



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογικός έλεγχος
νέων βιοδραστικών ενώσεων, αναλόγων της Νιλοτινίβης (Nilotinib)
και της Ιματινίβης (Imatinib) ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών
και της πολυμεράσης της πόλυ-(ADP-ριβόζης) (PARP)-
Ανάπτυξη νέας βελτιωμένης ολικής σύνθεσης του αναστολέα Rucaparib**

Ντέμου Νικολέτα
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογικός έλεγχος
νέων βιοδραστικών ενώσεων, αναλόγων της Νιλοτινίβης (Nilotinib)
και της Ιματινίβης (Imatinib) ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών
και της πολυμεράσης της πόλυ-(ADP-ριβόζης) (PARP)-
Ανάπτυξη νέας βελτιωμένης ολικής σύνθεσης του αναστολέα Rucaparib**

Ντέμου Νικολέτα
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας της Δράσης 1^η Προκήρυξη Υποτροφιών ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ., για υποψήφιους διδάκτορες, με κωδικό αίτησης (2000), με ημερομηνία έναρξης χορήγησης της Υποτροφίας (21/08/2017) και ημερομηνία λήξης (31/05/2020).

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κωνσταντίνος Σκομπρίδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων (Επιβλέπων Καθηγητής)

Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Μιχάλης Σίσκος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κωνσταντίνος Σκομπρίδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων (Επιβλέπων Καθηγητής)

Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Μιχάλης Σίσκος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεώργιος Βαρβούνης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

Λάζαρος Χατζηαράπογλου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δημήτρης Αλίβερης, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών
Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ: 941/23-12-2016

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 1016/14-5-2020

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Σκομπρίδης,

Μέλη:

Βασίλειος Τσίκαρης

Μιχάλης Σίσκος

Ημερομηνία τροποποίησης θέματος διδακτορικής διατριβής: 979/6-7-2018

Θέμα: <<Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογικός έλεγχος νέων βιοδραστικών ενώσεων, αναλόγων της Νιλοτινίβης (Nilotinib) και της Ιματινίβης (Imatinib) ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών και της πολυμεράσης της πολυ-(ADP-ριβόζης) (PARP)-Ανάπτυξη νέας βελτιωμένης ολικής σύνθεσης του αναστολέα Rucaparib>>

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ: 1019/13-07-2020

1. Κωνσταντίνος Σκομπρίδης
2. Βασίλειος Τσίκαρης
3. Μιχάλης Σίσκος
4. Γεώργιος Βαρβούνης
5. Αλέξανδρος Τσελέπης
6. Λάζαρος Χατζηαράπογλου
7. Δημήτρης Αλίβερης

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό <<Άριστα / 10>> στις 22-07-2020

Η πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Τουτουνζόγλου Ξανθή



Τμήμα Χημείας
Τομέας Οργανικής Χημείας &
Βιοχημείας
45 110, Ιωάννινα
Τηλ.: 26510 08398
Fax: 26510 08799

Ιωάννινα, 22-07-2020



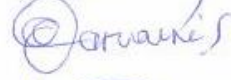



Προς
το Τμήμα Χημείας
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Θέμα: «Πρακτικό εξέτασης και απόφασης της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την απονομή του Διδακτορικού Διπλώματος στη Νικολέτα Ντέμου από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων»

Σήμερα, την 22^η Ιουλίου 2020 και ώρα 11:00 π.μ., έγινε η δημόσια παρουσίαση της Διδακτορικής Διατριβής, με θέμα: «*Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογικός έλεγχος νέων βιοδραστικών ενώσεων, αναλόγων της Νιλοτινίβης (Nilotinib) και και της Ιματινίβης (Imatinib) ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών και της πολυμεράσης της πολυ-(ADP-ριβόζης) (PARP)-Ανάπτυξη νέας βελτιωμένης ολικής σύνθεσης του αναστολέα Rucaparib*» από την υποψήφια κα Νικολέτα Ντέμου. Η παρουσίαση έλαβε χώρα στην αίθουσα διδασκαλίας Χ2-097 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώπιον της κατά το νόμο ορισθείσης Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Ο κα Ντέμου Νικολέτα ανέπτυξε επί περίπου 45 λεπτά τα κυριότερα αποτελέσματα της διδακτορικής της διατριβής και ακολούθως απάντησε σε σειρά ερωτήσεων. Κατόπιν, μετά την αποχώρηση της υποψήφιας και του ακροατηρίου, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής έκριναν ομόφωνα ότι ο κα Ντέμου Νικολέτα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής της διατριβής εργάστηκε συστηματικά στην ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης και απλούστερης μεθόδου σύνθεσης αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος της Ιματινίβης (Imatinib) και της Νιλοτινίβης (Nilotinib), τα οποία χορηγούνται σε ασθενείς για την αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, με μεγάλη επιτυχία. Συνέθεσε μια ευρεία κλίμακα τελικών ενώσεων, με πολλούς συνδυασμούς συντακτικών χαρακτηριστικών, επίσης βελτιστοποίησε τόσο τις συνθήκες, όσο και τις αποδόσεις διαφόρων σταδίων. Ο βιολογικός έλεγχος της ανασταλτικής δράσης των εν λόγω αναλόγων, κατέδειξε σε ορισμένες περιπτώσεις ισχυρή αντικαρκινική και αντιθρομβωτική δράση. Επίσης, εργάστηκε συστηματικά για την ανάπτυξη μιας νέας βελτιωμένης ολικής σύνθεσης του φαρμάκου Rucaparib, αναστολέα των ενζύμων πολυ (ADP-ριβοζο)πολυμεράσης (PARP), που διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην επισκευή του DNA, λειτουργώντας ως αντινεοπλασματικός παράγοντας. έργο της παρουσιάζει επάρκεια και πρωτοτυπία, αξιοποιεί τη διαθέσιμη διεθνή βιβλιογραφία και αναδεικνύει νέες δυνατότητες στον τομέα έρευνας των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Για τους λόγους αυτούς, η επιτροπή προτείνει ομόφωνα την απονομή της Διδακτορικής Διατριβής στην κα Νικολέτα Ντέμου με βαθμό **άριστα δέκα (10)**.

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

1. Κωνσταντίνος Σκομπρίδης, Καθηγητής, (Επιβλέπων Καθηγητής) 
2. Βασίλειος Τσίκαρης, Καθηγητής, (μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής)
3. Μιχάλης Σίσκος, Αναπληρωστή Καθηγητής, (μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής) 
4. Γεώργιος Βαρβούνης, Καθηγητής, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής) 
5. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής) 
6. Λάζαρος Χατζηαράπογλου, Καθηγητής, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής) 
7. Δημήτριος Αλίβεργης, Επίκουρος Καθηγητής, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής) 

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά την περίοδο 2016-2020 στο πλαίσιο του Αναμορφωμένου Προγράμματος Σπουδών (ΦΕΚ 2121/1-8-2014, 3356/15-12-2014) και χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας της Δράσης 1^η Προκήρυξη Υποτροφιών ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ., για υποψήφιους διδάκτορες με κωδικό αίτησης (2000).

Στη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής στην οργανική σύνθεση απέκομισα πολλές εμπειρίες και θα ήθελα να καταθέσω τη δική μου προσωπική εμπειρία: ενίοτε χρειάζεται επιμονή, υπομονή, μελέτη, οξυδέρκεια και ψυχικό σθένος για την πιθανή και συχνά επερχόμενη αποτυχία στη σύνθεση καθώς η αποτυχία είναι προάγγελος της επιτυχίας. Η επιτυχία είναι υποκειμενικός παράγοντας και είναι από το άθροισμα πολλών καθημερινών συνιστωσών. Κάποιες φορές απογοητεύεσαι κάποιες άλλες νοιώθεις χαρούμενος για τα θετικά αποτελέσματα της προσπάθειας στην οργανική σύνθεση. Ο πλέον σημαντικός παράγοντας για την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών είναι ο πανεπιστημιακός περίγυρος, ο καθένας μας τυγχάνει να έχει δίπλα του ανθρώπους που τον στηρίζουν, τον εμπνέουν και τον ανεπτερώνουν ηθικά.

Εγώ νιώθω τυχερή για αυτόν ακριβώς τον περίγυρο, γι' αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δάσκαλό μου Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τον ευχαριστώ για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου δραστηριότητας, τη γνωστική καθοδήγηση τόσο σε θεωρητικό επίπεδο όσο και σε πειραματικό επίπεδο. Αισθάνομαι τυχερή που συνεργάστηκα με έναν Καθηγητή που χαρακτηρίζεται από βαθιές γνώσεις, ήθος και πάνω από όλα ανθρωπιά. Ένα μεγάλο Ευχαριστώ στον Καθηγητή που στάθηκε δίπλα μου όταν μερικές φορές απογοητευόμουν για κάποια μη αναμενομένα αρνητικά αποτελέσματα κατά την πορεία της διδακτορικής διατριβής και συνεχώς με παρότρυνε να συνεχίσω. Είναι ο Δάσκαλος, μα πάνω απ' όλα ο άνθρωπος που με έχει στηρίξει αδιάκοπα και θα τον ευγνωμονώ παντοτινά. Κύριε Καθηγητά, σας Ευχαριστώ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Βασιλική Θεοδώρου που πάντα απλόχερα μου πρόσφερε την βοήθειά της στο εργαστήριο σε καθημερινή βάση. Με το χαμόγελό της, την καλοσύνη και την μητρική της στοργή μου έδινε πάντα κίνητρο να γίνομαι αισιόδοξος άνθρωπος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη, για την άμεση ανταπόκριση και την αποδοχή εκ μέρους του να συμμετάσχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και να αξιολογήσει την ερευνητική μου προσπάθεια.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μιχάλη Σίσκο, για την εποικοδομητική συνεργασία και για την θερμή αποδοχή εκ μέρους του να συμμετάσχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και να αξιολογήσει τη διδακτορική μου διατριβή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για την άριστη συνεργασία μας και την καλή του διάθεση του, για τη διεξαγωγή πειραμάτων προκειμένου να διενεργηθεί η βιολογική δράση των νέων εν δυνάμει αναστολέων ως αντιθρομβωτικών.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τους καθηγητές Γεώργιο Βαρβούνη και Λάζαρο Χατζηαράπογλου για την συμμετοχή τους στην κρίση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτριο Αλιβέρτη του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την άριστη συνεργασία μας και για την αμέριστη συμπαράστασή του στην επίλυση διαφόρων αποριών.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω, επίσης στην κ.α Δέσποινα Πανταζή για τη διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων από μέρος της στο Τμήμα Χημείας (του τομέα Βιοχημείας) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου, Αλέξιο Μπρέντα, Πηνελόπη Βούλγαρη, Μιχάλη Αλαγιάννη, Παναγιώτα Βελισσάρη, Μαρία Τσίπα, Μάριο Γιαννέλο, Ανδρομάχη Μπακαγιάννη και τον Στέλιο Κοτίδη, για την άριστη συνεργασία μας, για τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε, για την ψυχολογική υποστήριξη τους, ώστε να φέρω εις πέρας αυτήν την εργασία.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, που με στήριξε και συνεχίζει να με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια των Σπουδών μου. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σοφία και Ιωάννη, τον αδερφό μου Κωνσταντίνο, καθώς και το σύζυγό μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που τροποποιούν άλλες πρωτεΐνες, προσθέτοντας τους φωσφορική ομάδα από το ATP, μια διαδικασία που ονομάζεται φωσφορυλίωση. Οι κινάσες μεσολαβούν και ρυθμίζουν την πλειοψηφία των κυτταρικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένου αυτού της επιβίωσης, πολλαπλασιασμού, μεταγραφής, διαφοροποίησης, απόπτωσης καθώς και άλλες κυτταρικές διεργασίες. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργίας του υποστρώματος της πρωτεΐνης μέσω της αλλαγής της ενζυμικής δραστηριότητας. Ωστόσο, η απορρύθμιση των πρωτεϊνικών κινάσων οδηγεί σε τροποποιήσεις των ενζυμικών λειτουργιών, γεγονός που δυνητικά επάγει μια σειρά παθολογικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων και κακοήθων ασθενειών, όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, στρωματικοί όγκοι του πεπτικού, αλλά και διάφορες μη κακοήθεις ασθένειες. Υπάρχουν μη αμφιλεγόμενα στοιχεία που καταδεικνύουν ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν στόχους για τη θεραπεία πολυποικίλων ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Αποτελούν ελκυστικούς στόχους από πολλές φαρμακευτικές εταιρίες για την ανάπτυξη αναστολέων μικρού μοριακού βάρους ως θεραπευτικών παραγόντων κατά των διαφόρων ασθενειών που προκαλούν οι κινάσες.

Πέρα από το ρόλο των πρωτεϊνικών κινάσων στις κυτταρικές διεργασίες, θα γίνει αναφορά σε μια πολύ σημαντική οικογένεια πρωτεϊνών, που είναι πολυμεράσες της πόλυ-(ADP ριβόζης) (PARPs). Οι συγκεκριμένες πολυμεράσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση αρνητικά φορτισμένων και διακλαδισμένων πολυμερών της ADP ριβόζης (PAR), τα οποία προσαρτώνται σε πρωτεΐνες στόχους, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το NAD⁺. Εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες του κυττάρου συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης του DNA, της γονιδιωματικής σταθερότητας και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Σημαντικά στοιχεία που απορρέουν από κλινικές μελέτες αποδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα αποτελούν ελκυστικούς στόχους για την ανάπτυξη φαρμάκων στη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου των ωοθηκών και του μαστού, μέσω της ανάπτυξης αναστολέων που καταστέλλουν την ενζυματική λειτουργία των PARPs. Ένας ισχυρός αναστολέας των PARP-1 και PARP-2 είναι το Rucaparib (Rubraca™) που εγκρίθηκε από τη FDA το Δεκέμβριο του 2016 και χρησιμοποιείται σήμερα στη θεραπεία κατά του καρκίνου των ωοθηκών, σαλπίνγων και πρώιμου καρκίνου του περιτοναίου. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελέσε πρόκληση-στόχο η ανάπτυξη μιας νέας καινοτόμας, βελτιωμένης, χαμηλού κόστους ολικής συνθετικής πορείας για την ανάπτυξη του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος εν συγκρίσει με τη συνθετική πορεία που προτάθηκε από την Clovis Oncology και Pfizer. Η πορεία που ακολουθείται στις συγκεκριμένες εταιρίες χαρακτηρίζεται από χαμηλές αποδόσεις, τοξικά αντιδραστήρια και δυσκολίες στην απομόνωση των επιθυμητών ενδιάμεσων ενώσεων. Μελετήθηκε και προτάθηκε μια χαμηλού κόστους συνθετική πορεία που αποτελείται από επτά επιμέρους συνθετικά στάδια, τα οποία θα αναλυθούν στο κεφάλαιο υπ' αριθμόν 3.

Ένα επιπλέον αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής για τη σύνθεση αναστολέων κινάσων αποτελεί ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο βιολογικός έλεγχος νέων αναλόγων Nilotinib και Imatinib, και δη ισοστερικών ενώσεων που σχετίζονται δομικά με τα συγκεκριμένα φαρμακευτικά σκευάσματα, μετά από τις κάτωθι τροποποιήσεις.

Ανάλογα του Imatinib

- ❖ Αφαίρεση του Ν-μεθυλοπιπεραζινικού δακτυλίου που είναι προσαρτημένος στον τελικό βενζολικό δακτύλιο του Imatinib.
- ❖ Απομάκρυνση των υποκαταστατών του τελικού βενζολικού δακτυλίου και αντικατάσταση αυτών με διαφορετικές ομάδες υποκαταστατών στον τελικό βενζολικό δακτύλιο.
- ❖ Αντικατάσταση του αμιδικού δεσμού με δεσμό ουρίας και εισαγωγή διαφόρων υποκαταστατών σε διάφορες θέσεις του τελικού βενζολικού δακτυλίου.

Ανάλογα του Nilotinib

- ❖ Εξάλειψη του 3-μεθυλομιδαζολικού δακτυλίου, απομάκρυνση ή και διατήρηση της 3-τριφθορομέθυλο-ομάδας του Nilotinib και εισαγωγή διαφορετικών υποκαταστατών στον τελικό βενζολικό δακτύλιο.
- ❖ Εξάλειψη του 3-μεθυλοϊμιδαζολικού δακτυλίου του Nilotinib και εισαγωγή ενός δεύτερου αμιδικού δεσμού μέσω της εισαγωγής και σύζευξης μιας πρωτοταγούς αμίνης και ενός οξέος χρωμόνης ή κουμαρίνης.

Ένας επιπρόσθετος στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης, χαμηλού κόστους ολικής συνθετικής πορείας για την Παρασκευή των νέων αναλόγων του Nilotinib και Imatinib, εν συγκρίσει με την πορεία που προτάθηκε και κατοχυρώθηκε από την εταιρεία Novartis. Αναπτύχθηκε μια ολική συνθετική πορεία χαμηλού κόστους και με υψηλότερη συνολική απόδοση, κατά την οποία όλες οι ενδιάμεσες ενώσεις και τα τελικά προϊόντα, εν δυνάμει αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, απομονώθηκαν εύκολα και σε υψηλές αποδόσεις σε σχέση με την συνθετική πορεία της εταιρείας Novartis. Τέλος, όλες οι τελικές ενώσεις, εν δυνάμει αναστολείς ταυτοποιήθηκαν πλήρως με όλες τις σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές (IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ και φάσματα μάζας υψηλής ευκρίνειας/ESI-HRMS), απομονώθηκαν δε σε υψηλή αναλυτική καθαρότητα, 99% και άνω, μέσω χρωματογραφίας στήλης. Πέραν αυτού, θα γίνει βιολογικός έλεγχος για να εκτιμηθεί η βιολογική τους δραστηριότητα.

ABSTRACT

Protein kinase are enzymes that modifies other proteins by adding phosphate group from ATP to them, a process which is called phosphorylation. Kinases are known to mediate and regulate the majority of cellular pathways, including survival, proliferation, transcription, differentiation, apoptosis and many other cellular processes. Phosphorylation of proteins results in a functional change of the target substrate of protein via the alteration of the enzyme activity. Deregulation of protein kinases lead to alterations in functions of these enzymes which may launch series of pathological diseases and cancer, including malignant disorders such as chronic myeloid leukemia, gastrointestinal stromal tumors as well as non-malignant diseases. There are indisputable evidence that protein kinases are a validated drug targets for treatment of various diseases including cancer. The tremendous appeal for development of small low-molecule weight inhibitors as a therapeutic agents against many diseases constitutes a major target by many companies.

Beyond the role of protein kinases in cellular processes, a very important family of proteins are poly(ADP-ribose)polymerases, PARPs. These polymerases are enzymes that catalyze the synthesis of negatively charged and branched polymers of ADP ribose (PAR) attached to other proteins, using as a substrate NAD⁺. PARPs are involved in many cellular processes, including DNA repair, genomic stability and programmed cell death. Substantial evidence and clinical data has revealed that these enzymes are attractive and promising drug targets for treatment of various cancer including breast cancer and ovarian cancer via the development of inhibitors which suppress their enzymatic activity. A potent inhibitor of PARP-1 and PARP-2 is Rucaparib (Rubraca™) that was approved by the FDA in December 2016 and is currently being used in the clinical treatment of ovarian cancer, fallopian cancer and primary peritoneal cancer. In this present PhD thesis, it was found attractive to provide a low cost and more effective overall synthetic process for Rucaparib, compared to the Clovis Oncology and Pfizer synthetic route, considering that the suggested processes are characterized by low overall yields, toxic reagents and difficulties in the isolation of the desired intermediate compounds. We improvised and suggested a low cost overall synthetic route which is comprised of seven individual synthetic steps and will be expounded on chapter 3.

Another objective of this present Phd thesis is stated the design, synthesis, biological evaluation of a new series of analogues of Nilotinib and Imatinib, which constitute structurally related compounds to Tasigna and Gleevec with the following modifications.

Imatinib analogues

- ❖ Lack of N-methylpiperazine incorporated group which is attached to the final phenyl ring of Imatinib
- ❖ Elimination of the substituents at the final phenyl ring and incorporation of different groups at the final phenyl ring
- ❖ Replacement of the amide bond with the urea moiety and introduction of different groups and the final phenyl ring

Nilotinib analogues

- ❖ Lack of 3-methylimidazole and trifluoro moiety of Nilotinib and incorporation of different substituents at the final phenyl ring
- ❖ Elimination of 3-methylimidazole moiety of Nilotinib and incorporation of a second amide bond via conjugation of a primary amine located at the final phenyl ring with either a chromone acid or coumarin acid.

Besides the mentioned before modifications on the primary structure of Nilotinib and Imatinib, another major aim of the present PhD thesis is to provide a more effective and low cost total improved synthesis for the preparation of the imatinib and nilotinib analogues, compared to the described synthetic process by Novartis. We achieved a higher overall yield and a low cost synthetic process in which all the intermediate compounds and also the final compounds were easily isolated and obtained in higher yields compared to Novartis synthetic process. Finally, the new inhibitors were purified with column chromatography, considering that it is obligatory a high purity of them in the biological tests and were fully characterized by IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectroscopy and high resolution mass spectrometry (ESI-HRMS).

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- **An optimized approach in the synthesis of Imatinib intermediates and its analogues**
M. Kinigopoulou, M. Filippidou, M. Gogou, A. Giannousi, P. Fouka, N. Ntemou, D. Alivertis, C. Georgis, A. Brentas, V. Polychronidou, P. Voulgari, V. Theodorou and K. Skobridis, The Royal Society of Chemistry 2016, RSC Advances, 2016, 6, 61458–61467
- **Molecular requirements for the expression of antiplatelet effects by synthetic structural optimized analogues of the anticancer drugs imatinib and nilotinib.**
Pantazi, D., Ntemou, N., Brentas, A., Alivertis, D., Skobridis, K., and Tselepis, A. D., Drug Design, Development and Therapy 2019: 13 4225-4238
- **Mild alkaline hydrolysis of hindered esters in non-aqueous solution**
Vassiliki Theodorou, Michalis Alagiannis, Nikoleta Ntemou, Alexios Brentas, Pinelopi Voulgari, Vasiliki Polychronidou, Marina Gogou, Marios Giannelos, and Konstantinos Skobridis, Arkat, USA, Arkivoc 2018, part vii, 308-319

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	13
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	15
ABSTRACT	17
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	19
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 2	29
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ.....	35
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	35
ΣΧΗΜΑ 1I: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ABL ΚΑΙ ΤΟΥ GLIVEC Ή IMATINIB	37
ΣΧΗΜΑ 1II: Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ IMATINIB	37
1.2 ΣΚΟΠΟΣ	38
2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες.....	41
2.2 Οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών	43
2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης.....	45
2.3.1 Υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (RKTs)	47
2.3.2 Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRTKS)	56
2.4 Πρωτεϊνικές κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης	59
2.4.1 Πρωτεϊνική κινάση Σερίνης/Θρεονίνης A (c-AMP)	59
2.4.2 Πρωτεϊνική κινάση Σερίνης/Θρεονίνης C (PKC).....	60
2.4.3 Πρωτεϊνική κινάση Σερίνης/Θρεονίνης RAF	62
2.4.4 Άτυπες Πρωτεϊνικές Κινάσες (aPKs).....	63
2.5 ADP Ριβοζυλίωση	64
2.6 Η οικογένεια των PARP	65
2.6.1 Δομή της PARP-1	67
2.6.2 Βιολογικές Δράσεις	69
2.7 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	74
2.8 Αναστολείς των PARPs	79
2.8.1 Επιδιόρθωση μέσω εκτομής βάσης.....	80
2.8.2 Παγίδευση των PARPs.....	81
2.8.3 Δέσμευση των αναστολέων PARP-1 στη θέση δέσμευσης του NAD+.....	82
2.9 Συνθέσεις Αναστολέων	84
2.9.1 1 Imatinib (Gleevec)	84

2.9.1.2	Σύνθεση του Imatinib.....	87
2.9.2.1	Nilotinib (Tasigna)	90
2.9.2.2	Σύνθεση του Nilotinib	91
2.9.3.1	Dasatinib(SPRYCEL)	94
2.9.3.2	Σύνθεση του Dasatinib	96
2.9.4.1	Ponatinib (AP24534)	97
2.9.4.2	Σύνθεση του Ponatinib (AP24534).....	99
2.9.5	Σύνθεση του Bosunitib (Bosulif).....	100
2.9.6.1	Rucaparib (Rubraca).....	102
2.9.6.2	Φαρμακευτική Χημική Πορεία για το Rucaparib (Agouron and Cancer Research).....	104
2.9.6.3	Εναλλακτικές συνθετικές πορείες του Rucaparib.....	106
2.9.7	Olaparib (Lynparza)	109
2.9.8	Niraparib (Zejula).....	110
3	ΣΥΣΤΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	113
3.1	Μία σύντομη ανασκόπηση	113
3.2	Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων.....	119
3.3	Σχεδιασμός νέων αναστολέων με προγράμματα μοριακής μοντελοποίησης	124
3.4	Σύνθεση β-εναμιμόνης.....	124
3.4.1	Αντιδράσεις και μηχανισμοί κατά τη σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο) προπ-2-εν-1-όνης.....	124
3.4.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα της β εναμιμόνης.....	126
3.5	Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα-φασματοσκοπικά δεδομένα	131
3.5.1	Αντιδράση σύνθεσης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.....	131
3.5.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.....	131
3.6	Σύνθεση φαινυλαμινοπυριμιδίνης	133
3.6.1	Αντιδράσεις και μηχανισμοί κατά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης.....	133
3.7	Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος	134
3.7.1	Αντίδραση και μηχανισμός σχηματισμού του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος	134
3.7.2	Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος.....	137
3.8	Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος.....	140

3.8.1 Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος	140
3.8.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος	141
3.9 Σύνθεση τελικών προϊόντων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό, αναλόγων του Nilotinib..	143
3.9.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης τελικών προϊόντων.....	143
3.9.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα των τελικών ενώσεων/αναλόγων του Nilotinib	148
3.10 Σύνθεση τελικών προϊόντων-αναλόγων του Imatinib	157
3.11 Βελτιστοποιήσεις/Διαφοροποιήσεις στη συνθετική πορεία των αναλόγων του Imatinib	161
3.12 Μοριακή Μοντελοποίηση των νέων αναλόγων, εν δυνάμει αναστολέων του Nilotinib..	162
3.13 Βιολογικά αποτελέσματα των νέων εν δυνάμει αναστολέων, αναλόγων του Nilotinib και Imatinib με αντιθρομβωτική δράση	176
3.14 Εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος του Rucaparib.....	180
3.14.1 1 ^η σχεδιασθείσα εναλλακτική πορεία σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib.....	181
3.14.2 2 ^η σχεδιασθείσα εναλλακτική πορεία σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib.....	184
3.14.3 3 ^η σχεδιασθείσα εναλλακτική πορεία σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib.....	187
3.14.4 Βελτιστοποίηση/Τροποποίηση του σταδίου διάνοιξης και αποκαρβοξυλίωσης του οξέος Meldrum-στάδιο c.....	190
3.15 Προκλήσεις προβλήματα στο στάδιο ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel-Crafts.	192
3.16 Εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του τρικυκλικού ενδιάμεσου VIII	195
3.16.1 Προσάρτηση διαφόρων λειτουργικών ομάδων στη 2-θέση του ινδολικού δακτυλίου χωρίς τη μεσολάβηση προστασίας του ινδολικού αζώτου	195
3.16.2 Προστασία του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου μέσω της 2,2-διμεθυλοπροπανοϊκής προστατευτικής ομάδας	198
3.17 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5- {(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónης (ένωση I)	200
3.17.1 Αντίδραση σύνθεσης της 5-{(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónης και μηχανισμός αντίδρασης	200
3.17.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-{(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónης (ένωση I).....	202
3.18 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-{(2-βρωμο-6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónης (ένωση II)	205
3.18.1 Αντίδραση σύνθεσης της 5-{(2-βρωμο-6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónης και μηχανισμός αντίδρασης	205

3.18.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónης (ένωση II)	206
3.19 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης μεθυλεστέρα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού οξέος (ένωση III)	208
3.19.1 Αντίδραση σύνθεσης του μεθυλεστέρα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού οξέος και μηχανισμός αντίδρασης	208
3.19.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεθυλεστέρα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος III.....	210
3.20 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος (ένωση IV)	211
3.20.1 Αντίδραση σύνθεσης του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος	211
3.20.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος.....	212
3.21 Αντιδράσεις κυκλοποίησης του υποστρώματος 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος IV και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης VI.....	214
3.21.1 Αντιδράσεις κυκλοποίησης του υποστρώματος 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος IV.....	214
3.21.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 6-φθορο-2,3-διϋδροκυκλοπεντα[α]ινδεν-1-(8Η)-όνης VI.....	215
3.22 Δοκιμαστικές αντιδράσεις σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1Η-ινδολ-3-υλο)-3- προπανοϊκού οξέος VII.....	217
3.23 Βελτιστοποίηση της αντίδρασης σύνθεσης του 6-φθορο- 2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VIII και φασματοσκοπικά δεδομένα	220
3.23.1 Αντίδραση σύνθεσης του 6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)- 1Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VIII	220
3.23.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VIII	223
3.24 Αντίδραση υδρόλυσης της ένωσης VIII και φασματοσκοπικά δεδομένα	224
3.24.1 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1-Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VIV	224
3.24.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1-Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VIV.....	225
3.25 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης των υποστρωμάτων VIII και VIV	226
3.26 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (2-(4-((1,3διαθειαν-2-υλο)μεθυλο)φαινυλο)-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VVI και φασματοσκοπικά δεδομένα	228
3.26.1 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (2-(4-((1,3διαθειαν-2-υλο)μεθυλο)φαινυλο)-6-φθορο-1Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα	228

3.26.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-(4-((1,3διαθειαν- 2-υλο)μεθυλο)φαινυλο)-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα	230
3.27 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel-Crafts της ένωσης VVI.....	231
3.28 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-1-πιβαλοϋλ-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VVII και φασματοσκοπικά δεδομένα.....	232
3.28.1 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-1-πιβαλοϋλ-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VVII	232
3.28.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (6-φθορο-1-πιβαλοϋλ-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VVII	233
3.29 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel Crafts του υποστρώματος VVII .	235
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	237
4.1 Συσκευές και όργανα	237
4.2 Αντίδραση σύνθεσης β-εναμινόνης.....	237
4.2.1 Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο) προπ-2εν-1-όνης (1).....	237
4.3 Σύνθεση 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα.....	238
4.3.1 Σύνθεση 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (2)	238
4.4 Αντιδράσεις σχηματισμού υδροχλωρικών αλάτων του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα	239
4.4.1 Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (3)	239
4.5 Αντιδράσεις σχηματισμού υδροχλωρικού άλατος του 2-μεθυλο-5 βενζοϊκού μεθυλεστέρα της γουανιδίνης.....	240
4.5.1 Σύνθεση του 2-μεθυλο-5 βενζοϊκού μεθυλεστέρα της γουανιδίνης (4)	240
4.6 Αντιδράσεις σύνθεσης των φαινυλαμινων-πυριμιδινών	240
4.6.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέως (5)	240
4.7 Αντιδράσεις σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως.....	241
4.7.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6)	241
4.8 Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων-εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (1 ^η κατηγορία).	242
4.8.1 Σύνθεση του N-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (7)	242
4.8.2 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(4-χλωροφαινυλο)βενζαμιδίου (8).....	243

4.8.3 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(3-χλωροφαινυλο) βενζαμιδίου (9)	244
4.8.4 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(2-χλωροφαινυλο)βενζαμιδίου (10).....	246
4.8.5 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(2-φθοροφαινυλο)βενζαμιδίου (11)	247
4.8.6 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(3-νιτροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (12)	248
4.8.7 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(4-νιτροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (13)	249
4.8.8 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (14) .	250
4.9 Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων-εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (2 ^η κατηγορία)	252
4.9.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(5-νιτρο-2-χλωροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (15)	252
4.9.2 Σύνθεση του 4-μεθυλο- N-(4-νιτρο-3-χλωροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (16)	253
4.9.3 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(3-νιτρο-4-χλωροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (17)	254
4.9.4 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλοφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (18).....	255
4.9.5 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(5-νιτρο-2-φθοροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (19)	256
4.9.6 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(3-νιτρο-4-φθοροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (20)	257
4.9.7 Σύνθεση του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (21).....	258
4.9.8 Σύνθεση του N-(4-αμινο-3-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (22).....	259
4.9.9 Σύνθεση του N-(2-μεθυλο-5-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (23)	261
4.10 Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων-εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (3 ^η κατηγορία)	262
4.10.1 Σύνθεση του N-(3-(4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-2-οξο-2H-χρωμενη-3-καρβοξαμιδίου (24)	262
4.10.2 Σύνθεση του N-(3-(4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-οξο-4H-χρωμενη-3-καρβοξαμιδίου (25)	263

4.11 Σύνθεση της 5-((6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3 διοξάνιο-4,6-δiónης (26)	265
4.12 Σύνθεση της 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)- 2,2-διμεθυλο-1,3 διοξάνιο-4,6-δiónης (27)	266
4.13 Σύνθεση της (2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (28)....	267
4.14 Σύνθεση του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέως (29)	268
4.15 Σύνθεση της 6-φθορο-1,2-διϋδροκυκλοπεντα[b]ινδολ-3(4H)-όνης (30)	268
4.15.1 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με Sc(OTf) ₃	268
4.15.2 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με PPA	269
4.15.3 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με Sc(OTf) ₃	270
4.15.4 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με PPA	271
4.16 Σύνθεση του 3-μεθυλο-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού μεθυλεστέρα (31).....	272
4.17 Σύνθεση του 3-μεθυλο-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέως (32).....	273
4.18 Σύνθεση του 3-(2-4-(1,3-διθειανιο-2-υλο)φαινυλο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)προπιονικού μεθυλεστέρας (33)	273
4.19 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού μεθυλεστέρα (34)	274
4.20 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέως (35)	275
4.21 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1-πιβαλοϋλο-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού οξέως (36).....	276
4.22 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1-πιβαλοϋλο-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού χλωριδίου (37)...	277
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	279
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	281
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	297

Πίνακας Εικόνων και Σχημάτων Κεφαλαίου 2

Εικόνα 1: The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy, FATIMA ARDITO, MICHELE GIULIANI, DONATELLA PERRONE, GIUSEPPE TROIANO and LORENZO LO MUZIO, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, **2017**, 40: 271-280.

Εικόνα 2: The Protein Kinase Complement of the Human Genome, G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, Science. **2002** Dec 6;298(5600):1912-3

Εικόνα 3: Mark A. Lemmon, and Joseph Schlessinger, Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases, Cell. **2010** Jun 25;141(7):1117-34.

Εικόνα 4: Kodappully S. Siveen, Kirti S. Prabhu, Iman W. Achkar, Shilpa Kuttikrishnan, Sunitha Shyam, Abdul Q. Khan¹, Maysaloun Merhi, Said Dermime and Shahab Uddin, Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignances and its Targeting by Natural Products, Cancer (**2018**) 17:31

Εικόνα 5: Molecular Cell Biology. 4th edition, Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al.

New York: W. H. Freeman; **2000**.

Εικόνα 6: Molecular Cell Biology. 4th edition, Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al.

New York: W. H. Freeman; **2000**.

Εικόνα 7: MM Moasser, The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis, Oncogene (**2007**) 26, 6469–6487

Εικόνα 8: Robert Roskoski Jr., The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, Pharmacological Research 79 (**2014**) 34– 74

Εικόνα 9: Pierre De Meyts and Jonathan Whittaker, Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design, Nature Reviews Drug Discovery ,**2002**, 1(10):769-83

Εικόνα 10: Andrew Beenken and Moosa Mohammadi, The FGF family: biology, pathophysiology and therapy, Nature Reviews Drug Discovery, **2009**, 8(3):235-53

Εικόνα 11: Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J, Kannan N, Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. Biochim Biophys Acta. **2008** 1784 (1):16-26.

Εικόνα 12: Daria Mochly-Rosen, Kanad Das, and Kevin V Grimes, Protein kinase C, an elusive therapeutic target?, Nat Rev Drug Discov. **2012** Dec; 11(12): 937–957.

Εικόνα 13: Robert Roskoski Jr., RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation, Biochem Biophys Res Commun. 399 (**2010**) 313–317

Εικόνα 14: Protein Kinases: Atypical Protein Kinases, Cell Signaling Technology

Εικόνα 15: Hottiger MO, Nuclear ADP-Ribosylation and Its Role in Chromatin Plasticity, Cell Differentiation, and Epigenetics, *Annu Rev Biochem.*, **2015**, 84:227-63

Εικόνα 16: Haikarainen T, Krauss S, Lehtio L, Tankyrases: structure, function and therapeutic implications in cancer, *Curr Pharm Des.*, **2014**;20(41):6472-88.

Εικόνα 17: Sousa FG, Matuo R, Soares DG, Escargueil AE, Henriques JA, Larsen AK, Saffi J., PARPs and the DNA damage response, *Carcinogenesis*. **2012** Aug;33(8):1433-40.

Εικόνα 18: Langelier MF, Planck JL, Roy S, Pascal JM, Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1, *Science*. **2012** May 11;336(6082):728-32.

Εικόνα 19: Barkauskaite E, Jankevicius G, Ahel I, Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation, *Mol Cell*. **2015** Jun 18;58(6):935-46.

Εικόνα 20: Caldecott KW, Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin, *DNA Repair (Amst)*. **2007**, 6(4):443-53.

Εικόνα 21: Störm CE, Helleday T., Strategies for the Use of Poly (adenosine diphosphate ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Cancer Therapy., *Biomolecules*, **2012**, 2 (4):635-649

Εικόνα 22: Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov Today*. **2016** 21 (1):5-10.

Εικόνα 23: Zhang J, Yang PL, Gray NS, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat Rev Cancer*. **2009** 9(1):28-39.

Εικόνα 24: Zhang J, Yang PL, Gray NS, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat Rev Cancer*. **2009** 9(1):28-39.

Εικόνα 25: Zhang J, Yang PL, Gray NS, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat Rev Cancer*. **2009** 9(1):28-39

Εικόνα 26 : Konecny GE, Kristeleit RS, PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions, *Br J Cancer*. **2016** 8;115(10):1157-1173.

Εικόνα 27: Junko Murai and Yves Pommier, PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers, *Annu. Rev. Cancer Biol*. **2019**. 3:7.1–7.20

Εικόνα 28: Wang YQ, Wang PY, Wang YT, Yang GF, Zhang A, Miao ZH, Wang YQ, An Update on Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors: Opportunities and Challenges in Cancer Therapy, *J. Med. Chem*. **2016**, 59, (21), 9575–9598

Εικόνα 29β: Structure-Based Design of Drugs and Other Bioactive Molecules: Tools and Strategies.

Εικόνα 30: Peng Wu, Thomas E.Nielsen, Mads H.Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2015**, 36, 7, 422-439

Εικόνα 31: Peng Wu, Thomas E.Nielsen, Mads H.Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2015**, 36, 7, 422-439

Εικόνα 32: Peng Wu, Thomas E.Nielsen, Mads H.Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2015**, 36, 7, 422-439

Εικόνα 33: Peng Wu, Thomas E.Nielsen, Mads H.Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2015**, 36, 7, 422-439

Εικόνα 35: Kirby IT, Cohen MS, Small-Molecule Inhibitors of PARPs: From Tools for Investigating ADP-Ribosylation to Therapeutics, *Curr Top Microbiol Immunol.* **2019** ;420:211-231

Σχήμα 1: (a) Zimmermann, J. EP Patent 564,409, 1993. (b) Zimmermann, J. U.S. Patent 5,521,184, 1996. (c) Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B.; Traxler, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 11, 1221

Σχήμα 2: Szczepek W, Luniewski W, Kaczmarek L, Zagrodzki B, Samson Lazinska D, Szele Jewski W (2006) WO Patent 2006071130

Σχήμα 3: M. Kinigopoulou, M. Filippidou, M. Gogou, A. Giannousi, P. Fouka, N. Ntemou, D. Alivertis, C. Georgis, A. Brentas, V. Polychronidou, P. Voulgari, V. Theodorou and K. Skobridis, An optimized approach in the synthesis of imatinib intermediates and analogues, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 61458

Σχήμα 4: Benjamin J. Deadman, Mark D. Hopkin, Ian R. Baxendale and Steven V. Ley, The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**,11, 1766-1800

Σχήμα 5: Benjamin J. Deadman, Mark D. Hopkin, Ian R. Baxendale and Steven V. Ley, The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**,11, 1766-1800

Σχήμα 6: Benjamin J. Deadman, Mark D. Hopkin, Ian R. Baxendale and Steven V. Ley, The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**,11, 1766-1800

Σχήμα 7: Benjamin J. Deadman, Mark D. Hopkin, Ian R. Baxendale and Steven V. Ley, The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**,11, 1766-1800

Σχήμα 8: Benjamin J. Deadman, Mark D. Hopkin, Ian R. Baxendale and Steven V. Ley, The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**,11, 1766-1800

Σχήμα 9: Zou, D.; *et. al.* Bicyclic heteroaryl compounds. WO2007075869A2

Σχήμα 10: Murray, C. K. *et. al.* Crystalline forms of 3-(imidazo[1,2-b] pyridazin-3-ylethynyl)-4-methyl-n-(4-[4-methylpiperazin-1-yl] methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide and its mono hydrochloride salt. WO2014093579A2

Σχήμα 11: Xiao Jia Yin, Guan Hong Xu, Xu Sun, Yan Peng , Xing Ji , Ke Jiang and Fei Li, Synthesis of Bosutinib from 3-Methoxy-4-hydroxybenzoic Acid, *Molecules* **2010**, 15, 4261-4266

Σχήμα 12:WO2005019201A2/US7297795B2, *Org.Process Res. Dev.* **2013**, 17, 500-504

Σχήμα 13-18: Hughes DL. Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib, and Niraparib. *Organic Process Research and Development.* **2017**

I was captured for life by chemistry and by crystals

Dorothy Hodgkin

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος, αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου στις οικονομικά αναπτυγμένες χώρες. Τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν από τα φυσιολογικά, καθώς συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα, εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδιώματος και ενός ενζύμου, της τελομεράσης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας μάζας κυττάρων, τον όγκο. Στους κακοήθεις όγκους, τα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φυσιολογικά, εισβάλλουν στους γειτονικούς ιστούς και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ή της λέμφου είναι δυνατόν να μεταφερθούν σε άλλα σημεία του σώματος και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους, φαινόμενο που ονομάζεται μετάσταση. Εκτιμάται ότι περίπου 9.5 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από καρκίνο το 2018 παγκοσμίως.

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί επιτυχία στη θεραπεία των γυναικολογικών κακοηθειών, τόσο λόγω της προόδου στον τομέα της χειρουργικής επέμβασης, όσο και της ενσωμάτωσης της διεπιστημονικής βοηθητικής θεραπείας. Για δεκαετίες, η επιτυχία της χημειοθεραπείας υπόκειται σε περιορισμούς, δεδομένου ότι χαρακτηρίζεται από μειωμένη εκλεκτικότητα ως προς τα φυσιολογικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να καταδεικνύει κυτταρο-τοξικότητα. Οι αναστολείς των PARPs αποτέλεσαν μια νέα τάξη αντικαρκινικών παραγόντων στο πεδίο της στοχευμένης θεραπείας κατά του καρκίνου. Είναι μια σημαντική κατηγορία ενώσεων/μορίων που έχει πολλούς τομείς ανάπτυξης και εφαρμογών. Υπάρχουν πολλοί αναστολείς των PARPs, που είτε έχουν δείξει δραστηριότητα σε όγκους από μεταλλαγμένα *BRCA1* και *BRCA2* και έχουν ήδη λάβει έγκριση για κλινική θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνων (*rucaparib*, *olaparib*, *niraparib*, *talazoparib*), είτε βρίσκονται σε κλινικές μελέτες (*veliparib*), είτε βρίσκονται σε στάδια ανάπτυξης.

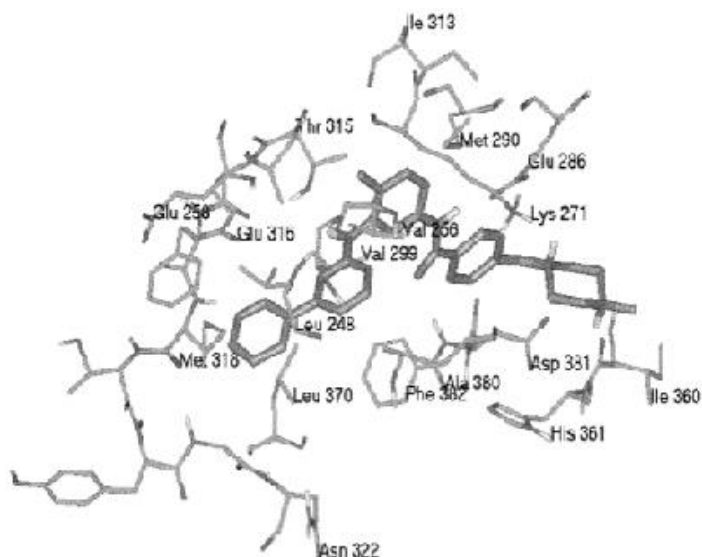
Οι αποκλίνουσες, μη φυσιολογικές οδοί μεταγωγής σήματος συνιστούν την κύρια αιτία καρκινογένεσης. Μεταλλάξεις των μορίων που εμπλέκονται στις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου, όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο, οδηγώντας στην αυτόνομη, μη φυσιολογική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων, που συνοδεύεται από την αντίσταση στην απόπτωση και, κατά συνέπεια, σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό αυτών.

Μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές κινάσες φωσφορυλιώνουν ανεξέλεγκτα πρωτεΐνες, ενεργοποιώντας ανεπιθύμητους μηχανισμούς του κυττάρου, με αποτέλεσμα, εκτός των άλλων, το συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αναστολή της απόπτωσης αυτών και, κατά συνέπεια, τη δημιουργία όγκων.

Σήμερα πλέον, έχει πυροδοτηθεί η αναζήτηση και ανάπτυξη νέων θεραπευτικών οδών, που επωφελούνται από την αυξανόμενη κατανόηση της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων. Οι στοχευμένες θεραπείες, όπως θα αναλυθεί παρακάτω, παρέχουν μια πιο κατευθυνόμενη-εξειδικευμένη προσέγγιση επιδρώντας εκλεκτικά σε στόχους, σε καρκινικά κύτταρα ή στο μικρο περιβάλλον του όγκου. Οι επιστήμονες ανά τον κόσμο έχουν στρέψει το ερευνητικό τους ενδιαφέρον στον ορθολογικό σχεδιασμό και σύνθεση φαρμακευτικών σκευασμάτων για την καταπολέμηση του καρκίνου, μέσω της ανάπτυξης εκλεκτικών αναστολέων των υπεύθυνων πρωτεϊνικών κινασών. Οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν την ανεξέλεγκτη δράση της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης, καθώς είτε δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης-κινάσης, που είναι η θέση πρόσδεσης του ATP, είτε «παγιδεύουν» την πρωτεϊνική κινάση στην ανενεργή της διαμόρφωση. Με αυτό τον τρόπο, ως μιμητές του ATP, καταλαμβάνοντας το ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης, μέσω δημιουργίας ισχυρών αλληλεπιδράσεων, όπως δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων κ.ά. Απενεργοποιούν τη δράση τους προς τα μόρια του ATP, οπότε αποτρέπεται η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης και δεν καθίσταται δυνατή η ενεργοποίηση αυτών.

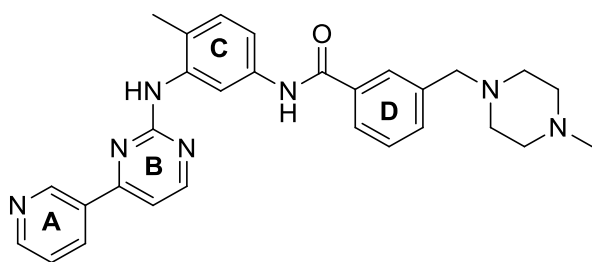
Το πρώτο φαρμακευτικό σκεύασμα Glivec (Imatinib) συντέθηκε από την εταιρία Novartis για την αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML) και είναι ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης. Στο σχήμα 1ί απεικονίζεται η κρυσταλλογραφική δομή καθώς και οι προκύπτουσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεϊνικής κινάσης Abl και του φαρμάκου Glivec που καταδεικνύουν τη δημιουργία ενός εκτενούς και ισχυρού δικτύου δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Η σημασία ανακάλυψης φαρμάκων που δρουν στοχευμένα εναντίον των καρκινικών κυττάρων αποτυπώνεται στο γεγονός ότι από τα 11 αντικαρκινικά φάρμακα που έχουν εγκριθεί ήδη μέσα στο 2019 από τον FDA, τα 10 αξιοποιούνται στη στοχευμένη θεραπεία και μόνο το 1 στη χημειοθεραπεία.



Σχήμα 1i: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κινάσης Abl και του Glivec ή Imatinib

Είναι αξιοσημείωτο, ότι η πρώτη ένωση με ασθενή ανασταλτική δράση κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) που συντέθηκε ήταν μια φαινυλαμινοπυριμιδίνη. Για την αύξηση της ανασταλτικής της δράσης έναντι της κινάσης C, έγιναν πολλές ερευνητικές προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση της μοριακής δομής, αρχικά με την εισαγωγή μιας 3-πυριδίνης στην 4-θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου. Ακολούθως, η προσάρτηση μιας μεθυλομάδας στην 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου (Glivec), δεν είχε την επιθυμητή ανασταλτική δράση κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C, παρουσίασε όμως σημαντική ανασταλτική και εκλεκτική δράση κατά της πρωτεϊνικής κινάσης Bcr-Abl. Πιθανότατα η εισαγωγή μιας μεθυλομάδας (δότη ηλεκτρονίων) στην 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου επέφερε σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου, συνεπώς και στις αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 1ii).

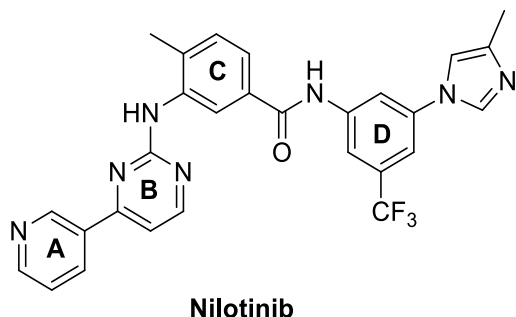


Imatinib

Σχήμα 1ii: Η δομή του Imatinib

Εντούτοις, σε κάποιους ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία μετά από μακροχρόνια θεραπεία με το Glivec, παρατηρήθηκε υποτροπή, λόγω μεταλλάξεων, σε μοριακό επίπεδο, στην περιοχή Bcr-Abl κινάσης, που κατέστησαν ανέφικτη την πρόσδεση της ιματινίβης στο ενεργό

κέντρο της κινάσης. Έτσι, κρίθηκε ζωτικής σημασίας από τους επιστήμονες ο σχεδιασμός και η σύνθεση δεύτερης γενιάς αναστολέων με βελτιστοποιημένη ανασταλτική δράση, όπως το Nilotinib (Tasigna, Σχήμα 1iii).



Σχήμα 1iii: Η μοριακή δομή του Nilotinib

1.2 ΣΚΟΠΟΣ

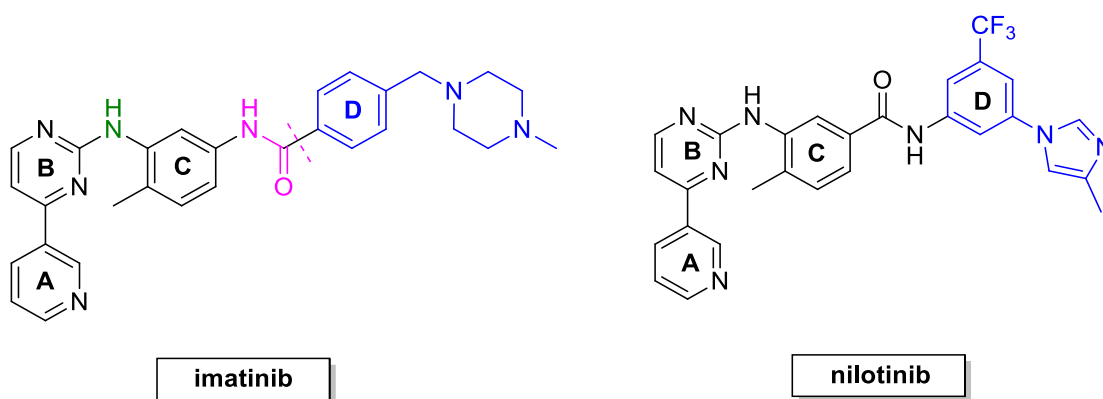
Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών, παραγώγων της φαινυλαμινοπυριμιδίνης, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος των Nilotinib και Imatinib. Έχοντας υπ' όψιν τα βιολογικά αποτελέσματα που κατέδειξαν συνθετικά ανάλογα του φαρμακευτικού παρασκευάσματος του Imatinib με την βέλτιστη ανασταλτική δράση από την προηγούμενη ερευνητική μας ομάδα και σε συνεργασία με το Imperial College, έναντι μίας σειράς πρωτεϊνικών κινασών, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέα φαινυλαμινοπυριμιδικά παράγωγα, ανάλογα των Nilotinib και Imatinib, με τη χρήση και βοήθεια θεωρητικών προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης, στοχεύοντας στα βελτιωμένα τους χαρακτηριστικά, που θα οδηγήσουν σε αυξημένη δραστηριότητα έναντι των μορίων στόχων, ήτοι των μη φυσιολογικών, απορυθμισμένων πρωτεϊνικών κινασών. Οι νέες αυτές ενώσεις, θα σχεδιαστούν θεωρώντας ότι μικρές, επουσιώδεις εκ πρώτης όψεως, αλλαγές της μοριακής δομής των ενώσεων-φαρμάκων, θα μπορούσαν ενδεχομένως να οδηγήσουν σε ουσιαστική αλλαγή της διαμόρφωσης του εκάστοτε εν δυνάμει αναστολέα και, κατά συνέπεια, σε αύξηση της ανασταλτικής του δράσης ή σε πιθανή αναστολή άλλων παθολογικών κινασών.

Ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ότι ο σχεδιασμός βάσει μοριακής μοντελοποίησης, και η σύνθεση ενώσεων, αναστολέων παθολογικών πρωτεϊνικών κινασών, είναι η «αχίλλειος πτέρνα» στην αντιμετώπιση, θεραπεία των νεοπλασιών σε μοριακό επίπεδο, παρέχοντας μια

βελτιστοποιημένη θεραπεία με αποτελεσματικότητα, χαμηλή τοξικότητα και μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής για τους ασθενείς.

Το πρώτο βήμα στο Εργαστήριο είναι ο ορθολογικός σχεδιασμός νέων αναλόγων του Nilotinib και του Imatinib μέσω μιας θεωρητικής προσέγγισης με θεωρητικά προγράμματα μοριακής μοντελοποίησης. Η προσομοίωση μέσω ομολογίας-συγκριτική προσομοίωση (Homology modeling), χρησιμοποιεί γνωστές πρωτεϊνικές δομές ως πρότυπα για τη δημιουργία μοντέλων των υπό σύνθεση άγνωστων δομών. Οι νέες σχεδιασθείσες ενώσεις, ανάλογα φαρμακευτικών σκευασμάτων, θα στηριχθούν στην εισαγωγή κατάλληλων υποκαταστατών (δεκτών ηλεκτρονίων) θεωρώντας πως μικρές, στοιχειώδεις αλλαγές θα επιφέρουν αλλαγή στην διαμόρφωση του εν δυνάμει αναστολέα και συνεπώς αύξηση της ανασταλτικής δράσης σε μία σειρά παθολογικών κινασών.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του φαρμακευτικού σκευάσματος Nilotinib διατηρήθηκαν ανέπαφοι οι δακτύλιοι A, B, C, όπως και ο αμιδικός δεσμός, με την -CO ομάδα να συνδέεται με το δακτύλιο C και την -NH ομάδα να συνδέεται με τον αρωματικό δακτύλιο D. Οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν η προσάρτηση-εισαγωγή διαφορετικών υποκαταστατών στον αρωματικό δακτύλιο D. Όσον αφορά τα παράγωγα του Imatinib, παρέμειναν ανέπαφοι οι δακτύλιοι A, B, C και έγινε προσάρτηση-εισαγωγή διαφόρων υποκαταστατών στον τελικό βενζολικό δακτύλιο D (δεκτών ηλεκτρονίων) και αντικατάσταση του αμιδικού δεσμού με δεσμό ουρίας (σχήμα 1iv).



Σχήμα 1iv: Οι διενεργηθείσες τροποποιήσεις στη δομή του Imatinib και Nilotinib

Παράλληλα με το σχεδιασμό των σχεδιασθεισών ενώσεων, στο ερευνητικό μας Εργαστήριο έχει αναπτυχθεί μια βελτιστοποιημένη προσέγγιση στην Παρασκευή των φαρμακευτικών σκευασμάτων Imatinib και Nilotinib, με λιγότερα βήματα σύνθεσης και αποδοτικότερη παραλαβή των

επιθυμητών ενώσεων, των εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Αξιοποιώντας τη βελτιστοποιημένη συνθετική προσέγγιση, επιτεύχθηκε μια νέα σειρά ενώσεων, βάσει θεωρητικών προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης. Στη συνέχεια, τα παράγωγα αυτά ελέγχθηκαν για την ανασταλτική τους δράση έναντι μιας σειράς παθολογικών πρωτεϊνικών κινασών με βιολογικά πειράματα. Διενεργήθηκαν βιολογικά πειράματα για τη διερεύνηση της αντιθρομβωτικής δράσης μιας σειράς αναστολέων σε αιμοπετάλια και μελετήθηκε/διερευνήθηκε η δράση τους έναντι μιας σειράς ανταγωνιστών. Οι ως άνω ενώσεις-αναστολείς, μιμητές του ATP, ως γνωστόν, προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου Abl, μιας μη-υποδοχικής πρωτεϊνικής κινάσης που προσομοιάζει εν μέρει την ακολουθία-ομολογία αμινοξέων της Src κινάσης, ενός ενζύμου που παίζει κεντρικό ρόλο στη διαμεσολάβηση της ταχείας αντίδρασης των αιμοπεταλίων σε αγγειακές βλάβες.

Πέραν του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμακευτικών-βιοδραστικών ενώσεων, της σύνθεσης και του βιολογικού ελέγχου των νέων βιοδραστικών ενώσεων, αναλόγων του Nilotinib και του Imatinib, επιπρόσθετος στόχος είναι η νέα βελτιστοποιημένη πορεία με λιγότερα στάδια και καλύτερες χημικές αποδόσεις, της ολικής σύνθεσης του Rucaparib, αναστολέα του ενζύμου πολυμεράση της πόλυ-(ADP-ριβόζης) (PARP), με αντικαρκινική δράση. Το Rucaparib είναι ένα πρώτη γραμμής φάρμακο που στοχεύει το ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA, της πολυμεράσης της πόλυ-(ADP-ριβόζης) (PARP-1).

Το εν λόγω φαρμακευτικό σκεύασμα, εγκρίθηκε το Δεκέμβριο του 2016 από το FDA και αποτελεί μια επιπρόσθετη πρόκληση στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, καθώς έχει προταθεί μια νέα βελτιστοποιημένη ολική συνθετική πορεία σε σύγκριση με εκείνη που έχει κατοχυρωθεί από την εταιρία την Clovis Oncology, καθώς και από την εταιρεία Pfizer, όπου η συνολική του απόδοση είναι εξαιρετικά χαμηλή 2.9%, ως απόρροια των πολλών συνθετικών σταδίων (12) που έχουν ακολουθούνται και έχουν κατοχυρωθεί. Στο Εργαστήριό μας, Οργανικής Σύνθεσης, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, έχει σχεδιαστεί μια ολική σύνθεση 8 σταδίων με χαμηλού κόστους αντιδραστήρια και χαμηλής τοξικότητας.

2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες

Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες συνιστούν μια μεγάλη οικογένεια των ομόλογων πρωτεϊνών, ενζύμων της οικογένειας των φωσφοροτρανσφερασών, οι οποίες τροποποιούν άλλες πρωτεΐνες προσθέτοντας σε αυτές χημικά φωσφορικές ομάδες. Οι εν λόγω κινάσες-ένζυμα αποτελούνται από την περιοχή κινάσης, γνωστή και ως καταλυτική περιοχή, η οποία αποτελείται από 250 έως 300 κατάλοιπα αμινοξέων. Η καταλυτική περιοχή των κινασών που καθορίζει αυτή την κατηγορία ενζύμων περιέχει 12 διατηρημένες υπο-περιοχές που “διπλώνουν” σε μια κοινή καταλυτική δομή πυρήνα, στοιχεία που απορρέουν από την τρισδιάστατη δομή πολλών πρωτεϊνικών κινασών σερίνης.^[1] Η περιοχή κινάσης των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών είναι υπεύθυνη για την καταλυτική της δραστικότητα. Τρεις ξεχωριστοί ρόλοι σχετίζονται με την περιοχή κινάσης: α) ο δεσμός και ο προσανατολισμός του ATP ή του GTP της φωσφορικής ομάδας, ως συμπλόκου με τα κατιόντα μαγνητίου ή μαγνησίου β) ο δεσμός και ο προσανατολισμός του υποστρώματος της πρωτεΐνης και γ) η μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP ή GTP στο υδροξυλικό κατάλοιπο της (σερίνης, θρεονίνης, τυροσίνης) του πρωτεϊνικού υποστρώματος.

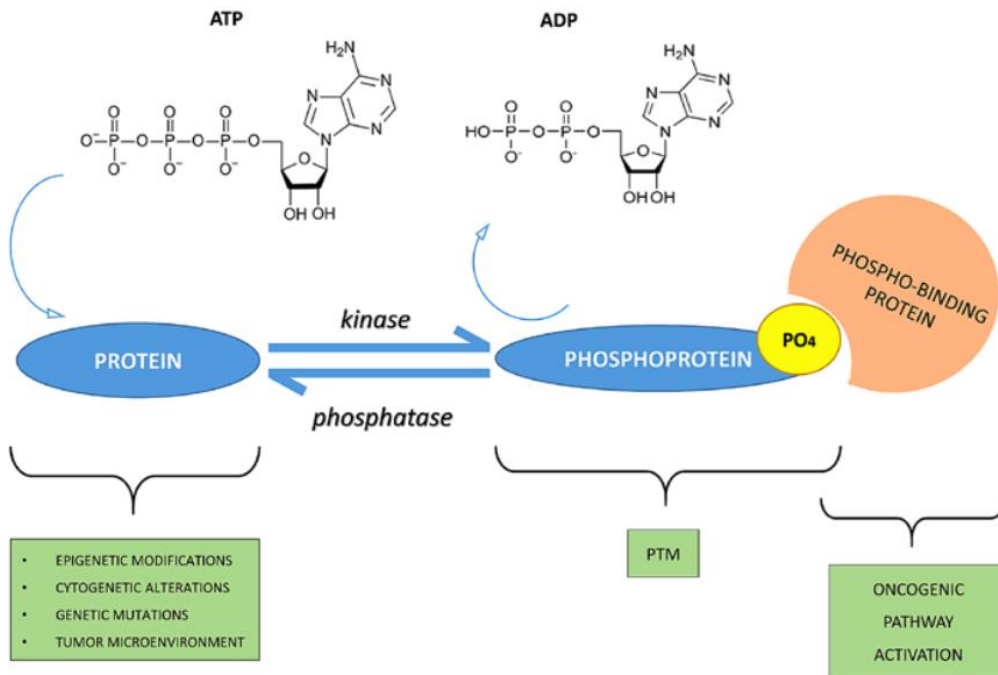
Η ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση που καταλύεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες και πυροδοτείται σε απόκριση από εξωκυττάρια σήματα, παρέχει έναν ενδοκυττάριο μηχανισμό έναρξης ή διακοπής πολυάριθμων βιολογικών διεργασιών. Αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν μεταβολικά μονοπάτια, ενεργοποίηση μονοπατιών, μεταφορά μεμβράνης και μεταγραφή γονιδίων. Η αντίθετη διεργασία, που ονομάζεται αποφωσφορυλίωση και καταλύεται από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες, πυροδοτείται από διαφορετικά ερεθίσματα, προκειμένου η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση να ενεργοποιούνται ξεχωριστά από διαφορετικά σημεία ελέγχου.^[2]

Η λεγόμενη φωσφορυλίωση, που συνίσταται στη μεταφορά της γ- φωσφορικής ομάδας από υψηλής ενέργειας μόρια δότες, όπως το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) ή από το GTP (τριφωσφορική γουανοσίνη), στην υδροξυλομάδα ενός αμινοξέος πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (μόρια δέκτες), συγκεκριμένα, στο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της ιστιδίνης, σερίνης, θρεονίνης, ή τυροσίνης μιας πρωτεΐνης (εικόνα 1). Με αυτό τον τρόπο, τροποποιείται η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης- στόχου, είτε μεταβάλλοντας την ενζυμική της δραστικότητα, είτε αλλάζοντας την κυτταρική θέση της, είτε τη συσχέτισή της με άλλες πρωτεΐνες. Αν και το 2 % των

πρωτεϊνών του ανθρωπίνου γονιδιώματος κωδικοποιείται από πρωτεϊνικές κινάσες,^[3] το 30-50% των πρωτεϊνών υπολογίζεται να φωσφορυλιώνεται^[4] και τροποποιείται από ένζυμα με δραστικότητα κινάσης, ενώ το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 500 κινάσες.^[3] Τα σημαντικότερα κυτταρικά μονοπάτια, όπως ο κυτταρικός κύκλος, ρυθμίζονται από τις πρωτεϊνικές κινάσες και ειδικά εκείνα που σχετίζονται με την μεταβίβαση σημάτων (σηματοδοτικά μονοπάτια).

Η φωσφορυλίωση χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη το ATP και πρόκειται δε για μια γρήγορη, αναστρέψιμη αντίδραση κατά την οποία τροποποιείται η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και καθίσταται κατά κανόνα ενεργή. Με την φωσφορυλίωση αλλάζει η στερεοτακτική διαμόρφωση της πρωτεΐνης, δηλαδή το ενεργό κέντρο ανοίγει ή κλείνει, με αποτέλεσμα κάποιο μόριο προσαρμογής να δεσμεύεται ή να αποδεσμεύεται, με συνεπακόλουθο να ενεργοποιούνται και άλλες αντιδράσεις. Κατά αυτόν τον τρόπο, ενεργοποιούνται οι οδοί μεταγωγής σήματος. Η θέση της πρωτεΐνης στο κύτταρο μπορεί να αλλάξει με την φωσφορυλίωση, καθώς τροποποιείται το σχήμα της, και της επιτρέπει να μετακινηθεί προς τον πυρήνα, καθιστώντας την πιο δραστική προς την πρωτεΐνη-στόχο.

Σύμφωνα με τη χαρτογράφηση του ανθρωπίνου γονιδιώματος, από τις 518 γνωστές πρωτεϊνικές κινάσες, πέραν των μεταλλαγμένων, την πλειοψηφία αυτών αποτελούν οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης (385), οι οποίες φωσφορυλιώνουν την υδροξυλική ομάδα της πλάγιας αλυσίδας των αμινοξέων σερίνης ή θρεονίνης (αμινοξέα με παρόμοια δομή). Η δεύτερη μεγάλη ομάδα αποτελείται από τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (90), οι οποίες υποδιαιρούνται σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (32) και αυτές οι οποίες σχετίζονται με διαμεμβρανικούς υποδοχείς (58).^[5]



Εικόνα 1: Κυτταρική σηματοδότηση. Ο μηχανισμός της φωσφορυλίωσης συνίσταται από κινάσες, φωσφατάσες. Και από υποστρώματα πρωτεΐνης με φωσφορική ομάδα. Για παράδειγμα, η φωσφορυλίωση πυροδοτείται από το ερεθίσματα, όπως επιγενετική τροποποίηση, γενετικές και κυτταρογενετικές μεταλλάξεις ή από το μικροπεριβάλλον του όγκου. Συνεπώς, η πρωτεΐνη δέχεται μια φωσφορική ομάδα από την υδρόλυση του, που οφείλεται στην ενζυματική δραστηριότητα της κινάσης. Αυτός είναι ο μηχανισμός της μεταγραφικής τροποποίησης. Επιπρόσθετα, η φωσφορυλίωση, είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία και η αντίστροφη διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης καταλύεται από τις φωσφατάσες. Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση είναι ένας μοριακός διακόπτης και συγκεκριμένα, η μεταγραφική τροποποίηση μπορεί να δώσει το έναυσμα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού σχηματισμού ογκογονιδίου από ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης με φωσφορική ομάδα που προσδέεται στην φωσφορική ομάδα της φωσφοπρωτεΐνης.

2.2 Οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών

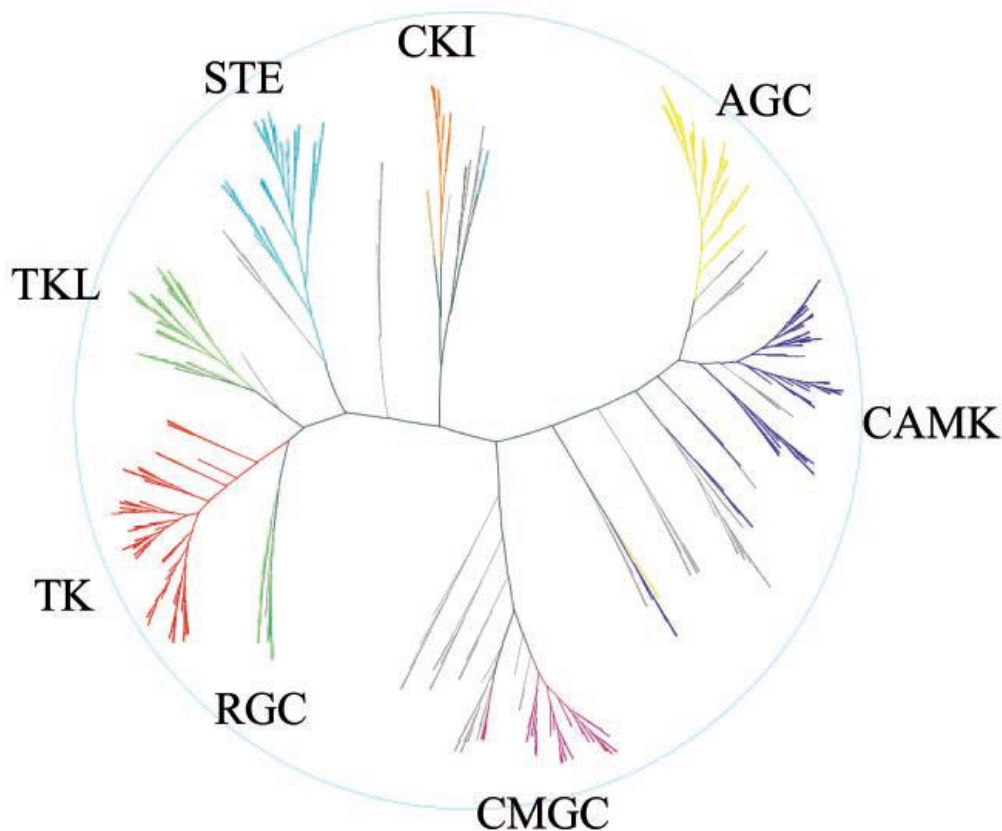
Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι από τις μεγαλύτερες οικογένειες ενζύμων στα ευκαρυωτικά κύτταρα και έχουν αποτελέσει εκτεταμένο αντικείμενο μελέτης, ενώ η μετάλλαξη και η απορύθμισή τους συνδέεται άρρηκτα με ασθένειες. Τα εν λόγω ένζυμα αποτελούν στόχους φαρμάκων για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών με ανάπτυξη αγωνιστών και ανταγωνιστών. Ο Manning και άλλοι^[6] ανέφεραν ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα που κωδικοποιεί πρωτεϊνικές κινάσες αποτελείται από 518 γονίδια και σε αυτή την κατηγορία συγκαταλέγονται 106 ψευδογονίδια.

Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (erk) κωδικοποιούνται από 478 γονίδια και 40 άτυπα γονίδια για τον προαναφερόμενο συνολικό αριθμό των 518 γονιδίων. Οι 478 πρωτεϊνικές κινάσες ταξινομούνται σε 9 κύριες ομάδες, χαρακτηριζόμενες ως TK, TKL, STE, CSNK1, AGC, CAMK, CMGC,

RGC και others. Οι τελευταίες είναι ξεχωριστή υποοικογένεια που δεν εμπίπτει σε καμία προηγούμενη ομάδα. Στο παρακάτω δένδρογραμμα (εικόνα 2) κατηγοριοποιούνται οι ξεχωριστές οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών. Εκτός από τις ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες, υφίστανται επιπλέον 40 άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (apks)^[6]. Μία από αυτές είναι αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Αναφέρθηκε από τον Linn και άλλους^[7], ότι αναστέλλεται από την φωσφορυλίωση, ενώ η αντίστροφη διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης από τις φωσφατάσες είχε ως αποτέλεσμα την αναστροφή της αναστολής και την ενεργοποίηση της. Η ομάδα των aPKs περιλαμβάνει λιγότερες πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες ταξινομούνται σε 4 κύριες οικογένειες: Alpha, PIKK, PDHK, RIO. Κάθε οικογένεια, όπως και στις ePK κινάσες, υποδιαιρείται σε αρκετές κατηγορίες και υποκατηγορίες.

Η ταξινόμηση των κινασών σε οικογένειες ποικίλει ανάλογα με το κριτήριο διαφοροποίησης. Ο διαχωρισμός των κινασών, έγινε με βάση την ομοιότητα που εμφανίζουν στην καταλυτική περιοχή, την ύπαρξη άλλων συμπληρωματικών περιοχών στη δομή τους και τις βιολογικές λειτουργίες. Τέλος, οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα ιστιδίνης, σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης.

Θα δοθεί έμφαση και θα γίνει αναφορά στις πιο συχνά απαντώμενες πρωτεϊνικές κινάσες, καθώς ο αριθμός τους είναι ιδιαίτερα μεγάλος.



Εικόνα 2: Δενδρόγραμμα των 491 των *erks* πρωτεϊνικών κινασών που κωδικοποιούνται από τα 478 γονίδια. Οι κύριες ομάδες αποτυπώνονται με κόκκινο χρώμα.

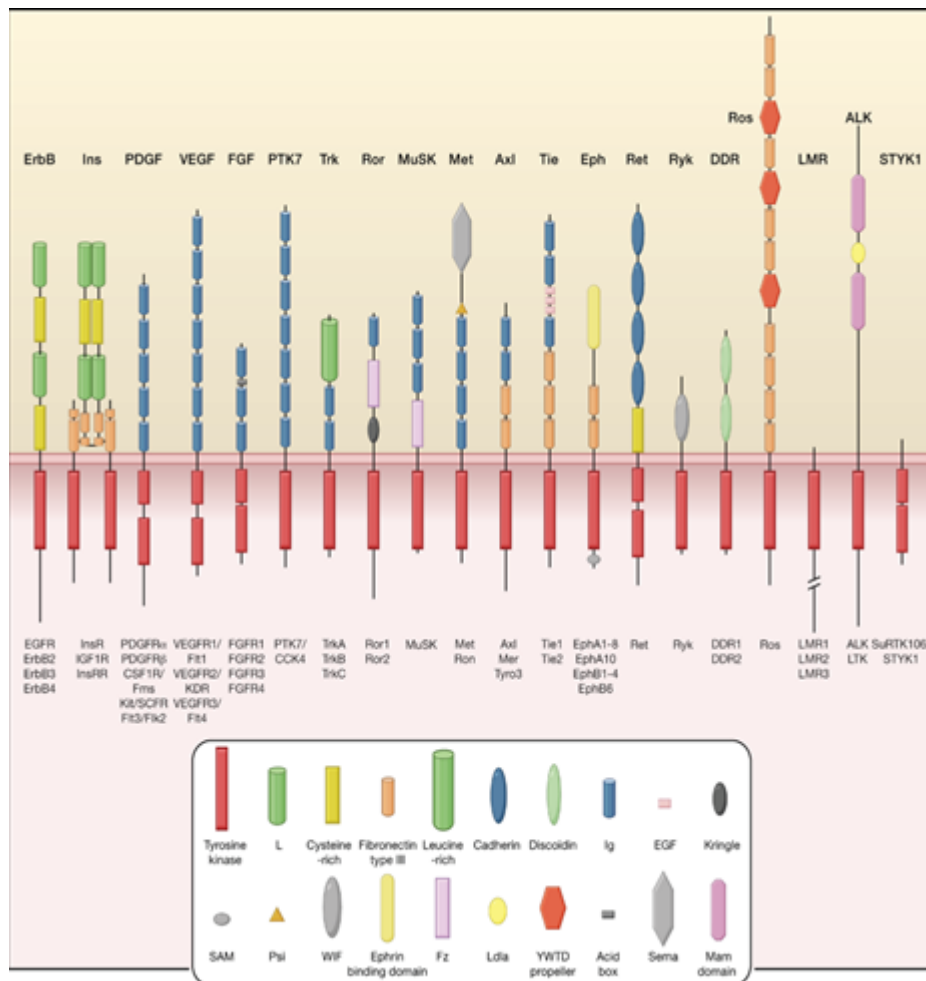
2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (tyrosine kinases, TKs) φωσφορυλιώνουν το φαινολικό υδροξύλιο της τυροσίνης, συμμετέχουν ευρύτατα στην ενδοκυτταρική μετάδοση μηνυμάτων και οδηγούν τα κύτταρα στον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, μετανάστευση, ακόμα και στην απόπτωση τους.^[7] Η ομάδα των TK (τυροσυλο-κινασών) αποτελείται από 90 μέλη, και περιλαμβάνει 58 υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες (EGFR, FGFR, FIT, insulin R, PDGFR) και 32 μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες (Abl, Eph, Jak, Src).^[8] Οι υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης είναι γνωστές ως RKTs, και οι μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες, συμβολίζονται ως NRKTs. Τέλος, οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες ταξινομούνται περαιτέρω σε είκοσι υποοικογένειες (εικόνα 3), ενώ οι μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες σε δέκα υποοικογένειες (εικόνα 4).

Η φωσφορυλίωση τυροσινικών καταλοίπων έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας και τη δημιουργία σημείων πρόσδεσης για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση. Δυο κατηγορίες των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης (PKTs) απαντούν στα κύτταρα και παρατίθενται παρακάτω.^[9]

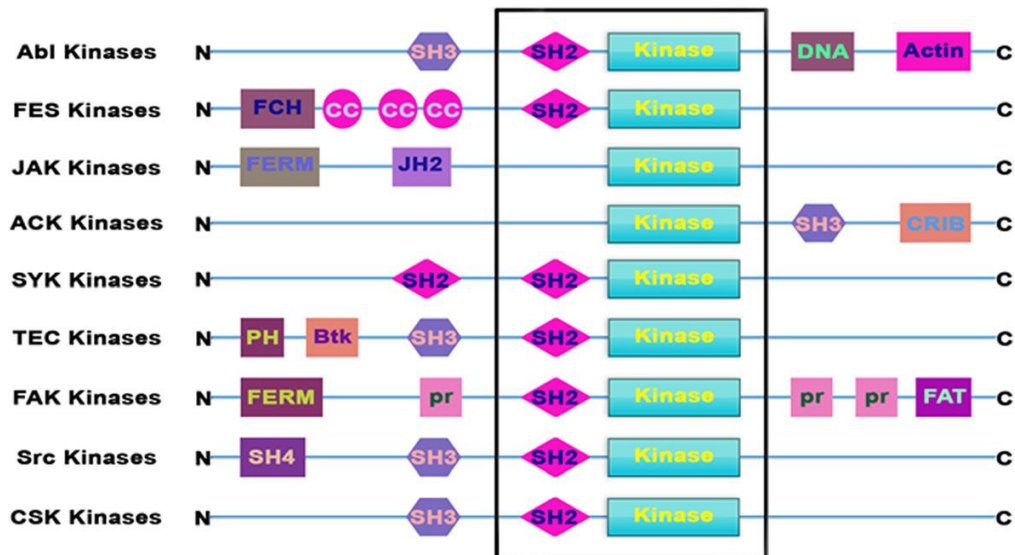
- Οι διαμεμβρανοί υποδοχείς με δραστικότητα τυροσινικής κινάσης
- Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης και, για αυτό τον λόγο, η ενζυμική δραστηριότητά τους ελέγχεται αυστηρά, ενώ η απορύθμιση τους σχετίζεται άρρηκτα με διάφορες ασθένειες, όπως ο καρκίνος και οι φλεγμονώδεις διαταραχές.^[7]



Εικόνα 3: Οικογένεια των υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών

Οι κινάσες τυροσίνης ανθρώπινων υποδοχέων (RTKs) περιέχουν 20 υποοικογένειες, που παρουσιάζονται σχηματικά, με τα μέλη της οικογένειας να παρατίθενται κάτω από κάθε υποδοχέα. Οι ενδοκυτταρικές περιοχές εμφανίζονται ως κόκκινα ορθογώνια.

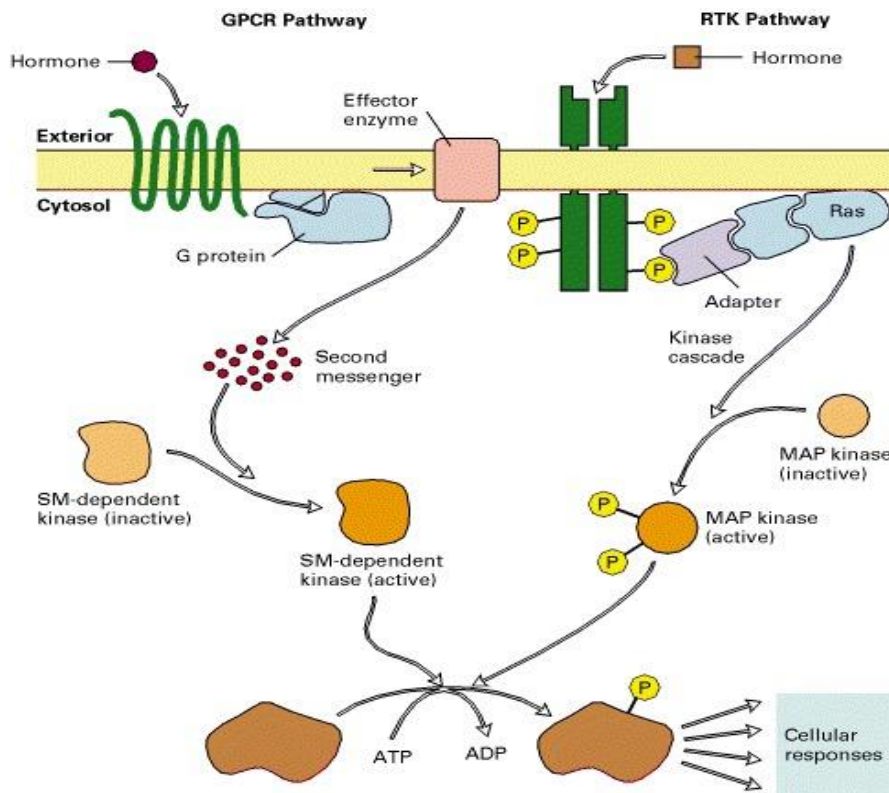


Εικόνα 4: Η κατηγοριοποίηση των μη υποδοχικών πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης (NRKs) σε 10 υποοικογένειες

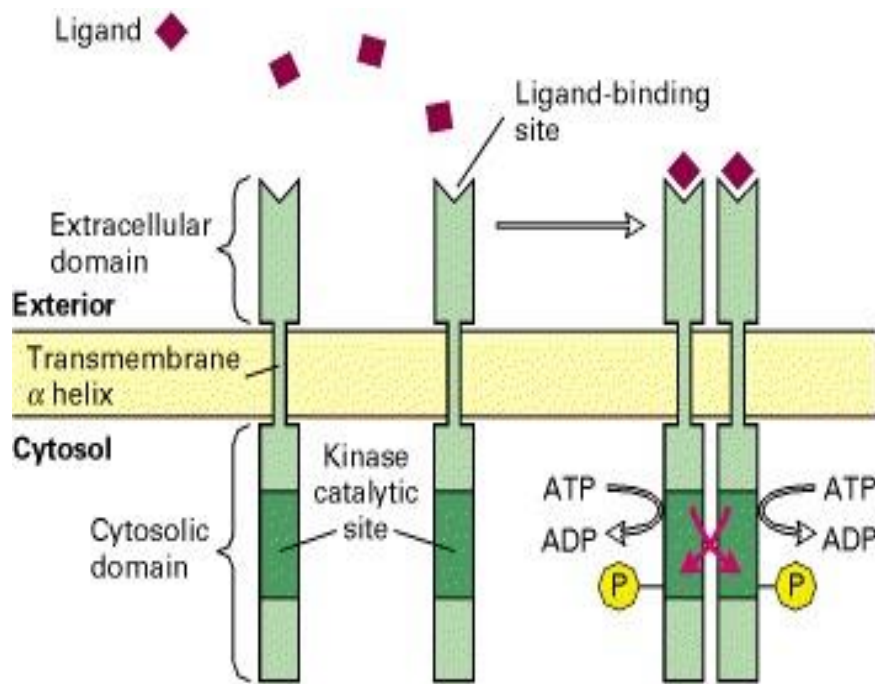
2.3.1 Υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (RKTs)

Ο συνολικός αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες υπολογίζεται να είναι περίπου 1000.^[10] Οι υποδοχικές πρωτεΐνες (RKTs) αποτελούν το 10% του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνικών κινάσων στον άνθρωπο^[5] και είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι εμφανίζονται στην εξωκυττάρια επιφάνειά τους, θέσεις πρόσδεσης για εξωκυττάριους προσδέτες. Όλες οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες διαθέτουν μια εξωκυττάρια περιοχή που αποτελεί το σημείο πρόσδεσης μια μονή διαμεμβρανική υδροφοβική α έλικα και μια κυτοσολική περιοχή με πρωτεϊνική δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Η πρόσδεση του υποκαταστάτη-προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα τον διμερισμό των περισσότερων υποδοχικών πρωτεϊνικών κινάσων.^[11] Με αυτόν τον τρόπο, πυροδοτείται η δραστηριότητα του υποδοχέα πρωτεϊνικής τυροσινικής κινάσης που περαιτέρω διεγείρει το μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης, τροποποιώντας την κυτταρική φυσιολογία και την γονιδιακή έκφραση (εικόνα 5). Μετά το διμερισμό, κάθε μονομερές του υποδοχέα με δράση τυροσυλοκινάσης φωσφορυλιώνει ξεχωριστά ένα ζευγάρι τυροσινικών καταλοίπων στη κυτοσολική περιοχή του διμερούς, μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοφωσφορυλίωση (εικόνα 6). Η αυτοφωσφορυλίωση πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Πρώτα τα τυροσινικά κατάλοιπα κοντά στο καταλυτικό κέντρο φωσφορυλιώνονται, με αποτέλεσμα μία αλλαγή της διαμόρφωσης που παρέχει τη δυνατότητα πρόσδεσης του ATP (π.χ. υποδοχέας της ινσουλίνης) και πρόσδεση της πρωτεΐνης σε άλλους υποδοχείς (FGF υποδοχέας). Έπειτα ο υποδοχέας τυροσυλοκινάσης φωσφορυλιώνει άλλα σημεία-κατάλοιπα στην κυτοσολική περιοχή που δρουν ως σημεία πρόσδεσης για άλλες πρωτεΐνες-στόχους, συμπεριλαμβανομένης και της

RTK-κυτταρικής σηματοδότησης. Τα φωσφορυλιωμένα τυροσινικά κατάλοιπα σε ενεργές υποδοχικές τυροσινικές κινάσες αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες-συνδέτες που περιέχουν SH2 ή PTB περιοχές. Τέλος, αυτές οι πρωτεΐνες συνδέουν τους ενεργοποιημένους υποδοχείς σε άλλους κυτταρικούς στόχους της κυτταρικής σηματοδότησης.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των κοινών μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης από τη συζευγμένη *g* πρωτεΐνη με υποδοχέα (GPCRs) και υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης (RTKs)



Εικόνα 6: Η γενική δομή και ενεργοποίηση των υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών (RTKs)

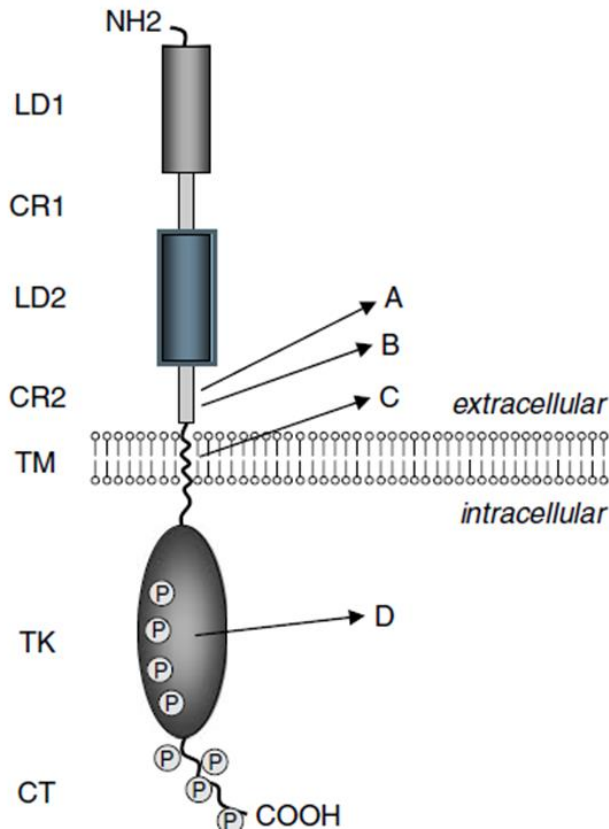
Τέλος, οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης, με βάση τη δομή τους, κατατάσσονται σε 2 υποκατηγορίες:

- Τους μονομερείς υποδοχείς (EGF, NGF, PDGF, κ.ά)
- Τους πολυμερείς υποδοχείς (υποδοχέας της ινσουλίνης)

Οι πιο συχνά εμπλεκόμενοι αντιπρόσωποι των δύο αυτών υποκατηγοριών θα αναφερθούν εν συντομία παρακάτω.

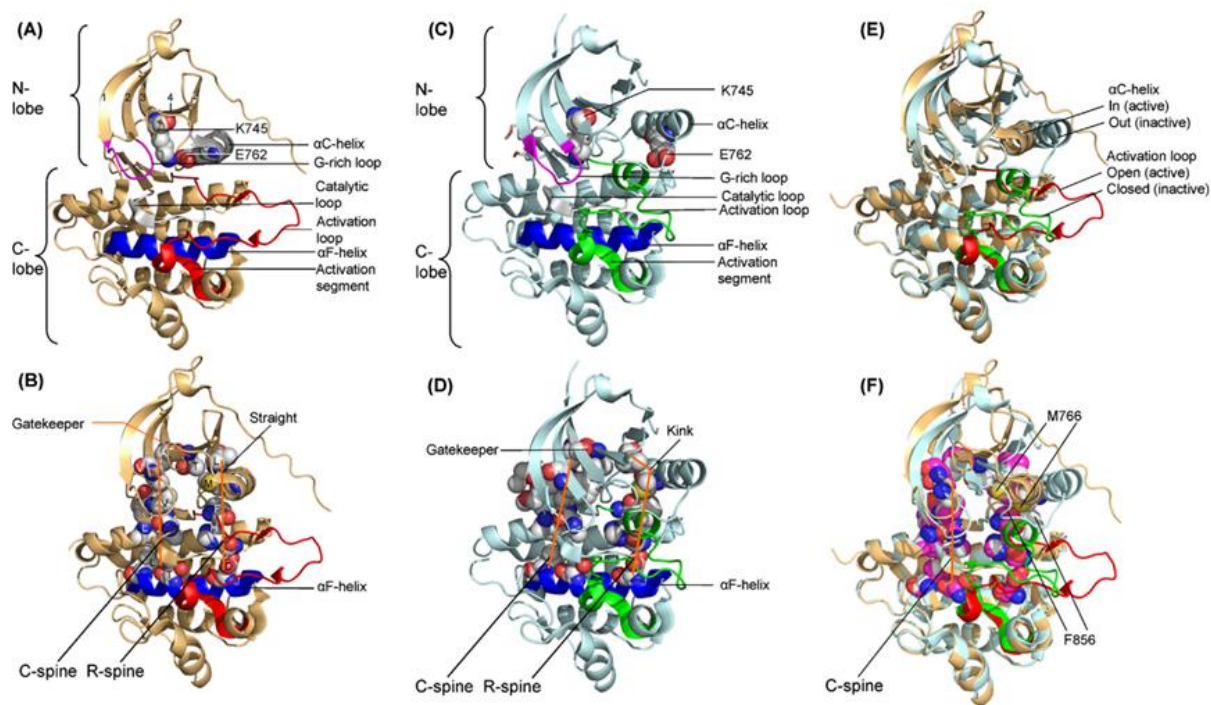
Υποδοχέας επιδερμικών αυξητικών παραγόντων HER1 ή EGF-R

Η οικογένεια των ERbB/HER πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών, που περιλαμβάνει τον υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), έχει μελετηθεί εκτεταμένα για τη σημασία τους στην κυτταρική σηματοδότηση στην επιστήμη της βιολογίας.^[12] Οι ανθρώπινοι υποδοχείς EGF αποτελούνται από τέσσερα μέλη (HER1/EGFR, HER2/ Neu, HER3, HER4) και ανήκουν στην οικογένεια των ERbB (ERbB1, ERbB2, ERbB3, ERbB4) πρωτεϊνών αντίστοιχα.^[13] Η δομή των υποδοχέων επιδερμικού αυξητικού παράγοντα αποτελείται από μία γλυκοζυλιωμένη εξωκυττάρια περιοχή, ένα μόνο διαμεμβρανικό υδροφοβικό τμήμα, μια ενδοκυττάρια περιοχή με παραμεμβρανικό τμήμα, την περιοχή πρωτεϊνικής κινάσης και ένα καρβοξυτελικό άκρο (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Η δομή των HER και Neu πρωτεϊνών

Το 2007 αποτέλεσε έτος ορόσημο για τη μελέτη του εν λόγω υποδοχέα, καθώς αποδείχθηκε ότι ο υποδοχέας HER2 εμπλεκόταν στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού.^[14] Ο ρόλος του EGFR στην ανάπτυξη ποικίλων ανθρώπινων κακοηθειών έχει εν μέρει αποσαφηνιστεί, ενώ αναμφίβολα παίζει σημαντικό ρόλο στα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης των καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς, ο EGFR έχει αποτελέσει τον καλύτερο στόχο αντικαρκινικής θεραπείας και μελετάται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια.^[15] Ο EGFR δεν μπορεί σαν μονάδα να συνδράμει στην κυτταρική επιβίωση, αλλά μπορεί να λειτουργήσει ως αισθητήρας στην κυτταρική σηματοδότηση για τον έλεγχο της κυτταρικής απόπτωσης. Το εξωκυττάριο τμήμα του EGFR αποτελείται από μία μονή υδροφοβική διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή, στην οποία εντοπίζεται η θέση πρόσδεσης της τυροσινικής κινάσης.^[16] Η ρύθμιση των εξαρτωμένων από τον EGFR μονοπατιών μπορεί να τροποποιηθεί σε πολλά και διαφορετικά επίπεδα-σημεία κατά τη διάρκεια της μελέτης κατά του καρκίνου και αποτελεί μια εύχρηστη και ευέλικτη προσέγγιση στην ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων στη θεραπεία αυτού.

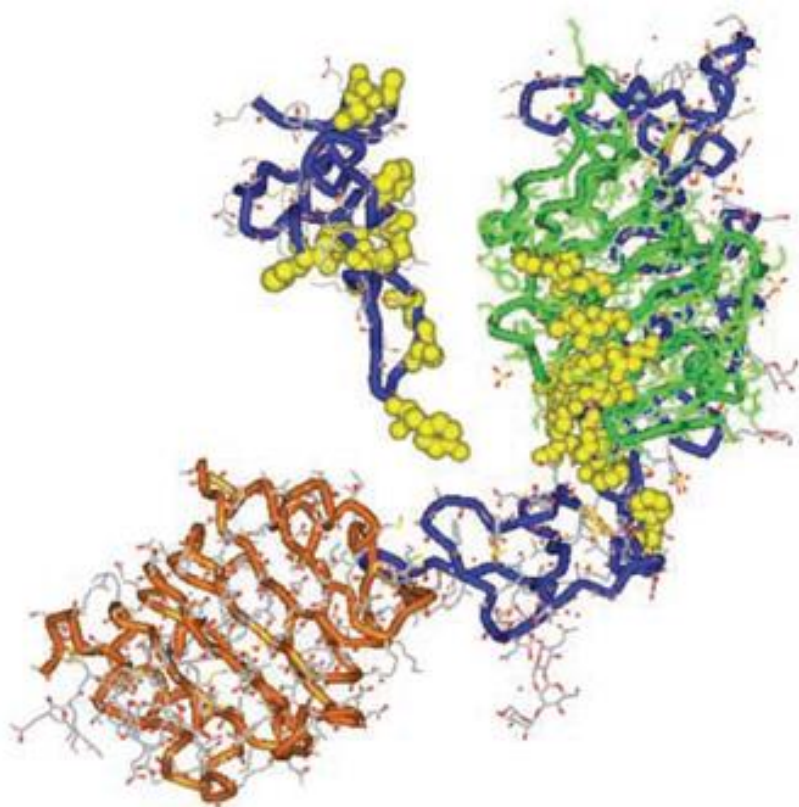


Εικόνα 8: Οι δομές των ενεργών και ανενεργών των ανθρωπίνων EGFR πρωτεϊνικών κινασών **(A)** Ενεργή EGFR (οι Lys745 και Glu762 πλησιάζουν το σημείο ενεργοποίησης στην ανοιχτή διαμόρφωση) **(B)** Οι σκελετοί των EGFR, όπως απεικονίζονται στο A. **(C)** Ανενεργή EGFR. (Οι Lys745 και Glu762 δεν πλησιάζουν το σημείο ενεργοποίησης, καθώς είναι στην κλειστή διαμόρφωση). **(D)** Οι σκελετοί των ανενεργών EGFR, όπως απεικονίζονται στο C. **(E)** Η υπέρθεση των ενεργών και μη ενεργών πρωτεϊνών. **(F)** Η υπέρθεση των σκελετών των ενεργών και μη ενεργών πρωτεϊνών.

Υποδοχές των αυξητικών παραγόντων της ινσουλίνης (IGF-1R και IGF-2R)

Η οικογένεια των IGFs (insulin like growth factors) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, απόπτωση, διαφοροποίηση και μετασχηματισμό.^[17] Το σύστημα του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης IGF περιλαμβάνει τους ινσουλινόμορφους αυξητικούς παράγοντες IGF1 και IGF2, μαζί με τους αντίστοιχους επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς IGF-1R και IGF-2R, τον υποδοχέα ινσουλίνης IR και ρυθμιστικές πρωτεΐνες συζευγμένες με αυξητικούς παράγοντας της ινσουλίνης, όπως αναφέρθηκε από τον Denley και άλλους επιστήμονες το 2005.^[18] Οι υποδοχείς των IGF1 και IGF2 είναι γλυκοπρωτεΐνες με δράση τυροσινικής κινάσης (RTKS). Από τη γονιδιακή ανάλυση, συνάγεται ότι ο υποδοχέας του αυξητικού ινσουλονόμορφου παράγοντα IGF1, εκφράζεται, κωδικοποιείται από ένα πρόδρομο μόριο που αποτελείται από 1367 αμινοξέα.^[19] Σε αντίθεση με τους μονομερείς διαμεμβρανικούς υποδοχείς της οικογένειας RTKS, ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι διμερής και αποτελείται από 2-α υπομονάδες και 2-β υπομονάδες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς S-S, δημιουργώντας ένα τετραμερές $\alpha_2\beta_2$.^[20-22]

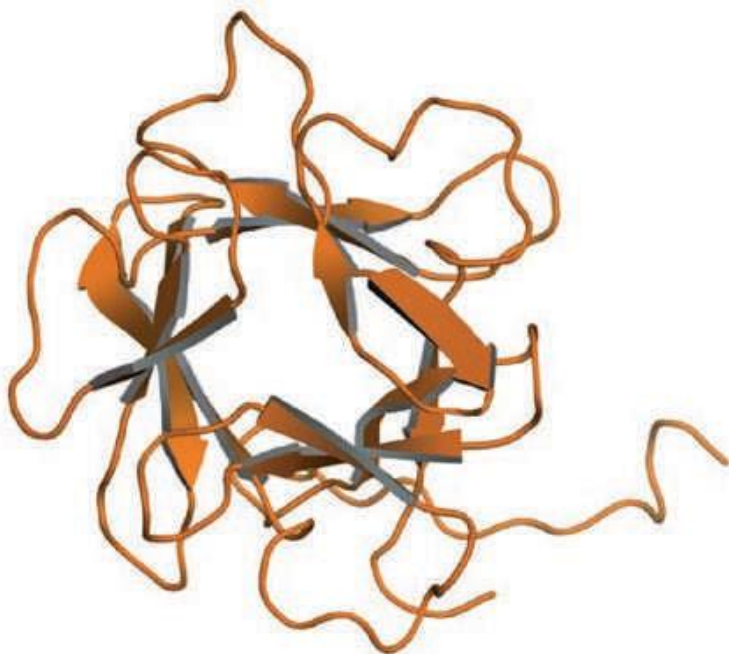
Υψηλές συγκεντρώσεις του IGF1 έχουν ανιχνευτεί σε διάφορους καρκινικούς όγκους στον άνθρωπο, ενώ επιδημιολογικές μελέτες διασαφηνίζουν τη συμβολή-συσχέτιση του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα IGF1 με την παθογένεια του καρκίνου του μαστού και του προστάτη.^[23] Συνεπώς ο IGF1 έχει αποτελέσει ένα υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο για την ανάπτυξη θεραπευτικών-αντικαρκινικών φαρμάκων.



Εικόνα 9: Η δομή του υποδοχέα ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα IGF1. Η τρισδιάστατη δομή της περιοχής 1 (L1)-Cys rich (Cr)-L2 περιοχή του IGF1R1 θάσει κρυσταλλογραφία με ακτίνες Χ.^[24]

Υποδοχείς των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων FGR-R

Μία μεγάλη οικογένεια των υποδοχικών πρωτεϊνών με δράση τυροσυλο-κινάσης, είναι οι υποδοχείς των ινοβλαστικοί αυξητικών παραγόντων FGF-R. Στα θηλαστικά υπάρχουν 18 ινοβλαστικοί αυξητικοί παράγοντες (FGF1–FGF10 και FGF16–FGF23) που υποδιαιρούνται σε 6 υποοικογένειες με κριτήριο διαφοροποίησης την ομολογία και την φυλογονία της ακολουθίας : FGF1 και FGF2, FGF3, FGF7, FGF10, FGF22; FGF4, FGF5 και FGF6; FGF8, FGF17 και FGF18, FGF9, FGF16 και FGF20, και FGF19, FGF21 και FGF23.^[25] Οι FGFs έχουν μια περιοχή ομολογίας στον πυρήνα που αποτελείται από 120-130 αμινοξέα διατεταγμένα σε 12 αντιπαράλληλα β φύλλα (β1-β12) και ένα καρβοξυ-τελικό άκρο ^[26] (εικόνα 10).



Εικόνα 10: Τα δομικά χαρακτηριστικά των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων, δε απεικονίζονται τα 12 αντιπαράλληλα β φύλλα και το καρβοξυ-τελικό άκρο.

Οι υποδοχείς των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων FGFR με δράση τυροσινικής κινάσης διενεργούν πολυποίκιλες διεργασίες και ενεργοποιούνται μέσω της πρόσδεσης υποκαταστατών. Υπάρχουν 4 γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς FGFR (FGFR1-4), αποτελούμενα από 3 εξωκυττάριας περιοχές με δομή ανοσοσφαιρίνης (ig) (D1, D2 και D3), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτοπλασμική περιοχή με δράση τυροσινικής κινάσης.^[27] Οι FGFs αυξητικοί παράγοντες προσδένονται στους υποδοχείς, με αποτέλεσμα να επάγουν το διμερισμό και την φωσφορυλίωση συγκεκριμένων τυροσινικών καταλοίπων. Η φωσφορυλίωση των FGFRs υποδοχέων πυροδοτεί την ενεργοποίηση του κυτταροπλασματικού μονοπατιού της μεταγωγής του σήματος, καθώς τα φωσφορυλιωμένα υποστρώματα προσδένονται περαιτέρω σε περιοχή SH2 αποτελούμενη από πρωτεΐνες. Τέλος, μεταλλάξεις στους υποδοχείς των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων σχετίζονται με διάφορες ασθένειες, όπως κρανιο-οστέωση, καρκίνος και σύνδρομο νανισμού.

Υποδοχέας των νευρικών αυξητικών παραγόντων (NGF-R)

Είναι γνωστό ότι, ο NGF αποτελεί μέλος της οικογένειας των νευρικών αυξητικών παραγόντων που συλλογικά αναφέρονται ως νευροτροφίνες. Πρόκειται για μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη-ορμόνη. Άλλα μέλη της οικογένειας των νευροτροφινών αποτελούν ο εγκεφαλικός νευροτροφικός παράγοντας (BDNF), η νευροτροφίνη (NT-3) και η νευροτροφίνη 4/5 (NT-4/5).^[28] Ο NGF αυξητικός παράγοντας εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως στην κυτταρική σηματοδότηση, συμπεριλαμβάνοντας τη διαφοροποίηση και τη κυτταρική επιβίωση, την παύση της ανάπτυξης και την απόπτωση νευρώνων.^[29] Αυτές οι διεργασίες που πραγματοποιούνται με μεσολαβητή το NGF είναι αποτέλεσμα της πρόσδεσής του στους 2 υποδοχείς του TrKA και p75^[30] που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της Trk οικογένειας είναι ο TrKA υποδοχέας (*tropomyosin receptor kinase A*) με δράση τυροσινικής κινάσης με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για τον νευρικό αυξητικό παράγοντα NGF.^[31] Στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, υπάρχουν 5 περιοχές, εκ των οποίων η μια από αυτές, είναι περιοχή όμοια με την ανοσοσφαιρίνη, που εντοπίζεται πλησίον της μεμβράνης (TrKA-d5), είναι δε απαραίτητη για την πρόσδεση του νευρικού αυξητικού παράγοντα NGF.^[32] Τέλος, ο Anderson και άλλοι ανέφεραν ότι με την πρόσδεση του NGF στον υποδοχέα TrKa, ενεργοποιείται το μονοπάτι MAPK (Ras-Mek πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιούμενης από μιτογόνο).^[33]

Υποδοχέας των αιμοπεταλιακών αυξητικών παραγόντων (PDGF-R)

Η οικογένεια των αιμοπεταλιακών αυξητικών παραγόντων PDGF αποτελείται από 4 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες που κωδικοποιούνται από 4 διαφορετικά γονίδια. Οι κλασικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C και PDGF-D με τις δύο τελευταίες να έχουν ανακαλυφθεί πρόσφατα.^[34-36] Αποτελούνται από ομοδιμερή των A, B, C, και D πολυπεπτιδικών αλυσίδων ενωμένα με δισουλφιδικό δεσμό, ή ετεροδιμερή των PDGF-AB.^[37] Οι εν λόγω ισομορφές των αιμοπεταλιακών αυξητικών παραγόντων επιδρούν στην κυτταρική λειτουργία μέσω της πρόσδεσής τους στους α και β υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης (PDGFRα και PDGFRβ). Συγκεκριμένα, οι α και β υποδοχείς των αιμοπεταλιακών αυξητικών παραγόντων αποτελούνται από εξωκυττάρια περιοχές συνολικά 5 με δομή όμοια της ανοσοσφαιρίνης (Ig) και ενδοκυττάρια περιοχές με δράση κινάσης, που περιέχουν 100 κατάλοιπα αμινοξέων με ομολογία κινασών. Η πρόσδεση των υποκαταστατών συμβαίνει κυρίως στις περιοχές Ig 2 και Ig 3 και αυτό επάγει το διμερισμό των υποδοχέων, που περαιτέρω σταθεροποιούνται από τις προκύπτουσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών Ig 4 στο διμερές που προκύπτει.^[38-39]

Ο διμερισμός είναι σημαντικός για την ενεργοποίηση, καθώς επιτυγχάνεται το να πλησιάζουν οι ενδοκυττάριας περιοχές των υποδοχέων και να ακολουθήσει η φωσφορυλίωση. Η αυτοφωσφορυλίωση “υπηρετεί” δύο πολύ σημαντικές λειτουργίες. Πρώτον, προκαλεί αλλαγή-τροποποίηση στη διαμόρφωση της ενδοκυττάριας περιοχής του υποδοχέα, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η δράση τυροσινικής κινάσης. Εικάζεται ότι υφίστανται τρεις μηχανισμοί απενεργοποίησης της δράσης της κινάσης. Ένας εξ αυτών υποστηρίζει πως ο βρόγχος ενεργοποίησης στην περιοχή κινάσης είναι πιθανόν να διπλώνει στη μέση της καταλυτικής σχισμής, ενώ με την αυτοφωσφορυλίωση του τυροσινικού καταλοίπου επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του βρόγχου, μακριά από το ενεργό κέντρο.^[40] Δεύτερον, η αυτοφωσφορυλίωση δημιουργεί τη δυνατότητα για την πρόσδεση μορίων με SH2 περιοχές στους υποδοχείς. Οι α και β υποδοχείς των PDGF είναι γνωστό ότι περιέχουν 10 και 11 αυτοφωσφορυλιωμένα τυροσινικά κατάλοιπα, αντίστοιχα.^[41]

Οι αιμοπεταλιακοί αυξητικοί παράγοντες ρυθμίζουν την ανάπτυξη, επιβίωση και την κινητικότητα των μεσεγχυματικών κυττάρων και άλλων διαφόρων κυτταρικών τύπων.^[42-43] Έχει αναφερθεί η σημαντική συμβολή τους στην εμβρυική ανάπτυξη, αλλά και στην ρύθμιση της ομοιόστασης των ιστών στους ενήλικες. Η ανεξέλεγκτη δραστηριότητα του PDGF στην σηματοδότηση έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη συγκεκριμένων κακοηθών ασθενειών, όπως και επίσης με μη κακοήθεις ασθένειες που χαρακτηρίζονται από υπερβολικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επιγραμματικά, αναφέρονται μερικές από τις κακοήθεις ασθένειες, όπως μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, σάρκωμα, λευχαιμία και λέμφωμα.^[37]

Υποδοχέας τυροσυλο-κινάσης c-Met

Ο c-Met αποτελεί ένα μέλος της οικογένειας των υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών και αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Η υπερέκφραση του εν λόγω υποδοχέα καθώς και οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν οδηγούν στην ανάπτυξη πολυποίκιλων κακοηθών ασθενειών. Η ενεργοποίηση του c-Met παίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, πολλαπλασιασμό, μετανάστευση και στην κυτταρική κινητικότητα.^[44]

Ο φυσικός υποκατάστατης που προσδέεται στον εν λόγω υποδοχέα είναι ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας HGF, ένα ετεροδιμερές μόριο ενωμένο με δισουλφιδικό δεσμό. Ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας προσδέεται στον υποδοχέα c-Met με υψηλή συγγένεια, αναγνωρίστηκε δε ανεξάρτητα και ως αυξητικός παράγοντας των ηπατοκυττάρων και ως ινοβλαστικός

παράγοντας των κυττάρων. Ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας αποτελεί μέλος των πλασμινογονικών σχετιζόμενων αυξητικών παραγόντων (PRGFs), που, επίσης, αναφέρεται και με το συμβολισμό PRGF-1.

Υποδοχέας τυροσυλο-κινάσης AxI

Ο υποδοχέας AxI αποτελεί μέλος της οικογένειας των υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών και συγκεκριμένο μέλος της υποοικογένειας TAM (Tyro3, AxI, Mertk), ανακαλύφθηκε δε και εντοπίστηκε σε καρκινικά κύτταρα πριν από δύο δεκατίες.^[45] Η ενεργοποίηση του AxI προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση, αυξάνει τη μετανάστευση, συσσωμάτωση και ανάπτυξη μέσω πολλαπλών μονοπατιών σηματοδότησης. Η υπερέκφραση και η αυξημένη δραστηριότητά του σχετίζεται με διάφορες χρόνιες παθολογικές καταστάσεις.

Δύο υποκατάστατες είναι αυτοί προσδένονται και ενεργοποιούν την οικογένεια των TAM υποδοχέων, η Gas6 (αυξητική ειδική πρωτεΐνη 6) και η πρωτεΐνη S3. Η Gas6 έχει την υψηλότερη συγγένεια στους TAM υποδοχείς και το μονοπάτι που εμπλέκεται συχνά αποκαλείται ως Gas6/AxI. Ο AxI είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που αποτελείται από μία εξωκυττάρια N περιοχή και μια ενδοκυττάρια C τερματική περιοχή με δράση τυροσινικής κινάσης. Η εξωκυττάρια περιοχή έχει δύο δομές όμοιες με την ανοσοσφαιρίνη Ig και δυο FN (φιμπρονεκτίνη) τύπου III μοτίβα, που τις διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες. Επιπλέον, στοιχεία υποστηρίζουν τον παθοφυσιολογικό ρόλο του Gas6/AxI μονοπατιού σε χρόνιες διαταραχές του ανοσοποιητικού^[46] και ενεργοποίηση του AxI που εμπλέκεται στην εξέλιξη καρδιαγγειακών παθήσεων.^[47]

2.3.2 Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRTKS)

Οι μη υποδοχικές πρωτεΐνες με δράσης τυροσυλο-κινάσης αποτελούν μια υποοικογένεια των τυροσινικών κινασών. Οι NRTKS έχουν τη δυνατότητα ρύθμισης πολλών κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής επιβίωσης, διαίρεσης, διάδοσης, προσκόλλησης, κυτταρικής έκφρασης, απόκρισης, ανοσιακής απάντησης/απόκρισης κ.ά. Πρόκειται για ενδοκυττάριας κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που μπορούν να μεταδώσουν ενδοκυττάρια σήματα^[48-49] και μπορούν είτε να προσδεθούν στην κυτταρική μεμβράνη είτε να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς τον πυρήνα του κυττάρου.^[48] Οι μη υποδοχικές πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν σε 9 υποοικογένειες με κριτήριο διαφοροποίησης την ομολογία της ακολουθίας,

κυρίως στην περιοχή της κινάσης. Η οικογένεια των εν λόγω κινασών περιλαμβάνει τις Abl, FES, JAK, ACK, SYK, TEC, FAK, Src, and CSK.^[50] Εν συνεχεία, θα γίνει αναφορά στις μη υποδοχικές πρωτεΐνες Abl, c-Src και Jak, δεδομένου ότι ο αριθμός τους είναι μεγάλος.

Μη-υποδοχικές τυροσυλο-κινάσες Abl

Τα μέλη της εν λόγω υποοικογένειας Abelson αποτελούνται από τις Abl1 και Abl2 και κωδικοποιούνται από τα γονίδια Abl1 και Abl2, αντίστοιχα. Οι ανθρώπινες Abl1 και Abl2 πρωτεΐνες εκφράζονται ευρέως και είναι απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη. Η κυτταροπλασματική c-Abl ενεργοποιείται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες, όπως ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας PDGF, EGFR, τροποποιώντας τον αυξητικό παράγοντα β και τους υποδοχείς της αγγειοτενσίνης τύπου 1.^[51] Οι Abl κινάσες συνδέουν διαφορετικά εξωκυττάρια ερεθίσματα-σήματα με τον καταρράκτη κυτταρικής σηματοδότησης, ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επιβίωση, απόκριση σε βλάβες του DNA, κυτταρική μετανάστευση, δυναμική ακτίνης και προσκόλληση.^[52] Δομικά αποτελούνται από μια κεντρική περιοχή SH3-SH2-SH1 (τυροσινική κινάση) με ομολογία ακολουθίας 90% και άνω, με την τελευταία να διατηρείται στην πλειοψηφία των κυτταροπλασματικών κινασών. Τόσο η Abl1 όσο και η Abl2 πρωτεΐνη περιέχουν στη δομή τους μια N “cap” στην N-τερματική περιοχή, μια μακρά καρβοξυ-αλυσίδα και διάφορα άλλα σημεία για αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών.

Το Abl1 αρχικά θεωρήθηκε να αποτελεί το ογκογονίδιο υπεύθυνο για την ανάπτυξη λευχαιμίας που πυροδοτήθηκε από τον ρετροϊό της λευχαιμίας κατά Abelson στα ποντίκια. Μεταγενέστερη ταυτοποίηση της χιμαιρικής ογκοπρωτεΐνης BCR-ABL1, που σχηματίζεται από τη χρωμοσωμική διαμετάθεση t(9;22)(q34.1;q11.2), γνωστή και ως χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph), συνετέλεσε στην συσχέτιση της Abl οικογένειας με την ανάπτυξη καρκίνου, όπως η οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), η χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML) και η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL), αναφερόμενες ως αιματολογικές κακοήθειες.^[50]

Μη υποδοχικές τυροσυλο-κινάσες Src

Η οικογένεια των Src των τυροσινικών κινασών (SFKs) είναι μη υποδοχικές ενεργές πρωτεΐνες και λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες που μεσολαβούν στα βιολογικά μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 11 σχετιζόμενες κινάσες, τις ακόλουθες : Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, c-Src, c-Yes, Yrk, Frk και Srm.^[53-54] Τα μέλη των SFK έχουν μία διατηρημένη

μεμβρανική περιοχή που στοχεύει παλμιτικές SH4 ομάδες στο N τελικό άκρο, μια περιοχή κινάσης και μια βραχεία καρβοξυ-τελική ουρά, με την τελευταία να διαθέτει ένα αυτο-ανασταλτικό σημείο φωσφορλίωσης.^[53]

Τα πέντε μέλη της εν λόγω οικογένειας (Blk, Fgr, Hck, Lck and Lyn) εκφράζονται κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα. Ωστόσο, τα υπόλοιπα μέλη, c-Src, c-Yes, Yrk και Fyn, εκφράζονται ευρέως στα αιμοπετάλια, νευρώνες και σε κάποια επιθηλιακά κύτταρα.^[53,55] Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολυποίκιλες διεργασίες των μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από διάφορες υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (PDGF-R, EGF-R, FGF-R, IGF1-R, CSF-R)^[56] και υποδοχείς των G πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας την κυτταρική επιβίωση, σύνθεση του DNA, διαίρεση, μυοσκελετικές αναδιατάξεις της ακτίνης και την κυτταρική κινητικότητα.^[55,57] Η C-τερματική Src κινάση (Csk) και Csk ομόλογη κινάση (Chk) αποτελούν δύο μέλη της οικογένειας των NRTKs.

Η ανάπτυξη καρκίνου μπορεί να σχετίζεται με τις SFKs, καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση κυτταρικής προσκόλλησης. Το συγκεκριμένο μονοπάτι περιλαμβάνει διάφορα μόρια, όπως η p120- πρωτεΐνη, και ένα υπόστρωμα της Src.^[58] Συγκεκριμένα, η Src είναι πιθανόν να εμπλέκεται στην ογκογένεση μέσω της ενεργοποίησης των STAT μεταγραφικών παραγόντων, που ρυθμίζουν τη σηματοδότηση κυτοκίνης στα αιμοποιητικά κύτταρα.^[59] Τέλος, η Src θεωρείται ότι εμπλέκεται μερικώς στην εξέλιξη-πορεία των CML, AML, CLL, και ALL, μέσω της ενεργοποίησης των STAT μονοπατιών και ρύθμισης των RAS/RAF/MEK/ERK MAPK και VEGF μονοπατιών.^[50]

Μη-υποδοχικές τυροσυλο-κινάσες Jak

Η οικογένεια JAK των μη υποδοχικών τυροσινικών κινασών αποτελείται από τέσσερα μέλη που περιλαμβάνει τις JAK1, JAK2, JAK3, and Tyk2.^[60] Όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν παρόμοια δομή πρωτεΐνης που περιλαμβάνει ένα τελικό καρβοξυ-άκρο συνδεδεμένο με μια καταλυτική ανενεργή JH2 (Janus homology domain 2, περιοχή 2), μια περιοχή ψευδοκινάσης που χαρακτηρίζεται από τη ρυθμιστική ιδιότητα κινάσης μέσω της SH2 περιοχής. Επιπλέον, υπάρχει μια FERM περιοχή στη δομή της, που ρυθμίζει την πρόσδεση σε διαμεμβρανική περιοχή στους υποδοχείς κυτοκίνης.^[61-62] Μέσω της πρόσδεσης διαφόρων υποκαταστατών, με συνήθεις εκπροσώπους τις κυτοκίνες, όπως η ιντερφερόνη $\alpha/\beta/\gamma$, και άλλων υποκαταστατών και αυξητικών παραγόντων, επάγεται η ενεργοποίηση^[63] των συγκεκριμένων κινασών, μέσω φωσφορλίωσης τυροσινικών καταλοίπων στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα της κυτοκίνης.^[64]

Η στοιχειώδης ενεργοποίηση των JAKs έχει αναφερθεί και συσχετιστεί σε πολλές μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων κακοηθών αιματολογικών διαταραχών. Η απορρύθμιση των JAK οφείλεται σε πολυάριθμους παράγοντες και περιλαμβάνει αφύσικη-ασυνήθιστη παραγωγή κυτοκίνης μέσω αυτοκρινούς/παρακρινούς μηχανισμού. Μία από τις γνωστές μεταλλάξεις των JAK είναι η JAK2V617F, που απαντάται κυρίως σε ασθενείς στα αρχικά στάδια μυελοϊνώσεως ή βασικής θρομβοκυτταμίας.

2.4 Πρωτεϊνικές κινάσες Σερίνης/θρεονίνης

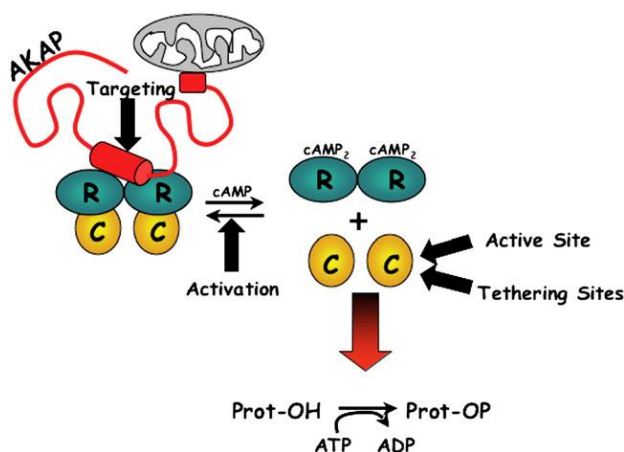
Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (PS/TKs) αποτελούν μέλη μιας ευρείας κατηγορίας πρωτεϊνικών κινασών, είναι φωσφοτρανσαφεράσες και φωσφορυλιώνουν το υδροξύλιο μιας σερίνης ή θρεονίνης. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση και στην σηματοδότηση μέσω της ικανότητάς τους να φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς και ρυθμιστικούς παράγοντες του κυττάρου, ακόμη μια μεγάλη κατηγορία κυτταροπλασματικών και πυρηνικών δραστικών παραγόντων.^[65] Η υπεροικογένεια των PS/TKs περιλαμβάνει τις εξής οικογένειες: την AGC ομάδα κινασών, μέλος της οποίας είναι το κυκλικό εξαρτώμενο νουκλεοτίδιο, την οικογένεια πρωτεϊνικής κινάσης C, τον β αδενεργικό υποδοχέα με δράση κινάσης και την ριβοσωμική S6 κινάση. Θα αναφερθούμε σε ένα μικρό αριθμό πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης.

2.4.1 Πρωτεϊνική κινάση Σερίνης/θρεονίνης A (c-AMP)

Το πιο καλομελετημένο μέλος της υπεροικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών αποτελεί η cAmp εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση PKA και ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που ανακαλύφθηκε,^[66] ταξινομήθηκε^[67] και κλωνοποιήθηκε,^[68] ενώ η αποσαφήνιση της δομής παρείχε την τρισδιάστατη δομή-μοτίβο για την οικογένεια αυτή.^[69] Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους η συγκέντρωση του c AMP επηρεάζει την πορεία του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η cAMP ενδέχεται να έχει αυξητικό ρυθμιστικό ρόλο,^[70] ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις συνήθως αναστέλλουν την μιτογόνο σηματοδότηση μέσω της PKA φωσφορυλίωσης της Raf,^[71] μιας πρωτεΐνης που θα αναλυθεί μεταγενέστερα.

Η PKA αποτελείται από 2 τύπους υπομονάδων. Δύο καταλυτικές C υπομονάδες ενώνονται με μια διμερή ρυθμιστική υπομονάδα R για να σχηματιστεί ένα ανενεργό ολοενζυμικό σύμπλοκο (εικόνα 11). Η απάντηση στην ενεργοποίηση της κυκλάσης της αδενοσίνης οδηγεί στην

παραγωγή της Camp. Έπειτα, η πρόσδεσή της στην ρυθμιστική υπομονάδα επάγει την χαλάρωση-αποδέσμευση της καταλυτικής υπομονάδας, ώστε να επιτευχθεί σε μεταγενέστερο στάδιο η φωσφορυλίωση. Τα εν λόγω υποστρώματα περιλαμβάνουν δύο ιονικά κανάλια στο κυτταρόπλασμα και μεταγραφικούς παράγοντες στον πυρήνα που ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων. Επιπρόσθετα, εκτός των R και C υπομονάδων υπάρχουν πολυποϊκίλια ζευγάρια πολυδύναμων πρωτεϊνών που ονομάζονται A κινάσες αγκύρωσης/σταθεροποίησης (AKAPS/A kinase Anchoring) και εντοπίζουν την PKA σε ειδικά σημεία κοντινών αποστάσεων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.^[72]



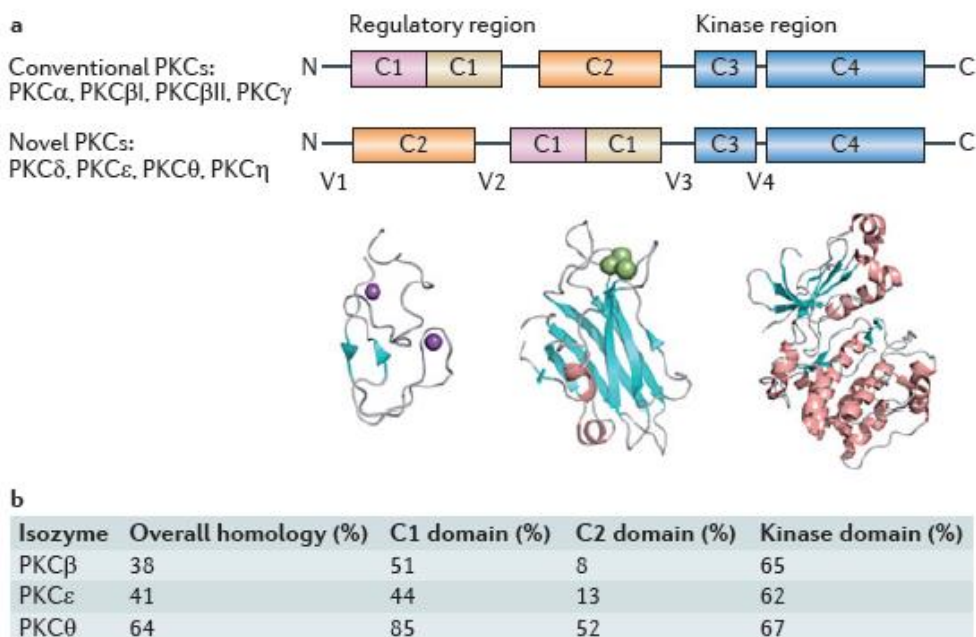
Εικόνα 11: Οι αλλαγές της διαμόρφωσης της PKA και οι εν δυνάμει αναστολείς της PKA σηματοδότησης. Η ελεύθερη καταλυτική υπομονάδα C μπορεί να καταστεί ανενεργή με αναστολείς που προσδένονται στο ενεργό κέντρο και με αναστολείς που διακόπτουν την πρόσδεση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.

2.4.2 Πρωτεϊνική κινάση Σερίνης/Θρεονίνης C (PKC)

Η οικογένεια της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) περιλαμβάνει μια ομάδα πρωτεϊνικών κινασών που έχει αποτελέσει ένα ελκυστικό στόχο στην προσπάθεια για την ανακάλυψη φαρμακευτικών φαρμάκων τα τελευταία είκοσι χρόνια.^[73] Αυτή η πρωτεϊνική κινάση ανήκει στην κατηγορία ενζύμων που φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, σε μια μεγάλη κατηγορία πρωτεϊνών. Ανακαλύφθηκε πριν από χρόνια από τον Nishizuka και τους συνεργάτες^[74] τους, ως κινάσες που ενεργοποιούνται από πρωτεόλυση. Μετά από την πρώτη περιγραφή της PKC, ανακαλύφθηκε ότι η συγκεκριμένη κινάση μπορούσε να ενεργοποιηθεί από τον εστέρα 1 της Phorbol που είναι υπεύθυνος για ογκογένεση. Αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε το εφαλτήριο για την αντιμετώπιση της PKC ως στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων, πρώτα στη θεραπεία του καρκίνου και σε μεταγενέστερο στάδιο σε άλλες ασθένειες. Έχει αποδειχθεί ότι, η PKC διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως ο διαβήτης τύπου II,^[75] ο καρκίνος,^[76] η ισχαιμική καρδιακή ασθένεια,^[77] μερικά αυτοάνοσα νοσήματα,^[78] κ.ά. Ωστόσο, τα

μέλη της οικογένειας PKC έχουν ένα μοναδικό ρόλο και μερικές φορές αντικρουόμενο στην κυτταρική σηματοδότηση και σε ασθένειες.^[79,80] Στην πραγματικότητα, το ίδιο ένζυμο θα μπορούσε να έχει αντικρουόμενο και διττό ρόλο στο κύτταρο, εξαρτώμενο από τις συνθήκες διέγερσης.^[81]

Όπως και άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, η PKC αποτελείται από μια ρυθμιστική και καταλυτική περιοχή. Η καταλυτική περιοχή, ενυπάρχει στο καρβοξυ τελικό μισό μέρος της PKC (εικόνα 12), περιέχει μια διατηρημένη πλευρά για το ATP και μια περιοχή πρόσδεσης του μαγνησίου και τέλος μια θέση πρόσδεσης για φωσφορικές ομάδες (δέκτες) σε πρωτεϊνικά υποστρώματα (εικόνα 12). Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 12 το *N*-τελικό μισό μέρος του ενζύμου αποτελεί την ρυθμιστική περιοχή. Στην ανενεργή κατάσταση η ρυθμιστική περιοχή αποτελείται από μια διατηρημένη C1 και C2 περιοχή που προσδέεται στην καταλυτική περιοχή και αναστέλλει τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η άρση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων επάγει την ενεργοποίηση του ενζύμου. Τόσο η καταλυτική όσο και η ρυθμιστική περιοχή θα μπορούσε να αποτελέσει ένα φαρμακευτικό στόχο στην παραγωγή και ανάπτυξη φαρμάκων για τη ρύθμιση της PKC δραστηριότητα είτε μέσω αναστολής ή μέσω ενεργοποίησης της.

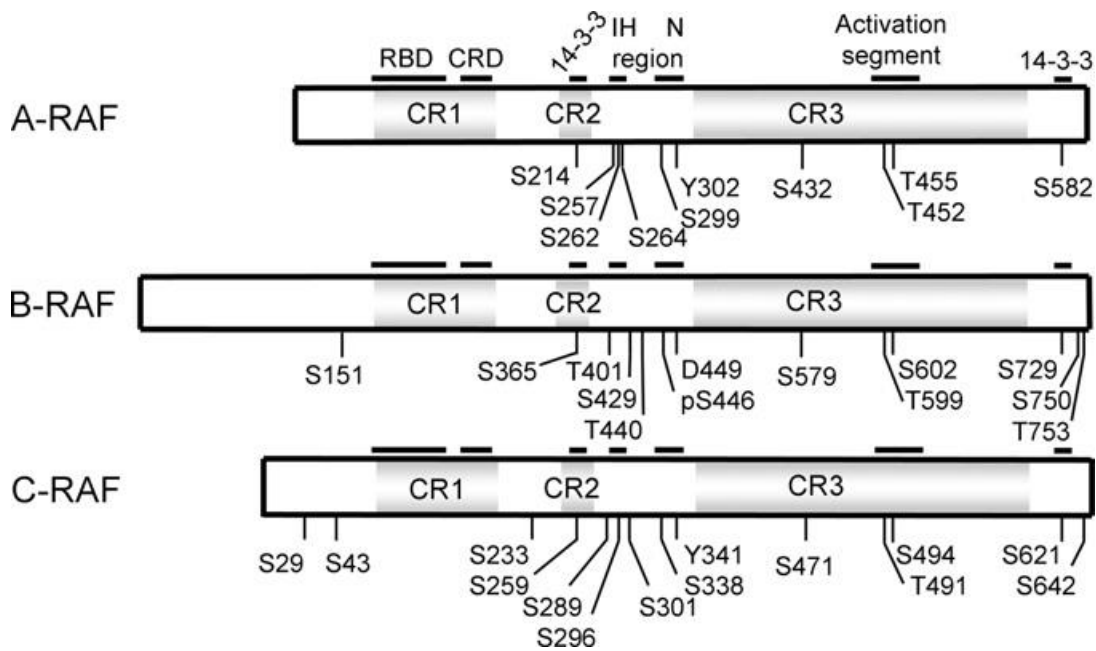


Εικόνα 12: Σχηματική ταξινόμηση των περιοχών από τα μελέτη της οικογένειας PKC

2.4.3 Πρωτεϊνική κινάση Σερίνης/Θρεονίνης RAF

Η οικογένεια των A-RAF, B-RAF, C-RAF αποτελούν μέλη της οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης και σχετίζονται με ρετροϊκά ογκογονίδια που ανακαλύφθηκαν το 1983.^[82] Οι RAF κινάσες συμμετέχουν στον RAS-RAF-MEK-ERK καταρράκτη κυτταρικής σηματοδότης, που μερικές φορές εμφανίζεται ως καταρράκτης μιτογόνου ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK).^[82] Η RAS-GTP οδηγεί στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας της RAF κινάσης μέσω μιας διαδικασίας πολλών σταδίων. Συγκεκριμένα, οι RAF κινάσες έχουν αυστηρή εκλεκτικότητα υποστρώματος και καταλύουν την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των MEK1 και MEK2, οι οποίες είναι πρωτεϊνικές κινάσες με διττό ρόλο εκλεκτικότητας, μεσολαβούν δε στην φωσφορυλίωση τυροσινικών υποστρωμάτων πριν από την φωσφορυλίωση της θρεονίνης στις ERK1 ή ERK2, τα μοναδικά υποστρώματά τους. Η προαναφερόμενη φωσφορυλίωση επάγει την ενεργοποίηση των ERK1/2, οι οποίες είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η ρύθμιση των RAF κινασών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία πολλαπλών σταδίων και περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, φωσφορυλίωση, αποφωσφορυλίωση και διαμορφωτικές αλλαγές.^[83] Οι περισσότερες RAF κινάσες απαντούν στο κυτταρόπλασμα, όπου τα ένζυμα είναι στην ανενεργή κατάσταση και μπορούν να σχηματίσουν είτε ομοδιμερή, είτε ετεροδιμερή.^[84]

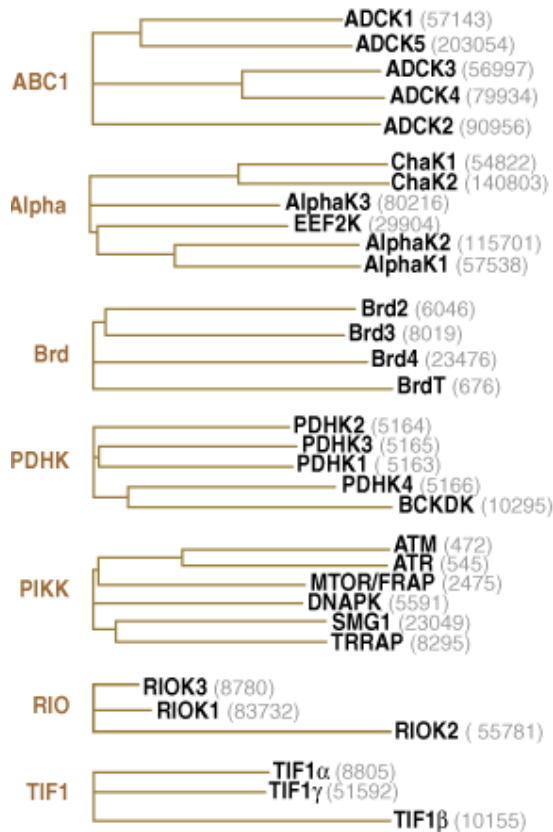
Κάθε μέλος των RAF κινασών αποτελείται από τρεις διατηρημένες περιοχές CR1, CR2 και CR3, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 13. Ειδικότερα η CR1 περιοχή αποτελείται από περιοχή πρόσδεσης της RAS (RDB/Ras binding domain), μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (CRD/ Cysteine rich domain), που μπορεί να ενώνεται με δύο ιόντα ψευδαργύρου. Η CR1 αλληλεπιδρά με την RAS και φωσφολιπίδια που βρίσκονται στην μεμβράνη. Η CR2 περιοχή είναι πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη, περιέχει μια θέση που φωσφορυλιώνεται και έπειτα προσδένεται σε μια 14-3-3 ρυθμιστική πρωτεΐνη, γεγονός που αναστέλλει την δραστηριότητα της κινάσης. Η CR3 αποτελεί την περιοχή πρωτεϊνικής κινάσης και εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο.^[85] Οι RAF κινάσες έχουν ένα χαρακτηριστικό μικρό N-τελικό λοβό με αντιπαράλληλα β φύλλα που προσανατολίζουν το ATP να προσδεθεί, ένα μεγάλο C-τελικό λοβό (α έλικα), που απαντάται σε όλες τις κινάσες, και μια περιοχή πρόσδεσης του ATP πλούσια σε γλυκίνη, που συχνά αποκαλείται P-βρόγχος. Τέλος, το σημείο που ενέχει την καταλυτική δραστηριότητα βρίσκεται ανάμεσα στον μικρό και μεγάλο λοβό που σχετίζονται μεταξύ τους, μπορούν να ανοίγουν ή να κλείνουν τη σχισμή-θέση πρόσδεσης του ATP.



Εικόνα 13: Η ταξινόμηση των RAF ενζύμων και η οργάνωσή τους σε τρεις διατηρημένες περιοχές, με την CR3 περιοχή να αποτελεί το τμήμα ενεργοποίησης

2.4.4 Άτυπες Πρωτεϊνικές Κινάσες (aPKs)

Οι άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs) περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, που χαρακτηρίζονται από δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, εμπλέκονται σε διαδικασίες φωσφορυλίωσης, σημαντικές για πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, όπως προαναφέρθηκε έχουν αναγνωρισθεί 518 πρωτεϊνικές κινάσες, εκ των οποίων οι 40 κατατάσσονται στις άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες.^[6] Οι aPKs χωρίζονται σε 13 υπο-οικογένειες (εικόνα 14) και έχει αναφερθεί ότι έχουν βιοχημική δραστικότητα κινάσης, αλλά έχουν έλλειψη ομοιότητας της ακολουθίας που χαρακτηρίζει τις ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες και τα ομόλογά τους.^[86] Οι κλασικά απαντώμενες ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν στην περιοχή δραστικότητας της κινάσης ένα μικρό N-τελικό άκρο, που αποτελείται από β-φύλλο και ένα μεγαλύτερο C-τερματικό λοβό α-ελικοειδούς μορφής.^[87] Εντούτοις, μερικές aPKs παρουσιάζουν κάποια δομική ομολογία με τις ePKs, παρά την έλλειψη ομοιότητας της ακολουθίας.^[88]



Εικόνα 14: Ταξινόμηση των άτυπων πρωτεϊνικών κινασών (σPKs) σε υπο-οικογένειες

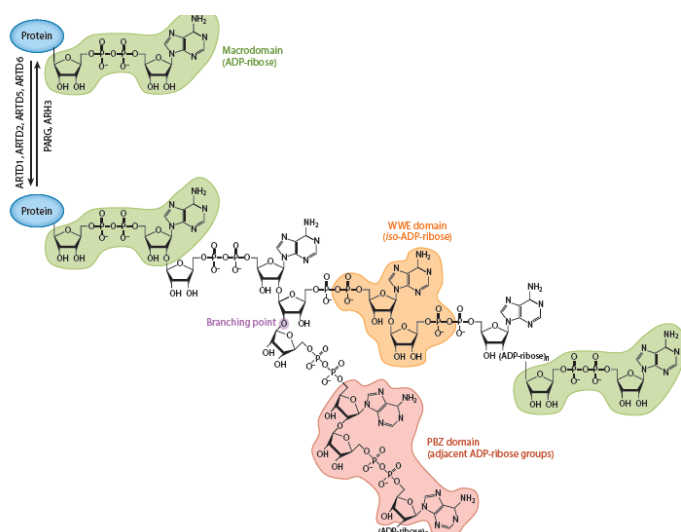
2.5 ADP Ριβοζυλίωση

Η ADP ριβοζυλίωση των πρωτεϊνών είναι μια αναστρέψιμη μεταγραφική τροποποίηση, με υψηλή βιοχημική πολυπλοκότητα και αποσκοπεί στην μεταφορά του ADP από το NAD⁺ σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων σε πρωτεϊνικά υποστρώματα ή στην ίδια την ADP ριβόζη (εικόνα 15).^[89] Η εν λόγω μεταγραφική τροποποίηση επάγεται-πυροδοτείται από διασπάσεις σε μονόκλωνο DNA, γεγονός που αποδεικνύει τον συσχετισμό σε μοριακό επίπεδο μεταξύ των βλαβών του DNA και της τροποποίησης της χρωματίνης. Τροποποιεί τη λειτουργία πρωτεϊνών, παρέχει ικρίωματα-καλούπια για τη προσέλκυση άλλων πρωτεϊνών και συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Σε αυτές τις πολυάριθμες διεργασίες περιλαμβάνονται η επιδιόρθωση και η αντιγραφή του DNA, η ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, η μεταγραφή και η κυτταρική διαφοροποίηση. Η ADP ριβοζυλίωση ελέγχεται και καταλύεται κατά κύριο λόγο από διάφορες ADP ριβοσυλοτρανσαφεράσες (ARTs) και από μια υποομάδα πρωτεϊνών εξαρτωμένων από το NAD,^[90a-92] ενώ η αντίστροφη διαδικασία απομάκρυνσης του ADP καταλύεται από τις ADP ριβοσυλυδρολάσες.

Η πρωτεϊνική ADP ριβοζυλίωση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως εξής:

1. Μονο-ADP ριβοζυλίωση (MARylation) κατά την οποία μόνο ADP ριβόζη (MAR) μεταφέρεται στα αμινοξέα της πρωτεΐνης στόχου.
2. Πολύ-ADP ριβοζυλίωση (PARylation), η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά και επιμήκυνση του αρχικού υποστρώματος του ADP, με στόχο την παραγωγή του βιοπολυμερούς, πολυ(ADP-ριβόζη) (PAR).

Μετά την ανακάλυψη της ADP ριβοζυλίωσης στην μεταγραφική τροποποίηση, το πρώτο ένζυμο που βρέθηκε ικανό να συνθέτει PAR ήταν η πολυμεράση της πόλυ-ADP ριβόζης (PARP-1),^[93] μιας πρωτεΐνης που η δομή και η βιολογική της δράση θα συζητηθεί αναλυτικά πιο κάτω.



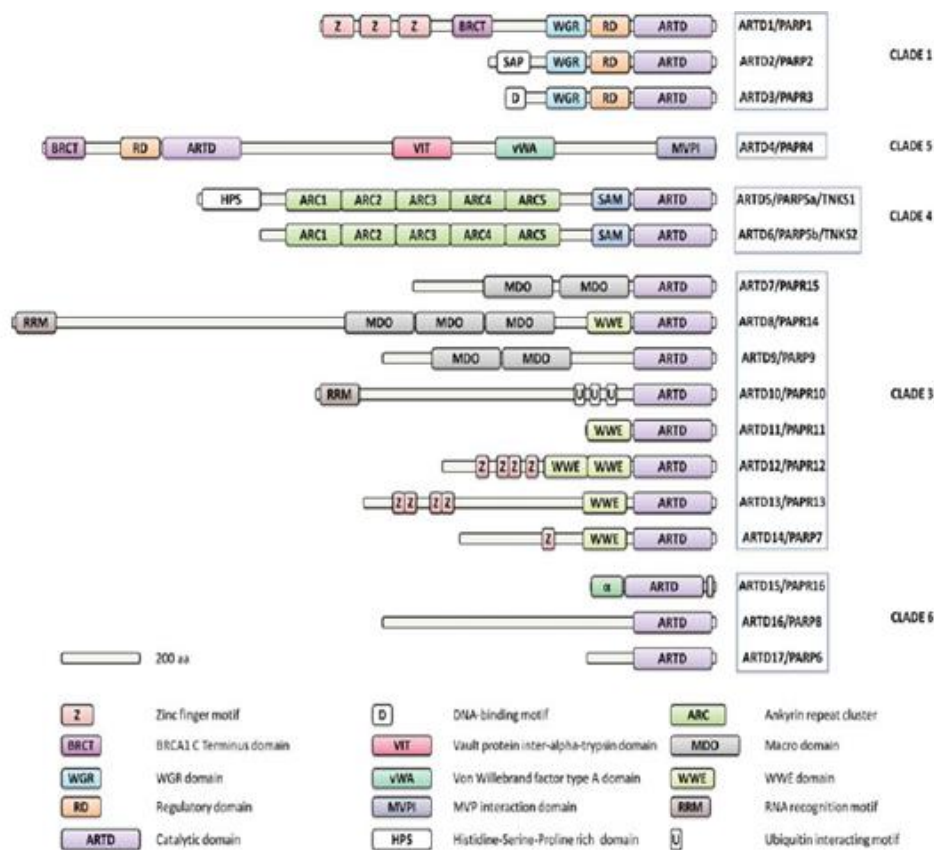
Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση της ADP-ριβοζυλίωσης πρωτεΐνης και η ειδικότητα πρόσδεσης (BINDING SPECIFICITIES) διαφόρων περιοχών που αναγνωρίζουν διαφορετικά σημεία της τροποποίησης

2.6 Η οικογένεια των PARP

Μετά από την ανακάλυψη της ADP ριβοζυλίωσης με ρόλο μεταγραφικής τροποποίησης, διαπιστώθηκε ότι το πρώτο ένζυμο που ήταν ικανό να συνθέτει PAR ήταν η PARP και ονομάστηκε ως πολυμεράση της πολύ ADP-ριβόζης.^[93] Οι πολυμεράσες της πόλυ ADP ριβόζης (PARPs) ή ADP-ριβοζυλοτρανσαφεράσες τύπου τοξίνης διφθερίτιδας (ARTDs), μιας υποκατηγορίας της οικογένειας των ADP-ριβοζυλοτρανσαφερασών (ARTs), είναι πυρηνικές πρωτεΐνες, άφθονες στα κύτταρα των θηλαστικών (περίπου 10^6 μόρια/κύτταρο) με μακρό χρόνο ημιζωής. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα, εκτός από τους ζυμομύκητες.^[94] Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί 17 ισομορφές της PARP με διαφορετικές δομές και λειτουργίες στο

κύτταρο και σε αυτές περιλαμβάνονται η PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, PARP-5 (Τρανκυράσες-1 και 2), PARP-6, PARP-7 (tiPARP), PARP-8, PARP-9 (BAL1), PARP-10, PARP-11, PARP-12, PARP-13 (ZAP), PARP-14 (CoaSt6), PARP-15, και PARP-16.^[95-96] Σύμφωνα με τον Hottiger και άλλους επιστήμονες,^[89] υπάρχει και ένα 18^ο μέλος της οικογένειας των PARPs (PARP-18), για το οποίο δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος του καθώς δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή ερευνητικά δεδομένα. Τα ένζυμα της PARP (ARTDs) χρησιμοποιούν νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD⁺) και καταλύουν τη σύνθεση μακρών διακλαδισμένων πολυμερών PAR της πόλυ-ADP ριβόζης τα οποία είναι προσδεμένα σε κατάλοιπα αμινοξέων πυρηνικών πρωτεϊνών.

Η PARP-1, PARP-2, τρανκράση 1 (TNK1), και τρανκυράση 2 (TNK2) συνθέτουν διακλαδωμένα πολυμερή πόλυ-(ADP-ριβόζη) PAR, ενώ τα υπόλοιπα μέλη των PARP είναι μονο- ή ολιγο-τρανσαφεράσες της ADP ριβόζης, με την εξαίρεση της PARP-13, που είναι ανενεργή, όπως διαπιστώθηκε και περιγράφηκε σύμφωνα με τον Hottiger και άλλους επιστήμονες^[90b] το 2015. Το αφθονότερο και πιο καλά χαρακτηρισμένο μέλος των PARP, αποτελεί η PARP-1, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι λειτουργεί ως ανιχνευτής-αισθητήρας βλάβης του DNA και εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA, στη διατήρηση της γονιδιωματικής ακεραιότητας και τη μακροβιότητα των θηλαστικών.^[97] Τέλος, η PARP-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια πολλών ασθενειών, όπως εγκεφαλικό, έμφραγμα του μυοκαρδίου, διαβήτης, αλλεργία, άσθμα, νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Αλτσχάιμερ και νόσος του Πάρκινσον) και σε άλλες φλεγμονώδεις διαταραχές.^[98,99]



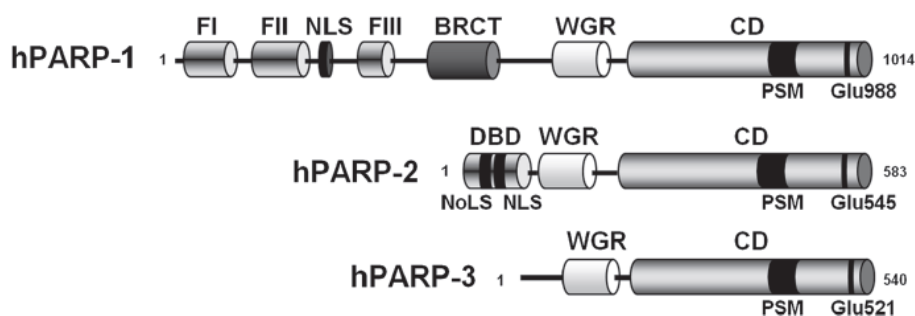
Εικόνα 16: Η οργάνωση των περιοχών των ανθρώπινων ARTD ενζύμων, σύμφωνα με τον Citarelli και τους συνεργάτες του ^[100]

2.6.1 Δομή της PARP-1

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των PARP που ανακαλύφθηκε, ήταν η PAPR-1 (ARTD1, ~116 kDa) μια πυρηνική πρωτεΐνη που ενεργοποιείται από τη θραύση κλώνων του DNA και καταλύει τη σύνθεση πολυμερών της ADP-ριβόζης (με μήκος 200 κατάλοιπα σε ευθεία αλυσίδα και με διακλαδισμένα τμήματα από 20 έως 30 κατάλοιπα). Στην αρθρωτή αρχιτεκτονική της περιλαμβάνονται τέσσερις βασικές περιοχές με έξι ευδιάκριτους τομείς. α) μια αμινο-τερματική περιοχή πρόσδεσης με DNA (DBD/ DNA-binding domain): Η περιοχή DBD αποτελείται από δύο διαδοχικά μοτίβα Zn (FI/Zn1 και FII/Zn2) και μια επιπρόσθετη περιοχή δέσμησης του Zn (FIII/Zn3) που μεσολαβεί στην πρόσδεση του DNA, και εμπλέκεται σε άλλες λειτουργίες, β) μια κεντρική περιοχή αυτόματης τροποποίησης AD, ένα σύμπλεγμα καταλοίπων γλουταμικών οξέων που λειτουργούν ως δέκτες της ADP ριβόζης, και περιλαμβάνει την BRCT (BRCA1 C-τερματική περιοχή) που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης,^[101-105] γ) μια περιοχή τρυπτοφάνης-γλυκίνης-αργινίνης, γνωστό ως WGR μοτίβο, για το οποίο δεν έχει διευκρινιστεί η λειτουργία και ο ρόλος του,^[105] (δ) μια καρβοξυ-τερματική περιοχή (CD):^[106] Η περιοχή CD που

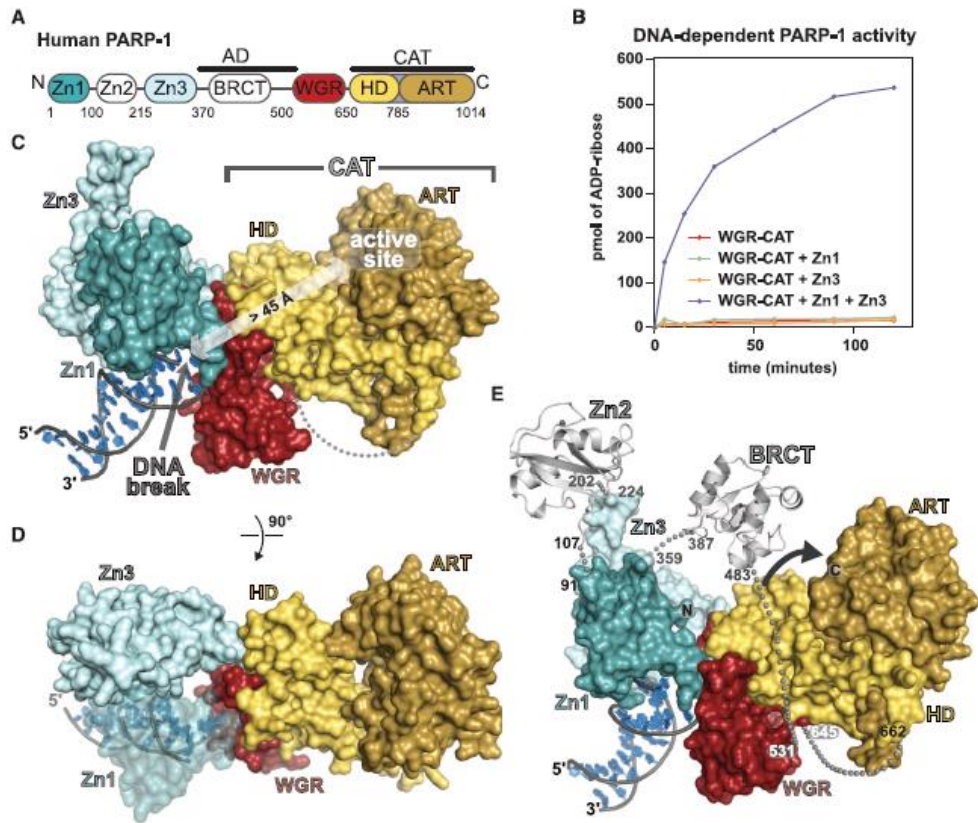
αποτελεί την καταλυτική περιοχή αποτελείται από 2 υποτομείς και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η ελικοειδής υποπεριοχή HD και η ART υποπεριοχή που παρατηρείται σε άλλες ADP ριβοζυλοτρανσφεράσες (ARTs). Περιλαμβάνει αμινοξέα που εμπλέκονται στην κατάλυση και στην πρόσδεση του δινουκλεοτιδίου αδενίνης του νικοτιναμιδίου (NAD⁺).^[107-108] Η ART περιοχή είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του NAD⁺ (donor site) και αποτελείται από δύο κεντρικά β- φύλλα, ένα αντιπαράλληλο φύλλο που περιέχει από τρία έως πέντε β-πτυχές και ένα φύλλο με τέσσερα έως πέντε μεικτές β-πτυχές (strands). Σύμφωνα με τους Steffen^[110α] και άλλους συνεργάτες, η εν λόγω περιοχή που αποτελεί θέση δότη (donor site) διατηρείται στις PARPs και αποτελείται από μια θέση δέσμευσης του νικοτιναμιδίου (nicotinamide-binding rocket), μια θέση δέσμευσης φωσφορικών (PH site), και μια θέση δέσμευσης της ριβόζης αδενίνης (AD site).^[110α]

Είναι σημαντικό να αναφερθεί, πως η περιοχή Zn/F1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση και αναγνώριση μονόκλωνων και δίκλωνων θραυσμάτων DNA, ενώ το δεύτερο μοτίβο ZnF2 εμπλέκεται στη δέσμευση μονόκλωνων θραυσμάτων DNA (SSBs), όπως περιγράφηκε από τον Ikejima και άλλους το 1990.^[110δ] Το τρίτο μοτίβο (ZnF3) είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της PARP-1 και συμμετέχει στην μετάδοση του σήματος που επάγεται από τη βλάβη του DNA σε άλλες περιοχές της PARP, σύμφωνα με τους Karlberg και άλλους επιστήμονες. Τέλος, ο Langelier^[110β-110γ] και άλλοι, το 2012, ανέφεραν ότι η περιοχή ZnF2 δεν είναι απαραίτητη στην ενεργοποίηση της PARP-1 για την απόκριση σε δίκλινα θραύσματα DNA, καθώς συνδυαζόμενες περιοχές των ZnF1, ZnF3, WGR και CAT επαρκούν στην ενζυματική δραστηριότητα της PARP-1.^[110α]

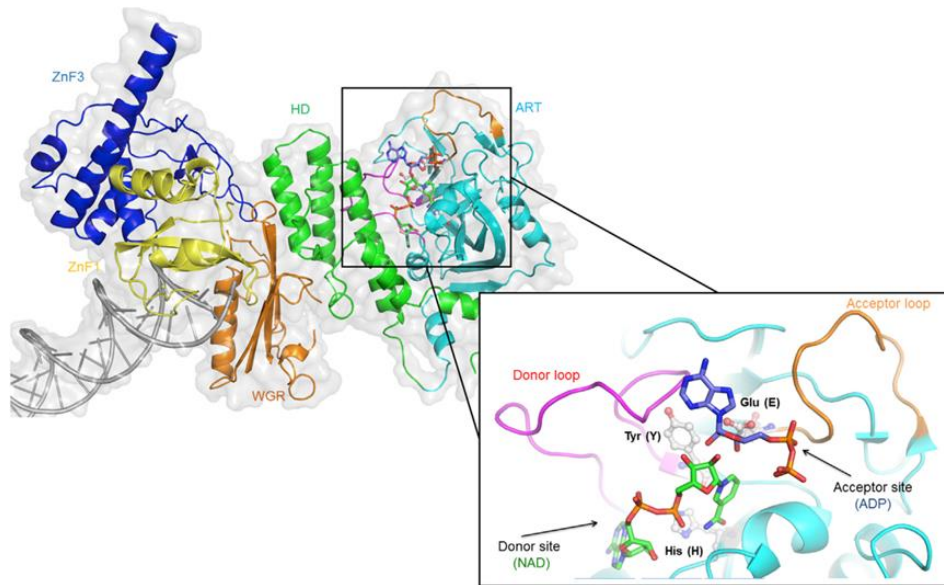


Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση των 1-3 περιοχών των ανθρώπινων hPARPs. Οι ακόλουθες περιοχές υποδηλώνονται ως εξής: μοτίβα Zn (FI και FII), περιοχή πρόσδεσης Zn (FIII), πυρηνικός εντοπισμός του σήματος, WGR μοτίβο, ενώ τα διατηρημένα γλουταμικά οξέα υποδηλώνονται ως έντονες περιοχές CDs.

2.6.2 Βιολογικές Δράσεις



Εικόνα 18: Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της PARP-1 σε σύμπλευξη με DNA. A) Η αρθρωτή αρχιτεκτονική της ανθρώπινης PARP-1. B) Η ανάλυση της εξαρτώμενης αυτόματης τροποποίησης της PARP-1/DNA. C) Η απεικόνιση της επιφανειακής δομής της PARP-1 συζευγμένη με DNA. D) Η περιστροφή κατά 90° που πραγματοποιήθηκε στη δομή που απεικονίζεται στην C. E) Οι Zn2 και BRCT περιοχές που εντοπίζονται στην δομή της PARP-1/DNA χρησιμοποιώντας τις δομές των Zn2 και BRCT με κωδικούς από PDB (3ODC και 2COK), αντίστοιχα.



Εικόνα 19: Η κρυσταλλογραφική δομή της PARP-1 συζευγμένης με δίκλωνο θραύσμα DNA (PDB: 4DQY). Στο σχήμα απεικονίζονται τρία κατάλοιπα που αποτελούν ενεργές θέσεις και είναι His(H)-862, Tyr(Y)-896, και Glu(E)-988. Ο βρόγχος D απεικονίζεται με χρώμα φούξια και ο βρόγχος δέκτης με πορτοκαλί χρώμα.^[109]

Οι πολυμεράσες της πόλυ-ADP ριβόζης είναι ένζυμα που καταλύουν τη σύνθεση αρνητικά φορτισμένων διακλαδισμένων πολυμερών της πόλυ-ADP ριβόζης (PAR) προσαρτημένων σε πρωτεΐνες στόχους με τη σύνδεση πολλών μονάδων ADP-ριβόζης, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί πως μόνο τέσσερα μέλη από την οικογένεια των PARP (PARP-1, PARP-2 και τρανσκυράσες) μπορούν να προσθέτουν πολλαπλές μονάδες ADP ριβόζης (πολυ(ADP-ribose)ation, PARylation), που συνδέονται με Ο-γλυκοσιδικό δεσμό ριβόζης-ριβόζης και να συνθέτουν PAR πολυμερή. Τα υπόλοιπα έντεκα μέλη μεταφέρουν και συνδέουν μόνο μία μονάδα μονο-ADP-ριβόζης σε πρωτεϊνικό υπόστρωμα συνθέτοντας MAR (mono(ADP-ribose)ation ή MARylation), ενώ τα εναπομείναντα είναι ανενεργά.^[111] Οι κύριοι στόχοι για την προσάρτηση της PAR από τις PARP-1 είναι οι ιστόνες και η ίδια η PARP-1.^[112-113]

Το DNA συνεχώς καταστρέφεται από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες με αποτέλεσμα την τροποποίηση βάσεων, σακχάρων και το σχηματισμό θραυσμάτων μονόκλωνου DNA.^[114] Οι PARP-1 και PARP-2 είναι ανιχνευτές-αισθητήρες των βλαβών που συμβαίνουν στο γενετικό υλικό που μέσω της πρόσδεσης τους στα θραύσματά του, προκαλούν την αυτο-πόλυ-ADP-ριβοζυλίωσή τους και σε πυρηνικές πρωτεΐνες. Η προκύπτουσα πρόσδεση του πολυμερούς ADP ριβόζης με πολύπλοκη διακλαδισμένη δομή δημιουργεί αρνητικό φορτίο στις PARP και ιστόνες, με

αποτέλεσμα την ηλεκτροστατική απώθηση των πρωτεϊνών συμπλεγμένων με DNA.^[115-116] Είναι παγκοσμίως αποδεκτό ότι η σύνθεση της PAR στις πρωτεΐνες που απαντούν στο πυρήνα των κυττάρων είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση της επιδιόρθωσης του γενετικού υλικού και της μεταγραφής. Εκτός από τον σταθερά καθορισμένο ρόλο της στην αποκατάσταση της BER και της SSB του DNA, η PARP-1 εμπλέκεται σε πολλαπλούς τύπους άλλων διεργασιών επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραυσμάτων (DSBs) του DNA, όπως είναι η HR, η NHEJ και η μικρο-ομόλογη τελική σύνδεση (MMEJ-Microhomology-Mediated End-Joining).^[117]

Η ενδογενής βλάβη στις βάσεις του DNA μπορεί να επιδιορθωθεί με δύο αλληλεπικαλυπτόμενα μονοπάτια: 1) με το μηχανισμό εκτομής βάσης (BER/SSBR/single strand base repair) που επάγεται από την DNA γλυκοζυλάση 2) το μηχανισμό αφαίρεσης νουκλεοτιδίου (NIR) με μεσολαβητές τις μη πουρινικές/μη πυριμιδινικές (AP) ενδονουκλεάσες.^[118]

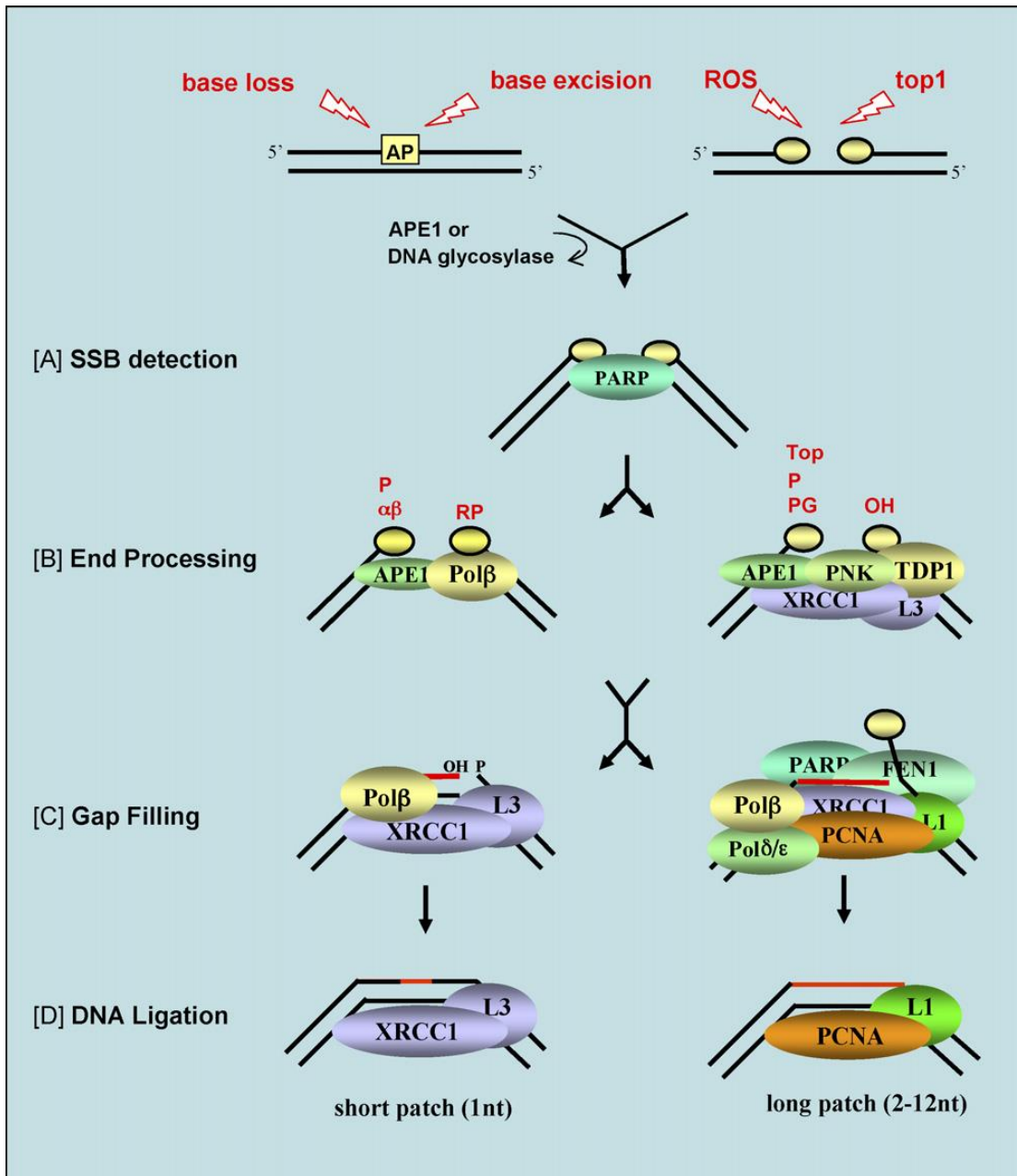
Στο μονοπάτι εκτομής βάσης BER η DNA γλυκοζυλάση αφαιρεί την τροποποιημένη βάση, δημιουργώντας μια μη βασική θέση AP (apurinic/apyrimidinic). Έπειτα ακολουθεί διάνοιξη των μη βασικών θέσεων από την APE1 ενδονουκλεάση σε μονόκλινα θραύσματα του DNA (SSB). Το συγκεκριμένο μονόκλινο θραύσμα του γενετικού υλικού λειτουργεί ως ενδιάμεσο υπόστρωμα για την PARP-1, η οποία αρχίζει τη σύνθεση μιας αλυσίδας PAR από NAD⁺ στην ίδια την PARP-1 και σε άλλες πρωτεΐνες επιδιόρθωσης του DNA.^[119-120] Η προκύπτουσα τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα την άμεση μετεγκατάσταση επιδιορθωτικών πρωτεϊνών, όπως η XRCC1. Η σύνδεση και η δραστηριότητα της PARP-1 σε θραύσματα του DNA είναι παροδική, καθώς μόλις αυτοριβοζυλιώνεται, το ένζυμο αποσυνδέεται από το DNA μέσω απώθησης των φορτίων.^[121-122] Το σχηματιζόμενο πολυμερές PAR αποδομείται ταχέως από την γλυκοϋδρολάση της ADP ριβόζης, επιτρέποντας την ενεργοποίηση της PARP-1 σε οποιοδήποτε θραύσμα του DNA.^[122]

Στο μονοπάτι αφαίρεσης νουκλεοτιδίου NIR, μια ειδική AP ενδονουκλεάση δημιουργεί μια τομή 5' σε μια κατεστραμμένη βάση με αποτέλεσμα την παραγωγή SSB με μια τελική 3-υδροξυλομάδα και ένα 5'κατεστραμμένο νουκλεοτίδιο.^[123]

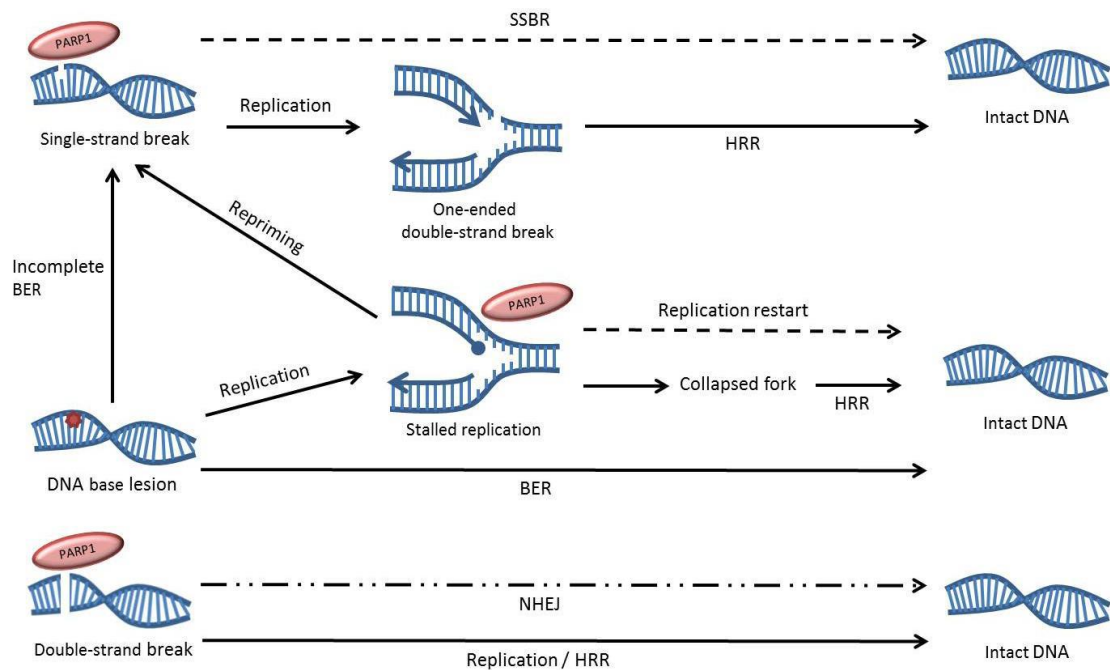
Εκτός από τον ρόλο της στην αποκατάσταση της BER και της SSB του DNA, η PARP-1 συμμετέχει σε πολλές διεργασίες επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραυσμάτων (DSBs) του DNA, όπως είναι η HR, η NHEJ και η μικρο-ομόλογη τελική σύνδεση (MMEJ – Microhomology-Mediated End-Joining).^[117] Αν και

ιστορικά ο ρόλος της PARP-1 εστιάζεται στην αποκατάσταση της BER/SSBR, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν την τελευταία δεκαετία αναδεικνύουν τη σημασία τους στην επιδιόρθωση σε δίκλινα θραύσματα DNA (DSB). Υποστηρίζεται ότι η PARP1 αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες της DSB απόκρισης, συμπεριλαμβανομένων των ATM, DNA-PKcs, Ku80, MRE11 και NBS1.^[124-127] Υπάρχουν τουλάχιστον τρία μονοπάτια επιδιόρθωσης σε κακοήθεις βλάβες του DNA: 1) ομόλογος ανασυνδυασμός HD, 2) κλασικός μη ομόλογος συνδετικός τερματισμός (C-NHEJ) και 3) εναλλακτικός μη ομόλογος συνδετικός τερματισμός (A-NHEJ).^[128]

Είναι σαφές πως η PARP-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA με πολλούς τρόπους και πέρα από τη δέσμευση του σε μονόκλινα ή δίκλινα θραύσματα DNA, συνεισφέρει στην τροποποίηση τόσο της δομής της χρωματίνης όσο και της λειτουργίας της. Μία ευρέως αποδεκτή υπόθεση είναι ότι η δραστηριότητα της PARP φαίνεται να ευνοεί τη χαλάρωση της χρωματίνης με αποτέλεσμα την πρόσβαση σε βλάβες του DNA από επιδιορθωτικούς παράγοντες.



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της αποκατάστασης των μονόκλωνων θραυσμάτων SSBs. Τα μονόκλινα θραύσματα προκύπτουν έμμεσα μέσω της ενζυματικής τομής μιας μη βασικής θέσης (AP) από την APE1 ή από την DNA γλυκοζυλάση (πάνω αριστερά), ή κατευθείαν από την καταστροφή-αποδόμηση σακχάρου από τα ενεργά ROS, ή από την ανεπιτυχή 1 δραστηριότητα (πάνω δεξιά).



Εικόνα 21: Ο ρόλος της PARP-1 στην επιδιόρθωση του DNA. Η PARP-1 προσδέεται σε μονόκλινα θραύσματα του DNA και σε δίκλινα θραύσματα, ενώ με στικτές γραμμές αναπαρίστανται τα μονοπάτια που έχουν υποστεί βλάβη από την αναστολή της PARP.

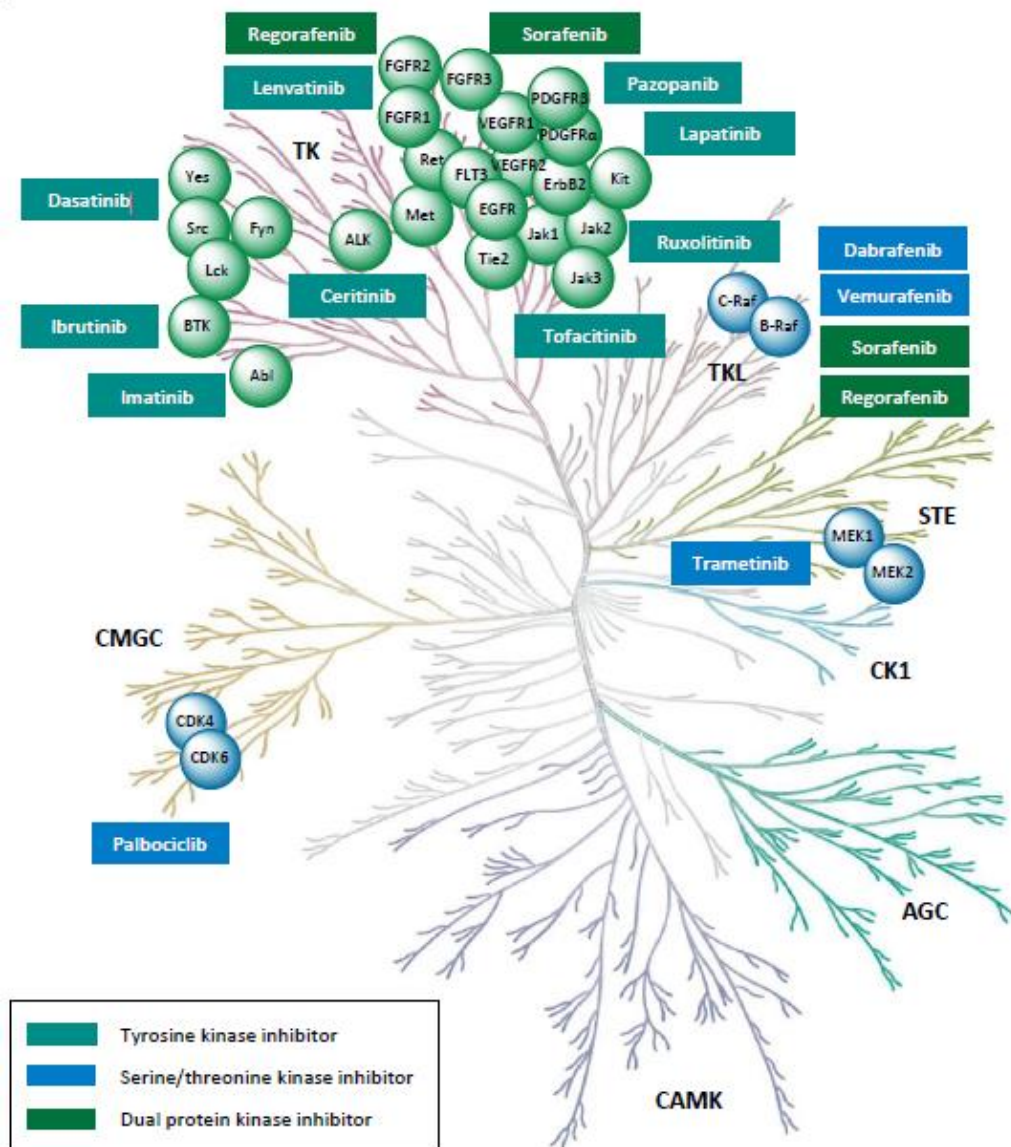
2.7 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Οι μεταλλάξεις, η υπερέκφραση και η απορρύθμιση των πρωτεϊνικών κινασών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια πολλών ασθενειών, όπως ο καρκίνος, το άσθμα, αυτοάνοσα και καρδιαγγειακά νοσήματα. Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών έχει αποτελέσει το επίκεντρο του ερευνητικού ενδιαφέροντος και συγκαταλέγεται ως ένας από τα σημαντικότερους στόχους στην ανάπτυξη φαρμάκων τα τελευταία είκοσι χρόνια.^[7,129] Ένας από τους λόγους που οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο, είναι η καθοριστική συμβολή τους στην κυτταρική σηματοδότηση καθώς και στη ρύθμιση πολυποίκιλων κυτταρικών διεργασιών. Αντίθετα από την αντιμετώπιση του καρκίνου και τη συμβατική χημειοθεραπεία που χαρακτηρίζεται από πολλές τοξικές παρενέργειες, η στοχευμένη θεραπεία έχει υψηλή εκλεκτικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων με χαμηλή τοξικότητα. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κυτταροτοξική χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία με σκοπό την ενίσχυση της επιπρόσθετης ή συνεργιστικής αντικαρκινικής δράσης.

Η στρατηγική της αναστολής των πρωτεϊνικών κινασών για την αντιμετώπιση ασθενειών αναπτύχθηκε στα τέλη του 1980 με την περιγραφή των αναστολέων του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα.^[130] Επιπρόσθετα, η έγκριση του Imatinib από το FDA το 2001, ενός

εκλεκτικού αναστολέα της μεταλλαγμένης Bcr-Abl πρωτεΐνης, αποτέλεσε ορόσημο στην ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών και σημαντική ανακάλυψη στην στοχευμένη θεραπεία κατά του καρκίνου. Μέχρι στιγμής έχουν εγκριθεί από το USA FDA 48 αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους, εκ των οποίων, 43 φάρμακα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία κακοηθών ασθενειών. Από τα 48 εγκεκριμένα φάρμακα, η πλειοψηφία αυτών (25) αποτελούν αναστολείς των υποδοχικών τυροσινικών κινασών, 10 στοχεύουν μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες και 13 αποτελούν αναστολείς των κινασών σερίνης/θρεονίνης.

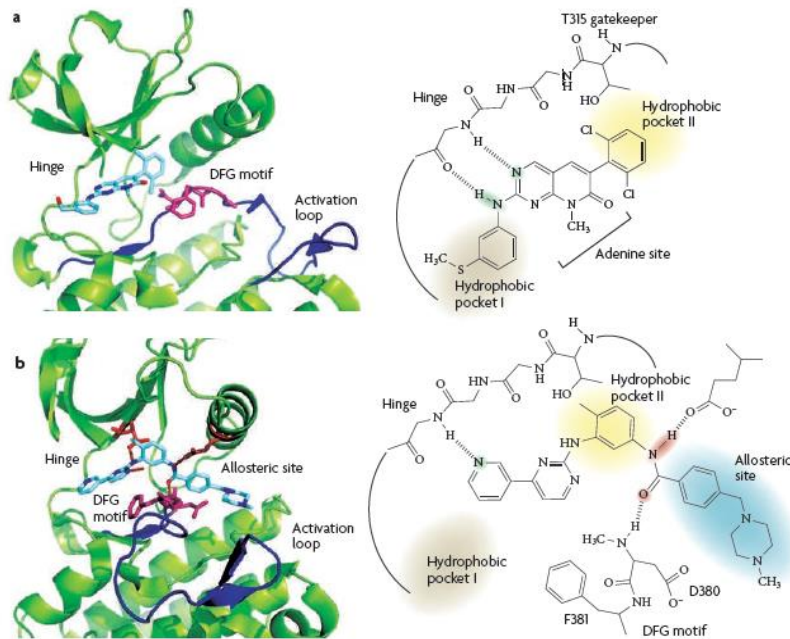
Οι πρωτεϊνικές κινάσες χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη υψηλού βαθμού ομοιότητας στην τρισδιάστατη κρυσταλλογραφική δομή τους και ειδικότερα στην καταλυτική ενεργή περιοχή, όπου εντοπίζεται η θέση δέσμησης του ATP η οποία βρίσκεται μεταξύ του N- και C- τερματικού λοβού. Οι περισσότεροι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών διαταράσσουν τις αλληλεπιδράσεις στην εν λόγω περιοχή μέσω της πρόσδεσής τους. Η κατηγοριοποίηση των αναστολέων βάσει του τρόπου δέσμησης στην πρωτεϊνική κινάση τους κατατάσσει σε αναστρέψιμους και μη αναστρέψιμους αναστολείς. Η συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση θα αναλυθεί εν συνεχεία. Μέχρι σήμερα, οι περισσότεροι εγκεκριμένοι αναστολείς είναι ανταγωνιστές του ATP^[131] και σχηματίζουν από έναν έως τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα της hinge περιοχής πρωτεϊνικής κινάσης. Στους συγκεκριμένους αναστολείς περιλαμβάνονται οι αναστολείς τύπου I που προσδέονται στη θέση αδενίνης του ATP, με το DGF μοτίβο να υιοθετεί την in διαμόρφωση και τους αναστολείς τύπου II, που προσδέονται τόσο στη θέση δέσμησης του ATP όσο και σε κοντινή αλλοστερική θέση σαν αποτέλεσμα της DGF out διαμόρφωσης. Από τους 25 μη ομοιοπολικούς αναστολείς μικρού μοριακού βάρους, το lenvatinib κατέδειξε ιδιότητες τύπου I και II αναστολής^[132] και επιπλέον κατατάσσεται ως αναστολέας τύπου V.^[133] Το Trametinib, το οποίο δεν προσδέεται στη θέση δέσμησης του ATP, αλλά καταλαμβάνει μια κοντινή αλλοστερική θέση είναι ο μοναδικός τύπου αναστολέα τύπου III που έχει εγκριθεί μέχρι πρότινος, ενώ κανένας τύπου IV αναστολέας δεν έχει εγκριθεί μέχρι στιγμής. Επιπρόσθετα, το Afatinib και Ibrutinib αντιπροσωπεύουν μια ομάδα αναστολέων που ενσωματώνουν ένα ενεργό ηλεκτρονιόφιλο δέκτη κατά Michael, που αντιδρά με την κυστεΐνη στην hinge περιοχή στη θέση δέσμησης του ATP για να σχηματίσουν ένα ομοιοπολικό δεσμό.^[134] Τέλος, μια συστηματική χαρτογράφηση-ανάλυση της οικογένειας πρωτεϊνικών κινασών κατέδειξε ότι περίπου 200 από αυτές διαθέτουν μια εκτεθειμένη κυστεΐνη στο καταλυτικό κέντρο που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ομοιοπολική αναστολή.^[135]



Εικόνα 22: Εγκεκριμένοι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους που στοχεύουν πρωτεϊνικές κινάσες (SMKIs). Οι κινάσες τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης απεικονίζονται με πράσινους και μπλε κύκλους αντίστοιχα. Οι επτά κύριες οικογένειες αναπαρίστανται ως διαφορετικά χρωματισμένοι κλάδοι.

Αναστολείς τύπου I

Η συγκεκριμένη κατηγορία αποτελεί την πλειοψηφία αναστολέων που δρουν ανταγωνιστικά του ATP και αναγνωρίζουν την ενεργή διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. Έχουν ανακαλυφθεί πολλές ενώσεις που ανήκουν στην εν λόγω κατηγορία που μιμούνται και ανταγωνίζονται το ATP, χρησιμοποιώντας ενζυματικές δοκιμές κατά τις οποίες οι κινάσες βρίσκονται παγιδευμένες στην ενεργή διαμόρφωση. Οι τύπου I αναστολείς αποτελούνται από έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο που καταλαμβάνει τη θέση δέσμευσης της πουρίνης και λειτουργεί σαν ικρίωμα για παράπλευρες αλυσίδες που καταλαμβάνουν τις υδροφοβικές περιοχές I και II.



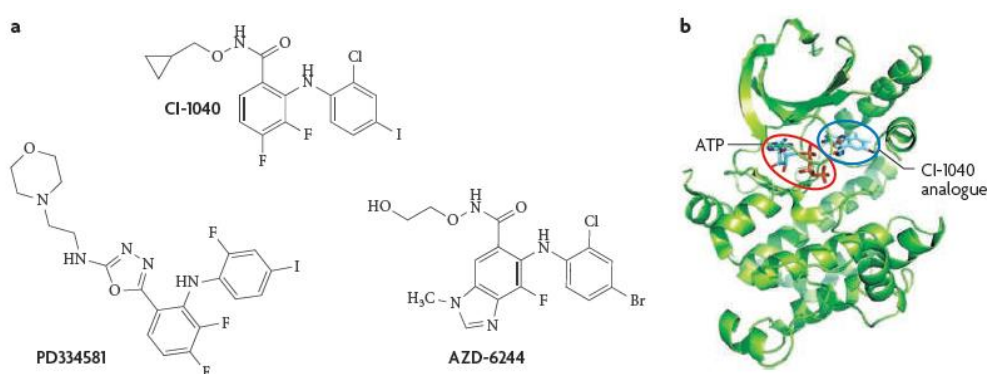
Εικόνα 23: Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αναστολέα και πρωτεΐνης αναπαρίστανται ως *ribbon* δομή (αριστερά) και ως χημική δομή (δεξιά). Στις χημικές δομές απεικονίζονται υδροφοβικές περιοχές I και II της ABL1 πρωτεΐνης και οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του αναστολέα και της ABL1 υποδηλώνονται με έντονες γραμμές. Το DFG μοτίβο (ροζ), η *hinge* περιοχή και ο βρόγχος ενεργοποίησης απεικονίζονται στις σκελετικές δομές. α) Η ABL1 συμπλεγμένη με τύπου I αναστολέα σε DFG in διαμόρφωση PD166326 (Protein Data Bank (PDB) ID 1OPK).^[136] β) Η DFG-out διαμόρφωση του βρόγχου ενεργοποίησης της ABL1 με το imatinib (PDB ID 1IEP).^[137] Η αλλοστερική θέση εκτίθεται στη DFG-out διαμόρφωση που απεικονίζεται ως μπλε σκιασμένη περιοχή (δεξιά).

Αναστολείς τύπου II

Σε αντίθεση με τους αναστολείς τύπου I, η κατηγορία αυτή αναγνωρίζει την ανενεργή διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 23 (1β). Η ανενεργή διαμόρφωση που αναγνωρίζεται από τους τύπου II αναστολείς αναφέρεται και ως DGF-out, λόγω της αναδιάταξης του μοτίβου. Ο βρόγχος ενεργοποίησης μετακινείται στην DGF out διαμόρφωση με αποτέλεσμα να εκτίθεται μια επιπλέον υδροφοβική θέση, κοντινή στη θέση δέσμευσης του ATP. Στη συγκεκριμένη κατηγορία ανήκουν το Imatinib και Sorafenib, οι κρυσταλλογραφικές δομές των οποίων κατέδειξαν πως έχουν παρόμοιο φαρμακοφόρο μοντέλο και εκμεταλλεύονται τον ίδιο αριθμό δεσμών υδρογόνου.^[138]

Αναστολείς τύπου III

Οι αναστολείς τύπου III ή αλλοστερικοί αναστολείς δεν δεσμεύονται στη θέση δέσμευσης του ATP, αλλά σε μια αλλοστερική θέση και τροποποιούν τη δραστηριότητα της της κινάσης με αλλοστερικό τρόπο. Έχουν την τάση να εκδηλώνουν υψηλή επιλεκτικότητα γιατί εκμεταλλεύονται σημεία δέσμευσης και ρυθμιστικούς μηχανισμούς μοναδικούς για κάθε κινάση. Ο πιο γνωστός και χαρακτηρισμένος αναστολέας της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι ο CI-1040, που αναστέλλει την MeK1 και MeK2 μέσω δέσμευσης της θέσης πλησίον του ενεργού κέντρου.^[139α]

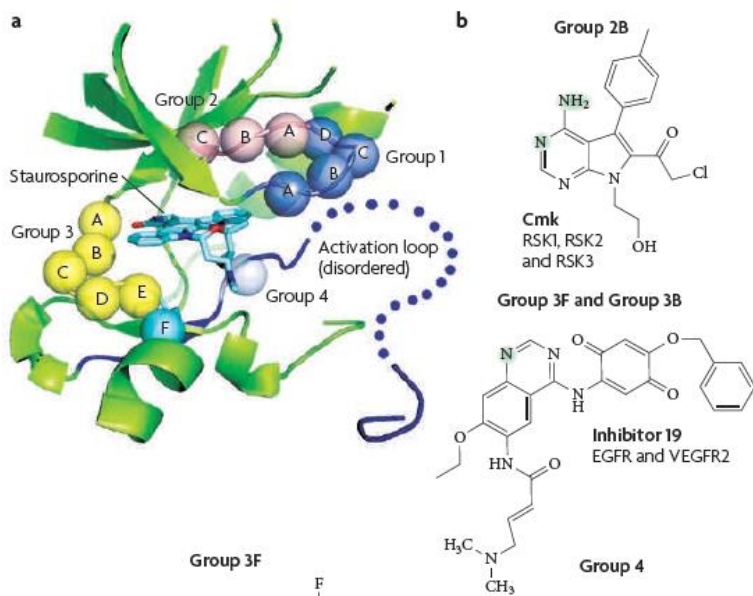


Εικόνα 24: Απεικονίζονται οι χημικές δομές των Mek1 αναστολέων. α) Ο AZD-6244 and PD334581 είναι δευτέρας γενιάς Mek 1 αναστολείς υπό κλινική ανάπτυξη β) Ο CI-1040 (μπλε κύκλος) δεσμεύεται στην MEK1 (πράσινος σκελετός, Protein Data Bank (PDB) ID 1S9^[139β]) πλησίον της θέσης δέσμευσης του ATP (κυκκινος κύκλος).

Ομοιοπολικοί Αναστολείς

Η τέταρτη κατηγορία αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών είναι μη αναστρέψιμοι, συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό στην ενεργή θέση της κινάσης και συχνά αντιδρούν με πυρηνόφιλο κατάλοιπο κυστεΐνης.^[140-141] Ένας εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι ο μη αναστρέψιμος αναστολέας του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR και HKI-272,^[142] που αναπτύχθηκαν για να εντοπίζουν ένα κατάλοιπο κυστεΐνης. Οι συγκεκριμένες ενώσεις σχεδιάστηκαν για να συνδέονται με ένα ηλεκτρονιόφιλο, το οποίο είναι δραστικό σε μία περιοχή πλούσια σε ηλεκτρόνια όπου βρίσκεται στο κατάλοιπο κυστεΐνης. Πραγματοποιείται μια αντίδραση κατά Michael στην οποία το εκτεθειμένο στο διαλύτη κατάλοιπο κυστεΐνης που απαντάται στους EGFR (C773) or ERBB2 (C805) σχηματίζει έναν ομοιοπολικό δεσμό με τον αναστολέα. Σαν αποτέλεσμα αυτού σχηματιζόμενου ομοιοπολικού δεσμού, η κινάση καθίσταται

ανενεργή, καθώς ο αναστολέας εμποδίζει και δεν επιτρέπει την πρόσδεση του ATP στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Μέχρι στιγμής πέντε αναστολείς των EGFR πρωτεϊνικών κινάσεων βρίσκονται υπό ανάπτυξη στη θεραπεία του καρκίνου στο πνεύμονα.^[141,143,144]

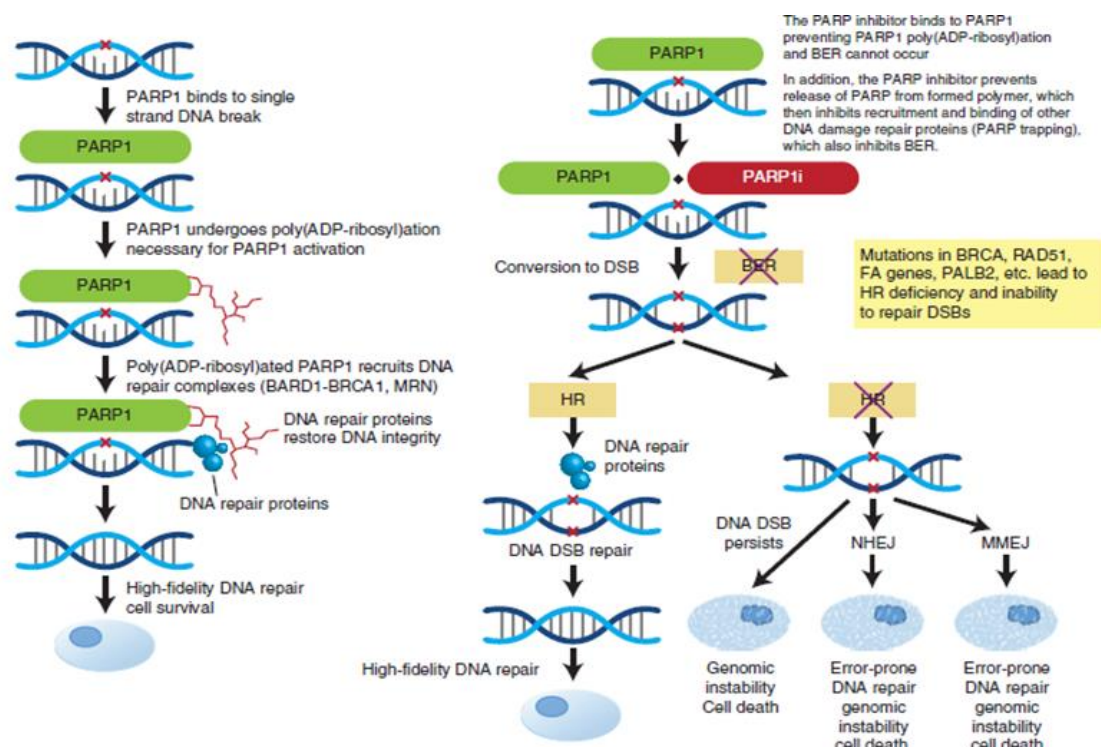


Εικόνα 25: Απεικόνιση των μη αναστρέψιμων αναστολέων και εντοπισμός των κατάλοιπων κυστεϊνών που είναι προσβάσιμα για την ομοιοπολική τροποποίηση. α) Η σκελετική δομή απεικονίζει την κυστεΐνη που περιέχεται στην ιντερλευκίνη 2 τυροσινική κινάση. β) Οι χημικές δομές των ομοιοπολικών αναστολέων που αντιδρούν με την ομάδα κυστεΐνης. Με πράσινο έντονο χρώμα υποδηλώνονται τα άτομα του αναστολέα που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου στην hinge περιοχή.

2.8 Αναστολείς των PPARs

Οι αναστολείς των πολύ-ADP πολυμερασών αποτελούν μια νέα κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων που επιλεκτικά οδηγούν τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο μέσω της στόχευσης ελαττωμάτων του ομόλογου ανασυνδυασμού, μηχανισμού επιδιόρθωσης. Το 2010, καταγράφηκαν σημαντικοί πρόοδοι στην ανάπτυξη αναστολέων της PARP-1.^[145] Ειδικότερα, η έγκριση του Olaparib το 2014 για τη θεραπεία του καρκίνου των ωθηκών με μεταλλάξεις της BCRA επικύρωσαν την PARP-1 ως αντικαρκινικό στόχο, καθώς και την κλινική τους σημασία στη θεραπεία του καρκίνου. Αρχικά, υπήρχε η αντίληψη ότι οι εν λόγω αναστολείς δρουν αναστέλλοντας την ενζυματική δραστηριότητα της PARP-1, καθυστερώντας τον μηχανισμό επιδιόρθωσης, μέσω εκτομής βάσης σε μονόκλωνο θραύσμα DNA. Πρόσφατα, μελέτες έδειξαν ότι οι εν λόγω αναστολείς μπορούν να δράσουν παγιδεύοντας την RARP -1 συζευγμένη με το DNA,^[146] ως αποτέλεσμα μιας αλλοστερικής αλλαγής της διαμόρφωσης που σταθεροποιεί τις PARP-1 και PARP-2 συμπλεγμένες με το DNA.

Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των PARPs μπορεί να στηριχθεί σε τέσσερα μοντέλα για τη διασαφήνιση της θνησιμότητας που προκαλούν στα καρκινικά κύτταρα. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται η αναστολή της επιδιόρθωσης μέσω εκτομής βάσης (BER), η παγίδευσή της σε καταστρεμμένο DNA, η μειωμένη απόκριση της BRCA1 στην επιδιόρθωση του ελαττωματικού DNA, και η ενεργοποίηση της NHEJ.^[147] Παρακάτω θα αναλυθούν δύο από τους κύριους μηχανισμούς δράσης των αναστολέων που έχουν προταθεί.



Εικόνα 26: Ο ρόλος της PARP στην επιδιόρθωση DNA και τα κύρια αποτελέσματα της αναστολής της. α) Η επιδιόρθωση σε θραύσμα μονόκλωνου μέσω του επιδιορθωτικού μηχανισμού εκτομής βάσης(BER). β) Το αποτέλεσμα της αναστολής των PARPs σε μονόκλωνο και δίκλωνο θραύσμα του DNA.

2.8.1 Επιδιόρθωση μέσω εκτομής βάσης

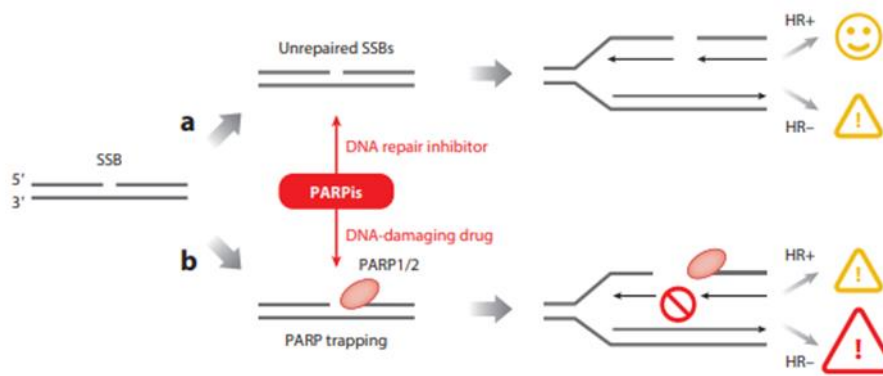
Η συνθετική θνησιμότητα που παρατηρείται στις BRCA1/2 μεταλλάξεις και η επιπρόσθετη αναστολή της PARP έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή του ομόλογου ανασυνδυασμού και μεταγενέστερα τη μείωση του ρυθμού της εκτομής βάσης, όπως ανέφερε ο Scott και άλλοι επιστήμονες. Υπό την επήρεια της φυσιολογικής αναστολής της PARP, τα προκύπτοντα θραύσματα σε μονόκλωνο DNA τα οποία επιδιορθώνονται μέσω της εκτομής βάσης, παραμένουν ως έχει, με αποτέλεσμα το DNA να αντιγράφεται, να οδηγείται σε θραύσματα δίκλωνου γενετικού υλικού που επιδιορθώνονται υπό κανονικές συνθήκες από το μονοπάτι

ομόλογου συνδυασμού και έτσι να διατηρείται η βιωσιμότητα του κυττάρου. Ωστόσο, ο Ashworth το 2008, ανέφερε ότι σε κύτταρα με έλλειψη της BRCA πρωτεΐνης, τα θραύσματα που υφίστανται σε δίκλωνο DNA δεν επιδιορθώνονται, με αποτέλεσμα να επέρχεται γονιδιωματική αστάθεια και κυτταρικός θάνατος (εικόνα 26).

2.8.2 Παγίδευση των PARPs

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε περίπτωση βλάβης του DNA, η PARP-1 ενεργοποιείται και πυροδοτείται η σύνθεση των PAR πολυμερών με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του γενετικού υλικού. Ωστόσο, η αναστολή της δεν προάγει τη σύνθεση των PAR με αποτέλεσμα η PARP να παραμένει ενωμένη-παγιδευμένη με το ελαττωματικό DNA και να μην επιτυγχάνεται περαιτέρω η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού.^[147] Οι εν λόγω αναστολές μπορούν να δράσουν ως δηλητήριο που παγιδεύουν την PARP-1 στο DNA επιδεικνύοντας μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα από ό,τι καταδεικνύει η απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας της PARP, όπως αναφέρθηκε από τον Murai και άλλους συνεργάτες. Η ικανότητα της παγίδευσης της PARP-DNA διασαφηνίζει το διαφορετικό μέγεθος κυτταροτοξικότητας που καταδεικνύουν διαφορετικοί αναστολές της πολύ-ADP πολυμεράσης της ριβόζης.

Οι PARP-1 αναστολές δεσμεύονται στη θέση δέσμευσης του NAD⁺ του ενζύμου, επάγοντας μια αλλοστερική αλλαγή της διαμόρφωσης και σταθεροποιούν την αναστρέψιμη σύνδεση της PARP1/2 με το DNA. Η συγκεκριμένη διαδικασία αναφέρεται ως παγίδευση των DNA-PARP-1/2 συμπλόκων.^[146,148-150] Τα σχηματιζόμενα ανθεκτικά σύμπλοκα παγίδευσης DNA-PARP, που εντοπίζονται στα θραύσματα μονόκλωνου DNA κατά τη διάρκεια της S φάσης, αντιγράφονται και προκύπτουν θραύσματα δίκλωνου DNA σε κύτταρα με έλλειψη HRR (homologous recombination repair) και οδηγούνται, τελικά, σε κυτταρικό θάνατο. Ο εν λόγω μηχανισμός έχει προταθεί ως υπεύθυνος για την αντικαρκινική δράση που καταδεικνύουν οι αναστολές της PARP-1.^[148-149] Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη με κάποιους αναστολές της PARP-1 υποδεικνύει πως η παγίδευση της με το DNA δεν αποδίδεται στην αλλοστερική διαμόρφωση, αλλά σχετίζεται με την αναστολή της καταλυτικής δραστηριότητας.^[145]



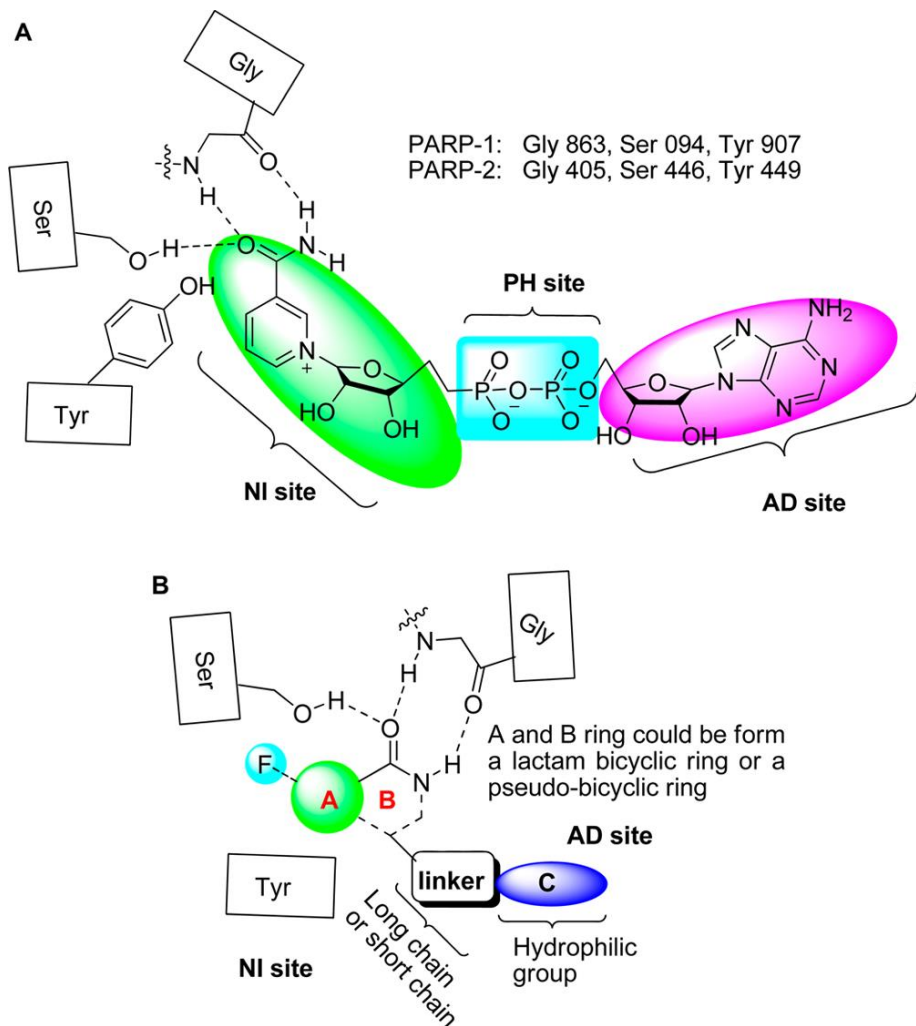
Εικόνα 27: Οι δύο μηχανισμοί δράσης των αναστολέων της πολυμεράσης της πολυ ADP ριβόζης (PARPis) σε κύτταρα με έλλειψη επιδιορθωτικού ομόλογου ανασυνδυασμού (HRR). α) Αναστολή της επιδιορθωσης του DNA μέσω καταλυτικής αναστολής. Τα θραύσματα σε δίκλωνο DNA που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή δεν είναι τοξικά αρκεί να υφίσταται ο ομόλογος επιδιορθωτικός ανασυνδυασμός. Σε περίπτωση απουσίας της επιδιορθωσης ομόλογου ανασυνδυασμού τα θραύσματα δε δίκλωνο DNA είναι τοξικά. β) Αναστολή μέσω παγίδευσης της PARP στο DNA.

2.8.3 Δέσμευση των αναστολέων PARP-1 στη θέση δέσμευσης του NAD⁺

Ο Ruf και οι συνεργάτες του περιέγραψαν τον τρόπο δέσμευσης του NAD⁺ στην καταλυτική περιοχή της PARP-1^[151] Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 28, η περιοχή της PARP-1 που δεσμεύεται το NAD⁺ ονομάζεται θέση δότη και κατηγοριοποιείται σε τρεις υποπεριοχές που συμπεριλαμβάνουν: α) την περιοχή NI που αποτελεί την περιοχή δέσμευσης της ριβόζης-νικοτιναμιδίου,^[151] β) την περιοχή δέσμευσης των φωσφορικών PH γ) την περιοχή δέσμευσης της ριβόζης-αδενίνης AD,^[151] μια υδρόφοβη περιοχή πλησίον της θέσης δέσμευσης του νικοτιναμιδίου.^[152] Αυτή η περιοχή μπορεί να αξιοποιηθεί από μια μεγάλη κατηγορία αναστολέων της PARP-1 για τη βελτίωση της διαλυτότητας, δραστηριότητας καθώς και άλλων φαρμακευτικών ιδιοτήτων των αναστολέων.

Οι περισσότεροι εγκεκριμένοι αναστολείς των PARP σχεδιάστηκαν ως μιμητές-ανταγωνιστές του NAD⁺ και προσομοιάζουν στη δομή τους πολλά από τα δομικά χαρακτηριστικά του νικοτιναμιδίου. Ειδικότερα, οι αναστολείς των PARP προσδένονται και δρουν ανταγωνιστικά στη θέση δέσμευσης του NAD⁺ στη περιοχή NI της PARP-1 που αποτελεί την καταλυτική περιοχή. Το νικοτιναμίδιο και τα 3-αμινοβενζοαμίδια ανάλογα του αποτέλεσαν τους πρώτους αναστολείς της PARP-1, αλλά κατέδειξαν χαμηλή δραστηριότητα έναντι της PARP-1, καθώς και κάποιες παρενέργειες. Μετέπειτα ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώθηκαν στον περιορισμό της περιστροφής της αμιδικής παράπλευρης αλυσίδας του 3-αμινοβενζοαμιδίου, γεγονός που οδήγησε σε δικυκλικά λακταμικά αμίδια ή σε ψευδο-δικυκλικά αμίδια. Οι συγκεκριμένοι δευτέρας γενιάς αναστολείς κατέδειξαν υψηλότερη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα έναντι της PARP-1 με τη αμιδική ομάδα να σχηματίζει

ένα σημαντικό δίκτυο δεσμών υδρογόνου με κατάλοιπα της γλυκίνης και σερίνης. Επίσης, σχηματίζονται ζωτικής σημασίας, αλληλεπιδράσεις π-π μεταξύ του A δακτυλίου (πράσινος κύκλος) και του καταλοίπου της τυροσίνης. Επιπρόσθετα, μια μακρά αλυσίδα ή μια βραχεία απαιτείται για τη σύνδεση της NI περιοχής με τις δομικές μονάδες της AD περιοχής, αλλά είναι σημαντική για τη εκδήλωση της δραστηριότητας καθώς και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αναστολέων. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι πρόσφατοι αναστολείς της PARP-1 καταδεικνύουν χαμηλή εκλεκτικότητα έναντι της PARP-2, εξαιτίας της υψηλής ομολογίας των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στην καταλυτική περιοχή. Δομικά οι PARP-1/2 μη επιλεκτικοί αναστολείς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δυο υποκατηγορίες συμπεριλαμβανομένων των δικυκλικών ή ψευδοδικυκλικών λακταμικών φαρμακοφόρων μοντέλων.



Εικόνα 28: Το φαρμακοφόρο μοντέλο των αναστολέων της PARP-1 στη θέση δέσμευσης του νικοτιναμιδίου. Α) Η περιοχή δέσμευσης του NAD⁺ και υποπεριοχές των PARP-1 και PARP-2. Β) Ο τρόπος δέσμευσης του αναστολέα της PARP-1 που αποτελείται από λακταμικό δικυκλικό σύστημα ή ένα ψευδο-δικυκλικό.

2.9 Συνθέσεις Αναστολέων

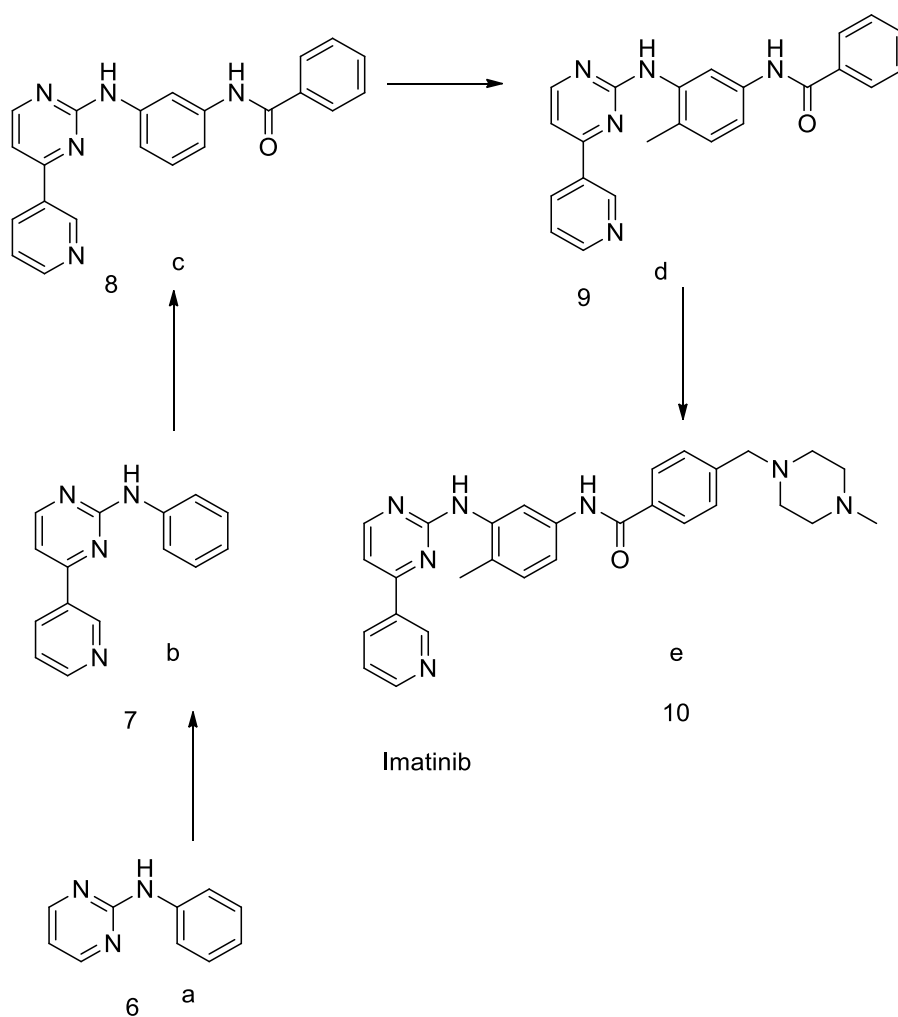
2.9.1 1 Imatinib (Gleevec)

Η Bcr-Abl αποτελεί την πρώτη κινάση για την οποία ένας αναστολέας μικρού μοριακού βάρους έλαβε έγκριση,^[153] ενώ πέντε αναστολείς της υβριδικής μεταλλαγμένης πρωτεΐνης έχουν εγκριθεί μέχρι στιγμής^[154]: Imatinib (Gleevec1, Novartis), Dasatinib (Sprycel1, Bristol-Myers Squibb), Nilotinib (Tasigna1, Novartis), bosutinib (Bosulif1, Wyeth), και Ponatinib (Iclusig1, Ariad Pharmaceuticals). Το Imatinib γνωστό και ως Gleevec ή Glivec, είναι ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης, και αναπτύχθηκε για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) το 2001. Ανακαλύφθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 από τον βιοχημικό Nicholas Lyndon και η εφαρμογή του ως θεραπευτικό μέσο ωθήθηκε από τον Brian Druker, έναν ογκολόγο του ιδρύματος Dana-Farber. Το 1998 διεξήχθη η πρώτη κλινική δοκιμή και εγκρίθηκε από το FDA το Μάιο του 2001. Κατέδειξε ένα υποσχόμενο θεραπευτικό μέσο κατά πολλών μορφών καρκίνου, όπου πρωτεϊνικές κινάσες υπερεκφράζονται, και σε αυτές συμπεριλαμβάνονται, όγκοι του γαστρεντερικού, κακοήθης μελάνωμα, χόρδωμα, αναπλαστικός καρκίνος του θυροειδούς^[155]. Τέλος, τα σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα μετά από χρήση του Imatinib, σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία, οδήγησαν και σε ευεργετικά κλινικά οφέλη μέσω της αναστολής και άλλων τυροσινικών κινασών, όπως του αυξητικού παράγοντα που παράγεται από τα αιμοπετάλια (PDGF), το υποδοχέα PDGF-R, του κυτταρικού παράγοντα (SCF) και του c-Kit.^[156]

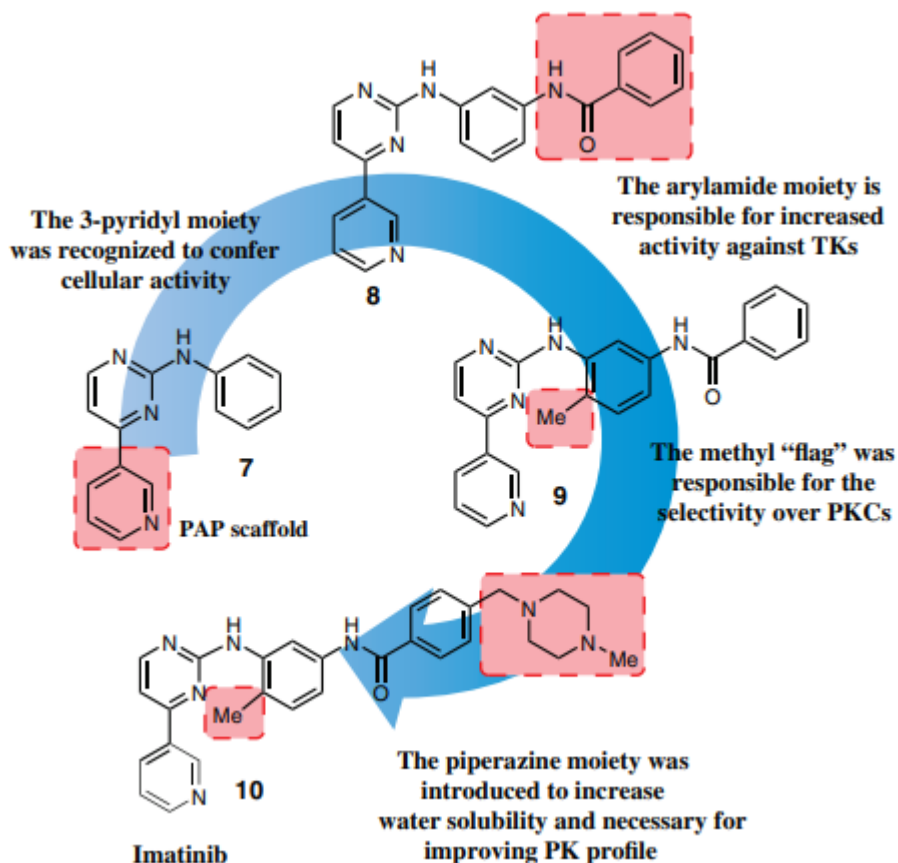
Στην περίπτωση του Imatinib (Glivec), μια πρώτης ένωσης-αναστολέα, παρατηρήθηκε ότι μια φαινυλαμινοπυριμιδίνη, (a) έδειξε ανασταλτική δράση έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης C. Ισχυρή ανασταλτική δράση της PKC παρατηρήθηκε με παράγωγα που φέρουν μια ομάδα 3-πυριδυλο (b) στη θέση 4 της πυριμιδίνης. Κατά τη διάρκεια βελτιστοποίησης της μοριακής δομής, παρατηρήθηκε ότι, η παρουσία ενός αμιδικού δεσμού, (c) στο βενζολικό δακτύλιο, είχε ως αποτέλεσμα την εντυπωσιακή αύξηση της ανασταλτικής του δράσης, καθώς και έναντι της τυροσινικής κινάσης Bcr-Abl (σχήμα 29α, β).

Μια βασική παρατήρηση ήταν ότι, η εισαγωγή μια μεθυλομάδας, (d) στη 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου οδήγησε σε μείωση της ανασταλτικής δράσης της εν λόγω ένωσης έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης C. Αντίθετα, η συγκεκριμένη ένωση, το Imatinib, έδειξε ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της Bcr-Abl πρωτεϊνικής κινάσης.

Ωστόσο, η πρώτη σειρά των εκλεκτικών αναστολέων που παρασκευάστηκε, κατέδειξε κακή βιοδιαθεσιμότητα από του στόματος και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Η προσάρτηση μιας πολικής πλευρικής αλυσίδας (N-μεθυλοπιπεραζίνη) (e) βελτίωσε την διαλυτότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα. Για να αποφευχθεί η πιθανότητα μετάλλαξης των ανιλινικών ομάδων εισήχθη ένας διαχωριστής μεταξύ του φαινυλικού δακτυλίου και του ατόμου του αζώτου. Η καλύτερη ένωση από αυτή την σειρά, ήταν ένα παράγωγο μεθυλοπιπεραζίνης, που αρχικά ονομάστηκε STI571 και σήμερα είναι γνωστό με την ονομασία Imatinib (Glivec).



Εικόνα 29α: Η εξέλιξη της φαινυλαμινοπυριμιδινυλ-ομάδας (PAP) στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων και στην ανάπτυξη του Imatinib.(10)

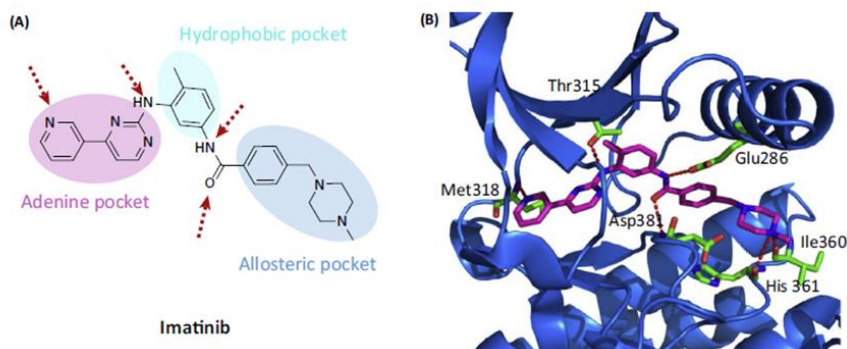


Εικόνα 29β: Η εξέλιξη της φαινυλαμινοπυριμιδινυλ-ομάδας (PAP) στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων και στην ανάπτυξη του Imatinib.(10)

Από μελέτες μοριακής μοντελοποίησης, κυρίως όμως από κρυσταλλογραφικά δεδομένα ακτίνων Χ, διαπιστώθηκε ότι το Imatinib (Glivec) προσδένεται στο σημείο πρόσδεσης του ATP στην Abl. Η ανάλυση της κρυσταλλογραφικής δομής έδειξε ότι το Imatinib αναστέλλει την κινάση Abl μέσω αλληλεπίδρασης με υψηλή εξειδίκευση σε μια ανενεργή μορφή της κινάσης. Η ανάγκη για την υιοθέτηση της ασυνήθιστης διαμόρφωσης της κινάσης, ευνοεί την πρόσδεση του αναστολέα σε μία θέση εγγύς της θέσης πρόσδεσης του ATP, σταθεροποιώντας την ανενεργή μορφή της Bcr-Abl, αντί να καταλαμβάνει όλο το θυλάκιο πρόσδεσης του ATP. Με αυτόν τον τρόπο, η Bcr-Abl χάνει την ικανότητα ανεξέλεγκτης φωσφορυλίωσης (άλλων) πρωτεϊνικών υποστρωμάτων με αποτέλεσμα να μη επάγεται η κυτταρική σηματοδότηση για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Το τμήμα πυριδίνη-πυριμιδίνη του Imatinib σχηματίζει ένα διατηρημένο δεσμό υδρογόνου με το hinge κατάλοιπο Met318. Η τολουολο-ομάδα καταλαμβάνει μια υδροφοβική περιοχή και η αμινο-ομάδα της τολουολαμινοπυριμιδίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο

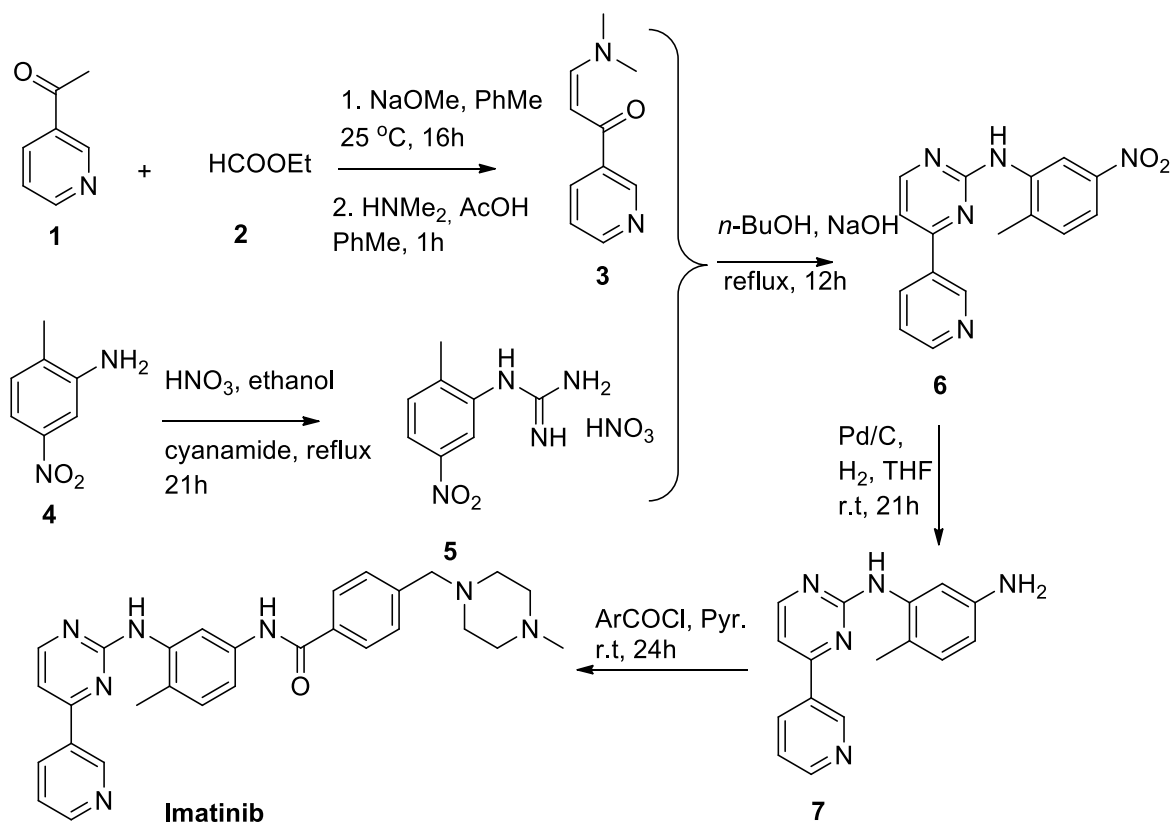
Thr315 (gatekeeper).^[154] Η τελική πιπεραζινυλφαινυλο ομάδα δεσμεύεται σε μια αλλοστερική θέση που σχηματίζεται λόγω της ανεστραμμένης διαμόρφωσης του DFG μοτίβου, όπου η πιπεραζινυλαμίνη σχηματίζει διδοντικές ιοντικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα His361 και Ile360. Τέλος, δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του αμιδίου και των κατάλοιπων Glu286 και Asp381.^[153]



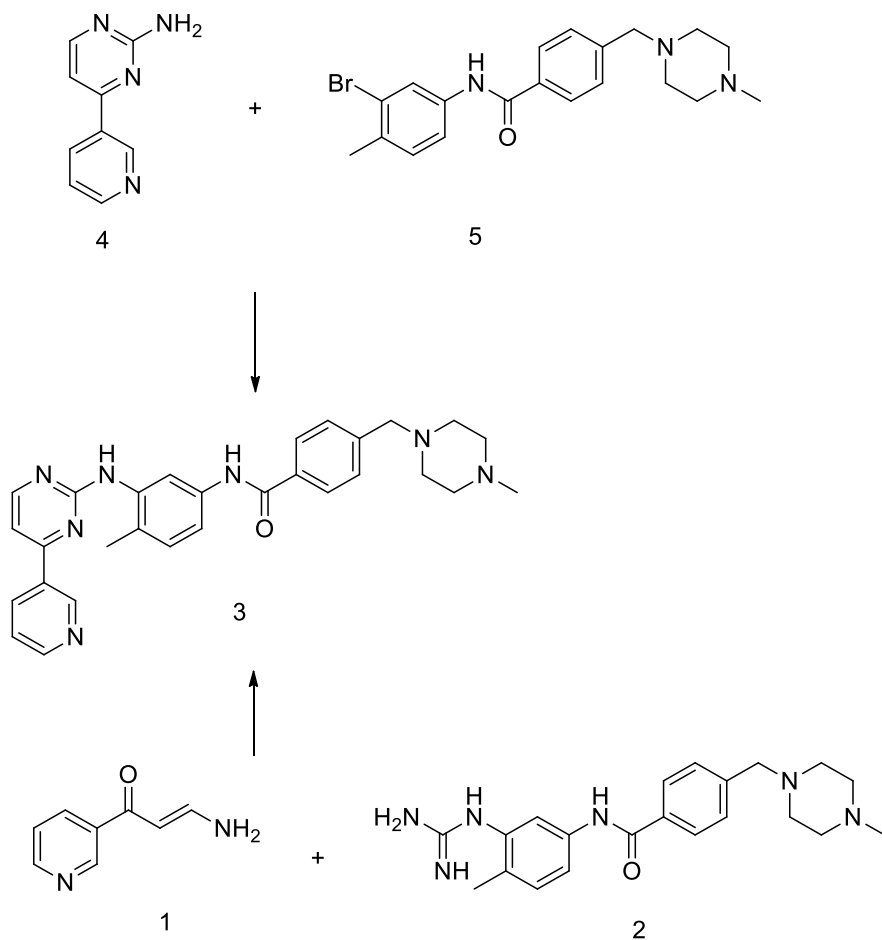
Εικόνα 30: A) Αναπαράσταση της χημικής δομής του *Imatinib* και του τρόπου πρόσδεσης στην *BCR-Abl*. B) Η κρυσταλλογραφική δομή του *Imatinib* [Protein Data Bank (PDB) ID: 1IEP, 2.10 Å]

2.9.1.2 Σύνθεση του *Imatinib*

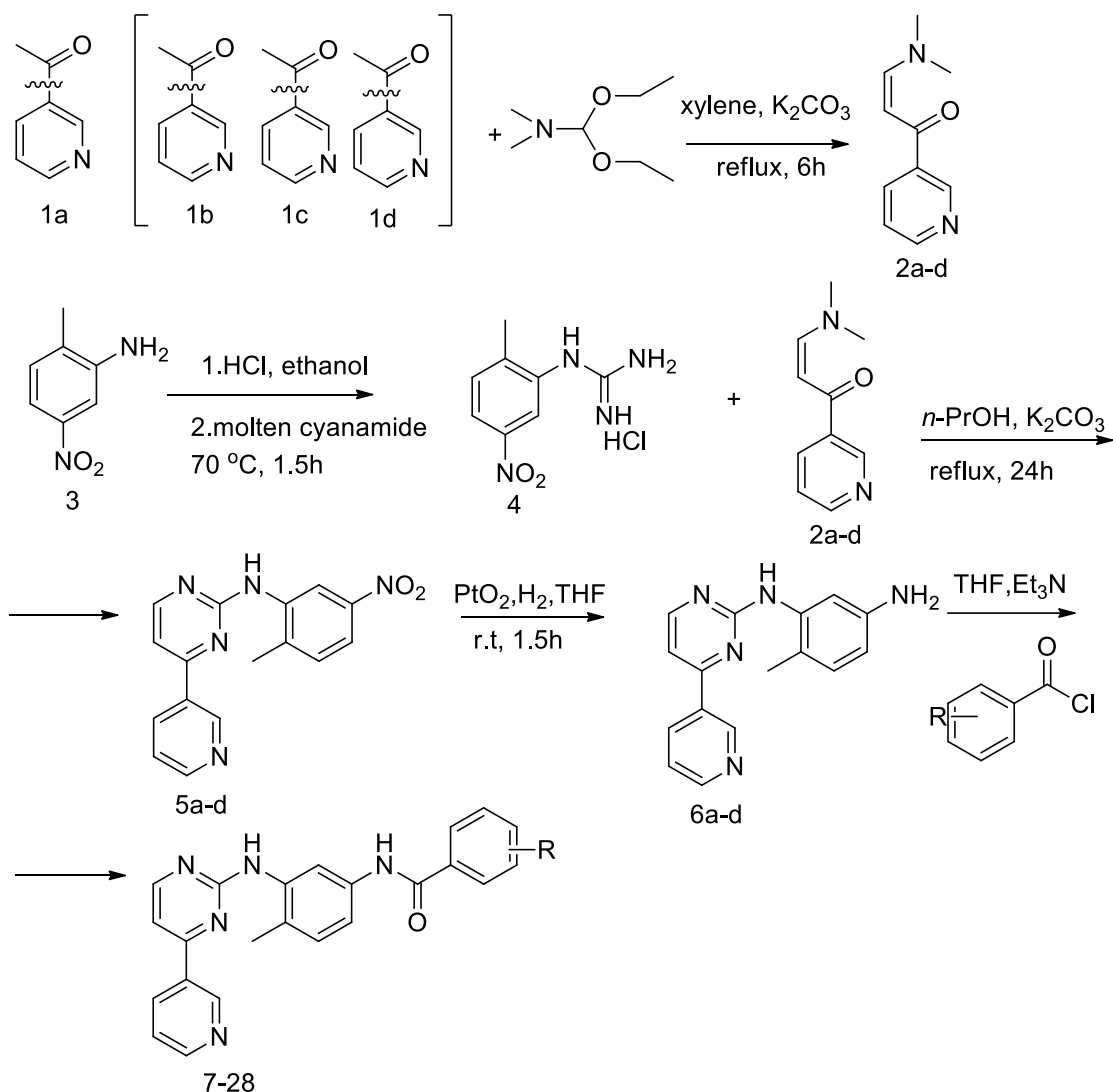
Η πρώτη σύνθεση του *Imanitib* αναφέρθηκε από τον Zimmermann και βασίζεται, μετά τη σύνθεση ενός ενδιαμέσου «κλειδιού» και την αναγωγή της νιτρο-ένωσης στην αντίστοιχη αμινο-ένωση, στη σύζευξη 2 ενδιάμεσων, της αρωματική αμίνης (7) και του 4-[(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)μεθυλο]βενζοϋλο-χλωριδίου (σχήμα 1). Στις εικόνες που ακολουθούν, περιγράφονται ορισμένες εναλλακτικές συνθετικές πορείες σύνθεσης του *Imatinib* και αναλόγων αυτών.



Σχήμα 1: Σύνθεση κατά Zimmerman ^[157]



Σχήμα 2: Σύνθεση του Imatinib κατά Szczepak ^[158]

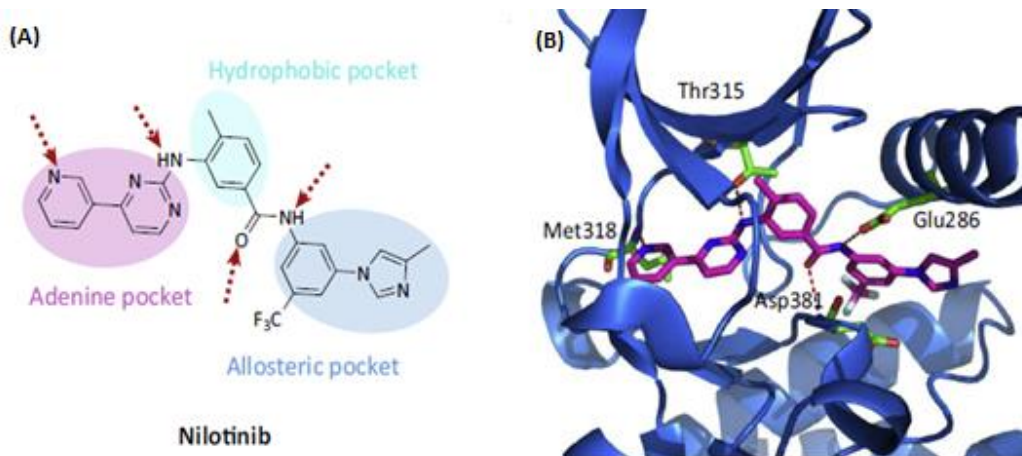


Σχήμα 3: Η σύνθεση του Imatinib κατά Skobridis K, Theodorou V^[159]

2.9.2.1 Nilotinib (Tasigna)

Αν και η στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς μικρού μοριακού βάρους κατέδειξε υψηλή αποτελεσματικότητα και χαμηλή τοξικότητα, εν συγκρίσει με τη συμβατική χημειοθεραπεία, σημειακές μεταλλάξεις στην περιοχή της παθολογικής κινάσης BCR-Abl είχαν αποτέλεσμα τη ανάπτυξη αντίστασης των ασθενών στο Imatinib.^[160-161] Το Nilotinib (AMN107)^[162] είναι ένας αναστολέας δευτέρας γενιάς και αναπτύχθηκε με σκοπό την αντιμετώπιση των σημειακών μεταλλάξεων στην Bcr-Abl, συμπεριλαμβανομένης της E255V, M351T, και F486S.^[154] Εγκρίθηκε το 2007 από το FDA ως πρώτη ή ως δευτέρας γραμμής φάρμακο για τη θεραπεία των ασθενών που φέρουν θετικό χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια στην αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML).^[163] Το φάρμακο αυτό είναι ένας ανταγωνιστής της Bcr-Abl, του PDGFRα/β και DDR1/2 (ChEMBL255863), με την Bcr-Abl να αποτελεί τον πρώτο στόχο.^[164]

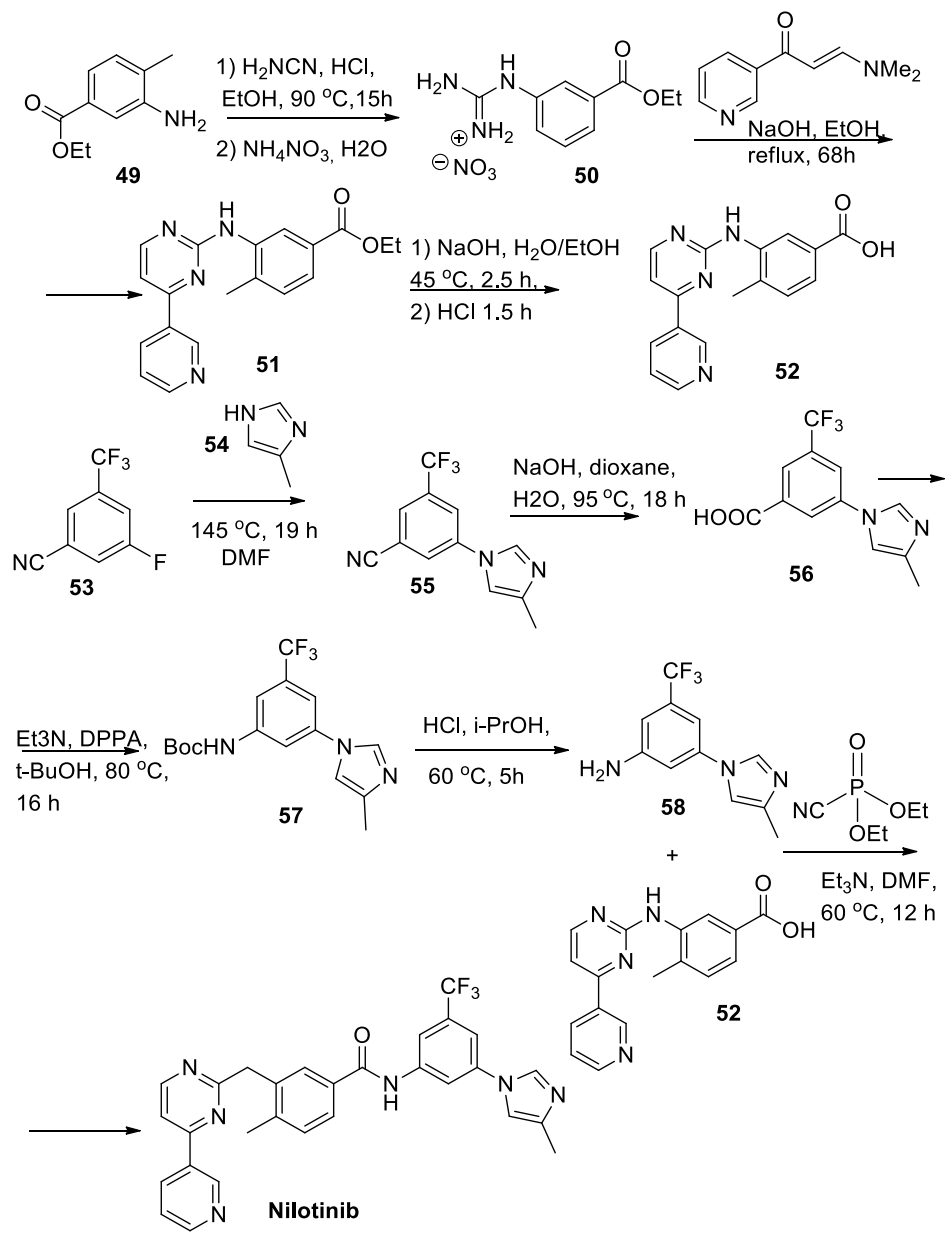
Το Nilotinib αναπτύχθηκε με βάση το Imatinib και χαρακτηρίζεται από το ίδια χημική δομή που αποτελείται από τους δακτυλίους της πυριδίνης-πυριμιδίνης-αμινοτολουλομάδας, με τη διαφορά ότι η μακρά αλυσίδα δεσμεύεται στην αλλοστερική θέση. Ειδικότερα, δεσμεύεται στην ανενεργή διαμόρφωση (DGF-out) της κινάσης και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την υδροξυλομάδα της T315. Η φαινυλο-ιμαδαζολική ομάδα και η προσαρτημένη τριφθορομεθυλομάδα το καθιστούν ικανό να δεσμεύεται ισχυρότερα και εκλεκτικότερα στον αλλοστερικό θύλακα με αποτέλεσμα να καταδεικνύει 20 φορές ισχυρότερη κυτταρική δράση εν συγκρίσει με το Imatinib (εικόνα 31). Επιπλέον, ο συγκεκριμένος αναστολέας είναι αποτελεσματικός έναντι των περισσότερων μεταλλάξεων εκτός της T315I, η οποία παρεμποδίζει τη δέσμευση στον αλλοστερικό θύλακα εξαιτίας της μετάλλαξης του καταλοίπου της θρεονίνης σε ένα ογκώδες κατάλοιπο ισολευκίνης. Για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη αναπτύχθηκε το Ponatinib, ένας ισχυρός αναστολέας της Bcr-Abl με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της T315I.



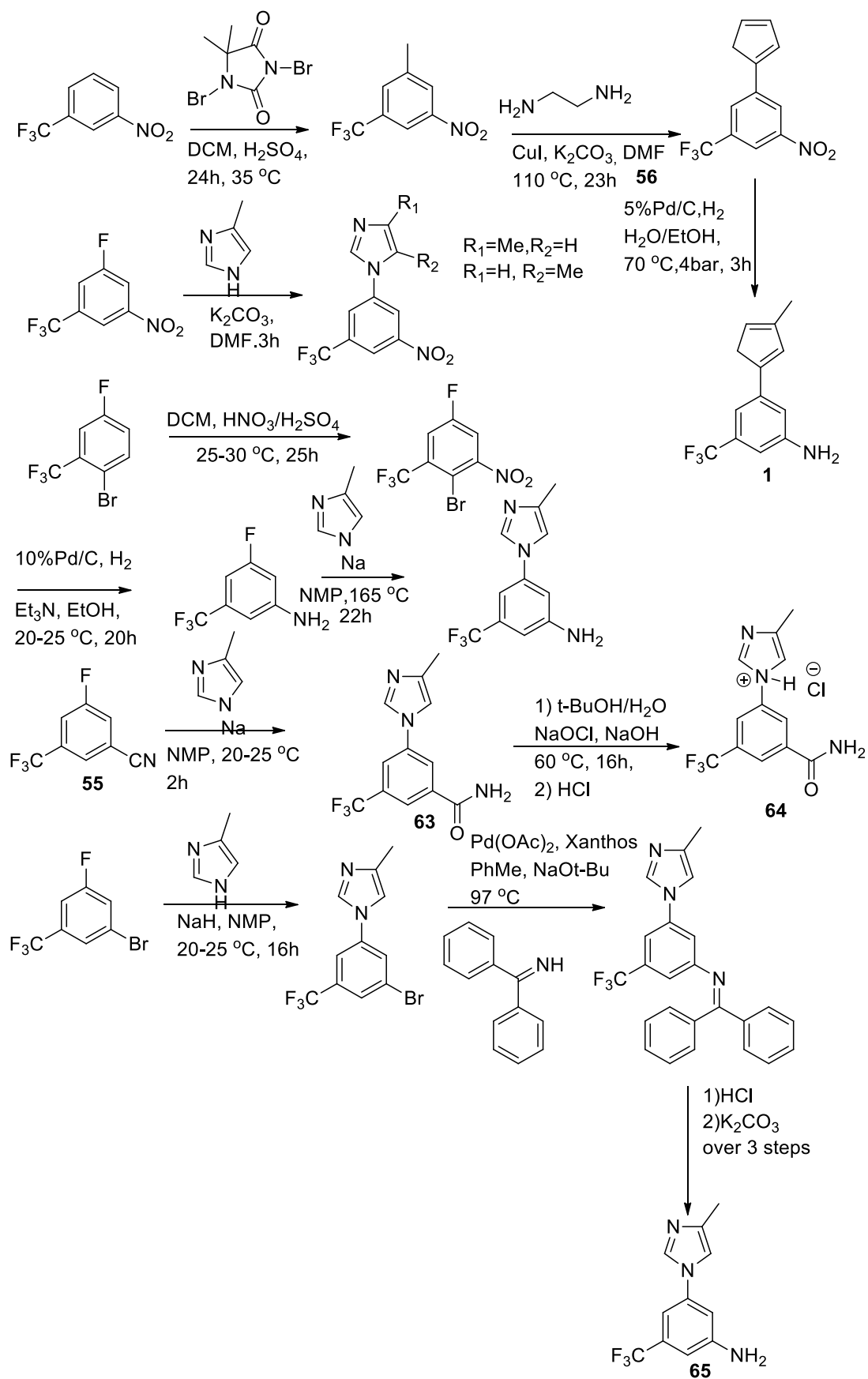
Εικόνα 31: Α) Αναπαράσταση της χημικής δομής του Nilotinib και ο τρόπος δέσμευσης στην BCR-Abl. (Β) Η κρυσταλλογραφική δομή του Nilotinib (PDB ID: 3CS9, 2.21 Å)

2.9.2.2 Σύνθεση του Nilotinib

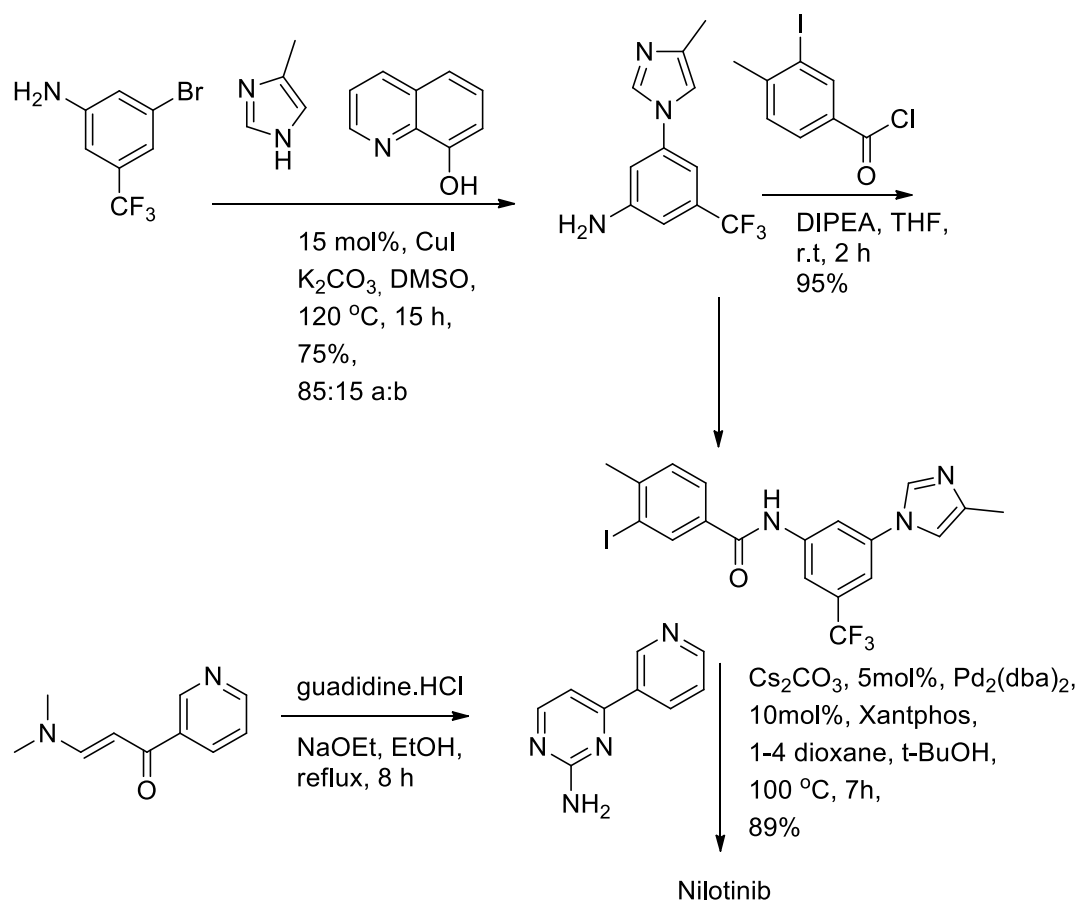
Το 2004 η εταιρεία Novartis καταχώρησε μια πατέντα για τη σύνθεση ενός αναστολέα τυροσινικής κινάσης δευτέρας γενιάς ως μια βελτιωμένη θεραπεία κατά της CML.^[165] Χορηγείται με τη μορφή υδροχλωρικού άλατος με την εμπορική ονομασία Tasigna (Η.Π.Α, Ευρώπη). Η συγκλίνουσα πορεία πέντε σταδίων διέπεται από μια κλασική προσέγγιση αποσύνδεσης που επωφελήθηκε από τα προηγούμενα αποτελέσματα σύνθεσης του Imatinib.



Σχήμα 4: Η πρώτη κατοχύρωση του Nilotinib από τη Novartis [166]



Σχήμα 5: Η εναλλακτική σύνθεση του Nilotinib από την Novartis ^[166]



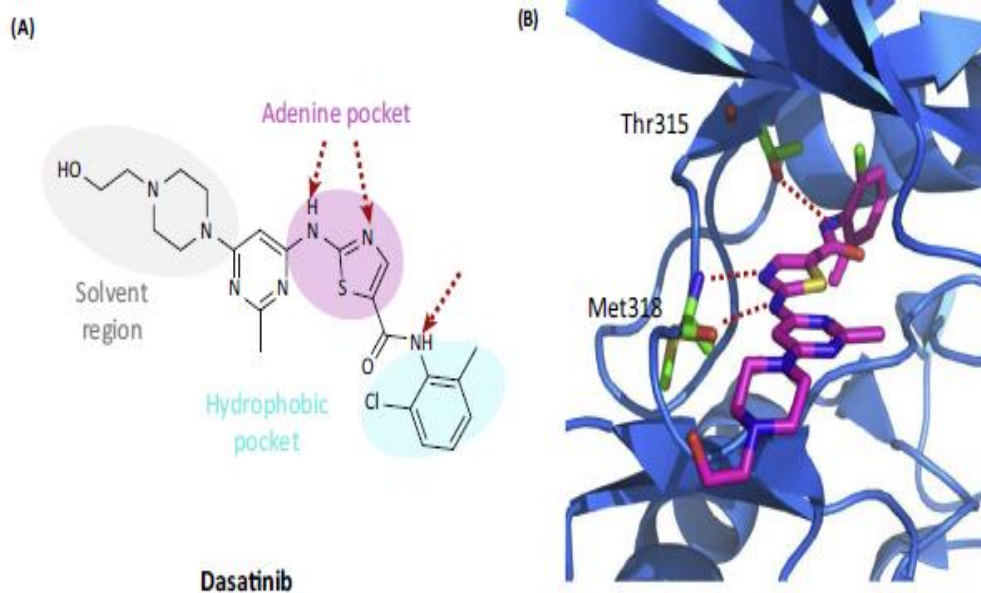
Σχήμα 6: Η σύνθεση του Nilotinib από την Φαρμακευτική Ariad ^[166]

2.9.3.1 Dasatinib(SPRYCEL)

Το Dasatinib είναι ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης, δεύτερης γενιάς, ανταγωνιστής του ATP, και εγκρίθηκε από τη FDA το 2006, για την αντιμετώπιση της αντίστασης των ασθενών με χρόνια μυελογενή λευχαιμία στο Imatinib και των πάσχοντων από Bcr-Abl οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ALL).^[167] Είναι ένα φάρμακο με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των εννέα μελών της οικογένειας Src^[167] και άλλων πολυάριθμων πρωτεϊνικών κινασών, όπως η BCR-ABL1, KIT, οι υποδοχείς των PDGFR, Eph, VEGFR και TIE2.^[168] Χαρακτηρίζεται από 10 φορές υψηλότερη δραστηριότητα, εν συγκρίσει με το Nilotinib,^[169] είναι αποτελεσματικός έναντι των μεταλλάξεων της Bcr-Abl1 με εξαίρεση την T315I. Αποτελεί ένα αμινο-θειαζολο-πυριμιδινο-παράγωγο και, σε αντίθεση με το Nilotinib, δεσμεύεται στην ενεργή διαμόρφωση της ABL κινάσης (DFG in).^[170]

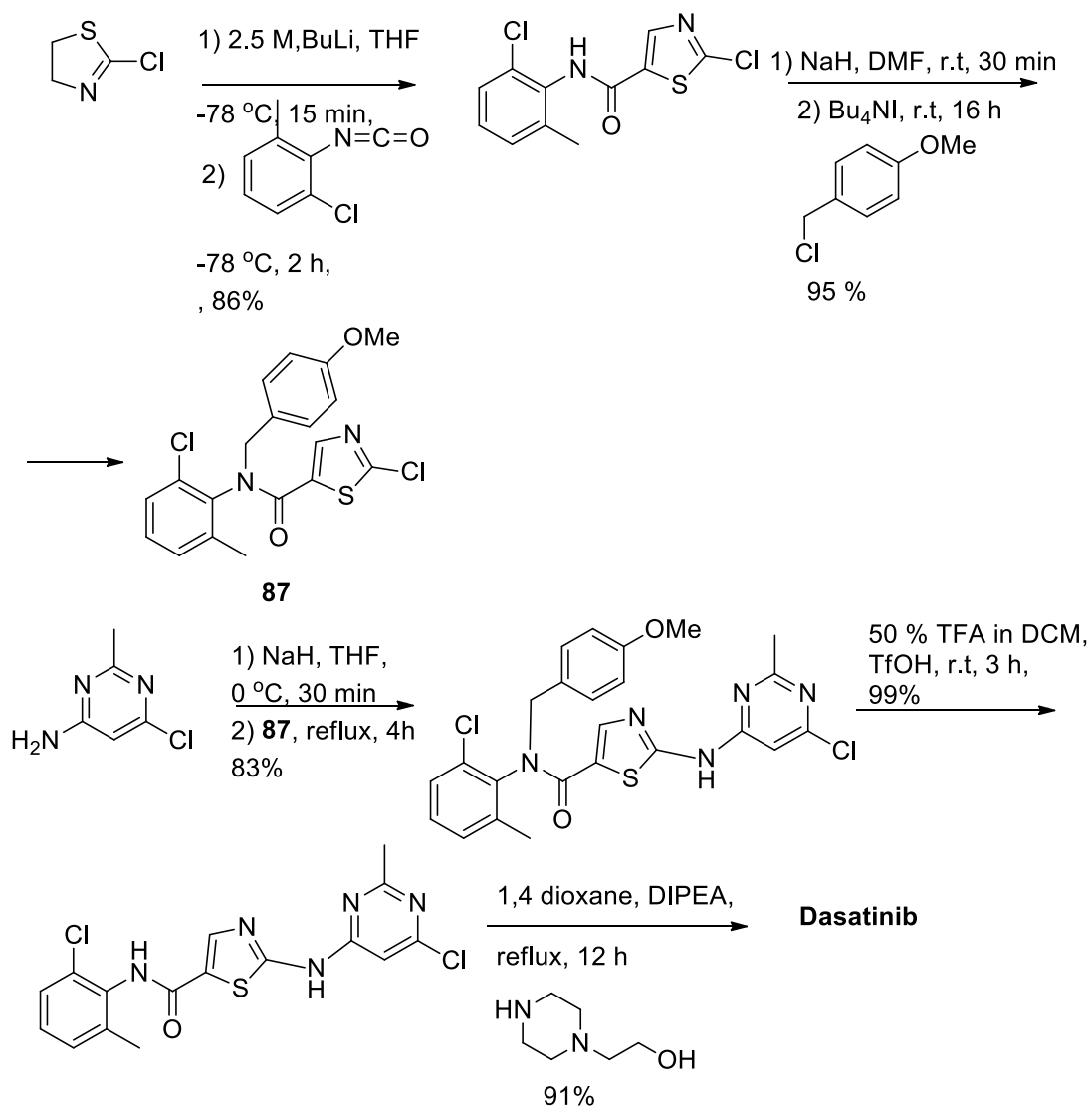
Από τη κρυσταλλογραφική δομή του Dasatinib με την Abl κινάση, προκύπτει ότι το άζωτο της θειαζολικής ομάδας και της προσαρτημένης αμινομάδας σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Met318 στην hinge περιοχή. Η μακρά υδροξυαιθυλο-πιπεραζινο-ουρά εκτίθεται

στην περιοχή του διαλύτη και η τελική τολουιδινική ομάδα είναι προσανατολισμένη προς τον υδροφοβικό θύλακα πλησίον του καταλοίπου Thr315 (gatekeeper), το οποίο αλληλεπιδρά με το αμίδιο μέσω δεσμού υδρογόνου (εικόνα 32). Τέλος, η σημειακή μεταλλαγή T315I που σχετίζεται με την αντίσταση στο φάρμακο επίσης παρατηρείται σε ασθενείς που λαμβάνουν το Dasatinib.^[154]

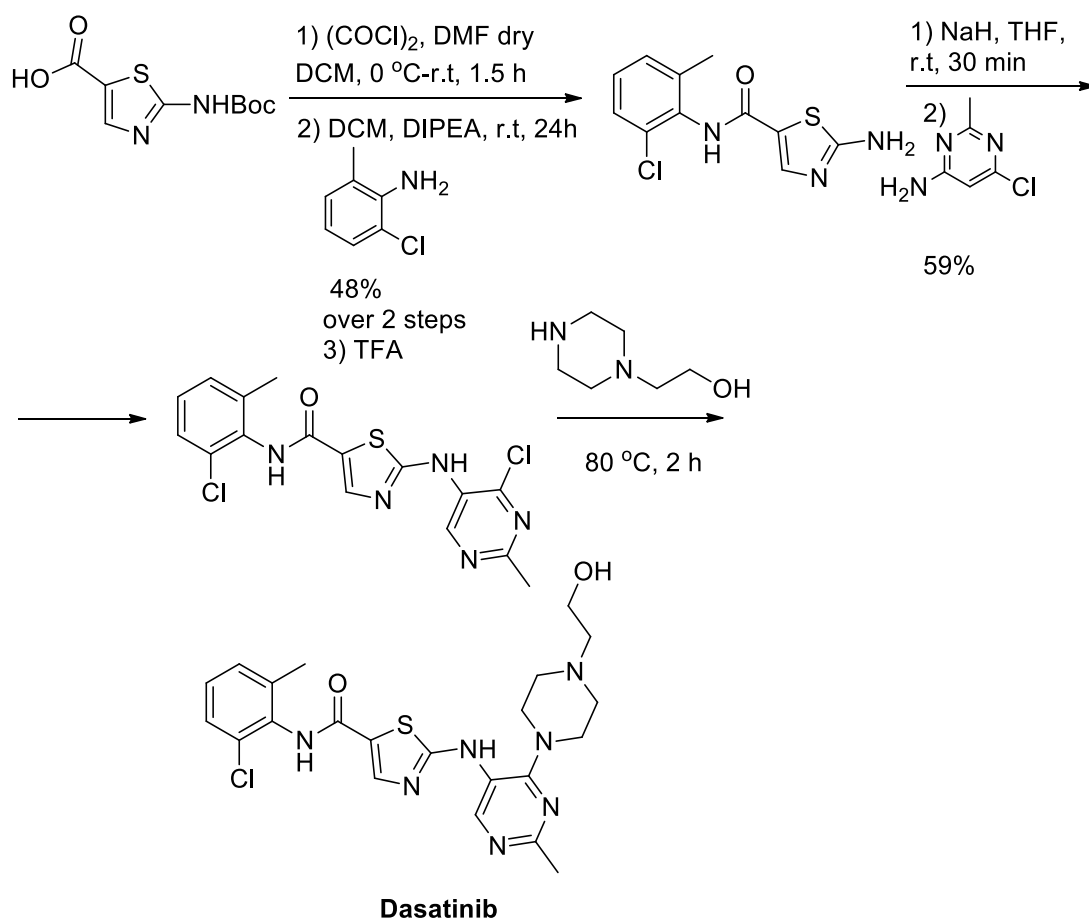


Εικόνα 32: Αναπαράσταση του Dasatinib με την ενεργή διαμόρφωση της BCR-Abl. (A) Η χημική δομή του Dasatinib και ο τρόπος πρόσδεσης του στην BCR-Abl (B) Η κρυσταλλογραφική δομή του Dasatinib (PDB) ID: 2GQG, 2.40 Å)

2.9.3.2 Σύνθεση του Dasatinib



Σχήμα 7: Η εναλλακτική σύνθεση του Dasatinib από την BMS (Bistol Myers Squibb) με αρχικό υπόστρωμα το 2-χλωροθειαζόλιο ^[166]



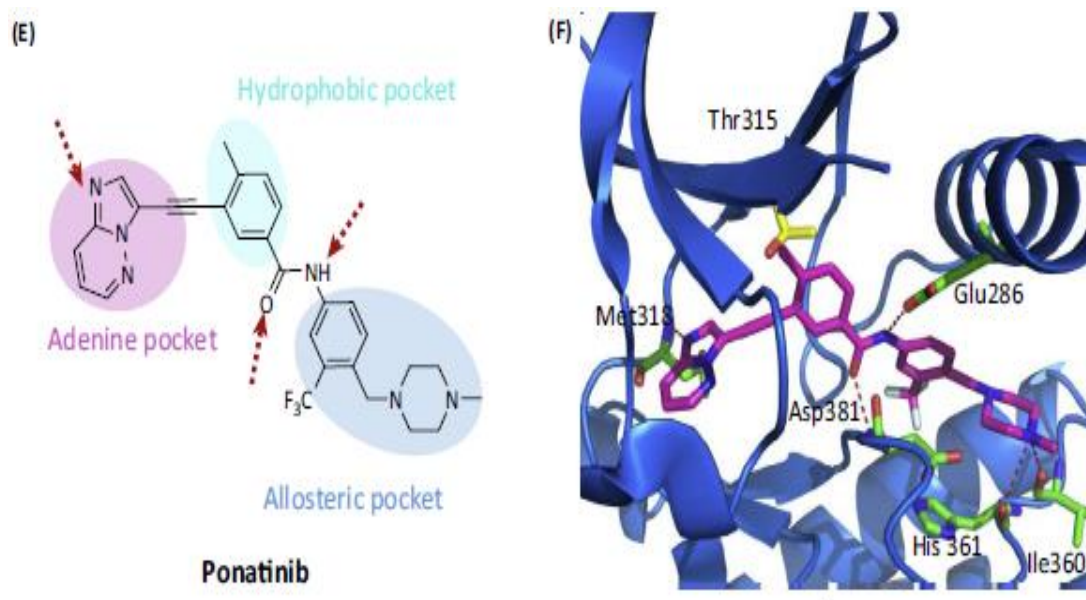
Σχήμα 8: Η αρχική BMS ανακάλυψη της σύνθεσης του Dasatinib ^[166]

2.9.4.1 Ponatinib (AP24534)

Το Ponatinib είναι αναστολέας τυροσινικής κινάσης που εγκρίθηκε το 2012 από τον FDA για την αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και επιπλέον, αποτελεί ένα εξειδικευμένο αναστολέα που στοχεύει τη μετάλλαξη T315I της Bcr-Abl. Επιπλέον, πολυάριθμες μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο αναστολέας αυτός στοχεύει πολλές σημαντικές τυροσινικές κινάσες (FGFR, PDGFR, SRC, RET, KIT, και FLT1)^[171] εμπλεκόμενες σε πολλές ανθρώπινες κακοήθειες.

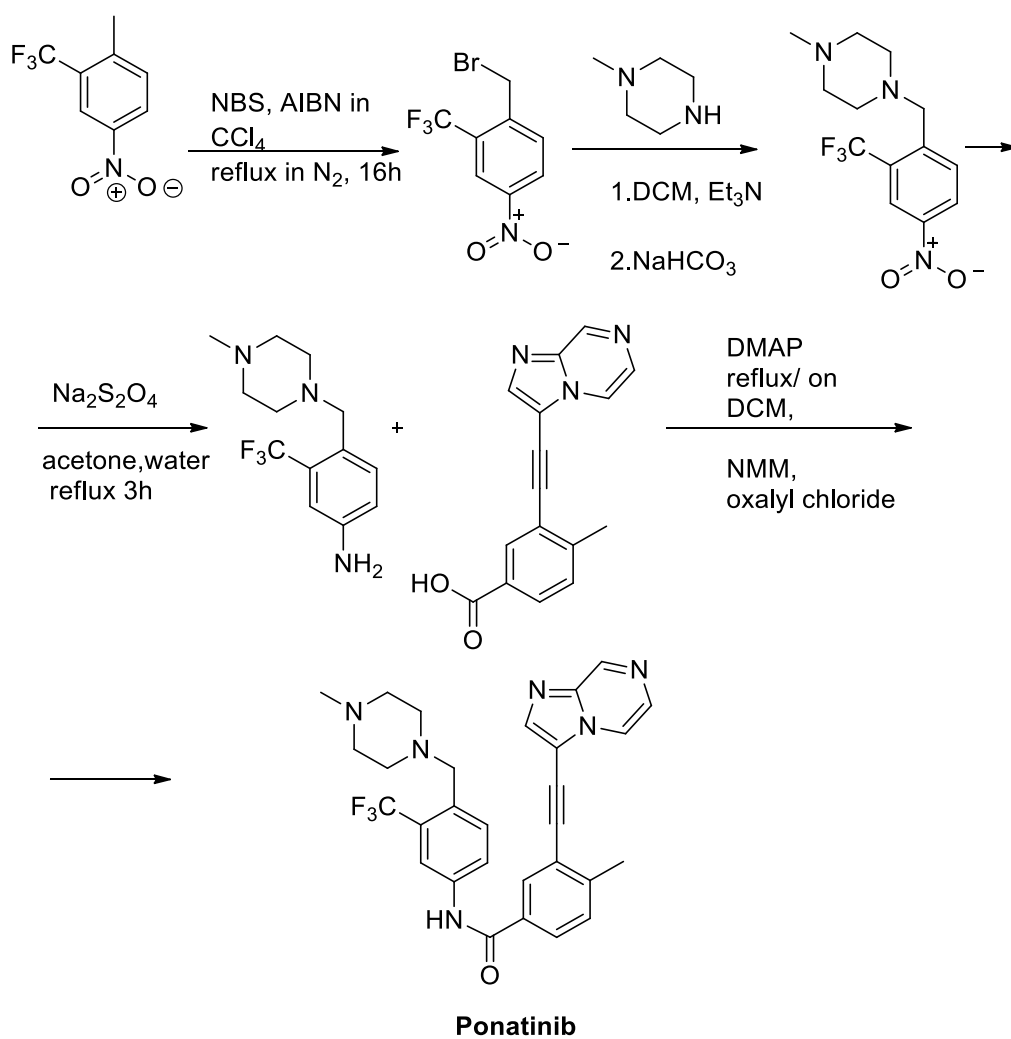
Η ανάπτυξη του Ponatinib ήταν αποτέλεσμα ορθολογικού σχεδιασμού με την προσάρτηση ενός τριπλού δεσμού C-C για την αντιμετώπιση της σημειακής μετάλλαξης T315I στην περιοχή της κινάσης Bcr-Abl. Δεν περιέχει στη δομή του μια πυριμιδιναμινο-ομάδα, που αλληλεπιδρά με το κατάλοιπο Thr315, χαρακτηρίζεται όμως από την ομάδα του τριπλού δεσμού C-C, ομάδα που λειτουργεί ως ένας μικρότερος σε όγκο συνδέτης και υπερνικά τη στερική παρεμπόδιση που προκαλείται από τη μετάλλαξη του καταλοίπου (gatekeeper). Επιπλέον, το Ponatinib έχει την

πιπεριζινολοφαιουλο-ομάδα του Imatinib και την τριφθορομεθυλο-ομάδα του Nilotinib, με αποτέλεσμα να καταδεικνύει καλύτερο τοπολογικό ταίριασμα με το αλλοστερικό θύλακα, καθώς σχηματίζεται ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με ισχυρότερες-συμπαγείς δυνάμεις.^[154] Τέλος, ο αναστολέας αυτός είναι τύπου II, δεσμεύεται στην ανενεργή διαμόρφωση (DFG out) της κινάσης με αποτέλεσμα να αξιοποιεί τρεις θύλακες πρόσδεσης (εικόνα 33).

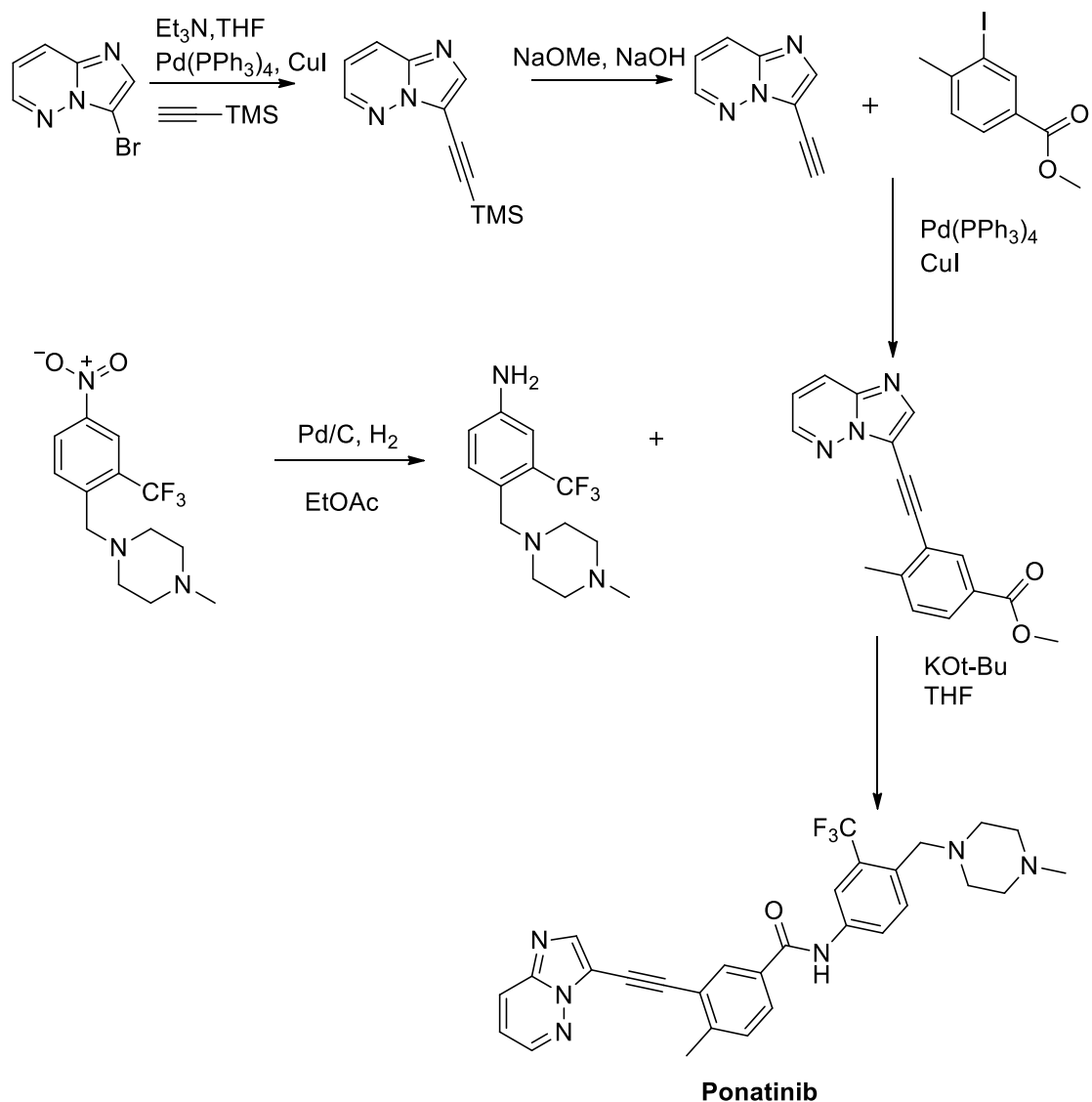


Εικόνα 33: Αναπαράσταση του Ponatinib με την ανενεργή διαμόρφωση της Bcr-Abl. (E) Η χημική δομή του Ponatinib και ο τρόπος πρόσδεσης του στην Bcr-Abl (F) Η κρυσταλλογραφική δομή του Ponatinib (PDB ID: 3OXZ, 2.20 Å)

2.9.4.2 Σύνθεση του Ponatinib (AP24534)



Σχήμα 9: Η κατοχυρωθείσα σύνθεση του Ponatinib^[172]

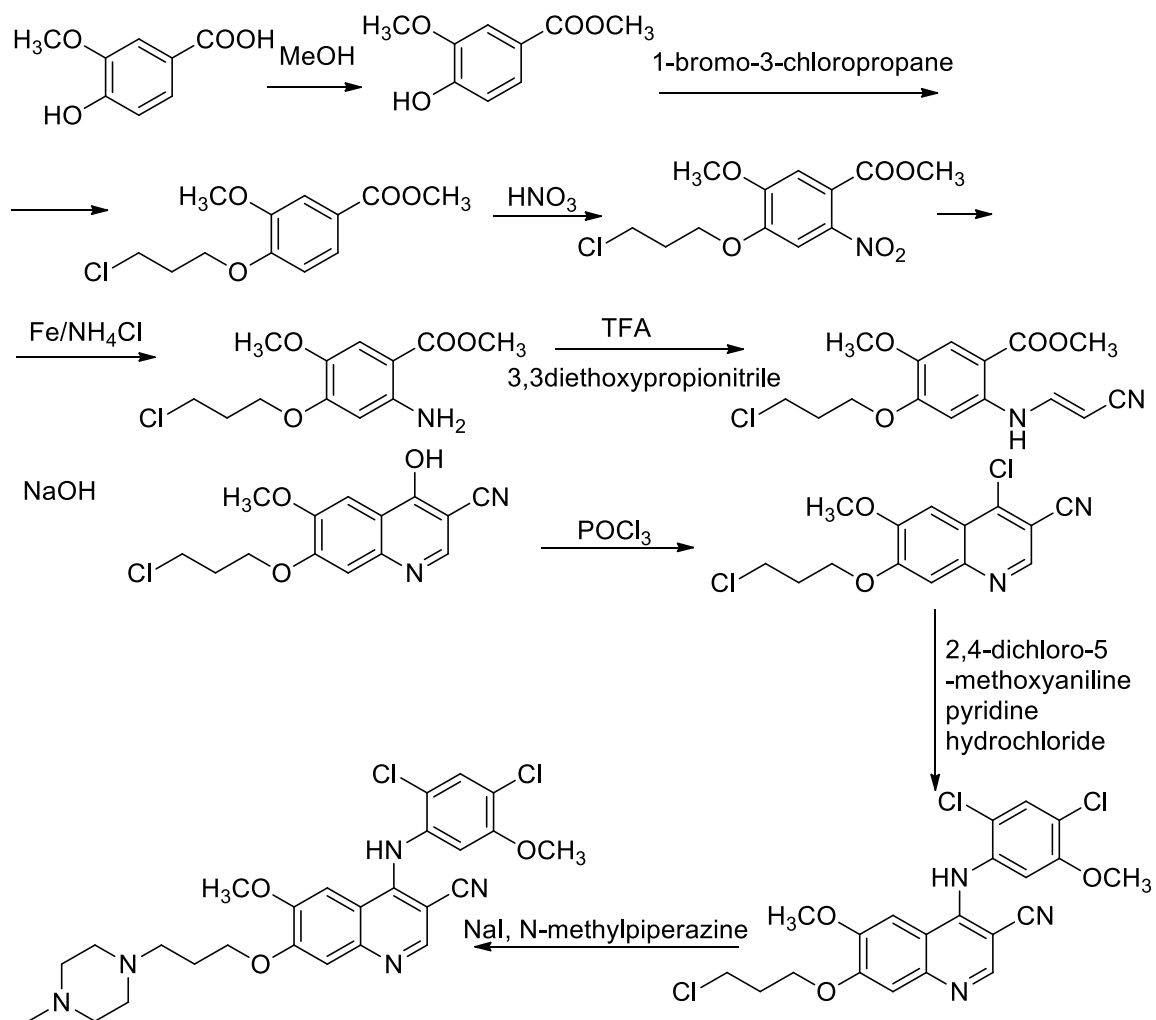


Σχήμα 10: Η κατοχυρωθείσα σύνθεση του Ponatinib.^[173]

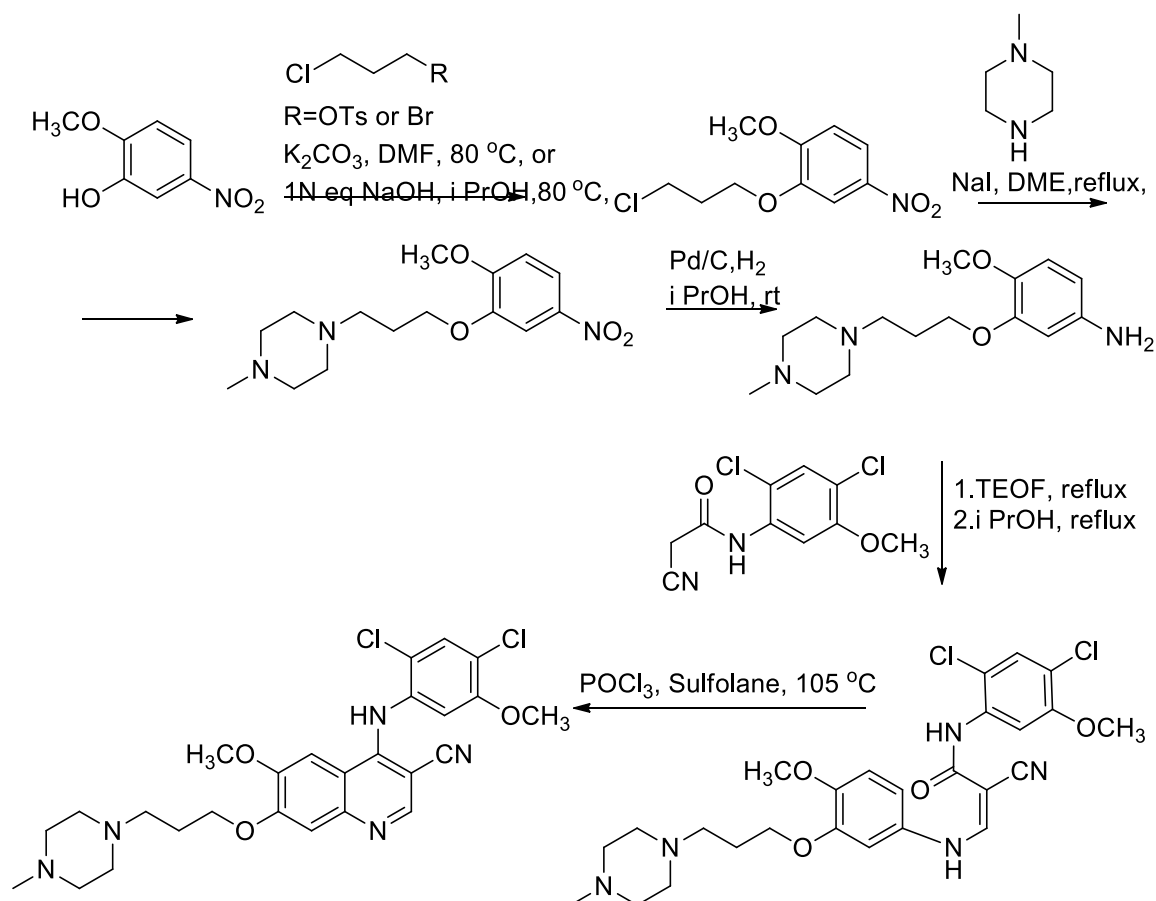
2.9.5 Σύνθεση του Bosunitib (Bosulif)

Το Bosunitib, γνωστό και ως SKI-606, είναι ένας αναστολέας κινάσης που εγκρίθηκε από τον FDA το 2012 για την αντιμετώπιση των ασθενών με χρόνια μυελογενή λευχαιμία. (Ph+CML).^[174] Το φάρμακο αυτό είναι ένας αναστολέας με διπλή δράση έναντι της Src/Abl κινάσης.^[175,176] Αποτελεί μια εναλλακτική θεραπεία για την αντιμετώπιση της αντίστασης των ασθενών στο Imatinib και χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό μέσο για την βελτίωση της θεραπείας^[177-178] άλλων ασθενειών που εμπλέκονται διαφορετικές κινάσες.

Σε αντίθεση, με άλλες ανταγωνιστές, αναστολείς τυροσίνης, το Bosunitib αναστέλλει την αυτοφωσφορυλίωση τόσο της Src όσο και της Abl κινάσης, οδηγώντας στην μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης και στην απόπτωση.^[175]



Σχήμα 11: Η καινοτόμα σύνθεση του Bosutinib^[179]



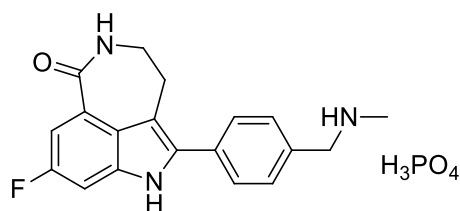
Σχήμα 12: Η καινοτόμα σύνθεση του *Bosutinib*^[180-181]

2.9.6 Αναστολείς των PARP

2.9.6.1 Rucaparib (Rubraca)

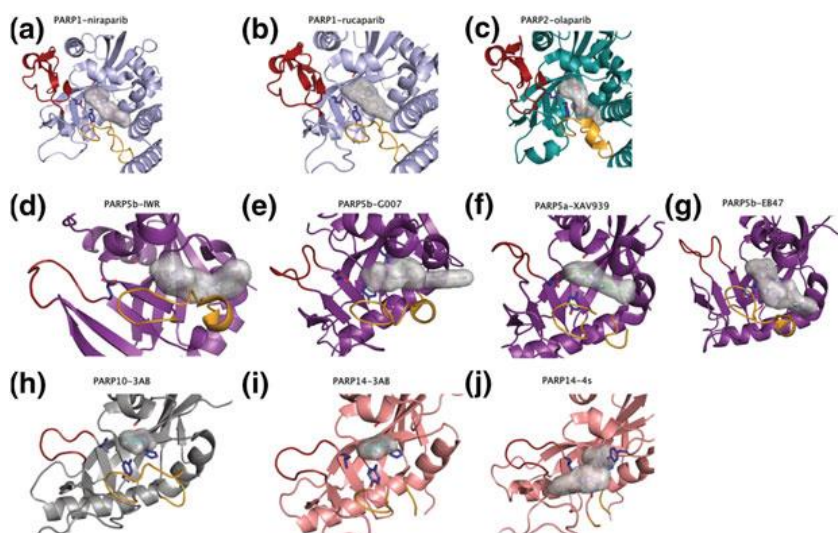
Το Rucaparib είναι ένας αναστολέας της PARP με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των PARP1/2, εγκρίθηκε από τον FDA το 2016 και από την EMA το 2018, ως αποκλειστικός παράγοντας για τη θεραπεία σε ασθενείς με προηγμένο καρκίνο των ωθηκών, με μετάλλαξη *BRCA* (γενετική ή/και σωματική), επίσης σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο των ωθηκών, οι οποίοι υποτροπίασαν μετά από δύο θεραπευτικές αγωγές με χημειοθεραπεία.^[182] Η καταδεικνυόμενη αναστολή τους έγγυται στην επαγωγή συνθετικής θανατότητας σε καρκίνο με έλλειψη *BRCA* μέσω της παρεμπόδισης των επιδιορθωτικών μηχανισμών του DNA που καταλύεται από την PARP-1. Το Rucaparib ως άλας με β-καμφοροσουλφονικό οξύ ανακαλύφθηκε ως μέρος της συνεργασίας μεταξύ του Northern Institute of Cancer, Newcastle University, και της Agouron Pharmaceuticals. Σε σχέση με τους υπόλοιπους εγκεκριμένους αναστολείς των PARP,

το Rucaparib διαφέρει σημαντικά από το Olaparib και το Niraparib, καθώς έχει ανασταλτική δράση εκτός των PARP1/2, και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των PARP, όπως (PARP 1, 2, 3, 4, 12, 15, 16) και τρανσκυράσες 2 (PARP5B/TNKS2), όπως ανέφεραν οι Musella και Wahlberg και άλλοι συνεργάτες του.^[183]



Εικόνα 34: Η δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib

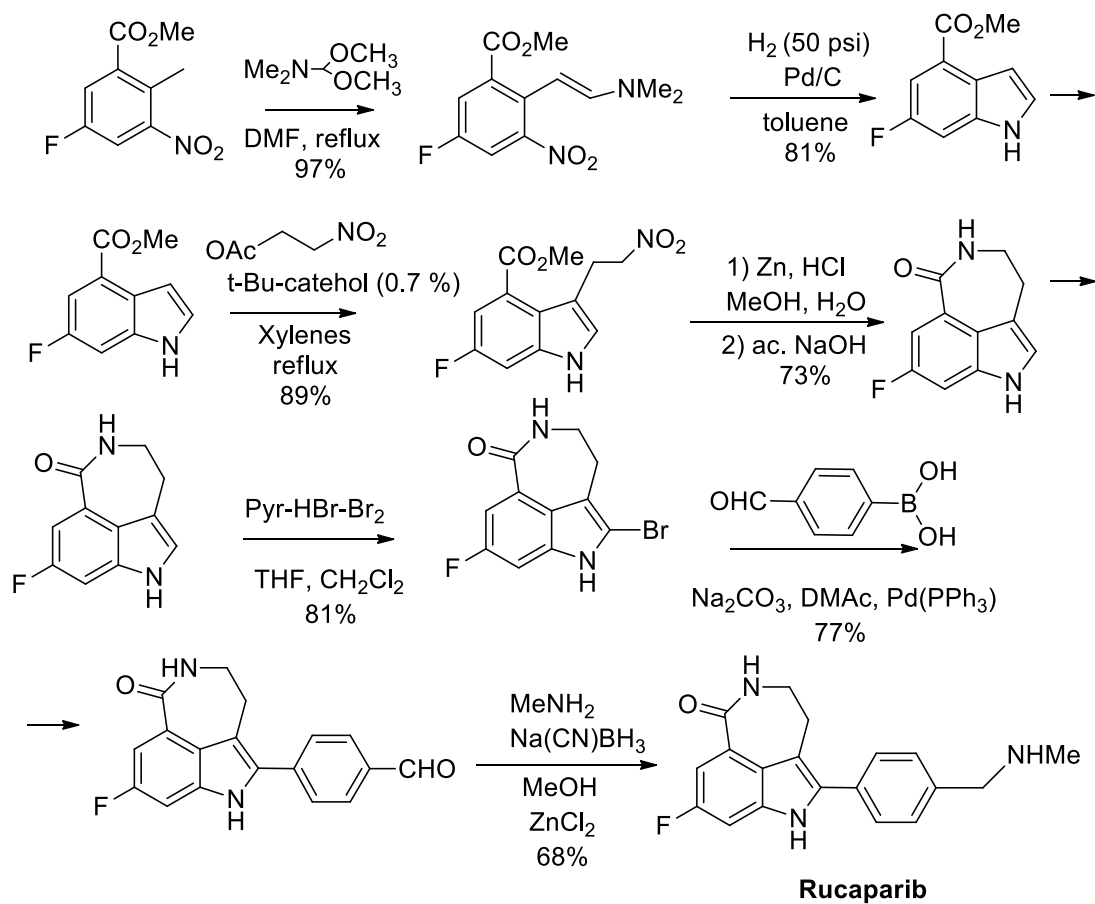
Οι τρεις εγκεκριμένοι αναστολείς από τον FDA, συμπεριλαμβανομένων των Olaparib, το Rucaparib, και το Niraparib, χαρακτηρίζονται από παρόμοιο τρόπο δέσμευσης στις PARP1/2 (εικόνα 35). Ένα κοινό και απαραίτητο χαρακτηριστικό σε αυτούς τους αναστολείς είναι οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ της ομάδας αμιδίου (μιμητής του νικοτιναμιδίου) με το σκελετό της γλυκίνης και την παράπλευρη αλυσίδα της ενεργής θέσης της σερίνης μιμούμενης τους δεσμούς υδρογόνου που παρατηρούνται και σχηματίζονται με το νικοτιναμίδιο του NAD⁺. Τέλος, οι συγκεκριμένοι αναστολείς περιέχουν στη δομή τους υποκαταστάτες που δεσμεύονται σε διαφορετικό βαθμό στο D βρόγχο και στη θέση-υποπεριοχή της αδενοσίνης.^[184]



Εικόνα 35: Αναπαράσταση των διαφορετικών αναστολέων μικρού μοριακού βάρους στις διάφορες περιοχές του NAD⁺ (θύλακας δέσμευσης). α) η PARP-1 σε σύμπλοκο με το niraparib (PDB 4R6E), β) η PARP1 σε σύμπλοκο με το rucaparib (PDB 4RV6), γ) η PARP2 συζευγμένη με το olaparib (PDB 4TVJ), δ) η PARP5b συζευγμένη με τη EB-47 (PDB 4TK5) ε) η PARP5b σε σύμπλοκο με την ενδο-IWR-1 (PDB 3UA9), ζ) η PARP5b σε σύμπλοκο με τη G007-LK, η) PARP10 συζευγμένη με το 3-αμινοβενζαμίδιο (PDB 3HKV), θ) η PARP14 σε σύμπλοκο με το 3-αμινοβενζαμίδιο (PDB 3GOY), ι) η PARP14 σε σύμπλοκο με τις 4s (PDB 5NQE).^[184]

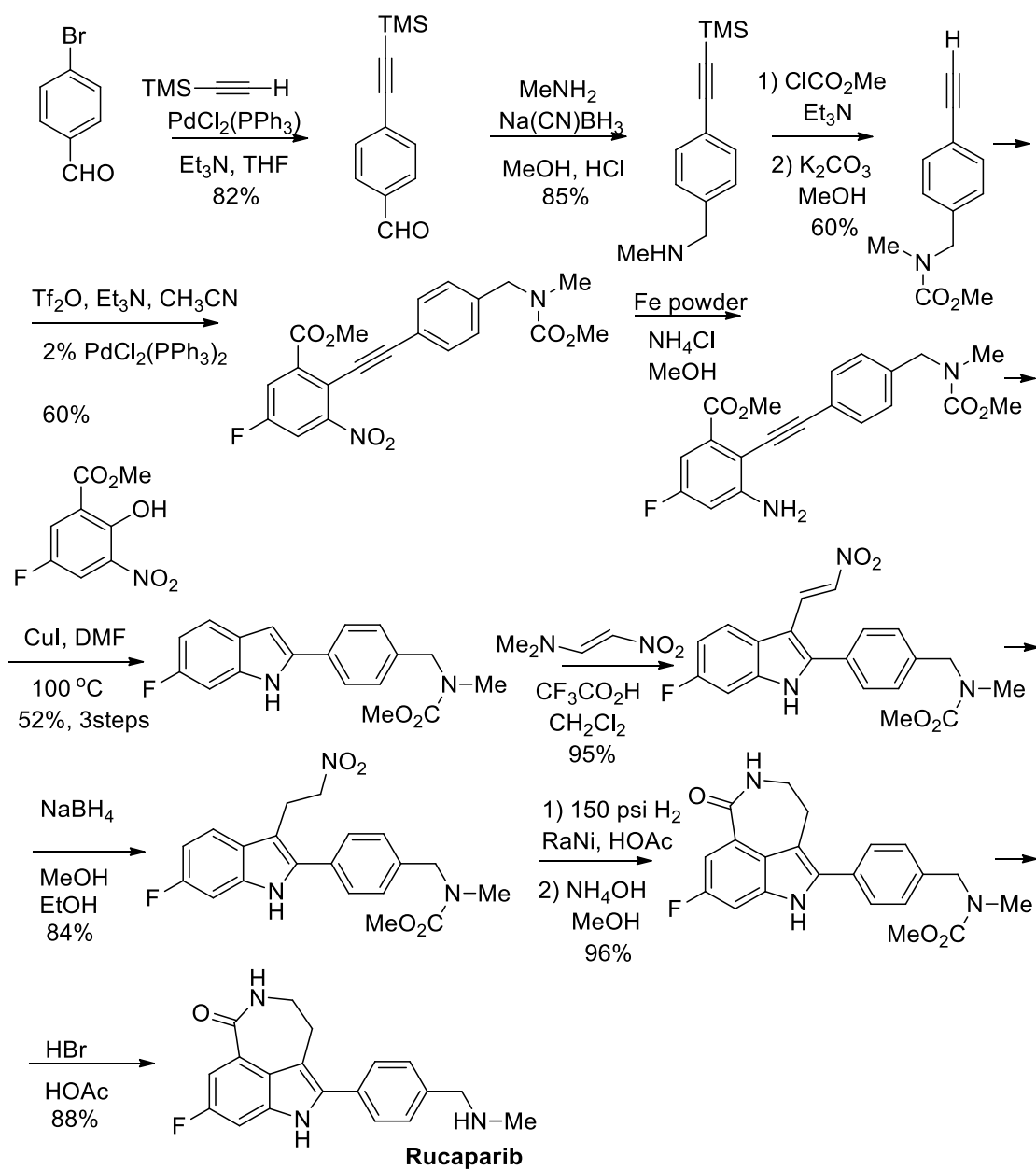
2.9.6.2 Φαρμακευτική Χημική Πορεία για το Rucaparib (Agouon and Cancer Research)

Η ολική σύνθεση συνίσταται από επτά στάδια μιας αποκλίνουσας συνθετικής πορείας με ολική απόδοση 22%, με βήματα-κλειδιά να περιλαμβάνουν σχηματισμό ινδολίου μέσω μιας Leimgruber-Batcho αντίδρασης και Suzuki σταυρωτής σύζευξης για την εισαγωγή του βενζολικού δακτυλίου στη 2-θέση του ινδολίου.^[185]

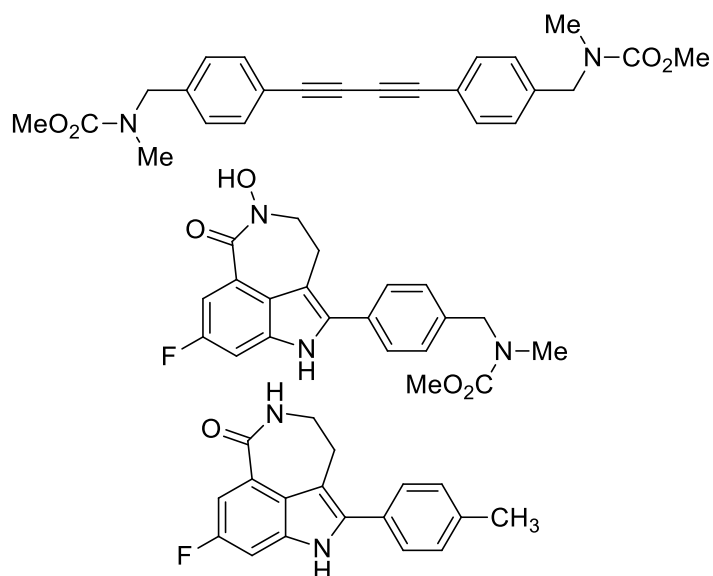


Σχήμα 13: Η φαρμακευτική πορεία της αντίδρασης για τη σύνθεση του Rucaparib^[185]

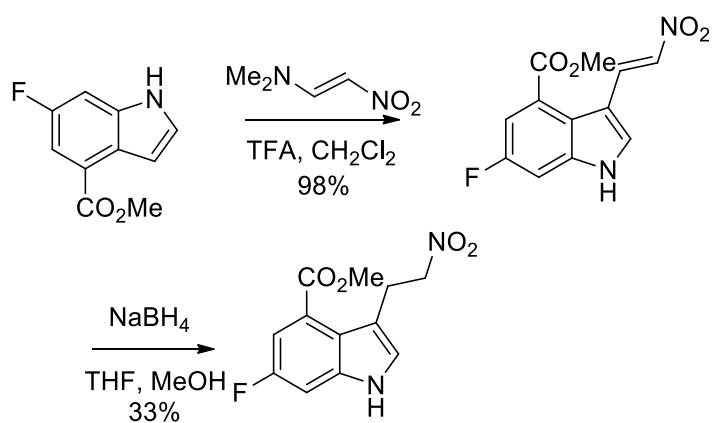
2.9.6.3 Εναλλακτικές συνθετικές πορείες του Rucaparib



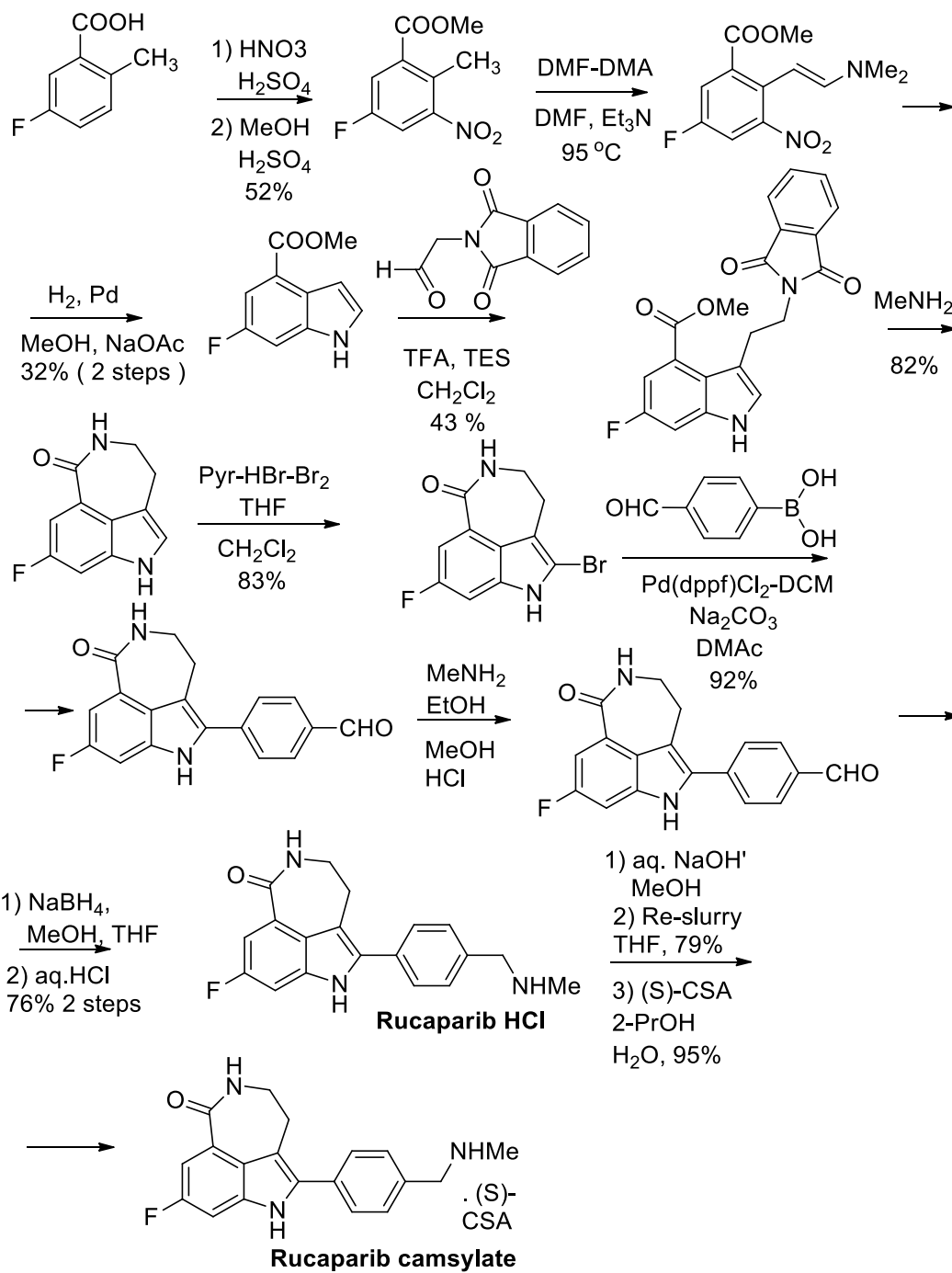
Σχήμα 14: Πρώτη εναλλακτική πορεία αντίδρασης για τη σύνθεση του Rucaparib. ^[185]



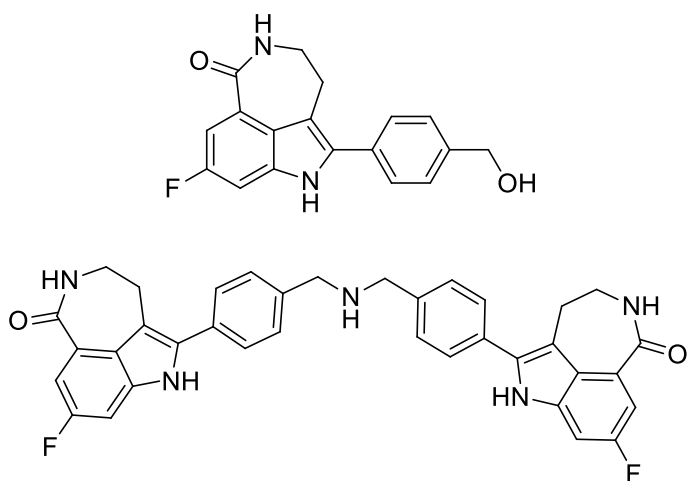
Εικόνα 36: Τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά την πρώτη εναλλακτική πορεία χημικής αντίδρασης ^[185]



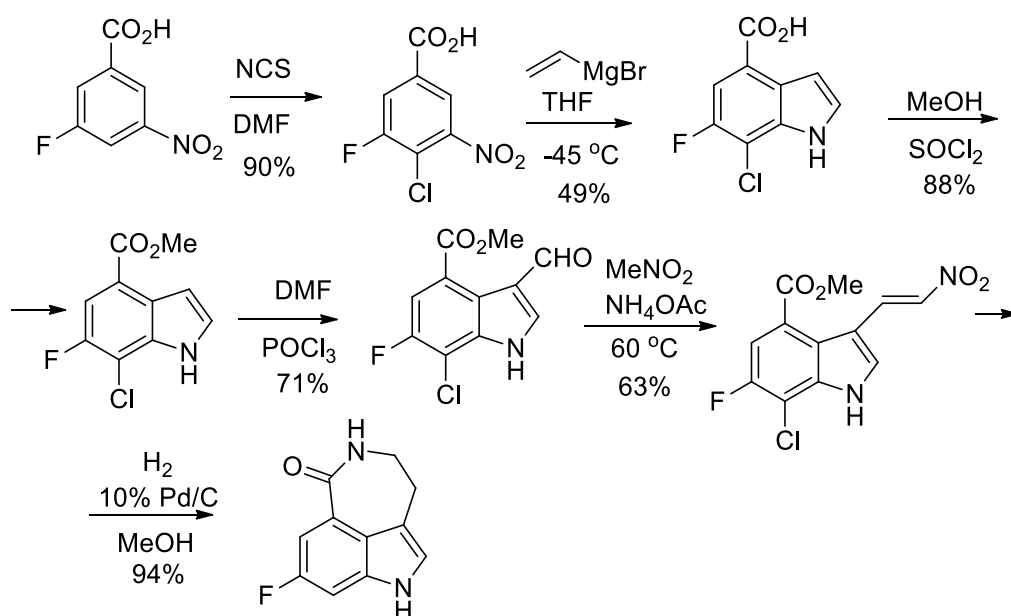
Εικόνα 37: Δεύτερη εναλλακτική πορεία χημικής αντίδρασης. Τροποποίηση που διενεργήθηκε λόγω δυσκολίας της εισαγωγής του 6-φθόρο-1H-ινδολο-4-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα της νιτροαλκενικής αλυσίδας. ^[185]



Σχήμα 15: Η χημική πορεία αντίδρασης για το σχηματισμό του Rucaparib σύμφωνα με τη Pfizer.^[185]



Εικόνα 38: Βασικά παραπροϊόντα που προκύπτουν από την χημική πορεία της Pfizer. ^[185]

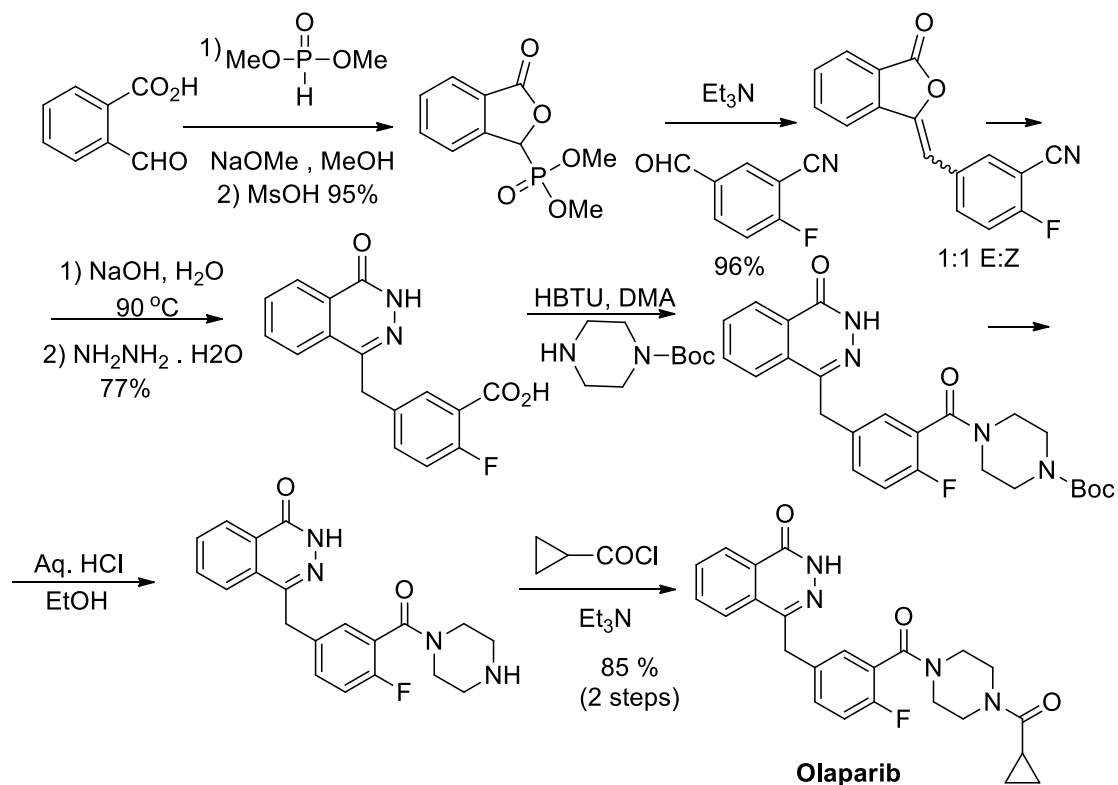


Σχήμα 16: Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του τρικυκλικού ινδολίου όπως προτάθηκε από την Shijiazhuang Biotechnology. ^[185,186]

2.9.7 Olaparib (Lynparza)

Το Olaparib αποτελεί τον πρώτο αναστολέα των PARP που ανακαλύφθηκε και εισήχθη σε κλινική εφαρμογή. Ανακαλύφθηκε από την KuDOS Pharmaceuticals, η οποία εξαγοράστηκε από την Astra Zeneca το 2006. Το 2014 η FDA ενέκρινε το olaparib για τη θεραπεία ασθενών με επαναλαμβανόμενο καρκίνο των ωθηκών, των σαλπινγών και του περιτοναίου, στην περίπτωση ασθενών που είχαν λάβει απόκριση πλήρως ή μερικώς σε χημειοθεραπεία υποστηριζόμενη με

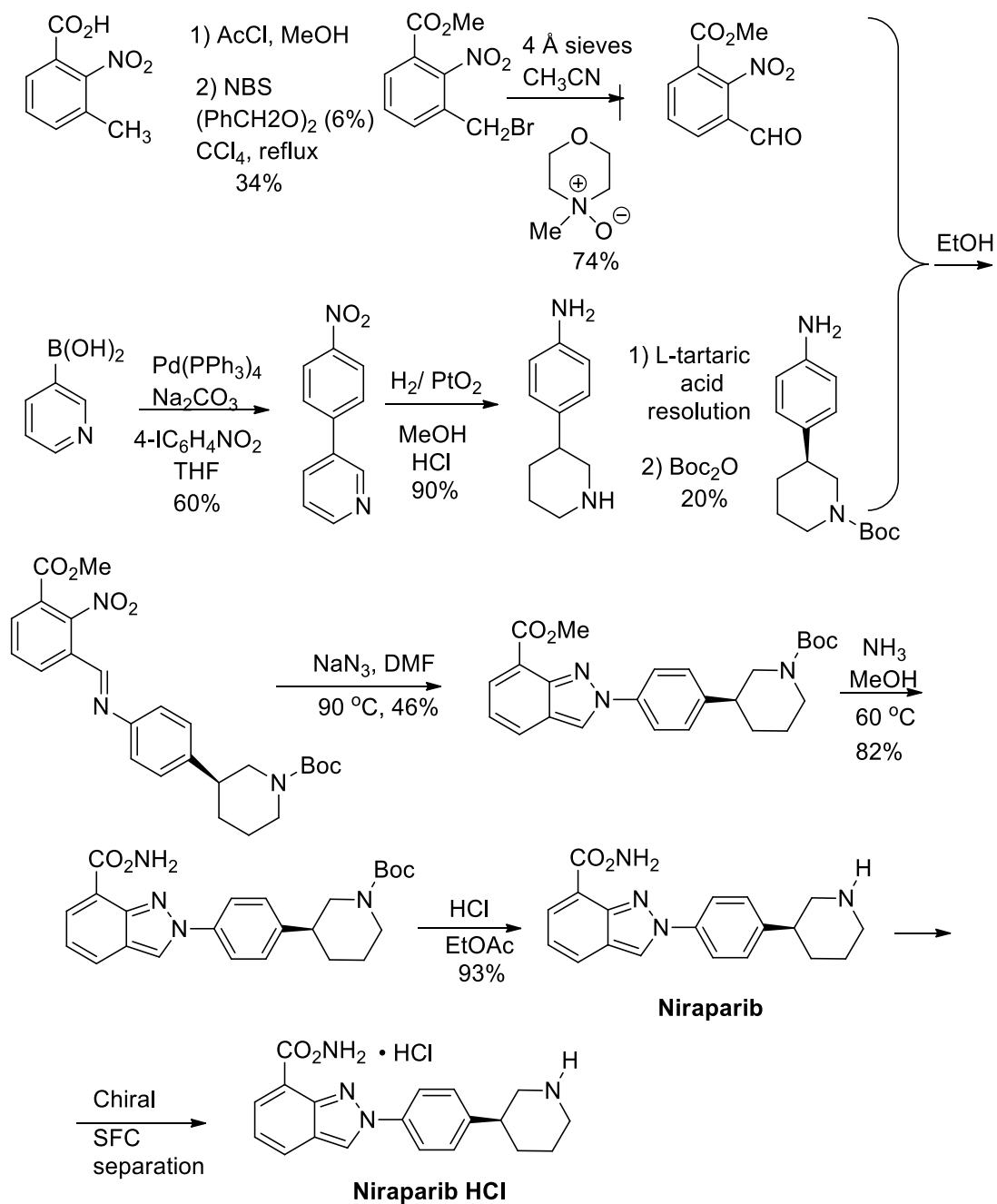
πλατίνα.^[187] Το 2018, η FDA ενέκρινε το olaparib για τη θεραπεία ασθενών με βλαβερή ή ύποπτη μετάλλαξη της βλαστικής σειράς BCRA (gBRCAm), και HER2-αρνητικό μεταστατικό καρκίνου του μαστού, οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία.



Σχήμα 17: Η Φαρμακευτική πορεία σύνθεσης που προτάθηκε για τη σύνθεση του Olaparib.^[185]

2.9.8 Niraparib (ZEJULA)

Τον Μάρτιο του 2017 η FDA ενέκρινε το Niraparib για τη διατήρηση της θεραπείας ενήλικων ασθενών με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών, του περιτοναίου ή αρχικό-πρώιμο καρκίνο του περιτοναίου που είχαν πλήρη ή μερική απόκριση στη θεραπεία με πλατίνα.^[185] Είναι ένας αναστολέας της PARP-1 και PARP-2 με συγκέντρωση αναστολής κατά 50% με τις (IC_{50}) να είναι 3·8 nmol/L για την PARP-1 και 2·1 nmol/L για την PARP-2.^[188] Το Niraparib αναστέλλει την ανάπτυξη όγκου σε κύτταρα με έλλειψη της BRCA και PTEN λειτουργίας.^[189] Να αναφερθεί ότι η φωσφατάση και το ομόλογο τενσίνης που έχει εξαλειφθεί στο χρωμόσωμα υπ' αριθμόν 10 (PTEN) αποτελεί μια φωσφατάση που συχνά τροποποιείται στον καρκίνο.^[190]



Σχήμα 18: Η Φαρμακευτική πορεία σύνθεσης που προτάθηκε για τη σύνθεση του Niraparib.^[185]

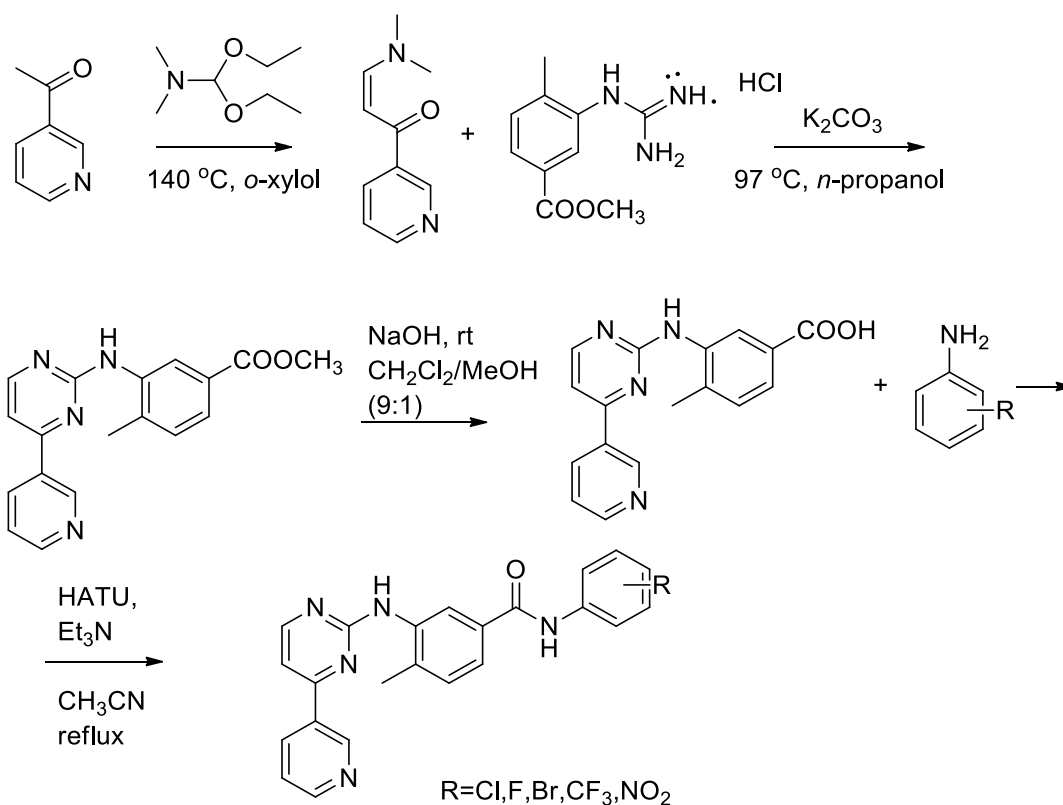
3 ΣΥΣΤΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μία σύντομη ανασκόπηση

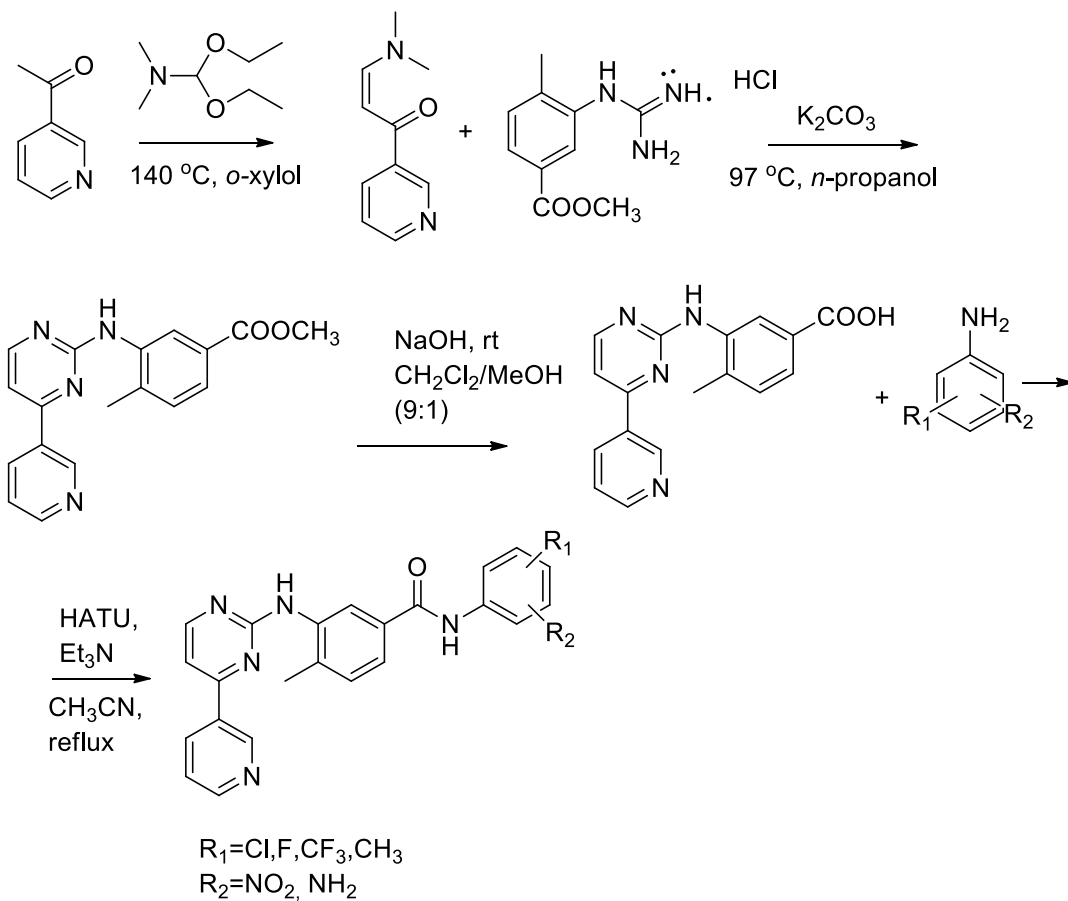
Στο θεωρητικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγινε εκτενής αναφορά στο ρόλο των πρωτεϊνικών κινασών, στην κυτταρική σηματοδότηση, στη φυσιολογική και μη δράση τους, στην εμπλοκή τους στην ογκογένεση, αλλά και στη σύνθεση και ανάπτυξη νέων αναστολέων αυτών, καθώς έχει πλέον επιβεβαιωθεί ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες συνιστούν την «Αχίλλειο πτέρνα» στην αντιμετώπιση νεοπλασιών, κυρίως μετά την αντιμετώπιση σε μεγάλο βαθμό της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML). Η αντοχή της ασθένειας (υποτροπή) στο Imatinib, που είναι ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας έναντι της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, ώθησε την επιστημονική κοινότητα να συνδράμει στο σχεδιασμό, ανάπτυξη και σύνθεση νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών δεύτερης γενιάς, όπως το Nilotinib, καθώς και παράγωγα αυτού. Κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μας προσπάθειας, επιχειρήθηκε ο σχεδιασμός, η σύνθεση, η απομόνωση και η ταυτοποίηση φαινυλαμινοπυριμιδικών παραγώγων, αναλόγων της Νιλοτινίβης, με σκοπό την ανάπτυξη νέων δραστικότερων και εκλεκτικότερων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, για την αντιμετώπιση-θεραπεία πλήθους σοβαρών ασθενειών.

Ακολούθως, περιγράφεται συνοπτικά η γενική βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία για τη σύνθεση νέων αναλόγων της Νιλοτινίβης και Ιματινίβης σε σχέση με την συνθετική πορεία που κατοχυρώθηκε από την εταιρία Novartis. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση αναλόγων, εν δυνάμει αναστολέων της Νιλοτινίβης, είναι η σύνθεση του βενζοϊκού μεθυλεστέρα από το αντίστοιχο αμινο-βενζοϊκό οξύ με την επίδραση π. H_2SO_4 σε απόλυτη μεθανόλη, και η μετατροπή του βενζοϊκού μεθυλεστέρα σε υδροχλωρικό άλας, ενώ παράλληλα διενεργείται η σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της επιθυμητής υποκατεστημένης γουανιδίνης με επίδραση κυαναμιδίου (H_2NCN). Ακολουθεί η σύνθεση β-εναμινόνης από την 3-ακετυλοπυριδίνη με την επίδραση της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφοακετάλης σε διαλύτη ο-ξυλόλιο. Μετά, πραγματοποιείται κυκλοποίηση από αντίδραση εναμινόνης με υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης, με σχηματισμό της φαινυλαμινοπυριμιδίνης. Ακολουθεί η βασική υδρόλυση (σαπωνοποίηση) του κυκλοποιημένου εστέρα προς το αντίστοιχο οξύ και, τέλος, διενεργείται η σύζευξη του οξέος (υδρολυμένου προϊόντος) με υποκαταστημένες ανιλίνες προς σχηματισμό τελικών προϊόντων με αμιδικό δεσμό. Αποτυπώνονται αναλυτικά οι ολικές συνθέσεις των εν δυνάμει αναστολέων του Nilotinib οι οποίοι έχουν προκύψει από τη σύζευξη του υποκατεστημένου οξέος με διάφορες υποκατεστημένες ανιλίνες.

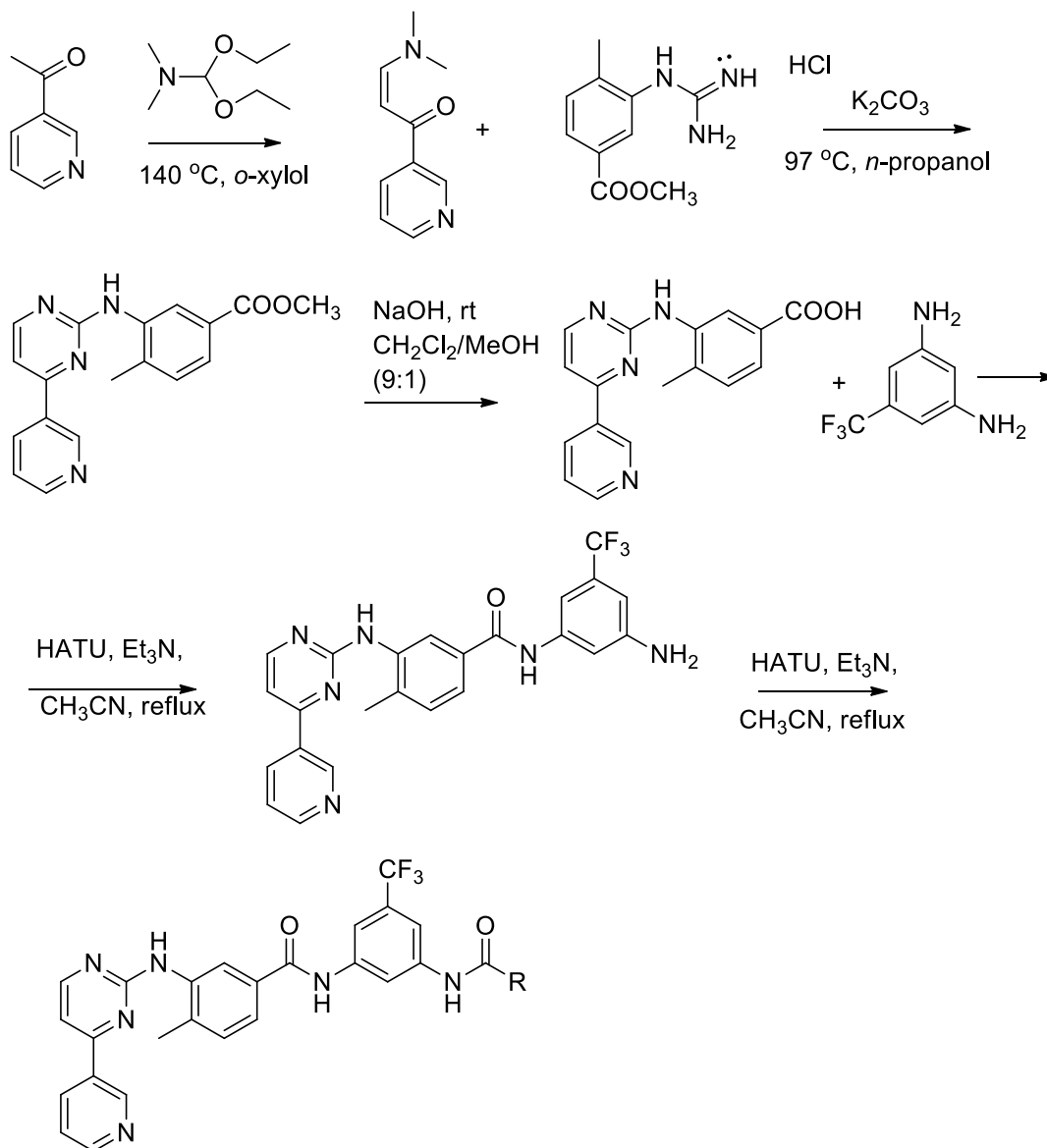
Σχετικά με τη σύνθεση των αναλόγων, ως εν δυνάμει αναστολέων, αναλόγων του Imatinib, το πρώτο βήμα είναι η σύνθεση β-εναμινόνης, ξεκινώντας από την 3-ακετυλοπυριδίνη με την επίδραση *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλης σε διαλύτη *o*-ξυλόλιο. Ακολουθεί η αντίδραση κυκλοποίησης της β-εναμινόνης με υδροχλωρικό άλας της γουανιδίνης, με σχηματισμό της φαινυλαμινοπυριμιδίνης. Ακολουθεί αναγωγή της νιτρομάδας με καταλύτη Adams παρουσία H_2 , λαμβάνοντας ποσοτικά το ανηγμένο ενδιάμεσο φαινυλαμινοπυριμιδίνης. Εν συνεχεία διενεργείται, είτε μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης μεταξύ της φαινυλαμινοπυριμιδίνης και διαφόρων υποκατεστημένων χλωριδίων του βενζοϊκού οξέος είτε μέσω της επίδρασης διαφόρων υποκατεστημένων ισοκυανικών φαινυλίων προς σχηματισμό αναλόγων τόσο του Imatinib όσο και του Nilotinib, με ενσωματωμένο το δεσμό της ουρίας στον τελικό βενζολικό δακτύλιο.



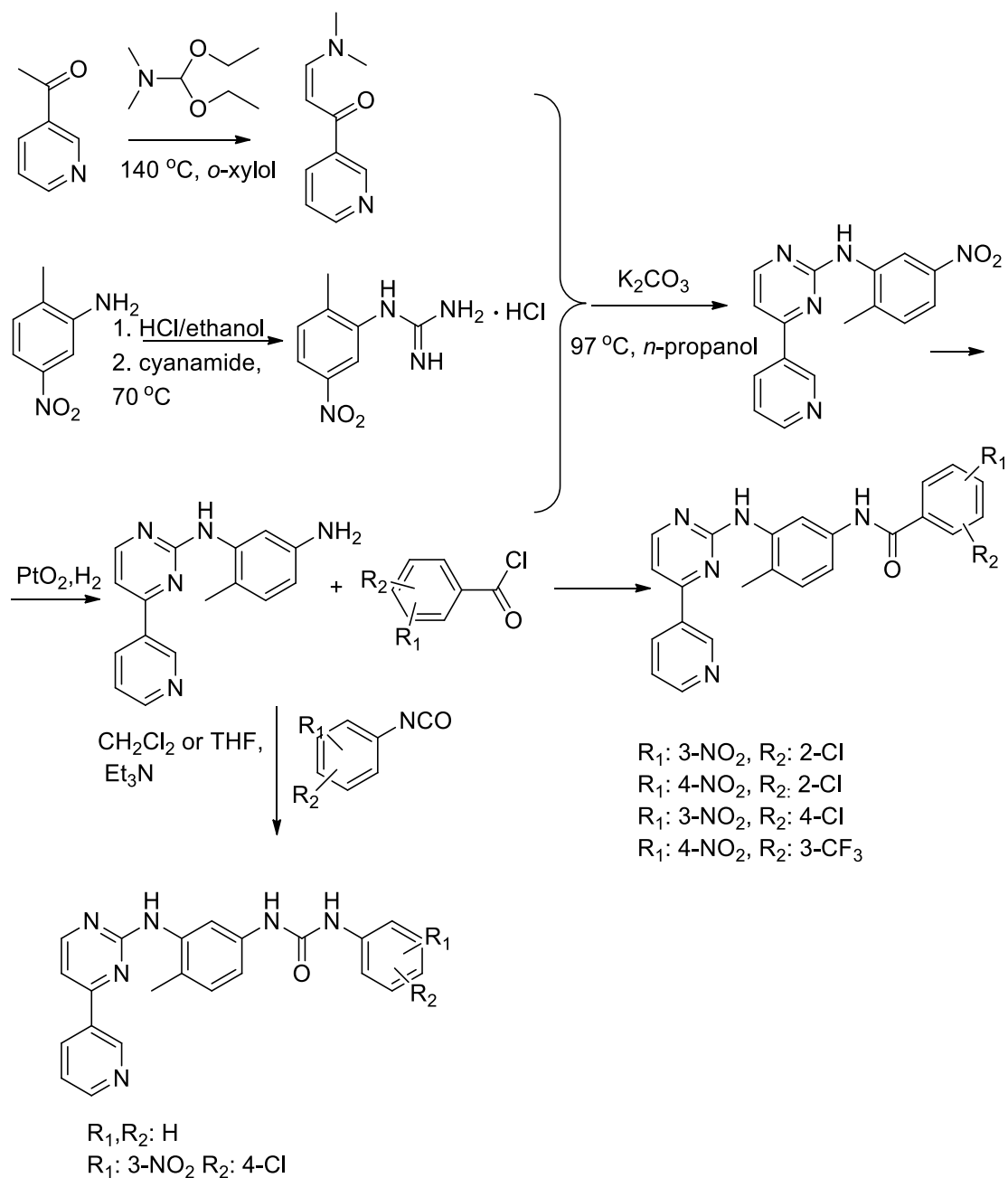
Σχήμα 1: Ολική συνθετική πορεία των αναλόγων του Nilotinib, εν δυνάμει αναστολέων 1^{ης} κατηγορίας



Σχήμα 2: Ολική συνθετική πορεία των αναλόγων του Nilotinib, εν δυνάμει αναστολέων 2^{ης} κατηγορίας



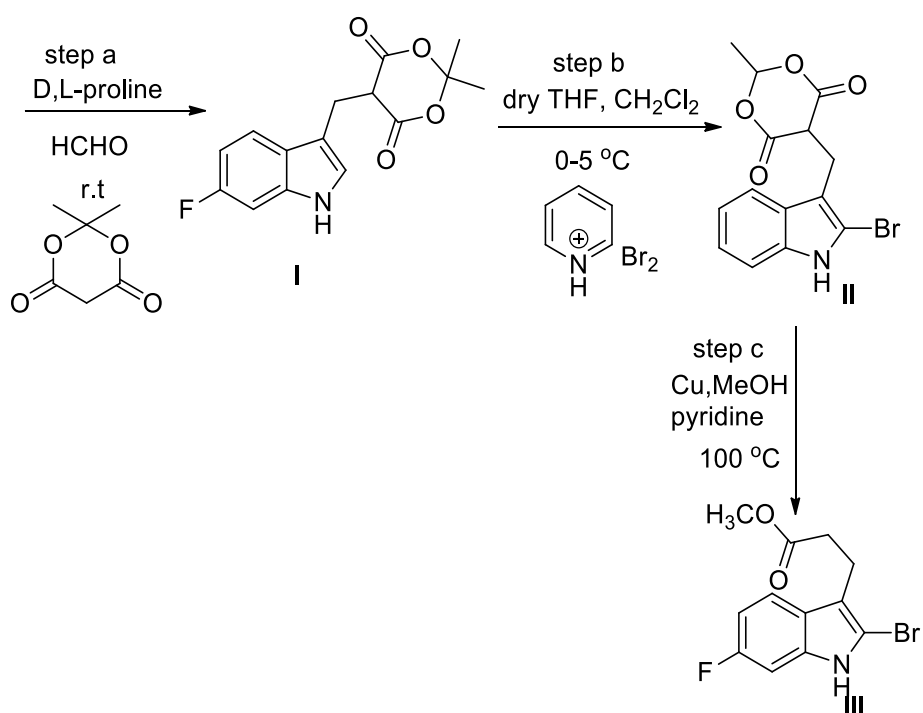
Σχήμα 3: Ολική συνθετική πορεία των αναλόγων του Nilotinib, εν δυνάμει αναστολέων 3^{ης} κατηγορίας

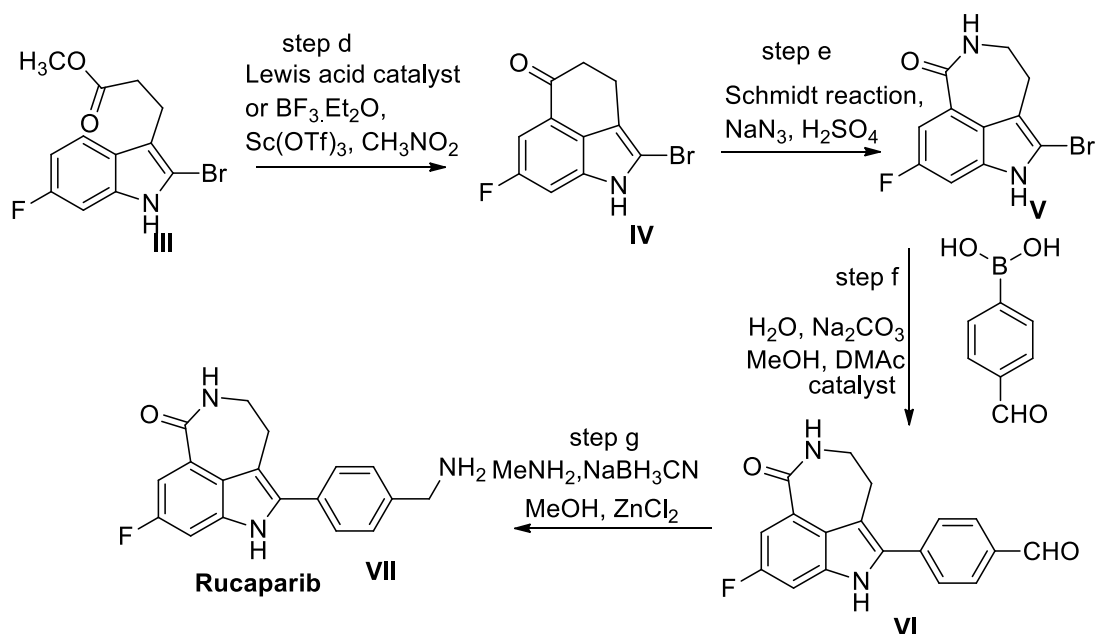


Σχήμα 4: Ολική συνθετική πορεία σύνθεσης αναλόγων του *Imatinib* που αναπτύχθηκε από την ερευνητική μας ομάδα.

Πέρα από το σχεδιασμό, σύνθεση, και βιολογικό έλεγχο των νέων εν δυνάμει αναστολέων, αναλόγων του *Nilotinib* και *Imatinib*, ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, που αποτελέσαν και πρωταρχικό στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, επιπρόσθετος στόχος αποτελεί η τροποποίηση και ανάπτυξη νέας βελτιωμένης ολικής σύνθεσης του *Rucaparib*. Ως γνωστόν, η συνολική απόδοση του *Rucaparib* με τις υπάρχουσες συνθετικές πορείες, όπως προτάθηκαν από διάφορες φαρμακευτικές πορείες ανέρχεται σε χαμηλές τιμές, συγκεκριμένα 22%. Έτσι, η

σύνθεση του Rucaparib αποτέλεσε πρόκληση για την παρούσα διδακτορική διατριβή με στόχο την τροποποίησή της και συγχρόνως την βελτιστοποίησή της. Η προτεινόμενη ολική συνθετική πορεία συνίσταται από επτά επιμέρους στάδια, το καθένα θεωρητικά υψηλής απόδοσης και ξεκινάει με το εμπορικά διαθέσιμο και φθινό αντιδραστήριο 6-φθορο-ινδόλιο, ενώ θα γίνει αναλυτική αναφορά των συνθηκών σε κάθε επιμέρους στάδιο. Παράλληλα με την κάτωθι περιγραφόμενη ολική πειραματική πορεία παραλαβής του Rucaparib, έγινε διεύρυνση-ανασκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, και προτάθηκαν επιπρόσθετες εναλλακτικές συνθετικές πορείες του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος, οι οποίες θα αποτυπωθούν στο κείμενο αυτό.

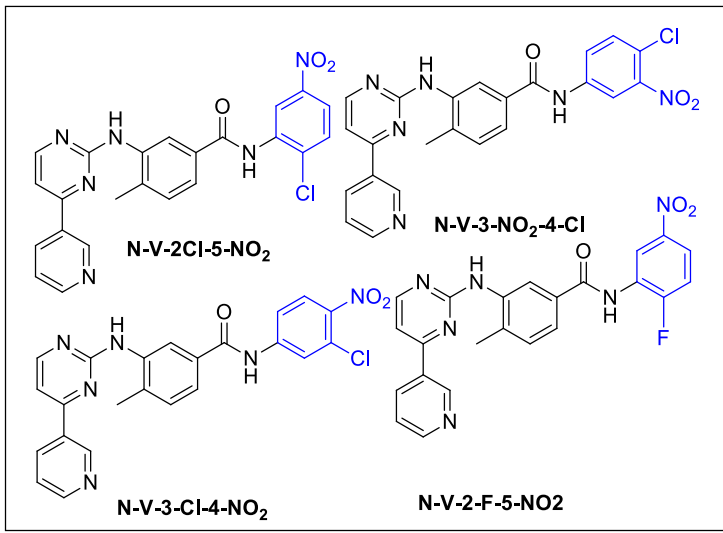
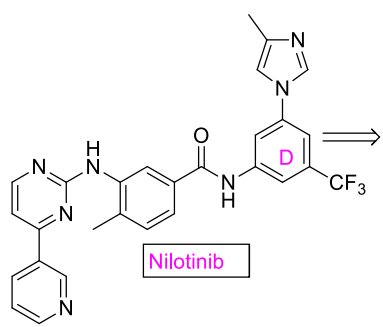




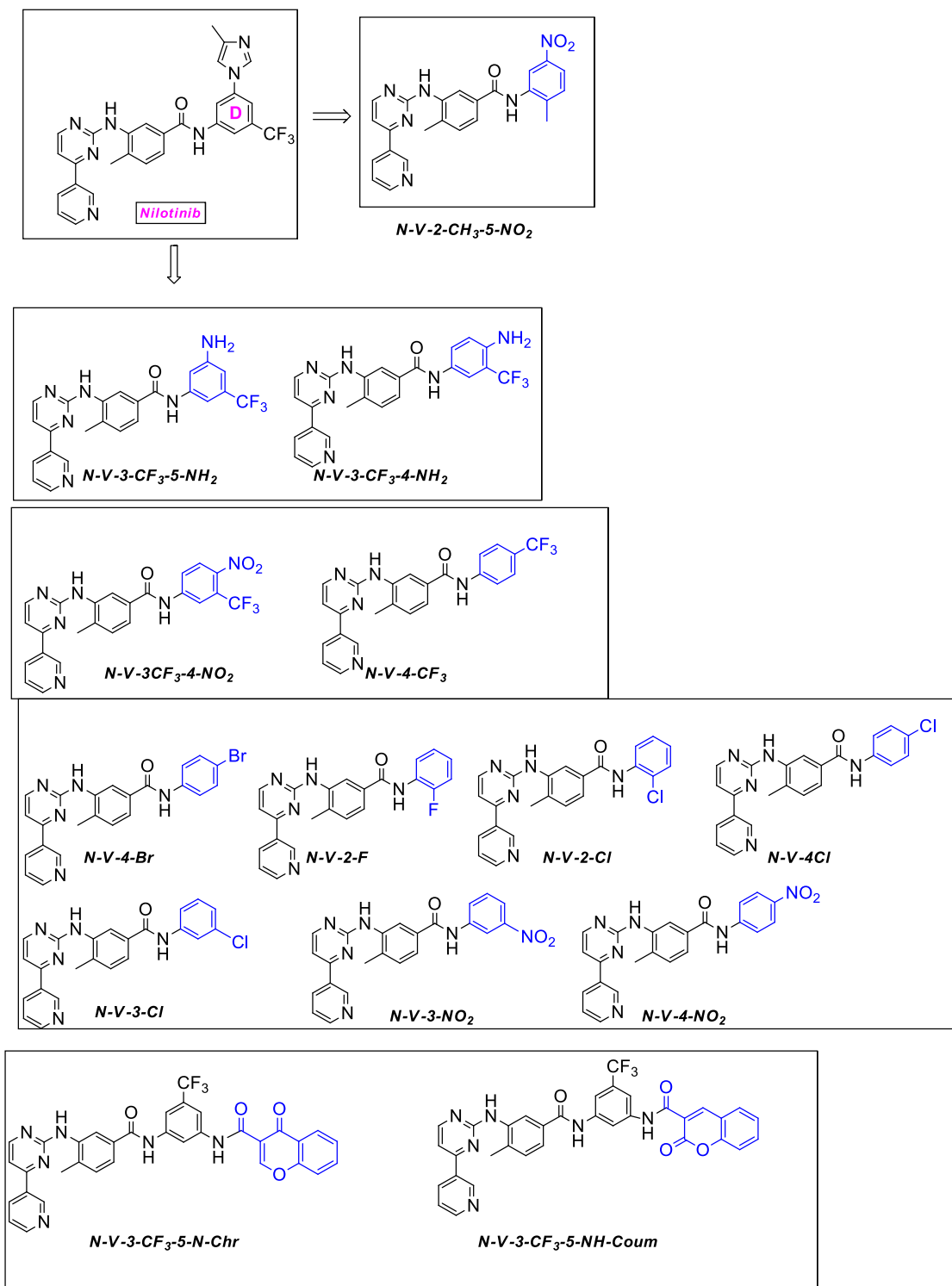
Σχήμα 5: Η αρχική ολική συνθετική πορεία του Rucaparib που προτάθηκε και σχεδιάστηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο.

3.2 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων

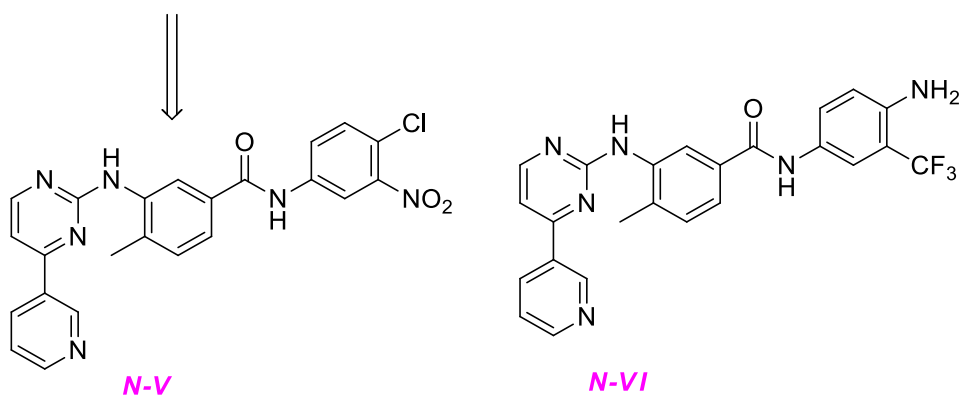
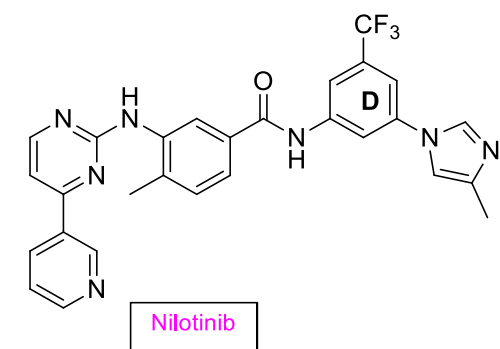
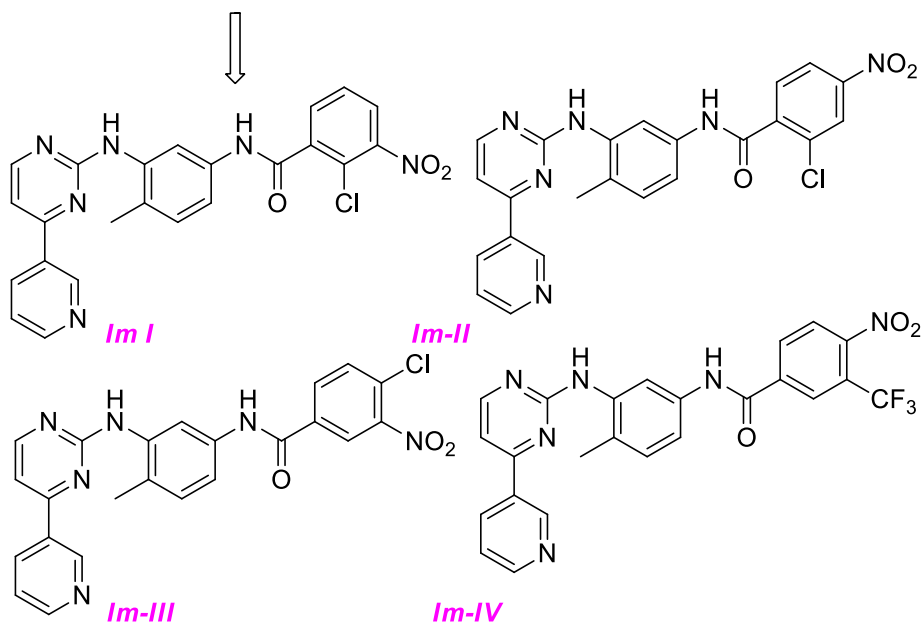
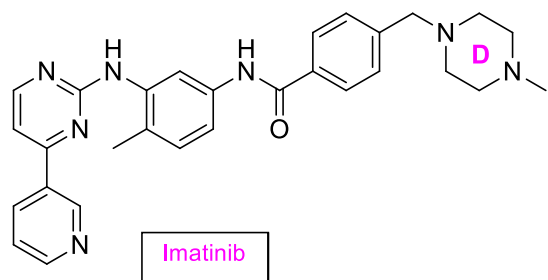
Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η σύνθεση νέων εν δυνάμει αναστολέων κινασών, αναλόγων του Nilotinib και Imatinib. Ο σχεδιασμός των παρακάτω ενώσεων στηρίχθηκε στην αυξημένη ανασταλτική δράση που παρουσίασαν ορισμένα παράγωγα του Imatinib έναντι μιας σειράς πρωτεϊνικών κινασών,^[191] κυρίως έναντι της οικογένειας των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα PDGF που συντέθηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου. Η βελτιστοποίηση της ανασταλτικής δράσης των παραγώγων του Nilotinib πιστεύεται να οφείλεται στην αλλαγή της μοριακής δομής, έστω στοιχειωδώς του Tasigna. Σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν 18 ανάλογα του φαρμακευτικού σκευάσματος Tasigna και Gleevec με τροποποιήσεις στον τελικό αρωματικό δακτύλιο D. Για συγκριτικούς λόγους, αναφέρεται η δομή του Nilotinib και Imatinib και τα ανάλογα αυτών, που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν επιτυχώς. Να σημειωθεί πως η σύνθεση των αναλόγων του Imatinib (σχήμα 4) αποτελούν μέρος της διδακτορικής διατριβής των συναδέλφων Αιμιλίας Γιαννούση και Μαρίας Κυνηγοπούλου. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα γίνει αναφορά στη βιολογική δράση που κατέδειξαν ορισμένα ανάλογα της Ιματινίβης και της Νιλοτινίβης έναντι συσσωρευμένων αιμοπεταλίων υπό την επίδραση διαφόρων αγωνιστών.

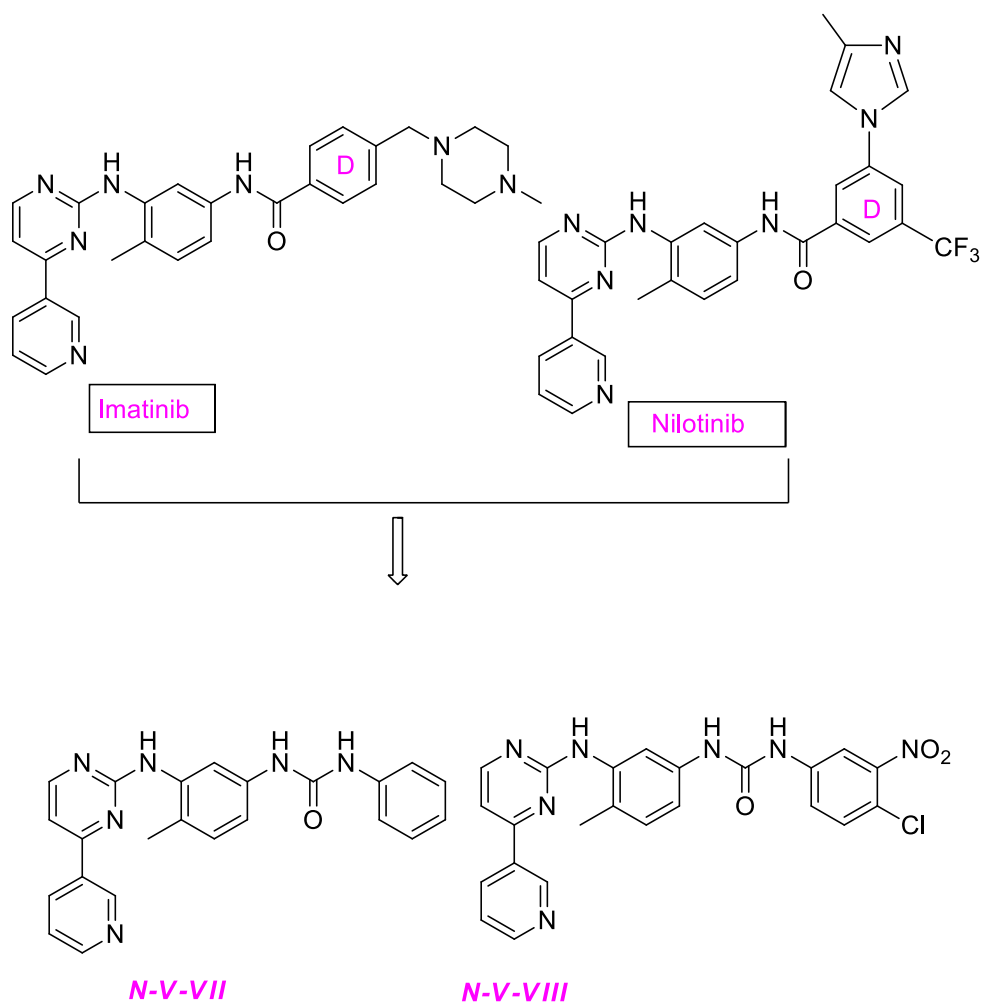


Σχήμα 6α: Τροποποιήσεις σε ανάλογα της Νιλοτινίβης (*Tasigna*) και τα τελικά ανάλογα του *Tasigna* με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό. Έγινε αφαίρεση του ιμιδαζολικού δακτυλίου στο *Nilotinib*, οι δε διάφορες τροποποιήσεις έγιναν στον τελικό βενζολικό δακτύλιο.



Σχήμα 6β: Τροποποιήσεις σε ανάλογα της Νιλοτινίβης (*Tasigna*) και τα τελικά ανάλογα του *Tasigna* με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό. Έγινε αφαίρεση του ιμιδαζολικού δακτυλίου στο *Nilotinib*, οι δε διάφορες τροποποιήσεις έγιναν στον τελικό βενζολικό δακτύλιο.





Σχήμα 7: Τροποποιήσεις σε ανάλογα της Ιματινίβης και Νιλοτινίβης. Στα ανάλογα της Ιματινίβης έγινε εξάλειψη του πιπεραζινικού δακτυλίου στο Imatinib και οι τροποποιήσεις διενεργήθηκαν στο τελικό βενζολικό δακτύλιο, (Im-I, Im-II, Im-III, Im-IV). Στα ανάλογα της Νιλοτινίβης έγινε εξάλειψη του μιδαζολικού δακτυλίου στο Nilotinib και οι τροποποιήσεις διενεργήθηκαν στο τελικό βενζολικό δακτύλιο, (N-V και N-V-VI). Οι δομές των αναλόγων του Imatinib και Nilotinib με αντικατάσταση του αμιδικού δεσμού από δεσμό ουρίας. (N-V-VII, N-V-VIII).

Η μοριακή μοντελοποίηση των ως άνω αναλόγων του Nilotinib (Tasigna), και Imatinib (Gleevec) διενεργήθηκε στο εργαστήριο μας υπό την καθοδήγηση και αρωγή του Αλέξη Μπρέντα, σε σχέση με το φαρμακοφόρο μοντέλο Nilotinib (Tasigna) και Imatinib (Gleevec) στη θέση πρόσδεσης στη πρωτεϊνική κινάση Src. Τα αποτελέσματα των οποίων περιγράφονται παρακάτω.

3.3 Σχεδιασμός νέων αναστολέων με προγράμματα μοριακής μοντελοποίησης

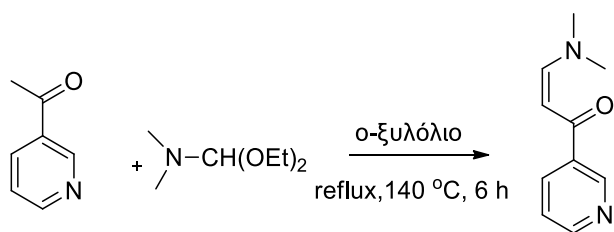
Ο σχεδιασμός των νέων αναστολέων, αναλόγων του Nilotinib, διεκπεραιώθηκε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοντελοποίησης, που προβλέπουν την πιθανή ανασταλτική δράση των εν λόγω ενώσεων έναντι της Abl και Src κινάσης, καθώς επιτρέπει τη σύγκριση των ενώσεων με πιθανή δράση με γνωστούς αναστολείς, έναντι της κινάσης. Με μοριακούς υπολογισμούς πρόσδεσης του αναστολέα στο ένζυμο, υποδεικνύονται οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των εν λόγω ενώσεων και της κινάσης, παρέχοντας τη δυνατότητα στοιχειοθέτησης ενός «φαρμακοφόρου μοντέλου» με τη συσχέτιση δομής-δραστικότητας των μορίων. Μέσω αυτής της υπέρθεσης των ενώσεων με την κινάση και την πρόβλεψη των αναπτυσσόμενων αλληλεπιδράσεων, υποδεικνύονται οι ενώσεις που είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν ανασταλτική δράση για το σχεδιασμό δραστικότερων και εκλεκτικότερων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Κατ' αυτόν τον τρόπο σχεδιάστηκαν νέοι αναστολείς τύπου II, ανάλογα του Nilotinib, οι οποίοι προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, στη θέση πρόσδεσης του ATP στην τυροσινική κινάση Abl, δημιουργώντας διαφόρων ειδών αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Για την μοριακή μοντελοποίηση των παραγώγων του Nilotinib, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Nilotinib, καθώς είναι 10 φορές πιο δραστικό σε σχέση με το Imatinib.

3.4 Σύνθεση β-εναμινόνης

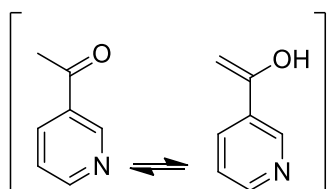
3.4.1 Αντιδράσεις και μηχανισμοί κατά τη σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο) προπ-2-εν-1-όνης.

Το αρχικό στάδιο στην όλη συνθετική πορεία, βελτιστοποιημένη στο ερευνητικό μας εργαστήριο, όπως δημοσιεύθηκε προσφάτως,^[192α] είναι η σύνθεση της β-εναμινόνης, που σχηματίζεται σε μια αντίδραση συμπύκνωσης της 3-ακετυλοπυριδίνης με την *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλη σε διαλύτη ο-ξυλόλιο υπό βρασμό.



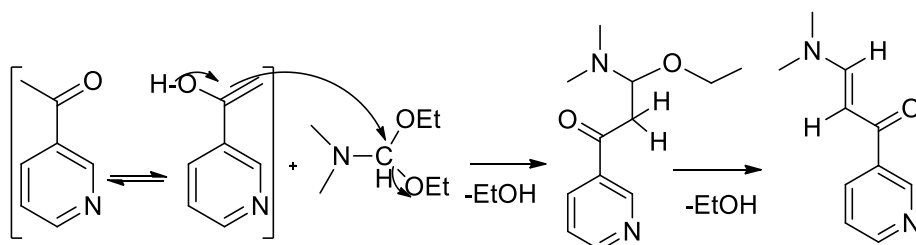
Σχήμα 8: Αντίδραση σχηματισμού εναμινόνης

Η *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλη είναι το προϊόν προστασίας καρβονυλικού άνθρακα του διμεθυλοφορμαμιδίου διαθέτοντας δυο καλές αποχωρούσες ομάδες, αιθοξυ-ομάδες. Αντιδρά με την ενολική μορφή της 3-ακετυλοπυριδίνης, ως πυρηνόφιλου, και δίνει την εναμινόνη.



Σχήμα 9: Ταυτομέρεια κετόνης-ενόλης

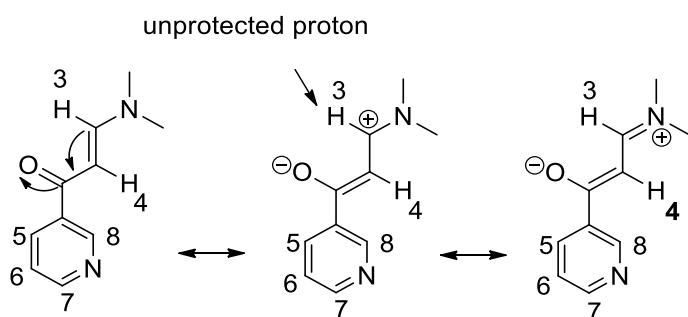
Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 140 °C, όπου το θερμοδυναμικά ευνοούμενο ενολικό ταυτομερές της 3-ακετυλοπυριδίνης, ως πυρηνόφιλο προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλης με αποτέλεσμα την αποβολή μιας αιθοξυ-ομάδας από την *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλοακετάλη και το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου. Το επιθυμητό σταθερό προϊόν (β-εναμινόνη) σχηματίζεται με απόσπαση ενός δευτέρου μορίου αιθανόλης από την ενδιάμεση ένωση. Ο μηχανισμός σχηματισμού της β-εναμινόνης δίνεται στο σχήμα 10.



Σχήμα 10: Μηχανισμός σύνθεσης β-εναμινόνης

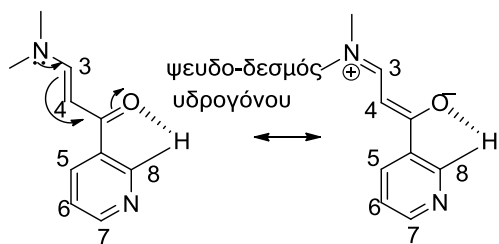
3.4.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της β εναμιनोंης

Στο φάσμα ^1H NMR (σχήμα 14α) της β-εναμιनोंης διακρίνουμε μια μετατόπιση του ολεφινικού πρωτονίου σε β-θέση ως προς το καρβονύλιο σε ασθενέστερα πεδία, δηλαδή σε υψηλότερες τιμές ppm. Συγκεκριμένα το πρωτόνιο σε β-θέση ως προς το καρβονύλιο (υπ' αριθμόν 3) δίνει σήμα συντονισμού στα 7.86 ppm, ενώ το πρωτόνιο σε α-θέση ως προς το καρβονύλιο (υπ' αριθμόν 4) συντονίζεται στα 5.7 ppm. Συντονισμός σε χαμηλότερο πεδίο συνάδει με μεγαλύτερη αποπροστασία των πρωτονίων και είναι αναμενόμενο σε α,β- ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις. Το πρωτόνιο σε α-θέση ως προς το καρβονύλιο συνδέεται με άνθρακα που φέρει μερικό θετικό φορτίο, επομένως το πρωτόνιο αντιλαμβάνεται ηλεκτρονιακή έλλειψη, ήτοι αποπροστασία. Η παρακάτω αναγραφόμενη δομή συζυγίας εξηγεί το συντονισμό του πρωτονίου σε α-θέση ως προς το καρβονύλιο σε ισχυρότερο πεδίο. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, ότι τα πρωτόνια 3 και 4 σχάζονται σε 2 διπλές κορυφές με μεγάλη και χαρακτηριστική σταθερά σύζευξης $^3J=12.5$ Hz. Πρόκειται για δυο ολεφινικά πρωτόνια, σύμφωνα με θεωρητικούς υπολογισμούς σε θέση trans/(E-), δεδομένου ότι τα δύο ολεφινικά πρωτόνια στο φάσμα ^1H -NMR σχάζονται σε δύο διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης $^3J=12.5$ Hz, ενώ από βιβλιογραφικά δεδομένα σε συστήματα εναμιनोंων με cis (Z-) γεωμετρία η συγκεκριμένη σταθερά σύζευξης κυμαίνεται από 8 έως 9 Hz.



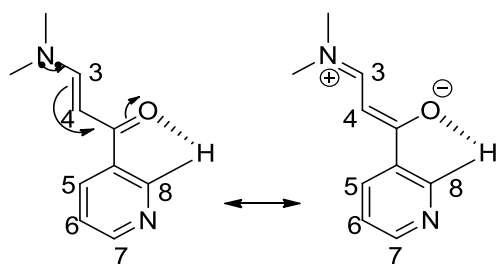
Σχήμα 11: Αποπροστασία πρωτονίου (3) σε β- θέση ως προς τον καρβονυλικό άνθρακα

Η μεγάλη αποπροστασία του πρωτονίου στα 9.08 ppm (υπ' αριθμόν 8), που αποδίδεται, εκτός της γειννίασης με το πυριδινικό N, επιπλέον σε ψευδοδεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ αυτού και του οξυγόνου του καρβονυλικού άνθρακα με σχηματισμό πενταμελούς δακτυλίου. Επιπλέον, είναι σε 2-θέση ως προς το ηλεκτραρνητικό N του δακτυλίου, οπότε αποπροστατεύεται. Όπως φαίνεται στο φάσμα ^1H NMR της β-εναμιनोंης, παρατηρείται μια μεγάλη αποπροστασία για το πρωτόνιο-7 και συντονίζεται στα 8.67 ppm, καθώς βρίσκεται πλησίον του ηλεκτραρνητικού ετεροατόμου (N). Το πρωτόνιο-5 συντονίζεται στα 8.2 ppm, ενώ το πρωτόνιο-6 στα 7.37 ppm.

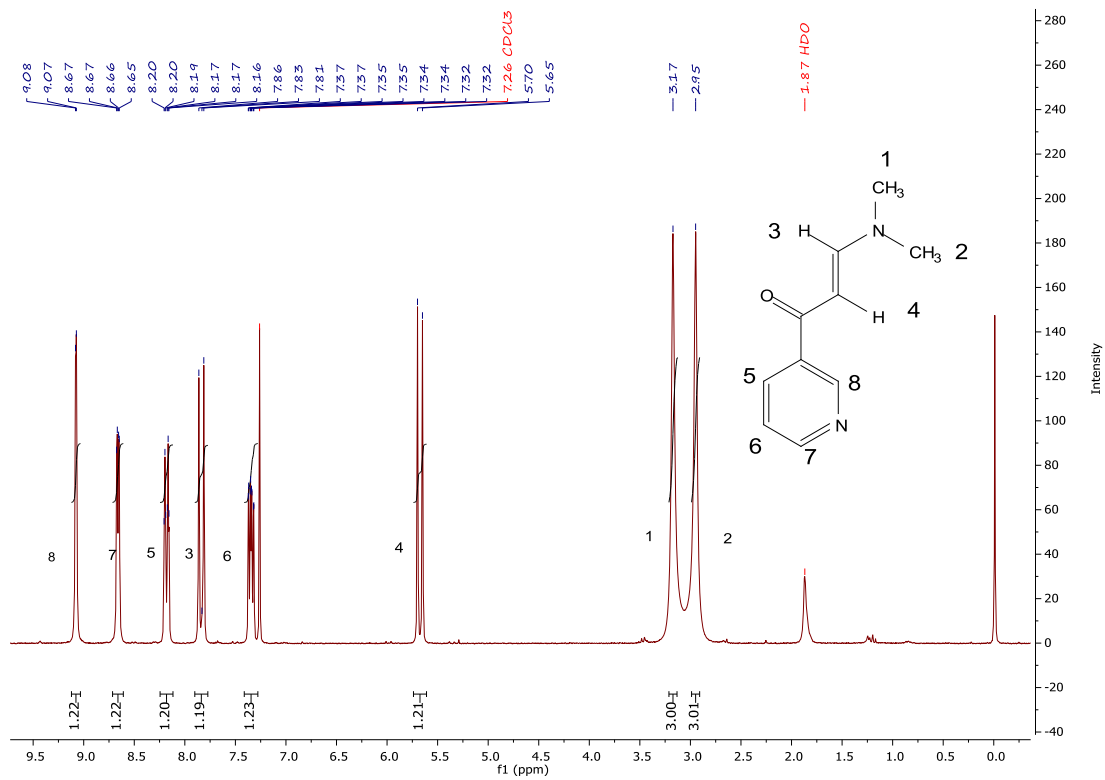


Σχήμα 12: Σχηματισμός ψευδο-δεσμού υδρογόνου

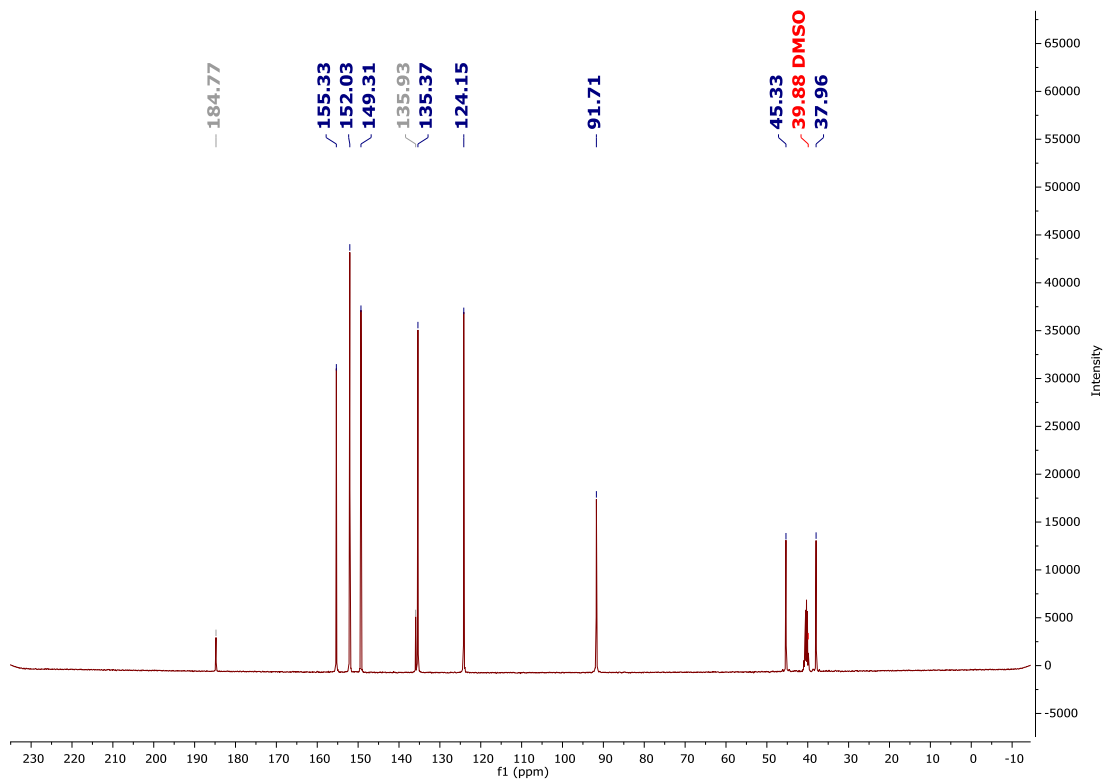
Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως στο φάσμα ^1H NMR εμφανίζονται δυο σήματα συντονισμού και ειδικότερα δυο απλές κορυφές στα 3.17 και 2.95 ppm, που αντιστοιχούν στα N-μεθυλικά πρωτόνια. Αναλυτικότερα, τα πρωτόνια των μεθυλομάδων αντιλαμβάνονται διαφορετικό χημικό και μαγνητικό περιβάλλον και συντονίζονται σε διαφορετικά πεδία, καθώς λόγω της εκδηλωμένης συζυγίας δεν υπάρχει ελεύθερη- γρήγορη περιστροφή γύρω από το δεσμό μεταξύ αζώτου και του ολεφινικού άνθρακα, καθώς ο δεσμός N-C αποκτά φύση διπλού δεσμού, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα.



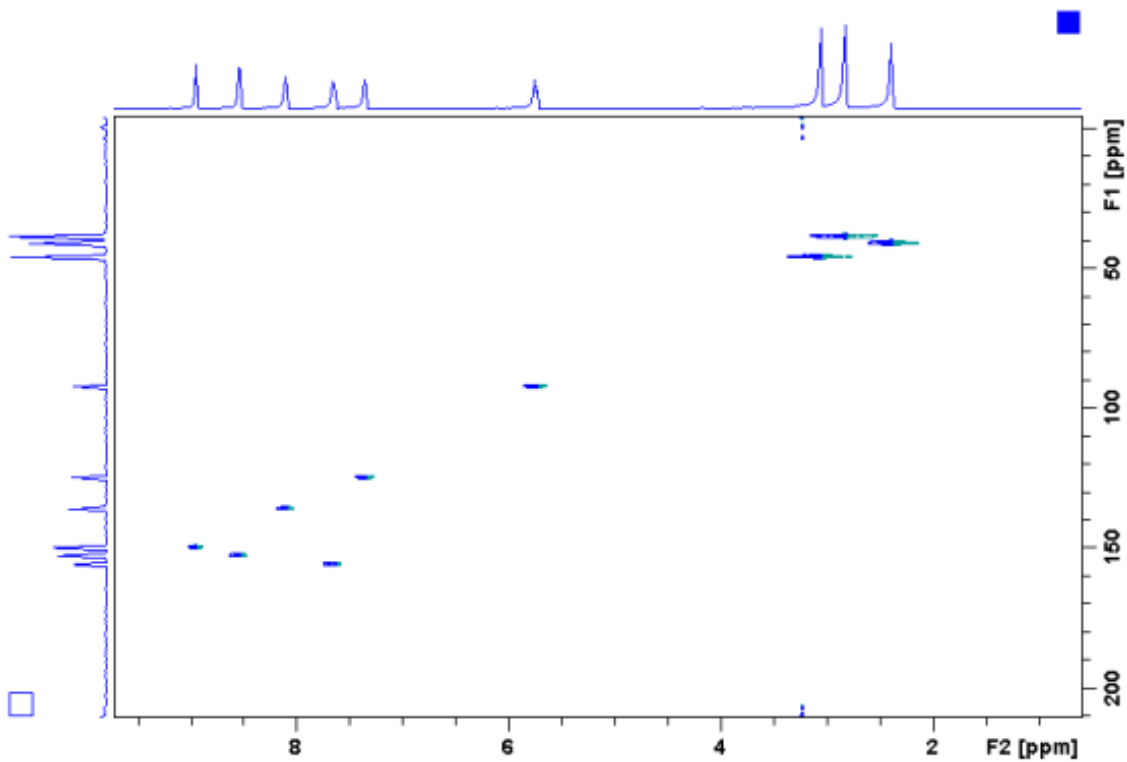
Σχήμα 13: Περιορισμός περιστροφής γύρω από το δεσμό μεταξύ του ολεφινικού άνθρακα και αζώτου



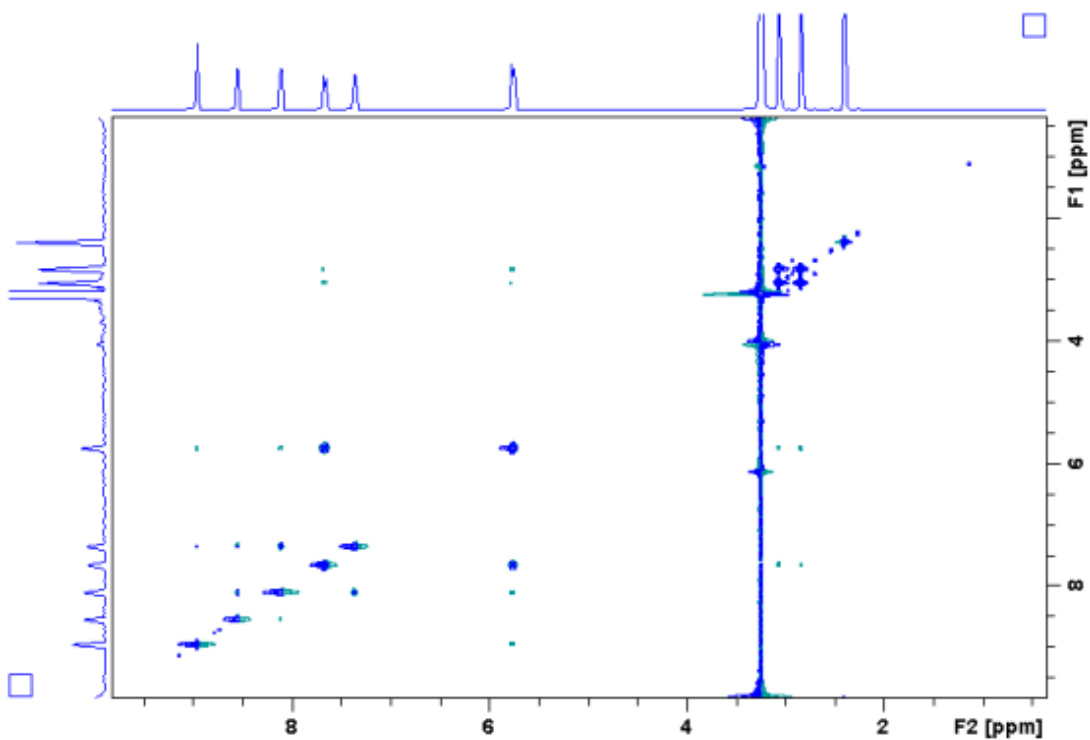
Σχήμα 14α: Φάσμα ¹H NMR (250 MHz) της β-εναμινόνης σε CDCl₃



Σχήμα 14β: Φάσμα ¹³C NMR (400MHz) της β-εναμινόνης σε DMSO



Σχήμα 15: Φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR (HSQC) της β-εναμινόνης

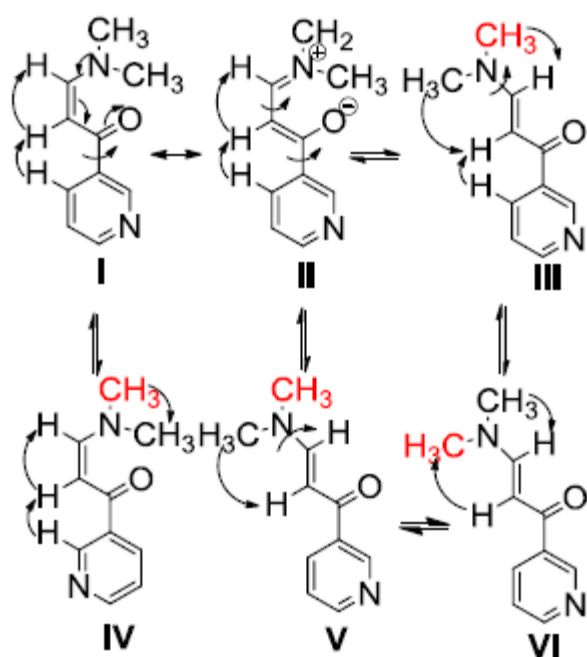


Σχήμα 16α: Φάσμα $^1\text{H}/^1\text{H}$ NOESY (500MHz, DMSO- d_6) της β-εναμινόνης

Από το φάσμα NOESY εξάγονται οι εξής πληροφορίες/συσχετίσεις/κορυφές διαταύρωσης, μεταξύ:

- Των δύο ολεφινικών πρωτονίων, γεγονός που καταδεικνύει την ύπαρξη της cis-(Z-) διαμόρφωσης (I), εξαιτίας της ελεύθερης περιστροφής.
- Των δύο μεθυλομάδων (μαύρο και κόκκινο χρώμα) και με τα δύο ολεφινικά πρωτόνια, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη της trans-(E-) στερεοχημείας (διαμορφώσεις III, V και VI).
- Υπάρχουν ευδιάκριτες κορυφές διασταύρωσης του λιγότερου απο-προστατευμένου ολεφινικού πρωτονίου, τόσο με το πρωτόνιο του πυριδινικού δακτυλίου στη 2-θέση (διαμόρφωση IV) όσο και με αυτό στην 4-θέση του πυριδινικού δακτυλίου (διαμόρφωση III).^[192β]

Συνοψίζοντας, αν και ενεργειακά ευνοείται η trans-(E-) διαμόρφωση λόγω του συζυγιακού φαινομένου (II) που εκδηλώνεται, σε θερμοκρασία 298 Κέλβιν λαμβάνει χώρα μία εναλλαγή από τη μία διαμόρφωση στην άλλη (trans→cis, cis→trans) στερεοχημεία/διαμόρφωση.^[192β]

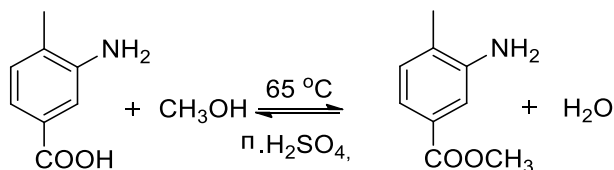


Σχήμα 16β: Διαμορφώσεις της β-εναμινόνης^[192β]

3.5 Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα-φασματοσκοπικά δεδομένα

3.5.1 Αντιδράση σύνθεσης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα

Το δεύτερο στάδιο στην όλη συνθετική πορεία είναι η σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκού μεθυλεστέρα που σχηματίζεται σε μια αντίδραση εστεροποίησης με το αντίστοιχο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ με πυκνό θειικό οξύ σε απόλυτη μεθανόλη.

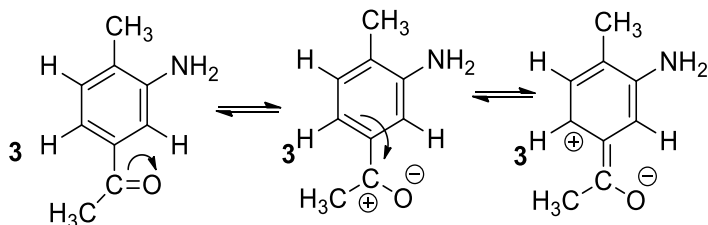


Σχήμα 17: Αντίδραση σχηματισμού του 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκού μεθυλεστέρα.

Η ως άνω μέθοδος σύνθεσης του 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκού μεθυλεστέρα, είχε απόδοση της τάξεως του 70 %. Η μεθανόλη δρα ως πυρηνόφιλο, καθώς προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο που με την αποβολή ενός μορίου νερού σχηματίζει το προϊόν εστεροποίησης.

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

Στο φάσμα ^1H NMR του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα παρατηρούμε ότι σε ασθενέστερα πεδία, σε υψηλότερες τιμές ppm, συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 και σχάζεται σε διπλή κορυφή με $^3J=8.8$ Hz. Αυτό είναι σχετικά αποπροστατευμένο, καθώς πλησίον βρίσκεται καρβονυλική ομάδα που μέσω του συζυγιακού φαινομένου αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το βενζολικό δακτύλιο.

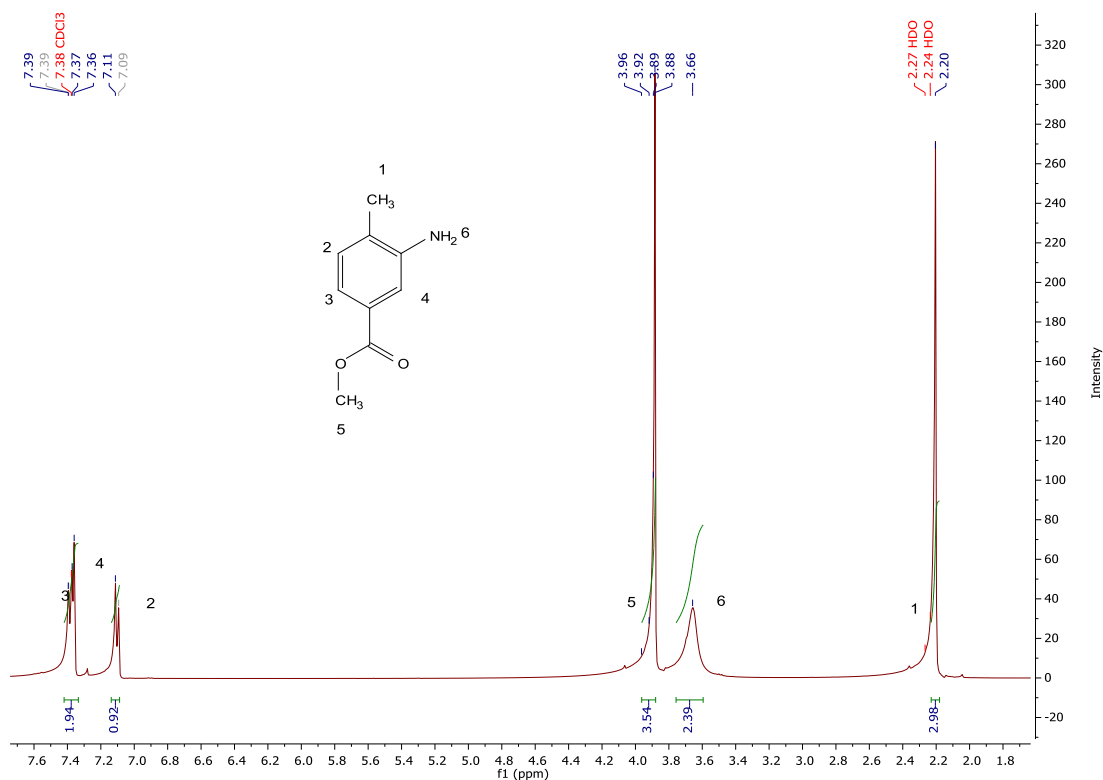


Σχήμα 18: Δομές συντονισμού του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα και αποπροστασία του H (υπ' αριθμόν 3) λόγω εκδήλωσης αρνητικού συζυγιακού φαινομένου.

Στα 7.36 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4, δίνοντας μια απλή κορυφή, καθώς δεν υφίσταται πλησίον του γειτονικό πρωτόνιο. Η σχετική αποπροστασία του αποδίδεται στο ότι σε ορθο-θέση βρίσκεται μια ομάδα που είναι δέκτης ηλεκτρονίων (-M), αλλά και σε ορθο-θέση ως προς την αμινομάδα που του προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω συζυγιακού φαινομένου, που είναι ενεργοποιητής.

Στα 7.09 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 και σχάζεται σε διπλή κορυφή με $^3J=7.6\text{Hz}$, εφόσον πλησίον του υφίσταται γειτονικό πρωτόνιο. Είναι το περισσότερο προστατευμένο πρωτόνιο καθώς σε ορθο-θέση υφίσταται η μεθυλο-ομάδα που του προσφέρει μέσω επαγωγικού φαινομένου ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Η άλλη διπλή κορυφή αντιστοιχεί στο πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 στα 7.39 ppm.

Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 5 της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται ως απλή κορυφή στα 3.88 ppm, λόγω της ηλεκτραρνητικότητας του οξυγόνου που έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα από αυτά, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου υπ' αριθμόν 1 συντονίζονται ως απλή κορυφή στα 2.22 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια της αμινομάδας συντονίζονται στα 3.66 ppm και δίνουν μια απλή ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 2H.



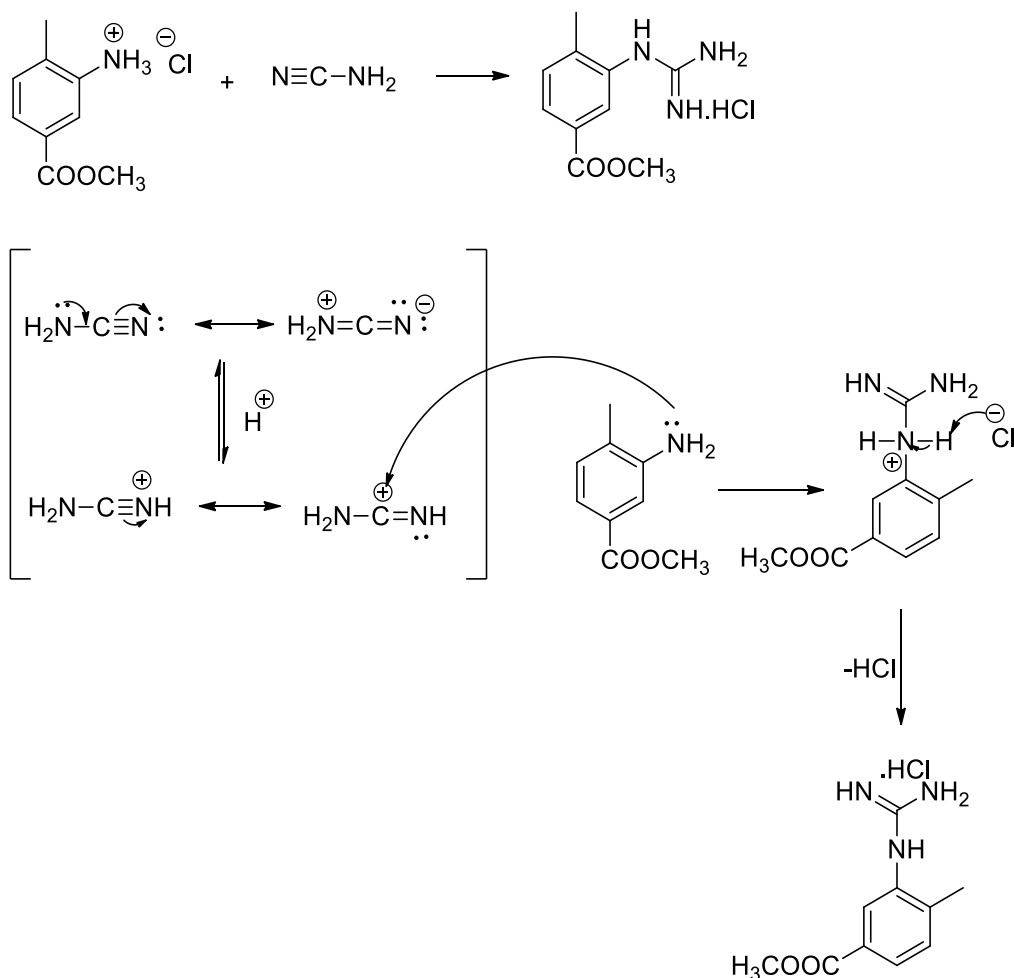
Σχήμα 19: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα σε CDCl_3

3.6 Σύνθεση φαινυλαμινοπυριμιδίνης

Η σύνθεση της φαινυλαμινοπυριμιδίνης αποτελεί διαδικασία τριών σταδίων, όπου το πρώτο στάδιο είναι η σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ακολουθούμενη από την σύνθεση της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης και, στο τέλος, την αντίδραση κυκλοποίησης μετά από αντίδραση της φαινυλογουανιδίνης με την εναμινόνη.

3.6.1 Αντιδράσεις και μηχανισμοί κατά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης

Για την επίτευξη της σύνθεσης του κυκλοποιημένου προϊόντος ήταν απαραίτητη η σύνθεση των υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών. Κατά την συγκεκριμένη αντίδραση το υποκατεστημένο άλας της ανιλίνης αντιδρά με το κυαναμίδιο, το οποίο έχει διττό ρόλο, λειτουργεί ως αντιδραστήριο και ως διαλύτης στη θερμοκρασία της αντίδρασης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 65 °C, όπου τήκεται το κυαναμίδιο και η απόδοση της ανέρχεται στο 90 %. Παρακάτω παρατίθεται η αντίδραση και ο μηχανισμός της.

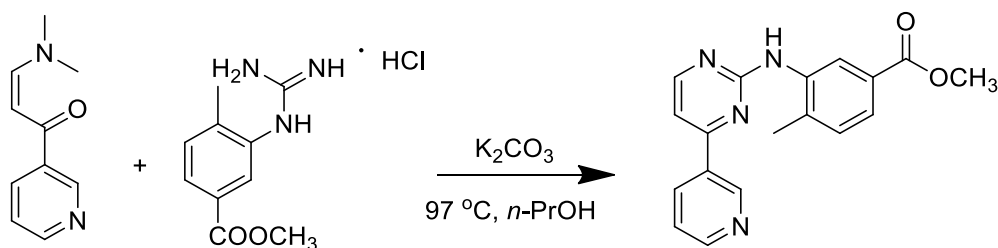


Σχήμα 20: Αντίδραση και μηχανισμός του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης με κυαναμίδιο και με το υδροχλωρικό άλας της υποκατεστημένης ανιλίνης.

3.7 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος

3.7.1 Αντίδραση και μηχανισμός σχηματισμού του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος

Το επόμενο στάδιο στη συνθετική πορεία είναι η κυκλοποίηση της εναμιμόνης για τη σύνθεση των υποκατεστημένων φαινυλαμινοπυριμιδινών, το βασικό βήμα, ήτοι το στάδιο κλειδί για τη σύνθεση των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών, καθώς σχηματίζεται το δομικό συστατικό των αναστολέων, αναλόγων του Imatinib, που είναι ο πυριμιδινικός δακτύλιος. Είναι, εκτός των άλλων, ο δακτύλιος που διεκδικεί τη θέση πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, λειτουργώντας ανταγωνιστικά, καθώς δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης του ATP με συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων.

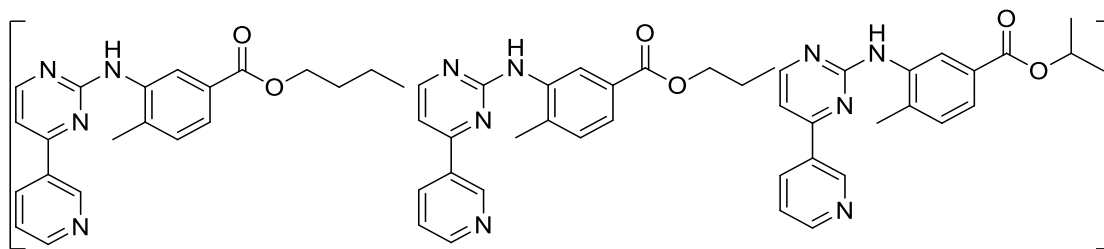


Σχήμα 21: Αντίδραση σχηματισμού του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος.

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

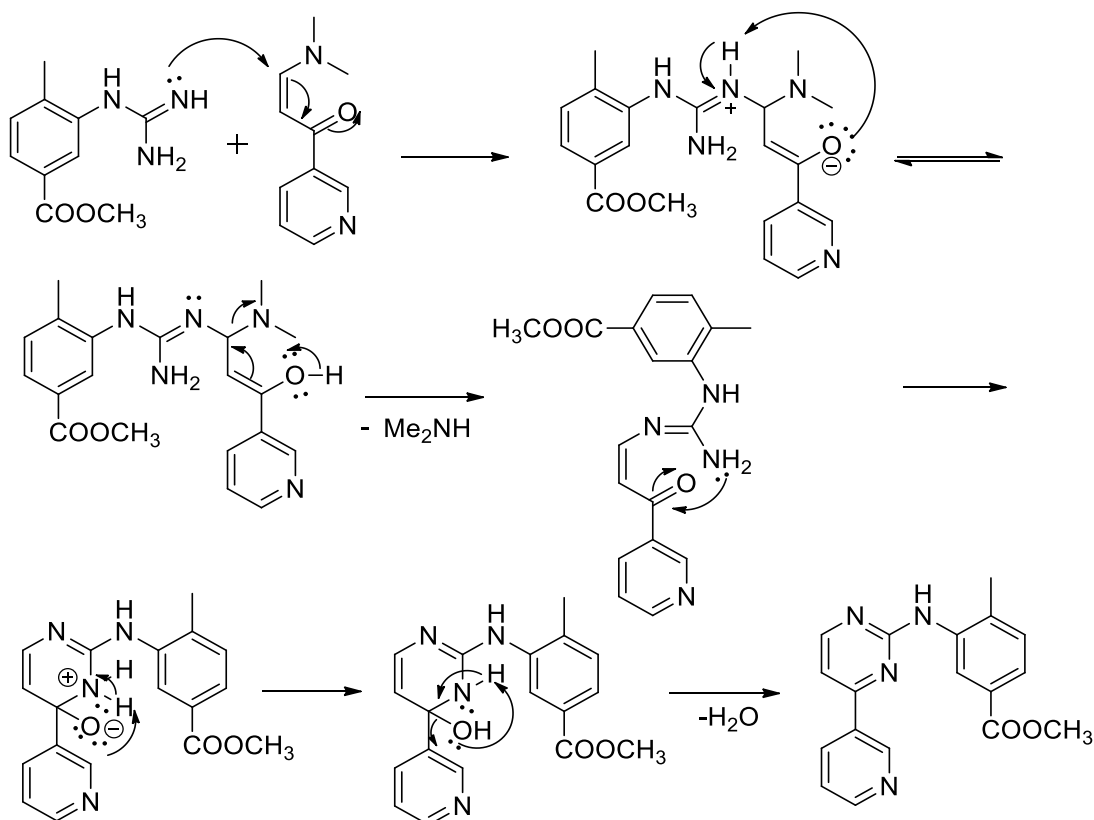
Αρχικά, το ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3) δεσμεύει το υδροχλώριο και επιτρέπει στη γουανιδίνη με πυρηνόφιλη προσθήκη να προσβάλλει το α,β -ακόρεστο τμήμα της β -εναμιμόνης στον β -άνθρακα ως προς τον καρβονυλικό άνθρακα της β -εναμιμόνης. Σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο μέσω μιας Michael προσθήκης που, στη συνέχεια, με απόσπαση ενός μορίου διμεθυλαμίνης (ως καλής αποχωρούσας ομάδας) ακολουθεί μια δεύτερη πυρηνόφιλη προσβολή μιας αμινομάδας της γουανιδίνης στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου, και σχηματίζεται ο δακτύλιος. Ακολούθως, με απώλεια ενός μορίου νερού, προκύπτει το τελικό προϊόν, ένας σταθερός ετεροαρωματικός δακτύλιος, ο πυριμιδινικός.

Να σημειωθεί, ότι η αντίδραση κυκλοποίησης της εναμιμόνης πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη *n*-βουτανόλη και 2-προπανόλη, όμως παρατηρήθηκε μικρότερη απόδοση της τάξεως του 20%. Μάλιστα, παρατηρήθηκε και στις δυο περιπτώσεις ο σχηματισμός προϊόντων μετεστεροποίησης με τους αντίστοιχους διαλύτες-αλκοόλες, καθώς με την παρατεταμένη θέρμανση με πυρηνόφιλη προσβολή από τη 1-βουτανόλη, την 1-προπανόλη και την 2-προπανόλη, αντίστοιχα, προέκυψαν τα αντίστοιχα προϊόντα μετεστεροποίησης. Για το συγκεκριμένο λόγο επιλέχθηκε ως βέλτιστος διαλύτης της αντίδρασης με τα λιγότερα παραπροϊόντα μετεστεροποίησης η 1-προπανόλη.



Σχήμα 22: Απομονωθέντα παραπροϊόντα μετεστεροποίησης του μεθυλεστέρα βενζοϊκού οξέος με τους διαλύτες/αλκοόλες (1-βουτανόλη, 1-προπανόλη και 2-προπανόλη)

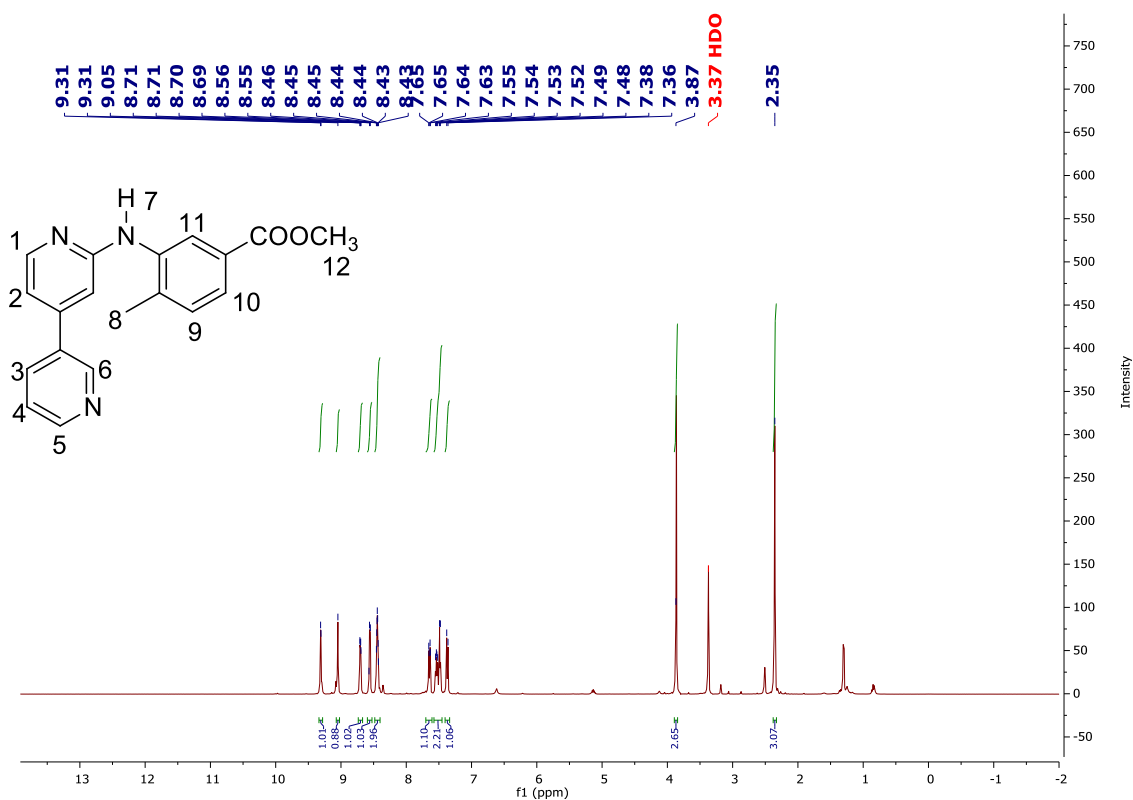
Μηχανισμός σύνδεσης 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος



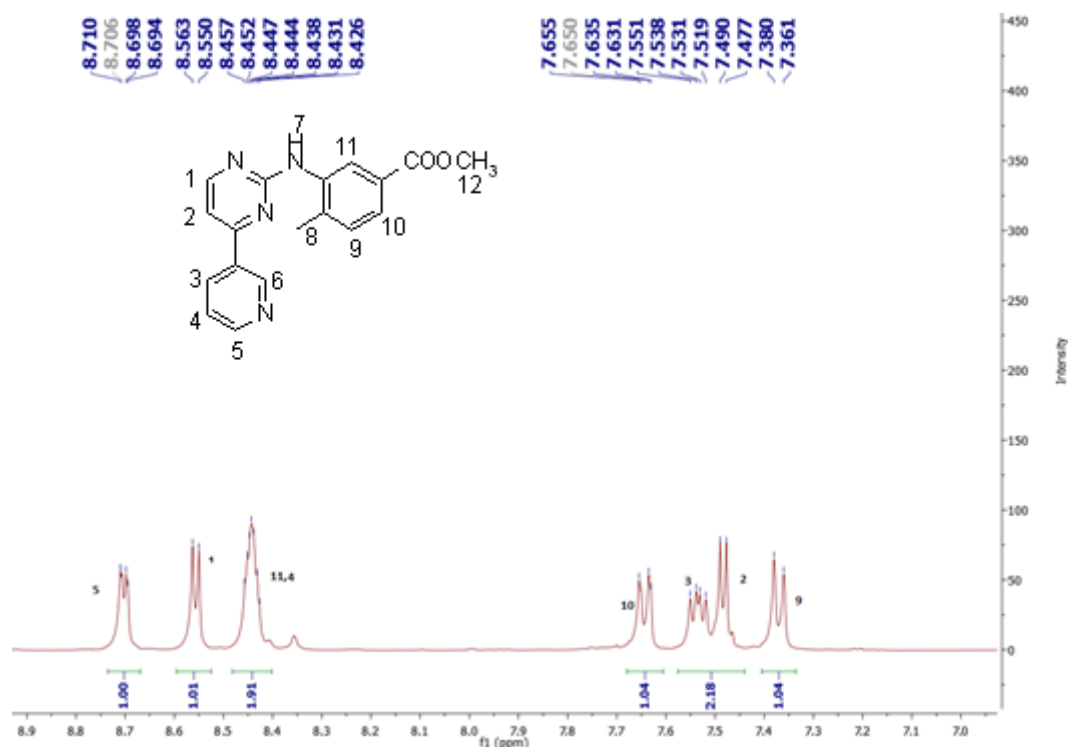
Σχήμα 23α: Μηχανισμός σύνδεσης του κυκλοποιημένου προϊόντος.

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

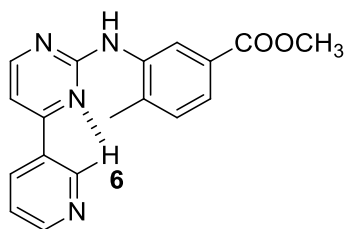
Από το φάσμα ^1H NMR μπορούμε να αποφανθούμε για το σχηματισμό του πυριμιδικού δακτυλίου, καθώς παρατηρούνται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές. Καταρχάς, να αναφερθεί πως σε ετεροαρωματικούς δακτυλίους η 3J μειώνεται σε σχέση με τους απλούς αρωματικούς δακτυλίους. Συγκεκριμένα τα πρωτόνια 1 και 2 του πυριμιδικού δακτυλίου συτονίζονται στα 8.56 και 7.49 ppm, αντίστοιχα, ως διπλή κορυφή και σχετίζονται μεταξύ τους με μία χαρακτηριστική σταθερά σύζευξης $^3J=5.2\text{Hz}$. Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο εκ των δύο, είναι το πρωτόνιο 1, καθώς βρίσκεται σε α-θέση ως προς το ηλεκτραρνητικό άζωτο. Στα 9.31 ppm συτονίζεται το περισσότερο αποπροστατευμένο εν γένει πρωτόνιο 6, λόγω ενδομοριακού ψευδοδεσμού υδρογόνου, καθώς και της γειτονικής θέσης με το άζωτο.



Σχήμα 23β: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος σε DMSO-d_6

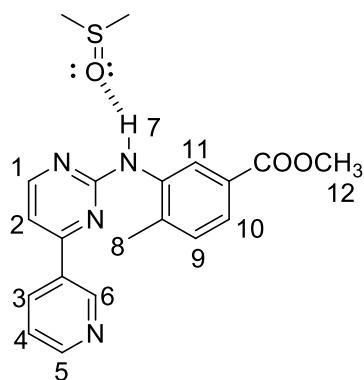


Σχήμα 24: Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος στην αρωματική περιοχή σε DMSO d_6



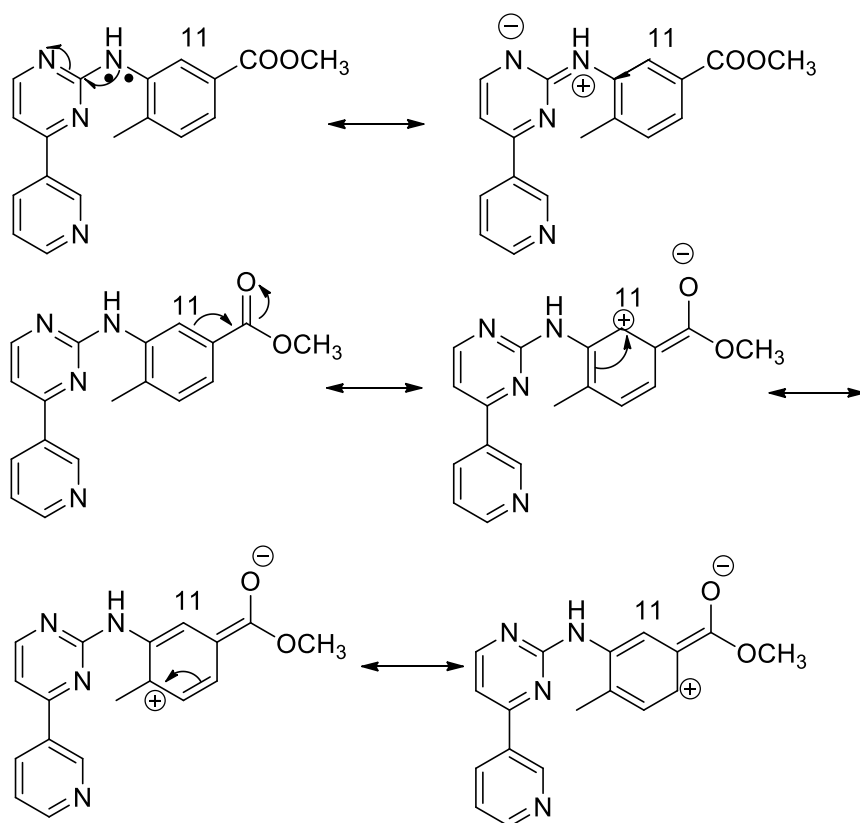
Σχήμα 25: Αποπροστασία του πρωτονίου 6 λόγω ενδομοριακού ψευδο-δεσμού υδρογόνου

Επίσης, είναι γνωστό ότι τα αμινικά πρωτόνια παρουσιάζουν χημικές μετατοπίσεις, οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με το διαλύτη, τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση. Έτσι, το πρωτόνιο της δευτεροταγούς αμίνης υπ' αριθμόν 7, εμφανίζεται στα 9.05 ppm ως μια σχετικά ευρεία απλή κορυφή, καθώς έλκεται ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τα 2 άζωτα της πυριμιδίνης και, επίσης, σχηματίζει διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με το διαλύτη (DMSO) και «απογυμνώνεται» ηλεκτρονικά.



Σχήμα 26: Αποπροστασία του αμινικού πρωτονίου λόγω σχηματισμού διαμοριακού δεσμού υδρογόνου με το διαλύτη

Το πρωτόνιο 5 συντονίζεται στα 8.71 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφής (γεινιάζει με το H₄ σε απόσταση 3 δεσμών και σε απόσταση 4 δεσμών με το H₃) και η σχετική αποπροστασία του δικαιολογείται, καθώς βρίσκεται δίπλα στο άζωτο. Στα 8.44 ppm παρατηρούμε μια αλληλοεπικάλυψη κορυφών (ολοκλήρωση 2H) που αντιστοιχούν στα πρωτόνια 4 και 11, λόγω της μικρής διακριτικότητας του οργάνου. Κανονικά, θα περιμέναμε διπλή της τριπλής για το πρωτόνιο 3, καθώς βλέπει το H₄ με ³J και το H₅ και το H₆ με ⁴J. Στο H₁₁ θα αναμέναμε την καταγραφή μιας σχάσης μακράς απόστασης (⁴J) με το H₁₀ και είναι σχετικά αποπροστατευμένο, γιατί το H₁₁ βρίσκεται ανάμεσα από την αμινομάδα και την καρβονυλομάδα του βενζοϊκού μεθυλεστέρα, αποπροστατεύεται ισχυρώς, καθώς η καρβονυλική ομάδα έλκει ηλεκτρόνια μέσω του συζυγιακού φαινομένου, ενώ το ελεύθερο ζεύγος της αμινομάδας απεντοπίζεται προς την πλευρά του πυριμιδινικού δακτυλίου. Έτσι εκδηλώνεται ισχυρό επαγωγικό φαινόμενο προς τον γειτονικό βενζοϊκό δακτύλιο. Το H₉ σχάζεται σε διπλή κορυφή στα 7.38 ppm ³J= 8 Hz και είναι προστατευμένο, καθώς πλησίον του υφίσταται η μεθυλομάδα που του προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω επαγωγικού φαινομένου. Τέλος, τα πρωτόνια 12 και 8 απορροφούν ως απλές κορυφές στα 3.87 και 2.55 ppm, αντίστοιχα, με ολοκλήρωση 3H η καθεμία.



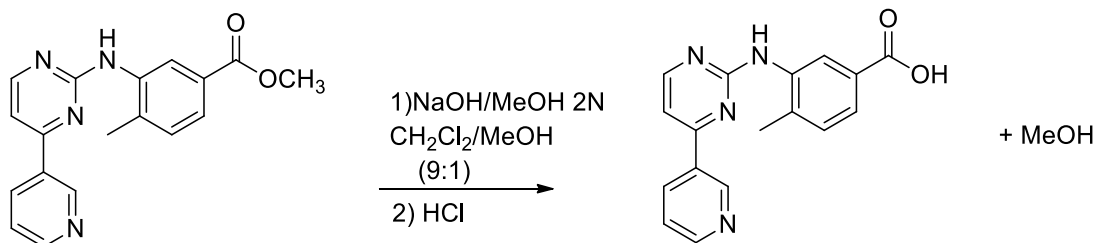
Σχήμα 27: Αποπροστασία του πρωτονίου 11 λόγω εκδήλωσης αρνητικού συζυγιακού φαινομένου από την καρβονυλομάδα και απεντοπισμός του ηλεκτρονιακού νέφους της αμινομάδας προς τον πυριμιδινικό δακτύλιο.

3.8 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος

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

Επόμενο στάδιο στη συνθετική πορεία είναι η βασική υδρόλυση του κυκλοποιημένου προϊόντος (σαπωνοποίηση). Σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο στο ερευνητικό μας εργαστήριο,^[192γ] η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μη υδατικό περιβάλλον, συγκεκριμένα σε μεθανολικό διάλυμα καυστικού καλίου (2N) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Χρησιμοποιούμε ήπιες βασικές συνθήκες, καθώς τυχόν αποπρωτονίωση του αμινικού πρωτονίου είναι μη επιθυμητή και θα οδηγούσε σε πλήθος παραπροϊόντων. Μετά το πέρας ενός εικοσιτετραώρου θερμαίνουμε ήπια στο σημείο ζέσεως του διαλύτη (40 °C) για να ολοκληρωθεί η αντίδραση ποσοτικά προς την κατεύθυνση σχηματισμού του προϊόντος υδρόλυσης. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται, προστίθεται περίσσεια ύδατος γίνεται διήθηση του προϊόντος

(άλατος) με νερό και ακολουθεί οξύνιση με 1.2 N HCl, καθώς το προϊόν βρίσκεται υπό τη μορφή μετά νατρίου άλατος, ενώ απαιτείται για τις επόμενες αντιδράσεις η παραλαβή του ως οξέος. Ακολουθεί, διήθηση και ξήρανση του προϊόντος υπεράνω P₂O₅.

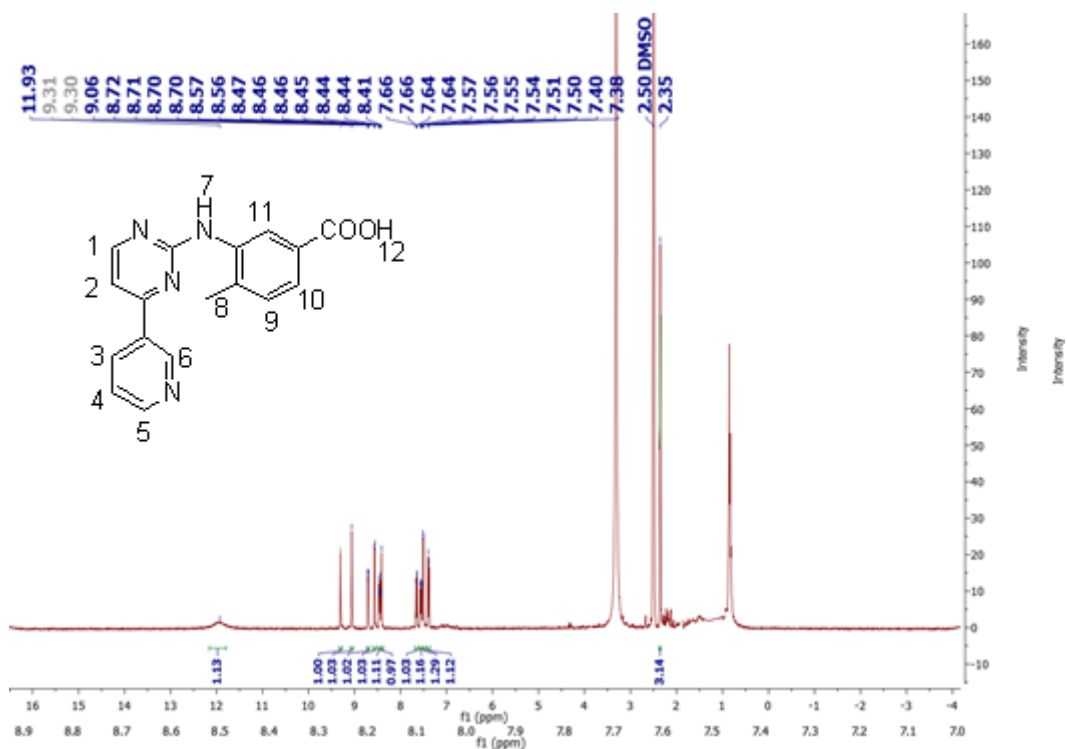


Σχήμα 28: Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του προϊόντος κυκλοποίησης

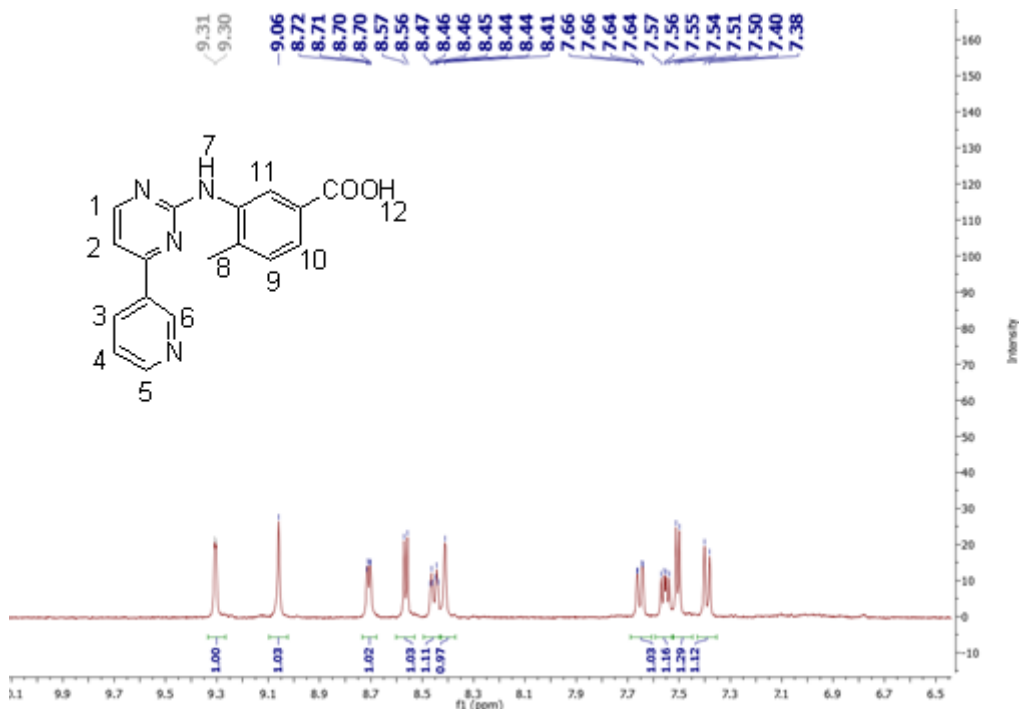
3.8.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος

Παρατηρώντας το φάσμα ¹H NMR (σχήμα 29) του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος διαπιστώνουμε πως οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των τριών αρωματικών δακτυλίων συνεχίζουν να συντονίζονται-καταγράφονται, ως αναμένεται, σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας τις σχέσεις τους, σε ισοδυναμία με τα πρωτόνια του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος. Καταγράφεται βέβαια η ευρεία χαρακτηριστική κορυφή στο φάσμα που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του οξέος, σε χαμηλά πεδία, περίπου στα 12 ppm.

Στο φάσμα ¹H NMR του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος σε DMSO για τις κορυφές και τις πολλαπλότητες δεν θα γίνει εκτενής αναφορά, καθώς ό,τι αναλύθηκε για τα φάσματα των προϊόντων κυκλοποίησης ισχύει και εδώ. Θα γίνει αναφορά στην ευρεία κορυφή του πρωτονίου H-12 του βενζοϊκού οξέος περίπου στα 12 ppm που είναι ισχυρά αποπροστατευμένο. Όπως φαίνεται στο φάσμα η απλή κορυφή που αντιστοιχούσε στα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας στα 3.87 ppm έχει εξαφανιστεί, στοιχείο που αποδεικνύει την πλήρη υδρόλυση του εστέρα.



Σχήμα 29: Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) του 4-μεθυλο-3-((4- (πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέος σε DMSO- d_6

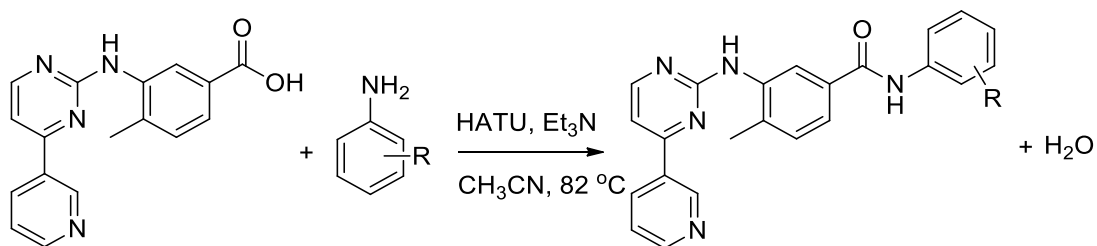


Σχήμα 30: Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της αρωματικής περιοχής του 4-μεθυλο-3-((4- (πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέος σε DMSO- d_6

3.9 Σύνθεση τελικών προϊόντων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό, αναλόγων του Nilotinib

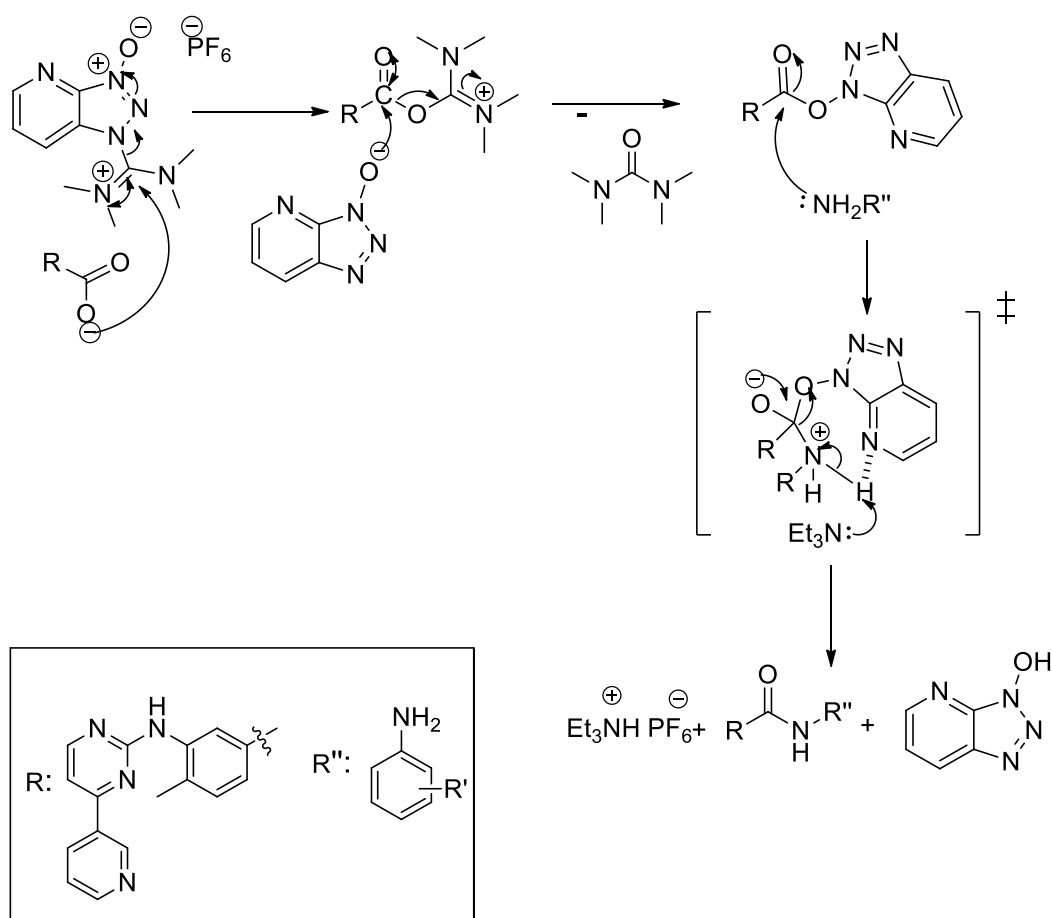
3.9.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης τελικών προϊόντων

Για την επιθυμητή σύνθεση των προϊόντων με έναν αμιδικό δεσμό, ακολουθεί σύζευξη μεταξύ των υποκατεστημένων ανιλινών και του κυκλοποιηθέντος οξέος (4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος). Η αντίδραση σύζευξης, είναι περίπτωση πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης μεταξύ των υποκατεστημένων ανιλινών και του οξέος, παρουσία βάσεως για την απόσπαση του πρωτονίου του οξέος. Συγκεκριμένα, η Et₃N αποσπά το όξινο πρωτόνιο του οξέος μετατρέποντας το στο αντίστοιχο καρβοξυλικό ανιόν, που, δρώντας ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον άνθρακα διπλού δεσμού και ταυτόχρονα αποβάλλεται ένα μόριο τριαζολο-πυριδιν-3-ολικού ανιόντος (OAt) σχηματίζοντας ένα ασταθές O-ακυλ(τετραμεθυλο)ισουουρονικό άλας. Εν συνεχεία, το ανιόν Oat προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του ισουουρονικού άλατος σχηματίζοντας τον OAt ενεργοποιημένο εστέρα με την αποβολή στοιχειομετρικής ποσότητας τετραμεθυλο-ουρίας. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με την πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας της υποκατεστημένης ανιλίνης στο καρβονυλικό άνθρακα του ενεργοποιημένου εστέρα με το σχηματισμό ενός νέου ενδιαμέσου με το θετικό φορτίο να εντοπίζεται στο άτομο του αζώτου της υποκατεστημένης ανιλίνης και το αρνητικό φορτίο στο άτομο του οξυγόνου του ενεργοποιημένου εστέρα. Το εν λόγω ενδιάμεσο σταθεροποιείται μέσω αλληλεπίδρασης του ατόμου αζώτου της πυριδίνης με το πρωτόνιο της ανιλίνης μέσω σχηματισμού δεσμού υδρογόνου και μιας επταμελούς κυκλικής μεταβατικής κατάστασης. Η Et₃N αποσπά το πρωτόνιο της υποκατεστημένης ανιλίνης και το αρνητικό φορτίο του οξυγόνου επιστρέφεται στον καρβονυλικό άνθρακα με την ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου (τριαζολο)πυριδιν-3-όλης (σχήμα 32). Η αντίδραση διενεργήθηκε σε απόλυτο CH₃CN, με χρήση HATU και Et₃N για την ενεργοποίηση του οξέος και σχηματισμό ενεργοποιημένου εστέρα με προσθήκη των διαφόρων υποκατεστημένων ανιλινών σε αναλογία (1:1.2:1.1:2) (οξέος/ανιλίνης/HATU/Et₃N), αντίστοιχα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, πως στο τελικό στάδιο σύνθεσης των εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό αποτελεί αποτέλεσμα πολλών ερευνητικών προσπαθειών, καθώς διενεργήθηκαν πολλά πειράματα με διάφορους διαλύτες και πολλά συμπλεκτικά αντιδραστήρια, δεδομένου ότι ήταν δύσκολος ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού με τη χρήση απενεργοποιημένων ανιλινών. Ωστόσο, η εν λόγω πειραματική πορεία με τη χρήση HATU και CH₃CN αποτέλεσε το βέλτιστο συνδυασμό συνθηκών, καθώς επιτεύχθη ο σχηματισμός των επιθυμητών προϊόντων αμιδικού δεσμού, δεν παρατηρήθηκαν παραπροϊόντα και η απόδοση της αντίδρασης αυξήθηκε εντυπωσιακά.



Σχήμα 31: Αντίδραση σύνθεσης τελικών προϊόντων με ένα αμιδικό δεσμό (**1^η κατηγορία**)

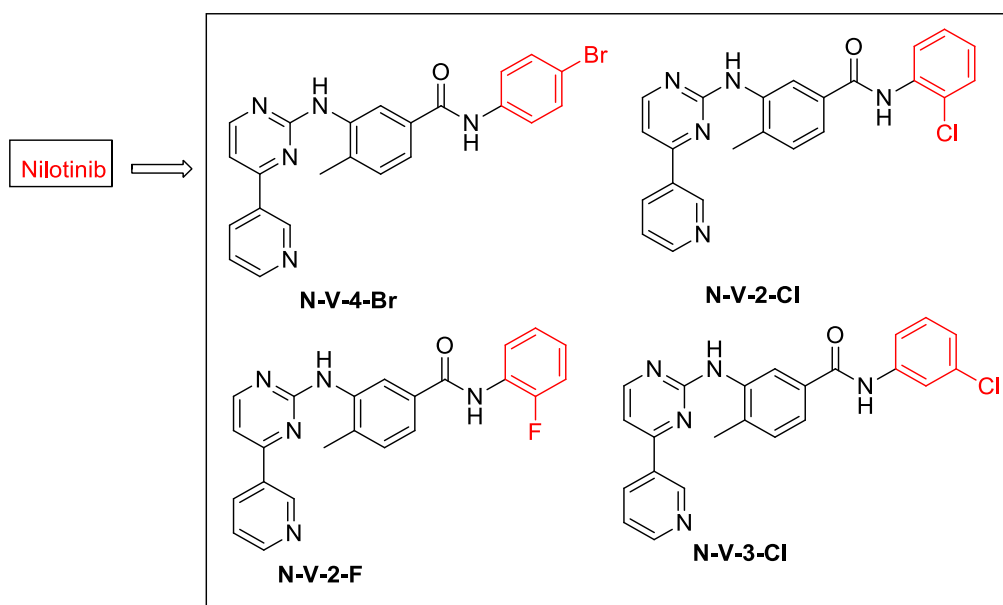
Όπου R = CF₃, Cl, Br, F, NO₂, NH₂

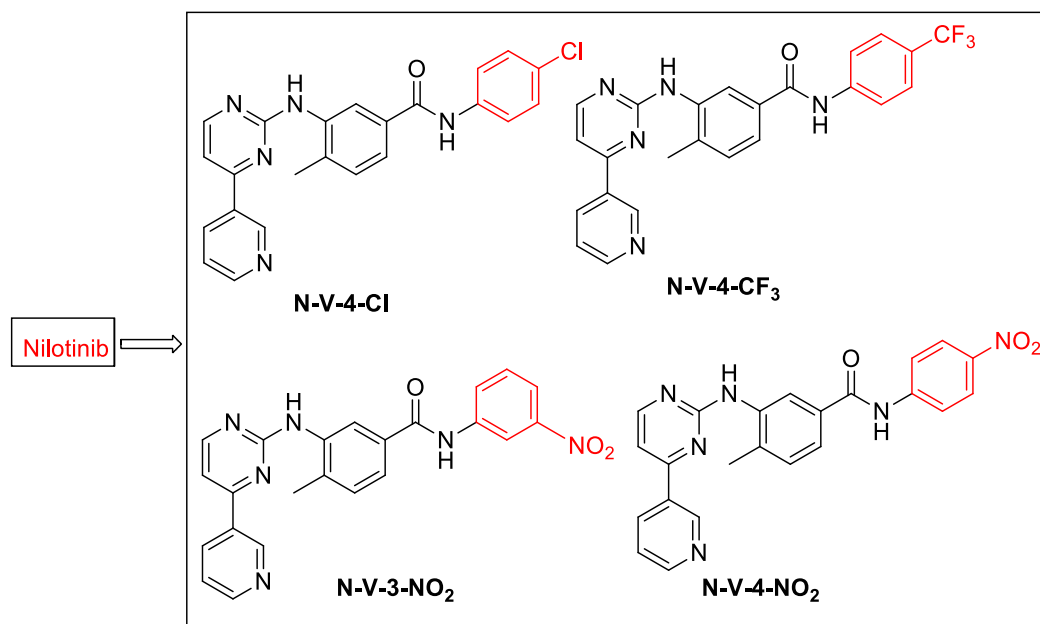


Όπου R' = CF₃, Cl, Br, F, NO₂

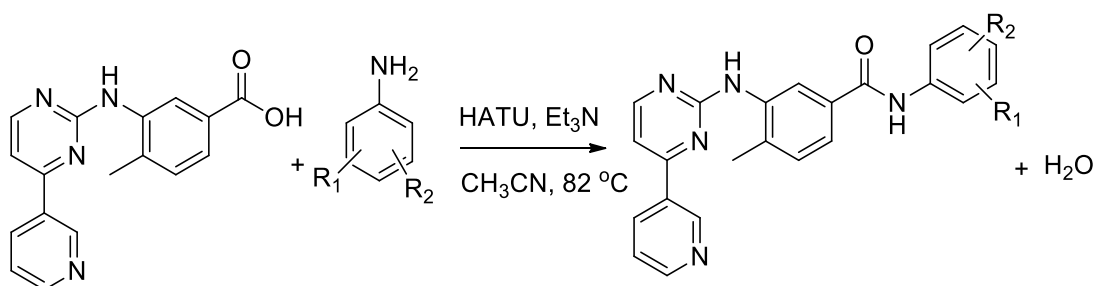
Σχήμα 32: Μηχανισμός σύνθεσης τελικών προϊόντων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (**1^η κατηγορία**)

Σύμφωνα με την ως άνω περιγραφόμενη πορεία, συντέθηκαν, απομονώθηκαν σε υψηλή αναλυτική καθαρότητα και ταυτοποιήθηκαν πλήρως με όλες τις σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές 18 νέα τελικά προϊόντα, ανάλογα της Νιλοτινίβης τα οποία απεικονίζονται παρακάτω και ταξινομούνται σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες, με κριτήριο ταξινόμησης τις διενεργούμενες τροποποιήσεις, ως απόρροια προσάρτησης διαφορετικών υποκαταστατών στον τελικό βενζολικό δακτύλιο. Στην 1^η κατηγορία των μονοϋποκατεστημένων αναλόγων ως προς τον τελικό βενζολικό δακτύλιο έχουν εισαχθεί διάφορες ηλεκτραρνητικές ενώσεις και μετακίνηση αυτών σε διάφορες θέσεις του βενζολικού δακτυλίου. Η δεύτερη κατηγορία τελικών προϊόντων, περιλαμβάνει διϋποκατεστημένα ανάλογα της Νιλοτινίβης με ηλεκτραρνητικές ομάδες, συνδυάζοντας ως επί το πλείστον την νιτρο-ομάδα με διάφορους ηλεκτραρνητικούς υποκαταστάτες, ενώ σε 2 ανάλογα της συγκεκριμένης κατηγορίας έγινε προσάρτηση στον τελικό βενζολικό δακτύλιο η τριφθορομεθυλο-ομάδα και μια ελεύθερη αμινομάδα. Η τρίτη κατηγορία τελικών ενώσεων χαρακτηρίζεται από την παρουσία 2 αμιδικών δεσμών, ενός ανεστραμμένου (Nilotinib) και ενός μη ανεστραμμένου αμιδικού δεσμού, όπως αποτυπώνεται στη δομή του Imatinib. Οι νέοι εν δυνάμει αναστολείς ελέγχονται ως προς τη βιολογική τους δράση σε μια σειρά πρωτεϊνικών κινασών, ενώ σε μερικά από αυτά, όπως θα αναφερθεί στο παράρτημα βιολογικών αποτελεσμάτων, έχουν διεξαχθεί βιολογικά πειράματα ελέγχου ως προς την εκλεκτικότητα και δραστικότητα των νέων αναλόγων σε ανθρώπινο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, υπό παρουσία τριών αγωνιστών συσσώρευσης, του αραχιδονικού οξέος (AA), της ADP και της TRAP-6.



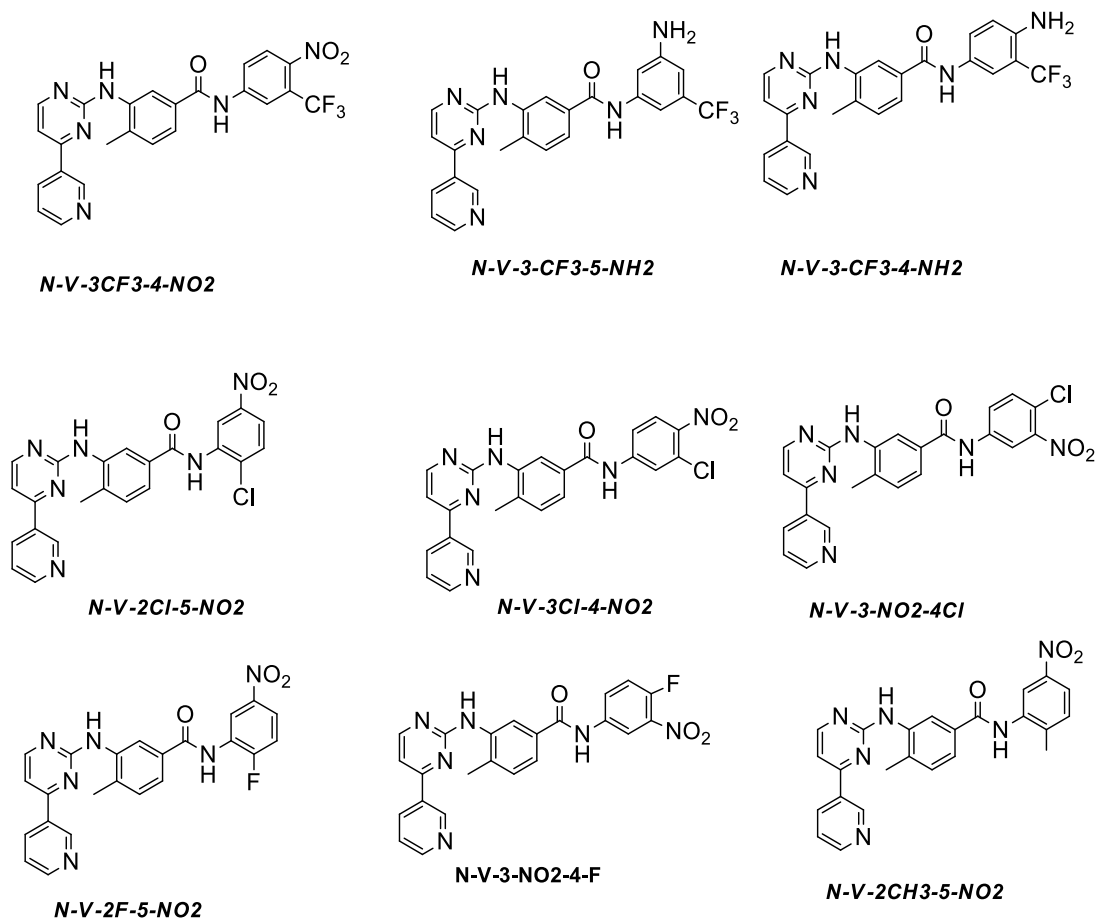


Σχήμα 33: Τελικά προϊόντα εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (**1^η κατηγορία**). Στην εν λόγω κατηγορία είναι προσαρτημένες σε κάθε περίπτωση μια ηλεκτραρνητική ομάδα ή άτομο σε διάφορες θέσεις του τελικού βενζολικού δακτυλίου.

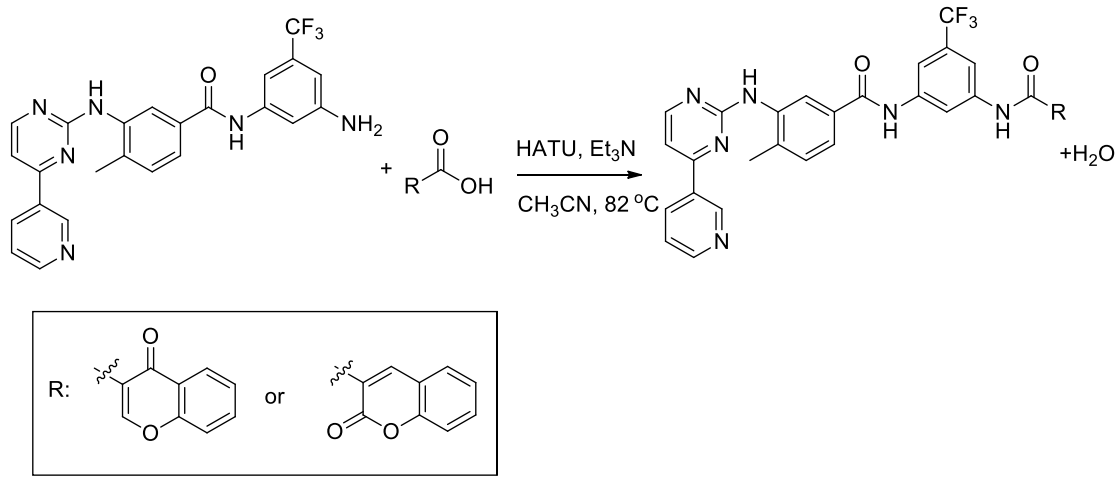


Όπου R₁ = Cl, F, CF₃, CH₃, και R₂ = NO₂, NH₂

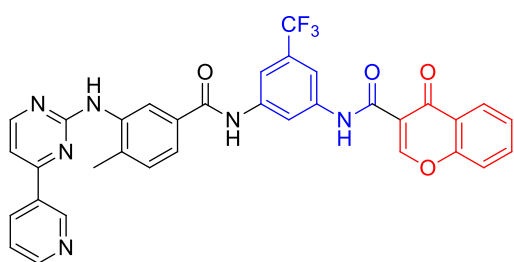
Σχήμα 34: Αντίδραση σύνθεσης τελικών προϊόντων, εν δυνάμει αναστολέων (**2^{ης} κατηγορίας**)



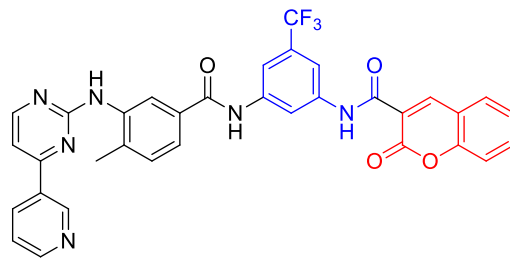
Σχήμα 35: Τελικά προϊόντα εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (**2^η κατηγορία**).



Σχήμα 36: Αντίδραση σύνθεσης τελικών προϊόντων με δύο αμιδικούς δεσμούς (**3^η κατηγορία**)



N-V-3-CF₃-5-NH chr



N-V-3-CF₃-5-NH-Coum

Σχήμα 37: Τελικά προϊόντα εν δυνάμει αναστολέων με δύο αμιδικούς δεσμούς (3^η κατηγορία).

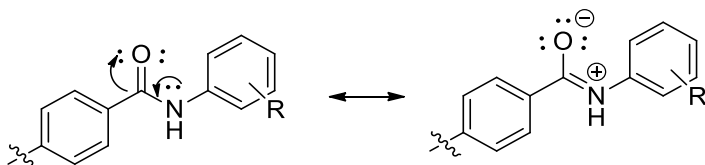
Όλα τα νέα ανάλογα του Nilotinib, εν δυνάμει αναστολείς, έχουν απομονωθεί σε υψηλή αναλυτική καθαρότητα άνω του 99%, έχουν ταυτοποιηθεί με όλες τις σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές, ενώ η βιολογική τους δράση μερικών εξ' αυτών, έναντι μιας σειράς πρωτεϊνικών κινάσεων έχει διεξαχθεί από τη φαρμακευτική εταιρεία Novartis (Βασιλεία, Ελβετία) και στο τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η βιολογική δράση των τελικών ενώσεων ως αντιθρομβωτικών έχει διερευνηθεί και βρίσκεται εν εξελίξει στο Τμήμα Χημείας (τομέας Βιοχημείας) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπο την επίβλεψη του Καθηγητού κ. Αλέξανδρου Τσελέπη.

3.9.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα των τελικών ενώσεων/αναλόγων του Nilotinib

Όλοι οι εν δυνάμει αναστολείς, τελικές ενώσεις της πρώτης, δεύτερης και τρίτης κατηγορίας, ταυτοποιήθηκαν με όλες τις σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές και στο παράρτημα διατριβής της παρατίθενται όλα τα φασματοσκοπικά δεδομένα αυτών. Δεδομένου ότι ο όγκος των τελικών ενώσεων είναι μεγάλος και οι εν λόγω ενώσεις παρουσιάζουν μεταξύ τους επαναληψιμότητα στις χημικές μετατοπίσεις και πολλαπλότητες των πρωτονίων των τριών πρώτων αρωματικών δακτυλίων, θα γίνει φασματοσκοπική ανάλυση μερικών από τα συνολικά 18 τελικά προϊόντα. Ακολούθως, παρατίθεται η φασματοσκοπική ανάλυση αντιπροσωπευτικών παραδειγμάτων τριών τελικών προϊόντων (*N-V-4-Cl*, *N-V-2-F* και *N-V-3-NO₂-4-Cl*).

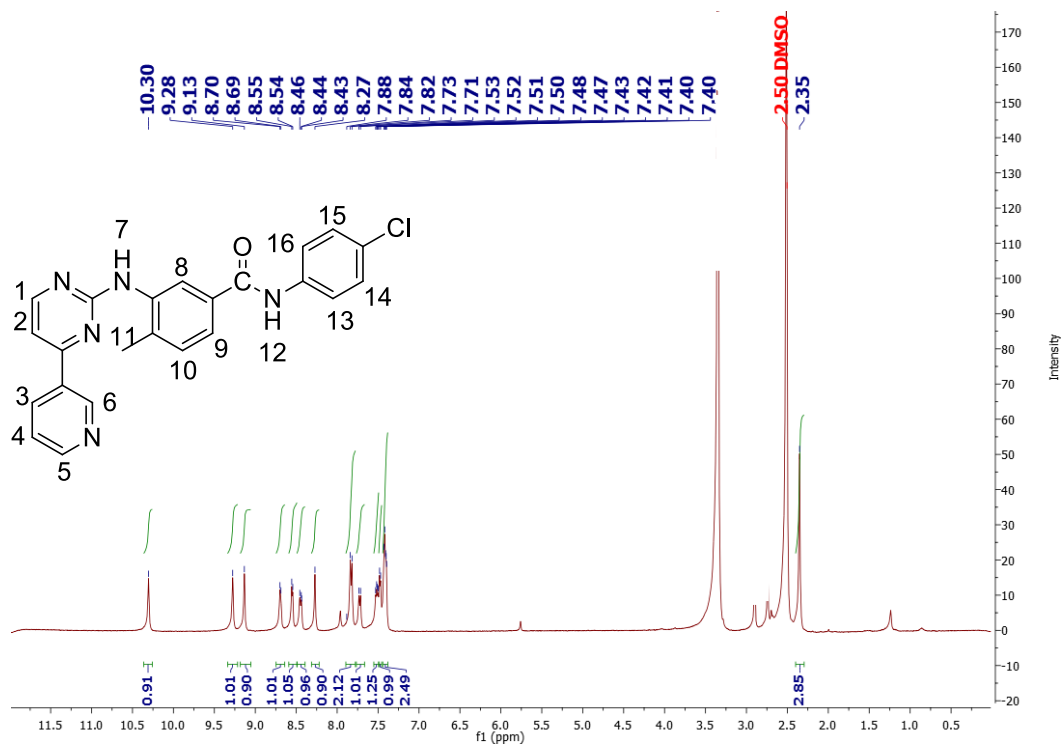
Το κύριο χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν τα τελικά προϊόντα είναι ο αμιδικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ του καρβονυλίου του ενεργοποιημένου εστέρα και της αμινομάδας της πρωτοταγούς υποκατεστημένης ανιλίνης. Όπως είναι γνωστό, τα αμιδικά πρωτόνια, εμφανίζονται σε χαμηλά πεδία (10 ppm και άνω), καθώς το ηλεκτρονικό νέφος γύρω από το πρωτόνιο μειώνεται εξαιτίας της εκδήλωσης του συζυγιακού φαινομένου, προς την πλευρά της

καρβονυλομάδας του αμιδίου, όπως φαίνεται και στην παρακάτω δομή συντονισμού (σχήμα 38). Σε όλες τις περιπτώσεις των τελικών προϊόντων, γεγονός που αποτυπώνεται σε όλα τα φάσματα, ο συντονισμός του αμιδικού πρωτονίου καταγράφεται σε ασθενέστερο πεδίο, σε σχέση με τις αντίστοιχες ενώσεις που φέρουν στον τελικό βενζολικό δακτύλιο την αμινομάδα.

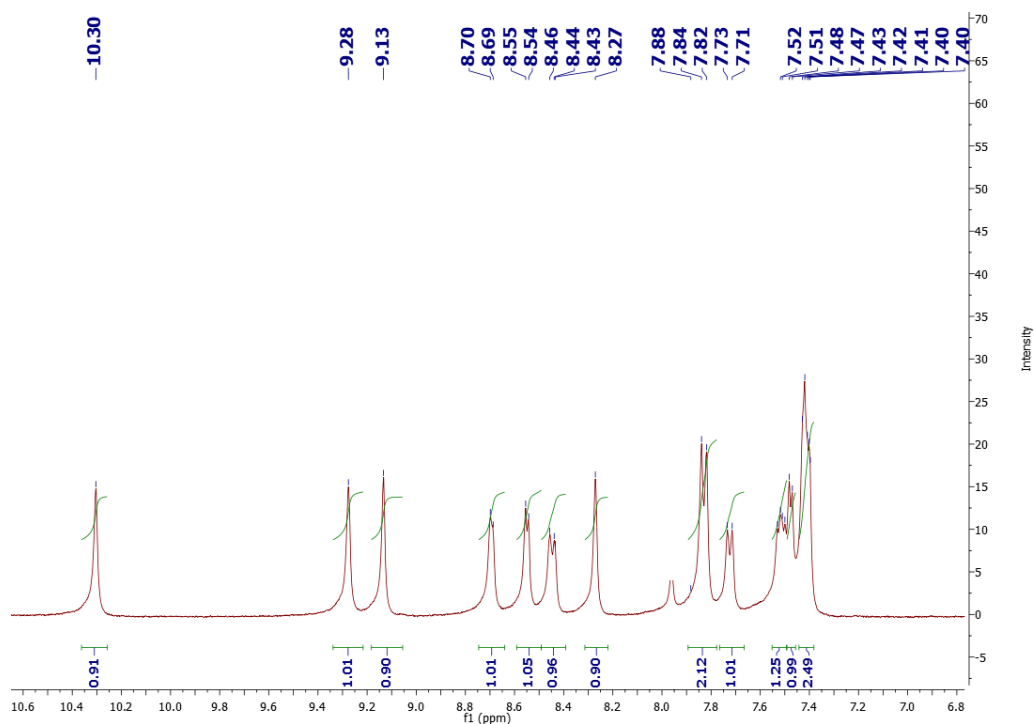


Σχήμα 38: Αποπροστασία αμιδικού πρωτονίου

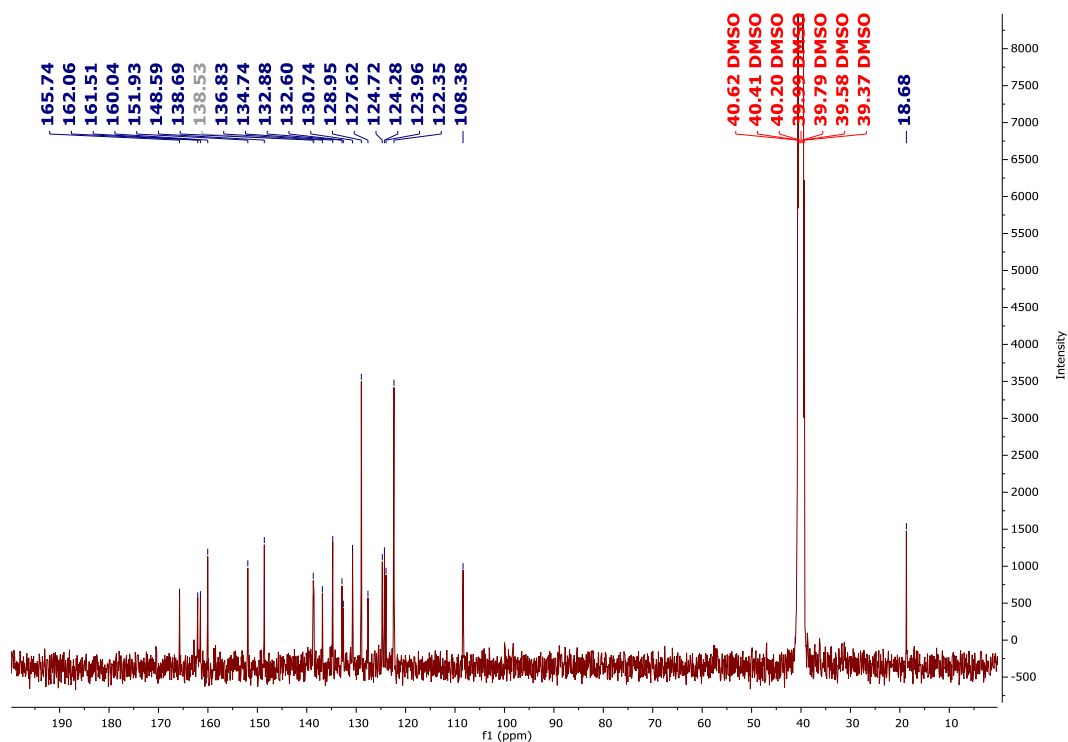
Ενδεικτικά θα γίνει φασματοσκοπική ανάλυση της τελικής ένωσης *N-V-4-Cl*, της *N-V-2-F* και της *N-V-3-NO₂-4-Cl*, καθώς παρατηρείται μια επαναληψιμότητα στα φασματοσκοπικά δεδομένα και στις υπόλοιπες ενώσεις της πρώτης κατηγορίας. Αναλύοντας το φάσμα ¹H-NMR (σχήμα 39) της ένωσης *N-V-4-Cl*, καταγράφονται οι εξής χαρακτηριστικές απορροφήσεις. Η πρώτη χαρακτηριστική κορυφή ασθενούς πεδίου αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού H-12, 10.30 ppm (s, 1H), καθώς το ηλεκτρονικό νέφος γύρω από το πρωτόνιο μειώνεται εξαιτίας της εκδήλωσης του συζυγιακού φαινομένου, όπως αποτυπώνεται στο σχήμα 38. Ακολούθως, καταγράφεται η απορρόφηση σε ασθενές πεδίο που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H6 στα 9.28 ppm (s, 1H), λόγω του σχηματισμού ψευδο-δεσμού υδρογόνου με το γειτονικό άζωτο της πυριμιδίνης και έπειτα του πρωτονίου H-7 της δευτεροταγούς αμίνης στα 9.13 ppm (s, 1H). Οι απορροφήσεις-κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των τριών πρώτων αρωματικών δακτυλίων εμφανίζουν την ίδια επαναληψιμότητα, ως αναμένεται, σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας τις σχέσεις τους σε όλες τις τελικές ενώσεις. Η χαρακτηριστική διπλή κορυφή στα 7.84 ppm (d, 2H) με ολοκλήρωση 2 πρωτόνια αντιστοιχεί στα ισοδύναμα πρωτόνια H-14 και H-15 του νέου αρωματικού δακτυλίου σε όρθο θέση ως προς το Cl, που μέσω επαγωγικού φαινομένου αφαιρεί ηλεκτρονική πυκνότητα από το δακτύλιο και απογυμνώνει ηλεκτρονικά τα συγκεκριμένα πρωτόνια. Σε αντίθεση με τα πρωτόνια που γειτνιάζουν με το Cl σε όρθο θέση, τα ισοδύναμα H-13 και H-16 σχάζονται σε διπλή κορυφή και συντονίζονται στα 7.4 ppm (d, 2H) καθώς ευρισκόμενα σε όρθο θέση ως προς το άζωτο του αμιδικού δεσμού προστατεύονται λόγω εκδήλωσης θετικού συζυγιακού φαινομένου της αμινομάδας. Τέλος, η μεθυλομάδα του τρίτου αρωματικού δακτυλίου απορροφά στα 2.35 ppm δίνοντας μια απλή κορυφή (s, 3H).



Σχήμα 39: Φάσμα ^1H NMR (400MHz) του *N*-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου *N*-V-4-Cl σε DMSO-*d*-6

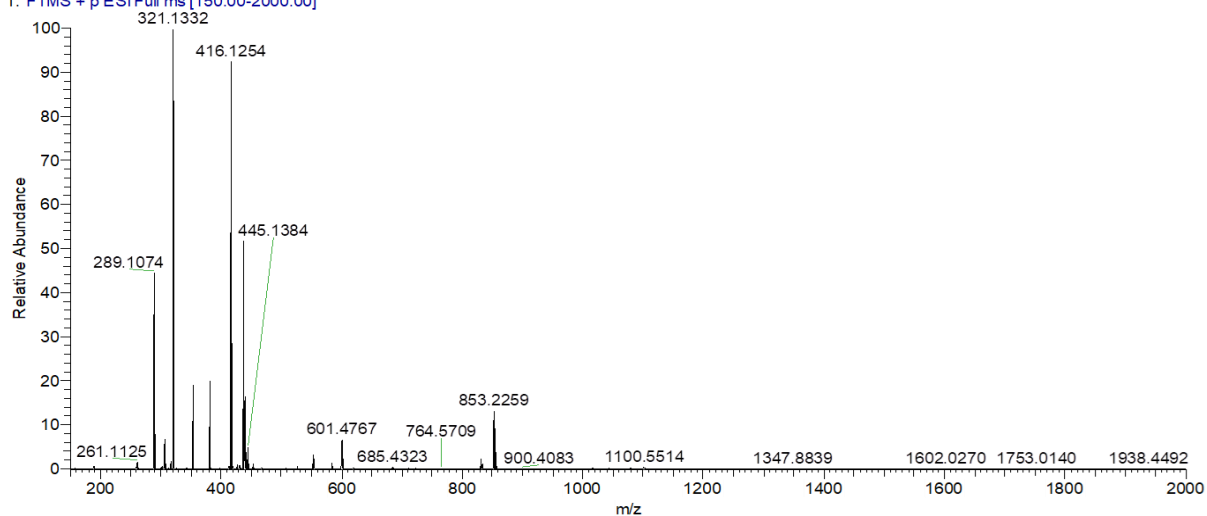


Σχήμα 40: Φάσμα ^1H NMR (400MHz) της αρωματικής περιοχής του *N*-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου *N*-V-4-Cl σε DMSO-*d*-6



Σχήμα 41: Φάσμα ^{13}C NMR (400MHz) του *N*-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου σε DMSO- d_6

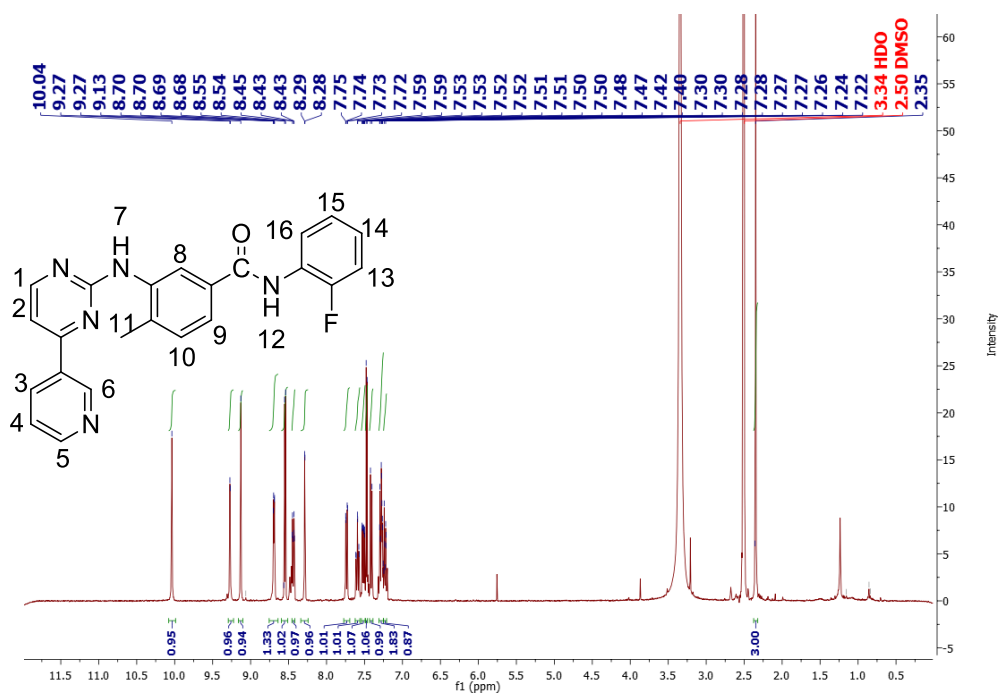
VN4CL_19120403 #4 RT: 0.06 AV: 1 NL: 1.35E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



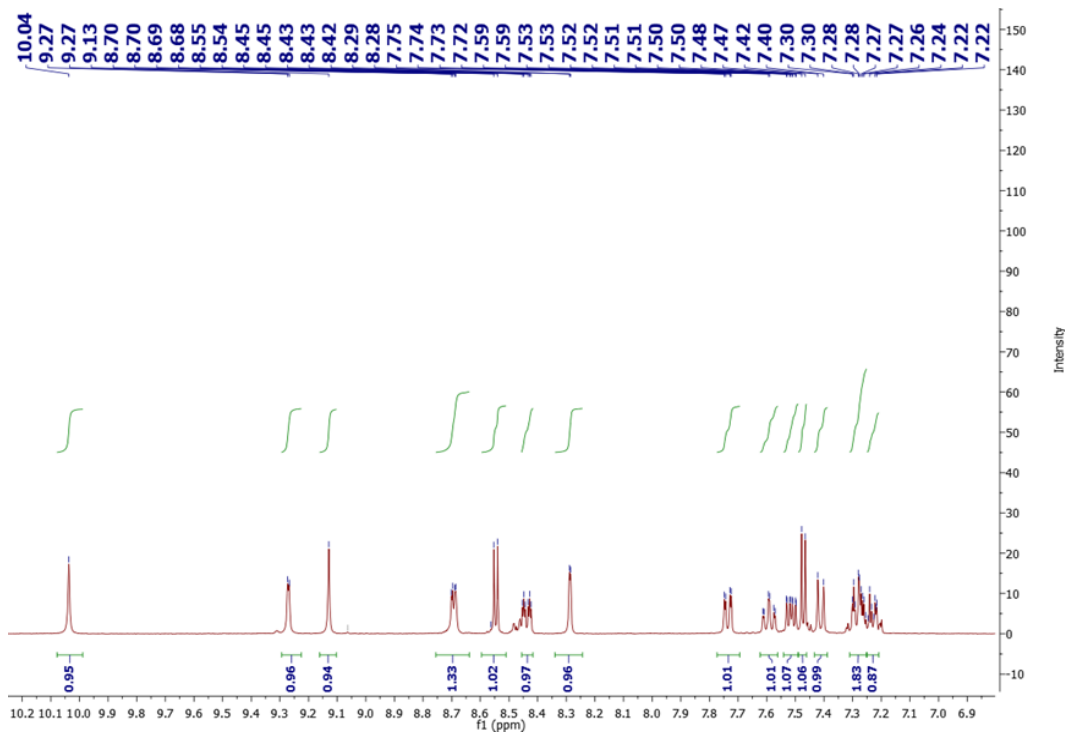
Σχήμα 42: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) της ένωσης με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) *N*-V-4-Cl

Όπως αποτυπώνεται στο παραπάνω φάσμα μάζας της ένωσης *N*-V-4-Cl καταγράφεται το μοριακό ιόν $\text{M}+\text{H}^+$: 416.1254 που συνάδει με τη θεωρητική τιμή του μοριακού ιόντος $\text{M}+\text{H}^+$: 416.1254

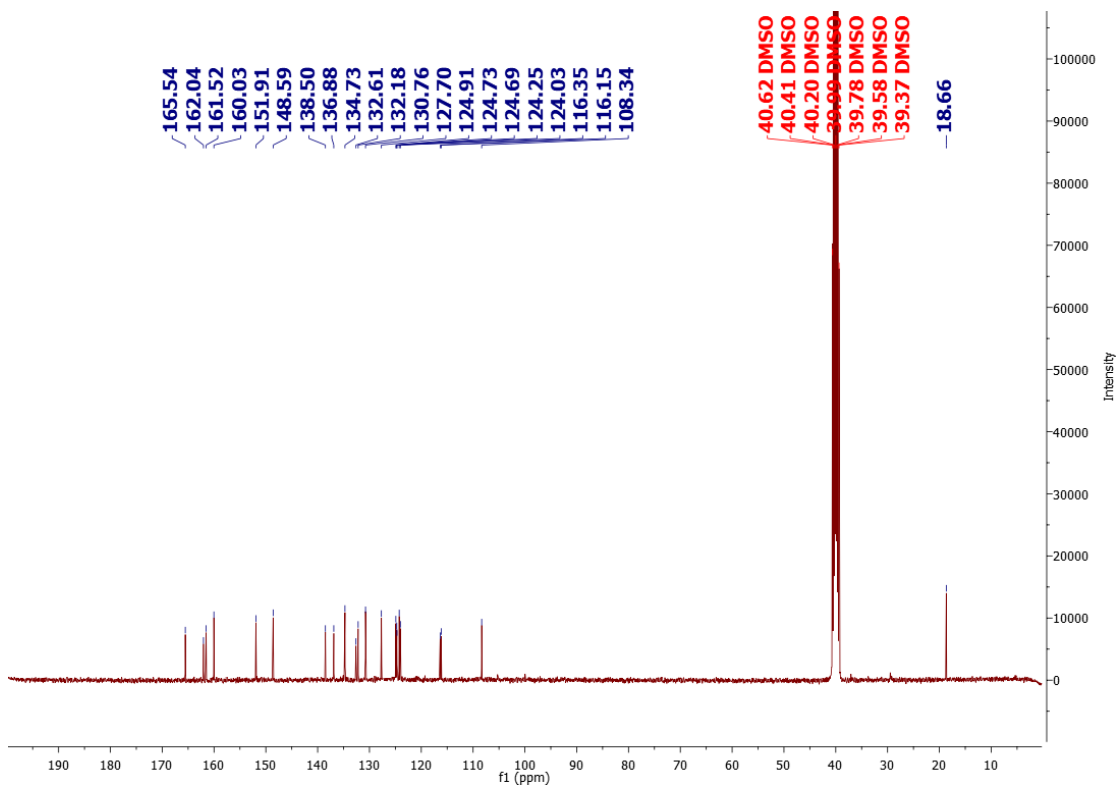
Παρατηρώντας και αναλύοντας το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του τελικού προϊόντος N-V-2-F, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε την εν λόγω ένωση και να αποφανθούμε για τον επιτυχή σχηματισμό της. Συγκεκριμένα, η πρώτη χαρακτηριστική απορρόφηση ασθενούς πεδίου αποδίδεται στο πρωτόνιο H-12 του αμιδικού δεσμού (s, 1H, 10.04 ppm) και οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε στην απογύμνωση του ηλεκτρονιακού νέφους γύρω από το πρωτόνιο H-12 μέσω εκδήλωσης αρνητικού συζυγιακού φαινομένου (σχήμα 43). Για τα πρωτόνια των τριών πρώτων δακτυλιών διατηρούνται, ως αναμένεται, οι πολλαπλότητες τους και οι απορροφήσεις σε παραπλήσιες τιμές ppm. Αξίζει να σημειωθεί πως το πρωτόνιο H-13 απορροφά ως πλέον το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο του τετάρτου βενζολικού δακτυλίου στα 7.61 ppm και σχάζεται σε μια τριπλή της διπλής κορυφής (dt, 1H, 7.61 ppm), καθώς γειτνιάζει σε απόσταση 1 δεσμού με το F με χαρακτηριστική σταθερά σύζευξης $^3J=8$ Hz. Τα υπόλοιπα πρωτόνια του νέου δακτυλίου συνοστίζονται και δίνουν πολλαπλές κορυφές περίπου στα 7.30 ppm. Οι παρατηρούμενες σχάσεις στο εν λόγω φάσμα οφείλονται στη σύζευξη του φθορίου (spin $\frac{1}{2}$) με το πρωτόνιο, που είναι πολύ ισχυρή. Για πρωτόνια που βρίσκονται σε απόσταση 2 δεσμών άνθρακα ως προς τον άνθρακα που είναι συνδεδεμένο το F, η τιμή της 4J κυμαίνεται στα 4 Hz.



Σχήμα 43: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400MHz) του N-(2-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου N-V-2-F σε DMSO- d_6

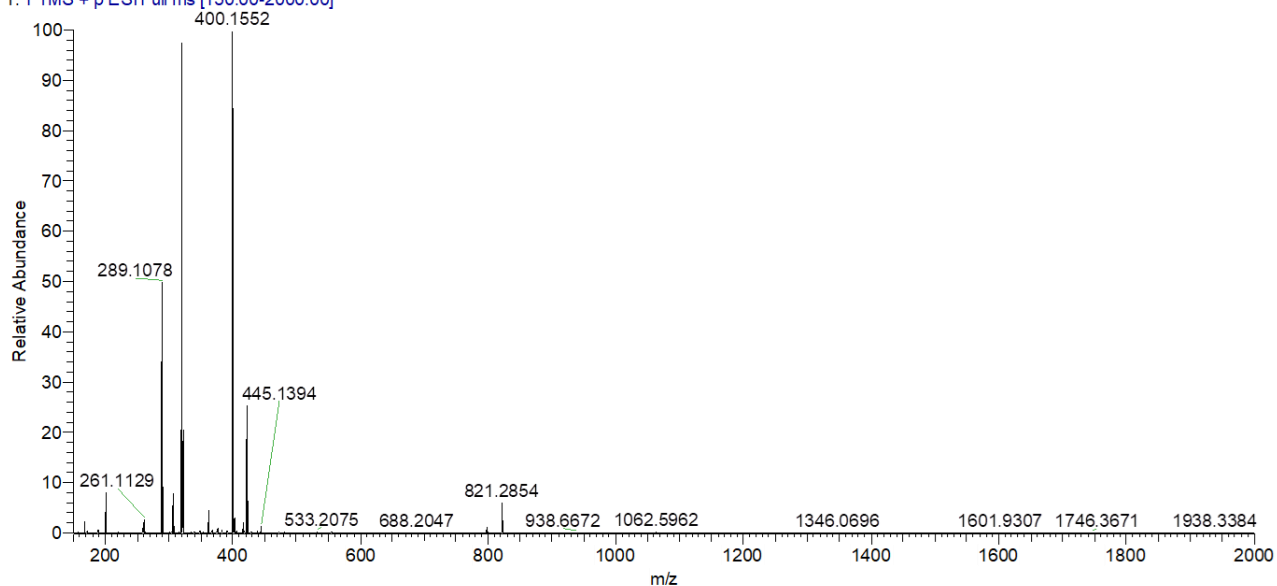


Σχήμα 44: Φάσμα ^1H NMR (400MHz) της αρωματικής περιοχής του *N*-(2-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου *N*-V-2-F σε DMSO- d_6



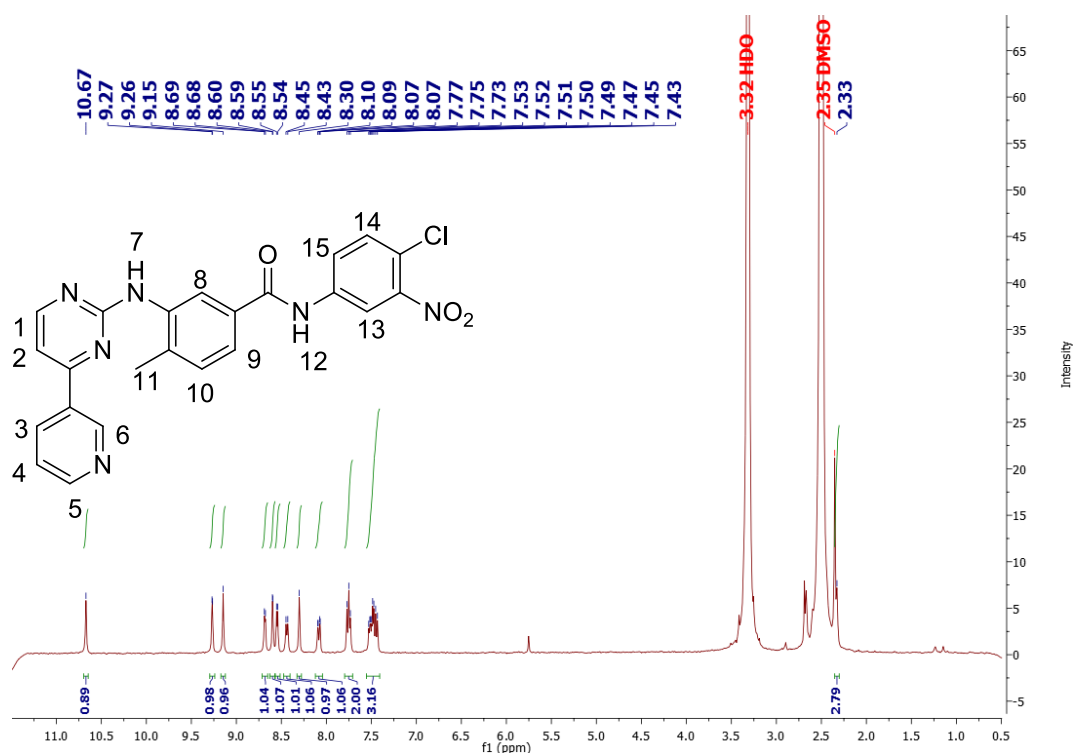
Σχήμα 45: Φάσμα ^{13}C NMR (400MHz) του *N*-(2-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου σε DMSO- d_6

PVSK153_1(3)_19120403#3 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.53E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



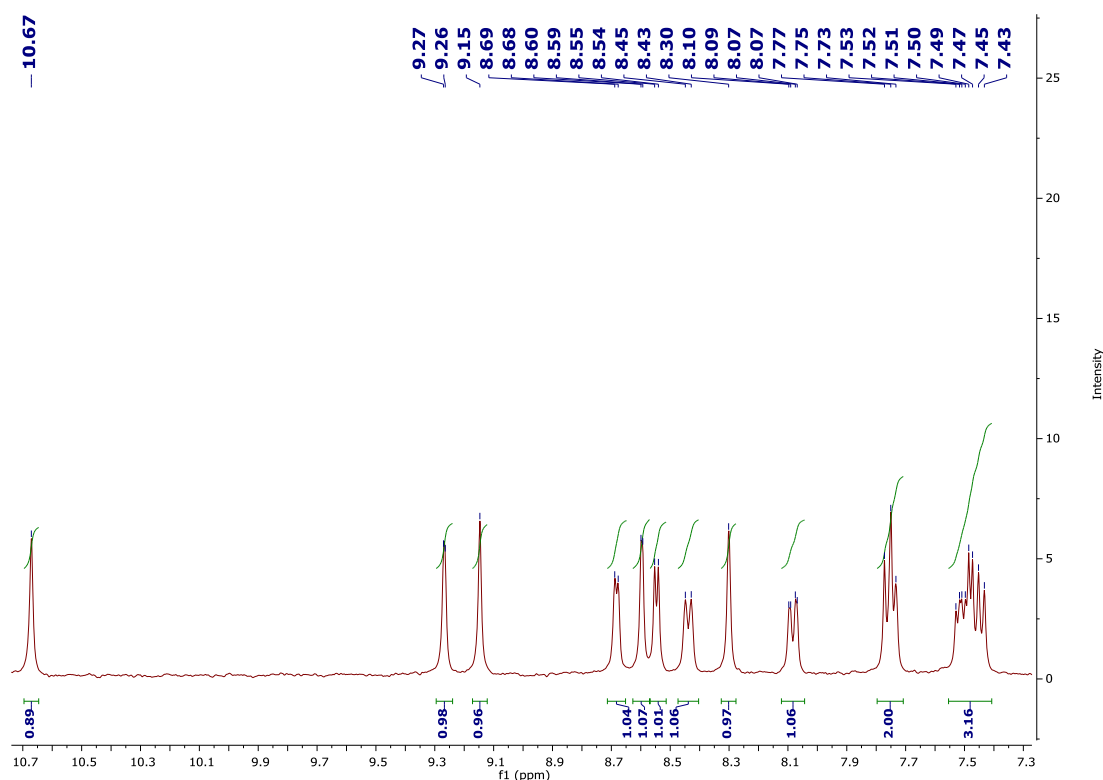
Σχήμα 46: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) της ένωσης με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) N-V-2-F

Στο φάσμα μάζας της ένωσης N-V-2-F καταγράφεται το μοριακό ιόν M+H⁺: 400.1552 που συνάδει με τη θεωρητική τιμή του μοριακού ιόντος M+H⁺: 400.1552

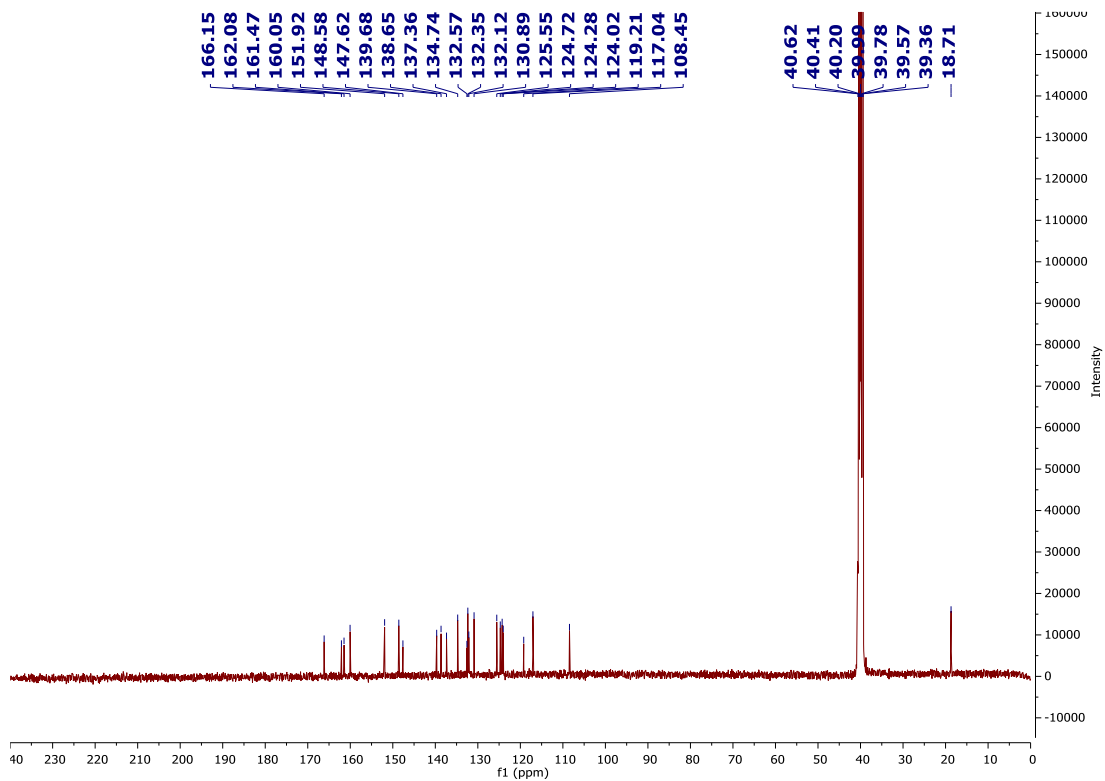


Σχήμα 47: Φάσμα ¹H NMR (400MHz) του N-(4-χλωρο-3-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου N-V-3-NO₂-4-Cl σε DMSO-d₆

Μελετώντας το φάσμα ^1H NMR της ένωσης $N\text{-}V\text{-}3\text{-NO}_2\text{-}4\text{-Cl}$ (σχήμα 47) παρατηρούμε πως οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των τριών αρωματικών δακτυλίων συνεχίζουν να εμφανίζονται σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας τις σχάσεις τους, κάτι το οποίο επαληθεύεται, καθώς καταγράφεται σε όλη τη σειρά των τελικών προϊόντων. Κύριο χαρακτηριστικό του φάσματος αποτελεί ο συντονισμός του αμιδικού πρωτονίου H-12 που εμφανίζεται στα 10.67 ppm. Όσον αφορά τα τρία νέα αρωματικά πρωτόνια που προκύπτουν μετά από την αντίδραση σύζευξης, πιο αποπροστατευμένο από τα τρία εμφανίζεται το H-13, στα 8.6 ppm, λόγω της θέσης του, ευρισκόμενο σε όρθο θέση ως προς τη νιτρο-ομάδα που το αποπροστατεύει αφαιρώντας του ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω του συζυγιακού φαινομένου και με σύζευξη spin-spin μακράς απόστασης με το H-15. Ακολουθεί το πρωτόνιο 15 στα 8.1 ppm που σχάζεται σε διπλή της διπλής λόγω γειννίασης με το H-14 σε απόσταση τριών δεσμών και με σύζευξη spin-spin μακράς απόστασης με το H-13. Τέλος ακολουθεί το H-14 που συντονίζεται στα 7.77 ppm που σχάζεται σε διπλή κορυφή λόγω γειννίασης με το H-15.

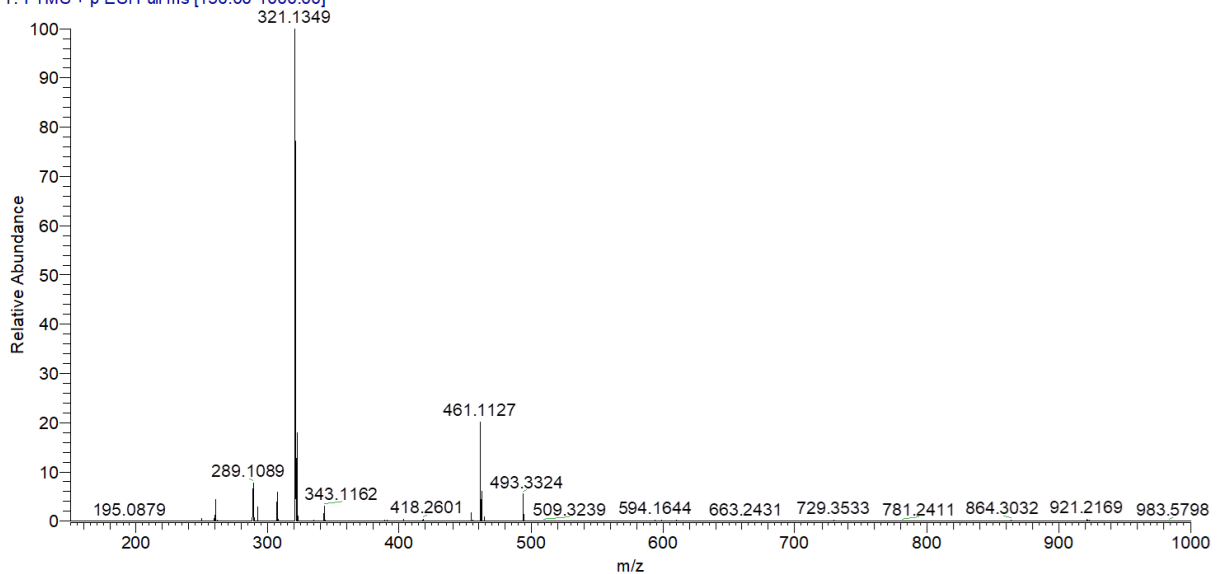


Σχήμα 48: Φάσμα ^1H NMR (400MHz) της αρωματικής περιοχής του $N\text{-}(4\text{-}\chi\lambda\omega\rho\text{-}3\text{-νιτροφαινυλο})\text{-}4\text{-μεθυλο-}3\text{-}((4\text{-πυριδιν-}3\text{-υλο})\text{πυριμιδιν-}2\text{-υλο})\text{αμινο})\text{βενζαμιδίου } N\text{-}V\text{-}3\text{-NO}_2\text{-}4\text{-Cl}$ σε $\text{DMSO-}d_6$



Σχήμα 49: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz) του *N*-(4-χλωρο-3-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου *N*-V-3-NO₂-4-Cl σε DMSO-d₆

SKNIL24_171122105614 #23 RT: 0.36 AV: 1 NL: 3.01E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-1000.00]



Σχήμα 50: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) της ένωσης με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) *N*-V-3-NO₂-4-Cl

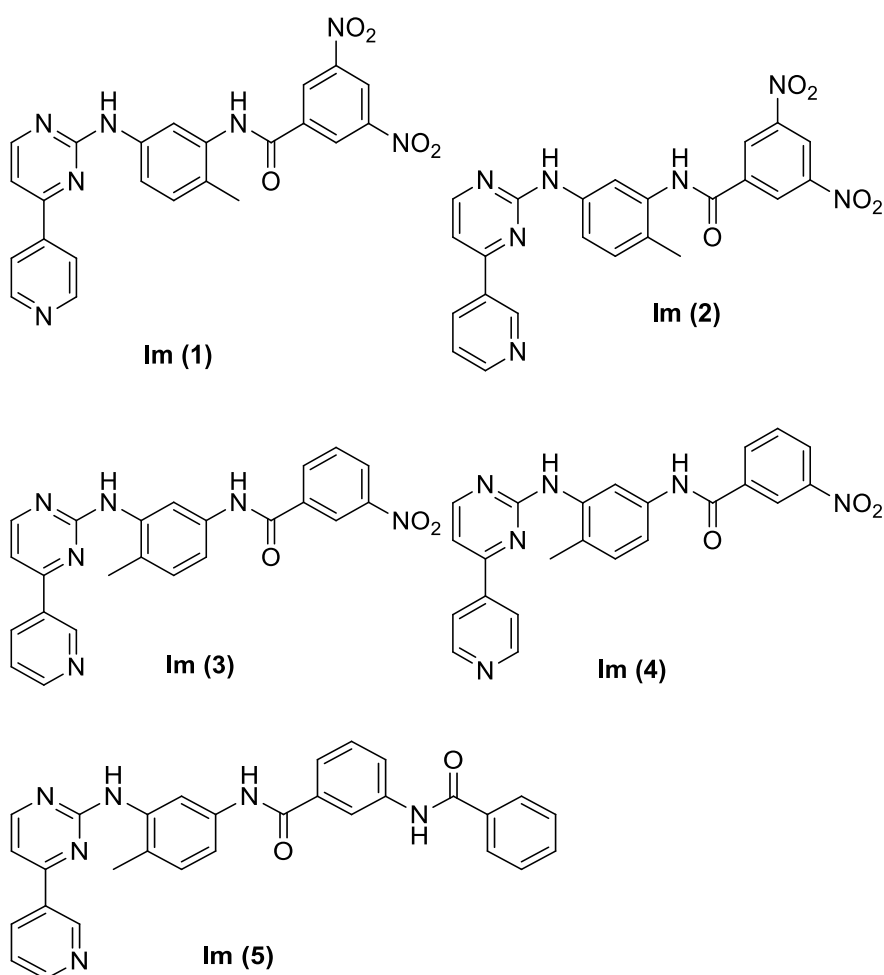
Στο φάσμα μάζας υψηλής διακριτικότητας ικανότητας καταγράφεται το μοριακό ιόν $M+H^+$: 461.1127 που συνάδει με τη θεωρητική τιμή του μοριακού ιόντος $M+H^+$: 461.1127

3.10 Σύνθεση τελικών προϊόντων-αναλόγων του Imatinib

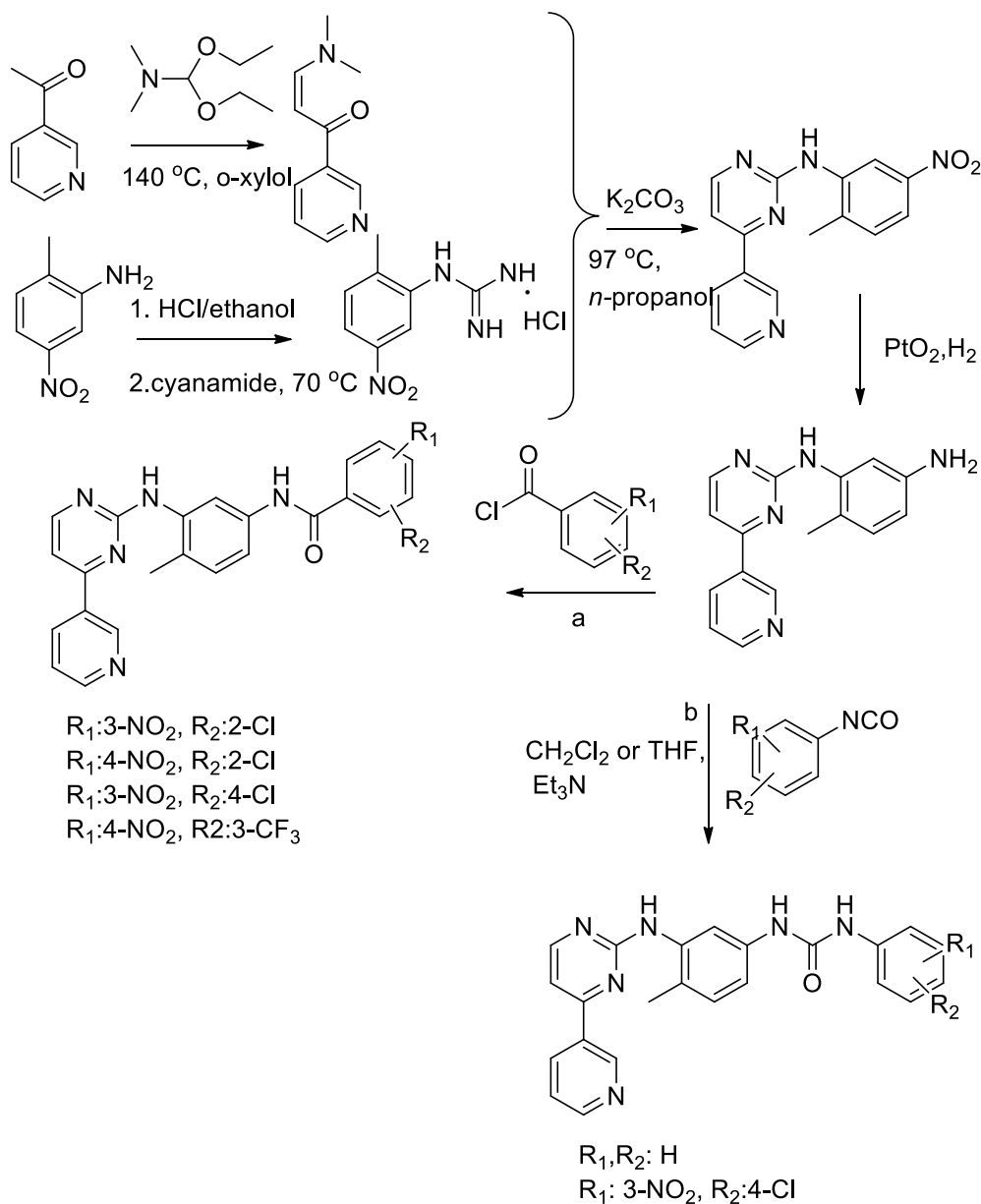
Το Imatinib (Gleevec) αποτελεί ένα σημαντικό φάρμακο, αναστολέα τυροσινικών κινασών για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, η οποία προκαλείται από την παραγωγή της χιμαιρικής μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Bcr-Abl, καθώς και σε ορισμένους όγκους που εμπλέκονται οι μεταλλάξεις της οικογένειας υποδοχέων PDGF. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα γίνει επιπρόσθετη αναφορά στην ολική συνθετική πορεία που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο για την ανάπτυξη νέων εν δυνάμει αναστολέων του Imatinib. Η κάτωθι πειραματική πορεία αποτελεί μια βελτιστοποιημένη σύνθεση των αναλόγων του Imatinib, εν συγκρίσει με την κατοχυρωμένη πορεία από τη Novartis, και έχει αποτελέσει μια καινοτόμα πορεία στη σύνθεση πολλών τελικών προϊόντων, αναλόγων του Imatinib, με στοχευμένες τροποποιήσεις στη δομή του. Θα γίνει μια σύντομη αναφορά σε μικρό αριθμό αναλόγων δεδομένου ότι έχουν συντεθεί άνω των 150 αναλόγων της Ιματινίβης, στο εργαστήριό μας, στη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής της Μαρίας Κυνηγοπούλου και της Αιμιλίας Γιαννούση. Έχει διενεργηθεί έλεγχος με βιολογικά πειράματα από τη φαρμακευτική εταιρεία Novartis, ως προς τη βιολογική τους δράση έναντι ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών και έχουν καταδείξει αξιόλογη βιολογική δράση.^[191,193] Στον πίνακα 1 απεικονίζονται ορισμένα ανάλογα της Ιματινίβης που κατέδειξαν εντυπωσιακή βιολογική δράση έναντι δύο πρωτεϊνικών κινασών, των B-Raf-V599E και CDK2/A. Η b-Raf πρωτεϊνική κινάση έχει αναλυθεί εκτενώς στην υποενότητα 2.4.3, εμπλέκεται στην μεταγωγή μιτογονικών σημάτων από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα του κυττάρου, ενώ η απορρύθμισή της σχετίζεται με διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Η CDK2/A είναι μια εξαρτώμενη κινάση από την κυκλίνη, δηλαδή προσδέεται σε αυτή και ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, τη μεταγραφή, ενώ η υπερέκφρασή της έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση καρκίνου και συγκεκριμένα του μαστού. Οι δομές των αναλόγων του Imatinib, που κατέδειξαν εντυπωσιακή βιολογική δράση έναντι των B-Raf και CDK/A απεικονίζονται στο σχήμα 51.

B-Raf- V599E	>10	>10	0.55	0.48	0.73
CDK2/A	0.50	0.014	>10	>10	>10
Im(1)	Im(2)	Im(3)	Im(4)	Im(5)	Im(6)

Πίνακας 1 Έλεγχος εν δυνάμει αναστολέων ως προς τη δραστηκότητά τους έναντι των B-Raf και CDK/2A

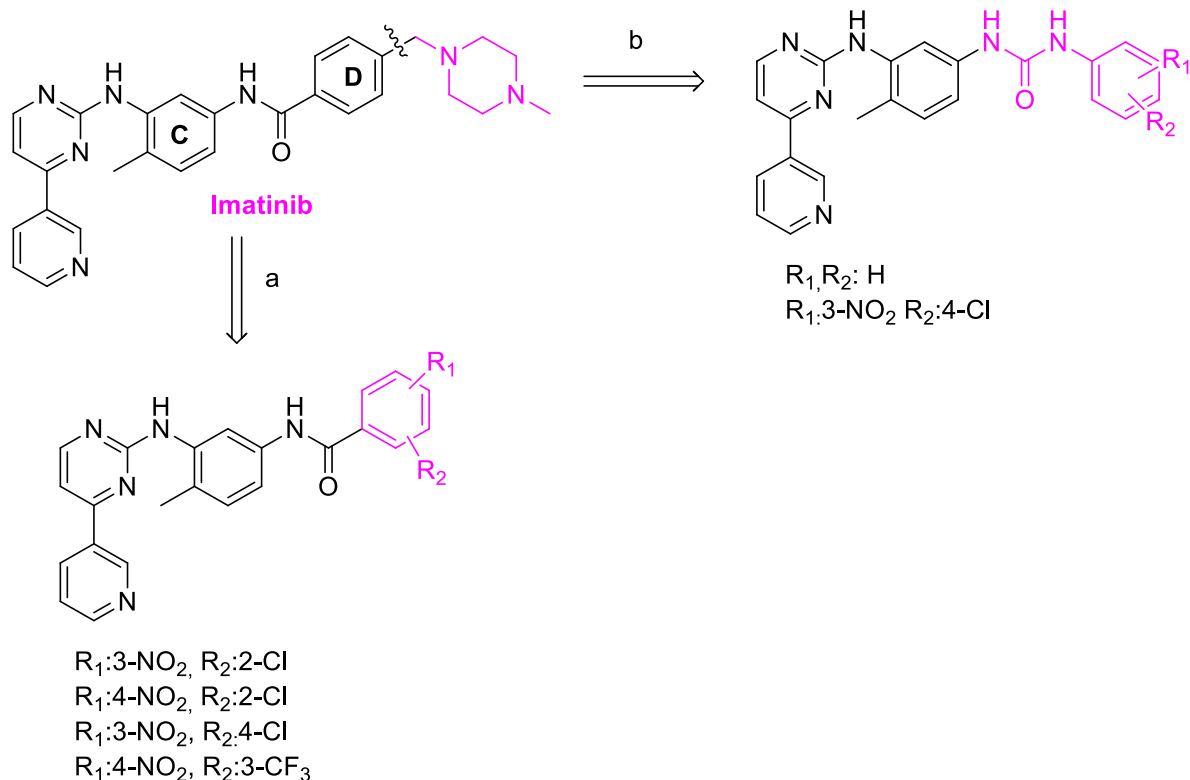


Σχήμα 51: Μερικά από τα ανάλογα του Imatinib που έχουν συντεθεί στο εργαστήριό μας ως εν δυνάμει αναστολείς με αξιόλογη βιολογική δράση



Σχήμα 52: Ολική συνθετική πορεία των αναλόγων του Imatinib που αναπτύχθηκε από την ερευνητική μας ομάδα

Η ως άνω συγκλίνουσα συνθετική πορεία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας αποτελείται πέντε επιμέρους στάδια, κατά τη σύνθεση αναλόγων του Imatinib έγινε αντικατάσταση του αμιδικού δεσμού από ένα δεσμό ουρίας (b, NH-CO→NH-CO-NH), επίσης, με αντικατάσταση του πιπεραζινικού δακτυλίου με υποκατεστημένους βενζολικούς δακτυλίους με διάφορους υποκαταστάτες όπως, -NO₂ και -Cl. Ακόμη, έγινε η σύνθεση αναλόγων με εξάλειψη του πιπεραζινικού δακτυλίου και αντικατάσταση του με υποκατεστημένους βενζολικούς δακτυλίους, με υποκαταστάτες όπως, -Cl, -NO₂, -CF₃ και μετακίνηση αυτών σε διάφορες θέσεις του τελικού βενζολικού δακτυλίου D (σχήμα 53).



Σχήμα 53: Τροποποιήσεις στη δομή του Imatinib και ανάλογα που έχουν καταδείξει αξιολογή βιολογική δράση έναντι μιας σειρά πρωτεϊνικών κινασών^[193] α) Ανάλογα της Ιματινίβης με εξάλειψη του πιπεραζιλικού δακτυλίου και εισαγωγή υποκαταστατών στον τελικό βενζολικό δακτύλιο D, όπως, -Cl, -NO₂, -CF₃ β) Ανάλογα της Ιματινίβης με αντικατάσταση του αμιδικού δεσμού μεταξύ του δακτυλίου C και D από ένα δεσμό ουρίας και εισαγωγή υποκαταστατών στον τελικό βενζολικό δακτύλιο D, όπως, -NO₂ και -Cl

Η ως άνω πειραματική πορεία αποτελείται από τα εξής στάδια:

- Σύνθεση β-εναμινόνης
- Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της γουανιδίνης
- Κυκλοποίηση β-εναμινόνης
- Αναγωγή του νιτρο ομάδας του προϊόντος κυκλοποίησης
- Σχηματισμός αμιδικού δεσμού μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης ακυλο υποκατάστασης μεταξύ διαφόρων υποκατεστημένων βενζουλόχλωριδίων
- Σχηματισμός του δεσμού ουρίας μέσω μιας πυρηνόφιλης ακυλο-προσθήκης μεταξύ της πρωτοταγούς αμίνης και των υποκατεστημένων ισοκυανικών φαινυλίων.

Να σημειωθεί πως στην ενότητα αυτή θα γίνει αναφορά μόνο στις διαφοροποιήσεις-τροποποιήσεις κατά τη συνθετική πορεία των αναλόγων του Imatinib, δεδομένου ότι αποτελούν τα επιμέρους συνθετικά βήματα έχουν αναλυθεί προηγουμένως. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή θα εστιάσουμε στη βιολογική δράση που κατέδειξαν τα ανάλογα του Imatinib και Nilotinib έναντι συσσωρευμένων αιμοπεταλίων παρουσία διαφόρων αγωνιστών.

Όλα τα ανάλογα, εν δυνάμει αναστολείς, έχουν απομονωθεί σε υψηλή αναλυτική καθαρότητα άνω του 99%, έχουν ταυτοποιηθεί με όλες τις σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές, ενώ η βιολογική τους δράση έναντι μιας σειράς πρωτεϊνικών κινασών έχει διεξαχθεί στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στην Ιατρική σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

3.11 Βελτιστοποιήσεις/Διαφοροποιήσεις στη συνθετική πορεία των αναλόγων του Imatinib

Η ολική συνθετική πορεία αυτή του φαρμακευτικού σκευάσματος του Imatinib, που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο χαρακτηρίζεται από σημαντικές τροποποιήσεις από την αναπτυχθείσα και κατοχυρωθείσα από τη φαρμακοβιομηχανία Novartis. Επεναξετάσαμε την κλασική συνθετική πορεία για τη σύνθεση του Imatinib και προτείναμε μια διαφορετική αποτελεσματικότερη μεθοδολογία για τη σύνθεση μιας σειράς νέων αναλόγων της Ιματινίβης. Η εν λόγω προτεινόμενη μεθοδολογία χαρακτηρίζεται από τη χρησιμοποίηση χαμηλού κόστους αντιδραστηρίων, εξοικονόμηση χρόνου και εργασίας, δεδομένου ότι οι επιθυμητές ενδιάμεσες ενώσεις παραλάμβανονται εύκολα σε υψηλές αποδόσεις, και έχει τη δυνατότητα να εφαρμοστεί στη σύνθεση πολλών αναλόγων.

Το 1^ο βήμα η σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της 2-μεθυλο-5-νιτροφαινυλογουανιδίνης, διεξήχθη με την αντίδραση του υδροχλωρικού άλατος της κατάλληλης υποκατεστημένης ανιλίνης με περίσσεια τηγμένου κυαναμίδιου ως διαλύτη και η αντίδραση προχώρησε σχεδόν ποσοτικά σε απόδοση (~98%). Αντιπαραβάλλοντας τη προσέγγιση του Zimmermann (σχήμα 51), η ως άνω αντίδραση διεξάγεται με τη χρήση οργανικών διαλυτών, κυαναμίδιου, με διάρκεια πάνω από 20 ώρες και με χαμηλή απόδοση της τάξεως του **20%**. Εν αντιθέσει της προσέγγισης Zimmermann, η προτεινόμενη μεθοδολογία για τη σύνθεση της επιθυμητής ενδιάμεσης ένωσης «κλειδιού», το υδροχλωρικό άλας της κατάλληλης υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης, πραγματοποιήθηκε σε τηγμένο κυαναμίδιο (45 °C), χωρίς τη προσθήκη κάποιου άλλου διαλύτη. Μετέπειτα η προσθήκη του καταλλήλου άλατος της υποκατεστημένης ανιλίνης στους 70 °C, οδήγησε στο προϊόν σχεδόν ποσοτικά (**~98%**) σε 1.5 h, αντί των 20 ωρών της προσέγγισης Zimmermann. Συνεπώς καταφέραμε να μειώσουμε το μεγάλο χρόνο αντίδρασης αυξάνοντας εντυπωσιακά την απόδοση της εν λόγω αντίδρασης.

Το 2^ο βήμα αφορά το στάδιο κυκλοποίησης αφορά τη συμπύκνωση της β-εναμινόνης με το υδροχλωρικό άλας της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης με τη χρήση ήπιας βάσης K₂CO₃, αντί του NaOH, και, ως διαλύτη *n*-PrOH, αντί των *n*-BuOH ή *i*-PrOH, που χρησιμοποιήθηκαν στην προσέγγιση Zimmermann. Η χρήση ήπιας βάσης και της *n*-PrOH ως διαλύτη οδήγησαν στην απομόνωση του επιθυμητού ενδιάμεσου σε υψηλή απόδοση (~80%), χωρίς το σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων και συγχρόνως στη βελτιστοποίηση του σταδίου κυκλοποίησης.

Το 3^ο βήμα, αναγωγής της νιτρομάδας σε αμινομάδα συνιστά ένα σημαντικό αποτέλεσμα της ως άνω ολικής συνθετικής πορείας, καθώς αντικαταστάθηκε ο καταλύτης παλλάδιο προσροφημένος σε άνθρακα, της προσέγγισης Zimmermann Pd/C, που έδινε πολύ χαμηλή απόδοση, της τάξεως του 10%. Στο εργαστήριό μας χρησιμοποιήσαμε καταλύτη Adams (PtO₂) και παρατηρήσαμε εντυπωσιακή αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης, καθώς απομονώσαμε το προϊόν αναγωγής, σχεδόν ποσοτικά ~100%, χωρίς το σχηματισμό παραπροϊόντων. Εν συνεχεία, το προϊόν αναγωγής συζεύγγονται με διάφορα υποκατεστημένα χλωρίδια του βενζοϊκού οξέος, οπότε παραλαμβάνονται πολυάριθμα τελικά προϊόντα, ανάλογα της Ιματινίβης.

3.12 Μοριακή Μοντελοποίηση των νέων αναλόγων, εν δυνάμει αναστολέων του Nilotinib

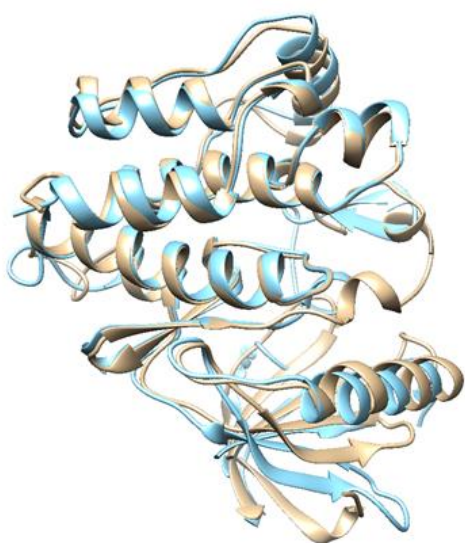
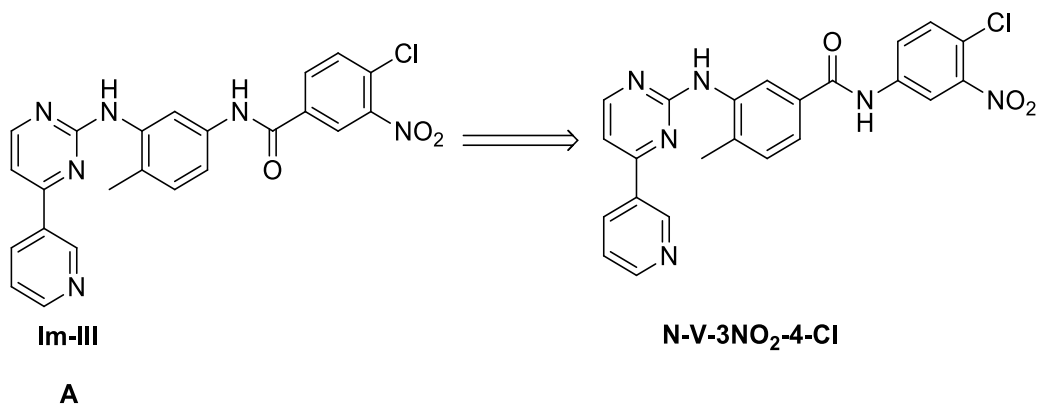
Η μοριακή μοντελοποίηση θεωρείται ένα χρήσιμο εργαλείο στην ανακάλυψη φαρμάκων, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός μορίου μικρού μοριακού βάρους και μιας πρωτεΐνης σε ατομικό επίπεδο, παρέχοντας τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της συμπεριφοράς των μικρών μορίων στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών και αποσαφήνισμού στοιχειωδών βιοχημικών διεργασιών.^[194] Η διαδικασία της μοριακής μοντελοποίησης περιλαμβάνει 2 βασικά στάδια: α) την πρόβλεψη της διαμόρφωσης του υποκαταστάτη, β) τη θέση-προσανατολισμό εντός των σημείων πρόσδεσης και την εκτίμηση της συγγένειας πρόσδεσης.

Ο σχεδιασμός των νέων αναστολέων, αναλόγων του Nilotinib, διενεργήθηκε με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοντελοποίησης, που προβλέπουν την πιθανή ανασταλτική δράση των εν λόγω ενώσεων έναντι της c-Src κινάσης, μιας μη υποδοχικής τυροσινικής κινάσης, καθώς επιτρέπει τη σύγκριση των ενώσεων με πιθανή δράση έναντι της κινάσης με γνωστούς αναστολείς. Μέσω της υπέρθεσης των ενώσεων με την κινάση και την πρόβλεψη των αναπτυσσόμενων αλληλεπιδράσεων, προκύπτουν οι ενώσεις που είναι πιθανότερο να παρουσιάσουν ανασταλτική δράση για το σχεδιασμό δραστικότερων και εκλεκτικότερων

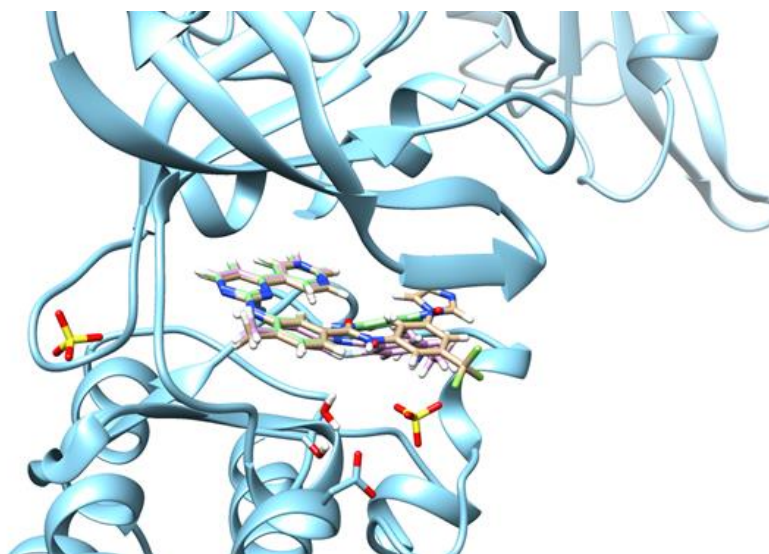
αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Κατ' αυτόν τον τρόπο σχεδιάστηκαν νέοι αναστολείς τύπου II, ανάλογα του Nilotinib, οι οποίοι προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, στη θέση πρόσδεσης του ATP στην τυροσινική κινάση c-Src, δημιουργώντας διαφόρων ειδών αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Για την μοριακή μοντελοποίηση των παραγώγων του Nilotinib, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Nilotinib, καθώς είναι 10-30 φορές πιο δραστικό σε σχέση με το Imatinib.

Βασιζόμενοι σε κάποια αξιολογικά βιολογικά αποτελέσματα που κατέδειξαν κάποια ανάλογα του Imatinib έναντι του PDGF-R σε συνεργασία με το Imperial College,^[191] και μάλιστα ένα εξ' αυτών, το ισοστερικό ανάλογο Im-III του Imatinib αποδείχθηκε εξίσου δραστικό όσο και το Imatinib. Ως συνέχεια των αποτελεσμάτων, σχεδιάσαμε αρχικά ένα ισοστερικό ανάλογο του Im-III με αναστροφή του αμιδικού δεσμού και διατήρηση της μοριακής αρχιτεκτονικής του. Το προκύπτον ανάλογο του Nilotinib που προέκυψε, ήτοι το N-V-3-NO₂-4-Cl, συγκρίθηκε ως προς τις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της c-Src, μέσω προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης, και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν αντιπαραβάλλονται παρακάτω. Πράγματι, προέκυψε ότι η εν λόγω ένωση N-V-3-NO₂-4-Cl έχει καλύτερο τοπολογική βελτιωμένη στερική συμπληρωματικότητα στο σημείο πρόσδεσης της c-Src. Πέραν, των θεωρητικών προβλέψεων που εξάγονται από τη μοριακή μοντελοποίηση, προβήκαμε στο βιολογικό έλεγχο αναλόγων του Imatinib και Nilotinib ως προς την ανασταλτική τους δράση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία διαφόρων αγωνιστών. Τα αποτελέσματα των διενεργηθέντων βιολογικών πειραμάτων είναι άκρως ενθαρρυντικά και αναλύονται εκτενώς στο παρακάτω εδάφιο.

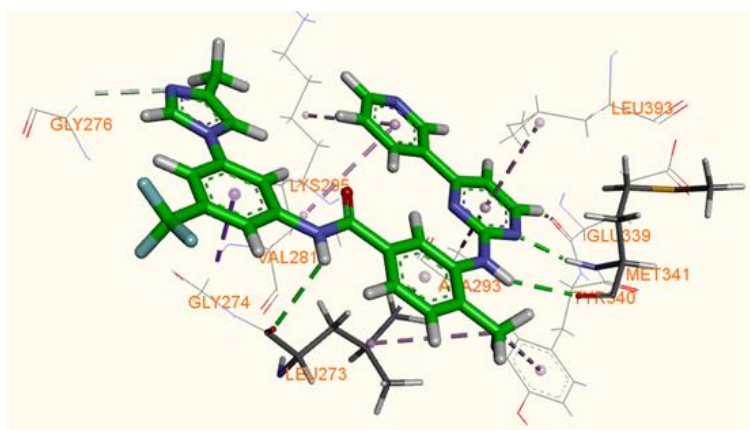
Η ανάλυση docking πραγματοποιήθηκε στη δομή 1y57 από το πρόγραμμα glide maestro. Η μοντελοποίηση πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα discovery studio visualiser 2016 και το Chimera 1.11c. Αρχικά, συγκρίναμε τις δύο ενώσεις αναφοράς Imatinib και Nilotinib μέσω υπέρθεσης αυτών στο ενεργό κέντρο της c-Src και αποσαφηνίστηκε η ομοιότητα του ενεργού κέντρου των πρωτεϊνικών κινασών c-Src και Abl κινάσης, καθώς και η μη ισχυρή αναστολή της c-Src από την ιματινίβη που επιβεβαιώνεται και με βιβλιογραφικά δεδομένα.^[195,196] Εν συνεχεία, έγινε υπέρθεση του Imatinib και του Nilotinib με την ένωση N-V-3-NO₂-4-Cl, ώστε να συγκριθεί ο προσανατολισμός της και η στερική συμπληρωματικότητα στο ενεργό κέντρο της c-Src σε σχέση-σύγκριση με τις δύο ενώσεις αναφοράς.



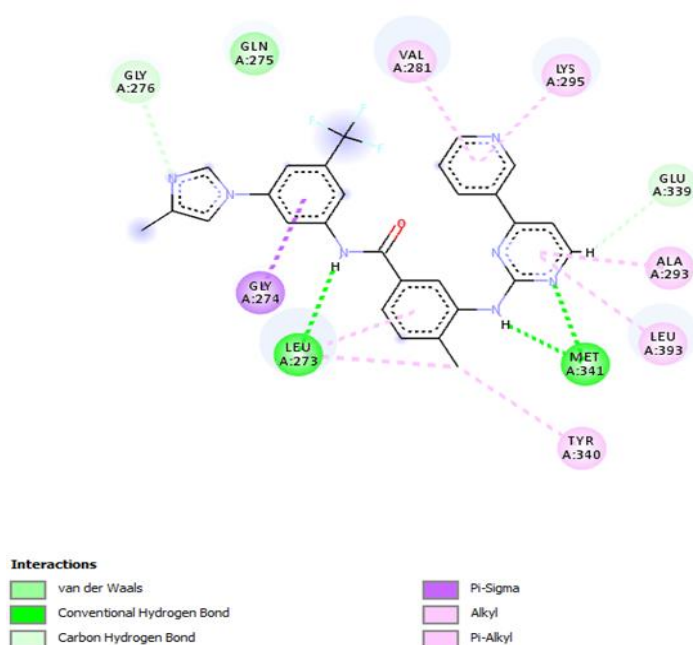
Σχήμα 54α: Από την μοριακή δομή της ένωσης *Im-III*, αναλόγου του *Imatinib* (*Gleevec*) στη δραστικότερη ένωση *N-V-3-NO₂-4-Cl*, β) Η υπέρθεση της *Abl* (γαλάζιο) και *c-Src* (καφέ) κινάσης



Σχήμα 54β: Υπέρθεση του *Nilotinib* (καφέ χρώμα) και *Imatinib* (ροζ χρώμα) με την συντεθειμένη ένωση *N-V-3-NO₂-4-Cl* (πράσινο χρώμα) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της *c-Src*. Οι διαφοροποιήσεις εστιάζονται στο τελικό βενζολικό δακτυλίο.

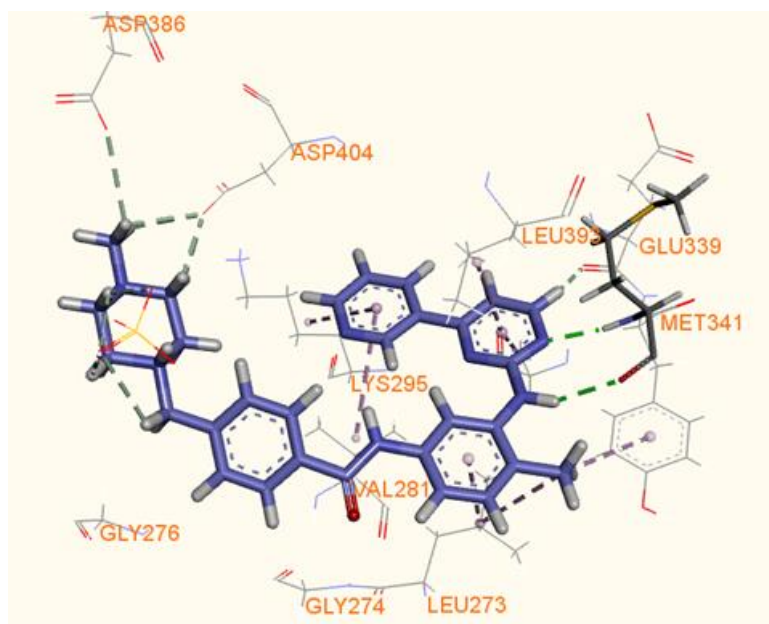


Σχήμα 55: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Nilotinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της c-Src κινάσης.

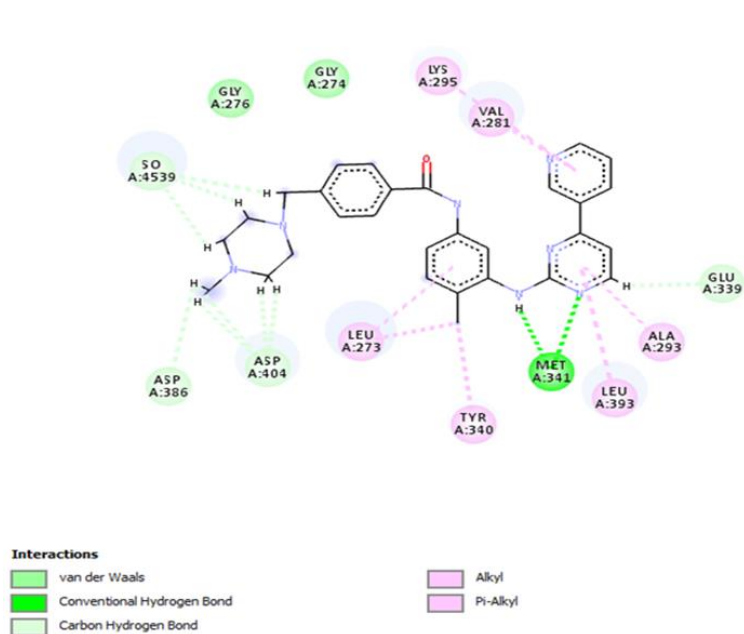


Σχήμα 56: Απλοποιημένο διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων της νιλοτινίβης με το ενεργό κέντρο της c-Src.

Όπως φαίνεται παραπάνω, το Nilotinib αλληλεπιδρά με την c-Src κινάση, σχηματίζοντας τρεις δεσμούς υδρογόνου (Σχήμα 56). Το πυριδινυλικό άτομο αζώτου και η αμινική ομάδα -NH σχηματίζουν 2 δεσμούς υδρογόνου με την -NH της Met341. Η αμινική ομάδα του αμιδικού δεσμού σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την -NH της Leu 273.



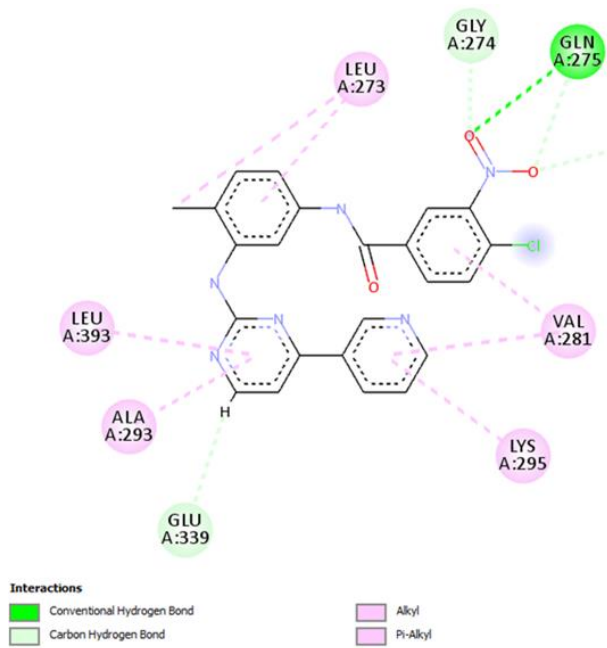
Σχήμα 57: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Imatinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της c-Src.



Σχήμα 58: Απλοποιημένο διάγραμμα δύο διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του Imatinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της c-Src

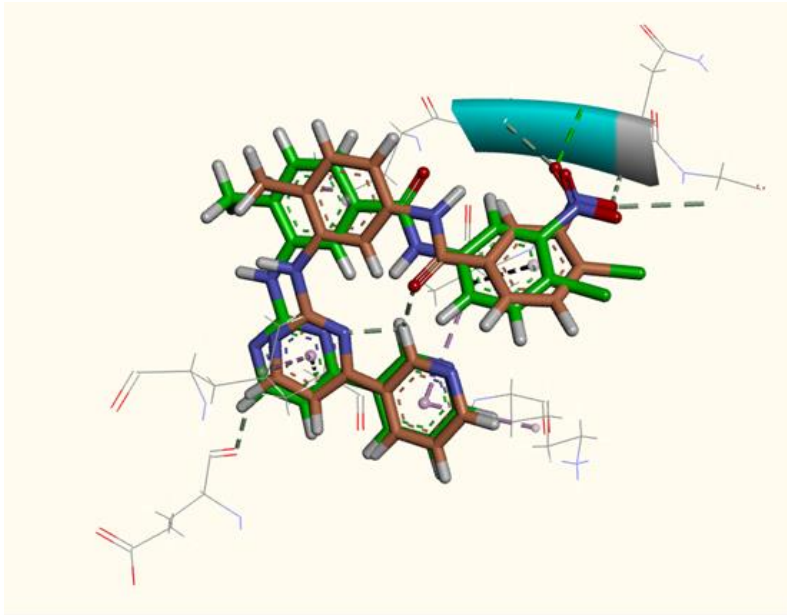
Από το ως άνω διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του Imatinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, παρατηρούμε ότι το Imatinib σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου. Το πυριδινυλικό άτομο αζώτου και η αμινική ομάδα –NH σχηματίζουν 2 δεσμούς υδρογόνου με την –NH της Met341. Η αμινική ομάδα του αμιδικού δεσμού δε σχηματίζει πλέον δεσμό υδρογόνου με την –NH της Leu 273,

όπως παρατηρήθηκε στο διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων της Νιλοτινίβης με το ενεργό κέντρο της c-Src, όπου η αμινική ομάδα του αμιδικού δεσμού του Nilotinib σχηματίζει εένα επιπλέον δεσμό υδρογόνου με την -NH της Leu 273. Η απώλεια ενός δεσμού υδρογόνου ίσως να εξηγεί τη παρατηρούμενη ασθενέστερη πρόσδεση του Imatinib στο ενεργό κέντρο της c-Src και το γεγονός ότι το Nilotinib είναι εννιά φορές δραστικότερο από το Imatinib.



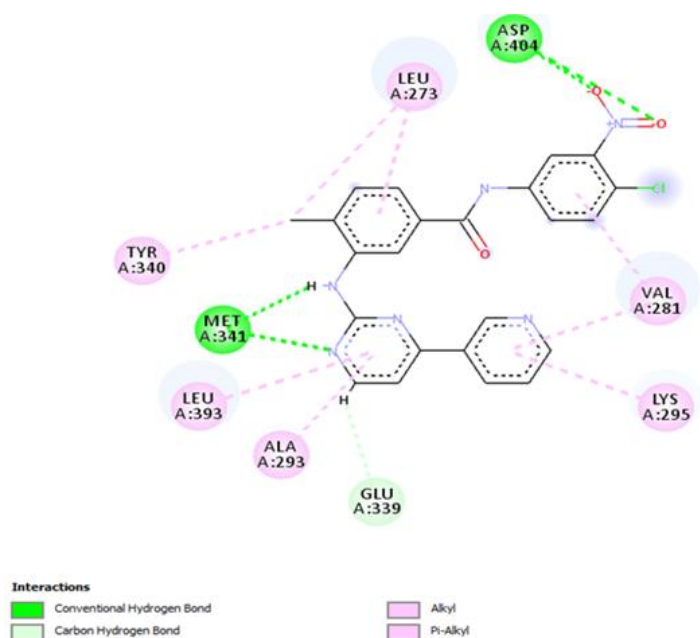
Σχήμα 59: Απλοποιημένο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της ένωσης SK 21 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της c-Src

Από το ως άνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι σχηματίζονται 2 επιπλέον δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των 2 ατόμων οξυγόνου της ντρομάδας και της -NH της Glu και μία επιπλέον άλκυλο αλληλεπίδραση του τελικού βενζολικού δακτυλίου με την Val 281.



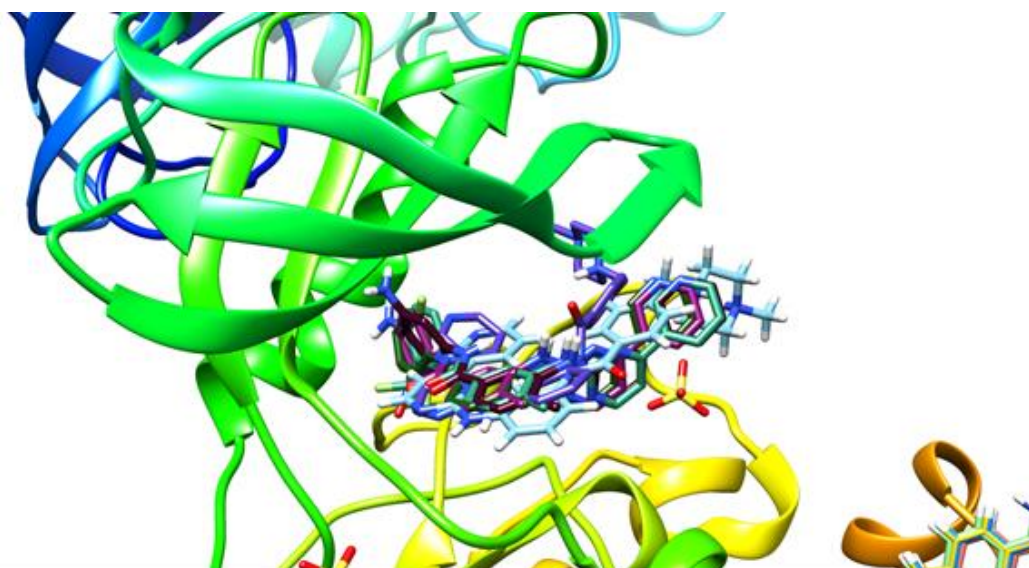
Σχήμα 60: Υπέρθυση των ενώσεων *Im-III* και *N-V-3-NO₂-4-Cl* στο ενεργό κέντρο της *c-Src*

Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η ένωση *N-V-3-NO₂-4-Cl* και με πράσινο χρώμα το ανάλογο *Im-III* (πορτοκαλί χρώμα) με μη ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό. Παρατηρούμε ότι αλλάζει ο προσανατολισμός του μορίου με αποτέλεσμα να έχουμε απώλεια των δεσμών υδρογόνου του πυριμιδινικού δακτυλίου και του αμινικού δεσμού με το κατάλοιπο MET341.



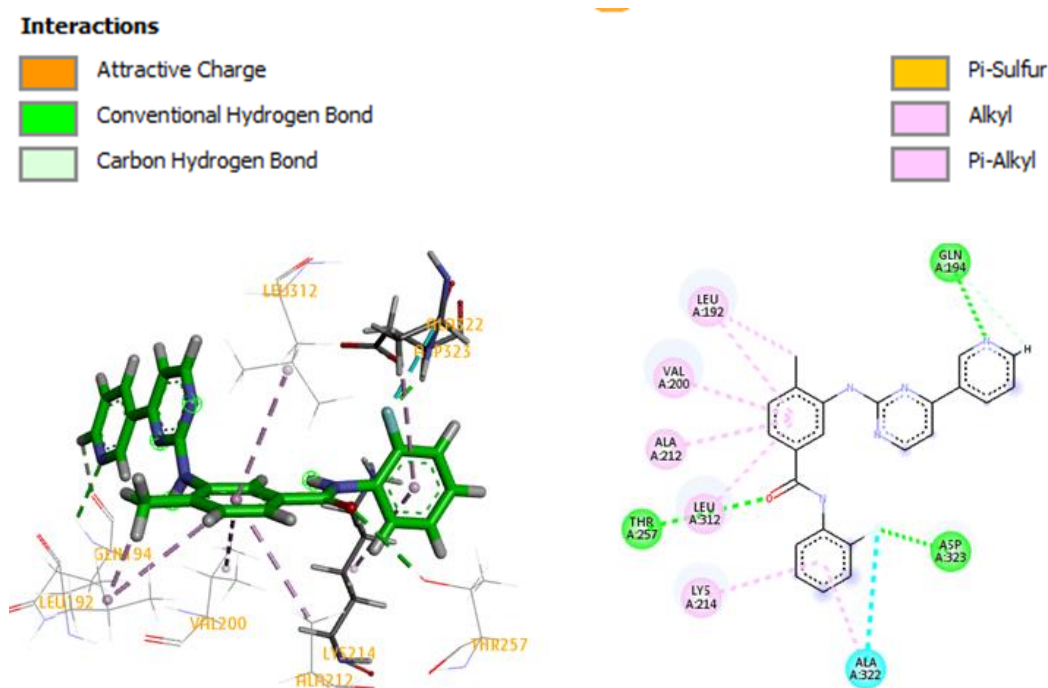
Σχήμα 61: Απλοποιημένο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της ένωσης *N-V-3-NO₂-4-Cl* με το ενεργό κέντρο της *c-Src*.

Συγκρίνοντας τα απλοποιημένα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων του Nilotinib και του ισοστερικού της αναλόγου της, N-V-3-NO₂-4-Cl με το ενεργό κέντρο c-Src, παρατηρούμε δύο επιπλέον δεσμούς υδρογόνου της νιτρο-ομάδας και μία επιπλέον άκυκλο αλληλεπίδραση μεταξύ του τελικού βενζολικού δακτυλίου και της βαλίνης 281. Η παρατηρούμενη άκυκλο αλληλεπίδραση της εν λόγω ένωσης ίσως να επιφέρει καλύτερο τοπολογικό ταίριασμα με το ενεργό κέντρο της c-Src, καθιστώντας την περισσότερη δραστική και εκλεκτική σε σύγκριση με τη στερική συμπληρωματικότητα του Nilotinib στο ενεργό κέντρο της εν λόγω κινάσης. Αυτό το γεγονός, αποτέλεσε το εφελτήριο για την περαιτέρω σύνθεση νέων εν δυνάμει αναλόγων, χρησιμοποιώντας ως ένωση οδηγό (lead compound) την N-V-3-NO₂-4-Cl στο σχεδιασμό ισοστερικών ενώσεων με τις τροποποιήσεις να εστιάζονται στον τελικό βενζολικό δακτύλιο μέσω εισαγωγής-προσάρτησης ηλεκτραρνητικών υποκαταστατών, ομάδων που εκδηλώνουν φαινόμενα μεταφοράς φορτίου. Προβήκαμε στη μοριακή μοντελοποίηση των νέων αναλόγων με σκοπό την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται στο ενεργό κέντρο της c-Src πρωτεϊνικής κινάσης. Αρχικά έγινε υπέρθεση των σχεδιασθέντων ενώσεων στο ενεργό κέντρο της c-Src κινάσης με σκοπό την διεύρυνση-εκτίμηση του προσανατολισμού-γεωμετρίας των νέων εν δυνάμει αναστολέων του Nilotinib στο σημείο πρόσδεσης του ATP. Όλα τα ανάλογα έχουν παρόμοιο προσανατολισμό του πυριμιδινικού και πυριδινικού δακτυλίου στο ενεργό κέντρο της κινάσης, ενώ ο τελικός βενζολικός δακτύλιος παρουσιάζει μια μικρή διαφοροποίηση ως προς τον προσανατολισμό-διευθέτηση πέριξ του ενεργού κέντρου.

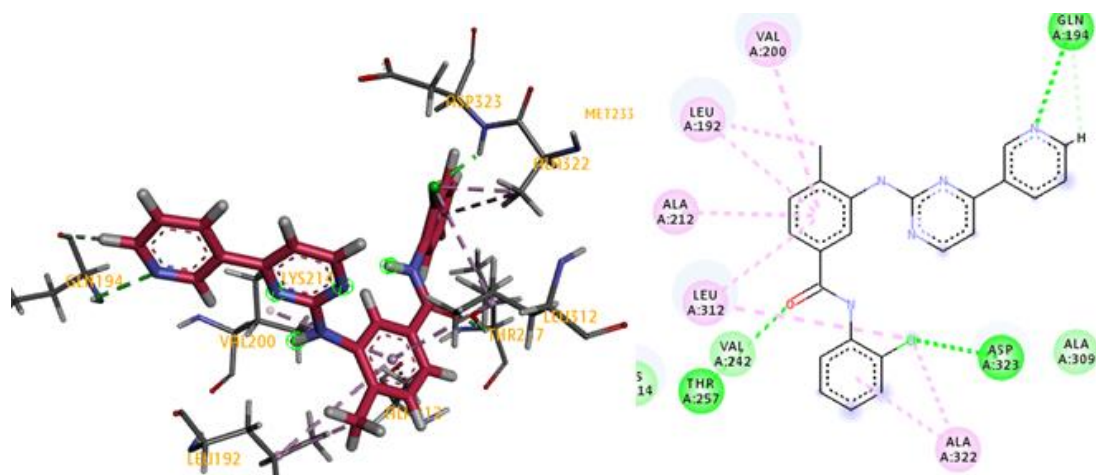


Σχήμα 62: Υπέρθεση των αποτελεσμάτων *docking* των αναλόγων του Nilotinib που συντέθηκαν στο εργαστήριο στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης cSrc

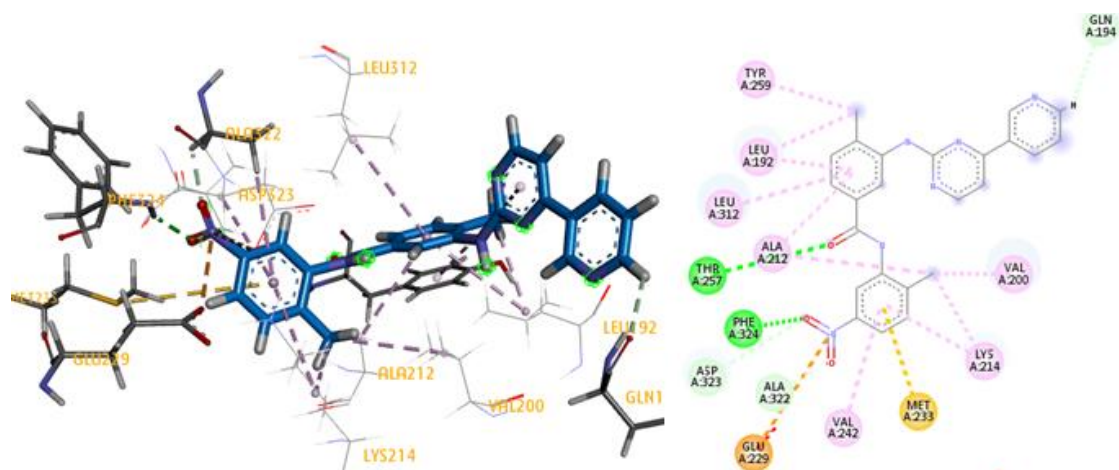
Ακολουθεί περιγραφή των αποτελεσμάτων μοριακή μοντελοποίησης σε κάποια από τα νέα ανάλογα του Nilotinib που κατέδειξαν αξιόλογες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο της c-Src κινάσης. Στις εικόνες που παρατίθενται παρακάτω, απεικονίζονται τα καλύτερα αποτελέσματα της ανάλυσης Docking για τα ανάλογα του Nilotinib που συντέθηκαν στο εργαστήριο και σχολιάζονται οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις που αφορούν στις δομικές τροποποιήσεις της Νιλοτινίβης. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου, με ροζ οι άκυλο αλληλεπιδράσεις, με γαλάζιο οι δεσμοί αλογόνου, με καφέ οι αλληλεπιδράσεις φορτίου, όπως ακριβώς φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.



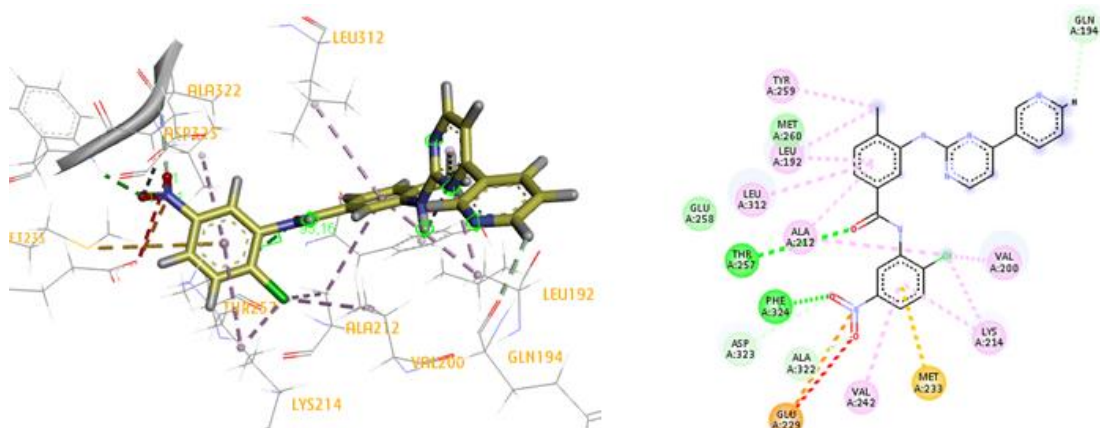
Σχήμα 63: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου N-V-2-F στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης c-Src, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου N-V-2-F με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της c-Src.



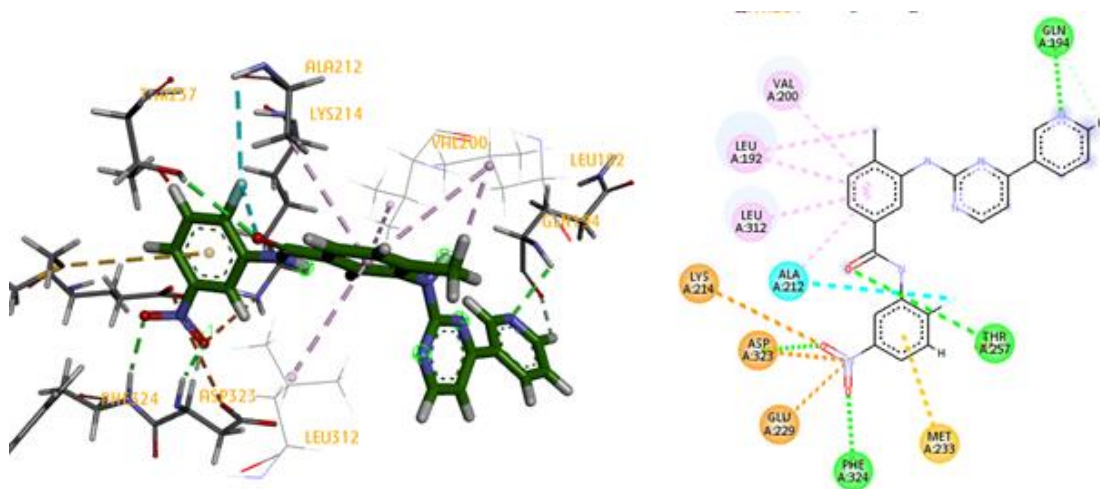
Σχήμα 64: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-2-Cl* στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης *c-Src*, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-2-Cl* με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της *c-Src*.



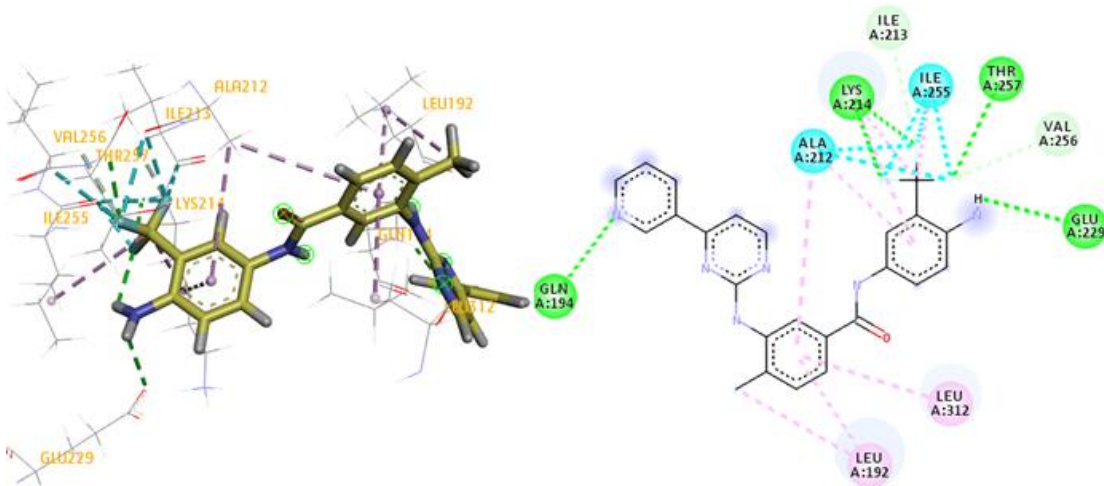
Σχήμα 65: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-2-CH₃-5-NO₂* στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης *c-Src*, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-2-CH₃-5-NO₂* με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της *c-Src*. Παρατηρούμε ότι η νιτρο-ομάδα σχηματίζει πλούσιες αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.



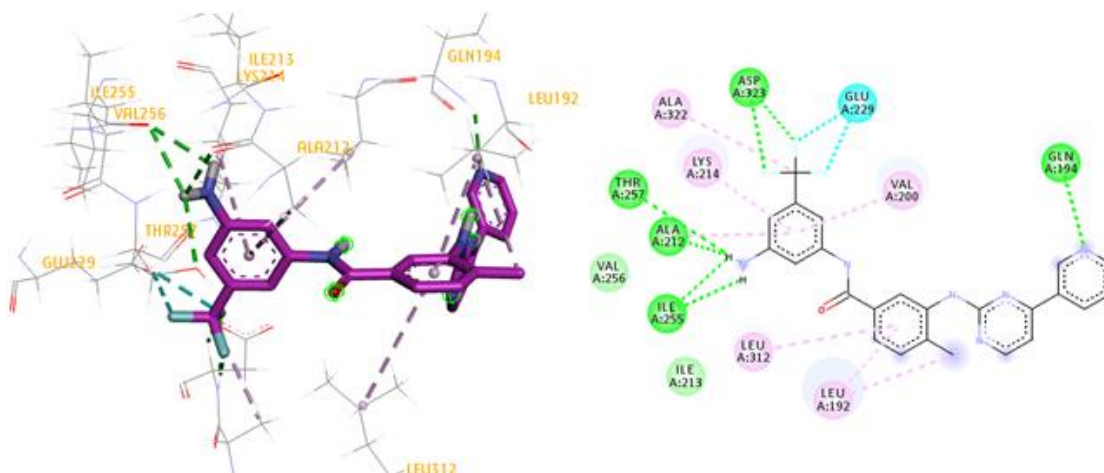
Σχήμα 66: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου N-V-2-Cl-5-NO₂ στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης c-Src, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων.



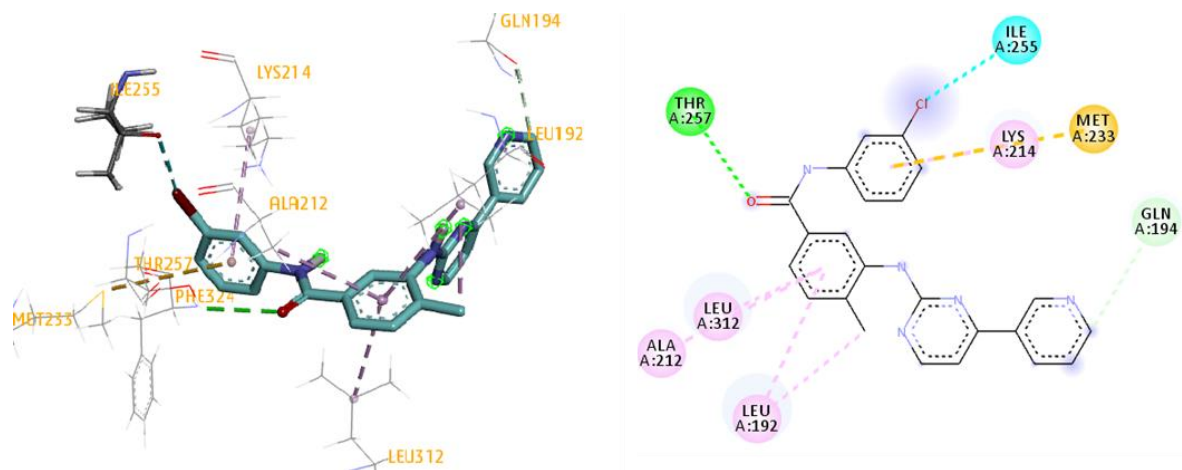
Σχήμα 67: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου N-V-2-F-5-NO₂ στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης c-Src, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων.



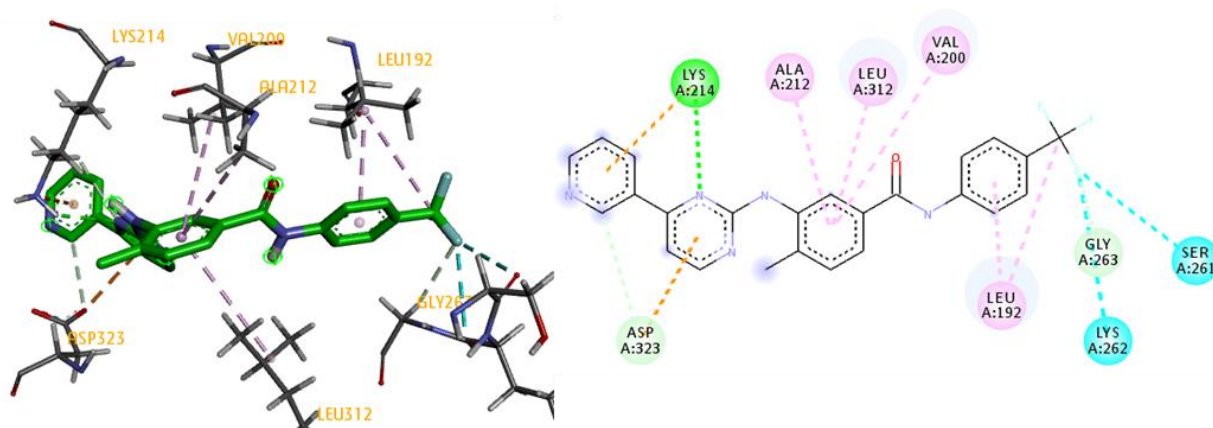
Σχήμα 68: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-3-CF₃-4-NH₂* στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης *c-Src*, ενώ δεξιά παρουσιάζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων.



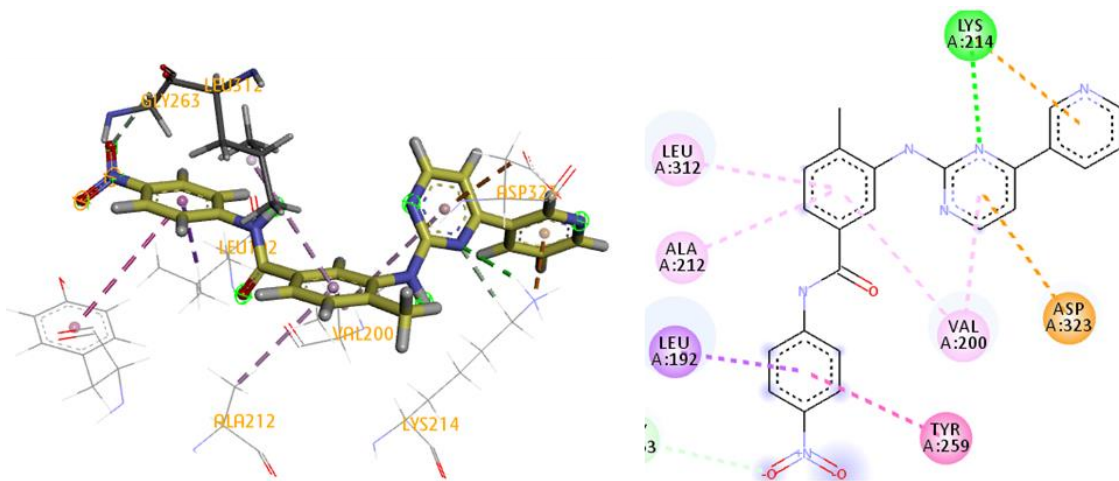
Σχήμα 69: Στα αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-3-CF₃-5-NH₂* στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης *C-Src*, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων.



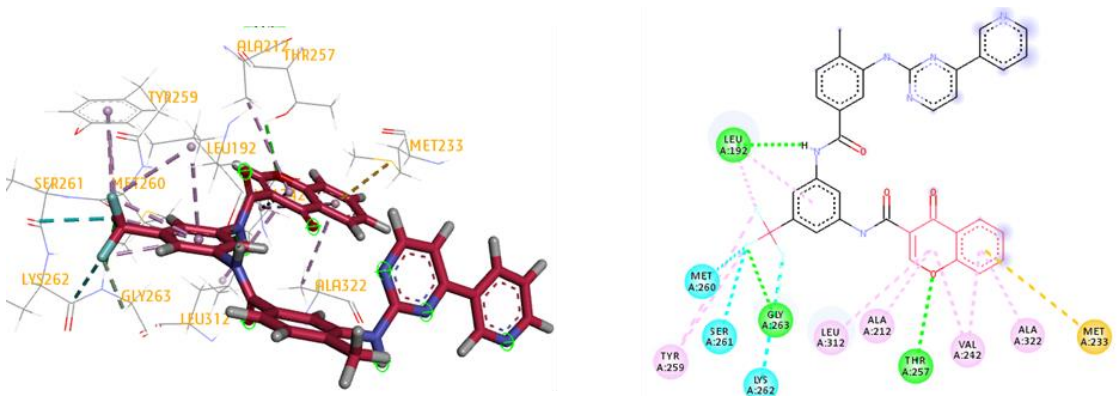
Σχήμα 70: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου N-V-3-Cl στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης c-Src, ενώ δεξιά απεικονίζεται παρουσιάζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων.



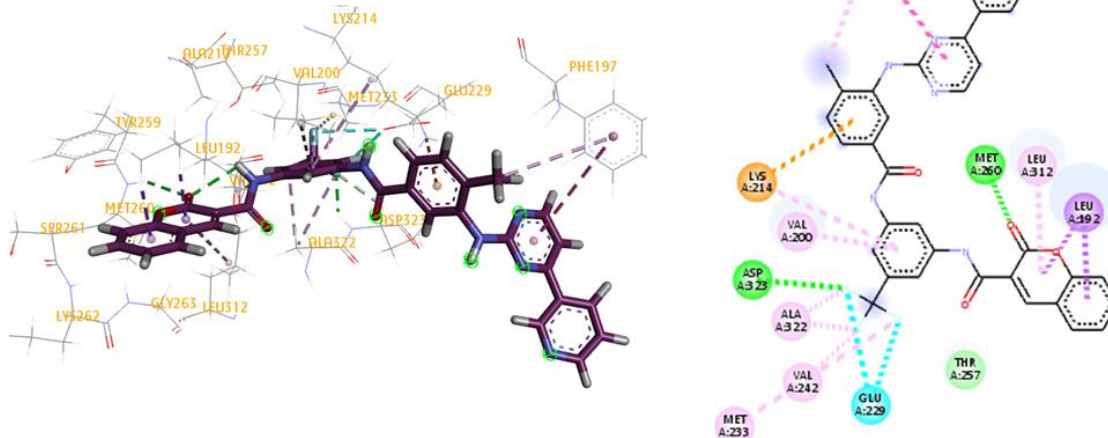
Σχήμα 71: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου N-V-4-CF₃ στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης c-Src, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων.



Σχήμα 72: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-4-NO₂* στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης *c-Src*, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων. Παρατηρούμε ότι οι τροποποιήσεις στην θέση 4 του τελικού βενζολικού δακτυλίου δεν εμφανίζουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.



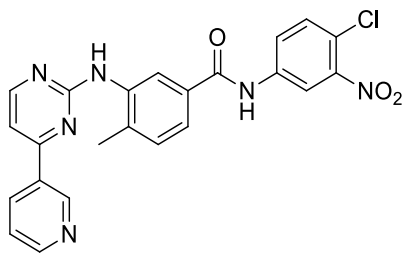
Σχήμα 73: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου *N-V-3-CF₃-Chrom* στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης *c-Src*, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων. Παρόλο που αναπτύσσονται πολλές αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της *c-Src* κινάσης, ένα μέρος του αναστολέα βγαίνει εκτός του ενεργού κέντρου, καθώς οι δύο δακτύλιοι της χρωμόνης αυξάνουν το μήκος του μορίου.



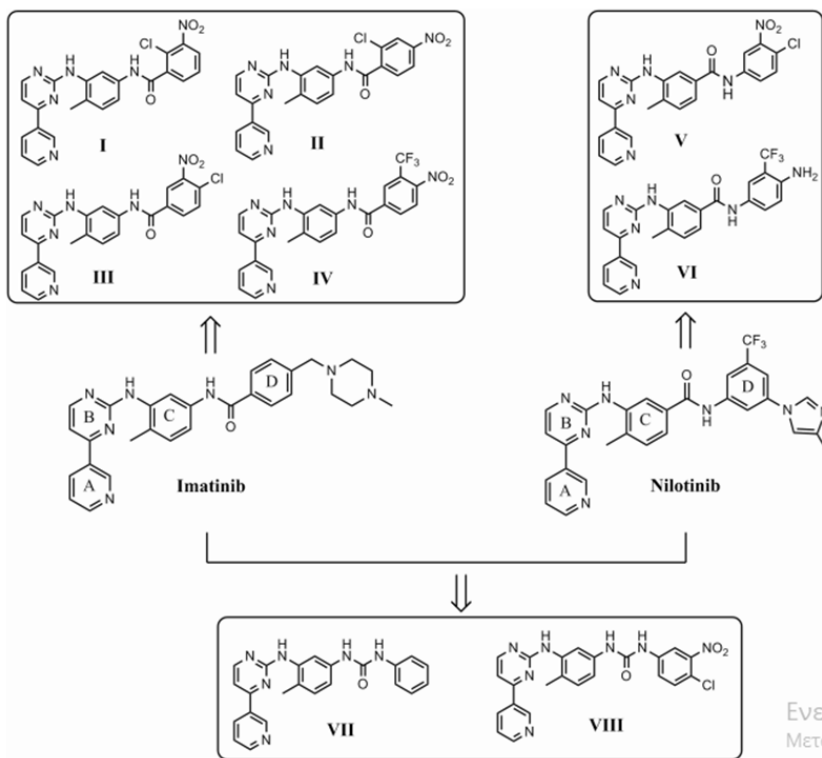
Σχήμα 74: Αριστερά απεικονίζεται η τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου N-V-3-CF₃-Coum στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης c-Src, ενώ δεξιά απεικονίζεται το διάγραμμα δύο διαστάσεων. Παρόλο καταγράφονται πλούσιες αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, ένα μέρος του αναστολέα βγαίνει εκτός του ενεργού κέντρου, καθώς οι δύο δακτύλιοι της κουμαρίνης αυξάνουν το μήκος του μορίου.

3.13 Βιολογικά αποτελέσματα των νέων εν δυνάμει αναστολέων, αναλόγων του Nilotinib και Imatinib με αντιθρομβωτική δράση

Βασιζόμενοι σε μια βελτιωμένη προσέγγιση σύνθεσης αναλόγων του Imatinib και Nilotinib ^[192α] που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο και προσφάτως δημοσιεύτηκε σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέοι εν δυνάμει αναστολείς μετά από στοχευμένες τροποποιήσεις στη μοριακή αρχιτεκτονική τους. Στο σχήμα 75 αποτυπώνονται τα νέα ανάλογα της Νιλοτινίβης και Ιματινίβης που ελέγχθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση στη συσσώρευση αιμοπεταλίων και στην έκφραση της Σελεκτίνης P υπό την επίδραση αραχιδονικού οξέος, διφωσφορικής αδενοσίνης και ενός υποδοχέα θρομβίνης (TRAP-6).^[193] Τα αποτελέσματα των διενεργηθέντων βιολογικών πειραμάτων δημοσιεύτηκαν πρόσφατα ^[193] και είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί πως τα νέα ανάλογα εκδήλωσαν μια βελτιωμένη ανασταλτική δράση εν συγκρίσει με την αντιθρομβωτική δράση που κατέδειξε το Imatinib. Το ανάλογο V του Nilotinib κατέδειξε εννιά φορές υψηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με το Nilotinib. Η ένωση V (N-V-3-NO₂-4-Cl, **17**) θα μπορούσε να αποτελέσει ένωση οδηγό στην περαιτέρω ανάπτυξη και σύνθεση νέων αναλόγων που θα καταδεικνύουν βελτιωμένες αντιθρομβωτικές ιδιότητες.



N-V-3NO₂-4-Cl

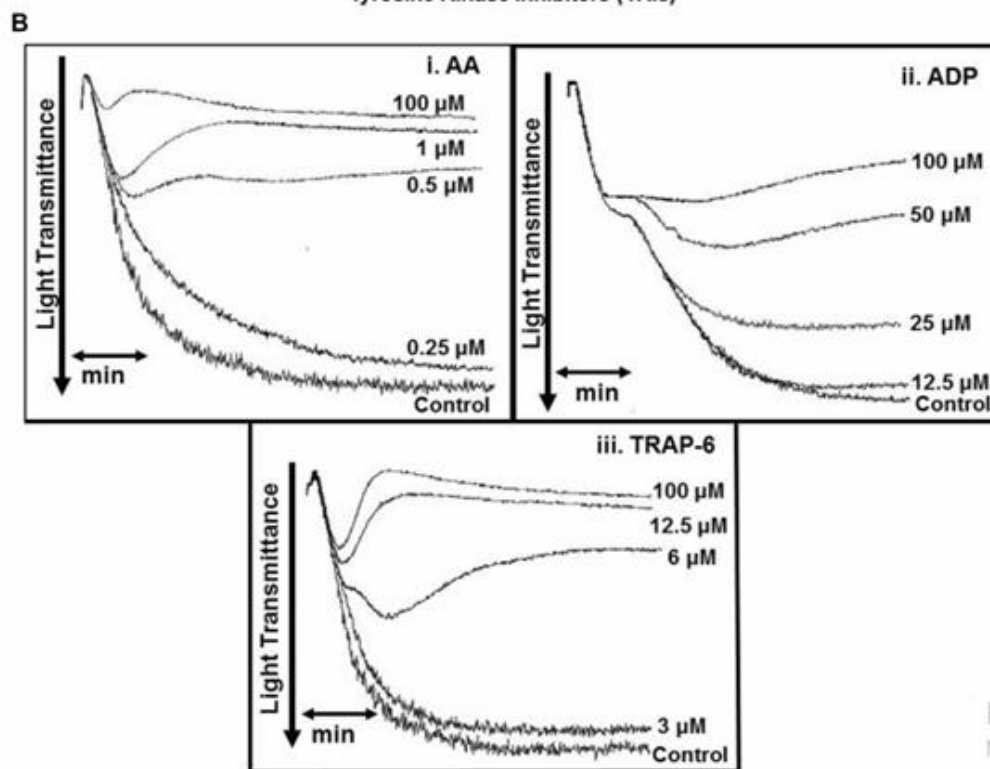
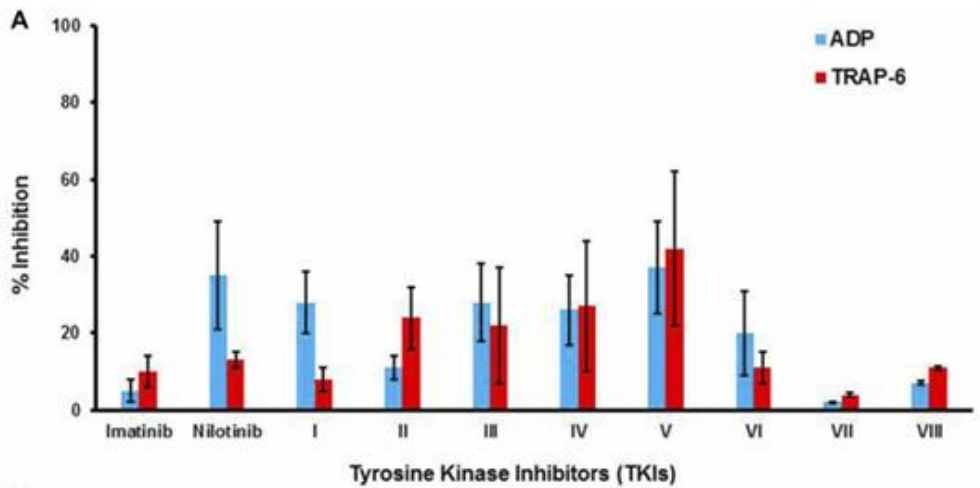


Σχήμα 75: Τροποποιήσεις σε ανάλογα της Ιματινίβης και Νιλοτινίβης. Πάνω σχήμα αριστερά: Εξάλειψη του πιπεραζινικού δακτυλίου στο *Imatinib*, οι τροποποιήσεις έγιναν στον τελικό βενζολικό δακτύλιο, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα (I-IV). Πάνω σχήμα δεξιά: Εξάλειψη του μιδαζολικού δακτυλίου στο *Nilotinib*, οι τροποποιήσεις έγιναν στον τελικό βενζολικό δακτύλιο, όπως παρουσιάζεται στο σχήμα (V,VI). Κάτω σχήμα: Οι δομές των αναλόγων του *Imatinib* και *Nilotinib* με αντικατάσταση του αμιδικού δεσμού από το δεσμό της ουρίας. (VII,VIII).^[193]

Πίνακας 2 Η ανασταλτική δράση του Imatinib, Nilotinib και των συνθετικών αναλόγων του σε συσσωρευμένα αιμοπετάλια με την επίδραση αραχιδονικού οξέος (AA).

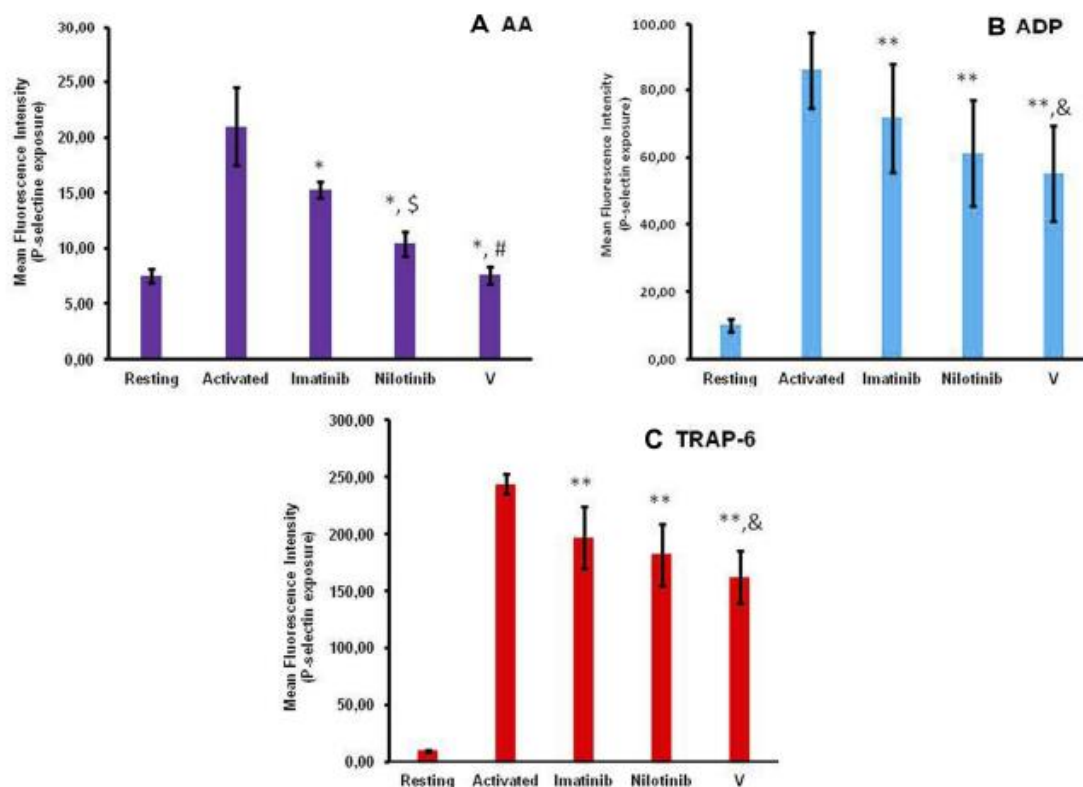
Αναστολείς Τυροσινικών IC50 (μ M) (5 min επώαση) IC50 (μ M) (1 min επώαση) κινασών

Imatinib	13.30	21.71
I	4.30	n.d.
II	6.88	n.d.
III	30.39	n.d.
IV	23.77	n.d.
Nilotinib	3.91	11.75
V	0.41	2.94
VI	4.67	n.d.
VII	31.90	n.d.
VIII	3.47	n.d.



Ενεργς
Μετάβας
των Win

Σχήμα 76: Α) Ραβδόγραμμα που απεικονίζει την % αναστολή που προκαλείται από το *Imatinib*, *Nilotinib* και των συνθετικών αναλόγων τους (σε συγκέντρωση των 100 Μμ) σε συσσωρευμένα αιμοπετάλια από *ADP* και *TRAP-6*. Β) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες συσσώρευσης που απεικονίζουν την ανασταλτική δράση της ένωσης V σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε συσσωρευμένα αιμοπετάλια από i) AA, ii) *ADP*, iii) *TRAP-6*.^[193]



Σχήμα 77: Απεικόνιση ραβδογράμματος των αποτελεσμάτων του Imatinib, Nilotinib και του συνθετικού αναλόγου V στην έκφραση της Σελεκτίνης P υπό την επίδραση αγωνιστών α) Αραχιδονικού οξέος (AA), β) διφωσφορικής αδενοσίνης (ADP) γ) υποδοχέα της θρομβίνης (TRAP-6). Τα αιμοπετάλια επισημάνθηκαν με αντιμονοκλωνικό αντίσωμα και αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής προκειμένου να καθοριστεί η έκφραση της P σελεκτίνης σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.^[193] Τα Imatinib, nilotinib και η ένωση V χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση των 100μΜ

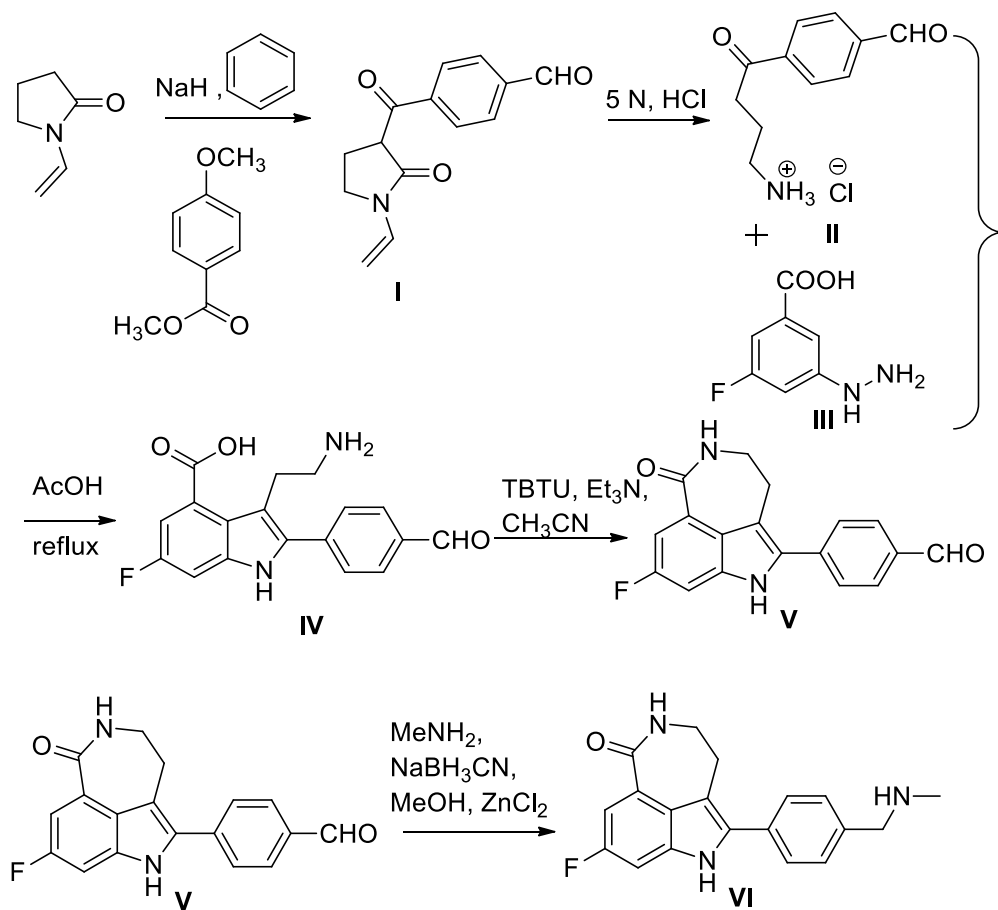
3.14 Εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος του Rucaparib

Η σύνθεση του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib αποτέλεσε πρόκληση για το ερευνητικό μας εργαστήριο, καθώς οι προτεινόμενες συνθετικές πορείες συνίστανται από πολλά στάδια, χαμηλές αποδόσεις, τον περαιτέρω σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, υψηλό κόστος, και αυξημένο χρόνο εργασίας. Πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για τη χημεία του ινδολίου, δεδομένου ότι η δομή του απαντάται σε πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα και φυσικά προϊόντα και εστίασαμε την προσοχή μας σε εκείνες τις πειραματικές πορείες με υψηλές αποδόσεις των ενδιάμεσων σταδίων και χρήση φθηνών αντιδραστηρίων. Ως απόρροια ενδελεχούς μελέτης της βιβλιογραφίας, σχεδιάσαμε επί χάρτου κάποιες συνθετικές πορείες για το σχηματισμό του Rucaparib, ουσιαστικά πραγματοποιήθηκε ένας καινοτόμος συνδυασμός σταδίων για τη σύνθεση της επιθυμητής τελικής ένωσης, λαμβάνοντας υπόψη όλα

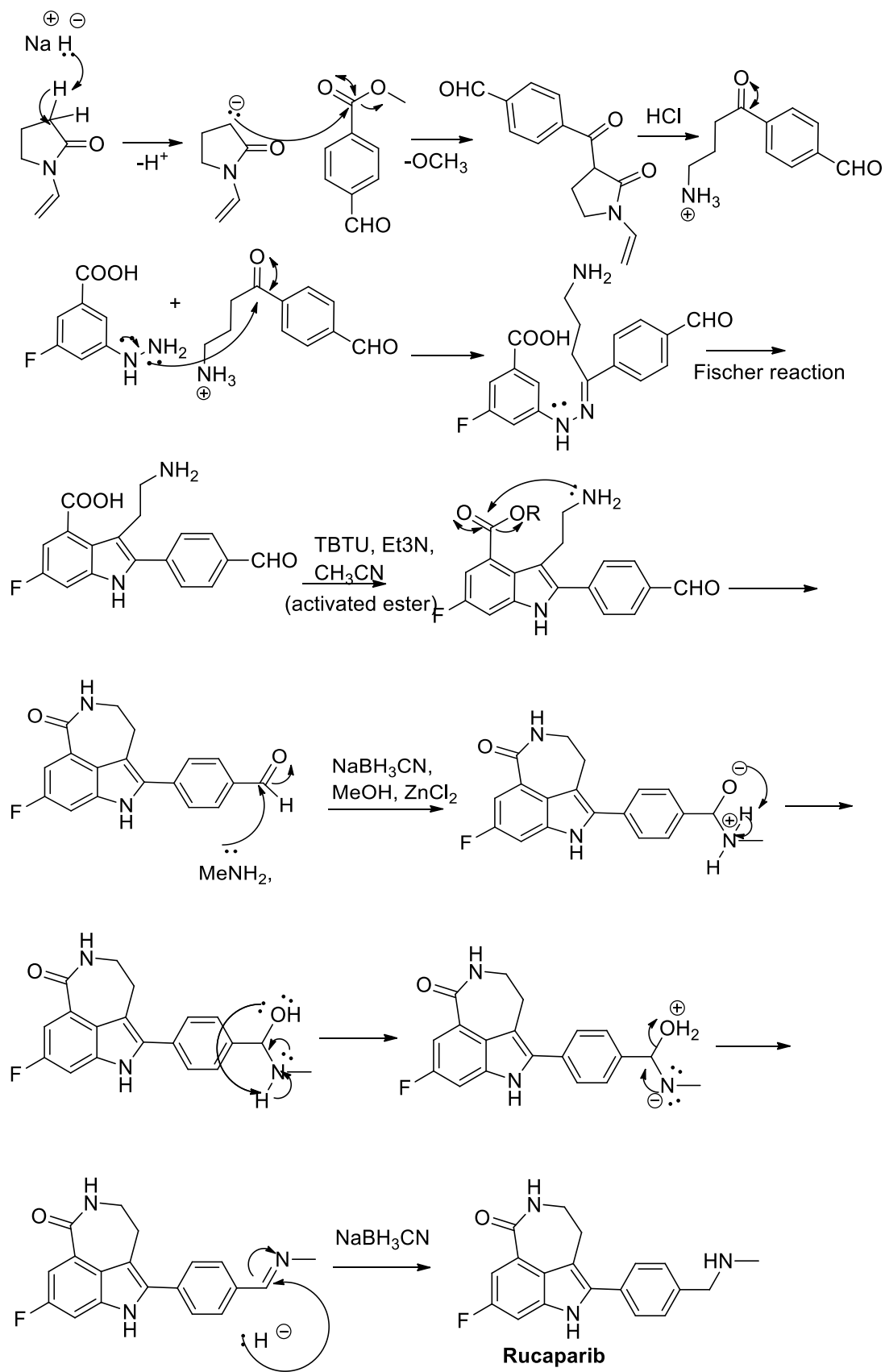
τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Παρακάτω παρατίθενται οι προτεινόμενες συνθετικές πορείες που σχεδιάστηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο. Το ερευνητικό μας ενδιαφέρον στράφηκε κυρίως προς την συνθετική πορεία που αποτυπώνεται παρακάτω στο σχήμα 81, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη πορεία δεν απαιτούσε το σχηματισμό του ινδολίου με συνέπεια τη μείωση χρόνου εργασίας και την εξοικονόμηση αντιδραστηρίων.

3.14.1 1^η σχεδιασθείσα εναλλακτική πορεία σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib

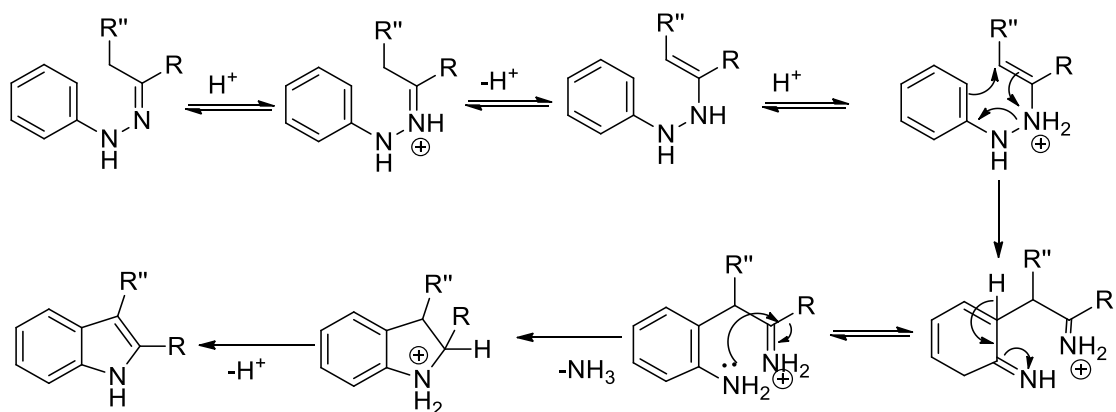
Η κάτωθι εναλλακτική πορεία σύνθεσης ξεκινάει με την προσθήκη μιας ισχυρής βάσης όπως, είναι το υδρίδιο του νατρίου (NaH) στην ένωση 1-βινυλοπυρρολιδιν-2-όνη, όπου η βάση αποσπά το όξινο πρωτόνιο σε α-θέση ως προς την καρβονυλομάδα, σχηματίζοντας ένα σταθερό ενολικό ανιόν. Το προκύπτον ενολικό ανιόν ως πυρηνόφιλο προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα (C=O) του μεθυλεστέρα του 4-φορμυλοβενζοϊκού οξέος, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο, το οποίο με την αποβολή της μεθοξυομάδας δίνει την ένωση I μέσω μιας συμπύκνωσης Claisen. En συνεχεία, με επίδραση υδατικού διαλύματος HCl, η ένωση I υφίστανται διάνοση του πενταμελούς διακτυλίου της 1-βινυλοπυρρολιδιν-2-όνης, δίνοντας την ενδιάμεση ένωση II, η οποία αντιδρά με το (3-φθορο-5-υδραζινυλο-βενζοϊκό οξύ) (III) παρουσία οξικού οξέος μέσω μιας κλασικής αντίδρασης κατά Fischer. Στη συγκεκριμένη αντίδραση η υποκατεστημένη φαινυλδραζίνη παρουσία οξικού οξέος αντιδρά με τον καρβονυλικό άνθρακα της ένωσης II σχηματίζοντας μια φαινυλδραζόνη που υφίσταται μια ισομερείωση προς την αντίστοιχη εναμίνη. Μετά από την πρωτονίωση, μια {3,3} σιγματροπική αναδιάταξη συμβαίνει με αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας αμίνης, η οποία σχηματίζει μια κυκλική αμινοακετάλη. Με την επίδραση οξέος απελευθερώνεται NH₃, σχηματίζοντας το σταθερό ινδολικό αρωματικό δακτύλιο που ευνοείται θερμοδυναμικά (σχήμα 79). Η ένωση IV που προκύπτει υπό την επίδραση κάποιου αντιδραστηρίου ενεργοποίησης και μιας ήπιας βάσης σχηματίζει ένα ενεργοποιημένο εστέρα που προσβάλλεται από την αμινομάδα μέσω μιας πυρηνόφιλης ακυλοποκατάστασης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός επταμελούς δακτυλίου καπρολακτάμης ένωση V. Τέλος, μέσω μιας αντίδρασης αναγωγικής αμίνωσης η αλδεϋδομάδα υπό την επίδραση μεθυλαμίνης παράγει μια ενδιάμεση εναμίνη, η οποία μέσω πρωτονίωσης δίνει ένα ιμινικό κατιόν που αντιδρά με ένα αναγωγικό αντιδραστήριο (κυανοβοροϋδρίδιο του νατρίου) και σχηματίζει την επιθυμητή τελική ένωση VI. Η συνθετική πορεία/μηχανισμός της ως άνω περιγραφθείσας συνθετικής πορείας αποτυπώνεται συνολικά στο σχήμα 78 (α και β).



Σχήμα 78α: 1^η σχεδιασθείσα προσέγγιση του φαρμακευτικού σκευάσματος του *Riscararib*



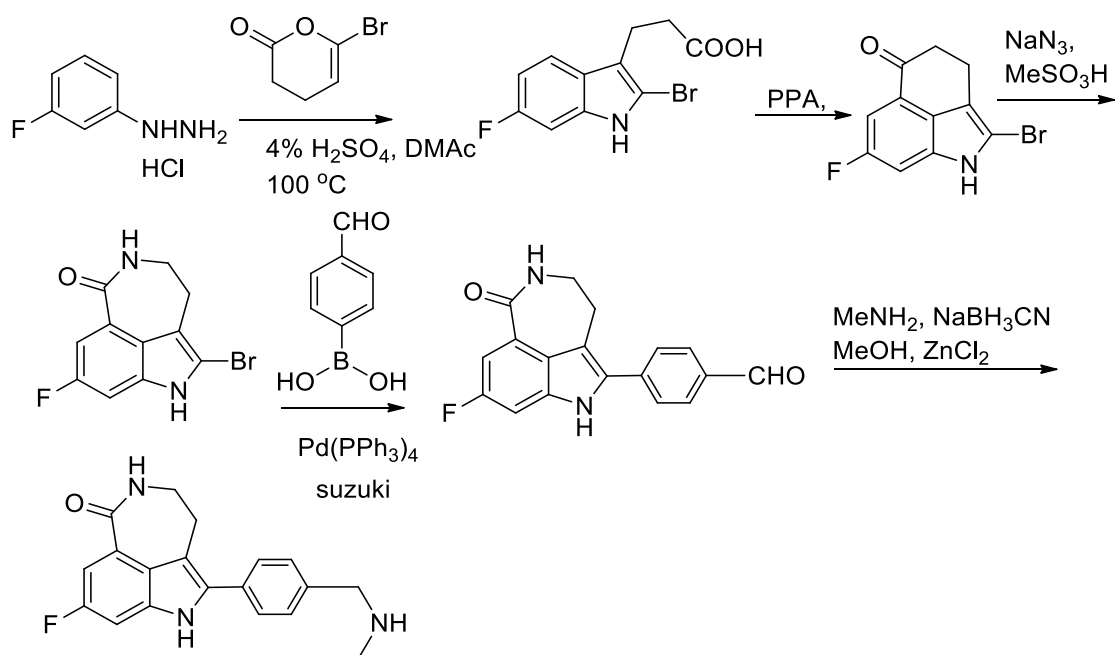
Σχήμα 78β: Μηχανισμός σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος του Rucaparib σύμφωνα με την 1^η σχεδιασθείσα εναλλακτική.



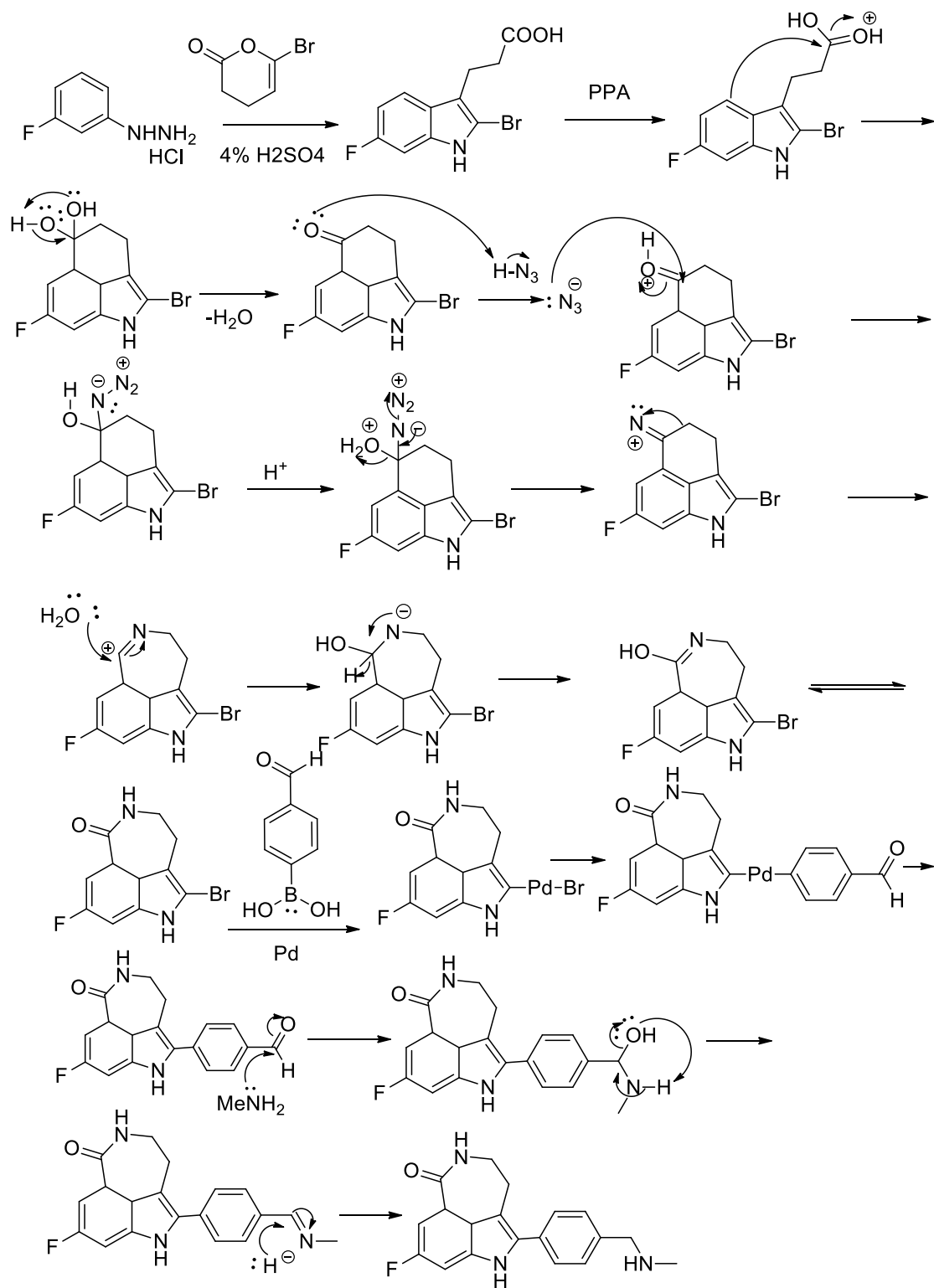
Σχήμα 79: Μηχανισμός σύνθεσης του ινδολίου κατά Fischer

3.14.2 2^η σχεδιασθείσα εναλλακτική πορεία σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib

Η αντίδραση μεταξύ μιας φαινυλνυδραζίνης και μιας κυκλικής ενολικής λακτόνης, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο σχήμα 80α, βασίζεται στην προσέγγιση που εισήχθη από τον Camrus και άλλους συνεργάτες του.^[197] Βάσει της διερεύνησης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, η ως άνω περιγραφόμενη αντίδραση αποτέλεσε το πρώτο βήμα στη συνθετική πορεία που προτάθηκε από το ερευνητικό μας εργαστήριο. Πρόκειται για μια αντίδραση κατά την οποία εικάζεται ότι συμβαίνει σε ένα στάδιο ο σχηματισμός της υδραζόνης από την αντίστοιχη υδραζίνη και μια {3,3} αναδιάταξη με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός υποκατεστημένου ινδολικού δακτυλίου στην C-2 και C-3 θέση ως προς το ετεροάτομο (N) του ινδολικού δακτυλίου. Ακολούθησε μια αντίδραση ενδομοριακής αντίδρασης κατά Friedel Crafts (κυκλοαφυδάτωση) με ένα καταλύτη οξύ κατά Lewis, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπυκνωμένου πενταμελούς δακτυλίου κετόνης (α-τετραλόνη) με τον ινδολικό δακτύλιο. Εν συνεχεία, με την επίδραση αζιδίου του νατρίου και τη χρήση ενός οξέος λαμβάνει χώρα μια αντίδραση Schmidt, μια αντίδραση που προσομοιάζει την αναδιάταξη κατά Curtius προς σχηματισμό του κυκλικού επταμελούς δακτυλίου λακτάμης (καπρολακτάμη). Το σχηματιζόμενο κυκλικό αμίδιο μετέπειτα, αντιδρά με το φορμυλοβορονικό οξύ σε μια αντίδραση Suzuki, δίνοντας την ενδιάμεση ένωση κλειδί, που ενσωματώνει δομικά φορμυλοβενζυλομάδα στην C-2 θέση του ινδολικού δακτυλίου. Τέλος, η εν λόγω ενδιάμεση ένωση αντιδρά με την μεθυλαμίνη σχηματίζοντας μια εναμίνη, η οποία πρωτονιώνεται, παράγοντας ένα ιμινικό κατιόν. Η επίδραση ενός αναγωγικού μέσου στο ιμινικό κατιόν παρέχει την τελική δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος του Rucaparib. Στο σχήμα 80 α αποτυπώνεται η συνολική προτεινόμενη συνθετική πορεία, καθώς στο σχήμα 80 β ο μηχανισμός της.



Σχήμα 80α: 2^η σχεδιασθείσα εναλλακτική ολική συνθετική πορεία που προτάθηκε από το ερευνητικό εργαστήριο στη σύνθεση του Ruscagarib.



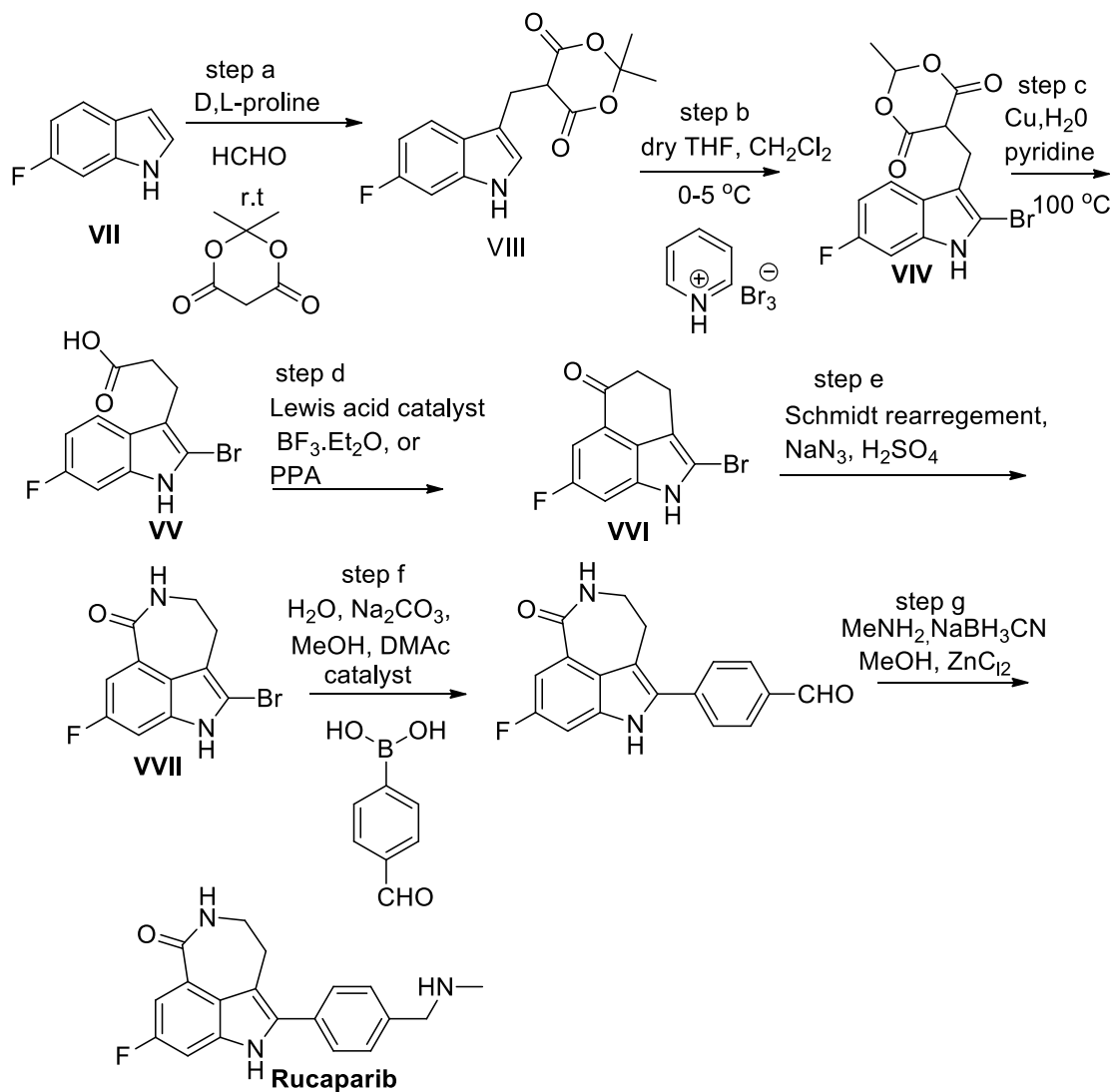
Σχήμα 80β: 2^η σχεδιασθείσα εναλλακτική ολική συνθετική πορεία που προτάθηκε από το ερευνητικό μας εργαστήριο στη σύνθεση του Rucaparib

3.14.3 3^η σχεδιασθείσα εναλλακτική πορεία σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib

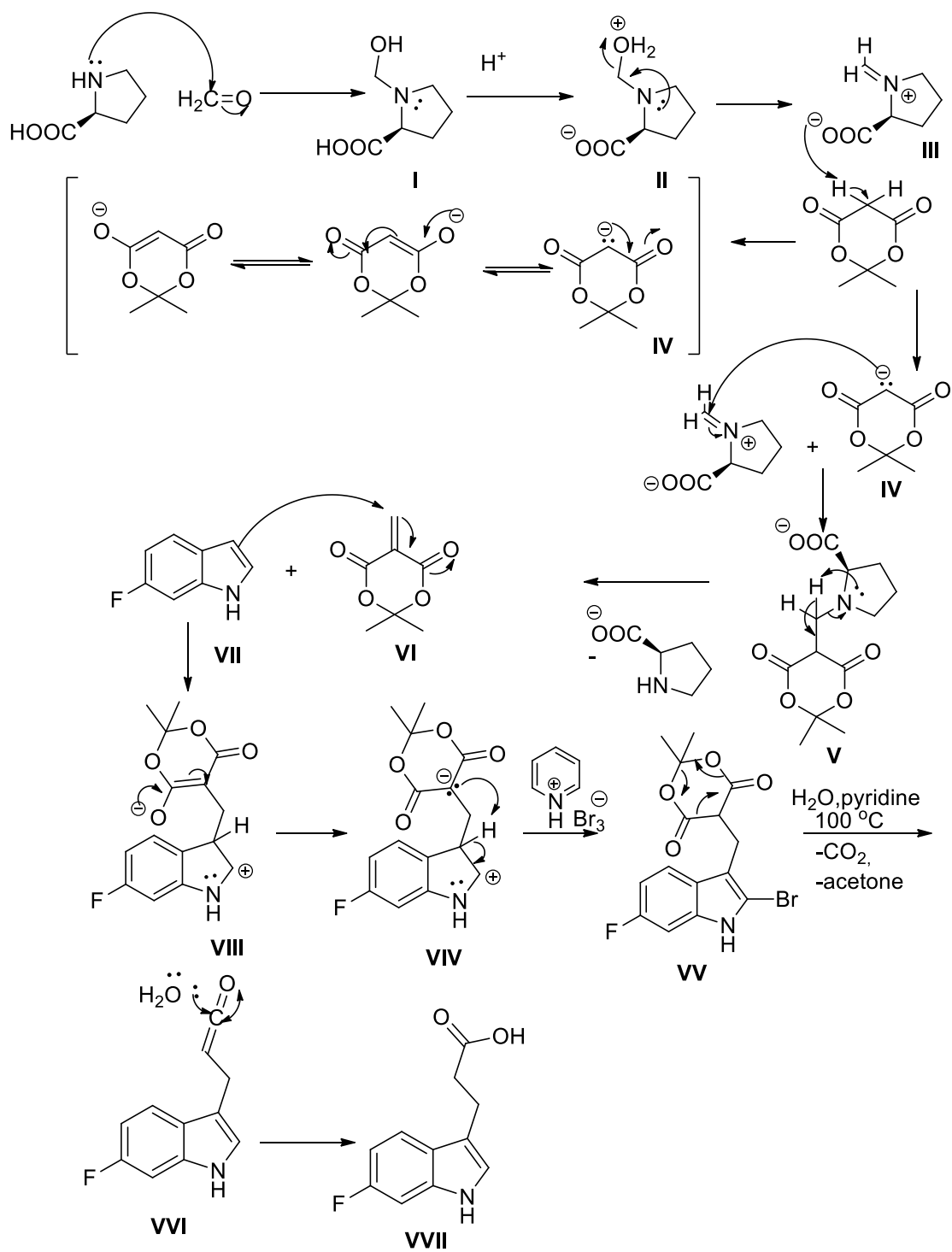
Όπως περιγράφηκε παραπάνω οι προτεινόμενες συνθετικές πορείες που προτάθηκαν και κατοχυρώθηκαν από τις εταιρίες Pzifer και Clovis Oncology χαρακτηρίζονται από πολλά στάδια σύνθεσης και χαμηλές αποδόσεις, δεδομένου ότι στις εν λόγω πορείες απαιτείται η σύνθεση του ινδολίου. Ως αποτέλεσμα της διερεύνησης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας στο ερευνητικό μας εργαστήριο σχεδιάσαμε και προτείναμε μια καινοτόμα ολική σύνθεση του Rucaparib, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο σχήμα 81. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η συγκεκριμένη πορεία σύνθεσης αποτέλεσε τον οδηγό για τη σύνθεση του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος και σε αυτή επικεντρώθηκε το ερευνητικό ενδιαφέρον.

Το πρώτο στάδιο σύνθεσης αποτέλεσε μια αντίδραση Yonemitsu, πολλών συστατικών σε ένα στάδιο, MCR: (multicomponent reaction). Το εμπορικά διαθέσιμο 6-φθορο-ινδόλιο αντιδρά με τη φορμαλδεΰδη και το οξύ του Meldrum (2,2-διμεθυλο-1,3-διοξάνιο-4,6-διόνη με την επίδραση D ή L προλίνης ως καταλύτη. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το οξύ του Meldrum, μπορεί εύκολα να απωλέσει ένα πρωτόνιο ευρισκόμενο ανάμεσα από τους δύο καρβονυλικούς άνθρακες, καθώς το ανιόν που προκύπτει απεντοπίζει το αρνητικό φορτίο και σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού μεταξύ των δύο καρβονυλικών ανθράκων. Αρχικά, η φορμαλδεΰδη σχηματίζει ένα κατιονικό/ανιονικό, άλας-συμπλόκου με την προλίνη, το οποίο προσβάλλεται από το ενολικό ιόν του οξέος του Meldrum, δίνοντας ένα ενδιάμεσο (III), το οποίο αποβάλλει ένα μόριο προλίνης και σχηματίζει την α, β-ακόρεστη καρβονυλική ένωση (VI) δέκτη Michael (σχήμα 82). Εν συνεχεία, το 6-φθορο ινδόλιο (VII) λειτουργεί ως δότης κατά Michael και το π ζεύγος του ινδολικού δακτυλίου προσβάλλει τον β-άνθρακα ως προς το καρβονύλιο της ενδιάμεσης ένωσης (VI), με αποτέλεσμα το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος (VV) ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης στην πλέον δραστική θέση C-3 άνθρακα του ινδολικού δακτυλίου. Μετέπειτα στάδιο αποτελεί η κατεργασία της ενδιάμεσης ένωσης (VIV) με ένα ήπιο αντιδραστήριο βρωμίωσης (τριβρωμιούχο άλας της πυριδίνης) σε χαμηλή θερμοκρασία με αποτέλεσμα την υποκατάσταση του Br στην C-2 θέση του ινδολικού δακτυλίου. Η ένωση VV με επίδραση υδατικού διαλύματος πυριδίνης με θέρμανση υφίσταται διάνοιξη και αποκαρβοξυλίωση, δίνοντας μια δραστική ενδιάμεση ένωση VVI (κετένη), η οποία με περαιτέρω πυρηνόφιλη προσβολή του H₂O στο διπλό δεσμό του δεσμού άνθρακα άνθρακα της κετένης, δίνει την επιθυμητή ένωση (VVII) σύμφωνα με το μηχανισμό που αποτυπώνεται στο σχήμα 82. Το εν λόγω στάδιο απέδωσε σε επιθυμητή απόδοση το προϊόν της διάνοιξης και αποκαρβοξυλίωσης του οξέος Meldrum, με αποτέλεσμα να επινοήσουμε μια επιπλέον εναλλακτική για το εν λόγω

στάδιο με απώτερο στόχο την αύξηση της απόδοσης του συγκεκριμένου βήματος, που θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω. Τα επόμενα στάδια της εν λόγω προτεινόμενης πειραματικής πορείας, καθώς και ο μηχανισμός τους έχουν περιγραφεί αναλυτικά στις προηγούμενες εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του Rucaparib.



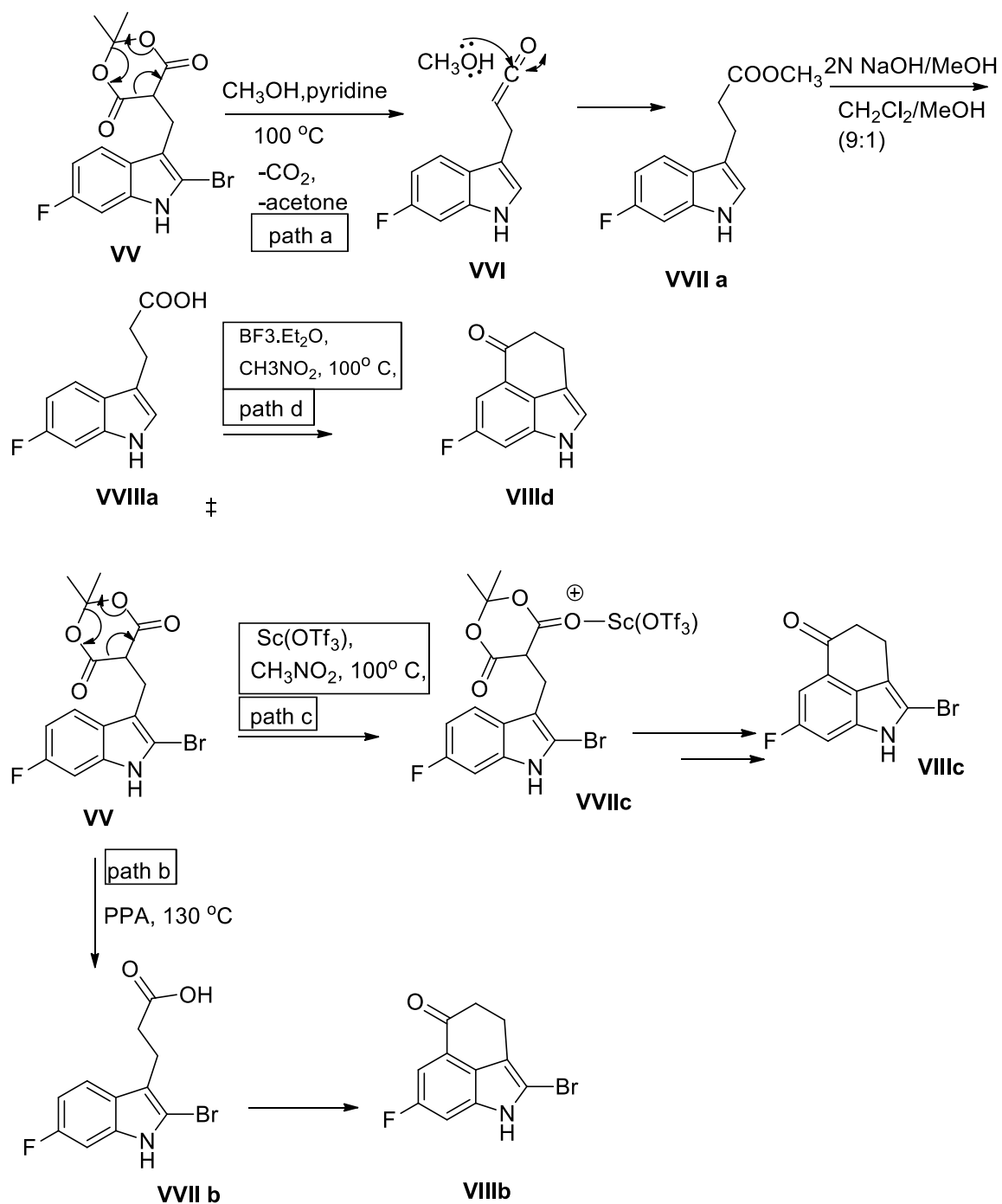
Σχήμα 81: Η 3^η σχεδιασθείσα εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Rucaparib που σχεδιάστηκε και ακολουθήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο



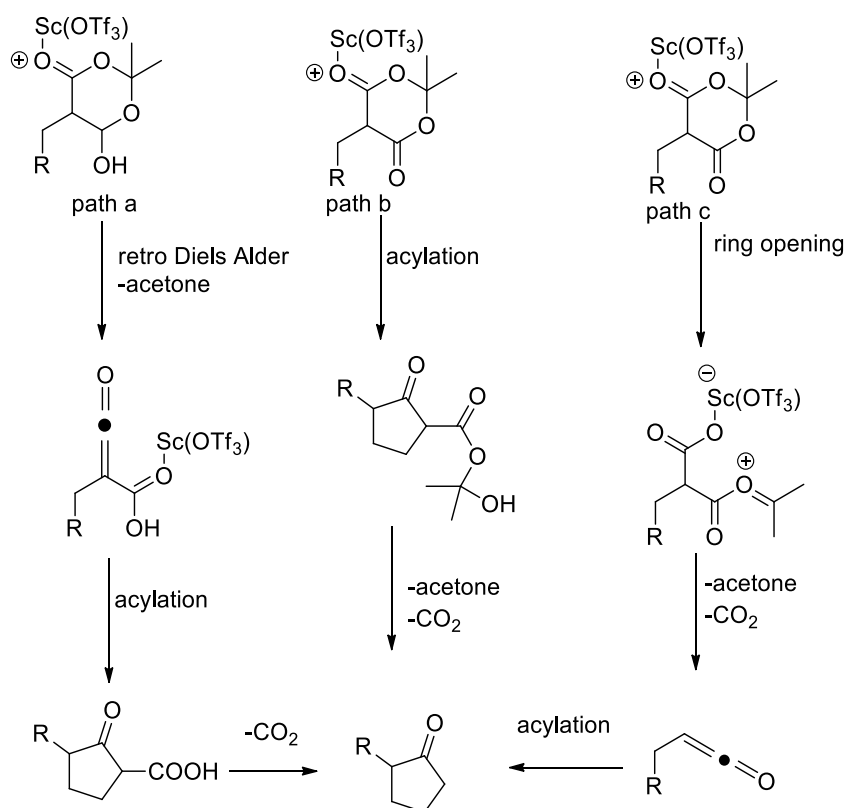
Σχήμα 82: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης VVII

3.14.4 Βελτιστοποίηση/Τροποποίηση του σταδίου διάνοιξης και αποκαρβοξυλίωσης του οξέος Meldrum-στάδιο c

Με στόχο τη βελτιστοποίηση του σταδίου αυτού και αύξηση της απόδοσης, επινοήσαμε 4 εναλλακτικά μονοπάτια-στάδια διάνοιξης και αποκαρβοξυλίωσης της ενδιάμεσης ένωσης VV. Στο σχήμα 83 αποτυπώνονται οι τέσσερις εναλλακτικές πορείες με απώτερο στόχο τη σύνθεση και απομόνωση της επιθυμητής ενδιάμεσης ένωσης κλειδί VIII, ο μηχανισμός και οι συνθήκες των οποίων θα περιγραφθούν αναλυτικά στη συνέχεια. Το πρώτο μονοπάτι περιλαμβάνει κατεργασία της ενδιάμεσης ένωσης VV, με την επίδραση στοιχειακού χαλκού ως καταλύτη, απόλυτης μεθανόλης και πυριδίνης, δίνοντας το προϊόν διάνοιξης/αποκαρβοξυλίωσης VVIIa. Ακολουθεί βασική υδρόλυση της ένωσης με 2 N μεθανολικό διάλυμα καυστικού νατρίου, με τη μέθοδο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο, παραλαμβάνοντας ποσοτικά (100%) το αντίστοιχο οξύ VVIIIa. Εν συνεχεία, με την επίδραση ενός οξέος κατά Lewis, δυνητικά θα μπορούσε να λάβει χώρα μια ενδομοριακή κυκλοποίηση κατά Friedel Crafts, προς σχηματισμό της ένωσης VIIIId. Η δεύτερη εναλλακτική περιλαμβάνει αντίδραση της ένωσης VV με πολυφωσφορικό οξύ προς σχηματισμό του οξέος ενεργοποίηση της καρβονυλομάδας και προσβολή από το π ζεύγος του βενζολικού δακτυλίου. Σε ένα στάδιο δυνητικά θα μπορούσε να λάβει χώρα κυκλοαφυδάτωση με το σχηματισμό της ένωσης VIIIf. Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει τη προσθήκη τριφλικού σκανδίου, ως καταλύτη, σε διαλύτη νιτρομεθάνιο με το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου συμπλόκου της ένωσης VVIIf, κατά το οποίο αλληλεπιδρούν τα τροχιακά του οξυγόνου του καρβονυλίου του οξέος Meldrum με το σκάνδιο. Έπειτα, πιθανολογώντας θα μπορούσε να σχηματιστεί η επιθυμητή ενδιάμεση ένωση κλειδί VIIIc, ως απόρροια μιας ενδομοριακής κυκλοποίησης με την ταυτόχρονη αποβολή ενός μορίου H₂O. Ο πιθανός μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης VIIIc αποτυπώνεται στο σχήμα 84 μέσω τριών μηχανιστικών μονοπατιών.



Σχήμα 83: Οι προτεινόμενες εναλλακτικές πορείες σύνθεσης της επιθυμητής ένωσης «κλειδιού» VIII που προτάθηκαν στο ερευνητικό μας εργαστήριο.

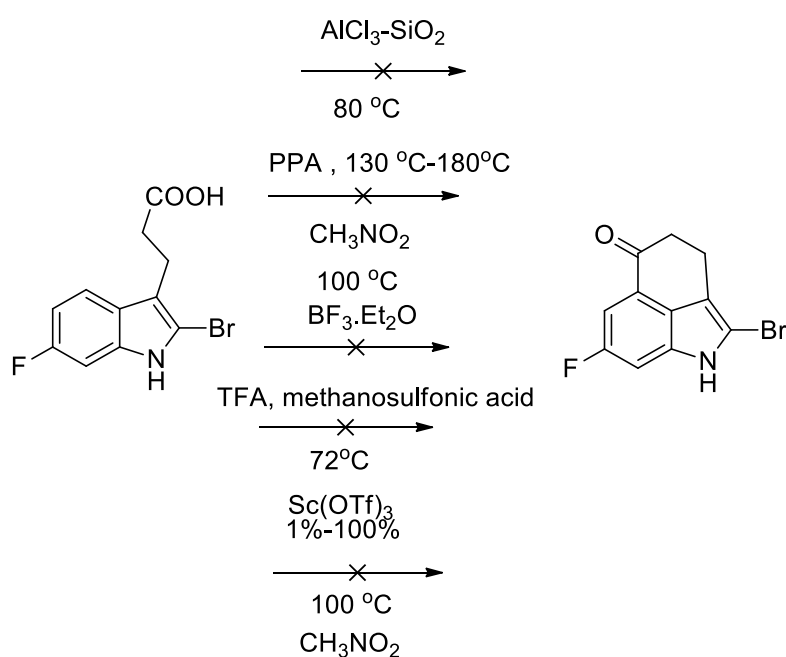


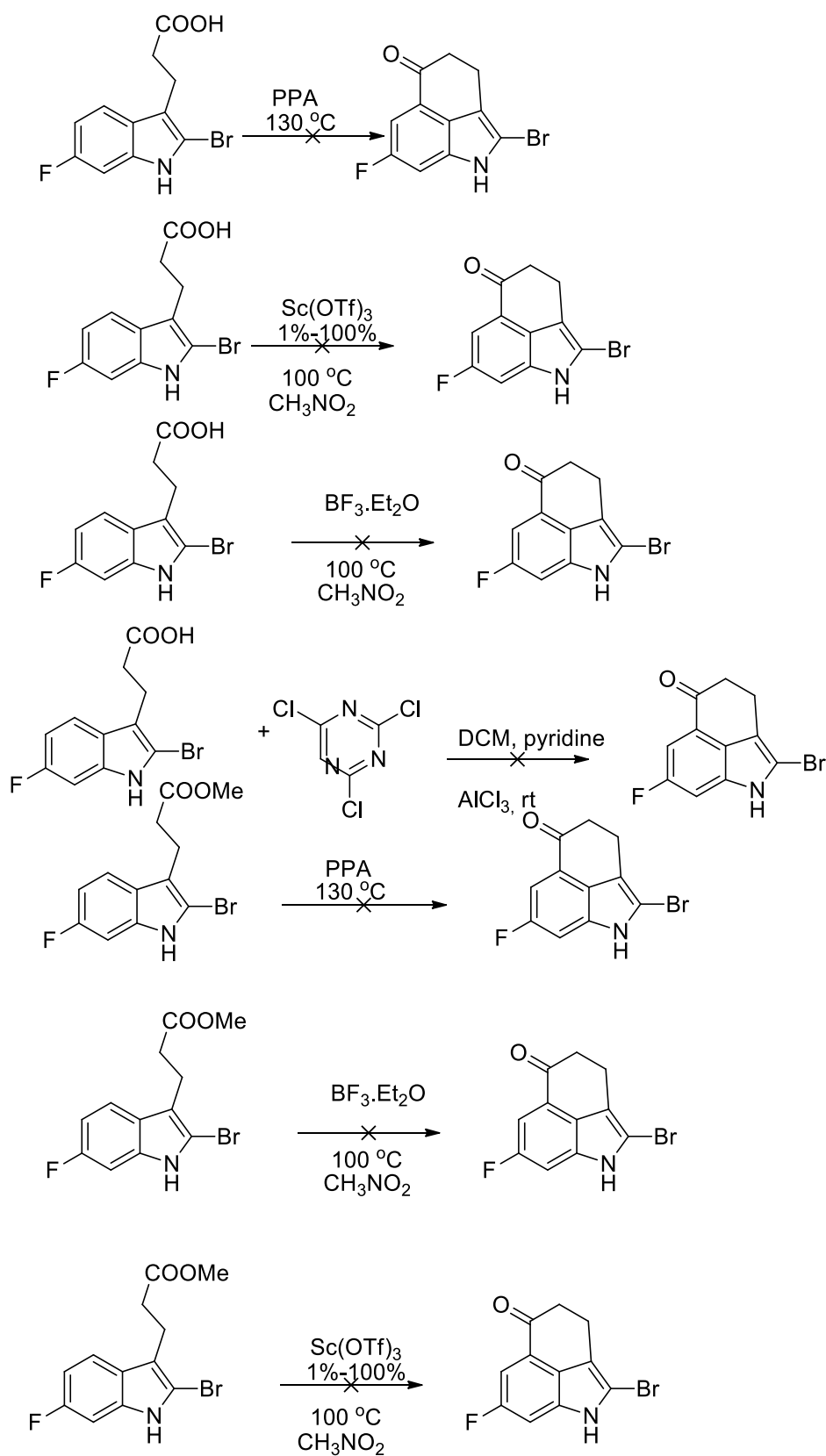
Σχήμα 84: Οι τρεις μηχανισμοί σύνθεσης της κυκλοπεντανόνης, καταλυόμενης από τριφλικό स्कάνδιο μέσω τριών προτεινόμενων μηχανιστικών μονοπατιών ^[198]

3.15 Προκλήσεις προβλήματα στο στάδιο ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel-Crafts

Όπως αναλύθηκε στην υποενότητα 3.14 προτάθηκαν διάφορες εναλλακτικές συνθετικές πορείες σύνθεσης της ενδιάμεσης ένωσης VIII, που θα αποτελούσε την πρόδρομη ένωση «κλεδί» για την μετέπειτα ολική συνθετική πορεία. Στο ερευνητικό εργαστήριο, διενεργήθηκαν πολλά και παράλληλα πειράματα απόρροια των τεσσάρων εναλλακτικών πορειών σύνθεσης που απεικονίζονται στο σχήμα 85 και καταλήγουν στην ίδια επιθυμητή τρικυκλική ενδιάμεση ένωση VIII, ήτοι ένα συμπυκνωμένο παράγωγο τετραλόνης με ινδολικό δακτύλιο. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μετά από αλληπάλληλα και πολυάριθμα πειράματα παρατηρήθηκε πως υπήρχε δυσκολία σύνθεσης και απομόνωσης της ένωσης VIII και στα τέσσερα προτεινόμενα συνθετικά μονοπάτια. Ως συνέπεια αυτής της αδυναμίας, δοκιμάστηκαν πολλές και διαφορετικές συνθήκες, μεταβάλλοντας καταλύτες, αναλογίες αντιδραστηρίων, διαλύτες και θερμοκρασία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, απομονώθηκαν ανεπιθύμητα-παραπροϊόντα ως κυρίαρχα και δεν επιτεύχθη η απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, πέραν από μία περίπτωση αντίδρασης, όπου σχηματίστηκε, όμως δεν καταφέραμε να την απομονώσουμε σε καθαρή

μορφή, δεδομένου ότι οι δοκιμαστικές αντιδράσεις ήταν μικρής κλίμακας (microscale) με εύρος τιμών από 50 έως 100 mg. Η παρατηρούμενη δυσκολία οφείλεται στην μεγαλύτερη δραστικότητα, ήτοι αυξημένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα που παρουσιάζει ο πενταμελής δακτύλιος του ινδολίου έναντι του εξαμελούς βενζολικού δακτυλίου, με αποτέλεσμα το ζεύγος του ινδολίου να είναι η κινητήριος δύναμη και να ωθεί το σύστημα προς σχηματισμό συμπυκνωμένης πεντανόνης προς την πλευρά του πενταμελούς ινδολικού δακτυλίου. Σε όλες τις περιπτώσεις το βρώμιο που ήταν προσαρτημένο στην 2-θέση του ινδολικού δακτυλίου ως προς το άζωτο αποχωρούσε ως Br^+ με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ως κυρίαρχο προϊόν ο δακτύλιος ινδανόνης. Ως απόρροια της αποχώρησης του βρωμίου προτείναμε είτε την προστασία του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου με την εισαγωγή της 2,2-διμεθυλοπροπανοϊκής ομάδας ή την εισαγωγή/προσάρτηση της φαινυλομάδας στην 2-θέση του ινδολικού δακτυλίου. Παρακάτω συνοψίζονται μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές δοκιμαστικές αντιδράσεις που διενεργήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο, αλλά δεν συνετέλεσαν στον επιτυχή σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel-Crafts.





Σχήμα 85: Ανεπιτυχείς δοκιμαστικές αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά *Friedel-Crafts*

3.16 Εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του τρικυκλικού ενδιάμεσου VIII

3.16.1 Προσάρτηση διαφόρων λειτουργικών ομάδων στη 2-θέση του ινδολικού δακτυλίου χωρίς τη μεσολάβηση προστασίας του ινδολικού αζώτου

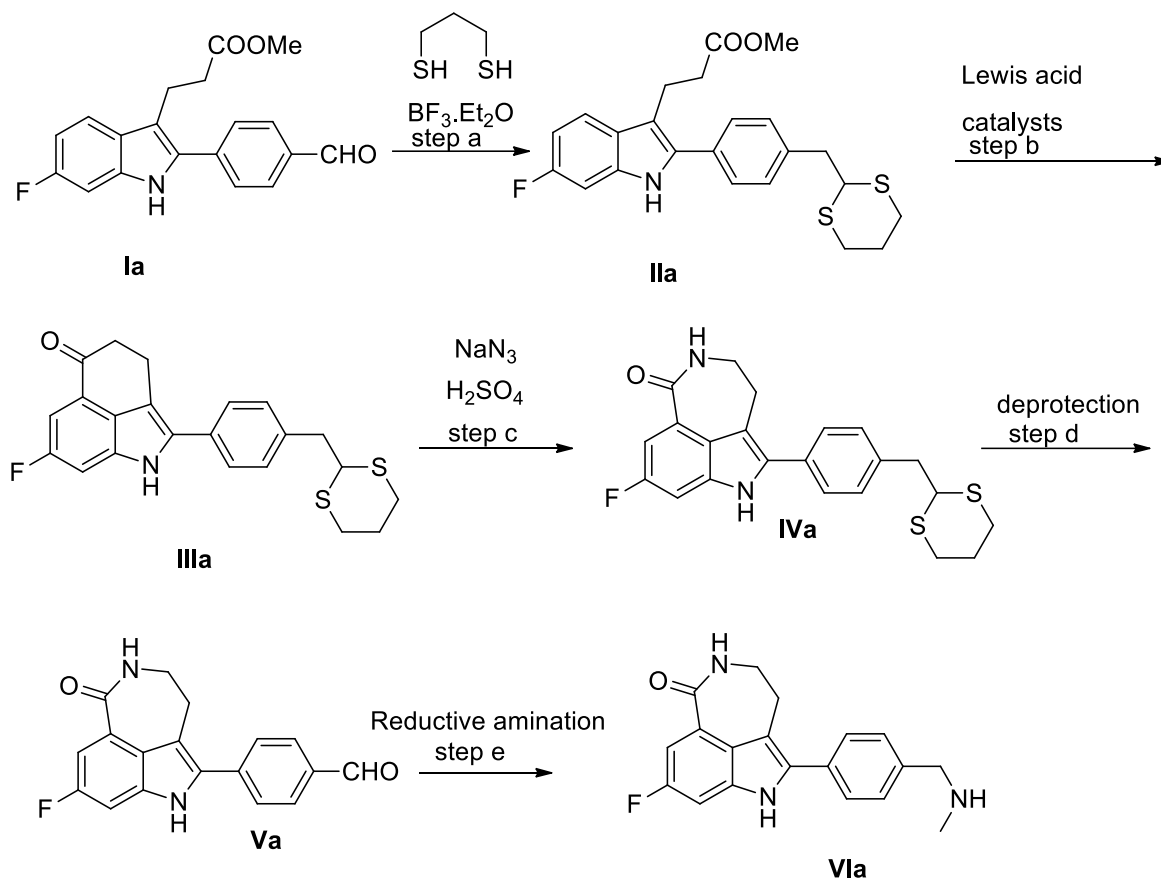
Μετά τη μη επιτυχή σύνθεση του επιθυμητού τρικυκλικού ενδιάμεσου VIII σχεδιάσαμε και προτείναμε μετά από ενδελεχή διερεύνηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, επιπλέον εναλλακτικές και καινοτόμες πορείες σύνθεσης που συνοψίζονται και αποτυπώνονται αναλυτικά παρακάτω στα σχήματα 86 και 87. Οι συνθήκες των προτεινόμενων εναλλακτικών πορειών σύνθεσης θα περιγραφούν εκτενώς στο κεφάλαια 3.25 και 3.27.

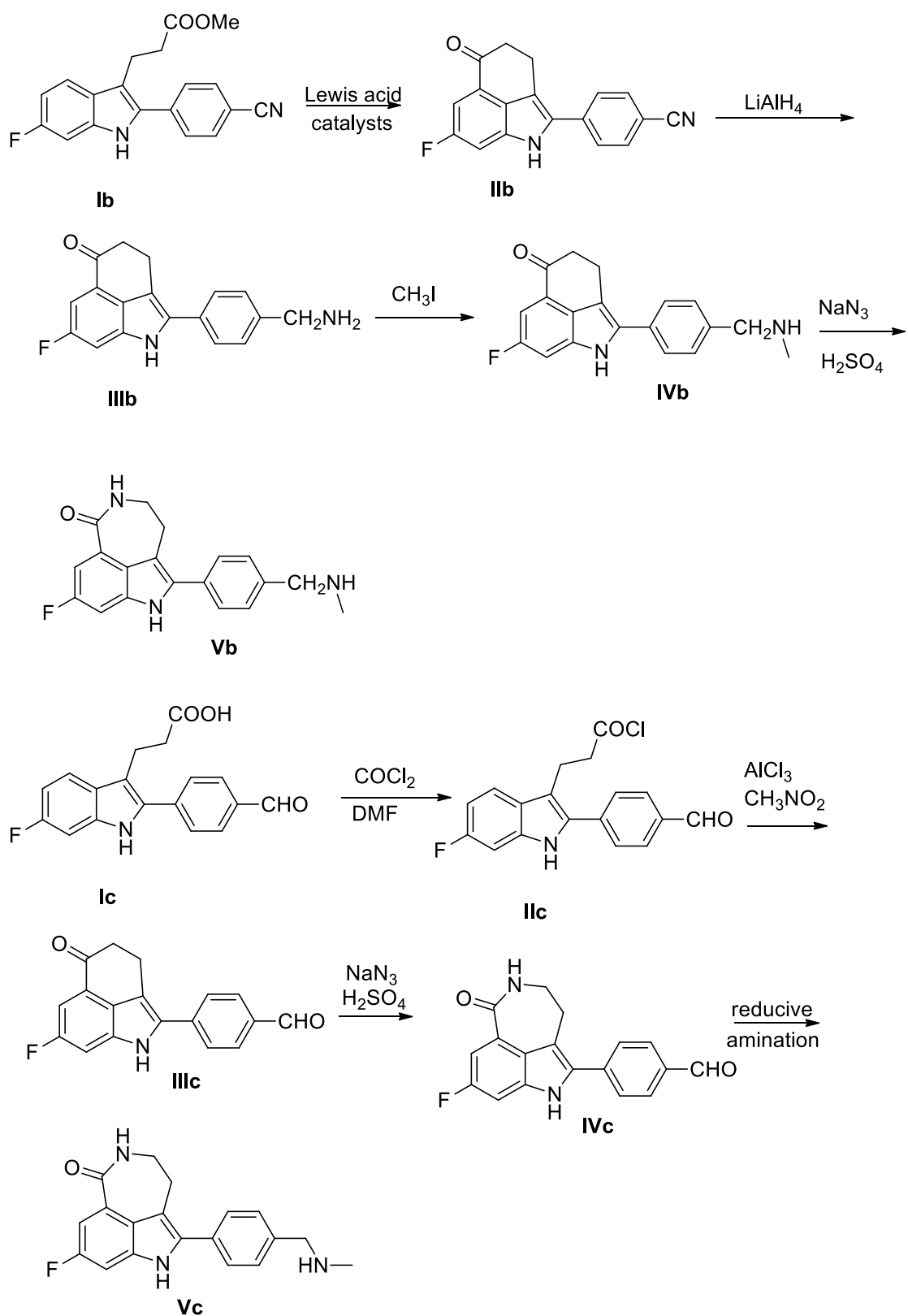
Η πρώτη προτεινόμενη πορεία του σχήματος 86 περιλαμβάνει την προστασία της αλδεϋδομάδας του ενδιάμεσου Ia του οποίου η σύνθεση θα αναλυθεί παρακάτω, με την προσθήκη 1,3-προπανοδιθειόλης. Εν συνεχεία, το ενδιάμεσο IIa υπόκειται σε διάφορες δοκιμαστικές αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης με μια ποικιλία καταλυτών κατά Lewis με στόχο τη σύνθεση της ενδιάμεσης ένωσης IIIa. Ακολουθεί μια κλασική αντίδραση Schmidt με αζίδιο του νατρίου και θειικό οξύ ώστε να παραλάβουμε το κυκλικό αμιδίο, ήτοι την λακτάμη, σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει αναλυθεί στην υποενότητα 3.14.2. Έπειτα, διενεργείται αποπροστασία και απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας προς την ένωση IVa, η οποία μέσω μιας κλασικής αντίδρασης αναγωγικής αμίνωσης θα μπορούσε δυνητικά να δώσει το επιθυμητό τελικό προϊόν, το Rucaparib.

Η δεύτερη εναλλακτική πορεία συνίσταται από την αντίδραση της ένωσης Ib με διάφορους καταλύτες κατά Lewis με στόχο τη σύνθεση του τρικυκλικού ενδιάμεσου IIb μέσω μιας ενδομοριακής κυκλοαφυδάτωσης. Ακολουθεί, αναγωγή της κυανομάδας της ένωσης IIb σε μεθυλοαμινομάδα με τη χρήση ενός αναγωγικού μέσου, όπως το λιθιοαργιλιούδριδιο και δυνητικά παραλαμβάνεται η ενδιάμεση ένωση «κλειδί» IIIb. Η ένωση IIIb υπόκειται σε μια κλασική αντίδραση μεθυλίωσης με τη χρήση ενός μεθυλιωτικού μέσου, όπως το μεθυλοϊωδίδιο, δίνοντας την ένωση IVb, η οποία μέσω μιας αντίδρασης Schmidt, παράγει την τελική ένωση στόχο που αποτυπώνεται στο σχήμα 86.

Τρίτη και τελευταία προτεινόμενη πορεία είναι η αντίδραση της ένωσης Ic, που έχει προσαρτημένη ελεύθερο καρβοξυλικό άκρο, με το οξαλικό χλωρίδιο σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο. Η συντεθεισα δραστική ένωση IIc, το αντίστοιχο χλωρίδιο οξέος, υπόκειται σε μια κλασική αντίδραση κατά Friedel Crafts με τη χρήση τριχλωριούχου αργιλίου ως καταλύτη. Η ενδιάμεση τρικυκλική ένωση IIIc που προκύπτει, αντιδρά με αζίδιο του νατρίου και θειικό οξύ για να συντεθεί η επιθυμητή καπρολακτάμη IVc που αποτελείται από ένα

συμπυκνωμένο επταμελή δακτύλιο. Τέλος, η λακτάμη IVc υπόκειται σε μια αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης με στόχο τη σύνθεση του επιθυμητού φαρμακευτικού σκευάσματος, ένωσης Vc. Παρακάτω στο σχήμα 86 απεικονίζονται οι τρεις καινοτόμες εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του Rucaraγib που σχεδιάστηκαν και προτάθηκαν από την ερευνητική μας ομάδα.





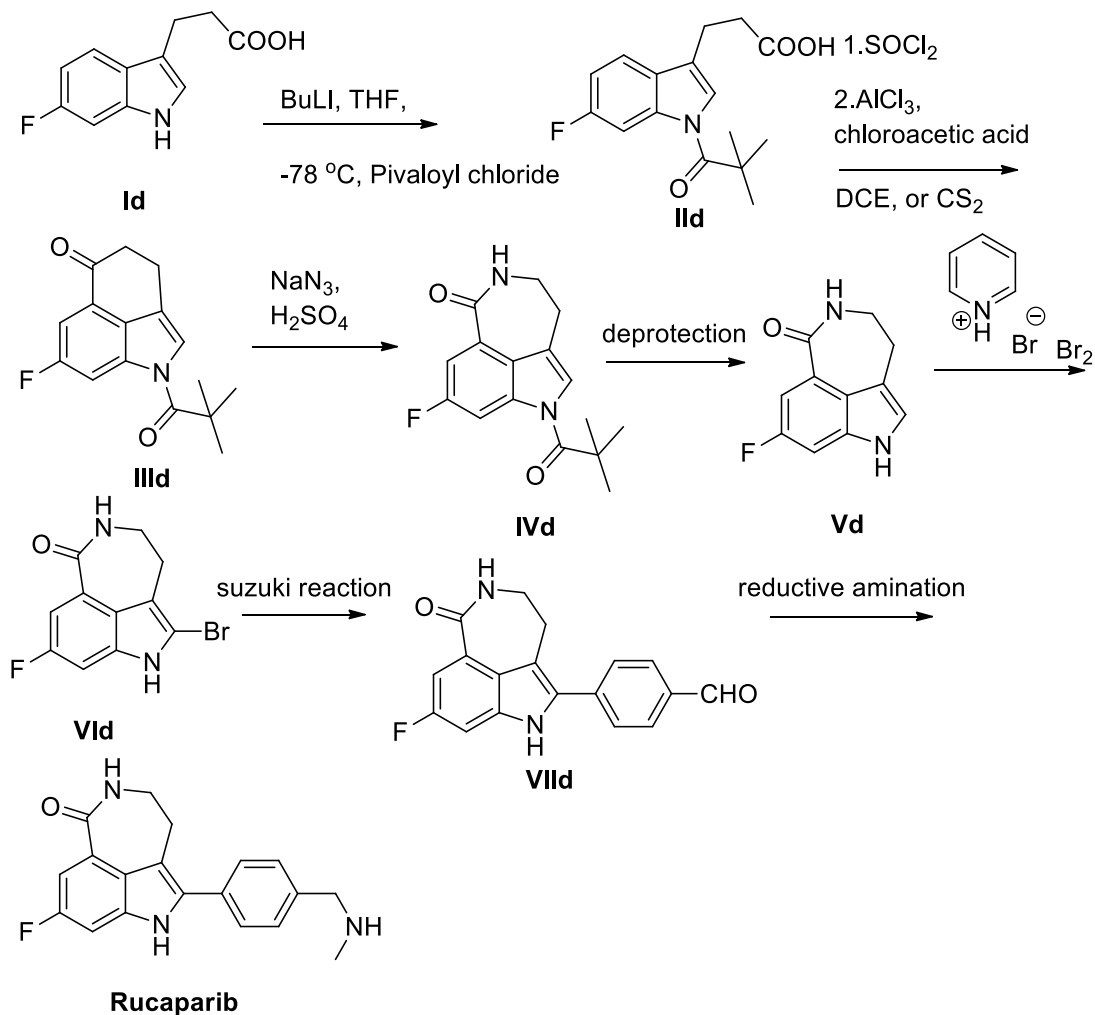
Σχήμα 86: Εναλλακτικές πορείες σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος του *Ruscariarib*

3.16.2 Προστασία του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου μέσω της 2,2-διμεθυλοπροπανοϊκής προστατευτικής ομάδας

Η κάτωθι πορεία του σχήματος 87 αποτέλεσε την τελική εναλλακτική ολική πορεία σύνθεσης του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος λόγω της μη επιτυχούς σύνθεσης και απομόνωσης του επιθυμητού τρικυκλικού ενδιάμεσου που συνίσταται από τους συμπυκνωμένους δακτυλίους του ινδολίου και κυκλοεξανόνης. Διενεργήθηκαν πολυάριθμες δοκιμαστικές αντιδράσεις ως απόρροια του ορθολογικού σχεδιασμού των τριών εναλλακτικών πορειών που αποτυπώνονται στο σχήμα 86, αλλά καμία δεν απέδωσε επιτυχώς τη σύνθεση και απομόνωση της ενδιάμεσου ένωσης «κλειδιού» για τη μετέπειτα ολική συνθετική πορεία. Σε όλες τις περιπτώσεις των διενεργούμενων αντιδράσεων των απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ανεπιθύμητα παραπροϊόντα που μερικά από αυτά θα αναφερθούν εν συνεχεία. Η δυσκολία που παρατηρήθηκε στις αντιδράσεις εξηγείται και εντοπίζεται στη δραστικότητα της 2-θέσης του πενταμελούς ινδολικού δακτυλίου, αν και αντικαταστάθηκε η ομάδα του βρωμίου με ογκώδεις υποκατεστημένους βενζολικούς δακτυλίους, υπεύθυνους για το σχηματισμό παραπροϊόντων, καθώς προσαρτήθηκαν στην 2-θέση δραστική θέση του ινδολίου. Έτσι, σκεφτήκαμε ως τελευταία εναλλακτική στρατηγική την εισαγωγή μιας ογκώδους προστατευτικής ομάδας στο άζωτο του ινδολικού δακτυλίου που θα παρεμποδίζει τόσο στερεοχημικά όσο και ηλεκτρονικά είτε την ενδομοριακή κυκλοποίηση σε ανεπιθύμητη θέση ή ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις μεταξύ άλλων λειτουργικών ομάδων.

Αυτή η εναλλακτική πορεία περιλαμβάνει την προστασία του ινδολικού αζώτου του υποστρώματος Id μέσω ενός σταδίου αποπρωτονίωσης με τη χρήση βουτυλολιθίου στους $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τη μετέπειτα προσθήκη του 2,2-διμεθυλοπροπανοϊκού χλωριδίου. Η προστατευμένη ένωση IIId που προκύπτει μετατρέπεται σε ένα δραστικό παράγωγο- χλωριδίου που υπόκειται σε μια κλασική αντίδραση κατά Friedel-Crafts με τη χρήση τριχλωριούχου αργιλίου ως καταλύτη και του χλωροακετυλο-χλωριδίου. Εν συνεχεία, η επιθυμητή τρικυκλική ενδιάμεση ένωση IIIId μετατρέπεται στην λακτάμη IVd, μέσω μιας αντίδρασης Schimidt. Μετέπειτα υπόκειται σε αποπροστασία και απομάκρυνσης της προστατευτικής ομάδας, με σκοπό τη σύνθεση του ενδιάμεσου Vd. Ακολουθεί βρωμίωση στη 2-θέση του ινδολικού δακτυλίου, αντίδραση μεταξύ του οξέος και του 4-φορμυλοφαινυλο-βορονικού οξέος μέσω μιας αντίδρασης Suzuki. Η συντεθείσα ένωση VIId από την αντίδραση Suzuki, μέσω μιας αναγωγικής αμίνωσης, μετατρέπεται στην τελική ένωση στόχο VIIId. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εν λόγω πορεία απέδωσε επιτυχώς την ενδιάμεση ένωση IIId, προϊόν προστασίας, σχεδόν ποσοτικά με τις

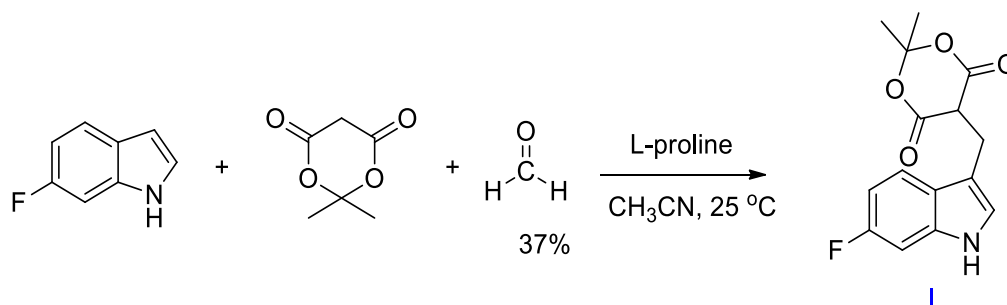
συνθήκες που ακολουθήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο, αλλά καμία δοκιμαστική αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης δεν απέδωσε στο σχηματισμό της επιθυμητής ένωσης IIIId για τη μετέπειτα συνθετική προτεινόμενη πορεία.



Σχήμα 87: Προστασία του αζώτου μέσω εισαγωγής της 2,2-διμεθυλοπροπανοϊκής ομάδας στην ολική σύνθεση του Rucaparib

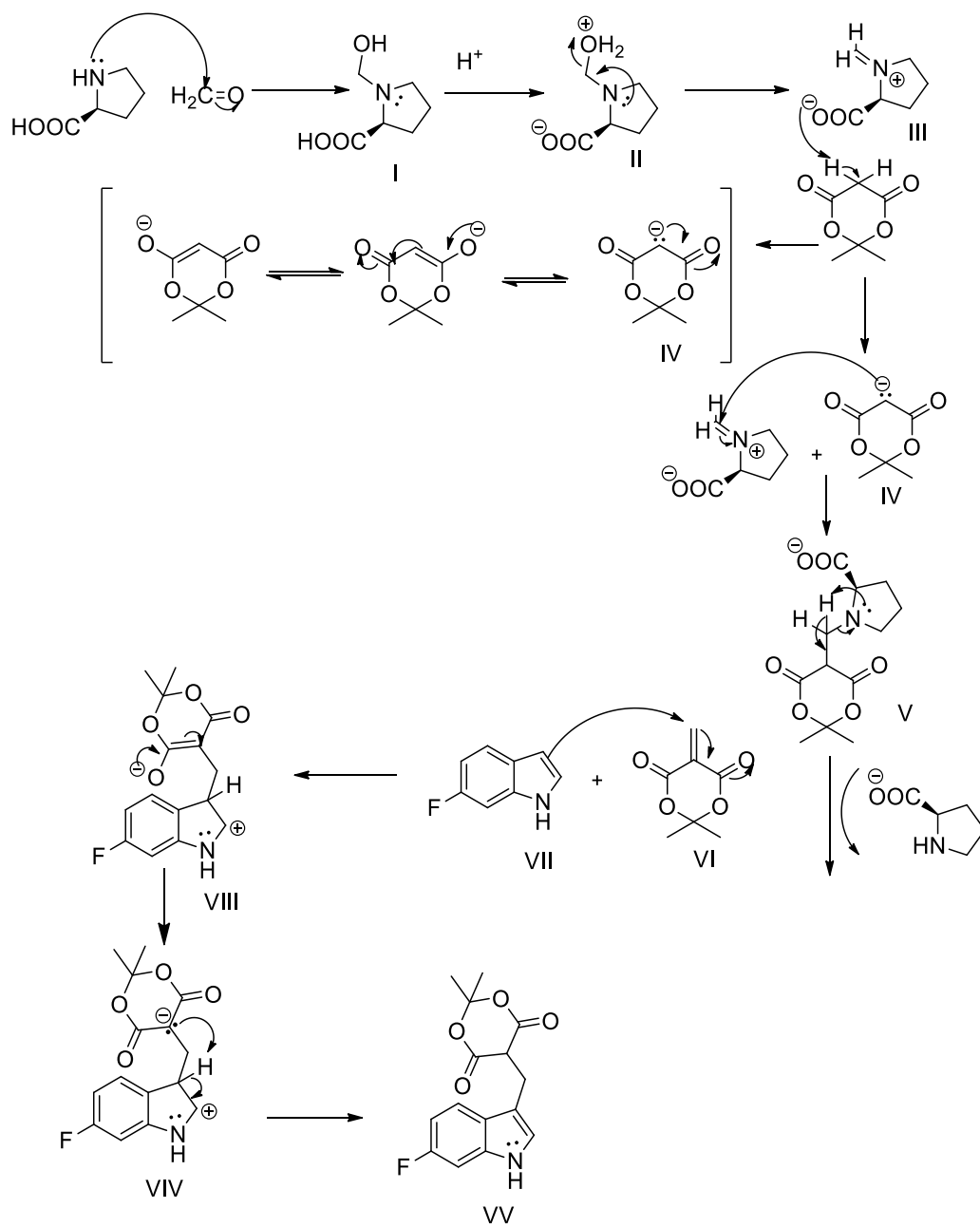
3.17 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5- {(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6- διόνης (ένωση I)

3.17.1 Αντίδραση σύνθεσης της 5- {(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2- διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης και μηχανισμός αντίδρασης



Σχήμα 88: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 5-
{(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-
διοξανιο-4,6-διόνης

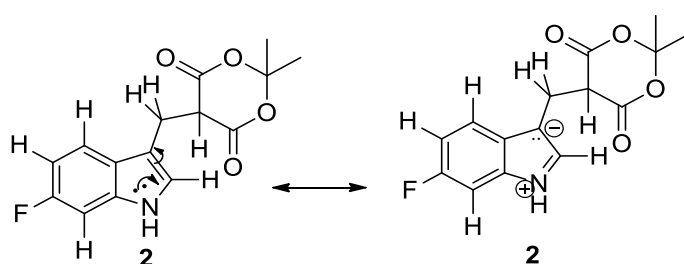
Το αρχικό στάδιο στην όλη προτεινόμενη συνθετική πορεία από το ερευνητικό μας εργαστήριο είναι η σύνθεση της ένωσης 5-
{(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-
διόνης που σχηματίζεται σε μια αντίδραση τύπου Michael μεταξύ του υποστρώματος 6-φθορο-
ινδολίου και των οξέος Meldrum (2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης) και φορμαλεΐδης,
παρουσία καταλύτη L-προλίνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στην πλέον δραστική 3-θέση του
ινδολίου με αποτέλεσμα την ανοικοδόμηση του αρχικού υποστρώματος με αύξηση της
ανθρακικής αλυσίδα μέσω εισαγωγής-προσάρτησης της λειτουργικής ομάδας του οξέος
Meldrum. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 25 °C σε διαλύτη ακετονιτρίλιο επί 24 ώρες
δίνοντας σχεδόν ποσοτικά το επιθυμητό προϊόν (I) που αποτυπώνεται στο σχήμα 88. Ο
μηχανισμός της εν λόγω αντίδρασης προχωρά μέσω ενός καταλυτικού κύκλου της L-προλίνης
πολλαπλών σταδίων που απεικονίζονται αναλυτικά στο κάτωθι σχήμα (89).



Σχήμα 89: Μηχανισμός αντίδρασης μέσω του καταλυτικού κύκλου της L-προλίνης.

3.17.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-{{(6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο}-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης (ένωση I)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της επιθυμητής συντεθείσας ένωσης καταγράφεται η χαρακτηριστική ευρεία κορυφή του πρωτονίου H-2 σε τιμές χαμηλού πεδίου και συγκεκριμένα στα 8.06 ppm, που αντιστοιχεί στο πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο που συνδεεται με το άζωτο του ινδολικού δακτυλίου. Η παρατηρούμενη αποπροστασία οφείλεται στην εκδήλωση αρνητικού συζυγιακού φαινομένου από το άζωτο, που μέσω δομών συντονισμού προσφέρει το μονήρες ζεύγος τόσο στον πενταμελή όσο και στον εξαμελή δακτύλιο του ινδολίου, με αποτέλεσμα να απογυμνώνεται ηλεκτρονικά.

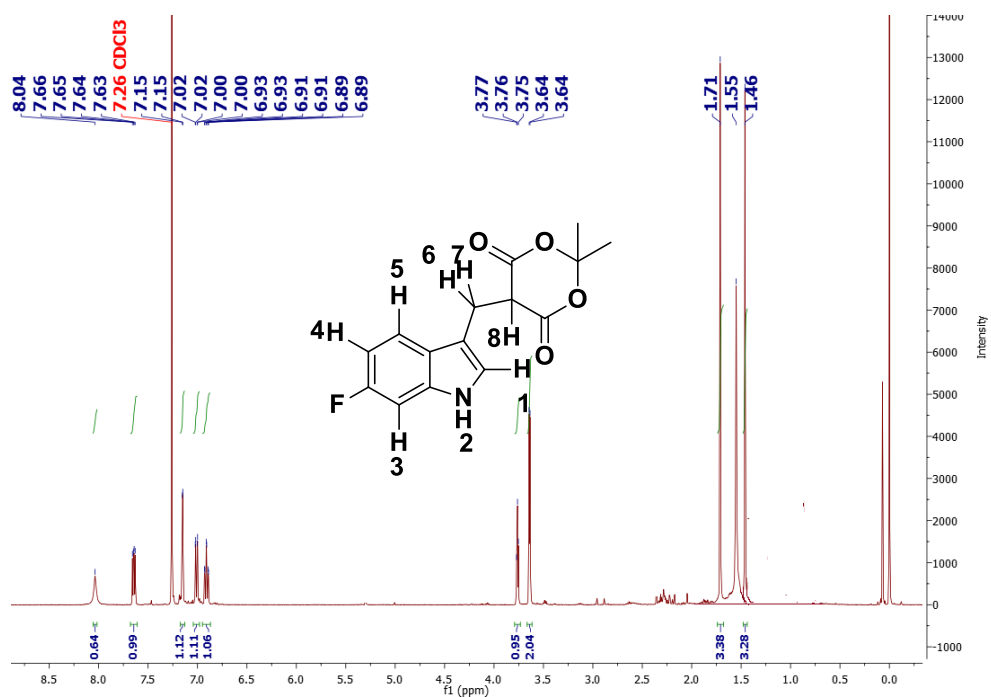


Σχήμα 90: Η αποπροστασία του H-2 μέσω εκδήλωσης αρνητικού συζυγιακού φαινομένου

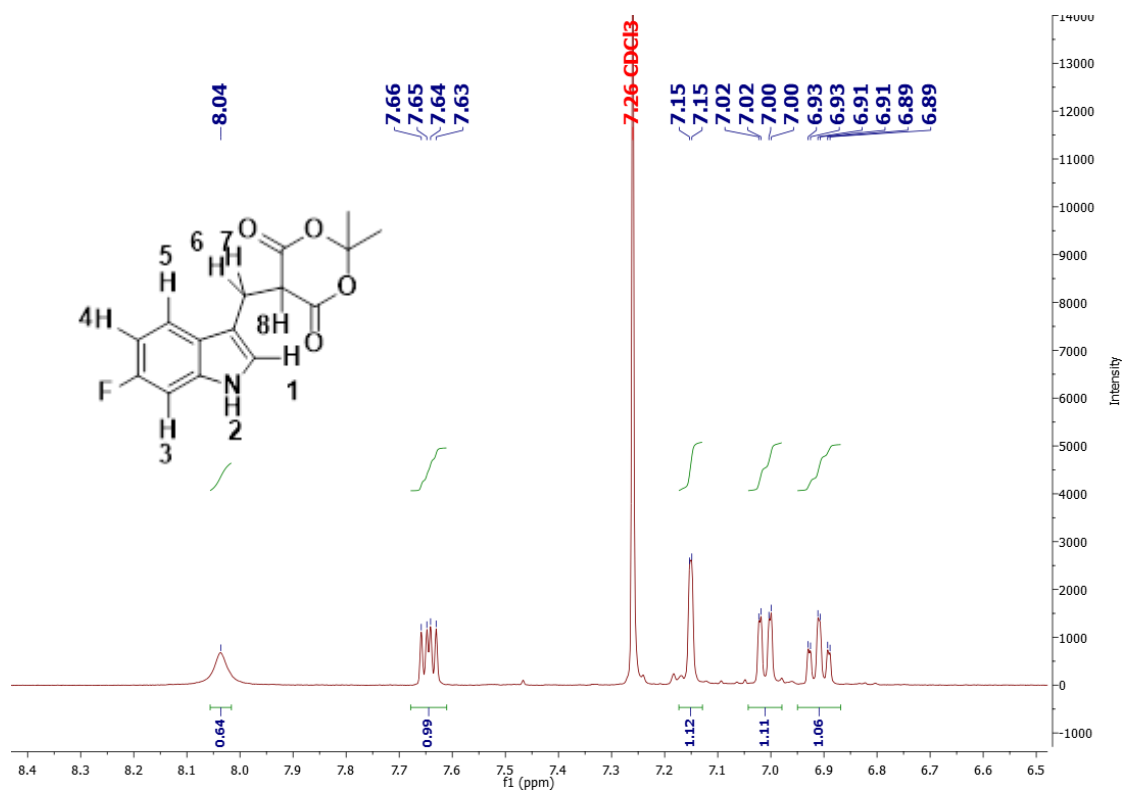
Η επόμενη πολλαπλή τύπου τετραπλή κορυφή στο πρωτονιακό φάσμα στα 7.66 ppm αντιστοιχεί στο H-5, που σχάζεται πρώτα σε μια διπλή κορυφή μέσω συσχέτισης 3J με το H-4 και έπειτα σε μια διπλή κορυφή λόγω 4J συσχέτισης, μακράς απόστασης με το F. Ακολουθεί η απορρόφηση του H-1 σε μια απλή κορυφή στα 7.15 ppm που σχάζεται σε μία διπλή κορυφή λόγω γειννίας με H-2 του αζώτου μέσω συσχέτισης 4J , μακράς απόστασης. Στα 7.02 ppm το H-3 σχάζεται σε μια διπλή της διπλής κορυφής λόγω γειννίας και αλληλεπίδρασης μέσω συσχέτισης 3J με το F και 4J με το H-4. Τέλος, όσον αφορά την απορρόφηση στην αρωματική περιοχή καταγράφεται μια τριπλή της διπλής κορυφής στα 6.93 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4. Το H-4 σχάζεται πρώτα σε μια τριπλή κορυφή μέσω συσχέτισης 3J με το H-5 και το F και, έπειτα, σε διπλή κορυφή μέσω γειννίας, συσχέτισης 4J με το βενζυλικό πρωτόνιο H-3.

Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος εντοπίζεται μια τριπλή κορυφή στα 3.77 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, βάσει του κανόνα n+1 (H-6, H-7). Τα ισοδύναμα H-6 και H-7 βάσει του ίδιου αντιλαμβανόμενου χημικού περιβάλλοντος σχάζονται σε διπλή κορυφή στα 3.64 ppm λόγω συσχέτισης 3J με το H-8. Τέλος, οι μεθυλομάδες του εξαμελούς κορεσμένου δακτυλίου καταγράφονται ως δύο διακριτές μη ισοδύναμες απλές κορυφές στα 1.71 και 1.46 ppm με ολοκλήρωση 3 η καθεμία. Η παρατηρούμενη μη ισοδυναμία των δύο μεθυλομάδων ίσως να

οφείλεται στον υβριδισμό sp^2 των καρβονυλικών ανθράκων και στην συνεισφορά των μονήρων ζευγών ηλεκτρονίων των οξυγόνων προς την πλευρά της καρβονυλομάδας με αποτέλεσμα οι δεσμοί C-O να αποκτούν φύση διπλού δεσμού. Έτσι, παρατηρείται μια σχετική επιβράδυνση στην περιστροφή των δεσμών C-O, είναι σημαντικό δε να αναφερθεί πως ο εξαμελής κυκλοεξανοϊκός δακτύλιος του οξέος Meldrum να αποκτά διαμόρφωση ανάκλιτρου.

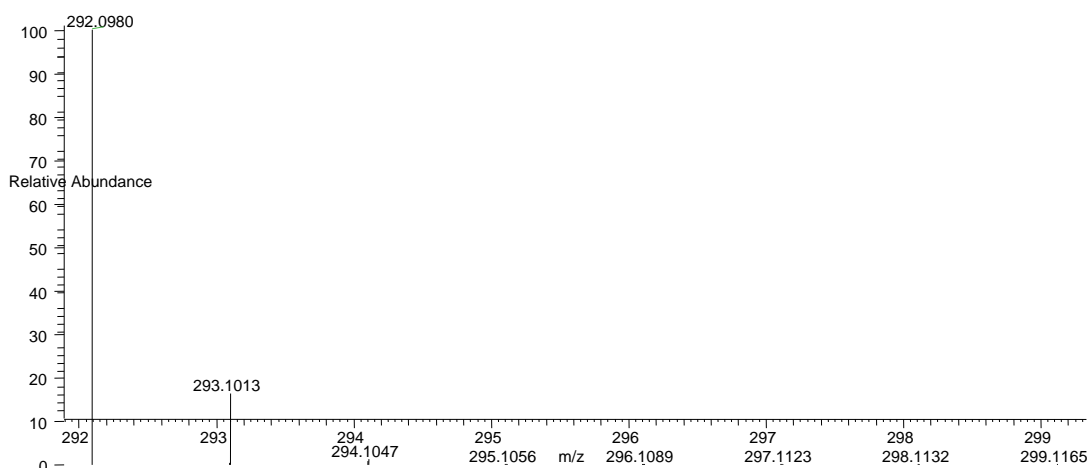


Σχήμα 91: Φάσμα $^1\text{H NMR}$ της 5-((6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξαnio-4,6-διόνης σε CDCl_3 στα 500MHz



Σχήμα 92: Φάσμα $^1\text{HNMR}$ της αρωματικής περιοχής της 5-((6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης σε CDCl_3 στα 500MHz.

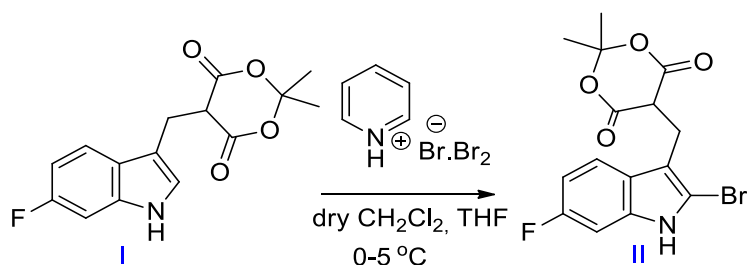
Επιπλέον, προκειμένου να αποφανθούμε για το σχηματισμό της ως άνω ένωσης προβήκαμε στη λήψη του φάσματος μάζας υψηλής ευκρίνειας σε μεθανολικό διάλυμα μυρμηκικού οξέος 1%. Η υπολογιζόμενη τιμή του m/z της βασικής κορυφής είναι 292.0980 που αντιστοιχεί στον μοριακό τύπο $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FNO}_4+\text{H}]^+$, λόγω πρωτονίωσης και συνάδει με τη θεωρητική τιμή 292.0980 που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FNO}_4+\text{H}]^+$.



Σχήμα 93: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης I.

3.18 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης (ένωση II)

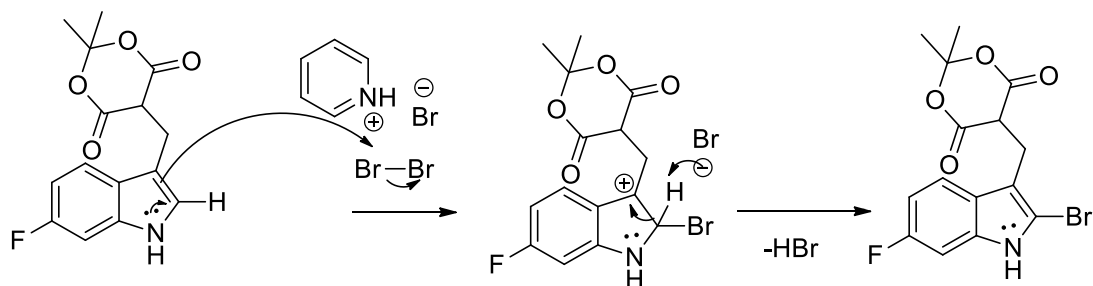
3.18.1 Αντίδραση σύνθεσης της 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης και μηχανισμός αντίδρασης



Σχήμα 94: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης

Επόμενο στάδιο στην όλη συνθετική πορεία του Rucaparib είναι η ως άνω απεικονιζόμενη αντίδραση βρωμίωσης στην πλέον δραστική θέση-2 του ινδολικού δακτυλίου που αποτελεί μια αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Η αντίδραση διενεργείται σε ήπιες συνθήκες στους 0-5 °C με την προσθήκη τριβρωμιούχου άλατος της πυριδίνης σε μείγμα άνυδρων διαλυτών (DCM και THF) για 2 ώρες, δίνοντας σχεδόν ποσοτικά το επιθυμητό προϊόν βρωμίωσης. Ο μηχανισμός της διενεργούμενης βρωμίωσης αποτυπώνεται παράκατω στο σχήμα

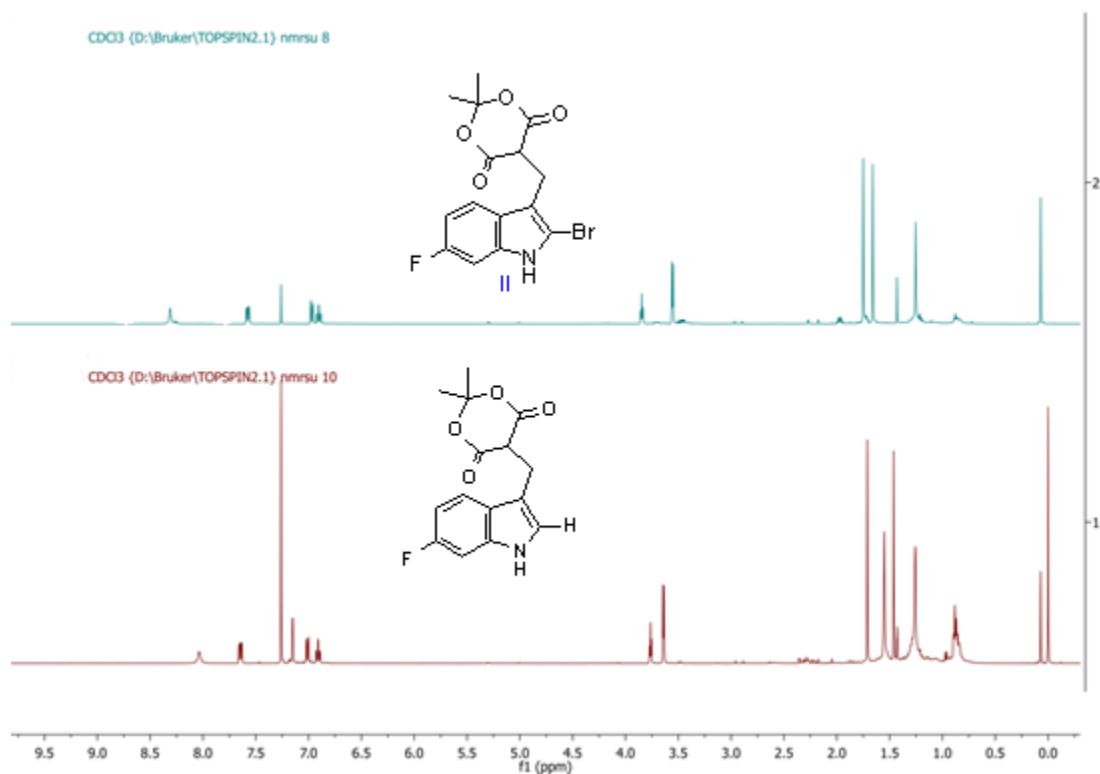
95, όπου το π ζεύγος του ινδολικού δακτυλίου προσβάλλει το Br, σχηματίζοντας ένα ηλεκτρονιόφιλο ενδιάμεσο με το + φορτίο να εντοπίζεται στη θέση-3 του ινδολίου και απελευθερώντας ένα ανιόν Br⁻. Ακολουθεί απόσπαση του πρωτονίου από το ανιόν βρωμίου με αποτέλεσμα να επανακάττει η αρωματικότητα του ινδολικού δακτυλίου, σχηματίζοντας επιλεκτικά μόνο το προϊόν ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης στην C-2 θέση.



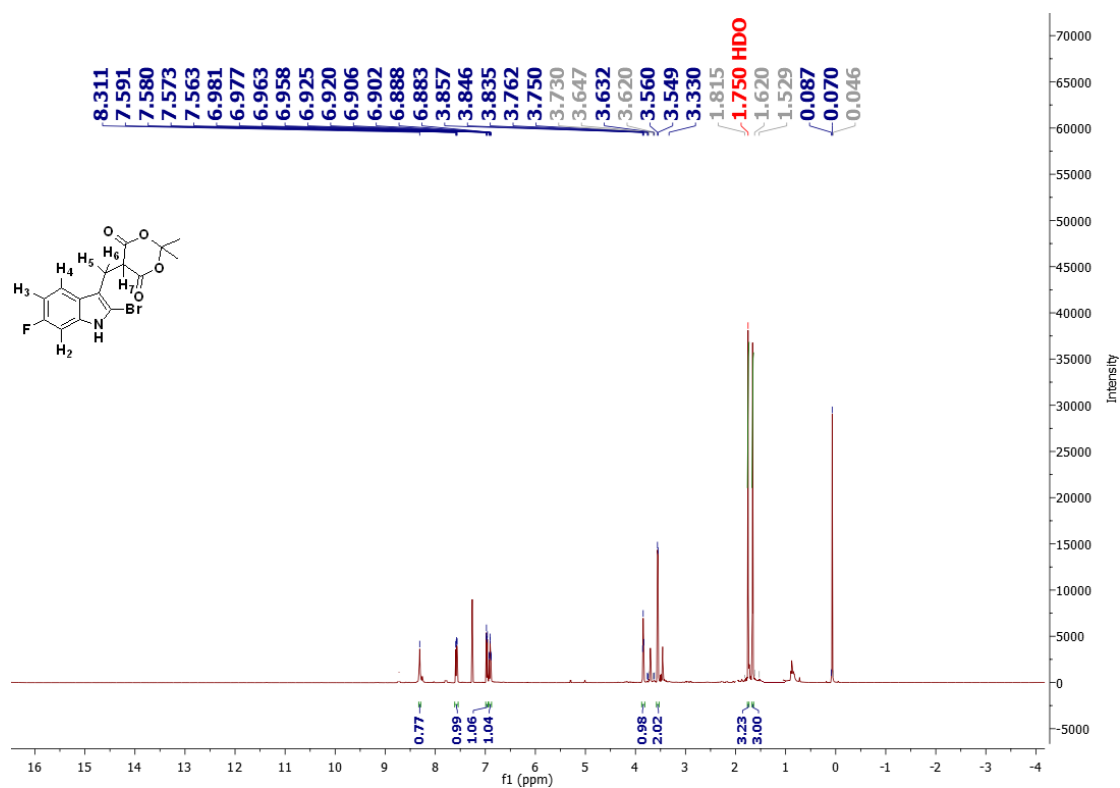
Σχήμα 95: Μηχανισμός βρωμίωσης στην C-2 θέση του ινδολίου

3.18.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1-H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης (ένωση II)

Παρατηρώντας το φάσμα ¹H NMR (σχήμα 96) της 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1-H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης II διαπιστώνουμε πως οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου του ινδολίου και του οξέος Meldrum απορροφούν ως αναμένεται, σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας τις σχέσεις τους, σε ισοδυναμία με τα πρωτόνια της 5-((6-φθορο-1-H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνης που αποτυπώνονται στο φάσμα ¹H NMR του σχήματος 96. Μπορούμε να αποφανθούμε για τον επιτυχή σχηματισμό του προϊόντος βρωμίωσης στη C-2 θέση του ινδολικού δακτυλίου στηριζόμενοι στο γεγονός ότι η απλή κορυφή που καταγράφονταν στο πρωτονιακό φάσμα του σχήματος 91 στα 7.15 ppm και αντιστοιχούσε στο H-1 δεν υφίσταται πλέον στο φάσμα ¹H NMR του σχήματος 96, καθώς αντικαταστάθηκε από το βρώμιο.

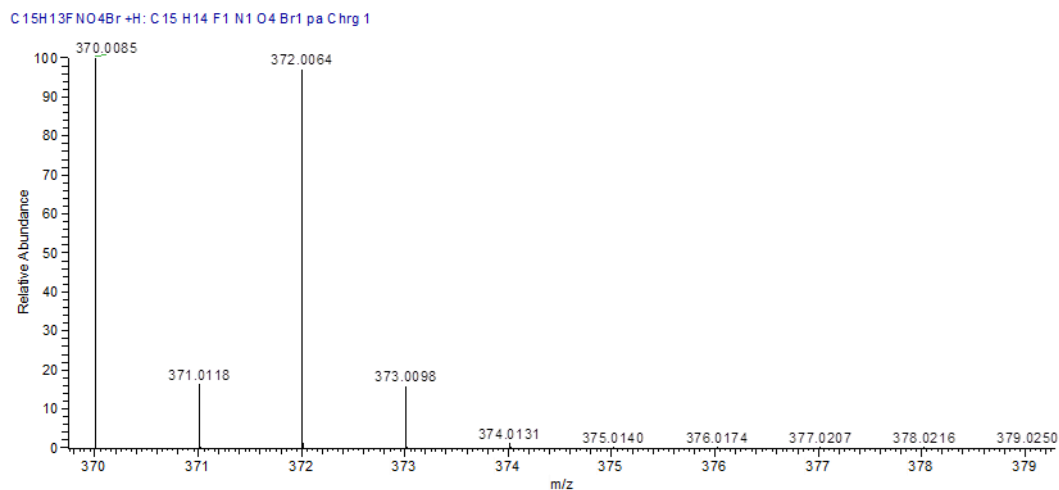


Σχήμα 96: Φάσματα ^1H NMR των ενώσεων I (κάτω) και II (πάνω) σε αντιπαραβολή



Σχήμα 97: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 5-[(2-βρωμο-6-φθορο-1-Η-ινδολ-3-υλο)μεθυλ]-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξαινο-4,6-διόνης (II) σε CDCl_3 στα 500MHz

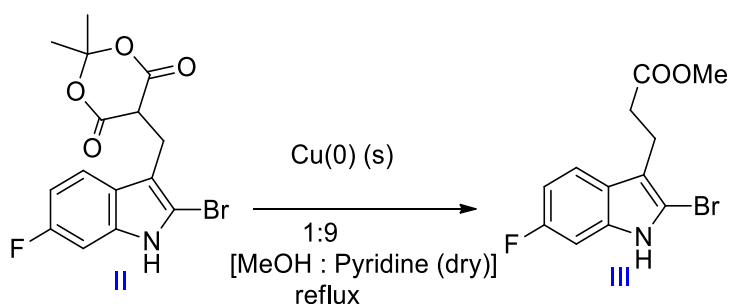
Πέραν της λήψης φάσματος ^1H NMR, προβήκαμε στη ταυτοποίηση της ένωσης II, μέσω φασματοσκοπίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%. Η θεωρητική τιμή m/z του μοριακού ιόντος με μοριακό τύπο $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrFNO}_4+\text{H}]^+$ είναι 370.0084 που συνάδει με την υπολογιζόμενη τιμή 370.0085 λόγω πρωτονίωσης, που αντιστοιχεί στον μοριακό ιόν με μοριακό τύπο $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrFNO}_4+\text{H}]^+$.



Σχήμα 98: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης II

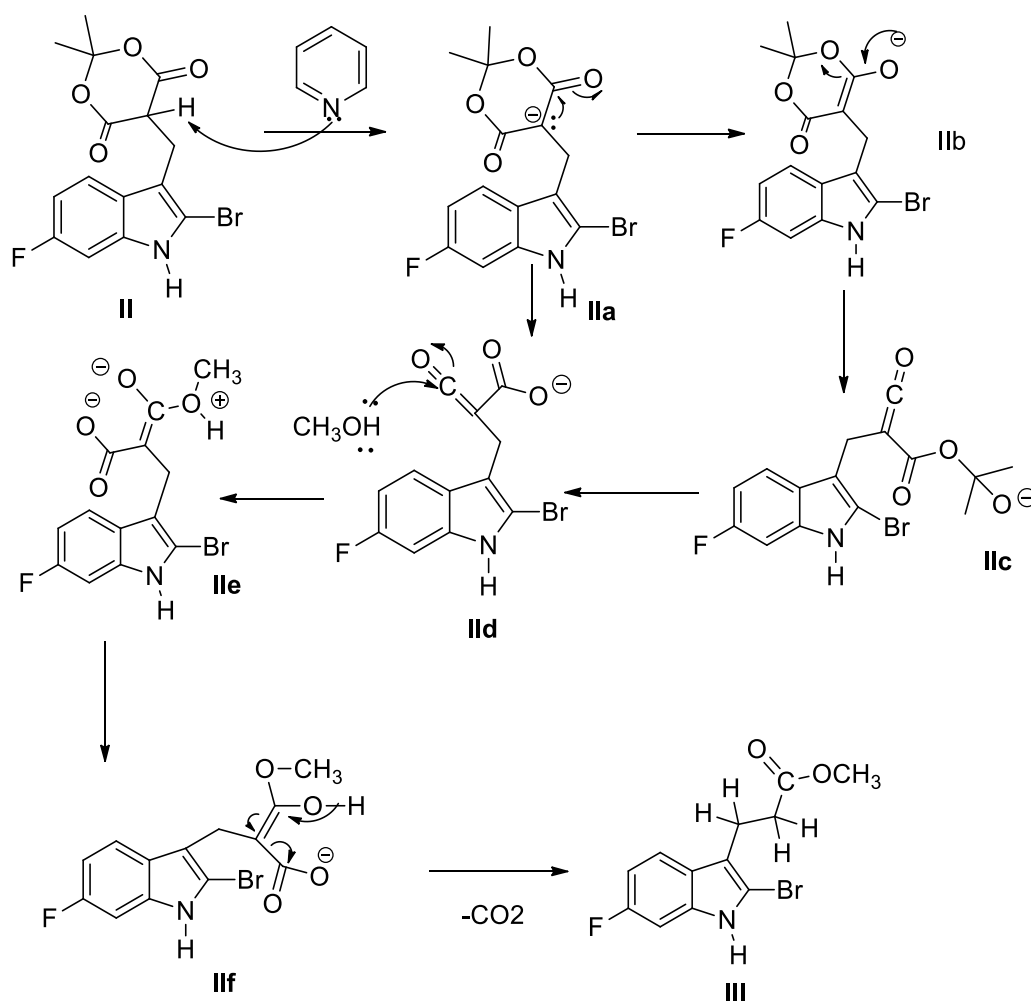
3.19 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης μεθυλεστέρα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού οξέος (ένωση III)

3.19.1 Αντίδραση σύνθεσης του μεθυλεστέρα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού οξέος και μηχανισμός αντίδρασης



Σχήμα 99: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης III σε σύστημα διαλυτών MeOH και πυριδίνης με καταλύτη στοιχειακό χαλκό

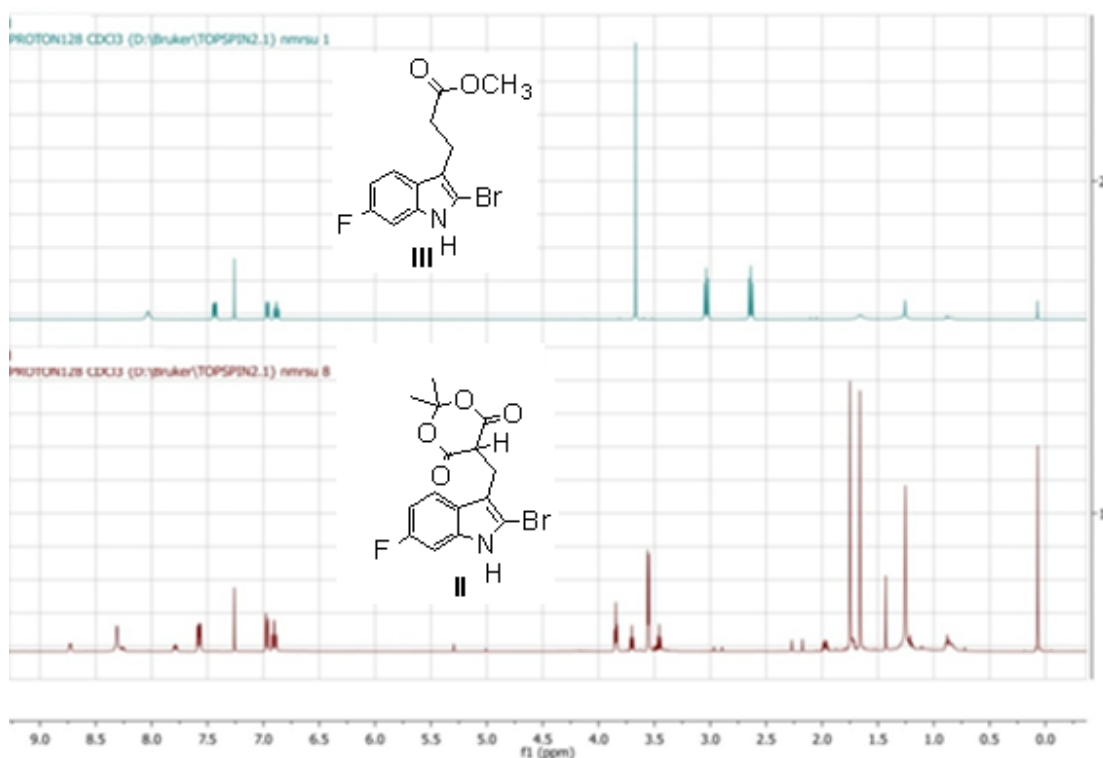
Τρίτο στάδιο στη ολική συνθετική πορεία αποτελεί η διάνοιξη και η αποκαρβοξυλίωση του υποστρώματος II σε σύστημα απόλυτων διαλυτών MeOH και πυριδίνης σε αναλογία (1:9) παρουσία στοιχειακού χαλκού ως καταλύτη. Η θερμική πυρόλυση του παραγώγου II που φέρει στην θέση-3 του ινδολικού δακτυλίου το οξύ Meldrum ξεκινά με τη αποπρωτονίωση του όξινου πρωτονίου της μεθυλενομάδας με το σχηματισμό ενός σταθερού ενολικού ιόντος IIa. Το ενολικό ιόν που προκύπτει σταθεροποιείται με απεντοπισμό του αρνητικού φορτίου και υπόκειται σε διάνοιξη του δακτυλίου με το περαιτέρω σχηματισμό ενός δραστικού ενδιάμεσου κετένης IIb. Έπειτα, αποβάλλεται ένα μόριο ακετόνης, σχηματίζοντας ένα νέο ενδιάμεσο IIc που με περαιτέρω πυρηνόφιλη προσβολή από τη μεθανόλη στον άνθρακα του καρβονυλίου της κετένης σχηματίζει το ενδιάμεσο IIe, το οποίο με μεταφορά ενός πρωτονίου δίνει το νέο ενδιάμεσο IIf. Αυτό το ενδιάμεσο με αποβολή ενός μορίου CO₂ παράγει το επιθυμητό προϊόν διάνοιξης και αποκαρβοξυλίωσης III. Ο ως άνω περιγραφόμενος μηχανισμός της διάνοιξης και αποκαρβοξυλίωσης του οξέος Meldrum αποτυπώνεται στο κάτωθι σχήμα 100.



Σχήμα 100: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης III

3.19.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του μεθυλεστέρα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος III

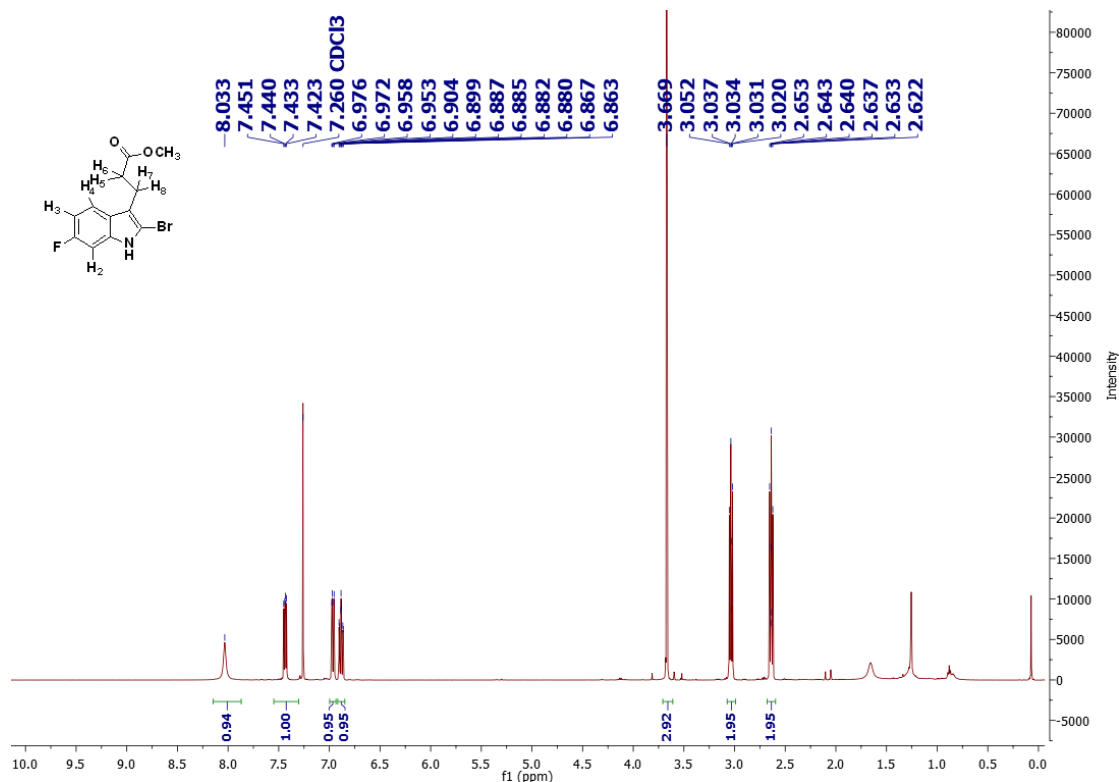
Συγκρίνοντας το φάσμα ^1H NMR του αρχικού υποστρώματος II και της συντεθεισας ένωσης III, παρατηρούμε ότι απουσιάζουν οι δύο χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων (H-5 και H-6) της μεθυλενομάδας και του πρωτονίου H-7 που εντοπιζοταν ανάμεσα από τις δύο καρβονυλομάδες του εξαμελούς δακτυλίου Meldrum στα 3.5 και 3.8 ppm αντίστοιχα. Οι δύο χαρακτηριστικές απλές κορυφές στα 1.75 και 1.66 ppm που αντιστοιχούν στις δύο μεθυλομάδες του αρχικού υποστρώματος II δεν υφίστανται στο φάσμα ^1H NMR του σχήματος 102 γεγονός που επιβεβαιώνει τη δημιουργία του επιθυμητού προϊόντος III, μέσω διάνοιξης και αποκαρβοξυλίωσης του οξέος Meldrum.



Σχήμα 101: Φάσματα ^1H NMR της ένωσης III (πάνω) και της ένωσης II (κάτω) σε αντιπαραβολή.

Κατά την ανάλυση του κάτωθι φάσματος ^1H NMR μπορούμε να αποφανθούμε για το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος από τη χαρακτηριστική απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3H στα 3.7 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθοξυομάδας του προπανοϊκού μεθυλεστέρα. Επιπρόσθετα, καταγράφονται δύο τριπλές κορυφές στα 3.05 και 2.65 ppm που αντιστοιχούν στα H-7, H-8 και H-5, H-6, αντίστοιχα των μεθυλενομάδων της προπανοϊκής αλυσίδας του μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος που είναι προσαρτημένη στη C-3 θέση του ινδολικού δακτυλίου. Τέλος, στην αρωματική κορυφή καταγράφονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στα

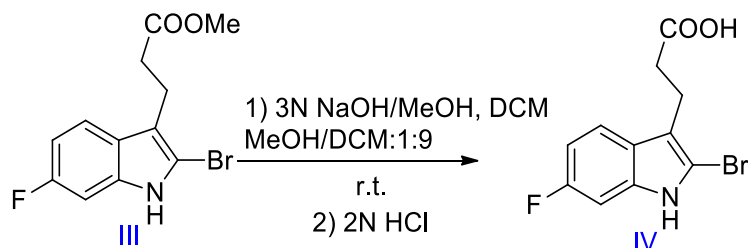
αρωματικά πρωτόνια του ινδολίου σε παραπλήσιες τιμές ppm, σε αντιστοιχία με τις απορροφήσεις των πρωτονίων της ένωσης II του πρωτονιακού φάσματος του σχήματος 97, του οποίου η αποτίμηση αποδόθηκε αναλυτικά.



Σχήμα 102: Φάσμα ¹H NMR του μεθυλεστέρα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος (500 MHz) σε CDCl₃

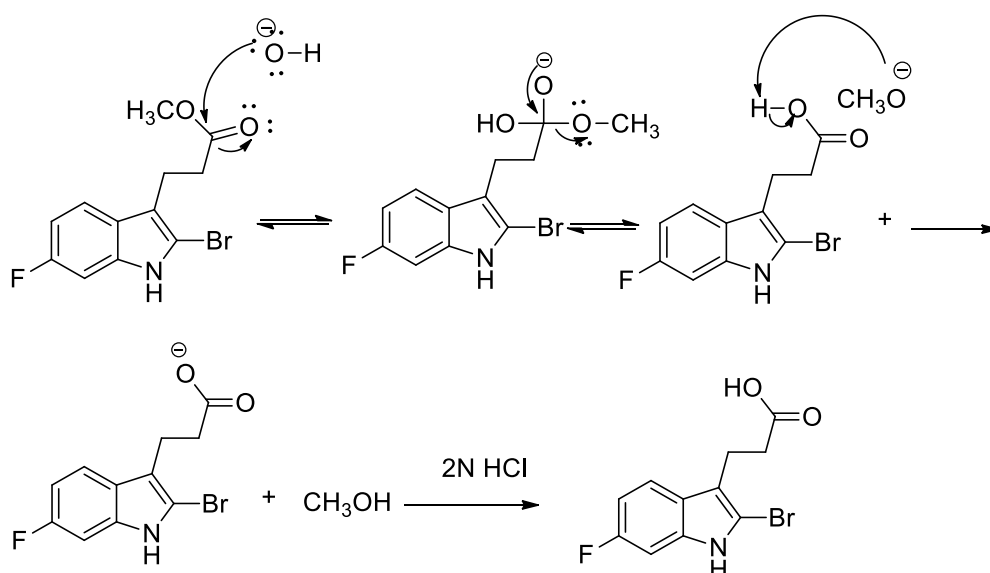
3.20 Σύνθεση και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος (ένωση IV)

3.20.1 Αντίδραση σύνθεσης του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος



Σχήμα 103: Αντίδραση βασικής υδρόλυσης της ένωσης III που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο

Επόμενο στάδιο στην προτεινόμενη συνθετική πορεία αποτελεί η βασική υδρόλυση (σαπωνοποίηση) της ένωσης III παρουσία 3N μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο. Η αντίδραση αυτή αποτελεί μια πολύ ήπια πορεία υδρόλυσης που έχει αναπτυχθεί στο ερευνητικό μας εργαστήριο μας παρέχοντας ποσοτικά το προϊόν υδρόλυσης IV (100%), χωρίς το σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Σε αντίθεση με τις υπάρχουσες υποβοηθούμενες τεχνικές υδρόλυσης του οξέος Meldrum από μικροκύματα, παρουσία πυκνού υδροχλωρικού οξέος, όπου απαιτείται παρατεταμένος χρόνος αντίδρασης με δραστικότερες συνθήκες, η ως άνω προτεινόμενη βασική υδρόλυση αποτελεί μια βελτιστοποίηση του εν λόγω σταδίου, παρέχοντας σε ιδιαίτερα ήπιες συνθήκες, χωρίς τη μεσολάβηση μικροκυμάτων και θέρμανσης, την επιθυμητή ένωση IV. Ο μηχανισμός της βασικής υδρόλυσης του υποστρώματος III περιγράφεται παρακάτω στο σχήμα 104.

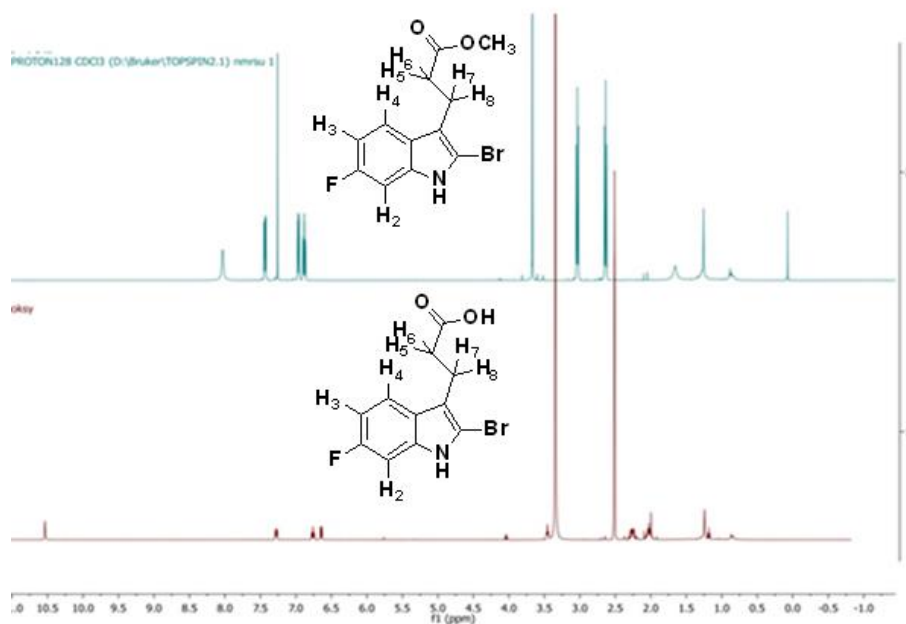


Σχήμα 104: Μηχανισμός βασικής υδρόλυσης της ένωσης III

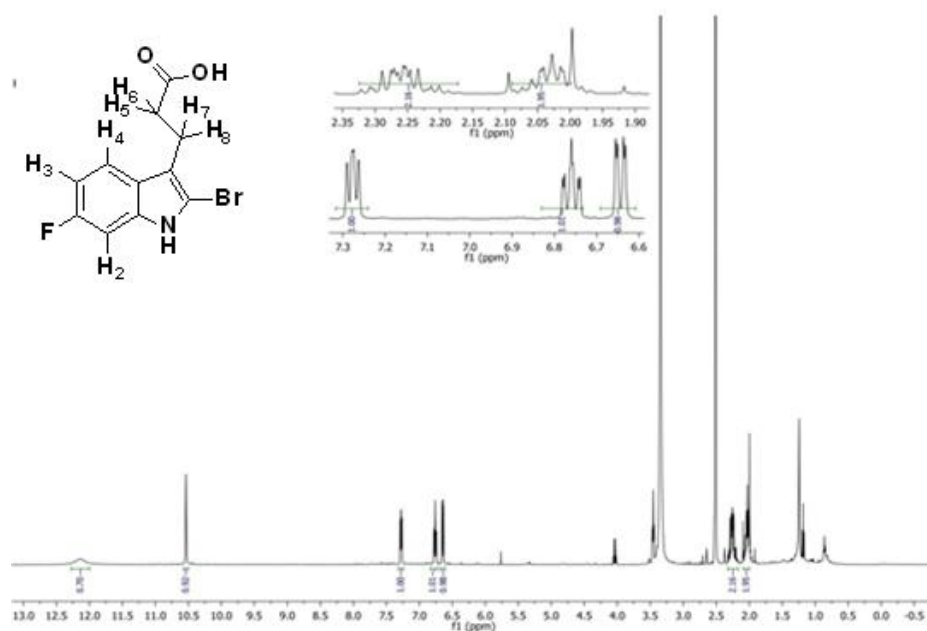
3.20.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος

Αντιπαραβάλλοντας τα πρωτονιακά φάσματα (σχήμα 105) των ενώσεων III και IV που αποτυπώνονται συγκριτικά στο σχήμα 105 παρατηρούμε πως η απλή κορυφή της μεθοξυομάδας στα 3.7 ppm της ένωσης III δεν υφίσταται πλέον στο φάσμα της ένωσης IV, στοιχείο που καθιστά βέβαιο το σχηματισμό της. Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$, που αποτυπώνεται στο κάτωθι σχήμα καταγράφεται μια απλή ευρεία κορυφή περίπου στα 12 ppm που αντιστοιχεί στο ανταλλάξιμο πρωτόνιο του καρβοξυλικού οξέος, οι δε σχάσεις των κορυφών στην αρωματική περιοχή που

αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια του ινδολίου συνεχίζουν να υφίστανται σε παραπλήσιες τιμές ppm, σε αντιστοιχία με τις σχάσεις των πρωτονίων της ένωσης III στο πρωτονιακό φάσμα του σχήματος 102.



Σχήμα 105: Απεικόνιση των φασμάτων ^1H NMR των ενώσεων III (πάνω) και IV (κάτω) σε αντιπαραβολή

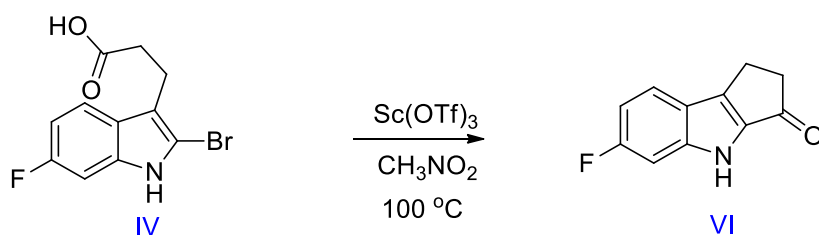
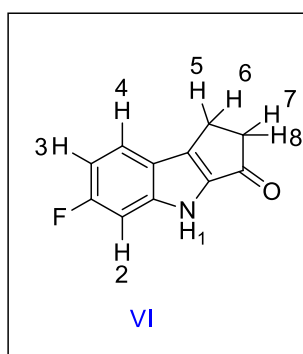
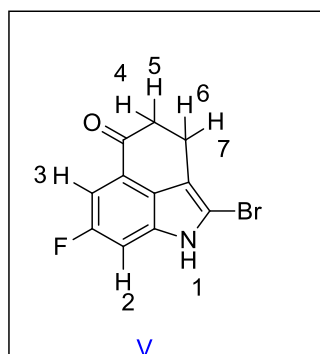


Σχήμα 106: Φάσμα ^1H NMR του του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος IV (500 MHz) σε DMSO- d_6

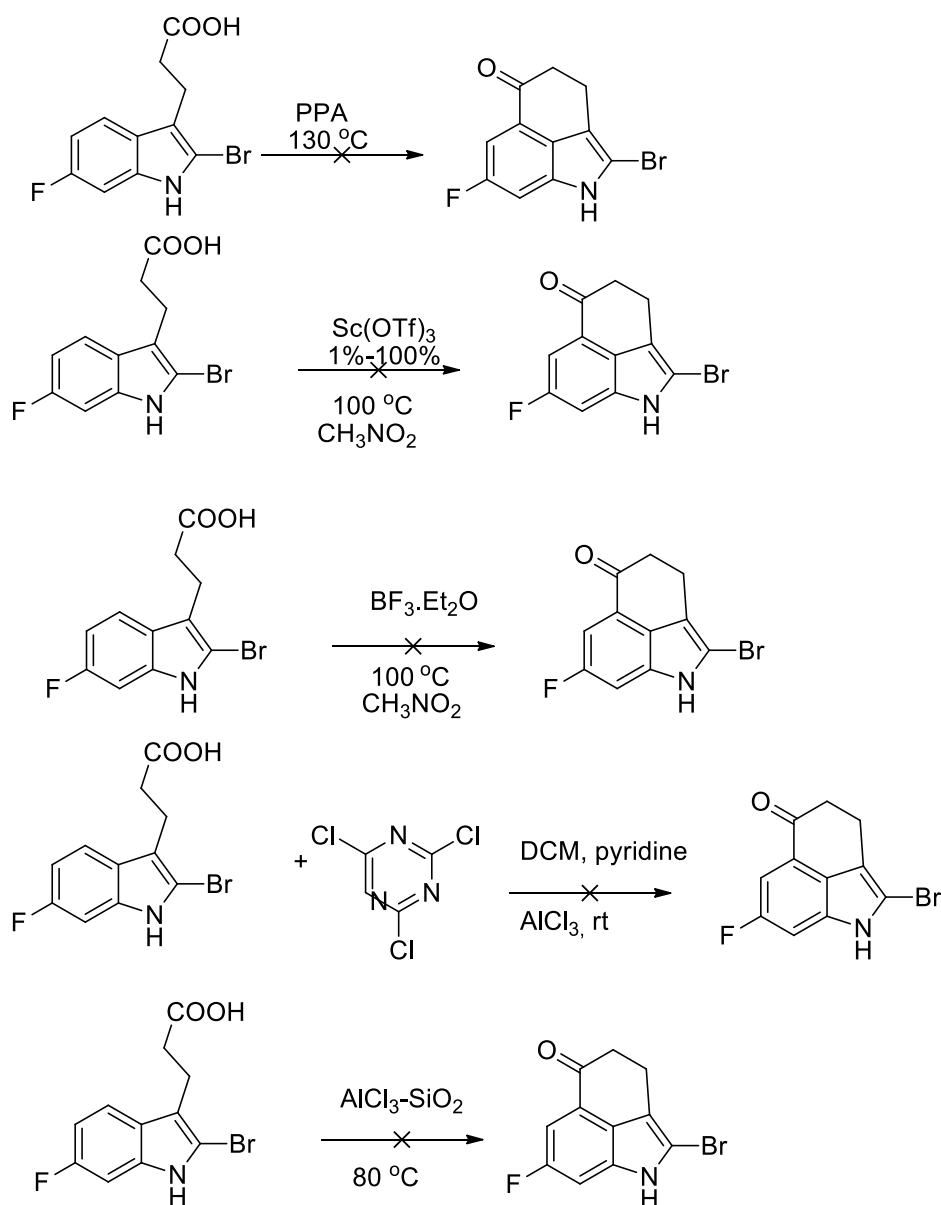
3.21 Αντιδράσεις κυκλοποίησης του υποστρώματος 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος IV και φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης VI

3.21.1 Αντιδράσεις κυκλοποίησης του υποστρώματος 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέος IV

Διενεργήθηκαν διάφορες δοκιμαστικές αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης χρησιμοποιώντας διαφορετικούς καταλύτες, διαλύτες σε μια ποικιλία συνθηκών, αλλά δε καταφέραμε να απομονώσουμε την επιθυμητή ενδιάμεση ένωση V. Απομονώθηκε ένα παραπροϊόν ενδομοριακής κυκλοποίησης στη θέση C-2 του ινδολικού δακτυλίου ως απόρροια αποχώρησης του Br⁺, ως καλή αποχωρούσα ομάδα. Συνοψίζοντας, αν και ευνοείται θερμοδυναμικά ο σχηματισμός του εξαμελούς δακτυλίου, κυκλοεξανόνης, VI, σχηματίζεται ο πενταμελής δακτύλιος, της κυκλοπεντανόνης V, κινητικό προϊόν, ως απόρροια της δραστηρότητας της C-2 θέσης έναντι της C-4 θέσης του ινδολικού δακτυλίου. Παρατηρήσαμε ότι σε μια δοκιμαστική αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης του υποστρώματος IV καταλυόμενη από τριφλικό σκάνδιο σε διαλύτη νιτρομεθάνιο (σχήμα 107), το σχηματισμό της ένωσης VI σε απόδοση 80 % (κύριο προϊόν αντίδρασης). Τέλος, στο σχήμα 108 αποτυπώνονται κάποιες χαρακτηριστικές δοκιμαστικές αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης της ένωσης VI που διενεργήθηκαν στο ερευνητικό μας εργαστήριο χρησιμοποιώντας διαφορετικές συνθήκες και δεν απέδωσαν στο σχηματισμό της ένωσης κλειδί V.



Σχήμα 107: Αντίδραση σύνθεσης του προϊόντος VI καταλυόμενη από τριφλικό σκάνδιο

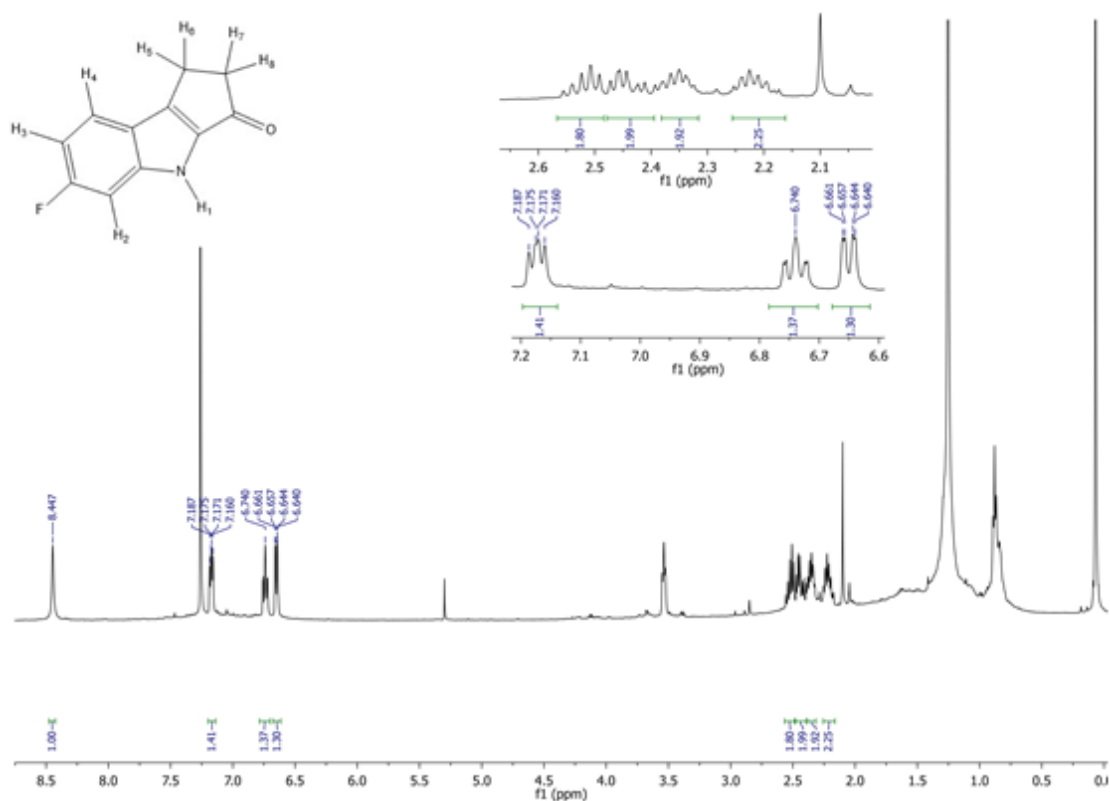


Σχήμα 108: Προσπάθειες-αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης του υποστρώματος IV σε μια ποικιλία καταλυτών και συνθηκών

3.21.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 6-φθορο-2,3-διϋδροκυκλοπεντα[α]ινδεν-1-(8H)-όνης VI

Αναλύοντας το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης VI παρατηρούμε κάποιες χαρακτηριστικές πολλαπλές κορυφές στην αλειφατική περιοχή που καταδεικνύουν το σχηματισμό της. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε πως υπάρχει μια επαναληψιμότητα στις σχάσεις των κορυφών της αρωματικής περιοχής, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του ινδολικού δακτυλίου, αντίστοιχα με τις σχάσεις των πρωτονίων της ένωσης III που καταγράφονται στο φάσμα $^1\text{HNMR}$ του σχήματος 106. Στην αλειφατική περιοχή (από 2.2 έως 2.6 ppm) καταγράφονται τέσσερις διακριτές πολλαπλές

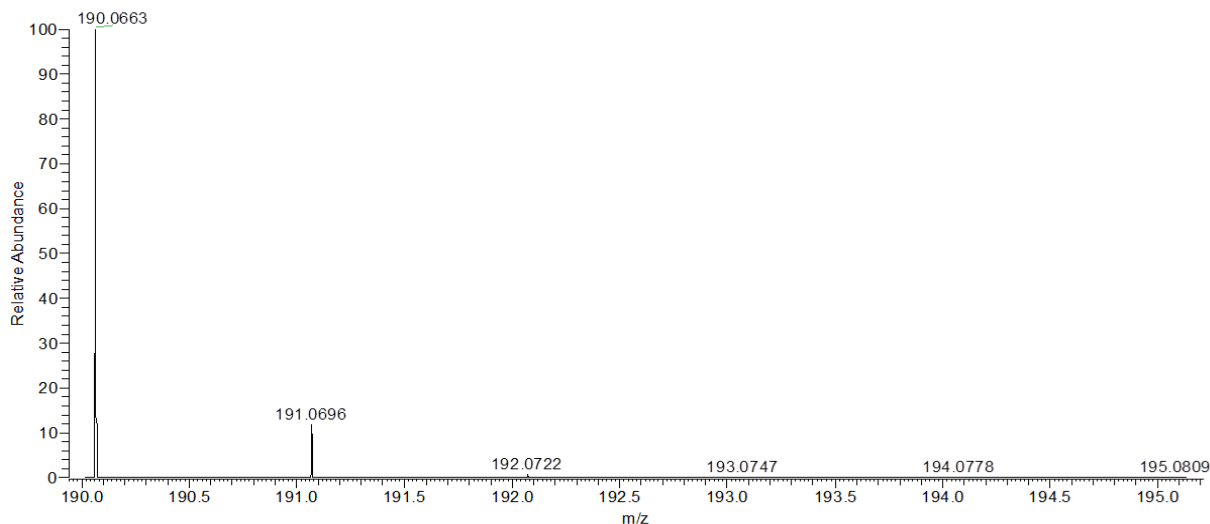
κορυφές σε τιμές ισχυρού πεδίου που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του πενταμελούς δακτυλίου. Ειδικότερα, στα τα H-7 και H-8 σε α-θέση ως προς τον καρβονυλικό άνθρακα σχάζονται σε 2 διακριτές πολλαπλές κορυφές περίπου στα 2.6 και 2.4 ppm και απορροφούν σε υψηλότερες τιμές ppm. Η γεινίαση των H-7 και H-8 με το οξυγόνο του διπλού δεσμού C=O που μέσω τόσο σ και π δεσμού έλκει το ηλεκτρονιακό νέφος προς τη μεριά του έχει ως αποτέλεσμα ο άνθρακας του καρβονυλίου να φέρει θετικό φορτίο, να απογυμνώνεται ηλεκτρονιακά και να έλκει με τη σειρά του ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το γειτονικό του άνθρακα με αποτέλεσμα τη απογύμνωση και αποπροστασία των H-7 και H-8. Τα πρωτόνια H-5 και H-6 σχάζονται σε δύο διακριτές πολλαπλές κορυφές περίπου στα 2.2 και 2.3 ppm και είναι περισσότερο προστατευμένα σε σχέση με τα H-7 και H-8, καθώς βρίσκονται σε β θέση ως προς τον καρβονυλικό άνθρακα. Τέλος, η παρατηρούμενη μη ισοδυναμία των εν λόγω πρωτονίων οφείλεται στη μείωση της περιστροφής του πενταμελούς κετονικού δακτυλίου με αποτέλεσμα να αντιλαμβάνονται διαφορετικό χημικό περιβάλλον.



Σχήμα 109: Φάσμα ¹HNMR της ένωσης VI σε διαλύτη CDCl₃ στα 500 MHz

Για να αποφανθούμε για το σχηματισμό της ένωσης VI, την ταυτοποιήσαμε του μέσω φασματοσκοπίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%. Η υπολογιζόμενη τιμή του μοριακού ιόντος $M+H^+$:190.0663 που συνάδει με τη θεωρητική του μοριακού ιόντος $M+H^+$: 190.0659

C11H8FNO +H: C11 H9 F1 N1 O1 p(gss, s/p:40) Chrg 1...



Σχήμα 110: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης VI

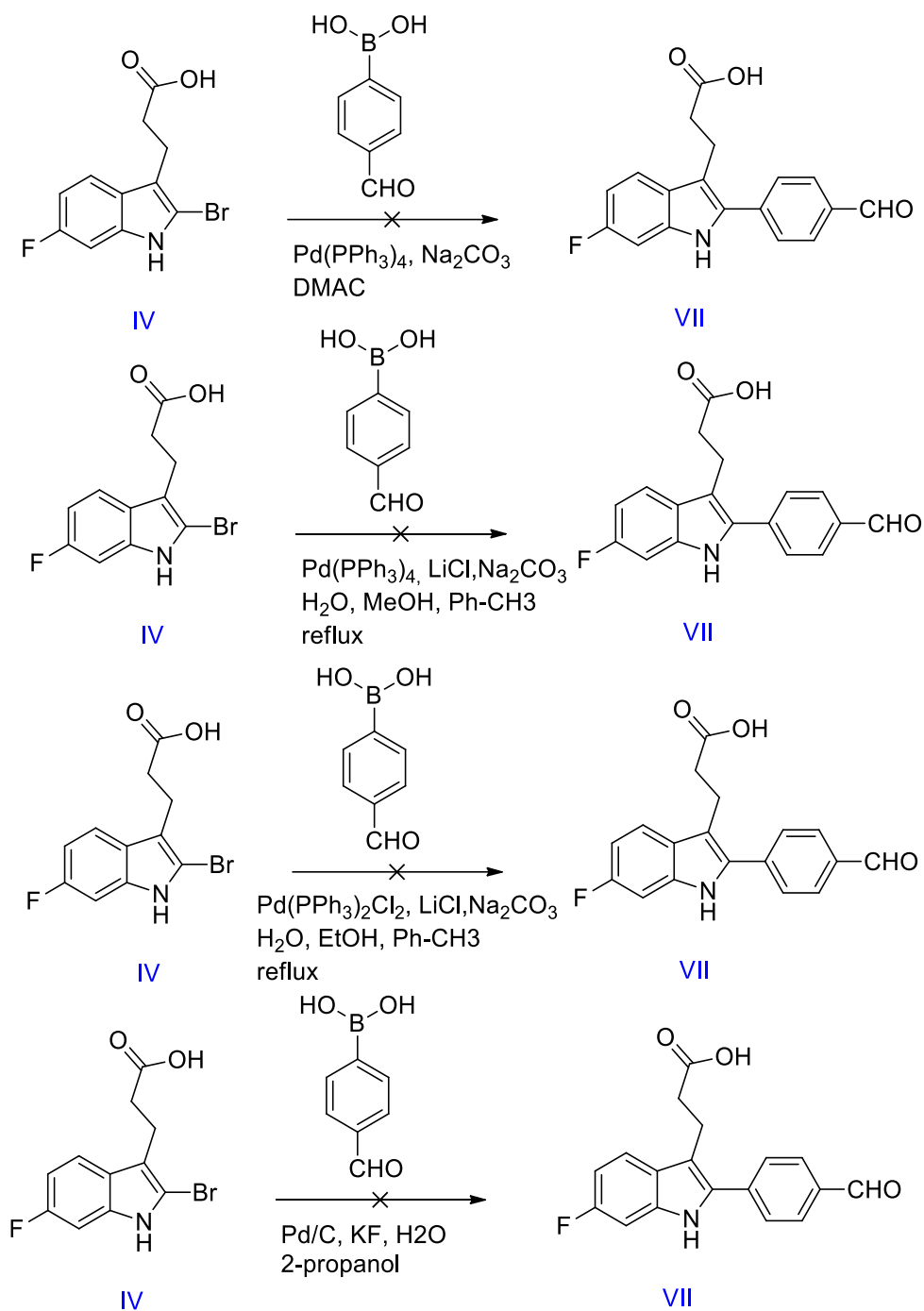
Υπολογιζόμενη τιμή του $[M+H^+]$:190.0663

Θεωρητική τιμή του $[M+H^+]$:190.0659

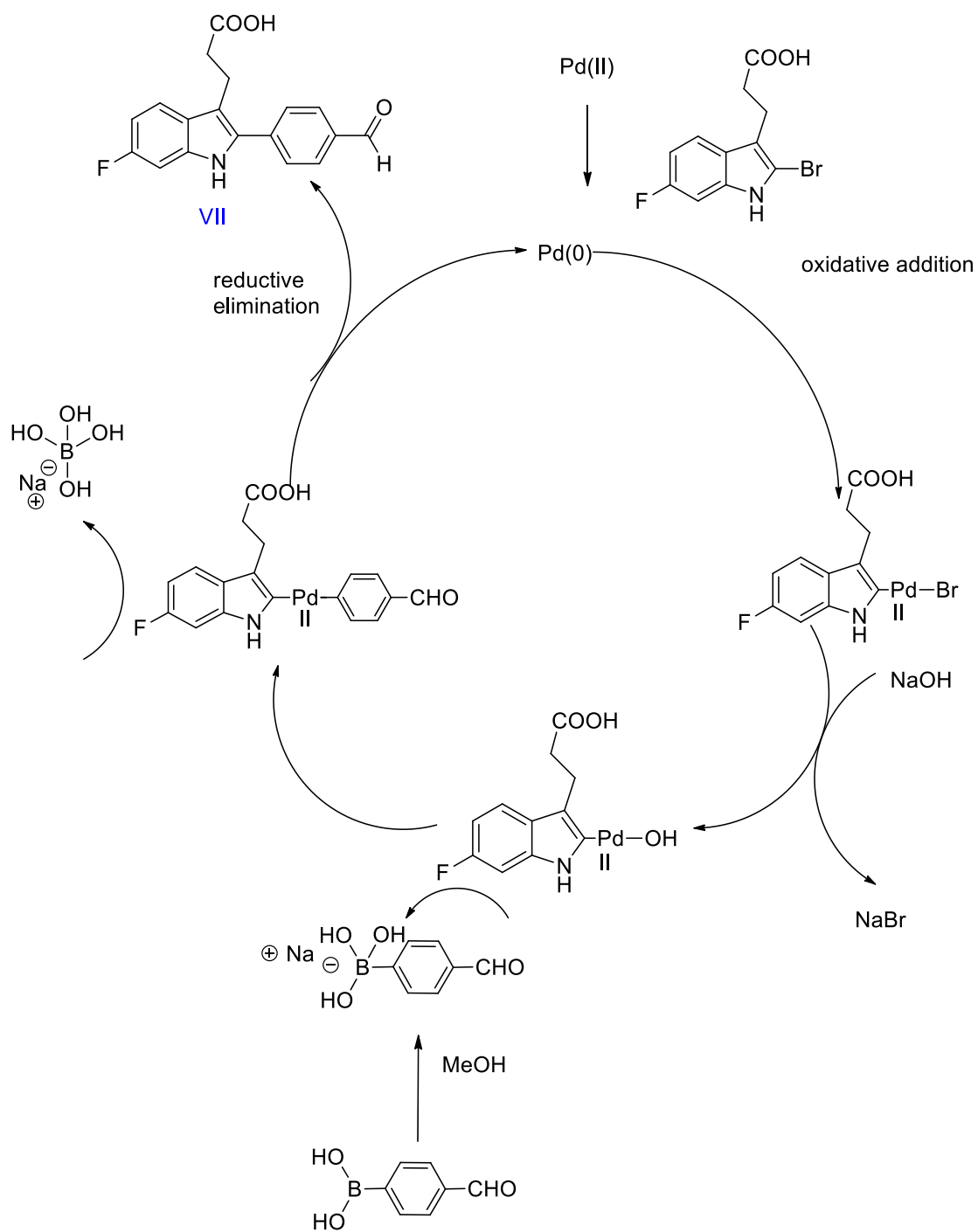
3.22 Δοκιμαστικές αντιδράσεις σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)-3- προπανοϊκού οξέος VII

Στη συγκεκριμένη υποενότητα θα αποτυπωθούν οι δοκιμαστικές αντιδράσεις σύζευξης Suzuki που διενεργήθηκαν στο ερευνητικό μας εργαστήριο χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ένωση VI και το εμπορικά διαθέσιμο αντίδραστήριο 4-φορμυλοβορονικό οξύ, διερευνώντας μια ποικιλία συνθηκών (καταλύτες, βάσεις, διαλύτες) για την ανεύρεση των βέλτιστων συνθηκών στη σύνθεση της ένωσης VII. Αξιοποιήσαμε μια ποικιλία καταλυτων παλλαδίου, διαφορετικούς διαλύτες, βάσεις και ιοντικές ενώσεις ώστε να συνθέσουμε την επιθυμητή ενδιάμεση ένωση, το προϊόν σύζευξης Suzuki, για τις απαιτούμενες ενδομοριακές αντιδράσεις κυκλοποίησης. Διαπιστώσαμε πως κανένας συνδυασμός αντιδραστηρίων δεν απέδωσε στον επιτυχή σχηματισμό της ένωσης VII. Η πιθανότερη αιτιολογία για την παρατηρούμενη αδυναμία, ίσως να οφείλεται στο σχηματισμό ενδιάμεσου συμπλόκου του οξέος με τον καταλύτη, με αποτέλεσμα

να απενεργοποιείται ο καταλύτης και να μην αλληλεπιδρά με το άτομο του βρωμίου στη C-2 θέση του ινδολίου, ίσως να γίνεται η ένταξη του παλλαδίου και να μην σχηματίζεται η επιθυμητή ένωση. Στο σχήμα 111 αποτυπώνονται κάποιες ενδεικτικές διενεργηθείσες δοκιμαστικές αντιδράσεις σύζευξης Suzuki που έλαβαν μέρος στο ερευνητικό μας εργαστήριο που δεν απέδωσαν στον επιτυχή σχηματισμό VII, ενώ στο σχήμα 112 περιγράφεται ο πιθανός καταλυτικός κύκλος του παλλαδίου.



Σχήμα 111: Δοκιμαστικές αντιδράσεις Suzuki του υποστρώματος IV

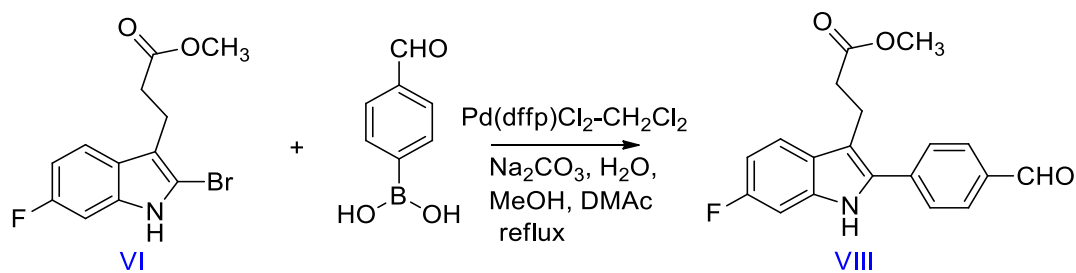


Σχήμα 112: Ο υποθετικός καταλυτικός κύκλος του Pd και ο μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης VII

3.23 Βελτιστοποίηση της αντίδρασης σύνθεσης του 6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VIII και φασματοσκοπικά δεδομένα

3.23.1 Αντίδραση σύνθεσης του 6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VIII

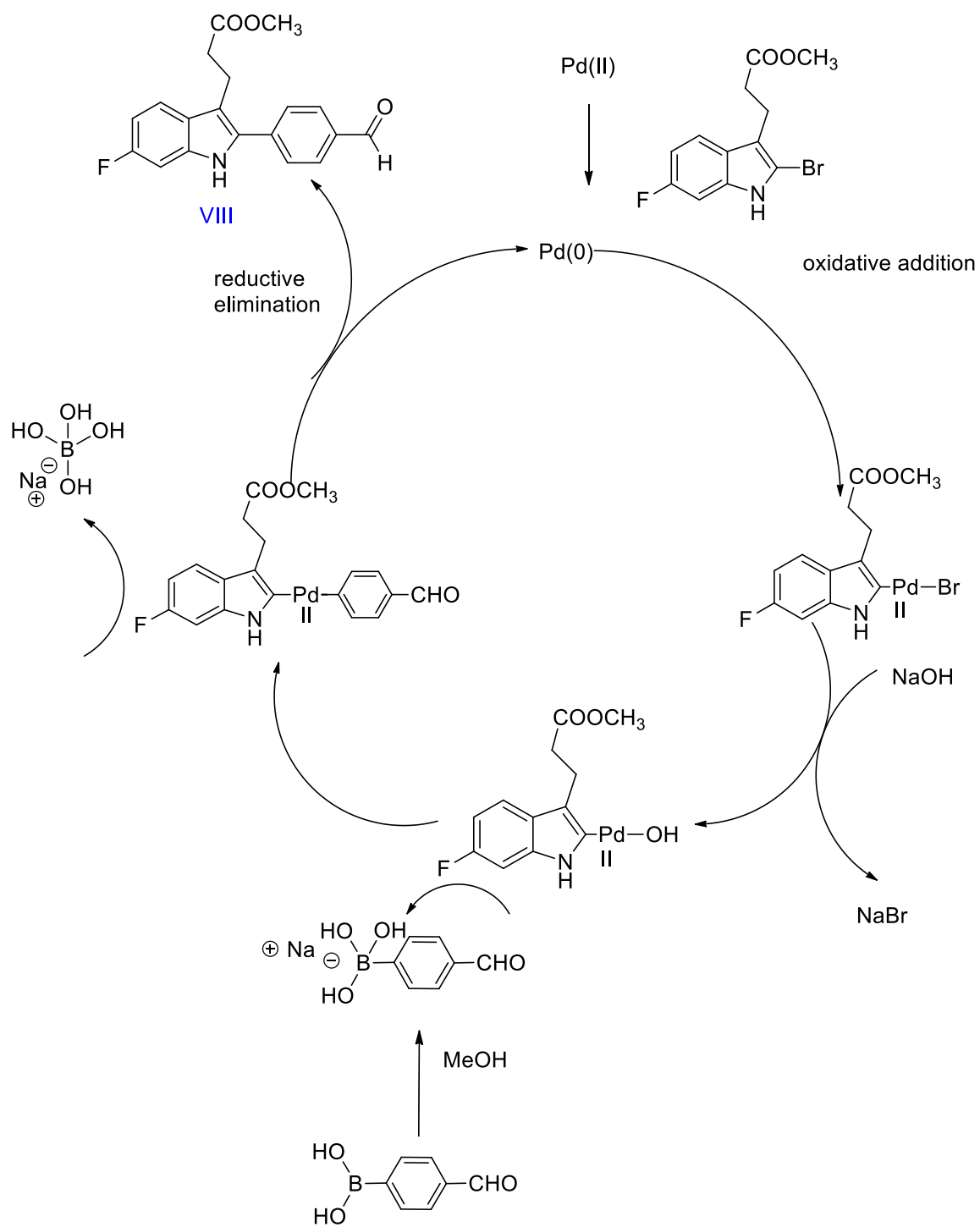
Στην προηγούμενη υποενότητα έγινε αναφορά στην υστέρηση που παρατηρήθηκε στην προσπάθεια σύνθεσης της ενδιάμεσης ένωσης VII καθώς και στις δοκιμαστικές αντιδράσεις που διεξήχθησαν στο ερευνητικό εργαστήριο αξιοποιώντας μια ποικιλία αντιδραστηρίων. Ως απόρροια της παρατηρούμενης δυσκολίας στη σύνθεση του επιθυμητού υποστρώματος της αντίδρασης Suzuki, αποφασίσαμε να τροποποιήσουμε τη δομή του αρχικού υποστρώματος αντικαθιστώντας την υδροξυλομάδα του καρβοξυλικού οξέος με την μεθυλομάδα. Παρατηρήθηκε πως το καρβοξυλικό οξύ απενεργοποιούσε όλους τους καταλύτες με αποτέλεσμα να μην προάγεται το στάδιο της τρανσμετάλλωσης, ήτοι η ένταξη του μετάλλου C-2 θέση του ινδολικού δακτυλίου και σε μεταγενέστερο στάδιο η αναγωγική απόσπαση που θα οδηγούσε στο επιθυμητό προϊόν της αντίδρασης Suzuki. Συγκρίνοντας την πορεία σύνθεσης του Rucaparib που αναπτύχθηκε από την εταιρεία Agouron στο στάδιο σύζευξης Suzuki χρησιμοποιούσαν διαφορετικό υπόστρωμα και ως καταλύτη, τετράκις (τριφαινυλοφωσφίνο) παλλάδιο 0 με την απόδοση της αντίδρασης να ανέρχεται στο 77%. Στο ερευνητικό μας εργαστήριο τροποποιήσαμε τόσο το αρχικό υπόστρωμα στην αντίδραση Suzuki, όσο και τις συνθήκες που διενεργήθηκαν οι δοκιμαστικές αντιδράσεις αξιοποιώντας μια ποικιλία αντιδραστηρίων με στόχο τη διερεύνηση των παραγόντων που θα συντελούσαν στη βελτιστοποίηση του εν λόγω σταδίου. Πράγματι, μετά από τη διεξαγωγή τριών δοκιμαστικών αντιδράσεων με μια ποικιλία συνθηκών που αποτυπώνονται στον πίνακα 3, καταφέραμε να αυξήσουμε την απόδοση της αντίδρασης Suzuki κατά 20% (97%), εν συγκρίσει με την απόδοση που επιτεύχθη από την εταιρεία Agouron (77%), αντικαθιστώντας τον καταλύτη $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ με τον $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ και τη σχεδόν ποσοτική παραλαβή της επιθυμητής ένωσης VIII.



Σχήμα 113: Βελτιστοποίηση του σταδίου σύνθεσης της ένωσης VIII που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο

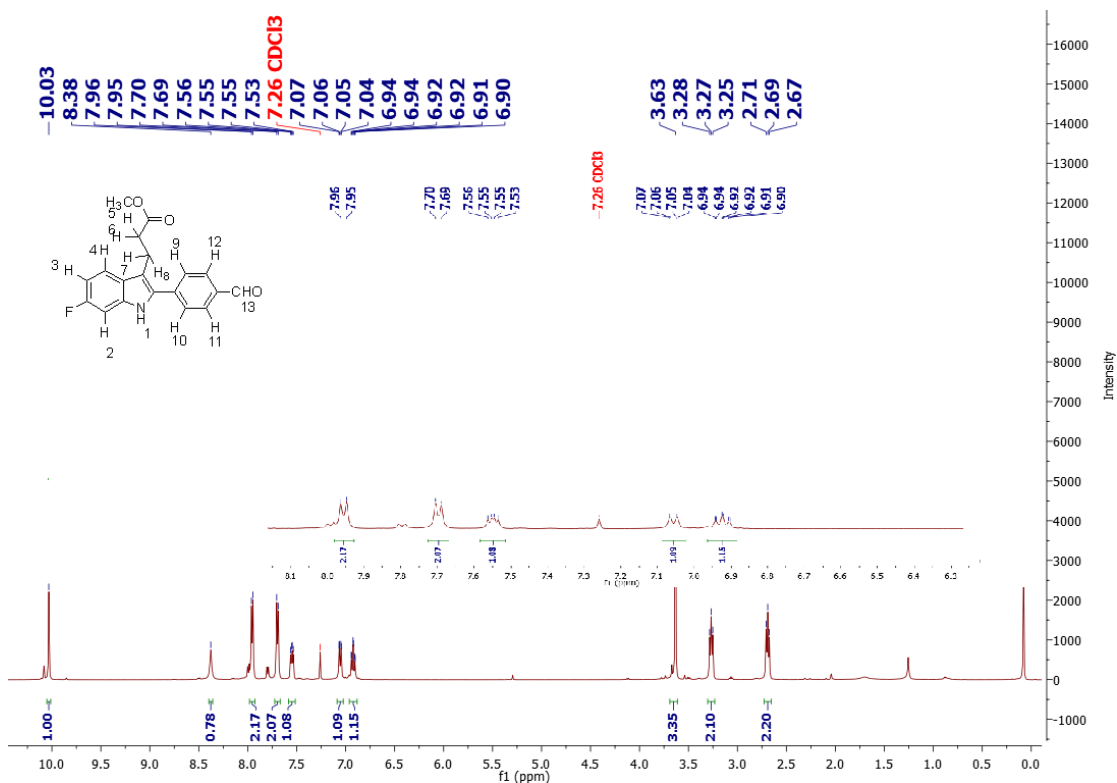
Πίνακας 3

Υπόστρωμα 1	Υπόστρωμα 2	Καταλύτης	Διαλύτης	Βάση	Πρωθητικό μεσο
VI	4-φορμυλοβορονικό οξύ	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	$\text{PhCH}_3, \text{EtOH}, \text{H}_2\text{O}$	Na_2CO_3	LiCl
VI	4-φορμυλοβορονικό οξύ	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$	$\text{PhCH}_3, \text{EtOH}, \text{H}_2\text{O}$	Na_2CO_3	-
VI	4-φορμυλοβορονικό οξύ	$\text{Pd}(\text{dffp})_2\text{Cl}_2$	$\text{DMAc}, \text{H}_2\text{O}, \text{MeOH}$	Na_2CO_3	-



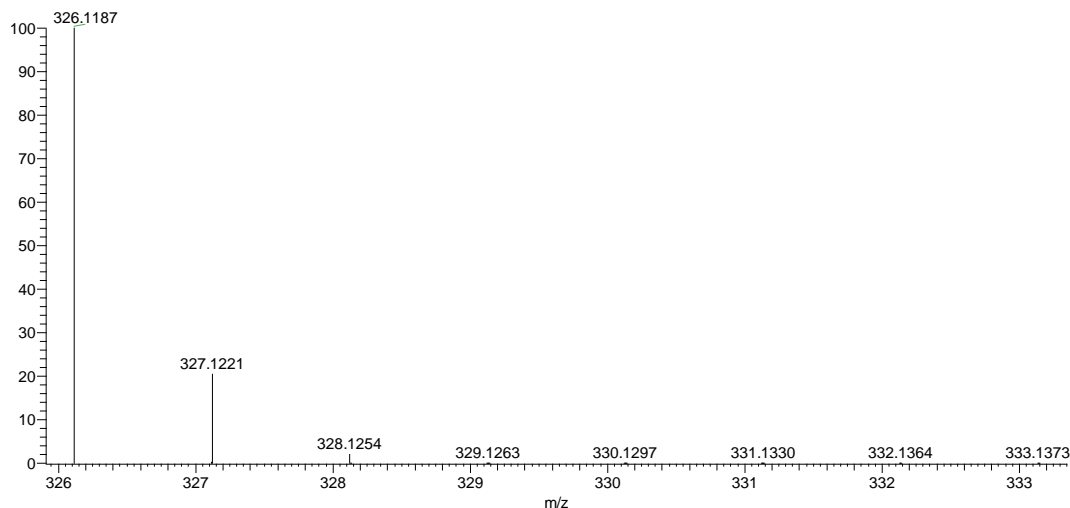
Σχήμα 114: Μηχανισμός αντίδρασης σύνδεσης της ένωσης VIII μέσω αντίδρασης Suzuki

3.23.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VIII



Σχήμα 115: Φάσμα ¹HNMR (500Hz) της ένωσης VIII σε διαλύτη CDCl₃.

Αναλύοντας το ως άνω φάσμα ¹HNMR παρατηρούμε κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές που αποδεικνύουν τον επιτυχή σχηματισμό της ένωσης VIII. Ξεκινώντας από τιμές ασθενούς πεδίου, καταγράφεται μια απλή κορυφή περίπου στα 10 ppm που αντιστοιχεί στο πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H-13 της βενζαλδεΐδης, του δακτυλίου που εντάχθηκε στη C2-θέση του ινδολικού δακτυλίου. Τα δύο ζεύγη ισοδύναμων πρωτονίων H-9, H-10 και H-11, H-12 σχάζονται σε δύο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 7.70 και 7.96 ppm, αντίστοιχα, με ολοκλήρωση 2H η καθεμία. Οι υπόλοιπες κορυφές του ως άνω φάσματος αντιστοιχούν στα πρωτόνια του ινδολικού δακτυλίου και στα πρωτόνια της ανθρακικής αλυσίδας του προπιονικού μεθυλεστέρα στη C-3 του ινδολικού δακτυλίου, και εκτενής αποτίμησή τους έγινε σε προηγούμενο εδάφιο.



Σχήμα 116: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης VIII

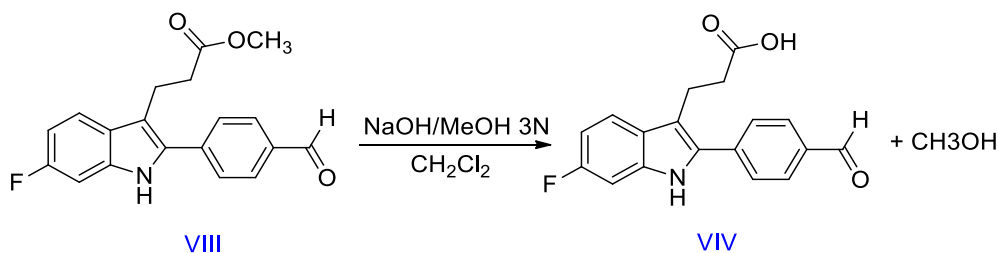
Υπολογιζόμενη τιμή του $[M+H^+]$: 326.1183

Θεωρητική τιμή του $[M+H^+]$: 326.1187

3.24 Αντίδραση υδρόλυσης της ένωσης VIII και φασματοσκοπικά δεδομένα

3.24.1 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1-H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος IV

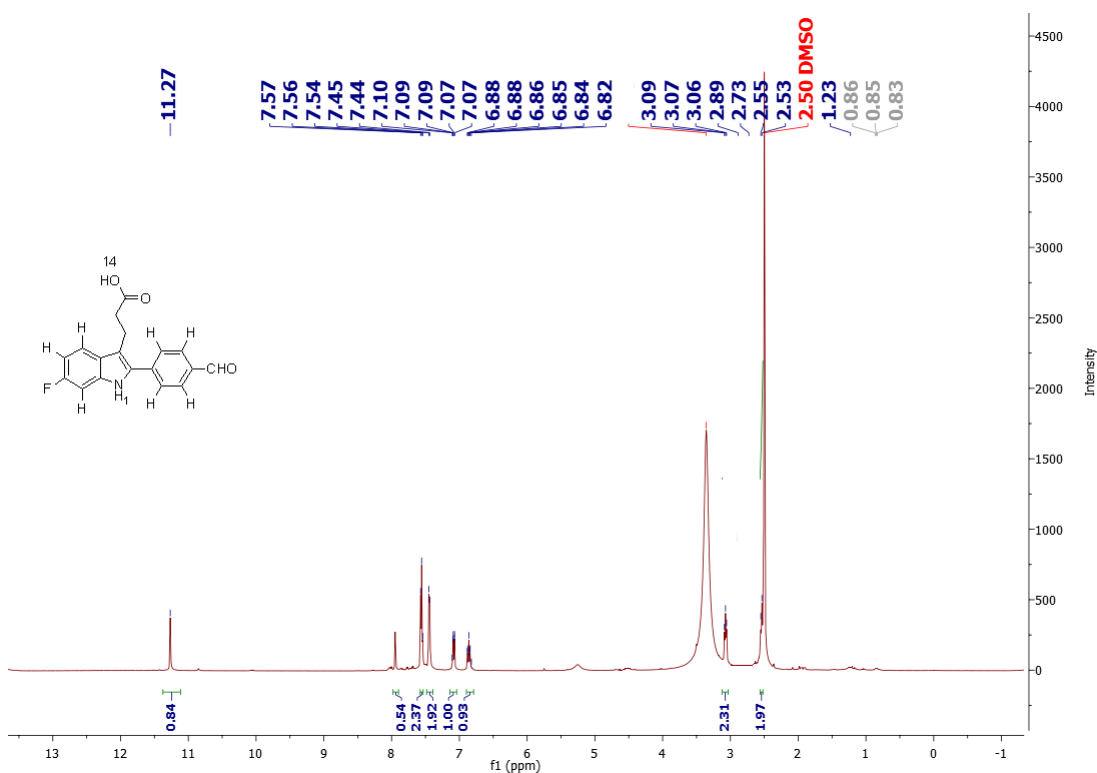
Επόμενο στάδιο στην όλη συνθετική πορεία που προτείνουμε στο ερευνητικό μας εργαστήριο είναι η υδρόλυση του υποστρώματος VIII με ήπιες βασικές συνθήκες προς σχηματισμό της ένωσης IV. Με τη μέθοδο αυτή που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο εντός 10 ωρών, παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν υδρόλυσης σχεδόν ποσοτικά (100%), χωρίς το σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων.



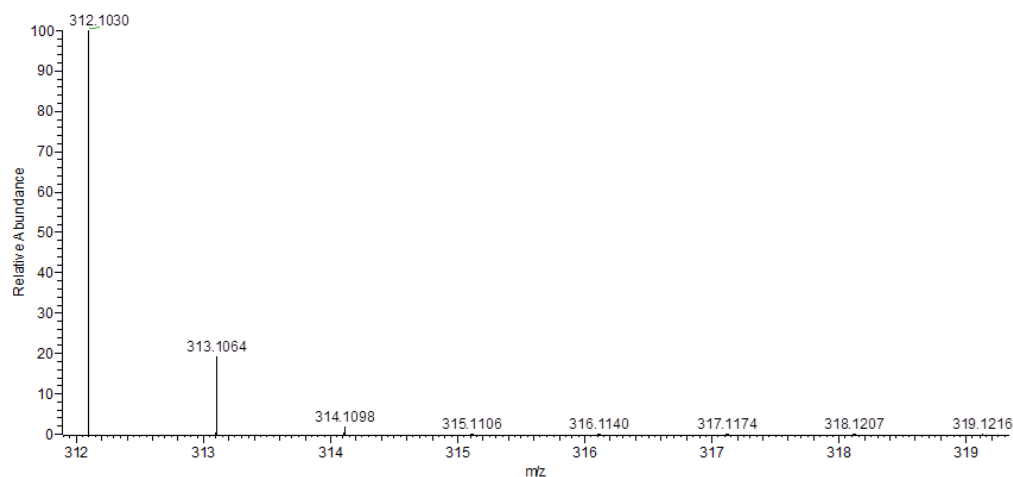
Σχήμα 117: Αντίδραση υδρόλυσης της ένωσης VIII με ήπιες βασικές συνθήκες που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο

3.24.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1-Η-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VIV

Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα του προϊόντος υδρόλυσης VIV μπορούμε να αποφανθούμε για το σχηματισμό του. Στο πρωτονιακό φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πλέον δε καταγράφεται η απλή κορυφή στα 3.6 ppm που αντιστοιχούσε στα πρωτόνια της μεθοξυμάδας του σχήματος 115, λόγω αντικατάστασής της από την υδροξυλομάδα. Ωστόσο, η ευρεία κορυφή που αναμέναμε για το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας του καρβοξυλικού οξέος δε καταγράφεται στο φάσμα του σχήματος 118 καθώς είναι ανταλλάξιμο και δεν είναι εφικτός ο εντοπισμός του. Τέλος, παρατηρούμε μια επαναληψιμότητα των κορυφών σε παραπλήσιες τιμές ppm, ως αναμένετο, και σε αντιστοιχία με τις κορυφές που παρατηρούνται και καταγράφονται στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης VIII.



Σχήμα 118: Φάσμα ^1H NMR (500Hz) της ένωσης VIV σε διαλύτη DMSO d-6

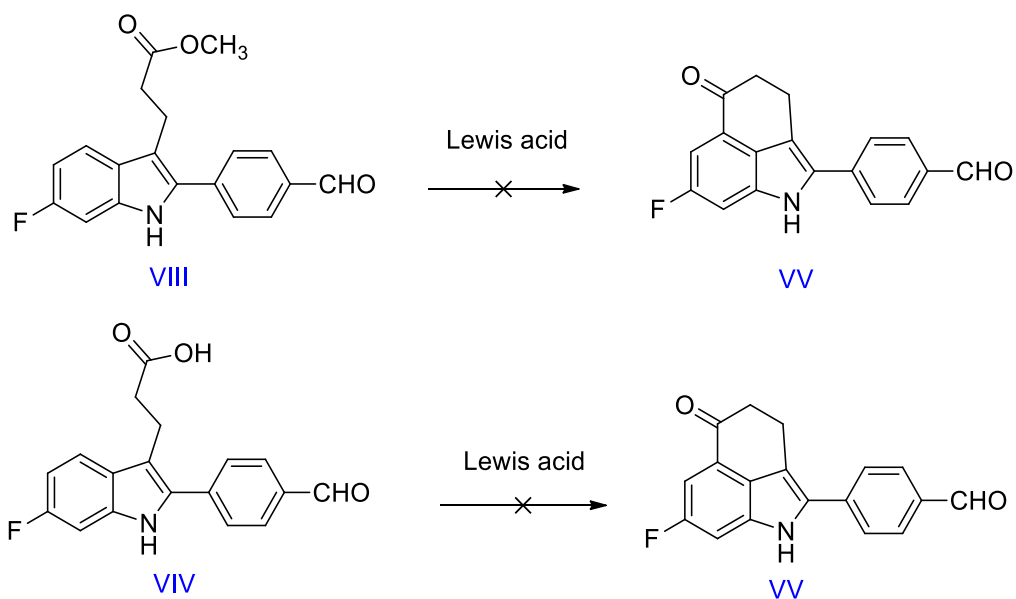


Σχήμα 119: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης VIV

Από τη λήψη φάσματος μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας υπολογίστηκε η τιμή του πρωτονιωμένου μοριακού ιόντος. Η υπολογιζόμενη τιμή του μοριακού ιόντος $M+H^+$: 312.1030, που συνάδει με τη θεωρητική του μοριακού ιόντος $M+H^+$: 312.1029

3.25 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης των υποστρωμάτων VIII και VIV

Στο ερευνητικό εργαστήριο διενεργήθηκαν πολλές δοκιμαστικές αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel Crafts, αξιοποιώντας τα υποστρώματα VIII και VIV με διάφορους καταλύτες που δρουν ως οξέα κατά Lewis, με στόχο τη σύνθεση της επιθυμητής ένωσης VV, που απεικονίζεται στο σχήμα 120. Ωστόσο, δεν επιτεύχθη η σύνθεση και η απομόνωση της επιθυμητής ένωσης με κανένα συνδυασμό συνθηκών, όπως αποτυπώνεται στο πίνακα 4. Μέσω φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$, καταλήξαμε στο συμπέρασμα πως η δραστική αλδεϋδομάδα παρεμπόδιζε την αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης προς σχηματισμό του εξαμελούς δακτυλίου κυκλοεξανόνης συμπυκνωμένης με το ινδόλιο. Η εν λόγω ομάδα, λόγω δραστικότητας αλληλεπιδρούσε και αντιδρούσε με τους καταλύτες μέσω παράπλευρων αντιδράσεων σχηματίζοντας παραπροϊόντα. Λόγω του σχηματισμού του σχηματισμού ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, κρίθηκε επιτακτική η ανάγκη της προστασίας της αλδεϋδομάδας μέσω εισαγωγής της 1,3-προπανοδιθειόλης, γιατί παρουσιάζει συμβατότητα και απομακρύνεται με συνθήκες που δεν προκαλούν διάσπαση σε περίπτωση επιτυχούς σχηματισμού του δακτυλίου της κυκλοεξανόνης.



Σχήμα 120: Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης των υποστρωμάτων VIII και VIV

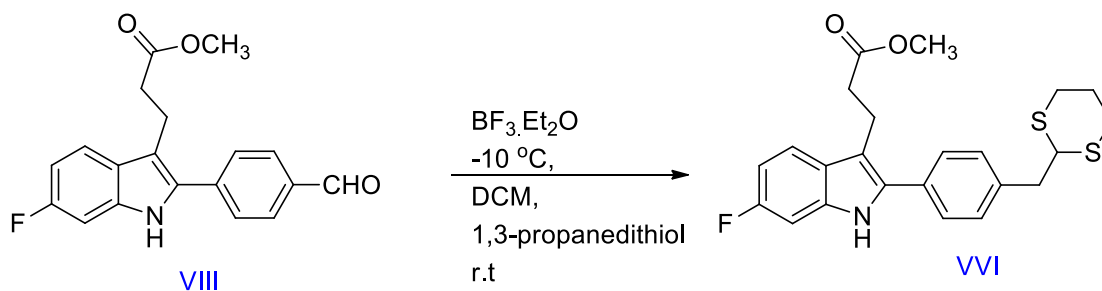
Πίνακας 4

Υπόστρωμα	Υπόστρωμα 2	Καταλύτης	Διαλύτης
1			
VIII	VIV	SiO ₂ -AlCl ₃	-
VIII	VIV	PPA	PPA
VIII	VIV	PPA, AlCl ₃	PPA, AlCl ₃
VIII	VIV	BF ₃ ·Et ₂ O	CH ₃ NO ₂
VIII	VIV	Sc(OTf) ₃	CH ₃ NO ₂
VIII	VIV	TFA/CH ₃ COOH	CH ₃ COOH
VIII	VIV	TFA, MSA	TFA/MSA

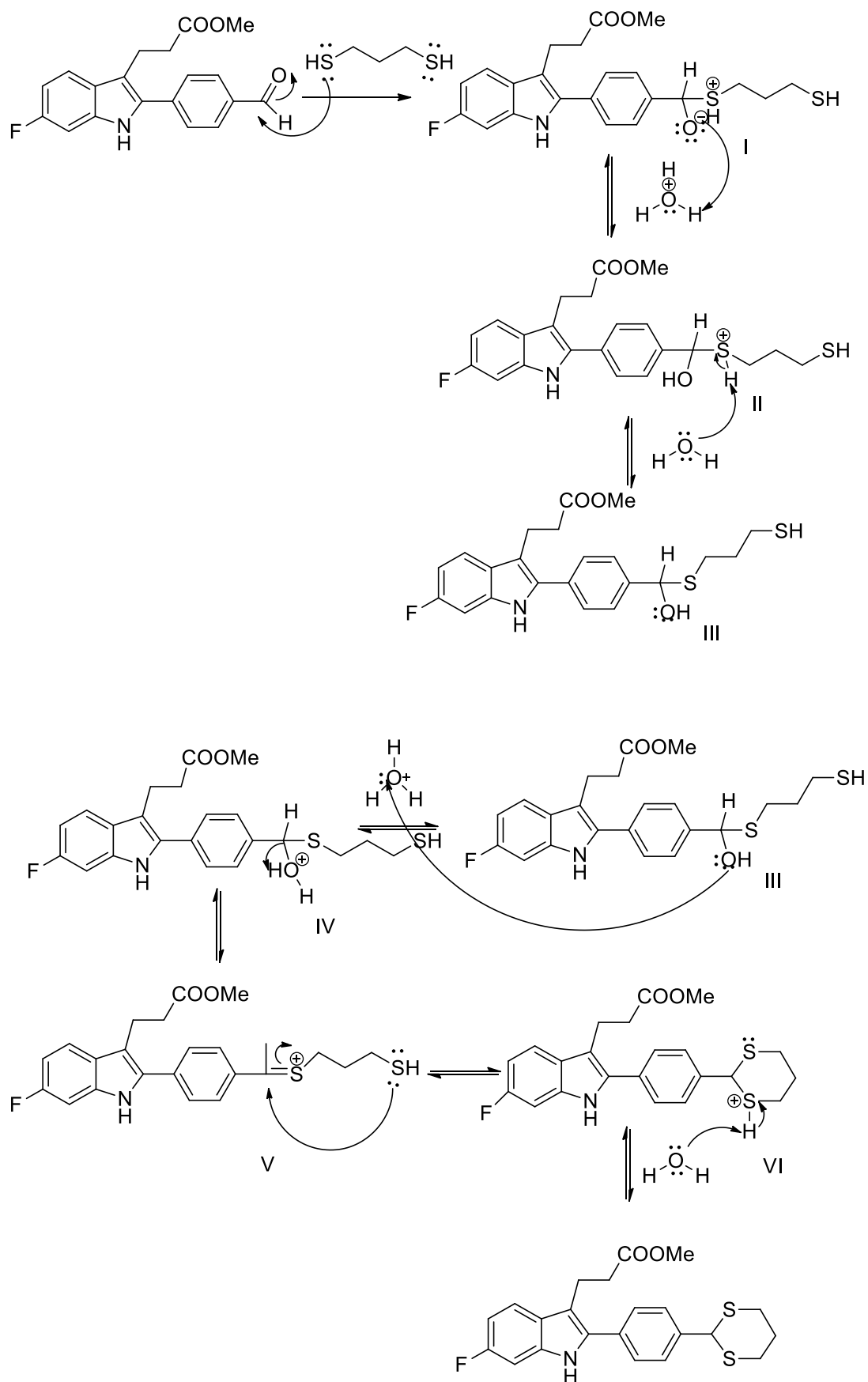
3.26 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (2-(4-((1,3διαθειαν-2-υλο)μεθυλο)φαινυλο)-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα VVI και φασματοσκοπικά δεδομένα

3.26.1 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (2-(4-((1,3διαθειαν-2-υλο)μεθυλο)φαινυλο)-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα

Η προστασία της αλδεϋδομάδας περιλαμβάνει την αντίδραση του υποστρώματος της ένωσης VIII και της 1,3 προπανοδιθειόλης με προσθήκη καταλυτικής ποσότητας αιθερικού τριφθοριούχου βορίου στους $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μετά το πέρας της προσθήκης της 1,3-προπανοδιθειόλης η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου δίνοντας ποσοτικά (100%) το προϊόν προστασίας VVI σε διάστημα 2 ωρών. Ο μηχανισμός αποδίδεται αναλυτικά στο σχήμα 121 και περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του θείου στην καρβονυλομάδα της αλδεΐδης με το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου I το οποίο με μεταφορά πρωτονίου σχηματίζει το ενδιάμεσο II το οποίο θα απωλέσει ένα πρωτόνιο συνδεδεμένο στο θείο δίνοντας ένα μόριο ημιθειαικετάλης III. Εν συνεχεία η υδροξυλομάδα του ενδιάμεσου III με μεταφορά πρωτονίου μετατρέπεται σε μια καλύτερη αποχωρούσα ομάδα η οποία αποχωρεί σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο ιόν V σουλφιδικού τύπου, το οποίο με περαιτέρω πυρηνόφιλη προσβολή από το θείο σχηματίζει στον άνθρακα του διπλού δεσμού δίνει ένα κυκλικό ενδιάμεσο VI. Τέλος, το ενδιάμεσο VI με απώλεια ενός πρωτονίου σχηματίζει την επιθυμητή ένωση-προϊόν προστασίας.



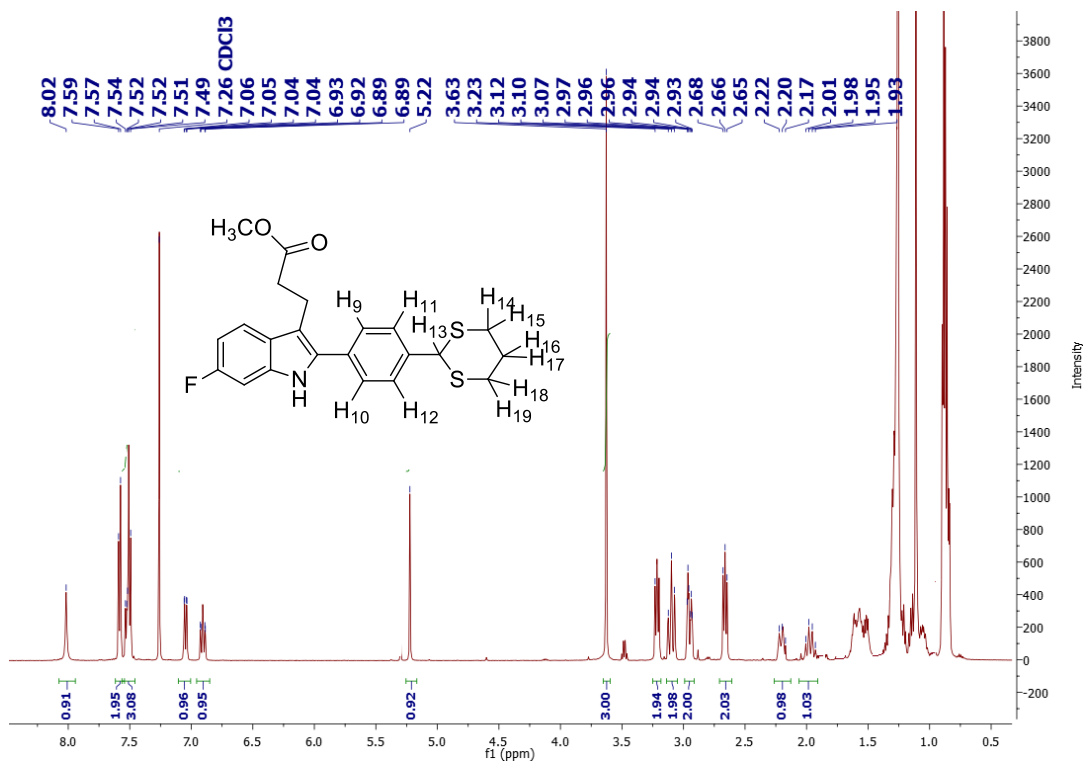
Σχήμα 121: Αντίδραση προστασίας της αλδεϋδομάδας της ένωσης VIII μέσω εισαγωγής της 1,3-προπανοδιθειόλης



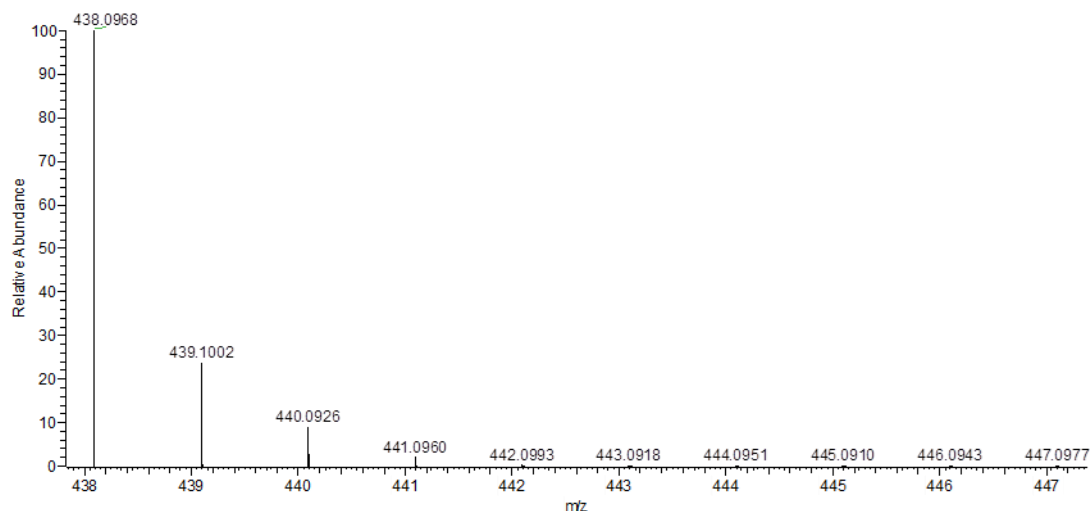
Σχήμα 122: Μηχανισμός σύνθεσης της θειοακετάλης

3.26.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-(4-((1,3διαθειαν-2-υλο)μεθυλο)φαινυλο)-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ μπορούμε να αποφανθούμε για τον επιτυχή σχηματισμό του προϊόντος προστασίας θειοακετάλης, καθώς απουσιάζει πλέον η απλή κορυφή σε στα 11.27 ppm, που αντιστοιχούσε στο πρωτόνιο της αλδεΐδομάδας, ως το πλέον αποπροστατευμένο. Διακρίνεται στα 5.22 ppm μια απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-13 που ευρίσκεται μεταξύ των δύο θείων και το περισσότερο αποπροστατευμένο εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα πρωτόνια του κυκλοεξανοϊκού δακτυλίου του διθειανίου, λόγω του εκδηλούμενου αρνητικού επαγωγικού φαινομένου από τα άτομα θείου μέσω σ δεσμών. Στην αλειφατική περιοχή του φάσματος καταγράφονται στα 3.12 ppm και 2.97 ppm, δύο πολλαπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα δύο ισοδύναμα ζεύγη H-14, H-15 και H-18, H-19, αντίστοιχα. Τέλος, στα 2.22 και 2.01 ppm, καταγράφονται ως δύο διακριτές πολλαπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα H-16 και H-17, τα πλέον προστατευμένα πρωτόνια του νεοσχηματιθέντος δακτυλίου. Θα αναμένετο, τα εν λόγω πρωτόνια να αντιλαμβάνονται το ίδιο χημικό περιβάλλον και να καταγράφεται μια κοινή κορυφή με ολοκλήρωση 2H, ωστόσο η μη ισοδυναμία τους μάλλον οφείλεται στη μείωση της περιστροφής του δακτυλίου γύρω από τους δεσμούς C-C.



Σχήμα 123: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500MHz) της ένωσης VVI σε CDCl_3



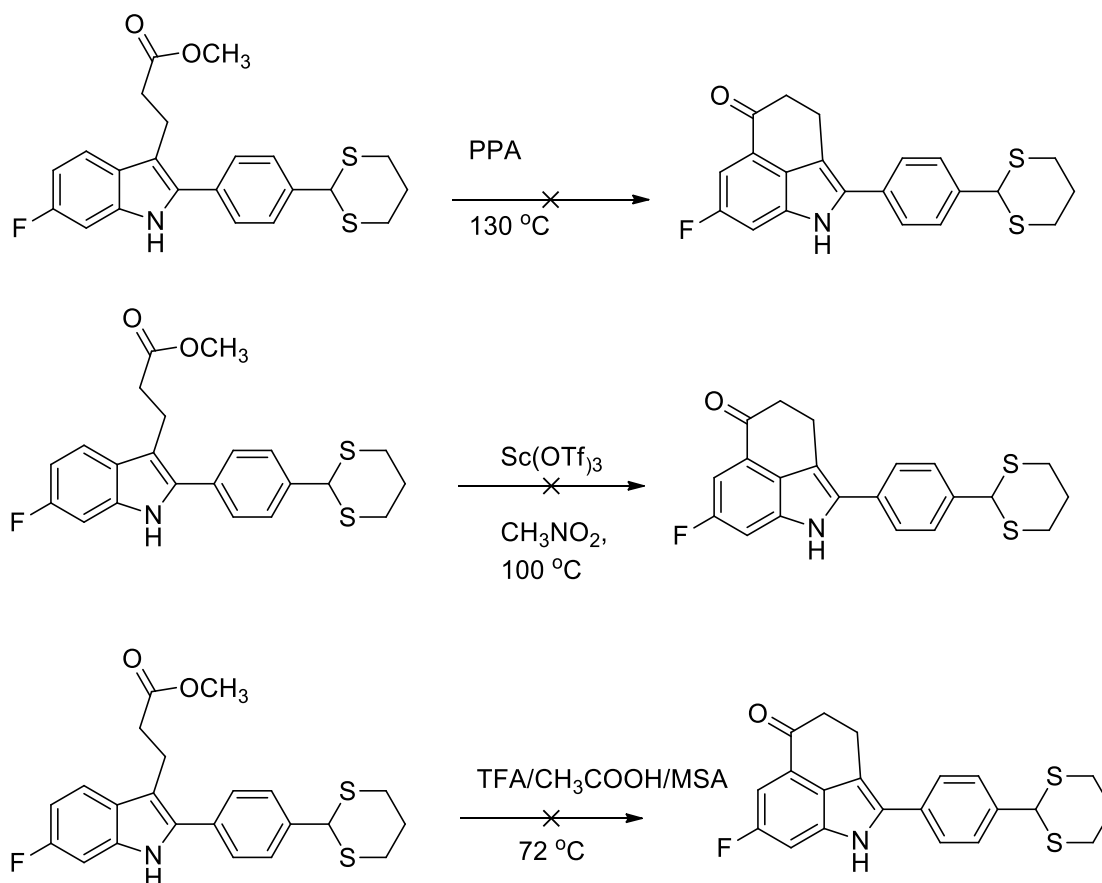
Σχήμα 124: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης VVI

Υπολογιζόμενη τιμή του $[M+H^+, Na^+]$: 439.1002

Θεωρητική τιμή του $[M+H^+, Na^+]$: 439.1005

3.27 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel-Crafts της ένωσης VVI

Το επόμενο στάδιο της προτεινόμενης συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την ενδομοριακή κυκλοποίηση του υποστρώματος VVI με τη χρήση καταλυτών που δρουν ως οξέα κατά Lewis. Διενεργήθηκαν τρεις δοκιμαστικές αντιδράσεις με τη χρήση διαφορετικών καταλυτών, όπως αποτυπώνεται στο σχήμα 125. Λόγω των δραστικών συνθηκών που αναπτύχθηκαν παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ο σχηματισμός πολλών ανεπιθύμητων παραπροϊόντων με αποτέλεσμα να καθίσταται ανέφικτη η επιτυχής σύνθεση και απομόνωση της επιθυμητής ένωσης.

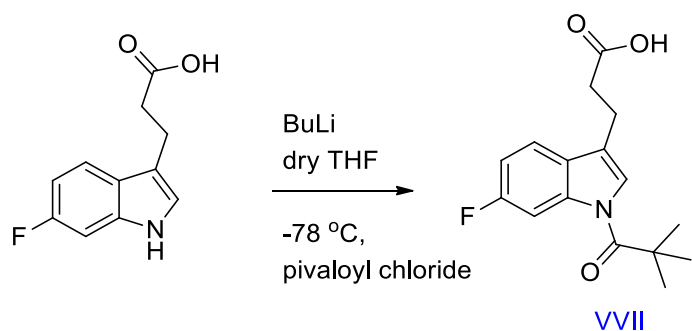


Σχήμα 125: Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel-Crafts του υποστρώματος VVI που δεν απέδωσαν στο σχηματισμό της επιθυμητής ένωσης

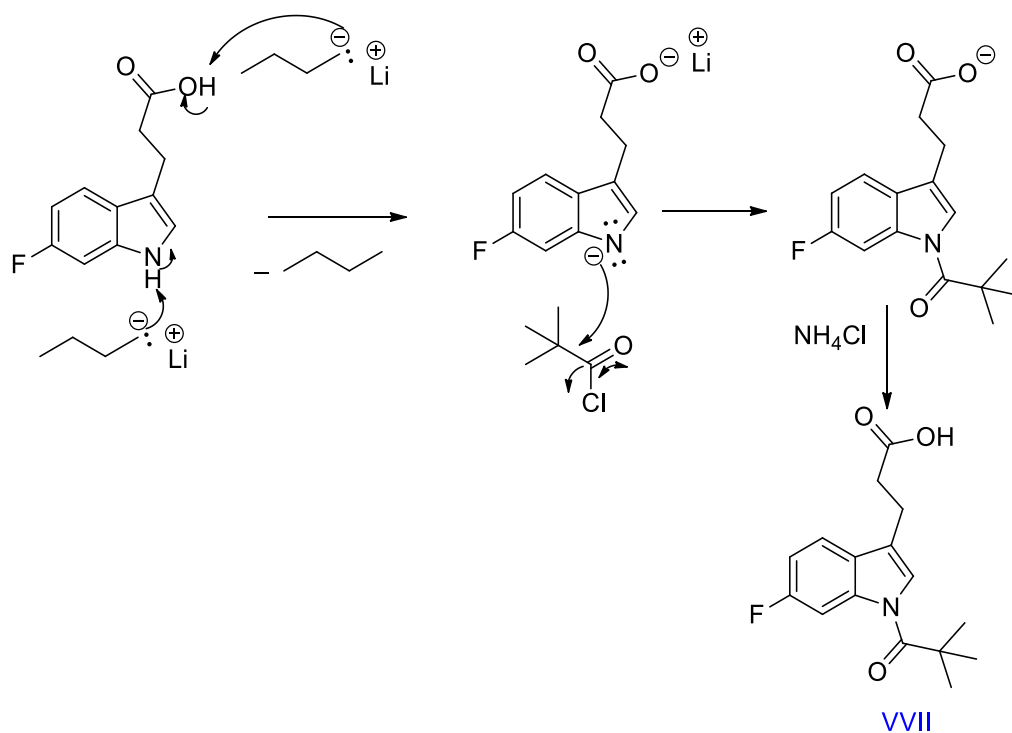
3.28 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-1-πιβαλοϋλ-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VVII και φασματοσκοπικά δεδομένα

3.28.1 Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης (6-φθορο-1-πιβαλοϋλ-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VVII

Τελευταία εναλλακτική προσπάθεια αποτελεί η σύνθεση της ένωσης VVII που αποτελεί το προϊόν προστασίας του αζώτου του ινδολίου μέσω εισαγωγής 2,2-διμεθυλοπροπανοϊκής ομάδας. Μέσω διερεύνησης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας κρίθηκε σκόπιμη η προστασία του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου με μιας ογκώδη ομάδα να παρεμποδίζει τόσο στερεοχημικά όσο και ηλεκτρονιακά, σε μετέπειτα στάδιο, την ενδομοριακή κυκλοποίηση κατά Friedel-Crafts προς αποφυγή του παραπροϊόντος κυκλοποίησης στην C-2 θέση του ινδολίου. Έτσι κατευθύνεται η κυκλοαφυδάτωση στη θέση C-4 του ινδολίου και η επιθυμητή ένωση απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε με όλες τις σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές σε πολύ ικανοποιητική απόδοση.



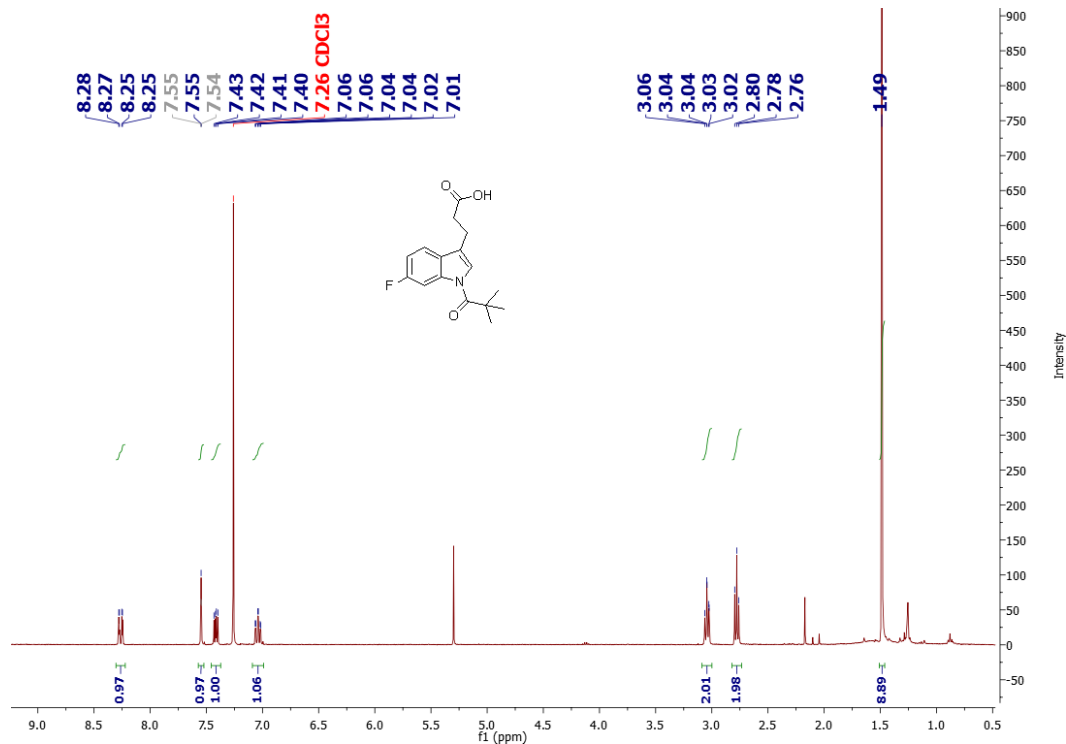
Σχήμα 126: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης VVII



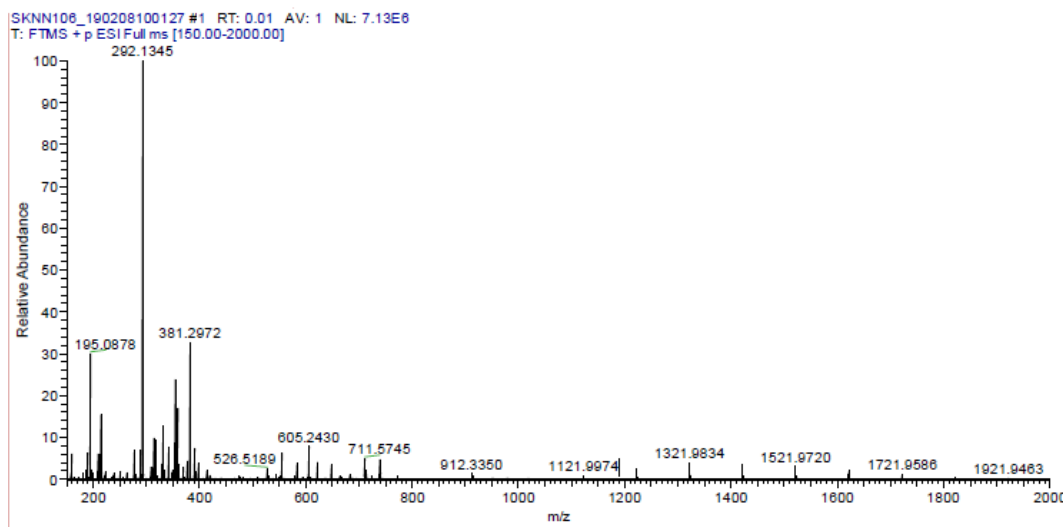
Σχήμα 127: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης VVII

3.28.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (6-φθορο-1-πιβαλοϋλ-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέος VVII

Από το πρωτονιακό φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καταδεικνύεται ο σχηματισμός του προϊόντος προστασίας του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου μέσω εισαγωγής της πιβαλοϋλο-ομάδας. Καταγράφονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του αρωματικού ινδολικού δακτυλίου, των οποίων η αποτίμηση τους έχει γίνει εκτενώς σε προηγούμενες. Παρατηρούμε, μια έντονη απλή κορυφή στην αλειφατική περιοχή, στα 1.49 ppm, με ολοκλήρωση 9H, που αντιστοιχεί στα πλέον προστατευμένα πρωτόνια των 3 μεθυλομάδων της πιβαλοϋλο-ομάδας.



Σχήμα 128: Φάσμα ^1H NMR (400MHz) της ένωσης VII σε CDCl_3



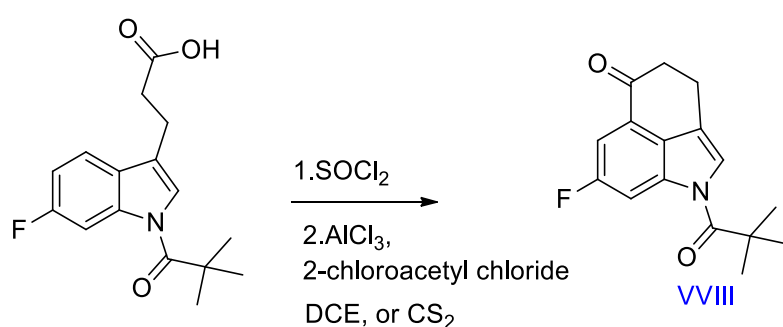
Σχήμα 129: Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονικού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης VII

Υπολογιζόμενη τιμή του $[\text{M}+\text{H}^+]$: 292.1345

Θεωρητική τιμή του $[\text{M}+\text{H}^+]$: 292.1343

3.29 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης κατά Friedel Crafts του υποστρώματος VVII

Στο ερευνητικό εργαστήριο διενεργήθηκαν δοκιμαστικές αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης αξιοποιώντας τη συντεθείσα ένωση VVII. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την προσθήκη απεσταγμένου θειονυλοχλωριδίου προς σχηματισμό του αντίστοιχου χλωριδίου το οποίο περαιτέρω αντιδρά με καταλύτη τριχλωριούχο αργίλιο και υπό την παρουσία ενός προωθητικού μέσου (2-χλωροακετυλο χλωριδίου) σε διαλύτη διχλωροαιθάνιο ή διθειάνθρακα. Από τη λήψη φάσματος $^1\text{H NMR}$ δε καταφέραμε να απομονώσουμε το επιθυμητό προϊόν VVIII, καθώς σχηματίστηκαν πολλά ανεπιθύμητα παραπροϊόντα.



Σχήμα 130: Αντίδραση σύνθεσης του προϊόντος κυκλοποίησης VVIII.

4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Συσκευές και όργανα

Η ταυτοποίηση των συνθετιμένων ενδιάμεσων και τελικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω λήψης φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AMX 250, 400 και 500, καθώς και μέσω φασματοσκοπίας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS). Τα σημεία τήξεως των τελικών ενώσεων προσδιορίσθηκαν σε συσκευή Buchi 510.

Οι πρόδρομες-αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Fluorochem, Fluka, Aldrich, Alfa Aesear και Merck και χρησιμοποιήθηκαν, ως επί το πλείστον, χωρίς ενδιάμεση επεξεργασία. Οι δευτεριωμένοι διαλυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται επίσης από τις παραπάνω εταιρείες. Οι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν για την αναλυτική επεξεργασία των αντιδράσεων και όπου κρίθηκε απαραίτητο καταστήθηκαν απόλυτοι και ακολούθως διατηρήθηκαν σε αδρανές περιβάλλον υπό ατμόσφαιρα αζώτου.

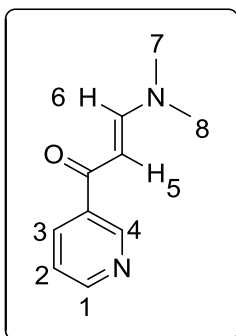
Ο καθαρισμός των ενώσεων κατέστη εφικτός με χρωματογραφία στήλης μέσης πίεσης, όπου χρησιμοποιήθηκε 9385 silica gel F₂₅₄ της Merck, καθώς και με παρασκευαστική TLC με τις πλάκες silica gel F₂₅₄ ms της Merck. Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F₂₅₄ ms της Merck.

4.2 Αντίδραση σύνθεσης β-εναμινόνης

4.2.1 Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο) προπ-2εν-1-όνης (1)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της 3-ακετυλοπυριδίνης (4 ml, $d=1,1020 \text{ kg/m}^3$, 0,0364 mol) σε ο-ξυλόλιο (15 ml), σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα του N,N διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφοακετάλης (7.5 ml, 0.043 mol) σε ο-ξυλόλιο (5 ml) και το μείγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (-140 °C) επί 6 ώρες. Καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης έγινε έλεγχος για το ρυθμό σχηματισμού του επιθυμητού προϊόντος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθανίου-μεθανόλης (15:1). Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ο διαλύτης συμπυκνώνεται στο ήμισυ της αρχικής του ποσότητας. Στη συνέχεια προστίθεται διαιθυλαιθέρας (20 ml) και το μείγμα ψύχεται, έως ότου καταβυθιστεί ποσοτικά το προϊόν της αντίδρασης (περίπου 24 ώρες).

Ακολουθεί διήθηση και έκπλυση του ιζήματος με ψυχρό διαιθυλαιθέρα, δίνοντας την εναμινόνη 1 ως πορτοκαλί στερεό (5.02 g, 77.5%).



Σ.Τ.:83-85 °C

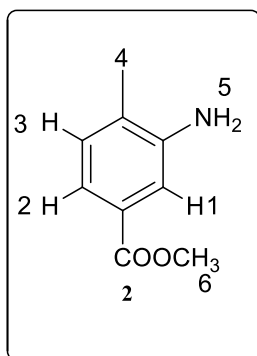
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2.95 (s, 3H, H-7), 3.17 (s, 3H, H-8), 5.70 (d, ³J=12.50Hz, 1H, H-5), 7.35 (m, 1H, H-2), 7.86 (d, ³J=12.50 Hz, 1H, H-6), 8.20 (dt, ³J=8 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-3), 8.67 (dd, ³J=5 Hz, ⁴J=1.75 Hz, 1H, H-1), 9.08 (d, ⁴J=2.5 Hz, 1H, H-4)

¹³C NMR (400MHz, DMSO,) δ (ppm): 37.96, 45.33, 91.71, 124.15, 135.37, 135.93, 149.31, 152.03, 155.33, 184.77

4.3 Σύνθεση 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα

4.3.1 Σύνθεση 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (2)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 3-αμινο-4- μεθυλοβενζοϊκού οξέος (9.95 g, 0.066 mol) σε απόλυτη μεθανόλη (120 ml) στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθεται στάγδην π.Η₂SO₄ (4ml) και αμέσως μετά το μείγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (65 °C) για 22 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη μέχρι ξηρού. Ακολούθως, στους 0 °C γίνεται ρύθμιση του pH=8-9 με υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (5%), ούτως ώστε να μεταφερθεί το υπολειπόμενο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ υπό μορφή μετά νατρίου άλατος στην υδατική φάση. Ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα για την απομάκρυνση των αλάτων από την οργανική στοιβάδα, ξήρανση με άνυδρο θειικό νάτριο, διήθηση και εξάτμιση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Τέλος, η ένωση (2) παραλαμβάνεται καθαρή, σε κρυσταλλική μορφή χρώματος πορτοκαλί (7.86 g, 0.048 mol, 70%).



Σ.Τ.:84-86 °C

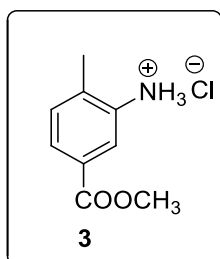
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm):2.20 (s, 2H, H-5), 2.12 (s, 3H, H-4), 3.79 (s, 3H, H-6), 7.07 (d, ³J=7.5 Hz, 1H, H-3), 7.33 (s, 1H, H-1), 7.37 (d, ³J=8.8 Hz, 1H, H-2)

¹³C NMR (400MHz, CDCl₃) δ ppm: 17.87, 52.21, 115.87, 120.09, 127.94, 129.20, 130.68, 144.95, 167.72

4.4 Αντιδράσεις σχηματισμού υδροχλωρικών αλάτων του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα

4.4.1 Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (3)

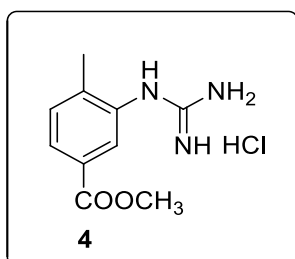
Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (2.48 g, 0.015 mol) σε μεθανόλη (40 ml) και υπό ψύξη (0 °C) προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl (3 ml, 37% w/v) και έπειτα αφήνεται υπό ανάδευση για είκοσι λεπτά. Στο τέλος της αντίδρασης, απομακρύνεται ο διαλύτης και στο ελαιώδες μίγμα που παραλαμβάνεται προστίθεται διαιθυλαιθέρας προκειμένου να καταβυθιστεί το άλας. Έπειτα, ο αιθέρας συμπυκνώνεται και το στερεό που παραλαμβάνεται ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου (P₂O₅). Η ένωση (3) παραλαμβάνεται ως στερεό αχνού ροζ χρώματος (2.93 g, 0.0145 mol, 97%).



4.5 Αντιδράσεις σχηματισμού υδροχλωρικού άλατος του 2-μεθυλο-5 βενζοϊκού μεθυλεστέρα της γουανιδίνης

4.5.1 Σύνθεση του 2-μεθυλο-5 βενζοϊκού μεθυλεστέρα της γουανιδίνης (4)

Σε δίλιαιμη σφαιρική φιάλη τήκεται κυαναμίδιο (6.09 g, 0.145 mol) στους 45 °C υπό ατμόσφαιρα αργού, έπειτα προστίθεται το υδροχλωρικό άλας του 2-μεθυλο-5 βενζοϊκού μεθυλεστέρα της γουανιδίνης (2.11 g, 0.011 mol) και αυξάνεται σταδιακά η θερμοκρασία στους 70 °C. Μετά την πάροδο τεσσάρων ωρών η αντίδραση διακόπτεται και το μείγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 ml διαιθυλαιθέρα, 10 ml τετραϋδροφουράνιο και αφήνεται υπό ισχυρή ανάδευση έως ότου το ελαιώδες υπόλειμμα μετατραπεί στο λεπτόκοκκο στερεό ίζημα. Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (3 χ 8 ml), οπότε παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας της φαινυλογουανιδίνης (4) ως αχνό ροζ στερεό (2.56 g, 0.0099 mol, 88%).

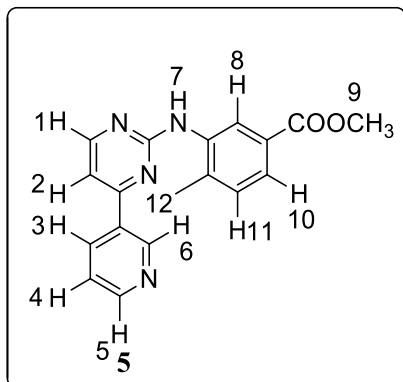


4.6 Αντιδράσεις σύνθεσης των φαινυλαμινων-πυριμιδινών

4.6.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο) αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέως (5)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του υδροχλωρικού άλατος της φαινυλογουανιδίνης (1.25 g, 0.0051 mol) σε *n*-προπανόλη (20 ml) προστίθεται περίσσεια ανθρακικού καλίου (2.13 g, 0.015 mol). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση σε ατμόσφαιρα αργού. Όταν η θερμοκρασία ανέρχεται στο σημείο βρασμού του διαλύτη (97 °C) πραγματοποιείται η προσθήκη της εναμινόνης (1) (0.78 g, 0.0044 mol) και το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται σε αυτές τις συνθήκες επί 48 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), το ίζημα διηθείται υπό κενό και εκπλύνεται με ψυχρή *n*-προπανόλη (50 ml). Το διήθημα, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού για την απομάκρυνση της *n*-προπανόλης και έπειτα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη, όπου εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3 χ 20 ml) και νερό (3 χ 10 ml). Ο έλεγχος TLC του ιζήματος και

της οργανικής φάσης έδειξε την ύπαρξη εναμινόνης, οπότε ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (οξικό αιθυλεστέρα/μεθανόλη (12:1). Η φαινυλαμινο-πυριμιδίνη (5) παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (0.86 g, 0.0027 mol, 62%).



Σ.Τ.: 116-118 °C

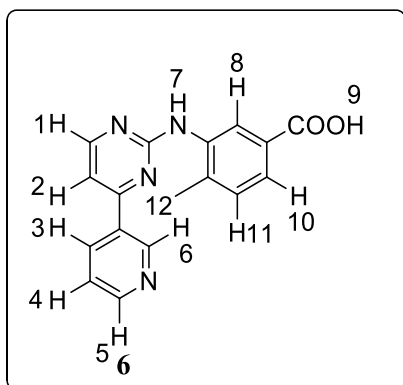
¹H NMR (400 MHz, DMSO, d-₆) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-12), 3.84(s, 3H, H-9), 7.38 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H11), 7.49 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.55 (m, 1H, H-3), 7.66 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-10), 8.46 (s, 2H, H-8, H-4), 8.56 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.71 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-5), 9.05 (s, 1H, H-7), 9.31 (d, ⁴J=2 Hz, 1H, H-6).

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-₆) δ ppm: 19.07, 52.80, 108.90, 124.56, 125.22, 125.45, 128.22, 131.42, 134.98, 137.73, 138.97, 148.93, 152.25, 160.35, 161.50, 162.25, 167.00.

4.7 Αντιδράσεις σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως

4.7.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο) πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) μεθυλεστέρα του βενζοϊκού οξέος (1.03 g, 0.0032 mol) σε 18 ml απόλυτου διχλωρομεθανίου προστίθεται 1 ml μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου 3N. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 21 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη και εξουδετέρωση με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (1.2N), μέχρι το pH να ρυθμιστεί στο 5-6. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διήθηση του ιζήματος και εκπλένεται με απεσταγμένο νερό (100 ml). Το προκύπτον ίζημα ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Το επιθυμητό προϊόν (6) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (0.95 g, 0.0031 mol, 97%).

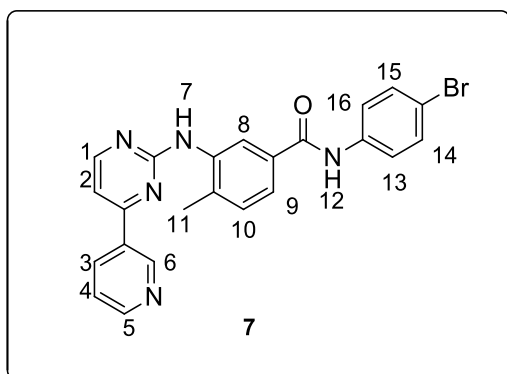


¹H NMR (250 MHz, DMSO, d-₆) δ (ppm): 2.35 (s, 3H, H-12), 7.40 (d, ³J=5 Hz, 1H, H-11), 7.51 (d, ³J=3.25 Hz, 1H, H-2), 7.57 (m, 1H, H-3), 7.66 (dd, ³J=4.75 Hz, ⁴J=1 Hz, 1H, H-10), 8.41(s, 1H, H-8), 8.47 (dt, ³J=5Hz, ⁴J=1.25 Hz, 1H, H-4), 8.57 (d, ³J=3.25 Hz, 1H, H-1), 8.72 (dd, ³J=3.25 Hz, ⁴J=1 Hz, 1H, H-5), 9.06 (s, 1H, H-7), 9.31 (d, ⁴J=1.25 Hz, 1H, H-6), 11.93 (s, 1H, H-9)

4.8 Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων-εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (1^η κατηγορία).

4.8.1 Σύνθεση του N-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (7)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 4-βρωμοανιλίνης (0.39 mmol, 67.3 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 9 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (7) παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (39 mg, 70%)



¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 2.35 (s, 3H, H-11), 7.45 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10), 7.55 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.73 (d, ³J=8.4 Hz, 2H, H-13,16), 7.8 (d, ³J=7.6 Hz, 2H, H-3,9), 8.03 (d, ³J=8.4 Hz, 2H, H-14,15), 8.27 (s, 1H, H-8), 8.59 (d, ³J=5.6 Hz, 1H, H-1), 8.70 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-4), 8.80 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-5), 9.21 (s, 1H, H-7), 9.32 (s, 1H, H-6), 10.52 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-₆) δ ppm: 18.67, 108.38, 115.69, 122.74, 123.96, 124.36, 124.40, 124.71, 130.74, 131.86, 132.85, 134.90, 136.85, 138.50, 139.08, 148.43, 151.75, 160.05, 161.49, 162.00, 166.75.

Σ.Τ: 194-196 °C

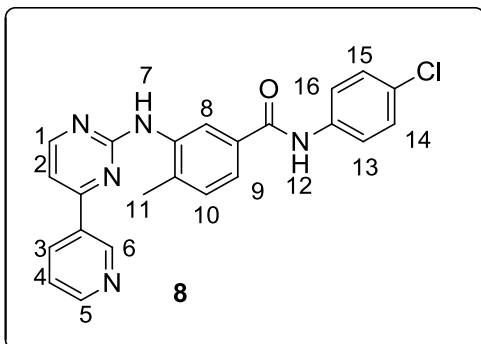
Υπολογίστηκε για C₂₃H₁₈BrN₅O [M+H]⁺ : 460.0767

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 460.0775

4.8.2 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(4-χλωροφαινυλο)βενζαμιδίου (8)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 4-χλωροανιλίνης (0.39 mmol, 49.8 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 9 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και

απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θεϊκό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (8) παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (30 mg, 72%).



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.35 (s, 3H, H-11), 7.43 (m, 3H, H-13-16,10) 7.48 (d, $^3J=5.2$ Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.73 (d, $^3J=8$ Hz, 2H, H-9), 7.84 (d, $^3J=8.4$ Hz, 2H, H-14,15), 8.27 (s, 1H, H-8), 8.46 (dd, $^3J=7.6$ Hz, $^4J=1$ Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, $^3J=5.2$ Hz, 1H, H-1), 8.70 (d, $^3J=4.8$ Hz, 1H, H-5), 9.13 (s, 1H, H-7), 9.28 (s, 1H, H-6), 10.34 (s, 1H, H-12)

$^{13}\text{C NMR}$ (400MHz, DMSO, d_6) δ ppm: 18.68, 108.38, 122.35, 123.96, 124.28, 124.72, 127.62, 128.96, 130.74, 132.60, 132.88, 134.74, 136.83, 138.53, 138.69, 148.59, 151.93, 160.03, 161.51, 162.06, 165.74.

$\Sigma.T$: 197-199 °C

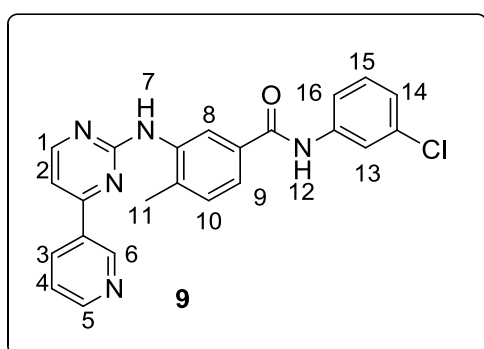
Υπολογίστηκε για $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}$ $[M+H]^+$: 416.1273

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 416.1254

4.8.3 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(3-χλωροφαινυλο) βενζαμιδίου (9)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 3-χλωροανιλίνης (0.39 mmol, 49.8 mg)

σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 9 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (9) παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. (29 mg, 70%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.35 (s, 3H, H-11), 7.17 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=2Hz, 1H, H-16), 7.4 (t, ³J=8 Hz, 1H, H-15), 7.44 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10) 7.49 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.74 (d, ³J=8 Hz, 2H, H-9,14), 7.97 (s, 1H, H-13), 8.27 (s, 1H, H-8), 8.46 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.70 (d, ³J=4 Hz, 1H, H-5), 9.14 (s, 1H, H-7), 9.28 (s, 1H, H-6), 10.33 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.69, 108.39, 119.11, 119.97, 120.18, 123.69, 123.97, 124.26, 124.72, 130.75, 132.59, 132.72, 133.36, 134.72, 136.95, 138.55, 141.20, 148.57, 151.91, 160.03, 161.50, 162.06, 165.89

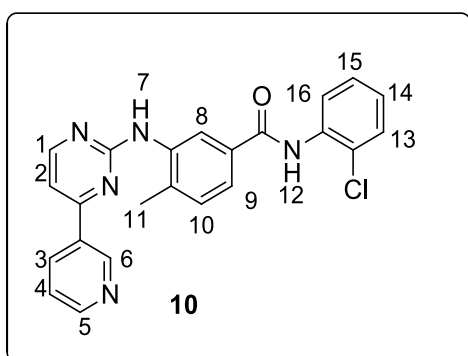
Σ.Τ: 191-193 °C

Υπολογίστηκε για C₂₃H₁₈ClN₅O [M+H]⁺ : 416.1273

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 416.1269

4.8.4 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(2-χλωροφαινυλο)βενζαμιδίου (10)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 2-χλωροανιλίνης (0,39 mmol, 49.8 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 9 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (10) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (26 mg, 62%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.31 (td, ³J=8 Hz, ³J=7.6 Hz, ⁴J=1.6Hz, 1H, H-15), 7.39 (td, ³J=7.6 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-14), 7.43 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10) 7.48 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.56 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-13), 7.62 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-9), 7.76 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-16), 8.3 (d, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-8), 8.46 (dt, ³J=8 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-4), 8.57 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.70 (dd, ³J=5.2 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-5) 9.14 (s, 1H, H-7), 9.28 (d, ⁴J=2 Hz, 1H, H-6), 10 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.67, 108.36, 121.13, 123.92, 124.27, 124.8, 127.8, 127.91, 129.97, 130.82, 132.23, 132.59, 134.70, 135.67, 136.85, 138.54, 148.61, 151.46, 151.93, 160.05, 161.51, 162.02, 165.53

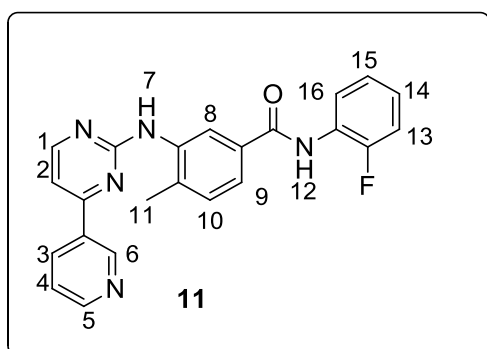
Σ.Τ: 121-123 °C

Υπολογίστηκε για $C_{23}H_{18}ClN_5O$ $[M+H]^+$: 416.1273

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 416.1262

4.8.5 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)-N-(2-φθοροφαινυλο)βενζαμιδίου (11)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 2-φθοροανιλίνης (0.39 mmol, 43.3 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 9 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (11) παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (20 mg, 55%).



1H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.3 (m, 3H, H-13,14,16), 7.42 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H, H-10), 7.48 (d, $^3J=4.8$ Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.61 (td, $^3J=8$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-15),

7.75 (dd, $^3J=8$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-9), 8.29 (d, $^4J=1.6$ Hz, 1H, H-8), 8.46 (dt, $^3J=8$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, $^3J=4.4$ Hz, 1H, H-1), 8.70 (dd, $^3J=5.2$ Hz, $^4J=1.6$ Hz, 1H, H-5) 9.13 (s, 1H, H-7), 9.27 (d, $^4J=2$ Hz, 1H, H-6), 10.04 (s, 1H, H-12)

^{13}C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.67, 108.34, 116.15, 124.03, 124.26, 124.73, 124.91, 124.8, 127.70, 129.00, 130.76, 132.18, 132.61, 134.70, 134.73, 136.88, 138.50, 148.59, 151.91, 160.02 161.52, 162.03, 165.54

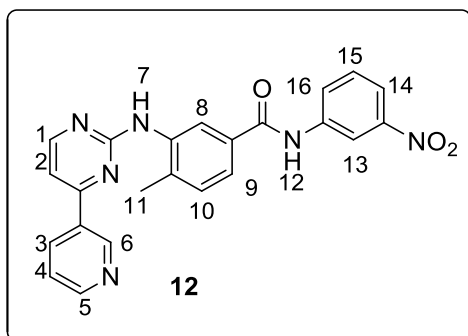
$\Sigma.T$: 105-107 °C

Υπολογίστηκε για $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{FN}_5\text{O}$ $[M+H]^+$: 400.1568

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 400.1552

4.8.6 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(3-νιτροφαινυλο)-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (12)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 3-νιτροανιλίνης (0.39 mmol, 53.9 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (12) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (20 mg, 45%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.46 (d, ³J=8 Hz, 1H,H-10), 7.49 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.68 (t, ³J=8 Hz, 1H, H-15), 7.78 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-16), 7.98 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-9), 8.23 (d, ³J=8.4 Hz, 1H, H-14), 8.32 (s, 1H, H-8), 8.46 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.69(d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-5), 8.81 (s, 1H, H-13), 9.16 (s, 1H, H-7), 9.28 (s, 1H, H-6), 10.63 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.71, 108.42, 114.85, 118.49, 124.04, 124.28, 124.8, 126.70, 130.51, 130.84, 132.38, 132.59, 134.74, 137.23, 138.62, 140.91, 148.37, 148.58, 151.92, 160.04 161.49, 162.07, 166.14

Σ.Τ: 198-200 °C

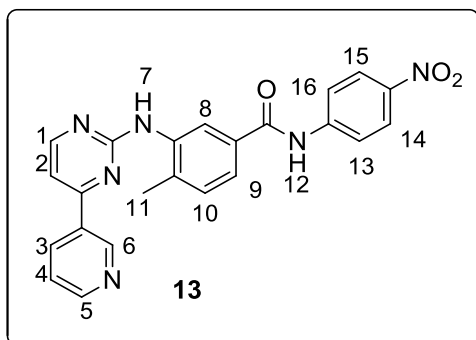
Υπολογίστηκε για C₂₃H₁₈N₆O₃ [M+H]⁺ : 427.1513

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 427.1519

4.8.7 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(4-νιτροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (13)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 3-νιτροανιλίνης (0.39 mmol, 53.9 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και

απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (13) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (21 mg, 47%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.46 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10), 7.5 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.56 (m, 1H, H-3), 7.68 (t, ³J=7.6 Hz, 1H, H-9), 7.79 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-16), 7.98 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-13), 8.24 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-15), 8.32 (d, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-8), 8.49 (dt, ³J=8Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-4), 8.57 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.71 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-5), 8.81 (t, ⁴J=2 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H, H-14) 9.17 (s, 1H, H-7), 9.29 (d, ⁴J=2 Hz, 1H, H-6), 10.4 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.20, 107.94, 114.35, 118.04, 123.56, 123.90, 124.29, 126.18, 130.01, 130.36, 131.88, 132.20, 134.55, 136.75, 138.10, 140.40, 147.83, 151.15, 159.57, 160.99, 161.47, 165.64

Σ.Τ: 210-212 °C

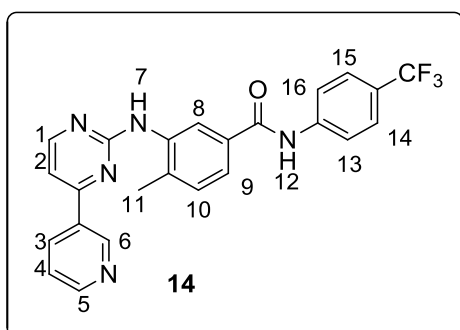
Υπολογίστηκε για C₂₃H₁₈N₆O₃ [M+H]⁺ : 427.1513

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 427.1517

4.8.8 Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (14)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα,

προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 4-τριφθορομεθυλοανιλίνης (0.39 mmol, 62.8 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 9 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (14) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (26 mg, 50%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.34 (s, 3H, H-11), 7.44 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-10), 7.53 (d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-2), 7.76 (m, 4H, H-3,9,14,15), 8.02 (d, ³J=8.4 Hz, 2H, H-13,16), 8.27 (s, 1H, H-8), 8.59 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.7(d, ³J=6.8Hz, 1H, H-4), 8.79 (d, ³J=3.6 Hz, 1H, H-5), 9.21 (s, 1H, H-7), 9.32 (s, 1H, H-6), 10.52 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 25.75, 115.54, 127.71, 131.18, 131.83, 131.90, 133.37, 133.41, 133.45, 137.90, 138.28, 139.71, 140.07, 142.91, 144.22, 145.59, 150.43, 154.74, 158.06, 167.22, 167.28, 168.54, 168.74, 173.20

Σ.Τ: 118-120°C

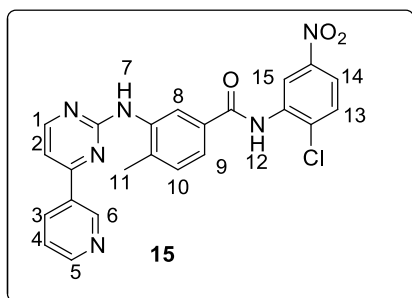
Υπολογίστηκε για C₂₄H₁₈F₃N₅O [M+H]⁺ : 450.1536

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 450.1529

4.9 Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων-εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (2^η κατηγορία).

4.9.1 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(5-νιτρο-2-χλωροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (15)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 2-χλωρο-5-νιτροανιλίνης (0.39 mmol, 67.3 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (15) παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (27 mg, 47%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.37 (s, 3H, H-11), 7.41 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-10), 7.53 (m, 2H, H-3,2), 7.77 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-9), 7.88 (d, ³J=8.8 Hz, 1H, H-13), 8.14 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=2.8 Hz, 1H, H-14), 8.34 (s, 1H, H-8), 8.45 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-4), 8.57 (s, 2 H, H-1,15), 8.7 (d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-5), 9.16 (s, 1H, H-7), 9.31 (s, 1H, H-6), 10.27 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.41, 108.18, 118.85, 121.65, 123.82, 124.03, 124.41, 126.72, 127.58, 130.64, 131.69, 132.23, 134.47, 137.26, 138.34, 141.76, 144.45, 148.22, 151.63, 159.76, 161.10, 161.75, 163.41, 166.16

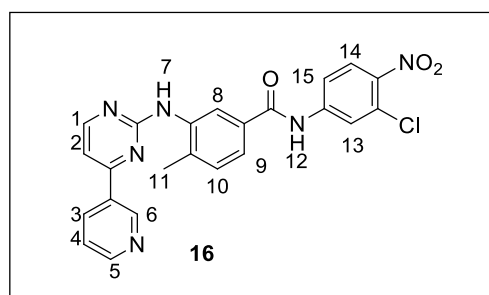
Σ.Τ.:189-191 °C

Υπολογίστηκε για $C_{23}H_{17}ClN_6O_3$ $[M+H]^+$:461.1123

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 461.1116

4.9.2 Σύνθεση του 4-μεθυλο- N-(4-νιτρο-3-χλωροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (16)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 3-χλωρο-4-νιτροανιλίνης (0.39 mmol, 67.3 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (16) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (24 mg, 42%).



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.47 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H, H-10), 7.49 (d, $^3J=5.2$ Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.78 (d, $^3J=8$ Hz, 1H, H-9), 7.99 (d, $^3J=8.8$ Hz, 1H, H-15), 8.18 (d, $^3J=8.8$ Hz, 1H, H-14), 8.23, (s, 1H, H-13), 8.31 (s, 1H, H-8), 8.45 (d, $^3J=8$ Hz, 1H, H-4), 8.57 (d, $^3J=5.2$ Hz, 1H, H-1), 8.71 (d, $^3J=5.2$ Hz, 1H, H-5), 9.15 (s, 1H, H-7), 9.27 (s, 1H, H-6), 10.76 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 29.45, 108.49, 119.16, 121.92, 124.13, 124.34, 124.72, 127.033, 127.89, 130.95, 132.00, 132.55, 134.78, 137.57, 138.65, 142.08, 144.77, 148.53, 151.94, 160.07, 161.41, 162.06, 163.72, 166.47.

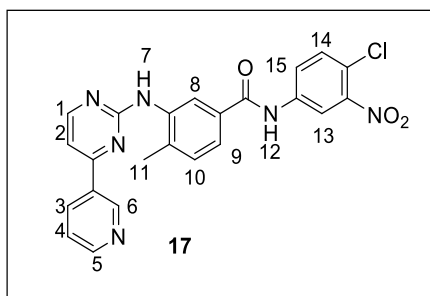
Σ.Τ: 145-148 °C

Υπολογίστηκε για C₂₃H₁₇ClN₆O₃ [M+H]⁺ :461.1123

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 461.1111

4.9.3 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(3-νιτρο-4-χλωροφαινυλο)-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (17)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 4-χλωρο-3-νιτροανιλίνης (0.39 mmol, 67.3 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (17) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (28 mg, 49%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.46 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-10), 7.49 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.7 (m, 2H, H-9,14), 8.1 (dd, ³J=8.8 Hz, ⁴J=2.4 Hz, 1H,

H-15), 8.31 (s, 1H, H-8), 8.45 (d, $^3J=8$ Hz, 1H, H-4), 8.6 (d, $^3J=5.2$ Hz, 1H, H-1), 8.61 (s, 1 H, H-13), 8.69 (d, $^3J=4.8$ Hz, 1H, H-5), 9.15 (s, 1H, H-7), 9.27 (s, 1H, H-6), 10.68 (s, 1H, H-12)

^{13}C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.71, 108.45, 117.04, 119.21, 124.03, 124.28, 124.72, 125.55, 130.89, 132.13, 132.35, 132.57, 134.74, 137.36, 138.65, 139.68, 147.62, 148.58, 151.92, 160.05, 161.46, 162.08, 166.15.

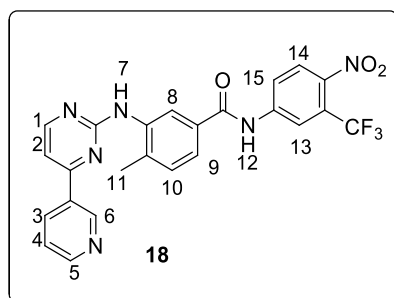
*S.T:*204-206 °C

Υπολογίστηκε για $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{ClN}_6\text{O}_3$ $[M+H]^+$:461.1123

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$:461.1127

4.9.4 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(4-νιτρο-3τριφθορομεθυλοφαινυλο)-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (18)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 4-νιτρο-3-τριφθορομεθυλοανιλίνης (0.39 mmol, 80.4 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (18) παραλαμβάνεται ως πορτοκαλί στερεό. (27 mg, 40%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.37 (s, 3H, H-11), 7.48 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10), 7.5 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.54 (m, 1H, H-3), 7.78 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=2Hz, 1H, H-9), 8.27 (d, ³J=9 Hz, 1H, H-15), 8.34 (s, 1H, H-8), 8.39 (dd, ³J=8 Hz, ⁴J=1.2Hz, 1H, H-14), 8.48 (m, 2 H, H-1,4), 8.57 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-5), 8.69 (d, ⁴J=1.2Hz, 1H, H-13), 9.17 (s, 1H, H-7), 9.28 (s, 1H, H-6), 10.91 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.73, 108.49, 118.89, 118.92, 119.70, 123.67, 124.16, 124.32, 124.79, 128.03, 130.96, 131.88, 132.60, 134.86, 137.67, 138.71, 141.98, 144.50, 148.48, 151.82, 160.07, 161.45, 162.03, 166.49

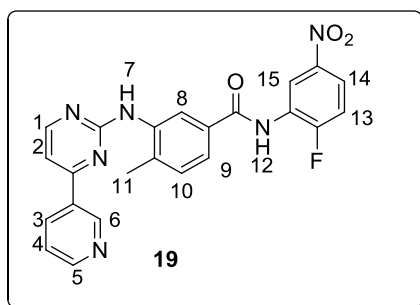
Σ.Τ: 150-152 °C

Υπολογίστηκε για C₂₄H₁₇F₃N₆O₃ [M+H]⁺ :495.1387

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ :495.1376

4.9.5 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(5-νιτρο-2-φθοροφαινυλο)- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (19)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 5-νιτρο-2-φθοροανιλίνης (0.39 mmol, 60.88 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (19) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (22 mg, 43%).



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.45 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10), 7.50 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.64 (t, ³J=9.6 Hz, 1H, H-13), 7.77 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-9), 8.18 (dt, ³J=8.8 Hz, ⁴J=3.6Hz, 1H, H-14), 8.32 (s, 1H, H-8), 8.45 (dt, ³J=8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-1), 8.65 (m, 1H, H-15), 8.69 (d, ⁴J=4.2 Hz, 1H, H-5), 9.15 (s, 1H, H-7), 9.28 (s, 1H, H-6), 10.41 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.72, 108.42, 117.45, 117.69, 121.93, 122.46, 122.55, 124.19, 124.26, 124.92, 127.67, 130.88, 131.55, 132.57, 134.73, 138.61, 144.13, 148.59, 151.93, 160.04, 161.47, 162.05, 165.86

Σ.Τ: Στους 185 °C παρατηρείται αποσύνθεση της ένωσης 19.

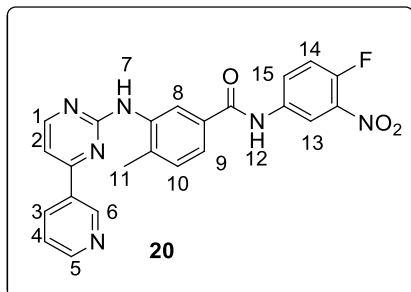
Υπολογίστηκε για C₂₃H₁₇FN₆O₃ [M+H]⁺ : 445.1419

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 445.1398

4.9.6 Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-(3-νιτρο-4-φθοροφαινυλο)-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (20)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 5-νιτρο-2-φθοροανιλίνης (0.39 mmol, 60.88 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο

θεϊκό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (20) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (25 mg, 50%)



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.32 (s, 3H, H-11), 7.43 (d, ³J=5.6 Hz, 1H, H-10), 7.51 (d, 2H, H-2,14), 7.57 (m, 1H, H-3), 7.71 (dd, ³J=7.6 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-9), 8.1 (m, 1H, H-14), 8.27 (d, ⁴J=1.2 Hz, 1H, H-8), 8.45 (dt, ³J=8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-4), 8.51 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.64 (m, 1H, H-15), 8.65 (dd, ³J=4.4 Hz, ⁴J=1.2 Hz, 1H, H-5), 9.03 (s, 1H, H-7), 9.21 (s, 1H, H-6), 10.63 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.56, 108.51, 117.38, 119.03, 119.25, 123.96, 124.41, 124.48, 128.31, 128.38, 131.05, 132.13, 132.58, 135.00, 136.19, 137.20, 138.45, 148.28, 151.79, 160.07, 161.32, 162.05, 166.28

Σ.Τ: 201-203 °C

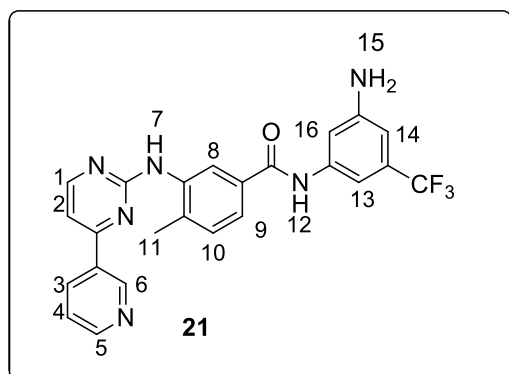
Υπολογίστηκε για C₂₃H₁₇FN₆O₃ [M+H]⁺ : 445.1419

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 445.1432

4.9.7 Σύνθεση του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (21)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 5-τριφθορομεθυλοβενζολιο-1,3-διαμίνης (0.39 mmol, 68.7 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και

έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (21) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (39 mg, 68%)



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.34 (s, 3H, H-11), 5.61 (s, 2H, H-15), 6.59 (s, 1H, H-16), 7.25 (s, 1H, H-13), 7.37 (s, 1H, H-14), 7.42 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10), 7.48 (d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.72 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-9), 8.24 (s, 1H, H-8), 8.45 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-4), 8.55 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.69 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-5), 9.13 (s, 1H, H-7), 9.27 (s, 1H, H-6), 10.15 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.66, 104.46, 105.53, 108.34, 108.84, 123.59, 124.00, 124.79, 130.68, 132.60, 132.98, 134.72, 136.82, 138.46, 141.04, 148.57, 150.30, 151.90, 160.01, 161.52, 162.05, 165.75

Σ.Τ: 178- 180 °C

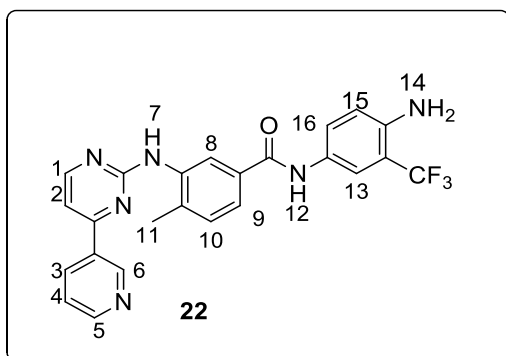
Υπολογίστηκε για C₂₄H₁₉F₃N₆O [M+H]⁺ : 465.1645

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 465.1641

4.9.8 Σύνθεση του N-(4-αμινο-3-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο- 3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (22)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό

ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 2-τριφθορομεθυλοβενζολιο-1,4-διαμίνης (0.39 mmol, 68.7 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (22) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (37 mg, 64%)



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.33 (s, 3H, H-11), 5.41 (s, 2H, H-14), 6.84 (d, ³J=8.8 Hz, 1H, H-15), 7.39 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-10), 7.47 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.52 (m, 1H, H-3), 7.72 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-9), 7.66 (dd, ³J=8.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-16), 7.71 (dd, ³J=8Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-9), 7.82 (d, ⁴J=2 Hz, 1H, H-13), 8.23 (s, 1H, H-8), 8.45 (dt, ³J=7.6 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-4), 8.54 (d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-1), 8.69 (dd, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-5), 9.11 (s, 1H, H-7), 9.27 (d, ³J=1.6 Hz, 1H, H-6), 10.02 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.94, 108.60, 110.82, 117.77, 119.02, 119.07, 124.11, 124.56, 124.97, 127.08, 128.70, 130.96, 132.91, 133.34, 135.03, 136.82, 138.74, 143.31, 148.90, 152.20, 160.32, 161.85, 162.35, 165.40

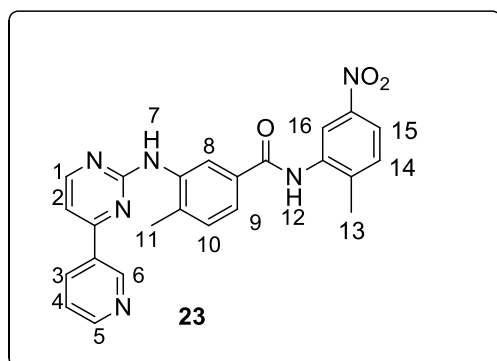
Σ.Τ: 206-208 °C

Υπολογίστηκε για C₂₄H₁₉F₃N₆O [M+H]⁺ : 465.1645

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 465.1647

4.9.9 Σύνθεση του N-(2-μεθυλο-5-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (23)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζοϊκού οξέως (6) (0.326 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.815 mmol, 0.11 ml) και HATU (0.36 mmol, 136 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα της 2-μεθυλο-5-νιτροανιλίνης (0.39 mmol, 59.3mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 12 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο/μεθανόλη (3:1:0.2). Το επιθυμητό προϊόν (23) παραλαμβάνεται ως πορτοκαλί στερεό. (22 mg, 45%)



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 2.38 (s, 3H, H-13), 7.45 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-10), 7.49 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.52 (m, 1H, H-3), 7.58 (dd, ³J=8.4 Hz, ⁴J=1.6 Hz, 1H, H-14), 7.77 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-9), 8.04 (d, ³J=8.4 Hz, 1H, H-15), 8.33 (s, 2H, H-8,16), 8.45 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-1), 8.69 (d, ³J=4.2 Hz, 1H, H-5), 9.15 (s, 1H, H-7), 9.28 (s, 1H, H-6), 10.09 (s, 1H, H-12)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.69, 38.71, 103.38, 120.72, 120.98, 124.00, 124.25, 124.76, 130.82, 131.93, 132.13, 132.57, 134.71, 136.92, 137.98, 138.56, 142.15, 146.18, 148.59, 151.92, 160.06, 161.48, 161.99, 165.81

Σ.Τ:160-162 °C

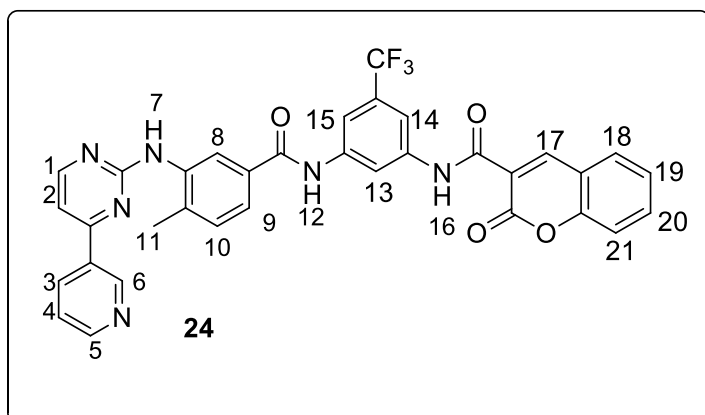
Υπολογίστηκε για C₂₄H₂₀N₆O₃ [M+H]⁺ : 463.1489

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 463.1479

4.10 Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων-εν δυνάμει αναστολέων με ανεστραμμένο αμιδικό δεσμό (3^η κατηγορία).

4.10.1 Σύνθεση του N-(3-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-2-οξο-2H-χρωμενη-3-καρβοξαμιδίου (24)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 2-οξο-2H-χρωμενη-3-καρβοξυλικού οξέως (0.53 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (1.33 mmol, 0.19 ml) και HATU (0.58 mmol, 222 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (0.64 mmol, 297 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των mmol οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 15 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (5:5:1). Το επιθυμητό προϊόν (24) παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. (229 mg, 68%)



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.34 (s, 3H, H-11), 6.72 (t, $^3J=7.6$ Hz, 1H, H-19), 6.8 (d, $^3J=8$ Hz, 1H, H-18), 7.02 (t, $^3J=7.6$ Hz, 1H, H-20), 7.09 (d, $^3J=7.2$ Hz 1H, H-21), 7.43 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H, H-10), 7.49 (d, $^3J=5.2$ Hz, 1H, H-2), 7.53 (m, 1H, H-3), 7.76 (d, $^3J=7.6$ Hz, 1H, H-9), 7.83 (s, 2H, H-17, H-15), 8.27 (s, 1H, H-8), 8.38 (s, 1H, H-14), 8.45 (d, $^3J=8$ Hz, 1H, H-4), 8.55 (d, $^3J=4.8$ Hz, 1H, H-1), 8.69 (d, $^3J=4.8$ Hz, 1H, H-5), 9.15 (s, 1H, H-13), 9.26 (s, 1H, H-7), 9.39 (s, 1H, H-6), 10.30 (s, 1H, H-12), 10.48 (s, 1H, H-16),

$^{13}\text{C NMR}$ (400MHz, DMSO, d_6) δ ppm: 18.70, 108.41, 111.78, 116.40, 119.49, 124.11, 124.19, 124.30, 124.84, 125.44, 126.70, 130.83, 132.48, 132.60, 134.76, 135.62, 137.23, 138.57, 139.25, 141.0, 148.55, 151.91, 155.61, 155.78, 158.65, 160.03, 161.51, 162.09, 166.08, 177.80

Σ.Τ: Έως τους 225 °C δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή, ήτοι κάποια αλλαγή χρώματος.

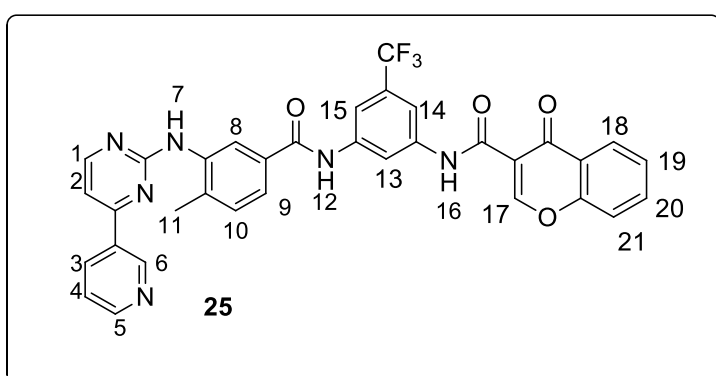
Υπολογίστηκε για $\text{C}_{34}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4$ $[M+H]^+$: 637.1088

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 637.1086

4.10.2 Σύνθεση του N-(3-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-οξο-4H-χρωμενη-3-καρβοξαμιδίου (25)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 4-οξο-4H-χρωμενη-3-καρβοξυλικού οξέως (0.53 mmol, 100 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (3 ml) προστίθεται τριαιθυλαμίνη (1.33 mmol, 0.19 ml) και HATU (0.58 mmol, 222 mg) στους 0 °C. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε ατμόσφαιρα αργού για μισή ώρα στους 0 °C για την ενεργοποίηση του οξέος. Έπειτα, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα του N-(3-αμινο-5-τριφθορομεθυλοφαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο) βενζαμιδίου (0.64 mmol, 297 mg) σε απόλυτο ακετονιτρίλιο (2 ml). Η αναλογία των

μπολι οξέος και ανιλίνης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1:1.2) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες και έπειτα ακολουθεί θέρμανση για 16 ώρες στους 82 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού, ακολουθεί εκχύλιση με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η υδατική φάση ελέγχεται και απορρίπτεται, καθώς σε αυτή δεν περιέχεται το προϊόν. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (5:5:1). Το επιθυμητό προϊόν (25) παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. (209 mg, 62%)



¹H NMR (400MHz, DMSO-d-6) δ (ppm): 2.36 (s, 3H, H-11), 7.02 (s, 1H, H-17), 7.46 (d, ³J=7.6 Hz, 1H, H-10), 7.49 (d, ³J=5.2 Hz, 1H, H-2), 7.54 (m, 1H, H-3), 7.61 (t, ³J= 7.2 Hz, 1H, H-19), 7.79 (d, ³J= 8 Hz, 1H, H-9), 7.88 (d, ³J=8.4 Hz, 1H, H-18), 7.96 (m, 2H, H-14, H-20), 8.0 (s, 1H, H-8), 8.11(dd, ³J=7.6 Hz, 1H, H-21), 8.32 (s, 1H, H-15), 8.46 (d, ³J=8 Hz, 1H, H-4), 8.56 (d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-1), 8.69 (d, ³J=4.8 Hz, 1H, H-5), 8.75 (s, 1H, H-13), 9.15 (s, 1H, H-7), 9.27 (s, 1H, H-6), 10.60 (s, 1H, H-12) 11.07 (s, 1H, H-16)

¹³C NMR (400MHz, DMSO, d-6) δ ppm: 18.71, 108.40, 111.78, 112.71, 113.34, 116.36, 119.48, 124.11, 124.20, 124.28, 124.86, 125.44, 126.67, 129.86, 130.16, 130.81, 132.48, 132.59, 134.74, 135.60, 137.23, 138.58, 139.28, 141.09, 148.57, 151.91, 155.60, 155.78, 158.65, 160.03, 161.52, 162.09, 166.05, 177.76

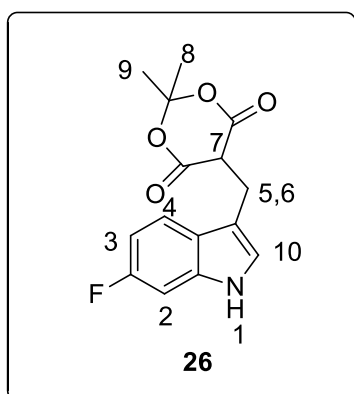
Σ.Τ: Έως τους 225 °C δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή, ήτοι κάποια αλλαγή χρώματος.

Υπολογίστηκε για C₃₄H₂₃F₃N₆O₄ [M+H]⁺ : 637.1806

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ : 637.1804

4.11 Σύνθεση της 5-((6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3 διοξανιο-4,6-διόνης (26)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 6-φθοροινδολίου (100 mg, 0.74 mmol) σε ακετονιτρίλιο (1 ml) προστίθεται το οξύ του Meldrum (97 mg, 0.67 mmol), 37 % φορμαλδεΐδη, (0.05 mL, 0.67 mmol) και καταλυτική ποσότητα L προλίνης (4 mg). Η αναλογία των mmol 6-φθοροινδολίου, οξέως του Meldrum και φορμαλδεΐδης υπολογίστηκε βάση στοιχειομετρίας και είναι (1.1:1:1) αντίστοιχα. Μετά το τέλος της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση στους 25-30 °C για 18 ώρες και η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών CH₃COOCH₂CH₃: C₆H₁₄ (2:1). Όταν το οξύ του Meldrum καταναλωθεί πλήρως η αντίδραση διακόπτεται, απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα έως ξηρού. Ακολουθεί εκχύλιση με CH₃COOCH₂CH₃/H₂O, ξήρανση της οργανικής φάσης με Na₂SO₄, διήθηση της οργανικής φάσης και συμπύκνωση του διαλύτη μέχρι ξηρού. Στο προκύπτον μείγμα προστίθεται διαιθυλαιθέρας (2 ml) και αφήνεται στο ψυγείο για 16 ώρες έως ότου καταβυθιστεί ίζημα. Το επιθυμητό προϊόν (26) διηθείται σε πτυχωτό ηθμό εκπλύνεται με ψυχρό διαιθυλαιθέρα και παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. (185 mg, 95%)



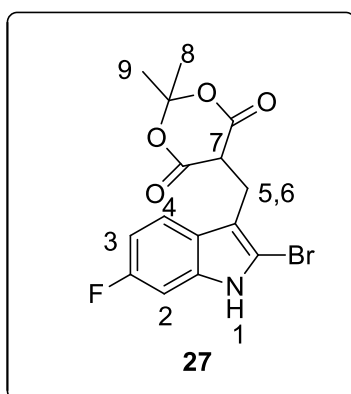
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.46 (s, 3H, H-8), 1.71 (s, 3H, H-9), 3.64 (d, ³J=4.5 Hz, 2H, H-6, H-5), 3.76 (t, ³J=4.5 Hz, 1H, H-7), 6.93 (td, ³J= 9.5 Hz, ⁴J=2.5 Hz, 1H, H-4), 7.02 (dd, ³J= 9.5 Hz, ⁴J=2.5 Hz, 1H, H-2), 7.15 (d, ⁴J= 2 Hz, H-10), 7.65 (m, 1H, H-3), 8.03 (s, 1H, H-1)

Υπολογίστηκε για C₁₅H₁₄FNO₄[M+H]⁺ : 292.0975

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ :292.0980

4.12 Σύνθεση της 5-((2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3 διοξανιο-4,6-διόνης (27)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της 5-((6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3 διοξανιο-4,6-διόνης (26) (100 mg, 0.27 mmol) σε μείγμα απόλυτων διαλυτών CH₂Cl₂ και THF (1:1) και ψύχεται στους 0°C για 20 λεπτά. Εν συνεχεία προστίθεται το τριβρωμιούχο άλας της πυριδίνης (121 mg, 0.3 mmol) και αφήνεται υπό ανάδευση στους 0-5 °C για μια 1.5 ώρα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₆. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθεται υδατικό διάλυμα Na₂CO₃ (100 mg) και αφήνεται υπό ανάδευση για μισή ώρα στους 0-5 °C. Ακολουθεί εκχύλιση του εν λόγω μείγματος με διαιθυλαιθέρα/H₂O ώστε να απομακρυνθεί το εναπομείναν τριβρωμιούχο άλας της πυριδίνης από την αντίδραση και έπειτα η υδατική φάση εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη έως ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μείγμα καθαρίζεται με την μέθοδο της ανακρυστάλλωσης σε σύστημα διαλυτών οξικού αιθυλεστέρα και εξανίου και το διάλυμα μεταφέρεται στο ψυγείο μέχρι να επιτευχθεί η ανακρυστάλλωση. Το προκύπτον ίζημα διηθείται υπό κενό και εκπλύνεται με ψυχρό εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν (27) παραλαμβάνεται ως πορτοκαλί στερεό. (88 mg, 88%)



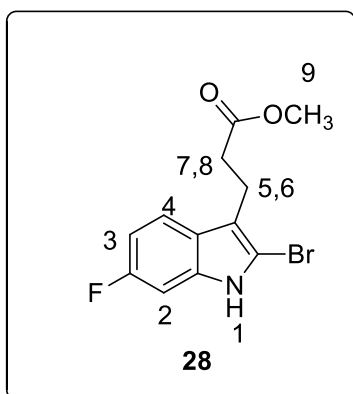
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ ppm: 1.66 (s, 3H, H-8), 1.75 (s, 3H, H-9), 3.56 (d, ³J=4.5 Hz, 2H, H-6, H-5), 3.86 (t, ³J=4.5 Hz, 1H, H-7), 6.93 (td, ³J= 9.5 Hz, ⁴J=2.5 Hz, 1H, H-4), 6.98 (dd, ³J= 9.5 Hz, ⁴J=2.5 Hz, 1H, H-2), 7.59 (m, 1H, H-3), 8.31 (s, 1H, H-1)

Υπολογίστηκε για C₁₅H₁₃BrFNO₄[M+H]⁺ : 370.0084

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ :370.0085

4.13 Σύνθεση της (2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού μεθυλεστέρα (28)

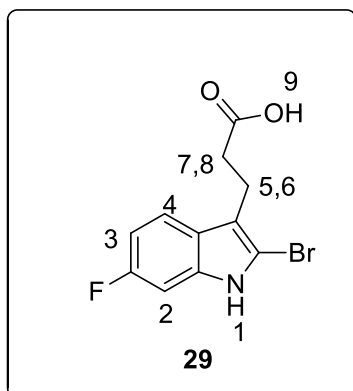
Σε μια στεγνή δίλιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα N₂ προστίθεται η ένωση 27 (500 mg, 1.4 mmol) διαλυμένη σε σύστημα απόλυτων διαλυτών πυριδίνης-μεθανόλης (9:1) σε συνολικό όγκο 12 ml. Εν συνεχεία, προστίθεται ο χαλκός Cu(0) (12 mg, 0.2 mmol). Ακολουθεί θέρμανση της εν λόγω αντίδρασης σε θερμοκρασία 112 °C για 4 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ανά τακτά χρονικά διαστήματα διενεργείται εκτόνωση της αντίδρασης, ώστε να απομακρυνθεί από την αντίδραση τα προκύπτοντα αέρια, προπανόνη και διοξείδιο του άνθρακα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών C₆H₁₄:CH₃COOCH₂CH₃ 3:1 έως ότου καταναλωθεί το αρχικό υπόστρωμα 27. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση γίνεται εξουδετέρωση της πυριδίνης με 1 N HCl, μετατρέποντας την σε υδροχλωρικό άλας και το προκύπτον μείγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3 x 25 ml). Η οργανική φάση εκπλύνεται με υδατικό διάλυμα NH₄Cl 15%, ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με Na₂SO₄, διήθηση και εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το εναπομείναν ελαιώδες μείγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών C₆H₁₄:CH₃COOCH₂CH₃ 3:1. Η επιθυμητή ένωση (28) παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (220 mg, 68%)



¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) δ ppm: 2.65 (t, ³J= 8 Hz, 2H, H-5, H-6), 3.05 (t, ³J= 7.5 Hz, 2H, H-7, H-8), 3.67 (s, 3H, H-9), 6.90 (td, ³J= 8.5 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-3), 6.98 (dd, ³J= 9 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-2), 7.45 (m, 1H, H-4), 8.03 (s, 1H, H-1)

4.14 Σύνθεση του 3-(2-βρωμο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)-3-προπανοϊκού οξέως (29)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης 28 (100 mg, 0.33 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (4 ml) προστίθεται το μεθανολικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 3N (1 mmol, 0.4 ml) και το όλο μίγμα αφήνεται να υδρολυθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 22-24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε συστήμα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOCH₂CH₃. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη και εξουδετέρωση με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (1.2 N), μέχρι το pH να ρυθμιστεί στο 5-6. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκχύλιση με CH₃COOCH₂CH₃/H₂O, ξήρανση της οργανικής φάσης Na₂SO₄, διήθηση και εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξάτμιστήρα. Το προκύπτον ίζημα ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Το επιθυμητό προϊόν (29) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (92 mg, 97%).



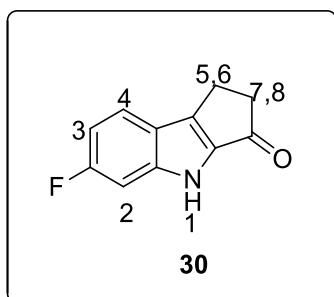
¹H NMR (500 Hz, DMSO, d-6) δ ppm: 2.24 (t, ³J= 8 Hz, 2H, H-5, H-6), 3.47 (t, ³J= 6.5 Hz, 2H, H-7, H-8), 6.66 (dd, ³J= 9 Hz, ⁴J= 2 Hz, 1H, H-2), 6.78 (td, ³J= 8 Hz, ⁴J= 2 Hz, 1H, H-3), 7.29 (m, 1H, H-4), 10.54 (s, 1H, H-1), 12.13 (s, 1H, H-9)

4.15 Σύνθεση της 6-φθορο-1,2-διϋδροκυκλοπεντα[b]ινδολ-3(4H)-όνης (30)

4.15.1 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με Sc(OTf)₃

Σε μία στεγνή δίλιμη σφαιρική φιάλη προσαρμοσμένη με κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα N₂ προστίθεται η ένωση (29) (50 mg, 0.17 mmol) διαλυμένη σε νιτρομεθάνιο (1 ml), 12% τριφλικό σκάνδιο Sc(OTf)₃ (10 mg, 0.02 mmol) και η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε προθερμασμένο ελαιόλουτρο στους 105 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής

στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 3:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅. Μετά το τέλος της αντίδρασης (4 ώρες) η αντίδραση διακόπτεται και ακολουθεί η συμπύκνωση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προκύπτον μείγμα εκχυλίζεται με CH₃COOC₂H₅/H₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι ξηρού. Ακολουθεί καθαρισμός του εν λόγω μείγματος με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών C₆H₁₄ : CH₃COOC₂H₅ (4:1). Το προϊόν 30 παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (15 mg, 45%)



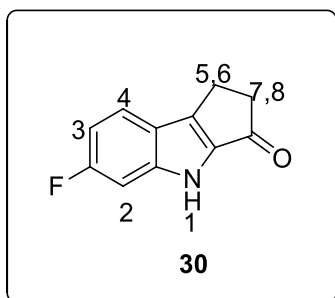
¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) δ ppm: 2.24 (m, 1H, H-5), 2.39 (m, 1H, H-6), 2.48 (m, 1H, H-8), 2.56 (m, 1H, H-7), 6.65 (dd, ³J= 8.5 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1H, H-2), 6.77 (td, ³J= 8.5 Hz, ⁴J = 2 Hz, 1H, H-3), 7.19 (m, 1H, H-4), 8.17 (s, 1H, H-1)

Υπολογίστηκε για C₁₁H₈FNO[M+H]⁺ : 190.0059

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]⁺ :190.0663

4.15.2 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με PPA

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθεται το πολυφωσφορικό οξύ (2.8 ml, 5.9 g) και υποβάλλεται σε προθερμασμένο ελαιόλουτρο στους 135 °C. Έπειτα, προστίθεται η ένωση 29 (50 mg, 0.17 mmol) και το προκύπτον μείγμα αφήνεται να αντιδράσει διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή και ελέγχοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου μειωθεί η αρχική ένωση 29. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε συστήματα διαλυτών C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅ (4:1). Μετά το τέλος της αντίδρασης, (3 ώρες) η αντίδραση διακόπτεται, αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσει και εν συνεχεία προστίθεται υδατικό διάλυμα Na₂CO₃ μέχρι το pH να ρυθμιστεί στο 5-6. Ακολουθεί με CH₃COOCH₂CH₃/H₂O, ξήρανση της οργανικής φάσης Na₂SO₄, διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προκύπτον μείγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅ (4:1). Το προϊόν 30 παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (13 mg, 40%)



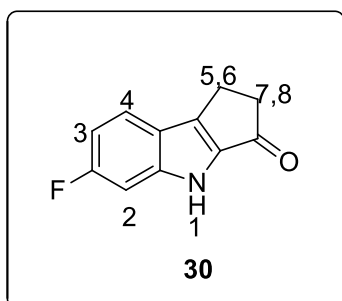
$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ ppm: 2.24 (m, 1H, H-5), 2.39 (m, 1H, H-6), 2.48 (m, 1H, H-8), 2.56 (m, 1H, H-7), 6.65 (dd, $^3J=8.5$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-2), 6.77 (td, $^3J=8.5$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-3), 7.19 (m, 1H, H-4), 8.17 (s, 1H, H-1)

Υπολογίστηκε για $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FNO}$ $[M+H]^+$: 190.0059

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$:190.0663

4.15.3 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με $\text{Sc}(\text{OTf})_3$

Σε μία στεγνή δύλιμη σφαιρική φιάλη προσαρμοσμένη με κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα N_2 προστίθεται η ένωση (27) (50 mg, 0.14 mmol) διαλυμένη σε νιτρομεθάνιο (1 ml), 12% τριφλικό σκάνδιο $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (10 mg, 0.02 mmol) και η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε προθερμασμένο ελαιόλουτρο στους 105 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 3:1 $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$. Μετά το τέλος της αντίδρασης (2.5 ώρες) η αντίδραση διακόπτεται και πραγματοποιείται συμπύκνωση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προκύπτον μείγμα εκχυλίζεται με $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5/\text{H}_2\text{O}$. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα μέχρι ξηρού. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (3:1). Το προϊόν (30) παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (13 mg, 50%)



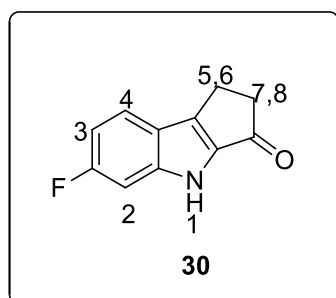
$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ ppm: 2.24 (m, 1H, H-5), 2.39 (m, 1H, H-6), 2.48 (m, 1H, H-8), 2.56 (m, 1H, H-7), 6.65 (dd, $^3J=8.5$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-2), 6.77 (td, $^3J=8.5$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-3), 7.19 (m, 1H, H-4), 8.17 (s, 1H, H-1)

Υπολογίστηκε για $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FNO}[\text{M}+\text{H}]^+$: 190.0059

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$:190.0663

4.15.4 Κυκλοποίηση της ένωσης 29 με PPA

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθεται το πολυφωσφορικό οξύ (2.8 ml, 5.9 g) και υποβάλλεται σε προθερμασμένο ελαιόλουτρο στους 135 °C. Έπειτα, προστίθεται η ένωση 27 (50 mg, 0.14 mmol) και το προκύπτον μείγμα αφήνεται να αντιδράσει διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή και ελέγχοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα έως ότου μειωθεί η αρχική ένωση. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε συστήματα διαλυτών $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (3:1). Μετά το τέλος της αντίδρασης, (5 ώρες) η αντίδραση διακόπτεται, αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσει και εν συνεχεία προστίθεται υδατικό διάλυμα Na_2CO_3 μέχρι το pH να ρυθμιστεί στο 5-6. Ακολουθεί με $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3/\text{H}_2\text{O}$, ξήρανση της οργανικής φάσης Na_2SO_4 , διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προκύπτον μείγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (3:1). Το προϊόν 30 παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό. (9 mg, 35%)



$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ ppm: 2.24 (m, 1H, H-5), 2.39 (m, 1H, H-6), 2.48 (m, 1H, H-8), 2.56 (m, 1H, H-7), 6.65 (dd, $^3J=8.5$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-2), 6.77 (td, $^3J=8.5$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-3), 7.19 (m, 1H, H-4), 8.17 (s, 1H, H-1)

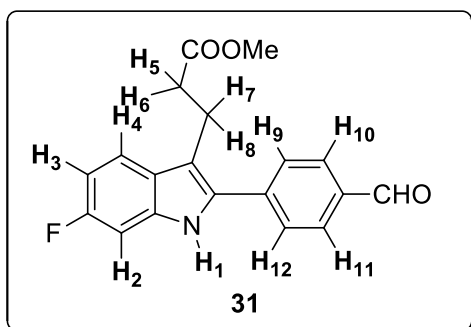
Υπολογίστηκε για $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{FNO}[\text{M}+\text{H}]^+$: 190.0059

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$:190.0663

4.16 Σύνθεση του 3-μεθυλο-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού μεθυλεστέρα (31)

Σε μια μονόλαιμη σφαιρική φιάλη με προστίθεται το 4-φορμυλοβορονικό οξύ (150 mg, 0.7 mmol) και υπό ανάδευση διαλύεται στο *N,N*-διμεθυλοακεταμίδιο (DMAc, 2.8ml) και το προκύπτον μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Εν συνεχεία, προστίθεται υδατικό διάλυμα Na₂CO₃ (0.13 g, 12.2 mol) και αφήνεται να ενεργοποιηθεί 4-φορμυλοβορονικό οξύ 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε στεγνή δίλαιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα N₂, προστίθεται ο καταλύτης (12 mg ,0.03 mmol, 5%) και η ένωση 28 (177 mg, 0.59 mmol), διαλυμένη σε *N,N*-διμεθυλοακεταμίδιο (0.5 ml) και το εν λόγω μείγμα αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση στους 95 °C για μία ώρα. Μετά το πέρας μίας ώρας το περιεχόμενο της μονόλαιμης σφαιρικής φιάλης που περιέχει το 4-φορμυλοβορονικό οξύ προστίθεται στάγδην στη δίλαιμη σφαιρική και αφήνεται να αντιδράσει στους 95 °C για 2 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 3:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅. Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 2 ώρες και ακολουθούν εκχυλίσεις με CH₂Cl₂/H₂O. Έπειτα, η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και ο διαλύτης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το εναπομείναν *N,N*-διμεθυλοακεταμίδιο απομακρύνεται στην αντλία υψηλού κενού με ήπια θέρμανση στους 50 °C και ανάδευση. Ο καθαρισμός της ένωσης πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 3: 1: C₆H₁₄: CH₃COOC₂H₅ και το επιθυμητό προϊόν (31) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (176 mg, 77%)



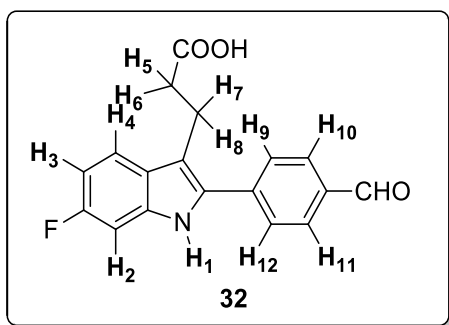
¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) δ (ppm): 2.73 (t, ³J=8 Hz, 2H, H-7, H-8), 3.31 (t, ³J=8 Hz, 2H, H-5, H-6), 3.66 (s, 3H, O-CH₃), 6.92 (td, ³J= 9.5 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-3), 7.09 (d, ³J=9.5 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-2), 7.59 (m, 1H, H-4), 7.73 (d, ³J= 8 Hz, 2H, H-9, H-12), 7.99 (d, ³J=8 Hz, 2H, H-10, H-11), 8.40 (s, 1H, H-1), 10.06 (s, 1H, CHO)

Υπολογίστηκε για $C_{19}H_{16}FNO_3[M+H]^+$: 326.1187

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 326.1183

4.17 Σύνθεση του 3-μεθυλο-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού οξέως (32)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 3-μεθυλο-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού μεθυλεστέρα (31) (100 mg, 0.26 mmol) σε 2.5 ml απόλυτου διχλωρομεθανίου προστίθεται 0.3 mL μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου 3N. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 21 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη και εξουδετέρωση με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (1.2 N), μέχρι το pH να ρυθμιστεί στο 5-6. Το προκύπτον ίζημα ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Το επιθυμητό προϊόν (32) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (96 mg, 98%).



1H NMR (500 Hz, DMSO) δ ppm : 2.59 (t, $^3J=7.5$ Hz, 2H, H-7, H-8), 3.10 (t, $^3J=7.5$ Hz, 2H, H-5, H-6), 6.89 (dt, dd, $^3J=8.5$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-3), 7.11 (dd, $^3J=10$ Hz, $^4J=2$ Hz 1H, H-2), 7.46 (d, $^3J=7.5$ Hz, 2H, H-9, H-12), 7.58 (m, 3H, H-4, H-10, H-11), 7.96 (s, 1H, H-1), 11.28 (s, 1H, CHO)

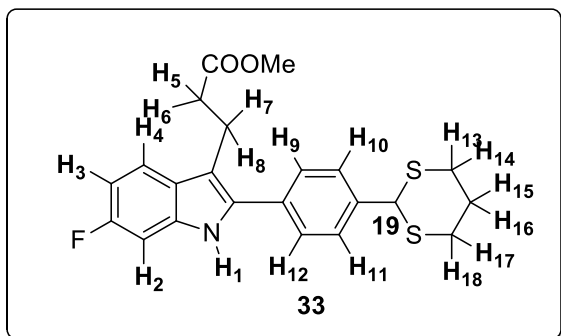
Υπολογίστηκε για $C_{18}H_{14}FNO_3[M+H]^+$: 312.1029

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 312.1030

4.18 Σύνθεση του 3-(2-4-(1,3-διθειανιο-2-υλο)φαινυλο-6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)προπιονικού μεθυλεστέρα (33)

Σε μία μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθεται η ένωση 31 (26 mg, 0.08 mmol) διαλυμένη σε διχλωρομεθάνιο (0.5 ml) και αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 15 λεπτά. Έπειτα στην ίδια θερμοκρασία εισάγονται 10 μ L (0.096 mmol) 1,3-προπανοδιθειόλης και 15 μ L αιθερικό διάλυμα

τριφθοριούχου βορανίου (BF₃·Et₂O). Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών 4: 1: C₆H₁₄: CH₃COOC₂H₅. Μετά το τέλος της αντίδρασης (17 ώρες) η αντίδραση διακόπτεται, ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O, ξήρανση της οργανικής φάσης με Na₂SO₄, διήθηση και ο διαλύτης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν (33) παραλάμβανεται ως λευκό στερεό. (33 mg, 98%)



¹H NMR (500 Hz, DMSO) δ ppm : 2.04 (m, 1H, H-15), 2.26 (m, 1H, H-16), 2.71 (t, ³J=9 Hz, 2H, H-8, H-7), 3.00 (m, 2H, H-17, H-18), 3.16 (m, 2H, H-13, H-14), 3.26 (t, ³J= 8Hz, 2H, H-5, H-6), 3.66 (s, 3H, COOMe), 5.26 (s, 1H, H-19), 6.95 (td, ³J= 9 Hz, ⁴J=2 Hz, 1H, H-3), 7.09 (dd, ³J=9.5 Hz, ⁴J=2Hz, 1H, H-2), 7.52 (d, ³J=8 Hz, 1H, H10, H-11), 7.56 (m, 1H, H-4), 7.62 (d, ³J=8Hz, 2H, H-9, H-12), 8.04 (s, 1H, H-1)

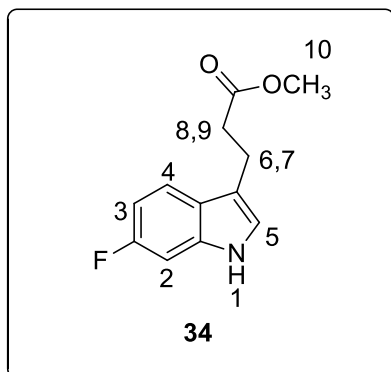
Υπολογίστηκε για C₂₂H₂₂FNO₂S₂[M+H + Na]⁺ : 439.1005

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [:M+H + Na]⁺: 439.1002

4.19 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού μεθυλεστέρα (34)

Σε μια στεγνή δίλιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα N₂ προστίθεται η ένωση 26 (500 mg, 1.7 mmol) διαλυμένη σε σύστημα απόλυτων διαλυτών πυριδίνης-μεθανόλης (9:1) σε συνολικό όγκο 12 ml. Εν συνεχεία, προστίθεται ο χαλκός Cu(0) (12 mg, 0.2 mmol). Ακολουθεί θέρμανση της εν λόγω αντίδρασης σε θερμοκρασία 112 °C για 4 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ανά τακτά χρονικά διαστήματα διενεργείται εκτόνωση της αντίδρασης, ώστε να απομακρυνθεί από την αντίδραση τα προκύπτουντα αέρια, προπάνονη και διοξείδιο του άνθρακα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα διαλυτών C₆H₁₄:CH₃COOCH₂CH₃ 3:1 έως ότου καταναλωθεί το αρχικό υπόστρωμα 26. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση γίνεται εξουδετέρωση της πυριδίνης με 1 N HCl, μετατρέποντας την σε υδροχλωρικό άλας και το προκύπτον μείγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3x 25 ml). Η

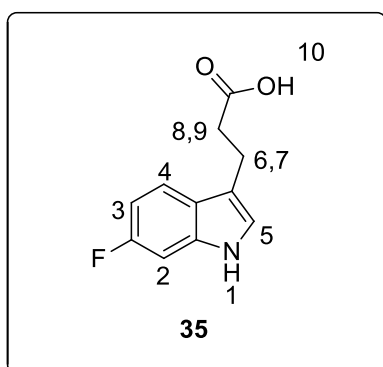
οργανική φάση εκπλύνεται με υδατικό διάλυμα NH_4Cl 15%, ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με Na_2SO_4 , διήθηση και εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το εναπομείναν ελαιώδες μείγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 3:1. Η επιθυμητή ένωση (34) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό. (263 mg, 70%)



$^1\text{H NMR}$ (400 Hz, CDCl_3) δ ppm : 2.74 (t, $^3\text{J}=7.6$ Hz, 2H, H-6, H-7), 3.10 (t, $^3\text{J}=7.6$ Hz, 2H, H-8, H-9), 3.68 (s, 3H, H-10), 6.92 (td, $^3\text{J}=9.6$ Hz, $^4\text{J}=2.4$ Hz, 1H, H-3), 6.97 (s, 1H, H-5), 7.04 (dd, $^3\text{J}=9.6$ Hz, $^4\text{J}=1.6$ Hz, 1H, H-2), 7.51 (m, 1H, H-4), 8.02 (s, 1H, H-1)

4.20 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέως (35)

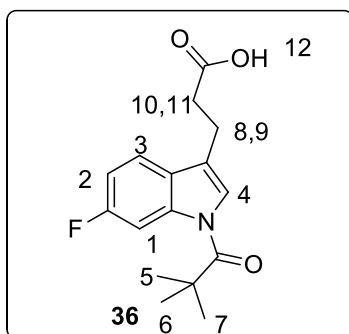
Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 3-(6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού μεθυλεστέρα (34) (100 mg, 0.45 mmol) σε 4 ml απόλυτου διχλωρομεθανίου προστίθεται 0.45 ml μεθανολικού διαλύματος καυστικού νατρίου 3N. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη και εξουδετέρωση με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (1.2 N), μέχρι το pH να ρυθμιστεί στο 5-6. Το προκύπτον ίζημα ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Το επιθυμητό προϊόν (35) παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (92 mg, 98%).



$^1\text{H NMR}$ (400 Hz, CDCl_3) δ ppm : 2.78 (t, $^3J=7.6$ Hz, 2H, H-6, H-7), 3.10 (t, $^3J=7.6$ Hz, 2H, H-8, H-9), 6.91 (td, $^3J=9.6$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-3), 6.99 (s, 1H, H-5), 7.04 (dd, $^3J=9.6$ Hz, $^4J=2.4$ Hz, 1H, H-2), 7.51 (m, 1H, H-4), 8.02 (s, 1H, H-1)

4.21 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1-πιβαλοϋλο-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού οξέως (36)

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του 3-(6-φθορο-1H-ινδολ-3-υλο) προπανοϊκού οξέως (35) (45 mg, 0.217 mmol) υπό ατμόσφαιρα N_2 σε 1 ml απόλυτου THF προστίθεται (0.24 ml, 0.43 mmol) BuLi στους -78°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 15 λεπτά. Εν συνεχεία, προστίθενται (26 mg, 26 μL , 0.22 mmol) πιβαλοϋλο χλωριδίου στάγδην και μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση στους -78°C για 45 λεπτά. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC, σε σύστημα διαλυτών 1:2 $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστίθεται στο εν λόγω μείγμα 2 ml κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl και ακολουθούν εκχυλίσεις με $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3/\text{H}_2\text{O}$. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται και γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το εναπομείναν μείγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 1:2. Η επιθυμητή ένωση (36) παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό. (44 mg, 69%)



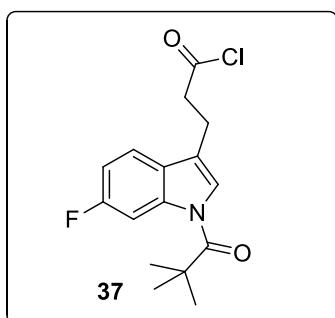
$^1\text{H NMR}$ (400 Hz, CDCl_3) δ ppm : 1.49 (s, 9H, H-5, H-6, H-7), 2.80 (t, $^3J=7.2$ Hz, 2H, H-8, H-9), 3.06 (t, $^3J=6.8$ Hz, 2H, H-10, H-11), 7.07 (td, $^3J=8.8$ Hz, $^4J=2.4$ Hz, 1H, H-3), 7.43 (m, 1H, H-3), 7.55 (s, 1H, H-4), 8.28 (dd, $^3J=10.8$ Hz, $^4J=2$ Hz, 1H, H-1)

Υπολογίστηκε για $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FNO}_3$ $[M+H]^+$: 292.1343

Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) $[M+H]^+$: 292.1345

4.22 Σύνθεση του 3-(6-φθορο-1-πιβαλοϋλο-1H-ινδολ-3-υλο)προπανοϊκού χλωριδίου (37)

Σε στεγνή δύλαμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα N₂ προστίθεται η ένωση 36 (76 mg, 0.26 mmol) και στάγδην απεσταγμένο SOCl₂ (1 ml, 154 mg, 1.3 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε ανάδευση υπό ατμόσφαιρα N₂ σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας SOCl₂ στην υδραντλία και έπειτα το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης μεταφέρεται στην αντλία υψηλού κενού για απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων SOCl₂. Η επιθυμητή ένωση (37) δε καθαρίζεται, δεδομένου ότι η αντίδραση σύνθεσης ακυλοχλωριδίων λαμβάνει χώρα ποσοτικά.



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα προκύπτοντα αποτελέσματα από την παρούσα διδακτορική διατριβή που διενεργήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ₃-210 με ακαδημαϊκό υπεύθυνο τον κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη παρουσιάζονται εν συντομία παρακάτω:

- ❖ Καταφέραμε να αναπτύξουμε μια αποδοτικότερη μέθοδο παρασκευής αναλόγων των Imatinib και Nilotinib εν συγκρίσει με την πατέντα που κατοχυρώθηκε από την εταιρεία Novartis.
- ❖ Οι προκύπτοντες αποδόσεις των επιμέρους σταδίων της ολικής συνθετικής πορείας αναλόγων των Imatinib και Nilotinib που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο είναι υψηλές.
- ❖ Επιτεύχθη βελτιστοποίηση των επιμέρους σταδίων της ολικής σύνθεσης και μάλιστα η απόδοση του τελικού σταδίου που αφορά την αντίδραση πυρηνόφιλης άκυλο υποκατάστασης στην Παρασκευή προϊόντων με αμιδικό δεσμό σημείωσε αύξηση άνω του 50%.
- ❖ Ως απόρροια του ορθολογικού σχεδιασμού, συντέθηκαν 18 νέοι αναστολείς, ανάλογα του Nilotinib, τα οποία κατηγοριοποιούνται σε 3 υποομάδες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ανάλογα της Νιλοτινίβης με μονοϋποκατεστημένο τελικό βενζολικό δακτύλιο μέσω εισαγωγής/προσάρτησης διαφόρων ηλεκτραρνητικών ομάδων και μετακίνηση αυτών σε όλες τις πιθανές θέσεις. Η δεύτερη ομάδα περιέχει διϋποκατεστημένα ανάλογα όσον αφορά το τελικό βενζολικό δακτύλιο μέσω προσάρτησης σε κάθε περίπτωση 2 υποκαταστατών και την μετακίνηση αυτών σε διάφορες θέσεις του τελικού βενζολικού δακτυλίου. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει ανάλογα του Nilotinib που χαρακτηρίζονται από την παρουσία δύο αμιδικών δεσμών, ως ανάλογα Νιλοτινίβης-κουμαρίνης και Νιλοτινίβης-χρωμόνης.
- ❖ Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής διενεργήθηκαν βιολογικά πειράματα αξιοποιώντας μερικά ανάλογα των Nilotinib και Imatinib από τα εκατοντάδες ανάλογα που έχουν συντεθεί στο ερευνητικό εργαστήριο Χ₃-210.
- ❖ Κάποια νέο-συντεθειμένα ανάλογα του Nilotinib κατέδειξαν αξιόλογη βιολογική δράση εν συγκρίσει με την αναστολή που κατέδειξε το Nilotinib, έναντι συσσωρευμένων αιμοπεταλίων και τα βιολογικά αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν προσφάτα.^[193]
- ❖ Η **ένωση 17** που περιγράφεται κατέδειξε την πιο αξιόλογη αιμοπεταλιακή δράση και αποδείχθηκε εννιά φορές δραστικότερο από το φαρμακευτικό σκεύασμα Nilotinib. Η εν λόγω ένωση θα αποτελέσει ένωση οδηγό (lead compound) για την περαιτέρω ανάπτυξη

αναστολέων, αναλόγων του Nilotinib έναντι διαφόρων πρωτεϊνικών κινάσων με στόχο την ανάπτυξη φαρμάκων με βιολογική δράση και εκλεκτικότητα έναντι μιας σειράς πρωτεϊνικών κινάσων.

- ❖ Όλοι οι νεο-συντεθειμένοι αναστολείς, ανάλογα της Νιλοτινίβης χαρακτηρίστηκαν πλήρως με όλες τις σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές (IR, ¹HNMR, ¹³CNMR, MS).
- ❖ Όσον αφορά τη βελτιστοποίηση του φαρμακευτικού σκευάσματος Rucaparib, καταφέραμε να προτείνουμε μέσω διεύρυνσης της υπάρχουσας βιβλιογραφίας μια ποικιλία καινοτόμων ολικών συνθετικών πορειών εν συγκρίσει με εκείνες, που έχουν προταθεί και αναπτυχθεί από τις εταιρείες Clovis Oncology και Pfizer. Οι συγκεκριμένες συνθετικές πορείες χαρακτηρίζονται από χαμηλές απόδοσεις κάτω του 22%.
- ❖ Μία από τις προτεινόμενες συνθετικές πορείες που αναπτύχθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο μέσω αντίστροφης ρετροσυνθετικής ανάλυσης κατάφερε να κεντρίσει το ερευνητικό μας ενδιαφέρον και επιλέχθηκε ως τη βέλτιστη και εύχρηστη όσον αφορά τις συνθήκες (αντιδραστήρια, διαλύτες, χαμηλή τοξικότητα).
- ❖ Μέχρι και το πέμπτο στάδιο επιτεύχθη η σύνθεση της επιθυμητής ένωσης κλειδί για τη μετέπειτα ενδομοριακή κυκλοποίηση κατά Friedel-Crafts και μάλιστα όλα τα επιμέρους στάδια χαρακτηρίζονται από υψηλές αποδόσεις (90% και άνω). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια υστέρηση-δυσκολία στο στάδιο ενδομοριακής κυκλοποίησης και δεν επιτεύχθη η σύνθεση και απομόνωση της επιθυμητής ενδιάμεσης ένωσης.
- ❖ Ως απόρροια της ως άνω δυσκολίας, προτείναμε περαιτέρω εναλλακτικές πορείες που αφορούν, όπως αναφέρθηκε, μερικά τεχνάσματα, ήτοι μέσω προστασίας του αζώτου του ινδολίου με την εισαγωγή της πιβαλοϋλομάδας που θα διευκόλυε την ενδομοριακή κυκλοποίηση στην επιθυμητή θέση του βενζολικού δακτυλίου. Ωστόσο, δεν κατέστη δυνατή η απόμωση της ενδιάμεσης ένωσης κλειδί.
- ❖ Οι πειραματικές προσπάθειες με στόχο τη βελτιστοποίηση του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος συνεχίζονται στο ερευνητικό εργαστήριο X₃-210 από τα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας με ακαδημαϊκό υπεύθυνο τον κ.Κωνσταντίνο Σκομπρίδη.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Peter Van der Geer and Tony Hunter, Receptor Protein-Tyrosine Kinases and their Signal Transduction Pathways, *Annu. Rev. Cell Biology*, **1994**, 10:251-337
2. Louise N.Johnson and Richard J. Lewis, Structural Basis for Control by Phosphorylation, *Chem. Rev.*, **2000**, 201,101, 2209-2242
3. L.A. Pinna, M. Ruzzene, How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* 1314 (**1996**) 191–225
4. A. Kreegipuu, N. Blom, S. Brunak, PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0, *Nucleic Acids Res* 27 **1999**,237-239
5. Dan R Robinson,1, Yi-Mi Wu and Su-Fang Lin, The protein tyrosine kinase family of the human genome, *Oncogene* (**2000**) 19, 5548-5557
6. G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298 (**2002**) 1912–1934
7. Robert Roskoski Jr, A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors, *Pharmacol Res.*,100 (**2015**) 1–23
8. G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome, *Science* 298 (**2002**) 1912–1934
9. Stevan R. Hubbard and Jeffrey H. Till, PROTEIN TYROSINE KINASE STRUCTURE AND FUNCTION, *Annu. Rev. Biochem.*, **2000**, 69:373–98
10. Chih-Chen Hong , Jong-Ding Lay , Jhy-Shrian Huang , Ann-Lii Cheng , Jih-Luh Tang , Ming-Tseh Lin , Gi-Ming Lai, Shuang-En Chuang, Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia, *Cancer Letters* 268 (**2008**) 314–324
11. *Molecular Cell Biology*. 4th edition, Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al.,New York: W. H. Freeman; **2000**
12. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **2010**;141:1117–34
13. Robert Roskoski Jr. ,The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer, *Pharmacological Research* 79 (**2014**) 34– 74
14. MM Moasser, The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis, *Oncogene* (**2007**) 26, 6469–6487
15. DL Wheeler, S Huang, TJ Kruser, MM Nechrebecki, EA Armstrong, S Benavente, V Gondi, K-T Hsu and PM Harari, Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members, *Oncogene* (**2008**) 27, 3944–3956

16. Roberto Bianco a, Teresa Gelardi a, Vincenzo Damianoa, Fortunato Ciardiello b, Giampaolo Tortora Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (2007) 1416–1431
17. Krywicki RF, Yee D. The insulin-like growth factor family of ligands, receptors, and binding proteins. *Breast Cancer Res Treat*, 1992;22:7–19
18. James Brown, Carlie Delaine, Oliver J Zaccheo, Christian Siebold, Robert J Gilbert, Gijs van Boxel, Adam Denley, John C Wallace, A Bassim Hassan, Briony E Forbes and E Yvonne Jones, Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction, *The EMBO Journal* (2008) 27, 265–276
19. DEREK LEROITH, HAIM WERNER, DANA BEITNER-JOHNSON, AND CHARLES T. ROBERTS, JR., Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor, *Endocr Rev.*, 1995 Apr;16(2):143-63
20. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*, 1995;16:143–63
21. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 1996; 76:1005–26
22. Sepp-Lorenzino L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:235–53
23. T. E. Adamsa, V. C. Epab, T. P. J. Garrettb and C. W. Warda, Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050–1093
24. Heldin, C. H. & Ostman, A. Ligand-induced dimerization of growth factor receptors: variations on the theme. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1996, 7, 3–10
25. Itoh, N. & Ornitz, D. M. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families, *Trends Genet.* (2004), 20, 563–569
26. Andrew Beenken and Moosa Mohammadi, The FGF family: biology, pathophysiology and therapy, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009, 8(3):235-53
27. Mohammadi, M., Olsen, S. K. & Ibrahimi, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005 16, 107–137
28. J.C. Petruska and L.M. Mendell, *Encyclopedia of Neuroscience*, 2016, 71-78
29. Vos, M. H., Rappaport, F., Lambry, J.-C., Breton, J. & Martin, J.-L. Visualization of coherent nuclear motion in a membrane protein by femtosecond spectroscopy. *Nature* 363, 320±325 (1993)

30. Wang, Q., Schoenlein, R. W., Peteanu, L. A., Mathies, R. A. & Shank, C. V. Vibrationally coherent photochemistry in the femtosecond primary event of vision. *Science* 266, 422±424 (1994)
31. Zhu, L., Sage, J. T. & Champion, P. M. Observation of coherent reaction dynamics in heme proteins, *Science* 266, 629±632 (1994)
32. Vos, M. H. et al. Direct observation of vibrational coherence in bacterial reaction centers using femtosecond absorption spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 8885±8889 (1991)
33. Anderson & Tolkovsky 1999; Mazzoni et.al., 1999; Kaplan & Miller, 2000
34. Li X, Pontén A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF-receptor. *Nat Cell Biol* 2000;2:302–9
35. Bergsten E, Uutela M, Li X, Pietras K, Östman A, Heldin CH, et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF-receptor. *Nat Cell Biol* 2001;3:512–6
36. LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Giese NA, Lokker NA, et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:517–21
37. Carl-Henrik Heldin, Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment , *Cell Communication and Signaling*, 2013, 11:97
38. Omura T, Heldin C-H, Östman A: Immunoglobulin-like domain 4-mediated receptor-receptor interactions contribute to platelet-derived growth factor-induced receptor dimerization. *J Biol Chem*, 1997, 272:12676–12682
39. Yang Y, Yuzawa S, Schlessinger J: Contacts between membrane proximal regions of the PDGF receptor ectodomain are required for receptor activation but not for receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:7681–7686
40. Baxter RM, Secrist JP, Vaillancourt RR, Kazlauskas A: Full activation of the platelet-derived growth factor beta-receptor kinase involves multiple events. *J Biol Chem* 1998, 273:17050–17055
41. Heldin C-H, Östman A, Rönstrand L: Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1378:F79–F113
42. Heldin C-H, Westermark B: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 1999, 79:1283–1316
43. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 2008, 22:1276–1312

44. Patrick C. Ma, Gautam Maulik, James Christensen and Ravi Salgia ,c-Met: Structure, functions and potential for therapeutic inhibition *Cancer and Metastasis Reviews*, **2003**, 22: 309–325
45. O’Bryan, J. P., Frye, R. A., Cogswell, P. C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R. d., Le Beau, M. M., Earp, H. S. and Liu, E. T. (1991) Axl, a transforming gene solated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5016–5031
46. Lemke, G. and Rothlin, C. V. (2008) Immunobiology of the TAM receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 327–336
47. Berk, B. C. (2001) Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol. Rev.* **81**, 999–1030
48. Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, Hegele RA. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype–phenotype relationships. *Nat Rev Genet.*, **2010**;11:60–74
49. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer.*, **2002**;38(Suppl 5):S3–10
50. Kodappully S. Siveen¹, Kirti S. Prabhu¹, Iman W. Achkar, Shilpa Kuttikrishnan¹, Sunitha Shyam, Abdul Q. Khan, Maysaloun Merhi, Said Dermime and Shahab Uddin, Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignances and its Targeting by Natural Products, *Molecular Cancer* (2018) 17:31
51. Sirvent A, Benistant C, Roche S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell.* **2008**;100:617–31
52. Wang J, Pendergast AM. The emerging role of ABL kinases in solid tumors. *Trends in cancer.* **2015**;1:110–23
53. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene.* **2004**;23:7906–9
54. Sen B, Johnson FM. Regulation of SRC family kinases in human cancers. *J Signal Transduct.* **2011**;2011:865819
55. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2003**;22:337–58
56. Bromann PA, Korkaya H, Courtneidge SA. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene.* **2004**;23:7957–68
57. Luttrell DK, Luttrell LM. Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases. *Oncogene.* **2004**;23:7969–78

58. Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. **2004**;23:7947–56
59. Silva CM. Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*. **2004**;23:8017–23
60. Furqan M, Mukhi N, Lee B, Liu D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark Res*. **2013**;1:5
61. Haan C, Is'harc H, Hermanns HM, Schmitz-Van De Leur H, Kerr IM, Heinrich PC, Grotzinger J, Behrmann I. Mapping of a region within the N terminus of Jak1 involved in cytokine receptor interaction. *J Biol Chem*. **2001**;276:37451–8
62. Wilks AF. The JAK kinases: not just another kinase drug discovery target. *Semin Cell Dev Biol*. **2008**;19:319–28.57
63. O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med*. **2015**;66:311–28
64. 58. Levine RL, Gilliland DG. JAK-2 mutations and their relevance to myeloproliferative disease. *Curr Opin Hematol*. **2007**;14:43–7
65. Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG. Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem* **1987**;56: 567–613
66. D.A. Walsh, J.P. Perkins, E.G. Krebs, An adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle, *J. Biol. Chem*. 243, (**1968**) 3763–3765
67. S. Shoji, D.C. Parmelee, R.D. Wade, S. Kumar, L.H. Ericsson, K.A. Walsh, H. Neurath, G.L. Long, J.G. Demaille, E.H. Fischer, K. Titani, Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (**1981**), 848–851
68. M.D. Uhler, D.F. Carmichael, D.C. Lee, J.C. Chivria, E.G. Krebs, G.S. McKnight, Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 (**1986**) 1300–1304
69. D.R. Knighton, J.H. Zheng, L.F. Ten Eyck, V.A. Ashford, N.H. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase, *Science* 253 (**1991**) 407–414
70. Dumont JE, Jauniaux JC, Roger PP. **1989**. The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation. *Trends Biochem. Sci.* 14:67–71 76.
71. Chen J, Iyengar R. **1994**. Suppression of Ras-induced transformation of NIH 3T3 cells by activated Gαs. *Science* 263:1278– 81

72. Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J, Kannan N, Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta*. **2008** 1784(1):16-26.
73. Castagna, M. et al. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein-kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257,7847–7851 (**1982**)
74. Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. & Nishizuka, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues.1. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* 252, 7603–7609 (**1977**)
75. Geraldes, P. & King, G. L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ. Res.* 106, 1319–1331 (**2010**)
76. Toton, E., Ignatowicz, E., Skrzeczkowska, K. & Rybczynska, M. Protein kinase C ϵ as a cancer marker and target for anticancer therapy. *Pharmacol. Rep.* 63, 19–29 (**2011**)
77. Inagaki, K., Churchill, E. & Mochly-Rosen, D. Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart. *Cardiovasc. Res.* 70, 222–230 (**2006**)
78. Zanin-Zhorov, A., Dustin, M. L. & Blazar, B. R. PKC- θ function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends Immunol.* 32, 358–363 (**2011**)
79. Chen, L. *et al.* Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of δ PKC and ϵ PKC. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 11114–11119 (**2001**).
80. Murriel, C. L. & Mochly-Rosen, D. Opposing roles of δ and ϵ PKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**, 246–254 (**2003**).
81. Basu, A. & Pal, D. Two faces of protein kinase C δ : the contrasting roles of PKC δ in cell survival and cell death. *ScientificWorldJournal* 10, 2272–2284 (**2010**).
82. A. Zebisch, J. Troppmair, Back to the roots: the remarkable RAF oncogene story, *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (**2006**) 1314–1330
83. C. Wellbrock, M. Karasarides, R. Marais, The RAF proteins take centre stage, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (**2004**) 875–885
84. L.K. Rushworth, A.D. Hindley, E. O’Neill, W. Kolch, Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization, *Mol. Cell. Biol.* 26 (**2006**) 2262–2272
85. Robert Roskoski Jr., RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation, *Biochem Biophys Res Commun.* 399 (**2010**) 313–317
86. See supporting data on *Science Online* and at www.kinase.com/human/kinome.
87. H. Yamaguchi, M. Matsushita, A. C. Nairn, J. Kuriyan, *Mol. Cell* **7**, 1047 (**2001**)

88. Taylor SS, Radzio-Andzelm E (1994) Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* 2: 345–355
89. Hottiger MO, Nuclear ADP-Ribosylation and Its Role in Chromatin Plasticity, Cell Differentiation, and Epigenetics, *Annu Rev Biochem.*, **2015**, 84:227-63
90. a)Hottiger MO, Hassa PO, Luscher B, Schuler H, Koch-Nolte F. **2010**. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 35:208–b) Hottiger MO, *Mol Cell.* **2015** Jun 18; 58(6):1134-1134.e1
91. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. **2012**. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:225–38
92. Aravind L, Zhang D, de Souza RF, Anand S, Iyer LM. **2014**. The natural history of ADPribosyltransferases and the ADP-ribosylation system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 384:3–32
93. Shimizu Y, Hasegawa S, Fujimura S, Sugimura T. **1967**. Solubilization of enzyme forming ADPR polymer from NAD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29:80–83
94. Z. Herceg and Z. Q. Wang, “Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 477, no. 1–2, pp. 97–110, **2001**
95. H.Otto, P.A. Reche, F. Bazan, K. Dittmar, F. Haag, F. Koch-Nolte, *BMC Genomics* 6 (**2005**) 139
96. Hottiger MO, Hassa PO, Luscher B, Schuler H, Koch-Nolte F. *Trends Biochem Sci*; 35 (4):208–219
97. B.C. Woodhouse, G.L. Dianov, *DNA Repair (Amst)* 7 (7) (**2008**) 1077–1086
98. P. Jagtap, C. Szabo, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (5) (**2005**) 421–440
99. S. Beneke, *Exp. Gerontol.* 43 (7) (**2008**) 605–614.
100. Citarelli M, Teotia S, Lamb RS. Evolutionary history of the poly(ADP-ribose) polymerase gene family in eukaryotes. *BMC Evol Biol* **2010**; 10: 308
101. Schreiber, V. et al. (**2006**) Poly(ADPribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 517–528
102. Hottiger, M.O. et al. (**2010**) Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.*, 35, 208–219
103. Rulten, S.L. et al. (**2011**) PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-Joining. *Mol. Cell*, 41, 33–45

104. Langelier, M.F. et al. **(2008)** A third zinc-binding domain of human poly (ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J. Biol. Chem.*, 283, 4105–4114
105. Ye'lamos, J. et al. **(2011)** PARP-1 and PARP-2: new players in tumour development. *Am. J. Cancer Res.*, 1, 328–346.
106. Krishnakumar, R. et al. **(2010)** The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol. Cell*, 39, 8–23
107. A. Ruf, G. de Murcia, G. E. Schulz, *Biochemistry* 37, 3893 **(1998)**
108. 14. A. Ruf, J. Mennissier de Murcia, G. de Murcia, G. E. Schulz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7481 **(1996)**
109. Barkauskaite E, Jankevicius G, Ahel I, Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation, *Mol Cell.* **2015** Jun 18;58(6):935-46
110. α) Steffen, J.D., Brody, J.R., Armen, R.S., and Pascal, J.M. **(2013)**. Structural Implications for Selective Targeting of PARPs. *Front Oncol* 3, 301. β) Langelier, M.-F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. **(2012)**. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribose)ation by human PARP-1. *Science* 336, 728–732. γ) Langelier, M.-F., Riccio, A.A., and Pascal, J.M. **(2014)** PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 50 phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* 42, 7762–7775. δ) Ikejima, M., Noguchi, S., Yamashita, R., Ogura, T., Sugimura, T., Gill, D.M., and Miwa, M. **(1990)**. The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *J. Biol. Chem.* 265, 21907–21913.
111. Anthony K.L. Leung ,PARPs, *Current Biology*, 27, 23, **2017**
112. Adamietz, P. **(1987)**. Poly(ADP-ribose) synthase is the major endogenous nonhistone acceptor for poly(ADPribose) in alkylated rat hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.* 169, 365–372
113. Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C. & Mandel, P. **(1982)**. Poly (ADPribose)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 79, 3423–3427
114. Cadet, J. and Wagner, J.R. **(2013)** DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a012559

115. Tanaka, Y., Yoshihara, K., Itaya, A., Kamiya, T. and Koide, S.S. (1984) Mechanism of the inhibition of Ca²⁺, Mg²⁺-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.*, 259, 6579–6585
116. Satoh, M.S., Poirier, G.G. and Lindahl, T. (1994) Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry*, 33, 7099–7106.
117. C. Kumar, L. P.T.V., and A. Arunachalam, “Structure based pharmacophore study to identify possible natural selective PARP-1 trapper as anti-cancer agent,” *Comput. Biol. Chem.*, vol. 80, pp. 314–323, 2019
118. Yasui, A. (2013) Alternative excision repair pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a012617
119. Lindahl, T.; Satoh, M.S.; Poirier, G.G.; Klungland, A. Post-translational modification of poly(adpribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 1995, 20, 405–411
120. Satoh, M.S.; Lindahl, T. Role of poly(adp-ribose) formation in DNA repair. *Nature* 1992, 356, 356–358
121. A.M. Ferro, B.M. Olivera, Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7808–7813
122. P. Zahradka, K. Ebisuzaki, A shuttle mechanism for DNA–protein interactions. The regulation of poly(ADP-ribose) polymerase, *Eur. J. Biochem.* 127 (1982) 579–585
123. Ischenko, A.A. and Saparbaev, M.K. (2002) Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature*, 415, 183–187
124. Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, et al. Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* 1999;18:4616–25
125. Galande S, Kohwi-Shigematsu T. Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences. *J Biol Chem* 1999;274:20521–28
126. Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ, et al. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem* 2008;283:1197–208
127. Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA damaging agents. *J Biol Chem* 2007;282:16441–53

128. Ciccia A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* **2010**;40:179–204
129. P. Cohen, Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (**2002**) 309–315
130. Yaish, P. et al. (**1988**) Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 242, 933–935.
131. Noble, M.E.M. et al. (**2004**) Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science* 303, 1800–1805
132. Okamoto, K. et al. (**2015**) Distinct binding mode of multikinase inhibitor lenvatinib revealed by biochemical characterization. *ACS Med. Chem. Lett.* 6, 89–94
133. Cox, K.J. et al. (**2010**) Tinkering outside the kinase ATP box: allosteric (type IV) and bivalent (type V) inhibitors of protein kinases. *Future Med. Chem.* 3, 29–43
134. Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov Today*. **2016** 21 (1):5-10
135. Leproult, E. et al. (**2011**) Cysteine mapping in conformationally distinct kinase nucleotide binding sites: application to the design of selective covalent inhibitors. *J. Med. Chem.* 54, 1347–1355
136. Nagar, B. et al. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859–871 (**2003**).
137. Nagar, B. et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 62, 4236–4243 (**2002**)
138. Zhang J, Yang PL, Gray NS, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors, *Nat Rev Cancer.* **2009** 9(1):28-39
139. α) Ohren, J. F. et al. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11, 1192–1197 (**2004**) β) Adrian, F. J. et al. Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nature Chem. Biol.* 2, 95–102 (**2006**).
140. Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science* 308, 1318–1321 (**2005**)
141. This study is an instructive example of how a selective irreversible inhibitor of RSK was designed. Kwak, E. L. et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 7665–7670 (**2005**)
142. Rabindran, S. K. et al. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res.* 64, 3958–3965 (**2004**)

143. Heymach, J. V., Nilsson, M., Blumenschein, G., Papadimitrakopoulou, V. & Herbst, R. Epidermal growth factor receptor inhibitors in development for the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 4441s–4445s (**2006**)
144. Felip, E., Santarpia, M. & Rosell, R. Emerging drugs for non-small-cell lung cancer. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 12, 449–460 (**2007**)
145. Ying-Qing Wang, Ping-Yuan Wang, Yu-Ting Wang, Guang-Fu Yang, Ao Zhang, and Ze-Hong Miao. An Update on Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors: Opportunities and Challenges in Cancer Therapy, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, (21), 9575–9598
146. J. Murai *et al.*, “Rationale for Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Combination Therapy with Camptothecins or Temozolomide Based on PARP Trapping versus Catalytic Inhibition,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 349, no. 3, pp. 408–416, **2014**
147. Konecny GE1, Kristeleit RS2, PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions, *Br J Cancer.* **2016** 8;115(10):1157-1173
148. Shen, Y, Aoyagi-Scharber, M.; Wang, B. Trapping poly(ADPRibose) polymerase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2015**, 353, 446–457
149. Murai, J.; Huang, S. Y.; Das, B. B.; Renaud, A.; Zhang, Y.; Doroshow, J. H.; Ji, J.; Takeda, S.; Pommier, Y. Trapping of PARP1 and PARP-2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* **2012**, 72, 5588–5599
150. Murai, J.; Huang, S. Y.; Renaud, A.; Zhang, Y.; Ji, J.; Takeda, S.; Morris, J.; Teicher, B.; Doroshow, J. H.; Pommier, Y. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13, 433–443
151. Ruf, A.; de Murcia, G.; Schulz, G. E. Inhibitor and NAD⁺ binding to poly (ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and homology modeling. *Biochemistry* **1998**, 37, 3893– 3900
152. Dana V. Ferraris, Evolution of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors. From Concept to Clinic, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4561–4584
153. Druker, B.J. et al. (**2001**) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Eng. J. Med.* 344, 1031–1037
154. Peng Wu, Thomas E.Nielsen, Mads H.Clausen, FDA-approved small-molecule kinase inhibitors, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2015**, 36, 7, 422-439
155. Iqbal N, Iqbal N., Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer, *Chemother Res Pract.***2014**;2014:357027

156. Abbaspour Babaei M1, Kamalidehghan B2, Saleem M3, Huri HZ4, Ahmadipour F1, Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells , Drug Des Devel Ther. **2016** 1;10:2443-59
157. (a) Zimmermann, J. EP Patent 564,409, **1993**. (b) Zimmermann, J. U.S. Patent 5,521,184, **1996**. (c) Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N. B.; Traxler, P. Bioorg. Med. Chem. Lett. **1996**, 11, 1221
158. Szczepek W, Luniewski W, Kaczmarek L, Zagrodzki B, Samson Lazinska D, Szele Jewski W (**2006**) WO Patent 2006071130
159. M. Kinigopoulou, M. Filippidou, M. Gogou, A. Giannousi, P. Fouka, N. Ntemou, D. Alivertis, C. Georgis, A. Brentas, V. Polychronidou, P. Voulgari, V. Theodorou and K. Skobridis, An optimized approach in the synthesis of imatinib intermediates and analogues, RSC Adv., **2016**, 6, 61458
160. Lamontanara, A.J. et al. (**2013**) Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors. Biochim. Biophys. Acta 1834, 1449–1459 37
161. Ma, L. et al. (**2014**) A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. Sci. Transl. Med. 6, 252ra121
162. Weisberg, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr–Abl, *Cancer Cell* **7**, 129–141 (**2005**)
163. J.E. Cortes, C. Gambacorti-Passerini, M.W. Deininger, M.J. Mauro, C. Chuah, D.W. Kim, et al., Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results from the randomized BFORE trial, J. Clin. Oncol. 36 (**2018**) 231–237
164. Robert Roskoski Jr, Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors, Pharmacol Res.,**2019**, 144:19-50
165. W. Breitenstein, P. Furet, S. Jacob and P. W. Manley, World Pat., 2004005281, **2004**
166. Benjamin J. Deadman, Mark D. Hopkin, Ian R. Baxendale and Steven V. Ley, The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib, Org. Biomol. Chem., **2013**,11, 1766-1800
167. S. Ongoren, A.E. Eskazan, V. Suzan, S. Savci, I. Erdogan Ozunal, et al., Third-line treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors (dasatinib or nilotinib) in patients with chronic myeloid leukemia after two prior TKIs: real-life data on a single center experience along with the review of the literature, Hematology
168. Karaman, M. W. et al. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. Nature Biotechnol. 26, 127–132 (**2008**)

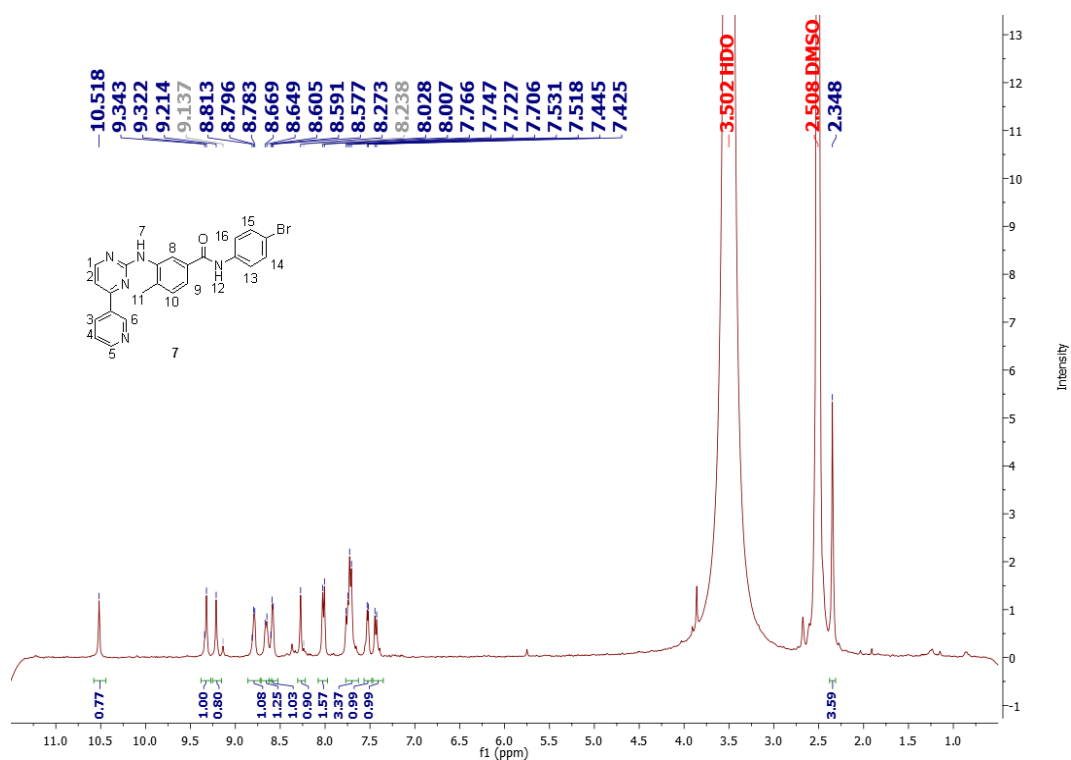
169. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem.* **2004**;47:6658-6661
170. Vajpai, N. et al. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J. Biol. Chem.* 283, 18292–18302 (**2008**)
171. Fiona H Tan, Tracy L Putoczki, Stanley S Stylli, and Rodney B Luwor, Ponatinib: a novel multi-tyrosine kinase inhibitor against human malignancies, *Onco Targets Ther.* **2019**; 12: 635–645
172. Zou, D.; *et. al.* Bicyclic heteroaryl compounds. WO2007075869A2
173. Murray, C. K. *et. al.* Crystalline forms of 3-(imidazo[1,2-b] pyridazin-3-ylethynyl)-4-methyl-n-(4-[(4-methylpiperazin-1-yl) methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl)benzamide and its mono hydrochloride salt. WO2014093579A2
174. Keller-von Amsberg, G.; Koschmieder, S. *OncoTargets Ther.* **2013**, 6, 99
175. Golas, J. M.; Arndt, K.; Etienne, C.; Lucas, J.; Nardin, D.; Gibbons, J.; Frost, P.; Ye, F.; Boschelli, D. H.; Boschelli, F. *Cancer Res.* **2003**, 63, 375
176. Boschelli, D. H.; Wang, Y. D.; Johnson, S.; Wu, B.; Ye, F.; Sosa, A. C. B.; Golas, J. M.; Boschelli, F. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1599
177. Houry, H. J.; Cortes, J. E.; Kantarjian, H. M.; Gambacorti-Passerini, C.; Baccarani, M.; Kim, D.-W.; Zaritskey, A.; Countouriotis, A.; Besson, N.; Leip, E.; Kelly, V.; Brummendorf, T. H. *Blood* **2012**, 119, 3403
178. Cortes, J. E.; Kantarjian, H. M.; Brummendorf, T. H.; Kim, D.-W.; Turkina, A. G.; Shen, Z.-X.; Pasquini, R.; Houry, H. J.; Arkin, S.; Volkert, A.; Besson, N.; Abbas, R.; Wang, J.; Leip, E.; Gambacorti-Passerini, C. *Blood* **2011**, 118, 4567
179. Xiao Jia Yin , Guan Hong Xu , Xu Sun , Yan Peng , Xing Ji , Ke Jiang and Fei Li, Synthesis of Bosutinib from 3-Methoxy-4-hydroxybenzoic Acid, *Molecules* **2010**, 15, 4261-4266
180. WO2005019301A2/US7297795B2
181. *Org.Process Res. Dev.* **2013**, 17, 500-504
182. Elisena Franzesea, Sara Centonzea, Anna Dianaa, Francesca Carlinoa, Luigi Pio Guerreraa, Marilena Di Napolib, Ferdinando De Vita, Sandro Pignatab, Fortunato Ciardielloa, Michele Orditura, PARP inhibitors in ovarian cancer, *Cancer Treatment Reviews* 73 (**2019**) 1–9

183. Junko Murai and Yves Pommier, PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers, *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2019**, 3:7.1–7.20
184. Kirby IT, Cohen MS, Small-Molecule Inhibitors of PARPs: From Tools for Investigating ADP-Ribosylation to Therapeutics, *Curr Top Microbiol Immunol.* **2019**;420:211-231
185. Hughes DL. Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib, and Niraparib. *Organic Process Research and Development.* **2017**
186. Wang, Z.; Li, S.; Hu, L. A Method for Preparing a Key Intermediate of the Anti-Ovarian, Cancer Drug Rucaparib. Chinese Patent Application CN 106008530, Oct 12, **2016**
187. Role of PARP Inhibitors in *BRCA*-Related Malignancies, Sana Iqbal, PharmD; Mohammad A. Rattu, PharmD, BCOP, BCPS, BCGP; Neal Shah, PharmD, US Pharmacist. **2018**;43(9):HS10-HS17
188. Jones P, Altamura S, Boueres J, et al. Discovery of 2-{4-[(3S)- piperidin-3-yl]phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): a novel oral poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitor efficacious in *BRCA*-1 and -2 mutant tumors. *J Med Chem* **2009**; 52: 7170–8
189. Roscilli G, Gavory G, Lamartin S, et al. PARP inhibitor MK-4827 is synthetic lethal for tumors with homologous recombination defects associated with *ATM*-deficiency, *PTEN*-deletion and microsatellite instability (MSI). Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; Washington, DC, USA; April 17–21, **2010**. 685
190. Benjamin D. Hopkins, Cindy Hodakoski, Doug Barrows, Sarah Mense, and Ramon E. Parsons, *PTEN* function, the long and the short of it, *Trends Biochem Sci.* **2014** Apr; 39(4): 183–190
191. Skobridis K, Kinigopoulou M, Theodorou V, Giannousi E, Russell A, Chauhan R, Sala R, Brownlow N, Kiriakidis S, Domin J, Tzakos AG, Dibb NJ, Novel imatinib derivatives with altered specificity between *Bcr-Abl* and *FMS*, *KIT*, and *PDGF* receptors, *ChemMedChem*, **2010**, 5, 130-139
192. α) M. Kinigopoulou, M. Filippidou, M. Gogou, A. Giannousi, P. Fouka, N. Demou, D. Alivertis, C. Georgis, A. Brentas, V. Polychronidou, P. Voulgari, V. Theodorou and K. Skobridis, *RSC Adv.*, **2016**, DOI: 10.1039/C6RA09812F. β) Διδακτορική Διατριβή, Αιμιλία Γιαννούση, Σχεδιασμός και ανάπτυξη συνθετικής πορείας για τη σύνθεση νέων αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος της Ιματινίβης (Imatinib) ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών για τη θεραπεία νεοπλασιών, Ιωάννινα **2018**. γ) Konstantinos Skobridis, Andreas G. Tzakos and Valentine Ragoussisa, A simple method for the alkaline hydrolysis of esters Vassiliki Theodorou, a,* *Tetrahedron Letters* 48 (**2007**) 8230–8233

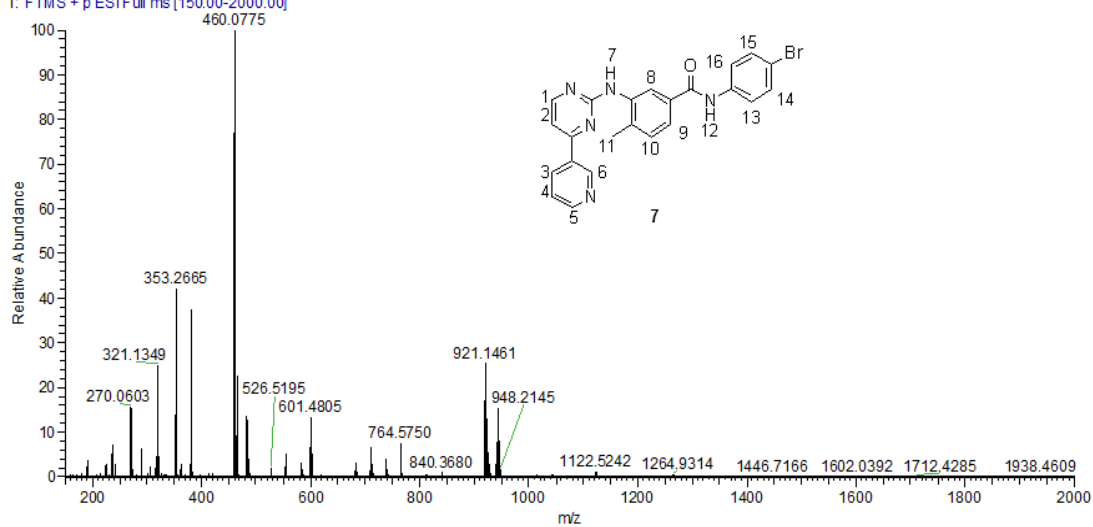
193. Pantazi, D., Ntemou, N., Brentas, A., Alivertis, D., Skobridis, K., and Tselepis, Molecular requirements for the expression of antiplatelet effects by synthetic structural optimized analogues of the anticancer drugs imatinib and nilotinib. *A. D., Drug Design, Development and Therapy* **2019**; 13 4225-4238
194. McConkey, B.J.; Sobolev, V.; Edelman, M. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Curr. Sci.*, **2002**, 83, 845-855
195. Xuan-Yu Meng, Hong-Xing Zhang, Mihaly Mezei, and Meng Cui, Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery, *Current Computer-Aided Drug Design*, **2011**, 7, 146-157
196. Sandra W Cowan-Jacob ¹, Gabriele Fendrich, Paul W Manley, Wolfgang Jahnke, Dorian Fabbro, Janis Liebetanz, Thomas Meye, The Crystal Structure of a c-Src Complex in an Active Conformation Suggests Possible Steps in c-Src Activation, *Structure*, **2005** Jun;13(6):861-71
197. Campos, K. R.; Woo, J. C. S.; Lee, S.; Tillyer, R. D. A General Synthesis of Substituted Indoles from Cyclic Enol Ethers and Enol Lactones *Org. Lett.* **2004**, 6, 79
198. Eric Fillion Dan Fishlock, Scandium triflate-catalyzed intramolecular Friedel–Crafts acylation with Meldrum's acids: insight into the mechanism, *Tetrahedron* 65 (**2009**) 6682–6695

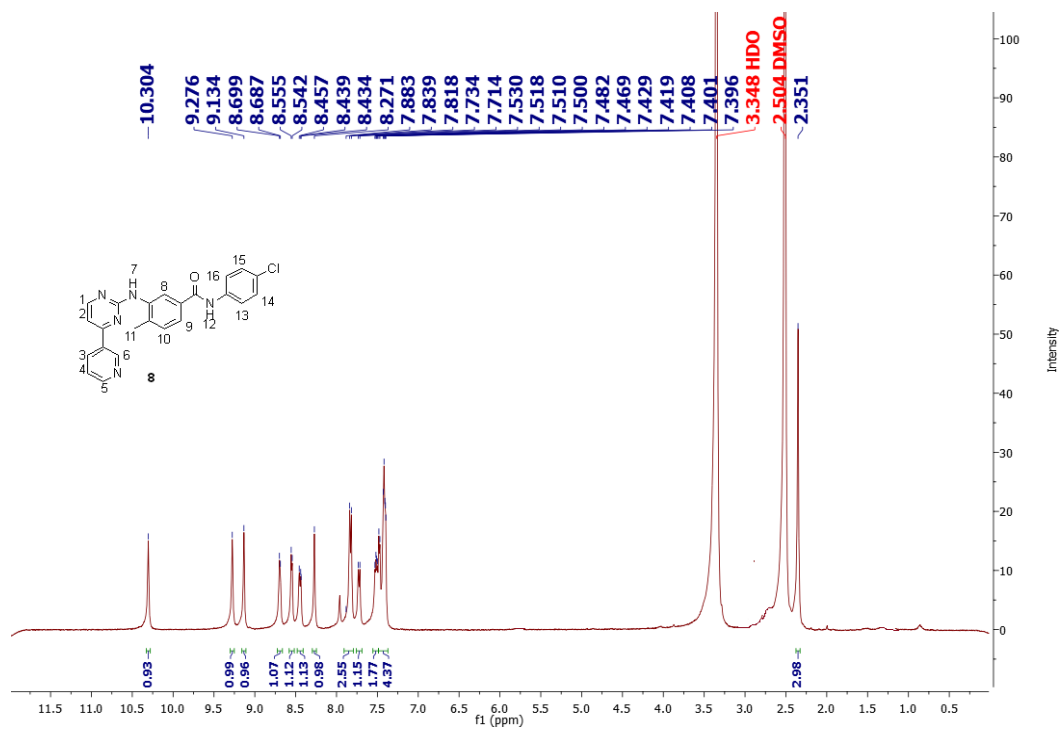
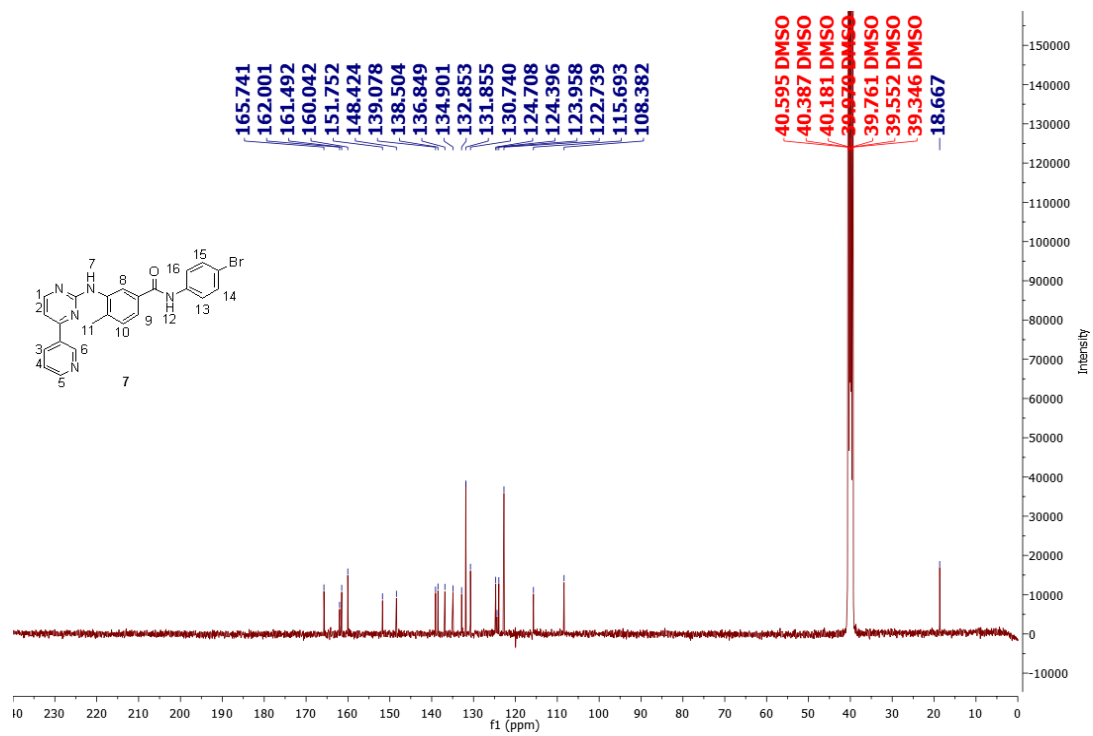
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

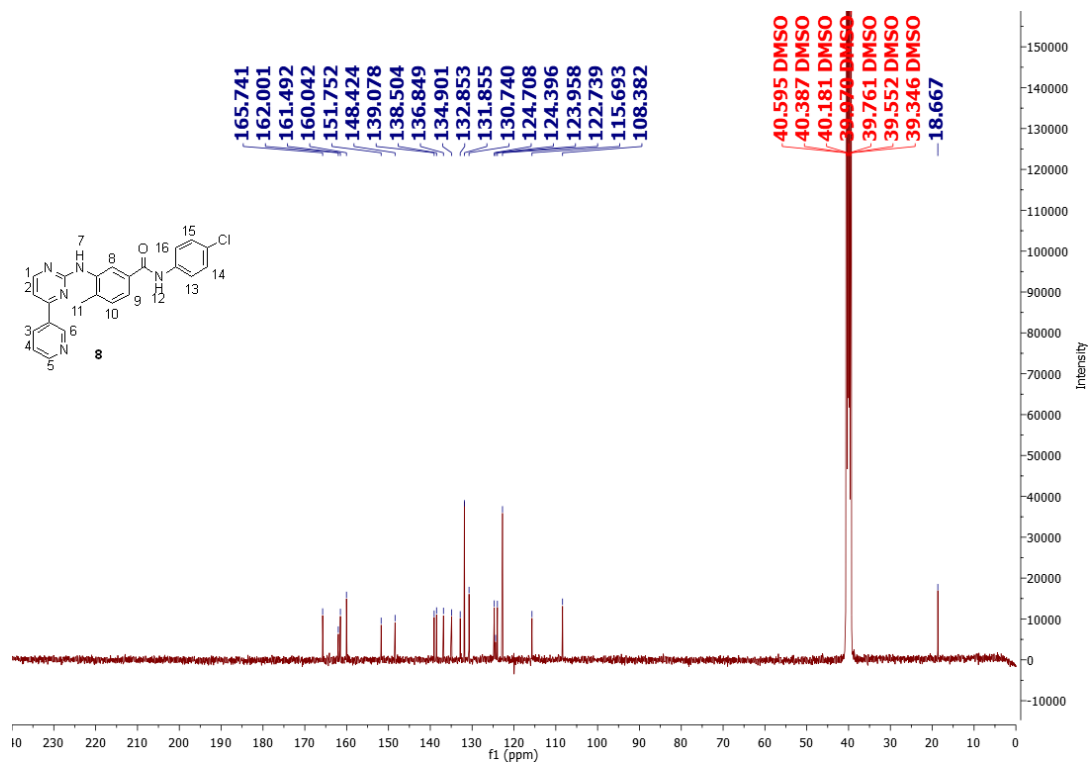
Παρακάτω παρατίθενται φάσματα $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR, MS, των τελικών ενώσεων που συντέθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο.



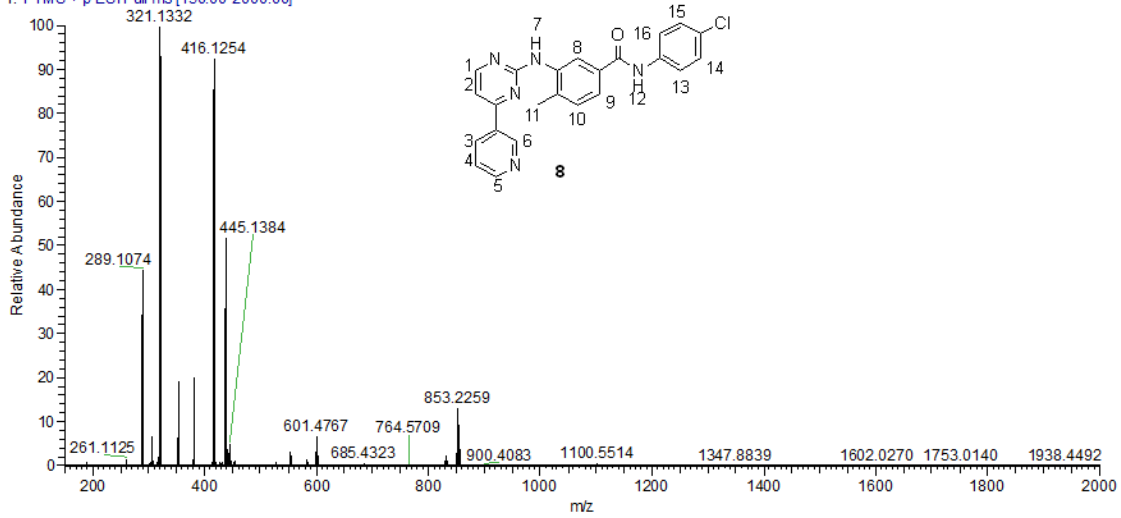
NV 4Br 200526100747 #6 RT: 0.04 AV: 1 NL: 3.02E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

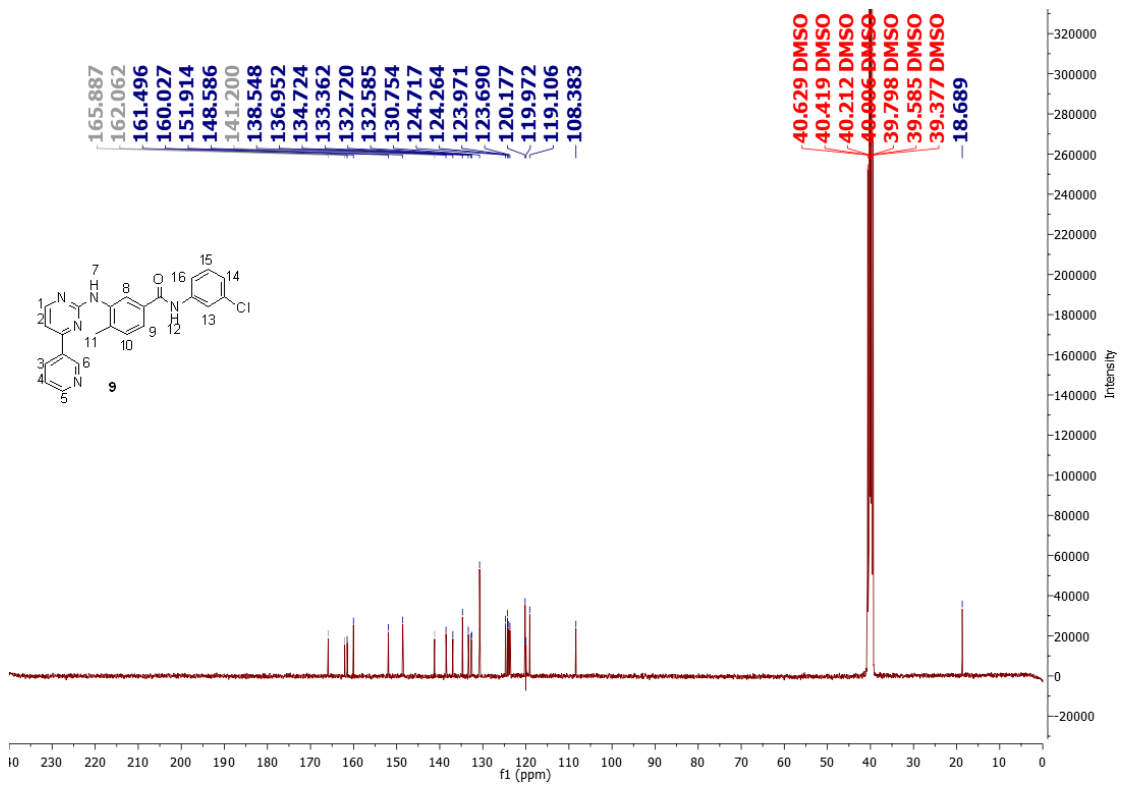
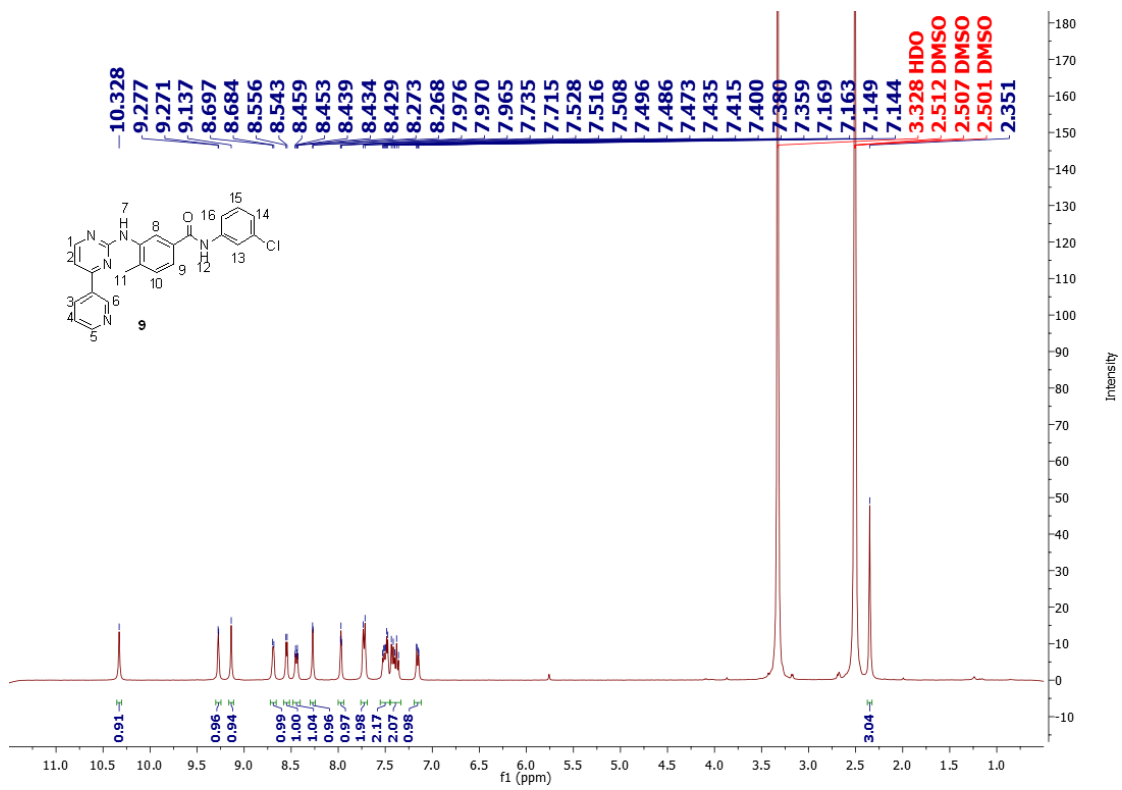




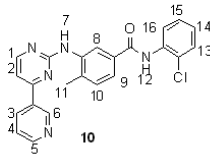
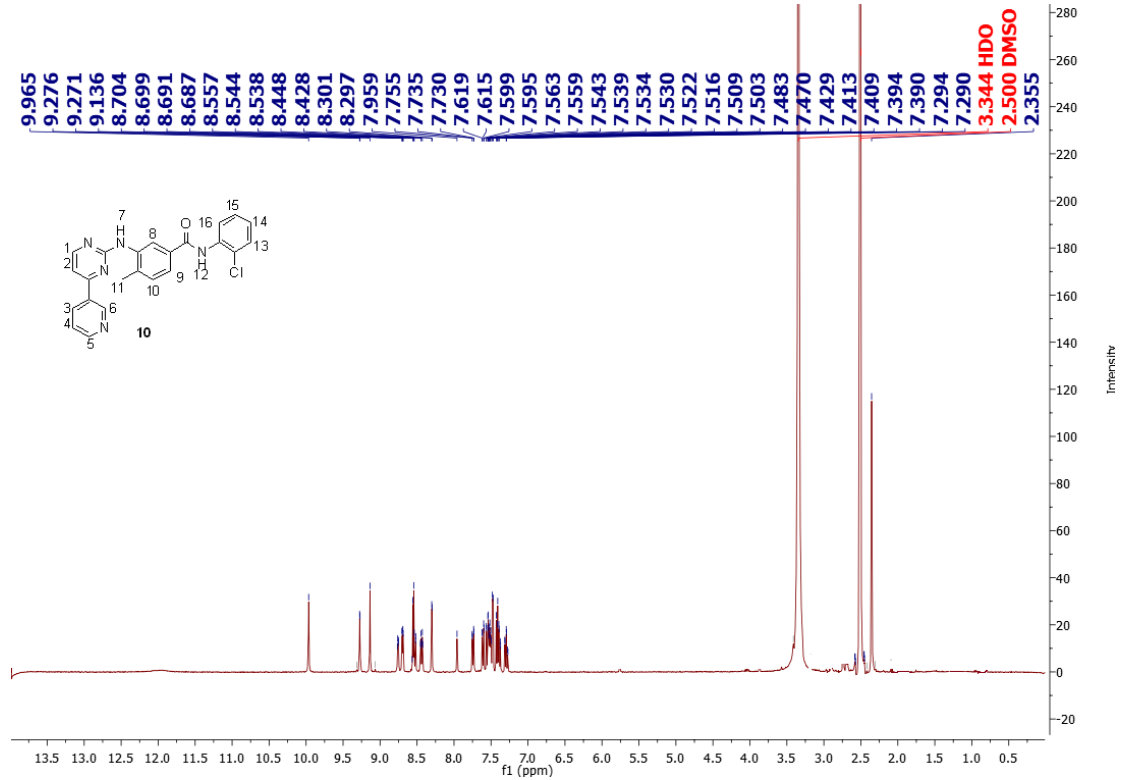
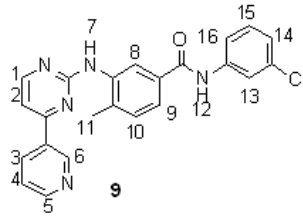
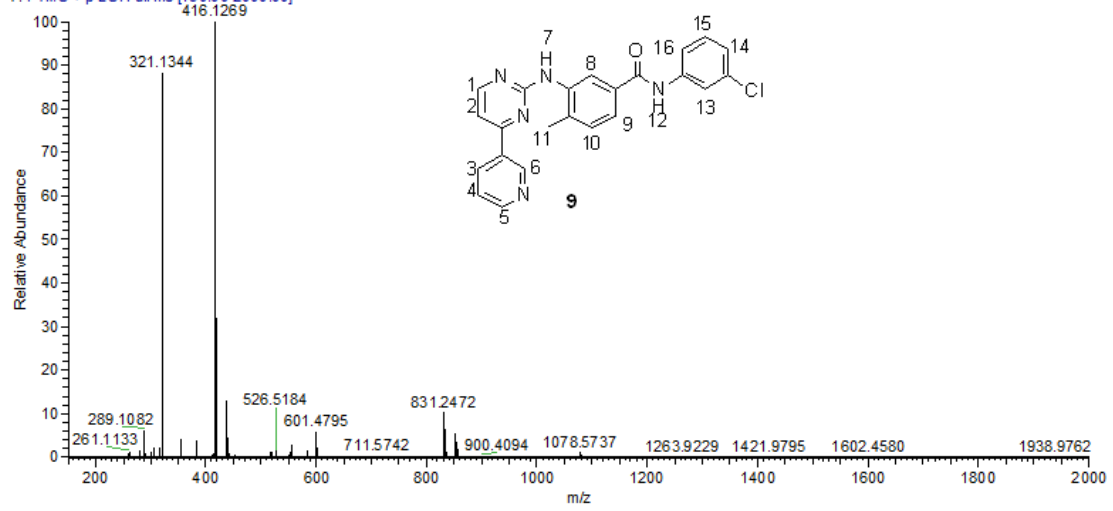


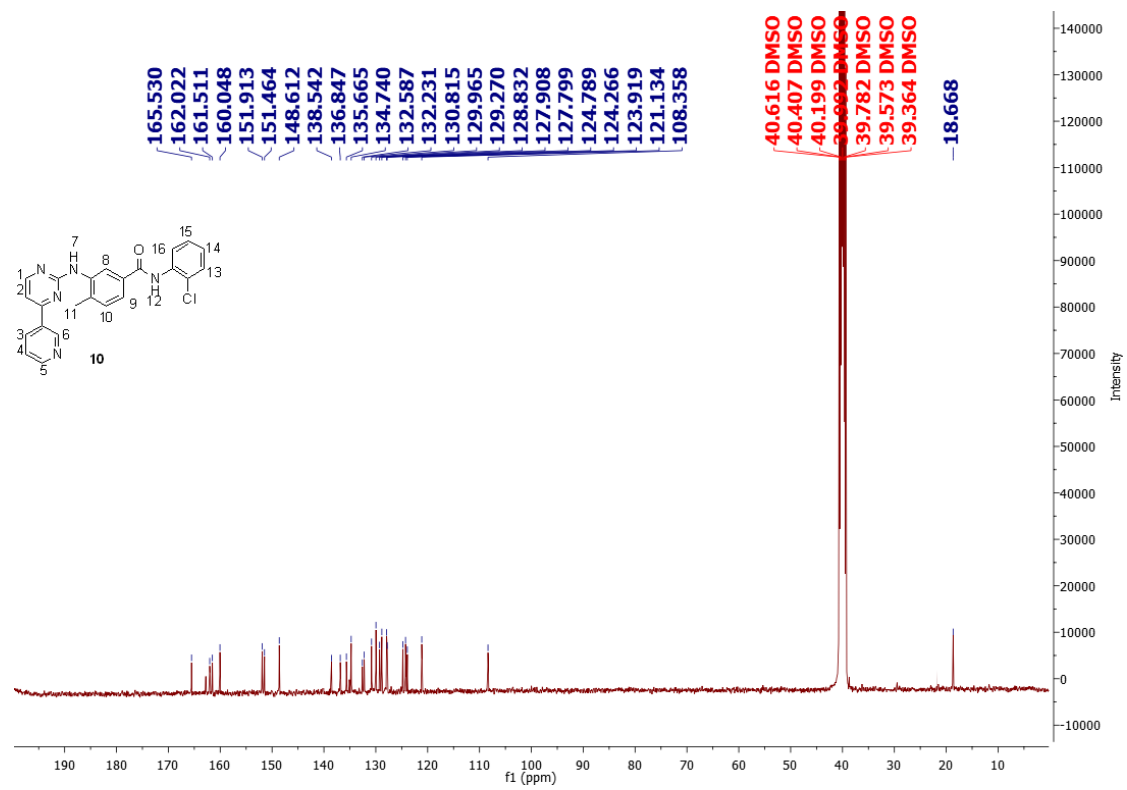
VN4CI 19120403 #4 RT: 0.06 AV: 1 NL: 1.35E7
 T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



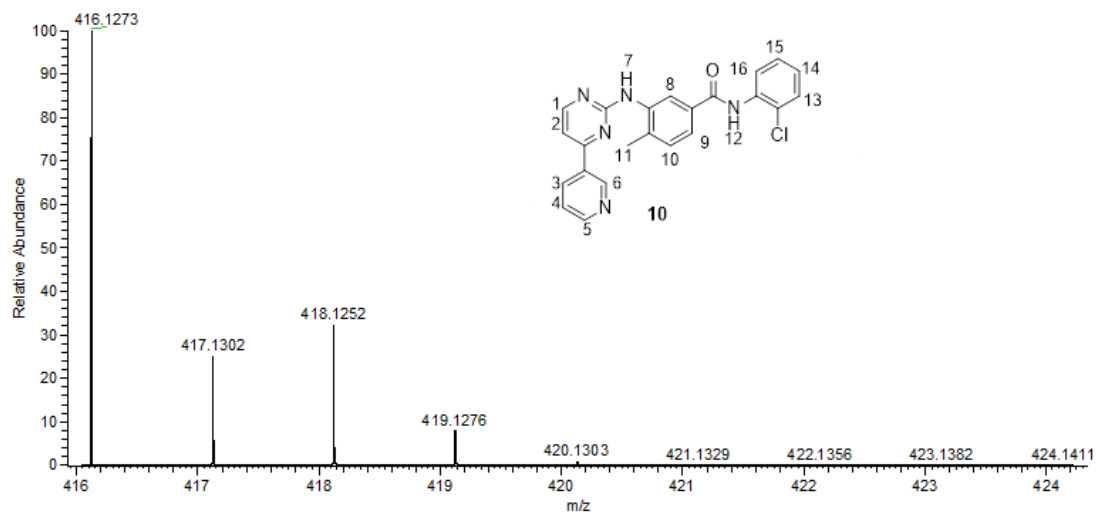


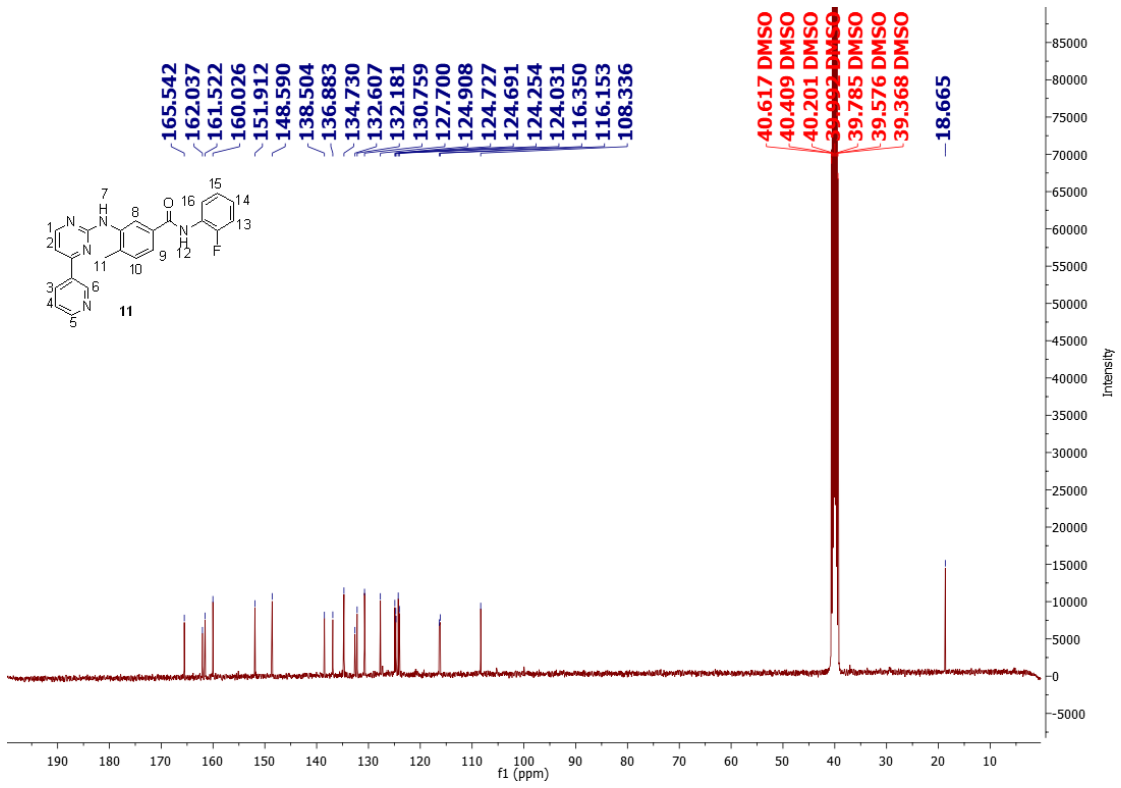
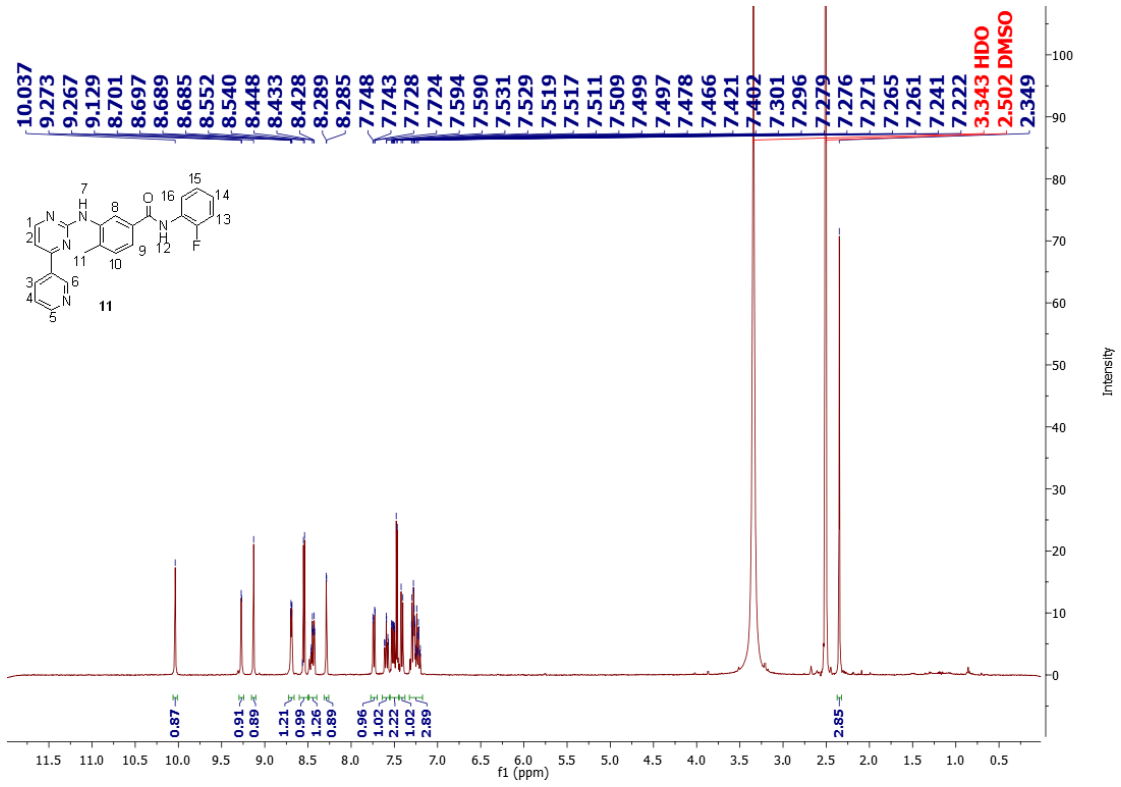
NV3C_1_200526104502 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.37E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



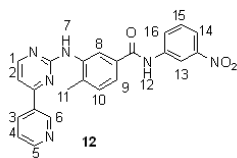
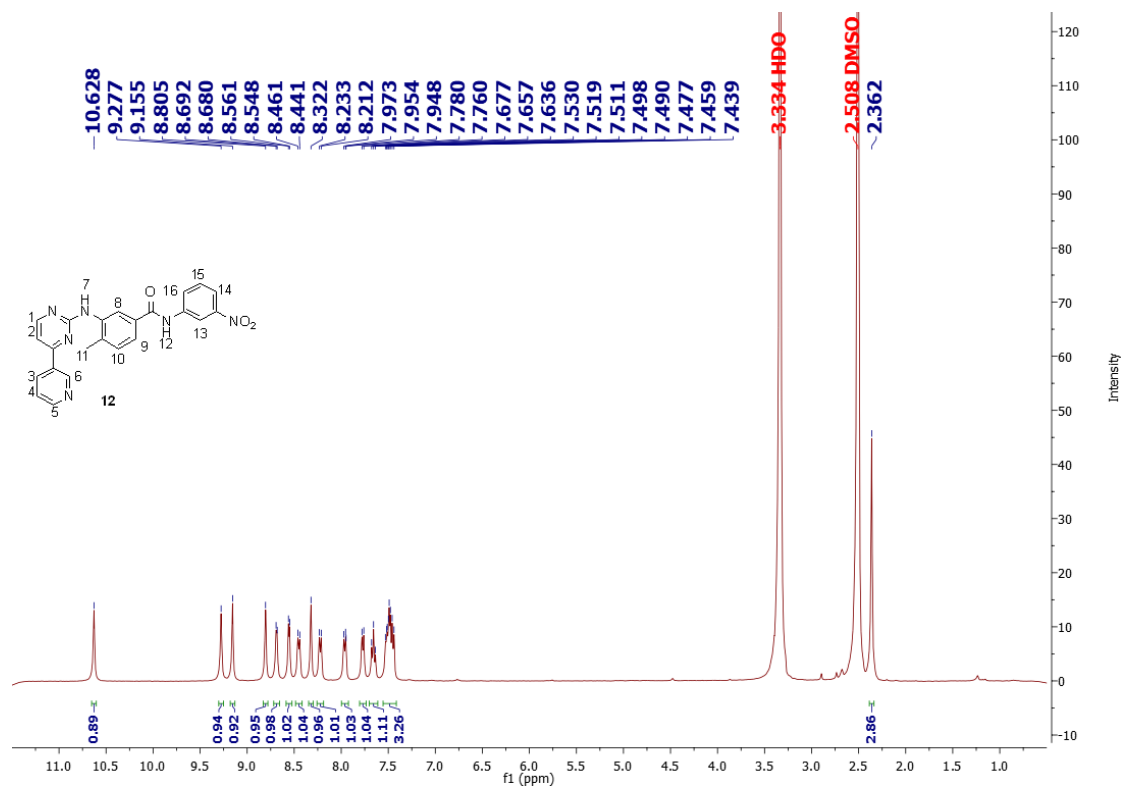
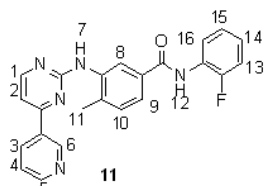
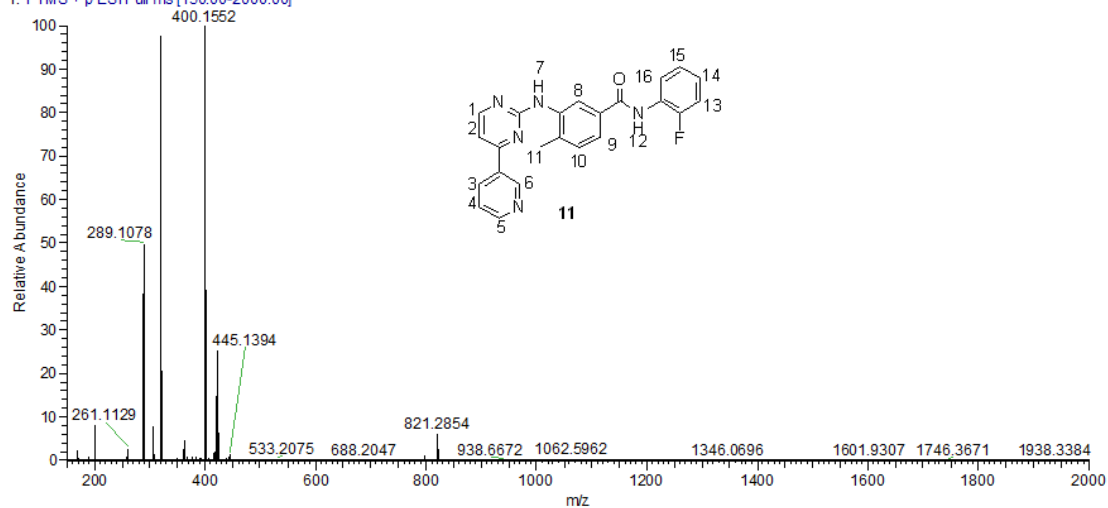


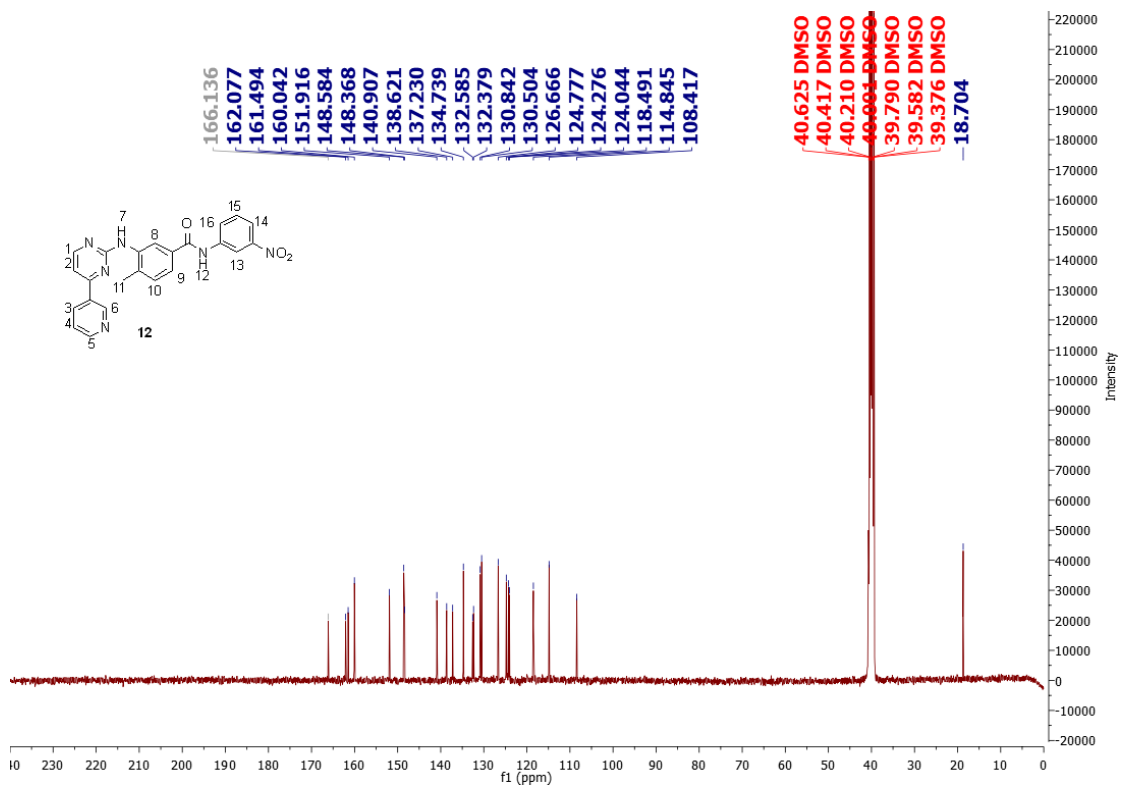
C23H18ClN5O +H: C23 H 19 Cl1 N 5 O1 p(gss, s/p:40) Chr...



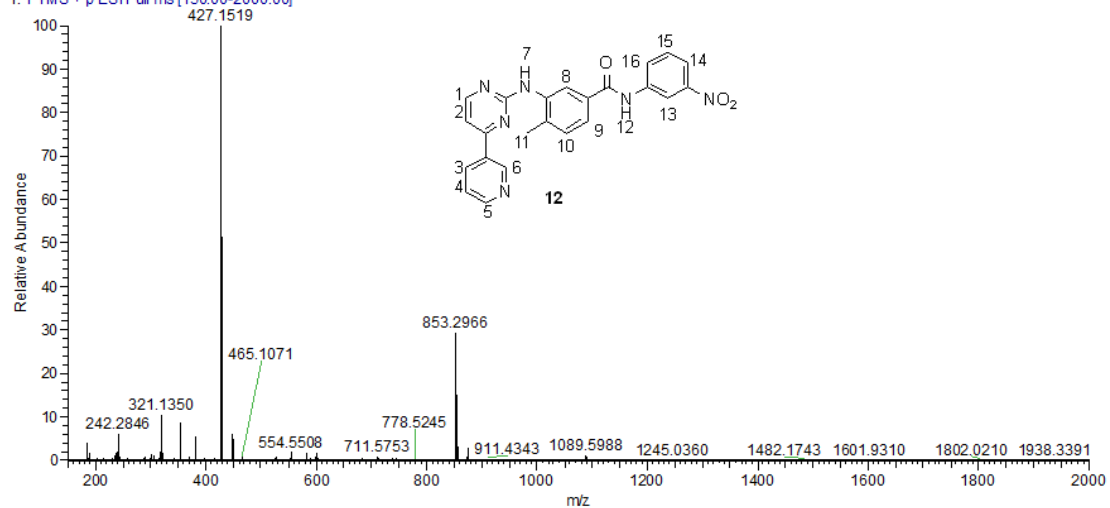


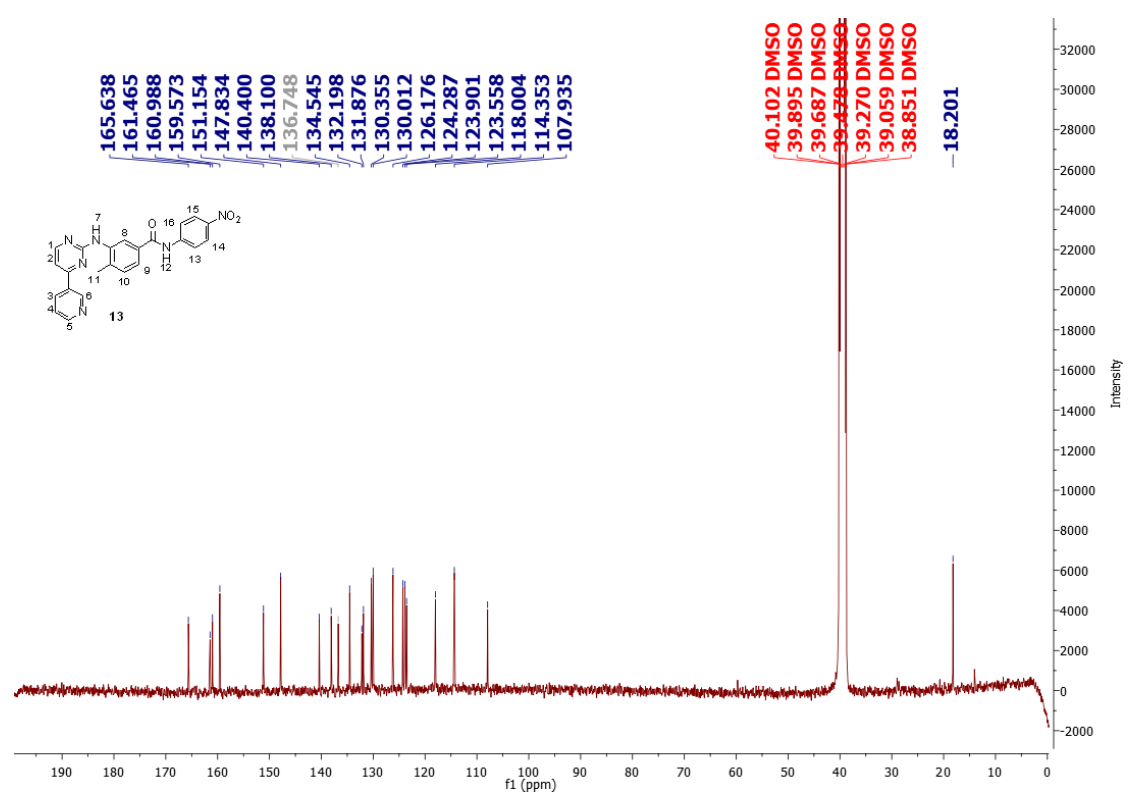
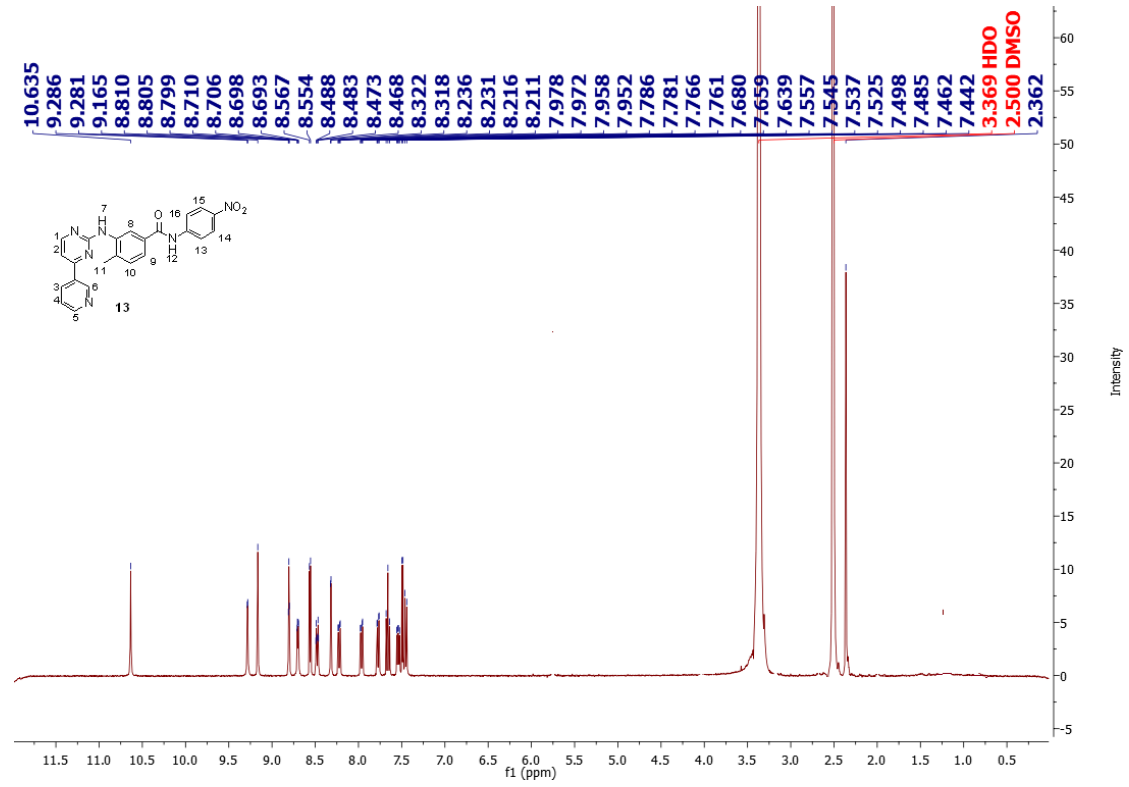
PVSK153 1(3) 19120403#3 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.53E7
 T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



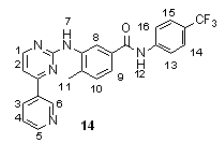
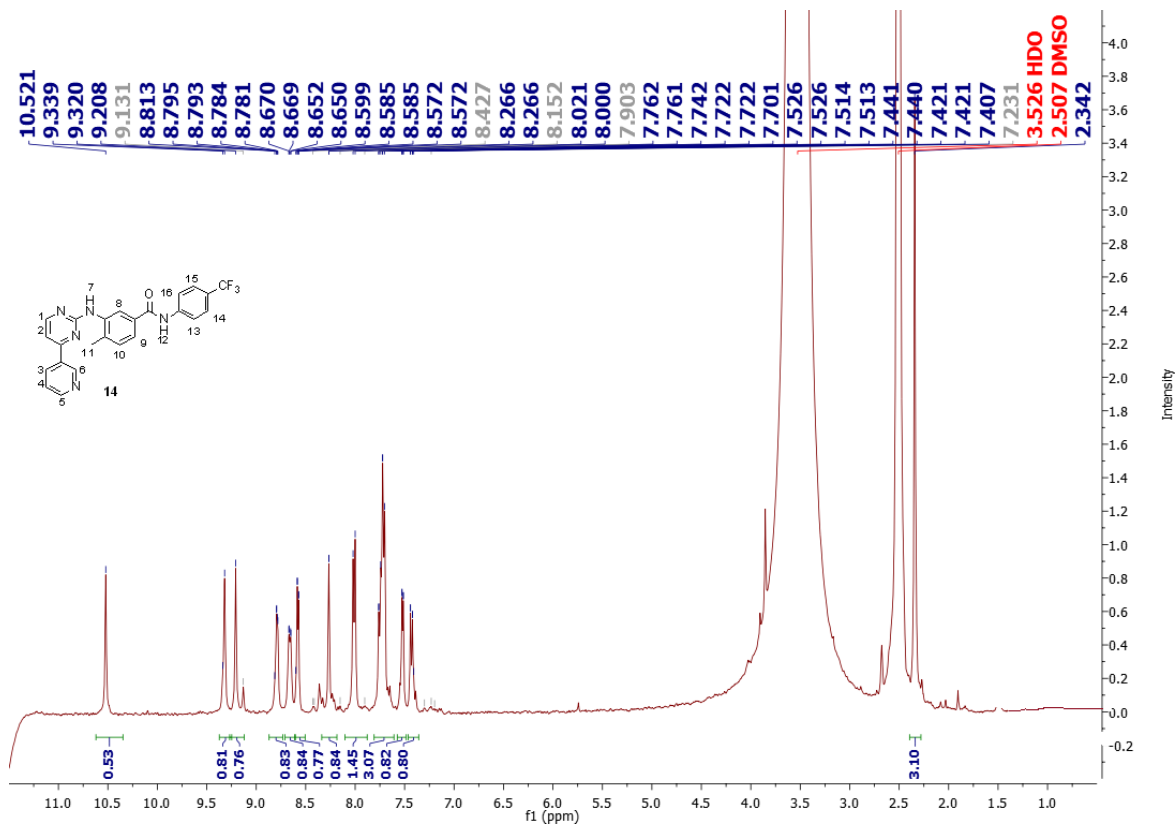
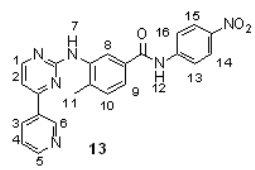
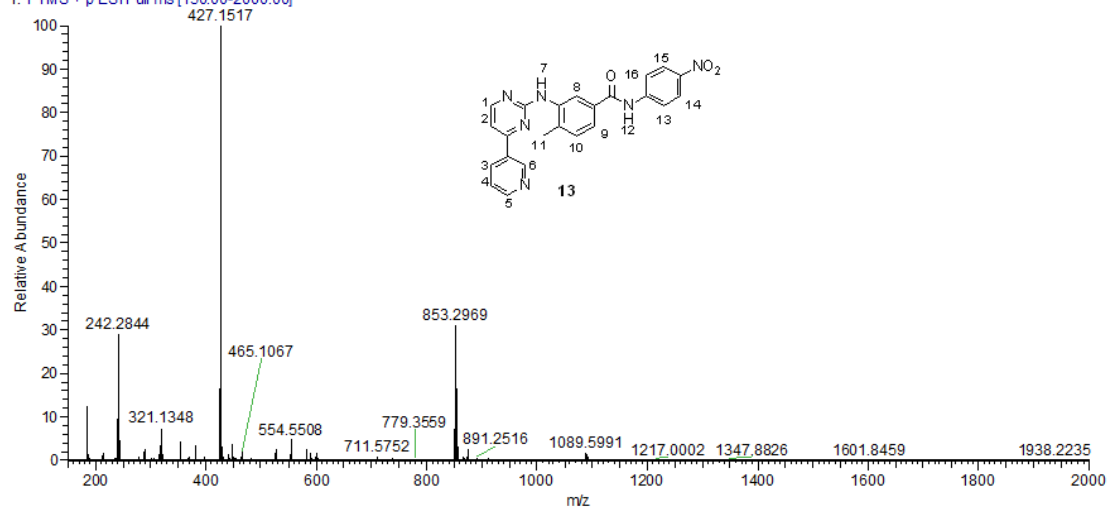


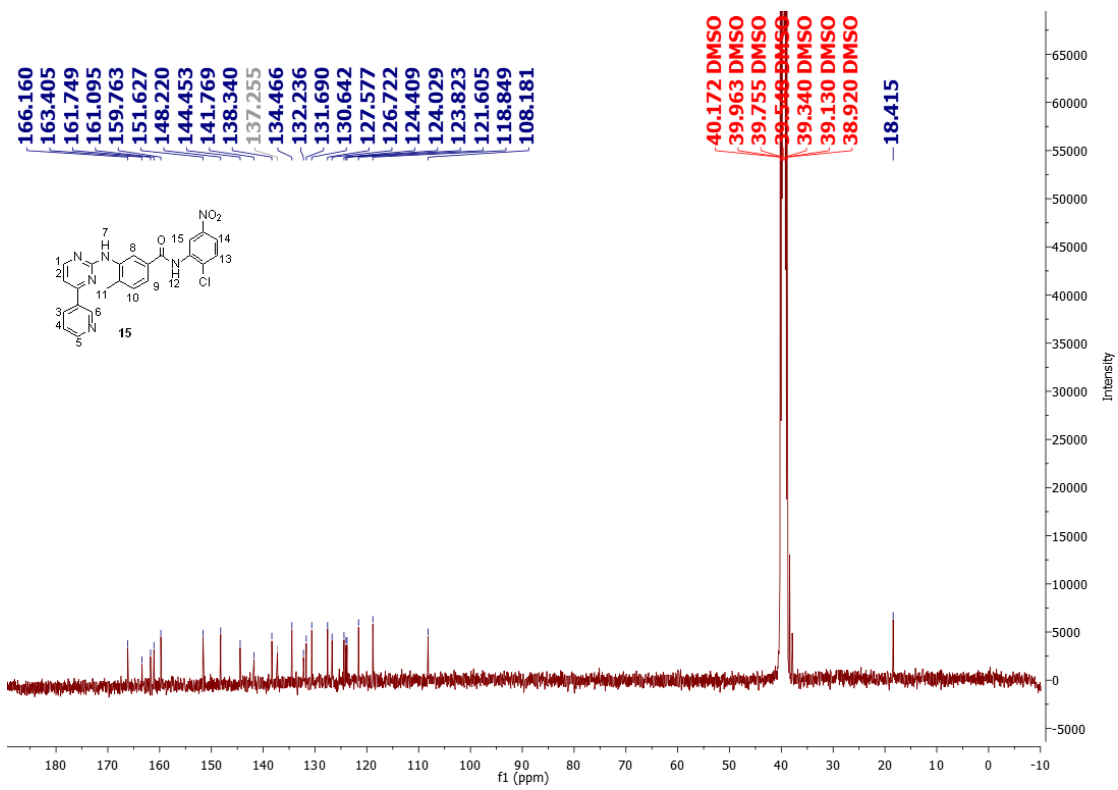
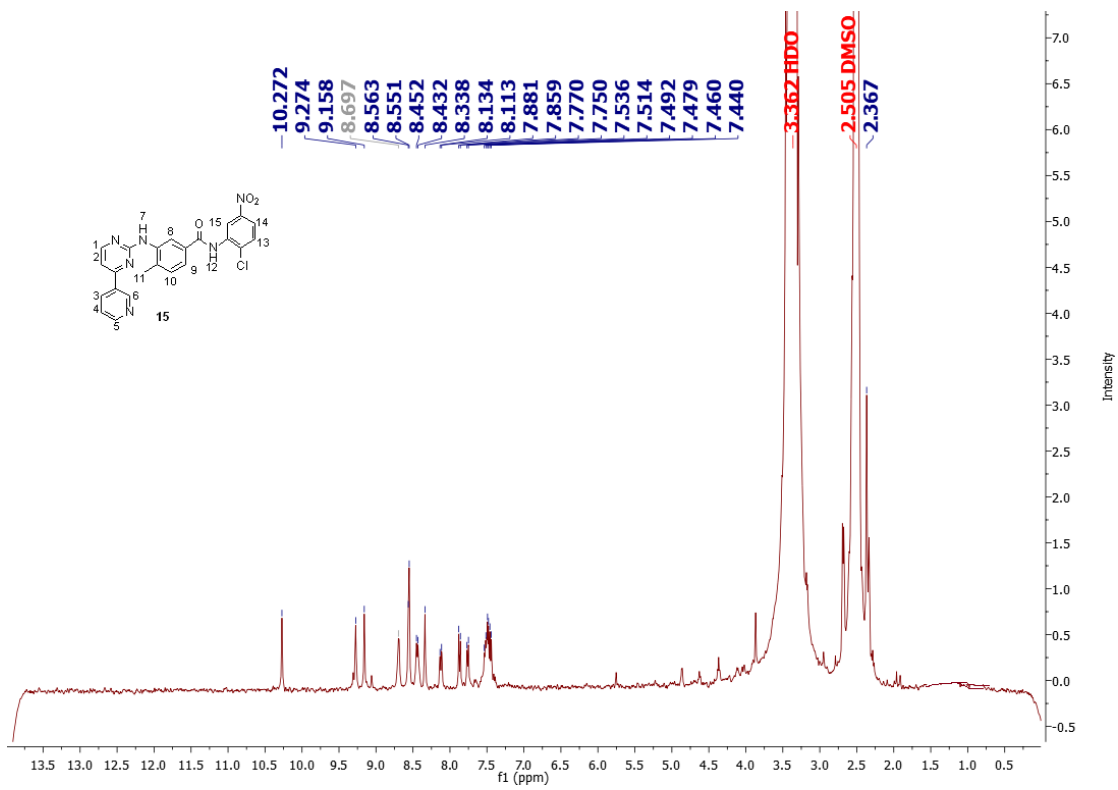
NV3NO2 200227110021#11 RT: 0.08 AV: 1 NL: 7.95E7
 T: FTMS + p ESIFull.ms [150.00-2000.00]

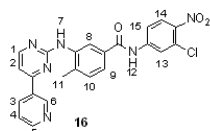
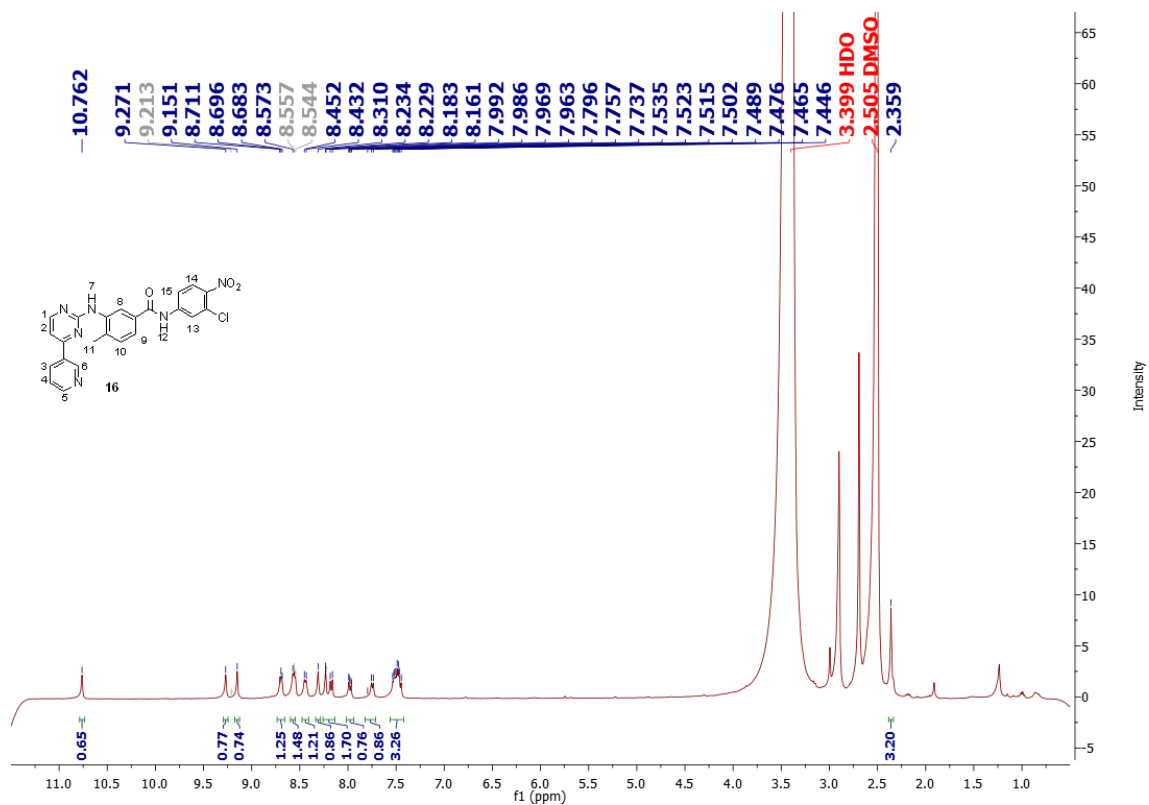
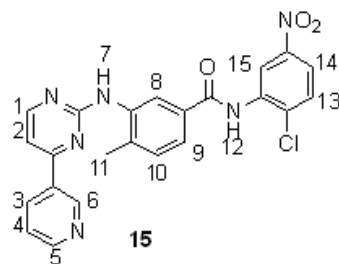
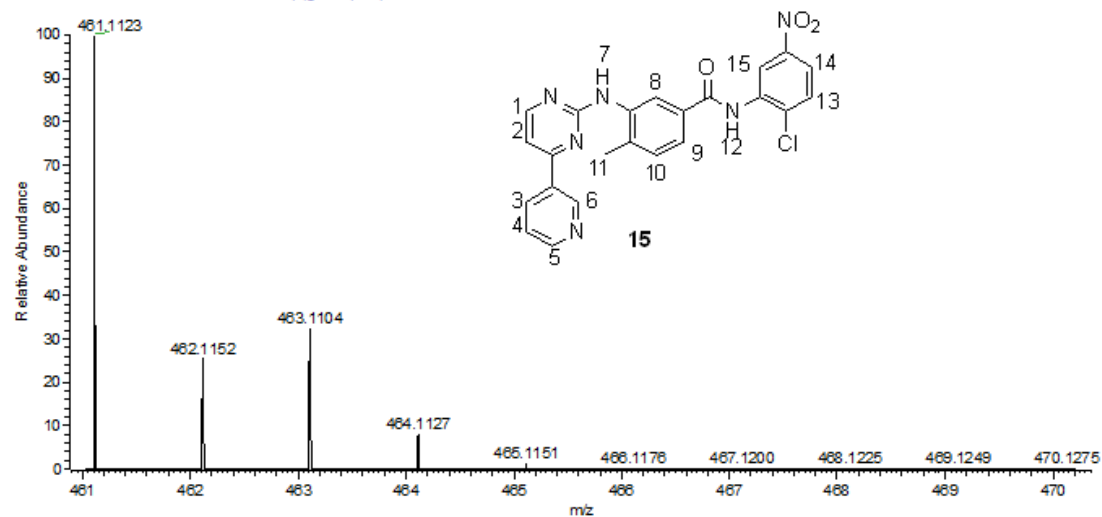


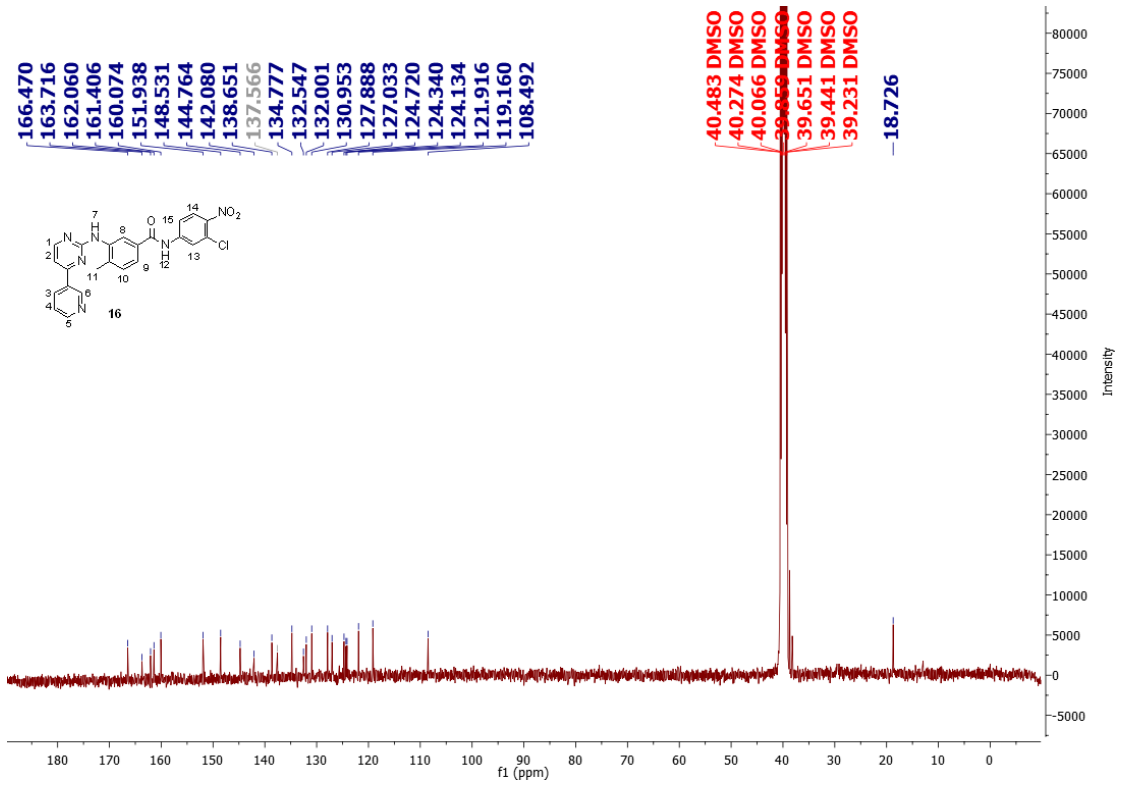


NV4NO2_200227110021#7 RT: 0.05 AV: 1 NL: 7.84E7
 T: FTMS + p ESIFull.ms [150.00-2000.00]

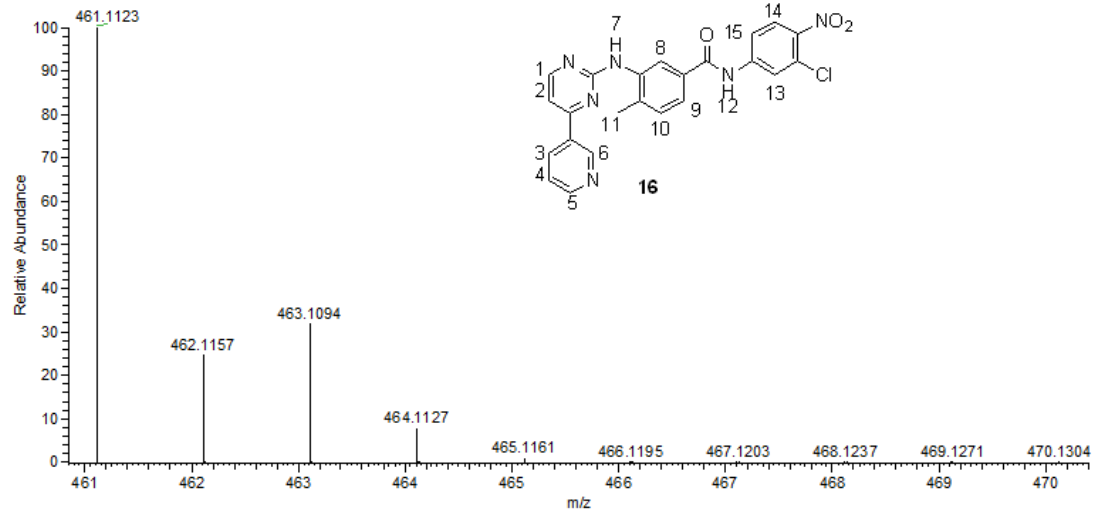


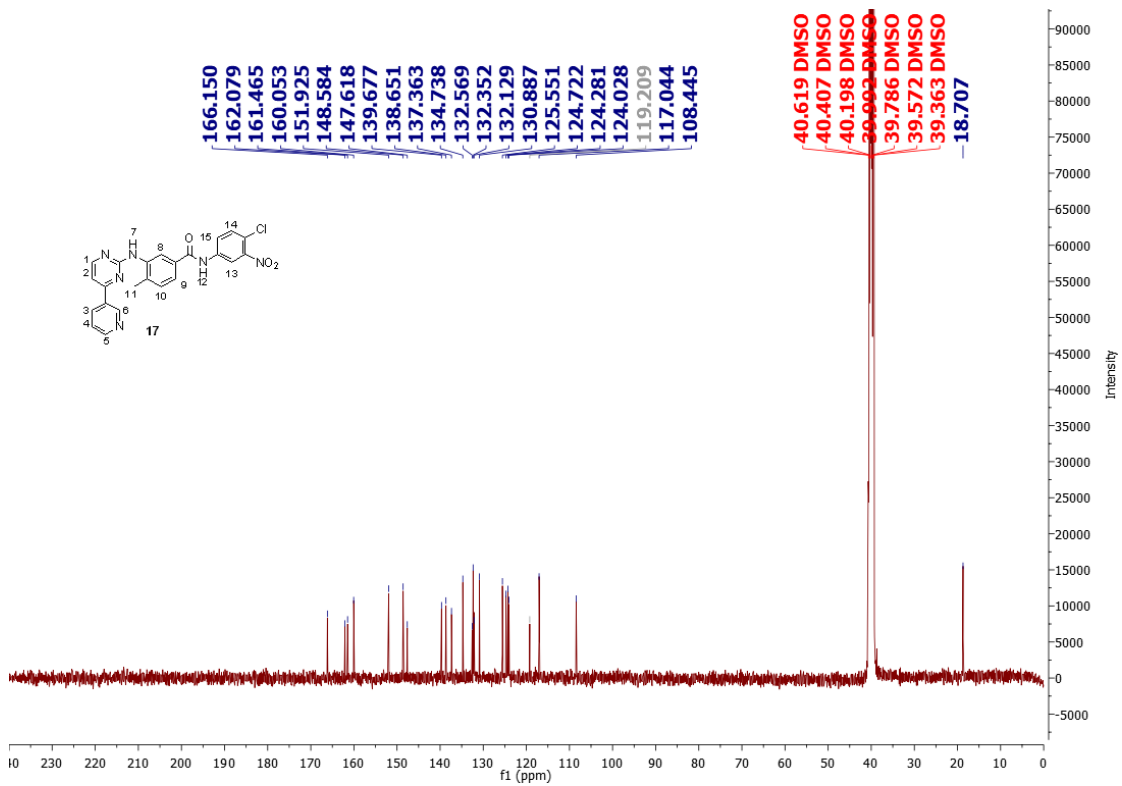
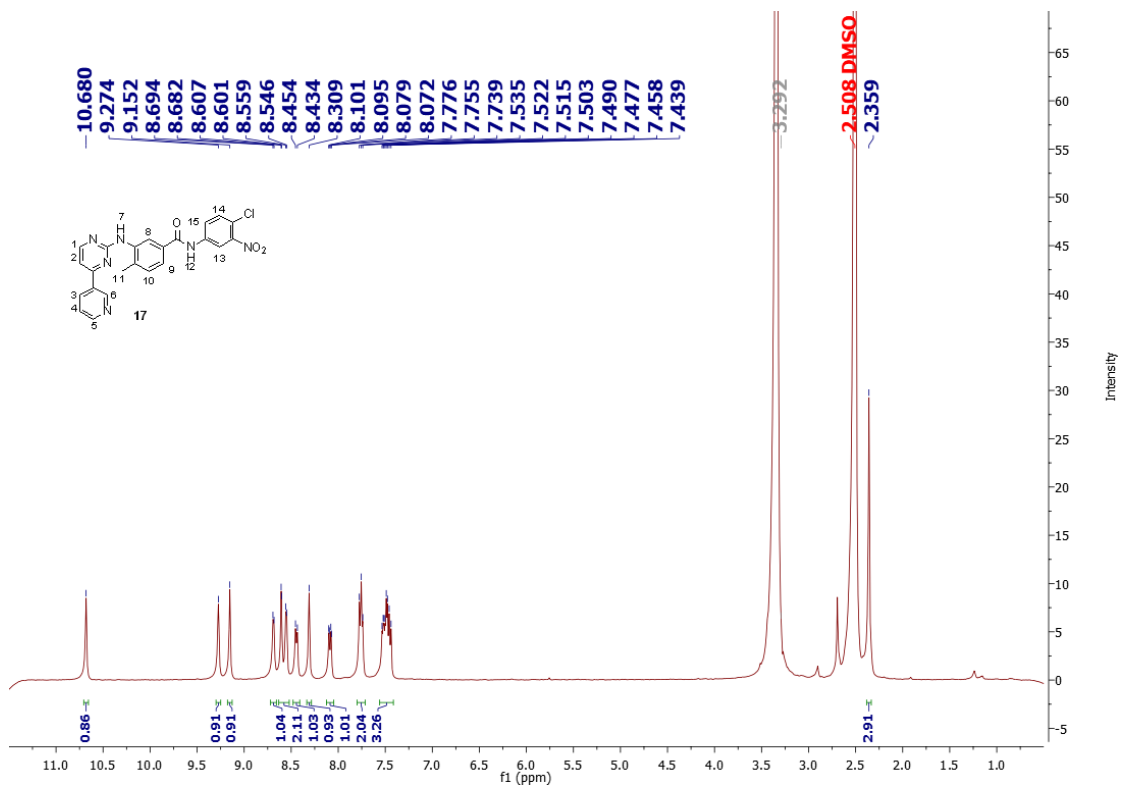




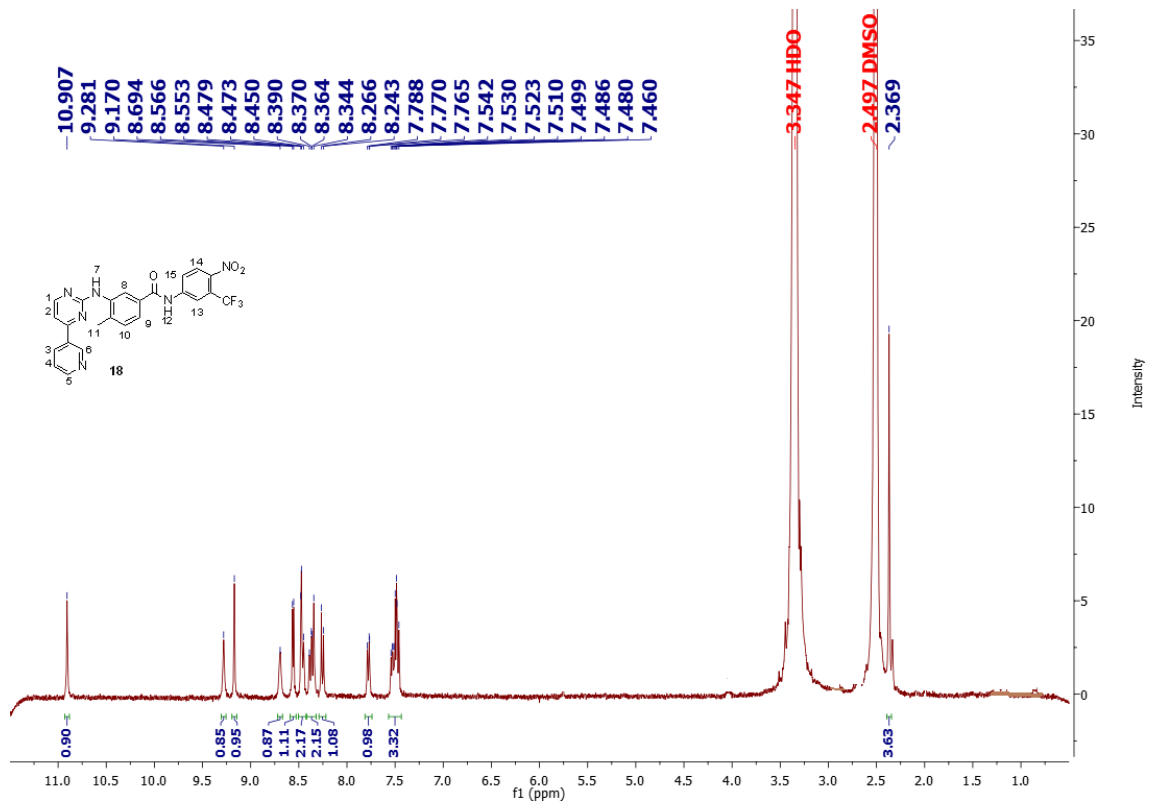
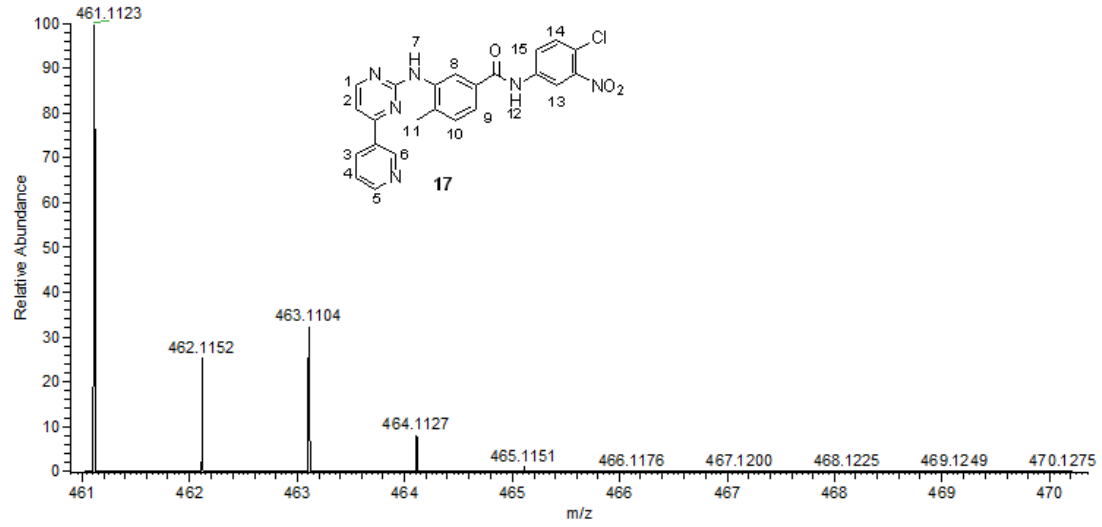


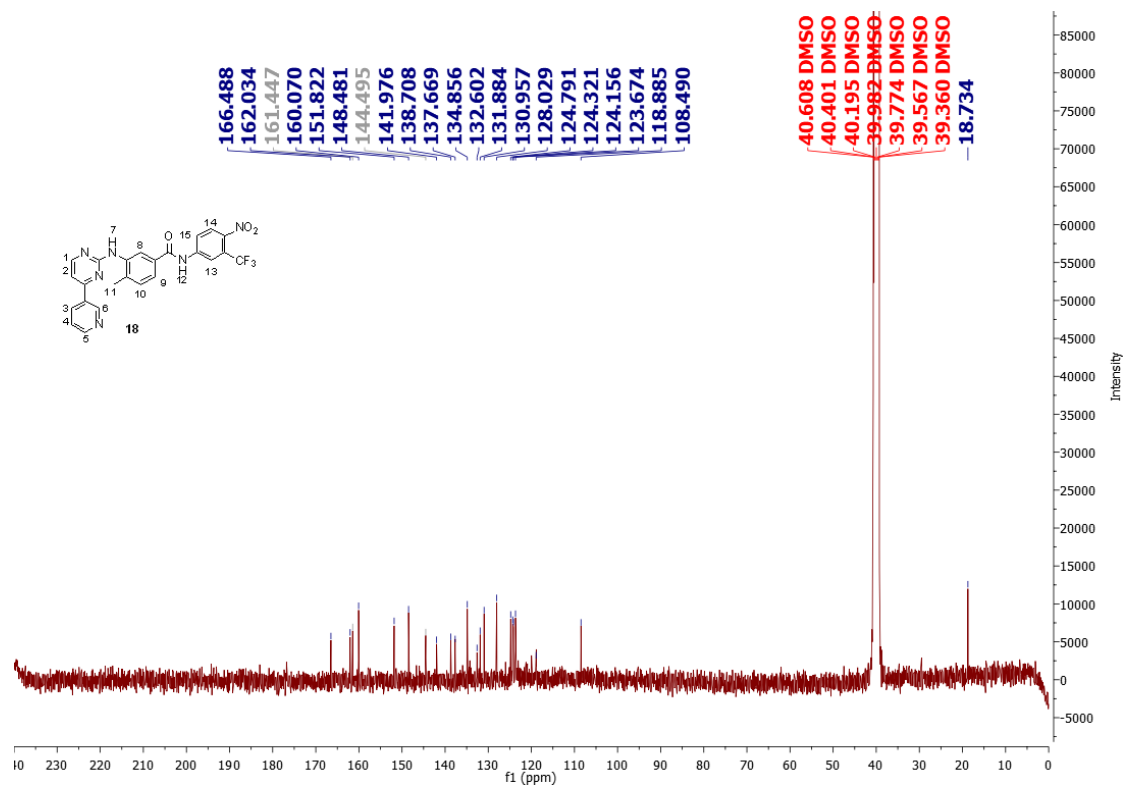
C 23H17ClN6O3 +H: C 23H 18 Cl1 N 6 O3 pa Chrg 1



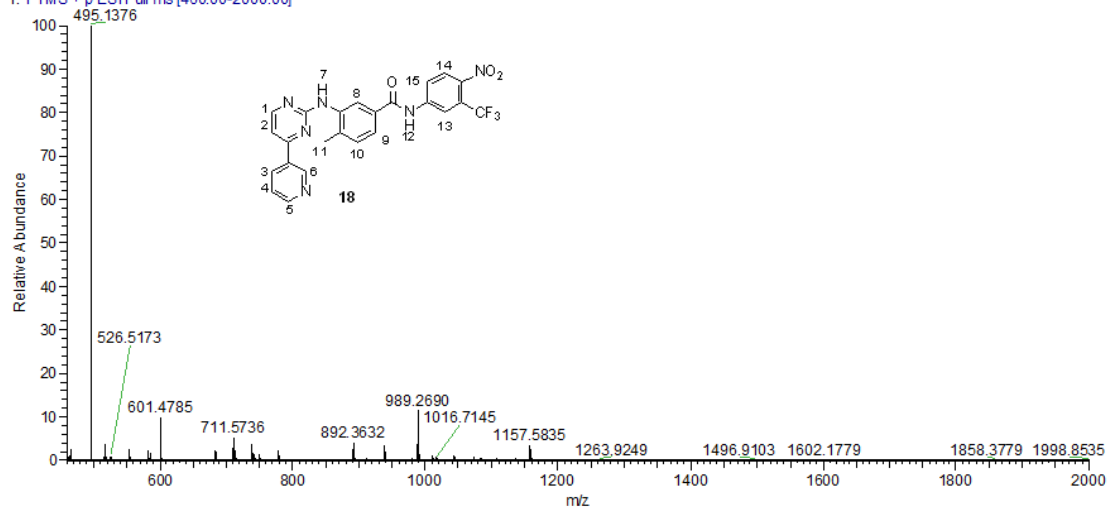


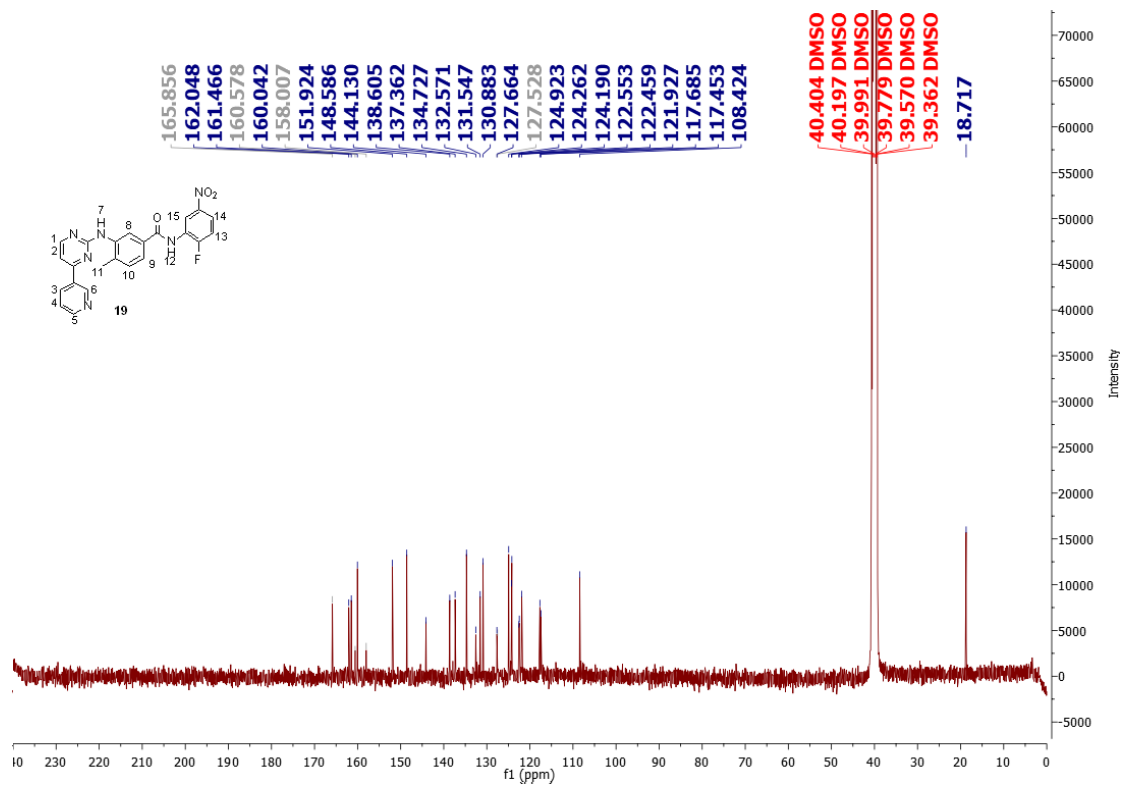
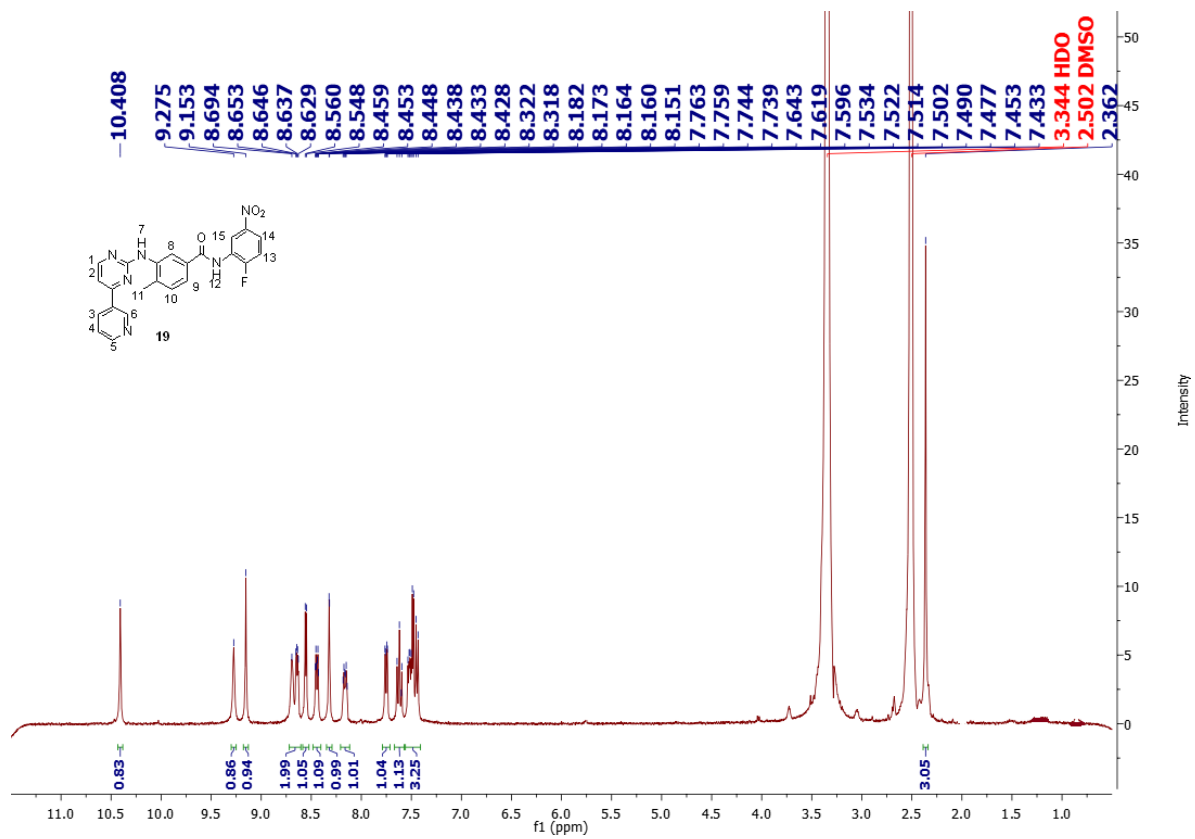
C 23H17N6O3Cl+H: C 23H18 N6 O3 Cl H p(gss, sp:40) Ch...



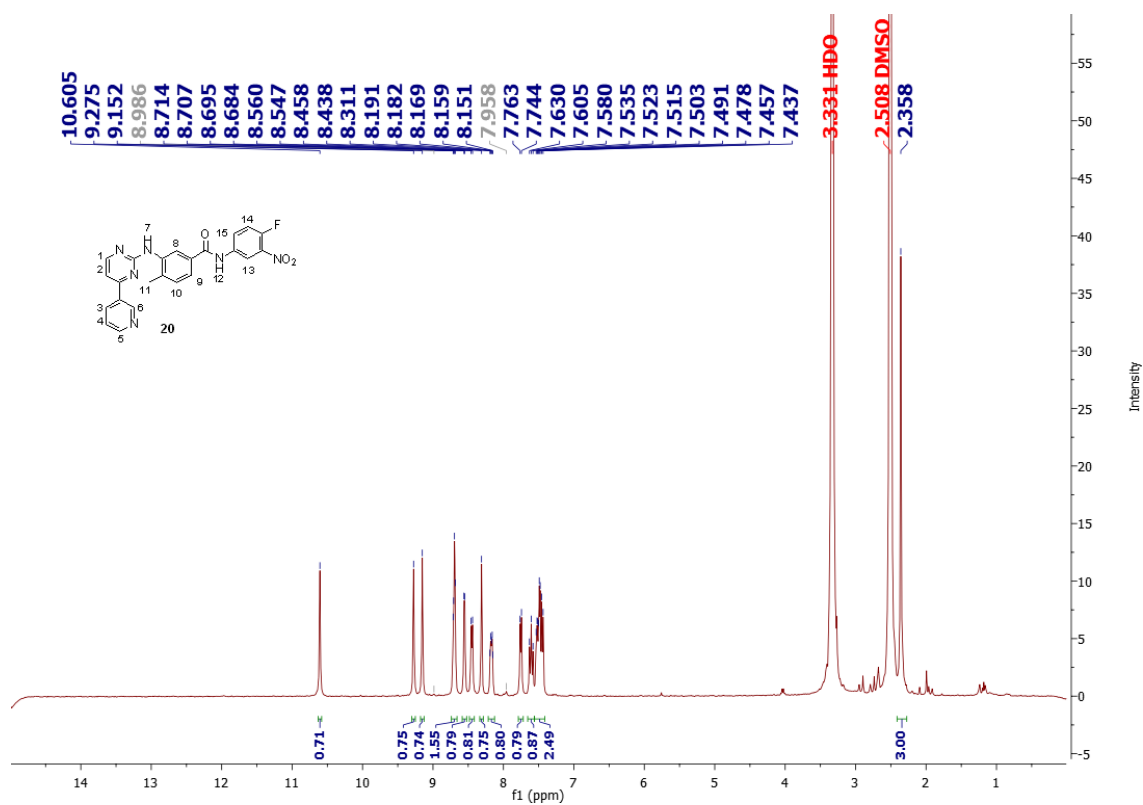
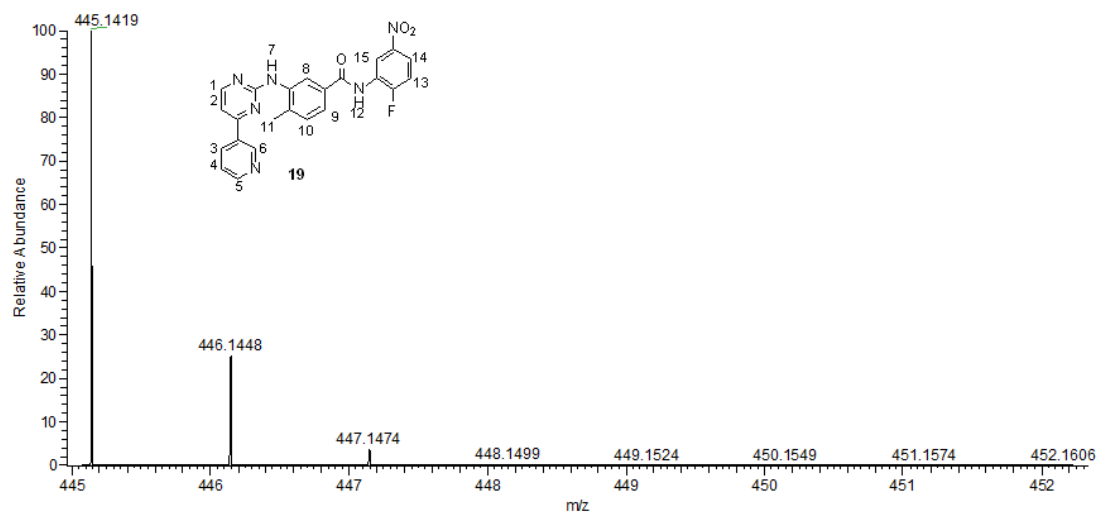


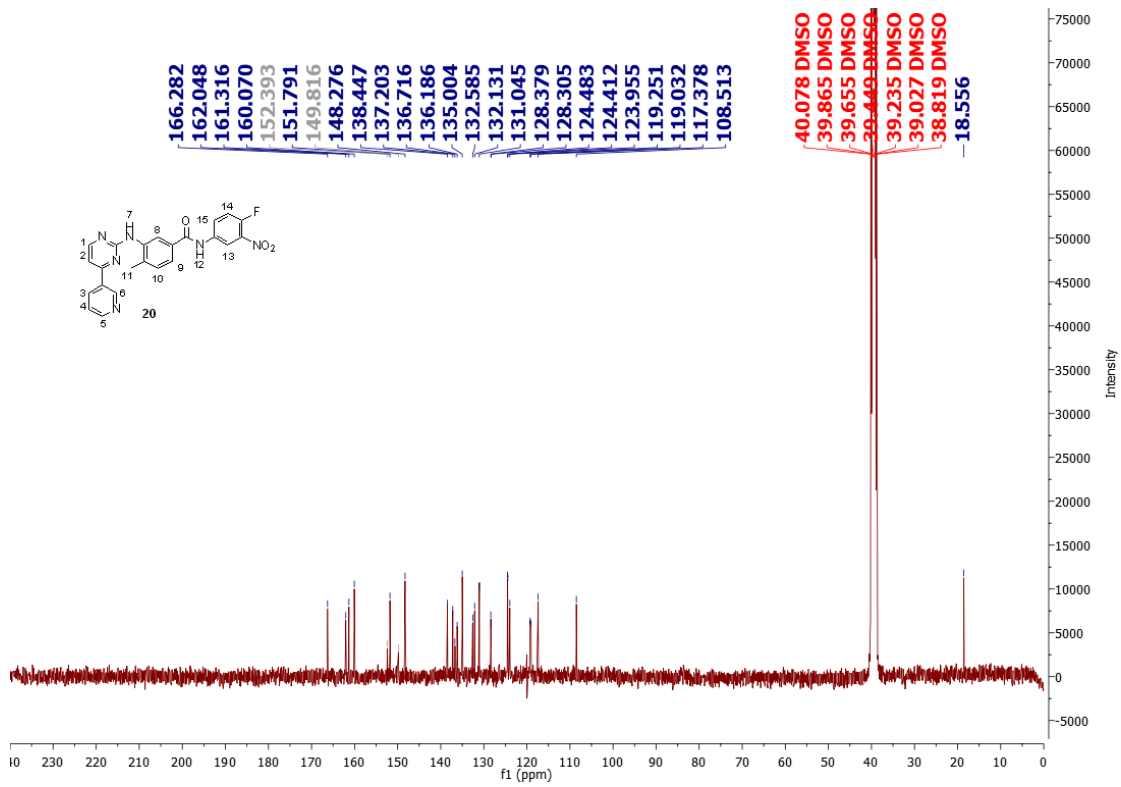
NV4NO2 3CF3 200312121518 #36 RT: 0.39 AV: 1 NL: 6.10E7
 T: FTMS + p ESI Full ms [460.00-2000.00]



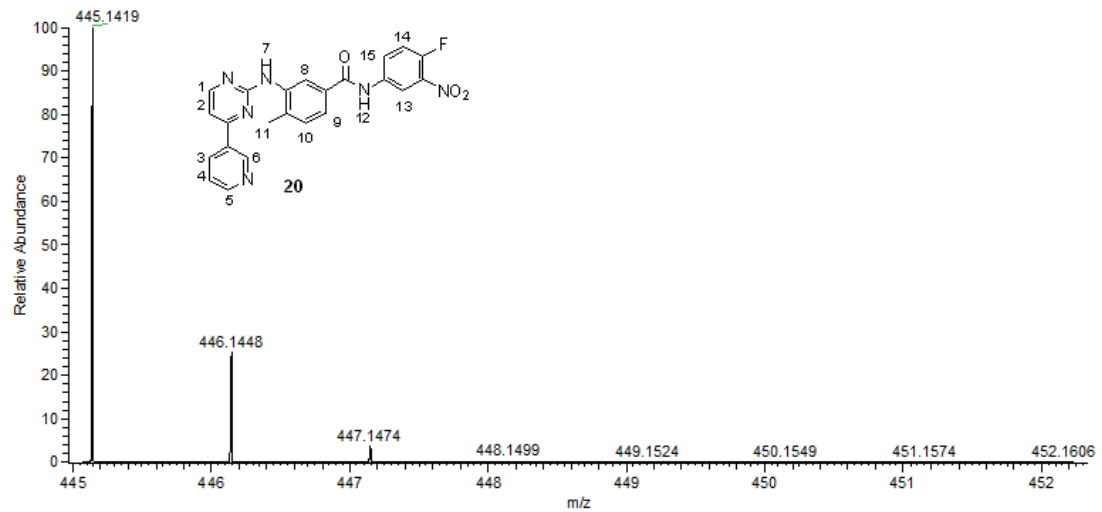


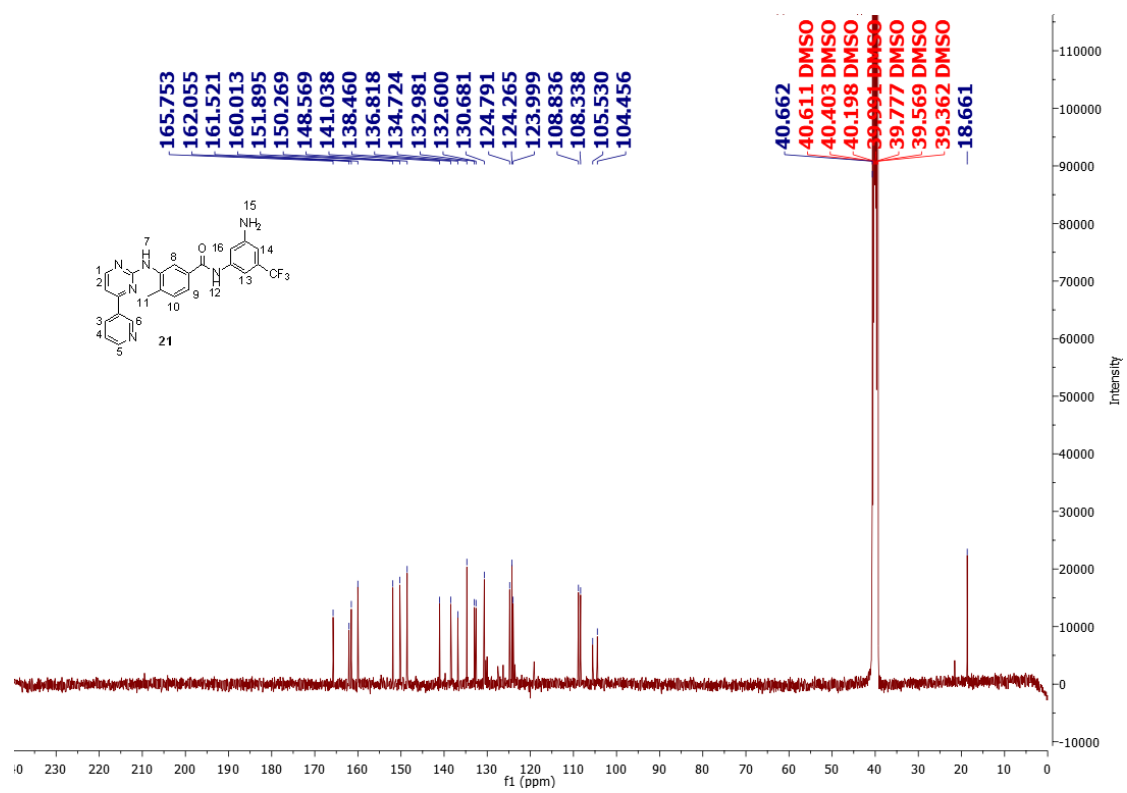
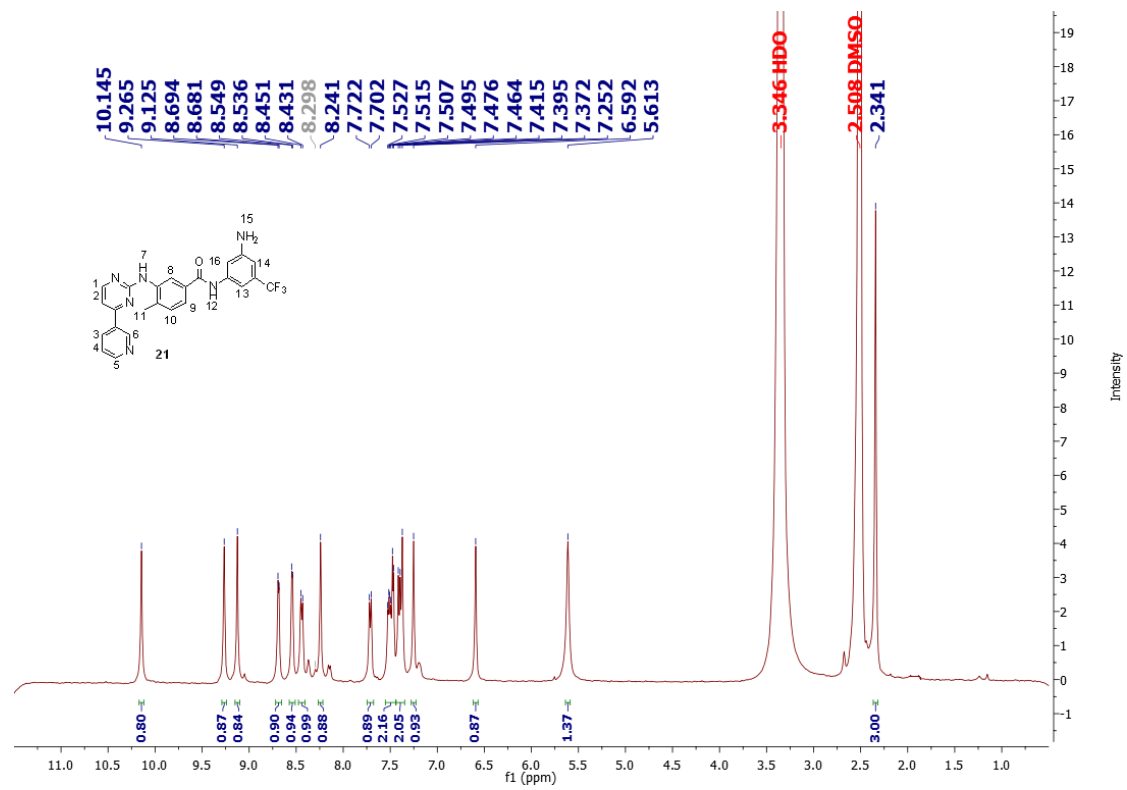
C23H17FN6O3 +H. C23 H18 F1 N6 O3 p(gss, s/p:40) Chrg...



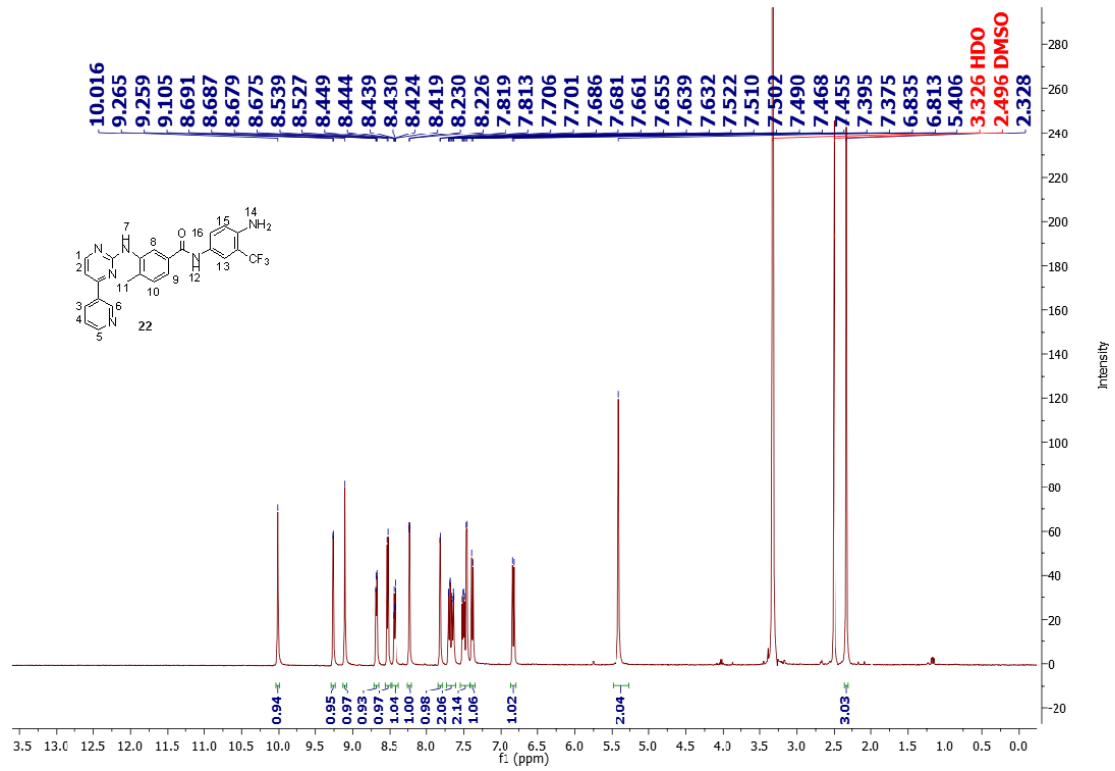
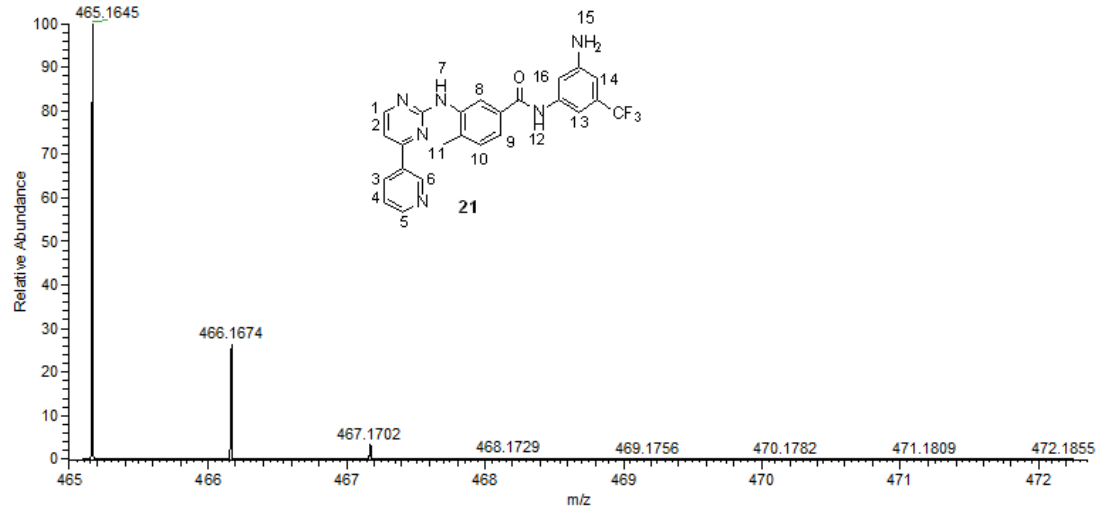


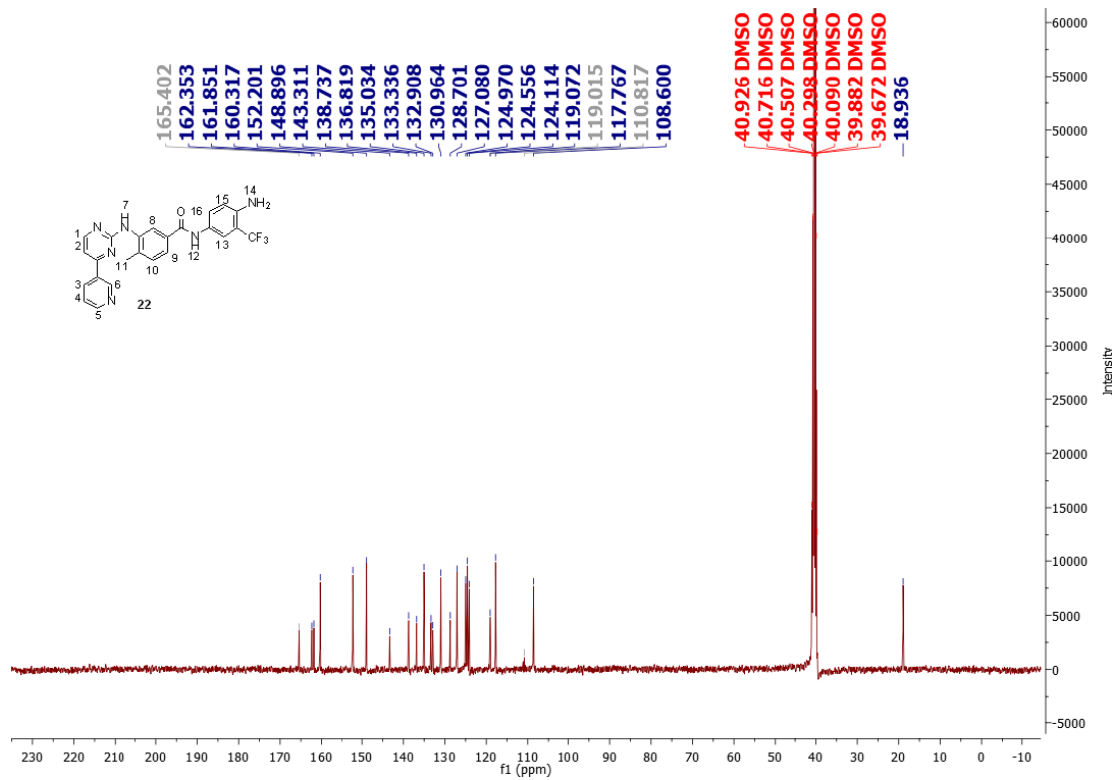
C23H17F1N6O3 +H: C23 H18 F1 N6 O3 p(gss, s/p:40) Chr...



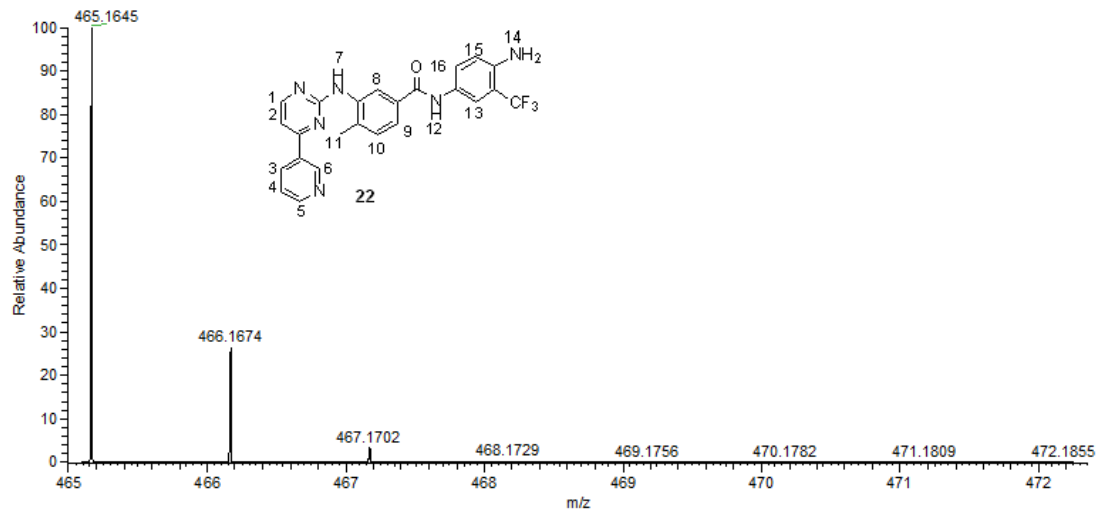


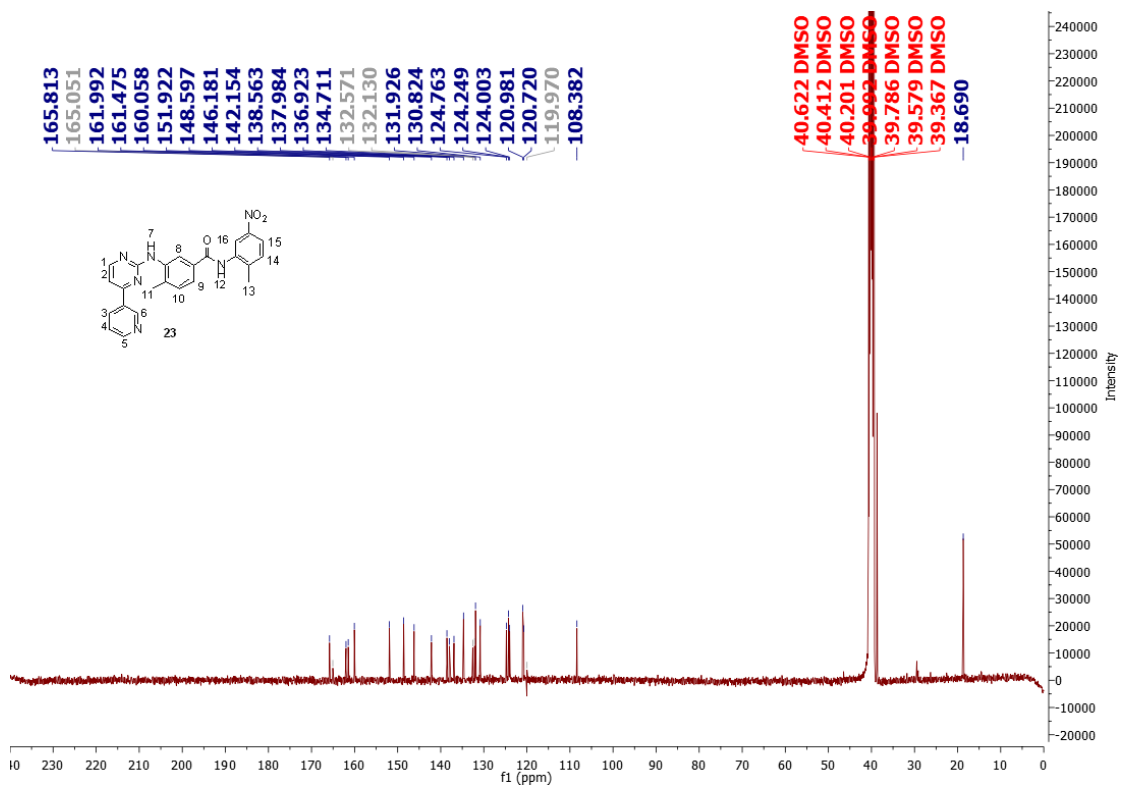
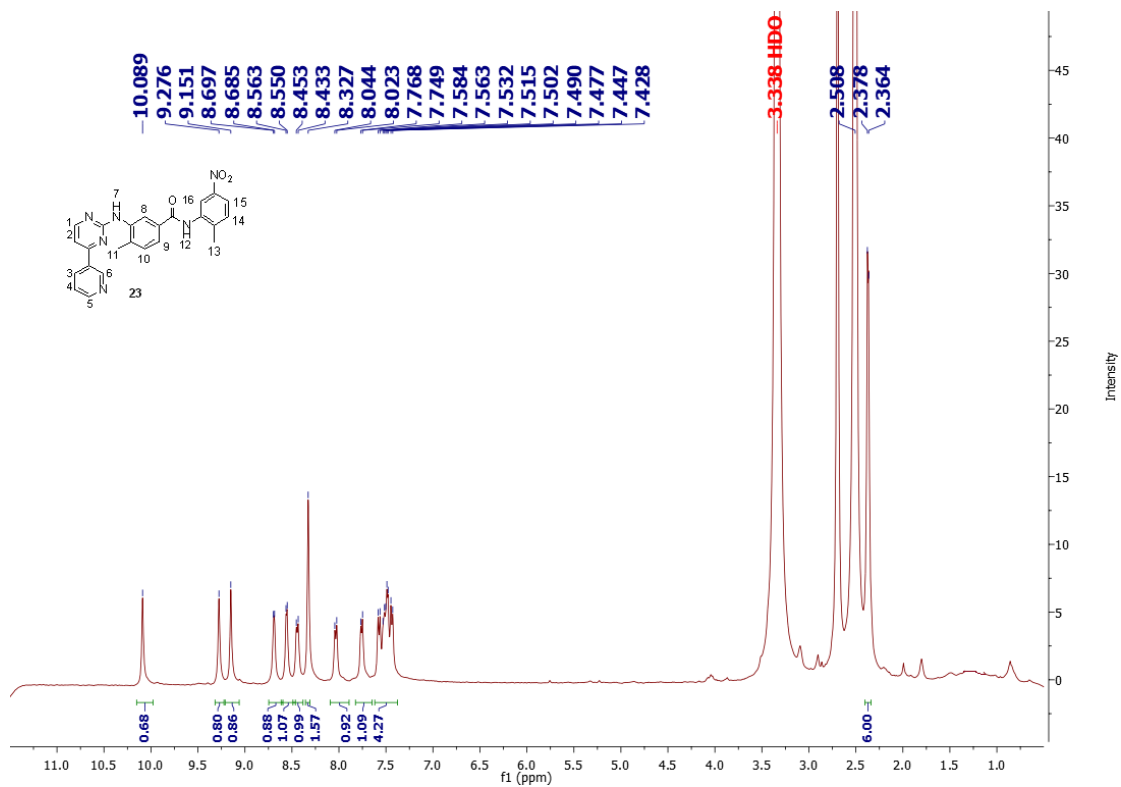
C24H19F3N6O1 p(gss, s/p:40) Chrg...



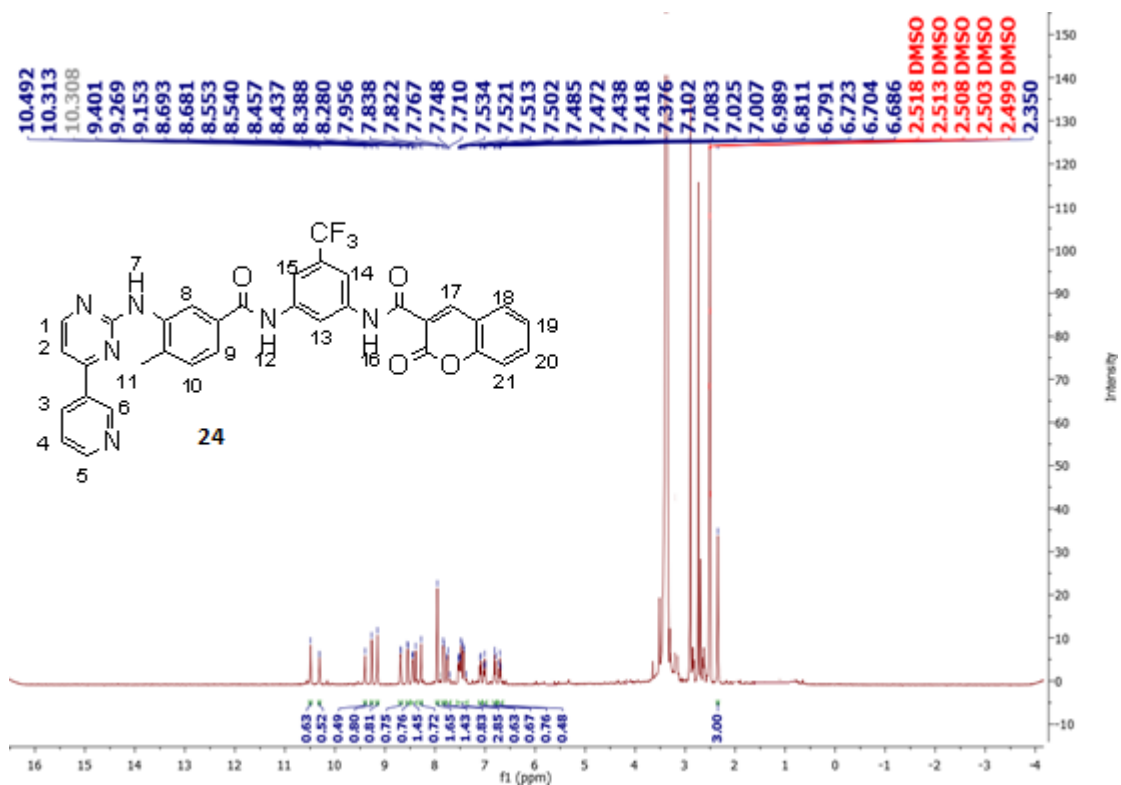
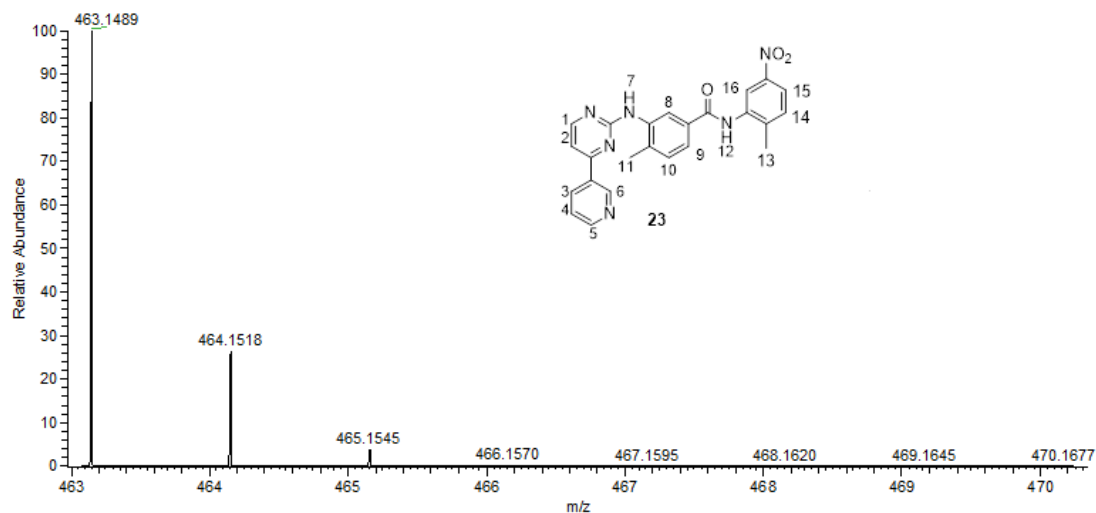


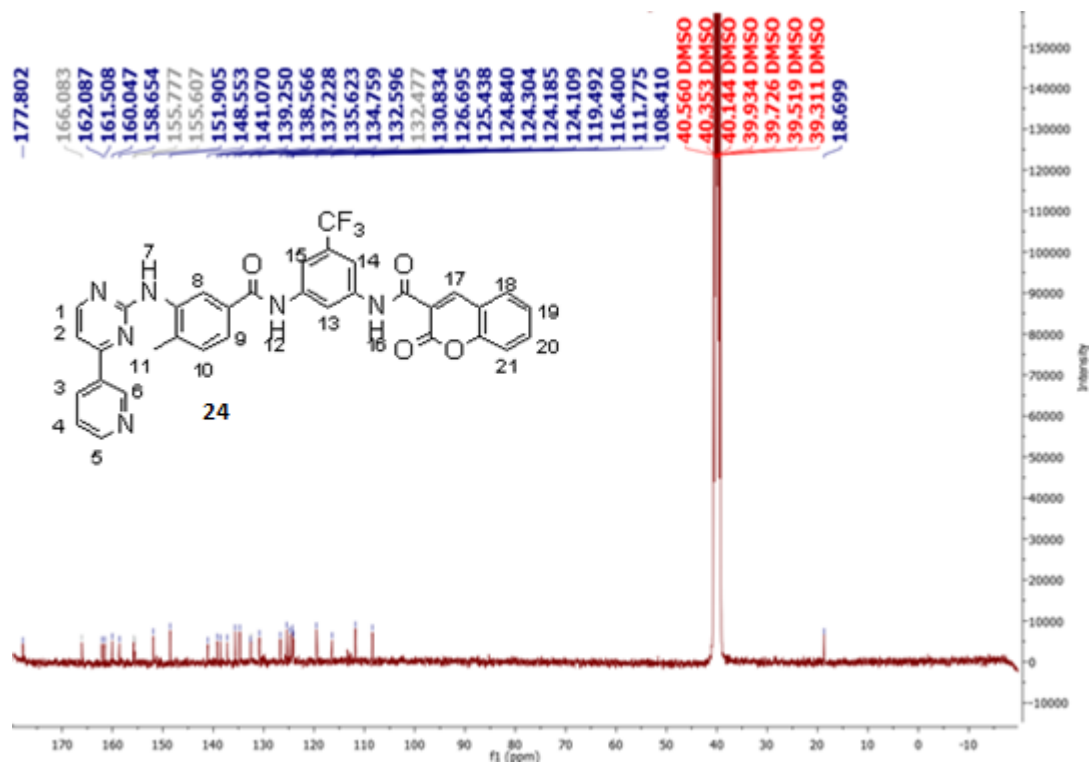
C24H19F3N6O +H: C24 H20 F3 N6 O1 p(gss, s/p40) Chrg...



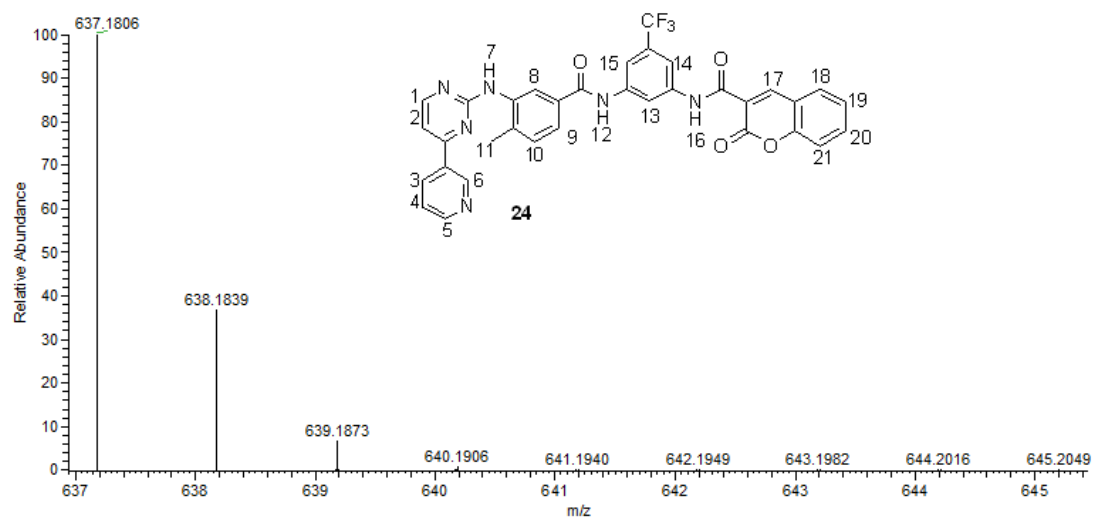


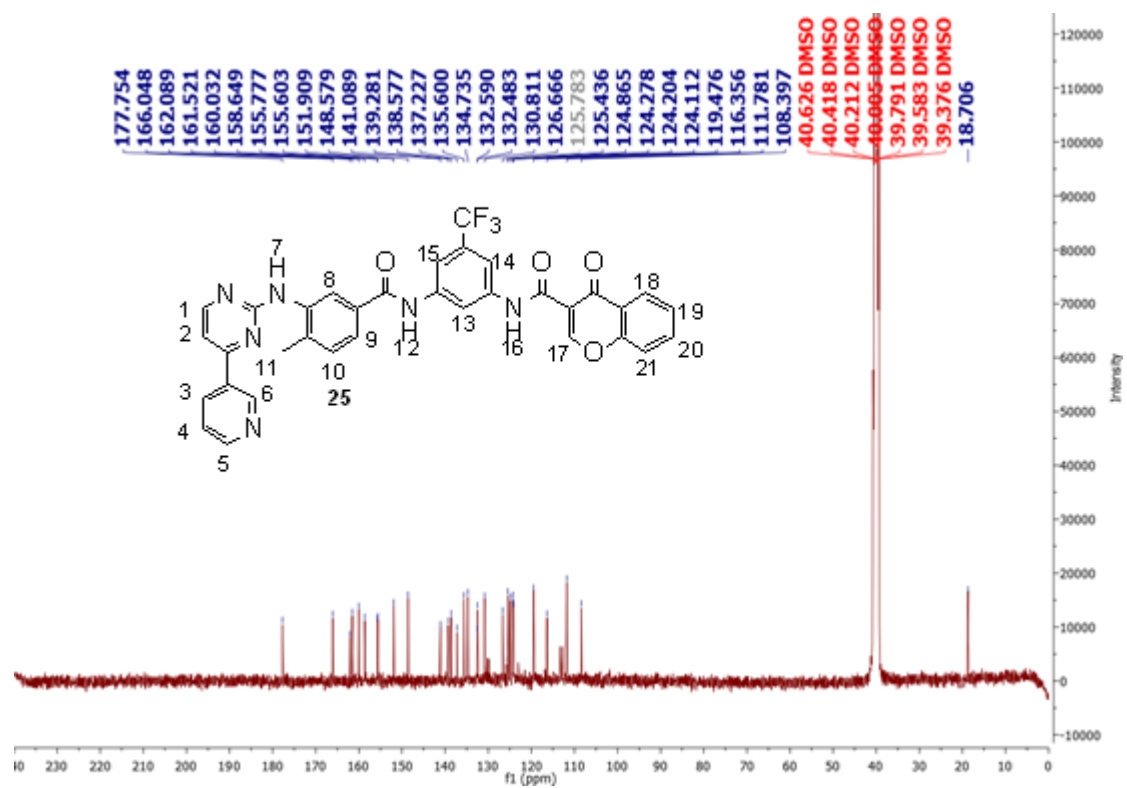
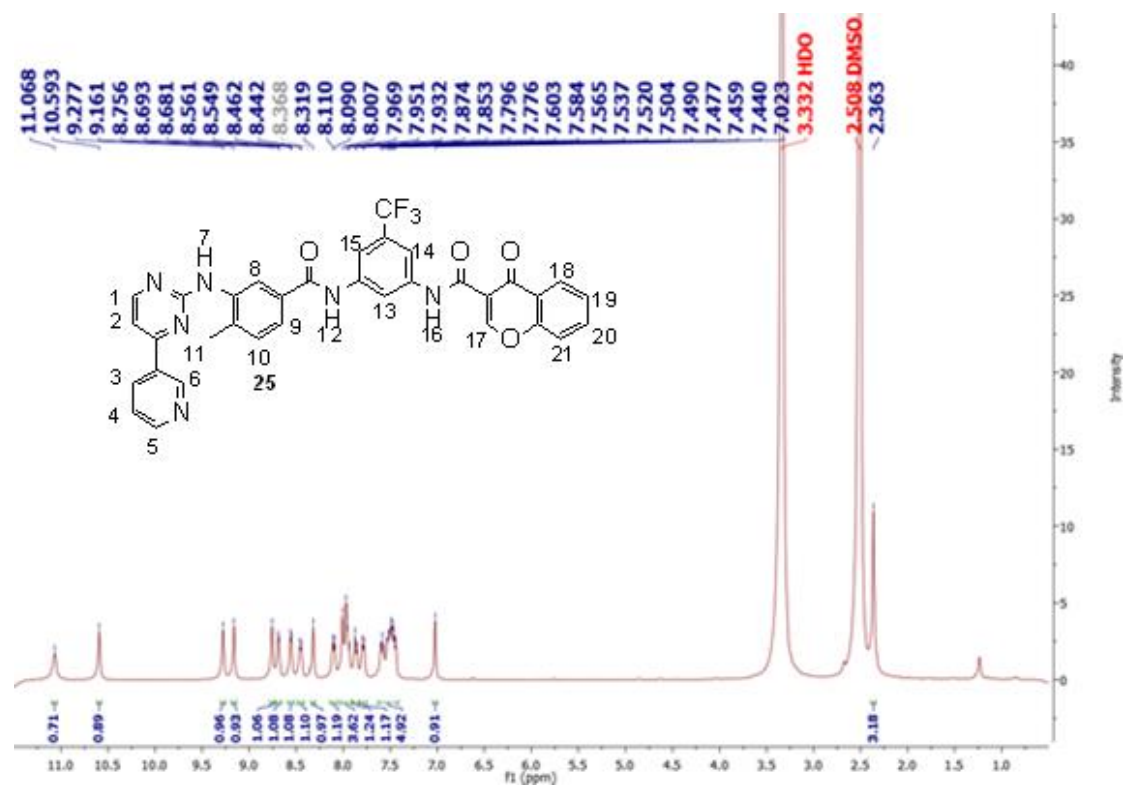
C24H20N6O3 +Na: C24 H20 N6 O3 Na1 p(gss, s/p:40) Chr...





C 34H23F3N6O4 +H: C34 H24 F3 N6 O4 pa C hrg 1





C34H23F3N6O4+H, C34H24 F3 N6 O4 p(gss, s/p:40) Chr...

