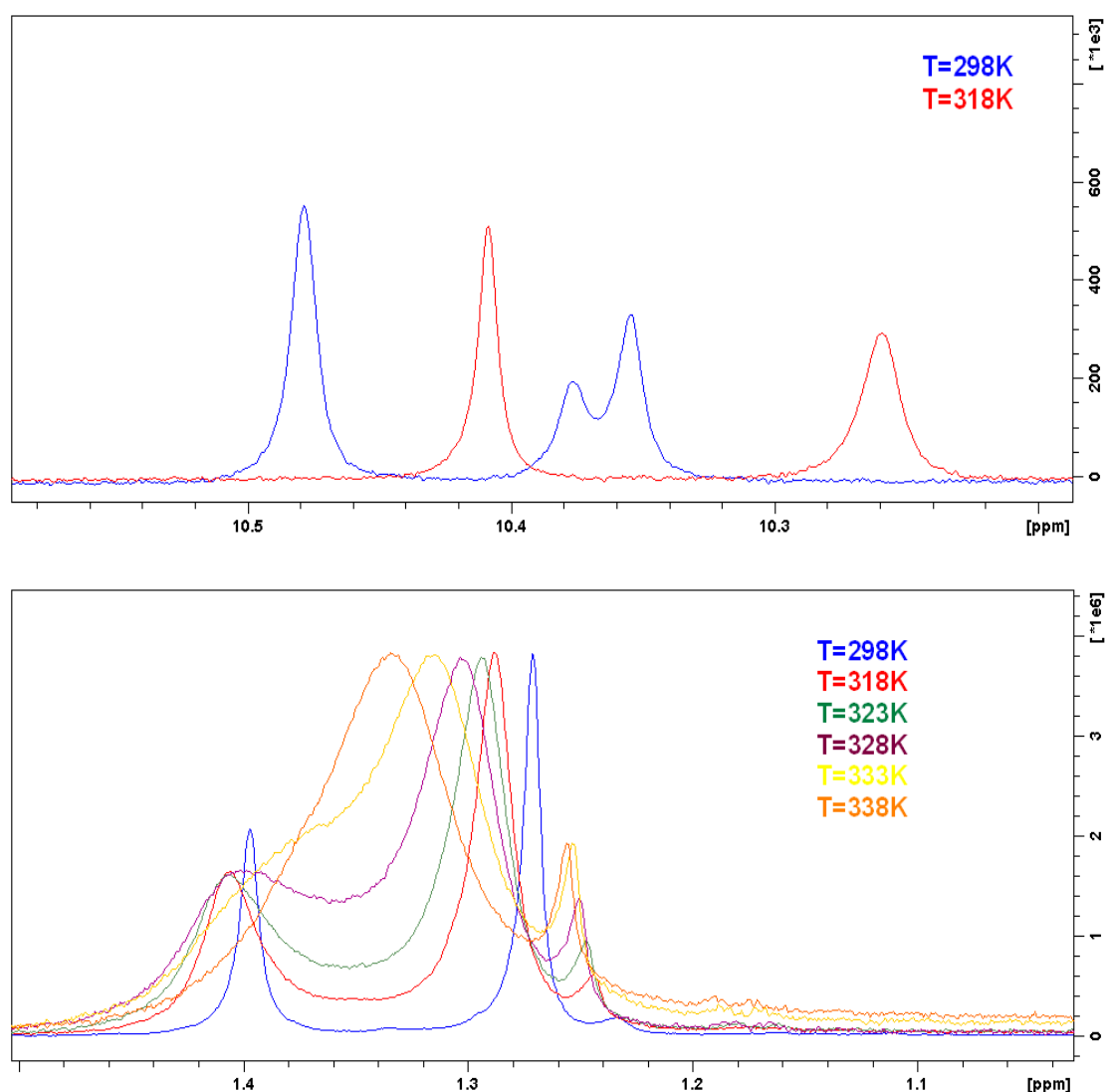
Ένα ακόμη γεγονός που αρχικά μας προκάλεσε εντύπωση, δεδομένου ότι δεν είχε ξαναπαρατηρηθεί σε κάποιο άλλο φάσμα των προηγούμενων ενώσεων, είναι ότι τόσο στην ένωση **15**, όσο και στην ένωση **16** τα πρωτόνια της Boc προστατευτικής ομάδας εμφανίζονται ως δυο απλές κορυφές με ολοκλήρωση 3 και 6, αντίστοιχα και αναλογία περίπου 1:2 (Σχήμα 77). Το γεγονός αυτό ήρθε να ενισχύσει την υπόθεση που κάναμε για τη συνύπαρξη της *cis* και *trans* προλίνης, με την ως άνω αναλογία - ποσοστό.



Σχήμα 77: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*L*-προλίνη (ένωση **15**), επάνω, και του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*D*-προλίνη (ένωση **16**), κάτω, σε DMSO

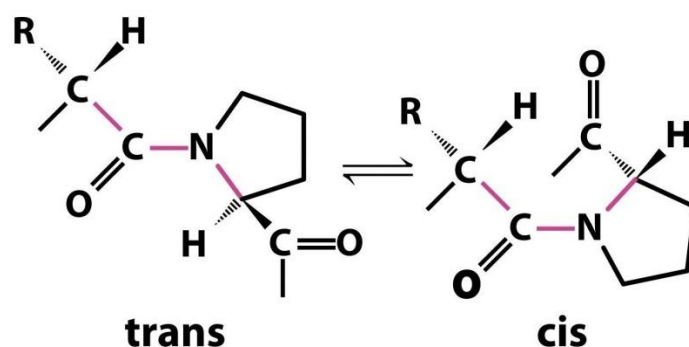
Έχοντας υπ' όψιν τη σχέση του H_{16} (Σχήμα 75) και τη διαφοροποίηση στη χημική μετατόπιση των μεθυλομάδων της Boc προστατευτικής ομάδας (Σχήμα 77), θέλοντας παράλληλα να επιβεβαιώσουμε την υπόθεση που κάναμε για την ύπαρξη του *cis* και *trans* ισομερούς της προλίνης, προβήκαμε στη λήψη φασμάτων ^1H NMR μεταβλητής θερμοκρασίας (Dynamic NMR Spectroscopy). Ουσιαστικά, το όργανο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C) αντιλαμβάνεται την ύπαρξη δύο διαμορφωμένων ενώσεων, με τη διαδικασία διαμορφωτικής αλληλομετατροπής αρκούντως αργή, και γι αυτό στη συγκεκριμένη θερμοκρασία δίνει δυο ξεχωριστά σήματα τόσο για το αμιδικό πρωτόνιο όσο και για τα εννιά πρωτόνια της Boc ομάδας.

Εάν ισχύει η υπόθεση μας, αυξάνοντας τη θερμοκρασία εκτέλεσης του πειράματος, αυξάνεται παράλληλα και η κινητική ενέργεια των μορίων του δείγματος με αποτέλεσμα τη γρηγορότερη διαμορφωτική μεταβολή-αλληλομετατροπή από το ένα διαμορφωμερές στο άλλο. Κατ' επέκταση το όργανο, λόγω της γρήγορης αυτής αλληλομετατροπής, δεν αντιλαμβάνεται πλέον δυο αλλά μια ένωση, δίνοντας τώρα ένα σήμα για το αμιδικό πρωτόνιο και ένα σήμα για τα εννιά πρωτόνια της Βοσομάδας, ως μέσο όρο των χημικών μετατοπίσεων των αντίστοιχων σημάτων-συντονισμών. Η θερμοκρασία κατά την οποία οι κορυφές συνενώνονται ονομάζεται θερμοκρασία συνένωσης. Παρακάτω απεικονίζονται τα φάσματα μεταβλητής θερμοκρασίας για την ένωση **15** (Σχήμα 78).



Σχήμα 78: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *N*-Boc-*L*-προλίνη (ένωση **15**) σε διάφορες θερμοκρασίες σε DMSO

Λαμβάνοντας τα φάσματα, διαπιστώσαμε ότι η υπόθεση μας για την ύπαρξη των δυο ισομερών *trans* και *cis* της προλίνης επαληθεύτηκε. Παρατηρήσαμε ότι σε θερμοκρασία 45 °C (313 K, θερμοκρασία συνένωσης) η σχάση που φαινόταν στην κορυφή που αντιστοιχεί στο H₁₆ πλέον δεν υπάρχει και σε υψηλότερη θερμοκρασία, υφίσταται μια διακριτή απλή κορυφή. Επιπρόσθετα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία ανά 5 °C είδαμε ότι σταδιακά οι δυο διακριτές κορυφές που αντιστοιχούν στα 9 πρωτόνια της Boc ομάδας, συνενώνονται σε μια απλή κορυφή (πορτοκαλί κορυφή Σχήματος 78). Η πλήρης συνένωση τους επιτυγχάνεται στους 65 °C. Είναι προφανές, από το παραπάνω σχήμα, ότι σε θερμοκρασίες από 25 °C - 65 °C, οι δυο διακριτές κορυφές σταδιακά διευρύνονται και έρχονται πιο κοντά η μια στην άλλη προκειμένου να δώσουν ένα διακριτό σήμα, ως μια απλή κορυφή, τον μέσο όρο των σημάτων (πορτοκαλί) και με ένταση το άθροισμα των επιμέρους ολοκληρώσεων στους 25 °C (μπλέ χρώμα). Υποδεικνύοντας έτσι ότι τα πρωτόνια αυτά είναι ισοδύναμα και πως τα δυο σήματα όντως οφείλονται στις δυο πιθανές διαμορφώσεις της προλίνης *cis* και *trans*.

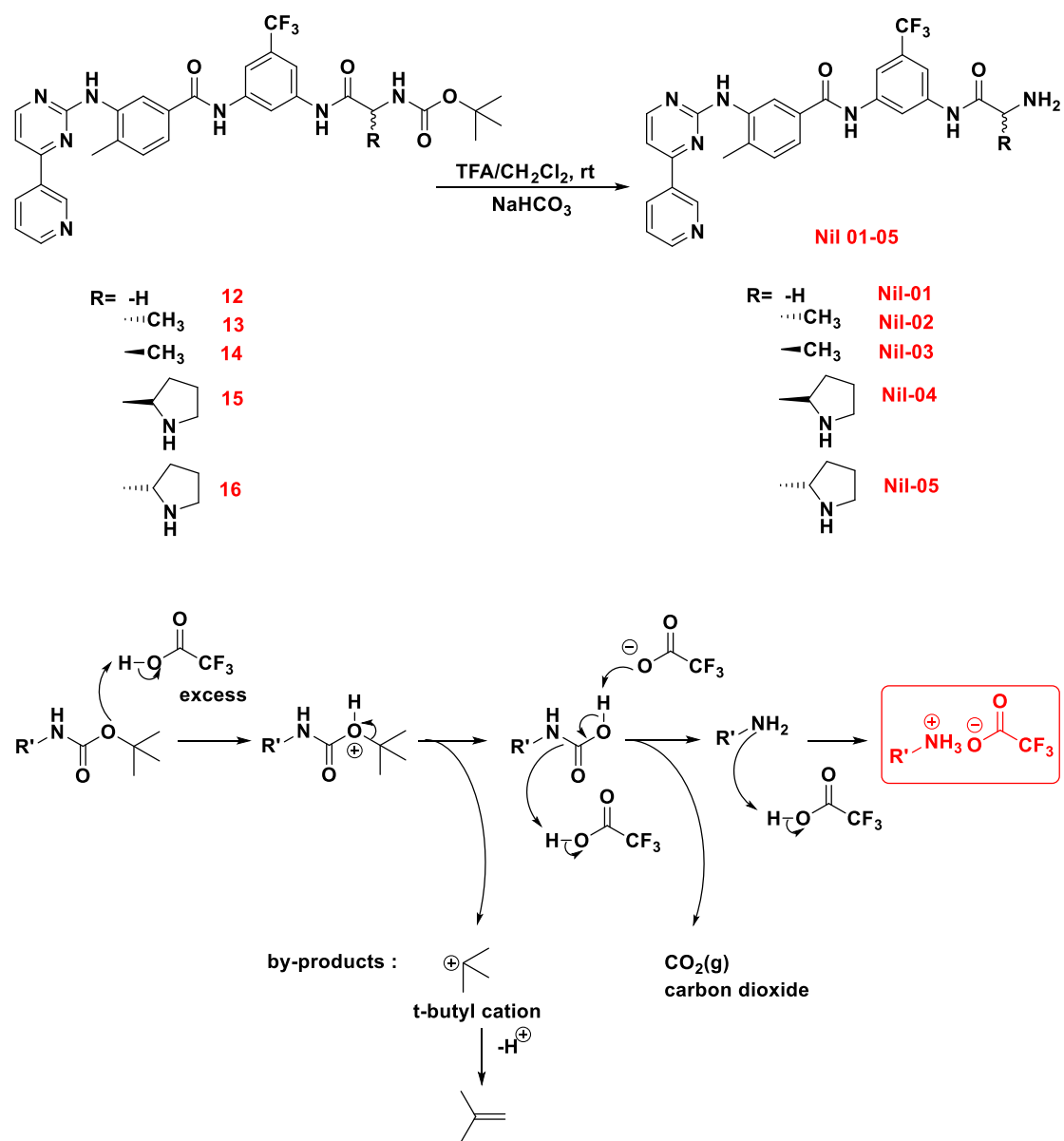


Εικόνα 65: Trans και cis ισομερή της προλίνης

3.5.5.6 Αποπροστασία της προστατευτικής Boc ομάδας των προϊόντων σύζευξης, ενώσεις 12,13,14,15,16 για το σχηματισμό των τελικών προϊόντων Nil-01-Nil-05.

Τελικό στάδιο για τη λήψη των επιθυμητών παραγώγων/αναλόγων του Nilotinib, Nil-01-Nil-05 είναι η αποπροστασία, δηλαδή η απομάκρυνση της Boc ομάδας από το N-τελικό άκρο των αντίστοιχων προστατευμένων ενώσεων, ενώσεις 12-16. Με την ύπαρξη ελεύθερης αμινομάδας είναι πιθανή η ισχυρότερη δέσμευση του αναστολέα, μέσω δεσμών υδρογόνου, στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Η

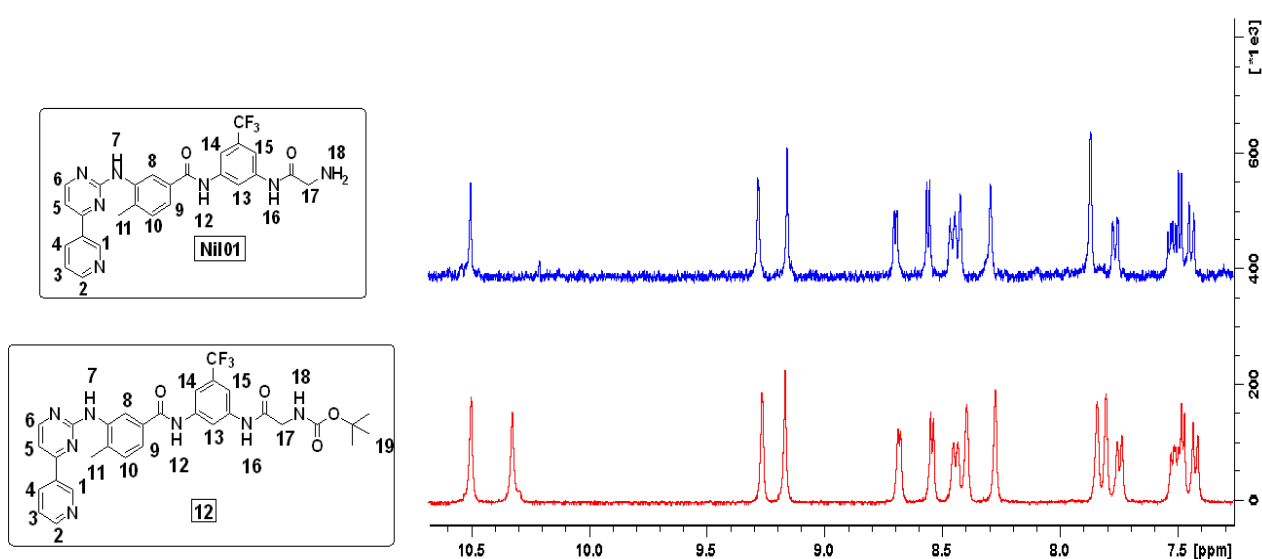
κλασική μέθοδος αποπροστασίας N-Boc προστατευμένων αμινοξέων, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι η κατεργασία τους με TFA (trifluoroacetic acid) σε θερμοκρασία δωματίου. Δεδομένου ότι με αυτό τον τρόπο λαμβάνουμε το επιθυμητό προϊόν με τη μορφή άλατος, ακολουθεί προσθήκη κάποιας βάσης προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση και να γίνει παραλαβή του προϊόντος με ελεύθερη την αμινομάδα. Η αντίδραση και ο μηχανισμός της φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 79).

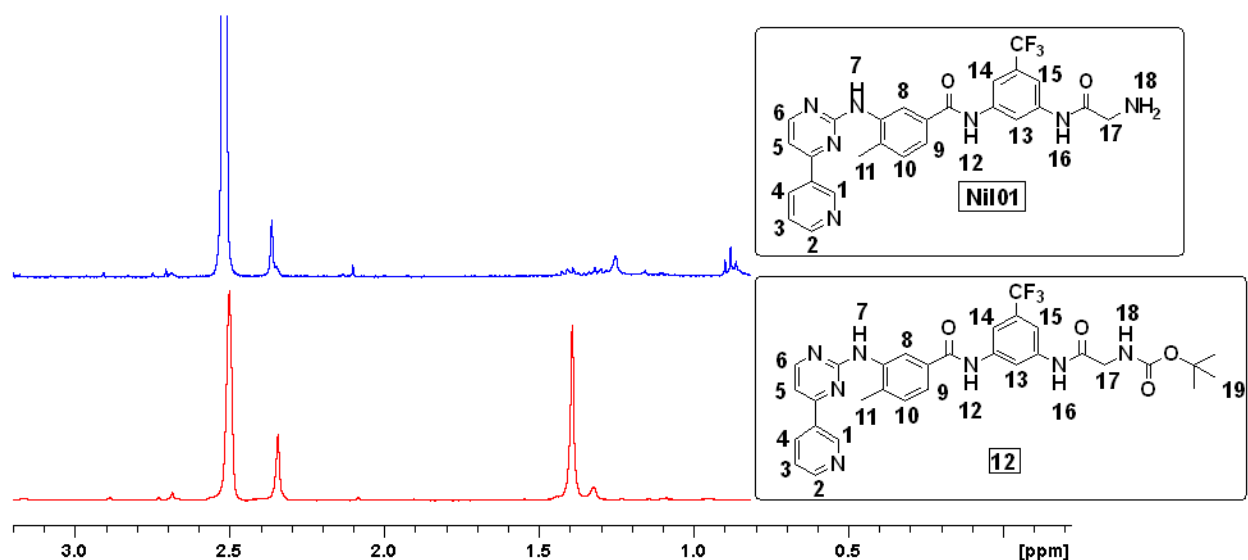


Σχήμα 79 : Αντίδραση και μηχανισμός αποπροστασίας N-Boc προστατευμένων ενώσεων.

Αρχικά, προβήκαμε στην αποπροστασία της ένωσης **12**, δηλαδή του προϊόντος σύζευξης με N-Boc γλυκίνη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αντίδραση

κατεργάστηκε με 50% TFA/CH₂Cl₂ για 1.5 h και ακολούθησε εξουδετέρωση με 10% NaHCO₃. Μετά τη σχετική επεξεργασία της αντίδρασης και ελέγχοντας με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC), διαπιστώσαμε ότι αυτή πραγματοποιήθηκε σε ποσοστό 100%. Στο ¹H NMR, αναμέναμε να δούμε τις δυο κορυφές των αμιδικών πρωτονίων, την απουσία των 9 πρωτονίων της προστατευτικής ομάδας και τα πρωτόνια της ελεύθερης αμινικής ομάδας. Αντί αυτού, η κορυφή του ενός αμιδικού πρωτονίου είχε εξαφανιστεί, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 80, ενώ τα πρωτόνια του πυριδινικού, πυριμιδινικού και των δυο ακόμη βενζολικών δακτυλίων υφίστανται, εμφανίζοντας την ίδια χημική μετατόπιση. Επίσης, παρατηρούμε ότι η Boc ομάδα δεν εμφανίζεται στο φάσμα του αποπροστατευμένου προϊόντος στα 1.4 ppm (Σχήμα 80). Τα πρωτόνια της ελεύθερης αμινομάδας του τελικού προϊόντος επίσης δεν έδωσαν κορυφή, όμως αυτό δικαιολογείται μερικώς, καθώς λαμβάνοντας το φάσμα σε DMSO μπορεί να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με αυτό και η αναμενόμενη κορυφή να είναι πολύ μικρή και να μη φαίνεται.





Σχήμα 80: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της προστατευμένης ένωσης **12** (κόκκινο χρώμα) και της αντίστοιχης αποπροστατευμένης **Nil-01** (μπλέ χρώμα) σε DMSO

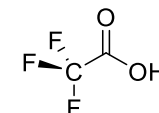
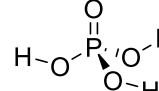
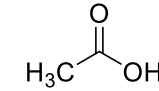
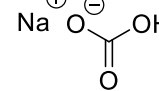
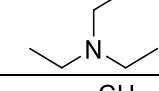
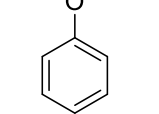
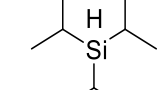
Με τα δεδομένα αυτά, υποθέσαμε πως η ένωση μας ίσως είναι ασταθής στις όξινες συνθήκες που διενεργήθηκε η αποπροστασία με αποτέλεσμα να διασπάται και για το λόγο αυτό να μην εμφανίζεται το ένα αμιδικό πρωτόνιο. Ως εκ τούτου, προβήκαμε στην εκτέλεση μιας σειράς πειραμάτων σε λιγότερο όξινες συνθήκες, διαφοροποιώντας τη χρησιμοποιούμενη βάση στην εξουδετέρωση, το χρόνο και τη θερμοκρασία της αντίδρασης με την παράλληλη χρήση κάποιου αντιδραστήριου παγίδευσης του tert-butyl κατιόντος (ανισόλη) που πιθανώς να σχημάτιζε παραπροϊόντα, εμποδίζοντας την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Τα πειράματα που διενεργήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 6 και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στον Πίνακα 7.

Πίνακας 6 : Πειραματικές συνθήκες για την αποπροστασία της Boc ομάδας

Πείραμα	Αντιδραστήριο αποπροστασίας	Βάση	Αντιδραστήριο παγίδευσης	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	50% TFA	NaHCO ₃	-	rt	1.5 h
2	50% TFA	NaHCO ₃	Ανισόλη	rt	30 min
3	50% TFA	NaHCO ₃	Ανισόλη	rt	5 min
4	40% TFA	Et ₃ N	Ανισόλη	rt	3 min
5	10% TFA	Et ₃ N	Ανισόλη	0 °C	5 min
6	40% TFA	NaHCO ₃	Τρισοπρότυλο-σιλάνιο	rt	5 min

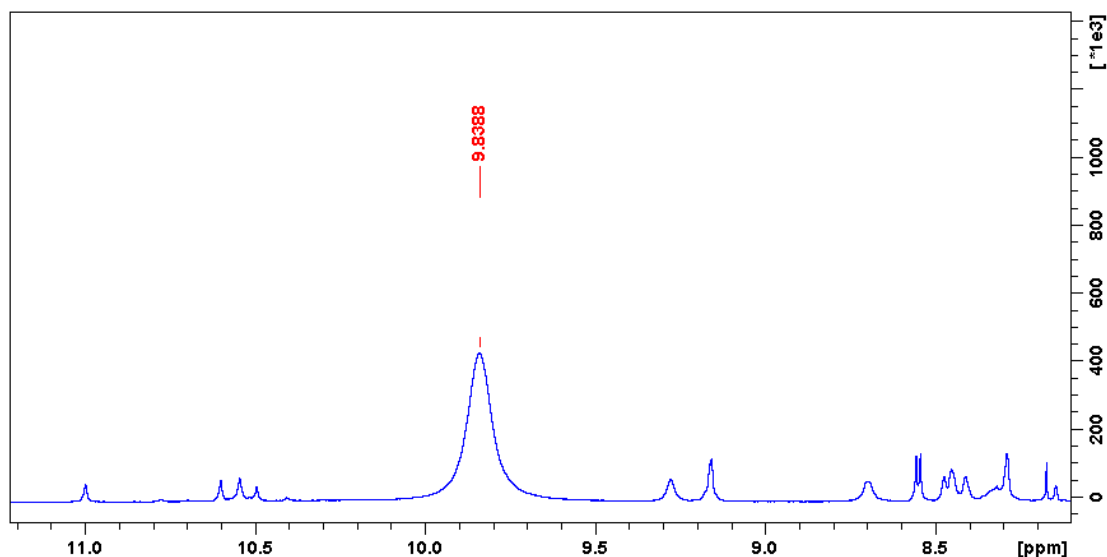
7	10% TFA	NaHCO ₃	Τρισοπρότυλο-σιλάνιο	rt	3 days
8	85% H ₃ PO ₄	NaHCO ₃	Τρισοπρότυλο-σιλάνιο	rt	15 min
9	50% CH ₃ COOH	NaHCO ₃	Τρισοπρότυλο-σιλάνιο	rt	3 days

Πίνακας 7 : Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση αποπροστασίας

Αντιδραστήριο	Ονοματολογία	Δομή
TFA	Τριφθοροξικό οξύ	
H ₃ PO ₄	Φωσφορικό οξύ	
CH ₃ COOH	Οξικό οξύ	
NaHCO ₃	Όξινο ανθρακικό νάτριο	
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη	
Anisole	Μεθοξυβενζόλιο	
Triisopropylsilane	Τρισοπρότυλο-σιλάνιο	

Να σημειωθεί ότι η βάση χρησιμοποιείται για να αποπρωτονιώσει τα άζωτα της ένωσης (πυριδινικά, πυριμιδινικά, αμινικά) που πιθανόν πρωτονιώθηκαν στο όξινο περιβάλλον της αντίδρασης. Χρησιμοποιώντας NaHCO₃ σχηματίζονται ως παραπροϊόντα τριφθοροξικό νάτριο, H₂O, ενώ παράλληλα εκλύεται CO₂. Η προσθήκη NaHCO₃ προκαλούσε αφρισμό στην αντίδραση με αποτέλεσμα να υπάρχουν δυσκολίες στην παραιτέρω επεξεργασία της, κυρίως λόγω του σχηματισμού γαλακτωμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε Et₃N. Όμως, το σχηματιζόμενο άλας της τριαιθυλαμίνης δεν απομακρυνόταν εύκολα κατά την επεξεργασία και η εμφάνιση του στα 9.8ppm σε συνδυασμό με τις τρεις αιθυλομάδες, προκαλούσε

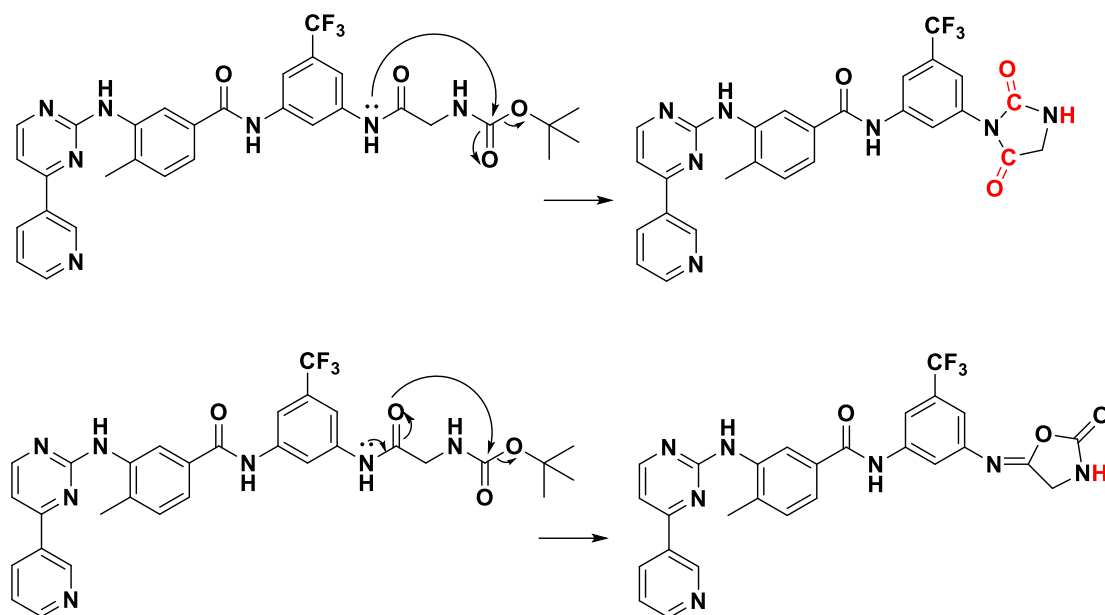
αλληλεπικάλυψη κορυφών και η ερμηνεία του φάσματος για την ταυτοποίηση του προϊόντος κατέστη αδύνατη (Σχήμα 81). Συνεπώς, ξαναχρησιμοποιήσαμε ως βάση το NaHCO_3 .



Σχήμα 81 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της αντίδρασης απορροστασίας της ένωσης **12** με τη χρήση Et_3N σε DMSO

Επιπλέον, τόσο η ανισόλη όσο και το τρισοπροπυλο-σιλάνιο χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδραστήρια παγίδευσης του tert-butyl κατιόντος προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πιθανών παραπροϊόντων, κυρίως μέσω αντιδράσεων ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Αρχικά επιλέχθηκε η ανισόλη ως το πλέον κλασσικό αντιδραστήριο παγίδευσης. Δεδομένου ότι έχει αρκετά υψηλό σημείο ζέσης ($153.8\text{ }^\circ\text{C}$), ήταν δύσκολη απομάκρυνση της ακόμη και στην αντλία υψηλού κενού. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να φαίνεται στο φάσμα NMR και να προκαλείται συσσώρευση πρωτονίων, ιδίως στη αρωματική περιοχή. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκε το τρισοπροπυλο-σιλάνιο με χαμηλότερο σημείο ζέσης από αυτό της ανισόλης, κάνοντας την απομάκρυνση του ευκολότερη. Να σημειωθεί, επίσης, ότι στο πείραμα υπ' αριθμόν 5 δε σχηματίστηκε καθόλου προϊόν, καθώς στο φάσμα ^1H NMR υπήρχαν και οι δυο αμιδικοί δεσμοί και η Βοσομάδα. Έτσι ξαναπραγματοποιώντας την αντίδραση με 10% TFA για 3 μέρες, καταγράφηκε μόνο ο ένας αμιδικός. Δοκιμάστηκαν εναλλακτικά και άλλα οξέα, πειράματα 8 και 9 (Πίνακας 6), όμως το φάσμα NMR ήταν ίδιο με αυτό του Σχήματος 80. Έχοντας υπ' όψιν όλα τα παραπάνω αποτελέσματα υποθέσαμε πως κατά την αντίδραση

αποπροστασίας του μορίου μας γίνονται οι ακόλουθες παράλευρες ενδομοριακές αντιδράσεις:



Σχήμα 82 : Πιθανές παράλευρες αντιδράσεις κατά την αποπροστασία των *N*-Boc προστατευμένων αμινοξέων

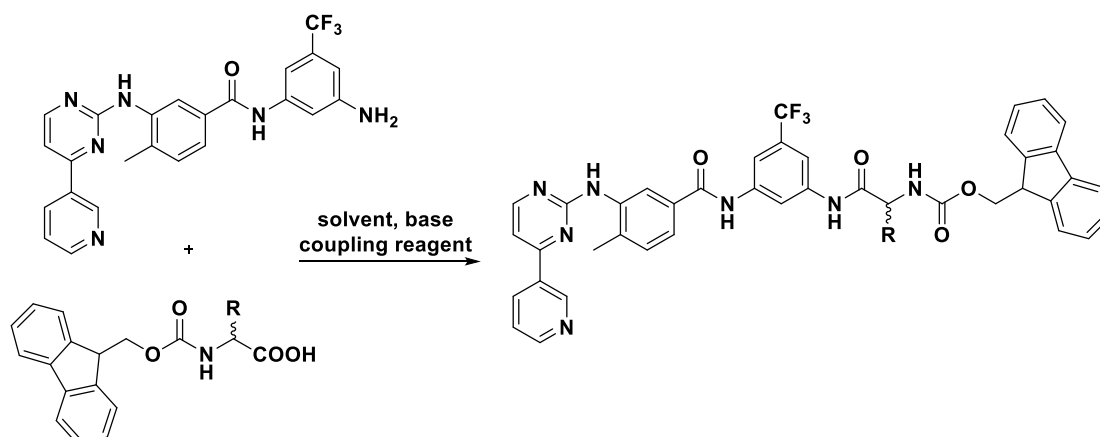
Εάν όντως γίνεται η παραπάνω αντίδραση τότε πράγματι στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ δικαιολογείται η απουσία ενός αμιδικού πρωτονίου (κόκκινο χρώμα), δικαιολογείται η απουσία της Boc ομάδας, και η καταγραφή όλων των υπολοίπων πρωτονίων των δακτυλίων, όπως στο *Σχήμα 80*. Για να επαληθεύσουμε την υπόθεση μας βασιστήκαμε αρχικά σε φαρματοσκοπικά δεδομένα. Πήραμε φάσμα $^1\text{H NMR}$ σε $\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$, προκειμένου να δούμε αν θα εξαφανιστεί η κορυφή του αμιδικού πρωτονίου λόγω ανταλλαγής του με το δευτέριο του D_2O και φάσμα ^{13}C για να πιστοποιήσουμε την ύπαρξη των 2 καρβονυλικών ανθράκων (κόκκινο χρώμα, *Σχήμα 82*). Από τα φάσματα δεν μπορέσαμε να καταλήξουμε σε κάποιο συμπέρασμα, καθώς το δείγμα ήταν αραιό και παράλληλα οι κορυφές των διαλυτών σε αυτό δυσκόλεψαν αρκετά το χαρακτηρισμό των εμφανιζόμενων κορυφών. Όλες οι παραπάνω προσπάθειες έγιναν στην ένωση **12**, καθώς ήταν διαθέσιμη σε μεγαλύτερη ποσότητα.

Δεδομένου ότι από τα φασματοσκοπικά δεδομένα δεν υπήρξε κάποιο σαφές συμπέρασμα διενεργήσαμε την αντίδραση αποπροστασίας στην ένωση **15**, καθώς η ύπαρξη της προλίνης θα εμπόδιζε να λάβει χώρα η αντίδραση του *Σχήματος 82* λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Πραγματοποιώντας την αντίδραση είδαμε ότι

εμφανίζεται μόνο ο ένας αμιδικός δεσμός, ενώ απουσίαζαν τα πρωτόνια της προστατευτικής ομάδας. Συνεπώς τα αποτελέσματα ήταν επαναλήψιμα με τα αντίστοιχα του παραγώγου της γλυκίνης. Κατ' επέκταση, η υπόθεση μας για την πραγματοποίηση της ενδομοριακής κυκλοποίησης ήταν λανθασμένα. Αντιδράσεις αποπροστασίας των ενώσεων **13** και **14** δεν έγιναν, καθώς η παρουσία μιας μεθυλομάδας από το αμινοξύ της αλανίνης δε θα άλλαζε το αποτέλεσμα.

3.5.5.7 Σχηματισμός του 2^{ου} αμιδικού δεσμού με τη χρήση F-moc προστατευμένων αμινοξέων.

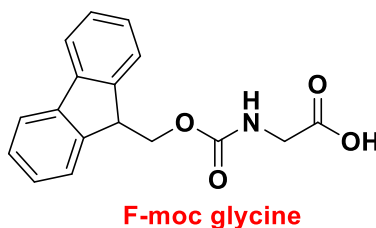
Δεδομένου ότι δεν καταφέραμε να απομονώσουμε τα επιθυμητά τελικά προϊόντα σε καθαρή μορφή κατά την αποπροστασία της Boc προστατευτικής ομάδας, σε συνδυασμό με το γεγονός της εμφάνισης μόνο του ενός αμιδικού πρωτονίου, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις μας είναι ασταθείς σε όξινο περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η αποπροστασία και στο τελικό στάδιο διασπώνται. Για το λόγο αυτό, προβήκαμε στη σύνθεση-εισαγωγή του δεύτερου αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και προστατευμένων, αυτή τη φορά, F-moc αμινοξέων. Η αντίδραση αποπροστασίας στην περίπτωση αυτή για την απομάκρυνση της F-moc ομάδας, γίνεται σε βασικές συνθήκες με τη χρήση πιπεριδίνης, αποφεύγοντας έτσι τη διάσπαση των μορίων μας. Αρχικά, ξεκινήσαμε με τη σύνθεση του δεύτερου αμιδικού δεσμού σύμφωνα με την αντίδραση του Σχήματος 83. Ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης είναι ανάλογος αυτού που περιγράφηκε στο Σχήμα 60, ενεργοποιώντας τώρα το αμινοξύ.



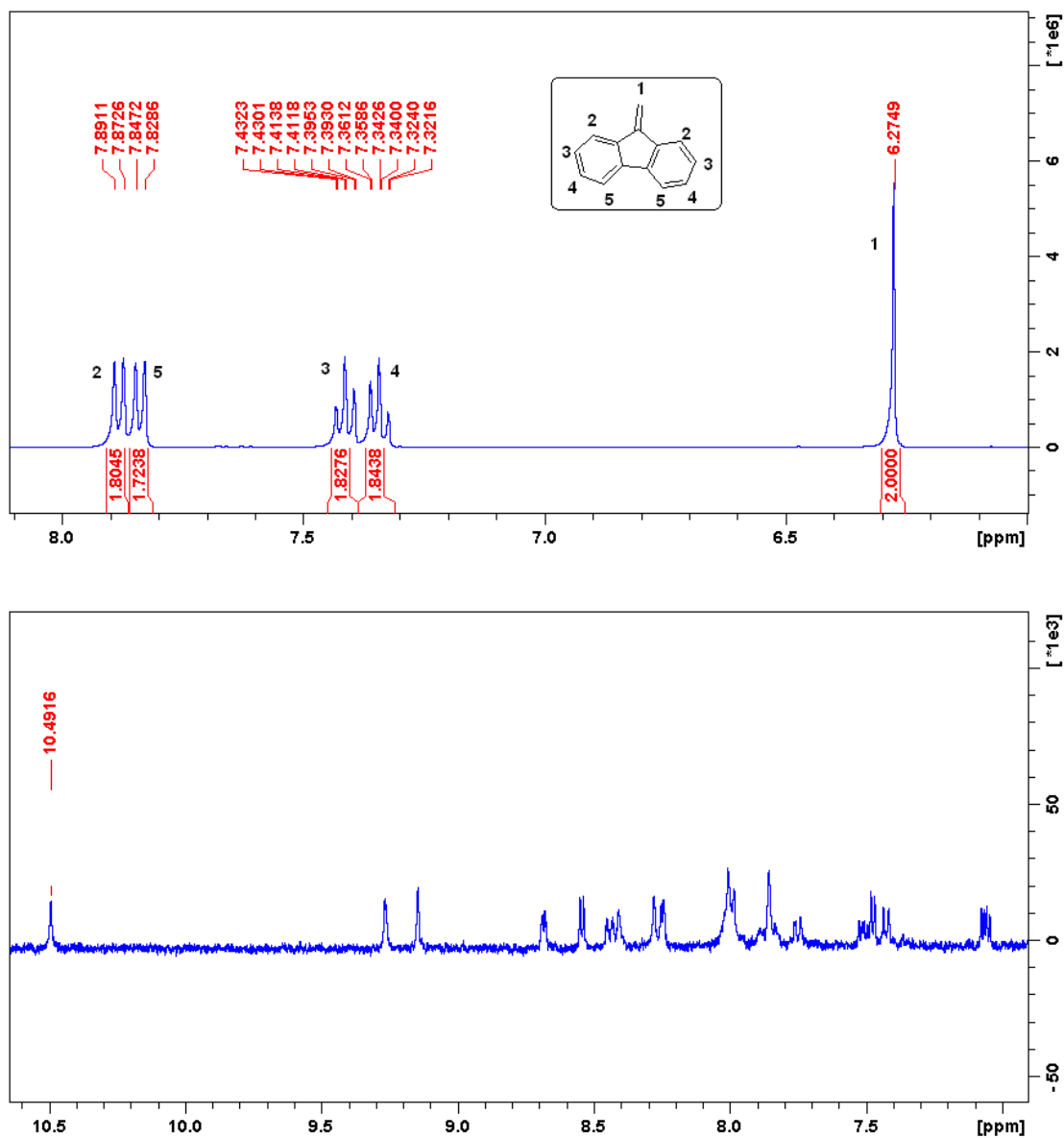
Σχήμα 83 : Γενική αντίδραση σχηματισμού 2^ο αμιδικού δεσμού με F-moc προστατευμένα αμινοξέα, όπου R η πλευρική ομάδα των αμινοξέων.

❖ Αντίδραση σύζευξης προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και της F-moc γλυκίνης.

Ξεκινήσαμε με τη σύνθεση των νέων παραγώγων με το σχηματισμό του δεύτερου αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και της F-moc γλυκίνης.

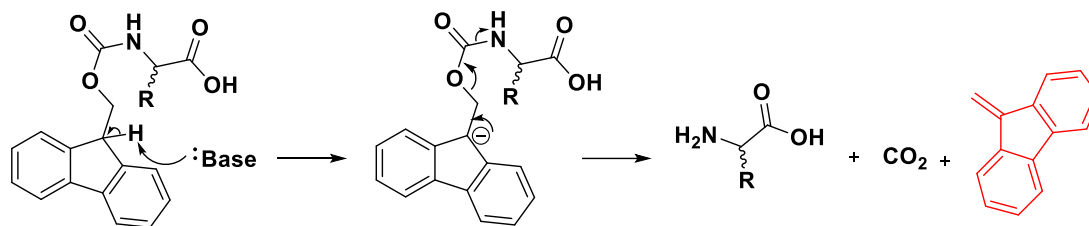


Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε απόλυτο DMF, ως αντιδραστήριο σύζευξης το HATU και ως βάσεις οι Et₃N και DIPEA, καθώς στις προηγούμενες αντιδράσεις σύζευξης, όπως προαναφέρθηκε, βρέθηκε να είναι οι βέλτιστες συνθήκες για το σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Παρόλα αυτά, μετά τη σχετική επεξεργασία της αντίδρασης και τη λήψη του φάσματος ¹H NMR δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος. Αντί αυτού, η αρχική ένωση **11** δεν αντέδρασε, ενώ μια κηλίδα, που κατά τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είχε R_f = 0.9, απομονώθηκε. Ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε να είναι ένα παράγωγο φλουρενίου της προστατευτικής ομάδας (Σχήμα 84). Τα H₂ και τα H₅ εμφανίζονται ως δυο διπλές κορυφές στα 7.88 ppm και 7.83 ppm, λόγω των γειτονικών πρωτονίων 3 και 4 αντίστοιχα. Τα H₃ και τα H₄ σχάζονται σε δυο τριπλές κορυφές στα 7.41 και 7.34 ppm, καθώς το καθένα έχει από δύο γειτονικά πρωτόνια. Τέλος, τα δυο πρωτόνια της μεθυλενομάδας εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή στα 6.27 ppm.



Σχήμα 84: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του παραγώγου φλουρενίου που απομονώθηκε (πάνω) και της αρχικής ένωσης **II** (κάτω) σε DMSO

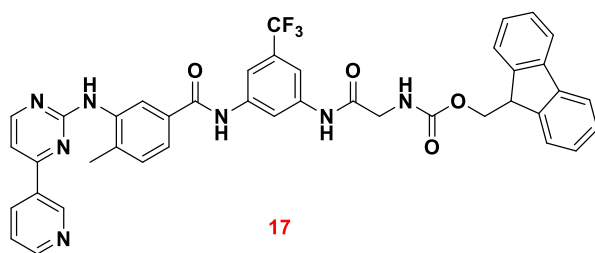
Το παράγωγο αυτό, είναι προϊόν που προκύπτει από την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας, σε βασικές συνθήκες, από το F-moc προστατευμένο αμινοξύ, σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό. Η βάση αποσπά το όξινο πρωτόνιο με αποτέλεσμα ο άνθρακας να φορτίζεται αρνητικά. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 85, στη συνέχεια εκλύεται CO_2 και παράλληλα σχηματίζεται το παράγωγο φλουρενίου και το ελεύθερο αμινοξύ.



Σχήμα 85 : Αντίδραση σχηματισμού του παραγώγου φλουρενίου

Σχηματισμός του συγκεκριμένου παραγώγου σημαίνει ότι στην αντίδραση υπάρχει βασικό περιβάλλον, γεγονός που όντως συμβαίνει καθώς απαιτείται για την ενεργοποίηση του αμινοξέος. Δεδομένου ότι αυτό σχηματίστηκε εξ' αρχής υποθέσαμε πως το περιβάλλον της αντίδρασης είναι αρκετά βασικό και πως πέρα από την ύπαρξη της Et₃N και DIPEA, το DMF διασπάται σε διμεθυλαμίνη ((CH₃)₂NH) και μονοξείδιο του άνθρακα (CO), με αποτέλεσμα την απόσπαση του όξινου πρωτονίου. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε την αντίδραση σε διαλύτη THF, με την προσθήκη Et₃N και DIPEA. Στην περίπτωση αυτή, το παράδοξο ήταν πως, ενώ στα πρώτα λεπτά της αντίδρασης κατά τον έλεγχο με TLC δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός της ένωσης αυτής αλλά μια κηλίδα κάτω από την αρχική ένωση, μετά από μια ώρα σχηματίστηκε το παράγωγο φλουρενίου και η σχηματιζόμενη κηλίδα άρχισε να εξαφανίζεται. Όσο προχωρούσε η αντίδραση, σχηματιζόταν όλο και περισσότερο παράγωγο φλουρενίου. Συνεπώς, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως και η Et₃N αποσπά το όξινο πρωτόνιο (Σχήμα 85) με αποτέλεσμα να μη σχηματίζεται το επιθυμητό προϊόν. Τέλος, η αντίδραση σύζευξης διενεργήθηκε μόνο με την προσθήκη DIPEA ως βάση.

Η N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) διαθέτει ασθενέστερο πυρηνόφιλο χαρακτήρα σε σχέση με την τριαιθυλαμίνη και παράλληλα είναι ασθενέστερη βάση από αυτή, γεγονός που πιθανόν να οδηγούσε στο σχηματισμό του επιθυμητού αμιδικού δεσμού αλλά όχι στη μη επιθυμητή, παράπλευρη αντίδραση απόσπασης – απομάκρυνσης της F-moc προστατευτικής ομάδας. Διενεργώντας την αντίδραση σε διαλύτη THF, με HATU και DIPEA λάβαμε το επιθυμητό προστατευμένο προϊόν, ήτοι την ένωση **17**, με την υπόθεση μας να επιβεβαιώνεται (Σχήμα 86).



Σχήμα 86:** Δομή του προϊόντος σύζευξης της ένωσης **11** με την F-moc γλυκίνη, ένωση **17

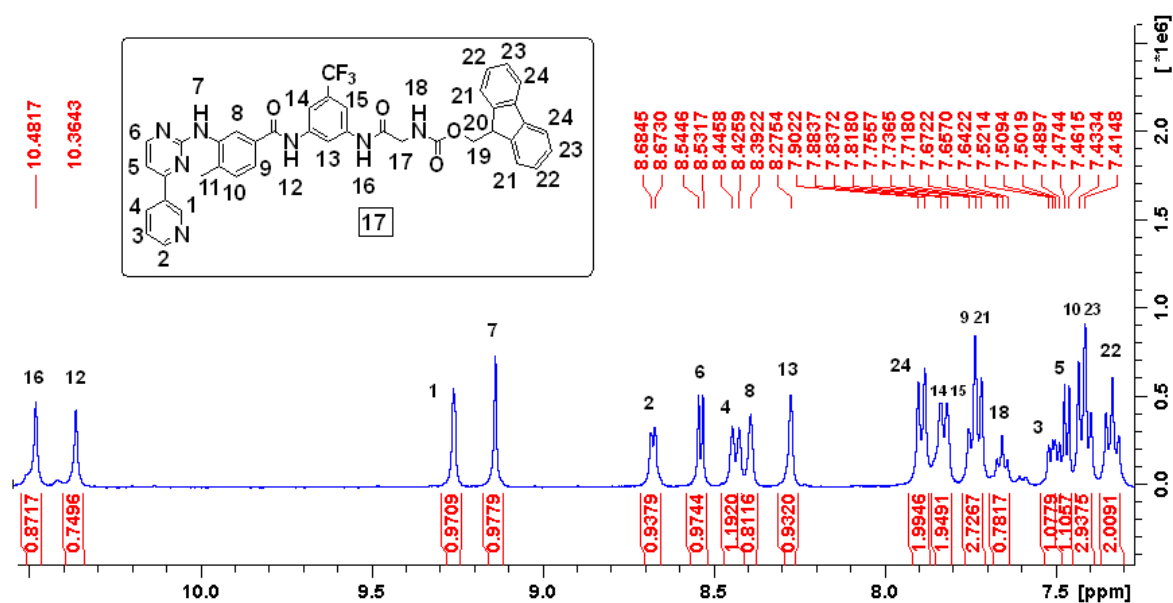
Όμως και με αυτές τις πειραματικές συνθήκες, μετά από αρκετές ώρες, σχηματίστηκε σε μικρότερο ποσοστό βέβαια, το παράγωγο φλουρενίου. Για να αποφύγουμε τελείως το σχηματισμό του, έγινε προσπάθεια σύνθεσης του αμιδικού δεσμού με χλωρίδιο οξέος (Πίνακας 8, πείραμα 5). Η αντίδραση απέτυχε, καθώς το χλωρίδιο υδρολύθηκε. Συνεπώς, ελεγχόμενα με τη χρήση μιας ασθενούς βάσης, επιτεύχθηκε η αντίδραση, καθώς με την πάροδο του χρόνου αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός του ανεπιθύμητου προϊόντος, ακόμη και σε ήπιες συνθήκες, ως ένα βαθμό είναι αναπόφευκτος. Παρακάτω, στον Πίνακα 8, συνοψίζονται οι πειραματικές πορείες που διενεργήθηκαν για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών.

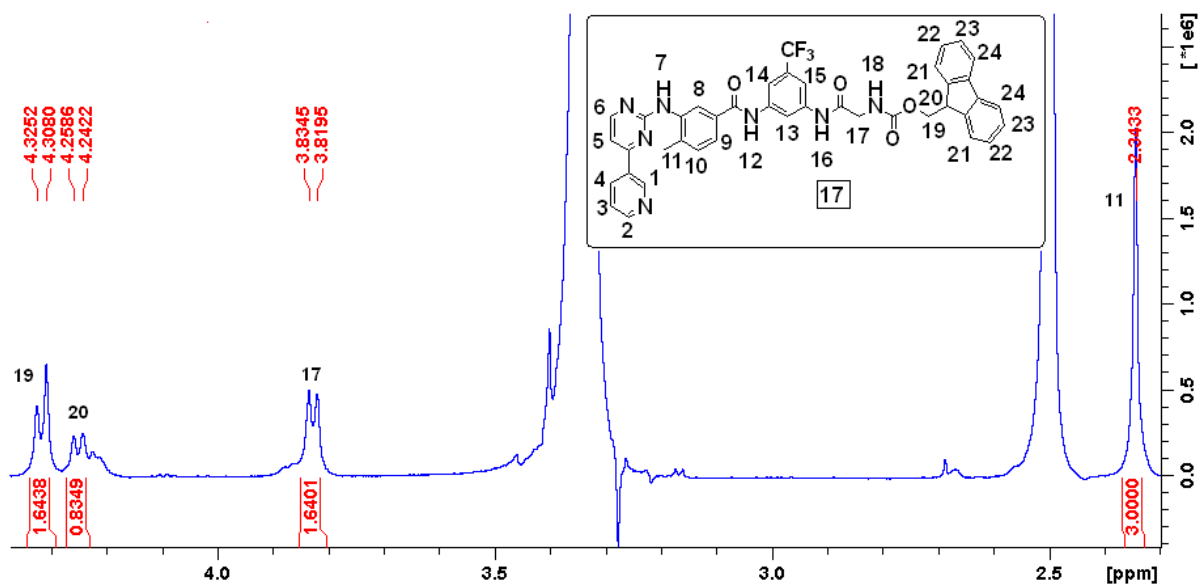
***Πίνακας 8:** Πειραματικές συνθήκες για αντίδραση σύζευξης με F-moc γλυκίνη*

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο σύζευξης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	DMF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	rt	48 h	0%
2	THF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	rt	24 h	0%
3	THF	DIPEA	HATU	rt	18 h	50%
4	THF	DIPEA	HATU	rt	20 h	80%
5	THF		SOCl ₂	80 °C	21 h	0%
6	Dioxane	DIPEA	HATU	rt	4 h	90%

Με τη χρήση διοξανίου ως διαλύτη, σχηματίστηκαν αρκετά παραπροϊόντα τα οποία δυσκόλεψαν τον καθαρισμό και γι αυτό, ως βέλτιστες συνθήκες επιλέχθηκαν αυτές του πειράματος 4.

Το φάσμα ^1H NMR επιβεβαίωσε το σχηματισμό του δεύτερου αμιδικού δεσμού, δηλαδή της επιθυμητής ένωσης **17**. Η πλέον χαρακτηριστική κορυφή είναι αυτή στα 10.48 ppm, που αντιστοιχεί στο αμιδικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 16, δηλαδή του δεύτερου αμιδικού δεσμού. Τα πρωτόνια 1-15 εμφανίζουν περίπου τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις και τις ίδιες πολλαπλότητες με τα ήδη περιγραφέντα φάσματα. Στο συγκεκριμένο φάσμα, υπάρχει αλληλεπικάλυψη κορυφών των πρωτονίων 9 και 10, με τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της F-moc ομάδας, καθώς υφίσταται συσσώρευση πρωτονίων στη συγκεκριμένη αρωματική περιοχή (~7.4-7.6 ppm) και η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου (400 MHz) δεν επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, τα πρωτόνια 21,24 και 22,23 εμφανίζονται ως διπλές και τριπλές κορυφές, αντίστοιχα, όπως ακριβώς και στο φάσμα του παραγώγου φλουρενίου στο Σχήμα 84. Το H_{18} εμφανίζεται ως τριπλή κορυφή στα 7.66 ppm, σχετικά αποπροστατευμένο, καθώς το γειτονικό οξυγόνο έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τα H_{17} και H_{19} εμφανίζονται ως διπλές κορυφές, με τα H_{19} να αποπροστατεύονται περισσότερο, καθώς σε γειτονική θέση υπάρχει οξυγόνο (Σχήμα 87).

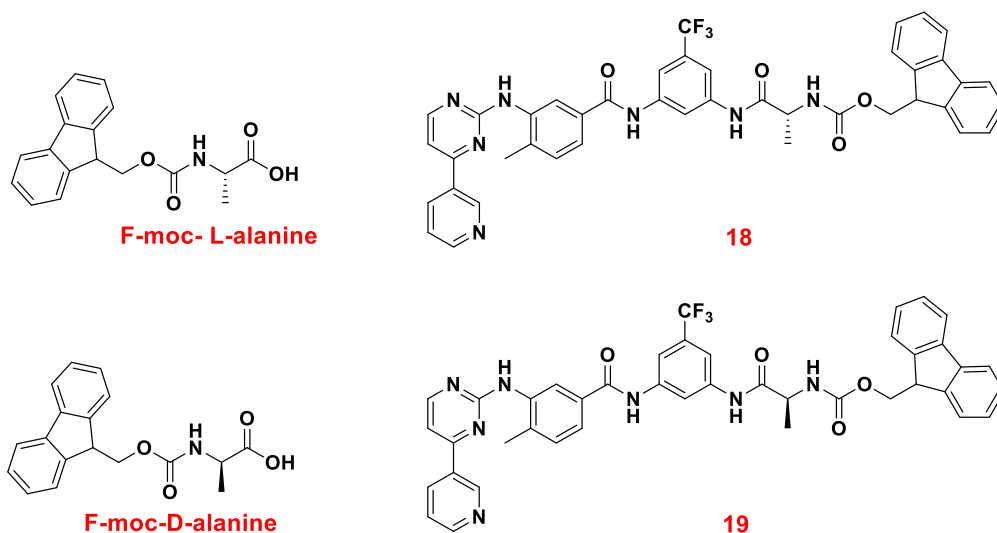




Σχήμα 87: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με την F-moc γλυκίνη (ένωση **17**) σε DMSO

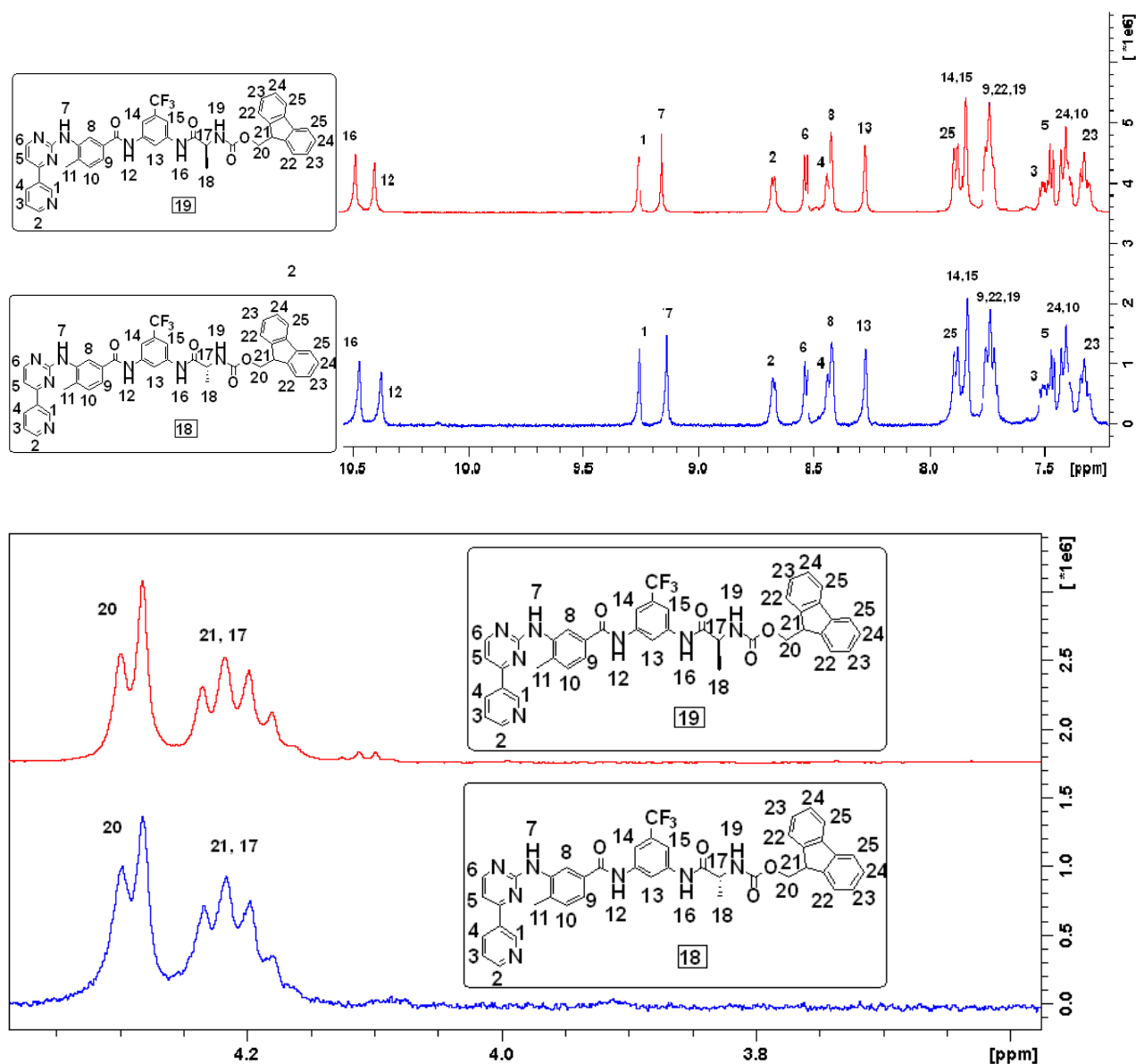
- ❖ Αντίδραση σύζευξης προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και των F-moc-L-αλανίνης και F-moc-D-αλανίνης.

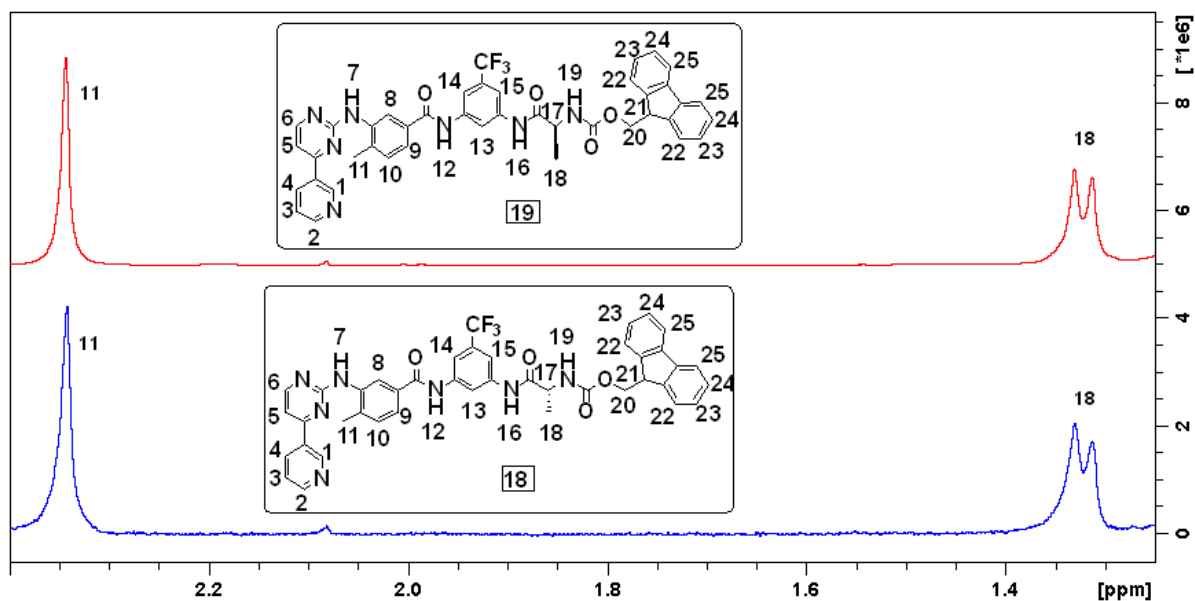
Χρησιμοποιώντας ως διαλύτη THF, ως αντιδραστήριο σύζευξης HATU και ως βάση DIPEA, συνθέσαμε τις ενώσεις **18** και **19** με την προσάρτηση της F-moc-L-αλανίνης και της F-moc-D-αλανίνης στην ένωση **11** (Σχήμα 88).



Σχήμα 88: Δομές των προστατευμένων αμινοξέων F-moc-L-, F-moc-D-αλανίνης και των προϊόντων σύζευξης της ένωσης **11** με τα παραπάνω αμινοξέα, ένωση **18** και ένωση **19** αντίστοιχα.

Η επιτυχής τους σύνθεση ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR. Τα φάσματα των ενώσεων **18** και **19**, όπως είναι φυσικό, είναι πανομοιότυπα όπως φαίνεται παρακάτω, καθώς δε διαφέρουν, παρά μόνο στη στεreoχημεία του στερεογονικού κέντρου. Και στις δυο ενώσεις η πιο χαρακτηριστική κορυφή είναι αυτή του δεύτερου αμιδικού πρωτονίου στα 10.47 και 10.49 ppm για την ένωση **18** και **19** αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα πρωτόνια εμφανίζουν ίδιες σχάσεις και χημικές μετατοπίσεις. Παρατηρούμε όμως, ότι οι σχάσεις των πρωτονίων στην αρωματική περιοχή δε διακρίνονται ικανοποιητικά, λόγω της συσσώρευσης μεγάλου αριθμού πρωτονίων στη συγκεκριμένη περιοχή και στην όχι και τόσο καλή διακριτική ικανότητα του οργάνου (Σχήμα 89). Επίσης, τα πρωτόνια της μεθυλομάδας της αλανίνης H_{18} , είναι πιο προστατευμένα από τα πρωτόνια της μεθυλομάδας H_{11} .

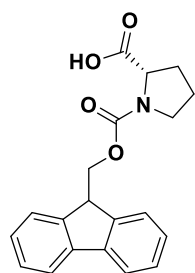




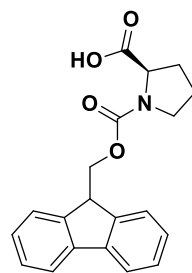
Σχήμα 89: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *F-moc-L*-αλανίνη (ένωση **18**), κάτω, και του προϊόντος σύζευξης **11** με *F-moc-D*-αλανίνη (ένωση **19**), επάνω, σε DMSO

❖ Αντίδραση σύζευξης προς σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **11** και των *F-moc-L*-προλίνης και *F-moc-D*-προλίνης.

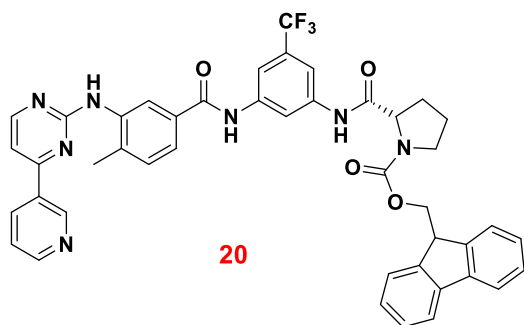
Κατ' ανάλογο τρόπο συντέθηκαν και οι ενώσεις **20** και **21** με την προσάρτηση της *F-moc-L*-προλίνης και *F-moc-D*-προλίνης στην ένωση **11**, αντίστοιχα, με απόδοση περίπου 80%.



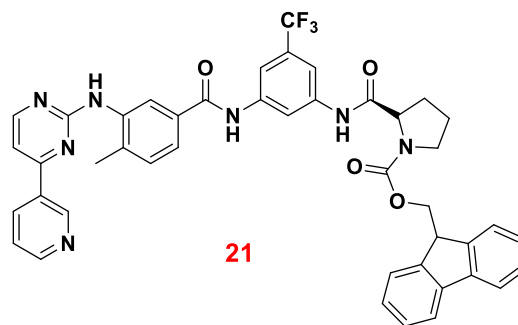
F-moc-L-proline



F-moc-D-proline



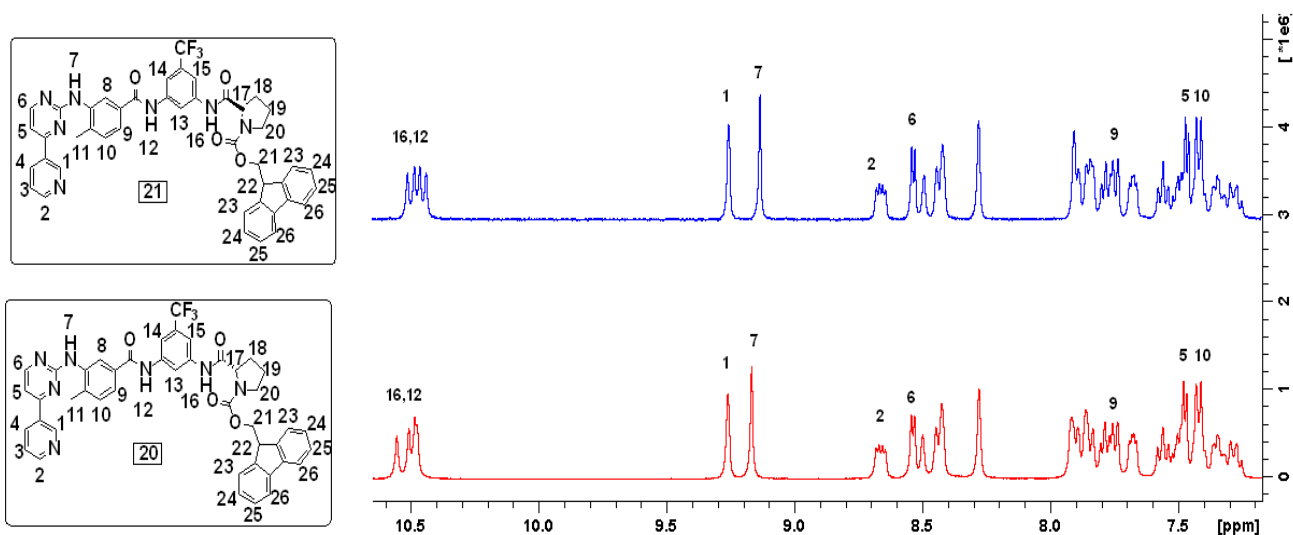
20



21

Σχήμα 90: Δομές των προστατευμένων αμινοξέων *F-moc-L-*, *F-moc-D-* προλίνης και των προϊόντων σύζευξης της ένωσης **11** με τα παραπάνω αμινοξέα, ένωση **20** και ένωση **21** αντίστοιχα.

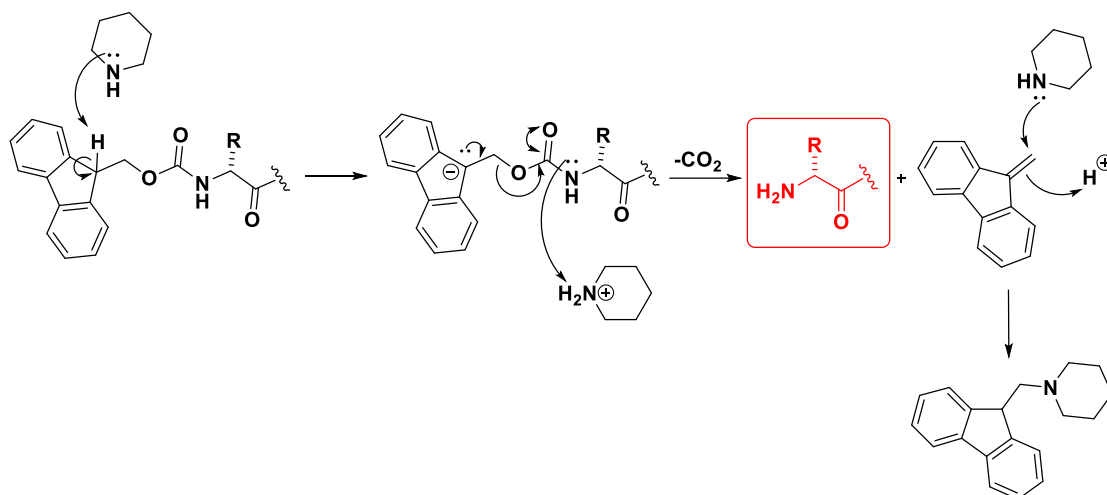
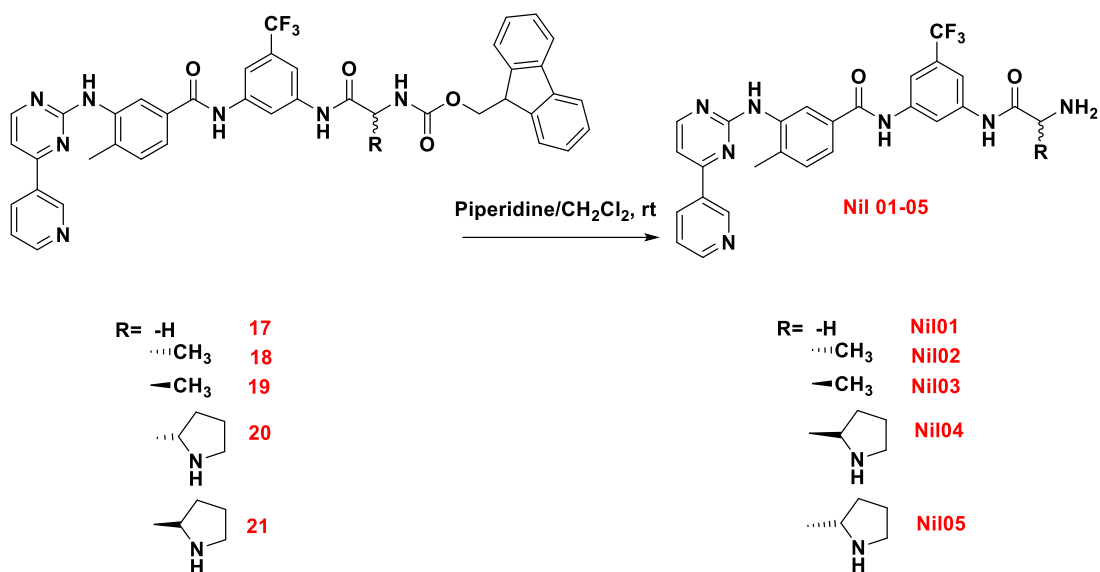
Τα φάσματα ^1H NMR επιβεβαιώνουν το σχηματισμό των εν λόγω ενώσεων. Τόσο στο φάσμα της ένωσης **20** όσο και σε αυτό της ένωσης **21** παρατηρούμε ότι τα αμιδικά πρωτόνια, που εμφανίζονται στα 10.50 ppm περίπου, σχάζονται δίνοντας μια τύπου τετραπλή κορυφή. Αυτό δικαιολογείται καθώς και στα *F-moc* προστατευμένα παράγωγα, όπως και στα *Boc*, συνυπάρχουν τα ισομερή *trans* και *cis* της προλίνης, με αποτέλεσμα τα πρωτόνια να "βλέπουν" διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα. Επίσης, εκτός από τα δυο αμιδικά πρωτόνια, η συνύπαρξη των πρωτονίων της *F-moc* προλίνης επιβεβαιώνει το σχηματισμό των παραπάνω ενώσεων. Παρατηρούμε ότι στην αρωματική περιοχή λόγω συσσώρευσης των πρωτονίων των δακτυλίων της ένωσης και της προστατευτικής ομάδας, οι σχάσεις αυτών δεν φαίνονται καθαρά, με τις αλληλεπικαλύψεις είναι αναπόφευκτες (Σχήμα 91).



Σχήμα 91: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **11** με *F-moc-L*-προλίνη (ένωση **20**), κάτω, και του προϊόντος σύζευξης **11** με *F-moc-D*-προλίνη (ένωση **21**), επάνω, σε DMSO

3.5.5.8 Αποπροστασία της προστατευτικής *F-moc* ομάδας των προϊόντων σύζευξης, ενώσεις 17,18,19,20,21 για το σχηματισμό των τελικών προϊόντων Nil-01-Nil-05.

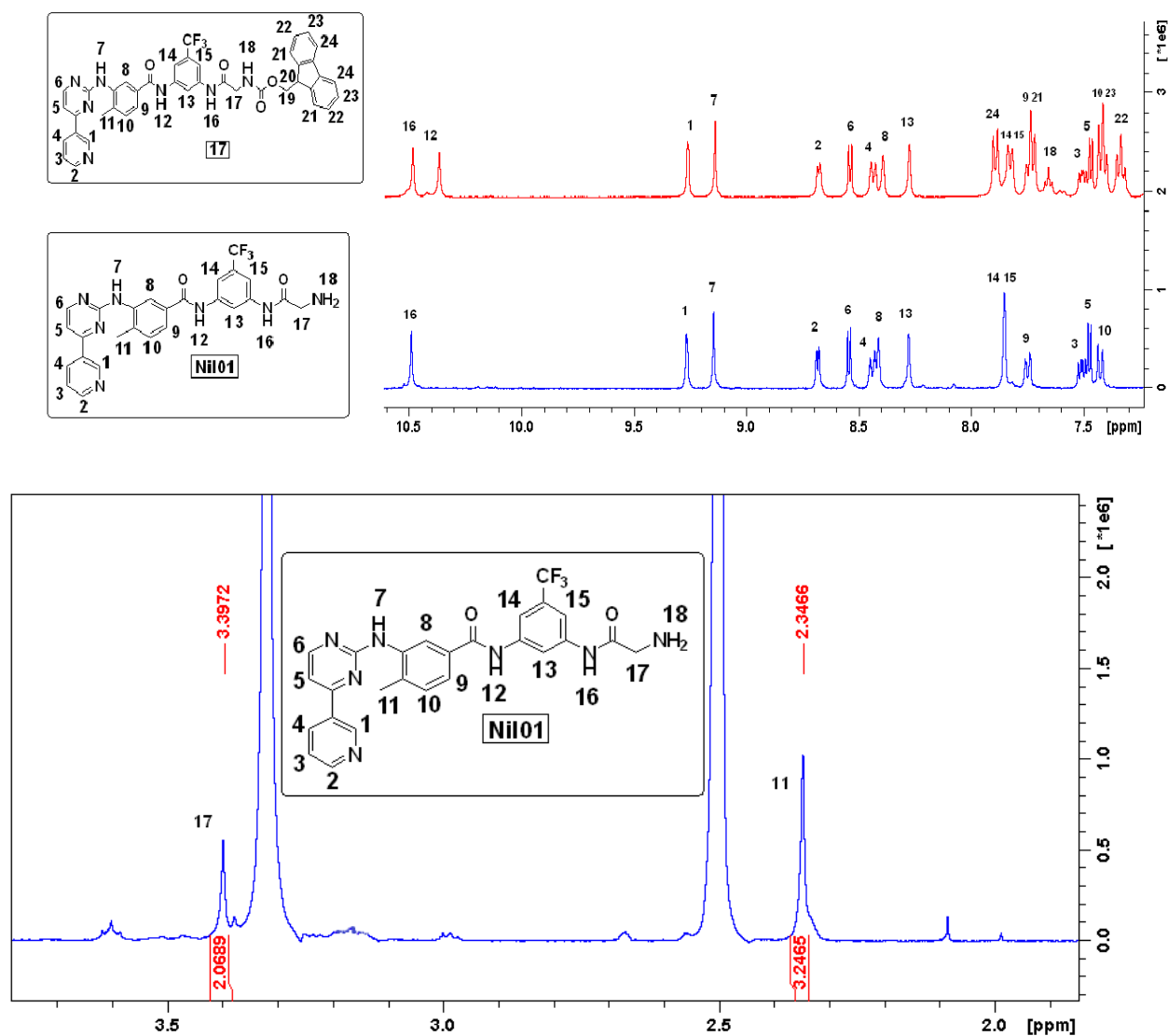
Όπως και στην περίπτωση των Boc προστατευμένων αναλόγων, έτσι και στα *F-moc* προστατευμένα ανάλογα, τελικό βήμα για την παραλαβή των τελικών προϊόντων **Nil-01-Nil-05**, ήταν η αποπροστασία τους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η *F-moc* ομάδα απομακρύνεται σε βασικές συνθήκες, με τη χρήση μιας ήπιας βάσης, της πιπεριδίνης, με απόδοση 100%. Η αντίδραση και ο μηχανισμός της φαίνονται στο Σχήμα 92. Ουσιαστικά, η πιπεριδίνη, ως βάση, αποσπά το όξινο πρωτόνιο του πενταμελούς δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας, με αποτέλεσμα την έκλυση διοξειδίου του άνθρακα, το σχηματισμό της επιθυμητής ένωσης με ελεύθερη αμινομάδα και του φλουρενίου, το οποίο εν συνεχεία αντιδρά με την περίσσεια της πιπεριδίνης, δίνοντας το παραπροϊόν του Σχήματος 92.



Σχήμα 92 : Αντίδραση και μηχανισμός αποπροστασίας *F*-moc προστατευμένων ενώσεων.

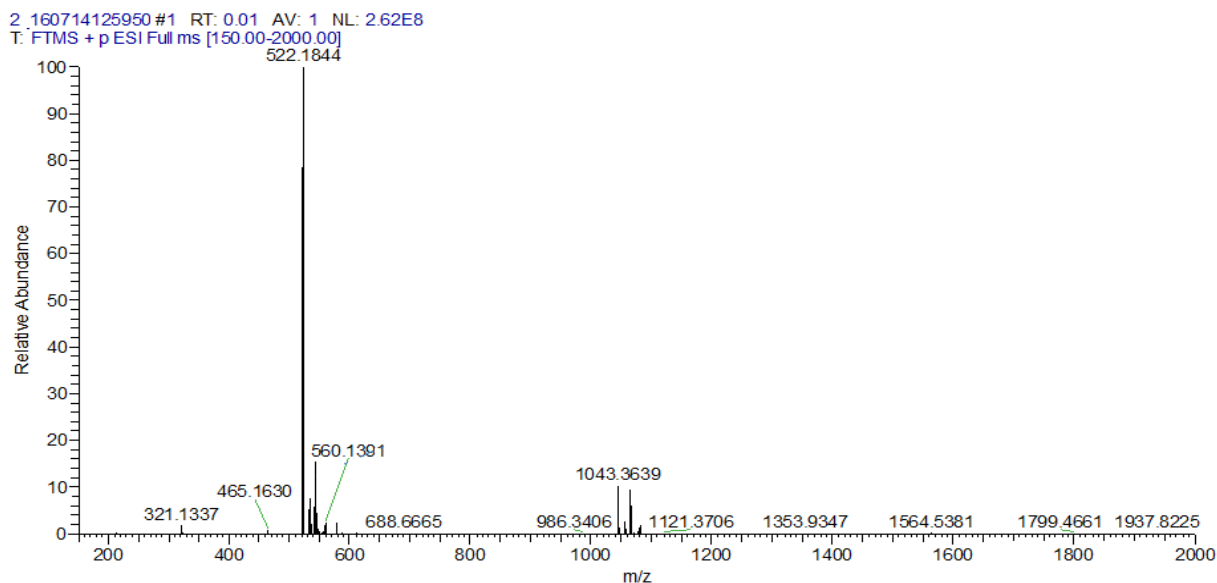
Η αντίδραση αποπροστασίας σε βασικές συνθήκες μας βοήθησε κατά το χρωματογραφικό έλεγχο της με TLC, καθώς το παράγωγο φλουρενίου απορροφά στο υπεριώδες, παρέχοντας έτσι ένα ποιοτικό έλεγχο για την πορεία της αντίδρασης, σε αντίθεση με την Boc ομάδα που δεν απορροφά. Όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενο εδάφιο, δεδομένου ότι κατά την αποπροστασία σε όξινες συνθήκες στο ¹H NMR φαινόταν μόνο ένα αμιδικό πρωτόνιο, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις μας είναι ασταθείς και διασπώνται στις συνθήκες αυτές. Κατ' επέκταση, υποθέσαμε ότι σε βασικό περιβάλλον θα είναι σταθερές και θα λάβουμε τα επιθυμητά προϊόντα, βλέποντας στο ¹H NMR και τα δυο αμιδικά πρωτόνια.

Έτσι διενεργήσαμε αυτή τη σειρά αντιδράσεων με την αποπροστασία της ένωσης **17**. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε διαλύοντας την αρχική μας ένωση είτε σε άνυδρο DMF είτε σε CH₂Cl₂, με την ακόλουθη προσθήκη πιπεριδίνης σε διάφορες αναλογίες. Έκπληξη προκάλεσε το γεγονός ότι και σε αυτή την περίπτωση, όπως και στην αποπροστασία των Boc προστατευμένων παραγώγων, καταγράφηκε πάλι ένας αμιδικός δεσμός, ενώ παράλληλα από το φάσμα απουσίαζαν τα πρωτόνια της F-moc προστατευτικής ομάδας (Σχήμα 93). Να σημειωθεί, ότι στα 3.39 ppm εμφανίζονται τα πρωτόνια H₁₇, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη της γλυκίνης στην ένωση, ενώ στο φάσμα απουσιάζουν και τα 2 πρωτόνια της τελικής ελεύθερης αμινικής ομάδας.



Σχήμα 93: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) της προστατευμένης ένωσης **17** (κόκκινο χρώμα) και της αντίστοιχης αποπροστατευμένης **Nil-01** (μπλε χρώμα) σε DMSO

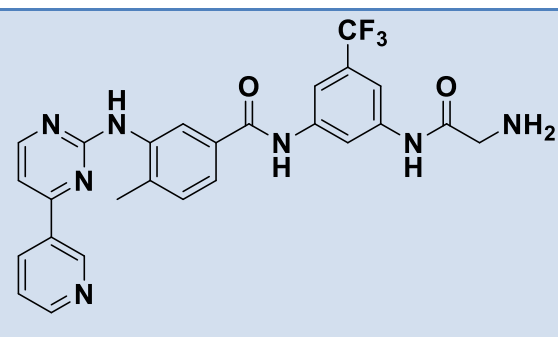
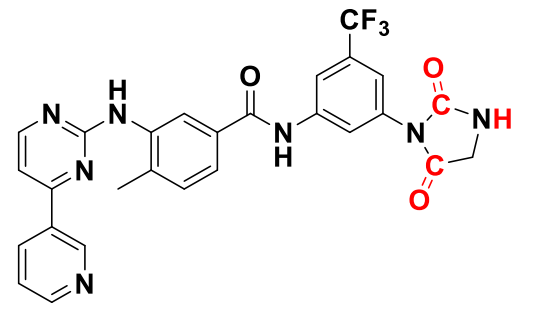
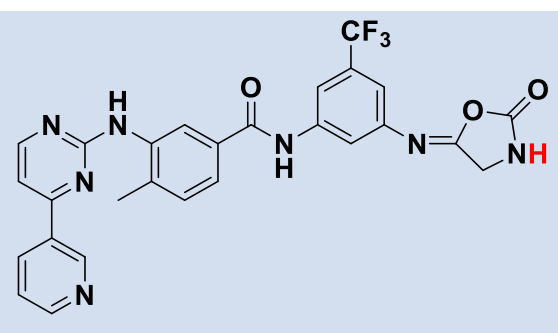
Δεδομένης της απουσίας του χαρακτηριστικού αμιδικού πρωτονίου και των δυο πρωτονίων της ελεύθερης αμινομάδας, υποθέσαμε ξανά ότι ίσως σε βασικές συνθήκες πραγματοποιείται ενδομοριακή αντίδραση κυκλοποίησης, όπως αυτή του Σχήματος 82. Έτσι προβήκαμε στη λήψη φασμάτων υψηλής ευκρίνειας HRMS για την ταυτοποίηση της ένωσης. Προς μεγάλη μας έκπληξη το m/z βρέθηκε να είναι 522.1844, τιμή που αντιστοιχεί στο m/z του μοριακού ιόντος $[C_{26}H_{22}F_3N_7O_2+H]^+$ (Σχήμα 94).



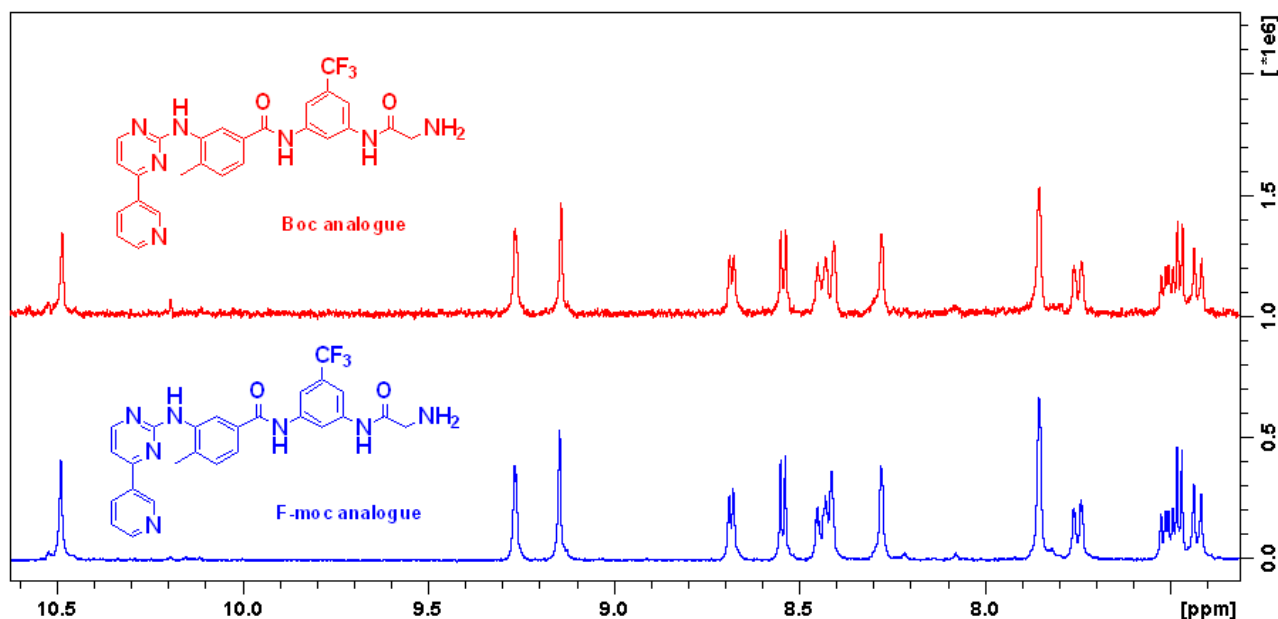
Σχήμα 94: Φάσμα HRMS (ESI) του προϊόντος αποπροστασίας της ένωσης **17**.

Το παραπάνω φασματοσκοπικό δεδομένο σε συνδυασμό με τον ακόλουθο πίνακα, όπου καταγράφονται τα πιθανά προϊόντα αποπροστασίας με το πηλίκιο m/z , αποδεικνύει πως τελικά το μοναδικό προϊόν που σχηματίζεται κατά την αποπροστασία της ένωσης **17** είναι το επιθυμητό παράγωγο **Nil-01** με m/z 521.1787. Συνεπώς, καμία παράπλευρη ενδομοριακή αντίδραση δε λαμβάνει χώρα.

Πίνακας 9 : Πιθανά προϊόντα της αντίδρασης αποπροστασίας

Συντακτικός τύπος	Μοριακός τύπος	m/z
	$C_{26}H_{22}F_3N_7O_2$	521.1787
	$C_{27}H_{20}F_3N_7O_3$	547.1579
	$C_{27}H_{20}F_3N_7O_3$	547.1579

Παράλληλα, κάνοντας υπέρθεση των φασμάτων των προϊόντων αποπροστασίας από τα Boc και F-moc προστατευμένα ανάλογα, παρατηρούμε ότι τα φάσματα είναι πανομοιότυπα (Σχήμα 95). Συνεπώς, βάσει και των παραπάνω φασμασκοπικών δεδομένων, HRMS, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι πρόδρομες προστατευμένες ενώσεις δεν είναι ασταθείς ούτε σε όξινο, ούτε σε βασικό περιβάλλον.

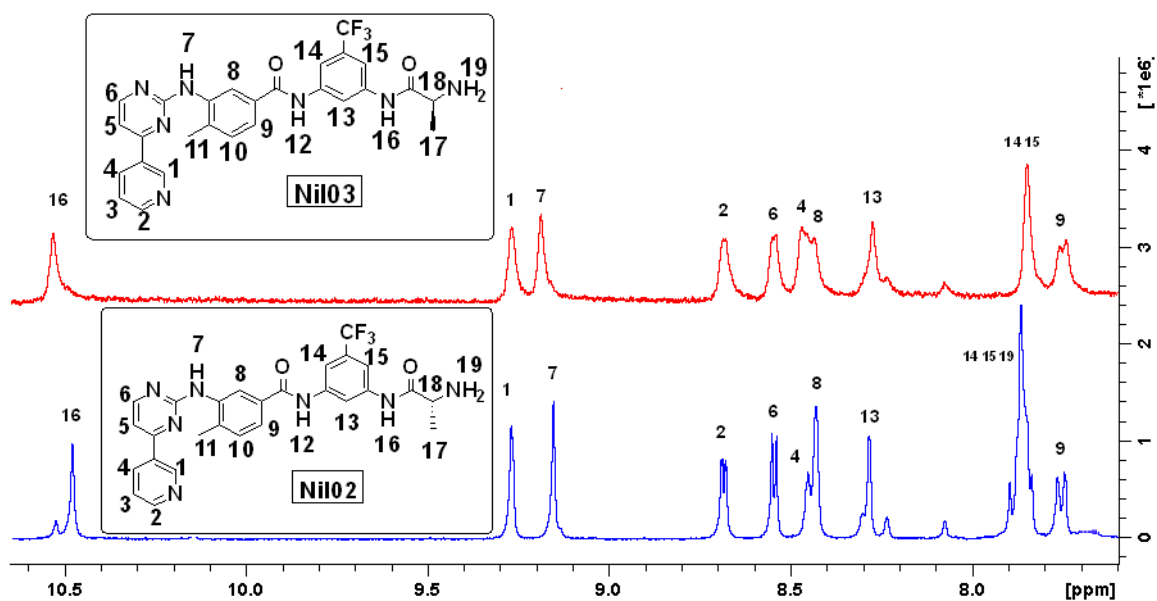


Σχήμα 95: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του προϊόντος αποπροστασίας των ενώσεων **12** και **17**, με Boc και F-moc προστασία αντίστοιχα σε DMSO

Συνεπώς, το αμιδικό και τα δυο πρωτόνια της αμινομάδας υφίστανται. Άρα, εμφανίζονται σε διαφορετικές τιμές ppm και αλληλεπικαλύπτονται με κάποιο άλλο πρωτόνιο της ένωσης, είτε σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με το DMSO με αποτέλεσμα να μην φαίνονται στην αναμενόμενη περιοχή της κλίμακας ppm. Χρησιμοποιήσαμε και άλλους δευτεριωμένους διαλύτες, εκτός από το DMSO, όπως CD₃CN, CD₃OD και DMSO/D₂O, όμως ο εντοπισμός τους κατέστη ανέφικτος. Φυσικά επιπρόσθετη επιβεβαίωση για το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος θα παρείχε η ετεροπυρηνική φασματοσκοπία ¹H/ ¹⁵N NMR.

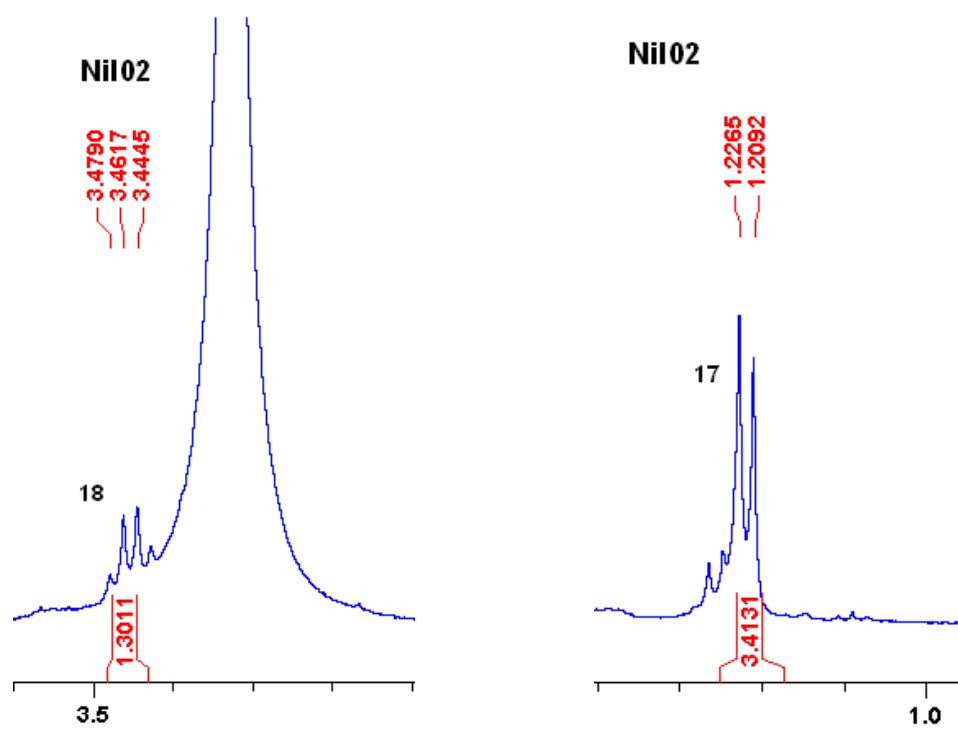
❖ **Αποπροστασία των ενώσεων 18 και 19 για το σχηματισμό των τελικών προϊόντων Nil-02 και Nil-03 αντίστοιχα.**

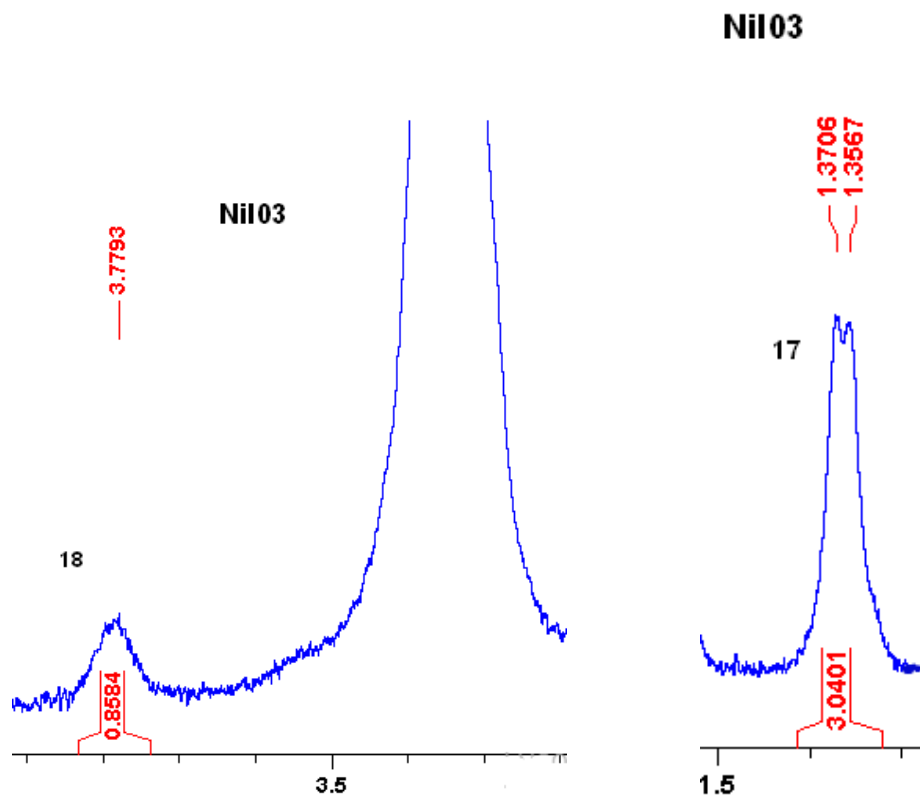
Κατ' ανάλογο τρόπο διενεργήθηκε η αποπροστασία των ενώσεων **18** και **19**, των παραγώγων εκείνων με την προσάρτηση της F-moc-L- και F-moc-D-αλανίνης στην ένωση **11**.



Σχήμα 96 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) των τελικών προϊόντων- ενώσεων **18** (κάτω) και **19** (πάνω) σε DMSO

Παρατηρούμε ότι και σε αυτήν την περίπτωση απουσιάζει το δεύτερο αμιδικό πρωτόνιο, ενώ παράλληλα, σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα, καταγράφονται τα 3 πρωτόνια του μεθυλίου της αλανίνης, καθώς και το πρωτόνιο μεταξύ της αμινομάδας και του καρβονυλικού άνθρακα.



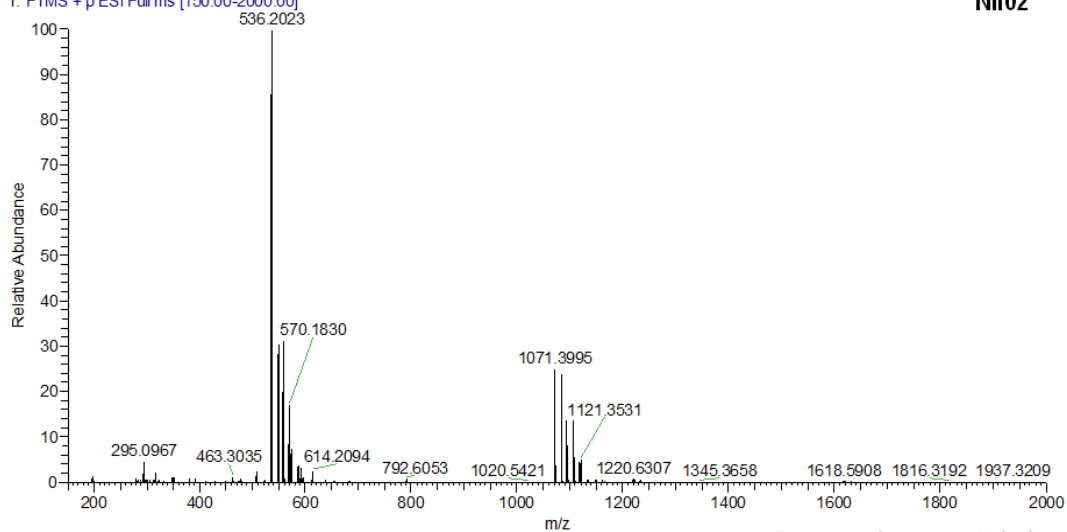


Σχήμα 97 : Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) των τελικών προϊόντων- ενώσεων **18** (πάνω) και **19** (κάτω) σε DMSO

Για την πλήρη ταυτοποίηση των παραγώγων **Nil-02** και **Nil-03** προβήκαμε στη λήψη φασμάτων μάζας υψηλής ευκρίνειας. Για τα εν λόγω ανάλογα με μοριακό τύπο C₂₇H₂₄F₃N₇O₂ υπολογίστηκε m/z=535.1944. Βρέθηκε ότι το m/z για το μοριακό ιόν [C₂₇H₂₄F₃N₇O₂+H]⁺ στην περίπτωση του L- αναλόγου είναι 536.2023 και στην περίπτωση του D- αναλόγου είναι 536.2013, ήτοι πλήρης ταυτοποίηση με το υπολογισθέν μοριακό βάρος (Σχήμα 98).

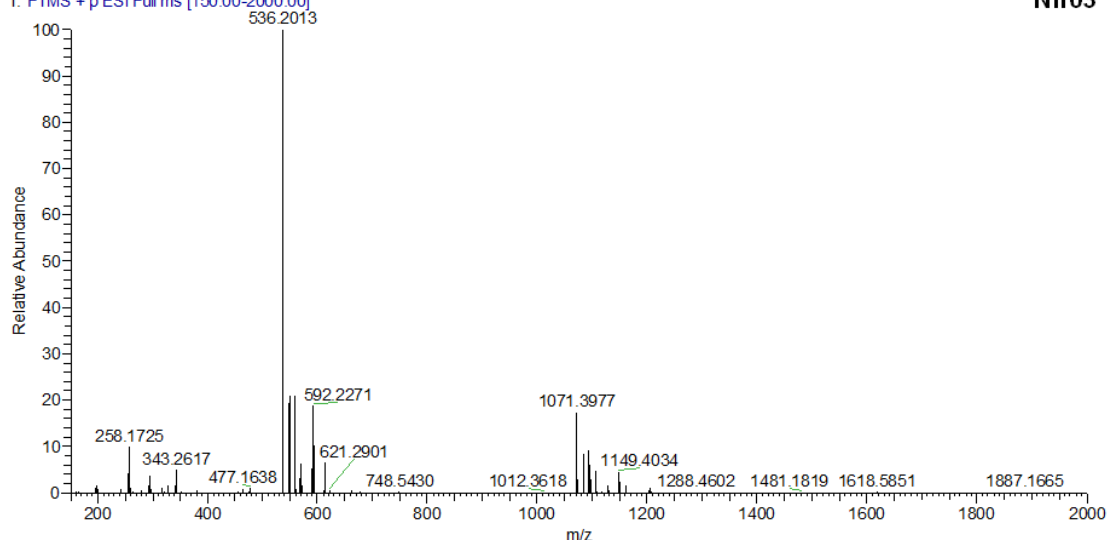
12 161101121321 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 5.75E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

Nil02



13 161101121321 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 6.97E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

Nil03

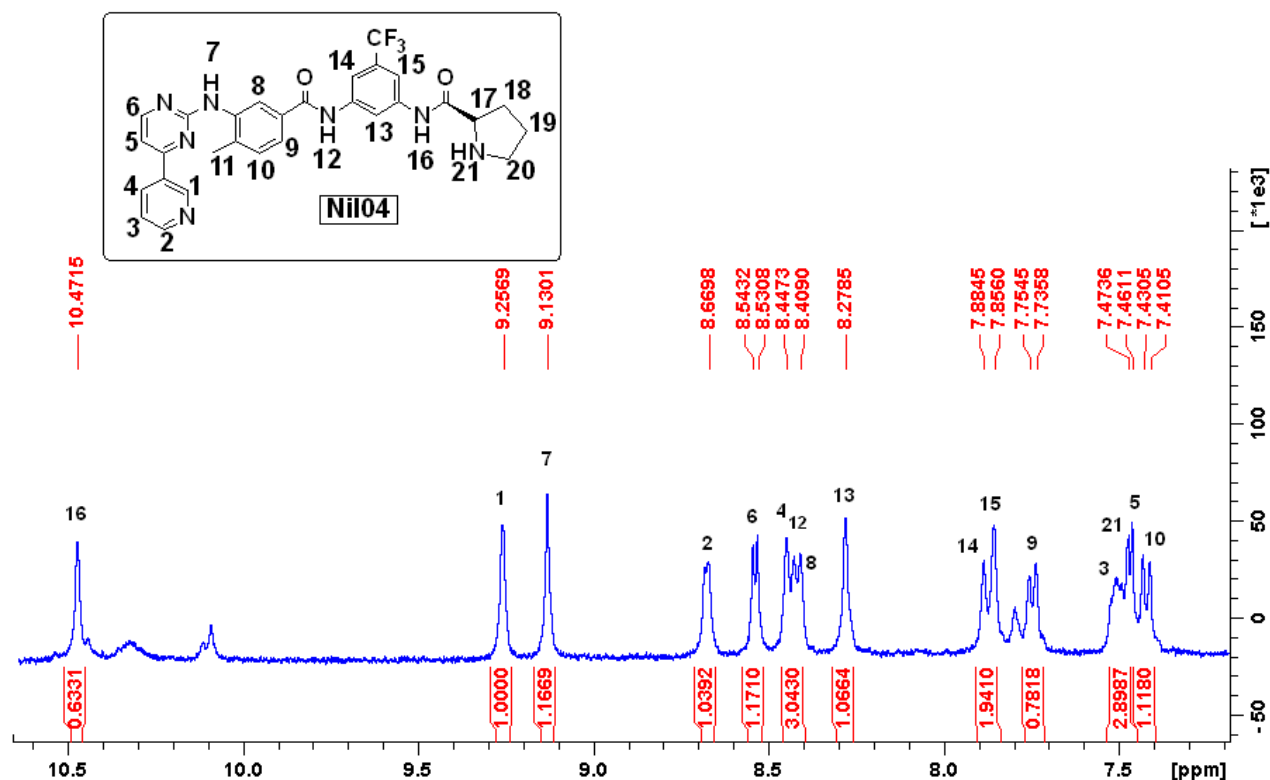


Σχήμα 98: Φάσμα HRMS (ESI) των προϊόντων αποπροστασίας Nil-02 και Nil-03.

❖ **Αποπροστασία των ενώσεων 20 και 21 για το σχηματισμό των τελικών προϊόντων Nil-04 και Nil-05 αντίστοιχα.**

Όσον αφορά τις αντιδράσεις αποπροστασίας των ενώσεων **20** και **21**, διενεργήθηκαν όπως ακριβώς και στις παραπάνω περιπτώσεις, όμως οι αποδόσεις δεν ήταν αρκετά ικανοποιητικές. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη αραιού, κακής ποιότητας φάσματος. Επίσης, ο καθαρισμός του **Nil-05** από τα επιμέρους παραπροϊόντα ήταν δύσκολος και δεν κατέστη εφικτή η παραλαβή του τελικού

αναλόγου σε καθαρή μορφή, όπως, άλλωστε, μας κατέδειξε και το φάσμα μάζας που λάβαμε.



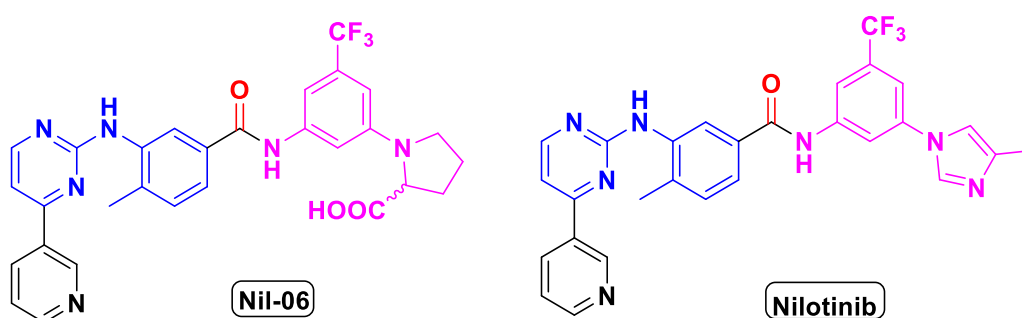
Σχήμα 99 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) των προϊόντων αποπροστασίας της ένωσης 20 σε DMSO

Παρατηρούμε πάλι την ύπαρξη ενός αμιδικού πρωτονίου στα 10.47 ppm. Επίσης, στα περίπου 8.43 ppm, ενώ στα άλλα φάσματα αντιστοιχούσαν τα πρωτόνια H_4 και H_8 , με τη συγκεκριμένη περιοχή να έχει ολοκλήρωση 2, τώρα βλέπουμε ότι δεδομένης της ολοκλήρωσης, στην περιοχή αυτή αντιστοιχούν 3 πρωτόνια. Συνεπώς, θα μπορούσε το δευτερο αμιδικό πρωτόνιο να συντονίζεται εκεί. Στα 7.46 ppm εμφανίζεται και το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 21, αυτό δηλαδή που συνδέεται στο άζωτο της προλίνης. Επίσης, καθώς το φάσμα είναι αρκετά αραιό και παράλληλα ο δευτεριωμένος διαλύτης που χρησιμοποιήσαμε για τη λήψη του έχει προσροφήσει πολλή υγρασία από το περιβάλλον, τα υπόλοιπα πρωτόνια του δακτυλίου της προλίνης αλληλεπικαλύπτονται από την κορυφή του νερού και δε διακρίνονται στο φάσμα.

3.5.6 Σύνθεση παραγώγων-αναλόγων του Nilotinib με έναν αμιδικό δεσμό (Nil-06-Nil-09)

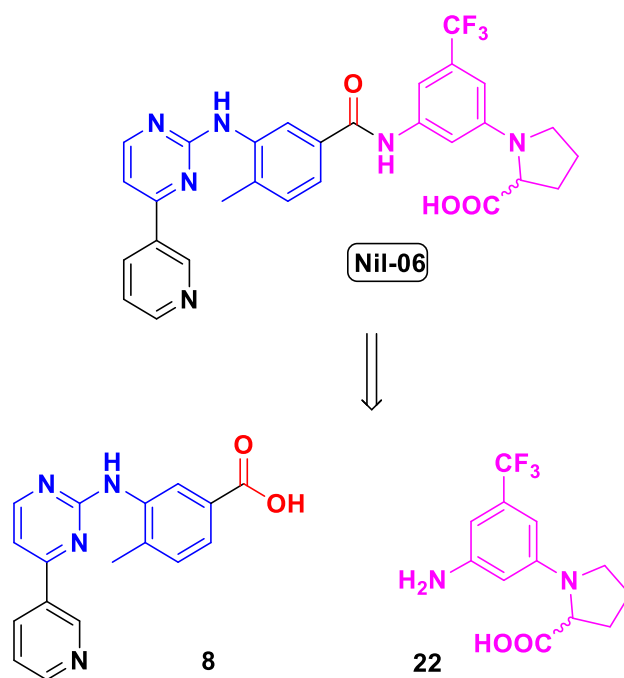
3.5.6.1 Σύνθεση του αναλόγου Nil-06

Θεωρητικές μελέτες κατέδειξαν ότι το ισοστερικό ανάλογο του Nilotinib, όπου στη θέση του μεθυλοϊμιδαζολίου εισάγεται είτε η L- είτε η D- προλίνη, δίνει καλύτερα αποτελέσματα, σύμφωνα με τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης (Σχήμα 100). Φυσικά αυτό μένει επιβεβαιωθεί ή όχι από τα βιολογικά πειράματα που θα ακολουθήσουν.



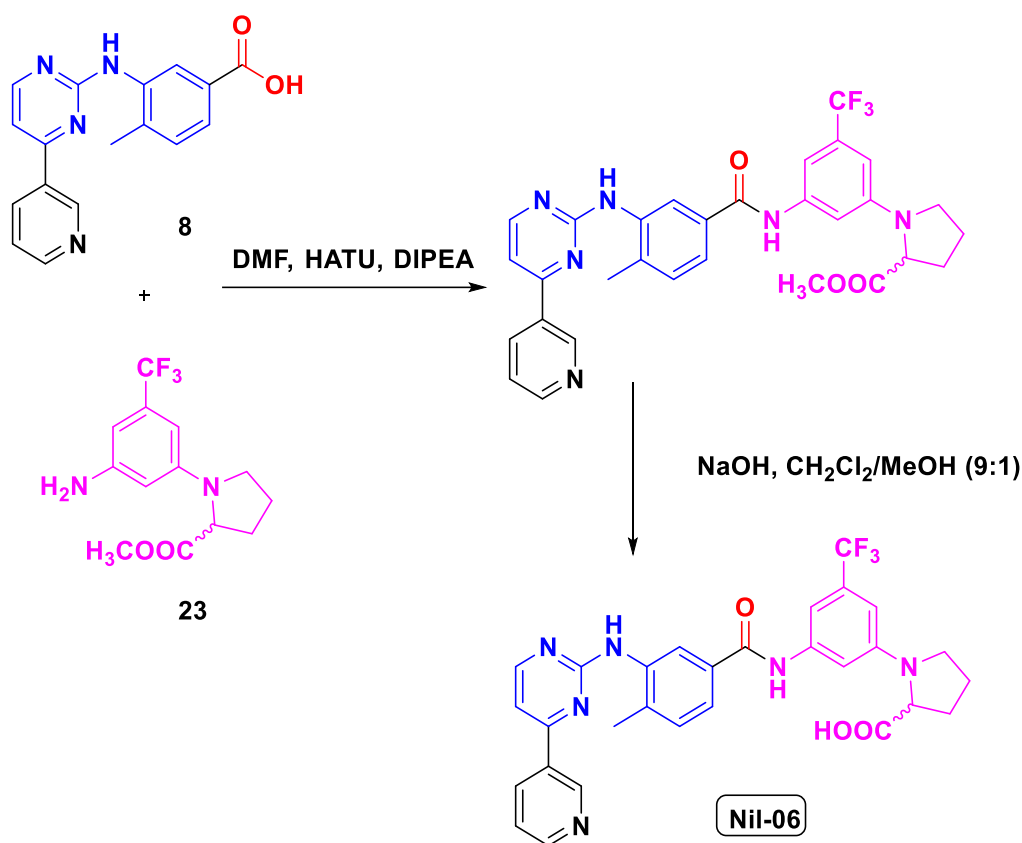
Σχήμα 100 : Nil-06, το ισοστερικό ανάλογο του Nilotinib

Με μια πρώτη αποσυνδετική προσέγγιση επικεντρώσαμε την προσοχή μας στον αμιδικό δεσμό και μέσω της σχάσης του συγκεκριμένου δεσμού, οδηγούμαστε σε δυο απλούστερες δομές, σε δυο δομικά στοιχεία του εν δυνάμει αναστολέα. Καταλήξαμε και ακολουθήσαμε μια συγκλίνουσα συνθετική πορεία ανάπτυξης της επιθυμητής ένωσης.



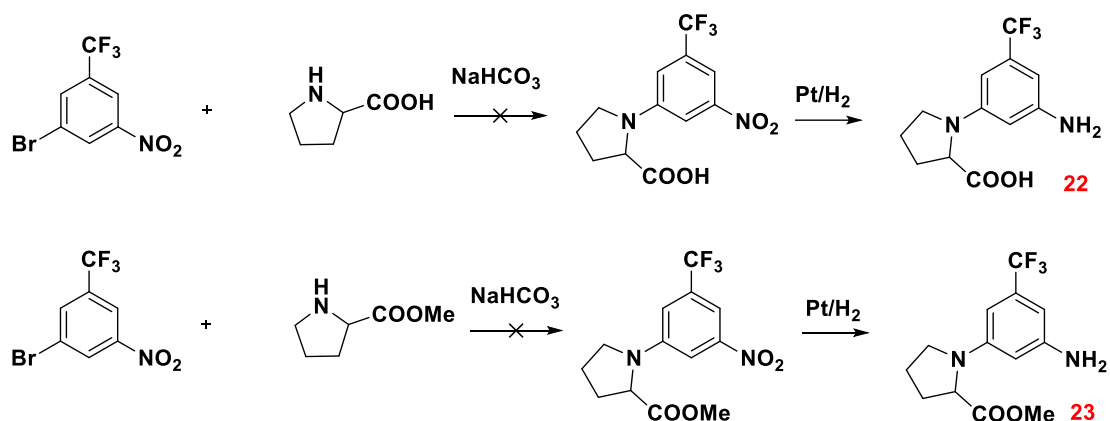
Σχήμα 101: Αποσυνδεδετική προσέγγιση για το σχεδιασμό της σύνθεσης του αναλόγου Nil-06

Για τη σύνθεση του Nil-06, δεν επιχειρήθηκε απευθείας σύζευξη του οξέος **8** και της ένωσης **22**. Κατά την αντίδραση σύζευξης, η καρβοξυλομάδα της ένωσης **22** προτιμήθηκε να είναι στην προστατευμένη της μορφή ως μεθυλεστέρας. Για τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος, στο τελικό στάδιο της σχεδιασθείσης ολικής σύνθεσης, απαιτείται υδρόλυση του μεθυλεστέρα σε βασικές μη υδατικές συνθήκες, όπως έχει αυτή έχει περιγραφεί σε προηγούμενο εδάφιο.



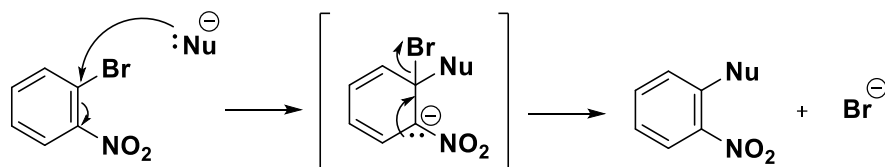
Σχήμα 102 : Αντίδραση σύζευξης - συγκλίνουσα συνθετική πορεία για τη λήψη του Nil-06

Η σύνθεση της ένωσης **8** έχει περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενο εδάφιο, σύμφωνα με τη δική μας βελτιστοποιημένη μέθοδο. Η συνθετική πορεία των ενώσεων **22** και **23** απαιτεί μια σειρά κλασικών αντιδράσεων οργανικής συνθετικής χημείας (Σχήμα 103). Στο εργαστήριο δοκιμάστηκαν κάποιες πειραματικές συνθήκες, με τροποποιήσεις κυρίως στο διαλύτη, στη θερμοκρασία και τα αντιδρώντα, όπως φαίνεται και σχηματικά παρακάτω. Αρχικά, ξεκινήσαμε από το εμπορικά διαθέσιμο 1-βρωμο-3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοβενζόλιο, διεξάγοντας μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με την προλίνη ή το μεθυλεστέρα αυτής. Επόμενο βήμα ήταν η αναγωγή της νιτρο-ομάδας σε αμινική, προκειμένου να ακολουθήσει η σύζευξη με το οξύ **8**. Παρόλα αυτά, η πυρηνόφιλη υποκατάσταση δεν έλαβε χώρα ακόμα και σε πολύ πολικό διαλύτη, το DMSO, καθώς και σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες (100 °C).



Σχήμα 103 : Αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης και αναγωγής για τη σύνθεση των ενώσεων **22** και **23**.

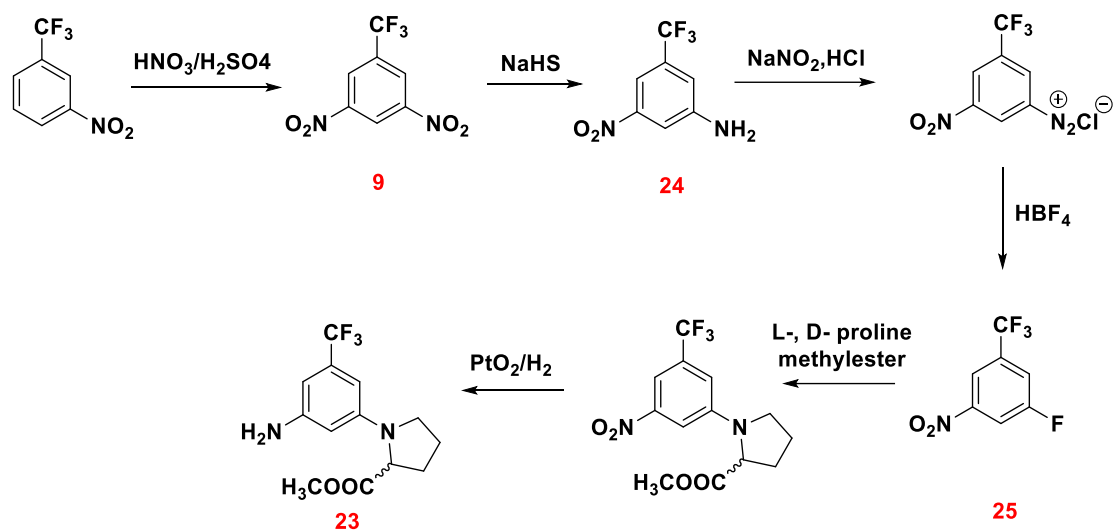
Κατά κανόνα, οι πυρηνόφιλες αρωματικές υποκαταστάσεις λαμβάνουν χώρα μέσω ενός μηχανισμού προσθήκης/απόσπασης (Σχήμα 104), και πραγματοποιούνται μόνο εάν ο αρωματικός δακτύλιος είναι αρκετά ενεργοποιημένος, δηλαδή φέρει κάποιον υποκαταστάτη που είναι ισχυρός δέκτης ηλεκτρονίων σε ορθο- ή παρα- θέση ως προς το αλογόνο. Μόνο σε αυτές τις θέσεις μπορούν οι υποκαταστάτες που είναι δέκτες ηλεκτρονίων να σταθεροποιήσουν επαρκώς το ανιονικό ενδιάμεσο μέσω συντονισμού και να οδηγήσουν στο προϊόν πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, μέσω μιας μεταβατικής κατάστασης χαμηλού ενεργειακού επιπέδου.



Σχήμα 104: Μηχανισμός της αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης

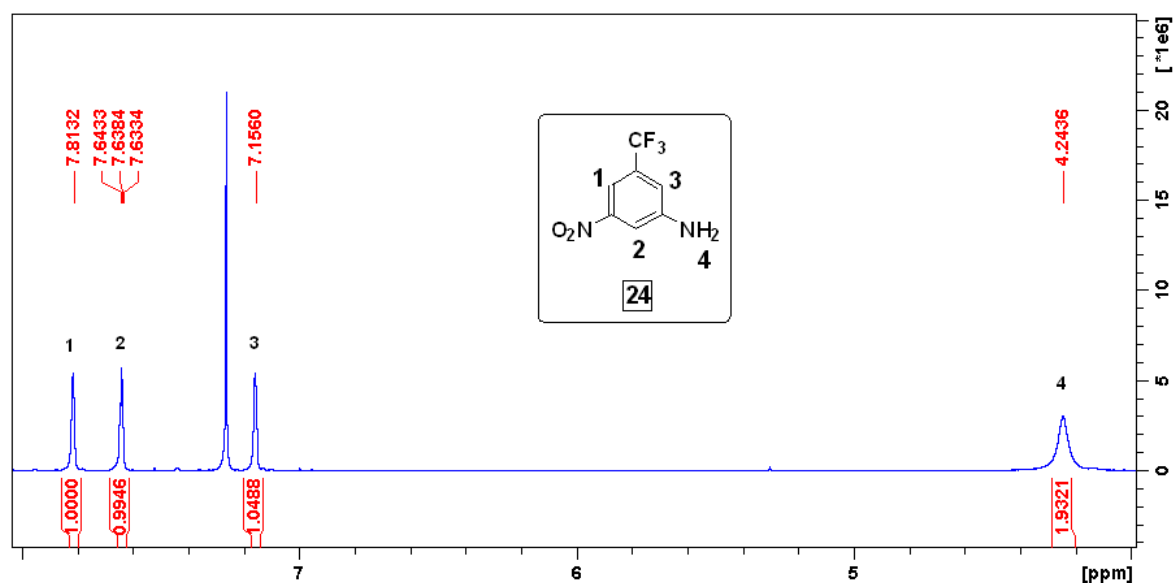
Ωστόσο, σκεφτήκαμε να διενεργήσουμε την ίδια αντίδραση, χρησιμοποιώντας το 1-φθορο-3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (**25**), δεδομένου ότι το φθόριο στις αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης είναι πολύ καλύτερη αποχωρούσα ομάδα σε σχέση με το βρώμιο. Αυτό συμβαίνει γιατί, καθώς το φθόριο είναι πιο ηλεκτραρνητικό από το βρώμιο, έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον άνθρακα με τον οποίο συνδέεται, διευκολύνοντας την πυρηνόφιλη προσβολή. Συνεπώς, ο άνθρακας καθίσταται καλύτερο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο και η προσβολή γίνεται ευκολότερα. Όμως, το 1-φθορο-3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (**25**) δεν

ήταν εμπορικά διαθέσιμο όπως το 1-βρωμο-3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοβενζόλιο και έτσι προβήκαμε στη σύνθεση του, όπως φαίνεται σχηματικά παρακάτω.



Σχήμα 105 : Πειραματική πορεία σύνθεσης των ενώσεων **25** και **23**

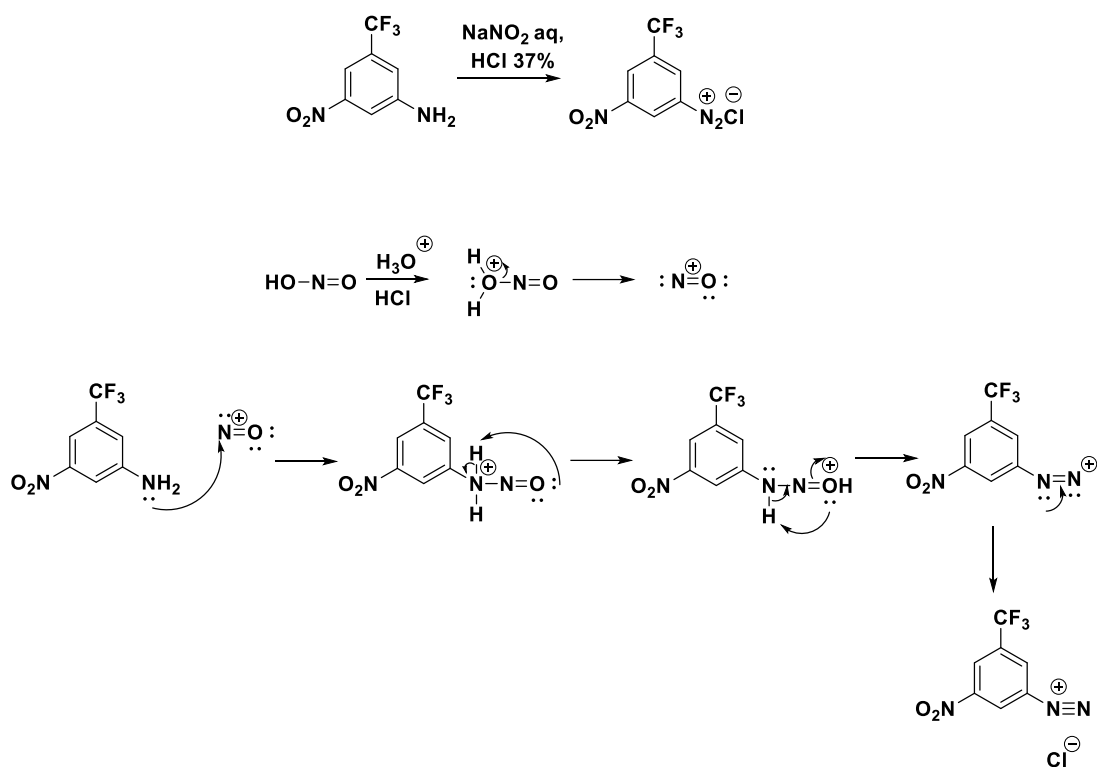
Η ένωση **9** συντέθηκε, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενο εδάφιο και ακολούθησε επιλεκτική αναγωγή αυτής με την επίδραση όξινου θειούχο νατρίου. Η προσθήκη αυτού γίνεται ελεγχόμενα, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Η ένωση **24** συντέθηκε επιτυχώς, όπως φαίνεται και από το φάσμα $^1\text{H NMR}$ παρακάτω.



Σχήμα 106: Φάσμα $^1\text{H NMR}$ (400 MHz) της 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοανιλίνης, ένωση **24** σε CDCl_3

Χαρακτηριστική κορυφή στο φάσμα είναι η ευρεία κορυφή στα 4.24 ppm με ολοκλήρωση 2H, που αντιστοιχεί στα 2 πρωτόνια της αμινομάδας. Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο (υπ' αριθμόν 1) συντονίζεται στα 7.81 ppm, καθώς βρίσκεται μεταξύ δύο απενεργοποιητών (CF_3 και NO_2), που αντίστοιχα ο ένας μέσω επαγωγικού και ο δεύτερος μέσω αρνητικού συζυγιακού και αρνητικού επαγωγικού φαινομένου μειώνουν το ηλεκτρονιακό νέφος και ως εκ τούτου αποπροστατεύουν ισχυρά το εν λόγω πρωτόνιο. Στα 7.63 ppm εμφανίζεται το H_2 , καθώς η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από αυτό αφαιρείται μεν λόγω της νιτρομάδας, μέσω εκδήλωσης αρνητικού συζυγιακού φαινομένου, αλλά το έλλειμμα αυτό αίρεται μερικώς από την αμινομάδα που προσφέρει ηλεκτρόνια μέσω του εκδηλούμενου θετικού συζυγιακού φαινομένου (+M), προστατεύοντας το. Τέλος, το H_3 είναι το πιο προστατευμένο από τα αρωματικά, καθώς η τριφθορομεθυλομάδα έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω επαγωγικού φαινομένου, με την αμινομάδα όμως να προσθέτει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω του ισχυρού θετικού φαινομένου συντονισμού (+M).

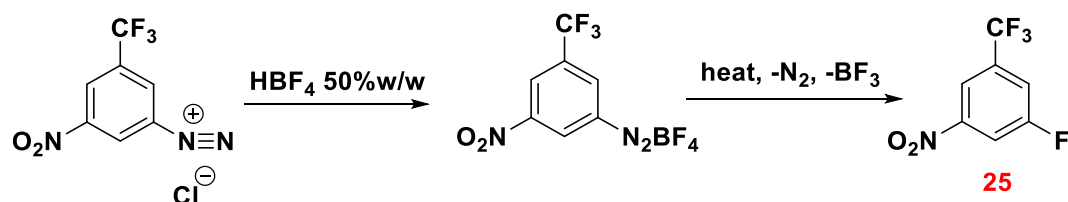
Μετά την επιτυχή σύνθεση της 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοανιλίνης (**24**), επόμενο βήμα για το σχηματισμό του 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφθοροβενζολίου (**25**), ήταν η διεξαγωγή μιας αντίδρασης Schiemann, αντίδρασης κατά την οποία οι ανιλίνες μετατρέπονται σε αρυλοφθορίδια. Έτσι, επόμενο στάδιο στην όλη συνθετική πορεία είναι ο σχηματισμός του διαζωνιακού άλατος της 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλο ανιλίνης σε υδατικό διάλυμα νιτρώδους νατρίου και την επίδραση πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Παρακάτω παρατίθενται η αντίδραση και ο μηχανισμός σύνθεσης του διαζωνιακού άλατος.



Σχήμα 107 : Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του διαζωνιακού άλατος

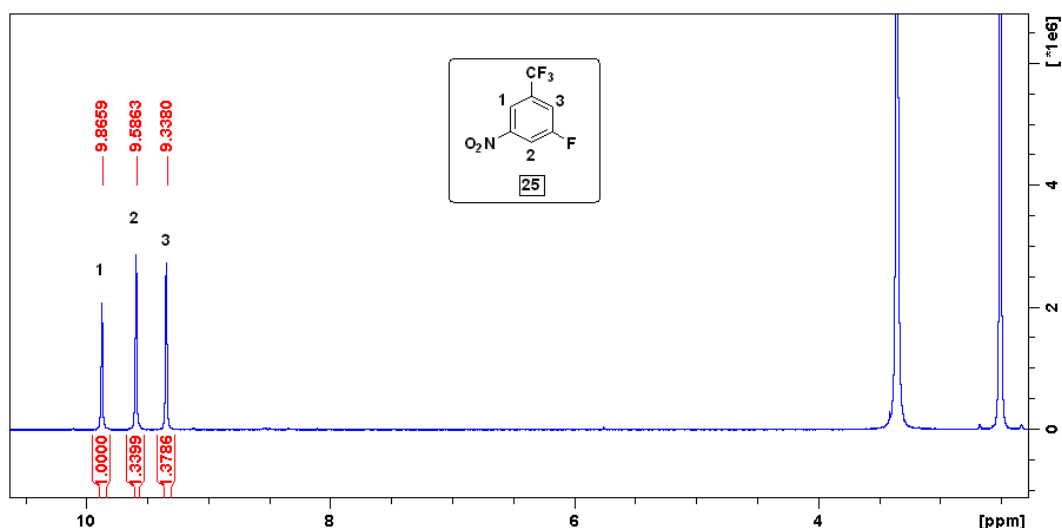
Είναι επιτακτική η ανάγκη παραμονής της αντίδρασης σε χαμηλή σχετικά θερμοκρασία, καθώς εύκολα το διαζωνιακό άλας μπορεί να δώσει ως παραπροϊόν 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφαινόλη, καθώς η ομάδα N_2^+ είναι μια πολύ καλή αποχωρούσα ομάδα.

Σε ένα δεύτερο στάδιο, το διαζωνιακό άλας αντιδρά με τετραφθοροβορικό οξύ δίνοντας το αντίστοιχο άλας, το οποίο μετά την απομόνωση και την ξήρανση του θερμαίνεται σταδιακά και ελεγχόμενα απελευθερώνοντας N_2 και BF_3 , προς σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.



Σχήμα 108 : Αντίδραση σχηματισμού του 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφθοροβενζολίου, ένωση 25

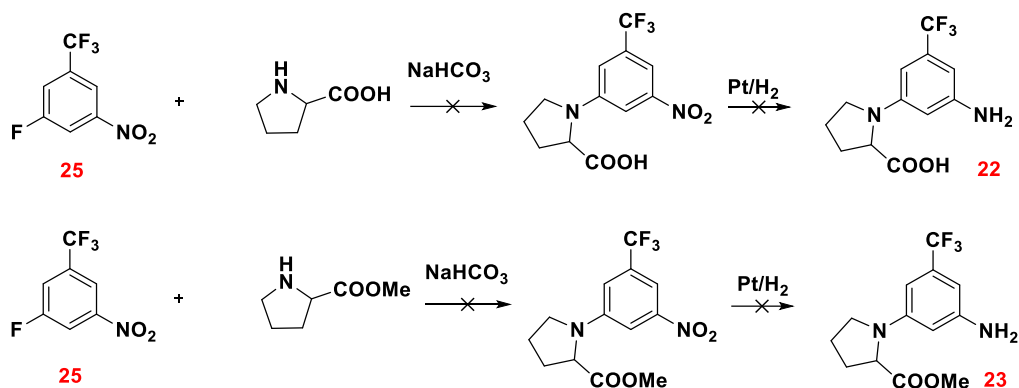
Το 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφθοροβενζόλιο απομονώθηκε καθαρό, όπως υποδεικνύει το φάσμα $^1\text{H NMR}$.



Σχήμα 109 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ (400 MHz) του 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφθοροβενζολίου, ένωση **25** σε *DMSO*

Δεδομένου ότι η $-\text{CF}_3$ ομάδα εκδηλώνει ισχυρό αρνητικό επαγωγικό φαινόμενο, η $-\text{NO}_2$ ομάδα αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το δακτύλιο κυρίως μέσω συντονισμού (-M) και η $-\text{F}$ ομάδα επίσης εκδηλώνει αρνητικό επαγωγικό φαινόμενο, ασθενέστερο σε σχέση με αυτό της $-\text{CF}_3$, το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H_1 , ενώ ακολουθεί το H_2 . Το πιο προστατευμένο από τα τρία αρωματικά πρωτόνια είναι το H_3 .

Επόμενο στάδιο για τη σύνθεση των ενώσεων **22** και **23** ήταν και πάλι μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης προσθήκης/απόσπασης, με τη χρήση αυτή τη φορά του φθοροπαραγωγού **25**, καθώς το φθόριο, όπως προαναφέρθηκε, είναι πολύ καλύτερη αποχωρούσα ομάδα σε αυτού του τύπου τις αντιδράσεις.

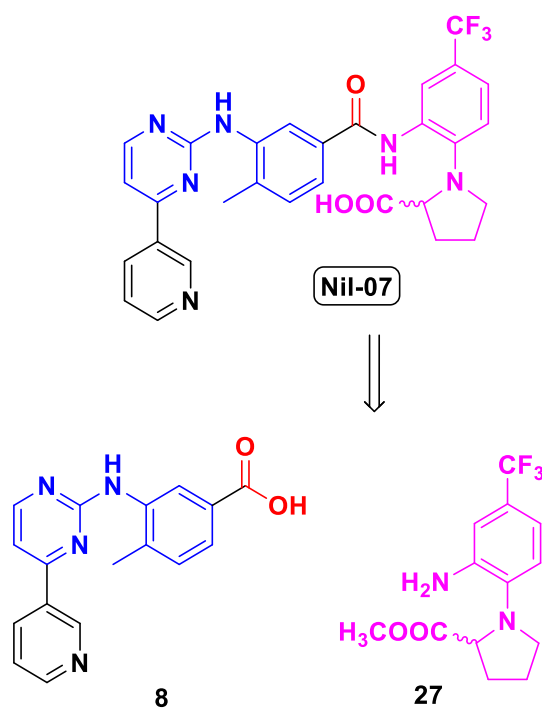


Σχήμα 110 : Αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης και αναγωγής για τη σύνθεση των ενώσεων **22** και **23**.

Από το παραπάνω σχήμα είναι φανερό ότι οι δυο πυρηνόφιλες αρωματικές υποκαταστάσεις δεν έλαβαν χώρα. Η ένωση **25** δεν συντέθηκε σε μεγάλες ποσότητες και δεδομένου ότι για τη σύνθεση της απαιτείται μια σειρά αντιδράσεων, πέντε σταδίων, καθώς και η χαμηλή απόδοση της αντίδρασης Schiemann, δε μας επέτρεψε να διενεργήσουμε σειρά αντιδράσεων για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για τις επόμενες αντιδράσεις. Δεδομένου ότι για την παραλαβή του **Nil-06** απαιτείται ακόμη η αντίδραση σύζευξης, ενώ στην περίπτωση χρήσης του μεθυλεστέρα της προλίνης επιπλέον η υδρόλυση του, η σύνθεση της ένωσης **25** θα έπρεπε να επαναληφθεί πολλές φορές. Λόγω περιορισμένου χρόνου και καθώς είχαμε ήδη σχεδιάσει να συνθέσουμε κι άλλα ανάλογα του Nilotinib, αποφασίσαμε να συνεχίσουμε με τη σύνθεση των υπόλοιπων αναλόγων. Συνεπώς, το επιθυμητό παράγωγο **Nil-06** δεν συντέθηκε στο εργαστήριο, όμως οι προσπάθειες συνεχίζονται από την ερευνητική μας ομάδα.

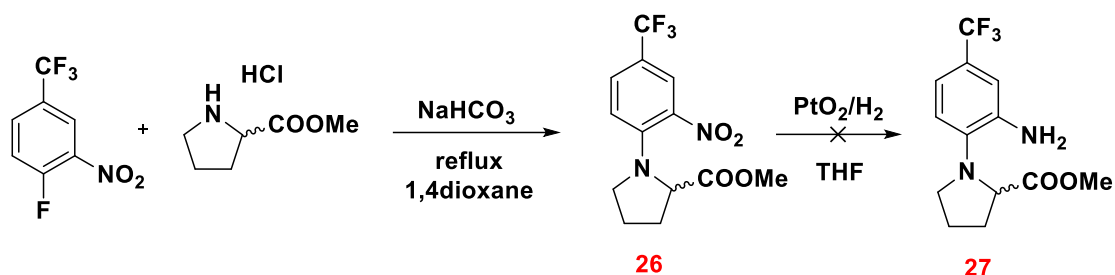
3.5.6.2 Σύνθεση του αναλόγου Nil-07

Και για τη σύνθεση του αναλόγου **Nil-07** ακολουθήσαμε μια συγκλίνουσα συνθετική πορεία ανάπτυξης, όπως προκύπτει από την αποσυνδεδετική μας προσέγγιση (Σχήμα 111).



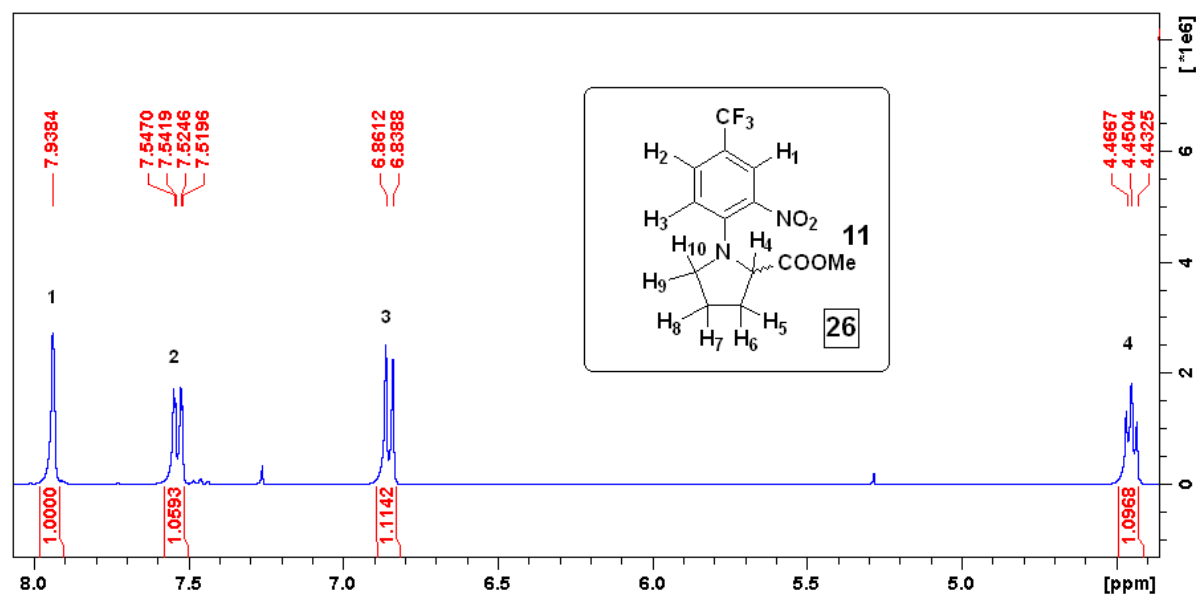
Σχήμα 111: Αποσυνδεδετική προσέγγιση για το σχεδιασμό της σύνθεσης του αναλόγου **Nil-07**

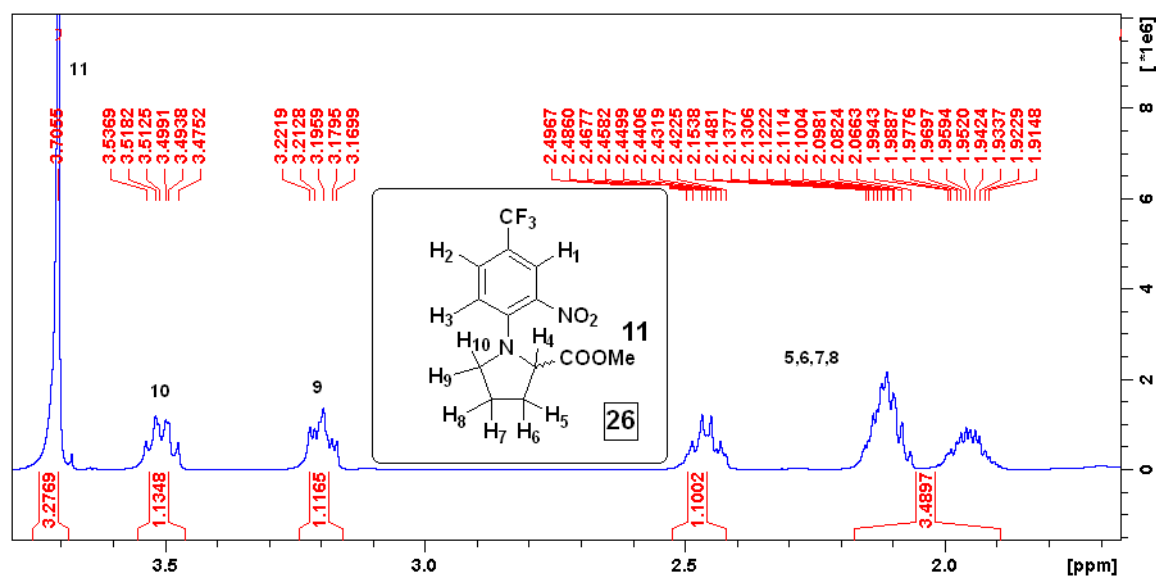
Όπως και στο προηγούμενο παράγωγο, **Nil-06**, τη σύζευξη του οξέος **8** και της ένωσης **27** θα ακολουθήσει στο τελικό στάδιο η υδρόλυση του μεθυλεστέρα, με σκοπό τη σύνθεση της ένωσης **Nil-07** (Σχήμα 102). Έχοντας διαθέσιμο το οξύ **8**, προβήκαμε στη σύνθεση της ένωσης **26**. Στην περίπτωση αυτή το αντίστοιχο φθορο-παράγωγο υπήρχε εμπορικά διαθέσιμο και συνεπώς δεν προβήκαμε στη σύνθεση του, εξοικονομώντας χρόνο. Έτσι, διενεργήσαμε τις αντιδράσεις του Σχήματος 112.



Σχήμα 112 : Πειραματική πορεία σύνθεσης της ένωσης **27**

Σε πρώτο στάδιο διενεργήθηκε επιτυχώς η πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση του 1-φθορο-2-νιτρο-4-τριφθορομεθυλοβενζολίου με το υδροχλωρικό άλας του μεθυλεστέρα της προλίνης και έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία λήφθηκε σε υψηλή απόδοση το προϊόν **26** σε καθαρή μορφή.

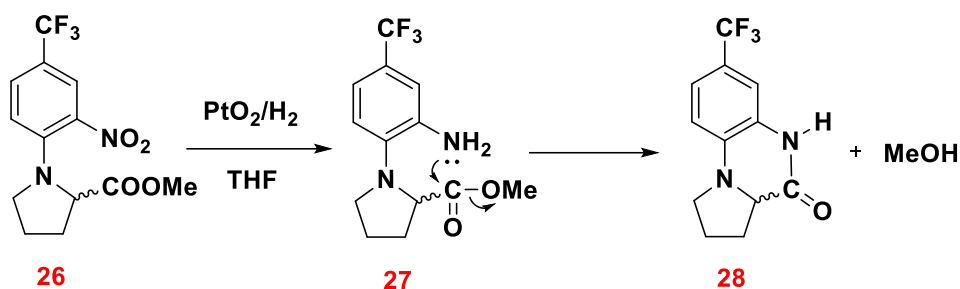




Σχήμα 113 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της ένωσης **26** σε CDCl_3

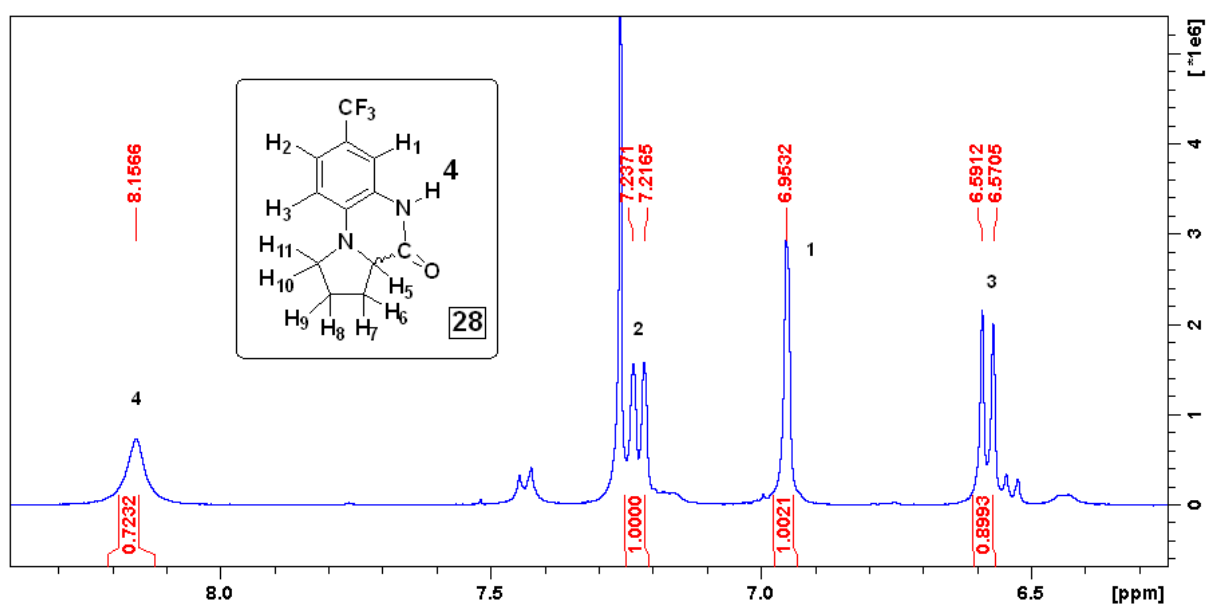
Από τα τρία αρωματικά πρωτόνια το H_1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο, καθώς σε γειτονική θέση έχει υποκαταστάτες που αφαιρούν ηλεκτρονιακή πυκνότητα είτε μέσω επαγωγικού ($-\text{CF}_3$) είτε μέσω συζυγιακού και επαγωγικού ($-\text{NO}_2$) φαινομένου. Το H_4 αποπροστατεύεται περισσότερο από τα υπόλοιπα πρωτόνια του δακτυλίου της προλίνης, καθώς βρίσκεται σε άνθρακα που γειτνιάζει με την καρβονυλομάδα και το άτομο αζώτου. Ακολουθούν τα H_9 και H_{10} που εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές και η αποπροστασία τους οφείλεται στο γειτονικό άζωτο. Τέλος, τα H_5 , H_6 , H_7 , H_8 εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές. Η ταυτοποίηση του καθενός καθίσταται δύσκολη αφού έχουν παρόμοιο χημικό περιβάλλον και το καθένα από αυτά σχάζεται από τα γειτονικά του (J^3) όσο και από αυτό που βρίσκεται πάνω στον ίδιο άνθρακα (J^2), καθώς λόγω του πενταμελούς δακτυλίου διαφοροποιούνται χημικά και μαγνητικά (ισημερινά και αξονικά υδρογόνα).

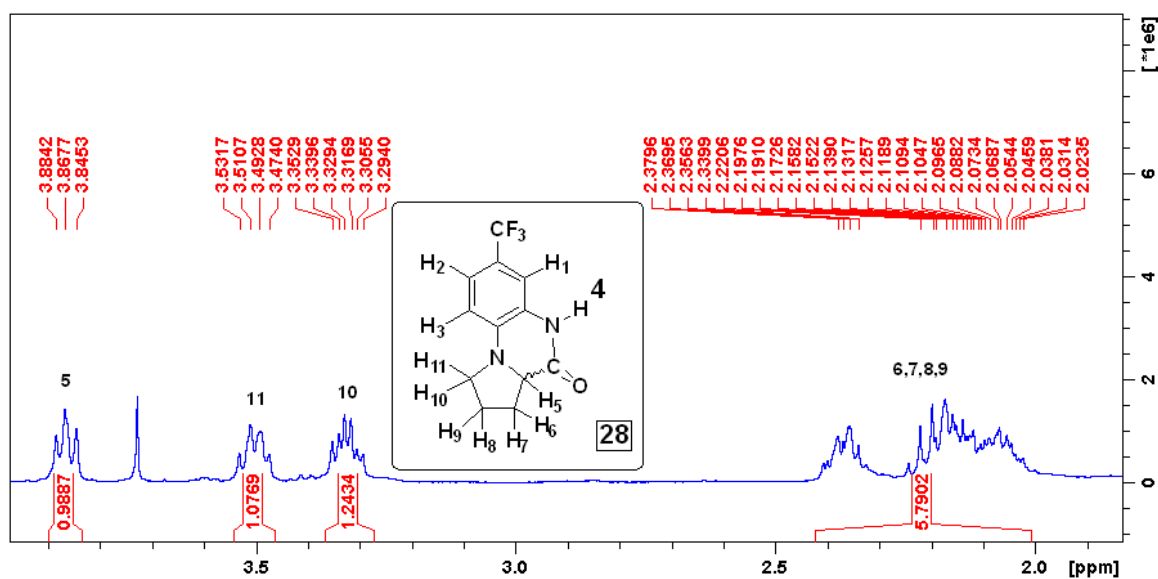
Προς μεγάλη μας έκπληξη, η αντίδραση αναγωγής της ένωσης **26** με καταλύτη Adams (PtO_2) σε ατμόσφαιρα H_2 , δεν έδωσε το επιθυμητό ανηγμένο προϊόν **27**. Αντί αυτού, το φάσμα ^1H NMR που παρατίθεται κατέδειξε το σχηματισμό ενός προϊόντος κυκλοποίησης (Σχήμα 114). Η επιθυμητή ένωση, ακαριαία μετά το σχηματισμό της, κυκλοποιήθηκε, σχηματίζοντας ένα σταθερό εξαμελή δακτύλιο, προς μια λακτάμη.



Σχήμα 114 : Αντίδραση κυκλοποίησης της ανηγμένης ένωσης **27** προς τη λακτάμη **28**

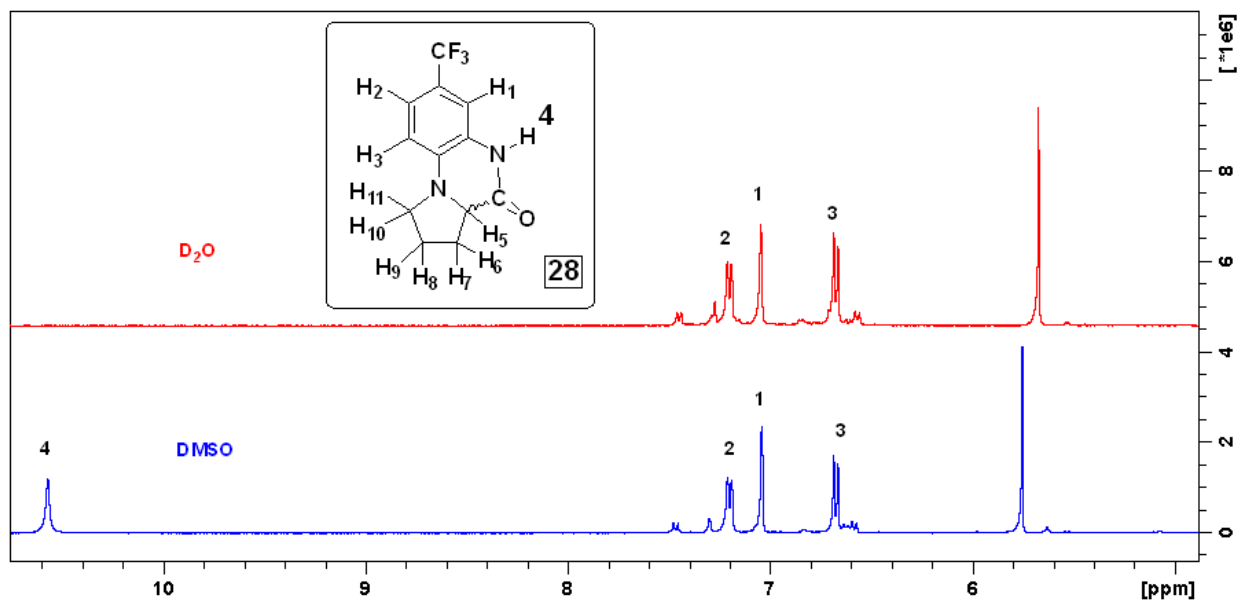
Λαμβάνοντας σε CDCl_3 θα αναμέναμε να δούμε μια ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 2, η οποία θα αντιστοιχούσε στα πρωτόνια της ελεύθερης αμινομάδας. Όμως, η ευρεία κορυφή στα 8.15 ppm κατέδειξε την ύπαρξη ενός αμιδικού πρωτονίου. Τα υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζονται με μικρές διαφορές στη χημική μετατόπιση. Επιπροσθέτως, το σχηματισμό του κυκλοποιημένου προϊόντος, σύμφωνα με το *Σχήμα 115*, επιβεβαιώνει η απουσία των 3 πρωτονίων της μεθύλυ ομάδας του εστέρα.





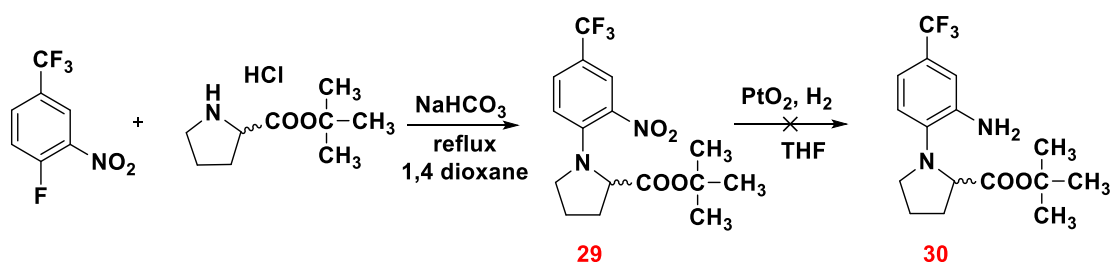
Σχήμα 115 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της ένωσης **28** σε CDCl_3

Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας το φάσμα της ένωσης σε DMSO, το H_4 εμφανίστηκε στα 10.57 ppm, μια τιμή που είναι χαρακτηριστική για τα αμιδικά πρωτόνια. Με προσθήκη D_2O στο δείγμα, η κορυφή εξαφανίστηκε, ενώ όλα τα άλλα πρωτόνια έδωσαν σήμα (Σχήμα 116).



Σχήμα 116 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της ένωσης **28**, σε DMSO (κάτω) και $\text{DMSO}/\text{D}_2\text{O}$ (πάνω)

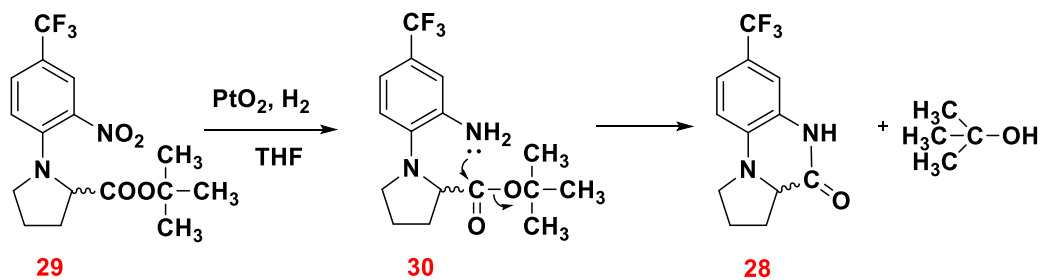
Προκειμένου να υπερβούμε το εμπόδιο αυτό και να συνθέσουμε την επιθυμητή ένωση **27**, προστατέψαμε την καρβοξυλική ομάδα της προλίνης, σχηματίζοντας ένα σταθερό – ογκώδη εστέρα που να μη μπορεί, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων να δεχθεί ενδομοριακά από την αμινομάδα μια πυρηνόφιλη προσβολή προς το προϊόν κυκλοποίησης. Έτσι, χρησιμοποιώντας τον tert-βουτυλεστέρα ως προστατευτική ομάδα, διενεργήσαμε τις αντιδράσεις του Σχήματος 117. Επιλέξαμε αυτήν την προστατευτική ομάδα, καθώς όπως προαναφέρθηκε είναι σταθερή και μόνο σε όξινες συνθήκες μπορεί να αποχωρήσει ως καρβοκατιόν.



Σχήμα 117 : Πειραματική πορεία σύνθεσης της ένωσης **30**

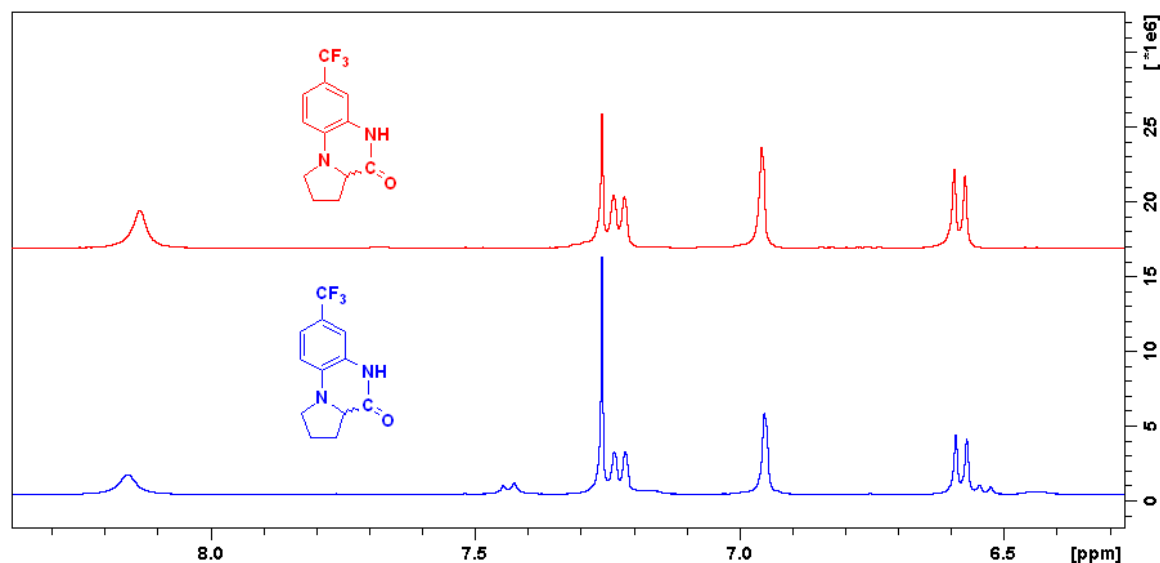
Το φάσμα ^1H NMR της πρόδρομης ένωσης **29** είναι πανομοιότυπο με αυτό της ένωσης **26**, με τη μόνη διαφορά πως πλέον δεν υφίσταται η απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3, στα 3.70 ppm που αντιστοιχούσε στα πρωτόνια της μεθυλομάδας, αλλά μια απλή κορυφή στα 1.39 ppm με ολοκλήρωση 9, η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια του tert-βουτυλεστέρα.

Και στην περίπτωση αυτή όμως, κατά την αναγωγή, σχηματίστηκε πάλι ακαριαία η λακτάμη **28** του Σχήματος 118 κάτι που αποδεικνύει ότι η πυρηνόφιλη προσβολή σε ένα στερικά παρεμποδισμένο ηλεκτρονιόφιλο κέντρο, όταν πραγματοποιείται ενδομοριακά, είναι εφικτή.



Σχήμα 118 : Αντίδραση κυκλοποίησης της ανηγμένης ένωσης **30** προς τη λακτάμη **28**

Κάνοντας υπέρθεση των φασμάτων των προϊόντων αναγωγής των ενώσεων **27** και **30** καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται ακριβώς για την ίδια λακτάμη **28**. Στο συγκεκριμένο φάσμα απουσιάζει η κορυφή στα 1.39 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του tert-βουτυλεστέρα, όπως αντίστοιχα απουσίαζαν τα πρωτόνια του μεθυλεστέρα. Το αμιδικό πρωτόνιο της σχηματισθείσης λακτάμης εμφανίζεται και εδώ στα 8.14 ppm. Στο παρακάτω σχήμα, με μπλέ χρώμα απεικονίζεται το προϊόν κυκλοποίησης της ένωσης **27** και με κόκκινο το προϊόν κυκλοποίησης της ένωσης **30**.

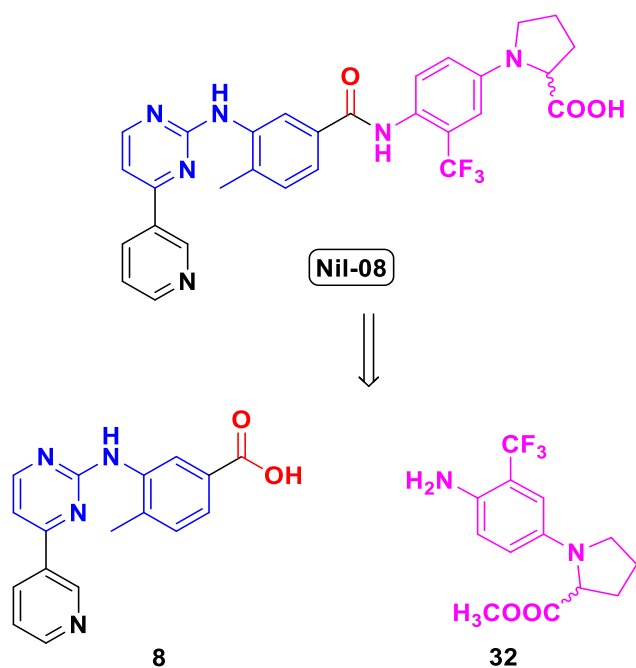


Σχήμα 119 : Φάσμα $^1\text{H NMR}$ (400 MHz) των προϊόντων κυκλοποίησης (λακτάμες) των ενώσεων **27** (κάτω) και **30** (πάνω) σε CDCl_3

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι και στις δυο περιπτώσεις ευνοείται ο σχηματισμός της λακτάμης, ενδομοριακά, καθώς σχηματίζεται ένας σταθερός εξαμελής δακτύλιος, δεδομένου ότι οι ενδομοριακές αντιδράσεις, όταν στερικά είναι επιτρεπτό, απαιτούν χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης. Προκειμένου όμως να συντεθούν και τα υπόλοιπα ανάλογα που έχουν σχεδιαστεί, η προσπάθεια σύνθεσης του **Nil-07** σταμάτησε στο σημείο αυτό, όμως πρόκειται να συνεχιστεί από την ερευνητική ομάδα.

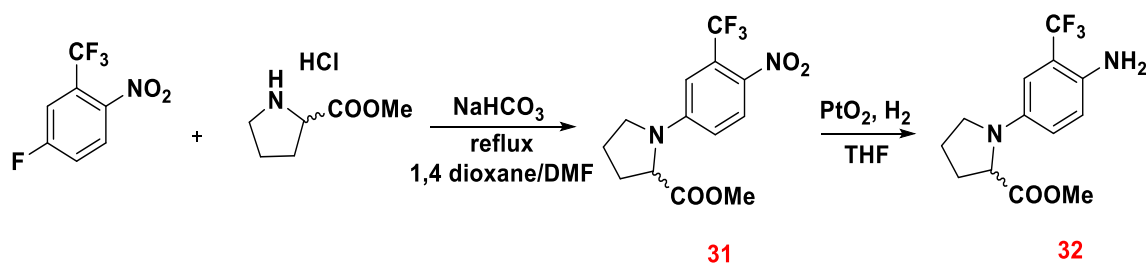
3.5.6.3 Σύνθεση του αναλόγου **Nil-08**

Μέσω συγκλίνουσας συνθετικής πορείας επιχειρήθηκε η σύνθεση του αναλόγου **Nil-08** (Σχήμα 120).

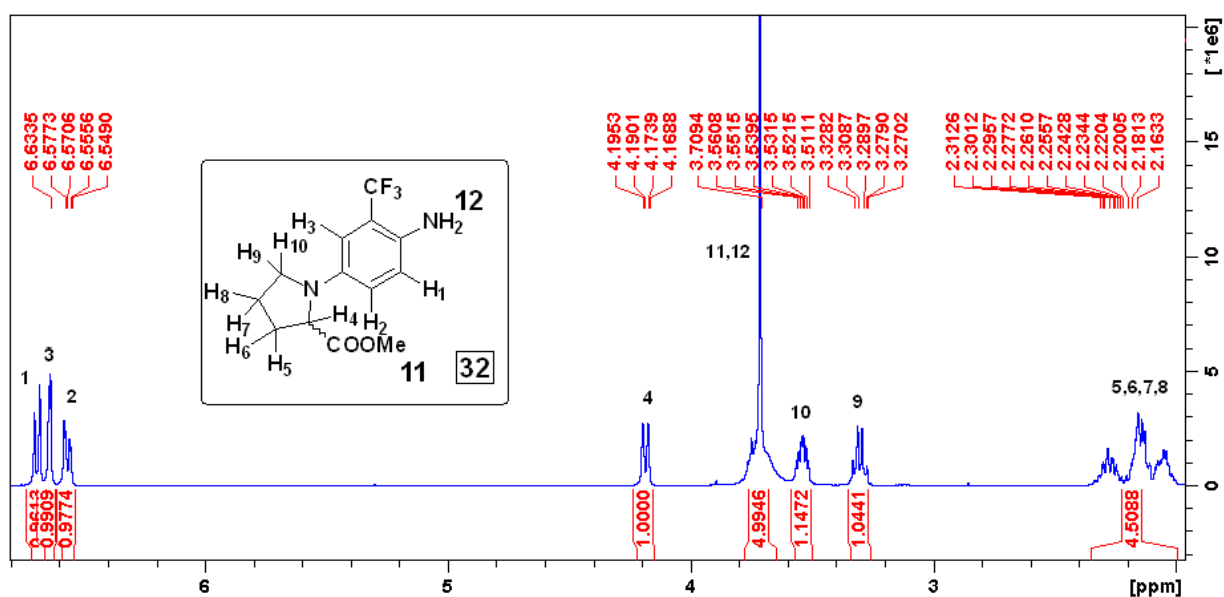
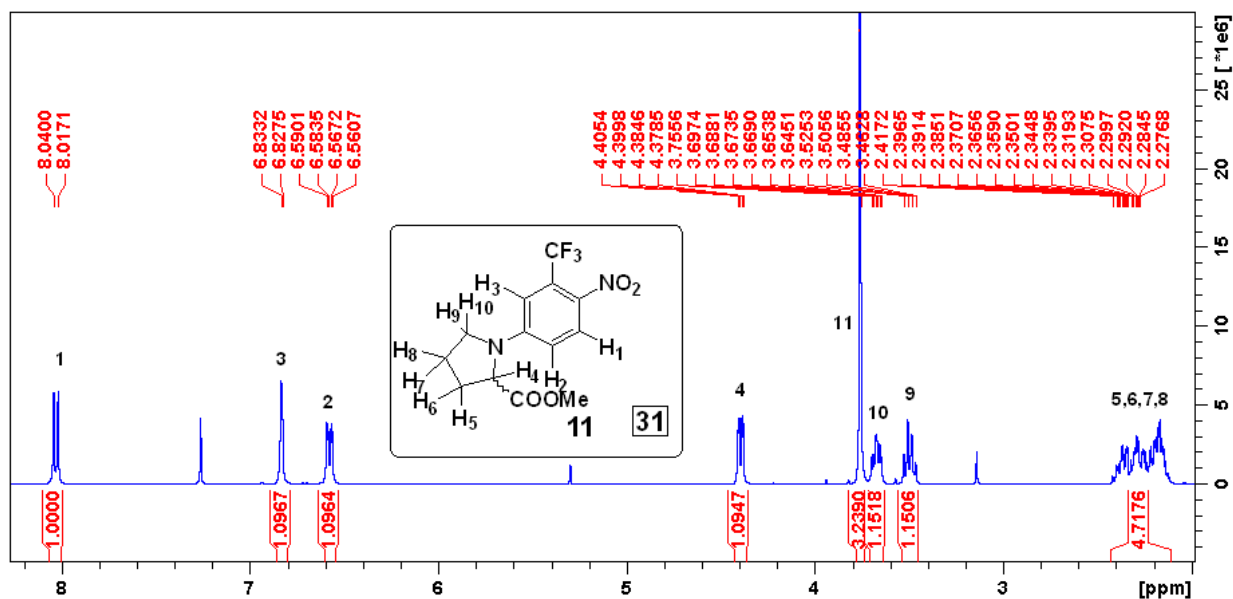


Σχήμα 120 : Αποσυνδεδετική προσέγγιση σχεδιασμού της σύνθεσης του αναλόγου *Nil-08*

Κατ' ανάλογο τρόπο με τα προαναφερθέντα ανάλογα, διενεργήσαμε τη σύνθεση της ένωσης **32**. Με αρχικό αντιδραστήριο το 5-φθορο-2-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο διενεργήσαμε μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με το υδροχλωρικό άλας του μεθυλεστέρα της προλίνης, με την προσθήκη μιας ασθενούς βάσεως (NaHCO_3) σε μείγμα διαλυτών 1,4 – διοξάνιο / DMF (2:1). Η ένωση **31** ανάχθηκε επιτυχώς αυτή τη φορά στην επιθυμητή ένωση **32** σε ποσοστό 100% (Σχήμα 121 και 122), χωρίς να λάβει χώρα, λόγω απόστασης των δυο λειτουργικών ομάδων, της αμινομάδας και της εστερομάδας, ο ενδομοριακός σχεδιασμός της λακτάμης.



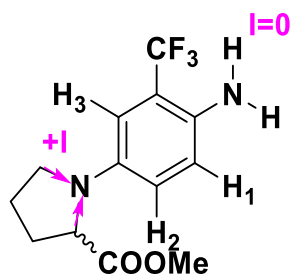
Σχήμα 121 : Πειραματική πορεία σύνθεσης της ένωσης **32**



Σχήμα 122 : Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του προϊόντος πυρηνόφιλης υποκατάστασης, ένωση **31** (πάνω) και του προϊόντος αναγωγής της ένωσης **31**, ένωση **32** (κάτω), σε CDCl₃

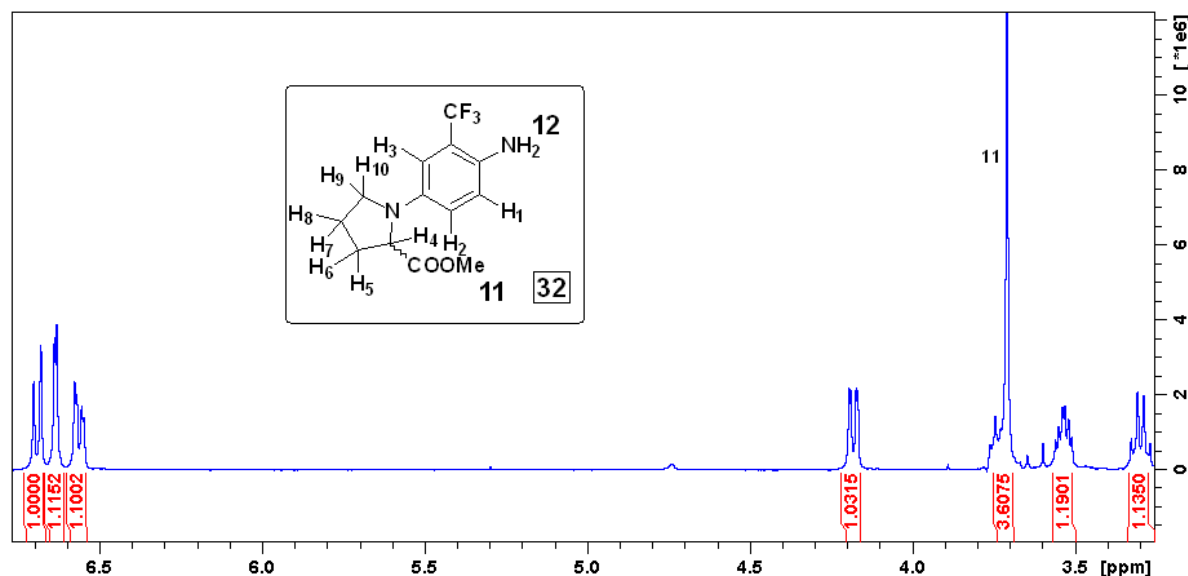
Στο φάσμα της ένωσης **32** αναμένουμε το H₃ να είναι πιο αποπροστατευμένο σε σχέση με το H₁ που βρίσκεται δίπλα στην αμινομάδα. Στο φάσμα ¹H NMR (Σχήμα 122) όμως, βλέπουμε το αντίθετο. Η ηλεκτρονική πυκνότητα (αδεσμικό ζεύγος) στο άτομο του αζώτου της τριτοταγούς αμίνης (προλίνης), που βρίσκεται σε συζυγία με τον αρωματικό δακτύλιο, είναι αυξημένη συγκριτικά με την ηλεκτρονική πυκνότητα της πρωτοταγούς αμινομάδας, λόγω της επίδρασης του θετικού επαγωγικού φαινομένου των μεθυλενομάδων της προλίνης προς το ενδοκυκλικό

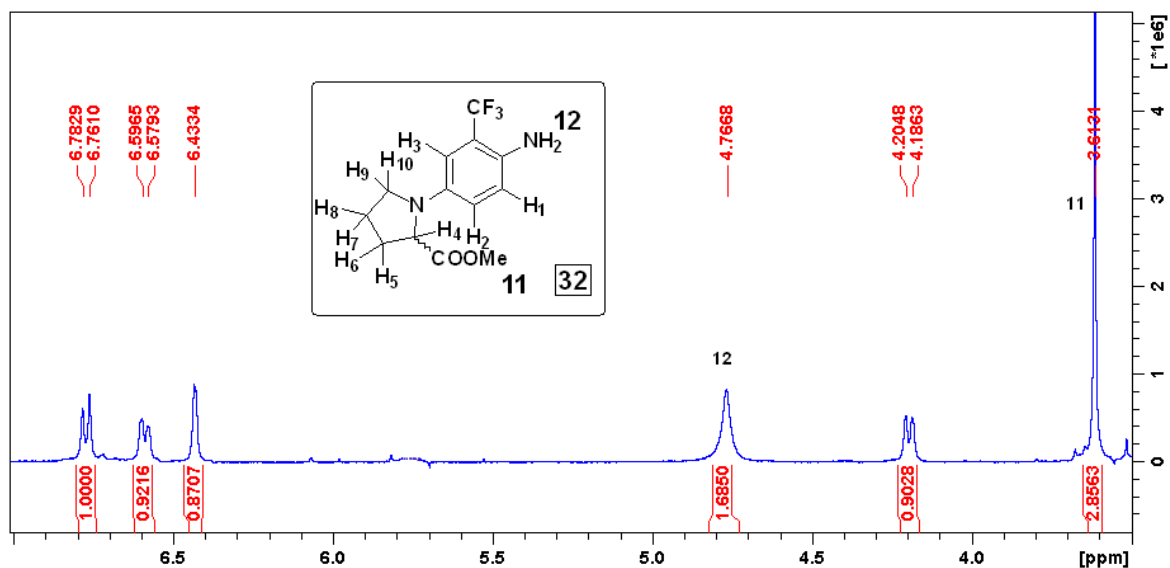
άζωτο (ροζ χρώμα, Σχήμα 123). Οπότε τα δυο πρωτόνια H₂ και H₃ προστατεύονται περισσότερο σε σχέση με το H₁, που βρίσκεται σε γειτονική θέση ως προς την πρωτοταγή αμινομάδα.



Σχήμα 123 : Ερμηνεία για τη σχετική προστασία και αποπροστασία των H₁, H₂ και H₃

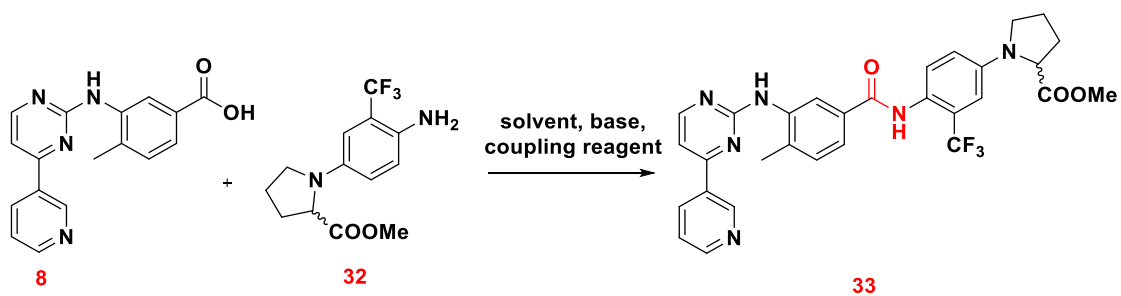
Επίσης, στο φάσμα ¹H NMR (CDCl₃) της ένωσης **32** (Σχήμα 122), παρατηρούμε ότι στα 3.71 ppm η απλή κορυφή έχει ολοκλήρωση 5 και αντιστοιχεί στα 3 πρωτόνια της μεθυλομάδας και στα 2 της αμινομάδας. Προσθέτοντας στο δείγμα D₂O η ολοκλήρωση μειώθηκε στο 3, γεγονός που υποδηλώνει την αλληλεπικάλυψη των πρωτονίων της αμινομάδας στην περιοχή αυτή, καθώς αυτά ανταλλάχθηκαν με δευτέριο. Τέλος, λαμβάνοντας το φάσμα της ένωσης **32** σε DMSO τα δυο αμινικά πρωτόνια καταγράφηκαν στα 4.76 ppm ως μια απλή ευρεία χαρακτηριστική κορυφή (Σχήμα 124).





Σχήμα 124: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος αναγωγής, ένωση **32**, σε $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$ (πάνω) και σε DMSO (κάτω)

Έχοντας στη διάθεση μας την ένωση **32**, με ελεύθερη την αμινομάδα, διενεργήσαμε μια σειρά δοκιμαστικών αντιδράσεων σύζευξης μεταξύ αυτής και του οξέος **8**. Ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης έχει περιγραφεί σε προηγούμενο εδάφιο και περιλαμβάνει πρώτα το σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα του οξέος και στη συνέχεια την προσθήκη της αμίνης.

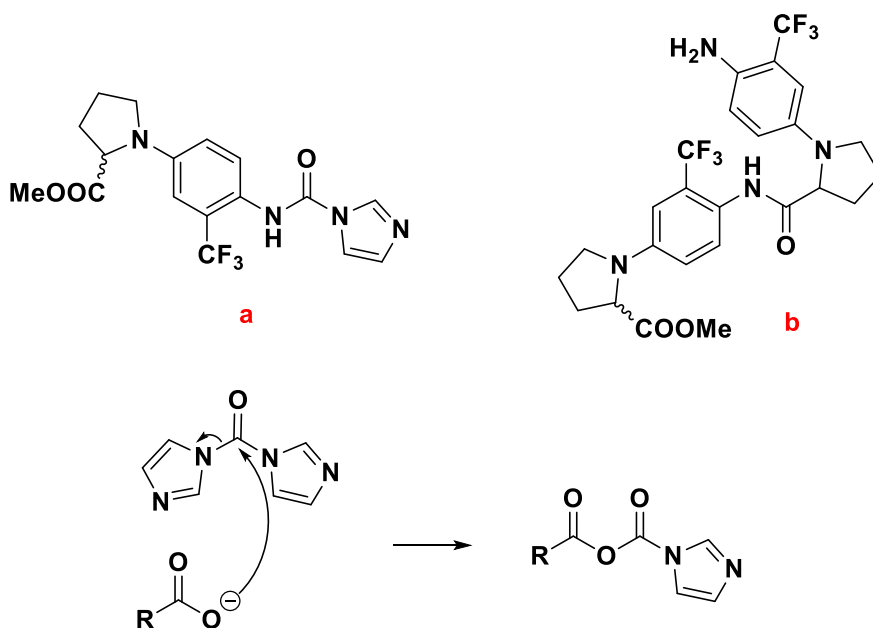


Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο σύζευξης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	THF/DMF	Et_3N	HATU	75 °C	24 h	-
2	DMF	DIPEA/DMAP	HATU	70 °C	45 h	< 10%
3	THF	Et_3N	CDI	66 °C	24 h	-

4	THF/DMF	Et ₃ N	PyBroP	66 °C	72 h	< 10%
5	DMF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	rt	96 h	< 10%

Σχήμα 125 : Αντίδραση και πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση του προϊόντος σύζευξης **33**

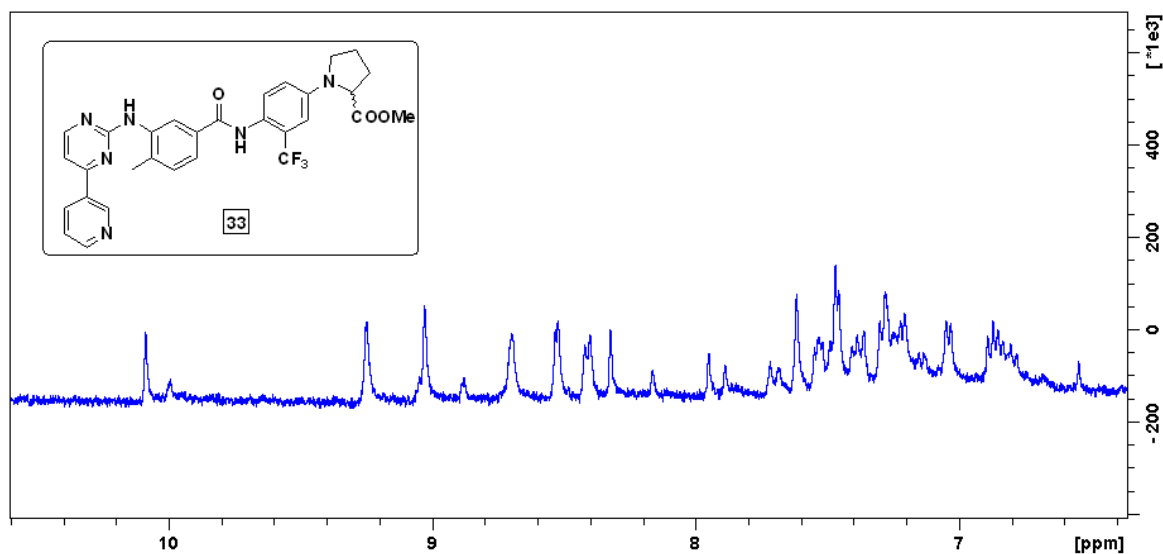
Με τις συνθήκες του πειράματος 1 δεν είδαμε στο φάσμα ¹H NMR κανένα αμιδικό πρωτόνιο. Λαμβάνοντας φάσμα ¹H NMR από την αντίδραση υπ' αριθμόν 4 του παραπάνω πίνακα, ένα αμιδικό πρωτόνιο καταγράφηκε στα 10.55 ppm, όμως παράλληλα, από το φάσμα απουσίαζαν τα πρωτόνια του πυριδινικού και πυριμιδινικού δακτυλίου του οξέος. Σύμφωνα με το φάσμα, καταλήξαμε ότι είναι πολύ πιθανό να σχηματίστηκε κάποιο από τα παρακάτω παραπροϊόντα (**a**, **b**).



Σχήμα 126 : Πιθανά σχηματισθέντα παραπροϊόντα κατά την αντίδραση σύζευξης.

Στις δυο παραπάνω περιπτώσεις η αμίνη (ένωση **32**) έδρασε με τον ίδιο τρόπο που θα έπρεπε να δράσει το ανιόν του οξέος **8**, προσφέροντας το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων της στον καρβονυλικό άνθρακα του αντιδραστηρίου σύζευξης, σχηματίζοντας έτσι έναν αμιδικό δεσμό με αυτό (παραπροϊόν **a**). Το παραπροϊόν **b**, πρόκειται για το διμερές της ένωσης **32**. Δεν ήταν εφικτό να ταυτοποιήσουμε πλήρως ποιά ένωση σχηματίστηκε, καθώς η ποσότητα του δείγματος δεν επαρκούσε.

Στα υπόλοιπα πειράματα που πραγματοποιήσαμε, τα φάσματα ^1H NMR που λάβαμε ήταν της ακόλουθης μορφής.

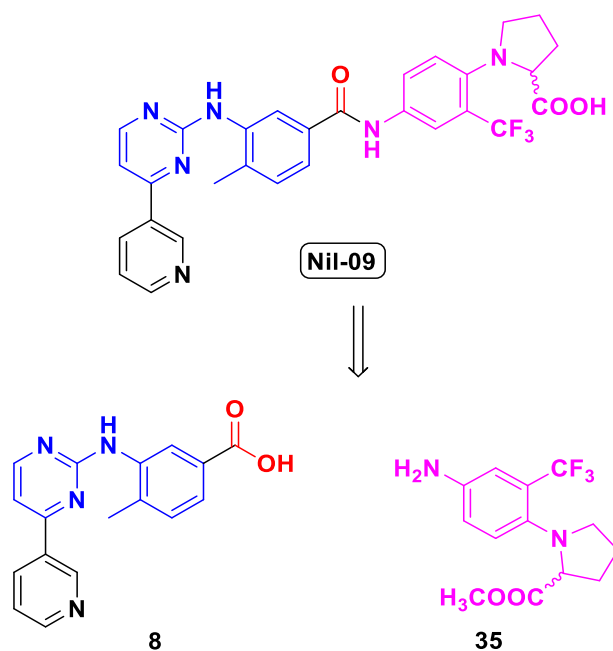


Σχήμα 127 : Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **33** σε DMSO

Στα 10.10 ppm περίπου το χαρακτηριστικό αμιδικό πρωτόνιο επιβεβαιώνει το σχηματισμό της επιθυμητής ένωσης. Επιπλέον, στις αναμενόμενες τιμές ppm βλέπουμε και τα πρωτόνια των τριών δακτυλίων του οξέος **8**. Παρόλα αυτά, η ένωση **33** δε σχηματίστηκε σε ικανοποιητική απόδοση και ο καθαρισμός της δεν ήταν εφικτός. Λόγω έλλειψης χρόνου και μη επαρκούς ποσότητας της ένωσης **33**, η τελική αντίδραση υδρόλυσης για το σχηματισμό του **Nil-08** δεν έλαβε χώρα. Στο εργαστήριο συνεχίζονται οι προσπάθειες εύρεσης των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών με σκοπό τη σύνθεση της ένωσης **33** σε υψηλή απόδοση και σε καθαρή μορφή, προκειμένου να ακολουθήσει η υδρόλυση του μεθυλεστέρα και κατ' επέκταση η λήψη του **Nil-08**.

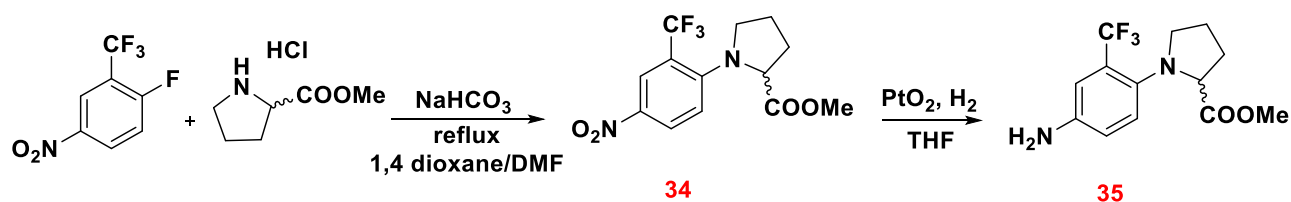
3.5.6.4 Σύνθεση του αναλόγου **Nil-09**

Κατ' ανάλογο τρόπο με τα παραπάνω παράγωγα, ξεκίνησε η σύνθεση του αναλόγου **Nil-09**.



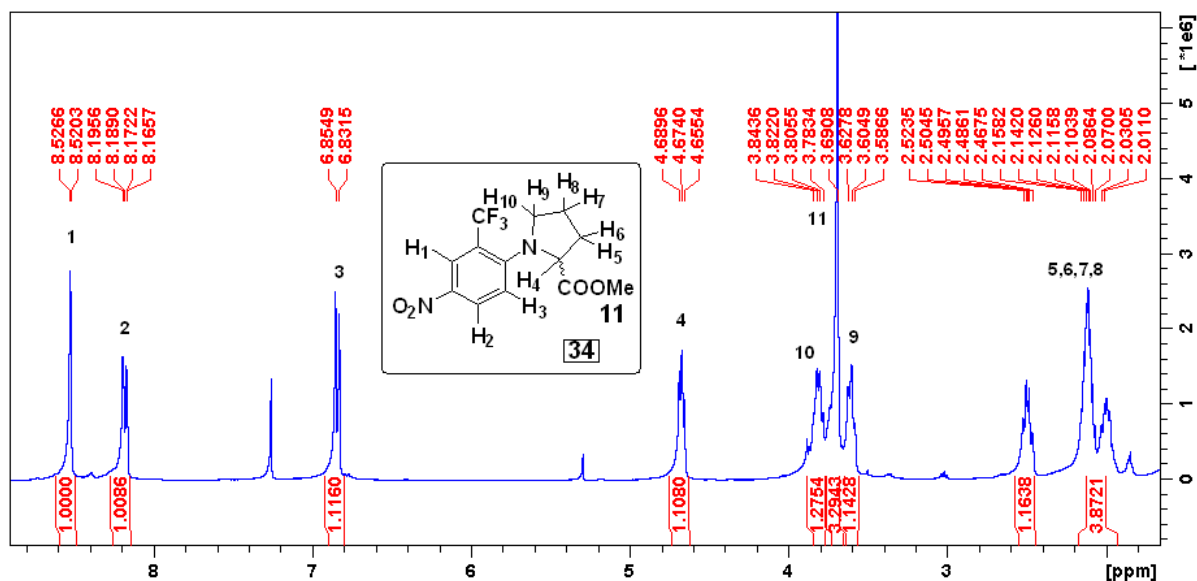
Σχήμα 128 : Αποσυνδετική προσέγγιση για τη σύνθεση του αναλόγου Nil-09

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση διενεργήθηκε μεταξύ του 2-φθορο-5-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου και του υδροχλωρικού άλατος του μεθυλεστέρα της προλίνης. Η ακόλουθη αναγωγή έδωσε το επιθυμητό προϊόν **35** σε πολύ καλή απόδοση (~70%).



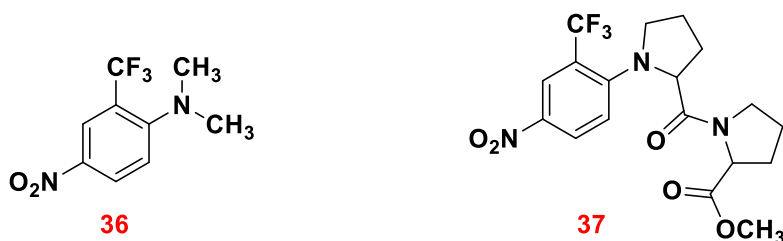
Σχήμα 129 : Πειραματική πορεία σύνθεσης της ένωσης **35**

Όπως υποδεικνύει και το φάσμα της ένωσης **34** στο Σχήμα 130, αυτή απομονώθηκε καθαρή και όλα τα πρωτόνια εμφανίζουν τις ίδιες περίπου χημικές μετατοπίσεις και σχάσεις, όπως στα αντίστοιχα προϊόντα πυρηνόφιλων αρωματικών υποκαταστάσεων των αναλόγων που προαναφέρθηκαν στα προηγούμενα εδάφια.

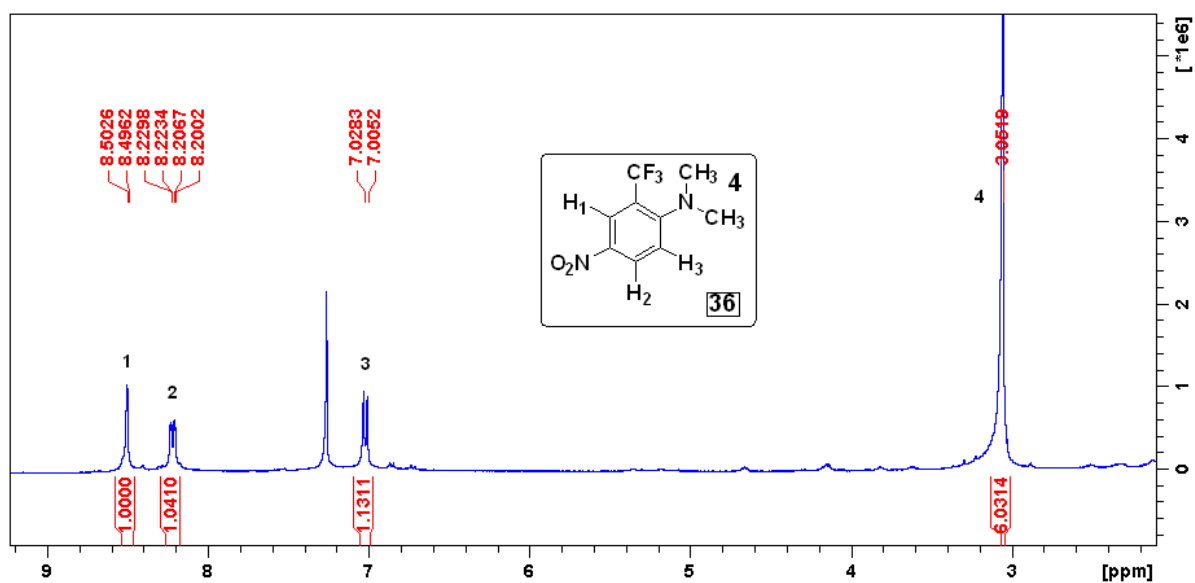


Σχήμα 130 : Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του προϊόντος πυρηνόφιλης υποκατάστασης, ένωση **34** σε CDCl₃

Κατά την αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, ωστόσο, σχηματίστηκαν κάποια ανεπιθύμητα παραπροϊόντα. Δεδομένου ότι η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη DMF και σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία, ο διαλύτης διασπάστηκε, σχηματίζοντας μικρή ποσότητα διμεθυλαμίνης. Η διμεθυλαμίνη λειτούργησε ως πυρηνόφιλο σε μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, δίνοντας το ανεπιθύμητο προϊόν **36**. Κατ' ανάλογο τρόπο σχηματίστηκε και το παραπροϊόν **37**. Ο μεθυλεστέρας της ένωσης **34** υδρολύθηκε και το υδροχλωρικό άλας του μεθυλεστέρα, που στην αντίδραση υπήρχε σε περίσσεια, προσέβαλε τον καρβονυλικό άνθρακα, δίνοντας το προϊόν άκυλο-υποκατάστασης (Σχήμα 131).

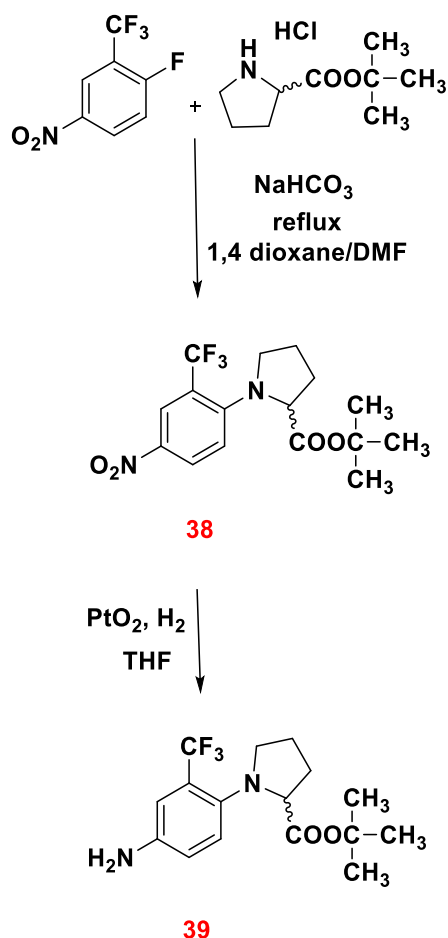


Σχήμα 131 : Παραπροϊόντα κατά την πυρηνόφιλη υποκατάσταση του 2-φθορο-5-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου



Σχήμα 132: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του παραπροϊόντος **36** σε CDCl₃

Προκειμένου να αποφύγουμε το σχηματισμό των παραπάνω παραπροϊόντων, διενεργήσαμε την αντίδραση σε χαμηλότερη θερμοκρασία, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά tert-βουτυλεστέρα ως προστατευτική ομάδα, καθώς η υδρόλυση του δεν ευνοείται στις ως άνω συνθήκες της αντίδρασης.

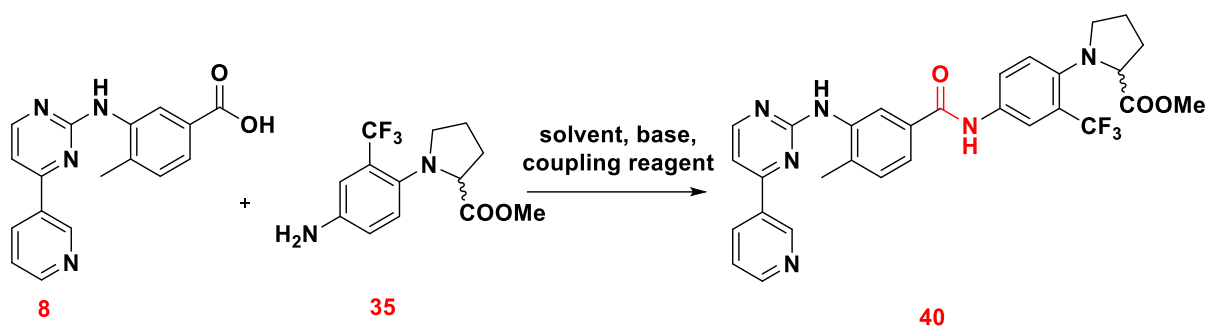


Σχήμα 133 : Εναλλακτική πειραματική πορεία σύνθεσης της ένωσης **39**

Η ένωση **38** συντέθηκε επιτυχώς και απομονώθηκε καθαρή. Όμως παρόλα αυτά, αναπόφευκτος ήταν ο μερικώς σχηματισμός της ένωσης **36** και του αντίστοιχου διμερούς, όπως στο Σχήμα 131.

Η αντίδραση αναγωγής του **34** έγινε ποσοτικά λαμβάνοντας το προϊόν **35**. Αντίθετα, κατά την αναγωγή της ένωσης **38** σχηματίστηκαν παραπροϊόντα. Δεν έγινε λήψη φασμάτων των δυο ανηγμένων ενώσεων, καθώς αμέσως μετά το σχηματισμό τους χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη με το οξύ.

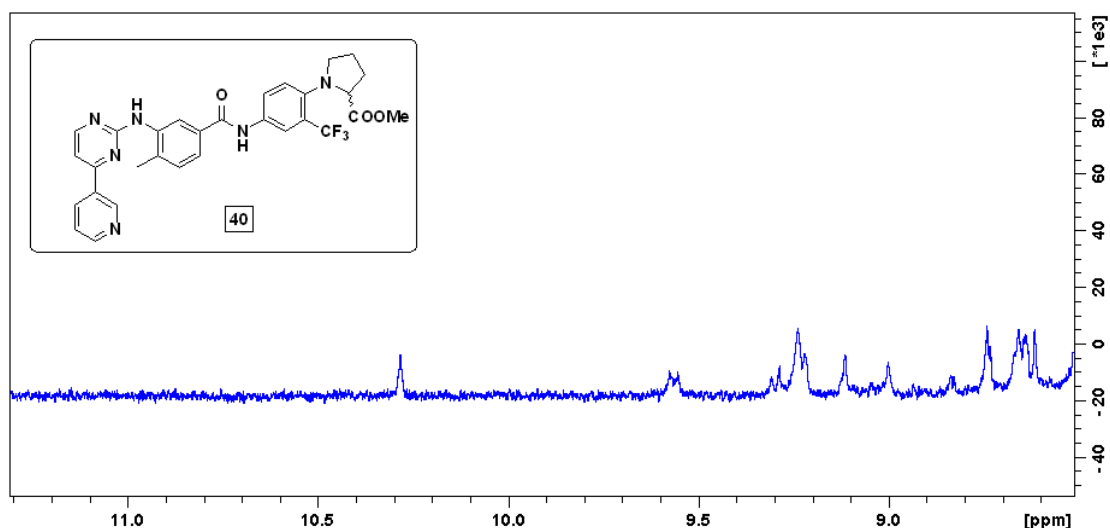
Για το σχηματισμό της ένωσης **40** εφαρμόστηκαν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες, όπως και στην περίπτωση σύνθεσης της ένωσης **33**.



Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο σύζευξης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	DMF	DIPEA/DMAP	HATU	90 °C	5 days	< 10%
2	THF/DMF	Et ₃ N	PyBroP	40 °C	5 days	< 10%

Σχήμα 134 : Αντίδραση και πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση του προϊόντος σύζευξης **40**

Και στην περίπτωση αυτή, το επιθυμητό προϊόν δε σχηματίστηκε σε μεγάλη ποσότητα. Όπως υποδεικνύει το φάσμα ¹H NMR, ο αμιδικός δεσμός (10.28 ppm) σχηματίστηκε, ενώ εμφανίζονται και τα πρωτόνια των υπόλοιπων δακτυλίων του οξέος **8**.



Σχήμα 135: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του προϊόντος σύζευξης **40** σε DMSO

Οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, προκειμένου να απομονώσουμε σε επαρκή ποσότητα και καθαρή την ένωση **40**, δεν έχουν ακόμη βρεθεί. Συνεπώς δεν κατέστη δυνατή η τελική αντίδραση υδρόλυσης του μεθυλεστέρα για τη λήψη του τελικού αναλόγου **Nil-09**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Μεθοδολογία

4.1 Συσκευές και όργανα

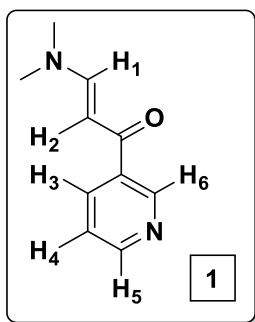
Η λήψη φασμάτων πυρηνικού συντονισμού έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AMX 400 και 250. Η λήψη φασμάτων μάζας έγινε επίσης στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Τα σημεία τήξεως των ενώσεων προσδιορίστηκαν σε συσκευή Buchi 510.

Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρίες Aldrich, Merck και Alfa Aesar και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία. Οι διαλύτες προέρχονται από τις παραπάνω εταιρίες και, όπου ήταν απαραίτητο, κατέστησαν απόλυτοι και διατηρήθηκαν σε άνυδρες συνθήκες. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται επίσης από τις παραπάνω εταιρείες.

Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F₂₅₄ ms Aldrich και πλάκες silicagel F₂₅₄ ms της Merck. Στους διαχωρισμούς μιγμάτων ενώσεων εφαρμόστηκε χρωματογραφία στήλης με silica gel F₂₅₄ της Aldrich.

4.2 Σύνθεση εναμινόνης, ένωση (1)

Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml φέρεται διάλυμα 3-ακετυλοπυριδίνης (4 ml, d=1.102 g/ml, 36.3 mmol) σε ο-ξυλόλιο (~15ml) και θερμαίνεται στους 100 °C με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και σε ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί στάγδην και υπό ανάδευση διάλυμα *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφακετάλης (7.5 ml, d=0.859 g/ml, 43 mmol) σε οξυλόλιο (5 ml) και το μίγμα θερμαίνεται στους 150 °C για 48 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, συμπυκνώνεται ο διαλύτης μέχρι το ήμισυ της αρχικής του ποσότητας και προστίθεται Et₂O. Το μίγμα ψύχεται μέχρι να καταβυθιστεί ποσοτικά ίζημα (~24 h), οπότε και ακολουθεί διήθηση και έκπλυση του ιζήματος με ψυχρό διαιθυλαιθέρα. Η εναμινόνη απομονώνεται ως κίτρινο κρυσταλλικό στερεό (78%).



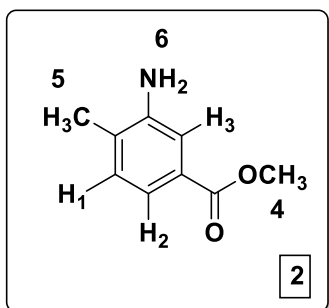
Σ.Τ. : 83-85 °C

¹H NMR (250MHz, CDCl₃) δ: 2.95 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 5.68 (d, J=12.2Hz, 1H, H₂), 7.34 (dd, J_{H₃-H₄}= 7.4 Hz, J_{H₅-H₄}= 4.8 Hz, 1H, H₄), 7.84 (d, J=12.2 Hz, 1H, H₁), 8.18 (dt, J= 7.4 Hz, J= 3.9 Hz, 1H, H₃), 8.66 (dt, J= 4.8 Hz, J= 1.6 Hz, 1H, H₅), 9.07 (d, J= 1.6 Hz, 1H, H₆) ppm

4.3 Προστασία του καρβοξυλικού οξέος

4.3.1 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση (2)

Σε σφαιρική φιάλη των 150 ml φέρεται διάλυμα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος (9.94 g, 66 mmol) σε απόλυτη μεθανόλη (120 ml) και προστίθεται στάγδην πυκνό H₂SO₄ (4 ml) στους 0 °C, υπό ατμόσφαιρα αργού. Αφού προστεθεί το θειϊκό οξύ, το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (65 °C) για 24 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης και αφού το μίγμα ψυχθεί, η μεθανόλη συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Στους 0 °C προστίθεται H₂O και κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ μέχρι pH = 8-9. Έτσι, μεταφέρεται το υπολειπόμενο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ υπό μορφή μετά νατρίου άλατος στην υδατική φάση. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₃COOCH₂CH₃. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Διηθείται το Na₂SO₄ και ο οξικός αιθυλεστέρας συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προϊόν απομονώνεται ως πορτοκαλί στερεό (70%).



Σ.Τ. : 84-86 °C

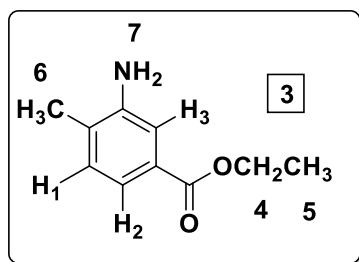
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 2.21 (s, 3H, H₅), 3.69 (s, 2H, H₆), 3.87 (s, 3H, H₄), 7.09 (d, J= 7.6 Hz, 1H, H₁), 7.34 (s, 1H, H₃), 7.37 (d, J=7.9 Hz, 1H, H₂) ppm

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 17.60, 51.94, 115.60, 119.83, 127.67, 128.93, 130.42, 144.68, 167.46 ppm

¹H NMR (400MHz, D₂O) δ : 2.20 (s, 3H, H₅), 3.66 (s, 2H, H₆), 3.88 (s, 3H, H₄), 7.10 (d, J= 7.6 Hz, 1H, H₁), 7.36 (s, 1H, H₃), 7.38 (d, J= 8.6 Hz, 1H, H₂) ppm

4.3.2 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα, ένωση (3)

Σε σφαιρική φιάλη των 150 ml φέρεται διάλυμα 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος (9.94 g, 66 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (120 ml) και προστίθεται στάγδην πυκνό H₂SO₄ (4 ml) στους 0 °C, υπό ατμόσφαιρα αργού. Αφού προστεθεί τοθειικό οξύ, το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (78 °C) για 24 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης και αφού το μίγμα ψυχθεί, η αιθανόλη συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Στους 0 °C προστίθεται H₂O και κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ μέχρι pH = 8-9. Έτσι, μεταφέρεται το υπολειπόμενο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ υπό μορφή μετά νατρίου άλατος στην υδατική φάση. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₃COOCH₂CH₃. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Διηθείται το Na₂SO₄ και ο οξικός αιθυλεστέρας συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προϊόν απομονώνεται ως στερεό, χρώματος αχνού πορτοκαλί (40%).



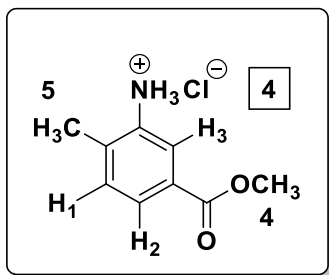
Σ.Τ. : 65-71 °C

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 1.37 (t, 3H, H₅), 2.2 (s, 3H, H₆), 3.69 (s, 2H, H₇), 4.34 (q, 2H, H₄), 7.09 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H₁), 7.34 (s, 1H, H₃), 7.38 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H₂) ppm

4.3 Αντιδράσεις σύνθεσης υδροχλωρικών αλάτων

4.3.1 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση (4)

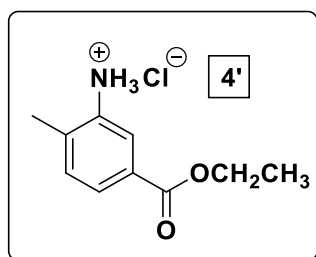
Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα **2** (4.0 g, 24 mmol) σε μεθανόλη (20 ml) και προστίθεται HCl 37% (5 ml) υπό ψύξη. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, συμπυκνώνεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού και προστίθεται Et₂O, οπότε καταβυθίζεται το άλας. Ακολουθεί διήθηση σε ηθμό Buchner και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν τοποθετείται σε ξηραντήρα με P₂O₅ και απομονώνεται ως στερεό αχνού κόκκινου χρώματος (95%).



^1H NMR (400MHz, D_2O) δ : 2.45 (s, 3H, H_5), 3.95 (s, 3H, H_4), 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_1), 7.94 (s, 1H, H_3), 7.98 (dd, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H, H_2) ppm

4.3.2 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα, ένωση (4')

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα **3** (1.27 g, 7 mmol) σε μεθανόλη (15 ml) και προστίθεται HCl 37% (1.5 ml) υπό ψύξη. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, συμπυκνώνεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού και προστίθεται Et_2O , οπότε καταβυθίζεται το άλας. Ακολουθεί διήθηση σε ηθμό Buchner και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν τοποθετείται σε ξηραντήρα με P_2O_5 και απομονώνεται ως στερεό αχνού καφέ χρώματος (95%).

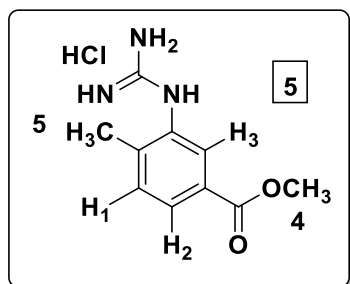


4.4 Αντιδράσεις σύνθεσης υδροχλωρικών αλάτων γουανιδίνης

4.4.1 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση (5)

Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθεται κυαναμίδιο (6.0 g, 86 mmol) και τήκεται υπό ανάδευση στους 45 °C, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολούθως, προστίθεται το υδροχλωρικό άλας του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα **2** (2.11 g, 12.7 mmol). Η θέρμανση συνεχίζεται στους 70 °C για 2 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται Et_2O υπό ανάδευση έως ότου το ελαιώδες υπόλειμμα μετατραπεί σε λεπτόκοκκο στερεό ίζημα. Ο αιθέρας μεταφέρεται σε

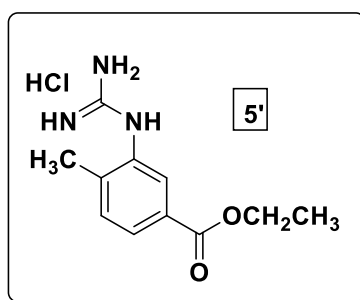
ποτήρι ζέσεως και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές με διαιθυλαιθέρα και THF. Το προϊόν διηθείται σε ηθμό Buchner, εκπλύνεται με Et₂O και παραλαμβάνεται ως αχνό ροζ στερεό (90%).



¹H NMR (400MHz, D₂O) δ: 2.38 (s, 3H, H₅), 3.94 (s, 3H, H₄), 7.51 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H₁), 7.89 (s, 1H, H₃), 7.93 (d, J= 8.7 Hz, 1H, H₂) ppm

4.4.1 Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα, ένωση (5')

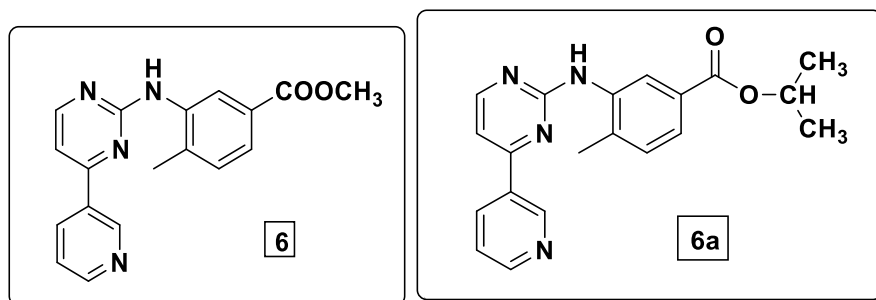
Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθεται κυαναμίδιο (6.23 g, 88 mmol) και τήκεται υπό ανάδευση στους 45 °C με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολούθως, προστίθεται το υδροχλωρικό άλας του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού αιθυλεστέρα **3** (2.11 g, 11.8 mmol). Η θέρμανση συνεχίζεται στους 70 °C για 2 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται Et₂O υπό ανάδευση έως ότου το ελαιώδες υπόλειμμα μετατραπεί σε λεπτόκοκκο στερεό ίζημα. Ο αιθέρας μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές με διαιθυλαιθέρα και THF. Το προϊόν διηθείται σε ηθμό Buchner, εκπλύνεται με Et₂O και παραλαμβάνεται ως αχνό καφέ στερεό (90%).



4.5 Αντιδράσεις σύνθεσης των φαινολ-αμινο-πυριμιδινών

4.5.1 Προσπάθεια σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση (6)

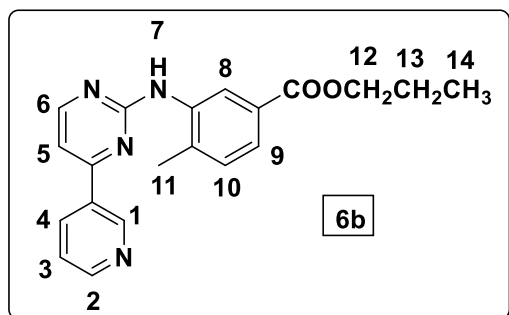
Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα της ένωσης **5** (4.0 g, 16.4 mmol) σε *i*-PrOH (50 ml) και προστίθεται υπό ανάδευση περίσσεια άνυδρου K₂CO₃ (6.36 g, 46 mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100 °C και προστίθεται η εναμινόνη **1** (2.59 g, 14.7 mmol). Η θέρμανση συνεχίζεται στους 100 °C υπό ανάδευση για 48 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα διηθείται για απομάκρυνση της περίσσειας K₂CO₃ και στη συνέχεια εκχυλίζεται με H₂O και CH₂Cl₂. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH₃COOCH₂CH₃/CH₂Cl₂ 12:1. Απομονώνεται το επιθυμητό προϊόν και το προϊόν μετεστεροποίησης, ο αντίστοιχος ισοπροπυλεστέρας, σε αναλογία περίπου 1:1 (ένωση **6a**).



4.5.2 Προσπάθεια σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση (6)

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα της ένωσης **5** (4.0 g, 16.4 mmol) σε *n*-PrOH (50 ml) και προστίθεται υπό ανάδευση περίσσεια άνυδρου K₂CO₃ (6.36 g, 46 mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100 °C και προστίθεται η εναμινόνη **1** (2.59 g, 14.7 mmol). Η θέρμανση συνεχίζεται στους 100 °C υπό ανάδευση για 48 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα διηθείται για απομάκρυνση της περίσσειας K₂CO₃ και στη συνέχεια εκχυλίζεται με H₂O και CH₂Cl₂. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το μίγμα

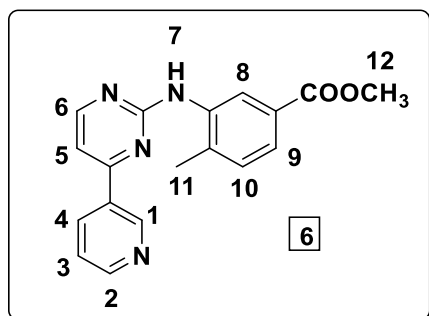
καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 12:1). Απομονώνεται το επιθυμητό προϊόν και το προϊόν μετεστεροποίησης, ο αντίστοιχος προπυλεστέρας (ένωση **6b**) σε αναλογία 2:1.



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO) δ : 0.92(t, 3H, H_{14}), 1.70 (m, 2H, H_{13}), 4.23 (t, 2H, H_{12}), 7.39 (d, $J= 7.9$ Hz, 1H, H_{10}), 7.49 (d, $J= 5.2$ Hz, 1H, H_5), 7.54 (dd, $J_{\text{H}_3-\text{H}_4}= 7.8$ Hz, $J_{\text{H}_3-\text{H}_2}= 4.9$ Hz, 1H, H_3), 7.66 (d, $J= 7.8$ Hz, 1H, H_9), 8.36 (s, 1H, H_8), 8.44 (dt, $J= 8.1$ Hz, 1H, H_4), 8.56 (d, $J= 5.1$ Hz, 1H, H_6), 8.71 (d, $J= 4.6$ Hz, $J= 1.2$ Hz, 1H, H_2), 9.09 (s, 1H, H_7), 9.29 (s, 1H, H_1) ppm

4.5.3 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση (6)

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα της ένωσης **5** (3.52 g, 14.4 mmol) σε *n*-PrOH (20 ml) και προστίθεται υπό ανάδευση περίσσεια άνυδρου K_2CO_3 (5.59 g, 40.4 mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100 °C και προστίθεται η εναμινόνη **1** (2.33 g, 13.2 mol). Η θέρμανση συνεχίζεται στους 100 °C υπό ανάδευση για 48 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα διηθείται για απομάκρυνση της περίσσειας K_2CO_3 και στη συνέχεια εκχυλίζεται με H_2O και CH_2Cl_2 . Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 12:1). Το προϊόν απομονώθηκε ως υποκίτρινο στερεό (70%).



Σ.Τ. : 116-118°C

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO) δ : 2.35 (s, 3H, H_{11}), 3.85 (s, 3H, H_{12}), 7.36 (d, $J= 7.8$ Hz, 1H, H_{10}), 7.47 (d, $J= 5.1$ Hz, 1H, H_5), 7.53 (dd, $J_{\text{H}_3-\text{H}_4}= 7.9$ Hz, $J_{\text{H}_3-\text{H}_2}= 4.8$ Hz 1H, H_3), 7.64 (d, $J= 7.8$ Hz, 1H, H_9), 8.43 (s, 2H, H_4 , H_8),

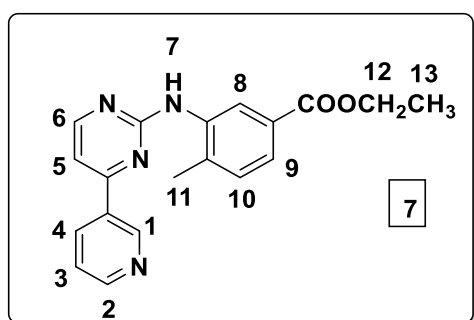
8.54 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.69 (d, J= 4.5 Hz, 1H, H₂), 9.04 (s, 1H, H₇), 9.30 (s, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (400 MHz, DMSO) δ : 19.07, 52.80, 108.91, 124.57, 125.23, 125.32, 128.26, 131.43, 132.80, 134.99, 137.75, 138.98, 148.94, 152.26, 160.36, 161.50, 162.26, 167.01 ppm

4.5.4 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινοβενζοϊκού αιθυλεστέρα, ένωση (7)

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα της ένωσης 5' (1.26 g, 4.9 mmol) σε *i*-PrOH (45 ml) και προστίθεται υπό ανάδευση περίσσεια ανυδρου K₂CO₃ (2.0 g, 14.4 mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100 °C και προστίθεται η εναμινόνη 1 (0.80 g, 4.5 mmol). Η θέρμανση συνεχίζεται στους 100 °C υπό ανάδευση για 48 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το διάλυμα διηθείται για απομάκρυνση της περίσσειας K₂CO₃ και στη συνέχεια εκχυλίζεται με H₂O και CH₂Cl₂. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (CH₃COOCH₂CH₃/CH₂Cl₂ 12:1). Το προϊόν απομονώθηκε ως υποκίτρινο στερεό (24%).

Σ.Τ. : 59-61 °C



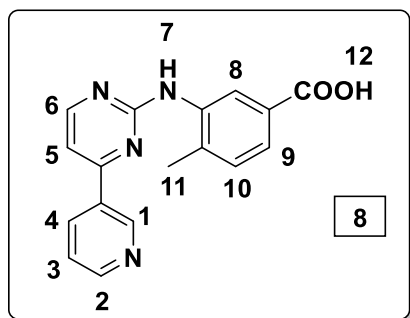
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 1.4 (s, 3H, H₁₃), 2.43 (s, 3H, H₁₁), 4.4 (q, 2H, H₁₂), 7.27 (s, 1H, H₁₀), 7.32 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H₅), 7.59 (dd, J_{H3-H4}= 7.9 Hz, J_{H3-H2}= 5.1 Hz, 1H, H₃), 7.77 (dd, J= 7.8 Hz, J= 1.4 Hz, 1H, H₉), 7.84 (s, 1H, H₇), 8.53 (d, J= 5.3 Hz, 1H, H₆), 8.62 (dt, J= 8.1 Hz, J= 3.4 Hz, 1H, H₄), 8.76 (s, 1H, H₈), 8.78 (s, 1H, H₂), 9.32 (s, 1H, H₁) ppm

4.6 Αντίδραση υδρόλυσης του βενζοϊκού μεθυλεστέρα (6) / αιθυλεστέρα (7) / προπυλεστέρα(6b)

4.6.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2υλο)αμινοβενζοϊκού οξέος, ένωση (8)

Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml φέρεται διάλυμα του μεθυλεστέρα **6** (1.95 g, 6.08 mmol) σε CH₂Cl₂ (10 ml) και προστίθεται υπό ανάδευση NaOH 2N (3 ml). Μετά την προσθήκη του NaOH το μίγμα αναδεύεται για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται, το ίζημα διαλύεται σε H₂O και οξινίζεται με HCl 1.2N μέχρι pH = 5-6. Το γαλάκτωμα που δημιουργείται διηθείται σε ηθμό Buchner και εκπλύνεται με Et₂O. Στην περίπτωση όπου το προϊόν έχει κατακρατήσει H₂O, διαλύεται σε αιθανόλη, δημιουργώντας έτσι αζεotropικό μίγμα νερού-αιθανόλης με αποτέλεσμα η περίσσεια νερού να απομακρύνεται ευκολότερα. Το προϊόν απομονώνεται ως κίτρινο στερεό (97%).

Κατά την υδρόλυση του βενζοϊκού αιθυλεστέρα **7**, η αντίδραση πραγματοποιείται στους ~60 °C για 48 h, ενώ στην περίπτωση του βενζοϊκού προπυλεστέρα **6b** η αντίδραση διαρκεί μέχρι και μια εβδομάδα. Σε όλες τις περιπτώσεις η επεξεργασία που ακολουθεί είναι η ίδια, λαμβάνοντας το επιθυμητό οξύ **8**.



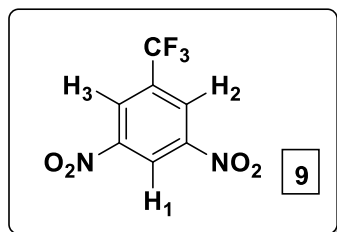
¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 2.33 (s, 3H, H₁₁), 7.36 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.49 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₅), 7.53 (dd, J_{H3-H4}= 7.9 Hz, J_{H3-H2}= 4.7 Hz, 1H, H₃), 7.64 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H₉), 8.30 (s, 1H, H₈), 8.45 (dt, J= 8.1 Hz, J= 3.2 Hz, 1H, H₄), 8.55 (d, J= 5.2Hz, 1H, H₆), 8.69 (d, J= 4.4 Hz, 1H, H₂), 9.06 (s, 1H, H₇), 9.23 (d, J= 1.5 Hz, 1H, H₁), 12.76 (s, 1H, H₁₂) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₁₇H₁₄N₄O₂, m/z = 306.1117, βρέθηκε ότι για το [C₁₇H₁₄N₄O₂ +H]⁺ το m/z = 307.1177

4.7 Σύνθεση του 1,3-δινιτρο-5-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου, ένωση (9)

Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml φέρεται το 3-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (5.74 g, 4ml, d= 1.485 g/ml, 24 mmol) και υπό ανάδευση προστίθεται διάλυμα HNO₃

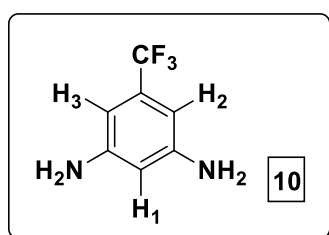
100% (6 ml) σε H₂SO₄ (18 ml) στάγδην. Το μίγμα θερμαίνεται στους 150 °C για 72 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα εκχυλίζεται με H₂O και CH₂Cl₂ και το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών *n*-hexane/CH₂Cl₂ 3:1. Το προϊόν απομονώνεται ως υποκίτρινο κρυσταλλικό στερεό (50%).



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 8.84 (s, 2H, H₂, H₃),
9.26 (s, 1H, H₁) ppm

4.8 Σύνθεση του 1,3-διάμινο-5-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου, ένωση (10)

Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml φέρεται το 1,3-δινιτρο-5-(τριφθορομεθυλο)βενζόλιο **9** (60 mg, 0.25 mmol) και 4 ml απόλυτου THF. Υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα H₂ γίνεται η προσθήκη PtO₂ (39 mg, 0.17 mmol). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ποσοστό 100% σε 2 h. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της, ακολουθεί διήθηση αυτής σε τριπλό πτυχωτό ηθμό, για την απομάκρυνση του καταλύτη και τέλος απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το 1,3-διαμινο-5-(τριφθορομεθυλο)βενζόλιο απομονώθηκε ως κίτρινη ελαιώδης ουσία.



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ : 3.72 (s, 4H, -NH₂),
6.10 (s, 1H, H₁), 6.31 (s, 2H, H₂, H₃) ppm

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 5.15 (s, 4H, -NH₂),
5.99 (s, 1H, H₁), 6.03 (s, 2H, H₂, H₃) ppm

4.9 Σύνθεση του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου, ένωση (11)

Για τη σύνθεση του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** πραγματοποιήθηκε μια σειρά αντιδράσεων προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες για τη λήψη του προϊόντος σε υψηλή απόδοση. Σε κάθε περίπτωση, σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, σε υπό ανάδευση διάλυμα του οξέος **8** (0.1 g, 0.33 mmol), σε απόλυτο διαλύτη

(2 ml) υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται υπό ψύξη η εκάστοτε βάση και το αντιδραστήριο σύζευξης. Οι αναλογίες των αντιδρώντων και η ποσότητα του διαλύτη για κάθε πείραμα αποτυπώνονται στον Πίνακα 10. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα, σύμφωνα με το χρόνο και στη θερμοκρασία που καταγράφεται στον Πίνακα 3. Στη συνέχεια, στο μίγμα προστίθεται στάγδην, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού το 1,3-διαμινο-5-(τριφθορομεθυλο)βενζόλιο **10** (74.6 mg, 0.42 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη (1 ml). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στην περίπτωση που ως διαλύτης χρησιμοποιείται DMF, τα υπολείμματά του απομακρύνονται στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στα πειράματα 1-4, το μίγμα της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με διαφορετικά συστήματα έκλυσης, όπως υποδεικνύει ο Πίνακας 10. Στα πειράματα 5 και 6, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη, προστίθεται στη σφαιρική φιάλη CH₂Cl₂, καταβυθίζοντας έτσι ως ίζημα το επιθυμητό προϊόν. Το N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο απομονώθηκε ως υποκίτρινο στερεό σε απόδοση κυμαινόμενη από 10-80%, ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος Πίνακα 3.

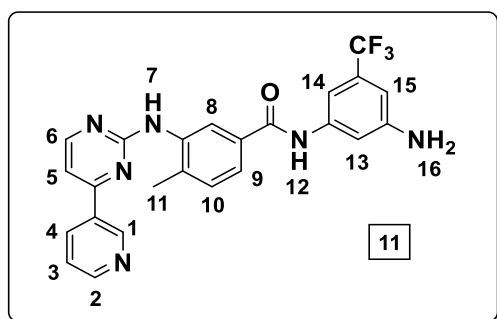
Πίνακας 3 : Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης **11**

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο Σύζευξης	Χρόνος και θερμοκρασία σχηματισμού ενεργοποιημένου εστέρα	Χρόνος και θερμοκρασία αντίδρασης	Απόδοση
1	THF	Et ₃ N	PyBroP	20 min, 0 °C 10 min, rt	21 h, rt	~10%
2	THF	Et ₃ N	DCC	30 min, 0 °C 10 min, rt	24 h, 30 °C	0%
3	THF	Et ₃ N	TBTU	30 min, 0 °C 10 min, rt	4 days, rt	~20%

4	THF	Et ₃ N	TBTU, HOBt	40 min, 0 °C 10 min, rt	6 days, 40 °C	50%
5	THF	Et ₃ N, DIPEA	TBTU	1 h 30 min, -97.6 °C (MeOH) 20 min, rt	4 days, 50 °C	50%
6	DMF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	10 min, rt	48 h, rt	80%

Πίνακας 10 : Αναλογίες των αντιδρώντων και συστήματα διαλυτών κατά τη χρωματογραφία στήλης

Πείραμα	Ισοδύναμα οξέος 8	Ισοδύναμα διαμίνης 10	Ισοδύναμα αντιδραστήριου σύζευξης	Ισοδύναμα βάσης	Διαλύτης (ml)	Σύστημα διαλυτών κατά τη χρωματογραφία στήλης
1	1	1.3	1.1	περίσσεια	3 ml	5:5:1(CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ : MeOH)
2	1	1.3	1.1	περίσσεια	3 ml	5:5:1(CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ COOCH ₂ CH ₃ : MeOH)
3	1	1.3	1.1	περίσσεια	3 ml	6:2:0.5(CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ COCH ₃ : MeOH)
4	1	1.3	1.1	περίσσεια	6 ml	8:4:0.5(CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ COCH ₃ : MeOH)
5	1	1.1	1.1	περίσσεια	6 ml	-
6	1	1.3	1.1	περίσσεια	6 ml	-



¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 2.33 (s, 3H, H₁₁), 5.62 (s, 2H, H₁₆), 6.58 (s, 1H, H₁₃), 7.24 (s, 1H, H₁₅), 7.37 (s, 1H, H₁₄), 7.40 (d, J= 8.1 Hz, 1H, H₁₀), 7.47 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₅), 7.49 (dd, J_{H3-H4}= 7.9 Hz, J_{H3-H2}= 4.8 Hz, 1H, H₃), 7.71 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H₉), 8.23 (s, 1H, H₈), 8.44 (dt, J= 8.4 Hz, J= 3.4 Hz, 1H, H₄), 8.54 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₆), 8.68 (dd, J= 4.0 Hz, J_{H2-H4}= 3.3 Hz, J_{H2-H1}= 3.2 Hz, 1H, H₂), 9.14 (s, 1H, H₇), 9.26 (d, J= 1.8 Hz, 1H, H₁), 10.14 (s, 1H, H₁₂) ppm

4.10 Σύνθεση της ένωσης 12

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη, σε υπό ανάδευση διάλυμα της N-Boc γλυκίνης, σε απόλυτο διαλύτη, υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται υπό ψύξη η εκάστοτε βάση και το αντιδραστήριο σύζευξης. Οι αναλογίες των αντιδρώντων και η ποσότητα του διαλύτη για κάθε πείραμα καταγράφονται στον Πίνακα 11. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα, σύμφωνα με το χρόνο και τη θερμοκρασία που καταγράφεται στον Πίνακα 5. Στη συνέχεια, στο παραπάνω μίγμα, προστίθεται στάγδην, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού το N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο **11**, το οποίο έχει ήδη διαλυθεί στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στην περίπτωση που ως διαλύτης χρησιμοποιείται DMF, απομακρύνεται στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στα πειράματα 1-3, το μίγμα της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 11. Στο πείραμα 4, μετά την απομάκρυνση του διαλύτη, προστίθεται στη σφαιρική φιάλη CH₂Cl₂, καταβυθίζοντας έτσι ως ίζημα το επιθυμητό προϊόν. Η ένωση **12** απομονώθηκε ως λευκό στερεό σε απόδοση 95% (πείραμα 4, Πίνακας 4, Πίνακας 11).

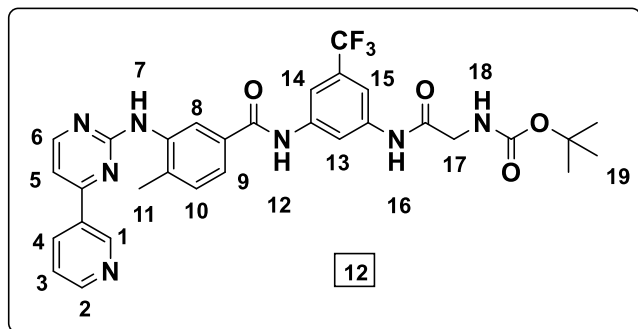
Πίνακας 5: Πειραματικές συνθήκες για την αντίδραση σύζευξης με N-Boc γλυκίνη

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο Σύζευξης	Χρόνος και θερμοκρασία σχηματισμού του ενεργοποιημένου εστέρα	Χρόνος και θερμοκρασία αντίδρασης	Απόδοση
1	THF	Et ₃ N,	TBTU, HOBt	20 min, 0 °C 20 min, rt	48 h, rt 48 h, 30 °C	~10%
2	THF	Et ₃ N,	TBTU, HOBt	20 min, 0 °C 20 min, rt	48 h, rt 48 h, 50 °C	~10%

3	THF	Et ₃ N	PyBroP	20 min, 0 °C 20 min, rt	24 h, 0 °C 72 h, rt 1 h, 70 °C 48 h, rt	~10%
4	DMF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	10 min, rt	48 h, rt	~95%

Πίνακας 11 : Αναλογίες των αντιδρώντων και συστήματα διαλυτών κατά τη χρωματογραφία στήλης

Πείραμα	Ισοδύναμα διαμίνης 11	Ισοδύναμα N-Boc γλοκίνης	Ισοδύναμα αντιδραστηρίου σύζευξης	Ισοδύναμα βάσης	Διαλύτης (ml)	Σύστημα διαλυτών κατά τη χρωματογραφία στήλης
1	1	1.1	1.1	περίσσεια	3 ml	30:1(CH ₂ Cl ₂ :MeOH)
2	1	2	1.1	περίσσεια	3 ml	30:1(CH ₂ Cl ₂ :MeOH)
3	1	3	1.1	περίσσεια	3 ml	30:1(CH ₂ Cl ₂ :MeOH)
4	1	3	1.1	περίσσεια	3 ml	-



¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 1.39

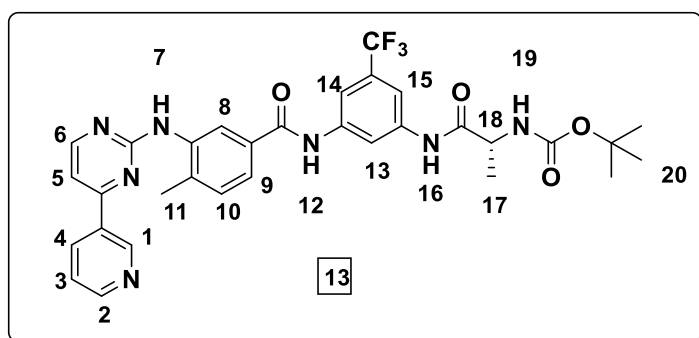
(s, 9H, H₁₉), 2.34 (s, 3H, H₁₁), 3.74 (d, J= 5.8 Hz, 2H, H₁₇), 7.11 (t, 1H, H₁₈), 7.42 (d, J= 8.1 Hz, 1H, H₁₀), 7.47 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₅), 7.51 (dd, J_{H₃-H₄}= 7.9 Hz, J_{H₃-H₂}= 4.8 Hz, 1H, H₃), 7.74 (d, J= 7.7Hz, 1H, H₉), 7.80 (s, 1H, H₁₅), 7.84 (s, 1H, H₁₄), 8.27 (s, 1H, H₁₃), 8.39(s, 1H, H₈), 8.44 (dt,

J= 7.7 Hz, J= 3.4 Hz, 1H, H₄), 8.54 (d, J= 4.9 Hz, 1H, H₆), 8.68 (d, J= 4.1 Hz, 1H, H₂), 9.17 (s, 1H, H₇), 9.27 (s, 1H, H₁), 10.32 (s, 1H, H₁₂), 10.50 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₃₁H₃₀F₃N₇O₄, m/z = 621.2311, βρέθηκε ότι για το [C₃₁H₃₀F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 622.2379

4.10 Σύνθεση της ένωσης 13

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της N-Boc-L-αλανίνης (73.3 mg, 0.387 mmol) σε απόλυτο DMF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 440 μl Et₃N και HATU (162 mg, 0.426 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη 6 σταγόνων DIPEA και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N - (3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (60 mg, 0.129 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml DMF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 48 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα του στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μείγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COOCH₂CH₃/CH₃OH 5:5:1. Το προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό (70%).



¹H NMR (400MHz, DMSO)

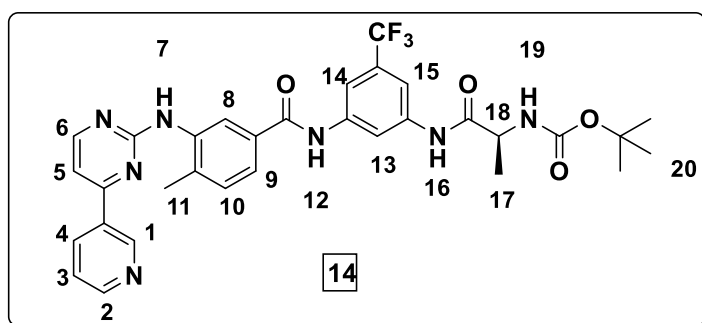
δ : 1.26 (s, 3H, H₁₇), 1.37 (s, 9H, H₂₀), 2.34 (s, 3H, H₁₁), 4.11 (m, 1H, H₁₈), 7.16 (d, J= 7.0 Hz, 1H, H₁₉), 7.42 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H₁₀), 7.47 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₅), 7.51 (dd, J_{H3-H4}= 7.9 Hz, J_{H3-H2}= 4.8 Hz, 1H, H₃),

7.75 (dd, J= 7.7 Hz, J= 1.6 Hz, 1H, H₉), 7.81 (s, 1H, H₁₅), 7.84 (s, 1H, H₁₄), 8.27 (s, 1H, H₁₃), 8.42 (s, 1H, H₈), 8.44 (dt, J= 8.1 Hz, J= 3.5 Hz 1H, H₄), 8.54 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₆), 8.68 (dd, J= 4.8 Hz, J= 1.7 Hz, 1H, H₂), 9.17 (s, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₁), 10.33 (s, 1H, H₁₂), 10.49 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₃₂H₃₂F₃N₇O₄, m/z = 635.2468, βρέθηκε ότι για το [C₃₂H₃₂F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 636.2531

4.11 Σύνθεση της ένωσης 14

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της N-Boc-D-αλανίνης (73.3 mg, 0.387 mmol) σε απόλυτο DMF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 440 μl Et₃N και HATU (162 mg, 0.426 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη 6 σταγόνων DIPEA και το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (60 mg, 0.129 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml DMF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 48 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα του στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COOCH₂CH₃/CH₃OH 5:5:1. Το προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό (80%).



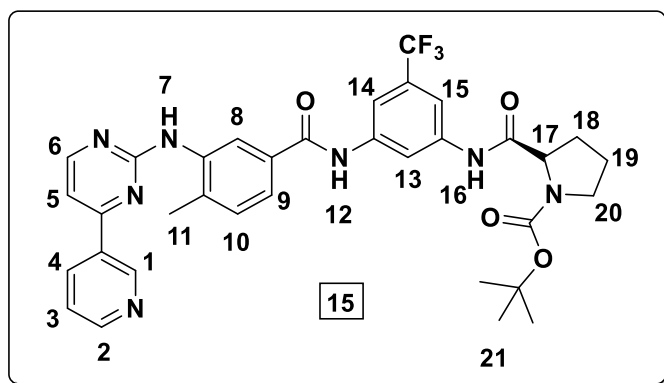
¹H NMR (400MHz, DMSO) δ : 1.27 (s, 3H, H₁₇), 1.38 (s, 9H, H₂₀), 2.35 (s, 3H, H₁₁), 4.12 (m, 1H, H₁₈), 7.13 (d, J= 7.0 Hz, 1H, H₁₉), 7.42 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H₁₀), 7.47 (d, J= 5.2 Hz,

1H, H₅), 7.51 (dd, J_{H3-H4}= 7.9 Hz, J_{H3-H2}= 4.9 Hz, 1H, H₃), 7.75 (dd, J= 7.9 Hz, J= 1.6 Hz, 1H, H₉), 7.81 (s, 1H, H₁₅), 7.85 (s, 1H, H₁₄), 8.28 (s, 1H, H₁₃), 8.42 (s, 1H, H₈), 8.44 (dt, J= 8.2 Hz, J= 7.8 Hz, 1H, H₄), 8.54 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.68 (dd, J= 4.7 Hz, J= 1.5 Hz, 1H, H₂), 9.14 (s, 1H, H₇), 9.26 (d, J= 1.7 Hz, 1H, H₁), 10.31 (s, 1H, H₁₂), 10.48 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₃₂H₃₂F₃N₇O₄, m/z = 635.2468, βρέθηκε ότι για το [C₃₂H₃₂F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 636.2521

4.12 Σύνθεση της ένωσης 15

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της N-Boc-L-προλίνης (83.4 mg, 0.387 mmol) σε απόλυτο DMF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 500 μl Et₃N και HATU (162 mg, 0.426 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη 6 σταγόνων DIPEA και το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (60 mg, 0.129 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml DMF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 72 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα του στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Προσθέτοντας CH₂Cl₂ καταβυθίζεται το επιθυμητό προϊόν ως λευκό ίζημα. Επειδή η καταβύθιση δεν έγινε ποσοτικά, το διήθημα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COCH₃/CH₃OH 10:2:0.5. Το προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό (50%).



¹H NMR (400MHz, DMSO) δ

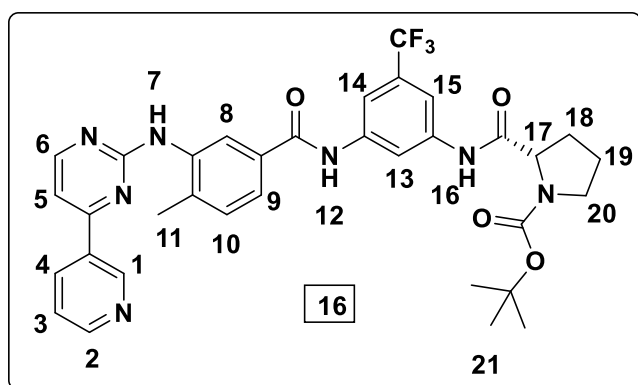
: 1.28 (s, 6H, H₂₁), 1.41 (s, 3H, H₂₁), 1.78-2.25 (m, 4H, H₁₈, H₁₉), 2.35 (s, 3H, H₁₁), 3.38-3.48 (m, 2H, H₂₀), 4.20-4.31 (m, 1H, H₁₇), 7.43 (d, J= 8.0 Hz, 1H, H₁₀), 7.48 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₅), 7.49-7.52

(m, 1H, H₃), 7.76 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H₉), 7.84 (s, 1H, H₁₅), 7.85 (s, 1H, H₁₄), 8.29 (s, 1H, H₁₃), 8.44 (s, 1H, H₈), 8.46 (s, 1H, H₄), 8.55 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.69 (d, J= 4.3Hz, 1H, H₂), 9.14 (s, 1H, H₇), 9.27 (s, 1H, H₁), 10.37 (d, 1H, H₁₂), 10.49 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₃₄H₃₄F₃N₇O₄, m/z = 661.2624, βρέθηκε ότι για το [C₃₄H₃₄F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 662.2704

4.13 Σύνθεση της ένωσης 16

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της N-Boc-D-προλίνης (36 mg, 0.167 mmol) σε απόλυτο DMF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 216 μl Et₃N και HATU (70.2 mg, 0.184 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη 6 σταγόνων DIPEA και το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (60 mg, 0.129 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml DMF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 72 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα του στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COCH₃/CH₃OH 10:2:0.5. Το προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό (50%).



¹H NMR (400MHz, DMSO) δ :

1.28 (s, 6H, H₂₁), 1.40 (s, 3H, H₂₁), 1.80-2.25 (m, 4H, H₁₈, H₁₉), 2.35 (s, 3H, H₁₁), 3.40-3.47 (m, 2H, H₂₀), 4.20-4.31 (m, 1H, H₁₇), 7.43 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.49 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₅), 7.50-7.53 (m, 1H, H₃), 7.76 (d, J= 7.7 Hz, 1H, H₉),

7.84 (s, 2H, H₁₄, H₁₅), 8.29 (s, 1H, H₁₃), 8.44 (s, 1H, H₈), 8.46 (s, 1H, H₄), 8.55 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.69 (d, J= 4.3 Hz, 1H, H₂), 9.18 (s, 1H, H₇), 9.27 (s, 1H, H₁), 10.40 (d, 1H, H₁₂), 10.50 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₃₄H₃₄F₃N₇O₄, m/z = 661.2624, βρέθηκε ότι για το [C₃₄H₃₄F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 662.2604

4.14 Σύνθεση του Nil-01

Για τη σύνθεση του αναλόγου **Nil-01** πραγματοποιήθηκε μια σειρά αντιδράσεων, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες και να

απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν σε καθαρή μορφή. Τροποποιήσεις πραγματοποιήθηκαν στο αντιδραστήριο αποπροστασίας, στη χρησιμοποιούμενη βάση, στο αντιδραστήριο παγίδευσης της ενδιάμεσης δραστικής ένωσης κατά την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας (tert- βουτυλοκατιόν), όπως, επίσης, και στη θερμοκρασία και το χρόνο της αντίδρασης. Σε κάθε περίπτωση, σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, σε διάλυμα της ένωσης **12** (10 mg, 0.016 mmol) σε CH₂Cl₂ (2 ml), υπό ανάδευση, προστίθενται 4 σταγόνες του αντιδραστηρίου παγίδευσης. Ακολουθεί η προσθήκη της ανάλογης ποσότητας του αντιδραστηρίου αποπροστασίας (TFA, H₃PO₄, CH₃COOH). Η αντίδραση συνεχίζεται στη θερμοκρασία και στο χρόνο που αναγράφεται στον Πίνακα 6. Μετά την πάροδο του εκάστοτε χρόνου, προστίθεται στη σφαιρική φιάλη ποσότητα βάσης (NaHCO₃, Et₃N), έως το pH= 9-10. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το μείγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται είτε με CH₂Cl₂ και H₂O, είτε με CH₃COOCH₂CH₃ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ωστόσο, δεν ανιχνεύτηκε ούτε ταυτοποιήθηκε το προϊόν αποπροστασίας με τις πειραματικές αυτές συνθήκες.

Πίνακας 6 : Πειραματικές συνθήκες για την αποπροστασία της Boc ομάδας

Πείραμα	Αντιδραστήριο αποπροστασίας	Βάση	Αντιδραστήριο παγίδευσης	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	50% TFA	NaHCO ₃	-	rt	1.5 h
2	50% TFA	NaHCO ₃	Anisole	rt	30 min
3	50% TFA	NaHCO ₃	Anisole	rt	5 min
4	40% TFA	Et ₃ N	Anisole	rt	3 min
5	10% TFA	Et ₃ N	Anisole	0 °C	5 min
6	40% TFA	NaHCO ₃	Triisopropylsilane	rt	5 min
7	10% TFA	NaHCO ₃	Triisopropylsilane	rt	72 h
8	85% H ₃ PO ₄	NaHCO ₃	Triisopropylsilane	rt	15 min
9	50% CH ₃ COOH	NaHCO ₃	Triisopropylsilane	rt	72 h

4.15 Σύνθεση της ένωσης 17

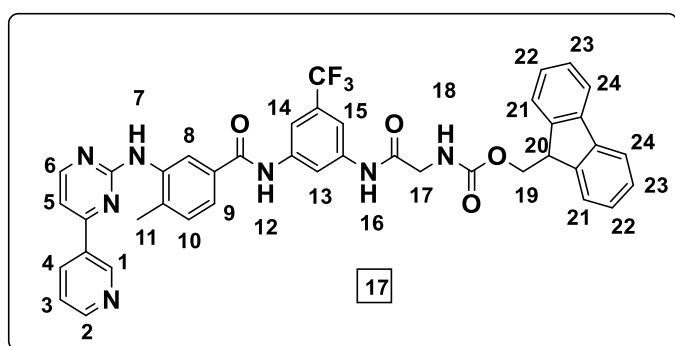
Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη, σε υπό ανάδευση διάλυμα της F-moc-γλυκίνης, σε απόλυτο διαλύτη (2 ml), υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου η εκάστοτε βάση και το αντιδραστήριο σύζευξης. Οι αναλογίες των αντιδρώντων και η ποσότητα του διαλύτη για κάθε πείραμα αποτυπώνονται στον Πίνακα 12. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 10 min προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Στη συνέχεια, στο παραπάνω μίγμα, προστίθεται στάγδην, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού το N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο **11**, το οποίο έχει ήδη διαλυθεί στον εκάστοτε διαλύτη (1 ml). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με προσθήκη CH₂Cl₂ στη σφαιρική φιάλη, καταβυθίζεται ως ίζημα το επιθυμητό προϊόν. Η ένωση **17** απομονώθηκε ως υποκίτρινο στερεό σε απόδοση 80% (πείραμα 4, Πίνακας 8, Πίνακας 12).

Πίνακας 8: Πειραματικές συνθήκες για αντίδραση σύζευξης με F-moc γλυκίνη

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο σύζευξης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	DMF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	rt	48 h	0%
2	THF	Et ₃ N, DIPEA	HATU	rt	24 h	0%
3	THF	DIPEA	HATU	rt	18 h	50%
4	THF	DIPEA	HATU	rt	20 h	80%
5	THF	SOCl ₂		80 °C	21 h	0%
6	Dioxane	DIPEA	HATU	rt	4 h	90%

Πίνακας 12: Αναλογίες των αντιδρώντων κατά τη σύνθεση της ένωσης **17**

Πείραμα	Ισοδύναμα διαμίνης 11	Ισοδύναμα F-moc γλυκίνης	Ισοδύναμα αντιδραστήριου σύζευξης	Ισοδύναμα βάσης	Διαλύτης (ml)
1	1	3	1.1	περίσσεια	3 ml
2	1	3	1.1	περίσσεια	3 ml
3	1	3	1.1	περίσσεια	3 ml
4	1	1.3	1.1	περίσσεια	3 ml
5	1	περίσσεια	-	-	3 ml
6	1	3	1.1	περίσσεια	3 ml



¹H NMR (400MHz, DMSO)

δ : 2.34 (s, 3H, H₁₁), 3.83 (d, J= 6.0 Hz, 2H, H₁₇), 4.25 (d, J= 6.6 Hz, 1H, H₂₀), 4.32 (d, J= 6.8 Hz, 2H, H₁₉), 7.33 (t, 2H, H₂₂), 7.42 (t, 2H, H₂₃), 7.43 (d, 1H, H₁₀), 7.47 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₅), 7.50 (dd, J_{H3-H4}= 7.7 Hz, J_{H3-H2}= 4.9 Hz,

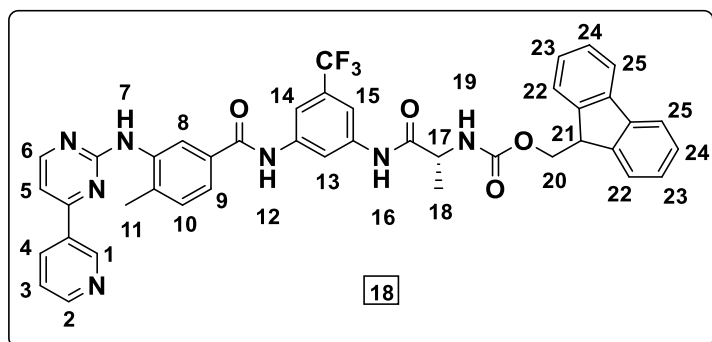
1H, H₃), 7.66 (t, 1H, H₁₈), 7.73 (d, J= 7.4 Hz, 2H, H₂₁), 7.76 (d, 1H, H₉), 7.82 (s, 1H, H₁₅), 7.84 (s, 1H, H₁₄), 7.89 (d, J= 7.4 Hz, 2H, H₂₄), 8.27 (s, 1H, H₁₃), 8.39 (s, 1H, H₈), 8.44 (dt, J= 8.0 Hz, J= 3.3 Hz, 1H, H₄), 8.54 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₆), 8.68 (d, J= 4.6 Hz, 1H, H₂), 9.14 (s, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₁), 10.36 (s, 1H, H₁₂), 10.48 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₄₁H₃₂F₃N₇O₄, m/z = 743.2468, βρέθηκε ότι για το [C₄₁H₃₂F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 744.2524

4.16 Σύνθεση της ένωσης 18

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της F-moc-L-αλανίνης (100.5 mg, 0.323 mmol) σε απόλυτο THF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 603 μ l DIPEA και HATU (135 mg, 0.355 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (50 mg, 0.108

mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml THF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 19 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με προσθήκη CH₂Cl₂ στη σφαιρική φιάλη το προϊόν καταβυθίζεται ως λευκό στερεό (80%).



¹H NMR (400MHz, DMSO)

δ: 1.32 (d, 3H, H₁₈), 2.34 (s, 3H, H₁₁), 4.19-4.23 (m, 2H, H₁₇, H₂₁), 4.29 (d, 2H, H₂₀), 7.33 (t, 2H, H₂₃), 7.41-7.43 (m, 3H, H₁₀, H₂₄), 7.45 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₅), 7.48-7.51

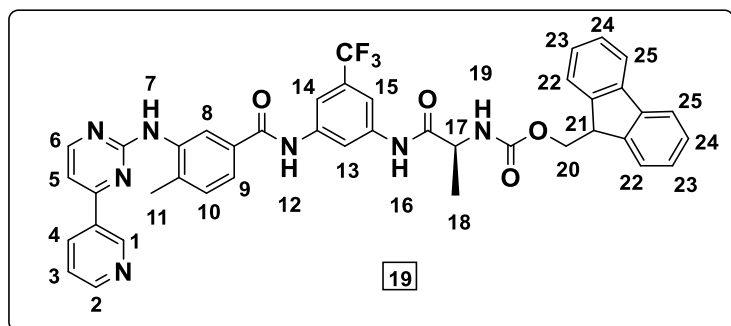
(m, 1H, H₃), 7.70-7.75 (m, 4H, H₁₉, H₂₂, H₉), 7.83 (s, 2H, H₁₄, H₁₅), 7.88 (d, J= 7.3 Hz, 2H, H₂₅), 8.28 (s, 1H, H₁₃), 8.42 (s, 1H, H₈), 8.44 (s, 1H, H₄), 8.53 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.68 (d, J= 4.3 Hz, 1H, H₂), 9.12 (s, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₁), 10.38 (s, 1H, H₁₂), 10.47 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₄₂H₃₄F₃N₇O₄, m/z = 757.2624, βρέθηκε ότι για το [C₄₂H₃₄F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 758.2675

4.17 Σύνθεση της ένωσης 19

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της F-moc-D-αλανίνης (100.5 mg, 0.323 mmol) σε απόλυτο THF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 603 μl DIPEA και HATU (135 mg, 0.355 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (50 mg, 107.6 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml THF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 48 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με

Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με προσθήκη CH₂Cl₂ στη σφαιρική φιάλη το προϊόν καταβυθίζεται ως λευκό στερεό (70%).



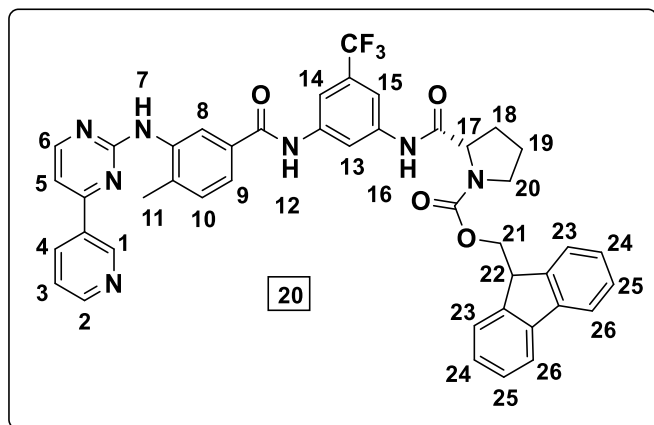
¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 1.32 (d, 3H, H₁₈), 2.34 (s, 3H, H₁₁), 4.18-4.23 (m, 2H, H₁₇, H₂₁), 4.29 (d, 2H, H₂₀), 7.33 (t, 2H, H₂₃), 7.39-7.43 (m, 3H, H₁₀, H₂₄), 7.47 (d, J= 5.2 Hz, 1H,

H₅), 7.50 (dd, J_{H3-H4}= 8.0 Hz, J_{H3-H2}= 5.1 Hz, 1H, H₃), 7.72-7.76 (m, 4H, H₁₉, H₂₂, H₉), 7.85 (s, 2H, H₁₄, H₁₅), 7.88 (d, J= 7.4 Hz, 2H, H₂₅), 8.28 (s, 1H, H₁₃), 8.43 (s, 1H, H₈), 8.45 (s, 1H, H₄), 8.54 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.68 (d, J= 4.3 Hz, 1H, H₂), 9.16 (s, 1H, H₇), 9.27 (s, 1H, H₁), 10.41 (s, 1H, H₁₂), 10.49 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₄₂H₃₄F₃N₇O₄, m/z = 757.2624, βρέθηκε ότι για το [C₄₂H₃₄F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 758.2674

4.18 Σύνθεση της ένωσης 20

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της F-moc-L-προλίνης (108.9 mg, 0.322 mmol) σε απόλυτο THF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 653 μl DIPEA και HATU (135 mg, 0.355 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (50 mg, 107.6 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml THF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COCH₃/CH₃OH 10:2:0.5. Το προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό (80%).



¹H NMR (400MHz, DMSO)

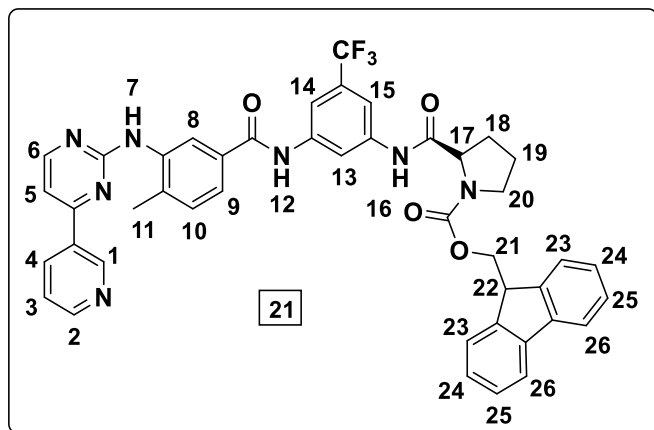
δ : 1.88-1.22 (m, 4H, H₁₈, H₁₉), 2.34 (s, 3H, H₁₁), 3.42-3.52 (m, 2H, H₂₀), 4.11-4.49 (m, 4H, H₂₁, H₁₇, H₂₂), 7.01-7.06 (m, 1H, H₂₄), 7.25-7.29 (m, 1H, H₂₄), 7.32-7.36 (m, 1H, H₂₃), 7.41-7.43 (m, 1H, H₂₆), 7.42 (d, J= 7.5 Hz, 1H, H₁₀),

7.47 (d, J= 5.0 Hz, 1H, H₅), 7.49-7.52 (m, 1H, H₃), 7.56 (t, 1H, H₂₅), 7.66-7.69 (m, 1H, H₂₃), 7.74 (d, J= 7.5 Hz, 1H, H₉), 7.78 (t, 1H, H₂₅), 7.83-7.89 (m, 1H, H₂₆), 7.83-7.91 (m, 2H, H₁₄, H₁₅), 8.28 (s, 1H, H₁₃), 8.42 (s, 1H, H₈), 8.47 (d, 1H, H₄), 8.54 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.65-8.68 (m, 1H, H₂), 9.17 (s, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₁), 10.48-10.56 (m, 2H, H₁₂, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₄₄H₃₆F₃N₇O₄, m/z = 783.2781, βρέθηκε ότι για το [C₄₄H₃₆F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 784.2852

4.19 Σύνθεση της ένωσης 21

Σε σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα της F-moc-D-προλίνης (108.9 mg, 0.322 mmol) σε απόλυτο THF (2 ml) και υπό ανάδευση προστίθενται 653 μ l DIPEA και HATU (135 mg, 0.355 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου **11** (50 mg, 0.107 mmol), το οποίο έχει ήδη διαλυθεί σε 1 ml THF. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 h, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COCH₃/CH₃OH 10:2:0.5. Το προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό (80%).



¹H NMR (400MHz, DMSO)

δ : 1.88-1.22 (m, 4H, H₁₈, H₁₉), 2.34 (s, 3H, H₁₁), 3.38-3.52 (m, 2H, H₂₀), 4.06-4.49 (m, 4H, H₂₁, H₁₇, H₂₂), 7.02-7.07 (m, 1H, H₂₄), 7.25-7.29 (m, 1H, H₂₄), 7.32-7.36 (m, 1H, H₂₃), 7.41-7.43 (m, 1H, H₂₆), 7.42 (d, J= 7.6 Hz, 1H, H₁₀), 7.47

(d, J= 4.9 Hz, 1H, H₅), 7.49-7.52 (m, 1H, H₃), 7.56 (t, 1H, H₂₅), 7.66-7.69 (m, 1H, H₂₃), 7.74 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H₉), 7.78 (t, 1H, H₂₅), 7.84-7.89 (m, 1H, H₂₆), 7.84-7.90 (m, 2H, H₁₄, H₁₅), 8.28 (s, 1H, H₁₃), 8.42 (s, 1H, H₈), 8.47 (d, 1H, H₄), 8.53 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₆), 8.65-8.68 (m, 1H, H₂), 9.14 (s, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₁), 10.44-10.51 (m, 2H, H₁₂, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₄₄H₃₆F₃N₇O₄, m/z = 783.2781, βρέθηκε ότι για το [C₄₄H₃₆F₃N₇O₄+H]⁺ το m/z = 784.2823

4.20 Σύνθεση του Nil-01

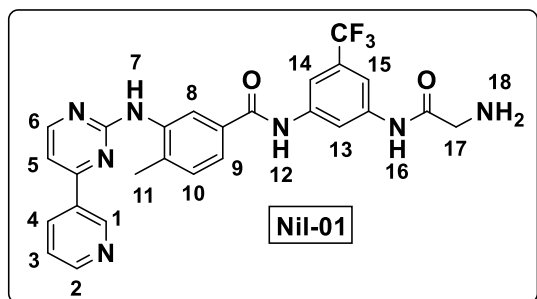
Για την απομάκρυνση της F-moc ομάδας από την ένωση **17** δοκιμάστηκαν πολλές πειραματικές συνθήκες (Πίνακας 13). Σε κάθε περίπτωση, σε διάλυμα της ένωσης **17** (20 mg, 0.027 mmol) στον εκάστοτε απόλυτο διαλύτη (2 ml) προστίθεται υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου πιπεριδίνη και η αντίδραση συνεχίζεται σύμφωνα με το χρόνο που αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 13: Πειραματικές συνθήκες για την αποπροστασία της F-moc ομάδας από την ένωση **17**.

Πείραμα	Διαλύτης	Πιπεριδίνη	Χρόνος
1	80% DMF	20%	13 min
2	50% DMF	50%	20 min
3	80% CH ₂ Cl ₂	20%	20 min
4	80% CH ₂ Cl ₂	20%	2.5 h

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και η πιπεριδίνη στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται,

ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με την προσθήκη διαιθυλαιθέρα καταβυθίστηκε το επιθυμητό προϊόν ως λευκό ίζημα (95%).



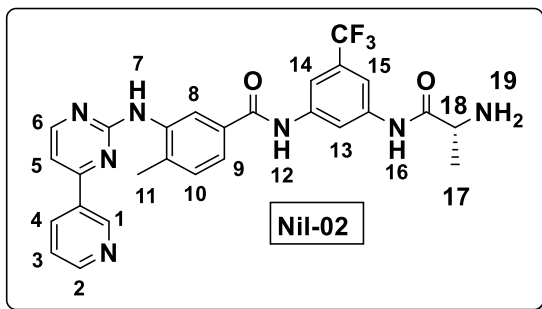
¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 2.35 (s, 3H, H₁₁), 3.39 (s, 2H, H₁₇), 7.42 (d, J= 8.0 Hz, 1H, H₁₀), 7.48 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₅), 7.51 (dd, J_{H₃-H₄}= 8.0 Hz, J_{H₃-H₂}= 4.8 Hz, 1H, H₃), 7.75 (dd, J= 7.9 Hz, J= 1.7 Hz, 1H, H₉), 7.85 (s, 2H, H₁₄, H₁₅), 8.28 (s, 1H, H₁₃),

8.41 (s, 1H, H₈), 8.44 (dt, J= 8.2 Hz, J= 3.8 Hz, 1H, H₄), 8.54 (d, J= 5.2Hz, 1H, H₆), 8.68 (dd, J= 4.7 Hz, J= 1.5 Hz, 1H, H₂), 9.15 (s, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₁), 10.49 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₂₆H₂₂F₃N₇O₂, m/z = 521.1787, βρέθηκε ότι για το [C₂₆H₂₂F₃N₇O₂+H]⁺ το m/z = 522.1844

4.21 Σύνθεση του Nil-02

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **18** (30 mg, 0.040 mmol) σε απόλυτο CH₂Cl₂ (2 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου 50% πιπεριδίνη και η αντίδραση συνεχίζεται για 3 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και η πιπεριδίνη στην αντλία υψηλού κενού. Ακολούθως, το μείγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με την προσθήκη διαιθυλαιθέρα καταβυθίζεται λευκό ίζημα, το οποίο περιέχει το επιθυμητό προϊόν και την αρχική ένωση **18**. Το ίζημα διαλύεται σε CH₂Cl₂ και καθαρίζεται με παρασκευαστική χρωματογραφική πλάκα TLC σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃OH 5:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε ως λευκό ίζημα (95%).



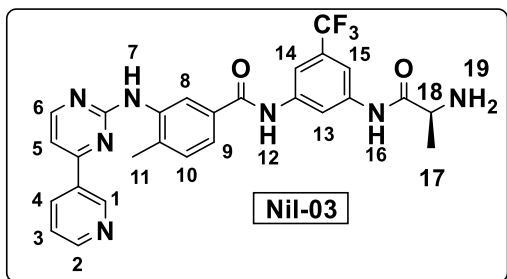
¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 1.22 (d, 3H, H₁₇), 2.34 (s, 3H, H₁₁), 3.42-3.47 (m, 1H, H₁₈), 7.42 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.47 (d, J= 5.1 Hz, 1H, H₅), 7.51 (dd, J_{H₃-H₄}= 7.9 Hz, J_{H₃-H₂}= 4.9 Hz, 1H, H₃), 7.75 (d, J= 7.8 Hz, 1H, H₉), 7.83-7.89 (m, 4H, H₁₄, H₁₅, H₁₉), 8.28 (s, 1H, H₁₃), 8.42 (s, 1H, H₈), 8.45 (dt, J= 3.5 Hz, 1H, H₄),

8.54 (d, J= 5.2 Hz, 1H, H₆), 8.68 (dd, J= 4.6 Hz, J= 1.4 Hz, 1H, H₂), 9.15 (s, 1H, H₇), 9.27 (s, 1H, H₁), 10.47 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το C₂₇H₂₄F₃N₇O₂, m/z = 535.1944, βρέθηκε ότι για το [C₂₇H₂₄F₃N₇O₂+H]⁺ το m/z = 536.2023

4.22 Σύνθεση του Nil-03

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **19** (20 mg, 0.026 mmol) σε απόλυτο CH₂Cl₂ (2 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου 40% πιπεριδίνη και η αντίδραση συνεχίζεται για 3 h και 40 min. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και η πιπεριδίνη στην αντλία υψηλού κενού. Ακολούθως, το μείγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με την προσθήκη διαιθυλαιθέρα καταβυθίζεται υποκίτρινο ίζημα, το οποίο περιέχει το επιθυμητό προϊόν και την αρχική ένωση **19**. Το ίζημα διαλύεται σε CH₂Cl₂ και καθαρίζεται με παρασκευαστική χρωματογραφική πλάκα TLC σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃OH 5:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε ως λευκό ίζημα (95%).



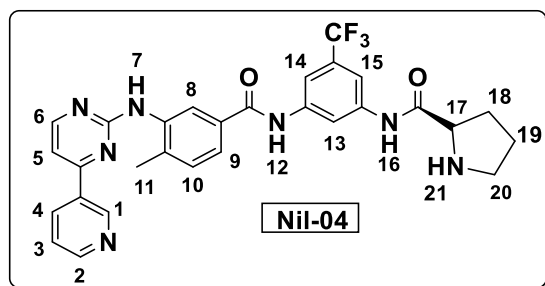
¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 1.36 (d, 3H, H₁₇), 2.34 (s, 1H, H₁₁), 3.77 (s, 1H, H₁₈), 7.42-7.52 (m, 2H, H₁₉), 7.43 (d, J= 7.9 Hz, 1H, H₁₀), 7.47-7.52 (m, 2H, H₃, H₅), 7.75 (d, J= 7.4 Hz, 1H, H₉), 7.84 (s,

2H, H₁₄, H₁₅), 8.27 (s, 1H, H₁₃), 8.43-8.46 (m, 2H, H₄, H₈), 8.53 (s, 1H, H₆), 8.68 (s, 1H, H₂), 9.18 (s, 1H, H₇), 9.26 (s, 1H, H₁), 10.53 (s, 1H, H₁₆) ppm

HRMS (ESI): Υπολογισθέν, για το $C_{27}H_{24}F_3N_7O_2$, $m/z = 535.1944$, βρέθηκε ότι για το $[C_{27}H_{24}F_3N_7O_2+H]^+$ το $m/z = 536.2013$

4.23 Σύνθεση του Nil-04

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **20** (30 mg, 0.038 mmol) σε απόλυτο CH_2Cl_2 (2 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου 40% πιπεριδίνη και η αντίδραση συνεχίζεται για 3 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και η πιπεριδίνη στην αντλία υψηλού κενού. Ακολούθως, το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH_2Cl_2 και H_2O . Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με την προσθήκη διαιθυλαιθέρα καταβυθίζεται λευκό ίζημα, το οποίο περιέχει το επιθυμητό προϊόν και την αρχική ένωση **20**. Το ίζημα διαλύεται σε CH_2Cl_2 και καθαρίζεται με παρασκευαστική χρωματογραφική πλάκα TLC σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2/CH_3OH 5:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε ως λευκό ίζημα (95%).



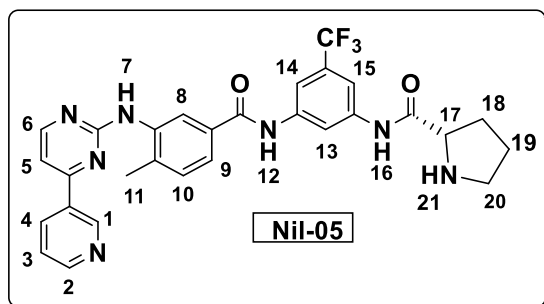
1H NMR (400MHz, DMSO) δ : 2.34 (s, 3H, H_{11}), 7.42 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_{10}), 7.47 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H_5), 7.46-7.53 (m, 1H, H_{21}), 7.48-7.52 (m, 1H, H_3), 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H_9), 7.86 (s, 1H, H_{15}), 7.88 (s, 1H, H_{14}), 8.28 (s, 1H,

H_{13}), 8.41 (s, 1H, H_8), 8.43 (s, 1H, H_{12}), 8.45 (s, 1H, H_4), 8.53 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, H_6), 8.67 (s, 1H, H_2), 9.13 (s, 1H, H_7), 9.26 (s, 1H, H_1), 10.47 (s, 1H, H_{16}) ppm

4.24 Σύνθεση του Nil-05

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **21** (30 mg, 0.038 mmol) σε απόλυτο CH_2Cl_2 (2 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου 40% πιπεριδίνη και η αντίδραση συνεχίζεται για 3 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και η πιπεριδίνη στην αντλία υψηλού κενού. Ακολούθως, το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH_2Cl_2 και H_2O . Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με την προσθήκη διαιθυλαιθέρα καταβυθίζεται λευκό ίζημα το οποίο περιέχει το επιθυμητό προϊόν και

την αρχική ένωση **21**. Το ίζημα διαλύεται σε CH₂Cl₂ και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃OH 5:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε ως υποκίτρινο ίζημα (95%).



Ωστόσο, η ποσότητα δεν επαρκούσε για τη λήψη ενός ευκρινούς φάσματος ¹H NMR. Παρόλα αυτά, το φάσμα έστω και αραιό, επιβεβαίωσε τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος.

4.25 Σύνθεση της 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοανιλίνης, ένωση (24)

Η σύνθεση 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοανιλίνης **24** απαιτεί 2 στάδια: 1) τη σύνθεση του αντιδραστηρίου επιλεκτικής αναγωγής, NaSH, 2) τη σύνθεση της 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοανιλίνης με την επίδραση μεθανολικού διαλύματος του παρασκευασθέντος αντιδραστηρίου επιλεκτικής αναγωγής στους 50 °C.

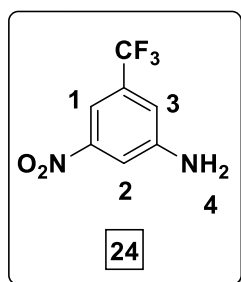
4.25.1 Σύνθεση του αντιδραστηρίου επιλεκτικής αναγωγής, NaSH

Σε κωνική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα Na₂S (4.5 g) σε H₂O (17.5 ml) και προστίθεται NaHCO₃ (1.5 g). Το διάλυμα αρχικά είναι κίτρινο. Ακολουθεί προσθήκη MeOH (15 ml) και καταβυθίζεται λευκό ίζημα Na₂CO₃, το οποίο διηθείται και εκπλύνεται με MeOH. Το ίζημα απορρίπτεται, ενώ το διήθημα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

4.25.2 Σύνθεση της ένωσης 24

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται διάλυμα της ένωσης **9** (0.50 g, 2.1 mmol) σε ζεστή MeOH (6.66 ml) και προστίθενται υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού, στάγδην 2 ml του πρώτου διαλύματος και το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C. Η αντίδραση διακόπτεται στη 1 h. Αφού ψυχθεί το διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 100 ml παγωμένου H₂O και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Αφού το ξηραντικό

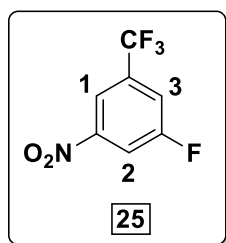
διηθηθεί, το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH_2Cl_2 / *n*-hexane 3:1. Το προϊόν απομονώνεται ως καφέ στερεό (30%).



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 4.24 (s, 2H, H_4), 7.15 (s, 1H, H_3), 7.63 (t, 1H, H_2), 7.81 (s, 1H, H_1) ppm

4.26 Σύνθεση του 3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφθοροβενζολίου, ένωση (25)

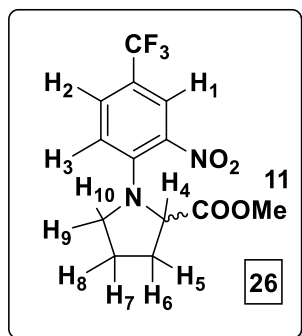
Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml, υπό ψύξη, προστίθενται 250.3 mg (1.2 mmol) της ένωσης **24**. Ακολουθεί η προσθήκη 0.75 ml HCl 37%. Ακολούθως, στο μίγμα της αντίδρασης προστίθενται στάγδην υπό ανάδευση και στους 0 °C, 92 mg (1.33 mmol) NaNO_2 , διαλυμένα σε λίγες σταγόνες H_2O . Το χρώμα της αντίδρασης είναι έντονο κίτρινο. Μετά από 40 min γίνεται προσθήκη 263 mg HBF_4 50% w/w. Η θερμοκρασία διατηρείται στους 0 °C. Το κίτρινο μίγμα που δημιουργείται αναδεύεται με δυσκολία. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση για 50 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί διήθηση του περιεχομένου της σφαιρικής με υδραντλία. Το ίζημα εκπλύνεται με εξάνιο και μεταφέρεται σε ξηραντήρα με CaCl_2 για 12 h. Το κοκκώδες πλέον ίζημα, μεταφέρεται σε μια σφαιρική των 10 ml και θερμαίνεται σταδιακά μέχρι τους 90 °C. Η αντίδραση αποκτά σκούρο καφέ χρώμα και τερματίζεται μετά από 4 h θέρμανσης. Τέλος, στη σφαιρική προστίθεται CH_2Cl_2 και H_2O , με αποτέλεσμα την καταβύθιση του επιθυμητού προϊόντος ως λευκό ίζημα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και έκπλυση του ιζήματος με CH_2Cl_2 .



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO) δ : 9.33 (s, 1H, H_1), 9.58 (s, 1H, H_2), 9.86 (s, 1H, H_3) ppm

4.27 Σύνθεση της ένωσης 26

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα του 4-φθορο-3-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου (100 mg, 0.48 mmol) σε απόλυτο 1,4 διοξάνιο (2 ml). Υπό ανάδευση προστίθεται NaHCO_3 (73.12 mg, 0.87 mmol). Η αντίδραση θερμαίνεται και τέλος ακολουθεί η προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος του μεθυλεστέρα της L- προλίνης (102.9 mg, 0.62 mmol). Ακαριαία, το μίγμα αποκτά κίτρινο χρώμα. Η αντίδραση αφήνεται σε βρασμό, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού για 48 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα του στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH_2Cl_2 και H_2O . Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Εκχυλίζεται εκ νέου με CH_2Cl_2 και HCl (2N) / H_2O και εκπλύνεται γρήγορα με H_2O (x2). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Τέλος, εκπλύνεται με 10% NaHCO_3 και H_2O (x3). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na_2SO_4 , το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Όλες οι υδατικές φάσεις απορρίπτονται. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με τη μορφή υποκίτρινου ιζήματος (90%).

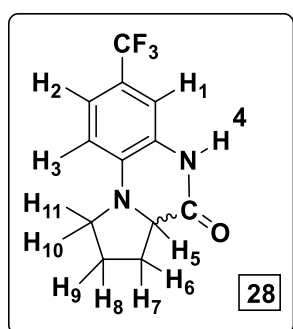
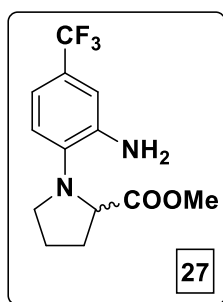


$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ : 1.91-2.48 (m, 4H, H₅, H₆, H₇, H₈), 3.16-3.22 (m, 1H, H₉), 3.47-3.54 (m, 1H, H₁₀), 3.70 (s, 3H, H₁₁), 4.45 (t, 1H, H₄), 6.85 (d, 1H, J= 8.9 Hz, H₃), 7.53 (dd, J= 8.9 Hz, 1H, H₂), 7.91 (s, 1H, H₁) ppm

4.28 Σύνθεση της ένωσης 27

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται η ένωση **26** (63.8 mg, 0.20 mmol), διαλυμένη σε απόλυτο THF (1.5 ml). Ακολουθεί υπό ανάδευση η προσθήκη PtO_2 (40.1 mg, 0.17 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση και σε ατμόσφαιρα H_2 για 45 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί διήθηση σε τριπλό πτυχωτό ηθμό για την απομάκρυνση του καταλύτη και έκπλυση αυτού με CH_2Cl_2 πολλές φορές. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται στον

περιστροφικό εξατμιστήρα. Ωστόσο, δεν παραλάβαμε το επιθυμητό ανηγμένο προϊόν **27**, αλλά σχηματίστηκε ποσοτικά (~100 %) το κυκλοποιημένο προϊόν **28**.

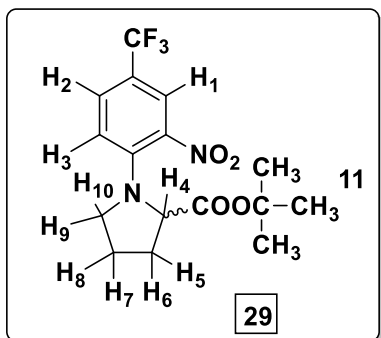


¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 2.02-2.38 (m, 4H, H₆, H₇, H₈, H₉), 3.29-3.35 (m, 1H, H₁₀), 3.47-3.53 (m, 1H, H₁₁), 3.87 (t, 1H, H₅), 6.58 (d, J= 8.3 Hz, 1H, H₃), 6.95 (s, 1H, H₁), 7.22 (d, J= 8.2 Hz, 1H, H₂), 8.15 (s, 1H, H₄) ppm

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 1.90-2.17 (m, 4H, H₆, H₇, H₈, H₉), 3.23-3.27 (m, 1H, H₁₀), 3.41-3.47 (m, 1H, H₁₁), 3.81 (t, 1H, H₅), 6.67 (d, J= 8.3 Hz, 1H, H₃), 7.04 (s, 1H, H₁), 7.20 (d, J= 8.1 Hz, 1H, H₂), 10.57 (s, 1H, H₄) ppm

4.29 Σύνθεση της ένωσης 29

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα του 4-φθορο-3-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου (100 mg, 0.48 mmol) σε απόλυτο 1,4 διοξάνιο (2 ml). Υπό ανάδευση προστίθεται NaHCO₃ (61.8 mg, 0.74 mmol). Η αντίδραση θερμαίνεται και τέλος ακολουθεί η προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος του tertβουλυτεστέρα της L-προλίνης (109.2 mg, 0.53 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε βρασμό, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού για 48 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα του στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών n-hexane/CH₃COOCH₂CH₃ 5:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως κίτρινη ελαιώδης ουσία (80%).

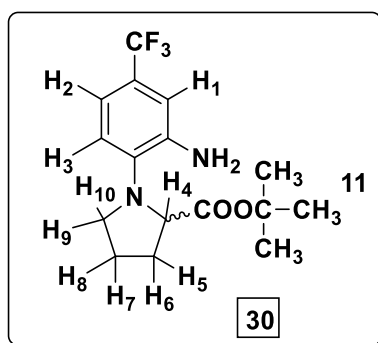


^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 1.39 (s, 9H, H_{11}), 1.9-2.47 (m, 4H, H_5 , H_6 , H_7 , H_8), 3.20-3.25 (m, 1H, H_9), 3.44-3.50 (m, 1H, H_{10}), 4.34 (t, 1H, H_4), 6.88 (d, 1H, $J=8.9$ Hz, H_3), 7.54 (dd, $J=8.9$ Hz, $J=1.9$ Hz, 1H, H_2), 7.96 (s, 1H, H_1) ppm

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 24.84, 28.09, 31.11, 51.70, 63.11, 82.69, 117.29, 124.64, 129.36, 137.23, 143.61, 171.23 ppm

4.30 Σύνθεση της ένωσης 30

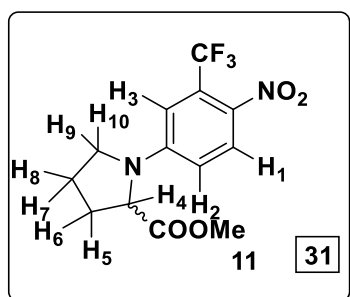
Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται η ένωση **29** (30 mg, 0.083 mmol), διαλυμένη σε απόλυτο THF (1 ml). Ακολουθεί υπό ανάδευση η προσθήκη PtO_2 (16.7 mg, 0.074 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση και σε ατμόσφαιρα H_2 για 4.5 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί διήθηση σε τριπλό πτυχωτό ηθμό για την απομάκρυνση του καταλύτη και έκπλυση αυτού με CH_2Cl_2 πολλές φορές. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με προσθήκη εξανίου στη φιάλη, καταβυθίζεται λευκό ίζημα. Πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Ούτε και σε αυτήν την περίπτωση λάβαμε το ανηγμένο προϊόν **30**, καθώς το ίζημα χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR ως η μη επιθυμητή ένωση **28**.



4.31 Σύνθεση της ένωσης 31

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα του 5-φθορο-2-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου (120 mg, 0.57 mmol) σε απόλυτο 1,4 διοξάνιο (2 ml) και απόλυτο DMF (1 ml). Υπό ανάδευση προστίθεται NaHCO_3 (75 mg, 0.89 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος του μεθυλεστέρα

της L-προλίνης (114.1 mg, 0.69 mmol). Η αντίδραση αφήνεται στους 85 °C, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού για 24 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα τους στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μείγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών n-hexane/ CH₃COOCH₂CH₃ 2:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως κίτρινη ελαιώδης ουσία (70%).



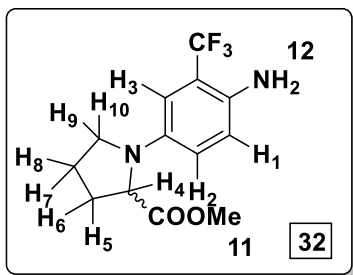
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 2.12-2.42 (m, 4H, H₅, H₆, H₇, H₈), 3.46-3.52 (m, 1H, H₉), 3.64-3.69 (m, 1H, H₁₀), 3.75 (s, 3H, H₁₁), 4.39 (dd, J= 8.6 Hz, J= 2.4 Hz, 1H, H₄), 6.57 (dd, J= 9.1 Hz, J= 2.6 Hz, 1H, H₂), 6.83 (s, 1H, H₃), 8.02 (d, J= 9.2 Hz, 1H, H₁) ppm

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 1.93-2.33 (m, 4H, H₅, H₆, H₇, H₈), 3.45-3.51 (m, 1H, H₉), 3.58-3.63 (m, 1H, H₁₀), 3.67 (s, 3H, H₁₁), 4.71 (d, J= 8.3 Hz, 1H, H₄), 6.81 (d, J= 9.0 Hz, 1H, H₂), 6.88 (s, 1H, H₃), 8.10 (d, J= 9.2 Hz, 1H, H₁) ppm

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 23.94, 31.07, 49.05, 52.96, 61.07, 77.01, 77.33, 77.65, 113.33, 129.16, 149.93, 172.86 ppm

4.32 Σύνθεση της ένωσης 32

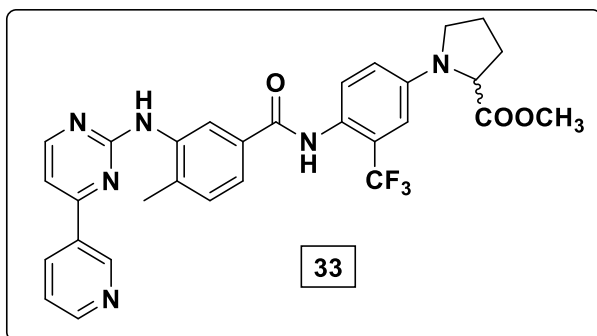
Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται η ένωση **31** (33.3 mg, 0.104 mmol), διαλυμένη σε απόλυτο THF (1.5 ml). Ακολουθεί υπό ανάδευση η προσθήκη PtO₂ (21 mg, 0.092 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση και σε ατμόσφαιρα H₂ για 15 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί διήθηση σε τριπλό πτυχωτό ηθμό για την απομάκρυνση του καταλύτη και έκπλυση αυτού με CH₂Cl₂ πολλές φορές. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστή. Το προϊόν απομονώθηκε ως κίτρινη ελαιώδης ουσία ποσοτικά (~100%).



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 2.01-2.31 (m, 4H, H₅, H₆, H₇, H₈), 3.27-3.33 (m, 1H, H₉), 3.51-3.56 (m, 1H, H₁₀), 3.71 (s, 5H, H₁₁, H₁₂), 4.18 (dd, J= 8.5 Hz, J= 2.0 Hz, 1H, H₄), 6.56 (dd, J= 8.6 Hz, J= 2.6 Hz, 1H, H₂), 6.63 (s, 1H, H₃), 6.68 (d, J= 8.7 Hz, 1H, H₁) ppm

¹H NMR (400MHz, DMSO) δ: 1.95-2.26 (m, 4H, H₅, H₆, H₇, H₈), 3.20-3.24 (m, 1H, H₉), 3.39 (m, 1H, H₁₀), 3.61 (s, 3H, H₁₁), 4.19 (d, J= 7.2 Hz, 1H, H₄), 4.76 (s, 2H, H₁₂), 6.43 (s, 1H, H₃), 6.58 (d, J= 8.6 Hz, 1H, H₂), 6.77 (d, J= 8.8 Hz, 1H, H₁) ppm

4.33 Σύνθεση της ένωσης 33



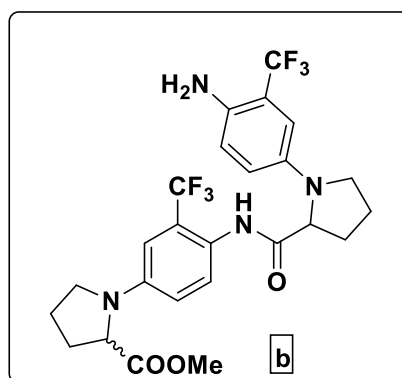
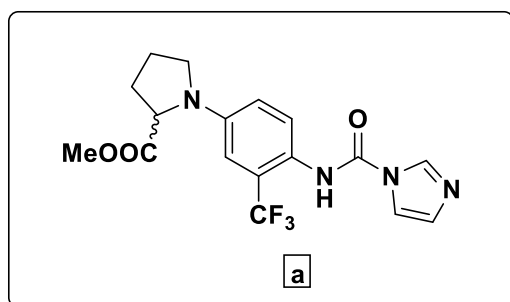
A' προσπάθεια: Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται διάλυμα του οξέος **8** (4.7 mg, 0.015 mmol) σε απόλυτο THF (1 ml). Υπό ανάδευση και στους 0 °C προστίθενται HATU

(6.4 mg, 0.017 mmol) και Et₃N (29 μl). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και σε ψύξη για 30 min προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Ύστερα, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί η προσθήκη της ένωσης **32** (5 mg, 0.017 mmol) διαλυμένη σε απόλυτο THF (1 ml), στάγδην. Μετά από 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού, το μείγμα θερμαίνεται στους 75 °C και προστίθεται επιπλέον απόλυτο DMF (1 ml). Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 24 h. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το φάσμα ¹H NMR δεν επιβεβαιώνει το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **33**.

B' προσπάθεια: Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται διάλυμα του οξέος **8** (10.3 mg, 0.033 mmol) σε απόλυτο DMF (1 ml). Υπό ανάδευση και στους 0 °C προστίθενται HATU (19.2 mg, 0.051 mmol), DIPEA (18 μl) και DMAP (6.18 mg, 0.051 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη της ένωσης **32** (14.6

mg, 0.051 mmol). Μετά από 10 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού, το μίγμα θερμαίνεται στους 70 °C. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 45 h. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH 20:1. Το φάσμα ¹H NMR επιβεβαίωσε το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού, της ένωσης **33**, αλλά μη καθαρή και σε πολύ μικρό ποσοστό.

Γ' προσπάθεια: Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται διάλυμα του οξέος **8** (27.57 mg, 0.09 mmol) σε απόλυτο THF (1 ml). Υπό ανάδευση και στους 0 °C προστίθεται CDI (16.05 mg, 0.099 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 40 min προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Ακολουθεί η προσθήκη της ένωσης **32** (38.94 mg, 0.14 mmol) διαλυμένη σε απόλυτο THF (1 ml), στάγδην. Μετά από 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού, το μίγμα θερμαίνεται στους 66 °C και προστίθενται 4 σταγόνες Et₃N. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 24 h. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COOCH₂CH₃ 2:1. Το φάσμα ¹H NMR δεν επιβεβαίωσε το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **33**. Αντιθέτως, σχηματίστηκε κάποιο από τα παρακάτω παραπροϊόντα.

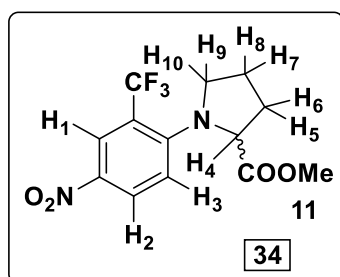


Δ' προσπάθεια: Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται διάλυμα του οξέος **8** (26.71 mg, 0.087 mmol) σε απόλυτο THF (1 ml). Υπό ανάδευση και στους 0 °C προστίθενται PyBroP (44.71 mg, 0.096 mmol) και Et₃N (160.2 μl). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και σε ψύξη για 30 min προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Ύστερα, ακολουθεί η προσθήκη της ένωσης **32** (30.15 mg, 0.10 mmol) διαλυμένη σε απόλυτο THF (1 ml) στάγδην. Μετά από 10 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού, το μίγμα θερμαίνεται στους 66 °C και προστίθεται DMF (2 ml). Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 72 h. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH 20:1. Με λήψη φάσματος ¹H NMR διαπιστώθηκε ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού της ένωσης **33** σε πολύ μικρό ποσοστό, όμως η ένωση δε λήφθηκε σε καθαρή μορφή.

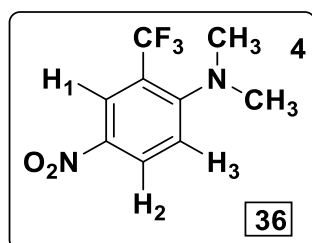
Ε' προσπάθεια: Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται διάλυμα του οξέος **8** (17.9 mg, 0.058 mmol) σε απόλυτο DMF (1 ml). Υπό ανάδευση και στους 0 °C προστίθενται HATU (24.56 mg, 0.065 mmol), Et₃N (108 μl) και 5 σταγόνες DIPEA. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και σε ψύξη για 30 min προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Ύστερα, σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί η προσθήκη της ένωσης **32** (22 mg, 0.076 mmol) διαλυμένη σε απόλυτο DMF (0.5 ml), στάγδην. Μετά από 1 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού, το μίγμα θερμαίνεται στους 65 °C για 24 h. Η αντίδραση συνεχίζεται σε θερμοκρασία δωματίου και διακόπτεται μετά από 96 h. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH 30:1. Με λήψη φάσματος ¹H NMR διαπιστώθηκε ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού της ένωσης **33** σε πολύ μικρό ποσοστό, όμως η ένωση δε λήφθηκε σε καθαρή μορφή.

4.34 Σύνθεση της ένωσης 34

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα του 2-φθορο-5-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου, (120 mg, 0.57 mmol) σε απόλυτο 1,4 διοξάνιο (2 ml) και απόλυτο DMF (1 ml). Υπό ανάδευση προστίθεται NaHCO₃ (75 mg, 0.89 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος του μεθυλεστέρα της L-προλίνης (114.1 mg, 0.69 mmol). Η αντίδραση αφήνεται στους 90 °C, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού για 24 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα τους στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών n-hexane/CH₃COOCH₂CH₃ 2:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως κίτρινη ελαιώδης ουσία (70%). Δεδομένου ότι η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη DMF και σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία για αρκετές ώρες, αυτό διασπάστηκε, σχηματίζοντας διμεθυλαμίνη, η οποία με τη σειρά της προσέβαλε τον άνθρακα που φέρει το φθόριο του 2-φθορο-5-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου, δίνοντας, μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, το ανεπιθύμητο προϊόν **36**.



¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 1.98-2.52 (m, 4H, H₅, H₆, H₇, H₈), 3.58-3.62 (m, 1H, H₉), 3.69 (s, 3H, H₁₁), 3.78-3.84 (m, 1H, H₁₀), 4.65-4.68 (m, 1H, H₄), 6.84 (d, J= 9.4 Hz, 1H, H₃), 8.18 (dd, J= 9.3 Hz, J= 2.6 Hz, 1H, H₂), 8.52 (s, 1H, H₁) ppm

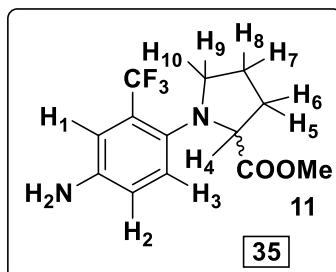


¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 3.05 (s, 6H, H₄), 7.01 (d, J= 9.2 Hz, 1H, H₃), 8.21 (dd, J= 9.3 Hz, J= 2.5 Hz, 1H, H₂), 8.50 (s, 1H, H₁) ppm

4.35 Σύνθεση της ένωσης 35

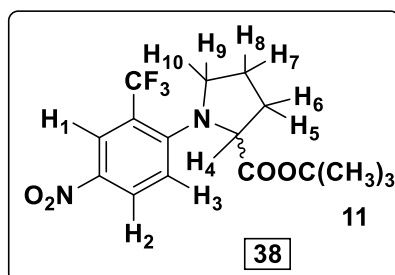
Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται η ένωση **34** (44.33 mg, 0.14 mmol), διαλυμένη σε απόλυτο THF (1 ml). Ακολουθεί υπό ανάδευση η προσθήκη PtO₂ (27 mg, 0.12 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση

και σε ατμόσφαιρα H₂ για 10 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί διήθηση σε τριπλό πτυχωτό ηθμό για την απομάκρυνση του καταλύτη και έκλυση αυτού με CH₂Cl₂ πολλές φορές. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν απομονώθηκε ως κίτρινη ελαιώδης ουσία (100%).



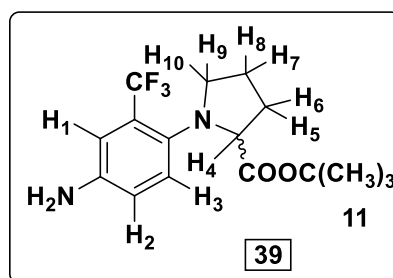
4.36 Σύνθεση της ένωσης 38

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, φέρεται διάλυμα του 2-φθορο-5-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζολίου, (100 mg, 0.48 mmol) σε απόλυτο 1,4 διοξάνιο (1 ml) και απόλυτο DMF (0.5 ml). Υπό ανάδευση προστίθεται NaHCO₃ (67.4 mg, 0.80 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος του tert-βουτυλεστέρα της L- προλίνης (119 mg, 0.57 mmol). Η αντίδραση αφήνεται στους 90 °C, υπό ανάδευση και σε ατμόσφαιρα αργού για 24 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης, οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα τους στην αντλία υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών n-hexane/ CH₃COOCH₂CH₃ 5:1. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως κίτρινη ελαιώδης ουσία (80%).

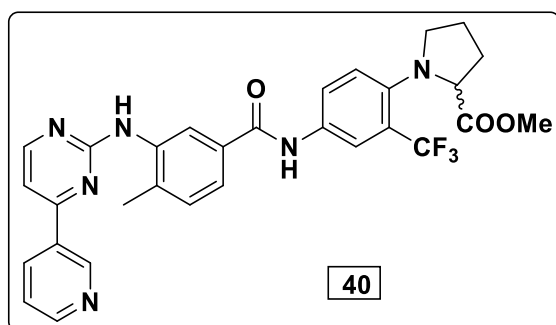


4.37 Σύνθεση της ένωσης 39

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται η ένωση **38** (26.40 mg, 0.071 mmol), διαλυμένη σε απόλυτο THF (1 ml). Ακολουθεί υπό ανάδευση η προσθήκη PtO₂ (14.65 mg, 0.065 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση και σε ατμόσφαιρα H₂ για 60 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί διήθηση σε τριπλό πτυχωτό ηθμό για την απομάκρυνση του καταλύτη και έκπλυση αυτού με CH₂Cl₂ πολλές φορές. Ο διαλύτης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν δεν απομονώθηκε καθαρό, καθώς κατά την αντίδραση αναγωγής σχηματίστηκαν πολλά παραπροϊόντα.



4.38 Σύνθεση της ένωσης 40



Α' προσπάθεια: Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται διάλυμα του οξέος **8** (7.6 mg, 0.025 mmol) σε απόλυτο DMF (1 ml). Υπό ανάδευση και στους 0 °C προστίθενται HATU (14.25 mg, 0.038 mmol), DIPEA (13 μl) και DMAP

(4.58 mg, 0.038 mmol). Ακολουθεί η προσθήκη της ένωσης **35** (8 mg, 0.027 mmol). Μετά από 17 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού το μίγμα θερμαίνεται στους 75 °C για 2 μέρες. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 5 μέρες. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Με λήψη φάσματος ¹H NMR επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού της ένωσης **40** σε πολύ μικρό ποσοστό, όμως η ένωση δεν λήφθηκε σε καθαρή μορφή.

B' προσπάθεια: Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρεται διάλυμα του οξέος **8** (39.3 mg, 0.13 mmol) σε απόλυτο THF (1 ml). Υπό ανάδευση και στους 0 °C προστίθενται PyBroP (65.7 mg, 0.14 mmol) και Et₃N (236 μl). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και σε ψύξη για 30 min προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Ακολουθεί η προσθήκη της ένωσης **35** (44.33 mg, 0.15 mmol) διαλυμένη σε απόλυτο THF (1 ml), στάγδην. Μετά από 10 h σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού στο μείγμα προστίθεται DMF (1 ml). Μετά από 48 h σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση θερμαίνεται στους 40 °C. Η αντίδραση διακόπτεται μετά από 5 μέρες. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στην αντλία υψηλού κενού. Το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ και H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/MeOH 20:1. Με λήψη φάσματος ¹H NMR επιβεβαιώθηκε ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού της ένωσης **40** σε πολύ μικρό ποσοστό, όμως η ένωση δεν λήφθηκε σε καθαρή μορφή.

Βιβλιογραφία

1. Harden A, Young W. "The alcoholic ferment of yeast-juice" Proc R.Soc. Lond Ser B 1905;77:405-420
2. Gribble FM, Loussouarn G, Tucker SJ, Zhao C, Nichols CG, Ashcroft FM, "A novel method for measurement of submembrane ATP concentration". J.Biol Chem 2000;275(39):30046-30049
3. Traut TW. "Physiological concentrations of purines and pyrimidines". Mol Chem Biochem 1994;140(1):1-20
4. Davidson JN, Frazer SC, Hutchison WC, "Phosphorus compounds in the cell", "Protein-bound phosphorus fractions studied with the aid of radioactive phosphorus". Biochem J.1951;49(3):311-321
5. Berg J., Tymoczko J., Stryer L., Βιοχημεία 5η έκδοση, **2001**, Εκδόσεις Κρήτης
6. Hunter, "Protein Kinase Classification". 200, **1991**.
7. "Structural Basis for Control by Phosphorylation", Louise N. Johnson, Richard J. Lewis, Chem. Rev., 2001, 101 (8), 2209–2242 DOI: 10.1021/cr000225s
8. Manning G, Whyte DB, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome". Science 298 (5600) : 1912–1934 doi:10.1126/science.1075762
9. Hanks SK, Hunter T. "Protein kinase 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase catalytic domain structure and classification". FASEB J 1995;9(8): 576-596
10. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of catalytic domains". Science 1988;241(4861): 42-52
11. "High-Throughput Structural Biology in Drug Discovery: Protein Kinases" T.J. Stout, P.G. Foster and D.J. Matthews, Current Pharmaceutical Design, 2004, 10, 1069-1082 1069
12. "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase" Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM Science. 253 (5018) : 407-14. doi:10.1126/science.1862342.

13. <http://www.compbio.dundee.ac.uk/kinomer/families.html>
14. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/66/16/8147> "Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers" Capra et al. *Cancer Research*. 2006
15. Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG. "Protein serine/threonine kinases". *Annu Rev Biochem* 1987;56: 567–613.
16. "The Serine/Threonine Protein Kinase, p90 Ribosomal S6 Kinase, Is an Important Regulator of Prostate Cancer Cell Proliferation"D.E. Clark, T.M. Errington, J.A. Smith, H.F. Frierson Jr., M.J. Weber and D.A. Lannigan DOI: 10.1158/0008-5472
17. H. Hug, T.F. Sarre, "Protein kinase C isoenzymes: divergence in signaltransduction" *Biochem. J.* 291 (1993) 329–343.
18. M. Musashi, S. Ota, N. Shiroshita, "The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis", *Int. J. Hematol.* 72 (2000) 12–19.
19. "Nuclear protein kinase C", Alberto M. Martelli, Camilla Evangelisti, Maria Nyakern, Francesco Antonio Manzoli,*Biochimica et Biophysica Acta* 1761 (2006) 542–551
20. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". *Endocrine Reviews*. 22 (2): 153–83. doi:10.1210/er.22.2.153
21. Coulombe P, Meloche S (2007). "Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1773 (8): 1376–87. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.001
22. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance". *Nature* 420 (6913): 333–6. doi:10.1038/nature01137
23. Hunter, T. *Signaling-2000 and Beyond*. *Cell*, 2000;100: 113-127.
24. Schlessinger, J. "Cell Signaling by receptor tyrosine kinases". *Cell*, 2000. 103: 211-225
25. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. "The protein tyrosine kinase family of the human genome". *Oncogene* 2000;19(49): 5548-5557
26. "Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases" Mark A. Lemmon, Joseph Schlessinger, DOI 10.1016/j.cell.2010.06.011

27. "Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer" Manash K. Paul and Anup K. Mukhopadhyay *Int. J. Med. Sci.* 2004 1(2): 101-115
28. Elghazi L., Balcazar N., Bernal-Mizrachi E., "The International Journal of Biochemistry and Cell Biology", 2006,38,157
29. Reilly J. *Blood Reviews*,2003,17,241
30. Contessa J., Abell A., Valerie K., Lin P., Schmidt-Ullrich R., *Int. J. Radiation Oncology Biol. Psys*, 2006,65,851
31. Neet K, Hunter T (1996). "Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families". *Genes Cells*. 1 (2): 147–69. doi:10.1046/j.1365-2443.1996.d01-234
32. Schenk, PW and Snarr-Jagalska, BE. "Signal perception and transduction: the role of protein kinases". *Biochim Biophys Acta*. 1999. 1449: 1-24.
33. Heldin, GH. "Dimerization of cell surface receptor tyrosine kinases". *Cell*, 1995. 80: 213-223.
34. "Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells". Elzbieta Gocek, Anargyros N. Moulas, and George P. Studzinski DOI: 10.3109/10408363.2013.874403
35. M.T. Brown, J.A. Cooper, "Regulation, substrates and functions of src", *Biochim. Biophys. Acta* 1287 (1996) 121–149, ‘‘A thorough review of the biochemical properties of Src’’.
36. "Src protein–tyrosine kinase structure and regulation" Robert Roskoski Jr. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (2004) 1155–1164
37. Dehm SM, Bonham K (2004). "SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation". *Biochem. Cell Biol.* 82 (2): 263–74. doi:10.1139/o03-077
38. Okada M, Nakagawa H (1989). "A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function". *J. Biol. Chem.* 264 (35): 20886–93.
39. Szczylik C, Skorski T, Nicolaides NC, Manzella L, Malaguarnera L, Venturelli D, Gewirtz AM, Calabretta B (August 1991). "Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides". *Science*. 253 (5019):562–5 doi:10.1126/science.1857987

40. "Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells". Audrey Sirvent, Christine Benistant and Serge Roche *Biol. Cell* (2008) 100, 617–631 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BC20080020
41. "Raf Kinases: Function, Regulation and Role in Human Cancer" Deborah T. Leicht, Vitaly Balan, Alexander Kaplun, Vinita Singh-Gupta, Ludmila Kaplun, Melissa Dobson, and Guri Tzivion *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug; 1773(8): 1196–1212.
42. LaRonde-LeBlanc N., Wlodawer A., *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005,1754,14
43. "FDA-approved small-molecule kinase inhibitors" Peng Wu, Thomas E. Nielsen, and Mads H. Clausen
44. "Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs" Peng Wu, Thomas E. Nielsen and Mads H. Clausen
45. Cox, K.J. et al. (2010) "Tinkering outside the kinase ATP box: allosteric (type IV) and bivalent (type V) inhibitors of protein kinases". *Future Med. Chem.* 3, 29–43
46. "Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors" Jianming Zhang, Priscilla L. Yang and Nathanael S. Gray
47. "Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs" Dorian Fabbro, Stephan Ruetz, Elisabeth Buchdunger, Sandra W. Cowan-Jacob, Gabriele Fendrich, Janis Liebetanz, Jurgen Mestan, Terence O'Reilly, Peter Traxler, Bhabatosh Chaudhuri, Heinz Fretz, Jurg Zimmermann, Thomas Meyer, Giorgio Caravatti, Pascal Furet, Paul W. Manley *Pharmacology & Therapeutics* 93 (2002) 79– 98
48. <http://www.bestrong.org.gr/el/cancer/typesofcancer/leukemia/>
49. "Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy" Amit Arora and Eric M. Scholar *JPET* 315:971–979, 2005
50. "Glivec (STI571,IMATINIB), a rationally developed, targeted anticancer drug", Renaud Capdeville, Elisabeth Buchdunger, Juerg Zimmermann and Alex Matter
51. "Targeting the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia" John M. Goldman, D.M. Junia V. Melo, M.D., PH.D. *N Engl J Med*, Vol. 344, No. 14 · April 5, 2001

52. "The interplay of structural information and functional studies in kinase drug design: insights from BCR-Abl" Michael J Eck^{1,2} and Paul W Manley
Current Opinion in Cell Biology 2009, 21:288–295
53. "Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor" P.W. Manley, S.W. Cowan-Jacob, E. Buchdunger, D. Fabbro, G. Fendrich, P. Furet, T. Meyer and J. Zimmermann *European Journal of Cancer* Vol. 38 Suppl. 5 (2002) S19–S27
54. J. Zimmermann, EU Pat., 0564409, 1993.
55. J. Zimmermann, US Pat., 5521184, 1996.
56. O. Loiseleur, D. Kaufmann, S. Abel, H. M. Buerger, M. Meisenbach, B. Schmitz and G. Sedelmeier, World Pat, 03066613, 2003.
57. "The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib" Benjamin J. Deadman, a Mark D. Hopkin, a Ian R. Baxendale b and Steven V. Ley* a *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 1766
58. "An optimized approach in the synthesis of imatinib intermediates and analogues" M. Kinigopoulou, M. Filippidou, M. Gogou, A. Giannousi, P. Fouka, N. Ntemou, D. Alivertis, C. Georgis, A. Brentas, V. Polychronidou, P. Voulgari, V. Theodorou and K. Skobridis *RSC Adv.*, 2016, 6, 61458
59. "A New Challenging and Promising Era of Tyrosine Kinase Inhibitors" J. Jean Cui doi.org/10.1021/ml500091p | *ACS Med. Chem. Lett.*
60. "Second generation inhibitors of BCR ABL for the treatment of imatinib resistant chronic myeloid leukaemia", Ellen Weisberg, Paul W. Manley, Sandra W. Cowan-Jacob, Andreas Hochhaus and James D. Griffin
61. "Kinase Domain Mutations in Cancer: Implications for Small Molecule Drug Design Strategies" Jack A. Bikker, Natasja Brooijmans, Allan Wissner, and Tarek S. Mansour *Journal of Medicinal Chemistry* Volume 52, Number 6
62. "Small Molecule Kinase Inhibitors as Anti-Cancer Therapeutics" O. Chahrour, D. Cairns and Z. Omran *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2012, 12, 399-411
63. "AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL" E Weisberg, P Manley, J Mestan, S Cowan-Jacob, A Ray and JD Griffin, *British Journal of Cancer* (2006) 94, 1765 – 1769
64. "Nilotinib: A Novel, Selective Tyrosine Kinase Inhibitor" Jean-Yves Blay and Margaret von Mehren

65. "Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib" Paul W. Manley, Nikolaus Stiefl, Sandra W. Cowan-Jacob, Susan Kaufman, Jörgen Mestan, Markus Wartmann, Marion Wiesmann, Richard Woodman, Neil Gallagher *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (2010) 6977–6986
66. "Dasatinib: a new step in molecular target therapy" A. Olivieri & L. Manzione *Annals of Oncology* 18 (Supplement 6): vi42–vi46, 2007 doi:10.1093/annonc/mdm223
67. "Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance" *Chem Biol Drug Des* 2011; 77: 1–11
68. "FDA Approves Nexavar for Patients with Inoperable Liver Cancer" (Press release). FDA. November 19, 2007. Retrieved November 10, 2012.
69. Keating GM, Santoro A (2009). "Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma". *Drugs*. 69 (2): 223–40. doi:10.2165/00003495-200969020-00006. PMID 19228077.
70. 2009 – "SATURN: A double-blind, randomized, phase III study of maintenance erlotinib versus placebo following nonprogression with first-line platinum-based chemotherapy in patients with advanced NSCLC"
71. Raymond E, Faivre S, Armand J (2000). "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy". *Drugs*. 60 Suppl 1: 15–23; discussion 41–2. doi:10.2165/00003495-200060001-00002. PMID 11129168
72. "Improved Synthesis of Substituted 6,7-Dihydroxy-4-quinazolineamines: Tandtutinib, Erlotinib and Gefitinib" Petr Knesl, Dirk Rösling and Ulrich Jordis *Molecules* 2006, 11, 286-297.
73. "Synthesis of [11C]Iressa as a new potential PET cancer imaging agent for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase" Ji-Quan Wang, Mingzhang Gao, Kathy D. Miller, George W. Sledg and Qi-Huang Zhenga, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16 (2006) 4102–4106
74. "A Convenient and Easy Purification Approach to High-Yield Synthesis of Gefitinib as an Anticancer Agent from Isovaniline" November 2014, Volume 48, Issue 8, pp 520–524
75. US Food and Drug Administration (2006). "FDA approves new treatment for gastrointestinal and kidney cancer".

- 76.** [http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR_-Summary for the public/human/000687/WC500057689](http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR_-Summary_for_the_public/human/000687/WC500057689).
- 77.** "Sunitinib: a novel tyrosine kinase inhibitor. A brief review of its therapeutic potential in the treatment of renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumors (GIST)" Christophe Le Tourneau, Eric Raymond, and Sandrine Faivre 2007 Jun; 3(2): 341–348.
- 78.** "An improved synthesis of sunitinib malate via a solvent-free decarboxylation process" Ge Meng, Chunyan Liu, Shidong Qin, Mengshu Dong, Xiaomi Wei, Meilin Zheng, Liwen Qin, Huihui Wang, Xiaoshuang He, Zhiguo Zhang, November 2015, Volume 41, Issue 11, pp 8941–8954