



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ
ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΛΕΝΒΑΤΙΝΙΒ, ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ
ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΝΙΚΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2020**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΝΙΚΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

A.M. 222

Επιβλέπων καθηγητής

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής

Σίσκος Μιχαήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής

Θεοδώρου Βασιλική, Ομότιμη Καθηγήτρια

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

10/07/2020

Ευχαριστίες

Το παρόν Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης αφορά τη μοριακή μοντελοποίηση, το σχεδιασμό, τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος της Λεμβατινίμπης (Lenvatinib), ως εν δυνάμει δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, στο πλαίσιο του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) «Ιατρική Χημεία».

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των εν λόγω ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ3-210 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Νοέμβριο του 2018 έως τον Ιούνιο του 2020, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην ανάπτυξη της έρευνας και την προαγωγή της γνώσης σε επιστημονικά πεδία της Χημείας και της Βιολογίας που σχετίζονται με την Ιατρική επιστήμη.

Πρώτα απ'όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα και επιστημονικό μου υπεύθυνο, Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο, για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού μου διπλωμάτος ειδίκευσης, καθώς και κατά το εξάμηνο της πτυχιακής μου εργασίας. Είμαι ευγνώμων που είχα την τύχη να είμαι μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Με καθοδηγούσε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του μεταπτυχιακού, προσφέροντας απλόχερα τις γνώσεις και την εμπειρία του, λύνοντας μου κάθε απορία, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πειραματικό επίπεδο. Θεωρώ πως εκτός από ένας εξάαιρετος επιστήμονας, είναι πάνω απ'όλα ένας εξαιρετικός άνθρωπος που δείχνει κατανόηση και στηρίζει όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Βασιλική Θεοδώρου, τόσο για την επιστημονική καθοδήγηση όσο και για τη θερμή της στήριξη όλο το διάστημα διεξαγωγής της διατριβής μου. Εκτιμώ απεριόριστα τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθειά της.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Σίσκο Μιχάλη που δέχτηκε ευχαρίστως να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής μου και να αξιολογήσει την ερευνητική μου προσπάθεια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους εργαστηριακούς μου συναδέλφους Αλαγιάννη Μιχάλη, Βούλγαρη Πηνελόπη, Ντέμου Νικολέτα, Μπρέντα Αλέξιο,

Καραμέτου Χριστίνα, Γούτσιου Γεωργία, Τσίπα Μαρία, Βελισσάρη Παναγιώτα, Κουσαξίδη Αντώνη, Κοτίδη Στέλιο, Γιαννακού Ιωάννα, Μπράκουλλι Ελένη, Μπακαγιάννη Ανδρομάχη και Γιαννέλο Μάριο για την άριστη συνεργασία μας, την ψυχολογική υποστήριξη και τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε, καθώς επίσης και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Καθηγητή κ. Βαρβούνη, Θεοδωρακοπούλου Παρασκευή, Γκάλπινο Βασίλη, Τσεμπερλίδου Ειρήνη και Γεροντίτη Ιωάννη, που μου πρόσφεραν απλόχερα τη βοήθειά τους όποτε τη χρειάστηκα. Ακόμη, ευχαριστώ και τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου Νίκη, Θεοδοσία, Μαρία, Χρήστο και Νεοφύτα για την ψυχολογική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

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

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην αναφερθώ στην οικογένειά μου. Ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου και τα αδέρφια μου, Στέλλα, Δημήτρη, Ραφαέλα, για τη στήριξη, οικονομική και ψυχολογική, καθώς και την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου προσπάθεια και πιστεύουν σε μένα. Χωρίς αυτούς, η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής θα ήταν αδύνατη.

Στην οικογένειά μου...

Περίληψη

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο στη λειτουργία του κυττάρου, καθώς ρυθμίζουν πολλές σηματοδοτικές οδούς, επάγοντας τη φωσφορυλίωση από το ATP, ενώ η απορρυθμισμένη δράση των πρωτεϊνικών κινασών σχετίζεται με διάφορες ασθένειες.

Η εκλεκτική αναστολή αυτών των παθολογικών πρωτεϊνικών κινασών, μέσω μορίων μικρού μοριακού βάρους που ανταγωνίζονται τη θέση πρόσδεσης του ATP, συμβάλλει σημαντικά στη θεραπεία νεοπλασιών. Ακριβώς για το λόγο αυτό, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για το σχεδιασμό, την ανάπτυξη και τη σύνθεση νέων εκλεκτικών αναστολέων απορρυθμισμένων πρωτεϊνικών κινασών.

Ο VEGF είναι ο ενδοαγγειακός παράγοντας της αγγειογένεσης στα καρκινικά κύτταρα, στα οποία υπερεκφράζεται από ογκογονίδια, διάφορους αυξητικούς παράγοντες, καθώς και από υποξία. Οι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες VEGF δεσμεύονται στους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης VEGFR, οδηγώντας σε μεταγενέστερη μεταγωγή σήματος. Το Lenvatinib (Lenvima) είναι ένας αναστολέας πολλαπλών κινασών. Συγκεκριμένα, αναστέλλει αποτελεσματικά τις τυροσινικές κινάσες της οικογένειας VEGFR. Έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς, του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (σε συνδιασμό με το everolimus), του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και του προχωρημένου ενδομητριακού καρκινώματος (σε συνδιασμό με το pembrolizumab).

Στο εργαστήριο, τα ανάλογα του Lenvatinib που συντέθηκαν, έχουν προκύψει από μελέτες μοριακής μοντελοποίησης. Είναι πιθανό να δρουν πιο αποτελεσματικά, από το ίδιο το φάρμακο, στις πρωτεϊνικές κινάσες στόχους. Αυτά τα ανάλογα σχεδιάστηκαν μέσω στοχευμένων τροποποιήσεων στη δομή του Lenvatinib, βασισμένων στην διαθέσιμη κρυσταλλογραφική δομή του VEGFR2. Συγκεκριμένα, ο δακτύλιος κυκλοπροπανίου αντικαταστάθηκε από άλλες χημικές δομές, οι οποίες αυξάνουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναστολέα και της πρωτεϊνικής κινάσης. Τα ανάλογα συντέθηκαν μέσω μιας εναλλακτικής συνθετικής πορείας από εκείνη που είχε προταθεί αρχικά από την Eisai Co. Επιπλέον, έγιναν σημαντικές προσπάθειες βελτιστοποίησης της πορείας αυτής. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίστηκαν πλήρως με ^1H NMR, ^{13}C NMR φασματοσκοπία και φασματομετρία μάζας (MS).

Abstract

Protein kinases are enzymes that play a fundamental role in cell function, as they regulate many signaling pathways, inducing phosphorylation by ATP. Deregulation of the normal action of protein kinases has been associated with various diseases.

Selective inhibition of these abnormal protein kinases by low molecular weight compounds that compete the ATP binding site, contributes significantly to the treatment of neoplasms. For this reason, there is a great interest in the scientific community for the design, development and synthesis of new selective inhibitors of pathological protein kinases.

VEGF is the key mediator of angiogenesis in cancer, in which it is overexpressed by oncogenes, a variety of growth factors and also hypoxia. VEGF ligands bind to the tyrosine kinase receptors VEGFR, leading to subsequent signal transduction. Lenvatinib (Lenvima) is a multiple kinase inhibitor against the VEGFR tyrosine kinases' family. It is approved for the treatment of differentiated thyroid cancer, advanced renal cell carcinoma (in combination with everolimus), hepatocellular carcinoma and advanced endometrial carcinoma (in combination with pembrolizumab).

In the laboratory the Lenvatinib analogues which were synthesized, had been the result of molecular modelling studies. These analogues are likely to be more efficient and selective for protein kinases' inhibition than Lenvatinib. They were designed through targeted modifications on the structure of Lenvatinib, based on the available crystallographic structure of VEGFR2. Specifically, the cyclopropane ring was replaced by other chemical structures which increase the intermolecular interactions that take place between the inhibitor and the protein kinase. The analogues of Lenvatinib were synthesized through an alternative synthetic route than the one that was originally proposed by Eisai Co. In addition, significant efforts were made in order to optimize this route. All new compounds were fully characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR spectroscopy and Mass Spectrometry (MS).

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη.....	8
Abstract	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	17
Εισαγωγή – Σκοπός.....	17
1.1 Εισαγωγή	17
1.2 Σκοπός εργασίας	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	27
Θεωρητικό μέρος	27
2.1 Κυτταρικός Κύκλος	27
2.2 Φωσφορυλίωση Πρωτεϊνών	29
2.3 Πρωτεϊνικές Κινάσες	30
2.3.1 Δομή Πρωτεϊνικών Κινασών.....	31
2.3.2 Ταξινόμηση Πρωτεϊνικών Κινασών	33
2.3.2.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης (STKs)	34
2.3.2.1.1 Πρωτεϊνική Κινάση Καζεΐνης II (CK2/CSNK2).....	35
2.3.2.1.2 Πρωτεϊνική Κινάση A (PKA)	36
2.3.2.1.3 Πρωτεϊνική Κινάση C (PKC).....	37
2.3.2.1.4 Ενεργοποιημένες από Μιτογόνο Πρωτεϊνικές Κινάσες (MAPKs)	38
2.3.2.1.5 Πρωτεϊνικές Κινάσες Εξαρτώμενες από το Σύμπλοκο Ca^{2+} /Καλμοδουλίνη (CAMK)	40
2.3.2.1.6 Κινάση της Φωσφορυλάσης (PhK)	41
2.3.2.1.7 Πρωτεϊνική Κινάση B (Akt)	41
2.3.2.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες Τυροσίνης (TKs).....	42
2.3.2.2.1 Υποδοχικές Τυροσινικές Κινάσες (RTKs).....	43
2.3.2.2.1.1 Υποδοχείς Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGFR).....	45
2.3.2.2.1.2 Υποδοχείς Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR).....	48
2.3.2.2.1.3 Υποδοχείς Ινοβλαστικού Αυξητικού Παράγοντα (FGFR)	50
2.3.2.2.1.4 Υποδοχέας Αιμοπεταλιακού Αυξητικού Παράγοντα (PDGFR).....	52
2.3.2.2.1.5 Υποδοχική Τυροσινική Κινάση c-KIT.....	53
2.3.2.2.1.6 Υποδοχική τυροσινική κινάση RET	54
2.3.2.2.2 Μη Υποδοχικές Τυροσινικές Κινάσες (nRTKs)	54
2.3.2.2.2.1 Μη Υποδοχική Κινάση Τυροσίνης Abl	55

2.3.2.2.2 Μη Υποδοχική Κινάση Τυροσίνης c- <i>Src</i>	56
2.3.2.1.8 Tyrosine Kinase-Like Κινάσες (TKL).....	57
2.3.2.3 Άτυπες Πρωτεϊνικές Κινάσες (aPKs).....	58
2.4 Καρκίνος	59
2.4.1 Μετάσταση του όγκου	62
2.4.2 Αγγειογένεση.....	63
2.4.3 Καρκίνος του θυροειδούς αδένα.....	66
2.4.5 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)	68
2.4.6 Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC)	69
2.5 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών στην στοχευμένη θεραπεία.....	70
2.5.1 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.....	71
2.5.2 Χαρακτηριστικά αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.....	75
2.5.3 Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών στην καρκινική θεραπεία.....	76
2.5.4 Αναστολείς της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR2	83
2.5.5 Σχέση δομής - δραστικότητας (SAR) των αναστολέων της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR2	84
2.6 Σύνθεση κινολίνης.....	87
2.7 Lenvatinib	93
2.7.1 Μηχανισμός δράσης του Lenvatinib και αλληλεπιδράσεις με τον VEGFR2	98
2.7.2 Συνθετική πορεία του Lenvatinib	102
2.8 Sorafenib	112
2.8.1 Σύνθεση του Sorafenib	114
2.9 Sunitinib.....	117
2.9.1 Σύνθεση του Sunitinib	118
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	122
Συζήτηση - Αποτελέσματα.....	122
3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων.....	122
3.2 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου Lenvatinib-VEGFR2	125
3.3 Μοριακή μοντελοποίηση των νέων αναλόγων του Lenvatinib σε σύμπλοκο με τον VEGFR2	129
3.3.1 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου Lenv1-VEGFR2	129
3.3.2 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου Lenv2-VEGFR2	131
3.3.3 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου Lenv3-VEGFR2	132
3.3.4 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου Lenv4-VEGFR2	134

3.3.5 Αποτελέσματα μοριακής μοντελοποίησης.....	135
3.3.6 Μοριακή μοντελοποίηση του Lenvatinib και των νέων ενώσεων στο ενεργό κέντρο άλλων κινασών.....	136
3.4 Ολική πορεία σύνθεσης νέων αναλόγων του Lenvatinib.....	137
3.5 Βελτιστοποιήσεις στη συνθετική πορεία των νέων αναλόγων του Lenvatinib.....	140
3.6 Σύνθεση νέων αναλόγων του Lenvatinib	142
3.6.1 Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1.....	144
3.6.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1.....	144
3.6.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1.....	146
3.6.2 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 2.....	149
3.6.2.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 2.....	149
3.6.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 2.....	150
3.6.3 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3..	153
3.6.3.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3.....	153
3.6.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3.....	155
3.6.4 Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 4.....	157
3.6.4.1 Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικού χλωριδίου	157
3.6.4.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικού χλωριδίου.....	157
3.6.4.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 4.....	160
3.6.4.2 Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5.....	162
3.6.4.2.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5.....	162
3.6.4.2.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5.....	164
3.6.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 6.....	165

3.6.5.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο) καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 6.....	165
3.6.5.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 6.....	170
3.6.5.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (4-((tert-βουτοξυκαρβονυλ)οξυ)-2-χλωροφαινυλικού tert-βουτυλεστέρα, παραπροϊόν 6a.....	172
3.6.5.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα του ανθρακικού 4-αμινο-3-χλωροφαινυλο tert-βουτυλεστέρα, παραπροϊόν 6b.....	173
3.6.6 Σύνθεση του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7.....	174
3.6.6.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο) καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7.....	174
3.6.6.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7.....	177
3.6.7 Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 8.....	177
3.6.7.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 8.....	177
3.6.7.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 8.....	178
3.6.8 Σύνθεση των αναλόγων του Lenvatinib της σειράς A (Lenv1, Lenv2, Lenv3).....	182
3.6.8.1 Σύνθεση του Lenv1.....	183
3.6.8.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του Lenv1.....	183
3.6.8.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του Lenv1.....	186
3.6.8.2 Σύνθεση του Lenv2.....	189
3.6.8.3 Σύνθεση του Lenv3.....	193
3.6.9 Σύνθεση των αναλόγων της σειράς B (Lenv4).....	198
3.6.9.1 Σύνθεση του Lenv4.....	198
3.6.9.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του Lenv4.....	198
3.6.9.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της συμμετρικής ουρίας, ένωση 11.....	202
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	205
Πειραματικό μέρος.....	205
4.1 Συσκευές και όργανα.....	205
4.2 Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1.....	205
4.3 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 2.....	206

4.4	Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3.....	206
4.5	Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 4.....	208
4.5.1	Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικού χλωριδίου	208
4.5.2	Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5	209
4.6	Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 6 ..	210
4.6.1	Προσπάθεια N-Βoc προστασίας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (σύνθεση ένωσης 6a, 6b)	210
4.6.2	Προσπάθεια προστασίας της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, με τη χρήση άλλων προστατευτικών ομάδων.....	212
4.6.3	Προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, σύνθεση ένωσης 6.....	213
4.7	Σύνθεση του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7	214
4.8	Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 8	215
4.9	Σύνθεση του Lenv1	215
4.10	Σύνθεση του Lenv2	217
4.10.1	Σύνθεση της ένωσης 9.....	217
4.11	Σύνθεση του Lenv3	219
4.11.1	Σύνθεση της ένωσης 10.....	219
4.12	Σύνθεση του Lenv4	220
4.12.1	Σύνθεση του Lenv4, μέσω του σχηματισμού του ισοκυανικού παραγώγου της 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης	221
4.12.2	Σύνθεση του Lenv4, μέσω του σχηματισμού του ισοκυανικού παραγώγου της αμίνης 8.....	222
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	223
	Συμπεράσματα	223
	Βιβλιογραφία	225

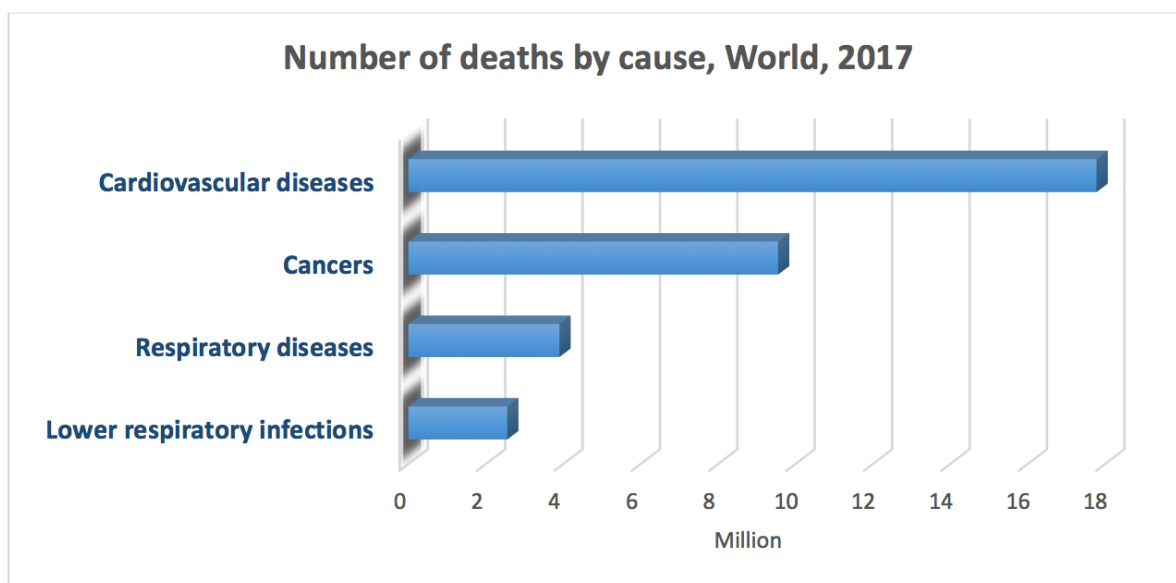
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή – Σκοπός

1.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που συναντώνται σήμερα. Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες, στις ανεπτυγμένες χώρες, αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες (Εικόνα 1) ^[1]. Ο όρος <<καρκίνος>> αποδίδεται σε ένα σύνολο σχετικών ασθενειών.

Τα υγιή κύτταρα αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, ενώ τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται στους γειτονικούς ιστούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων. Οι όγκοι μπορεί να είναι καλοήθεις ή κακοήθεις ^[2]. Κάθε χρόνο χάνουν τη ζωή τους εκατομμύρια άνθρωποι από πολλούς διαφορετικούς τύπους κακοήθων όγκων. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 2018 τα νέα κρούσματα καρκίνου ξεπέρασαν τα 18 εκατομμύρια και σημειώθηκαν πάνω από 9 εκατομμύρια θάνατοι ^[3]. Για το λόγο αυτό, είναι απολύτως απαραίτητη η ανάπτυξη νέων φαρμάκων για την αντιμετώπιση αυτής της συχνά εμφανιζόμενης και πολυδιάστατης νόσου.

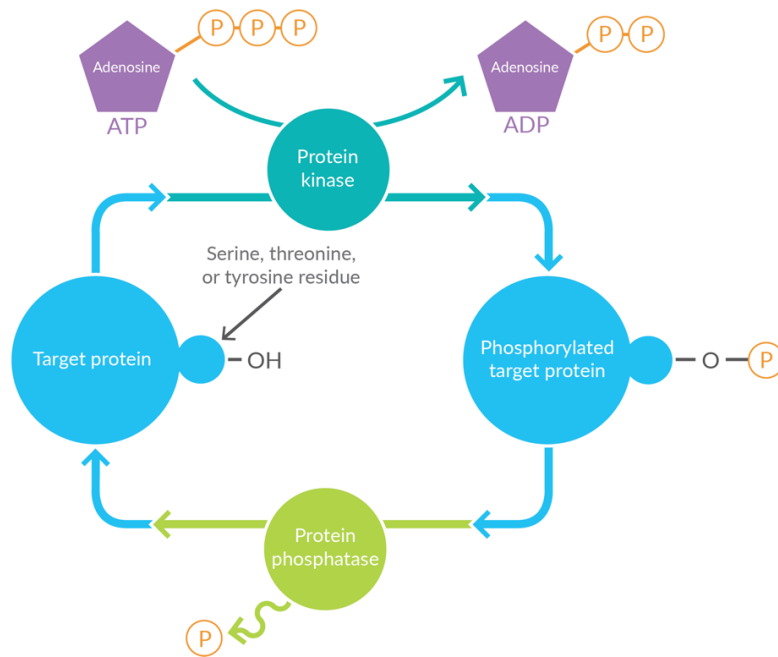


Εικόνα 1: Στατιστικά στοιχεία αιτιών θανάτου, παγκοσμίως για το 2017, σύμφωνα με τον ΙΗΜΕ, *Global Burden of Disease*.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τρόποι θεραπείας του καρκίνου. Οι πιο συνηθισμένοι είναι χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ορμονική θεραπεία και η στοχευμένη θεραπεία, εκτός των άλλων, μέσω της αναστολής των πρωτεϊνικών κινασών [4]. Η θεραπεία που ακολουθείται για τον κάθε ασθενή, εξαρτάται από τον τύπο, τη θέση και την ποιότητα του καρκίνου, καθώς και από την υγεία και τις προτιμήσεις του ασθενούς. Μερικές από τις προαναφερθείσες θεραπείες καταστρέφουν όχι μόνο τα καρκινικά, αλλά και τα υγιή κύτταρα. Συνεπώς, σημαντική είναι η σύνθεση και ανάπτυξη τροποποιημένων και βελτιωμένων φαρμάκων που στοχεύουν εκλεκτικά σε μοριακό επίπεδο, αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς. Για τους λόγους αυτούς, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει πλέον στραφεί στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου και, συγκεκριμένα, στη σύνθεση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους. Οι ερευνητές επιδιώκουν οι ενώσεις αυτές να εμφανίζουν εξειδικευμένη αλληλεπίδραση με απορρυθμισμένα μόρια, τα οποία ευθύνονται για την εμφάνιση και την εξέλιξη της ασθένειας, αναστέλλοντας τη δράση τους. Η εις βάθος κατανόηση της χημείας και της βιοχημείας μιας ασθένειας, καθώς και η συμβολή όλων των κλάδων της χημείας, δύνανται να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια οικογένεια ευκαριωτικών ενζύμων που δρουν ως καταλύτες μεταφοράς της τελικής φωσφορικής ομάδας σε μία πρωτεΐνη-στόχο. Το ATP προσδένεται στο ενεργό κέντρο της κινάσης και προσφέρει τη γ-φωσφορική ομάδα του σε μια υδροξυλομάδα της σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης της πρωτεΐνης-στόχου (Εικόνα 2). Με τον τρόπο αυτόν, οι πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζουν, κατά κανόνα μέσω της ενεργοποίησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες των κυττάρων [5].

Ως εκ τούτου, οι κινάσες διαδραματίζουν έναν αναπόσπαστο ρόλο στις οδούς σηματοδότησης που ρυθμίζουν τις λειτουργίες των κυττάρων. Είναι μια απαραίτητη, γρήγορη και αναστρέψιμη διαδικασία. Μέσω της φωσφορυλίωσης μεταβάλλεται η διαμόρφωση και η δραστηριότητα της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να προσδένεται ή να αποδεσμεύεται κάποιο υπόστρωμα και να ενεργοποιούνται μονοπάτια της μεταγωγής σήματος.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνικών κινασών [6].

Οι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών. Είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς οι οποίοι αποτελούνται από ένα ενδοκυτταρικό (εσωτερικό) και εξωκυτταρικό (εξωτερικό) τμήμα. Το εξωκυτταρικό τμήμα έχει θέσεις στις οποίες μπορούν να προσδεθούν πρωτεΐνες και ορμόνες που στέλνουν σήμα, ώστε να ξεκινήσουν διάφορα βιοχημικά μονοπάτια. Στο ενδοκυτταρικό τμήμα, προσδέεται το ATP και προσθέτει μία φωσφορική ομάδα στην πρωτεΐνη [7].

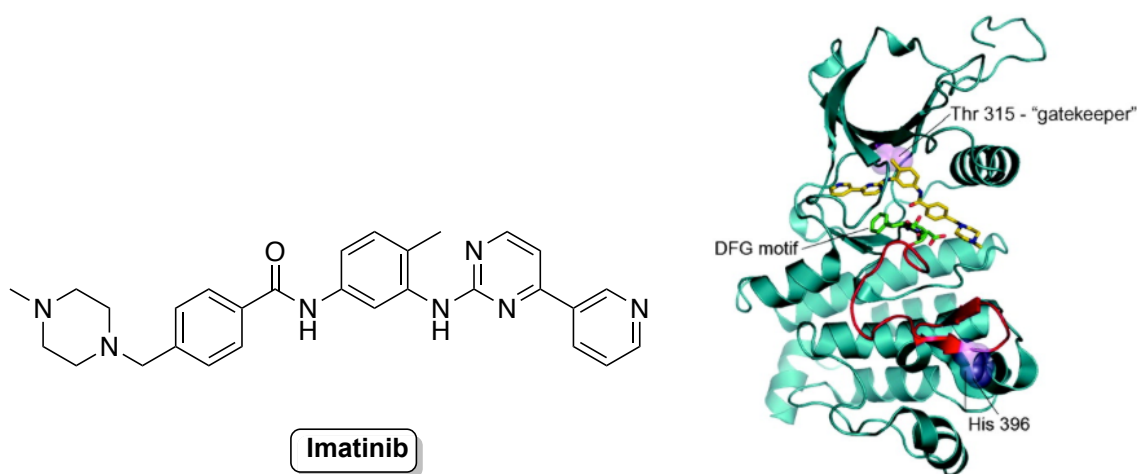
Η απορρύθμιση της λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών-στόχων. Έχει αποδειχθεί πως οι μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές κινάσες σχετίζονται με ανάπτυξη και τη μετάσταση του καρκίνου, καθώς και για πολλές άλλες ανθρώπινες ασθένειες. Μερικές από αυτές είναι η φλεγμονή, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι νευρολογικές παθήσεις η καρδιαγγειακή νόσος και ο διαβήτης [8]. Η εκλεκτική αναστολή της δράσης των απορρυθμισμένων πρωτεϊνικών κινασών έχει καθιερωθεί ως μία από τις πλέον υποσχόμενες θεραπευτικές στρατηγικές για την ανάπτυξη φαρμάκων που στοχεύουν στη καταπολέμηση του καρκίνου.

Σήμερα, περίπου το ένα τρίτο όλων των πρωτεϊνικών στόχων που διεξάγονται στο πλαίσιο της έρευνας σε καινοτόμες φαρμακοβιομηχανίες βασίζονται σε κινάσες [9]. Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που χορηγούνται στη στοχευμένη θεραπεία, η οποία προκύπτει από την κατανόηση της μοριακής γενετικής

και των μονοπατιών μοριακής σηματοδότησης. Οι περισσότεροι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίοι έχουν εγκριθεί από τον FDA, στοχεύουν στο ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης και αναστέλλουν τη λειτουργία της, καταλαμβάνοντας το χώρο του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης, σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων. Ως μιμητές του ATP εμφανίζουν ανταγωνιστική δράση μαζί του, με αποτέλεσμα τα μόρια του ATP να αδυνατούν, πλέον, να προσδεθούν σε έναν ήδη κατειλημμένο χώρο, ώστε να προσφέρουν τη φωσφορική τους ομάδα σε μια πρωτεΐνη, προκειμένου να ενεργοποιηθεί.

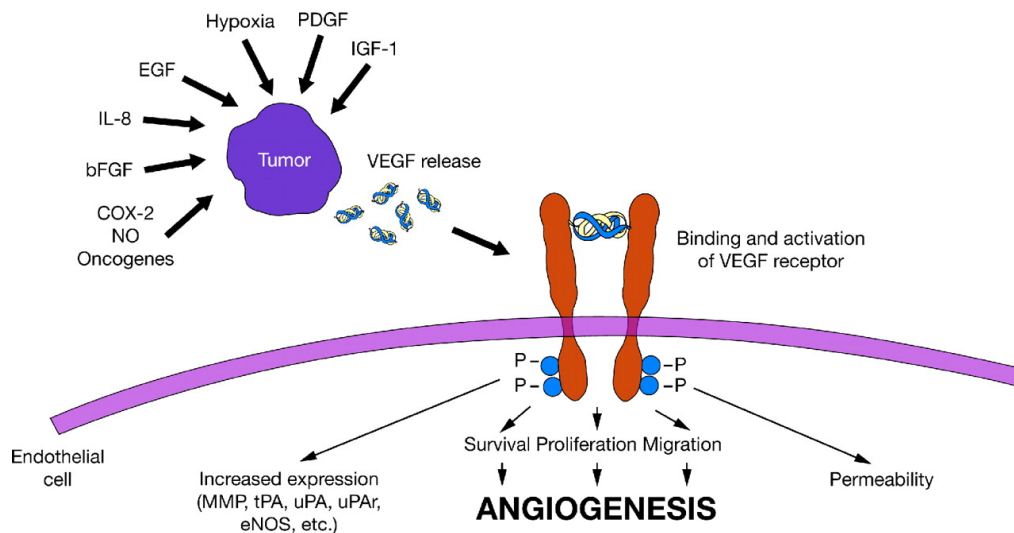
Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών έχουν ξεπεράσει ένα σημαντικό μειονέκτημα της παραδοσιακής θεραπείας του καρκίνου, καθώς διακρίνουν αποτελεσματικά τα φυσιολογικά, μη κακοήθη κύτταρα από τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα. Λόγω αυτής της ξεχωριστής ικανότητας των αναστολέων, επιτυγχάνεται η χαμηλή τοξικότητα στον πληθυσμό ασθενών με καρκίνο.

Ο πρώτος αναστολέας τυροσινικής κινάσης που εγκρίθηκε από τον FDA ήταν η Ιματινίβη (Gleevec) (Εικόνα 3), το 2001. Είναι αναστολέας της υβριδικής, μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Bcr-Abl και χορηγείται για τη θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Το Imatinib (Gleevec) λόγω της μεγάλης κλινικής επιτυχίας κατέστη φάρμακο πρώτης γραμμής για τη θεραπεία της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Σηματοδοτήθηκε, έτσι, η αρχή μιας νέας εποχής στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου. Από τότε μέχρι και σήμερα έχουν αναπτυχθεί και εγκριθεί από τον FDA πολλές νέες ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες δρουν ως φάρμακα έναντι των απορρυθμισμένων πρωτεϊνικών κινασών [10].



Εικόνα 3: Αριστερά: Χημική δομή του Imatinib. **Δεξιά:** Σχηματική απεικόνιση της δομής του Imatinib εντός του ενεργού κέντρου της Abl κινάσης [11].

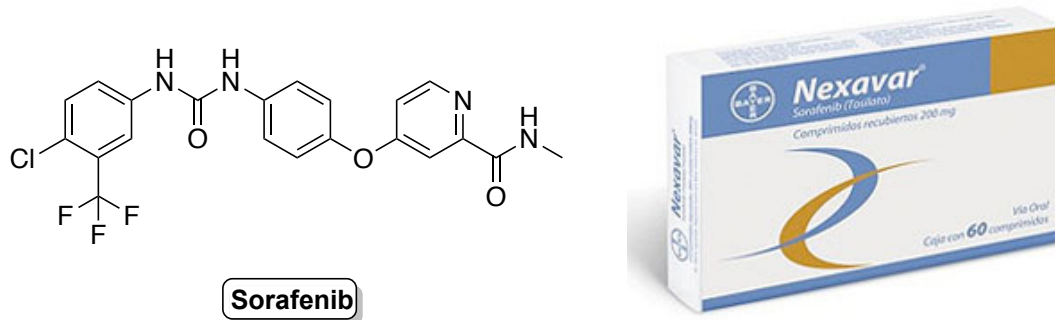
Η οικογένεια ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων, VEGF, περιλαμβάνει εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες, των οποίων η φυσιολογική λειτουργία στον οργανισμό είναι να δημιουργούν νέα αιμοφόρα αγγεία κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ή μετά από τραυματισμό. Στα καρκινικά κύτταρα, οι πρωτεΐνες VEGF υπερεκφράζονται και εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου βρίσκεται το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, VEGFR. Οι VEGFR είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, οι οποίοι εντοπίζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και έχουν εγγενή κυτταροπλασματική ενζυμική δραστηριότητα. Η γλυκοπρωτεΐνη VEGF προσδένεται στον υποδοχέα VEGFR και ενεργοποιεί έναν πολύπλοκο καταρράκτη σηματοδότησης, ο οποίος διεγείρει την αγγειογένεση (Εικόνα 4), μια απαραίτητη διεργασία ανάπτυξης του όγκου [12].



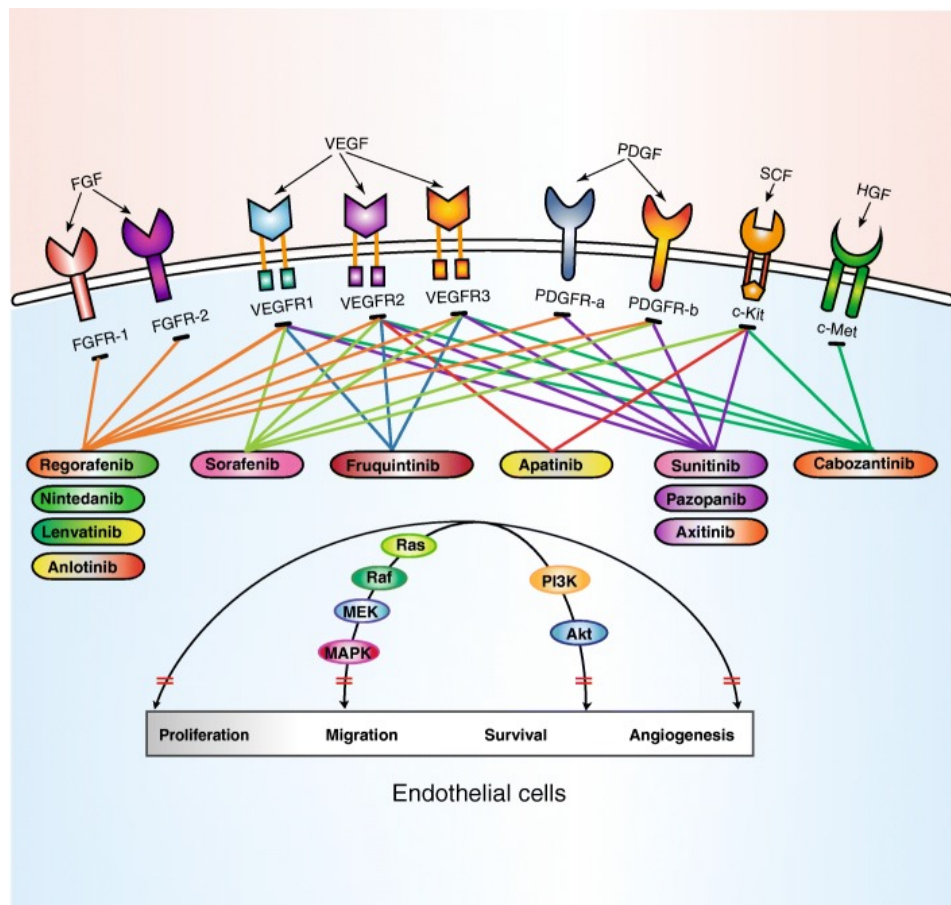
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας πρόκλησης αγγειογένεσης από τον VEGF.

Μελέτες και *in vivo* κλινικές δοκιμές που αφορούν καρκινικές κυτταρικές σειρές, έχουν δείξει ότι η αναστολή της υποδοχικής πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR μπορεί να αποτελέσει αντιαγγειογενετική θεραπευτική μέθοδο για μερικούς τύπους καρκίνου, όπως είναι ο καρκίνος του θυρεοειδούς αδένου [13]. Ο πρώτος, μικρού μοριακού βάρους, εκλεκτικός αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR που εγκρίθηκε από τον FDA, για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC), ήταν το Sorafenib (Nexavar), το 2005 (Εικόνα 5) [14]. Το Sorafenib εγκρίθηκε, επίσης, το 2007 για τη θεραπεία των ασθενών με προχωρημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) και το 2013 για τη θεραπεία του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς (DTC). Στις κλινικές μελέτες που έλαβαν χώρα, τα αποτελέσματα ήταν πολύ θετικά και για τους τρεις προαναφερθέντες τύπους καρκίνου. Αυτός, όπως και οι άλλοι 10 αναστολείς τυροσινικών κινασών, που στοχεύουν

στην αντιαγγειογενετική θεραπεία, έχουν εγκριθεί και κυκλοφορούν στο εμπόριο μέχρι σήμερα. Οι αναστολείς αυτοί μπορούν να στοχεύουν ταυτόχρονα σε πολλαπλούς υποδοχείς (Εικόνα 6). Οι κύριοι στόχοι περιλαμβάνουν τον υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR), τον υποδοχέα αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFR), τον υποδοχέα ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGFR), τον c-Kit και τον c-Met.

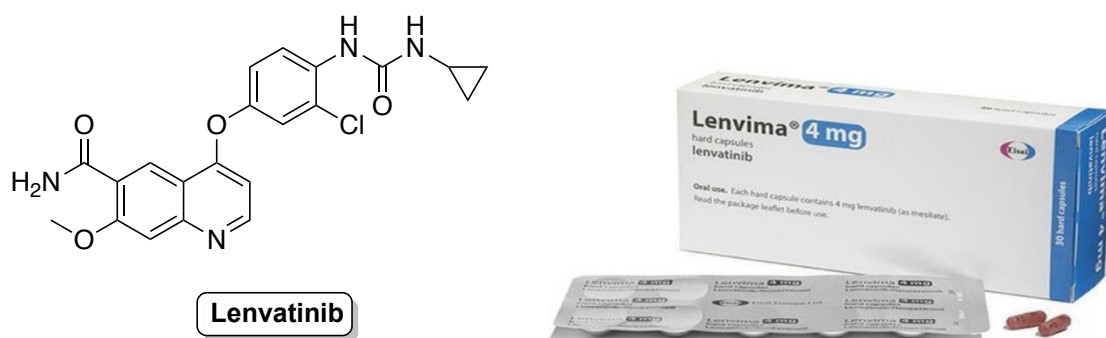


Εικόνα 5: Αριστερά: Χημική δομή του φαρμάκου Sorafenib. Δεξιά: Το φαρμακευτικό σκεύασμα του Sorafenib, όπως κυκλοφορεί στο εμπόριο.



Εικόνα 6: Οι κύριοι στόχοι των εγκεκριμένων αντιαγγειογενετικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών [14].

Το Lenvatinib (Lenvima) είναι ένας αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών που αναστέλλει αντιστρεπτά τις κινάσες VEGFR1/2/3, PDGFRα/β, FGFR1/2/3, RET, και c-Kit (Εικόνα 7) ^[10]. Χορηγείται στη μορφή μεσυλικού άλατος και εγκρίθηκε το 2015 από τον FDA για τη θεραπεία ασθενών με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς (DTC). Το 2016 εγκρίθηκε για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC), ως συνδιαστική θεραπεία με everolimus. Επίσης, το 2018 εγκρίθηκε ως θεραπεία πρώτης γραμμής των ασθενών με μη αναστρέψιμο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Στις 17 Σεπτεμβρίου 2019, ο FDA ενέκρινε το φάρμακο για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο καρκίνωμα του ενδομητρίου σε συνδυασμό με το Pembrolizumab. Οι συχνότερες παρενέργειες που έχουν σημειωθεί σε ασθενείς, μετά τη λήψη του φαρμάκου, είναι υπέρταση, κούραση και διάρροια. Στις κλινικές μελέτες, τα αποτελέσματα της συνολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών που έλαβαν Lenvatinib ήταν εξίσου θετικά με αυτά των ασθενών που έλαβαν Sorafenib. Τα αποτελέσματα της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη (PFS), καθώς και το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης (ORR) ήταν σηματικά θετικότερα απ'ότι του Sorafenib. Το Lenvatinib, ως το δεύτερο φάρμακο πρώτης γραμμής των ασθενών με μη αναστρέψιμο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), αποτέλεσε μεγάλη επιτυχία στον τομέα της αντιαγγειογενετικής θεραπείας.



Εικόνα 7: Αριστερά: Χημική δομή του φαρμάκου Lenvatinib. Δεξιά: Το φαρμακευτικό σκεύασμα του Lenvatinib, όπως κυκλοφορεί στο εμπόριο.

1.2 Σκοπός εργασίας

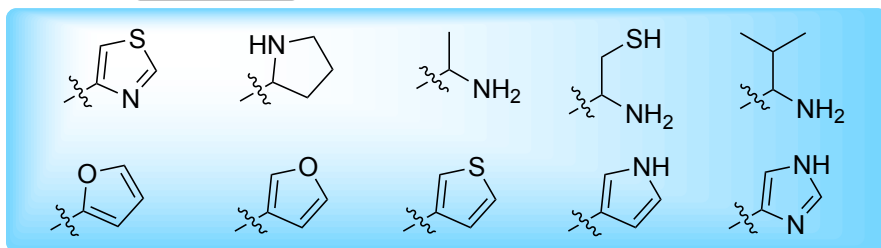
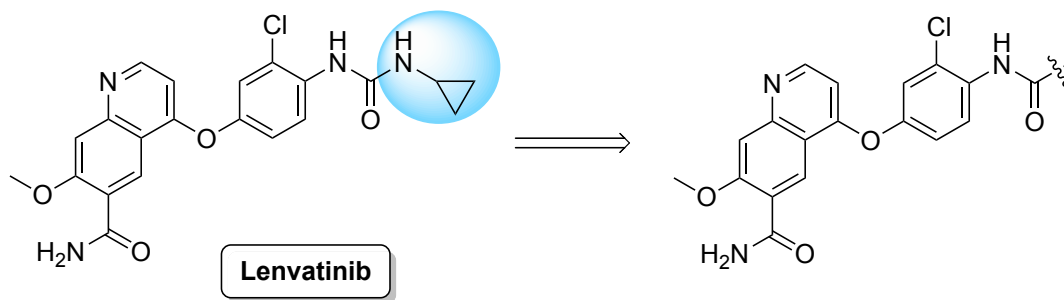
Λαμβάνοντας υπόψη όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, σχετικά με τη σπουδαία συμβολή των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών στην αντικαρκινική θεραπεία, έχει καταστεί επιτακτική η ανάγκη σύνθεσης νέων βιοδραστικών αναλόγων του φαρμάκου Lenvatinib, εν δυνάμει αναστολέων για τη θεραπεία νεοπλασιών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος του Lenvatinib, διενεργώντας μικρές, στοχευμένες τροποποιήσεις στη δομή του. Οι νέες αυτές ενώσεις σχεδιάστηκαν μέσω ορθολογικού σχεδιασμού με πειράματα μοριακής μοντελοποίησης, τα οποία διενεργήθηκαν στο εργαστήριό, με τη χρήση του προγράμματος AutodockVina. Μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των νέων αναλόγων με την τυροσινική κινάση VEGFR2, ωστόσο οι νέες αυτές ενώσεις δύνανται να αναστέλλουν και άλλα μέλη πρωτεϊνικών κινασών, όπως είναι οι VEGFR1/2/3, PDGFR α/β , FGFR1/2/3, RET, και c-Kit.

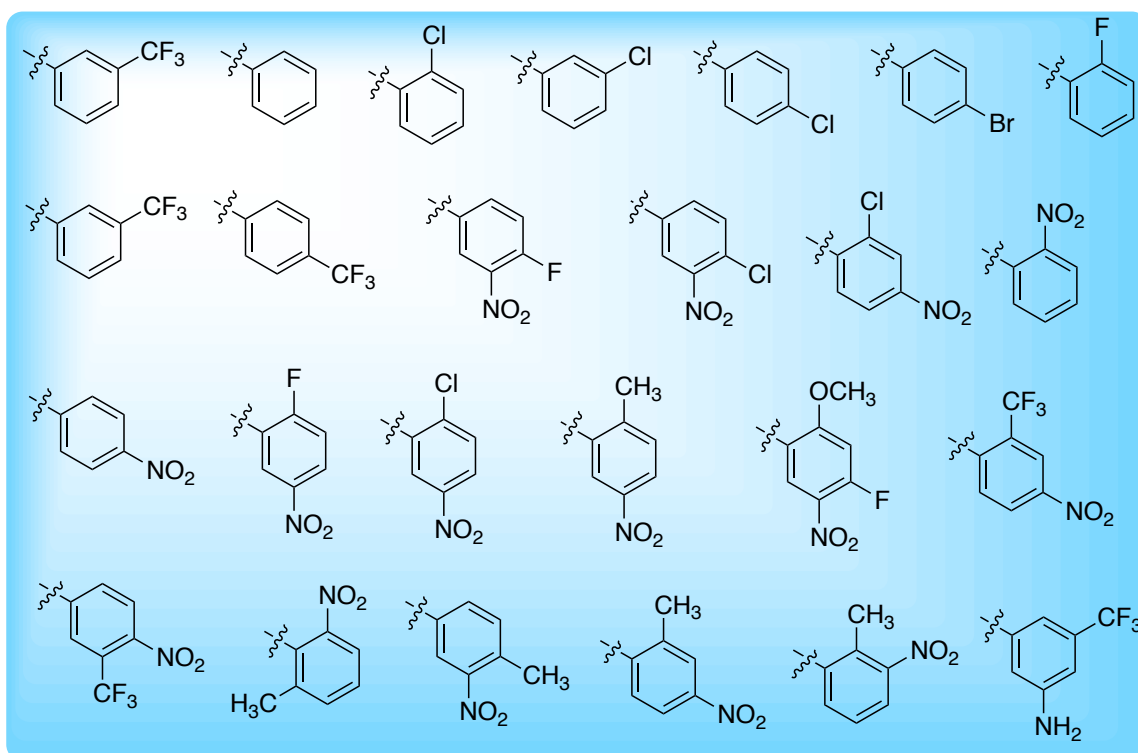
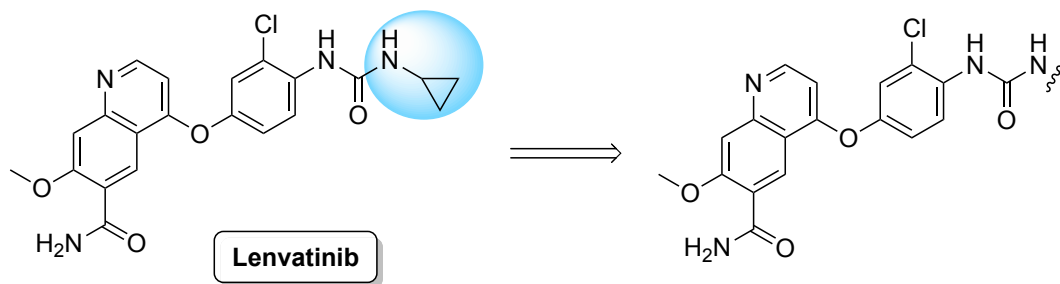
Στο εργαστήριο σχεδιάστηκαν δύο σειρές αναλόγων. Η πρώτη, *σειρά A*, αποτελείται από ανάλογα του Lenvatinib, τα οποία στοχεύουν στην DFG-in διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR2. Στη διαμόρφωση αυτή στοχεύει και ο αναστολέας Lenvatinib. Στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου Lenvatinib, πολύ σημαντική είναι η π αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα ανάμεσα στον δακτύλιο κυκλοπροπανίου του αναστολέα και τον αρωματικό φαινυλικό δακτύλιο του καταλοίπου φαινυλαλανίνης του βρόγχου της πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR2. Έχει αποδειχτεί πως στην αλληλεπίδραση αυτή οφείλεται η παράταση του χρόνου παραμονής του Lenvatinib εντός της κινάσης VEGFR2. Για το λόγο αυτό, στον σχεδιασμό των νέων αναλόγων του φαρμάκου που στοχεύουν στην DFG-in διαμόρφωση του VEGFR2, απαραίτητο κριτήριο ήταν η διατήρηση ή και η αύξηση τέτοιου τύπου π αλληλεπιδράσεων (*Σχήμα 1*).

Η δεύτερη σειρά αναλόγων που σχεδιάστηκε, *σειρά B*, περιλαμβάνει ενώσεις οι οποίες στοχεύουν στην DFG-out διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR2. Για το σχεδιασμό των αναλόγων αυτών, σημαντικό κριτήριο υπήρξε ο μεγάλος αριθμός των υδρόφιλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου αναστολέα-VEGFR2 (*Σχήμα 2*).

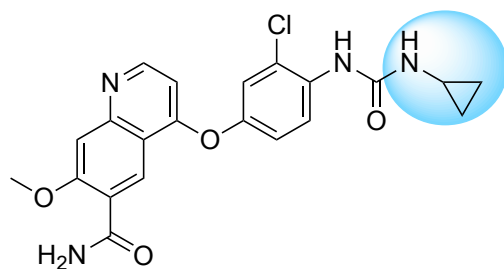
Παράλληλα, κατά τη σύνθεση του Lenvatinib και των αναλόγων του, διερευνήθηκε η βελτιστοποίηση της πειραματικής πορείας με σκοπό την ανάπτυξη μιας οικονομικότερης και αποδοτικότερης συνθετικής προσέγγισης.



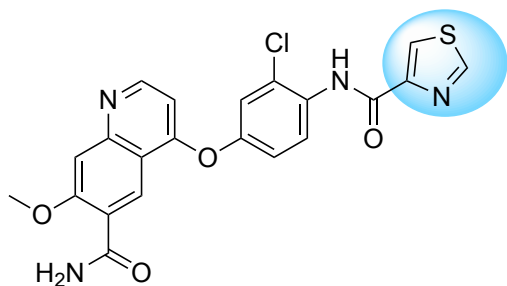
Σχήμα 1: Ανάλογα του Lenvatinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και στοχεύουν στην DFG-in διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR2 (Σειρά Α).



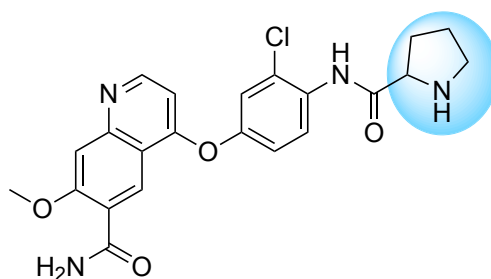
Σχήμα 2: Ανάλογα του Lenvatinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και στοχεύουν στην DFG-out διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR2 (Σειρά Β).



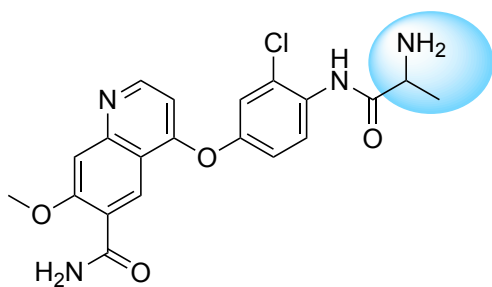
Lenvatinib



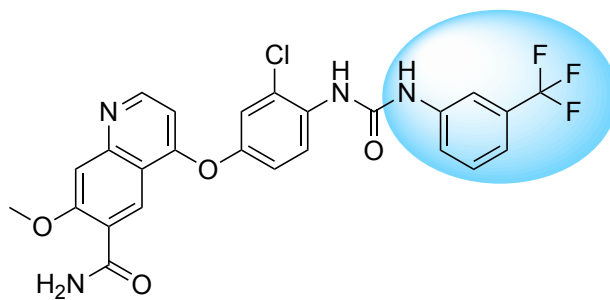
Lenv1



Lenv2



Lenv3



Lenv4

Σχήμα 3: Τελικές ενώσεις για τις οποίες έγινε προσπάθεια σύνθεσης κατά τη διάρκεια εκπόνησης του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Θεωρητικό μέρος

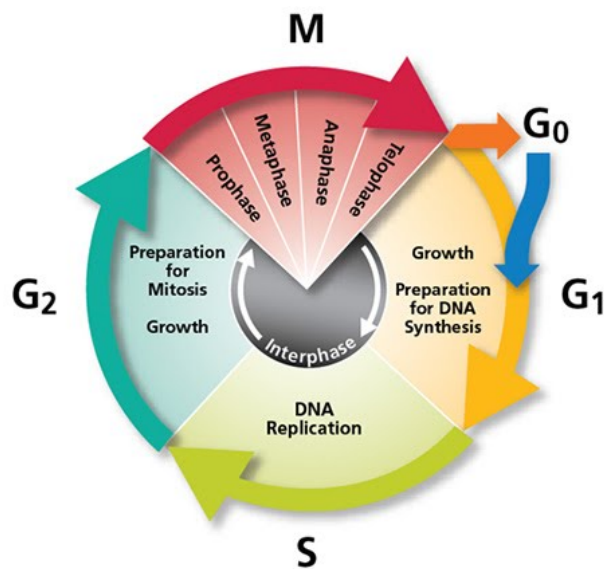
2.1 Κυτταρικός Κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος, ή κύκλος κυτταρικής διαίρεσης, είναι η σειρά γεγονότων που λαμβάνει χώρα σε ένα κύτταρο, οδηγώντας στο διπλασιασμό του DNA (αντιγραφή DNA) και, εν συνεχεία, στη διαίρεση του κυτταροπλάσματος και των οργανιδίων, ώστε να παραχθούν τελικά δύο θυγατρικά κύτταρα ^[15]. Στα ευκαριωτικά κύτταρα ο κυτταρικός κύκλος διαχωρίζεται σε δύο κύρες φάσεις, τη μεσόφαση και τη μίτωση. Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, το κύτταρο αναπτύσσεται, αποθηκεύοντας τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για τη μίτωση και υφίσταται διπλασιασμό του DNA του, ώστε να προετοιμαστεί για κυτταρική διαίρεση. Κατά τη διάρκεια της μιτωτικής φάσης, τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα και το κυτταρόπλασμα διαχωρίζονται σε δύο νέα θυγατρικά κύτταρα. Ο κυτταρικός κύκλος έχει αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, με τους οποίους εξασφαλίζεται η σωστή λειτουργία και διαίρεση του κυττάρου. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι γνωστοί ως σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints). Σε περίπτωση κάποιας βλάβης, ενεργοποιούνται μηχανισμοί επιδιόρθωσης και απόπτωσης, ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση ασθενειών.

Ο κύκλος διαίρεσης των κυττάρων είναι μια απαραίτητη διαδικασία, με την οποία ένα μονοκύτταρο γονιμοποιημένο ωάριο αναπτύσσεται σε έναν ώριμο οργανισμό. Επίσης, με τη διαδικασία αυτή, ανανεώνονται τα μαλλιά, το δέρμα, τα κύτταρα του αίματος, καθώς και κάποια εσωτερικά όργανα. Μετά την κυτταρική διαίρεση, κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα ξεκινά τη μεσόφαση ενός νέου κύκλου. Ο κυτταρικός κύκλος, στους ευκαριωτικούς οργανισμούς, περιλαμβάνει τέσσερις διακριτές φάσεις οι οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1), (Εικόνα 8).

Φάση Κυτταρικού Κύκλου	Περιγραφή
Gap 1 (G ₁)	Τα κύτταρα αυξάνονται σε μέγεθος και προετοιμάζονται για τη φάση S , όπου θα διπλασιαστεί το DNA
Synthesis (S)	Λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA
Gap 2 (G ₂)	Τα κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται και προετοιμάζονται για τη φάση M, όπου θα διαιρεθούν
Mitosis (M)	Τα κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται σε αυτό το στάδιο και αποθηκεύεται ενέργεια, ώστε το κάθε κύτταρο να διαιρεθεί σε δύο θυγατρικά

Πίνακας 1: Φάσεις του κυτταρικού κύκλου.

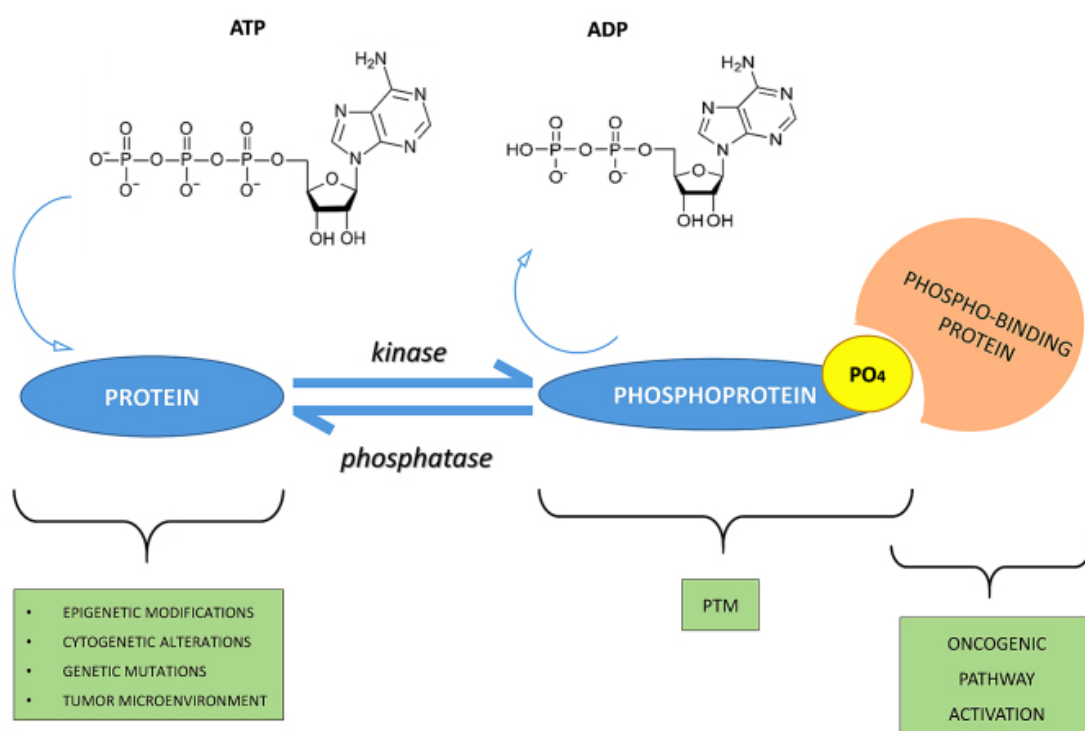


Εικόνα 8: Ο κυτταρικός κύκλος.

Κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου έχει ένα ξεχωριστό σύνολο εξειδικευμένων βιοχημικών διεργασιών που προετοιμάζουν το κύτταρο για την έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα διάφορα σημεία ελέγχου, βασίζεται στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών που επάγουν, αναστέλλουν ή ρυθμίζουν στάδια του κυτταρικού κύκλου ^[16]. Η απορρύθμιση της λειτουργίας των παραγόντων αυτών, έχει ως αποτέλεσμα τον μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εμφάνιση πολλών ασθενειών, όπως ο καρκίνος.

2.2 Φωσφορυλίωση Πρωτεϊνών

Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών είναι μία από τις πιο συνηθισμένες και σημαντικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Εικόνα 9) ^[17]. Κατά την αναστρέψιμη αυτή διεργασία, η οποία συμβαίνει μέσω πρωτεϊνικών κινασών, προστίθεται μία φωσφορική ομάδα, συγκεκριμένα η γ-φωσφορική ομάδα του ATP, στην πολική ομάδα διάφορων αμινοξέων. Κατά συνέπεια, αυτή η προσθήκη καθιστά την πρωτεΐνη από υδρόφοβη (άπολη) σε υδρόφιλη (πολική), επιτρέποντάς της να αλλάξει τη διαμόρφωσή της και να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια ^[18].



Εικόνα 9: Φωσφορυλίωση πρωτεϊνικών κινασών ^[19].

Περισσότερο από το ένα τρίτο των πρωτεϊνικών φωσφορυλίωσεων λαμβάνει χώρα στην υδροξυλομάδα μιας σερίνης (Ser ή S), θρεονίνης (Thr ή T) ή τυροσίνης (Tyr ή Y) της πρωτεΐνης-στόχου ^[20]. Μερικές φορές, συμβαίνει φωσφορυλίωση σε αμινομάδες καταλοίπων ιστιδίνης (His ή H) και ασπαρτικού (Asp ή D), αλλά και στις δύο περιπτώσεις, η φωσφορυλίωση αυτή είναι λιγότερο σταθερή από άλλες.

Η πρωτεϊνική φωσφορυλίωση είναι ένας εξαιρετικά σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης, ο οποίος λαμβάνει χώρα στις περισσότερες κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η σύνθεση πρωτεϊνών, η κυτταρική διαίρεση, η μεταγωγή σήματος, η ανάπτυξη και η γήρανση

των κυττάρων, καθώς πολλά ένζυμα και υποδοχείς ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης με την επίδραση κινασών και φωσφατάσεων [21].

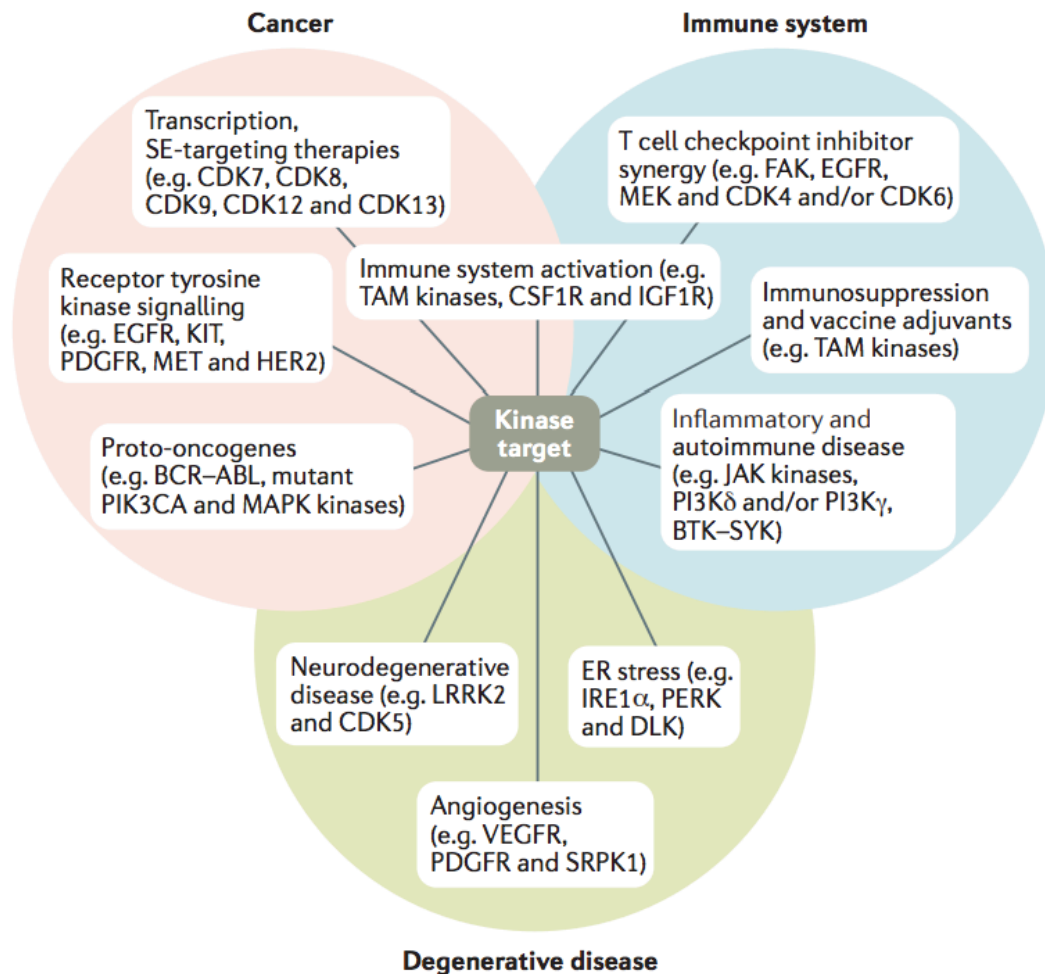
2.3 Πρωτεϊνικές Κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ευκαρυωτικά ένζυμα, τα οποία διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο σε πολλές διεργασίες του κυττάρου, όπως είναι η μεταγραφή των γονιδίων, η ρύθμιση και η κατάλυση του μεταβολισμού της γλυκόζης, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η απόπτωση των κυττάρων. Ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση και ενεργοποιούν, με τη σειρά τους, έναν καταρράκτη βιοχημικών διεργασιών που οδηγούν στη φωσφορυλίωση διαφορετικών αμινοξέων.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των κινασών και είναι υπεύθυνες για τον μηχανισμό της φωσφορυλίωσης. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει 568 πρωτεϊνικές κινάσες και 156 πρωτεϊνικές φωσφατάσες που ρυθμίζουν τη φωσφορυλίωση, επομένως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο βιολογικών διεργασιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση των κυττάρων. Αν και τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν, περίπου, μόλις το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος [22], έχει αποδειχτεί πως περισσότερο από τα δύο τρίτα των 21.000 πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα υφίστανται φωσφορυλίωση και τροποποιούνται με τη δράση των πρωτεϊνικών κινασών. Δεδομένου, λοιπόν, ότι ρυθμίζουν την πλειονότητα των κυτταρικών οδών, ειδικά εκείνων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος, μια ανισορροπία στον μηχανισμό φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε πλήθος ασθενειών, καθώς και στην ανάπτυξη καρκίνου (Εικόνα 10) [23].

Η κυτταρική σηματοδότηση είναι ο τρόπος επικοινωνίας των κυττάρων. Σε αυτήν εμπλέκονται πολλά εξωκυτταρικά μόρια, όσον αφορά τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Τα κύτταρα λαμβάνουν τις εξωκυτταρικές εντολές και εκτελούν τις κατάλληλες διεργασίες, ώστε να αποκριθούν στο ερέθισμα. Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται, η καθεμία με το δικό της ρόλο, σε διεργασίες κυτταρικής σηματοδότησης, με στόχο την εξασφάλιση της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της σωστής ρύθμισης της

μεταγραφής γονιδίων, του μεταβολισμού της γλυκόζης, της αγγειογένεσης, του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων.

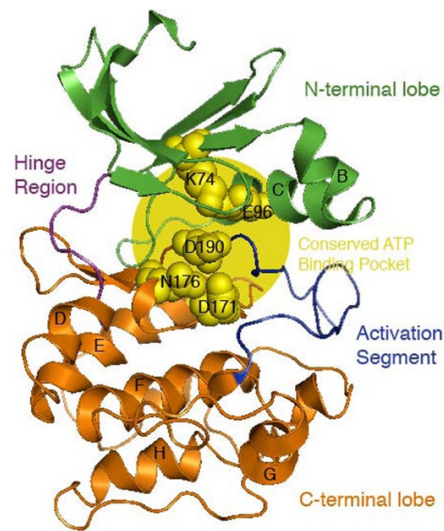


Εικόνα 10: Βιοχημικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται οι πρωτεϊνικές κινάσες και ασθένειες οι οποίες σχετίζονται με την απορρυθμισμένη λειτουργία τους ^[24].

2.3.1 Δομή Πρωτεϊνικών Κινασών

Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούνται από 300, περίπου, κατάλοιπα αμινοξέων ^[25]. Η αρχική ανάλυση της αλληλουχίας των κινασών αποκάλυψε την ύπαρξη έντεκα διατηρημένων υπο-ομάδων, οι οποίες αναφέρονται με λατινικούς αριθμούς I-XI. Σύμφωνα με κρυσταλλογραφικές μελέτες, η δομή των πρωτεϊνικών κινασών συνίσταται από δυο δομικά ανόμοιους λοβούς, τον N-λοβό και τον C-λοβό. Μεταξύ τους, οι δύο αυτοί λοβοί συνδέονται μέσω μιας μικρής πολυπεπτιδικής αλυσίδας, που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης ή hinge περιοχή. Η θέση δέσμευσης του ATP, καθώς και η καταλυτική περιοχή, βρίσκονται

στη διεπιφάνεια των δυο αυτών λοβών. Οι I-V υποομάδες αποτελούν τον N-τερματικό λοβό της κινάσης, ενώ οι υποομάδες V-XI τον C-τερματικό λοβό [26].



Εικόνα 11: Δομή των πρωτεϊνικών κινασών [27].

Ο N-τερματικός λοβός απαρτίζεται από περίπου 90 αμινοξέα, δομημένα σε β-πτυχωτά φύλλα και σε μία τουλάχιστον έλικα, η οποία ονομάζεται C-έλικα [28]. Ο C-τερματικός λοβός αποτελείται κυρίως από α-έλικες και περιέχει το βρόγχο ενεργοποίησης, καθώς και καταλυτικά κατάλοιπα. Στον N-τερματικό λοβό βρίσκεται η θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου που αναγνωρίζει και δεσμεύει το ATP. Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες χρησιμοποιούν το ATP ως πηγή φωσφορικών, επομένως πολλά από τα κατάλοιπα της περιοχής δέσμευσης είναι διατηρημένα.

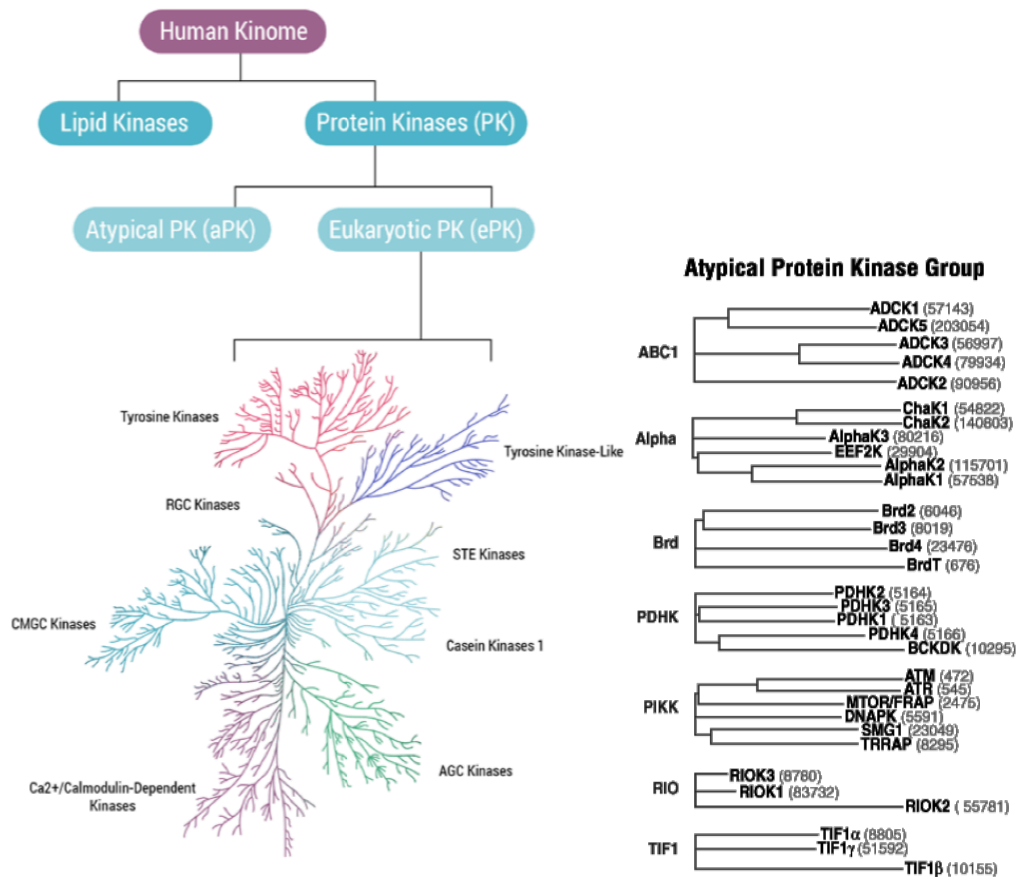
Η διεπιφάνεια των δύο λοβών αποτελείται από ένα πλήθος καταλοίπων που σχηματίζουν τη θηλιά πρόσδεσης του ATP και το καταλυτικό κέντρο [29]. Στον N-τερματικό λοβό βρίσκεται ο βρόχος P (P-loop), ο οποίος είναι απαραίτητος για την πρόσδεση του ATP. Στο κέντρο της καταλυτικής περιοχής βρίσκεται ένα διατηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού, το οποίο θεωρείται ότι είναι σημαντικό για την καταλυτική δράση του ενζύμου. Επίσης, στις ενεργές διαμορφώσεις της πρωτεϊνικής κινάσης, η C-έλικα του N-τερματικού λοβού σχηματίζει μια γέφυρα άλατος με ένα αμετάβλητο κατάλοιπο λυσίνης εντός του N-τερματικού λοβού, επιτρέποντας τη βέλτιστη τοποθέτηση των φωσφορικών ομάδων του ATP. Σε ανενεργές διαμορφώσεις μεταβάλλεται η δομή της έλικας C, με αποτέλεσμα να απουσιάζει η γέφυρα άλατος.

2.3.2 Ταξινόμηση Πρωτεϊνικών Κινασών

Το 2002, ο ερευνητής Gerard Manning και οι συνεργάτες του χαρτογράφησαν, για πρώτη φορά στην ιστορία, ολόκληρο τον ανθρώπινο κίνομα ^[30]. Η έρευνά τους αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα προς την κατανόηση των ασθενειών και την ανάπτυξη θεραπειών που μπορούν να στοχεύσουν μεταλλαγμένες ή μη ρυθμισμένες πρωτεϊνικές και λιπιδικές κινάσες. Το ανθρώπινο κίνομα (kinome) περιέχει 518 πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες αποτελούν το 1.7% του ανθρώπινου γονιδιώματος και, περίπου, 20 λιπιδικές κινάσες ^[31]. Στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών ανήκουν εκατοντάδες μέλη, των οποίων οι ακολουθίες είναι γνωστές. Υπάρχουν πολλές διαφορές στις δομές και στον τρόπο ρύθμισης μεταξύ των πρωτεϊνικών κινασών, ωστόσο υπάρχουν και κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Οι πρωτεϊνικές κινάσες, ανάλογα με τις διεργασίες που πραγματοποιούν στο κύτταρο, κατατάσσονται σε οικογένειες. Κάθε οικογένεια υποδιαιρείται σε κατηγορίες και υποκατηγορίες ^[32].

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνικών κινασών σε δύο μεγάλες ομάδες, περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Hanks και Hunter ^[33]. Την πρώτη ομάδα αποτελούν οι 478 τυπικές ή ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) και τη δεύτερη οι 40 άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs). Οι τυπικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) διαιρούνται σε οκτώ επιπλέον μεγάλες υποοικογένειες (*Εικόνα 12*). Οι άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs) περιέχουν πρωτεΐνες με βιοχημική δραστηριότητα κινάσης, η αλληλουχία των οποίων διαφέρει από αυτή των ePKs.

Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης των πρωτεϊνικών κινασών έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με το υπόστρωμα προς φωσφορυλίωση ^[36]. Οι δύο κύριες κατηγορίες, σύμφωνα με αυτόν τον τρόπο, είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (TKs), οι οποίες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα τυροσίνης και οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STKs), οι οποίες φωσφορυλιώνουν, αντίστοιχα, κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης. Αυτές οι δύο κατηγορίες υποδιαιρούνται σε μικρότερες, σύμφωνα με τη δράση των πρωτεϊνικών κινασών και τη τρισδιάστατη δομή του ενεργού τους κέντρου. Έχουν και οι δύο έναν κοινό καταλυτικό πυρήνα, ο οποίος περιέχει έναν πλούσιο σε γλυκίνη N-τερματικό θύλακα δέσμησης ATP και ένα κεντρικό διατηρημένο υπόλειμμα ασπαρτικού οξέος που απαιτείται για την καταλυτική του δράση.



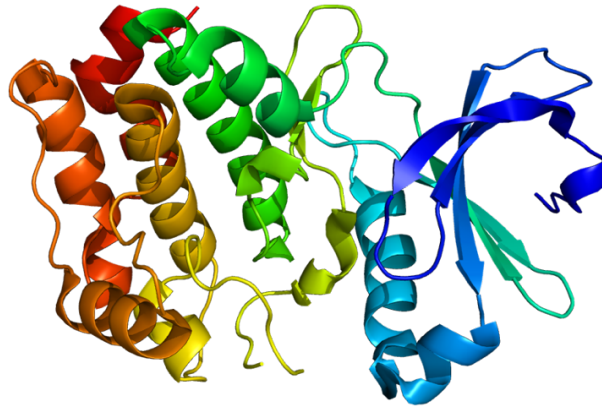
Εικόνα 12: Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών κατά Hanks και Hunter [34], [35].

2.3.2.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης (STKs)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STKs) είναι μία από τις πιο μεγάλες κατηγορίες πρωτεϊνικών κινασών. Τουλάχιστον 125 από τις 518 ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία (Εικόνα 13). Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STKs) είναι ευκαρυωτικά ένζυμα με δράση κινάσης, που φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα ενός κατάλοιπου σερίνης ή θρεονίνης [37]. Τα δύο αυτά αμινοξέα έχουν παρόμοιες πλευρικές αλυσίδες, συνεπώς δε γίνεται διάκριση μεταξύ τους.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Λόγω του εξαιρετικά συντηρημένου καταλυτικού κέντρου κι επειδή τα υπολείμματα της αλληλουχίας ενός υποστρώματος-στόχου φτάνουν σε επαφή με μερικά, μόνο, βασικά αμινοξέα μέσα στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης (συνήθως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και ιοντικών δεσμών), οι κινάσες

δεν είναι εκλεκτικές σε ένα μόνο υπόστρωμα, αλλά αντίθετα φωσφορυλιώνουν μία οικογένεια υποστρωμάτων που μοιράζονται κοινές ακολουθίες αναγνώρισης.



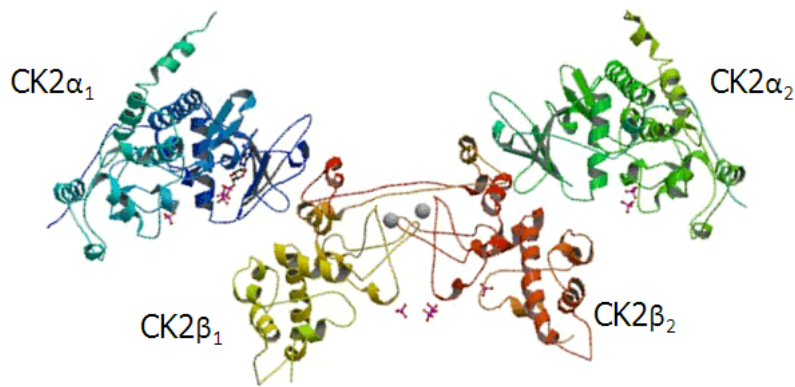
Εικόνα 13: Κρυσταλλογραφική δομή μιας πρωτεϊνικής κινάσης σερίνης/θρεονίνης [38].

Αν και η καταλυτική περιοχή αυτών των κινάσεων είναι εξαιρετικά διατηρημένη, η παραλλαγή αλληλουχίας που παρατηρείται στο υποσύνολο γονιδίων του γονιδιώματος που κωδικοποιεί τις κινάσεις, παρέχει διάκριση μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων [39]. Οι περισσότερες κινάσεις αναστέλλονται από ένα ψευδο-υπόστρωμα, το οποίο δεσμεύεται 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. Υπάρχουν τύποι καρκίνου οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με την απορρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνικών κινάσεων σερίνης/θρεονίνης [40].

Οι πρωτεϊνικές κινάσεις σερίνης/θρεονίνης περιλαμβάνουν υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσεις σερίνης/θρεονίνης, καθώς και ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά πεπτιδία και πρωτεΐνες. Στα παρακάτω κεφάλαια αναφέρονται τύποι πρωτεϊνικών κινάσεων σερίνης/θρεονίνης που λειτουργούν ως ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια.

2.3.2.1.1 Πρωτεϊνική Κινάση Καζεΐνης II (CK2/CSNK2)

Η πρωτεϊνική κινάση καζεΐνης II (CK2/CSNK2) είναι μια εκλεκτική πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που εμπλέκεται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, την επιδιόρθωση του DNA και άλλων κυτταρικών διεργασιών. Η απορρύθμιση της CK2 έχει συσχετιστεί με την καρκινογένεση, ως πιθανός μηχανισμός προστασίας των μεταλλαγμένων κυττάρων [41]. Η σωστή λειτουργία της CK2 είναι απαραίτητη για την επιβίωση των κυττάρων. Το ένζυμο αυτό αποτελείται από δύο άλφα και δύο βήτα υπομονάδες (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Κρυσταλλογραφική δομή της CK2 ^[42].

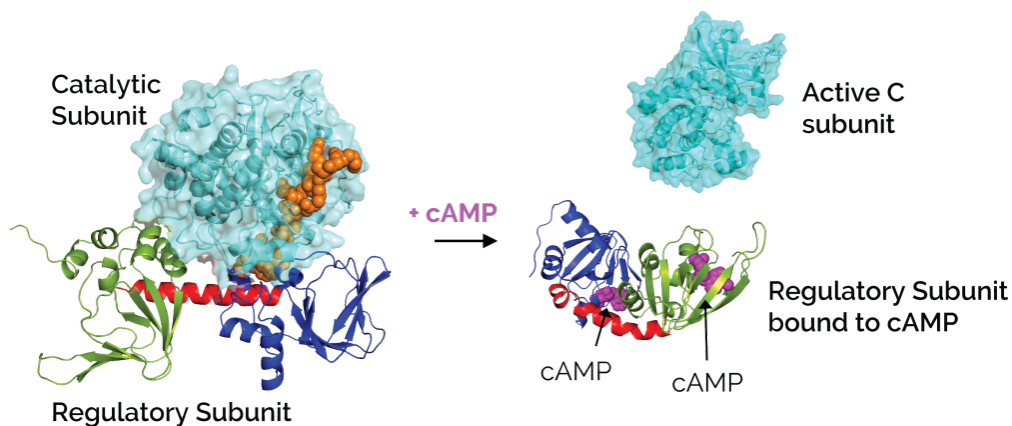
Η CK2 είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων σε διάφορες βιοχημικές οδούς του κυττάρου. Ως πηγή φωσφορικών χρησιμοποιεί ATP ή GTP. Η CK2 εμπλέκεται στην κυτταρική ανάπτυξη, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων ^[43]. Επιπρόσθετα, συμμετέχει σε οδούς επιδιόρθωσης DNA και σε πολλαπλές οδούς σηματοδότησης σημάτων, όπως είναι η φωσφορυλίωση της p53 ή της MAPK.

2.3.2.1.2 Πρωτεϊνική Κινάση A (PKA)

Η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) είναι μια οικογένεια ενζύμων των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται από τα κυτταρικά επίπεδα κυκλικού AMP (cAMP). Η PKA είναι επίσης γνωστή ως εξαρτώμενη από cAMP πρωτεϊνική κινάση ^[44], που εμπλέκεται σε πολλές διεργασίες του κυττάρου, όπως είναι η ρύθμιση του γλυκογόνου και του σακχάρου, καθώς και ο μεταβολισμός των λιπιδίων.

Το ολοενζύμο PKA είναι ένα τετραμερές, αν και σχηματίζονται δομές υψηλότερης τάξης σε κύτταρα όπου το PKA στοχεύει σε συγκεκριμένα συστατικά ^[45]. Αποτελείται από δύο περιοχές, μία μικρή που δομείται κυρίως από β-φύλλα και μία μεγαλύτερη που δομείται κυρίως από α-ελίκες. Η κλασική δομή του ολοενζύμου PKA αποτελείται από δύο ρυθμιστικές υπομονάδες και δύο καταλυτικές υπομονάδες. Η καταλυτική υπομονάδα περιέχει το ενεργό κέντρο, μια σειρά από κατάλοιπα στα οποία δεσμεύεται και υδρολύεται το ATP και μια περιοχή που δεσμεύει την ρυθμιστική υπομονάδα. Η ρυθμιστική υπομονάδα διαθέτει περιοχές, οι οποίες δεσμεύονται με το κυκλικό AMP, μία περιοχή που αλληλεπιδρά με την καταλυτική υπομονάδα και μία περιοχή αυτο-αναστολής ^[46].

Η PKA ενεργοποιείται μέσω απελευθέρωσης των καταλυτικών υπομονάδων όταν αυξάνονται τα επίπεδα του αγγελιοφόρου cAMP, ως απόκριση σε μια ποικιλία σημάτων. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του cAMP είναι ικανές να προκαλέσουν διαχωρισμό των ολοενζύμων και απελευθέρωση των καταλυτικών υπομονάδων (Εικόνα 15). Οι θέσεις πρόσδεσης για το υπόστρωμα και το ATP εντοπίζονται στην καταλυτική σχισμή μεταξύ των περιοχών (ή λοβών). Όταν συνδέεται το ATP ή το υπόστρωμα στην PKA, οι δύο λοβοί περιστρέφονται έτσι ώστε η τελική φωσφορική ομάδα του ATP και το αμινοξύ-στόχος του υποστρώματος να κινούνται στις σωστές θέσεις, ώστε να λάβει χώρα η καταλυτική αντίδραση.



Εικόνα 15: Ανενεργή (αριστερά) κι ενεργή (δεξιά) διαμόρφωση της CK2 ^[47].

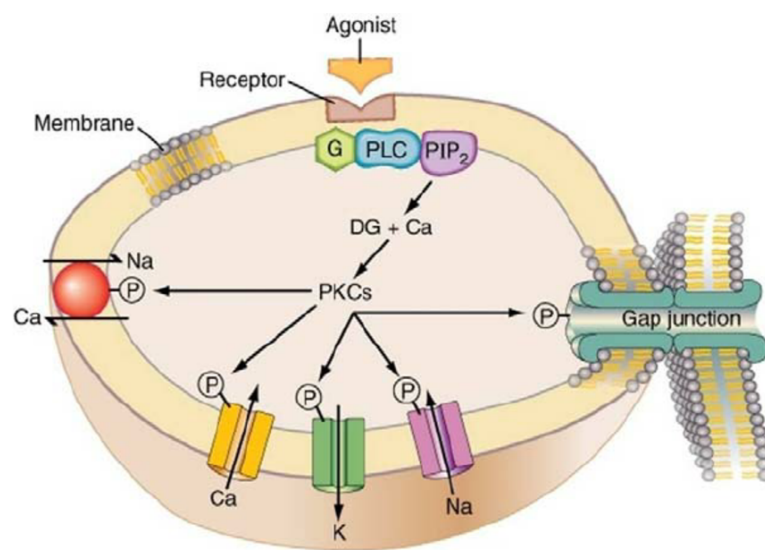
Οι εξωκυτταρικές ορμόνες, όπως η γλυκαγόνη και η επινεφρίνη, ξεκινούν έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη σηματοδότησης, ο οποίος πυροδοτεί την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A, εφόσον πρώτα συνδεθεί σε έναν υποδοχέα συζευγμένο με πρωτεΐνη G (GPCR) στο κύτταρο-στόχο.

2.3.2.1.3 Πρωτεϊνική Κινάση C (PKC)

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) είναι μια οικογένεια ενζύμων πρωτεϊνικής κινάσης και, συγκεκριμένα, φωσφοτρανφερασών που εμπλέκονται στον έλεγχο της λειτουργίας άλλων πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης υδροξυλομάδων καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης των υποστρωμάτων ^[48]. Τα ένζυμα PKC ενεργοποιούνται από σήματα όπως είναι η αύξηση της συγκέντρωσης διακυλογλυκερόλης (DAG) ή των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}). Ως εκ τούτου, τα ένζυμα PKC διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση,

η ογκογένεση, η απόπτωση και η διαμόρφωση των διαύλων ιόντων. Οι πρωτεϊνικές κινάσες C βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αν και συναντώνται και στον κυτταρικό πυρήνα.

Η οικογένεια PKC αποτελείται από δεκαπέντε ισοένζυμα στον άνθρωπο. Διακρίνονται σε τρεις υπο-οικογένειες, τις συμβατικές (ή κλασικές), τις νέες και τις άτυπες [49]. Οι συμβατικές (c)PKCs περιέχουν τις ισομορφές α , β_1 , β_{II} και γ . Αυτές απαιτούν Ca^{2+} , DAG και ένα φωσfolιπίδιο όπως μια φωσφατιδυλοσερίνη για ενεργοποίηση. Οι νέες (n)PKCs περιλαμβάνουν τις δ , ϵ , η και θ ισομορφές και απαιτούν DAG, αλλά δεν απαιτούν Ca^{2+} για ενεργοποίηση. Από την άλλη πλευρά, οι άτυπες (α)PKCs δεν απαιτούν ούτε Ca^{2+} ούτε διακυλογλυκερόλη για ενεργοποίηση.



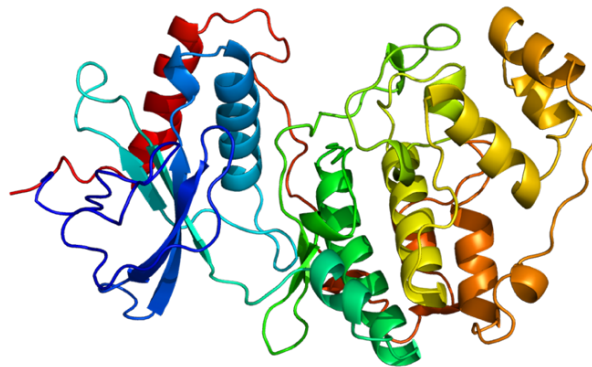
Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης της PKC στο κύτταρο [50].

Η δομή όλων των PKCs αποτελείται από μία ρυθμιστική περιοχή και μια καταλυτική περιοχή συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω μιας περιοχής άρθρωσης (hinge region). Η καταλυτική περιοχή είναι εξαιρετικά διατηρημένη μεταξύ των διαφόρων ισομορφών. Η πρωτεϊνική κινάση C εμπλέκεται στην ανάπτυξη ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, τα καρδιακά νοσήματα και η νόσος του Alzheimer.

2.3.2.1.4 Ενεργοποιημένες από Μιτογόνο Πρωτεϊνικές Κινάσες (MAPKs)

Οι ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK ή MAP κινάσες) είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Εικόνα 17), οι οποίες εμπλέκονται σε πλήθος κυτταρικών αποκρίσεων που ενεργοποιούνται από μια ποικιλία ερεθισμάτων, όπως τα μιτογόνα, το οσμωτικό στρες, το θερμικό σοκ και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες [51].

Ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η γονιδιακή έκφραση, η διαφοροποίηση, η μίτωση, η κυτταρική επιβίωση και η απόπτωση, για την αντιμετώπιση των μεταβαλλόμενων συνθηκών στο κύτταρο. Οι MAP κινάσες είναι καταλυτικά ανενεργές στη βασική τους δομή. Για την ενεργοποίησή τους, απαιτούνται πολλαπλές φωσφορυλιώσεις στο βρόγχο ενεργοποίησής τους. Τα σήματα που ενεργοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς και πρωτεΐνες σχετιζόμενες με αυτούς, καθώς και τα σήματα που απενεργοποιούν τις φωσφατάσες περιορίζοντας τις MAP κινάσες, επηρεάζουν τη δραστηριότητα των MAP κινασών.



Εικόνα 17: Κρυσταλλογραφική δομή της MAPK1 [52].

Οι περισσότερες MAP κινάσες έχουν κοινά χαρακτηριστικά, καθώς η ενεργοποίηση εξαρτάται από δύο φωσφορυλιώσεις, ένα σηματοδοτικό μονοπάτι τριών σταδίων και παρόμοιες θέσεις αναγνώρισης του υποστρώματος. Αυτές ονομάζονται «κλασικές» MAP κινάσες. Ωστόσο, υπάρχουν και κάποιες περιπτώσεις MAP κινασών που δεν έχουν διπλή θέση φωσφορυλίωσης, αποτελούμενες από δύο σηματοδοτικά μονοπάτια, οι οποίες στερούνται τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται από άλλες MAP κινάσες για τη δέσμευση του υποστρώματος. Αυτές αναφέρονται ως «άτυπες» MAP κινάσες [53].

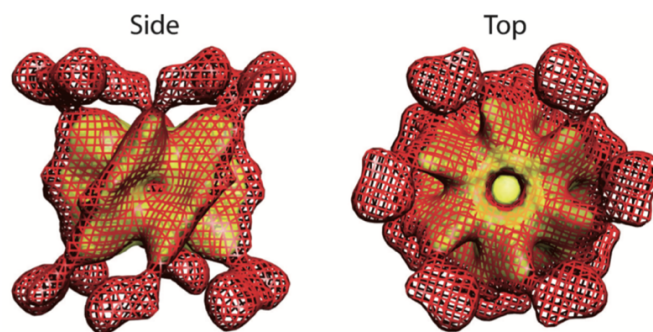
Η πρώτη MAP που ανακαλύφθηκε ήταν η ERK κινάση, η οποία συνήθως ενεργοποιείται από μιτογονικά σήματα. Το σηματοδοτικό μονοπάτι ERK εμπλέκεται στο φυσιολογικό και παθολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι JNK κινάσες, που ανήκουν επίσης στην κατηγορία των MAPKs, εμπλέκονται στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη σε παχύσαρκα άτομα [54]. Πολύ γνωστή είναι και η p38 κινάση, η οποία εντάσσεται στην κατηγορία των MAPKs. Οι Raf και Mos κινάσες σερίνης/θρεονίνης ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες και εμπλέκονται στο μονοπάτι που ενεργοποιείται από τις MAPKs. Τα ένζυμα αυτά ενεργοποιούν την κυτταρική ανάπτυξη. Η αναστολή της Raf έχει γίνει ο

στόχος για νέα φάρμακα κατά του μεταστατικού καρκίνου. Τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τον καταρράκτη MAPK, μειώνοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

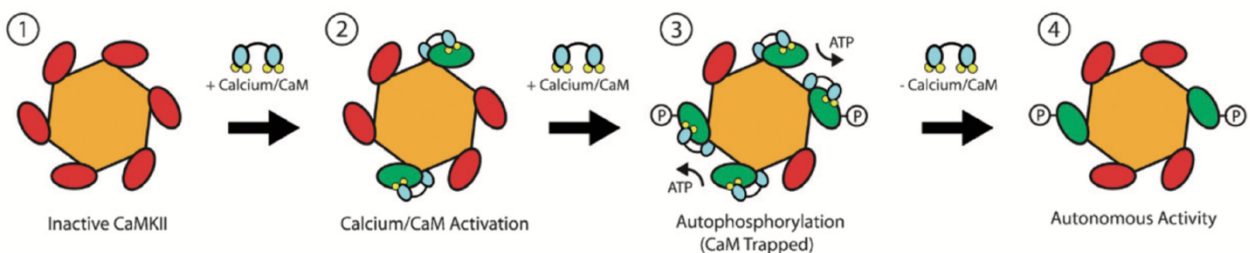
2.3.2.1.5 Πρωτεϊνικές Κινάσες Εξαρτώμενες από το Σύμπλοκο Ca^{2+} / Καλμοδουλίνη (CAMK)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από καλμοδουλίνη/ Ca^{2+} είναι ένζυμα τα οποία ενεργοποιούνται από αυξήσεις της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) και της καλμοδουλίνης μέσα στο κύτταρο (Εικόνα 18) [55]. Μόλις ενεργοποιηθούν, μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες, μέσω του ATP, σε κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης πρωτεϊνών. Επομένως, είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης [56]. Οι ενεργοποιημένες CAMKs εμπλέκονται στη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων και, συνεπώς, στη ρύθμιση της έκφρασης των αποκρινόμενων γονιδίων. Οι CAMKs λειτουργούν, επίσης, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

A.



B.

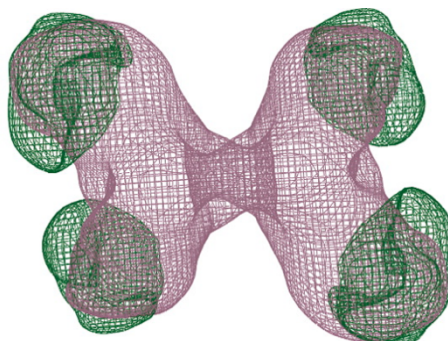


Εικόνα 18: Δομή και ρύθμιση του CaMKII. **(A)** Πλευρική και άνω όψη του ολοενζύμου CaMKII. **(B)** Διάγραμμα που απεικονίζει την αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στην ενεργοποίηση και την αυτοφωσφορυλίωση του CaMKII. **1)** Το CaMKII βρίσκεται αρχικά σε ανενεργή κατάσταση. **2)** Καθώς αυξάνονται τα επίπεδα Ca^{2+} , το CaM καθίσταται κορεσμένο με το ιόν, το οποίο δεσμεύεται σε μεμονωμένες υπομονάδες του ολοενζύμου, προκαλώντας έτσι εξαρτώμενη από Ca^{2+} /CaM δραστικότητα. **3)** Συμβαίνει αυτοφωσφορυλίωση στο κατάλοιπο Thr286, πράγμα που οδηγεί σε

παγίδευση του CaM. 4) Όταν το σύμπλοκο Ca^{2+}/CaM διαχωρίζεται από το CaMKII, οι υπομονάδες που φωσφορυλιώνονται στο κατάλοιπο Thr286 παραμένουν αυτόνομα δραστικές πέρα από τη διάρκεια του σήματος Ca^{2+} που προκάλεσε την ενεργοποίησή του [55].

2.3.2.1.6 Κινάση της Φωσφορυλάσης (PhK)

Η κινάση φωσφορυλάσης (PhK) είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση γλυκογόνου για απελευθέρωση της 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο [57]. Η PhK φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση γλυκογόνου σε δύο κατάλοιπα σερίνης, προκαλώντας μια αλλαγή στη διαμόρφωση, η οποία ευνοεί την πιο δραστική μορφή φωσφορυλάσης γλυκογόνου "a" έναντι της λιγότερο δραστικής φωσφορυλάσης γλυκογόνου "b". Το ολοένζυμο είναι ένα ομοτετραμερές στο οποίο κάθε υπομονάδα είναι το ίδιο τετραμερές διατεταγμένο σε ένα κατά προσέγγιση σχήμα "πεταλούδας" (συνολικά 16 υπομονάδες) (Εικόνα 19). Καθεμία από τις υπομονάδες αποτελείται από μια α , β , γ και δ υπομονάδα. Στη γ υπομονάδα βρίσκεται η θέση της καταλυτικής δραστικότητας του ενζύμου, ενώ οι άλλες τρεις υπομονάδες εξυπηρετούν ρυθμιστικές λειτουργίες.



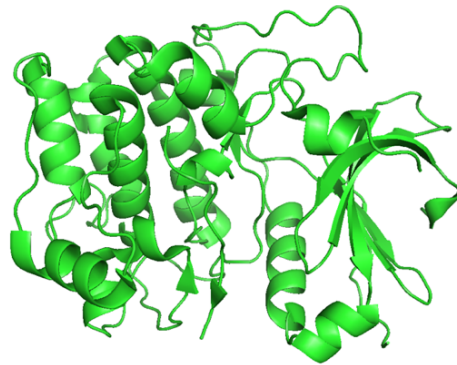
Εικόνα 19: Σχήμα της PhK [58].

Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν PhKs μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της ενζυμικής τους δραστικότητας, προκαλώντας ασθένειες που επηρεάζουν την φυσιολογική ανάπτυξη παιδιών και τη φυσιολογική λειτουργία του ήπατος [59].

2.3.2.1.7 Πρωτεϊνική Κινάση B (Akt)

Η πρωτεϊνική κινάση B (PKB), επίσης γνωστή ως Akt, είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που διαδραματίζει βασικό ρόλο σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες,

όπως είναι ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η μεταγραφή (Εικόνα 20) ^[60].

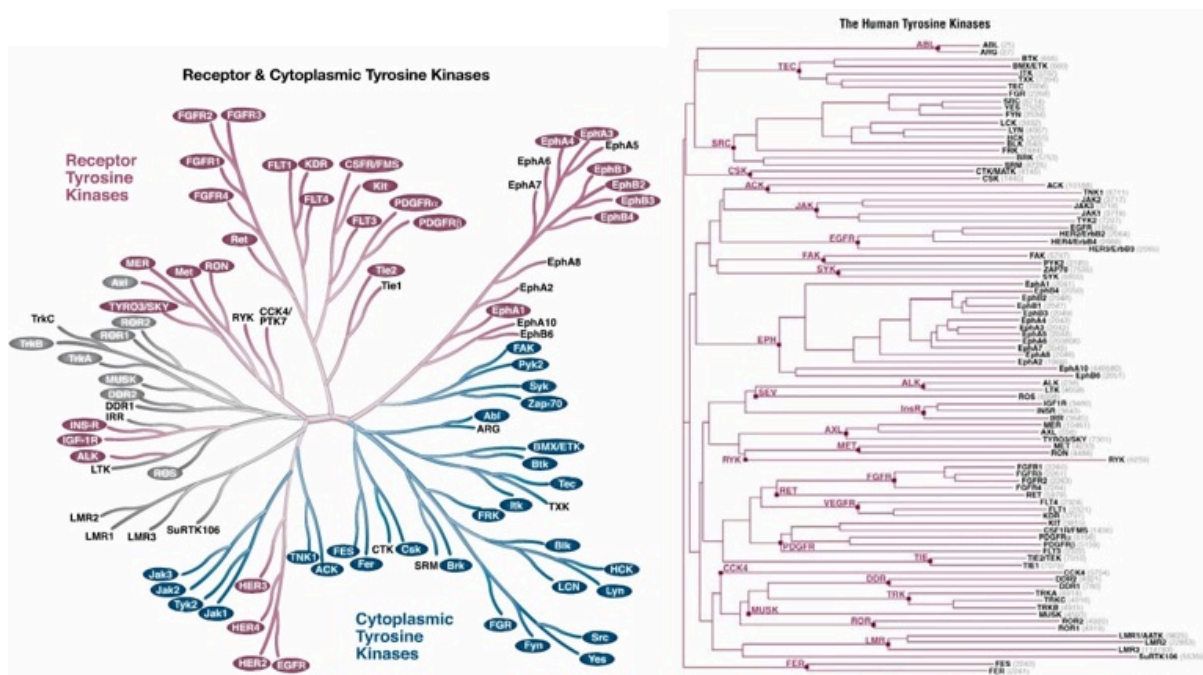


Εικόνα 20: Κρυσταλλογραφική δομή της PKB ^[61].

Το ένζυμο Akt1 εμπλέκεται στις οδούς κυτταρικής επιβίωσης, παρεμποδίζοντας τις αποπτωτικές διεργασίες. Είναι ικανό να επάγει οδούς σύνθεσης πρωτεϊνών και ως εκ τούτου αποτελεί πρωτεΐνη-κλειδί στη σηματοδότηση κυτταρικών οδών που οδηγούν σε υπερτροφία των σκελετικών μυών και γενική ανάπτυξη ιστού. Δεδομένου ότι μπορεί να εμποδίσει την απόπτωση και, επομένως, να προωθήσει την επιβίωση των κυττάρων, η Akt1 συνδέεται με πολλούς τύπους καρκίνου. Το ένζυμο Akt2 είναι ένα σημαντικό μόριο στην οδό σηματοδότησης της ινσουλίνης. Οι ισόμορφες Akt υπερεκφράζονται σε μια ποικιλία ανθρώπινων όγκων.

2.3.2.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες Τυροσίνης (TKs)

Οι τυροσινικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία λαμβάνουν χώρα σε πολλά βιοχημικά μονοπάτια του ανθρώπινου οργανισμού, οδηγώντας στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, το μεταβολισμό και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ^[62]. Συγκεκριμένα, οι τυροσινικές κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, χρησιμοποιώντας το ATP. Με τον τρόπο αυτόν επιτυγχάνεται η επικοινωνία των κυττάρων και η διατήρηση της ομοιόστασης. Υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνικών κινάσων, οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο ^[63]. Οι τυροσινικές κινάσες (TKs) ήταν οι πρώτες πρωτεϊνικές κινάσες που ανακαλύφθηκαν και έχουν μελετηθεί αναλυτικά.

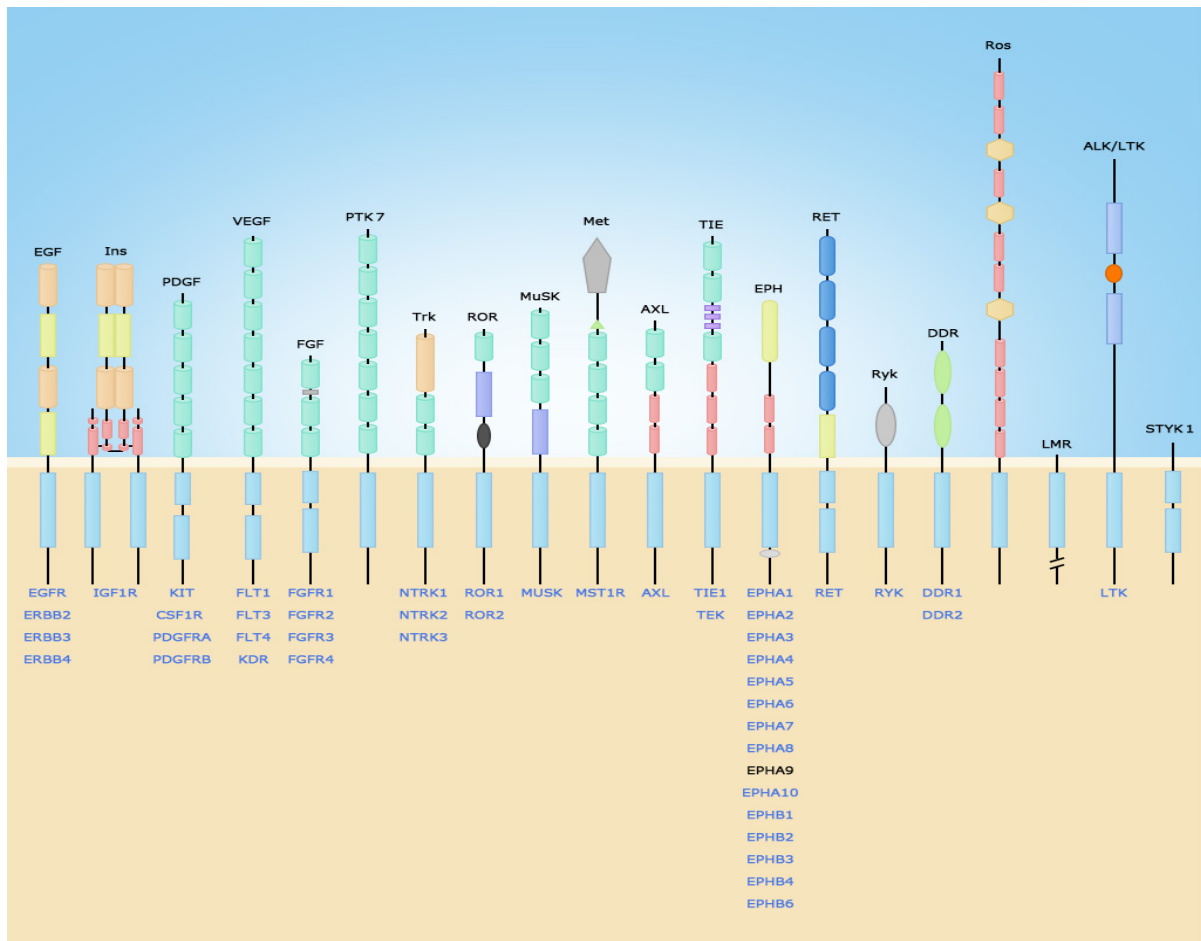


Εικόνα 21: **Αριστερά:** Δενδρόγραμμα τυροσινικών κινασών. **Δεξιά:** Ιστόγραμμα που παρουσιάζει τις γενετικές και μορφολογικές ομοιότητες ανάμεσα στα ένζυμα της οικογένειας των ενζύμων των τυροσινικών κινασών [64].

Στον άνθρωπο υπάρχουν περίπου 90 τυροσινικές κινάσες, οι οποίες ταξινομούνται σε υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) και σε μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (hRTKs) (Εικόνα 21). Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στην διαμεμβρανική σηματοδότηση, ενώ οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στη σηματοδότηση προς τον πυρήνα.

2.3.2.2.1 Υποδοχικές Τυροσινικές Κινάσες (RTKs)

Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες, όχι μόνο αποτελούν βασικούς ρυθμιστές των φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, αλλά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην πρόοδο πολλών τύπων καρκίνου [65]. Μεταλλάξεις σε αυτές τις κινάσες οδηγούν στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη σηματοδότησης, ο οποίος έχει πολυάριθμες επιδράσεις στην έκφραση πρωτεϊνών [66]. Βάσει της ομόλογης αλληλουχίας και της δομής των εξωκυττάρων περιοχών τους, οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης υποδιαιρούνται σε 20 υπο-οικογένειες (Εικόνα 22).

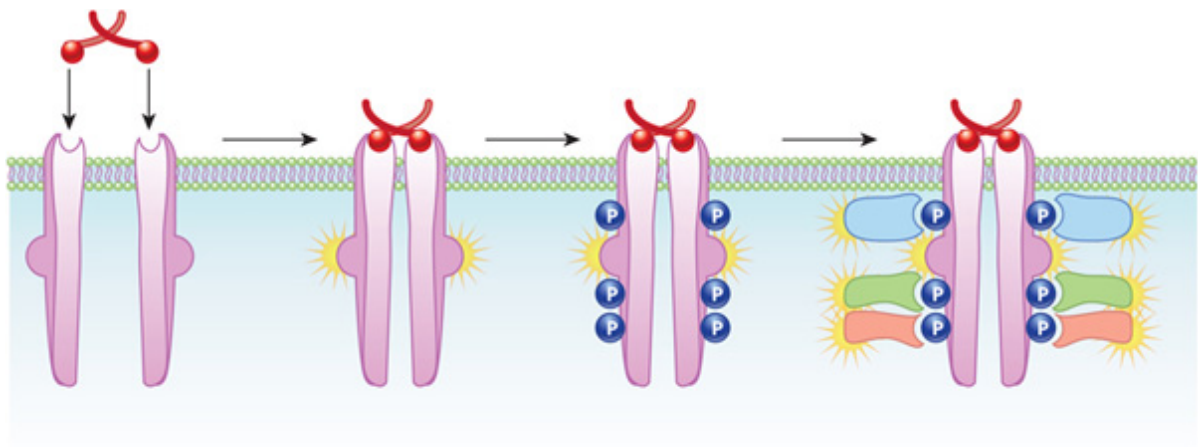


Εικόνα 22: Οικογένειες και μέλη των υποδοχικών τυροσινικών κινασών [67].

Δομικά, οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) αποτελούνται από ένα εξωκυτταρικό τμήμα, στο οποίο δεσμεύονται προσδέτες ξεκινώντας τη σηματοδότηση [68]. Αποτελούνται, επίσης, από μια διαμεμβρανική έλικα και μια ενδοκυτταρική καταλυτική περιοχή, ικανή να δεσμεύει και να φωσφορυλιώνει τα επιλεγμένα υποστρώματα. Το εξωκυττάριο τμήμα μπορεί να αποτελεί ανεξάρτητο τμήμα, το οποίο συνδέεται με τον υπόλοιπο υποδοχέα με δισουλφιδικό δεσμό.

Οι υποκαταστάτες είναι εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια, τα οποία συνδέονται στην εξωκυτταρική περιοχή υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών, με αποτέλεσμα να τις ενεργοποιούν, μέσω επαγωγής του διμερισμού του υποδοχέα (εκτός από τους υποδοχείς της ινσουλίνης) [69]. Με τον ολιγομερισμό του υποδοχέα αυξάνεται η τοπική συγκέντρωση των RTKs. Η αύξηση αυτή οδηγεί σε φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης στο βρόχο ενεργοποίησης της καταλυτικής περιοχής. Η πρόσδεση του υποκαταστάτη στην εξωκυτταρική περιοχή προκαλεί μια σειρά από δομικές μεταβολές στις RTKs, οι οποίες οδηγούν στην ενζυματική ενεργοποίησή τους. Στη συνέχεια, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

προσδένονται στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης των ενδοκυττάρων περιοχών και ενεργοποιούνται, καθώς μετακίνηση ορισμένων τμημάτων της περιοχής της κινάσης επιτρέπει την ελεύθερη πρόσβαση στην τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και στο υπόστρωμα, ώστε να εισέλθουν στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 23). Με αυτόν τον τρόπο, πυροδοτείται η βιολογική απόκριση του κυττάρου ενεργοποιώντας μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων. Μέσω της απόκρισης μπορεί να επιτευχθεί η μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων και να επηρεαστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, ο μεταβολισμός και η κυτταρική διαίρεση. Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες αποφωσφορυλιώνουν τη διαμεμβρανική πρωτεϊνική κινάση, διακόπτοντας τη σηματοδότηση.



Εικόνα 23: Ενεργοποίηση υποδοχικών τυροσικών κινασών [70].

Οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται οι RTKs, περιλαμβάνουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Συνεπώς, με την απορρυθμισμένη λειτουργία των υποδοχέων προκύπτει η έναρξη και η εξέλιξη πολλών ειδών καρκίνου.

2.3.2.2.1.1 Υποδοχείς Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGFR)

Οι υποδοχείς VEGFR είναι υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) [71]. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι VEGFR, οι VEGFR1/2/3. Η οικογένεια ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) ανήκει στους παράγοντες αγγειογενετικής ανάπτυξης και περιλαμβάνει τις εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE, καθώς και τους πλακουντιακούς αυξητικούς παράγοντες (Placental Growth Factor, PlGF) PlGF1 και PlGF2 (Πίνακας 2) [72].

Τύποι VEGF	Υποδοχείς	Λειτουργίες
VEGF (VEGFA)	VEGFR1, VEGFR2, neuropilin1	Αγγειογένεση Αγγειακή συντήρηση
VEGFB	VEGFR1	Δεν έχει καθιερωθεί
VEGFC	VEGFR2, VEGFR3	Λεμφαγγειογένεση
VEGFD	VEGFR2, VEGFR3	Λεμφαγγειογένεση
VEGFE	VEGFR2	Αγγειογένεση
PlGF	VEGFR1, neuropilin-1	Αγγειογένεση, Φλεγμονή

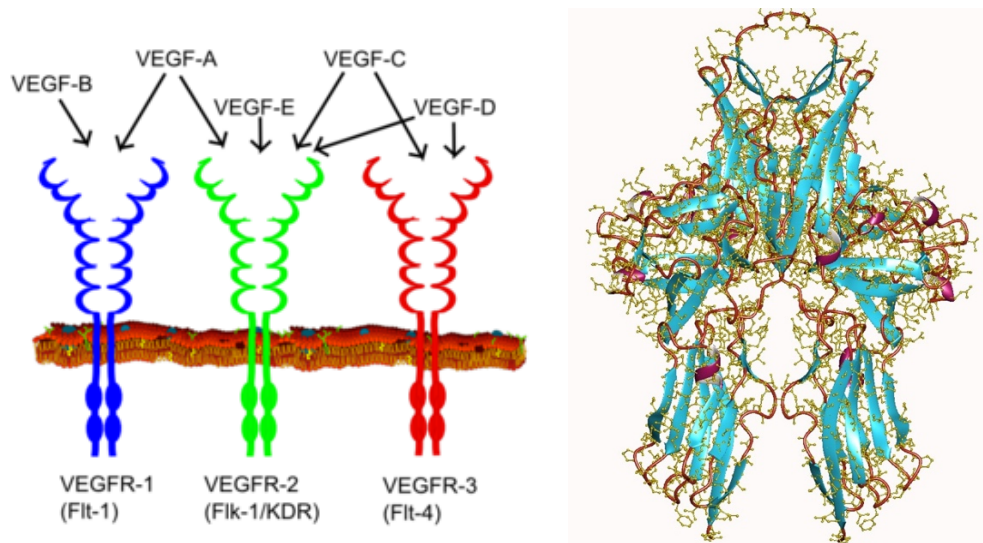
Πίνακας 2: Μέλη, υποδοχείς και λειτουργίες της οικογένειας VEGF.

Συγκεκριμένα, τα μέλη της οικογένειας VEGF ελέγχουν:

- Τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του μονοπατιού των MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase).
- Την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων.
- Την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία επιφέρει αλλαγές στον κυτταροσκελετό των κυττάρων, ώστε να είναι εφικτή η μετανάστευσή τους για τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων.
- Τη διείσδυση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω της επαγωγής μεταλλοπρωτεασών, κολλαγενασών και ενεργοποιητών του πλασμινογόνου. Τα λυτικά αυτά ένζυμα διασπούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (Extracellular matrix-ECM). Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τη διείσδυση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ώστε να δημιουργηθούν νέα αιμοφόρα αγγεία.

Ο VEGFA χαρακτηρίστηκε, αρχικά, ως παράγοντας επαγωγής της αγγειακής διαπερατότητας. Η αυξημένη έκφρασή του επάγεται στα καρκινικά κύτταρα. Είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας ρύθμισης της ανάπτυξης του αγγειακού συστήματος και, συνήθως, υπερεκφράζεται στους ανθρώπινους όγκους^[73]. Οι παράγοντες VEGF δρουν μέσω ειδικής δέσμευσης σε τρεις διαφορετικούς υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης, τους VEGFR1 (Flt1) και VEGFR2 (Flk/KDR), που αναγνωρίστηκαν αρχικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά εκφράστηκαν, επίσης, σε διάφορες κυτταρικές σειρές στους ενήλικες, και τους VEGFR3 (Flt4).

Αυτοί οι υποδοχείς αποτελούνται από ένα εξωκυτταρικό τμήμα, το οποίο δεσμεύει ειδικούς υποκαταστάτες VEGF, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα που περιέχει μια περιοχή τυροσινικής κινάσης (Εικόνα 24) [74]. Το εξωκυτταρικό τμήμα αποτελείται από ένα N-τελικό άκρο και από μια περιοχή παρόμοια με τη δομή ανοσοσφαιρίνης. Το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα αποτελείται από ένα C-τελικό άκρο και από την περιοχή τυροσινικής κινάσης, η οποία διαιρείται σε περιοχές εγγύς και απομακρυσμένης κινάσης.

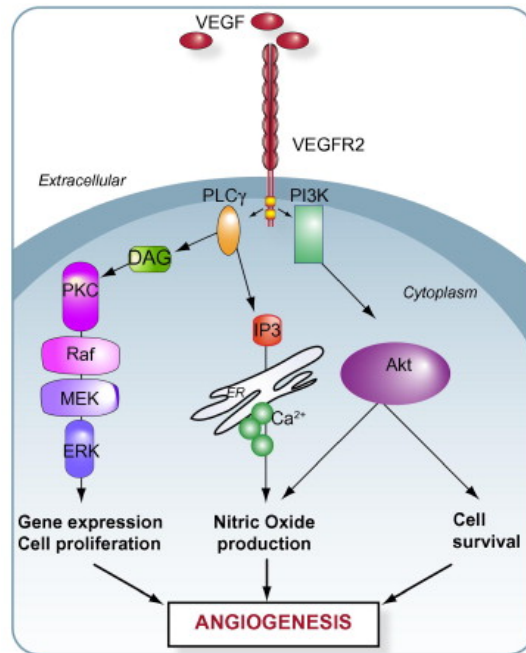


Εικόνα 24: Αριστερά: Οι VEGF και οι υποδοχείς τους VEGFR. Δεξιά: Δομή του VEGFR1 [75].

Όλα τα μέλη της οικογένειας VEGF ενεργοποιούν κυτταρικές αποκρίσεις μέσω της δέσμευσής τους στους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (VEGFR) στην κυτταρική επιφάνεια, προκαλώντας τον διμερισμό τους και, συνεπώς, την ενεργοποίησή τους μέσω της φωσφορυλίωσης.

Η αλληλεπίδραση του VEGF με τον VEGFR επάγει την ενεργοποίηση της περιοχής της τυροσινικής κινάσης του VEGFR, η οποία τελικά οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών οδών που εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιβίωσης. Ο VEGFR1 είναι ένας ισχυρός ρυθμιστής της φυσιολογικής αγγειογένεσης και θεωρείται ότι είναι σημαντικός για τη μετανάστευση και διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων [76]. Πρόσφατα, αποδείχτηκε πως η ενεργοποίηση του VEGFR1, από προσδέτες της οικογένειας VEGF, μπορεί να ενεργοποιήσει διαδικασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Ο VEGFR2 μεσολαβεί στην πλειονότητα των επιδράσεων του VEGFA, συμπεριλαμβανομένης της αγγειακής διαπερατότητας, του πολλαπλασιασμού, της εισβολής, της μετανάστευσης και της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο VEGFR3

εμπλέκεται στην λεμφαγγειογένεση και η έκφρασή του έχει συνδεθεί με τη εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων στους περιφερειακούς λεμφαδένες. Ο καθιερωμένος ρόλος του VEGF στην προαγωγή της αγγειογένεσης του όγκου και η παθογένεση των ανθρώπινων καρκίνων οδήγησε στον ορθολογικό σχεδιασμό και ανάπτυξη παραγόντων που στοχεύουν επιλεκτικά σε αυτή την οδό (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Μονοπάτια που σηματοδοτούνται από την πρόσδεση του VEGF στον VEGFR [77].

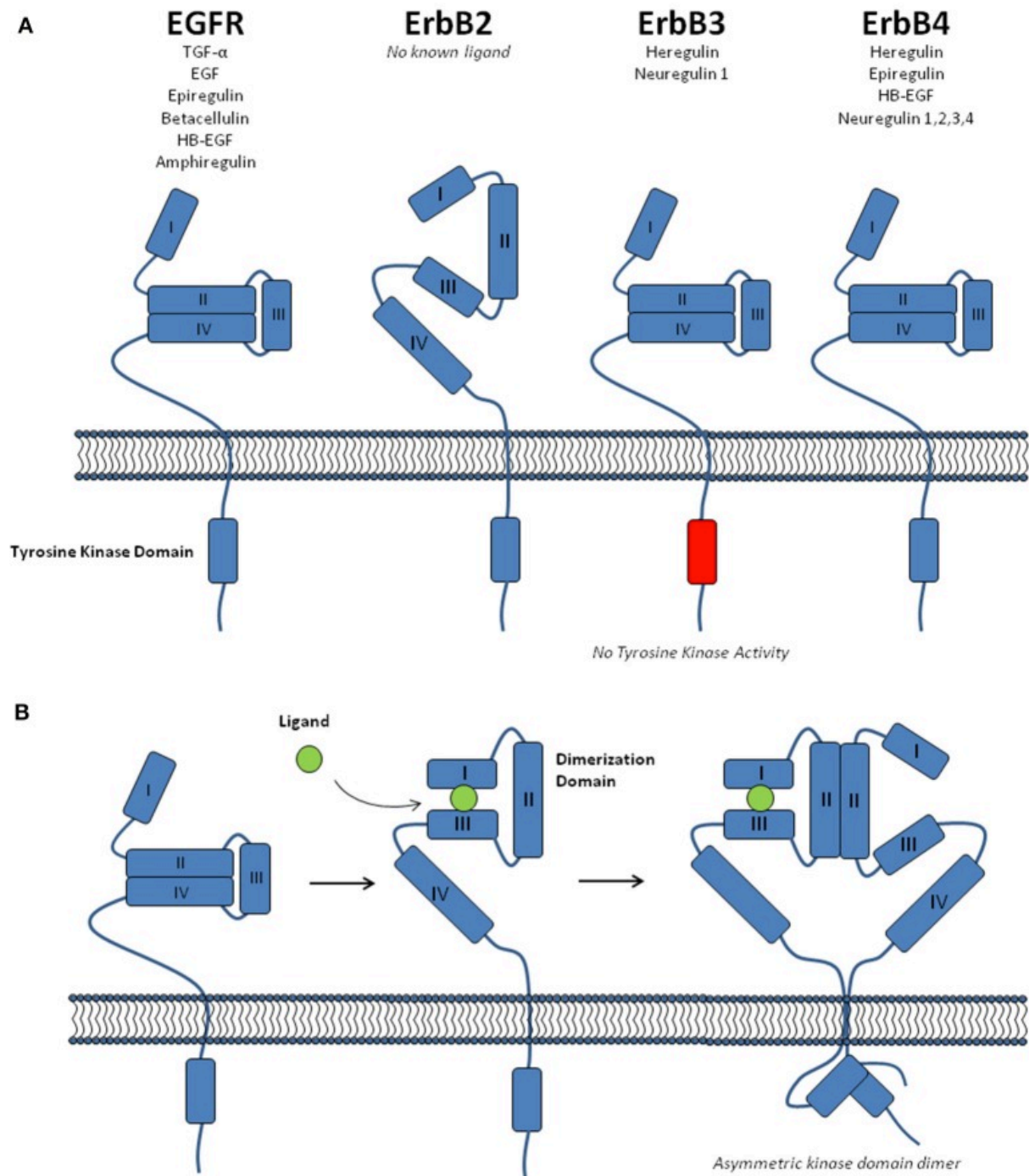
Υπάρχουν πολλές δραστικές ουσίες οι οποίες στοχεύουν στη λειτουργία των VEGF και άλλες που στοχεύουν στους VEGFR, οδηγώντας σε αποκλεισμό της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης.

2.3.2.2.1.2 Υποδοχείς Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR)

Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, ErbB1, HER1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που είναι υποδοχέας για μέλη της οικογένειας των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (οικογένεια EGF), εξωκυτταρικών πρωτεϊνικών υποκαταστατών.

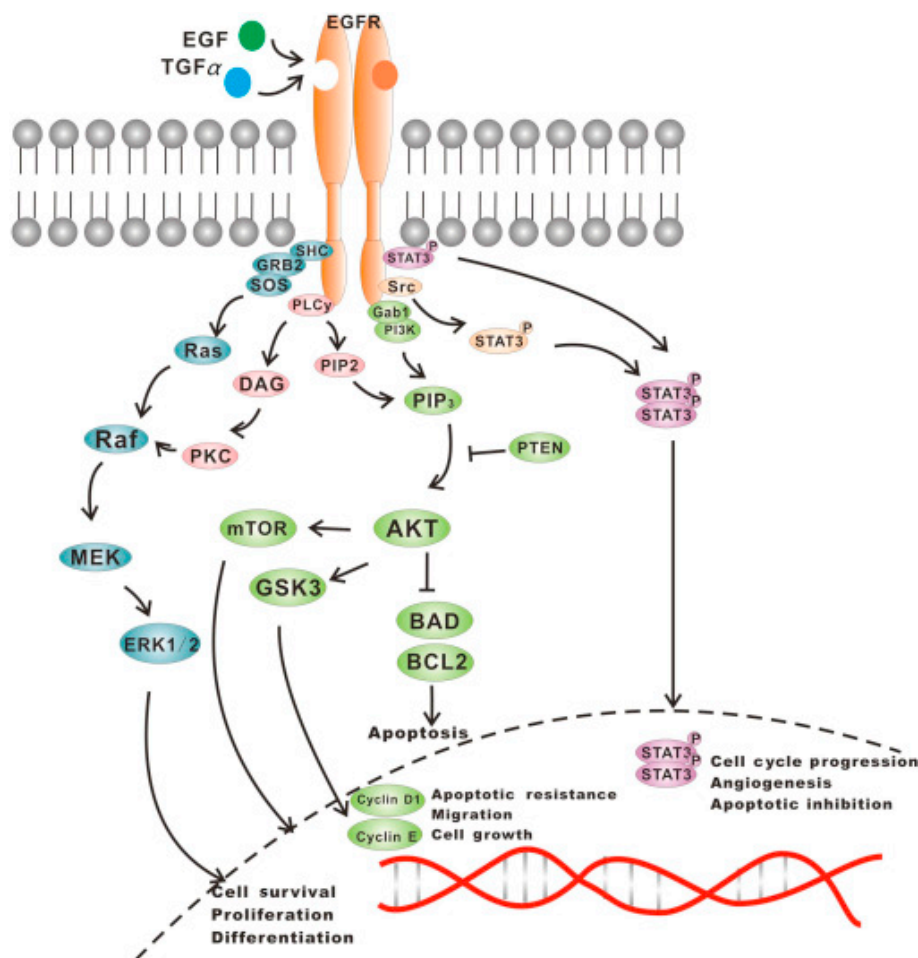
Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων ErbB, μια υπο-οικογένεια τεσσάρων στενά συγγενών υποδοχικών κινάσεων τυροσίνης: EGFR (ErbB1), HER2/neu (ErbB2), Her3 (ErbB3) και Her4 (ErbB4) (Εικόνα 26) [78]. Η ανεπαρκής σηματοδότηση του EGFR και άλλων υποδοχικών κινάσεων τυροσίνης συνδέεται με ασθένειες όπως η νόσος του Alzheimer, ενώ η υπερέκφραση σχετίζεται με την ανάπτυξη όγκων [79]. Η διακοπή της σηματοδότησης του EGFR, είτε με αποκλεισμό των θέσεων

πρόσδεσης του EGFR στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα είτε με την αναστολή της ενδοκυτταρικής δραστηριότητας κινάσης τυροσίνης, μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη όγκων και να βελτιώσει την κατάσταση του ασθενούς.



Μόλις προσδεθεί ο EGF στον EGFR, λαμβάνει χώρα ο διμερισμός του EGFR, με αποτέλεσμα να διεγείρεται η ενδογενή ενδοκυτταρική δραστηριότητα της τυροσινικής

κινάσης. Ως αποτέλεσμα, λαμβάνει χώρα αυτοφωσφορυλίωση αρκετών υπολειμμάτων τυροσίνης στην C-τερματική περιοχή του EGFR [81]. Η αυτοφωσφορυλίωση αυτή, προκαλεί την ενεργοποίηση και τη σηματοδότηση από άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με τις φωσφορυλιωμένες τυροσίνες μέσω των δικών τους τομέων που δεσμεύουν φωσφοτυροσίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες σηματοδότησης ενεργοποιούν αρκετούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος, όπως είναι τα μονοπάτια MAPK, Akt και JNK, οδηγώντας σε σύνθεση DNA και σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 27) [82]. Τέτοιες πρωτεΐνες ρυθμίζουν λειτουργίες, όπως η κυτταρική μετανάστευση, η προσκόλληση και ο πολλαπλασιασμός.



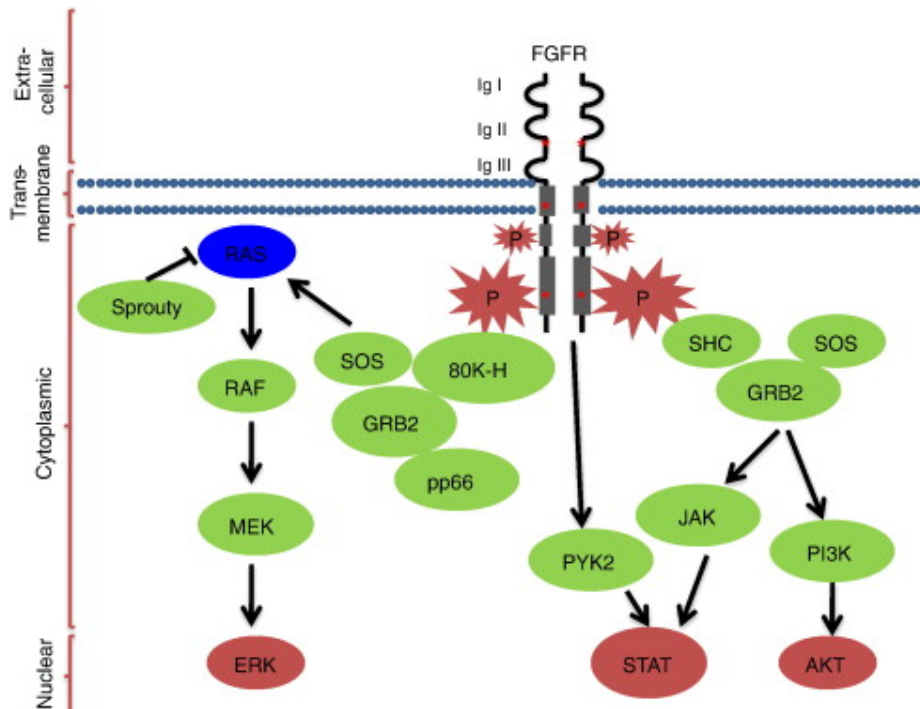
Εικόνα 27: Καταρράκτης μονοπατιών που σηματοδοτούνται μέσω της ενεργοποίησης των EGFR [83].

2.3.2.2.1.3 Υποδοχείς Ινοβλαστικού Αυξητικού Παράγοντα (FGFR)

Οι ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες (FGFs) αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων που βρίσκονται στον ανθρώπινο, και όχι μόνο, οργανισμό. Στους ανθρώπους, η μοριακή μάζα των 22 μελών της οικογενείας FGF κυμαίνεται από 17 έως 34 kDa και μοιράζονται την ίδια αλληλουχία αμινοξέων σε ποσοστό 13 με 71%

[84]. Οι FGF είναι εξαιρετικά διατηρημένοι τόσο στη δομή του γονιδίου, όσο και στην αλληλουχία των αμινοξέων. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, οι FGF έχουν διαφορετικούς ρόλους στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης των κυττάρων.

Στους ενήλικες, οι FGF συνδέονται στους υποδοχείς του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGFR), λειτουργώντας ως ομοιοστατικοί παράγοντες, καθώς εκκρίνονται σε περίπτωση τραυματισμού, ώστε να γίνει η αναδόμηση των ιστών. Οι υποδοχείς του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (FGFRs) ανήκουν στη κατηγορία των υποδοχικών τυροσινικών κινασών. Αποτελούνται από μία εξωκυτταρική περιοχή, αποτελούμενη από τρεις περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες, μία περιοχή διαμεμβρανικής έλικας και μία ενδοκυτταρική περιοχή με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων αυτών πραγματοποιείται με την πρόσδεση των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων στην εξωκυττάρια περιοχή τους (Εικόνα 28). Έρευνες έχουν δείξει πως εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές δραστηριότητες, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η αγγειογένεση. Όταν δεν εκφράζονται σωστά, ορισμένοι FGFRs μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη καρκίνου [85].

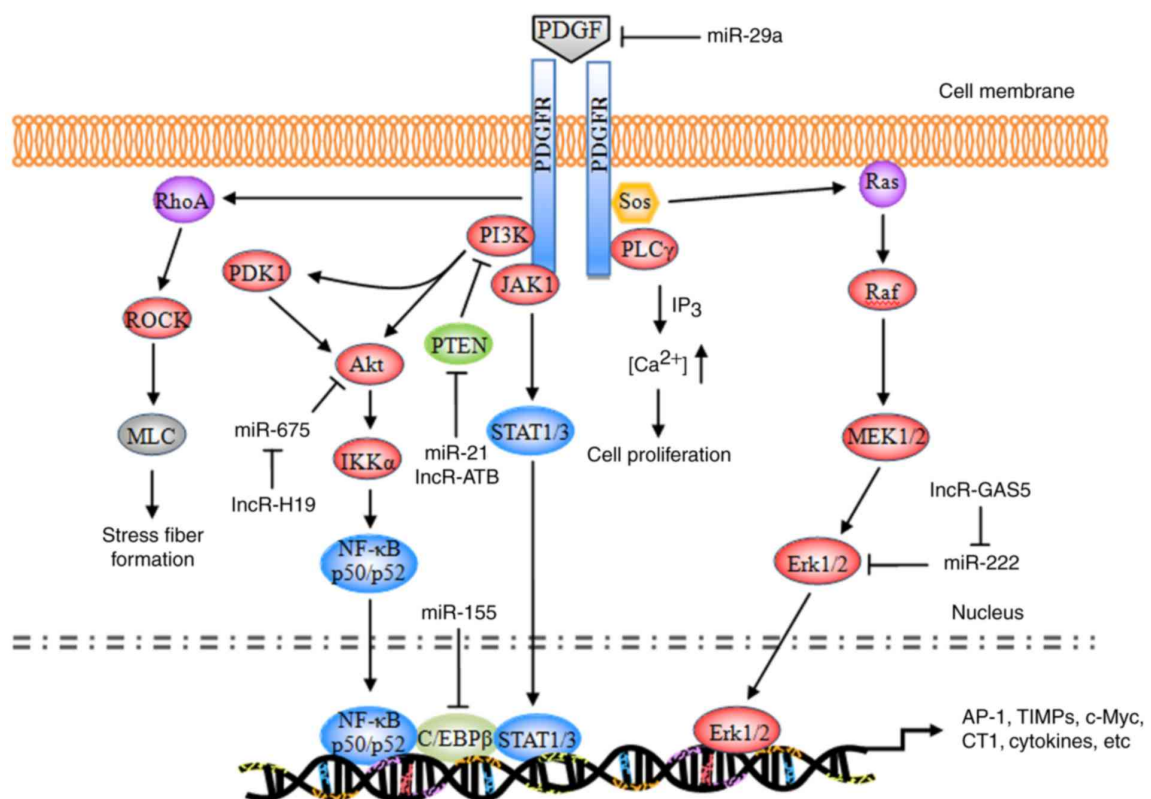


Εικόνα 28: Μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μέσω της ενεργοποίησης των FGFR

[86].

2.3.2.2.1.4 Υποδοχέας Αιμοπεταλιακού Αυξητικού Παράγοντα (PDGFR)

Ο υποδοχέας αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (Platelet Derived Growth Factor Receptor, PDGFR), είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχικών τυροσινικών κινασών και συναντάται στην επιφάνεια πολλών τύπων κυττάρων. Υπάρχουν δύο μορφές του PDGFR, ο PDGFRA και ο PDGFRB, οι οποίοι κωδικοποιούνται από ένα διαφορετικό γονίδιο [87]. Ανάλογα με τον παράγοντα που δεσμεύεται στον PDGFR, αυτός ομοδιμερίζεται ή ετεροδιμερίζεται [88].



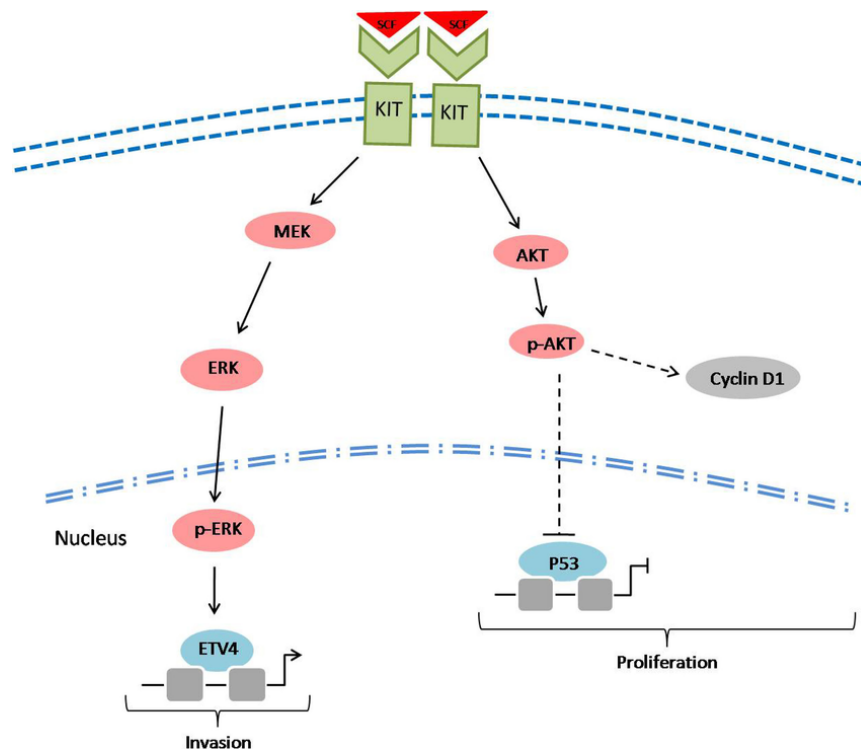
Εικόνα 29: Μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μέσω της ενεργοποίησης των PDGFR [89].

Στον υποδοχέα δεσμεύονται ορισμένες ισομορφές των αυξητικών αιμοπεταλιακών παραγόντων (PDGFs), με αποτέλεσμα ο PDGFR να καθίσταται ενεργός [90]. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας PDGFR φωσφορυλιώνει τον εαυτό του και άλλες πρωτεΐνες και έτσι εμπλέκεται σε οδούς σηματοδότησης που προκαλούν κυτταρικές αποκρίσεις, όπως είναι η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων (Εικόνα 29). Η σωστά ρυθμισμένη λειτουργία τέτοιων υποδοχέων είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη ορισμένων ιστών και οργάνων, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, καθώς και για τη διατήρηση αυτών των

ιστών και οργάνων, ιδιαίτερα των αιματολογικών ιστών, σε όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον PDGFR, δηλαδή στο γονίδιο του PDGFR, σχετίζονται με την ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου.

2.3.2.2.1.5 Υποδοχική Τυροσινική Κινάση c-KIT

Το πρωτο-ογκογονίδιο c-KIT, γνωστό επίσης ως πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης KIT, είναι υποδοχέας τυροσινικής κινάσης που κωδικοποιείται από το γονίδιο KIT. Το KIT είναι μια υποδοχική τυροσινική κινάση τύπου III, η οποία δεσμεύεται με τον παράγοντα βλαστικών κυττάρων (SCF) ^[91] (μια ουσία που προκαλεί την ανάπτυξη ορισμένων τύπων κυττάρων), σχηματίζοντας ένα διμερές που ενεργοποιεί την ενδογενή δραστικότητα τυροσινικής κινάσης, το οποίο στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί έναν καταρράκτη μεταγωγής σήματος στο κύτταρο (Εικόνα 30) ^[92]. Μετά την ενεργοποίηση, ο υποδοχέας συνδέεται με ουβικιτίνη, ώστε να μεταφερθεί στα λυσοσώματα και να καταστραφεί.



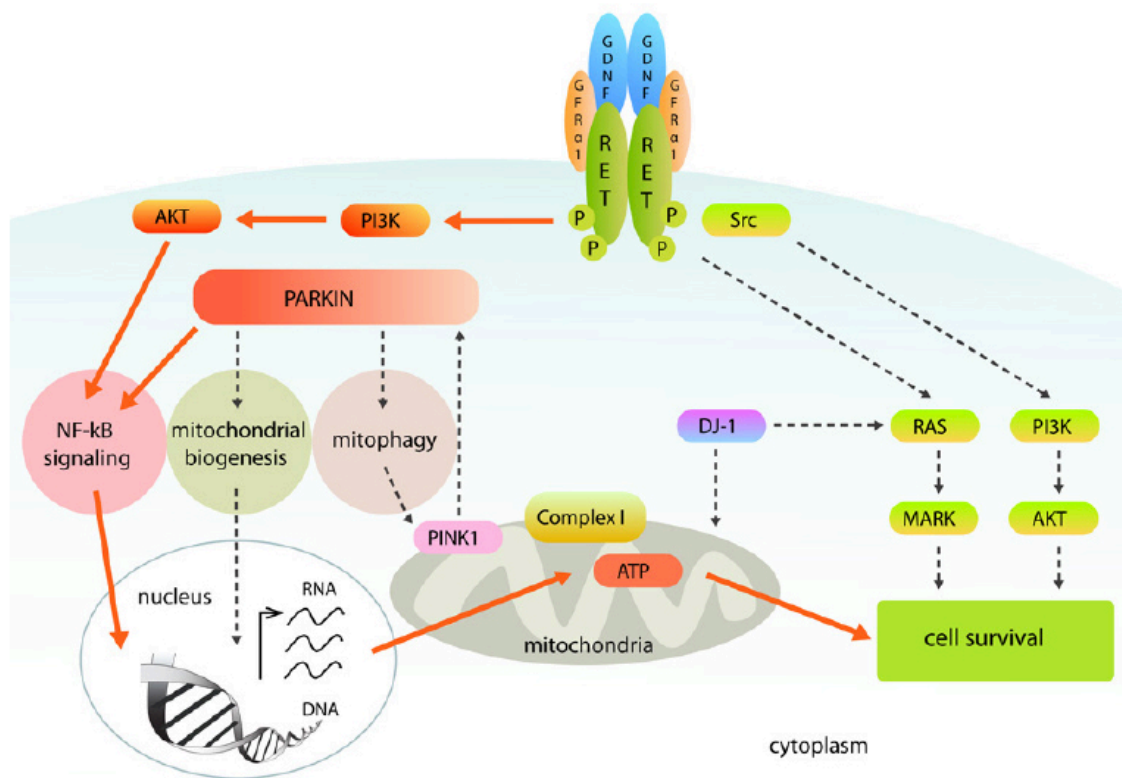
Εικόνα 30: Μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μέσω του υποδοχέα c-KIT ^[93].

Η σηματοδότηση μέσω του KIT παίζει ρόλο στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η κακή ρύθμιση του c-Kit, όπως η υπερέκφρασή του και μεταλλάξεις του, έχει ανιχνευθεί σε αρκετές μορφές ανθρώπινου καρκίνου. Η λευχαιμία

είναι ένας τύπος καρκίνου που συνδέεται μεταλλάξεις στο c-Kit ^[94]. Πλέον, γίνεται χρήση των αναστολέων Kit για τη θεραπεία του καρκίνου ^[95].

2.3.2.2.1.6 Υποδοχική τυροσινική κινάση RET

Το πρωτο-ογκογονίδιο RET κωδικοποιεί μία υποδοχική τυροσινική κινάση στην οποία προσδένονται εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια της οικογένειας GDNF. Οι μεταλλάξεις που προκαλούν απώλεια της λειτουργίας της κινάσης RET συνδέονται με την ανάπτυξη της νόσου του Hirschsprung, ενώ οι μεταλλάξεις που προκαλούν την αυξημένη λειτουργία της κινάσης συσχετίζονται με την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου του ανθρώπου, καθώς εμπλέκεται σε πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια (Εικόνα 31) ^[96].



Εικόνα 31: Μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία εμπλέκεται ο υποδοχέας RET ^[97].

2.3.2.2.2 Μη Υποδοχικές Τυροσινικές Κινάσες (nRTKs)

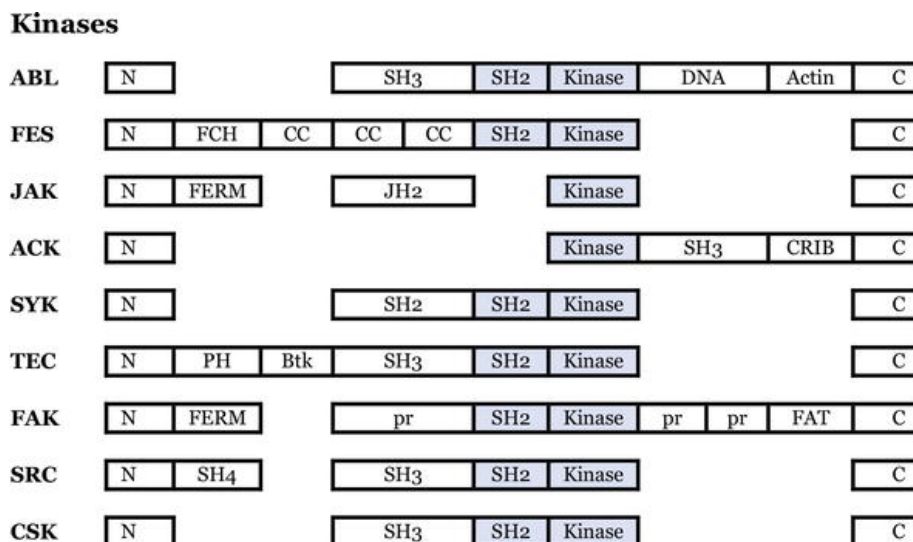
Σε αντίθεση με τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs), η δεύτερη κατηγορία των τυροσινικών κινασών, οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (nRTKs) είναι κυτταροπλασματικά ένζυμα. Σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν ταυτοποιηθεί 32 μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες. Αυτές, είναι υπεύθυνες για την κατάλυση της μεταφοράς της τελικής

φωσφορικής ομάδας της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), σε κατάλοιπα τυροσίνης της πρωτεΐνης-στόχου. Με τη διαδικασία αυτή, οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και την απόπτωση και είναι κρίσιμα μόρια για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος [98].

Η δομή τους περιέχει τον τομέα της τυροσινικής κινάσης, την SRC ομολογία 2 (SH₂) και την SRC ομολογία 3 (SH₃). Οι SH₂ περιοχές συνδέονται με ένα φωσφορυλιωμένο υπόλειμμα τυροσίνης. Οι περιοχές SH₃ συμμετέχουν στη συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλοκών.

Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Ενεργοποιούνται μέσω ενδομοριακών σημάτων με ολιγομερισμό, αυτοφωσφορυλίωση και τρανς-φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες. Στην ανενεργή μορφή, οι λοβοί των κινασών είναι ευθυγραμμισμένοι, εμποδίζοντας το ATP να εισέλθει στο καταλυτικό κέντρο. Με την αυτοφωσφορυλίωση της θηλιάς ενεργοποίησης, οι δύο λοβοί μετακινούνται και ελευθερώνεται η καταλυτική περιοχή, ώστε να προσδεθεί το ATP.

Οι nRTKs υποδιαιρούνται σε 9 κύριες κατηγορίες βάσει των ομοιοτήτων τους στη δομή (Εικόνα 32).



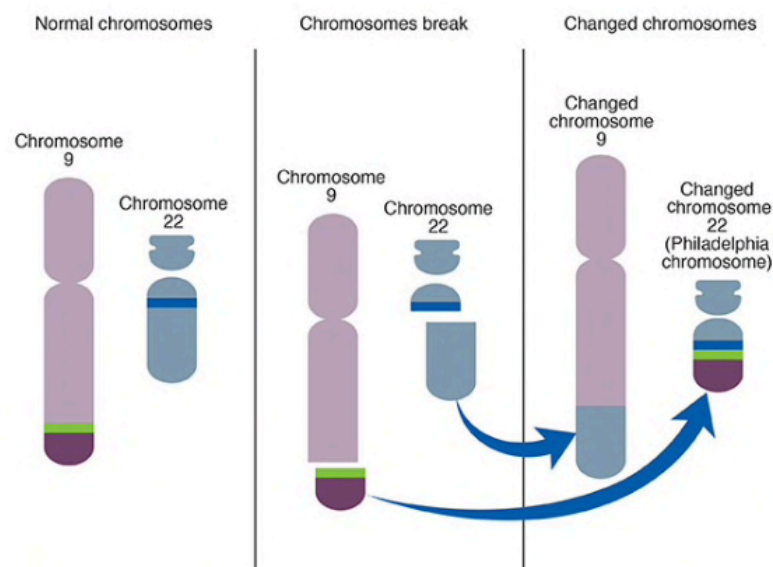
Εικόνα 32: Οι 9 κυριότερες οικογένειες των nRTKs [99].

2.3.2.2.2.1 Μη Υποδοχική Κινάση Τυροσίνης Abl

Στην οικογένεια Abl ανήκουν δύο σημαντικά μέλη, η ABL1 (c-Abl) και η ABL2 (ARG). Η φυσιολογική τυροσινική κινάση Abl, στους ανθρώπους, κωδικοποιείται από το γονίδιο

ABL. Η Abl κινάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα του κυττάρου και συμμετέχει στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες, τη μεταγωγή ενδογενών και εξωγενών σημάτων, την καταστροφή του DNA, τη διαφοροποίηση και τη διαίρεση των κυττάρων. Η c-Abl περιέχει την Src ομολογία, την SH₃, την SH₂ και την περιοχή της τυροσινικής κινάσης. Οι SH₂ και SH₃ ρυθμίζουν την δραστηριότητα της κινάσης.

Με γονιδιακές ανακατατάξεις, δύναται να προκύψουν χμαιρικά γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν χμαιρικές πρωτεΐνες. Στην περίπτωση της Abl, με τη μετάθεση τμήματος του χρωμοσώματος 9 σε τμήμα του χρωμοσώματος 22, προκύπτει ένα χαρακτηριστικό χρωμόσωμα, το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας (Εικόνα 33). Το ογκογονίδιο που προκύπτει από τη μετάθεση αυτή, είναι ένα χμαιρικό γονίδιο που αποτελείται από τμήμα της κινάσης c-Abl, καθώς και από αλληλουχίες της Bcr ^[100]. Η χμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl είναι μια διαρκώς ενεργή κινάση, η οποία ενεργοποιεί πολλές άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Η Abl κινάση έχει χάσει, πλέον, τη ρυθμιστική της περιοχή και δρα ιδιοσυστατικά. Τα αιμοποιητικά κύτταρα που φέρουν το χρωμόσωμα αυτό, εμπλέκονται σε μια μορφή κακοήθειας του αίματος προάγοντας την εμφάνιση της Χρόνια Μυελογενούς Λευχαιμίας.



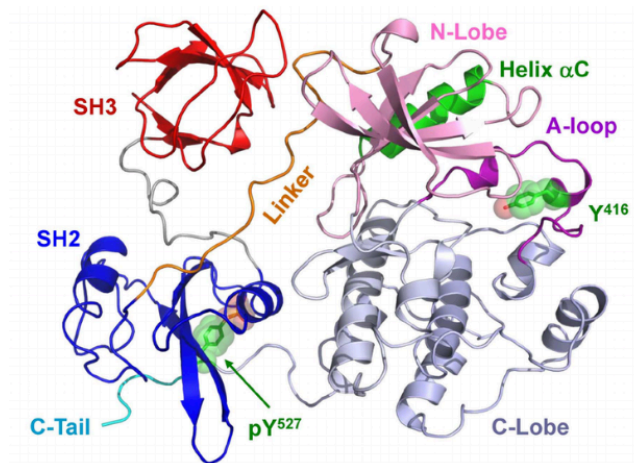
Εικόνα 33: Σχηματισμός του χρωμοσώματος της Φιλαδέλφειας ^[101].

2.3.2.2.2 Μη Υποδοχική Κινάση Τυροσίνης c-Src

Η οικογένεια των Src πρωτεϊνικών κινάσεων ανήκει στις μη-υποδοχικές πρωτεϊνικές τυροσινικές κινάσες και αποτελείται από 9 διακριτά μέλη. Τα μέλη αυτά έχουν ταξινομηθεί σε 3 υπο-οικογένειες, την 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, η οποία αποτελεί μια υπο-οικογένεια μόνη της ^[102].

Το πρωτο-ογκονίδιο της τυροσινικής πρωτεϊνικής κινάσης Src, c-Src, είναι μια μη υποδοχική τυροσινική κινάση, που κωδικοποιείται από το γονίδιο SRC. Η ενεργοποίηση της c-Src οδηγεί στην προώθηση της αγγειογένεσης, της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Γενετικές μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα ή την υπερέκφραση του γονιδίου c-Src, οδηγούν στη συνεχή ενεργοποίηση της κινάσης. Τέτοιες μεταλλάξεις παρατηρούνται σε μεγάλο ποσοστό σε όγκους του παχέος εντέρου, του ήπατος, του πνεύμονα, του μαστού και του παγκρέατος ^[103]. Η δομή της πρωτεΐνης Src περιλαμβάνει μία N-τερματική περιοχή που ακολουθείται από μια SH₃ και SH₂ περιοχή, το καταλυτικό κέντρο και μια C-τερματική αλληλουχία (Εικόνα 34).



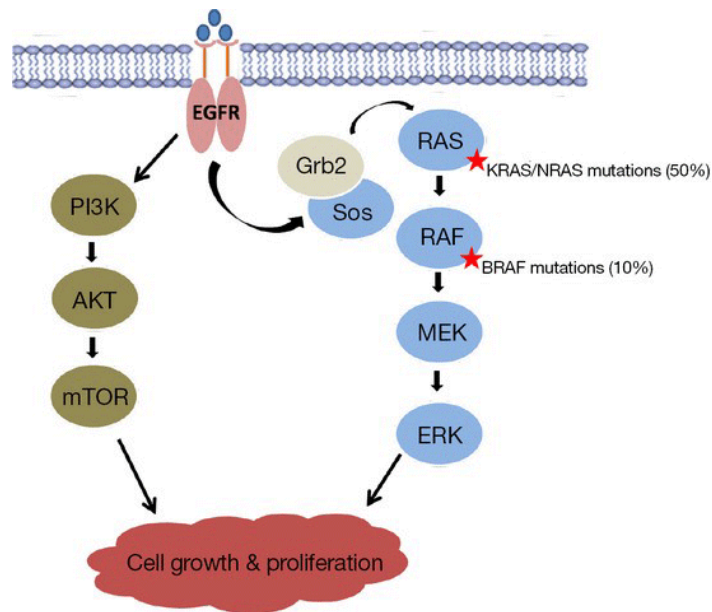
Εικόνα 34: Κρυσταλλογραφική δομή της ανενεργής c-Src ^[104].

2.3.2.1.8 Tyrosine Kinase-Like Κινάσες (TKL)

Οι Tyrosine Kinase-like κινάσες (TKL) είναι μια ομάδα πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης-θρεονίνης, οι οποίες διαθέτουν πολλές ομοιότητες στις αλληλουχίες τους με τις κινάσες τυροσίνης (TK). Η ομάδα TKL είναι πολύ διαφορετική από τις τυπικές κινάσες ^[105].

Στην κατηγορία των TKLs περιλαμβάνεται η οικογένεια των RAF κινάσων, με τα μέλη A-RAF, B-RAF και c-RAF. Οι τρεις RAF πρωτεΐνες δομικά εμφανίζουν πολλές ομοιότητες. Η ρύθμιση της δραστηριότητας των RAF κινάσων είναι πολύπλοκη και σημαντική, καθώς εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο, τον κυτταρικό θάνατο και τον κυτταρικό μεταβολισμό. Συμμετέχουν στον RAS-RAF-MEK-ERK καταρράκτη σηματοδότησης του κυττάρου, γνωστός ως σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK ^[106]. Μεταλλάξεις οι οποίες απορρυθμίζουν τη λειτουργία

των RAF κινασών, ιδιαίτερα της B-RAF, ευθύνονται συχνά για την ανάπτυξη όγκων (Εικόνα 35).

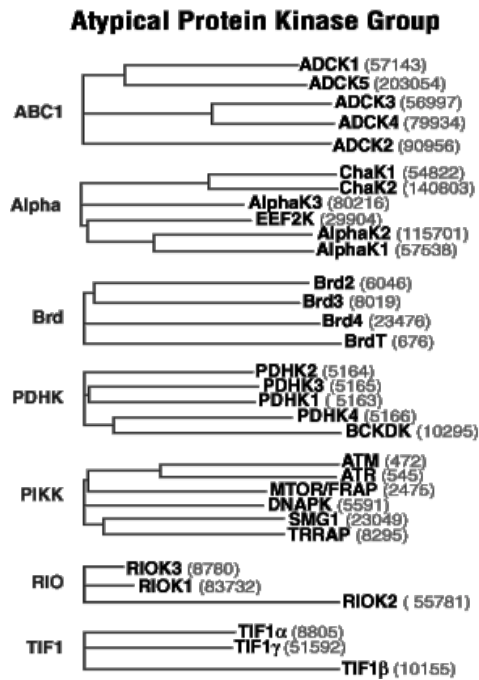


Εικόνα 35: Οι μεταλλάξεις στο B-RAF γονίδιο καταλήγουν σε ιδιосуστατική ενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη όγκου [107].

2.3.2.3 Άτυπες Πρωτεϊνικές Κινάσες (αPKs)

Οι άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (αPKs) περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης και εμπλέκονται σε διαδικασίες φωσφορυλίωσης, σημαντικές για πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες. Τα μέλη της οικογένειας των αPKs χωρίζονται σε 13 υπο-οικογένειες, που αποτελούνται από 2 έως 6 μέλη. Δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη η λειτουργία όλων των μελών (Εικόνα 36) [108].

Δομικά, οι κινάσες αυτές, έχουν στην περιοχή δραστηριότητας της κινάσης ένα N-τελικό άκρο που αποτελείται από ένα β-φύλλο, μία α-έλικα (αC) και έναν C-τερματικό λοβό, που έχει κυρίως ελικοειδή δομή. Σε αντίθεση με τις τυπικές πρωτεϊνικές κινάσες, οι άτυπες διαφέρουν αρκετά στην ομόλογη σειρά. Εν τούτοις, μερικές αPKs παρουσιάζουν κάποια δομική ομολογία με τις ePKs, παρά την έλλειψη ομοιότητας της ακολουθίας.



Εικόνα 36: Υπο-οικογένειες και μέλη των aPKs [35].

2.4 Καρκίνος

Ο όρος καρκίνος χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα σύνολο ασθενειών. Κάθε χρόνο χάνουν τη ζωή τους εκατομμύρια άνθρωποι από πολλές διαφορετικές μορφές καρκίνου. Στα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων περιλαμβάνονται ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, η αποφυγή καταστολών ανάπτυξης, η ικανότητα εισβολής και μετάστασης, η αγγειογένεση, η αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο, η αποφυγή της αντίστασης ανοσοποιητικού, η φλεγμονή προηγμένη από όγκο, η μετάλλαξη και αστάθεια γονιδιώματος, καθώς και η απορρύθμιση κυτταρικής ενέργειας (Εικόνα 37) [109].

Ανεπάρκεια στη δυνατότητα διαφύλαξης της ακεραιότητας του DNA (λάθη στην αντιγραφή ή εξωγενείς βλάβες) συνεισφέρουν στη γενωμική αστάθεια και στη προώθηση της καρκινογένεσης. Η πλειονότητα των κακοήθων όγκων, περίπου το 90-95% των περιπτώσεων, οφείλονται σε γενετικές μεταλλάξεις που προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στους συνήθεις περιβαλλοντικούς παράγοντες, που συμβάλλουν στον θάνατο από καρκίνο, περιλαμβάνεται ο καπνός (25-30%), η διατροφή και η παχυσαρκία (30-35%), οι λοιμώξεις (15-20%), η ακτινοβολία (ιοντίζουσα και μη ιοντίζουσα), η έλλειψη φυσικής δραστηριότητας και η ρύπανση. Το ψυχολογικό στρες δεν φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση του καρκίνου, αν και μπορεί να επιδεινώσει τα αποτελέσματα σε όσους έχουν ήδη καρκίνο [110]. Το υπόλοιπο 5-10% οφείλεται στην

κληρονομική γενετική. Στους κληρονομούμενους καρκίνους γίνεται κληρονόμηση τύπου γονιδίων, τα οποία έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Κληρονομείται η προδιάθεση για καρκίνο και όχι ο ίδιος ο καρκίνος. Αυτό συμβαίνει, επειδή μόνο το ένα αλληλίο γονίδιο είναι φυσιολογικό.



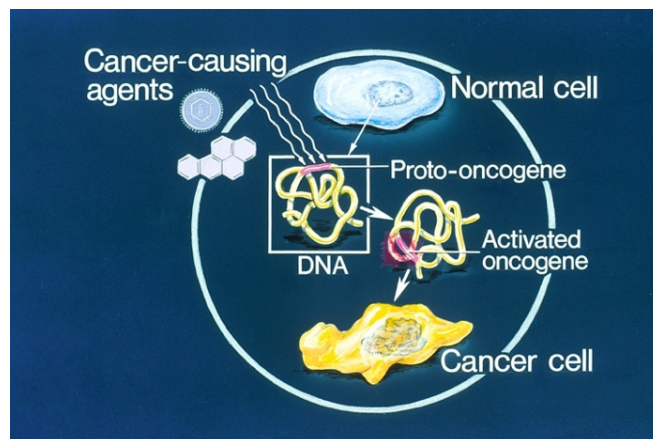
Εικόνα 37: Τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων ^[111].

Οι δύο κύριες κατηγορίες γονιδίων, που σχετίζονται με κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα, είναι τα γονίδια-συντηρητές του γονιδιώματος (Caretakers) και τα γονίδια ελέγχου της φυσιολογίας του κυττάρου (Gatekeepers) ^[112]. Τα γονίδια “Caretakers” κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες επιδιορθώνουν το DNA. Τα γονίδια “Gatekeepers” ελέγχουν τη κατάσταση του κυττάρου, καθώς αντιλαμβάνονται τότε πρέπει να σταματήσουν τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου και να επάγουν την απόπτωση. Απορρύθμιση της έκφρασης ή της δράσης τέτοιων μορίων, προάγουν την ανάπτυξη καρκίνου.

Άλλα μόρια τα οποία συνδέονται με την εμφάνιση νεοπλασμάτων, είναι αυτά που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο. Στον καρκίνο, η φάση του κυτταρικού κύκλου που αποδιοργανώνεται είναι η G₁. Κατά τον πολλαπλασιασμό εκφράζονται οι κυκλίνες, οι οποίες ενεργοποιούν κινάσες που φωσφορυλιώνουν υποστρώματα, ενώ στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η διαδοχή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου ^[113].

Τα ογκογονίδια ενεργοποιούνται από γενετικές μεταβολές που επηρεάζουν την έκφραση ή τη δομή κυτταρικών πρωτο-ογκογονιδίων ^[114]. Τα πρωτο-ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προωθούν τον πολλαπλασιασμό και αναστέλλουν την απόπτωση και τη μετάπτωση των κυττάρων (Εικόνα 38). Ενεργοποιούνται με:

- Γονιδιακή επέκταση
- Σημειακή μετάλλαξη
- Χρωμοσωμική μετάλλαξη (χωρίς υβριδικό γονίδιο)
- Γονιδιακές ανακατατάξεις (χιμαιρικά γονίδια, χιμαιρικές πρωτεΐνες)



Εικόνα 38: Απεικόνιση του τρόπου μετατροπής ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό κύτταρο, μέσω της ενεργοποίησης ενός ογκογονιδίου ^[115].

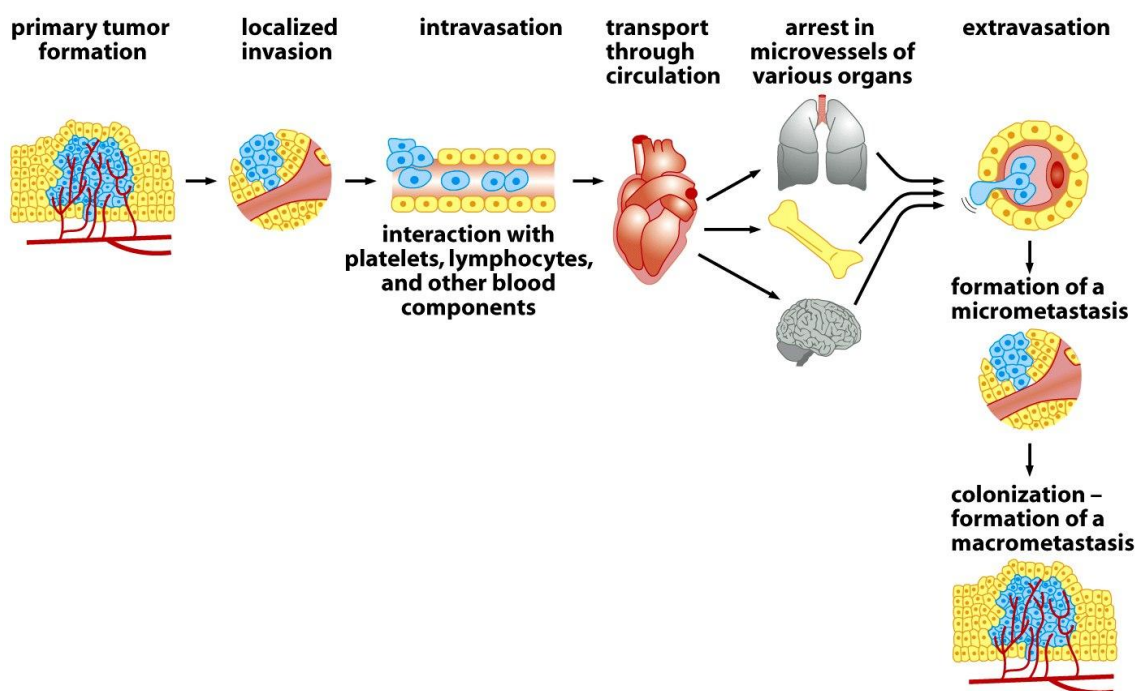
Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω πολλών βιοχημικών μηχανισμών ^[116]. Το κοινό στοιχείο των γονιδίων αυτών είναι ότι η απώλεια του καθενός από αυτά αυξάνει τη πιθανότητα να υποστεί το κύτταρο νεοπλασματικό μετασχηματισμό. Αν χαθεί το ένα αλληλίο, το άλλο συνεχίζει να είναι λειτουργικό, σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, στα οποία αρκεί να μεταλλαχθεί το ένα αλληλίο για να εκφραστεί η ογκοπρωτεΐνη. Ωστόσο, αν χαθούν και τα δύο αλληλία των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, τότε εμφανίζεται η ανάπτυξη καρκίνου.

Γίνεται κατανοητό πως η απορρύθμιση μεγάλου αριθμού μηχανισμών του κυττάρου

εμπλέκεται με την ανάπτυξη καρκίνου. Επιπρόσθετα, η πολυδιάστατη φύση και η μεγάλη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας αυτής, κρίνουν επιτακτική την ανάπτυξη φαρμάκων εναντίον αυτής νόσου.

2.4.1 Μετάσταση του όγκου

Μετάσταση του όγκου, ονομάζεται η μετανάστευση καρκινικών κυττάρων από τον πρωτογενή καρκινικό όγκο, μέσω της λέμφου ή της κυκλοφορίας του αίματος, σε άλλα μέρη του σώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δευτερογενούς όγκου (μεταστατικός όγκος) ^[117]. Η διαδικασία της μετάστασης αποτελείται από 7 στάδια ^[118] (Εικόνα 39):



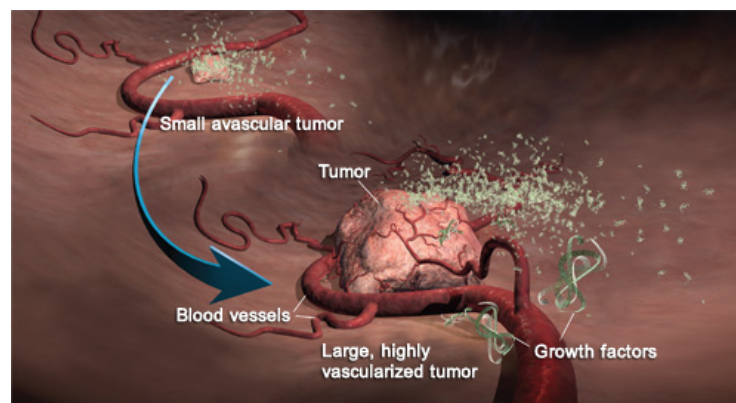
Εικόνα 39: Απεικόνιση των σταδίων της μετάστασης ^[119].

1. Μετατροπή των καρκινικών κυττάρων σε κύτταρα με δυνατότητα διείσδυσης, δηλαδή μετατροπή του επιθηλιακού κυττάρου σε μεσέγχυμα (**transformation**). Τα καρκινώματα είναι επιθηλιακοί όγκοι, οι οποίοι συνδέονται με τη βασική μεμβράνη. Τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν μορφολογία, η οποία τους επιτρέπει να μεταναστεύσουν. Για να γίνει η επιθυμητή μετατροπή, αλλάζουν τα γονίδια τα οποία εκφράζονται. Για να επιτευχθεί η μεταβολή αυτή, το κύτταρο πρέπει να χάσει την κυτοκερατίνη, ένα ενδιάμεσο ινίδιο.
2. Τοπική διείσδυση των καρκινικών κυττάρων στους περιβάλλοντες ιστούς (**invasion**). Η διηθητικότητα των κυττάρων ελέγχεται από διάφορες μεταλλοπρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, οι οποίες την αποικοδομούν.

3. Ενδαγγείωση των καρκινικών κυττάρων (**intravasation**).
4. Διασπορά των καρκινικών κυττάρων μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος (**dissemination**).
5. Εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων από το αγγειακό δίκτυο απομακρυσμένων ιστών (**extravasation**).
6. Εγκατάσταση των κυττάρων στους απομακρυσμένους ιστούς (**homing**).
7. Ανάπτυξη της μετάστασης στο περιβάλλον του νέου ιστού (**proliferation**).

2.4.2 Αγγειογένεση

Ο όρος «αγγειογένεση» χρησιμοποιείται για να δηλώσει την αύξηση και αναδιάπλαση ενός ήδη υπάρχοντος αγγειακού δικτύου σε ένα πιο πολύπλοκο δίκτυο. Είναι η διαδικασία η οποία ρυθμίζεται αυστηρά από μεγάλο αριθμό προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων. Η αγγειογένεση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της ανάπτυξης του όγκου ^[120]. Είναι ένα απαραίτητο μέρος της διαδικασίας προόδου του καρκίνου από μικρά, εντοπισμένα νεοπλάσματα σε μεγαλύτερους, αναπτυσσόμενους και δυνητικά μεταστατικούς όγκους (Εικόνα 40) ^[121].



Εικόνα 40: Απεικόνιση της αγγειογένεσης για τη μετατροπή ενός μικρού νεοπλάσματος σε μεγαλύτερο όγκο ^[122].

Για να αυξηθεί η διάμετρος ενός όγκου περισσότερο από 2 mm, χρειάζεται ανεξάρτητη παροχή αίματος, η οποία αποκτάται από την έκφραση αυξητικών παραγόντων που δημιουργούν νέα αγγεία από υπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία ^[123]. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται ακόμα και όταν ο όγκος ωριμάσει. Συνεπώς, η ρύθμιση της αγγειογένεσης είναι ένας βασικός μηχανισμός για την ανάπτυξη του όγκου, κρίσιμος για τη μετάστασή του.

Ο καταρράκτης που οδηγεί σε αγγειογένεση μπορεί να χωριστεί σε δύο γενικές φάσεις, την προαγγειακή και την αγγειακή ^[124]. Μόλις τα καρκινικά κύτταρα υποστούν μετασχηματισμό, αποκτώντας αγγειογόνο φαινότυπο, τα κακοήθη κύτταρα είναι ικανά, πλέον, να επάγουν φαινοτυπικές μεταβολές στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε αυτό το σημείο, ο όγκος μπορεί να αποκτήσει τη δική του παροχή αίματος, η οποία επιτρέπει τον ταχύ ρυθμό ανάπτυξής του. Οι όγκοι που έχουν υποβληθεί σε νεοαγγειογένεση είναι ικανοί, όχι μόνο να εισέλθουν σε μια φάση ταχείας ανάπτυξης, αλλά και να έχουν αυξημένο μεταστατικό δυναμικό. Αντίθετα, οι όγκοι που δεν έχουν επαρκές αγγειακό δίκτυο γίνονται νεκρωτικοί ή αποπτωτικοί.

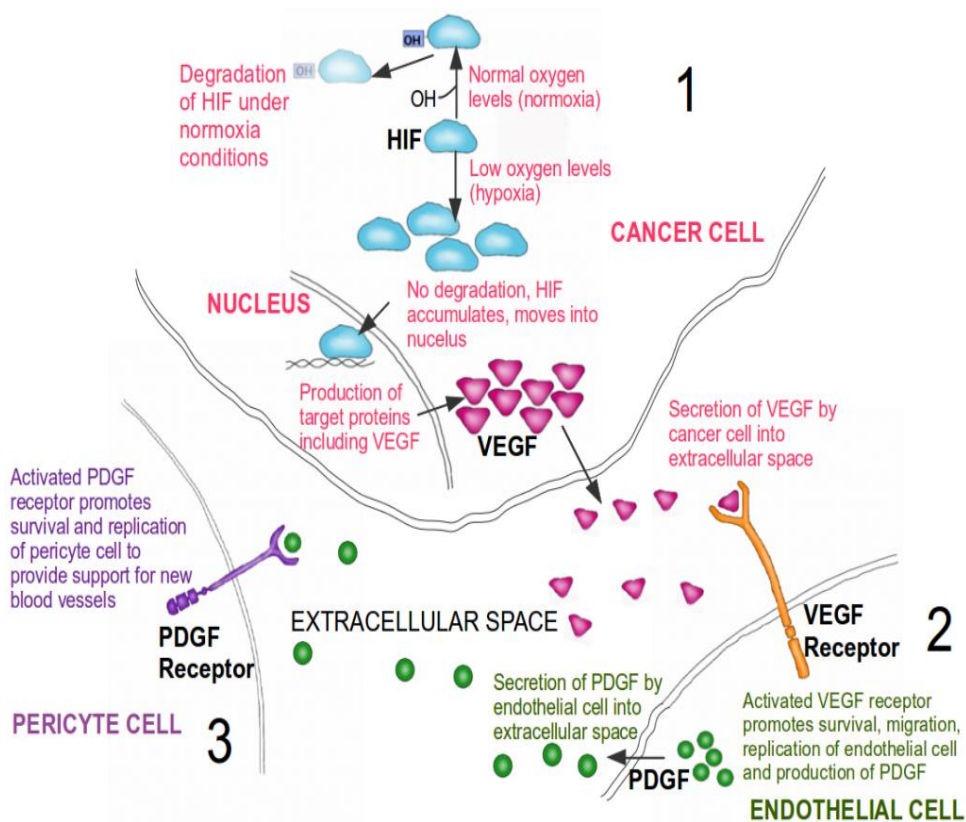
Είναι γνωστό πως ο πρωτοπαθής όγκος επάγει τη νεοαγγειογένεση και τη λεμφαγγειογένεση, παράλληλα με τη διαδικασία της διήθησης, ώστε να εξασφαλιστεί η άμεση πρόσβαση των καρκινικών κυττάρων στις βασικές οδούς διασποράς. Καθοριστική, στην διαδικασία της αγγειογένεσης, είναι η λειτουργία του επαγόμενου από υποξία μεταγραφικού παράγοντα HIF1 (Εικόνα 41) ^[125]. Οι επαγόμενοι από υποξία μεταγραφικοί παράγοντες (Hypoxia-inducible factors, HIFs) ενεργοποιούνται σε συνθήκες υποξίας, όταν, δηλαδή, το διαθέσιμο οξυγόνο του κυτταρικού περιβάλλοντος είναι εξαιρετικά μειωμένο ^[126].



Εικόνα 41: Κρυσταλλογραφική δομή του HIF1A ^[127].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, στα υγιή κύτταρα, γίνεται η προσθήκη μιας υδροξυλομάδας σε ένα κατάλοιπο προλίνης του HIF1 ^[128]. Το πρωτεάσωμα αναγνωρίζει τον πλέον υδροξυλιωμένο παράγοντα και τον μεταφέρει στα λυσοσώματα, όπου καταστρέφεται. Ωστόσο, στα καρκινικά κύτταρα, καθώς ο όγκος αναπτύσσεται η παροχή αίματος δεν είναι αρκετή, με αποτέλεσμα να προκύπτουν περιοχές όπου η συκέντρωση οξυγόνου είναι εξαιρετικά χαμηλότερη από αυτήν που επικρατεί στους υγιείς ιστούς. Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, δεν λαμβάνει χώρα η υδροξυλίωση ενός καταλοίπου προλίνης του HIF1, με αποτέλεσμα ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας, ο οποίος μεταγράφει το

γονίδιο του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF, να μην αναγνωρίζεται από το πρωτεάσωμα και να επιβιώνει (Εικόνα 42). Για το λόγο αυτό, στα καρκινικά κύτταρα γίνεται υπερέκφραση του VEGF.

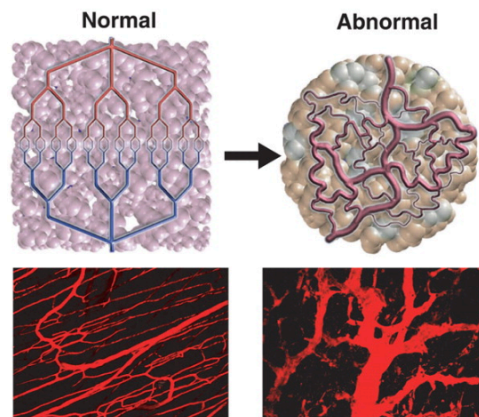


Εικόνα 42: Διαδικασία ενεργοποίησης των υποδοχών VEGFR και PDGFR σε συνθήκες υποξίας.

Η υποξία, λοιπόν, φαίνεται να αποτελεί σημαντικό ερέθισμα για την παραγωγή VEGF τόσο σε κακοήθη όσο και σε φυσιολογικά κύτταρα, κατά τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ή μετά από τραυματισμό. Ο επαγόμενος από υποξία VEGF είναι ο ενορρηστρωτής της αγγειογένεσης ^[129]. Μόλις μεταγραφεί, εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου βρίσκονται οι υποδοχείς VEGFR, οι οποίοι είναι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες και επάγουν τον καταρράκτη σηματοδότησης, ο οποίος σηματοδοτεί την αγγειογένεση ^[130].

Ο VEGF είναι ικανός να διεγείρει την αγγειογένεση στους κακοήθεις όγκους, αλλά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της πρόσδεσής του στους αντίστοιχους υποδοχείς VEGFR. Η μεταγραφή του mRNA του VEGF επάγεται επίσης από μία ποικιλία αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών. Τα αγγεία που διαμορφώνονται στον καρκίνο λόγω υπερέκφρασης του VEGF είναι δαιδαλώδη και δεν συγκρατούνται επαρκώς από περικύτταρα (Εικόνα 43) ^[131]. Τα

διασταλμένα, σακκοειδή, γιγαντιαία, με αρτηριοφλεβώδεις επικοινωνίες αγγεία του όγκου παρουσιάζουν διαρροή, με εύκολη διαπερατότητα από τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία εισέρχονται στην κυκλοφορία σε υψηλά επίπεδα, λόγω της λύσης της συνέχειας της βασικής μεμβράνης.

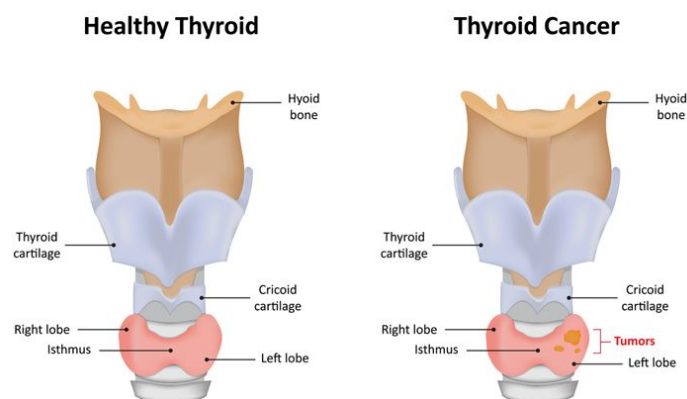


Εικόνα 43: **Αριστερά:** Αγγειακό δίκτυο σε υγιείς ιστούς. **Δεξιά:** Αγγειακό δίκτυο σε αναπτυσσόμενους κακοήθεις όγκους ^[132].

2.4.3 Καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένος είναι ο μεγαλύτερος ενδοκρινής αδένος του ανθρώπινου σώματος ^[133]. Εντοπίζεται στην πρόσθια περιοχή του τραχήλου, μπροστά και εκατέρωθεν της τραχείας. Ζυγίζει περίπου 20 γραμμάρια και αποτελείται από 2 λοβούς σε σχήμα πεταλούδας, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους μέσω του ισθμού (Εικόνα 44). Ο θυρεοειδής αδένος χρησιμοποιεί ιώδιο για να εκκρίνει ορμόνες που ελέγχουν τον καρδιακό ρυθμό, την αρτηριακή πίεση, τη θερμοκρασία του σώματος και τον βασικό μεταβολικό ρυθμό ^[134].

Thyroid Cancer



Εικόνα 44: Ανατομία του θυρεοειδούς αδένος. **Αριστερά:** Υγιής θυρεοειδής αδένος. **Δεξιά:** Θυρεοειδής αδένος με καρκινικούς όγκους ^[135].

Οι όζοι του θυρεοειδούς είναι πολύ συνηθισμένοι στον γενικό πληθυσμό και οι περισσότεροι από αυτούς είναι καλοήθεις ^[136]. Ένας όζος του θυρεοειδούς είναι μια τοπική διόγκωση (όγκος) στον θυρεοειδή αδένα ^[137], που βρίσκεται στην πρόσθια περιοχή του λαιμού. Περίπου το 5% των εντοπισμένων όζων του θυρεοειδούς είναι κακοήθεις ^[138]. Εκτός από τους όζους, μερικά από τα συμπτώματα του καρκίνου του θυρεοειδούς είναι ένα ανώδυνο οίδημα στο μπροστινό μέρος του λαιμού, δυσκολία στην κατάποση και την αναπνοή, καθώς και βραχνάδα, ή αλλαγή φωνής.

Υπάρχουν 6 κύριοι τύποι καρκίνου του θυρεοειδούς, ανάλογα με τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου:

- *Θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (Papillary thyroid cancer)*. Είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος τύπος (75-85%).
- *Θυλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (Follicular thyroid cancer)*. Ο δεύτερος τύπος σε συχνότητα εμφάνισης (10-20%).
- *Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς (Medullary thyroid cancer)*. Εμφανίζεται σε ποσοστό 5-8%.
- *Αδιαφοροποίητος καρκίνος του θυρεοειδούς (Anaplastic thyroid cancer)*. Εμφανίζεται σε ποσοστό μικρότερο από 5% των περιπτώσεων καρκίνου του θυρεοειδούς. Δεν ανταποκρίνεται σε θεραπείες.
- *Καρκίνος του θυρεοειδούς από κύτταρα Hürthle (Hürthle cell carcinoma)*.
- *Λέμφωμα του θυρεοειδούς (Thyroid lymphoma)*.

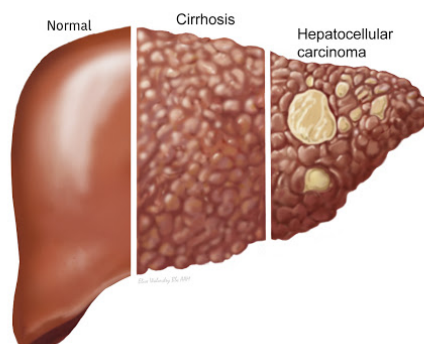
Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο έκτος συνηθέστερος καρκίνος στις γυναίκες και ο πιο συνηθισμένος καρκίνος στις γυναίκες ηλικίας 20 έως 34 ετών. Μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικιακή ομάδα, αλλά περισσότερο σε ενήλικες ηλικίας 45 έως 54 ετών. Περίπου το 2% των περιπτώσεων καρκίνου του θυρεοειδούς εμφανίζονται σε παιδιά και εφήβους. Το ποσοστό θνησιμότητας αυξήθηκε ελαφρώς τα τελευταία χρόνια, αλλά παραμένει πολύ χαμηλό σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου. Οι γυναίκες έχουν 3 φορές περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του θυρεοειδούς από τους άνδρες ^[139], ^[140].

Η τυπική θεραπεία ασθενών που έχουν διαγνωστεί με αυτό το είδος καρκίνου, περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση, όπου γίνεται ολική θυρεοειδεκτομή ^[141]. Μετεγχειρητικά, χορηγείται συχνά ραδιενεργό ιώδιο στους ασθενείς, για την αφαίρεση

υπολοιπόμενου ιστού του θυρεοειδούς, καθώς και για εξάλειψη τυχόν μικρομεταστάσεων του όγκου. Ωστόσο, το 5-15% των ασθενών αναπτύσσουν αντίσταση στο ραδιενεργό ιώδιο. Σε αυτούς τους ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος, πραγματοποιείται στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς τυροσινικής κινάσης.

2.4.5 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ή ηπάτωμα) είναι πρωτοπαθής κακοήθης όγκος του ήπατος (Εικόνα 45) ^[142]. Ο όγκος αποτελείται από ηπατικά κύτταρα. Μεγάλο ποσοστό των ασθενών με HCC πάσχει ήδη από κίρρωση ή ηπατίτιδα Β, ή έχει εκτεθεί σε μεγάλο βαθμό σε τοξίνες όπως το αλκοόλ ή η αφλατοξίνη ^[143]. Η θεραπεία και η πρόγνωση του HCC ποικίλλουν ανάλογα με το μέγεθος, τα ιστολογικά χαρακτηριστικά, το βαθμό εξάπλωσης του όγκου και τη γενική κατάσταση του ασθενούς ^[144]. Συχνά, η θεραπεία που ακολουθούν οι ασθενείς, περιλαμβάνει χειρουργική αφαίρεση του όγκου. Η έκβαση της θεραπείας δεν είναι πάντα θετική και εξαρτάται από το στάδιο της νόσου ^[145].



Εικόνα 45: Απεικόνιση υγιούς ήπατος, ήπατος με κίρρωση και ηπατοκυτταρικού καρκινώματος ^[146].

Το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα δεν παρουσιάζει συμπτώματα στα αρχικά του στάδια, με αποτέλεσμα συχνά να διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Μερικά από τα συμπτώματα που εμφανίζονται συχνά σε ασθενείς είναι η απώλεια βάρους, ο τοπικός πόνος, ο ίκτερος και συμπτώματα κίρρωσης ^[147].

Η συντριπτική πλειονότητα κρουσμάτων ηπατοκυτταρικού καρκινώματος εντοπίζεται στην Ασία και την Αφρική, καθώς στις χώρες αυτές η μόλυνση από ηπατίτιδα Β είναι ενδημική. Τα κρούσματα HCC στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε άλλες αναπτυσσόμενες χώρες αυξάνονται συνεχώς, λόγω της αύξησης των λοιμώξεων από τον ιό της ηπατίτιδας C.

Η εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκινώματος είναι συχνότερη στους άντρες απ'ότι στις γυναίκες ^[143].

Σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με προχωρημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, στους οποίους δηλαδή ο όγκος έχει εξαπλωθεί πέρα από το συκώτι, προτείνεται στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών ^[148].

2.4.6 Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC)

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) προέρχεται από την εσωτερική επιφάνεια του εγγύς νεφρικού σωληναρίου, ένα μέρος των πολύ μικρών σωληναρίων στους νεφρούς που μεταφέρουν πρωτογενή ούρα ^[149]. Το RCC είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος καρκίνου των νεφρών στους ενήλικες ^[150].

Οι μεγαλύτεροι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση RCC είναι το κάπνισμα, η παχυσαρκία και η υπέρταση (υψηλή αρτηριακή πίεση), η έκθεση σε συγκεκριμένες χημικές ουσίες και η μακροχρόνια χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων ^[151]. Η θεραπεία που ακολουθούν συνήθως οι ασθενείς είναι η μερική ή η πλήρης αφαίρεση των προσβεβλημένων νεφρών. Το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών, για 5 τουλάχιστον χρόνια, είναι 65-90%, ωστόσο το ποσοστό αυτό μειώνεται σημαντικά όταν ο όγκος έχει κάνει μετάσταση ή έχει διεισδύσει βαθύτερα στους ιστούς των νεφρών.

Η νόσος αυτή έχει ελάχιστα έως καθόλου συμπτώματα, με αποτέλεσμα οι ασθενείς με RCC να διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο. Τα αρχικά συμπτώματα του RCC περιλαμβάνουν συχνά αίμα στα ούρα (που εμφανίζεται στο 40% των προσβεβλημένων ατόμων κατά τη στιγμή που ζητούν ιατρική φροντίδα), πόνο στην πλάτη (40%), μάζα στην κοιλιακή χώρα ή στο πλευρό (25%), απώλεια βάρους (33%), πυρετό (20%), υψηλή αρτηριακή πίεση (20%), νυχτερινές εφιδρώσεις και γενικά αίσθημα αδιαθεσίας ^[152]. Όταν γίνεται μετάσταση του RCC, συνηθέστερα εξαπλώνεται στους λεμφαδένες, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τον εγκέφαλο ή τα οστά ^[153]. Η ανοσοθεραπεία και η στοχευμένη θεραπεία βελτίωσαν τις προοπτικές για το μεταστατικό RCC ^[154].

Στην περίπτωση ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα, συχνή είναι η χορήγηση στοχευμένης θεραπείας για την αναστολή τυροσινικών κινασών, οι οποίες έχει αποδειχθεί πως προάγουν την ανάπτυξη και την εξάπλωση των νεοπλασμάτων ^[155].

2.5 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων στην στοχευμένη θεραπεία

Οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η επιβίωση και η διαφοροποίηση του κυττάρου. Η δυσλειτουργία των πρωτεϊνικών κινάσων εμπλέκεται στην εμφάνιση καρκινογένεσης και μπορεί να επέλθει από μεταλλάξεις στο γονίδιο ή την πρωτεΐνη της κινάσης, καθώς και από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων [156]. Η κατανόηση των μονοπατιών σηματοδότησης έχει οδηγήσει στον σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων.



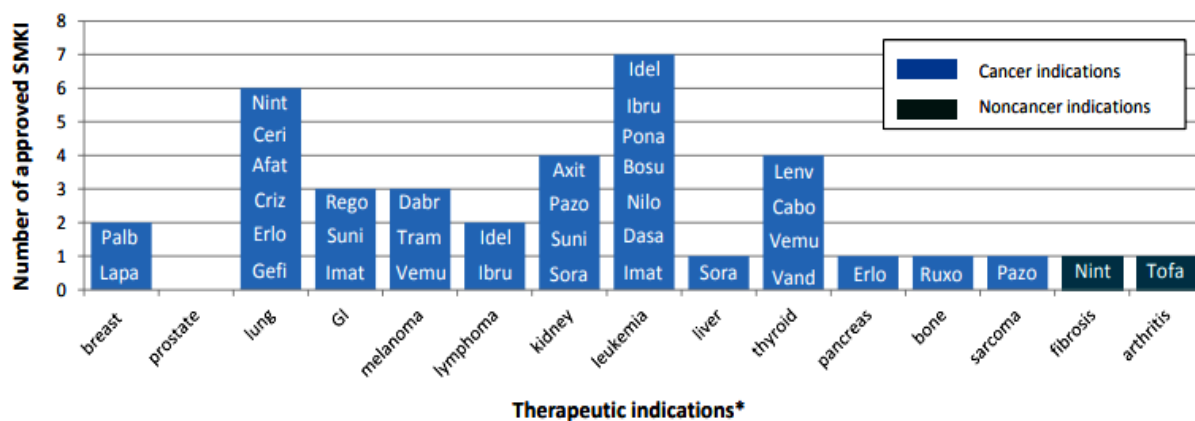
Εικόνα 46: Εγκεκριμένοι από το FDA αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων που κυκλοφορούν στο εμπόριο, από το 2001 έως τον Απρίλιο του 2020 [34], [157], [158], [159].

Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων είναι χημικές ενώσεις, συνήθως μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες μπορούν και αναστέλλουν τη δράση των πρωτεϊνικών κινάσων και δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Υπάρχουν 54 μικρού μοριακού βάρους αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων (SMKIs) που έχουν εγκριθεί από τον FDA τις τελευταίες δεκαετίες και πολλοί ακόμη οι οποίοι βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικής αξιολόγησης [160] (Εικόνα 46). Η έλευση των αναστολέων της πρωτεϊνικής κινάσης ήταν καθοριστικό σημείο στη θεραπεία

πολλών μορφών καρκίνου, καθώς και άλλων ασθενειών όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο διαβήτης και οι νευρολογικές διαταραχές ^[161] (Εικόνα 47).

Οι περισσότεροι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών αναστέλλουν τυροσινικές κινάσες. Οι υπόλοιποι εγκεκριμένοι αναστολείς, είναι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης, αναστολείς διττής εξειδίκευσης (dual protein kinase inhibitors) και αναστολείς λιπιδίων κινάσης (lipid kinase inhibitors).

Πολλές θεραπείες που ακολουθούν ασθενείς με καρκίνο, όπως η χημειοθεραπεία, επικεντρώνονται στην πρόκληση θανάτου των ταχέως διαιρούμενων κυττάρων, καθώς το κύριο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός. Ωστόσο, μέσω των θεραπειών αυτών δε διακρίνονται αποτελεσματικά τα καρκινικά από τα υγιή κύτταρα, με συνέπεια την υψηλή τοξικότητα. Αντιθέτως, η στοχευμένη θεραπεία με μικρού μοριακού βάρους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, δρα αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει τα φυσιολογικά, μειώνοντας την τοξικότητα. Συνεπώς, δε προκαλεί έκπληξη το γεγονός πως η στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την θεραπεία του καρκίνου, η οποία έχει εμφανίσει πολύ θετικά κλινικά αποτελέσματα.



Εικόνα 47: Εγκεκριμένοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών από τον FDA από το 2001 έως το 2015, ταξινομημένοι βάσει του τύπου καρκίνου για τον οποίο έχουν εμφανίσει θεραπευτικές ενδείξεις. Οι αναστολείς Nintedanib και Tofacitinib χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της ίνωσης και αρθρίτιδας, αντίστοιχα ^[162].

2.5.1 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Όλες οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες εμφανίζουν μεγάλες ομοιότητες στη τεταρτοταγή τους δομή. Στο καταλυτικό τους κέντρο βρίσκεται ο θύλακας πρόσδεσης του

ATP. Το ATP προσδένεται στη διεπιφάνεια μεταξύ του N και του C λοβού. Όλες έχουν έναν εύκαμπτο βρόγχο ενεργοποίησης που ξεκινά με τη διατηρημένη αλληλουχία αμινοξέων Asp-Phe-Gly (DFG). Οι περισσότεροι από τους εγκεκριμένους, από το FDA, αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι αδενινικοί μιμητές, δηλαδή προσδένονται στη θέση δέσμησης του ATP. Οι υπόλοιποι απενεργοποιούν τη πρωτεϊνική κινάση μέσω αλληλεπίδρασης με επιφανειακά αμινοξέα σε μία αλλοστερική περιοχή εκτός του ενεργού κέντρου. Γενικά, οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών διαταράσσουν τη δέσμηση της πρωτεϊνικής κινάσης με το ATP μέσω αλληλεπιδράσεων με αυτή ή με αλλοστερική περιοχή.

Ανάλογα με τον τρόπο που δεσμεύονται στην κινάση, οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες, τους αναστρέψιμους και τους μη αναστρέψιμους. Οι μη αναστρέψιμοι δεσμεύονται ομοιοπολικά με ένα δραστικό κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση πρόσδεσης του ATP, με αποτέλεσμα την κατάληψη της θέσης πρόσδεσης και τη μη αναστρέψιμη αναστολή. Οι αναστρέψιμοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε τέσσερις βασικούς τύπους με βάση το μοτίβο DFG και τη θέση στην οποία προσδένονται (*Εικόνα 48*), (*Πίνακας 3*)^[163].

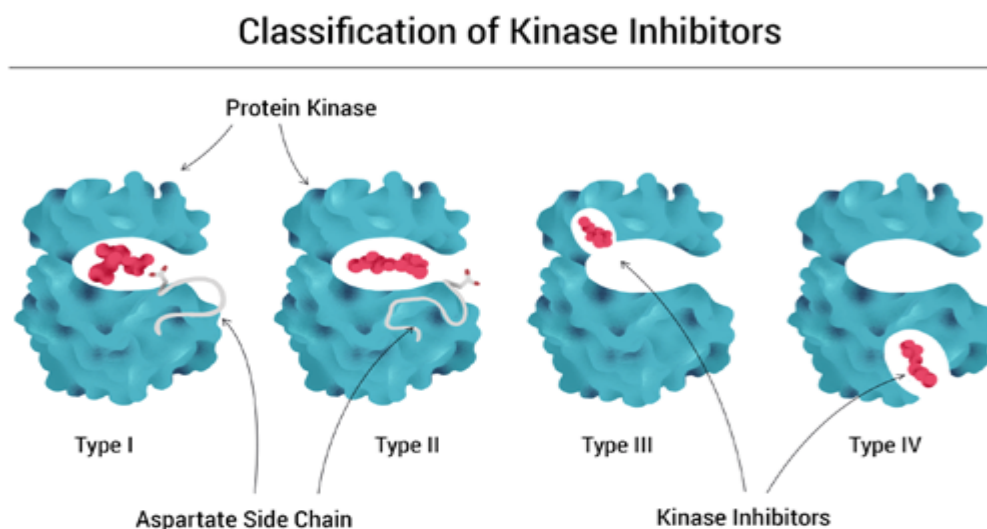
Οι αναστολείς τύπου I είναι ανταγωνιστές του ATP, προσδένονται δηλαδή στη θέση πρόσδεσης του ATP, καταλαμβάνοντας την. Μόλις συμπλοκοποιηθούν με την πρωτεϊνική κινάση, αυτή υιοθετεί ενεργή διαμόρφωση (inconformation), δηλαδή το κατάλοιπο του ασπαρτικού του μοτίβου DFG είναι στραμμένο προς τη θέση πρόσδεσης του ATP (DFG-in)^[163].

Οι αναστολείς τύπου II προσδένονται πρόσδεσης του ATP, δηλαδή είναι μιμητές του ATP, αλλά οι περισσότεροι έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται ταυτόχρονα και σε άλλες αλλοστερικές περιοχές, καθώς το κατάλοιπο ασπαρτικού του μοτίβου DFG είναι στραμμένο αντίθετα από τη θέση πρόσδεσης του ATP (DFG-out). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή εκλεκτικότητα κινάσης. Συνεπώς, οι αναστολείς αυτοί δεσμεύονται στην ανενεργή διαμόρφωση του ATP^[163]. Γενικά, οι αναστολείς τύπου I έχουν ταχύτερη κινητική σύνδεσης και διάστασης, ενώ οι αναστολείς τύπου II έχουν αργή κινητική σύνδεσης, η οποία οδηγεί σε παρατεταμένο χρόνο παραμονής (δηλαδή, η χρονική περίοδος που μια ένωση καταλαμβάνει έναν στόχο).

Οι αναστολείς τύπου III δεσμεύονται σε μια αλλοστερική γειτονική περιοχή ως προς τη θέση πρόσδεσης του ATP. Μέσω της αλληλεπίδρασης του αναστολέα με την αλλοστερική

αυτή περιοχή, αλλάζει η διαμόρφωση της κινάσης, με αποτέλεσμα το ATP πλέον να αδυνατεί να μπει στο ενεργό κέντρο της κινάσης ^[163].

Οι αναστολείς τύπου IV δεσμεύονται σε μια αλλοστερική περιοχή, απομακρυσμένη από τη θέση πρόσδεσης του ATP. Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά το σχηματισμό του συμπλόκου πρωτεϊνικής κινάσης-αναστολέα, τροποποιούν τη διαμόρφωση της κινάσης, εμποδίζοντας τη διείσδυση του ATP ^[163].



Εικόνα 48: Απεικόνιση της θέσης πρόσδεσης των διαφορετικών τύπων αντιστρεπτών αναστολέων στην πρωτεϊνική κινάση ^[34].

	Τύπου I	Τύπου II	Τύπου III	Τύπου IV
DFG διαμόρφωση	In (ενεργή διαμόρφωση)	Out (ανενεργή διαμόρφωση)	Μεταβλητή	Μεταβλητή
Περιοχή δέσμευσης	Θέση πρόσδεσης του ATP	Θέση πρόσδεσης του ATP και αλλοστερική γειτονική περιοχή	Αλλοστερική γειτονική περιοχή	Αλλοστερική περιοχή απομακρυσμένη από τη θέση πρόσδεσης του ATP
Ανταγωνιστής ATP	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
Εκλεκτικότητα	Συνήθως χαμηλή	Υψηλή	Υψηλή	Υψηλή

Πίνακας 3: Τύποι και χαρακτηριστικά αντιστρεπτών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ^[164].

Συναντώνται, επίσης, σε μικρότερη συχνότητα, αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών τύπου V. Οι αναστολείς αυτοί συνδέονται ταυτόχρονα στη θέση πρόσδεσης του ATP, καθώς

και σε μία αλλοστερική γειτονική θέση. Κατά τη συμπλοκοποίηση, το κατάλοιπο ασπαρτικού που ανήκει στο DFG μοτίβο είναι στραμμένο προς το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (Πίνακας 4) ^[164].

	Τύπου V	Τύπου VI	Τύπου I ½ (A/B)
DFG διαμόρφωση	In (ενεργή διαμόρφωση)	Μεταβλητή	In (ανενεργή διαμόρφωση)
Περιοχή δέσμευσης	Θέση πρόσδεσης του ATP και αλλοστερική γειτονική περιοχή	Αλλοστερική περιοχή, δεσμεύεται ομοιοπολικά	Θέση πρόσδεσης του ATP
Ανταγωνιστής ATP	Ναι	Όχι	Ναι

Πίνακας 4: Τύποι και χαρακτηριστικά αντιστρεπτών αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων ^[162].

Υπάρχουν αναστολείς, οι οποίοι προσδέονται στην πρωτεϊνική κινάση, σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης, μέσω μια αντίδρασης συζυγούς προσθήκης τύπου Michael με μια δομή α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης, την οποία διαθέτουν στο μόριο τους. Τέτοιες ενώσεις ταξινομούνται ως αναστολείς τύπου VI ^[163].

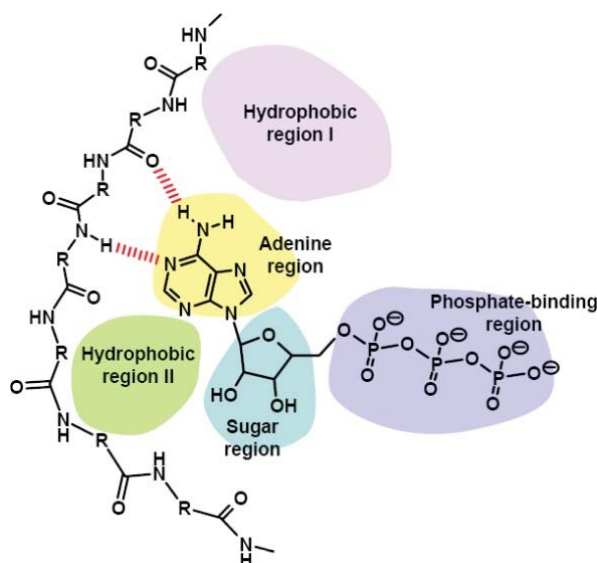
Στους αναστολείς τύπου I^{1/2} περιλαμβάνονται ενώσεις που συνδέονται με την περιοχή πρόσδεσης του ATP, όπως οι αναστολείς τύπου I, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με την περιοχή άρθρωσης. Εν συνεχεία, επεκτείνονται στην οπίσθια κοιλότητα της θέσης του ATP, αναπτύσσοντας ειδικές αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα αμινοξέων, όμοιες με αυτές που εμπλέκονται στους αναστολείς τύπου II ^[163]. Ως εκ τούτου, η κινάση κατά τη δέσμευση ενός αναστολέα τύπου I^{1/2} έχει διαμόρφωση DFG-in και αC-out. Οι αναστολείς αυτοί διακρίνονται περαιτέρω σε αναστολείς I^{1/2} A και I^{1/2} B. Οι αναστολείς τύπου A προσδέονται σε μια DFG-out διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης, με το κατάλοιπο ασπαρτικού προς τα έξω, ενώ επεκτείνονται στην οπίσθια σχισμή. Αντίθετα, οι αναστολείς τύπου B συνδέονται σε μια DFG-out διαμόρφωση με το κατάλοιπο ασπαρτικού προς τα έξω, χωρίς, όμως, να επεκτείνονται στην οπίσθια σχισμή.

Σύμφωνα με έρευνες, οι αναστολείς τύπου A έχουν μεγάλο χρόνο παραμονής (λεπτά έως ώρες), ενώ οι αναστολείς τύπου B έχουν μικρό χρόνο παραμονής (δευτερόλεπτα έως λεπτά).

2.5.2 Χαρακτηριστικά αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Οι περισσότεροι, από τους διαθέσιμους στο εμπόριο, αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι μιμητές του ATP και λειτουργούν ως ανταγωνιστές του. Αυτό σημαίνει πως προσδέονται στη θέση δέσμευσης του ATP, καταλαμβάνοντας την. Έχουν μελετηθεί οι αλληλεπιδράσεις του ATP με πρωτεϊνικές κινάσες, ώστε να επιτευχθεί η σύνθεση αναστολέων που αλληλεπιδρούν με όμοιο τρόπο με την πρωτεϊνική κινάση.

Το ATP προσδέεται στο ενεργό κέντρο της κινάσης μέσω της περιοχής αδενίνης [165]. Αναπτύσσονται δύο δεσμοί υδρογόνου στους οποίους συμμετέχει ένα άτομο αζώτου και ένα άτομο υδρογόνου της περιοχής αδενίνης. Η συντριπτική πλειοψηφία των αναστολέων πρωτεϊνικής κινάσης, διαθέτει δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτύλιους και άτομα αζώτου στη δομή τους, ώστε να είναι ικανοί να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με τη θέση πρόσδεσης του ATP, καταλαμβάνοντάς την. Στο σημείο πρόσδεσης υπάρχει, επίσης, η περιοχή του σακχάρου, δύο υδροφοβικές περιοχές και η περιοχή δέσμευσης φωσφορικών (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: Απεικόνιση της θέσης πρόσδεσης του ATP στην πρωτεϊνική κινάση [166].

Στο σχεδιασμό και τη σύνθεση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, στόχος είναι η διατήρηση τουλάχιστον ενός από τους δύο δεσμούς υδρογόνου, καθώς και η αξιοποίηση των περιοχών που προαναφέρθηκαν, ώστε να επιτευχθεί μεγάλος αριθμός αλληλεπιδράσεων στο σύμπλοκο αναστολέα-κινάσης. Μέσω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο σύμπλοκο, μπορεί να αυξηθεί η εκλεκτικότητα και η συγγένεια πρόσδεσης του αναστολέα.

Οι κανόνες του Lipinski χρησιμεύουν στην αξιολόγηση της διαλυτότητας, της απορρόφησης και της διαπερατότητας των φαρμάκων [167]. Ο κανόνας αυτός (κανόνας του 5) έχει τα εξής σημεία: Το μοριακό βάρος της δραστικής ένωσης θα πρέπει να είναι μικρότερο από 500 ($M.W \leq 500$), ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού θα πρέπει να είναι μικρότερος του 5 ($\log P \leq 5$), ο αριθμός των δοτών δεσμού υδρογόνου θα πρέπει να είναι μικρότερο από 5 ($HBDs \leq 5$), ενώ το άθροισμα των δεκτών δεσμού υδρογόνου θα πρέπει να είναι μικρότερο από 10 ($HBAAs \leq 10$).

Το μοριακό βάρος των αναστολέων, κυμαίνεται από 300 έως 700 g/mol, ώστε να μπορούν να προσδεθούν στη θέση πρόσδεσης του ATP, το οποίο έχει μοριακό βάρος 507.18 g/mol [10]. Ο αριθμός των δοτών δεσμών υδρογόνου του κάθε αναστολέα κυμαίνεται από 1 έως 3, ενώ ο αριθμός των δεκτών δεσμών υδρογόνου κυμαίνεται από 4 έως 10. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού, $\log P$, κυμαίνεται από 1 έως 6.1.

2.5.3 Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών στην καρκινική θεραπεία

Σήμερα, πολλοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, κυρίως μιμητές του ATP, κυκλοφορούν στο εμπόριο ως αντικαρκινικά φάρμακα (Πίνακας 5). Τα φάρμακα αυτά χορηγούνται στη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου. Οι μεγαλύτερες φαρμακευτικές εταιρίες, παγκοσμίως, καθώς και πολλά ερευνητικά εργαστήρια οργανικής χημείας και βιοχημείας, ασχολούνται με τη σύνθεση νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών για στοχευμένη θεραπεία.

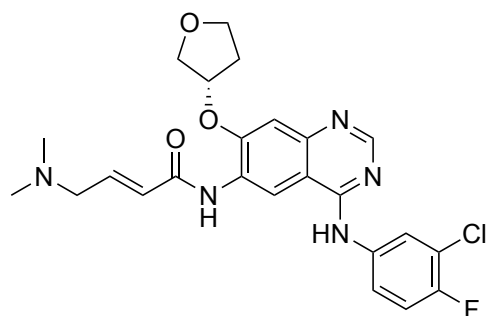
Αναστολέας	Χρονιά έγκρισης	Εταιρία	Βασικός στόχος	MW	D ^d	A ^d	clogP
Abemaciclib	2017	Lilly	CDK4/6	507	1	9	5,2
Acalbrutinib	2017	Acerta Pharma	BTK	466	2	6	1,1
Afatinib	2013	Boehringer Ingelheim	EGFR	486	2	8	4
Alectinib	2015	Hoffman-LaRoche	ALK	483	1	5	4,7
Avapritinib	2020	Blueprint Medicines	PDGFRA	499	1	9	2,8
Axitinib	2012	Pfizer	VEGFR	386	2	4	3,8
Baricitinib	2018	Lilly	JAK1/2	371	1	7	0,3
Binimetinib	2018	Array	MEK1/2	441	3	7	2,6
Bosutinib	2012	Pfizer	BCR-Abl	530	1	8	5
Brigatinib	2017	Ariad	ALK	584	2	9	5,2
Cabozantinib	2012	Exelixis	RET	501	2	7	4,5
Ceritinib	2014	Novartis	ALK	558	3	8	6,1
Cobimetinib	2015	Genentech	MEK	531	3	7	5,1
Crizotinib	2011	Pfizer	ALK	450	2	6	4,4
Dabrafenib	2013	GSK	B-Raf	520	2	11	4,5

Dacomitinib	2018	Pfizer	EGFR	470	2	7	4,8
Dasatinib	2006	Bristol-Myers Squibb	BCR-Abl	488	3	9	3
Encorafenib	2018	Array	B-Raf	540	3	10	3,1
Entrectinib	2019	Ignitya	Trk	561	3	8	5,5
Erdafitinib	2019	Jansen	FGFR 1/2/3/4	447	1	7	4,6
Erlotinib	2004	Genentech	EGFR	393	1	7	3,1
Everolimus	2009	Novartis	FKBP12/mTOR	958	3	14	4,5
Fedratinib	2019	Celgene	JAK-2	525	3	9	4,9
Fostamatinib	2018	Rigel	Syk	580	4	15	1,7
Gefitinib	2003	Astra Zeneca	EGFR	447	1	8	4,5
Gilteritinib	2018	Astellas	Flt3	553	3	10	3
Ibrutinib	2013	Pharmacocyclics and J&J	BTK	441	1	6	3,1
Imatinib	2001	Novartis	BCR-Abl	494	2	7	4,2
Lapatinib	2007	GSK	ErbB2	581	2	9	5
Larotrectinib	2018	Bayer	TRK	428	2	7	2,6
Lenvatinib	2015	Eisai	VEGFR	427	3	5	3,6
Lorlatinib	2018	Pfizer	ALK	406	1	7	2
Midostaurin	2017	Novartis	Flt3	571	1	4	5,3
Neratinib	2017	Puma	ErbB2	557	2	8	5,1
Netarsudil	2018	Aerie Pharm	Rho	454	2	5	4,2
Nilotinib	2007	Novartis	Bcr-Abl	530	2	9	5
Nintedanib	2014	Boehringer Ingelheim	FGFR	540	2	7	3,9
Osimertinib	2015	Astra Zeneca	EGFR	500	2	7	3,4
Palbociclib	2015	Park Davis	CDK4/6	447	2	8	0,3
Pazopanib	2009	GSK	VEGFR	437	2	8	3,8
Pexidartinib	2019	Plexikon	CSF1	418	2	7	4,5
Ponatinib	2012	Ariad	BCR-Abl	533	1	8	4,7
Regorafenib	2012	Bayer	VEGFR	483	3	8	4,8
Ribociclib	2017	Novartis	CDK4/6	435	2	7	2,6
Ruxolitinib	2011	Incyte	JAK	306	1	4	2
Sirolimus	1999	Wyeth	FKBP12/mTOR	914	3	13	4,5
Sorafenib	2005	Onyx	VEGFR	465	3	7	4,6
Sunitinib	2006	Pfizer	VEGFR	398	3	4	3,2
Temsirolimus	2007	Wyeth	FKBP12/mTOR	1029	4	16	4,3
Tofacitinib	2012	Pfizer	JAK3	312	1	5	1
Trametinib	2013	GSK	MEK	615	2	6	3,4
Upadacitinib	2019	AbbVie	JAK	380	2	6	1
Vandetanib	2011	AstraZeneca	VEGFR	475	1	7	5,3
Vemurafenib	2011	Genentech	B-Raf	489	2	7	4,9
Zanubrutinib	2019	BeiGene	BTK	472	2	5	2,7

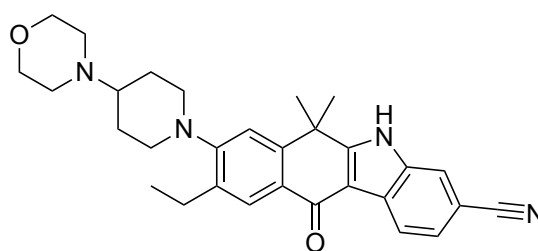
Πίνακας 5: Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που κυκλοφορούν στο εμπόριο ^[10]. MW: μοριακό βάρος της ένωσης, D^d: αριθμός ατόμων δοτών δεσμών υδρογόνου, A^d: αριθμός ατόμων δοτών δεσμών υδρογόνου, cLogP: συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού.

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται οι συντακτικοί τύποι όλων των αναστολέων υποδοχικών τυροσινικών κινασών που χορηγούνται σήμερα σε ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με

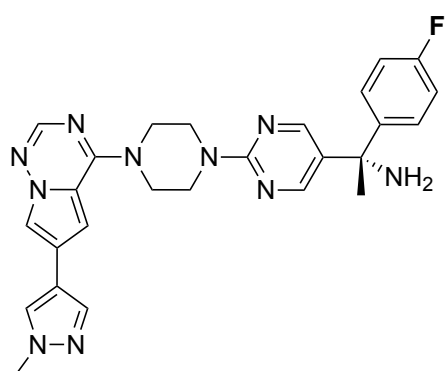
διάφορους τύπους καρκίνου και ακολουθούν στοχευμένη θεραπεία, ενώ στο Σχήμα 5 οι συντακτικοί τύποι όλων των εγκεκριμένων αναστολέων μη υποδοχικών κινάσων.



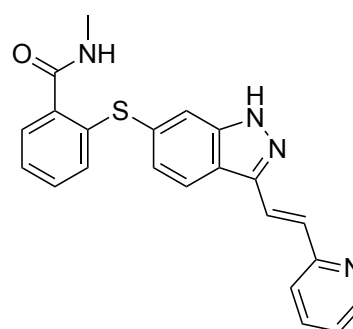
Afatinib



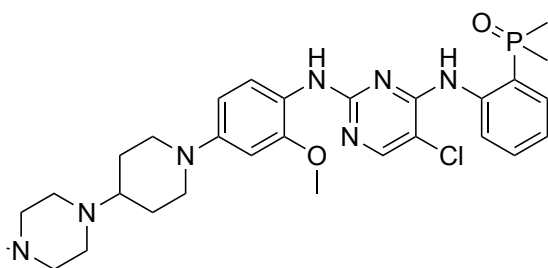
Alectinib



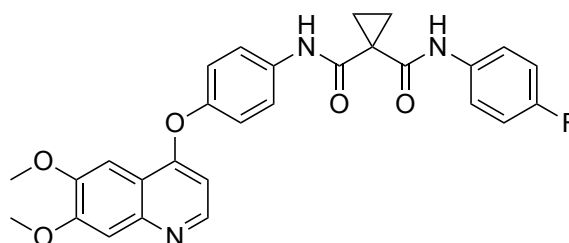
Avapritinib



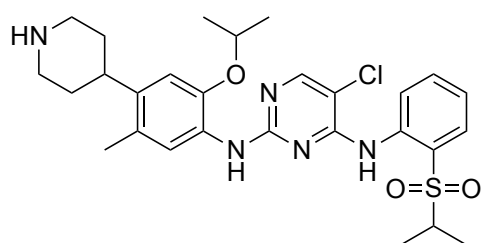
Axitinib



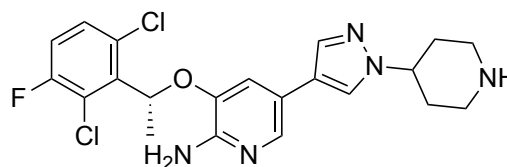
Brigatinib



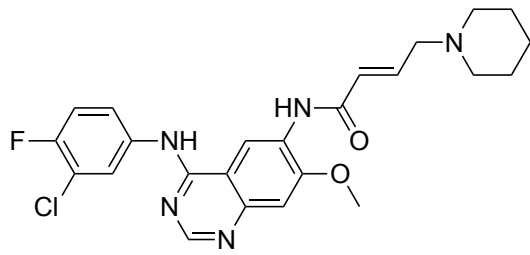
Cabozantinib



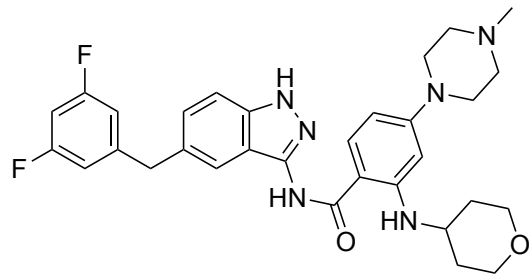
Ceritinib



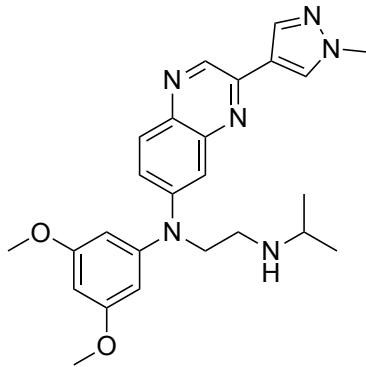
Crizotinib



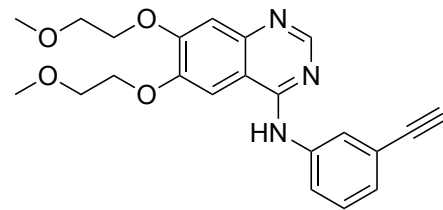
Dacomitinib



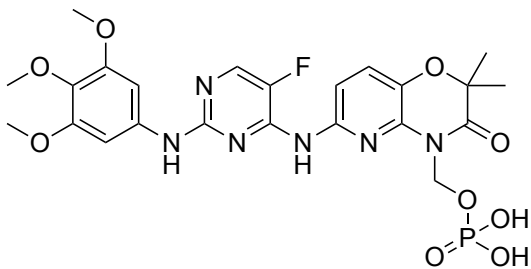
Entrectinib



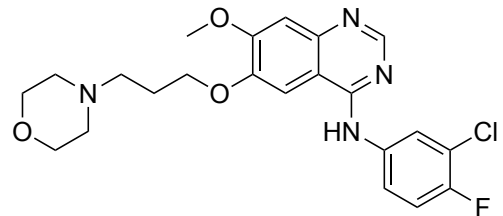
Erdafitinib



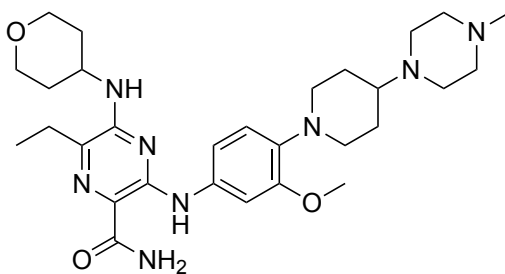
Erlotinib



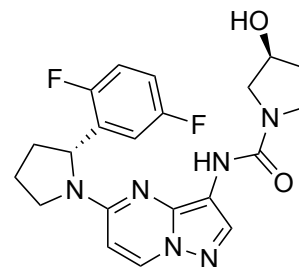
Fostamatinib



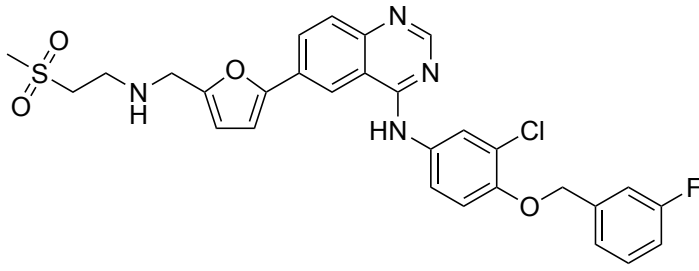
Gefitinib



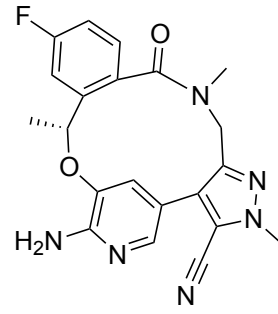
Gilteritinib



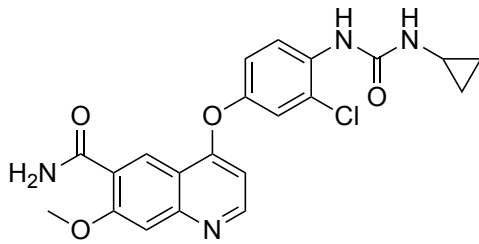
Larotrectinib



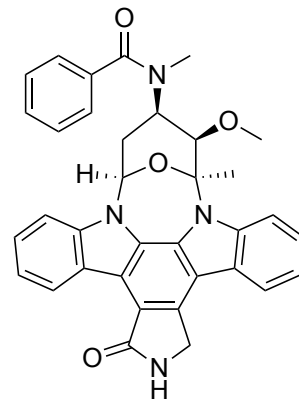
Lapatinib



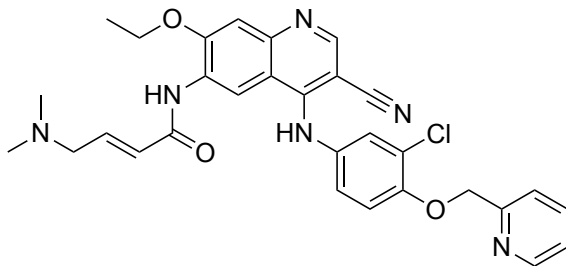
Lorlatinib



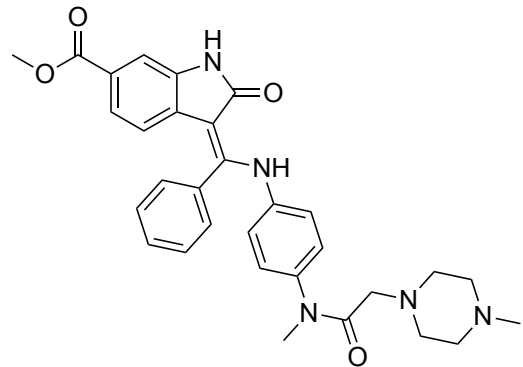
Lenvatinib



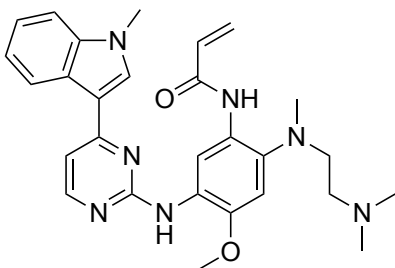
Midostaurin



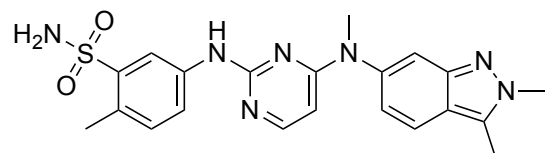
Neratinib



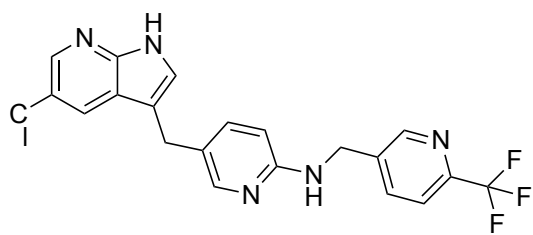
Nintedanib



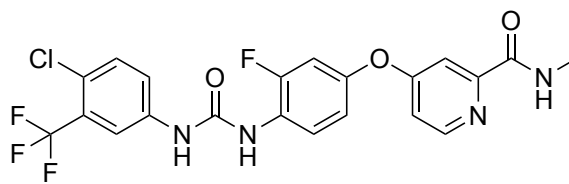
Osimertinib



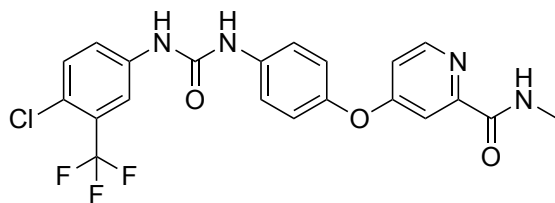
Pazopanib



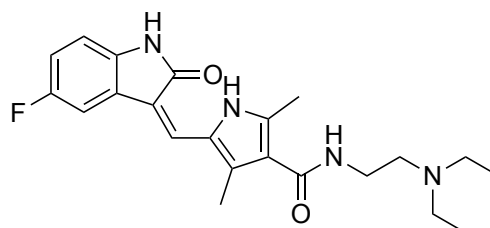
Pexidartinib



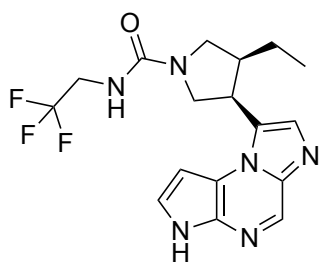
Regorafenib



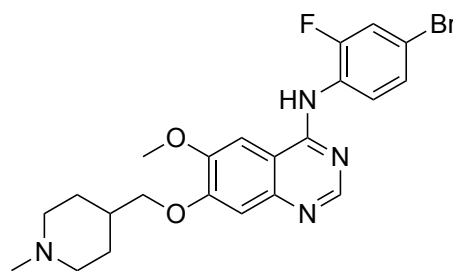
Sorafenib



Sunitinib

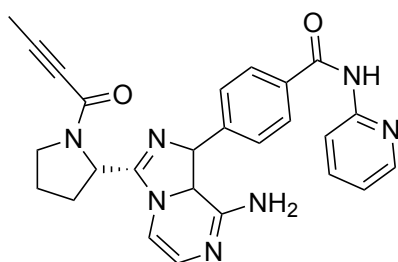


Upadacitinib

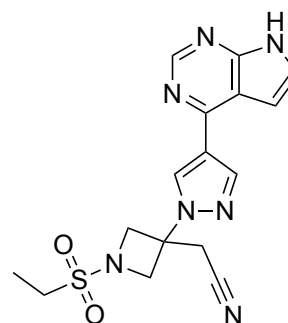


Vandetanib

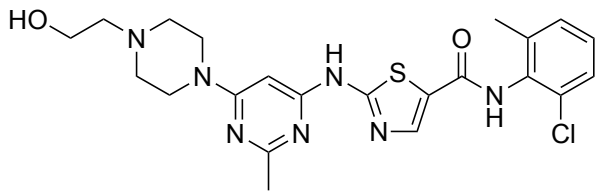
Σχήμα 4: Συντακτικοί τύποι αναστολέων υποδοχικών τυροσινικών κινασών που έχουν εγκριθεί από τον FDA.



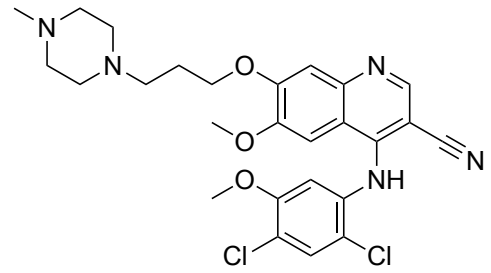
Acalabrutinib



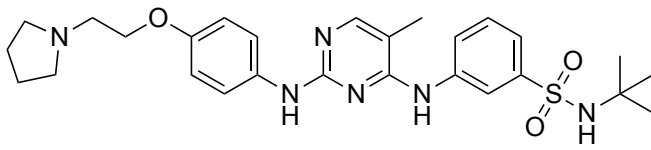
Baricitinib



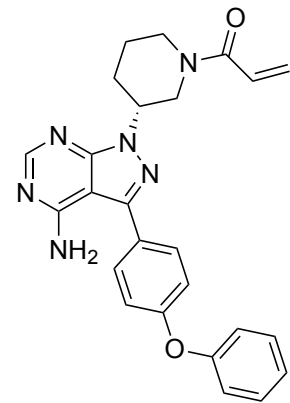
Dasatinib



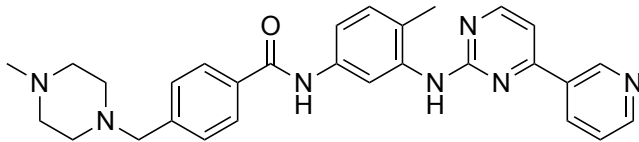
Bosutinib



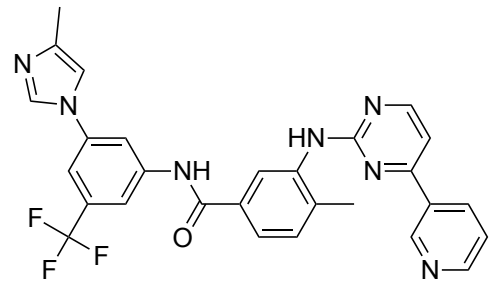
Fedratinib



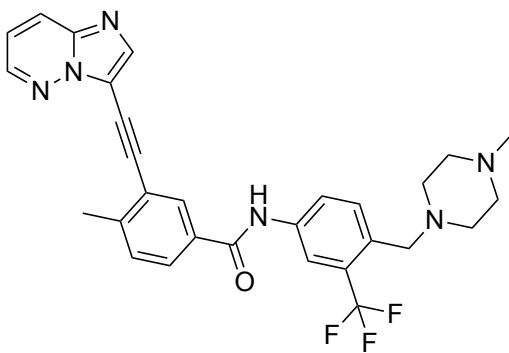
Ibrutinib



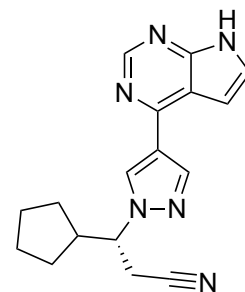
Imatinib



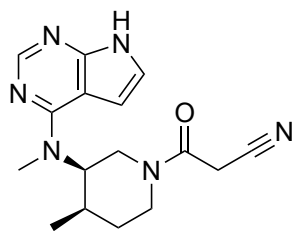
Nilotinib



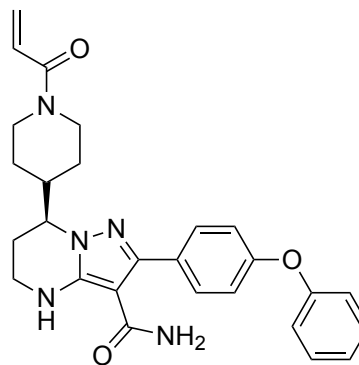
Ponatinib



Ruxolitinib



Tofacitinib



Zanubrutinib

Σχήμα 5: Συντακτικοί τύποι αναστολέων μη υποδοχικών τυροσινικών κινάσων που έχουν εγκριθεί από τον FDA.

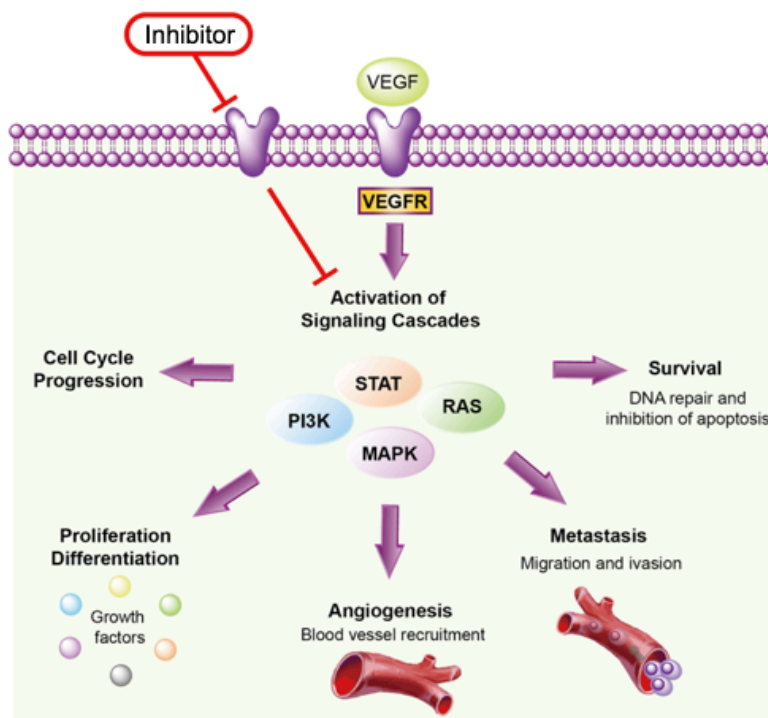
2.5.4 Αναστολείς της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR2

Οι αναστολείς του υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 (VEGFR2) είναι αναστολείς υποδοχικής τυροσινικής κινάσης οι οποίοι εμποδίζουν την αγγειογένεση και τη λεμφαγγειογένεση και χορηγούνται στη στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία. Είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, ανταγωνιστές του ATP. Οι εκλεκτικοί αναστολείς του VEGFR2 είναι ικανοί να διακόπτουν πολλαπλές σηματοδοτικές οδούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη όγκων, όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετάσταση και η αγγειογένεση [168].

Όπως παρουσιάστηκε σε προηγούμενες ενότητες, ο VEGFR2 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη (210-230 kDa) που εκφράζεται σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και συνδέεται με τον VEGFA. Ο VEGFR2 έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τον VEGFR1. Ωστόσο, ο VEGFR2 είναι μια πολύ δραστική κινάση, ενώ ο VEGFR1 έχει πιο ασθενή δράση. Οι προσδέτες VEGF προσδένονται στον VEGFR2, αυτός με τη σειρά του διμερίζεται και ακολουθεί αυτοφωσφορυλίωση των περιοχών με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης. Ο φωσφορυλιωμένος VEGFR2 ενεργοποιεί σηματοδοτικές οδούς, οι οποίες είναι υπερ-ενεργοποιημένες σε μερικούς όγκους. Αυτές οι οδοί σηματοδότησης εμπλέκονται στην αγγειογένεση του όγκου, η οποία διεγείρει την ανάπτυξή του, τροφοδοτώντας τον με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά [169]. Ο VEGFR2 υπερεκφράζεται σε αρκετούς καρκίνους, όπως είναι ο ωοθηκικός, ο θυρεοειδής, το μελάνωμα και το μυελοβλάστωμα [74].

Οι αναστολείς του VEGFR2 προσδένονται στη θέση πρόσδεσης του ATP, στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, εμποδίζοντας την αυτοφωσφορυλίωσή του.

Αναστέλλεται με αυτόν τον τρόπο η ενεργοποίηση ενζυματικών μονοπατιών, με αποτέλεσμα την εμπόδιση της αγγειογένεσης και άλλων διεργασιών, απαραίτητων για την ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 50).



Εικόνα 50: Αναστολή σηματοδοτικών μονοπατιών από τους αναστολείς υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR2.

Αναστολέας VEGFR2	Χρονιά έγκρισης
Axitinib	2012
Cabozantinib	2012
Lenvatinib	2015
Nintedanib	2014
Pazopanib	2009
Regorafenib	2012
Sorafenib	2005
Sunitinib	2006
Vandetanib	2011

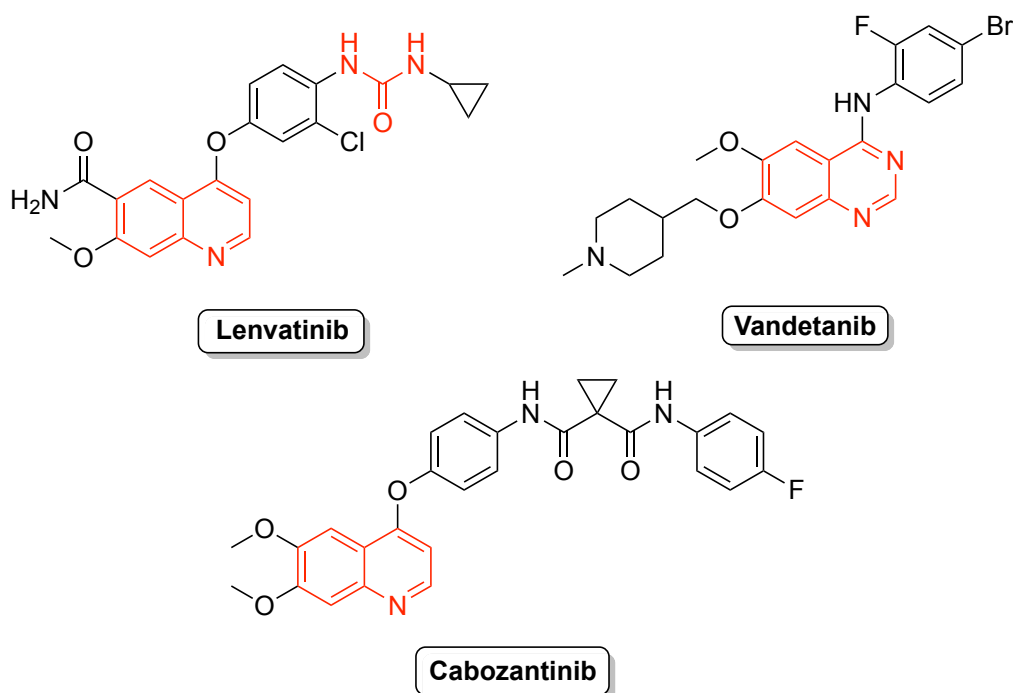
Πίνακας 6: Οι αναστολείς του υποδοχέα VEGFR2 που κυκλοφορούν στο εμπόριο ^[10].

2.5.5 Σχέση δομής - δραστηριότητας (SAR) των αναστολέων της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR2

Όλοι οι αναστολείς της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR2 είναι μιμητές του ATP, ενώ η δομή τους αποτελείται από δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους και

έναν αριθμό ατόμων αζώτου. Συγκεκριμένα, όλοι οι εγκεκριμένοι αναστολείς είναι είτε παράγωγα κινολίνης/κιναζολίνης, είτε παράγωγα ουρίας, είτε παράγωγα ινδολινόνης, είτε παράγωγα πυριδίνης, είτε παράγωγα πυριμιδίνης [170].

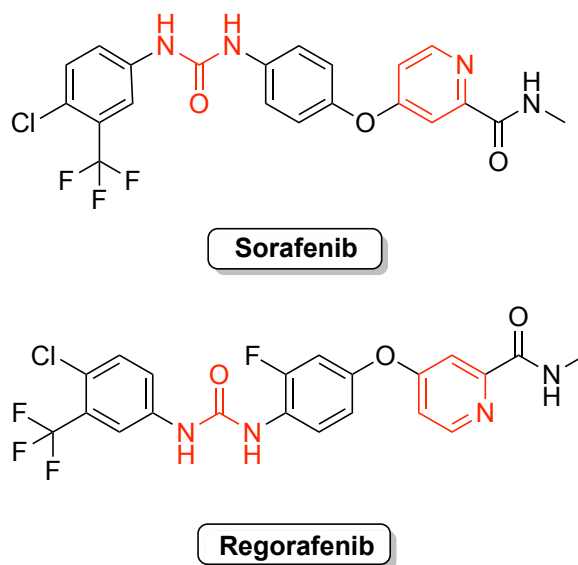
- *Παράγωγα κινολίνης/κιναζολίνης:* Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα Lenvatinib, Cabozantinib, Vandetanib (Σχήμα 6). Το Lenvatinib έχει μία ομάδα κινολίνης και μία ομάδα ουρίας, στις οποίες οφείλεται η αποτελεσματικότητά του. Έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς που εμφανίζει αντίσταση στη θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (DTC), του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) και του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC). Το Cabozantinib έχει μία ομάδα κινολίνης και χορηγείται στη στοχευμένη θεραπεία του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC) και του μυελοειδούς καρκίνου του θυρεοειδούς. Το Vandetanib έχει μία ομάδα κιναζολίνης και εγκρίθηκε για τη θεραπεία όγκων του θυρεοειδούς αδένα [10].



Σχήμα 6: Συντακτικοί τύποι παραγώγων κινολίνης/κιναζολίνης που έχουν εγκριθεί ως αναστολείς του VEGFR2.

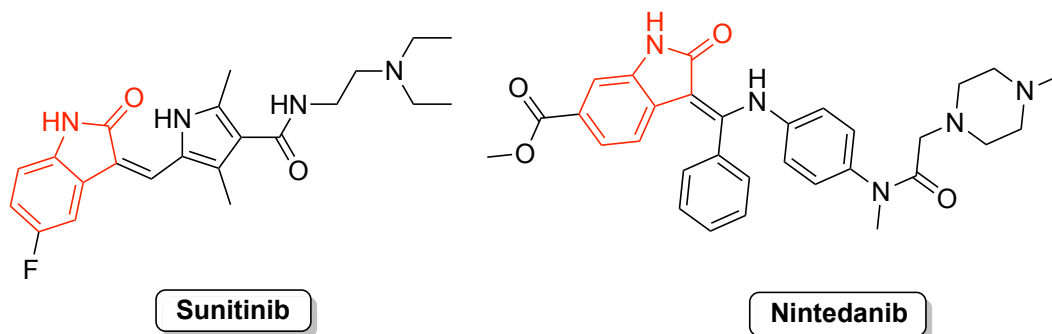
- *Παράγωγα ουρίας:* Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναστολείς Sorafenib και Regorafenib (Σχήμα 7). Αυτοί οι δύο αναστολείς εκτός από μια ομάδα ουρίας διαθέτουν στο μόριό τους και μια ομάδα πυριδίνης. Το Sorafenib έχει εγκριθεί για τη

θεραπεία του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC), του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC) και του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς (DTC). Το Regorafenib χορηγείται στην θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου, του προχωρημένου στρωματικού όγκου του γαστρεντερικού συστήματος (GIST) και του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC) ^[10].



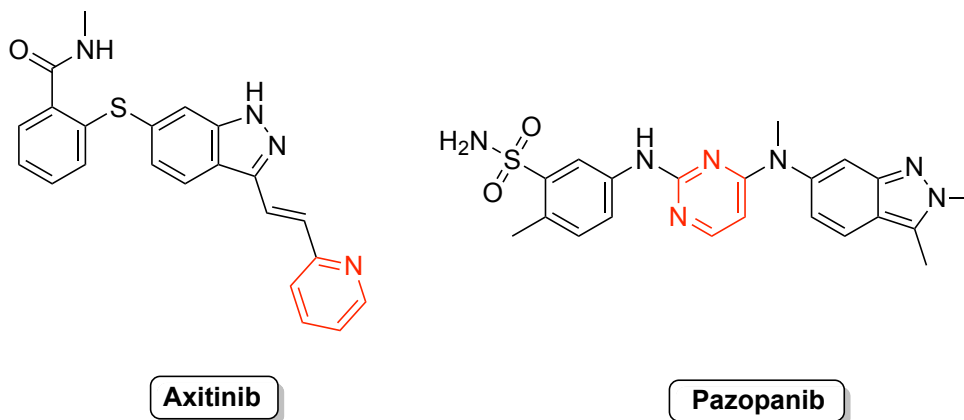
Σχήμα 7: Συντακτικοί τύποι παραγώγων ουρίας που έχουν εγκριθεί ως αναστολείς του VEGFR2.

- **Παράγωγα ινδολινόνης:** Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα φάρμακα Sunitinib και Nintedanib (Σχήμα 8). Το Sunitinib εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC) και για τη θεραπεία του προχωρημένου στρωματικού όγκου του γαστρεντερικού συστήματος (GIST), ανθεκτικού στο Imatinib. Το Nintedanib χορηγείται για τη θεραπεία της ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης και, συνδιαστικά με άλλα φάρμακα, για ορισμένους τύπους μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα ^[10].



Σχήμα 8: Συντακτικοί τύποι παραγώγων ινδολινόνης που έχουν εγκριθεί ως αναστολείς του VEGFR2.

- *Παράγωγα πυριδίνης/πυριμιδίνης.* Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναστολείς Axitinib και Pazopanib (Σχήμα 9). Το Axitinib, το οποίο διαθέτει μια ομάδα πυριδίνης, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη του νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC). Το Pazopanib, το οποίο έχει μια ομάδα πυριμιδίνης, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC) και του σαρκώματος μαλακών μορίων ^[10].

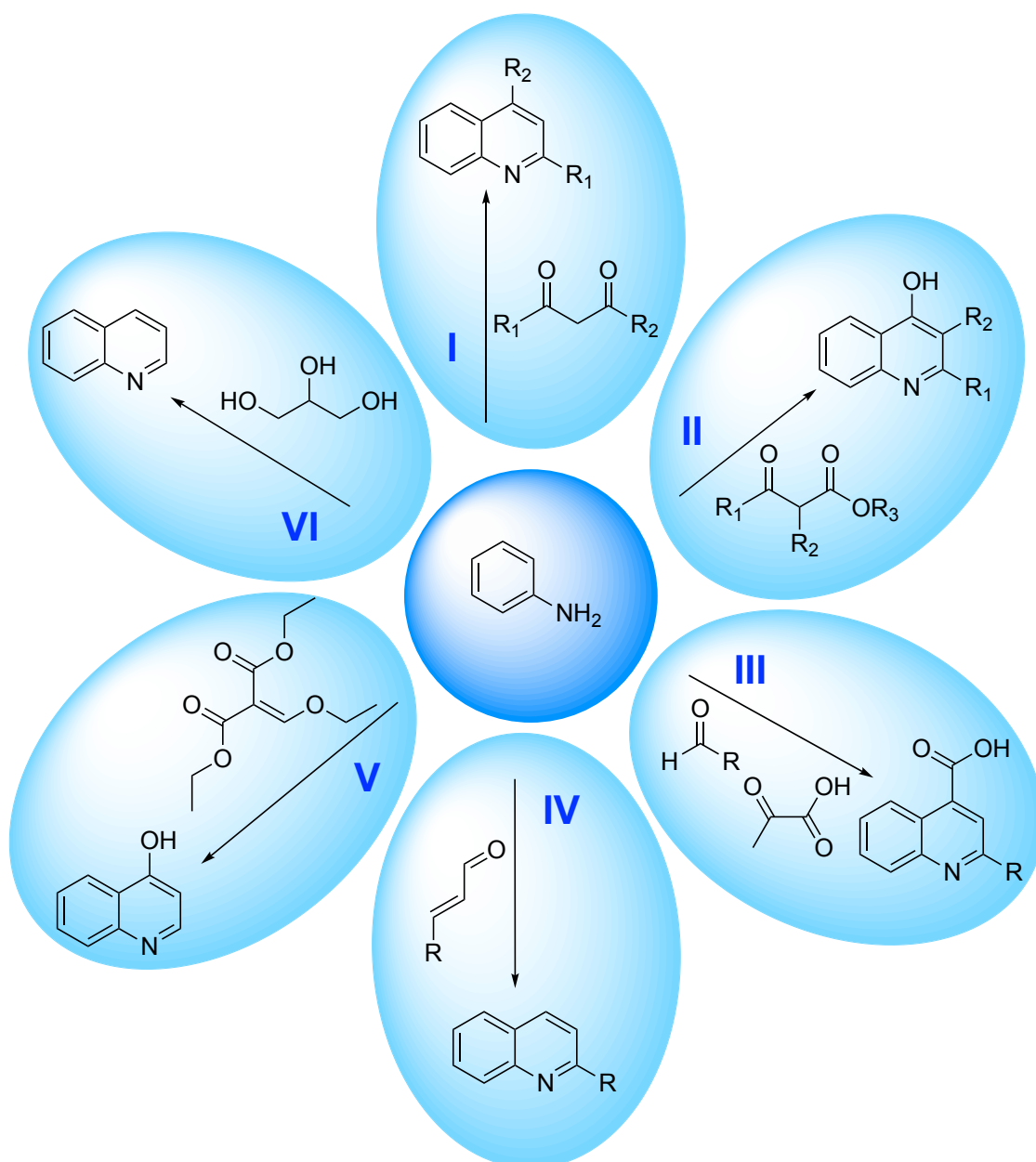


Σχήμα 9: Συντακτικοί τύποι παραγώγων πυριδίνης/πυριμιδίνης που έχουν εγκριθεί ως αναστολείς του VEGFR2.

2.6 Σύνθεση κινολίνης

Η σύνθεση των παραγώγων κινολίνης έχει επικρατήσει στις βιοϊατρικές μελέτες, καθώς οι συνθετικές μέθοδοι είναι αποτελεσματικές και η παραγωγή των ενώσεων αυτών είναι σχετικά χαμηλού κόστους και μπορεί να γίνει σε μεγάλες κλίμακες. Η κινολίνη είναι μια

σημαντική ετεροκυκλική ένωση που χρησιμεύει ως δομικό στοιχείο για πολλές συνθετικές ενώσεις με φαρμακευτική δράση. Η κινολίνη και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται συνήθως σε φάρμακα, μυκητοκτόνα, αντιβιοτικά και βαφές [171]. Οι κινολίνες συχνά συντίθενται κυρίως από απλές ανιλίνες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.

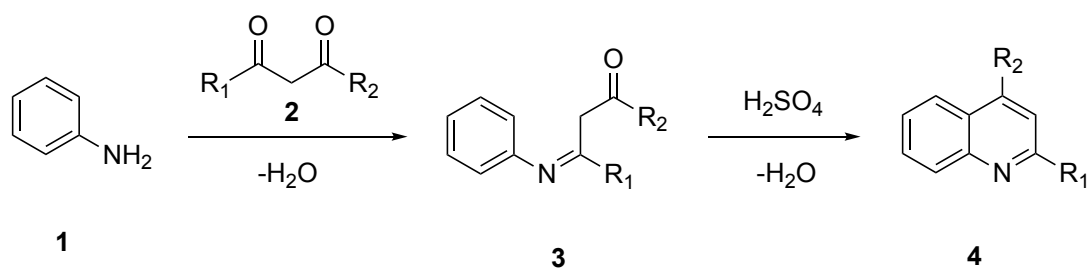


Σχήμα 10: Μέθοδοι σύνθεσης κινολίνης από ανιλίνη.

- Μέθοδος I

Η σύνθεση κινολίνης κατά Combes περιλαμβάνει τη συμπύκνωση της ανιλίνης (1) με β-δικετόνες (2) με ενδιάμεσο σχηματισμό μιας βάσης του Schiff (3), η οποία κυκλοποιείται

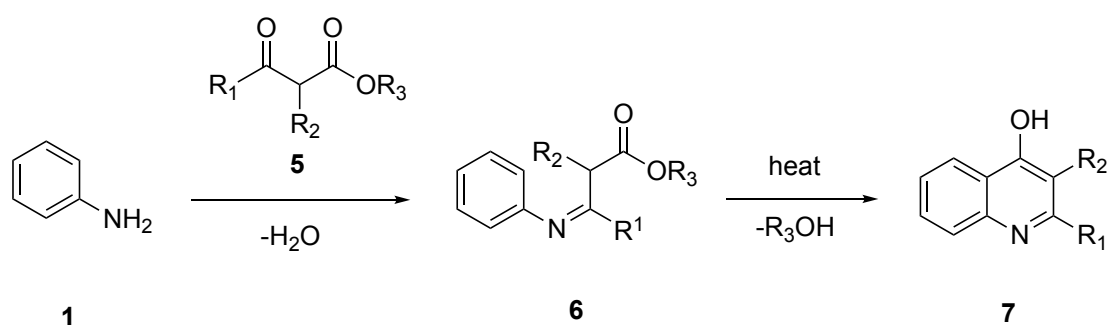
μέσω όξινης κατάλυσης και σχηματίζεται η υποκατεστημένη κινολίνη (**4**). Η αντίδραση αυτή αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Combes το 1888 (Σχήμα 11) ^[172].



Σχήμα 11: Σύνθεση κινολίνης κατά Combes.

- Μέθοδος II

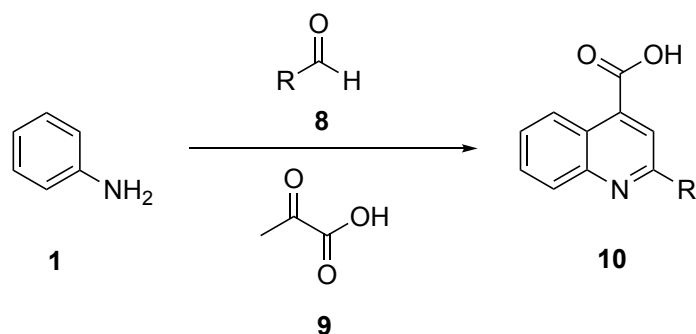
Η σύνθεση κινολίνης κατά Conrad–Limpach περιλαμβάνει τη συμπύκνωση της ανιλίνης (**1**) με β-κετοεστέρες (**5**), ώστε να παραχθεί 4-υδροξυ-κινολίνη (**7**) με ενδιάμεσο σχηματισμό βάσης του Schiff (**6**). Αυτή η αντίδραση ανακαλύφθηκε από τον Max Conrad και Leonhard Limpach το 1887, ενώ μελετούσαν τη σύνθεση παραγώγων κινολίνης (Σχήμα 12) ^[173].



Σχήμα 12: Σύνθεση κινολινών κατά Conrad–Limpach.

- Μέθοδος III

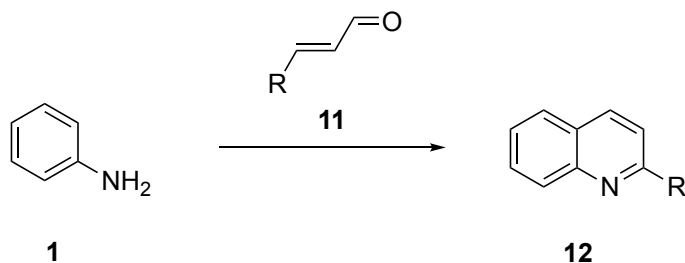
Η σύνθεση κινολίνης κατά Döbner περιλαμβάνει τη χημική αντίδραση μιας ανιλίνης (**1**) με μια αλδεΐδη (**8**) και το πυροσταφυλικό οξύ (**9**), ώστε να σχηματιστούν κινολινο-4-καρβοξυλικά οξέα (**10**) (Σχήμα 13) ^[174].



Σχήμα 13: Σύνθεση κινολινών κατά Döbner.

- Μέθοδος IV

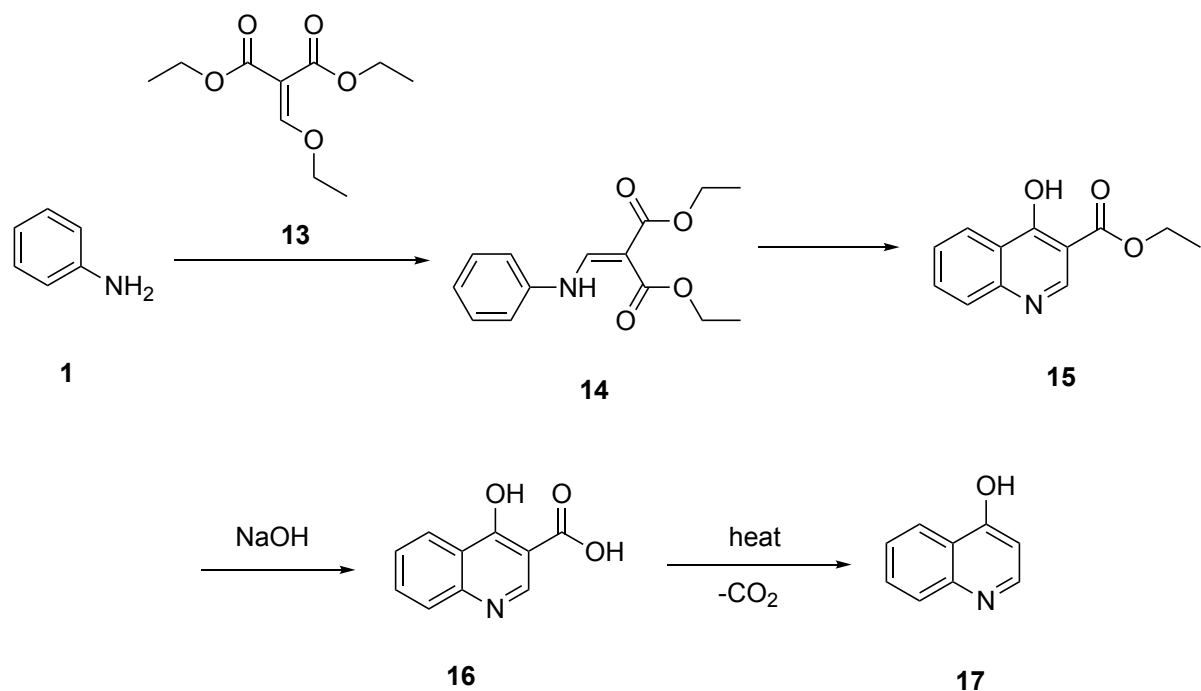
Η αντίδραση Döbner-Miller είναι η οργανική αντίδραση της ανιλίνης (**1**) ή κάποιου παραγώγου της με α, β-ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις (**11**), ώστε να σχηματιστούν 2-υποκατεστημένα παράγωγα κινολίνης (**12**). Η αντίδραση έχει πάρει το όνομά της από τον Τσέχο χημικό Zdenko Hans Skraup και τους Γερμανούς Oscar Döbner και Wilhelm von Miller. Η μέθοδος είναι γνωστή και ως σύνθεση Skraup-Doebner-Von Miller και αν οι καρβονυλικές ενώσεις παράγονται in situ (με αλδολική συμπύκνωση), ονομάζεται και μέθοδος Beyer. Η αντίδραση καταλύεται από οξέα (Σχήμα 14) ^[175].



Σχήμα 14: Σύνθεση κινολινών με αντίδραση Döbner-Miller.

- Μέθοδος V

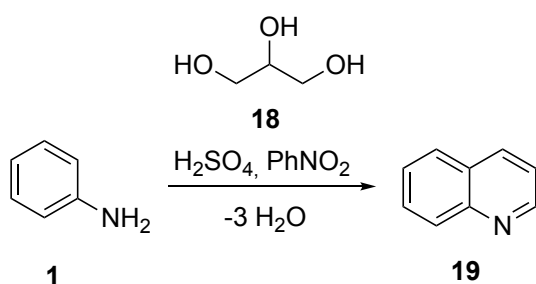
Ένας ακόμη τρόπος σύνθεσης κινολίνης είναι μέσω της αντίδρασης Gould-Jacobs, η οποία στη πραγματικότητα περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων. Η ανιλίνη (**1**) ή κάποιο παράγωγό της πρώτα αντιδρά με μηλονικό οξύ (**13**), ώστε να παραχθεί προϊόν με αντικατάσταση της αιθοξυ-ομάδας από άζωτο (**14**). Στη συνέχεια με κυκλοποίηση, θέρμανση, υδρόλυση σε βασικές συνθήκες με τη χρήση υδροξειδίου του νατρίου και αποκαρβοξυλίωση, προκύπτει τελικά 4-υδροξυ-κινολίνη (**17**) (Σχήμα 15) ^[176].



Σχήμα 15: Σύνθεση κινολινών με αντίδραση Gould-Jacobs.

- Μέθοδος VI

Οι κινολίνες παρασκευάζονται κυρίως με τη σύνθεση Skraup. Η αντίδραση έχει πάρει το όνομά της από τον Τσέχο χημικό Zdenko Hans Skraup. Η ανιλίνη (**1**) θερμαίνεται με θειικό οξύ, γλυκερόλη (**18**) και οξειδωτικά μέσα, όπως το νιτροβενζόλιο, με αποτέλεσμα τη σύνθεση κινολίνης (**19**). Η βίαιη αυτή αντίδραση μετριαάζεται με την προσθήκη θειικού σιδήρου (Σχήμα 16) ^[177].

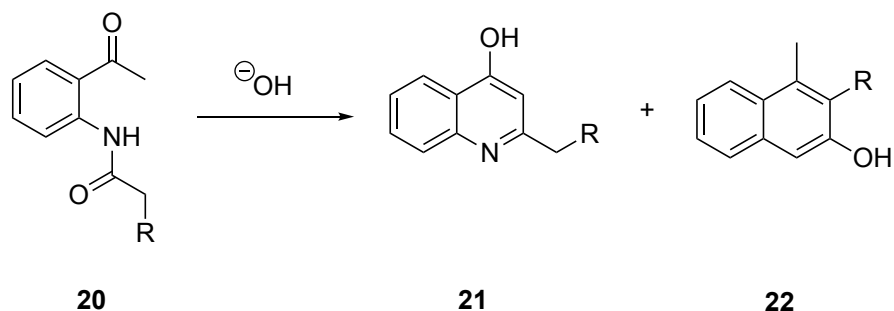


Σχήμα 16: Σύνθεση κινολινών κατά Skraup.

Υπάρχει, επίσης, ένας μεγάλος αριθμός συνθετικών μεθόδων για την παραγωγή κινολίνης που χρησιμοποιούν ως αρχικό αντιδραστήριο μια υποκατεστημένη ανιλίνη ή σχετικές ενώσεις.

- Μέθοδος VII

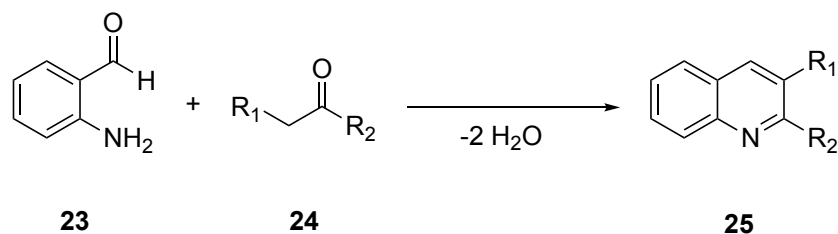
Η σύνθεση Camps, γνωστή και ως κυκλοποίηση Camps, περιλαμβάνει την αντίδραση της ο-ακυλο-αμινο-ακετοφαινόνης (**20**) με ιόντα υδροξυλίου, ώστε να προκύψουν δύο ισομερείς υδροξυ-κινολίνες (**21,22**) με την ομάδα υδροξυλίου στη θέση 4 και 2, αντίστοιχα (Σχήμα 17) [178].



Σχήμα 17: Σύνθεση κινολινών κατά Camps.

- Μέθοδος VIII

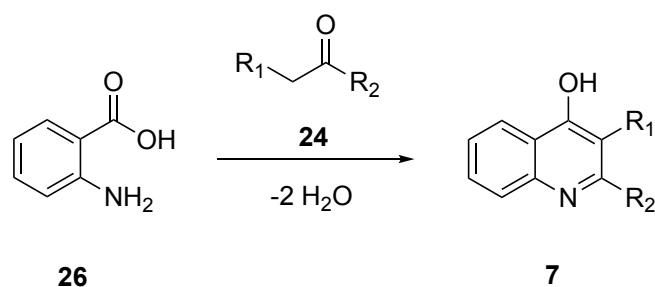
Στη σύνθεση Friedländer, η 2-αμινο-βενζαλδεΐδη (**23**) αντιδρά με μια κετόνη (**24**) σχηματίζοντας παράγωγα κινολίνης (**25**). Η αντίδραση μπορεί να καταλυθεί από οξέα και έχει πάρει την ονομασία της από τον Γερμανό χημικό Paul Friedländer (Σχήμα 18) [179].



Σχήμα 18: Σύνθεση κινολινών κατά Friedländer.

- Μέθοδος IX

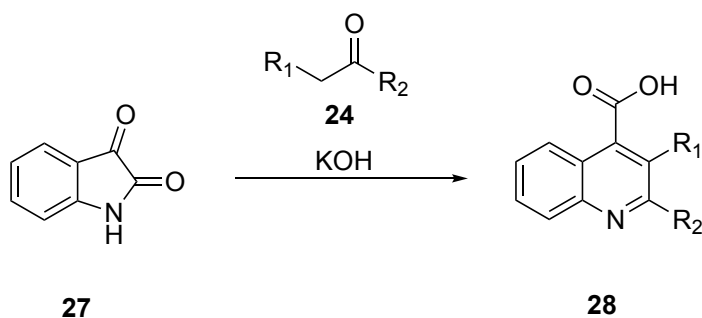
Η σύνθεση κινολίνης κατά Niementowski περιλαμβάνει τη χημική αντίδραση του ανθρανιλικού οξέος (**26**) με κετόνες ή αλδεΐδες, ώστε να σχηματιστούν παράγωγα 4-υδροξυκινολίνης (Σχήμα 19) [180].



Σχήμα 19: Σύνθεση κινολινών κατά Niementowski.

- Μέθοδος Χ

Η αντίδραση Pfitzinger, γνωστή και ως αντίδραση Pfitzinger-Borsche, περιγράφει την αντίδραση της ισατίνης (**27**) με μια βάση και μια καρβονυλική ένωση (**24**), με αποτέλεσμα τη σύνθεση κινολινο-4-καρβοξυλικού οξέος (**28**) (Σχήμα 20) ^[181].



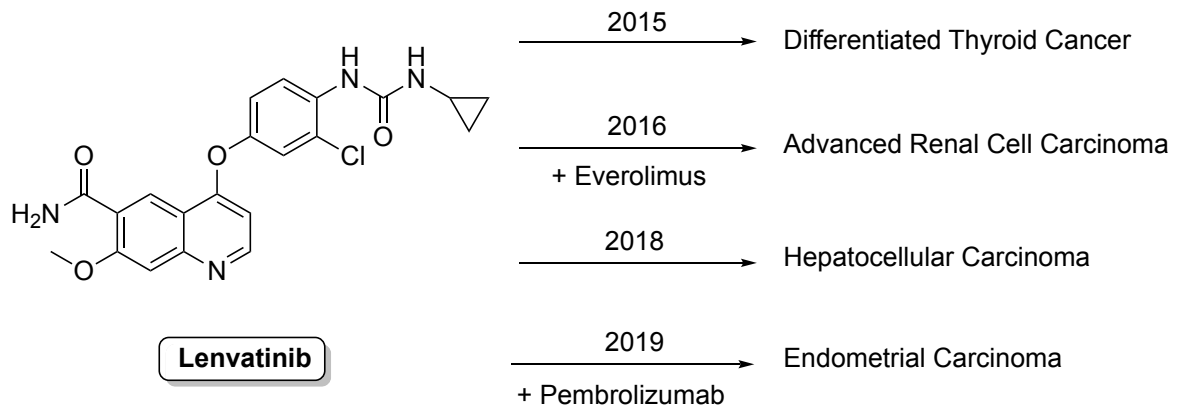
Σχήμα 20: Σύνθεση κινολινών με αντίδραση Pfitzinger.

2.7 Lenvatinib

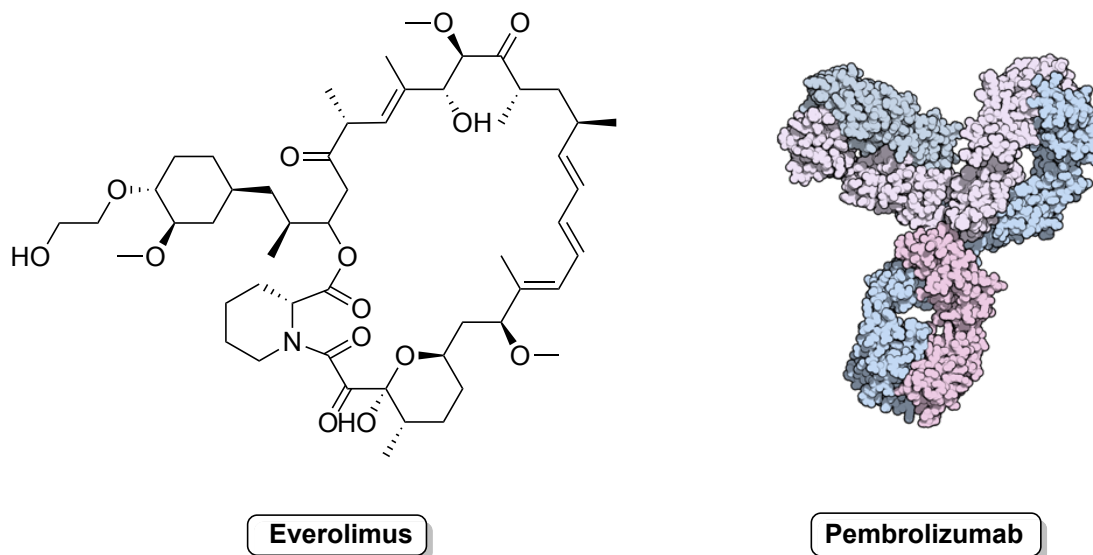
Το Lenvatinib (κωδική ονομασία E7080) κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία Lenvima και είναι ένας μικρού μοριακού βάρους αναστολέας πολλαπλών υποδοχικών τυροσινικών κινασών, ο οποίος αναπτύχθηκε από την Eisai Co. ^[182]. Χορηγείται στη μορφή μεσουλίου άλατος. Τον Φεβρουάριο του 2015, ο FDA ενέκρινε το Lenvatinib για τη θεραπεία του διαφοροποιημένου, ανθεκτικού σε ραδιενεργό ιώδιο καρκίνου του θυρεοειδούς (Differentiated Thyroid Cancer, DTC). Τον Μάιο του 2015, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) ενέκρινε το φάρμακο για την ίδια ένδειξη ^[183]. Τον Μάιο του 2016, ο FDA το ενέκρινε (σε συνδυασμό με everolimus) για τη θεραπεία του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC), εφόσον προηγηθεί αντι-αγγειογόνος θεραπεία. Τον Αύγουστο του 2018, ο FDA το ενέκρινε για τη θεραπεία πρώτης γραμμής των ασθενών με μη

αναστρέψιμο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Τέλος, τον Σεπτέμβριο του 2019 εγκρίθηκε για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο καρκίνωμα του ενδομητρίου σε συνδυασμό με το Pembrolizumab (Σχήμα 21).

A.



B.



Σχήμα 21: A: Χημική δομή του Lenvatinib και χρονολογία έγκρισης για χορήγηση στον εκάστοτε τύπο καρκίνου. **B: Αριστερά:** Χημική δομή του Everolimus. **Δεξιά:** Δομή του Pembrolizumab.

Συγκεκριμένα, το Lenvatinib αναστέλλει τις δραστηριότητες κινάσης των υποδοχέων αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1) και VEGFR3 (Flt4) ^[184]. Η λεμβατινίμη αναστέλλει, επίσης, άλλους υποδοχείς τυροσινικών κινασών που εμπλέκονται στην παθολογική αγγειογένεση, την ανάπτυξη όγκου και την πρόοδο του καρκίνου, καθώς και στις φυσιολογικές κυτταρικές τους λειτουργίες. Οι υποδοχείς αυτοί είναι οι υποδοχείς του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (Fibroblast Growth Factor, FGF) FGFR1/2/3/4, ο υποδοχέας αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα

άλφα (Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha, PDGFRa), καθώς και τα πρωτογονίδια c-KIT και RET.

Το *Everolimus* είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της mTOR, η οποία είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης ^[185]. Η απορρυθμισμένη λειτουργία της κινάσης αυτής είναι πολύ συχνό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, καθώς εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την κυτταρική κινητικότητα, την κυτταρική επιβίωση, τη σύνθεση πρωτεϊνών, την αυτοφαγία και τη μεταγραφή.

Το *Pembrolizumab* είναι ένα εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο χρησιμοποιείται στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου ^[186]. Προσδένεται στον υποδοχέα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου-1 (PD-1), παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τους υποκαταστάτες προγραμματισμένου θανάτου PD-L1 και PD-L2. Ο υποδοχέας PD-1 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της δραστηριότητας των T-κυττάρων, που εμπλέκεται στον έλεγχο των ανοσολογικών ανταποκρίσεων των T-κυττάρων.

Φαρμακοκινητικές ιδιότητες

Έπειτα από μία εφάπαξ από του στόματος δόση των 10 mg, η λενβατινίμη απορροφάται ταχέως και η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα (C_{max}) επιτυγχάνεται 1-4 ώρες μετά τη δόση (ο διάμεσος χρόνος έως C_{max}/t_{max} είναι 2 h) ^[187]. Η τροφή δεν έχει σημαντική επίδραση στις φαρμακοκινητικές (PK) ιδιότητες του Lenvatinib, συνεπώς το φάρμακο μπορεί να χορηγηθεί ανεξάρτητα από το γεύμα ^[188]. Ο χρόνος ημιζωής ($t_{1/2}$) του φαρμάκου ισούται με 28 ώρες και η βιοδιαθεσιμότητα φτάνει το 85%. Το Lenvatinib μεταβολίζεται εκτενώς σε ανθρώπους μέσω ενζυματικών (> 80% από CYP3A4) και μη ενζυματικών οδών. Ο μέσος όγκος κατανομής (V_d) της πρώτης δόσης υπολογίζεται μεταξύ 50.5-92 L, με τη δόση του φαρμάκου να κυμαίνεται από 3.2 έως 32 mg. Συνδέεται εκτεταμένα με πρωτεΐνες του ανθρώπινου πλάσματος (98-99%), κυρίως με την αλβουμίνη, μεταβολίζεται από το ήπαρ και εκκρίνεται μέσω των κοπράνων και των ούρων ^[187].

Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες

Υπολογίστηκαν οι τιμές IC_{50} με τη δόση φαρμάκου κυμαίνεται από 0.3–10,000 nmol/L (Πίνακας 7) ^[189]. Η τιμή IC_{50} αντιπροσωπεύει τη ποσότητα φαρμάκου που χρειάζεται για την αναστολή in vitro της αντίστοιχης τυροσινικής κινάσης κατά 50%. Το Lenvatinib έδειξε ισχυρή

δραστικότητα αναστολής πολλαπλών κινασών με ανταγωνιστικό τρόπο. Οι κινάσες που έδειξαν να επηρεάζονται περισσότερο ήταν οι VEGFR1/2/3. Άλλοι αγγειογόνοι παράγοντες οι οποίοι έδειξαν να επηρεάζονται από το Lenvatinib ήταν ο RET, ο KIT, ο FGFR1/2/3/4 και ο PDGFRa. Οι διάφορες τιμές της σταθεράς αναστολής (Ki) καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις του φαρμάκου οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 0.3–260 nmol/L, καθώς και 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις του ATP. Όσο μικρότερη είναι η Ki, τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια πρόσδεσης του φαρμάκου με τη πρωτεϊνική κινάση. Το lenvatinib αναστέλλει πιο αποτελεσματικά την οικογένεια VEGFR.

Κινάση	IC ₅₀ (nmol/L)	Ki (nmol/L)
VEGFR1	4.7	1.3
VEGFR2	3.0	0.74
VEGFR3	2.3	0.71
RET	6.4	1.5
KIT	85	11
FGFR1	61	22
FGFR2	27	8.2
FGFR3	52	15
FGFR4	43	-
PDGFRa	29	-

Πίνακας 7: Τιμές IC₅₀ (nmol/L), Ki (nmol/L) για την κάθε πρωτεϊνική κινάση που αναστέλλει το Lenvatinib ^[189].

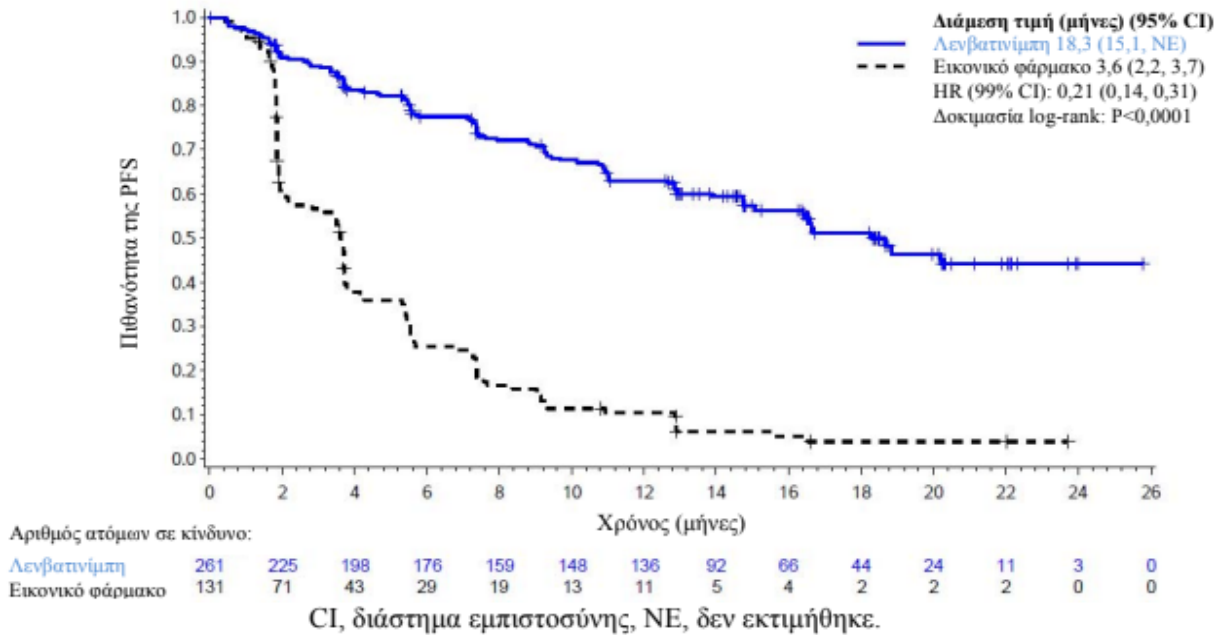
Παρενέργειες

Η υπέρταση ήταν η συχνότερη ανεπιθύμητη ενέργεια στις μελέτες (73% των ασθενών), ακολουθούμενη από διάρροια (67%) και κόπωση (67%). Άλλες συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν ήταν η μειωμένη όρεξη, η υπόταση (χαμηλή αρτηριακή πίεση), η θρομβοπενία (χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων), η ναυτία και ο πόνος στους μύς και στα οστά ^[184].

Αποτελεσματικότητα

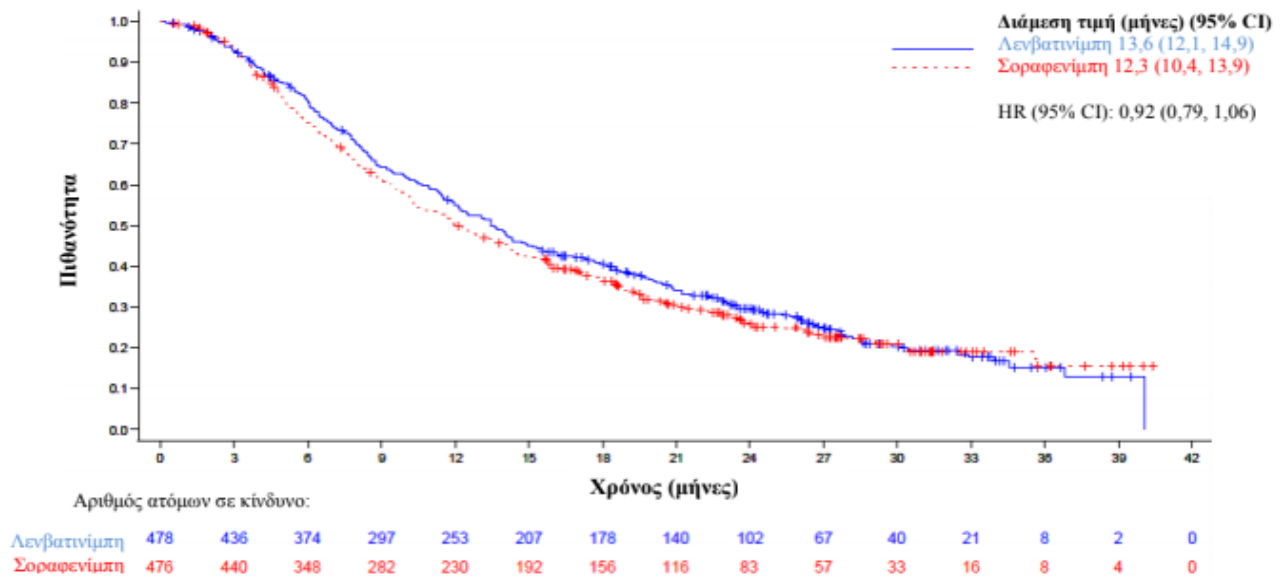
Το κύριο σημείο για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς (DTC), σύμφωνα με τη μελέτη SELECT, ήταν η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression Free Survival, PFS) ^[190]. Μια στατιστικά

σημαντική παράταση στην μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου αποδείχτηκε σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με λενβατινίπη (18.3 μήνες), σε σύγκριση με τους ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο (3.6 μήνες). Η θετική επίδραση στην PFS παρατηρήθηκε σε όλες τις υποομάδες της ηλικίας (άνω ή κάτω των 65 ετών), του φύλου, της φυλής, του ιστολογικού υποτύπου και της γεωγραφική περιοχής. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 51).



Εικόνα 51: Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα κλινικών μελετών σε ασθενείς με διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς. Με μπλε καμπύλη απεικονίζεται της PFS των ασθενών που λαμβάνουν Λενβατινίπη, σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα κατά το οποίο λαμβάνουν το φάρμακο. Με τη καμπύλη μαύρου χρώματος απεικονίζεται η αντίστοιχη πιθανότητα για τους ασθενείς οι οποίοι έλαβαν το εικονικό φάρμακο ^[190].

Εκτιμήθηκε, επίσης, η αποτελεσματικότητα του Lenvatinib από τη μελέτη REFLECT σε ασθενείς με προχωρημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) ^[190]. Σε σύγκριση με το Sorafenib, το οποίο χορηγείται επίσης για τον καρκίνο αυτό, το Lenvatinib εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά μέσης επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) (7.3 μήνες) και μέσης συνολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) (13.6 μήνες), όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 52).

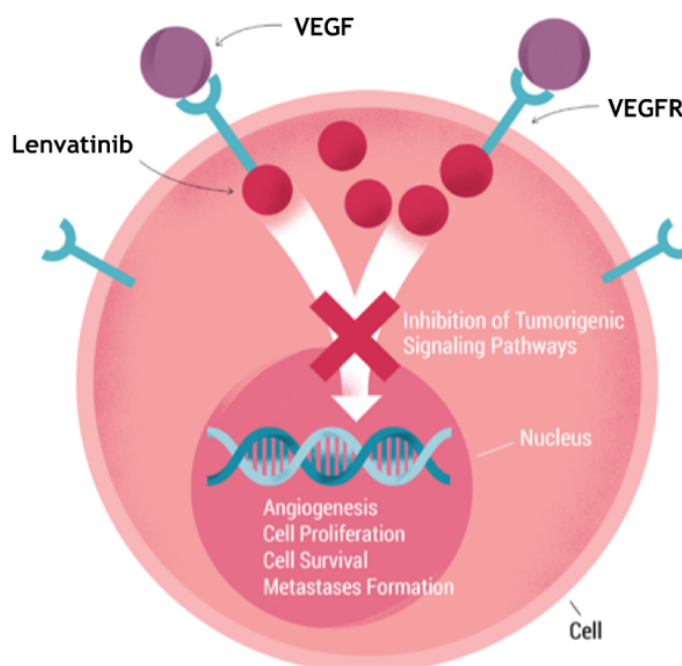


Εικόνα 52: Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα αποτελέσματα κλινικών μελετών σε ασθενείς με προχωρημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Με μπλε καμπύλη απεικονίζεται η πιθανότητα συνολικής επιβίωσης (OS) των ασθενών σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα κατά το οποίο λαμβάνουν λεμβατινίμη και αντίστοιχα σοραφενίμη με την καμπύλη κόκκινου χρώματος ^[190].

2.7.1 Μηχανισμός δράσης του Lenvatinib και αλληλεπιδράσεις με τον VEGFR2

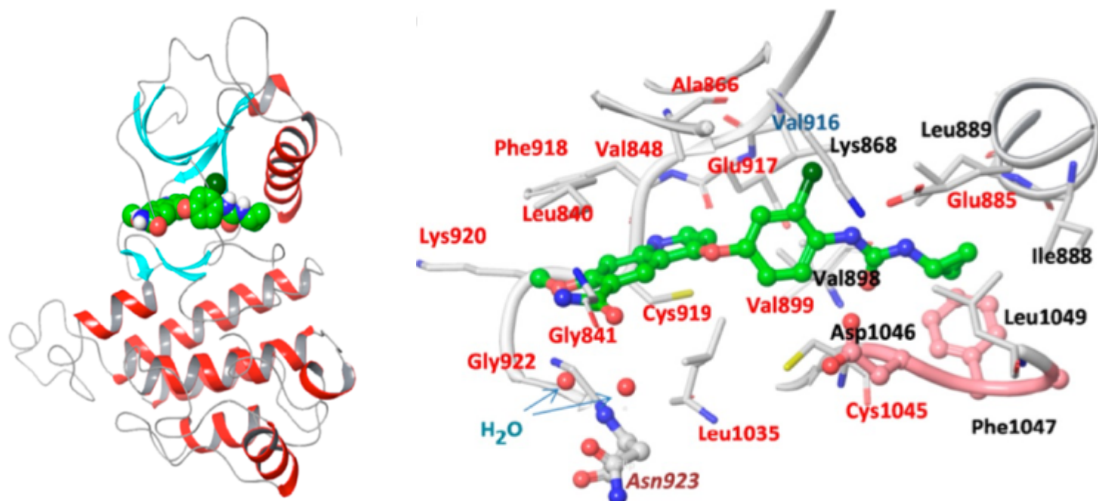
Το Lenvatinib είναι ένας αδενινικός μιμητής, ο οποίος προσδένεται σε υποδοχικές τυροσινικές κινάσες, καταλαμβάνοντας τη θέση πρόσδεσης του ATP. Είναι παράγωγο κινολίνης και μέσω του δακτυλίου αυτού προσδένεται στη θέση πρόσδεσης του ATP στις τυροσινικές κινάσες. Με την πρόσδεση αυτή εμποδίζει τον διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση των τυροσινικών κινασών, αναστέλλοντας την δράση τους ^[191]. Αναστέλλει αποτελεσματικά τους υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1), VEGFR3 (Flt4). Εμφανίζει ανασταλτική δράση, επίσης, στους υποδοχείς του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (Fibroblast Growth Factor, FGF) FGFR1/2/3/4, στον υποδοχέα αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα άλφα (Platelet Derived Growth Factor Receptor alpha, PDGFRa), καθώς και στα πρωτο-ογκογονίδια c-KIT και RET. Αναστέλλοντας τη δράση των κινασών αυτών, το Lenvatinib επιτυγχάνει τον αποκλεισμό της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης, αναστέλλοντας σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα PI3K/AKT/mTOR και MAPK/ERK. Μέσω της αναστολής αυτής εμποδίζεται η αγγειογένεση, καθώς και άλλες διεργασίες απαραίτητες για την ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 53). Χωρίς τη

δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων, ο κακοήθης όγκος αδυνατεί να τροφοδοτηθεί με θρεπτικά συστατικά και να αναπτυχθεί [192].



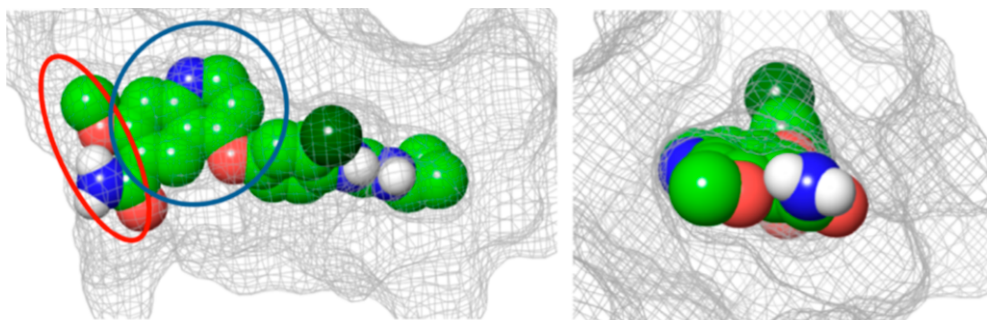
Εικόνα 53: Αναστολή της τυροσινικής κινάσης VEGFR από το Lenvatinib [193].

Η κινητική ανάλυση αποκάλυψε ότι η λενβατινίμη σχηματίζει γρήγορα και σε μεγάλο ποσοστό σύμπλοκο με τον VEGFR2, ενώ ο χρόνος που μεσολαβεί μέχρι να διασπαστεί το σχηματιζόμενο σύμπλοκο είναι σχετικά μεγάλος [164]. Η ανάλυση της συγκρυσταλλικής δομής κατέδειξε ότι η λενβατινίμη δεσμεύεται μέσω της κινολίνης στη θέση πρόσδεσης του ATP και μέσω του δακτυλίου κυκλοπροπανίου στην γειτονική περιοχή, υιοθετώντας τη διαμόρφωση DFG-in (Εικόνα 54). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η λενβατινίμη είναι πολύ ξεχωριστή στον τρόπο δέσμευσης και αλληλεπίδρασής της σε σύγκριση με τους διάφορους εγκεκριμένους αναστολείς τυροσινικής κινάσης του VEGFR2. Είναι αντιστρεπτός αναστολέας τύπου V, καθώς μπορεί να δεσμευθεί τόσο στη θέση δέσμευσης ATP όσο και στη γειτονική αλλοστερική περιοχή του VEGFR2 σε διαμόρφωση DFG-in και έχει υψηλή εκλεκτικότητα κινάσης.



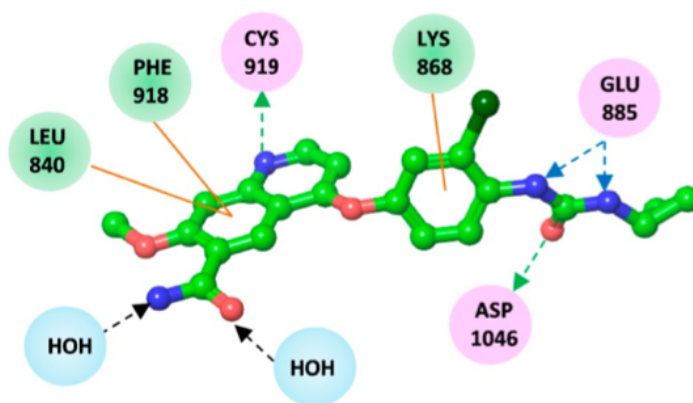
Εικόνα 54: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Lenvatinib-VEGFR2. **Αριστερά:** Με μπλε χρώμα εμφανίζεται η δομή β-φύλλου, οι α-έλικες με κόκκινο χρώμα και άλλα δομικά στοιχεία με γκρι χρώμα. **Δεξιά:** Τα άτομα άνθρακα του τομέα DFG φαίνονται με ροζ χρώμα. Στη δομή του lenvatinib με ανοιχτό πράσινο χρώμα υποδεικνύονται τα άτομα άνθρακα, με κόκκινο χρώμα τα άτομα οξυγόνου, με μπλε χρώμα τα άτομα αζώτου και με σκούρο πράσινο χρώμα τα άτομα χλωρίου. Τα ονόματα καταλοίπων στις θέσεις δέσμησης ATP υποδεικνύονται με κόκκινα γράμματα και στις γειτονικές περιοχές με μαύρα γράμματα. Το κατάλοιπο στην περιοχή της εισόδου, Val916, υποδεικνύεται από τα μπλε γράμματα και το κατάλοιπο Asn923, το οποίο αλληλεπιδρά με το lenvatinib με τη μεσολάβηση μορίων νερού, υποδεικνύεται με γράμματα καφέ ^[164].

Το Lenvatinib καταλαμβάνει πλήρως τη θέση πρόσδεσης του δακτυλίου αδενίνης και εκδηλώνει ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εντός της περιοχής εισόδου (Εικόνα 55). Οι αλληλεπιδράσεις με τη περιοχή εισόδου συνεισφέρουν συχνά στην αύξηση της εκλεκτικότητας, λόγω της ποικιλομορφίας και της διαμόρφωσής της αλληλουχίας της και μπορεί να επηρεάσει θετικά τον χρόνο παραμονής εντός του καταλυτικού κέντρου ^{[194], [195]}.



Εικόνα 55: Σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2. Η θέση πρόσδεσης του ATP υποδεικνύεται από τον μπλε κύκλο και η περιοχή εισόδου από τον κόκκινο κύκλο. **Αριστερά:** Προβολή από την N-τερματική περιοχή του VEGFR2. **Δεξιά:** Προβολή από την περιοχή εισόδου του VEGFR2 ^[164].

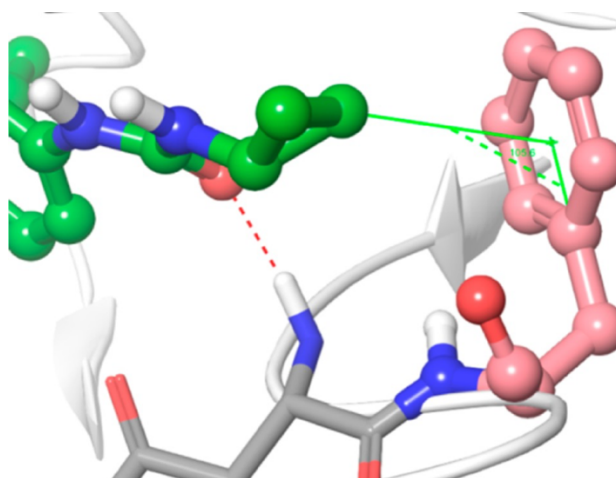
Ταυτοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2 (Εικόνα 56). Οι τρεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στην ομάδα ουρίας του Lenvatinib και τα κατάλοιπα Glu885 και Asp1046, ενώ η άλλη ανάμεσα στο κατάλοιπο Cys919 και το άζωτο της κινολίνης. Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals, στις οποίες εμπλέκονται τα κατάλοιπα Phe918, Leu840 και Lys868 είναι συνολικά τρεις. Αναπτύσσονται, επίσης, δύο υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην αμιδική ομάδα και το κατάλοιπο Asp923, μέσω της μεσολάβησης δύο μορίων νερού ^[164].



Εικόνα 56: Αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2. Τα κατάλοιπα που εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις μέσω φορτίων ή σε πολικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται σε ροζ κύκλους. Τα υπολείμματα που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις Van der Waals εμφανίζονται σε πράσινους κύκλους. Μόρια νερού που γεφυρώνουν το Lenvatinib και το κατάλοιπο Asp923 παρουσιάζονται σε γαλάζιους κύκλους. Οι αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων παριστάνονται με μπλε διακεκομμένα βέλη που κατευθύνονται προς τον δότη ηλεκτρονίων. Οι αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με κύριες αλυσίδες αμινοξέων αντιπροσωπεύονται από πράσινα διακεκομμένα βέλη που κατευθύνονται προς τον δότη ηλεκτρονίων και τα μαύρα βέλη δείχνουν ένδειξη αλληλεπίδρασης δεσμού υδρογόνου με μόρια νερού. Οι αλληλεπιδράσεις π αντιπροσωπεύονται από πορτοκαλί γραμμές. Στη δομή του Lenvatinib με ανοιχτό πράσινο χρώμα υποδεικνύονται τα άτομα άνθρακα, με κόκκινο χρώμα τα άτομα οξυγόνου, με μπλε χρώμα τα άτομα αζώτου και με σκούρο πράσινο χρώμα τα άτομα χλωρίου ^[164].

Ο δακτύλιος κυκλοπροπανίου του Lenvatinib εκδηλώνει μία π αλληλεπίδραση με τον δακτύλιο φαινυλίου του καταλοίπου Phe1047 του βρόγχου DFG (Εικόνα 57). Αν και η αλληλεπίδραση π είναι μία από τις ασθενέστερες μοριακές αλληλεπιδράσεις, μερικές φορές παίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του προσδέτη στην πρωτεΐνη. Σε αυτή την

αλληλεπίδραση π οφείλεται η παράταση του χρόνου παραμονής της λενβατινίμπης σε σύμπλοκο με τον VEGFR2 ^[164].

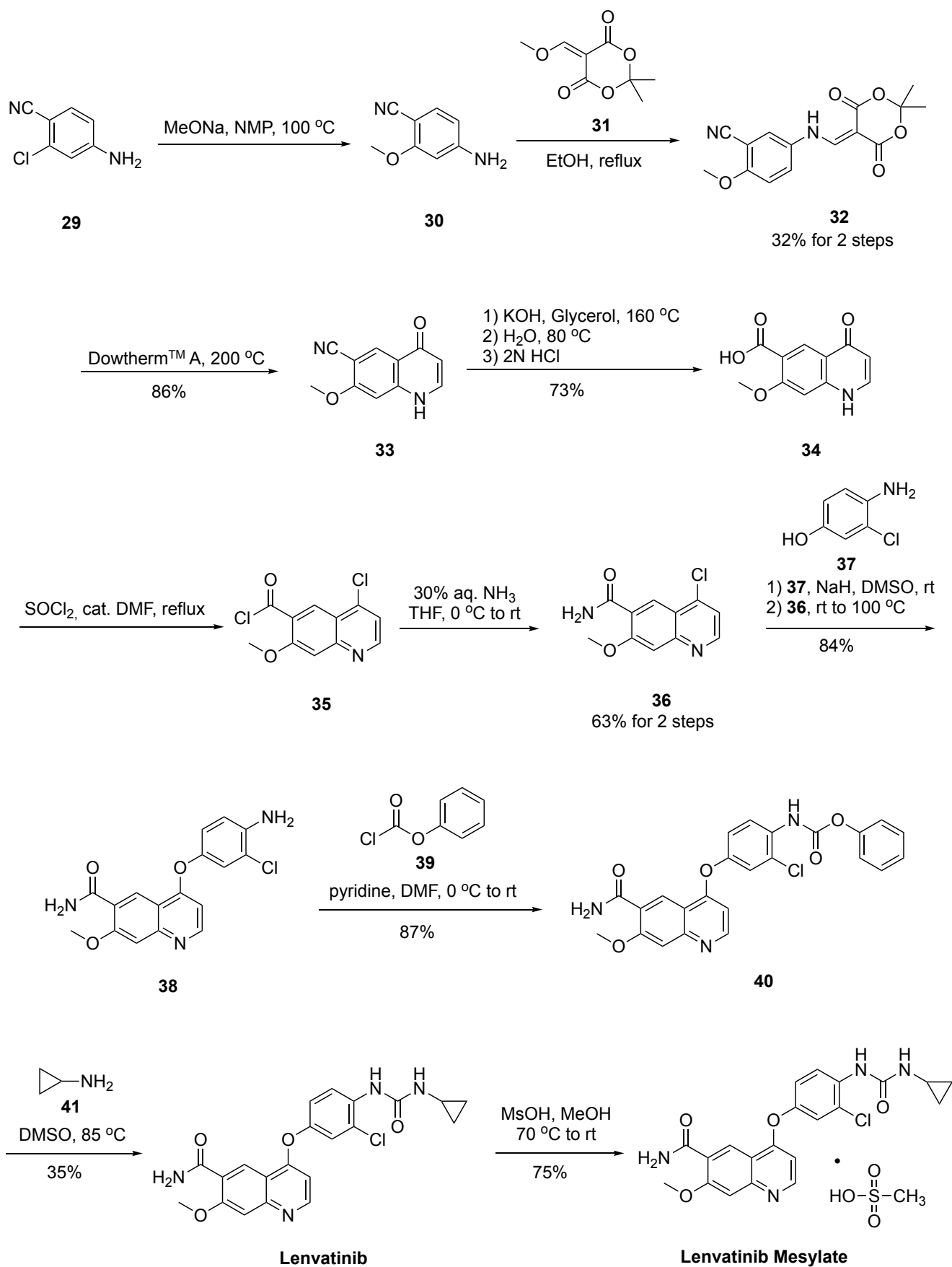


Εικόνα 57: Σε μεγέθυνση, απεικονίζεται η π αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα ανάμεσα στον δακτύλιο κυκλοπροπανίου του lenvatinib και τον δακτύλιο φαινυλίου του καταλοίπου Phe1047. Η απόσταση μεταξύ του δακτυλίου κυκλοπροπανίου και του κέντρου του δακτυλίου βενζολίου του καταλοίπου Phe1047 (χρώματος ροζ) είναι 3,43 Å και η γωνία είναι 105,6°. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται τα άτομα άνθρακα, με κόκκινο χρώμα τα άτομα οξυγόνου, με μπλε χρώμα τα άτομα αζώτου με σκούρο πράσινο χρώμα τα άτομα χλωρίου και με λευκό χρώματα άτομα υδρογόνου ^[164].

2.7.2 Συνθετική πορεία του Lenvatinib

Η πρώτη πορεία σύνθεσης του μεσυλικού άλατος του Lenvatinib, η οποία κατοχυρώθηκε το 2004 από την φαρμακευτική εταιρία Eisai R&D Management Company, Ltd παρουσιάζεται στο Σχήμα 22 ^[196]. Οι χημικοί Funahashi Y., Tsuruoka A, συγγραφείς αυτού του διπλώματος ευρεσιτεχνίας, περιγράφουν την παρασκευή του μεσυλικού άλατος του Lenvatinib σε κλίμακα χιλιογράμμων (kg).

Η πορεία αποτελείται συνολικά από 10 στάδια ^[196]. Ξεκινάει με τη μετατροπή του εμπορικά διαθέσιμου 4-αμινο-2-χλωρο-βενζονιτριλίου (**29**) σε 4-αμινο-2-μεθοξυ-βενζονιτρίλιο (**30**) μέσω μιας αντίδρασης υποκατάστασης, με τη χρήση μεθοξειδίου του νατρίου σε διαλύτη N-μεθυλο-2-πυρρολιδόνη, στους 100 °C. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα μία αντίδραση υποκατάστασης, μεταξύ του νιτριλίου **30**) και του εμπορικά διαθέσιμου βινυλο-μεθόξυ παράγωγου του οξέος Meldrum (**31**), υπό ουδέτερες συνθήκες, σε θερμή αιθανόλη, με αποτέλεσμα την παραγωγή της εναμίνης (**32**).



Σχήμα 22: Η πρώτη κατοχυρωμένη συνθετική πορεία του μεσυλικού άλατος του Lenvatinib από την εταιρία Eisai^[196].

Στα 2 πρώτα αυτά βήματα της συνθετικής πορείας, η απόδοση ισούται με 32%. Στη συνέχεια, η εναμίνη (**32**) υποβάλλεται σε DOWTHERM™ A στους 200 °C και υφίσταται μια ενδομοριακή κυκλοποίηση, μέσω αντίδρασης υποκατάστασης, με αποβολή ακετόνης και αποκαρβοξυλίωση, ώστε να παραχθεί η κινολόνη (**33**), σε απόδοση 86%. Ακολουθεί κατεργασία τριών σταδίων, ώστε να επιτευχθεί η υδρόλυση της ομάδας νιτριλίου σε ομάδα καρβοξυλικού οξέος. Πραγματοποιείται, αρχικά, η προσθήκη καυστικού καλίου και γλυκερόλης στους 160 °C, σε δεύτερο στάδιο ακολουθεί προσθήκη νερού στους 80 °C και σε τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα κατεργασία με υδροχλώριο. Η συνολική απόδοση της υδρόλυσης του νιτριλίου (**33**) σε οξύ (**34**) ανέρχεται το 73%. Στη συνέχεια, με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο, υψηλής θερμοκρασίας, λαμβάνει χώρα χλωρίωση σε δύο διαφορετικές θέσεις της υποκατεστημένης κινολόνης (**34**), η οποία μετατρέπεται στην αντίστοιχη χλωρο-υποκατεστημένη κινολίνη (**35**). Σε τελικό στάδιο, με τη χρήση υδατικής αμμωνίας 30% σε διαλύτη THF, του οποίου η θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 0-25 °C, γίνεται η μετατροπή της ομάδας του χλωριδίου του οξέος σε ομάδα αμιδίου και προκύπτει η βασική υπομονάδα χλωροκινολίνης (**36**) του Lenvatinib. Η συνολική απόδοση για τα δύο τελικά στάδια είναι 63%.

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την κατεργασία της εμπορικά διαθέσιμης 4-αμινο-3-χλωρο-φαινόλης (**37**) σε βασικές συνθήκες, οι οποίες εξασφαλίζονται με τη χρήση υδριδίου του νατρίου σε διμεθυλοσουλφοξείδιο, σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να λάβει χώρα πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση της ομάδας υδροξυλίου της 4-αμινο-3-χλωρο-φαινόλης (**37**) από το άτομο χλωρίου της κινολίνης (**36**). Προκύπτει η υποκατεστημένη κινολίνη (**38**) με απόδοση 84%, η οποία εν συνεχεία υφίσταται κατεργασία με χλωρομυρμηκικό φαινυλεστέρα (**39**) και πυριδίνη σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο, σε θερμοκρασία μεταξύ 0-25 °C, ώστε να προκύψει, με υποκατάσταση, το παράγωγο φαινοξυκινολίνης (**40**), με απόδοση 87%. Ακολουθεί κατεργασία με την εμπορικά διαθέσιμη κυκλοπροπυλαμίνη (**41**) σε διμέθυλοσουλφοξείδιο, σε θερμοκρασία 85 °C, ώστε να προκύψει το Lenvatinib σε απόδοση 35%. Τελικά, παράγεται το μεσυλικό άλας του Lenvatinib, με απόδοση 75%, έπειτα από κατεργασία με μεθανοσουλφονικό οξύ και μεθανόλη.

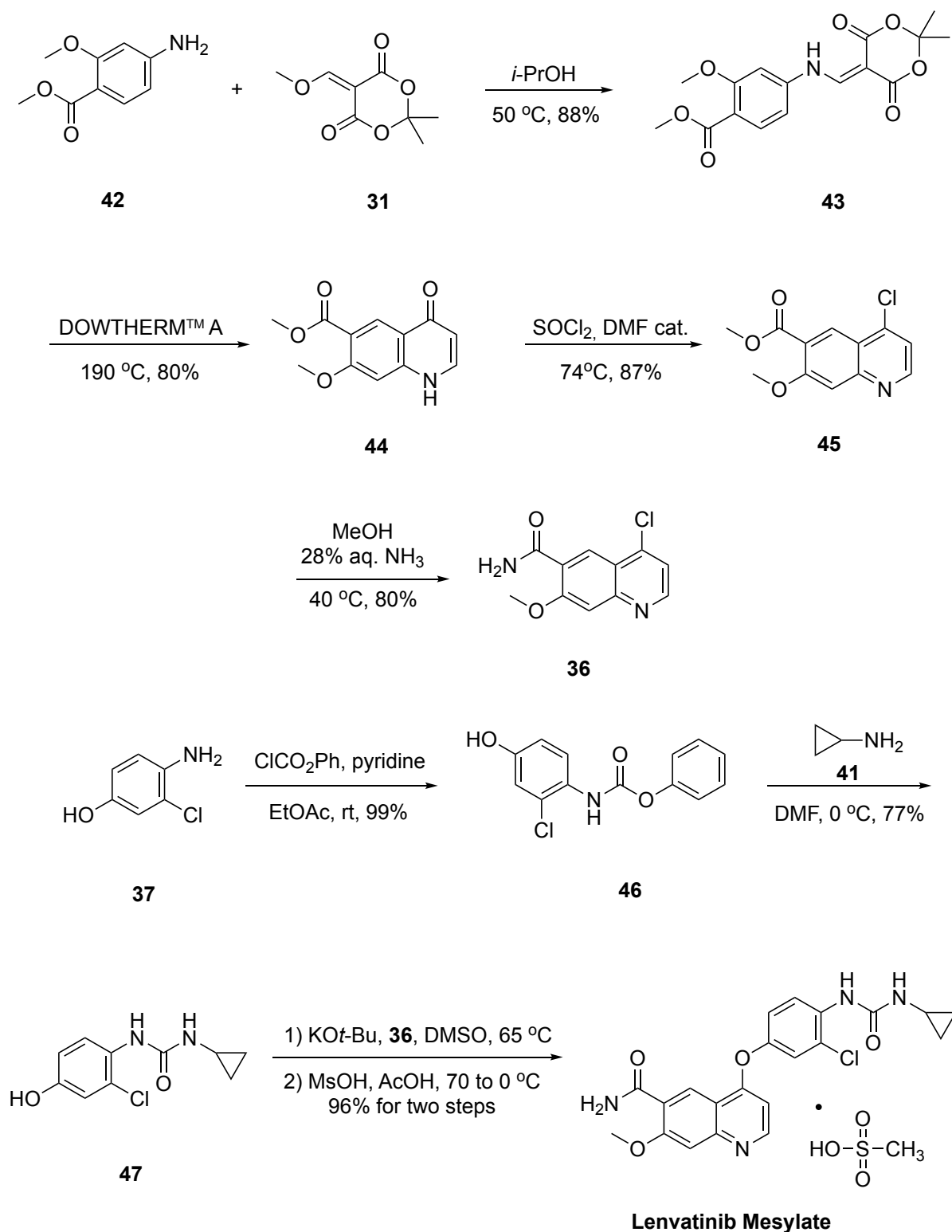
Έκτοτε, έχουν προταθεί πολλές εναλλακτικές πορείες για τη σύνθεσή του Lenvatinib. Η ίδια η εταιρία έχει προτείνει νέες, εναλλακτικές συνθετικές προσεγγίσεις. Μία από αυτές

παρουσιάζεται στο *Σχήμα 23*. Αυτή η βελτιωμένη συνθετική πορεία κατοχυρώθηκε από την Eisai R&D Management Company, Ltd το 2007 και περιλαμβάνει 8 συνθετικά στάδια ^[197].

Ξεκινώντας από τη διαθέσιμη στο εμπόριο υποκατεστημένη ανιλίνη (**42**) και το βινυλο-μεθόξυ παράγωγο του οξέος Meldrum (**31**), το οποίο είναι επίσης διαθέσιμο στο εμπόριο, λαμβάνει χώρα μια αντίδραση υποκατάστασης υπό ουδέτερες συνθήκες, σε θερμή ισοπροπυλική αλκοόλη, με αποτέλεσμα την παραγωγή της εναμίνης (**43**), σε καλή απόδοση. Στη συνέχεια, η εναμίνη (**43**) υποβάλλεται σε DOWTHERM™ A στους 190 °C και υφίσταται μια ενδομοριακή κυκλοποίηση, μέσω αντίδρασης υποκατάστασης, με αποβολή ακετόνης και μία αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης, ώστε να παραχθεί η κινολόνη (**44**). Αυτή η αντίδραση κυκλοποίησης, η οποία είναι μια παραλλαγή της αντίδρασης Conrad-Limpach ^[198], είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτη, λόγω της θερμοκρασίας και του pH στο οποίο λαμβάνει χώρα. Οι κυκλοποιήσεις Conrad-Limpach τυπικά διεξάγονται υπό βασικές συνθήκες σε θερμοκρασίες πολύ υψηλότερες από 240 °C ^[199]. Ωστόσο, αναπτύχθηκε μια διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την υποβολή της εναμίνης (**43**) σε DOWTHERM™ A (εμπορικά διαθέσιμο από την Dow και Sigma-Aldrich, ένα ευτηκτικό μίγμα διφαινυλίου και διφαινυλαιθέρα ^[200]), με αποτέλεσμα την ενδομοριακή κυκλοποίηση σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία. Ακολουθεί απλή ψύξη και κατεργασία με αιθέρα, ώστε να διευκολυνθεί ο σχηματισμός ιζήματος ^[201]. Το προκύπτον στερεό μπορεί να συλλεχθεί με διήθηση σε απόδοση 80% και δεν απαιτεί επιπλέον καθαρισμό ^[201]. Η κινολόνη (**44**), στη συνέχεια, μετατρέπεται στο αντίστοιχο χλωρίδιο με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου. Ο προκύπτων εστέρας (**45**) μετατρέπεται στο αντίστοιχο αμίδιο μέσω της χρήσης υδατικής αμμωνίας 28% σε θερμή μεθανόλη. Τελικά, παράγεται η βασική υπομονάδα χλωρο-υποκατεστημένης κινολίνης (**36**) του Lenvatinib σε απόδοση 80% ^[197].

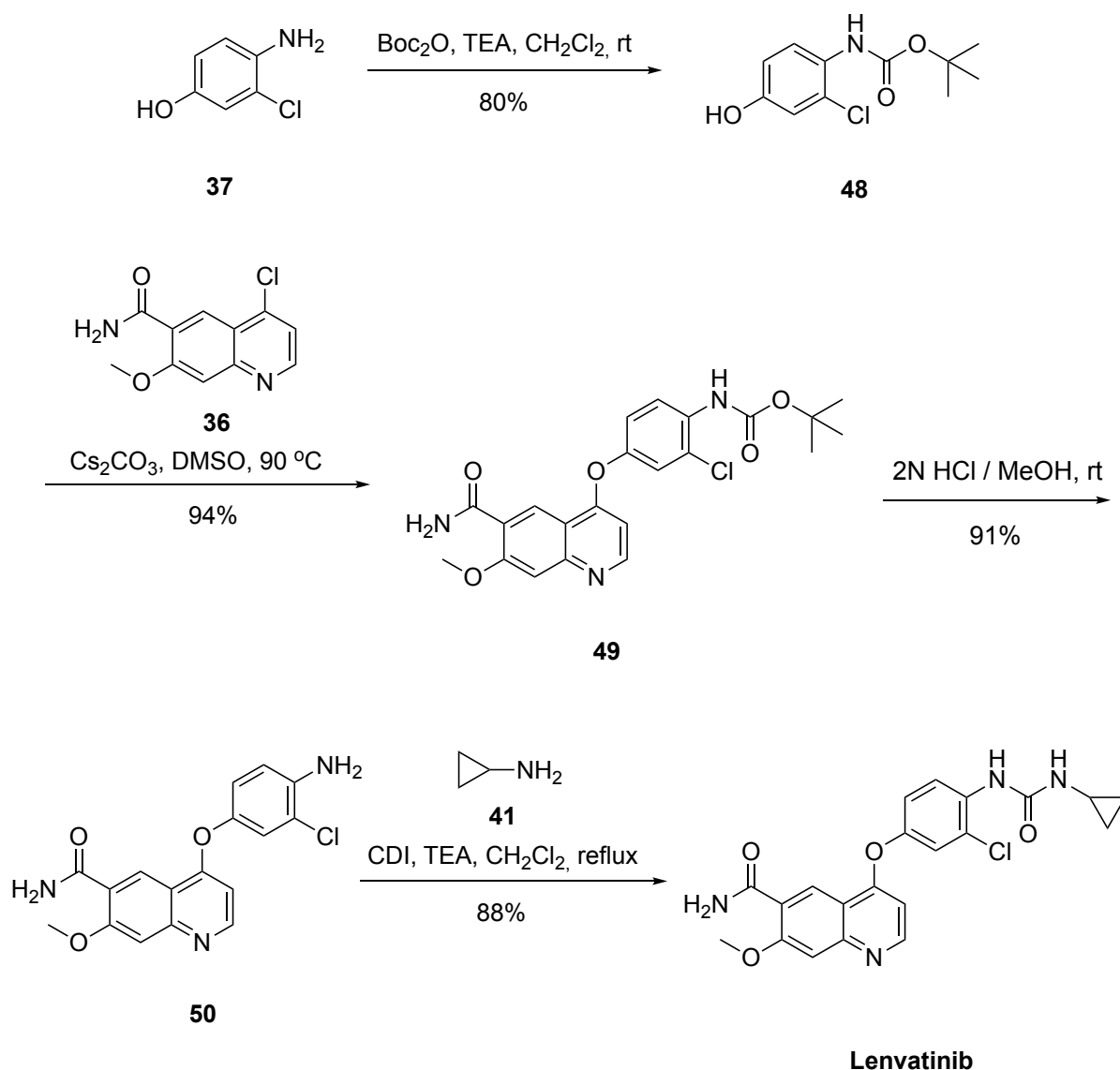
Η τελική προσέγγιση στη σύνθεση του μεσυλικού άλατος του Lenvatinib περιγράφεται, επίσης, στο *Σχήμα 23*. Η διαθέσιμη στο εμπόριο αμινοφαινόλη (**37**) μετατρέπεται ποσοτικά στον αντίστοιχο καρβαμικό φαινυλεστέρα (**46**), μέσω της χρήσης χλωρομυρμηκικού φαινυλεστέρα. Στη συνέχεια, ο εστέρας (**46**) μετατρέπεται στην υποκατεστημένη ουρία (**47**) με απόδοση 77%, με τη χρήση κυκλοπροπυλαμίνης (**41**), η οποία είναι εμπορικά διαθέσιμη, σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο, θερμοκρασίας 0 °C. Ακολουθεί η σύζευξη της χλωροκινολίνης (**36**) με το παράγωγο ουρίας (**47**), παρουσία *t*-βουτοξειδίου του καλίου, ακολουθούμενη από κατεργασία με μεθανοσουλφονικό οξύ και οξικό οξύ, η

οποία οδηγεί σε σχηματισμό του μεσυλικού άλατος του Lenvatinib σε απόδοση 96% κατά μήκος της ακολουθίας δύο σταδίων ^[197].



Σχήμα 23: Βελτιωμένη σύνθεση του μεσυλικού άλατος του Lenvatinib από την Eisai Co ^[197].

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει μία ακόμη συνθετική μέθοδος, η οποία κατοχυρώθηκε στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας που δημοσιεύτηκε το 2017 από κινέζους ερευνητές ^[202]. Σε αυτό προτείνεται μία εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Lenvatinib η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 24.



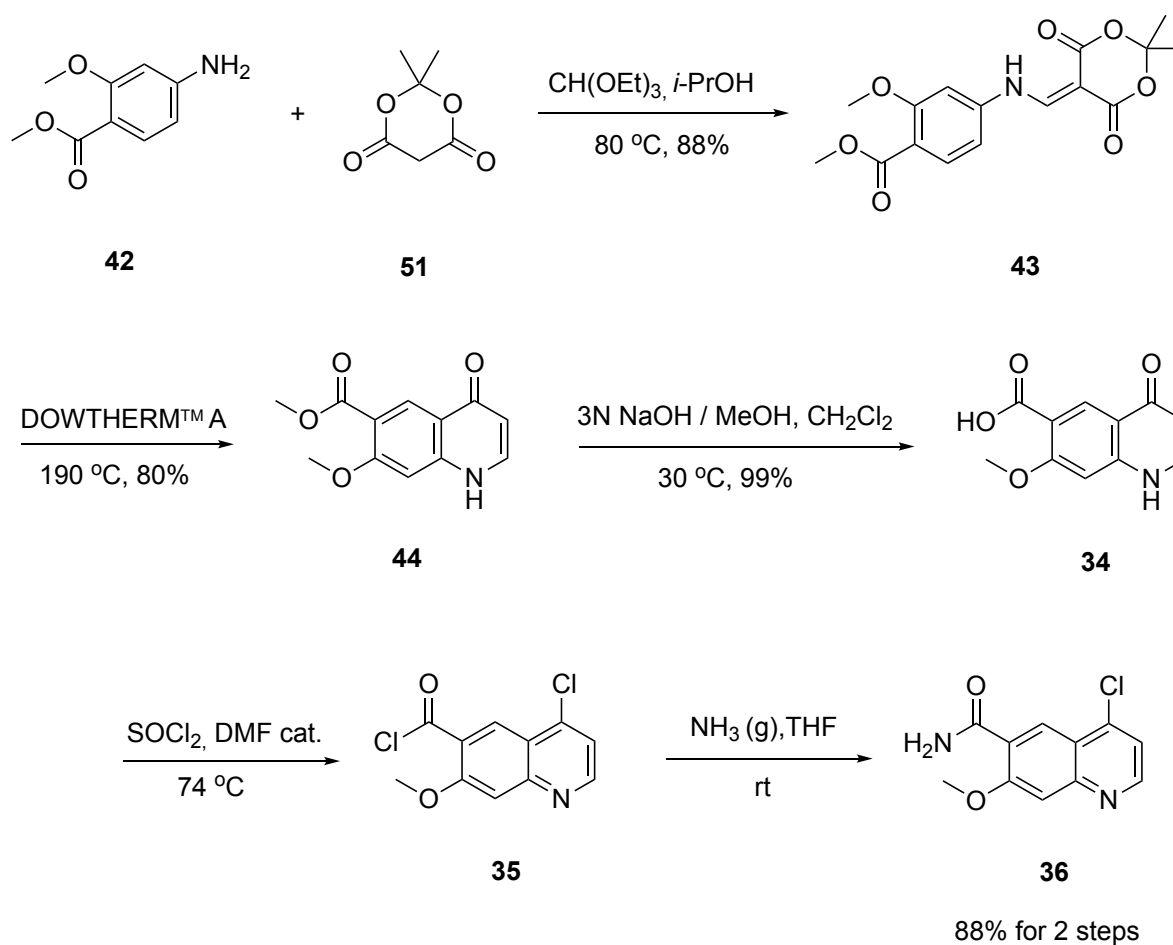
Σχήμα 24: Σύνθετική πορεία του Lenvatinib η οποία έχει προταθεί από κινέζους ερευνητές ^[202].

Ξεκινά με την N-Boc προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (**37**), με χρήση Boc-ανυδρίτη, τριαιθυλαμίνης και διχλωρομεθανίου, με απόδοση 80%. Μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, η N-Boc προστατευμένη 4-αμινο-3-χλωροφαινόλη (**48**) συζεύγνυται με τη χλωρο-υποκατεστημένη κινολίνη (**36**), σε βασικές συνθήκες, που εξασφαλίζονται από το ανθρακικό κάισιο. Προκύπτει η N-Boc προστατευμένη ένωση **49** με απόδοση 94%. Ακολουθεί αποπροστασία της Boc προστατευτικής ομάδας με

τη χρήση διαλύματος υδροχλωρίου σε μεθανόλη, με απόδοση 91%. Η ελεύθερη αμίνη **50** που προκύπτει, υφίσταται κατεργασία με την εμπορικά διαθέσιμη κυκλοπροπυλαμίνη (**41**), τριαιθυλαμίνη και το αντιδραστήριο σύζευξης CDI, ώστε να προκύψει το Lenvatinib σε απόδοση 88% [202].

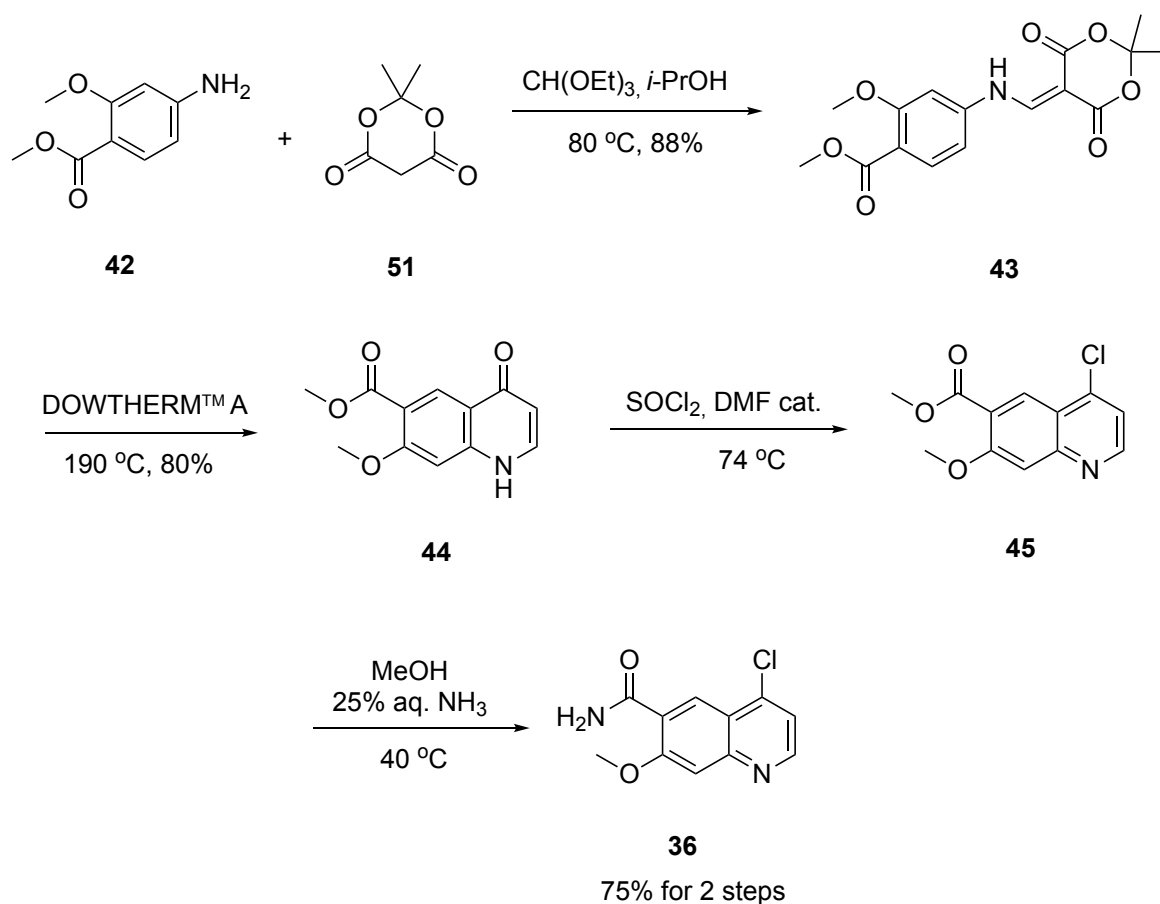
Στο ερευνητικό εργαστήριο, η σύνθεση του τμήματος της υποκατεστημένης κινολίνης (**36**) των αναλόγων του Lenvatinib βασίστηκε στη μέθοδο που προτείνει η εταιρία Eisai το 2007 [197], ενώ τα επόμενα συνθετικά βήματα, που οδηγούν στη παρασκευή των αναλόγων του Lenvatinib, βασίστηκαν στο συνθετικό μονοπάτι που ακολουθείται στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας που δημοσιεύτηκε το 2017 από κινέζους ερευνητές [202]. Στο εργαστήριό έχουν γίνει τροποποιήσεις, ώστε να βελτιστοποιηθεί η απόδοση κάποιων σταδίων. Η ολική, βελτιστοποιημένη, συγκλίνουσα συνθετική πορεία που ακολουθείται στο εργαστήριό μας, ώστε να παραχθούν το Lenvatinib και τα ανάλογά του, περιγράφεται παρακάτω.

Στο *Σχήμα 25* απεικονίζονται τα πρώτα βήματα που καταλήγουν στη σύνθεση της κινολίνης (**36**). Ξεκινώντας από τα διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια, τον 4-αμινο-2-μεθοξυ-βενζοϊκό μεθυλεστέρα (**42**), το οξύ Meldrum (**51**) και τον μυρμηκικό τριαιθυλεστέρα, λαμβάνει χώρα μια συζυγής προσθήκη τύπου Michael σε θερμή ισοπροπυλική αλκοόλη, με αποτέλεσμα την παραγωγή της εναμίνης (**43**), σε καλή απόδοση (88%). Στη συνέχεια, η εναμίνη (**43**) υποβάλλεται σε DOWTHERM™ A στους 190 °C και υφίσταται μια ενδομοριακή κυκλοποίηση, μέσω αντίδρασης υποκατάστασης, με αποβολή ακετόνης και έκλυση διοξειδίου του άνθρακα, ώστε να παραχθεί η κινολόνη (**44**), σε απόδοση 80%. Ακολουθεί υδρόλυση του εστέρα (**44**) σε καρβοξυλικό οξύ (**34**), σε μη υδατικό περιβάλλον και βασικές συνθήκες, η οποία ουσιαστικά είναι ποσοτική. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η υδρόλυση περιγράφονται από τους Theodorou V., Skobridis K., και συνεργάτες [203]. Στη συνέχεια πραγματοποιείται χλωρίωση σε δύο θέσεις της υποκατεστημένης κινολόνης (**34**) με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου και προσθήκη διμεθυλοφορμαμιδίου για την κατάλυση της αντίδρασης. Απευθείας λαμβάνει χώρα μία υποκατάσταση, μέσω παροχής αέριας αμμωνίας, ώστε να προκύψει το αντίστοιχο αμίδιο (**36**). Η συνολική απόδοση για τα τελευταία δύο στάδια ανέρχεται στο 88%, ένα πολύ ικανοποιητικό ποσοστό.



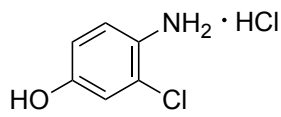
Σχήμα 25: Το πρώτο μέρος της κύριας πορείας που ακολουθείται στο εργαστήριο για τη σύνθεση των αναλόγων του Lenvatinib.

Εναλλακτικά, μία συνθετική πορεία που πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο, περιλαμβάνει την χλωρίωση της κετο-ομάδας της κινολόνης (**44**), με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου και καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμίδιου, χωρίς να προηγηθεί υδρόλυση της ομάδας του εστέρα (Σχήμα 26). Η 4-χλωρο-υποκατεστημένη κινολίνη (**45**) που προκύπτει διαλύεται σε μεθανολικό διάλυμα υδατικής αμμωνίας 25%, θερμοκρασίας 40 °C, με αποτέλεσμα την αμμωνιόλυση του εστέρα και το σχηματισμό του αμιδίου (**36**). Η συνολική απόδοση των δύο τελικών σταδίων είναι 75%, χαμηλότερη από αυτήν των αντίστοιχων σταδίων της εναλλακτικής πειραματικής πορείας, και συνεπώς δεν προτιμήθηκε στο εργαστήριο.

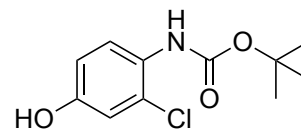
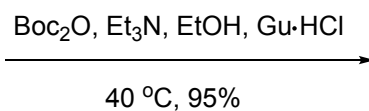


Σχήμα 26: Η εναλλακτική πορεία του πρώτου μέρους που ακολουθείται στο εργαστήριο για τη σύνθεση των αναλόγων του Lenvatinib.

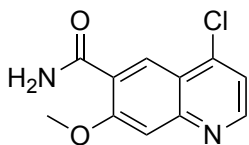
Το δεύτερο μέρος της συνθετικής πορείας που ακολουθείται στο εργαστήριο (Σχήμα 27), περιλαμβάνει, αρχικά, μια N-Boc προστασία της αμινομάδας του υδροχλωρικού άλατος της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (**37**), με χρήση Boc-ανυδρίτη, τριαιθυλαμίνης και υδροχλωρικού άλατος της γουανιδίνης ως οργανοκαταλύτη ^[204]. Με αυτές τις συνθήκες, οι οποίες προτάθηκαν από τους Jahani, F., Tajbakhsh, M., Golchoubian, H. και Khaksar, S. το 2011 ^[204], επιτυγχάνεται η N-Boc προστασία με απόδοση 95%. Μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, η N-Boc προστατευμένη 4-αμινο-3-χλωροφαινόλη (**48**) συζεύγνυται με τη χλωρο-υποκατεστημένη κινολίνη (**36**), σε βασικές συνθήκες, που εξασφαλίζονται από το ανθρακικό κάλιο. Προκύπτει το προϊόν σύζευξης (**49**) με απόδοση 94%. Ακολουθεί απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας με τη χρήση διαλύματος υδροχλωρίου σε μεθανόλη, σε απόδοση 91%. Η ελεύθερη αμίνη (**50**) που προκύπτει, συζεύγνυται με ενώσεις οι οποίες διαθέτουν είτε μια καρβοξυλική ομάδα (**52a**) είτε μία αμινομάδα (**52b**), ώστε να επιτευχθεί η σύζευξη και να προκύψει η σειρά A και η σειρά B αναλόγων του Lenvatinib, αντίστοιχα.



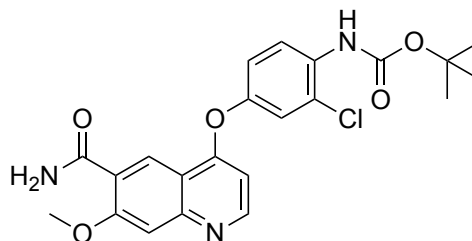
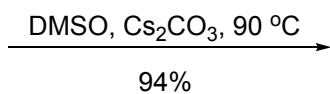
37



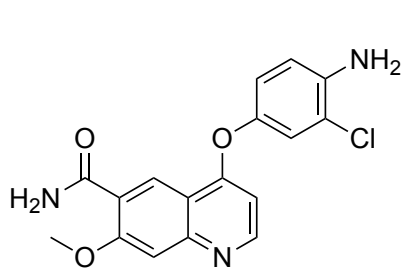
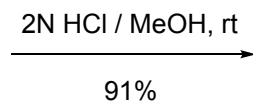
48



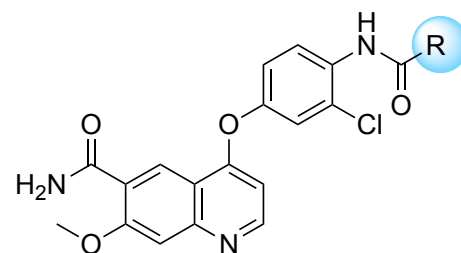
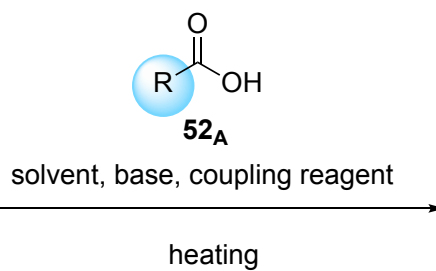
36



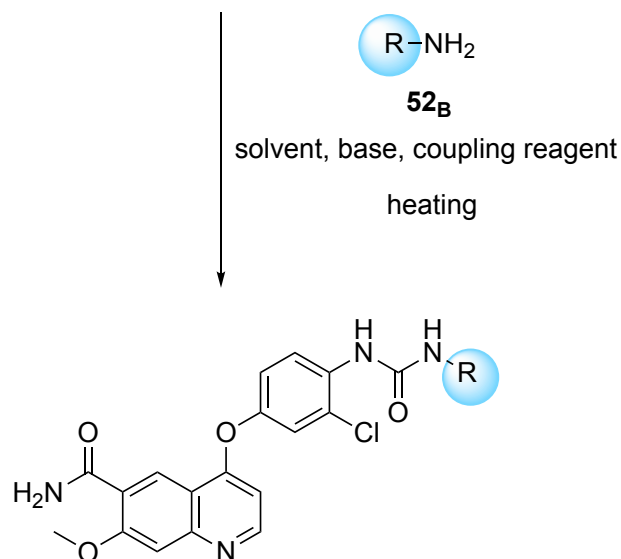
49



50



Series A of Lenvatinib analogues



Series B of Lenvatinib analogues

Σχήμα 27: Το δεύτερο μέρος της κύριας πορείας που ακολουθήθηκε στο εργαστήριό μας για τη σύνθεση των αναλόγων του Lenvatinib.

Η σύνθεση αυτή, των 9 σταδίων, έχει υψηλή ολική απόδοση (50-55%), υψηλή αναλυτική καθαρότητα (>99.5%), ενώ παράλληλα εξοικονομείται χρόνος και διαλύτες κατά τον καθαρισμό των ενώσεων.

2.8 Sorafenib

Το Sorafenib (εμπορική ονομασία Nexavar) είναι ένας μικρού μοριακού βάρους αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών, ο οποίος αναπτύχθηκε από τη φαρμακευτική εταιρία Onyx Pharmaceuticals σε συνεργασία με τη Bayer ^[205]. Ο αναστολέας αυτός έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC), του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC), και του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς, ανθεκτικού στη θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (DTC). Αναστέλλει πρωτεϊνικές κινάσες, συγκεκριμένα τον υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFR, τον υποδοχέα αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα PDGFR, τον c-KIT και την οικογένεια των Raf κινασών ^[206].

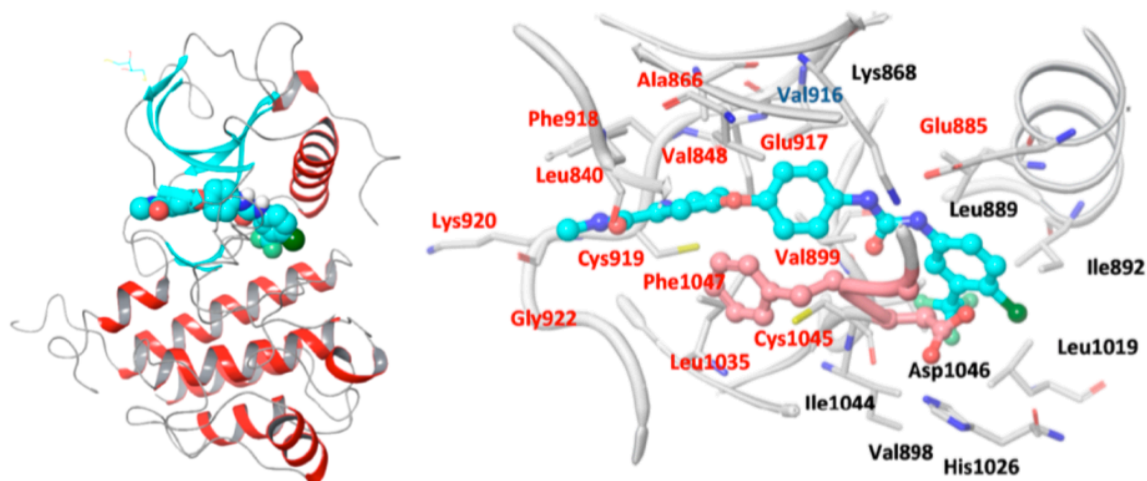
Τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών, που δημοσιεύθηκαν τον Ιανουάριο του 2007, έδειξαν ότι σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο, η θεραπεία με Sorafenib παρατείνει την επιβίωση των ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) χωρίς εξέλιξη του όγκου ^[207]. Η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) του όγκου ήταν 5,5 μήνες στους ασθενείς που έλαβαν Sorafenib και 2,8 μήνες στους ασθενείς που έλαβαν το εικονικό φάρμακο ^[207].

Το 2007 παρουσιάστηκαν αποτελέσματα από τη μελέτη SHARP, στην οποία μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα του Sorafenib στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ^[208]. Το κύριο σημείο της αποτελεσματικότητας ήταν η μέση συνολική επιβίωση (OS), η οποία ήταν μεγαλύτερη κατά 44% στους ασθενείς που έλαβαν Sorafenib (12.3 μήνες) σε σύγκριση με αυτούς που έλαβαν το εικονικό φάρμακο. Εξαιτίας αυτής της δοκιμής, το Sorafenib έλαβε την έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, το Νοέμβριο του 2007 ^[208].

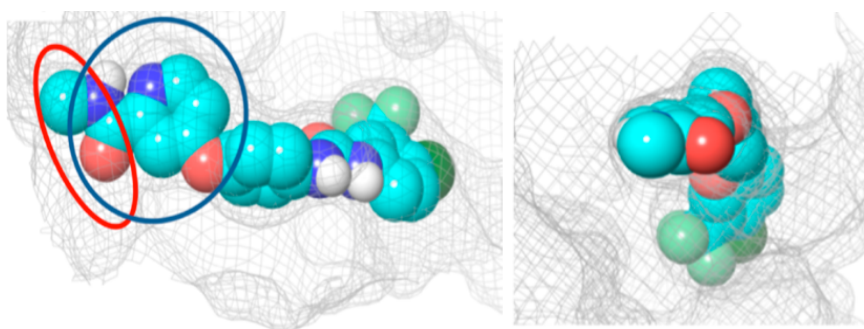
Τον Νοέμβριο του 2013 το Sorafenib εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς (DTC) ανθεκτικού στη θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο ^[209]. Η μελέτη DECISION έδειξε σημαντική βελτίωση στην επιβίωση χωρίς

εξέλιξη της νόσου, αλλά όχι και στη συνολική επιβίωση. Ωστόσο, οι παρενέργειες ήταν πολύ συχνές [209].

Σύμφωνα με κρυσταλλικές μελέτες, το Sorafenib όταν συμπλοκοποιείται με τον VEGFR2, αλληλεπιδρά με τη θέση πρόσδεσης του ATP, καθώς και με τον βρόγχο ενεργοποίησης, σε DFG-out διαμόρφωση (Εικόνα 58) [164]. Αυτός ο μιμητής του ATP είναι αντιστρεπτός αναστολέας τύπου II, επειδή αλληλεπιδρά επίσης με μια αλλοστερική γειτονική περιοχή, εμφανίζοντας υψηλή εκλεκτικότητα.



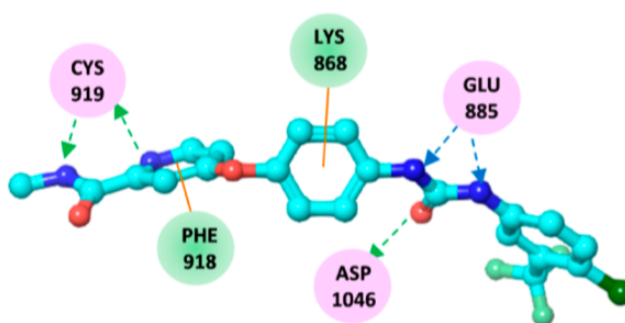
Εικόνα 58: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Sorafenib-VEGFR2. **Αριστερά:** Με μπλε χρώμα εμφανίζεται η δομή β-φύλλου, οι α-έλικες με κόκκινο χρώμα και άλλα δομικά στοιχεία με γκρι χρώμα. **Δεξιά:** Τα άτομα άνθρακα του τομέα DFG φαίνονται με ροζ χρώμα. Στη δομή του Sorafenib με γαλάζιο χρώμα υποδεικνύονται τα άτομα άνθρακα, με κόκκινο χρώμα τα άτομα οξυγόνου, με μπλε χρώμα τα άτομα αζώτου και με σκούρο πράσινο χρώμα τα άτομα χλωρίου. Τα ονόματα καταλοίπων της θέσης δέσμευσης ATP υποδεικνύονται με κόκκινα γράμματα και των γειτονικών περιοχών με μαύρα γράμματα. Το κατάλοιπο στην περιοχή εισόδου, Val916, υποδεικνύεται από τα μπλε γράμματα [164].



Εικόνα 59: Σύμπλοκο Sorafenib-VEGFR2. Η θέση πρόσδεσης του ATP υποδεικνύεται από τον μπλε κύκλο και η περιοχή εισόδου από τον κόκκινο κύκλο. **Αριστερά:** Προβολή από την N-τερματική περιοχή του VEGFR2. **Δεξιά:** Προβολή από την περιοχή εισόδου του VEGFR2 [164].

Το Sorafenib καταλαμβάνει μεγάλο μέρος της θέσης πρόσδεσης του δακτυλίου αδενίνης και εκδηλώνει ισχυρές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εντός της περιοχής εισόδου (Εικόνα 59) ^[164].

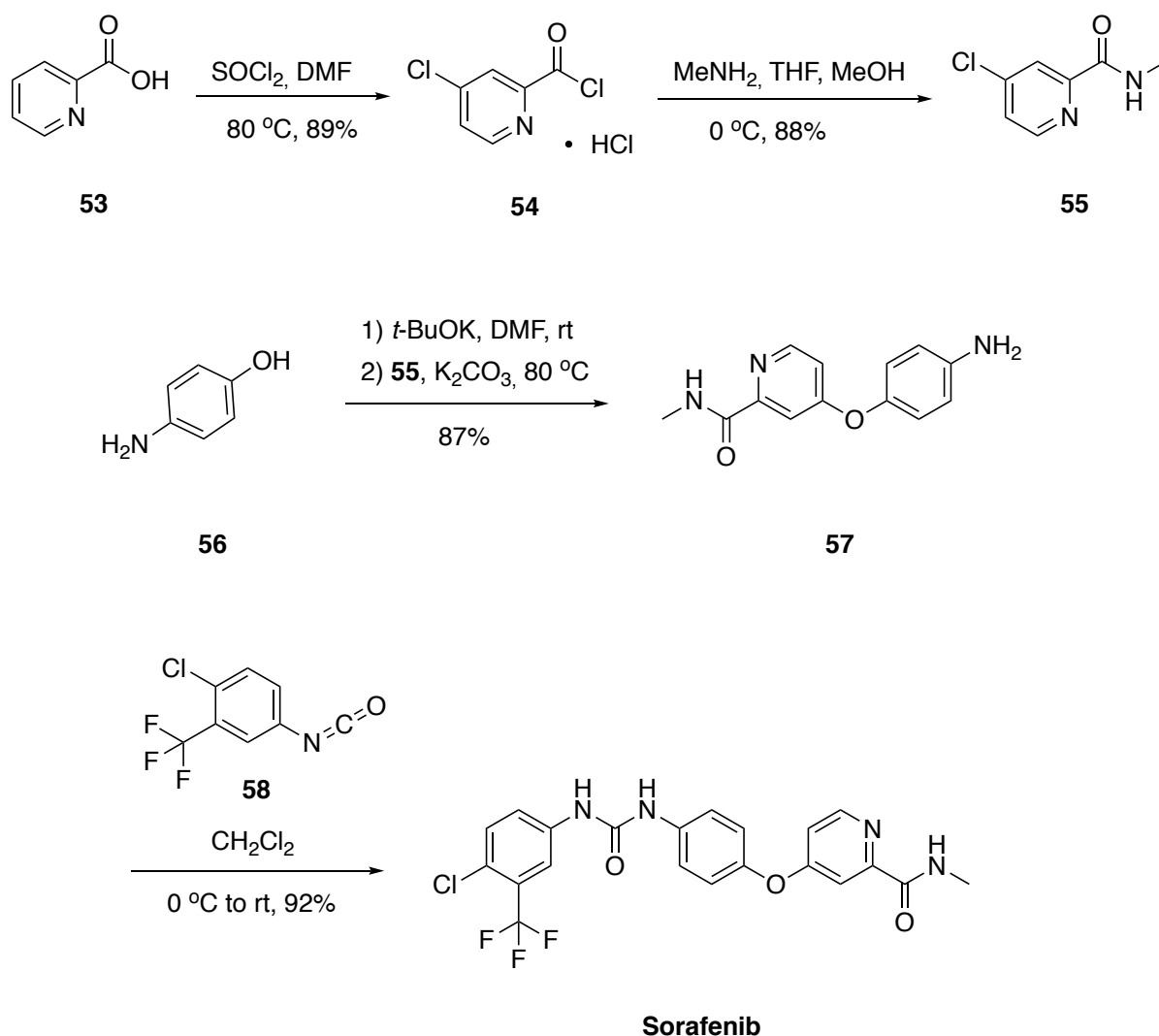
Ταυτοποιήθηκαν συνολικά πέντε δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο Sorafenib-VEGFR2 (Εικόνα 60), με τα κατάλοιπα Glu885 του N-λοβού, με το κατάλοιπο Asp1046 του βρόγχου ενεργοποίησης και με το κατάλοιπο Cys919. Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals, στις οποίες εμπλέκονται τα κατάλοιπα Phe918 και Lys868 είναι συνολικά τρεις ^[164].



Εικόνα 60: Αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο σύμπλοκο Sorafenib-VEGFR2. Τα κατάλοιπα που εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις μέσω φορτίων ή σε πολικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται σε ροζ κύκλους. Τα υπολείμματα που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις Van der Waals εμφανίζονται σε πράσινους κύκλους. Οι αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων παριστάνονται με μπλε διακεκομμένα βέλη που κατευθύνονται προς τον δότη ηλεκτρονίων. Οι αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με κύριες αλυσίδες αμινοξέων αντιπροσωπεύονται από πράσινα διακεκομμένα βέλη που κατευθύνονται προς τον δότη ηλεκτρονίων. Οι αλληλεπιδράσεις π αντιπροσωπεύονται από πορτοκαλί γραμμές. Στη δομή του Sorafenib με γαλάζιο χρώμα υποδεικνύονται τα άτομα άνθρακα, με κόκκινο χρώμα τα άτομα οξυγόνου, με ανοιχτό πράσινο χρώμα τα άτομα φθορίου, με μπλε χρώμα τα άτομα αζώτου και με σκούρο πράσινο χρώμα τα άτομα χλωρίου ^[164].

2.8.1 Σύνθεση του Sorafenib

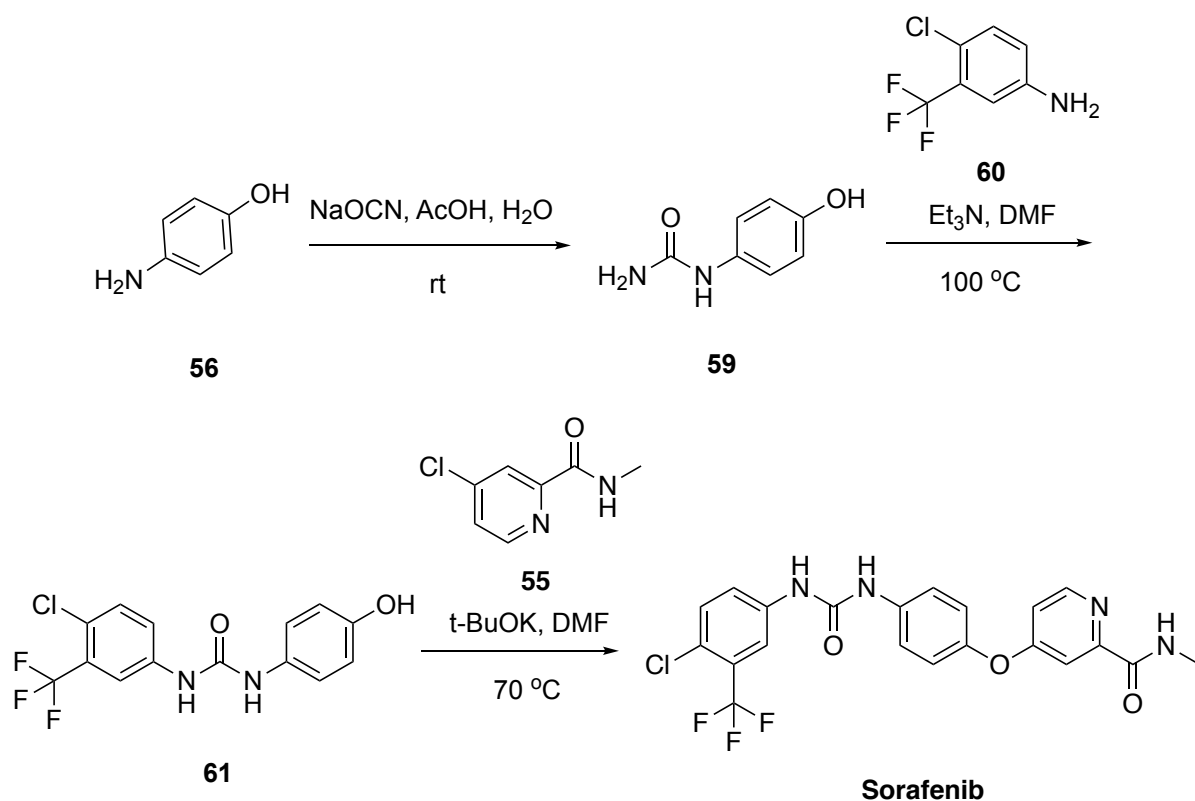
Έχει προταθεί μεγάλος αριθμός διαφορετικών οδών σύνθεσης του Sorafenib. Όλες περιλαμβάνουν κυρίως αντιδράσεις σύζευξης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό διαρυλουρίας, ώστε να συντεθεί το επιθυμητό προϊόν. Στο Σχήμα 28 παρουσιάζεται η μέθοδος σύνθεσης του Sorafenib η οποία κατοχυρώθηκε από τη Bayer Corporation το 2001 ^[210].



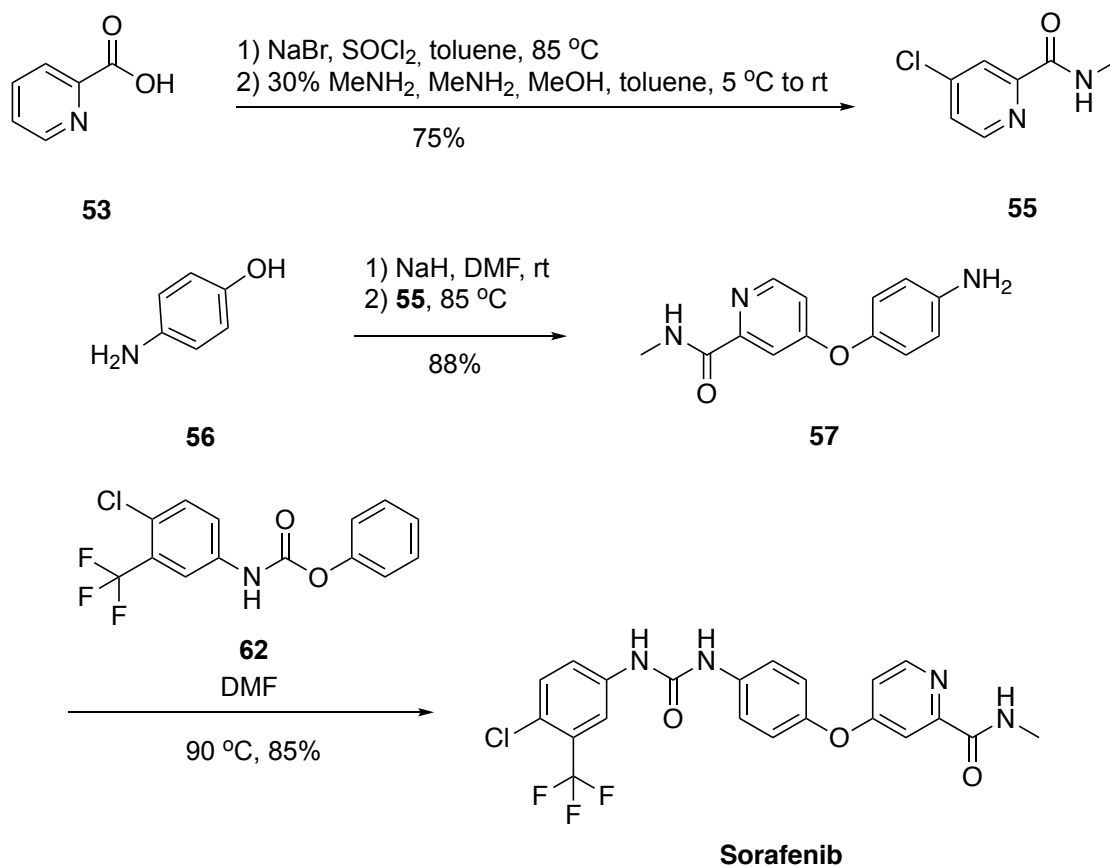
Σχήμα 28: Συνθετική πορεία του Sorafenib, κατοχυρωμένη από την εταιρία Bayer ^[210].

Η παραπάνω μέθοδος περιλαμβάνει την αντίδραση χλωρίωσης του εμπορικά διαθέσιμου πικολινικού οξέος (**53**) με θειονυλοχλωρίδιο και καταλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο, ώστε να σχηματιστεί το άλας χλωριούχου οξέος (**54**), σε απόδοση 89%. Το άλας (**54**) στη συνέχεια αντιδρά με μεθυλαμίνη διαλυμένη σε τετραϋδροφουράνιο και προκύπτει το καρβοξαμίδιο (**55**), σε απόδοση 88%. Η εμπορικά διαθέσιμη 4-αμινοφαινόλη (**56**) υφίσταται κατεργασία με tert-βουτυλοξείδιο του καλίου σε διμεθυλοφορμαμίδιο και στη συνέχεια συζεύγνυται με το καρβοξαμίδιο (**55**), με αποτέλεσμα τη σύνθεση του παραγώγου ανιλίνης (**57**), με απόδοση 87%. Με την επακόλουθη αντίδραση της υποκατεστημένης ανιλίνης (**57**) με το εμπορικά διαθέσιμο 1-χλωρο-4-ισοκυανο-2-τριφθορομεθυλο-βενζόλιο (**58**) προκύπτει το Sorafenib, σε απόδοση 92%. Παρακάτω, παρουσιάζονται δύο ακόμα δημοφιλείς εναλλακτικές συνθετικές πορείες του Sorafenib (Σχήμα 29).

• Συνθετική πορεία I:



• Συνθετική πορεία II:



Σχήμα 29: Δύο από τις εναλλακτικές συνθετικές πορείες του Sorafenib ^{[211], [212]}.

2.9 Sunitinib

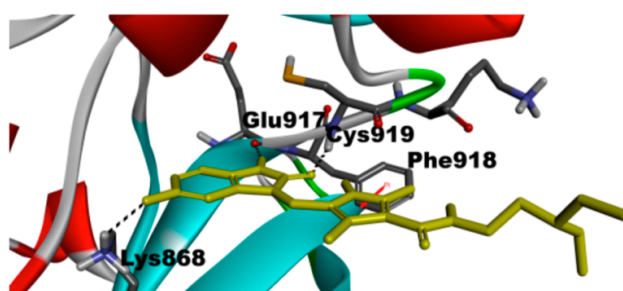
Το Sunitinib (κωδική ονομασία SU11248), που διατίθεται στο εμπόριο με την ονομασία Sutent από την φαρμακευτική εταιρία Pfizer, είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος μικρού μοριακού βάρους αναστολέας πολλαπλών υποδοχικών τυροσινικών κινασών ^[213]. Εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία του νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC) και για τη θεραπεία του στρωματικού όγκου του γαστρεντερικού συστήματος (GIST), ανθεκτικού στο Imatinib, στις 26 Ιανουαρίου του 2006. Το Sunitinib ήταν το πρώτο φάρμακο για τον καρκίνο που εγκρίθηκε ταυτόχρονα για δύο διαφορετικές ενδείξεις.

Το Sunitinib εμποδίζει την κυτταρική σηματοδότηση, αναστέλλοντας την δράση των υποδοχών του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFR α , PDGFR β), των υποδοχών του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), του πρωτο-ογκογονιδίου c-KIT και του πρωτο-ογκογονιδίου RET ^[214]. Οι υποδοχείς αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην αγγειογένεση όσο και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ^[215], ^[216]. Επομένως, η ταυτόχρονη αναστολή αυτών εμποδίζει την αγγειογένεση και πυροδοτεί την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας σε συρρίκνωση του όγκου.

Το κύριο σημείο της μελέτης για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου στη θεραπεία στρωματικού όγκου του γαστρεντερικού συστήματος (GIST), ανθεκτικού στο Imatinib, ήταν ο μέσος χρόνος για την πρόοδο του όγκου (Time to Tumor Progression, TTP). Με τη χορήγηση του Sunitinib ο χρόνος αυτός ήταν ίσος με 27 εβδομάδες, ενώ με τη χορήγηση του εικονικού φαρμάκου έξι εβδομάδες ^[217]. Το κύριο σημείο της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου στη θεραπεία του νεφροκυτταρικού καρκινώματος ήταν η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη του όγκου (PFS), η οποία ισούται με έντεκα μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν Sunitinib και με πέντε μήνες για αυτούς που έλαβαν ένα άλλο αντικαρκινικό φάρμακο, την ιντερφερόνη άλφα ^[218]. Το Sunitinib, συνεπώς, κατέστη εξαιρετικά αποτελεσματικό στη θεραπεία του μεταστατικού νεφροκυτταρικού καρκινώματος.

Το Sunitinib είναι ένας αντιστρεπτός αναστολέας τύπου I ^[164]. Είναι μιμητής του ATP, καθώς εκδηλώνει αλληλεπιδράσεις με τη περιοχή πρόσδεσης του ATP σε DFG-in διαμόρφωση. Η εκλεκτικότητα που εμφανίζει ο αναστολέας αυτός δεν είναι πολύ υψηλή ^[164]. Όταν συμπλοκοποιείται με τον VEGFR2, στον δακτύλιο ινδολινόνης αναπτύσσονται δύο

δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Glu917 και Cys919, τα οποία βρίσκονται στη θέση πρόσδεσης του ATP. Σχηματίζεται επίσης ένας δεσμός υδρογόνου ανάμεσα στο φθόριο, το οποίο είναι συνδεδεμένο στον δακτύλιο ινδολινόνης, και το κατάλοιπο Lys868 (Εικόνα 61) [219]. Λαμβάνει χώρα, επίσης, μία π-π αλληλεπίδραση ανάμεσα στον δακτύλιο της φαινόλης του καταλοίπου Phe918 και τον πυρρολικό δακτύλιο του Sunitinib. Η τερματική αλυσίδα εκτίθεται στο διαλύτη.

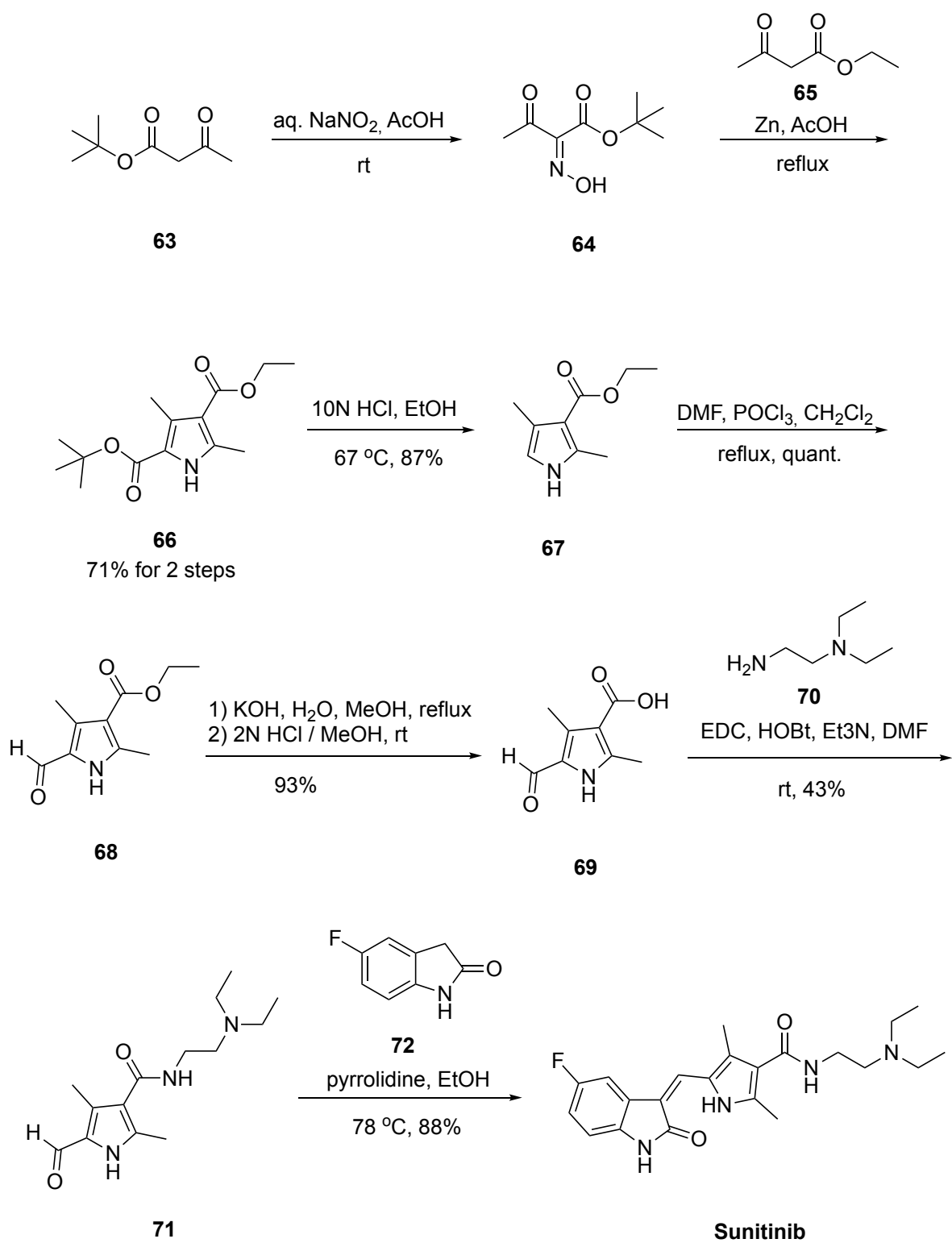


Εικόνα 61: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Sunitinib-VEGFR2. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται η δομή του Sunitinib και με γράμματα μαύρου χρώματος τα κατάλοιπα των αμινοξέων που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις. Με διακεκομμένες γραμμές μαύρου χρώματος παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου που λαμβάνουν χώρα και με γραμμές κόκκινου χρώματος οι π-π αλληλεπιδράσεις [219].

2.9.1 Σύνθεση του Sunitinib

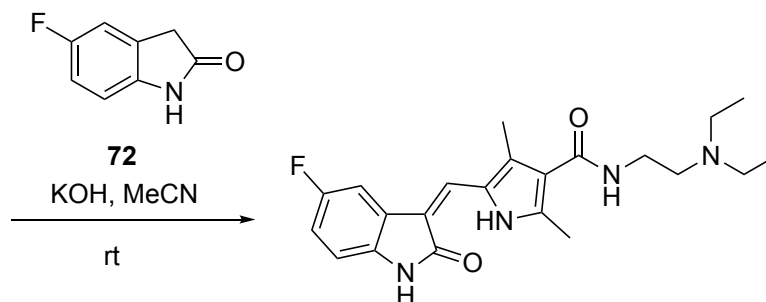
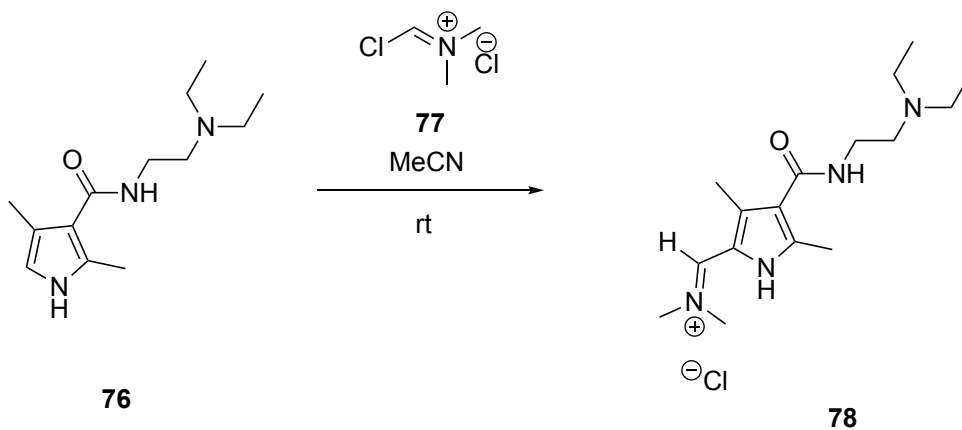
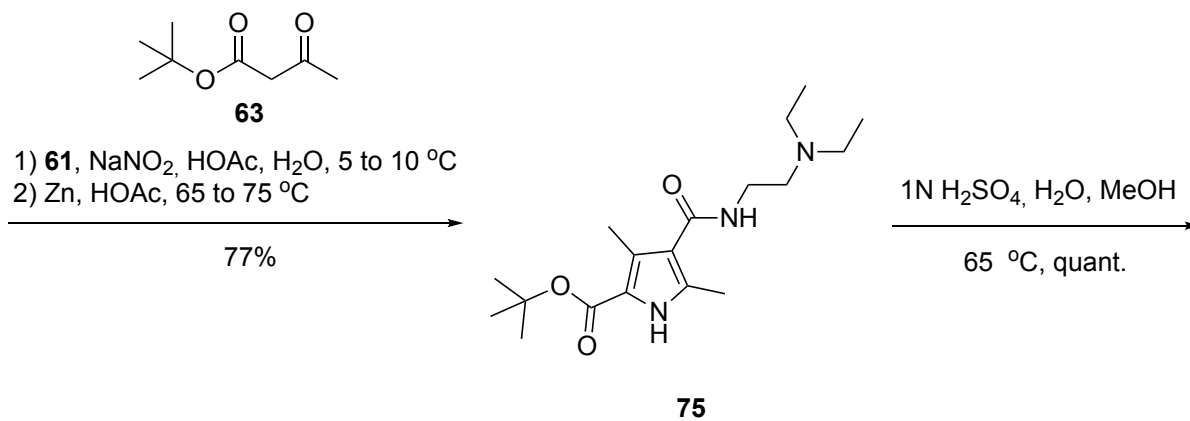
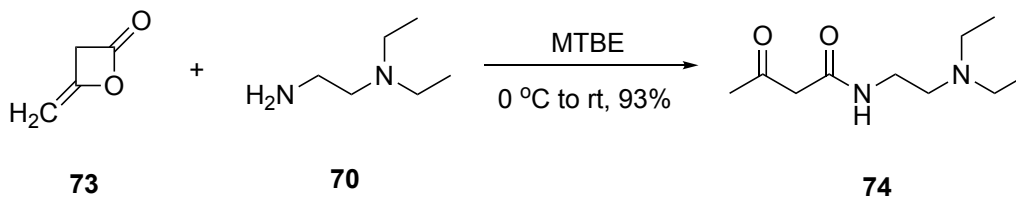
Έχει προταθεί μεγάλος αριθμός συνθετικών πορειών του Sunitinib. Μία από αυτές παρουσιάζεται στο Σχήμα 30. Η σύνθεση ξεκινά με νίτρωση του tert-βουτυλ-ακετο-οξικού (63) και η προκύπτουσα οξίμη (64) υποβάλλεται σε αναγωγική κυκλοποίηση με ακετοξικό αιθυλεστέρα (65), ώστε να παραχθεί το επιθυμητό πυρρόλιο (66) σε καλή απόδοση [220]. Ο tert-βουτυλεστέρας υδρολύεται επιλεκτικά υπό όξινες συνθήκες, ακολουθεί αποκαρβοξυλίωση και προκύπτει το πυρρόλιο (67), το οποίο υφίσταται φορμυλίωση, ώστε να παραχθεί το φορμυλο-πυρρόλιο (68). Μετά από υδρόλυση του αιθυλεστέρα και οξίνιση, απομονώνεται το καρβοξυλικό οξύ (69) σε απόδοση 93%. Η ενεργοποίηση του οξέος με EDC παρουσία υδροξυ-βενζο-τριαζολίου και N1,N1-διαιθυλαιθυλενο-1,2-διαμίνης (70) παρέχει το αμίδιο (71), το οποίο συζεύγνυται με την ινδολινόνη (72) υπό ήπιες βασικές συνθήκες και προκύπτει το Sunitinib.

Η παραπάνω πορεία σύνθεσης είναι αρκετά ικανοποιητική, ωστόσο είναι σαφές ότι είναι πιο πρακτικό να τοποθετηθεί η κατάλληλη πλευρική αλυσίδα στη θέση 3 της πυρρόλης κατά την έναρξη του σχηματισμού της.



Σχήμα 30: Συνθετική πορεία του Sunitinib, κατοχυρωμένη από την Sugen, Inc., Pharmacia & Upjohn Company ^[220].

Στο Σχήμα 31 παρουσιάζεται μία βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία του Sunitinib ^[221].



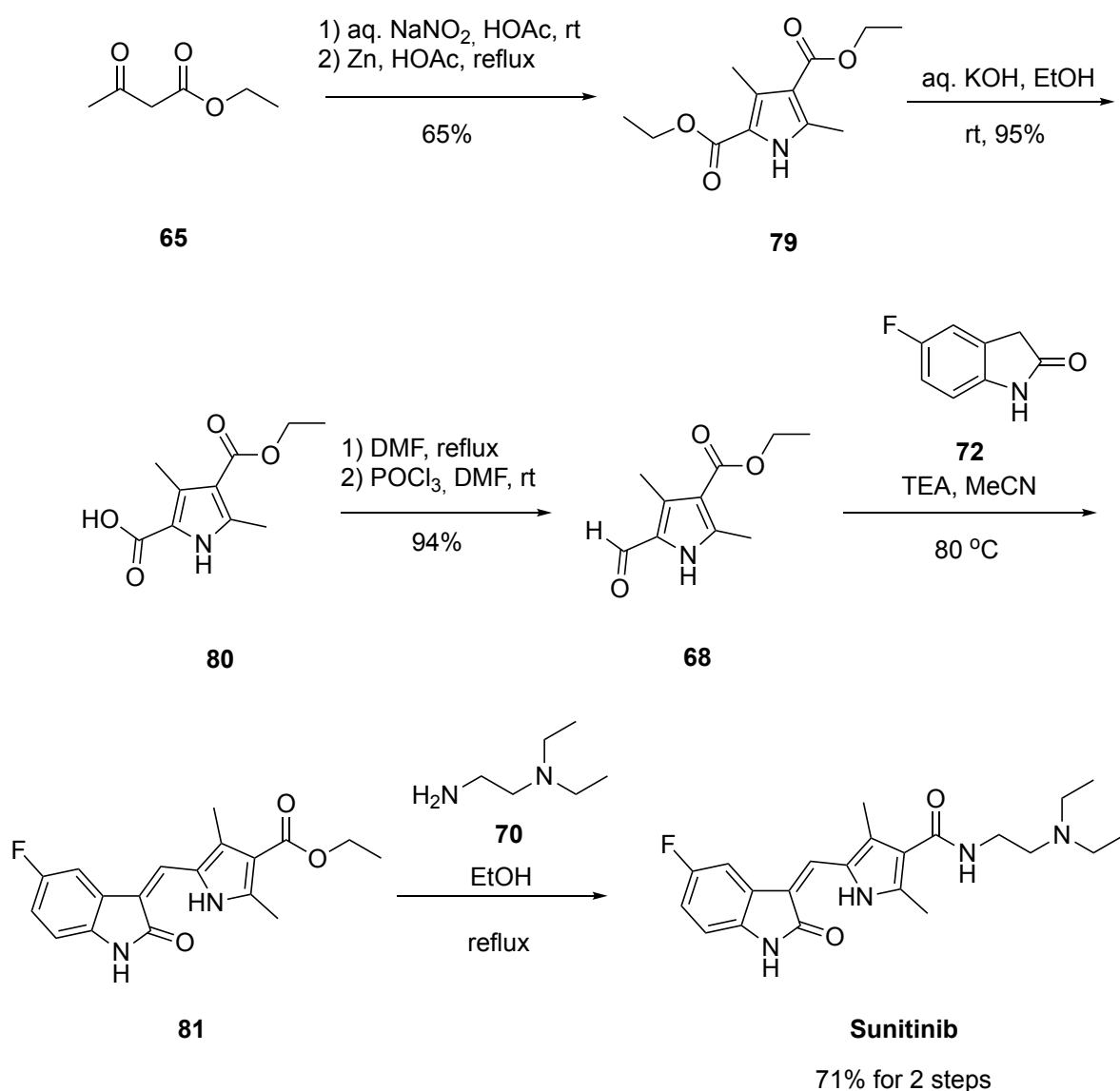
Sunitinib

74% for 2 steps

Σχήμα 31: Βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία του Sunitinib ^[221].

Το αμίδιο (**74**) παρασκευάζεται με συμπύκνωση της κετόνης (**73**) με την αμίνη (**70**), σε απόδοση 93%. Με καταλυτικές συνθήκες υδρογόνωσης επιτυγχάνεται αναγωγική κυκλοποίηση και προκύπτει το πυρρόλιο (**75**), το οποίο αποκαρβοξυλιώνεται ποσοτικά. Η αντίδραση Vilsmeier-Haack παράγει το άλας ιμινίου (**78**), το οποίο υφίσταται κατεργασία απευθείας με την ινδολινόνη (**72**), παρουσία KOH, για να δώσει την επιθυμητή φαρμακευτική ουσία.

Στο Σχήμα 32 απεικονίζεται άλλη μια εναλλακτική συνθετική πορεία του Sunitinib, η οποία αποτελείται από 6 βήματα ^[222].



Σχήμα 32: Εναλλακτική συνθετική πορεία του Sunitinib ^[222].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Συζήτηση - Αποτελέσματα

3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων

Ο σχεδιασμός νέων οργανικών ενώσεων είναι το πρώτο βήμα προς τη σύνθεση νέων εν δυνάμει αναστολέων. Μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεϊνικής κινάσης και του αναστολέα της, γίνεται κατανοητή η σχέση δομής-δραστικότητας του αναστολέα και καθίσταται δυνατός ο σχεδιασμός νέων ενώσεων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, τα οποία δύνανται να οδηγήσουν σε αυξημένη και στοχευμένη δράση έναντι των πρωτεϊνών-στόχων. Μικρές, ουσιαστικές αλλαγές στη μοριακή δομή των φαρμάκων είναι ικανές να βελτιώσουν σημαντικά την ανασταλτική τους δράση ενάντια στον κύριο πρωτεϊνικό τους στόχο ή και σε άλλες κινάσες.

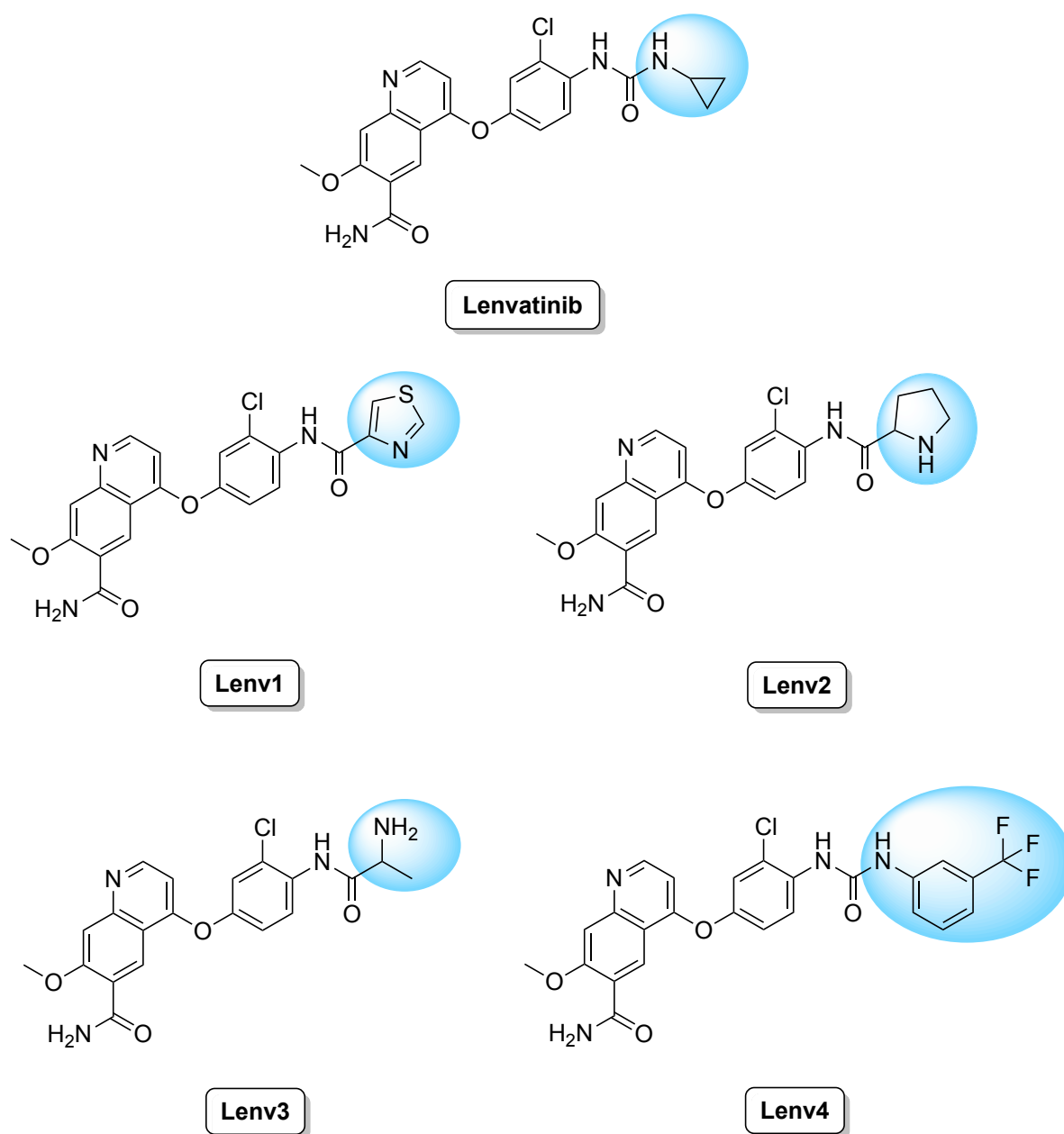
Η μοριακή μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου των πρωτεϊνικών κινασών, με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και με προσομοίωση της μοριακής πρόσδεσης του αναστολέα στο ένζυμο, επιτρέπει τη σύγκριση ενώσεων με πιθανή δράση έναντι της κινάσης με γνωστούς αναστολείς. Με αυτόν τον τρόπο, επιλέγονται οι ενώσεις που είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν βιολογική δράση. Μέσω της συσχέτισης δομής-δραστικότητας των μορίων παρέχεται ένα φαρμακοφόρο μοντέλο για το σχεδιασμό νέων δραστικότερων και εκλεκτικότερων αναστολέων.

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

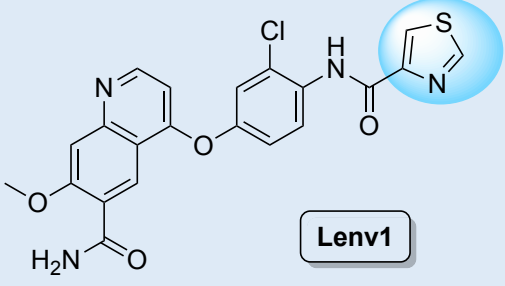
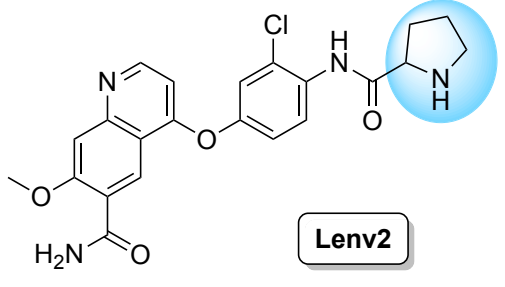
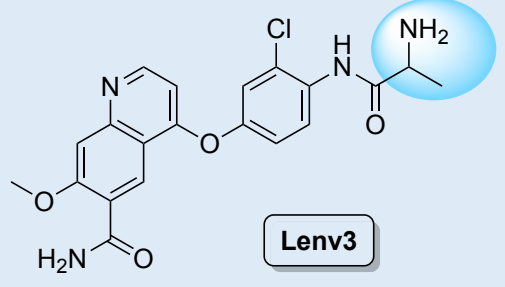
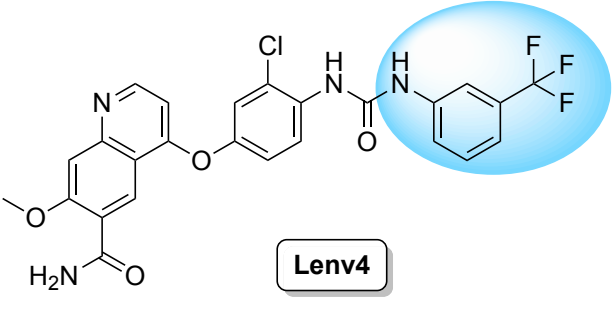
Στο εργαστήριο μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του φαρμακευτικού σκευάσματος Lenvatinib με την πρωτεϊνική κινάση VEGFR2. Βάσει αυτών, σχεδιάστηκαν νέες ανάλογες ενώσεις, οι οποίες προέκυψαν με μικρές τροποποιήσεις στη δομή του Lenvatinib. Οι στοχευμένες τροποποιήσεις αφορούσαν την αντικατάσταση της ομάδας της κυκλοπροπυλαμίνης από άλλα χημικά μόρια, μέσω σχηματισμού αμιδικού δεσμού. Οι δακτύλιοι της κινολίνης και του βενζολίου του φαρμάκου διατηρήθηκαν ανέπαφοι.

Στο *Σχήμα 33* παρουσιάζονται τα ανάλογα που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο, τα οποία ήταν αποτέλεσμα μοριακής μοντελοποίησης, ενώ οι σχετικές

τροποποιήσεις περιγράφονται στον Πίνακα 8. Αναμένεται να διενεργηθούν τα βιολογικά πειράματα, προκειμένου να αξιολογηθεί η ανασταλτική τους δράση.



Σχήμα 33: Ανάλογα-παράγωγα του Lenvatinib, εν δυνάμει αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, που σχεδιάστηκαν και έλαβε χώρα η προσπάθεια σύνθεσής τους κατά την εκπόνηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.

Ένωση	Χαρακτηριστικά
 <p style="text-align: center;">Lenv1</p>	<p>Ανάλογο του Lenvatinib με την αντικατάσταση της ομάδας κυκλοπροπυλαμίνης από θειαζόλιο. Στοχεύει στην DFG-in διαμόρφωση του VEGFR2.</p>
 <p style="text-align: center;">Lenv2</p>	<p>Ανάλογο του Lenvatinib με την αντικατάσταση της ομάδας κυκλοπροπυλαμίνης από D-προλίνη. Στοχεύει στην DFG-in διαμόρφωση του VEGFR2.</p>
 <p style="text-align: center;">Lenv3</p>	<p>Ανάλογο του Lenvatinib με την αντικατάσταση της ομάδας κυκλοπροπυλαμίνης από L-αλανίνη. Στοχεύει στην DFG-in διαμόρφωση του VEGFR2.</p>
 <p style="text-align: center;">Lenv4</p>	<p>Ανάλογο του Lenvatinib με την αντικατάσταση του δακτυλίου κυκλοπροπανίου από <i>m</i>-τριφθορομεθυλο-βενζόλιο. Στοχεύει στην DFG-out διαμόρφωση του VEGFR2.</p>

Πίνακας 8: Περιγραφή της τροποποίησης που διενεργήθηκε στο φάρμακο Lenvatinib, ώστε να προκύψει το εκάστοτε ανάλογο.

Συγκεκριμένα, στο εργαστήριο σχεδιάστηκαν δύο σειρές αναλόγων. Όλα τα ανάλογα προσδένονται μέσω του δακτυλίου κινολίνης στη θέση πρόσδεσης του ATP, καθώς και σε μια γειτονική αλλοστερική θέση, μέσω της χημικής ομάδας η οποία έχει αντικαταστήσει τον δακτύλιο κυκλοπροπανίου του Lenvatinib. Η πρώτη σειρά αναλόγων, *σειρα Α*, αποτελείται από τα ανάλογα **Lenv1**, **Lenv2**, **Lenv3**, τα οποία στοχεύουν στην DFG-in διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης VEGFR2. Αυτοί είναι αναστολείς τύπου V, όπως και το Lenvatinib. Η

δεύτερη σειρά αναλόγων που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο, *σειρά Β*, στοχεύει στην DFG-out διαμόρφωση του VEGFR2, συνεπώς ανήκουν στην κατηγορία των αναστολέων τύπου II. Τέτοιος αναστολέας είναι το **Lenv4**.

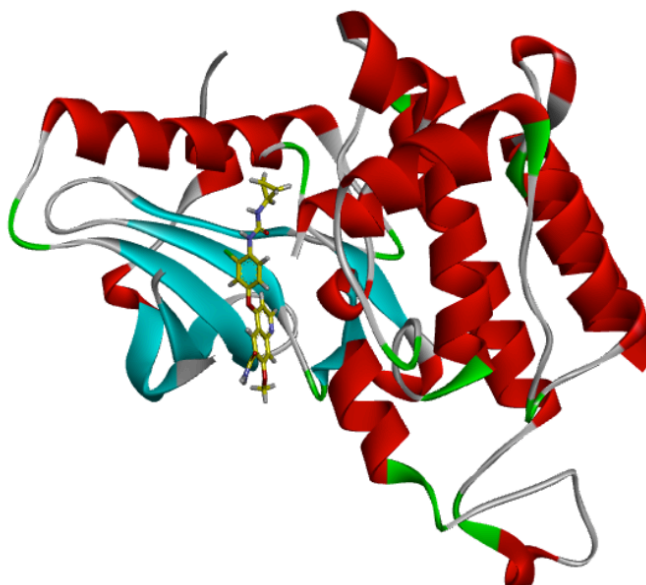
Η κρυσταλλογραφική δομή του VEGFR2 (PDB ID: 3WZD) λήφθηκε από την ιστοσελίδα RCSB Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>). Όλα τα μόρια νερού και άλλων μικρών μορίων αφαιρέθηκαν από την δομή της πρωτεΐνης. Η δομή που λήφθηκε αποθηκεύτηκε σε αρχείο μορφής rdb καθώς και mol2. Η προετοιμασία του VEGFR2 για μοριακή μοντελοποίηση έγινε με το DockPrep του προγράμματος UCSF Chimera 1.13.1, όπου έγινε απαλοιφή μορίων νερού, πρόσθεση φορτίων και ατόμων υδρογόνου και ένωση τμημάτων στη δομή της πρωτεΐνης. Τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των συμπλόκων VEGFR2-Lenvatinib και VEGFR2-αναλόγων διενεργήθηκαν μέσω του AutoDock Vina, του προγράμματος UCSF Chimera. Τα αποτελέσματα δίνονται σε μορφή πίνακα όπου λαμβάνεται η ελεύθερη ενέργεια, $\Delta G_{\text{binding}}$, ενώ καταγράφεται και αποθηκεύεται σε μορφή rdbqt το αποτέλεσμα της πόζας του μορίου με τη μικρότερη ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις του VEGFR2 με τα προσδέματα απεικονίζονται με το πρόγραμμα Discovery Studio Visualizer της εταιρίας BIOVIA.

3.2 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου Lenvatinib-VEGFR2

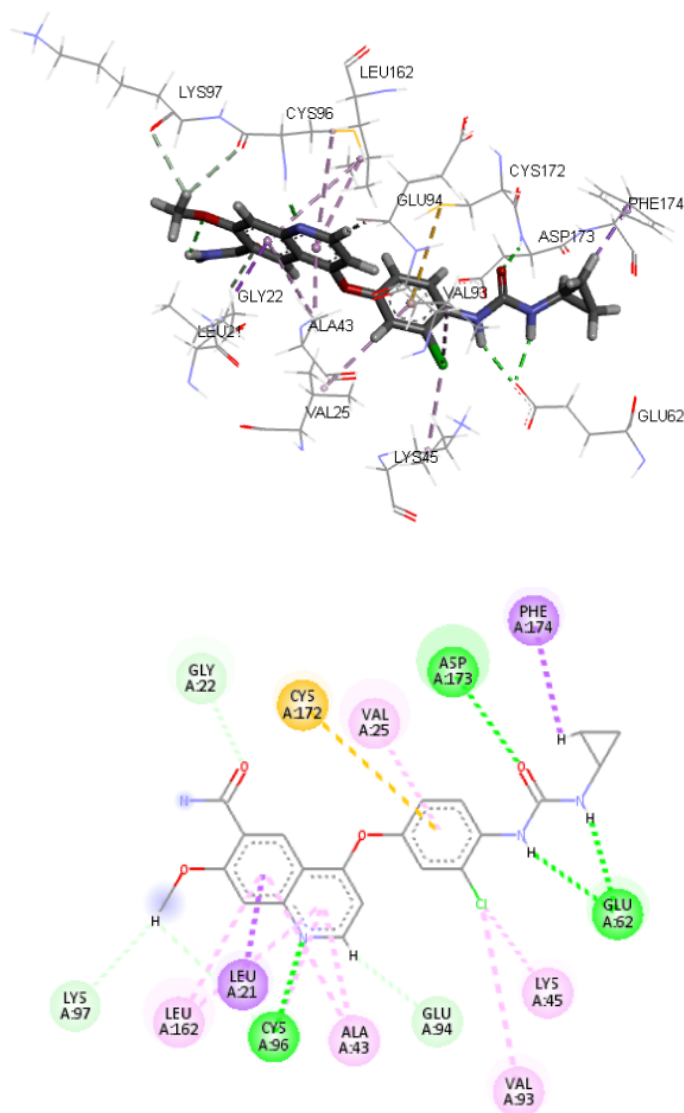
Το πρώτο βήμα προς το σχεδιασμό αναλόγων του Lenvatinib, εν δυνάμει αναστολέων, είναι η μελέτη της μοριακής πρόσδεσης του Lenvatinib στην πρωτεϊνική κινάση VEGFR2 και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο, μέσω μοριακής μοντελοποίησης.

Το Lenvatinib, που δεσμεύεται στην DFG-in διαμόρφωση του VEGFR2, είναι αναστολέας τύπου V, ο οποίος καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του ATP μέσω του δακτυλίου κινολίνης (*Εικόνα 62*). Επιπρόσθετα, αλληλεπιδρά με μια αλλοστερική γειτονική περιοχή, ως προς τη θέση πρόσδεσης του ATP, μέσω μιας π αλληλεπίδρασης, η οποία λαμβάνει χώρα ανάμεσα στον δακτύλιο κυκλοπροπανίου του Lenvatinib και τον δακτύλιο φαινυλίου του καταλοίπου Phe174 του βρόγχου DFG, η οποία φαίνεται στην *Εικόνα 63*. Ταυτοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2. Οι τρεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στην ομάδα ουρίας του Lenvatinib και τα κατάλοιπα Glu62 και Asp173, ενώ η άλλη ανάμεσα στο κατάλοιπο Cys96 και το άζωτο της κινολίνης.

Πολύ σημαντικοί στην ανασταλτική δράση του φαρμάκου είναι οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται, όπως και η αλληλεπίδραση π που λαμβάνει χώρα ανάμεσα στον αρωματικό δακτύλιο του φαινυλίου του καταλοίπου Phe174 και τον δακτύλιο κυκλοπροπανίου του φαρμάκου. Αν και η αλληλεπίδραση π είναι μία από τις ασθενέστερες μοριακές αλληλεπιδράσεις, μερικές φορές διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του προσδέτη στην πρωτεΐνη. Σε αυτή την αλληλεπίδραση π οφείλεται, πιθανότατα, η παράταση του χρόνου παραμονής της λενβατινίμπης σε σύμπλοκο με τον VEGFR2. Συνεπώς, πολύ σημαντικό κριτήριο στο σχεδιασμό νέων αναλόγων του Lenvatinib υπήρξε ο αριθμός δεσμών υδρογόνου και ο αριθμός των π αλληλεπιδράσεων κάθε αναλόγου με το κατάλοιπο Phe174 του VEGFR2.



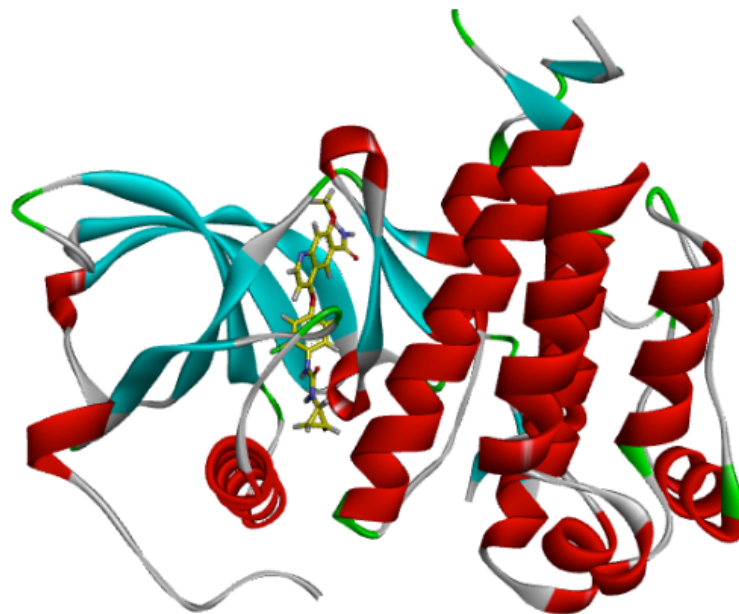
Εικόνα 62: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου *Lenvatinib-VEGFR2* στην *DFG-in* διαμόρφωση της κινάσης.



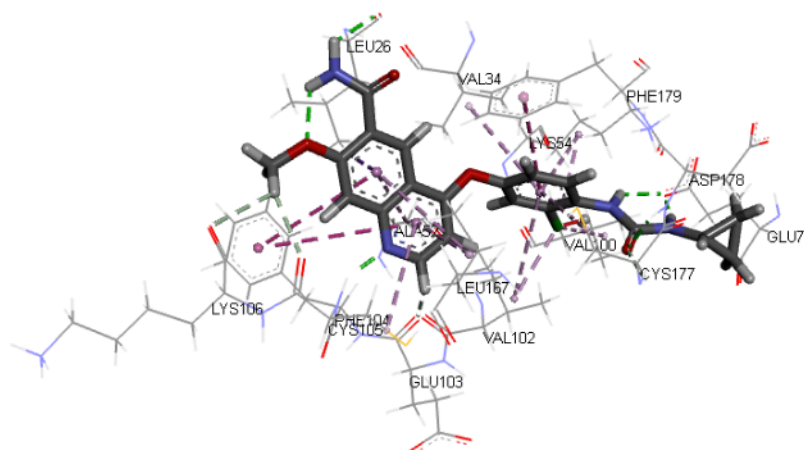
Εικόνα 63: Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου Lenvatinib-VEGFR2 στην DFG-in διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. **Πάνω:** 3D δομή του Lenvatinib και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2. Με σκούρο γκρι χρώμα απεικονίζονται τα άτομα άνθρακα, με κόκκινο χρώμα τα άτομα οξυγόνου, με μπλε χρώμα τα άτομα αζώτου και με ανοιχτό γκρι χρώμα τα άτομα υδρογόνου. Με μαύρα γράμματα σημειώνονται τα ονόματα των αμινοξικών κατάλοιπων του VEGFR2 που αλληλεπιδρούν με τον αναστολέα. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν τις αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα. **Κάτω:** 2D δομή του Lenvatinib και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται, με μωβ χρώμα οι αλληλεπιδράσεις π-σ, με κίτρινο χρώμα οι αλληλεπιδράσεις π με θείο (S), και με ροζ χρώμα οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

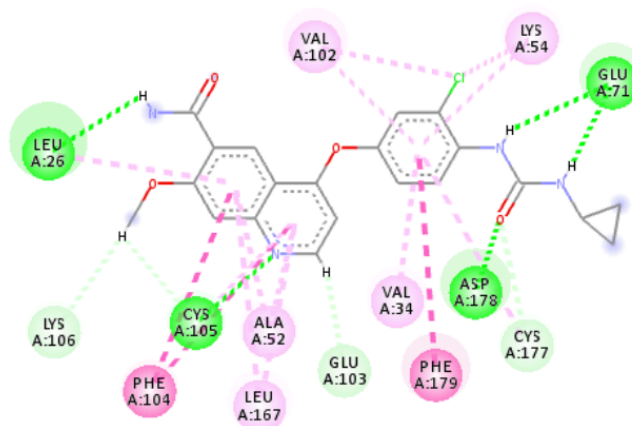
Μελετήθηκε, επίσης, η πρόσδεση του Lenvatinib στον VEGFR2, όταν ο τελευταίος υιοθετεί DFG-out διαμόρφωση (Εικόνα 64, 65). Συνολικά, αναπτύσσονται πέντε δεσμοί

υδρογόνου με τα κατάλοιπα Leu26, Cys105, Asp178 και Glu71, καθώς και πολλές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ο δακτύλιος κυκλοπροπανίου δεν εμφανίζει καμία αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη. Οι αλληλεπιδράσεις στο σύμπλοκο αυτό μελετήθηκαν, ώστε να είναι δυνατή η σύγκρισή τους με τις αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων που σχηματίζουν τα ανάλογα της σειράς B του Lenvatinib με τον VEGFR2, τα οποία ανάλογα διαθέτουν στο μόριό τους ογκώδεις ομάδες στη θέση του δακτυλίου κυκλοπροπανίου, με αποτέλεσμα να μην είναι ικανά να σχηματίσουν σύμπλοκο με τον VEGFR2, όταν αυτός υιοθετεί DFG-in διαμόρφωση.



Εικόνα 64: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Lenvatinib-VEGFR2 στην DFG-out διαμόρφωση της κινάσης.





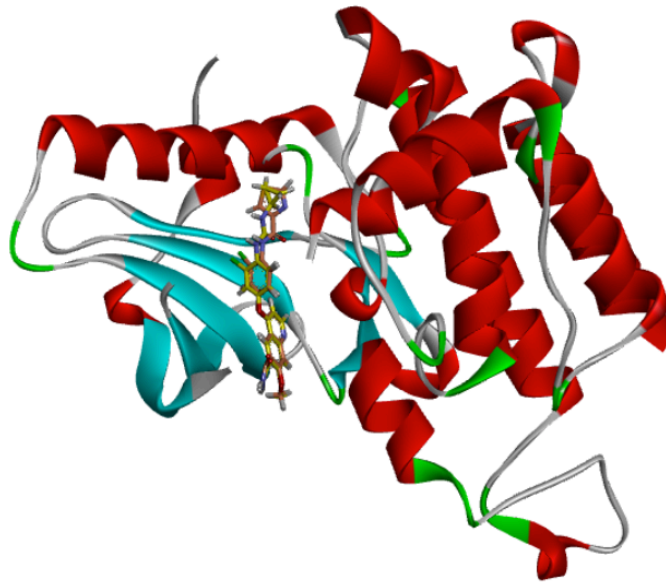
Εικόνα 65: Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου *Lenvatinib-VEGFR2* στην DFG-out διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. **Πάνω:** 3D δομή του *Lenvatinib* και οι αλληλεπιδάσεις με τα αμινοξέα της κινάσης *VEGFR2*. **Κάτω:** 2D δομή του *Lenvatinib* και οι αλληλεπιδάσεις με τα αμινοξέα της κινάσης *VEGFR2*.

3.3 Μοριακή μοντελοποίηση των νέων αναλόγων του *Lenvatinib* σε σύμπλοκο με τον *VEGFR2*

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης των νέων ενώσεων, αναλόγων του *Lenvatinib*, σε σύμπλοκο με την τυροσινική κινάση *VEGFR2*. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε το AutoDock Vina για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

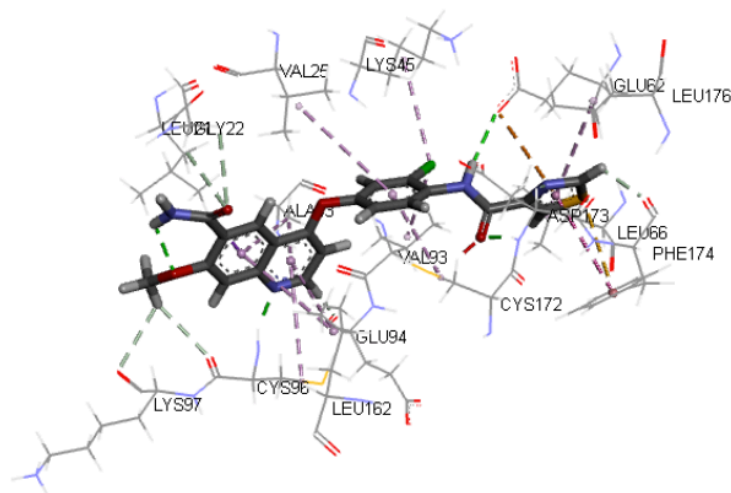
3.3.1 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου *Lenv1-VEGFR2*

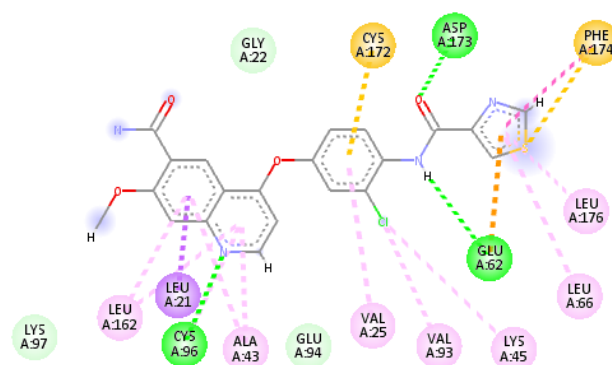
Το **Lenv1**, που δεσμεύεται στην DFG-in διαμόρφωση του *VEGFR2*, καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του ATP μέσω του δακτυλίου κινολίνης (*Εικόνα 66*). Όπως φαίνεται από την συγκρυστάλλωση του **Lenv1** και του *Lenvatinib*, οι δυο αυτές ενώσεις ταυτίζονται σχεδόν πλήρως στον τομέα του *VEGFR2*. Οι διαφορές τους είναι πολύ μικρές και εστιάζονται στην αντικατάσταση του δακτυλίου με άλλα δομικά συστατικά, κυκλικά ή μη.



Εικόνα 66: Συγκρυστάλλωση **Lenv1** και του *Lenvatinib* στον τομέα του VEGFR2. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το *Lenvatinib* και με ροζ χρώμα το **Lenv1**.

Συνολικά, οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου είναι τρεις (Εικόνα 67). Σε αυτούς εμπλέκονται τα κατάλοιπα Asp173, Glu62, Cys96 της πρωτεϊνικής κινάσης. Πολύ σημαντικές είναι, επίσης, οι δύο αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στον θειαζολικό δακτύλιο και το κατάλοιπο Phe174. Η μια από αυτές είναι π-π αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα ανάμεσα στο άτομο θείου του θειαζολίου και τον αρωματικό δακτύλιο φαινυλίου. Η δεύτερη είναι μια π-π αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται μεταξύ των δύο αρωματικών δακτυλίων. Ο δακτύλιος θειαζολίου εμπλέκεται, επίσης, σε τρεις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με άλλα κατάλοιπα αμινοξέων.

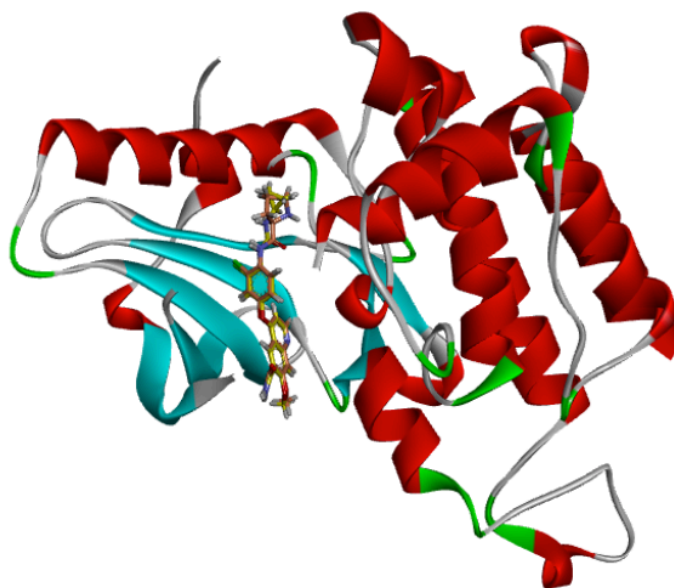




Εικόνα 67: Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου **Lenv1-VEGFR2** στην DFG-in διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. **Πάνω:** 3D δομή του **Lenv1** και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης **VEGFR2**. **Κάτω:** 2D δομή του **Lenv1** και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης **VEGFR2**.

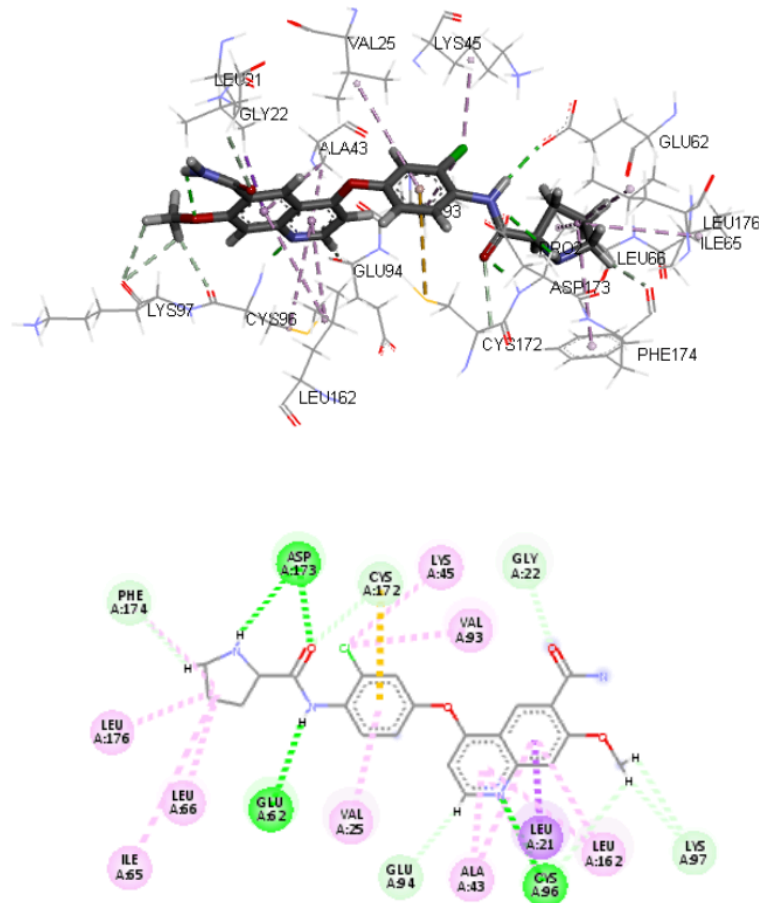
3.3.2 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου **Lenv2-VEGFR2**

Το **Lenv2** δεσμεύεται στην DFG-in διαμόρφωση του **VEGFR2**, καταλαμβάνοντας τη θέση πρόσδεσης του **ATP** μέσω του δακτυλίου κινολίνης (Εικόνα 68). Όπως φαίνεται από την συγκρυστάλλωση του **Lenv2** και του **Lenvatinib**, οι δυο αυτές ενώσεις ταυτίζονται σχεδόν πλήρως στον τομέα του **VEGFR2**.



Εικόνα 68: Συγκρυστάλλωση **Lenv2** και του **Lenvatinib** στον τομέα του **VEGFR2**. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το **Lenvatinib** και με ροζ χρώμα το **Lenv2**.

Συνολικά, οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου είναι τέσσερις (Εικόνα 69). Σε αυτούς εμπλέκονται τα κατάλοιπα Asp173, Glu62, Cys96 της πρωτεϊνικής κινάσης. Παρατηρείται μια υδρόφοβη αλληλεπίδραση ανάμεσα στην ομάδα της D-προλίνης και το κατάλοιπο Phe174, ενώ αναπτύσσονται τρεις ακόμη υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην ομάδα της D-προλίνης και άλλα κατάλοιπα αμινοξέων.

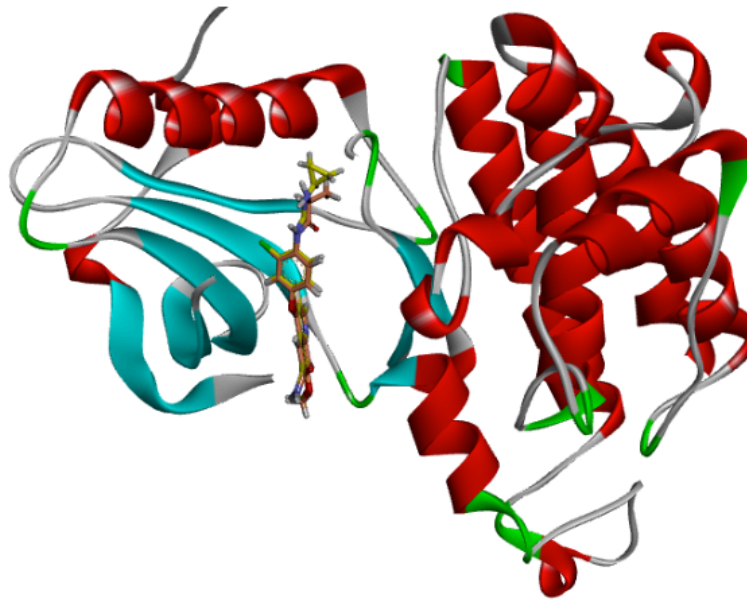


Εικόνα 69: Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου **Lenv2-VEGFR2** στην DFG-in διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. **Πάνω:** 3D δομή του **Lenv2** και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης **VEGFR2**. **Κάτω:** 2D δομή του **Lenv2** και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης **VEGFR2**.

3.3.3 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου **Lenv3-VEGFR2**

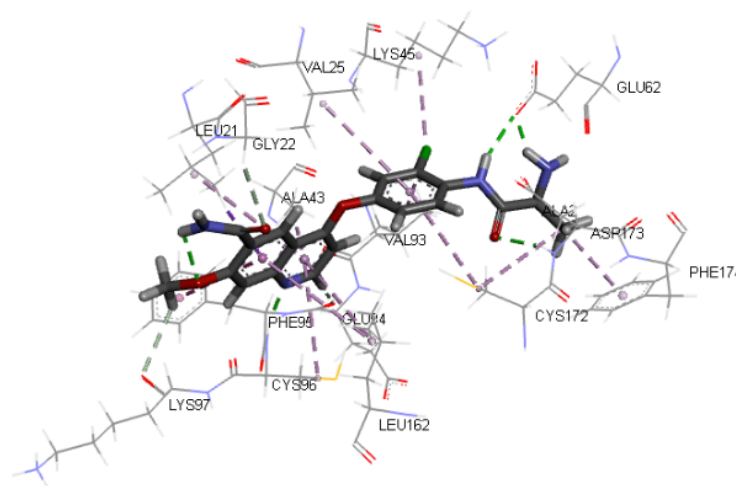
Το **Lenv3** δεσμεύεται στην DFG-in διαμόρφωση του **VEGFR2** και καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του **ATP** μέσω του δακτυλίου κινολίνης (Εικόνα 70). Μέσω της συγκρυστάλλωσης του **Lenv3** και του **Lenvatinib**, γίνεται αντιληπτό πως οι δυο αυτές ενώσεις

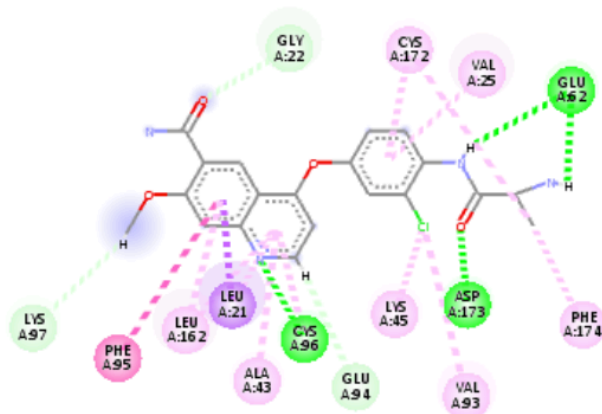
ταυτίζονται σχεδόν πλήρως στον τομέα του VEGFR2, καθώς οι διαφορές τους είναι πολύ μικρές.



Εικόνα 70: Συγκρουστικότητα **Lenv3** και του **Lenvatinib** στον τομέα του VEGFR2. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το **Lenvatinib** και με ροζ χρώμα το **Lenv3**.

Συνολικά, οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου είναι τέσσερις (Εικόνα 71). Σε αυτούς εμπλέκονται τα κατάλοιπα Asp173, Glu62, Cys96 του VEGFR2, ενώ στον έναν από αυτούς εμπλέκεται η δομή της L-αλανίνης. Παρατηρούνται, επίσης, δύο υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην ομάδα της L-αλανίνης και τα κατάλοιπα Phe174 και Cys172.

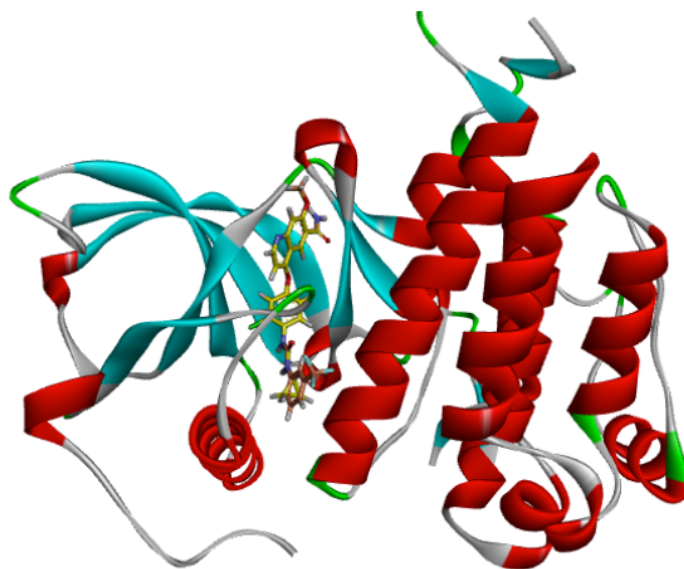




Εικόνα 71: Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου **Lenv3-VEGFR2** στην **DFG-in** διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. **Πάνω:** 3D δομή του **Lenv3** και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης **VEGFR2**. **Κάτω:** 2D δομή του **Lenv3** και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης **VEGFR2**.

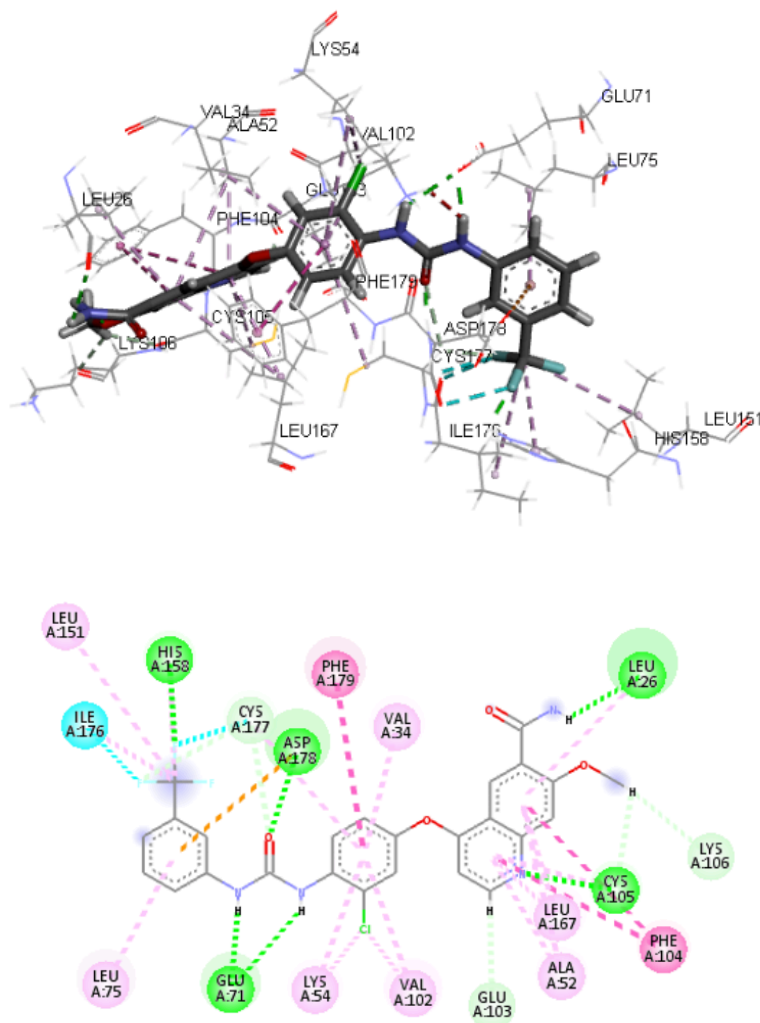
3.3.4 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου **Lenv4-VEGFR2**

Το **Lenv4** δεσμεύεται στην **DFG-out** διαμόρφωση του **VEGFR2**. Μέσω της συγκρυστάλλωσης του **Lenv4** και του **Lenvatinib** (Εικόνα 72), γίνεται αντιληπτό πως οι δυο αυτές ενώσεις ταυτίζονται σχεδόν πλήρως στον τομέα του **VEGFR2**, καθώς οι διαφορές τους είναι πολύ μικρές και εστιάζονται στην αντικατάσταση του δακτυλίου.



Εικόνα 72: Συγκρυστάλλωση **Lenv4** και του **Lenvatinib** στον τομέα του **VEGFR2**. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται το **Lenvatinib** και με ροζ χρώμα το **Lenv4**.

Συνολικά, οι σχηματιζόμενοι δεσμοί υδρογόνου, είναι έξι (Εικόνα 73). Σε αυτούς εμπλέκονται τα κατάλοιπα His158, Asp178, Leu26, Glu71, Cys105 του VEGFR2. Η δομή του τριφθορομεθυλοβενζολίου εμπλέκεται συνολικά σε οχτώ αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 73: Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου *Lenv4*-VEGFR2 στην DFG-out διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. **Πάνω:** 3D δομή του *Lenv4* και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2. **Κάτω:** 2D δομή του *Lenv4* και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

3.3.5 Αποτελέσματα μοριακής μοντελοποίησης

Η μοριακή μοντελοποίηση των συμπλόκων που σχηματίζουν οι πιθανοί αναστολείς με την πρωτεϊνική κινάση, παρέχει τη δυνατότητα θεωρητικού υπολογισμού της ελεύθερης ενέργειας Gibbs του κάθε συμπλόκου (Πίνακας 9). Το αποτέλεσμα της ενέργειας αυτής, είναι

συνάρτηση των επιμέρους ηλεκτροστατικών, Van der Waals, περιστροφικών συνεισφορών και συνεισφορών από δεσμούς υδρογόνου και φαινόμενα επιδιалύτωσης, μεταξύ προσδέματος-στόχου και δίνεται ως το άθροισμα: $\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{es}} + \Delta G_{\text{hb}} + \Delta G_{\text{tor}} + \Delta G_{\text{desolv}}$.

Τα σύμπλοκα που σχηματίζουν οι νέες ενώσεις, **Lenv1**, **Lenv2**, **Lenv3**, με τον VEGFR2, συγκρίθηκαν με το σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2, στην DFG-in διαμόρφωση του VEGFR2. Το σύμπλοκο **Lenv4**-VEGFR2 συγκρίθηκε με το σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2, στην DFG-out διαμόρφωση του VEGFR2. Όσο μικρότερη είναι η ελεύθερη ενέργεια Gibbs ενός συμπλόκου, τόσο ευνοείται θερμοδυναμικά ο σχηματισμός του, συνεπώς, τόσο ισχυρότερα και πιο αποτελεσματικά δεσμεύεται ο αναστολέας στο ενεργό κέντρο, κατά τη θεωρητική πάντα προσέγγιση, ως απόρροια της στερικής συμπληρωματικότητας ως προς το σχήμα, το μέγεθος, καθώς και της συμπληρωματικότητας των αλληλεπιδράσεων. Η αρνητική τιμή της ενέργειας αυτής υποδηλώνει ότι η διεργασία γίνεται αυθόρμητα.

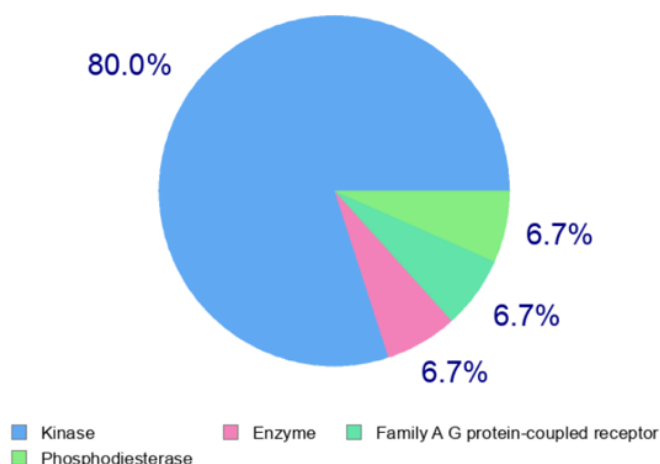
Σύμπλοκο	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)
Lenvatinib-VEGFR2 (DFG-in)	-10.2
Lenv1-VEGFR2	-9.6
Lenv2-VEGFR2	-9.8
Lenv3-VEGFR2	-9.4
Lenvatinib-VEGFR2 (DFG-out)	-11.0
Lenv4-VEGFR2	-13.5

Πίνακας 9: Θεωρητικά αποτελέσματα ελεύθερης ενέργειας Gibbs του κάθε συμπλόκου.

3.3.6 Μοριακή μοντελοποίηση του Lenvatinib και των νέων ενώσεων στο ενεργό κέντρο άλλων κινασών

Η πρόβλεψη της πιθανής αναστολής πρωτεϊνικών κινασών, πέρα από τον VEGFR2, πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα SwissTargetPrediction. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το Lenvatinib στοχεύει κυρίως πρωτεϊνικές κινάσες (80.0%) (Εικόνα 74) και είναι ικανό να αναστείλει 100 ανθρώπινες πρωτεϊνικές δομές. Από αυτές, μεγαλύτερη πιθανότητα ανασταλτικής δράσης εμφανίζει έναντι των VEGFR2, VEGFR3 και RET (Πίνακας 10). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα βιολογικών πειραμάτων, το

Lenvatinib εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι των τυροσινικών κινασών VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PDGFRα και c-KIT [189].



Εικόνα 74: Γράφημα των αποτελεσμάτων από την πρόβλεψη των πιθανών στόχων του Lenvatinib, σύμφωνα με το υπολογιστικό πρόγραμμα SwissTargetPrediction.

Target	Common Name	Target Class	Probability
Vascular endothelial growth factor receptor 2	KDR	Kinase	100%
Vascular endothelial growth factor receptor 3	FLT4	Kinase	100%
Kinesin-1 heavy chain/Tyrosine-protein kinase receptor RET	RET	Kinase	100%

Πίνακας 10: Στόχοι του Lenvatinib και των αναλόγων του με τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης βιοενεργότητας, σύμφωνα με το υπολογιστικό πρόγραμμα SwissTargetPrediction.

Τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης του Lenvatinib και των νέων ενώσεων στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνικών κινασών που αναφέρθηκαν, βρίσκονται σε εξέλιξη από την ερευνητική ομάδα.

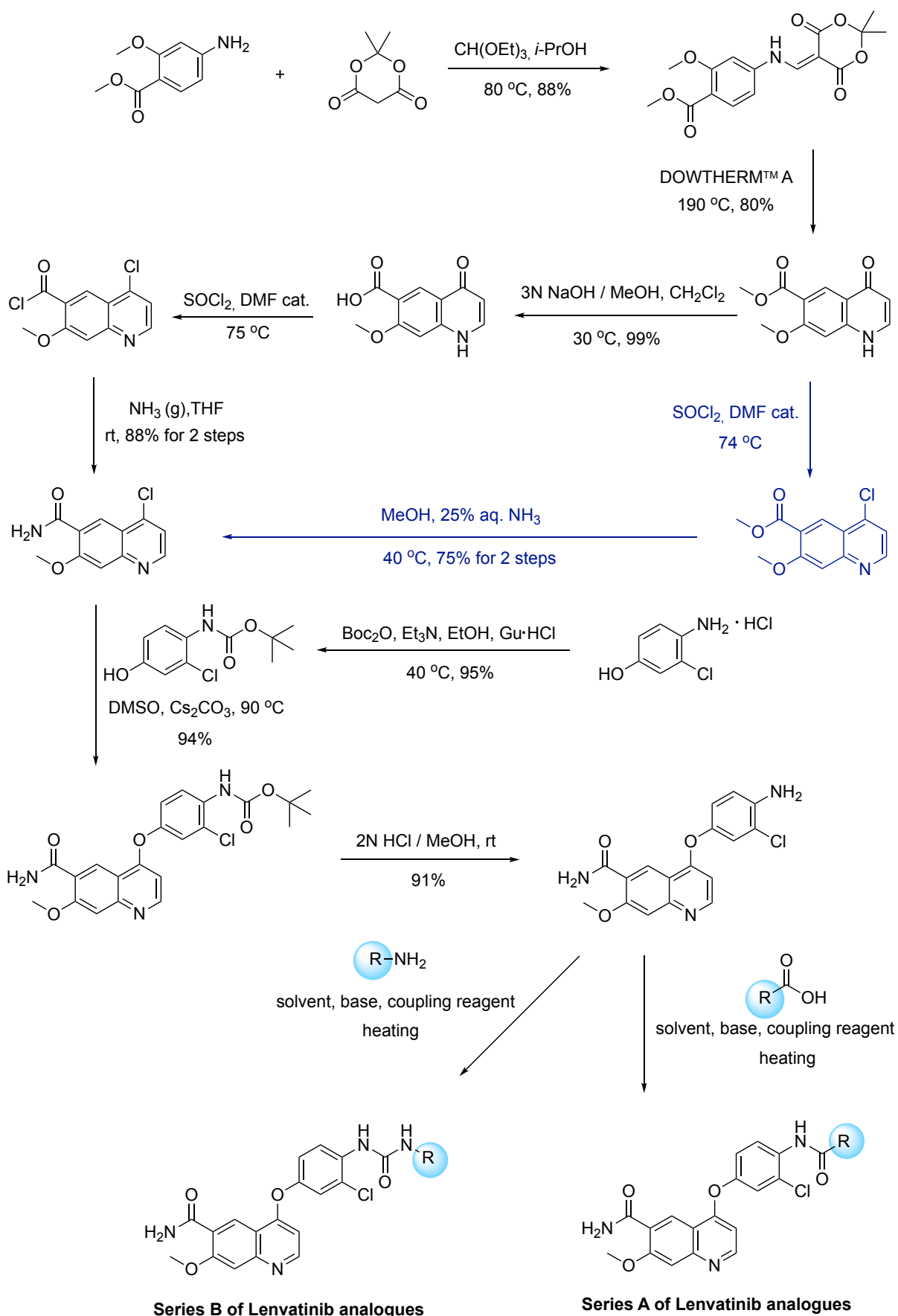
3.4 Ολική πορεία σύνθεσης νέων αναλόγων του Lenvatinib

Στο ερευνητικό εργαστήριο, η σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου βασίστηκε στη μέθοδο που πρότεινε η εταιρία Eisai το 2007 [197], ενώ τα επόμενα συνθετικά βήματα που οδηγούν στη παρασκευή του των αναλόγων του Lenvatinib, βασίστηκαν στο συνθετικό μονοπάτι που δημοσιεύτηκε το 2017 από κινέζους ερευνητές [202]. Η ολική συνθετική πορεία περιγράφεται στο Σχήμα 34.

Ξεκινώντας από τα διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια, τον 4-αμινο-2-μεθοξυ-βενζοϊκό μεθυλεστέρα, το οξύ Meldrum και τον μυρμηκικό τριαιθυλεστέρα, λαμβάνει χώρα μια αντίδραση υποκατάστασης, με αποτέλεσμα την παραγωγή εναμίνης. Στη συνέχεια, η εναμίνη υφίσταται μια ενδομοριακή κυκλοποίηση, μέσω αντίδρασης υποκατάστασης, με αποβολή ακετόνης και αποκαρβοξυλίωση, ώστε να παραχθεί η κινολόνη. Ακολουθεί υδρόλυση του εστέρα σε καρβοξυλικό οξύ, σε βασικές συνθήκες. Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η υδρόλυση περιγράφονται από τους Theodorou V., Skobridis K., και συνεργάτες ^[203]. Στη συνέχεια πραγματοποιείται χλωρίωση σε δύο θέσεις της υποκατεστημένης κινολόνης με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου. Απευθείας λαμβάνει χώρα μία αντίδραση υποκατάστασης, μέσω παροχής αέριας αμμωνίας, ώστε να προκύψει το αντίστοιχο αμίδιο.

Παράλληλα, πραγματοποιείται η Boc-προστασία της αμινομάδας του υδροχλωρικού άλατος της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, με συνθήκες οι οποίες προτάθηκαν από τους Jahani F., Tajbakhsh M., Golchoubian H. και Khaksar S. το 2011 ^[204]. Μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης σε βασικές συνθήκες, η N-Boc προστατευμένη 4-αμινο-3-χλωροφαινόλη συζεύγνυται με το 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιο. Ακολουθεί αποπροστασία της N-Boc προστατευμένης ένωσης σε όξινες συνθήκες. Το υδροχλωρικό άλας της αποπροστατευμένης αμίνης που προκύπτει, συζεύγνυται με ενώσεις οι οποίες διαθέτουν είτε μια καρβοξυλική ομάδα (**50A**) είτε μία αμινομάδα (**50B**), ώστε να επιτευχθεί η σύζευξη και να προκύψει η *σειρα A* και η *σειρά B* αναλόγων του Lenvatinib, αντίστοιχα.

Εναλλακτικά, στο ερευνητικό εργαστήριο, πραγματοποιήθηκε χλωρίωση της κετο-ομάδας του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, χωρίς να προηγηθεί υδρόλυση της ομάδας του εστέρα (*Σχήμα 34*). Στην 4-χλωρο-υποκατεστημένη κινολίνη που προκύπτει πραγματοποιείται αμμωνιόλυση του εστέρα και σχηματίζεται το αμίδιο. Ωστόσο, η απόδοση των εναλλακτικών αυτών σταδίων είναι μικρότερη (75%), συνεπώς δεν προτιμάται.



Σχήμα 34: Ολική συνθετική πορεία αναλόγων του Lenvatinib. Με μπλε χρώμα απεικονίζεται το εναλλακτικό συνθετικό βήμα.

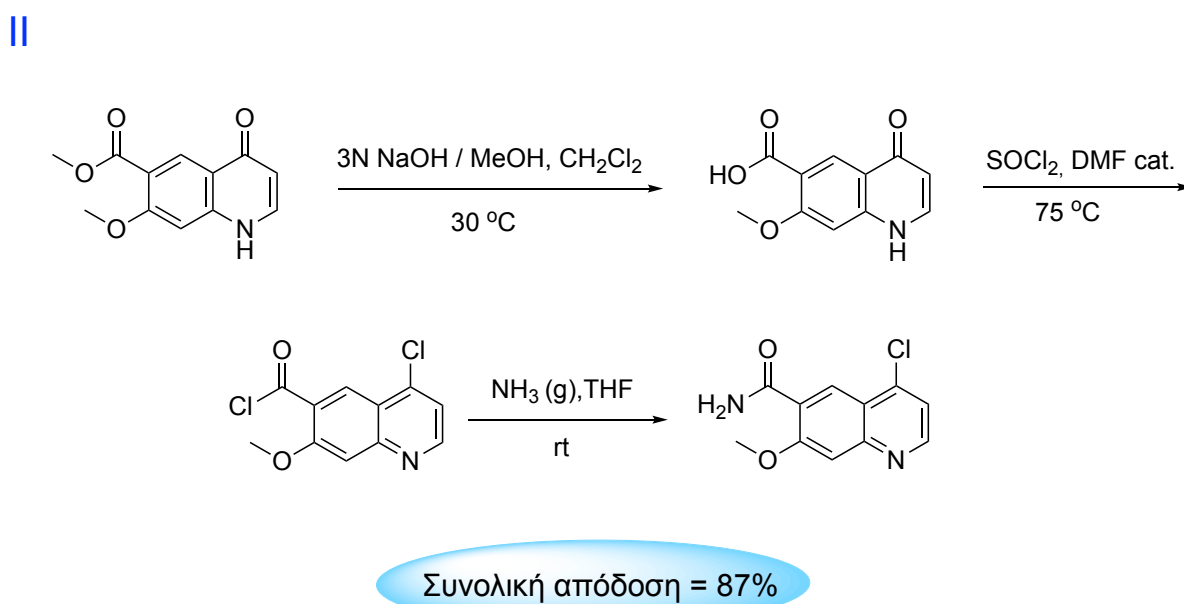
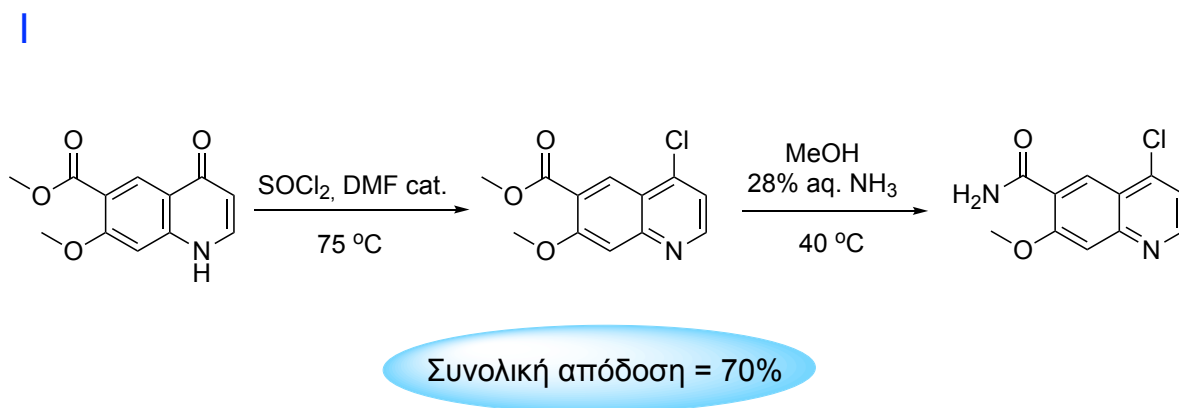
3.5 Βελτιστοποιήσεις στη συνθετική πορεία των νέων αναλόγων του Lenvatinib

Η συνθετική πορεία που ακολουθείται στο εργαστήριο για τη σύνθεση αναλόγων του Lenvatinib αποτελείται από 9 στάδια και χαρακτηρίζεται από υψηλές αποδόσεις των ενδιάμεσων και των τελικών προϊόντων. Έχει βασιστεί στις συνθετικές πορείες που πρότειναν η εταιρία Eisai το 2007 ^[197] και κινέζοι ερευνητές το 2017 ^[202], ωστόσο είναι διαφοροποιημένη και βελτιωμένη σε συγκεκριμένα στάδια, τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

- Στάδια μετατροπής του μεθυλεστέρα σε αμίδιο

Στη πορεία που προτάθηκε από την εταιρία Eisai το 2007 ^[197] πραγματοποιείται χλωρίωση της κετο-ομάδας του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, χωρίς να προηγηθεί υδρόλυση της ομάδας του εστέρα (Σχήμα 35, I). Η ομάδα αμιδίου προκύπτει από τον μεθυλεστέρα της 4-χλωροϋποκατεστημένης κινολίνης απευθείας μέσω αμμωνιόλυσης, με τη χρήση υδατικής αμμωνίας 28% σε μεθανολικό διάλυμα, στους 40 °C. Η συνολική απόδοση μετατροπής της ομάδας του μεθυλεστέρα σε αμίδιο, μέσω αυτής της οδού, ανέρχεται στο 70%.

Μια πολύ αποδοτικότερη συνθετική πορεία μετατροπής του μεθυλεστέρα στο αντίστοιχο αμίδιο πραγματοποιείται, πλέον, στο εργαστήριο, η οποία περιλαμβάνει την υδρόλυση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ (Σχήμα 35, II). Η υδρόλυση αυτή είναι ουσιαστικά ποσοτική, καθώς επιτυγχάνεται σε απόδοση 99%. Πραγματοποιείται σε βασικές συνθήκες, οι οποίες παρέχονται από μεθανολικό διάλυμα καυστικού νατρίου σε διχλωρομεθάνιο, στους 30 °C. Οι συνθήκες αυτές περιγράφονται από τους Theodorou V., Skobridis K., και συνεργάτες ^[203]. Στη συνέχεια, γίνεται χλωρίωση του καρβοξυλικού οξέος με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου και παρέχεται αέρια αμμωνία στο διαλυμένο σε τετραϋδροφουράνιο 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-καρβονυλικό χλωρίδιο που προκύπτει, σε θερμοκρασία δωματίου. Η συνολική απόδοση μετατροπής της ομάδας του μεθυλεστέρα σε αμίδιο, μέσω αυτής της οδού, ανέρχεται στο 87%. Με τη διαφοροποίηση αυτή, προστίθεται ένα παραπάνω βήμα στη συνθετική πορεία, ωστόσο το βήμα αυτό πραγματοποιείται ποσοτικά και μέσω αυτού επιτυγχάνεται αύξηση της απόδοσης των παρακάτω συνθετικών σταδίων.

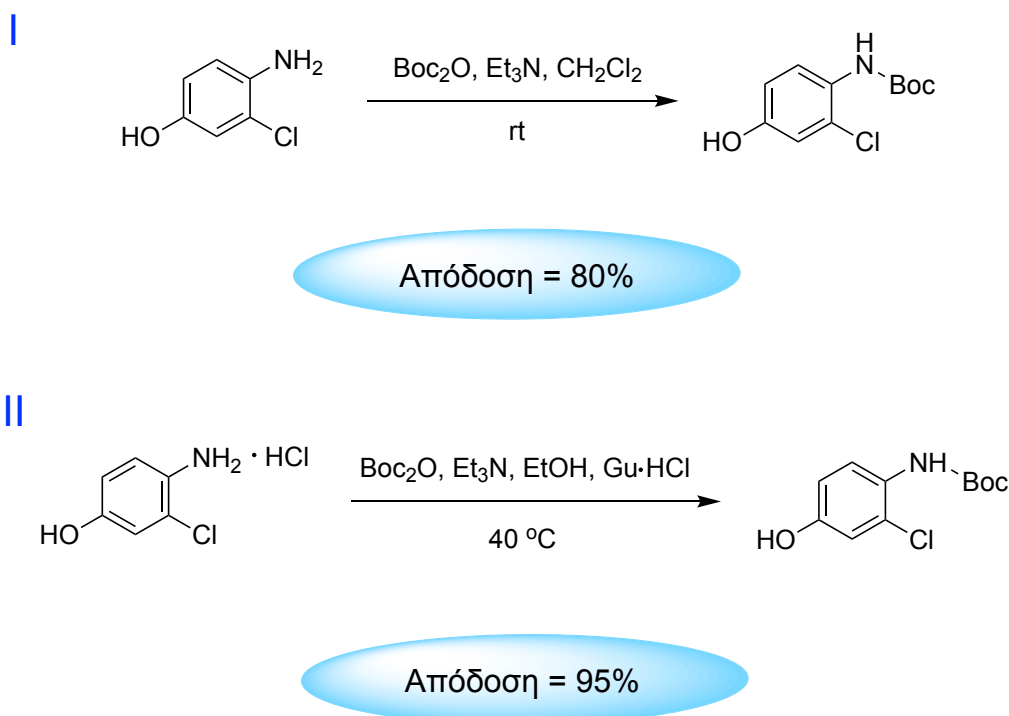


Σχήμα 35: Στάδια μετατροπής του μεθυλεστέρα στο αντίστοιχο αμίδιο. **I:** Στάδια που προτάθηκαν από την εταιρία Eisai^[197] και η αντίστοιχη απόδοση. **II:** Βελτιστοποιημένα στάδια που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο, λόγω της πολύ ικανοποιητικής απόδοσης.

- Προστασία αμινομάδας

Η Boc-προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, σύμφωνα με τη συνθετική οδό που δημοσιεύτηκε το 2017 από κινέζους ερευνητές^[202], επιτυγχάνεται με τη χρήση Boc-ανυδρίτη, τριαιθυλαμίνης και διχλωρομεθανίου, με απόδοση 80% (Σχήμα 36, I).

Στο εργαστήριο, για να αυξηθεί η απόδοση της Boc-προστασίας της αμινομάδας του υδροχλωρικού άλατος της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, έγινε χρήση Boc-ανυδρίτη, τριαιθυλαμίνης και υδροχλωρικού άλατος της γουανιδίνης ως οργανοκαταλύτη. Με αυτές τις συνθήκες, οι οποίες προτάθηκαν από τον Jahani και τους συνεργάτες του το 2011^[204], πραγματοποιείται η N-Boc προστασία με πολύ υψηλή απόδοση (95%) (Σχήμα 36, II).



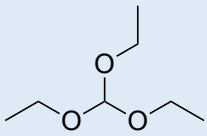

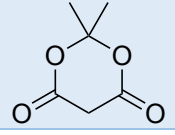
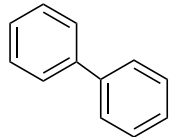
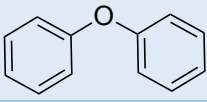
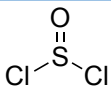
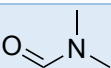

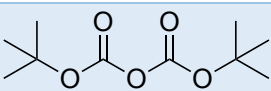
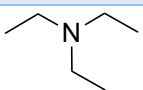
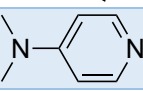
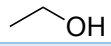
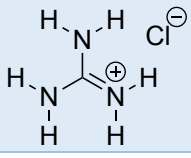

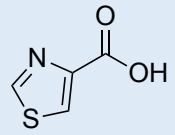
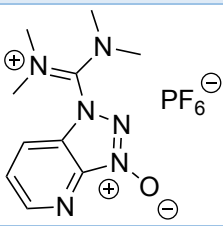
Σχήμα 36: Προστασία αμινομάδας. **I:** Συνθήκες που προτάθηκαν από την εταιρία κινέζους ερευνητές ^[202] και η αντίστοιχη απόδοση. **II:** Βελτιστοποιημένες συνθήκες που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο, λόγω της πολύ ικανοποιητικής απόδοσης.

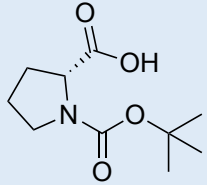
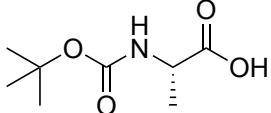
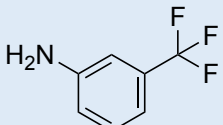
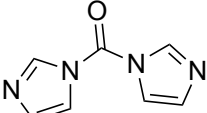
Οι παραπάνω βελτιστοποιήσεις στην πορεία σύνθεσης των αναλόγων του Lenvatinib αύξησαν τη συνολική απόδοση και συνέβαλαν στην εξοικονόμηση χρόνου και διαλυτών για τη σύνθεση και τον καθαρισμό των προϊόντων.

3.6 Σύνθεση νέων αναλόγων του Lenvatinib

Στο εργαστήριο, για τη σύνθεση νέων αναλόγων του Lenvatinib πραγματοποιείται, αρχικά, η σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου. Αυτό το τμήμα του Lenvatinib διατηρείται αναλοίωτο κατά τη σύνθεση των αναλόγων του. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται σύζευξη του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου με τη N-Boc προστατευμένη 4-αμινο-3-χλωροφαινόλη, ώστε με αποπροστασία να προκύψει το 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιο. Το αμίδιο αυτό, συζεύγνυται με τις κατάλληλες χημικές ενώσεις, ώστε να συντεθούν τα επιθυμητά ανάλογα.

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 11) παρουσιάζεται η δομή όλων των αντιδραστηρίων και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στα κατά την πορεία σύνθεσης των αναλόγων του Lenvatinib.

Αντιδραστήριο	Ονοματολογία	Δομή
CH(OEt) ₃	Μυρμηκικός τριαιθυλεστέρας	
<i>i</i> -PrOH	Ισοπροπανόλη	
Meldrum's acid	2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανο-4,6-διόνη	
Phe ₂	Διφαινύλιο	
Phe ₂ O	Διφαινυλαιθέρας	
SOCl ₂	Θειονυλοχλωρίδιο	
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο	
THF	Τετραυδροφουράνιο	
Boc ₂ O	Boc ανυδρίτης	
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη	
DMAP	4-Διμεθυλαμινοπυριδίνη	
EtOH	Αιθανόλη	
Gu·HCl	Υδροχλωρικό άλας γουανιδίνης	
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	
C ₄ H ₃ NO ₂ S	4-θειαζολο-καρβοξυλικό οξύ	
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate	

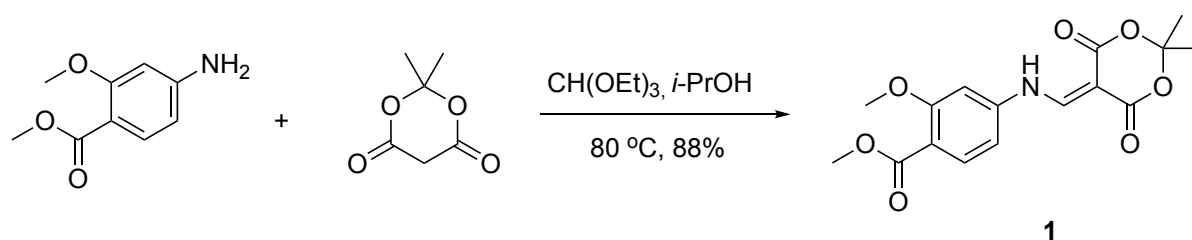
N-Boc-D-Pro	N-Boc-D-προλίνη	
N-Boc-L-Ala	N-Boc-L-αλανίνη	
C ₇ H ₆ F ₃ N	3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη	
CDI	1,1'-Καρβονυλοδιιμιδαζόλιο	

Πίνακας 11: Δομή και ονοματολογία αντιδραστηρίων και διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση των πειραμάτων.

3.6.1 Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1

3.6.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1

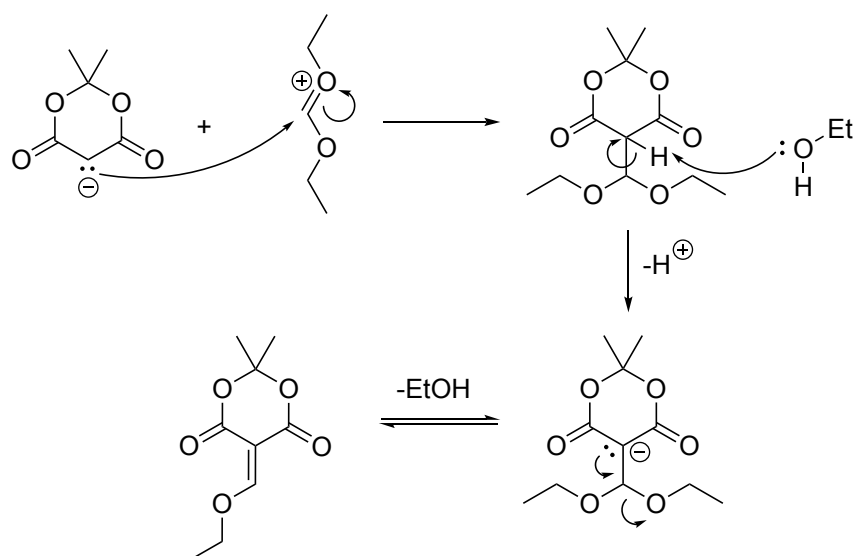
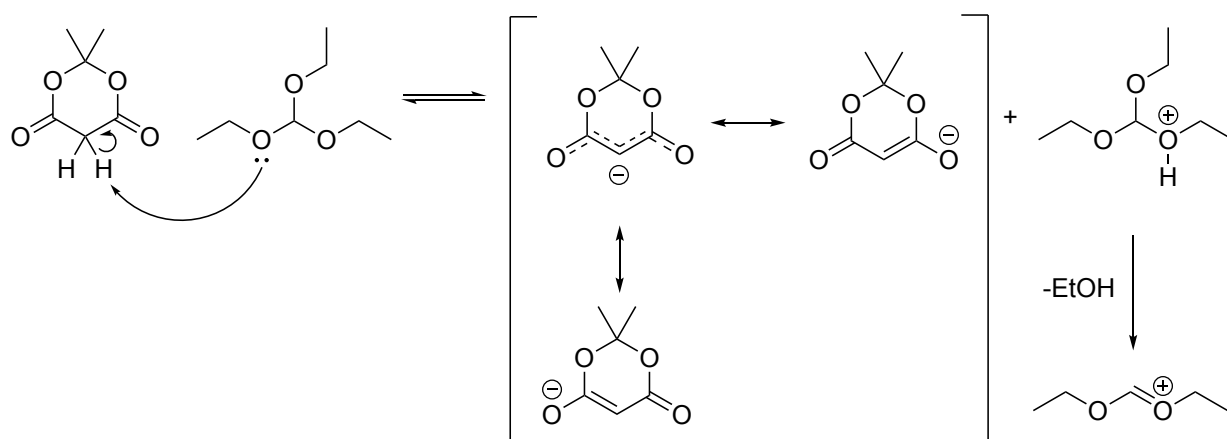
Ξεκινώντας από τα διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια, 4-αμινο-2-μεθοξυβενζοϊκό μεθυλεστέρα, οξύ Meldrum και ορθοφορμικό αιθύλιο, λαμβάνει χώρα μια συζυγής προσθήκη τύπου Michael σε διαλύτη ισοπροπυλική αλκοόλη και θερμοκρασία 80 °C, με αποτέλεσμα την παραγωγή της εναμίνης **1**, σε απόδοση 88% (Σχήμα 37).

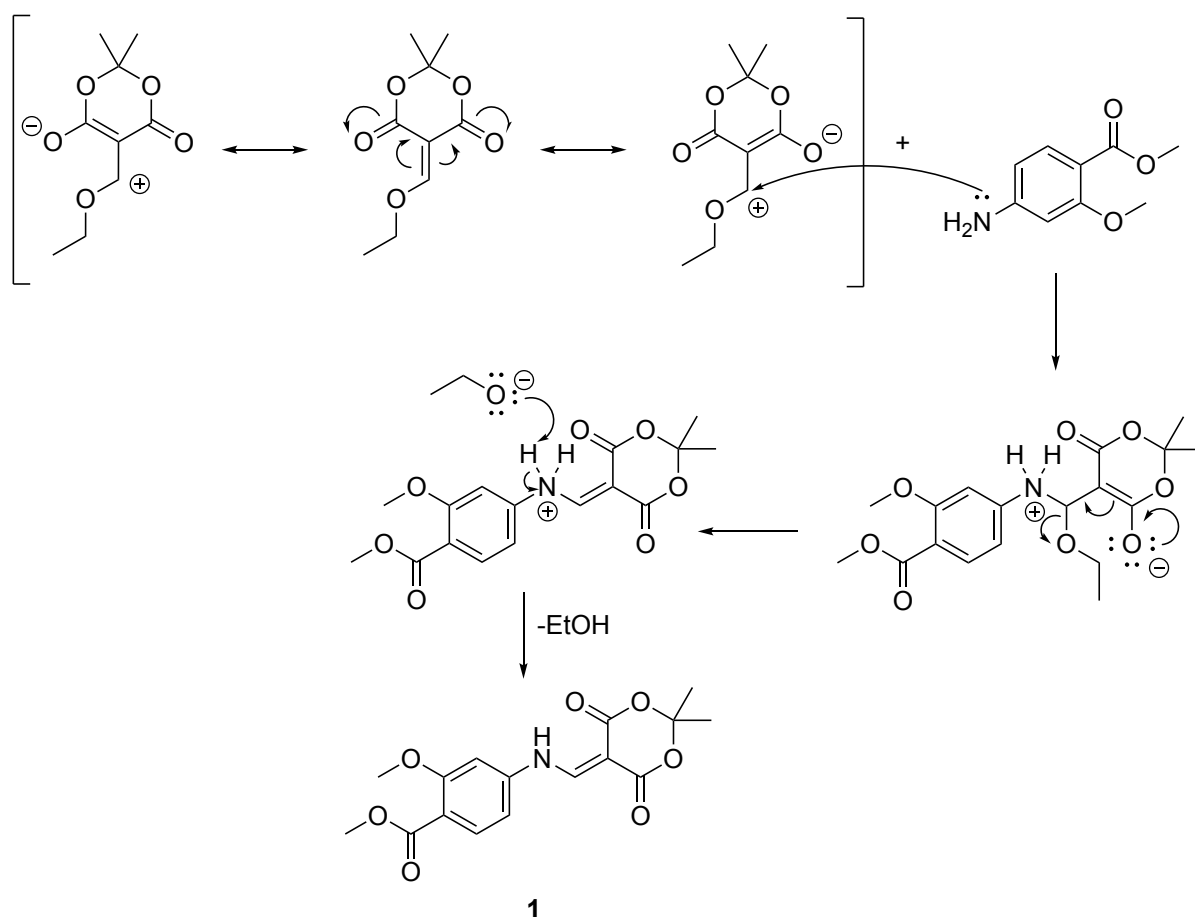


Σχήμα 37: Αντίδραση σχηματισμού της εναμίνης **1**.

Ο μυρμηκικός τριαιθυλεστέρας, ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του οξέος Meldrum, αποβάλλοντας ένα μόριο αιθανόλης. Σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο μια ενδιάμεση ένωση, η οποία με την απόσπαση ενός δεύτερου μορίου αιθανόλης παρέχει την 5-(αιθοξυμεθυλενο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανο-4,6-διόνη (Σχήμα 38). Εν συνεχεία, η διόνη πραγματοποιεί μια συζυγή προσθήκη τύπου Michael με τον 4-αμινο-2-

μεθοξυ-βενζοϊκό μεθυλεστέρα, ενώ αποβάλλεται ταυτόχρονα ένα μόριο αιθανόλης, σχηματίζοντας την επιθυμητή εναμίνη **1**.

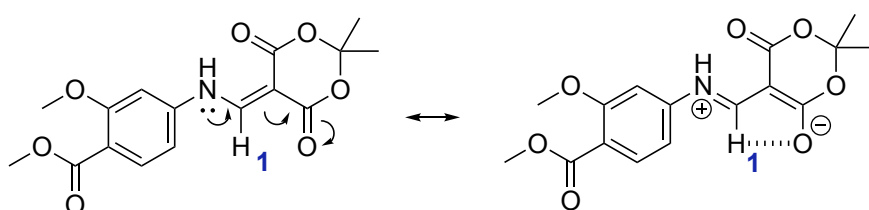




Σχήμα 38: Μηχανισμός σύνθεσης της εναμίνης **1**.

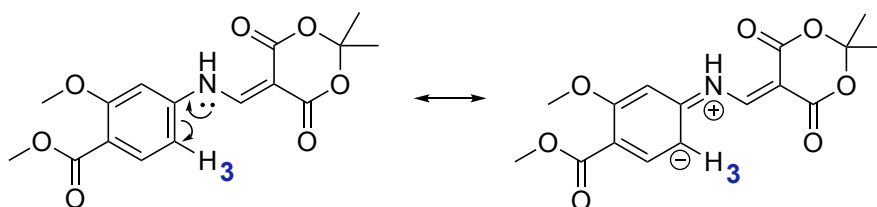
3.6.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση **1**

Στο φάσμα ^1H NMR του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα (Σχήμα 43), παρατηρείται πως πιο αποπροστατευμένο εμφανίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 7 που ανήκει στο άζωτο της εναμίνης, δίνοντας μία απλή διευρυμένη κορυφή στα 11.26 ppm. Το βινυλικό πρωτόνιο της εναμίνης, H_1 , συντονίζεται στα 8.71 ppm και δίνει μία απλή κορυφή. Απογυμνώνεται ισχυρά από ηλεκτρονιακή πυκνότητα, λόγω της αλληλεπίδρασής του με το γειτονικό οξυγόνο (Σχήμα 39), μέσω της οποίας σχηματίζεται ένας ψευδοδεσμός υδρογόνου.

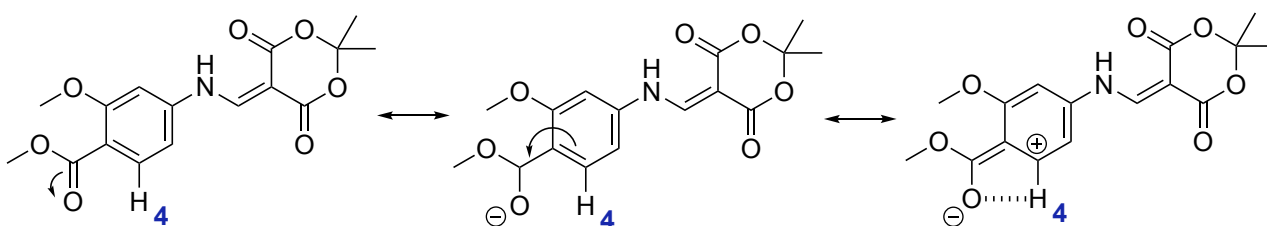


Σχήμα 39: Ερμηνεία αποπροστασίας του H_1 . Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου.

Τα αρωματικά πρωτόνια H₃ και H₄ συντονίζονται στα 7.20 και 7.73 ppm, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να προκύπτει από το καθένα μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $^3J = 8.5$ Hz, καθώς σχάζονται λόγω γεινιάσης των δύο πυρηνικών spin. Το πρωτόνιο H₄ εμφανίζεται πιο αποπροστατευμένο από το πρωτόνιο H₃, επειδή το τελευταίο γεινιάζει με το άζωτο της εναμίνης, το οποίο μέσω συζυγιακού φαινομένου προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο αρωματικό σύστημα (Σχήμα 40), ενώ ταυτόχρονα η σχετική αποπροστασία του πρωτονίου H₄ αποδίδεται στο γεγονός ότι σε ορθο-θέση ως προς αυτό, βρίσκεται μια ομάδα που είναι δέκτης ηλεκτρονίων, η εστερική ομάδα, η οποία αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το δακτύλιο, καθώς και στο ότι αλληλεπιδρά με το γειτονικό καρβονυλικό οξυγόνο, λόγω θέσης, σχηματίζοντας ένα ψευδοδεσμό υδρογόνου (Σχήμα 41).

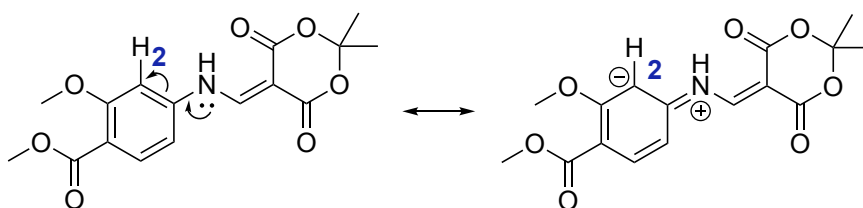


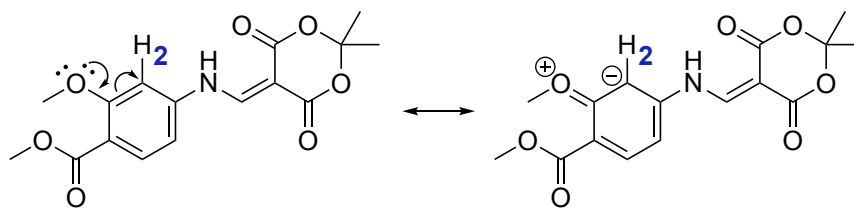
Σχήμα 40: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H₃.



Σχήμα 41: Ερμηνεία αποπροστασίας του H₄. Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου.

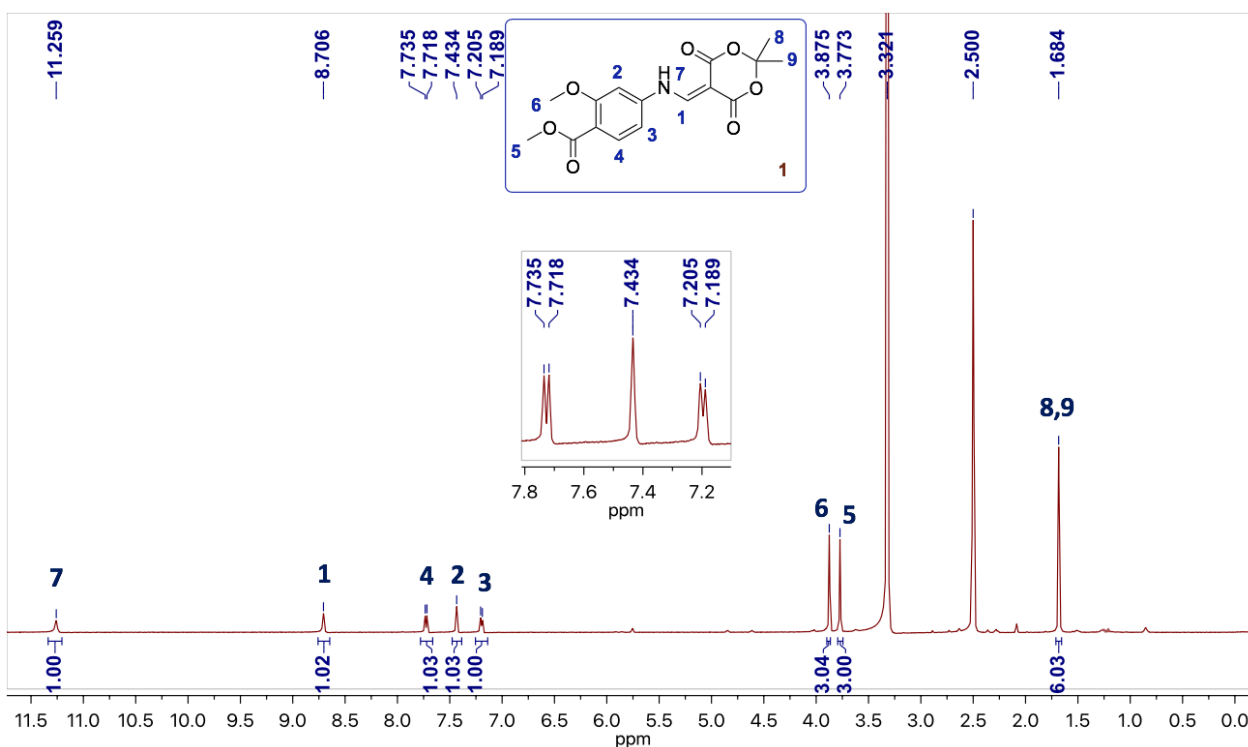
Στο αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 οφείλεται η απλή κορυφή στα 7.43 ppm. Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται ανάμεσα στην μεθοξυ-ομάδα και το άζωτο της ομάδας εναμίνης, ομάδες οι οποίες προσφέρουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον δακτύλιο μέσω του εκδηλούμενου συζυγιακού φαινομένου (Σχήμα 42).



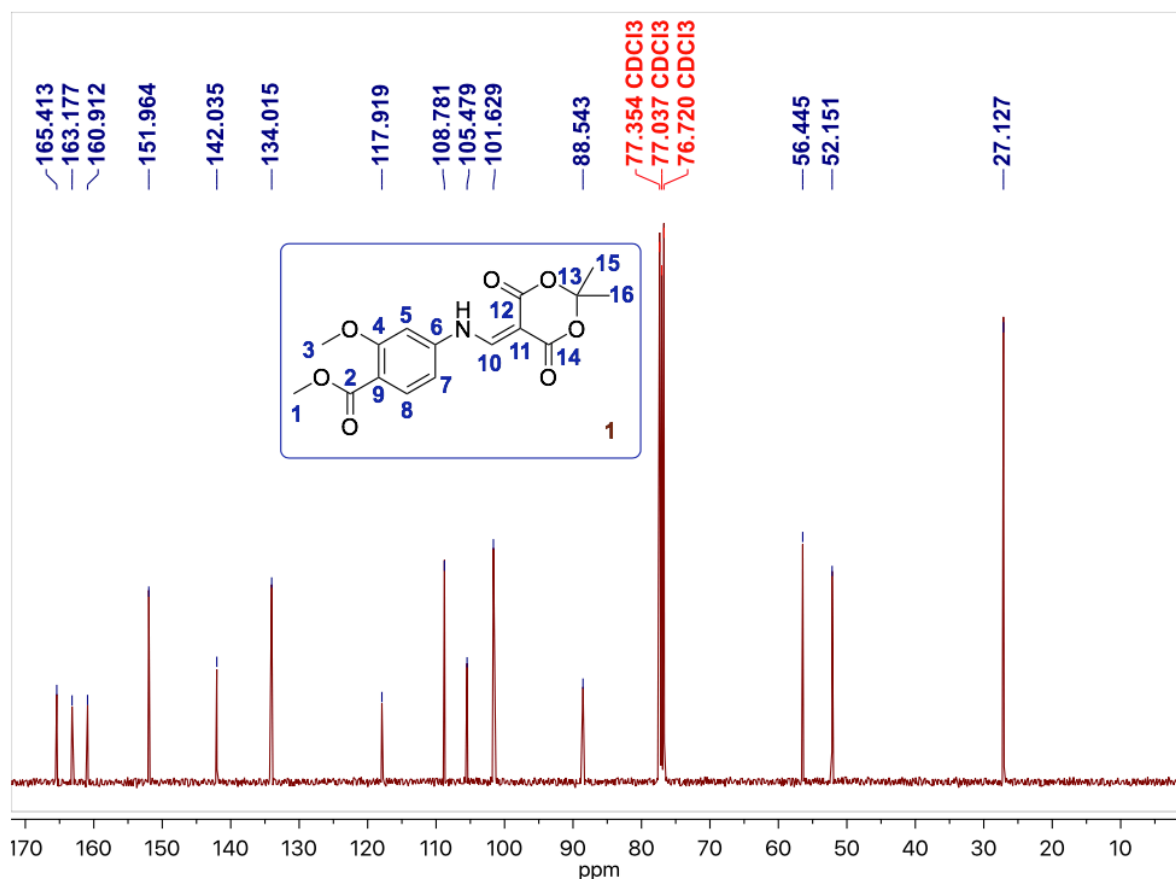


Σχήμα 42: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H₂.

Τα πρωτόνια υπάριθμόν 6 της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται στα 3.88 ppm ως μία απλή κορυφή, με ολοκλήρωση 3, ενώ τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 5 του μεθυλεστέρα εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3 στα 3.77 ppm. Τα πρωτόνια του μεθυλεστέρα είναι πιο προστατευμένα από αυτά της μεθοξυ-ομάδας, καθώς η ηλεκτρονική πυκνότητα του γειτονικού οξυγόνου των πρωτονίων της μεθοξυ-ομάδας κατανέμεται στο αρωματικό σύστημα μέσω δομών συντονισμού. Τέλος, τα πρωτόνια των δύο μεθυλοομάδων, 8 και 9, εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6 στα 1.68 ppm, καθώς αντιλαμβάνονται όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον.



Σχήμα 43 : Φάσμα ¹H NMR (500 MHz) του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο) μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση **1**) σε DMSO-d₆, στους 298 K.

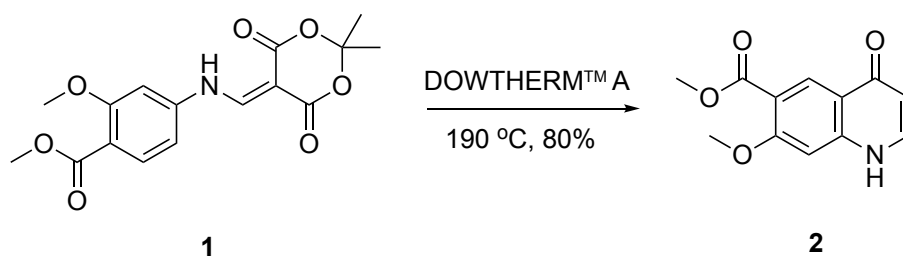


Σχήμα 44 : Φάσμα ^{13}C NMR (400 MHz) του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενό)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση **1**) σε CDCl_3 , στους 298 K. Για τα 16 διαφορετικά άτομα άνθρακα της ένωσης εμφανίζονται 14 διαφορετικές κορυφές, καθώς οι άνθρακες υπ' αριθμόν 12 και 14 αντιλαμβάνονται όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον. Αντίστοιχα, όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον αντιλαμβάνονται και οι άνθρακες υπ' αριθμόν 15 και 16.

3.6.2 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση **2**

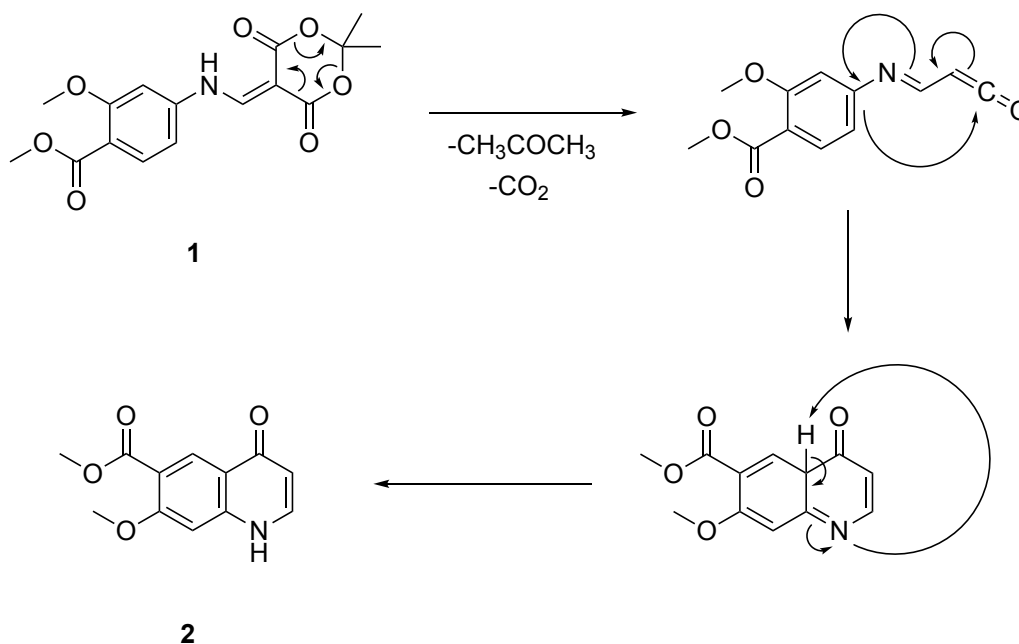
3.6.2.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση **2**

Η εναμίνη **1** υποβάλλεται σε DOWTHERM™ A στους 190 °C και υφίσταται μια ενδομοριακή κυκλοποίηση, μέσω αντίδρασης υποκατάστασης, αποβάλλοντας ακετόνη και διοξείδιο του άνθρακα, ώστε να παραχθεί η κινολόνη **2**, σε απόδοση 80% (Σχήμα 45). Το DOWTHERM™ A είναι ευτηκτικό μίγμα διφαινυλίου 26.5% και διφαινυλαιθέρα 73.5%.



Σχήμα 45: Ενδομοριακή κυκλοποίηση και σχηματισμός της κινολόνης **2**.

Αυτή η αντίδραση κυκλοποίησης, η οποία είναι μια παραλλαγή της αντίδρασης Conrad-Limpach ^[198], είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτη, λόγω της θερμοκρασίας και του pH στο οποίο λαμβάνει χώρα. Οι κυκλοποιήσεις Conrad-Limpach τυπικά διεξάγονται υπό βασικές συνθήκες σε θερμοκρασίες πολύ υψηλότερες από 240 °C ^[199]. Ωστόσο, αναπτύχθηκε μια διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει την υποβολή της εναμίνης **2** σε DOWTHERM™ A, με αποτέλεσμα την ενδομοριακή κυκλοποίηση σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία, με αποκαρβοξυλίωση και αποβολή ακετόνης (Σχήμα 46).

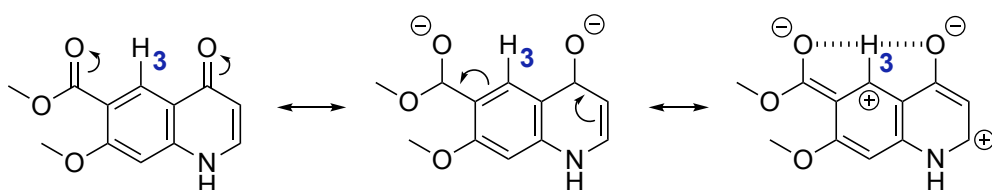


Σχήμα 46: Μηχανισμός σύνθεσης της κινολόνης.

3.6.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση **2**

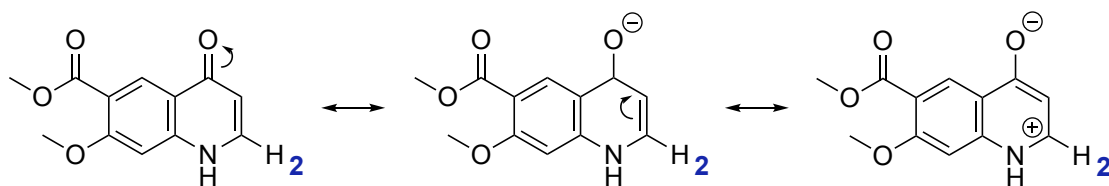
Στο φάσμα ¹H NMR του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (Σχήμα 51), πιο αποπροστατευμένο παρουσιάζεται το πρωτόνιο που συνδέεται με το άζωτο της κινολόνης, H₇, το οποίο συντονίζεται στα 11.70 ppm ως μια απλή κορυφή, λόγω του ηλεκτραρνητικού αζώτου και της εκδήλωσης της συζυγίας του ζεύγους

ηλεκτρονίων αυτού προς τις δύο κατευθύνσεις του αρωματικού συστήματος (Σχήμα 49). Το H₃ συντονίζεται στα 8.43 ppm ως μία απλή κορυφή, καθώς δεν έχει γειτονικά πρωτόνια. Είναι αρωματικό πρωτόνιο, το οποίο βρίσκεται σε γειτονική θέση από την καρβοξυλομάδα του μεθυλεστέρα και την κετο-ομάδα της κινολόνης. Αποπροστατεύεται ισχυρώς, καθώς οι δύο αυτές ομάδες έλκουν ηλεκτρόνια μέσω του συζυγιακού φαινομένου, καθώς και λόγω ισχυρής αλληλεπίδρασης με τα δύο αυτά καρβονυλικά άτομα οξυγόνου, μέσω σχηματισμού ψευδοδεσμού υδρογόνου (Σχήμα 47).



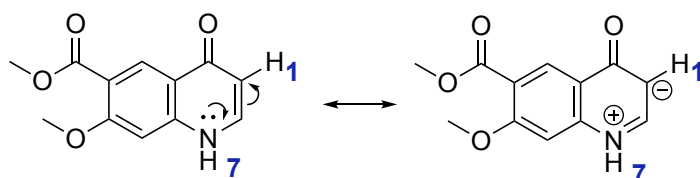
Σχήμα 47: Ερμηνεία αποπροστασίας του H₃. Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου.

Το H₂ συντονίζεται ως μία τριπλή κορυφή στα 7.86 ppm. Το πρωτόνιο αυτό αποπροστατεύεται λόγω της κετο-ομάδας, μέσω φαινομένου συζυγίας (Σχήμα 48).



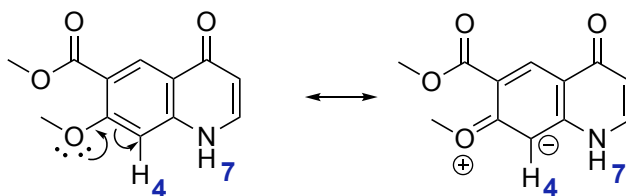
Σχήμα 48: Ερμηνεία αποπροστασίας του H₂.

Το H₁ συντονίζεται ως μια διπλή κορυφή, λόγω του γειτονικού H₂ στα 5.99 ppm με $^3J = 7.5$ Hz. Το H₁ είναι πιο προστατευμένο από το H₂, καθώς μέσω της εκδήλωσης συζυγίας ο άνθρακας με τον οποίο συνδέεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 εμφανίζεται με μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων (Σχήμα 49).



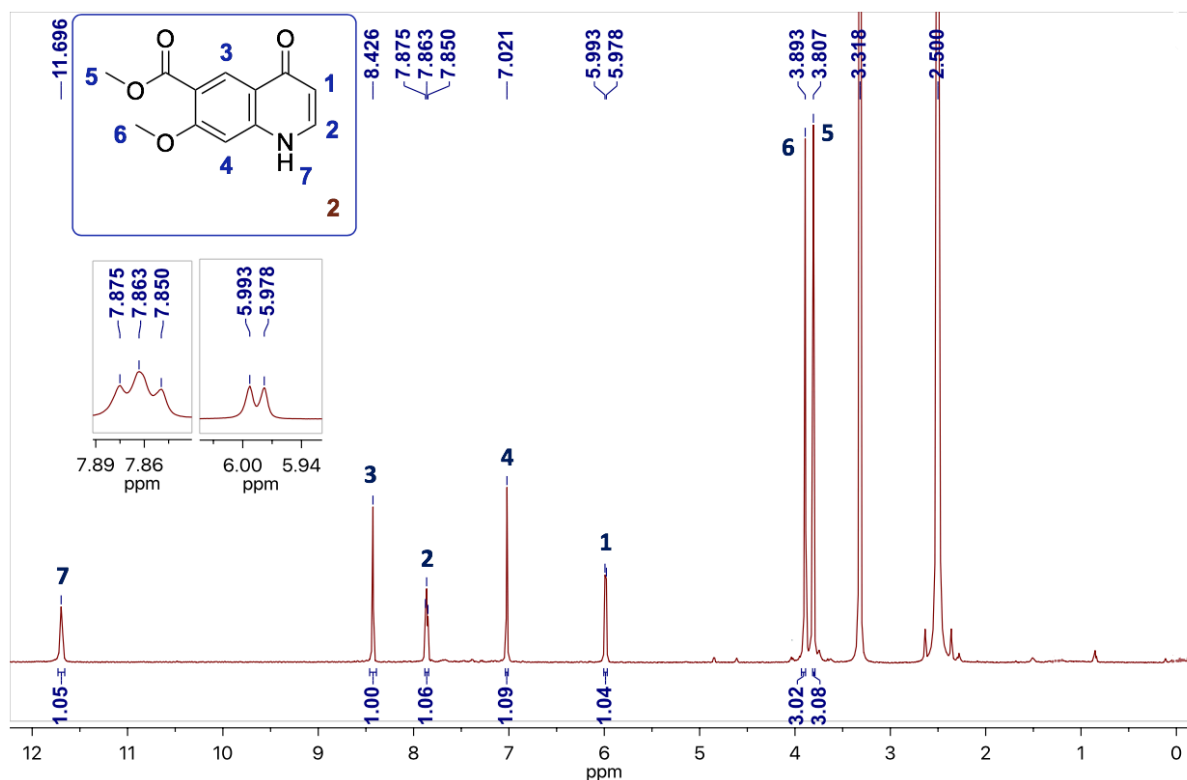
Σχήμα 49: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H₁ και ταυτόχρονη ερμηνεία αποπροστασίας του H₇.

Το H₄ είναι αρωματικό πρωτόνιο, το οποίο συντονίζεται στα 7.02 ppm δίνοντας μία απλή κορυφή. Βρίσκεται δίπλα από τη μεθοξυ-ομάδα, η οποία του προσφέρει ηλεκτρονική πυκνότητα μέσω συζυγιακού φαινομένου (Σχήμα 50).



Σχήμα 50: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H₄.

Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 6 της μεθοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3 στα 3.89 ppm, καθώς η ηλεκτρονική πυκνότητα του γειτονικού τους οξυγόνου διασπείρεται στο αρωματικό σύστημα μέσω δομών συντονισμού, ενώ τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 5 του μεθυλεστέρα συντονίζονται στα 3.81 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3.

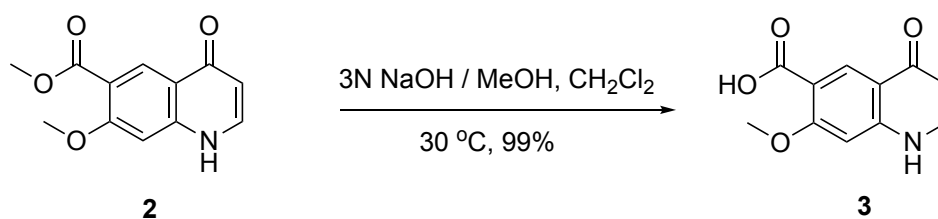


Σχήμα 51 : Φάσμα ¹H NMR (500 MHz) του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (ένωση 2) σε DMSO-d₆, στους 298 K.

3.6.3 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3

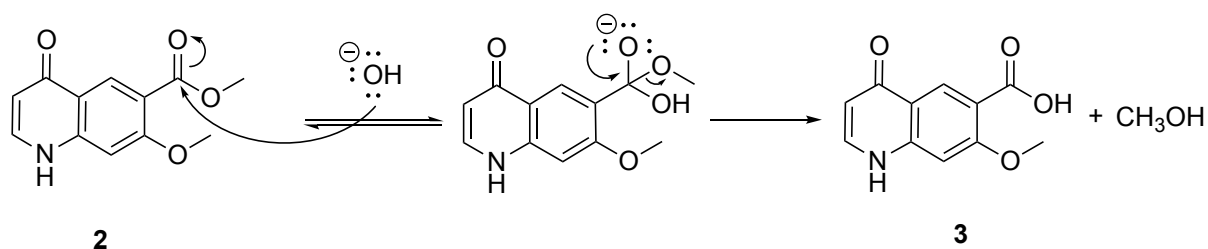
3.6.3.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3

Μετά την αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης και την απομόνωση καθαρού προϊόντος, ακολούθησε η υδρόλυση του εστέρα προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε σε μη υδατικό περιβάλλον, συγκεκριμένα σε μεθανολικό διαλύμα καυστικού νατρίου (3 N), σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, σε αναλογία $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1, συνεπώς σε τελική συγκέντρωση 0.3 N. Χρησιμοποιούνται ήπιες βασικές συνθήκες, ώστε να μη πραγματοποιηθεί ανεπιθύμητη αποπρωτονίωση του πρωτονίου του αζώτου της κινολίνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία παραπροϊόντων. Η αντίδραση θερμαίνεται στους 35 °C για 30 λεπτά και ολοκληρώνεται ποσοτικά προς την κατεύθυνση σχηματισμού του προϊόντος υδρόλυσης. Με τη μέθοδο αυτή, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας ^[203], παραλαμβάνεται πολύ εύκολα και ποσοτικά το οξύ από τον αντίστοιχο εστέρα, σε ιδιαίτερα ήπιες συνθήκες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί οξύνισή της με υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου, συγκέντρωσης 6 N σε pH~6, ώστε το προϊόν που βρίσκεται ως μετά νατρίου άλας, να μετατραπεί σε οξύ, αποφεύγοντας την πρωτονίωση του αζώτου της κινολίνης (Σχήμα 52).



Σχήμα 52: Βασική υδρόλυση του εστέρα προς καρβοξυλικό οξύ.

Οι καρβοξυλικοί εστέρες υφίστανται υδρόλυση, τόσο υπό όξινες, όσο και υπό βασικές συνθήκες. Όταν η υδρόλυση γίνεται υπό όξινες συνθήκες, η αντίδραση αυτή είναι η ακριβώς αντίστροφη αντίδραση της εστεροποίησης Fischer. Όταν η υδρόλυση γίνεται υπό βασικές συνθήκες, το υδροξείδιο, που συνήθως χρησιμοποιείται ως βάση για αυτήν την αντίδραση, δρα ως πυρηνόφιλο, ενώ το αντίστοιχο παραγόμενο αλκοξείδιο αποτελεί καλή αποχωρούσα ομάδα (Σχήμα 53). Η βασική υδρόλυση με υδροξείδιο ονομάζεται και σαπωνοποίηση.



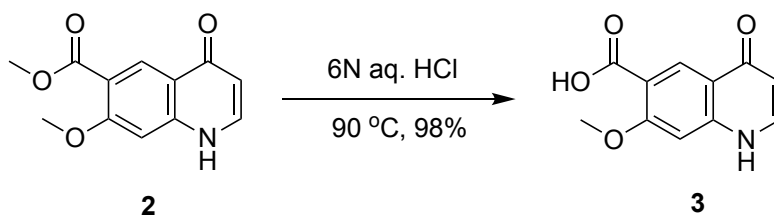
Σχήμα 53: Μηχανισμός βασικής υδρόλυσης.

Στο εργαστήριο, επιχειρήθηκε βασική υδρόλυση με τη χρήση υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου 25%. Ωστόσο, η απόδοση της υδρόλυσης δεν ήταν όσο υψηλή είναι όταν πραγματοποιείται σε μη υδατικό περιβάλλον. Οι συνθήκες των πειραμάτων που έλαβαν χώρα για την εύρεση των αποδοτικότερων συνοψίζονται στον Πίνακα 12.

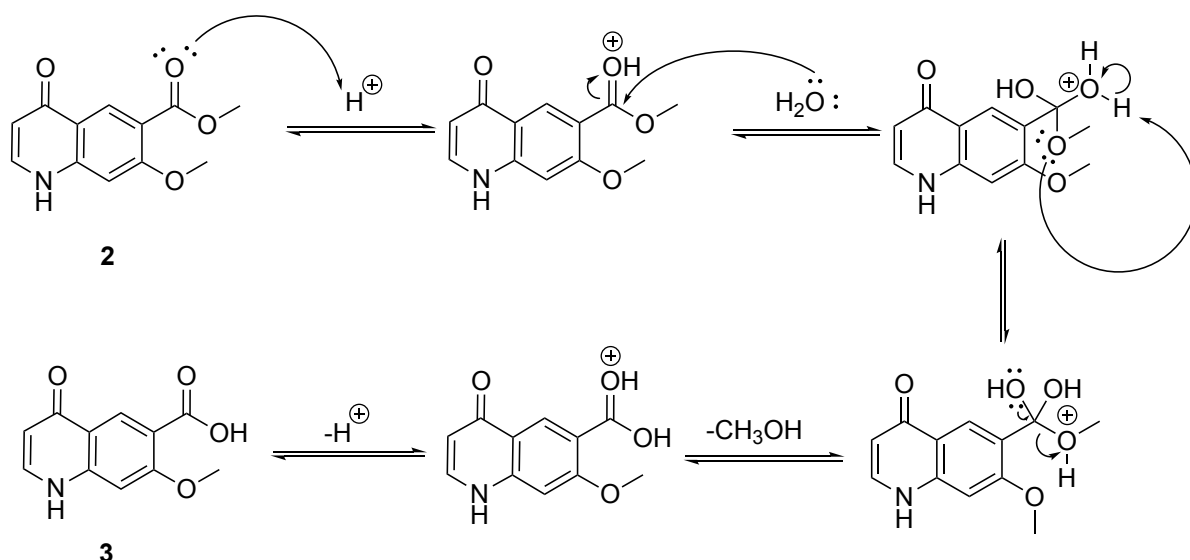
Πείραμα	Βασικό διάλυμα	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	3N NaOH/MeOH	CH ₂ Cl ₂ CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9/1	35 °C	30 min	99%
2	25% aq. NaOH	MeOH	65 °C	30 min	94%
3	25% aq. NaOH	EtOH	65 °C	30 min	94%

Πίνακας 12: Πειραματικές συνθήκες για την υδρόλυση του εστέρα 2.

Εναλλακτικά, πραγματοποιήθηκε η υδρόλυση του εστέρα σε όξινες συνθήκες. Έγινε χρήση υδατικού διαλύματος υδροχλωρίου συγκέντρωσης 12 N, στους 90 °C για 45 λεπτά (Σχήμα 54). Η απόδοση της όξινης υδρόλυσης είναι εξίσου υψηλή (98%) με αυτή της βασικής. Ωστόσο, προτιμάται στην περίπτωση αυτή η βασική υδρόλυση, για την εξοικονόμηση χρόνου και διαλυτών.



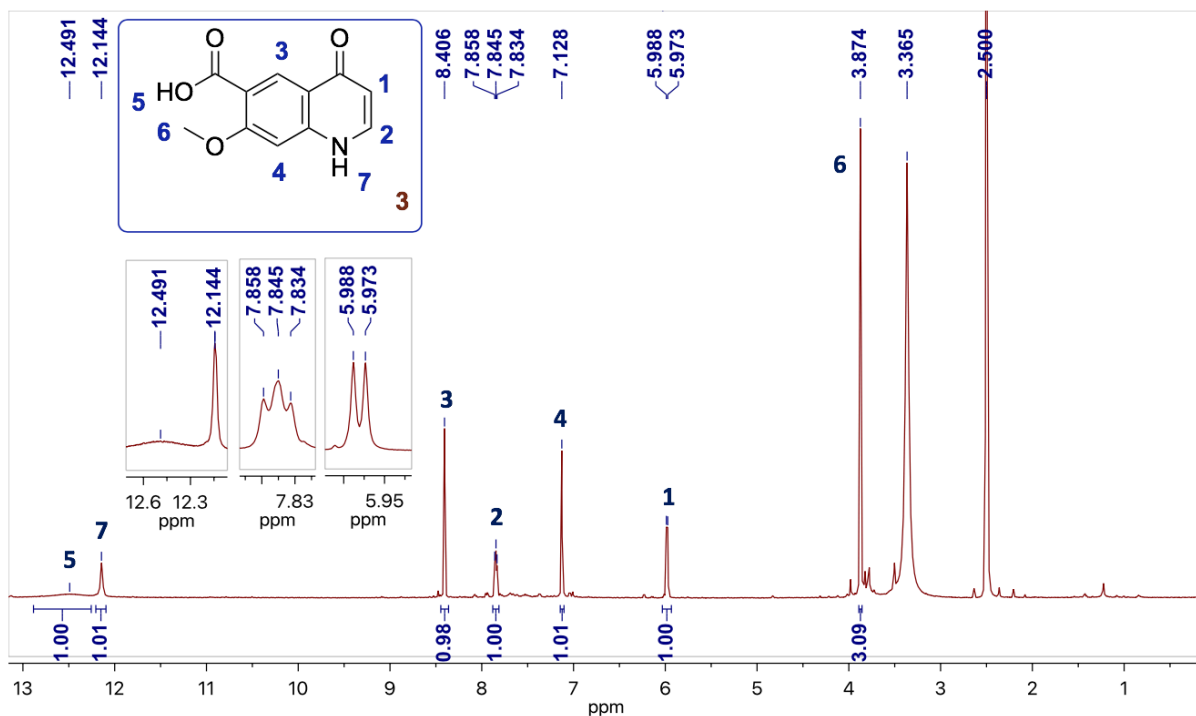
Σχήμα 54: Όξινη υδρόλυση 2 του εστέρα προς καρβοξυλικό οξύ.



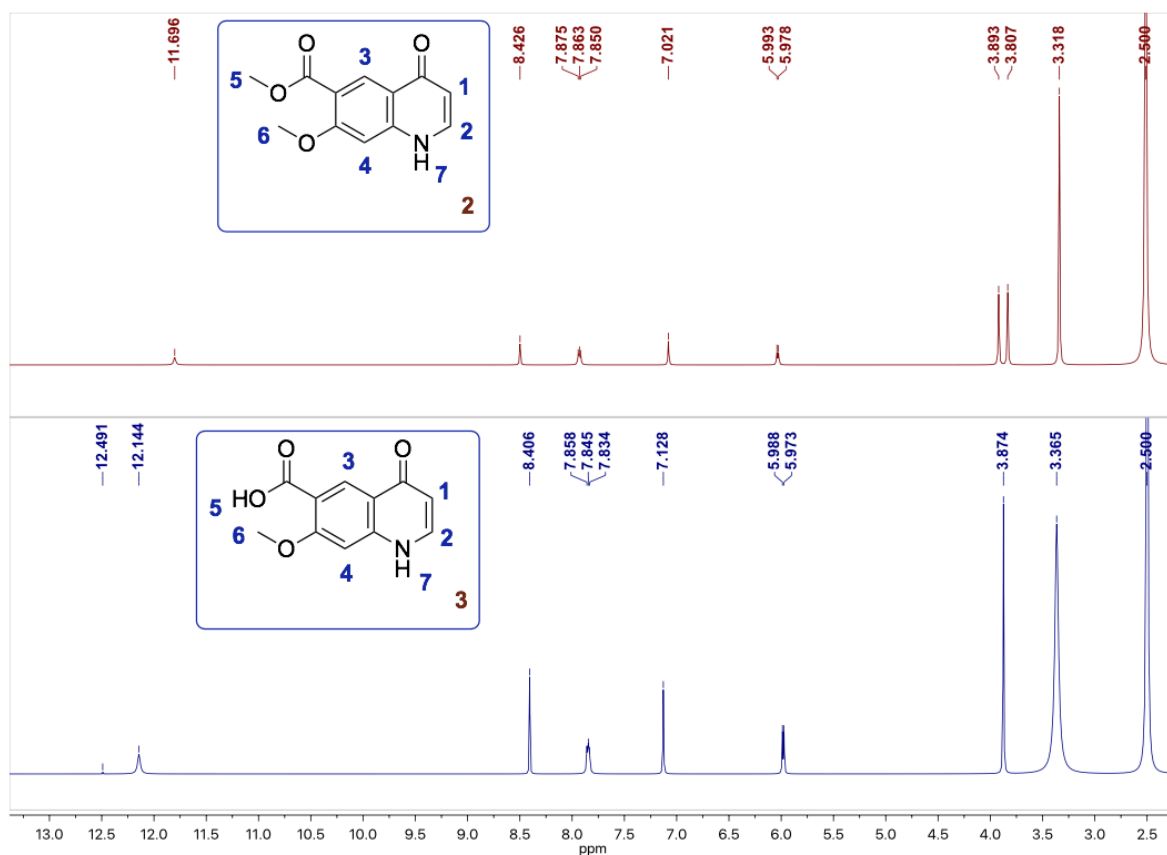
Σχήμα 55: Μηχανισμός όξινης υδρόλυσης.

3.6.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3

Η εικόνα του φάσματος 1H NMR του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος (Σχήμα 56) είναι ανάλογη με αυτή του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα. Χαρακτηριστική κορυφή που αποδεικνύει την ύπαρξη της ομάδας οξέος είναι η απλή, ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 1, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5 και εμφανίζεται στα ~ 12.49 ppm. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 7 της αμινομάδας συντονίζεται στα 12.14 ppm ως απλή κορυφή. Στο αρωματικό πρωτόνιο H_3 οφείλεται η απλή κορυφή στα 8.41 ppm. Το πρωτόνιο H_1 συντονίζεται στα 5.98 ppm ως διπλή κορυφή, καθώς σχάζεται λόγω γειτνίασης με το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 με σταθερά σύζευξης $^3J = 7.5$ Hz. Το πρωτόνιο H_2 εμφανίζεται ως μία τριπλή κορυφή στα 7.84 ppm. Το αρωματικό πρωτόνιο H_4 συντονίζεται στα 7.13 ppm δίνοντας μία απλή κορυφή. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 6 της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται στα 3.87 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3.



Σχήμα 56: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz) του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος (ένωση **3**) σε $\text{DMSO-}d_6$, στους 298 K.



Σχήμα 57: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz) του μεθυλεστέρα **2** (κόκκινο χρώμα) και του αντίστοιχου οξέος **3** (μπλε χρώμα) σε $\text{DMSO-}d_6$, στους 298 K.

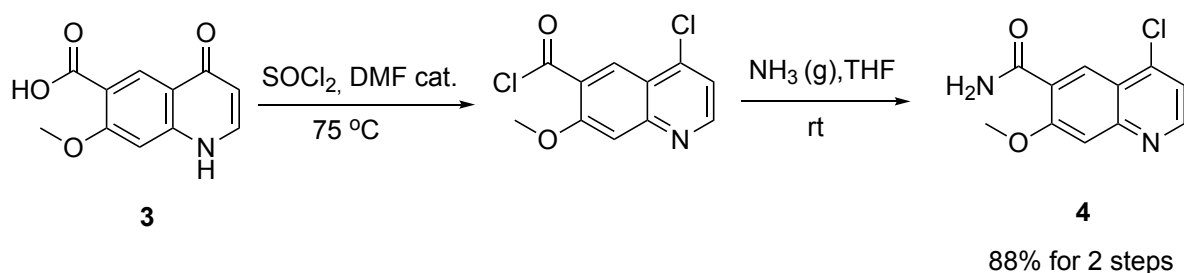
Στο Σχήμα 57 παρουσιάζεται το φάσμα του μεθυλεστέρα **2** και του αντίστοιχου οξέος **3**. Οι κορυφές των φασμάτων αυτών είναι όμοιες, με τη διαφορά ότι στο φάσμα του οξέος **3** απουσιάζει η κορυφή που οφείλεται στον πυρηνικό συντονισμό των πρωτονίων υπ' αριθμόν 5 της ομάδας του μεθυλεστέρα και εμφανίζεται στα ~12.49 ppm η ευρεία κορυφή που οφείλεται στο πρωτόνιο της ομάδας του οξέος.

3.6.4 Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 4

3.6.4.1 Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικού χλωριδίου

3.6.4.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικού χλωριδίου

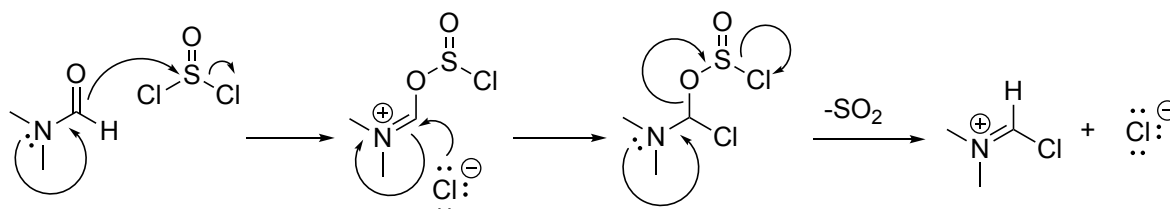
Στη συνέχεια, πραγματοποιείται χλωρίωση σε δύο θέσεις της υποκατεστημένης κινολόνης **3** με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου και προσθήκη διμεθυλοφορμαμίδιου για την κατάλυση της αντίδρασης, σε θερμοκρασία ~75 °C, για δύο ώρες. Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση, απομακρύνεται το θειονυλοχλωρίδιο που δεν αντέδρασε. Απευθείας, το χλωρίδιο διαλύεται σε απόλυτο τετραϋδροφουράνιο και λαμβάνει χώρα μία ακυλο-υποκατάσταση, μέσω παροχής αέριας αμμωνίας, σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να προκύψει το αντίστοιχο αμίδιο **4**. Η αέρια αμμωνία προκύπτει με τη στάγδην προσθήκη υδατικού καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 12 N σε χλωριούχο αμμώνιο. Η συνολική απόδοση για τα δύο στάδια είναι 88% (Σχήμα 58).



Σχήμα 58: Αντίδραση σχηματισμού ακυλο-χλωριδίου και απευθείας σχηματισμός του αντίστοιχου αμιδίου.

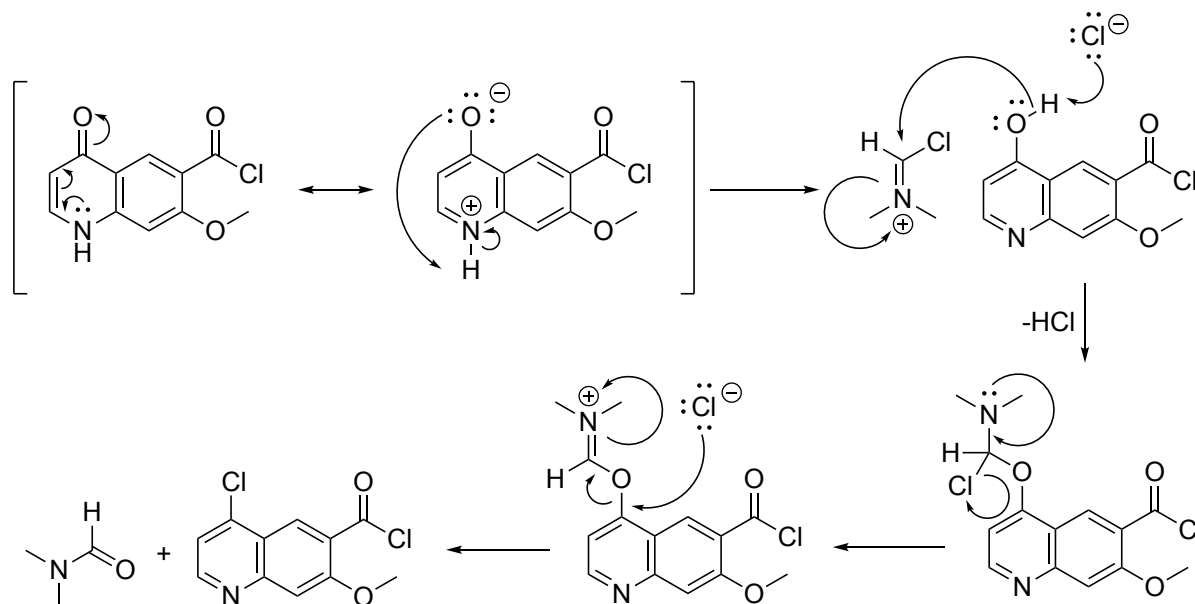
Η αντίδραση χλωρίωσης που λαμβάνει χώρα με χρήση θειονυλοχλωριδίου, μπορεί να καταλυθεί με τη προσθήκη διμεθυλοφορμαμίδιου. Σε αυτή την αντίδραση, το διοξείδιο του θείου και το υδροχλώριο που παράγονται είναι αέρια που διαφεύγουν από τη φιάλη της αντίδρασης, οδηγώντας την αντίδραση προς τα δεξιά. Η περίσσεια θειονυλοχλωριδίου εξατμίζεται επίσης εύκολα, στους ~75 °C.

Στο Σχήμα 59 παρουσιάζεται ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του διμεθυλοφορμαμίδιου με το θειονυλοχλωρίδιο. Προκύπτει το χλωριούχο (χλωρομεθυλενο)διμεθυλιμίνιο ή, αλλιώς, αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack. Το αντιδραστήριο αυτό είναι ένα άλας το οποίο αποτελείται από ανιόν χλωρίου και κατιόν N,N-διμεθυλιμινίου.



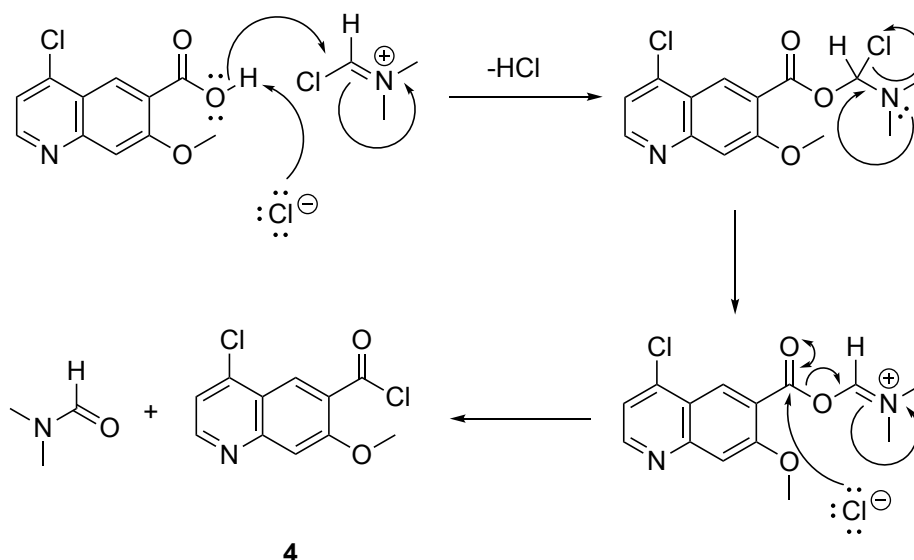
Σχήμα 59: Μηχανισμός σχηματισμού του αντιδραστηρίου Vilsmeier-Haack.

Ακολουθεί χλωρίωση της ομάδας του καρβοξυλικού οξέος, η οποία λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα με την χλωρίωση της κετο-ομάδας, αφού πρώτα αυτή μετατραπεί σε ομάδα εναμίνης. Στο Σχήμα 60 παρουσιάζεται σε πρώτο στάδιο η χλωρίωση της κετο-ομάδας και στο Σχήμα 61 παρουσιάζεται ξεχωριστά, για λόγους ευκολίας, η χλωρίωση της ομάδας του καρβοξυλικού οξέος, όπου το ενδιάμεσο ιμίνιο που προκύπτει αντιδρά με το καρβοξυλικό οξύ και αναγεννάται ο καταλύτης διμεθυλοφορμαμίδιο.



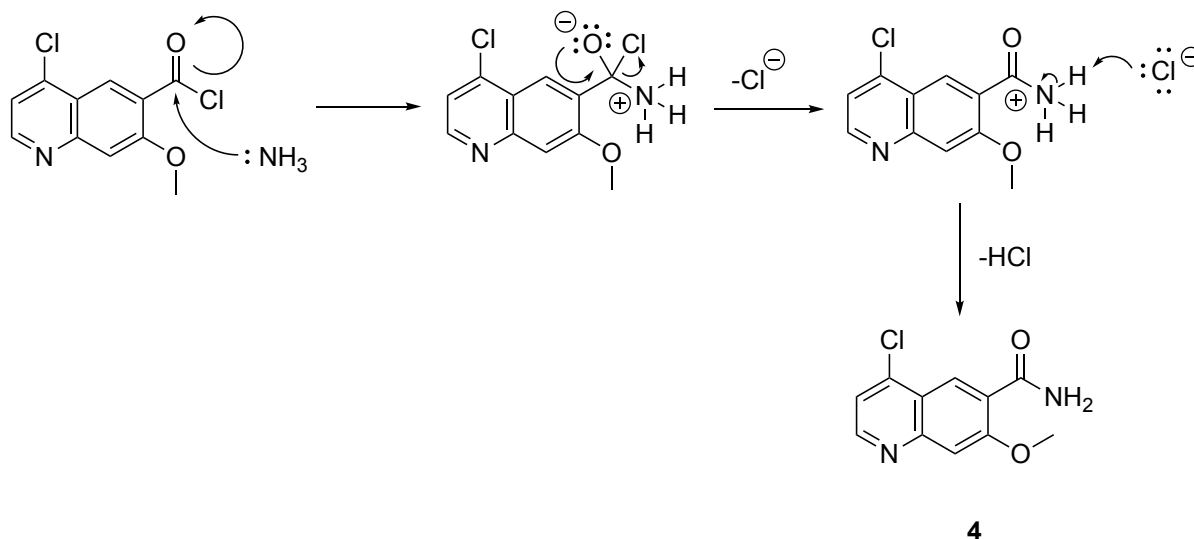
4

Σχήμα 60: Μηχανισμός χλωρίωσης της κετόνης.



Σχήμα 61: Μηχανισμός χλωρίωσης του καρβοξυλικού οξέος.

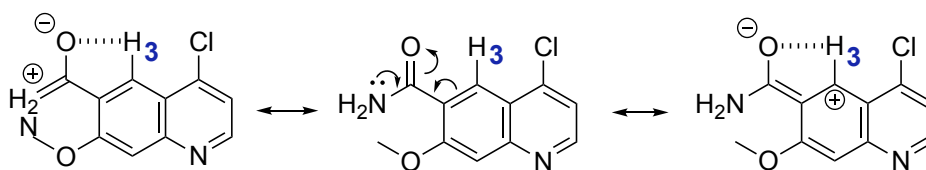
Εν συνεχεία, παρέχεται αέρια αμμωνία στο σχηματιζόμενο ακυλο-χλωρίδιο, ώστε να μετατραπεί στο αντίστοιχο αμίδιο, μέσω μηχανισμού ακυλο-υποκατάστασης. Η αμμωνία δρα ως πυρηνόφιλο και προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του ακυλο-χλωριδίου. Σχηματίζεται με αυτόν τον τρόπο ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο και μέσω αυτού γίνεται η μετάβαση από το χλωρίδιο, που είναι το πλέον δραστικό από τα παράγωγα των καρβοξυλικών οξέων αμίδιο (επίσης παράγωγο καρβοξυλικού οξέος) (Σχήμα 62).



Σχήμα 62: Μηχανισμός σχηματισμού αμιδίου. Η αντίδραση είναι μια ακυλο-υποκατάσταση ενός καρβοξυλικού οξέος.

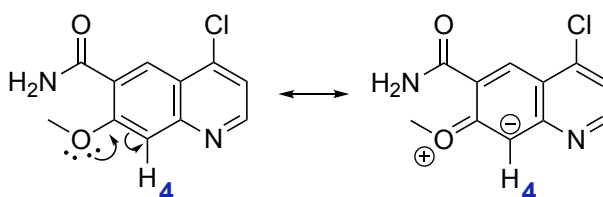
3.6.4.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 4

Στο φάσμα ^1H NMR του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου (Σχήμα 66) παρατηρείται πως σε υψηλότερες τιμές ppm, συγκεκριμένα στα 8.82 ppm, συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 και σχάζεται σε μια διπλή κορυφή, λόγω της γειτνιάσής του με το πρωτόνιο H_2 με $^3J = 4.5$ Hz. Είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο, αφού βρίσκεται δίπλα από το άτομο του χλωρίου, το οποίο έλκει ισχυρά τα ηλεκτρόνια του άνθρακα με τον οποίο συνδέεται το H_1 , μέσω επαγωγικού φαινομένου. Το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 συντονίζεται στα 7.65 ppm και δίνει μια διπλή κορυφή, καθώς σχάζεται από το γειτονικό πρωτόνιο H_1 με $^3J = 4.5$ Hz. Το πρωτόνιο H_3 συντονίζεται στα 8.50 ppm ως μία απλή κορυφή, καθώς δεν έχει γειτονικά πρωτόνια. Είναι αρωματικό πρωτόνιο και βρίσκεται σε γειτονική θέση από την αμιδική ομάδα, η οποία έλκει ηλεκτρόνια μέσω συζυγιακού φαινομένου και μέσω αλληλεπίδρασης με σχηματισμό ψευδοδεσμού υδρογόνου (Σχήμα 63).



Σχήμα 63: Ερμηνεία αποπροστασίας του H_3 . Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου.

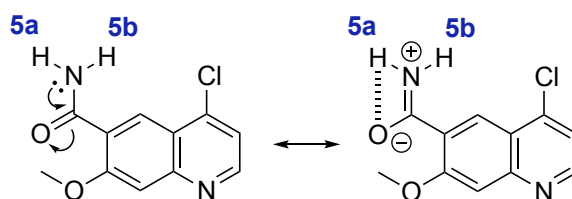
Το H_4 είναι το πιο προστατευμένο από τα αρωματικά πρωτόνια, καθώς μέσω δομών συντονισμού, ο άνθρακας με τον οποίο συνδέεται εμφανίζεται με μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων (Σχήμα 64). Το πρωτόνιο αυτό συντονίζεται στα 7.60 ppm και δίνει μια απλή κορυφή.



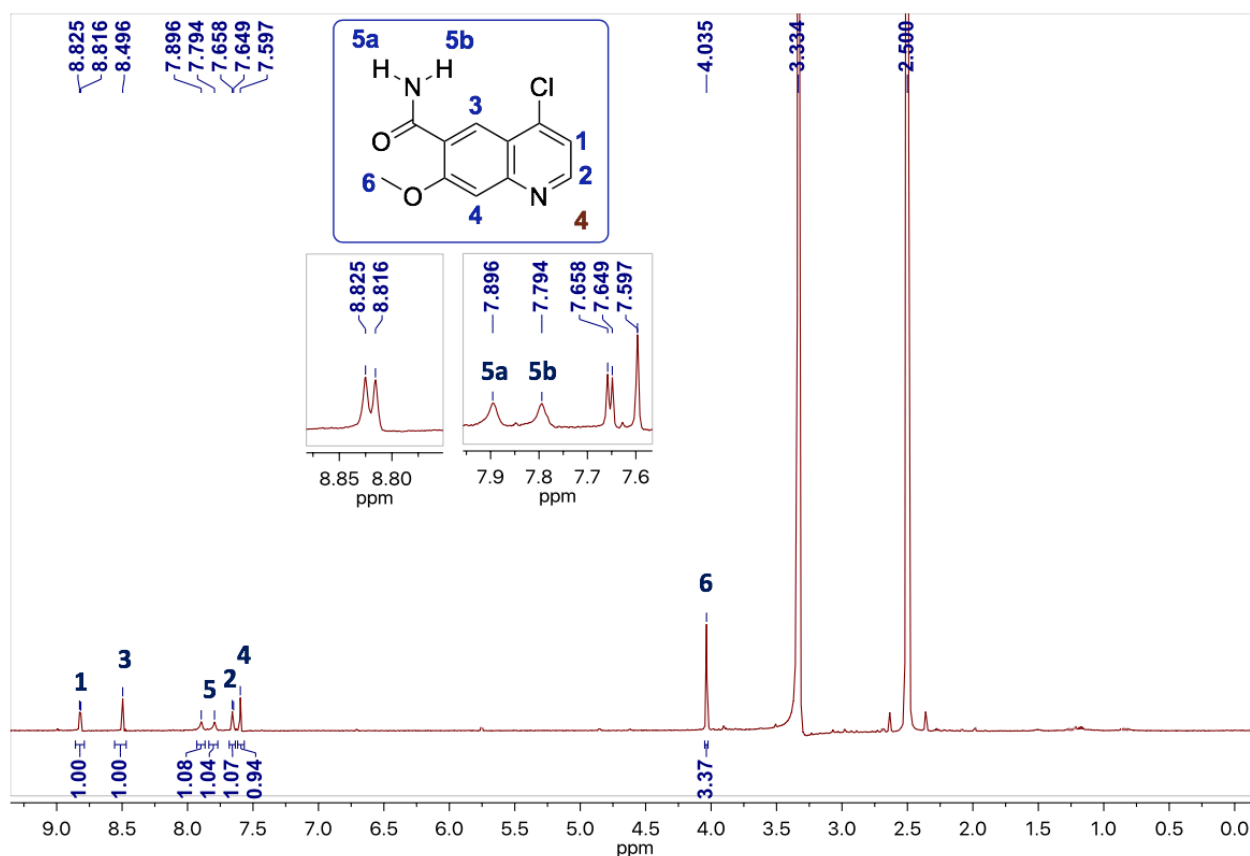
Σχήμα 64: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H_4 .

Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 6 της μεθοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3 στα 4.04 ppm. Εμφανίζονται αρκετά αποπροστατευμένα, επειδή το οξυγόνο της μεθοξυ-ομάδας προσφέρει το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του στο αρωματικό σύστημα. Τα δύο πρωτόνια της αμιδικής ομάδας 5a και 5b εμφανίζονται ως δύο διαφορετικές ευρείες απλές κορυφές στα 7.90 και 7.79 ppm, αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει, επειδή ο αμιδικός

δεσμός ανάμεσα στο άζωτο και τον άνθρακα έχει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού, όπως φαίνεται από τις δομές συντονισμού (Σχήμα 65). Συνεπώς, η περιστροφή του δεσμού είναι τόσο αργή, ώστε ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου να συμβαίνουν δύο διαφορετικές απορροφήσεις. Σε αυξημένη θερμοκρασία, η περιστροφή θα γινόταν πιο γρήγορα, με αποτέλεσμα να συντονιστούν τα 2 πρωτόνια ως μια απλή διευρυμένη κορυφή με ολοκλήρωση 2. Το πρωτόνιο 5a αλληλεπιδρά με το οξυγόνο της αμιδικής ομάδας, λόγω της θέσης του, σχηματίζοντας ψευδοδεσμό υδρογόνου με αυτό, με συνέπεια να αποπροστατεύεται περισσότερο από το πρωτόνιο 5b (Σχήμα 65).



Σχήμα 65: Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου στον αμιδικό δεσμό, ο οποίος έχει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού.



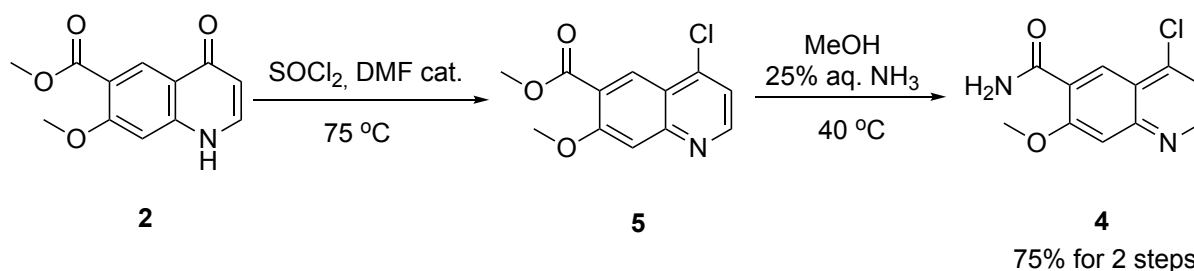
Σχήμα 66 : Φάσμα ^1H NMR (500 MHz) του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου (ένωση 4) σε $\text{DMSO-}d_6$, στους 298 K.

3.6.4.2 Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5

3.6.4.2.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5

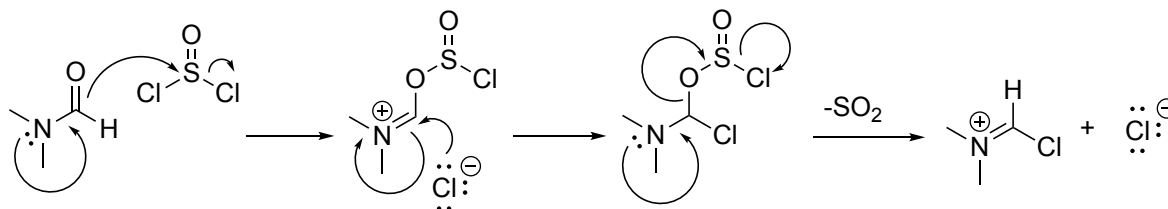
Παραπάνω, παρουσιάστηκε η μέθοδος μετατροπής του εστέρα **2** στο αμίδιο **4**. Ο εστέρας **2** υδρολύεται στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ **3**, εν συνεχεία πραγματοποιείται χλωρίωση σε δύο σημεία της ένωσης **3**, στη θέση 4 του δακτυλίου κινολόνης και στην καρβοξυλομάδα, και προκύπτει το αντίστοιχο ακυλο-χλωρίδιο. Τελικά, συντίθεται το αντίστοιχο αμίδιο με ακυλο-υποκατάσταση.

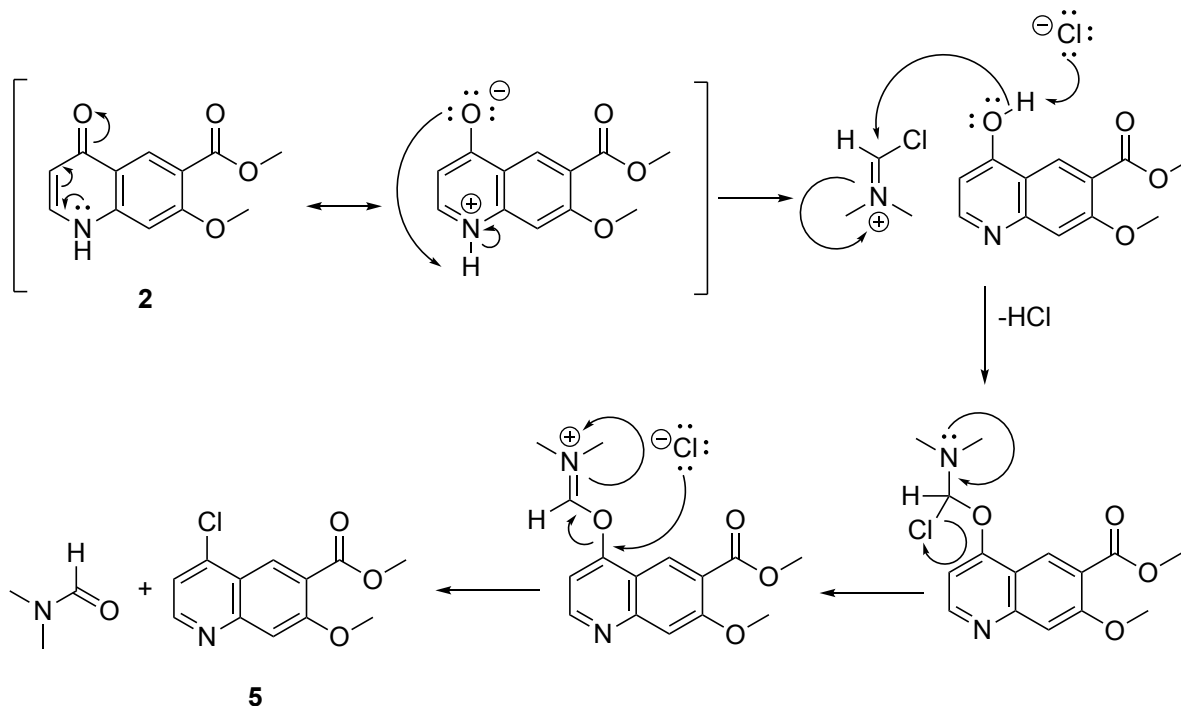
Εναλλακτικά, ο εστέρας **2** υφίσταται χλωρίωση, με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου και προσθήκη διμεθυλοφορμαμίδιου για την κατάλυση της αντίδρασης, σε θερμοκρασία ~75 °C για δύο ώρες, με αποτέλεσμα να προκύψει η 4-χλωρο-κινολίνη **5**. Η κινολίνη **5** διαλύεται σε μεθανολικό διάλυμα υδατικής αμμωνίας 25%, στους 40 °C και η ομάδα του εστέρα μετατρέπεται στο αντίστοιχο αμίδιο **4**, μέσω αμμωνιόλυσης (Σχήμα 67). Η συνολική απόδοση των δύο τελικών σταδίων είναι 75%, χαμηλότερη από αυτήν των αντίστοιχων σταδίων της εναλλακτικής πειραματικής πορείας (88%) και συνεπώς δεν προτιμάται στο εργαστήριο.



Σχήμα 67: Αντίδραση χλωρίωσης και απευθείας σχηματισμός του αντίστοιχου αμιδίου.

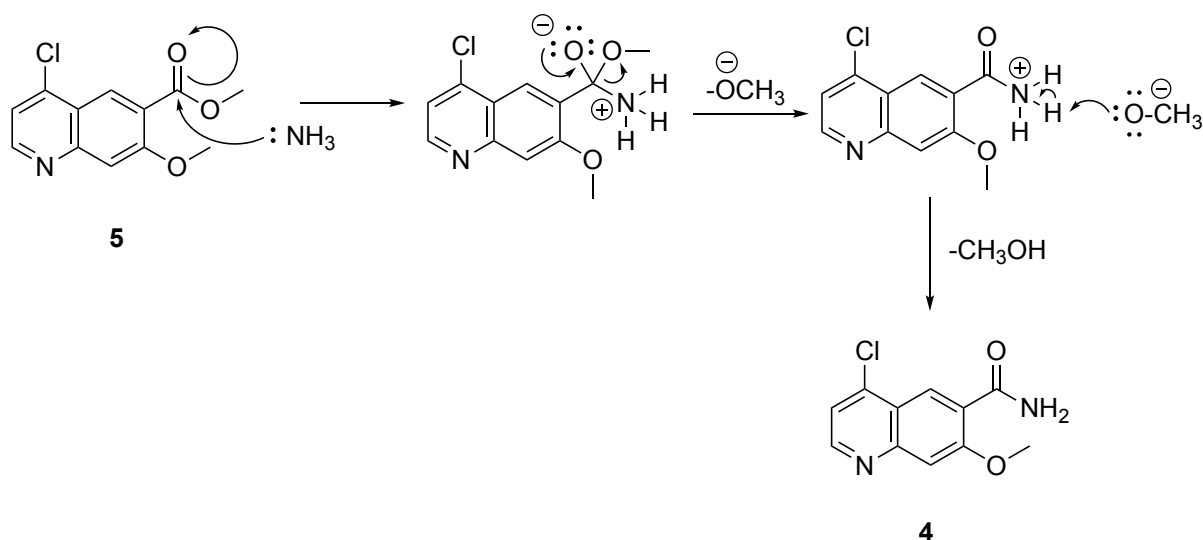
Αρχικά, προκύπτει το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack και ακολουθεί χλωρίωση στη θέση 4 της κινολόνης **2**, αφού πρώτα η κετο-ομάδα μετατραπεί σε εναμίνη. Προκύπτει η κινολίνη **5** και αναγεννάται ο καταλύτης διμεθυλοφορμαμίδιο (Σχήμα 68).





Σχήμα 68: Μηχανισμός χλωρίωσης της κετόνης.

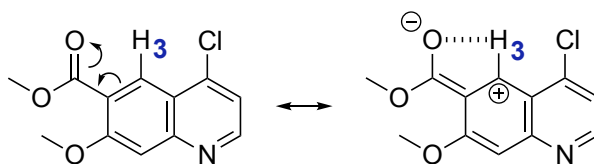
Εν συνεχεία, προστίθεται μεθανολικό διάλυμα υδατικής αμμωνίας 25% στον εστέρα **5**, ώστε να πραγματοποιηθεί η αμμωνιόλυσή του. Η αμμωνία δρα ως πυρηνόφιλο και προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του εστέρα. Προκύπτει το επιθυμητό αμίδιο, μέσω ενός μηχανισμού ακυλο-υποκατάστασης, με το σχηματισμό αρχικά ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου και την παραγωγή ενός μορίου μεθανόλης (Σχήμα 69).



Σχήμα 69: Μηχανισμός σχηματισμού αμιδίου με αμμωνιόλυση.

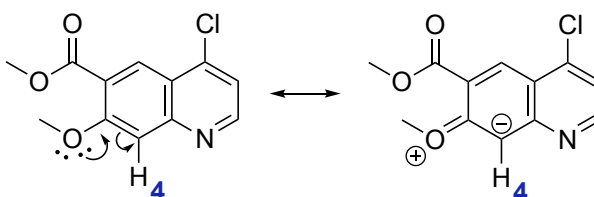
3.6.4.2.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5

Στο φάσμα ^1H NMR του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (Σχήμα 72) διακρίνεται στα 8.75 ppm μια διπλή κορυφή, η οποία οφείλεται στον συντονισμό του πρωτονίου υπ' αριθμόν 1 και σχάζεται λόγω της γειτνιάσής του με το πρωτόνιο H_2 με $^3J = 4.8$ Hz. Είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο, καθώς βρίσκεται δίπλα από το άτομο του χλωρίου, το οποίο έλκει ηλεκτρόνια από τον άνθρακα με τον οποίο συνδέεται το H_1 , μέσω επαγωγικού φαινομένου. Το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 συντονίζεται στα 7.39 ppm και αποδίδει μια διπλή κορυφή, καθώς σχάζεται λόγω γειτνίασης με το πρωτόνιο H_1 με $^3J = 4.8$ Hz. Το πρωτόνιο H_3 συντονίζεται στα 8.62 ppm ως μία απλή κορυφή, καθώς δεν έχει γειτονικά πρωτόνια. Είναι αρωματικό πρωτόνιο και βρίσκεται δίπλα από καρβονυλική ομάδα του μεθυλεστέρα, η οποία έλκει ηλεκτρόνια μέσω του συζυγιακού φαινομένου, καθώς και μέσω της αλληλεπίδρασης του καρβονυλικού οξυγόνου με το H_3 , με αποτέλεσμα το σχηματισμό ψευδοδεσμού υδρογόνου (Σχήμα 70).



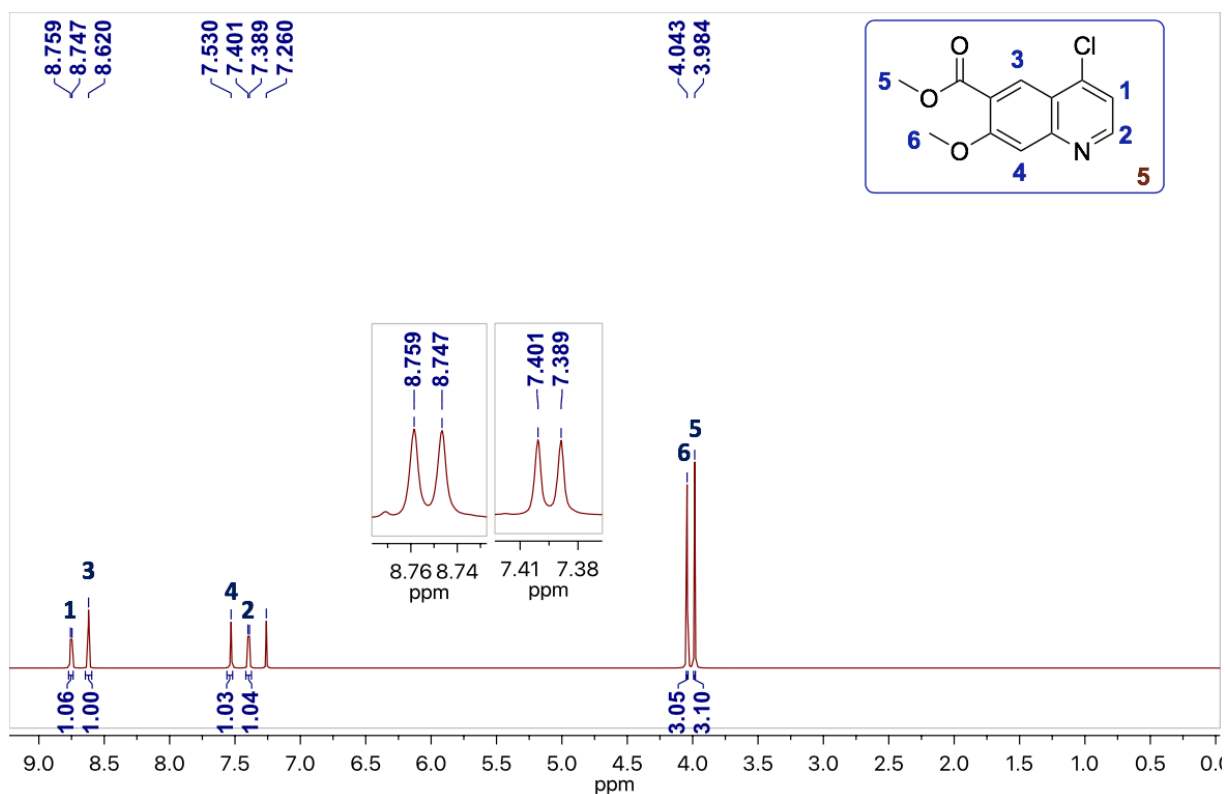
Σχήμα 70: Ερμηνεία αποπροστασίας του H_3 . Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου.

Το H_4 συντονίζεται στα 7.53 ppm, δίνοντας μια απλή κορυφή. Βρίσκεται δίπλα από την μεθοξυ-ομάδα, η οποία μέσω συζυγιακού φαινομένου του προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα (Σχήμα 71).



Σχήμα 71: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H_4 .

Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 6 της μεθοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3 στα 4.04 ppm. Εμφανίζονται πιο προστατευμένα από τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 5 του μεθυλεστέρα, τα οποία συντονίζονται στα 3.98 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3, καθώς το οξυγόνο της μεθοξυ-ομάδας προσφέρει το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του στο αρωματικό σύστημα.

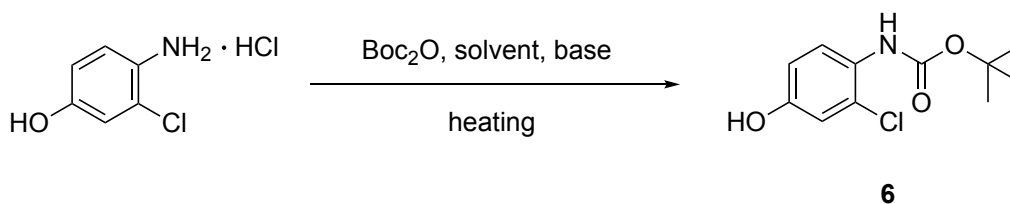


Σχήμα 72: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα (ένωση 5) σε CDCl_3 , στους 298 K.

3.6.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού *tert*-βουτυλεστέρα, ένωση 6

3.6.5.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο) καρβαμικού *tert*-βουτυλεστέρα, ένωση 6

Μόλις συντεθεί το αμίδιο 4, ακολουθεί η σύζευξή του με την 4-αμινο-3-χλωροφαινόλη. Ωστόσο, για τη πραγματοποίηση της σύζευξης αυτής σε καλή απόδοση, απαραίτητη είναι η προστασία της αμινομάδας της διαθέσιμης στο εμπόριο 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, η οποία βρίσκεται στη μορφή υδροχλωρικού άλατος. Η προστασία πραγματοποιείται με τη χρήση Boc ανυδρίτη (Σχήμα 73).



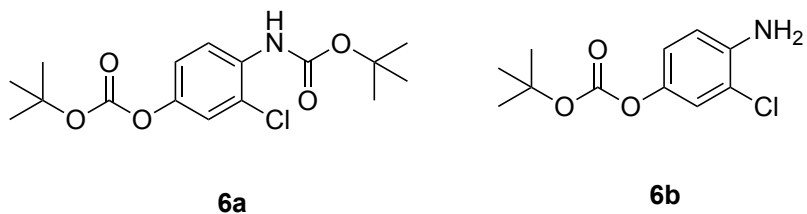
Σχήμα 73: Boc προστασία αμινομάδας.

Πραγματοποιήθηκαν πολλά πειράματα στα οποία έγιναν μεταβολές στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη, τη βάση, τη θερμοκρασία και τον αριθμό των ισοδύναμων ποσοτήτων, ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, με στόχο τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος σε μεγάλη απόδοση, χωρίς το σχηματισμό παραπροϊόντων. Η ισοδύναμη ποσότητα της βάσης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα όφειλε να είναι τουλάχιστον διπλάσια από την ποσότητα του υδροχλωρικού άλατος της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, ώστε να μετατραπεί αρχικά το άλας στην αντίστοιχη αμίνη και, εν συνεχεία, να αποπρωτονιωθεί. Τα διαφορετικά πειράματα συνοψίζονται στον Πίνακα 13.

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Boc ανυδρίτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	CH ₂ Cl ₂	2.2 eq Et ₃ N	1.2 eq	rt	4 h	55%
2	CH ₂ Cl ₂	5 eq Et ₃ N	1.2 eq	rt	4 h	60%
3	THF	2.2 eq Et ₃ N	1.2 eq	65 °C	2 h	30%
4	THF	2.2 eq Et ₃ N	1.2 eq	65 °C	2 h	50%
5	CH ₂ Cl ₂	2.2 eq Et ₃ N	1.2 eq	35 °C	4 h	70%
6	THF	1 eq Et ₃ N 0.1 eq DMAP	2.2 eq	65 °C	4 h	20%
7	THF	2 eq Et ₃ N 0.1 eq DMAP	1.2 eq	rt	4 h	20%

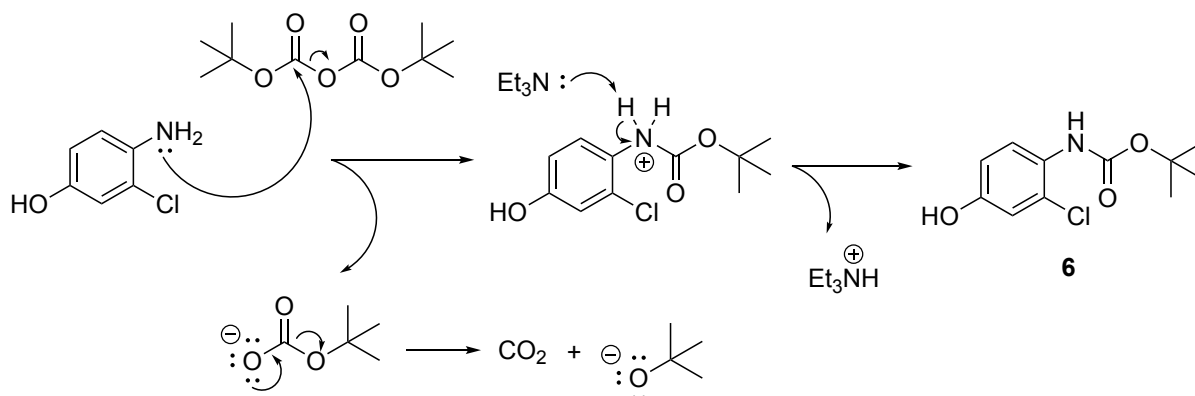
Πίνακας 13: Πειραματικές συνθήκες για την N-Boc προστασία της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης. Σε κάθε προσπάθεια η ισοδύναμη ποσότητα υδροχλωρικού άλατος της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης είναι 1.

Στα πειράματα 1-5 που συνοψίζονται στον Πίνακα 13 λαμβάνει χώρα, επίσης, η Boc προστασία της υδροξυλομάδας, ταυτόχρονα με την Boc προστασία της αμινομάδας, με αποτέλεσμα, εκτός από το κύριο προϊόν **6** να προκύπτει και το διπλά Boc-προστατευμένο παραπροϊόν **6a** (Σχήμα 74). Επιπρόσθετα, στα πειράματα 6 και 7 παρατηρήθηκε πως με τη χρήση της 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης, ο Boc ανυδρίτης προσβάλλει σε μικρό ποσοστό την υδροξυλομάδα, με αποτέλεσμα να προκύπτει σε μικρή αναλογία το παραπροϊόν **6b** (Σχήμα 74).

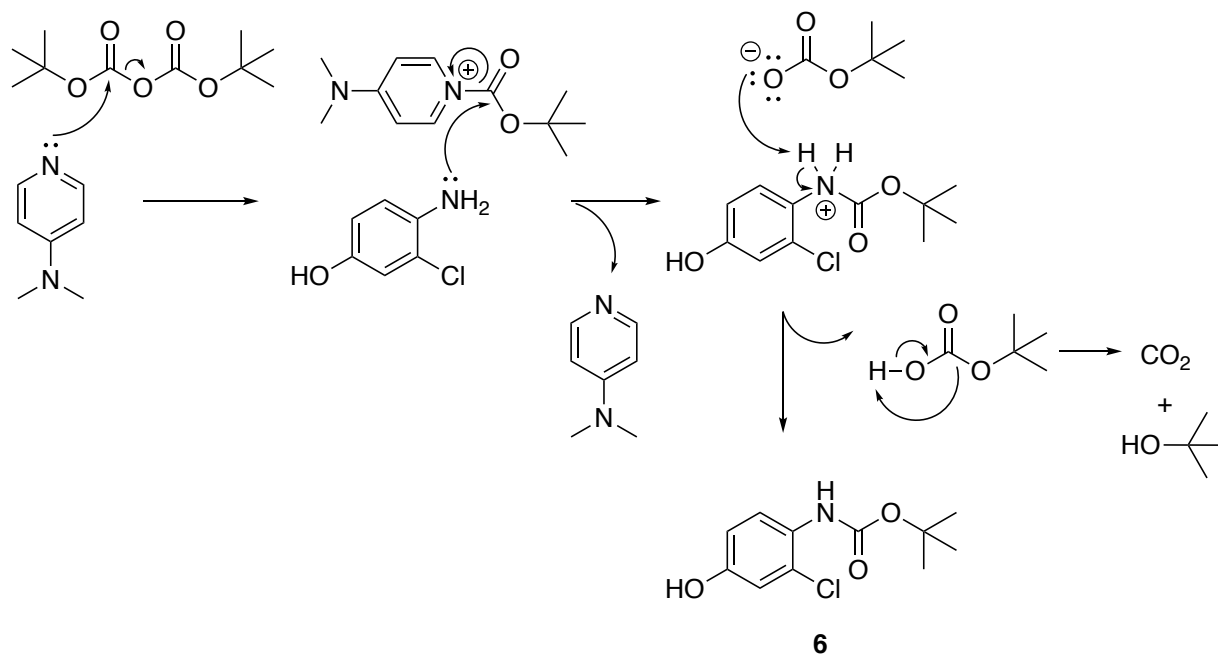


Σχήμα 74: Δομή σχηματιζόμενων παραπροϊόντων.

Στα Σχήματα 75, 76 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της N-Boc προστασίας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης με τη χρήση τριαιθυλαμίνης και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης, αντίστοιχα.



Σχήμα 75: Μηχανισμός N-Boc προστασίας με τη χρήση τριαιθυλαμίνης.



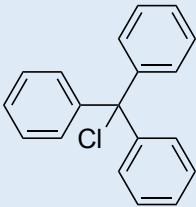
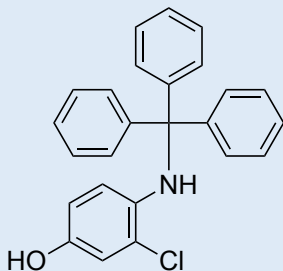
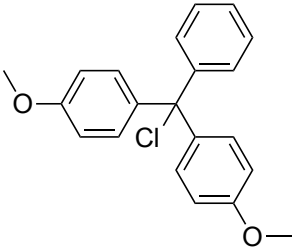
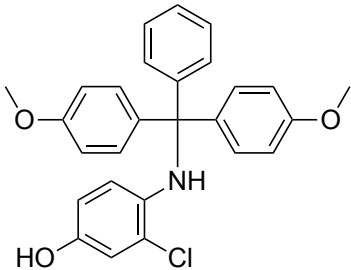
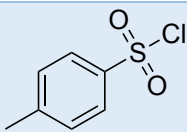
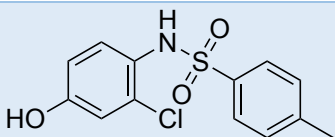
Σχήμα 76: Μηχανισμός N-Boc προστασίας με τη χρήση 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης.

Έγινε, επίσης, προσπάθεια προστασίας της αμινομάδας με τη χρήση άλλων προστατευτικών ομάδων. Σε όλες τις προσπάθειες οι αναλογίες των αντιδρώντων ήταν 1 αμίνη : 1.1 αντιδραστήριο προστασίας : 2.2 βάση. Στις προσπάθειες αυτές (Πίνακας 14) ο

αριθμός παραπροϊόντων που σχηματίστηκαν ήταν μεγάλος, συνεπώς δεν έλαβε χώρα η προσπάθεια απομόνωσης του επιθυμητού προϊόντος.

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο προστασίας	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	Τριτυλοχλωρίδιο	0 °C	2 h
2	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	Τριτυλοχλωρίδιο	rt	2 h
3	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	4,4'-Διμεθοξυ- τριτυλοχλωρίδιο	rt	3h
4	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	4-Τολουολο- σουλφονυλοχλωρίδιο	rt	2h

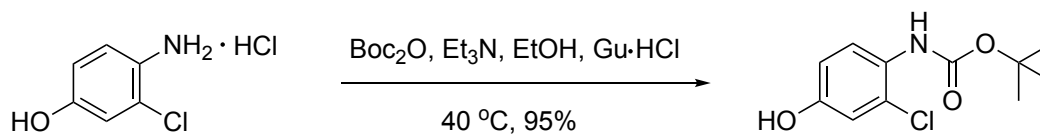
Πίνακας 14: Πειραματικές συνθήκες για την προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, με τη χρήση διάφορων αντιδραστηρίων προστασίας.

Αντιδραστήριο	Δομή	Επιθυμητό προϊόν προστασίας
Τριτυλοχλωρίδιο		
4,4'-Διμεθοξυ- τριτυλοχλωρίδιο		
4-Τολουολο- σουλφονυλοχλωρίδιο		

Πίνακας 15: Δομή και ονοματολογία αντιδραστηρίων προστασίας που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι δομές των επιθυμητών προϊόντων προστασίας.

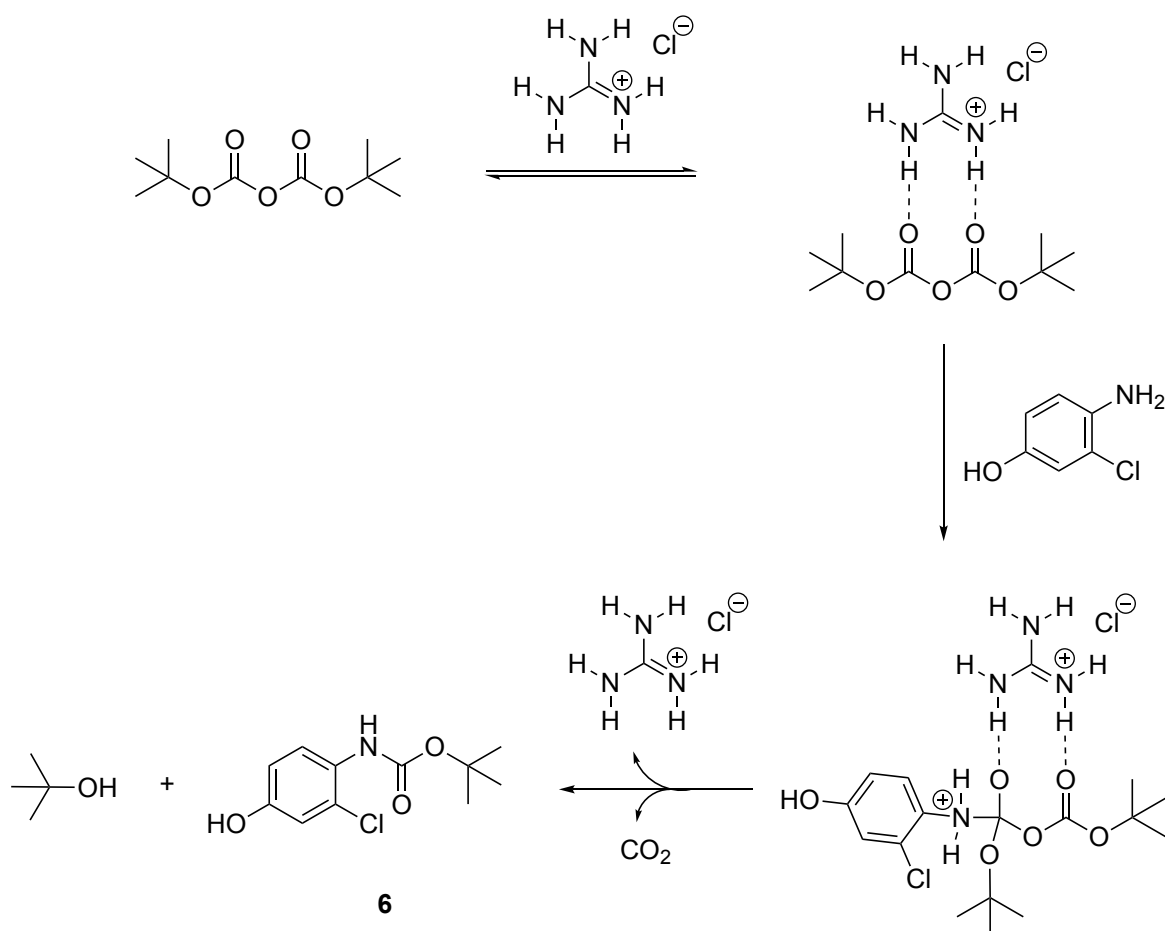
Θεωρήθηκε πως όλα τα παραπάνω πειράματα δεν είχαν ικανοποιητικές αποδόσεις, συνεπώς συνεχίστηκε η έρευνα για την εύρεση αποδοτικότερων συνθηκών προστασίας της αμινομάδας. Τελικά, δοκιμάστηκαν οι συνθήκες που παρουσιάζονται στο Σχήμα 77 με τις οποίες επιτυγχάνεται η επιλεκτική Boc προστασία της αμινομάδας, χωρίς το σχηματισμό παραπροϊόντων, σε εξαιρετική απόδοση (95%). Χρησιμοποιείται υδροχλωρικό άλας της

γουανιδίνης, η οποία δρα ως οργανοκαταλύτης, σε διαλύτη αιθανόλη και βάση τριαιθυλαμίνη. Ο χρόνος της αντίδρασης ισούται με 30 λεπτά σε θερμοκρασία 40 °C. Η βέλτιστη αναλογία των αντιδρώντων είναι 1 αμίνη : 1.1 Boc-ανυδρίτης : 2.2 βάση: 0.15 υδροχλωρικό άλας γουανιδίνης.



6

Σχήμα 77: Συνθήκες της N-Boc προστασίας οι οποίες εφαρμόστηκαν για τη σύνθεση των αναλόγων του *Lenvatinib*, καθώς ήταν οι πιο αποδοτικές.



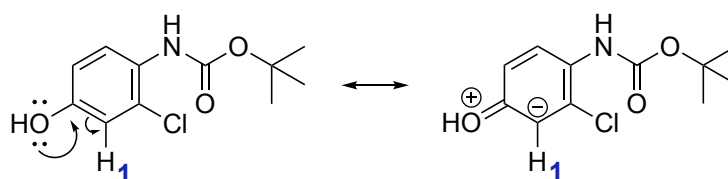
Σχήμα 78: Μηχανισμός N-Boc προστασίας με τη χρήση οργανοκαταλύτη.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός της προστασίας με οργανοκατάλυση παρουσιάζεται στο *Σχήμα 78*. Οι καρβονυλομάδες του Boc ανυδρίτη ενεργοποιούνται σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τον καταλύτη. Με αυτόν τον τρόπο, διευκολύνεται η επακόλουθη

προσβολή της αμινομάδας στον άνθρακα του καρβονυλίου. Στη συνέχεια, απομακρύνεται διοξείδιο του άνθρακα και tert-βουτυλο-αλκοόλη, με αποτέλεσμα να προκύψει το N-Boc προστατευμένο προϊόν. Ο δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσεται ανάμεσα στο άτομο αζώτου του υδροχλωρικού άλατος της γουανιδίνης και το άτομο υδρογόνου της αμίνης (πυρηνόφιλη ενεργοποίηση), πιθανότατα επιταχύνει το σχηματισμό του προϊόντος.

3.6.5.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 6

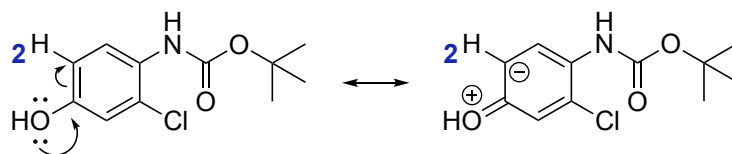
Στο φάσμα ^1H NMR του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα (Σχήμα 82) παρατηρείται πως σε υψηλότερες τιμές ppm, συγκεκριμένα στα 9.73, συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5, το οποίο συνδέεται με το άζωτο του αμιδικού δεσμού, δίνοντας μια απλή κορυφή. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4 της υδροξυλικής ομάδας εμφανίζεται στα 8.39 ppm ως απλή διευρυμένη κορυφή. Η αποπροστασία του οφείλεται στην προσφορά του μονήρες ζεύγους του οξυγόνου, με το οποίο συνδέεται το πρωτόνιο αυτό, στο αρωματικό σύστημα (Σχήματα 79, 80). Η απλή κορυφή που οφείλεται στον συντονισμό του αρωματικού πρωτονίου H_1 εμφανίζεται στα 6.82 ppm. Φυσιολογικά, θα αναμενόταν να σχάζεται σε διπλή κορυφή λόγω του γειτονικού H_2 με σταθερά σύζευξης 4J , ωστόσο, λόγω κακής ομογενοποίησης η σχάση αυτή δε διακρίνεται. Το H_1 βρίσκεται ανάμεσα στο άτομο χλωρίου, το οποίο έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον αρωματικό δακτύλιο, μέσω ισχυρού επαγωγικού φαινομένου και την υδροξυλομάδα, η οποία προσφέρει μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων στο αρωματικό σύστημα, μέσω συζυγιακού φαινομένου (Σχήμα 79).



Σχήμα 79: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H_1 , μέσω συζυγιακού φαινομένου.

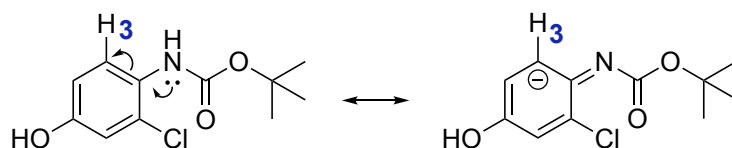
Το H_2 εμφανίζεται στα 6.69 ppm ως μια διπλή κορυφή, καθώς σχάζεται από το γειτονικό πρωτόνιο H_3 με σταθερά σύζευξης $^3J = 8.4$ Hz. Φυσιολογικά, θα αναμενόταν να σχάζεται περαιτέρω σε μια κορυφή με μοτίβο διπλή της διπλής, λόγω του γειτονικού H_1 με σταθερά σύζευξης 4J , ωστόσο, λόγω κακής ομογενοποίησης η σχάση αυτή δε διακρίνεται.

Βρίσκεται δίπλα από την υδροξυλομάδα, η οποία προσφέρει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων στο αρωματικό σύστημα μέσω συζυγιακού φαινομένου (Σχήμα 80).

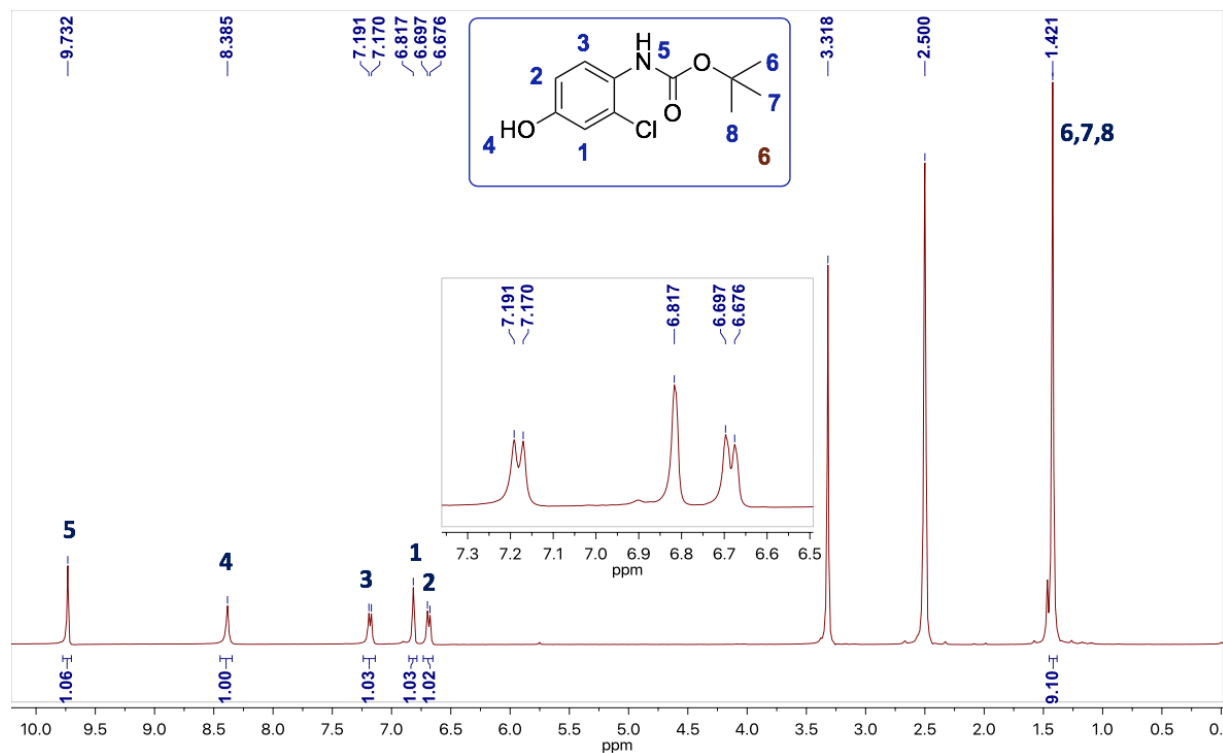


Σχήμα 80: Ερμηνεία σχετικής προσασίας του H₂, μέσω συζυγιακού φαινομένου.

Η κορυφή που οφείλεται στον συντονισμό του αρωματικού πρωτονίου H₃ εμφανίζεται στα 7.18 ppm και σχάζεται σε μια διπλή κορυφή, λόγω του γειτονικού H₂ με ³J = 8.4 Hz. Η γειτονική αμιδική ομάδα προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο πρωτόνιο αυτό, μέσω συζυγιακού φαινομένου (Σχήμα 81). Τέλος, τα πρωτόνια της tert-βουτυλομάδας υπ' αριθμόν 6,7,8 εμφανίζουν μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9 στα 1.42 ppm, καθώς αντιλαμβάνονται όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον.



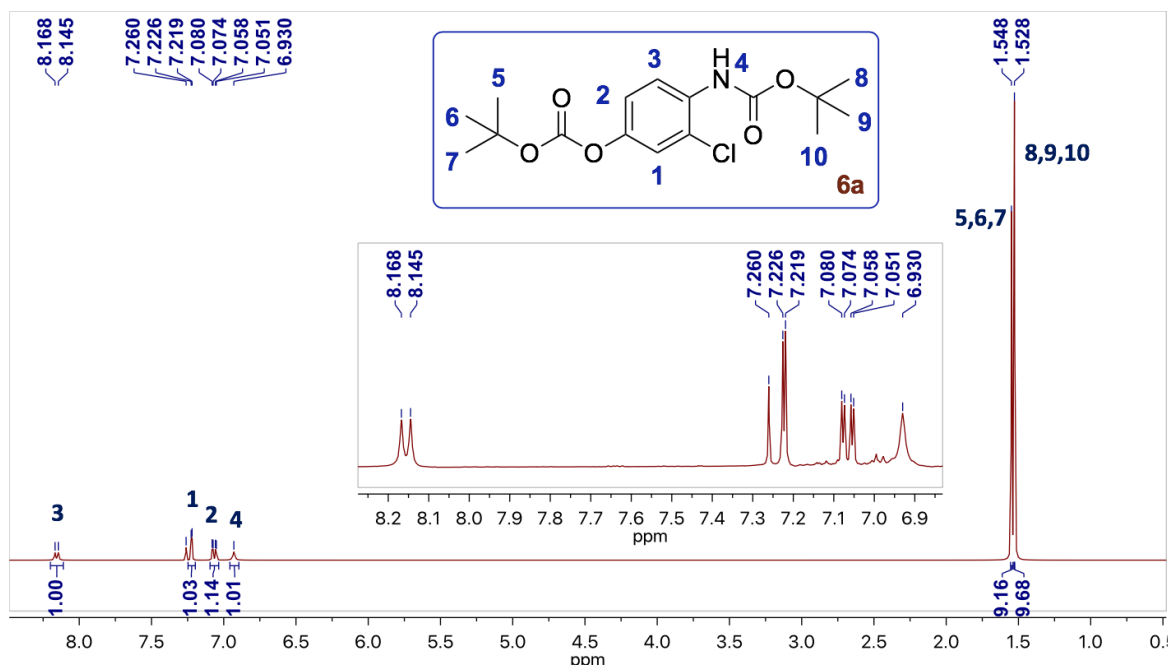
Σχήμα 81: Ερμηνεία σχετικής προσασίας του H₃, μέσω συζυγιακού φαινομένου.



Σχήμα 82: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα (ένωση 6) σε DMSO-d₆, στους 298 K.

3.6.5.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (4-((*tert*-βουτοξυκαρβονυλ)οξυ)-2-χλωροφαινυλικού *tert*-βουτυλεστέρα, παραπροϊόν 6a

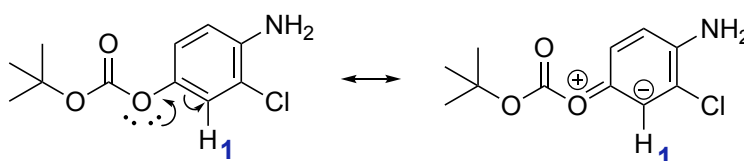
Στο φάσμα ^1H NMR του διπλά Voc-προστατευμένου παραπροϊόντος 6a (Σχήμα 83) παρατηρείται στα 8.16 ppm μία διπλή κορυφή, η οποία οφείλεται στο συντονισμό του αρωματικού πρωτονίου H₃. Η κορυφή αυτή σχάζεται με σταθερά σύζευξης $^3J = 9.2$ Hz, λόγω του γειτονικού H₂. Το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 συντονίζεται ως μια κορυφή στα 7.22 ppm, η οποία σχάζεται σε διπλή, λόγω του γειτονικού H₂, με $^4J = 2.8$ Hz. Η κορυφή στα 7.07 ppm που εμφανίζεται με μοτίβο διπλή της διπλής, οφείλεται στο συντονισμό του αρωματικού πρωτονίου H₂. Η κορυφή αυτή σχάζεται λόγω του H₃ με σταθερά σύζευξης $^3J = 9.2$ Hz και λόγω του H₁ με $^4J = 2.8$ Hz. Στα 6.93 ppm εμφανίζεται μία απλή, ευρεία κορυφή, η οποία οφείλεται στον συντονισμό του αμιδικού πρωτονίου υπ' αριθμόν 4. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 5, 6, 7 που ανήκουν στον *tert*-βουτυλεστέρα της υδροξυλομάδας ανταλαμβάνονται όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον, εξαιτίας της ταχείας περιστροφής του δεσμού, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9 στα 1.55 ppm. Ομοίως, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 8, 9, 10 που ανήκουν στον *tert*-βουτυλεστέρα της αμινομάδας εμφανίζουν μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9 στα 1.53 ppm.



Σχήμα 83: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του (4-((*tert*-βουτοξυκαρβονυλ)οξυ)-2-χλωροφαινυλικού *tert*-βουτυλεστέρα, παραπροϊόν 6a σε CDCl_3 , στους 298 K.

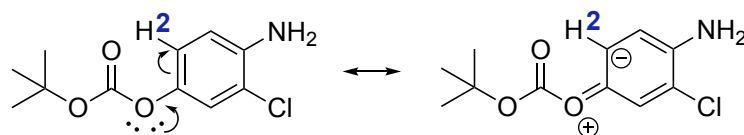
3.6.5.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα του ανθρακικού 4-αμινο-3-χλωροφαινυλο tert-βουτυλεστέρα, παραπροϊόν 6b

Στο φάσμα ^1H NMR του ανθρακικού 4-αμινο-3-χλωροφαινυλο tert-βουτυλεστέρα (Σχήμα 87) πιο απογυμνωμένο από ηλεκτρονιακή πυκνότητα παρουσιάζεται το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1. Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται ανάμεσα στο άτομο χλωρίου, το οποίο έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω ισχυρού επαγωγικού φαινομένου και την ομάδα του ανθρακικού εστέρα, η οποία προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον δακτύλιο μέσω συζυγιακού φαινομένου (Σχήμα 84). Εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή στα 7.08 ppm, η οποία σχάζεται λόγω του αρωματικού πρωτονίου H_2 με $^4J = 2.4$ Hz.



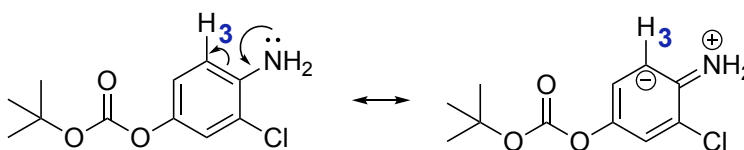
Σχήμα 84: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H_1 , μέσω συζυγιακού φαινομένου.

Στα 6.86 ppm εμφανίζεται η κορυφή που οφείλεται στον συντονισμό του πρωτονίου H_2 , ως κορυφή διπλή της διπλής. Η κορυφή αυτή σχάζεται λόγω του γειτονικού πρωτονίου H_3 με $^3J = 8.8$ Hz και του H_1 με $^4J = 2.8$ Hz. Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται σε ορθο-θέση ως προς την ομάδα του ανθρακικού εστέρα, η οποία μέσω συζυγιακού φαινομένου προσφέρει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων στον αρωματικό δακτύλιο (Σχήμα 85).



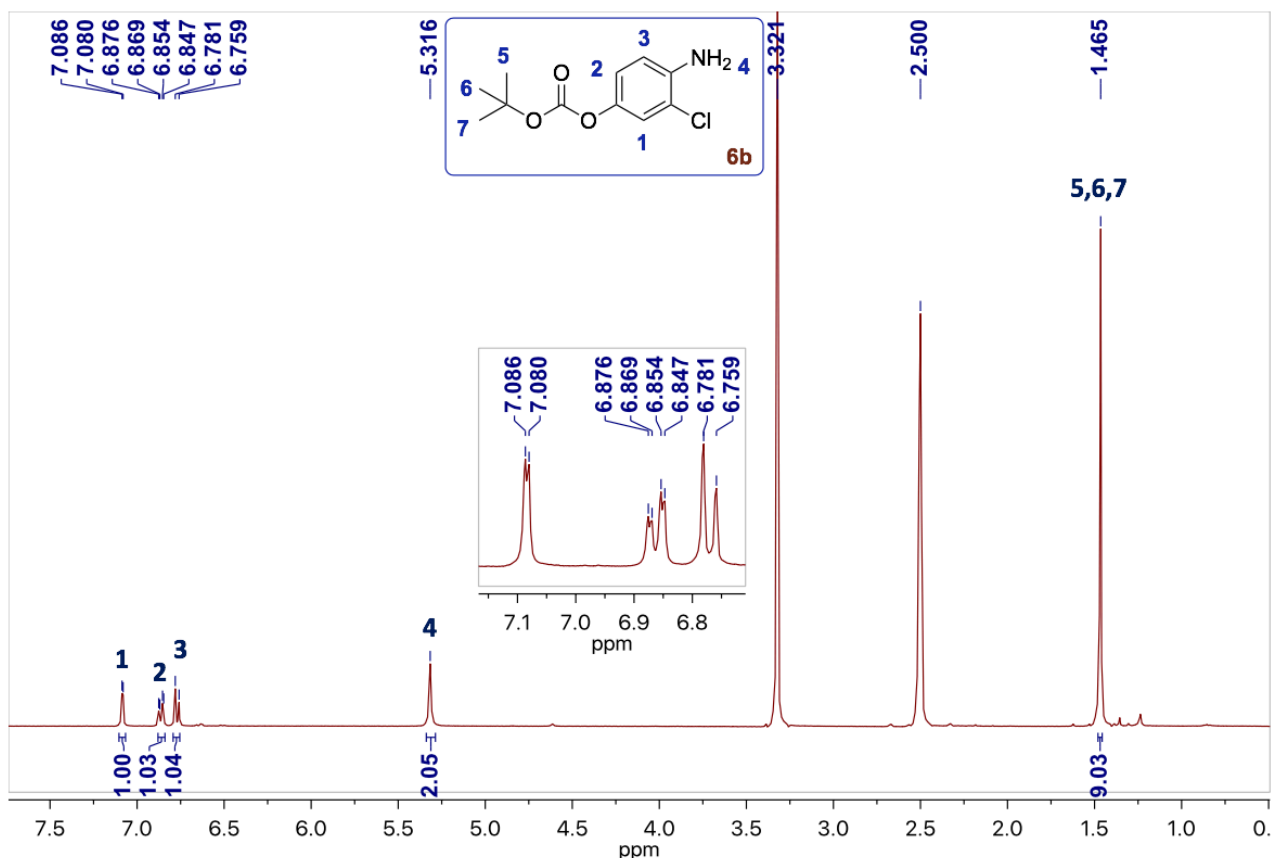
Σχήμα 85: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H_2 , μέσω συζυγιακού φαινομένου.

Το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 βρίσκεται σε ορθο-θέση ως προς την αμινομάδα, η οποία του προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω συζυγιακού φαινομένου, καθώς είναι ενεργοποιητής (Σχήμα 86). Συντονίζεται στα 6.77 ppm δίνοντας μια διπλή κορυφή με $^3J = 8.8$ Hz, καθώς σχάζεται από το γειτονικό πρωτόνιο H_2 .



Σχήμα 86: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H_3 , μέσω συζυγιακού φαινομένου.

Η απλή κορυφή στα 5.32 ppm αποδίδεται στο συντονισμό των πρωτονίων υπ' αριθμόν 4 της αμινομάδας και έχει ολοκλήρωμα 2. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 5, 6, 7 της tert-βουτυλομάδας εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή στα 1.47 ppm, με ολοκλήρωση 9, καθώς αντιλαμβάνονται όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον, λόγω της ταχείας περιστροφής του απλού δεσμού.



Σχήμα 87: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 4-αμινο-3-χλωροφαινυλο tert-βουτυλεστέρα (παραπροϊόν **6b**) σε $\text{DMSO}-d_6$, στους 298 K.

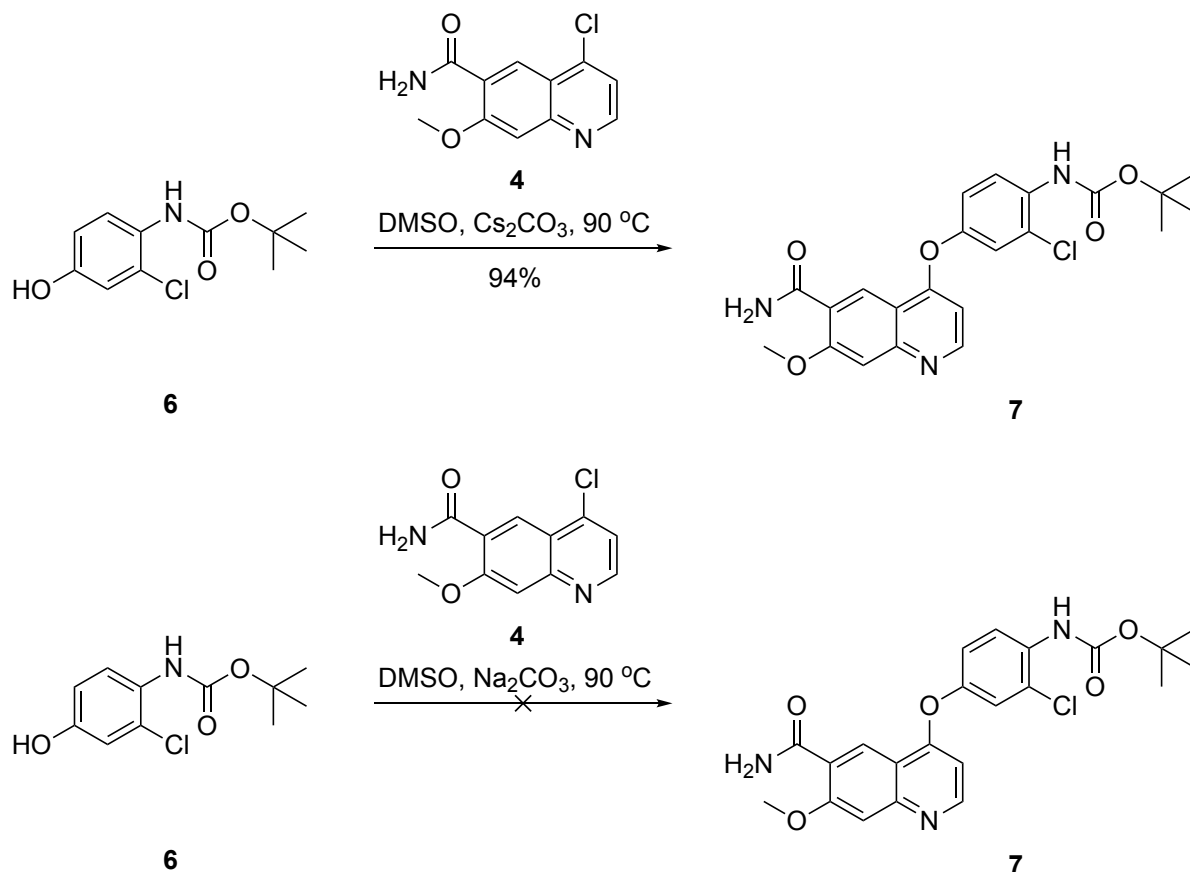
3.6.6 Σύνθεση του (4-((6-καρβαμούλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7

3.6.6.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του (4-((6-καρβαμούλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο) καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7

Ακολουθεί μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση σε βασικές συνθήκες, με αποτέλεσμα τη σύζευξη της N-Boc προστατευμένης 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (**6**) με τη χλωρο-υποκατεστημένη κινολίνη (**4**) και προκύπτει ο καρβαμικός tert-βουτυλεστέρας (**7**) σε απόδοση 94% (Σχήμα 88). Οι βασικές συνθήκες εξασφαλίζονται από το ανθρακικό καίσιο. Το ανθρακικό καίσιο είναι μια λευκή κρυσταλλική στερεή ένωση. Έχει υψηλή διαλυτότητα σε

πολικούς διαλύτες όπως νερό, αλκοόλη, διμεθυλοφορμαμίδιο και διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η διαλυτότητα του είναι υψηλότερη σε οργανικούς διαλύτες, σε σύγκριση με άλλα ανθρακικά άλατα, όπως ανθρακικά άλατα καλίου και νατρίου, αν και παραμένει αρκετά αδιάλυτο σε άλλους οργανικούς διαλύτες όπως το τολουόλιο, το *p*-ξυλόλιο και το χλωροβενζόλιο. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο, στους 90 °C για 16 ώρες.

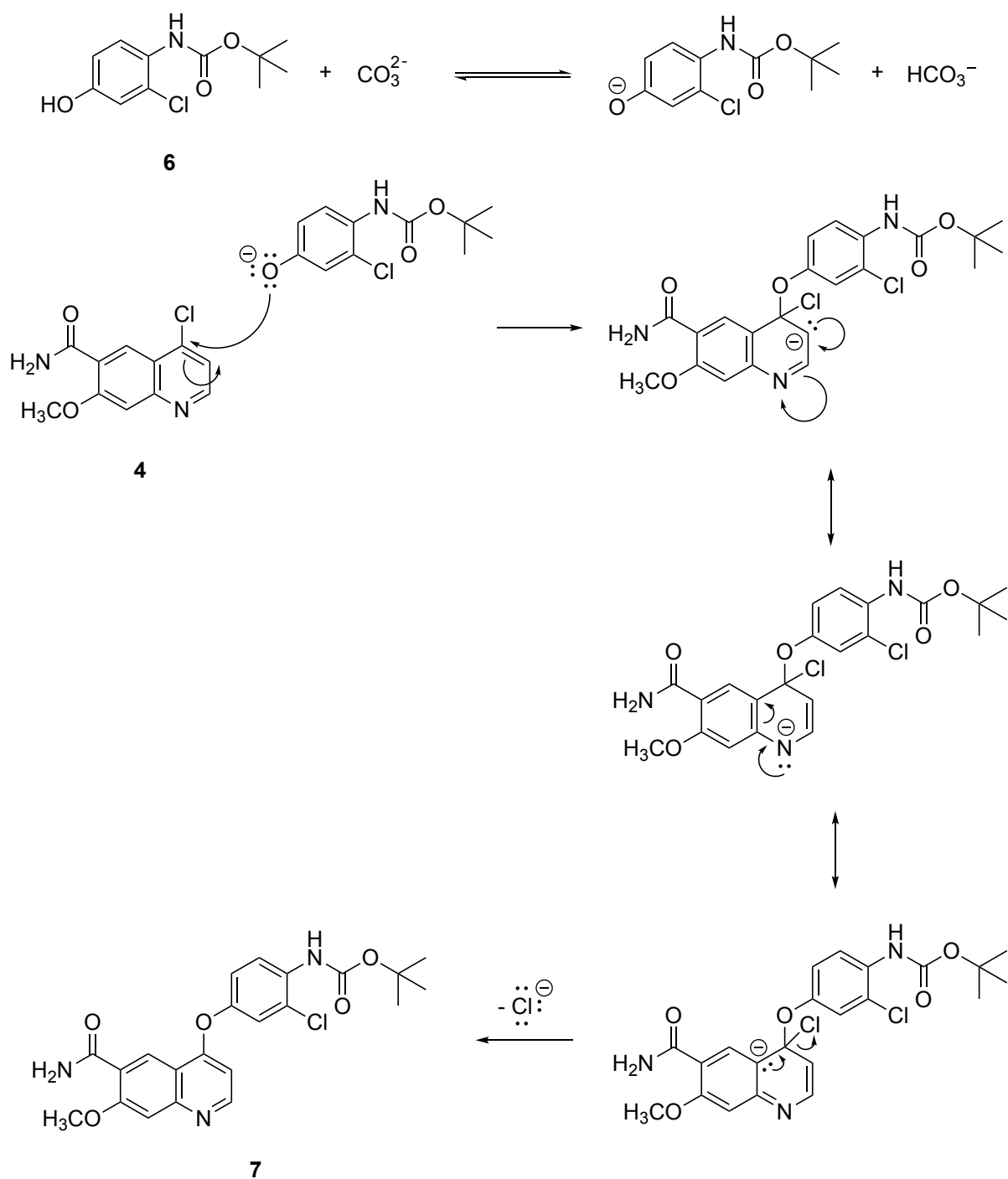
Για την ίδια αντίδραση, αντικαταστάθηκε η βάση ανθρακικό καίσιο με ανθρακικό νάτριο. Με αυτές τις συνθήκες δεν προέκυψε το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 88: Σύζευξη της αλκοόλης **6** με το χλωρίδιο **4**.

Η σύζευξη πραγματοποιείται με μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση σε βασικές συνθήκες, μέσω μηχανισμού προσθήκης-απόσπασης. Τα ανθρακικά ανιόντα αποπρωτονιώνουν την ομάδα υδροξυλίου, μετατρέποντάς την ομάδα αυτή σε ισχυρό πυρηνόφιλο (Σχήμα 89). Ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος σύζευξης (**7**) ευνοείται, καθώς το πυρηνόφιλο οξυγόνο της αλκοόλης **6** προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα που βρίσκεται στη θέση 4 της κινολίνης **4**. Στη θέση αυτή, το ενδιάμεσο ανιόν σταθεροποιείται, λόγω του ηλεκτραρνητικού ατόμου αζώτου που βρίσκεται στη θέση 1 και

στη συνέχεια το ανιόν χλωρίου αποσπάται ως καλή αποχωρούσα ομάδα. Συνεπώς, μέσω του σταθερού αυτού ενδιάμεσου, ευνοείται θερμοδυναμικά το προϊόν **7**.



Σχήμα 89: Πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με μηχανισμό προσθήκης-απόσπασης, σε βασικές συνθήκες.

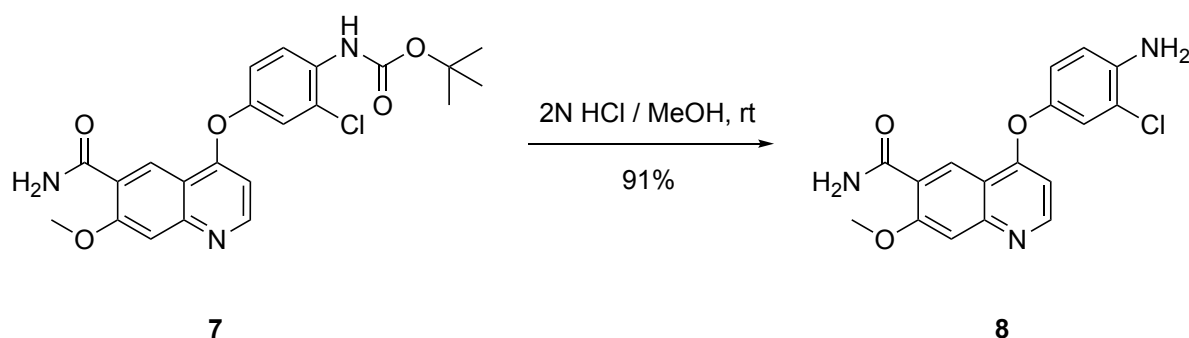
3.6.6.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7

Η N-Boc προστατευμένη ένωση 7 είναι πολύ ευαίσθητη σε όξινες συνθήκες, καθώς σε όξινες συνθήκες πραγματοποιείται η απομάκρυνση της Boc ομάδας, με αποτέλεσμα να προκύπτει η αντίστοιχη ελεύθερη αμίνη. Συνεπώς, κατά τον καθαρισμό της ένωσης 7 μέσω χρωματογραφίας στήλης, πραγματοποιείται Boc-αποπροστασία, καθώς η σίλικα είναι ελαφρώς όξινη. Αυτός είναι ο λόγος που δεν επιτεύχθηκε η λήψη φάσματος ^1H NMR της N-Boc προστατευμένης ένωσης 7.

3.6.7 Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 8

3.6.7.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 8

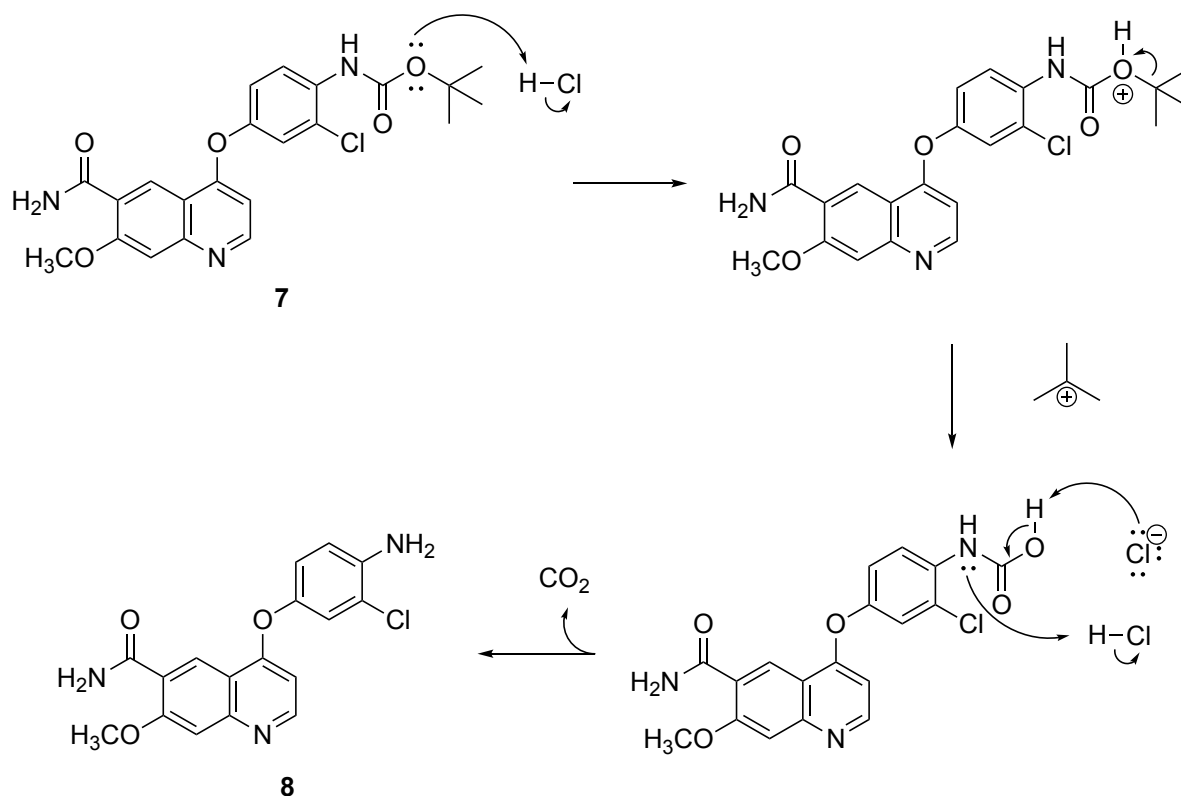
Τελικό στάδιο για τη λήψη της επιθυμητής αμίνης 8, η οποία στη συνέχεια θα συζευκτεί με τις κατάλληλες ενώσεις μέσω δημιουργίας αμιδικού δεσμού, ώστε να συντεθούν τα τελικά ανάλογα, είναι η αποπροστασία της αμινομάδας, δηλαδή η απομάκρυνση της Boc ομάδας από το N-τελικό άκρο της προστατευμένης ένωσης 7. Η αποπροστασία της N-Boc προστατευμένης ένωσης επιτυγχάνεται με τη χρήση μεθανολικού διαλύματος υδροχλωρίου, συγκέντρωσης 2N, σε θερμοκρασία δωματίου (Σχήμα 90). Το προϊόν, το οποίο προκύπτει στη μορφή υδροχλωρικού άλατος, υφίσταται κατεργασία με ανθρακικό νάτριο, μια ασθενής βάση, ώστε να προκύψει το επιθυμητό προϊόν, με απόδοση 91%.



Σχήμα 90: Αποπροστασία της N-Boc προστατευμένης ένωσης 7 σε όξινες συνθήκες.

Το υδροχλώριο προσφέρει ένα πρωτόνιο στο πυρηνόφιλο οξυγόνο της καρβαμικής ομάδας της προστατευμένης ένωσης 7 και αποβάλλεται κατιόν ισοβουτανίου. Εν συνεχεία,

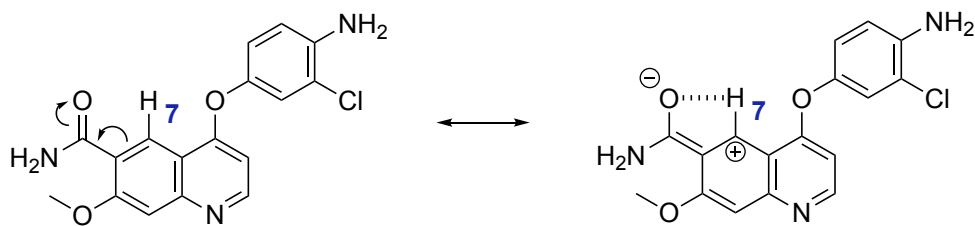
το πυρηνόφιλο άτομο αζώτου προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο και με αποκαρβοξυλίωση προκύπτει η αμίνη **8** (Σχήμα 91).



Σχήμα 91: Μηχανισμός αποπροστασίας της N-Boc προστατευμένης ένωσης **7** με την κατεργασία του σε όξινες συνθήκες.

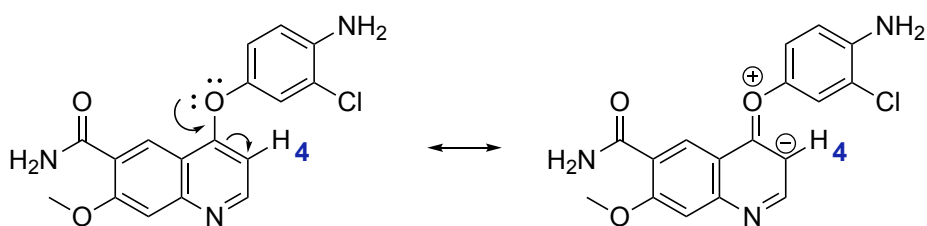
3.6.7.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση **8**

Από το φάσμα ¹H NMR επιβεβαιώνεται η επιτυχής σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου **8**, όπως φαίνεται σχηματικά και παρακάτω (Σχήμα 99). Στα 5.45 ppm διακρίνεται η απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2, η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια της ελεύθερης αμινομάδας, H₁₀. Με βάση αυτή τη κορυφή μπορεί κάποιος να αποφανθεί για την επιτυχή απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας. Πιο αποπροστατευμένο, στο φάσμα της ένωσης **8**, απεικονίζεται το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 7. Στο πρωτόνιο αυτό οφείλεται η απλή κορυφή στα 8.67 ppm, καθώς δεν έχει γειτονικά πρωτόνια. Η αποπροστασία του αποδίδεται στο γεγονός ότι βρίσκεται δίπλα από την αμιδική ομάδα, η οποία μέσω συζυγιακού φαινομένου απογυμνώνει το πρωτόνιο 7 από το μεγαλύτερο μέρος της ηλεκτρονιακής του πυκνότητας (Σχήμα 92). Επιπρόσθετα, λόγω της θέσης του, το H₇ αναπτύσσει ισχυρή αλληλεπίδραση με το οξυγόνο του αμιδικού δεσμού, σχηματίζοντας ψευδοδεσμό υδρογόνου.



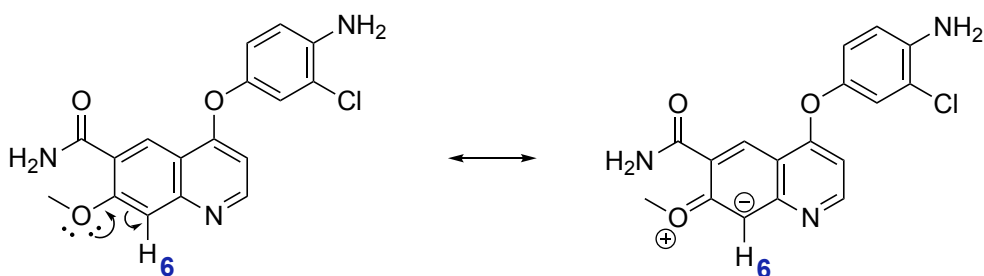
Σχήμα 92: Ερμηνεία αποπροστασίας του H₇. Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου.

Στα 8.64 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία οφείλεται στο συντονισμό του αρωματικού πρωτονίου H₅, το οποίο υφίσταται ισχυρό επαγωγικό φαινόμενο από το γειτονικό, ηλεκτραρνητικό άτομο αζώτου. Η κορυφή σχάζεται, λόγω αλληλεπίδρασης με το γειτονικό H₄ με $^3J = 5.5$ Hz. Το γειτονικό H₄ συντονίζεται στα 6.46 ppm, παρουσιάζοντας μια διπλή κορυφή με $^3J = 5.0$ Hz. Η σχετική του προστασία οφείλεται στο γεγονός ότι δέχεται ηλεκτρονιακή πυκνότητα, μέσω συζυγιακού φαινομένου, από το οξυγόνο της φαινοξυ-ομάδας (Σχήμα 93).



Σχήμα 93: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H₄, μέσω συζυγιακού φαινομένου.

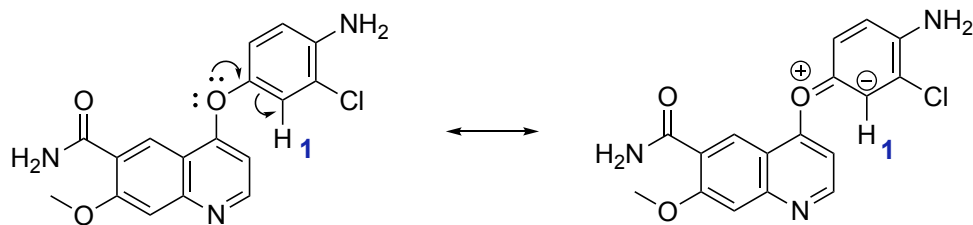
Το αρωματικό H₆ συντονίζεται ως μια απλή κορυφή στα 7.49 ppm, καθώς δε διαθέτει γειτονικά πρωτόνια. Μέσω δομών συντονισμού, το οξυγόνο της μεθοξυ-ομάδας προσφέρει το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του, με αποτέλεσμα ο άνθρακας με τον οποίο συνδέεται το πρωτόνιο H₆ να εμφανίζεται με μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων (Σχήμα 94).



Σχήμα 94: Ερμηνεία σχετικής προστασίας του H₆, μέσω συζυγιακού φαινομένου.

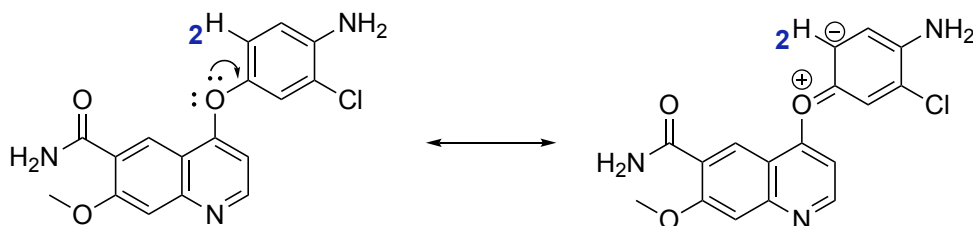
Στα 7.24 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H₁. Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται ανάμεσα στο άτομο χλωρίου και το οξυγόνο της φαινοξυ-ομάδας. Το άτομο χλωρίου έλκει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πρωτονίου H₁,

μέσω άσκησης ισχυρού επαγωγικού φαινομένου, ενώ η φαινυλοξυ-ομάδα προσφέρει στον άνθρακα με τον οποίο συνδέεται το H₁ ένα ζεύγος ηλεκτρονίων, μέσω συζυγιακού φαινομένου (Σχήμα 95). Η κορυφή σχάζεται, λόγω του γειτονικού H₂ με ⁴J = 2.5 Hz.

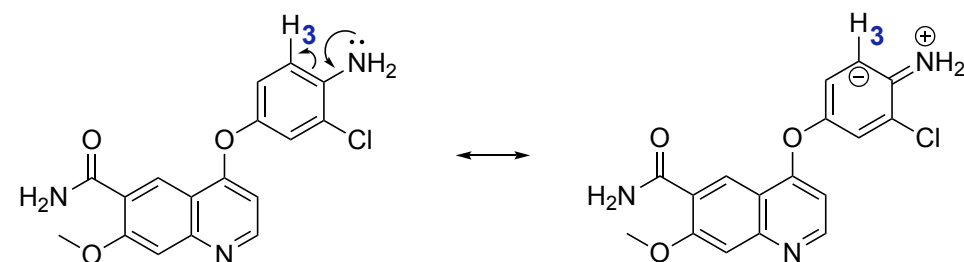


Σχήμα 95: Ερμηνεία σχετικής προσασίας του H₁, μέσω συζυγιακού φαινομένου.

Το αρωματικό πρωτόνιο H₂ συντονίζεται στα 7.01 ppm και συντονίζεται ως μια κορυφή με μοτίβο διπλή της διπλής. Αυτό συμβαίνει επειδή η κορυφή σχάζεται από το γειτονικό H₃ σε διπλή, με σταθερά σύζευξης ³J = 8.5 Hz. Η διπλή αυτή κορυφή σχάζεται περαιτέρω σε διπλή της διπλής, λόγω αλληλεπίδρασης με το γειτονικό H₁, με ⁴J = 2.5 Hz. Η σχετική του προσασία οφείλεται στο γεγονός ότι δέχεται ηλεκτρονιακή πυκνότητα, μέσω συζυγιακού φαινομένου, από το οξυγόνο της φαινοξυ-ομάδας (Σχήμα 96).



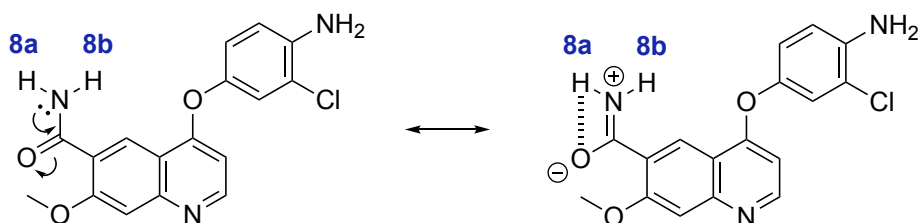
Σχήμα 96: Ερμηνεία σχετικής προσασίας του H₂, μέσω συζυγιακού φαινομένου.



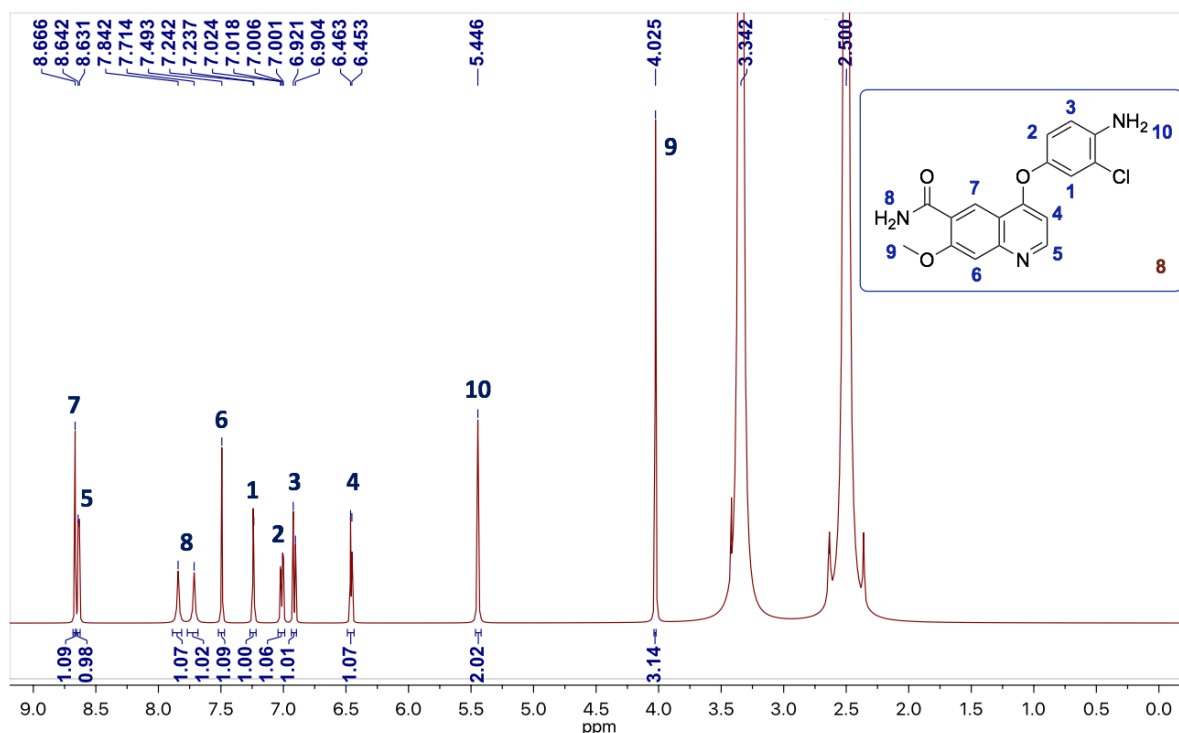
Σχήμα 97: Ερμηνεία σχετικής προσασίας του H₃, μέσω συζυγιακού φαινομένου.

Στο αρωματικό πρωτόνιο H₃ οφείλεται η κορυφή στα 6.91 ppm, η οποία σχάζεται λόγω του γειτονικού πρωτονίου H₂ με ³J = 8.5 Hz. Σε ορθο-θέση ως προς το πρωτόνιο αυτό, βρίσκεται η ελεύθερη αμινομάδα, η οποία μέσω συζυγιακού φαινομένου του προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα, καθώς είναι ενεργοποιητής (Σχήμα 97). Τα δύο πρωτόνια της αμιδικής ομάδας 8a και 8b εμφανίζονται ως δύο διαφορετικές ευρείες απλές κορυφές στα

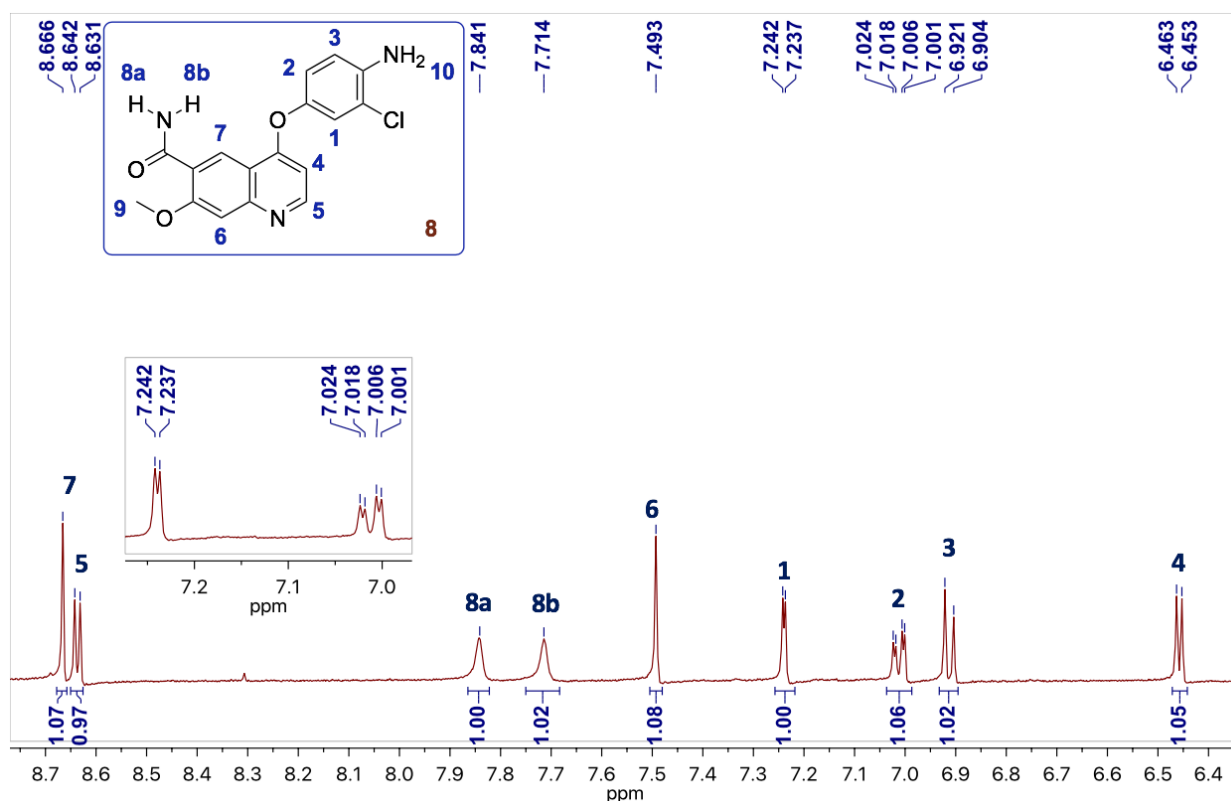
7.84 και 7.71 ppm, αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει, επειδή ο αμιδικός δεσμός ανάμεσα στο άζωτο και τον άνθρακα έχει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού, όπως φαίνεται από τις δομές συντονισμού (Σχήμα 98). Συνεπώς, η περιστροφή του δεσμού είναι τόσο αργή, με αποτέλεσμα να συμβαίνουν δύο διαφορετικές απορροφήσεις, ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες η περιστροφή του δεσμού θα ήταν ταχύτερη, οπότε θα συντονιζόταν τα δύο αμιδικά πρωτόνια ως μια απλή διευρυμένη κορυφή με ολοκλήρωση 2. Το πρωτόνιο 8a αλληλεπιδρά με το οξυγόνο της αμιδικής ομάδας, λόγω της θέσης του, σχηματίζοντας ψευδοδεσμό υδρογόνου με αυτό, με συνέπεια να αποπροστατεύεται περισσότερο από το πρωτόνιο 8b (Σχήμα 98). Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 9 που ανήκουν στη μεθοξυ-ομάδα συντονίζονται στα 4.03 ppm, δίνοντας μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3.



Σχήμα 98: Σχηματισμός ψευδοδεσμού υδρογόνου στον αμιδικό δεσμό, ο οποίος έχει μερικό χαρακτήρα διπλού δεσμού.



Σχήμα 99: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz) του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου (ένωση 8) σε $\text{DMSO}-d_6$, στους 298 K.

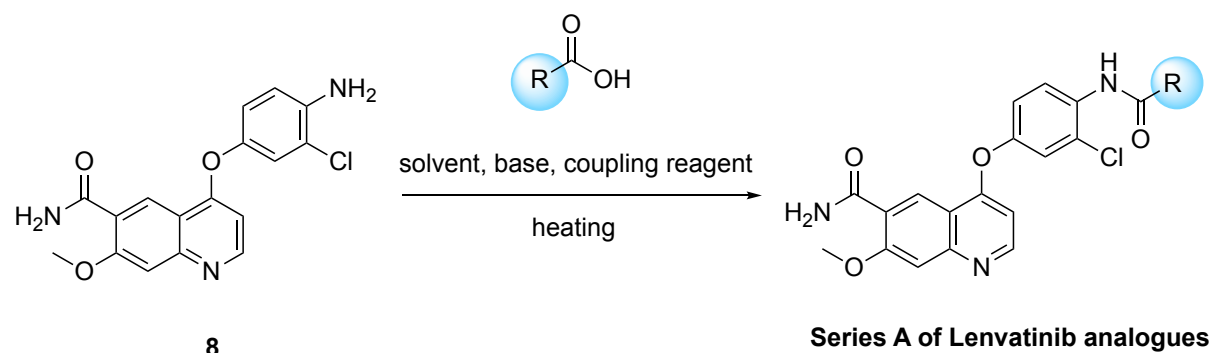


Σχήμα 100: Φάσμα ^1H NMR (500 MHz) του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιου (ένωση **8**), στην αρωματική περιοχή, σε DMSO-d_6 , στους 298 K.

3.6.8 Σύνθεση των αναλόγων του *Lenvatinib* της σειράς A (*Lenv1*, *Lenv2*, *Lenv3*)

Για τη σύνθεση της σειράς A αναλόγων του *Lenvatinib* είναι απαραίτητος ο σχηματισμός ενός αμιδικού δεσμού ανάμεσα στην αμίνη **8** και το κατάλληλο καρβοξυλικό οξύ. Στην περίπτωση του **Lenv1**, ο δεσμός αυτός σχηματίζεται ανάμεσα στην αμίνη **8** και το 4-θειαζολο-καρβοξυλικό οξύ. Στην περίπτωση των **Lenv2** και **Lenv3**, ο δεσμός αυτός σχηματίζεται ανάμεσα στην αμίνη **8** και την ελεύθερη καρβοξυλομάδα του μη φυσικού αμινοξέος D-προλίνη και του φυσικού αμινοξέος L-αλανίνη, αντίστοιχα (Σχήμα 101). Κάθε ένα από τα εναντιομερή (S-, R-) μιας χειρόμορφης ένωσης, ως γνωστόν, συμπεριφέρεται πολύ διαφορετικά στο βιολογικό περιβάλλον. Για μια δεδομένη χειρόμορφη ένωση, εξετάζονται και τα δύο εναντιομερή ξεχωριστά ως διαφορετικές ενώσεις, με διαφορετικές ιδιότητες. Τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται στη σύζευξη αυτή απαιτείται να είναι προστατευμένα στο N-τελικό τους άκρο, προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός πολυπεπτιδίου. Το τελικό στάδιο για τη λήψη των επιθυμητών προϊόντων είναι η αποπροστασία των αμινοξέων, ώστε να μείνει ελεύθερη η αμινομάδα, η οποία δύναται να

σχηματίζει αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της κινάσης, και να αυξήσει την ανασταλτική δράση της εκάστοτε ένωσης.

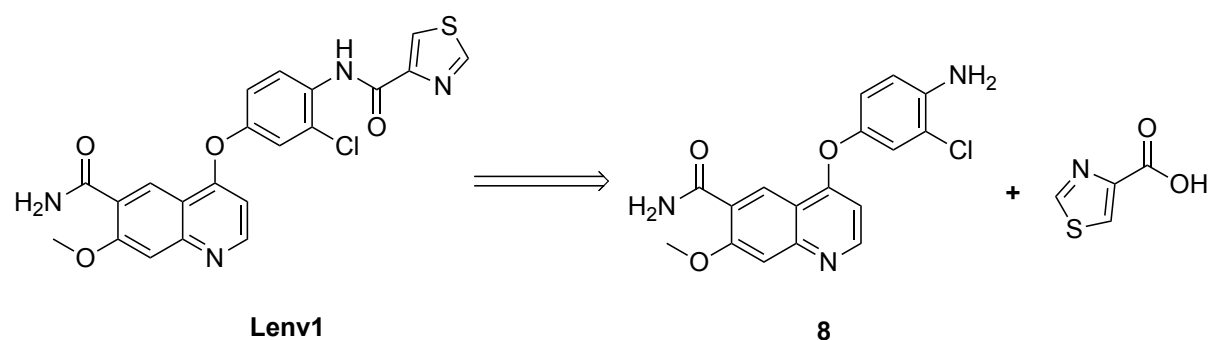


Σχήμα 101: Γενική πορεία σύνθεσης της σειράς A των αναλόγων του Lenvatinib. Αν η ομάδα καρβοξυλικού οξέος ανήκει σε φυσικό (-L) και μη (-D) αμινοξύ, προστατευμένο στο N-τελικό άκρο, τότε απαραίτητη είναι η αποπροστασία του για τη σύνθεση του τελικού αναλόγου.

3.6.8.1 Σύνθεση του Lenv1

3.6.8.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του Lenv1

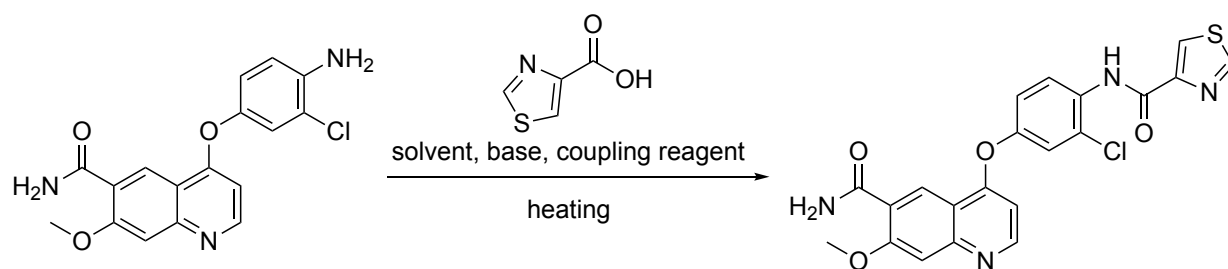
Μέσω αποσυνδεδετικής προσέγγισης του **Lenv1**, πραγματοποιείται σχάση του αμιδικού δεσμού και προκύπτουν δυο απλούστερες δομές (Σχήμα 102). Τα δυο δομικά στοιχεία του εν δυνάμει αναστολέα είναι η αμίνη **8** και το 4-θειαζολο-καρβοξυλικό οξύ. Συνεπώς, στο εργαστήριο ακολουθήθηκε μια συγκλίνουσα συνθετική πορεία ανάπτυξης της επιθυμητής ένωσης.



Σχήμα 102: Αποσυνδεδετική προσέγγιση για το σχεδιασμό της σύνθεσης του αναλόγου **Lenv1**.

Η αντίδραση σύζευξης της αμίνης **8** και του 4-θειαζολο-καρβοξυλικού οξέος πραγματοποιήθηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σε απόλυτο διαλύτη. Το οξύ διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη, ακολουθεί η προσθήκη βάσης και τελευταίο προστίθεται το

αντιδραστήριο σύζευξης. Με τον τρόπο αυτόν ενεργοποιείται το οξύ, προκειμένου να αντιδράσει ευκολότερα και αποτελεσματικότερα με την αμίνη (Σχήμα 103).



8

Lenv1

Σχήμα 103: Αντίδραση σύζευξης για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και τη σύνθεση του **Lenv1**.

Για να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, ώστε να πραγματοποιηθεί η λήψη του επιθυμητού προϊόντος σε υψηλή απόδοση και να αποφευχθεί η δημιουργία παραπροϊόντων, διενεργήθηκε μια ποικιλία αντιδράσεων, όπου έγινε χρήση διαφορετικών θερμοκρασιών και αναλογιών του αντιδραστήριου σύζευξης, της βάσης και του 4-θειαζολο-καρβοξυλικού οξέος. Οι αντιδράσεις αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 16.

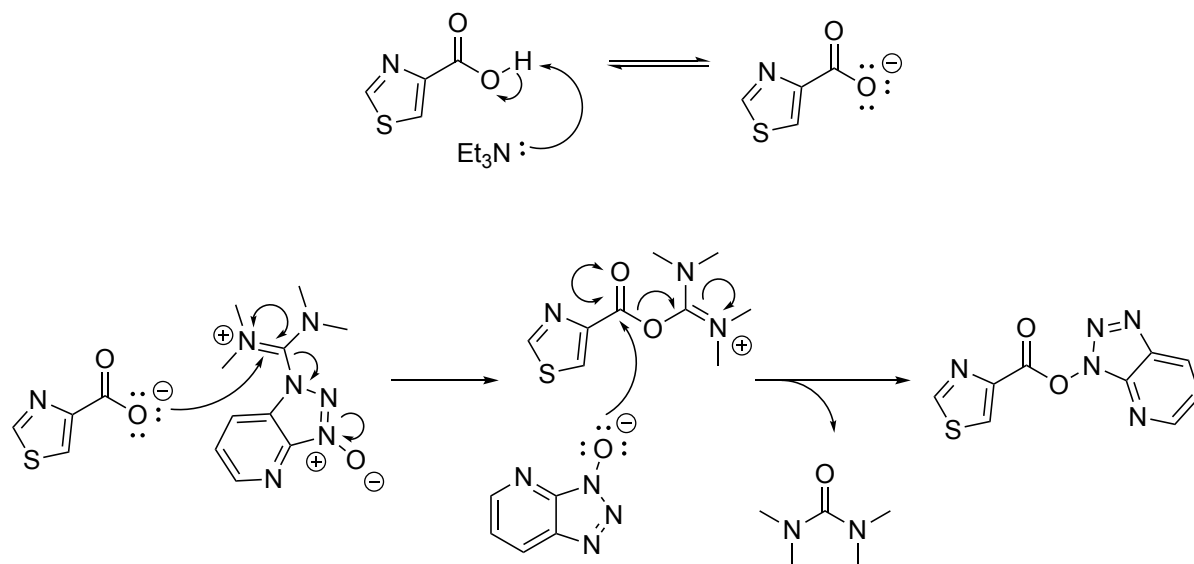
Πείραμα	4-θειαζολο-καρβοξυλικό οξύ (eq)	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	1.5	THF	HATU 2 eq	Et ₃ N 5 eq	rt	24h	10%
2	1.5	THF	HATU 2 eq	Et ₃ N 5 eq	60 °C	24h	50%
3	3.0	THF	HATU 4 eq	Et ₃ N 14 eq	60 °C	24h	85%

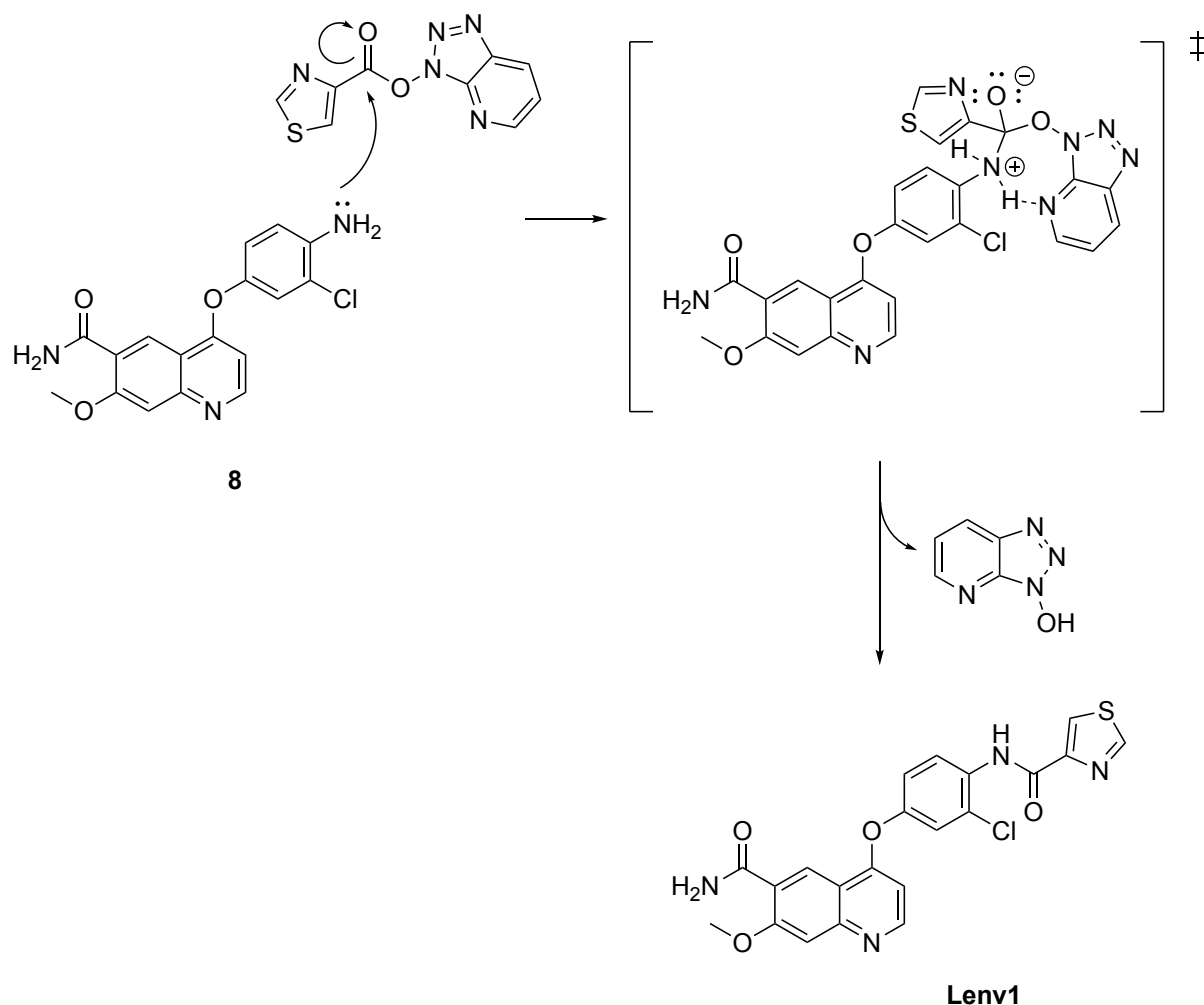
Πίνακας 16: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση του **Lenv1**. Η θερμοκρασία στην οποία έλαβε χώρα ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα ήταν 0 °C σε όλες τις προσπάθειες. Όπου eq, η ισοδύναμη ποσότητα του αντιδρώντος. Σε κάθε προσπάθεια η ισοδύναμη ποσότητα της αμίνης **8** είναι 1.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε πολύ καλή απόδοση (85%), με την ενεργοποίηση του 4-θειαζολο-καρβοξυλικού οξέος (3 eq) στους 0 °C, με τη χρήση τριαιθυλαμίνης (14 eq) και HATU (4 eq), σε απόλυτο διαλύτη τετραϋδροφουράνιο, ώστε να σχηματιστεί ο

ενεργοποιημένος εστέρας και να αποφευχθεί ο σχηματισμός του ανυδρίτη του οξέος. Εν συνεχεία, προστίθεται η αμίνη **8** (1 eq) και η θερμοκρασία της αντίδρασης σταθεροποιείται στους 60 °C.

Στο Σχήμα 104 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης. Για τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού απαιτείται η παρουσία βάσης. Η βάση διευκολύνει την απομάκρυνση του πρωτονίου του οξέος, το οποίο στη συνέχεια ως ανιόν (ισχυρότερο πυρηνόφιλο) μπορεί να αντιδράσει με το αντιδραστήριο σύζευξης. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε η τριαιθυλαμίνη. Αρχικά, η βάση αποπρωτονώνει το οξύ και σχηματίζεται το αντίστοιχο ανιόν, το οποίο με τη σειρά του προσβάλλει το αντιδραστήριο σύζευξης, HATU, δημιουργώντας τον ενεργοποιημένο εστέρα. Ακολούθως, το πυρηνόφιλο άζωτο της αμίνης προσβάλλει (με το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων) την καρβonyλομάδα του ενεργοποιημένου εστέρα, προκειμένου να σχηματιστεί ο επιθυμητός αμιδικός δεσμός. Παρατηρούμε ότι ο καρβonyλικός άνθρακας του ενεργοποιημένου εστέρα θα μπορούσε να προσβληθεί και από το ανιόν του οξέος σχηματίζοντας έτσι, τον ανεπιθύμητο ανυδρίτη. Παρουσία υγρασίας επανασηματίζεται το οξύ, αφού το νερό δρα ως πυρηνόφιλο. Για το λόγο αυτό, οι αντιδράσεις σύζευξης πρέπει να πραγματοποιούνται σε άνυδρες συνθήκες.



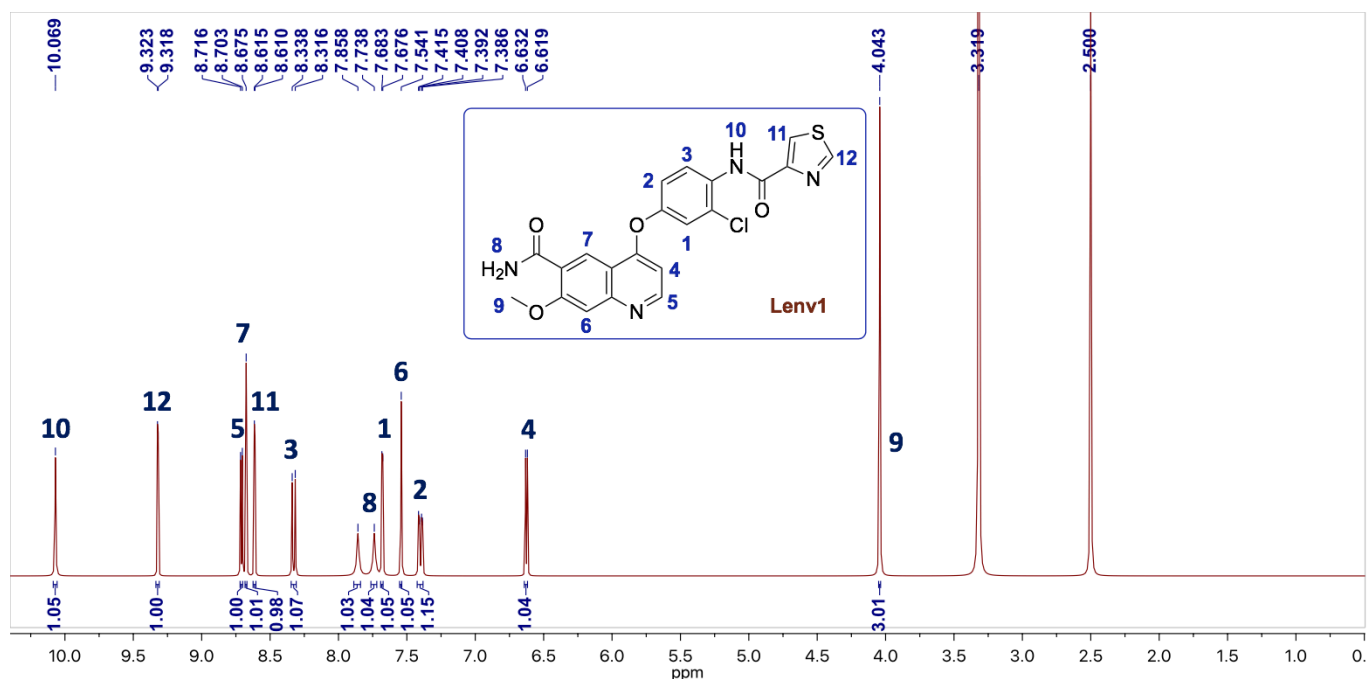


Σχήμα 104: Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με τη χρήση τριαιθυλαμίνης και HATU και σχηματισμός του **Lenv1**.

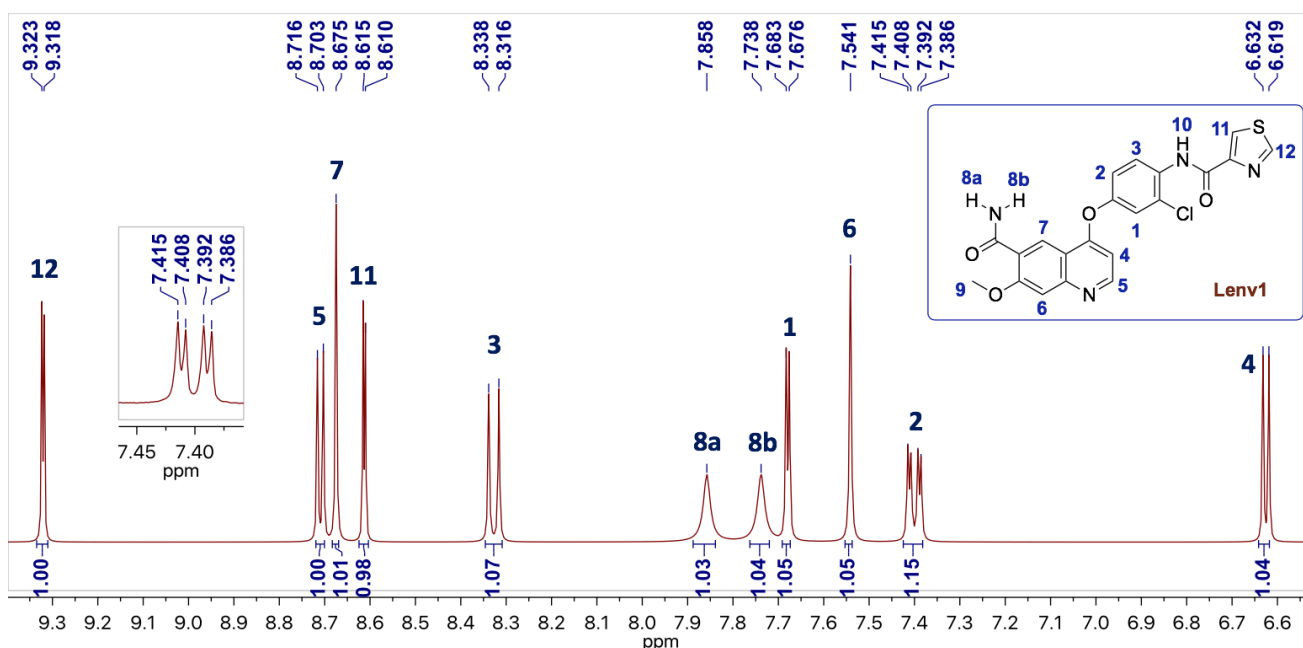
3.6.8.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του **Lenv1**

Από τα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR επιβεβαιώνεται η επιτυχής σύνθεση του **Lenv1**. Στο φάσμα ^1H NMR του **Lenv1** (Σχήματα 105, 106, 107) χαρακτηριστική είναι η κορυφή στα 10.07 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H_{10} και επιβεβαιώνει τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού. Τα πρωτόνια που ανήκουν στον θειαζολικό δακτύλιο, H_{12} και H_{11} , συντονίζονται στα 9.32 και 8.61 ppm, αντίστοιχα, δίνοντας από μία διπλή κορυφή το καθένα, με $^4J = 2.0$ Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 12 εμφανίζεται σε υψηλότερες τιμές ppm, καθώς βρίσκεται ανάμεσα σε δύο ηλεκτραρνητικά άτομα τα οποία έλκουν ισχυρά ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω επαγωγικού φαινομένου, το άτομο θείου και το άτομο αζώτου. Τα αρωματικά πρωτόνια H_5 και H_4 , συντονίζονται στα 8.71 και 6.63 ppm, αντίστοιχα, δίνοντας από μία διπλή κορυφή το καθένα με $^3J = 5.2$ Hz. Στα 8.68 ppm διακρίνεται μια απλή κορυφή

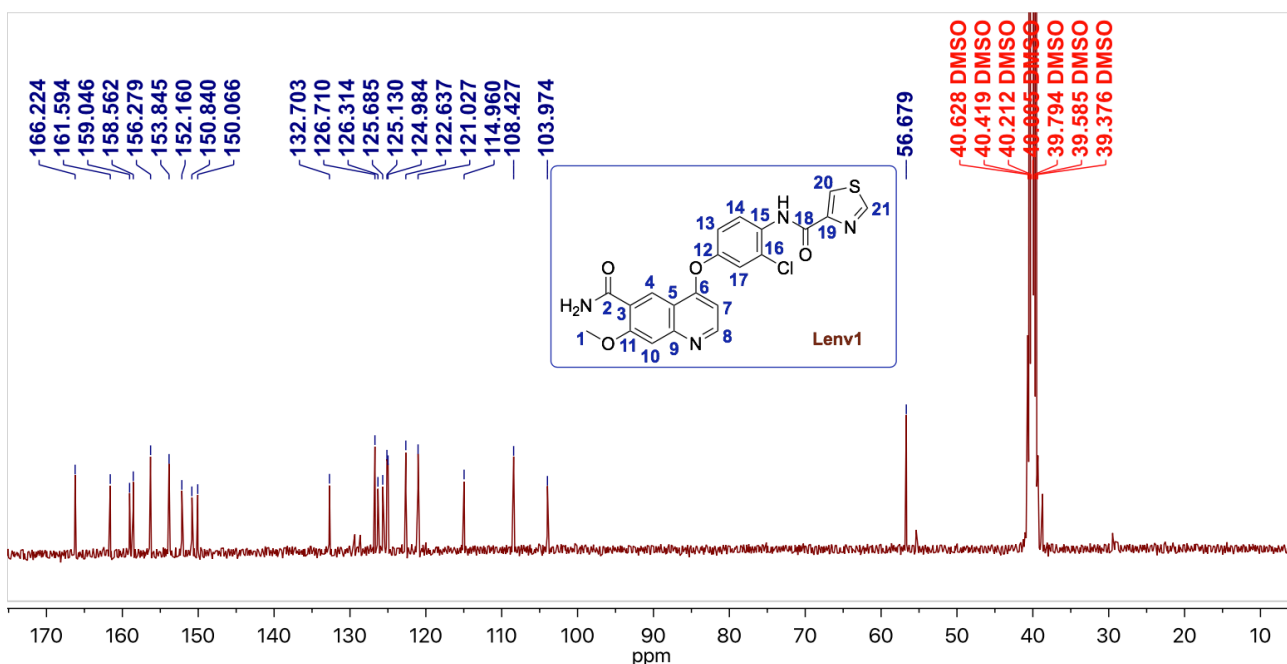
που οφείλεται στο συντονισμό του αρωματικού πρωτονίου υπ' αριθμόν 7. Η απλή κορυφή στα 7.54 ppm αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 6. Στα 7.40 ppm εμφανίζεται μια κορυφή με το μοτίβο διπλή της διπλής. Αυτή, αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο 2 και σχάζεται από τα γειτονικά πρωτόνια H₃ και H₁ με ³J = 8.8 Hz και ⁴J = 2.8 Hz, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H₃ συντονίζεται ως μια διπλή κορυφή στα 8.33 ppm. Η κορυφή σχάζεται λόγω της γειννιάσής του με το H₂ με ³J = 8.8 Hz. Στα 7.68 ppm εμφανίζεται η διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1, η οποία σχάζεται λόγω του γειτονικού H₂ με ⁴J = 2.8 Hz. Τα δύο πρωτόνια της αμιδικής ομάδας 8a και 8b εμφανίζονται ως δύο διαφορετικές ευρείες απλές κορυφές στα 7.86 και 7.74 ppm, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο 8a αλληλεπιδρά με το οξυγόνο της αμιδικής ομάδας, λόγω της θέσης του, σχηματίζοντας ψευδοδεσμό υδρογόνου με αυτό, με συνέπεια να αποπροστατεύεται περισσότερο από το πρωτόνιο 8b. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 9 που ανήκουν στη μεθοξυ-ομάδα συντονίζονται στα 4.04 ppm, δίνοντας μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3.



Σχήμα 105: Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) του Lenv1 σε DMSO-d₆, στους 298 K.

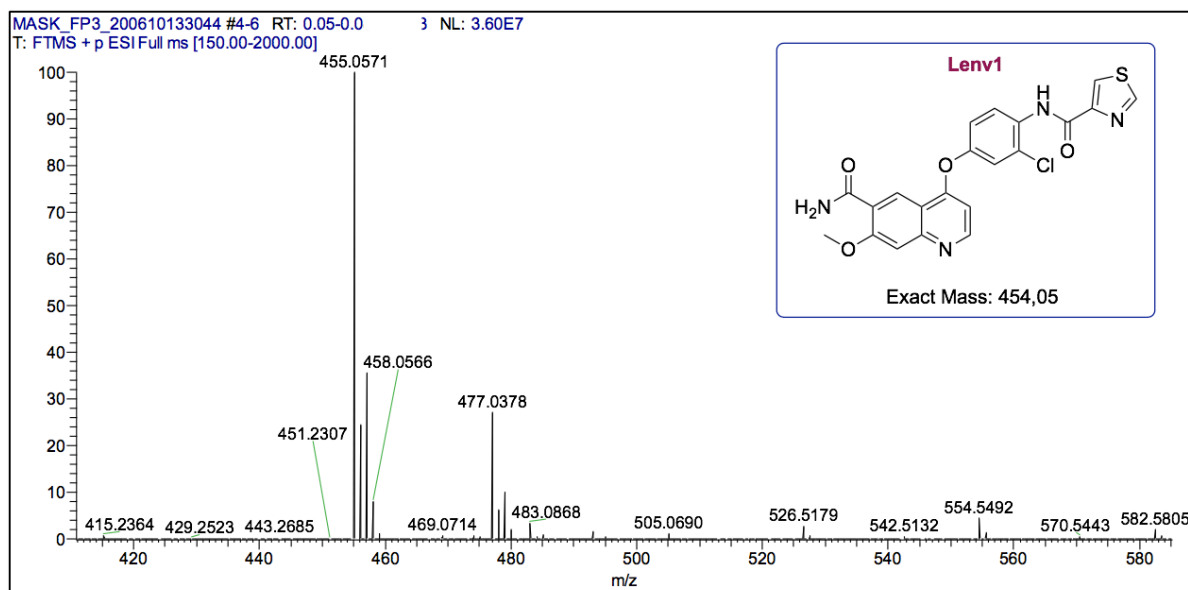


Σχήμα 106: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του **Lenv1**, στην αρωματική περιοχή, σε $\text{DMSO-}d_6$, στους 298 K.



Σχήμα 107: Φάσμα ^{13}C NMR (400 MHz) του **Lenv1** σε $\text{DMSO-}d_6$, στους 298 K. Η ένωση διαθέτει 21 άτομα άνθρακα και ο καθένας συντονίζεται σε διαφορετική τιμή ppm, με αποτέλεσμα την εμφάνιση 21 διαφορετικών κορυφών.

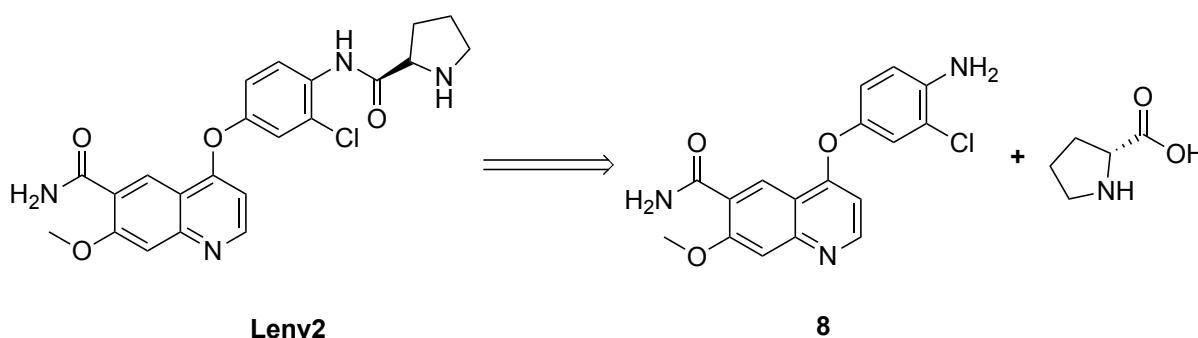
Για την πλήρη ταυτοποίηση της ένωσης **Lenv1** έγινε λήψη του φάσματος μάζας με διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%. Για την εν λόγω ένωση, με μοριακό τύπο $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}$ η ακριβής μάζα είναι 454.05, ενώ βρέθηκε ότι το m/z της βασικής κορυφής είναι 455.0571, λόγω πρωτονίωσης, και αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}+\text{H}]^+$, γεγονός που επιβεβαιώνει τη πλήρη ταυτοποίηση με το υπολογισθέν μοριακό βάρος (Σχήμα 108).



Σχήμα 108: Φάσμα μάζας της ένωσης **Lenv1** στο +MS.

3.6.8.2 Σύνθεση του **Lenv2**

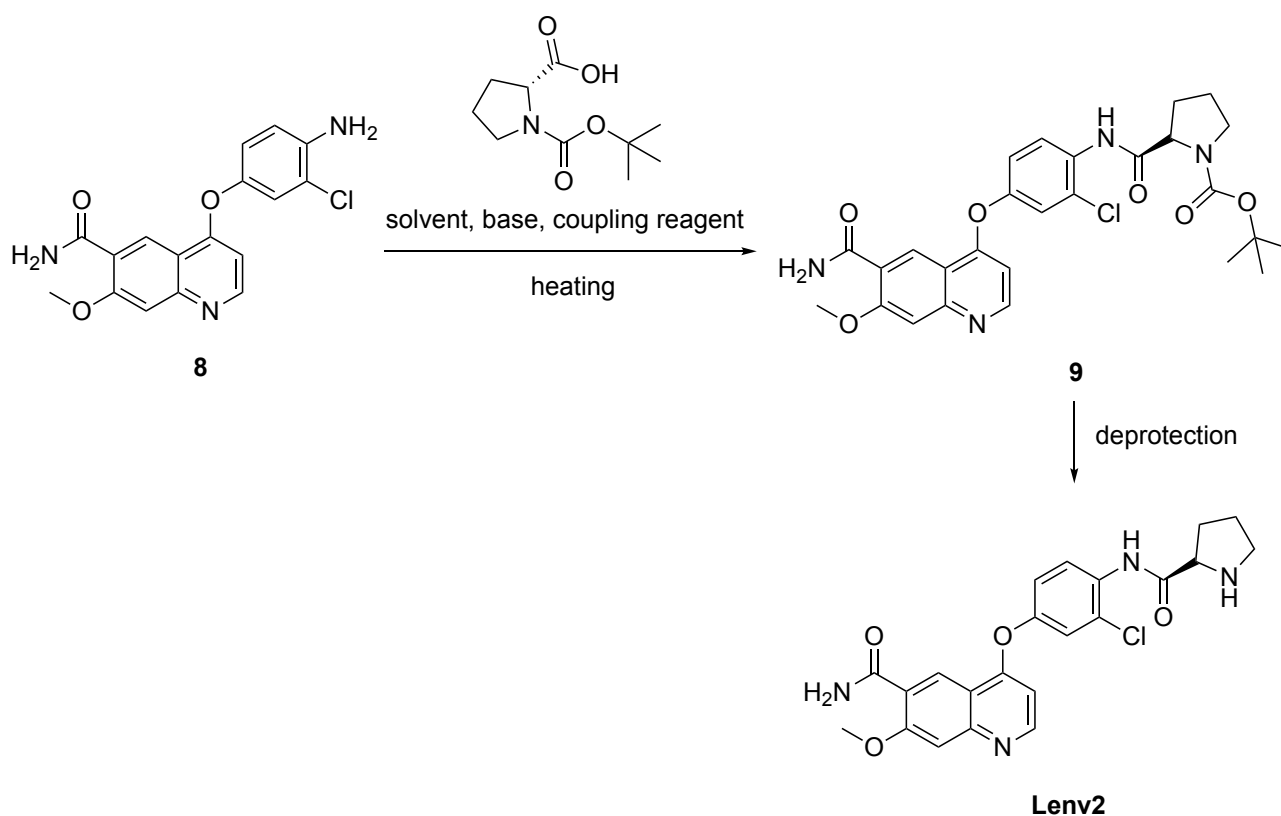
Το ανάλογο **Lenv2**, μέσω αποσυνδεδετικής προσέγγισης, προκύπτει από δυο απλούστερες δομές, οι οποίες συζεύονται με το σχηματισμό αμιδικού δεσμού (**Σχήμα 109**). Τα δυο δομικά στοιχεία του εν δυνάμει αναστολέα είναι η αμίνη **8** και η D-προλίνη. Συνεπώς, στο εργαστήριο ακολουθείται μια συγκλίνουσα συνθετική πορεία ανάπτυξης του επιθυμητού αναλόγου.



Σχήμα 109: Αποσυνδεδετική προσέγγιση για το σχεδιασμό της σύνθεσης του αναλόγου **Lenv2**.

Για να πραγματοποιηθεί η σύζευξη της αμίνης **8** με την D-προλίνη, είναι αναγκαίο να γίνει προστασία της D-προλίνης στο N-τελικό της άκρο, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πολυπεπτιδίου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται η N-Boc προστατευμένη D-προλίνη, η οποία είναι εμπορικά διαθέσιμη. Η αντίδραση σύζευξης της αμίνης **8** και της N-Boc προστατευμένης D-προλίνης πραγματοποιείται υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σε απόλυτο

διαλύτη. Το οξύ διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη, ακολουθεί η προσθήκη βάσης και τελευταίο προστίθεται το αντιδραστήριο σύζευξης. Με τον τρόπο αυτόν ενεργοποιείται το οξύ, προκειμένου να αντιδράσει ευκολότερα και αποτελεσματικότερα με την αμίνη. Κατά την ενεργοποίηση του οξέος θα πρέπει να αποκλειστεί η υγρασία από την αντίδραση, καθώς ίχνη υγρασίας μπορούν να υδρολύσουν τον ενεργοποιημένο εστέρα που έχει παραχθεί και στο διάλυμα της αντίδρασης να σχηματιστεί εκ νέου το οξύ. Η βάση που προστίθεται στο διάλυμα του οξέος αποπρωτονιώνει την ομάδα καρβοξυλικού οξέος της N-Boc προστατευμένης D-προλίνης. Με τον τρόπο αυτό η καρβοξυλομάδα αποκτά περισσότερο πυρηνόφιλο χαρακτήρα και προσβάλλει ευκολότερα το αντιδραστήριο σύζευξης. Επιπλέον, η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και υπό χαμηλή θερμοκρασία για να ελαχιστοποιηθεί η παραγωγή παραπροϊόντων. Μόλις σχηματιστεί το προϊόν σύζευξης (**9**), ακολουθεί απομάκρυνση της Boc ομάδας, ώστε να προκύψει το επιθυμητό προϊόν **Lenv2** (Σχήμα 110).



Σχήμα 110: Αντίδραση σύζευξης για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και, εν συνεχεία, αποπροστασία της ένωσης **9**, ώστε να προκύψει το ανάλογο **Lenv2**.

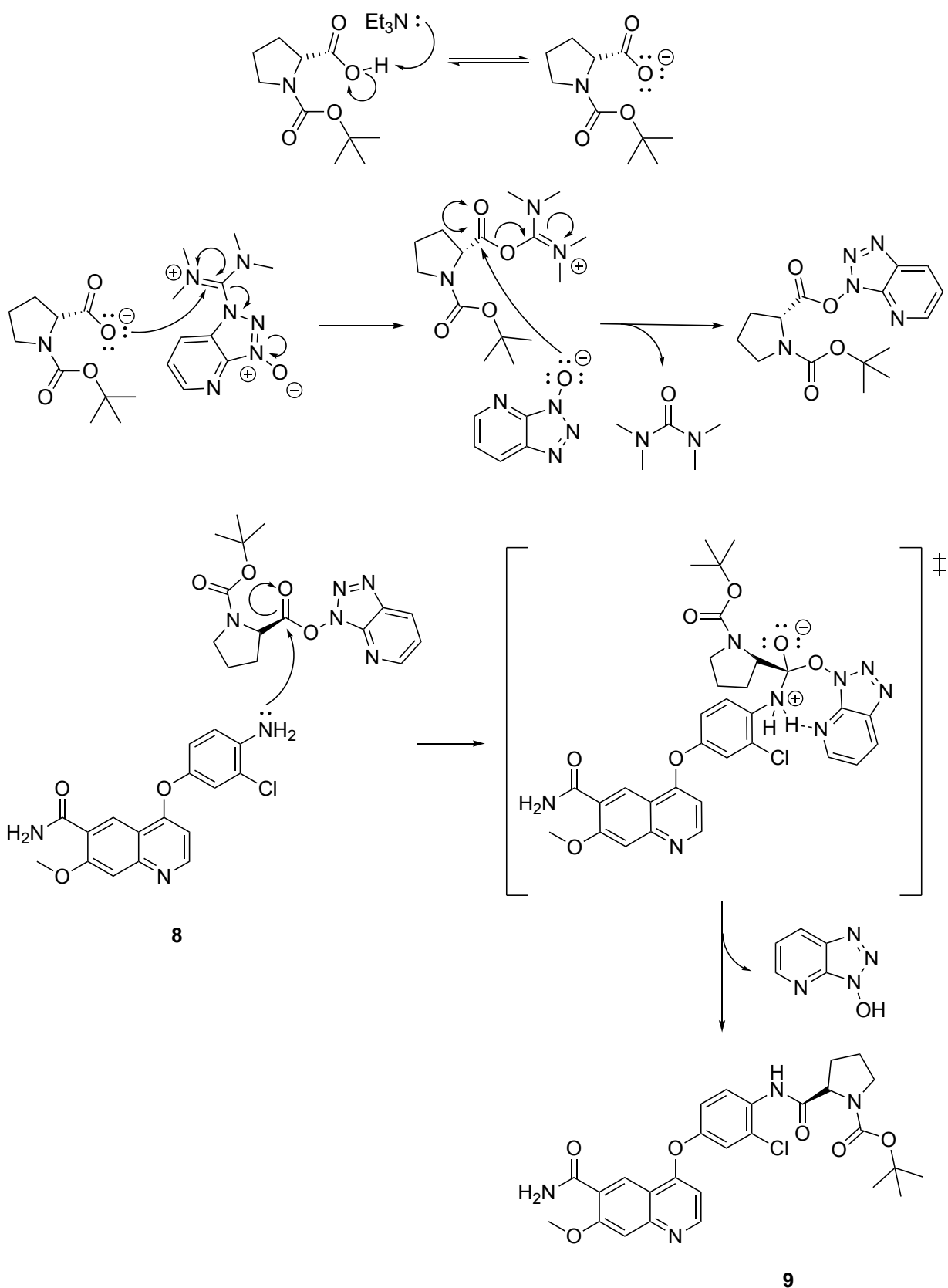
Για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών, ώστε να σχηματιστεί το επιθυμητό προϊόν, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, όπου έγινε χρήση

διαφορετικών βάσεων και θερμοκρασιών, καθώς και διαφορετικών αναλογιών του αντιδραστήριου σύζευξης, της βάσης και της N-Boc-D-προλίνης. Οι συνθήκες των αντιδράσεων συνοψίζονται στον Πίνακα 17.

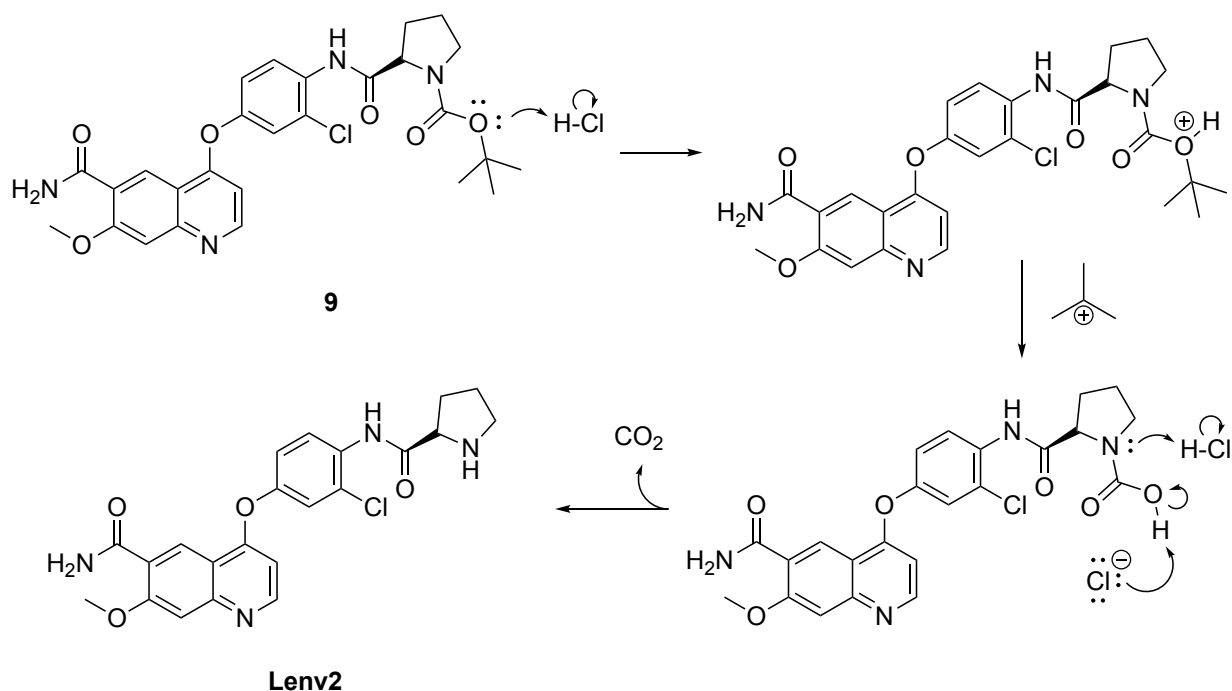
Οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, προκειμένου να συντεθεί η ένωση **9**, δεν έχουν βρεθεί ακόμη. Συνεπώς δεν κατέστη δυνατή η τελική αποπροστασία της ένωσης **9** για τη λήψη του τελικού αναλόγου **Lenv2**. Στο Σχήμα 111 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης. Για τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού απαιτείται η παρουσία βάσης. Αρχικά, η βάση αποπρωτονώνει το οξύ και σχηματίζεται το αντίστοιχο ανιόν. 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. Μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου συμπλόκου, λαμβάνεται ο επιθυμητός αμιδικός δεσμός. Στο Σχήμα 112 παρουσιάζεται ο μηχανισμός απομάκρυνσης της Boc ομάδας, σε όξινες συνθήκες, ώστε να προκύψει το επιθυμητό ανάλογο **Lenv2**.

Πείραμα	N-Boc-D-προλίνη (eq)	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	1.1	DMF	HATU 1.1 eq	Et ₃ N 3 eq	rt	24h	0%
2	1.2	DMF	HATU 2 eq	Et ₃ N 3 eq	rt	24h	0%
3	1.5	DMF	HATU 2 eq	Et ₃ N 3 eq	60 °C	24h	0%
4	1.5	DMF	HATU 2 eq	Et ₃ N 3 eq + DMAP 0.1 eq	60 °C	24h	0%

Πίνακας 17: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης **9**. Η θερμοκρασία στην οποία έλαβε χώρα ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα ήταν 0 °C σε όλες τις προσπάθειες. Όπου eq, η ισοδύναμη ποσότητα του αντιδρώντος. Σε κάθε προσπάθεια η ισοδύναμη ποσότητα της αμίνης **8** είναι 1.



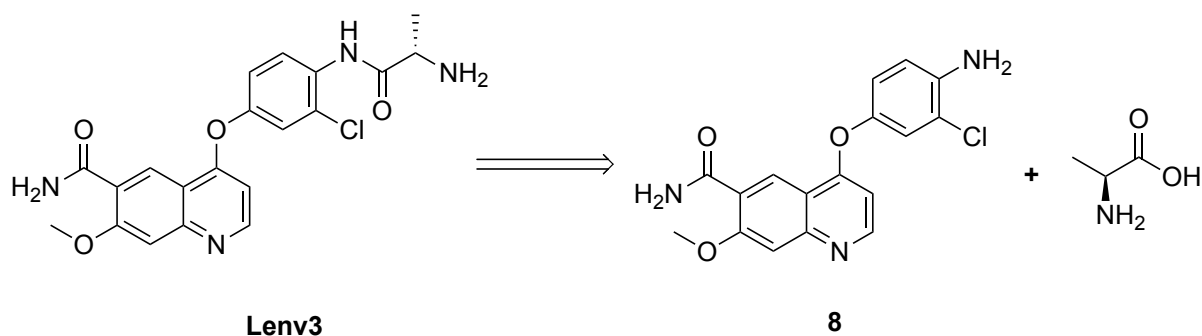
Σχήμα 111: Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης, με τη χρήση τριαιθυλαμίνης και HATU, ώστε να προκύψει η ένωση **9**.



Σχήμα 112: Μηχανισμός Boc αποπροστασίας, ώστε να προκύψει το επιθυμητό ανάλογο **Lenv2**.

3.6.8.3 Σύνθεση του **Lenv3**

Μέσω αποσυνδεδετικής προσέγγισης του **Lenv3** πραγματοποιείται σχάση του αμιδικού δεσμού και προκύπτουν δυο απλούστερες δομές (Σχήμα 113). Τα δυο δομικά στοιχεία του εν δυνάμει αναστολέα είναι η αμίνη **8** και η L-αλανίνη. Συνεπώς, στο εργαστήριο ακολουθείται μια συγκλίνουσα συνθετική πορεία, ώστε να προκύψει η επιθυμητή ένωση.

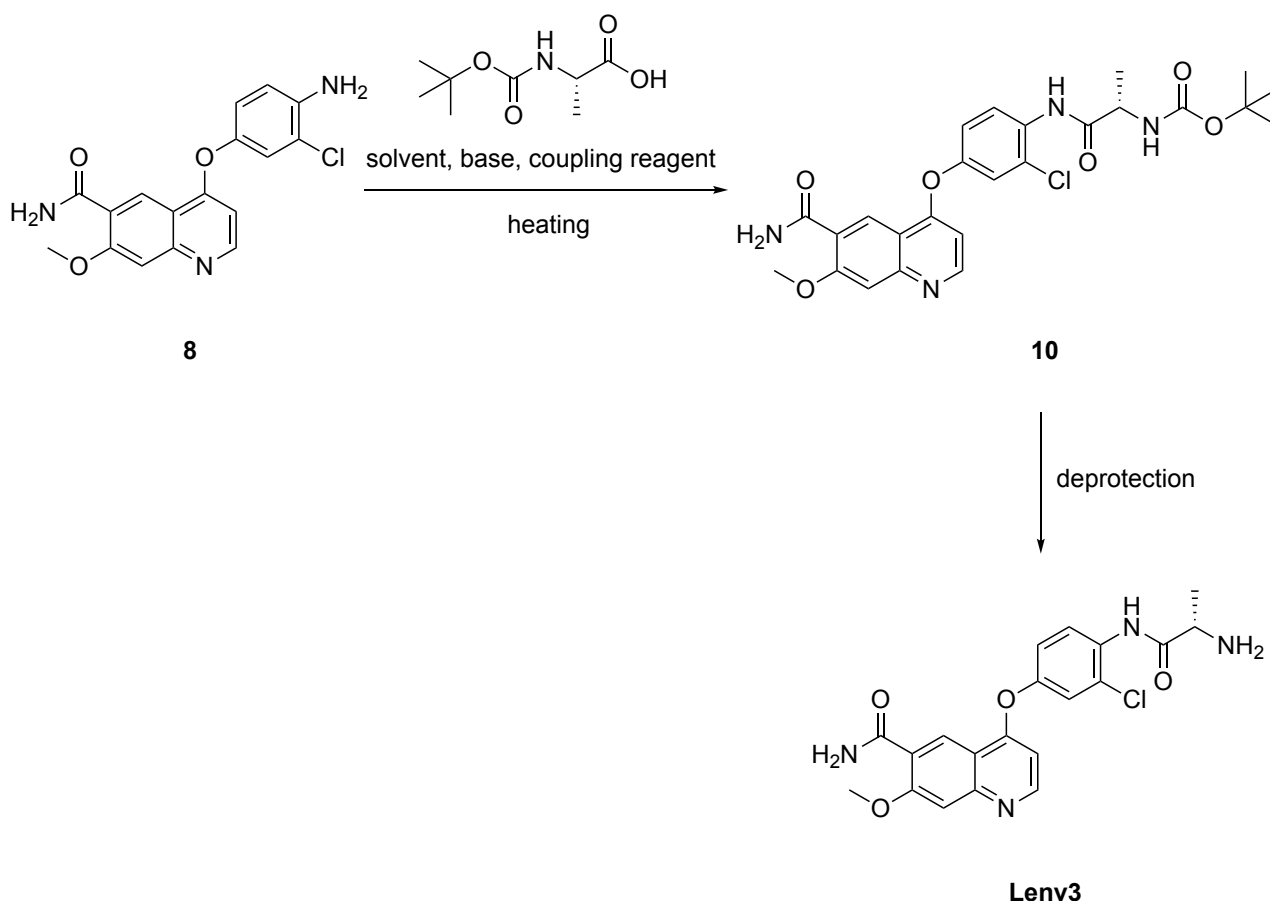


Σχήμα 113: Αποσυνδεδετική προσέγγιση για το σχεδιασμό της σύνθεσης του αναλόγου **Lenv3**.

Για να πραγματοποιηθεί η σύζευξη της αμίνης **8** με την L-αλανίνη, πρέπει η τελευταία να προστατευθεί στο N-τελικό της άκρο, ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πολυπεπτιδίου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται η εμπορικά διαθέσιμη N-Boc προστατευμένη L-αλανίνη.

Για την αντίδραση σύζευξης της αμίνης **8** και της N-Boc προστατευμένης L-αλανίνης, αρχικά πραγματοποιείται η ενεργοποίηση της N-Boc προστατευμένης L-αλανίνης, στον

κατάλληλο διαλύτη, με τη προσθήκη της βάσης και του αντιδραστήριου σύζευξης. Κατά την ενεργοποίηση του οξέος θα πρέπει να αποκλειστεί η υγρασία από την αντίδραση, καθώς ίχνη υγρασίας μπορούν να υδρολύσουν τον ενεργοποιημένο εστέρα που έχει παραχθεί και στο διάλυμα της αντίδρασης να σχηματιστεί εκ νέου το οξύ. Συνεπώς, η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και υπό χαμηλή θερμοκρασία για να ελαχιστοποιηθεί η παραγωγή παραπροϊόντων. Η βάση που προστίθεται στο διάλυμα του οξέος αποπρωτονιώνει την ομάδα καρβοξυλικού οξέος της N-Boc προστατευμένης L-αλανίνης, ώστε να αποκτήσει η καρβοξυλομάδα ισχυρότερο πυρηνόφιλο χαρακτήρα και προσβάλλει ευκολότερα το αντιδραστήριο σύζευξης. Μόλις σχηματιστεί το προϊόν σύζευξης (**10**), ακολουθεί απομάκρυνση της Boc ομάδας, ώστε να προκύψει το επιθυμητό προϊόν **Lenv3** (Σχήμα 114).



Σχήμα 114: Αντίδραση σύζευξης για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και, εν συνεχεία, αποπροστασία της ένωσης **10**, ώστε να προκύψει το ανάλογο **Lenv3**.

Για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών, ώστε να σχηματιστεί το επιθυμητό προϊόν, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, όπου έγινε χρήση

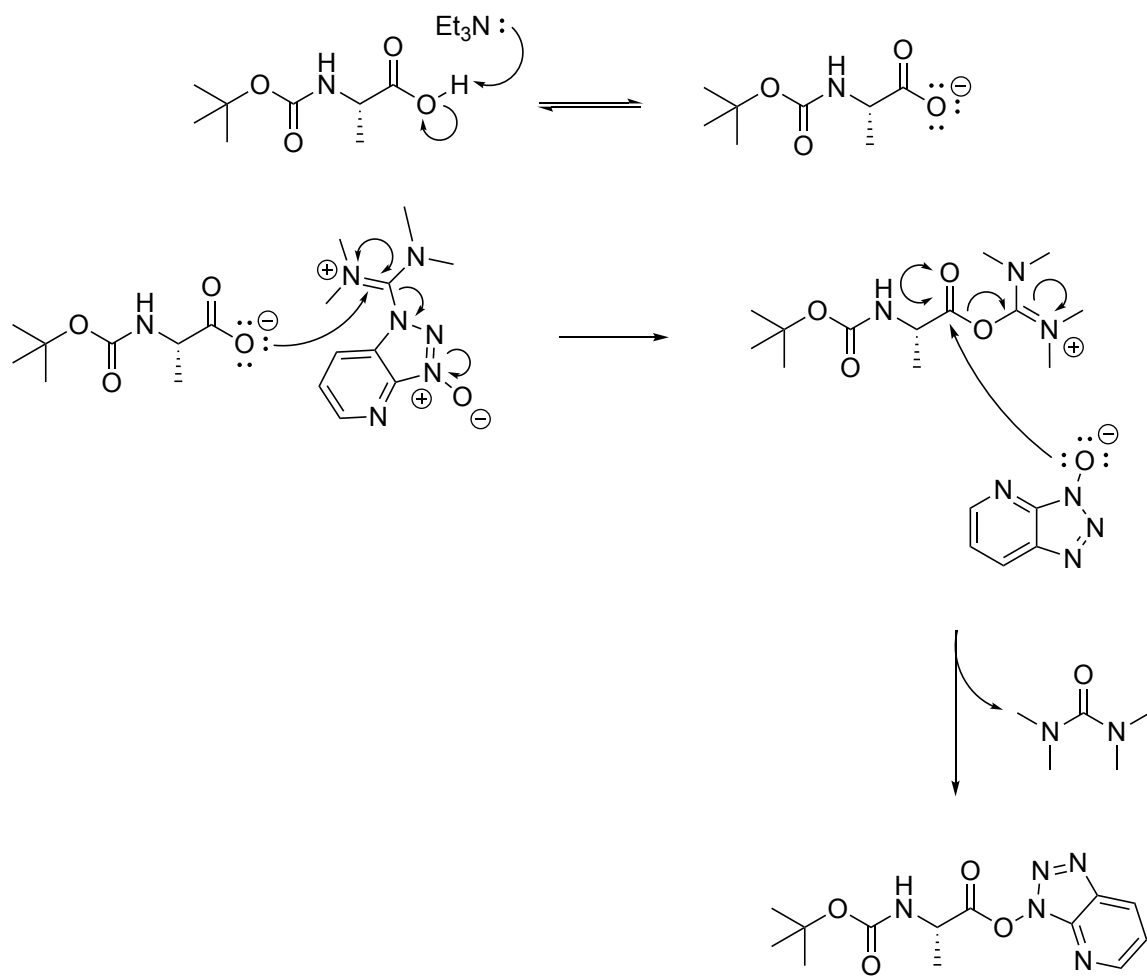
διαφορετικών βάσεων και θερμοκρασιών, καθώς και διαφορετικών αναλογιών του αντιδραστήριου σύζευξης, της βάσης και της N-Boc-L-αλανίνης. Οι συνθήκες των αντιδράσεων συνοψίζονται στον Πίνακα 18.

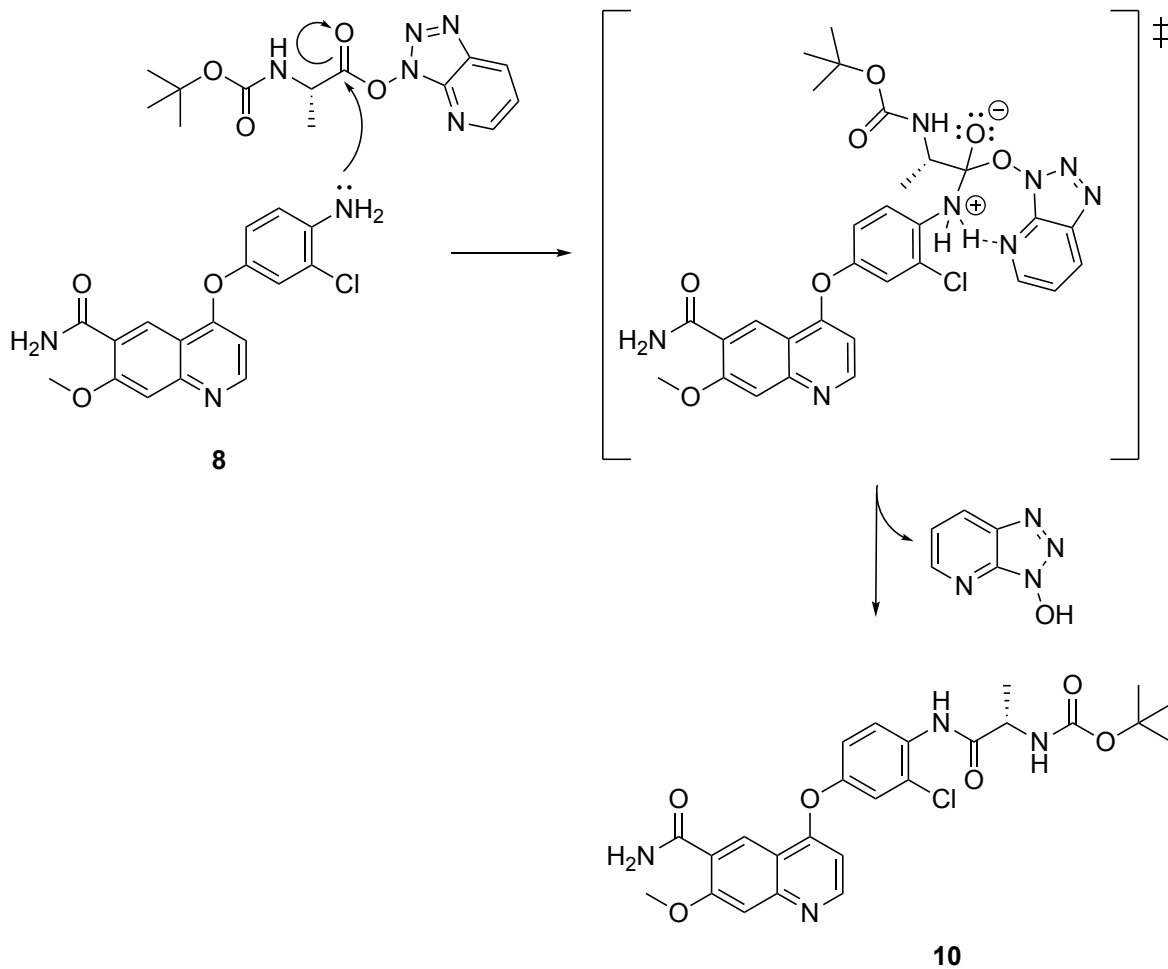
Οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, προκειμένου να συντεθεί η ένωση **10**, δεν έχουν βρεθεί ακόμη. Συνεπώς δεν κατέστη δυνατή η τελική αποπροστασία της ένωσης **10** για τη λήψη του τελικού αναλόγου **Lenv3**.

Πείραμα	N-Boc-L-αλανίνη (eq)	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	1.5	DMF	HATU 2 eq	Et ₃ N 5 eq	rt	24h	0%
2	1.5	DMF	HATU 2 eq	Et ₃ N 5 eq	50 °C	24h	0%
3	1.5	DMF	HATU 2 eq	Et ₃ N 5 eq + DMAP 0.1 eq	50 °C	24h	0%

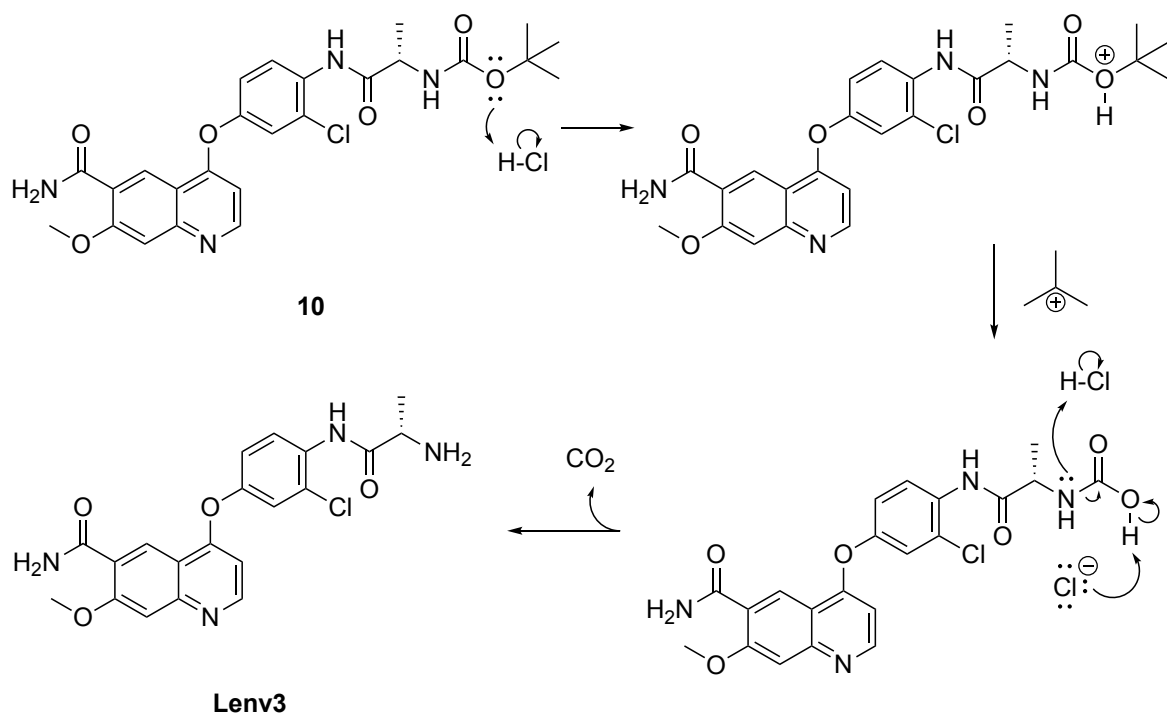
Πίνακας 18: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης **10**. Η θερμοκρασία στην οποία έλαβε χώρα ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα ήταν 0 °C σε όλες τις προσπάθειες. Όπου eq, η ισοδύναμη ποσότητα του αντιδρώντος. Σε κάθε προσπάθεια η ισοδύναμη ποσότητα της αμίνης **8** είναι 1.

Στο Σχήμα 115 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης. Για τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού απαιτείται η παρουσία βάσης. Αρχικά, η βάση αποπρωτονώνει το αμινοξύ και σχηματίζεται το αντίστοιχο ανιόν. 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. Μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου συμπλόκου, σχηματίζεται ο επιθυμητός αμιδικός δεσμός. Στο Σχήμα 116 παρουσιάζεται ο μηχανισμός απομάκρυνσης της Boc ομάδας, σε όξινες συνθήκες, ώστε να προκύψει το επιθυμητό ανάλογο **Lenv3**.





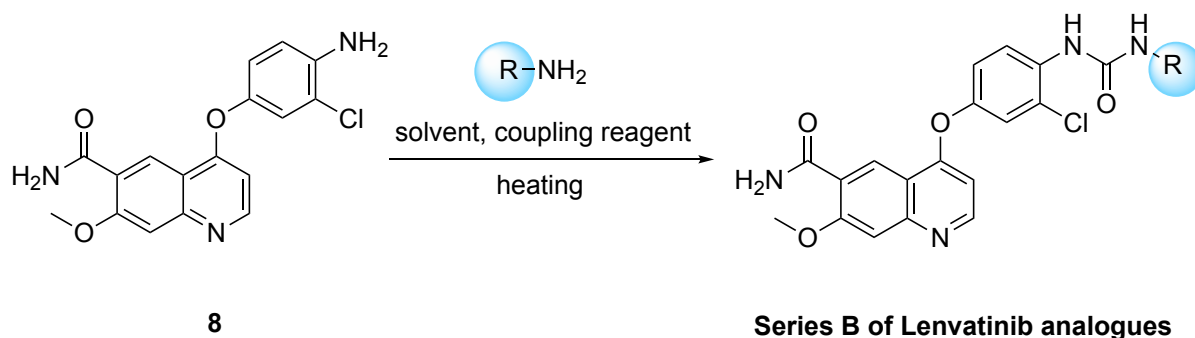
Σχήμα 115: Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης, με τη χρήση τριαιθυλαμίνης και HATU, ώστε να προκύψει η ένωση **10**.



Σχήμα 116: Μηχανισμός Boc αποπροστασίας, ώστε να προκύψει το επιθυμητό ανάλογο **Lenv3**.

3.6.9 Σύνθεση των αναλόγων της σειράς B (Lenv4)

Για τη σύνθεση της σειράς B αναλόγων του Lenvatinib απαραίτητη είναι η σύζευξη της αμίνης **8** με ενώσεις που διαθέτουν μια ελεύθερη αμινομάδα, ώστε να σχηματιστεί το εκάστοτε ανάλογο. Μέσω του κατάλληλου αντιδραστηρίου σύζευξης, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός αμιδικού δεσμού και προκύπτουν παράγωγα της ουρίας (Σχήμα 117). Στην περίπτωση του **Lenv4**, η αμίνη **8** συζεύγνυται με την 3-τριφθορο-μεθυλο-ανιλίνη.

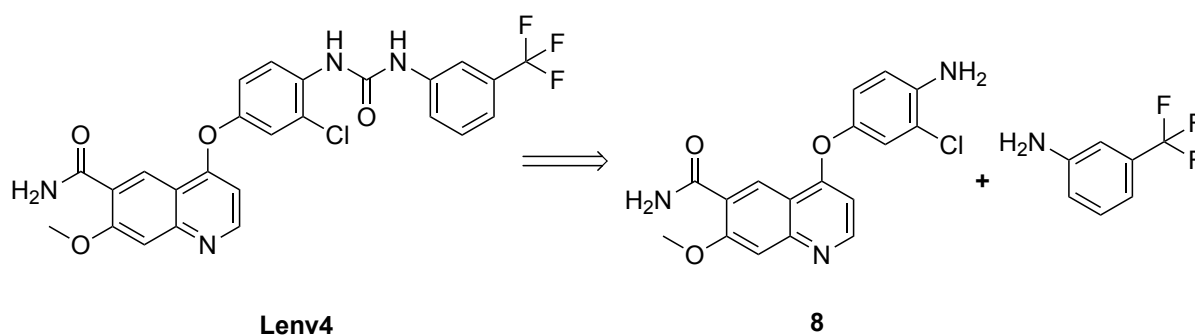


Σχήμα 117: Γενική πορεία σύνθεσης της σειράς B των αναλόγων του Lenvatinib. Τα ανάλογα που ανήκουν στη σειρά αυτή διαθέτουν τη δομή της ουρίας στο μόριό τους.

3.6.9.1 Σύνθεση του Lenv4

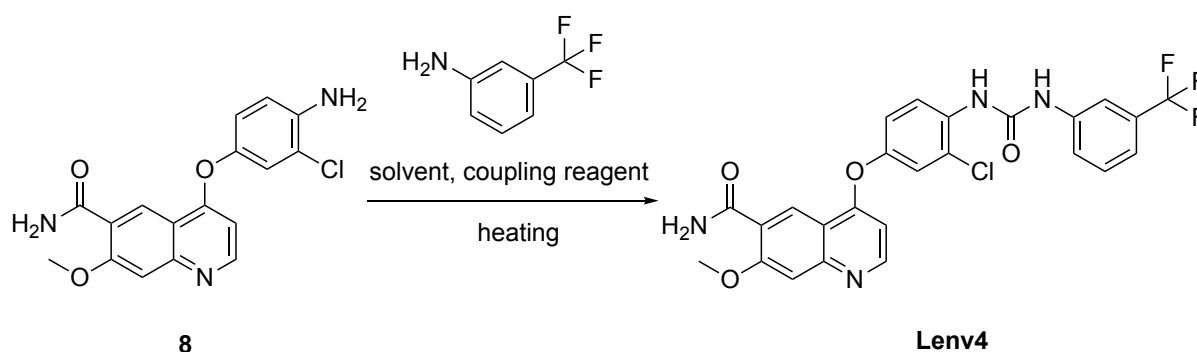
3.6.9.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 1

Μέσω αποσυνδεδετικής προσέγγισης του **Lenv4** πραγματοποιείται σχάση του αμιδικού δεσμού και προκύπτουν δυο απλούστερες δομές (Σχήμα 118). Τα δυο δομικά στοιχεία του εν δυνάμει αναστολέα είναι η αμίνη **8** και η 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη. Συνεπώς, στο εργαστήριο ακολουθείται μια συγκλίνουσα συνθετική πορεία, ώστε να προκύψει η επιθυμητή ένωση.



Σχήμα 118: Αποσυνδεδετική προσέγγιση για το σχεδιασμό της σύνθεσης του αναλόγου **Lenv4**.

Παρατηρώντας τη δομή του εν δυνάμει αναστολέα **Lenv4**, παρατηρείται πως διαθέτει έναν δεσμό ουρίας και μέσω των δύο ατόμων αζώτου σχηματίζει δεσμούς με δύο αρυλομάδες. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύζευξης ανάμεσα στην αμίνη **8** και την 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη και να προκύψει η διαρυλουρία **Lenv4** (Σχήμα 119), απαιτείται ατμόσφαιρα αζώτου, σε απόλυτο διαλύτη. Αρχικά, η 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη και προστίθεται το αντιδραστήριο σύζευξης CDI. Η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες, ώστε να σχηματιστεί το ισοκυανικό ενδιάμεσο. Ακολουθεί η προσθήκη της αμίνης **8**, ώστε να προκύψει το ανάλογο **Lenv4**.



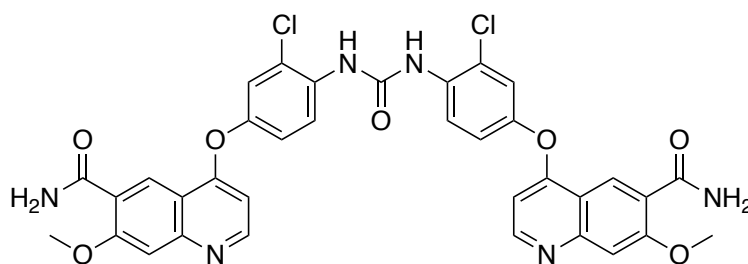
Σχήμα 119: Αντίδραση σύζευξης για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και τη σύνθεση του **Lenv4**.

Για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών, ώστε να σχηματιστεί το επιθυμητό προϊόν, διενεργήθηκε μια σειρά αντιδράσεων, όπου έγινε χρήση διαφορετικών διαλυτών και θερμοκρασιών, καθώς και διαφορετικών αναλογιών του αντιδραστήριου σύζευξης. Οι αντιδράσεις αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 19.

Πείραμα	3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη (eq)	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	1.1	CH ₂ Cl ₂	CDI 1.1 eq	rt	48 h	0%
2	1.1	CH ₂ Cl ₂	CDI 1.1 eq	35 °C	48 h	0%
3	1.1	THF	CDI 3 eq	70 °C	48 h	0%

Πίνακας 19: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση του **Lenv4**. Ο σχηματισμός του ισοκυανικού παραγώγου έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε όλες τις προσπάθειες. Όπου eq η ισοδύναμη ποσότητα του αντιδρώντος. Σε κάθε προσπάθεια η ισοδύναμη ποσότητα της αμίνης **8** είναι 1.

Εναλλακτικά, η αμίνη **8** διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη και προστίθεται το αντιδραστήριο σύζευξης CDI. Για να σχηματιστεί το επιθυμητό ισοκυανικό ενδιάμεσο, η αντίδραση αφήνεται στους 70 °C για 24 ώρες, καθώς σε θερμοκρασία δωματίου δεν λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός του. Ακολουθεί η προσθήκη της 3-(τριφθορο-μεθυλο)ανιλίνης, και το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει στους 70 °C για 48 ώρες, ώστε να προκύψει το ανάλογο **Lenv4**. Ωστόσο, βάσει του φάσματος ¹H NMR του προϊόντος που απομονώθηκε με τη μέθοδο αυτή, γίνεται αντιληπτό πως έλαβε χώρα η σύνθεση της συμμετρικής αμίνης **11**, αντί του επιθυμητού προϊόντος **Lenv4** (Σχήμα 120). Αυτό συμβαίνει επειδή το ισοκυανικό ενδιάμεσο δε σχηματίζεται σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά στους 70 °C, με αποτέλεσμα τα μόρια του μίγματος της αντίδρασης που σχηματίζουν το ισοκυανικό ενδιάμεσο της αμίνης **8** να προσβάλλουν μόρια του μίγματος της αντίδρασης τα οποία δεν έχουν προλάβει να σχηματίσουν το ισοκυανικό ενδιάμεσο. Η προσβολή αυτή ευνοείται λόγω αύξησης της θερμοκρασίας.



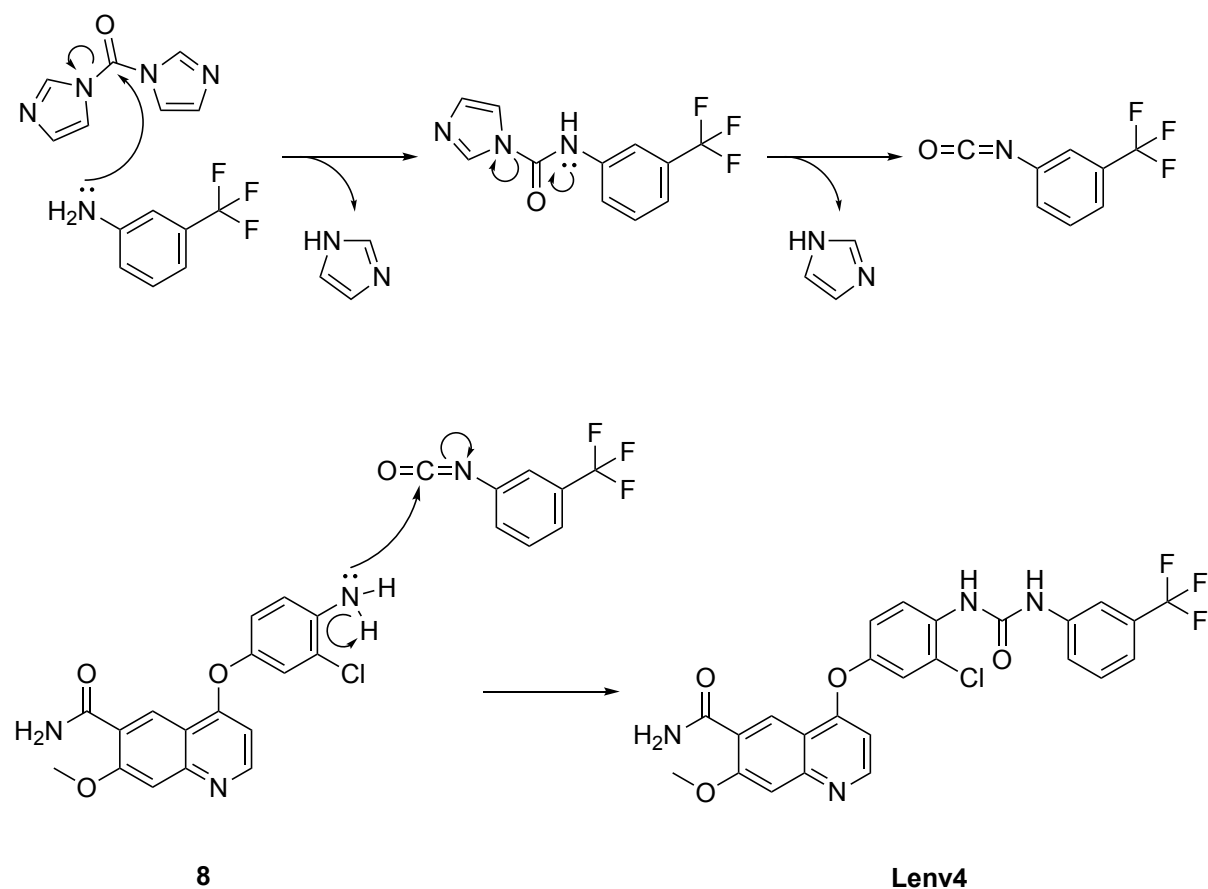
11

Σχήμα 120: Δομή σχηματιζόμενου παραπροϊόντος.

Στις δύο εναλλακτικές μεθόδους που διενεργήθηκαν έλαβε χώρα ο σχηματισμός των ισοκυανικών παραγώγων. Ωστόσο, με καμία από τις δύο μεθόδους δεν έλαβε χώρα η τελική σύζευξη με την εκάστοτε αμίνη και δεν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του τελικού αναλόγου **Lenv4**.

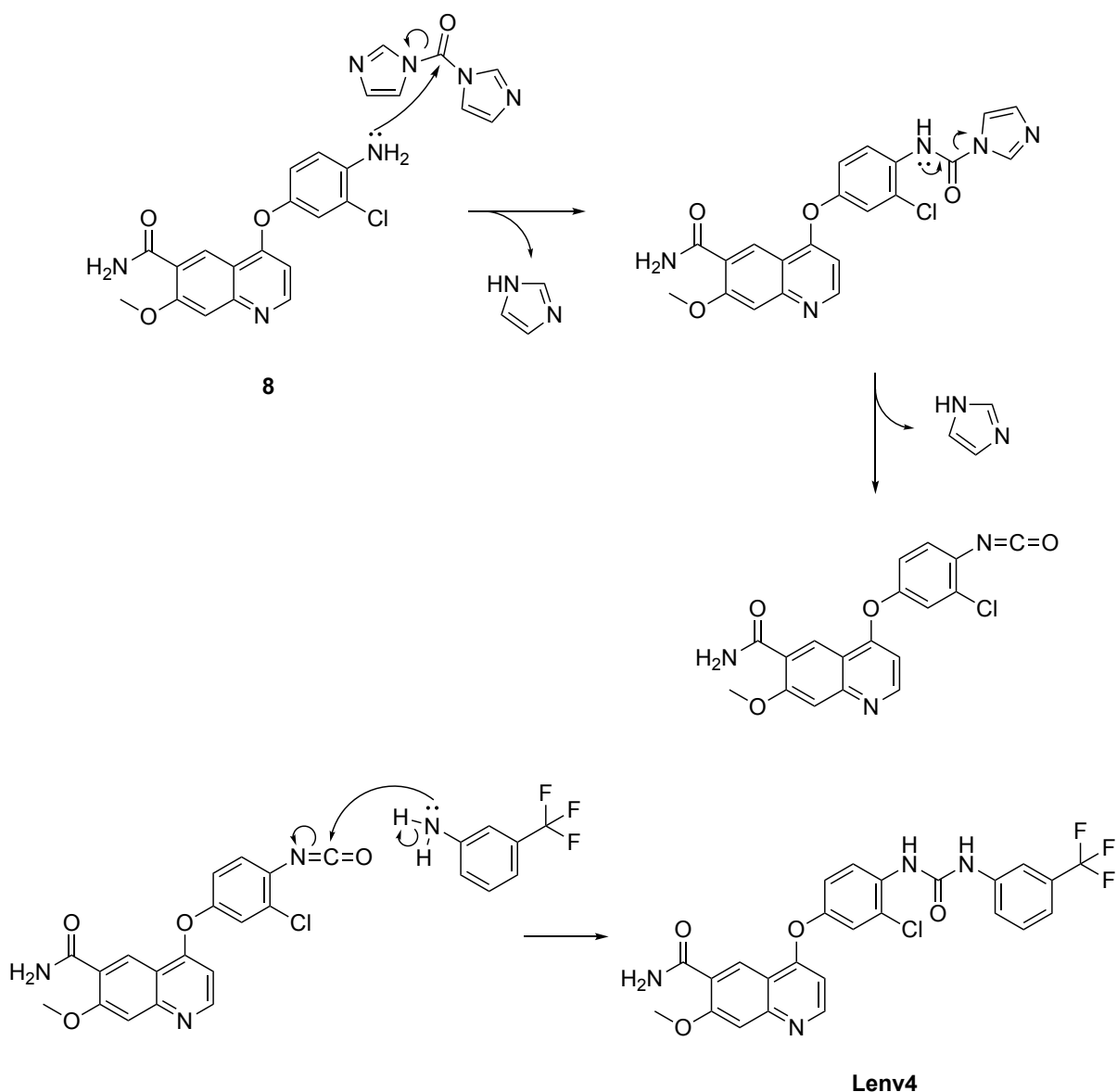
Στο Σχήμα 121 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης, όπου το ισοκυανικό ενδιάμεσο προέρχεται από την 3-(τριφθορο-μεθυλο)ανιλίνη. Με τη προσθήκη του αντιδραστήριου σύζευξης λαμβάνει χώρα μια πυρηνόφιλη προσβολή. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου της αμίνης προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο κέντρο του διμιδαζολίου, τον καρβονυλικό άνθρακα. Στη συνέχεια, με απόσπαση, προκύπτει το επιθυμητό ισοκυανικό ενδιάμεσο. Κατά το σχηματισμό ενός μορίου ισοκυανικού παραγώγου, προκύπτουν δύο μόρια ιμιδαζολίου. Προστίθεται, στη συνέχεια, η αμίνη **8** και

λαμβάνει χώρα μία ακόμη πυρηνόφιλη προσβολή. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου της αμίνης **8** προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του ισοκυανικού παραγώγου και προκύπτει το ανάλογο **Lenv4**.



Σχήμα 121: Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με τη χρήση CDI, όπου το ισοκυανικό ενδιάμεσο προέρχεται από την 3-(τριφθορο-μεθυλο)ανιλίνη, ώστε να προκύψει το **Lenv4**.

Εναλλακτικά, στο Σχήμα 122 παρουσιάζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης, όπου το ισοκυανικό ενδιάμεσο προέρχεται από την αμίνη **8**. Ομοίως με τον προηγούμενο μηχανισμό, με τη προσθήκη του αντιδραστήριου σύζευξης λαμβάνει χώρα μια πυρηνόφιλη προσβολή. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου της αμίνης προσβάλλει το ηλεκτρονιόφιλο κέντρο του διμιδαζολίου, τον καρβονυλικό άνθρακα, ενώ με απόσπαση προκύπτει το επιθυμητό ισοκυανικό ενδιάμεσο. Κατά το σχηματισμό ενός μορίου ισοκυανικού παραγώγου, προκύπτουν δύο μόρια ιμιδαζολίου. Προστίθεται, στη συνέχεια, η 3-(τριφθορο-μεθυλο)ανιλίνη και λαμβάνει χώρα μία ακόμη πυρηνόφιλη προσβολή. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου της 3-(τριφθορο-μεθυλο)ανιλίνης προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του ισοκυανικού παραγώγου και προκύπτει το ανάλογο **Lenv4**.

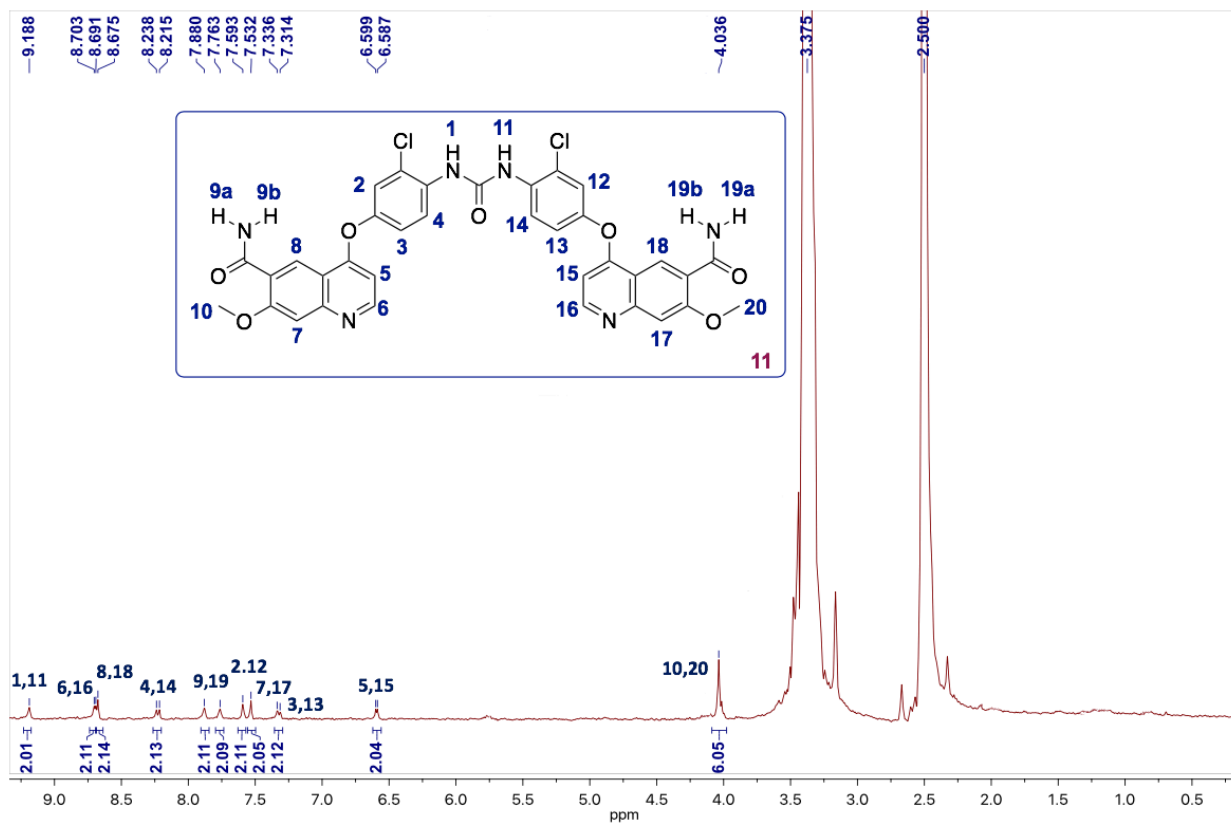


Σχήμα 122: Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με τη χρήση CDI, όπου το ισοκυανικό ενδιάμεσο προέρχεται από την ανιλίνη **8**, ώστε να προκύψει το **Lenv4**.

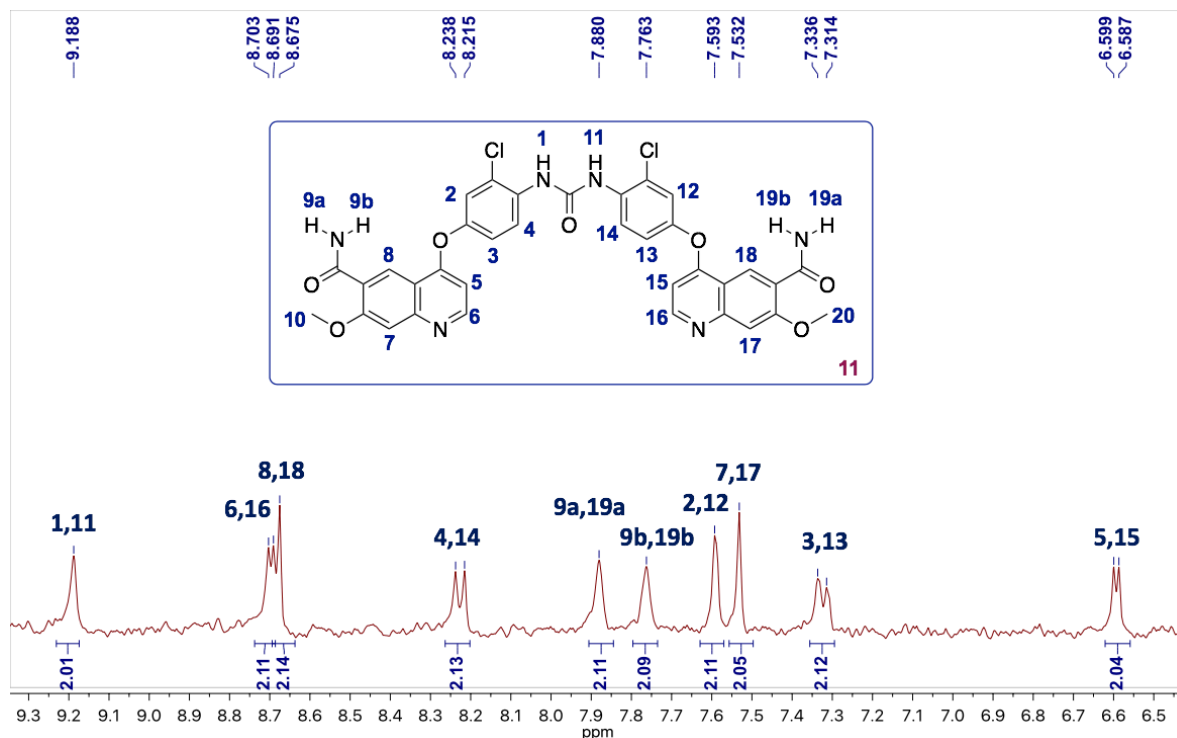
3.6.9.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της συμμετρικής ουρίας, ένωση **11**

Η αμίνη **11** είναι μία ένωση πλήρως συμμετρική. Αυτός είναι ο λόγος που στο φάσμα ^1H NMR η κάθε κορυφή που εμφανίζεται αντιστοιχεί στον πυρηνικό συντονισμό δύο ή περισσότερων πρωτονίων (Σχήμα 123, 124). Συγκεκριμένα, τα συμμετρικά αμιδικά πρωτόνια H_1 και H_{11} εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 9.19 ppm. Ανάμεσα στα αρωματικά πρωτόνια πιο αποπροστατευμένα εμφανίζονται τα συμμετρικά πρωτόνια H_6 και H_{16} ως μια διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 8.70 ppm, καθώς το H_6 σχάζεται από το γειτονικό του H_5 και το H_{16} από το H_{15} με σταθερά σύζευξης $^3J = 4.8$ Hz. Αντίστοιχα, τα

συμμετρικά αρωματικά πρωτόνια H₅ και H₁₅ εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 6.59 ppm με $^3J = 4.8$ Hz. Στα συμμετρικά αρωματικά πρωτόνια υπ' αριθμόν 8 και 18 οφείλεται η απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 8.68 ppm. Τα συμμετρικά αρωματικά πρωτόνια H₄ και H₁₄ συντονίζονται στα 8.23 ppm, δίνοντας μια διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2, καθώς το H₄ σχάζεται από το γειτονικό του H₃ και το H₁₄ από το H₁₃ με σταθερά σύζευξης $^3J = 9.2$ Hz. Τα συμμετρικά αρωματικά πρωτόνια H₃ και H₁₃ θα έπρεπε να αποδίδουν μια κορυφή με χαρακτηριστικό μοτίβο διπλής της διπλής, λόγω σχάσης από τα γειτονικά πρωτόνια H₄, H₁₄ και H₂, H₁₂ με σταθερές σύζευξης 3J και 4J , αντίστοιχα. Ωστόσο, λόγω μη επαρκούς ομογενοποίησης, τα H₃ και H₁₃ εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 7.33 ppm με $^3J = 8.8$ Hz. Θα ήταν αναμενόμενη η εμφάνιση μιας διπλής κορυφής, λόγω πυρηνικού συντονισμού των αρωματικών συμμετρικών πρωτονίων υπ' αριθμόν 2 και 12 με σταθερές σύζευξης 4J , λόγω των γειτονικών πρωτονίων H₃ και H₁₃. Ωστόσο, λόγω μη επαρκούς ομογενοποίησης τα πρωτόνια αυτά εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 7.59 ppm. Τα αρωματικά συμμετρικά πρωτόνια H₇ και H₁₇ εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 7.53 ppm. Τα αμιδικά πρωτόνια 9a και 19a είναι συμμετρικά και εμφανίζουν μια απλή ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 7.88 ppm. Αλληλεπιδρούν με το οξυγόνο της αμιδικής ομάδας, λόγω της θέσης τους, σχηματίζοντας ψευδοδεσμό υδρογόνου με αυτό, με συνέπεια να αποπροστατεύονται περισσότερο από τα αμιδικά πρωτόνια 9b και 19b, στα οποία οφείλεται η απλή ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 7.76 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 10 και 20 που ανήκουν στις δύο συμμετρικές μεθοξυ-ομάδες, συντονίζονται στα 4.04 ppm, δίνοντας μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6.



Σχήμα 123: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της ένωσης 11 σε $\text{DMSO}-d_6$, στους 298 K.



Σχήμα 124: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της ένωσης 11, στην αρωματική περιοχή, σε $\text{DMSO}-d_6$, στους 298 K.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πειραματικό μέρος

4.1 Συσκευές και όργανα

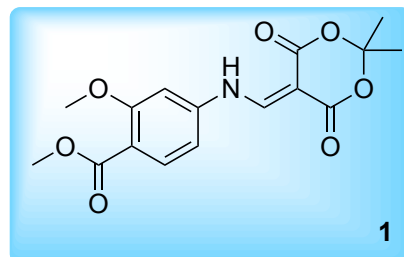
Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AV 400 MHz και 500 MHz. Τα φάσματα μάζας χαμηλής διακριτικής ικανότητας λήφθηκαν στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων στο όργανο Agilent MSD – Trap (ESI).

Οι αρχικές ενώσεις και οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται από τις εταιρείες Fluorochem, Fluka, Aldrich, Alfa Aesear, TCI America και Merck. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την αναλυτική επεξεργασία των αντιδράσεων προέρχονται, επίσης, από τις προαναφερθείσες εταιρίες και, όπου ήταν απαραίτητο, καταστήθηκαν απόλυτοι και ακολούθως διατηρήθηκαν σε αδρανές περιβάλλον, σύμφωνα με τις μεθόδους των Perri και Armarego [223].

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

4.2 Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο 4-αμινο-2-μεθοξυ-βενζοϊκός μεθυλεστέρας (1.50 g, 8.29 mmol) και προστίθεται η 2-προπανόλη (15 mL). Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό ανάδευση προστίθεται το οξύ Meldrum (1.30 g, 9.03 mmol) και ο μυρμηκικός



τριαιθυλεστέρας (3.39 g, 22.88 mmol, d=0.891 g/mL). Το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 1 h. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 1 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη στους 20 °C, παρατηρείται η παρουσία λευκού

ιζήματος. Πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και λαμβάνεται το ίζημα, το οποίο εκπλένεται με ψυχρό διαιθυλαιθέρα. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν λευκού χρώματος (2.45 g, 7.30 mmol, 88%).

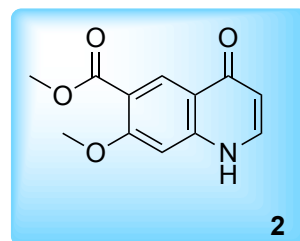
Σ.Τ. : 194 - 200 °C (αποσύνθεση)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.26 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.20 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 1.68 (s, 6H).

^{13}C NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 165.41, 163.18, 160.91, 151.96, 142.04, 134.02, 117.92, 108.78, 105.48, 101.63, 88.54, 56.45, 52.15, 27.13.

4.3 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 2

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται το διάλυμα του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυ-βενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 1 (2.45 g, 7.31 mmol) σε DOWTHERM™ A (6.8 mL). Το διάλυμα θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 190 °C. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 1 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται μέχρι να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με ψυχρό διαιθυλαιθέρα. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, το προϊόν απομονώνεται ως στερεό κίτρινου χρώματος (1.36 g, 5.85 mmol, 80%).

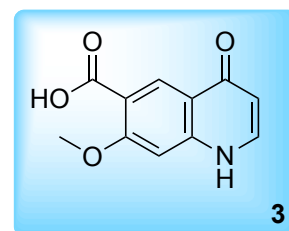


Σ.Τ. : > 210 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 11.70 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.86 (t, 1H), 7.02 (s, 1H), 5.99 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.81 (s, 3H).

4.4 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 3

Η υδρόλυση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 2, πραγματοποιήθηκε και σε όξινες και σε βασικές συνθήκες, προκειμένου να βρεθεί ποιες είναι οι βέλτιστες για τη λήψη του προϊόντος σε υψηλή απόδοση.



Υδρόλυση σε βασικές συνθήκες

Για την υδρόλυση του εστέρα **2** σε βασικές συνθήκες, σε κάθε περίπτωση, ο 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδρο-κινολινο-6-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας, ένωση **2** (1.36 g, 5.85 mmol) φέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και προστίθεται το εκάστοτε βασικό διάλυμα. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σύμφωνα με το χρόνο και τη θερμοκρασία που αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 20). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Εν συνεχεία, προστίθεται στάγδην υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου, συγκέντρωσης 6 N, μέχρι το pH του διαλύματος να φτάσει την τιμή 6 (έλεγχος με πεχαμετρικό χαρτί). Σε αυτή τη τιμή pH παρατηρείται ο σχηματισμός ιζήματος. Πραγματοποιείται διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με ψυχρό διαιθυλαιθέρα. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο. Το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, προκύπτει το επιθυμητό προϊόν κίτρινου χρώματος (1.27 g, 5.79 mmol, 99 %, Πείραμα 1, Πίνακας 20).

Πείραμα	Βασικό διάλυμα	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	3N NaOH/MeOH (4 mL)	CH ₂ Cl ₂ (30 mL)	35 °C	30 min	1.27 g 5.79 mmol 99%
2	25% aq. NaOH (4 mL)	MeOH (20 mL)	65 °C	30 min	1.21 g 5.50 mmol 94%
3	25% aq. NaOH (4 mL)	EtOH (20 mL)	65 °C	30 min	1.21 g 5.50 mmol 94%

Πίνακας 20: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης **3**.

Υδρόλυση σε όξινες συνθήκες

Για υδρόλυση του εστέρα **2** σε όξινες συνθήκες, σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας, ένωση **2** (1.36

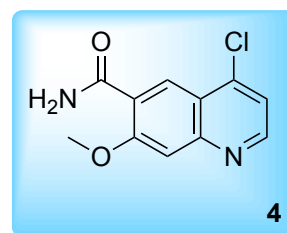
g, 5.85 mmol) και προστίθεται υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου συγκέντρωσης 12 N (15 mL, 180 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο, στους 90 °C, υπό ανάδευση. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 45 min με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Στη συνέχεια προστίθεται το τετραϋδροφουράνιο (25 mL), ώστε να προκύψει αζεοτροπικό μίγμα H₂O/THF, το οποίο έχει σημείο βρασμού ίσο με 65 °C. Πραγματοποιείται εξάτμιση του αζεοτροπικού μίγματος υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, προκύπτει το κίτρινου χρώματος προϊόν (1.26 g, 5.73 mmol, 98%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.49 (s, 1H), 12.14 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.84 (t, 1H), 7.13 (s, 1H), 5.98 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H).

4.5 Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 4

4.5.1 Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικού χλωριδίου

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται το διάλυμα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση **3** (1.27 g, 5.79 mmol) σε περίσσεια απόλυτου θειονυλοχλωριδίου (5 mL) και προστίθεται καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμιδίου (2 drops). Το μίγμα της αντίδρασης



θερμαίνεται μέχρι βρασμού, στους ~75 °C, για 2 h, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της περίσσειας θειονυλοχλωριδίου. Συνεπώς, προκύπτει το προϊόν σκούρου καφέ χρώματος, 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικό χλωρίδιο, το οποίο απευθείας διαλύεται σε απόλυτο τετραϋδροφουράνιο (5 mL), υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στο διάλυμα που προκύπτει, το οποίο βρίσκεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, παρέχεται περίσσεια αέριας αμμωνίας, μέσω σωλήνα που περιέχει ανθρακικό ασβέστιο, με αποτέλεσμα την εμφάνιση φυσαλίδων στο μίγμα της αντίδρασης. Η αέρια αμμωνία παράγεται με την προσθήκη στάγδην υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 12 N (18 mL) σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, η οποία περιέχει χλωριούχο αμμώνιο (12 g). Η παροχή της αέριας αμμωνίας συνεχίζεται για 30 min, μέχρι να καταναλωθεί πλήρως η αρχική ένωση (έλεγχος TLC). Το περιεχόμενο της δίλαιμης σφαιρικής φιάλης, στην οποία περιέχεται και το προϊόν,

μεταφέρεται σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL. Το τετραϋδροφουράνιο εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το επιθυμητό στερεό κίτρινου χρώματος (1.21 g, 5.10 mmol, 88%).

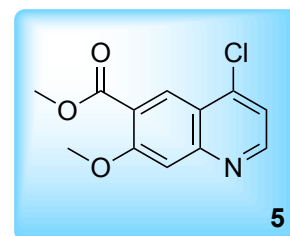
Εναλλακτικά, το προϊόν σκούρου καφέ χρώματος, 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλικό χλωρίδιο, που προκύπτει διαλύεται σε τετραϋδροφουράνιο (5 mL) και το διάλυμα ψύχεται έως τους 0 °C. Προστίθεται σε αυτό υδατικό διάλυμα αμμωνίας 25% (3 mL) και το προκύπτον μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Το περιεχόμενο της δίλαιμης σφαιρικής φιάλης, στην οποία περιέχεται και το προϊόν, μεταφέρεται σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL. Το τετραϋδροφουράνιο εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το επιθυμητό στερεό κίτρινου χρώματος (1.10 g, 4.63 mmol, 80%).

Σ.Τ. : 170 - 177 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.82 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 4.04 (s, 3H).

4.5.2 Σύνθεση του αμιδίου 4, μέσω σχηματισμού του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 5

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται διάλυμα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδρο-κινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση **2** (1.36 g, 5.85 mmol) σε περίσσεια απόλυτου θειονυλοχλωριδίου (5 mL) και προστίθεται καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμιδίου (2 drops). Το μίγμα της αντίδρασης



θερμαίνεται μέχρι βρασμού (~75 °C) για 2 h, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC), το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της περίσσειας θειονυλοχλωριδίου. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται μέχρι να φτάσει τη

θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιείται προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου (2 mL), κατά την οποία παρατηρείται έκλυση φυσαλίδων. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, προκύπτει ο επιθυμητός 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας (1.27 g, 5.04 mmol, 87%), ως ίζημα καφέ χρώματος.

Σ.Τ. : 136-143 °C

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.75 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.98 (s, 3H).

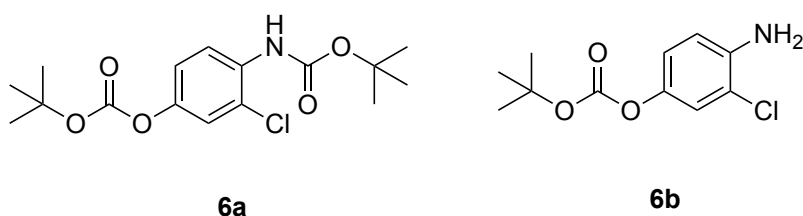
Για τη σύνθεση του αμιδίου **4**, σε σφαιρική φιάλη των 50 mL διαλύεται ο 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας (1.27 g, 5.04 mmol) σε μεθανόλη (5 mL). Στο διάλυμα αυτό προστίθεται υδατικό διάλυμα αμμωνίας 25% (3 mL) και το προκύπτον μίγμα θερμαίνεται στους 40 °C για 15 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC), το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, προκύπτει το επιθυμητό στερεό κίτρινου χρώματος (0.95 g, 4.03 mmol, 80 %).

4.6 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 6

4.6.1 Προσπάθεια N-Boc προστασίας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης

Για την N-Boc προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης δοκιμάστηκαν πολλές πειραματικές συνθήκες (Πίνακας 21). Σε κάθε περίπτωση, σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, φέρεται το υδροχλωρικό άλας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (1.15 g, 6.4 mmol) και προστίθεται ο εκάστοτε διαλύτης (15 mL), η εκάστοτε βάση και η εκάστοτε ποσότητα Boc ανυδρίτη. Το μίγμα που προκύπτει, αφήνεται να αντιδράσει σύμφωνα με το χρόνο και τη θερμοκρασία που αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα. Η πλήρης κατανάλωση της αρχικής ένωσης σημαίνει την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος TLC). Τότε ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με

εξάνιο και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Στα πειράματα 1-5 του πίνακα προκύπτει και το διπλά προστατευμένο με Boc ομάδα προϊόν **6a** (Σχήμα 125), συνεπώς το μίγμα διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών C₆H₁₄/CH₃COOCH₂CH₃ 10/3. Απομονώνεται το επιθυμητό προϊόν και το διπλά προστατευμένο με Boc ομάδα προϊόν σε αναλογία 3/1. Στα πειράματα 6,7 απομονώνεται το επιθυμητό προϊόν **6** και το παραπροϊόν **6b** με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών C₆H₁₄/CH₃COOCH₂CH₃ 10/3 σε αναλογία 3/1. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, το προϊόν **6** απομονώνεται ως στερεό ανοιχτού καφέ χρώματος σε διαφορετικές αποδόσεις, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.



Σχήμα 125: Δομή σχηματιζόμενων παραπροϊόντων.

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Boc ανυδρίτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N 1.42 g 14.08 mmol d=0.726 g/mL	1.67 g 7.68 mmol d=0.95 g/mL	rt	4 h	55% 0.86 g 3.52 mmol
2	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N 3.23 g 32.00 mmol d=0.726 g/mL	1.67 g 7.68 mmol d=0.95 g/mL	rt	4 h	60% 0.94 g 3.84 mmol
3	THF	Et ₃ N 1.42 g 14.08 mmol d=0.726 g/mL	1.67 g 7.68 mmol d=0.95 g/mL	65 °C	2 h	30% 0.47 g 1.92 mmol
4	THF	Et ₃ N 1.42 g 14.08 mmol d=0.726 g/mL	1.67 g 7.68 mmol d=0.95 g/mL	65 °C	2 h	50% 0.78 g 3.20 mmol
5	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N 1.42 g 14.08 mmol d=0.726 g/mL	1.67 g 7.68 mmol d=0.95 g/mL	35 °C	4 h	70% 1.09 g 4.48 mmol

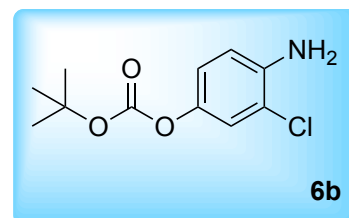
6	THF	Et ₃ N 0.65 g 6.40 mmol d=0.726 g/mL DMAP 0.08 g 0.64 mmol	3.07 g 14.08 mmol d=0.95 g/mL	65 °C	4 h	20%
7	THF	Et ₃ N 1.30 g 12.80 mmol d=0.726 g/mL DMAP 0.08 g 0.64 mmol	1.67 g 7.68 mmol d=0.95 g/mL	rt	4 h	20%

Πίνακας 21: Πειραματικές συνθήκες για την *N*-Boc προστασία της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.16 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 2.8, 9.2 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 1.55 (s, 9H), 1.53 (s, 9H).



¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.86 (dd, *J* = 2.8, 8.8 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.32 (s, 2H), 1.47 (s, 9H).



4.6.2 Προσπάθεια προστασίας της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, με τη χρήση άλλων προστατευτικών ομάδων

Σε μια σειρά πειραμάτων έγινε προσπάθεια προστασίας της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης με προστατευτικές ομάδες διαφορετικές από την Boc. Σε κάθε περίπτωση, σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, φέρεται το υδροχλωρικό άλας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (50 mg, 0.28 mmol) και προστίθεται ο εκάστοτε διαλύτης (15 mL), το εκάστοτε αντιδραστήριο προστασίας, η εκάστοτε βάση και η εκάστοτε ισοδύναμη ποσότητα Boc ανυδρίτη. Το μίγμα που προκύπτει, αφήνεται να αντιδράσει σύμφωνα με το χρόνο και τη θερμοκρασία που αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα. Στις προσπάθειες αυτές (Πίνακας 22) ο αριθμός

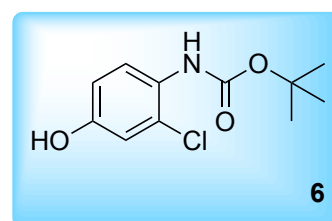
παραπροϊόντων που σχηματίστηκαν ήταν μεγάλος, συνεπώς δεν έλαβε χώρα η προσπάθεια απομόνωσης του επιθυμητού προϊόντος.

Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Αντιδραστήριο προστασίας	Θερμοκρασία	Χρόνος
1	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N 62 mg 0.62 mmol d=0.726 g/mL	Τριτυλοχλωρίδιο 85 mg 0.31 mmol	0 °C	2 h
2	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N 62 mg 0.62 mmol d=0.726 g/mL	Τριτυλοχλωρίδιο 85 mg 0.31 mmol	rt	2 h
3	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N 62 mg 0.62 mmol d=0.726 g/mL	4,4'-Διμεθοξυ- τριτυλοχλωρίδιο 112 mg 0.31 mmol	rt	3h
4	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N 62 mg 0.62 mmol d=0.726 g/mL	4-Τολουολο- σουλφονυχλωρίδιο 59 mg 0.31 mmol	rt	2h

Πίνακας 22: Πειραματικές συνθήκες για την προστασία της αμινομάδας τις 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, με τη χρήση διάφορων αντιδραστηρίων προστασίας.

4.6.3 Προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, σύνθεση ένωσης 6

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, φέρεται το υδροχλωρικό άλας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (1.15 g, 6.4 mmol), διαλύεται σε αιθανόλη (15 mL) και, υπό ανάδευση, προστίθεται η τριαιθυλαμίνη (1.42 g, 14.08 mmol, d=0.725 g/mL). Στη συνέχεια προστίθεται ο Boc ανυδρίτης (1.53 g, 7.0 mmol, d=0.95 g/mL) και το υδροχλωρικό άλας γουανιδίνης (0.09 g, 0.96 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο, στους 40 °C, υπό ανάδευση, για 30 min. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30 min με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Τότε ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, προκύπτει το στερεό προϊόν ανοιχτού καφέ χρώματος (1.48 g, 6.08 mmol, 95%).



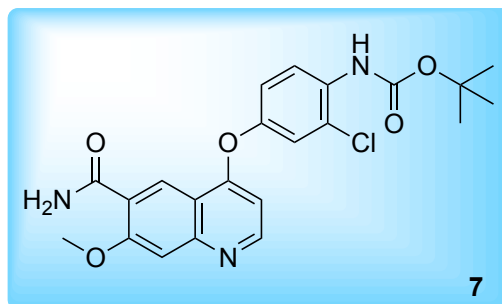
Σ.Τ. : 100 - 107 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.73 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 1.42 (s, 9H).

4.7 Σύνθεση του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7

Προσπάθεια Α

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικός tert-βουτυλεστέρας (1.48 g, 6.08 mmol) σε απόλυτο διμεθυλοσουλφοξείδιο (10 mL) και προστίθενται, υπό ανάδευση, το 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιο (1.21 g, 5.10 mmol) και το ανθρακικό



νάτριο (4.56 g, 14.04 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 90 °C με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά από 24 h η εικόνα της αντίδρασης παρέμεινε ίδια. Ο έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) δε φανέρωσε κατανάλωση της αρχικής ένωσης, συνεπώς δεν συντέθηκε επιτυχώς το επιθυμητό προϊόν.

Προσπάθεια Β

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικός tert-βουτυλεστέρας (1.48 g, 6.08 mmol) σε απόλυτο διμεθυλοσουλφοξείδιο (10 mL) και προστίθενται, υπό ανάδευση, το 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιο (1.21 g, 5.10 mmol) και το ανθρακικό καίσιο (4.56 g, 14.04 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 90 °C με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σε 24 h παρατηρείται πλήρης κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται μέχρι να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση, μέχρι ξηρού. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, απομονώνεται το επιθυμητό στερεό κόκκινου χρώματος (2.13 g, 4.79 mmol, 94 %).

Σ.Τ. : 111 - 118 °C

4.8 Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 8

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο 4-((6-καρβαμυλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωρο-φαινοξυ)καρβαμικός tert-βουτυλεστέρας (2.13 g, 4.79 mmol) και προστίθεται το μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρίου, συγκέντρωσης 2N (10 mL). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 h. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 4 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού νατρίου (9 %). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃COOCH₂CH₃/CH₃OH 1/1/0.1. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, απομονώνεται το επιθυμητό στερεό μωβ χρώματος (1.50 g, 4.36 mmol, 91 %).

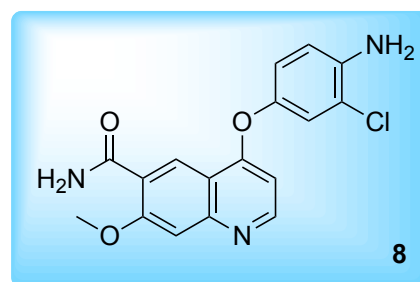
Σ.Τ. : 122 - 129 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.67 (s, 1H), 8.64 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.46 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.03 (s, 3H).

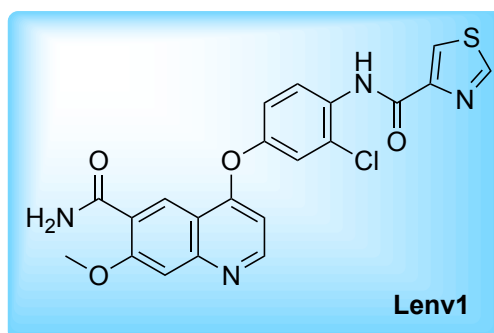
4.9 Σύνθεση του Lenv1

Για να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του εν δυνάμει αναστολέα Lenv1 σε υψηλή απόδοση και να αποφευχθεί η δημιουργία παραπροϊόντων, διενεργήθηκε μια σειρά αντιδράσεων, όπου έγινε χρήση διαφορετικών

θερμοκρασιών, καθώς και διαφορετικών αναλογιών του αντιδραστήριου σύζευξης, της βάσης και του 4-θειαζολο-καρβοξυλικού οξέος. Σε κάθε περίπτωση, σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, προστίθεται, υπό ανάδευση



8



Lenv1

και ατμόσφαιρα αζώτου, το 4-θειαζολο-καρβοξυλικό οξύ και διαλύεται σε απόλυτο τετραϋδροφουράνιο (1 mL). Ακολούθως, προστίθεται η τριαιθυλαμίνη. Η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και προστίθεται το HATU. Οι ποσότητες των αντιδρώντων για κάθε πείραμα αποτυπώνονται στον Πίνακα 23. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου σε παγόλουτρο για 30 min. Η πρόοδος της ενεργοποίησης του οξέος ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Εφόσον ενεργοποιηθεί το οξύ, στη φιάλη προστίθεται, υπό ανάδευση, η αμίνη **8** (20 mg, 0.06 mmol). Η θερμοκρασία στην οποία αφήνεται το μίγμα να αντιδράσει αποτυπώνεται στον Πίνακα 23. Εφόσον η αντίδραση ολοκληρωθεί με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC), το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃OH 1/0.4. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, απομονώνεται το επιθυμητό στερεό καφέ χρώματος (22.5 mg, 0.05 mmol, 85 %, Πείραμα 3, Πίνακας 23).

Πείραμα	4-θειαζολο-καρβοξυλικό οξύ	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	12 mg 0.09 mmol	THF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et ₃ N 30 mg 0.30 mmol d=0.726 g/mL	rt	24h	> 10%
2	12 mg 0.09 mmol	THF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et ₃ N 30 mg 0.30 mmol d=0.726 g/mL	60 °C	24h	50% 13.6 mg 0.03 mmol
3	24 mg 0.18 mmol	THF	HATU 92 mg 0.24 mmol	Et ₃ N 84 mg 0.84 mmol d=0.726 g/mL	60 °C	24h	85% 22.5 mg 0.05 mmol

Πίνακας 23: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση του **Lenv1**.

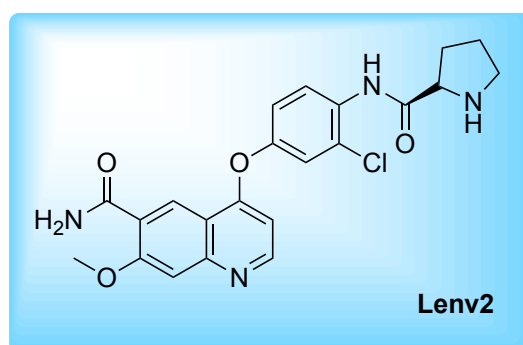
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10.07 (s, 1H), 9.32 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.71 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.61 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.40 (dd, $J = 2.8, 8.8$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.04 (s, 3H).

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 166.22, 161.59, 159.05, 158.56, 156.28, 153.84, 152.16, 150.84, 150.07, 132.70, 126.71, 126.31, 125.68, 125.13, 124.98, 122.64, 121.03, 114.96, 108.43, 103.97, 56.68.

HRMS (ESI): m/z υπολογίστηκε για $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 455.05. Βρέθηκε 455.05.

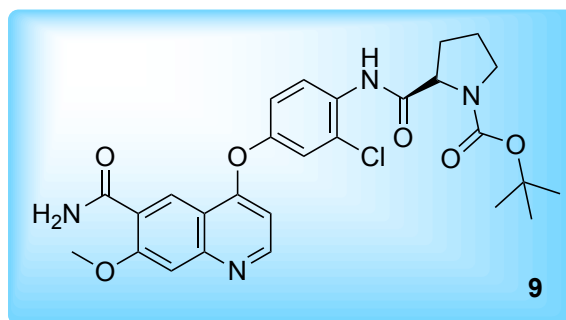
4.10 Σύνθεση του Lenv2

Για τη σύνθεση του αναλόγου Lenv2 πραγματοποιείται η σύζευξη ανάμεσα στην αμίνη **8** και την N-Boc προστατευμένη D-προλίνη, ώστε να προκύψει η ένωση **9**. Εν συνεχεία, λαμβάνει χώρα η αποπροστασία της αμινομάδας με αποτέλεσμα να προκύψει ο εν δυνάμει αναστολέας Lenv2.



4.10.1 Σύνθεση της ένωσης 9

Για τη σύνθεση της ένωσης **9** πραγματοποιήθηκε μια σειρά αντιδράσεων, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες και να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν σε καθαρή μορφή. Στις αντιδράσεις αυτές γίνεται χρήση



διαφορετικών βάσεων και θερμοκρασιών, καθώς και διαφορετικών αναλογίων του αντιδραστηρίου σύζευξης, της βάσης και της N-Boc-D-προλίνης. Σε κάθε περίπτωση, σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, προστίθεται, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, η N-Boc-D-προλίνη και διαλύεται σε απόλυτο διαλύτη (1 mL). Ακολούθως, προστίθεται η βάση. Η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και προστίθεται το HATU. Οι ποσότητες των αντιδρώντων για κάθε πείραμα αποτυπώνονται στον Πίνακα 24. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα

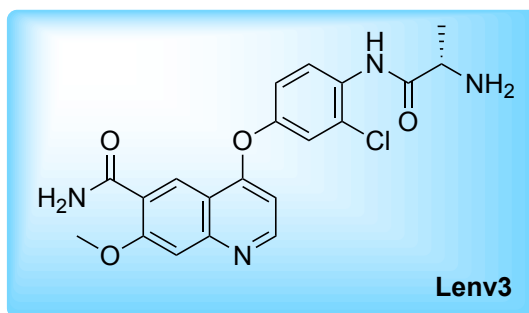
αζώτου σε παγόλουτρο για 30 min. Η πρόοδος της ενεργοποίησης του αμινοξέος ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Εφόσον ενεργοποιηθεί το αμινοξύ, στη φιάλη προστίθεται, υπό ανάδευση, η αμίνη **8** (20 mg, 0.06 mmol). Η θερμοκρασία στην οποία αφήνεται το μίγμα να αντιδράσει αποτυπώνεται στον Πίνακα 24. Εφόσον η αντίδραση ολοκληρωθεί με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC), το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το μίγμα διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃OH 1/0.4. Το φάσμα ¹H NMR δεν επιβεβαίωσε το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **9**. Συνεπώς δεν κατέστη δυνατή η τελική αποπροστασία της ένωσης **9** για τη λήψη του τελικού αναλόγου **Lenv2**.

Πείραμα	N-Boc-D-προλίνη	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	14 mg 0.06 mmol	DMF	HATU 25 mg 0.06 mmol	Et ₃ N 18 mg 0.18 mmol d=0.726 g/mL	rt	24 h	0%
2	15 mg 0.07 mmol	DMF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et ₃ N 18 mg 0.18 mmol d=0.726 g/mL	rt	24 h	0%
3	19 mg 0.09 mmol	DMF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et ₃ N 18 mg 0.18 mmol d=0.726 g/mL	60 °C	24 h	0%
4	19 mg 0.09 mmol	DMF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et ₃ N 18 mg 0.18 mmol d=0.726 g/mL DMAP 0.7 mg 0.006 mmol	60 °C	24 h	0%

Πίνακας 24: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης **9**.

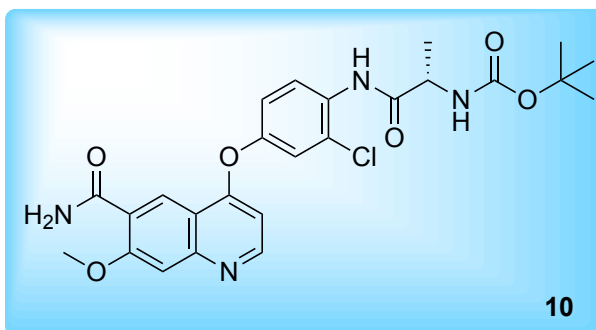
4.11 Σύνθεση του Lenv3

Για τη σύνθεση του εν δυνάμει αναστολέα **Lenv3** πραγματοποιείται η σύζευξη ανάμεσα στην αμίνη **8** και την N-Boc προστατευμένη L-αλανίνη, ώστε να προκύψει η ένωση **10**. Εν συνεχεία, λαμβάνει χώρα η αποπροστασία της αμινομάδας με αποτέλεσμα να προκύψει ο εν δυνάμει αναστολέας **Lenv3**.



4.11.1 Σύνθεση της ένωσης 10

Για τη σύνθεση της ένωσης **10** πραγματοποιήθηκε μια σειρά αντιδράσεων, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες και να απομονωθεί το επιθυμητό προϊόν σε καθαρή μορφή. Στις αντιδράσεις αυτές γίνεται χρήση



διαφορετικών βάσεων και θερμοκρασιών. Σε κάθε περίπτωση, σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, προστίθεται, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, η N-Boc-L-αλανίνη και διαλύεται σε απόλυτο διαλύτη (1 mL). Ακολούθως, προστίθεται η εκάστοτε βάση. Η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και προστίθεται το HATU. Οι ποσότητες των αντιδρώντων για κάθε πείραμα αποτυπώνονται στον Πίνακα 25. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου σε παγόλουτρο για 30 min. Η πρόοδος της ενεργοποίησης του αμινοξέος ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Εφόσον ενεργοποιηθεί το αμινοξύ, στη φιάλη προστίθεται, υπό ανάδευση, η αμίνη **8** (20 mg, 0.06 mmol). Η θερμοκρασία στην οποία αφήνεται το μίγμα να αντιδράσει αποτυπώνεται στον Πίνακα 25. Εφόσον η αντίδραση ολοκληρωθεί με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC), το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το μίγμα διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃OH 1/0.4.

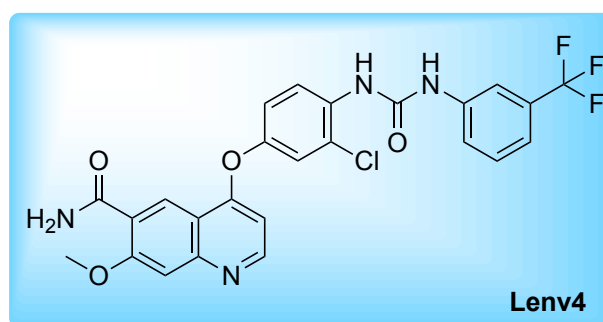
Το φάσμα ^1H NMR δεν επιβεβαίωσε το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **10**. Συνεπώς δεν κατέστη δυνατή η τελική αποπροστασία της ένωσης **10** για τη λήψη του τελικού αναλόγου **Lenv3**.

Πείραμα	N-Boc-L-αλανίνη	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Βάση	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	17 mg 0.09 mmol	DMF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et_3N 30 mg 0.30 mmol d=0.726 g/mL	rt	24 h	0%
2	17 mg 0.09 mmol	DMF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et_3N 30 mg 0.30 mmol d=0.726 g/mL	50 °C	24 h	0%
3	17 mg 0.09 mmol	DMF	HATU 46 mg 0.12 mmol	Et_3N 30 mg 0.30 mmol d=0.726 g/mL DMAP 0.7 mg 0.006 mmol	50 °C	24 h	0%

Πίνακας 25: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση της ένωσης **10**.

4.12 Σύνθεση του **Lenv4**

Για τη σύνθεση του εν δυνάμει αναστολέα **Lenv4** πραγματοποιείται η σύζευξη ανάμεσα στην αμίνη **8** και την 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη, με τη χρήση του κατάλληλου αντιδραστήριου σύζευξης, ώστε να σχηματιστεί η διαρλουρία. Αυτό



δύναται να συμβεί είτε με το σχηματισμό του ισοκυανικού παραγώγου της 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης και τη σύζευξη αυτού με την αμίνη **8**, είτε με το σχηματισμό του ισοκυανικού παραγώγου της αμίνης **8** και τη σύζευξη αυτού με την 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη.

4.12.1 Σύνθεση του *Lenv4*, μέσω του σχηματισμού του ισοκυανικού παραγώγου της 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης

Για να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του αναλόγου *Lenv4* διενεργήθηκε μια ποικιλία αντιδράσεων, όπου έγινε χρήση διαφορετικών θερμοκρασιών, διαλυτών και αναλογιών του αντιδραστηρίου σύζευξης. Σε κάθε περίπτωση, σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, προστίθεται, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, η 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη και στη συνέχεια προστίθεται ο εκάστοτε απόλυτος διαλύτης (1 mL). Ακολούθως, προστίθεται το αντιδραστήριο σύζευξης CDI. Οι ποσότητες των αντιδρώντων για κάθε πείραμα αποτυπώνονται στον Πίνακα 26. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου σε θερμοκρασία δωματίου για 16 h. Η πρόοδος σχηματισμού του ισοκυανικού παραγώγου ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Εφόσον συντεθεί το ισοκυανικό ενδιάμεσο, στη φιάλη προστίθεται, στάγδην και υπό ανάδευση, η αμίνη **8** (20 mg, 0.06 mmol), αφού πρώτα διαλυθεί σε απόλυτο διαλύτη (1 mL). Η θερμοκρασία στην οποία αφήνεται το μίγμα να αντιδράσει παρουσιάζεται στον Πίνακα 26. Εφόσον η αντίδραση ολοκληρωθεί με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC), το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂/CH₃OH 1/0.5. Το φάσμα ¹H NMR δεν επιβεβαίωσε το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος *Lenv4*.

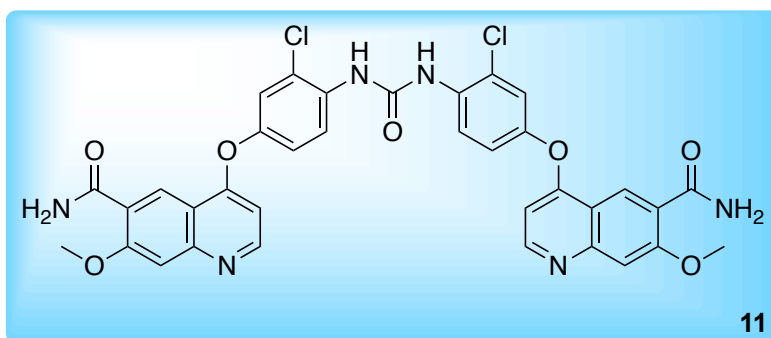
Πείραμα	3-(τριφθορομεθυλο)-ανιλίνη	Διαλύτης	Αντιδραστήριο σύζευξης	Θερμοκρασία αντίδρασης	Χρόνος	Απόδοση
1	11 mg 0.07 mmol d=1.295	CH ₂ Cl ₂	CDI 11 mg 0.07 mmol	rt	48 h	0%
2	11mg 0.07 mmol d=1.295	CH ₂ Cl ₂	CDI 11 mg 0.07 mmol	35 °C	48 h	0%
3	11 mg 0.07 mmol d=1.295	THF	CDI 29 mg 0.18 mmol	70 °C	48 h	0%

Πίνακας 26: Πειραματικές συνθήκες για τη σύνθεση του *Lenv4*.

4.12.2 Σύνθεση του Lenv4, μέσω του σχηματισμού του ισοκυανικού παραγώγου της αμίνης **8**

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, προστίθεται, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, η αμίνη **8** (20 mg, 0.06 mmol) και διαλύεται σε απόλυτο τετραϋδροφουράνιο (2 mL). Ακολούθως, προστίθεται το CDI (29 mg, 0.18 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου στους 70 °C για 24 h. Η πρόοδος σχηματισμού του ισοκυανικού παραγώγου ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Εφόσον συντεθεί το ισοκυανικό ενδιάμεσο, προστίθεται στη φιάλη, στάγδην και υπό ανάδευση, η 3-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη (11 mg, 0.07 mmol, $d=1.295$). Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση, στους 70 °C για 48 h. Εφόσον η αντίδραση ολοκληρωθεί με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC), το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1/0.5. Το φάσμα ^1H NMR δεν επιβεβαίωσε το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **Lenv4**, αλλά κατέδειξε το σχηματισμό της συμμετρικής ουρίας **11** καφέ χρώματος (21.4 mg, 0.03 mmol, 50 %)

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9,19 (s, 2H), 8,70 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 8,68 (s, 2H), 8,23 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7,88 (s, 2H), 7,76 (s, 2H), 7,59 (s, 2H), 7,53 (s, 2H), 7,33 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6,59 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4,04 (s, 6H).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από το παρόν μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, συνοψίζονται επιγραμματικά ως εξής:

- Μέσω μοριακής μοντελοποίησης πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός δύο νέων σειρών αναλόγων του Lenvatinib, οι οποίες περιλαμβάνουν στοχευμένες τροποποιήσεις στον δακτύλιο κυκλοπροπανίου. Οι ενώσεις αυτές παρουσίασαν καλύτερα θεωρητικά αποτελέσματα από τον αναστολέα Lenvatinib και εμφάνισαν αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα του ενεργού κέντρου του VEGFR2, αλλά και με κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται σε αλλοστερική γειτονική περιοχή. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι κρίσιμες για την εκδήλωση ισχυρής και εκλεκτικής ανασταλτικής δράσης του εν δυνάμει αναστολέα.
- Αναπτύχθηκε μια αποδοτικότερη και απλούστερη μέθοδος σύνθεσης των αναλόγων του Lenvatinib. Αυτή, βασίστηκε σε δύο πορείες σύνθεσης, οι οποίες αποτυπώθηκαν σε διπλώματα ευρεσιτεχνίας. Σε κάποια βήματα αυτών, διενεργήθηκαν επιπρόσθετες αλλαγές, για περαιτέρω βελτιστοποίηση της απόδοσης. Συγκεκριμένα, για τη μετατροπή του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα σε 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιο, πραγματοποιήθηκε ποσοτική υδρόλυση και στη συνέχεια χλωρίωση και σχηματισμός του αμιδίου με παροχή αέριας αμμωνίας, με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης σε σχέση με τη μέθοδο που ακολουθεί η εταιρία Eisai, όπου λαμβάνει χώρα η χλωρίωση στη θέση 4 του δακτυλίου κινολίνης του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα και, εν συνεχεία, ο σχηματισμός του αμιδίου με τη χρήση υδατικής αμμωνίας. Επιπρόσθετα, η Boc-προστασία της αμινομάδας του υδροχλωρικού άλατος της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης πραγματοποιήθηκε με οργανοκατάλυση, η οποία εξασφαλίστηκε με τη χρήση υδροχλωρικού άλατος της γουανιδίνης και είχε ως συνέπεια σημαντική αύξηση της απόδοσης.
- Έγιναν προσπάθειες σύνθεσης τεσσάρων αναλόγων του Lenvatinib χωρίς όμως να ληφθούν σε όλες τις περιπτώσεις τελικά αποτελέσματα. Όλες οι τελικές ενώσεις

χαρακτηρίστηκαν πλήρως μέσω φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, φασματομετρίας μάζας (MS) και σημείου τήξης.

- Αναμένεται να πραγματοποιηθεί έλεγχος της βιολογικής δράσης των αναλόγων που συντέθηκαν, ώστε να αξιολογηθεί η ανασταλτική τους ικανότητα και να συγκριθεί με αυτή του Lenvatinib.
- Αναμένεται να μελετηθούν και άλλοι πιθανοί βιολογικοί στόχοι των νέων αναλόγων του Lenvatinib με πειράματα μοριακής μοντελοποίησης.
- Στο εργαστήριο, συνεχίζονται οι προσπάθειες σύνθεσης των αναλόγων του Lenvatinib από την ερευνητική ομάδα.

Βιβλιογραφία

1. Cancer Fact sheet N°297 - World Health Organization. February 2014. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. What Is Cancer? - National Cancer Institute. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
3. Cancer Today - World Health Organization, March 2019. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.p>.
4. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol*. 2018;9:1300. Published 2018 Nov 13. doi:10.3389/fphar.2018.01300
5. Taylor, S. S. & Kornev, A. P. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 36, 65–77 (2011).
6. Kinase Inhibitors. (2019). Available from: <https://www.caymanchem.com/news/kinase-inhibitors>
7. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Lo Muzio L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med*. 2017;40(2):271–280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036
8. Stout, T. J., Foster, P. G. & Matthews, D. J. High-throughput structural biology in drug discovery: protein kinases. *Curr. Pharm. Des.* 10, 1069–82 (2004).
9. Bhullar K., Lagarón N., McGowan E., et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer*. 2018;17(1):48. Published 2018 Feb 19. doi:10.1186/s12943-018-0804-2.
10. Roskoski, R. (2019). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2020 update. *Pharmacological Research*, 104609. doi:10.1016/j.phrs.2019.104609.
11. Young, M. A., et al., (2006). Structure of the Kinase Domain of an Imatinib-Resistant Abl Mutant in Complex with the Aurora Kinase Inhibitor VX-680. *Cancer Research*, 66(2), 1007–1014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2788>.
12. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*. 2000;5(Suppl 1):3–10. doi:10.1634/theoncologist.5-suppl_1-3
13. Lin J-D, Chao T-C. Vascular endothelial growth factor in thyroid cancers. *Cancer Biother Radiopharm*. 2005;20(6):648–661. doi:10.1089/cbr.2005.20.648.
14. Qin S., Li A., Yi M., Yu S., Zhang M., Wu K. Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):27. Published 2019 Mar 12. doi:10.1186/s13045-019-0718-5
15. Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(11):822–827. doi:10.1038/nrmicro2202

16. Yang, N. & Sheridan, A. M. Cell Cycle. *Encycl. Toxicol.* Third Ed. 753–758 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00273-6
17. Li X., Wilmanns M., Thornton J., Köhn M. Elucidating human phosphatase-substrate networks. *Sci Signal.* 2013;6:rs10. doi: 10.1126/scisignal.2003203
18. Sacco F., Perfetto L., Castagnoli L., Cesareni G. The human phosphatase interactome: an intricate family portrait. *FEBS Lett.* 2012;586:2732–2739. doi:10.1016/j.febslet.2012.05.008.
19. Ardito F., Giuliani M., Perrone D., Troiano G., Lo Muzio L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med.* 2017;40(2):271–280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036.
20. Roskoski R., Jr ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66:105–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.
21. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. In: *Molecular Biology of the Cell.* 5th edition. Anderson M, Granum S, editors. Garland Science; New York, NY: 2007. p. 175.
22. Manning G, Whyte DB, et al. (2002). "The protein kinase complement of the human genome". *Science* 298 (5600) : 1912–1934 doi:10.1126/science.1075762.
23. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:833–846. doi: 10.1038/nrm2039.
24. Ferguson, F. M., & Gray, N. S. (2018). *Kinase inhibitors: the road ahead.* *Nature Reviews Drug Discovery, 17(5), 353–377.* doi:10.1038/nrd.2018.21.
25. Hanks SK, Hunter T. "Protein kinase 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase catalytic domain structure and classification". *FASEB J* 1995;9(8): 576-596.
26. Stout, T., Foster, P., & Matthews, D. (2004). *High-Throughput Structural Biology in Drug Discovery: Protein Kinases.* *Current Pharmaceutical Design, 10(10), 1069–1082.* doi:10.2174/1381612043452695.
27. Izarzugaza JM, Hopcroft LE, Baresic A, Orengo CA, Martin AC, Valencia A. Characterization of pathogenic germline mutations in human protein kinases. *BMC Bioinformatics.* 2011;12 Suppl 4(Suppl 4):S1. doi:10.1186/1471-2105-12-S4-S1.
28. Knighton, D. R. et al. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 407–14.
29. McClendon CL, Kornev AP, Gilson MK, Taylor SS. Dynamic architecture of a protein kinase [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Nov 25;111(47):16973]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(43):E4623–E4631. doi:10.1073/pnas.1418402111.
30. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002;298:1912–1934.
31. Heath CM, Stahl PD, Barbieri MA. Lipid kinases play crucial and multiple roles in membrane trafficking and signaling. *Histol. Histopathol.* 2003;18:989–998.
32. Duong-Ly KC, Peterson JR. The human kinome and kinase inhibition. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013;Chapter 2:Unit2.9. doi:10.1002/0471141755.ph0209s60.

33. Hanks, S. & Hunter, T. The eukaryotic protein kinase superfamily: (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9, 576-596 (1995).
34. LABIOTECH.eu. The human kinome. A Study Of Protein Kinases, Their Scientific Background, Therapeutic Potential & Promising Future. Available from: https://www.labiotech.eu/wpcontent/uploads/2019/04/Labiotech_Cisbio_The_Human_Kinome_White_Paper_2019.pdf.
35. Protein Kinases: Atypical Protein Kinases | CST. Available from: <https://www.cellsignal.com/contents/science-protein-kinases/protein-kinases-atypical-protein-kinases/kinases-atypical>.
36. Shchemelinin I, Sefc L, Necas E. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia biologica.* 2006;52(3):81–100.
37. Nowakowski, J., Cronin, C. N., McRee, D. E., Knuth, M. W., Nelson, C. G., Pavletich, N. P., Thompson, D. A. (2002). *Structures of the Cancer-Related Aurora-A, FAK, and EphA2 Protein Kinases from Nanovolume Crystallography.* *Structure*, 10(12), 1659–1667. doi:10.1016/s0969-2126(02)00907-3.
38. Ser/Thr selective protein kinase crystal structure. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Serine/threonine-specific_protein_kinase.
39. Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., & Krebs, E. G. (1987). *Protein Serine/Threonine Kinases.* *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 567–613. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.003031.
40. Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., Di Fiore, P. P. (2006). *Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers.* *Cancer Research*, 66(16), 8147–8154. doi:10.1158/0008-5472.can-05-3489.
41. LITCHFIELD, D. W. (2003). *Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death.* *Biochemical Journal*, 369(1), 1–15. doi:10.1042/bj20021469.
42. The Frappier Lab. Projects: CK2 kinase. Available from: http://individual.utoronto.ca/frappierlab/projects_CK2kinase.html.
43. Ahmad, K. A., Wang, G., Unger, G., Slaton, J., & Ahmed, K. (2008). *Protein kinase CK2 – A key suppressor of apoptosis.* *Advances in Enzyme Regulation*, 48(1), 179–187. doi:10.1016/j.advenzreg.2008.04.002.
44. Knighton, D., Zheng, J., Ten Eyck, L., Xuong, N., Taylor, S., & Sowadski, J. (1991). *Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase.* *Science*, 253(5018), 414–420. doi:10.1126/science.1862343.
45. Smith, F. D., Esseltine, J. L., Nygren, P. J., Veessler, D., Byrne, D. P., Vonderach, M., Scott, J. D. (2017). *Local protein kinase A action proceeds through intact holoenzymes.* *Science*, 356(6344), 1288–1293. doi:10.1126/science.aaj1669.
46. Byrne, D. P., Vonderach, M., Ferries, S., Brownridge, P. J., Evers, C. E., & Evers, P. A. (2016). *cAMP-dependent protein kinase (PKA) complexes probed by complementary*

- differential scanning fluorimetry and ion mobility-mass spectrometry. Biochemical Journal, 473(19), 3159–3175.* doi:10.1042/bcj20160648.
47. Maillard Lab. Mechanisms of signal transduction in Protein Kinase A (PKA). Available at: <https://maillardlab.org/mechanisms-of-signal-transduction-in-pka/>.
 48. Martelli, A. M., Evangelisti, C., Nyakern, M., & Manzoli, F. A. (2006). *Nuclear protein kinase C. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1761(5-6), 542–551.* doi:10.1016/j.bbalip.2006.02.009.
 49. Hug, H., & Sarre, T. F. (1993). *Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? Biochemical Journal, 291(2), 329–343.* doi:10.1042/bj2910329.
 50. Ferreira J.C., Mochly-Rosen D., Boutjdir M. Regulation of cardiac excitability by protein kinase C isozymes. *Front Biosci (Schol Ed).* 2012;4:532–546. Published 2012 Jan 1. doi:10.2741/283.
 51. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". *Endocrine Reviews.* 22 (2): 153–83. doi:10.1210/er.22.2.153.
 52. MAPK1 structure. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/MAPK1>.
 53. Coulombe P, Meloche S (2007). "Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions". *Biochimica et Biophysica Acta.* 1773 (8): 1376–87. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.001.
 54. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance". *Nature* 420 (6913): 333–6. doi:10.1038/nature01137.
 55. Swulius, M. T., & Waxham, M. N. (2008). *Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinases. Cellular and Molecular Life Sciences, 65(17), 2637–2657.* doi:10.1007/s00018-008-8086-2.
 56. Rosengart, M., Arbabi, S., Garcia, I., & Maier, R. (1999). *INTERACTIONS OF CALCIUM-CALMODULIN DEPENDENT PROTEIN KINASES(CaMK) AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES(MAPK) IN MONOCYTE ADHERENCE AND TNF PRODUCTION. Shock, 11(Supplement), 43.* doi:10.1097/00024382-199906001-00149.
 57. Fischer, E. H. (2010). *Phosphorylase and the origin of reversible protein phosphorylation. Biological Chemistry, 391(2/3).* doi:10.1515/bc.2010.011.
 58. Vénien-Bryan, C., Lowe, E. M., Boisset, N., Traxler, K. W., Johnson, L. N., & Carlson, G. M. (2002). *Three-Dimensional Structure of Phosphorylase Kinase at 22 Å Resolution and Its Complex with Glycogen Phosphorylase b. Structure, 10(1), 33–41.* doi:10.1016/s0969-2126(01)00691-8.
 59. Hendrickx, J., Lee, P., Keating, J. P., Carton, D., Sardharwalla, I. B., Tuchman, M., Willems, P. J. (1999). *Complete Genomic Structure and Mutational Spectrum of PHKA2 in Patients with X-Linked Liver Glycogenosis Type I and II. The American Journal of Human Genetics, 64(6), 1541–1549.* doi:10.1086/302399.

60. Heerding, D. A., Rhodes, N., Leber, J. D., Clark, T. J., Keenan, R. M., Lafrance, L. V., Kumar, R. (2008). *Identification of 4-(2-(4-Amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-(((3S)-3-piperidinylmethyl)oxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a Novel Inhibitor of AKT Kinase. Journal of Medicinal Chemistry, 51(18), 5663–5679. doi:10.1021/jm8004527.*
61. Freeman-Cook, K. D., Autry, C., Borzillo, G., Gordon, D., Barbacci-Tobin, E., Bernardo, V., Morris, J. (2010). *Design of Selective, ATP-Competitive Inhibitors of Akt. Journal of Medicinal Chemistry, 53(12), 4615–4622. doi:10.1021/jm1003842.*
62. Hanks, S., Quinn, A., & Hunter, T. (1988). *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science, 241(4861), 42–52. doi:10.1126/science.3291115.*
63. Wiley, H. S., & Burke, P. M. (2001). *Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Endocytic Trafficking. Traffic, 2(1), 12–18. doi:10.1034/j.1600-0854.2001.020103.x.*
64. TK-Targeted Library. Available from: <https://www.chemdiv.com/portfolio/tk-targeted-library/>.
65. Zwick, E. (2001). *Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. Endocrine Related Cancer, 8(3), 161–173. doi:10.1677/erc.0.0080161.*
66. Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. Cell, 141(7), 1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.*
67. Sino Biological. Receptor Tyrosine Kinase. Available from: <https://www.sinobiological.com/category/receptor-tyrosine-kinase-elite>.
68. Hubbard, S. R. (1999). *Structural analysis of receptor tyrosine kinases. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 71(3-4), 343–358. doi:10.1016/s0079-6107(98)00047-9.*
69. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci.* 2004;1(2):101–115. doi:10.7150/ijms.1.101.
70. Essentials of Cell Biology, Unit 4.4. Available from: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010/118241359/>.
71. Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). *The biology of VEGF and its receptors. Nature Medicine, 9(6), 669–676. doi:10.1038/nm0603-669.*
72. Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., & Leung, D. W. (1991). *The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA. Molecular Endocrinology, 5(12), 1806–1814. doi:10.1210/mend-5-12-1806.*
73. Hiratsuka S, Maru Y, Okada A et al. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* 2001;61:1207–1213.
74. Musumeci, F., Radi, M., Brullo, C., & Schenone, S. (2012). *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors: Drugs and New Inhibitors. Journal of Medicinal Chemistry, 55(24), 10797–10822. doi:10.1021/jm301085w*

75. Ligands for different VEGF receptors. VEGF receptor. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/VEGF_receptor#cite_note-cancerpublications.com-4.
76. Morabito, A., De Maio, E., Di Maio, M., Normanno, N., & Perrone, F. (2006). *Tyrosine Kinase Inhibitors of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in Clinical Trials: Current Status and Future Directions*. *The Oncologist*, *11*(7), 753–764. doi:10.1634/theoncologist.11-7-753.
77. Bosch, J., Abrales, J. G., Fernández, M., & García-Pagán, J. C. (2010). *Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: New targets in the treatment of portal hypertension*. *Journal of Hepatology*, *53*(3), 558–567. doi:10.1016/j.jhep.2010.03.021.
78. Herbst, R. S. (2004). *Review of epidermal growth factor receptor biology*. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, *59*(2), S21–S26. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.11.041.
79. Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., & Greene, M. I. (2007). *ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies*. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(8), 2051–2058. doi:10.1172/jci32278.
80. Kennedy, S. P., Hastings, J. F., Han, J. Z. R., & Croucher, D. R. (2016). *The Under-Appreciated Promiscuity of the Epidermal Growth Factor Receptor Family*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*. doi:10.3389/fcell.2016.00088.
81. Downward, J., Parker, P., & Waterfield, M. D. (1984). *Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor*. *Nature*, *311*(5985), 483–485. doi:10.1038/311483a0.
82. Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., & Kitano, H. (2005). *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. *Molecular Systems Biology*, *1*(1), E1–E17. doi:10.1038/msb4100014.
83. Huang, L., & Fu, L. (2015). *Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *5*(5), 390–401. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.001.
84. Ornitz D.M., Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001;2(3):REVIEWS3005. doi:10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005.
85. Yun Y.R., Won J.E., Jeon E., et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.* 2010;2010:218142. Published 2010 Nov 7. doi:10.4061/2010/218142.
86. Ahmad, I., Iwata, T., & Leung, H. Y. (2012). *Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1823*(4), 850–860. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.004.
87. Heldin, C.-H., & Westermark, B. (1989). *Platelet-derived growth factor: Three isoforms and two receptor types*. *Trends in Genetics*, *5*, 108–111. doi:10.1016/0168-9525(89)90040-1.
88. Heldin, C.-H., Östman, A., Eriksson, A., Siegbahn, A., Claesson-Welsh, L., & Westermark, B. (1992). *Platelet-derived growth factor: Isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes*. *Kidney International*, *41*(3), 571–574. doi:10.1038/ki.1992.84.

89. Ying, H.-Z., Chen, Q., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-H., Ma, Y., Zhang, S.-Z., Yu, C.-H. (2017). *PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics*. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 7879–7889. doi:10.3892/mmr.2017.7641.
90. Lei H, Kazlauskas A. Growth factors outside of the platelet-derived growth factor (PDGF) family employ reactive oxygen species/Src family kinases to activate PDGF receptor alpha and thereby promote proliferation and survival of cells. *J Biol Chem*. 2009;284(10):6329–6336. doi:10.1074/jbc.M808426200.
91. Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., Ullrich, A. (1987). *Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand*. *The EMBO Journal*, 6(11), 3341–3351. doi:10.1002/j.1460-2075.1987.tb02655.x.
92. Roskoski, R. (2005). *Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase—The stem cell factor receptor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(3), 1307–1315. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.150.
93. Tan J., Yang S., Shen P., Sun H., Xiao J., Wang Y., Wu B., Ji F., Yan J., Xue H., Zhou D. C-kit signaling promotes proliferation and invasion of colorectal mucinous adenocarcinoma in a murine model. *Oncotarget*. 2015; 6: 27037-27048. doi: 10.18632/oncotarget.4815.
94. Yarden Y., Kuang W., Yang-Feng T., et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6(11):3341–3351.
95. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Huri HZ, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2443–2459. Published 2016 Aug 1. doi:10.2147/DDDT.S89114.
96. Knowles, P. P., Murray-Rust, J., Kjær, S., Scott, R. P., Hanrahan, S., Santoro, M., McDonald, N. Q. (2006). *Structure and Chemical Inhibition of the RET Tyrosine Kinase Domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44), 33577–33587. doi:10.1074/jbc.m605604200.
97. Kramer ER. The neuroprotective and regenerative potential of parkin and GDNF/Ret signaling in the midbrain dopaminergic system. *Neural Regen Res*. 2015;10:1752–1753. doi: 10.4103/1673-5374.165295.
98. Neet K., Hunter T. (1996). "Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families". *Genes Cells*. 1 (2): 147–69. doi:10.1046/j.1365-2443.1996.d01-234.
99. Azevedo, A., Silva, S., & Rueff, J. (2019). *Non-receptor Tyrosine Kinases Role and Significance in Hematological Malignancies. Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Cancer*. doi:10.5772/intechopen.84873.
100. Siveen K., Prabhu K., Achkar I., et al. Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignancies and its Targeting by Natural Products. *Mol Cancer*. 2018;17(1):31. Published 2018 Feb 19. doi:10.1186/s12943-018-0788-y.
101. Mayo Foundation. How the Philadelphia chromosome forms. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/chronic-myelogenous-leukemia/multimedia/how-the-philadelphia-chromosome-forms/img-20007421>.

102. Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). *Src family kinases, key regulators of signal transduction*. *Oncogene*, 23(48), 7906–7909. doi:10.1038/sj.onc.1208160.
103. Dehm SM, Bonham K (2004). "SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation". *Biochem. Cell Biol.* 82 (2): 263–74. doi:10.1139/o03-077.
104. Moroco, J. A., Craigo, J. K., Iacob, R. E., Wales, T. E., Engen, J. R., & Smithgall, T. E. (2014). *Differential Sensitivity of Src-Family Kinases to Activation by SH3 Domain Displacement*. *PLoS ONE*, 9(8), e105629. doi:10.1371/journal.pone.0105629.
105. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, et al. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1196–1212. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.05.001.
106. Bonni, A. (1999). *Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms*. *Science*, 286(5443), 1358–1362. doi:10.1126/science.286.5443.1358.
107. Clarke, C., & Kopetz, E. (2015). BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *Journal Of Gastrointestinal Oncology*, 6(6), 660–667. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.077.
108. Kanev, G. K., de Graaf, C., de Esch, I. J. P., Leurs, R., Würdinger, T., Westerman, B. A., & Kooistra, A. J. (2019). *The Landscape of Atypical and Eukaryotic Protein Kinases*. *Trends in Pharmacological Sciences*. doi:10.1016/j.tips.2019.09.002.
109. Rudson RW. What Makes a Cancer Cell a Cancer Cell? In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12516/>.
110. Ames, B. N., Gold, L. S., & Willett, W. C. (1995). *The causes and prevention of cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5258–5265. doi:10.1073/pnas.92.12.5258.
111. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
112. Deininger P. Genetic instability in cancer: caretaker and gatekeeper genes. *Ochsner J*. 1999;1(4):206–209.
113. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):2776–2778. doi:10.1073/pnas.94.7.2776.
114. Cline, M. J. (1987). *Keynote address: The role of proto-oncogenes in human cancer: Implications for diagnosis and treatment*. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, 13(9), 1297–1301. doi:10.1016/0360-3016(87)90219-7.
115. Illustration of how a normal cell is converted to a cancer cell, when an oncogene becomes activated. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Oncogene>.
116. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 24.2, Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21662/>.

117. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, et al. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>.
118. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275–292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024.
119. The Biology of Cancer (© Garland Science 2007). Figure 14.4.
120. Adair TH, Montani JP. Angiogenesis. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 1, Overview of Angiogenesis. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53238/>.
121. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2(3):213–219. doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.213.
122. Genentech. Tumor Angiogenesis and the VEGF Pathway. Available from: <https://www.biooncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/vegf/vegf-tumor-angiogenesis.html>.
123. Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401–410. doi:10.1038/nrc1093.
124. Mac Gabhann F, Qutub AA, Annex BH, Popel AS. Systems biology of pro-angiogenic therapies targeting the VEGF system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):694–707. doi:10.1002/wsbm.92.
125. Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., & Harris, A. L. (2000). *The Expression and Distribution of the Hypoxia-Inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α in Normal Human Tissues, Cancers, and Tumor-Associated Macrophages*. *The American Journal of Pathology*, 157(2), 411–421. doi:10.1016/s0002-9440(10)64554-3.
126. Smith, T. G., Robbins, P. A., & Ratcliffe, P. J. (2008). *The human side of hypoxia-inducible factor*. *British Journal of Haematology*, 141(3), 325–334. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07029.x.
127. Structure of HIF1A. Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/HIF1A>.
128. Ziello JE, Jovin IS, Huang Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*. 2007;80(2):51–60.
129. Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, 23(5), 1011–1027. doi:10.1200/jco.2005.06.081.
130. Ferrara, N. (2004). *Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress*. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581–611. doi:10.1210/er.2003-0027.
131. Maj, E., Papiernik, D., & Wietrzyk, J. (2016). *Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review)*. *International Journal of Oncology*, 49(5), 1773–1784. doi:10.3892/ijo.2016.3709.

132. Jain, R. K. (2005). *Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy*. *Science*, 307(5706), 58–62. doi:10.1126/science.1104819.
133. Nussey S, Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001. Chapter 3, The thyroid gland. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28/>.
134. Armstrong M, Aziz N, Fingeret A. *Physiology, Thyroid Function*. [Updated 2019 Jun 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537039/>.
135. Gleneagles Hospital. Thyroid Cancer. Available from: <https://www.gleneagles.com.sg/facilities-services/centre-excellence/cancer-care/thyroid-cancer>.
136. Knox MA. Thyroid nodules. *Am Fam Physician* 2013;88:193–6.
137. Corso, C., Gomez, X., Sanabria, A., Vega, V., Dominguez, L. C., & Osorio, C. (2014). *Total thyroidectomy versus hemithyroidectomy for patients with follicular neoplasm. A cost-utility analysis*. *International Journal of Surgery*, 12(8), 837–842. doi:10.1016/j.ijssu.2014.07.005.
138. Cooper, D. S., Doherty, G. M., Haugen, B. R., Kloos, R. T., Lee, S. L., Mandel, S. J., ... Tuttle, R. M. (2009). *Revised American Thyroid Association Management Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer*. *Thyroid*, 19(11), 1167–1214. doi:10.1089/thy.2009.0110.
139. National Cancer Institute. A snapshot of thyroid cancer. November 5, 2014. www.cancer.gov/researchandfunding/snapshots/thyroid. Accessed January 12, 2015.
140. National Cancer Institute. SEER stat fact sheets: thyroid cancer. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>. Accessed January 12, 2015.
141. Nguyen QT, Lee EJ, Huang MG, Park YI, Khullar A, Plodkowski RA. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Health Drug Benefits*. 2015;8(1):30–40.
142. Forner, A., Llovet, J. M., & Bruix, J. (2012). *Hepatocellular carcinoma*. *The Lancet*, 379(9822), 1245–1255. doi:10.1016/s0140-6736(11)61347-0.
143. Kumar V, Fausto N, Abbas A, eds. (2015). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (9th ed.)*. Saunders. pp. 870–873. ISBN 978-1455726134.
144. Balogh J, Victor D 3rd, Asham EH, et al. Hepatocellular carcinoma: a review. *J Hepatocell Carcinoma*. 2016;3:41–53. Published 2016 Oct 5. doi:10.2147/JHC.S61146.
145. Crissien AM, Frenette C. Current management of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2014;10(3):153–161.
146. Liver.ca. Liver Cancer. Available from: <http://ps70.sb.marqui.com/liver-disease/types/liver-cancer.aspx>.
147. Sun VC, Sarna L. Symptom management in hepatocellular carcinoma. *Clin J Oncol Nurs*. 2008;12(5):759–766. doi:10.1188/08.CJON.759-766.

148. Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., Bruix, J. (2008). *Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390. doi:10.1056/nejmoa0708857.
149. Rini, B. I., Rathmell, W. K., & Godley, P. (2008). *Renal cell carcinoma*. *Current Opinion in Oncology*, 20(3), 300–306. doi:10.1097/cco.0b013e3282f9782b.
150. Cairns P. Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2010;9(1-6):461–473. doi:10.3233/CBM-2011-0176.
151. Häggström, C., Rapp, K., Stocks, T., Manjer, J., Bjørge, T., Ulmer, H., Stattin, P. (2013). *Metabolic Factors Associated with Risk of Renal Cell Carcinoma*. *PLoS ONE*, 8(2), e57475. doi:10.1371/journal.pone.0057475.
152. Fausto, V; Abbas, A; Fausto, N (2004). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease* (7th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. ISBN 978-0721601878.
153. Master, VA (November 2013). "Renal Cell Carcinoma". *Merck Manual Professional*. Merck Sharp & Dohme Corp. Archived from the original on 7 March 2014. Retrieved 7 March 2014.
154. Singer, E. A., Gupta, G. N., Marchalik, D., & Srinivasan, R. (2013). *Evolving therapeutic targets in renal cell carcinoma*. *Current Opinion in Oncology*, 1. doi:10.1097/cco.0b013e32835fc857.
155. Santoni, M., De Tursi, M., Felici, A., Lo Re, G., Ricotta, R., Ruggeri, E. M., Milella, M. (2013). *Management of metastatic renal cell carcinoma patients with poor-risk features: current status and future perspectives*. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(6), 697–709. doi:10.1586/era.13.52.
156. Kannaiyan R., Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(12):1249–1270. doi:10.1080/14737140.2018.1527688.
157. Roskoski, R. (2019). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2020 update. *Pharmacological Research*, 104609. doi:10.1016/j.phrs.2019.104609.
158. FDA. Novel Drug Approvals for 2020. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2020>.
159. FDA. Novel Drug Approvals for 2019. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2019>.
160. Rask-Andersen, M., Zhang, J., Fabbro, D., & Schiöth, H. B. (2014). *Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(11), 604–620. doi:10.1016/j.tips.2014.09.007.
161. Wu, P., Clausen, M. H., & Nielsen, T. E. (2015). *Allosteric small-molecule kinase inhibitors*. *Pharmacology & Therapeutics*, 156, 59–68. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.10.002.

162. Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2016). *Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs*. *Drug Discovery Today*, 21(1), 5–10. doi:10.1016/j.drudis.2015.07.008.
163. Roskoski, R. (2016). *Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes*. *Pharmacological Research*, 103, 26–48. doi:10.1016/j.phrs.2015.10.021.
164. Okamoto K., Ikemori-Kawada M., Jestel A., et al. Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization. *ACS Med Chem Lett*. 2014;6(1):89–94. Published 2014 Nov 17. doi:10.1021/ml500394m.
165. Romano V., de Beer T.A., Schwede T. A computational protocol to evaluate the effects of protein mutants in the kinase gatekeeper position on the binding of ATP substrate analogues. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):104. Published 2017 Feb 20. doi:10.1186/s13104-017-2428-9.
166. Le Corre, L., Girard, A.-L., Aubertin, J., Radvanyi, F., Benoist-Lasselain, C., Jonquoy, A., Le Merrer, Y. (2010). *Synthesis and biological evaluation of a triazole-based library of pyrido[2,3-d]pyrimidines as FGFR3 tyrosine kinase inhibitors*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(9), 2164. doi:10.1039/b923882d.
167. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1-3), 3–25. doi:10.1016/s0169-409x(96)00423-1.
168. Harmange, J.-C., Weiss, M. M., Germain, J., Polverino, A. J., Borg, G., Bready, J., Zanon, R. (2008). *Naphthamides as Novel and Potent Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors: Design, Synthesis, and Evaluation*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(6), 1649–1667. doi:10.1021/jm701097z.
169. Li, C., Ai, J., Zhang, D., Peng, X., Chen, X., Gao, Z., Liu, H. (2015). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Imidazo[1,2-a]pyridine Derivatives as Potent c-Met Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(5), 507–512. doi:10.1021/ml5004876.
170. Peng, F.-W., Liu, D.-K., Zhang, Q.-W., Xu, Y.-G., & Shi, L. (2017). VEGFR-2 inhibitors and the therapeutic applications thereof: a patent review (2012-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(9), 987–1004. doi:10.1080/13543776.2017.1344215.
171. "Quinolines". Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich Co. LLC. Retrieved 7 December 2013. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16269315>.
172. Combes, A (1888). *Bull. Chim. Soc. France*. 49: 89.
173. Conrad, M., & Limpach, L. (1887). *synthesen von Chinolinderivaten mittelst Acetessigester*. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 20(1), 944–948. doi:10.1002/cber.188702001215
174. Döbner, O. (1887). 1) Ueber α -Alkylcinchoninsäuren und α -Alkylchinoline. *Justus Liebig's Annalen Der Chemie*, 242(3), 265–289. doi:10.1002/jlac.18872420302.

175. Doebner, O., & v. Miller, W. (1881). Ueber eine dem Chinolin homologe Base. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 14(2), 2812–2817. doi:10.1002/cber.188101402258.
176. Gould, R. G., & Jacobs, W. A. (1939). The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-Benzoquinolines. *Journal of the American Chemical Society*, 61(10), 2890–2895. doi:10.1021/ja01265a088.
177. Skraup, Z. H. (1880). "Eine Synthese des Chinolins". *Berichte*. 13: 2086.
178. Jones, C. P., Anderson, K. W., & Buchwald, S. L. (2007). Sequential Cu-Catalyzed Amidation-Base-Mediated Camps Cyclization: A Two-Step Synthesis of 2-Aryl-4-quinolones from Halophenones. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(21), 7968–7973. doi:10.1021/jo701384n.
179. Friedländer, P., & Gohring, C. F. (1883). *Ueber eine Darstellungsmethode im Pyridinkern substituierter Chinolinderivate. Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 16(2), 1833–1839. doi:10.1002/cber.18830160265.
180. Niementowski, S. (1894). *Synthesen der Chinolinderivate. Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27(2), 1394–1403. doi:10.1002/cber.18940270242.
181. Pfitzinger, W. (1886). Chinolinderivate aus Isatinsäure. *Journal Für Praktische Chemie*, 33(1), 100–100. doi:10.1002/prac.18850330110.
182. Matsui, J., Funahashi, Y., Uenaka, T., Watanabe, T., Tsuruoka, A., & Asada, M. (2008). *Multi-Kinase Inhibitor E7080 Suppresses Lymph Node and Lung Metastases of Human Mammary Breast Tumor MDA-MB-231 via Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 Kinase. Clinical Cancer Research*, 14(17), 5459–5465. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-5270.
183. FDA Professional Drug Information for Lenvima. Available from: <https://www.drugs.com/pro/lenvima.html>.
184. Fala L. Lenvima (Lenvatinib), a Multireceptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Approved by the FDA for the Treatment of Patients with Differentiated Thyroid Cancer. *Am Health Drug Benefits*. 2015;8(Spec Feature):176–179.
185. Formica R., Lorber K., Friedman A., Bia M., Lakkis F., Smith J., & Lorber M. (2004). *The evolving experience using everolimus in clinical transplantation. Transplantation Proceedings*, 36(2), S495–S499. doi:10.1016/j.transproceed.2004.01.015.
186. Flynn JP, Gerriets V. Pembrolizumab. [Updated 2019 Dec 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546616/>.
187. Lenvima Product Information. Available from: <http://www.lenvima.com/pdfs/prescribing-information.pdf>.
188. Al-Salama, Z. T., Syed, Y. Y., & Scott, L. J. (2019). *Lenvatinib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. Drugs*. doi:10.1007/s40265-019-01116-x.

189. Capozzi M, De Divitiis C, Ottaiano A, et al. Lenvatinib, a molecule with versatile application: from preclinical evidence to future development in anti-cancer treatment. *Cancer Manag Res.* 2019;11:3847–3860. Published 2019 May 1. doi:10.2147/CMAR.S188316.
190. Lenvima product information. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lenvima-epar-product-information_el.pdf.
191. Cabanillas, M. E., & Habra, M. A. (2016). *Lenvatinib: Role in thyroid cancer and other solid tumors.* *Cancer Treatment Reviews*, 42, 47–55. doi:10.1016/j.ctrv.2015.11.003.
192. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008;358(19):2039–2049. doi:10.1056/NEJMra0706596.
193. Adapted from *Cancer Research UK, Eckstein, & N. et al. 2014.*
194. Liao, J. J. Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 409–424.
195. Nishio, M. CH/Pai Hydrogen Bonds in Crystals. *CrystEng- Comm* 2004, 6, 130.
196. Funahashi Y., Tsuruoka A., et al. Nitrogen-containing aromatic derivatives. Eisai R&D Management Co Ltd. US20040053908A1, 2004.
197. Sakaguchi T., Tsuruoka A. Amorphous Salt of 4-(3-Chloro-4-(cyclopropylaminocarbonyl)aminophenoxy)-7-methoxy-6-quinoline-carboxamide and Process for Preparing the Same. Eisai R&D Management Co Ltd. US20070004773A1, 2007.
198. Barker, J. M. Huddleston, P. R. Jones, A. W. Edwards, M. Thienopyridines. Part 2. Application of the Conrad–Limpach and Gould–Jacobs reactions to the synthesis of thieno[3,4-b]pyridin-4(1H)-ones. *J. Chem. Res., Synop.* 1980, 1, 4–5.
199. Brouet, J.-C. Gu, S. Peet, N. P.; Williams, J. D. Survey of Solvents for the Conrad–Limpach Synthesis of 4-Hydroxyquinolones. *Synth. Commun.* 2009, 39, 1563–1569.
200. Dowtherm Synthetic Organic Fluids; Dow Chemical Company: Midland, MI, 2017. <http://www.dow.com/heattrans/products/synthetic/dowtherm.htm> (accessed March 1, 2017).
201. Thomas A. P., Hennequin L. F. A., Ple P. Quinoline Derivatives Inhibiting the Effect of Growth Factors Such as VEGF. US 6809097B1, 2004.
202. Preparation method of lenvatinib. CN104876864A, 2017.
203. Theodorou V., Alagiannis M., Ntemou N., Brentas A., Voulgari P., Polychronidou V., Gogou M., Giannelos M., Skobridis K., (2018). *Mild alkaline hydrolysis of hindered esters in non-aqueous solution.* *Arkivoc*, 2018(7). doi:10.24820/ark.5550190.p010.673.
204. Jahani, F., Tajbakhsh, M., Golchoubian, H., & Khaksar, S. (2011). *Guanidine hydrochloride as an organocatalyst for N-Boc protection of amino groups.* *Tetrahedron Letters*, 52(12), 1260–1264. doi:10.1016/j.tetlet.2011.01.023.
205. "FDA Approves Nexavar for Patients with Inoperable Liver Cancer" (Press release). FDA. November 19, 2007. Retrieved November 10, 2012.

206. Wilhelm, S. M., Adnane, L., Newell, P., Villanueva, A., Llovet, J. M., & Lynch, M. (2008). *Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), 3129–3140. doi:10.1158/1535-7163.mct-08-0013.
207. Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Bukowski, R. M. (2007). *Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 356(2), 125–134. doi:10.1056/nejmoa060655.
208. Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.-F., Bruix, J. (2008). *Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 359(4), 378–390. doi:10.1056/nejmoa0708857.
209. FDA Approval for Sorafenib Tosylate". *National Cancer Institute*. 5 October 2006.
210. Riedl B., Dumas J., et al. ϕ -CARBOXYARYL SUBSTITUTED DIPHENYL UREAS AS RAF KINASE INHIBITORS. WO2000042012A1, 2000.
211. Rao D. R., Narayanrao K., Ghagare M., Chikhalikar S. WO2009034308A2, 2009.
212. Optimal synthetic method of sorafenib. CN103408488A, 2013.
213. US Food and Drug Administration (2006). "FDA approves new treatment for gastrointestinal and kidney cancer".
214. Quek, R., & George, S. (2009). *Gastrointestinal Stromal Tumor: A Clinical Overview*. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(1), 69–78. doi:10.1016/j.hoc.2008.11.006.
215. Blay, J.-Y., & Reichardt, P. (2009). *Advanced gastrointestinal stromal tumor in Europe: a review of updated treatment recommendations*. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 9(6), 831–838. doi:10.1586/era.09.34.
216. Gan, H. K., Seruga, B., & Knox, J. J. (2009). *Sunitinib in solid tumors*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(6), 821–834. doi:10.1517/13543780902980171.
217. Demetri, G. D., van Oosterom, A. T., Garrett, C. R., Blackstein, M. E., Shah, M. H., Verweij, J., Casali, P. G. (2006). *Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial*. *The Lancet*, 368(9544), 1329–1338. doi:10.1016/s0140-6736(06)69446-4.
218. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., Figlin, R. A. (2007). *Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma*. *New England Journal of Medicine*, 356(2), 115–124. doi:10.1056/nejmoa065044.
219. Yang T., Lee C., Huang W., Lee A. Synthesis and Evaluation of Novel 2-Pyrrolidone-Fused (2-Oxoindolin-3-ylidene)methylpyrrole Derivatives as Potential Multi-Target Tyrosine Kinase Receptor Inhibitors. *Molecules*. 2017;22(6):913. Published 2017 May 31. doi:10.3390/molecules22060913.
220. Tang, P. C., Miller T., Li X., Sun L., Wei C.C., Shirazian S., Liang C., Vojtkovsky T., Nematalla A. S. Preparation of pyrrole substituted 2-indolinone protein kinase inhibitors for treatment of cancer. WO2001060814A2, 2001.

221. Christ J., Striegel H. Process for the preparation of n-[2-diethylamino)ethyl]-5-[(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3h-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1h-pyrrole-3-carboxamide. WO2010136458A1, 2010.
222. Bigatti E., Canavesi A., Macdonald P. L., Scarpitta F. Processes for preparing sunitinib and salts thereof. WO2009124037A1, 2009.
223. Armarego, W. L. F. & Perin, D. D. Purification of Laboratory Chemicals, Fourth Edition. 529 (2000). doi:10.3390/21000152.