



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

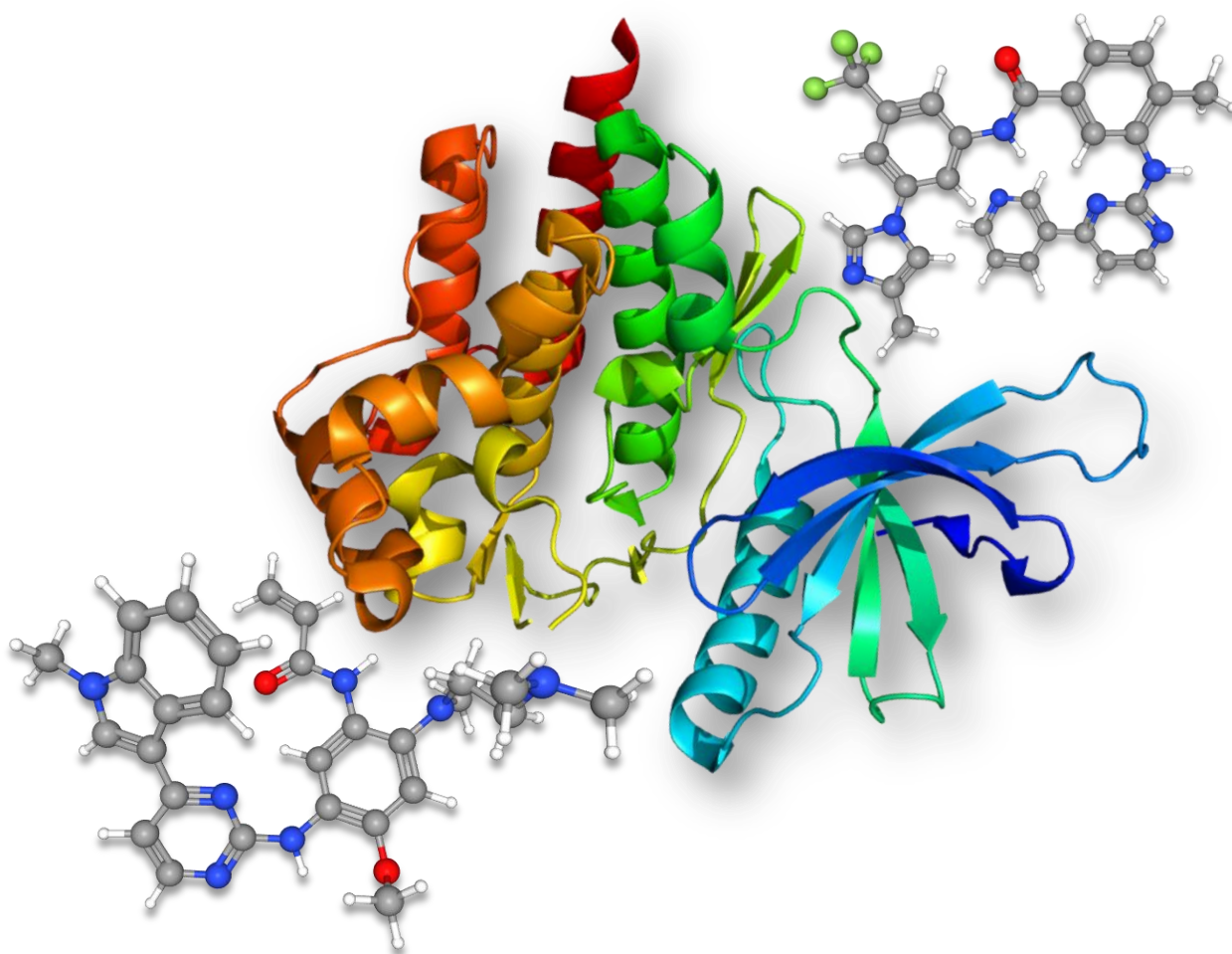


Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Επιβλέπων Καθηγητής: Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

**ΓΟΥΤΣΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**



**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΧΗΜΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΝΙΛΟΤΙΝΙΒΗΣ (NILOTINIB) ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΣΙΜΕΡΤΙΝΙΜΠΗΣ (OSIMERTINIB) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ**

Ιωάννινα  
2019

Εικόνες Εξωφύλλου:

Nilotinib:

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Nilotinib, CID=644241, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nilotinib> (accessed on Sept. 15, 2019)

TYK2:

By Pleiotrope - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15989149>

Osimertinib:

National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Osimertinib mesylate, CID=78357807, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Osimertinib-mesylate> (accessed on Sept. 15, 2019)



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ  
ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΑ ΧΗΜΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ  
ΝΙΛΟΤΙΝΙΒΗΣ (ΝΙΛΟΤΙΝΙΒ) ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΣΙΜΕΡΤΙΝΙΜΠΗΣ  
(ΟΣΙΜΕΡΤΙΝΙΒ) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ  
ΕΚΛΕΚΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ**

ΓΟΥΤΣΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ  
Χημικός

Ιωάννινα  
- 2019 -

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Γούτσιου Γεωργία

A.M. 1213

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Καθηγητής

Βαρβούνης Γεώργιος

Καθηγητής

Θεοδώρου Βασιλική

Ομότιμη Καθηγήτρια

Ιωάννινα

4/10/2019





Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά το σχεδιασμό, τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό νέων εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων, της Νιλοτινίβης (Nilotinib, Tasigna™) και του Osimertinibmesylate (Tagrisso™).

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των εν λόγω ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ3-210 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Χημείας και συγκεκριμένα της κατεύθυνσης «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία-Βιοδραστικές Ενώσεις». Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην προαγωγή της επιστήμης σε πεδία, όπως η Χημεία και η Βιολογία, που σχετίζονται εν γένει με την επιστήμη της Ιατρικής.

Πρώτα απ' όλους θα ήθελα, φυσικά, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου και επιστημονικό μου υπεύθυνο Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει τα τελευταία τρία χρόνια, κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού μου διπλωμάτος ειδίκευσης και κατά το χρόνο της πτυχιακής μου εργασίας που ως προπτυχιακή φοιτήτρια είχα την τύχη να είμαι μέλος της ομάδας του. Θα ήθελα, επίσης να τον ευχαριστήσω, καθώς, χωρίς υπερβολές, όσες φορές χρειάστηκα τη βοήθειά του, είτε για κάποιο εργαστηριακό θέμα που προέκυπτε είτε για θέματα που αφορούσαν δικές μου υποχρεώσεις, ήταν κοντά μου, πάντα προσιτός να μου λύσει κάθε μου πρόβλημα. Τέλος, οι συμβουλές του είναι αυτές που θα με συντροφεύουν στα μελλοντικά μου σχέδια.

Θα ήταν λίγο ένα μόνο ευχαριστώ στην Ομότιμη Καθηγήτρια κα. Βασιλική Θεοδώρου. Πέρα από τις συμβουλές της σε επιστημονικό επίπεδο, το ενδιαφέρον της για καθέναν από εμάς, ανεξαιρέτως, ήταν αξιοθαύμαστο. Μπορεί πολλά από τα άτομα της ομάδας μας να μην ήταν ιδιαίτερα εκδηλωτικά μαζί σας, αλλά τα μάτια μας δεν μπορούν να πουν ψέματα. Και στα μάτια όλων, όποτε βρισκόμασταν αντικατοπτρίζονταν η απεριόριστη συμπάθεια και ο θαυμασμός.

Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω τον κ. Γεώργιο Βαρβούνη για την άμεση ανταπόκριση και την αποδοχή εκ μέρους του να συμμετάσχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και να αξιολογήσει την ερευνητική μου προσπάθεια.

Θα ήταν αμέλεια εκ μέρους μου αν δεν αναφερόμουν στους εργαστηριακούς μου συναδέλφους Πηνελόπη Βούλγαρη, Νικολέτα Ντέμου, Μιχάλη Αλαγιάννη, Αλέξιο Μπρέντα, Ανδρομάχη Μπακαγιάννη, Παναγιώτα Βελισσάρη, Αλεξία Νίκου, Στέλιο Κοτίδη, Χριστίνα Καραμέτου, Αντώνη Κουσαξίδη, Μάριο-Ηλία Γιαννέλο και Μαρία Τσίπα. Με τα άτομα αυτά, καθώς και με τους μεταπτυχιακούς φοιτητές από το εργαστήριο του κ. Βαρβούνη Βασίλη Γκάλπινο, Παρασκευή Θεοδωρακοπούλου, Ιωάννη Γεροντίτη και Ειρήνη Τσιμπερλίδου, περνούσαμε τουλάχιστον 8-10 ώρες την ημέρα. Έχοντας αυτό ως δεδομένο, είναι πιθανό πολλές φορές να υπάρξουν φθορές, ίσως καυγάδες ή παρεξηγήσεις, ωστόσο είναι ακόμη πιθανότερο να αναπτυχθούν φιλίες. Προσωπικά νοιώθω τυχερή που μπορώ να αποκαλώ κάποια από τα παραπάνω άτομα, εκτός από φίλους, και οικογένειά μου. Ακόμη, ένα ευχαριστώ και στους φίλους μου εκτός εργαστηρίου Αγγελική, Βερόνικα, Σταυρούλα και Αναστασία που πάντα είναι δίπλα μου και με ενθαρρύνουν.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο κέντρο NMR του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$ , καθώς και το κέντρο μάζας για τη λήψη φασμάτων μάζας, όπως φυσικά και τον κ. Γεώργιο Βαρβούνη για τη λήψη φασμάτων μάζας χαμηλής διακριτικής ικανότητας. Ακόμη, τους συναδέλφους μου Αντώνιο Κουσαξίδη και Αλέξιο Μπρέντα για τα υπολογιστικά πειράματα μοριακής μοντελοποίησης.

Τελευταία αφήνω την οικογένειά μου. Εδώ όμως οφείλω το μεγαλύτερο και πιο θερμό ευχαριστώ. Οι δικοί μου άνθρωποι ήταν αυτοί που εκτός από την οικονομική ενίσχυση, μου παρείχαν κυρίως την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη που χρειάστηκα ενίοτε. Πίστευαν σε εμένα και τις δυνατότητές μου, ακόμη και όταν εγώ έχανα την πίστη μου.

Τέλος, να μου επιτραπεί, να ξεχωρίσω τη μαμάμου που είναι αυτή που προσπαθεί πάντα να με κάνει να σκέφτομαι και να αρχίσω, επιτέλους, να πιστεύω στον εαυτό μου και σε αυτά που μπορώ να καταφέρω.

*Στα αδέρφια μου*  
*Νεραντζούλα και Πέτρο...*

## Περιεχόμενα

---

Περίληψη.....	xv
Abstract .....	xvii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> .....	1
Εισαγωγή - Σκοπός .....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Σκοπός.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> .....	7
Θεωρητικό μέρος .....	7
2.1 Κυτταρικός Κύκλος.....	7
2.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες-Φωσφορυλίωση.....	8
2.3 Οικογένειες Πρωτεϊνικών Κινασών .....	9
2.4 Δομή Πρωτεϊνικών Κινασών .....	12
2.5 Πρωτεϊνικές Κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης .....	13
2.6 Πρωτεϊνικές Κινάσες Τυροσίνης.....	25
2.6.1 Οικογένεια Srcπρωτεϊνικών κινασών .....	30
2.6.2 Η c-Abl πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης.....	33
2.7 Οικογένεια ErbB Υποδοχέων-Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας EGFR .....	35
2.8 Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες .....	41
2.9 Καρκίνος.....	42
2.10 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία - Χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph) <sup>123</sup> .....	44
2.11 Καρκίνος Πνεύμονα .....	46
2.12 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών-Τύποι.....	49
2.13 Παραδείγματα Αναστολέων Πρωτεϊνικών Κινασών .....	53
2.13.1 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου I.....	53
2.13.2 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου I ½ A .....	69
2.13.3 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου I ½ B .....	70
2.13.4 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου II.....	72
2.13.5 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου III και VI.....	81
2.13.6 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών με Άγνωστες Δεσμευτικές Ιδιότητες .....	82
2.14 Δομικά Χαρακτηριστικά Αναστολέων Πρωτεϊνικών Κινασών .....	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> .....	93
Συζήτηση - Αποτελέσματα .....	93
3.1 Ορθολογικός σχεδιασμός νέων αναστολέων μέσω Μοριακής Μοντελοποίησης .....	93
3.1.A Ανάλογα Nilotinib .....	94

3.1.1 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα του Nilotinib με την Abl1 .....	94
3.1.B Ανάλογα Osimertinib .....	99
3.1.2 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα του Osimertinib με την περιοχή τυροσινικής κινάσης του EGFR.....	99
3.2 Μοριακή Μοντελοποίηση Nilotinib και αναλόγων του Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο άλλων πρωτεϊνικών κινασών .....	104
3.2.1 Εύρεση βιολογικών στόχων του Nilotinib μέσω του προγράμματος SwissTargetPrediction.....	104
3.2.1 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01και Nil-02 στο ενεργό κέντρο του PDGFRα .....	108
3.2.2 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της c-SRC.....	110
3.3.3 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της MAPK11 .....	112
3.3.4 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της TEK.....	114
3.3.5 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01και Nil-02 στο ενεργό κέντρο του CSF1R.....	116
3.3.6 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της c-KIT.....	119
3.3.7 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της DDR1.....	121
3.3.8 Δομική ομοιότητα της πρωτεϊνικής κινάσης Abl1 με τις δομές των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης .....	123
A. Ανάλογα Nilotinib.....	126
3.3 Ολική πορεία σύνθεσης των νέων εν δυνάμει αναστολέων .....	126
3.4 Σύνθεση β-εναμινόνης.....	127
3.4.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν- 3-υλο) προπ-2-εν-1-όνης .....	127
3.4.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της β-εναμινόνης.....	127
3.5 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.....	130
3.5.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του 3-αμινο-4- μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.....	130
3.5.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.....	131
3.6 Σύνθεση της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης.....	133
3.6.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης.....	133
3.7 Σύνθεση της φαινυλαμινοπυριμιδίνης.....	133

3.7.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του αντίστοιχου υποκατεστημένου μεθυλεστέρα βενζοϊκού οξέος.....	134
3.7.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5.....	135
3.8 Υδρόλυση του εστέρα προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ.....	138
3.8.1 Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος.....	138
3.8.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέος.....	139
A1. Σύνθεση αναλόγου Nil-01.....	140
3.9 Σύνθεση του μεθυλεστέρα της N-((4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.....	140
3.9.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλ (4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού.....	140
Σχήμα 3.67 :Αντίδραση σχηματισμού του μεθυλεστέρα της N-((4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.....	141
.....	141
3.9.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεθυλεστέρα της N-((4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.....	141
3.10 Σύνθεση του μεθυλεστέρα της N-((4-αμινο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.....	144
3.10.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλεστέρα της N-((4-αμινο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.....	144
Σχήμα 3.73: Αντίδραση σύνθεσης του μεθυλεστέρα της N-((4-αμινο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.....	145
3.11 Δημιουργία Αμιδικού Δεσμού για το σχηματισμό του Nil-01.....	146
3.11.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και μηχανισμός της ενεργοποίησης του οξέος.....	146
3.12 Εναλλακτικές προτεινόμενες πορείες για τη σύνθεση του αναλόγου Nil-01.....	150
3.12.1 Ολική σύνθεση 1 <sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας.....	150
3.12.2 Ολική σύνθεση 2 <sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας.....	151
3.13 Σύνθεση του μεθυλ (4- (3-ιωδο-4-μεθυλβενζαμιδο) -3- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικό.....	154
3.13.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλ (4- (3-ιωδο-4-μεθυλβενζαμιδο) -3- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικό.....	154
A2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-02.....	155
3.14 Σύνθεση του μεθυλ (3-νιτρο-5- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού.....	155
3.14.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλ (3-νιτρο-5- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού.....	155

3.14.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεθυλ (3-νιτρο-5-(τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού .....	158
3.15 Εναλλακτικές προτεινόμενες πορείες για τη σύνθεση το αναλόγου Nil-02 .....	161
3.15.1 Ολική σύνθεση 1 <sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας .....	161
3.15.3 Ολική σύνθεση 3 <sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας .....	163
B. Σύνθεση αναλόγων του Osimertinib .....	165
3.16 Ολική πορεία σύνθεσης αναλόγων του Osimertinib .....	165
3.17 Σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης.....	166
3.17.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης.....	166
3.17.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης.....	168
3.18 Σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-c]πυριδίνης.....	170
3.18.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-c]πυριδίνης .....	170
3.18.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-c]πυριδίνης.....	171
3.19 Σύνθεση του 3-(2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1H-ινδολίου .....	173
3.19.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του 3-(2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1H-ινδολίου.....	173
3.20 Σύνθεση της N-(4-φθορο-2-μεθοξυ-5-νιτροφαινυλ)-4- (1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-αμίνης.....	175
3.20.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-(4-φθορο-2-μεθοξυ-5-νιτροφαινυλ)-4- (1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-αμίνης.....	175
3.21 Σύνθεση της N <sup>1</sup> -(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-N <sup>1</sup> -μεθυλ-N <sup>4</sup> -4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-υλ)-2-νιτροβενζολο-1, 4-διαμίνης .....	177
3.21.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N <sup>1</sup> -(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-N <sup>1</sup> -μεθυλ-N <sup>4</sup> -4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-υλ)-2-νιτροβενζολο-1, 4-διαμίνης .....	177
Σχήμα 3.108: Μηχανισμός πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης (προσθήκη/απόσπαση) κατά τη σύνθεση της ένωσης O8. ....	177
3.22 Σύνθεση της N <sup>1</sup> -(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-N <sup>1</sup> -μεθυλ-N <sup>4</sup> -(4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-υλ)-τριαμίνης .....	178
3.22.1 Αντίδραση κατά τη σύνθεση της N <sup>1</sup> -(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-N <sup>1</sup> -μεθυλ-N <sup>4</sup> -(4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλ)-τριαμίνης.....	178
3.23 Σύνθεση του N-(2-((2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο) (μεθυλο) αμινο) -4- μεθοξυ -5- ((4- (1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-) φαινυλο) ακρυλαμιδίου) .....	178
3.23.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του N-(2-((2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)(μεθυλο)αμινο)-4-μεθοξυ-5-((4- (1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-) φαινυλο) ακρυλαμιδίου).....	178



3.24 Εναλλακτικές προτεινόμενες πορείες για τη σύνθεση του <i>Osimertinib</i> και των αναλόγων του .....	181
3.24.1 Ολική σύνθεση 1 <sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας .....	181
3.24.2 Ολική σύνθεση 2 <sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας .....	183
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> .....	184
Πειραματικό μέρος .....	184
4.1 Συσκευές και όργανα.....	184
4.2 Σύνθεση του αναλόγου Nil-01 .....	184
4.2.1 Σύνθεση της ένωσης 1 .....	184
4.2.2 Σύνθεση της ένωσης 2 .....	185
4.2.3 Σύνθεση της ένωσης 3 .....	186
4.2.4 Σύνθεση της ένωσης 4 .....	186
4.2.5 Σύνθεση της ένωσης 5 .....	187
4.2.6 Σύνθεση της ένωσης 6 .....	187
4.2.7 Σύνθεση της ένωσης 7 .....	188
4.2.8 Σύνθεση της ένωσης 8 .....	189
4.2.9 Σύνθεση της ένωσης 9 .....	190
4.2.10 Σύνθεση της ένωσης 10 .....	193
4.2.11 Σύνθεση της ένωσης 11 .....	194
4.2.12 Σύνθεση της ένωσης 12 .....	197
4.3 Σύνθεση του αναλόγου Nil-02 .....	198
4.3.1 Σύνθεση της ένωσης 13 .....	198
4.3.2 Σύνθεση της ένωσης 14 .....	199
4.4 Σύνθεση αναλόγων του <i>Osimertinib</i> .....	201
4.4.1 Σύνθεση της ένωσης O1.1 .....	201
4.4.2 Σύνθεση της ένωσης O1.2.....	202
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 <sup>ο</sup> .....	204
Συμπεράσματα.....	204
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <sup>ο</sup> .....	205
Βιβλιογραφία.....	205



## Περίληψη

---

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο σε πληθώρα λειτουργιών του κυττάρου, καθώς και σε πορείες μεταγωγής σήματος που επάγονται από τη φωσφορυλίωση με ATP. Η απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών έχει συνδεθεί με την εμφάνιση διάφορων νεοπλασιών, νευρολογικών ασθενειών και καρκίνο. Μεταξύ των ασθενειών βρίσκονται η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (ΧΜΛ) και ο Μη-μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (ΜΜΚΠ). Η εκλεκτική αναστολή των παθολογικών πρωτεϊνικών κινασών με ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που μιμούνται το ATP έχει καθιερωθεί ως μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την αντιμετώπιση του καρκίνου, καθώς αυτές οι διαδικασίες αποτελούν το τρωτό σημείο των καρκινικών κυττάρων. Ακριβώς γι' αυτόν το λόγο, οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών επιστημονικών ομάδων κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες.

Η Ιματινίβη (Imatinib) είναι ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας που εγκρίθηκε το 2001 για την αναστολή της χιμαιρικής τυροσινικής κινάσης Bcr-Abl και τη θεραπεία της ΧΜΛ. Αν και αρχικά τα αποτελέσματα της θεραπείας ήταν ενθαρρυντικά, δεν άργησαν να αναπτυχθούν μορφές λευχαιμίας με ιδιαίτερα ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, κατέστη επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη νέων εκλεκτικών αναστολέων με στόχο την αναστολή αυτών των μεταλλάξεων. Έτσι, αναπτύχθηκαν οι 2<sup>ης</sup> και 3<sup>ης</sup> γενιάς αναστολείς όπως η Νιλοτινίβη (Nilotinib). Κατά ανάλογο τρόπο, η αναστολή του EGFR, του οποίου υπερ-έκφραση έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του ΜΜΚΠ, οι αρχικοί αναστολείς Gefitinib και Erlotinib, έδωσαν τη θέση τους σε νέας γενιάς αναστολείς, ικανούς να αναστείλουν ανθεκτικές μεταλλάξεις, όπως η T790M μετάλλαξη του EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), συγκεκριμένα το Osimertinib.

Στο εργαστήριο σχεδιάστηκαν και έγιναν προσπάθειες σύνθεσής τους, ανάλογα δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων, του Nilotinib και του Osimertinib, ως αποτέλεσμα θεωρητικών υπολογισμών μοριακής μοντελοποίησης. Στην πρώτη περίπτωση οι τροποποιήσεις εστιάζονται στον τελικό ιμιδαζολικό δακτύλιο που αντικαταστάθηκε από το πενταμελή δακτύλιο της προλίνης, ενώ στα ανάλογα του δεύτερου σκευάσματος, οι τροποποιήσεις γίνονται στο αρωματικό σύστημα του ινδολίου,

πρόδρομης ένωσης του φαρμάκου. Οι συντεθείσες ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές ( $^1\text{H-NMR}$ ,MS).

## *Abstract*

---

Protein kinases are enzymes that play a pivotal role in a variety of cellular functions, as well as in ATP-induced signal transduction pathways. Deregulation of the normal function of protein kinases has been linked to the appearance of various neoplasms, neurological diseases, and cancer. Among the diseases are Chronic Myelogenous Leukemia (CML) and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). Selective inhibition of abnormal protein kinases by low molecular weight compounds that mimics ATP vulnerability of cancer cells. Precisely for this reason, protein kinases have been the focus of interest for many scientific groups over the last two decades.

Imatinib, the first selective inhibitor approved in 2001 for the inhibition of Bcr-Abl chimeric tyrosine kinase and the treatment of CML. Although initially encouraging the results of the treatment, it did not take long to develop forms of leukemia with highly resistant cancer cells. Therefore, it has become imperative to develop new selective inhibitors to inhibit such mutations. Thus, 2nd and 3rd generation inhibitors such as Nilotinib were developed. Similarly, inhibition of EGFR, whose overexpression has been observed in various cancers including NSCLC. In this regard, inhibitors such as Gefitinib and Erlotinib have given rise to a new generation of inhibitors capable of inhibiting resistant mutations such as the T790M mutation of EGFR and Osimertinib.

Our team in the laboratory designed and attempted to synthesize analogs of two medicinal products, Nilotinib and Osimertinib, as a result of theoretical molecular modeling calculations, with modifications. In the first case focusing on the final imidazole ring substituted by L-proline ring, which enters the form with a nucleophilic substitution. In analogs of the second formulation, Osimertinib, the modifications are concentrated in the aromatic system of the indole, a precursor compound of the drug. The synthesized compounds were identified by spectroscopic techniques ( $^1\text{H-NMR}$ , MS).



## Εισαγωγή - Σκοπός

### 1.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος αποτελεί μία θανατηφόρα ομάδα ασθενειών που προσβάλλει εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως. Πρόκειται για μια πολύπλευρη ασθένεια που, δυστυχώς, μπορεί να αντισταθεί στους θεραπευτικούς παράγοντες που αναπτύσσονται για την καταστολή της. Για κάθε οδό επιβίωσής της που εμποδίζεται, τα καρκινικά κύτταρα, ο καρκίνος δηλαδή, αναπτύσσουν αντισταθμιστικές οδούς που ανατρέπουν τον αποκλεισμό και επιτρέπουν την επιβίωσή τους. Σύμφωνα με τους Hanahan και Weinberg,<sup>1</sup> τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ορισμένες ικανότητες που τα καταστύουν κακοήθη και εγγυώνται την ανάπτυξη και τη διάδοση του όγκου. Σε αυτές τις δυνατότητες αποδόθηκε ο όρος "Χαρακτηριστικά του Καρκίνου". Ένα από τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά γνωρίσματα των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να υποστηρίζουν την πολλαπλασιαστική σηματοδότηση, κατά συνέπεια πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, οδηγώντας στην ανάπτυξη όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να το επιτύχουν δια χειρισμού των υποδοχέων κινασών τυροσίνης (RTK), των επιδρώντων υποκαταστατών τους και των συγγενών τους καθοδικών οδών σηματοδότησεως.

Στη βιοχημεία, η κινάση είναι ένα είδος ενζύμου που καταλύει τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και παίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό, την κυτταρική σηματοδότηση, τη ρύθμιση των πρωτεϊνών, την κυτταρική διακίνηση που οδηγεί στη διαίρεση, τις διαδικασίες έκκρισης και πολλές άλλες κυτταρικές οδούς. Οι κινάσες τυροσίνης, μια υποκατηγορία πρωτεϊνικών κινασών δρουν ως διακόπτες σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Η φωσφορυλίωση της κινάσης τυροσίνης καταλύει τη φωσφορυλίωση υπολειμμάτων τυροσίνης σε πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη μετάσταση. Ωστόσο, ορισμένες μεταλλάξεις ή ανωμαλίες στην δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης μπορεί να οδηγήσουν σε αδιάλειπτη, υψηλά ενεργή κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου. Έχει αποδειχθεί ότι η δυσλειτουργία της δραστηριότητας των RTKs έχει

συσχετιστεί με την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Εφόσον αποκαλύφθηκε η σχέση μεταξύ κινασών τυροσίνης και καρκίνου, έχουν αναπτυχθεί πολλοί αναστολείς μικρού μοριακού βάρους της κινάσης τυροσίνης και εφαρμόζονται στην κλινική θεραπεία, συμβάλλοντας σημαντικά στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

Τα τελευταία 30 χρόνια, οι πρωτεϊνικές κινάσες υπήρξαν οι πλέον μελετημένοι στόχοι στον τομέα των αντικαρκινικών φαρμάκων. Μέχρι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία 48 νέα μόρια, ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, φάρμακα έναντι πρωτεϊνικών κινασών.

Οι αναστολείς της κινάσης τυροσίνης TKI-ABL, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML – Chronic Myeloid Leukemia) η οποία είναι καρκίνος του αίματος που προκαλείται από τις θετικές σε χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph<sup>+</sup>) λευχαιμίες, ως συνέπεια της αμιβαίας ματάθεσης των χρωμοσωμάτων t(9,22) και (q34-q11). Ο καρκίνος μπορεί να προκληθεί από την ανισορροπία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και των ογκογόνων. Μέχρι σήμερα έχουν εντοπιστεί εκατοντάδες ογκογονίδια, όπως η μετάλλαξη του γονιδίου *BRCA1* και 2 στον καρκίνο του μαστού, η μετάλλαξη του γονιδίου του *EGFR* στον καρκίνο του πνεύμονα και το γονίδιο *BCR-ABL* στη χρόνια μυελοειδή λευχαιμία (CML). Η ABL κινάση, η οποία είναι πρωτεϊνική τυροσινική κινάση πρωτοογκογονιδίου που εμπλέκεται στην κυτταρική διαφοροποίηση, μετανάστευση και σηματοδότηση υποφέρει από μία ογκογονική ενεργοποίηση σε ανθρώπινες λευχαιμίες Ph + όπου παράγεται μια πρωτεΐνη σύντηξης (BCR-ABL) με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, με αρκετούς μηχανισμούς αυτής να εμπλέκονται στον κακοήγη μετασχηματισμό. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη BCR-ABL υπάρχει σε περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ), έχει γίνει ένας καλά επικυρωμένος νέος στόχος για το σχεδιασμό μικρών μοριακών αναστολέων για τη θεραπεία της ΧΜΛ. Μετά την αναγνώριση του μηχανισμού ανάπτυξης της νόσου, το Imatinib (Gleevec™), ο πρώτος εγκεκριμένος αναστολέας κινάσης τυροσίνης (2001), αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ΧΜΛ με στόχο την αναστολή της BCR-ABL κινάσης. Ως αναστολέας κινάσης BCR-Abl πρώτης γενιάς, το Imatinib εμφάνισε μεγάλη κλινική επιτυχία και κατέστη το φάρμακο πρώτης γραμμής για τη θεραπεία της ΧΜΛ. Εν τούτοις, λόγω των μεταλλάξεων στην περιοχή της ABL ή για άλλους λόγους έχει προκύψει ανθεκτικότητα των καρκινικών



κυττάρων σε πολλαπλά φάρμακα έναντι των υφιστάμενων BCR-ABL. Η BCR-ABL T315I είναι η πιο συνηθισμένη μετάλλαξη που προκύπτει από την αντικατάσταση του λεγόμενου υπολείμματος θρεονίνης 'gatekeeper' στη θέση 315 με ισολευκίνη, όπου θυσιάζει μια ευνοϊκή αλληλεπίδραση δέσμευσης υδρογόνου μεταξύ της imatinib και της Thr 315 και επιβάλλει μία δυσμενή στερική σύγκρουση λόγω της ογκώδους πλευρικής αλυσίδας της ισολευκίνης. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας οδήγησε στην ανάπτυξη δεύτερης γενεάς αναστολέων της κινάσης τυροσίνης BCR-ABL όπως η Νιλοτινίβη, η Δασατινίβη και η Βοσουτινίβη.

Το Nilotinib λοιπόν, ένας TKI δεύτερης γενιάς, που εγκρίθηκε από το Αμερικανικό FDA το 2007 (Tasigna™), ανακαλύφθηκε και αναπτύχθηκε από τη Novartis μέσω στρατηγικών δομικής βιολογίας και φαρμακευτικής χημείας για τη βελτιστοποίηση της κυτταρικής ισχύος και της επιλεκτικότητας προς την BCR-ABL για να ξεπεράσει τη ανθεκτικότητα της CML στο Imatinib. Το Nilotinib είναι περίπου 10 έως 30 φορές πιο ισχυρό από το Imatinib στην αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης τυροσίνης BCR-ABL και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που εκφράζουν BCR-ABL. Είναι αποτελεσματικό έναντι κυττάρων ανθεκτικών στο Imatinib που φέρουν μεταλλάξεις BCR-ABL (ενώ αναστέλει και την έκφραση του ABCB1, ακόμα και απουσία BCR-ABL).

Η οικογένεια του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι μία ομάδα τεσσάρων πρωτεϊνών και θεωρείται ως ένας ορθολογικός στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου δεδομένου ότι εκφράζεται συνήθως σε υψηλό επίπεδο στην παθογένεση και εξέλιξη μιας ποικιλίας τύπων καρκίνου. Οι κινάσες τυροσίνης EGFR εμπλέκονται στο στάδιο έναρξης ενός πολύπλοκου καταρράκτη σηματοδότησης που ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την ωρίμανση, την επιβίωση, τη μετάσταση, τη μετανάστευση, την προσκόλληση, τη διαφοροποίηση και την αγγειογένεση. Μεταλλάξεις της περιοχής της κινάσης τυροσίνης EGFR έχουν πρόσφατα ανακαλυφθεί σε κλινικά καρκινώματα. Σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) οι μεταλλάξεις EGFR εντοπίζονται σε 10-30 % των ασθενών. Ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας EGFR μικρού μοριακού βάρους υπήρξε το Gefitinib (Iressa™ - 2009). Πρόσφατα, οι εκλεκτικοί αναστολείς κινάσης τυροσίνης EGFR μικρού μοριακού βάρους (EGFR - TKI) έχουν καταστεί η θεραπεία πρώτης γραμμής για προχωρημένο NSCLC που περιλαμβάνει μεταλλάξεις του EGFR. Παρόλο

που οι ασθενείς με ευαισθητοποιητικές μεταλλάξεις EGFR θα μπορούσαν να επιτύχουν καλές αποκρίσεις στη θεραπεία με EKRTKI πρώτης γενιάς, όπως το Gefitinib και το Erlotinib, οι περισσότεροι ασθενείς απέκτησαν αντοχή στους αναστολείς EGFR πρώτης γενιάς εντός του 1 έτους θεραπείας. Αν και τα TKI δεύτερης γενιάς EGFR, όπως το Afatinib, το Neratinib και το Dacomitinib, παρουσίασαν πολλά υποσχόμενη δράση έναντι της μετάλλαξης T790M σε προκλινικά μοντέλα, απέτυχαν να ξεπεράσουν την αντίσταση που προκαλείται από την T790M σε ασθενείς λόγω της τοξικότητας που περιορίζει τη δόση που προκύπτει από μη-εκλεκτική αναστολή του αγρίου τύπου (WT) EGFR.

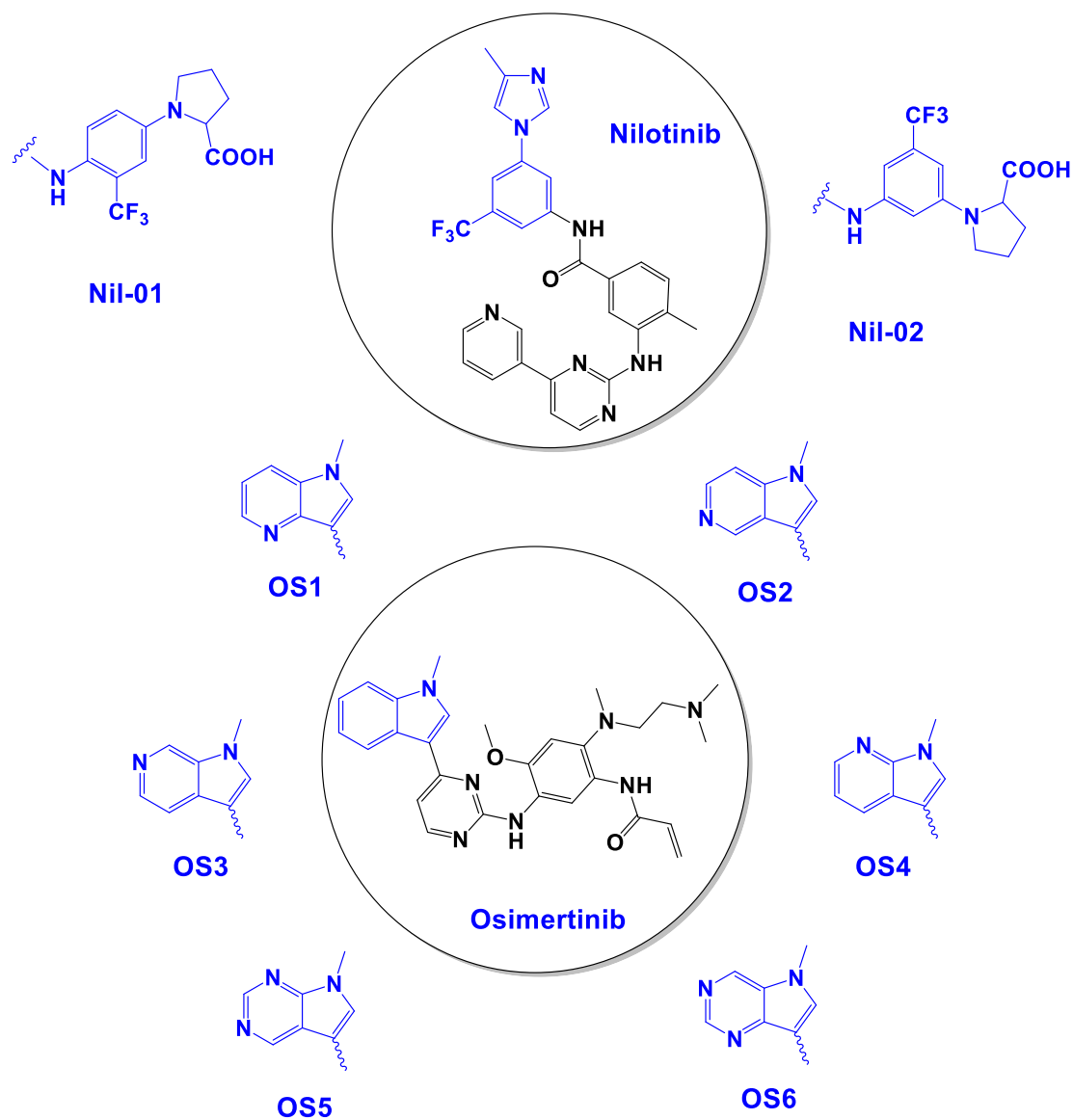
Το Osimertinib (Tagrisso<sup>TM</sup> - AZD9291), ένας από του στόματος αναστολέας τρίτης γενιάς μικρού μοριακού βάρους κατά του EGFR, έχει αναπτυχθεί ώστε να στοχεύει επιλεκτικά τον EGFR μετάλλαξης T790M με ομοιοπολικό μη αναστρέψιμο τρόπο. Το Osimertinib έλαβε γρήγορη έγκριση από τον FDA το Νοέμβριο του 2015 για τη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό NSCLC, θετικό για μετάλλαξη EGFR T790M, που έχουν λάβει θεραπεία με αναστολείς EGFR πρώτης ή δεύτερης γενιάς. Επί του παρόντος, οι αναφορές έδειξαν ότι το Osimertinib υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό στο σώμα, οδηγώντας σε χαμηλά επίπεδα της μητρικής ένωσης στα κόπρανα και τα ούρα, αλλά εμφανίζει θετικά ποσοστά απόκρισης.

## 1.2 Σκοπός

Λαμβάνοντας υπόψη όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω σχετικά με τη σημαντικότερη συμβολή των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών στην αντικαρκινική θεραπεία, αλλά και το αναδυόμενο πρόβλημα εμφάνισης αντίστασης από τα καρκινικά κύτταρα, έχει καταστεί σαφής η ανάγκη σχηματισμού παράγωγων ενώσεων των Nilotinib και Osimertinib, ως εν δυνάμει αναστολέων της κινάσης τυροσίνης BCR-ABL και του EGFR, αντίστοιχα.

Η παρούσα εργασία μεταπτυχιακής ειδίκευσης πραγματεύεται τον μοριακό σχεδιασμό, την ανάπτυξη και την ταυτοποίηση ακριβώς τέτοιων αναλόγων ενώσεων των Nilotinib και Osimertinib. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται εκτενής αναφορά στα δομικά χαρακτηριστικά που φέρουν τα δύο αυτά θεραπευτικά μόρια καθώς και όλοι οι υπόλοιποι αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών. Συσχετίζονται

τα δομικά χαρακτηριστικά με την ανασταλτική ικανότητα αυτών των μορίων, δηλαδή η σχέση δομής και βιολογικής δραστηριότητας. Με βάση τα ευρύτερα δομικά μοστοιχεία των υπαρχόντων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, παρουσιάζεται ο σχεδιασμός μίας σειράς ανάλογων ενώσεων.



Σχήμα 1.1: Ανάλογα Nilotinib και Osimertinib.

Ως εκ τούτου, τα ανάλογα του Nilotinib που σχεδιάστηκαν, διαφοροποιούνται, με το αρχικό φαρμακοφόρο μοντέλο στον τελικό βενζολικό και τον ιμιδαζολικό δακτύλιο. Ειδικότερα, στη θέση του ιμιδαζολικού δακτυλίου υπάρχει, πλέον, ενταγμένος μέσω

του ατόμου αζώτου του, ο πενταμελής δακτύλιος της προλίνης. Όσον αφορά τον τελικό βενζολικό δακτύλιο, η διαφορά έγκειται στις διαφορετικές θέσεις των υποκαταστατών, που ωστόσο παραμένουν οι ίδιοι.

Στην περίπτωση των αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος της Οσιμερτινίμπης, όλες οι τροποποιήσεις για την παραλαβή, εν τέλει, των έξι νέων αναλόγων εντοπίζονται αποκλειστικά στον ινδολικό δακτύλιο, ο οποίος αντικαθίσταται όπως φαίνεται στο ως άνω σχήμα, από πυρρολυλο-πυριδίνες (εμπειρική ονομασία αζα-ινδόλιο) και πυρρολυλο-πυριμιδίνες (εμπειρική ονομασία δι-αζα-ινδόλιο). Παράλληλα, κατά τη σύνθεση του Osimertinib και των αναλόγων του, διερευνήθηκε και η βελτιστοποίηση της πειραματικής πορείας με σκοπό την εύρεση μιας, πρωτίστως, οικονομικότερης και αποδοτικότερης προσέγγισης.

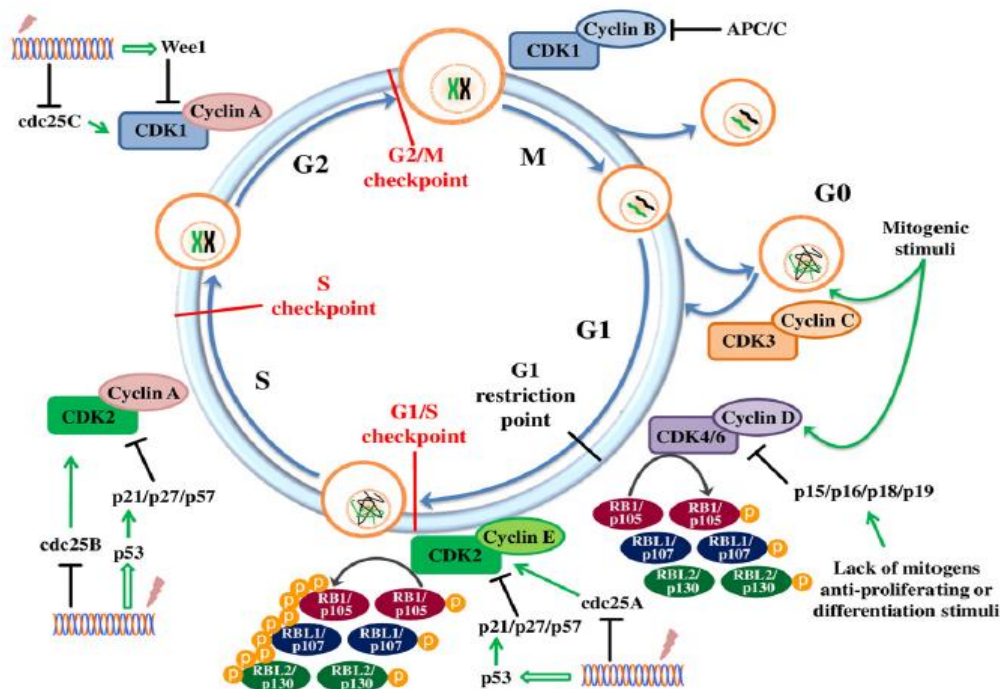
Ακολούθως, η παρούσα εργασία έχει στόχο τη θεωρητική μελέτη της πιθανής ανασταλτικής δράσης των αναλόγων της Νιλοτινίβης που σχεδιάστηκαν, σε διάφορα βιομόρια, κυρίως όμως σε πρωτεϊνικές κινάσες. Οι πρωτεϊνικές κινάσες-στόχοι έχουν επιλεγεί προσεκτικά, βάσει κάποιων κριτηρίων και είτε παρουσιάζουν κάποια δομική ομοιότητα με την κινάση, τη δράση της οποίας αναστέλλει το Nilotinib, είτε υπάρχει ήδη κάποιος εκλεκτικός αναστολέας για αυτές, που εμφανίζει δομική ομοιότητα με το Nilotinib.

Θεωρητικό μέρος

2.1 Κυτταρικός Κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος, ή κύκλος κυτταρικής διαίρεσης, είναι μία σειρά γεγονότων που λαμβάνει χώρα σε ένα κύτταρο και οδηγεί στο διπλασιασμό του DNA (αντιγραφή DNA) και εν συνεχεία στη διαίρεση του κυτταροπλάσματος και των οργανιδίων, για να παραχθούν τελικά δύο θυγατρικά κύτταρα. Περιλαμβάνει τέσσερις διαδοχικές φάσεις:

1. Φάση S, όπου λαμβάνει χώρα η σύνθεση του DNA,
2. Φάση M, όπου η κυψέλη χωρίζεται σε δύο θυγατρικά κύτταρα,
3. Φάση G1, μετά τη μίτωση και πριν από τη φάση S, όπου τα κυτταρικά βιοσυνθετικά συμβάντα λαμβάνουν χώρα με υψηλό ρυθμό και τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μέγεθος,
4. Φάση G2, όπου συμβαίνει μεταξύ των φάσεων S και M, κατά τη διάρκεια των οποίων τα κύτταρα προετοιμάζονται για τη μίτωση.<sup>1</sup>



Εικόνα 2.1: Κυτταρικός κύκλος.<sup>2</sup>

Η συναρμολόγηση και η επιβίωση οποιουδήποτε πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται από την κυτταρική διαίρεση (μίτωση).<sup>1</sup> Για να εξασφαλιστεί η σωστή διαίρεση του κυττάρου, υπάρχουν μηχανισμοί ελέγχου, γνωστοί ως σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints). Τα βασικά γονίδια και οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε ευκαρυώτες, από τους απλούστερους μέχρι τους πιο σύνθετους ως τον άνθρωπο.<sup>2</sup>

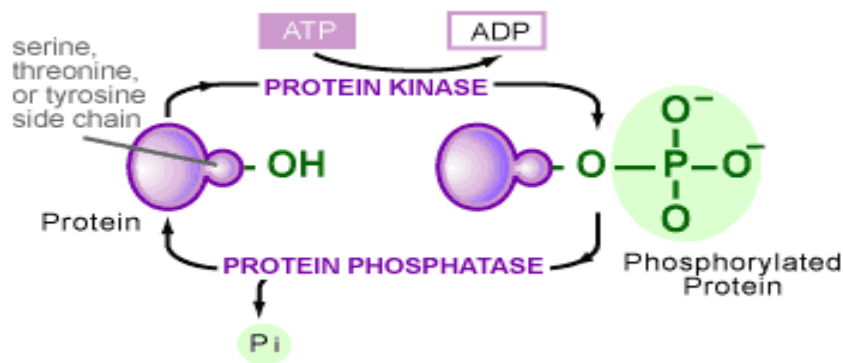
Ταυτόχρονα η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η συνέχισή του ή η διακοπή του είναι απόρροια εξωτερικών ή εσωτερικών ερεθισμάτων με αποτέλεσμα ο κυτταρικός κύκλος να διαταράσσεται και να παράγονται διάφορα κυτταρικά προϊόντα (πρωτεΐνες). Γενικά, η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σχετίζεται, σε πολλές περιπτώσεις, με την εμφάνιση καρκίνου.

## **2.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες-Φωσφορυλίωση**

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων, πολλές από τις οποίες μεσολαβούν στην απόκριση εξωτερικών ερεθισμάτων των ευκαρυωτικών κυττάρων.<sup>4</sup> Στο ανθρώπινο γονιδίωμα η υπερ-οικογένεια αυτή αποτελείται από 560 μέλη, 492 τυπικά και 68 άτυπα ένζυμα.<sup>3</sup>

Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν χημικές αντιδράσεις που μεταφέρουν την φωσφορυλική (γ-φωσφορική) ομάδα του ATP σε πρωτεΐνες υποστρώματος. Η φωσφορυλίωση, όπως καλείται η διεργασία αυτή, από πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζει κυτταρικούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος που ενορρηστρώνουν τις περισσότερες κυτταρικές διεργασίες.<sup>4</sup>

Η σημασία της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών στην ευκαρυωτική σηματοδότηση αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι οι περιοχές πρωτεϊνικής κινάσης βρίσκονται στο ~ 2% των ευκαρυωτικών γονιδίων.<sup>5</sup> Προωθείται από ειδικά ένζυμα, πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης και σερίνης-θρεονίνης.<sup>6</sup>



Εικόνα 2.2: Φωσφορυλίωση Πρωτεϊνικών Κινασών.<sup>7</sup>

Η πολυπλοκότητα του συστήματος συνεπάγεται την ευάλωτη θέση του. Μεταβολές στις λειτουργίες αυτών των ενζύμων μπορεί να προκαλέσουν μια σειρά παθολογικών αλλαγών μέσα στο κύτταρο. Απορρύθμιση της φωσφορυλίωσης προκαλεί ή συνοδεύει ορισμένες ασθένειες. Μεταβολές σε 218 γονίδια του γονιδιώματος θεωρείται ότι σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες. Έτσι, οι πρωτεϊνικές κινάσες χαρακτηρίζονται ως ένας ελπιδοφόρος θεραπευτικός στόχος σε κακοήθεις νόσους, ιογενείς λοιμώξεις και άλλες διαταραχές στις οποίες αυτές εμπλέκονται.<sup>6</sup>

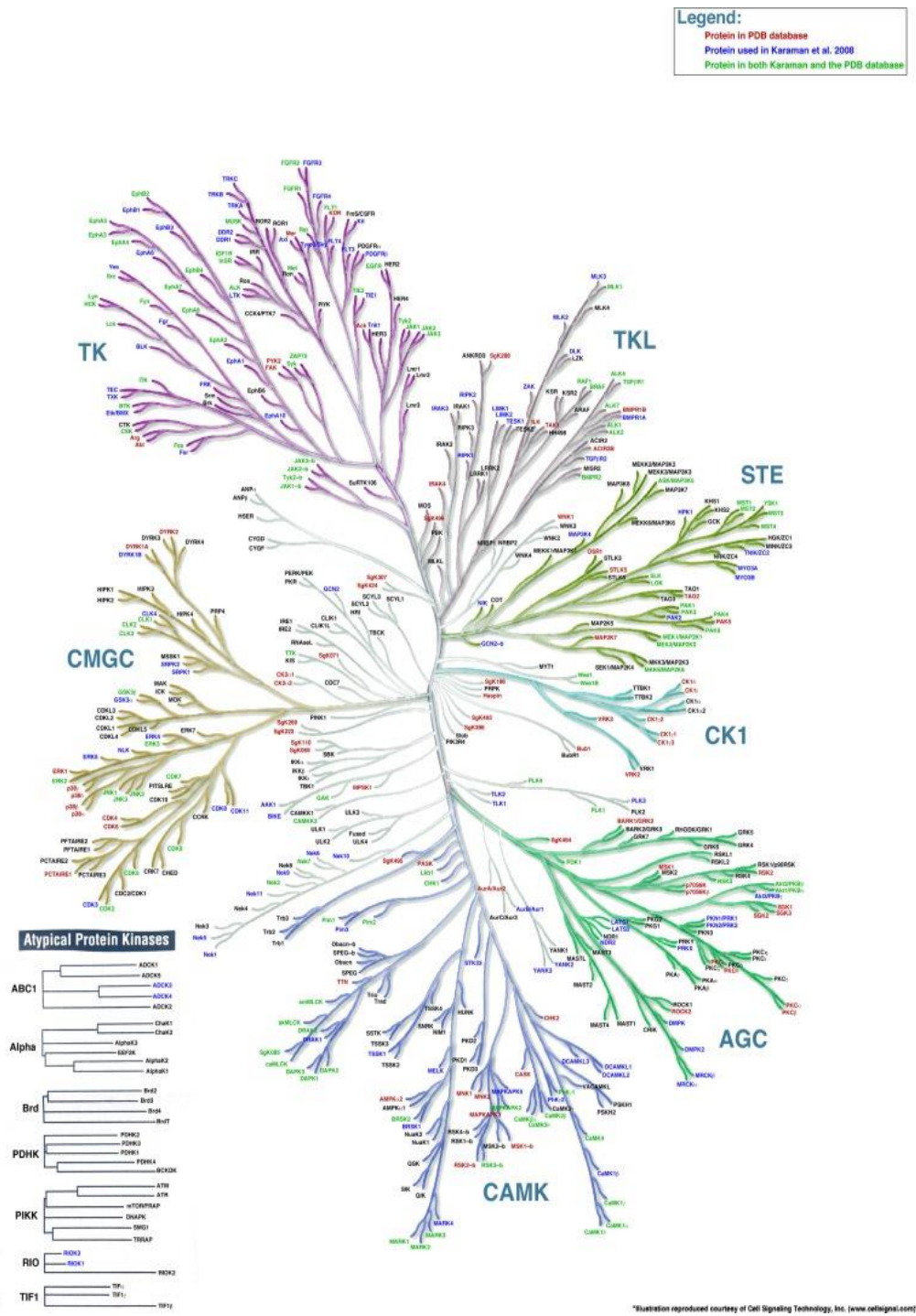
### 2.3 Οικογένειες Πρωτεϊνικών Κινασών

Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες υπερ-οικογένειες ομόλογων πρωτεϊνών και γονιδίων. Μέσα σε αυτήν την οικογένεια υπάρχουν σήμερα, εκατοντάδες διαφορετικά μέλη των οποίων οι ακολουθίες είναι γνωστές. Αν και υπάρχει μια πλούσια ποικιλία δομών, τρόπων ρύθμισης και ειδικοτήτων υποστρώματος μεταξύ των πρωτεϊνικών κινασών, υπάρχουν και κοινά δομικά χαρακτηριστικά.<sup>8</sup>

Υπάρχουν διαφορετικές ταξινομήσεις των πρωτεϊνικών κινασών. Οι δύο πιο συμβατικές από αυτές βασίζονται στην εξειδίκευση του υποστρώματος και τις αλληλουχίες των αμινοξέων των καταλυτικών περιοχών. Η πρώτη υποδηλώνει ότι οι κινάσες ταξινομούνται σύμφωνα με τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνουν. Οι δύο κύριες κατηγορίες κινασών είναι οι κινάσες τυροσίνης (TKs), οι οποίες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης και οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης, οι οποίες



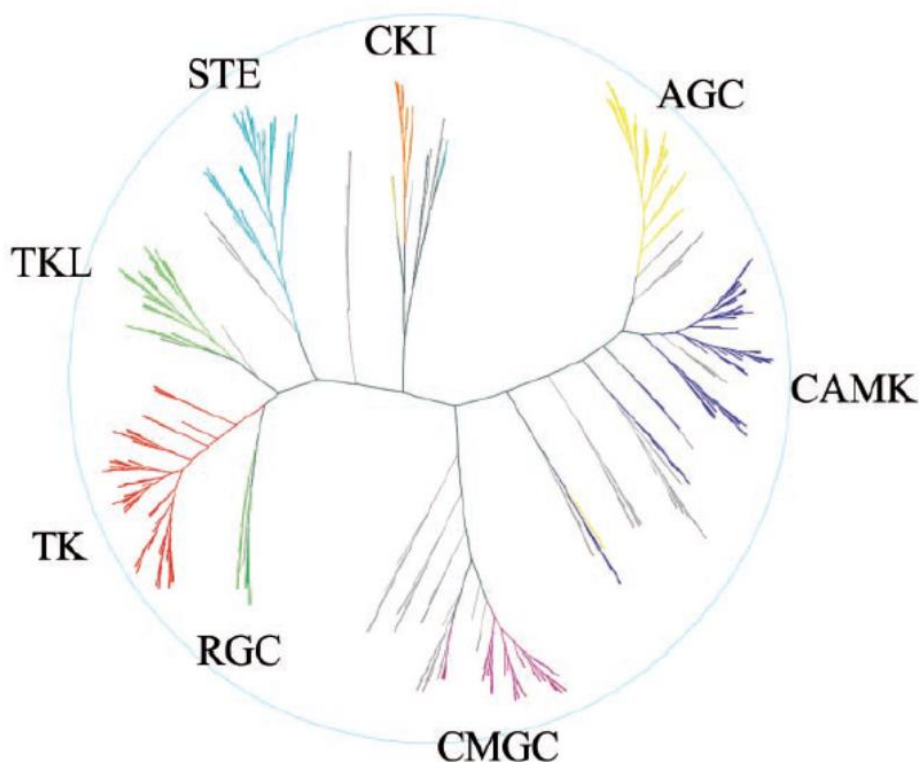
φωσφορυλιώνουν, αντίστοιχα, κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης. Και οι δύο έχουν έναν κοινό καταλυτικό πυρήνα, ο οποίος περιέχει πλούσιο σε γλυκίνη N-τερματικό θύλακα δέσμωσης ATP και ένα κεντρικό διατηρημένο υπόλειμμα ασπαρτικού οξέος που απαιτείται για την καταλυτική του δράση.<sup>6</sup>



Εικόνα 2.3: Δενδρόγραμμα Πρωτεϊνικών Κινάσων.<sup>11</sup>



Οι πρωτεϊνικές κινάσες του ανθρώπινου γονιδιώματος μπορούν να ταξινομηθούν σε επτά ομάδες με βάση την ομοιότητα αλληλουχίας στις καταλυτικές περιοχές (AGC, CaMK, CK1, CMGC, STE, TK και TKL). Η ομάδα AGC περιλαμβάνει τις οικογένειες κινάσεων PKA, PKC και PKG. Η ομάδα του CaMK περιλαμβάνει τις κινάσες που ρυθμίζονται από την καλμοδουλίνη, σημαντικές στη διαδικασία της μεταγωγής νευρικών ερεθισμάτων. Η ομάδα CK1 περιλαμβάνει τις κινάσες της οικογένειας PK1 καζεΐνης. Η ομάδα CMGC περιέχει τις εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDKs) και τις ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs), βασικά συστατικά ενός αριθμού οδών μεταγωγής σήματος που περιλαμβάνουν τις αποκρίσεις των κυττάρων σε εξωτερικά ερεθίσματα. Η ομάδα STE περιέχει ομόλογες κινάσες των ζυμομυκήτων Sterile 7, Sterile 11 και Sterile 20. Η ομάδα TK περιλαμβάνει τόσο κινάσες τυροσίνης συνδεδεμένες σε μεμβράνη, όσο και διαλυτές πρωτεΐνες (EGFRs, FGFRs, PDGFRs, InsR, κλπ.). Η ομάδα TKL περιέχει κινάσες τύπου τυροσινικής κινάσης.<sup>9</sup>



Εικόνα 2.4: Οικογένειες Πρωτεϊνικών Κινασών.<sup>10</sup>

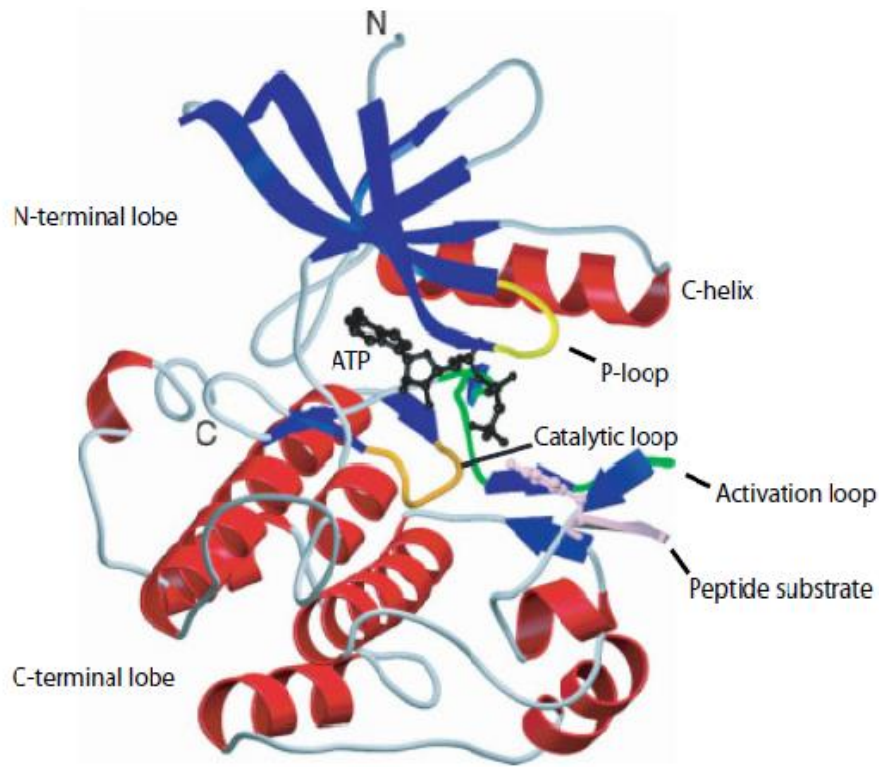
## 2.4 Δομή Πρωτεϊνικών Κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούνται από δύο ανόμοιους δομικά λοβούς, τον N και τον C, μια περιοχή δέσμευσης του ATP και μια καταλυτική περιοχή. Οι λοβοί συνδέονται μεταξύ τους με μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία ονομάζεται περιοχή άρθρωσης ή hinge περιοχή.

Ο N-τερματικός λοβός αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα που είναι οργανωμένα σε πέντε β-φύλλα και μία α-έλικα, που ονομάζεται C-έλικα.<sup>11</sup>

Αντίθετα, ο μεγαλύτερος C-τερματικός λοβός έχει, ως επί το πλείστον, α-ελικοειδή διαμόρφωση. Περιλαμβάνει δέσμη τεσσάρων ελίκων, επιπρόσθετες α-έλικες και δύο βραχείες β-αλυσίδες (β-φύλλα), ATP και 1 ή 2 μεταλλικά ιόντα που δεσμεύονται στη δι-επιφάνεια των δύο λοβών, ενώ η θέση πρόσδεσης για το πεπτιδικό υπόστρωμα βρίσκεται κυρίως εκεί. Τα ακόλουθα δομικά στοιχεία έχουν βρεθεί ότι είναι κρίσιμα για την κατάλυση και τον έλεγχο της πρωτεϊνικής κινάσης:

- Βρόχος πλούσιος σε γλυκίνη στον N-τερματικό λοβό. Αυτός ο βρόχος (επίσης αποκαλούμενος βρόχος P, P-loop) βρίσκεται σε παρόμοια μορφή και στις πρωτεΐνες Ga και απαιτείται για την αγκυροβόληση των φωσφορικών ομάδων του ATP.
- C-έλικα του N-τερματικού λοβού. Στις ενεργές διαμορφώσεις πρωτεϊνικής κινάσης, η C-έλικα σχηματίζει μια γέφυρα άλατος σε ένα αμετάβλητο κατάλοιπο λυσίνης εντός του N-τερματικού λοβού, επιτρέποντας τη βέλτιστη τοποθέτηση των φωσφορικών ομάδων του ATP. Σε ανενεργές διαμορφώσεις η δομή της έλικας C αλλάζει και η γέφυρα άλατος απουσιάζει.
- Καταλυτικός βρόχος. Ένα διατηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού (Asp 166 πρωτεϊνικής κινάσης A), που θεωρείται ότι είναι το καταλυτικό υπόλειμμα και ένα διατηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού που εμπλέκεται στη δέσμευση  $Mg^{2+}$ -ATP, βρίσκονται σε αυτόν τον βρόχο.<sup>11</sup>

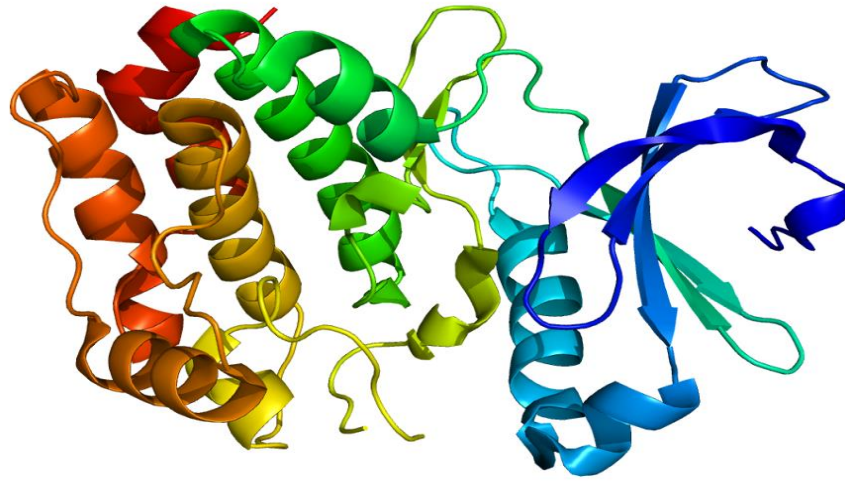


Εικόνα 2.5: Δομή Πρωτεϊνικών Κινασών. <sup>11</sup>

## 2.5 Πρωτεϊνικές Κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης

Επί του παρόντος, αρκετές εκατοντάδες διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες είναι γνωστές στα θηλαστικά, οι περισσότερες από τις οποίες είναι εκλεκτικές πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr ή Tyr. Επιπλέον, υπάρχουν μερικές πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν άλλα αμινοξέα. <sup>14</sup>

Μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης / θρεονίνης είναι ένα ένζυμο κινάσης που φωσφορυλιώνει την OH-ομάδα ενός καταλοίπου σερίνης ή θρεονίνης (τα 2 αμινοξέα έχουν παρόμοιες πλευρικές αλυσίδες). Τουλάχιστον 125 από τις 500+ ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες είναι κινάσες σερίνης / θρεονίνης (STKs). <sup>12</sup>



**Εικόνα 2.6:** Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας εκλεκτικής πρωτεϊνικής κινάσης Ser/Thr<sup>16</sup>

Ενώ όλες οι STKs φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης στα υποστρώματά τους, επιλέγουν κάποια συγκεκριμένα για φωσφορυλίωση με βάση ποια κατάλοιπα πλευρίζουν τη θέση φωσφορυλίωσης, και μαζί αποτελούν την αλληλουχία αναγνώρισης. Επειδή τα κατάλοιπα αλληλουχίας αναγνώρισης ενός υποστρώματος στόχου φτάνουν μόνο σε επαφή με κάποια βασικά αμινοξέα μέσα στην καταλυτική σχισμή της κινάσης (συνήθως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και ιοντικών δεσμών), μια κινάση συνήθως δεν είναι ειδική για ένα μόνο υπόστρωμα, αλλά μπορεί να φωσφορυλιώνει μία ολόκληρη "οικογένεια υποστρωμάτων" που μοιράζονται κοινές ακολουθίες αναγνώρισης. Ενώ η καταλυτική περιοχή αυτών των κινάσεων είναι εξαιρετικά διατηρημένη, η παραλλαγή της αλληλουχίας που παρατηρείται στο κίνωμα (το υποσύνολο, δηλαδή, των γονιδίων στο γονιδίωμα που κωδικοποιεί τις κινάσες) παρέχει αναγνώριση διακριτών υποστρωμάτων. Οι περισσότερες κινάσες αναστέλλονται από ένα ψευδο-υπόστρωμα που προσδέεται στην κινάση όπως ένα πραγματικό υπόστρωμα αλλά στερείται του φωσφορυλιωμένου αμινοξέος. Όταν αφαιρεθεί το ψευδο-υπόστρωμα, η κινάση μπορεί να εκτελέσει την κανονική της λειτουργία.<sup>13</sup>

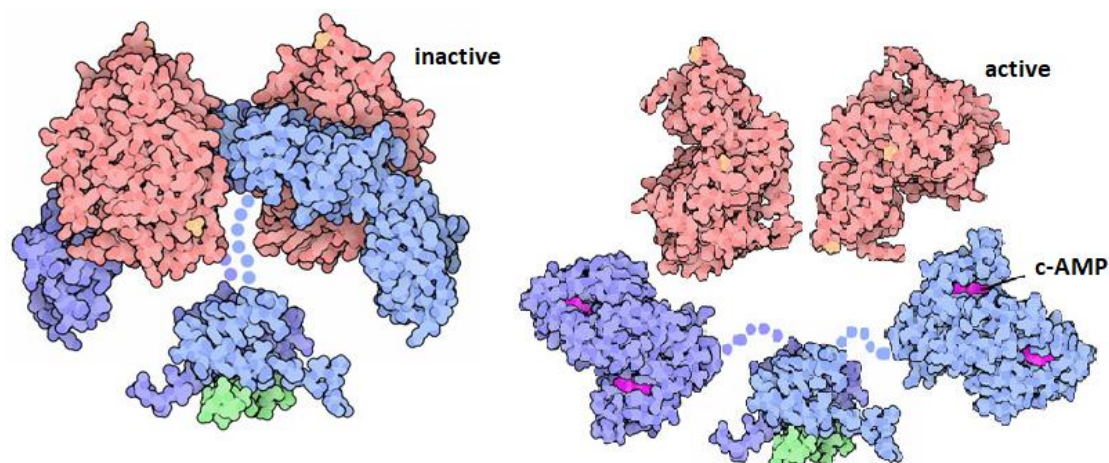
Μεταξύ των οικογενειών των πρωτεϊνικών κινάσεων που φωσφορυλιώνουν αμινοξέα σερίνης και θρεονίνης είναι η AGC, η CAMK (εξαρτώμενες από καλμοδουλίνη κινάσες), η CMGC (MAP κινάσες), η STE (MAPK και MAPKK κινάσες), η οικογένεια TKL (IRAK), καθώς επίσης και άλλες οικογένειες όπως κινάσες καζεΐνης, η GYC οικογένεια κινάσεων και η IKK.<sup>14</sup>





αποτελούν το ανθρώπινο κίνωμα, είναι γνωστό ότι υπάρχει μόνο μία άλλη πρωτεϊνική κινάση, η καζεϊνική κινάση 2, σε ένα φυσιολογικό τετραμερικό σύμπλοκο.<sup>16</sup>

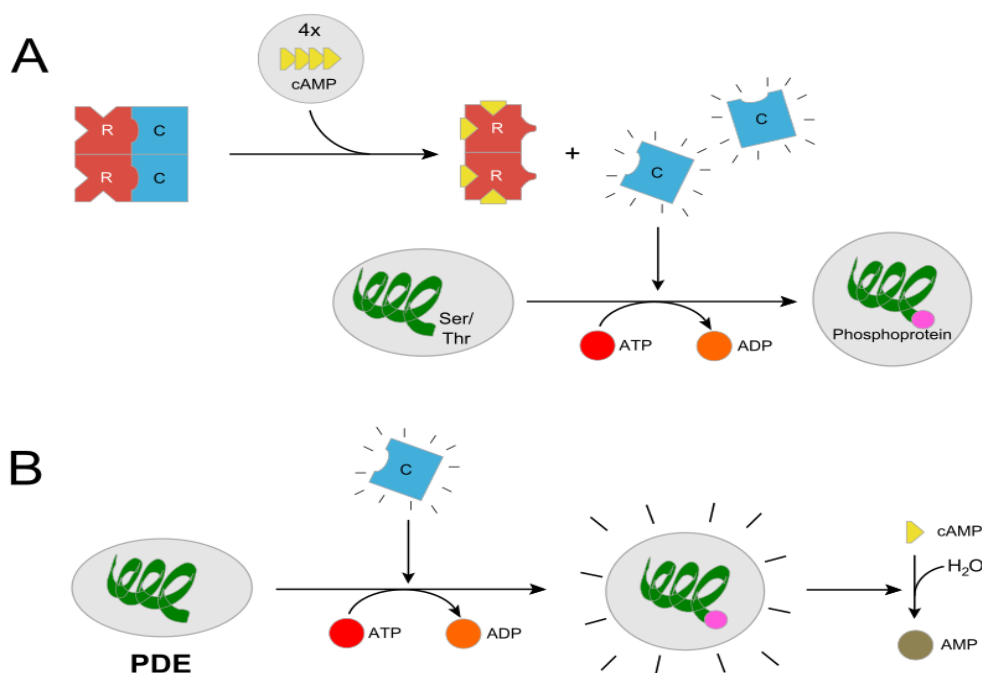
Το οζοενένζυμο PKA υπάρχει ως τετραμερές, αν και οι δομές υψηλότερης τάξης σχηματίζονται σε κύτταρα όπου το PKA στοχεύει σε συγκεκριμένα συστατικά. Η κλασική δομή του ολοενζύμου PKA αποτελείται από δύο ρυθμιστικές υπομονάδες και δύο καταλυτικές υπομονάδες. Η καταλυτική υπομονάδα περιέχει την ενεργό θέση, μια σειρά από κανονικά υπολείμματα που βρίσκονται σε πρωτεϊνικές κινάσες που δεσμεύουν και υδρολύουν το ATP και μια περιοχή που δεσμεύει την ρυθμιστική υπομονάδα. Η ρυθμιστική υπομονάδα έχει τομείς που δεσμεύονται με κυκλικό AMP, έναν τομέα που αλληλεπιδρά με την καταλυτική υπομονάδα και έναν τομέα αυτόματης αναστολής. Υπάρχουν δύο κύριες μορφές ρυθμιστικής υπομονάδας, RI και RII.<sup>17</sup>



**Εικόνα 2.8:** Δομή κινάσης PKA. Αριστερά το τετραμερές σύμπλοκο βρίσκεται στην ανενεργή του μορφή, ενώ δεξιά στην ενεργή του μορφή μετά από πρόσδεση του κυκλικού AMP. Με τελείες εμφανίζονται κάποια εύκαμπτα τμήματα του συμπλόκου.<sup>18</sup>

Οι εξωκυτταρικές ορμόνες όπως η γλυκαγόνη και η επινεφρίνη ξεκινούν έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη σηματοδότησης ο οποίος πυροδοτεί την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A με σύνδεση πρώτα σε έναν υποδοχέα συζευγμένο με πρωτεΐνη G (GPCR) στο κύτταρο στόχο. Όταν ένας GPCR ενεργοποιείται από τον εξωκυτταρικό του προσδέτη, προκαλείται μια μεταβολή της διαμόρφωσης στον υποδοχέα που μεταδίδεται σε ένα συνημμένο ενδοκυτταρικό σύμπλοκο ετεροτριμερούς πρωτεΐνης G με δυναμική περιοχή πρωτεϊνών. Η υπομονάδα άλφα

Gs του διεγερμένου συμπλέγματος G πρωτεΐνης ανταλλάσσει GDP για GTP και απελευθερώνεται από το σύμπλεγμα. Η ενεργοποιημένη άλφα υπομονάδα Gs δεσμεύεται και ενεργοποιεί ένα ένζυμο που ονομάζεται αδενυλυλκυκλάση, το οποίο, με τη σειρά του, καταλύει τη μετατροπή του ATP σε κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP), αυξάνοντας άμεσα τα ενδοκυτταρικά επίπεδα cAMP. Τέσσερα μόρια cAMP είναι ικανά να δεσμευθούν στις δύο R-υπομονάδες. Αυτό γίνεται με δύο μόρια cAMP που δεσμεύονται σε καθεμία από τις δύο θέσεις πρόσδεσης cAMP (CNB-B και CNB-A) η οποία επάγει μια μεταβολή διαμόρφωσης στις ρυθμιστικές υπομονάδες της PKA προκαλώντας τις υπομονάδες να αποσυνδέσουν και να απελευθερώσουν τις δύο (τώρα ενεργοποιημένες) καταλυτικές υπομονάδες.



**Εικόνα 2.9:** Ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της κινάσης PKA. <sup>19</sup>

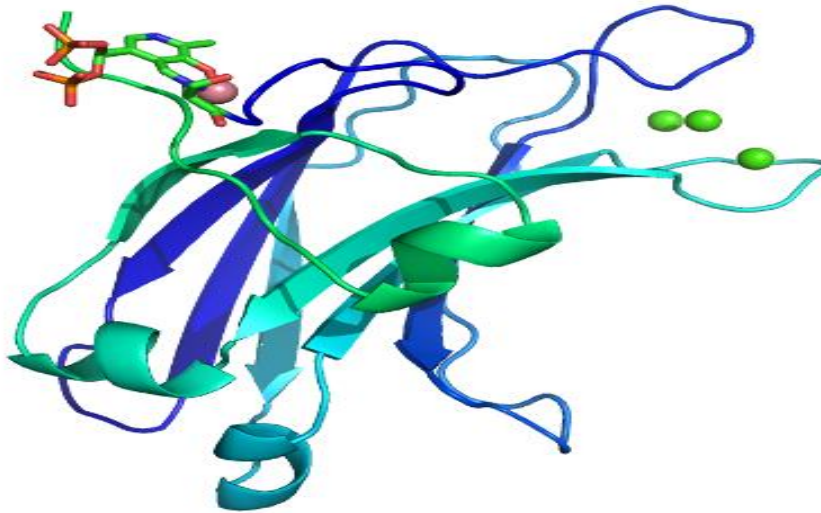
Άλλο ένα σπουδαίο μέλος της παραπάνω οικογένειας η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), είναι, και αυτή ομοίως με την PKA, μια οικογένεια ενζύμων πρωτεϊνικής κινάσης που εμπλέκονται στον έλεγχο της λειτουργίας άλλων πρωτεϊνών μέσω της φωσφορυλίωσης OH-ομάδων αμινοξικών καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης επί των πρωτεϊνών αυτών ή ενός μέλους αυτής της οικογένειας. Τα ένζυμα PKC, με τη σειρά τους, ενεργοποιούνται από σήματα όπως αυξήσεις στη συγκέντρωση δευτέρων αγγελιαφόρων όπως διακυγλυκερόλης (DAG) ή ιόντων

ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ).<sup>20</sup> Ως εκ τούτου, τα ένζυμα PKC διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος.<sup>21</sup>

Η οικογένεια PKC αποτελείται από δεκαπέντε ισοένζυμα στον άνθρωπο.<sup>22</sup> Διακρίνονται σε τρεις υπο-οικογένειες, με βάση τις απαιτήσεις του δεύτερου αγγελιαφόρου: συμβατικές (ή κλασσικές), νέες και άτυπες.<sup>23</sup> Οι συμβατικές (c)PKCs περιέχουν τις ισομορφές α, βI, βII και γ. Αυτές απαιτούν  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG και ένα φωσφολιπίδιο όπως μια φωσφατιδυλσερίνη για ενεργοποίηση. Οι νέες (n)PKCs περιλαμβάνουν τις δ, ε, η και θ ισομορφές και απαιτούν DAG, αλλά δεν απαιτούν  $\text{Ca}^{2+}$  για ενεργοποίηση. Έτσι, οι συμβατικές και νέες PKCs ενεργοποιούνται μέσω της ίδιας οδού μεταγωγής σήματος όπως η φωσφολιπάση C. Από την άλλη πλευρά, οι άτυπες (α)PKCs (συμπεριλαμβανομένων των ισομορφών πρωτεϊνικής κινάσης Mζ και I/λ) δεν απαιτούν ούτε  $\text{Ca}^{2+}$  ούτε διακυλογλυκερόληγια ενεργοποίηση. Ο όρος "πρωτεϊνική κινάση C" συνήθως αναφέρεται σε ολόκληρη την οικογένεια ισομορφών.

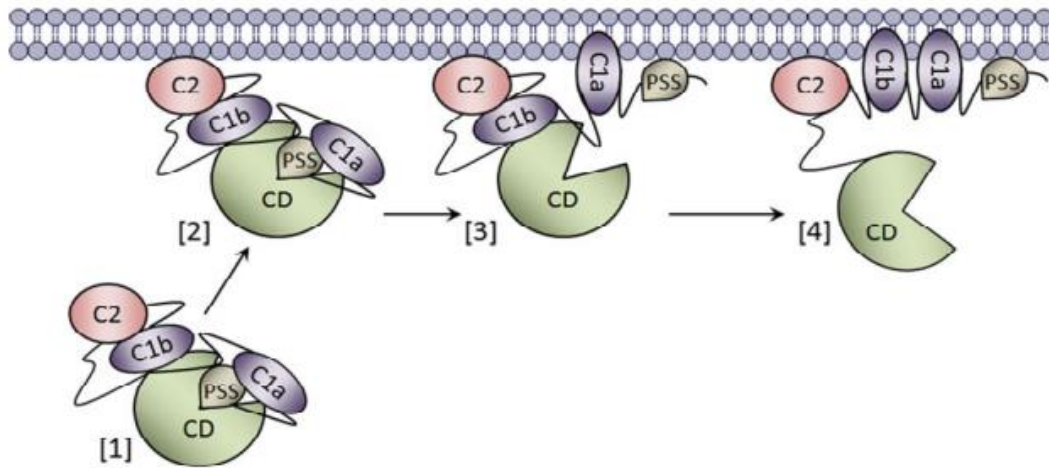
Η δομή όλων των PKCs αποτελείται από ένα ρυθμιστικό πεδίο και μια καταλυτική περιοχή συνδεδεμένα μεταξύ τους από μια περιοχή άρθρωσης (hinge region). Η καταλυτική περιοχή είναι εξαιρετικά διατηρημένη μεταξύ των διαφόρων ισομορφών, καθώς επίσης, σε μικρότερο βαθμό, μεταξύ της καταλυτικής περιοχής άλλων κινασών σερίνης/θρεονίνης. Η απαίτηση δεύτερου αγγελιαφόρου στις διαφορές ισομορφές είναι αποτέλεσμα της ρυθμιστικής περιοχής, η οποία είναι παρόμοια μέσα στις τάξεις αλλά διαφέρει μεταξύ αυτών. Το μεγαλύτερο μέρος της κρυσταλλικής δομής της καταλυτικής περιοχής της PKC δεν έχει προσδιοριστεί, εκτός από τις ισομορφές θ και ι. Λόγω της ομοιότητάς της με άλλες κινάσες των οποίων η κρυσταλλική δομή έχει προσδιοριστεί, η δομή μπορεί να προβλεφθεί ισχυρά.





**Εικόνα 2.10:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της ανθρώπινης πρωτεϊνικής κινάσης Cγ, τομέας C<sub>2</sub>.<sup>24</sup>

Ο ρυθμιστικός τομέας ή ο αμινο-τελικός των PKCs περιέχει αρκετές κοινές υπο-περιοχές. Η περιοχή C1, παρούσα σε όλες τις ισομορφές της PKC, έχει μια θέση πρόσδεσης για DAG καθώς και για μη υδρολυμένα, μη φυσιολογικά ανάλογα που ονομάζονται εστέρες φορβόλης. Αυτός ο τομέας είναι λειτουργικός και ικανός να δεσμεύει DAG τόσο σε συμβατικές όσο και σε νέες ισομορφές, ωστόσο, η περιοχή C1 σε άτυπες PKCs είναι ανίκανη να συνδέεται με DAG ή εστέρες φορβόλης. Η περιοχή C2 δρα ως αισθητήρας Ca<sup>2+</sup> και υπάρχει τόσο σε συμβατικές όσο και σε νέες ισομορφές, αλλά λειτουργεί ως αισθητήρας Ca<sup>2+</sup> μόνο στις συμβατικές. Η περιοχή ψευδο-υποστρώματος, η οποία υπάρχει και στις τρεις κατηγορίες PKC, είναι μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων που μιμούνται ένα υπόστρωμα και δεσμεύουν την κοιλότητα δέσμευσης υποστρώματος στην καταλυτική περιοχή, στερούνται κρίσιμων υπολειμμάτων φωσφο-υποδοχέων σερίνης/θρεονίνης, διατηρώντας το ένζυμο ανενεργό. Όταν τα Ca<sup>2+</sup> και DAG είναι παρόντα σε επαρκείς συγκεντρώσεις, δεσμεύονται στην περιοχή C2 και C1 αντιστοίχως και προσλαμβάνουν PKC στη μεμβράνη. Αυτή η αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ψευδο-υποστρώματος από την καταλυτική θέση και την ενεργοποίηση του ενζύμου. Για να συμβούν όμως αυτές οι αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις, η PKC πρέπει πρώτα να είναι σωστά διπλωμένη και με τη σωστή διαμόρφωση για να επιτραπεί η καταλυτική δράση. Αυτό εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της καταλυτικής περιοχής.

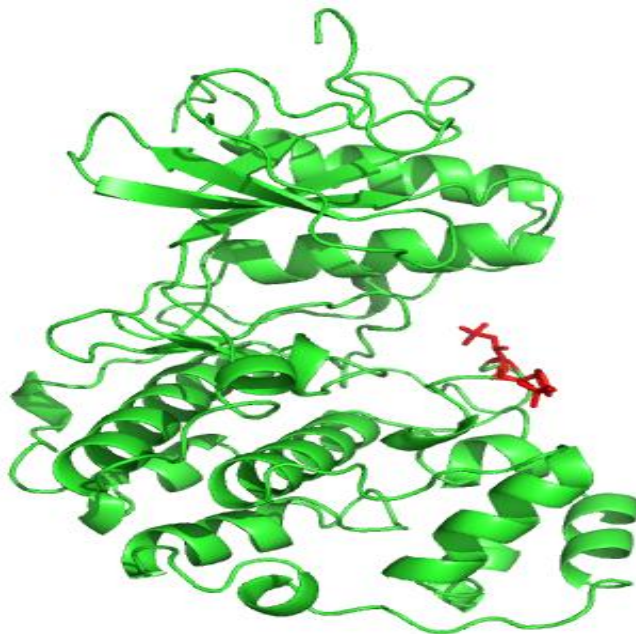


**Εικόνα 2.11:** Σχηματικό μοντέλο ενεργοποίησης cPKC. Η ανενεργή PKC βρίσκεται στο κυτταρόσωμο με την αλληλουχία ψευδο-υποστρώματος (PSS) και τις επικαλύψεις τομέων C1a στην καταλυτική θέση εντός της καταλυτικής περιοχής (CD) [1]. Η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση  $Ca^{2+}$  επάγει μετατόπιση του PKC στη μεμβράνη, όπου η περιοχή C2 μεσολαβεί στη δέσμευση των φωσφολιπιδίων [2]. Η δέσμευση του DAG στην περιοχή C1a επάγει μια αλλαγή στη διαμόρφωση που οδηγεί στην απελευθέρωση της C1a και στη συνέχεια την απομάκρυνση του PSS από την καταλυτική σχισμή [3]. Η σύνδεση ενός δεύτερου μορίου DAG στην περιοχή C1b έχει ως αποτέλεσμα την εκκένωση του συγκροτήματος C1b-καταλυτικής περιοχής ενεργοποιώντας έτσι το ένζυμο [4].<sup>25</sup>

Συνεχίζοντας, στην ίδια κατηγορία, αυτή των εκλεκτικών πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης, εντοπίζουμε τις MAP κινάσες, δηλαδή τις ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες. Οι MAPKs ανήκουν στην οικογένεια κινασών CMGC (CDK/MAPK/GSK/CLK) και πλησιέστεροι συγγενείς τους είναι οι εξαρτώμενες από κυκλίνες κινάσες (CDKs).<sup>26</sup> Οι MAPKs κατευθύνουν τις κυτταρικές αποκρίσεις σε μια ποικιλία ερεθισμάτων, όπως είναι τα μιτογόνα, το οσμωτικό στρες, το θερμικό σοκ και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ρυθμίζουν, ακόμη, κάποιες κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, της γονιδιακής έκφρασης, της διαφοροποίησης, της μίτωσης, της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης.<sup>27</sup> Οι κινάσες MAP εκφράζονται παντού και εξελικτικά συντηρούνται μόνο σε ευκαρυώτες,<sup>28</sup> αλλά είναι αρκετά διαφορετικές και συναντώνται σε όλα τα ζώα, τους μύκητες και τα φυτά, ενώ ακόμη απαντώνται σε μια σειρά μονοκυτταρικών ευκαρυωτικών.

Οι περισσότερες MAPKs έχουν μια σειρά από κοινά χαρακτηριστικά, όπως η εξαρτώμενη από δύο γεγονότα φωσφορυλίωσης ενεργοποίηση, μια αρχιτεκτονική

σηματοδότησης τριών επιπέδων και παρόμοιες περιοχές αναγνώρισης υποστρώματος. Αυτές είναι οι "κλασικές" κινάσες MAP. Υπάρχουν όμως και κάποια αρχαία απομεινάρια στην ομάδα όπως έχουν σκιαγραφηθεί παραπάνω, που δεν έχουν διπλές θέσεις φωσφορυλίωσης, σχηματίζουν μονοπάτια δύο επιπέδων και στερούνται τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται από άλλες MAPK για δέσμευση υποστρώματος. Αυτές συνήθως αναφέρονται ως "άτυπες" MAPKs.<sup>33</sup> Δεν είναι ακόμα σαφές εάν οι άτυπες MAPKs αποτελούν μια ενιαία ομάδα σε αντίθεση με τις κλασικές.



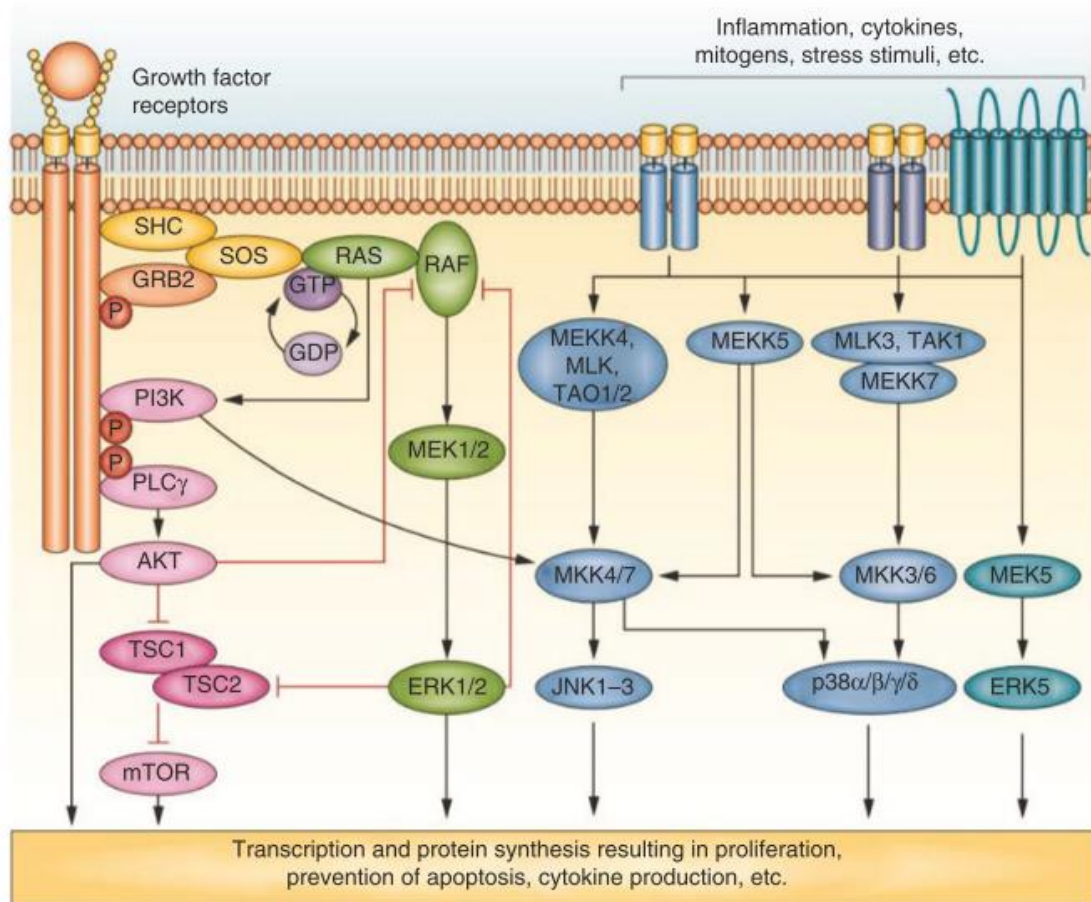
**Εικόνα 2.12:** Δομή ακτίνων-Χ της ERK2 MAPκινάσης στην ενεργή της μορφή. Με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα.<sup>29</sup>

Οι MAPKs είναι καταλυτικά ανενεργές στη βασική τους μορφή. Για την ενεργοποίησή τους, απαιτούνται (πιθανώς πολλαπλά) γεγονότα φωσφορυλίωσης στους βρόχους ενεργοποίησής τους. Αυτό διεξάγεται από εξειδικευμένα ένζυμα της οικογένειας STE κινασών. Με τον τρόπο αυτό, η δυναμική της πρωτεΐνης μπορεί να προκαλέσει μία αλλοστερική μεταβολή μεγάλης απόστασης στη δομή της πρωτεΐνης.

Στην περίπτωση των κλασικών κινασών MAP, ο βρόχος ενεργοποίησης περιέχει ένα χαρακτηριστικό μοτίβο TxY (θρεονίνη-χ-τυροσίνη) (TEY σε ERK1 και ERK2 θηλαστικού, TDY σε ERK5, TPY σε JNK, TGY στις ρ38κινάσες) που χρειάζεται να

φωσφορυλιωθεί τόσο το κατάλοιπο της θρεονίνης όσο και της τυροσίνης για να κλειδώσει την περιοχή κινάσης σε μία καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση. In vivo και in vitro, η φωσφορυλίωση της τυροσίνης πολλές φορές προηγείται αυτής της θρεονίνης, αν και η φωσφορυλίωση οποιουδήποτε καταλοίπου μπορεί να συμβεί απουσία του άλλου.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ένας μηχανισμός κλειδί στη μετάδοση ενός σήματος από τη μεμβράνη στα εσωτερικά τμήματα του κυττάρου, είναι μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών. Μεταξύ των δύο ομάδων ενζύμων που είναι υπεύθυνα γι' αυτή την μετάδοση είναι οι ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες και οι διπλής εκλεκτικότητας σερίνης-τυροσίνης φωσφατάσες (DUSP), επίσης γνωστές ως MAPK φωσφατάσες (MKP). Οι τελευταίες μπορούν να απομακρύνουν φωσφορικές ομάδες τόσο από κατάλοιπα σερίνης όσο και από κατάλοιπα θρεονίνης. Οι αντίθετοι ρόλοι που κατέχουν στη σηματοδότηση, καθώς και η ενεργοποίησή τους ή η κατώτερη ρύθμισή τους είναι στενά συντονισμένες ώστε να παρέχουν κατάλληλη σηματοδότηση. Η καλά συντονισμένη δραστηριότητα τους είναι σημαντική για τη διατήρηση μιας ισορροπίας στη σηματοδότηση μέσα στα κύτταρα. Ειδικότερα, πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο (MAPKs, ERK1/2, p38, JNK και ERK5) μετασχηματίζουν περιβαλλοντικά και αναπτυξιακά σήματα (παράγοντες ανάπτυξης ή στρες) σε προσαρμοστικές και προγραμματισμένες αποκρίσεις όπως επιβίωση, πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, φλεγμονή απόπτωση.<sup>30,31</sup>



**Εικόνα 2.13:** Απλοποιημένο σχήμα της σηματοδότησης MAPK. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα τυροσινικής κινάσης οδηγεί σε σηματοδότηση μέσω της οδού MAPK-RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2, η οποία προκαλεί μια σειρά κυτταρικών αποκρίσεων που σχετίζονται με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της μεταγραφής, της πρωτεϊνικής σύνθεσης και της αντιγραφής του DNA. Άλλα τμήματα των μονοπατιών MAPK σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την κινητικότητα, την διεισδυτικότητα και την αγγειογένεση, και μερικές από αυτές τις οδούς μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν κατάντη της οδού RAS-RAF. Επιπλέον, άλλοι σηματοδοτικοί οδοί –όπως η οδός PI3K-AKT-ενεργοποιούνται και υπάρχει σύνδεση με το μονοπάτι RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2. Πράγματι, μπορεί να απαιτείται συν-αναστολή αυτών των οδών για τη βελτιστοποίηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Συνομογραφίες: πρωτεΐνη 2 συνδεδεμένη με τον υποδοχέα GRB2-υποδοχέα, mTOR στόχος θηλαστικού ραπαμυκίνης, PLCγ φωσφολιπάση Cγ, ομολογία SHCSrc δύο πρωτεΐνες μετασχηματισμού που περιέχουν το πεδίο SOS (SonofSevenless), πρωτεΐνη σκλήρυνσης ½ TSC1/2.<sup>32,33</sup>

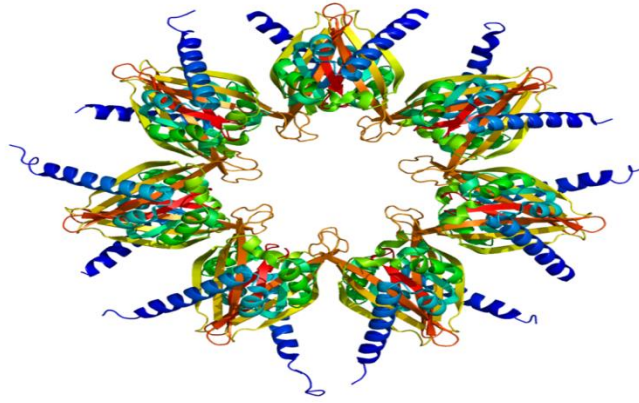
Οι MAP κινάσες ευρίσκονται κατάντη μιας ευρείας ποικιλίας τελεστών που περιλαμβάνουν υποδοχικές τυροσινικές κινάσες, υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G, υποδοχείς σερίνης/θρεονίνης, κινάσες της οικογένειας Src και υποδοχείς κυτοκίνης, μεταξύ πολλών άλλων. Η ενεργοποίηση αυτών των τελεστών τυπικά προκαλείται από ένα γεγονός δέσμευσης προσδέματος το οποίο εκκινεί έναν



καταρράκτη ενζυματικών αντιδράσεων. Η ενεργοποίηση MAP κινάσων περιλαμβάνει έναν πυρήνα τριών κινάσων που αποτελείται από μια κινάση κινάσης κινάσης MAP (MAP3K ή MAPKKK) η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί μία κινάση κινάσης MAP (MAP2K, MEK ή MKK) η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και αυξάνει τη δραστικότητα μιας ή περισσότερων MAP κινάσων.<sup>30</sup> Κατά την ενεργοποίηση, οι MAPK μπορούν να φωσφορυλιώσουν μια ποικιλία ενδοκυτταρικών στόχων που περιλαμβάνουν παράγοντες μεταγραφής, πυρηνικούς πρωτεϊνικούς πόρους, κυτταροσκελετικά στοιχεία και πρωτεϊνικές κινάσες.<sup>32</sup>

Η σηματοδοτική οδός MAPK είναι μία από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς σηματοδότησης που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, την κυτταρική ανάπτυξη, και την επιβίωση. Η μη φυσιολογική σηματοδότηση MAPK μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο ή ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων (καρκίνος) και αντοχή σε απόπτωση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και στοχευμένες θεραπείες. Ένας από πιο μελετημένους και κατανοητούς μηχανισμούς, το μονοπάτι MAPK είναι η υπερενεργοποίηση του MAPK σηματοδότηση από τον ογκογόνο BRAF σε πολλαπλές κακοήθειες όπως όγκοι μελανώματος, όγκοι θυρεοειδούς θηλώματος, καρκινικούς όγκους των ωοθηκών και όγκους του παχέος εντέρου, γεγονός που το καθιστά πιθανό στόχο της ογκολογίας. Με βάση αυτά τα ευρήματα, μια σειρά από οι εταιρείες αναπτύσσουν φάρμακα κατά του MAPK στοχεύοντας τη σηματοδότηση MAPK.<sup>32</sup>

Τέλος, οι πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από καλμοδουλίνη/ $Ca^{2+}$  (CAMK/CaMK) είναι και αυτές τάξη ενζύμων αυτής της κατηγορίας, που ενεργοποιούνται με την αύξηση της ενδομοριακής συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου και, με τη σειρά τους, μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης άλλων πρωτεϊνών. Ενεργοποιημένες CAMKs εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων, και επομένως, στη ρύθμιση της έκφρασης των αποκρινόμενων γονιδίων. Μέλη της οικογένειας αυτής είναι τα CAMKI ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ),<sup>34,35</sup> CAMKII ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ),<sup>36</sup> CAMKIII, CAMKVI και SCAMK.

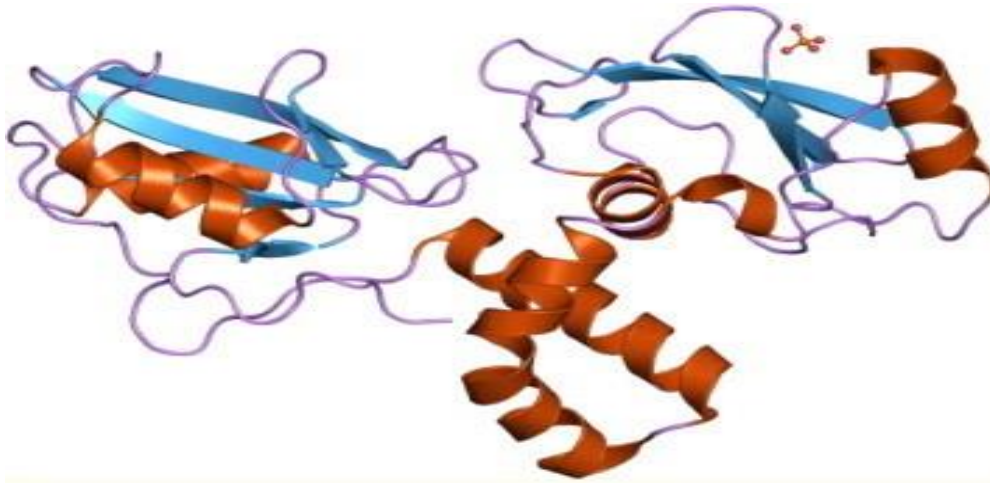


**Εικόνα 2.14:** Σχηματική απεικόνιση της δομής της CAMKIIA πρωτεϊνικής κινάσης.<sup>37</sup>

## 2.6 Πρωτεϊνικές Κινάσες Τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, καταλύουν τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο ATP σε ένα αμινοξικό κατάλοιπο μιας πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης καταλύουν τη φωσφορυλίωση ενός καταλοίπου τυροσίνης. Η φωσφορυλίωση υπολειμμάτων τυροσίνης, με τη σειρά της, προκαλεί μεταβολή στη λειτουργία της πρωτεΐνης στην οποία περιέχονται.<sup>38</sup>

Η φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης ελέγχει ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων σε πρωτεΐνες όπως την ενζυμική δραστηριότητα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων. Επιπλέον, οι κινάσες τυροσίνης συμμετέχουν σε πολλούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος όπου εξωκυτταρικά σήματα μεταδίδονται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα και συχνά στον πυρήνα, όπου η γονιδιακή έκφραση μπορεί να τροποποιηθεί. Τέλος, οι μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν την ενεργοποίηση ορισμένων κινασών τυροσίνης, μια μη λειτουργική κατάσταση που μπορεί να συμβάλει στην έναρξη ή την πρόοδο του καρκίνου.<sup>39</sup>

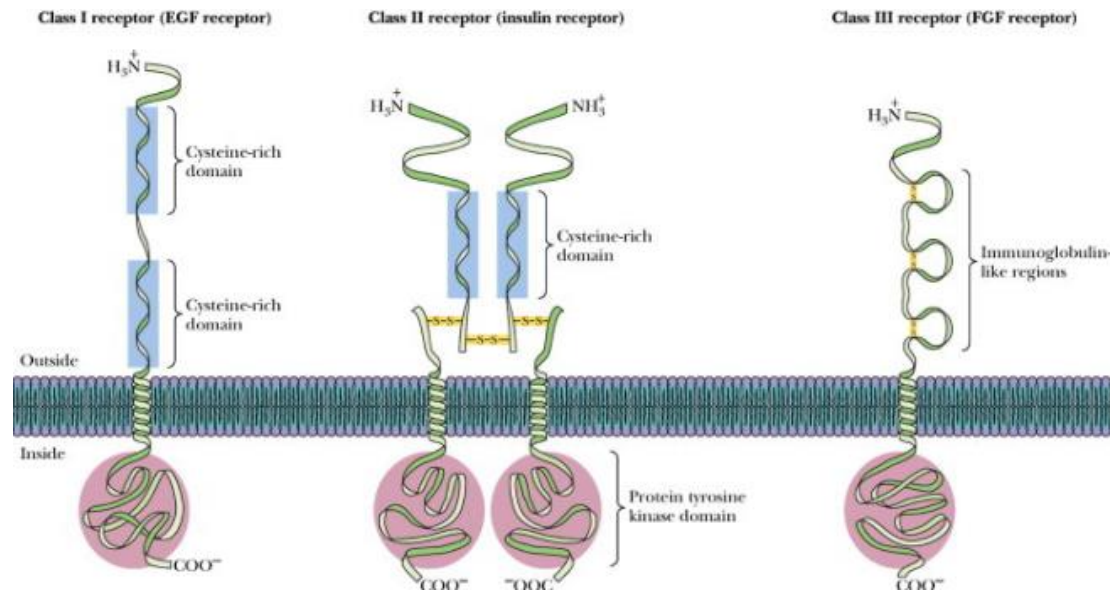


**Εικόνα 2.15:** Μοριακή δομή τυροσινικής κινάσης (TK).<sup>40</sup>

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης διαιρούνται σε δύο κύριες οικογένειες: τις κινάσες που συνδέονται με διαμεμβρανικούς υποδοχείς και αυτές που είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Περίπου 2000 κινάσες είναι γνωστές και περισσότερες από 90 πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (PTK) έχουν βρεθεί είτε χωριστά είτε και σε συστάδες εντός του ανθρώπινου γονιδιώματος.<sup>41</sup> Διακρίνονται, περαιτέρω, σε δύο κατηγορίες: σε υποδοχικές τυροσινικές πρωτεϊνικές κινάσες και σε μη υποδοχικές. Επί του παρόντος, 58 PTKs είναι γνωστές, ομαδοποιημένες σε 20 υποοικογένειες. Αυτές παίζουν βασικούς ρόλους σε ποικίλες κυτταρικές δραστηριότητες, όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, η πρόσφυση, η κινητικότητα και ο θάνατος (απόπτωση).<sup>39-44</sup>

Δομικά, οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) αποτελούνται από ένα εξωκυτταρικό πεδίο, ικανό να δεσμεύει ένα ειδικό πρόσδεμα, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική καταλυτική περιοχή, ικανή να δεσμεύει και να φωσφορυλιώνει τα επιλεγμένα υποστρώματα. Η σύνδεση ενός προσδέματος στην εξωκυτταρική περιοχή προκαλεί μια σειρά δομικών (μορφολογικών) αναδιατάξεων στην RTK που οδηγούν στην ενζυματική ενεργοποίησή της. Συγκεκριμένα, η μετακίνηση ορισμένων τμημάτων της περιοχής κινάσης δίνει ελεύθερη πρόσβαση στο ATP και το υπόστρωμα στην ενεργό θέση. Αυτό προκαλεί μια σειρά καταστάσεων μέσω της φωσφορυλίωσης των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που τελικά μετασχηματίζουν το εξωκυτταρικό σήμα προκαλώντας αλλαγές στο προφίλ της γονιδιακής έκφρασης.<sup>40,41,45,46</sup>





**Εικόνα 2.16:** Οι κύριες οικογένειες RTKs. Οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης καλύπτουν τη μεμβράνη του κυττάρου και έχουν έναν υποδοχέα ορμόνης στο εξωτερικό και ένα τμήμα κινάσης τυροσίνης στο εσωτερικό. Υπάρχουν αρκετές υποκατηγορίες αυτών των υποδοχέων όπως φαίνεται εδώ.<sup>40,45–47</sup>

Από την άλλη πλευρά, οι μη-υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία, όπως και οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες, ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες μέσω ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης άλλων ενζύμων μέσα στο κύτταρο.

Σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί 32 μη-υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (nRTKs), οι οποίες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο σε λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η προσκόλληση, η μετανάστευση και η απόπτωση, ενώ, ακόμη, αποτελούν κρίσιμα συστατικά στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος.

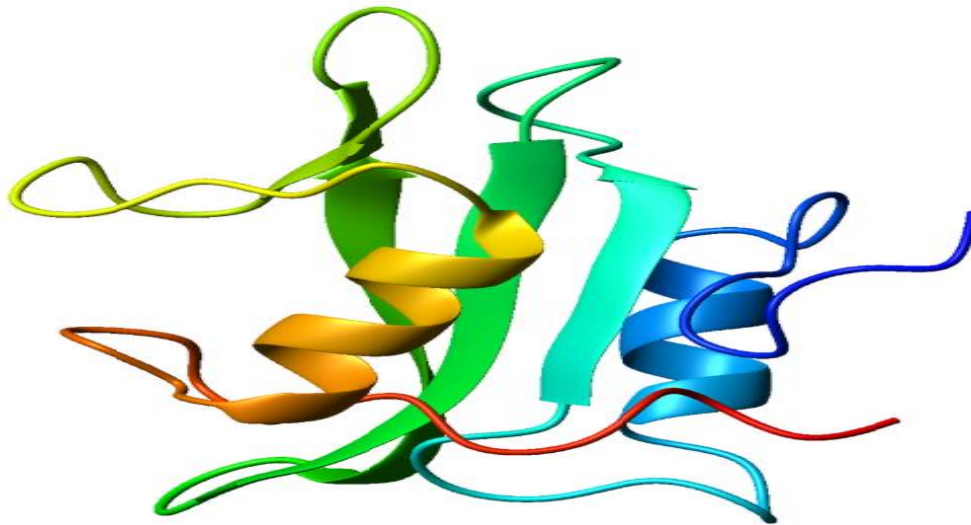
Σε αντίθεση με τις υποδοχικές κινάσες τυροσίνης, οι nRTKs στερούνται χαρακτηριστικών γνωρισμάτων υποδοχέα, όπως ενός πεδίου σύνδεσης εξωκυτταρικού προσδέματος και μιας επεκτεινόμενης διαμεμβρανικής περιοχής. Οι περισσότερες από τις nRTKs εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα,<sup>48</sup> αλλά ορισμένες είναι αγκυροβολημένες στην κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας αμινοτελικής τροποποίησης. Αυτά τα ένζυμα έχουν συνήθως αρθρωτή κατασκευή και μεμονωμένες περιοχές ενώνονται μεταξύ τους με εύκαμπτες αλληλουχίες. Μία από τις σημαντικές περιοχές των nRTKs είναι ο καταλυτικός τομέας κινάσης τυροσίνης, ο

οποίος έχει μήκος περίπου 275 αμινοξικά κατάλοιπα. Η δομή του καταλυτικού τομέα μπορεί να χωριστεί σε μικρό και μεγάλο λοβό, όπου το ATP δεσμεύεται στον μικρό λοβό και το υπόστρωμα της πρωτεΐνης συνδέεται με τον μεγάλο λοβό. Κατά τη σύνδεση της ATP και του υποστρώματος με τις nRTKs, η κατάλυση της φωσφορυλίωσης λαμβάνει χώρα σε μια σχισμή μεταξύ αυτών των δύο λοβών. Διαπιστώθηκε ότι οι nRTKs έχουν κάποια προτίμηση αλληλουχίας γύρω από το στόχο Tyr. Για παράδειγμα, η Src προτιμώμενη αλληλουχία είναι Glu-Glu/Asp-Ile-Tyr-Gly/Glu-Glu-Phe και η προτιμητέα αλληλουχία Abl είναι Ile/Val-Tyr-Gly-Val-Leu/Val.<sup>49</sup> Διαφορετικές προτιμώμενες αλληλουχίες γύρω από Tyr σε Src και Abl υποδηλώνουν ότι αυτοί οι δύο τύποι nRTKs φωσφορυλιώνουν διαφορετικούς στόχους. Οι μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης δεν περιέχουν μόνο μια περιοχή κινάσης τυροσίνης, οι nRTKs επίσης διαθέτουν τομείς που μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-λιπιδίων και πρωτεΐνης-DNA. Ένα από τα πεδία αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στις nRTKs είναι οι περιοχές ομολογίας 2 (SH2) και 3 (SH3) Src.<sup>50</sup>

Αναλυτικότερα, η περιοχή SH2 (Src Homology 2) είναι δομικά διατηρημένη πρωτεϊνική περιοχή που περιέχεται στην ογκοπρωτεΐνη Src<sup>51</sup> και σε πολλές άλλες πρωτεΐνες ενδοκυτταρικής μεταγωγής σήματος.<sup>52</sup> Οι περιοχές SH2 επιτρέπουν σε πρωτεΐνες που περιέχουν αυτές τις περιοχές να προσκολληθούν σε φωσφορυλιωμένα υπολείμματα τυροσίνης σε άλλες πρωτεΐνες. Οι περιοχές SH2 βρίσκονται συνήθως σε πρωτεΐνες προσαρμογής που βοηθούν στις οδούς μεταγωγής σήματος των υποδοχικών τυροσινικών κινασών.<sup>53</sup>

Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. Οι διαμορφωμένες περιοχές, οι οποίες είναι οι υπομονάδες μιας πρωτεΐνης, μετριάζουν αυτές τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, αναγνωρίζοντας τις βραχείες πεπτιδικές αλληλουχίες, που καθορίζουν τους εταίρους δέσμευσης κάθε πρωτεΐνης. Ένας από τους πιο σημαντικούς τομείς είναι ο τομέας SH2. Οι τομείς SH2 διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία. Το μήκος του είναι περίπου 100 αμινοξέα και βρίσκεται μέσα σε 111 ανθρώπινες πρωτεΐνες.<sup>59</sup> Όσον αφορά τη δομή του, περιέχει 2 άλφα-έλικες και 7 β-πτυχωτά φύλλα. Έρευνες έχουν δείξει ότι έχουν υψηλή συγγένεια με υπολείμματα

φωσφορυλιωμένης τυροσίνης και είναι γνωστό ότι ταυτοποιούν αλληλουχίες 3-6 αμινοξέων εντός πεπτιδίου μοτίβου.



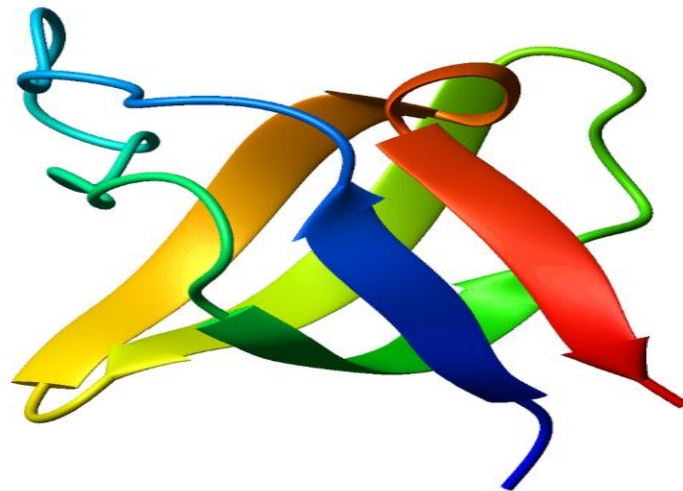
**Εικόνα 2.17:** Σχηματική απεικόνιση της δομής του πεδίου SH2. Η δομή αποτελείται από ένα μεγάλο βήτα-φύλλο (πράσινο) που πλαισιώνεται από δύο άλφα-έλικες (πορτοκαλί και μπλε).<sup>54</sup>

Η Src Homology 3 Domain (ή περιοχή SH3) είναι μια μικρή πρωτεϊνική περιοχή περίπου 60 υπολειμμάτων αμινοξέων. Αρχικά, η SH3 περιγράφηκε ως διατηρημένη αλληλουχία στην ιϊκή πρωτεΐνη προσαρμογής v-Crk. Αυτή η περιοχή υπάρχει επίσης στα μόρια φωσφολιπάσης και σε αρκετές κυτοπλασμικές κινάσες τυροσίνης όπως η Abl και η Src.<sup>55,56</sup> Έχει ταυτοποιηθεί επίσης σε αρκετές άλλες οικογένειες πρωτεϊνών όπως η κινάση PI3, η πρωτεΐνη ενεργοποίησης Ras GTPase, CDC24 και cdc25.<sup>57-59</sup> Οι περιοχές SH3 βρίσκονται σε πρωτεΐνες των οδών σηματοδότησης που ρυθμίζουν το κυτταροσκελετό, την πρωτεΐνη Ras, την κινάση Src και πολλά άλλα. Οι πρωτεΐνες SH3 αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες προσαρμογής και κινάσες τυροσίνης. Στις αλληλεπιδράσεις με τυροσινικές κινάσες, οι πρωτεΐνες SH3 συνήθως δεσμεύονται μακριά από την ενεργό περιοχή. Περίπου 300 πεδία SH3 βρίσκονται σε πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Επιπλέον, η περιοχή SH3 είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στις οδούς μεταγωγής σήματος<sup>60</sup> και τη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταροπλασματική σηματοδότηση.<sup>61</sup>

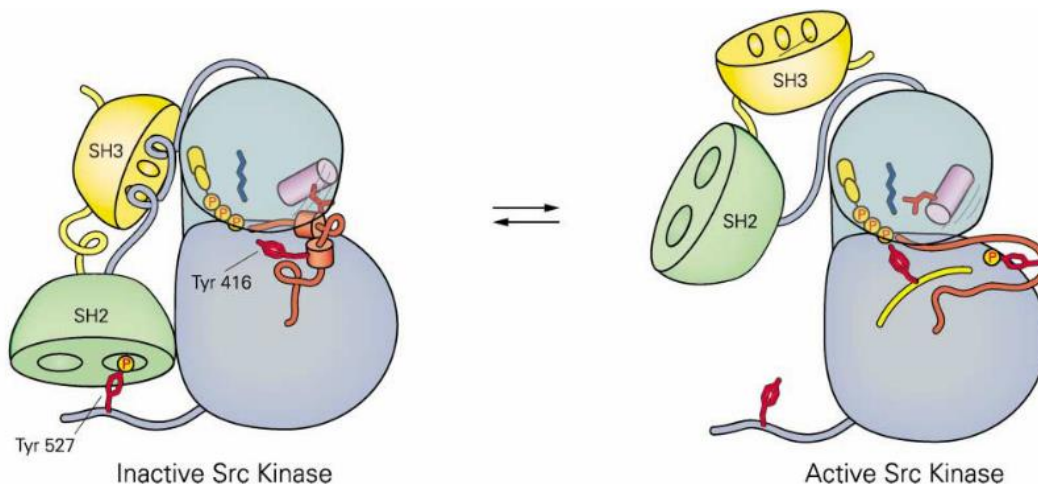
Η περιοχή SH3 έχει μία χαρακτηριστική πτυχή βήτα που αποτελείται από πέντε ή έξι β-κλώνους διευθετημένους ως δύο σφιχτά συσκευασμένα αντιπαράλληλα β-φύλλα.

Οι περιοχές συνδέσμου μπορεί να περιέχουν σύντομες έλικες. Η πτυχή τύπου SH3 είναι μια αρχαία πτυχή που βρίσκεται τόσο ευκαρυωτικά όσο και σε προκαρυωτικά.

62



**Εικόνα 2.18:** Διάγραμμα κορδέλας της περιοχής SH3, άλφα σπεκτρίνη, από κοτόπουλο. Με χρώμα μπλε το N-τελικό άκρο και με κόκκινο το C-τελικό άκρο. <sup>63</sup>



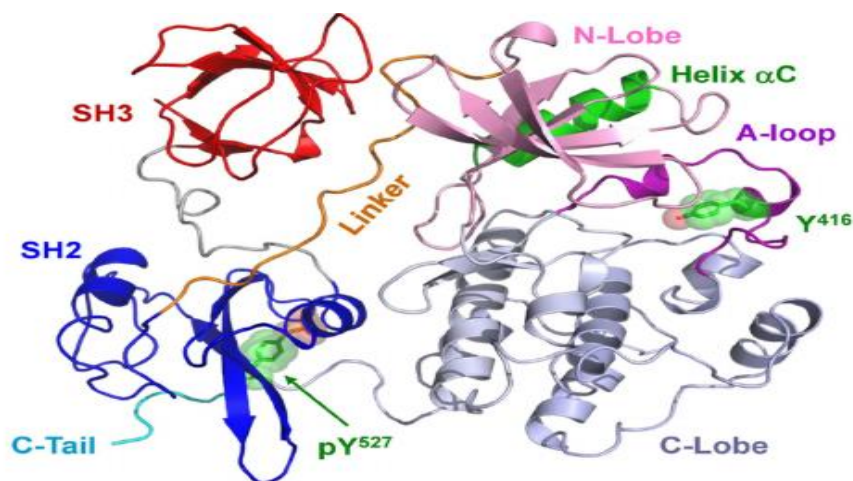
**Εικόνα 2.19:** Οι δομικές περιοχές SH2/SH3 στην κινάση Src. <sup>5</sup>

### 2.6.1 Οικογένεια Src πρωτεϊνικών κινασών

Η οικογένεια των Src πρωτεϊνικών κινασών ανήκει στις μη-υποδοχικές πρωτεϊνικές τυροσινικές κινάσες και αποτελείται από 9 διακριτά μέλη, τα οποία ταξινομούνται στις εξής υπο-οικογένειες: την υπο-οικογένεια SrcA με μέλη τις κινάσες Src, Yes, Fyn και Fgr, την υπο-οικογένεια SrcB με μέλη τις κινάσες Lck, Hck, Blk και Lyn και, τέλος, την κινάση Frk που μόνη της αποτελεί μια υπο-οικογένεια. Η έκφραση αυτών

των μελών της οικογένειας Src δεν είναι η ίδια σε όλους τους ιστούς και τους κυτταρικούς τύπους. Οι Src, Fyn και Yes εκφράζονται παντού, σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ οι άλλοι γενικά βρίσκονται στα αιμοποιητικά κύτταρα.<sup>64-67</sup>

Οι κινάσες της οικογένειας Src περιέχουν έξι διατηρούμενες περιοχές: ένα N-τελικό μυριστοϋλοποιημένο τμήμα, μία SH2 περιοχή, μία περιοχή SH3, μία περιοχή σύνδεσης, μία περιοχή κινάσης τυροσίνης και μία C-τερματική ουρά.<sup>68</sup>



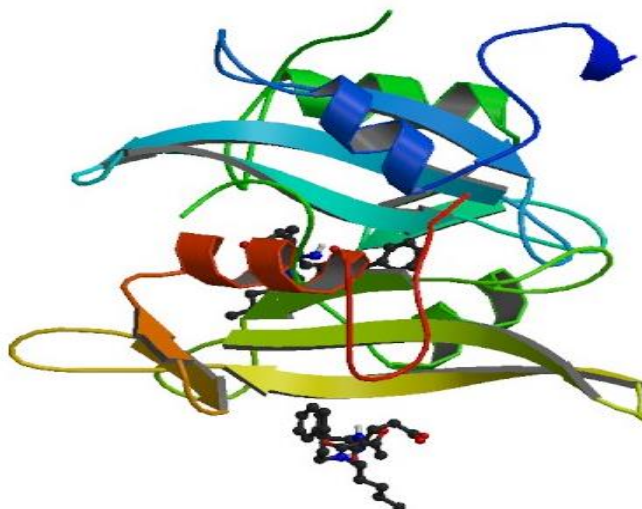
Εικόνα 2.20: Δομικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Src.<sup>69</sup>

Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει σε κάποιο συγκεκριμένο μέλος της παραπάνω οικογένειας, την πρωτο-ογκογενή πρωτεϊνική τυροσινική κινάση Src, επίσης γνωστή ως πρωτο-ογκογενή c-Src, ή απλώς c-Src, η οποία στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο *SRC* και φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα τυροσινικά κατάλοιπα που βρίσκονται σε άλλες τυροσινικές κινάσες.

Η c-Src αποτελείται από 6 λειτουργικές περιοχές: μια περιοχή ομολογίας 4 Src (περιοχή SH4), μια μοναδική περιοχή (unique region), την περιοχή SH3, την περιοχή SH2, μια καταλυτική περιοχή και μια σύντομη ρυθμιστική ουρά.<sup>70</sup> Όταν η Src είναι ανενεργή, η φωσφορυλιωμένη ομάδα τυροσίνης στη θέση 527 αλληλεπιδρά με την περιοχή SH2 η οποία βοηθά το πεδίο SH3 να αλληλεπιδράσει με την περιοχή εύκαμπτου συνδέσμου και έτσι διατηρεί την ανενεργή μονάδα στενά συνδεδεμένη. Η ενεργοποίηση του c-Src προκαλεί την αποφωσφορυλίωση της τυροσίνης 527. Αυτό επάγει μια μακράς περιοχής αλλοστερίνη μέσω δυναμικής περιοχής



πρωτεϊνών, προκαλώντας την αποσταθεροποίηση της δομής, με αποτέλεσμα το άνοιγμα των πεδίων SH3, SH2 και κινάσης και την αυτοφωσφορλίωση του υπόλειμμα τυροσίνης 416.<sup>71-73</sup>



**Εικόνα 2.21:** Σχηματική απεικόνιση της δομής της c-Src πρωτεϊνικής κινάσης.<sup>74</sup>

Η c-Src μπορεί να ενεργοποιηθεί από πολλές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν: υποδοχείς προσκόλλησης, υποδοχικές τυροσινικές κινάσες, συζευγμένους με G πρωτεΐνες υποδοχείς και υποδοχείς κυτοκίνης. Οι περισσότερες μελέτες έχουν εξετάσει τις υποδοχικές κινάσες τυροσίνης και παραδείγματα αυτών είναι ο υποδοχέας αυξητικών παραγόντων αυξημένου παράγοντα αιμοπεταλίων (PDGFR) και ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGFR).

Η Src περιέχει τουλάχιστον τρεις εύκαμπτες πρωτεϊνικές περιοχές, οι οποίες, σε συνδυασμό με μυριστοϋλίωση, μπορούν να μεσολαβούν στην προσκόλληση σε μεμβράνες και να καθορίσουν τον υποκυτταρικό εντοπισμό.<sup>75</sup>

Το πρωτο-ογκογονίδιο αυτό μπορεί να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και της κυτταρικής ανάπτυξης. Όταν ενεργοποιείται το src, προάγει τις οδούς επιβίωσης, αγγειογένεσης, πολλαπλασιασμού και εισβολής. Επίσης ρυθμίζει τους αγγειογόνους παράγοντες και την αγγειακή διαπερατότητα.<sup>76,77</sup>

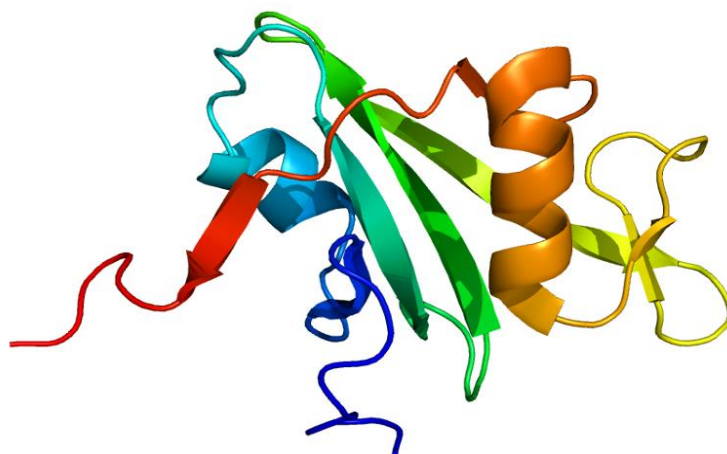
Η ενεργοποίηση της οδού c-Src έχει παρατηρηθεί σε περίπου 50 % των όγκων από το κόλον, το ήπαρ, τους πνεύμονες, το στήθος και το πάγκρεας.<sup>78</sup> Δεδομένου ότι η

ενεργοποίηση του c-Src οδηγεί στην προαγωγή της επιβίωσης, της αγγειογένεσης, των οδών πολλαπλασιασμού και εισβολής, παρατηρείται η ανώμαλη ανάπτυξη όγκων σε καρκίνους. Ένας κοινός μηχανισμός είναι ότι υπάρχουν γενετικές μεταλλάξεις που οδηγούν στην αυξημένη δραστηριότητα ή στην υπερέκφραση του c-Src που οδηγεί στη σταθερή ενεργοποίηση του.

Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στο σχεδιασμό, την ανάπτυξη και, έπειτα, τη θεραπευτική χρήση ενός αριθμού αναστολέων τυροσινικής κινάσης που στόχο έχουν την τυροσινική πρωτεϊνική κινάση c-Src (καθώς και σχετικές τυροσινικές κινάσες).<sup>79</sup> Αξιοσημείωτο παράδειγμα αποτελεί το Dasatinib, για το οποίο θα ακολουθήσει εκτενέστερη αναφορά σε επόμενη ενότητα, που έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) και της οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (ALL) θετικής σε χρωμόσωμα Philadelphia (PH+).<sup>80</sup>

### 2.6.2 Η c-Abl πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης

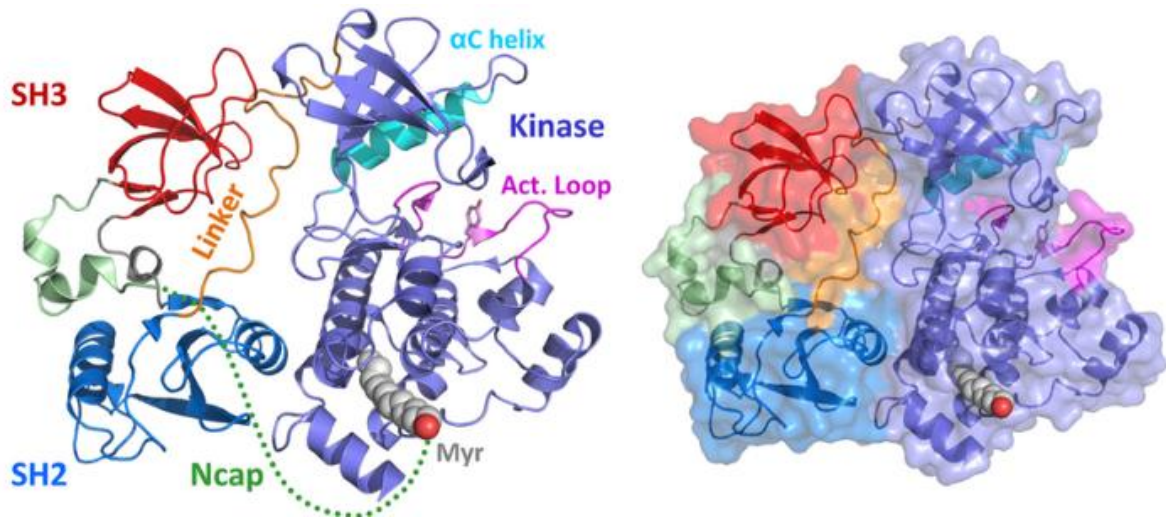
Άλλο ένα σημαντικό μέλος της κατηγορίας των μη-υποδοχικών πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών είναι η κινάση Abl1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1). Η φυσιολογική τυροσινική κινάση Abl είναι μία μεγάλη (~1150 αμινοξέα) πρωτεΐνη, η οποία στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το γονίδιο *ABL* το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9.<sup>81</sup>



Εικόνα 2.22: Σχηματική απεικόνιση της δομής του *ABL* γονιδίου.<sup>88</sup>

Η c-Abl (~530 αμινοξέα) πρωτεΐνη, στο -NH<sub>2</sub> τελικό άκρο της, περιέχει μία SH3-SH2-TK (Src homology 3–Src homology 2–tyrosine kinase) περιοχή. Το –COOH τελικό

άκρο της c-Abl περιέχει περιοχές πρόσδεσης DNA διάσπαρτες με θέσεις φωσφορυλίωσης και άλλα μικρά τμήματα αναγνώρισης, περιλαμβάνοντας τμήματα πλούσια σε προλίνη.<sup>82</sup>



Εικόνα 2.23: Σχηματική απεικόνιση της δομής της c-Abl κινάσης.<sup>83</sup>

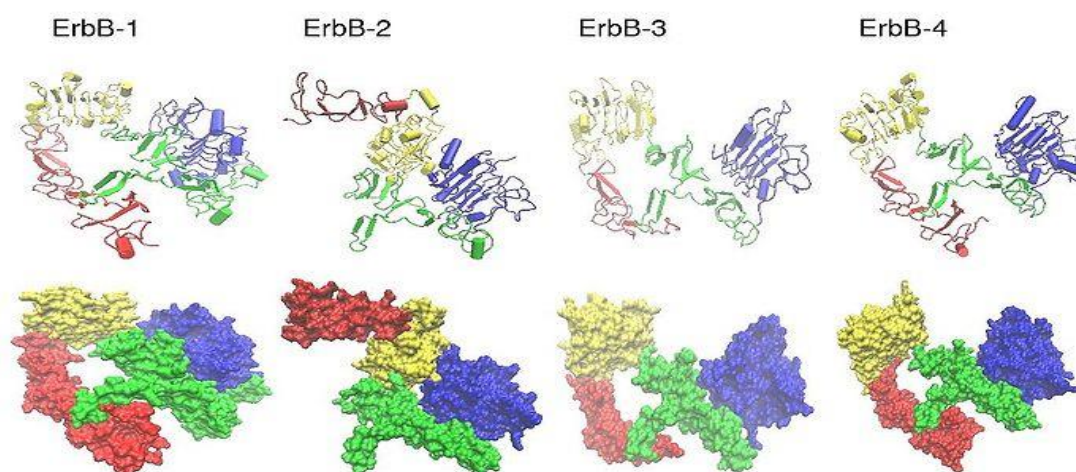
Φυσιολογικά, η c-Abl βρίσκεται σε ρυθμισμένη κατάσταση με χαμηλή δραστηριότητα. Η c-Abl κινάση εντοπίζεται σε διάφορες υποκυτταρικές θέσεις, όπως είναι ο πυρήνας, το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και οι φλοιοί των κυττάρων. Στις θέσεις αυτές, η c-Abl κινάση αλληλεπιδρά με μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών πρωτεϊνών στην οποία περιλαμβάνονται προσαρμογείς σηματοδότησης, κινάσες, φωσφατάσες, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, παράγοντες μεταγραφής και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Επιπλέον, εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, η επιβίωση, το οξειδωτικό στρες, οι αποκρίσεις σε βλάβες του DNA, η δυναμική της ακτίνης και η κυτταρική μετανάστευση. Εξαιτίας των πιθανών επιβλαβών συνεπειών της, η c-Abl τυροσινική κινάση ελέγχεται αυστηρά μέσα στο κύτταρο. Αυτό επιτυγχάνεται με την αυτοαναστολή (autoinhibition). Οι κρυσταλλικές δομές της ελεγχόμενης c-Abl κινάσης έχουν δείξει ότι η αυτοαναστολή στηρίζεται σε ένα περίπλοκο σύνολο ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, το οποίο περιλαμβάνει εκτός από την καταλυτική περιοχή της τυροσινικής κινάσης, τα τμήματα SH3 και SH2 και όλα τα άλλα τμήματα στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης.<sup>84</sup> Ωστόσο, όταν οι περιορισμοί της αυτοαναστολής διαταράσσονται από μεταλλάξεις, αυτές οι μορφές περιέχουν υψηλά ποσά φωσφο-τυροσίνης, γεγονός που



φανερώνει μία θετική συσχέτιση μεταξύ της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης και της δραστηριότητας της κινάσης.<sup>82</sup> Μεταλλάξεις στο γονίδιο *ABL* εμπλέκονται στην εμφάνιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, όπως θα αναλυθεί σε επόμενη ενότητα.

## 2.7 Οικογένεια *ErbB* Υποδοχέων-Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας *EGFR*

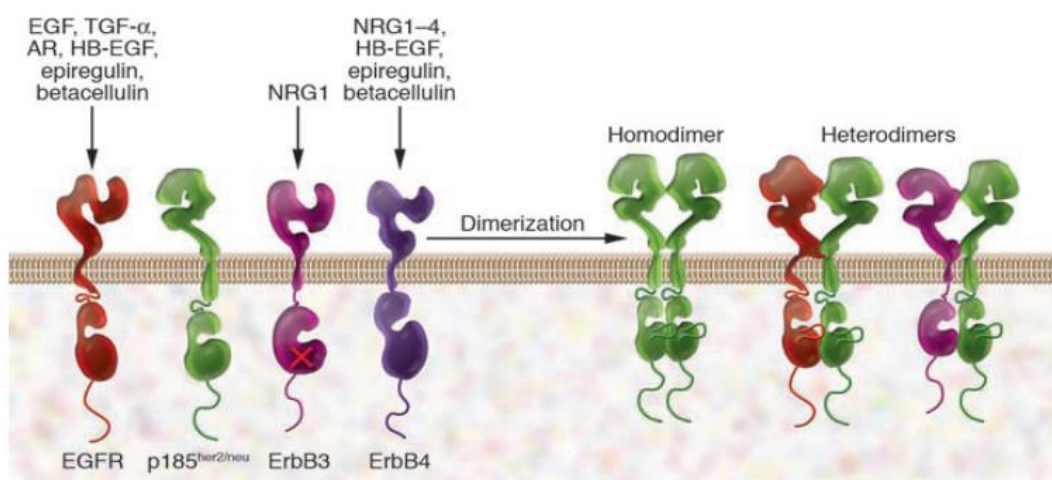
Ο υποδοχέας EGF (EGFR) ήταν ο πρώτος υποδοχέας που ταυτοποιήθηκε από μια οικογένεια υποδοχέων γνωστών ως υποδοχείς τύπου I με δράση τυροσυλοκινάσης ή υποδοχείς ErbB. Αυτή η οικογένεια υποδοχέων αποτελείται από τους ακόλουθους τέσσερις συγγενείς υποδοχείς: τον ίδιο τον EGFR (ErbB1/EGFR/HER1), τον ErbB2 (HER2/neu), τον ErbB3 (HER3) και τον ErbB4 (HER4).<sup>92-95</sup>



Εικόνα 2.24: Οικογένεια ErbB υποδοχέων.<sup>85-88</sup>

Όλες οι πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας έχουν μία περιοχή εξωκυτταρικού προσδέματος, μία απλή υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή<sup>95</sup> και τα μέλη της χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός τομέα τύπου EGF που αποτελείται από τρεις ενδομοριακές ομάδες συνδεδεμένες με δισουλφιδικό δεσμό, οι οποίες προσδίδουν εξειδίκευση στη δέσμευση,<sup>89</sup> καθώς και δομικά μοτίβα όπως περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες, θέσεις δέσμευσης ηπαρίνης και θέσεις γλυκοζυλίωσης.<sup>90-92</sup> Όσον αφορά την δέσμευση του υποδοχέα ErbB, οι αυξητικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον EGF μπορούν να χωριστούν σε τρεις ομάδες.

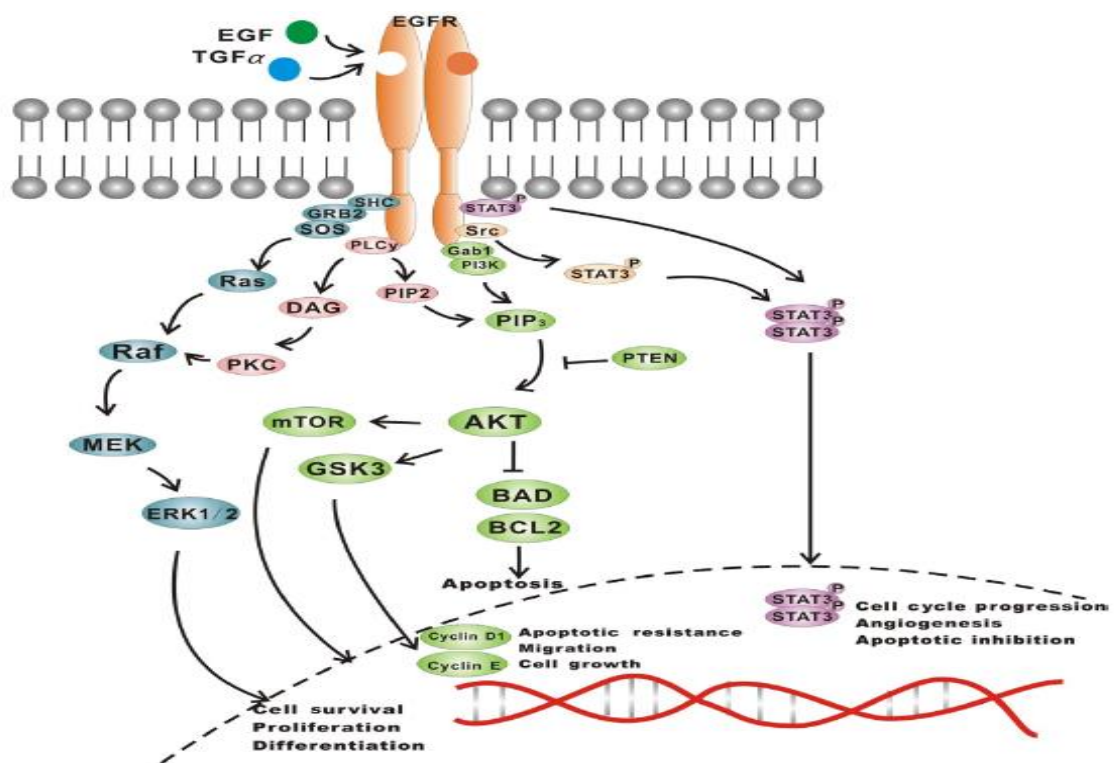
<sup>92,93</sup> Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τον EGF, το μετασχηματιστικό παράγοντα α (TGF-α) και την αμφιρεγκουλίνη (AR) που δεσμεύεται ειδικά με τον EGFR. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τη βητακυτταρινίνη (BTC), τον αυξητικό παράγοντα που δεσμεύει την ηπαρίνη (HB-EGF) και την επιρεγκουλίνη (EPR), οι οποίες παρουσιάζουν διπλή ειδικότητα δεσμεύοντας τόσο με τον EGFR όσο και με τον ErbB-4. Η τρίτη ομάδα αποτελείται από τις νευρορεγκουλίνες (NRGs) που μπορούν να χωριστούν σε δύο υποομάδες με βάση την ικανότητα δέσμησης ErbB-3 και ErbB-4 (NRG-1 και NRG-2) ή μόνο ErbB-4 (NRG-4).<sup>94-97</sup> Καμία οικογένεια πεπτιδίων EGF δε συνδέεται στον ErbB-2.<sup>98</sup>



**Εικόνα 2.25:** Παράγοντες ErbB και τα προσδέματά τους.<sup>99</sup>

Πιο συγκεκριμένα ο EGFR είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 170 kD.<sup>100</sup> Η δέσμηση με τα προσδέματά του (EGF και TGF-α) οδηγεί σε μεταβολές της διαμόρφωσής του και ομοδιμερισμό ή ετεροδιμερισμό με άλλα μέλη της οικογένειας HER. Υπάρχει επακόλουθη αυτοφωσφορλίωση της κυτταροπλασματικής περιοχής τυροσινικής κινάσης (TK), με τη βοήθεια πρωτεϊνικών προσαρμογών (π.χ. SHC και GRB-2), η οποία ενεργοποιεί την προς τα κάτω σηματοδότηση. Υπάρχουν τρεις κύριες πορείες: (1) Rat Σάρκωμα (RAS)/ταχέως επιταχυνόμενο ινοσάρκωμα που προκαλεί μεταγενέστερη σηματοδότηση (RAF)/ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (MAPK), (2) Μονοπάτι φωσφατιδυλινοσιτόλης-3-κινάσης, (PI3K)/πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt) και (3)

Κινάσης Janus (JAK)/μορφοτροποποιητές σήματος και ενεργοποιητές της οδού μεταγραφής (STAT), που διεγείρει τη μίτωση, οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αναστολή της απόπτωσης. Αυτές οι οδοί είναι κρίσιμες για την κανονική ανάπτυξη των κυττάρων.<sup>101,102</sup>



Εικόνα 2.26: Οι σηματοδοτικές οδοί που προάγει ο EGFR.<sup>101</sup>

Ο σημαντικός ρόλος του EGFR στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την επιβίωση και τη μετάσταση τον καθιστά έναν ελκυστικό μοριακό στόχο, καθώς η παρεμβολή στις δραστηριότητές του μπορεί να διακόψει τη μεταγωγή σήματος. Η υπερέκφραση του EGFR διακρίνει κύτταρα όγκου από φυσιολογικά κύτταρα, καθιστώντας δυνατό σε μόρια ανασταλτικά του EGFR να δρουν πιο επιλεκτικά σε καρκινικά κύτταρα και να εξασθενίζουν τον επιθετικό πολλαπλασιασμό τους. Εκτός από τις αντι-πολλαπλασιαστικές επιδράσεις, η αναστολή του EGFR μπορεί να επιβραδύνει τη μεταστατική δραστηριότητα, να ενισχύσει την απόπτωση που προκαλείται από την ακτινοβολία και να προωθήσει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και, ως εκ τούτου, να εμποδίσει τα κύτταρα που έχουν καταστραφεί από την ακτινοβολία να εισέλθουν στη φάση G2 / διακοπή κυτταρικού

κύκλου στη φάση G1 όπου λαμβάνει χώρα επιδιόρθωση της προκαλούμενης από ακτινοβολία βλάβης του DNA.<sup>100,103</sup>

**Για να ανασταλεί η ανεξέλεγκτη δράση του EGFR** υπάρχουν δύο δυνατοί τρόποι, είτε με πρόσδεση κάποιου μικρού μορίου στην εξωκυττάρια περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (κυρίως αντισώματα), είτε στην ενδοκυττάρια και πιο συγκεκριμένα στο ενεργό κέντρο με δράση τυροσυλο-κινάσης.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες αναστολέων τυροσινικής κινάσης (TKIs) για την οικογένεια των ErbB υποδοχέων, οι αναστρέψιμοι και οι μη αναστρέψιμοι αναστολείς. Οι αναστρέψιμοι αναστολείς ανταγωνίζονται μόνο την πρόσδεση του ATP στην κινάση, ενώ οι μη αναστρέψιμοι αναστολείς μπορούν επίσης να αλκυλιώνουν ένα μοναδικό κατάλοιπο κυστεΐνης (κυστεΐνη 773 του EGFR) μέσα στον θύλακα δέσμευσης του ATP και να αδρανοποιούν μόνιμα την κινάση.<sup>99</sup> Ένα άλλο χαρακτηριστικό των τελευταίων TKIs είναι η ευρεία τους δραστηριότητα έναντι πολλαπλών υποδοχέων της οικογένειας ErbB. Οι υποδοχείς με έλλειψη κινάσης έχουν αποδειχθεί ότι προκαλούν κυτταρικό μετασχηματισμό με την πρόσληψη ενός υποδοχέα, ο οποίος έχει ανέπαφα πεδία κινάσης.<sup>99</sup>

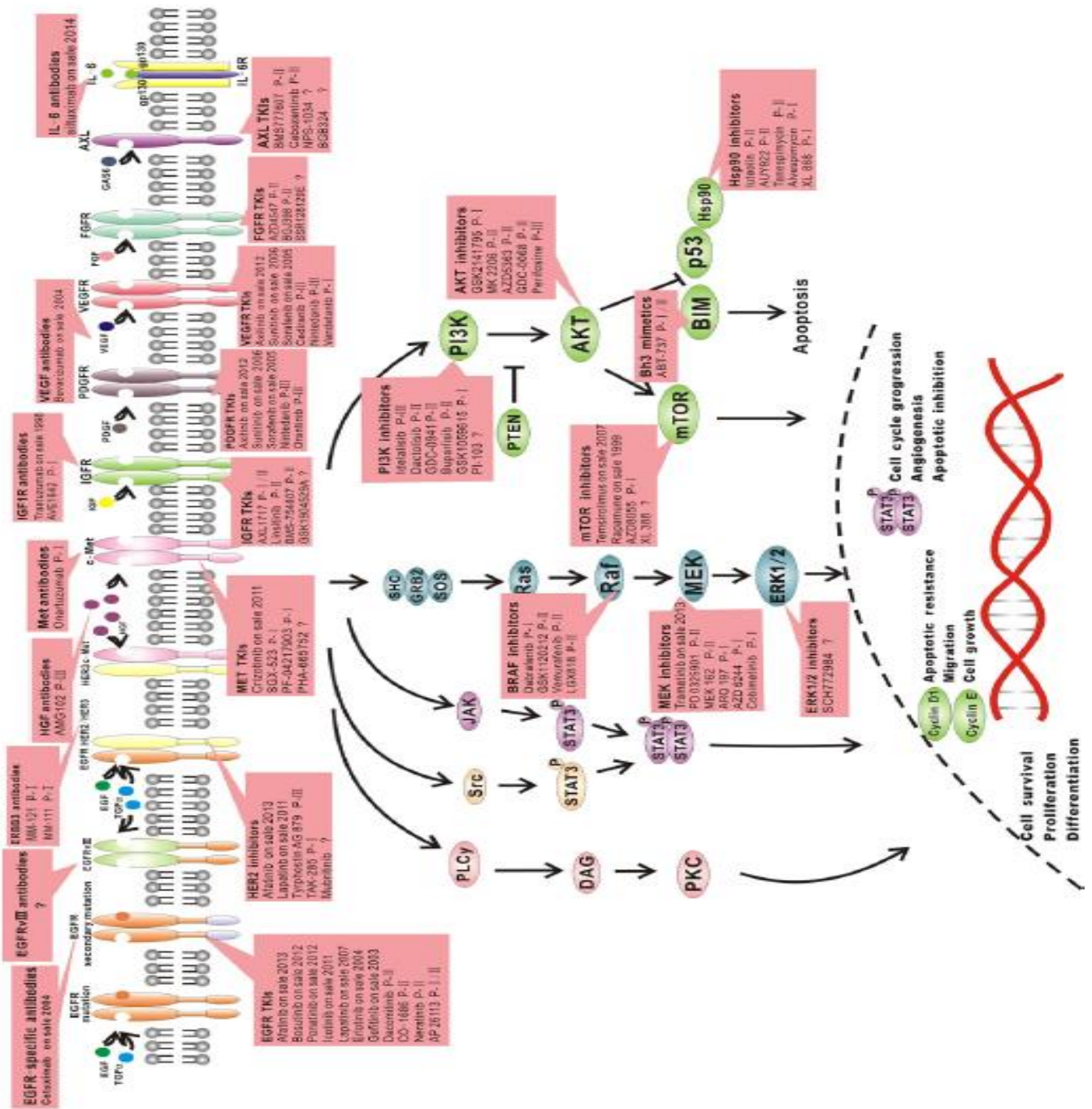
Οι τρέχοντες αντιστρεπτοί TKIs είναι παράγωγα κιναζολινών. Το Gefitinib (επίσης γνωστό και ως Iressa™) και το Erlotinib (επίσης γνωστό ως Tarceva™) είναι επιλεκτικά δραστικοί αναστολείς έναντι της τυροσινικής κινάσης του EGFR,<sup>104,105</sup> ενώ η λαπατινίβη (Lapatinib) παρουσιάζει συγκρίσιμη δραστηριότητα έναντι τόσο του EGFR όσο και του p185her2/neu.<sup>106</sup> Σε κρυσταλλογραφικές μελέτες, μόνο το Lapatinib δέσμευσε την περιοχή κινάσης του EGFR σε μια ανενεργή διαμόρφωση<sup>107</sup> που μοιάζει με αυτή των ανενεργών κινασών της οικογένειας SRC.<sup>108,109</sup> Η κινάση EGFR που δεσμεύεται με το erlotinib διατηρεί ακόμη μια ενεργή διαμόρφωση,<sup>110</sup> αν και σε επεξεργασμένα καρκινικά κύτταρα, οι EGFRs δεν είναι πλέον αυτοφωσφορυλιωμένοι.<sup>111</sup> Δεν υπάρχουν ουσιαστικά δομικές πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση της περιοχής p185her2/neu κινάσης με οποιονδήποτε από αυτούς τους αναστολείς.<sup>99</sup>

Στην κατηγορία των μη αναστρέψιμων αναστολέων ανήκουν μόρια που δεσμεύονται μη αναστρέψιμα στην περιοχή της τυροσινικής κινάσης προκαλώντας τη μόνιμη τροποποίησή της. Τα μόρια αυτά αναπτύχθηκαν αρχικά για να επιτευχθεί

η ανθεκτική καταστολή της εξαρτώμενης από προσδέματα αυτοφωσφορυλίωσης του EGFR.<sup>112</sup> Το πλεονέκτημα των μη αναστρέψιμων αναστολέων κατέστη εμφανές αφού διαπιστώθηκε ότι αναστέλλουν τις μεταλλάξεις του EGFR (όπως την T790M) που είναι ανθεκτικές στους αναστρέψιμους αναστολείς.<sup>113</sup> Παρουσιάζουν κλινική δραστηριότητα σε ανθεκτικούς σε Gefitinib Ιάπωνες ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.<sup>114</sup> Ένα άλλο πλεονέκτημα των μη αναστρέψιμων αναστολέων είναι ότι αναστέλλουν όλες τις υποδοχικές κινάσες της οικογένειας ErbB.<sup>99</sup>

Ωστόσο πολλοί από τους υπάρχοντες RTKs παρουσιάζουν ευαισθησία έναντι σωματικών μεταλλάξεων ή αντίσταση, που προκαλείται από τα φάρμακα. Επομένως μια επιτυχής στρατηγική για τη στοχευμένη αναστολή-θεραπεία των ErbB μπορεί να απαιτεί την αναστολή άλλων στόχων που σχετίζονται με τις οδούς σηματοδότησης των παραγόντων αυτών. Στην παρακάτω εικόνα σημειώνονται κάποιοι τέτοιοι πιθανοί στόχοι.<sup>99</sup>





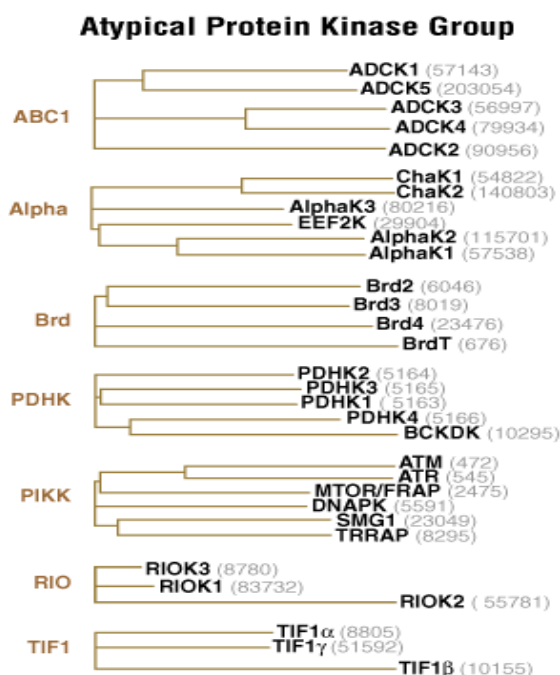
Εικόνα 2.27: Πιθανοί στόχοι για τη συγγενή θεραπεία ώστε να ξεπεραστεί η αντίσταση των EGFR-TKIs.<sup>110</sup>

Υπερέκφραση του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα EGFR, έχει συνδεθεί με πολλά είδη καρκίνου συμπεριλαμβανομένου και του αδενοκαρκινώματος, ενός εκ των επιμέρους ειδών του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

## 2.8 Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες

Οι άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs) περιλαμβάνουν πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης και εμπλέκονται σε διαδικασίες φωσφορυλίωσης, σημαντικές για πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες. Από ένα σύνολο μεγαλύτερο των 560 πρωτεϊνικών κινασών του ανθρωπίνου γονιδιώματος, οι 68 κατατάσσονται στις άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs). Οι aPKs χωρίζονται σε 13 υπο-οικογένειες, με αυτές που απαντώνται στον άνθρωπο να αποτελούνται από 2 έως 6 μέλη, ενώ ο ρόλος μόνο μερικών από αυτές έχει χαρακτηριστεί.<sup>26,115–117</sup>

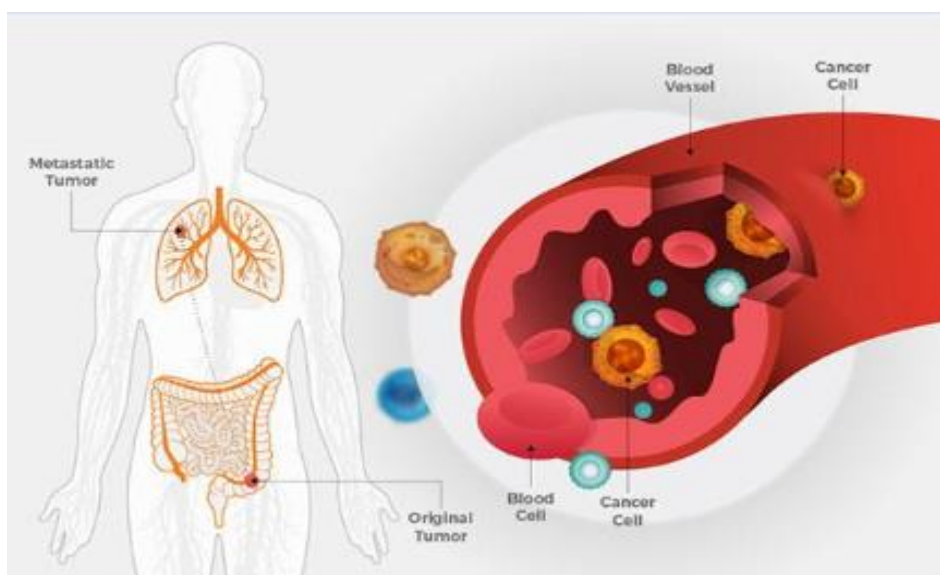
Οι κλασικά απαντώμενες ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν στην περιοχή δραστικότητας της κινάσης ένα N-τελικό άκρο που αποτελείται από ένα β-φύλλο πλησίον της α-έλικας (αC) και ένα C-τερματικό λοβό που έχει κυρίως ελικοειδή δομή. Σε αντίθεση με τις τυπικές πρωτεϊνικές κινάσες, οι άτυπες διαφέρουν αρκετά στην ομόλογη σειρά.<sup>118</sup> Εν τούτοις, μερικές aPKs παρουσιάζουν κάποια δομική ομολογία με τις ePKs, παρά την έλλειψη ομοιότητας της ακολουθίας.<sup>26</sup>



**Σχήμα 2.28:** Ταξινόμηση άτυπων πρωτεϊνικών κινασών (aPKs) σε υπο-οικογένειες.<sup>119</sup>

## 2.9 Καρκίνος

Η λέξη καρκίνος είναι ένας γενικός όρος για μια μεγάλη ομάδα ασθενειών που μπορούν να επηρεάσουν οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Άλλοι όροι που χρησιμοποιούνται είναι οι κακοήθεις όγκοι και οι νεοπλασίες. Ένα στοιχείο που χαρακτηρίζει τον καρκίνο είναι η ταχεία δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων που ξεπερνούν τα συνήθη όριά τους και τα οποία μπορούν στη συνέχεια να εισβάλλουν σε παρακείμενα τμήματα του σώματος (εξάπλωση στους ιστούς) και σε άλλα όργανα, με μεταφορά μέσω του αίματος (αιματογενής εξάπλωση) ή της λέμφου (λεμφογενής εξάπλωση). Η τελευταία διαδικασία αναφέρεται με τον όρο μετάσταση. Αυτές είναι, κατά κύριο λόγο, υπεύθυνες για τους θανάτους από καρκίνο.



**Εικόνα 2.29:** Μετάσταση, μεταφορά καρκινικών κυττάρων μέσω του αίματος.<sup>120</sup>

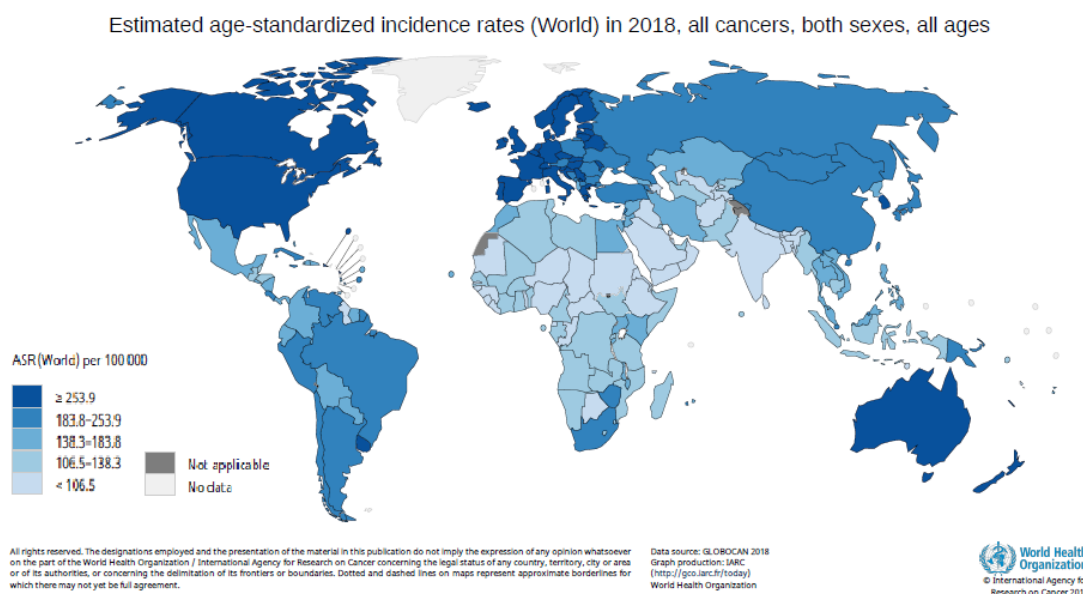
Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά κύτταρα με πολλούς τρόπους που τους επιτρέπουν να ξεφύγουν από τον έλεγχο και να γίνουν επεμβατικά. Μια σημαντική διαφορά είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο εξειδικευμένα από τα κανονικά κύτταρα. Δηλαδή, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα ωριμάζουν σε πολύ διαφορετικούς τύπους κυττάρων με ειδικές λειτουργίες, τα καρκινικά κύτταρα δεν το κάνουν. Αυτός είναι ένας λόγος που, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται χωρίς να σταματούν.



Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να αγνοούν τα σήματα που σταματούν τη διαίρεση των κυττάρων ή αρχίζουν μια διαδικασία γνωστή ως προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση που χρησιμοποιεί το σώμα για να απαλλαγεί από τα περιττά κύτταρα.

Τα καρκινικά κύτταρα είναι επίσης συχνά ικανά να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα, ένα δίκτυο οργάνων, ιστών και εξειδικευμένων κυττάρων που προστατεύουν το σώμα από λοιμώξεις και άλλες καταστάσεις. Αν και το ανοσοποιητικό σύστημα απομακρύνει κανονικά τα κατεστραμμένα ή ανώμαλα κύτταρα από το σώμα, μερικά καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να "κρύβονται" από το ανοσοποιητικό σύστημα.<sup>120</sup>

Από άποψη στατιστικής, ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτων παγκοσμίως. Το 2018 υπολογίζεται ότι περίπου 9.6 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν, δηλαδή 1 στους 6 θανάτους οφείλονταν στον καρκίνο.



**Εικόνα 2.30:** Ποσοστά Θνησιμότητας από Καρκίνο Παγκοσμίως το 2018.<sup>121</sup>

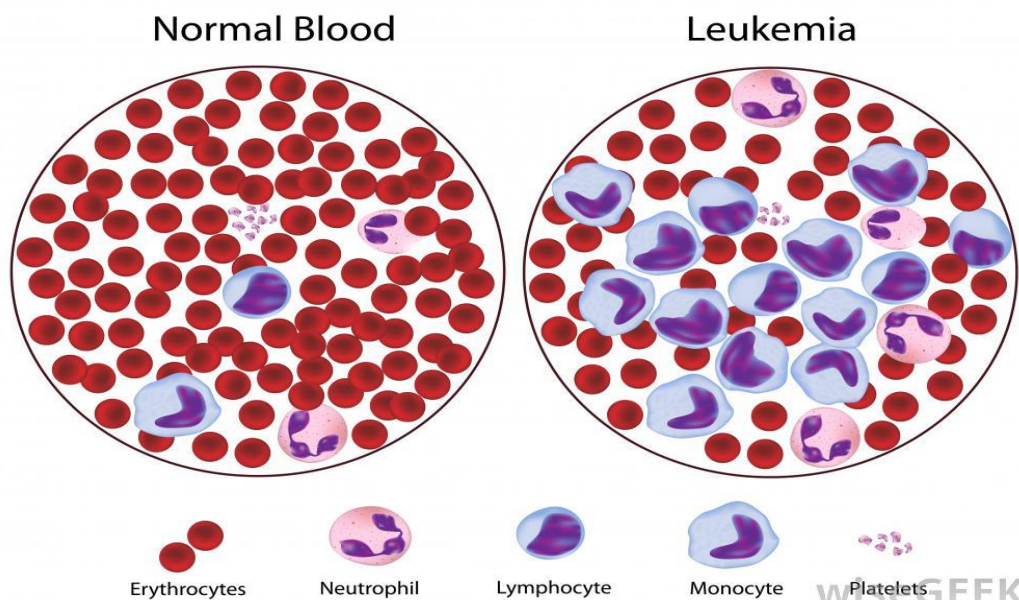
Περίπου το 70% των θανάτων από καρκίνο συμβαίνουν στις χώρες με χαμηλό και μεσαίο εισόδημα. Ο οικονομικός αντίκτυπος του καρκίνου είναι σημαντικός και αυξάνεται, ενώ το συνολικό ετήσιο οικονομικό κόστος του καρκίνου το 2010 εκτιμήθηκε σε περίπου 1,16 τρισεκατομμύρια δολάρια στις ΗΠΑ.<sup>122</sup>

## 2.10 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία - Χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph)<sup>123</sup>

Οι λευχαιμίες είναι ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση κακοήθων λευκών αιμοσφαιρίων στον μυελό των οστών και στο αίμα. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα δημιουργούν συμπτώματα λόγω: (α) οστεομυελικής ανεπάρκειας (δηλ. αναιμίας, ουδετεροπενίας, θρομβοκυτταροπενίας) και (β) διήθησης οργάνων (π.χ. ήπατος, σπλήνα, λεμφαδένων, μηνίγγων, εγκεφάλου, δέρματος ή όρχεων).

Οι λευχαιμίες διακρίνονται σε οξείες και χρόνιες, που υποδιαιρούνται κατόπιν σε λεμφογενείς και μυελογενείς. Οι χρόνιες λευχαιμίες διακρίνονται από τις οξείες λόγω της βραδύτερης εξέλιξής τους. Παραδόξως, είναι και πιο δύσκολο να θεραπευθούν. Οι χρόνιες λευχαιμίες υποδιαιρούνται αδρά σε μυελογενείς και λεμφογενείς.

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία BCR-ABL1+ (ΧΜΛ) είναι κλωνική ανωμαλία και αντιπροσωπεύει το 15-20% των λευχαιμιών στους ενήλικες και είναι μία από τις πιο μελετημένες νεοπλασίες.<sup>124</sup>

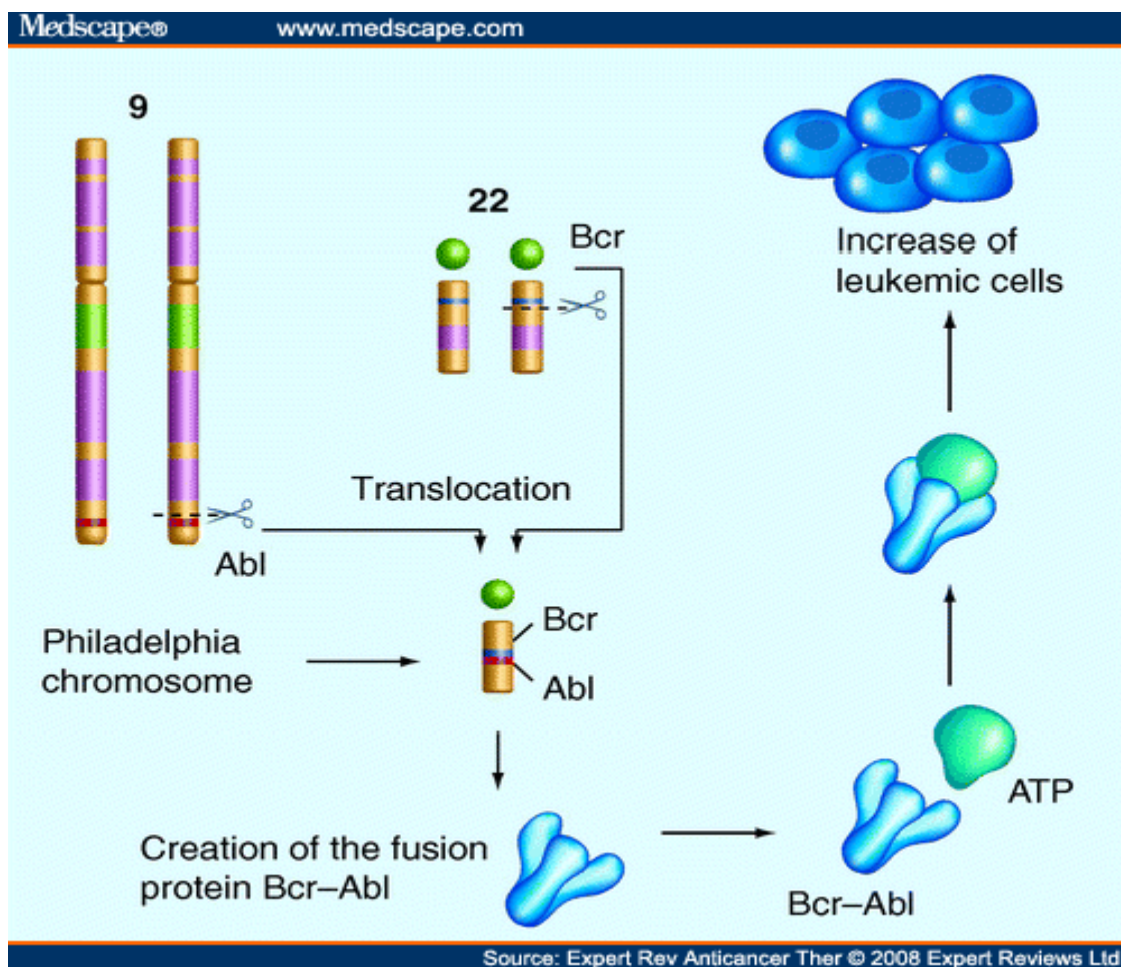


Εικόνα 2.31: Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία -Σχηματική Απεικόνιση.<sup>125</sup>

Η διάγνωση της ΧΜΛ συνήθως είναι εύκολη και υποβοηθείται από τη χαρακτηριστική παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια (Ph+). Το χρωμόσωμα αυτό προκύπτει από την αμιβαία μετάθεση t(9;22) (q34;q11), μεταξύ των

χρωμοσωμάτων 9 και 22. Διαφοροποιείται με βάση το μέγεθος του τμήματος του ογκογονιδίου ABL1 που μετατίθεται στο γονίδιο BCR στο χρωμόσωμα 22 και, αντίστοιχα, από το μήκος του τμήματος του χρωμοσώματος 22 που μετατίθεται στο χρωμόσωμα 9. Το ανώμαλο χρωμόσωμα 22 (βραχύτερο από το φυσιολογικό χρωμόσωμα 22) είναι το χρωμόσωμα Ph. Το σχηματιζόμενο χιμαιρικό γονίδιο BCR-ABL1 κωδικοποιεί μια υβριδική πρωτεΐνη που έχει μοριακή μάζα 210 kDa (p210) και εμφανίζει δραστικότητα τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης πολύ εντονότερη από εκείνη της πρωτεΐνης ABL1, με μοριακή μάζα 145 kDa, κανονικό γονιδιακό προϊόν.

Η μετάθεση Ph παρατηρείται επίσης σε μικρό αριθμό περιπτώσεων οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ΟΛΛ).



Εικόνα 2.32: Χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια - Ογκοπρωτεΐνη BCR-ABL1. <sup>135</sup>

Σε μικρή μερίδα ασθενών, η ανωμαλία του Ph<sup>+</sup> δεν είναι ορατή στη μικροσκοπική ανάλυση του καρυοτύπου, αλλά η ίδια μοριακή αναδιάταξη ανιχνεύεται με πιο ευαίσθητες τεχνικές, π.χ. με φθορίζοντα in situ υβριδισμό (FISH, fluorescence in situ

hybridization) ή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η αρνητική για Ph και θετική για BCR-ABL1 ΧΜΛ έχει κλινική πορεία όμοια με αυτήν της θετικής για Ph ΧΜΛ. Επειδή το χρωμόσωμα Ph είναι επίκτητη ανωμαλία των στελεχιαίων αιμοποιητικών κυττάρων, η παρουσία του διαπιστώνεται στα κύτταρα τόσο της μυελικής (κοκκιοκύτταρα, ερυθρά και μεγακαρυοκύτταρα) όσο και της λεμφικής (B- και T-κύτταρα).

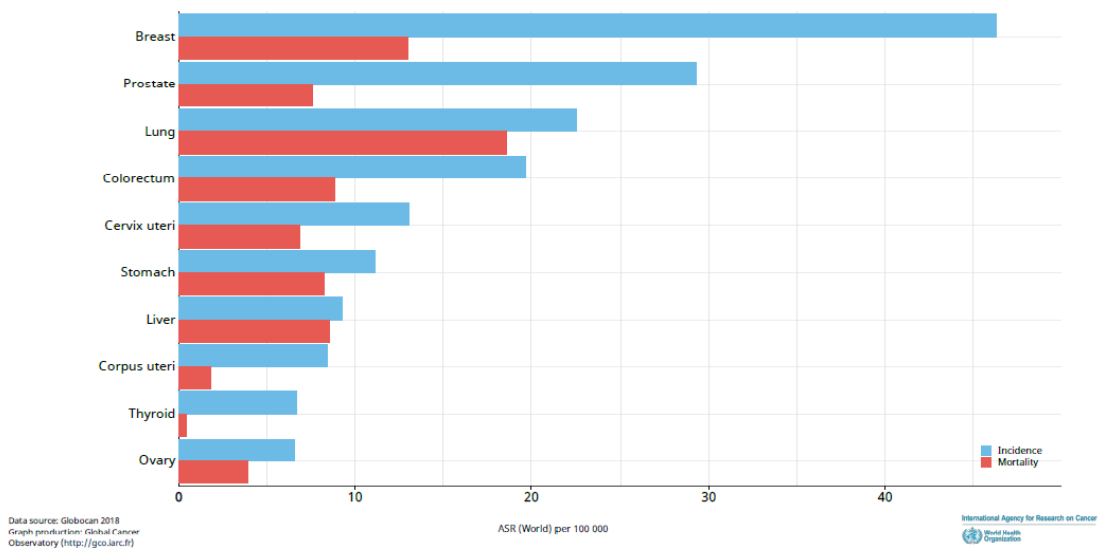
Από την περιγραφή της στη δεκαετία του 1850, έχει διερευνηθεί μια μυριάδα επιλογών θεραπείας στη ΧΜΛ, συμπεριλαμβανομένου του τριοξειδίου του αρσενικού, της ακτινοβολίας του σπληνός, της βουσουλφάνης, της υδροξυκαρβαμίδης, της μεταμόσχευσης βλαστικών κυττάρων και της ιντερφερόνης-α. Μεταξύ αυτών, η ιντερφερόνη-α έδειξε ανώτερη δραστηριότητα σε σύγκριση με άλλους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.<sup>124</sup>

Σήμερα, ωστόσο, οι εκλεκτικοί αναστολείς της τυροσινικής κινάσης BCR-ABL1, πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς, αποτελούν τη θεραπεία επιλογής της ΧΜΛ.

## 2.11 Καρκίνος Πνεύμονα

Από τα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα η ευρεία διάδοση της καπνιστικής συνήθειας, η αυξημένη περιβαλλοντική έκθεση σε καπνό (παθητικό κάπνισμα), καθώς και η ατμοσφαιρική ρύπανση, συνδέθηκαν με την επιδημική αύξηση τόσο της επίπτωσης, όσο και θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα. Παγκοσμίως είναι ο δεύτερος συχνότερος καρκίνος τόσο στους άνδρες (μετά τον καρκίνο του προστάτη), όσο και στις γυναίκες (μετά από τον καρκίνο του μαστού), αλλά ο πιο θανατηφόρος.<sup>126</sup> Παγκοσμίως υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο ο αριθμός των ασθενών που καταλήγουν λόγω καρκίνου του πνεύμονα είναι περίπου ίσος με το άθροισμα των θανάτων από καρκίνο προστάτη, μαστού και παχέος εντέρου.<sup>137</sup>

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages

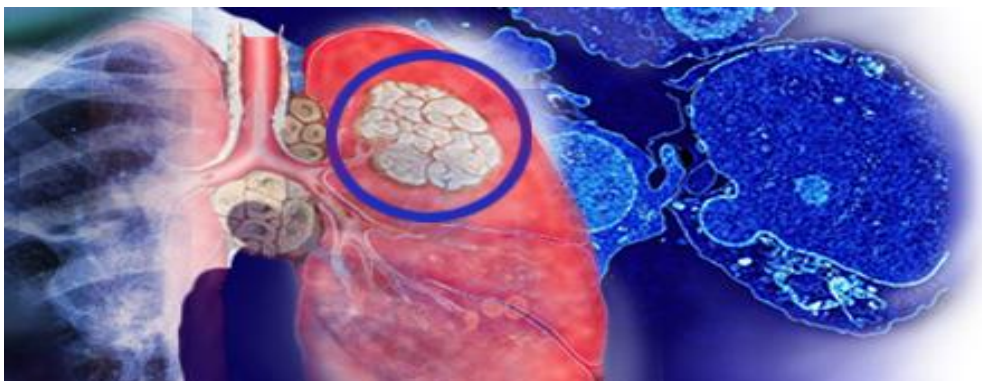


**Εικόνα 2.33:** Στατιστικά για τον καρκίνο του πνεύμονα για το 2018.<sup>121</sup>

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένα είδος καρκίνου που προσβάλλει την τραχεία (αναπνευστικός σωλήνας), τους βρόγχους (αεραγωγοί) ή τους αερόσακους που βρίσκονται στους πνεύμονες (πνευμονικές κυψελίδες).<sup>127</sup> Ξεκινά, γενικά, από τα κύτταρα και τους ιστούς των πνευμόνων και μπορεί να δώσει μεταστάσεις.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα:

1. Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα (ΜΜΚΠ), (Non-Small Cell Lung Cancer – NSCLC): αντιστοιχεί στο 80 % έως 85 % των περιπτώσεων<sup>128</sup> και χωρίζεται σε 3 υποτύπους, οι οποίοι παρουσιάζουν διαφορές στην εμφάνιση των κυττάρων τους και στο μικροσκόπιο, αλλά ανήκουν στην ίδια ομάδα γιατί η θεραπεία και η πρόγνωση τους είναι παρόμοια.

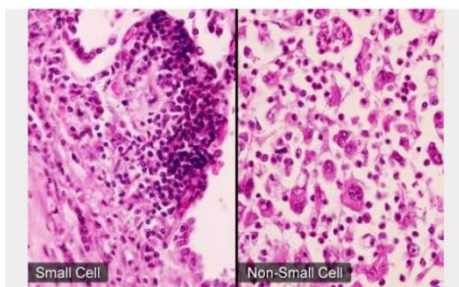


**Εικόνα 2.34:** Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα.<sup>129</sup>



- **Αδενοκαρκίνωμα:** αντιστοιχεί στο 40 % περίπου των περιπτώσεων και αν και εμφανίζεται κατά κύριο λόγο σε άτομα με ιστορικό καπνίσματος, αποτελεί τον πιο συχνό καρκίνο του πνεύμονα σε μη καπνιστές. Αφορά συχνότερα σε γυναίκες και σε σχετικά νεότερα άτομα, σε ποσοστό μεγαλύτερο από την εμφάνιση άλλων καρκίνων. Αυτοί οι καρκίνοι αρχίζουν στις πρώιμες εκδόσεις των κυττάρων που κανονικά θα εκκρίνουν ουσίες όπως η βλέννα. Το αδενοκαρκίνωμα συνήθως βρίσκεται στα εξωτερικά μέρη του πνεύμονα. Αν και τείνει να αναπτύσσεται βραδύτερα από άλλους τύπους καρκίνου του πνεύμονα και είναι πιο πιθανό να βρεθεί προτού εξαπλωθεί, αυτό ποικίλλει από ασθενή σε ασθενή. Τα άτομα με έναν τύπο αδενοκαρκινώματος που ονομάζεται αδενοκαρκίνωμα *in situ* (προηγουμένως είχε την ονομασία βρογχιολοκυτταρικό καρκίνωμα) τείνουν να έχουν καλύτερη προοπτική από εκείνα με άλλους τύπους καρκίνου του πνεύμονα.<sup>128</sup>
- **Πλακώδες καρκίνωμα:** αντιστοιχεί στο 30 % περίπου των περιπτώσεων και σχετίζεται με ιστορικό καπνίσματος. Συνήθως εντοπίζεται κεντρικά στους πνεύμονες, κοντά στους βρόγχους.
- **Καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα:** αντιστοιχεί στο 15 % περίπου των περιπτώσεων. Μια υποομάδα του, που ονομάζεται μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα, μοιάζει πολύ με το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.<sup>141</sup>

2. Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα (ΜΚΠ), (Small Cell Lung Cancer, SCLC): αντιστοιχεί στο 15 % περίπου των περιπτώσεων και ονομάζεται έτσι λόγω του μικρού μεγέθους που έχουν το κύτταρά του στο μικροσκόπιο. Είναι πολύ σπάνιο να εμφανιστεί σε μη καπνιστές. Συνήθως, έχει την τάση για γρήγορη ανάπτυξη και πρώιμη εμφάνιση μεταστάσεων. Παρόλα αυτά, συχνά παρουσιάζει ταχεία απόκριση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία.

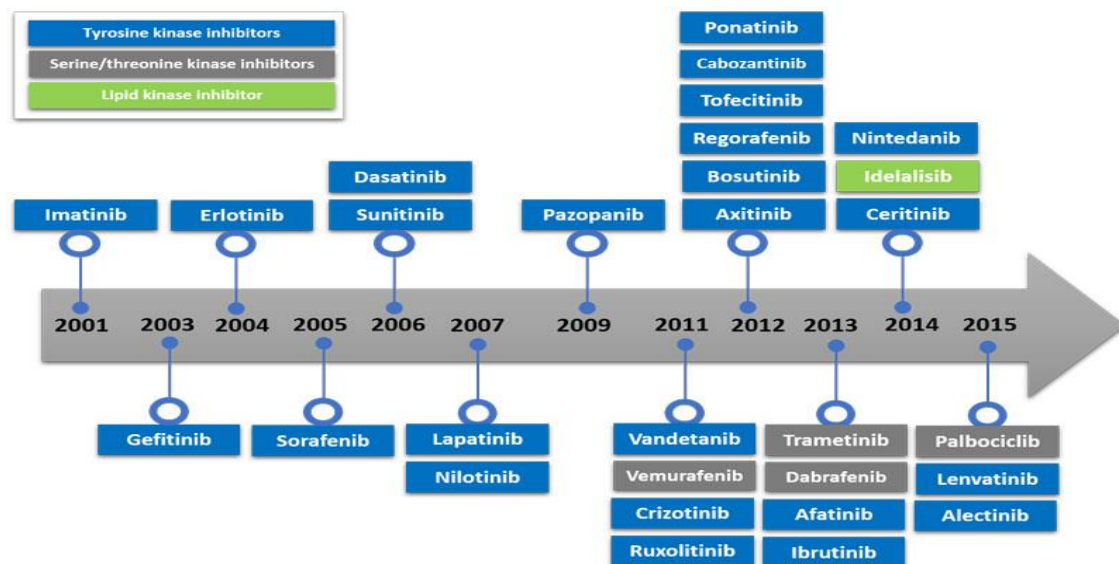


**Εικόνα 2.35:** Μικροσκοπική εικόνα ΜΚΠ και ΜΜΚΠ.

130

## 2.12 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών-Τύποι

Οι πρωτεϊνικές κινάσες, όπως αναλύθηκε εκτενώς στις προηγούμενες ενότητες, είναι ένζυμα που διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στις περισσότερες λειτουργίες των κυττάρων. Αυτό, όμως, όσο βρίσκονται στην φυσιολογική τους κατάσταση, καθώς η απορρύθμιση της λειτουργίας τους ή οι μεταλλάξεις που μπορούν να λάβουν χώρα, έχουν συνδεθεί με πολλές ανθρώπινες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων πολλών ειδών καρκίνου. Παράλληλα, οι κινάσες έχουν υποδειχθεί ως δυνητικοί θεραπευτικοί στόχοι στην αντιμετώπιση φλεγμονωδών ασθενειών, καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη, καθώς και νευρολογικών διαταραχών, όπως η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson.<sup>131,132</sup> Είναι, επομένως, απολύτως δικαιολογημένο το ενδιαφέρον των ερευνητών, που έχουν καταστήσει τις πρωτεϊνικές κινάσες τον υπ' αριθμόν ένα στόχο στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων για περίπου δύο δεκαετίες τώρα.<sup>133,134</sup>



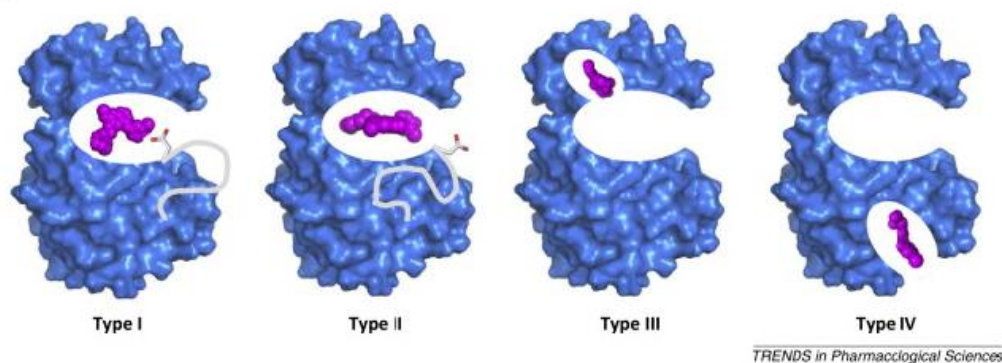
**Εικόνα 2.36:** Αναστολείς που αναπτύχθηκαν και τέθηκαν εμπορικά διαθέσιμοι την περίοδο 2001-2015.<sup>135</sup>

Ως εκ τούτου, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που είτε χορηγούνται ως θεραπεία σε διάφορες ασθένειες, είτε βρίσκονται σε κάποιο στάδιο κλινικών δοκιμών. Πιο συγκεκριμένα, μέχρι την 1<sup>η</sup> Μαρτίου 2019 έχουν εγκριθεί (από τον FDA και οργανισμούς άλλων χωρών) και κυκλοφορούν 48 μικρά μόρια, αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών. Από αυτούς η πλειοψηφία (συγκεκριμένα 25), είναι αναστολείς υποδοχικών τυροσινικών

πρωτεϊνικών κινασών, οι 10 αναστέλλουν τις μη-υποδοχικές τυροσινικές πρωτεϊνικές κινάσες και, τέλος, 13 κατευθύνονται προς τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης.<sup>3</sup>

Οι αναστολείς, αυτοί, μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν σε διάφορους τύπους, ανάλογα με την περιοχή της πρωτεϊνικής κινάσης όπου δεσμεύονται, σε κάποια διαμόρφωση του ενεργού της κέντρου ή σε κάποια άλλη περιοχή που δεν αλληλεπιδρά με αυτό. Ακόμη, μπορεί να είναι αντιστρεπτοί ή μη αντιστρεπτοί, να αναστέλλουν μία ή πολλαπλές κινάσες<sup>3,136</sup> και, τέλος, να ανακόπτουν τις σηματοδοτικές οδούς στις κινάσες όπου δεσμεύονται.<sup>137</sup>

Μεταξύ των παραπάνω πιθανών τρόπων ταξινόμησης των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινάσων, περισσότερο κοινός είναι ο διαχωρισμός τους με βάση τη σύνδεσή τους με την πρωτεϊνική κινάση. Σύμφωνα με το τελευταίο κριτήριο, οι εκλεκτικοί αναστολείς μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κλάσεις: τους μη αντιστρεπτούς και τους αντιστρεπτούς αναστολείς. Οι πρώτοι τείνουν να συνδέονται ομοιοπολικά με ένα δραστικό πυρηνόφιλο κατάλοιπο κυστεΐνης πλησίον της θέσης δέσμευσης ATP, με αποτέλεσμα την απόφραξη της θέσης αυτής και, ακολούθως, τη μη αναστρέψιμη αναστολή. Οι αντιστρεπτοί αναστολείς μπορούν, επιπλέον, να διακριθούν σε τέσσερις κύριους τύπους (τύποι I, II, III και IV), με κριτήρια τη διαμόρφωση της θέσης πρόσδεσής τους και του μοτίβου DFG.<sup>150-152</sup> Τελευταία, ωστόσο, ερευνητικά δεδομένα αναφέρουν και ακόμη δύο τύπους αναστολέων, τους τύπους I ½, V και VI αναστολείς.<sup>3,132,138,139</sup>

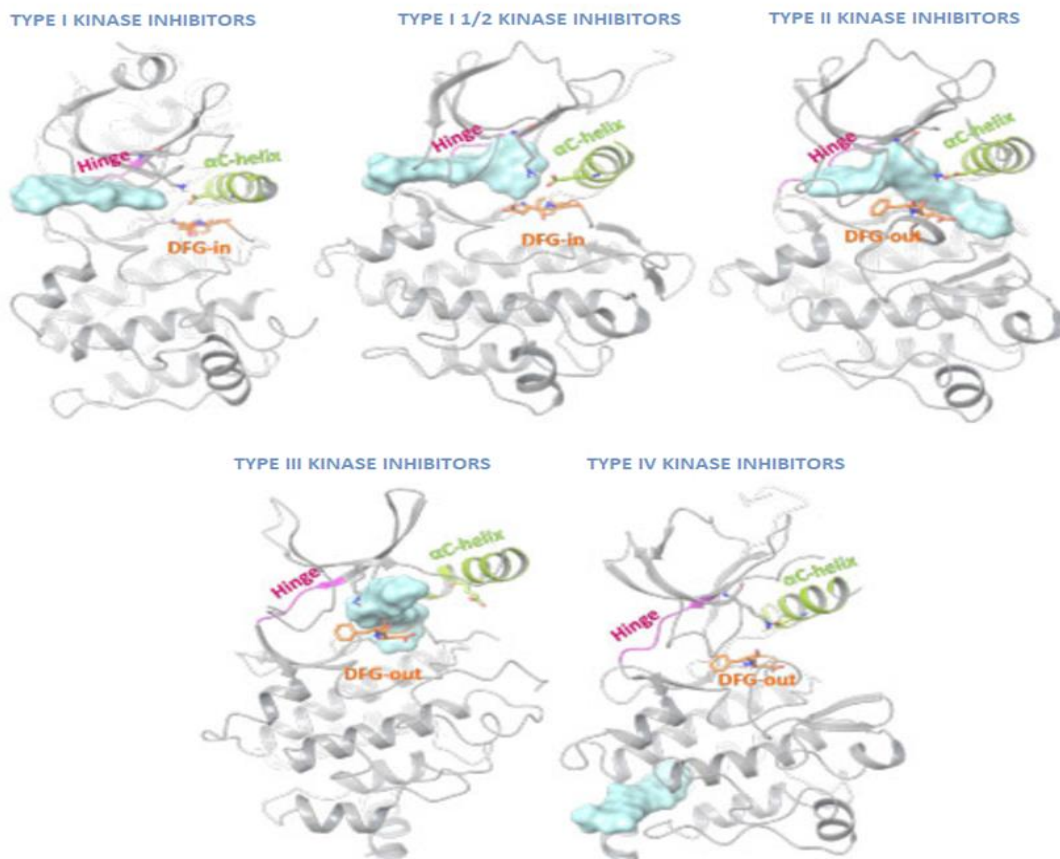


**Εικόνα 2.37:** Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων κύριων τύπων εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Διακρίνονται στους τύπου I αναστολείς, το προσανατολισμένο προς το εσωτερικό του ενεργού κέντρου κατάλοιπο ασπαρτικού (DFG-Din) και, αντίστοιχα, στους τύπου II το εν λόγω αμινοξύ έχει λάβει διαμόρφωση κατευθυνόμενο προς το εξωτερικό (DFG-Dout). Ακόμη, οι άλλοι δύο τύποι αναστολέων, οι τύπου III που προσδέονται σε



αλλοστερική θέση πλησίον του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης και, τέλος, οι τύπου IV που προσδένονται σε κάποια αλλοστερική θέση μακριά από το ενεργό κέντρο.<sup>152</sup>

Οι αναστολείς τύπου I είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς του ATP. Δεσμεύονται, δηλαδή, στο ενεργό κέντρο της κινάσης, όταν αυτή έχει λάβει μια ενεργή διαμόρφωση (με το κατάλοιπο ασπαρτικού του μοτίβου DFG να προσανατολίζεται προς την ενεργό θέση). Αντιθέτως, οι αναστολείς τύπου II, προσδένονται επίσης στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης, αλλά όταν η δεύτερη έχει υιοθετήσει μια ανενεργό διαμόρφωση, DFG-D-out, μια διαμόρφωση που το κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος του ενεργού κέντρου προεξέχει προς τα έξω από τη θέση δέσμευσης του ATP.<sup>138</sup> Εν συνεχεία, ως τύπου III αναφέρονται οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που προσδένονται σε κάποια αλλοστερική θέση πλησίον του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης. Οι δύο θέσεις, η αλλοστερική του αναστολέα και η ενεργή θέση, όπου προσδένεται το ATP, δε μοιράζονται κάποιο κοινό σημείο.<sup>3</sup> Στην τελευταία κύρια κατηγορία αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, βρίσκονται οι αναστολείς τύπου IV. Οι αναστολείς αυτού του τύπου προσδένονται σε μία αλλοστερική θέση μακριά από την ενεργή θέση της κινάσης.<sup>3,138,140</sup>



**Εικόνα 2.38:** Τύποι αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων. Συμπεριλαμβανομένου του τύπου I 1/2.<sup>141</sup>

Στους αναστολείς τύπου I ½ περιλαμβάνονται ενώσεις που συνδέονται με την περιοχή όπου συνδέεται και ο δακτύλιος της αδενίνης, όπως οι αναστολείς τύπου I, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με την περιοχή άρθρωσης. Εν συνεχεία, επεκτείνονται στην οπίσθια κοιλότητα της θέσης του ATP, προσδίδοντας ειδικές αλληλεπιδράσεις με υπολείμματα, όμοιες με αυτές που εμπλέκονται στους τύπου II αναστολείς.<sup>142</sup> Ως εκ τούτου, η κινάση κατά τη δέσμευση ενός αναστολέα τύπου I ½ έχει διαμόρφωση DFG-Din και αC-out.<sup>153</sup>

Άλλη μια δυνατότητα διάκρισης του συνόλου των αναστολέων αυτής της κατηγορίας είναι η επιμέρους διάκρισή τους σε αναστολείς τύπου I ½ A και I ½ B. Ως αναστολείς τύπου A ορίζονται όσοι δεσμεύονται στην πρόσθια σχισμή, στην οπίσθια σχισμή και κοντά στα υπολείμματα πύλης (gatekeeper residues). Όλα εμφανίζονται στην περιοχή που χωρίζει το μικρό και το μεγάλο λοβό της πρωτεϊνικής κινάσης. Οι αναστολείς τύπου B είναι αυτοί που δεσμεύονται στην

πρόσθια περιοχή σχισμής και την πύλη, αλλά δεν εκτείνονται στο οπίσθιο τμήμα. Μια ανάλυση περιορισμένων διαθέσιμων δεδομένων φανερώνει ότι οι αναστολείς τύπου A έχουν μακρό χρόνο παραμονής (λεπτά έως ώρες), ενώ οι αναστολείς τύπου B έχουν μικρό χρόνο παραμονής (δευτερόλεπτα έως λεπτά).<sup>139</sup>

Τέλος, ως τύπου V θεωρούνται οι αναστολείς που δεσμεύονται σε δύο διαφορετικές περιοχές του τομέα της πρωτεϊνικής κινάσης και, ως εκ τούτου είναι δισθενείς αναστολείς, ενώ ως τύπου VI θεωρούνται αυτοί που συνδέονται με την πρωτεϊνική κινάση, σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης μέσω μια αντίδρασης συζυγιακής προσθήκης Michael με μια δομή α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης που διαθέτουν στο μόριο τους.<sup>134,139</sup>

## 2.13 Παραδείγματα Αναστολέων Πρωτεϊνικών Κινασών

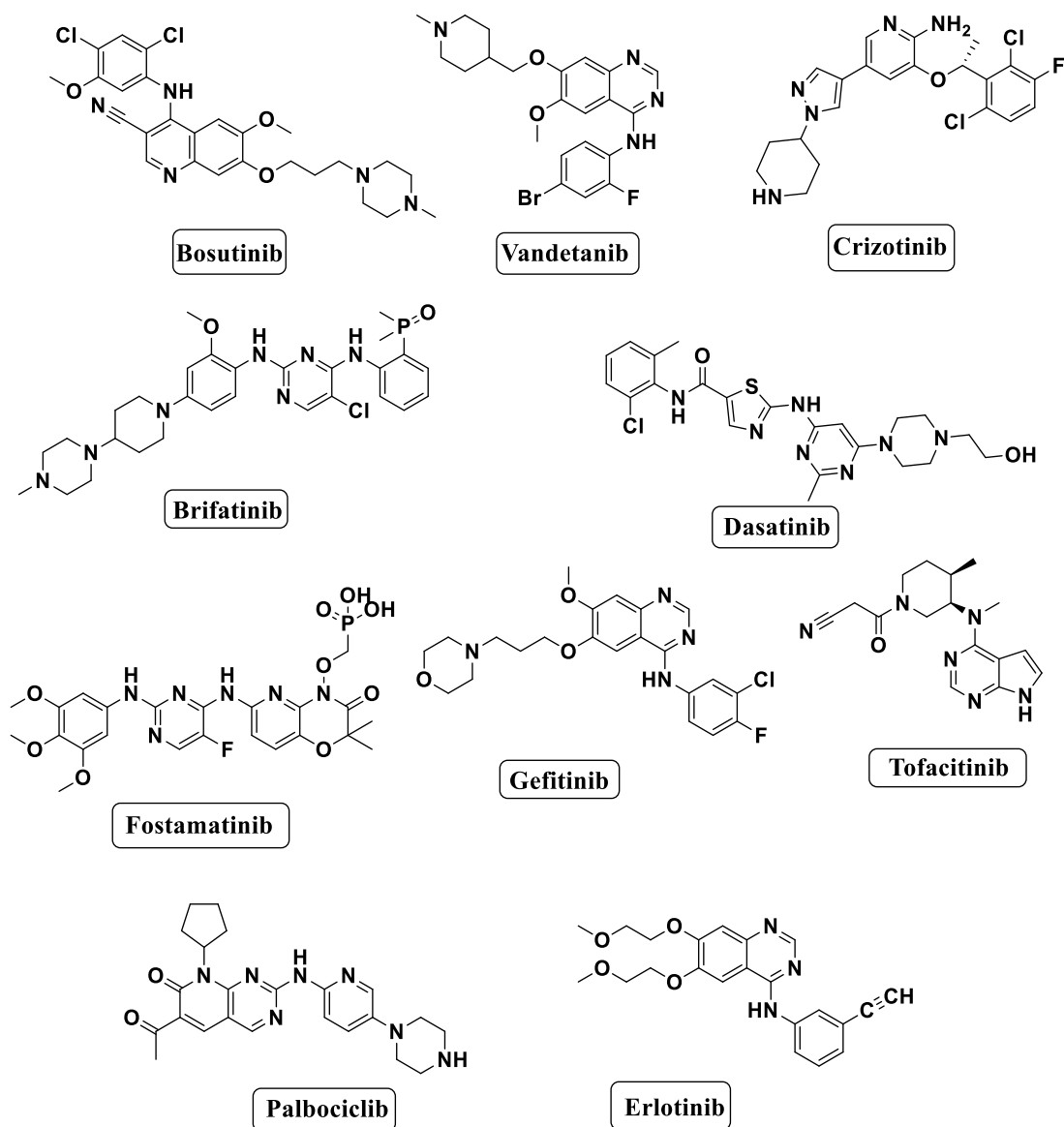
Στις υπο-ενότητες που ακολουθούν θα γίνει αναφορά κάποιων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών διαφόρων τύπων, μιμητών της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Μερικών εξ' αυτών θα γίνει εκτενέστερη αναφορά με την παράθεση και συνθετικών πορειών.

### 2.13.1 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου I

Πίνακας 2.1: Αναστολείς τύπου I<sup>153</sup>

Εγκεκριμένοι Αναστολείς	Έγκριση από FDA <sup>143</sup>	Πρωτεϊνικοί Στόχοι <sup>143</sup>	Χρήση στη θεραπεία <sup>3</sup>	Είδος Πρόσδεσης στην πρωτεϊνική κινάση (αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά) <sup>143</sup>
<b>Bosutinib</b> (παράγωγο ανιλινο-κινολίνης)	09/2019	ABL/SRC *H αλληλεπίδραση του bosutinib με την Abl δεν έχει περιγραφεί.	Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ) με θετικό το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph+). <sup>144</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Crizotinib</b> (παράγωγο άμινο πυραζολο-	08/2011	ALK/ROS1	ALK+ και ROS1+ Μη-μικροκυτταρικό Καρκίνο του	Αντιστρεπτά

πυριμιδίνης)	Πνεύμονα(NSCLC). 49,145–148			
<b>Brigatinib</b> (παράγωγο 2,4- διαμινο- πυριμιδίνης)	04/2017	ALK/EGFR	Ανθεκτικώσε Crizotinib ALK+ NSCLC. <sup>149</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Dasatinib</b> (παράγωγοαμινο- θειαζολο- πυριμιδίνης)	06/2006	ABL/SRC κ.ά.	(α) Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία και (β) Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία με Ph+. <sup>150</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Fostamatinib</b> (παράγωγο 2- ανιλινο- πυριμιδίνης)	04/2018	SYK	Χρόνια Ανοσολογική Θρομβοκυτοπενία. <sup>151</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Gefitinib</b> (παράγωγο ανιλινο- κινναζολίνης)	05/2003	EGFR	Θετικό για μεταλλάξεις EGFR, NSCLC. <sup>152,153</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Erlotinib</b> (παράγωγο κινναζολίνης)	11/2004	EGFR	Ως θεραπεία σε NSCLC, σε παγκρεατικούς καρκίνους και αρκετούα άλλους τύπους καρκίνων.	Αντιστρεπτά
<b>Palbociclib</b> (παράγωγο πυριδο-[2,3-d]- πυριμιδίνης)	02/2015	CDK4/6	Θετικό για τους Υποδοχείς Οιστρογόνων και Θετικό ErbB2/HER2 Καρκίνο του Μαστού. <sup>154–158</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Tofacitinib</b> (παράγωγο πυρολο-[2,3-d]- πυριμιδίνης)	11/2012	JAK1/3	Ρευματοειδή αρθρίτιδα, Ψωριασική αρθρίτιδα και Ελκώδη κολίτιδα. <sup>159,160</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Vandetanib</b> (παράγωγο ανιλινο- κινναζολίνης)	04/2011	VEGFR, EGFR κ.ά.	Μυελοειδούς καρκίνου του Θυρεοειδούς. <sup>161,162</sup>	Αντιστρεπτά



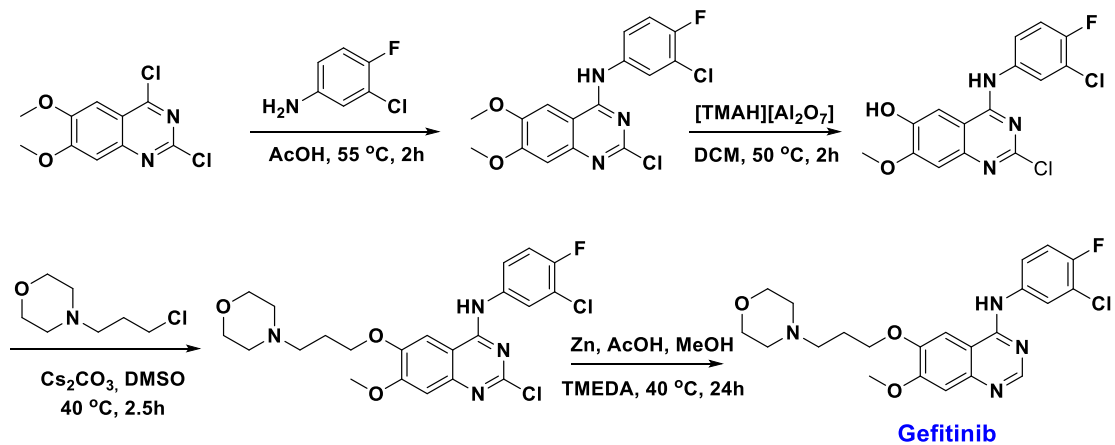
**Σχήμα 2.39:** Συντακτικοί τύποι αναστολέων τύπου I που αναφέρονται στον πίνακα 2.1.

Ο αναστολέας Gefitinib (ZD1839, εμπορική ονομασία Iressa<sup>TM</sup>)<sup>177</sup> είναι ένα φάρμακο, που χορηγείται στη θεραπεία συγκεκριμένων καρκίνων του μαστού, του πνεύμονα και άλλων. Ο Gefitinib είναι αναστολέας του EGFR και διακόπτει τις πορείες μεταγωγής σήματος δεσμευόμενος στον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, στην περιοχή τυροσινικής κινάσης που διαθέτει ο τελευταίος. Ως εκ τούτου είναι δραστικός μόνο σε περιπτώσεις καρκίνου που ανιχνεύεται μετάλλαξη ή υπερέκφραση του EGFR. Διατίθεται από τις φαρμακοβιομηχανίες Astra Zeneca και Tena.

Ο EGFR υπερεκφράζεται στα κύτταρα ορισμένων τύπων ανθρώπινων καρκινωμάτων, για παράδειγμα στους καρκίνους των πνευμόνων και του μαστού.

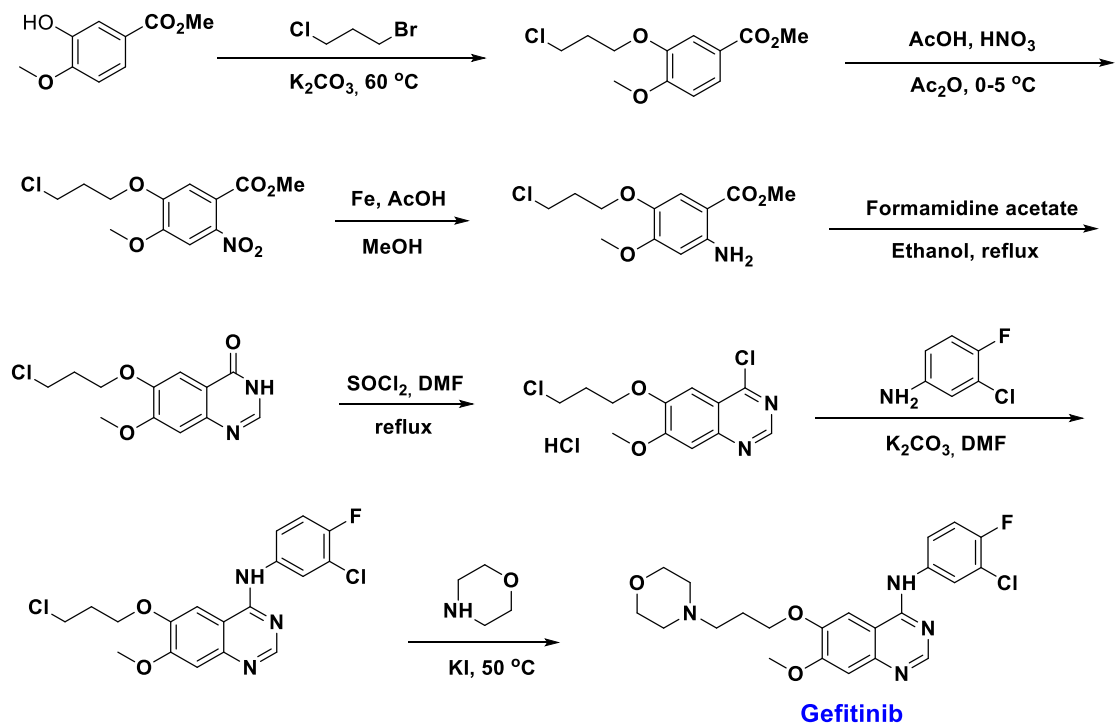


- Με αρχική ένωση την 2,4-Διχλωρο-6,7-Διμεθοξικιναζολίνη:



Σχήμα 2.41: Σύνθεση Gefitinib κατά Maskrey et al.

- Με αρχική ένωση την Ισοβανιλίνη:



Σχήμα 2.42: Σύνθεσής του Gefitinib από τους Ming Dong Li et al.

Ο αναστολέας **Erlotinib hydrochloride**, που διαδέχθηκε το Gefitinib στην ανάπτυξη αναστολέων που στοχεύουν την περιοχή τυροσινικής κινάσης του αυξητικού



επιδερμικού παράγοντα (EGFR), είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, παγκρεατικών καρκίνων, καθώς και άλλων ειδών καρκίνων. Διατίθεται με την εμπορική ονομασία Tarceva™ από τις εταιρίες Genentech και OSI Pharmaceuticals στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ενώ σε άλλα μέρη από την εταιρία Roche.

Το Erlotinib έδειξε ένα πλεονέκτημα επιβίωσης στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα στις κλινικές δοκιμές φάσης III. Η μελέτη SATURN (Sequential Tarceva σε μη ανιχνεύσιμο, μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα) διαπίστωσε ότι το Erlotinib που προστέθηκε στη χημειοθεραπεία βελτίωσε τη συνολική επιβίωση κατά 19% και αύξησε τα ποσοστά της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη του καρκίνου (PFS) κατά 29%, σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία μόνη της.

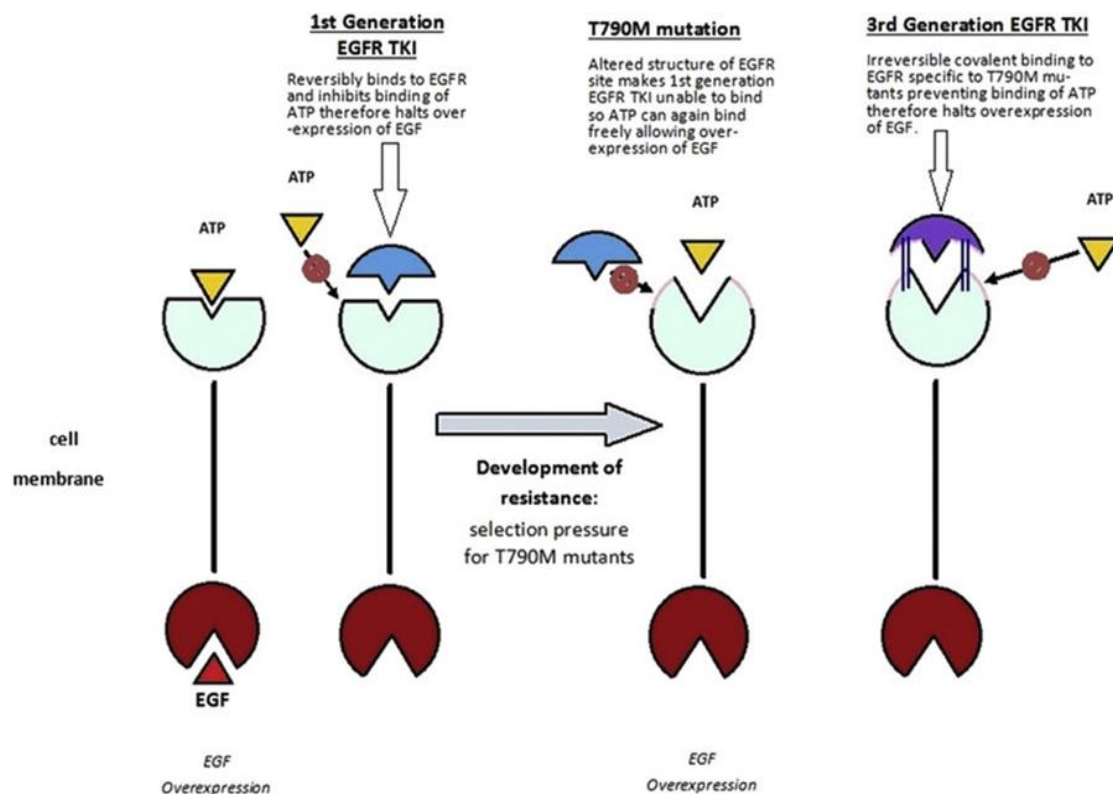
Το Erlotinib στοχεύει ειδικά στην κινάση τυροσίνης του υποδοχέα αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR), η οποία εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό και περιστασιακά μεταλλάσσεται σε διάφορες μορφές καρκίνου. Συνδέεται με αναστρέψιμο τρόπο στη θέση πρόσδεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) του υποδοχέα.<sup>180</sup> Για το σήμα που πρόκειται να μεταδοθεί, δύο μόρια EGFR πρέπει να έρθουν μαζί για να σχηματίσουν ένα ομοδιμερές. Στη συνέχεια χρησιμοποιούν το μόριο του ATP για να μετασχηματίζουν φωσφορυλιωμένα μεταξύ τους υπολείμματα τυροσίνης. Αυτά παράγουν υπολείμματα φωσφοτυροσίνης, προσλαμβάνοντας τις πρωτεΐνες δέσμευσης φωσφοτυροσίνης στον EGFR για να συναρμολογήσουν συμπλέγματα πρωτεϊνών, που μεταδίδουν πορείες σηματοδότησης στον πυρήνα, ή ενεργοποιούν άλλες κυτταρικές βιοχημικές διεργασίες. Όταν το Erlotinib συνδέεται με τον EGFR, ο σχηματισμός υπολειμμάτων φωσφοτυροσίνης στον EGFR δεν είναι δυνατός και οι καταρράκτες σήματος δεν ξεκινούν.

Παρακάτω, παρατίθενται κάποιες από τις πειραματικές πορείες που χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρασκευή του **Erlotinib**.<sup>181–183,183–194</sup>



η εταιρία ξεκινά από μία τελείως διαφορετική ένωση, την 6,7-διμεθοξυ-κιναζολιν-4(3H)-όνη, ενώ οι παράπλευρες προστίθενται προς το τέλος της συνθετικής πορείας.

Όπως συμβαίνει και με άλλους ανταγωνιστές μικρού μοριακού βάρους, αναστολέων κινάσης τυροσίνης, οι ασθενείς αναπτύσσουν ταχέως αντίσταση. Στην περίπτωση του Erlotinib, αυτό συμβαίνει συνήθως 8-12 μήνες από την έναρξη της θεραπείας. Πάνω από το 50 % της αντοχής προκαλείται από μια μετάλλαξη στον θύλακα δέσμησης ATP της περιοχής κινάσης του EGFR, που περιλαμβάνει την υποκατάσταση ενός μικρού πολικού καταλοίπου θρεονίνης με ένα μεγάλο μη πολικό κατάλοιπο μεθειονίνης (T790M).<sup>181</sup> Ενώ οι υποστηρικτές της υποθετικής μεταλλάξεως «gatekeeper» υποδεικνύουν ότι αυτή η μετάλλαξη παρεμποδίζει τη δέσμηση του Erlotinib μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης, έρευνες υποδηλώνουν ότι η μετάλλαξη T790M συμβάλλει στην αύξηση της συγγένειας δέσμησης του ATP, μειώνοντας έτσι την ανασταλτική αποτελεσματικότητα του Erlotinib.<sup>7, 19</sup>



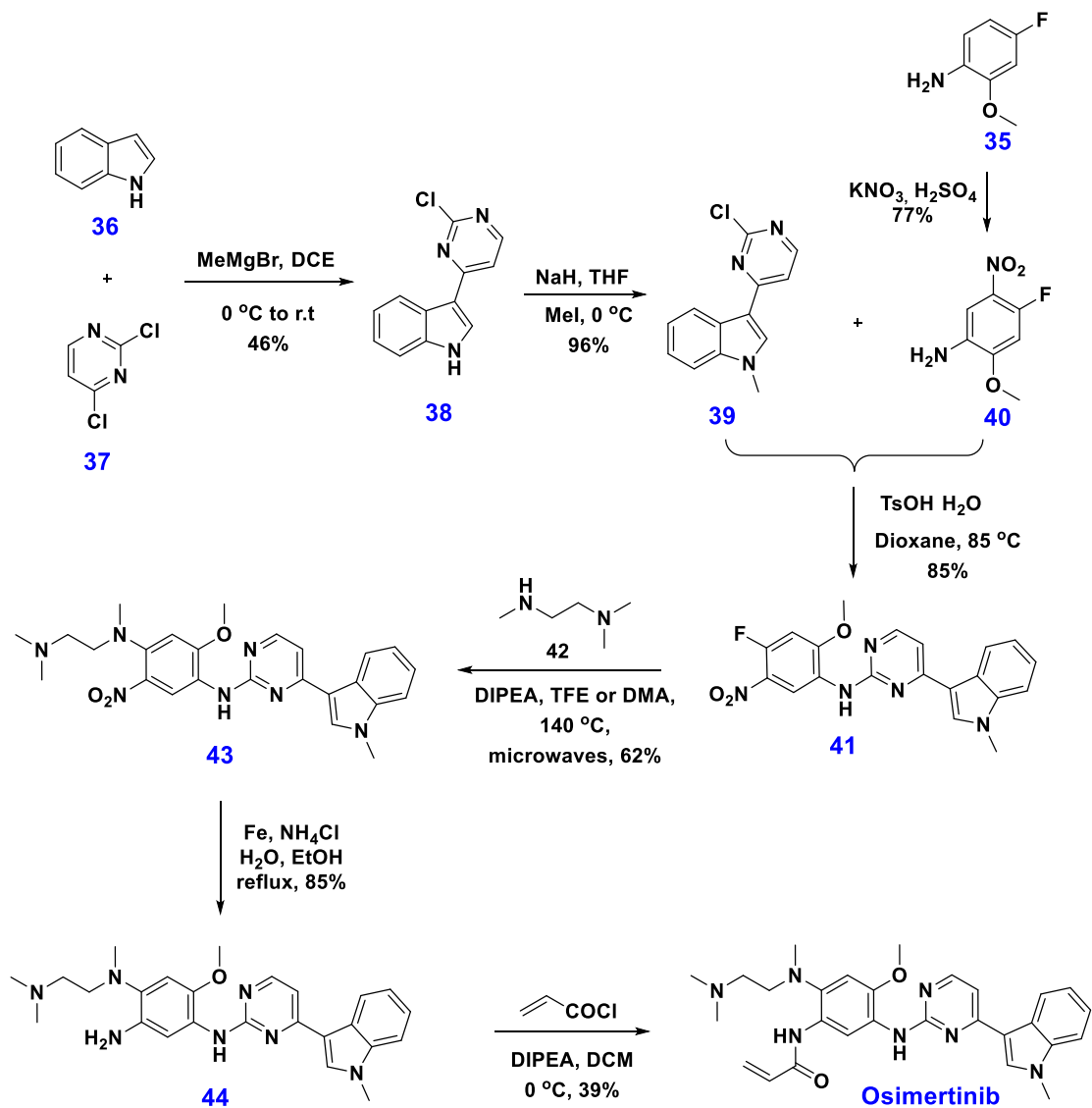
**Σχήμα 2.45:** Μηχανισμός αντίστασης στους αναστολείς 1<sup>ης</sup> γενιάς και ανάπτυξη αναστολέων 3<sup>ης</sup> γενιάς εκλεκτικών για τη μετάσταση T790M.<sup>182</sup>

Την αντίσταση αυτή, προσπάθησαν να καταπολεμήσουν με την ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων της τυροσινικής κινάσης του EGFR 3<sup>ης</sup> γενιάς. Έτσι, ένα πρόγραμμα ανακάλυψης φαρμάκων που ξεκίνησε το 2009 και έδωσε το φάρμακο μέχρι το 2012, μέσω μιας διαδικασίας καθοδηγούμενης από τη δομή, στόχευε να βρει έναν τέτοιο αναστολέα EGFR τρίτης γενιάς που θα στοχεύει εκλεκτικά τη μορφή T790M του υποδοχέα EGFR.<sup>183</sup>

Ο αναστολέας που προέκυψε ήταν ο **Osimertinib mesylate** (AZD9291, πριν γνωστός ως Mereletinib, ενώ κυκλοφορεί υπό την εμπορική ονομασία Tagrisso<sup>TM</sup>), είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, ο οποίος εμφανίζει μια συγκεκριμένη μετάλλαξη, την T790M.<sup>184,185</sup> Το φάρμακο διατίθεται από την εταιρία AstraZeneca, και το 2017 πήρε έγκριση ως θεραπεία για τον καρκίνο από τον FDA και από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή.

Πειραματικές πορείες που έχει κατοχυρώσει η εταιρία αλλά και παραλλαγές παρατίθενται παρακάτω.<sup>186–195</sup>

Η αρχική πειραματική πορεία (7 σταδίων) του Osimertinib αρχίζει με την αποπρωτονίωση του ινδολίου (**36**) με την οργανομαγνησιακή ένωση MeMgBr, ακολουθούμενη από την προσθήκη της 2,4-διχλωροπυριμιδίνης (**37**), στο ανιόν αυτής δίνοντας την ένωση **38** σε απόδοση 46%. Η ακολουθούμενη μεθυλίωση με τη χρήση NaH/MeI, δίνει το N-μεθυλο-ινδόλιο **39** σε απόδοση 96%. Η υποκατάσταση του δεύτερου ατόμου χλωρίου του δακτυλίου της πυριμιδίνης, με την ανιλίνη **40** σε διαλύτη διοξάνιο, η οποία λαμβάνει χώρα σε όξινες συνθήκες, δίνει την ένωση **41** (απομονώνεται με ανακρυστάλλωση) σε απόδοση 85%. Η ανιλίνη **40** προκύπτει από νίτρωση της ένωσης **35** με τη χρήση KNO<sub>3</sub> σε H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (77%). Η αντίδραση SNAr της διαμίνης **42** με την ένωση **41** με τη χρήση μικροκυμάτων δίνει την ένωση **43** σε απόδοση 62%. Στη συνέχεια, η ένωση **43** ανάγεται με τη χρήση Fe/NH<sub>4</sub>Cl σε νερό και δίνει την ένωση **44** σε απόδοση 85%. Τέλος, η ακυλίωση του ατόμου αζώτου της αμινο-ομάδας με το χλωρίδιο του ακρυλικού οξέος δίνει το Osimertinib σε απόδοση 39%.

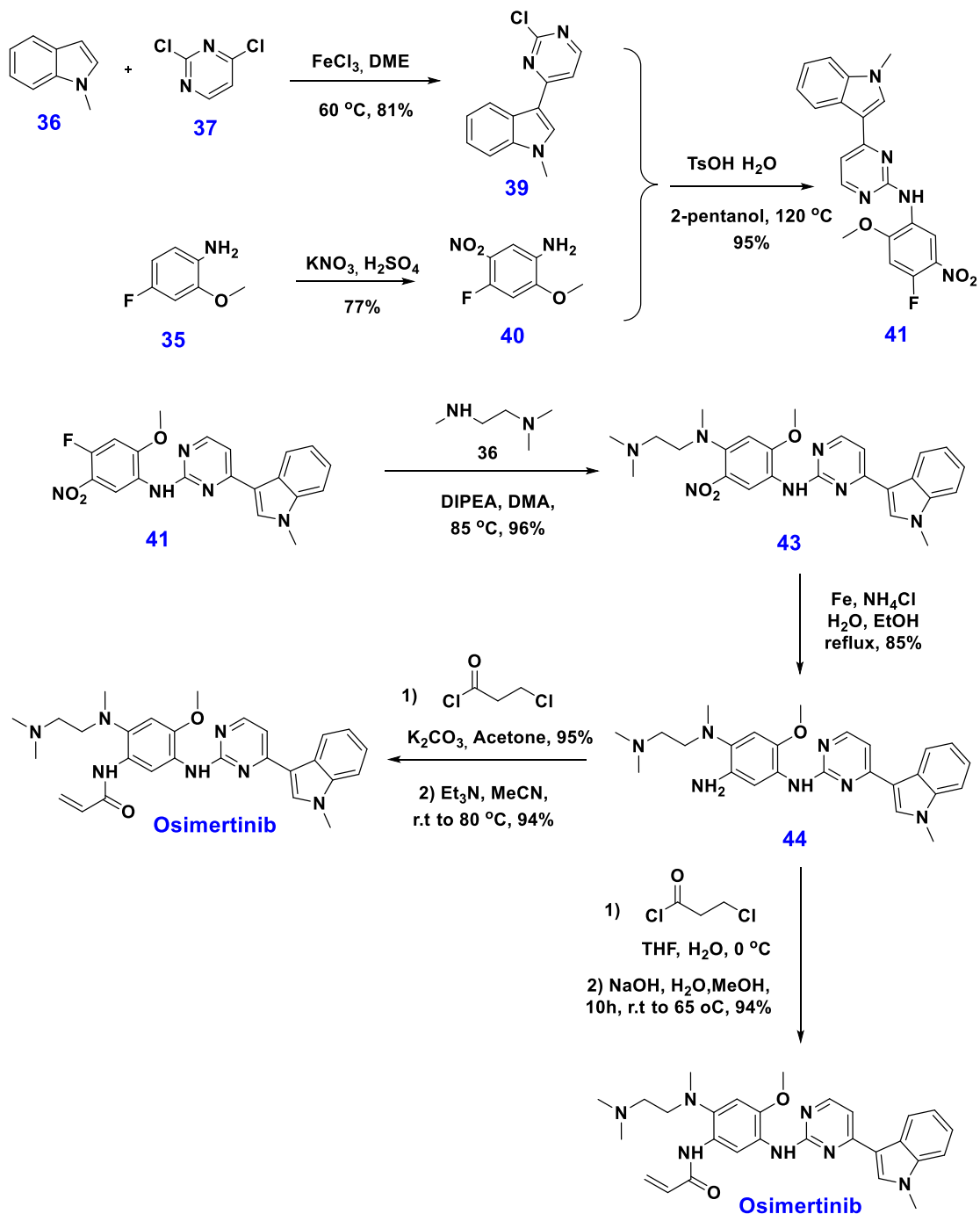


**Σχήμα 2.46:** Πρώτη κατοχυρωμένη σύνθεση του **Osimertinib** από την εταιρία Astra Zeneca (7 στάδια, ~7.7% ολική απόδοση).

Η δεύτερη κατοχυρωμένη συνθετική πορεία του Osimertinib από την Astra Zeneca (έξι στάδια) περιλαμβάνει αντιδράσεις που έχουν ήδη αναπτυχθεί στην πρώτη κατοχύρωση και στις οποίες χρησιμοποιούνται διαλύτες φιλικόι στο περιβάλλον. Επίσης, η εταιρία προσεγγίζει τη σύνθεση του φαρμάκου με μεθόδους στις οποίες η απομόνωση των ενδιάμεσων προϊόντων είναι εφικτή με ανακρυστάλλωση αντί χρωματογραφίας στήλης, ενώ ταυτόχρονα περιορίζονται οι συνθήκες υψηλής θέρμανσης και μικροκυμάτων. Πιο συγκεκριμένα, οι τροποποιήσεις της δεύτερης κατοχυρωμένης πορείας της AstraZeneca συνοψίζονται παρακάτω:

- Η ενδιάμεση ένωση **39** συντίθεται μέσω μιας αντίδρασης υποκατάστασης της 2,4-διχλωροπυριμιδίνης με N-μεθυλο-ινδόλιο, χρησιμοποιώντας  $\text{FeCl}_3$  σε DME στους  $60\text{ }^\circ\text{C}$  (81% απόδοση, ανακρυστάλλωση με μεθανόλη – νερό) ή  $\text{AlCl}_3$  σε DME στους  $80\text{ }^\circ\text{C}$  (67% απόδοση με ανακρυστάλλωση).
- Η αντίδραση μεταξύ των ενώσεων **39** και **40** λαμβάνει χώρα σε διαλύτη 2-πεντανόλη και θερμοκρασία  $105\text{ }^\circ\text{C}$ , αντί του διαλύτη 1,4-διοξάνιο και θέρμανση στους  $85\text{ }^\circ\text{C}$ . Με την τροποποίηση αυτή του διαλύτη και την υψηλότερη θερμοκρασία το προϊόν απομονώνεται από το μίγμα της αντίδρασης ως κρυσταλλικό στερεό σε απόδοση 95%.
- Η υψηλή θέρμανση με μικροκύματα για τη μετατροπή της ένωσης **41** στην ένωση **43** αποφεύγεται με τη χρήση DIPEA σε διαλύτη DMA στους  $85\text{ }^\circ\text{C}$ . Το προϊόν **43** απομονώνεται απευθείας με προσθήκη νερού στο μίγμα της αντίδρασης σε ποσοστό 96%.
- Η N-ακυλίωση ενός σταδίου της ένωσης **44** με το χλωρίδιο του ακρυλικού οξέος (39% απόδοση μετά από χρωματογραφία στήλης) αντικαταστάθηκε με δύο απλές αντιδράσεις υψηλότερης απόδοσης. Η πρώτη αντίδραση περιλαμβάνει την N-ακυλίωση με το 3-χλωρο-προπανοϋλοχλωρίδιο χρησιμοποιώντας  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ως βάση σε διαλύτη ακετόνη και σχηματίζεται η ένωση **46** σε απόδοση 95%. Η απόσπαση υδροχλωρίου από την ένωση **46** λαμβάνει χώρα στη δεύτερη αντίδραση όπου χρησιμοποιείται  $\text{Et}_3\text{N}$  σε MeCN, από r.t. -  $80^\circ\text{C}$  επί 6h. Η βασική μορφή του Osimertinib απομονώνεται με τη προσθήκη νερού στο μίγμα της αντίδρασης (απόδοση 94%). Η συνολική απόδοση αυτών των δύο σταδίων ανέρχεται στο 89.3%.

Για το τελευταίο στάδιο της αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά, όπως έχει προταθεί από την εταιρία Astra Zeneca, η αντίδραση ενός σταδίου (one-pot) της ένωσης **44** με το χλωρίδιο του ακρυλικού οξέος σε διαλύτη THF:H<sub>2</sub>O (10:1) στους  $0\text{ }^\circ\text{C}$  επί 15 min. Κατόπιν, προστίθεται NaOH και υπό θέρμανση στους  $65\text{ }^\circ\text{C}$  επί 10h, οπότε σχηματίζεται το προϊόν απόσπασης, Osimertinib, στη βασική του μορφή. Η απομόνωση του προϊόντος από το μίγμα της αντίδρασης γίνεται με προσθήκη μίγματος MeOH:H<sub>2</sub>O (1:2).



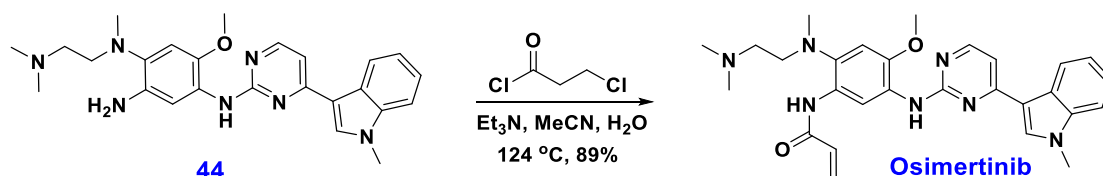
**Σχήμα 2.47:** Δεύτερη κατοχυρωμένη σύνθεση του **Osimertinib** από την εταιρία Astra Zeneca (6 στάδια, ~59% ολική απόδοση).

Μια τρίτη προσέγγιση στη συνθετική πορεία του Osimertinib δόθηκε από την εταιρία Astra Zeneca σε συνδυασμό με τα Πανεπιστήμια Lancaster και Leeds, όπου επιχειρήθηκε η μετατροπή της ένωσης **44** στο Osimertinib σε αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας σε πορεία δύο αντιδράσεων. Ως βάση τόσο για το στάδιο της

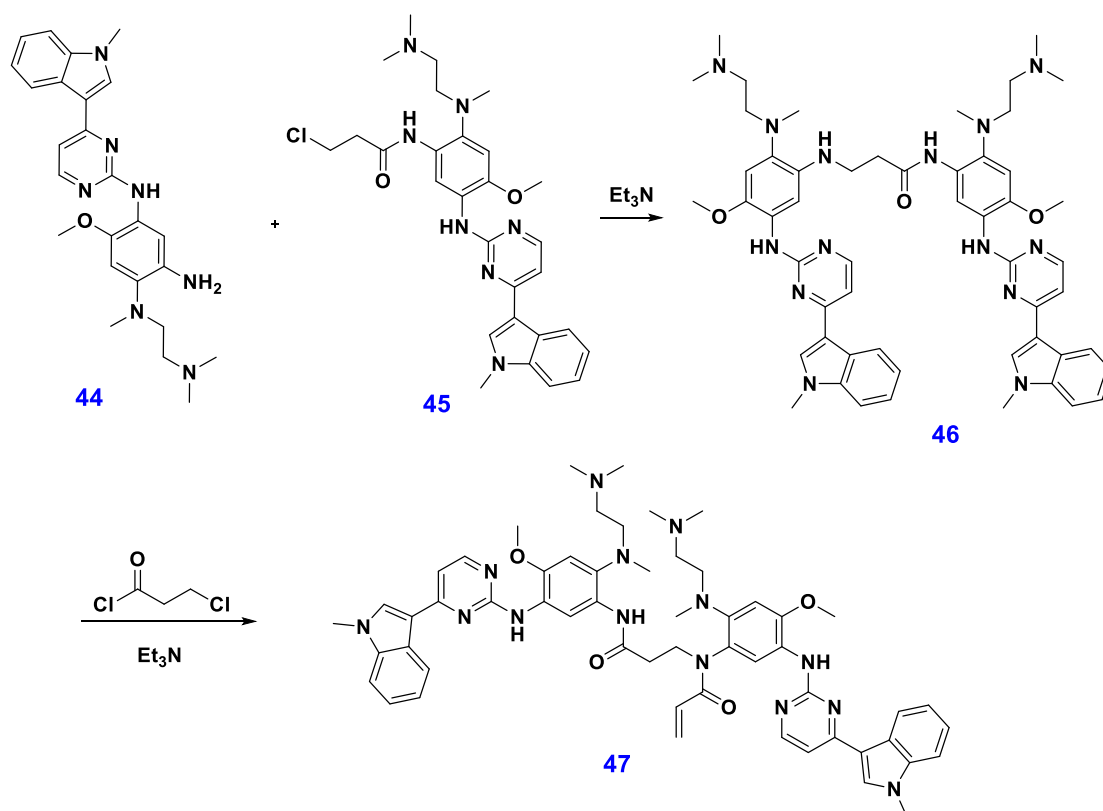


ακυλίωσης, όσο και για το στάδιο της απόσπασης χρησιμοποιήθηκε υδατική τριαμιθυλαμίνη σε MeCN.

Οι βέλτιστες συνθήκες επιτεύχθηκαν με τη χρήση 2.65 eq του 3-χλωροπροπανούλο-χλωριδίου (σε MeCN) και 10.5 eq Et<sub>3</sub>N. Η θερμοκρασία στην οποία έλαβε χώρα η αντίδραση ήταν ~124°C και η αντίδραση ολοκληρώθηκε με απόδοση 89%. Το μειονέκτημα αυτής της πορείας έγκειται στο σχηματισμό δύο κύριων παραπροϊόντων **46** και **47**, όπως φαίνεται και παρακάτω.

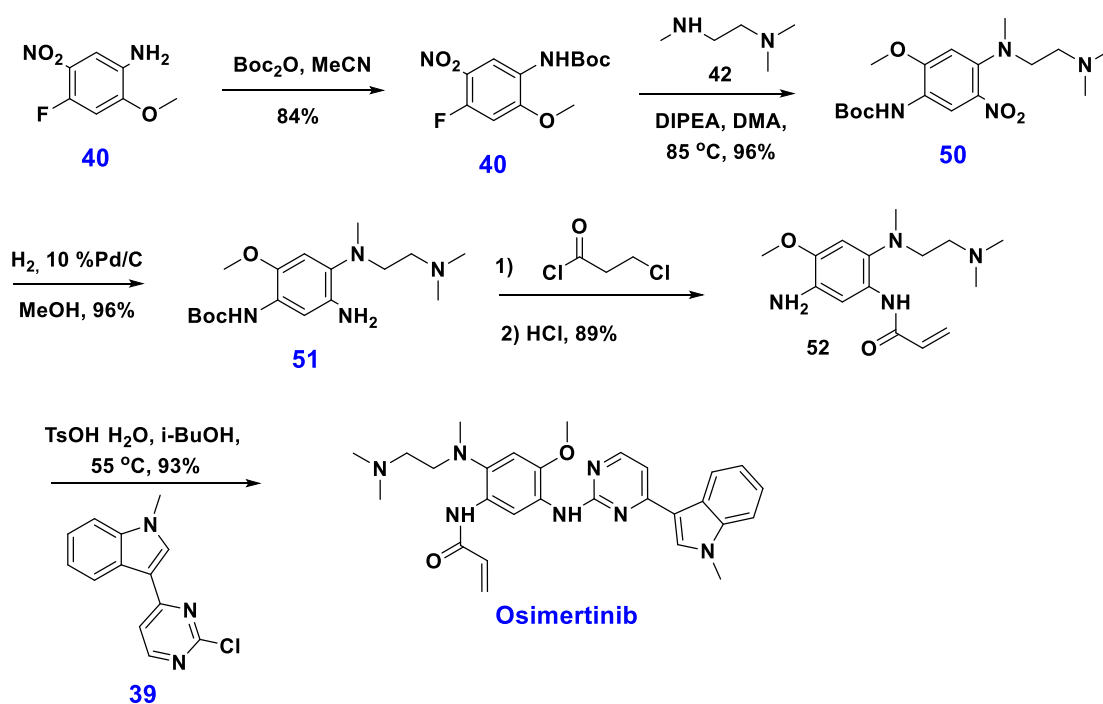


Σχήμα 2.48: Τροποποιημένη πορεία του τελικού σταδίου σύνθεσης του **Osimertinib**.



Σχήμα 2.49: Ο σχηματισμός των παραπροϊόντων **46** και **47** της τρίτης πορείας.

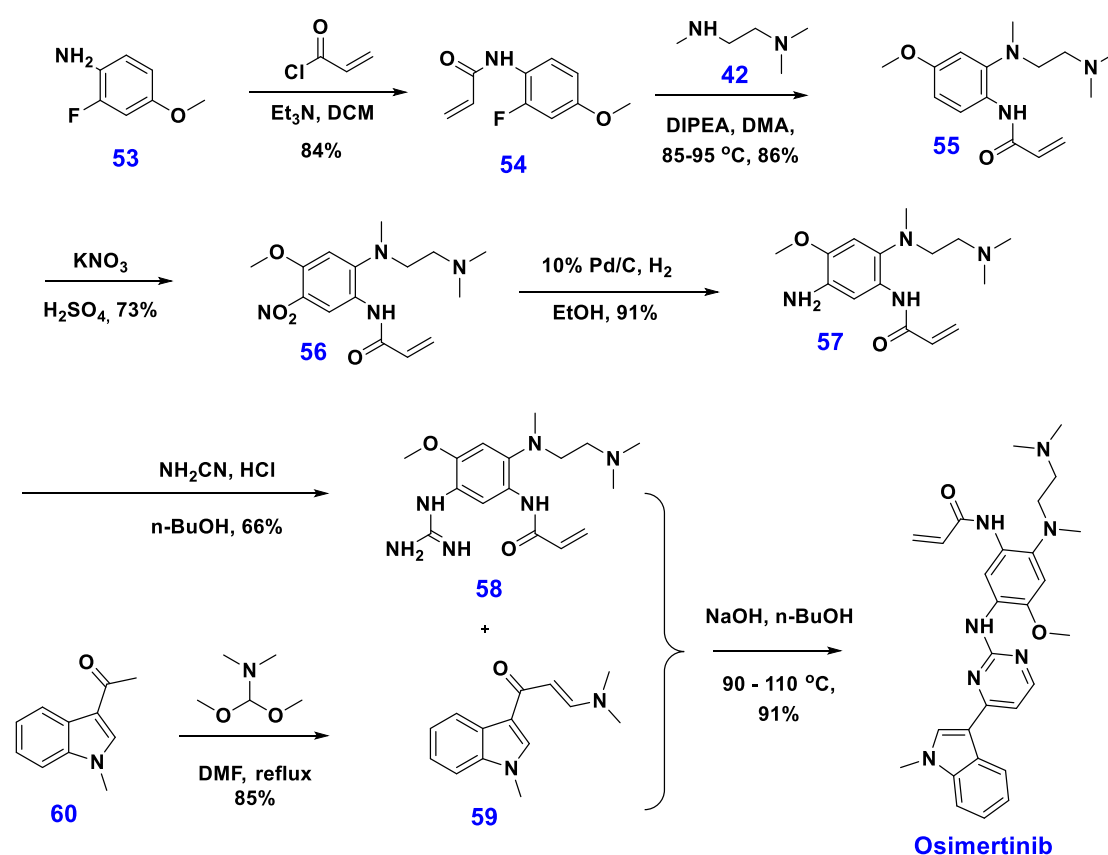
Η πρώτη εναλλακτική πορεία η οποία παρουσιάστηκε στην κατοχυρωμένη σύνθεση (CN104817541A) από Κινέζους ερευνητές αφορούσε τις ίδιες αποσυνδέσεις δεσμών στο μόριο του Osimertinib αλλά με διαφορετική σειρά των σταδίων. Η ανιλίνη **40** προστατεύεται με τη χρήση της Boc-ομάδας, ενώ η Boc-αποπροστασία λαμβάνει χώρα στο τελικό στάδιο σχηματισμού του ακρυλο-αμιδίου **52**. Η πορεία είναι συγκλίνουσα με την σύζευξη των ενώσεων **39** και **52** στο τελικό στάδιο. Η αμίνη **52** είναι περισσότερο πυρηνόφιλη από την αντίστοιχη αμινο-ένωση **40**. Η ανιλίνη **40** περιέχει στο βενζολικό δακτύλιο μια νιτρο-ομάδα (απενεργοποιητής), η οποία επιτρέπει την υποκατάσταση του ατόμου χλωρίου στη χαμηλή σχετικά θερμοκρασία των 55 °C (93 % απόδοση). Είναι σημαντικό το γεγονός ότι η ασταθής ακρυλαμιδο-ομάδα έχει ήδη θεμελιωθεί στο βενζολικό δακτύλιο, πριν το στάδιο της τελικής σύζευξης. Ως εκ τούτου αποφεύγεται ο σχηματισμός παραπροϊόντων, που είχε παρατηρηθεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες (105 °C) στην αρχική συνθετική πορεία του φαρμάκου από την Astra Zeneca.



**Σχήμα 2.50:** Πρώτη κατοχυρωμένη εναλλακτική συνθετική πορεία του Osimertinib από Κινέζους ερευνητές (6 στάδια, ~65% ολική απόδοση).

Η δεύτερη εναλλακτική πορεία η οποία παρουσιάστηκε στην κατοχυρωμένη σύνθεση από την ερευνητική ομάδα Zhu et al. καθώς και κινέζους ερευνητές

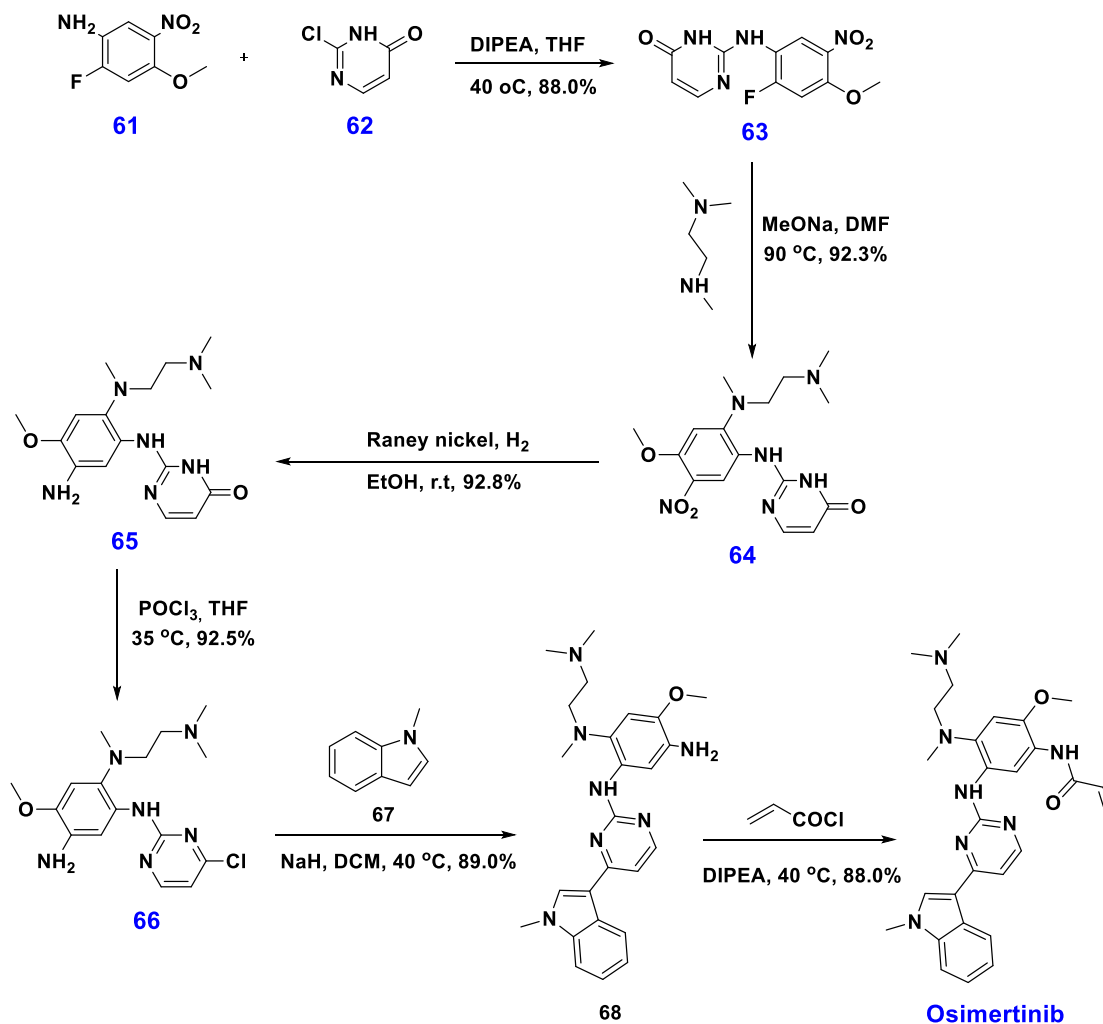
εμπλέκει το σχηματισμό του πυριμιδινικού δακτυλίου στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας. Το ακρυλαμίδιο προσαρτάται στο βενζολικό δακτύλιο στο πρώτο στάδιο της πορείας με αντίδραση μεταξύ του χλωριδίου του ακρυλικού οξέος και της 2-φθορο-4-μεθοξυ-ανιλίνης και σχηματισμό της ένωσης **54**. Η ένωση **54** υφίσταται αντίδραση S<sub>N</sub>Ar με την διαμίνη **42** σε DMA στους 85-95 °C και δίνει την ένωση **55** με 86% απόδοση. Η απόδοση αυτή είναι σχετικά μικρή, δεδομένου ότι απουσιάζουν ισχυρές ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες οι οποίες ενεργοποιούν τον βενζολικό δακτύλιο. Η νίτρωση και η ακολουθούμενη αναγωγή του αντίστοιχου υποστρώματος δίνει την ένωση **57** με 66% απόδοση για τα δύο στάδια. Η αντίδραση της ένωσης **57** με κυαναμίδιο δίνει τη γουανιδίνη **58** με 66% απόδοση. Η συμπύκνωση της εναμιμόνης **59** με την γουανιδίνη **58** οδηγεί στο σχηματισμό του Osimertinib με απόδοση 91%.



**Σχήμα 2.51:** Δεύτερη κατοχυρωμένη εναλλακτική συνθετική πορεία του **Osimertinib** από Κινέζους ερευνητές (6 στάδια, ~28% ολική απόδοση).

Η τρίτη εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Osimertinib, η οποία παρουσιάστηκε στην κατοχυρωμένη σύνθεση από Κινέζους ερευνητές, ξεκινάει με αρχικό

υπόστρωμα την 2-χλωρο-πυριμιδιν-4 (3H)-όνη **61**, η οποία υφίσταται αντίδραση SNA<sub>r</sub> με την 4-φθορο-2-μεθοξυ-5-νιτροανιλίνη **62** σε χαμηλή θερμοκρασία (40 °C) για τουλάχιστον 11h, παρουσία DIPEA σε διαλύτη THF. Μετά από ρύθμιση του pH σε ουδέτερες τιμές, απομονώνεται η ένωση **63** με 88.0 % απόδοση. Η ένωση **63** υφίσταται πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με την N,N,N'-τριμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη παρουσία MeONa στους 90 °C, οπότε λαμβάνεται η ένωση **64** σε απόδοση 92.3%. Η ένωση **64** ανάγεται στην ένωση **65**, με 92.8% απόδοση, παρουσία Raney νικελίου και υδρογόνου σε πίεση 0.5MPa σε θερμοκρασία δωματίου και σε διαλύτη EtOH. Στη συνέχεια η ένωση **65** μετατρέπεται στη χλωροπυριμιδίνη **66** με τη χρήση POCl<sub>3</sub> σε THF και θέρμανση στους 35 °C επί 12h. Η υποκατάσταση του ατόμου χλωρίου από το 1-μεθυλο-ινδόλιο **67** λαμβάνει χώρα με τη χρήση NaH σε διαλύτη DCM και θέρμανση στους 35 °C. Το προϊόν υποκατάσταση **68** ανακρυσταλλώνεται από ένα μίγμα EtOH και i-PrOH και λαμβάνεται σε απόδοση 89.0%. Στο τελευταίο στάδιο της πειραματικής πορείας η ένωση **68** υφίσταται ακυλίωση από το χλωρίδιο του ακρυλικού οξέος παρουσία DIPEA σε διαλύτη THF και θέρμανση στους 40 °C επί 12h (απόδοση 88.0%).



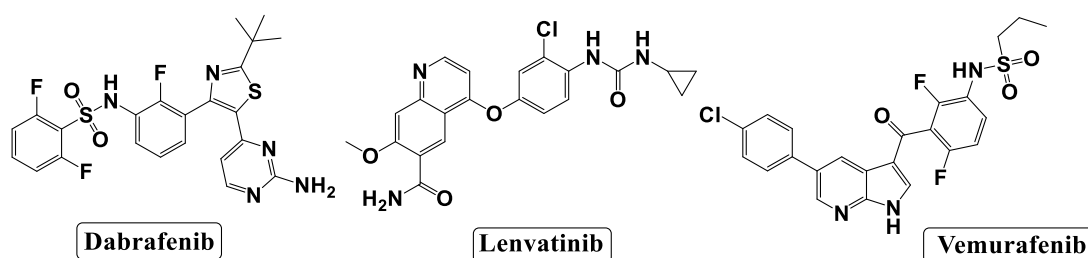
Σχήμα 2.52: Τρίτη κατοχυρωμένη εναλλακτική συνθετική πορεία του **Osimertinib** από Κινέζους ερευνητές (6 στάδια, ~54.6% ολική απόδοση).

### 2.13.2 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου I ½ A

Πίνακας 2.2: Αναστολείς τύπου I ½ A

Εγκεκριμένοι Αναστολείς	Έγκριση από FDA <sup>143</sup>	Πρωτεϊνικοί Στόχοι <sup>143</sup>	Χρήση στη θεραπεία <sup>3</sup>	Είδος Πρόσδεσης στην πρωτεϊνική κινάση (αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά) <sup>143</sup>
<b>Dabrafenib</b> (παράγωγο αμινο-πυριμιδίνης)	05/2013	BRAF	Ως μονοθεραπεία σε προχωρημένο μελάνωμα με BRAF <sup>V600E</sup> μετάλλαξη ή σε συνδυασμό με trametinib (αναστολέας	Αντιστρεπτά

			MEK1/2) για θετική μετάλλαξη BRAF <sup>V600E</sup> προχωρημένου μελανώματος ή στο NSCLC. <sup>212-214</sup>	
<b>Lenvatinib</b> (παράγωγο κινολίνης)	02/2015	VEGFR1/2/3	Διαφοροποιημένους καρκίνους θυρεοειδούς, ηπατοκυτταρικά καρκινώματα και ως θεραπεία δεύτερης γραμμής σε καρκινώματα νεφρικών κυττάρων σε συνδυασμό με everolimus. <sup>161,196-198</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Vemurafenib</b> (παράγωγο πυρρολο-[2,3-b]-πυριμιδίνης)	08/2011	BRAF	Σε προχωρημένο μελάνωμα με μετάλλαξη BRAF <sup>V600E</sup> και στη νόσο Erdheim-Chester. <sup>217,218</sup>	Αντιστρεπτά



**Σχήμα 2.53:** Συντακτικοί τύποι των αναστολέων τύπου I ½ A που αναφέρονται στον πίνακα 2.2.

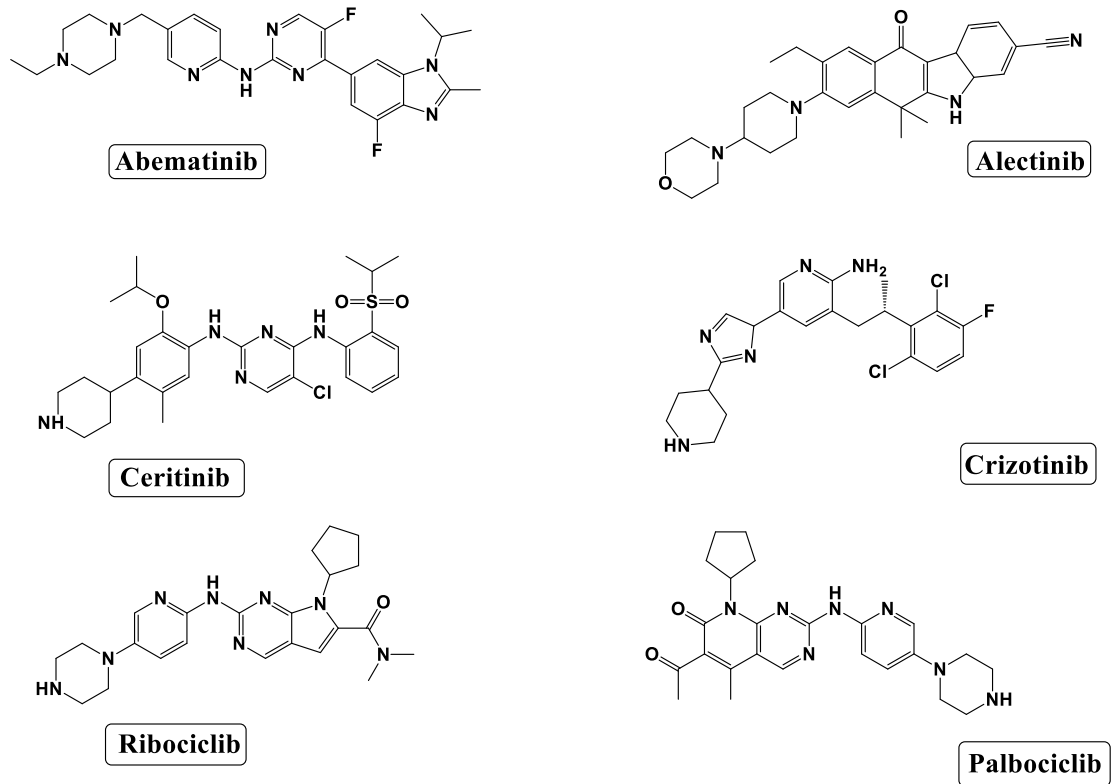
### 2.13.3 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου I ½ B

**Πίνακας 2.3:** Αναστολείς τύπου I ½ B

Εγκεκριμένοι Αναστολείς	Έγκριση από FDA <sup>143</sup>	Πρωτεϊνικοί Στόχοι <sup>143</sup>	Χρήση στη θεραπεία <sup>3</sup>	Είδος Πρόσδεσης στην πρωτεϊνική κινάση (αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά) <sup>143</sup>
<b>Abemaciclib</b> (παράγωγο αμινο-πυριμιδινο-βενζομιδαζόλης)	09/2017	CDK4/6	Σε θετικό ορμονικό υποδοχέα και αρνητικό ErbB2/HER2 προχωρημένο καρκίνο του	Αντιστρεπτά

μαστού. <sup>199-203</sup>				
<b><u>Alectinib</u></b> (παράγωγο βενζο-[b]-καρβαζόλης)	12/2015	ALK (RET)	Σε NSCLC με θετικές ALK μεταλλάξεις. <sup>161,204-207</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Ceritinib</u></b> (παράγωγο 2,4-διανιλινο-πυριμιδίνης)	04/2014	ALK	Σε NSCLC με ALK+ ως πρώτης και δεύτερης γραμμής θεραπεία. <sup>208-210</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Crizotinib</u></b> (παράγωγο πυραζολο-πυριμιδίνης)	08/2011	ALK/ROS1	Σε NSCLC με ALK+ και ROS1+. <sup>146-148,210-212</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Ribociclib</u></b> (παράγωγο 2-αμινο-[2,3-d]-πυριμιδίνης)	03/2017	CDK4/6	Σε προχωρημένο καρκίνο μαστού με θετικό ορμονικό υποδοχέα και ErbB2/HER2 αρνητικό. <sup>155,199,213-216</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Palbociclib</u></b> (παράγωγο αμινο-[2,3-d]-πυριμιδίνης)	02/2015	CDK4/6	Ως μέλος συνδυασμένης θεραπείας σε προχωρημένο καρκίνο του μαστού με θετικό οιστρογενή υποδοχέα και ErbB2/HER2 αρνητικό. <sup>155,157,158,199,217,218</sup>	Αντιστρεπτά





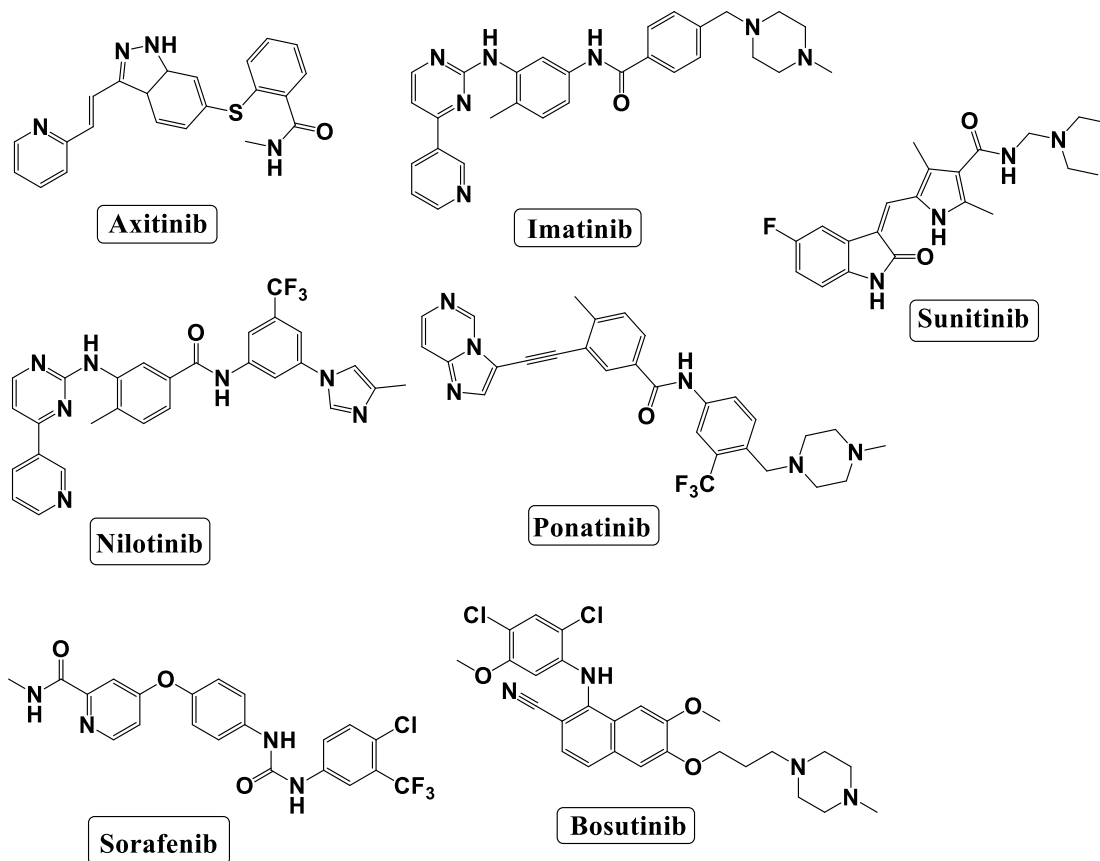
**Σχήμα 2.54:** Συντακτικοί τύποι των αναστολέων τύπου I ½ B που αναφέρονται στον πίνακα 2.3.

### 2.13.4 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου II

**Πίνακας 2.4:** Αναστολείς τύπου II

Εγκεκριμένοι Αναστολείς	Έγκριση από FDA <sup>143</sup>	Πρωτεϊνικοί Στόχοι <sup>143</sup>	Χρήση στη θεραπεία <sup>3</sup>	Είδος Πρόσδεσης στην πρωτεϊνική κινάση (αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά) <sup>14</sup> 3
<b>Axitinib</b> (παράγωγο ινδαζολίου)	01/2012	VEGFR κ.ά.	Ως 2 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε καρκινώματα νεφρικών κυττάρων. <sup>219,220</sup>	Αντιστρεπτά

<b><u>Imatinib</u></b> (παράγωγο 2-αμινο-4-πυριδο-πυριμιδίνης)	05/2001	ABL/PDGFR/c-KIT κ.ά.	Ως 1 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε Ph+ CML, σε θετικούς μεταλλάξεων στρωματικούς όγκους(GISTs), σε μυελοδυσπλαστικές / μυελοπολλαπλασιαστικές ασθένειες με αναδιατάξεις γονιδίων PDGFR, στη χρόνια ηωσινοφιλική λευχαιμία, στο σύνδρομο υπερεοσινοφιλικού και ως 2 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία στην επιθετική συστηματική μαστοκυττάρωση χωρίς μετάλλαξη KIT <sup>D816V</sup> και στην οξεία λεμφοβλαστική Λευχαιμία. 134,161,221–224	Αντιστρεπτά
<b><u>Nilotinib</u></b> (παράγωγο 2-αμινο-4-πυριδο-πυριμιδίνης)	10/2007	ABL/Kitκ.ά.	Ως 1 <sup>ης</sup> και 2 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε Ph+ CML. 164,245,246	Αντιστρεπτά
<b><u>Ponatinib</u></b> (παράγωγο ιμιδαζολ-[1,2-b]-πυριδαζίνης)	12/2012	ABL	Ως 2 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε CML και σε Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία μεPh+. <sup>225,226</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Sorafenib</u></b> (παράγωγο πυριδιν-2-καρβοξαμίδης )	12/2005	VEGFR/PDGFR κ.ά.	Σε καρκινώματα νεφρικών κυττάρων, σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα και σε διαφοροποιημένους καρκίνους θυρεοειδούς. 227–230	Αντιστρεπτά
<b><u>Bosutinib</u></b> (παράγωγο κινολίνης)	09/2012	ABL/SRC	Σε CML. <sup>144</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Sunitinib</u></b> (παράγωγο ινδολίου)	01/2006	KIT/PDGFR κ.ά.	Ως θεραπεία σε καρκινώματα νεφρικών κυττάρων, σε παγκρεατικούς νευροενδοκρινείς όγκους και σε γαστρεντερικούς στρωματικούς όγκους (GISTs). <sup>231</sup>	Αντιστρεπτά

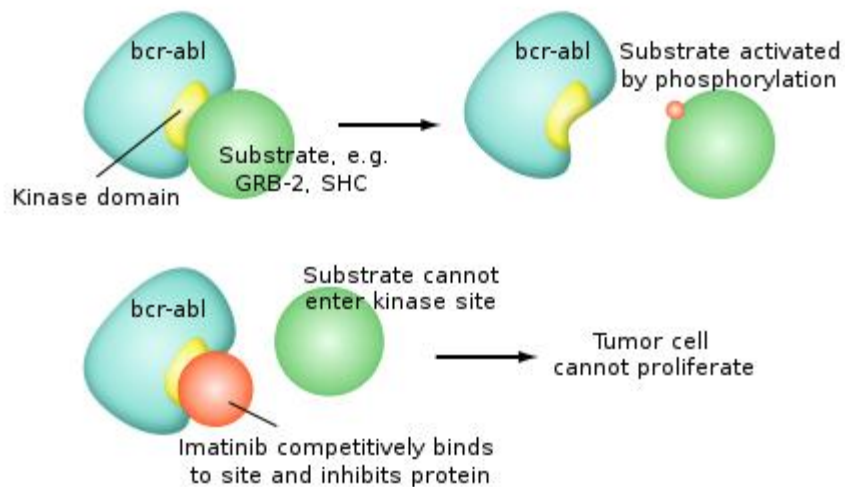


**Σχήμα 2.55:** Συντακτικοί τύποι αναστολέων τύπου II που αναφέρονται στον πίνακα 2.4.

Ο αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης BCR-Abl, Imatinib, όπως αναφέρεται στον παραπάνω πίνακα των αναστολέων τύπου II, είναι ο πρώτος αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης μικρού μοριακού βάρους που εγκρίθηκε από τον FDA. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ΧΜΛ. Το Imatinib είναι επίσης γνωστό ως STI-571 (Inhibitor Transduction Inhibitor-571), Gleevec (στις Ηνωμένες Πολιτείες) και Glivec (στην Ευρώπη). Η πρόδρομη ένωση του Imatinib εντοπίστηκε με τη χρονοβόρα διαδικασία δοκιμής ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων για την αναστολή της PKC *in vitro*.<sup>232,233</sup>

Η πρόδρομη ένωση του Imatinib ήταν μια φαινυλαμινοπυριδίνη, που αναστέλλει πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η προσθήκη μιας αμινο-ομάδας στο φαινυλικό δακτύλιο παρείχε ανασταλτική δραστηριότητα έναντι πρωτεϊνικών τυροσινικών κινάσεων όπως η BCR-Abl και ο PDGFR. Μία επακόλουθη υποκατάσταση στη θέση 6 του διαμινοφαινυλικού δακτυλίου κατέργησε την ανασταλτική δραστηριότητά του, έναντι της κινάσης PKC. Η πρόσθετη προσάρτηση

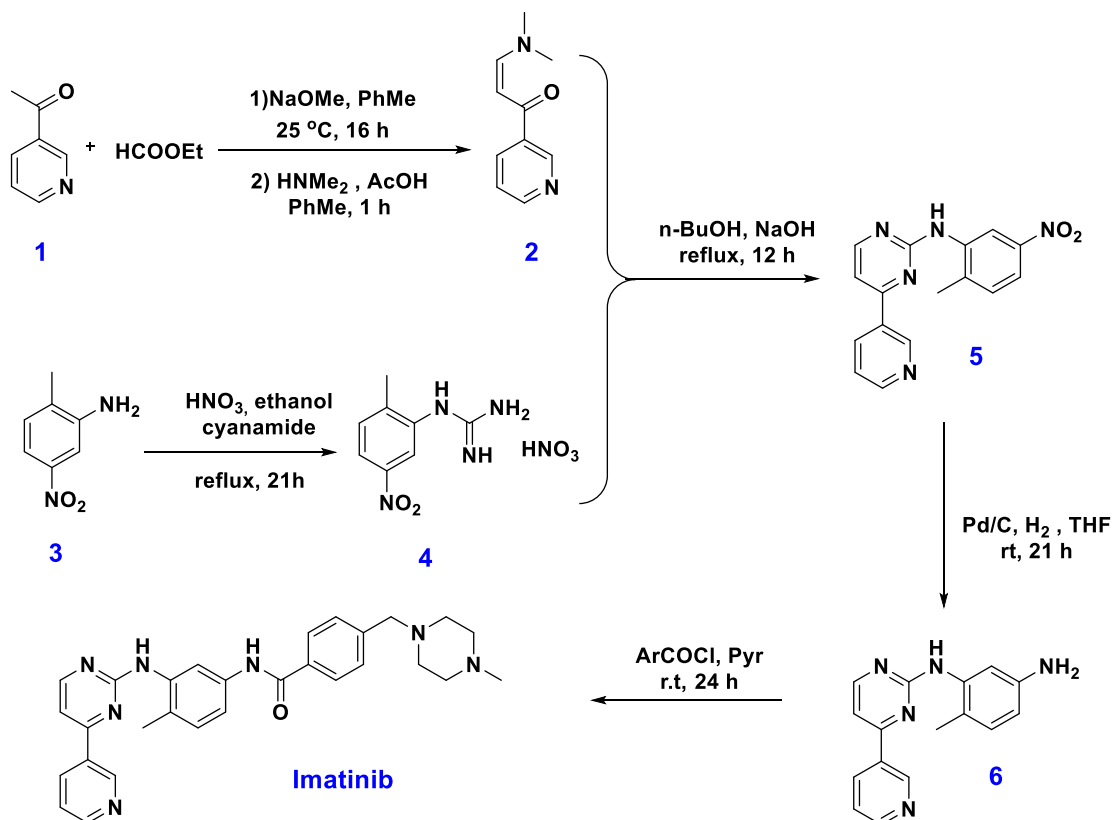
μιας πολύ πολικής πλευρικής αλυσίδας (N-μεθυλοπιπεραζίνης) αύξησε τη διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα οδηγώντας στο Imatinib, έναν αναστολέα πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών BCR-Abl, v-Abl, Kit και PDGFR<sup>233</sup>.



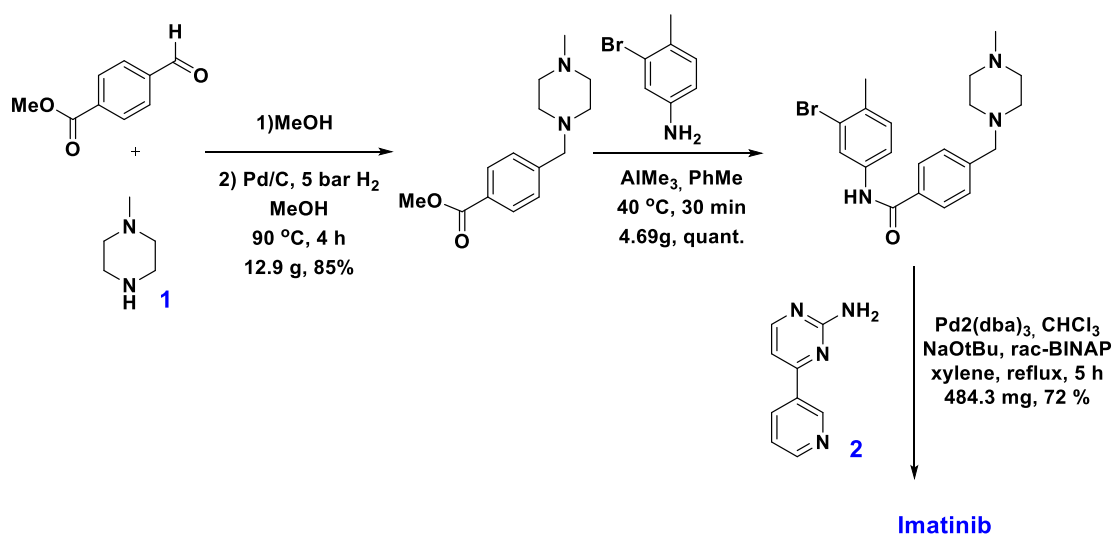
**Σχήμα 2.56:** Αναστολή από **Imatinib**.

Σημειώνεται πως οι αρχικοί στόχοι αυτής της έρευνας ήταν η κινάση PKC και ο PDGFR και όχι η κινάση BCR-Abl. Η Ιματινίβη αναστέλλει επίσης την πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης Kit (παράγοντα βλαστικών κυττάρων/ιστιοκυτταρικού παράγοντα),<sup>234</sup> η οποία αύξησε το θεραπευτικό της δυναμικό όπως αποδείχθηκε αργότερα.

Παρακάτω παρατίθενται μερικές από τις συνθετικές πορείες που έχουν προταθεί για τη σύνθεση του Imatinib. Ακόμη και η ίδια η εταιρία που το ανέπτυξε αρχικά και το διαθέτει στο εμπόριο, η Novartis, έχει συστήσει εναλλακτικές συνθετικές πορείες.



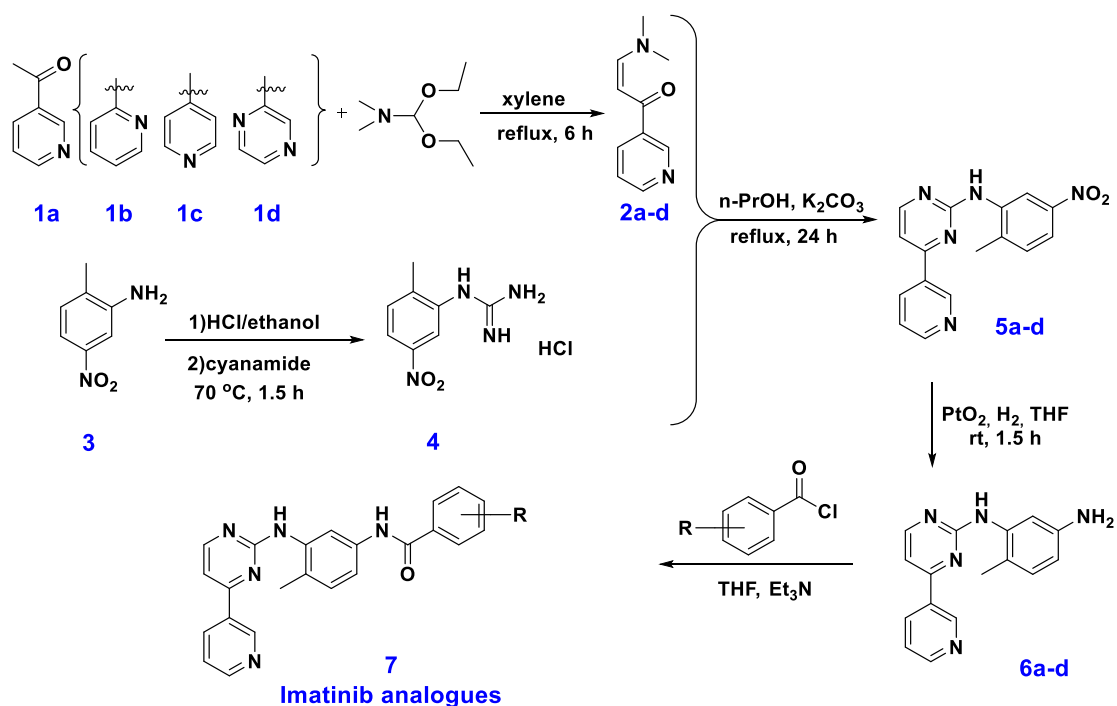
Σχήμα 2.57: Σύνθεση **Imatinib** κατά Zimmermann.



Σχήμα 2.58: : Σύνθεση του **Imatinib** από τη Novartis χρησιμοποιώντας μια σύζευξη Buchwald-Hartwig με την αμινοπυριμιδίνη **2**.

Μια τέτοια, εναλλακτική πειραματική πορεία, έχει προταθεί και από το δικό μας εργαστήριο, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα. Η μέθοδος αυτή, με μικρές

παραλλαγές, χρησιμοποιείται και στη σύνθεση των αναλόγων που σχεδιάζονται στο εργαστήριό μας.



**Σχήμα 2.59:** Σύνθεση Imatinib κατά Skobridis K., Kinigoroulou M. και Theodorou V.<sup>257</sup>

### Σύνθεση στο εργαστήριο

Οι κύριες διαφορές μεταξύ της πορείας της Novartis για το Imatinib και αυτής που πρότεινε η ερευνητική μας ομάδα, εντοπίζονται στο στάδιο σύνθεσης της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης και στο στάδιο αναγωγής.

Η εταιρία στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιεί κυαναμίδιο σε διαλύτη αιθανόλη με μία πολύ μικρή απόδοση της τάξης του 15-20%. Στη δική μας πορεία το κυαναμίδιο που χρησιμοποιείται έχει διττή λειτουργία, εφόσον λειτουργεί τόσο ως αντιδραστήριο για το σχηματισμό της φαινυλογουανιδίνης, όσο και ως διαλύτης στη θερμοκρασία της αντίδρασης (65 °C). Η μικρή αυτή αλλαγή, εκτοξεύει την απόδοση της μετατροπής αυτής στο 95%, μειώνοντας παράλληλα κατά πολύ το χρόνο αντίδρασης από τις 21 h στις 1.5 h.

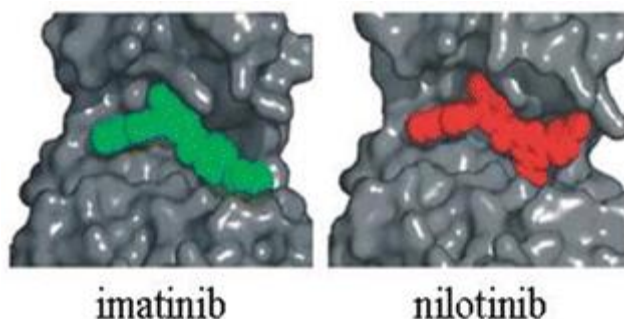
Η επόμενη αλλαγή, έχοντας τον ίδιο στόχο, τη μείωση, δηλαδή, του χρόνου αντίδρασης και την αύξηση της απόδοσης, αφορά τον τρόπο που διενεργείται η αναγωγή, που μετέπειτα θα οδηγήσει στο σχηματισμό του πρώτου αμιδικού



δεσμού. Ως εκ τούτου, η αναγωγή λαμβάνει χώρα υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου σε διαλύτη άνυδρο τετραϋδροφουράνιο και με PtO<sub>2</sub>, κατάλυτη Adam's, και όχι 10 % Pd/C που χρησιμοποιεί η εταιρία.

Η επί μακρόν χρήση της Ιματινίβης στη θεραπεία της ΧΜΛ, έχει οδηγήσει σε αντίσταση στο φάρμακο, με πιθανότητα το γεγονός αυτό να συνδέεται με τη φαρμακοκινητική του Imatinib. Ακόμη, μεταλλάξεις στο ενεργό κέντρο της τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης BCR-Abl, όπου συνδέεται το Imatinib, έχουν το ίδιο αποτέλεσμα.

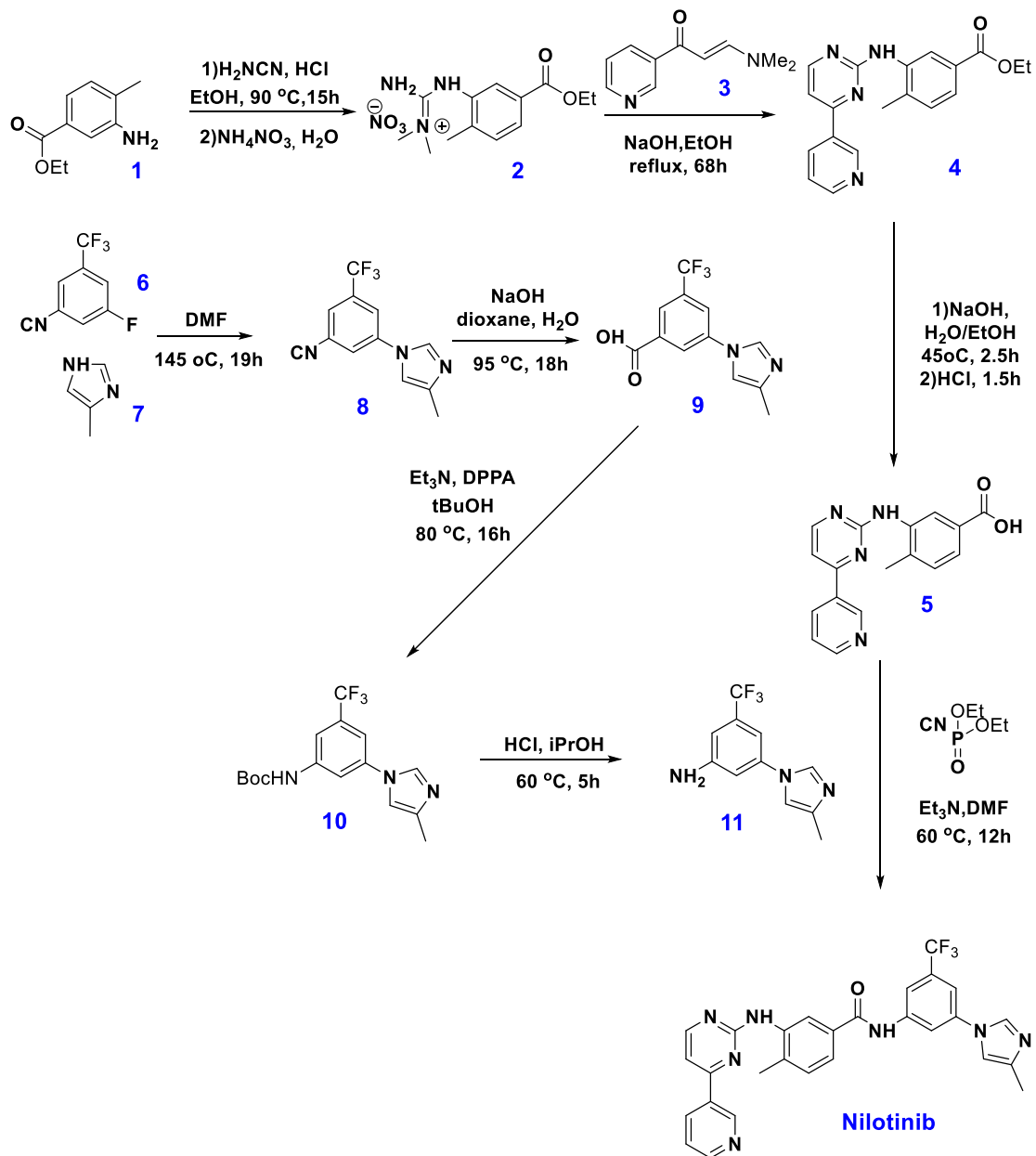
Η ανάγκη για καταπολέμηση των ως άνω προβλημάτων αντίστασης στο φάρμακο, ήταν αυτή που οδήγησε σε εκλεκτικούς αναστολείς δεύτερης γενιάς. Ένας τέτοιος αναστολέας είναι η Νιλοτινίβη (Nilotinib, AMN107, εμπορική ονομασία Tasisign<sup>TM</sup>), που στη μορφή υδροχλωρικού μονοένυδρου άλατος χρησιμοποιείται στη θεραπεία της ΧΜΛ, σε ασθενείς που έχουν παρουσιάσει αντίσταση στην Ιματινίβη. Το Nilotinib είναι δομικά όμοιο με το Imatinib, όμως η δυνατότητα πρόσδεσης του είναι 10-30 φορές υψηλότερη, καθώς από χωρική άποψη ταιριάζει περισσότερο στο ενεργό κέντρο της τυροσινικής κινάσης, παρόλο που σχηματίζει λιγότερους δεσμούς υδρογόνου από τους αντίστοιχους του Imatinib στο ενεργό κέντρο.



**Σχήμα 2.60:** Το Imatinib και το Nilotinib μέσα στο ενεργό κέντρο της κινάσης.

Χρησιμοποιείται, ακόμη, ως θεραπεία πρώτης γραμμής κατά των γαστροστρωματικών 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<sup>235</sup>.

Όσον αφορά τη σύνθεση του Nilotinib η αρχική κατοχύρωση από τη Novartis αποτελείται από επιμέρους στάδια και ποικίλες πειραματικές συνθήκες, χωρίς όμως υψηλή συνολική απόδοση<sup>248</sup>. Η αρχική γουανιδίνη λήφθηκε σε υψηλή απόδοση παρέχοντας το άλας νιτρικού οξέος (2) το οποίο, ως πολύ αδιάλυτο εύκολα απομονώνεται με διήθηση. Στη συνέχεια, με αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ της εναμινόνης (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 εμπορικώς διαθέσιμο 3-φθορο-5-τριφθοροβενζονιτρίλιο (6). Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση της ένωσης (7) προς το ενδιάμεσο βενζονιτρίλιο (8). Η υδρόλυση του νιτρίλιου που ακολουθείται από μετάθεση Curtius σε *t*-BuOH έδωσε την προστατευμένη Boc ανιλίνη (10). Η επιθυμητή ανιλίνη (11) ελήφθη μετά από όξινα καταλυόμενη αποπροστασία με HCl.



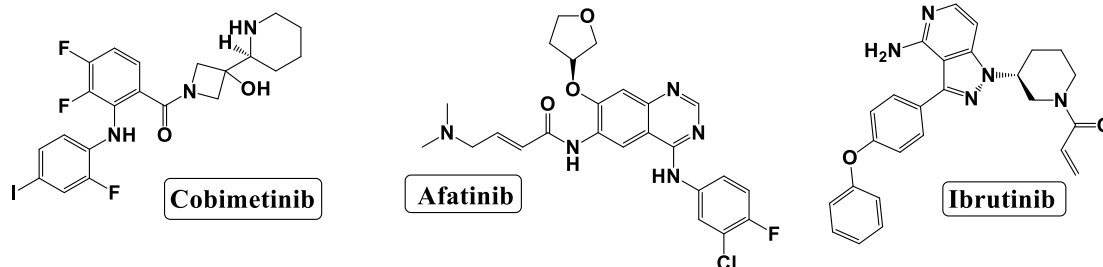
**Σχήμα 2.61:** Πρώτη κατοχυρωμένη πορεία του **Nilotinib** από την εταιρία Novartis.

Έκτοτε, έχουν προταθεί πολλές εναλλακτικές πορείες για τη σύνθεσή του. Η ίδια η εταιρία έχει προτείνει καινούριες συνθετικές προσεγγίσεις. Στην ίδια κατεύθυνση και η δική μας ερευνητική ομάδα. Βάσει της δικής μας συνθετικής προσέγγισης, σχεδιάζουμε και συνθέτουμε ανάλογα του Nilotinib, όπως θα εξηγηθεί εκτενώς στο επόμενο κεφάλαιο.

### 2.13.5 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών Τύπου III και VI

Πίνακας 2.5 : Αναστολείς τύπου III και VI

Εγκεκριμένοι Αναστολείς	Έγκριση από FDA <sup>143</sup>	Πρωτεϊνικοί Στόχοι <sup>143</sup>	Χρήση στη Θεραπεία <sup>3</sup>	Είδος Πρόσδεσης στην πρωτεϊνική κινάση (αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά) <sup>143</sup>
<b>Cobimetinib</b> (παράγωγο ανιλινο-βενζολίου)	11/2015	MEK	Ως 1 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε μελανώματα με BRAFv600E μετάλλαξη σε συνδυασμό με vemurafenib. <sup>214,260–262</sup>	Αντιστρεπτά
<b>Afatinib</b> (παράγωγο ανιλινο-κιναζολίνης)	07/2013	EGFR	Ως 1 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με NSCLC που φέρουν μεταλλάξεις του EGFR ή ως 2 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC που προοδεύει μετά από χημειοθεραπεία με βασισμένη σε πλατίνα <sup>237–240</sup>	Μη αντιστρεπτά
<b>Ibrutinib</b> (παράγωγο αμινο-πυραζολο-[3,4-d]-πυριμιδίνης)	11/2013	BTK	Ως θεραπεία λέμφωμα κυττάρων μανδύα, σε χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες, σε μακροσφαιριναιμία Waldenström και σε ασθένεια μοσχεύματος έναντι ξενιστή. <sup>241–244</sup>	Μη αντιστρεπτά



Σχήμα 2.62: Συντακτικοί τύποι αναστολέων τύπου III και VI που αναφέρονται στον πίνακα 2.5.

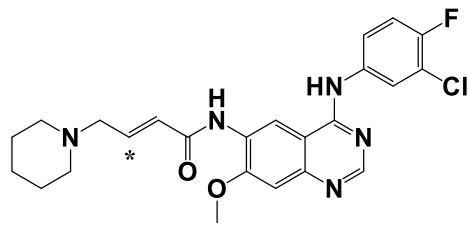
### 2.13.6 Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών με Άγνωστες Δεσμευτικές Ιδιότητες

Πίνακας 2.6: Αναστολείς με άγνωστες δεσμευτικές ιδιότητες

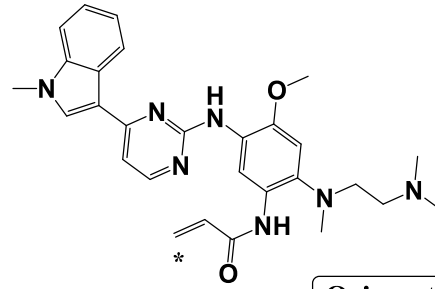
Εγκεκριμένοι Αναστολείς	Έγκριση από FDA <sup>143</sup>	Πρωτεϊνικοί Στόχοι <sup>143</sup>	Χρήση στη θεραπεία <sup>3</sup>	Είδος Πρόσδεσης στην πρωτεϊνική κινάση (αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά) <sup>143</sup>
<u>Dacomitinib</u> (παράγωγο ανιλινο-κιναζολίνης)	2018	EGFR	Ως 1 <sup>η</sup> γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC με μεταλλάξεις του EGFR, όπως exon-21 L858R ή exon-19.	Μη-αντιστρεπτά (Σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με C797 (τύπος VI)
<u>Osimertinib</u> (παράγωγο 3-πυριμιδο-ινδολίου)	2017	EGFR	Ως 1 <sup>η</sup> γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με μεταστατικό NSCLC με μεταλλάξεις του EGFR, όπως exon-21 L858R ή exon-19. Ως 2 <sup>η</sup> γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με θετική τη μετάλλαξη T790M του EGFR, μεταστατικό NSCLC που η ασθένεια τους ανέπτυξε αντίσταση σε προηγούμενη θεραπεία με αναστολείς EGFR. <sup>271</sup>	Μη-αντιστρεπτά (Σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με C797) (τύπος VI)
<u>Neratinib</u> (παράγωγο ανιλινο-κιναζόλης)	06/2017	EGFR/HER2	Ως επέκταση της επικουρικής θεραπείας γυναικών με πρώιμο στάδιο	Μη-αντιστρεπτά (μια ομάδα ακρυλαμίνης του μορίου, σχηματίζει

			HER2 / ErbB2-ενισχυμένου/ υπερεκφραζόμενου καρκίνου του μαστού. Η εκτεταμένη ανοσοενισχυτική θεραπεία ακολουθεί την ανοσοενισχυτική θεραπεία με βάση την τραστοζουμάμπη. <sup>245</sup>	ομοιοπολικό δεσμό με C805 κοντά στη θέση πρόσδεσης του ΑΤΡ του ErbB2/HER2) <b>(τύπος VI)</b>
<b><u>Razoranib</u></b> (παράγωγο 6-αμινο-ινδαζολίου)	10/2009	c-KIT/FGFR κ.ά.	Ως 1 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία προχωρημένων καρκινωμάτων νεφρικών κυττάρων και ως 2 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε σαρκώματα μαλακών μορίων. <sup>246–249</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Regorafenib</u></b> (παράγωγο πυριδιν-2-καρβοξαμίδιου που περιέχει ένα τμήμα διαρυσουρίας)	09/2012	VEGFR κ.ά.	Ως 3 <sup>ης</sup> ή 4 <sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία σε προχωρημένους καρκίνους του παχέος εντέρου. <sup>250–252</sup>	Αντιστρεπτά
<b><u>Trametinib</u></b> (παράγωγο πυριδο-[4,3-d]-πυριμιδίνης)	05/2013	MEK1	Ως θεραπεία σε συνδυασμό με dabrafenib του NSCLC και παγκρεατικών καρκίνων με BRAF <sup>V600E</sup> <sub>253</sub> μεταλλάξεις.	Αντιστρεπτά <b>(τύπος III)</b>
<b><u>Binimetinib*</u></b> (παράγωγο 6-ανιλινο-βενζιμιδαζολίου)	06/2018	MEK	Ως θεραπεία μελανώματος με BRAF <sup>V600E</sup> μεταλλάξεις σε συνδυασμό με encorafenib. <sup>281</sup>	Αντιστρεπτά <b>(τύπος III)</b>
<b><u>Encorafenib*</u></b> (παράγωγο πυραζολο-πυριμιδιν-αμίνης)	06/2018	BRAF <sup>V600K/E</sup>	Ως θεραπεία μελανώματος με BRAF <sup>V600E</sup> μεταλλάξεις σε συνδυασμό με binimetinib. <sup>281</sup>	Αντιστρεπτά <b>(τύπος I)</b>

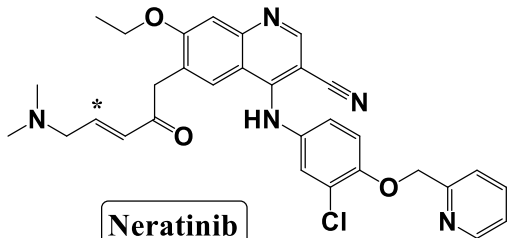
(\* Τα δύο φάρμακα εγκρίθηκαν συνδυαστικά)



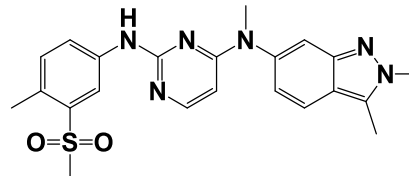
**Dacomitinib**



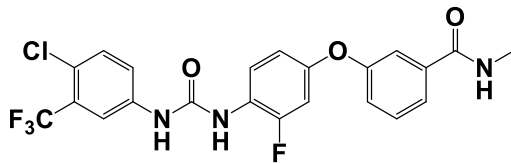
**Osimertinib**



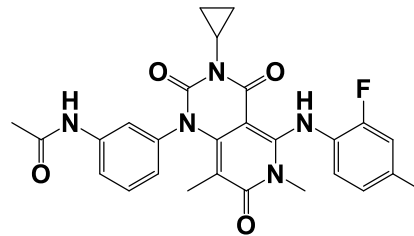
**Neratinib**



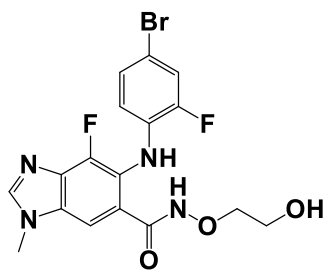
**Pazopanib**



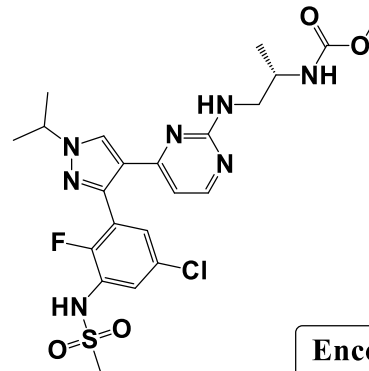
**Regorafenib**



**Trametinib**



**Binimetinib**



**Encorafenib**

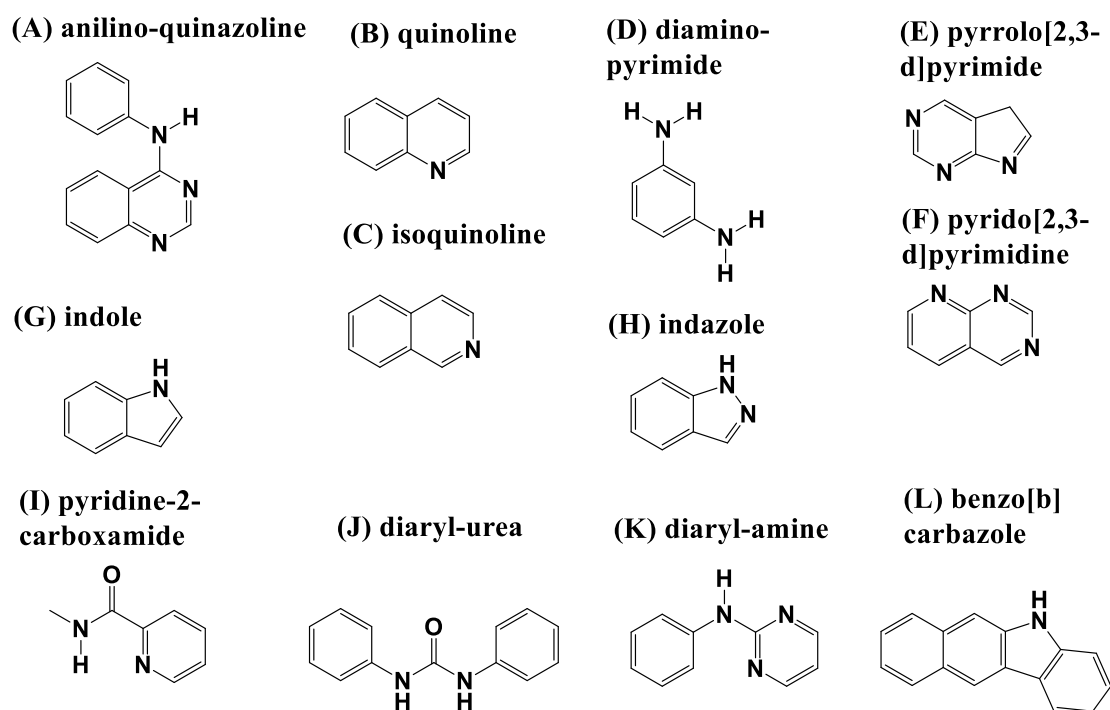
**Σχήμα 2.63:** Αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων με άγνωστες δεσμευτικές ιδιότητες, όπως αυτοί αναφέρονται στον πίνακα 2.6. Με αστερίσκο σημειώνονται οι θέσεις όπου λαμβάνει χώρα η συζυγής προσθήκη Michael, χαρακτηριστική των αναστολέων αυτού του τύπου.



## 2.14 Δομικά Χαρακτηριστικά Αναστολέων Πρωτεϊνικών Κινασών

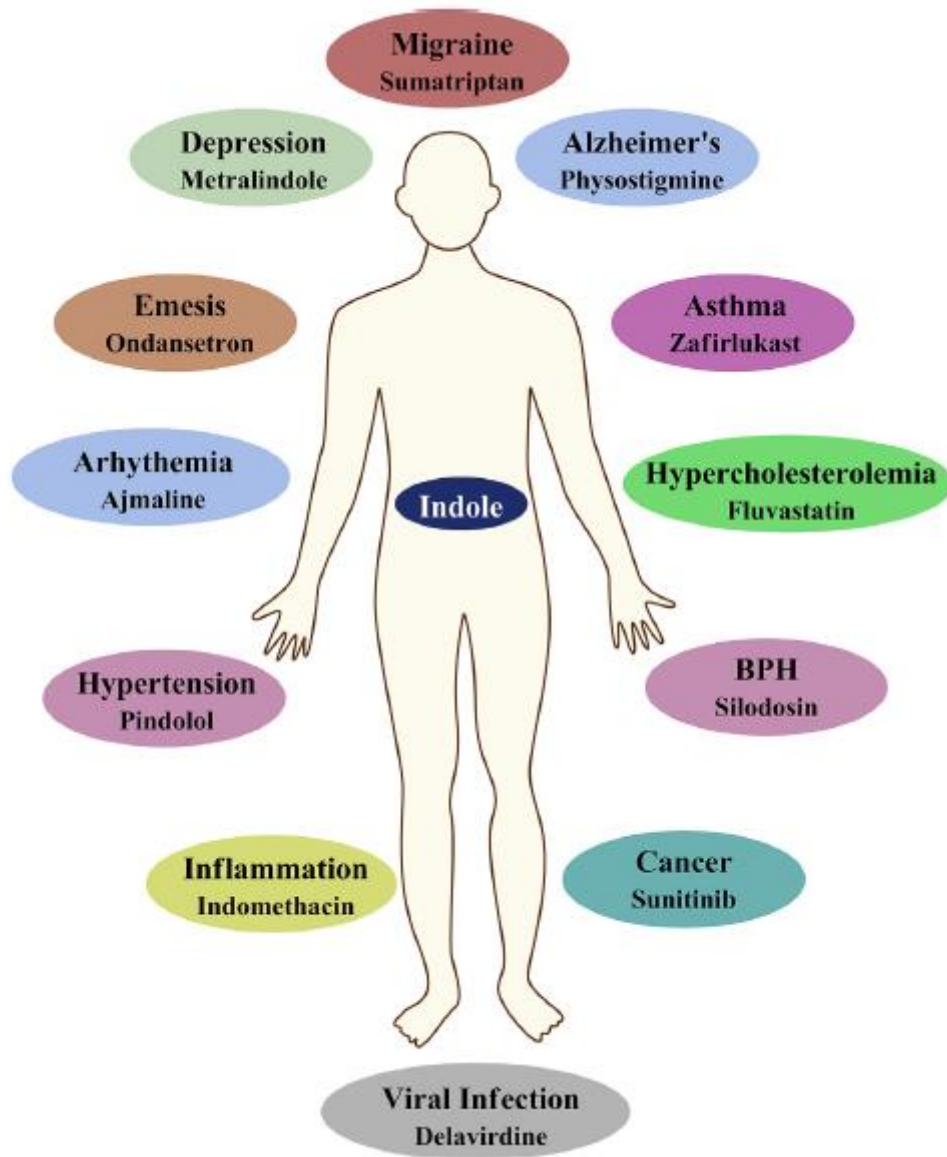
Στην προηγούμενη ενότητα έγινε αναφορά ενός μεγάλου αριθμού εκ του συνόλου των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών. Όλοι τους, ανεξαιρέτως τύπου ή τρόπου αναστολής, αποτελούσαν μιμητές του ATP, ενώ στην συντριπτική τους πλειοψηφία, αναπτύσσουν μία δομή που αποτελείται από δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και έναν αριθμό ατόμων αζώτου.<sup>254</sup>

Στο παρακάτω σχήμα παραθέτονται κάποιες από τις πρόδρομες ενώσεις, παράγωγα των οποίων αποτελούν ορισμένοι από τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, όπως αυτές αναφέρονται στις προηγούμενες υπο-ενότητες.



**Σχήμα 2.64:** Πρόδρομες ενώσεις κατά την ανάπτυξη της δομής των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Ειδικότερα, η σύνθεση του ινδολικού δακτυλίου έχει απασχολήσει εδώ και εκατοντάδες χρόνια τους Οργανικούς Χημικούς. Δακτύλιοι βιολογικά ενεργών ινδολίων απαντώνται σε πλήθος φυσικών προϊόντων (αλκαλοειδή, ορμόνες, κ.α.) καθώς και συνθετικών φαρμακευτικών ενώσεων, όπως φαίνεται και στη παρακάτω εικόνα.



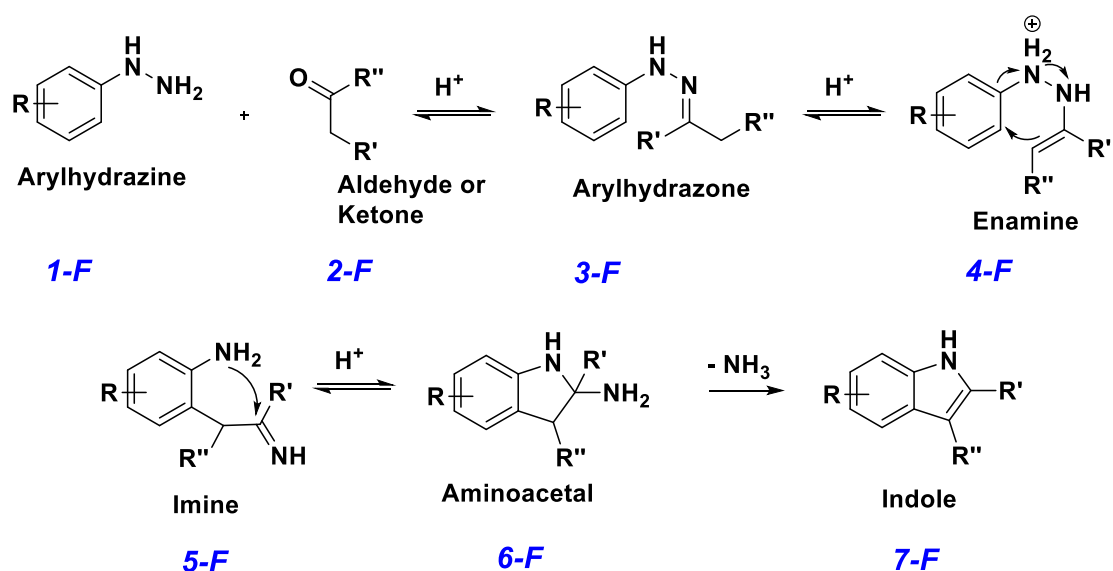
Εικόνα 2.65: Πολυφαρμακολογικές ιδιότητες του ινδολίου.

### Σύνθεση Ινδολίων

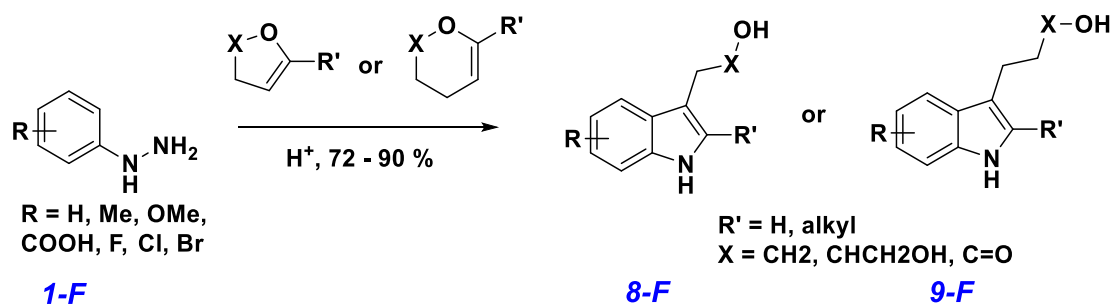
Ο Οργανικός Χημικός ενδιαφέρεται πρωτίστως για ήπιες μεθόδους που παρέχουν ταχεία σύνθεση της ένωσης του, εν προκειμένω, με μειωμένο κόστος, διατηρώντας, επίσης, τη χημική σταθερότητα σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών ομάδων. Οι πλέον γνωστές πορείες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία αφορούν τη σύνθεση του ινδολίου σύμφωνα με τις μεθόδους των **Bartoli, Bischler, Fischer, Hemetsberger, Leimgruber, Julia, Larock, Reissert, Fukuyama** και **Castro**.

Για πάνω από 100 χρόνια η αντίδραση **Fischer** χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ποικίλων βιολογικά δραστικών ινδολίων. Η αντίδραση **Fischer** αποτελεί μία απλή και αποδοτική μέθοδο για τη μετατροπή των N-αρυλο-υδραζονών σε ινδόλια. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα με απλή θέρμανση της αλδεΐδης ή της κετόνης με την

αρυλο-υδραζίνη παρουσία οξέος, χωρίς την απομόνωση της ενδιάμεσης υδραζόνης (Σχήμα 2.69). Η σύνθεση της ενδιάμεσης αρυλο-υδραζόνης, συχνά, λαμβάνει χώρα με συμπύκνωση της αρυλο-υδραζίνης και της κατάλληλης καρβονυλο-ένωσης, η οποία εμφανίζεται και στην ενολική της μορφή. Η ερευνητική ομάδα του Campos έχει προτείνει τη σύνθεση ινδολίων με παραλλαγή της συνθετικής πορείας **Fischer**, χρησιμοποιώντας κυκλικούς ενολο-αιθέρες ή ενολο-κετόνες και αρυλο-υδραζίνες σε όξινες συνθήκες.



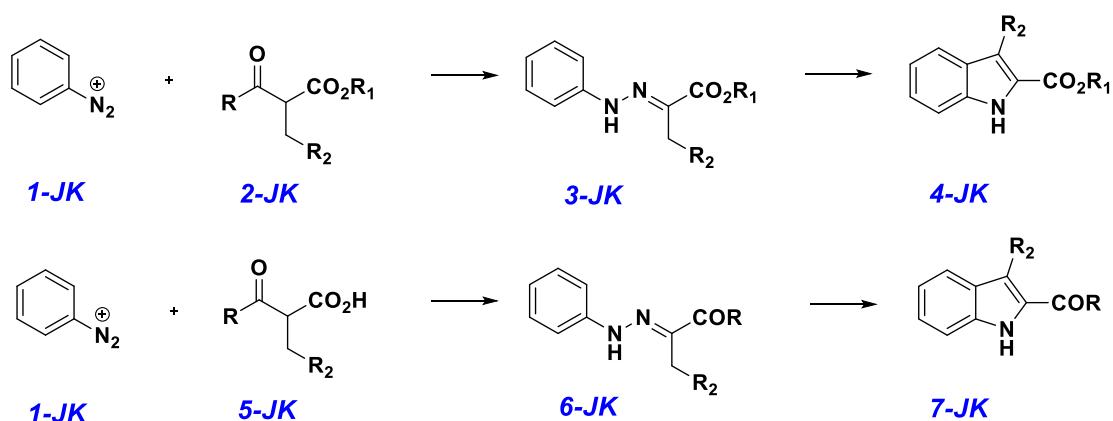
Σχήμα 2.66: Σύνθεση ινδολίων με τη μέθοδο **Fischer**.



Σχήμα 2.67: Παραλλαγή της σύνθεσης ινδολίων **Fischer (Camposetal.)**.

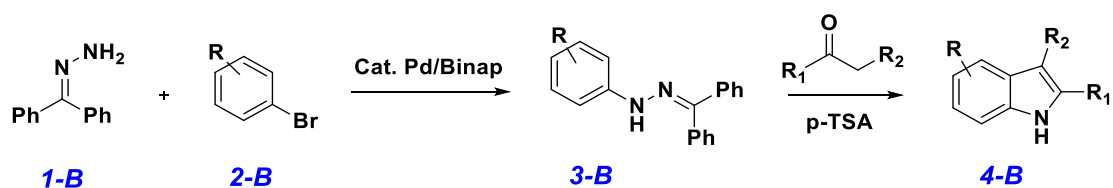
Μια δεύτερη μέθοδος-πορεία σύνθεσης των ενδιάμεσων αρυλο-υδραζονών αφορά την αντίδραση **Japp – Klingemann**. Στην αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα απευθείας συμπύκνωση του αρυλοδιαζωνιακού άλατος με τον κατάλληλο β-κετοεστέρα ή το κατάλληλο β-κετο-καρβοξυλικό οξύ σε βασικές συνθήκες. Η αποακετυλίωση ή αποκαρβοξυλίωση, αντίστοιχα, των ενδιάμεσων ενώσεων οδηγούν στον

σχηματισμό καρβοξυλικών εστέρων του ινδολίου στη θέση-2 ή στον σχηματισμό 2-ακυλοϊνδολίων, αντίστοιχα.

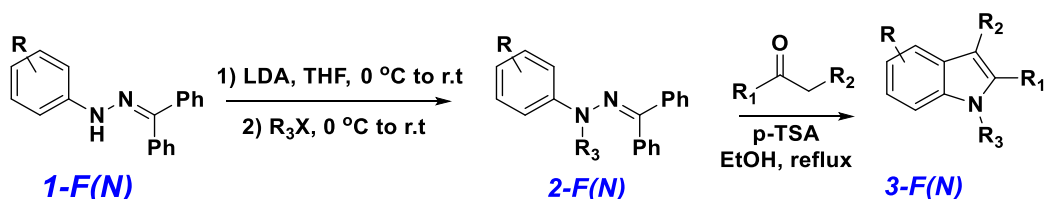


Σχήμα 2.68: Αντίδραση *Japp-Klingemann* σύνθεσης των ενδιάμεσων υδραζονών.

Λόγω της μικρής διαθεσιμότητας των αρυλο-υδραζινών στο εμπόριο, η ερευνητική ομάδα του **Buchwald** πρότεινε, για τη σύνθεση των αρυλο-υδραζονών της βενζοφαινόνης, την αντίδραση σύζευξης μεταξύ του κατάλληλου αρυλοβρωμιδίου και της υδραζόνης της βενζοφαινόνης, ως ένα φθινό εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο με τη χρήση καταλύτη παλλαδίου (II) και ενός συμπλεκτικού αντιδραστήριου φωσφίνης, όπως το *rac*-BINAP ή XantPhos. Ταυτόχρονα βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τη κυκλοποίηση *Fischer*, με τη χρήση καταλυτικής ποσότητας *p*-TSA και μικρής περίσσειας της κατάλληλης κετόνης (1.5 ισοδύναμα). Με την ίδια μέθοδο συντέθηκαν, επίσης, *N*-υποκατεστημένα βενζόλια.

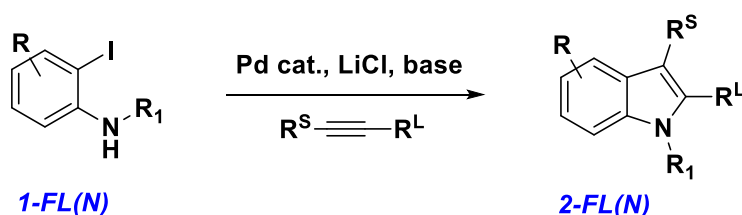


Σχήμα 2.69: Σύνθεση της αρυλο-υδραζόνης της βενζοφαινόνης.



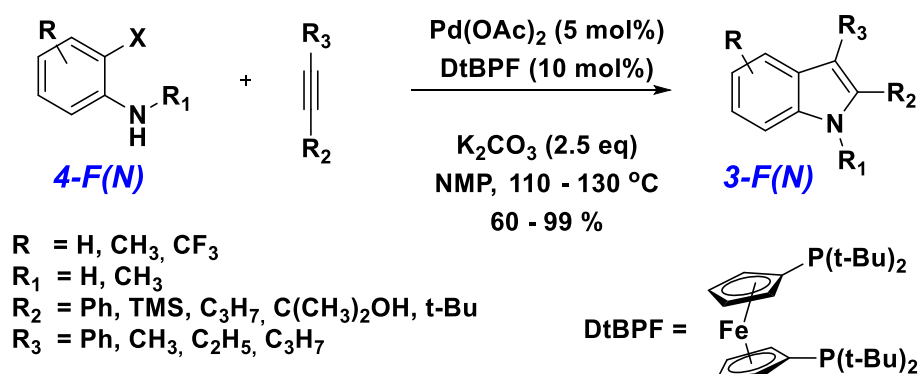
**Σχήμα 2.70:** Σύνθεση N-υποκατεστημένων ινδολίων με παραλλαγή της μεθόδου *Fischer*.

Η αντίδραση *Larock* χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ινδολικού δακτυλίου. Λαμβάνει χώρα μεταξύ της ο-ιωδο-ανιλίνης και του κατάλληλου αλκυνίου παρουσία καταλύτη Pd(II), όπως π.χ Pd(OAc)<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub>(dppf), κ.α. Η αντίδραση είναι τοποεκλεκτική, προκύπτουν 2,3-διυποκατεστημένα ινδόλια, και ο πιο ογκώδη υποκαταστάτη του αλκυνίου να καταλαμβάνει τη θέση-2 του ινδολικού δακτυλίου.



**Σχήμα 2.71:** Σύνθεση N-υποκατεστημένων ινδολίων με παραλλαγή της μεθόδου *Fischer*.

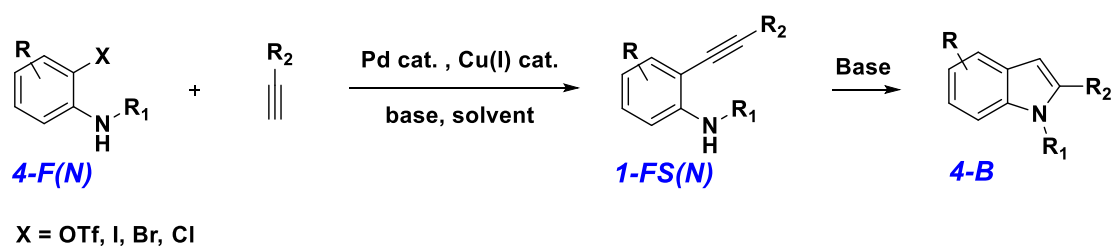
Οι αντίστοιχες 2-βρωμο- και 2-χλωρο-ανιλίνες υφίστανται μετατροπή σε ινδόλιο με τη χρήση των κατάλληλων αλκυνίων παρουσία K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και Pd(OAc)<sub>2</sub> και σε συνδυασμό με το συμπλεκτικό αντιδραστήριο 1,1-δισ(δι-*tert*-βουτυλοφωσφίνο)φεροκένιο (dtbpf). Οι αποδόσεις αυτών των αντιδράσεων ξεπερνούν το 60%.



**Σχήμα 2.72:** Σύνθεση N-υποκατεστημένων ινδολίων με παραλλαγή της μεθόδου *Fischer*.

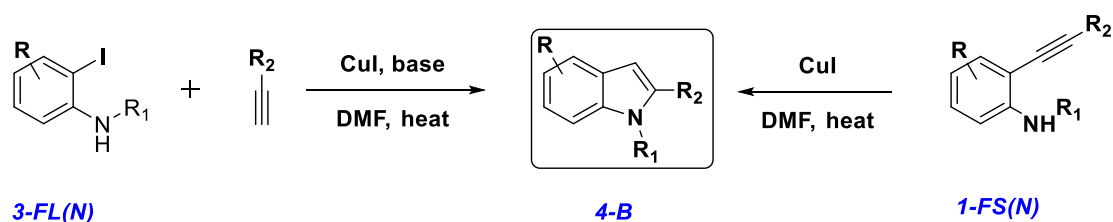
Η αντίδραση *Sonogashira* χρησιμοποιείται, επίσης, για τη σύνθεση ινδολικών δακτυλίων. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα με ακραία αλκύνια παρουσία καταλύτη

Pd(II) ή Pd(0) και καταλύτη Cu(I), ενώ για τηκυκλοποίηση της ενδιάμεσης ένωσης απαιτούνται βασικές συνθήκες.



**Σχήμα 2.73:** Σύνθεση N-υποκατεστημένων ινδολίων με παραλλαγή της μεθόδου *Fischer*.

Μια παραλλαγή της αντίδραση σύνθεσης ινδολίων *Larock*, αποτελεί η αντίδραση *Castro* στην οποία χρησιμοποιείται ως αρχικό υπόστρωμα κάποια υποκατεστημένη ο-ιωδο-ανιλίνη και CuI. Η αντίδραση αυτή έχει αρκετά καλές αποδόσεις.

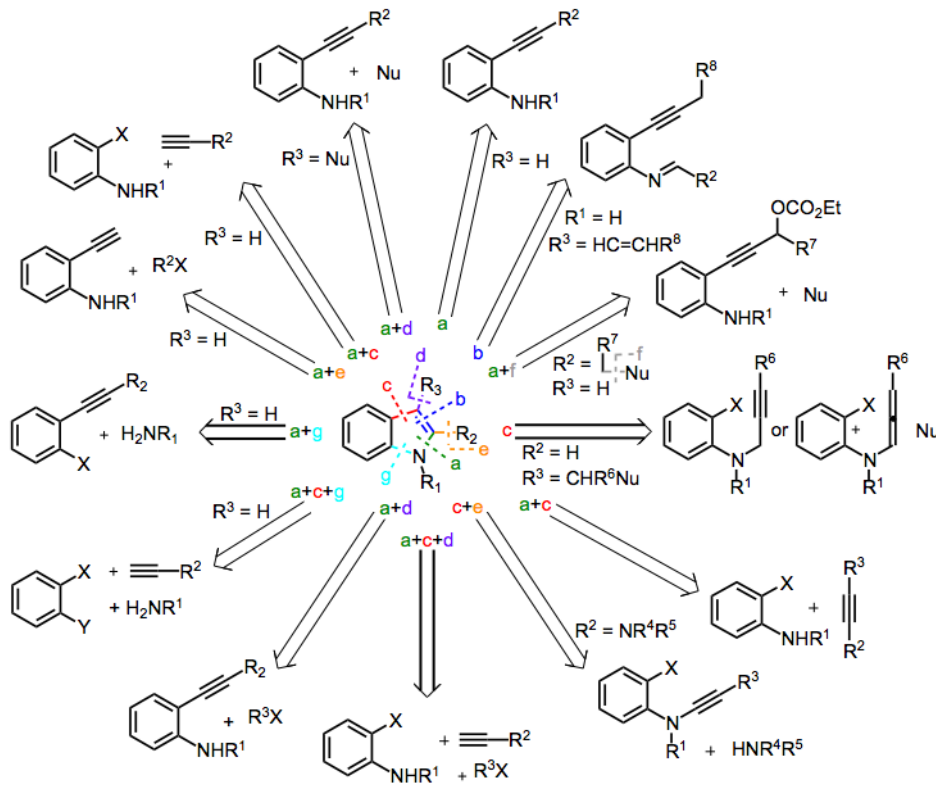


**Σχήμα 2.74:** Σύνθεση N-υποκατεστημένων ινδολίων με παραλλαγή της μεθόδου *Fischer*.

Η κλασική αντίδραση σύνθεσης του ινδολικού δακτυλίου *Leimgruber* λαμβάνει χώρα με τη συμπύκνωση του κατάλληλα υποκατεστημένου ο-νιτρο-τολουολίου και της διμεθυλοφορμαμιδο-διμεθυλο-ακετάλης (DMFDMA). Η ενδιάμεση ένωση β-(διμεθυλαμινο)-2-νιτροστυρένιο υφίσταται αναγωγική κυκλοποίηση σε ινδόλιο, όπως φαίνεται και στο επόμενο σχήμα. Η αντικατάσταση της διμεθυλαμινο-ομάδας της ενδιάμεσης ένωσης λαμβάνει χώρα λόγω της περίσσειας πυρρολιδίνης, κάτι το οποίο οδηγεί σε μεγαλύτερη απόδοση της αντίδρασης. Επιπρόσθετα, λόγω της αυξημένης οξύτητας των υδρογόνων της μεθυλομάδας του ο-νιτρο-τολουολίου είναι εφικτή η παρασκευή σταθερών υποκατεστημένων νιτροστυρενίων.

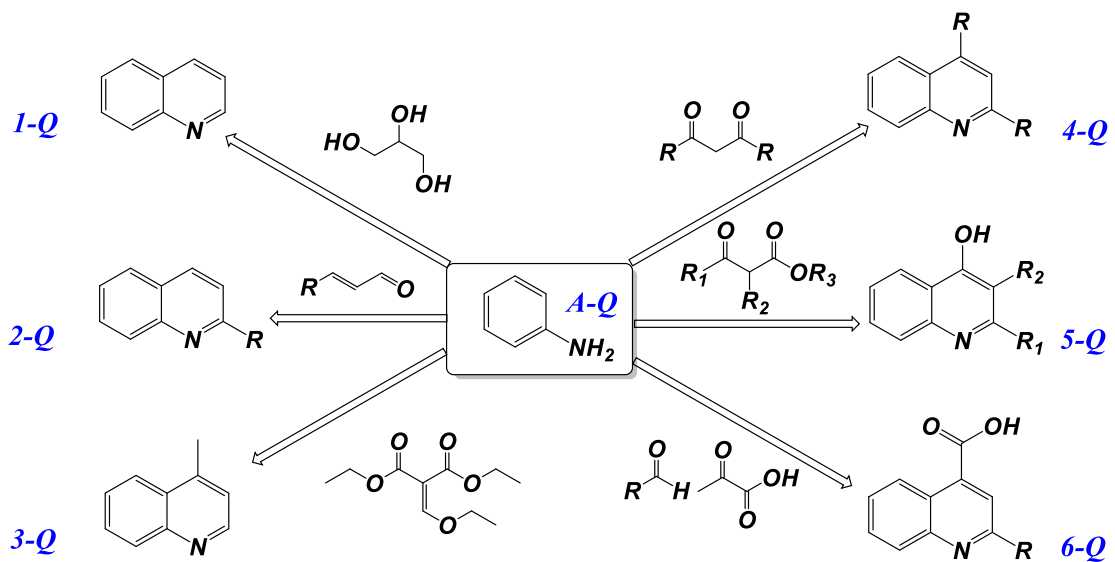






**Σχήμα 2.77:** Αποσυνδεδεμένες προσεγγίσεις ορισμένων αντιδράσεων σύζευξης των αλκυνίων με ανιλίνες παρουσία καταλύτη παλλαδίου για τη σύνθεση του ινδολίου.

Ένα άλλο ετεροατομικό σύστημα που απαντάται ευρέως στις δομές των διαφόρων αναστολέων είναι οι κινολίνες. Πολλοί αναστολείς, ανεξαιρέτως στόχου ή ασθένειας που θεραπεύουν, αποτελούν παράγωγα κινολινών.



**Σχήμα 2.78:** Μέθοδοι σύνθεσης κινολίνης από ανιλίνη.

### Συζήτηση - Αποτελέσματα

---

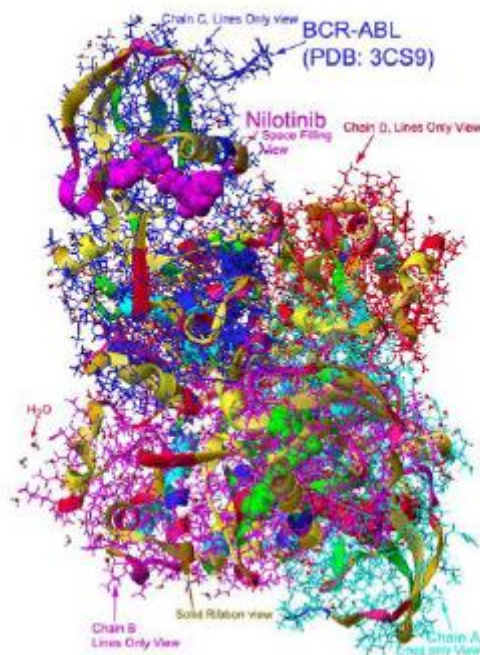
#### 3.1 Ορθολογικός σχεδιασμός νέων αναστολέων μέσω Μοριακής Μοντελοποίησης

Η μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου κινασών, με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοντελοποίησης ομολογίας και με μοριακούς υπολογισμούς πρόσδεσης του αναστολέα στο ένζυμο, επιτρέπει τη σύγκριση ενώσεων με πιθανή δράση έναντι της κινάσης με γνωστούς αναστολείς. Υποδεικνύει έτσι τις ενώσεις που είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν βιολογική δράση και παρέχει τη δυνατότητα στοιχειοθέτησης ενός “φαρμακοφόρου μοντέλου” με τη συσχέτιση δομής-δραστηκότητας των μορίων για το σχεδιασμό νέων δραστικότερων και εκλεκτικότερων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Κατ’ αυτόν τον τρόπο σχεδιάστηκαν νέοι αναστολείς τύπου II, ανάλογα/παράγωγα του Nilotinib, οι οποίοι προσδένονται στη θέση πρόσδεσης του ATP στην τυροσινική κινάση Abl, αλλά και στην παθολογική κινάση Bcr-Abl, δημιουργώντας αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο, παρόμοιες με αυτές του ως άνω φαρμακευτικού σκευάσματος.

Για τη μοριακή μοντελοποίηση των αναλόγων/παραγώγων του Nilotinib χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Nilotinib, καθώς ο στόχος μας ήταν οι νέες ενώσεις να παρουσιάζουν ίδιες ή καλύτερες τιμές πρόσδεσης από αυτό και καλύτερη συμπληρωματικότητα.

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, το Nilotinib έχει ένα βελτιωμένο προφίλ από το Imatinib. Η Εικόνα 3.1 δείχνει τη θέση δέσμευσης του Nilotinib στο στόχο του, τη Bcr-Abl.<sup>255</sup> Η συμβατότητα δέσμευσης και η εκλεκτικότητα του Nilotinib έχει βελτιωθεί σημαντικά με τροποποιήσεις που βασίζονται στην ενεργή θέση δέσμευσης της Bcr-Abl κινάσης, κυρίως ως απόρροια της ιδανικής στερικής συμπληρωματικότητας του αναστολέα εντός του ενεργού κέντρου.



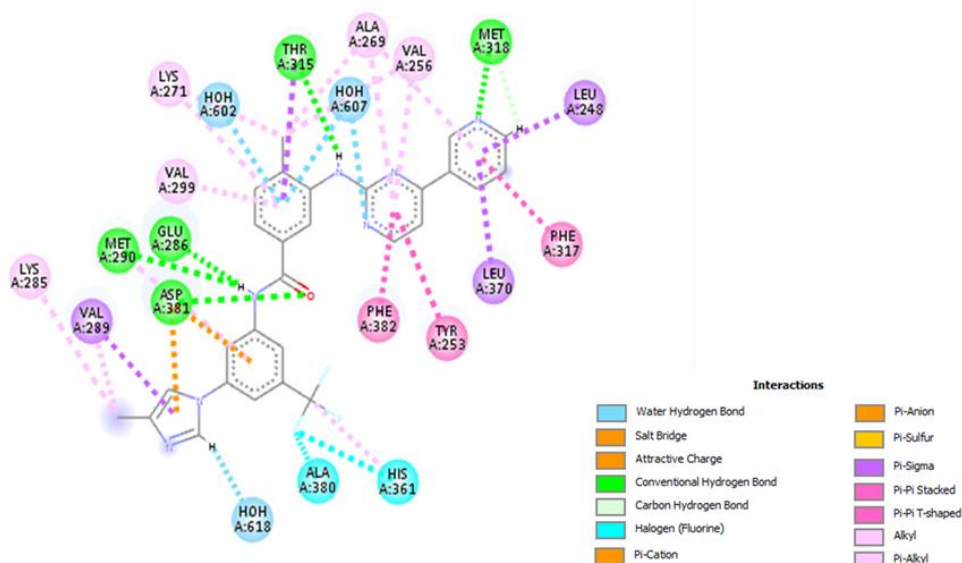
**Εικόνα 3.1:** Η περιοχή της Bcr-Abl κινάσης: με μωβ χρώμα απεικονίζεται η θηλιά πρόσδεσης του Nilotinib στην ενεργή θέση της Bcr-Abl, στην αλυσίδα C. Στην εικόνα αυτή, η Bcr-Abl απεικονίζεται ως ένα σύμπλεγμα τεσσάρων αλυσίδων ( chain A [πράσινη], chain B [μωβ], chain C [μπλε] και chain D [κόκκινη] ).

### 3.1.A Ανάλογα Nilotinib

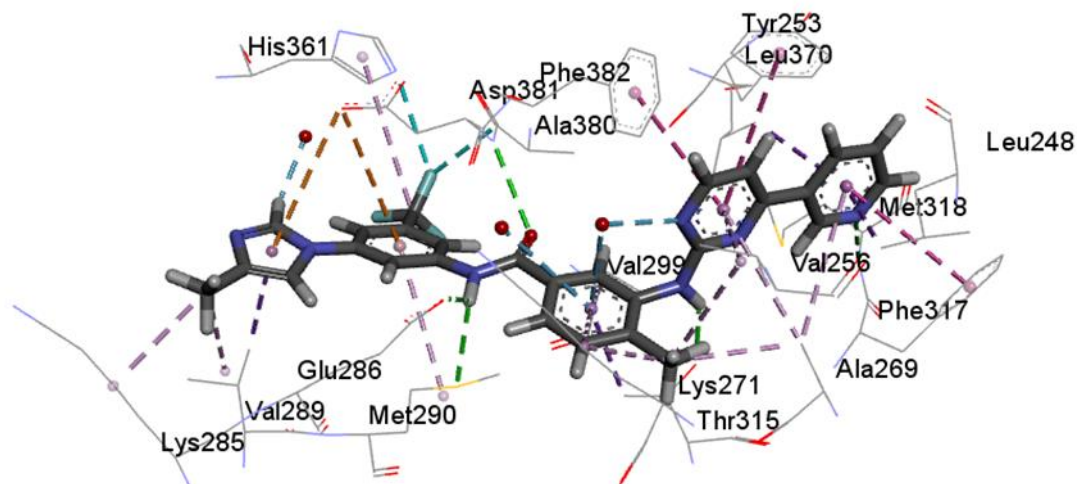
#### 3.1.1 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα του Nilotinib με την Abl1

Η αμιδική ομάδα της Νιλοτινίβης σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα κρίσιμα, για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης κατάλοιπα Asp381, Met290 και Glu286. Ο μεθυλο-βενζολικός δακτύλιος μαζί με τους δακτυλίους της πυριμιδίνης και της πυριδίνης συνεισφέρουν στην ανασταλτική δράση, σχηματίζοντας πλήθος αλληλεπιδράσεων με τα υδρόφοβα τμήματα κατάλοιπων βαλίνης, λυσίνης, αλανίνης, θρεονίνης, λευκίνης, φαινυλαλανίνης και τυροσίνης. Η αμινομάδα (δότης) του κατάλοιπου Met318 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το άτομο αζώτου (δέκτης) του πυριδινικού δακτυλίου, ενώ το άτομο οξυγόνου της Thr315 (δέκτης) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την αμινο-ομάδα (δότης). Επιπρόσθετες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται μεταξύ των κατάλοιπων Lys285 και Val289 της Abl1 και του μεθυλο-ιμιδαζολικού δακτυλίου του Nilotinib, στην αλλοστερική θέση. Τα άτομα φθορίου της τριφθορομεθυλο-ομάδας αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα

Ala380 και His361. Τέλος, στη δομή παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις του αναστολέα με τρία μόρια νερού στο ενεργό κέντρο της Abl1.



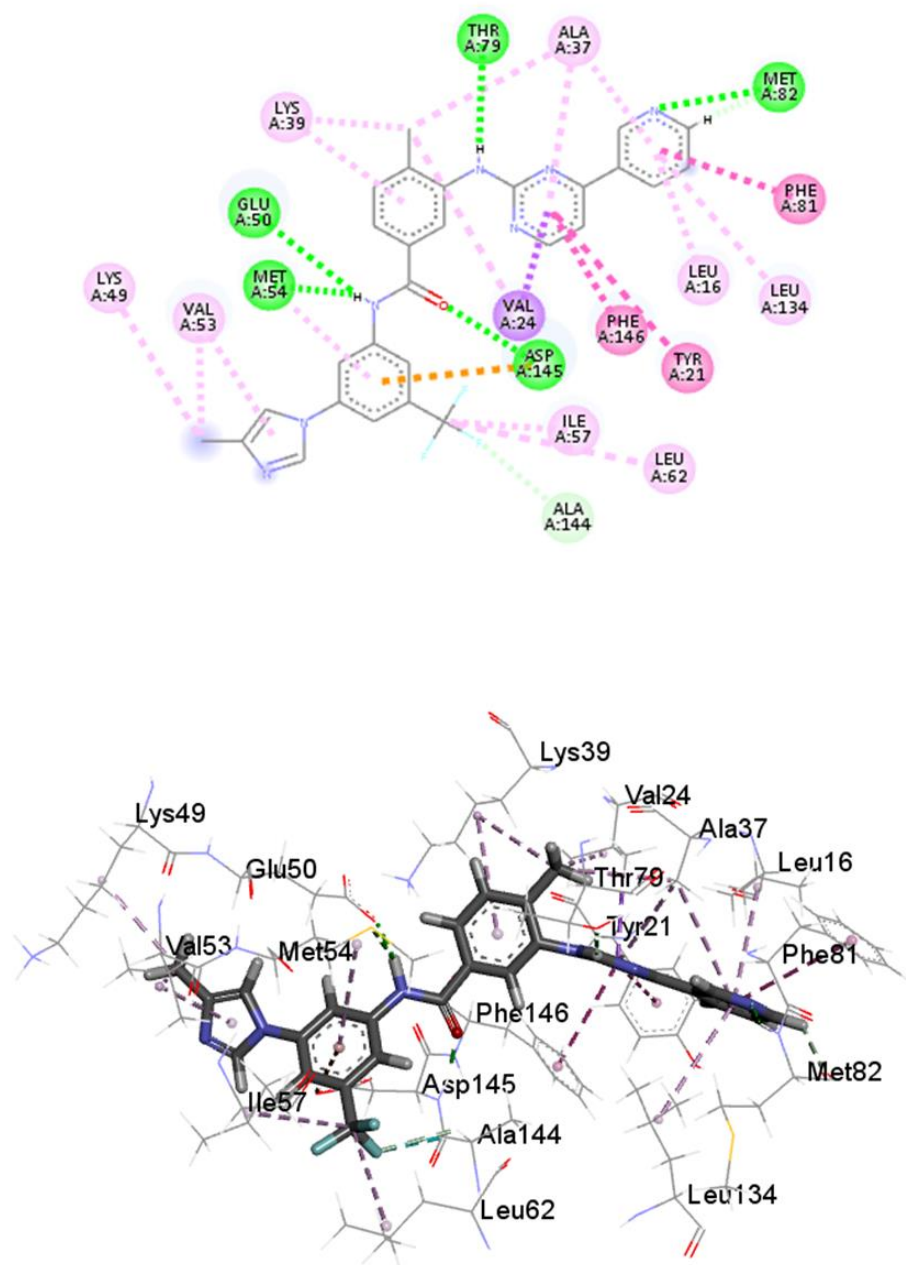
**Σχήμα 3.1:** Απεικόνιση δύο διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του Nilotinib με κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της κινάσης Abl1. Χρωματική απεικόνιση μερικών αλληλεπιδράσεων που παρατηρούνται κατά μοριακή μοντελοποίηση προσδεμάτων στο ενεργό κέντρο κινασών.



**Σχήμα 3.2:** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων (στο χώρο) μεταξύ του Nilotinib με κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της κινάσης Abl1.

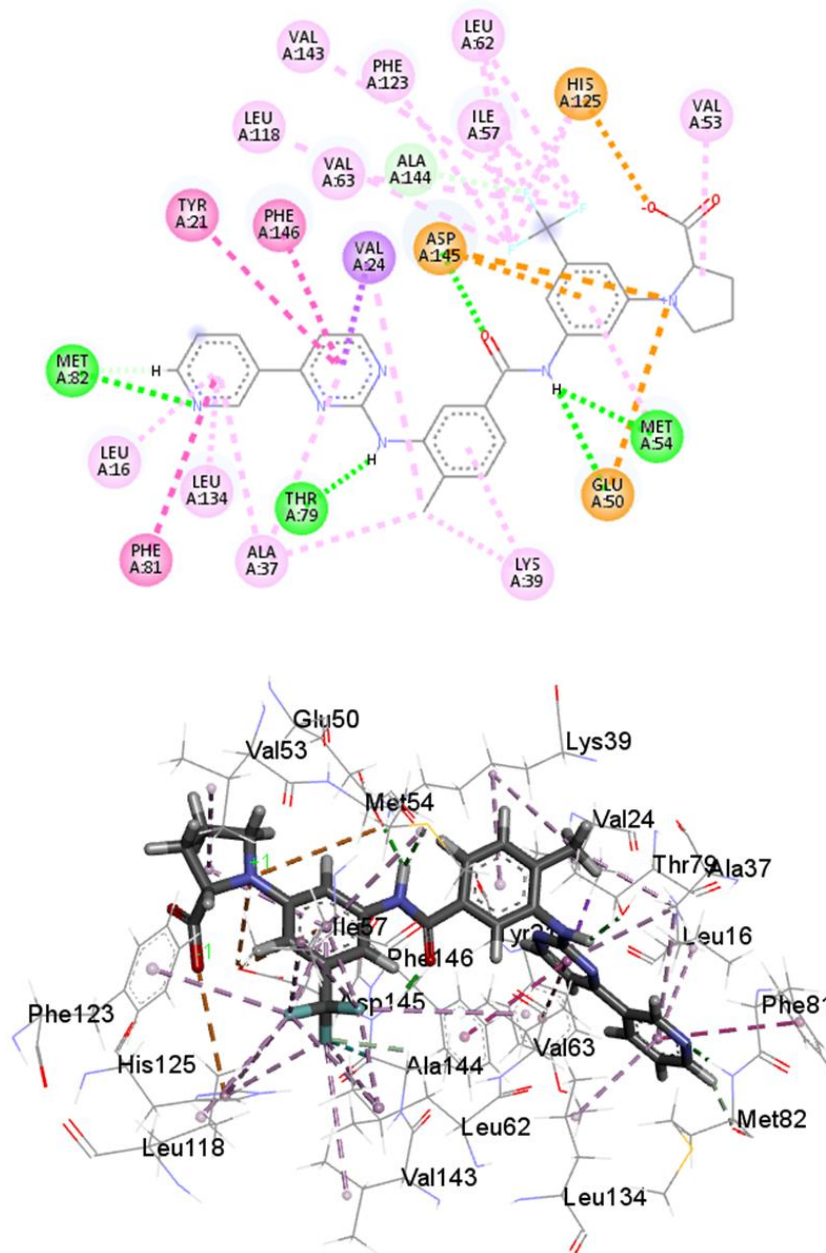
Κατά τη προετοιμασία της πρωτεΐνης για μοριακή μοντελοποίηση, εξαλείφονται μόρια νερού από τη κρυσταλλογραφική δομή, προστίθενται τα τυπικά φορτία στα

αμινοξέα, ενώ αλλάζει και η αρίθμηση των πεπτιδικών αλυσίδων. Η μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib καθώς και των νέων ενώσεων (Nil-01 και Nil-02) πραγματοποιείται μέσω του προγράμματος Chimera 1.13.1rc με τη χρήση του AutoDock Vina. Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης των συμπλόκων Nilotinib, Nil1 και Nil2 με την Abl1 παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**.



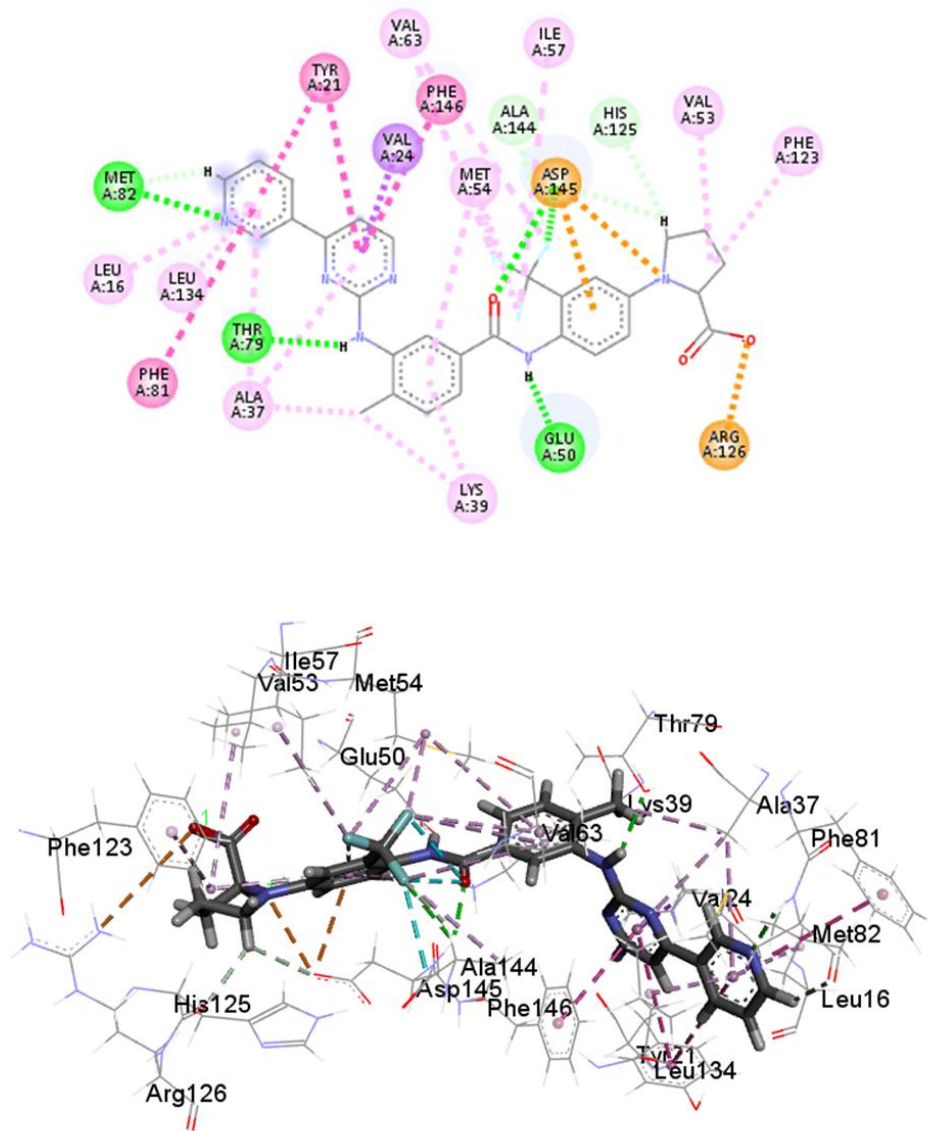
**Σχήμα 3.3:** Δομή του συμπλόκου της Abl1 με το **Nilotinib** μετά από τη μοριακή μοντελοποίηση (πάνω σε απεικόνιση δύο διαστάσεων και κάτω στο χώρο). Στην εικόνα φαίνεται ότι διατηρούνται όλες οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (ροζ, σκούρο ροζ και μωβ χρώμα) και οι δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα) με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της κινάσης Abl1.





**Σχήμα 3.4:** Δομή του συμπλόκου της Abl1 με το ανάλογο **Nii-02** μετά από τη μοριακή μοντελοποίηση (πάνω σε απεικόνιση δύο διαστάσεων και κάτω στο χώρο).

Οι κύριες διαφοροποιήσεις εστιάζονται στο τελικό βενζολικό δακτύλιο όπου, η αντικατάσταση του μεθυλο-ιμιδαζολικού δακτυλίου με την L-προλίνη, οδήγησε σε εμφάνιση ισχυρών αλληλεπιδράσεων ηλεκτροστατικού τύπου, μεταξύ τόσο του θετικά φορτισμένου ατόμου азώτου της προλίνης με τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα Glu50 και Asp145, όσο και μεταξύ της καρβοξυλομάδας της προλίνης με τη θετικά φορτισμένη His125. Ο ανθρακικός σκελετός του δακτυλίου της προλίνης σχηματίζει μια αλκυλο-αλληλεπίδραση με την βαλίνη53.

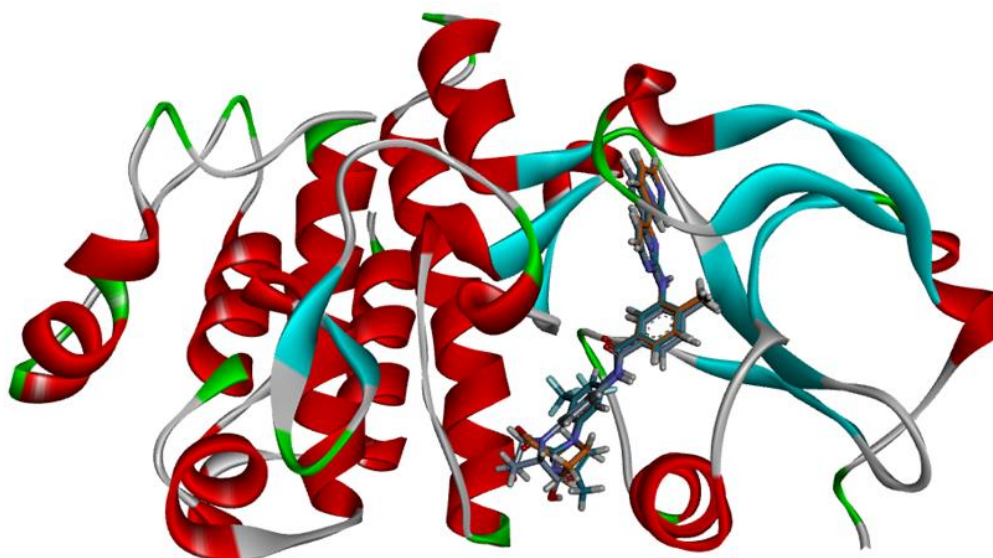


**Σχήμα 3.5:** : Δομή του συμπλόκου της Abl1 με το ανάλογο **Nil-01** μετά από τη μοριακή μοντελοποίηση (πάνω σε απεικόνιση δύο διαστάσεων και κάτω στο χώρο).

Οι κύριες διαφοροποιήσεις εστιάζονται στο τελικό βενζολικό δακτύλιο όπου, η αλλαγή προσανατολισμού των υποκαταστατών και ειδικά της L-προλίνης οδήγησε σε εμφάνιση ισχυρών αλληλεπιδράσεων ηλεκτροστατικού τύπου, μεταξύ τόσο του θετικά φορτισμένου ατόμου αζώτου της προλίνης με το αρνητικά φορτισμένο Asp145, όσο και μεταξύ της καρβοξυλομάδας της προλίνης με τη θετικά φορτισμένη Arg126. Ο ανθρακικός σκελετός του δακτυλίου της προλίνης σχηματίζει αλκυλο- και π-αλκυλο-αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Val53 και Phe123. Με την αλλαγή της θέσης της τριφθορο-μεθυλο ομάδας, σχηματίστηκε ένας επιπλέον δεσμός



υδρογόνου με το κατάλοιπο Asp145, ενώ διατηρήθηκαν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα ίδια κατάλοιπα.

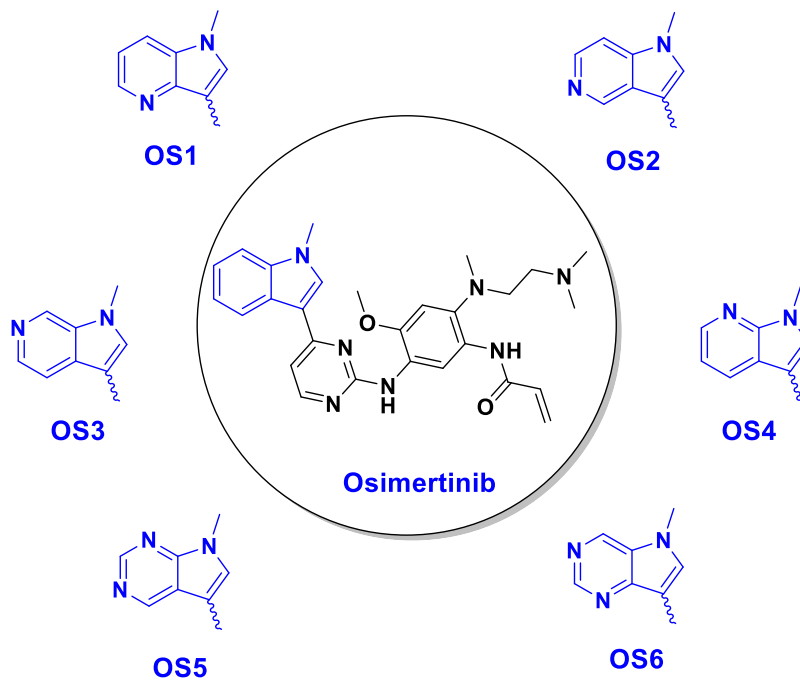


**Σχήμα 3.6:** Υπέρθηση των δομών των τριών αναστολέων (**Nilotinib**, **Nil-01**, **Nil-02**) στο ενεργό κέντρο της Abl1 με τη χρήση του προγράμματος Discovery Studio Visualizer 2017, όπου παρατηρείται η διαφοροποίηση στο προσανατολισμό του τελικού βενζολικού δακτυλίου.

### **3.1.B Ανάλογα Osimertinib**

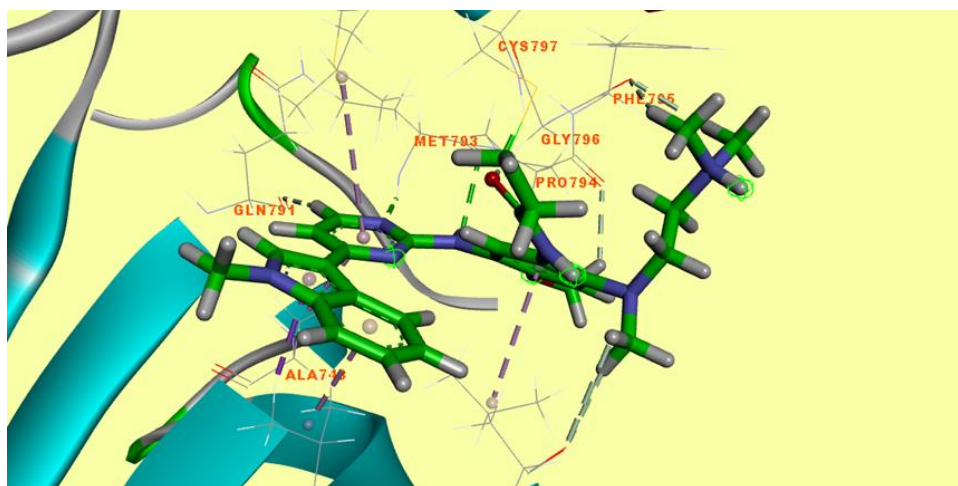
#### **3.1.2 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα του Osimertinib με την περιοχή τυροσινικής κινάσης του EGFR**

Όσον αφορά τα ανάλογα του Osimertinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριό μας, οι δομικές αλλαγές που έλαβαν χώρα σχετίζονταν αποκλειστικά με τον ινδολικό δακτύλιο. Έτσι αντικαθιστώντας τον ινδολικό δακτύλιο με διάφορα αζα-ινδόλια και διαζα-ινδόλια προέκυψαν τα έξι ανάλογα, όπως αυτά αναγράφονται στο παρακάτω σχήμα. Σημειώνεται πως το υπόλοιπο μόριο δεν υπέστη καμία τροποποίηση και παραμένει ως έχει σε όλα τα ανάλογα που σχεδιάστηκαν.



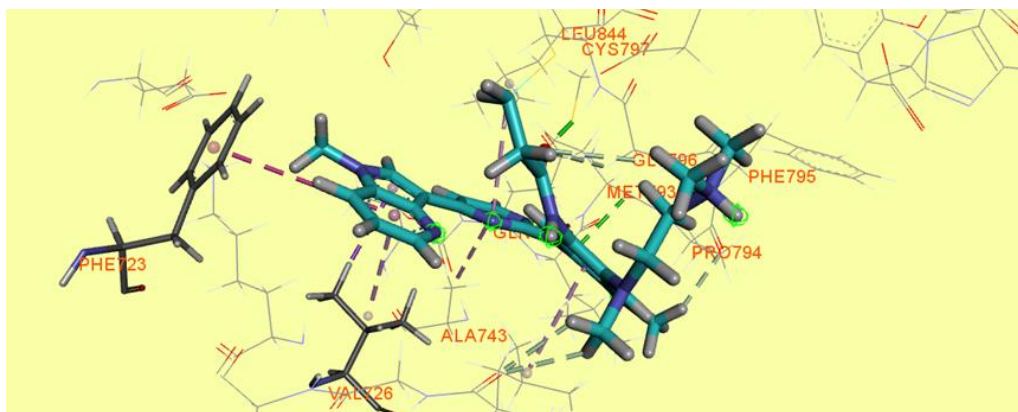
**Σχήμα 2.79:** Ανάλογα Osimertinib. Οι δομικές αλλαγές εντοπίζονται στον ινδολικό δακτύλιο, όπου το ινδόλιο αντικαθίσταται με αζα-ινδόλια και διαζα-ινδόλια.

Όπως φαίνεται στην παρακάτω διαδιάστατη δομή του Osimertinib με το ενεργό κέντρο της τυροσινικής κινάσης του EGFR παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις με τον ινδολικό δακτύλιο. Ειδικότερα, ο ινδολικός δακτύλιος σχηματίζει μία αλληλεπίδραση  $\rho$ -σμμακαϊάλλη μία  $\rho$ -alkyl με ένα κατάλοιπο Ala748.



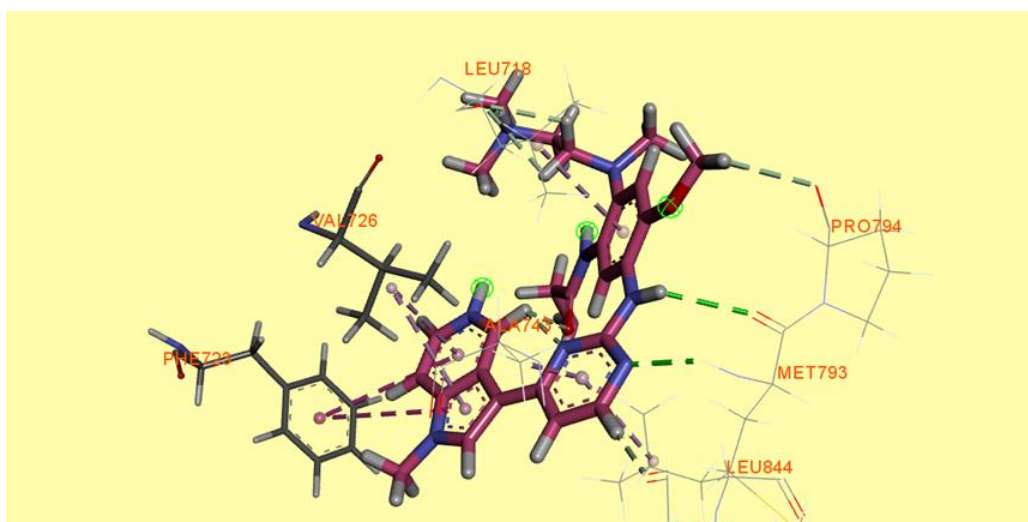
**Σχήμα 3.7:** Το Osimertinib στο ενεργό κέντρο του EGFR.

Στο πρώτο ανάλογο (**OS1**), όπου τη θέση του ινδολικού δακτυλίου έχει καταλάβει η 1H-πυρρολο-[2,3-b]-πυριμιδίνη (4-αζα-ινδόλιο) κατά την πρόσδεση του στο ενεργό κέντρο της κινάσης του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις τύπου *pi-sigma* με το κατάλοιπο Val726. Ακόμη, με το κατάλοιπο Phe723 του ενεργού κέντρου δημιουργείται μία αλληλεπίδραση *Pi-Pi T-shaped*.

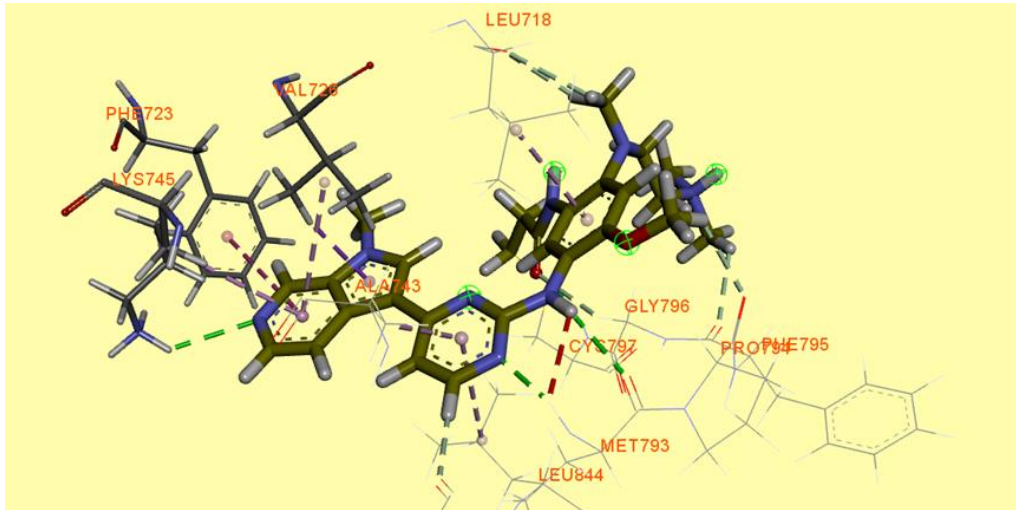


**Σχήμα 3.8:** Το **OS1** στο ενεργό κέντρο του EGFR. Παρατηρείται μια *pi-sigma* αλληλεπίδραση (με μωβ χρώμα) με ένα κατάλοιπο Val726, μια *Pi-alkyl* (με μπλε) με το ίδιο κατάλοιπο Val726 και μία *Pi-Pi T-shaped* με ροζ χρώμα με ένα κατάλοιπο Phe723.

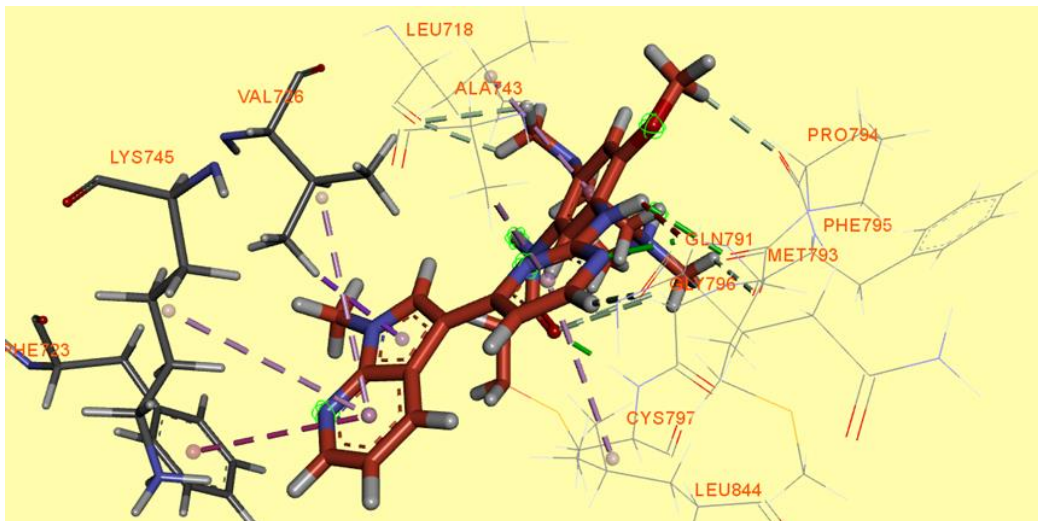
Στο δεύτερο ανάλογο, όπου ο ινδολικός δακτύλιος έχει δώσει τη θέση του στη 1H-πυρρολο-[2,3-c]-πυριμιδίνη.



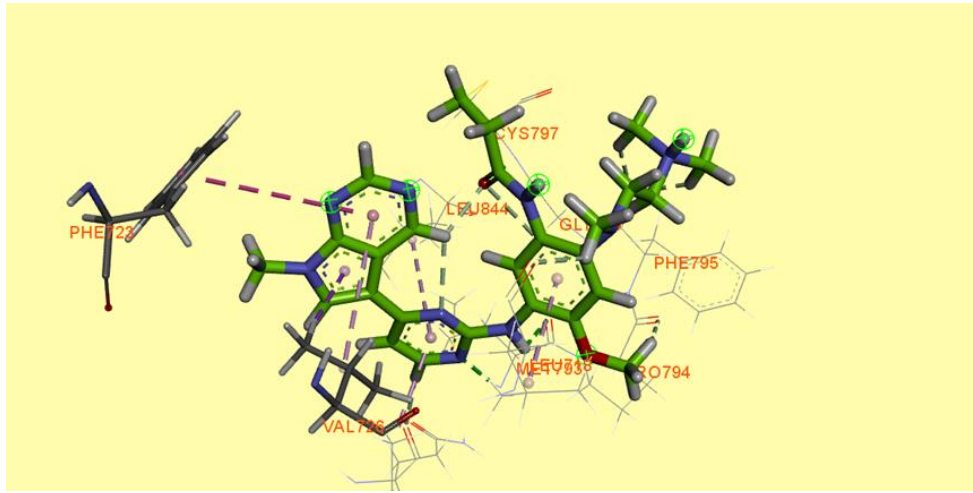
**Σχήμα 3.9:** Το **OS2** στο ενεργό κέντρο του EGFR. Παρατηρούμε δύο αλληλεπιδράσεις *Pi-Pi T-shaped* (με ροζ χρώμα) με το κατάλοιπο Phe723 του ενεργού κέντρου του ενζύμου και δύο αλληλεπιδράσεις *Pi-sigma* με μωβ χρώμα με ένα κατάλοιπο Val726.



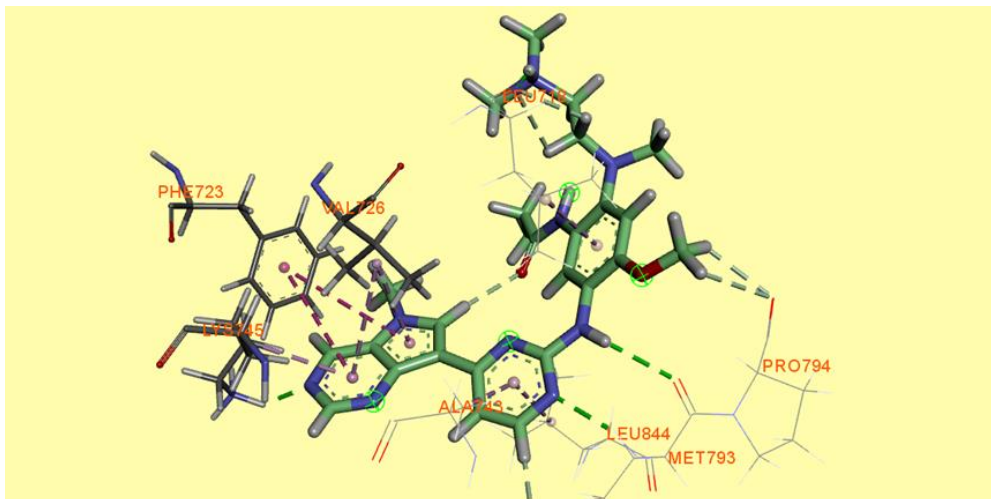
**Σχήμα 3.10:** Το **OS3** στο ενεργό κέντρο του EGFR. Παρατηρούμε έναν πρόσθετο δεσμό υδρογόνου (πράσινο χρώμα) και μία *Pi-alkyl* αλληλεπίδραση (μώβ χρώμα) με το κατάλοιπο Lys745, μία αλληλεπίδραση *Pi-Pi T-shaped* (με ρόζ χρώμα) με το κατάλοιπο Phe723 και δύο αλληλεπιδράσεις μία *Pi-alkyl* και μία *Pi-Sigma* με την Val726.



**Σχήμα 3.11:** Το **OS4** στο ενεργό κέντρο του EGFR. Παρατηρούμε μία *Pi-alkyl* αλληλεπίδραση (μώβ χρώμα) με το κατάλοιπο Lys745, μία αλληλεπίδραση *Pi-Pi T-shaped* (με ρόζ χρώμα) με το κατάλοιπο Phe723 και δύο αλληλεπιδράσεις μία *Pi-alkyl* και μία *Pi-Sigma* με την Val726.

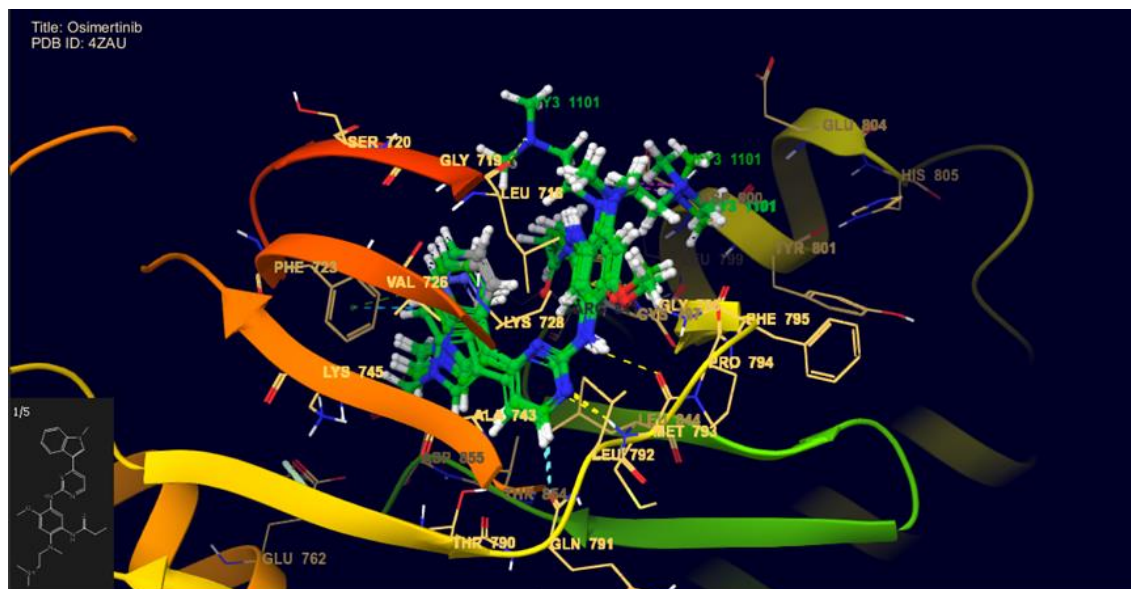


**Σχήμα 3.12:** Το **OS5** στο ενεργό κέντρο του EGFR. Παρατηρούμε μια *pi-sigma* αλληλεπίδραση (με μωβ χρώμα) και μια *Pi-alkyl* (με μπλε) πάλι με την Val726 και μία *Pi-Pi T-shaped* με ροζ χρώμα με ένα κατάλοιπο Phe723. Επίσης παρατηρούμε ενδομοριακούς δεσμούς με το H του ινδολικού δακτυλίου και την αμινομάδα της πυριμιδίνης αλλά και την καρβοξυλομάδα της κεφαλής του αναστολέα.



**Σχήμα 3.13:** Το **OS6** στο ενεργό κέντρο του EGFR. Παρατηρούμε έναν πρόσθετο δεσμό υδρογόνου (πράσινο χρώμα) και μία *Pi-alkyl* αλληλεπίδραση (μώβ χρώμα) με το κατάλοιπο Lys745, δύο αλληλεπιδράσεις *Pi-Pi T-shaped* (με ροζ χρώμα) με το κατάλοιπο Phe723 και δύο αλληλεπιδράσεις μία *Pi-alkyl* και μία *Pi-Sigma* με την Val726.





**Σχήμα 3.14:** Υπέρθηση στο ενεργό κέντρο του μορίου EGFR του osimertinib και των αναλόγων που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο. Οι κύριες διαφοροποιήσεις εστιάζονται στον ινδολικό δακτύλιο.

## 3.2 Μοριακή Μοντελοποίηση Nilotinib και αναλόγων του Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο άλλων πρωτεϊνικών κινασών

### 3.2.1 Εύρεση βιολογικών στόχων του Nilotinib μέσω του προγράμματος SwissTargetPrediction

Με τη χρήση του προγράμματος SwissTargetPrediction αναζητήθηκαν βιολογικοί στόχοι–πρωτεϊνικές κινάσες, με προσδέματα τα οποία έχουν παρόμοια δομή με αυτή της Νιλοτινίβης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, οι περιπτώσεις όπου το μόριο της Νιλοτινίβης παρουσιάζει την μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι βιοενεργό για την εκάστοτε πρωτεΐνη ή βιομόριο συνοψίζονται στο **Πίνακα 3.1**. Συνολικά βρέθηκαν 64 πρωτεϊνικές δομές όπου η πιθανότητα η Νιλοτινίβη να είναι βιοενεργή σε αυτές πλησίαζε τη μονάδα. Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη τα αποτελέσματα του **Πίνακα 3.1** καθώς και τα γνωστά μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα για τις οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών με διαθέσιμες δομές συνκρυστάλλωσης τους με αναστολείς, προβήκαμε στην μοριακή μοντελοποίηση των τριών ενώσεων (Nilotinib, Nil-01 και Nil-02) στο ενεργό κέντρο επτά πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης PDGFR $\alpha$ , c-SRC, MAPK11 (ή p38 $\beta$ ), CSF1R (ή c-FMS), TEK (ή TIE-2), c-KIT και DDR1.

Σε όλα τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης η ελεύθερης ενέργεια πρόσδεσης του αναλόγου Nil-02 στις πρωτεϊνικές κινάσες είναι μεγαλύτερη σε σχέση με το

ανάλογο Nil-01 (παρά το γεγονός ότι σχηματίζονται αναμενόμενες αλληλεπιδράσεις σε ορισμένες περιπτώσεις) λόγω της μη ικανοποιητικής στερικής συμπληρωματικότητας. Τα αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης αποτυπώνονται στον **Πίνακα 3.2**.

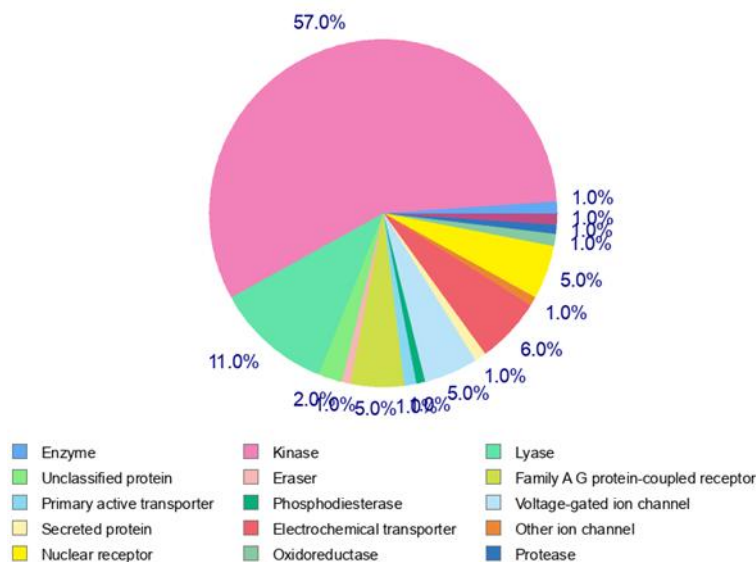
**Πίνακας 3.1:** Στόχοι του Nilotinib με την μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης βιοενεργότητας.

Target	Common name	Target Class
Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase type-2 gamma	PIP4K2C	Enzyme
Tyrosine-protein kinase FYN	FYN	Kinase
Macrophage colony stimulating factor receptor	CSF1R	Kinase
Tyrosine-protein kinase ABL	ABL1	Kinase
Serine/threonine-protein kinase RAF	RAF1	Kinase
Platelet-derived growth factor receptor beta	PDGFRB	Kinase
Stem cell growth factor receptor	KIT	Kinase
Tyrosine-protein kinase receptor FLT3	FLT3	Kinase
Platelet-derived growth factor receptor alpha	PDGFRA	Kinase
Kinesin-1 heavy chain/ Tyrosine-protein kinase receptor RET	RET	Kinase
Carbonic anhydrase II	CA2	Lyase
Ephrin type-A receptor 2	EPHA2	Kinase
Tyrosine-protein kinase YES	YES1	Kinase
Tyrosine-protein kinase BLK	BLK	Kinase
c-Jun N-terminal kinase 1	MAPK8	Kinase
Carbonic anhydrase VII	CA7	Lyase
Tyrosine-protein kinase LCK	LCK	Kinase
MAP kinase p38 alpha	MAPK14	Kinase
Carbonic anhydrase I	CA1	Lyase
Tyrosine-protein kinase CSK	CSK	Kinase
c-Jun N-terminal kinase 3	MAPK10	Kinase
Tyrosine-protein kinase SRC	SRC	Kinase
Carbonic anhydrase III	CA3	Lyase
Carbonic anhydrase VI	CA6	Lyase
Tyrosine-protein kinase HCK	HCK	Kinase
Carbonic anhydrase XII	CA12	Lyase
Ephrin type-B receptor 2	EPHB2	Kinase
Carbonic anhydrase XIV	CA14	Lyase
Carbonic anhydrase IX	CA9	Lyase
Carbonic anhydrase IV	CA4	Lyase
Mixed lineage kinase 7	MAP3K20	Kinase
Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	Kinase
MAP kinase p38 beta	MAPK11	Kinase
Serine/threonine-protein kinase 10	STK10	Kinase
Ephrin type-A receptor 5	EPHA5	Kinase



Ephrin type-A receptor 4	EPHA4	Kinase
Tyrosine-protein kinase ABL2	ABL2	Kinase
Tyrosine-protein kinase TIE-2	TEK	Kinase
Ephrin type-A receptor 8	EPHA8	Kinase
c-Jun N-terminal kinase 2	MAPK9	Kinase
Dual specificity protein kinase CLK4	CLK4	Kinase
Tyrosine-protein kinase FRK	FRK	Kinase
Dual specificity protein kinase CLK1	CLK1	Kinase
Tyrosine-protein kinase FGR	FGR	Kinase
Ephrin type-A receptor 6	EPHA6	Kinase
Carbonic anhydrase VA	CA5A	Lyase
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2	NTRK2	Kinase
Ephrin type-B receptor 3	EPHB3	Kinase
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	Kinase
Ephrin type-A receptor 3	EPHA3	Kinase
Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	CDC42BPB	Kinase
Ephrin type-B receptor 1	EPHB1	Kinase
Discoidin domain-containing receptor 2	DDR2	Kinase
Serine/threonine-protein kinase B-raf	BRAF	Kinase
Ephrin receptor	EPHB4	Kinase
Serine/threonine-protein kinase TNKI3K	TNKI3K	Kinase
Serine/threonine-protein kinase TAO1	TAOK1	Kinase
Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1	TIE1	Kinase
Epithelial discoidin domain-containing receptor 1	DDR1	Kinase
NT-3 growth factor receptor	NTRK3	Kinase
Serine/threonine-protein kinase TAO3	TAOK3	Kinase
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	MAP4K1	Kinase
Ephrin type-A receptor 1	EPHA1	Kinase
Carbonic anhydrase XIII (by homology)	CA13	Lyase

Τα παραπάνω δεδομένα για την εύρεση πιθανών στόχων της Νιλοτινίβης (στο σύνολο των ανθρώπινων πρωτεϊνών) συνοψίζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί. Παρατηρείται ότι το Nilotinib στοχεύει πρωτίστως πρωτεϊνικές κινάσες (~57%), ωστόσο μπορεί να εμφανίζει πιθανή βιολογική δράση και για λιγότερες (~11%), π.χ. καρβονικές ανυδράσες, σύμφωνα με τα δεδομένα του **Πίνακα 3.1**.



**Σχήμα 3.15:** Διαγραμματική απεικόνιση των στόχων του Nilotinib με την εμφάνιση πιθανής βιολογικής δράσης.

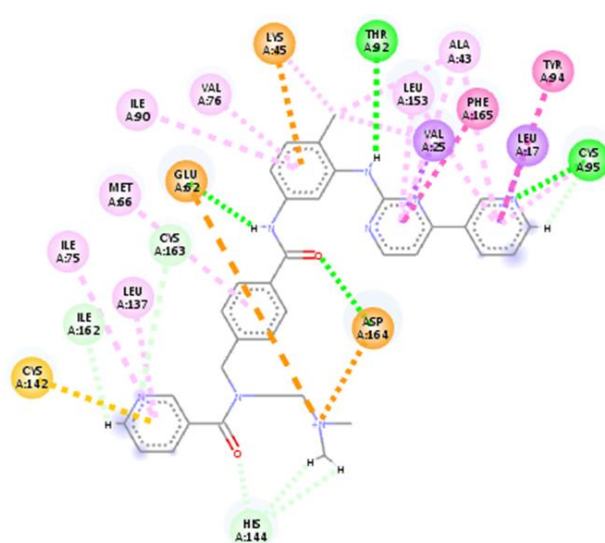
**Πίνακας 3.2:** Συνολικά αποτελέσματα μοριακής μοντελοποίησης.

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα ακτίνων-Χ			Ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ή $\Delta G_{binding}$ των συμπλόκων (kcal/mol)			
Όνομασία πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης	Κοινό όνομα	Κωδικός καταχώρησης (PDBID)	Πρόσδεμα	Nilotinib	Nil-01	Nil-02
Ιική πρωτεΐνη του Abelson	Abl1	3CS9	Nilotinib	-15.2	-10.7	-14.9
Κινάση- μέλος 11- που ενεργοποιείται από το μιτογόνο p38-β	MAPK11 (p38-β)	3GP0	Nilotinib	-14.4	-11.3	-14.0
Υποδοχέας-α του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα	PDGFR $\alpha$	5GRN	WQ-C-159 -13.7	-14.1	-12.6	-14.2
Υποδοχέας της αγγειοποιητίνης-1	TEK (TIE2)	2OSC	Muh -12.6	-12.1	-11.9	-12.2
Κινάση του πρωτο-ογκογονιδίου του ιού του σαρκώματος	c-SRC	2OIQ	Imatinib -12.7	-13.2	-12.5	-13.1
Υποδοχέας του παράγοντα διέγερσης των αποικιών-1	CSF1R (c-FMS)	4R7I	Imatinib -13.4	-13.9	-10.1	-13.9
Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των μαστικών και βλαστικών κυττάρων	MCSFR (c-KIT)	1T46	Imatinib -14.8	-15.3	-12.9	-15.0
Υποδοχέας του τομέα δισκοϊδίνης-1	DDR1	4BKJ	Imatinib -13.2	-13.6	-11.3	-13.3

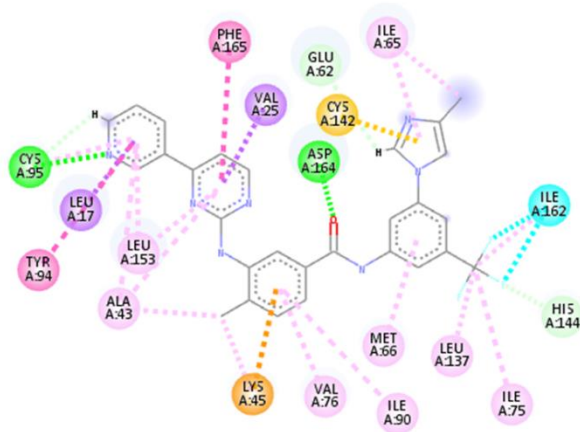
### 3.2.1 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο του PDGFRα

Ο αναστολέας WQ-C-159 έχει παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά με το Imatinib και η μοριακή μοντελοποίηση του στο ενεργό κέντρο του PDGFRα αποκαλύπτει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με αυτές του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της Abl1. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης είναι οι δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Cys96, Thr92 στο υδρόφοβο κανάλι της πρωτεΐνης καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με τα δομικά στοιχεία του αμιδίου και τα κατάλοιπα Glu62 και Asp164. Τα κατάλοιπα αυτά υπάρχουν σε όλες τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης που επιλέχθηκαν για τα μοριακή μοντελοποίηση, γεγονός που μπορεί να αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη αναστολέων πολλαπλών στόχων.

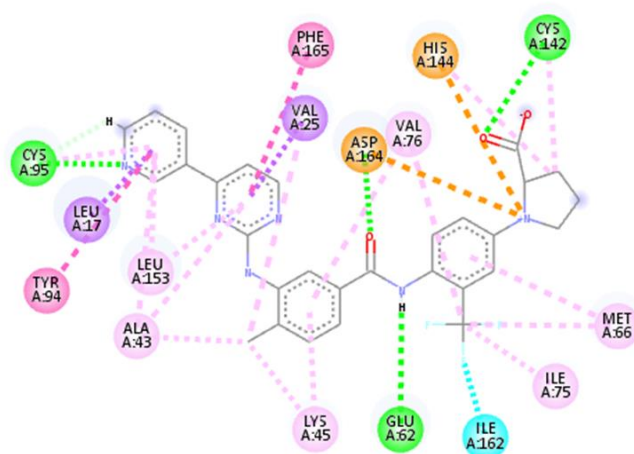
Η Νιλοτινίβη σχηματίζει πλήθος υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο του PDGFRα όπως αναμένεται καθώς και δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Cys95 και Asp164. Παρατηρείται, επίσης, ότι η τριφθορομεθυλο ομάδα όπως και ο ιμιδαζολικός δακτύλιος συμμετέχουν στην ανασταλτική δράση του μορίου. Ο αναστολέας Nil-02 σχηματίζει επίσης τους ίδιους δεσμούς υδρογόνου, ωστόσο η αμινο-ομάδα και η καρβοξυλο-ομάδα της L-προλίνης αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα κατάλοιπα Asp164, Glu62 και His144. Το ανάλογο Nil-01 έχει καλύτερη τοπολογική προσαρμογή εντός του ενεργού κέντρου του PDGFRα και σχηματίζει επιπρόσθετους δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Glu62 και Cys142.



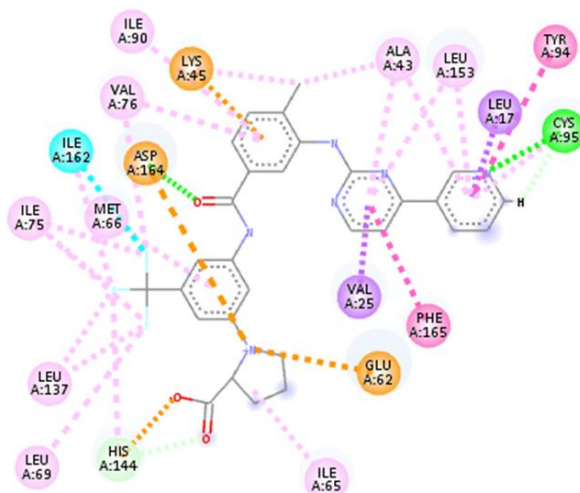
Σχήμα 3.16: Αλληλεπιδράσεις του WQ-C-159 στο ενεργό κέντρο του PDGFRα.



Σχήμα 3.17: Αλληλεπιδράσεις του **Nilotinib** στο ενεργό κέντρο του PDGFRα.



Σχήμα 3.18: Αλληλεπιδράσεις του **Nil-01** στο ενεργό κέντρο του PDGFRα.

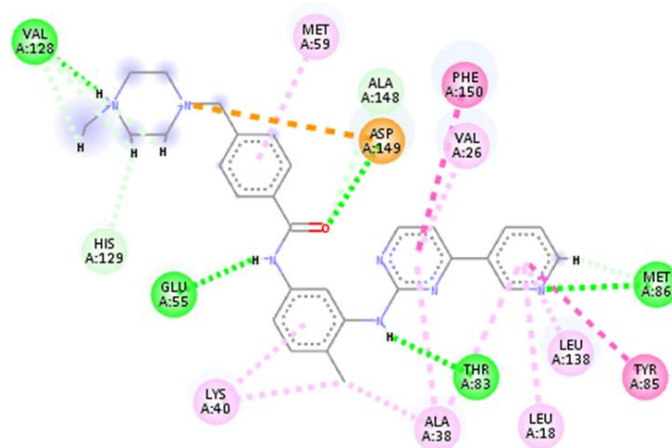


Σχήμα 3.19: Αλληλεπιδράσεις του **Nil-02** στο ενεργό κέντρο του PDGFRα.

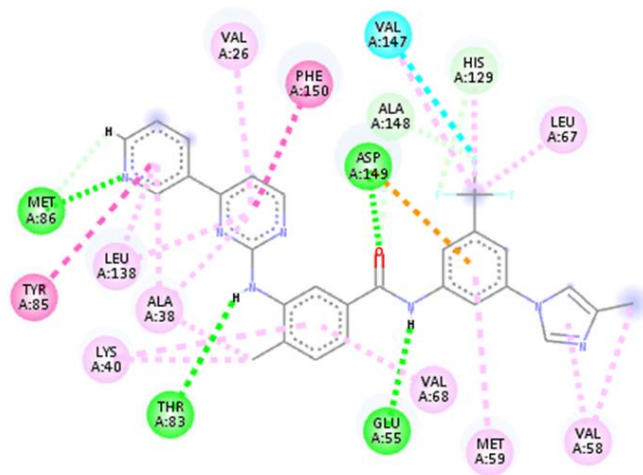
### 3.2.2 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της c-SRC

Η μοριακή μοντελοποίηση του Imatinib στο ενεργό κέντρο της SRC αποκαλύπτει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με αυτές του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της Abl1. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης είναι οι δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Met86, Thr83 στο υδρόφοβο κανάλι της πρωτεΐνης καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με τα δομικά στοιχεία του αμιδίου και τα κατάλοιπα Glu55 και Asp149.

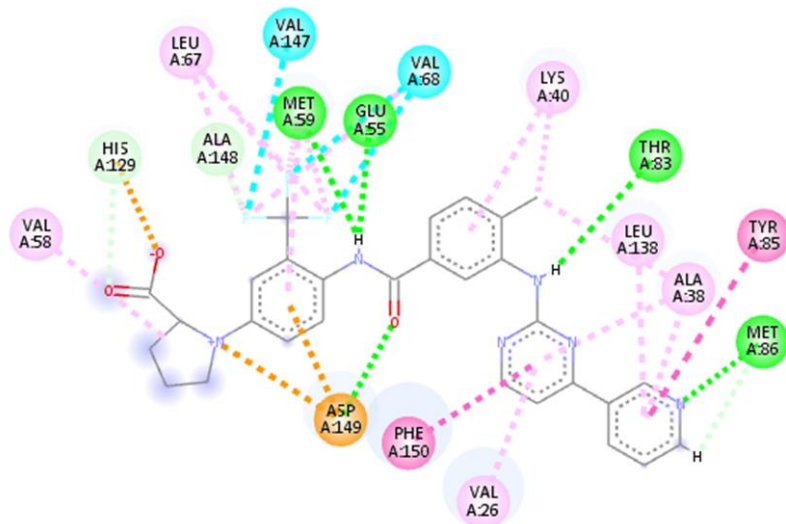
Η Νιλοτινίβη σχηματίζει πλήθος υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο της SRC και το ίδιο μοτίβο δεσμών υδρογόνου. Παρατηρείται, επίσης, ότι η τριφθορομεθυλο ομάδα όπως και ο ιμιδαζολικός δακτύλιος συμμετέχουν στην ανασταλτική δράση του μορίου. Ο αναστολέας Nil-02 σχηματίζει επίσης τους ίδιους δεσμούς υδρογόνου, ωστόσο ο η αμινο-ομάδα και η καρβοξυλο-ομάδα της L-προλίνης αλληλεπιδρούν ισχυρά με κατάλοιπα ασπαρτικού, γλουταμινικού και ιστιδίνης. Το ανάλογο Nil-01 έχει καλύτερη τοπολογική προσαρμογή εντός του ενεργού κέντρου της SRC και σχηματίζει επιπρόσθετο δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο Met59.



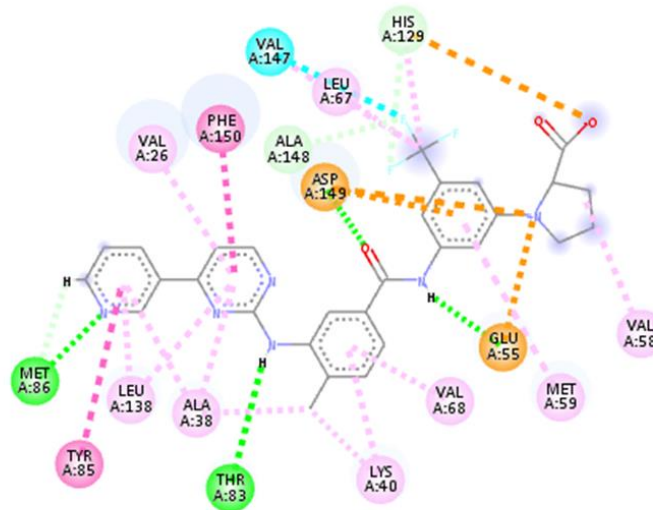
Σχήμα 3.20: Αλληλεπιδράσεις του Imatinib στο ενεργό κέντρο της SRC.



Σχήμα 3.21: Αλληλεπιδράσεις του **Nilotinib** στο ενεργό κέντρο της SRC.



Σχήμα 3.22: Αλληλεπιδράσεις του **Nil-01** στο ενεργό κέντρο της SRC.



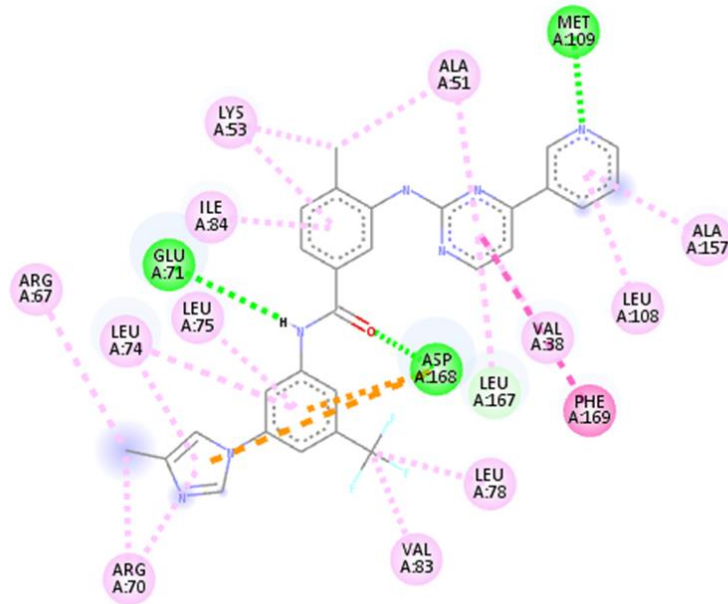
**Σχήμα 3.23:** Αλληλεπιδράσεις του **Nil-02** στο ενεργό κέντρο της SRC.

### 3.3.3 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της MAPK11

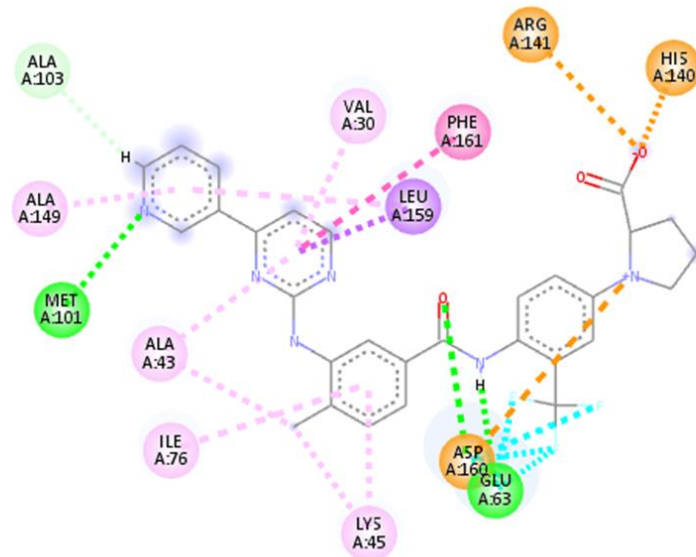
Η μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της MAPK11 αποκαλύπτει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις του μορίου στο ενεργό κέντρο της Abl1. Ωστόσο, απουσιάζει η αλληλεπίδραση του δεσμού υδρογόνου με κάποιο κατάλοιπο θρεονίνης. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης είναι οι δεσμοί υδρογόνου με το κατάλοιπο Met109 στο υδρόφοβο κανάλι της πρωτεΐνης καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με τα δομικά στοιχεία του αμιδίου και τα κατάλοιπα Glu71 και Asp168.

Η Νιλοτινίβη σχηματίζει πλήθος υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο της MAPK11 και το ίδιο μοτίβο δεσμών υδρογόνου. Παρατηρείται, επίσης, ότι η τριφθορομεθυλο ομάδα όπως και ο ιμιδαζολικός δακτύλιος συμμετέχουν στην ανασταλτική δράση του μορίου. Ο αναστολέας Nil-02 σχηματίζει επίσης τους ίδιους δεσμούς υδρογόνου, ωστόσο ο η αμινο-ομάδα και η καρβοξυλο-ομάδα της L-προλίνης αλληλεπιδρούν ισχυρά με κατάλοιπα ασπαρτικού, γλουταμινικού, ιστιδίνης και αργινίνης με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις. Η τριφθορομεθυλο-ομάδα σχηματίζει δεσμούς αλογόνου και δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Glu61 στη περίπτωση του αναλόγου Nil-01.

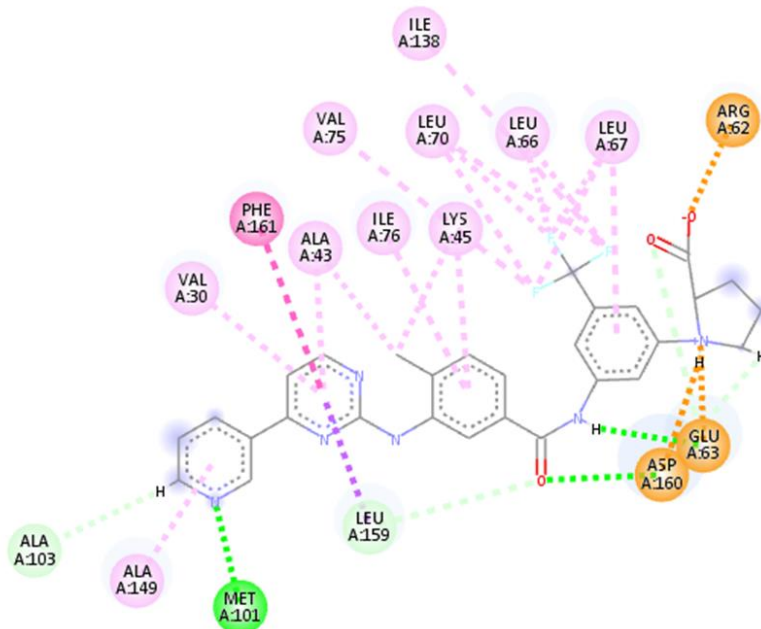




Σχήμα 3.24: Αλληλεπιδράσεις του **Nilotinib** στο ενεργό κέντρο του MAPK11.



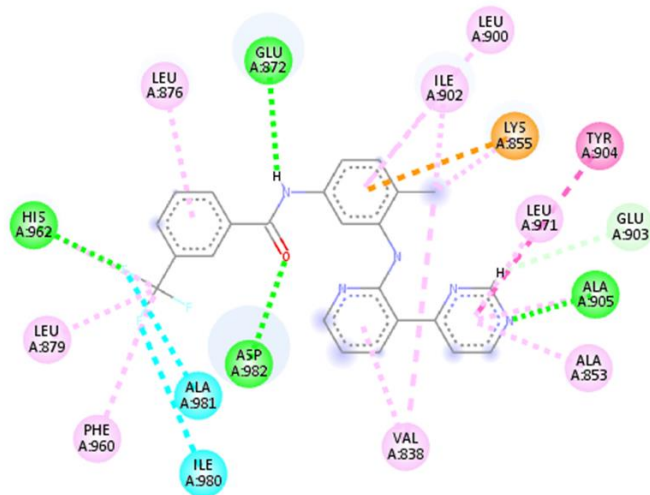
Σχήμα 3.25: Αλληλεπιδράσεις του **Nil-01** στο ενεργό κέντρο του MAPK11.



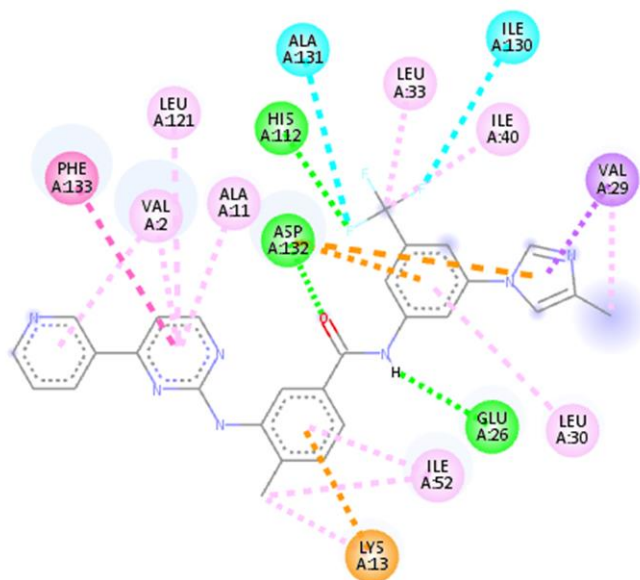
**Σχήμα 3.26:** Αλληλεπιδράσεις του **Nil-02** στο ενεργό κέντρο του MAPK11.

### 3.3.4 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της TEK

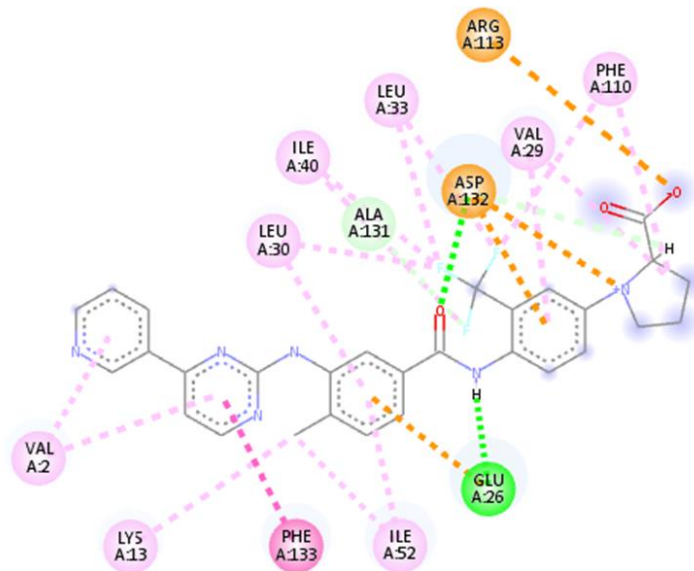
Η μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της TEK αποκαλύπτει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις του μορίου στο ενεργό κέντρο της Abl1. Ωστόσο, απουσιάζει η αλληλεπίδραση του δεσμού υδρογόνου με κάποιο κατάλοιπο θρεονίνης. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης είναι οι δεσμοί υδρογόνου με το κατάλοιπο Ala905 στο υδρόφοβο κανάλι της πρωτεΐνης, οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με τα δομικά στοιχεία του αμιδίου και τα κατάλοιπα Glu872 και Asp982, ενώ η τριφθορομεθυλο-ομάδα συμμετέχει στις περιπτώσεις των MuH, Nilotinib και Nil1 μέσω δεσμού υδρογόνου με το κατάλοιπο His962. Στην περίπτωση των τριών αναστολέων απουσιάζει ο δεσμός υδρογόνου με την Ala905, ωστόσο ο η αμινο-ομάδα και η καρβοξυλο-ομάδα της L-προλίνης αλληλεπιδρούν ισχυρά με κατάλοιπα ασπαρτικού, γλουταμινικού και αργινίνης με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις.



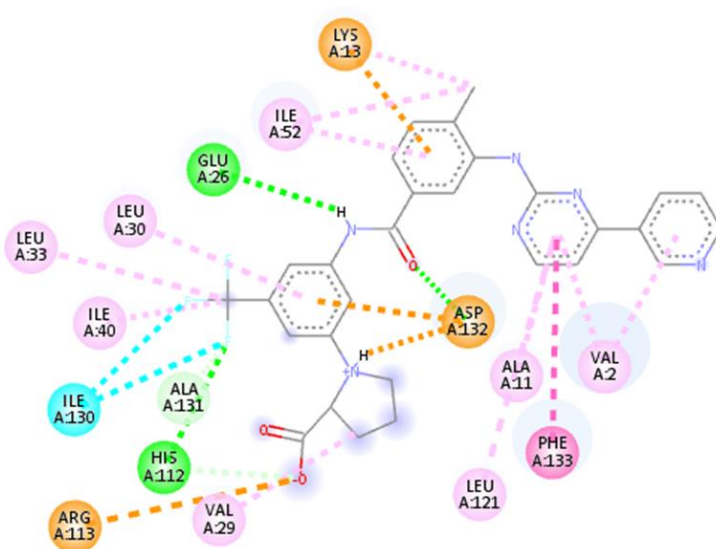
Σχήμα 3.27: Αλληλεπιδράσεις του αναστολέα Mdh στο ενεργό κέντρο της ΤΕΚ.



Σχήμα 3.28: Αλληλεπιδράσεις του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της ΤΕΚ.



Σχήμα 3.29: Αλληλεπιδράσεις του Nil-01 στο ενεργό κέντρο της ΤΕΚ.



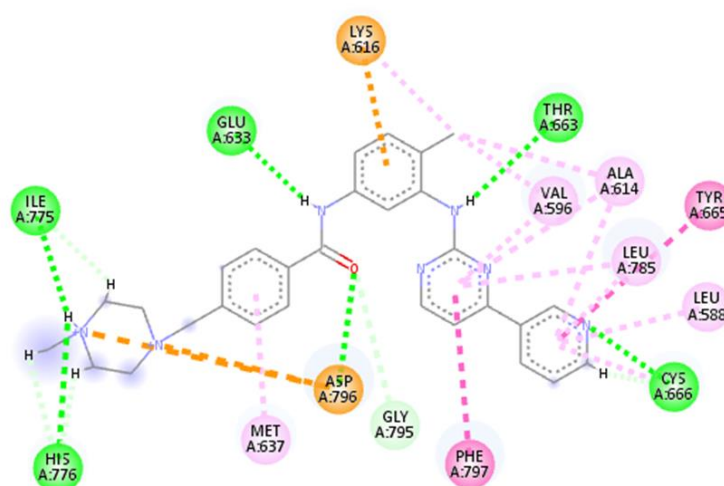
Σχήμα 3.30: Αλληλεπιδράσεις του Nil-02 στο ενεργό κέντρο της ΤΕΚ.

### 3.3.5 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο του CSF1R

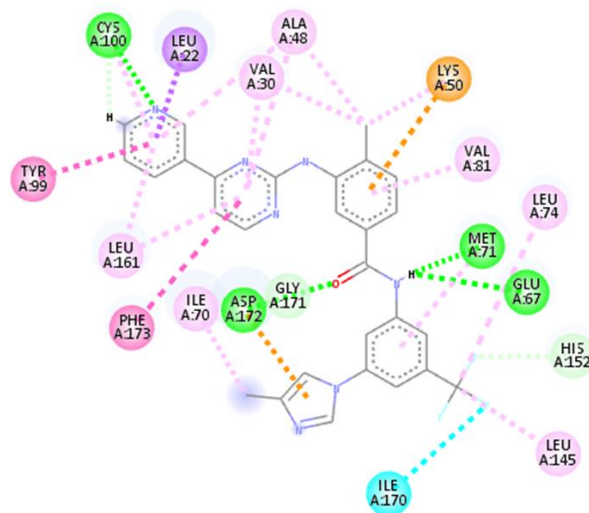
Η μοριακή μοντελοποίηση του Imatinib στο ενεργό κέντρο του CSF1R αποκαλύπτει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις του μορίου στο ενεργό κέντρο της Abl1. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης είναι οι δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Cys666 και Thr663 στο υδρόφοβο κανάλι της

πρωτεΐνης, οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με τα δομικά στοιχεία του αμιδίου και τα κατάλοιπα Glu663 και Asp796,. Στην περίπτωση του Imatinib σχηματίζονται δύο επιπλέον δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ile775 και His776 στον δακτύλιο της πιπεραζίνης, οποίος αλληλεπιδρά επίσης με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις με το κατάλοιπο Asp796.

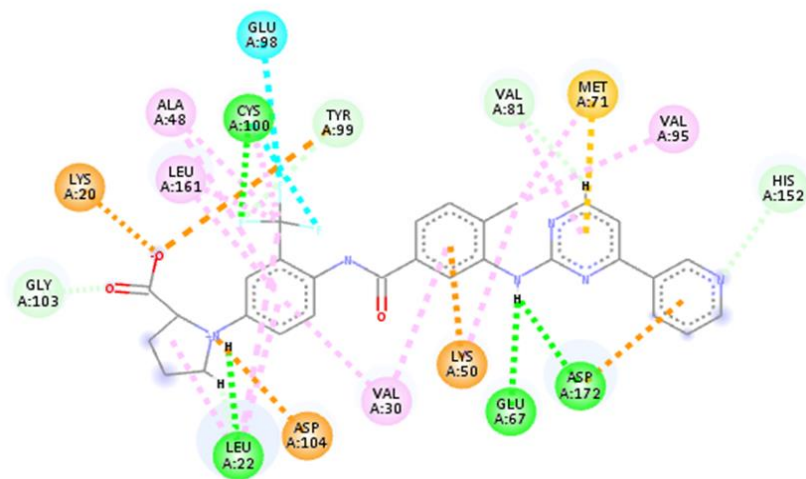
Στη περίπτωση των αναστολέων Nilotinib και Nil-02 απουσιάζει ο δεσμός υδρογόνου με την Thr663, ωστόσο εμφανίζεται αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου με το κατάλοιπο Met71. Η αμινο-ομάδα και η καρβοξυλο-ομάδα της L-προλίνης αλληλεπιδρούν ισχυρά με κατάλοιπα ασπαρτικού, γλουταμινικού και ιστιδίνης με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις. Ο αναστολέας Nil-01 προσανατολίζεται με αντίστροφη κατεύθυνση στο ενεργό κέντρο του CSF1R εκδηλώνοντας μη αναμενόμενες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα αυτά του ενεργού κέντρου.



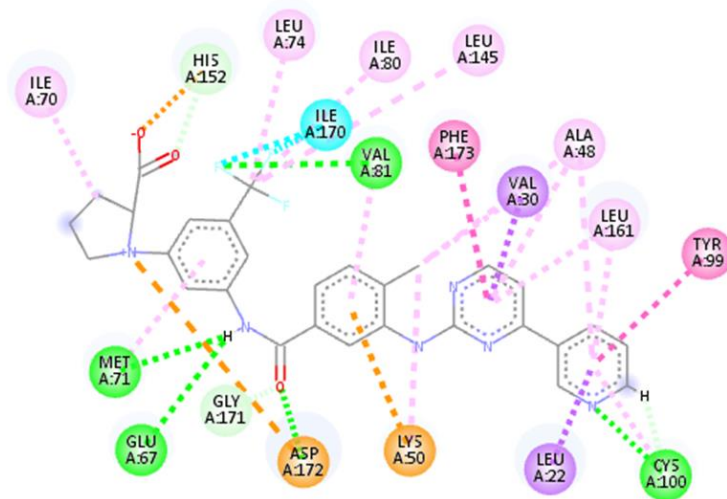
Σχήμα 3.31: Αλληλεπιδράσεις του Imatinib στο ενεργό κέντρο της CSF1R.



Σχήμα 3.32: Αλληλεπιδράσεις του **Nilotinib** στο ενεργό κέντρο της CSF1R.



Σχήμα 3.33: Αλληλεπιδράσεις του **Nil-01** στο ενεργό κέντρο της CSF1R.



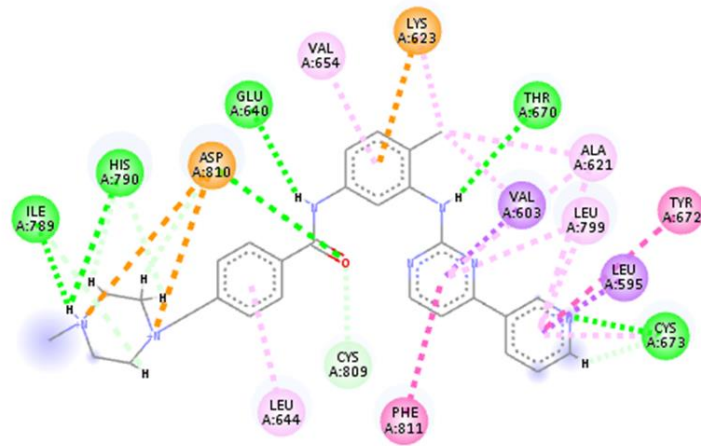
Σχήμα 3.34: Αλληλεπιδράσεις του Nil-02 στο ενεργό κέντρο της CSF1R.

### 3.3.6 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της c-KIT

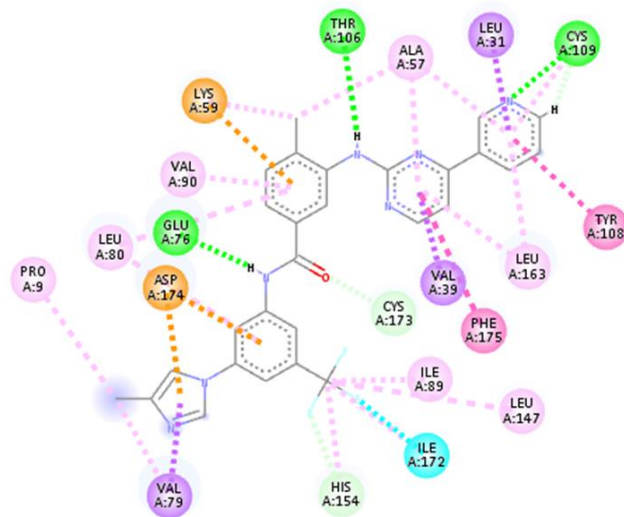
Η μοριακή μοντελοποίηση του Imatinib στο ενεργό κέντρο της KIT αποκαλύπτει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις του μορίου του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της Abl1. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης είναι οι δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Cys673 και Thr670 στο υδρόφοβο κανάλι της πρωτεΐνης, οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με τα δομικά στοιχεία του αμιδίου και τα κατάλοιπα Glu640 και Asp810. Στην περίπτωση του Imatinib σχηματίζονται δύο επιπλέον δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Ile789 και His790 στον δακτύλιο της πιπεραζίνης, οποίος αλληλεπιδρά επίσης με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις με το κατάλοιπο Asp810.

Στη περίπτωση του Nilotinib απουσιάζει ο δεσμός υδρογόνου με το κατάλοιπο Asp810, ενώ αντίθετα η αλληλεπίδραση αυτή υπάρχει στη περίπτωση του Nil-02. Η αμινο-ομάδα και η καρβοξυλο-ομάδα της L-προλίνης αλληλεπιδρούν ισχυρά με κατάλοιπα ασπαρτικού, γλουταμινικού και ιστιδίνης με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις. Ο αναστολέας Nil-01 εκδηλώνει λιγότερες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα αυτά του ενεργού κέντρου και πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι απουσιάζουν οι δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Glu640 και Thr670.

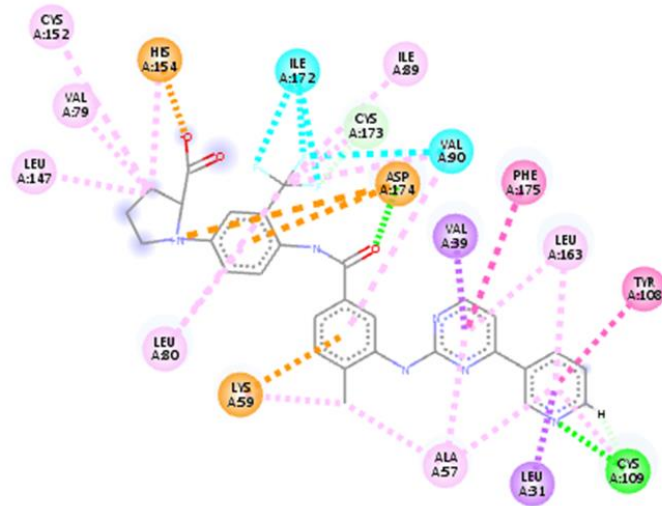




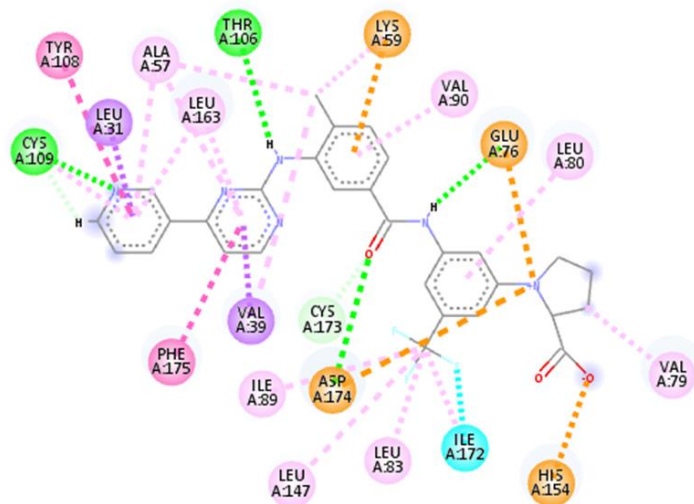
Σχήμα 3.35: Αλληλεπιδράσεις του **Imatinib** στο ενεργό κέντρο της KIT.



Σχήμα 3.36: Αλληλεπιδράσεις του **Nilotinib** στο ενεργό κέντρο της KIT.



Σχήμα 3.37: Αλληλεπιδράσεις του Nil-01 στο ενεργό κέντρο της KIT.



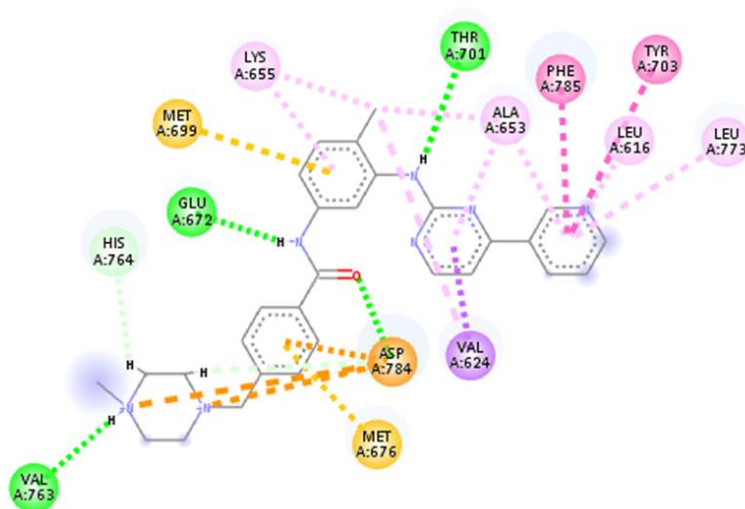
Σχήμα 3.38: Αλληλεπιδράσεις του Nil-02 στο ενεργό κέντρο της KIT.

### 3.3.7 Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων Nil-01 και Nil-02 στο ενεργό κέντρο της DDR1

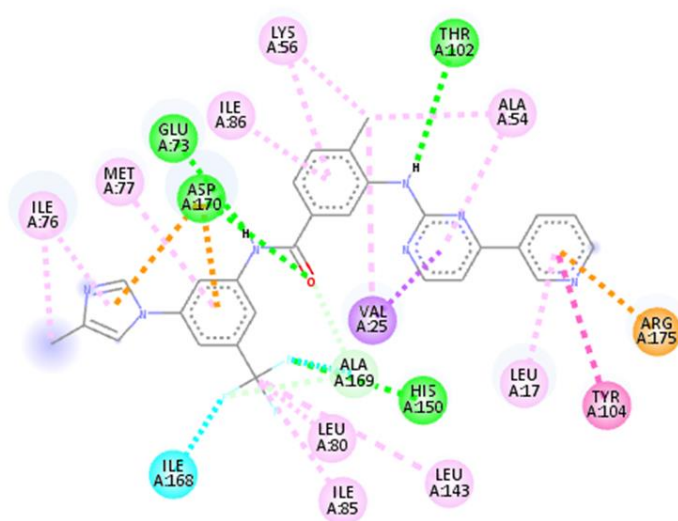
Η μοριακή μοντελοποίηση του Imatinib στο ενεργό κέντρο της DDR1 αποκαλύπτει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις του μορίου του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της Abl1. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις για την εκδήλωση ανασταλτικής δράσης είναι οι δεσμοί υδρογόνου με το κατάλοιπο Thr701 στο υδρόφοβο κανάλι της πρωτεΐνης, οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με τα δομικά στοιχεία του αμιδίου και τα κατάλοιπα Glu672 και Asp784. Στην περίπτωση του Imatinib σχηματίζεται ένας επιπλέον δεσμός υδρογόνου με το κατάλοιπο Val763 στον δακτύλιο της

πιπεραζίνης, ο οποίος αλληλεπιδρά επίσης με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις με το κατάλοιπο Asp784.

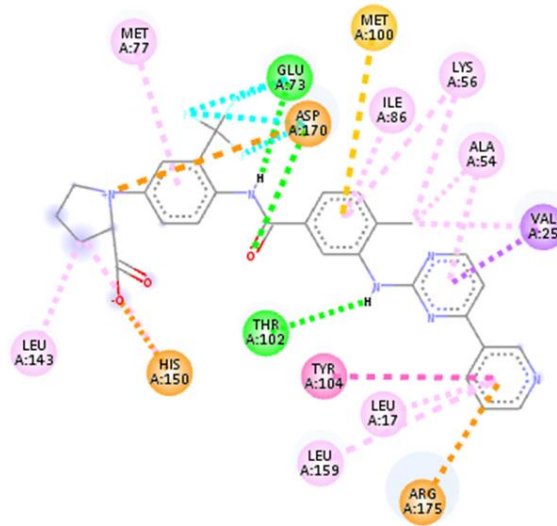
Στη περίπτωση του Nilotinib διατηρούνται οι αναμενόμενες αλληλεπιδράσεις, ενώ εμφανίζεται ένας επιπλέον δεσμός υδρογόνου με το κατάλοιπο His150. Αυτός ο δεσμός υδρογόνου απουσιάζει, ωστόσο, από τις δομές των Nil-01 και Nil-02. Η αμινο-ομάδα και η καρβοξυλο-ομάδα της L-προλίνης αλληλεπιδρούν ισχυρά με κατάλοιπα ασπαρτικού, γλουταμινικού και ιστιδίνης (His150) με ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις.



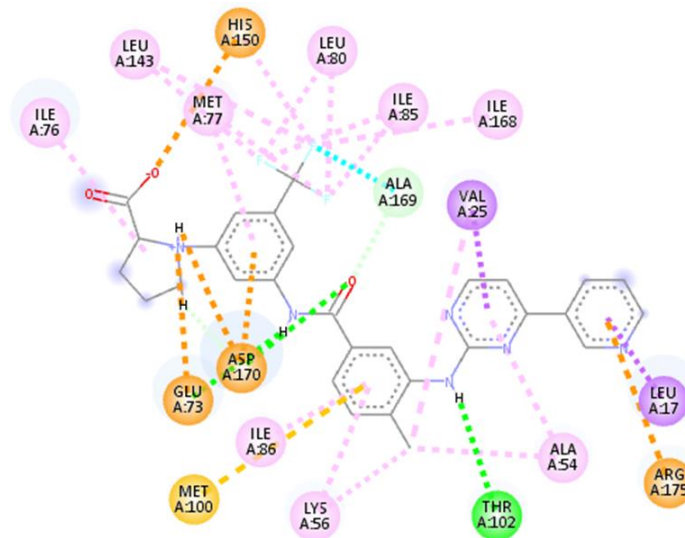
Σχήμα 3.39: Αλληλεπιδράσεις του **Imatinib** στο ενεργό κέντρο της DDR1.



Σχήμα 3.40: Αλληλεπιδράσεις του **Nilotinib** στο ενεργό κέντρο της DDR1.



Σχήμα 3.41: Αλληλεπιδράσεις του Nil-01 στο ενεργό κέντρο της DDR1.



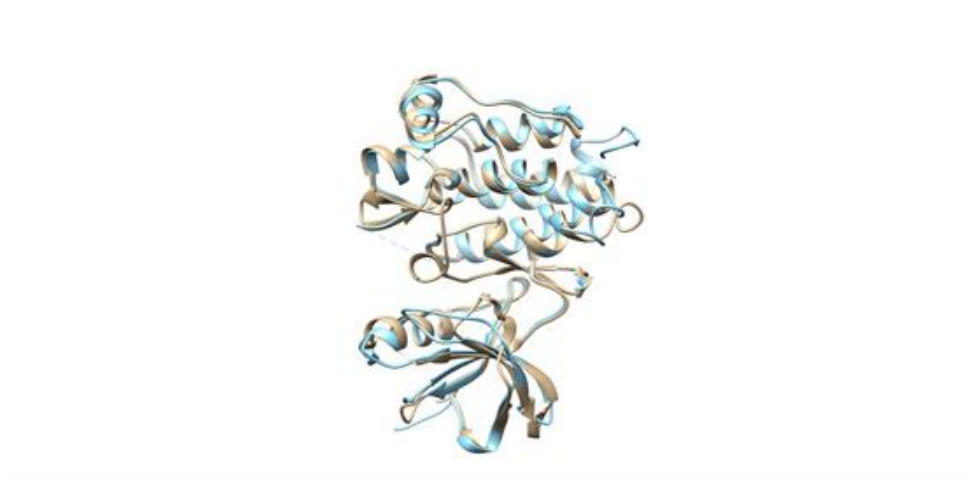
Σχήμα 3.42: Αλληλεπιδράσεις του Nil-02 στο ενεργό κέντρο της DDR1.

### 3.3.8 Δομική ομοιότητα της πρωτεϊνικής κινάσης Abl1 με τις δομές των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης

Με τη χρήση του προγράμματος Chimera 1.13.1rc λήφθηκαν οι δομές σύγκρισης της ομοιότητας των επτά πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης με τη πρωτεϊνική κινάση Abl1 (μόριο αναφοράς). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή εικόνων όπως φαίνεται παρακάτω και επιβεβαιώνουν την δομική ομοιότητα αυτών των πρωτεϊνικών κινασών.



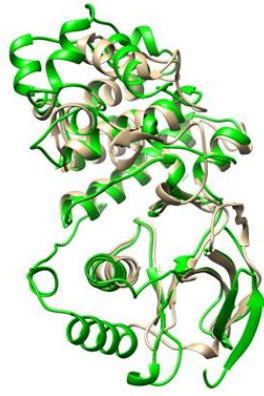
**Σχήμα 3.43:** Υπέρθωση των κινασών Abl1 (µπεζ) και CSF1R (κίτρινο), RMSD = 0.836 Å.



**Σχήμα 3.44:** Υπέρθωση των κινασών Abl1 (µπεζ) και c-SRC (µπλε), RMSD = 0.790 Å.



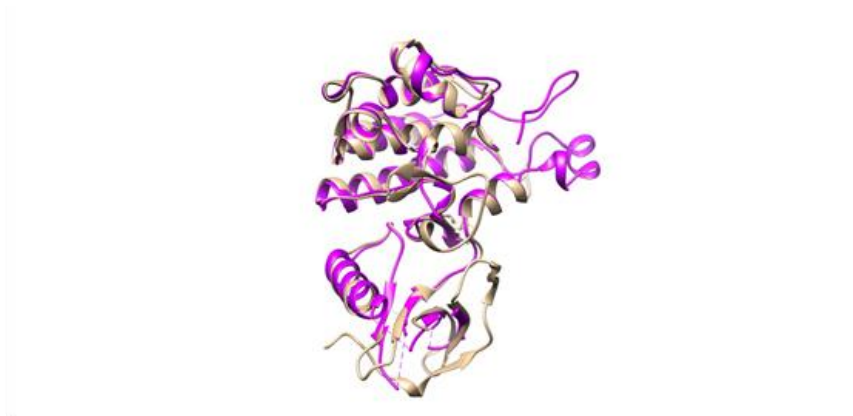
**Σχήμα 3.45:** Υπέρθωση των κινασών Abl1 (µπεζ) και c-KIT (πορτοκαλί), RMSD = 0.794 Å.



**Σχήμα 3.46:** Υπέρθεση των κινασών Abl1 (μπεζ) και MAPK11 (πράσινο), RMSD = 1.090 Å.



**Σχήμα 3.47:** Υπέρθεση των κινασών Abl1 (μπεζ) και PDGFRα (κόκκινο), RMSD = 0.790 Å.

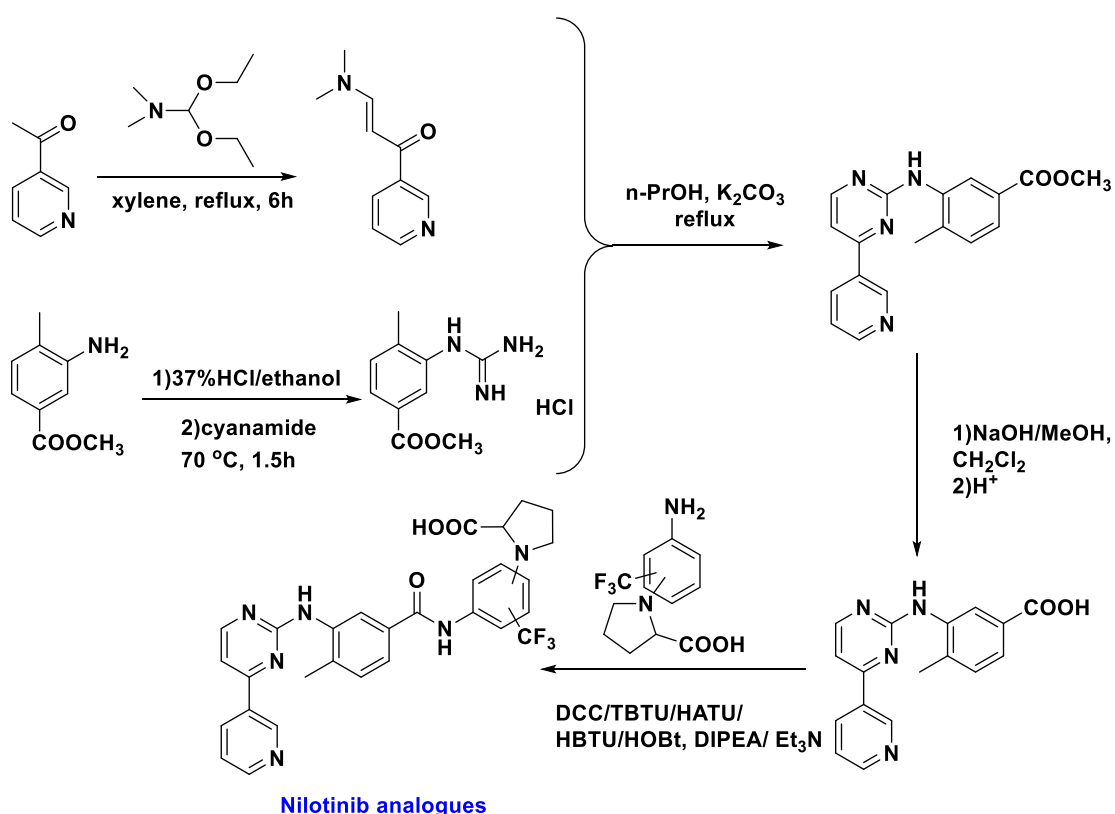


**Σχήμα 3.48:** Υπέρθεση των κινασών Abl1 (μπεζ) και TEK (μωβ), RMSD = 0.822 Å.

## A. Ανάλογα Nilotinib

### 3.3 Ολική πορεία σύνθεσης των νέων εν δυνάμει αναστολέων

Η σύνθεση των αναλόγων του Nilotinib έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο σύνθεσης πυριμιδινικών δακτυλίων, όπως έχει δημοσιευτεί από την ερευνητική μας ομάδα<sup>256</sup>. Η πορεία ξεκινάει με τη σύνθεση της επιθυμητής εναμινόνης, η οποία σχηματίζεται με επίδραση της N,N-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλης στην 3-ακετυλοπυριδίνη. Παράλληλα, πραγματοποιείται η σύνθεση μεθυλοφαινυλογουανιδίνης με τήξη του κυαναμιδίου και έπεται αντίδραση με τον μεθυλεστέρα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος. Ακολουθεί η αντίδραση κυκλοποίησης της εναμινόνης με τη μεθυλοφαινυλογουανιδίνη και βασική υδρόλυση του εστέρα, σε μη υδατικό περιβάλλον<sup>257</sup>. Τέλος, η σύζευξη του κυκλοποιημένου προϊόντος με υποκατεστημένες ανιλίνες (προσάρτηση του πενταμελούς δακτυλίου της προλίνης), με τη χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης, οδηγεί στα τελικά προϊόντα.



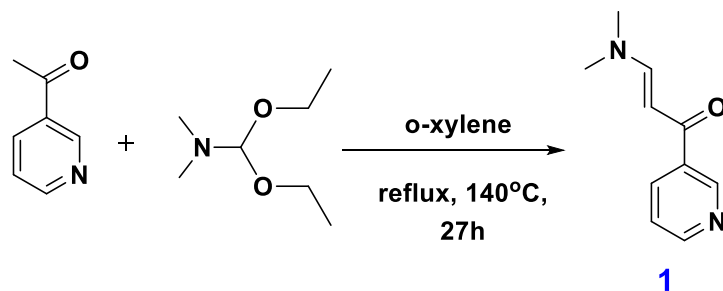
Σχήμα 3.49: Ολική πορεία σύνθεσης αναλόγων του Nilotinib.



### 3.4 Σύνθεση β-εναμινόνης

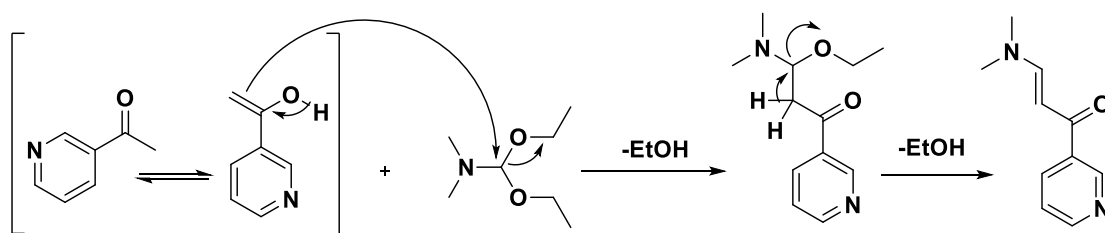
#### 3.4.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο) προπ-2-εν-1-όνης

Η αρχική αντίδραση σχηματισμού της β-εναμινόνης **1** είναι μια αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ της 3-ακετυλοπυριμιδίνης και της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλης σε διαλύτη ο-ξυλόλιο/ στο σ.ζ.



Σχήμα 3.50: Αντίδραση σύνθεσης της β-εναμινόνης.

Συγκεκριμένα η ταυτομερής ενολική μορφή της 3-ακετυλοπυριμιδίνης δρώντας ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλης με απόσπαση της μιας αιθοξυ-ομάδας. Σχηματίζεται, επομένως, μια ενδιάμεση ένωση από την οποία με απόσπαση ενός ακόμα μορίου αιθανόλης, προκύπτει η τελική σταθερή επιθυμητή (α,β-ακόρεστη καρβονυλική ένωση), η β-εναμινόνη.

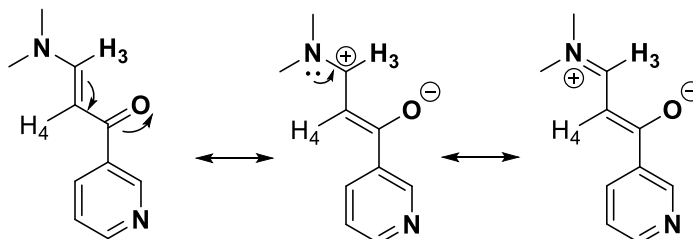


Σχήμα 3.51: Μηχανισμός σύνθεσης της β-εναμινόνης.

#### 3.4.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της β-εναμινόνης

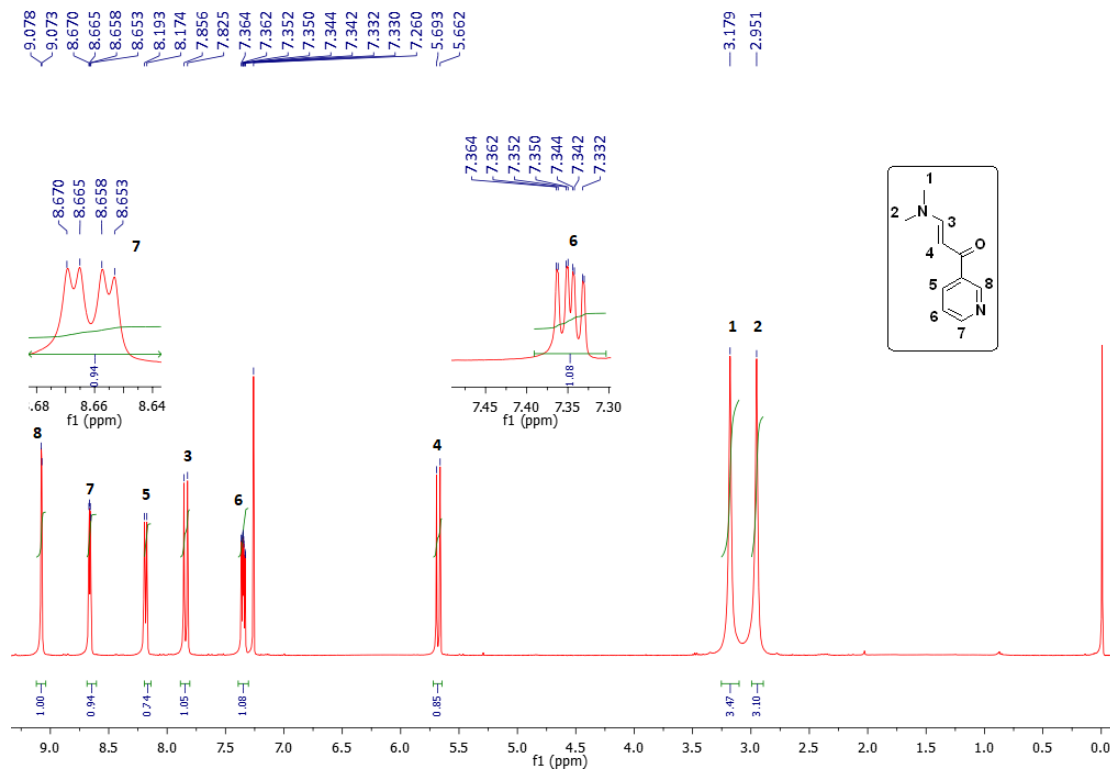
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της εναμινόνης **1** διακρίνουμε τα ολεφινικά πρωτόνια, δηλαδή τα δύο πρωτόνια του διπλού δεσμού στα 5.693 ppm ( $\text{H}_4$ ) και στα 7.856 ppm ( $\text{H}_3$ ). Το

πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 εμφανίζεται πιο αποπροστατεύμενο καθώς βρίσκεται σε β-θέση ως την καρβονυλική ομάδα. Ως εκ τούτου, όπως καταδεικνύεται και στις κάτωθι δομές συντονισμού, σε εκείνη τη θέση υπάρχει έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας (εμφάνιση θετικού φορτίου). Τα δύο σήματα εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης της τάξεως των 12.4 Hz.



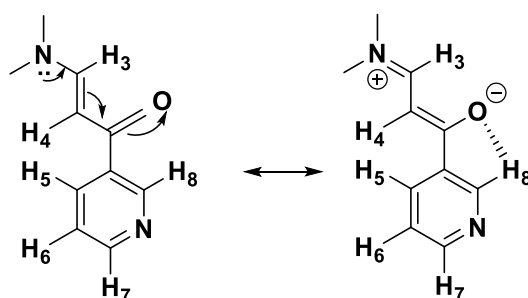
**Σχήμα 3.52:** Δομές συντονισμού που φανερώνουν την αποπροστασία του ολεφινικού πρωτονίου, σε β-θέση ως το καρβonyλίο.

Οι δύο μεθυλομάδες εμφανίζονται ως δύο διακριτές απλές κορυφές με ολοκλήρωση τρία στα 3.179 ppm και 2.951 ppm. Το γεγονός αυτό είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού περιβάλλοντος που αντιλαμβάνονται και συντονίζονται σε διαφορετικά πεδία, καθώς λόγω της εκδηλούμενης συζυγίας δεν υπάρχει ελεύθερη-γρήγορη περιστροφή γύρω από το δεσμό μεταξύ του αζώτου και του ολεφινικού άνθρακα, καθώς ο δεσμός N-C αποκτά φύση διπλού δεσμού.



**Σχήμα 3.53:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της  $\beta$ -εναμινόνης σε  $\text{CDCl}_3$  στα 400 MHz.

Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης είναι το  $\text{H}_8$ , καθώς είναι σε γειτονική θέση ως προς το N και επιπλέον υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού ενός ενδομοριακού ψευδο-δεσμού υδρογόνου, μεταξύ του πρωτονίου αυτού και του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων του οξυγόνου της καρβονυλικής ομάδας. Δίνει, λοιπόν, ένα σήμα με απλή σχάση στα 9.078 ppm.



**Σχήμα 3.54:** Ενδομοριακός ψευδο-δεσμός υδρογόνου που εξηγεί την αποπροστασία του  $\text{H}_8$ .

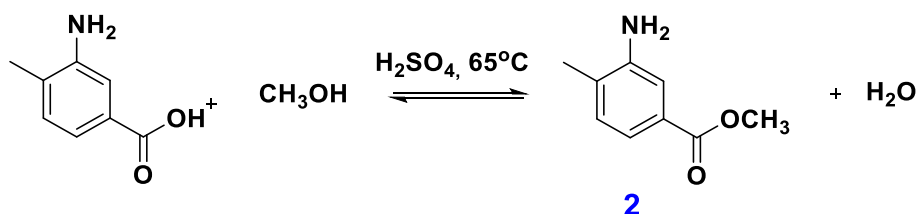
Εν συνεχεία, σε τιμές  $\delta=8.670$  ppm συντονίζεται το πρωτόνιο  $\text{H}_7$  καθώς γειτνιάζει και αυτό με το άτομο αζώτου του δακτυλίου. Πρόκειται για μια κορυφή με σχάση διπλή διπλής, αφού παρουσιάζει και σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης με τα

πρωτόνια H<sub>5</sub> και H<sub>8</sub> της τάξης των 4.8 Hz. Τέλος, το H<sub>5</sub> συντονίζεται στα 8.198 ppm και το H<sub>6</sub> στα 7.364 ppm, ως μια διπλή τριπλής σχάσης κορυφή με <sup>3</sup>J=7.6 Hz και <sup>4</sup>J=2 Hz και μια πολλαπλή κορυφή, αντίστοιχα.

### 3.5 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα

#### 3.5.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα

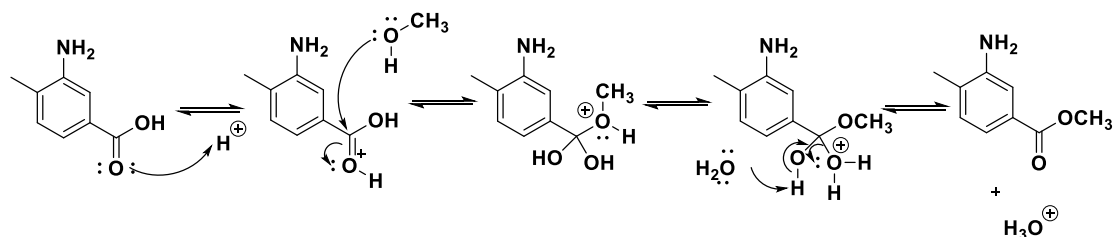
Πριν από τη σύνθεση του άλατος της γουανιδίνης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος, και τη μετέπειτα αντίδρασή της με την εναμινόνη, απαιτείται ένα στάδιο προστασίας του καρβοξυλικού οξέος, δηλαδή μετατροπή του σε εστέρα. Έτσι, το δεύτερο στάδιο της συνθετικής πορείας είναι η σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα που σχηματίζεται σε μια αντίδραση εστεροποίησης κατά **Fischer** με το αντίστοιχο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ με πυκνό θειικό οξύ σε απόλυτη μεθανόλη. Η μεθανόλη έχει διττό ρόλο, δρα, δηλαδή, ως διαλύτης και ως αντιδραστήριο, ενώ το θειικό οξύ δρα καταλυτικά. Με τη μέθοδο αυτή, η απόδοση της αντίδρασης είναι περίπου 70%.



**Σχήμα 3.55:** Αντίδραση σχηματισμού του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.

Η εστεροποίηση κατά **Fischer** αποτελεί μια αντίδραση πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης ενός καρβοξυλικού οξέος, που καταλύεται από οξέα. Το καρβονυλικό οξυγόνο είναι δυνατό να πρωτονιωθεί από τις όξινες συνθήκες που επικρατούν στην αντίδραση. Τώρα ο ηλεκτρονιόφιλος άνθρακας της καρβονυλικής ομάδας αντιλαμβάνεται μεγαλύτερη έλλειψη ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου είναι περισσότερο ευάλωτος σε ακυλο-υποκαταστάσεις. Με την προσβολή του άνθρακα αυτού από ένα μόριο μεθανόλης, έχουμε το σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Με την αποπρωτονίωση του μορίου της μεθανόλης και την

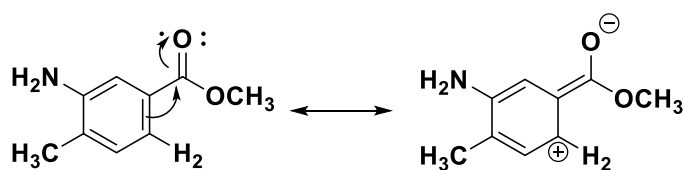
πρωτονίωση ενός από τα υδροξύλια της πρώην καρβοξυλικής ομάδας, έχουμε ουσιαστικά τη μετατροπή μιας κακής αποχωρούσας ομάδας (-OH) σε μια καλή αποχωρούσα ομάδα (-<sup>+</sup>OH<sub>2</sub>). Με απόσπαση ενός πρωτονίου προκύπτει ο επιθυμητός μεθυλεστέρας και αναγεννάται ο όξινος καταλύτης.



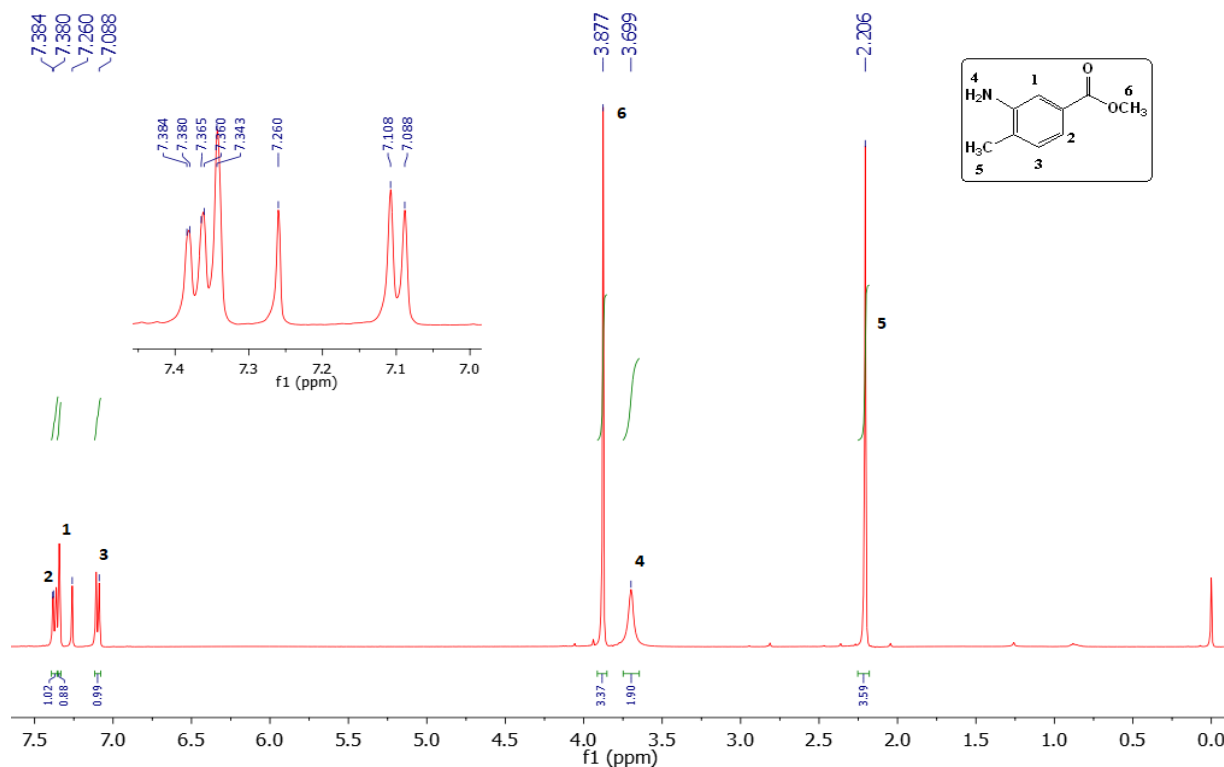
**Σχήμα 3.56:** Μηχανισμός εστεροποίησης κατά Fischer. Η αντίδραση είναι μια όξινα καταλυόμενη ακυλο-υποκατάσταση ενός καρβοξυλικού οξέος.

### 3.5.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του εστέρα παρατηρούμε ότι το πρωτόνιο που εντοπίζεται σε χαμηλότερα πεδία, δηλαδή σε υψηλότερες τιμές δ, είναι το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 (H<sub>2</sub>). Αυτό συμβαίνει λόγω της εκδήλωσης του αρνητικού συζυγιακού φαινομένου της εστερικής ομάδας που βρίσκεται στη γειτονική θέση και έλκει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα προς το μέρος της (παρακάτω σχήμα), δημιουργώντας ένα θετικό μερικό φορτίο στο άτομο άνθρακα που συνδέεται εκεί. Η κορυφή παρουσιάζει διπλή σχάση, εφόσον έχει ένα γειτονικό υδρογόνο και συντονίζεται στα 7.384 ppm με σταθερά σύζευξης της τάξεως των 8 Hz.



**Σχήμα 3.57:** Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία του H<sub>2</sub>.



**Σχήμα 3.58:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα σε CDCl<sub>3</sub> στα 400 MHz.

Στα 7.343 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 (H<sub>1</sub>), ως μια απλή κορυφή αφού δεν έχει κάποιο γειτονικό πρωτόνιο. Η σχετική αποπροστασία του οφείλεται στο γεγονός ότι βρίσκεται δίπλα σε απενεργοποιητή, ο οποίος έλκει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα προς το μέρος, όπως εξηγήθηκε παραπάνω. Ωστόσο, από την άλλη, δέχεται το θετικό συζυγιακό φαινόμενο που εκδηλώνει η NH<sub>2</sub>-ομάδα, που ως ενεργοποιητής δημιουργεί ένα αρνητικό φορτίο στις ορθο και παρα ως προς αυτήν.

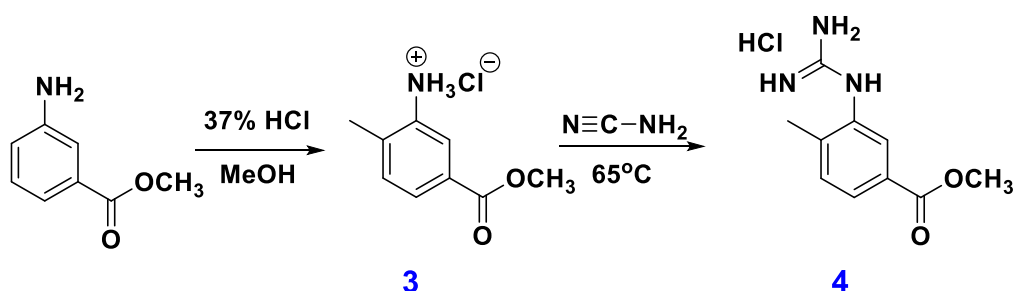
Το διπλό σήμα στα 7.108 ppm οφείλεται στο πρωτόνιο 3 (H<sub>3</sub>). Το πρωτόνιο αυτό προστατεύεται σχετικά, καθώς γεινιάζει με μια μεθυλομάδα που του παρέχει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω του θετικού επαγωγικού φαινομένου που εκδηλώνει. Το H<sub>3</sub> παρουσιάζει σταθερά σύζευξης με το H<sub>2</sub> της τάξεως <sup>3</sup>J = 8 Hz.

Οι δύο μεθυλ-ομάδες συντονίζονται σε δύο διακριτά απλά σήματα, καθώς η μία είναι μεθοξυ- (CH<sub>3</sub>O-) και η άλλη μεθυλο- (CH<sub>3</sub>-) στα 3.877 ppm και 2.206 ppm, αντίστοιχα. Τα H της NH<sub>2</sub>-ομάδας συντονίζονται, τέλος, σε μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση δύο στα 3.699 ppm.

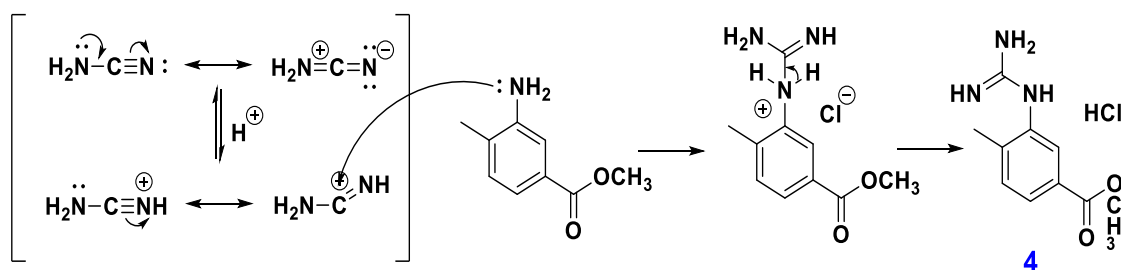
### 3.6 Σύνθεση της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης

#### 3.6.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης

Κατά τη συγκεκριμένη αντίδραση το υποκατεστημένο άλας της ανιλίνης, δηλαδή το υδροχλωρικό άλας του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλέστερα, αντιδρά με το κυαναμίδιο, το οποίο έχει διττό ρόλο, λειτουργεί ως αντιδραστήριο και ως διαλύτης στη θερμοκρασία της αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 65 °C, όπου τήκεται το κυαναμίδιο και η απόδοσή της ανέρχεται στο 90 %. Παρακάτω παρατίθεται η αντίδραση και ο μηχανισμός της.



Σχήμα 3.59: Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης.



Σχήμα 3.60: Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης.

### 3.7 Σύνθεση της φαινυλαμινοπυριμιδίνης

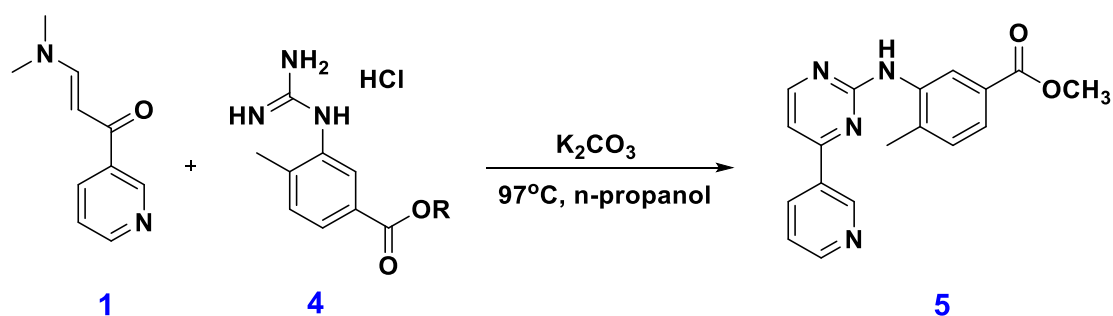
Η σύνθεση της φαινυλαμινοπυριμιδίνης αποτελεί διαδικασία τριών σταδίων, όπου το πρώτο στάδιο είναι η σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ακολουθούμενη από την σύνθεση της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης. Τελευταία στη διαδοχή των αντιδράσεων



βρίσκεται μια αντίδραση κυκλοποίησης, η οποία λαμβάνει χώρα μεταξύ της φαινυλογουανιδίνης και της εναμιμόνης.

### 3.7.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του αντίστοιχου υποκατεστημένου μεθυλεστέρα βενζοϊκού οξέος

Η κυκλοποίηση της εναμιμόνης με την υποκατεστημένη φαινυλογουανιδίνη, αποτελεί την κύρια αντίδραση κατά την ανάπτυξη αναστολέων. Αυτό γιατί με την αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός του πυριμιδινικού δακτυλίου, που αποτελεί το δομικό συστατικό αναστολέων, όπως η Ιματινίβη και η Νιλοτινίβη. Ακόμη, ο πυριμιδινικός δακτύλιος παίζει σημαντικότερο ρόλο στην πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο της κινάσης στόχου, αφού είναι αυτός που καταλαμβάνει τη θέση του ATP στο ενεργό κέντρο.

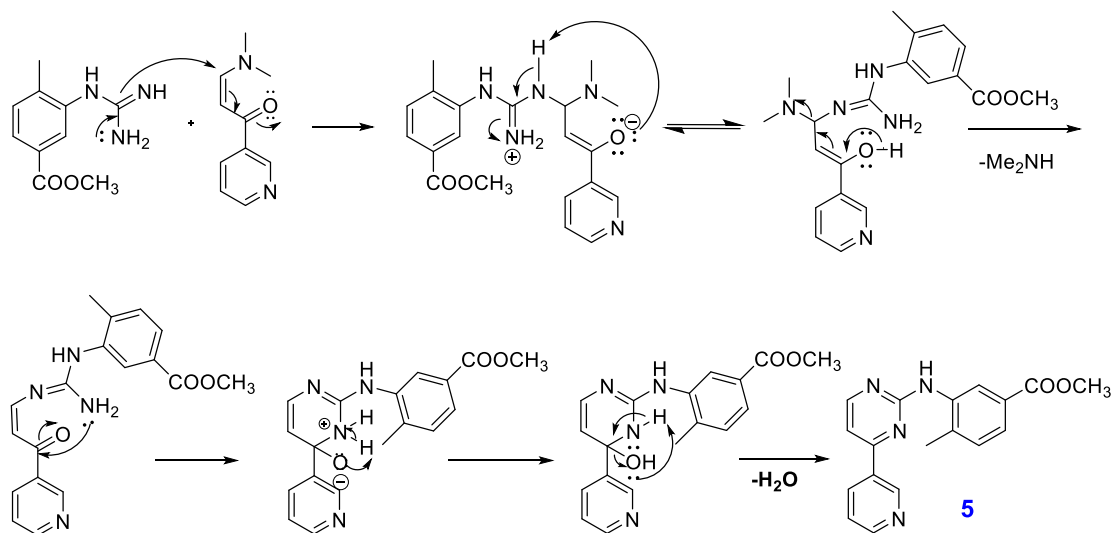


Σχήμα 3.61: Αντίδραση σχηματισμού της N-υποκατεστημένης πυριμιδίνης.

Όπως φαίνεται από την αντίδραση, η εναμιμόνη αντιδρά με το υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης σε βασικές συνθήκες υπό θέρμανση σε διαλύτη *n*-προπανόλη. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε το ανθρακικό κάλιο, καθώς εξουδετερώνει το υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης. Με αυτή τη βάση, ελαχιστοποιείται ο σχηματισμός παραπροϊόντων, λόγω μη επιθυμητών πυρηνόφιλων αρωματικών υποκαταστάσεων, καθώς και πιθανών άλλων αντιδράσεων, ως συνέπεια της αποπρωτονίωσης του σχετικά όξινου αμινικού πρωτονίου.

Αρχικά, η γουανιδίνη με πυρηνόφιλη προσθήκη προσβάλλει το  $\alpha,\beta$ -ακόρεστο τμήμα της  $\beta$ -εναμιμόνης και σχηματίζει ένα ενδιάμεσο, που στη συνέχεια, με απόσπαση

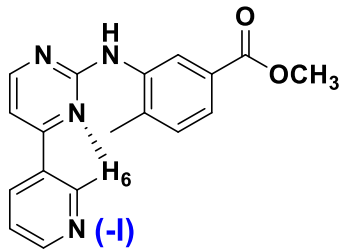
ενός μορίου διμεθυλαμίνης και μέσω μιας δεύτερης πυρηνόφιλης προσβολής μιας αμινομάδας της γουανιδίνης στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου, σχηματίζεται ο δακτύλιος. Εν συνεχεία, με απώλεια ενός μορίου ύδατος, προκύπτει το τελικό προϊόν, ένας σταθερός ετερο-αρωματικός δακτύλιος, ο πυριμιδινικός. Ο μηχανισμός σύνθεσης του εστέρα **5**.



**Σχήμα 3.62:** Μηχανισμός της αντίδρασης κυκλοποίησης.

### 3.7.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **5**

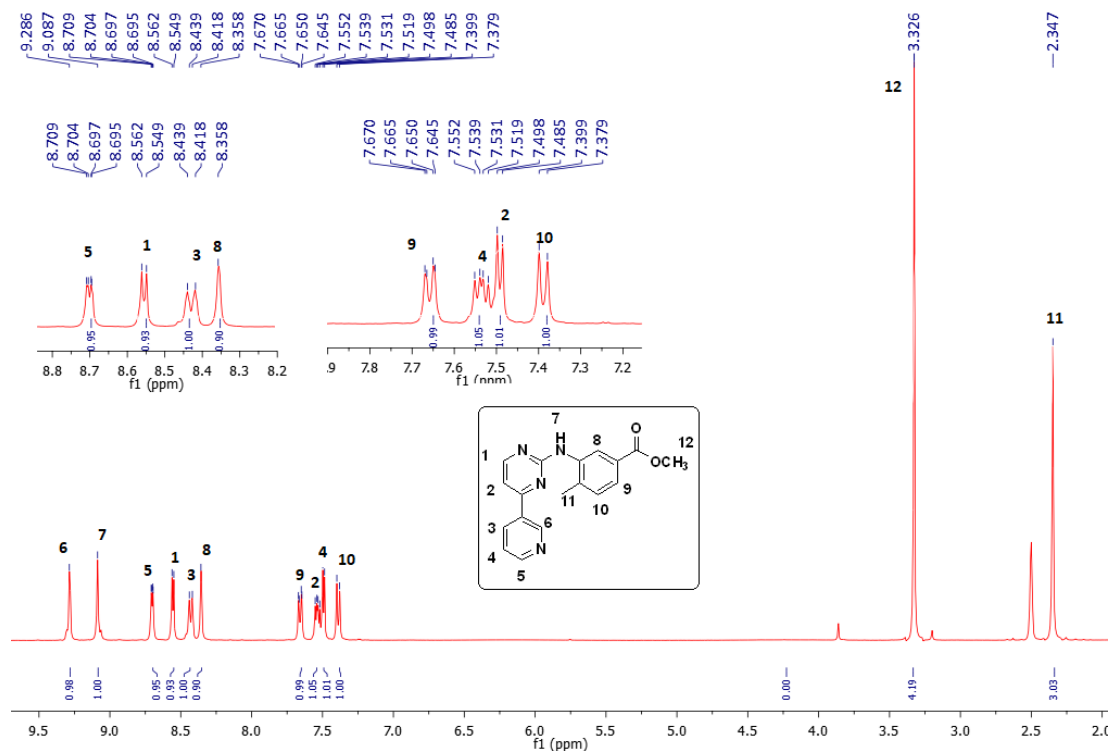
Από το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός του πυριδινικού δακτυλίου, καθώς παρατηρούνται όλες οι αναμενόμενες κορυφές. Αξίζει, εδώ, να σημειωθεί ότι η τιμή της σταθεράς σύζευξης  $^3J$  σε ετερο-αρωματικούς δακτυλίους μειώνεται σε σχέση με απλούς αρωματικούς δακτυλίους. Ειδικότερα, τα πρωτόνια του νέου, πυριδινικού δακτυλίου συντονίζονται ως δύο απλές κορυφές στα 8.562 ppm το  $\text{H}_1$  και στα 7.498 ppm το  $\text{H}_2$ , με σταθερά σύζευξης, ίδια, εφόσον συσχετίζονται στα 5.1 Hz. Η σχετική αποπροστασία του  $\text{H}_1$ , σε σχέση με το  $\text{H}_2$ , οφείλεται στην ύπαρξη του ηλεκτραρνητικού ατόμου N, που βρίσκεται σε γειτονική θέση με το  $\text{H}_1$ . Το σήμα που λαμβάνεται σε χαμηλότερες τιμές πεδίων, είναι αυτό που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο  $\text{H}_6$ . Το εν λόγω πρωτόνιο εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή στα 9.286 ppm, καθώς υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού ενός ψευδοδεσμού υδρογόνου με το ένα άτομο αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Ακόμη, αντιλαμβάνεται περαιτέρω έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας λόγω της γειτνίασης με ένα άτομο N.



**Σχήμα 3.63:** Εξήγηση αποπροστασίας του H<sub>6</sub>, λόγω σχηματισμού ψευδο-δεσμού υδρογόνου και λόγω εκδήλωσης του (-I) από το γειτονικό άτομο αζώτου.

Είναι, ακόμη, γνωστό ότι τα αμινικά πρωτόνια εμφανίζουν χημικές μετατοπίσεις, οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με το διαλύτη, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση. Έτσι, το αμινικό πρωτόνιο της δευτεροταγούς αμίνης συντονίζεται στα 9.087 ppm ως μια απλή κορυφή. Η σχετική αποπροστασία του πρωτονίου H<sub>7</sub> αιτιολογείται από την ύπαρξη δύο ατόμων αζώτου, που έλκουν την ηλεκτρονική πυκνότητα προς το μέρος τους. Παράλληλα, αντιλαμβάνεται περισσότερη έλλειψη ηλεκτρονίων λόγω διαμοριακών δεσμών υδρογόνου που μπορεί να σχηματίσει με μόρια του διαλύτη.

Η μεθοξυ-ομάδα και η μεθυλομάδα λαμβάνονται ως αναμένεται, ως δύο απλές κορυφές στα 2.347 ppm και 3.326 ppm για τα H<sub>11</sub> και H<sub>12</sub>, αντίστοιχα. Τα H<sub>12</sub> εμφανίζονται πιο αποπραστευμένα καθώς βρίσκονται σπνδεδεμένα πάνω σε ετεροάτομο, αντιλαμβανόμενα μειωμένη ηλεκτρονική πυκνότητα.



**Σχήμα 3.64:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος σε DMSO στα 400MHz.

Η μοναδική απλή κορυφή που λαμβάνουμε στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων αντιστοιχεί στο πρωτόνιο υπ' αριθμόν 8 (H<sub>8</sub>) του βενζολικού δακτυλίου. Το συγκεκριμένο πρωτόνιο βρίσκεται μεταξύ της αμινικής ομάδας και της καρβονυλομάδας του βενζοϊκού μεθυλεστέρα, δύο ισχυρών δεκτών ηλεκτρονίων. Ως εκ τούτου, παρέχει ένα σήμα σε αρκετά χαμηλά πεδία, ειδικότερα στα 8.358 ppm, αφού η μόνη δυνατότητα που υπάρχει ούτως ώστε να ανιληφθεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα το εν λόγω πρωτόνιο, είναι μέσω της εκδήλωσης του θετικού συζυγιακού φαινομένου από το άτομο αζώτου της δευτεροταγούς αμίνης. Ωστόσο το φαινόμενο αυτό προσανατολίζεται ως επί το πλείστον προς τον πυριμιδινικό δακτύλιο, ο οποίος είναι δακτύλιος έλλειψης ηλεκτρονίων.

Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5 (H<sub>5</sub>) συντονίζεται στα 8.709 ppm ως μια διπλή-διπλής κορυφή, αφού σε μονοπάτι τριών δεσμών συσχετίζεται με το H<sub>4</sub>, ενώ σε μονοπάτι τεσσάρων δεσμών μπορεί και συσχετίζεται με το H<sub>6</sub>. Ως εκ τούτου, εμφανίζει και τις αντίστοιχες τιμές σταθερών σύζευξης, 4.7 και 1.8 Hz.

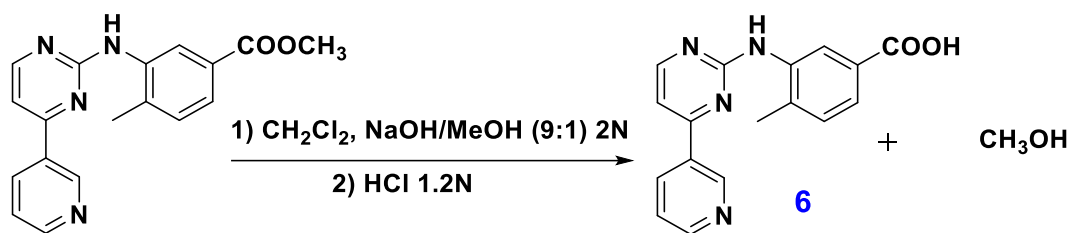
Μια πολύ χαρακτηριστική σχάση, διπλή της τριπλής (dt) στα 8.414-8.444 ppm, παρουσιάζει το πρωτόνιο H<sub>3</sub>. Το σήμα του πρωτονίου σχάζεται κατ' αυτόν τον τρόπο, καθώς σε μονοπάτι τριών δεσμών αντιλαμβάνεται ένα γειτονικό πρωτόνιο, ενώ σε δύο διακριτά μονοπάτια τεσσάρων δεσμών αντιλαμβάνεται άλλα δύο πρωτόνια. Οι σταθερές σύζευξης που παρουσιάζει το πρωτόνιο είναι 8.0 και 2.0 Hz, αντίστοιχα.

Το H<sub>10</sub> συντονίζεται, ως μια διπλή κορυφή, εφόσον αντιλαμβάνεται ένα μοναδικό γειτονικό πρωτόνιο, στα 7.399 ppm με σταθερά σύζευξης 7.9 Hz. Τη σχετική του προστασία, του την παρέχει η μεθυλομάδα που βρίσκεται σε γειτονικό άνθρακα, και μέσω της εκδήλωσης του θετικού επαγωγικού της φαινομένου, του προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα.

### **3.8 Υδρόλυση του εστέρα προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ**

#### **3.8.1 Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος**

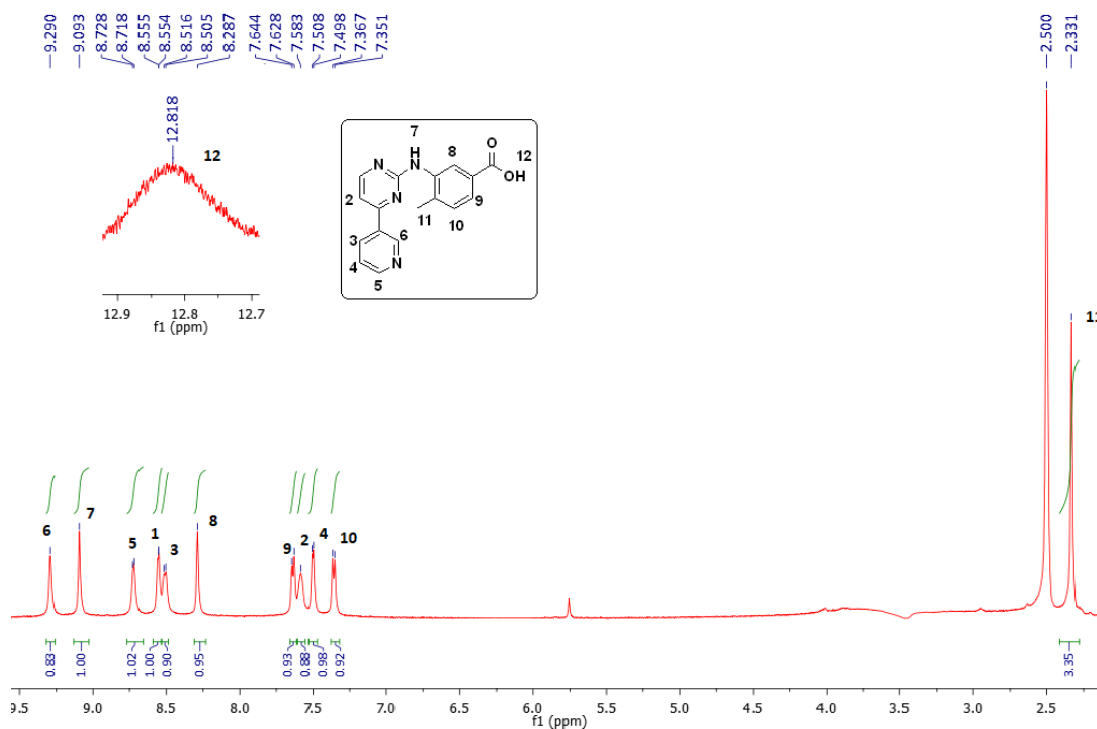
Μετά την αντίδραση της κυκλοποίησης και την απομόνωση καθαρού προϊόντος, ακολουθεί η αποπροστασία του -COOH με βασική υδρόλυση του μεθυλεστέρα προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε μη υδατικό περιβάλλον, συγκεκριμένα με μεθανολικό διάλυμα καυστικού νατρίου (2N) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, σε αναλογία MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:9. Χρησιμοποιήθηκαν ήπιες βασικές συνθήκες, καθώς τυχόν αποπρωτονίωση του αμινικού πρωτονίου θα ήταν μη επιθυμητή και θα οδηγούσε σε πλήθος παραπροϊόντων. Αφήνεται 1 ημέρα σε θερμοκρασία δωματίου και μετά θερμαίνεται ήπια στο σημείο ζέσεως του διαλύτη (40 °C) για να ολοκληρωθεί η αντίδραση ποσοτικά προς την κατεύθυνση σχηματισμού του προϊόντος υδρόλυσης. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται, προστίθεται περίσσεια ύδατος και ακολουθεί οξύνιση με 1,2 N HCl και εκχύλιση αυτού με AcOEt, καθώς το προϊόν βρισκόταν υπό τη μορφή μετά νατρίου άλατος, ενώ απαιτείται για τις επόμενες αντιδράσεις η παραλαβή του ως οξύ. Η απόδοση της αντίδρασης είναι ποσοτική ~100%, ενώ το προϊόν απομονώνεται ως έντονο κίτρινο στερεό μετά από τη διήθηση, έκπλυση με διαιθυλαιθέρα και ξήρανση σε ξηραντήρα κενού με τη χρήση P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.



**Σχήμα 3.65:** Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του μεθυλεστέρα προς το αντίστοιχο οξύ.

### 3.8.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέος

Τα πρωτόνια που εμφανίζονται στο πρωτονιακό φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του οξέος είναι κατ' αναλογία με τα πρωτόνια του προϊόντος κυκλοποίησης (του μεθυλεστέρα). Ειδικότερα τα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων καταγράφονται, ως αναμένεται, σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας τις σχέσεις τους σε ισοδυναμία με τα πρωτόνια του αντίστοιχου μεθυλεστέρα. Η μόνη διαφοροποίηση που υπάρχει είναι ότι λόγω της υδρόλυσης που υπέστη ο μεθυλεστέρας, στο νέο φάσμα του οξέος απουσιάζει η κορυφή που αντιστοιχούσε στην  $\text{CH}_3\text{O}$ -ομάδα. Αντ' αυτής στο φάσμα του οξέος παρατηρούμε με ευρεία κορυφή στα 12.8 ppm, χαρακτηριστική των καρβοξυλικών πρωτονίων ( $-\text{COOH}$ ).



**Σχήμα 3.66:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέος σε DMSO στα 500 MHz.

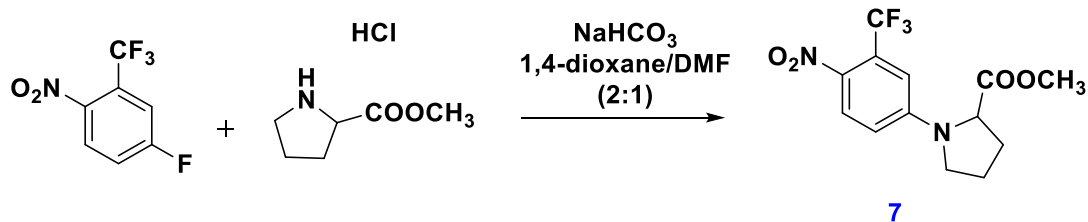
## A1. Σύνθεση αναλόγου Nil-01

### 3.9 Σύνθεση του μεθυλεστέρα της *N*-{(4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο)}-*L*-προλίνης

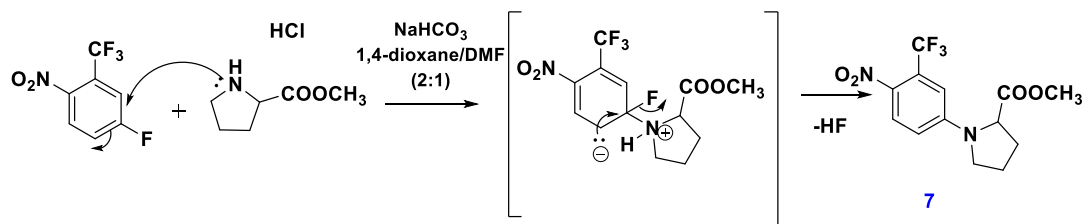
#### 3.9.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλ (4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού

Σε αυτό το τμήμα της συγκλίνουσας πορείας για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού, λαμβάνει, αρχικά, χώρα μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με μηχανισμό προσθήκης/απόσπασης, μέσω σχηματισμού ενός ενδιάμεσου Meisenheimer ανιονικής φύσης. Στο μηχανισμό αυτό η νέα ομάδα, δηλαδή ο μεθυλεστέρας της *L*-προλίνης προσβάλλει με το >NH της προλίνης τη θέση που πριν κατείχε το άτομο φθορίου. Επί πλέον, ευνοείται ο μηχανισμός αυτός γιατί σε πάρα θέση ως προς την αποχωρούσα ομάδα (άτομο φθορίου) υπάρχει ένας υποκαταστάτης ( $-\text{NO}_2$ ) που έλκει ισχυρά ηλεκτρόνια τόσο μέσω συζυγιακού φαινομένου, αλλά και μέσω επαγωγικού φαινομένου.





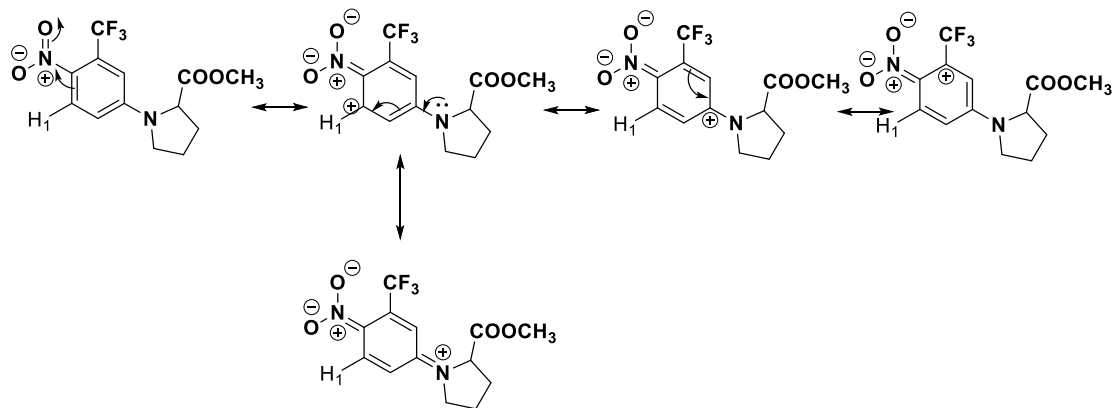
**Σχήμα 3.67** : Αντίδραση σχηματισμού του μεθυλεστέρα της N-((4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.



**Σχήμα 3.68**: Μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλεστέρα της N-((4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης.

### 3.9.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεθυλεστέρα της N-((4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης

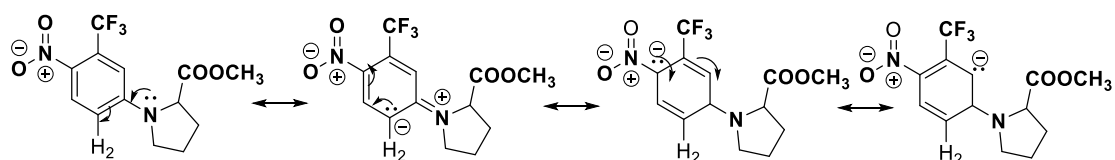
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του εστέρα **7** παρατηρούμε ότι σε χαμηλότερα πεδία, συντονίζονται τα αρωματικά πρωτόνια. Ως πιο αποπροστατευμένο εμφανίζεται το  $\text{H}_1$  που σχάζεται σε μια διπλή κορυφή στα 8.116 ppm με μια σταθερά σύζευξης  $^3J=9$  Hz. Το πρωτόνιο αυτό είναι το πλέον αποπροστατευμένο καθώς βρίσκεται σε ορθο-θέση ως προς τη νιτρο-ομάδα ( $\text{NO}_2$ -ισχυρός απενεργοποιητής) που του αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω εκδήλωσης ενός ισχυρού αρνητικού φαινομένου συντονισμού (-M).



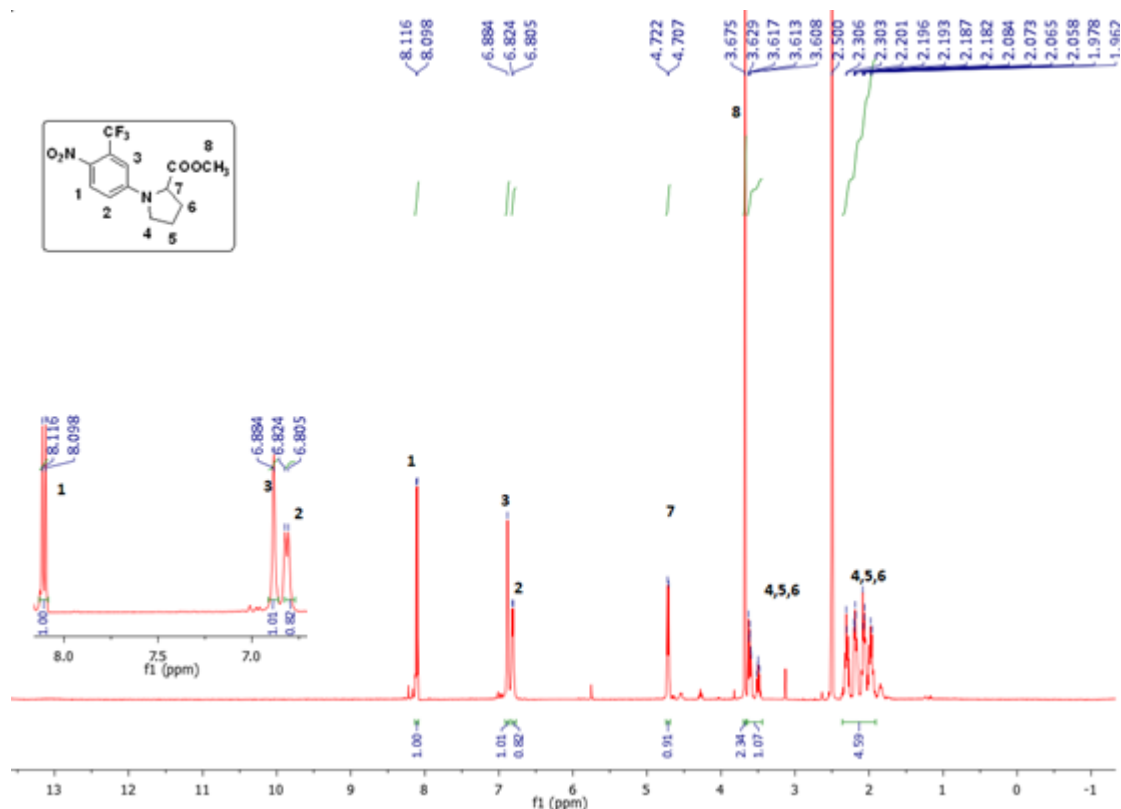
**Σχήμα 3.69:** Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία του πρωτονίου H<sub>1</sub>.

Το επόμενο σήμα στα 6.884 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο υπ' αριθμόν τρία (H<sub>3</sub>). Πρόκειται για μια απλή κορυφή, στην οποία δεν παρατηρείται κάποια σχάση καθώς το πρωτόνιο αυτό δε γειτνιάζει με κάποιο άλλο πρωτόνιο. Η σχετική του αποπροστασία οφείλεται στην τριφθορο-μεθυλο-ομάδα που βρίσκεται συνδεδεμένη με το γειτονικό άτομο άνθρακα. Η εν λόγω ομάδα εκδηλώνει ένα ισχυρό επαγωγικό αρνητικό φαινόμενο, καθώς φέρει τρία άτομα φθορίου, αφαιρώντας ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το βενζολικό δακτύλιο.

Στα 6.824 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο H<sub>2</sub>, το οποίο αποτελεί το πλέον προστατευμένο αρωματικό πρωτόνιο του συστήματος, καθώς τα φαινόμενα των υποκαταστατών έχουν μικρή επίδραση πάνω του. Αντίθετα δέχεται την ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων που του προσφέρει το άτομο αζώτου του δακτυλίου της προλίνης. Πρόκειται για μια διπλή κορυφή, εφόσον υπάρχει γειτονικό πρωτόνιο με μια σταθερά σύζευξης της τάξεως των  $^3J=9.5$  Hz.



**Σχήμα 3.70:** Δομές συντονισμού που φανερώνουν την προστασία του πρωτονίου 2 με την εκδήλωση θετικού φαινομένου συντονισμού από το άτομο αζώτου της προλίνης.

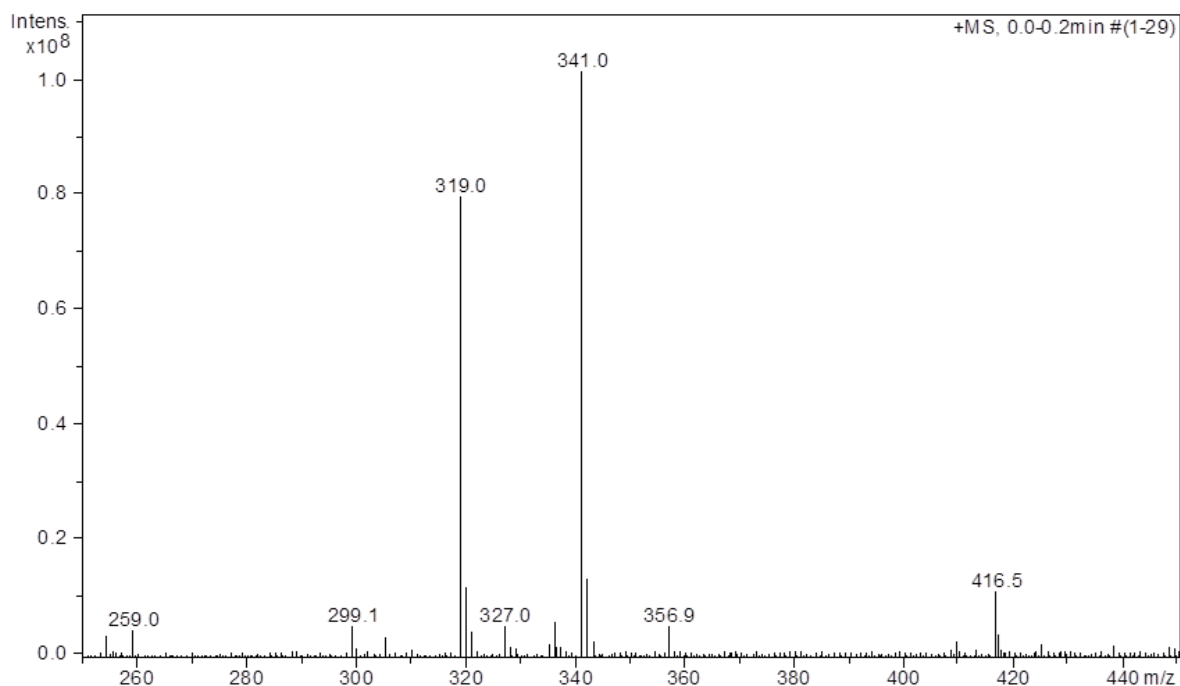


**Σχήμα 3. 71:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του μεθυλ-(4-νιτρο-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ) προλινικού σε DMSO στα 500 MHz.

Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 7 ( $\text{H}_7$ ) συντονίζεται στα 4.722 ppm ως μια διπλή κορυφή, και αυτό λόγω των δύο δυνατών διαμορφώσεων που μπορεί να λάβει, τη *cis* και την *trans*. Η όποια αποπροστασία οφείλεται στη γειτνίαση με την εστερική ομάδα, που λόγω ύπαρξης των ατόμων οξυγόνου αφαιρεί ηλεκτρονική πυκνότητα μέσω εκδήλωσης αρνητικού επαγωγικού φαινομένου. Η σταθερά σύζευξης είναι της τάξεως των  $^3J=7.5$  Hz. Ακόμη, η μεθοξυ-ομάδα της εστερικής ομάδας εμφανίζεται σε χαμηλότερες τιμές πεδίου από τις αναμενόμενες, καθώς είναι συνδεδεμένη σε άτομο οξυγόνου που της έλκει ηλεκτρονική πυκνότητα μέσω της εκδήλωσης ισχυρού αρνητικού επαγωγικού φαινομένου, με αποτέλεσμα να την αποπροστατεύει. Το σήμα είναι μια απλή κορυφή με τρία ισοδύναμα πρωτόνια στα 3.675 ppm.

Τέλος, τα υπόλοιπα πρωτόνια της προλίνης δίνουν πολλαπλές κορυφές με συγκεκριμένο μοτίβο. Αριθμητικά είναι όσα αναμέναμε, ωστόσο είναι δύσκολο να

γίνει ο διαχωρισμός τους σύμφωνα με τον ως άνω για τα υπόλοιπα πρωτόνια της ένωσης.



**Σχήμα 3.72:** Φάσμα μάζας, χαμηλής διακριτικής ικανότητας σε 0.1 % HCOOH σε MeOH.

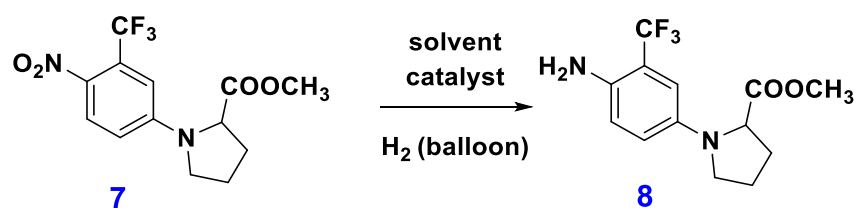
Το φάσμα μάζας επιβεβαιώνει πως σχηματίστηκε το προϊόν της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Έτσι, το θραύσμα που λαμβάνεται σε τιμή  $m/z$  319.0, αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1. Το επόμενο χαρακτηριστικό θραύσμα που εντοπίζεται, είναι αυτό σε τιμή  $m/z$  341.0, που αντιστοιχεί στο μετά νατρίου άλας της ένωσης. Τέτοια μετατροπή είναι λογικό να έχει λάβει χώρα, αφού κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε βάση ( $\text{NaHCO}_3$ ) και εφαρμόστηκε θέρμανση.

### 3.10 Σύνθεση του μεθυλεστέρα της *N*-{(4-αμινο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο)}-*L*-προλίνης

#### 3.10.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλεστέρα της *N*-{(4-αμινο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο)}-*L*-προλίνης

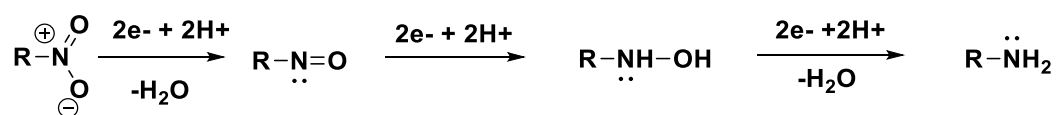
Η αντίδραση σύνθεσης του μεθυλ (4-αμινο-3- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού είναι μία αντίδραση αναγωγής του μεθυλ-(4-νιτρο-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ) προλινικού. Συγκεκριμένα, η νιτρο-ομάδα μετατρέπεται με την αναγωγή σε

ατμόσφαιρα υδρογόνου σε μια αμινο-ομάδα, διαδοχικά μέσω μιας νιτροζο-ομάδας και μιας N-υποκατεστημένης υδροξυλαμίνης.



**Σχήμα 3.73:** Αντίδραση σύνθεσης του μεθυλεστέρα της N-{{4-αμινο-3-τριφθορομεθυλοφαινυλο}}-L-προλίνης

Ένας γενικός μηχανισμός που μπορεί να εξηγήσει τη μετατροπή αυτή σχηματικά είναι ο ακόλουθος.



**Σχήμα 3.74:** Σχηματικός μηχανισμός της μετατροπής της νιτρο-ομάδας σε αμινο-ομάδα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κάποιες από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο για την εν λόγω μετατροπή. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις δε σχηματίζονταν παραπροϊόντα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, σε αντίθεση με τις τελευταίες πειραματικές συνθήκες που σχηματίστηκαν παραπροϊόντα αυτού του τύπου. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι στις ίδιες συνθήκες η αναγωγή λάμβανε χώρα σε μόλις λίγα λεπτά και ποσοτικά.

Το κύριο πρόβλημα κατά τη σύνθεση της αμινο-ένωσης ήταν ότι με την έναρξη, κιάλας, της επεξεργασίας της η αμίνη άρχιζε να διασπάται, καθώς παρουσίαζε ως ευοξειδωτή ευαισθησία τόσο στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο όσο και στο φως. Ως εκ τούτου, η επεξεργασία της έπρεπε να λάβει χώρα γρήγορα και ήτοι δυνατόν υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Η προσθήκη της στην επόμενη αντίδραση ήταν άμεση, καθώς η ευαισθησία της αυτή δημιουργούσε πολλαπλά προβλήματα στη μετέπειτα συγκλίνουσα πορεία και ιδιαίτερα στην αντίδραση σύζευξης.

**Πίνακας 3.1:** Συνθήκες κατά την αντίδραση αναγωγής.

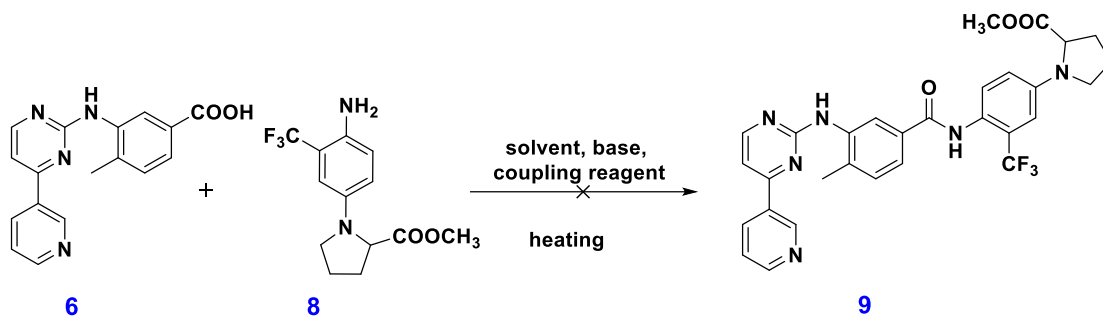
Καταλύτης	Ατμόσφαιρα H <sub>2</sub> (balloon)	Διαλύτης	Παραπροϊόντα
PtO <sub>2</sub>	✓	THF	-
10 % Pd/C	✓	MeOH	-
10 % Pd/C	✓	THF	-
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	✓	EtOAc	✓

### **3.11 Δημιουργία Αμιδικού Δεσμού για το σχηματισμό του Nil-01**

Η αντίδραση είναι μία κλασική αντίδραση σχηματισμού ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ ενός καρβοξυλικού οξέος, το οποίο έχει προκύψει από τη βασική υδρόλυση του προϊόντος κυκλοποίησης, και μιας αμίνης. Η αντίδραση σύζευξης απαιτεί την ενεργοποίηση του υπάρχοντος οξέος με την μετατροπή του σε κάποιο παράγωγο οξέος, όπως σε ενεργοποιημένο εστέρα (με τη χρήση κάποιου συμπλεκτικού αντιδραστήριου) ή σε χλωρίδιο, τα οποία είναι δραστικότερα και επιδέχονται μια πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου σε ευνοϊκότερες συνθήκες.

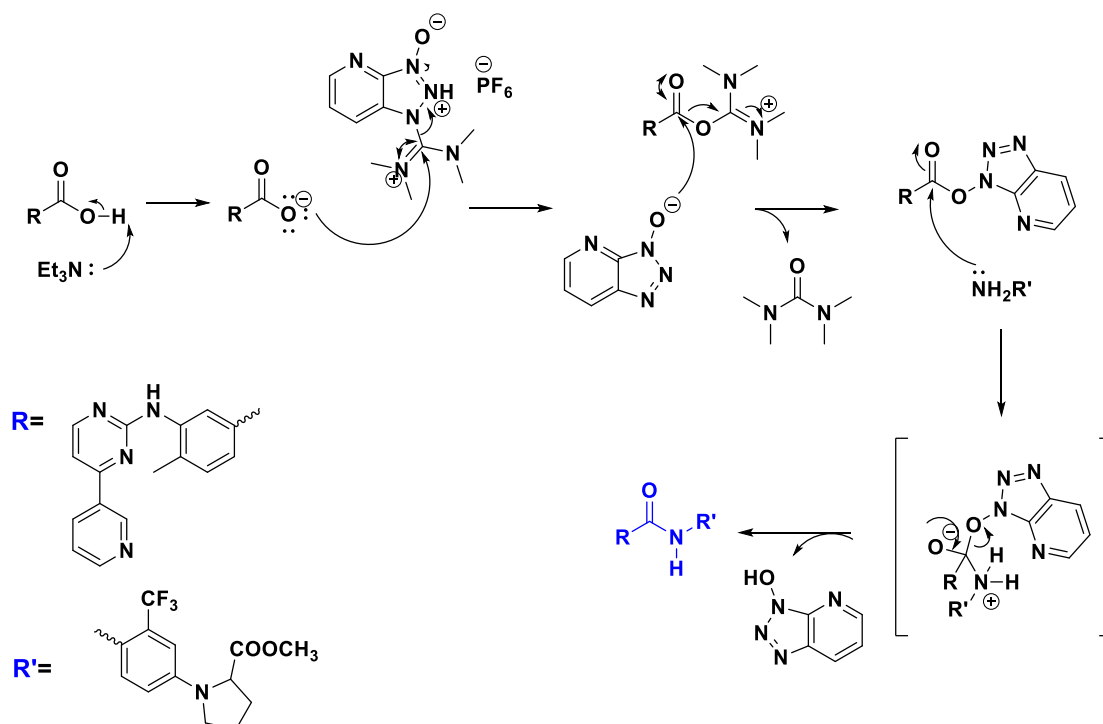
#### **3.11.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και μηχανισμός της ενεργοποίησης του οξέος**

Αρχικά, κατά την ενεργοποίηση του οξέος θα πρέπει να αποκλείσουμε, ει δυνατόν, την υγρασία από την αντίδραση μας, καθώς ίχνη υγρασίας μπορούν να υδρολύσουν τον ενεργοποιημένο εστέρα που έχει παραχθεί και στο διάλυμα της αντίδρασης να υπάρχει εκ νέου το οξύ. Η βάση που προστίθεται στο διάλυμα του οξέος ως σκοπό έχει την αποπρωτονίωση του καρβοξυλίου, το οποίο είναι αρκετά όξινο. Με τον τρόπο αυτό η καρβοξυλομάδα αποκτά περισσότερο πυρηνόφιλο χαρακτήρα και μια προσβολή στο αντιδραστήριο σύζευξης λαμβάνει χώρα ευκολότερα. Επιπλέον, η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα κάτω από αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και υπό χαμηλή θερμοκρασία για να ελαχιστοποιηθεί η παραγωγή παραπροϊόντων.



**Σχήμα 3.75:** Αντίδραση σύζευξης μεταξύ του οξέος και την αμίνης.

Με την προσθήκη της αμίνης, λαμβάνει χώρα μια πυρηνόφιλη προσβολή. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου της αμίνης προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο κέντρο του ενεργοποιημένου εστέρα, τον καρβονυλικό άνθρακα. Τώρα, στη μορφή του εστέρα μια τέτοια προσβολή είναι πολύ ευνοϊκότερη. Με την προσβολή και μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου συμπλόκου (όμοια με όλους τους μηχανισμούς παραγωγής παραγώγων των καρβοξυλικών οξέων), λαμβάνεται με απόσπαση του συμπλεκτικού αντιδραστήριου, ο επιθυμητός αμιδικός δεσμός.



**Σχήμα 3.76:** Μηχανισμός κατά την αντίδραση σύζευξης μεταξύ του οξέος και της αμίνης και μηχανισμός ενεργοποίησης του οξέος από αντιδραστήρια σύζευξης.


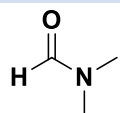
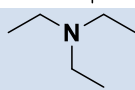
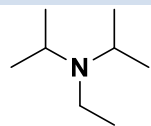
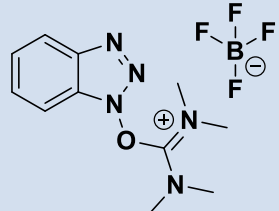


**Πίνακας 3.3:** Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση σύζευξης.

N°	Οξύ	Αμίνη	Διαλ.	Βάση	Αντιδρ. Σύζευξης	T Αντίδρ.	Χρόνος	Αποτέλ.
1	1 (-OCH <sub>3</sub> )	1	THF	KO <sup>t</sup> Bu (5.5 eq) (ως προς εστέρα)	-	rt	18h	-
2	1.2 (-OCH <sub>3</sub> )	1	THF	KOtBu (5.5 eq) (ως προς εστέρα)	-	rt	62h	-
3	1	1	THF	DIPEA (drops) NaH (1 eq) (ως προς την αμίνη)	HATU (1.1 eq) (ως προς το οξύ)	rt 22 h up to 80 °C 6 h 30 min rt overnight	46h 30min	-
4	1 (χλωρίδιο )	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (300μl)	-	rt	4h	-
5	1	1.2	DMF	Et <sub>3</sub> N (2 eq ως προς το οξύ)	HATU (1.1 eq ως προς το οξύ)	rt up to 70 °C, 18 h rt		-
6	1.2 (εστέρας)	1	THF	NaOCH <sub>3</sub> (1.2 eq (ως προς αμίνη)	-	17 h 35 min rt 8 h 30 min reflux 18h 30 min rt	43h 30min	-
7	1	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (1.2eq ως προς οξύ)	HBTU (1.1 eq)/ HOBT (1.1 eq) (ως προς οξύ)	rt	44h	-
8	1 (χλωρίδιο )	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (περίσ.)	-	Rt up to 60 °C, 2h 60 °C, 16h rt 3h 60 °C	21h	-
9	1 (οξύ)	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (1.2eq ως προς οξύ)	HBTU (1.1 eq)/ HOBT (1.1 eq) (ως προς οξύ)	Rt up to 60°C	5 days	-
10	1	1.2 (προσθήκη χωρίς επεξεργασία)	DMF (+THF)	Et <sub>3</sub> N (1.1 eq ως προς το οξύ)	HATU (1.1eq)	Rt up to 90 °C 4h 30 min 50 °C 19h rt 5h 90 °C	3 days	-

								18h rt
11	1	1.2 (προσθήκη χωρίς επεξεργασία)	DMF (+THF) ++DM SO	Et3N (1.1 eq)	HATU (1.1 eq)	Rt up to 100 °C 1 h 50 min 65 °C 17 h rt 7 h 45 min 90 °C 17 h rt +DMSO 105 °C	3 days	-
12	1	1.2 (προσθήκη χωρίς επεξεργασία)	CH3CN (+THF)	Et3N (1.1 eq)	HATU (1.1 eq)	rt	26h 30min	-
13	1	1.2 eq (προσθήκη χωρίς επεξεργασία)	DCM (dry) (+THF)	DIEA (4 eq) DMAP (1.2 eq) +0.6 eq Et3N	HATU (1.2 eq)	Rt up to 60 °C 19 h 35 min rt ~60 °C overnight	25 h activation 42 h coupling reaction	-
14	1	1.2	DMF (dry)	Et3N (1.1 eq)	HATU (1.1 eq)	Rt up to 80 °C		-

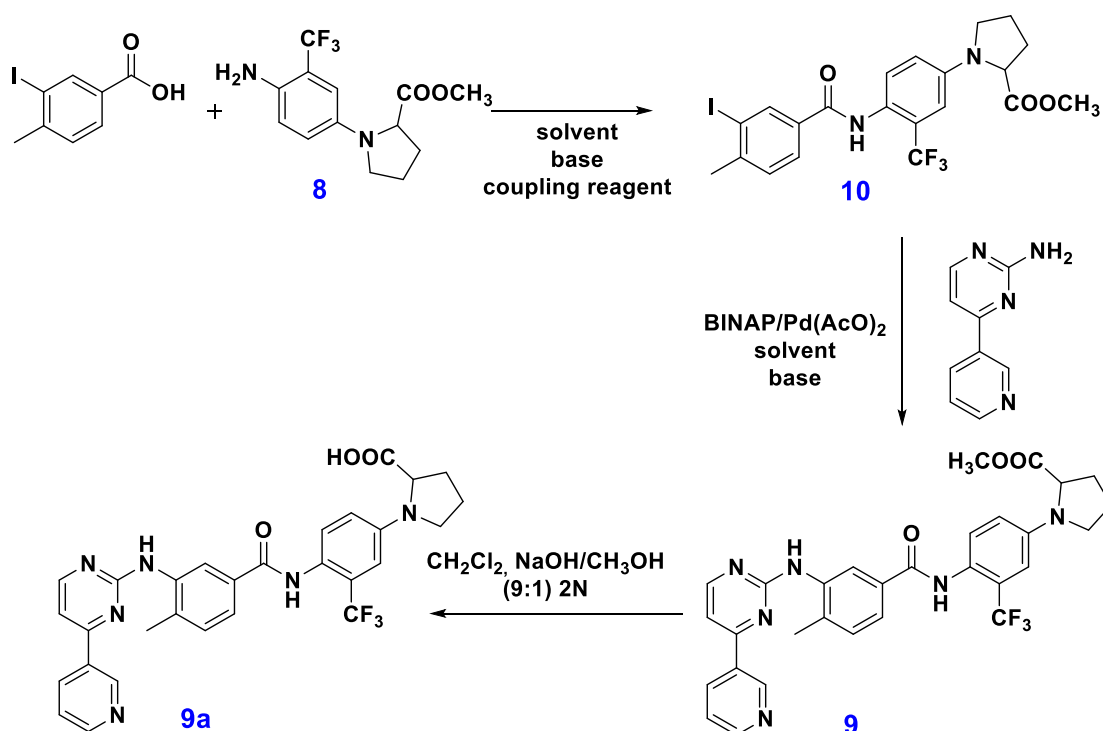
**Πίνακας 3.4:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση σύζευξης.

Αντιδραστήριο	Ονοματολογία	Δομή
THF	Τετραϋδροφουράνιο	
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο	
Et <sub>3</sub> N	Τριαιθυλαμίνη	
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine	
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate	

<b>HATU</b>	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate	
<b>HOBt</b>	Hydroxybenzotriazole	

### 3.12 Εναλλακτικές προτεινόμενες πορείες για τη σύνθεση του αναλόγου Nil-01

#### 3.12.1 Ολική σύνθεση 1ης εναλλακτικής πορείας



**Σχήμα 3.77:** Ολική συνθετική πορεία 1ης εναλλακτικής προσέγγισης σχηματισμού του αμιδικού δεσμού.

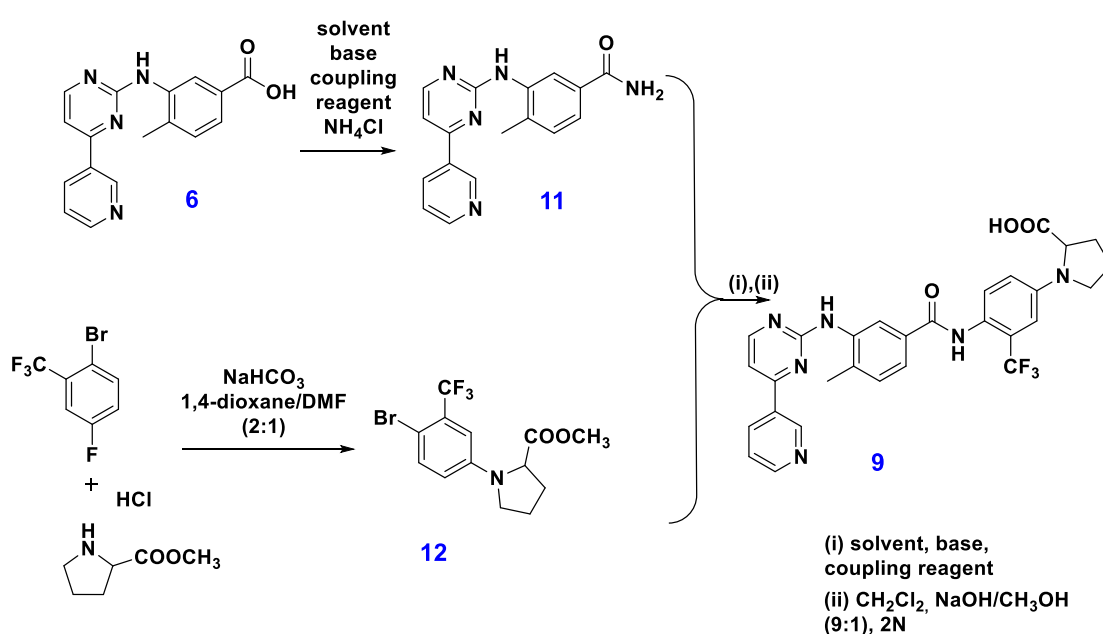
Η παραπάνω συνθετική πορεία σχηματισμού αμιδικού δεσμού ξεκινά με την αντίδραση μεταξύ των μεθυλεστέρα της N-((4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο))-L-προλίνης και 3-ιοδο-4-μεθυλο-βενζοϊκού οξέος. Είναι μια κλασική αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού, που ξεκινά με την ενεργοποίηση του 3-ιοδο-4-

μεθυλ-βενζοϊκού με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης προς το σχηματισμό του αντίστοιχου ενεργοποιημένου εστέρα. Ακολουθεί η πυρηνόφιλη προσβολή από το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου της αμινο-ομάδας του μεθυλεστέρα της N-{{(4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλο-φαινυλο)}}-L-προλίνης στον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα του ενεργοποιημένου οξέος. Μετά το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού, ακολουθεί μια αντίδραση Buchwald-Hartwig, όπου το ιώδιο του αρωματικού δακτυλίου αντικαθίσταται και στη θέση του σχηματίζεται ένας νέος δεσμός C-N. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ του προϊόντος με τον αμιδικό δεσμό και της 4-(3-(πυριδινυλο)-πυριμιδιν-2-αμίνης.

**Πίνακας 3.5:** Πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη του 3-ιοδο-4-μεθυλ-βενζοϊκού οξέος με την αμίνη.

N <sup>ο</sup>	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Διαλύτης
1	1 eq	1.2 eq	HBTU 1.1 eq/ HOBT 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.2 eq	Άνυδρο THF
2	1 eq	1.2 eq (Προσθήκη αμίνης χωρίς επεξεργασία)	HBTU 1.1 eq/ HOBT 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.2 eq	Άνυδρο THF

### 3.12.2 Ολική σύνθεση 2<sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας



**Σχήμα 3.78:** Ολική συνθετική πορεία 2<sup>ης</sup> εναλλακτικής προσέγγισης σχηματισμού του αμιδικού δεσμού.

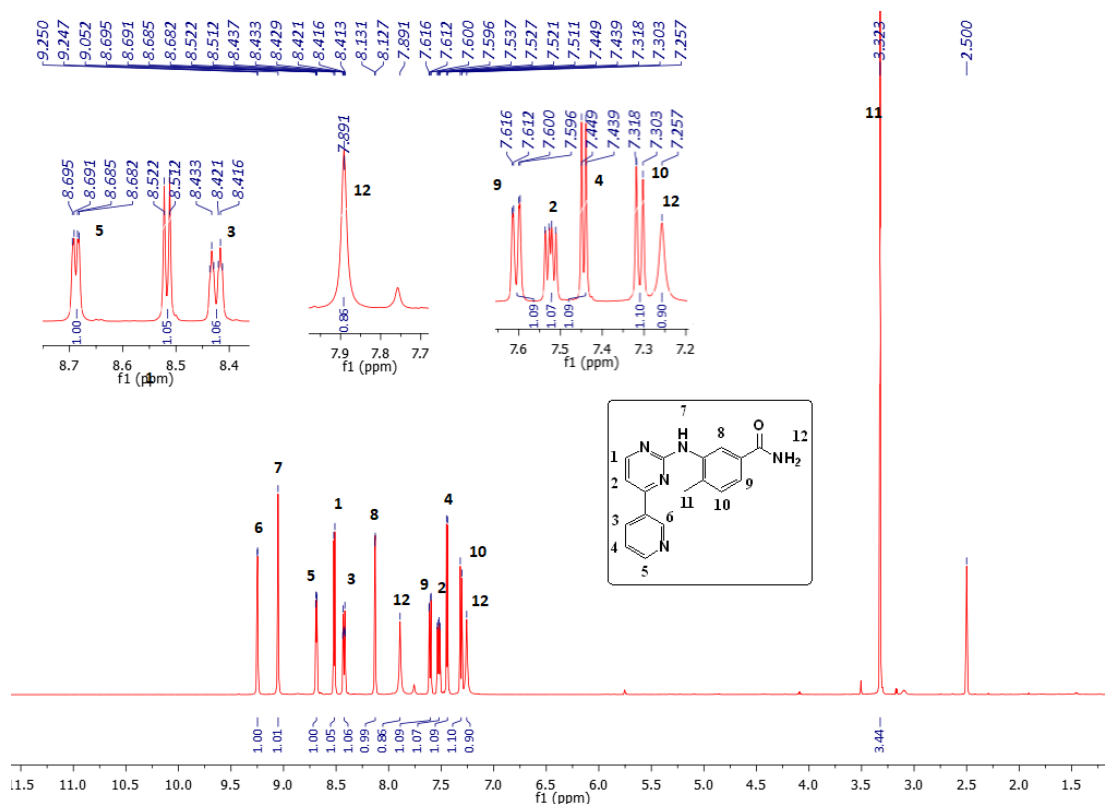
Η παραπάνω συνθετική πορεία σχηματισμού του αμιδικού δεσμού ξεκινά με την μετατροπή του οξέος στον αντίστοιχο αμίδιο. Παράλληλα σε μια συγκλίνουσα πορεία λαμβάνει χώρα μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση μεταξύ του 2-βρωμο-5-φθορο-τριφθορομεθυλοβενζολίου και του υδροχλωρικού μεθυλεστέρα της L-προλίνης. Η αντίδραση διεξάγεται μέσω ενός μηχανισμού προσθήκης-απόσπασης. Τα δύο προϊόντα των συγκλινουσών πορειών, το αμίδιο και το προϊόν πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης αντιδρούν προς το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού.

Αρχικά, λαμβάνει χώρα μια αντίδραση μετατροπής του οξέος στο αντίστοιχο αμίδιο. Η πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης του οξέος με αντιδραστήρια σύζευξης με ενδιάμεσο τον πιο δραστικό ενεργοποιημένο εστέρα ή με τη μέθοδο των χλωριδίων μέσω ενός ενδιάμεσου, πολύ δραστικού, χλωριδίου. Εν συνεχεία, με την προσθήκη μιας πηγής αμμωνίας στο διάλυμα της αντίδρασης λαμβάνεται το αμίδιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι βάσει των συνθηκών που δοκιμάστηκαν, οι αποδόσεις της εν λόγω μετατροπής ήταν πολύ χαμηλές, με αποτέλεσμα η περαιτέρω αντίδραση να μην καθίσταται εφικτή.

**Πίνακας 3.6:** Πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του αμιδίου.

N°	Οξύ	Αντιδραστήριο Σύζευξης	Βάση SOCl <sub>2</sub>	Πηγή Αμμωνίας	Διαλύτης
1	1 eq	HATU 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.1eq	NH <sub>4</sub> Cl 1 eq + Et <sub>3</sub> N	Άνυδρο DMF
2	1 eq	HATU 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 2 eq	NH <sub>4</sub> Cl 1 eq + Et <sub>3</sub> N 1eq (ως προς NH <sub>4</sub> Cl)	Άνυδρο DMF
3	1 eq	-	SOCl <sub>2</sub> 1 eq	25 % NH <sub>3</sub> (aq)	THF

Όσον, όμως, αφορούσε την απομόνωση και τον καθαρισμό του αμιδίου, αυτό ήταν δυνατόν να απομονωθεί μέσω μιας διαδικασίας καταβύθισης. Τελικά, λάβαμε το τελικό, επιθυμητό αμίδιο, καθαρό, όπως αποδεικνύεται από το φάσμα 1H-NMR, σε πολύ μικρές αποδόσεις.



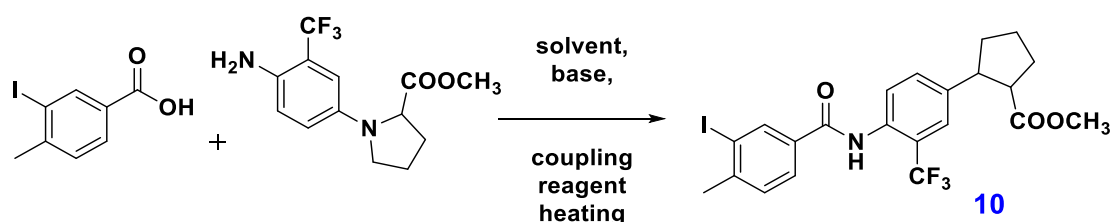
**Σχήμα 3.79:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του αμιδίου σε DMSO στα 500 MHz.

Στο παραπάνω φάσμα του αμιδίου τα πρωτόνια παρουσιάζουν αντιστοιχία με αυτά του κυκλοποιημένου προϊόντος και του οξέος. Ειδικότερα, τα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων λαμβάνονται, όπως αναμένονται σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας τις σχάσεις και τις πολλαπλότητες τους. Το πρωτόνιο  $\text{H}_8$ , έχει μια τάση να εμφανιστεί ως μια διπλή-διπλής κορυφή, που δικαιολογείται από το γεγονός ότι συσχετίζεται σε μονοπάτι τεσσάρων δεσμών από το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 9 ( $\text{H}_9$ ). Ακόμη, μια διαφοροποίηση μεταξύ των δύο φασμάτων, αυτού του αμιδίου και του οξέος του, είναι ότι από το φάσμα του αμιδίου απουσιάζει η χαρακτηριστική ευρεία κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της  $-\text{COOH}$  ομάδας του καρβοξυλικού οξέος. Αντ' αυτού υπάρχουν δύο διακριτές απλές κορυφές στα 7.257 και 7.891 ppm, που αντιστοιχούν στα δύο αμιδικά πρωτόνια. Τα δύο πρωτόνια αντιλαμβάνονται διαφορετικό χημικό περιβάλλον, αφού είναι δυνατή η διαμοριακή αλληλεπίδραση με τα μόρια του διαλύτη (DMSO), σχηματίζοντας διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου και αποπροστατεύοντας τα πρωτόνια. Επιπλέον, οι ολοκληρώσεις των δύο κορυφών

εμφανίζονται λίγο μικρότερες από τη μονάδα, καθώς τα εν λόγω πρωτόνια είναι ανταλλάξιμα με το διαλύτη και τη θέση τους μπορούν να λάβουν δευτέρια.

### 3.13 Σύνθεση του μεθυλ (4- (3-ιωδο-4-μεθυλβενζαμιδο) -3- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικό

#### 3.13.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλ (4- (3-ιωδο-4-μεθυλβενζαμιδο) -3- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικό



Σχήμα 3.80: Αντίδραση κατά τη σύνθεση της ένωσης 10.

Ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα είναι ο κλασικός μηχανισμός, όπως έχει αναλυτικά δειχθεί παραπάνω, σχηματισμού αμιδικού δεσμού, όπου το οξύ ενεργοποιείται με τη χρήση κάποιου αντιδραστήριου σύζευξης σε βασικές συνθήκες.

Πίνακας 3.7: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση σύζευξης της αμίνης με το 3-ιωδο-4-μεθυλο-βενζοϊκό οξύ.

N°	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο		
			Σύζευξης	Βάση	Διαλύτης
1	1eq	1.2eq	HBTU 1.1 eq HOBT 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.2 eq	THF
2	1eq	1.2eq (προσθήκη της αμίνης χωρίς επεξεργασία)	HBTU 1.1 eq HOBT 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.2 eq	THF



Κατά αναλογία με τις αντιδράσεις σύζευξης προς σχηματισμό του αμιδικού δεσμού, και σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρήσαμε κάποιο πρωτόνιο περίπου στα 10.3 ppm, το οποίο θα οφειλόταν στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού και επομένως θα μας υποδείκνυε το σχηματισμό ενός τέτοιου δεσμού.

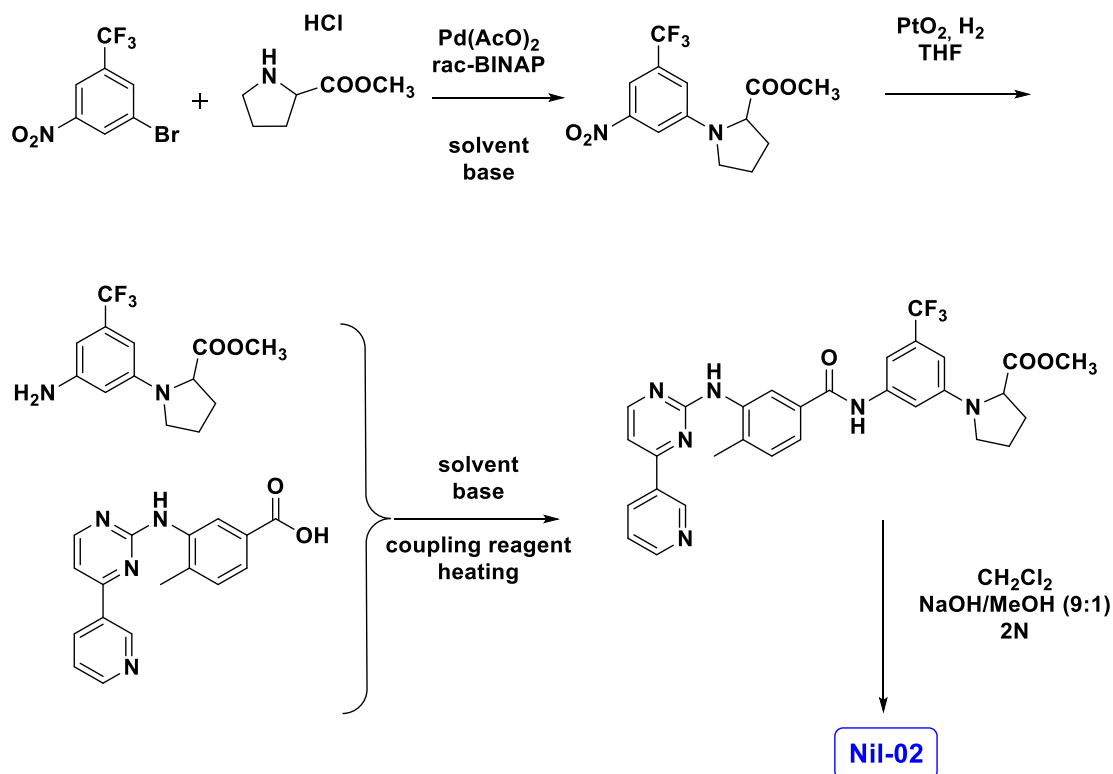
Αυτός ήταν και ο λόγος που δεν συνεχίσαμε με αυτή τη συγκλίνουσα πορεία προκειμένου να λάβουμε τα ανάλογα του Nilotinib που θεωρητικά είχαμε σχεδιάσει.

## A2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-02

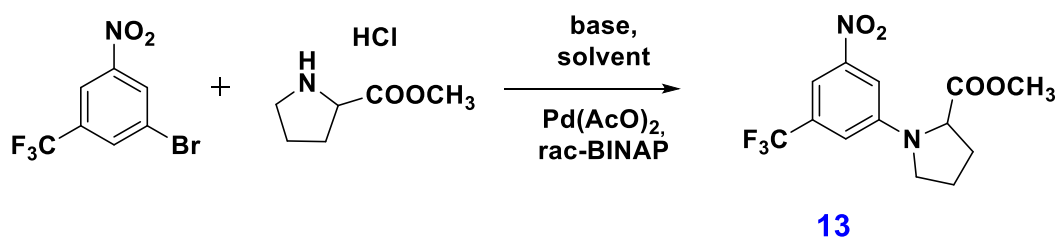
### 3.14 Σύνθεση του μεθυλ (3-νιτρο-5- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού

#### 3.14.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλ (3-νιτρο-5- (τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού

Η αντίδραση που θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω αποτελεί την 1<sup>η</sup> από μια σειρά αντιδράσεων για τη σύνθεση του αναλόγου Nil-02. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται η ολική συνθετική πορεία.



**Σχήμα 3.81:** Ολική συνθετική πορεία που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του αναλόγου Nil-02.

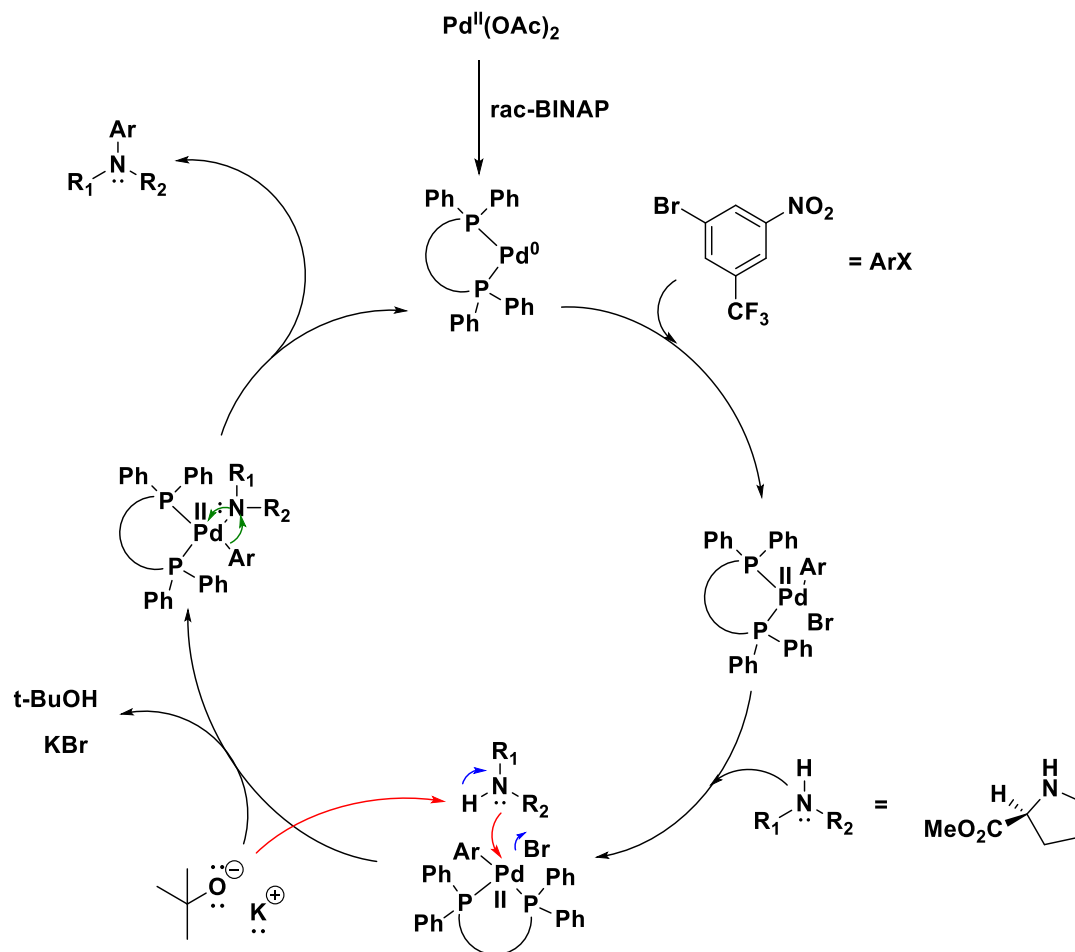


**Σχήμα 3.82:** Αντίδραση σύνθεσης του μεθυλεστέρα της N-((3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-L-προλίνης.

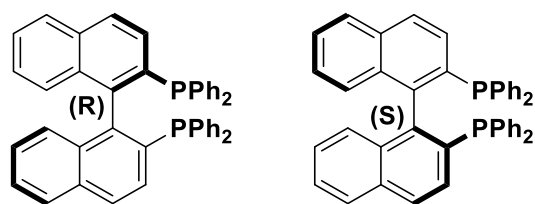
Η παραπάνω αντίδραση δε μπορεί να λάβει χώρα μέσω μιας κλασικής αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με μηχανισμό προσθήκης/απόσπασης, καθώς ο ισχυρός δέκτης ηλεκτρονίων υποκαταστάτης είναι σε θέση μετα ως προς την αποχωρούσα ομάδα (άτομο βρωμίου). Ακόμη, ένας μηχανισμός απόσπασης/προσθήκης δεν είναι επίσης δυνατός, καθώς προκύπτει ένα και μοναδικό προϊόν από την αντίδραση.

Πρόκειται, λοιπόν, για μια οργανομεταλλική αντίδραση που λαμβάνει χώρα μέσω ενός κλειστού καταλυτικού κύκλου παλλαδίου. Είναι μια τύπου Buchwald-Hartwig αντίδραση όπου σχηματίζεται ένας δεσμός C-N. Τέτοιου τύπου αντιδράσεις μπορούν, ακόμη να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό C-O και C-F.

Έτσι, όπως φαίνεται και στον παρακάτω μηχανισμό-καταλυτικό κύκλο, το πρώτο βήμα είναι μια οξειδωτική προσθήκη. Συγκεκριμένα, ο τρι-υποκατεστημένος βενζολικός δακτύλιος προστίθεται στο σύμπλοκο του Pd.



**Σχήμα 3.83:** Μηχανισμός κατά τη σύνθεση του μεθυλεστέρα της N-{{(3-νιτρο-5-τριφθορομεθυλο-φαινυλο)}-L-προλίνης.



**Σχήμα 3.84:** Δομή rac-BINAP, συμπλεκτικού αντιδραστηρίου του Pd (ligand φωσφίνης).

Με την ένταξη του αρυλ-αλογονιδίου στο σύμπλοκο του παλλαδίου, το μεταλλικό κέντρο οξειδώνεται και από την οξειδωτική κατάσταση 0 περνάει στην κατάσταση 2. Σε αυτό το σημείο, η προσθήκη μιας πρωτοταγούς ή και δευτεροταγούς αμίνης, ακόμη και ενός αμιδίου, μπορεί να προσβάλει το δεσμό του αρωματικού δακτυλίου και του αλογόνου μέσω του μετάλλου. Η χρήση μιας βάσης είναι σημαντική, καθώς

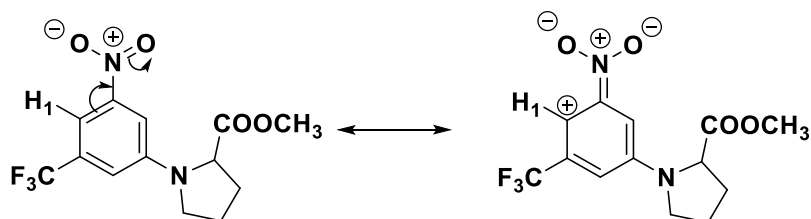
με απόσπαση του ιδιαίτερα όξινου πρωτονίου της αμίνης, το άτομο αζώτου, που ήδη έχει μεγάλη τάση να δώσει ηλεκτρόνια στο Pd, αποκτά, με αυτό τον τρόπο, ισχυρότερο πυρηνόφιλο χαρακτήρα, και ως εκ τούτου, η προσβολή που αναφέρθηκε παραπάνω πραγματοποιείται ευκολότερα. Σε ένα τελικό στάδιο, και με τη βοήθεια μορίων του διαλύτη, μια αναγωγική απόσπαση λαμβάνει χώρα.

**Πίνακας 3.8:** Πειραματικές συνθήκες κατά τη διεξαγωγή της αντίδρασης Buchwald-Hartwig.

N°	3-Br-5-NO <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub> -Ar	L-Pro-OMe.HCl/ L-Pro-OH	Pd(AcO) <sub>2</sub>	rac-BINAP	Βάση	Διαλύτης
1	1 eq	1.1 eq	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 1.4 eq	Άνυδρο THF
2	1 eq	1.1 eq (L-Pro-OH)	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 1.4 eq	Άνυδρο THF
3	1 eq	1.2 eq	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 2 eq	Άνυδρο THF
4	1 eq	1.2 eq	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 2 eq	Άνυδρο DMF
5	1 eq	1.1 eq	0.02 eq	0.04 eq	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5 eq	Άνυδρο THF

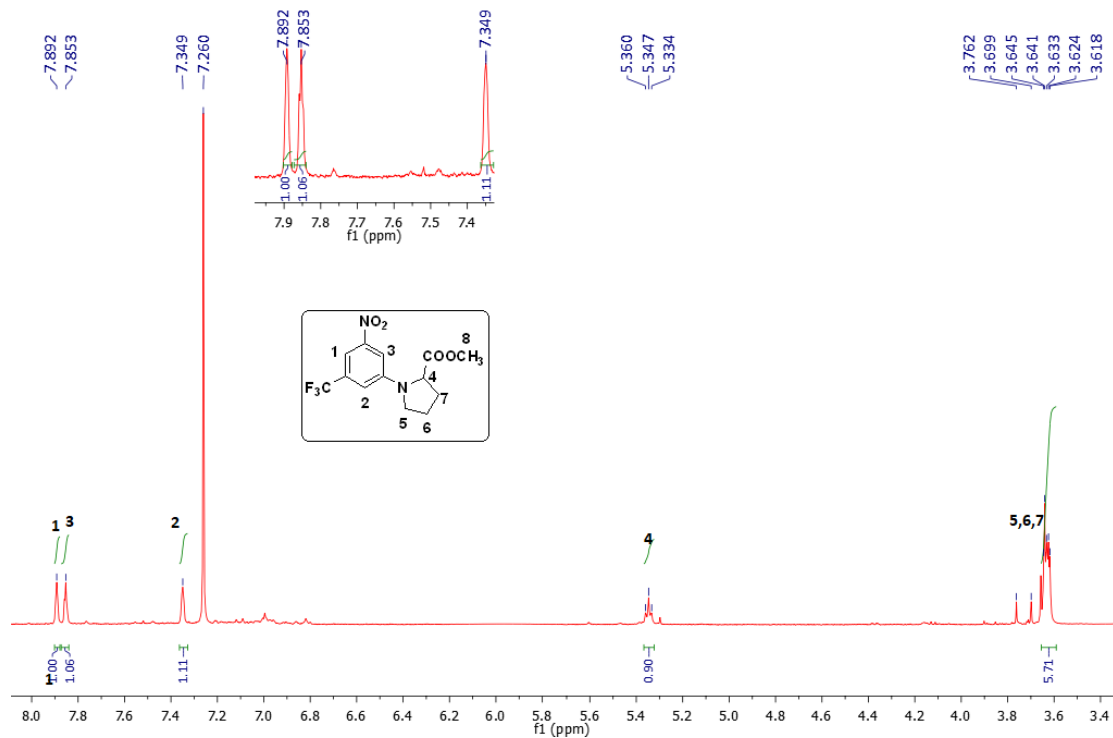
### 3.14.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεθυλ (3-νιτρο-5-(τριφθορομεθυλ) φαινυλ) προλινικού

Ως πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης εμφανίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 (H<sub>1</sub>). Το εν λόγω πρωτόνιο συντονίζεται σε χαμηλότερα πεδία, και συγκεκριμένα στα 7.892 ppm, καθώς αντιλαμβάνεται ένα πολύ ισχυρό αρνητικό φαινόμενο συντονισμού από τη NO<sub>2</sub>-ομάδα, η οποία είναι απενεργοποιητής και έλκει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα προς το μέρος της. Ακόμη, προκύπτει επιπλέον έλλειψη ηλεκτρονίων από την εκδήλωση του ισχυρού αρνητικού φαινομένου της τριφθορομεθυλο-ομάδας.



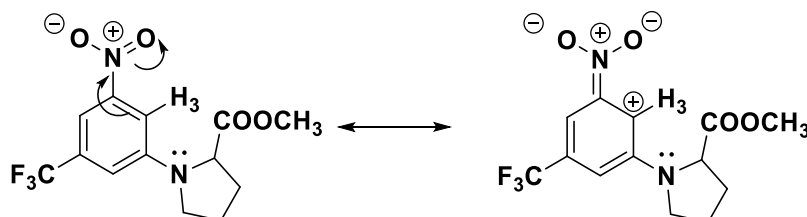
**Σχήμα 3.85:** Δομές συντονισμού που φανερώνουν την αποπροστασία του H<sub>1</sub>.

Το σήμα του πρωτονίου αυτού, ομοίως και των υπολοίπων, είναι μια απλή κορυφή καθώς δεν υφίστανται γειτονικά πρωτόνια.

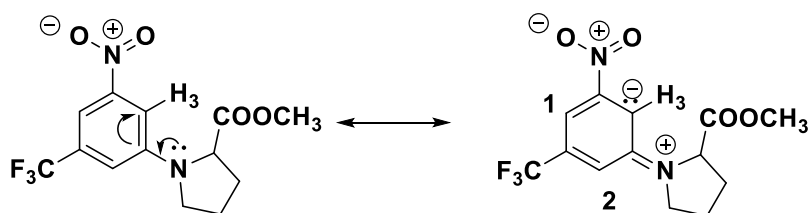


**Σχήμα 3.86:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του μεθυλ (3-νιτρο-5-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ) προλινικού σε CDCl<sub>3</sub> στα 500 MHz.

Αμέσως μετά στα 7.853 ppm ως μια απλή κορυφή, συναντάται το H<sub>3</sub> που βρίσκεται μεταξύ της NO<sub>2</sub>-ομάδας και του δακτυλίου της προλίνης. Η σχετική του αποπροστασία οφείλεται στην εκδήλωση ενός ισχυρού αρνητικού συζυγιακού και ενός αρνητικού επαγωγικού φαινομένου από την NO<sub>2</sub>-ομάδα. Επιπλέον δέχεται ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το θετικό φαινόμενο συντονισμού που εκδηλώνει το άτομο αζώτου του δακτυλίου της προλίνης, με το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων που διαθέτει.



**Σχήμα 3.87:** Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία του H<sub>3</sub> από την εκδήλωση του συζυγιακού φαινομένου της NO<sub>2</sub>-ομάδας.



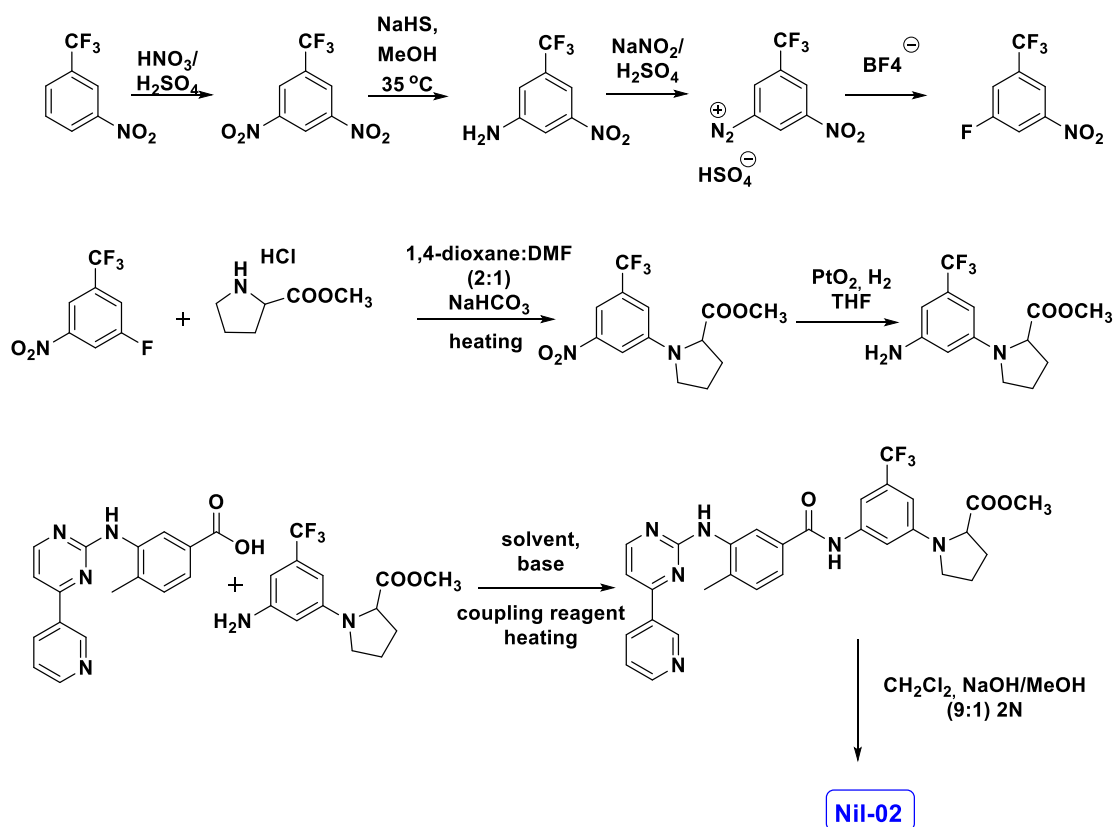
**Σχήμα 3.88:** Δομές συντονισμού που εξηγούν την προστασία του H<sub>3</sub> λόγω της εκδήλωσης θετικού συζυγιακού φαινομένου του αζώτου της προλίνης.

Το πιο προστατευμένο από τα αρωματικά πρωτόνια, στα 7.349 ppm είναι το H<sub>2</sub> το οποίο αντιλαμβάνεται την έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας λόγω της εκδήλωσης του ισχυρού επαγωγικού φαινομένου της CF<sub>3</sub>-ομάδας. Ωστόσο αντιλαμβάνεται κάποια ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το θετικό φαινόμενο συντονισμού που εκδηλώνει το άτομο αζώτου του δακτυλίου της προλίνης, κατά ανάλογο τρόπο, όπως δείχθηκε για το H<sub>3</sub>.

Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν τέσσερα (H<sub>4</sub>), του δακτυλίου της προλίνης συντονίζεται στα 5.360 ppm, ενώ τα υπόλοιπα σε μια πολλαπλή κορυφή στα 3.762 ppm. Το σήμα της μεθοξυ-ομάδας δεν εμφανίζεται καθώς κατά την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ισχυρή βάση με αποτέλεσμα να υδρολυθεί ο μεθυλεστέρας της προλίνης, αντ' αυτού υπάρχει στα 11 ppm περίπου μια ευρεία κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του οξέος.

### 3.15 Εναλλακτικές προτεινόμενες πορείες για τη σύνθεση το αναλόγου Nil-02

#### 3.15.1 Ολική σύνθεση 1<sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας



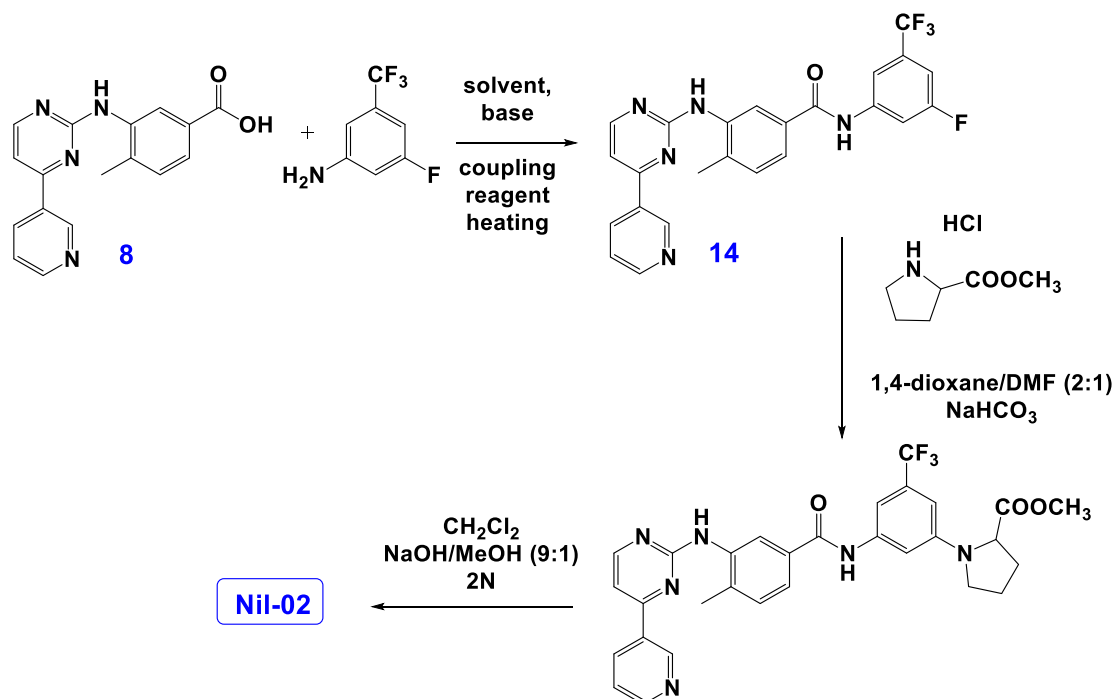
Σχήμα 3.89: Ολική πορεία σύνθεσης 1<sup>ης</sup> εναλλακτικής μεθόδου για το σχηματισμό του αναλόγου Nil-02.

Κατά την πρώτη συνθετική προσέγγιση, γίνεται η σύνθεση του αρχικού μας υποστρώματος μέσω διαδοχικών αντιδράσεων ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ξεκινώντας, λοιπόν από το m-νιτροτρυφθορομεθυλοβενζόλιο με νίτρωση λαμβάνεται το δινιτρο-προϊόν, ενώ μετά από μια αντίδραση αναγωγής και αντικατάστασης ενός διαζωνιακού άλατος παραλαμβάνεται το τελικό υπόστρωμα. Αυτό, εν συνεχεία, υφίσταται μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση, σε δραστικές συνθήκες, καθώς οι θέσεις της αποχωρούσας ομάδας και του υποκαταστάτη, ισχυρού δέκτη ηλεκτρονίων, δεν είναι οι πλέον δραστικές γι' αυτού του είδους τις αντιδράσεις. Ακολούθως, με αναγωγή του προϊόντος της



πυρηνόφιλης υποκατάστασης και σύζευξη με το οξύ, θα ληφθεί τελικά, μετά και από την υδρόλυση το ανάλογο Nil-02.

### 3.15.2 Ολική σύνθεση 2<sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας



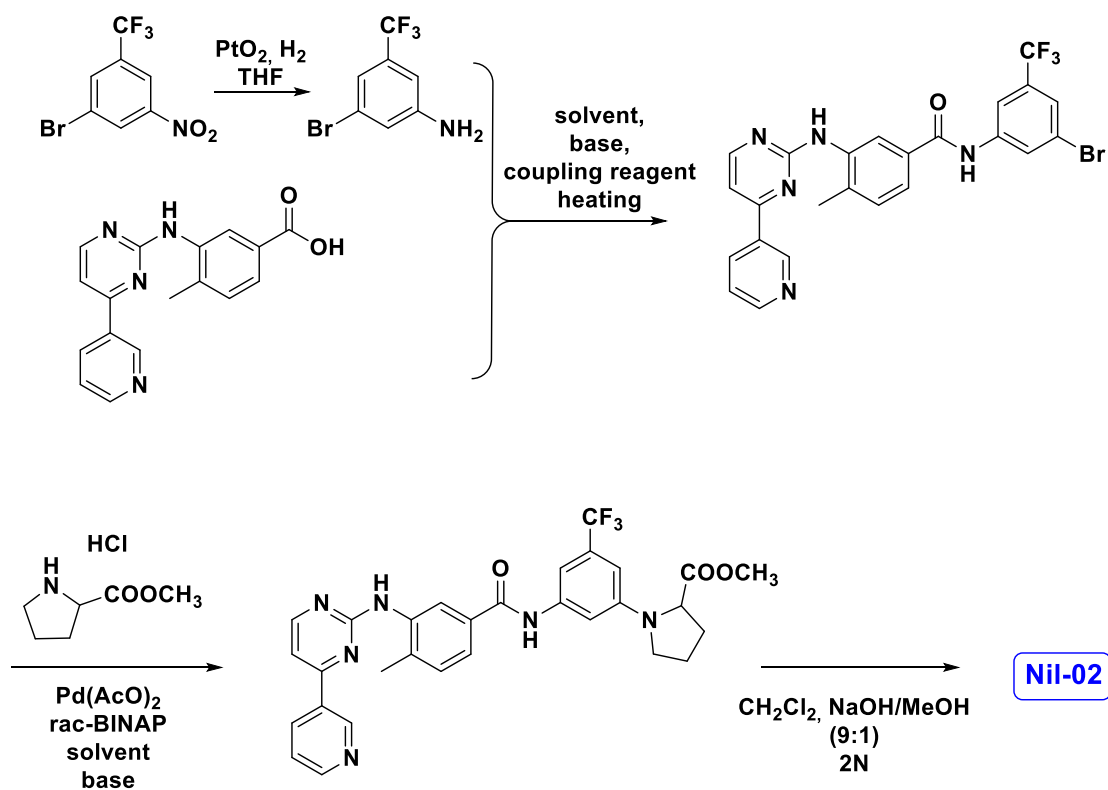
Σχήμα 3.90: Ολική πορεία σύνθεσης 2<sup>ης</sup> εναλλακτικής μεθόδου για το σχηματισμό του αναλόγου Nil-02.

Στη 2<sup>η</sup> εναλλακτική προσέγγιση σύνθεσης του αναλόγου Nil-02, πρώτα διενεργείται μια αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού κατά τον κλασικό μηχανισμό, μέσω ενεργοποίησης του οξέος. Ο δεσμός αυτός σχηματίζεται μεταξύ του οξέος και του 3-αμινο-5-φθορο-τριφθορομεθυλοβενζολίου, μιας εμπορικά διαθέσιμης ένωσης. Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιείται μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση, όπου η καλή αποχωρούσα ομάδα F<sup>-</sup> υποκαθίσταται από τον πενταμελή δακτύλιο της προλίνης, σε σχετικά δραστικές συνθήκες. Τελικά, το ανάλογο Nil-02 λαμβάνεται μετά και από μια αντίδραση υδρόλυσης, όπου ο μεθυλεστέρας της προλίνης υδρολύεται και τη θέση του παίρνει το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ.

Πίνακας 3.9: Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεση της ένωσης 14.

N°	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο	Θερμοκρασία
<b>Σύζευξης</b>				
1	Άνυδρο THF	DIPEA	HATU	70 °C
2	Άνυδρο DMF	DIPEA, Et <sub>3</sub> N	HATU	65-70 °C
3	Άνυδρο DMF	Et <sub>3</sub> N	HATU	r.t.
<b>Χλωρίδιο</b>				
4	Άνυδρο CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /2 σταγόνες DMF	Οξαλυλοχλωρίδιο	-	r.t.
5	Άνυδρο THF	Οξαλυλοχλωρίδιο	-	r.t.

### 3.15.3 Ολική σύνθεση 3<sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας



**Σχήμα 3.91:** Ολική πορεία σύνθεσης 3<sup>ης</sup> εναλλακτικής μεθόδου για το σχηματισμό του αναλόγου Nil-02.

Η τελική, αυτή, συνθετική προσέγγιση ξεκινά με μια αντίδραση αναγωγής του εμπορικά διαθέσιμου 3-βρωμο-5-νιτροτριφθορομεθυλοβενζολίου προς την

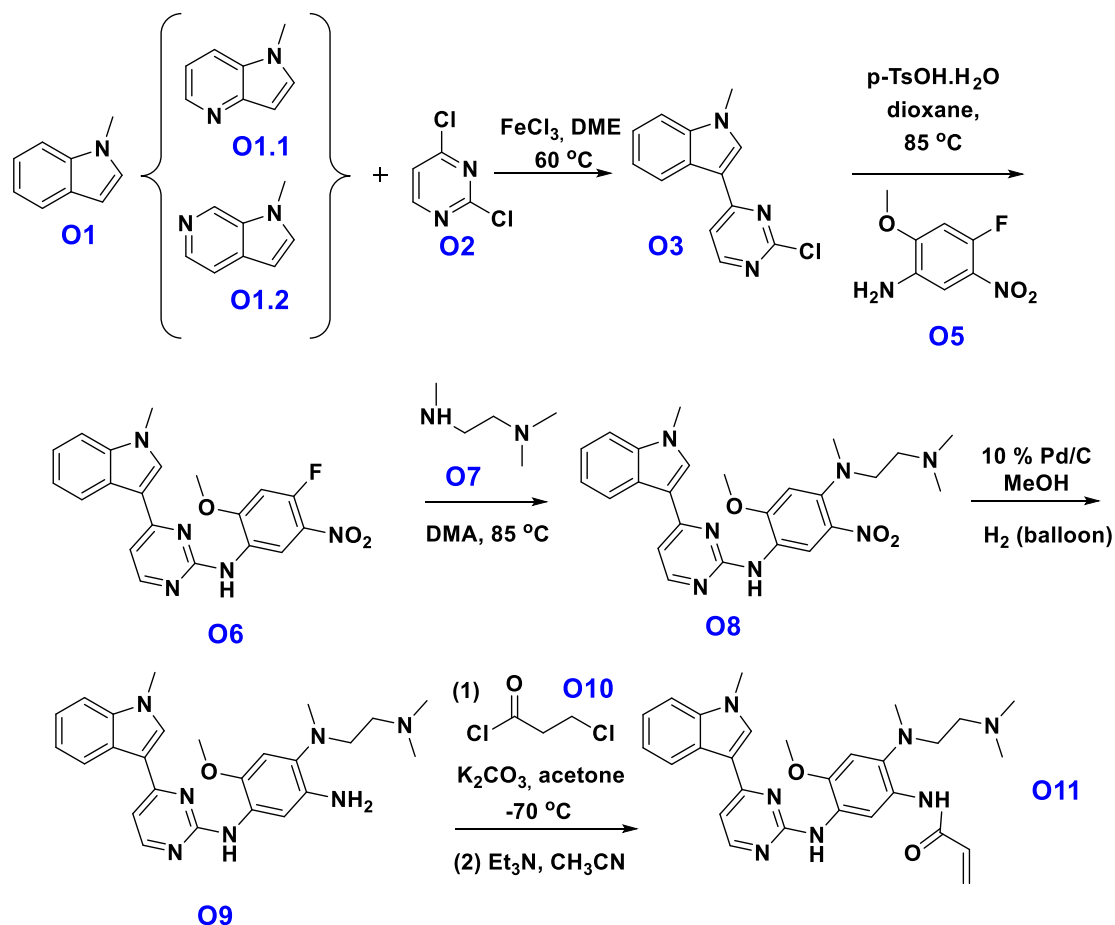
αντίστοιχη ένωση με NH<sub>2</sub>-ομάδα. Η αντίδραση διενεργείται υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου, σε άνυδρο THF και καταλύτη Adam's, PtO<sub>2</sub>. Έχει παρατηρηθεί, ακόμη και στο εργαστήριό μας, πως με τη χρήση 10 %Pd/C κατά την αναγωγή, λαμβάνει χώρα μια ανεπιθύμητη απόσπαση του ατόμου βρωμίου.

Το ανηγμένο υπόστρωμα, εν συνεχεία, αντιδρά με το ενεργοποιημένο οξύ σε μια κλασική αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού. Το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού διαδέχεται μια αντίδραση υποκατάστασης τύπου Buchwald-Hartwig, όπου τη θέση του ατόμου βρωμίου παίρνει ο δακτύλιος της προλίνης. Το τελικό ανάλογο Nil-02 λαμβάνεται, και σε αυτή την περίπτωση, με υδρόλυση με μεθανολικό διάλυμα καυστικού νατρίου και CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> σε αναλογία 1:9.

## B. Σύνθεση αναλόγων του Osimertinib

### 3.16 Ολική πορεία σύνθεσης αναλόγων του Osimertinib

Η πειραματική πορεία που ακολουθείται στο εργαστήριο, και παρατίθεται παρακάτω, για τη σύνθεση των αναλόγων του Osimertinib, έχουν ληφθεί υπόψη η πρώτη πειραματική πορεία που έχει καταχωρήσει η εταιρία. Σκοπός είναι η σύνθεση του Osimertinib και των αναλόγων του, ξεκινώντας με γνωστές συνθήκες και προσπαθώντας να διενεργήσουμε κάποιες τροποποιήσεις-βελτιστοποιήσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης.



**Σχήμα 3.92:** Ολική συνθετική πορεία των αναλόγων του Osimertinib, όπως καταχωρήθηκε από την εταιρία.

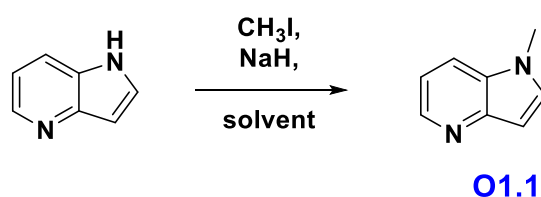
Η πρώτη αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την συνθετική πορεία των αναλόγων του Osimertinib είναι μια αντίδραση μεθυλίωσης του αζώτου του πυρρολικού δακτυλίου του ινδολίου, εφόσον προμηθευτήκαμε τα μη-μεθυλωμένα αζα-ινδόλια που ήταν οικονομικότερα από τα αντίστοιχα που έφεραν τις μεθυλομάδες στο N του ινδολίου. Με την προσθήκη βάσης, το όξινο ινδολικό πρωτόνιο αποσπάται, ενώ

σε δεύτερο στάδιο με την προσθήκη ιωδομεθανίου, μέσω ενός μηχανισμού πυρηνόφιλης υποκατάστασης, λαμβάνεται το μεθυλιωμένο, πλέον, παράγωγο. Εν συνεχεία, μια αντίδραση με μηχανισμό ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης πραγματοποιείται μεταξύ του N-μεθυλινδολίου και της 2,4-διχλωροπυριμιδίνης. Εδώ, παρουσία ενός καταλύτη, οξύ κατά Lewis, το ένα άτομο χλωρίου αποσπάται αφήνοντας πίσω του θετικό φορτίο. Ως εκ τούτου, ο με περίσσεια ηλεκτρονίων πυρρολικός δακτύλιος του ινδολίου προσβάλλει εκείνη τη θέση με αποτέλεσμα μια υποκατάσταση στη θέση-3 του ινδολικού δακτυλίου, που είναι και η πλέον δραστική για αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ακολούθως, μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με μηχανισμό προσθήκης/απόσπασης λαμβάνεται η επόμενη ένωση, με τους τέσσερις, πλέον, δακτυλίους. Με την πραγματοποίηση, ακόμη, μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, εισάγεται στο σύστημα μια διαμίνη. Τέλος, με διαδοχικές αντιδράσεις, μια αναγωγή, προσθήκη χλωριδίου και απόσπαση HCl προκύπτει το τελικό επιθυμητό προϊόν, με τη χαρακτηριστική δομή α,β-ακόραστης καρβονυλικής ένωσης που προσδίδει την ιδιαιτερότητα στη δέσμευση στην πρωτεϊνική κινάση των αναστολέων αυτού του τύπου.

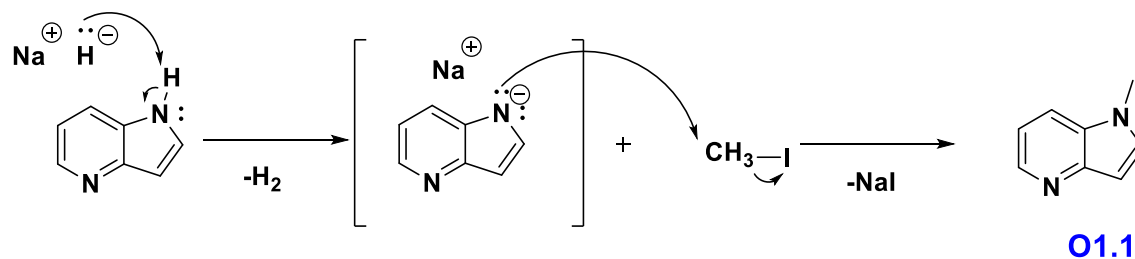
### 3.17 Σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης

#### 3.17.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης

Η αντίδραση μετατροπής της πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης στην αντίστοιχη N-μεθυλιωμένη ένωση είναι μια αντίδραση N-υποκατάστασης, και ειδικότερα N-αλκυλίωσης. Η προσθήκη βάσης έχει στόχο την αποπρωτονίωση του όξινου πρωτονίου του αζώτου του πυρρολικού δακτυλίου. Ο αυξημένος πυρηνόφιλος χαρακτήρας του αζώτου, όπως φαίνεται και στον παρακάτω μηχανισμό, προσβάλλει μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης  $SN^2$ , το μεθυλ-ιωδίδιο. Το άτομο αζώτου, τώρα, έχει μια μεθυλομάδα, ενώ σχηματίζεται NaI.



**Σχήμα 3.93:** Αντίδραση σύνθεσης της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης.



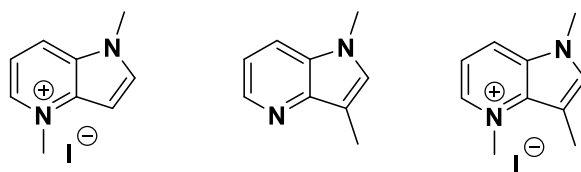
**Σχήμα 3.94:** Μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης.

**Πίνακας 3.10:** Πειραματικές συνθήκες κατά τη σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης.

N <sup>ο</sup>	Πυρρολο[2,3-d]πυριδίνη	Βάση NaH 60 %	CH <sub>3</sub> I	Διαλύτης	Θερμοκρασία
1	1	1.5	1.5	Άνυδρο DMF	0 °C-rt
2	1	1.5	1.1	Άνυδρο DMF	0 °C-rt
3	1	1.5	1.1	Άνυδρο DMF	0 °C
4	1	1.5	1.1	Άνυδρο DMF	-50 °C
5	1	1	1	o-xylene	0 °C -reflux
6	1	1.1	1.2	Άνυδρο DMF	0 °C-5 °C (~90 %)
7	1	1.2	1.2	Άνυδρο THF	0 °C/5 min

Κατά την αντίδραση σύνθεσης της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες όπως αυτές καταγράφονται στον παραπάνω πίνακα. Κατά τη διεξαγωγή των περισσότερων εξ αυτών των πειραμάτων, λαμβάναμε ένα τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας, καθώς το N του πυριδινικού δακτυλίου του ινδολίου δεν προσφέρει το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του για την αρωματικότητα του συστήματος και έχει αυξημένη βασικότητα σε σχέση με το άτομο N του πυρρολικού δακτυλίου. Με προσθήκη βάσης, ο ήδη βασικός χαρακτήρας αυτού του ατόμου αζώτου ενισχύεται. Οπότε, μια N-μεθυλίωση είναι πολύ πιθανό να λάβει χώρα σε εκείνη τη θέση.

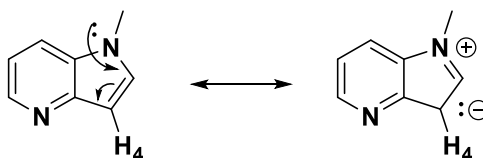
Ακόμη ένα πιθανό παραπροϊόν είναι αυτό που λαμβάνεται κατά την ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση, στην πλέον δραστική θέση του ινδολικού δακτυλίου, τη θέση 3.



**Σχήμα 3.95:** Πιθανά παραπροϊόντα της αντίδρασης της N-μεθυλίωσης.

### 3.17.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της N-μεθυολ-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης

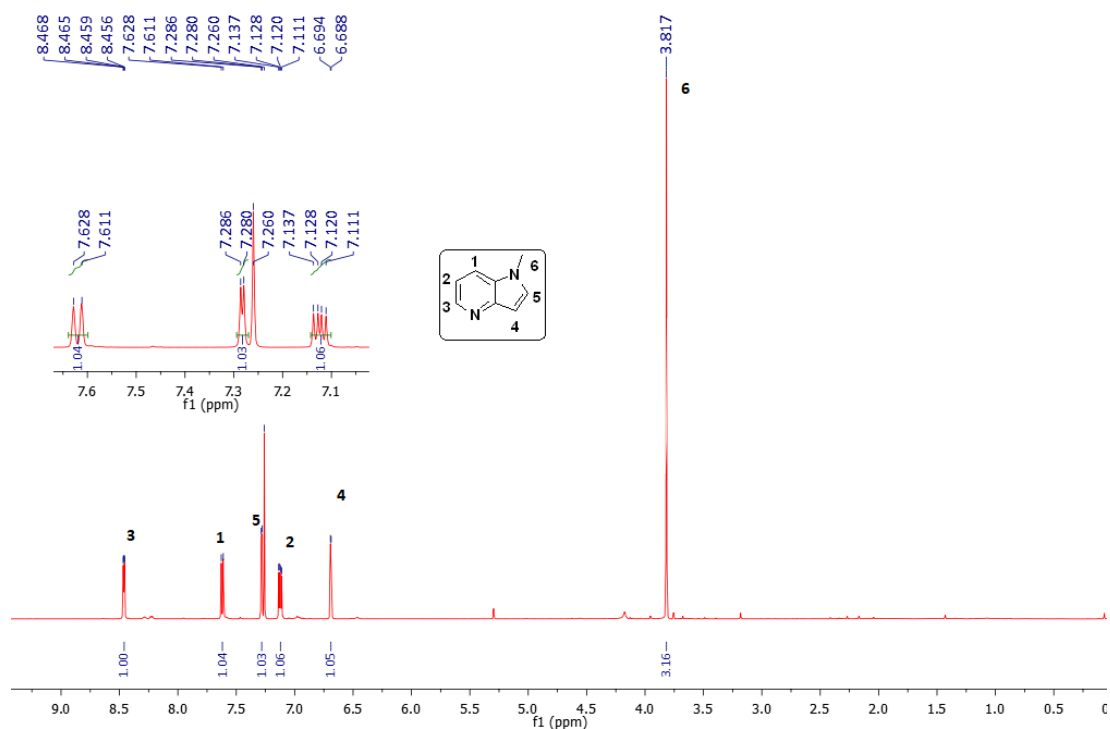
Παρατηρώντας το φάσμα της ένωσης, εντοπίζουμε το πρωτόνιο 4 ως το πιο προστατευμένο πρωτόνιο, εκ των αρωματικών. Το σήμα που λαμβάνεται είναι μία διπλή κορυφή στα 8.468 ppm που αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό πρωτόνιο, το H<sub>4</sub>. Το εν λόγω πρωτόνιο θεωρείται ως το πιο προστατευμένο, καθώς βάσει της παρακάτω δομής συντονισμού, λόγω της εκδήλωσης του θετικού συζυγιακού φαινομένου από το άτομο αζώτου του πυρρολικού δακτυλίου του ινδολίου, ο άνθρακας που βρίσκεται στη θέση 3 του δακτυλίου και κατ' επέκταση το ίδιο το πρωτόνιο, αντιλαμβάνεται σχετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Το πρωτόνιο αυτό, δίνει τελικά ένα σήμα διπλή-διπλής σχάσης με σταθερά σύζευξης  $^3J=2.6$  Hz.



**Σχήμα 3.96:** Δομή συντονισμού που δηλώνει την προστασία που δέχεται από το θετικό φαινόμενο συντονισμού του N το H<sub>4</sub>.

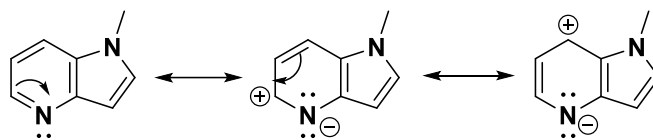
Ως πιο αποπροστατευμένο εμφανίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 (H<sub>3</sub>). Αυτό συντονίζεται στα 8.468 ppm ως μια διπλή-διπλής κορυφή και με σταθερά σύζευξης  $^3J=4.7$  Hz και σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης  $^4J=1.4$  Hz. Η σχετική αποπροστασία του πρωτονίου εξηγείται βάσει της θέσης του δίπλα στο ηλεκτραρνητικό άτομο αζώτου που έλκει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα προς το μέρος του, με αποτέλεσμα το H<sub>3</sub> να αντιλαμβάνεται έλλειψη ηλεκτρονίων.





**Σχήμα 3.97:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του N-μεθυλ-πυρρολο[2,3-d]πυριδίνης CDCl<sub>3</sub> στα 500 MHz.

Κατ' αναλογία με το H<sub>3</sub>, εξηγείται και η σχετική αποπροστασία του πρωτονίου H<sub>1</sub>, το οποίο εμφανίζεται ως το δεύτερο πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης. Έτσι, το πρωτόνιο H<sub>1</sub> συντονίζεται σε μια διπλή κορυφή στα 2.286 ppm με σταθερά σύζευξης της τάξεως των 3.2 Hz. Περισσότερο προστατευμένο από τα πρωτόνια H<sub>3</sub> και H<sub>1</sub>, εμφανίζεται το πρωτόνιο H<sub>5</sub>, το οποίο αν και το ίδιο βρίσκεται σε θέση γειτονική ως προς ένα άτομο N, δεν αντιλαμβάνεται την ίδια έλλειψη ηλεκτρονίων όπως τα άλλα δύο πρωτόνια. Αυτό γιατί ο πενταμελής δακτύλιος στον οποίο βρίσκεται το πρωτόνιο H<sub>5</sub>, είναι δακτύλιος περίσσειας ηλεκτρονίων, με την έννοια ότι 6 π ηλεκτρόνια μοιράζονται στα πέντε άτομα του δακτυλίου. Σε αντιδιαστολή, ο εξαμελής δακτύλιος που βρίσκονται τα άλλα δύο πρωτόνια είναι ένας δακτύλιος έλλειψης ηλεκτρονίων, καθώς ο ίδιος αριθμός π ηλεκτρονίων, δηλαδή 6 π ηλεκτρόνια, μοιράζονται στα έξι άτομα του δακτυλίου. Ειδικότερα, οι θέσεις που βρίσκονται τα πρωτόνια H<sub>1</sub> και H<sub>3</sub> είναι αυτές που αντιλαμβάνονται περισσότερο το εκδηλούμενο θετικό φαινόμενο συντονισμού του ατόμου N του πυριδινικού δακτυλίου του ινδολίου, όπως καταδεικνύεται από τις παρακάτω δομές συντονισμού.



**Σχήμα 3.98:** Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία των πρωτονίων H<sub>1</sub> και H<sub>3</sub>.

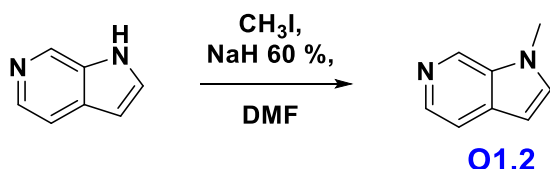
Τέλος, το πρωτόνιο H<sub>2</sub>, συντονίζεται ως μια διπλή-διπλής κορυφή στα 7.137 ppm με σταθερές σύζευξης  $^3J=8.3$  Hz και  $^4J=4.6$  Hz. η μεθυλομάδα συντονίζεται, όπως αναμένεται, σε μια απλή κορυφή στα 3.817 ppm, αισθητά αποπροστατευμένη, αφού εντοπίζεται πάνω σε άτομο N.

Το απρόσμενο, όσον αφορά το παραπάνω φάσμα, σχετίζεται με τις τιμές των σταθερών σύζευξης. Αυτές είναι αρκετά μικρότερες από τις αναμενόμενες για ινδολικούς δακτυλίους. Ειδικότερα, οι τιμές που δίνονται από τη βιβλιογραφία κυμαίνονται από 7-9 Hz, ενώ οι υπολογισθείσες παρουσιάζουν ένα τελείως διαφορετικό εύρος τιμών. Το αποτέλεσμα αυτό, θα μπορούσε, ίσως, να ερμηνευτεί βάσει της ύπαρξης του δεύτερου ατόμου αζώτου στο αρωματικό σύστημα του ινδολίου.

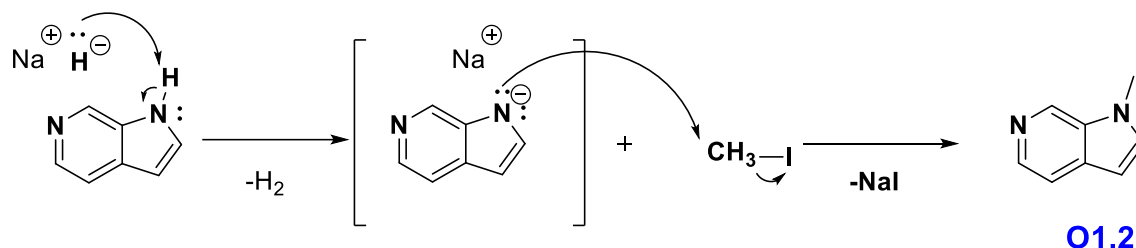
### 3.18 Σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-c]πυριδίνης

#### 3.18.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-c]πυριδίνης

Η αντίδραση μετατροπής της πυρρολο[2,3-c]πυριδίνης στην αντίστοιχη N-μεθυλιωμένη ένωση είναι μια αντίδραση N-υποκατάστασης και ειδικότερα N-ακυλίωσης. Η προσθήκη βάσης έχει στόχο την αποπρωτονίωση του όξινου πρωτονίου του αζώτου του πυρρολικού δακτυλίου. Ο αυξημένος πυρηνόφιλος χαρακτήρας του αζώτου, όπως φαίνεται και στον παρακάτω μηχανισμό, προσβάλλει μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης S<sub>N</sub><sup>2</sup>, το μεθυλο-ιωδίδιο. Το άτομο αζώτου, τώρα, έχει μια μεθυλομάδα, ενώ σχηματίζεται NaI.



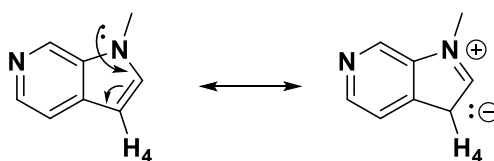
**Σχήμα 3.99:** Αντίδραση σύνθεσης του N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-*c*]πυριδίνης.



**Σχήμα 3.100:** Μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-*c*]πυριδίνης.

### 3.18.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της N-μεθυλο-πυρρολο[2,3-*c*]πυριδίνης

Παρατηρώντας το φάσμα της ένωσης, εντοπίζουμε το πρωτόνιο ως το πιο προστατευμένο πρωτόνιο, εκ των αρωματικών. Το σήμα που λαμβάνεται είναι μία διπλή κορυφή στα 6.480 ppm που αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό πρωτόνιο, το πρωτόνιο 4. Το εν λόγω πρωτόνιο θεωρείται ως το πιο προστατευμένο, καθώς βάσει της παρακάτω δομής συντονισμού, λόγω της εκδήλωσης του θετικού συζυγιακού φαινομένου από το άτομο αζώτου του πυρρολικού δακτυλίου του ινδολίου, το πρωτόνιο αντιλαμβάνεται σχετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα.



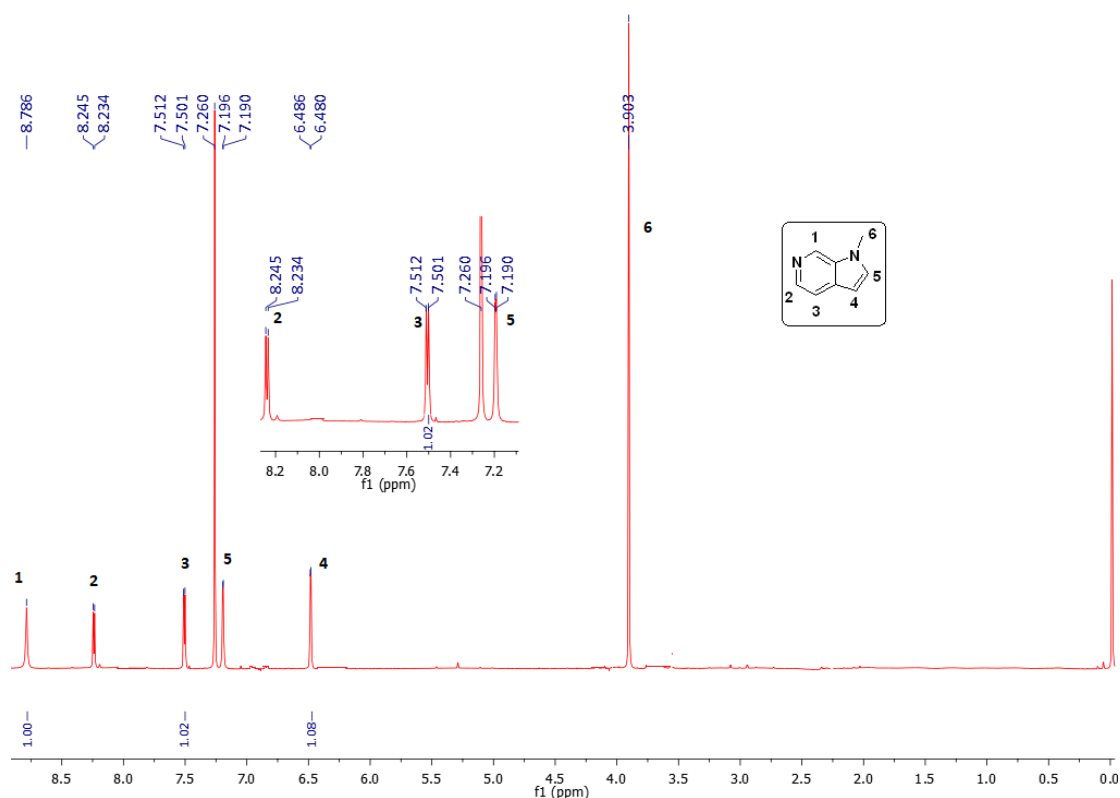
**Σχήμα 3.101:** Δομή συντονισμού που δηλώνει την προστασία που δέχεται από το θετικό φαινόμενο συντονισμού του N το H<sub>4</sub>.

Ακόμη το πρωτόνιο 4 (H<sub>4</sub>) εμφανίζει μία τιμή σταθεράς σύζευξης της τάξεως των 2.8 Hz.

Σε χαμηλότερες τιμές πεδίων, δηλαδή σε υψηλότερες τιμές δ, εντοπίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 (H<sub>1</sub>). Πρόκειται για μία απλή κορυφή στα 8.786 ppm, ενώ η

σχετική αποπροστασία του εν λόγω πρωτονίου δικαιολογείται βάσει της θέσης του, μεταξύ δύο ηλεκτραρνητικών ατόμων αζώτου που έλκουν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα προς το μέρος τους.

Εν συνεχεία, εντοπίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 (H<sub>2</sub>). Το σήμα που δίνει το συγκεκριμένο πρωτόνιο είναι μια κορυφή με διπλή σχάση στα 8.245 ppm και μια σταθερά σύζευξης της τάξεως των 5.5 Hz. Η σχετική του αποπροστασία εξηγείται από τη θέση του στο δακτύλιο, καθώς βρίσκεται σε γειτονική θέση ως προς το ηλεκτραρνητικό άτομο αζώτου του πυριδινικού δακτυλίου του ινδολίου. Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζεται πιο αποπροστατευμένο από το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5 (H<sub>5</sub>), το οποίο καταλαμβάνει, εξίσου, θέση δίπλα σε ένα άτομο αζώτου, καθώς ο πυριδινικός δακτύλιος είναι ένας δακτύλιος έλλειψης ηλεκτρονίων, σε σχέση με τον πυρρολικό δακτύλιο ο οποίος είναι δακτύλιος με περίσσεια ηλεκτρονίων. Το H<sub>5</sub> συντονίζεται στα 7.196 ppm ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης 3 Hz.



**Σχήμα 3.102:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της N-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-c]πυριδίνης CDCl<sub>3</sub> στα 500 MHz.

Επιπλέον, το πρωτόνιο H<sub>3</sub> συντονίζεται ως μια διπλή κορυφή, αφού αντιλαμβάνεται ένα μόνο γειτονικό υδρογόνο, στα 7.512 ppm με μια σταθερά σύζευξης 5.5 Hz.

Τέλος, η μεθυλομάδα εμφανίζεται σχετικά αποπροστατευμένη, ως αναμένεται, σε μια απλή κορυφή τριών ισοδύναμων πρωτονίων στα 3.903 ppm.

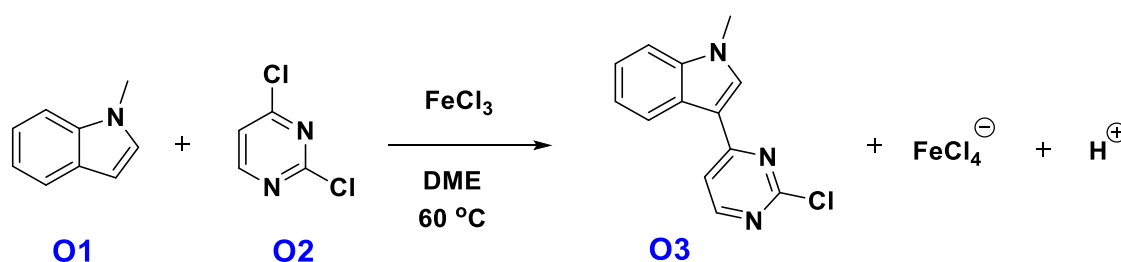
Το παράδοξο του φάσματος αυτού εντοπίζεται στις πολύ χαμηλές τιμές των σταθερών σύζευξης, οι οποίες απέχουν αρκετά από τις αναμενόμενες για ινδολικούς δακτυλίους. Αυτές οι τιμές είναι μεταξύ των 7 και 9 Hz, ενώ στο συγκεκριμένο φάσμα οι τιμές κυμαίνονται στα 3-5.5 Hz. Το γεγονός αυτό, μπορεί, ίσως, να εξηγηθεί βάσει της ύπαρξης ενός ακόμη ατόμου N στο αρωματικό σύστημα του ινδολίου.

### 3.19 Σύνθεση του 3-(2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1H-ινδολίου

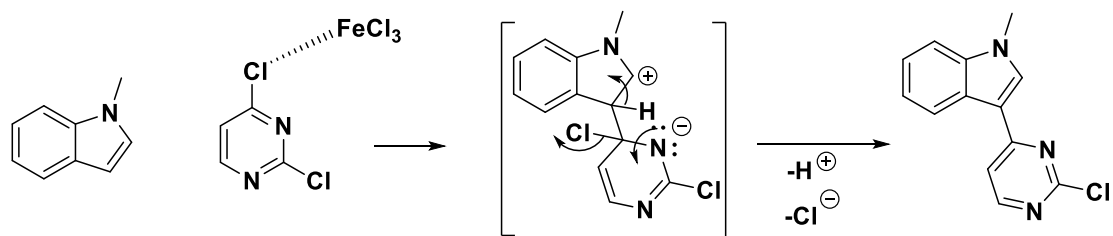
#### 3.19.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του 3-(2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1H-ινδολίου

Το N-μεθυλινδόλιο συνδέεται με τη 2,4-διχλωροπυριμιδίνη μέσω μια αντίδρασης ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, εάν προσεγγίσουμε την αντίδραση από τη σκοπιά του ινδολίου. Σε περίπτωση που λάβουμε υπόψη τη διχλωροπυριμιδίνη σαν αρχική ένωση, η αντίδραση λαμβάνει χώρα μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με μηχανισμό προσθήκης/απόσπασης.

Στην περίπτωση της ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, το οξύ Lewis που χρησιμοποιείται έχει σκοπό τη δημιουργία ενός μερικού θετικού φορτίου στον πυριμιδινικό δακτύλιο, έλκοντας προς το μέρος του το ένα άτομο χλωρίου.



Σχήμα 3.103: Αντίδραση σύνθεσης του 3-(2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1H-ινδολίου.



**Σχήμα 3.104:** Μηχανισμός ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης κατά τη σύνθεση του 3-(2-χλωροπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1H-ινδολίου.

Εν συνεχεία, το «ηλεκτρονιόφιλο» δέχεται την προσβολή από ένα π ζεύγος ηλεκτρονίων του πυρρολικού δακτυλίου του ινδολίου. Η υποκατάσταση θα λάβει χώρα στη θέση-3 του ινδολικού δακτυλίου, την πλέον δραστική για αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Με την προσβολή σχηματίζεται ένα μη αρωματικό κατιονικής φύσης σ-σύμπλοκο, το οποίο μετασχηματίζεται στο τελικό επιθυμητό αρωματικό προϊόν μέσω μιας απόσπασης  $H^+$ , σε ένα μη καθοριστικό για την ταχύτητα της αντίδρασης στάδιο.

Κατά τη διεξαγωγή αυτής της πρώτης ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, έλαβαν χώρα μερικές δοκιμαστικές αντιδράσεις, με ποικίλες συνθήκες σε μια προσπάθεια μας, να τροποποιήσουμε ή/και να βελτιστοποιήσουμε τη συνθετική πορεία που χρησιμοποιεί η εταιρία.

**Πίνακας 3.11:** Συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της πρώτης αντίδρασης ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.

N°	N-μεθυλο-ινδόλιο	2,4-δichλωρο-πυριμιδίνη	Καταλύτης (Οξύ Lewis)	Διαλύτης	Θερμοκρασία
1	1 eq	1 eq	$FeCl_3$ 1 eq	Δις-(2-μεθοξυ-αιθυλ)αιθέρας (diglyme)	70-120 °C
2	1 eq	1 eq	$FeCl_3$ 1 eq	Δις-(2-μεθοξυ-αιθυλ)αιθέρας (diglyme)	110 °C
3	1 eq	1 eq	$AlCl_3$ 1 eq	Δις-(2-μεθοξυ-αιθυλ)αιθέρας (diglyme)	80-110 °C
4	1 eq	1 eq	$AlCl_3$ 1 eq	Δις-(2-μεθοξυ-αιθυλ)αιθέρας	110 °C

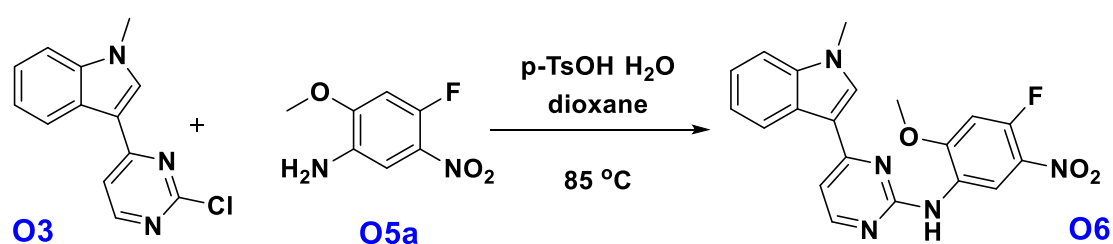
				(diglyme)	
5	1 eq	1 eq	FeCl <sub>3</sub> 1 eq	EtOAc (Οξικός αιθυλεστέρας)	60 °C

Τελικά, καμία από τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες δεν επικράτησε στις προσπάθειες σύνθεσης του Osimertinib και των αναλόγων του, καθώς οι αποδόσεις στους περισσότερους συνδυασμούς ήταν πολύ μικρές. Ως εκ τούτου, επικράτησε ο διαλύτης που χρησιμοποιεί και η ίδια η εταιρία (Διμεθοξυ-αιθάνιο, glyme, DME), όπου οι αποδόσεις είναι πολύ υψηλότερες. Οι προσπάθειες βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας του Osimertinib και των αναλόγων του, συνεχίζονται από την ερευνητική μας ομάδα.

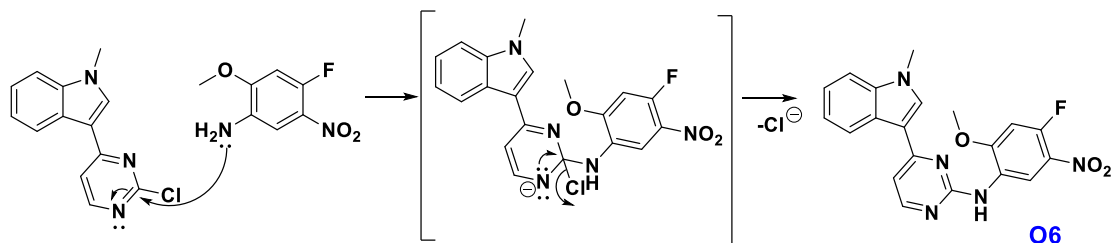
### 3.20 Σύνθεση της N-(4-φθορο-2-μεθοξυ-5-νιτροφαινυλ)-4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-αμίνης

#### 3.20.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της N-(4-φθορο-2-μεθοξυ-5-νιτροφαινυλ)-4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-αμίνης

Η σύνθεση της N-(4-φθορο-2-μεθοξυ-5-νιτροφαινυλ)-4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ)πυριμιδιν-2-αμίνης είναι μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ειδικότερα ο μηχανισμός μέσω του οποίου διενεργείται η υποκατάσταση είναι αυτός της προσθήκης/απόσπασης.



**Σχήμα 3.105:** Αντίδραση κατά τη σύνθεση της N-(4-φθορο-2-μεθοξυ-5-νιτροφαινυλ)-4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-αμίνης.

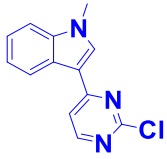
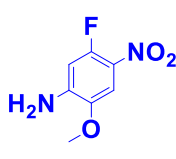


**Σχήμα 3.106:** Μηχανισμός κατά τη σύνθεση της ένωσης O6.

Συγκεκριμένα, προτιμάται ο μηχανισμός προσθήκης/απόσπασης, καθώς υπάρχει μια αποχωρούσα ομάδα και δύο ενσωματωμένα άτομα αζώτου στις γειτονικές θέσεις ως προς αυτήν, που έλκουν ισχυρά ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Ως εκ τούτου, το τελικό επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται με την απόσπαση ενός ατόμου χλωρίου, από ένα μη αρωματικό ανιονικής φύσης ενδιάμεσο σύπλοκο Meisenheimer.

Στα πρώτα στάδια της ενασχόλησης μας με τη σύνθεση του Osimertinib, κατά την προσπάθεια της βελτιστοποίησης της συνθετικής του οδού, δοκιμάστηκαν κάποιες πειραματικές συνθήκες από την ερευνητική μας ομάδα, όπως αυτές αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 3.12:** Δοκιμαστικές πειραματικές προσεγγίσεις της σύνθεσης της ένωσης O6, χωρίς, όμως την προστασία της NH<sub>2</sub>-ομάδας.

N <sup>ο</sup>			TsOH·H <sub>2</sub> O	Διαλύτης	Θερμοκρασία
1	1 eq	1 eq	1.2 eq	n-Βουτανόλη	60-120 °C
2	1 eq	1 eq	1.2 eq	1,4-Διοξάνιο	~85 °C
3	1 eq	1 eq	1.2 eq	2-Προπανόλη	~80 °C

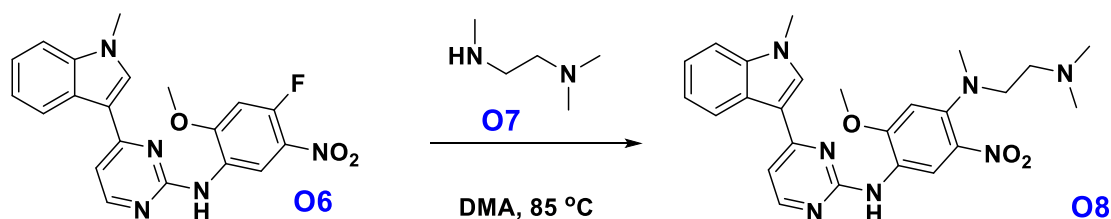
Στη διεξαγωγή της παραπάνω αντίδρασης, όσον αφορά τη δική μας συνθετική προσέγγιση του Osimertinib και αναλόγων του, κυριάρχησε να χρησιμοποιείται διαλύτης 1,4-διοξάνιο σε θερμοκρασία που προσεγγίζει τους 85 °C, κατά ομολογία με τη σύνθεση της εταιρίας.



### 3.21 Σύνθεση της *N*<sup>1</sup>-(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλ)-5-μεθοξυ-*N*<sup>1</sup>-μεθυλ-*N*<sup>4</sup>-4-(1-μεθυλ-1*H*-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-υλ)-2-νιτροβενζολο-1,4-διαμίνης

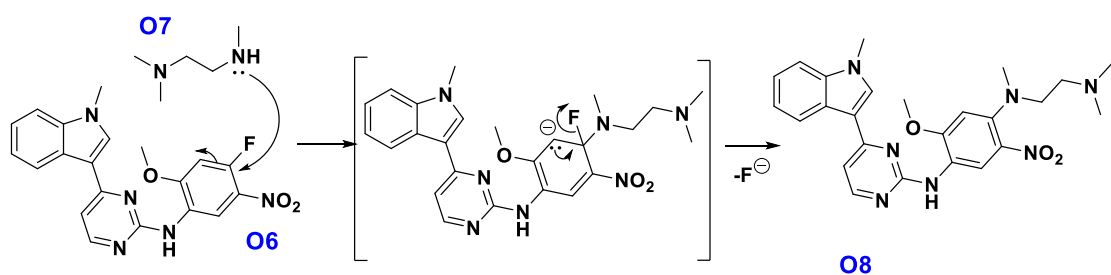
#### 3.21.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της *N*<sup>1</sup>-(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-*N*<sup>1</sup>-μεθυλ-*N*<sup>4</sup>-4-(1-μεθυλ-1*H*-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-υλ)-2-νιτροβενζολο-1,4-διαμίνης

Στι στάδιο αυτό διενεργείται ακόμη μία πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση, μέσω μηχανισμού προσθήκης/απόσπασης. Όπως και στην ως άνω περίπτωση, η ύπαρξη μιας καλής αποχωρούσας ομάδας (άτομο φθορίου), αλλά ο ισχυρός δέκτης ηλεκτρονίων (NO<sub>2</sub>-ομάδα) σε θέση ορθο ως προς αυτήν, είναι στοιχεία που προάγουν έναν τέτοιο μηχανισμό.



Σχήμα 3.107: Αντίδραση κατά τη σύνθεση της ένωσης O8.

Συνεπώς, το τελικό επιθυμητό προϊόν σχηματίζεται μετά από απόσπαση ενός αρνητικά φορτισμένου ατόμου φθορίου από το μη αρωματικό ανιονικής φύσης σύμπλοκο Meisenheimer.

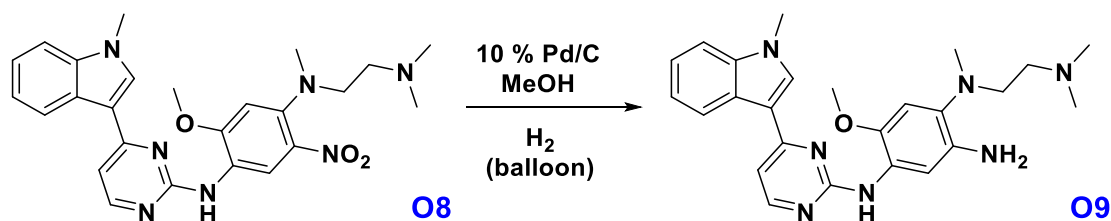


Σχήμα 3.108: Μηχανισμός πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης (προσθήκη/απόσπαση) κατά τη σύνθεση της ένωσης O8.

### 3.22 Σύνθεση της N<sup>1</sup>-(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-N<sup>1</sup>-μεθυλ-N<sup>4</sup>-(4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλ) πυριμιδιν-2-υλ)-τριαμίνης

#### 3.22.1 Αντίδραση κατά τη σύνθεση της N<sup>1</sup>-(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-N<sup>1</sup>-μεθυλ-N<sup>4</sup>-(4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλ)-τριαμίνης

Για τη σύνθεση της N<sup>1</sup>-(2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)-5-μεθοξυ-N<sup>1</sup>-μεθυλ-N<sup>4</sup>-(4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)-τριαμίνης διενεργείται μια αντίδραση αναγωγής με καταλύτη 10 % Pd/C και διαλύτη μεθανόλη σε ατμόσφαιρα υδρογόνου. Η αντίδραση είναι σχεδόν ποσοτική και από το νιτρο-παράγωγο, τελικά, λαμβάνουμε το αμινο-παράγωγο.



Σχήμα 3.109: Αντίδραση αναγωγής κατά τη σύνθεση της ένωσης O9.

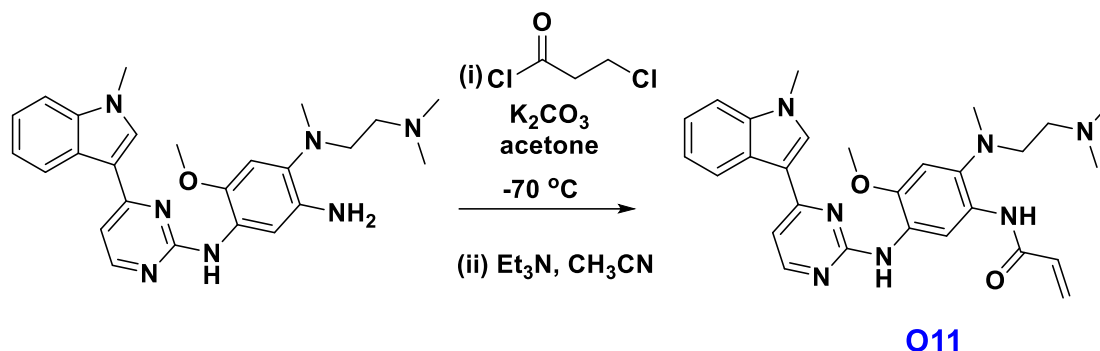
Ο μηχανισμός με τον οποίο λαμβάνει χώρα η αντίδραση αναγωγής είναι ο κλασικός μηχανισμός, που έχει δειχθεί σχηματικά σε παραπάνω ενότητα, όπου από τη νιτρο-ένωση μέσω μετατροπής της στη νιτροζο-ένωση και σε μία N-υποκατεστημένη ένωση, λαμβάνεται τελικά η επιθυμητή αμίνη.

### 3.23 Σύνθεση του N-(2-((2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)μεθυλο)αμινο)-4-μεθοξυ-5-((4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-φαινυλο)ακρυλαμίδιου

#### 3.23.1 Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του N-(2-((2-(διμεθυλαμινο)αιθυλο)μεθυλο)αμινο)-4-μεθοξυ-5-((4-(1-μεθυλ-1H-ινδολ-3-φαινυλο)ακρυλαμίδιου

Για την παραλαβή της τελικής μορφής του Osimertinib και των αναλόγων του απαιτείται, από το στάδιο αυτό, μια ακολουθία δύο βημάτων. Πρώτη στη σειρά, μια αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού. Με προσθήκη ήπιας βάσης, το όξινο πρωτόνιο της αμίνης αποσπάται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο βασικός χαρακτήρας του ατόμου αζώτου. Ως εκ τούτου, μια ακυλο-υποκατάσταση στον

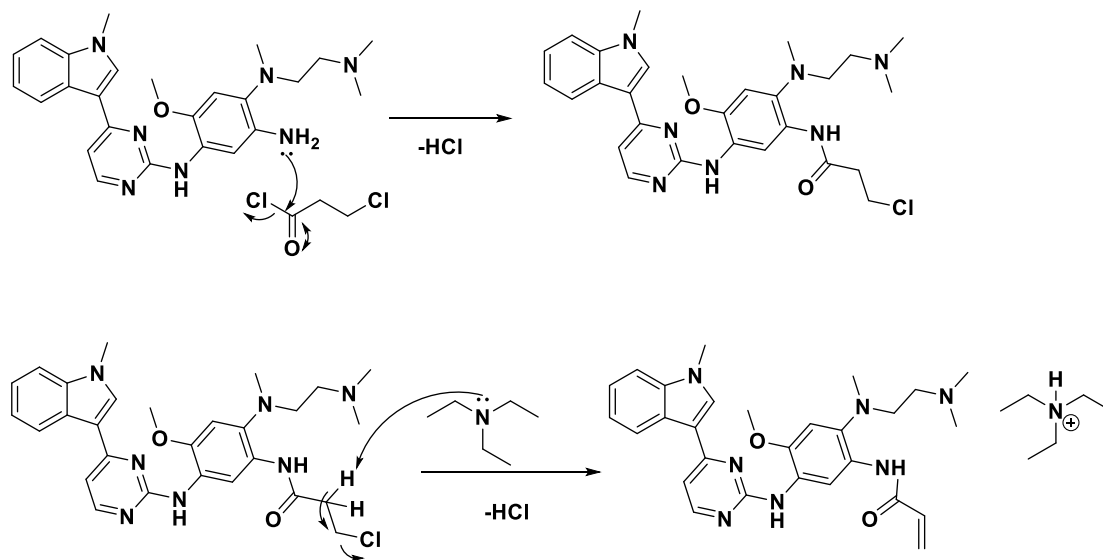
καρβονυλικό άνθρακα του 3-χλωροπροπανοϋλοχλωριδίου διενεργείται ευκολότερα. Δημιουργείται, υπό αυτόν τον τρόπο ένας αμιδικός δεσμός.



**Σχήμα 3.110:** Διαδικασία τριών σταδίων κατά τη σύνθεση της τελικής δομής του Osimertinib.

Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει μια απόσπαση με μηχανισμό  $E_2$ , καθώς χρησιμοποιείται μια ισχυρή βάση, η τριαιθυλαμίνη ( $Et_3N$ ). Η απόσπαση  $E_2$  είναι από τις κλασικές αντιδράσεις απόσπασης, που λαμβάνουν χώρα στα αλκυλαλογονίδια, κατά την οποία μια βάση (ισχυρή, στην περίπτωση των πρωτοταγών αλκυλαλογονιδίων) προσβάλλει ένα γειτονικό άτομο αδρογόνου, προκαλώντας απόσπαση  $HX$  προς σχηματισμό ενός αλκενίου.

Η αντίδραση  $E_2$  λαμβάνει χώρα σε ένα στάδιο, χωρίς τη συμμετοχή ενδιάμεσων. Καθώς, η προσβάλλουσα βάση αρχίζει να αποσπά ένα πρωτόνιο από κάποιον άνθρακα δίπλα στην αποχωρούσα ομάδα, ο δεσμός  $C=C$  αρχίζει να σχηματίζεται και η αποχωρούσα ομάδα αρχίζει να απομακρύνεται, παίρνοντας μαζί της το ζεύγος ηλεκτρονίων του δεσμού  $C-X$ .



O11

**Σχήμα 3.111:** Μηχανισμός κατά τη σύνθεση της τελικής δομής του Osimertinib.

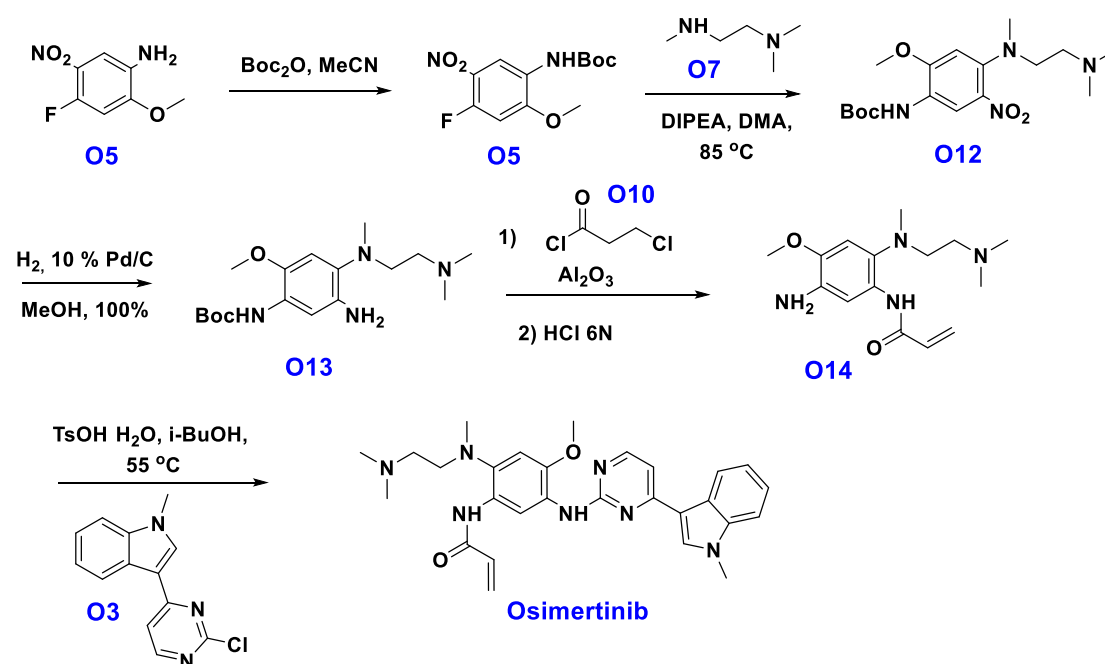
Για να διενεργηθεί μια αντίδραση απόσπασης E2, η γεωμετρία θα πρέπει πάντοτε να είναι ομοεπίπεδη, που σημαίνει ότι και τα τέσσερα αντιδρώντα άτομα –το υδρογόνο, οι δύο άνθρακες και η αποχωρούσα ομάδα- βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο. Η αντι-ομοεπίπεδη γεωμετρία, δηλαδή η γεωμετρία όπου τα H και X βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του μορίου, είναι προτιμότερη από ενεργειακή άποψη, καθώς επιτρέπει στα δύο άτομο άνθρακα να υιοθετήσουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση.

### 3.24 Εναλλακτικές προτεινόμενες πορείες για τη σύνθεση του Osimertinib και των αναλόγων του

#### 3.24.1 Ολική σύνθεση 1<sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας

Για την πρώτη αυτή εναλλακτική προσέγγιση βασιστήκαμε αρχικά στην Κινεζική κατωχύρωση, 6 σταδίων και σχετικά υψηλής απόδοσης (~ 65 %), η οποία παρουσιάστηκε στο θεωρητικό τμήμα (Σχήμα 2.53).

Ακόμη, επιλέξαμε μια τέτοια πορεία, καθώς το κόστος είναι μικρότερο. Τα πρώτα στάδια της πρώτης πορείας, με τις μεθυλιώσεις των αζα-ινδολίων των αναλόγων και η σύζευξη τους με την 2,4-δichλωροπυριμιδίνη, περιείχαν αντιδραστήρια αρκετά ακριβά. Ως εκ τούτου, προτιμήσαμε να έχουμε κάποιο απόθεμα του τμήματος, που παραμένει ίδιο σε όλα τα ανάλογα και το Osimertinib, το οποίο είναι και οικονομικότερο και να απαιτούνται δύο μόνο αντιδράσεις για να λάβουμε τα τελικά ανάλογα, κατ'αντιστοιχία με τη σύνθεση των αναλόγων του Nilotinib.



Σχήμα 3.112: Ολική πορεία σύνθεσης 1<sup>ης</sup> εναλλακτικής μεθόδου για το σχηματισμό του Osimertinib και των αναλόγων του.

Πρόκειται για μία συγκλίνουσα πειραματική πορεία που ξεκινά με την προστασία με *t*-βουτυλοξυκαρβονυλο-ανυδρίτη (Boc-προστασία) της ένωσης **O5**. Οι υπόλοιπες

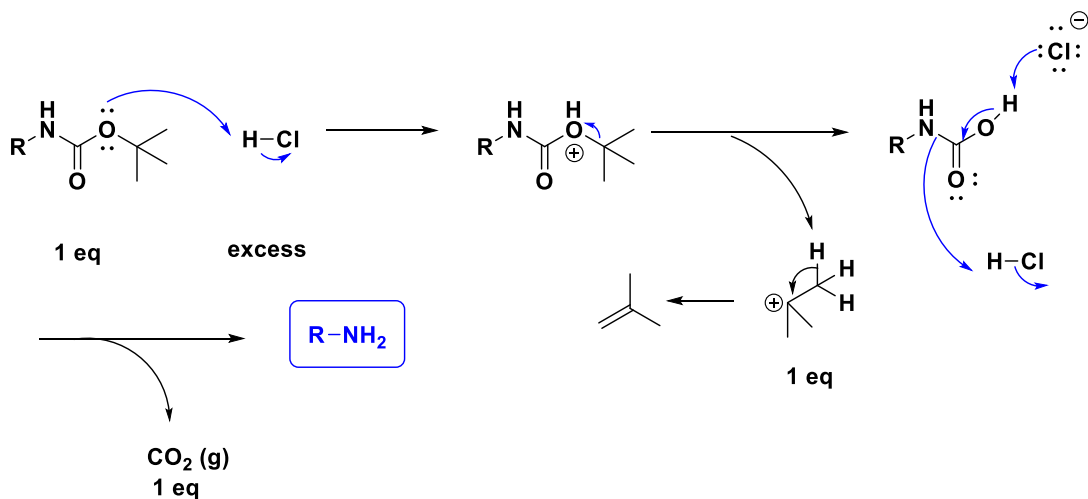
αντιδράσεις διενεργούνται κατ' αντιστοιχία με την πειραματική πορεία που ακολουθήσαμε αρχικά.

Οι κύριες διαφοροποιήσεις μας, συγκριτικά με την Κινεζική κατωχυρωμένη πορεία, εστιάζονται στο στάδιο της απόσπασης του ατόμου χλωρίου για την παραλαβή της δομής της α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ομάδας.

Κατά τη δική μας προσέγγιση το χλωρίδιο (**O10**) προστίθεται απευθείας με την αμίνη **O13** και η απόσπαση με μηχανισμό E2, διενεργείται στο ίδιο στάδιο με την προσθήκη ποσότητας  $Al_2O_3$  στη φιάλη της αντίδρασης με το πέρας αυτής. Καταλήξαμε σε αυτές τις συνθήκες για την απόσπαση, καθώς κατά το στάδιο του καθαρισμού για να παραλάβουμε την ένωση που προέκυπτε από την αντίδραση της αμίνης και του χλωριδίου και λεφερε ακόμη το HCl, χρωματογραφία στήλης με  $Al_2O_3$ , λαμβάναμε, τελικά, ποσότητα όπου το HCl είχε αποσπαστεί. Είχαμε, επομένως, καταφέρει να μειώσουμε τας τα στάδια της πειραματικής πορείας.

Ακόμη η δική μας προσέγγιση υπερισχύει στο γεγονός ότι είναι αρκετά οικονομική, αφού δεν απαιτούνται η διενέργεια ακριβών επεξεργασιών. Συγκεκριμένα, καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης λαμβάνει χώρα, μόνο, κατά το πρώτο στάδιο που λαμβάνεται το προστατευμένο προϊόν. Η επόμενη ένωση **O12** παραλαμβάνεται καθαρή μετά από ανακρυστάλλωση, ενώ η διαμίνη λαμβάνεται ποσοτικά και μετά από διήθηση του καταλύτη προστίθεται απευθείας στην επόμενη αντίδραση.

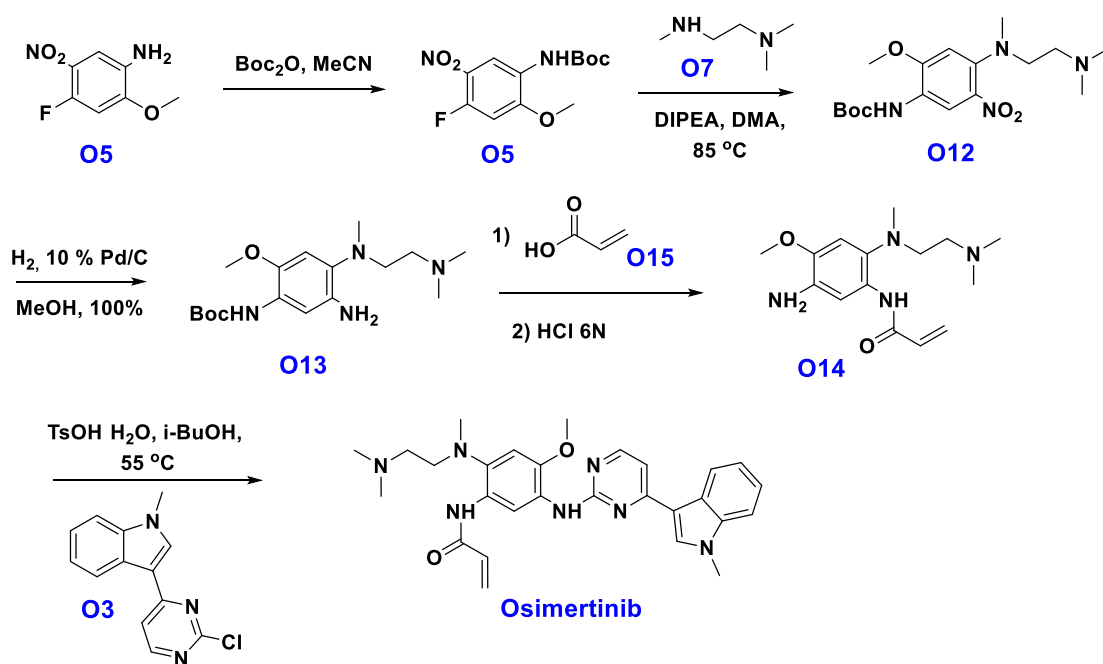
Το στάδιο πριν την τελική αντίδραση σύζευξης, απαιτεί την αποπροστασία της  $NH_2$ -ομάδας, ο οποίος λαμβάνει χώρα με την προσθήκη περίσσειας υδατικού διαλύματος HCl 6N. Ο μηχανισμός αποπροστασίας παρατίθεται παρακάτω.



Σχήμα 3.113: Μηχανισμός Boc-αποπροστασίας.

### 3.24.2 Ολική σύνθεση 2<sup>ης</sup> εναλλακτικής πορείας

Μελλοντικά έχουμε προγραμματίσει να λάβει χώρα η παρακάτω πορεία σύνθεσης. Οι δύο εναλλακτικές είναι πανομοιότητες και η μόνη διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι αντί να γίνεται προσθήκη του χλωριδίου και εν συνεχεία να απαιτείται απόσπαση για να ληφθεί η δομή της α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης, αυτή να προστίθεται έτοιμη για αντίδραση. Έτσι, αντί για την προσθήκη του χλωριδίου να προστίθεται το ακρυλικό οξύ (**O15**) μετά από μία απλή διαδικασία ενεργοποίησης με κάποιο αντιδραστήριο σύζευξης.



Σχήμα 3.114: Ολική πορεία σύνθεσης 2<sup>ης</sup> εναλλακτικής μεθόδου για το σχηματισμό του Osimertinib και των αναλόγων του.

### Πειραματικό μέρος

#### 4.1 Συσκευές και όργανα

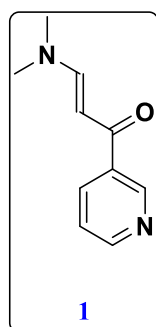
Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AV 400 και 500.

Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Fluka, Fluorochem, Aldrich, Alfa Aesear και Merck και χρησιμοποιήθηκαν, ως επί το πλείστον, χωρίς επεξεργασία. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται, επίσης, από τις παραπάνω εταιρείες. Οι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν για την αναλυτική επεξεργασία των αντιδράσεων και όπου ήταν απαραίτητο κατέστησαν απόλυτοι, ακολούθως δε, διατηρήθηκαν σε αδρανές περιβάλλον, σύμφωνα με τις μεθόδους των Perrin και Armarego.<sup>258</sup>

Ο καθαρισμός των ενώσεων κατέστη εφικτός με χρωματογραφία στήλης μέσης πίεσης, όπου χρησιμοποιήθηκε 9385 silica gel F254 της Merck, καθώς και με παρασκευαστική TLC με τις πλάκες silica gel F254 ms της Merck. Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F254 ms της Merck.

#### 4.2 Σύνθεση του αναλόγου Nil-01

##### 4.2.1 Σύνθεση της ένωσης 1



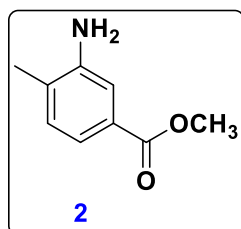
Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml φέρεται διάλυμα 3-ακετυλοπυριδίνης (4 ml,  $d=1.102 \text{ g/ml}$ , 36.3 mmol) σε ο-ξυλόλιο (~15 ml) και θερμαίνεται στους 100 °C με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και σε ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί στάγδην και υπό ανάδευση διάλυμα *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφακετάλης (7.5 ml,  $d=0.859 \text{ gr/ml}$ , 43 mmol) σε ο-ξυλόλιο (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 Et<sub>2</sub>O. Το μίγμα ψύχεται μέχρι να καταβυθιστεί ποσοτικά ίζημα (~24 h), οπότε και ακολουθεί διήθηση και έκπλυση του ιζήματος με ψυχρό διαιθυλαιθέρα. Η εναμινόνη **1** απομονώνεται ως κίτρινο κρυσταλλικό στερεό (78%).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 2.951(s, 3H, H<sub>2</sub>), 3.179 (s, 3H, H<sub>1</sub>), , 5.693 (d, <sup>3</sup>J=12.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.364 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 7.856 (d, <sup>3</sup>J=12.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 8.198 (dt, <sup>3</sup>J=7.6 Hz, <sup>4</sup>J=2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 8.670 (dd, <sup>3</sup>J=6.8 Hz, <sup>4</sup>J=2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 9.078 (s, 1H, H<sub>8</sub>).

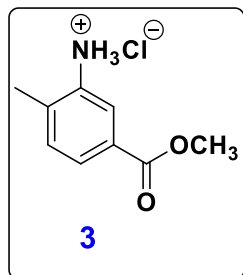
#### 4.2.2 Σύνθεση της ένωσης 2



Σε δίλαιομη σφαιρική φιάλη των 150 ml φέρεται υπό ανάδευση διάλυμα 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος (9.95 g, 66 mmol) σε απόλυτη μεθανόλη (120 ml) και προστίθεται στάγδην π.Η<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4 ml) στους 0 °C. Με την ολοκλήρωση της προσθήκης τουθειϊκούοξέος, το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (90 °C) για 24 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Ακολουθως, στους 0 °C γίνεται ρύθμιση του pH=8-9 με υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (5 %), έτσι ώστε να μεταφερθεί το υπολειπόμενο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ υπό μορφή μετά νατρίου άλατος στην υδατική φάση. Ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα για την απομάκρυνση των αλάτων από την οργανική στοιβάδα, ξήρανση με άνυδρο θειϊκό νάτριο, διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν **2** παραλαμβάνεται καθαρό, σε κρυσταλλική μορφή χρώματος αχνού πορτοκαλί (7.86 g, 48 mmol, 70 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 2.206 (s, 3H, H<sub>5</sub>), 3.699 (s, 2H, H<sub>4</sub>), 3.877 (s, 3H, H<sub>6</sub>), 7.108 (d, <sup>3</sup>J=8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.343 (s, 1H, H<sub>1</sub>), 7.384 (d, <sup>3</sup>J=8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>).

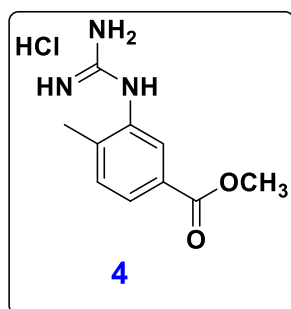
### 4.2.3 Σύνθεση της ένωσης 3



Σε δίλαιομη σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρεται υπό ανάδευση διάλυμα 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα **2** (2.48 g, 15 mmol) σε μεθανόλη (40 ml) και προστίθεται HCl 37 % w/v (3 ml) υπό ψύξη. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, απομακρύνεται ο

διαλύτης και στο ελαιώδες μίγμα που παραλαμβάνεται, προστίθεται διαιθυλαιθέρας προκειμένου να καταβυθιστεί το άλας. Έπειτα, ο αιθέρας συμπυκνώνεται και το στερεό που παραλαμβάνεται ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου (2.93 g, 14.5 mmol, 97%).

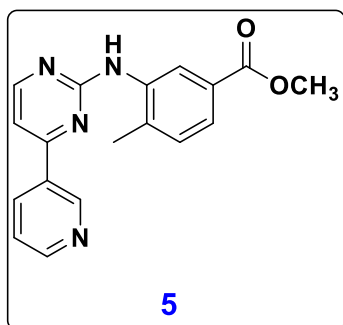
### 4.2.4 Σύνθεση της ένωσης 4



Σε δίλαιομη σφαιρική φιάλη των 50 ml, φέρεται κυαναμίδιο (2.88 g, 68.4 mmol) στους 65 °C με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αργού και ακολούθως προστίθεται το υδροχλωρικό άλας του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος (4.6 g, 22.8 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 στάγδην και υπό ανάδευση διαιθυλαιθέρας έως ότου καταβυθιστεί ίζημα. Ο αιθέρας μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως και η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές με διαιθυλαιθέρα και THF (τετραϋδροφουράνιο). Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (3x8 ml), οπότε παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας της φαινυλογουανιδίνης ως αχνό ροζ στερεό (4.1 g, 20.1 mmol, 88%).

#### 4.2.5 Σύνθεση της ένωσης 5



Σε τρίλιαιμη σφαιρική φιάλη των 250 ml φέρεται, υπό ανάδευση, διάλυμα της ένωσης **4** (4.0 g, 16 mmol) σε *n*-προπανόλη (22 ml) και προστίθεται περίσσεια  $K_2CO_3$  (6.36 g, 46.01 mmol). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση σε ατμόσφαιρα αργού. Όταν η θερμοκρασία

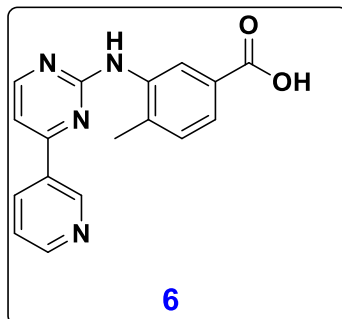
ανέρχεται στο σημείο βρασμού του διαλύτη (97 °C) πραγματοποιείται η προσθήκη της εναμινόνης **1** (2.59 g, 145 mmol) και το μίγμα αφήνεται στις ίδιες συνθήκες επί 48 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), το ίζημα διηθείται υπό κενό και εκπλύνεται με ψυχρή *n*-προπανόλη (20 ml). Το διήθημα, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού για την απομάκρυνση της *n*-προπανόλης και έπειτα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Ο έλεγχος TLC του ιζήματος και της οργανικής φάσης έδειξε την ύπαρξη εναμινόνης, οπότε ακολουθεί καθαρισμός της ένωσης με χρωματογραφία στήλης (οξικό αιθυλεστέρα/μεθανόλη (12:1)). Το προϊόν **5** παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (1.95 g, 6.12 mmol, 42%).

**$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 2.347 (s, 3H, H<sub>11</sub>), 3.326 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 7.399 (d,  $^3J=7.9$  Hz, 1H, H<sub>10</sub>), 7.498 (d,  $^3J=5.1$  Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.552 (dd,  $^3J=8.0$  Hz,  $^4J=4.9$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.670 (dd,  $^3J=7.8$  Hz,  $^4J=1.8$  Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 8.358 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.414-8.444 (dt,  $^3J=8.0$  Hz,  $^4J=2.0$  Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 8.562 (d,  $^3J=5.1$  Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 8.709 (dd,  $^3J=4.7$  Hz,  $^4J=1.8$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 9.087 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 9.286 (s, 1H, H<sub>6</sub>).

#### 4.2.6 Σύνθεση της ένωσης 6

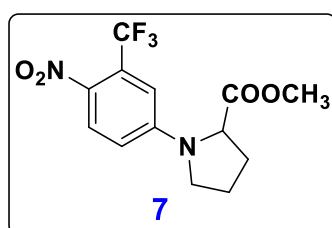
Σε μονόλιαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml προστίθενται υπό ανάδευση ο 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρας του βενζοϊκού οξέος (1.03 g, 3.2 mmol), 20 ml απόλυτου διχλωρομεθανίου και 3 ml μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 27 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ακολουθεί συμπύκνωση

του διαλύτη και εξουδετέρωση με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (1,2 N), ώσπου το pH να ρυθμιστεί στο 6-7. Το προκύπτον ίζημα διηθείται, εκπλύνεται με απεσταγμένο νερό και ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Το επιθυμητό προϊόν **6** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (0.95 g, 3.1 mmol, 97%).



**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO) δ (ppm):** 2.331 (s, 1H, H<sub>11</sub>), 7.367 (d, <sup>3</sup>J=7.9 Hz, 1H, H<sub>10</sub>), 7.508 (d, <sup>3</sup>J=5.2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.583 (d, <sup>3</sup>J=5.1 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 7.644(d, <sup>3</sup>J=7.9 Hz, 1H, H<sub>9</sub>), 8.287 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8.505 (d, <sup>3</sup>J=8.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 8.555 (d, <sup>3</sup>J=5.1 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 8.728 (d, <sup>3</sup>J=4.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 9.093 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 9.290 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 12.818 (s, 1H, H<sub>12</sub>).

#### 4.2.7 Σύνθεση της ένωσης 7



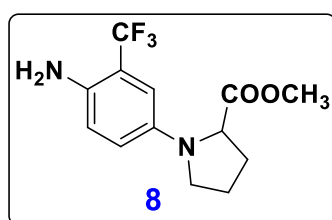
Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθεται υπό ανάδευση το 5-φθορο-2-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (1.02 g, 4.78 mmol) και 1,4-διοξάνιο (5 ml). Ακολούθως, προστίθενται όξινο ανθρακικό νάτριο (0.52 g, 5.74 mmol), ο υδροχλωρικός μεθυλεστέρας της L-προλίνης και άνυδρο DMF (2.5 ml). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση με εφαρμογή κάθετου ψυκτήρα (~90 °C). Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το 1,4-dioxane απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα, ενώ στο υπόλειμμα προστίθενται νερό και οξικός αιθυλεστέρας για την απομάκρυνση του DMF με εκχύλιση (3x20 ml). Οι δύο στοιβάδες ελέγχονται, η οργανική συλλέγεται,

ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα τοποθετείται στην αντλία υψηλού κενού για απομάκρυνση ιχνών διαλυτών. Με την προσθήκη εξανίου στους υπερήχους το επιθυμητό προϊόν καταβυθίζεται ως κίτρινο ίζημα, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό. Το διήθημα κατακρατά κάποια ποσότητα που όμως παραλαμβάνεται και αυτή με δκαθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (2:1). (~ 75 %)

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 3.617, 2.201 (m, 6H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 3.675 (s, 3H, H<sub>8</sub>), 4.722 (d, <sup>3</sup>J=7.5 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6.824 (d, <sup>3</sup>J=9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.884 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 8.116 (d, <sup>3</sup>J=9.3 Hz, 1H, H<sub>1</sub>).

#### 4.2.8 Σύνθεση της ένωσης 8

Καταλύτης	Ατμόσφαιρα H <sub>2</sub> (balloon)	Διαλύτης	Παραπροϊόντα
PtO <sub>2</sub>	✓	THF	-
10 % Pd/C	✓	MeOH	-
10 % Pd/C	✓	THF	-
SnCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	✓	EtOAc	✓



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται η νιτρο-ένωση **7** (0.05 g, 1.57 mmol) και άνυδρο THF (2 ml). Ακολουθώς προστίθεται καταλύτης (0.0314 g), μικρή ποσότητα άνυδρου THF και μπαλόνι με αέριο υδρογόνο. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο καταλύτης διηθείται από πτυχωτό ηθμό και ο ηθμός εκπλένεται με THF. Οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα τοποθετείται στην αντλία υψηλού κενού. Γίνεται άμεση χρήση αυτής στην επόμενη αντίδραση. (~100 %)

#### 4.2.9 Σύνθεση της ένωσης 9

N°	Acid	Amine	Solv.	Base/ Coupling reagent	Temp. Reaction	Time	
1	1 (-OCH <sub>3</sub> )	1	THF	KO <sup>t</sup> Bu (5.5 eq) (ως προς εστέρα)/-	rt	18h	-
2	1.2 (-OCH <sub>3</sub> )	1	THF	KOtBu (5.5 eq) (ως προς εστέρα)/-	rt	62h	-
3	1	1	THF	DIPEA (drops) NaH (1 eq) (ως προς την αμίνη)/HATU (1.1 eq) (ως προς το οξύ)	rt 22 h Μέχρι 80 °C 6 h 30 min rt overnight	46h 30min	DCM, DCM:MeOH (10:1) (οργανική φάση)
4	1 (χλωρίδιο )	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (300μl)/-	rt	4h	-
5	1	1.2	DMF	Et <sub>3</sub> N (2 eq ως προς το οξύ)/HATU (1.1 eq ως προς το οξύ)	rt -70 °C, 18 h rt		
6	1.2 (εστέρας)	1	THF	NaOCH <sub>3</sub> (1.2 eq (ως προς αμίνη)/-	17 h 35 min rt 8 h 30 min reflux 18h 30 min rt	43h 30min	
7	1	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (1.2eq ως προς οξύ)/HBTU (1.1 eq)/ HOBT (1.1 eq) (ως προς οξύ)	rt	44h	Οργανική φάση DCM + παρασκευαστι κή
8	1 (χλωρίδιο )	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (περίσ.)/-	Rt -60 °C, 2h 60 °C, 16h rt 3h 60 °C	21h	-
9	1 (οξύ)	1.2	THF	Et <sub>3</sub> N (1.2eq ως προς οξύ)/HBTU (1.1 eq)/	Rt-60°C	5 days	Οργανική φάσ η DCM, DCM:MeOH



### **Για την ενεργοποίηση του οξέος με αντιδραστήρια σύζευξης**

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml που έχει απομακρυνθεί η υγρασία, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται το οξύ (0.0443 g, 0.145 mmol) και διαλύεται σε ποσότητα άνυδρου διαλύτη. Ακολούθως προστίθεται η βάση (0.0161 g, 0.159 mmol, 22.18 ml) και η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο. Εν συνεχεία, προστίθεται το αντιδραστήριο σύζευξης και μικρή ποσότητα διαλύτη για τα τοιχώματα. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου σε παγόλουτρο για 10 min και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Η πρόοδος της ενεργοποίησης του οξέος ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

Όταν το οξύ έχει ενεργοποιηθεί, στη φιάλη της αντίδρασης προστίθεται η αμίνη (0.05 g, 0.173 mmol), διαλυμένη στο διαλύτη της αντίδρασης. Εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και η αντίδραση θερμαίνεται σταδιακά υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η φιάλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρεται με διχλωρομεθάνιο σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολούθως, το υπόλειμμα της σφαιρικής υφίσταται εκχύλιση με σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$  (3x10 ml). Οι δύο στοιβάδες ελέγχονται. Η οργανική στοιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ακολουθεί διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης όπως αναγράφεται στον ως άνω πίνακα.

### **Για την ενεργοποίηση του οξέος με τη μέθοδο των χλωριδίων**

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50ml, που προηγουμένως έχει απομακρυνθεί η υγρασία, εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και εν συνεχεία υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται το οξύ (0.0443 g, 0.145 mmol) και απεσταγμένο  $\text{SOCl}_2$  (~6 ml). Το  $\text{SOCl}_2$  έχει διπλό ρόλο, ως αντιδραστήριο και διαλύτης. Ακολούθως προστίθεται άνυδρο DMF (2 σταγόνες). Η αντίδραση θερμαίνεται μέχρι βρασμού για 3 ώρες. Με έλεγχο TLC παρακολουθούμε την πορεία της ενεργοποίησης. Όταν στην αντίδραση δεν υπάρχει άλλη ποσότητα οξέος, η φιάλη αφήνεται, αρχικά σε



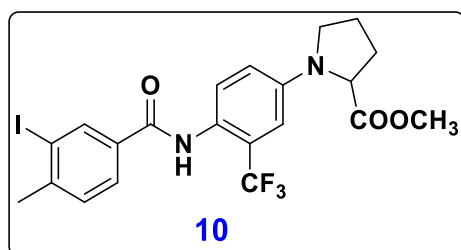
θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η συσκευή συνδέεται με την υδραντλία και το SOCl<sub>2</sub> απομακρύνεται. Η φιάλη αφήνεται περίπου 30 min στην υδραντλία για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του SOCl<sub>2</sub>. Εν συνεχεία, στην τρίλαιμη φιάλη προστίθεται άνυδρος διαλύτης και έπειτα προστίθεται η αμίνη (0.045 g, 0.173 mmol), διαλυμένη στο διαλύτη της αντίδρασης. Στη φιάλη εφαρμόζεται, εκ νέου, κάθετος ψυκτήρας και η αντίδραση θερμαίνεται σταδιακά. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Με το πέρας της αντίδρασης, η φιάλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης μεταφέρεται σε μονόλαιμη φιάλη με διχλωρομεθάνιο και οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα υφίσταται εκχύλιση με σύστημα διαλυτών H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x15 ml). Οι δύο στοιβάδες ελέγχονται. Η οργανική στοιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, δίηθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Με λήψη φάσματος <sup>1</sup>H-NMR, δεν διαπιστώθηκε η ύπαρξη πρωτονίου αμιδικού δεσμού, επομένως δεν έλαβε χώρα περαιτέρω επεξεργασία (καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης).

Το επιθυμητό προϊόν δε σχηματίστηκε!

#### 4.2.10 Σύνθεση της ένωσης 10

Ν°	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Διαλύτης
1	1 eq	1.2 eq	HBTU 1.1 eq/ HOBT 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.2 eq	Άνυδρο THF
2	1 eq	1.2 eq (Προσθήκη αμίνης χωρίς επεξεργασία)	HBTU 1.1 eq/ HOBT 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.2 eq	Άνυδρο THF



### Για την ενεργοποίηση του οξέος

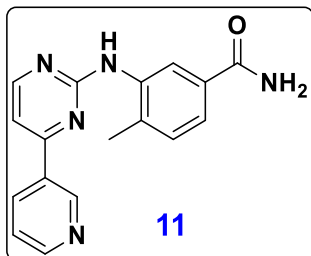
Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθεται το 3-ιοδο-4-μεθυλ-βενζοϊκό οξύ (0.034 g, 0.13 mmol) και διαλύεται σε περίπου 3 ml άνυδρο THF. Εν συνεχεία, γίνεται προσθήκη Et<sub>3</sub>N (0.0159 g, 0.157 mmol, 21.9 μl), ώστε να αποπρωτονιωθεί το οξύ, και η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο. Ακολούθως, προστίθενται HBTU (0.0546 g, 0.144 mmol) και HOBT (0.022 g, 0.144 mmol) και τα τοιχώματα ξεπλένονται με μικρή ποσότητα διαλύτη. Η ενεργοποίηση αφήνεται για 15 min στους 0 °C και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου.

Με έλεγχο TLC, βεβαιώνεται η ενεργοποίηση του οξέος, οπότε και γίνεται προσθήκη της αμίνης (0.045 g, 0.157 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου. Η πορεία της ελέγχεται με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, απομακρύνονται οι διαλύτες στον περιστροφικό εξατμιστήρα, ενώ το υπόλειμμα υφίσταται εκχύλιση με σύστημα H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Η οργανική στοιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα της οργανικής στοιβάδας καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH αυξανόμενης πολικότητας (1:0, 10:0.2, 10:0.5, 10:1, 0:1).

Το επιθυμητό προϊόν δε σχηματίστηκε!

#### 4.2.11 Σύνθεση της ένωσης 11

N°	Οξύ	Αντιδραστήριο Σύζευξης	Βάση SOCl <sub>2</sub>	Πηγή Αμμωνίας	Διαλύτης
1	1 eq	HATU 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 1.1eq	NH <sub>4</sub> Cl 1 eq + Et <sub>3</sub> N	Άνυδρο DMF
2	1 eq	HATU 1.1 eq	Et <sub>3</sub> N 2 eq	NH <sub>4</sub> Cl 1 eq + Et <sub>3</sub> N 1eq (ως προς NH <sub>4</sub> Cl)	Άνυδρο DMF
3	1 eq	-	SOCl <sub>2</sub> 1 eq	25 % NH <sub>3</sub> (aq)	THF



### **Για παραλαβή του αμιδίου με τη μέθοδο των αντιδραστηρίων σύζευξης**

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml που έχει απομακρυνθεί η υγρασία, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται το οξύ (0.0401 g, 0.131 mmol) και διαλύεται σε ~ 3 ml άνυδρου DMF. Ακολούθως προστίθεται Et<sub>3</sub>N (0.0182 g, 0.179 mmol, 25 μl) και η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και προστίθεται HATU (0.0683 g, 0.179 mmol) και μικρή ποσότητα διαλύτη για τα τοιχώματα. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου σε παγόλουτρο για 10 min και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Η πρόοδος της ενεργοποίησης του οξέος ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Εφόσον ενεργοποιηθεί το οξύ στη φιάλη προστίθεται χλωριούχο αμμώνιο (0.0100 g, 0.163 mmol) υπό ψύξη. Η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το πέρας της αντίδρασης στη φιάλη προστίθεται πάγος και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση. Ακολούθως, το μίγμα υφίσταται εκχύλιση με σύστημα H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, για να απομακρυνθεί, έτσι το DMF. Η οργανική στοιβάδα εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (9 %). Η υδατική στοιβάδα εκπλένεται με οξικό αιθυλεστέρα (3x10 ml). Οι στοιβάδες ελέγχονται, η υδατική απορρίπτεται και οι οργανικές συνενώνονται, συλλέγονται και ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στο υπόλειμμα προστίθεται εξάνιο και καταβυθίζεται κάποιο ίζημα, το οποίο διηθείται σε πορώδη ηθμό υπό κενό. Το ίζημα εκπλένεται με εξάνιο, συλλέγεται και ξηραίνεται, αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα στην αντλία υψηλού κενού.

Απομονώθηκε καθαρό το αμίδιο σε πολύ μικρή απόδοση (<10 %).

### **Για παραλαβή του αμιδίου με τη μέθοδο των χλωριδίων**

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml, που προηγουμένως έχει απομακρυνθεί η υγρασία, εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και εν συνεχεία υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται το οξύ (0.25 g, 0.81 mmol) και απεσταγμένο  $\text{SOCl}_2$  (~8 ml). Το  $\text{SOCl}_2$  έχει διπλό ρόλο, ως αντιδραστήριο και διαλύτης. Ακολούθως προστίθεται άνυδρο DMF (4 σταγόνες). Η αντίδραση θερμαίνεται μέχρι βρασμού για 3 h. Με έλεγχο TLC παρακολουθούμε την πορεία της ενεργοποίησης. Όταν στην αντίδραση δεν υπάρχει άλλη ποσότητα οξέος, η φιάλη αφήνεται, αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η συσκευή συνδέεται με την υδραντλία και το  $\text{SOCl}_2$  απομακρύνεται. Η φιάλη αφήνεται περίπου 30 min στην υδραντλία για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του  $\text{SOCl}_2$ .

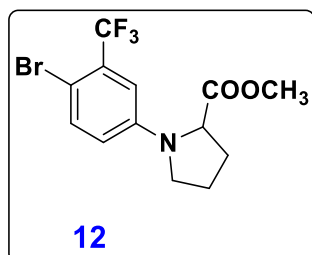
Εν συνεχεία στη φιάλη προστίθεται διαλύτης για να διαλυθεί το χλωρίδιο και ακολούθως υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται υπό ψύξη υδατικό διάλυμα αμμωνίας (25 %) (600 μl). Το παγόλουτρο αφαιρείται και η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το περιεχόμενο της σφαιρικής μεταφέρεται (στον απαγωγό), σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη με διχλωρομεθάνιο και οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στο στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται προστίθεται διχλωρομεθάνιο, και παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος, το οποίο διηθείται από πορώδη ηθμό υπό κενό. Το διήθημα που λαμβάνεται εξατμίζεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα, αφήνοντας, πάλι στερεό υπόλειμμα.

Με τη μέθοδο αυτή δεν απομονώθηκε το αμίδιο!

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  (ppm):** 3.323 (s, 3H,  $\text{H}_{11}$ ), 7.257 (s, 1H,  $\text{H}_{12}$ ), 7.318 (d,  $^3\text{J}=7.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{10}$ ), 7.521 (dd,  $^3\text{J}=8.0$  Hz,  $^4\text{J}=4.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.439 (d,  $^3\text{J}=5.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7.600 (dd,  $^3\text{J}=7.9$  Hz,  $^4\text{J}=1.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_9$ ), 7.891 (s, 1H,  $\text{H}_{12}$ ), 8.127 (d,  $^3\text{J}=1.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_8$ ), 8.427 (dd,  $^3\text{J}=8.1$  Hz,  $^4\text{J}=2.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 8.512 (d,  $^3\text{J}=5.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8.685 (dd,  $^3\text{J}=4.8$  Hz,  $^4\text{J}=1.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 9.052 (s, 1H,  $\text{H}_7$ ), 9.247 (s, 1H,  $\text{H}_6$ ).

#### 4.2.12 Σύνθεση της ένωσης 12

N <sup>o</sup>	2-Br-5-F-CF <sub>3</sub> -Ar	L-Pro-OMe.HCl	NaHCO <sub>3</sub>	Διαλύτες
1	1 eq	1.2 eq	1.3 eq	1,4-dioxane:DMF (2:1)
2	1 eq	1.2 eq	1.3 eq	DMF



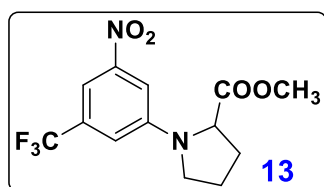
Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται 2-βρωμο-5-φθορο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (0.2 g, 0.823 mmol, 118 μl) και διαλύεται σε ~ 3 ml διαλύτη. Εν συνεχεία, προστίθεται η βάση, NaHCO<sub>3</sub> (0.1632 g, 1.39 mmol) και ο υδροχλωρικός μεθυλεστέρας της L-προλίνης, L-Pro-OMe.HCl (0.1632 g, 0.988 mmol), μαζί με μικρή ποσότητα διαλύτη. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και θερμαίνεται σε εύρος 80 - 95 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η φιάλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία το περιεχόμενο της μεταφέρεται σε μονόλαιμη φιάλη με διχλωρομεθάνιο. Οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα υφίσταται εκχύλιση με σύστημα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O. Με έλεγχο TLC, η υδατική στοιβάδα απορρίπτεται, ενώ η οργανική στοιβάδα συλλέγεται και ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διήθηση του ξηραντικού και εξάτμιση του διηθήματος στον περιτροφικό εξατμιστήρα. Η οργανική φάση καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, αυξανόμενης πολικότητας (4:0.5, 4:0.7, 4:1).

Το επιθυμητό προϊόν δε σχηματίστηκε!

## 4.3 Σύνθεση του αναλόγου Nil-02

### 4.3.1 Σύνθεση της ένωσης 13

N°	3-Br-5- NO <sub>2</sub> -CF <sub>3</sub> - Ar	L-Pro- OMe.HCl/ L-Pro-OH	Pd(AcO) <sub>2</sub>	rac-BINAP	Βάση	Διαλύτης
1	1 eq	1.1 eq	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 1.4 eq	Άνυδρο THF
2	1 eq	1.1 eq (L-Pro-OH)	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 1.4 eq	Άνυδρο THF
3	1 eq	1.2 eq	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 2 eq	Άνυδρο THF
4	1 eq	1.2 eq	0.02 eq	0.04 eq	<sup>t</sup> BuOK 2 eq	Άνυδρο DMF
5	1 eq	1.1 eq	0.02 eq	0.04 eq	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5 eq	Άνυδρο THF

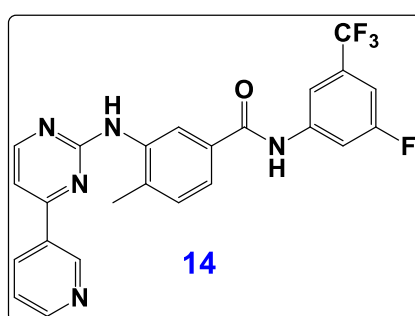


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθενται Pd(AcO)<sub>2</sub> (10 mg, 0.0037 mmol) και rac-BINAP (5 mg, 0.0074 mmol) και ποσότητα διαλύτη για να τα διαλύσει. Ακολούθως, προστίθεται *t*-BuOK (0.03 g, 0.269 mmol). Εν συνεχεία, προστίθεται ο υδροχλωρικός εστέρας της L-προλίνης (0.034 g, 0.204 mmol) και τέλος, το 3-βρωμο-5-νιτρο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο (0.05 g, 0.185 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, ενώ θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η φιάλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία το περιεχόμενο της μεταφέρεται με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> σε μονόλαιμη φιάλη. Οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα υφίσταται εκχύλιση με σύστημα H<sub>2</sub>O:AcOEt. Από έλεγχο TLC, η οργανική στοιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διήθηση και εξατμισμό του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα της οργανικής στοιβάδας καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>:CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (7:1). Το τελικό επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο. (40-50 %).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 3.762-3.618 (m, 6H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ), 5.360 (t,  $^3J=5.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.349 (s, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7.853 (s, 1H,  $\text{H}_3$ ), 7.892 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ).

#### 4.3.2 Σύνθεση της ένωσης 14

N°	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο	Θερμοκρασία
<b>Σύζευξης</b>				
1	Άνυδρο THF	DIPEA 1 eq	HATU	70 °C
2	Άνυδρο DMF	DIPEA, $\text{Et}_3\text{N}$ 1.1 eq, 1.1 eq	HATU	65-70 °C
3	Άνυδρο DMF	$\text{Et}_3\text{N}$ 1.1 eq	HATU	r.t.
<b>Χλωρίδιο</b>				
4	Άνυδρο $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /2 σταγόνες DMF	Οξαλυλο- χλωρίδιο	-	r.t.
5	Άνυδρο THF	Οξαλυλο- χλωρίδιο	-	r.t.



#### Για την ενεργοποίηση του οξέος με αντιδραστήρια σύζευξης

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 50 ml που έχει απομακρυνθεί η υγρασία, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται το οξύ (0.030 g, 0.098 mmol) και διαλύεται σε ποσότητα άνυδρου διαλύτη. Ακολούθως προστίθεται η βάση (0.0127

g, 0.098 mmol, 22.18 μl) και η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο. Εν συνεχεία, προστίθεται HATU (και μικρή ποσότητα διαλύτη για τα τοιχώματα. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου σε παγόλουτρο για 10 min και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Η πρόοδος της ενεργοποίησης του οξέος ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Στη φιάλη με τον ενεργοποιημένο εστέρα προστίθεται υπό ανάδευση η αμίνη, 3-αμινο-5φθορο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο, (0.019 g, 0.107 mmol, 14 μl). Η αντίδραση αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ σταδιακά θερμαίνεται μέχρι βρασμού με την εφαρμογή κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης, η φιάλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και το περιεχόμενο της μεταφέρεται με διχλωρομεθάνιο σε μονόλαιμη σφαιρική. Οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και τα υπολείμματα στην αντλία υψηλού κενού. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με σύστημα διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ . Οι δύο στοιβάδες ελέγχονται. Η οργανική στοιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διήθηση και εξάτμιση των διαλυτών στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Το υπόλειμμα της οργανικής στοιβάδας, διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

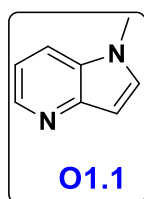
Με τη μέθοδο αυτή δεν απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν!



## 4.4 Σύνθεση αναλόγων του *Osimertinib*

### 4.4.1 Σύνθεση της ένωσης *O1.1*

N°	Πυρρολο[2,3-d]πυριδίνη	Βάση NaH 60 %	CH <sub>3</sub> I	Διαλύτης	Θερμοκρασία
1	1	1.5	1.5	Άνυδρο DMF	0 °C-rt
2	1	1.5	1.1	Άνυδρο DMF	0 °C-rt
3	1	1.5	1.1	Άνυδρο DMF	0 °C
4	1	1.5	1.1	Άνυδρο DMF	-50 °C
5	1	1	1	o-xylene	0 °C -reflux
6	1	1.1	1.2	Άνυδρο DMF	0 °C-5 °C (~90 %)
7	1	1.2	1.2	Άνυδρο THF	0 °C/5 min



#### Πειραματική πορεία N° 6

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθεται 4-αζα-ινδόλιο (0.02 g, 0.1692 mmol) και διαλύεται σε περίπου 2 ml άνυδρου DMF στους 0 °C, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου. Έπειτα, στους 0 °C, προστίθεται NaH 60 % (7.44 mg, 0.1861 mmol) και η αντίδραση αφήνεται για 30 min υπό ανάδευση. Με το πέρας του χρόνου προστίθεται στους 0 °C στάγδην CH<sub>3</sub>I (28.8 mg, 0.203 mmol, 12.64 μl) και η αντίδραση αφήνεται 30 min στους 0 °C. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθείται με έλεγχο TLC με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Με το πέρας της αντίδρασης, στο περιεχόμενο της φιάλης προστίθεται νερό και ακολουθεί εκχύλιση με σύστημα νερό:διαιθυλαιθέρας, για να απομακρυνθεί εκτός των αλάτων και το DMF. Με έλεγχο TLC, παρατηρείται πως η υδατική φάση συγκρατεί ποσότητα από το προϊόν. Ως εκ τούτου, ακολουθεί νέα εκχύλιση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl και διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν, με

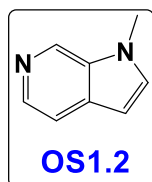
αυτόν τον τρόπο μεταφέρθηκε στην οργανική, η οποία συλλέγεται και ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν παραλαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο (~90 %).

### Πειραματική πορεία N° 7

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθεται 4-αζα-ινδόλιο (0.1 g, 0.84 mmol) και διαλύεται σε περίπου 2 ml άνυδρο THF στους 0 °C, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου. Έπειτα, στους 0 °C, προστίθεται NaH 60 % (40.62 mg, 1.01 mmol) και η αντίδραση αφήνεται για 30 min υπό ανάδευση. Με το πέρας του χρόνου προστίθεται στους 0 °C στάγδην  $\text{CH}_3\text{I}$  (144.15 mg, 1.01 mmol, 63.22  $\mu\text{l}$ ) και η αντίδραση αφήνεται 30 min στους 0 °C. Η μετατροπή λαμβάνει χώρα ποσοτικά στους 0 °C στα 5 min. Μετά το πέρας της αντίδρασης, στη σφαιρική φιάλη με το μίγμα της αντίδρασης προστίθεται νερό και ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl. Η υδατική στοιβάδα εκπλένεται τρεις φορές με διαιθυλαιθέρα. Η οργανική στοιβάδα, μετά από έλεγχο TLC, συλλέγεται, ξηραίνεται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθείται και εξατμίζεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται ως κίτρινο έλαιο (70 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 3.903 (s, 3H,  $\text{H}_6$ ), 6.694 (d,  $^3\text{J}=2.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.128 (dd,  $^3\text{J}=8.3$  Hz,  $^4\text{J}=4.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7.286 (D,  $^3\text{J}=3.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.628 (d,  $^3\text{J}=3.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ ), 8.468 (dd,  $^3\text{J}=4.7$  Hz,  $^4\text{J}=1.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ).

### 4.4.2 Σύνθεση της ένωσης O1.2



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 ml προστίθεται η 1H-πυρρολο[2,3-c]πυριδίνη (0.04 g, 0.34 mmol), υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου και διαλύεται σε 1 ml άνυδρο DMF. Ακολούθως, υπό ψύξη προστίθεται NaH 60 % και μικρή ποσότητα DMF για να ξεπλυθούν τα τοιχώματα. (0,020 g, 0.51 mmol). Η αντίδραση αφήνεται για 30 min υπό ψύξη. Με το πέρας του διαστήματος αυτού, προστίθεται  $\text{CH}_3\text{I}$  (0.072 g, 0.51 mmol, 31.62  $\mu\text{l}$ ). Το διάλυμα αφήνεται ακόμη 25 min υπό ψύξη και εν συνεχεία σε

θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης στη φιάλη με το δάλυμα της αντίδρασης προστίθεται νερό και ακολουθεί εκχύλιση με σύστημα  $\text{H}_2\text{O}$ /διαιθυλαιθέρα ( $2 \times 10$  ml) για να απομακρυνθεί από την αντίδραση το DMF. Με έλεγχο TLC, φαίνεται πως η υδατική στοιβάδα έχει συκρατήσει από το προϊόν, οπότε ακολουθεί ακόμη μια εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (10 ml). Οι οργανικές στοιβάδες έχουν την ίδια εικόνα, επομένως συνενώνονται, ξηραίνονται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και γίνεται διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξάτμιστήρα.

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 3.903 (s, 3H,  $\text{H}_6$ ), 6.480 (d,  $^3\text{J}=2.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 7.196 (d,  $^3\text{J}=3.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.512 (d,  $^3\text{J}=5.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 8.245 (d,  $^3\text{J}=5.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 8.786 (s, 1H,  $\text{H}_1$ ).

### Συμπεράσματα

Από όσα παραθέτονται στην παρούσα εργασία, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα.

- Στο εργαστήριο μας σχεδιάστηκαν ανάλογα της Νιλοτινίβης και της Οσιμερτινίμπης μέσω προγραμμάτων Μοριακής Μοντελοποίησης, ενώ μερικά από αυτά φάνηκε να έχουν καλύτερη ανασταλτική δράση από τα υπάρχοντα φάρμακα.
- Έγιναν προσπάθειες σύνθεσης των αναλόγων και των δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων, χωρίς όμως να ληφθούν σε όλες τις περιπτώσεις τελικά αποτελέσματα. Όπου προέκυψαν προβλήματα κατά τη σύνθεση, έγιναν προσπάθειες να υπερνικηθούν, προτείνοντας αρκετές εναλλακτικές συνθετικές προσεγγίσεις. Για τα ανάλογα της Οσιμερτινίβης ακολουθήθηκε μια πορεία συνδυαστική των ήδη χρησιμοποιούμενων.
- Έγινε επί μακρόν θεωρητική μελέτη της ανασταλτικής δράσης των αναλόγων της Νιλοτινίβης, που σχεδιάστηκαν, σε πλήθος πρωτεϊνικών κινασών. Ειδικότερα το ένα εκ των δύο αναλόγων (Nil-02), που παρουσιάζει και μεγαλύτερη ομοιότητα με το Nilotinib κατέδειξε σημαντική ανασταλτική δράση.

Οι προσπάθειες σύνθεσης αναλόγων των δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων της Νιλοτινίβης και της Οσιμερτινίβης συνεχίζονται από την ερρευνητική μας ομάδα στο εργαστήριο. Οι τελευταίες συνθετικές πορείες έδειξαν κάποια θετικά αποτελέσματα, τα οποία θα αξιολογηθούν καταλλήλως.

### Βιβλιογραφία

---

1. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **9**, (2009).
2. Yang, N. & Sheridan, A. M. Cell Cycle. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* 753–758 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00273-6
3. Roskoski, R. Accepted us cr t. *Pharmacol. Res.* (2019). doi:10.1016/j.phrs.2019.03.006
4. Duong-Ly, K. C. *et al.* Conformational Analysis of the DFG-Out Kinase Motif and Biochemical Profiling of Structurally Validated Type II Inhibitors. *J. Med. Chem.* **58**, 466–479 (2014).
5. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275–82 (2002).
6. Shchemelinin, I., Sefc, L. & Necas, E. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol. (Praha)*. **52**, 81–100 (2006).
7. Quarterly, T. S. C. PROTEIN PHOSPHORYLATION: A GLOBAL REGULATOR OF CELLULAR ACTIVITY. (2003). Available at: <https://www.scq.ubc.ca/protein-phosphorylation-a-global-regulator-of-cellular-activity/>.
8. Hanrs, S. K. & Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily : ( catalytic ) domam structure and classification of the. *FASEB J.* (1988).
9. Wu, G. Functional Assays for Protein Kinases. *Assay Dev.* 181–212 (2010). doi:10.1002/9780470583128.ch7
10. The protein kinase complement of the human genome. *Science (80-. )*. **298**, 1912–1934 (2002).
11. Kinases, P. *Ser / Thr-specific Protein Kinases and Protein Phosphatases. Signal Transduction* **2**, (2003).
12. Capra, M. *et al.* Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Res.* **66**, 8147–8154 (2006).
13. Ser/Thr selective protein kinase crystal structure. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Serine/threonine-specific\\_protein\\_kinase](https://en.wikipedia.org/wiki/Serine/threonine-specific_protein_kinase).
14. Laurence, A., Ghoreschi, K., Byrne, M. & O’Shea, J. J. Protein kinase antagonists as therapeutic agents for immunological and inflammatory disorders. in *Clinical Immunology: Principles and Practice: Fourth Edition* 1085–1094 (Elsevier Inc., 2012). doi:10.1016/B978-0-7234-3691-1.00102-1
15. Protein Kinases: AGC Kinase Group. Available at:

- <https://www.cellsignal.com/contents/science-protein-kinases/protein-kinases-agc-kinase-group/kinases-agc>.
16. Turnham, R. E. & Scott, J. D. Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology. *Gene* **577**, 101–108 (2016).
  17. Bauman, A. L. & Scott, J. D. Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: Harnessing the dynamic duo. *Nature Cell Biology* **4**, (2002).
  18. cAMP-dependent Protein Kinase (PKA). Available at: <https://pdb101.rcsb.org/motm/152>.
  19. Protein Kinase A. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Protein\\_kinase\\_A](https://en.wikipedia.org/wiki/Protein_kinase_A).
  20. Wilson, C. H. *et al.* Steatosis inhibits liver cell store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and reduces ER Ca<sup>2+</sup> through a protein kinase C-dependent mechanism. *Biochem. J.* **466**, 379–390 (2015).
  21. Ali, E. S. *et al.* The glucagon-like peptide-1 analogue exendin-4 reverses impaired intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling in steatotic hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1863**, 2135–2146 (2016).
  22. Mellor, H. & Parker, P. J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal* **332**, 281–292 (1998).
  23. Nishizuka, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484–496 (1995).
  24. Protein Kinase C. Available at: [https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/Protein\\_Kinase\\_C](https://cellbiology.med.unsw.edu.au/cellbiology/index.php/Protein_Kinase_C).
  25. Talman, V., Pascale, A., Antti, M. J., Amadio, M. & Tuominen, R. K. Protein Kinase C Activation as a Potential Therapeutic Strategy in Alzheimer’s Disease: Is there a Role for Embryonic Lethal Abnormal Vision-like Proteins? (2016). doi:10.1111/bcpt.12581
  26. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912–1934 (2002).
  27. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* (2001). doi:10.1210/er.22.2.153
  28. Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**, 3279–3290 (2007).
  29. X-ray structure of the ERK2 MAP kinase in its active form. Phosphorylated residues are displayed in red. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Mitogen-activated\\_protein\\_kinase](https://en.wikipedia.org/wiki/Mitogen-activated_protein_kinase).
  30. Avruch, J. MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochimica et*

- Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1773**, 1150–1160 (2007).
31. Escós, A., Risco, A., Alsina-Beauchamp, D. & Cuenda, A. p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  mitogen activated protein kinases (MAPKs), new stars in the MAPK galaxy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **4**, (2016).
  32. Zlobin, A. & Bloodworth, J. C. Predictive Biomarkers in Oncology. *Predict. Biomarkers Oncol.* 213–221 (2019). doi:10.1007/978-3-319-95228-4
  33. Zhao, Y. & Adjei, A. A. The clinical development of MEK inhibitors. *Nature Reviews Clinical Oncology* **11**, 385–400 (2014).
  34. Haribabu, B. *et al.* Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. *EMBO J.* **14**, 3679–86 (1995).
  35. *Entrez Gene: CAMK1 calcium/calmodulin-dependent protein kinase I.*
  36. Yamauchi, T. Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II - Discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: Implication for learning and memory. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **28**, 1342–1354 (2005).
  37. CAMKIIA. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/CAMK2A#/media/File:Protein\\_CAMK2A\\_PDB\\_1\\_hkx.png](https://en.wikipedia.org/wiki/CAMK2A#/media/File:Protein_CAMK2A_PDB_1_hkx.png).
  38. Nelson L. David, C. M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry.* (W.H. Freeman & Company; 5th edition edition (2008), 2008).
  39. Radha, V., Nambirajan, S. & Swarup, G. Association of Lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity. *Eur. J. Biochem.* **236**, 352–359 (1996).
  40. Haddad, J. J. The immunopharmacologic potential of Semaxanib and new generation directed therapeutic drugs: Receptor tyrosine kinase regulation with anti-tumorigenesis/angiogenesis properties. *Saudi Pharmaceutical Journal* **20**, 103–123 (2012).
  41. Dengjel, J., Kratchmarova, I., Biosystems, B. B.-M. & 2009, undefined. Receptor tyrosine kinase signaling: a view from quantitative proteomics. *pubs.rsc.org*
  42. Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science (80-. )*. (1988). doi:10.1126/science.3291115
  43. Ruetten, H. & Thiemermann, C. Effects of tyrphostins and genistein on the circulatory failure and organ dysfunction caused by endotoxin in the rat: A possible role for protein tyrosine kinase. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 59–70 (1997).
  44. Schaller, M. D. *et al.* pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions (phosphotyrosine/Rous sarcoma

- virus/focal adhesion kinase*). *Cell Biology* **89**, (1992).
45. Blanke, C. *et al.* Long-Term Results From a Randomized Phase II Trial of Standard-Versus Higher-Dose Imatinib Mesylate for Patients With Unresectable or Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors Ex Whole Lung Irradiation for Ewings Sarcoma View project Yondelis View project Long-Term Results From a Randomized Phase II Trial of Standard-Versus Higher-Dose Imatinib Mesylate for Patients With Unresectable or Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors Expressing KIT. *Artic. J. Clin. Oncol.* **26**, 620–625 (2008).
  46. Le Coutre, P. *et al.* Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* **111**, 1834–1839 (2008).
  47. Kuwai, T. *et al.* Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors. *ncbi.nlm.nih.gov*
  48. Neet, K. & Hunter, T. Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes to Cells* **1**, 147–169 (1996).
  49. Songyang, Z. *et al.* Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* **373**, 536–539 (1995).
  50. Kuriyan, J. & Cowburn, D. MODULAR PEPTIDE RECOGNITION DOMAINS IN EUKARYOTIC SIGNALING. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 259–288 (1997).
  51. Sadowski, I., Stone, J. C. & Pawson, T. A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 4396–4408 (2015).
  52. Russell, R. B., Breed, J. & Barton, G. J. Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains. *FEBS Lett.* **304**, 15–20 (1992).
  53. Koytiger, G. *et al.* Phosphotyrosine Signaling Proteins that Drive Oncogenesis Tend to be Highly Interconnected. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1204–1213 (2013).
  54. Tong, L. *et al.* Crystal structures of the human p56lck SH2 domain in complex with two short phosphotyrosyl peptides at 1.0 Å and 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **256**, 601–610 (1996).
  55. Pawson, T. & Schlessingert, J. SH2 and SH3 domains. *Curr. Biol.* **3**, 434–442 (1993).
  56. Mayer, B. J. SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.* **114**, 1253–63 (2001).
  57. Musacchio, A., Gibson, T., Lehto, V. P. & Saraste, M. SH3 - an abundant protein



- domain in search of a function. *FEBS Lett.* **307**, 55–61 (1992).
58. Mayer, B. J. & Baltimore, D. Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends in Cell Biology* **3**, 8–13 (1993).
  59. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573–580 (1995).
  60. Schlessinger, J. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 25–30 (1994).
  61. Koch, C. A., Anderson, D., Moran, M. F., Ellis, C. & Pawson, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**, 668–74 (1991).
  62. Whisstock, J. C. & Lesk, A. M. SH3 domains in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 132–133 (1999).
  63. SH3 Domain. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/SH3\\_domain#/media/File:1shg\\_SH3\\_domain.png](https://en.wikipedia.org/wiki/SH3_domain#/media/File:1shg_SH3_domain.png).
  64. Cance, W. G. *et al.* Rak, a novel nuclear tyrosine kinase expressed in epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **5**, 1347–55 (1994).
  65. Lee, J., Wang, Z., Luoh, S. M., Wood, W. I. & Scadden, D. T. Cloning of FRK, a novel human intracellular SRC-like tyrosine kinase encoding gene. *Gene* **138**, 247–251 (1994).
  66. Öberg-Welsh, C. & Welsh, M. Cloning of BSK, a murine FRK homologue with a specific pattern of tissue distribution. *Gene* **152**, 239–242 (1995).
  67. Thuveson, M., Albrecht, D., Zurcher, G., Andres, A. C. & Ziemiecki, A. IYK, A Novel Intracellular Protein Tyrosine Kinase Differentially Expressed in the Mouse Mammary Gland and Intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 582–589 (1995).
  68. Parsons, S. J. & Parsons, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906–7909 (2004).
  69. Structural features of Src-family kinases. Available at: [https://www.google.com/search?tbm=isch&q=src+family+kinases&chips=q:src+family+kinases,g\\_1:structure&usg=AI4\\_-kTv-oicdm85VKoFod830gni\\_CkFrg&sa=X&ved=0ahUKEwipiYKaqYDkAhVYysQBHfYL BaoQ4IYILCgB&biw=1366&bih=576&dpr=1#imgsrc=sLeThtqyNQTNHM](https://www.google.com/search?tbm=isch&q=src+family+kinases&chips=q:src+family+kinases,g_1:structure&usg=AI4_-kTv-oicdm85VKoFod830gni_CkFrg&sa=X&ved=0ahUKEwipiYKaqYDkAhVYysQBHfYL BaoQ4IYILCgB&biw=1366&bih=576&dpr=1#imgsrc=sLeThtqyNQTNHM):
  70. Arbesú, M. *et al.* The Unique Domain Forms a Fuzzy Intramolecular Complex in Src Family Kinases. *Structure* **25**, 630-640.e4 (2017).
  71. Cooper, J. A., Gould, K. L., Cartwright, C. A. & Hunter, T. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: Implications for regulation. *Science (80- )*. **231**, 1431–1434 (1986).
  72. Okada, M. & Nakagawa, H. A protein tyrosine kinase involved in regulation of

- pp60c-src function. *J. Biol. Chem.* **264**, 20886–93 (1989).
73. Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J. A. & Nakagawa, H. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* **351**, 69–72 (1991).
  74. c-Src Structure. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Proto-oncogene\\_tyrosine-protein\\_kinase\\_Src](https://en.wikipedia.org/wiki/Proto-oncogene_tyrosine-protein_kinase_Src).
  75. The src protein contains multiple domains for specific attachment to membranes. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1000–1009 (1990).
  76. Zan, L. *et al.* Temporal profile of Src, SSeCKS, and angiogenic factors after focal cerebral ischemia: Correlations with angiogenesis and cerebral edema. *Neurochem. Int.* **58**, 872–879 (2011).
  77. Zan, L. *et al.* Src regulates angiogenic factors and vascular permeability after focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience* **262**, 118–128 (2014).
  78. Dehm, S. M. & Bonham, K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 263–274 (2004).
  79. Musumeci, F., Schenone, S., Brullo, C. & Botta, M. An update on dual Src/Abl inhibitors. *Future Medicinal Chemistry* **4**, 799–822 (2012).
  80. Breccia, M., Salaroli, A., Molica, M. & Alimena, G. Systematic review of dasatinib in chronic myeloid leukemia. *OncoTargets and Therapy* **6**, 257–265 (2013).
  81. Szczylik, C. *et al.* Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. *Science (80- )*. **253**, 562–565 (1991).
  82. Hantschel, O. & Superti-Furga, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 33–44 (2004).
  83. c-Abl crystal structure. *ResearchGate* (2019). Available at: [https://www.researchgate.net/figure/Domain-organization-of-Abl-kinases-and-crystal-structure-of-the-down-regulated-c-Abl\\_fig1\\_234124906](https://www.researchgate.net/figure/Domain-organization-of-Abl-kinases-and-crystal-structure-of-the-down-regulated-c-Abl_fig1_234124906).
  84. Nagar, B. *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* **112**, 859–71 (2003).
  85. Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M. & Leahy, D. J. The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005). doi:10.1073/pnas.0507591102
  86. Franklin, M. C. *et al.* Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* (2004). doi:10.1016/S1535-6108(04)00083-2
  87. Cho, H. S. & Leahy, D. J. Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science (80- )*. (2002). doi:10.1126/science.1074611
  88. Ferguson, K. M. *et al.* EGF activates its receptor by removing interactions that

- autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* (2003). doi:10.1016/S1097-2765(03)00047-9
89. Guy, P. M., Platko, J. V, Cantley, L. C., Cerione, R. A. & Carraway, K. L. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8132–6 (1994).
  90. Olayioye, M. A., Neve, R. M. & Lane, H. A. The ErbB signaling network: heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* (2000). doi:10.1093/emboj/19.13.3159
  91. Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer* (2001). doi:10.1016/S0959-8049(01)00230-1
  92. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2001). doi:10.1038/35052073
  93. Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., Maiello, M. R. & Salomon, D. S. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr. Relat. Cancer* **10**, 1–21 (2003).
  94. Carraway, K. L. *et al.* Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* **387**, 512–6 (1997).
  95. Chang, H., Riese, D. J., Gilbert, W., Stern, D. F. & McMahan, U. J. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* (1997). doi:10.1038/387509a0
  96. Harari, D. *et al.* Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **18**, 2681–9 (1999).
  97. Zhang, D. *et al.* Neuregulin-3 (NRG3): A novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1997). doi:10.1073/pnas.94.18.9562
  98. Normanno, N. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* **366**, 2–16 (2006).
  99. Zhang, H. *et al.* ErbB receptors : from oncogenes to targeted cancer therapies Find the latest version : Review series ErbB receptors : from oncogenes to targeted cancer therapies. **117**, 2051–2058 (2007).
  100. Herbst, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol.* **59**, S21–S26 (2004).
  101. Huang, L. & Fu, L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 390–401 (2015).
  102. Ciardiello, F. & Tortora, G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *N. Engl. J. Med.* (2008). doi:10.1056/nejmra0707704
  103. Iliakis, G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin. Oncol.* (1997).

104. Fry, D. W. *et al.* A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* **265**, 1093–5 (1994).
105. Ward, W. H. *et al.* Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 659–66 (1994).
106. Rusnak, D. W. *et al.* The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res.* (2001).
107. Wood, E. R. *et al.* A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1168
108. Schindler, T. *et al.* Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol. Cell* **3**, 639–48 (1999).
109. Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J. & Harrison, S. C. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* **3**, 629–38 (1999).
110. Stamos, J., Sliwkowski, M. X. & Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M207135200
111. Moyer, J. D. *et al.* Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* **57**, 4838–48 (1997).
112. Allmeyer, S. U. T. R. & O'Ruskin, E. L. M. D. Fry DW, Bridges AJ, Denny WA, Doherty A, Greis KD, et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci..pdf. **95**, 12022–12027 (1998).
113. Carter, T. A. *et al.* Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11011–6 (2005).
114. Yoshimura, N. *et al.* EKB-569, a new irreversible epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with clinical activity in patients with non-small cell lung cancer with acquired resistance to gefitinib. *Lung Cancer* **51**, 363–8 (2006).
115. Knighton, D. R. *et al.* Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407–14 (1991).
116. Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E. & Owen, D. J. The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett.* **430**, 1–11 (1998).
117. Johnson, L. N., Noble, M. E. & Owen, D. J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149–58 (1996).
118. Johnson, L. N. & Lewis, R. J. Structural basis for control by phosphorylation.

- Chemical Reviews* **101**, 2209–2242 (2001).
119. Protein kinases: Atypical protein kinases. *Cell Signal Technology* Available at: <https://www.cellsignal.com/contents/science-protein-kinases/protein-kinases-atypical-protein-kinases/kinases-atypical>.
  120. National Cancer Institute. No Title. (2015). Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#cell-differences>.
  121. Organization, W. H. No Title. (2018). Available at: <http://gco.iarc.fr/today>.
  122. Organization, W. H. No Title. (2019). Available at: <https://www.who.int/en>.
  123. Hoffbrand, A. V. Moss, P. A. *Essential Haematology*.
  124. Azam, M. & Daley, G. Q. Anticipating clinical resistance to target-directed agents: The BCR-ABL paradigm. *Molecular Diagnosis and Therapy* (2006). doi:10.1007/BF03256446
  125. Hawk, C. CML. Available at: <https://cancerhawk.com/2012/10/19/got-chronic-myelogenous-leukemia-get-to-the-national-cml-society/>.
  126. Paez, J. G. *et al.* EGFR Mutations in Lung Cancer : Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* (80-. ). **304**, 1497–1501 (2004).
  127. Lung, E. No Title. (2019). Available at: <https://www.europeanlung.org/el/>.
  128. American Cancer Society. No Title. *American Cancer Society, Inc* (2019). Available at: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>.
  129. Made, C. M. No Title. Available at: <https://www.chestmedicine.org/>.
  130. WebMD. No Title. (2019). Available at: <https://www.webmd.com/lung-cancer/default.htm>.
  131. Rask-Andersen, M., Zhang, J., Fabbro, D. & Schiöth, H. B. Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 604–20 (2014).
  132. Wu, P., Clausen, M. H. & Nielsen, T. E. Allosteric small-molecule kinase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **156**, 59–68 (2015).
  133. Cohen, P. Protein kinases — the major drug target of twenty century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, (2002).
  134. Roskoski, R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* **100**, 1–23 (2015).
  135. Small molecule protein kinases inhibitors. Available at: [https://www.google.com/search?q=New+horizons+in+next-generation+small+molecule+kinase+inhibitors&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwjU6onStJLkAhUN6KYKHbFWCXcQ\\_AUICygC&biw=1366&bih=576&dpr=1#imgrc=m1jnO0d5PacHvM](https://www.google.com/search?q=New+horizons+in+next-generation+small+molecule+kinase+inhibitors&tbm=isch&source=lnms&sa=X&ved=0ahUKEwjU6onStJLkAhUN6KYKHbFWCXcQ_AUICygC&biw=1366&bih=576&dpr=1#imgrc=m1jnO0d5PacHvM):

136. Levitzki, A. *Protein kinase inhibitors. Handbook of Cell Signaling, 2/e 2*, (Elsevier Inc., 2010).
137. Dar, A. C. & Shokat, K. M. The Evolution of Protein Kinase Inhibitors from Antagonists to Agonists of Cellular Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 769–795 (2011).
138. Wu, P., Nielsen, T. E. & Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* (2015). doi:10.1016/j.tips.2015.04.005
139. Roskoski, R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol. Res.* **103**, 26–48 (2016).
140. Cox, K. J., Shomin, C. D. & Ghosh, I. Tinkering outside the kinase ATP box: allosteric (type IV) and bivalent (type V) inhibitors of protein kinases. *Future Med. Chem.* **3**, 29–43 (2011).
141. New horizons in next-generation small molecule kinase inhibitors. *Drug Target Review* (2016).
142. Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E. & Angiolini, M. Through the “gatekeeper door”: Exploiting the active kinase conformation. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 2681–2694 (2010).
143. Zhao, Z. & Bourne, P. E. Overview of Current Type I/II Kinase Inhibitors. (2018).
144. Cortes, J. E. *et al.* Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J. Clin. Oncol.* **36**, 231–237 (2018).
145. Roskoski, R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK): structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition. *Pharmacol. Res.* **68**, 68–94 (2013).
146. Roskoski, R. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitors in the treatment of ALK-driven lung cancers. *Pharmacological Research* **117**, 343–356 (2017).
147. Heigener, D. F. & Reck, M. Crizotinib. in *Recent Results in Cancer Research* **211**, 57–65 (Springer New York LLC, 2018).
148. Puig de la Bellacasa, R. *et al.* ALK and ROS1 as a joint target for the treatment of lung cancer: a review. *Transl. lung cancer Res.* **2**, 72–86 (2013).
149. Zhang, S. *et al.* The Potent ALK Inhibitor Brigatinib (AP26113) Overcomes Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Clin. Cancer Res.* **22**, 5527–5538 (2016).
150. Ongoren, S. *et al.* Third-line treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors (dasatinib or nilotinib) in patients with chronic myeloid leukemia after two prior TKIs: real-life data on a single center experience along with the review of the literature. *Hematology* **23**, 212–220 (2018).
151. Markham, A. Fostamatinib: First Global Approval. *Drugs* **78**, 959–963 (2018).



152. Kazandjian, D. *et al.* FDA Approval of Gefitinib for the Treatment of Patients with Metastatic EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1307–12 (2016).
153. Kucharczuk, C. R., Ganetsky, A. & Vozniak, J. M. Drug-Drug Interactions, Safety, and Pharmacokinetics of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Adv. Pract. Oncol.* **9**, 189–200 (2018).
154. Roskoski, R. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacol. Res.* **139**, 471–488 (2019).
155. Roskoski, R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol. Res.* **107**, 249–275 (2016).
156. Petrelli, F. *et al.* Comparative efficacy of palbociclib, ribociclib and abemaciclib for ER+ metastatic breast cancer: an adjusted indirect analysis of randomized controlled trials. *Breast Cancer Res. Treat.* **174**, 597–604 (2019).
157. McShane, T. M., Wolfe, T. A. & Ryan, J. C. Updates on managing advanced breast cancer with palbociclib combination therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1758835918793849 (2018).
158. Beaver, J. A. *et al.* FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 4760–6 (2015).
159. Roskoski, R. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* (2012). doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005
160. Dhillon, S. Tofacitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **77**, 1987–2001 (2017).
161. Roskoski, R. Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.* **135**, 239–258 (2018).
162. Fallahi, P. *et al.* The safety and efficacy of vandetanib in the treatment of progressive medullary thyroid cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **16**, 1109–1118 (2016).
163. Pao, W. *et al.* EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13306–13311 (2004).
164. Sordella, R., Bell, D. W., Haber, D. A. & Settleman, J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science (80-. ).* **305**, 1163–1167 (2004).
165. Research, C. for D. E. and. *Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers - Gefitinib (marketed as Iressa) Information.*
166. Dai, T., Thanh, L., Long, P. & Thuy, T. Preparation of Erlotinib Hydrochloride. *Sci. Technol. (Viện Hàn Lâm Khoa Học Và Công Nghệ Việt Nam)* **53**, 789 (2015).

167. Taylor, P., Street, M. & Wt, L. Access details : Access Details : [ subscription number 919488055 ] Improved Synthesis of Gefitinib and Erlotinib Hydrochloride- Anticancer Agents Improved Synthesis of Gefitinib and Erlotinib Hydrochloride- Anticancer Agents. *Synthesis (Stuttg)*. 286–297 (2007). doi:10.1080/00397910701483761
168. Barghi, L., Aghanejad, A., Valizadeh, H., Barar, J. & Asgari, D. Modified Synthesis of Erlotinib Hydrochloride. *Adv. Pharm. Bull.* **2**, 119–122 (2012).
169. Asgari, D., Aghanejad, A. & Mojarrad, J. S. An improved convergent approach for synthesis of erlotinib, a tyrosine kinase inhibitor, via a ring closure reaction of phenyl benzamidine intermediate. *Bull. Korean Chem. Soc.* **32**, 909–914 (2011).
170. Sequeira, A. *et al.* A Different Approach to the EGFR Inhibitor Gefitinib Involving Solid-Phase Synthesis. *Synlett* **29**, 1346–1350 (2018).
171. Chandrasekhar, M., Srinivasulu, D., Sessaiah, K. & Kumar, N. A Convenient and Easy Purification Approach to High-Yield Synthesis of Gefitinib as an Anticancer Agent from Iovaniline. *Pharm. Chem. J.* **48**, 520–524 (2014).
172. Chandregowda, V., Rao, G. V. & Reddy, G. C. Improved synthesis of gefitinib and erlotinib hydrochloride- anticancer agents. *Synth. Commun.* **37**, 3409–3415 (2007).
173. Kumar, N. *et al.* A simple and highly efficient process for synthesis of Gefitinib and its intermediate. *Indian J. Chem. - Sect. B Org. Med. Chem.* **53B**, 1269–1274 (2014).
174. Karunakara, A. C., Aparna, U., Kush, A. & Chandrasekara Reddy, G. Detection and analysis of intermediates formed during the synthesis of erlotinib via quinazoline-thione route using HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **36**, 2547–2558 (2013).
175. Davies. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
176. Zhang, Y. *et al.* Synthesis and Evaluation of Novel Erlotinib-NSAID Conjugates as More Comprehensive Anticancer Agents. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 1086–1090 (2015).
177. Minna, J. D. & Dowell, J. Erlotinib hydrochloride. *Nat. Rev. Drug Discov. Suppl*, S14-5 (2005).
178. Pallanza, G., Gaboardi, M. & Castaldi, G. ( 12 ) United States Patent No-1-9 C ' C ' s PMF no-nu-o n ! N - O - Yo1 ) - s ! OEt. **2**, (2016).
179. Maskrey, T. S., Kristufek, T., Laporte, M. G., Nyalapatla, P. R. & Wipf, P. A new synthesis of gefitinib. *Synlett* **30**, 471–476 (2019).
180. Raymond, E., Faivre, S. & Armand, J. P. Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase as a Target for Anticancer Therapy. *Drugs* **60**, 15–23 (2000).
181. Balak, M. N. *et al.* Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with



- acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* (2006). doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1570
182. Bartholomew, C., Eastlake, L., Dunn, P. & Yiannakis, D. EGFR targeted therapy in lung cancer; an evolving story. *Respir. Med. Case Reports* **20**, 137–140 (2017).
  183. Yver, A. Osimertinib (AZD9291)-a sciencedriven, collaborative approach to rapid drug design and development. *Ann. Oncol.* **27**, 1165–1170 (2016).
  184. Ayeni, D., Politi, K. & Goldberg, S. B. Emerging agents and new mutations in EGFR-mutant lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 3818–3820 (2015).
  185. Tan, C. S., Gilligan, D. & Pacey, S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology* **16**, e447–e459 (2015).
  186. Synthetic method of anti-tumor medicine. (2015).
  187. Finlay, M. R. V. *et al.* Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor. *J. Med. Chem.* **57**, 8249–8267 (2014).
  188. Hughes, D. L. Patent Review of Manufacturing Routes to Oncology Drugs: Carfilzomib, Osimertinib, and Venetoclax. *Organic Process Research and Development* **20**, 2028–2042 (2016).
  189. EP 3 144 292 A1.
  190. 6235b2, U. (12) *United States Patent*.
  191. Osimertinib mesylate preparation method. (2016).
  192. 2) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT).
  193. Zhu, G., Wang, X., Wang, F., Mao, Y. & Wang, H. New and Convergent Synthesis of Osimertinib. *J. Heterocycl. Chem.* **54**, 2898–2901 (2017).
  194. Butterworth. ( 12 ) *United States Patent*.
  195. AZD9291 intermediate and preparation method thereof. (2015).
  196. Zschäbitz, S. & Grüllich, C. Lenvatinib: A Tyrosine Kinase Inhibitor of VEGFR 1-3, FGFR 1-4, PDGFR $\alpha$ , KIT and RET. in *Recent Results in Cancer Research* **211**, 187–198 (Springer New York LLC, 2018).
  197. Cabanillas, M. E. & Habra, M. A. Lenvatinib: Role in thyroid cancer and other solid tumors. *Cancer Treatment Reviews* **42**, 47–55 (2016).
  198. Schlumberger, M. *et al.* Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N. Engl. J. Med.* **372**, 621–630 (2015).
  199. Roskoski, R. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacol. Res.* **139**, 471–488 (2019).

200. Kim, E. S. Abemaciclib: First Global Approval. *Drugs* **77**, 2063–2070 (2017).
201. Martin, J. M. & Goldstein, L. J. Profile of abemaciclib and its potential in the treatment of breast cancer. *Onco. Targets. Ther.* **11**, 5253–5259 (2018).
202. Goetz, M. P. *et al.* MONARCH 3: Abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **35**, 3638–3646 (2017).
203. McCartney, A. *et al.* The role of abemaciclib in treatment of advanced breast cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1758835918776925 (2018).
204. Herden, M. & Waller, C. F. Alectinib. in *Recent Results in Cancer Research* **211**, 247–256 (Springer New York LLC, 2018).
205. Peters, S. *et al.* Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **377**, 829–838 (2017).
206. Vavalà, T. & Novello, S. Alectinib in the treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer: an update on its properties, efficacy, safety and place in therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **10**, 1758835918789364 (2018).
207. Gadgeel, S. M. The use of alectinib in the first-line treatment of anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer. *Future Oncol.* **14**, 1875–1882 (2018).
208. Dhillon, S. & Clark, M. Ceritinib: first global approval. *Drugs* **74**, 1285–91 (2014).
209. Soria, J. C. *et al.* First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* **389**, 917–929 (2017).
210. Mohieldin, A. *et al.* Efficacy and safety of crizotinib in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag. Res.* **10**, 6555–6561 (2018).
211. Chen, R. L. *et al.* Crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer with concomitant ALK rearrangement and c-Met overexpression 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *BMC Cancer* **18**, (2018).
212. Camidge, D. R. *et al.* Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **379**, 2027–2039 (2018).
213. Syed, Y. Y. Ribociclib: First Global Approval. *Drugs* **77**, 799–807 (2017).
214. Hortobagyi, G. N. *et al.* Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1738–1748 (2016).
215. Sonke, G. S. *et al.* Ribociclib with letrozole vs letrozole alone in elderly patients with hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer in the randomized MONALEESA-2 trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **167**, 659–669 (2018).
216. O’Shaughnessy, J. *et al.* Ribociclib plus letrozole versus letrozole alone in patients with de novo HR+, HER2- advanced breast cancer in the randomized

- MONALEESA-2 trial. *Breast Cancer Res. Treat.* **168**, 127–134 (2018).
217. Schmidt, M. & Sebastian, M. Palbociclib-The First of a New Class of Cell Cycle Inhibitors. *Recent Results Cancer Res.* **211**, 153–175
218. Finn, R. S. *et al.* Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1925–1936 (2016).
219. A., B., E., C., J., A., F., G. & O., H. Axitinib in the treatment of renal cell carcinoma: Design, development, and place in therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 2801–2811 (2017).
220. Hutson, T. E. *et al.* Axitinib Versus Sorafenib in First-Line Metastatic Renal Cell Carcinoma: Overall Survival From a Randomized Phase III Trial. *Clin. Genitourin. Cancer* **15**, 72–76 (2017).
221. Fischer, P. M. Approved and Experimental Small-Molecule Oncology Kinase Inhibitor Drugs: A Mid-2016 Overview. *Med. Res. Rev.* **37**, 314–367 (2017).
222. Roskoski, R. Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.* **142**, 151–168 (2019).
223. Roskoski, R. The role of small molecule Kit protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of neoplastic disorders. *Pharmacol. Res.* **133**, 35–52 (2018).
224. Rossari, F., Minutolo, F. & Orciuolo, E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J. Hematol. Oncol.* **11**, 84 (2018).
225. Müller, M. C. *et al.* Ponatinib in chronic myeloid leukemia (CML): Consensus on patient treatment and management from a European expert panel. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **120**, 52–59 (2017).
226. Cortes, J. E. *et al.* Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. *Blood* **132**, 393–404 (2018).
227. Wang, H.-T. & Xia, M. A meta-analysis of efficacy and safety of sorafenib versus other targeted agents for metastatic renal cell carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. **98**, e13779 (2019).
228. Wen, T., Xiao, H., Luo, C., Huang, L. & Xiong, M. Efficacy of sequential therapies with sorafenib-sunitinib versus sunitinib-sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 20441–20451 (2017).
229. Iacovelli, R. *et al.* Is there still a role for sorafenib in metastatic renal cell carcinoma? A systematic review and meta-analysis of the effectiveness of sorafenib over other targeted agents. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **99**, 324–31 (2016).
230. Keating, G. M. Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Target. Oncol.* **12**, 243–253 (2017).

231. Roskoski, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor inhibitors in the treatment of renal cell carcinomas. *Pharmacol. Res.* **120**, 116–132 (2017).
232. Druker, B. J. & Lydon, N. B. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Investigation* **105**, 3–7 (2000).
233. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 493–502 (2002).
234. Heinrich, M. C. *et al.* Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* **96**, 925–32 (2000).
235. Chahrour, O., Cairns, D. & Omran, Z. Small Molecule Kinase Inhibitors as Anti-Cancer Therapeutics. *Mini-Reviews Med. Chem.* **12**, 399–411 (2012).
236. Deadman, B. J., Hopkin, M. D., Baxendale, I. R. & Ley, S. V. The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib. *Organic and Biomolecular Chemistry* **11**, 1766–1800 (2013).
237. Dungo, R. T. & Keating, G. M. Afatinib: first global approval. *Drugs* **73**, 1503–15 (2013).
238. Wind, S., Schnell, D., Ebner, T., Freiwald, M. & Stopfer, P. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Afatinib. *Clin. Pharmacokinet.* **56**, 235–250 (2017).
239. Wecker, H. & Waller, C. F. Afatinib. *Recent Results Cancer Res.* **211**, 199–215
240. Abdallah, S. M.-B. & Hirsh, V. Irreversible tyrosine kinase inhibition of epidermal growth factor receptor with afatinib in EGFR activating mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer. *Curr. Oncol.* **25**, S9–S17 (2018).
241. Miklos, D. *et al.* Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood* **130**, 2243–2250 (2017).
242. Spinner, M. A., Varma, G. & Advani, R. H. Novel Approaches in Waldenström Macroglobulinemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **32**, 875–890 (2018).
243. Strati, P., Jain, N. & O'Brien, S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* **93**, 651–664 (2018).
244. Pal Singh, S., Dammeijer, F. & Hendriks, R. W. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. *Mol. Cancer* **17**, 57 (2018).
245. Deeks, E. D. Neratinib: First Global Approval. *Drugs* **77**, 1695–1704 (2017).
246. Cella, D. & Beaumont, J. L. Pazopanib in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ther. Adv. Urol.* **8**, 61–9 (2016).
247. Harris, P. A. *et al.* Discovery of 5-[[4-[(2,3-dimethyl-2H-indazol-6-yl)methylamino]-2-pyrimidinyl]amino]-2-methyl-benzenesulfonamide (Pazopanib), a novel and potent vascular endothelial growth factor receptor

- inhibitor. *J. Med. Chem.* **51**, 4632–40 (2008).
248. Miwa, S. *et al.* Therapeutic targets for bone and soft-tissue sarcomas. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, (2019).
249. Schutz, F. A. B., Choueiri, T. K. & Sternberg, C. N. Pazopanib: Clinical development of a potent anti-angiogenic drug. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **77**, 163–71 (2011).
250. Ettrich, T. J. & Seufferlein, T. Regorafenib. *Recent Results Cancer Res.* **211**, 45–56
251. Røed Skårderud, M., Polk, A., Kjeldgaard Vistisen, K., Larsen, F. O. & Nielsen, D. L. Efficacy and safety of regorafenib in the treatment of metastatic colorectal cancer: A systematic review. *Cancer Treat. Rev.* **62**, 61–73 (2018).
252. Poveda, A. *et al.* GEIS guidelines for gastrointestinal sarcomas (GIST). *Cancer Treat. Rev.* **55**, 107–119 (2017).
253. Zeiser, R., Andrlová, H. & Meiss, F. Trametinib (GSK1120212). *Recent Results Cancer Res.* **211**, 91–100
254. Levitzki, A. Protein kinase inhibitors. in *Handbook of Cell Signaling*, 2/e (2010). doi:10.1016/B978-0-12-374145-5.00065-6
255. Weisberg, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**, 129–41 (2005).
256. Kinigopoulou, M. *et al.* An optimized approach in the synthesis of imatinib intermediates and analogues. *RSC Adv.* **6**, 61458–61467 (2016).
257. Theodorou, V., Skobridis, K., Tzakos, A. G. & Ragoussis, V. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Lett.* **48**, 8230–8233 (2007).
258. Perrin, D. D. *E I N E M A N N*.

