



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

Διατμηματικό Πρόγραμμα  
Μεταπτυχιακών Σπουδών  
«Ιατρική Χημεία»



**Μοριακός σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων  
αναλόγων του Ribociclib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών  
αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών**

---

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

*Χριστίνα Καραμέτου*

*Χημικός*

Επιβλέπων καθηγητής

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2020



# **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης**

**Καραμέτου Χριστίνα**

**A.M. 238**

**Επιβλέπων Καθηγητής**

**Σκομπρίδης Κωνσταντίνος**

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής**

**Θεοδώρου Βασιλική, Ομότιμη καθηγήτρια**

**Τζάκος Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής**

**Ιωάννινα**

**15 / 09 / 2020**



## ***Ευχαριστίες***

---

Το παρόν Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης αφορά το μοριακό σχεδιασμό, τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των νέων αναλόγων του Ribociclib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των εν λόγω ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ3-210 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο πλαίσιο του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) «Ιατρική Χημεία», κατά το χρονικό διάστημα από το Νοέμβριο 2018 έως το Μάρτιο 2020, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου.

Η ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης και ιδιαίτερα στην Οργανική Σύνθεση απαιτεί μεγάλη αφοσίωση, κόπο και χωρίς την απαραίτητη βοήθεια και στήριξη ορισμένων ανθρώπων θα ήταν φυσικά αδύνατη.

Πρώτα από όλους θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική του καθοδήγηση, τις υποδείξεις του, την επιμονή του, το αμείωτο ενδιαφέρον του, τη συμπαράστασή του, τη συνεχή του υποστήριξη, τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και την άριστη συνεργασία από την αρχή μέχρι το τέλος. Η συνεργασία μου με ένα Καθηγητή που συνέβαλε τα μέγιστα για την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια κα. Βασιλική Θεοδώρου για τη βοήθεια που προσέφερε σε επιστημονικό επίπεδο, αλλά και για το ενδιαφέρον και τη στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια πάντα με το χαμόγελο, την καλοσύνη και την αισιοδοξία της, μου έδινε δύναμη να συνεχίζω να προσπαθώ.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο που δέχτηκε ευχαρίστως να είναι στην τριμελή επιτροπή μου και να αξιολογήσει την ερευνητική μου προσπάθεια.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους του ερευνητικού εργαστηρίου του κ. Σκομπρίδη: Μπρέντα Αλέξη, Κουσαξίδη Αντώνη, Νίκου Αλεξία, Γούτσιου Γεωργία,

Αλαγιάννη Μιχάλη, Βούλγαρη Πηνελόπη, Τσίπα Μαρία, Μπακαγιάννη Ανδρομάχη, Γιαννέλο Μάριο, Βελισσάρη Παναγιώτα για την συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια τους, επίσης τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες και φίλες μου του Καθηγητή κ. Βαρβούνη Τσεμπερλίδου Ειρήνη και Θεοδωρακοπούλου Παρασκευή καθώς και τον Γκάλπινο Βασίλειο.

Δεν μπορώ φυσικά από τις ευχαριστίες να παραλείψω τις φίλες μου Αργυρώ, Ζωή, Λιάνα, Σάσα, Ράνια και Ιφιγένεια που ήταν πάντα εκεί όλα αυτά τα χρόνια πρόθυμες να ακούσουν τους προβληματισμούς μου, να με στηρίξουν, να με συμβουλευσουν και φυσικά να μου δώσουν κουράγιο να συνεχίσω να προσπαθώ παρά τις δυσκολίες.

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

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ θέλω να δώσω στην οικογένεια μου και στην αδελφή μου Βάσω για την συνεχή στήριξή τους σε κάθε μου προσπάθεια, για τις συμβουλές τους, την αγάπη τους και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια της ζωής μου αλλά και των σπουδών μου.

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

## **Περίληψη**

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες, διαδραματίζοντας ως εκ τούτου σπουδαίο ρόλο σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διεργασίες. Ειδικότερα, δρουν σε πρωτεΐνες, φωσφορυλιώνοντας τους σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης. Η φωσφορυλίωση μπορεί να τροποποιήσει τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης με πολλούς τρόπους, αυξάνοντας ή μειώνοντας τη δραστηριότητά της, να τη σταθεροποιήσει ή να την οδηγήσει για πρωτεόλυση, να την μεταφέρει σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα ή να ξεκινήσει την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες. Οι κινάσες, μαζί με τις φωσφατάσες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενζυμική ρύθμιση, όπως και στη σηματοδότηση του κυττάρου.

Στην έρευνα για την ανάπτυξη μορίων μικρού μοριακού βάρους εναντίον του καρκίνου και άλλων ασθενειών, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν ελκυστικούς στόχους και η αναστολή τους έχει αναγνωριστεί ως μία καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση, καθώς ορισμένες εξ αυτών συμβάλλουν, μεταξύ άλλων, στην εμφάνιση ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Ένα τέτοιο μόριο μικρού μοριακού βάρους είναι και το Ribociclib.

Το Ribociclib είναι ένας εκλεκτικός, από του στόματος βιοδιαθέσιμος αναστολέας των CDK4 και CDK6, ο οποίος έλαβε έγκριση από τον FDA τον Μάρτιο του 2017 και έχει προστεθεί στο δυναμικό θεραπείας μαζί με άλλους αναστολείς έναντι της CDK4/6. Η αναστολή του κόμβου CDK4/6, αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική, τόσο για την θεραπεία του HR θετικού και HR-2 αρνητικού προχωρημένου ή μεταστατικού καρκίνου του μαστού, σε ασθενείς στους οποίους ο καρκίνος προχώρησε, ενώ έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης ορμονών.

Στο εργαστήριο, κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, έγιναν προσπάθειες σύνθεσης νέων ενώσεων, αναλόγων/παραγώγων του Ribociclib, οι οποίες υπήρξαν αποτέλεσμα μοριακής μοντελοποίησης και είναι πιθανόν να δρουν αποτελεσματικότερα στις πρωτεϊνικές κινάσες στόχους, με την εκλεκτική αναστολή τους. Επομένως, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η βελτιστοποίηση της ανασταλτικής δράσης του Ribociclib ως προς την CDK4/6 καθώς και άλλες CDK πρωτεΐνες μέσω δομικών εκλεκτικών τροποποιήσεων. Παράλληλα, με τη σύνθεση των νέων ενώσεων έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης της ήδη υπάρχουσας συνθετικής πορείας του φαρμάκου που προτείνεται



από την Novartis. Όλες οι νέες ενώσεις που συντέθηκαν στο εργαστήριο χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φασματοσκοπικές τεχνικές  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS.

## **Abstract**

Protein kinases are enzymes that catalyze the transfer of the final ATP phosphate group to specific proteins, thus playing an important role in almost all cellular processes. In particular, they act on proteins, phosphorylating them on serine, threonine or tyrosine residues. Phosphorylation can modify the function of a protein in many ways, increasing or decreasing its activity, stabilizing or leading it to proteolysis, transferring it to a particular cell compartment, or initiating its interaction with other proteins. Kinases, along with phosphatases, play an important role in enzymatic regulation as well as in cell signaling.

In research into the development of low molecular weight molecules against cancer and other diseases, protein kinases are attractive targets and their inhibition has been recognized as an innovative therapeutic approach, as some of them contribute, among others, to the emergence of diseases, including cancer. One such molecule of low molecular weight is Ribociclib.

Ribociclib is a selective, oral bioavailable CDK4 and CDK6 inhibitor, approved by the FDA in March 2017 and has been added to the therapeutic potential along with other inhibitors against CDK 4/6. Inhibition of CDK4/6 node is an effective strategy for the treatment of both HR-positive and HR-2 negative advanced or metastatic breast cancer in patients with cancer who received endocrine therapy.

In the laboratory, during the preparation of the master's degree, efforts were made to synthesize new compounds, analogs / derivatives of Ribociclib, which have been the result of molecular modeling and are likely to act more efficiently on protein kinase targets for their selective inhibition. Therefore, the aim of the present work is to optimize the inhibitory effect of Ribociclib on CDK 6/4 as well as other CDK proteins through structural selective modifications. In parallel with the synthesis of the new compounds, efforts were made to optimize the already existing synthetic course of the drug proposed by Novartis. All new compounds synthesized in the laboratory were fully characterized by  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , MS spectroscopic techniques.



<b>Περιεχόμενα</b>	
<b>Περίληψη</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>x</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup></b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Εισαγωγή</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 Σκοπός</b> .....	<b>9</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup></b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Δομή πρωτεϊνικών κινασών</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης</b> .....	<b>20</b>
<b>2.5 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης</b> .....	<b>20</b>
<b>2.6 Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες(RTKs)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.7 Μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες(NRTKs)</b> .....	<b>22</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup></b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 Κυτταρικός κύκλος</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3 Κυκλιοεξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (CDKs)</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Κυκλίνες και η σύνδεση τους με CDKs</b> .....	<b>30</b>
<b>3.5 Ο ρόλος των CDKs στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6 Μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης των CDKs στον κυτταρικό κύκλο</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7 Αναστολή της δραστηριότητας των CDKs</b> .....	<b>36</b>
<b>3.8 Οι πρωτεΐνες Rb και η λειτουργία τους στον κυτταρικό κύκλο</b> .....	<b>37</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup></b> .....	<b>40</b>
<b>4.1 Καρκίνος</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2 Καρκίνος του μαστού και στατιστικά στοιχεία</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου του μαστού</b> .....	<b>43</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup></b> .....	<b>45</b>
<b>5.1 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών</b> .....	<b>45</b>
<b>5.2 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών</b> .....	<b>47</b>
<b>5.3 CDK αναστολείς</b> .....	<b>56</b>
5.3.1 Πρώτη γενιά CDK αναστολέων .....	56
5.3.2 Αναστολείς CDK δεύτερης γενιάς .....	59
5.3.3 Αναστολείς CDK τρίτης γενιάς .....	60
<b>5.4 Το Palbociclib και οι αλληλεπιδράσεις του με την CDK6</b> .....	<b>61</b>
<b>5.5 Το Abemaciclib και οι αλληλεπιδράσεις του με την CDK6</b> .....	<b>62</b>
<b>5.6 Σύγκριση των Abemaciclib, Palbociclib και Ribociclib</b> .....	<b>63</b>
<b>5.7 Τα χαρακτηριστικά και οι κλινικές μελέτες του Ribociclib</b> .....	<b>66</b>
<b>5.8 Συνδυαστική πορεία του Ribociclib</b> .....	<b>69</b>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 <sup>ο</sup> .....	74
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	74
6.1 Ορθολογικός σχεδιασμός νέων αναστολέων μέσω μοριακής μοντελοποίησης .....	74
6.2 Κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα του Ribociclib με την CDK6 .....	75
6.3 Ανάλογα του Ribociclib-Νέοι εν δυνάμει εκλεκτικοί αναστολείς .....	81
6.4 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της Rib-01 με την CDK6 .....	83
6.5 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-02 με την CDK6 .....	84
6.6 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-03 με την CDK6 .....	85
6.7 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-04 με την CDK6 .....	86
6.8 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-05 με την CDK6 .....	87
6.9 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-06 με την CDK6 .....	88
6.10 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-07 με την CDK6 .....	89
6.11 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-08 με την CDK6 .....	90
6.12 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-09 με την CDK6 .....	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 <sup>ο</sup> .....	92
7.1 Βελτιστοποίηση της συνθετικής πορείας .....	92
7.1.2 Αντίδραση Sonogashira .....	92
7.1.3 Αντίδραση κυκλοποίησης .....	94
7.1.4 Αντιδράσεις τύπου Ullmann .....	99
7.1.5 Αντίδραση οξειδωτικής αμίνωσης .....	106
7.1.6 Αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης .....	107
7.2 Σύνθεση αναλόγων του Ribociclib .....	110
7.2.1 Ολική πορεία σύνθεσης των νέων εν δυνάμει αναστολέων .....	110
7.3 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη .....	114
7.3.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη .....	115
7.4 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη .....	116
7.4.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα .. της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη .....	117
7.5 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη .....	119
7.5.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Hπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης .....	120
7.6 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο .....	121
7.6.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,Nδιμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμιδίου .....	122
7.7 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνη .....	124
7.7.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-Nκυκλοεξυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη .....	124

7.8	Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοεξυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη ....	125
7.8.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7Ηπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης .....	125
7.9	Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7Η-πυρρολο [2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη .....	127
7.9.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7Ηπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης .....	127
7.10	Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-N,N-διμεθυλο-7Ηπυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο .....	128
7.10.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-N,Nδιμεθυλο-7Η-πυρρολο[2,3d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμιδίου .....	129
7.11	Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-Nφαινυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη .....	130
7.11.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη .....	130
7.12	Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινοπυριμιδιν-5υλο)προπ-2-υν-1-όλη .....	132
7.12.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα της 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλης .....	132
7.13	Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-φαινυλο-7Η-πυρρολο[2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη	133
7.13.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-φαινυλο-7Ηπυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης .....	134
7.14	Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-φαινυλο-N,N-διμεθυλο-7Ηπυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο .....	135
7.14.1	Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-χλωρο-7-φαινυλο-N,Nδιμεθυλο-7Η-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμιδίου .....	135
7.15	Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος .....	137
7.16	Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης C <sub>12</sub> .....	138
7.17	Φασματοσκοπικά δεδομένα του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald– Hartwig Rib-02 .....	140
7.18	Φασματοσκοπικά δεδομένα του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald– Hartwig Rib-03	143
7.19	Φασματοσκοπικά δεδομένα του του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald– Hartwig Rib-04.....	145
7.20	Φασματοσκοπικά δεδομένα του του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald– Hartwig Rib-05.....	148
7.21	Φασματοσκοπικά δεδομένα του του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald– Hartwig Rib-06.....	150
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 <sup>ο</sup>	.....	153
8.1	Πειραματικό μέρος .....	153
8.1.1	Συσκευές και όργανα .....	153
8.2	Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη .....	154
8.3	Σύνθεση της ένωσης 3- (2-χλωρο-4- (κυκλοπεντυλαμινο) πυριμιδιν-5-υλ) προπ-2-υν-1-όλη .....	155

8.4	Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο [2,3d] πυριμιδιν-6-υλ)μεθανόλη .....	156
8.5	Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N, N-διμεθυλο-7H- πυρρολο [2,3-d] πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο .....	157
8.6	Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνη .....	158
8.7	Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοεξυλαμινοπυριμιδιν 5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη ....	159
8.8	Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλ-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδιν-6-υλ)μεθανόλη .....	160
8.9	Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλ-N,N-διμεθυλ-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο [2,3- d] πυριμιδινό- 6- καρβοξαμίδιο.....	161
8.10	Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη .....	162
8.11	Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινοπυριμιδιν -5υλο)προπ-2-υν-1-όλη .....	163
8.12	Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-φαινυλ-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδιν-6-υλ) μεθανόλη	164
8.13	Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-N,N-διμεθυλ-7-φαινυλ-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο .....	165
8.14	Σύνθεση της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος .....	166
8.15	Σύνθεση της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος .....	167
8.16	Σύνθεση του προϊόντος σύζευξης Buchwald-Hartwig .....	168
8.17	Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-02 .....	169
8.18	Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-03 .....	170
8.19	Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-04 .....	171
8.20	Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-05 .....	172
8.21	Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-06 .....	172

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>0</sup>

## 1.1 Εισαγωγή

Παρόλο που ο καρκίνος υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια της ιστορίας της ανθρωπότητας, αποτέλεσε κύρια αιτία θανάτου μόνο κατά τον τελευταίο αιώνα. Πριν από το 1900, οι περισσότεροι θάνατοι προέρχονταν από μολυσματικές ασθένειες, ενώ ο καρκίνος ήταν μια σπάνια ασθένεια που ευθύνονταν για ένα μικρό ποσοστό θανάτων. Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα της κατάρρευσης των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν την συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η επιβίωση κάθε κυττάρου σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό ρυθμίζονται προσεκτικά, ώστε να εξυπηρετούνται οι ανάγκες του οργανισμού με αρμονικό, συντονισμένο τρόπο. Στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται απώλεια αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών και έτσι αυτά αναπτύσσονται και διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Τελικά, εξαπλώνονται σε ολόκληρο το σώμα και παρεμποδίζουν τη λειτουργία των φυσιολογικών ιστών κι οργάνων.

Μια από τις κυριότερες αιτίες που οδηγούν στη δημιουργία καρκίνου είναι η αστοχία βασικών κυτταρικών ρυθμιστικών μηχανισμών. Πρόκειται δηλαδή για μια ασθένεια που πρέπει να την κατανοήσουμε τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο, είναι δε γνωστό ότι έχει αποτελέσει το αντικείμενο έρευνας πολλών επιστημόνων για πολλά χρόνια. Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότεροι από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά στην συμπεριφορά τους και στην απόκρισή τους στις θεραπείες.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγαλύτερο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα για τη ανάπτυξη νέων φαρμάκων που θα δρουν επιλεκτικά εναντίον των καρκινικών κυττάρων. Τα περισσότερα όμως φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία κατά του καρκίνου, είτε προκαλούν βλάβες στο DNA, είτε εμποδίζουν την αντιγραφή του. Συνεπώς, αυτά τα φάρμακα είναι τοξικά όχι μόνο για τα καρκινικά κύτταρα αλλά και για τα φυσιολογικά, καθώς και για τα είδη των κυττάρων που αντικαθίστανται συνεχώς από τις διαιρέσεις των βλαστικών κυττάρων. Η αρνητική επίδραση των αντικαρκινικών φαρμάκων στους φυσιολογικούς κυτταρικούς πληθυσμούς οφείλεται στη μη ειδική τοξικότητα αυτών των φαρμάκων και επηρεάζει την αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία του καρκίνου. <sup>[1]</sup>

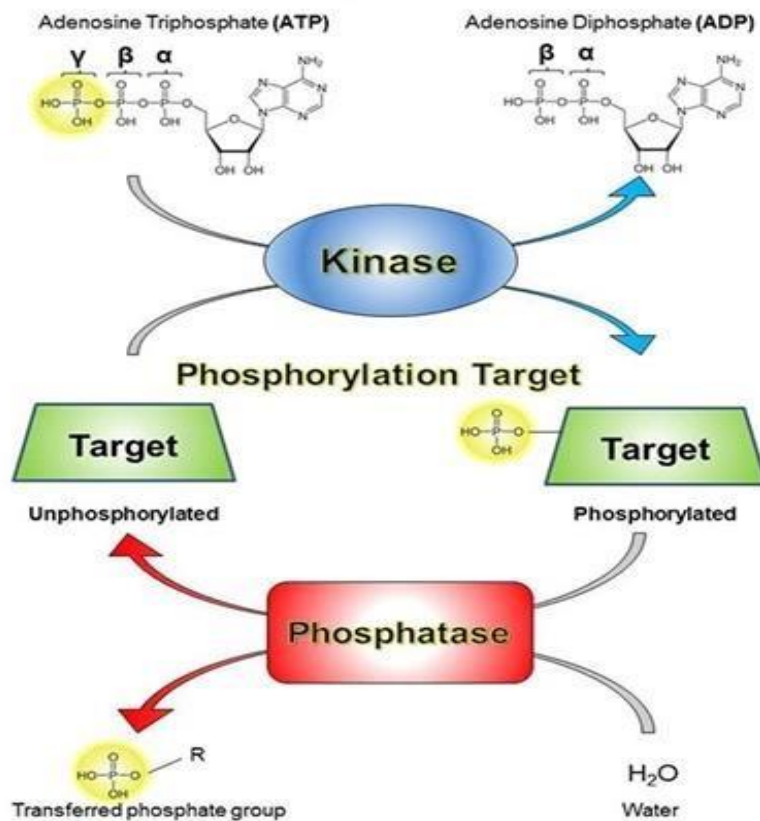
Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για μια πιο ενδελεχή κατανόηση της δημιουργίας του καρκίνου και της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης των όγκων, αποδεικνύουν ότι είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης μεταλλάξεων που επηρεάζουν διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των



κυττάρων. Διάφορες τέτοιες μεταλλάξεις μπορούν να σε πραγματοποιηθούν στις πρωτεϊνικές κινάσες, που είναι ένζυμα τα οποία επάγουν την διαδικασία της φωσφορυλίωσης σε διάφορες σηματοδοτικές οδούς των κυττάρων.

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι μία από τις πιο συνηθισμένες και σημαντικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα κύτταρο. Αυτός ο αναστρέψιμος μηχανισμός συμβαίνει μέσω των πρωτεϊνικών κινασών και συνίσταται στην προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας ( $\text{PO}_4^{2-}$ ) στην πολική υδροξυλομάδα των αμινοξέων της σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης. [2]

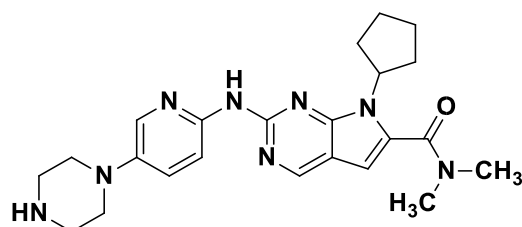
Η φωσφορική ομάδα προσφέρεται από ένα μόριο τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), το οποίο προσδένεται στο ενεργό κέντρο της κινάσης. [3]



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης στόχου. [4]

Η δυσλειτουργία των κινασών λόγω μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των περισσότερων ανθρώπινων καρκίνων και αναγνωρίζεται ολοένα και περισσότερο ως ένας κοινός μηχανισμός για πολλές άλλες ασθένειες. Ως αποτέλεσμα, η ανάπτυξη φαρμάκων αναστολέων κινασών, υπήρξε ένας από τους κύριους στόχους των επιστημόνων τις

τελευταίες δύο δεκαετίες.<sup>[3]</sup> Ένας χαρακτηριστικός αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών, που αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια, είναι και το Ribociclib (Σχήμα 1.1). Το Ribociclib είναι ένας αναστολέας των κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνη (CDK4 και CDK6), ένωση μικρού μοριακού βάρους, που λαμβάνεται εκ του στόματος και αναπτύχθηκε από την Novartis για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.<sup>[5]</sup>



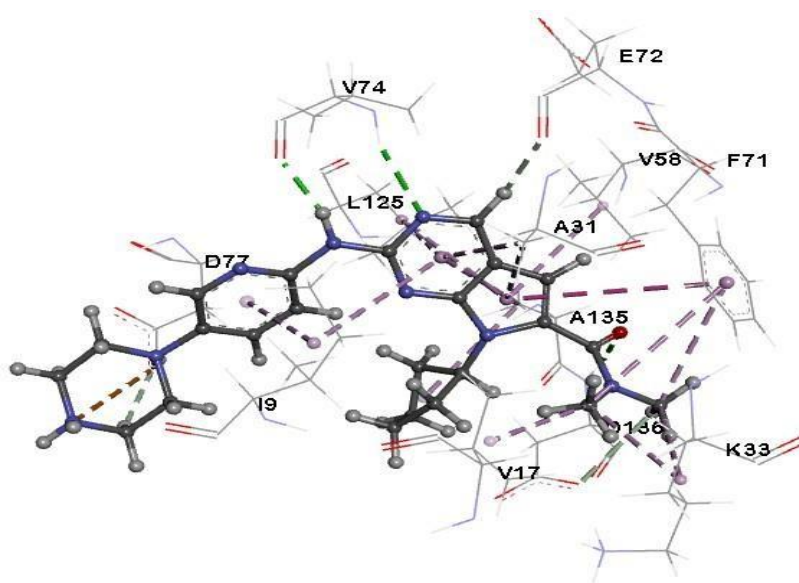
Σχήμα 1.1: Η δομή του Ribociclib.

Ο **καρκίνος του μαστού** είναι η συνηθέστερη μορφή καρκίνου στον γυναικείο πληθυσμό, σύμφωνα με στατιστικά που αφορούν την Ευρωπαϊκή Ένωση. Επιπλέον, αποτελεί το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας στις γυναίκες παγκοσμίως, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα.<sup>[6]</sup> Ετησίως, διαγιγνώσκονται περίπου ένα εκατομμύριο νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει πάνω από το 23% όλων των κακοηθειών.<sup>[7]</sup> Η αναστολή των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών 4 και 6 (CDK4/6) θα μπορούσε δυνητικά να αποτρέψει την αντίσταση στη θεραπεία υποκατάστασης ορμονών στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Μέχρι το 75% των καρκίνων του μαστού εκφράζει τον υποδοχέα οιστρογόνου ή τον υποδοχέα προγεστερόνης (θετικό για τον υποδοχέα ορμονών-υποδοχέα). Η θεραπεία υποκατάστασης ορμονών είναι το πρότυπο της θεραπείας για τις μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού, με τους αναστολείς της αρωματάσης να είναι η προτιμώμενη επιλογή θεραπείας πρώτης γραμμής. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των ασθενών, αναπτύσσεται τελικά αντίσταση στις διαθέσιμες επιλογές, γεγονός που απαιτεί τη χορήγηση διαδοχικής θεραπείας με εναλλακτικές θεραπευτικές αγωγές. Συνεπώς, είναι σημαντική η αναγνώριση των αποτελεσματικών επιλογών θεραπείας που παρατείνουν ή αποκαθιστούν την ευαισθησία στις θεραπείες υποκατάστασης ορμονών.<sup>[8]</sup> Οι CDKs (Cyclin Dependent Protein Kinases) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, και η αναστολή αυτών των κινασών με την βοήθεια του Ribociclib συντελεί στην διακοπή της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου. Το Ribociclib χορηγείται σε συνδυασμό με έναν αναστολέα

αρωματάσης, τη λετροζόλη. Παράλληλα, ο συγκριμένος αναστολέας αποτελεί αντικείμενο περαιτέρω ερευνών φάσης III για τον καρκίνο του μαστού και αξιολογείται με διάφορες δοκιμές στη φάση I ή II για διάφορους τύπους συμπαγούς όγκου και αιματολογικές κακοήθειες. Μέχρι σήμερα η ανάπτυξη του Ribociclib οδήγησε στην παγκόσμια έγκριση για την χρήση του ως αρχική θεραπεία υποκατάστασης ορμονών των μεταεμμηνοπαυσιακών γυναικών με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς(HR positive) ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού.<sup>[5]</sup>

## 1.2 Σκοπός

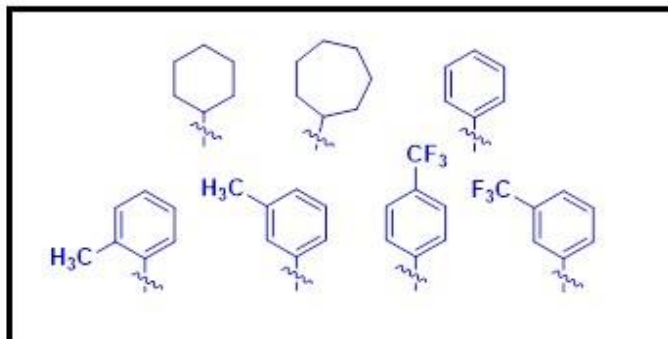
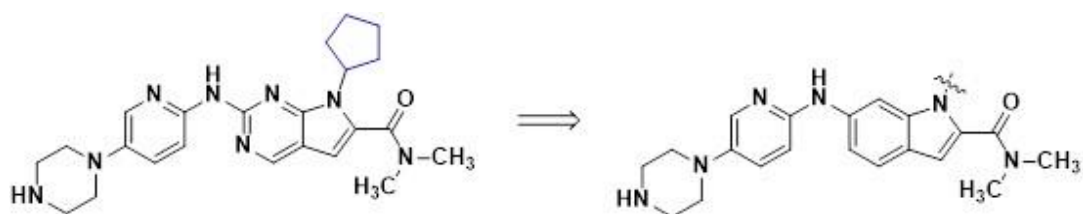
Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας είναι, μέσω της μοριακής μοντελοποίησης, να πραγματοποιηθεί σχεδιασμός νέων ενώσεων, αναλόγων του Ribociclib, η σύνθεση και η ταυτοποίηση τους στο εργαστήριο. Οι νέες αυτές ενώσεις αναμένεται να έχουν καλύτερη ανασταλτική δράση, καθώς προηγήθηκε ορθολογικός σχεδιασμός τους μέσω προγραμμάτων, με βάση το ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης CDK6.



Εικόνα 1.2: 3D κρυσταλλογραφική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Ribociclib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6.

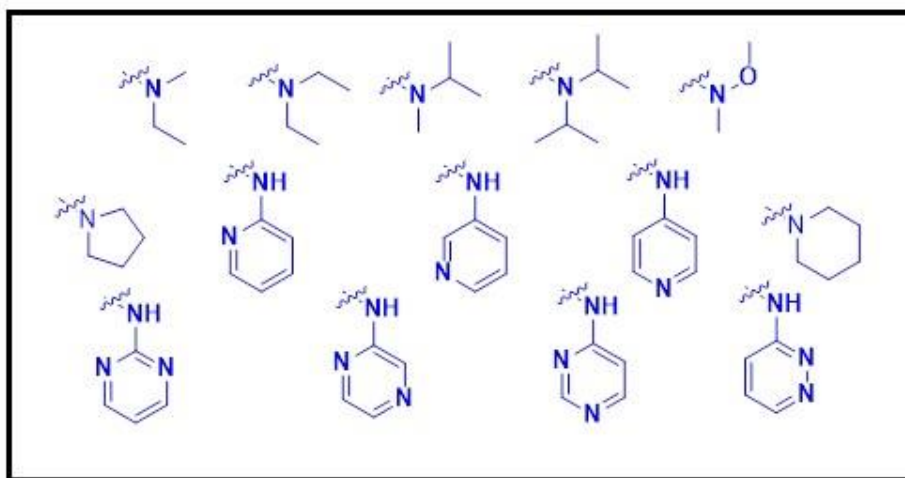
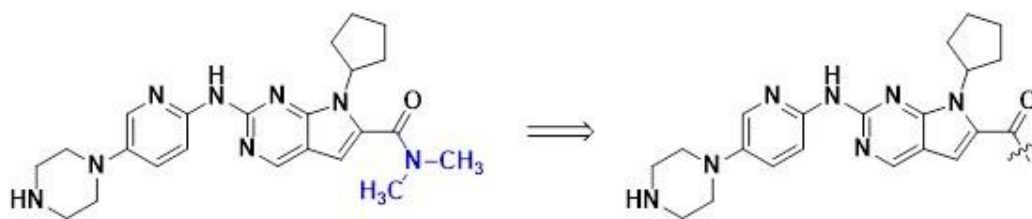
Για τη μοριακή μοντελοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Autodock Vina και το UCSF Chimera. Αναλυτικότερα, οι τροποποιήσεις στη δομή του Ribociclib είναι οι εξής:

Η θέση 1 του 5,7-διαζαϊνδολικού δακτυλίου είναι κατειλημμένη από το δακτύλιο του κυκλοπεντανίου, ο οποίος συνεισφέρει στη στερική συμπληρωματικότητα του ενεργού κέντρου των CDK4/6. Έγιναν προσπάθειες στο εργαστήριο αντικατάστασης του κυκλοπεντανίου με εξαμελή, καθώς και με βενζολικό δακτύλιο. Οι τροποποιήσεις αυτές, προσάρτηση δακτυλίων περισσότερο λιπόφιλων, στόχευαν στη βελτίωση της στερικής συμπληρωματικότητας του αναστολέα στο υδρόφοβο κανάλι του ενεργού κέντρου των κινασών.



Σχήμα 1.2: Τροποποιήσεις στη θέση 1 του 5,7-διαζα-ϊνδολικού δακτυλίου.

Η θέση 2 του 5,7 –διαζα-ϊνδολικού δακτυλίου υπάρχει η καρβοξαμιδική ομάδα, η οποία εμφανίζει αλληλεπιδράσεις υδρόφοβου χαρακτήρα με τις μεθυλομάδες και δεσμούς υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο και με αυτόν τον τρόπο η συμπληρωματικότητα εντός της υδρόφοβης κοιλότητας των CDK4/6 αυξάνεται. Γι' αυτό το λόγο έγινε προσάρτηση πιο ογκωδών αλκυλομάδων, καθώς και αρωματικών δακτυλίων.

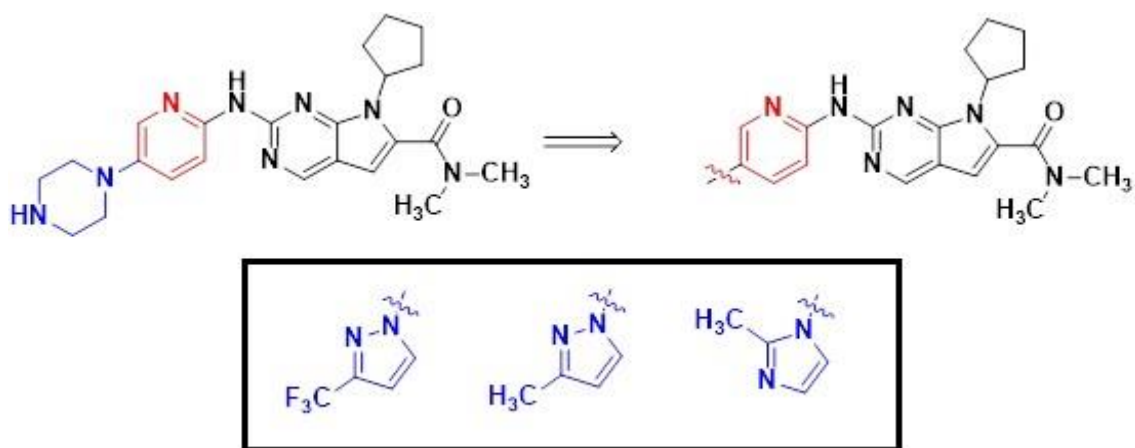


Σχήμα 1.3: Τροποποιήσεις στη θέση 2 του 5,7-διαζαϊνδολικού δακτυλίου.

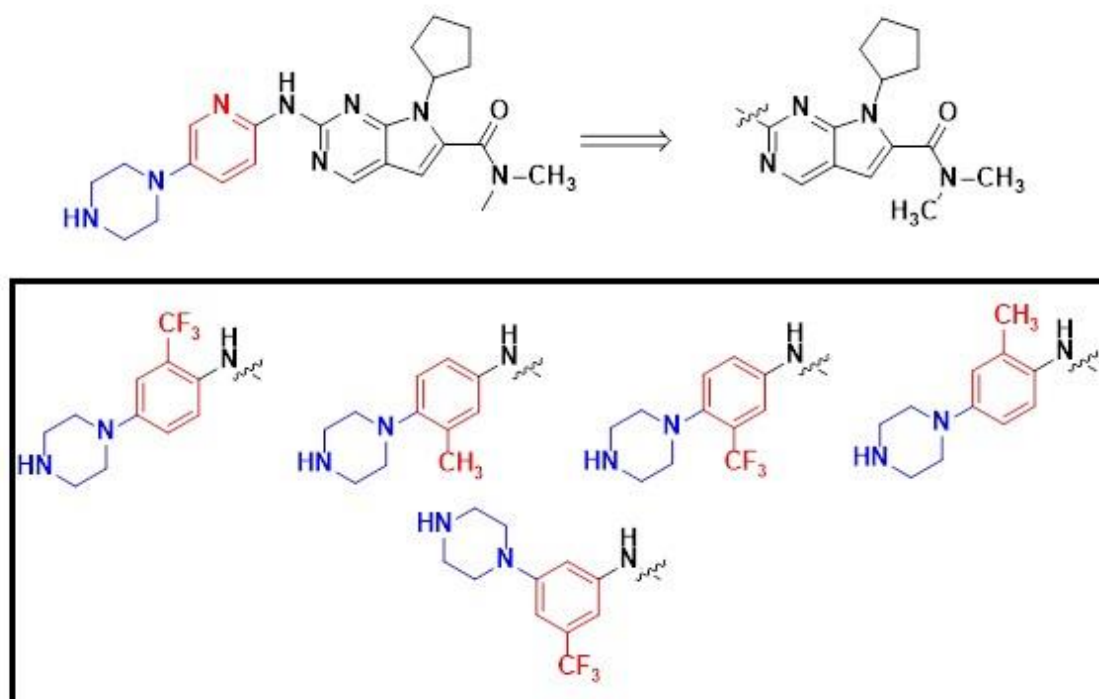
Η περιοχή της 2-αμινοπυριδίνης στον 5,7-διαζα-ϊνδολικό δακτύλιο, αλληλεπιδρά με το ATP στις CDK4/6 και συγκεκριμένα στη Hinge περιοχή του θύλακα δέσμευσής του. Ύστερα από βιβλιογραφική μελέτη, παρατηρήθηκε ότι ο 2-αμινοπυριδινικός δακτύλιος παρατηρείται στη δομή όλων των CDK αναστολέων κινασών. Σύμφωνα με τα συγκεκριμένα δεδομένα δεν πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στη συγκεκριμένη περιοχή.

Ο πιπεραζινικός δακτύλιος και το άτομο του αζώτου του πυριδινικού δακτυλίου που φέρει το φαρμακοφόρο μοντέλο του Ribociclib, διαπιστώθηκε ότι δεν βοηθά στην ανασταλτική δράση του ενζύμου. Επιπρόσθετα, από τη μελέτη της επιφάνειας δεσμών υδρογόνου της CDK6 στο ενεργό κέντρο της παρατηρήθηκε ότι υπάρχει περιοχή που είναι πλούσια σε δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου. Οι στοχευμένες αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν είχαν ως σκοπό το σχηματισμό ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων που βρίσκονται γύρω από τον δακτύλιο. Ως απόρροια των παραπάνω αποτελεσμάτων σε σχέση με τις τροποποιήσεις στη δομή του μορίου, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο νέα ανάλογα (Σχήμα 1.7) του φαρμακευτικού σκευάσματος Ribociclib. Αναμένεται να πραγματοποιηθούν τα βιολογικά πειράματα για να αποδείξουν τη συγκεκριμένη δράση.

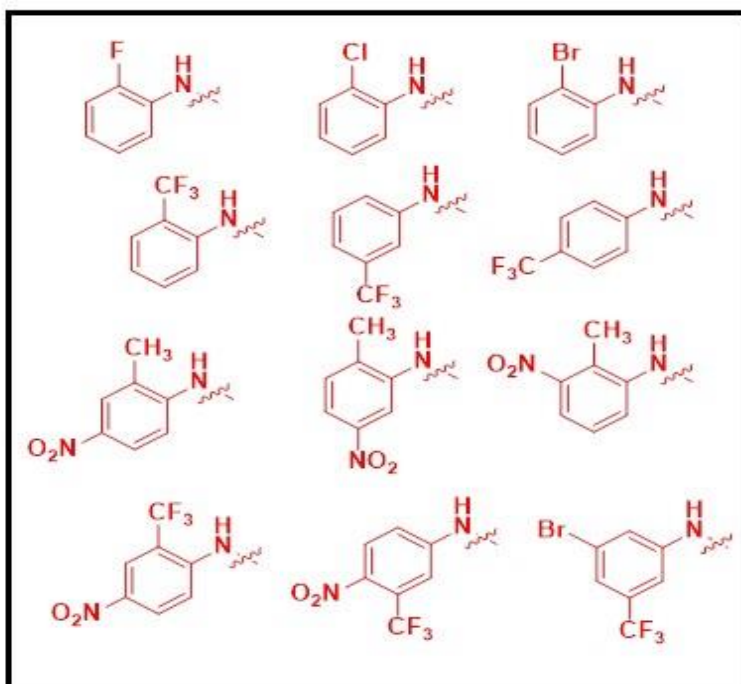
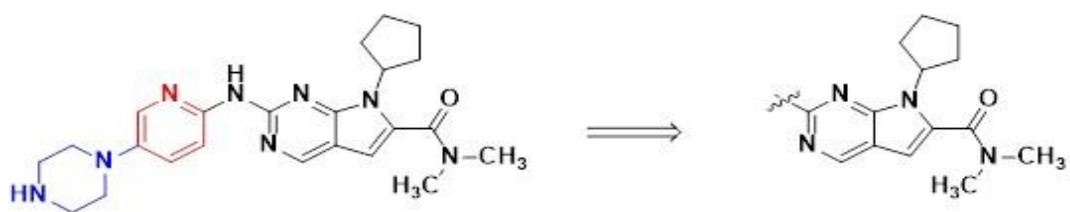
Επιπρόσθετα, έγιναν προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση της πειραματικής πορείας που προτείνεται από την εταιρεία Novartis. Πιο συγκεκριμένα, ο στόχος ήταν η μείωση των σταδίων της συνθετικής πορείας του Ribociclib και η εξοικονόμηση αντιδραστηρίων αλλά και χρόνου. Αναλυτικότερα, μέσω μιας one pot αντίδρασης σύνθεσης έγινε αντικατάσταση της αντίδρασης Sonogashira και της αντίδρασης κυκλοποίησης προς σχηματισμό του 5,7-διαζαϊνδολικού δακτυλίου.



Σχήμα 1.4: Τροποποιήσεις στη δομή με αντικατάσταση του πιπεραζινικού δακτυλίου με ιμιδαζολικούς και πυραζολικούς δακτυλίους.

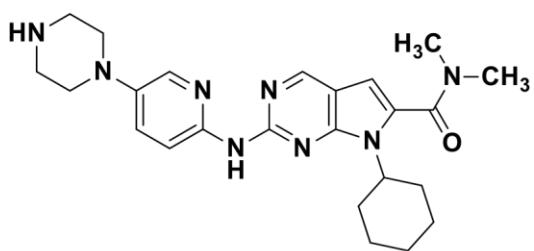


Σχήμα 1.5: Τροποποιήσεις στη δομή του πυριδινικού δακτυλίου με διατήρηση του πιπεραζινικού δακτυλίου.

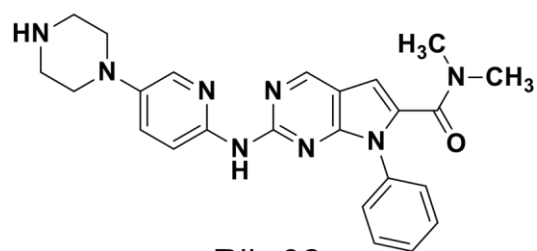


Σχήμα 1.6: Τροποποιήσεις στη δομή του πυριδινικού δακτυλίου με κατάργηση του πιπεραζινικού δακτυλίου.

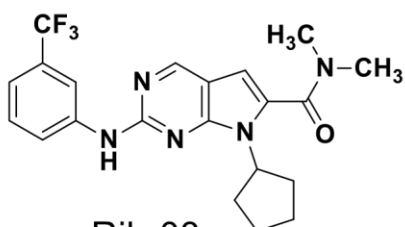




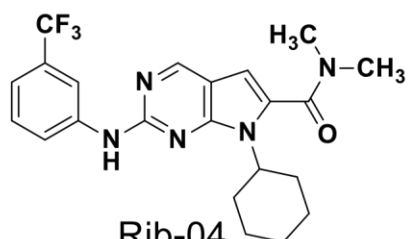
Rib-01



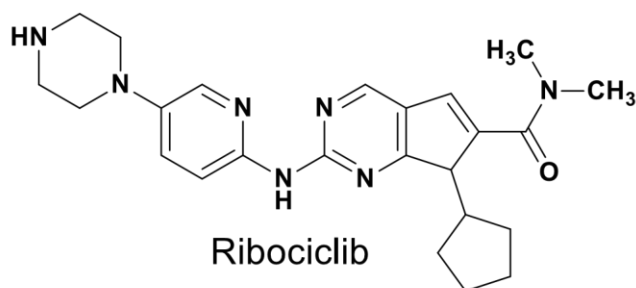
Rib-02



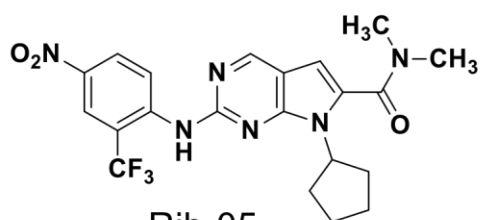
Rib-03



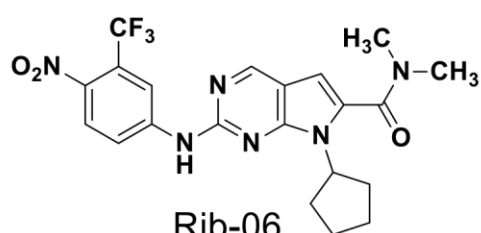
Rib-04



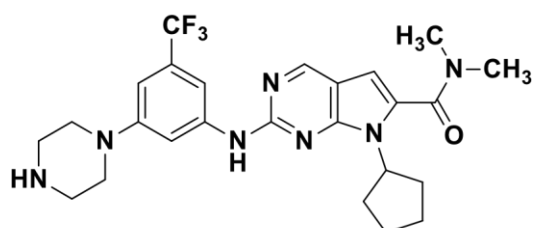
Ribociclib



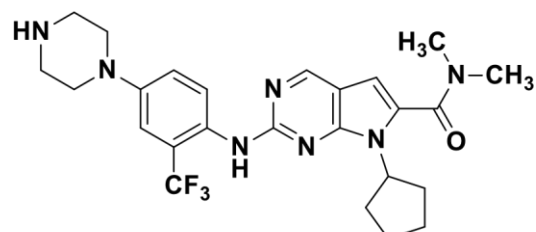
Rib-05



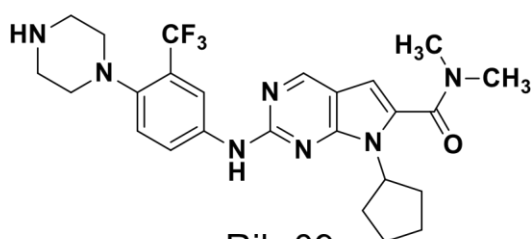
Rib-06



Rib-07



Rib-08



Rib-09

Σχήμα 1.7: Ανάλογα του φαρμακευτικού σκευάσματος Ribociclib που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>0</sup>

### 2.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες

Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών είναι η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια ενζύμων στους ανθρώπους. Οι πρωτεϊνικές κινάσες διαδραματίζουν κεντρικούς ρόλους σχεδόν σε κάθε πτυχή της κυτταρικής λειτουργίας. Ελέγχουν τον μεταβολισμό, τη μεταγραφή, την κυτταρική διαίρεση, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση και στη λειτουργία του νευρικού συστήματος.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περισσότερες από 500 πρωτεϊνικές κινάσες. Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών, μια σημαντική διεργασία κατά την οποία οι κυτταρικές λειτουργίες ρυθμίζονται. Μπορούν να τροποποιήσουν τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης σχεδόν με κάθε δυνατό τρόπο. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την ενζυμική δραστηριότητα και να μεταβάλει βιολογικές δραστηριότητες, όπως η μεταγραφή και η μετάφραση. Μπορεί να σταθεροποιήσει ή να αποσταθεροποιήσει μια πρωτεΐνη ή να προωθήσει την κίνηση μιας πρωτεΐνης από μία κυτταρική θέση στην άλλη. Επιπλέον, μερικές θέσεις φωσφορυλίωσης σε μια δεδομένη πρωτεΐνη είναι διεγερτικές, ενώ άλλες είναι ανασταλτικές.

Η ανώμαλη έκφραση των πρωτεϊνικών κινασών συνήθως προκαλούν υπερδραστηριότητα, οδηγώντας το κύτταρο σε απορρυθμισμένες λειτουργίες, π.χ. την ανάπτυξη του καρκίνου, φλεγμονώδεις ή πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, καρδιαγγειακή και καρδιακή ανεπάρκεια, νευρολογικές διαταραχές, άσθμα και ψωρίαση.

Έτσι, τα φάρμακα που επηρεάζουν τις πρωτεϊνικές κινάσες (και πιο συγκεκριμένα τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών κινασών) έχουν μεγάλη σημασία σε μελλοντικές θεραπευτικές στρατηγικές μιας μεγάλης ποικιλίας ασθενειών. Άμεσα ή έμμεσα, περισσότερες από 400 ανθρώπινες ασθένειες έχουν συνδεθεί με πρωτεϊνικές κινάσες.

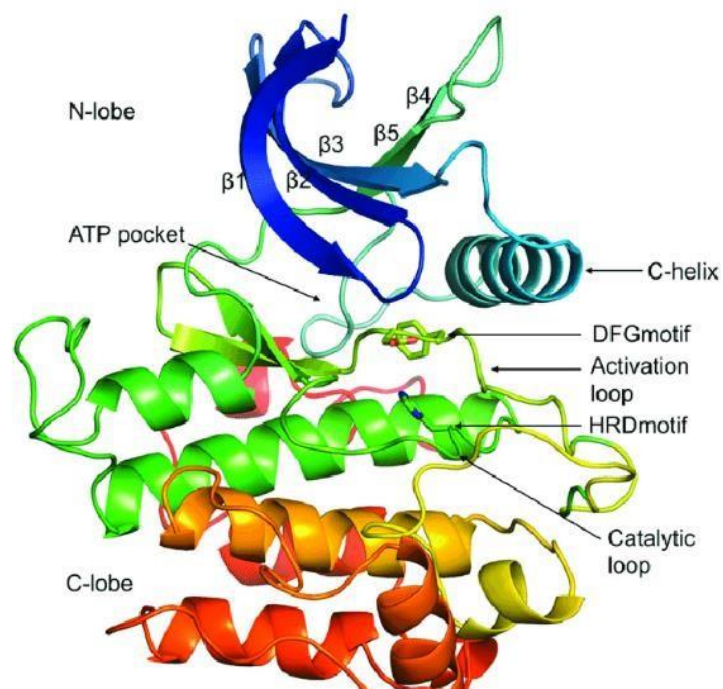
<sup>[9],[10],[11]</sup> Κατά συνέπεια, η έρευνα των οδών σηματοδότησης, στις οποίες μεσολαβούν πρωτεϊνικές κινάσες, και η πιθανότητα παρεμπόδισής τους με στοχευμένη θεραπεία έχει μεγάλη κλινική και θεραπευτική χρησιμότητα, μιας και πολλές από αυτές τις πρωτεΐνες δρουν ως ογκογονίδια. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών προέρχεται από πολλαπλούς τύπους γενετικών αλλαγών. <sup>[12]</sup>

## 2.2 Δομή πρωτεϊνικών κινασών

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

Ο N-τερματικός λοβός αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα που είναι οργανωμένα σε βπτυχωτά φύλλα και τουλάχιστον μια  $\alpha$ -έλικα, που ονομάζεται C έλικα. Ο συγκεκριμένος λοβός περιέχει τη θέση δέσμευσης των νουκλεοτιδίων, η οποία αναγνωρίζει και δεσμεύει ATP. Δεδομένου ότι όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες χρησιμοποιούν το ATP, ως την κύρια φωσφορική πηγή, πολλά από τα υπολείμματα αμινοξέων που περιλαμβάνει αυτός ο θύλακας σύνδεσης διατηρούνται.

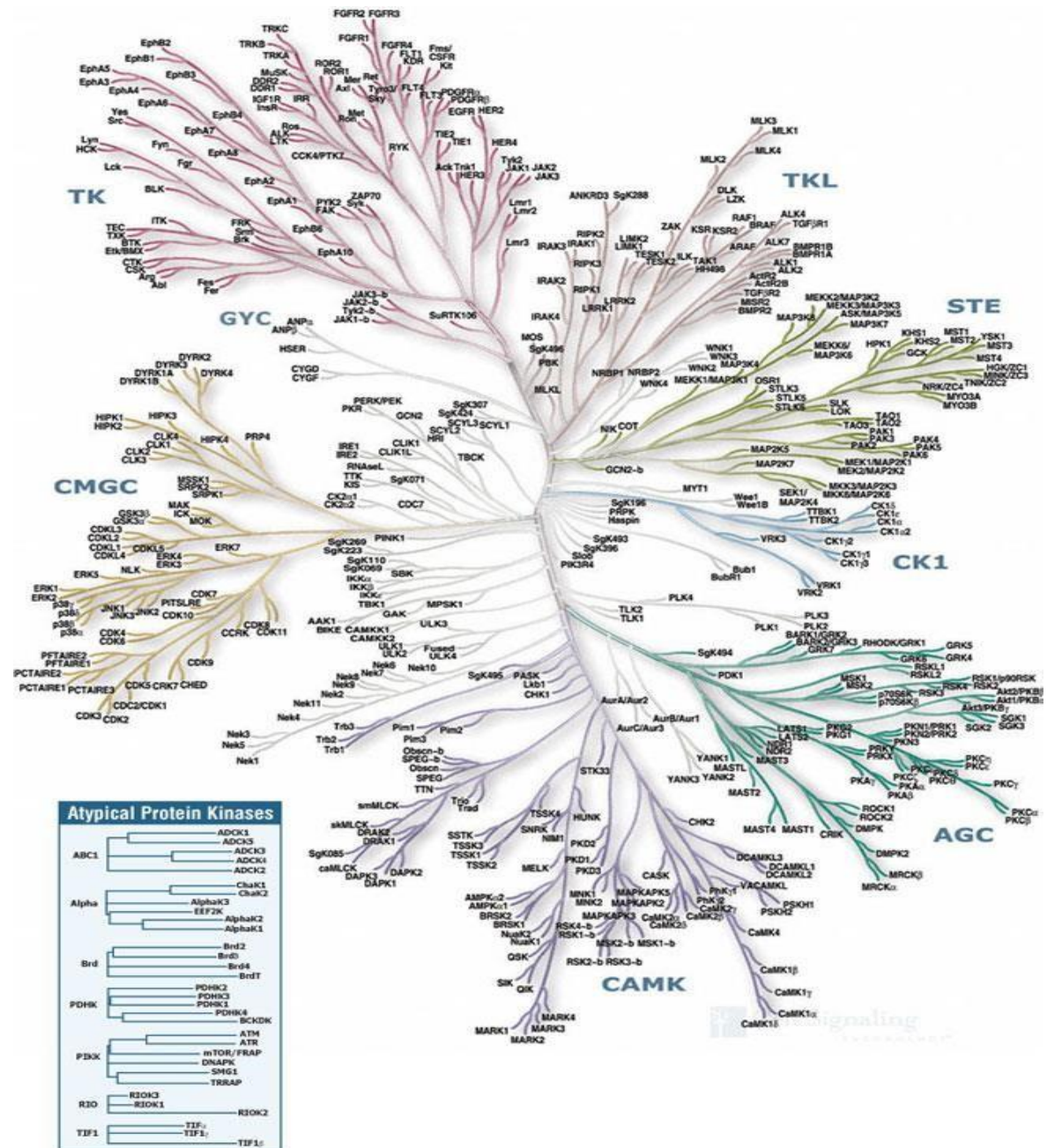
Ο C-τερματικός λοβός ποικίλλει σε μέγεθος, αλληλουχία και τοπολογία, ωστόσο αποτελείται κατά κύριο λόγο από  $\alpha$ -έλικες, τον βρόχο ενεργοποίησης και καταλυτικά υπολείμματα. <sup>[13]</sup> Το N-τερματικό άκρο της καταλυτικής περιοχής είναι πλούσιο σε γλυκίνη κοντά στο αμινοξύ της λυσίνης, το οποίο έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην δέσμευση του ATP. Στο κεντρικό τμήμα του καταλυτικού τομέα, υπάρχει ένα ασπαρτικό οξύ, το οποίο είναι σημαντικό για την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Αυτός ο καταλυτικός πυρήνας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας. <sup>[14]</sup>



Εικόνα 2.1: Δομή των πρωτεϊνικών κινασών. <sup>[15]</sup>

### 2.3 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών

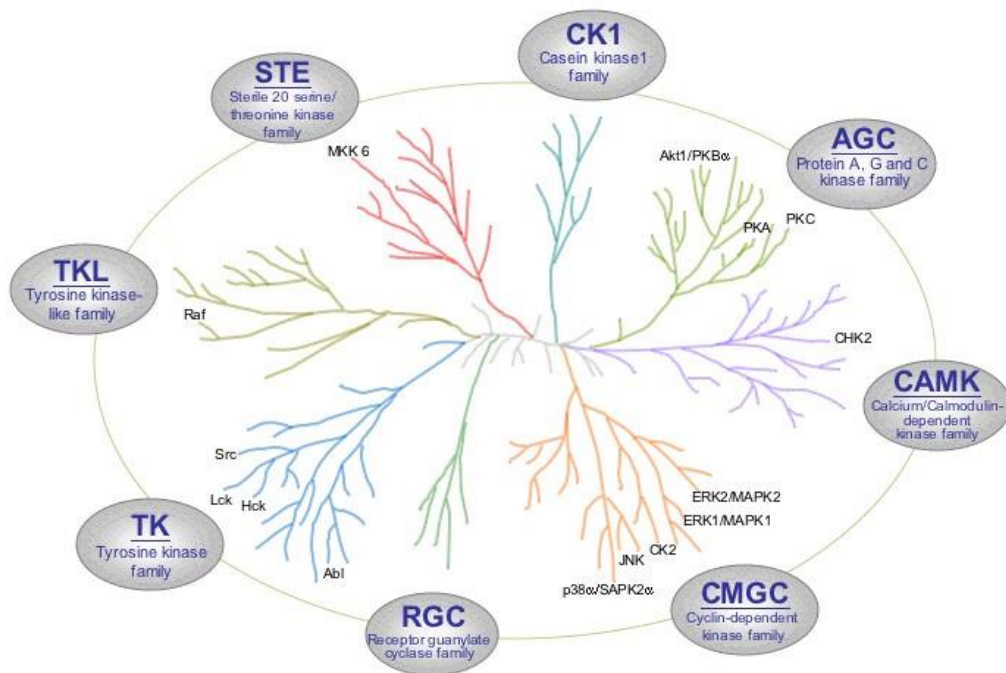
Για την καλύτερη μελέτη και κατανόηση του πλήθους των πρωτεϊνικών κινασών, οι περισσότερες από αυτές κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τις ομοιότητες που παρουσιάζουν στη δομή και στη βιολογική λειτουργία τους σε δυο μεγάλες υποκατηγορίες: τις τυπικές (ePKs) και τις άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs).



Εικόνα 2.2: Το σύνολο των πρωτεϊνικών κινασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα. [16]

Οι aPKs περιέχουν πρωτεΐνες με βιοχημική δραστικότητα κινάσης, αλλά δεν έχουν ομοιότητα στην αλληλουχία με την καταλυτική περιοχή των ePKs και τα ομόλογα τους. Κάποιες aPKs έχουν δομική ομοιότητα με την καταλυτική περιοχή των ePKs.

Οι τυπικές πρωτεϊνικές κινάσες υποδιαιρούνται σε 8 οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών (AGC, CAMK, CMGC, RGC, TK, TKL, STE, CKI) και στο σύνολο είναι 478. Η ταξινόμηση πραγματοποιείται ανάλογα με την αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου σε: AGC (A, G και C πρωτεϊνικές κινάσες), CAMK (εξαρτώμενες από  $Ca^{2+}$ /CAM πρωτεϊνικές κινάσες), CK1 (κινάση καζεΐνης 1), CMGC (CDK, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, MAPK, ενεργοποιημένες από μιτογόνο κινάσες, GSK3 (κινάση συνθάσης γλυκόζης-3), CLK, (ομοιάζουσες με cdc2 κινάσες), RGC (υποδοχική γουανυλική κυκλάση), STE (αποτελείται από Ste7/MAP2K, Ste11/MAP3K και Ste20/MAP4K), TK (κινάσες τυροσίνης) και TKL (πρωτεϊνικές κινάσες τύπου κινάσης τυροσίνης).



Εικόνα 2.3: Οι οκτώ κύριες ομάδες των τυπικών πρωτεϊνικών κινασών. [17]

Επιπλέον, οι πρωτεϊνικές κινάσες διαχωρίστηκαν σε δυο επιπλέον υποκατηγορίες ανάλογα με το υπόστρωμα των αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν σε πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνουν αμινοξέα σερίνης ή θρεονίνης και πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνουν αμινοξέα τυροσίνης. [17],[18]



## 2.4 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης

Είναι ένζυμα με δράση κινάσης, που φωσφορυλιώνουν την –OH ομάδα της σερίνης/θρεονίνης. Δε γίνεται διάκριση μεταξύ σερίνης και θρεονίνης, καθώς τα δυο αυτά αμινοξέα έχουν παρόμοιες πλευρικές αλυσίδες. Τουλάχιστον 125 από τις 500 ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες είναι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης.

Οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Λόγω του εξαιρετικά συντηρημένου καταλυτικού κέντρου, οι κινάσες δεν είναι εκλεκτικές σε ένα μόνο υπόστρωμα, αλλά αντίθετα φωσφορυλιώνουν μία οικογένεια υποστρωμάτων. Όλες αυτού του τύπου οι κινάσες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης στα υποστρώματά τους, κυρίως όμως επιλέγουν για φωσφορυλίωση συγκεκριμένα κατάλοιπα, βάσει αυτών που βρίσκονται δίπλα στο δέκτη της φωσφορικής ομάδας, αποτελώντας έτσι μια συναινετική αλληλουχία. Οι αλλαγές στην αλληλουχία των γονιδίων που κωδικοποιούν τις κινάσες, συμβάλλουν στην απαραίτητη διαφοροποίηση για την αναγνώριση των διαφορετικών υποστρωμάτων. Έτσι, πρωταρχικός καθοριστής της εξειδίκευσης είναι αλληλουχία των αμινοξέων που περιστοιχίζουν τη θέση φωσφορυλίωσης της σερίνης ή της θρεονίνης. Ωστόσο, απομακρυσμένα κατάλοιπα μπορούν να συνεισφέρουν στην εξειδίκευση. Η φωσφορυλίωση αναστρέφεται από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση των φωσφορυλιωμένων αμινοξέων. Μέσω της συνδυασμένης δράσης των πρωτεϊνικών κινασών και των πρωτεϊνικών φωσφατασών επιτυγχάνεται η αναστρέψιμη φωσφορυλίωση πολλών πρωτεϊνών. Συχνά οι πρωτεϊνικές κινάσες λειτουργούν στο πλαίσιο μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα οποία μια σειρά από κινάσες ενεργοποιούν διαδοχικά η μια την άλλη. Με τον τρόπο αυτό, ένα σήμα που λαμβάνεται στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να μεταφερθεί σε πρωτεΐνες στόχους στο εσωτερικό του και να προκαλέσει στο κύτταρο αλλαγές ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. <sup>[1]</sup>

## 2.5 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (TKs) είναι μια οικογένεια ενζύμων, η οποία καταλύει τη φωσφορυλίωση επιλεγμένων καταλοίπων τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, χρησιμοποιώντας το ATP. Αυτή η ομοιοπολική τροποποίηση είναι ένα καθοριστικό στοιχείο της φυσιολογικής επικοινωνίας των κυττάρων και της διατήρησης της ομοιόστασης. <sup>[19]</sup> Οι κύριες λειτουργίες τους περιλαμβάνουν τη ρύθμιση πολυκυτταρικών διεργασιών του

οργανισμού. Τα ενδοκυττάρια σήματα που αφορούν την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την προσκόλληση, την κινητικότητα και το θάνατο συχνά μεταδίδονται μέσω των τυροσινικών κινασών. Στους ανθρώπους, οι κινάσες τυροσίνης έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη πολλών παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη και του καρκίνου. Ιστορικά, οι τυροσινικές κινάσες καθορίζουν την πρωτότυπη κατηγορία ογκογονιδίων, που εμπλέκονται στις περισσότερες μορφές ανθρώπινων κακοηθειών. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περίπου 90 διαφορετικές τυροσινικές κινάσες, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω σε δύο υποκατηγορίες:

- τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs)
- και τις μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs).<sup>[20]</sup>

## 2.6 Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες(RTKs)

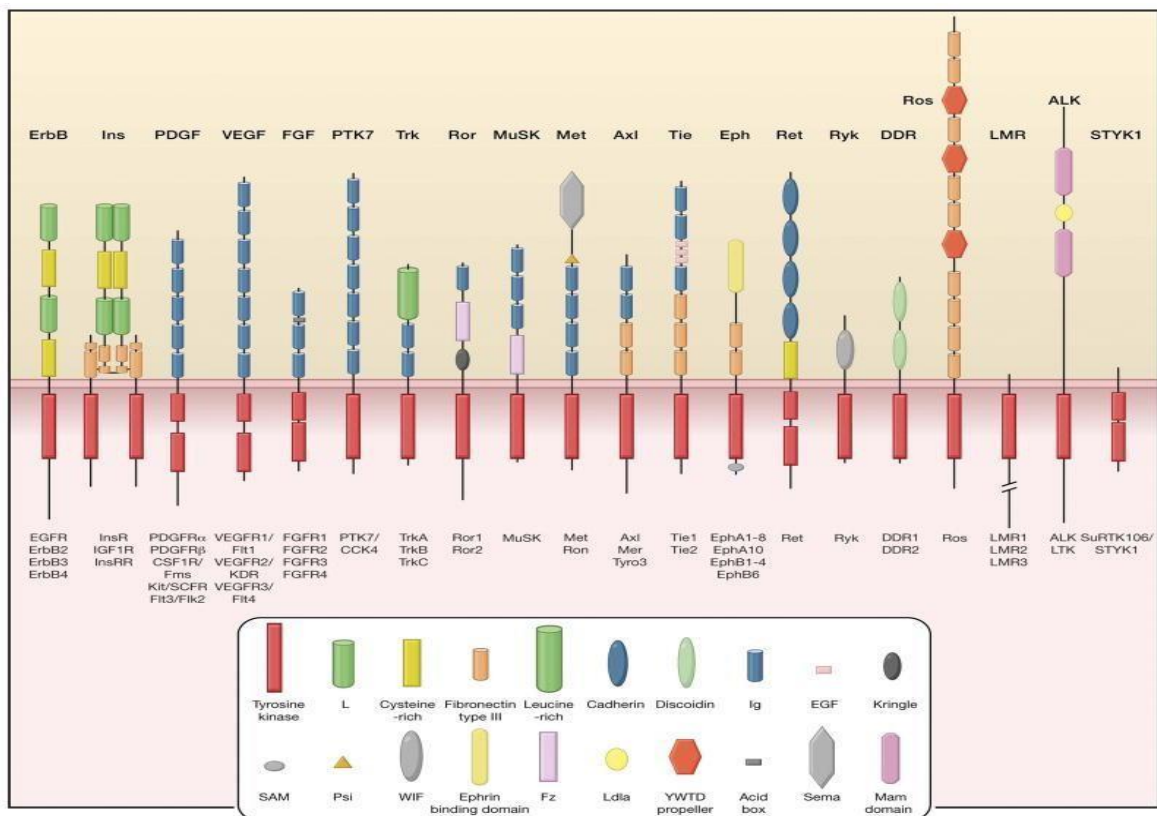
Από τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες είναι γνωστές 58 και λειτουργούν στην διαμεμβρανική σηματοδότηση ενώ από τις μη υποδοχικές 32 λειτουργούν στη σηματοδότηση προς τον πυρήνα.<sup>[19]</sup> Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες αποτελούνται από μια εξωκυττάρια περιοχή, η οποία προσδένεται σε συγκεκριμένο υποκαταστάτη (ligand), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδομοριακή καταλυτική περιοχή, η οποία προσδένεται και φωσφορυλιώνει επιλεγμένα υποστρώματα και διάφορες ρυθμιστικές ομάδες. Το εξωκυττάριο τμήμα μπορεί να αποτελεί ανεξάρτητο τμήμα, το οποίο συνδέεται με το τον υπόλοιπο υποδοχέα με δισουλφιδικό δεσμό.

Οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης υποδιαιρούνται σε 20 υπο-οικογένειες:

- Κατηγορία I (Epidermal Growth Factor Receptor Family, EGFR/ERBB)
- Κατηγορία II (Insulin Receptor Family, IR)
- Κατηγορία III (Platelet-derived Growth Factor Receptor Family, PDGF)
- Κατηγορία IV (Fibroblast Growth Factor Receptor Family, FGF)
- Κατηγορία V (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Family, VEGF)
- Κατηγορία VI (Hepatocyte Growth Factor Receptor Family, HGF)
- Κατηγορία VII (Tropomyocin-related Kinase Receptors, TRK)
- Κατηγορία VIII (EPH Receptors)



- Κατηγορία IX (AXL Receptor Family)
- Κατηγορία X (LTK Receptor Family)
- Κατηγορία XI (TIE Receptor Family)
- Κατηγορία XII (ROR Receptor Family)
- Κατηγορία XIII (DDR Receptor Family)
- Κατηγορία XIV (RET Receptor Family)
- Κατηγορία XV (KLG Receptor Family)
- Κατηγορία XVI (RYK Receptor Family)
- Κατηγορία XVII (MuSK Receptor Family) <sup>[21]</sup>

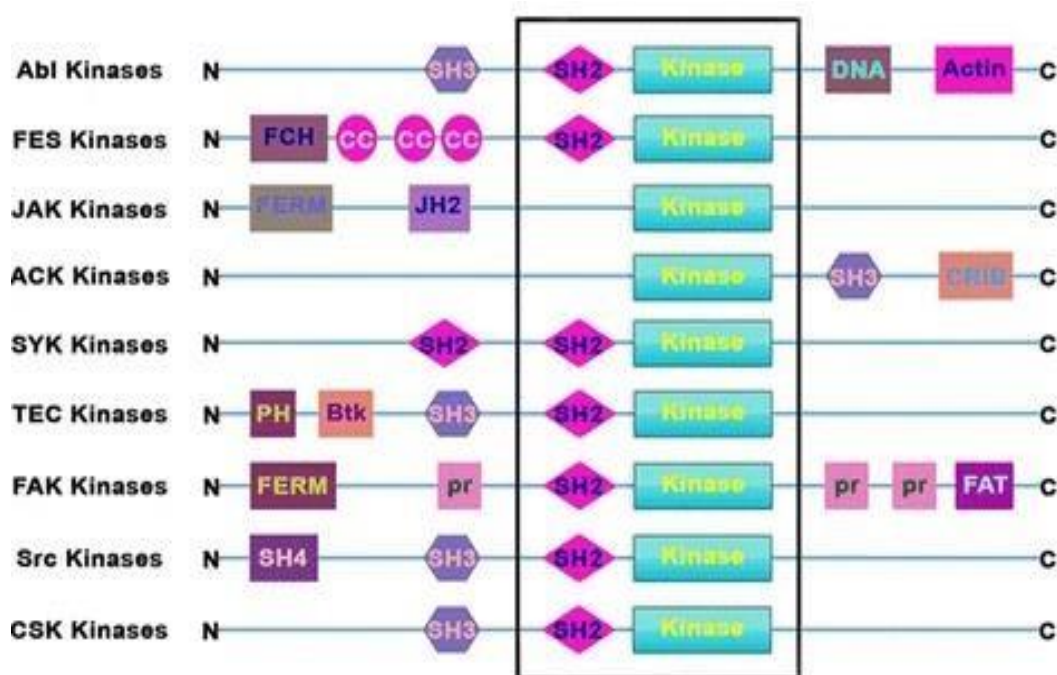


Εικόνα 2.4: Τα μέλη της οικογένειας των υποδοχικών κινασών τυροσίνης.<sup>[19]</sup>

## 2.7 Μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες(NRTKs)

Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου, όπως η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η αντιαποπτωτική

σηματοδότηση και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, μέσω πολλών καταρρακτών σηματοδότησης, όπου εξωκυττάρια σήματα μεταφέρονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα και συχνά στον πυρήνα. Δεν διαθέτουν διαμεμβρανική περιοχή και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Ενεργοποιούνται μέσω ποικίλων ενδομοριακών σημάτων με την απομάκρυνση αναστολέων, την πρόσληψή τους σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς, προκαλώντας ολιγομερισμό, αυτοφωσφορυλίωση και την τρανσ-φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες. Πιο συγκεκριμένα, δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με τους εξωκυττάριους ligands, ωστόσο, είναι στενά συνδεδεμένες με τους σηματοδοτικούς καταρράκτες ενός ευρέος φάσματος υποδοχικών κινασών, με υποδοχείς συνδεδεμένους σε G-πρωτεΐνες, και κυτοκινικούς υποδοχείς (cytokine receptors). [22]



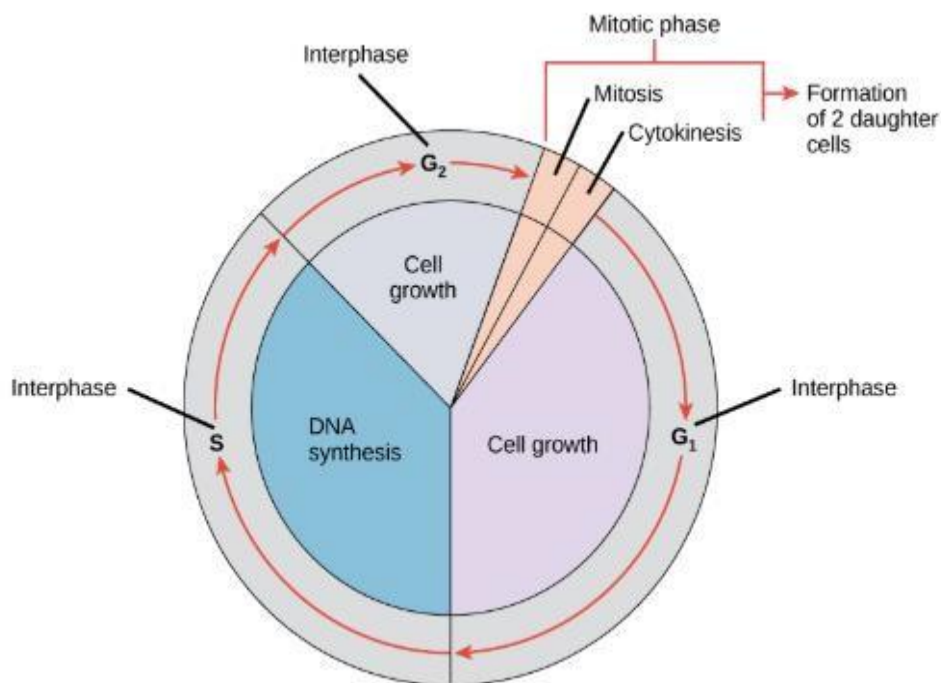
Εικόνα 2.5: Οι κύριες οικογένειες των NRTKs. [23]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>0</sup>

### 3.1 Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια διατεταγμένη ακολουθία συμβάντων που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο κατά την προετοιμασία της κυτταρικής διαίρεσης. Είναι μια διαδικασία τεσσάρων σταδίων, στην οποία το κύτταρο:

- αυξάνεται σε μέγεθος (G1 στάδιο),
- αντιγράφει το DNA του (σύνθεση ή S στάδιο),
- προετοιμάζεται να διαιρεθεί (G2 στάδιο),
- και διαιρείται (μίτωση ή M στάδιο).<sup>[24]</sup>



Εικόνα 3.1: Ο κυτταρικός κύκλος.<sup>[25]</sup>

Αναλυτικότερα, από τις τέσσερις φάσεις του κύκλου των ευκαρυωτικών κυττάρων περιλαμβάνονται δύο φάσεις G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>, στις οποίες δεν παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές. Επιπλέον στη φάση S, οι ευκαρυότυποι αντιγράφονται και στη φάση M λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός δύο θυγατρικών κυττάρων.

Κατά την έναρξη της πρώτης φάσης, φάση G<sub>1</sub>, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από τη διέγερση από επιπλέον κυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες, αλλά μπορεί ακόμα να κατασταλεί από αντιπολλαπλασιαστικούς παράγοντες. Στην αρχή της σύνθεσης του DNA το

κύτταρο εισέρχεται στη φάση S, όπου τα χρωμοσώματα αντιγράφονται. Μετά την ολοκλήρωση της φάσης S το νεοσυντιθέμενο DNA επιδιορθώνεται κατά τη διάρκεια της φάσης G2. Τέλος, το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μετάβαση στη φάση M (μίτωση), στην οποία διαχωρίζεται το διπλασιασμένο DNA.

Μετά τη διαίρεση, και τα δύο κύτταρα μπορούν να εισέλθουν στη φάση G1 να περάσουν ξανά τον κυτταρικό κύκλο ή να παραμείνουν σε κατάσταση ηρεμίας που ονομάζεται φάση G0. Οι φάσεις M και S διαχωρίζονται από τις δύο φάσεις G. Ένα ευκαρυωτικό κύτταρο χρειάζεται γενικά περίπου 10-20 ώρες για έναν κύκλο διαίρεσης. Η κατάσταση ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου ονομάζεται φάση G0 και μερικά κύτταρα, ανάλογα με τον τύπο τους, μπορεί να παραμένουν σε αυτή για αρκετά χρόνια. <sup>[24]</sup>

Η κατανόηση λοιπόν του κυτταρικού κύκλου έχει καταστεί ζωτικής σημασίας και για τη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου. <sup>[26]</sup> Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου καθώς τα καρκινικά κύτταρα έχουν αποκτήσει τυπικά βλάβη σε γονίδια που ρυθμίζουν άμεσα τους κυτταρικούς τους κύκλους. <sup>[27]</sup> Εφόσον τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται ραγδαία, βρίσκονται υπό υψηλή πίεση για να εκπληρώσουν τις ενεργειακές και βιοσυνθετικές απαιτήσεις τους, είναι πολύ σημαντικό να διευρύνουμε την κατανόηση των μη κανονικών ρόλων των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου στον καρκίνο. <sup>[28]</sup>

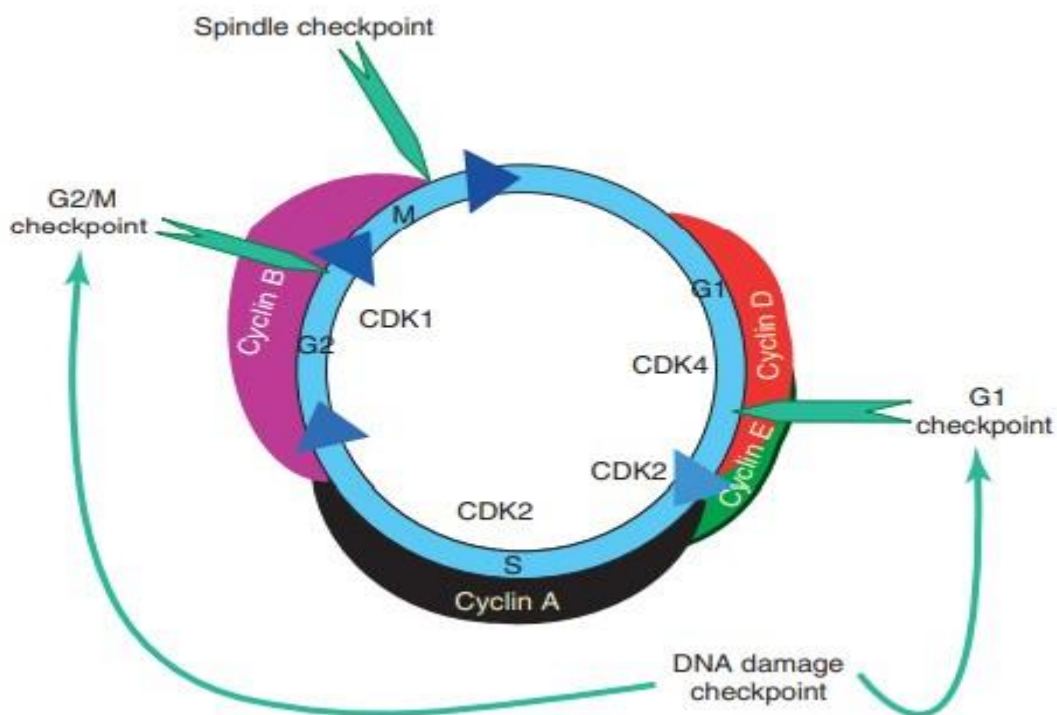
### 3.2 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι ρυθμιστικές οδοί που ελέγχουν τη σειρά και το χρονοδιάγραμμα των μεταβάσεων του κυτταρικού κύκλου και εξασφαλίζουν ότι τα κρίσιμα συμβάντα όπως η αναπαραγωγή του DNA και ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων ολοκληρώνονται με υψηλή πιστότητα. Επιπρόσθετα, τα σημεία ελέγχου ανταποκρίνονται σε βλάβες, συγκρατώντας τον κυτταρικό κύκλο, παρέχοντας χρόνο για επιδιόρθωση και προκαλώντας μεταγραφή γονιδίων. Η απώλεια του σημείου ελέγχου έχει ως αποτέλεσμα τη γονιδιωματική αστάθεια και εμπλέκεται στην εξέλιξη των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα. Οι πρόσφατες πρόοδοι έχουν αποκαλύψει μονοπάτια μεταγωγής σήματος που μεταδίδουν σήματα σημείων ελέγχου τα οποία αποκρίνονται σε βλάβες του DNA και του αναδιπλασιασμού. <sup>[29]</sup>

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου εξασφαλίζουν ότι η μετάβαση στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται όταν ολοκληρωθεί το προηγούμενο στάδιο.

Τα βασικά σημεία ελέγχου και οι μηχανισμοί ρύθμισης είναι οι εξής:

- G2/M: δεν γίνεται μετάβαση στη φάση της μίτωσης M χωρίς την ολοκλήρωση της φάσης του αναδιπλασιασμού S.
- σημείο ελέγχου της ατράκτου: αποτρέπει την έναρξη της ανάφασης μέχρι τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.
- σημείο εκκίνησης (G1) ή περιορισμού (R): τα κύτταρα που προέρχονται από την κυτταρική διαίρεση πρέπει να αποκτήσουν ένα κρίσιμο μέγεθος κατά τη διάρκεια της φάσης G1, πριν να αρχίσει η φάση S το κύτταρο μπορεί να κατευθύνεται σε απόπτωση.
- βλάβη του DNA: η επιδιόρθωση του DNA πραγματοποιείται από ειδικά ένζυμα για να αποφευχθούν μεταλλάξεις. Εάν η επιδιόρθωση αποτύχει, ρυθμιστικοί μηχανισμοί που καταγράφουν τις καταστροφές στο DNA σταματούν τον κυτταρικό κύκλο.



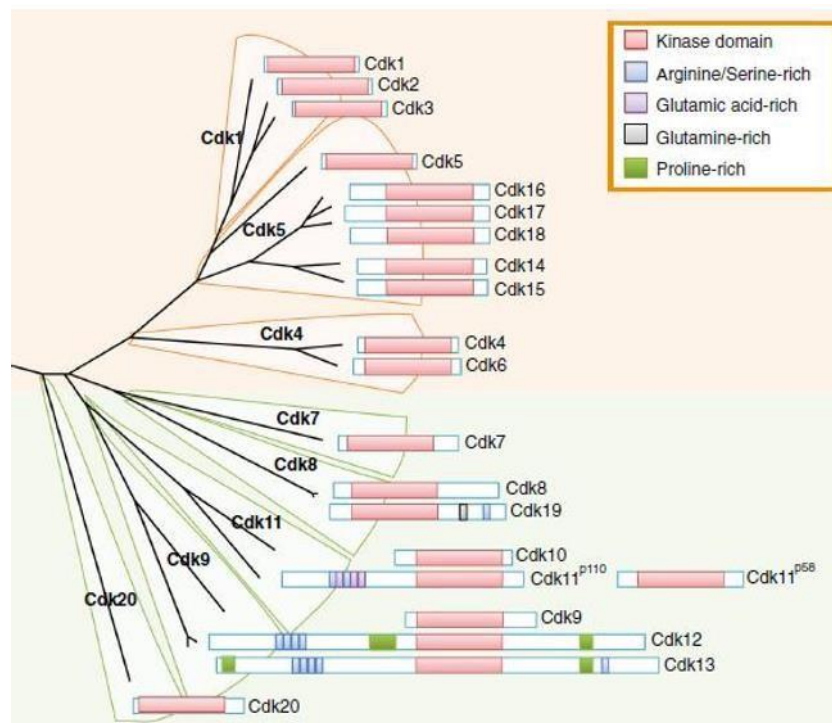
Εικόνα 3.2: Σημεία ελέγχου και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. [30]

Ο συντονισμός αυτών των περίπλοκων διαδικασιών επιτυγχάνεται από βασικούς ρυθμιστές γνωστές ως κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες(CDKs). [30]

### 3.3 Κυκλινοεξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (CDKs)

Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs) ανήκουν στην κατηγορία των πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης/θρεονίνης Ser/Thr που ενεργοποιούνται μέσω σύνδεσης με μια ρυθμιστική υπομονάδα που ονομάζεται κυκλίνη, που παρέχει πρόσθετες αλληλουχίες για ενζυματική δραστηριότητα, και δημιουργούν σύμπλοκα απαραίτητα για την προώθηση κάθε φάσης του κυτταρικού κύκλου. [31] Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι υπάρχουν περισσότερες από 21 εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDKs). [32] Τρεις από αυτές εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (CDK1, 4 και 5) και πέντε (CDK 7, 8, 9 και 11) σχετίζονται με τη μεταγραφή.

Εν συντομία, όλες οι CDKs έχουν στη δομή τους δυο λοβούς: έναν N-τερματικό που έχει βήτα φύλλα και έναν C-τερματικό αποτελούμενο από α-έλικες. Ο N-τελικός λοβός περιέχει έναν G-βρόγχο (πλούσιο σε γλυκίνη) και ο C-τερματικός περιέχει ένα τμήμα ενεργοποίησης που επίσης περιλαμβάνει υπολείμματα φωσφορυλίωσης σερίνης ή θρεονίνης (γνωστός ως T βρόγχος στην περίπτωση των CDKs). Για την ενεργοποίησή τους οι CDKs προσδένονται στο C-τερματικό άκρο των κυκλινών μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και η πρόσδεση αυτή οδηγεί στην προσβασιμότητα του ATP στην καταλυτική θέση για φωσφορυλίωση της θρεονίνης. [33]



Εικόνα 3.3: Τα μέλη των CDKs που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα. [34]

Αναλυτικότερα παρουσιάζονται οι CDKs οι οποίες έχει διαπιστωθεί ότι παρουσιάζουν συσχέτιση με τον καρκίνο του μαστού.



**CDK1:** Επειδή ο ρόλος της CDK1 στον κυτταρικό κύκλο είναι πάρα πολύ σημαντικός μπορεί να ρυθμιστεί με δυο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι μέσω της σύνδεσης της με τις κυκλίνες και ο δεύτερος είναι μέσω της φωσφορυλίωσης. Έχει διαπιστωθεί ότι η τυροσίνη 15(Tyr15) οδηγεί σε αναστολή της CDK1, καθώς με τη φωσφορυλίωση αλλάζει ο προσανατολισμός του ATP, εμποδίζοντας την αποτελεσματική δραστηριότητα της κινάσης. Με ορισμένες κυκλίνες, η CDK1 σχηματίζει σύμπλοκα τα οποία φωσφορυλιώνουν μια ποικιλία υποστρωμάτων στόχων.<sup>[35]</sup> Η CDK1, όπως και άλλες κινάσες, περιέχει μια σχισμή στην οποία ταιριάζει το ATP. Τα υποστρώματα της CDK1 συνδέονται κοντά στο στόμιο της σχισμής και τα υπολείμματα της CDK1 καταλύουν την ομοιοπολική σύνδεση του γ-φωσφορικού προς το οξυγόνο της υδροξυλομάδας της σερίνης/θρεονίνης του υποστρώματος. Εκτός από αυτόν τον καταλυτικό πυρήνα, η CDK1 περιέχει έναν T-βρόγχο, ο οποίος απουσία κυκλίνης, αποτρέπει την πρόσδεση του υποστρώματος στην ενεργό θέση CDK1. Η CDK1 περιέχει επίσης μια έλικα PSTAIRE, η οποία κατά την δέσμευση της κυκλίνης, κινείται και αναδιατάσσει την ενεργό θέση, διευκολύνοντας τις δραστηριότητες της CDK1. <sup>[36]</sup>

**CDK2:** Είναι μια καταλυτική υπομονάδα της εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης, η δραστηριότητα της οποίας περιορίζεται στη φάση G1-S του κυτταρικού κύκλου και είναι απαραίτητη για την μετάβαση G1/S. Αυτή η πρωτεΐνη συνδέεται και ρυθμίζεται από τις ρυθμιστικές υπομονάδες του συμπλόκου που περιλαμβάνουν την κυκλίνη E ή A. Η κυκλίνη E δεσμεύει την Cdk2, η οποία απαιτείται για τη μετάβαση από τη φάση G1 σε S ενώ η δέσμευση με την κυκλίνη A απαιτείται για να προχωρήσει στην S φάση. Η δραστηριότητά της ρυθμίζεται επίσης από τη φωσφορυλίωση. <sup>[37]</sup>

**CDK4:** Είναι μια καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου πρωτεϊνικής κινάσης που είναι σημαντική για την εξέλιξη της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου. Η δραστηριότητα αυτής της κινάσης περιορίζεται στη φάση G1/S, η οποία ελέγχεται από τις ρυθμιστικές υπομονάδες κυκλίνες τύπου D και τον αναστολέα CDK p16 (INK4α). Αυτή η κινάση αποδείχθηκε ότι είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του προϊόντος γονιδίου του αμφιβληστροειδούς (Rb). Οι μεταλλάξεις σε αυτό το γονίδιο καθώς και στις συγγενείς του πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων κυκλίνης τύπου D, p16 (INK4α) και Rb βρέθηκαν όλες να σχετίζονται με τη δημιουργία ποικιλίας καρκίνων. <sup>[38]</sup>

**CDK6:** Η CDK6 λειτουργεί και σαν κινάση του κυτταρικού κύκλου και ως ρυθμιστής μεταγραφής. Ρυθμίζεται από κυκλίνες, ειδικότερα από πρωτεΐνες κυκλίνης D και πρωτεΐνες

αναστολέων κινάσης εξαρτώμενες από κυκλίνη. Αυτή η κινάση είναι μια καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου πρωτεϊνικής κινάσης, σημαντική για την εξέλιξη της φάσης G1 και τη μετάβαση G1 / S του κυτταρικού κύκλου. Το σύμπλεγμα αποτελείται επίσης από μια υπομονάδα ενεργοποίησης, την κυκλίνη D. Η δραστηριότητα αυτής της κινάσης εμφανίζεται αρχικά στη μέση της φάσης G1, η οποία ελέγχεται από τις ρυθμιστικές υπομονάδες που περιλαμβάνουν κυκλίνες τύπου D και μέλη της οικογένειας INK4 αναστολέων CDK.<sup>[39]</sup> Αυτή η κινάση, καθώς και η CDK4, έχει αποδειχθεί ότι φωσφορυλιώνει και επομένως ρυθμίζει τη δραστηριότητα της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος καθιστώντας την CDK6 σημαντική πρωτεΐνη στην ανάπτυξη του καρκίνου.<sup>[31]</sup>

**CDK7:** Δεδομένου ότι η CDK7 εμπλέκεται σε πολλούς σημαντικούς ρόλους ρύθμισης, αναμένεται ότι η απορρύθμιση της μπορεί να μετατρέψει τα φυσιολογικά κύτταρα σε καρκινικά. Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού βρέθηκαν να έχουν αυξημένα επίπεδα CDK7 και κυκλίνης H σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού. Διαπιστώθηκε επίσης ότι τα υψηλότερα επίπεδα γενικά βρέθηκαν σε καρκίνο του μαστού με θετικό ER. Μαζί, αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι η θεραπεία με CDK7 μπορεί να έχει νόημα για ορισμένους ασθενείς με καρκίνο του μαστού.<sup>[40]</sup> Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η αναστολή της CDK7 μπορεί να είναι μια αποτελεσματική θεραπεία για καρκίνους του μαστού με θετικό HER2.<sup>[41]</sup>

**CDK9:** Αυτή η κινάση βρέθηκε ότι είναι ένα συστατικό του συμπλόκου πολυπρωτεΐνης TAK / P-TEPβ, το οποίο είναι ένας παράγοντας επιμήκυνσης για μεταγραφή κατευθυνόμενης από RNA πολυμεράση II και λειτουργεί με φωσφορυλίωση της C-τελικής περιοχής της μεγαλύτερης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II. Σχηματίζει σύμπλοκο με την ρυθμιστική υπομονάδα της κυκλίνης T ή την κυκλίνη K. Η CDK9 είναι επίσης γνωστό ότι συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες και εμπλέκεται στη διαφοροποίηση του σκελετικού μυός.<sup>[42]</sup>



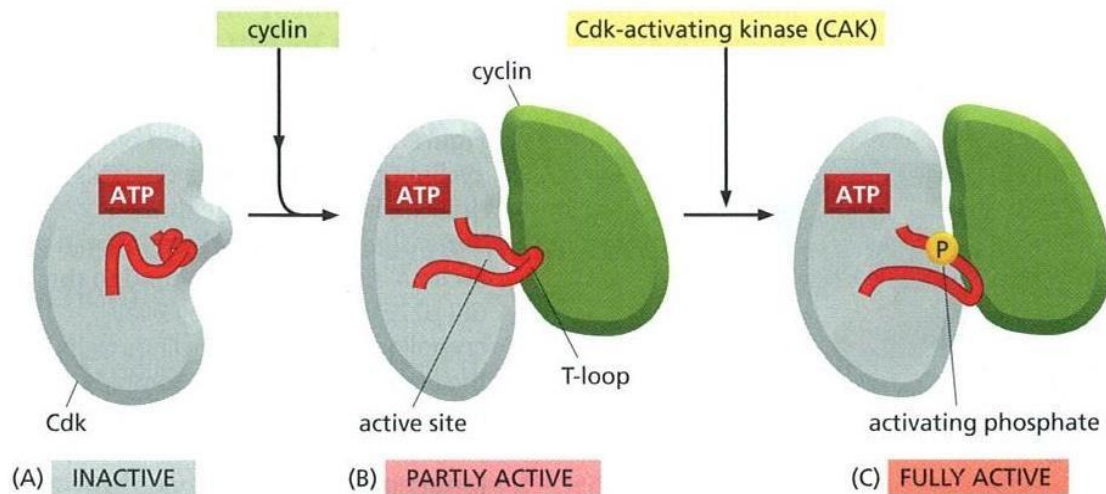
<b>CDKs</b>	<b>Βιολογικός ρόλος</b>	<b>Καρκίνος</b>	<b>Σύνδεση με κυκλίνες</b>
<b>CDK1</b>	Ρυθμιστής της M-φάσης	Πνεύμονα, Κύστης, Μαστού, Μελανώματα, Λεμφώματα	Κυκλίνη B
<b>CDK2</b>	Ρυθμιστής της G1/S-φάσης	Λεμφώματα, Μελανώματα, Μαστού	Κυκλίνη A, E
<b>CDK3</b>	Καταστροφή του DNA	Ήπατος, Νεφρού, Πνεύμονα	Κυκλίνη C
<b>CDK4</b>	Ρυθμιστής της G1/S -φάσης και της μεταγραφής pRb/E2F	Δέρματος, Μαστού, Πνεύμονα, Ουροδόχου Κύστης, Οστεοσάρκωμα, Μελανώματα	Κυκλίνη D
<b>CDK5</b>	Νευρωνικές λειτουργίες	Πνεύμονα, Νευροβλάστωμα	p39, p35
<b>CDK6</b>	Ρυθμιστής της G1/S -φάσης και της μεταγραφής pRb/E2F	Στομάχου, Δέρματος, Μαστού, Ουροδόχος κύστης	Κυκλίνη D
<b>CDK7</b>	Ενεργοποιεί τις CDKs, συμμετέχει στην μεταγραφή	Πνεύμονα, Μαστού	Κυκλίνη H
<b>CDK8</b>	Σηματοδότηση Wnt/β-κατενίνης, μεταγραφή της RNAPoIII	Δεν έχει συσχετιστεί με καρκίνο	Κυκλίνη C
<b>CDK9</b>	Επιδιόρθωση DNA, μεταγραφή της RNAPoIII	Πνεύμονα, Μαστού, Αυχένα	Κυκλίνη T
<b>CDK12</b>	Βλάβη του DNA, μεταγραφή της RNAPoIII	Προστάτη, Ωοθηκών	Κυκλίνη K
<b>CDK13</b>	Μεταγραφή της RNAPoIII	Προστάτη, Ωοθηκών	Κυκλίνη K

Πίνακας 3.1: CDKs: Ταξινόμηση, ο ρόλος τους και η συσχέτισή τους με τον καρκίνο. <sup>[33]</sup>

### 3.4 Κυκλίνες και η σύνδεση τους με CDKs

Οι κυκλίνες εμφανίζουν κυκλικές μεταβολές της συγκέντρωσής τους κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Τα 29 μέλη της οικογένειας των κυκλινών γίνονται ενεργά σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι περισσότερες εξ αυτών βρίσκονται στον

πυρήνα, αλλά υπάρχουν και οι κυκλίνες B1 και B2 που κατά τη φάση G2 βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

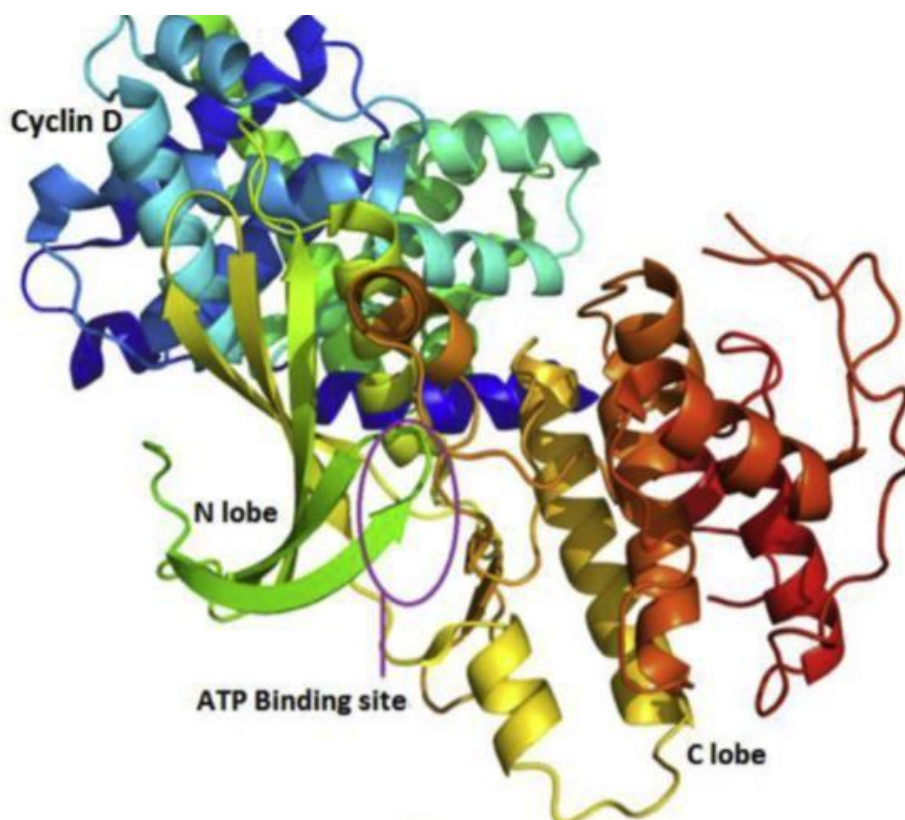


Εικόνα 3.4: Η σύνδεση των CDK με τις κυκλίνες και η ενεργοποίηση της δραστηριότητάς τους. [43]

Ο ρόλος των κυκλινών είναι να ενεργοποιούν τις CDKs. Η ποσότητα των CDKs που θα ενεργοποιηθούν περιορίζεται από τη συγκέντρωση των κυκλινών, και γι' αυτόν το λόγο οι αλλαγές στη συγκέντρωση των κυκλινών είναι ένας ρυθμιστικός παράγοντας του κυτταρικού κύκλου. Για την πλήρη ενεργοποίηση των CDKs απαιτείται η πρόσδεση της αντίστοιχης κυκλίνης και φωσφορυλίωση. Το σύμπλοκο CDK-κυκλίνης που δημιουργείται έχει δράση κινάσης. Με εξαίρεση τις CDK4 και CDK6, οι CDKs βρίσκονται ανενεργές σε μια σταθερή συγκέντρωση και συνήθως σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από τις αντίστοιχες κυκλίνες τους. [1], [44] Ύστερα από περαιτέρω έρευνες αναγνωρίστηκε και ταυτοποιήθηκε ο ρόλος των περισσότερων κυκλινών, οι οποίες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

**Κυκλίνες D ή κυκλίνες G:** Οι κυκλίνες τύπου D αποτελούν ένα καθοριστικό σημείο σύνδεσης της σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Οι κυκλίνες τύπου D (D1, D2 και D3) συνδέονται με την CDK4 και την CDK6 και δημιουργούν έξι σύμπλοκα τα οποία έχουν διαφορετική εξειδίκευση στον κυτταρικό κύκλο. Η σύνθεση της D1 επάγεται από αυξητικούς παράγοντες και συνεχίζεται για όσο διάστημα οι αυξητικοί παράγοντες είναι διαθέσιμοι. Ωστόσο η κυκλίνη D1 αποικοδομείται ταχύτητα μετά την απομάκρυνση των αυξητικών παραγόντων και η συγκέντρωσή της μειώνεται ραγδαία. Επομένως, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμοι αυξητικοί παράγοντες κατά την G1, δημιουργούνται σύμπλοκα CDK4,6/κυκλίνης D1, τα οποία προωθούν τη διέλευση από το

σημείο περιορισμού. Αν όμως οι αυξητικοί παράγοντες απομακρυνθούν πριν από αυτό το καθοριστικό ρυθμιστικό σημείο του κυτταρικού κύκλου, τα επίπεδα της κυκλίνης D1 μειώνονται ταχύτατα και τα κύτταρα δεν μπορούν να μεταβούν από την G1 στην S, αλλά εισέρχονται στην G<sub>0</sub>. Δεδομένου ότι η κυκλίνη D1 είναι ένας σημαντικός στόχος της σηματοδότησης από αυξητικούς παράγοντες, θα ήταν αναμενόμενο η αδυναμία ρύθμισης της να προκαλεί ανεξέλεγκτη αύξηση, χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις που προκαλούν συνεχή μη ρυθμιζόμενη έκφραση της κυκλίνης D1 εμπλέκονται στην ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνων του ανθρώπου, όπως είναι τα λεμφώματα και ο καρκίνος του μαστού. Επίσης, μεταλλάξεις οι οποίες απενεργοποιούν διάφορους αναστολείς που προσδέονται στην CDK4 και στη CDK6 εντοπίζονται πολύ συχνά σε καρκινικά κύτταρα.

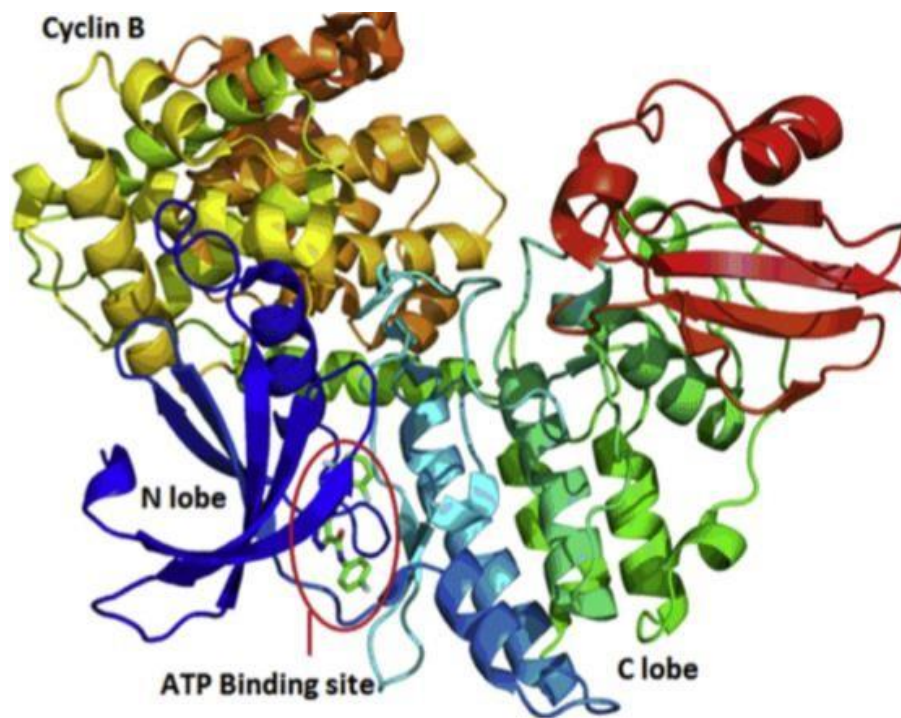


Εικόνα 3.5: 3D κρυσταλλογραφική δομή με ακτίνες X της CDK4 με την κυκλίνη D.

**Κυκλίνες E:** Οι κυκλίνες τύπου E (E1 και E2) είναι υπεύθυνες για την σύνθεση του DNA ενεργοποιώντας τις CDKs που είναι υπεύθυνες για την μετάβαση από την φάση G1 στην φάση S. Εκφράζονται αργότερα στην φάση G1 και συγκεκριμένα συνδέονται με την CDK2 και έτσι

δημιουργείται το σύμπλοκο κυκλίνης /CDK2 το οποίο είναι υπεύθυνο για την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb.

**Κυκλίνη B:** Στα κύτταρα των θηλαστικών, η κυκλίνη B συντίθεται και σχηματίζει σύμπλοκα με την CDK1 κατά την G2. Καθώς σχηματίζονται τα σύμπλοκα, η CDK1 φωσφορυλιώνεται σε δυο καθοριστικές ρυθμιστικές θέσεις μια από αυτές τις φωσφορυλίώσεις είναι απαραίτητη για την ενεργότητα κινάσης της CDK1. Η δεύτερη φωσφορυλίωση γίνεται στην τυροσίνη 15. Μαλιστα, στα κύτταρα των σπονδυλωτών συνοδεύεται από τη φωσφορυλίωση και της παρακείμενης θρεονίνης 14. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης 15, η οποία καταλύεται από μια πρωτεϊνική κινάση, καταστέλλει την ενεργότητα της CDK1, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται ανενεργά σύμπλοκα CDK1/κυκλίνης B σε όλη τη διάρκεια της G2. Στη συνέχεια, για τη μετάβαση από την G2 στην φάση M είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του συμπλόκου CDK1/κυκλίνης B, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της θρεονίνης 14 και της τυροσίνης 15 από μια πρωτεϊνική φωσφατάση. Μόλις, η πρωτεϊνική κινάση CDK1 ενεργοποιηθεί, φωσφορυλιώνει πολλαπλές πρωτεΐνες στόχους που ευθύνονται για την έναρξη των γεγονότων της φάσης M. Επιπλέον, η ενεργότητα της CDK1 πυροδοτεί την αποικοδόμηση της κυκλίνης B με πρωτεόλυση που εξαρτάται από την ουβικιτίνη. Η αποικοδόμηση της κυκλίνης B απενεργοποιεί τη CDK1, προκαλώντας έξοδο του κυττάρου από τη μίτωση, κυτταροκίνηση και επιστροφή στη μεσόφαση.



Εικόνα 3.6: 3D κρυσταλλογραφική δομή με ακτίνες X της CDK1 με την κυκλίνη B.

**Κυκλίνες A:** Οι κυκλίνες τύπου A αρχίζουν να εμφανίζονται στο τέλος της φάσης G1, κορυφώνονται στη φάση G2 και εξαφανίζονται εντελώς στην αρχή της μίτωσης. Η κυκλίνη A συνδέεται με την CDK2 στο τέλος της G1 και της S φάσης και με την CDK1 στο τέλος της S και της G2 φάσης. Αρχικά, συνδέονται με την CDK2, αντικαθιστώντας την κυκλίνη E μετά την έναρξη της φάσης S. Έπειτα, η CDK2 με σύμπλοκο που σχηματίζει με κυκλίνες τύπου A ρυθμίζει τη διέλευση από τη φάση S στην G2 και από την G2 στην M. <sup>[45],[1]</sup>

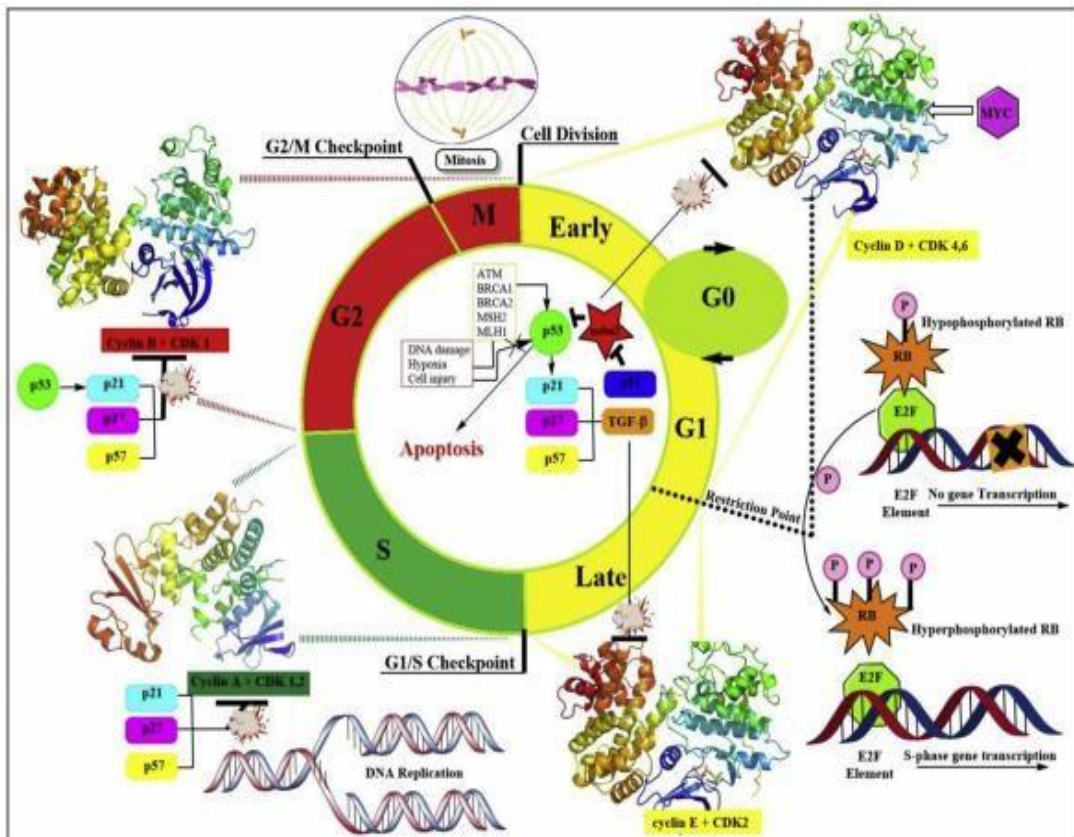
### 3.5 Ο ρόλος των CDKs στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου

Το p53, που είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής δύο σημαντικών σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου του G1/S και του G2/M, αλληλεπιδρά με την κυκλίνη B και την CDK1. Όταν το κύτταρο εισέλθει στην πρώιμη φάση G1, η οποία εξαρτάται από μιτογόνα ενεργοποιείται η κυκλίνη D, η οποία συζευγνύεται με την CDK 4 και 6.

Οι παράγοντες ανάπτυξης πρέπει να διαδραματίσουν τον ρόλο τους σε αυτό το σημείο. Από την στιγμή που η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου περνάει από το σημείο περιορισμού, τα μιτογόνα δεν απαιτούνται πλέον για την πρόοδο του. Η κυκλίνη D σε συνδυασμό με τις CDK4 και 6 προάγουν και διασφαλίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, φωσφορυλιώνοντας και επομένως αναστέλλοντας την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb), η οποία επιτρέπει τη μεταγραφή του γονιδίου της φάσης S με μεσολάβηση του E2F.



Το κύτταρο στη συνέχεια εισέρχεται στη φάση S όπου λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Το σημείο ελέγχου G1/S επιτρέπει τον έλεγχο της ακεραιότητας του DNA πριν ξεκινήσει η αντιγραφή του. Η κυκλίνη A, η CDK1 και η CDK2 διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη φάση S. Οι αναστολείς των CDK διακόπτουν έτσι την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου αναστέλλοντας τις κυκλίνες και τις CDKs. Δρουν σε πολλαπλές φάσεις στον κυτταρικό κύκλο και κυρίως στα σημεία ελέγχου G1/S και G2/M. [33]



Εικόνα 3.7: Ο ρόλος των CDKs στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. [33]

### 3.6 Μοριακοί μηχανισμοί ρύθμισης των CDKs στον κυτταρικό κύκλο

Μολονότι τα διάφορα σύμπλοκα CDK/κυκλίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες δρουν σε διαφορετικά στάδια του κυτταρικού κύκλου, η μελέτη των CDK και των κυκλίνων σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια αποκάλυψε ένα εκπληκτικό υψηλό επίπεδο πλαστικότητας. Οι έρευνες για τον ρόλο των CDKs στον κυτταρικό κύκλο δεν σταμάτησαν σε αυτό το σημείο, αλλά πυροδοτήσαν μια σειρά ερευνών που αφορούσαν τους μοριακούς μηχανισμούς από τους οποίους ελέγχεται η ενεργότητά τους. Βρέθηκε ότι οι CDKs κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ελέγχονται από τους παρακάτω μοριακούς μηχανισμούς.

Το πρώτο επίπεδο ρύθμισης βασίζεται στην σύνδεση των CDK με τις αντίστοιχες κυκλίνες τους. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός ειδικών συμπλοκών CDK/κυκλίνης ρυθμίζεται από τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των κυκλίνων.

Ο δεύτερος μηχανισμός ρύθμισης της ενεργοποίησης των συμπλοκών CDK/κυκλίνης αφορά τη φωσφορυλίωση μιας συντηρημένης θρεονίνης των CDK. Η φωσφορυλίωση αυτή καταλύεται από το ένζυμο CAK (CDK-Activating Kinase: κινάση που ενεργοποιεί τη CDK). Μάλιστα, το ίδιο ένζυμο CAK είναι σύμπλοκο που αποτελείται από μια κινάση CDK, τη CDK7, και από την κυκλίνη. Το σύμπλοκο CDK7/κυκλίνης συνδέεται με τον μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος είναι απαραίτητος για την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II.

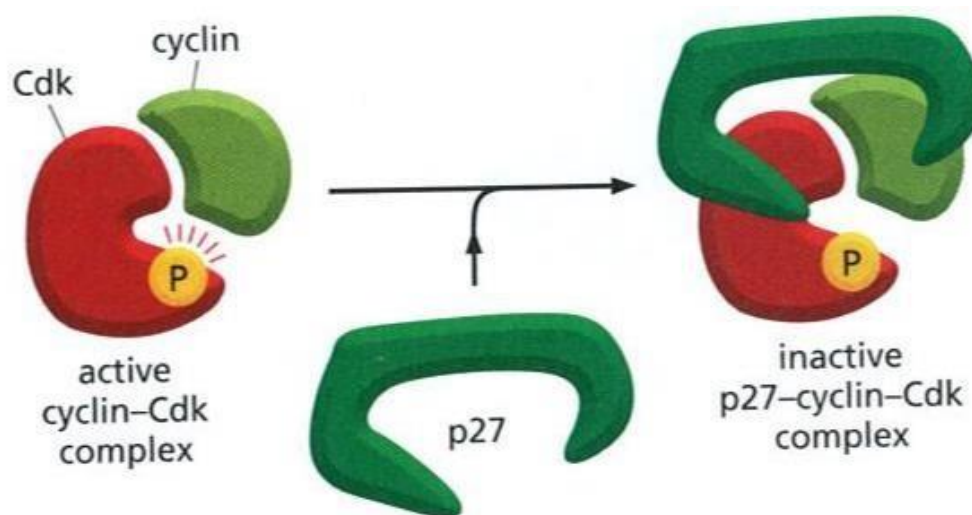
Ο τρίτος μηχανισμός ρύθμισης των CDK βασίζεται στη φωσφορυλίωση τυροσινών κοντά στο αμινοτελικό άκρο των CDK, η οποία καταλύεται από πρωτεϊνική κινάση. Σε αντίθεση από την φωσφορυλίωση από την CAK, η φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση προκαλεί την καταστολή των CDK. Συγκεκριμένα, τόσο η CDK1 και CDK2 καταστέλλονται από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης 15 (στα σπονδυλωτά καταστέλλονται και από τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 14. Αυτές οι CDK στη συνέχεια ενεργοποιούνται με αποφωσφορυλίωση των παραπάνω αμινοξέων από πρωτεϊνικές φωσφατάσες.<sup>[1]</sup>

### 3.7 Αναστολή της δραστηριότητας των CDKs

Οι αναστολείς των εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινάσες (CKIs) διαδραματίζουν βασικούς ρόλους στο συντονισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ανάπτυξη. Είναι σημαντικοί επίσης για τον έλεγχο των κρίσιμων μεταβάσεων του κυτταρικού κύκλου. Η δραστηριότητα των CKIs ελέγχεται αυστηρά μέσω του κυτταρικού κύκλου καθώς ανταποκρίνονται σε διάφορα σήματα. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τη λειτουργία των CKIs περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της μεταγραφής, της μετάφρασης και της πρωτεόλυσης.

Οι CKIs συνδέονται άμεσα με τις CDKs και επομένως αναστέλλουν τη δραστηριότητα τους. Δύο οικογένειες των CKIs έχουν ταυτοποιηθεί, οι οποίες διαφέρουν ως προς τη δομή, την εξειδίκευση και τον μηχανισμό αναστολής. Τα μέλη της οικογένειας Cip/Kip, τα οποία δεσμεύουν τις CDKs μέσω ενός διατηρούμενου N τερματικού άκρου και αναστέλλουν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από τις CDK2, CDK4 και CDK6 με κυκλίνες τύπου A, D και E. Τα

μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών INK, τα οποία περιλαμβάνουν τις p15, p16, p18 και p19 χαρακτηρίζονται από την παρουσία επαναλήψεων της ανκυρίνης και συγκεκριμένα αναστέλλουν τα σύμπλοκα CDK4 και CDK6.



Εικόνα 3.8: Αναστολή της δραστηριότητας των CDKs.<sup>[46]</sup>

### 3.8 Οι πρωτεΐνες Rb και η λειτουργία τους στον κυτταρικό κύκλο

Συνοψίζοντας λοιπόν, οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες 4 και 6 (CDK4 και CDK6), οι οποίες ενεργοποιούνται από κυκλίνες τύπου D, προάγουν μέσω της φωσφορυλίωσης της Rb (πρωτεΐνη του αμφιβληστροειδούς), τη μετάβαση από τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες για την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Έρευνες έχουν υποδείξει ότι πολλαπλά ογκογονικά σήματα στον καρκίνο του μαστού με θετικό ορμονικό υποδοχέα συγκλίνουν για να προάγουν την έκφραση της κυκλίνης D1, η οποία στην συνέχεια οδηγεί στην ενεργοποίηση των CDK4 και CDK6. Τα συμπλέγματα δραστικής κυκλίνης D-CDK4/6 φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Rb, σταματώντας την καταστολή των παραγόντων μεταγραφής E2F.

Τα κύτταρα αποφασίζουν να εισέλθουν στη φάση S ή να παραμείνουν σε κατάσταση ηρεμίας χρησιμοποιώντας μονοπάτια σηματοδότησης που συνδέουν εξωκυτταρικά σημάδια (π.χ. αυξητικούς παράγοντες) με τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Η πρόοδος μέσω της φάσης G1 ρυθμίζεται από πρωτεΐνες καταστολής όγκου του ρετινοβλαστώματος (Rbs), οι οποίες καταστέλλουν τη δραστηριότητα των παραγόντων μεταγραφής του παράγοντα δέσμευσης προαγωγέα E2 (E2F) των οποίων οι λειτουργίες απαιτούνται για τη μετάβαση από τη φάση G1

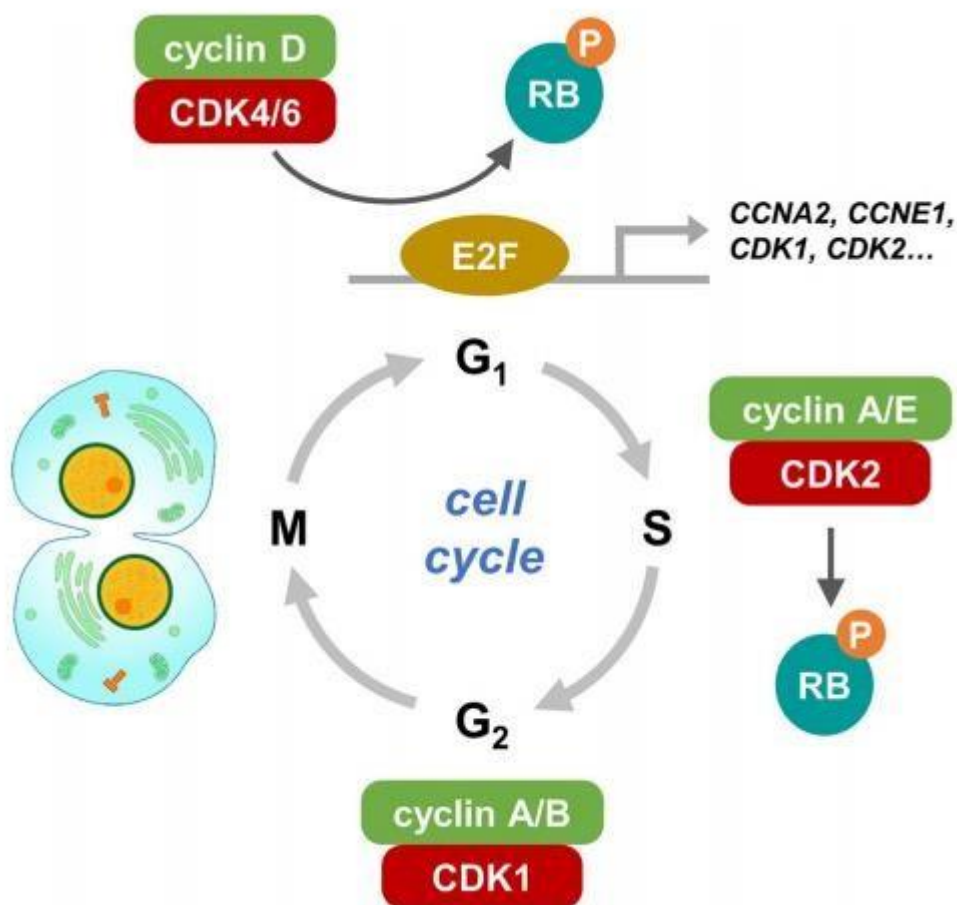


σε S. Οι πρωτεΐνες Rb είναι τα προϊόντα του γονιδίου Rb που είναι υπόδειγμα 22 ογκοκατασταλτικού γονιδίου (tumor suppressor gene), δηλαδή ενός γονιδίου του οποίου η απενεργοποίηση οδηγεί στην ανάπτυξη ενός όγκου.

Η φωσφορυλίωση της Rb με τις CDK κινάσες της φάσης G1 απελευθερώνει παράγοντες μεταγραφής E2F, προάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του DNA (π.χ. κυκλίνη A και κυκλίνη E). Οι πρωτογενείς κινάσες που φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες Rb κατά τη διάρκεια της φάσης G1 σε κύτταρα θηλαστικών είναι οι CDK4 και CDK6. Στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της (κατά την G<sub>0</sub> ή νωρίς στην G<sub>1</sub>), η Rb προσδέεται σε μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας E2F, οι οποίοι ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου που κωδικοποιεί την κυκλίνη E. Ο E2F μπορεί να προσδεθεί στις αλληλουχίες στόχους του ανεξάρτητα από την παρουσία της Rb. Ωστόσο, η Rb δρα ως καταστολέας και το Rb/E2F καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον E2F. Μελέτες έχουν δείξει ότι η οδός CDK4/6-Rb-E2F διαταράσσεται στο 90% των καρκίνων. Έτσι, τα CDK4/6 αντιπροσωπεύουν λογικούς στόχους για την ανάπτυξη μικρών μορίων για θεραπευτική παρέμβαση σε καρκίνους. Καθώς οι περισσότεροι αναστολείς συνδέονται με τη θέση σύνδεσης του ATP, η εκλεκτικότητα της κινάσης παραμένει άθικτη. Δεδομένου του σαφώς σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει η οδός Rb/E2F στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, που αντιπροσωπεύει την κρίσιμη σειρά συμβάντων που οδηγούν στην επαγωγή της αντιγραφής DNA και της φάσης S, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι οι ογκογονικές μεταλλάξεις φαίνεται να διαταράσσουν την κανονική λειτουργία της οδού. Κατ' αρχήν, χρειάζεται απλώς να απενεργοποιηθεί ένα βήμα στην ρυθμιστική οδό που σκιαγραφείται για να επιτευχθεί μια απελευθέρωση της δραστηριότητας E2F και έτσι μια απορύθμιση του κυτταρικού ελέγχου ανάπτυξης. Πράγματι, η ανάλυση ανθρώπινων καρκίνων έχει δείξει ότι οι μεταλλάξεις εντός της οδού Rb/E2F συνήθως δεν διπλασιάζονται, δηλαδή ένας όγκος που φέρει μια Rb μετάλλαξη δεν εμφανίζει γενικά μια μετάλλαξη σε ένα δεύτερο γονίδιο εντός της οδού.

Η ανάλυση ανθρώπινων όγκων αποκάλυψε ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων που μεταβάλλουν την οδό Rb/E2F. Παρόλο που η μετάλλαξη του γονιδίου Rb παρατηρήθηκε αρχικά στο κληρονομικό ρετινοβλάστωμα, είναι σαφές ότι η απώλεια της λειτουργίας Rb συνεισφέρει σε μια ευρεία σειρά ανθρώπινων καρκίνων. Πράγματι, ο ρόλος της Rb στην ανάπτυξη σποραδικών όγκων σωματικής προέλευσης είναι σημαντικά μεγαλύτερος, όσον αφορά τον αριθμό των περιπτώσεων, από τη συμβολή του Rb στους κληρονομικούς όγκους των ματιών. Οι μεταλλάξεις Rb, που είναι σύμφωνες με την απώλεια της λειτουργίας Rb, έχουν ταυτοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα όγκων, συμπεριλαμβανομένων των οστεοσαρκωμάτων, των καρκίνων μικρών κυτταρικών πνευμόνων, των καρκινωμάτων του μαστού και άλλων.

[47],[1]



Εικόνα 3.9: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από την Rb και τον E2F.<sup>[48]</sup>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>0</sup>

### 4.1 Καρκίνος

Οι διάφοροι τύποι καρκίνου αρχικά αναπτύσσονται από φυσιολογικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται εκ προθέσεως και τελικά μετατρέπονται σε κακοήθη. Αυτά τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται στη συνέχεια σε όγκους και τελικά έχουν τη δυνατότητα να μετασταθούν. Ένα κεντρικό ερώτημα στη βιολογία του καρκίνου είναι, ποια από τα κύτταρα μπορούν να μετασχηματιστούν για να σχηματίσουν όγκους. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι τα καρκινικά βλαστοκύτταρα έχουν την αποκλειστική δυνατότητα να αναγεννήσουν τους όγκους. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου έχουν πολλά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα φυσιολογικά βλαστοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της αυτοανανέωσης και της διαφοροποίησης. Με τις αυξανόμενες ενδείξεις ότι τα καρκινικά βλαστοκύτταρα υπάρχουν σε ένα ευρύ φάσμα όγκων, γίνεται ολοένα και πιο σημαντικό να κατανοήσουμε ότι οι μοριακοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την αυτοανανέωση και τη διαφοροποίηση, εμπλέκονται στα μονοπάτια που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του όγκου. Ο όρος καρκίνος λοιπόν δεν αποδίδεται σε μία και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Οι έρευνες κατέδειξαν ότι οι μοριακές βλάβες, που ευθύνονται για τον καρκίνο, διαταράσσουν τους μηχανισμούς ελέγχου των κυττάρων, μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη διαίρεση, την επιβίωση και το φυσιολογικό θάνατο, την απόπτωσή τους. Μεταλλάξεις μορίων που εμπλέκονται στις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων που εκφράζεται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και την αποφυγή της απόπτωσής τους.<sup>[49]</sup>

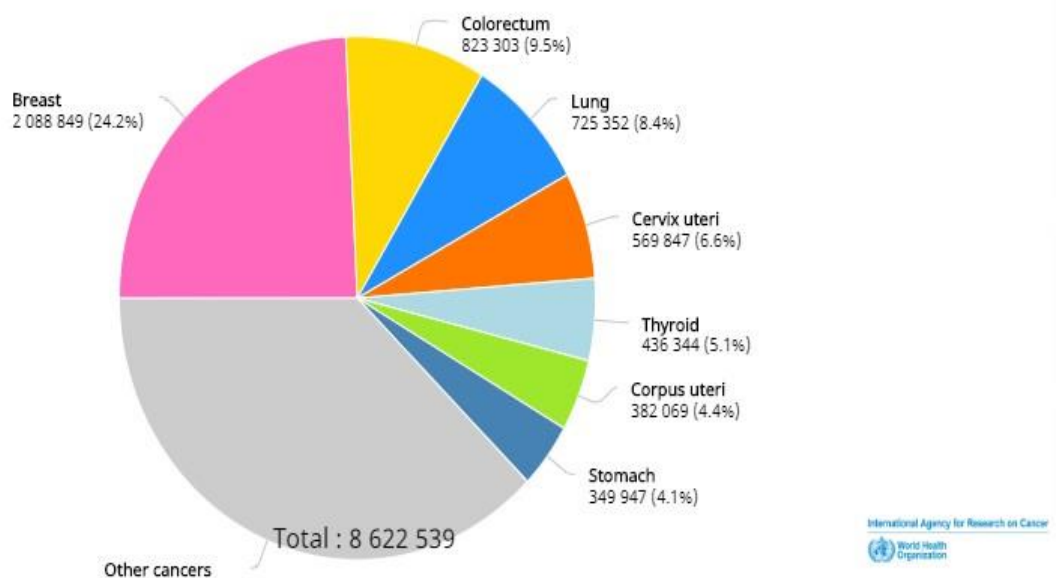
Παρά την πρόοδο στην ανίχνευση και τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού, η θνησιμότητα από αυτή τη νόσο παραμένει υψηλή επειδή οι τρέχουσες θεραπείες περιορίζονται από την εμφάνιση ανθεκτικών στη θεραπεία καρκινικών κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, ο καρκίνος τουλάχιστον του μαστού παραμένει μια ανίατη ασθένεια με τις τρέχουσες στρατηγικές θεραπείας. Ο καρκίνος πιστεύεται ότι προκύπτει από μια σειρά μεταλλάξεων που εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της γενετικής αστάθειας και από

περιβαλλοντικούς παράγοντες. Καλύτερη κατανόηση των συνεπειών αυτών των μεταλλάξεων μπορούν να οδηγήσουν σε νέες θεραπευτικές στρατηγικές.<sup>[50]</sup>

#### 4.2 Καρκίνος του μαστού και στατιστικά στοιχεία

Ο καρκίνος του μαστού είναι η συνηθέστερη κακοήθεια στις γυναίκες και ένας από τους τρεις πιο συνήθεις καρκίνους σε όλο τον κόσμο, μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα, με ετήσια επίπτωση άνω των 1,3 εκατομμυρίων, γεγονός που αντιπροσωπεύει πάνω από το 23% όλων των κακοηθειών. Αποτελεί μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου παγκοσμίως και είναι η πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων στο γυναικείο πληθυσμό. Προκαλείται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων που ως αποτέλεσμα προκαλούν το σχηματισμό κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα εξάπλωσης σε γειτονικούς ιστούς με δυσάρεστες συνέπειες για ολόκληρο τον οργανισμό, οπότε η καταπολέμησή του συνιστά σημαντική ερευνητική πρόκληση. Ο πρώιμος καρκίνος του μαστού θεωρείται δυνητικά θεραπεύσιμος. Η συμβατική χειρουργική δεν είναι η βέλτιστη επιλογή για όλους τους ασθενείς. Στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι θεραπευτικοί στόχοι είναι η παράταση της επιβίωσης διατηρώντας την ποιότητα ζωής. Οι πρόοδοι στις ενδοκρινικές θεραπείες, καθώς και η στόχευση του HER2 και η υπόσχεση των νεότερων στοχευμένων θεραπειών καθιστά την προοπτική μακροχρόνιου ελέγχου της νόσου στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού μια πραγματικότητα.<sup>[51]</sup>

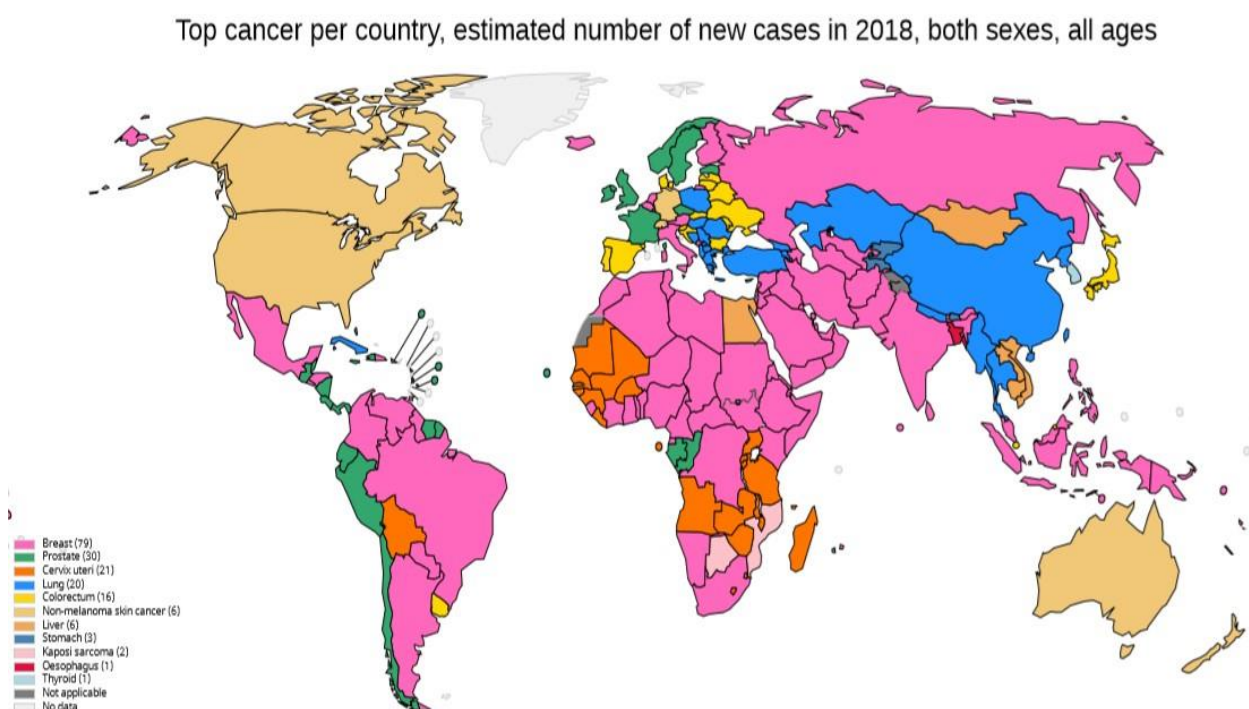
Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, females, all ages



Εικόνα 4.1: Ο αριθμός των νέων κρουσμάτων καρκίνου για το 2018, παγκοσμίως, για τις γυναίκες όλων

των ηλικιών. [52]

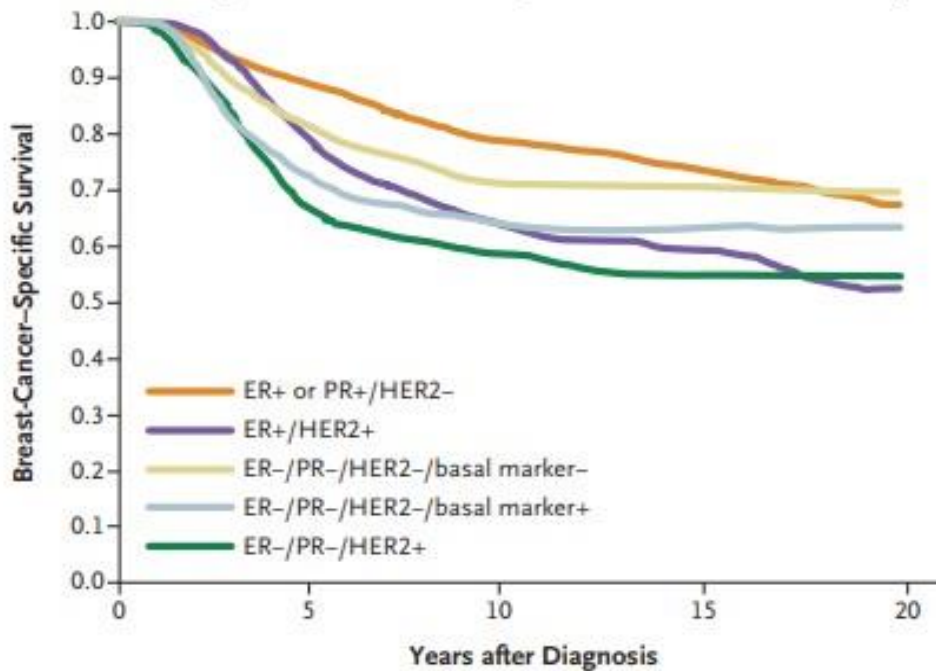
Σήμερα, οι ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού διαφέρουν ουσιαστικά από τους ασθενείς πριν από 10-20 χρόνια και είναι πιο δύσκολο να αντιμετωπιστούν, επειδή έχουν λάβει πολύ πιο ισχυρές θεραπείες. Συνεπώς, τα αποτελέσματα από τις δοκιμές θεραπείας που ξεκίνησαν πριν από αρκετά χρόνια μπορεί να μην είναι πλήρως αποτελεσματικά στους σημερινούς ασθενείς. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η έννοια του μεταστατικού καρκίνου του μαστού ως μια χρόνια ασθένεια που ελέγχεται από διαδοχικές θεραπείες για μεγάλο χρονικό διάστημα είναι ρεαλιστικά, τουλάχιστον για ορισμένες υποομάδες. [51]



Εικόνα 4.2: Οι τύποι καρκίνου με τα περισσότερα κρούσματα σε κάθε χώρα για το 2018, και για τα φύλα. [52]

Χάρη στη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που αφορούν τον μεταστατικό ή μη καρκίνο του μαστού, μελετήθηκαν και ταξινομήθηκαν οι μοριακοί υπότυποι σε κατηγορίες. Ο κάθε μοριακός υπότυπος έχει διαφορετική πρόγνωση και διαφορετική αντιμετώπιση στη θεραπεία. Οι μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού ταξινομήθηκαν ακολούθως: Luminal A (ER+ και / ή PR+), Luminal B (ER+ και / ή PR+), Luminal / HER2 (ER+ και / ή PR+ και HER2+), HER2-enriched (ER- και PR- και HER2+) και basal-like (ER- και PR- και HER2- και EGFR θετικό και / ή CK5/6 θετικό). Οι όγκοι με τριπλό αρνητικό (TN) που δεν εξέφραζαν EGFR ή CK5/6 θεωρήθηκαν ως TN non basal. [53]

**A Breast-Cancer-Specific Survival According to Immunohistochemical Subtype**



Εικόνα 4.3: Καμπύλες που αποτυπώνουν την επιβίωση από τον καρκίνο του μαστού (για κάθε υπότυπο) χρόνια μετά τη διάγνωση του. <sup>[53]</sup>

#### 4.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου του μαστού

Περίπου το 80% των καρκίνων του μαστού προκαλούνται από την απορρύθμιση των υποδοχέων οιστρογόνων, των υποδοχέων προγεστερόνης ή και των δύο. Η χημειοθεραπεία, η χειρουργική επέμβαση, η ενδοκρινική θεραπεία και η ακτινοθεραπεία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού όλα αυτά τα χρόνια. Τελευταία όμως έχουν αναπτυχθεί και άλλες θεραπείες όπως η ανοσοθεραπεία και η στοχευμένη θεραπεία που αποτελούν ερευνητικές προκλήσεις.

**Χημειοθεραπεία :** Γενικά, για τους περισσότερους ασθενείς με καρκίνο του μαστού υψηλού κινδύνου, χρησιμοποιούνται συνδυασμοί στη θεραπεία που περιλαμβάνουν κυρίως ανθρακυκλίνες. Οι συνδυασμοί χημειοθεραπείας με βάση την ανθρακυκλίνη είχαν μεγαλύτερο αντίκτυπο στη μείωση του ετήσιου ποσοστού θανάτου καρκίνου του μαστού για γυναίκες κάτω των 50 ετών (μείωση 38%) έναντι 20% για άτομα ηλικίας 50-69 ετών.

**Ενδοκρινική θεραπεία :** Οι ενδοκρινικές θεραπείες, με αναστολή των υποδοχέων ορμονών και παρεμπόδιση της οδού του ER, αποτελούν τον πυρήνα της θεραπείας για αυτού του είδους καρκίνους, θετικούς σε υποδοχείς ορμονών (HR-positive). Όμως η αποτελεσματικότητά τους περιορίζεται λόγω των υψηλών ποσοστών της υποτροπής που

εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Μόνο το 30% των ασθενών με μεταστατική νόσο έχουν αντικειμενική υποχώρηση του όγκου με αρχική ενδοκρινική θεραπεία, ενώ άλλα 20% έχουν παρατεταμένη σταθερή ασθένεια.

**Ανοσοθεραπεία :** Το Tecentriq (atezolizumab) είναι η πρώτη ανοσοθεραπεία που εγκρίθηκε για τον καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θεραπεία με atezolizumab μείωσε τον κίνδυνο πρόκλησης της νόσου ή του θανάτου (επιβίωση χωρίς εξέλιξη, PFS) σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο. Βελτίωσε επίσης τη διάμεση συνολική επιβίωση (OS). Η δραστική ουσία του Tecentriq, το atezolizumab, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, ένας τύπος πρωτεΐνης, που έχει σχεδιαστεί για να αναγνωρίζει και να προσκολλάται σε μια πρωτεΐνη που ονομάζεται «προγραμματισμένο συνδετικό θανάτου 1» (**PD-L1**), που υπάρχει στην επιφάνεια πολλών καρκινικών κυττάρων.

**Χειρουργική επέμβαση:** Η χειρουργική επέμβαση στοχεύει στην αφαίρεση του όγκου και των παρακείμενων ιστών, ώστε να ελεγχθούν και να ανιχνευθεί αν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί. Κάποιοι ασθενείς του σταδίου 2 και 3 μπορεί πριν το χειρουργείο να κάνουν χημειοθεραπεία, ώστε να συρρικνώσουν τον όγκο. <sup>[54]</sup>

**Ακτινοθεραπεία:** Η ακτινοθεραπεία είναι η προσπάθεια καταστροφής καρκινικών κυττάρων με τη βοήθεια ισχυρής ιονίζουσας ακτινοβολίας, που σήμερα παράγεται από ειδικές συσκευές υψηλής τεχνολογίας τους γραμμικούς επιταχυντές ηλεκτρονίων, ενώ παλαιότερα παραγόταν από το ραδιενεργό κοβάλτιο. Εκτός από τη βελτίωση της ποιότητας ζωής, δεν είχε αποδειχθεί μέχρι σήμερα να παρατείνει την επιβίωση των ασθενών. Τελευταίες μελέτες όμως, έχουν δείξει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, η ακτινοθεραπεία αμέσως μετά τη εγχείρηση και εφόσον γίνει με όλες τις νεότερες τεχνικές προδιαγραφές, αυξάνει την επιβίωση των ασθενών σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο. Το ραδιενεργό κοβάλτιο συνεχίζει να χρησιμοποιείται και σήμερα σε ορισμένα κέντρα, ιδιαίτερα στην ακτινοβολία των μεταστατικών εστιών. <sup>[55]</sup>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>0</sup>

### 5.1 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

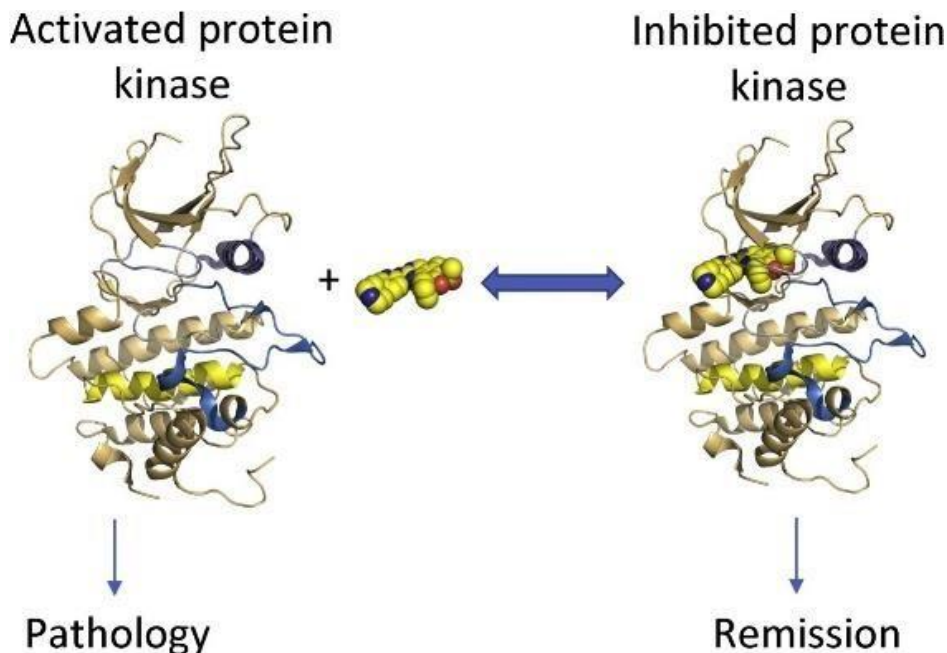
Επειδή ορισμένες γενετικές μεταβολές προκαλούνται από διάφορες μεταλλάξεις, όπως υπερέκφραση, μετατοπίσεις και δυσλειτουργία των πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες κινάσες εμπλέκονται στην παθογένεση πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων αυτοάνοσες, καρδιαγγειακές, φλεγμονώδεις και νευρικές ασθένειες καθώς και καρκίνο, αυτή η ομάδα ενζύμων έχει καταστεί ένας από τους σημαντικότερους φαρμακευτικούς στόχους τα τελευταία 20 χρόνια. Ο FDA των ΗΠΑ ενέκρινε τέσσερις μικρούς μοριακούς ανταγωνιστές πρωτεϊνικής κινάσης το 2019, το entrectinib, το erdafitinib, το pexidartinib και το fedratinib. Το Entrectinib συνδέεται με TRKA/B/C και ROS1 και συνταγογραφείται για τη θεραπεία στερεών όγκων με πρωτεΐνες σύντηξης NTRK και για ROS1-θετικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα(NLSCK). Το Erdafitinib αναστέλλει τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 1-4 και χρησιμοποιείται στην αγωγή καρκίνων ουροδόχου κύστεως. Το pexidartinib είναι ένας ανταγωνιστής CSF1R που συνταγογραφείται για τη θεραπεία του γιγαντοκυτταρικού όγκου τενοντίου. Το Fedratinib μπλοκάρει το JAK2 και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μυελοϊνώσεως. Συνολικά, ο FDA των ΗΠΑ έχει εγκρίνει 52 μικρά μόρια αναστολείς πρωτεϊνικής κινάσης, από τα οποία σχεδόν όλα είναι από του στόματος αποτελεσματικά με εξαιρέσεις το temsirolimus(το οποίο χορηγείται ενδοφλεβίως) και το netarsudil (οφθαλμική σταγόνα).

Από τα 52 εγκεκριμένα φάρμακα, 11 αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, 2 κατευθύνονται εναντίον κινασών πρωτεΐνης διπλής ειδικότητας, 11 μη υποδοχικές πρωτεΐνες τυροσίνης, ενώ 28 μπλοκάρουν υποδοχικές πρωτεΐνες τυροσίνης. Τα δεδομένα δείχνουν ότι 46 από αυτά τα φάρμακα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία νεοπλασματικών ασθενειών (8 για μη συμπαγείς όγκους, όπως λευχαιμίες και 41 για συμπαγείς όγκους συμπεριλαμβανομένων καρκίνων μαστού και πνεύμονα, μερικά και για τους δυο τύπους όγκων).

Από τα 52 εγκεκριμένα φάρμακα, χρησιμοποιούνται 17 για τη θεραπεία περισσότερων της μία νόσων. Το Imatinib, για παράδειγμα, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία 8 διαφορετικών διαταραχών. Οι πιο συνηθισμένοι στόχοι των εγκεκριμένων φαρμάκων περιλαμβάνουν την BCR-Abl, την B-Raf, υποδοχείς αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR), υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και ALK. Οι περισσότεροι ανταγωνιστές



μικρού μοριακού βάρους (49) δεσμεύονται στην κύρια περιοχή της πρωτεϊνικής κινάσης και 6 από αυτούς συνδέονται ομοιοπολικά. Σε αντίθεση, τα everolimus, temsirolimus και sirolimus είναι μεγαλύτερα μόρια ( $MW \approx 1000$ ) που δεσμεύονται με FK506 (FKBP-12) για να δημιουργήσουν ένα σύμπλοκο που αναστέλλει την (mTOR) πρωτεϊνική κινάση. Με εξαίρεση το everolimus, το sirolimus και το temsirolimus), το μέσο μοριακό βάρος των εγκεκριμένων φαρμάκων είναι 480 με εύρος 306 (ruxolitinib) έως 615 (trametinib). Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που παρουσιάζουν τα φάρμακα για τη θεραπεία κακοήθων ασθενειών είναι η σχεδόν καθολική ανάπτυξη αντίστασης σε κάθε θεραπευτική μέθοδο. Το 20-33% των προσπαθειών ανακάλυψης φαρμάκων παγκοσμίως στοχεύει την υπεροικογένεια πρωτεϊνικών κινασών. Η επιτυχία του imatinib στη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας και η έγκρισή της από τον FDA το 2001 προκάλεσε το ενδιαφέρον για τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών. Περίπου 175 από του στόματος αποτελεσματικοί αναστολείς πρωτεϊνικής κινάσης είναι σε κλινικές δοκιμές σε όλο τον κόσμο. Περίπου ένα στα 40 από όλα τα ανθρώπινα γονίδια κωδικοποιεί πρωτεϊνική κινάση (518 γονίδια πρωτεϊνικής κινάσης από ένα σύνολο 20.000 ανθρώπινων γονιδίων).



Εικόνα 5.1: Επίδραση αναστολέα σε μια παθολογική πρωτεϊνική κινάση.<sup>[56]</sup>

## 5.2 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

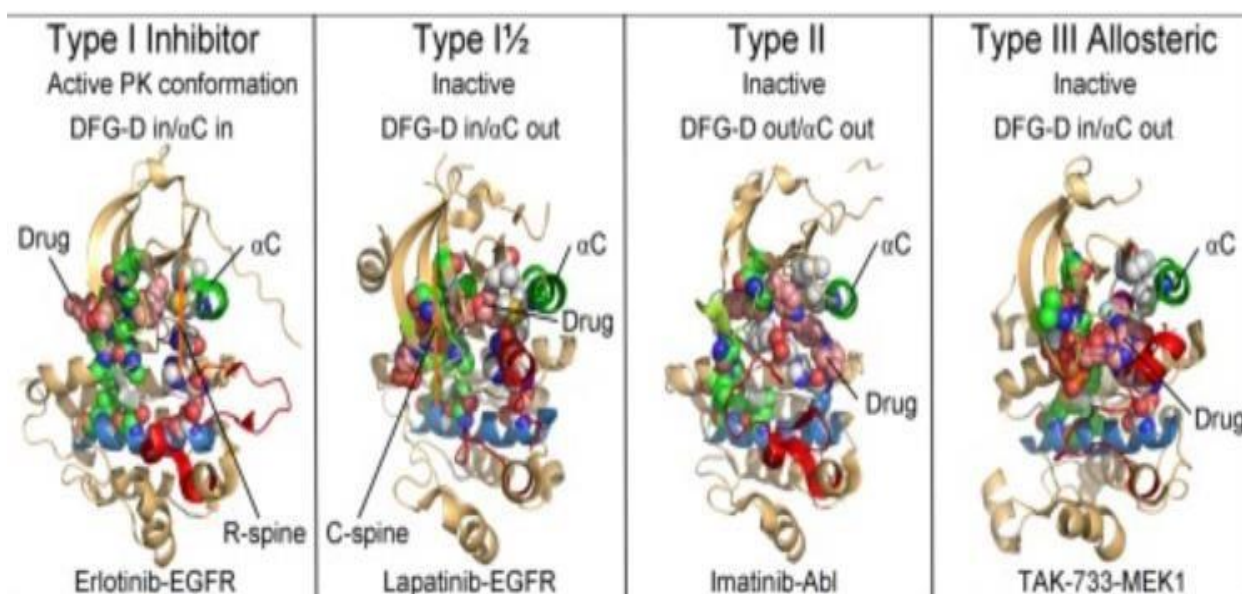
Κατά συνέπεια, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν περίπου το 2,5% όλων των ανθρώπινων γονιδίων. Ο FDA των ΗΠΑ ενέκρινε συνολικά 52 αναστολείς πρωτεϊνών κινασών μικρού μορίου βάρους μέχρι και την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου 2020. Οι Dar και Shokat ταξινόμησαν τους αναστολείς πρωτεϊνικής κινάσης σε τρεις ομάδες, τις οποίες χαρακτήρισαν ως τύπους I, II και III. Ορίστηκαν ως αναστολείς τύπου I εκείνοι που δεσμεύονται εντός και γύρω από τον θύλακα αδενίνης μιας καταλυτικά δραστηνικής πρωτεϊνικής κινάσης. Επιπλέον, όρισαν τύπο II αναστολείς αυτούς που δεσμεύονται σε μία αδρανή πρωτεϊνική κινάση DFG-Dout, ενώ οι αναστολείς τύπου III συνδέονται σε μια αλλοστερική περιοχή που δεν επικαλύπτει την αδενινική θέση σύνδεσης. Οι αλλοστερικοί αναστολείς δεσμεύονται σε μια περιοχή διακριτή από το ενεργό κέντρο, δηλαδή οι αναστολείς δεσμεύονται έξω από τον θύλακα δέσμευσης του ATP. [56]

Επιπρόσθετα, ως αναστολείς τύπου I½ ορίστηκαν από τον Zuccotto εκείνοι που προσδέονται σε μια αδρανή πρωτεϊνική κινάση με δομή DFG-Din. Στους αναστολείς τύπου I½ περιλαμβάνονται ενώσεις που συνδέονται με την περιοχή όπου συνδέεται και ο δακτύλιος της αδενίνης, όπως οι αναστολείς τύπου I, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με την περιοχή άρθρωσης. Εν συνεχεία, επεκτείνονται στην οπίσθια κοιλότητα της θέσης του ATP, προσδίδοντας ειδικές αλληλεπιδράσεις με υπολείμματα, όμοιες με αυτές που εμπλέκονται στους τύπου II αναστολείς. Ως εκ τούτου, η κινάση κατά τη δέσμευση ενός αναστολέα τύπου I½ έχει διαμόρφωση DFG-Din και αC-out. [57], [58]

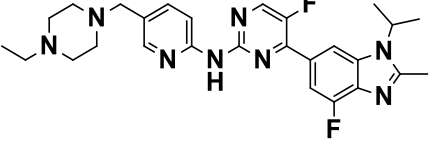
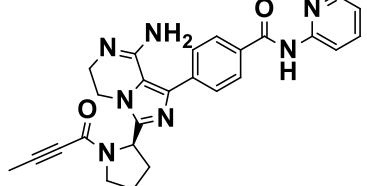
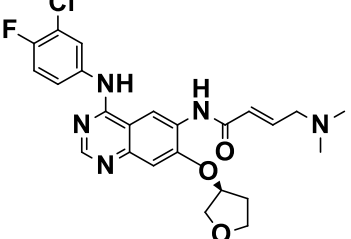
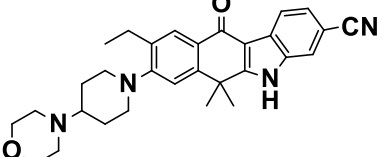
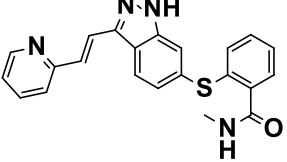
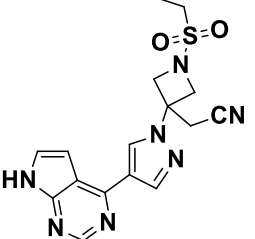

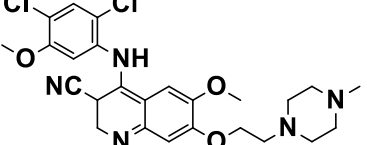
Άλλη μια δυνατότητα κατάταξης του συνόλου των αναστολέων αυτής της κατηγορίας είναι η επιμέρους κατάταξή τους σε αναστολείς τύπου I½ A και I½ B. Ως αναστολείς τύπου A ορίζονται όσοι δεσμεύονται στην πρόσθια σχισμή, στην οπίσθια σχισμή και κοντά στα υπολείμματα πύλης (gatekeeper residues). Όλα εμφανίζονται στην περιοχή που χωρίζει το μικρό και το μεγάλο λοβό της πρωτεϊνικής κινάσης. Οι αναστολείς τύπου B είναι αυτοί που δεσμεύονται στην πρόσθια περιοχή σχισμής και την πύλη, αλλά δεν εκτείνονται στο οπίσθιο τμήμα. Μια ανάλυση περιορισμένων διαθέσιμων δεδομένων φανερώνει ότι οι αναστολείς τύπου A έχουν μεγάλο χρόνο παραμονής (λεπτά έως ώρες), ενώ οι αναστολείς τύπου B έχουν μικρό χρόνο παραμονής (δευτερόλεπτα έως λεπτά).

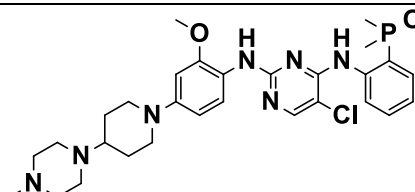
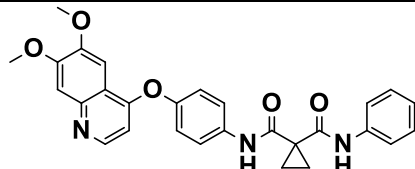
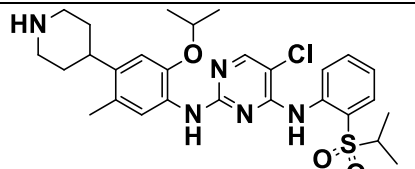
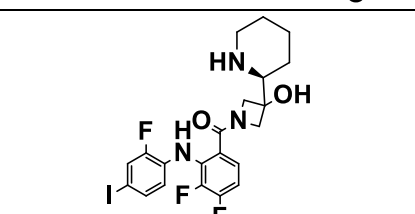
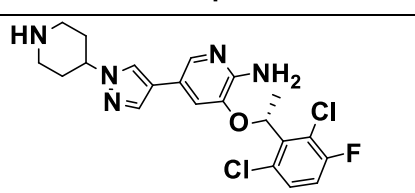
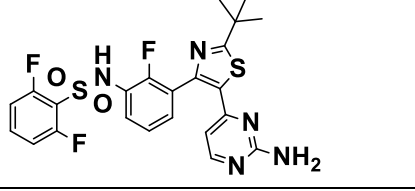
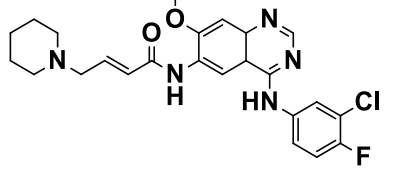
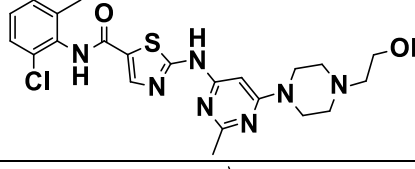
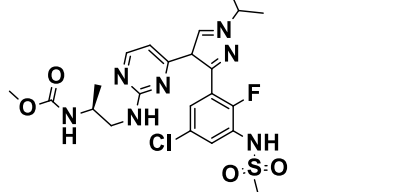
Αργότερα, ο Gavrin και ο Saiah διαίρεσαν τους αλλοστερικούς αναστολείς στους τύπους III και IV. Οι αναστολείς τύπου III δεσμεύονται εντός μιας βαθιάς σχισμής που διαχωρίζει τους αμινοτερματικούς και καρβοξυτερματικούς λοβούς, αλλά ανεξάρτητα από τη θέση δέσμευσης ATP. Αντίθετα, οι αναστολείς τύπου IV δεσμεύονται εκτός της σχισμής. Επιπλέον, οι Lambda και Gosh ορίζουν παράγοντες που καλύπτουν δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεϊνικής κινάσης ως τύπου V ή δισθενείς αναστολείς.

Για παράδειγμα, ένας υποκαταστάτης που δεσμεύεται με τον θύλακα πρόσδεσης αδενίνης και την περιοχή SH<sub>2</sub> της Src θα ταξινομούταν ως ένας αναστολέας τύπου V. Τέλος, ταξινομήθηκαν ως αναστολείς τύπου VI εκείνες οι ενώσεις που σχηματίζουν έναν ομοιοπολικό δεσμό με το στοχευόμενο ένζυμο. Για παράδειγμα, το afatinib είναι ένας αναστολέας τύπου VI που δεσμεύεται ομοιοπολικά με τον μεταλλαγμένο EGFR και συνταγογραφείται για τη θεραπεία του NSCLC. <sup>[56]</sup>

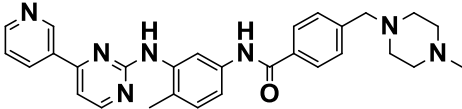
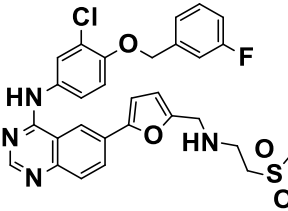
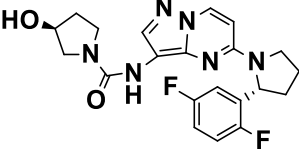
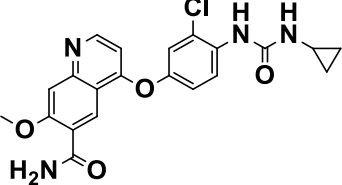
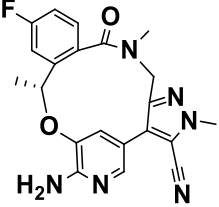
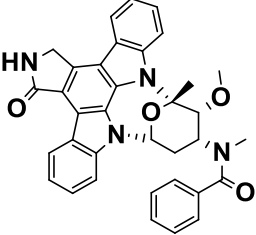
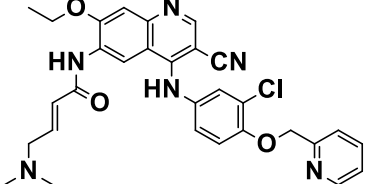
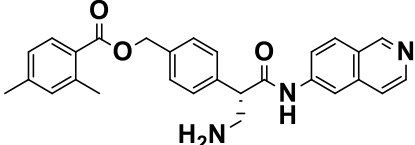


Εικόνα 5.2: Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσεων ανάλογα με τη θέση πρόσδεσης. <sup>[59]</sup>

Αναστολείς	Έτος έγκρισης από τον FDA/τύπος αναστολέα	Συντακτικοί τύποι αναστολέων	Θεραπευτικοί Στόχοι
Abemaciclib (LY2835219) Verzenio	2017 I <sup>1/2</sup> B		Συνδυαστική θεραπεία με (i) αναστολέα αρωματάσης ή με (ii)fulvestrant ή ως μονοθεραπεία για τον καρκίνο στο στήθος
Acalabrutinib (ACP-196) Calquence	2017 VI		Λεμφώματα μανδύα, CLL, SLL
Afinitinib (BIBW 2992) Tovok	2013 VI		Μη μικροκυτταρικό Καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC)
Alectinib (CH5424802) Alecensa	2015 I <sup>1/2</sup> B		ALK <sup>+</sup> Μη μικροκυτταρικό Καρκίνο του πνεύμονα(NSCLC)
Axitinib (AG013736) Inlyta	2012 IIA		Καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων(RCC)
Baricitinib (LY 3009104) Olmiant	2018 I		Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Binimetinib (MEK162) Mektovi	2018		Συνδυαστική θεραπεία με encorafenib για μελανώματα BRAF <sup>V600E</sup> / K
Bosutinib (SKI606) Bosulif	2012 I, IIB		Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML) με θετικό το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph <sup>+</sup> )

Brigatinib (AP 26113) Alunbrig	2017 I		Ανθεκτικό σε Crizotinib ALK <sup>+</sup> NSCLC
Cabozantinib (BMS-907351) Cometriq	2012 IIA		Καρκίνος του θυροειδούς, RCC, HCC
Ceritinib (LDK378) Zykadia	2014 I <sup>1/2</sup> B		ALK <sup>+</sup> NSCLC ανθεκτικό σε crizotinib
Cobimetinib (GDC0973) Cotellic	2015 III		BRAF <sup>V600E/K</sup> μελάνωμα σε συνδυασμό με vemurafenib
Crizotinib (PF 2341066) Xalkori	2011 I, I <sup>1/2</sup> B		ALK ή ROS1-θετικό NSCLC
Dabrafenib (GSK2118436) Tafinlar	2013 I <sup>1/2</sup> A		BRAF <sup>V600E/K</sup> μελάνωμα, BRAF <sup>V600E</sup> NSCLC, BRAF <sup>V600E</sup> αναπλαστικοί καρκίνοι του θυροειδούς
Dacomitinib (PF00299804) Visimpro	2018 VI		EGFR μεταλλαγμένο NSCLC
Dasatinib (BMS354825) Sprycell	2006 I		Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML)
Encorafenib (LGX818) Braftovi	2018 I		Συνδυασμός θεραπείας με binimetinib για BRAF <sup>V600E/K</sup> μελανώματα



<p>Imatinib (STI571) Gleevec</p>	<p>2001 I, IIA</p>		<p>Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML) με θετικό το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph<sup>+</sup>), υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο, GIST, συστηματική μαστοκυττάρωση, επηρεμένο δερματοϊνοσάρκωμα, μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο</p>
<p>Lapatinib (GW572016) Tykerb</p>	<p>2007 I<sup>1/2</sup> A</p>		<p>HER2- θετικοί καρκίνοι του μαστού</p>
<p>Larotrectinib (LOXO-101) Vitrakvi</p>	<p>2018</p>		<p>όγκοι με NTRK πρωτεΐνες σύντηξης</p>
<p>Lenvatinib (AK175809) Lenvima</p>	<p>2015 I<sup>1/2</sup> A</p>		<p>Διαφοροποιημένοι καρκίνοι του θυρεοειδούς</p>
<p>Lorlatinib (PF06463922) Lorbrena</p>	<p>2018</p>		<p>ALK<sup>+</sup> NSCLC</p>
<p>Midostaurin (CPG 41251) Rydapt</p>	<p>2017</p>		<p>AML, μαστοκυττάρωση, λευχαιμίες μαστοκυττάρων</p>
<p>Neratinib (HKI272) Nerlynx</p>	<p>2017 I<sup>1/2</sup> A</p>		<p>HER2-θετικοί καρκίνοι του μαστού</p>
<p>Netarsudil (AR11324) Rhopressa</p>	<p>2018</p>		<p>Γλαύκωμα</p>

Nilotinib (AMN107) Tasigna	2007 <b>IIA</b>		Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML) με θετικό το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph <sup>+</sup> )
Nintedanib (BIBF1120) Vargatef	2014 <b>IIB</b>		Ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση
Osimertinib (AZD9292) Tagrisso	2015		Μη μικροκυτταρικό Καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC)
Palbociclib (PD0332991) Ibrance	2015 <b>I, I<sup>1/2</sup> B</b>		Θετικό για τους Υποδοχείς Οιστρογόνων και Θετικό ErbB2/HER2 Καρκίνο του Μαστού
Pazopanib (GW786034) Votrient	2009		σαρκώματα μαλακού ιστού, Καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων(RCC)
Pexidartinib (PLX3397) Turalio	2019		γίγαντοκυτταρικός όγκος τενοντίου
Ponatinib (AP 24534) Iclusig	2012 <b>IIA</b>		Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML) με θετικό το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια (Ph <sup>+</sup> )ή ALL
Regorafenib (GSK2118436) Tafinlar	2012 <b>IIA</b>		Καρκίνοι του παχέος εντέρου
R406	2018		Χρόνια ανοσοποιητική θρομβοπενία



Ribociclib (LEE011) Kisqali	2017 I <sup>1/2</sup> B		Συνδυαστική θεραπεία με αναστολέα αρωματάσης για καρκίνου του μαστού
Ruxolitinib (INCB018424) Jakaf	2011 I		Μυελοϊνωση, αληθής πολυκυτταραιμία
Sorafenib (BAY 43-9006) Nexavar	2005 IIA		HCC, Καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων(RCC)
Sunitinib (SU11248) Sutent	2006 I <sup>1/2</sup> B, IIB		GIST,παγκρεατικοί νευροενδοκρινικοί όγκοι, Καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων(RCC)
Temsirolimus (CCI-779) Torisel	2007 IV		Καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων(RCC)
Tofacitinib (CP690550) Tasocitinib	2012 I		Ρευματοειδή αρθρίτιδα, Ψωριασική αρθρίτιδα και Ελκώδη κολίτιδα
Trametinib (GSK1120212) Mekinist	2013 III		BRAF <sup>V600E/K</sup> μελανώματα, BRAF <sup>V600E</sup> NSCLC
Vandetanib (ZD6474) Zactima	2011 I		Μυελοειδής καρκίνου του θυρεοειδούς
Vemurafenib (PLX-4032) Zelboraf	2011 I <sup>1/2</sup> A		BRAF <sup>V600E</sup> μελανώματα

*Πίνακας 5.1: Εγκεκριμένοι αναστολείς από τον FDA, τύπος αναστολέα, συντακτικοί τύποι αναστολέων, θεραπευτικός στόχος.<sup>[56]</sup>*

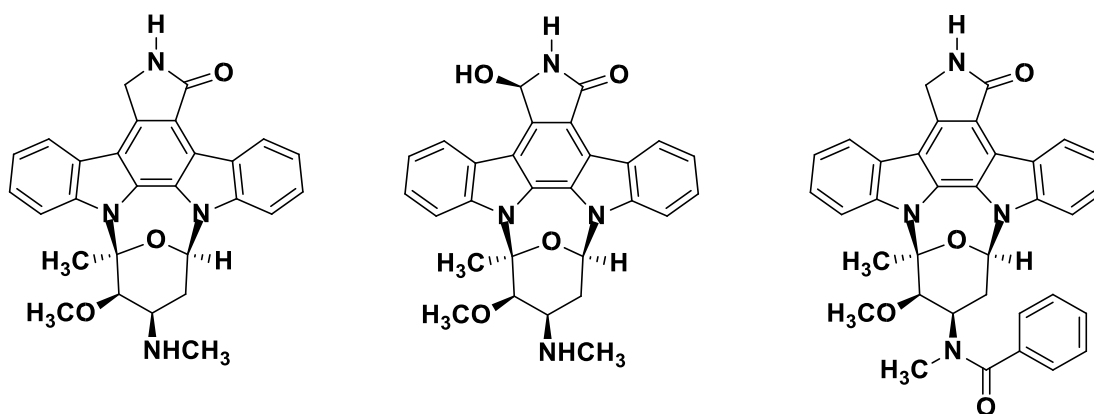
## 5.3 CDK αναστολείς

### 5.3.1 Πρώτη γενιά CDK αναστολέων

Οι CDK αναστολείς που ανταγωνίζονται τη θέση δέσμησης του ATP μπορούν να χωριστούν σε δύο διαφορετικές ομάδες ανάλογα με την εκλεκτικότητά τους. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους μη ειδικούς αναστολείς κινάσης, οι οποίοι μπορούν και μπλοκάρουν τις CDK και άλλες κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν δραστικές ενώσεις όπως η σταυροσπορίνη και το ανάλογό της UCN01. Η δεύτερη ομάδα είναι πιο περίπλοκη όσον αφορά τη δομή. Περιλαμβάνει εκλεκτικούς αναστολείς CDK που δεσμεύουν άλλες υποομάδες αυτής της οικογένειας με ισοδύναμο τρόπο (για παράδειγμα, η φλαβοπυριδόλη) και εκείνες που δείχνουν ισχυρή προτίμηση για μία από αυτές τις ομάδες.

Η **σταυροσπορίνη**, ένας μεταβολίτης από το *Streptomyces* sp., είναι ένα από τα λίγα παραδείγματα φυσικών προϊόντων που δρουν ως ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς.

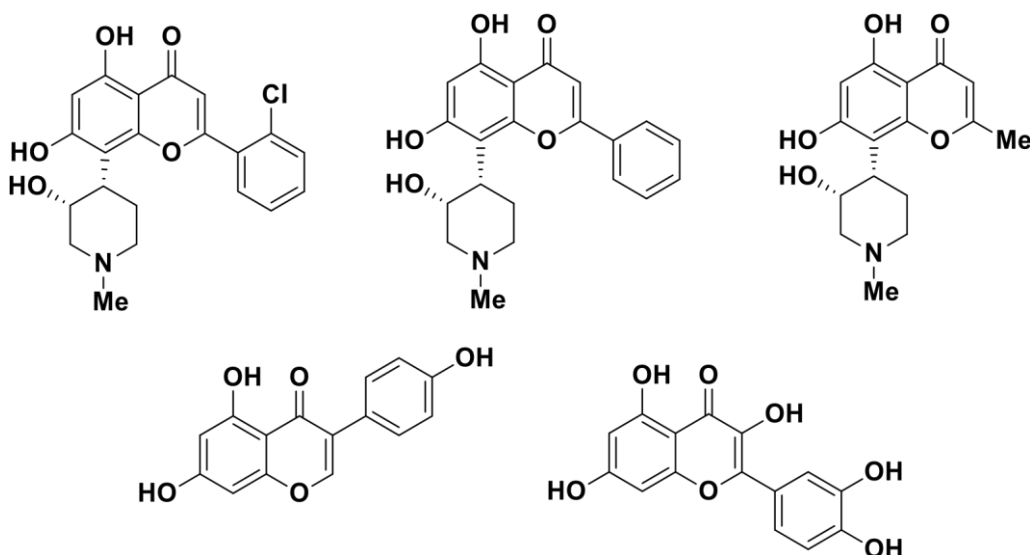
Η ινδολο [2,3-*a*] καρβαζόλη ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μια πολύ ισχυρή ένωση ( $IC_{50} = 1$  nM) σε ανάλογη μελέτη αναστολέων για κινάσες PKC. Περαιτέρω έρευνες αποδεικνύουν ότι η σταυροσπορίνη είναι ένας μη ειδικός αναστολέας που μπλοκάρει επίσης την κυκλίνη B/CDK1 με τιμή  $IC_{50}=3,2$  nM. Η έλλειψη μεγάλης εκλεκτικότητας της σταυροσπορίνης μπορεί να εξηγηθεί από την εξέταση των κρυσταλλικών δομών της σταυροσπορίνης σε διαφορετικά σύμπλοκα ενζύμων-αναστολέων. Παρόλα αυτά, το ετεροκυκλικό σύστημα δακτυλίου της σταυροσπορίνης είναι σχεδόν σύμφωνο με την αδενυλική ομάδα του ATP, η λακτάμη αναπαράγει τους ίδιους δεσμούς υδρογόνου, όπως το υπόλειμμα αδενίνης στο ένζυμο, έτσι και η ομάδα N-γλυκοζυλίου συνδέεται στην θέση της ριβόζης. Η δομική ανάλυση και η σύγκριση με άλλα ανάλογα δείχνουν τη σημασία των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεγάλη συγγένεια που παρουσιάζει ο αναστολέας με το ένζυμο. Παρά τη μικρή εκλεκτικότητα, η σταυροσπορίνη αποτελεί το πρότυπο δομής για την ανάπτυξη αναστολέων των PKC. Μερικά από αυτά τα ανάλογα, όπως UCN-01 (2,7-υδροξυσταυροσπορίνη  $IC_{50}$  (PKC) = 6,9 nM) και CGP 41251(3, N-βενζοξυσταυροσπορίνη  $IC_{50}$  (PKC) = 50 nM), παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες έναντι διαφορετικών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων σειρών.



Σχήμα 5.1: Η δομή των ενώσεων της σταυροσπορίνης, της 2,7-υδροξυσταυροσπορίνης και της 3,N-βενζοξυσταυροσπορίνης.

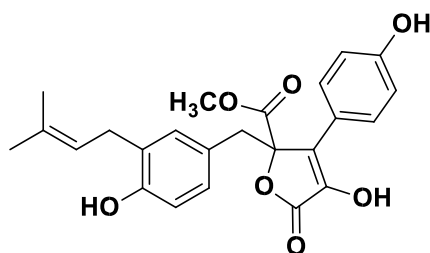
Η **φλαβοπυριδόλη** και η αποχλωροφλαβοπυριδόλη είναι ανάλογα της αλκαλοειδούς ένωσης Rohitukine .Η φλαβοπυριδόλη καθώς και δομικά ανάλογα φλαβονών, γενισταμίνη και κερκετίνη, εμφανίζουν ανασταλτικές και κυτταροτοξικές ιδιότητες έναντι πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών, είναι δε ο πρώτος CDK αναστολέας που εισήλθε σε κλινικές δοκιμές.

Η φλαβοπυριδόλη αναγνωρίστηκε αρχικά ως μικρομοριακός αναστολέας για διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες, όπως για παράδειγμα για τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες RTKs ( $IC_{50} = 21-25 \mu M$ ) και άλλες. Η φλαβοπυριδόλη παρουσιάζει μέτρια εκλεκτικότητα, όπως για παράδειγμα κυκλίνη D/CDK4 (20-40 nM), κυκλίνη D/CDK6 (60 nM) και κυκλίνη B/CDK1 (30-40 nM) σε σύγκριση με κυκλίνη A/CDK2, κυκλίνη E/CDK2 (100 nM) και κυκλίνη H /CDK7 (100-300 nM). Περαιτέρω έρευνες απέδειξαν ότι η φλαβοπυριδόλη προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 ή G2 / M, η οποία αντιστοιχεί στην ικανότητά της να μπλοκάρει τις CDK1 και CDK2.



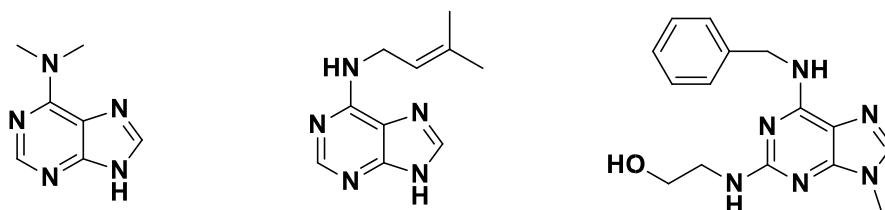
Σχήμα 5.2: Η δομή των ενώσεων της φλαβοπυριδόλης, της dechloroflavoripridol, Rohitukine, genistein και quercetin.

Η δραστική ένωση που απομονώθηκε από το στέλεχος του μύκητα *Aspergillus terreus* αναγνωρίστηκε ως μεταβολίτης **βουτυρολακτόνη I**, η οποία είναι ικανή να μπλοκάρει την CDK1 ( $IC_{50} = 0,68 \text{ mM}$ ) και την CDK2 ( $IC_{50} = 0,82 \text{ mM}$ ). Η ένωση αυτή μπορεί επίσης να αποτρέψει την πλήρη φωσφορυλίωση του pRb και της ιστόνης H1.



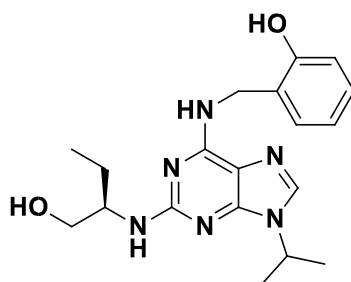
Σχήμα 5.3: Η δομή της Βουτυρολακτόνης-I.

Η πρώτη ουσία που ήταν γνωστή ως αναστολέας CDK ήταν **6-διμεθυλαμινοπουρίνη**. Αυτή η ένωση ήταν αρχικά σχεδιασμένη ως ανάλογο πουρομυκίνης με σκοπό τη διακοπή βιοσύνθεσης πρωτεΐνης. Η 6-διμεθυλαμινοπουρίνη προκάλεσε αντιθέτως, την αναστολή της μίτωσης σε ωκύτταρα αχινού χωρίς όμως να μπλοκάρει τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Τελικά, βρέθηκε ότι η 6-διμεθυλαμινοπουρίνη αναστέλλει την CDK1 ( $IC_{50} = 120 \text{ }\mu\text{M}$ ). Άλλα ανάλογα πουρινών βρέθηκαν αργότερα όπως η Ισοπεντενυλαδενίνη ( $IC_{50} = 55 \text{ }\mu\text{M}$ ) και η Ολομυκίνη. Τα ανάλογα αυτά βρέθηκαν μέσω *in vitro* πειραμάτων, είναι δε πιο ισχυροί και εκλεκτικοί αναστολείς από την 6-διμεθυλαμινοπουρίνη. Η Ολομυκίνη εμφάνισε σημαντική εκλεκτικότητα για τις CDK1/2 ( $IC_{50} = 7 \text{ }\mu\text{M}$ ) και CDK5 ( $IC_{50} = 3 \text{ }\mu\text{M}$ ) σε σχέση με τις CDK4/6 καθώς και άλλες κινάσες, όπως π.χ PKC. Οι ενώσεις αυτές αποτέλεσαν ενώσεις-οδηγούς για την ανεύρεση επιπλέον αναλόγων ενώσεων των 2,6,9-τριϋποκατεστημένων πουρινών.



Σχήμα 5.4: Η δομή των ενώσεων της 6-διμεθυλαμινοπουρίνης, της ισοπεντενυλαδενίνης και της ολομυκίνης.

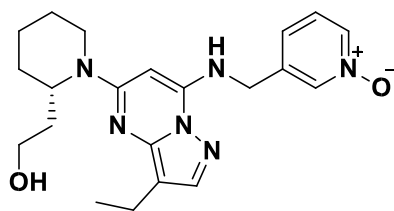
Η **(R)-Ροσκοβιτίνη**, έδειξε το ίδιο προφίλ εκλεκτικότητας, αλλά ήταν 10 φορές πιο δραστική στην αναστολή της CDK1. Η (R)-Ροσκοβιτίνη αναστέλλει τις CDK1/κυκλίνη B ( $IC_{50} = 450$  nM), CDK2/κυκλίνη A ( $IC_{50} = 700$  nM), CDK2/κυκλίνη E ( $IC_{50} = 700$  nM) και CDK5/p35 ( $IC_{50} = 160$  nM). Η (R)-Ροσκοβιτίνη ήταν η δεύτερη ένωση μετά τη Φλαβοπιριδόλη που εισήλθε σε κλινικές μελέτες. Όμως, παρά τις προκλινικές επιτυχίες αυτών των δύο αναστολέων, οι διάφορες κλινικές δοκιμές συνεχίζονται χωρίς ιδιαίτερα υποσχόμενα αποτελέσματα.



Σχήμα 5.5: Η δομή της (R)-Ροσκοβιτίνης.

### 5.3.2 Αναστολείς CDK δεύτερης γενιάς

Το **Dinaciclib** (MK7965, SCH727965) σχεδιάστηκε από την εταιρία Merck και είναι ανάλογο πυρραζολο[1,5-a]πυριμιδίνης, το οποίο δρα ως ισχυρός αναστολέας των CDK1 ( $IC_{50} = 3$  nM), CDK2 ( $IC_{50} = 1$  nM), CDK5 ( $IC_{50} = 1$  nM) και CDK9 ( $IC_{50} = 4$  nM) 12. Έχει βρεθεί ότι το Dinaciclib αναστέλλει τη μεταγραφή του DNA σε καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών και επιπλέον αναστέλλει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb σε κύτταρα προκαλώντας την απόπτωση τους.

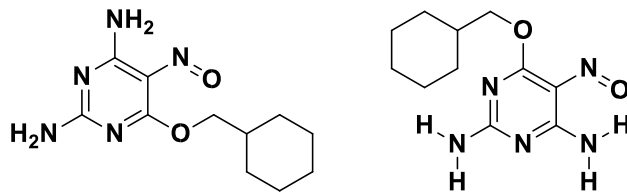


Σχήμα 5.6: Η δομή του Dinaciclib.

Εισήλθε σε κλινικές δοκιμές ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για τη θεραπεία διάφορων κακοηθειών, όπως είναι η οξεία μυελογενής αναιμία, λεμφώματα, μελανώματα, ο καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού. Επίσης, μελετήθηκε η χρήση του στη θεραπεία του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού, καθώς και των προχωρημένων όγκων.

Οι περισσότερες από αυτές τις κλινικές δοκιμές απέτυχαν διότι η μείωση της εξέλιξης της νόσου ήταν ασύμμαντη, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίσθηκε και τοξικότητα .

Η **πυριμιδίνη NU6027** σχεδιάστηκε ως ανάλογο με βάση την πουρίνη. Εκτός από την CDK4 ( $IC_{50} = 1,5 \text{ mM}$ ) και CDK6 ( $IC_{50} = 5,6 \text{ mM}$ ), μπλοκάρει επίσης το CDK5 ( $IC_{50} = 25 \text{ mM}$ ). Μέχρι σήμερα έχουν συντεθεί πολλές υποκατεστημένες φαινυλαμινο-πυριμιδίνες με υψηλή εκλεκτικότητα. Το ενδιαφέρον αυτού του ετεροκυκλικού δακτυλίου έγκειται στο γεγονός ότι μιμείται το δακτύλιο της αδερίνης του ATP, με αποτέλεσμα αυτό το φαρμακοφόρο να υπάρχει σε πολλούς αναστολείς κινασών. Το ανάλογο πυριμιδίνης μπορεί και αναστέλλει τη φωσφορυλίωση pRb, προκαλεί δε διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε pRb κύτταρα κατά τη φάση G1.



Σχήμα 5.7: Η ένωση NU6027 αποτελεί παράδειγμα CDK2 αναστολέας ο οποίος αναπτύχθηκε μέσω δομικών βελτιστοποιήσεων της ένωσης NU2058. Αριστερά η ένωση NU6027 και δεξιά η ένωση NU2058.

Η εταιρία Astex με τη χρήση κρυσταλλογραφικών δεδομένων ακτίνων Χ της CDK2 έκανε έρευνα για την ανακάλυψη νέων ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που θα στοχεύουν την CDK2. Η πρώτη ένωση που ανακαλύφθηκε ήταν το **ινδαζόλιο**. Η βελτιστοποίηση της δομής του ινδαζολίου οδήγησε και σε πιο σύνθετα ανάλογα. <sup>[60]</sup>

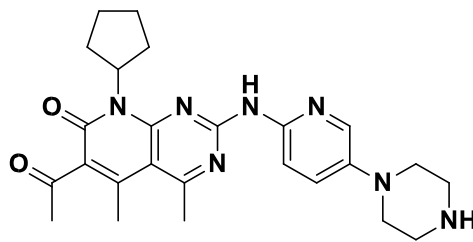
### 5.3.3 Αναστολείς CDK τρίτης γενιάς

Πιο πρόσφατα, αναστολείς ειδικοί για CDK4 και CDK6 έχουν εισαχθεί σε κλινικές δοκιμές. Αυτοί οι εκλεκτικοί αναστολείς ελευθερώνουν τη δραστικότητα της CDK2, αποφεύγοντας την αναστολή της γενικής δραστηριότητας της φάσης S. Τρεις εκλεκτικοί αναστολείς CDK4/6 βρίσκονται σε κλινική ανάπτυξη: το **Ribociclib** (LEE011, Novartis), το **Palbociclib** (Ibrance®, PD0332991, Pfizer) και το **Abemaciclib** (LY-2835219, Eli Lilly). Το Palbociclib σε συνδυασμό με τη λετροζόλη, ή το fulvestrant, έχει αποδείξει αποτελεσματικότητα σε

ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού HR + και έχει εγκριθεί στις ΗΠΑ και την Ευρώπη για χρήση.

#### 5.4 Το Palbociclib και οι αλληλεπιδράσεις του με την CDK6

Ο πρώτος αναστολέας CDK τρίτης γενιάς, το Palbociclib (Ibrance, Pfizer), εγκρίθηκε τον Φεβρουάριο του 2015 για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας των CDK4/D1 ( $IC_{50} = 11$  nM), CDK4/D3 ( $IC_{50} = 9$  nM) και CDK6/D2 ( $IC_{50} = 15$  nM). Το Palbociclib είναι μια ένωση πυριδινοπυριμιδίνης που φέρει πλευρική αλυσίδα πυριδινοπυραζίνης.



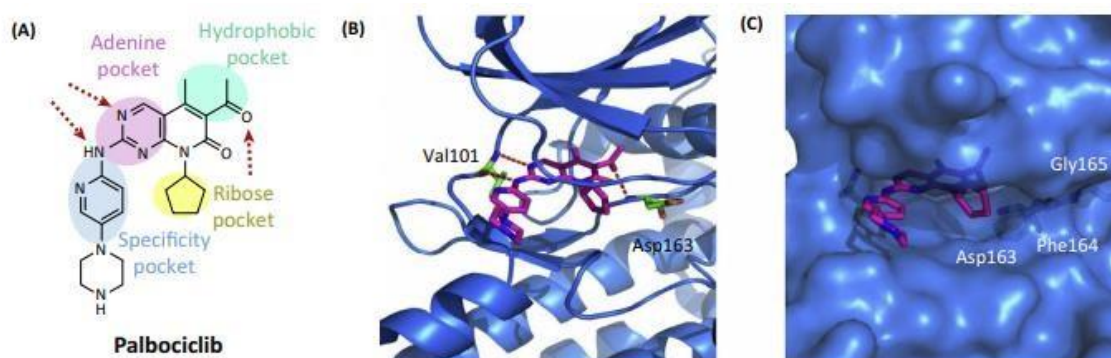
Σχήμα 5.8: Η δομή του Palbociclib.

Ύστερα από μελέτη του PFS, δηλαδή το χρονικό διάστημα στο οποίο δεν παρατηρείται περαιτέρω ανάπτυξη ή μετάσταση του όγκου κατά την διάρκεια θεραπείας και έπειτα, ήταν 10,2 μήνες για τους ασθενείς που έπαιρναν μόνο Λετροζόλη και 20,2 μήνες για τους ασθενείς που έπαιρναν Λετροζόλη μαζί με Palbociclib. Ένα χρόνο αργότερα, το Palbociclib έλαβε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία δεύτερης γραμμής HR+, HER2- καρκίνου του μαστού σε συνδυασμό με Φουλβεστράντη (Fulvestrant), έναν ανταγωνιστή του οιστρογονικού υποδοχέα. Στη μελέτη αυτή το PFS ήταν 9,2 μήνες για τους ασθενείς που λάμβαναν το συνδυασμό Palbociclib-Fulvestrant, ενώ για τους ασθενείς που λάμβαναν Fulvestrant μαζί με το εικονικό φάρμακο ήταν 3,8 μήνες.

Η συγκρυσταλλική δομή του Palbociclib με την CDK6 έδειξε έναν τρόπο δέσμευσης κατά την οποία σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της Hinge περιοχής της Val101 και το τμήμα της αμινοπυριμιδίνης και μεταξύ του υπολείμματος DFG Asp163 και την 6- COCH<sub>3</sub> ομάδα. Οι ομάδες 5-CH<sub>3</sub> και 6-COCH<sub>3</sub> σχηματίζουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τον θύλακα δέσμευσης του ATP και ο δακτύλιος της πιπεραζίνης έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη. Συνολικά, το Palbociclib δεσμεύεται σφιχτά με την CDK6 και υιοθετεί έναν σχετικά άκαμπτο



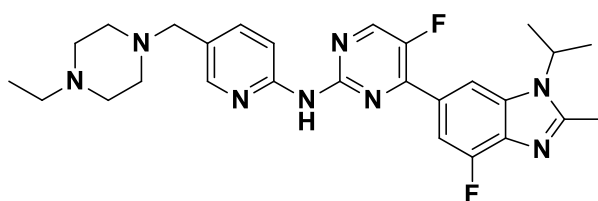
προσανατολισμό σε σύγκριση με άλλους αναστολείς CDK λόγω των προηγούμενων δεσμευτικών χαρακτηριστικών που αναφέρθηκαν. [59]



Εικόνα 5.4: **(A)** Χημική δομή του Palbociclib και ο απεικονιζόμενος τρόπος δέσμευσής του με CDK6. **(B,C)** Η δομή συγκρουστάλλωσης του Palbociclib με την CDK6. [61]

### 5.5 Το Abemaciclib και οι αλληλεπιδράσεις του με την CDK6

Το Abemaciclib (Verzenio, LY2835219) είναι ο τελευταίος βιοδιαθέσιμος αναστολέας CDK4/6 που εγκρίθηκε. Καταστέλλει τη φωσφορυλίωση Rb προκαλώντας τον κυτταρικό κύκλο να σταματήσει στη φάση G1 και είναι μια ένωση φαινυλοπυριμιδίνης που δομικά σχετίζεται με το Palbociclib και το Ribociclib. Το φάρμακο εγκρίθηκε το 2017 και ενδείκνυται για τη θεραπεία του HR-positive/ HER<sub>2</sub>-προχωρημένου ή μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε συνδυασμό με το Fulvestrant. Αναπτύχθηκε από την εταιρία Eli Lilly και αναστέλλει εκλεκτικά τις κινάσες CDK4/D1 (IC<sub>50</sub> = 2 nM) και CDK6/D1 (IC<sub>50</sub> = 10 nM). Έχει αποδειχτεί επίσης ότι το Abemaciclib είναι ο λιγότερο εκλεκτικός αναστολέας από τους τρεις .

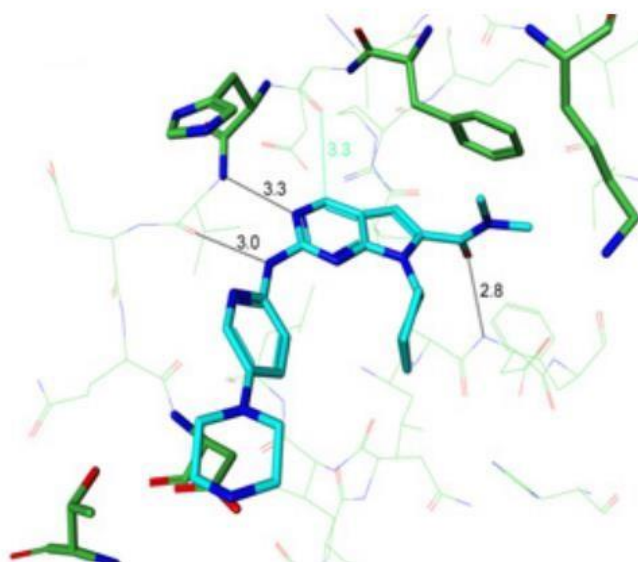


Σχήμα 5.9 : Η δομή του Abemaciclib.

Το Abemaciclib έχει δείξει αποτελεσματικότητα ως μεμονωμένο φάρμακο. Σε συνδυασμό με ενδοκρινικές θεραπείες σε ασθενείς με HR-positive έχει εισέλθει στην κλινική φάση III, σύμφωνα με την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Στην κλινική μελέτη MONARCH-2, οι ασθενείς που λάμβαναν το Abemaciclib σε συνδυασμό με Fulvestrant είχαν

κατά μέσο όρο PFS 16,4 μήνες σε σχέση με τους ασθενείς που λάμβαναν Fulvestrant μαζί με το εικονικό φάρμακο, οι οποίοι είχαν κατά μέσο όρο PFS 9,3 μήνες.

Εντούτοις, το Abemaciclib φαίνεται να δεσμεύεται πιο εύκολα στο ATP και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με καταλυτικό υπόλειμμα τη λυσίνη 43 (Lys43) που διατηρείται ανάμεσα στις κινάσες, υποδηλώνοντας ότι δεσμεύεται με λιγότερη εκλεκτικότητα από ότι το Ribociclib και το Palbociclib. Η κρυσταλλογραφική δομή του Abemaciclib με την CDK6 καταδεικνύει επίσης την ύπαρξη δύο δεσμών υδρογόνου μέσω της 2-αμινοπυριδινικής ομάδας στον θύλακα δέσμησης του ATP, καθώς και την ύπαρξη ενός μορίου νερού το οποίο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το άτομο αζώτου του πυριδινικού δακτύλιου και την γειτονική αμινομάδα.<sup>[62],[63],[64]</sup>



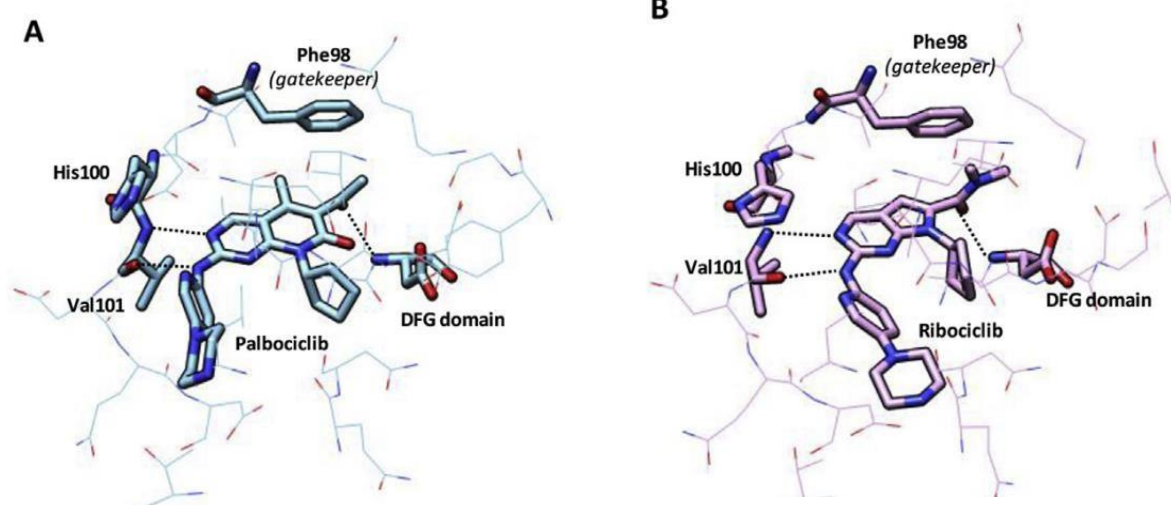
Εικόνα 5.5: Οι αλληλεπιδράσεις του Abemaciclib με την CDK6.<sup>[65]</sup>

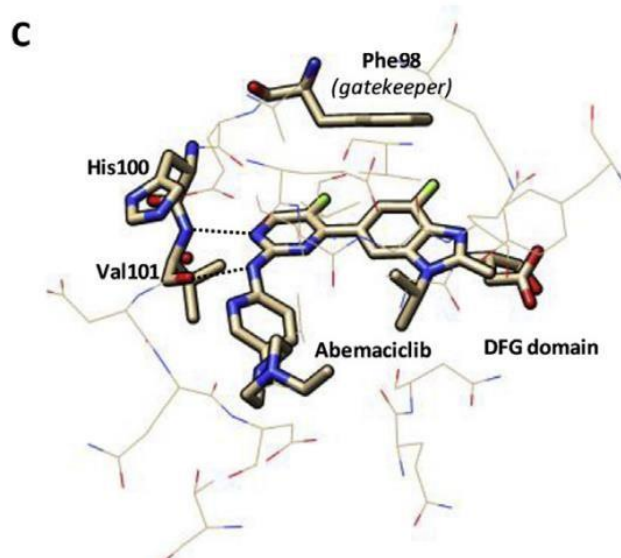
### 5.6 Σύγκριση των Abemaciclib, Palbociclib και Ribociclib

Η επίδραση στην ανθρώπινη φυσιολογία των φαρμάκων αυτών είναι επίσης διαφορετική. Το Palbociclib εμφανίζει κυρίως τοξικότητα στο μυελό των οστών (65% ουδετεροπενία, 23% λευκοπενία, 7% αναιμία), με μικρή τοξικότητα στο γαστρεντερικό (GI) 7% συνδυασμένη διάρροια/εμετό/ναυτία. Αντίθετα, το Abemaciclib έχει διάχυτη τοξικότητα GI (ναυτία 57%, εμετό 40%, διάρροια 68%, κόπωση 18%), καθώς και τοξικότητα του μυελού των οστών (ουδετεροπενία 40%, θρομβοπενία 32%, λευκοπενία 28%, αναιμία 18%). Μια άλλη διαφορά είναι τα ανεκτά χρονοδιαγράμματα δοσολογίας. Το Palbociclib και το Ribociclib χορηγούνται με διαλείμματα (3 εβδομάδες, 1 εβδομάδα) ενώ ο εμβολιασμός γίνεται συνεχώς. Συνολικά,

τα κλινικά προφίλ των φαρμάκων τρίτης γενεάς υποδηλώνουν ότι επηρεάζουν τη βιολογία του ασθενούς με μοναδικούς τρόπους. Το Ribociclib και το Palbociclib φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη λιποφιλικότητα και μεγαλύτερες πλευρικές αλυσίδες από το Abemaciclib. Τα Ribociclib, Palbociclib και Abemaciclib παρουσιάζουν ποικίλες τιμές μισής μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ( $IC_{50}$ ) σε σχέση με διαφορετικά σύμπλοκα CDK- και μη-CDK κυκλίνης σε βιοχημικές αναλύσεις.

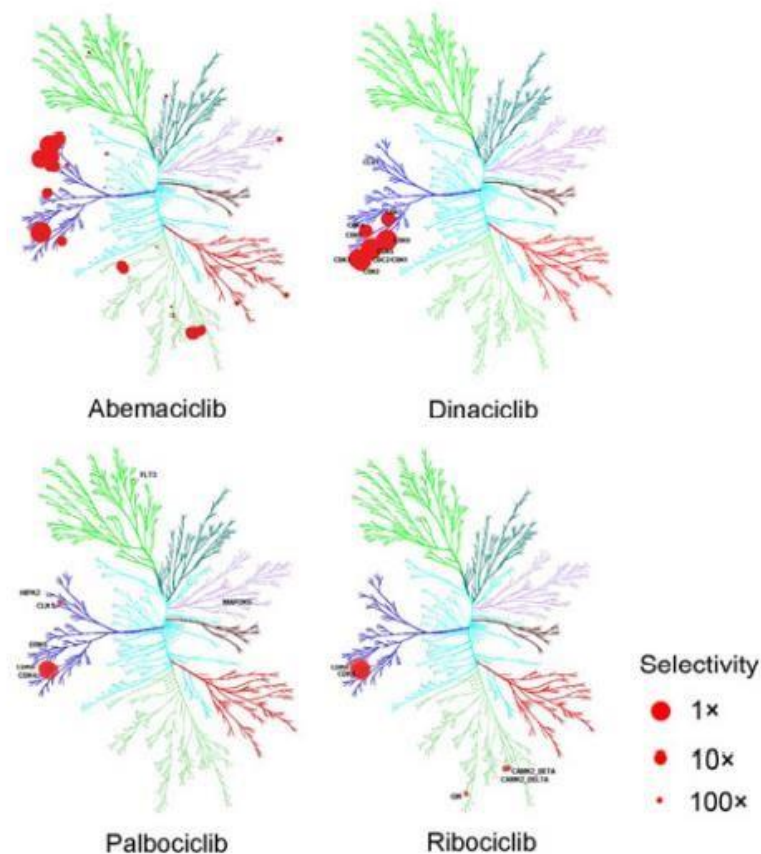
Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις των τριών αναστολέων με την CDK6 παρατηρείται ότι ένας δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ της Lys43 και του Abemaciclib, ο οποίος όμως δεν σχηματίζεται με τους άλλους αναστολείς. Οι αλληλεπιδράσεις με τα καταλυτικά αμινοξέα αναμένεται να μειώσουν την εκλεκτικότητα της κινάσης. Άλλη μια διαφορά οφείλεται στο γεγονός ότι το Abemaciclib εισχωρεί στο υδρόφοβο κανάλι πιο εύκολα μέσω των δύο ατόμων φθορίου, από την πλευρά της περιοχής δέσμευσης του ATP, ενώ το Palbociclib και το Ribociclib φέρουν αρκετά πιο ογκώδεις ομάδες (το Ribociclib την αμιδική ομάδα, ενώ στο Palbociclib τη μεθυλοκετόνη και τη γειτονική μεθυλομάδα), οι οποίες είναι πιο δύσκολο να αλληλεπιδράσουν με άλλες κινάσες.<sup>[66]</sup>





Εικόνα 5.6: Συγκριτικά οι αλληλεπιδράσεις του *Palbociclib*, *Ribociclib* και *Abemaciclib* με την CDK6.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε μία μελέτη της δραστηριότητας του αναστολέα CDK4/6 σε κυτταρικές σειρές καρκινώματος πνεύμονα και δείγματα πρωτοπαθούς όγκου, βρέθηκε ότι το *Ribociclib* ήταν σημαντικά πιο εκλεκτικό έναντι της CDK4 και της CDK6 από ότι το *Palbociclib*).<sup>[66]</sup>



Εικόνα 5.7: Η εκλεκτικότητα των CDK4/6 αναστολέων Abemaciclib, Dinaciclib, Palbociclib και Ribociclib. [65]

### 5.7 Τα χαρακτηριστικά και οι κλινικές μελέτες του Ribociclib

Το **Ribociclib(LEE011)** είναι ένας εκλεκτικός βιοδιαθέσιμος αναστολέας των CDK4( $IC_{50} = 10$  nM) και CDK6( $IC_{50} = 39$  nM), ο οποίος εγκρίθηκε από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) τον Μάρτιο του 2017, με την εμπορική ονομασία Kisqali, εμποδίζοντας έτσι την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και προκαλώντας τη διακοπή φάσης G1.

Αναπτύχθηκε από την Novartis και την Astex Pharmaceuticals για τη θεραπεία HR-θετικών, HER2-αρνητικών προχωρημένων ή μεταστατικών καρκίνων του μαστού σε συνδυασμό με έναν αναστολέα αρωματάσης (όπως η λετροζόλη). Στον καρκίνο, η αναστολή της οδού κυκλίνης D-CDK4/6-p16-Rb αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική, τόσο για την θεραπεία του HR θετικού προχωρημένου καρκίνου του μαστού ασθενών στους οποίους η ασθένεια προχώρησε, ενώ έλαβαν ενδοκρινική θεραπεία, όσο και για πολλά είδη καρκίνου. Ουσιαστικά, ο ρόλος του Ribociclib είναι η αναστολή της φωσφορυλίωσης της Rb πρωτεΐνης, που είναι προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου του Rb. Απουσία του φαρμάκου, η φωσφορυλίωση επάγεται από τις CDK4 και CDK6. Παρουσία του φαρμάκου, η δράση των

CDK4/6 αναστέλλεται, καθώς δρα ανταγωνιστικά με το ATP με αποτέλεσμα να προσδένεται στη θέση του, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Η υψηλή επιλεκτικότητα του μάλιστα το καθιστά ένα σημαντικό φάρμακο για στοχευμένες θεραπείες και έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την κλινική δραστηριότητα των υφισταμένων αντικαρκινικών θεραπειών και καθυστερεί την ανάπτυξη αντοχής στην αγωγή χωρίς να αυξάνει σημαντικά την τοξικότητα.

Το Ribociclib εμφάνισε αντικαρκινική δράση σε προκλινικές και κλινικές μελέτες μιας ευρείας ποικιλίας τύπων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του μελανώματος και του νευροβλαστώματος. Ένα δισκίο Ribociclib σε συνδυασμό με τον αναστολέα αρωματάσης (letrozole) εγκρίθηκε στις ΗΠΑ τον Μάρτιο του 2017 για τη θεραπεία μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με HR-θετικό υποδοχέα ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) - αρνητικό προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Το Ribociclib πρέπει να συγχορηγείται με λετροζόλη 2,5 mg μία φορά ημερησίως χορηγούμενη συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου των 28 ημερών και υποβάλλεται σε περαιτέρω έρευνες φάσης III παγκοσμίως για τον καρκίνο του μαστού. Σε κλινική μελέτη φάσης III (MONALEESA-2) το Ribociclib αύξησε δραματικά το PFS. Για τους ασθενείς που λαμβάνουν λετροζόλη μαζί με το εικονικό φάρμακο, το PFS είναι 16 μήνες κατά μέσο όρο, ενώ για τους ασθενείς που λαμβάνουν λετροζόλη μαζί με το Ribociclib, το PFS είναι 25 μήνες, σύμφωνα με τα δεδομένα της ανάλυσης μέχρι και το 2017.

Εξετάζεται επίσης στις δοκιμές φάσης I και II για διάφορους τύπους συμπαγών όγκων και αιματολογικές κακοήθειες. Η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη του όγκου ήταν 25 μήνες με το Ribociclib σε σύγκριση με 16 μήνες με το εικονικό φάρμακο, το δε ποσοστό ανταπόκρισης ήταν σημαντικά υψηλότερο 51% έναντι 36%. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι το Ribociclib εμφανίζει μεγαλύτερη ανασταλτικότητα και εκλεκτικότητα έναντι των πρωτεϊνών CDK4/6 και καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε σχέση με τους υπόλοιπους αναστολείς CDK4/6, το Pablociclib, και το Amemaciclib. Οι κυριότερες παρενέργειες που έχουν παρατηρηθεί από τη χορήγηση Ribociclib είναι ουδετεροπενία, αναιμία, ναυτία, διάρροια και αλωπεκία.

Επιπλέον, κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το Ribociclib σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για τη θεραπεία και άλλων ειδών καρκίνου εμφανίζουν τα παρακάτω θετικά αποτελέσματα:

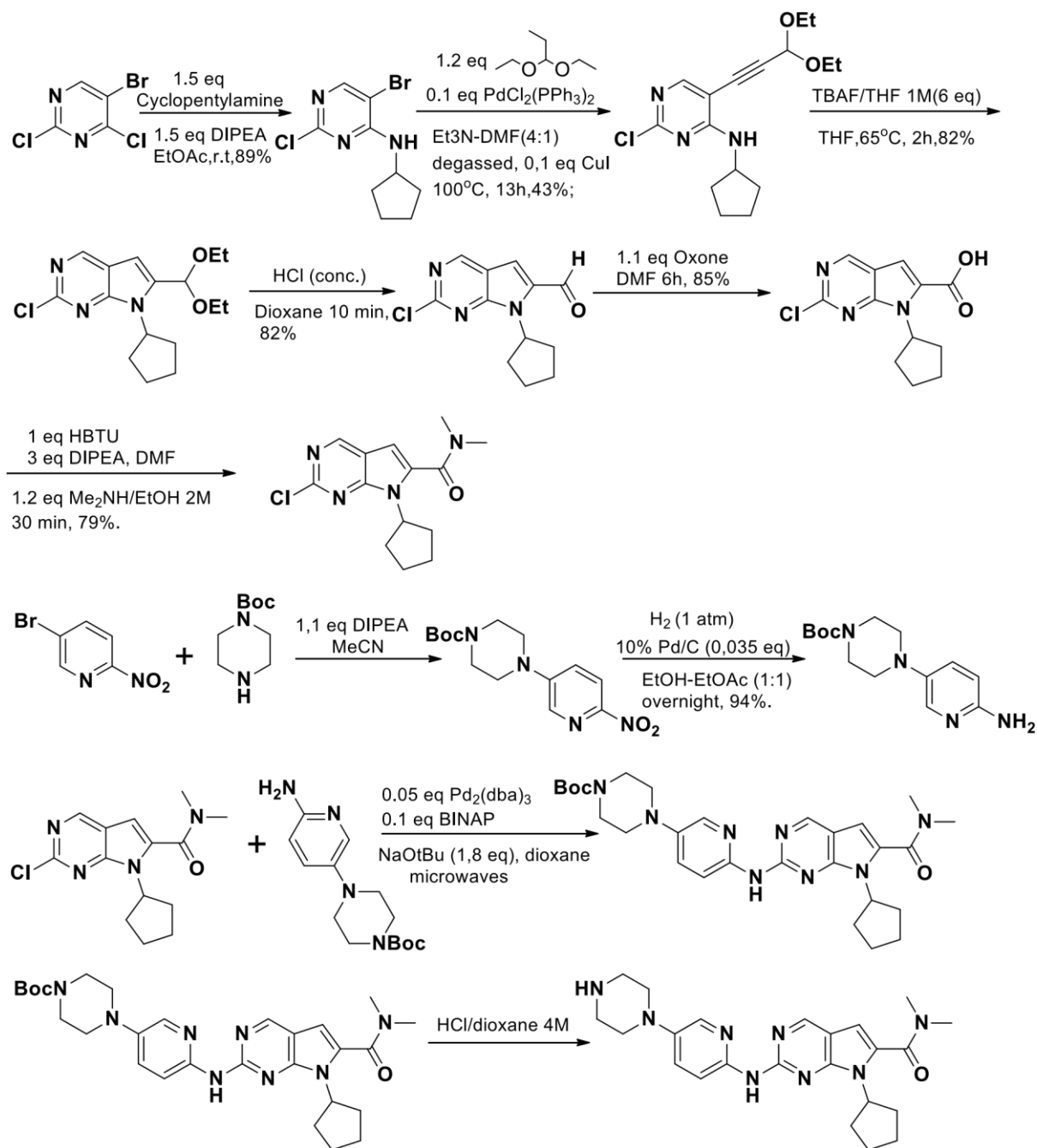
- το Ribociclib με το **Everolimus**, που είναι ανταγωνιστής του mTOR, σε ασθενείς με ER+, HER2- με προχωρημένο καρκίνο μαστού,

- το Ribociclib με το **Encorafenib**, ανταγωνιστής του B-Raf, σε ασθενείς με μελάνωμα,
- το Ribociclib με το **Paclitaxel**, σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού(Rb+)
- το Ribociclib με το **Enzalutamide**, σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του προστάτη(Rb+)
- Ribociclib με το **Ceritinib**, αναστολέας της ALK, σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα
- Ribociclib με το **Ruxolitinib**, αναστολέας της κινάσης Janus, σε ασθενείς με μυελοϊνώματωση
- Ribociclib με το **Tamoxifen**, αγωνιστής οιστρογονικού υποδοχέα, ασθενείς με ER+, σε ασθενείς με HER2- προχωρημένο καρκίνο μαστού
- Ribociclib με το **Letrozole**, αναστολέας αρωματάσης, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με ER+, HER2- προχωρημένο καρκίνο μαστού ή με υποτροπιάζοντα ER+ καρκίνο των ωοθηκών, των σαλπίνγων, πρωτογενή περιτοναϊκό ή καρκίνο του ενδομητρίου
- Ribociclib με το **Fulvestrant**, σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού
- Ribociclib με το **Trastuzumab**, μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι EGFR2/HER2, σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικός HER2+ καρκίνο του μαστού
- Ribociclib με το **Everolimus** και το **Exemestane**, αναστολέας αρωματάσης, ασθενείς με ER+, HER2- προχωρημένο καρκίνο μαστού <sup>[5],[8],[66],[67]</sup>



## 5.8 Συνθετική πορεία του Ribociclib

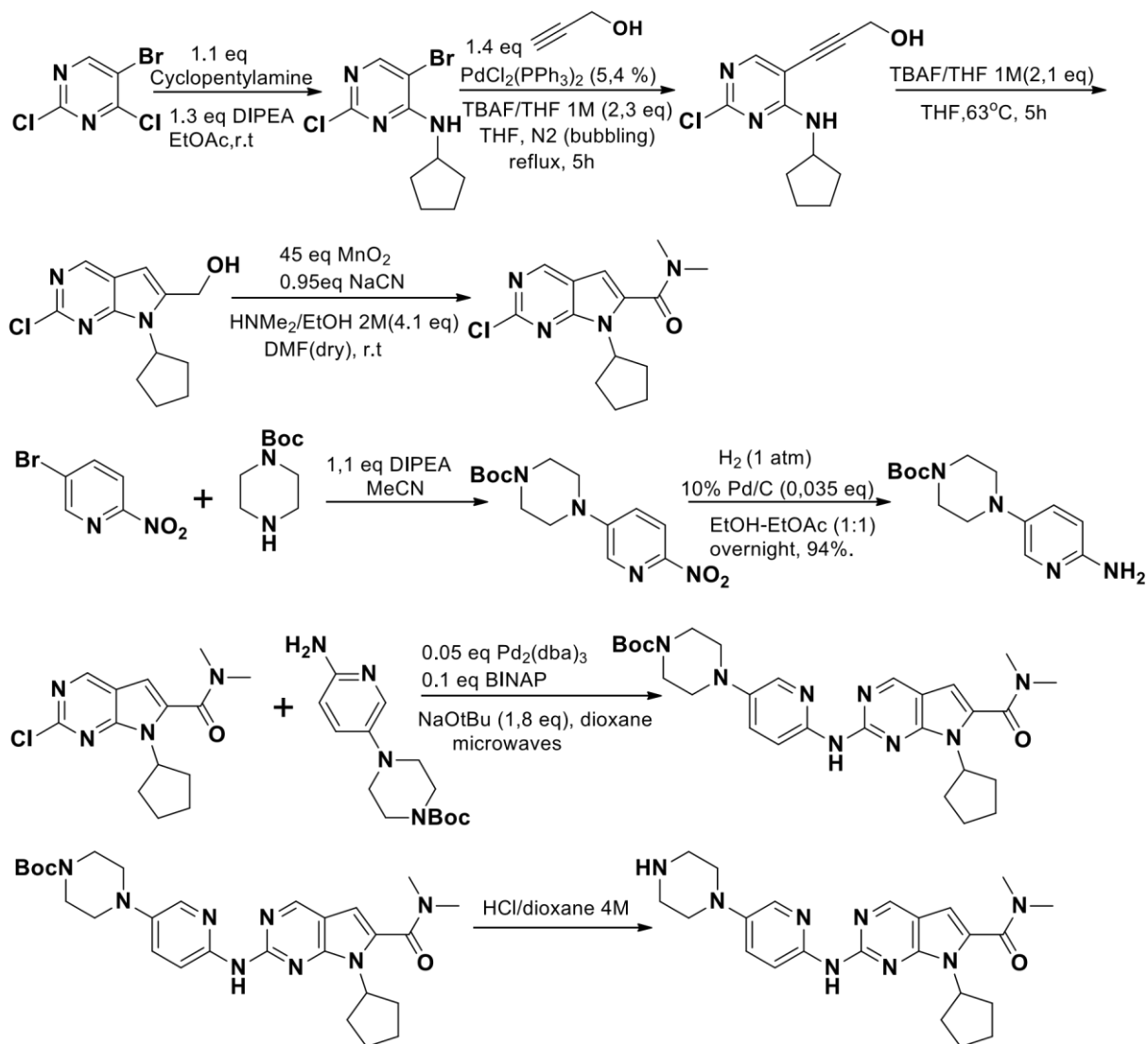
Η πρώτη πατέντα που κυκλοφόρησε από την εταιρία Novartis ήταν το 2010. Σύμφωνα με την πατέντα WO2010020675 η ενδιάμεση χλωροπυριμιδίνη συντίθεται με μετατροπή της ακετάλης σε αλδεΐδη, οξείδωση αλδεΐδης σε οξύ και σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Το Ribociclib προκύπτει τελικά μέσω μιας αντίδρασης σύζευξης Buchwald Hartwig της χλωροπυριμιδίνης και της αμινοπυριδίνης και τέλος Boc-αποπροστασία με HCl σε διοξάνιο (4N).



Σχήμα 5.10: Πρώτη πατέντα WO2010020675 που κυκλοφόρησε το 2010 για τη σύνθεση του Ribociclib.

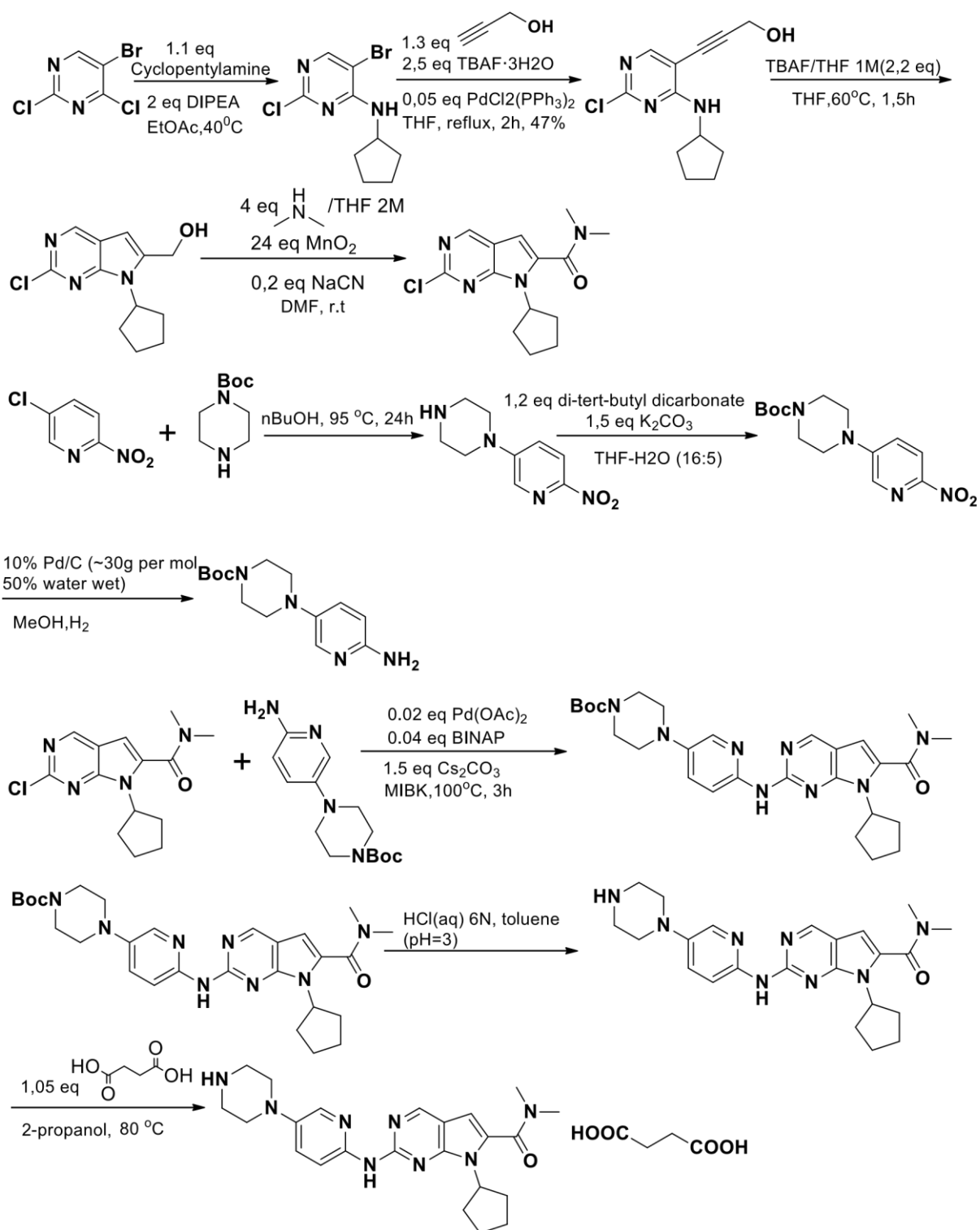


Η δεύτερη πατέντα που κυκλοφόρησε από την εταιρία Novartis ήταν το 2011. Σύμφωνα με την πατέντα WO2011101409 ο σχηματισμός του πυρρολο[2,3-d]πυριμιδικού δακτυλίου προκύπτει μέσω μιας αντίδρασης Sonogashira, μετά την οποία ακολουθεί μια αντίδραση κυκλοποίησης μέσω του καταλύτη μεταφοράς φάσης, TBAF σε διαλύτη THF. Η πατέντα αυτή παρουσιάζει ένα βασικό πλεονέκτημα σε σχέση με την πρώτη πατέντα. Η χλωροπυριμιδίνη συντίθεται σε λιγότερα στάδια και με λιγότερα αντιδραστήρια.



Σχήμα 5.11: Δεύτερη πατέντα WO2010020675 που κυκλοφόρησε το 2011 για τη σύνθεση του Ribociclib.

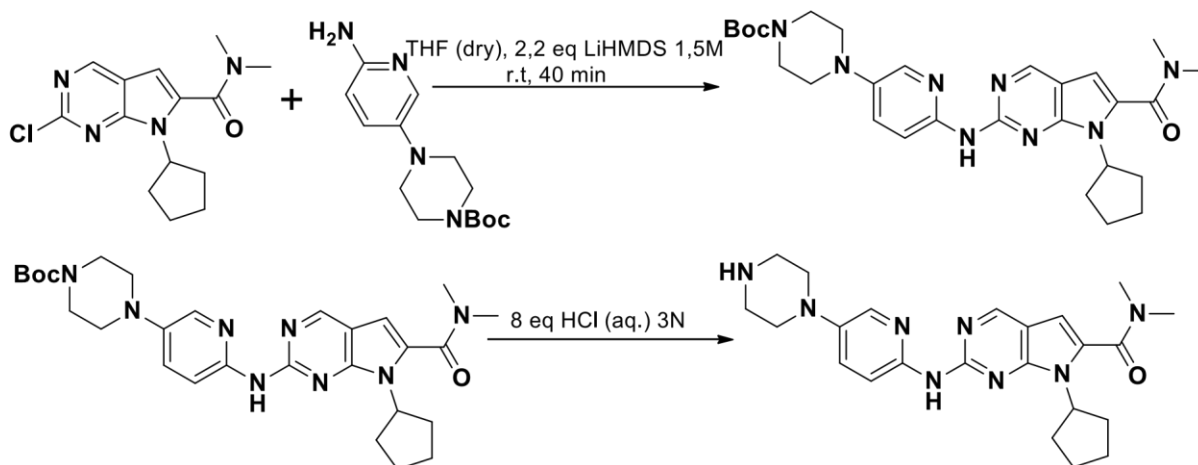
Η τρίτη πατέντα που κυκλοφόρησε από την εταιρία Novartis ήταν το 2012. Σύμφωνα με την πατέντα WO2011101409 η συνολική απόδοση της παρακάτω μεθόδου για τη σύνθεση του Ribociclib ως άλας του ηλεκτρικού οξέος είναι περίπου 15-16%.



Σχήμα 5.12: Τρίτη πατέντα WO2012064805 που κυκλοφόρησε το 2012 για τη σύνθεση του Ribociclib.

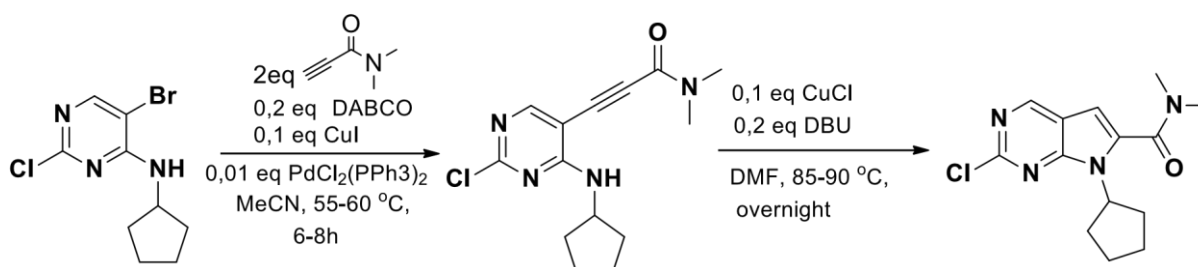
Η εταιρία Novartis το 2016 κατοχύρωσε πατέντα για τη βελτιστοποίηση της αντίδρασης σύζευξης Buchwald-Hartwig χωρίς τη χρήση του αντιδραστήριου καταλύτη του παλλαδίου και με τη χρήση της ισχυρής βάσης LiHMDS σε THF. Στη συνέχεια, η αντίδραση Boc αποπροστασίας λαμβάνει χώρα με τη χρήση υδατικού διαλύματος HCl 3N, όπου λαμβάνεται

το υδροχλωρικό άλας του Ribociclib. Έτσι μειώθηκε το κόστος σύνθεσης, ο χρόνος παραγωγής του φαρμάκου και η επεξεργασία-καθαρισμός του τελικού προϊόντος. Η απόδοση της συνθετικής πορείας της ένωσης είναι περίπου 92%.



Σχήμα 5.13: Τρίτη πατέντα που κυκλοφόρησε η εταιρία Novartis το 2016 για τη σύνθεση του Ribociclib.

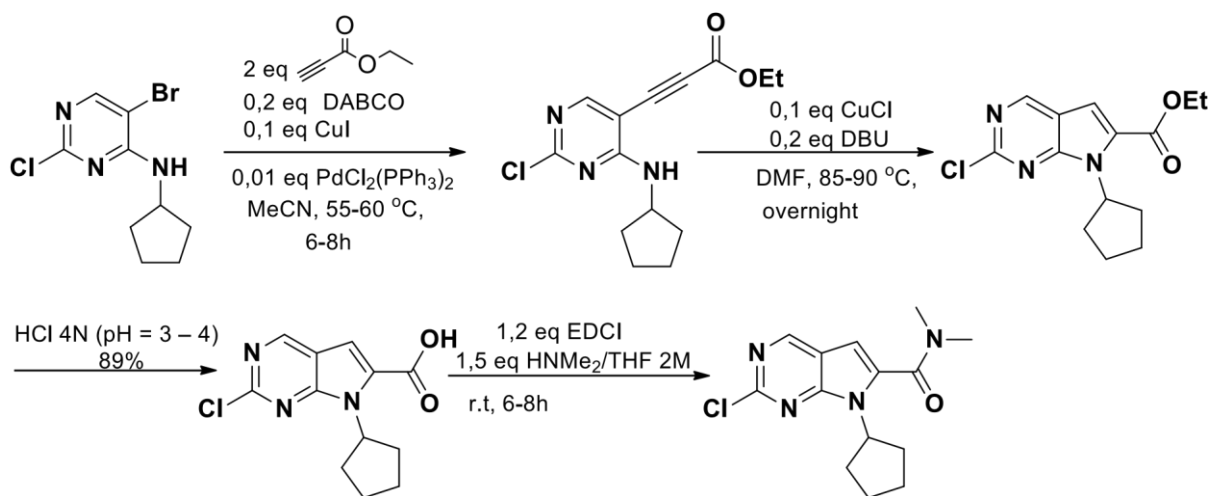
Η τέταρτη πατέντα WO2016192522 που κυκλοφόρησε από την Suzhou MiracPharma Technology ήταν το 2017. Σε αυτήν την περίπτωση η χλωροπυριμιδίνη συντίθεται με τη χρήση N,N-διμεθυλοπροπαργυλικού αμιδίου και στο επόμενο στάδιο λαμβάνει χώρα μια κυκλοποίηση καταλυόμενη από ιόντα Cu(I). Η απόδοση της συνθετικής πορείας της ένωσης είναι περίπου 71%.



Σχήμα 5.14: Τέταρτη πατέντα WO2016192522 που κυκλοφόρησε το 2017 για τη σύνθεση του Ribociclib.

Η έκτη πατέντα CN106478641A που κυκλοφόρησε ήταν το 2017. Σε αυτήν την περίπτωση η χλωροπυριμιδίνη συντίθεται με τη χρήση προπαργυλικών εστέρων. Απαιτείται μετά το στάδιο της κυκλοποίησης, αλκαλική υδρόλυση του εστέρα προς καρβοξυλικό οξύ και σύζευξη με διμεθυλαμίνη για το σχηματισμό της. Η απόδοση της σύνθεσης της χλωροπυριμιδίνης με

τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια είναι περίπου 51%. Αν και η απόδοση είναι αρκετά μεγάλη, το κόστος των προπαρυλικών εστέρων είναι μεγαλύτερο από αυτό της προπαρυλικής αλκοόλης. [68],[69]



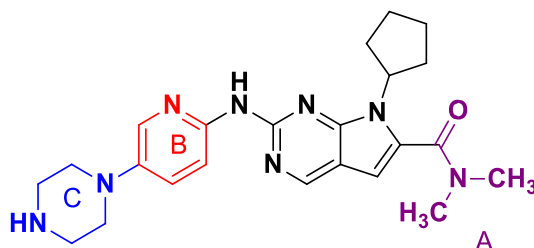
Σχήμα 5.15: Έκτη πατέντα CN106478641A που κυκλοφόρησε το 2017 για τη σύνθεση του Ribociclib. [68]

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>0</sup>

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 6.1 Ορθολογικός σχεδιασμός νέων αναστολέων μέσω μοριακής μοντελοποίησης

Με τον σχεδιασμό των νέων εν δυνάμει αναστολέων έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης του γνωστού αναστολέα των CDK4/6, Ribociclib, αξιολογώντας τα ανάλογα, μέσων διάφορων δομικών τροποποιήσεων εντός της κοιλότητας δέσμευσης του ATP. Τα ανάλογα αυτά χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες (A, B και C), με βάση τις τροποποιήσεις στο φαρμακοφόρο μοντέλο του Ribociclib. Οι τροποποιήσεις στη δομή του Ribociclib αποτυπώνονται παρακάτω αναλυτικά. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι ο πυρρολο[2,3d]πυριμιδινικός δακτύλιος παρέμεινε ίδιος, διότι οι αλληλεπιδράσεις του (δεσμοί υδρογόνου και υδρόφοβες) είναι σημαντικές για την αναστολή της CDK6.



Σχήμα 6.1: Οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν στη δομή του φαρμακοφόρου μοντέλου του Ribociclib.

Η μοριακή μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου των πρωτεϊνικών κινασών, που πραγματοποιείται με τη βοήθεια των προγραμμάτων AutoDock Vina, Chimera και Discovery Studio, δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης ενώσεων με δράση έναντι της κινάσης με ήδη γνωστούς αναστολείς. Με αυτόν τον τρόπο γίνονται προσπάθειες για την εύρεση ενώσεων, που είναι πολύ πιθανό να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νέοι εν δυνάμει αναστολείς, που θα είναι δραστηρότεροι και εκλεκτικότεροι και θα παρουσιάζουν ίσως διαφορετική βιολογική δραστηριότητα από το αρχικό φάρμακο, στη συγκεκριμένη περίπτωση το Ribociclib.

Τα βήματα και η πορεία που ακολουθήθηκε για την εξαγωγή συμπερασμάτων και τελικά την σύνθεση των ενώσεων είναι η εξής:

1. μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου πρωτεϊνικών κινασών και το λογικός σχεδιασμό παραγώγων/αναλόγων του Ribociclib, με βάση το μοριακό σκελετό του φαρμάκου

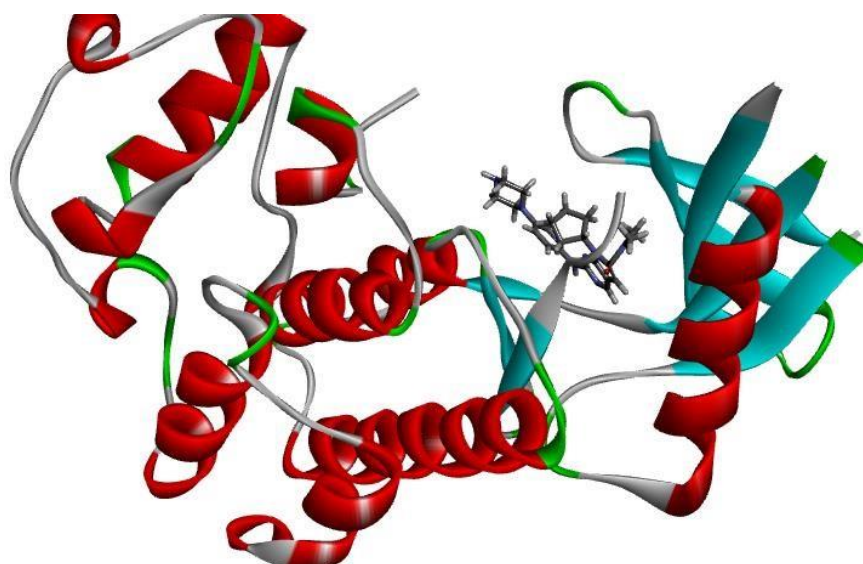
2. σύνθεση, απομόνωση και ταυτοποίηση παραγώγων/αναλόγων του Ribociclib. Ο σχεδιασμός για τη βήμα προς βήμα σύνθεση των αναστολέων, αναλόγων του Ribociclib, βασίζεται είτε σε μια συγκλίνουσα είτε σε μία αποκλίνουσα συνθετική πορεία, συνεκτιμώντας κάθε φορά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της μοριακής δομής των υπό σύνθεση αναστολέων. Οι ενώσεις, τόσο οι τελικές όσο και όλες οι ενδιάμεσες, μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους (χρωματογραφία στήλης, παρασκευαστική HPLC, ανακρυστάλλωση κλπ.), θα ταυτοποιηθούν και θα μελετηθούν κυρίως με τη μέθοδο του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR)
3. βελτιστοποίηση της πορείας σύνθεσης των νέων εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του Ribociclib.

## 6.2 Κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα του Ribociclib με την CDK6

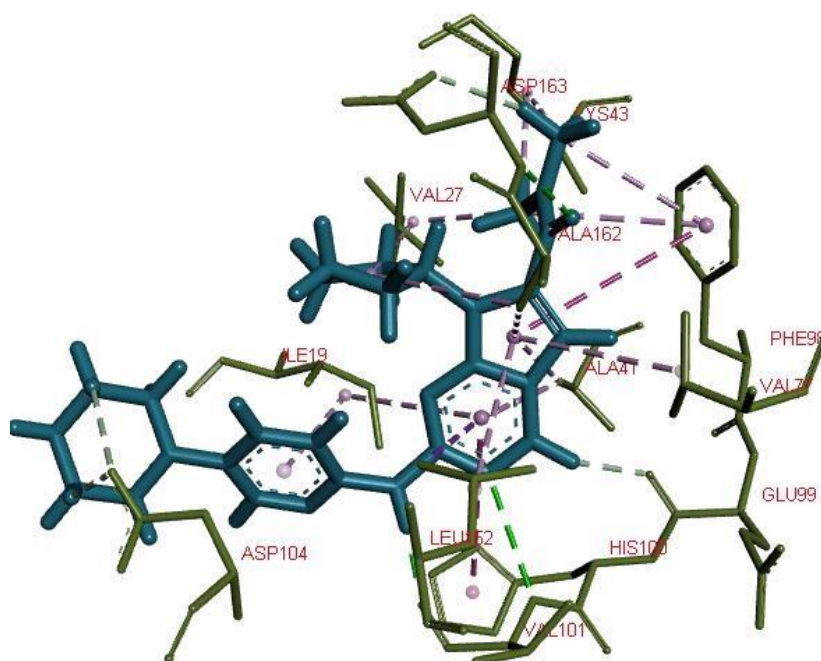
Κατά τη προετοιμασία της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα της CDK6 για μοριακή μοντελοποίηση, εξαλείφονται τα μόρια νερού από τη κρυσταλλογραφική δομή, προστέθηκαν φορτία, ενώθηκαν τμήματα στη δομή της πρωτεΐνης, ενώ προστέθηκαν άτομα υδρογόνου. Η προετοιμασία του Ribociclib και των αναλόγων για τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης περιλάμβανε τη προσθήκη φορτίων στο πιπεραζινικός δακτύλιο.

Δεδομένου ότι η δομή συγκρυστάλλωσης της CDK4 με κάποιον αναστολέα δεν υφίσταται, τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης πραγματοποιήθηκαν με βάση τη δομή του Ribociclib και της CDK6. Το αποτέλεσμα του πειράματος μοριακής μοντελοποίησης του Ribociclib με τη CDK6 ήταν η τιμή  $\Delta G_{\text{binding}} = -11,0$  kcal/mol, σύμφωνα με το AutoDock Vina.

Από την μελέτη της δομής συγκρυστάλλωσης της CDK6 και του Ribociclib, διαπιστώνεται ότι ο πυριδινικός δακτύλιος καθώς και ο πιπεραζινικός δακτύλιος δεν συνεισφέρουν στην ανασταλτική δράση του μορίου μέσω αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.



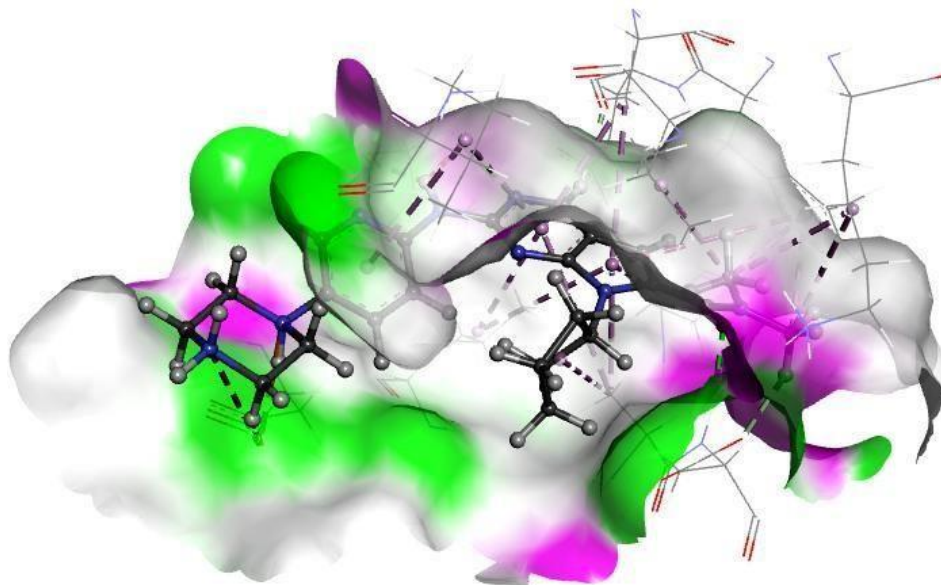
Εικόνα 6.1: Κρυσταλλογραφική δομή της CDK6 με το Ribociclib.



Εικόνα 6.2: 3D κρυσταλλογραφική απεικόνιση του Ribociclib με τις αλληλεπιδράσεις του με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6 πρωτεϊνικής κινάσης.

Από την αναπαραγωγή της επιφάνειας των αμινοξέων, της πρωτεΐνης του ενεργού κέντρου που μπορούν να δράσουν ως δέκτες και ως δότες δεσμών υδρογόνου, παρατηρείται ότι γύρω από τον πυριδινικό και πιπεραζινικό δακτυλίου υπάρχει επιφάνεια πλούσια σε δέκτες και δότες δεσμών υδρογόνου. Αρχικά, ορισμένες από τις τροποποιήσεις που μπορούν να

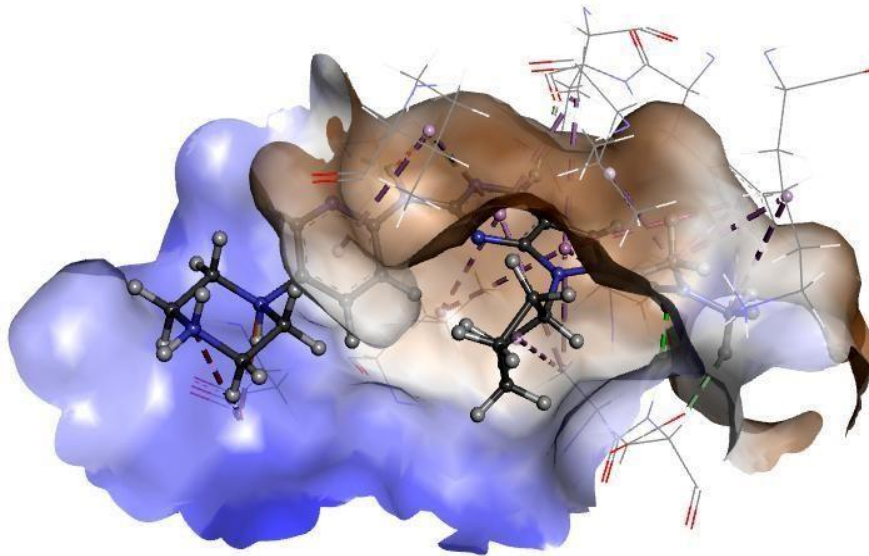
πραγματοποιηθούν είναι η προσθήκη στους δύο δακτυλίους ομάδες που μπορούν να σχηματίσουν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου.



*Εικόνα 6.3: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει το Ribociclib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6 όπου δίνονται οι επιφάνειες του ενεργού κέντρου με αμινοξέα δέκτες (πράσινο) και δότες (μωβ) δεσμών υδρογόνου.*

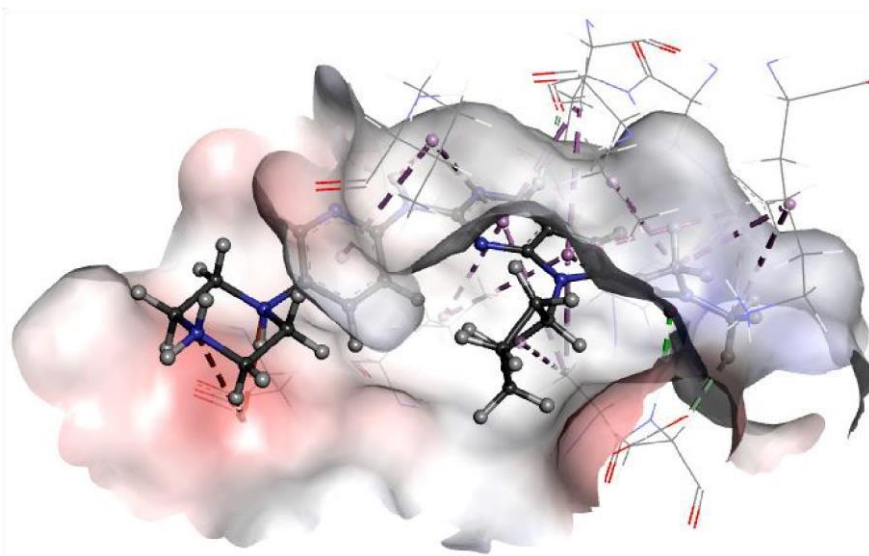
Η περιοχή γύρω από τον πυριδινικό δακτύλιο είναι υδρόφιλη, οπότε μπορούν να προστεθούν υδρόφιλες ομάδες για να αυξηθεί η ανασταλτική δράση του μορίου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αντικατάσταση της διμεθυλαμινομάδας με πιο ογκώδεις αλκυλομάδες και η αντικατάσταση του πενταμελούς δακτυλίου με εξαμελή ή βενζολικό δακτύλιο, ίσως βελτιώσει την στερική συμπληρωματικότητα του αναστολέα στο υδρόφοβο κανάλι του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.





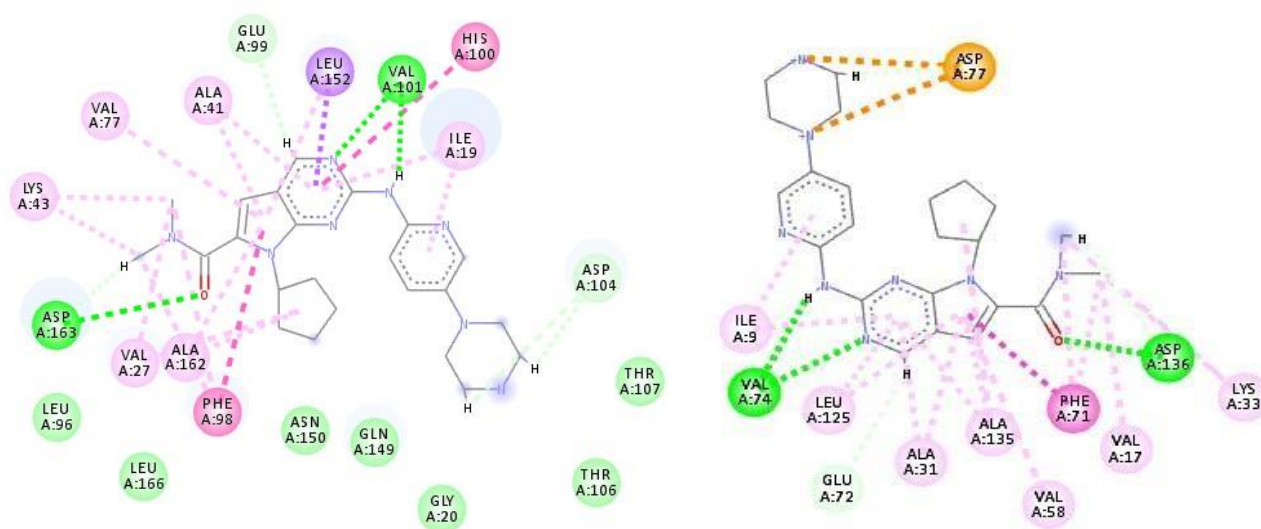
Εικόνα 6.4: Σχηματική απεικόνιση της αρωματικότητας που εμφανίζει το Ribociclib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6 όπου δίνονται οι επιφάνειες του ενεργού κέντρου με αμινοξέα που εμφανίζουν αρωματικότητα (μπλε) και αυτά που δεν εμφανίζουν αρωματικότητα (πορτοκαλί).

Από την επιφάνεια φορτίων από κατάλοιπα γύρω από το Ribociclib, είναι σαφές ότι επικρατούν κυρίως αρνητικά φορτία λόγω των αμινοξέων Asp77 (που αλληλεπιδρά με τη θετικά φορτισμένη πιπεραζίνη), καθώς και Asp136 (του DFG μοτίβου). Έτσι σχεδιάστηκαν και ανάλογα που είτε διατηρούν τον δακτύλιο της πιπεραζίνης, είτε φέρουν πολικές ομάδες, είτε μιδαζολικούς και πυρραζολικούς δακτυλίους με πιθανή αλληλεπίδραση τύπου π-ανιόντος.



Εικόνα 6.5: Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας του φορτίου που εμφανίζει το Ribociclib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6 όπου δίνονται οι επιφάνειες του ενεργού κέντρου με τα

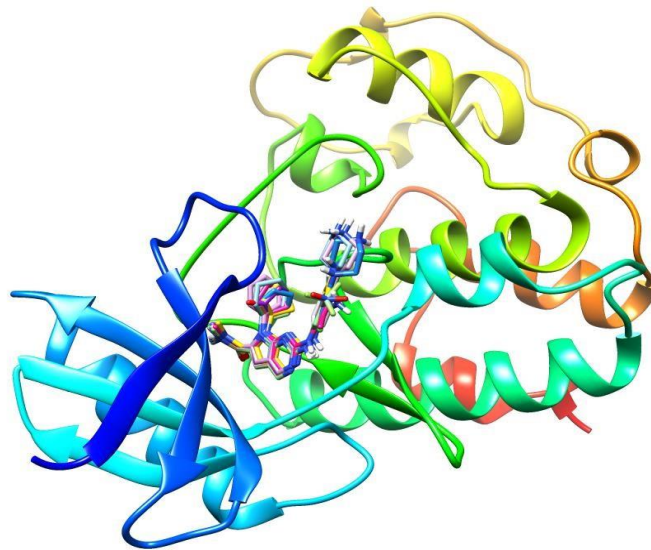
αμινοξέα που εμφανίζουν ηλεκτροθετικότητα (κόκκινο) και αυτά που εμφανίζουν ηλεκτραρνητικότητα (μπλε).



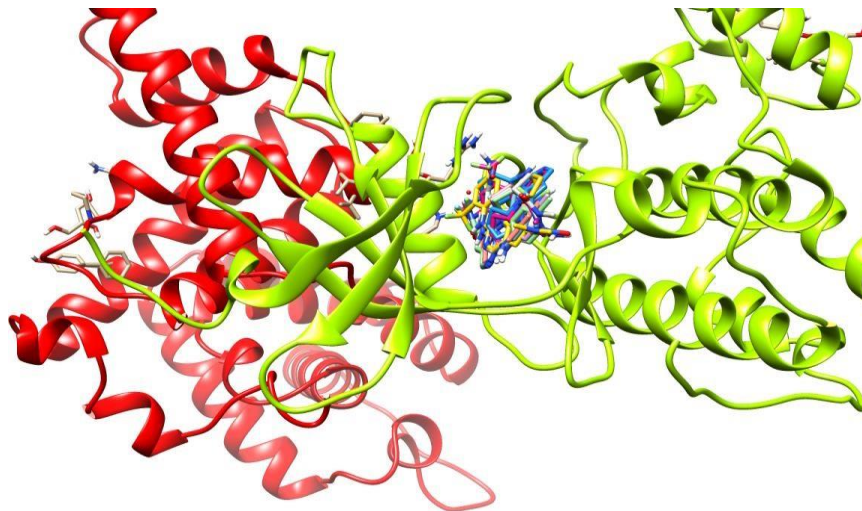
Εικόνα 6.6: Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Ribociclib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6 πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) τη μοριακή μοντελοποίηση.

Σύμφωνα με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, το Ribociclib αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της CDK6 πρωτεϊνικής κινάσης και σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου (πράσινο χρώμα). Το καρβονυλικό οξυγόνο του καρβοξαμιδίου (δέκτης) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την –NH του ασπαραγινικού οξέος Asp163, η αμινική ομάδα –NH (δότης) με την καρβοξυλική ομάδα της βαλίνης Val101 και το πυριμιδινικό άτομο αζώτου (δέκτης) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την –NH της βαλίνης Val101. Επίσης, υφίστανται και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις Leu152, Ile19.

Από βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς και από το πρόγραμμα swisstarget prediction, παρατηρήθηκε ότι το συγκεκριμένο δομικό στοιχείο του διαζα-ίνδολικού δακτυλίου β επαναλαμβάνεται σχεδόν σε όλους τους αναστολείς των CDKs κινασών. Οπότε, επεκτείνεται η ανάλυση docking και σε άλλες CDK πρωτεΐνες, με σκοπό να εκτιμήσουμε τόσο την ανασταλτικότητα όσο και την εκλεκτικότητα των αναλόγων.



Εικόνα 6.7: Αποτελέσματα ανάλυσης *docking* των τροποποιημένων αναλόγων με την CDK6.



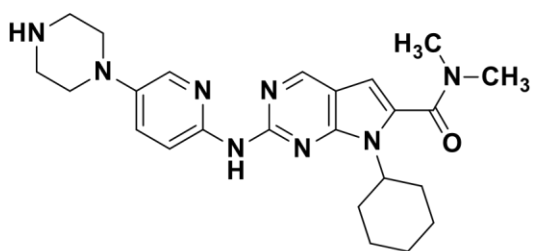
Εικόνα 6.8: Αποτελέσματα ανάλυσης *docking* των τροποποιημένων αναλόγων με την CDK9.

### 6.3 Ανάλογα του Ribociclib-Νέοι εν δυνάμει εκλεκτικοί αναστολείς

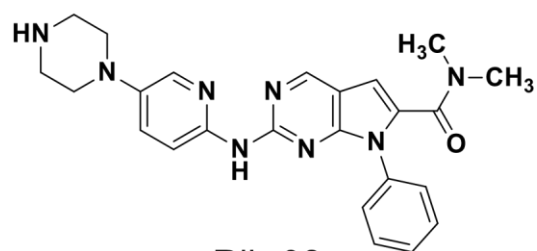
Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες τροποποιήσεων στη δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος Ribociclib. Τα ανάλογα που σχεδιάστηκαν, ως αποτέλεσμα της μοριακής μοντελοποίησης, και συντέθηκαν στο εργαστήριο αποτυπώνονται σχηματικά παρακάτω (Σχήμα 6.2).

Συνοπτικά αναφέρεται ότι, στην περιοχή A, όπου βρίσκεται η καρβοξαμιδική ομάδα έγιναν προσπάθειες προσάρτησης πιο ογκωδών αλκυλομάδων καθώς και αρωματικών δακτύλιων πάνω στο άτομο του αζώτου του αμιδίου. Στην περιοχή B, όπου βρίσκεται ο πυριδινικός δακτύλιος έγιναν ορισμένες τροποποιήσεις και συγκεκριμένα εισαγωγή ομάδων όπως  $-CF_3$ ,  $-NO_2$  προκειμένου να σχηματισθούν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα. Τέλος, όσον αφορά τον πιπεραζινικό δακτύλιο έγιναν στοχευμένες τροποποιήσεις που αφορούσαν την αντικατάστασή του με ιμιδαζολικούς και πυρραζολικούς δακτύλιους. Η δομή της 2-άμινοπυριμιδίνης βέβαια, προτιμήθηκε να παραμείνει ανέπαφη διότι οι αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζει είναι απαραίτητες για την αναστολή της κινάσης CDK6.

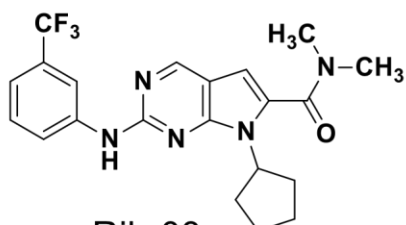
Οι ενώσεις λοιπόν, που πιθανόν παρουσιάζουν βιολογική δράση, συγκρίνονται με κάποιον γνωστό τρόπον τινά αναστολέα μέσω των προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης. Εφόσον πραγματοποιηθεί η συσχέτιση της δομής των μορίων με τη δράση τους, αποτυπώνεται μια δομή φαρμακοφόρου μοντέλου με σκοπό τον σχεδιασμό πιο δραστικών ενώσεων αναστολέων. Για τη μοριακή μοντελοποίηση των παραγώγων του Ribociclib χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Ribociclib, καθώς ο στόχος ήταν οι νέες ενώσεις να παρουσιάζουν καλύτερες τιμές πρόσδεσης από αυτό και όσο το δυνατόν καλύτερη συμπληρωματικότητα. Συμπερασματικά, τα ανάλογα του Ribociclib που συντέθηκαν προσδένονται στη θέση δέσμευσης του ATP στην κινάση CDK6 και εκδηλώνουν παρόμοιες αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.



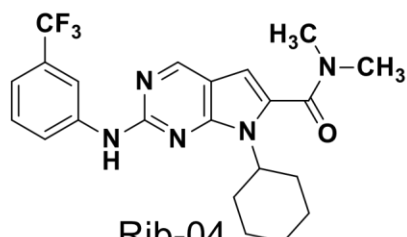
Rib-01



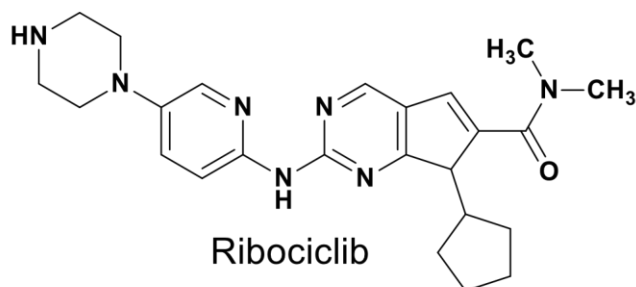
Rib-02



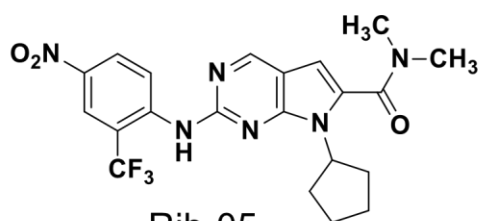
Rib-03



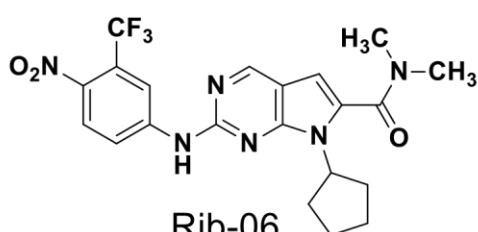
Rib-04



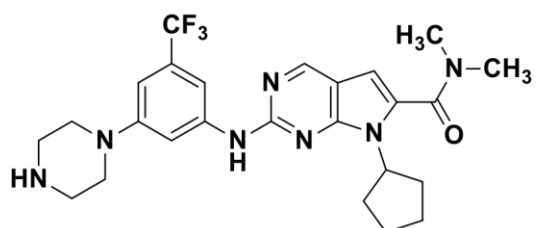
Ribociclib



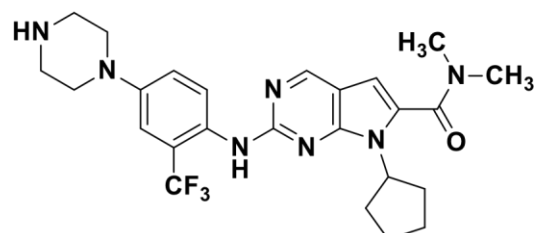
Rib-05



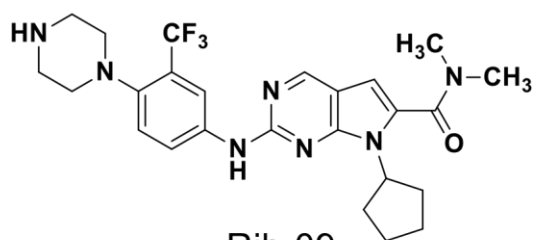
Rib-06



Rib-07



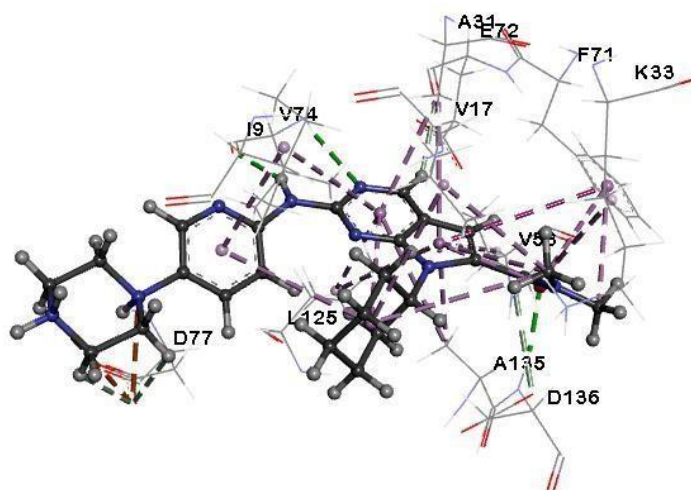
Rib-08



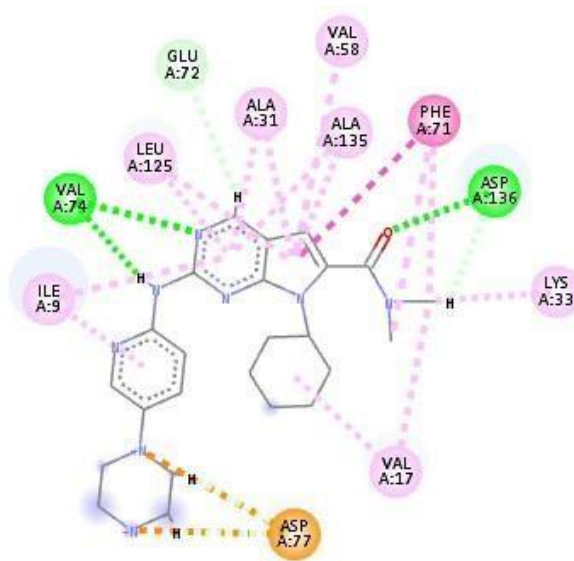
Rib-09

#### 6.4 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της Rib-01 με την CDK6

Οι δακτύλιοι κυκλοεξανίου και βενζολίου, που προσαρτήθηκαν στις ενώσεις Rib-01 και Rib02 αντίστοιχα, βρίσκουν τοπολογική προσαρμογή στην περιοχή σύνδεσης του δακτυλίου της ριβόζης του ATP, με αποτέλεσμα την μείωση της  $\Delta G$  (-11,4kcal/mol) σε σχέση με το Ribociclib (-11kcal/mol).



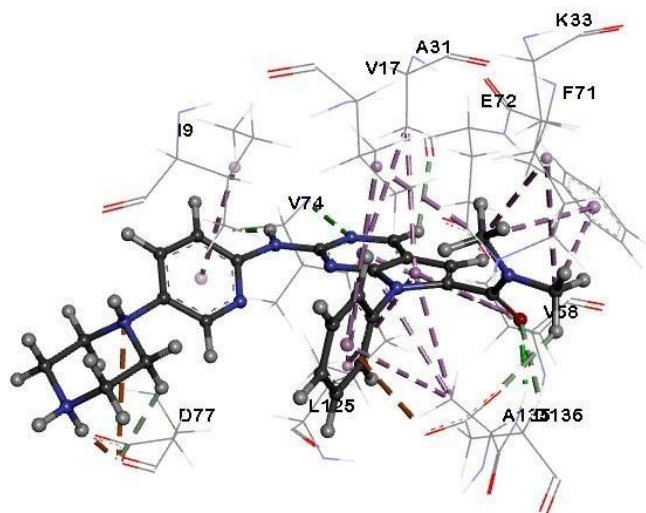
Εικόνα 6.9: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-01.



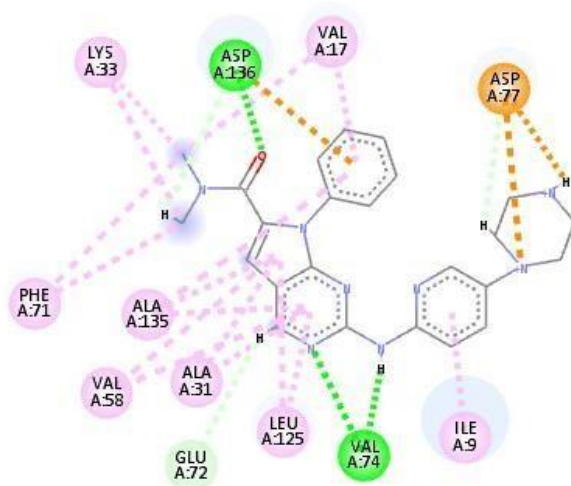
Εικόνα 6.10: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-01.



## 6.5 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-02 με την CDK6

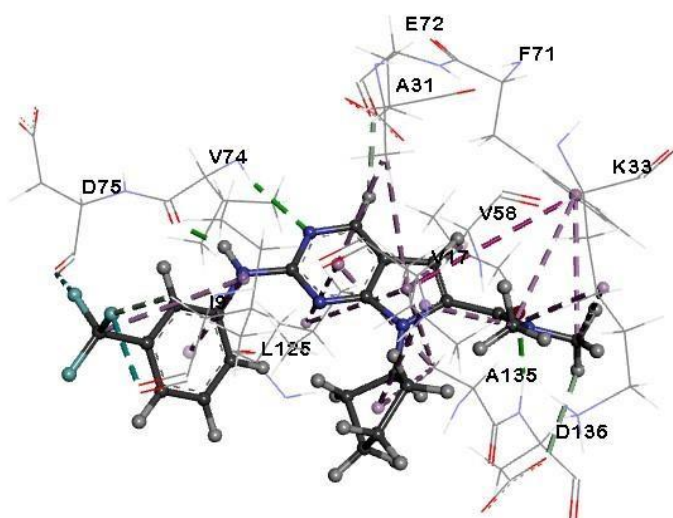


Εικόνα 6.11: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-02.

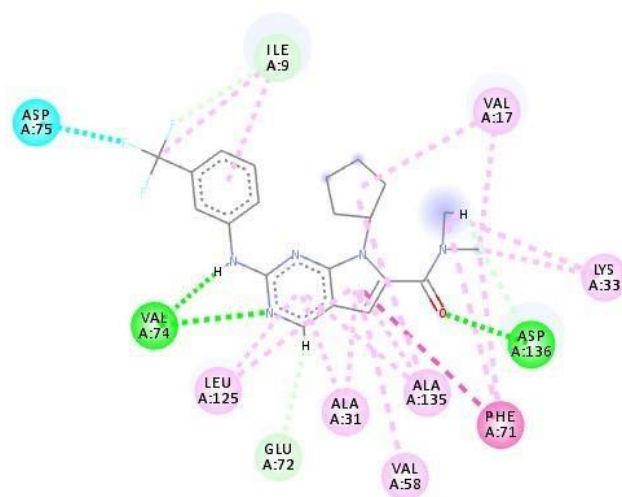


Εικόνα 6.12: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-02.

## 6.6 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-03 με την CDK6



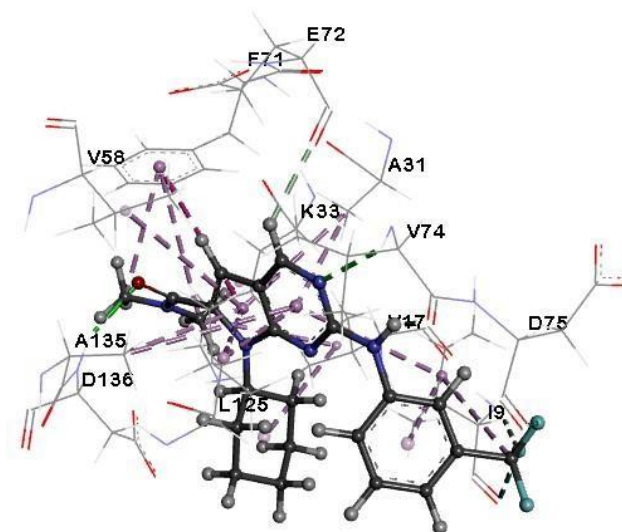
Εικόνα 6.13: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-03.



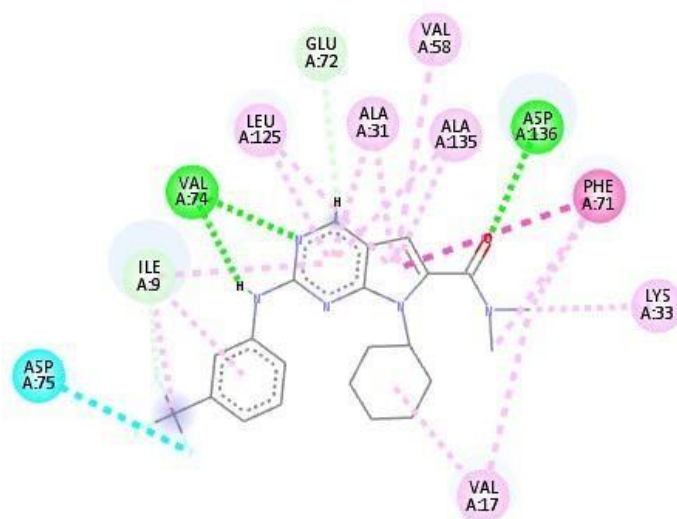
Εικόνα 6.14: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-03.



## 6.7 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-04 με την CDK6

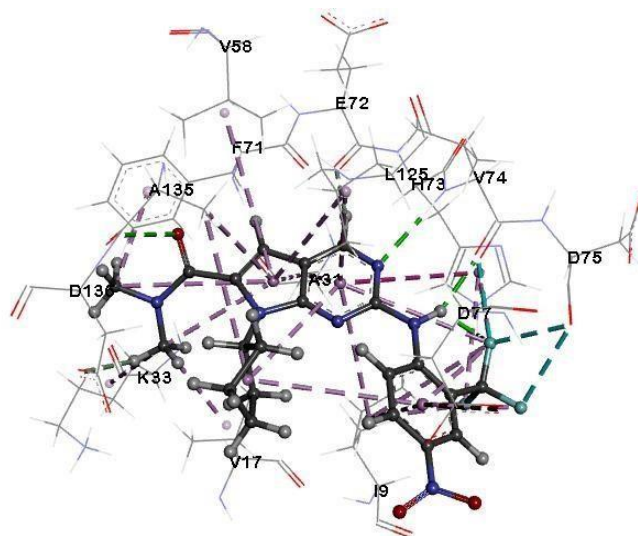


Εικόνα 6.15: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-04.

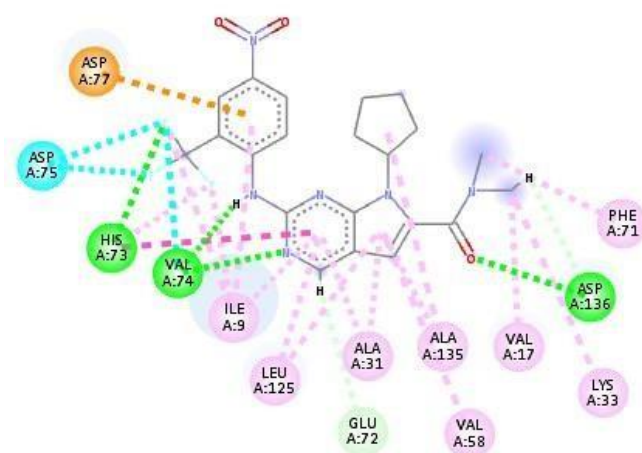


Εικόνα 6.16: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-04.

## 6.8 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-05 με την CDK6

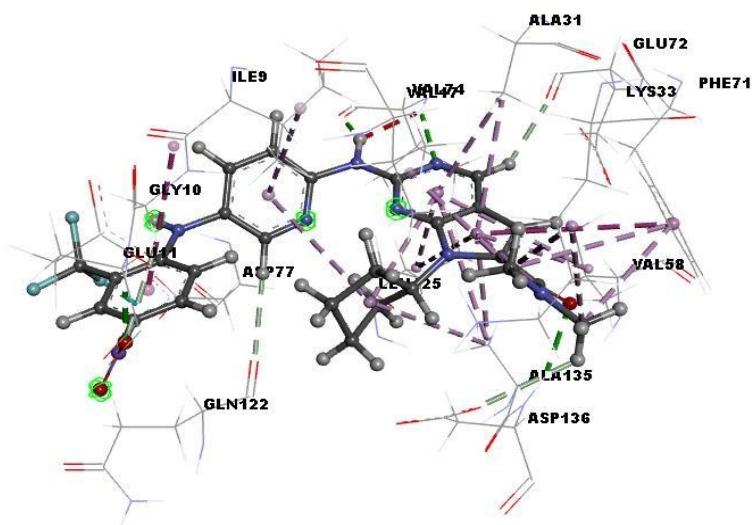


Εικόνα 6.17: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-05.

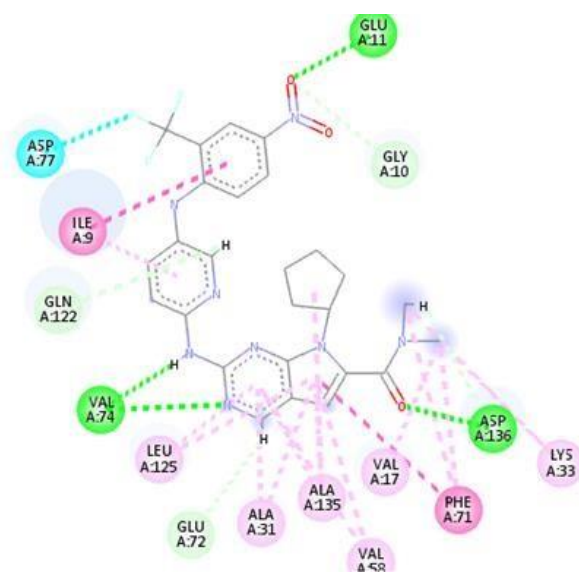


Εικόνα 6.18: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-05.

## 6.9 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-06 με την CDK6

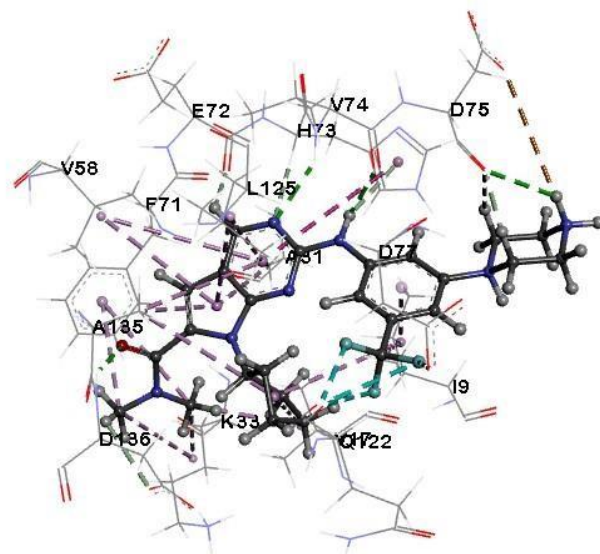


Εικόνα 6.19: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-06.

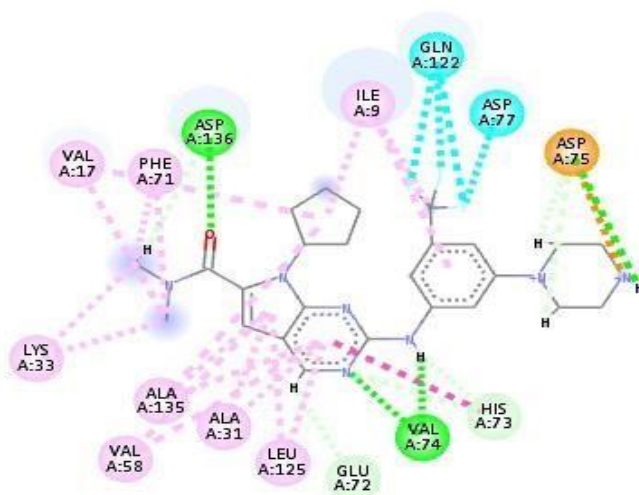


Εικόνα 6.20: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-06.

## 6.10 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-07 με την CDK6

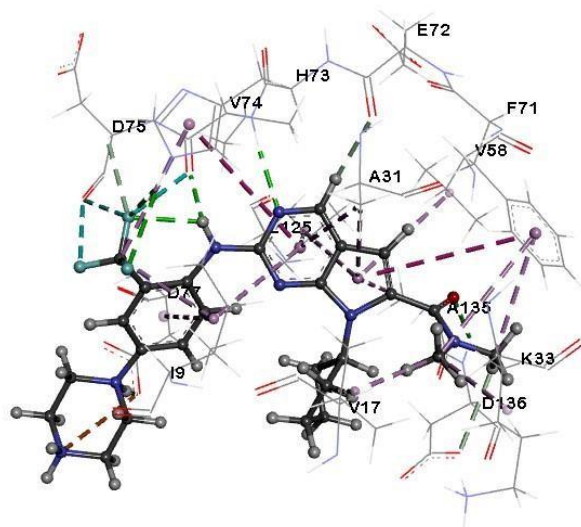


Εικόνα 6.21: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-07.

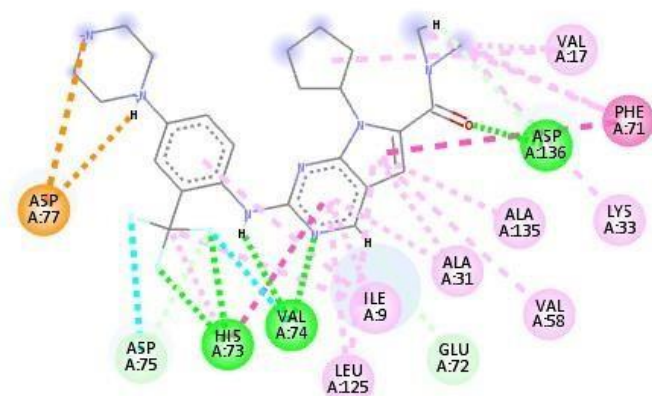


Εικόνα 6.22: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-07.

### 6.11 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-08 με την CDK6

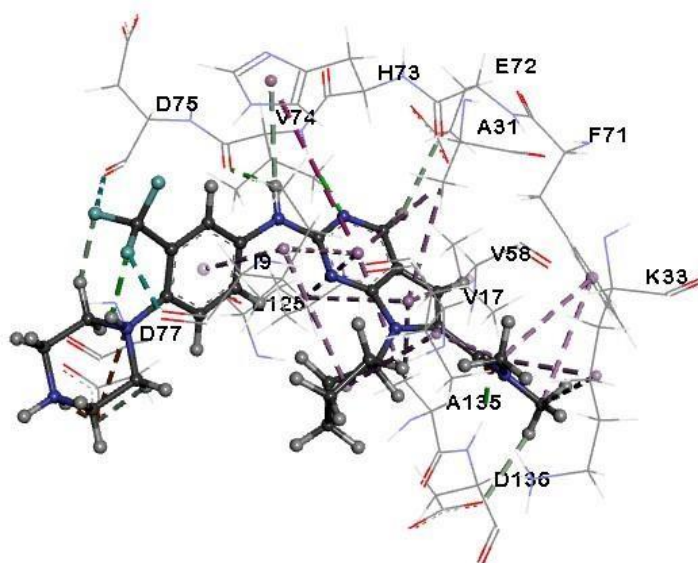


Εικόνα 6.23: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-08.

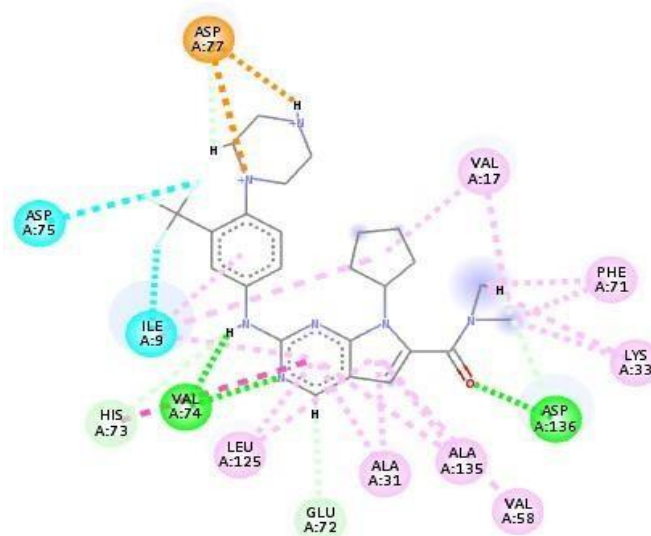


Εικόνα 6.24: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-08.

## 6.12 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα της ένωσης Rib-09 με την CDK6



Εικόνα 6.25: 3D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-09.



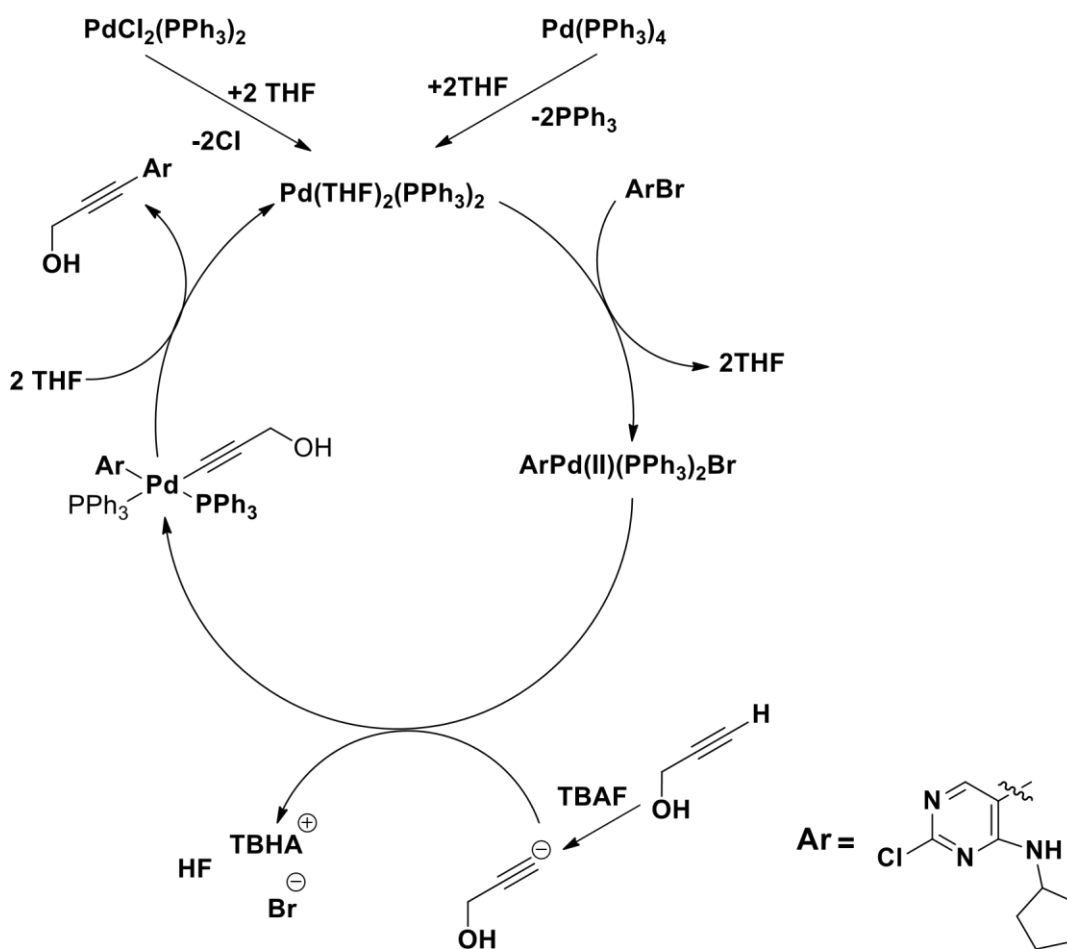
Εικόνα 6.26: 2D Κρυσταλλογραφικές αλληλεπιδράσεις της CDK6 με την ένωση Rib-09.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>0</sup>

### 7.1 Βελτιστοποίηση της συνθετικής πορείας

#### 7.1.2. Αντίδραση Sonogashira

Στο εργαστήριο έγιναν αρχικά προσπάθειες βελτιστοποίησης της πειραματικής πορείας που προτείνει η εταιρία Novartis. Οι προσπάθειες βελτιστοποίησης επικεντρώνονται στη σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινη-6καρβοξαμίδιο. Σύμφωνα με την πατέντα η πειραματική πορεία που ακολουθεί η εταιρία Novartis, η οποία συνθέτει την ένωση μέσω δυο σταδίων, το πρώτο στάδιο αφορά την αντίδραση Sonogashira και το δεύτερο στάδιο είναι ουσιαστικά ο σχηματισμός του προϊόντος μέσω αντίδρασης κυκλοποίησης. Όσον αφορά την αντίδραση Sonogashira λαμβάνει χώρα με τα εξής αντιδραστήρια: προπαργυλική αλκοόλη, χρήση κάποιου καταλύτη παλλαδίου, είτε του  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  είτε του  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ , το αμμωνιακό άλας, TBAF και διαλύτη τετραϋδροφουράνιο και θέρμανση σε συνθήκες reflux.

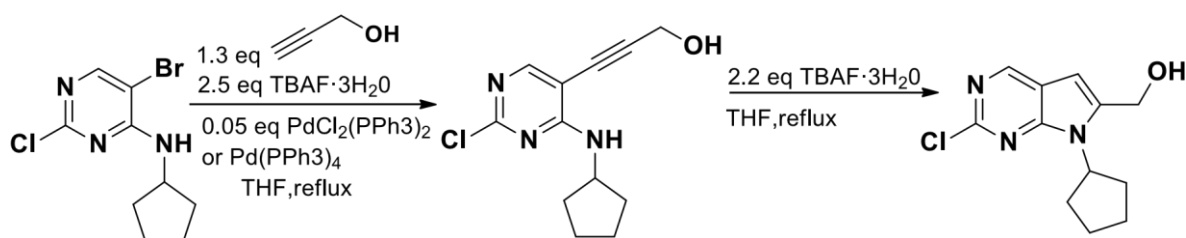


Σχήμα 7.1: Μηχανισμός της αντίδρασης Sonogashira . [70]



Ο μηχανισμός της αντίδρασης Sonogashira περιλαμβάνει την οξειδωτική προσθήκη της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνης στο  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{THF})_2$ . Στη συνέχεια το σύμπλοκο του παλλαδίου με το ανιόν του αλκινίου που προκύπτει υφίσταται αναγωγική απόσπαση για να σχηματίσει το προϊόν και το αρχικό  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{THF})_2$ . Το  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2(\text{THF})_2$  σχηματίζεται από τον καταλύτη  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  με αποχώρηση δύο μορίων τριφαινυλοφωσφίνης ή από τον καταλύτη  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  με αποχώρηση δύο ιόντων χλωρίου.

Η συνολική απόδοση της αντίδρασης Sonogashira είναι 47% και της αντίδρασης κυκλοποίησης 85%, οπότε η συνολική απόδοση των δυο αυτών σταδίων είναι περίπου 40%.

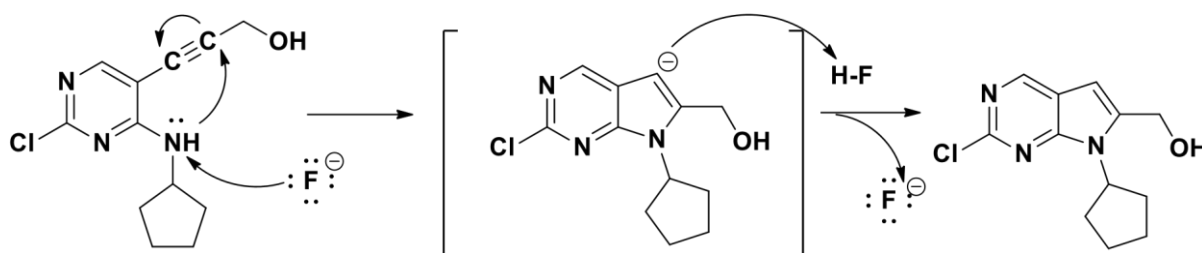


Σχήμα 7.2: Η πειραματική πορεία που έχει προταθεί από την εταιρία Novartis.

Κατά την πραγματοποίηση όλων των αντιδράσεων Sonogashira παρατηρήθηκε ότι σχηματίζονται ορισμένα ένδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου και κάποια παραπροϊόντα, πιθανά λόγω της ελεύθερης υδροξυλομάδας της προπαργυλικής αλκοόλης. Παρατηρήθηκε επιπλέον σχηματισμός του προϊόντος κυκλοποίησης, το οποίο εμφανίζεται μόλις σχηματισθεί το προϊόν Sonogashira και πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη περίσσειας άλατος TBAF και λόγω της υψηλής θερμοκρασίας από τη ζέση του THF.



### 7.1.3 Αντίδραση κυκλοποίησης



Σχήμα 7.3: Μηχανισμός της αντίδρασης κυκλοποίησης.

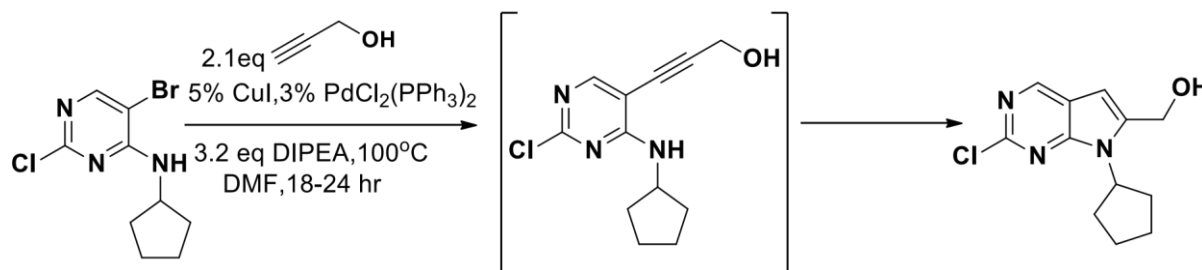
Για το σχηματισμό του 5,7-διαζα-ϊνδολίου δακτυλίου η ένωση 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη αποπρωτονώνεται στο άτομο αζώτου από τα ιόντα φθορίου που προέρχονται από το TBAF. Στη συνέχεια ακολουθεί μια αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής στο άτομο άνθρακα του αλκινίου από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του κυκλοποιημένου προϊόντος. Το ενδιάμεσο 5,7-διαζα-ϊνδόλιο είναι ανιόν στη θέση 3 και ξανά πρωτονιώνεται από τα μόρια HF που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι αρχικές προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο για τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης του προϊόντος (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Hπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-5-υλο)μεθανόλη αφορούσαν αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε ένα βήμα. Ουσιαστικά, το κύριο μέλημα και ο στόχος ήταν η πραγματοποίηση των δυο αυτών σταδίων σε ένα. Το κύριο πλεονέκτημα της *one pot* αντίδρασης είναι κατά βάση το κόστος καθώς μειώνεται ο αριθμός των αντιδραστηρίων, των διαλυτών που χρησιμοποιούνται και εξοικονομείται αρκετός χρόνος, καθώς η επεξεργασία και ο καθαρισμός του προϊόντος είναι απλούστερα. Όσον αφορά, το πειραματικό κομμάτι, στο εργαστήριο δοκιμάστηκε μια πληθώρα αντιδράσεων Sonogashira, με πολλούς και διαφορετικούς καταλύτες και διαλύτες χωρίς όμως οι προσπάθειες αυτές να τελεσφορήσουν. Το προϊόν στις περισσότερες περιπτώσεις απομονώθηκε σε πάρα πολύ μικρή ποσότητα, σχεδόν ίχνος, πράγμα που δυσκόλεψε την διαδικασία της επεξεργασίας και αρκετές φορές ήταν ακάθαρμο. Οι συνθήκες επίσης των αντιδράσεων αυτών ήταν ποικίλες καθώς χρησιμοποιήθηκαν αρκετές μέθοδοι για την προετοιμασία των διαλυτών και οι θερμοκρασίες που δοκιμάστηκαν στις συγκεκριμένες αντιδράσεις διέφεραν. Χρησιμοποιήθηκαν ως αρχική ένωση πάντα η 5βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη, περίσσεια προπαραγυλικής αλκοόλης, καταλύτης PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuI, DIPEA ως βάση

και διαλύτη άνυδρο DMF, το οποίο έχουμε απαερώσει είτε με παροχή αζώτου είτε με ψύξη με υγρό άζωτο υπό κενό.

### 1<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης

Ενώ παρατηρήθηκε αρχικά αλλαγή του χρώματος της αντίδρασης από έντονο πορτοκαλί σε καστανό σκούρο μετά από 4 ώρες θέρμανσης, που ήταν ένα θετικό σημάδι για το σχηματισμό του προϊόντος Sonogashira ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης δεν σχηματίστηκε το προϊόν κυκλοποίησης, παρά μόνο ορισμένα ενδιάμεσα προϊόντα. Αν και έγινε προσθήκη επιπλέον ποσοτήτων διαλύτη και καταλύτη και η θέρμανση συνεχίστηκε, το προϊόν κυκλοποίησης δεν σχηματίστηκε. Δεν προχωρήσαμε στην επεξεργασία της αντίδρασης.

Το σύστημα που δοκιμάστηκε για τον έλεγχο της αντίδρασης ήταν 2:1 AcOEt:Hex.



Σχήμα 7.4: Πρώτη προσπάθεια βελτιστοποίησης της σύνθεσης της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης.

Οι επόμενες προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν την αλλαγή του διαλύτη στην αντίδραση Sonogashira, χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες με την εταιρία Novartis. Η χρήση διαφορετικού διαλύτη σε κάθε προσπάθεια είχε ως σκοπό να βρεθεί η καλύτερη συνθήκη αντίδρασης της αρχικής ένωσης και των υπολοίπων αρχικών αντιδραστήριων.

### 2<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης

- διαλύτης THF και θέρμανση reflux στους 67°C

Εφόσον ο σχηματισμός του προϊόντος κυκλοποίησης λαμβάνει χώρα ήδη στη θερμοκρασία των 60°C η σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας και παράταση της θέρμανσης σε υψηλή θερμοκρασία θεωρήθηκε ότι ίσως αποτελεί μια αξιόλογη συνθήκη για το σχηματισμό προϊόντος. Έπειτα από 6 ώρες αντίδρασης δεν παρατηρείται αλλαγή στην εικόνα της αντίδρασης ούτε ένδειξη για την ύπαρξη του κυκλοποιημένου προϊόντος. Έγινε προσθήκη

βάσης  $\text{Et}_3\text{N}$  με σκοπό να αποπρωτονιώσει το ενδιάμεσο προϊόν Sonogashira και να προχωρήσει η αντίδραση προς σχηματισμό του κυκλοποιημένου προϊόντος, χωρίς όμως αποτέλεσμα.

### **3<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης διοξάνιο και θέρμανση reflux στους  $101^\circ\text{C}$

Παρατηρήθηκε ότι η ποσότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε δεν διαλυτοποίησε επαρκώς τα αντιδραστήρια και οι συγκεκριμένες συνθήκες κρίθηκαν ακατάλληλες.

### **4<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης DMF και σταδιακή θέρμανση από  $80^\circ\text{C}$  στους  $110^\circ\text{C}$

Ο διαλύτης DMF διέλυσε τα αντιδραστήρια, παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος κυκλοποίησης αλλά σε ίχνος και όχι απόλυτα καθαρό.

### **5<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης MIBK(methyl isobutyl ketone) και σταδιακή θέρμανση από  $65^\circ\text{C}$  στους  $110^\circ\text{C}$

Στη συγκεκριμένη αντίδραση δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ούτε προϊόντος Sonogashira ούτε κυκλοποίησης παρά το γεγονός ότι μετά από 7 ώρες αντίδρασης προστέθηκαν μια μικρή ποσότητα καταλύτη και διαλύτη, προκειμένου να γίνει υποβοήθηση της αντίδρασης. Η θέρμανση σταματά μετά από 23 ώρες, καθώς οι συγκεκριμένες συνθήκες είναι ατελέσφορες.

### **6<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης DMAc(dimethylacetamide) και σταδιακή θέρμανση από  $65^\circ\text{C}$  στους  $110^\circ\text{C}$

Παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος Sonogashira και άλλων παραπροϊόντων μετά από 3 ώρες, αλλά όχι προϊόντος κυκλοποίησης. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά, αλλά ύστερα από 23 ώρες θέρμανση δεν σχηματίστηκε το επιθυμητό προϊόν.

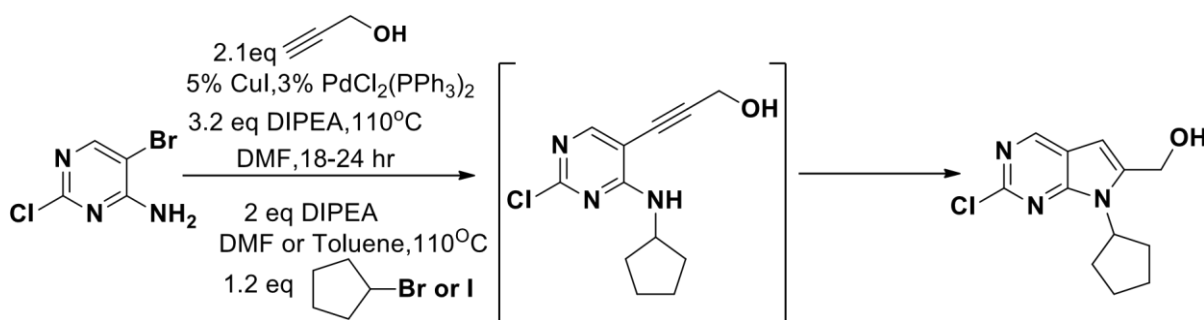
### **7<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

Δεν χρησιμοποιήθηκε διαλύτης και η θερμοκρασία δεν ξεπέρασε τους  $80^\circ\text{C}$ . Τα αντιδραστήρια προστέθηκαν αφού προηγουμένως είχε διαλυθεί το  $\text{TBAF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  πλήρως. Δεν σχηματίστηκε προϊόν κυκλοποίησης μετά από 17 ώρες θέρμανσης παρά μόνο φθορίζοντα παραπροϊόντα.

	Προπαρυλική αλκοόλη	Βάση TBAF·3H <sub>2</sub> O	Καταλύτης PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Προϊόν
<b>2</b>	1.3 eq	5%-mol	2.5 eq	THF	reflux (67 ° C)	δεν σχηματίσθηκε
<b>3</b>	1.3 eq	5%-mol	2.5 eq	Dioxane	reflux (101 ° C)	δεν σχηματίσθηκε
<b>4</b>	1.3 eq	5%-mol	2.5 eq	DMF	80→110 ° C	ίχνος
<b>5</b>	2.5 eq	10%-mol	2.5 eq	MIBK	65→110 ° C	δεν σχηματίσθηκε
<b>6</b>	1.3 eq	5%-mol	2.5 eq	DMAc	65→110 ° C	δεν σχηματίσθηκε
<b>7</b>	1.3 eq	5%-mol	6 eq	χωρίς διαλύτη	80 ° C	δεν σχηματίσθηκε

Πίνακας 7.1: Προσπάθειες βελτιστοποίησης της σύνθεσης της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Hπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης.

### 8<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης

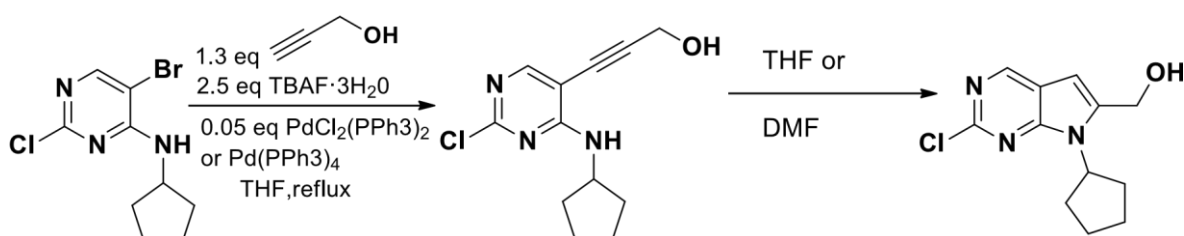


Σχήμα 7.5: Όγδοη προσπάθεια βελτιστοποίησης της σύνθεσης της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Hπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης.

Στην όγδοη προσπάθεια βελτιστοποίησης της σύνθεσης της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Hπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη μετατροπή των τριών σταδίων που ακολουθεί η εταιρία Novartis σε ένα στάδιο (one pot σύνθεση). Αρχικά, δοκιμάζεται μια αντίδραση Sonogashira μιας βρωμο-4αμινοπυριμιδίνης

με τις συνθήκες που απεικονίζονται παραπάνω. Τέλος, το προϊόν αυτής θα πραγματοποιηθεί αντίδραση N-αλκυλίωσης με βρωμο- ή ιωδοκυκλοπεντάνιο, με σκοπό το σχηματισμό του προϊόντος κυκλοποίησης με καλές αποδόσεις. Στη συγκεκριμένη προσπάθεια ενώ σχηματίστηκε το προϊόν Sonogashira, στη συνέχεια ύστερα από αρκετές ώρες θέρμανσης παρατηρήθηκαν αρκετά παραπροϊόντα με αποτέλεσμα το προϊόν κυκλοποίησης να μην σχηματισθεί και η αντίδραση να μην προχωρήσει. Πιθανόν, τα ενδιάμεσα παραπροϊόντα είναι σύμπλοκα που δημιουργήθηκαν με τους καταλύτες. Η αύξηση της θερμοκρασίας έγινε σταδιακά.

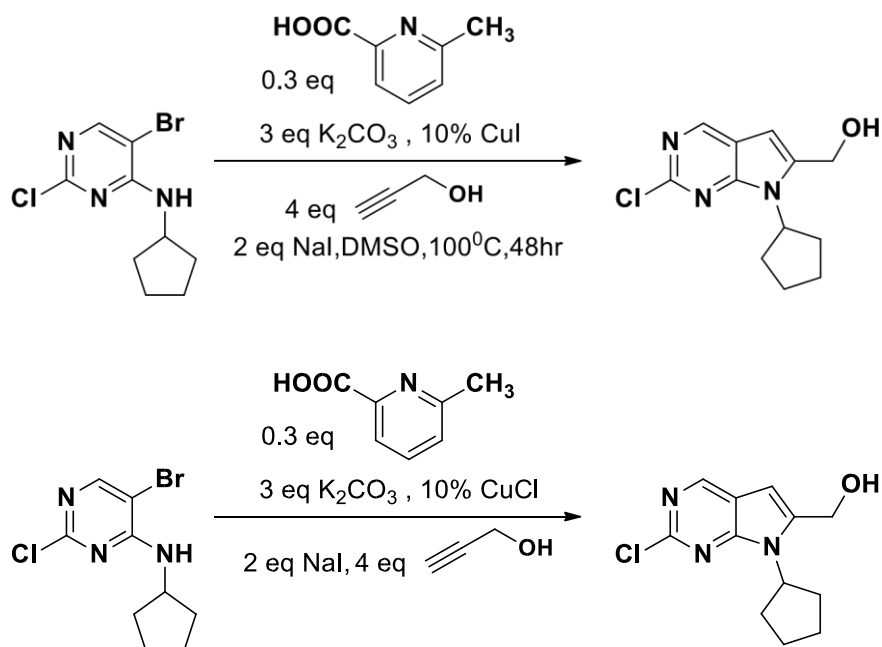
### 9<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης



Σε αυτήν την προσπάθεια χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς οι ίδιες συνθήκες που προτείνει η εταιρία Novartis με μόνη τη διαφορά ότι μόλις παρατηρήθηκε, ύστερα από περίπου 4 ώρες, ο σχηματισμός του προϊόντος Sonogashira, δεν διακόπηκε η θέρμανση για την επεξεργασία και απομόνωση του προϊόντος, όπως αναφέρει η πειραματική πορεία αλλά προστίθεται επιπλέον διαλύτης THF και συνεχίζεται η θέρμανση για το σχηματισμό του προϊόντος κυκλοποίησης. Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται είναι reflux αλλά δεν παρατηρείται σχηματισμός του. Η συγκεκριμένη προσπάθεια επαναλήφθηκε τρεις φορές και στην τελευταία προσπάθεια μετά το σχηματισμό του προϊόντος Sonogashira, προστίθεται διαλύτης DMF αντί για THF. Στην τελευταία περίπτωση παρατηρήθηκε ίχνος προϊόντος κυκλοποίησης.

#### 7.1.4 Αντιδράσεις τύπου Ullmann

Οι τελευταίες προσπάθειες στη βελτιστοποίηση της πειραματικής πορείας αφορούν την αντίδραση τύπου Ullmann. Ύστερα από αρκετή βιβλιογραφική έρευνα καθώς οι προηγούμενες προσπάθειες δεν επέφεραν τα προσδοκώμενα αποτελέσματα αποφασίστηκε από την ερευνητική ομάδα το ενδιαφέρον να στραφεί στη συγκεκριμένη αντίδραση. Η αντίδραση τύπου Ullmann είναι μια one pot αντίδραση. Στόχος είναι ο σχηματισμός του κυκλοποιημένου προϊόντος με αρχική την ένωση 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη, με τη χρήση άλατος μονοσθενούς χαλκού CuCl ή CuI, προπαργυλική αλκοόλη και 6-μέθυλοπικολινικό οξύ σε βασικές συνθήκες. Η απόδοση της αντίδρασης, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι 60%.<sup>[71], [72]</sup>



Σχήμα 7.7: Προσπάθειες βελτιστοποίησης της σύνθεσης της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης μέσω αντίδρασης τύπου Ullmann με τη χρήση χλωριούχου χαλκού και διαφορετικές συνθήκες.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι δοκιμαστικές αντιδράσεις που διενεργήθηκαν στο εργαστήριο. Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 4 ισοδύναμα προπαργυλικής αλκοόλης, 10%-mol CuCl, 30%-mol 6-Μεθυλοπικολινικό οξύ, 2 ισοδύναμα NaI και 3 ισοδύναμα K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ως βασικές συνθήκες.

Οι διαφοροποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση αφορούσαν το διαλύτη, τη μέθοδο απαέρωσης του διαλύτη και τις συνθήκες (άνυδρες ή μη άνυδρες). Η απαέρωση του σκεύους και του διαλύτη με παροχή αζώτου, έγινε με δυο μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος αναφέρεται ως bubbling και η δεύτερη ως cooling bath με σκοπό να απομακρυνθεί το οξυγόνο της ατμόσφαιρας ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση και τελικά η αδρανοποίηση του καταλύτη CuCl. Ο καταλύτης CuCl είναι ευαίσθητος στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο οξειδώνεται πολύ γρήγορα, γι' αυτό ήταν απαραίτητη η σύνθεση του συγκεκριμένου αντιδραστηρίου πριν από κάθε αντίδραση. Η μέθοδος βέβαια που χρησιμοποιήθηκε περισσότερο από τις δυο ήταν το cooling bath χρησιμοποιώντας ως διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα και υγρό N<sub>2</sub>. Στις αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκαν πολικότεροι διαλύτες, όπως DMSO, DMF και DMAc, η αντίδραση ολοκληρώθηκε γρηγορότερα και σε μερικές περιπτώσεις σε λιγότερο από 48 ώρες. Στους μη πολικούς διαλύτες τα προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν ήταν αρκετά, όπως μη διαλυτοποίηση των αρχικών αντιδραστηρίων και αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μην σχηματισθεί το προϊόν κυκλοποίησης ή να σχηματισθεί σε ίχνη. Τέλος, μια από τις σημαντικότερες παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη διενέργεια των αντιδράσεων ήταν ο ρόλος της εκάστοτε θερμοκρασίας στην ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες με σημείο ζέσης άνω των 100°C αυξάνεται η ταχύτητα της αντίδρασης, παρόλο που βιβλιογραφικά η θερμοκρασία που συνιστάται είναι 60°C.

Ως παρατήρηση να σημειωθεί ότι από τα σκεύη απομακρύνθηκε η υγρασία, για να είναι στεγνά και η προσθήκη όλων των αρχικών αντιδραστηρίων έγινε με ταυτόχρονη παροχή υγρού N<sub>2</sub>.

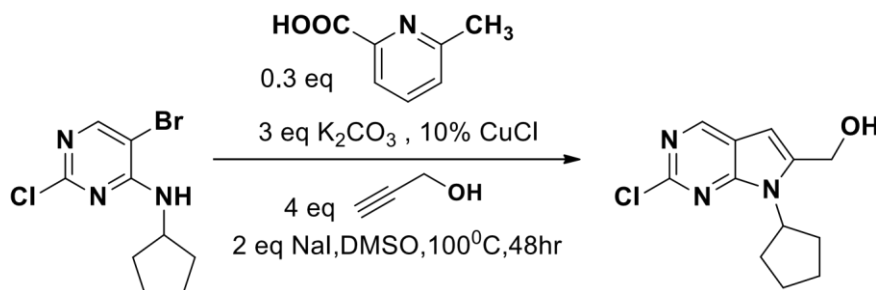
<i>Πειραματικές προσπάθειες</i>	<i>Διαλύτης</i>	<i>Σημείο ζέσεως διαλύτη</i>	<i>Συνθήκες</i>	<i>Μέθοδος απαέρωσης διαλύτη</i>	<i>Προϊόν</i>
<b>1</b>	DMSO	189°C	<i>μη άνυδρες</i>	<i>δεν έγινε απαέρωση</i>	<i>δεν σχηματίστηκε</i>
<b>2</b>	DMSO dry	189°C	<i>μη άνυδρες</i>	<i>δεν έγινε απαέρωση</i>	<i>ίχνος</i>
<b>3</b>	DMSO dry	189°C	<i>άνυδρες</i>	<i>απαέρωση με N<sub>2</sub></i>	<i>σχηματίστηκε με την μεγαλύτερη απόδοση <b>82,1%</b></i>

<b>4</b>	DMF	152°C	μη άνυδρες	απαέρωση με N <sub>2</sub>	σχηματίστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό
<b>5</b>	DMF dry	152°C	άνυδρες	απαέρωση με N <sub>2</sub>	σχηματίστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό
<b>6</b>	DMAc	165°C	άνυδρες	απαέρωση με N <sub>2</sub>	σχηματίστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό
<b>7</b>	Glyme	85 °C	άνυδρες	απαέρωση με N <sub>2</sub>	δεν σχηματίστηκε
<b>8</b>	MIBK	117 °C	άνυδρες	απαέρωση με N <sub>2</sub>	δεν σχηματίστηκε
<b>9</b>	1,4-Dioxane	101 °C	άνυδρες	απαέρωση με N <sub>2</sub>	δεν σχηματίστηκε
<b>10</b>	o-Xylene	144°C	άνυδρες	απαέρωση με N <sub>2</sub>	δεν σχηματίστηκε

Πίνακας 7.2: Προσπάθειες δοκιμαστικών αντιδράσεων βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Ηπυρρολο [2,3-*d*]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης.

### 1<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης

- διαλύτης *DMSO dry* και μη άνυδρες συνθήκες



Χρησιμοποιώντας ως διαλύτη *DMSO dry*, ενώ το προϊόν Sonogashira σχηματίζεται, η αντίδραση δεν προχωρά για το σχηματισμό του προϊόντος κυκλοποίησης. Το χρώμα της



αντίδρασης έγινε καστανό σκούρο από ανοιχτό κίτρινο σε λιγότερο από 2h. Όμως επειδή ύστερα από 29 ώρες αντίδρασης έχουν σχηματισθεί μόνο ενδιάμεσα γίνονται προσθήκες των αρχικών αντιδραστηρίων σε μικρές ποσότητες. Αρχικά, προστίθεται το 6-μεθυλοπικολινικό οξύ του οποίου ο ρόλος του στην αντίδραση είναι ο σχηματισμός συμπλόκου με τον μονοσθενή χαλκό. Μετά την προσθήκη του παρατηρείται ότι καταναλώνεται η αρχική ένωση 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη και σχηματίζεται το προϊόν Sonogashira. Στη συνέχεια, προστίθεται ιωδιούχο νάτριο, το οποίο χρησιμοποιείται για να σχηματίσει την ιωδο-πυριμιδίνη και να αυξήσει την ταχύτητα της αντίδρασης. Δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή μετά την προσθήκη του. Ύστερα από περίπου 48 ώρες θέρμανση και αφού δεν παρατηρείται σχηματισμός του προϊόντος ξεκινά η επεξεργασία της αντίδρασης. Στο μείγμα της αντίδρασης πραγματοποιούνται 3 εκχυλίσσεις. Η πρώτη με  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (κορεσμένο διάλυμα), η δεύτερη εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaCl}$  και η τρίτη εκχύλιση με  $\text{H}_2\text{O}$ . Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται για τις τρεις αυτές εκχυλίσσεις είναι ο οξικός αιθυλεστέρας. Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με το  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και οι υδατικές φάσεις ελέγχονται και εφόσον δεν περιέχουν προϊόν απορρίπτονται. Το ξηραντικό απομακρύνεται από τις οργανικές φάσεις με διήθηση και η περίσσεια του διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα εξατμίζεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία στήλης είναι αρχικά το εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (2:1) και μετά αλλάζει η πολικότητα του συστήματος σε (1:1). Μετά από χαρακτηρισμό των ενώσεων διαπιστώθηκε ότι το προϊόν κυκλοποίησης δεν σχηματίστηκε παρά μόνο ενδιάμεσα παραπροϊόντα.

### **2<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- **διαλύτης DMSO και μη άνυδρες συνθήκες**

Η δεύτερη προσπάθεια δεν διαφοροποιείται σε σχέση με την πρώτη προσπάθεια, παρά μόνο στο γεγονός ότι ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ξηρός. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 47 ώρες και το προϊόν απομονώθηκε σε ίχνος ύστερα από επεξεργασία και καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης εξάνιο : ακετόνη (4:1). Συμπερασματικά, λοιπόν παρόλο που οι συνθήκες ήταν μη άνυδρες το γεγονός τι ο διαλύτης ήταν ξηρός βοήθησε στο σχηματισμό του προϊόντος, έστω και σε ίχνος.

### **3<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- **διαλύτης DMSO dry και άνυδρες συνθήκες**

Χρησιμοποιώντας διαλύτη DMSO dry και άνυδρες συνθήκες, απαέρωση διαλύτη και προσέχοντας την αποφυγή ατμοσφαιρικού οξυγόνου στην αντίδραση η βελτιστοποίηση **πραγματοποιήθηκε σε ποσοστό 82,1%**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε ύστερα από 48 ώρες και το προϊόν άρχισε να σχηματίζεται στην αντίδραση μετά το πέρας των 22 ωρών.

Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό του είναι αρχικά το εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (2:1) και μετά άλλαξε η πολικότητα του συστήματος σε (1:1).

#### **4<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης *DMF* και μη άνυδρες συνθήκες

Σχηματίστηκε προϊόν σε ικανοποιητικό βαθμό.

#### **5<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης *DMF dry* και άνυδρες συνθήκες

Οι δοκιμαστικές αντιδράσεις με *DMF* και *DMF dry* δεν παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Το προϊόν σχηματίστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό και στις δυο περιπτώσεις με μόνη τη διαφορά ότι στην αντίδραση που οι συνθήκες ήταν μη άνυδρες ολοκληρώθηκε πιο γρήγορα. Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό του στην πρώτη περίπτωση είναι το εξάνιο : ακετόνη (4:1) και μετά άλλαξε η πολικότητα του συστήματος σε (2:1). Στη δεύτερη περίπτωση εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (2:1) και μετά (1:1). Ο διαλύτης *DMF* είναι ένας διαλύτης που βοηθά το σχηματισμό του προϊόντος, χωρίς όμως να αποτελεί το βέλτιστο διαλύτη γι' αυτού του τύπου τις αντιδράσεις.

#### **6<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης *DMAc* και άνυδρες συνθήκες

Ο διαλύτης *DMAc* διαλυτοποίησε τα αρχικά αντιδραστήρια και το προϊόν σχηματίστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό μέσα σε 48 ώρες. Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία στήλης για τον καθαρισμό του είναι αρχικά το εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (4:1) και μετά άλλαξε η πολικότητα του συστήματος σε (2:1).

#### **7<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης *Glyme* και άνυδρες συνθήκες

Δεν σχηματίσθηκε προϊόν σε ικανοποιητικό βαθμό.

**8<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης *MIBK* και άνυδρες συνθήκες

Δεν σχηματίσθηκε προϊόν σε ικανοποιητικό βαθμό.

**9<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

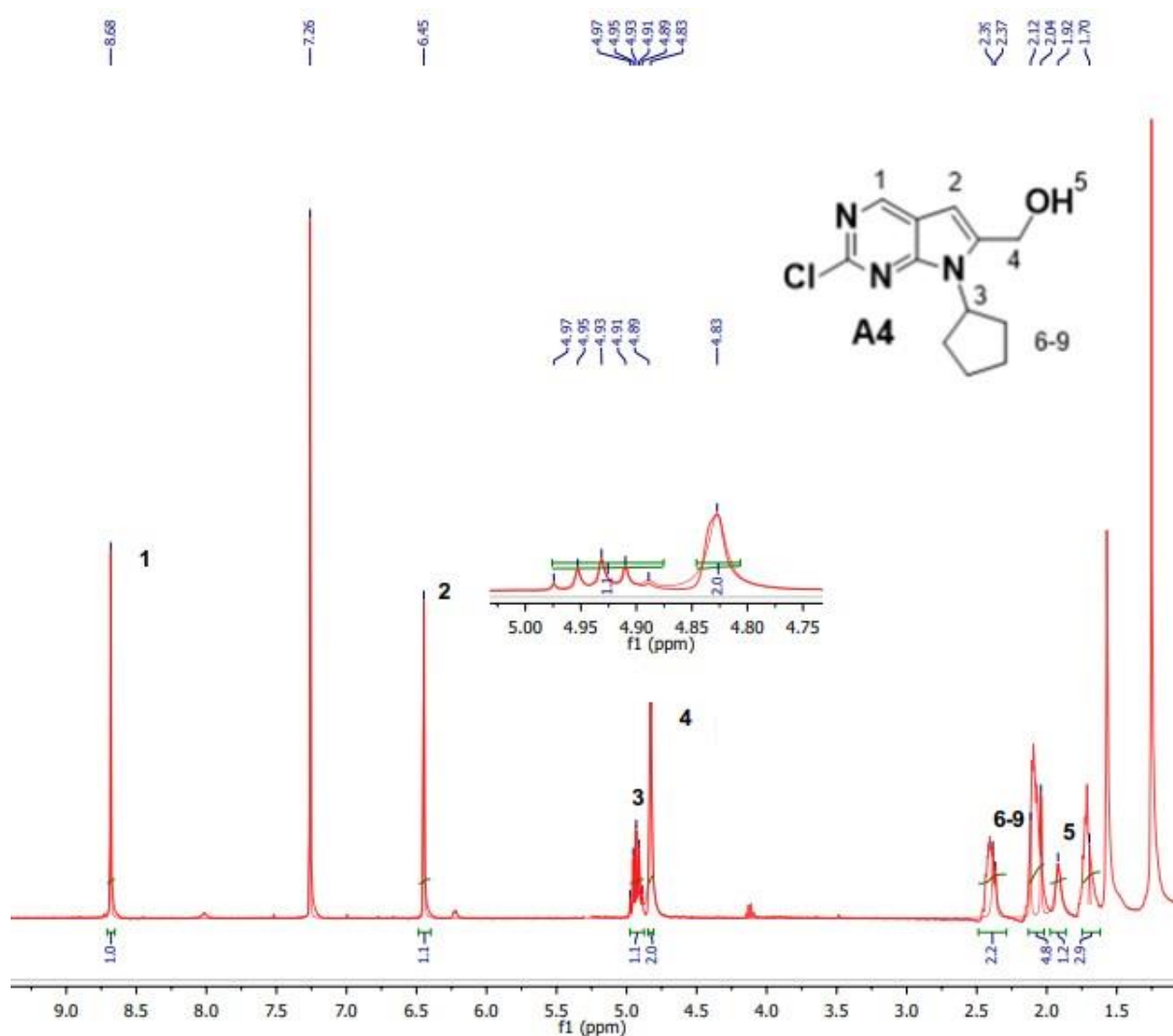
- διαλύτης *1,4-Dioxane dry* και άνυδρες συνθήκες

Δεν σχηματίσθηκε προϊόν σε ικανοποιητικό βαθμό.

**10<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- διαλύτης *o-xylene* και άνυδρες συνθήκες

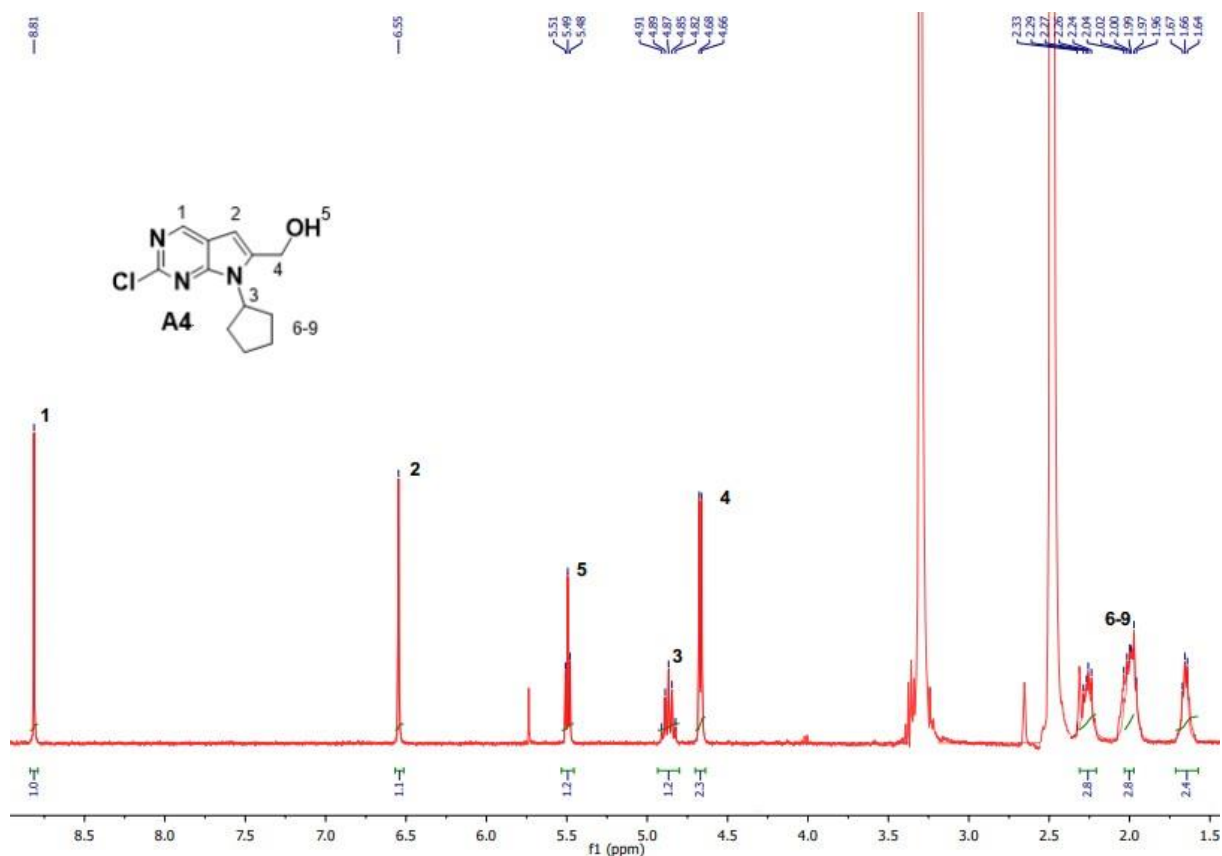
Οι παραπάνω διαλύτες κρίθηκαν ακατάλληλοι καθώς δεν διαλυτοποιούσαν τα αρχικά αντιδραστήρια και εξατμίζονταν αρκετά γρήγορα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Το προϊόν δεν σχηματίσθηκε σε καμιά περίπτωση παρόλο που οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν άνυδρες και σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε απαέρωση με  $N_2$ .



Σχήμα 7.8: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης A4, 400 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ . Η αντίδραση τύπου Ullmann πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύτη DMSO dry και το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε στη μεγαλύτερη απόδοση.

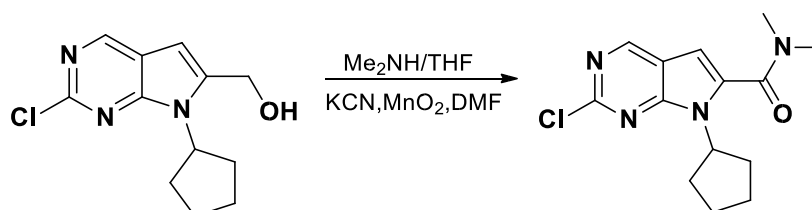
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-7H-πυρρολο [2,3d] πυριμιδιν-6-υλ)μεθανόλη τα πλέον αποπροστατευμένα είναι τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 1 και 2, τα οποία συντονίζονται στα 8,68 ppm και 6,45 ppm αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H1 αποπροστατεύεται περισσότερο από το πρωτόνιο 2, λόγω του εκδηλωμένου **+M** συζυγιακού φαινομένου του μονήρους ζεύγους του αζώτου, και εμφανίζεται στο φάσμα ως απλή κορυφή, καθώς σε γειτονικό άνθρακα δεν υπάρχει κάποιο πρωτόνιο. Το πρωτόνιο H2 εμφανίζεται και αυτό ως απλή κορυφή στο φάσμα. Η χημική μετατόπιση στα 4,93 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3 και εμφανίζεται πλέον ως μια πενταπλή κορυφή, λόγω της παρουσίας τεσσάρων γειτονικών πρωτονίων. Τα δυο πρωτόνια υπ' αριθμόν 4 συντονίζονται στα 4,83 ppm και εμφανίζονται ως απλή κορυφή στο φάσμα, καθώς το H της υδροξυλομάδας ανταλλάσσεται με D και δεν το

βλέπουμε στο φάσμα, λόγω σχηματισμού του 5,7-διαζαϊνδολικού δακτυλίου, εφόσον δεν υπάρχει περιστροφή της αμινομάδας για να το παγιδεύσει. Τα περισσότερο προστατευμένα είναι τα οκτώ πρωτόνια του κυκλοπεντανίου τα οποία εμφανίζονται σαν τρεις ευρείες κορυφές και διαμορφώνουν όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις ένα περίπλοκο αλληλεπικαλυπτόμενο τύπο σχάσης και συντονίζονται στην περιοχή από 1,5-2,5 ppm.



Σχήμα 7.9: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης A4, 500 MHz σε  $\text{DMSO-d}_6$ . Η αντίδραση τύπου Ullmann πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύτη DMAc.

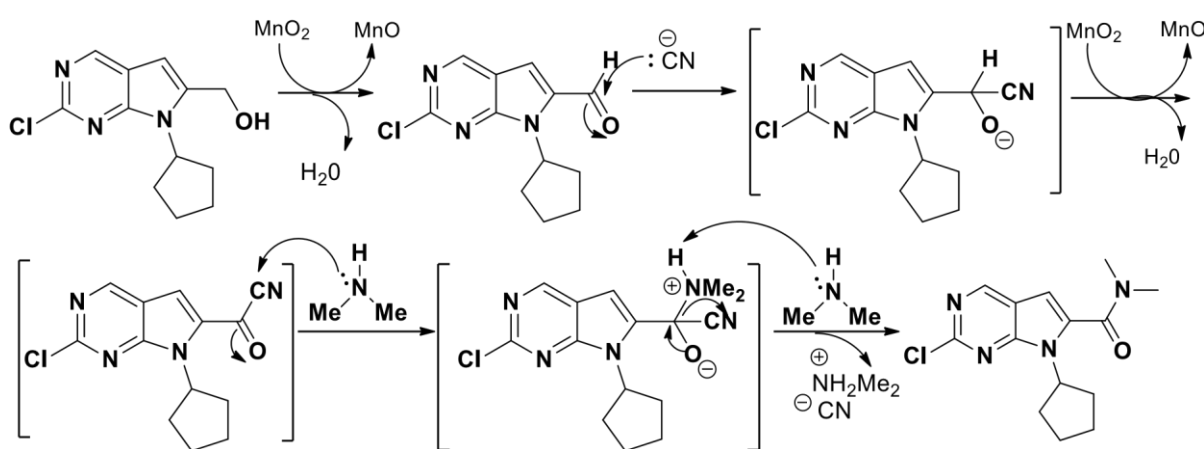
### 7.1.5 Αντίδραση οξειδωτικής αμίνωσης



Σχήμα 7.10: Αντίδραση οξειδωτικής αμίνωσης.

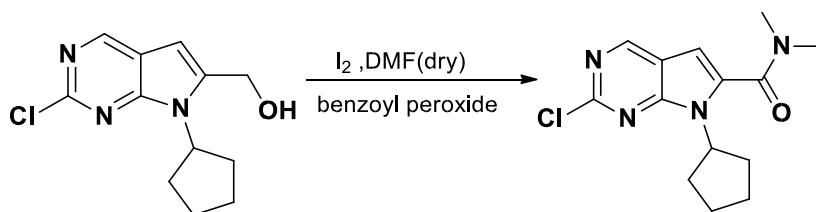
Για τη σύνθεση του αμιδίου πραγματοποιείται αρχικά μια αντίδραση οξειδωσης της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Hπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης προς αλδεΐδη με τη χρήση  $MnO_2$  ως οξειδωτικό. Ακολουθεί μια αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης των κυανιούχων ιόντων και οξείδωση του ενδιάμεσου σε κετο-νιτρίλιο με τη χρήση  $MnO_2$  σε διαλύτη άνυδρο DMF και θερμοκρασία δωματίου.

Στο κετο-νιτρίλιο που σχηματίζεται πραγματοποιείται μια πυρηνόφιλη προσθήκη από τη διμεθυλαμίνη και σχηματίζεται ξανά ένα ενδιάμεσο, το οποίο με απώλεια πρωτονίου σχηματίζεται το επιθυμητό αμίδιο.



Σχήμα 7.11: Μηχανισμός της αντίδρασης οξειδωτικής αμίνωσης .

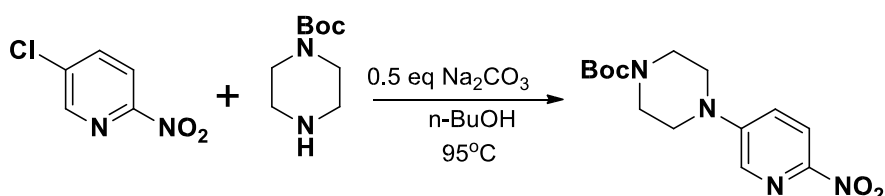
Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες βελτιστοποίησης της συγκεκριμένης αντίδρασης χρησιμοποιώντας λιγότερα αντιδραστήρια σε σχέση με αυτά που προτείνει η εταιρία και σε λιγότερο χρόνο. Σκοπός ήταν να μειωθεί το κόστος της αντίδρασης και να αυξηθεί η απόδοση. Οι προσπάθειες βέβαια που έγιναν στο εργαστήριο ήταν ελάχιστες καθώς δημιουργούνταν πολλά παραπροϊόντα και δεν υπήρχε η δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν πολλά και διαφορετικά οξειδωτικά αντιδραστήρια.



Σχήμα 7.12: Αντίδραση βελτιστοποίησης οξειδωτικής αμίνωσης.

Χρησιμοποιήθηκαν 2eq benzoyl peroxide, 0,1 eq I<sub>2</sub> iodine και 0,5 eq της αρχικής ένωσης. Βιβλιογραφικά ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το φορμαμίδιο, όμως αντί για αυτό χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Χρησιμοποιώντας τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια ο μηχανισμός της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω ριζών, έτσι σχηματίζονται αρκετά παραπροϊόντα και ο καθαρισμός και η επεξεργασία της αντίδρασης ήταν αρκετά χρονοβόρα και επίπονη. Το προϊόν δεν σχηματίστηκε και επομένως το ενδιαφέρον της ερευνητικής ομάδας στράφηκε στη βελτιστοποίηση άλλων αντιδράσεων.

#### 7.1.6 Αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης



Σχήμα 7.13: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος.

Η σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1καρβοξυλικού οξέος πραγματοποιείται με αρχική την ένωση 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη, με τη 1-Boc-πιπεραζίνη αντί της πιπεραζίνης που χρησιμοποιείται από την εταιρία Novartis. Με αυτόν τον τρόπο καταφέραμε να βελτιστοποιήσουμε την πειραματική πορεία καθώς το στάδιο της Boc-προστασίας δεν πραγματοποιείται, και εξοικονομείται χρόνος, αντιδραστήρια διαλύτες.

Στο εργαστήριο διενεργήθηκαν αρκετά πειράματα για την εύρεση βέλτιστων συνθηκών καθώς χρησιμοποιήθηκαν αρκετές βάσεις σε ποικίλες αναλογίες και διαφορετικοί διαλύτες.

#### 1<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης

- διαλύτης 1-βουτανόλη

Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24h, δηλαδή στον ελάχιστο χρόνο που προτείνει η εταιρία με θέρμανση στους 95°C και στη συνέχεια προστίθενται 0.5 eq Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ως βάση και η αντίδραση ολοκληρώθηκε συνολικά σε 30h. Το προϊόν της πυρηνόφιλης αρωματικής

υποκατάστασης απομονώνεται ως ελεύθερη βάση αντί του υδροχλωρικού άλατος σε απόδοση 64%.

### **2<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- **διαλύτης 1-βουτανόλη**

Στη συγκεκριμένη προσπάθεια δοκιμάστηκε ο ίδιος διαλύτης με 0.5 eq  $K_2CO_3$ , ως βάση και επιπλέον μειώσαμε την ποσότητα της ένωσης 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνης στη μισή, αλλάζοντας έτσι την αναλογία. Στην αντίδραση παρόλο που σχηματίστηκε το προϊόν δεν θεωρήθηκε επιτυχής καθώς σκοπός ήταν η ολοκλήρωση της σε 24h, όπως προηγουμένως. Δεν πραγματοποιήθηκε κατανάλωση της 1-Boc-πιπεραζίνης άρα η συγκεκριμένη αναλογία δεν βοηθά στη βέλτιστη πορεία της αντίδρασης.

### **3<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- **διαλύτης 1-προπανόλη**

### **4<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

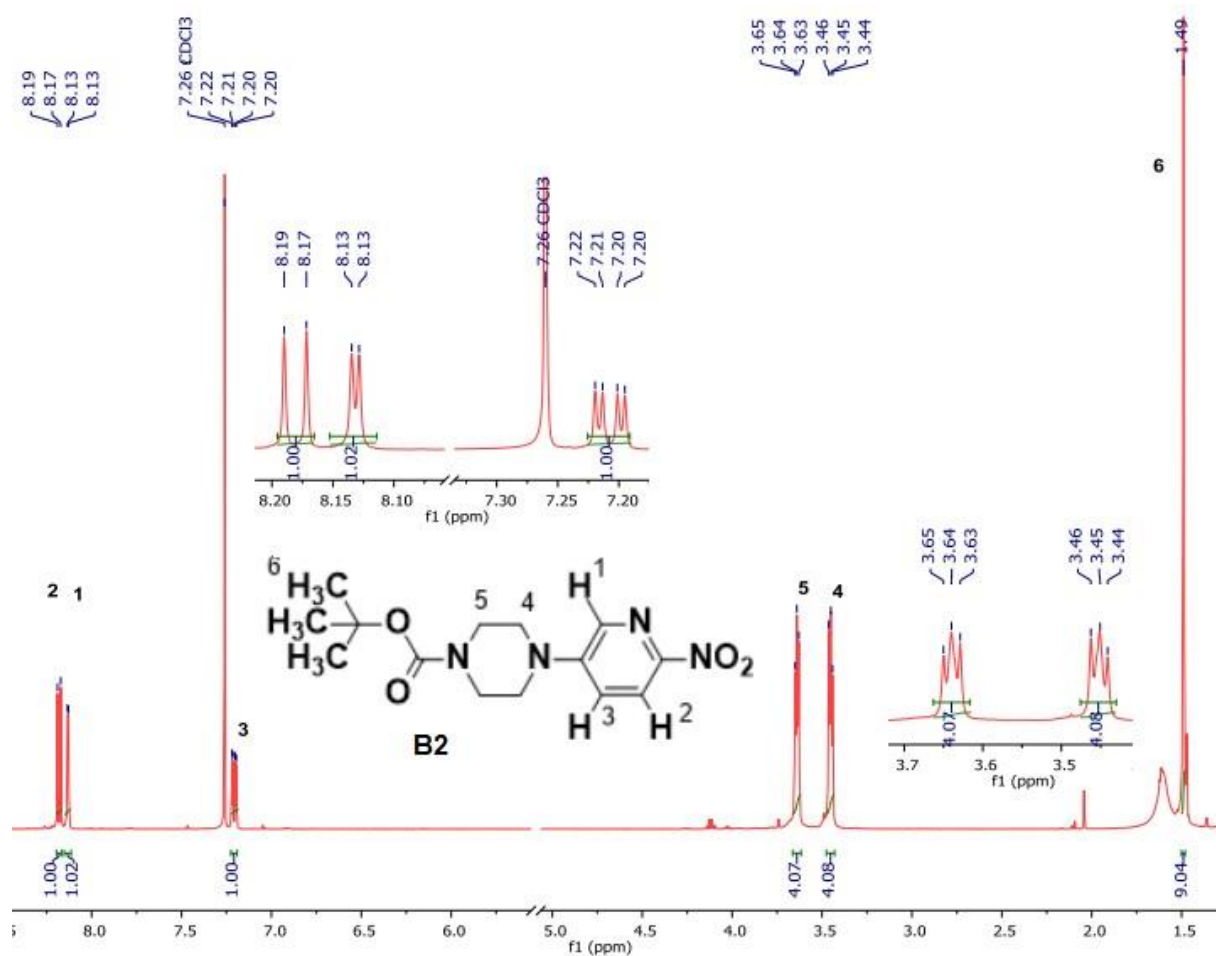
- **διαλύτης 2-προπανόλη**

### **5<sup>η</sup> προσπάθεια δοκιμαστικής αντίδρασης**

- **διαλύτης 1,4 διοξάνιο**

Σε αυτές τις προσπάθειες χρησιμοποιούνται 0.5 eq  $Na_2CO_3$ , ως βάση. Σε καμία από αυτές τις περιπτώσεις οι αρχικές ενώσεις δεν καταναλώθηκαν εξ ολοκλήρου και επιπλέον οι διαλύτες αυτοί εξατμιζόταν αρκετά γρήγορα κατά την διάρκεια της αντίδρασης και η ολοκλήρωσή τους σε 24 ώρες ήταν αδύνατη.





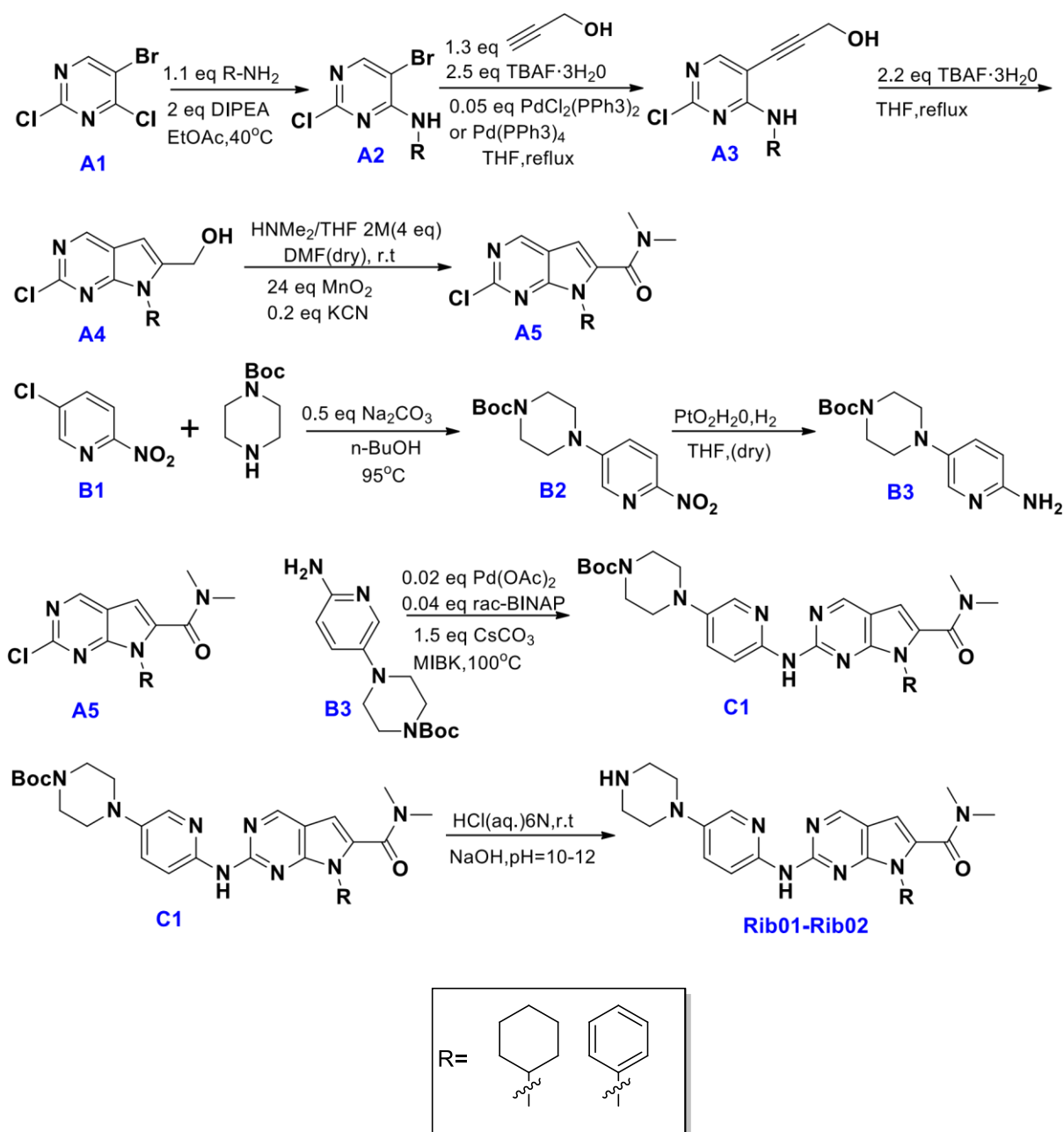
Σχήμα 7.14: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος, 500 MHz σε CDCl<sub>3</sub>.

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H<sub>2</sub>, εξαιτίας της νιτροομάδας σε γειτονική θέση, η οποία λόγω του -I επαγωγικού και -M συζυγιακού φαινομένου αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 συντονίζεται στα 8,18 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή, με <sup>3</sup>J = 9,14 Hz λόγω σχάσης με το γειτονικό πρωτόνιο H<sub>3</sub>. Το πρωτόνιο H<sub>1</sub> συντονίζεται στα 8,13 ppm λόγω της αποπροστασίας του γειτονικού ατόμου αζώτου της πυριδίνης και συντονίζεται ως μια διπλή κορυφή. Το πρωτόνιο H<sub>3</sub> συντονίζεται στα 7,21 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό πρωτόνιο H<sub>2</sub> και λόγω σχάσης μακράς απόστασης με το H<sub>1</sub>. Η χημική μετατόπιση στα 3,64 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια H<sub>5</sub> του πιπεραζινικού δακτυλίου, τα οποία εμφανίζονται ως τριπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H<sub>4</sub> συντονίζονται στα 3,45 ppm σαν μια τριπλή κορυφή. Όσον αφορά τα πρωτόνια H<sub>6</sub> της tert-βουτυλο-ομάδας συντονίζονται στα 1,49 ppm ως μια απλή κορυφή.

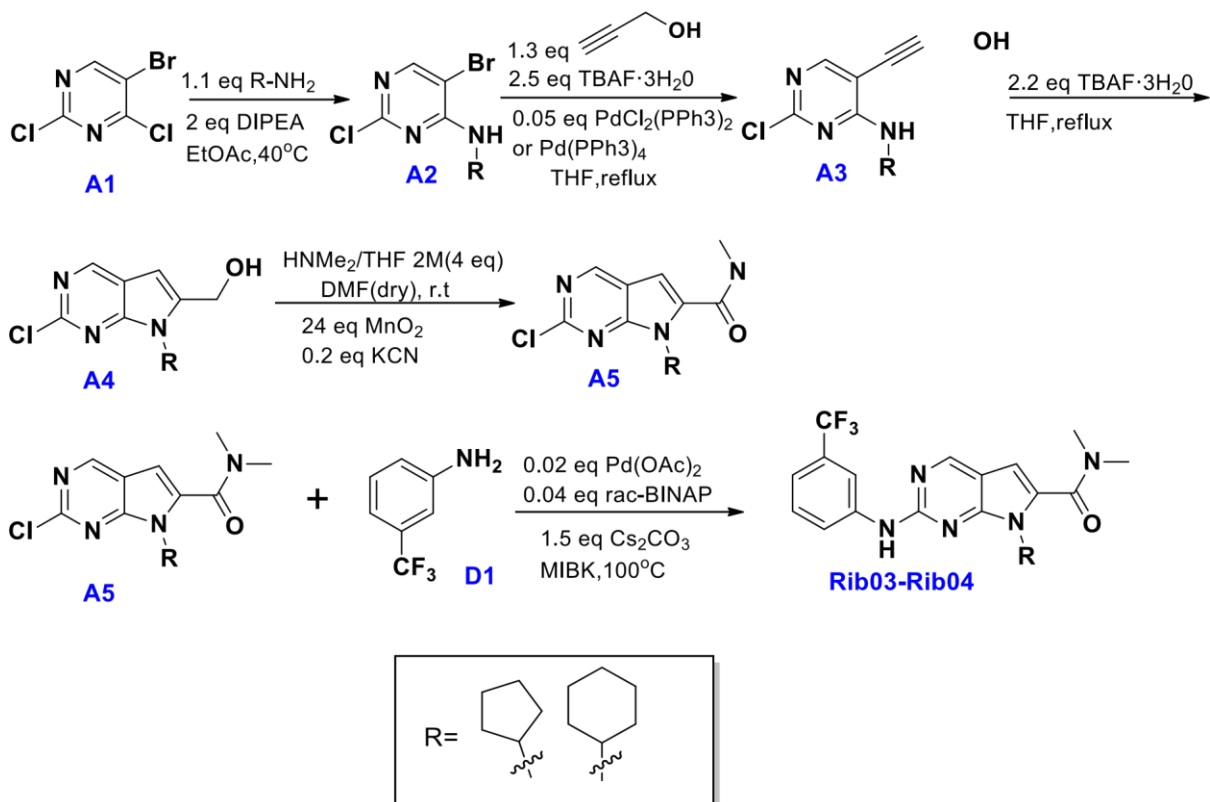
## 7.2 Σύνθεση αναλόγων του Ribociclib

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

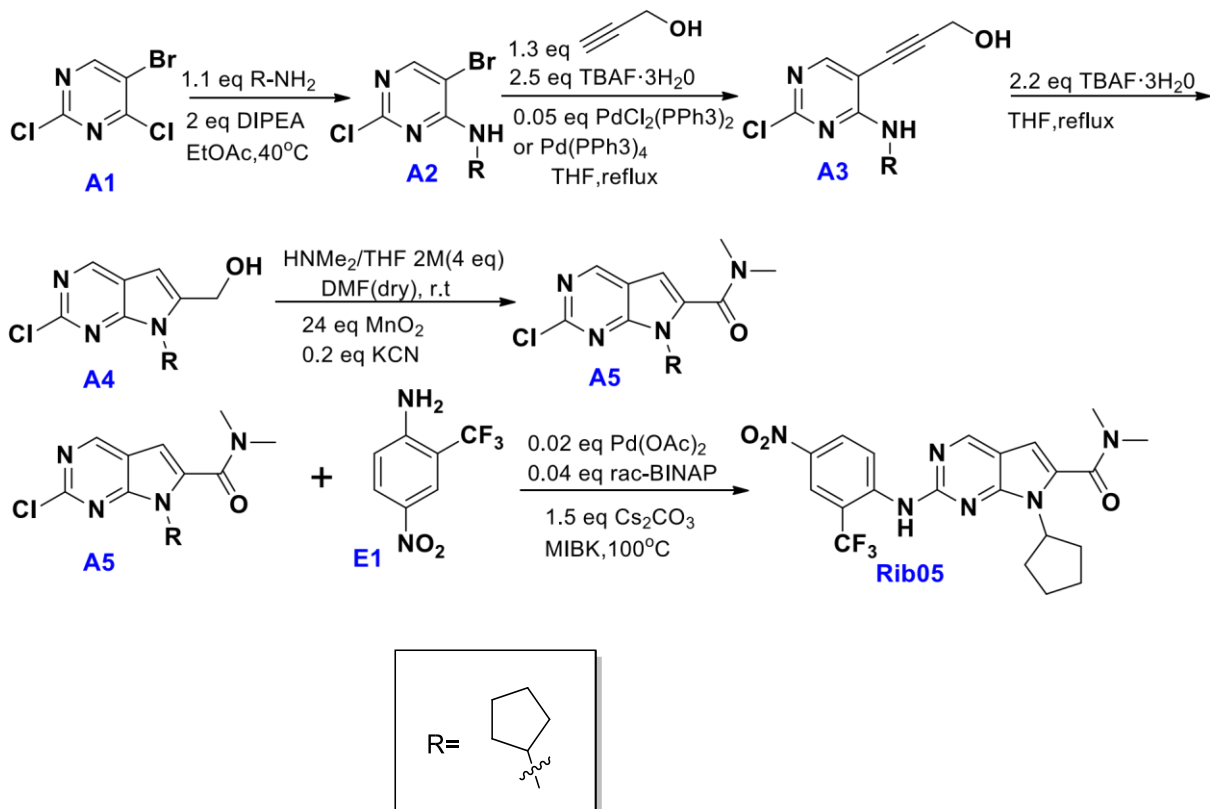
Στο εργαστήριο εκτός από τις προσπάθειες για βελτιστοποίηση της ήδη υπάρχουσας πειραματικής πορείας του Ribociclib, συντέθηκαν και εννέα ανάλογα απο την ερευνητική μας ομάδα. Οι συνθετικές πορείες αυτών των αναλόγων αποτυπώνονται επακριβώς στα παρακάτω σχήματα. Βέβαια, στο συγκεκριμένο δίπλωμα ειδίκευσης θα παρουσιαστούν αναλυτικά πέντε από αυτά, καθώς πραγματοποιήθηκαν και με τη δική μου ερευνητική εργασία.



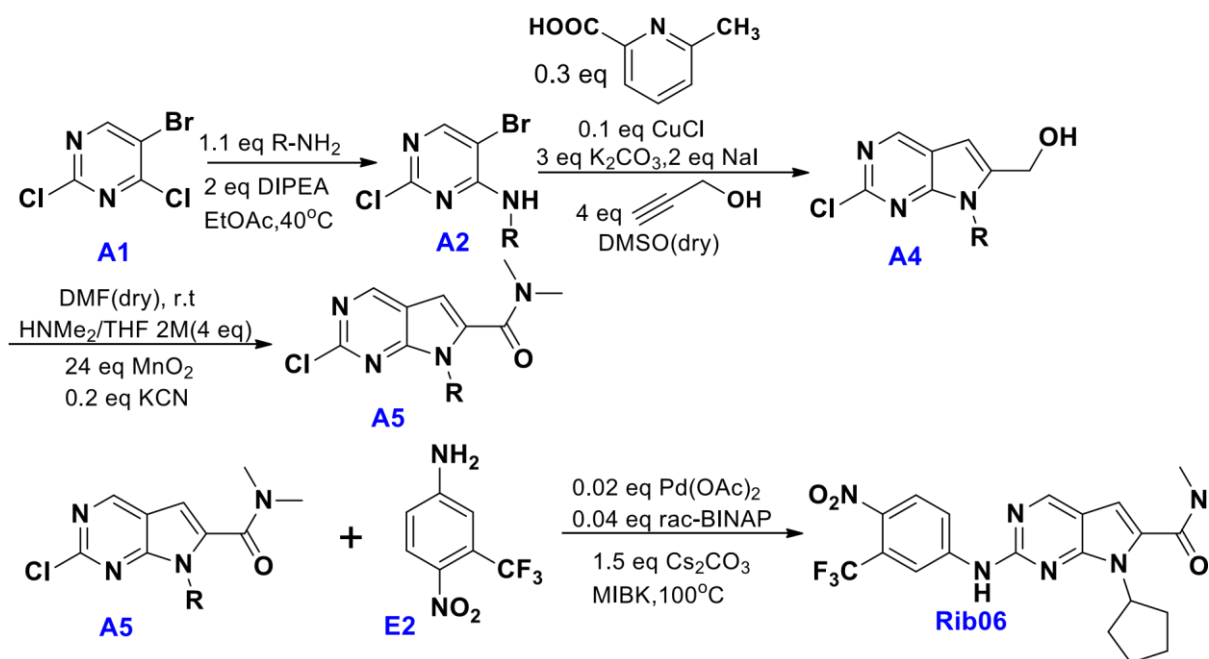
Σχήμα 7.15: Ολική συνθετική πορεία των ενώσεων **Rib01** και **Rib02**.



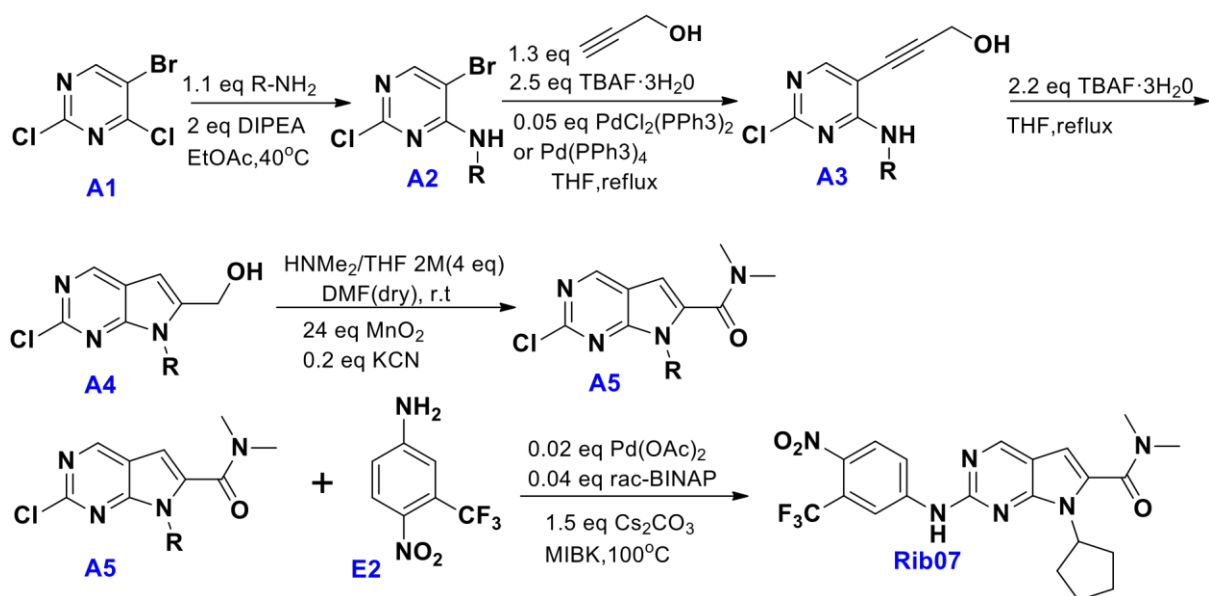
Σχήμα 7.16: Ολική συνθετική πορεία των ενώσεων **Rib03** και **Rib04**.



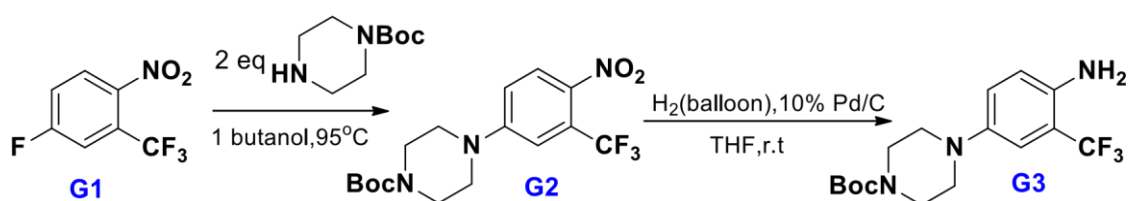
Σχήμα 7.17: Ολική συνθετική πορεία της ένωσης **Rib05**.

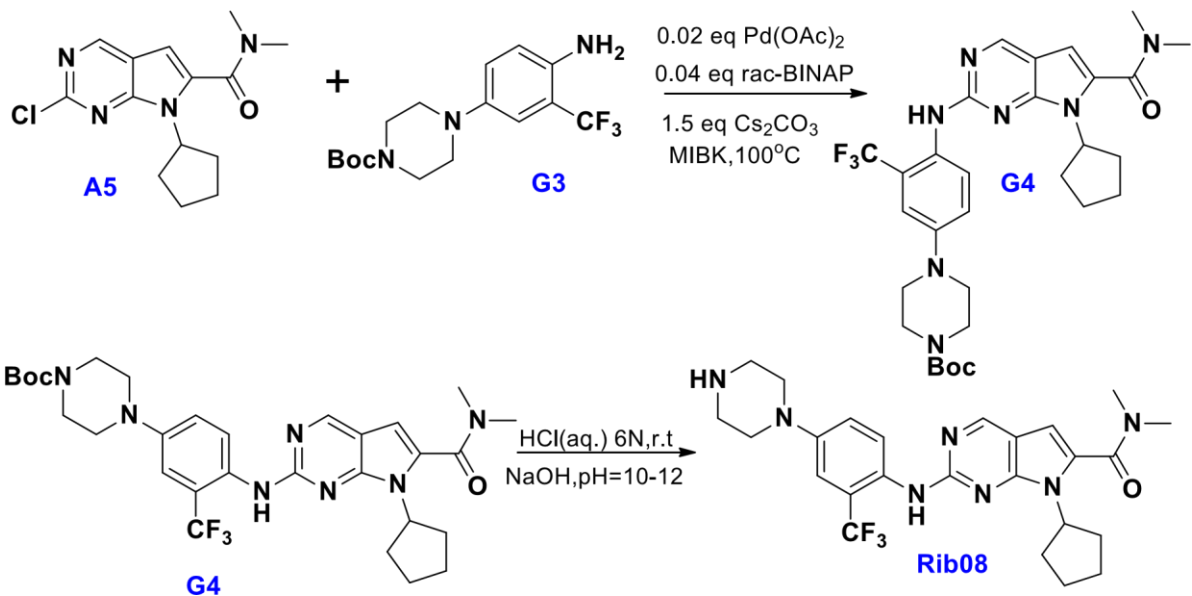


Σχήμα 7.18 : Ολική συνθετική πορεία της ένωσης **Rib06**.

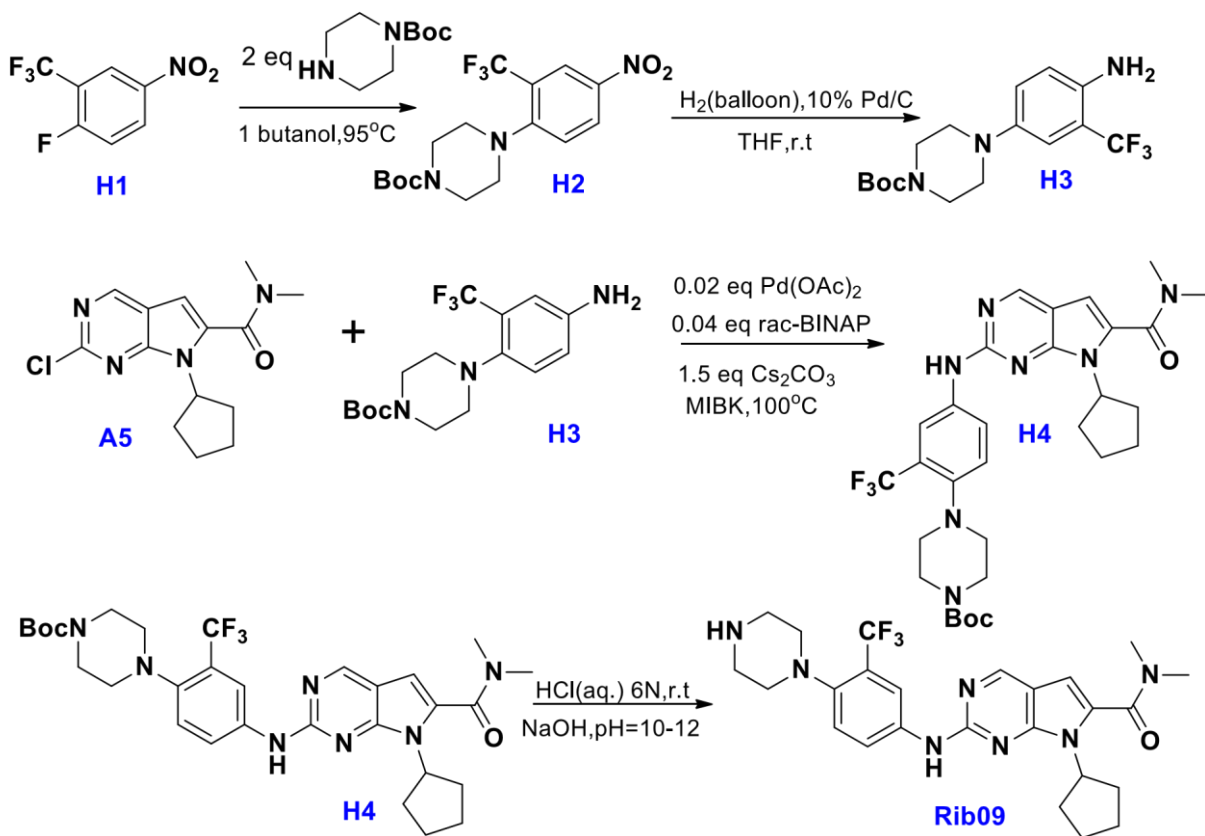


Σχήμα 7.19: Ολική συνθετική πορεία της ένωσης **Rib07**.





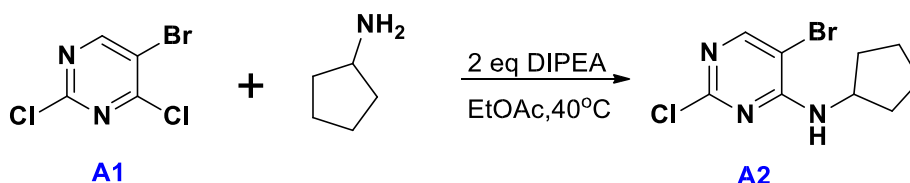
Σχήμα 7.20: Ολική συνθετική πορεία της ένωσης **Rib08**.



Σχήμα 7.21: Ολική συνθετική πορεία της ένωσης **Rib09**.

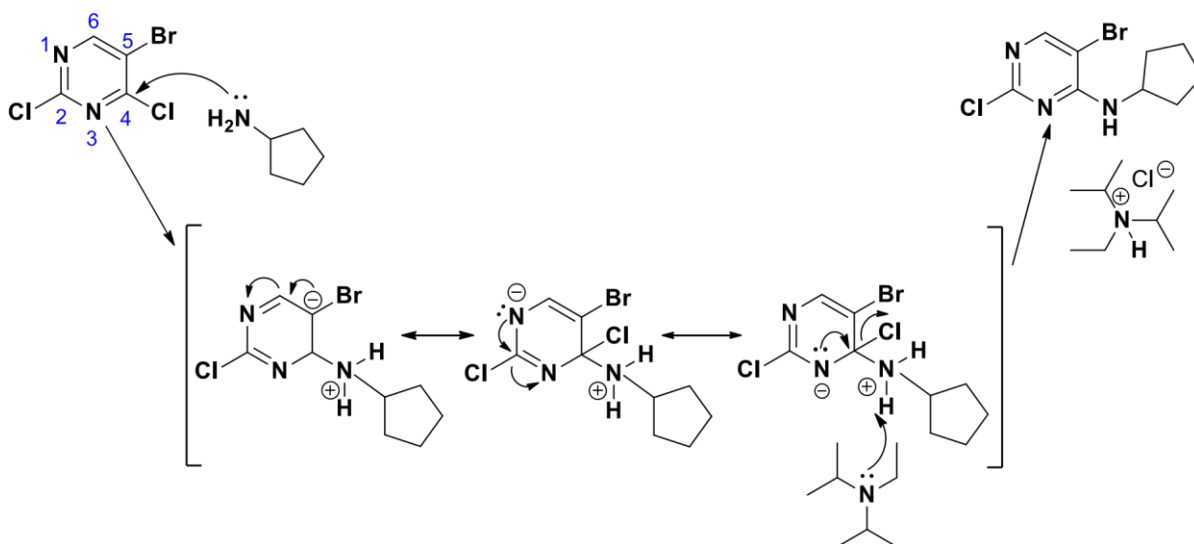
### 7.3 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη

Προκειμένου να γίνει σύνθεση της ένωσης **A2**, πραγματοποιείται αρχικά μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Η 5-βρωμο-2,4-δichλωροπυριμιδίνη, δηλαδή η ένωση **A1** και η κυκλοπεντυλαμίνη αντιδρούν σε αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση DIPEA (N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα στους 40°C.



Σχήμα 7.22: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης **A2**.

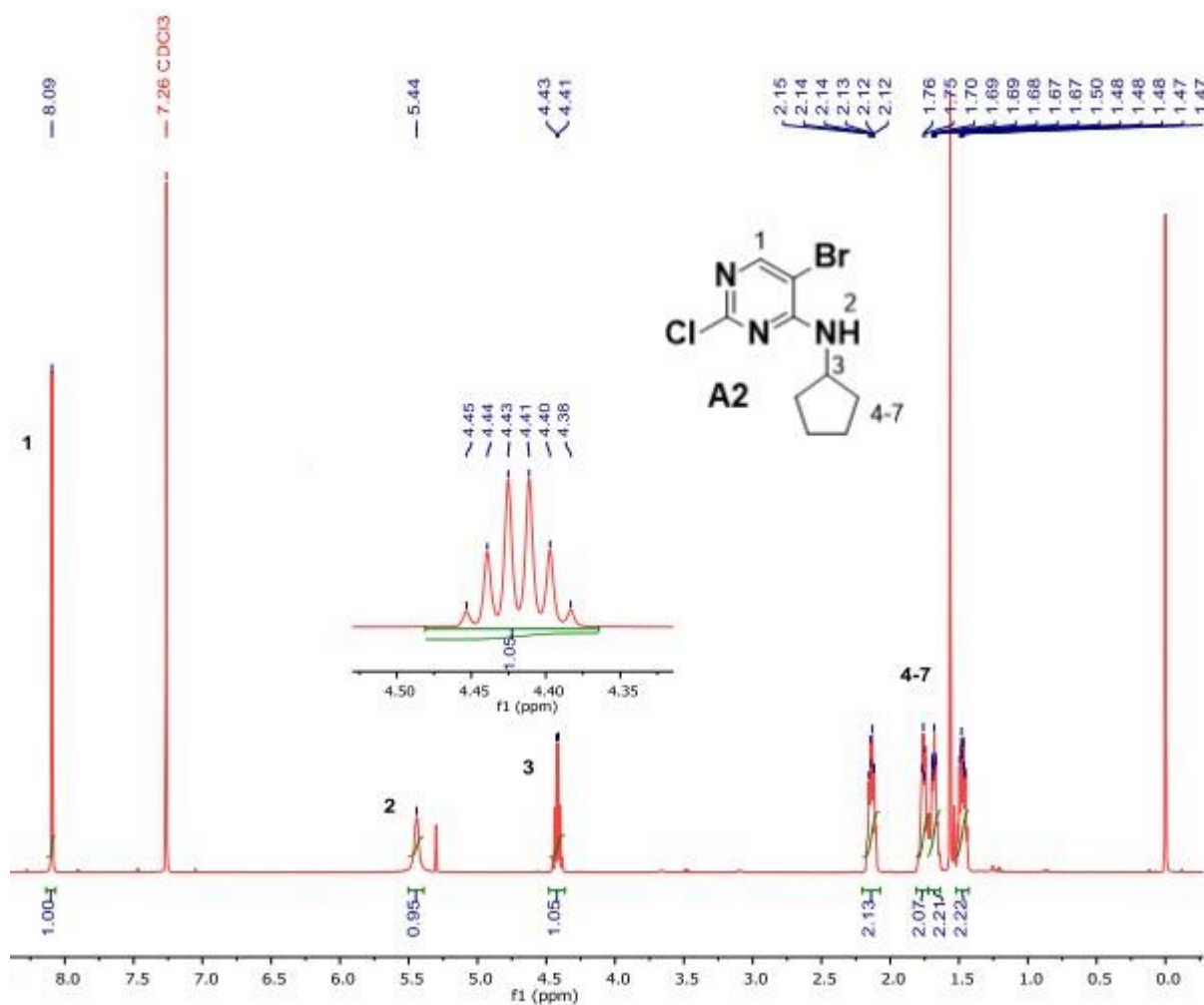
Πιο συγκεκριμένα, ο μηχανισμός της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης περιλαμβάνει δυο στάδια: την προσβολή του δακτυλίου της 5-βρωμο-2,4-δichλωροπυριμιδίνης από ένα πυρηνόφιλο, την κυκλοπεντυλαμίνη και σε δεύτερο στάδιο την απομάκρυνση της αποχωρούσας ομάδας για να ανακτηθεί η αρωματικότητα. Το ενδιάμεσο προϊόν σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού, το οποίο ονομάζεται σύμπλοκο **Meisenheimer**, και είναι αρνητικά φορτισμένο. Στην 5-βρωμο-2,4-δichλωροπυριμιδίνη η θέση 4 είναι πιο δραστική σε σχέση με τη θέση 2 λόγω καλύτερης σταθεροποίησης του ενδιαμέσου και άρα πραγματοποιείται η πυρηνόφιλη στη θέση αυτή.



Σχήμα 7.23: Μηχανισμός σύνθεσης του προϊόντος πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης **A2**.

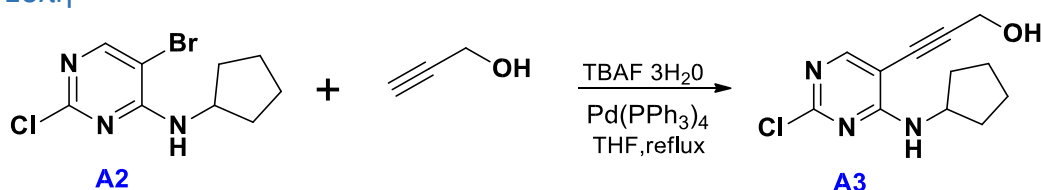
### 7.3.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη παρατηρούμε ότι στις υψηλότερες τιμές, στα 8.09ppm, συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 και απεικονίζεται στο φάσμα ως μια απλή κορυφή καθώς δεν γειτνιάζει με κάποιο πρωτόνιο. Είναι το πλέον αποπροστατευμένο, καθώς σε θέσεις γειτονικές ως προς αυτό βρίσκονται το άτομο του αζώτου της πυριμιδίνης που είναι αρκετά ηλεκτροαρνητικό με αποτέλεσμα να αποπροστατεύεται ισχυρά. Το πρωτόνιο H<sub>2</sub> δίνει μια απλή κορυφή, σχετικά ευρεία στα 5,44ppm και το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 συντονίζεται στα 4,42ppm. Το πρωτόνιο H<sub>2</sub> είναι περισσότερο αποπροστατευμένο σε σχέση με το πρωτόνιο H<sub>3</sub> καθώς συνδέεται με το άτομο του αζώτου που είναι δότης ηλεκτρονίων στον πυριμιδινικό δακτύλιο, μέσω θετικού συζυγιακού φαινομένου(+M), οπότε το H<sub>2</sub> αποπροστατεύεται περισσότερο σε σχέση με το H<sub>3</sub> που βρίσκεται απλά σε γειτονική θέση με το άτομο του αζώτου. Το πρωτόνιο H<sub>3</sub> εμφανίζεται ως μια εξαπλή κορυφή, λόγω σχάσης με τα τέσσερα γειτονικά πρωτόνια του κυκλοπεντανικού δακτυλίου και το αμινικό πρωτόνιο, H<sub>2</sub>. Τα πιο προστατευμένα πρωτόνια είναι πρωτόνια του κυκλοπεντανίου, τα οποία εμφανίζονται με τέσσερα διαφορετικά σήματα στο φάσμα διαμορφώνουν έναν περίπλοκο αλληλεπικαλυπτόμενο τύπο σχάσης, και συντονίζονται 1,4–2,2 ppm, με ολοκλήρωση 8.



Σχήμα 7.24: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A2**, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

#### 7.4 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη



Σχήμα: Αντίδραση σχηματισμού της προπαργυλικής αλκοόλης **A3**.

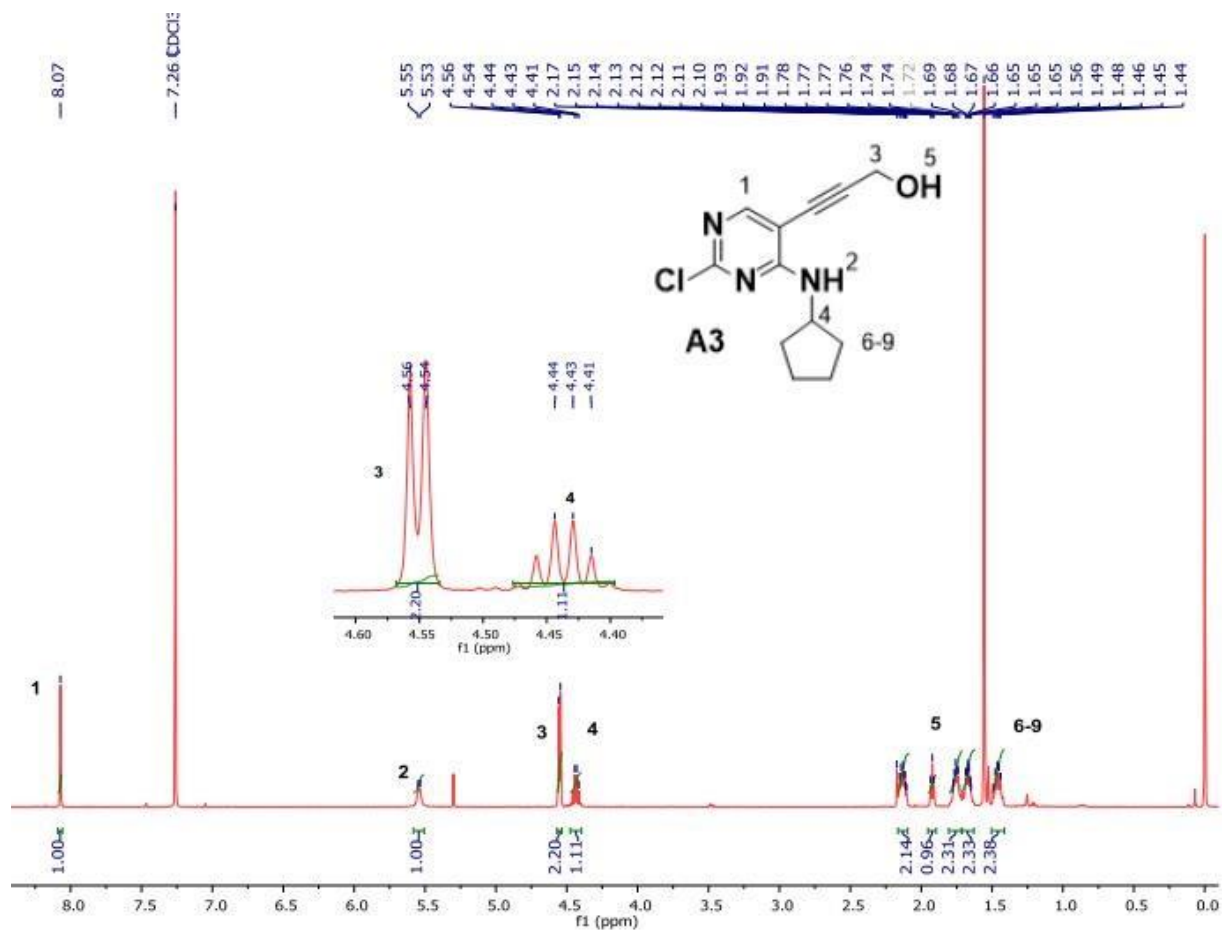
Το προϊόν Sonogashira συντέθηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικά αντιδραστήρια την ένωση 5βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη, προπαργυλική αλκοόλη, καταλύτη παλλαδίου, είτε το  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , είτε το  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ . Η χρήση κάποιας ήπιας βάσης απαιτείται στον καταλυτικό κύκλο για την αποπρωτονίωση του όξινου αλκινικού υδρογόνου.

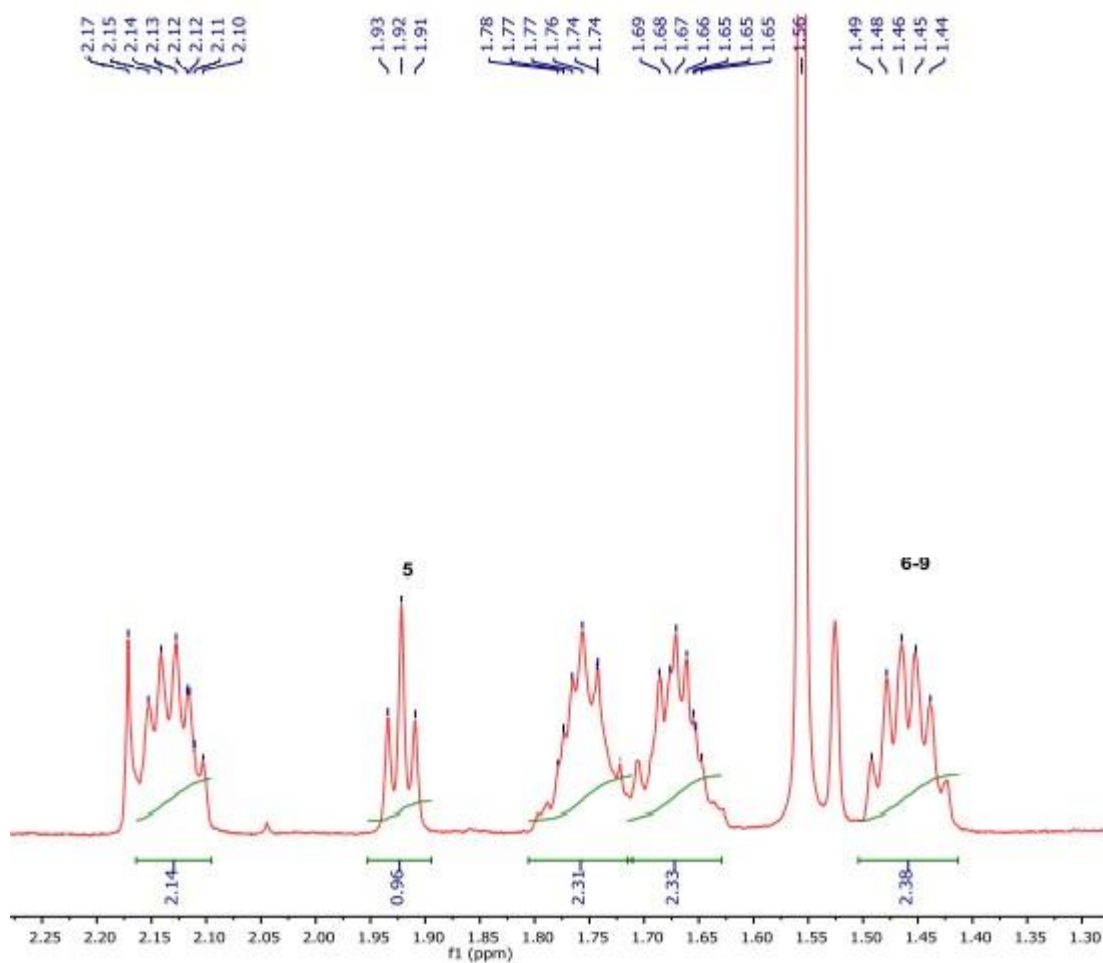


Η αντίδραση Sonogashira που ακολουθήσαμε, σύμφωνα με την εταιρία Novartis, περιλαμβάνει τη χρήση καταλύτη  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  αντί  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ . Επιπρόσθετα, απουσιάζουν τα άλατα  $\text{Cu(I)}$ , που χρησιμοποιούνται σε άλλους καταλυτικούς κύκλους και ενώ αντί κάποιας κλασικής βάσης χρησιμοποιήθηκε το τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας, TBAF, με δράση ήπιας βάσης λόγω των ιόντων φθορίου ( $\text{F}^-$ ) που διαθέτει. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε διαλύτης τετραϋδροφουράνιο και θέρμανση reflux.

#### 7.4.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη

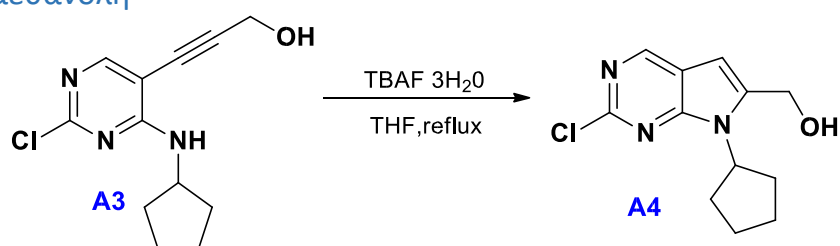
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη το πλέον αποπροστατευμένο είναι το πυριμιδινικό και εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8,0 ppm. Όσον αφορά το αμινικό πρωτόνιο 2 συντονίζεται στα 5,54 ppm ως ευρεία κορυφή. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 3 αντιστοιχούν στη διπλή κορυφή με χημική μετατόπιση 4,55 ppm λόγω του υδρογόνου της υδροξυλομάδας με  $^3J = 6,21 \text{ Hz}$ . Στα 4,44 ppm ως εξαπλή κορυφή εμφανίζεται το πρωτόνιο  $\text{H}_4$  και το πρωτόνιο  $\text{H}_5$  της υδροξυλομάδας καταγράφεται και αυτό στο φάσμα NMR στα 1,92 ppm σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  ως τριπλή κορυφή ( $^3J = 6,24 \text{ Hz}$ ) λόγω σχάσης με τα δύο γειτονικά μεθυλικά υδρογόνα  $\text{H}_3$ . Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ευκίνητης διαμόρφωσης που παρουσιάζει στο χώρο το κυκλοπεντάνιο που συνδέεται με δεσμό με το άτομο του αζώτου και παγιδεύει την υδροξυλομάδα. Εφόσον παγιδεύεται η υδροξυλομάδα δεν μπορεί να γίνει ανταλλαγή του H με δευτέριο D. Τα πρωτόνια  $\text{H}_6$ - $\text{H}_9$  του κυκλοπεντανικού δακτυλίου εντοπίζονται πάλι στη περιοχή 1,4–2,2 ppm.





Σχήμα 7.25: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης A3, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

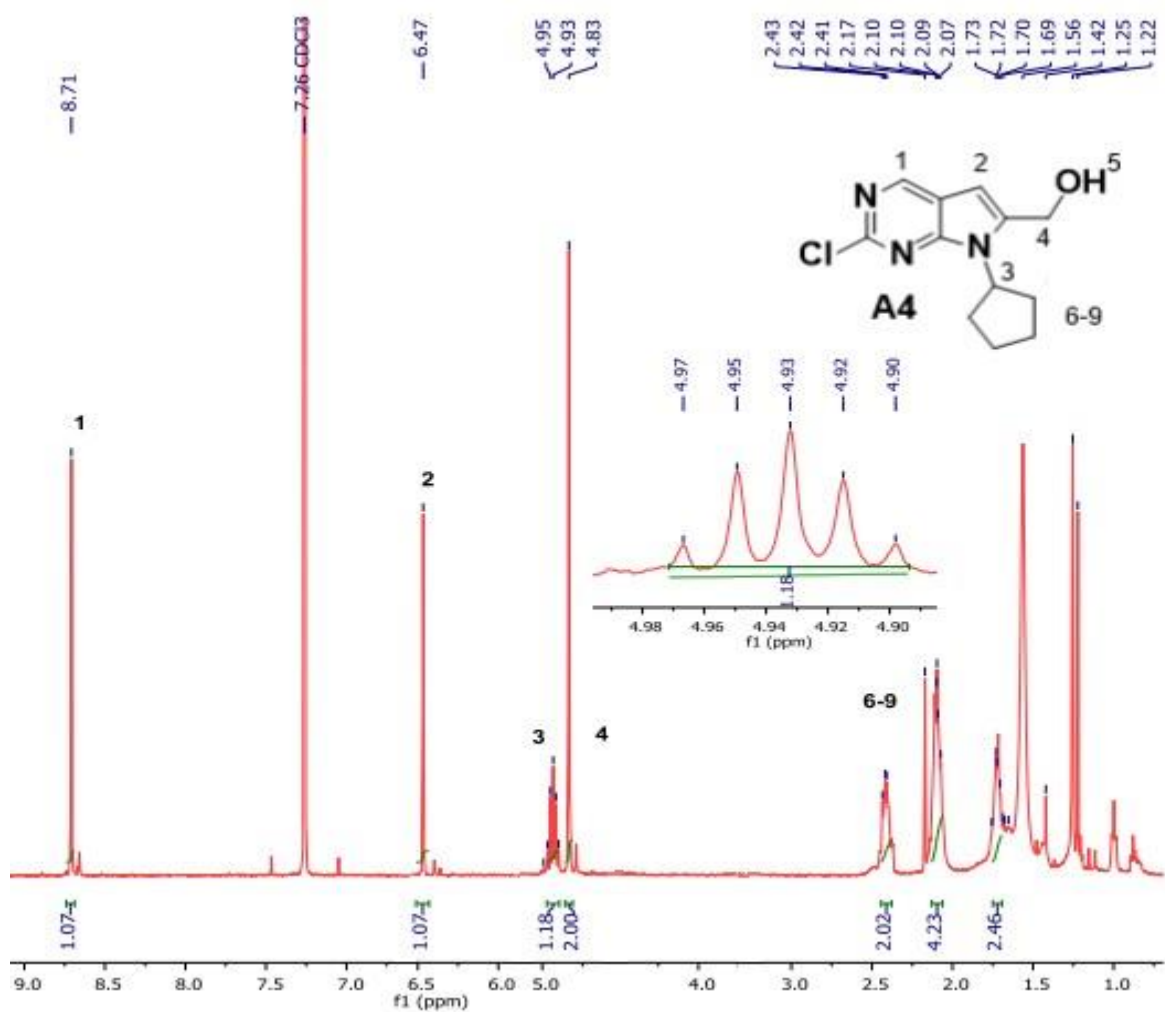
### 7.5 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6υλο)μεθανόλη



Σχήμα 7.26: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος κυκλοποίησης-αλκοόλη A4.

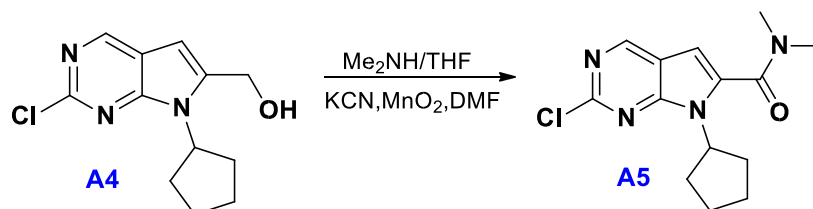
### 7.5.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7Hπυρρολο [2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-7H-πυρρολο [2,3d] πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη τα πλέον αποπροστατευμένα είναι τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 1 και 2, τα οποία συντονίζονται στα 8,7 ppm και 6,42 ppm αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H1 αποπροστατεύεται περισσότερο από το πρωτόνιο 2, λόγω του εκδηλωμένου **+M** συζυγιακού φαινομένου του μονήρους ζεύγους του αζώτου, και εμφανίζεται στο φάσμα ως απλή κορυφή, καθώς σε γειτονικό άνθρακα δεν υπάρχει κάποιο πρωτόνιο. Το πρωτόνιο H2 εμφανίζεται και αυτό ως απλή κορυφή στο φάσμα. Η χημική μετατόπιση στα 4,93 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3 και εμφανίζεται πλέον ως μια πενταπλή κορυφή, λόγω της παρουσίας τεσσάρων γειτονικών πρωτονίων. Τα δυο πρωτόνια υπ' αριθμόν 4 συντονίζονται στα 4,83 ppm και εμφανίζονται ως απλή κορυφή στο φάσμα, καθώς το H της υδροξυλομάδας ανταλλάσσεται με D και δεν το βλέπουμε στο φάσμα, λόγω σχηματισμού του 5,7-διαζα-ϊνδολικού δακτυλίου, εφόσον δεν υπάρχει περιστροφή της αμινομάδας για να το παγιδεύσει. Τα περισσότερο προστατευμένα είναι τα οκτώ πρωτόνια του κυκλοπεντανίου τα οποία εμφανίζονται σαν τρεις ευρείες κορυφές και διαμορφώνουν όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις ένα περίπλοκο αλληλεπικαλυπτόμενο τύπο σχάσης και συντονίζονται στην περιοχή από 1,5-2,5 ppm.



Σχήμα 7.27: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης A4, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

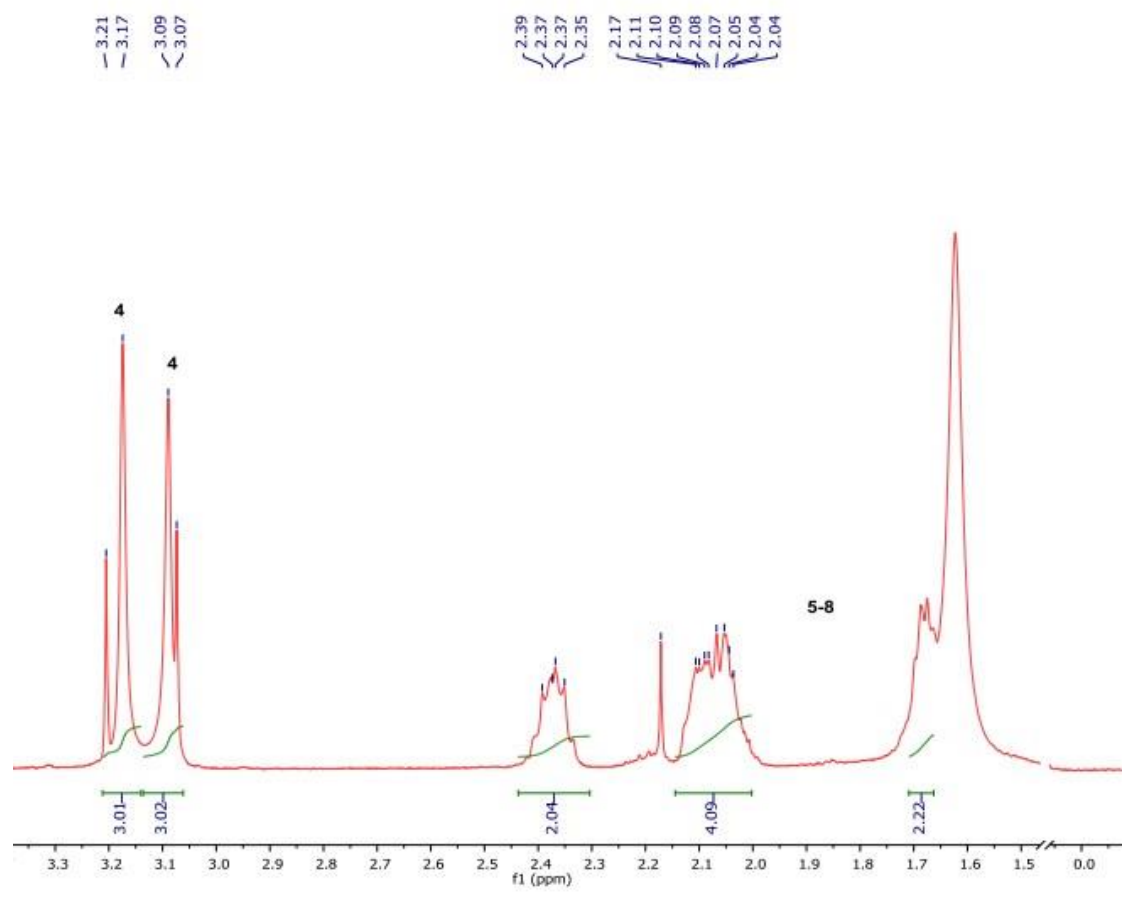
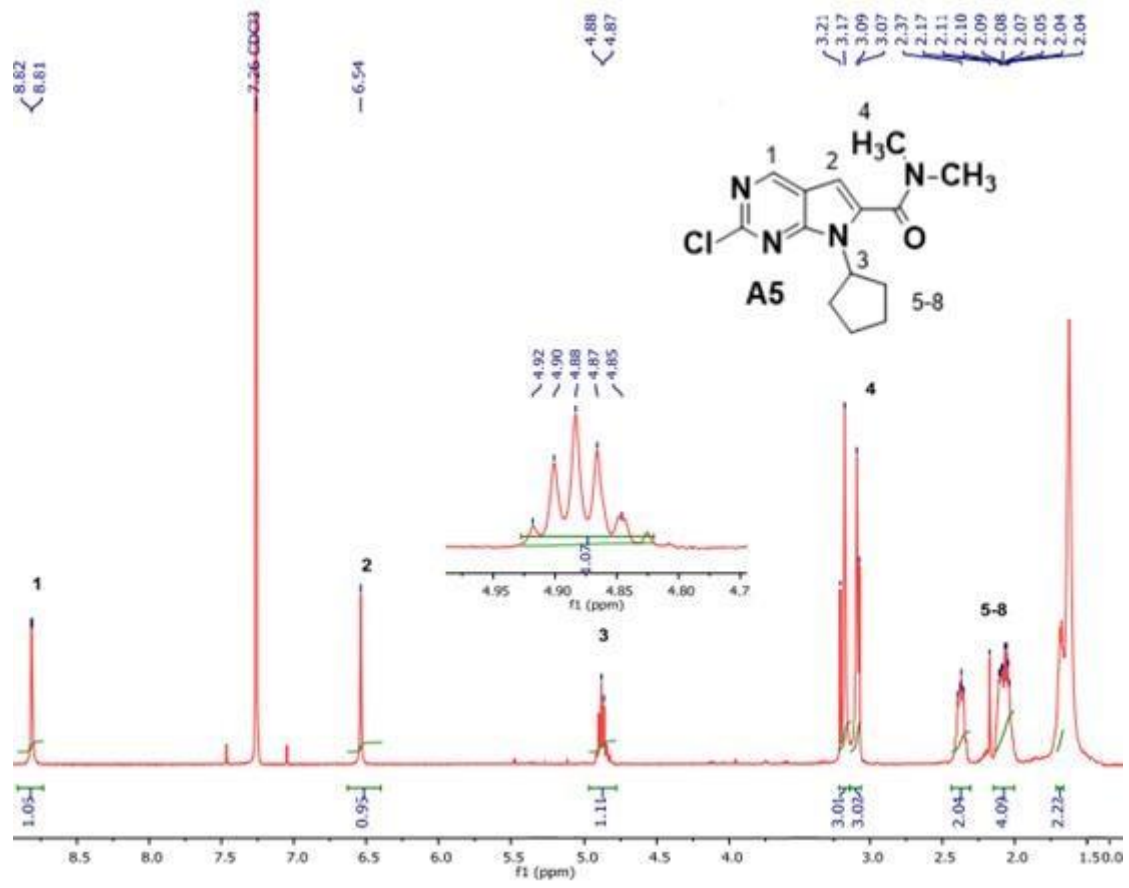
## 7.6 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3d]πυριμιδινη-6-καρβοξαμίδιο



Σχήμα 7.28: Αντίδραση σχηματισμού του αμιδίου A5.

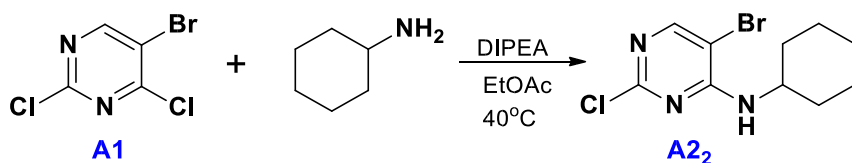
### 7.6.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιου

Στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο [2,3d] πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο το πλέον αποπροστατευμένο υδρογόνο είναι το H1 στα 8,81 ppm, εμφανίζεται στο φάσμα ως απλή κορυφή εφόσον πλησίον του δεν υπάρχει κάποιο γειτονικό πρωτόνιο. Το επόμενο πιο αποπροστατευμένο υδρογόνο είναι το H2 στα 6,54 ppm, το οποίο αποπροστατεύεται εξαιτίας της εκδηλούμενης συζυγίας που δημιουργείται μεταξύ του πυριμιδινικού και πυρρολικού δακτυλίου και όπως το πρωτόνιο 1 εμφανίζει απλή κορυφή. Παρατηρείται μεγαλύτερη αποπροστασία στα δυο πρωτόνια, η οποία οφείλεται στη παρουσία του αμίδιου. Τα πρωτόνια H4 των δυο μεθυλομάδων συντονίζονται στα 3,09 και 3,1ppm και καταγράφονται στο φάσμα ως δυο απλές κορυφές, όπως αναμένεται με ολοκλήρωση τρία η κάθε μια γεγονός που αποδεικνύει το σχηματισμό του αμίδιου. Παρατηρείται ότι οι δυο μεθυλομάδες δεν συντονίζονται στα ίδια ppm, επομένως δεν είναι ισοδύναμες λόγω της συζυγίας που εκδηλώνεται στο αμίδιο (**+M**). Η χημική μετατόπιση στα 4,87 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3, το σήμα του οποίου σχάζεται σε μια πενταπλή κορυφή. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις τα περισσότερο προστατευμένα είναι τα πρωτόνια του κυκλοπεντανίου, τα οποία διαμορφώνουν ένα περίπλοκο αλληλεπικαλυπτόμενο τύπο σχάσης στην περιοχή 1,5-2,5 ppm.



Σχήμα 7.29: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A5**, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

## 7.7 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνη

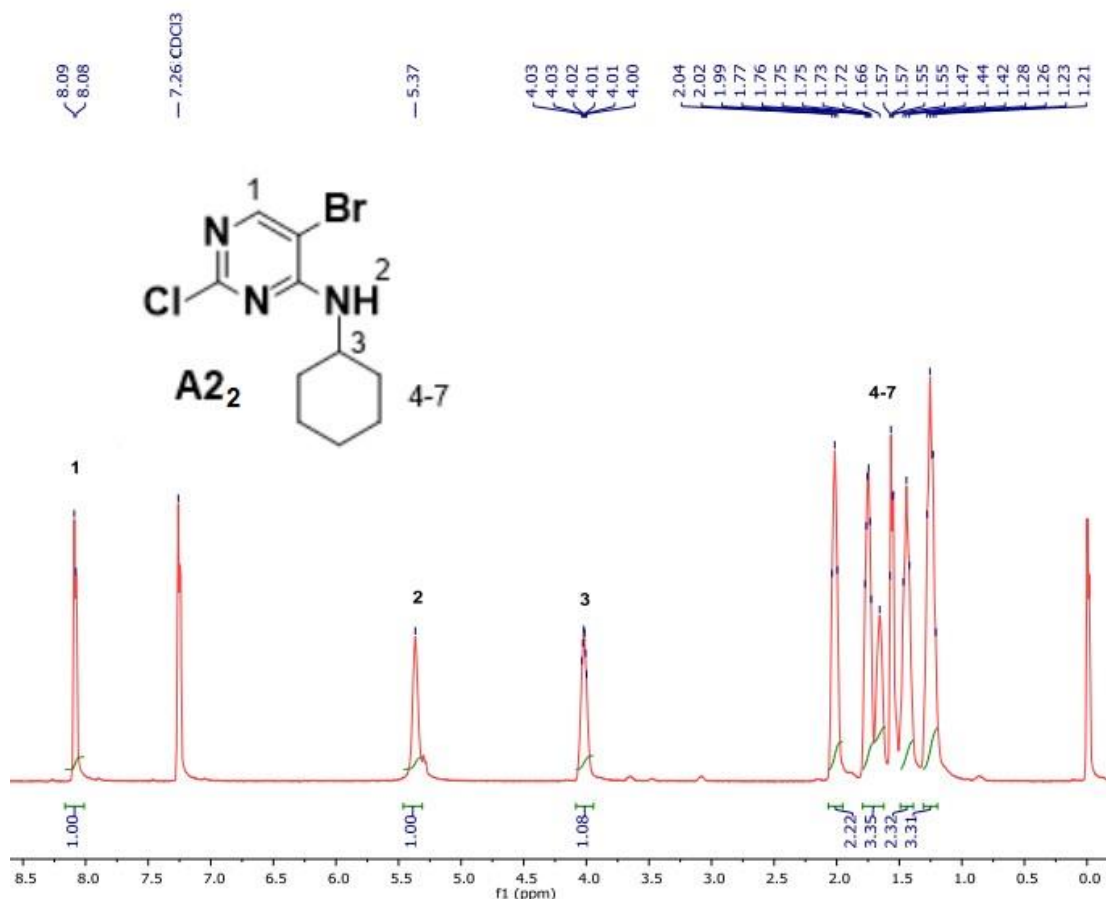


Σχήμα 7.30: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος πυρηνόφιλης αρωματική υποκατάστασης **A2<sub>2</sub>**.

### 7.7.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνη

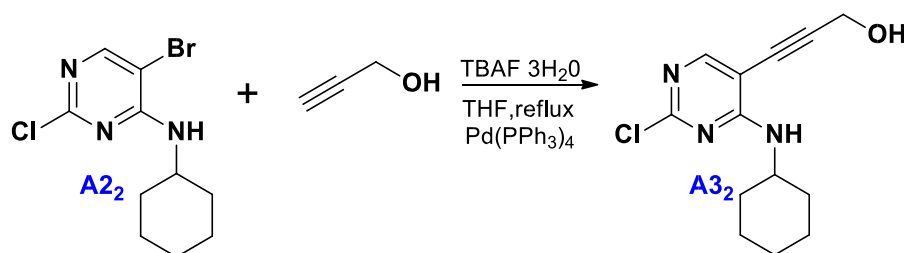
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνη παρατηρούμε ότι στις υψηλότερες τιμές, στα 8,09 ppm, συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 και απεικονίζεται στο φάσμα ως μια απλή. Το πρωτόνιο H2 δίνει μια απλή κορυφή στα 5,37 ppm και το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 συντονίζεται στα 4,02 ppm. Το πρωτόνιο H3, που ανήκει στο κυκλοεξάνιο εμφανίζεται ως μια πολλαπλή κορυφή. Τα πιο προστατευμένα πρωτόνια είναι τα πρωτόνια του εξανίου, τα οποία δίνουν μια πολλαπλή αλληλεπικαλυπτόμενη κορυφή, περίπου από 1,1-2,1 ppm, με ολοκλήρωση 10.





Σχήμα 7.31: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A22**, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

## 7.8 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοεξυλαμινοπυριμιδιν 5-υλο)προπ-2-υν-1όλη

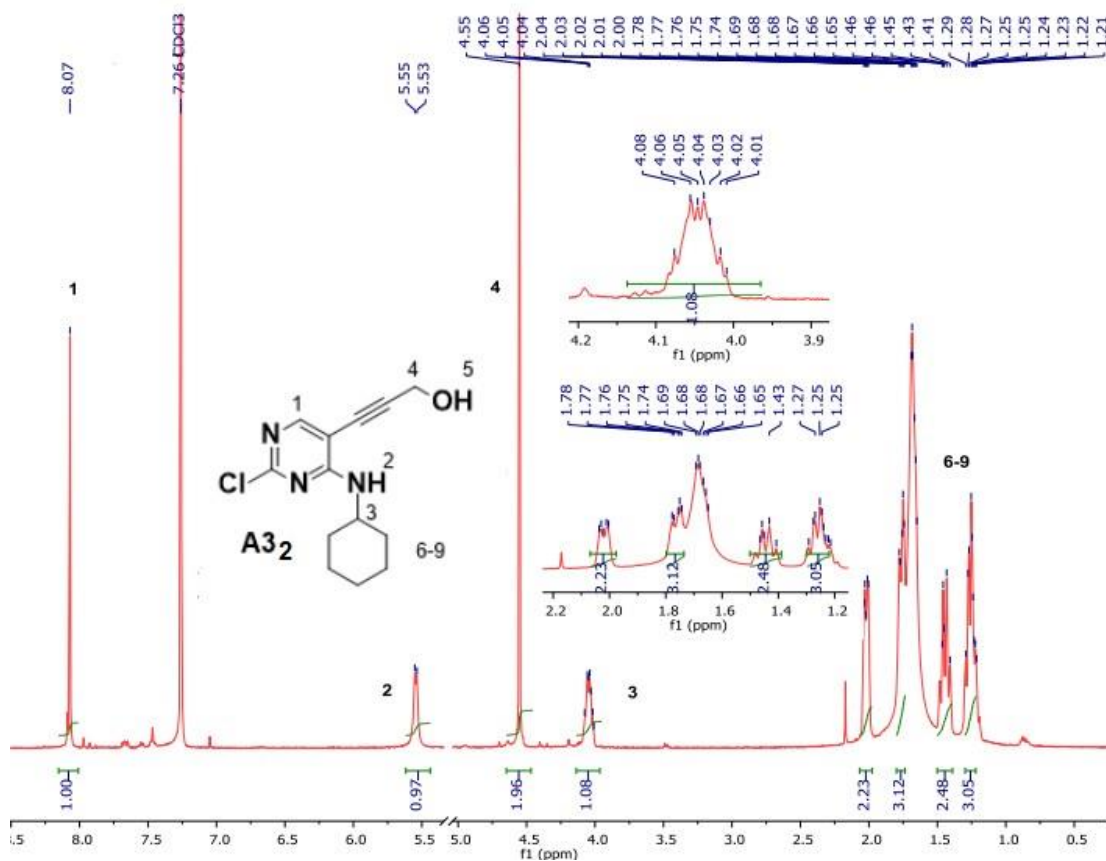


Σχήμα 7.32: Αντίδραση σχηματισμού της προπαργυλικής αλκοόλης **A32**.

### 7.8.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7Hπυρρολο [2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης

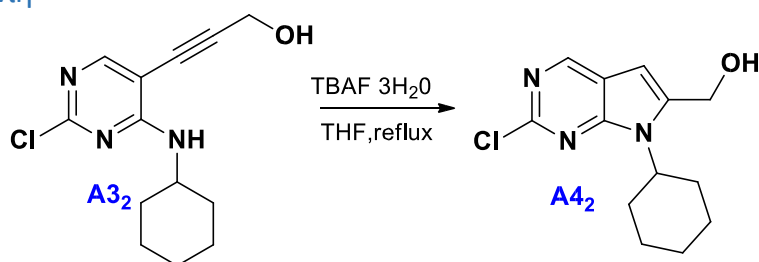
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7Hπυρρολο [2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης παρατηρούμε ότι στα 8,07 ppm εμφανίζεται το H1 ως απλή κορυφή. Το αμινικό πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 5,54 ppm ως μια ευρεία κορυφή. Όσον αφορά το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 εμφανίζεται στο φάσμα ως πολλαπλή κορυφή στα 4,05 ppm. Στα

4,55ppm συντονίζονται τα πρωτόνια της μεθυλενομάδας δίπλα από το τριπλό δεσμό, ως απλή κορυφή. Τα πρωτόνια του κυκλοπεξανίου, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως διαμορφώνουν έναν περίπλοκο αλληλεπικαλυπτόμενο τύπο σχάσης με χημική μετατόπιση από τα 1-2,2 ppm.



Σχήμα 7.33: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A32**, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

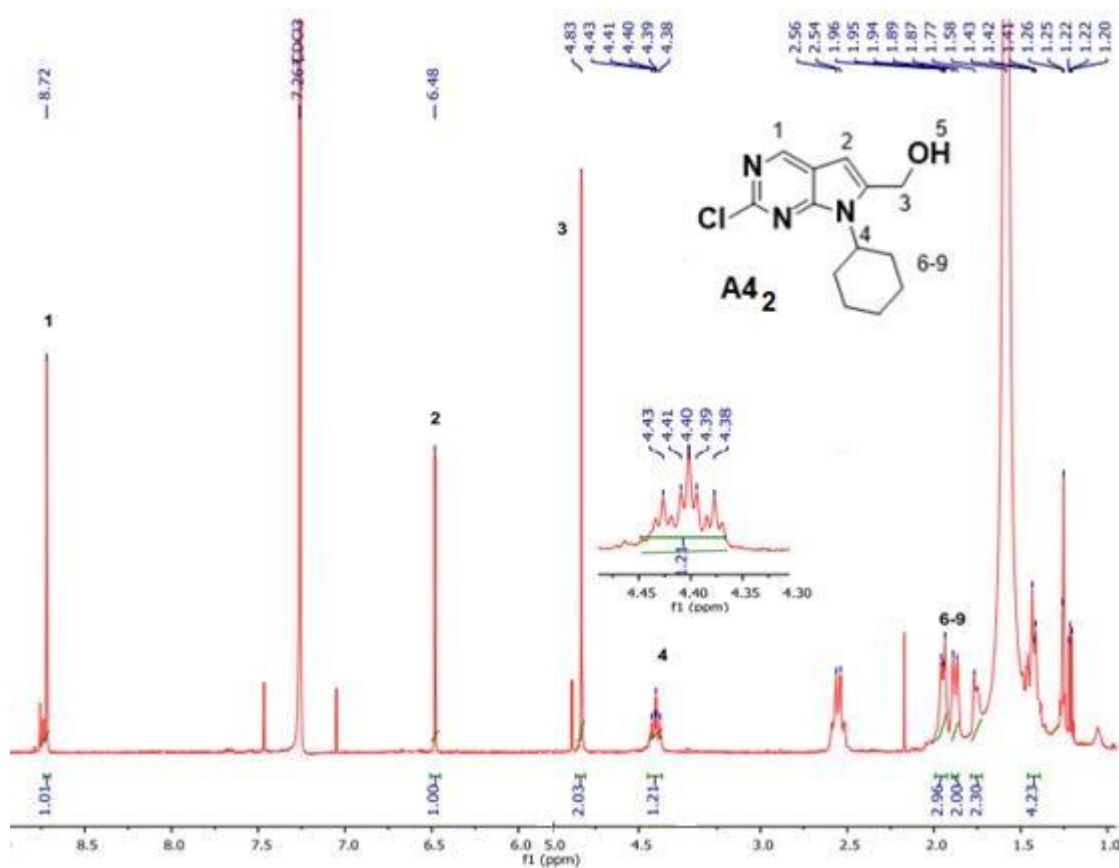
## 7.9 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7H-πυρρολο [2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη



Σχήμα 7.34 :Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος κυκλοποίησης **A4<sub>2</sub>**.

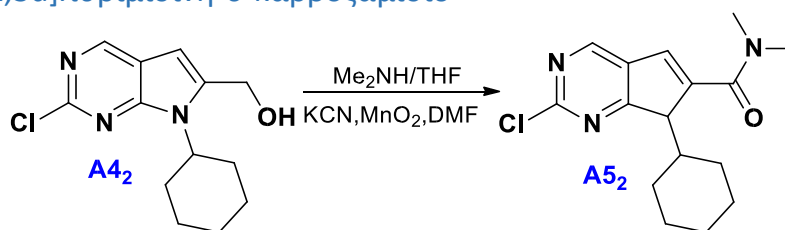
### 7.9.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7H-πυρρολο [2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7H-πυρρολο [2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη τα πλέον αποπροστατευμένα είναι τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 1 και 2, τα οποία συντονίζονται στα 8,72 ppm και 6,48 ppm αντίστοιχα. Το πρωτόνιο H1 αποπροστατεύεται περισσότερο από το πρωτόνιο 2, λόγω του εκδηλωμένου (+M) συζυγιακού φαινομένου του μονήρους ζεύγους του αζώτου στη θέση 1 του 5,7 διαζα-ϊνδολικού δακτυλίου και αποτυπώνονται στο φάσμα ως δυο απλές κορυφές. Η απουσία του αμινικού πρωτονίου και η παρουσία του πρωτονίου H2 μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κυκλοποίηση πραγματοποιήθηκε. Τα δυο πρωτόνια υπ' αριθμόν 3 συντονίζονται στα 4,83 ppm και εμφανίζονται ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 στο φάσμα. Η χημική μετατόπιση στα 4,4 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H4 και είναι περισσότερο προστατευμένο από τα δυο πρωτόνια υπ' αριθμόν 3, καθώς σε γειτονική θέση βρίσκεται το άτομο του αζώτου, που αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το συγκεκριμένο πρωτόνιο και προσθέτει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον πυρρολικό δακτύλιο μέσω θετικού συζυγιακού φαινομένου(+M). Τα δέκα πρωτόνια του κυκλοεξανίου συντονίζονται ξανά στην περιοχή 1,5-2,5 ppm.



Σχήμα 7.35: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A4<sub>2</sub>**, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

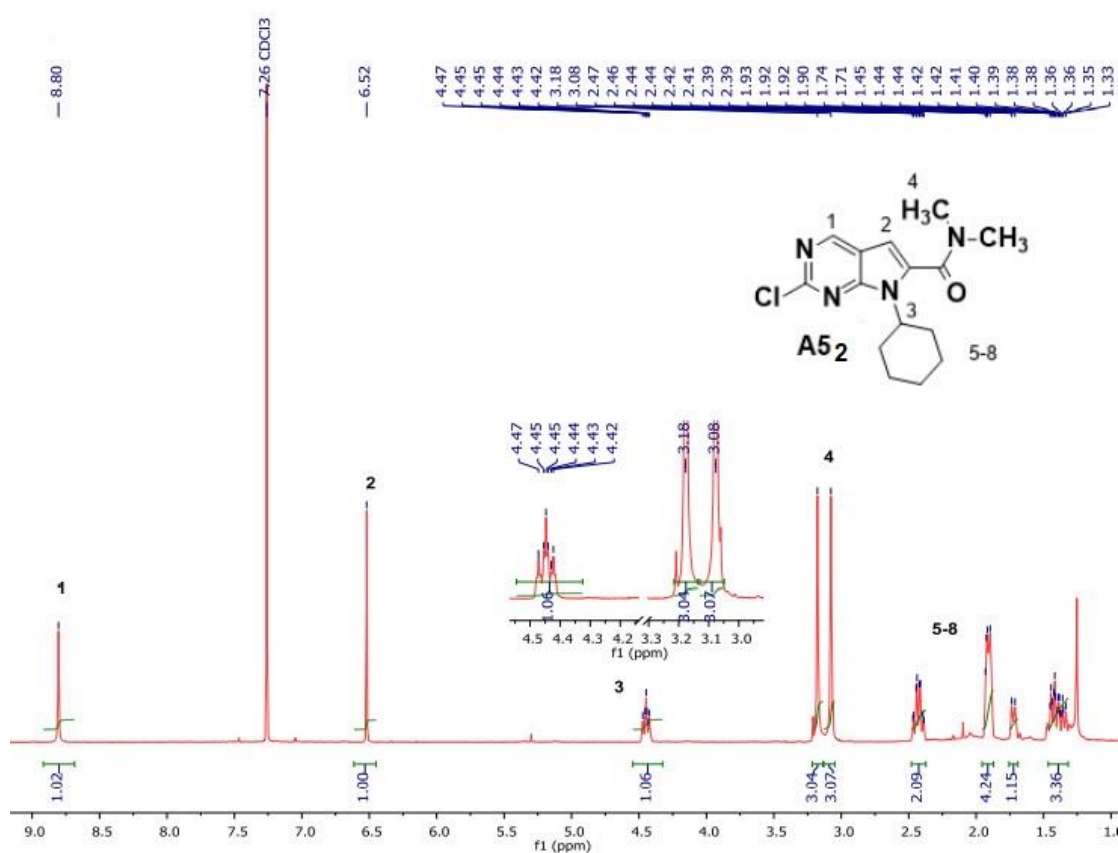
### 7.10 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-N,N-διμεθυλο-7Hπυρρολο[2,3d]πυριμιδινη-6-καρβοξαμίδιο



Σχήμα 7.36: Αντίδραση σχηματισμού του αμιδίου **A5<sub>2</sub>**.

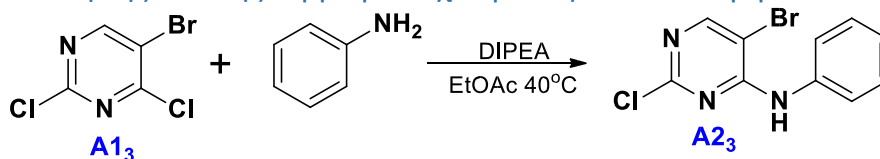
### 7.10.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-N,Nδιμεθυλο-7Hπυρρολο[2,3d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμιδίου

Στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-N,Nδιμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμιδίου παρατηρούμε μεγαλύτερη αποπροστασία στο πυριμιδινικό πρωτόνιο H1 (8,80 ppm), καθώς και στο ινδολικό πρωτόνιο H2 (6,52 ppm), η οποία οφείλεται στη παρουσία του αμιδίου. Το χαρακτηριστικό πρωτόνιο του κυκλοεξανίου H3 συντονίζεται στα 4,45 ppm και δίνει μια πενταπλή κορυφή. Η παρουσία των δύο μεθυλομάδων στα 3,08 ppm και 3,18 ppm επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό του προϊόντος. Το μοτίβο του κυκλοεξανίου υπάρχει στη περιοχή 1,2 – 2,5 ppm.



Σχήμα 7.37: Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης **A52**, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

## 7.11 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη

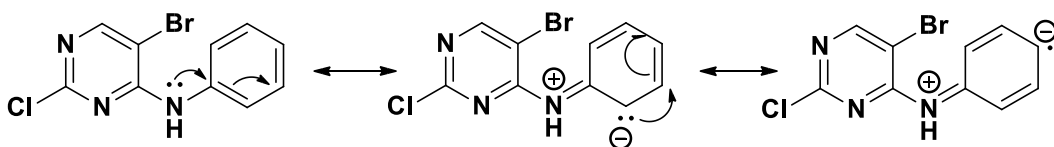


Σχήμα 7.38: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης **A23**.

### 7.11.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη

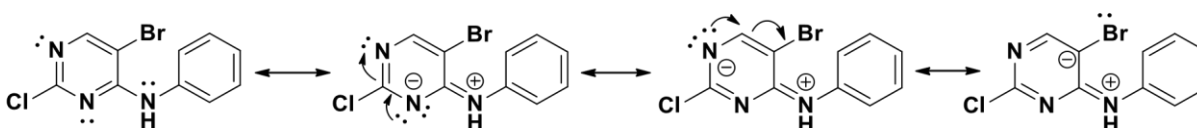
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλοπυριμιδιν-4-αμίνη παρατηρούμε ότι στις υψηλότερες τιμές, στα 8,30 ppm, συντονίζεται το πρωτόνιο 1. Το αμινικό πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 7,28 ppm, ως μια ευρεία κορυφή, η οποία επικαλύπτεται από το σήμα του  $\text{CDCl}_3$ , με ολοκλήρωση σχεδόν ένα.

Ενώ κανονικά θα αναμέναμε να είναι περισσότερο απροστατευμένα τα πρωτόνια H4, δηλαδή αυτά που βρίσκονται σε –meta θέση εξαιτίας του συζυγιακού φαινομένου(+M), το οποίο εκδηλώνεται και δείχνει τον εντοπισμό της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε –ortho και –para θέση, περισσότερο αποπροστατευμένα είναι τα πρωτόνια H3, αυτά δηλαδή που βρίσκονται σε –ortho θέση, όπως φαίνεται και από το σχήμα.

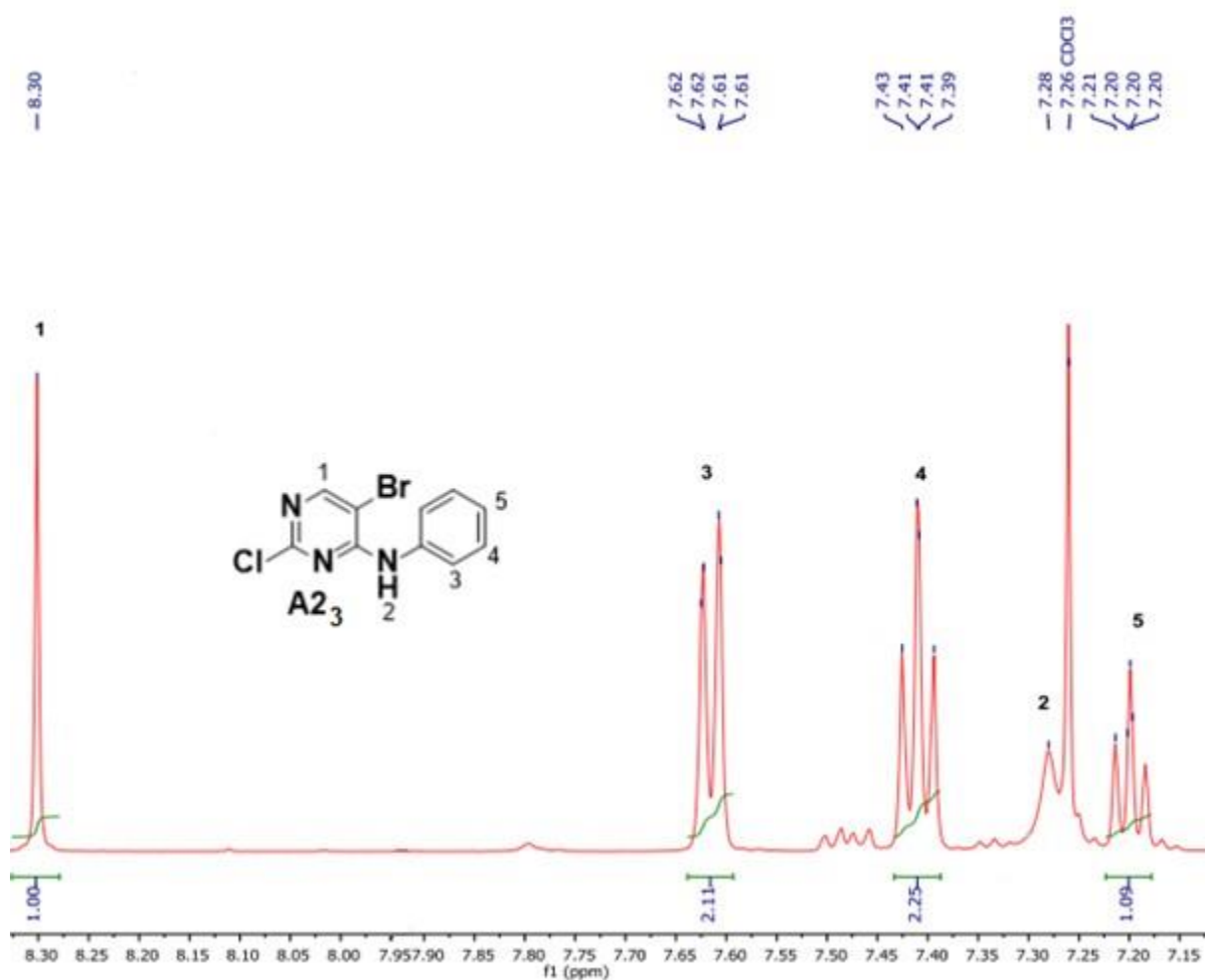


Η εξήγηση που μπορεί να δοθεί για τα συγκεκριμένα πρωτόνια είναι ότι το συζυγιακό φαινόμενο εκδηλώνεται κατά κύριο λόγο στο δακτύλιο της πυριμιδίνης παρά στο δακτύλιο του βενζολίου, όπως φαίνεται και από το σχήμα.

Η αμινομάδα έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το βενζολικό δακτύλιο μέσω του –I επαγωγικού φαινομένου. Στον δακτύλιο της πυριμιδίνης παρατηρείται έλλειψη ηλεκτρονίων λόγω των ισχυρά ηλεκτραρνητικών ατόμων αζώτου(-I) και, επιπλέον, η παρουσία αλογόνων το ενισχύει(Cl, Br).

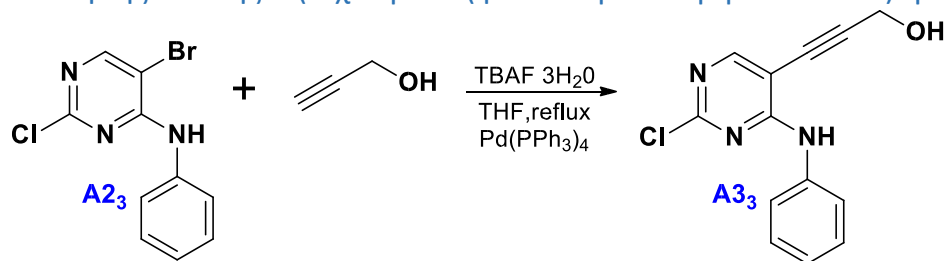


Έτσι λοιπόν τα πρωτόνια 3 που βρίσκονται σε *-ortho* θέση συντονίζονται στα 7,61ppm ως μια διπλή κορυφή ( $^3J = 7,43 \text{ Hz}$ ), εξαιτίας των πρωτονίων υπ' αριθμόν 4 που γειτνιάζουν. Τα H4 που βρίσκονται σε *-meta* θέση συντονίζονται στα 7,41ppm ως τριπλή κορυφή, λόγω σχάσης με το γειτονικό H3 ( $^3J = 7,88 \text{ Hz}$ ) και το γειτονικό H5 ( $^3J = 7,88 \text{ Hz}$ ). Τα πρωτόνια που βρίσκονται στην *-para* θέση είναι τα πλέον προστατευμένα στα 7,199 ppm και καταγράφονται ως τριπλή κορυφή. Το *para*-πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 7,20 ppm ως μια τριπλή κορυφή λόγω σχάσης με τα δύο γειτονικά *meta*-πρωτόνια ( $^3J = 7,44 \text{ Hz}$ ,  $^3J = 7,44 \text{ Hz}$ ).



Σχήμα 7.39: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A23**, 500 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

## 7.12 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλης

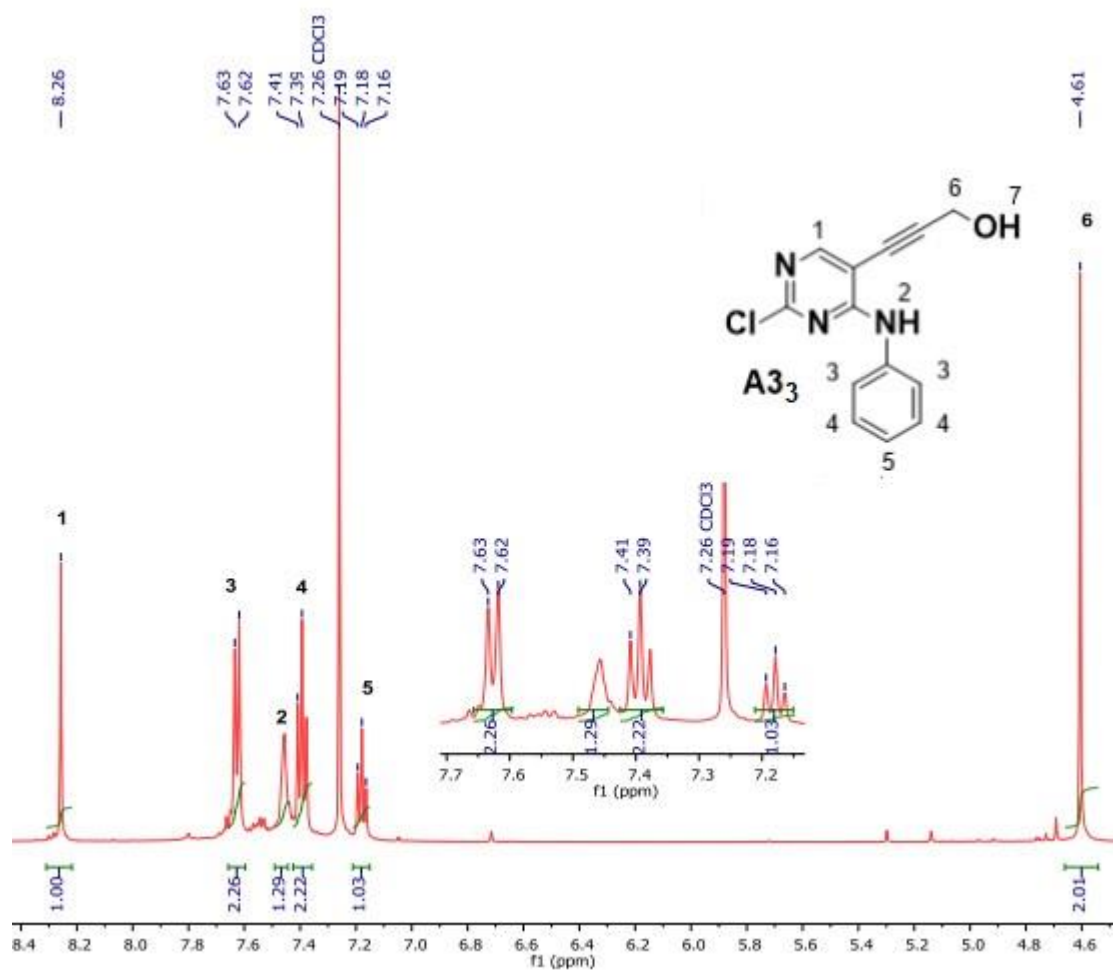


Σχήμα 7.40: Αντίδραση σχηματισμού της προπαργυλικής αλκοόλης **A3**.

### 7.12.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλης

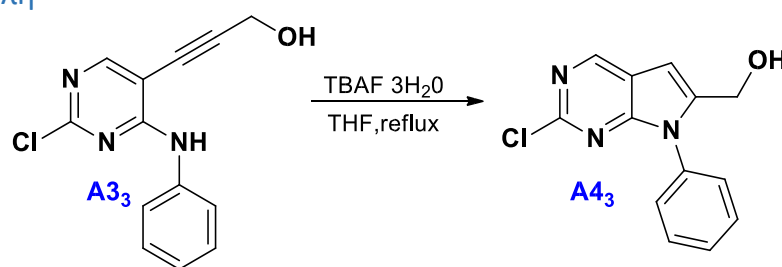
Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλης παρατηρούμε ότι στα 8,26 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο 1, ως απλή κορυφή και είναι το πλέον αποπροστατευμένο. Το αμινικό πρωτόνιο H<sub>2</sub> συντονίζεται στα 7,46 ppm ως ευρεία κορυφή. Όσον αφορά τα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου, αυτά που βρίσκονται σε θέση –ortho καταγράφονται στο φάσμα στα 7,62 ppm ως διπλή κορυφή με <sup>3</sup>J=8,03 ppm. Τα πρωτόνια που βρίσκονται στη θέση –meta εμφανίζονται στα 7,39 ppm ως τριπλή κορυφή με <sup>3</sup>J=7,88Hz και τα πρωτόνια της –para θέσης στα 7,18 ppm ως τριπλή κορυφή με <sup>3</sup>J = 7,42 Hz. Τέλος, τα πρωτόνια H<sub>6</sub> της μεθυλενομάδας δίπλα από το τριπλό δεσμό συντονίζονται στα 4,61 ppm δίνοντας μια απλή κορυφή λόγω των μη γειτονικών υδρογόνων.





Σχήμα 7.41: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης **A3**, 500 MHz σε CDCl<sub>3</sub>.

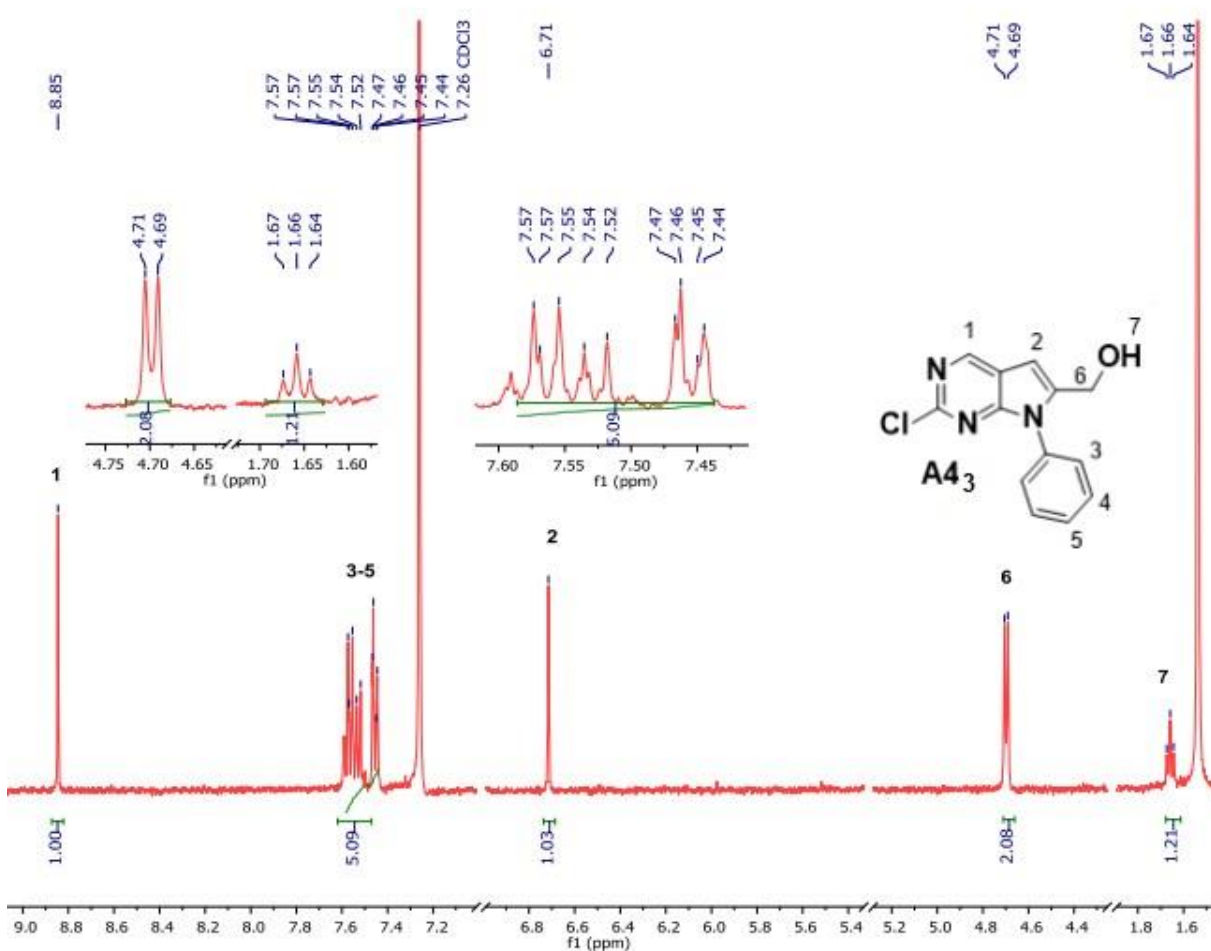
### 7.13 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-φαινυλο-7H-πυρρολο[2,3d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη



Σχήμα 7.42: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος κυκλοποίησης-αλκοόλη **A4**.

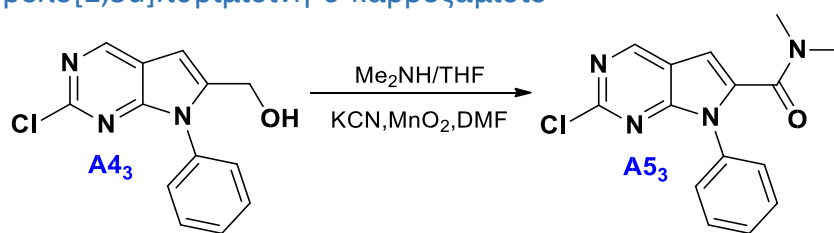
### 7.13.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-χλωρο-7-φαινυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης (2-χλωρο-7-φαινυλο-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη το πλέον προστατευμένο είναι το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 στα 8,97 ppm, το οποίο εμφανίζεται ως απλή κορυφή. Η χημική μετατόπιση στα 6,79 ppm αντιστοιχεί στο H2 ως απλή κορυφή και η εμφάνιση του στο φάσμα αποδεικνύει το σχηματισμό του προϊόντος κυκλοποίησης. Τα δυο πρωτόνια υπ' αριθμόν H6 συντονίζονται στα 4,49 ppm με  $^3J = 5,36$  Hz ως απλή κορυφή και το πρωτόνιο 7 της υδροξυλομάδας στα 5,44 ppm με  $^3J = 5,43$  Hz ως μια τριπλή κορυφή καθώς αλληλεπιδρά με μόρια του DMSO-d6. Όσον αφορά τα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου συντονίζονται στη περιοχή 7,4–7,6 ppm και αποτυπώνονται ως μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 5.



Σχήμα 7.43: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A43**, 400 MHz σε  $\text{DMSO-d}_6$ .

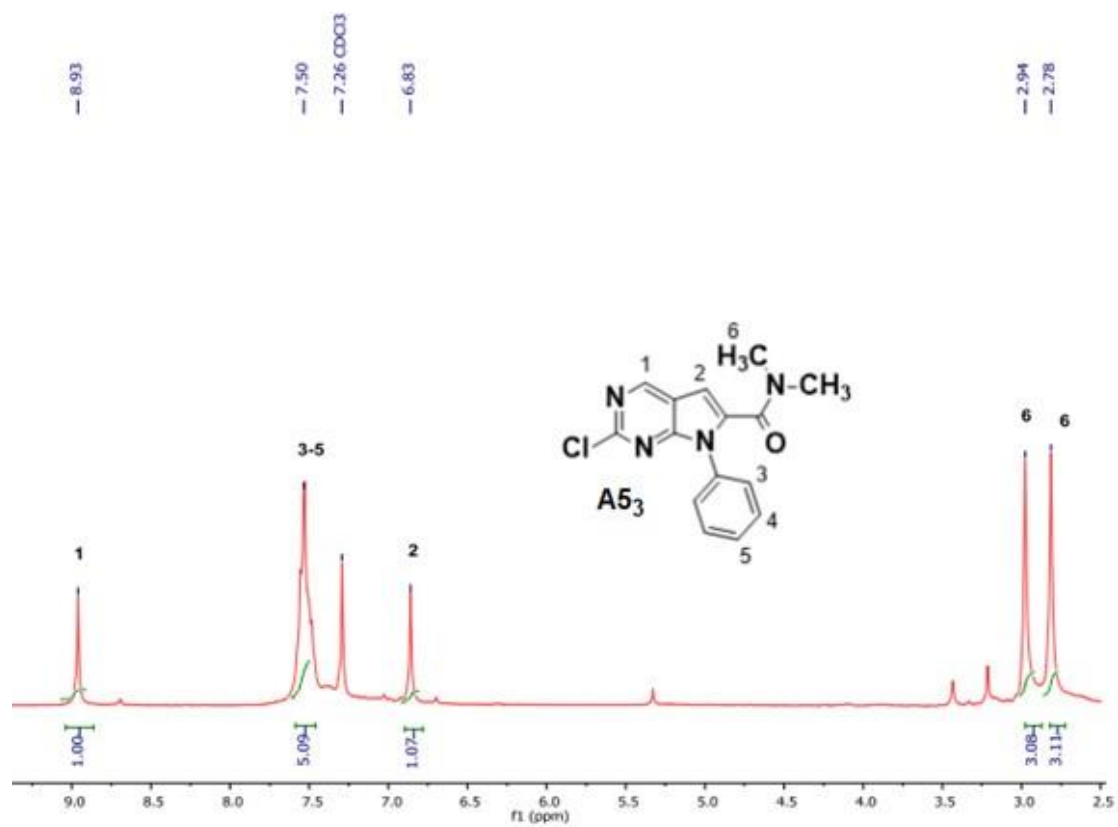
## 7.14 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-φαινυλο-N,N-διμεθυλο-7Hπυρρολο[2,3d]πυριμιδινη-6-καρβοξαμίδιο



Σχήμα 7.44: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος αμίδιου **A53**.

### 7.14.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-χλωρο-7-φαινυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινη-6-καρβοξαμίδιου

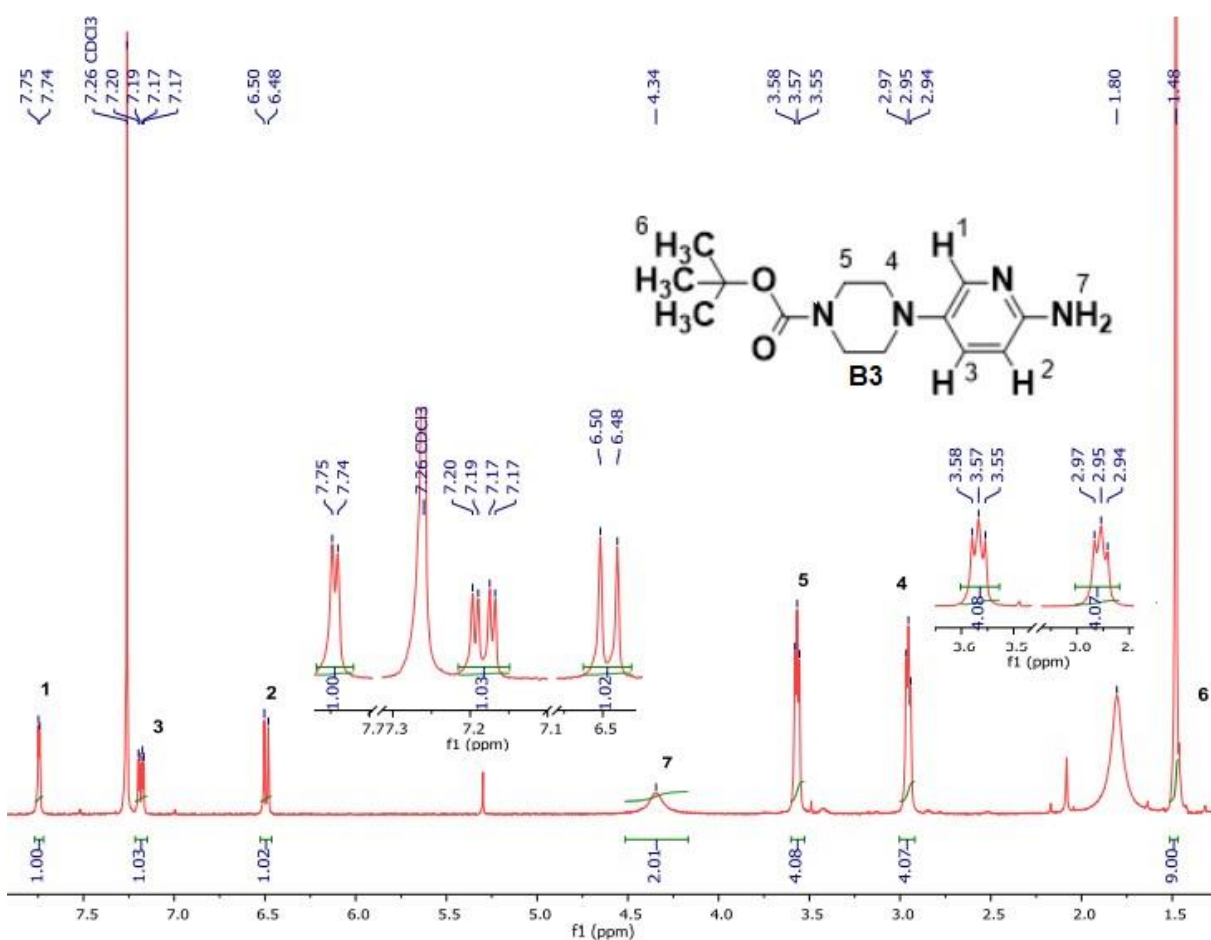
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης 2-χλωρο-7-φαινυλο-N,N-διμεθυλο-7Hπυρρολο[2,3d]πυριμιδινη-6-καρβοξαμίδιο το πρωτόνιο H1 του πυριμιδινικού δακτυλίου συντονίζεται στα 8,93 ppm ως απλή κορυφή, ενώ το ινδολικό πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,83 ppm. Τα πρωτόνια των δύο μεθυλομάδων στα 2,78 ppm και 2,94 ppm επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό του προϊόντος. Οι δύο μεθυλομάδες καθίστανται μη ισοδύναμες λόγω της συζυγίας (+M) που εκδηλώνεται στο αμίδιο, με αποτέλεσμα την μη ελεύθερη περιστροφή. Τα πρωτόνια H3-H5 του βενζολίου συντονίζονται στα 7,50 ppm ως μία ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 5. Η σχάση της κορυφής δεν παρατηρείται πιθανά καθώς το φάσμα λήφθηκε σε συχνότητα 400MHz.



Σχήμα 7.45: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **A53**, 400 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

### 7.15 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος

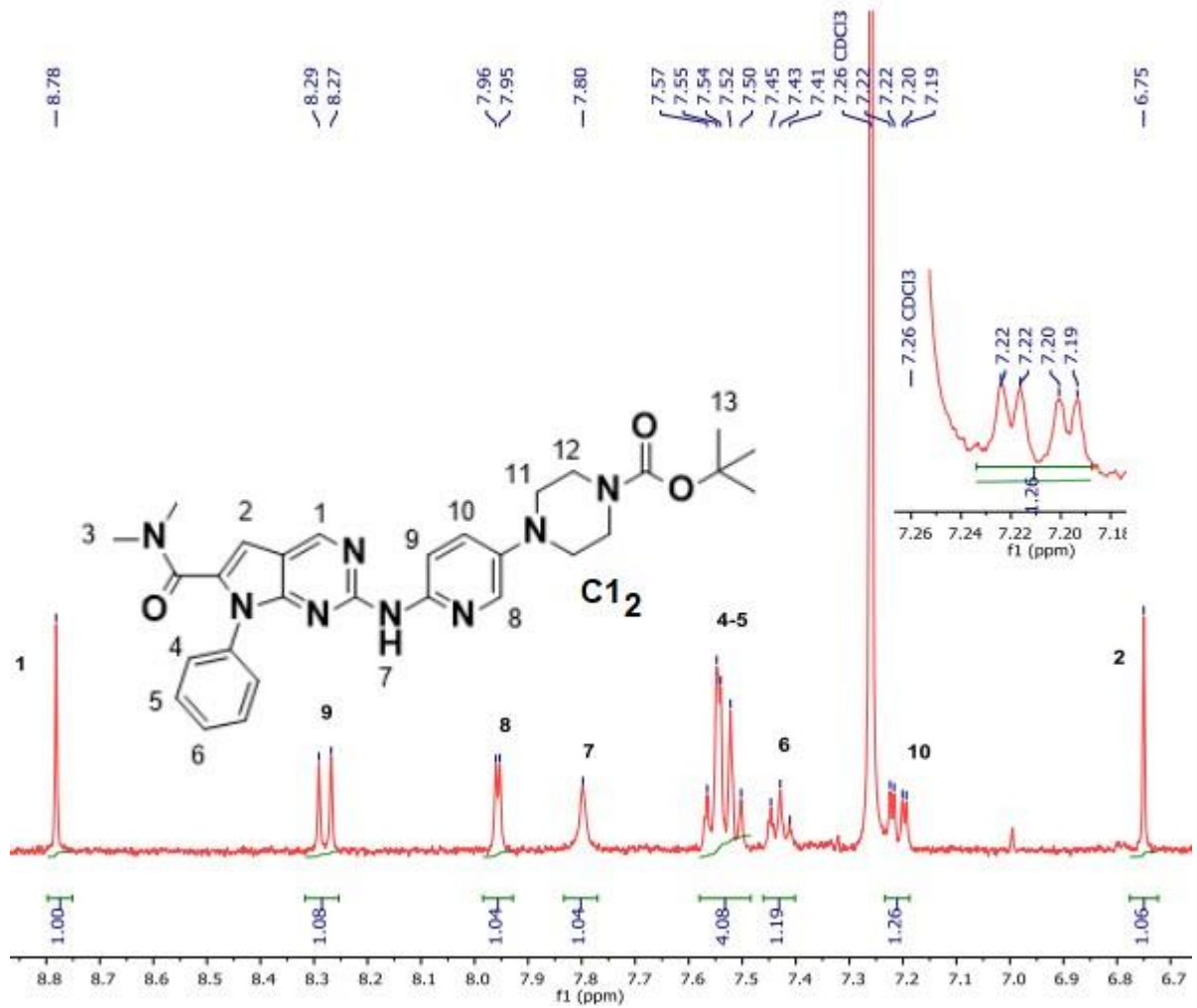
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το πρωτόνιο H1 και συντονίζεται στα 7,74 ppm ως μια απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H3 συντονίζεται στα 7,18 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό H2 ( $^3J = 8,80 \text{ Hz}$ ). Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,49 ppm ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης με το πρωτόνιο H3 ( $^3J = 8,83 \text{ Hz}$ ). Τα πρωτόνια H4 συντονίζονται στα 2,95 ppm ως μια τύπου τριπλή κορυφή με ολοκλήρωση 4. Τα πρωτόνια H5 της πιπεραζινης συντονίζονται στα 3,57 ppm ως μια τύπου τριπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H6 της tert-βουτυλο-ομάδας συντονίζονται στα 1,48 ppm ως μια απλή κορυφή. Τέλος, η ευρεία κορυφή στα 4,34 ppm με ολοκλήρωση 2 οφείλεται στα πρωτόνια H7 της αμινομάδας.



Σχήμα 7.46: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος, 400 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

### 7.16 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης C<sub>12</sub>

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της C<sub>12</sub> το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 της πυριμιδίνης συντονίζεται στα 8,78 ως μια απλή κορυφή. Το ινδολικό πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,75 ppm ως μια απλή κορυφή. Τα πρωτόνια H4 και H5 συντονίζονται στα 7,5 – 7,6 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή. Το πρωτόνιο H6 είναι πιο προστατευμένο από τα H4 και H5 εξαιτίας του –I επαγωγικού φαινομένου που εκδηλώνεται στο βενζολικό δακτύλιο και συντονίζεται στα 7,43 ppm ως μια τριπλή κορυφή. Το πρωτόνιο H9 συντονίζεται στα 8,28 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή. Το πρωτόνιο H8 συντονίζεται στα 7,96 ppm και εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή. Το αμινικό πρωτόνιο H7 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 7,80 ppm, ενώ το πρωτόνιο H10 συντονίζεται στα 7,21 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό H9 (<sup>3</sup>J = 9,22 Hz) και μακράς απόστασης με το H8 (<sup>4</sup>J = 3,01 Hz). Η χημική μετατόπιση στα 3,69 ppm και 3,05 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της πιπεραζίνης, H12 και H11 ως τριπλές κορυφές. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 3 των δύο μεθυλομάδων του αμιδίου συντονίζονται στα 2,85 ppm και 2,95 ppm ως δύο απλές κορυφές με ολοκλήρωση 3 η κάθε μία. Τέλος, τα πρωτόνια H13 συντονίζονται στα 1,49 ppm.

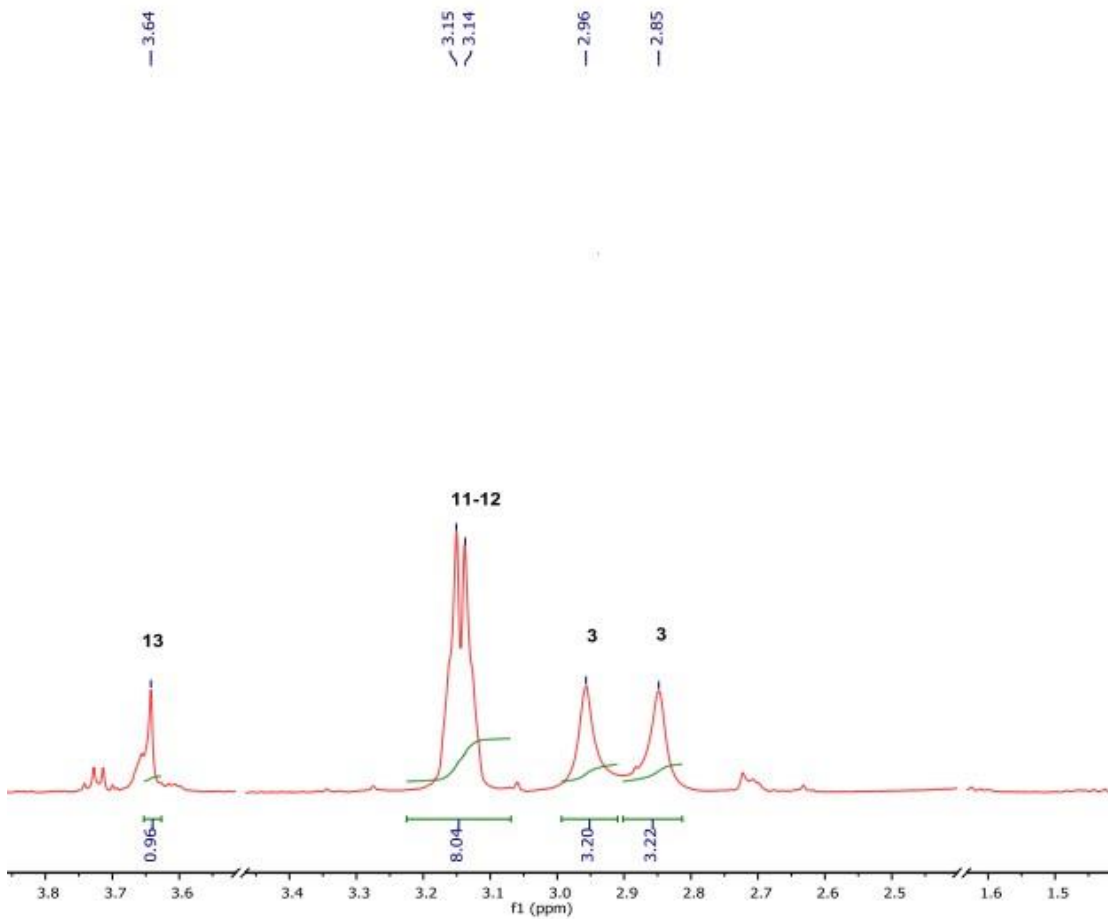
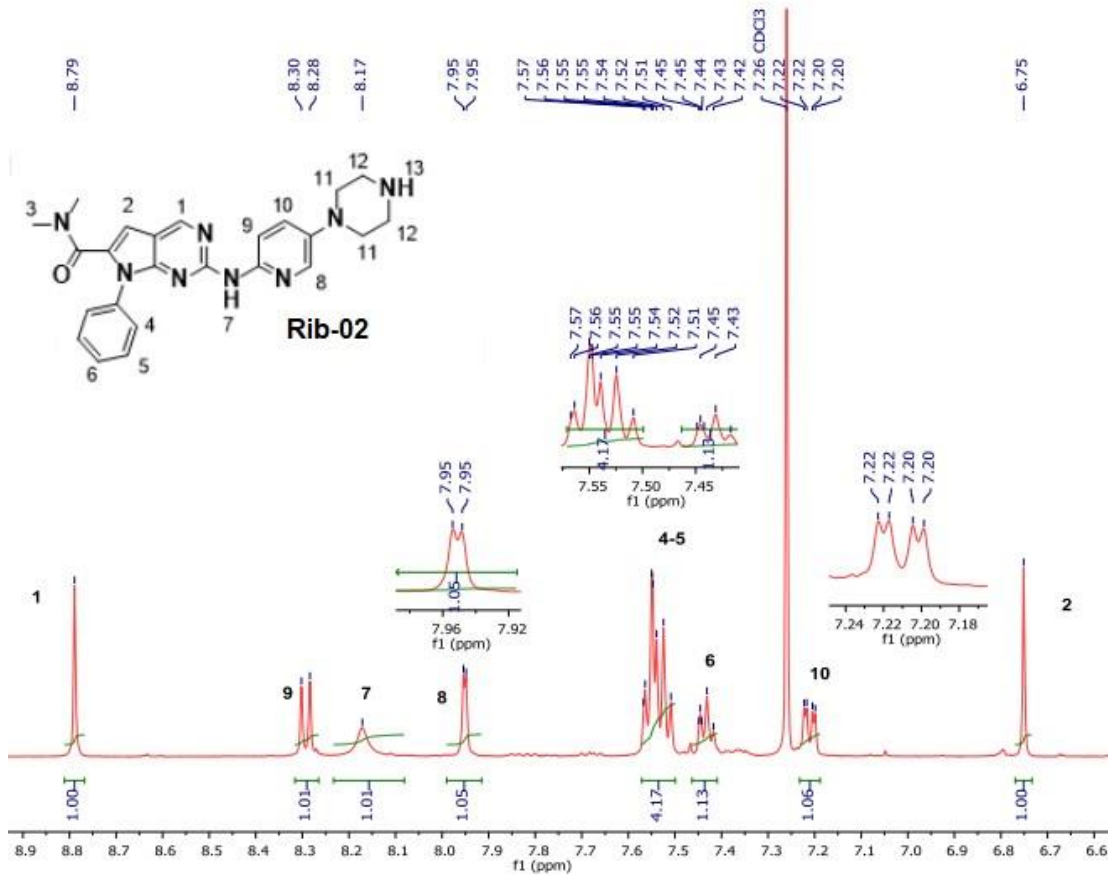


Σχήμα 7.47: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης σύζευξης του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3υλο)πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος με την 2-χλωρο-7-φαινυλο-*N,N*-διμεθυλο-7Ηπυρρολο[2,3d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο .

### 7.17 Φασματοσκοπικά δεδομένα του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald– Hartwig Rib-02

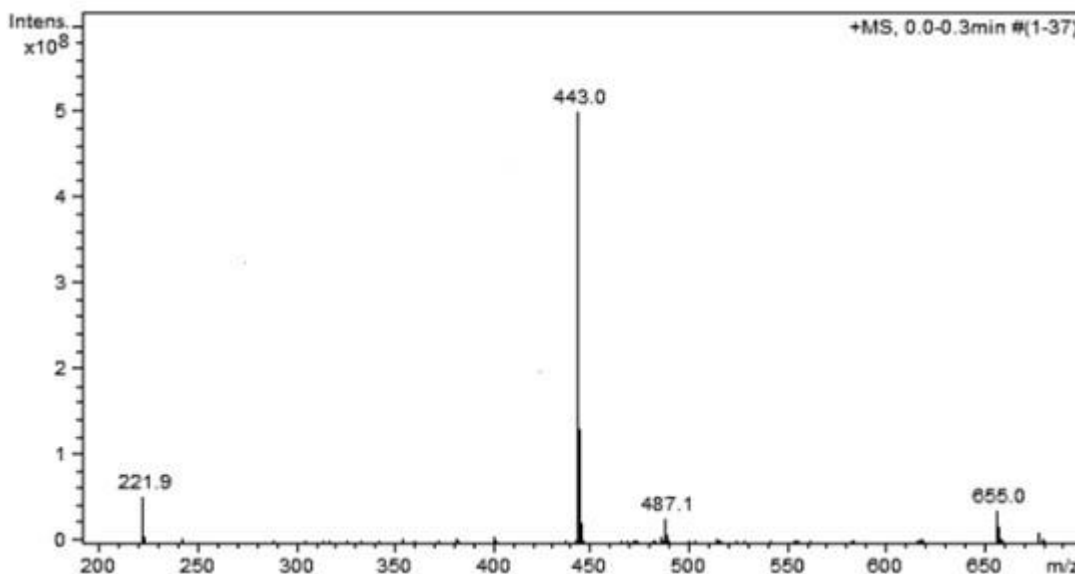
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης Rib-02 το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 του πυριμιδινικού δακτυλίου αποτυπώνεται ως μια απλή κορυφή στα 8,79ppm. Το ινδολικό πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,75 ppm ως μια απλή κορυφή. Τα πρωτόνια H3 των δύο μεθυλομάδων του αμιδίου συντονίζονται στα 2,85 ppm και 2,96 ppm ως δύο απλές κορυφές με ολοκλήρωση 3 η κάθε μία. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 4 και 5 συντονίζονται στη περιοχή γύρω από τα 7,54 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 4. Το πρωτόνιο H6 αποτυπώνεται στα 7,43 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1. Το αμινικό πρωτόνιο H7 εμφανίζεται ως ευρεία κορυφή στα 8,17 ppm, ενώ το πρωτόνιο H8 συντονίζεται στα 7,95 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή. Το πρωτόνιο H9 συντονίζεται στα 8,29 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή ( $^3J = 9,11 \text{ Hz}$ ) και το πρωτόνιο H10 συντονίζεται στα 7,21 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό H9 ( $^3J = 9,18 \text{ Hz}$ ) και λόγω σχάσης μακράς απόστασης με το H8 ( $^4J = 2,93 \text{ Hz}$ ). Τα πρωτόνια της πιπεραζίνης H11 και H12 συντονίζονται στα 3,14ppm και 3,15ppm, ως μία διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 8. Οσον αφορά, τα πρωτόνια της tert-βουτυλο-ομάδας δεν αποτυπώνονται στο φάσμα στη περιοχή 1,49 ppm, οπότε συμπεραίνουμε ότι η Boc-αποπροστασία πραγματοποιήθηκε ποσοτικά. Εμφανίζεται επιπλέον μια κορυφή στα 3,64 ppm η οποία πιθανά θα οφείλεται στο ελεύθερο πιπεραζινικό πρωτόνιο H13, με την προϋπόθεση ότι δεν αντιστοιχεί σε κάποιο πρωτόνιο διαλύτη.





Σχήμα 7.48: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **Rib-02**, 400 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

Το φάσμα μάζας επιβεβαιώνει πως σχηματίστηκε η ένωση Rib-02 σε διαλύτη  $\text{HCOOH}$  σε  $\text{MeOH}$  0.1%. Έτσι, το θραύσμα που λαμβάνεται σε τιμή  $m/z$  443.0, αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1 με μοριακό τύπο  $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}+\text{H}]^+$ . Η ένωση  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}$  έχει ακριβή μάζα 442.22.

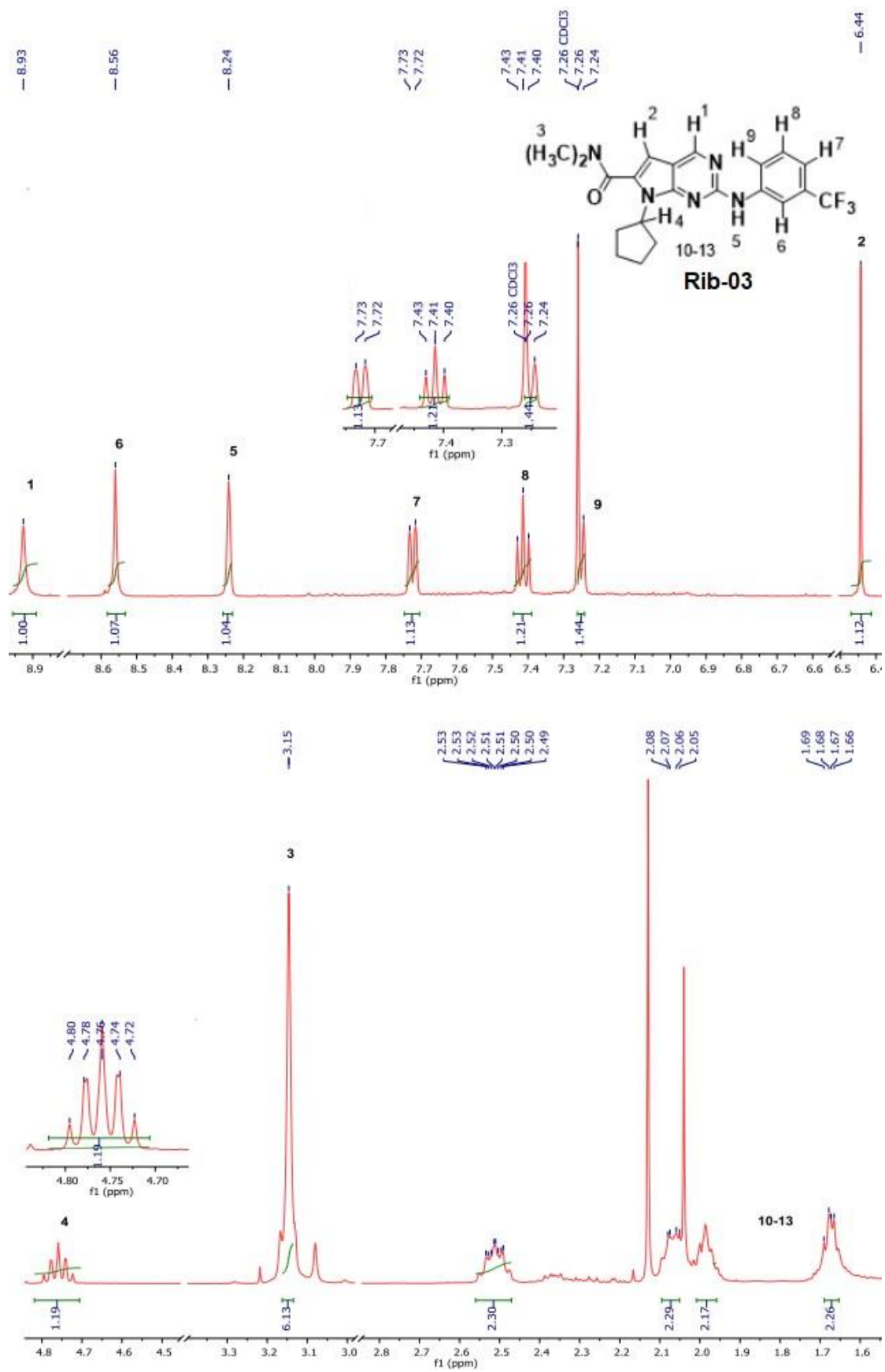


Σχήμα 7.49: Φάσμα μάζας, χαμηλής διακριτικής ικανότητας 0.1 %  $\text{HCOOH}$  σε  $\text{MeOH}$ .

### 7.18 Φασματοσκοπικά δεδομένα του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald–Hartwig Rib-03

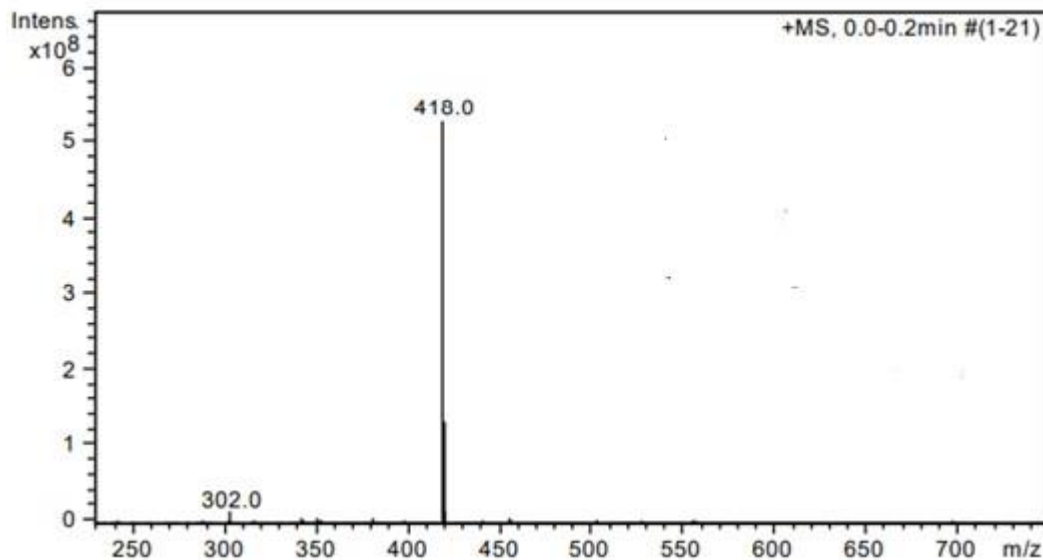
Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης Rib-03 αποτυπώνεται ως το πλέον αποπροστατευμένο το πυριμιδινικό πρωτόνιο H1, το οποίο συντονίζεται στα 8,93 ppm ως μια απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,44 ppm ως μια απλή κορυφή. Τα πρωτόνια των δύο μεθυλομάδων H3 συντονίζονται στα 3,15 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6, ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια του κυκλοπεντανίου έχουν το χαρακτηριστικό μοτίβο στη περιοχή 1,6–2,6 ppm. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4 συντονίζεται στα 4,6 ppm ως μια πενταπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1. Το αμινικό πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 8,24 ppm ως απλή κορυφή και το πρωτόνιο H6 συντονίζεται στα 8,56 ppm ως μια απλή κορυφή και είναι αρκετά αποπροστατευμένο εξαιτίας της γειτονικής  $\text{CF}_3$ -ομάδας, η οποία εκδηλώνει έντονο  $-I$  επαγωγικό φαινόμενο. Επιπλέον, το πρωτόνιο H7 συντονίζεται στα 7,72 ppm ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό πρωτόνιο H8 ( $^3J = 8,01\text{ Hz}$ ). Το H8 συντονίζεται στα 7,41 ppm με μια τριπλή κορυφή λόγω σχάσης με το H7 ( $^3J = 7,93\text{ Hz}$ ) και λόγω σχάσης με το H9 ( $^3J = 7,93\text{ Hz}$ ). Τέλος, το H9 αναμένεται ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό πρωτόνιο H8, με ολοκλήρωση 1. Λογικά λόγω επικάλυψης με το σήμα του διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  και

δεδομένης της προστασίας του ortho-πρωτονίου, στο φάσμα φαίνεται ότι το H9 εμφανίζεται στα 7,25 ppm με σταθερά σύζευξης ( $^3J = 7,90 \text{ Hz}$ ) και επιβεβαιώνεται ότι πρόκειται για το πρωτόνιο H9.



Σχήμα 7.50: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **Rib-03**, 400 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

Το φάσμα μάζας επιβεβαιώνει πως σχηματίστηκε η ένωση Rib-03 σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%. Έτσι, το θραύσμα που λαμβάνεται σε τιμή  $m/z$  418.0, αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1 με μοριακό τύπο  $[C_{21}H_{22}F_3N_5O+H]^+$ . Η ένωση έχει ακριβή μάζα 417.18.

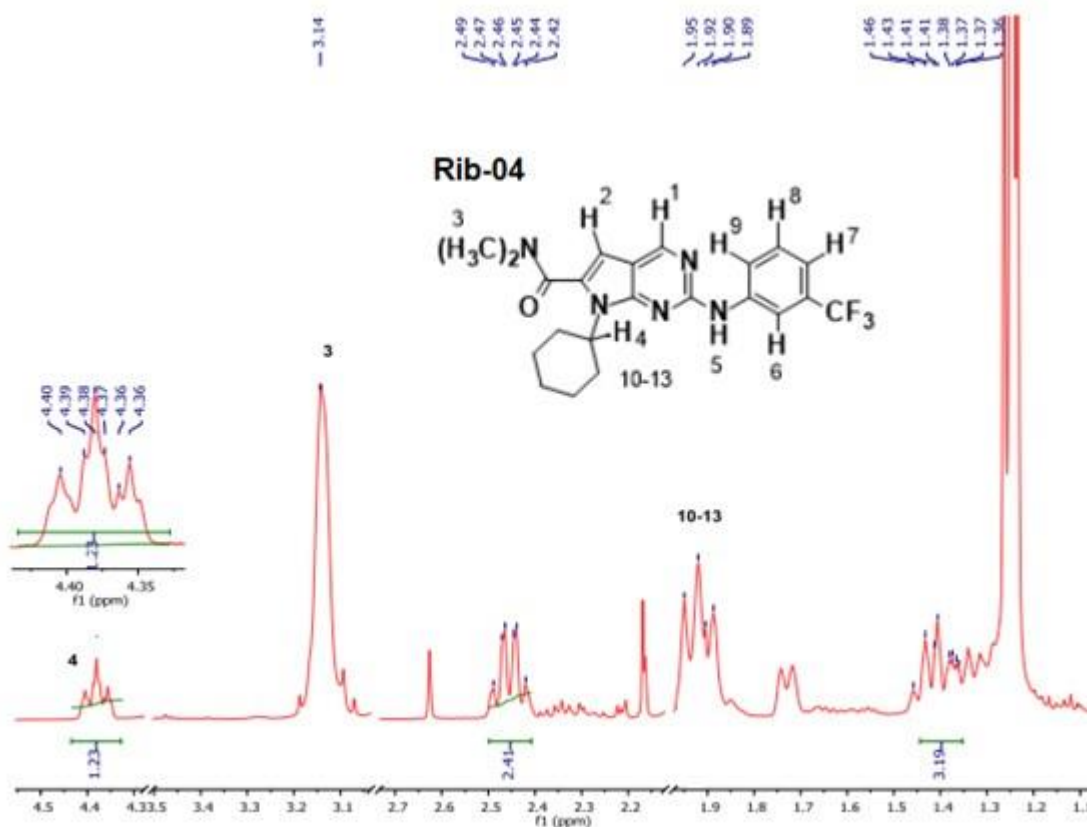
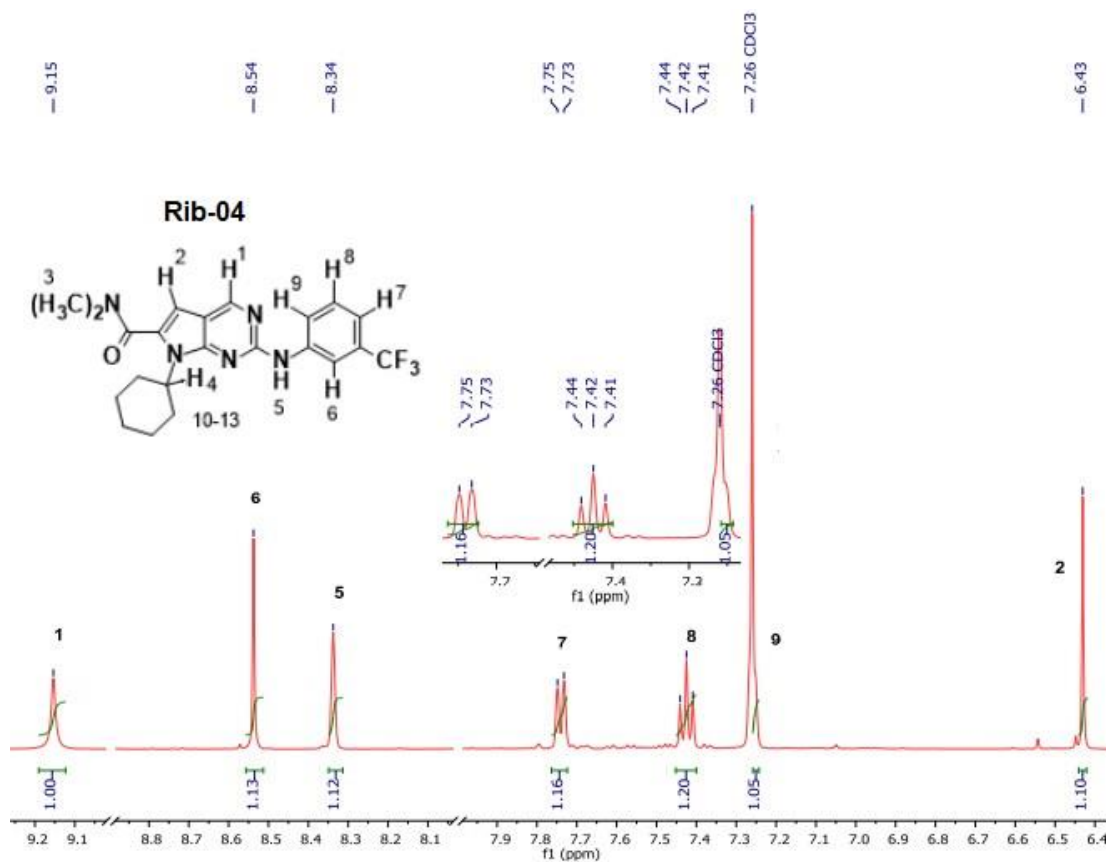


Σχήμα 7.51: Φάσμα μάζας, χαμηλής διακριτικής ικανότητας σε 0.1 % HCOOH σε MeOH.

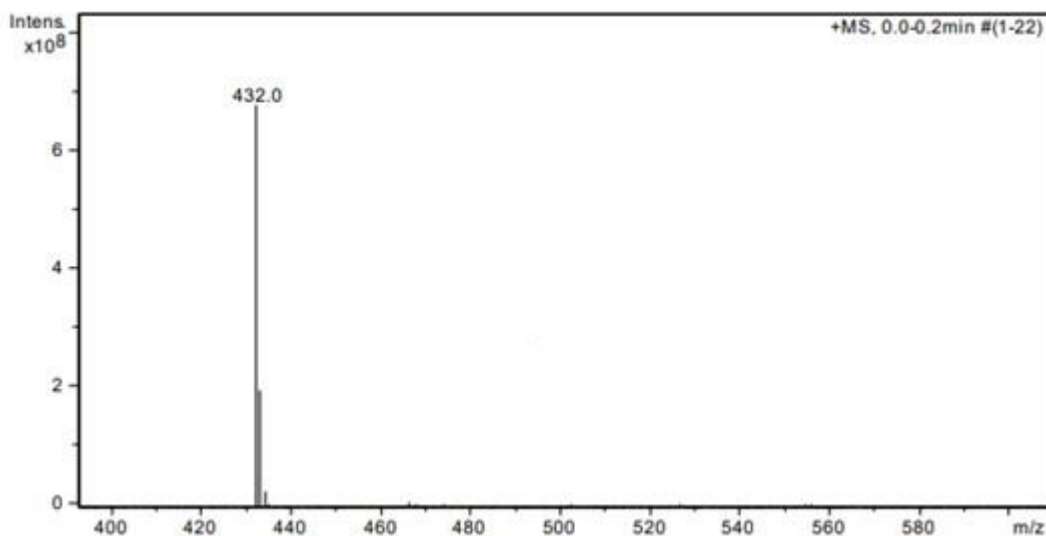
### 7.19 Φασματοσκοπικά δεδομένα του του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald–Hartwig Rib-04

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης Rib-04 αποτυπώνεται ως το πλέον αποπροστατευμένο το πυριμιδινικό πρωτόνιο H1, το οποίο συντονίζεται στα 9,15 ppm ως μια απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,43 ppm ως μια απλή κορυφή. Τα πρωτόνια των δύο μεθυλομάδων H3 συντονίζονται στα 3,14 ppm ως μια απλή κορυφή, ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια του κυκλοεξανίου συντονίζονται στη περιοχή 1,3–2,5 ppm. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4 συντονίζεται στα 4,38 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1. Το αμινικό πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 8,34 ppm ως απλή κορυφή και το πρωτόνιο H6 συντονίζεται στα 8,54 ppm ως μια απλή κορυφή και είναι αρκετά αποπροστατευμένο εξαιτίας της γειτονικής CF<sub>3</sub>-ομάδας, η οποία εκδηλώνει έντονο –I επαγωγικό φαινόμενο, καθώς και του –I φαινομένου της –NH- ομάδας. Επιπλέον, το πρωτόνιο H7 συντονίζεται στα 7,74 ppm ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό πρωτόνιο H8 ( $^3J = 8,12$  Hz) και το πρωτόνιο H9 ( $^3J = 7,95$ Hz). Το H8 συντονίζεται στα 7,42 ppm ως μια τριπλή κορυφή λόγω σχάσης με το H7 ( $^3J = 8,12$  Hz) και λόγω σχάσης με το H9 ( $^3J = 7,95$  Hz). Τέλος, το H9 αναμένεται ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό πρωτόνιο H8, με ολοκλήρωση 1. Λογικά λόγω επικάλυψης με το σήμα του διαλύτη CDCl<sub>3</sub> και δεδομένης της προστασίας του ortho-

πρωτονίου, στο φάσμα φαίνεται ότι το H9 εμφανίζεται στα 7,25 ppm με σταθερά σύζευξης ( $^3J = 7,95 \text{ Hz}$ ) και επιβεβαιώνεται ότι πρόκειται για το πρωτόνιο H9.



Σχήμα 7.52: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **Rib-04**, 400 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

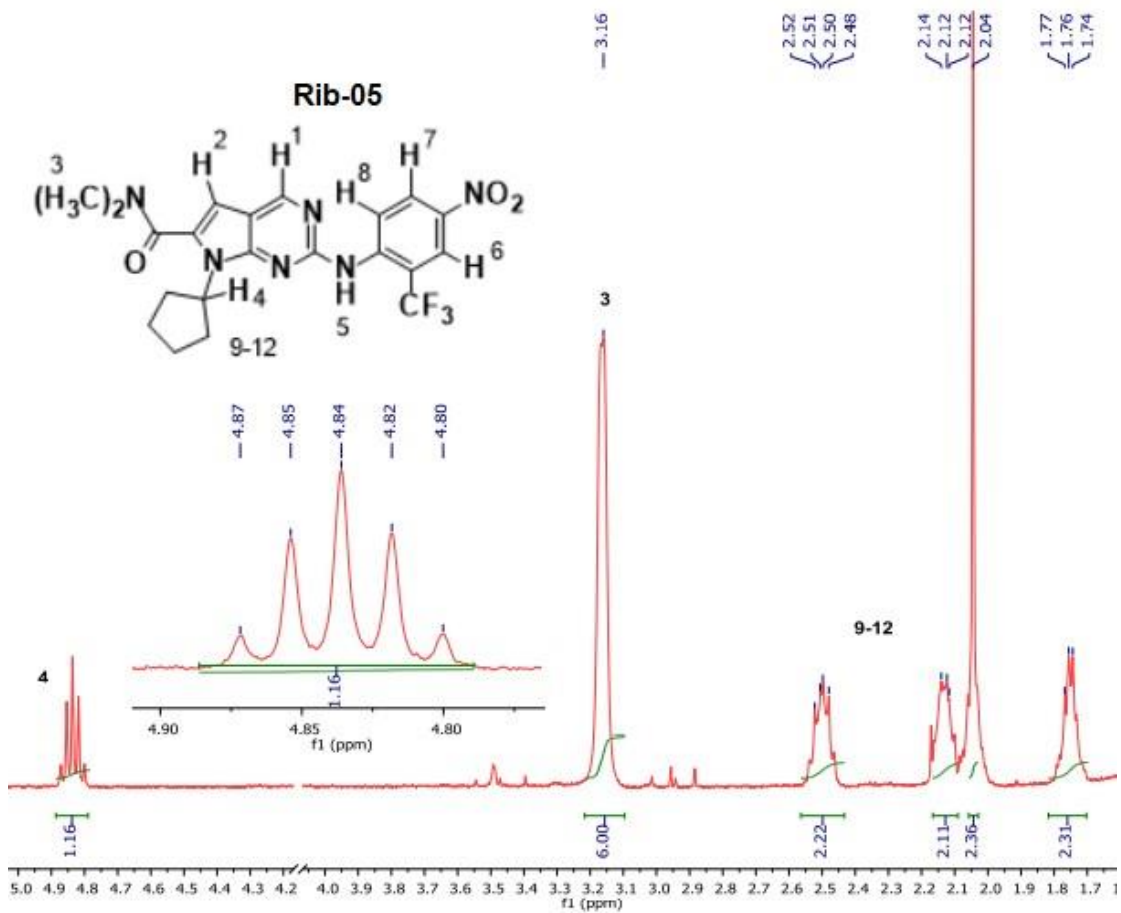
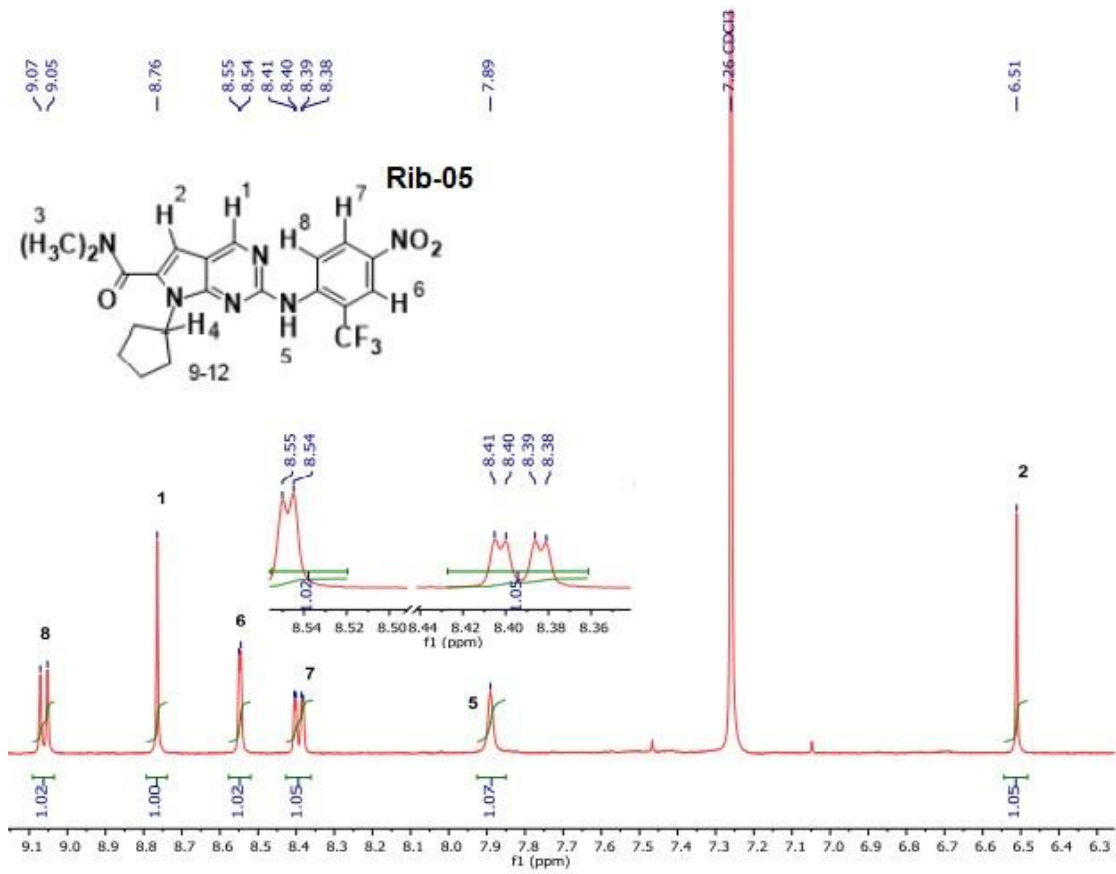


Σχήμα 7.53: Φάσμα μάζας, χαμηλής διακριτικής ικανότητας σε 0.1 %  $\text{HCOOH}$  σε  $\text{MeOH}$ .

Το φάσμα μάζας επιβεβαιώνει πως σχηματίστηκε η ένωση Rib-04 σε διαλύτη  $\text{HCOOH}$  σε  $\text{MeOH}$  0.1%. Έτσι, το θραύσμα που λαμβάνεται σε τιμή  $m/z$  418.0, αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1 με μοριακό τύπο  $[\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}+\text{H}]$ . Η ένωση  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$  έχει ακριβή μάζα 431.19.

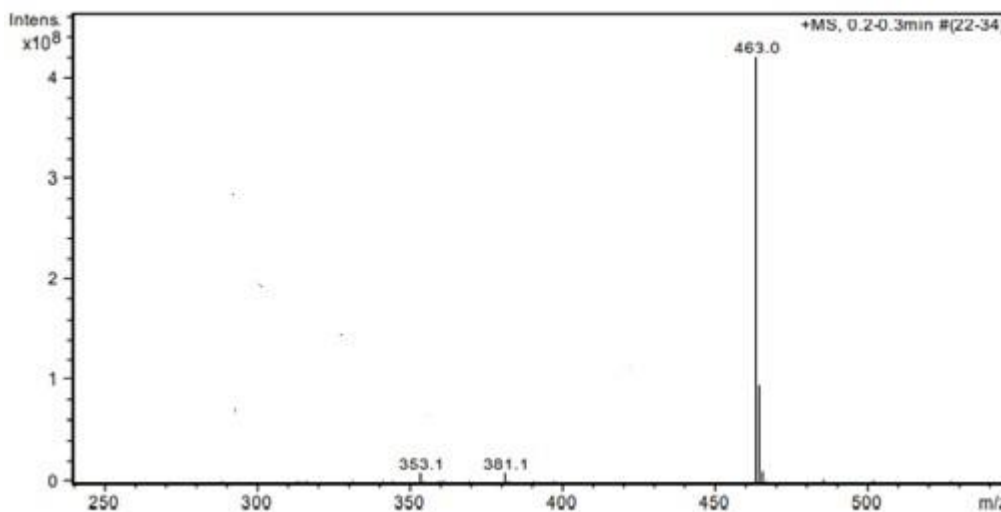
## 7.20 Φασματοσκοπικά δεδομένα του του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald–Hartwig Rib-05

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης Rib-05 το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H8 στα 9,06 ppm ως διπλή κορυφή λόγω της σχάσης με το πρωτόνιο H7 ( $^3J = 9,40\text{ Hz}$ ). Το πυριμιδινικό H1 πρωτόνιο συντονίζεται στα 8,6 ppm ως απλή κορυφή. Το ινδολικό πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,51 ppm ως μια απλή κορυφή. Τα πρωτόνια H3 των δύο μεθυλομάδων συντονίζονται στα 3,16 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6. Το πρωτόνιο H6 συντονίζεται στα 8,55 ppm ως διπλή κορυφή, η οποία σχάζεται μέσω μιας σχάσης μακράς απόστασης από το πρωτόνιο H7 ( $^4J = 2,63\text{ Hz}$ ). Το πρωτόνιο H7 συντονίζεται στα 8,39 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό H8 ( $^3J = 9,46\text{ Hz}$ ) και λόγω σχάσης μακράς απόστασης με το πρωτόνιο H6. Το αμινικό πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 7,89 ppm ως μια απλή ευρεία κορυφή. Το πρωτόνιο H4 συντονίζεται στα 4,84 ppm ως μια πενταπλή κορυφή. Τέλος, το χαρακτηριστικό μοτίβο των πρωτονίων του κυκλοπεντανίου υπάρχει στη περιοχή 1,5 – 2,5 ppm.





Σχήμα 7.54: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **Rib-05**, 400 MHz σε  $\text{CDCl}_3$ .

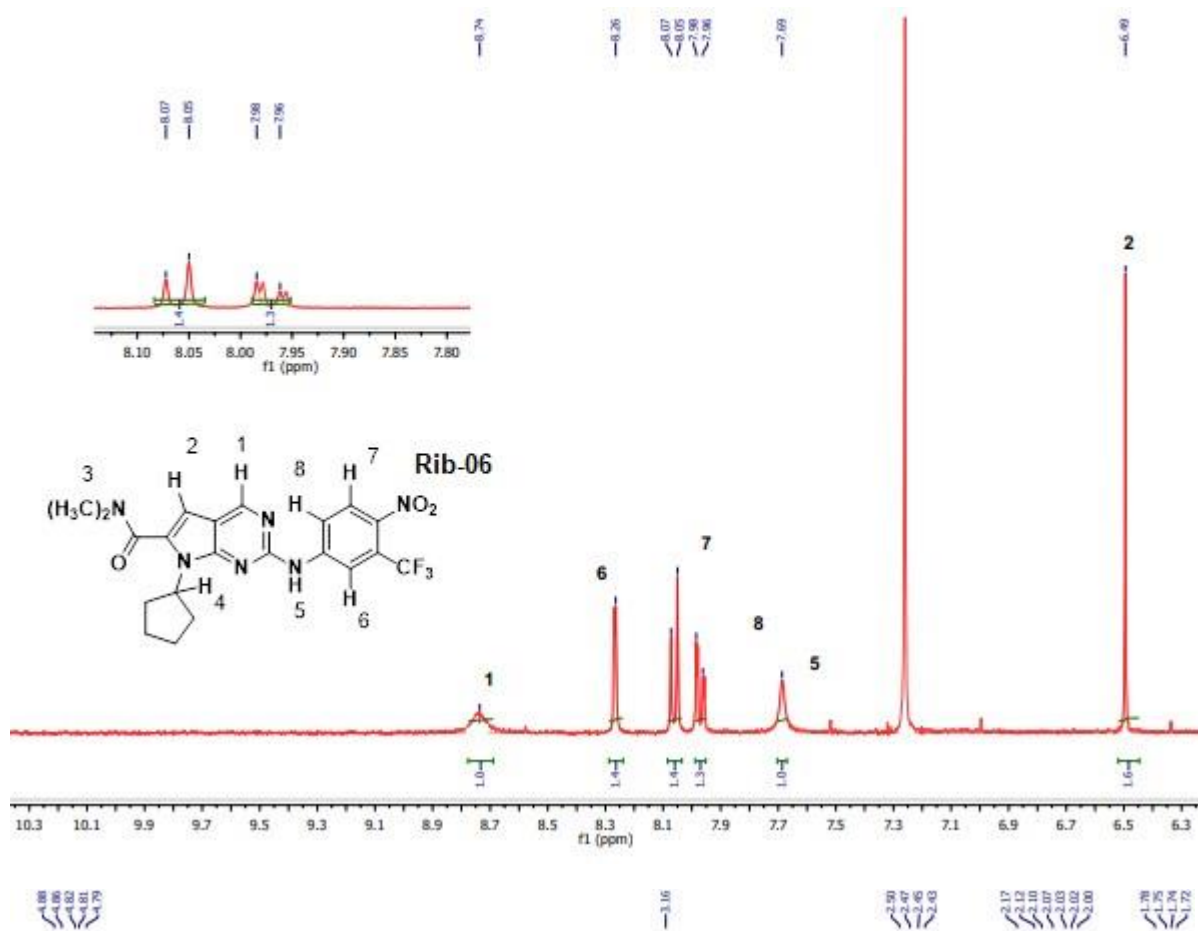


Σχήμα 7.55: Φάσμα μάζας, χαμηλής διακριτικής ικανότητας σε 0.1 %  $\text{HCOOH}$  σε  $\text{MeOH}$ .

Το φάσμα μάζας επιβεβαιώνει πως σχηματίστηκε η ένωση Rib-05 σε διαλύτη  $\text{HCOOH}$  σε  $\text{MeOH}$  0.1%. Έτσι, το θραύσμα που λαμβάνεται σε τιμή  $m/z$  463.0, αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1 με μοριακό τύπο  $[\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_3+\text{H}]^+$ . Η ένωση  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_3$  έχει ακριβή μάζα 462.16.

## 7.21 Φασματοσκοπικά δεδομένα του του τελικού προϊόντος σύζευξης Buchwald–Hartwig Rib-06

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης Rib-06 το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το πυριμιδινικό H1 το οποίο εμφανίζεται στο φάσμα ως απλή κορυφή. Στα 8,06 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο 7 ως μια τύπου διπλή της διπλής σχάσης εξαιτίας του γειτονικού πρωτονίου 8 με ( $^4J = 8,9\text{ Hz}$ ) και λόγω μακράς απόστασης με το πρωτόνιο 6. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 8 συντονίζεται στα 7,96 ppm για τους ίδιους λόγους με το πρωτόνιο 7. Τα δυο αυτά πρωτόνια 7 και 8 είναι αρκετά αποπροστατευμένα και ιδιαίτερα το πρωτόνιο 7, εξαιτίας της  $-\text{NO}_2$ , η οποία εκδηλώνει  $-M$  συζυγιακό φαινόμενο. Η χημική μετατόπιση στα 8,62 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 6 ως διπλή κορυφή και είναι ιδιαίτερα αποπροστατευμένο καθώς αφαιρείται ηλεκτρονιακή πυκνότητα εξαιτίας της  $-\text{CF}_3$  που εμφανίζει  $-I$  επαγωγικό φαινόμενο. Το ινδολικό πρωτόνιο 2 συντονίζεται στα 6,49 ppm ως απλή κορυφή. Το αμινικό πρωτόνιο 5 συντονίζεται στα 7,69 ppm ως απλή κορυφή και το πρωτόνιο 4 στα 4,82 ppm ως πολλαπλή κορυφή. Τα έξι πρωτόνια της μεθυλομάδας στα 3,16 ppm ως απλή κορυφή και τέλος τα πρωτόνια του κυκλοπεντανίου συντονίζονται από τα 1,7-2,5 ppm.



Σχήμα 7.56: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της ένωσης **Rib-06**, 400 MHz σε CDCl<sub>3</sub>.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8<sup>ο</sup>

### 8.1 Πειραματικό μέρος

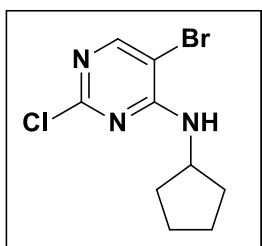
#### 8.1.1 Συσκευές και όργανα

Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Fluka, Fluorochem και TCI America και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία. Οι διαλύτες προέρχονται από τις παραπάνω εταιρίες και, όπου ήταν απαραίτητο, κατέστησαν απόλυτοι και διατηρήθηκαν σε άνυδρες συνθήκες. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες ( $\text{CDCl}_3$  και  $\text{DMSO-d}_6$ ) που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται επίσης από τις παραπάνω εταιρίες.

Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F<sub>254</sub> ms Merck, ενώ στους διαχωρισμούς μιγμάτων ενώσεων εφαρμόστηκε χρωματογραφία στήλης με silica gel 60 F<sub>254</sub> της Merck.

Η λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H-NMR}$  πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AMX 400 και 500, ενώ η λήψη φασμάτων μάζας έγινε στο όργανο LC-MSD-Trap-SL του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

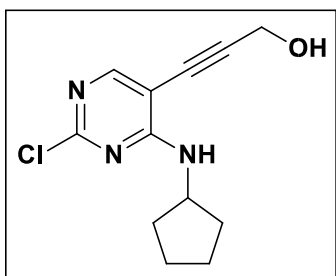
## 8.2 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη



Σε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η ένωση 5-βρωμο-2,4 διχλωροπυριμιδίνη(2.5g, 11mmol) και οξικός αιθυλεστέρας (12.5ml). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η 5-βρωμο-2,4 διχλωροπυριμιδίνη και έπειτα προστίθεται *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη(DIPEA) (2.8435g, 22mmol, 0.742g/ml). Ακολούθως, στο μείγμα της αντίδρασης προστίθεται στάγδην με σταγονομετρικό χωνί σε διάστημα 60 λεπτών διάλυμα που αποτελείται από κυκλοπεντυλαμίνη 1.3 mL (12.1 mmol, 1.067 g,  $d = 0.863 \text{ g/mL}$ ) και οξικό αιθυλεστέρα(12.5ml). Απαιτείται προσοχή κατά την παρασκευή του διαλύματος καθώς η κυκλοπεντυλαμίνη είναι πτητική ένωση. Κατά την προσθήκη του διαλύματος στο μείγμα της αντίδρασης παρατηρείται θόλωμα και εμφάνιση λευκού ιζήματος, το οποίο σταδιακά διαλύεται. Η αντίδραση είναι εξώθερμη και φτάνει μέχρι τους 35°C και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 40°C. Αυτή η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή για 6h όπου παρατηρείται κατανάλωση της αρχικής ένωσης με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας(TLC) σε διαλύτη ανάπτυξης εξάνιο:διχλωρομεθάνιο (2:1). Έπειτα σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί εκχύλιση με απεσταγμένο H<sub>2</sub>O (15ml) και οξικό διαιθυλεστέρα (15ml). Το περιεχόμενο της διαχωριστικής χοάνης αναδεύεται και οι φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ακολουθεί διήθηση με πτυχωτό ηθμό του ξηραντικού και το διήθημα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Για τον καθαρισμό του προϊόντος μετά τη συμπύκνωση, καθώς είναι ελαιώδες κίτρινου χρώματος, απαιτείται ανακρυστάλλωση με εξάνιο και θέρμανση με χρήση κάθετου ψυκτήρα. Το διάλυμα γίνεται διαυγές άχρωμο ,όμως μετά την ψύξη του μίγματος στους 4° C και διήθηση υπό κενό λαμβάνεται το λευκό ίζημα, το οποίο εκπλένεται με 1-2 mL ψυχρού εξανίου και παρατηρείται σχηματισμός λευκού ιζήματος που παραλαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού. Λαμβάνονται 2.54 g προϊόντος (**83 %**).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)** δ 8.09 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.42 (q,  $J = 7.0 \text{ Hz}$ , 1H), 2.23 – 2.02 (m, 2H), 1.80 – 1.71 (m, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 2H), 1.51 – 1.41 (m, 2H).

### 8.3 Σύνθεση της ένωσης 3- (2-χλωρο-4- (κυκλοπεντυλαμινο) πυριμιδιν-5-υλ) προπ-2-υν-1-όλη

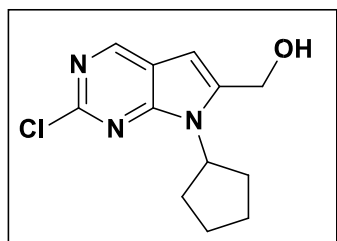


Σε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται η 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη (2.5318 g, 9.0564 mmol) μαζί με 33mL διαλύματος THF. Στη συνέχεια, προστίθεται ο καταλύτης τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνη) παλλάδιο(0)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (524mg, 0.453 mmol), έπειτα τριένυδρο φθοριούχο τετραβουτυλο-αμμώνιο ( $\text{TBAF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (14g, 22.641 mmol) και τέλος η προπ-2-υν-1-όλη (680μL, 660 mg, 11.773 mmol,  $d = 0,9715 \text{ g/mL}$ ) με αυτόματη πιπέτα. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται μέχρι βρασμού σε συνθήκες reflux και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σταδιακά, υφίσταται αλλαγή του χρώματος από καστανοκίτρινο σε αρκετά σκούρο καστανό χρώμα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, γίνεται έλεγχος για το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του THF, αφού πρώτα έχει μεταφερθεί σε μονόλιμη σφαιρική φιάλη και έχουν προστεθεί 5-10mL οξικού αιθυλεστέρα. Το μίγμα διαλύεται σε 40 mL οξικού αιθυλεστέρα και στη συνέχεια υπό ανάδευση προστίθενται 20 mL υδατικού διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$  4.2% για την εξουδετέρωση της προπαργυλικής αλκοόλης. Η οργανική φάση εκχυλίζεται τρεις φορές με 20ml απεσταγμένο νερό και οι υδατικές φάσεις απορρίπτονται. Έπειτα, στην οργανική φάση προστίθεται επιπλέον οξικός αιθυλεστέρας και άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , που χρησιμοποιείται ως ξηραντικό και αφήνεται υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, γίνεται διήθηση του ξηραντικού και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, όπου λαμβάνεται λασπώδες ίζημα καστανού χρώματος. Το μίγμα διαλύεται σε ελάχιστον οξικό αιθυλεστέρα και διηθείται υπό κενό χρησιμοποιώντας ηθμό από celite για την απομάκρυνση του καταλύτη. Η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με ανακρυστάλλωση προσθέτοντας 15ml καθαρής ακετόνης. Έπειτα, από 30 λεπτά reflux, διακόπτεται η θέρμανση και το μείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρείται καταβύθιση ιζήματος ανοιχτού καστανού χρώματος κατά τη σταδιακή ψύξη του μείγματος και ακολούθως τοποθετείται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διηθείται υπό κενό εκπλέοντας τον ηθμό με ελάχιστη κρύα

ακετόνη. Το προϊόν λαμβάνεται ως ανοιχτό καφέ στερεό. Λαμβάνονται 1.12 g προϊόντος(48.0 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)** δ 8.0 (s, 1H), 5.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.44 (h, *J* = 7.3 Hz, 1H), 2.16 – 2.07 (m, 1H), 1.92 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 1.78 – 1.72 (m, 2H), 1.67 (dt, *J* = 9.1, 4.6 Hz, 1H), 1.46 (dq, *J* = 13.9, 7.0 Hz, 2H).

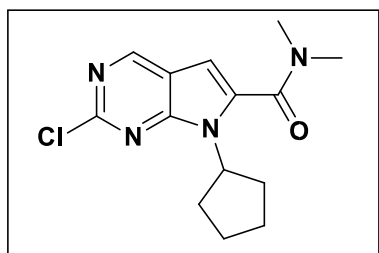
#### 8.4 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο [2,3d] πυριμιδιν-6υλ)μεθανόλη



Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται η ένωση 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλο) προπ-2-υν-1-όλη (1.1072g, 4.3467mmol) και 12 mL THF. Αμέσως μετά τη διάλυση της αρχική ένωσης προστίθενται 10.0 mL διαλύματος TBAF·3H<sub>2</sub>O (3.02 g, 9.5628 mmol) σε THF. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (reflux) μέχρι να διαπιστωθεί η πλήρης κατανάλωση της αρχικής ένωσης στο TLC. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 20h με εξαφάνιση της κηλίδας της αρχικής. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (1:2). Στη συνέχεια, το μείγμα της αντίδρασης εξατμίζεται στον περιστροφικό για την απομάκρυνση του διαλύτη THF μέχρι να μειωθεί αρκετά η στάθμη του και έπειτα προστίθεται ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Ακολούθως προστίθενται 1.2mL 2-προπανόλης υπό ανάδευση και 12mL απεσταγμένο H<sub>2</sub>O μέχρι να σταματήσει να σχηματίζεται ίζημα. Παρατηρείται σχηματισμός καστανοκόκκινου ιζήματος. Πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και έκπλυση με κρύο H<sub>2</sub>O, για την απομάκρυνση τυχόν αλάτων. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνονται 1.03 g προϊόντος (93 %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)** δ 8.71 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.93 (p, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 2.47 – 2.36 (m, 1H), 2.14 – 2.06 (m, 5H), 1.78 – 1.70 (m, 2H).

## 8.5 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N, N-διμεθυλο-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο



Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται η αρχική ένωση (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d] πυριμιδινό-6-υλ)μεθανόλη (185,5mg, 0,73mmol) μαζί με 12 mL άνυδρο DMF. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση, και προστίθενται υπό ανάδευση KCN (53mg, 0.804 mmol), 8 mL διαλύματος διμεθυλαμίνης (16.08 mmol) σε THF(2M) και το μίγμα αναδεύεται για περίπου 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα προστίθεται το MnO<sub>2</sub> (0.84 g, 9.65 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 30 min. Κατόπιν προστίθενται MnO<sub>2</sub> (5.01 g, 57.63 mmol) σε τρία μέρη κάθε 30 min (1<sup>ο</sup> μέρος: 0.84 g, 2<sup>ο</sup> μέρος: 1.64 g και 3<sup>ο</sup> μέρος: 2.53 g). Μετά την προσθήκη του 3ου μέρους το μίγμα αναδεύεται για επιπλέον 60 min και τέλος προστίθενται επιπλέον 2.53 g MnO<sub>2</sub>. Το οξειδωτικό μέσο προστίθεται σε μικρές δόσεις γιατί απαιτείται σταδιακή μετατροπή σε κυανυδρίνη που θα μετατραπεί τελικά σε αμίδιο. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να διαπιστωθεί αρκετή κατανάλωση της αρχικής ένωσης στο TLC. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε συνολικά στις 4 ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Το μίγμα διηθείται σε ηθμό με celite χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα, για την απομάκρυνση του διοξειδίου του μαγγανίου. Η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί και στο διήθημα που λαμβάνουμε σε περίπτωση που υπάρχει ακόμη μακροσκοπικά μαύρο λεπτόκοκκο ίζημα λόγω του MnO<sub>2</sub>. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών και της διμεθυλαμίνης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό με τη χρήση αντλίας υψηλού κενού για την απομάκρυνση του DMF. Μετά την απόσταξη του DMF διαλύθηκε σε 30-40 mL οξικού αιθυλεστέρα και έγινε εκχύλιση της οργανικής φάσης:

- με 15 mL υδατικού διαλύματος FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.07 g) για την απομάκρυνση των κυανιούχων ιόντων,
- στην συνέχεια με 15 mL H<sub>2</sub>O,
- τέλος, με 15 mL υδατικού διαλύματος NaCl 10%.

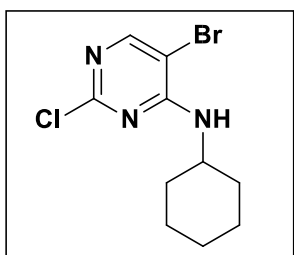
Οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και εκχυλίζονται με 10-15 mL οξικό αιθυλεστέρα, ενώ οι οργανικές φάσεις αφού συνενωθούν, ξηραίνονται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Διηθείται το ξηραντικό



και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, το δε προκύπτον ακατέργαστο μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διαλυτών διχλωρομεθάνιο : μεθανόλη (40:1). Το προϊόν λαμβάνεται καθαρό, ως έλαιο κίτρινου χρώματος. Για την απομόνωση του προϊόντος σε καθαρή μορφή, το έλαιο θερμάνθηκε με αιθέρα, όπου και διαλύθηκε πλήρως, ενώ στη συνέχεια με τη σταδιακή προσθήκη ψυχρού εξανίου, σχηματίσθηκε μπεζ ίζημα. Το ίζημα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με ελάχιστο ψυχρό εξάνιο. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνονται 470 mg προϊόντος (40%).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.81 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.88 (p,  $J = 9.8, 9.2$  Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 2.43 – 2.32 (m, 3H), 2.14 – 1.97 (m, 2H), 1.68 (q,  $J = 6.6$  Hz, 3H).

#### 8.6 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-*N*-κυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνη

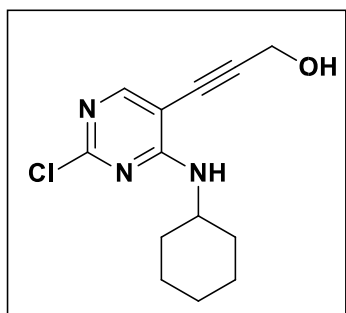


Σε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η ένωση 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνης (1g, 4.40 mmol) και οξικός αιθυλεστέρας (5 ml). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη και έπειτα προστίθεται *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (1.1374 g, 8.80 mmol, 0.742g/ml). Ακολουθώντας, στο μείγμα της αντίδρασης προστίθεται στάγδην με σταγονομετρικό χωνί σε διάστημα 60 λεπτών διάλυμα που αποτελείται από κυκλοεξυλαμίνη 550  $\mu\text{L}$  (12.1 mmol, 1.067 g,  $d = 0.863$  g/mL) και οξικό αιθυλεστέρα (12.5ml). Η αντίδραση είναι εξώθερμη και φτάνει μέχρι τους  $35^\circ\text{C}$  και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους  $40^\circ\text{C}$ . Αυτή η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή για 6h όπου παρατηρείται κατανάλωση της αρχικής ένωσης με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε διαλύτη ανάπτυξης εξάνιο:διχλωρομεθάνιο (2:1). Ακολουθεί εκχύλιση με απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  (15ml) και οξικό διαιθυλεστέρα (15ml). Το περιεχόμενο της διαχωριστικής χοάνης αναδεύεται και οι φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθείται με πτυχωτό ηθμό το ξηραντικό και το διήθημα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Για τον καθαρισμό του προϊόντος μετά τη συμπύκνωση, καθώς είναι ελαιώδες κίτρινου χρώματος, απαιτείται ανακρυστάλλωση με

εξάνιο και θέρμανση με χρήση κάθετου ψυκτήρα. Το διάλυμα είναι διαυγές άχρωμο, όμως μετά την ψύξη του μίγματος στους 4° C και διήθηση υπό κενό λαμβάνεται το λευκό ίζημα, το οποίο εκπλένεται με 1-2 mL ψυχρού εξανίου και παρατηρείται σχηματισμός προϊόντος που παραλαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού. Λαμβάνονται 0.9703 g προϊόντος (**75.6 %**).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)** δ 8.1 – 8.01 (m, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.04 (td, J = 7.5, 3.9 Hz, 1H), 2.05 (d, J = 10.8 Hz, 3H), 1.77 (dq, J = 14.7, 4.7 Hz, 3H), 1.67 (d, J = 11.1 Hz, 2H), 1.63 – 1.51 (m, 2H), 1.45 (q, J = 12.2 Hz, 3H), 1.26 (q, J = 11.5 Hz, 4H).

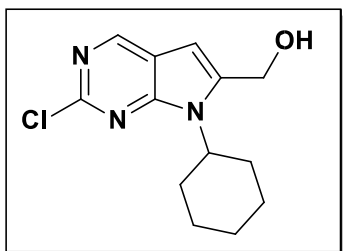
### 8.7 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοεξυλαμινοπυριμιδιν 5-υλο)προπ-2-υν-1όλη



Σε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται η 5 βρωμο-2-χλωρο-Nκυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνη (970.3 mg, 3.338 mmol) μαζί με 12mL διαλύματος THF. Στη συνέχεια, προστίθεται ο καταλύτης τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνη) παλλάδιο(0) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (193mg, 8.345mmol), το τριένυδρο φθοριούχο τετραβουτυλο-αμμώνιο (TBAF·3H<sub>2</sub>O) (14g, 22.641 mmol) και τέλος η προπ-2-υν-1όλη(252μL, 244 mg, 4.339 mmol, d = 0,9715 g/mL) με αυτόματη πιπέτα. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται μέχρι βρασμού σε συνθήκες reflux και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σταδιακά, υφίσταται αλλαγή του χρώματος από καστανοκίτρινο σε αρκετά σκούρο καστανό χρώμα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, γίνεται έλεγχος για το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας(TLC) σε σύστημα διαλυτών εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 2.5h. Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του THF, αφού πρώτα έχει μεταφερθεί σε μονόλιμη σφαιρική φιάλη και έχουν προστεθεί 5-10mL οξικού αιθυλεστέρα. Το μίγμα διαλύεται σε 40 mL οξικού αιθυλεστέρα και στη συνέχεια υπό ανάδευση προστίθενται 20 mL υδατικού διαλύματος NaHCO<sub>3</sub> 4.2% για την εξουδετέρωση της προπαργυλικής αλκοόλης. Η οργανική φάση εκχυλίζεται τρεις φορές με 20ml απεσταγμένο νερό και οι υδατικές φάσεις απορρίπτονται. Έπειτα, στην οργανική φάση προστίθεται επιπλέον οξικός αιθυλεστέρας

και άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ως ξηραντικό και αφήνεται υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, γίνεται διήθηση του ξηραντικού και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, όπου λαμβάνεται λασπώδες ίζημα καστανού χρώματος. Το μίγμα διαλύεται σε ελάχιστον οξικό αιθυλεστέρα και διηθείται υπό κενό χρησιμοποιώντας ηθμό από σελίτη για την απομάκρυνση του καταλύτη. Η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με ανακρυστάλλωση με ακετόνη. Έπειτα, από 30 λεπτά από την έναρξη του reflux, διακόπτεται η θέρμανση και το μείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρείται καταβύθιση ιζήματος ανοιχτού καστανού χρώματος κατά τη σταδιακή ψύξη του μείγματος και ακολούθως τοποθετείται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διηθείται υπό κενό εκπλένοντας τον ηθμό με ελάχιστη κρύα ακετόνη. Το προϊόν λαμβάνεται ως ανοιχτό καφέ στερεό. Λαμβάνονται 355 mg προϊόντος (40.0 %).

### 8.8 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλ-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδιν-6υλ)μεθανόλη

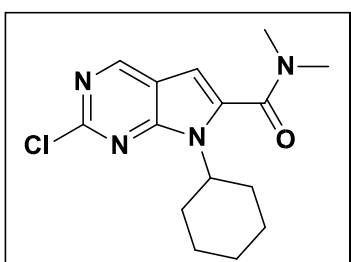


Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η ένωση 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοεξυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη (355.1 mg, 4.3467 mmol) και 4 mL THF. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό ανάδευση προστίθενται 3 mL διαλύματος TBAF·3H<sub>2</sub>O (0.93 g, 2.9392 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (reflux) για τουλάχιστον 90 λεπτά και η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 10 ώρες με εξαφάνιση της κηλίδας της αρχικής. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (1:2). Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του THF. Στο μίγμα προστίθενται 5-10 mL οξικού αιθυλεστέρα και εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την πλήρη απομάκρυνση του THF. Το ακατέργαστο μίγμα μετά την συμπύκνωση των διαλυτών είναι λασπώδες ίζημα καστανοκόκκινου χρώματος. Το ίζημα διαλύεται πλήρως σε 0.5 mL ισοπροπανόλης και προστίθενται υπό ανάδευση στάγδην περίπου 4-5 mL H<sub>2</sub>O σε διάστημα περίπου μισής ώρας, οπότε παρατηρείται καταβύθιση ιζήματος αχνού καφέ χρώματος. Το ίζημα διηθείται υπό κενό

και εκπλένεται με ελάχιστο νερό, για την απομάκρυνση τυχόν αλάτων. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνονται 305 mg προϊόντος (**86%**).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-d)** δ 8.72 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.40 (tt, J = 12.3, 3.8 Hz, 1H), 2.55 (q, J = 12.1, 11.7 Hz, 3H), 1.95 (d, J = 11.4 Hz, 3H), 1.88 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 1.80 – 1.72 (m, 1H).

### 8.9 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλ-N,N-διμεθυλ-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο [2,3- d] πυριμιδινο- 6- καρβοξαμίδιο



Σε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100mL και υπο ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η ένωση (2-χλωρο-7κυκλοεξυλο-7H πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (305 mg, 1.148 mmol) και 4 mL άνυδρο DMF. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό ανάδευση προστίθενται KCN (15 mg , 0.2296 mmol), 2.5 mL

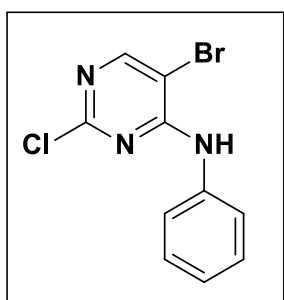
διαλύματος διμεθυλαμίνης (4.592 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο (2M). Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 15 min υ και στη συνέχεια γίνεται η πρώτη προσθήκη του MnO<sub>2</sub> (0.24 g). Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 30 min και έπειτα προστίθενται 1.435 g MnO<sub>2</sub> σε τρία μέρη κάθε 30 min (1<sup>ο</sup> μέρος: 0.24 g, 2<sup>ο</sup> μέρος: 0.47 g και 3<sup>ο</sup> μέρος: 0.725 g). Μετά την προσθήκη του 3ου μέρους το μίγμα αναδεύεται για επιπλέον 60 min και προστίθενται επιπλέον 0.725g MnO<sub>2</sub>. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 60 λεπτά. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 6 ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Το μίγμα διηθείται σε ηθμό με σελίτη χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα, για την απομάκρυνση του διοξειδίου του μαγγανίου. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών και της διμεθυλαμίνης με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα, το μίγμα αποστάζεται υπό κενό με αντλία υψηλού κενού για την απομάκρυνση του DMF. Το ακατέργαστο μίγμα που λήφθηκε μετά την απόσταξη του DMF διαλύθηκε σε 30-40 mL οξικού αιθυλεστέρα και έγινε εκχύλιση της οργανικής φάσης με :

- 20 mL υδατικού διαλύματος FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.45 g) για την απομάκρυνση των κυανιούχων ιόντων,
- στη συνέχεια με 20 mL H<sub>2</sub>O,
- τέλος με 20 mL υδατικού διαλύματος NaCl 10%.

Οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και εκχυλίζονται με 10-15 mL οξικό αιθυλεστέρα, ενώ οι οργανικές φάσεις αφού συνενωθούν ξηραίνονται με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθείται το ξηραντικό και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, όπου λαμβάνεται παχύρευστο στερεό. Το ακατέργαστο μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Το προϊόν λαμβάνεται ως ίζημα (13.7 mg) μπεζ χρώματος (39 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  8.80 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.45 (tt,  $J = 12.4, 3.7$  Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 2.43 (qd,  $J = 13.1, 12.6, 3.7$  Hz, 2H), 1.91 (d,  $J = 10.7$  Hz, 4H), 1.72 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 1.46 – 1.32 (m, 3H).

#### 8.10 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-*N*-φαινυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη



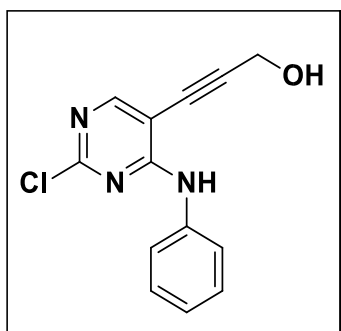
Σε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η ένωση 5-βρωμο-2, 4- διχλωροπυριμιδίνης (1g, 4.40 mmol) και οξικός αιθυλεστέρας (5 ml). Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί η 5-βρωμο 2,4 διχλωροπυριμιδίνη και έπειτα προστίθεται *N,N* δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (1.1374 g, 8.80 mmol, 0.742g/ml).

Ακολούθως, προστίθεται στάγδην με σταγονομετρικό χωνί σε διάστημα 60 λεπτών διάλυμα που αποτελείται από ανιλίνη 400  $\mu\text{L}$  (4.4 mmol, 0.4098 g,  $d = 1.0217$  g/mL) και οξικό αιθυλεστέρα (5.0 ml). Η αντίδραση είναι εξώθερμη και φτάνει μέχρι τους  $35^\circ\text{C}$  και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους  $40^\circ\text{C}$ . Αυτή η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή για 6h όπου παρατηρείται κατανάλωση της αρχικής ένωσης με τη βοήθεια χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε διαλύτη ανάπτυξης εξάνιο : οξικό αιθυλεστέρα (5:1). Έπειτα, σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί εκχύλιση με απεσταγμένο  $\text{H}_2\text{O}$  (15ml) και οξικό διαιθυλαθέρα (15ml). Το περιεχόμενο της διαχωριστικής χοάνης αναδεύεται και οι φάσεις αφήνονται να διαχωριστούν. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Ακολουθεί διήθηση με πτυχωτό ηθμό του ξηραντικού και το διήθημα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Για τον καθαρισμό του προϊόντος μετά τη συμπύκνωση, καθώς είναι ελαιώδες κίτρινου χρώματος, απαιτείται ανακρυστάλλωση με εξάνιο και θέρμανση. Το διάλυμα είναι διαυγές άχρωμο, όμως μετά την ψύξη του μίγματος στους  $4^\circ\text{C}$  και διήθηση υπό

κενό λαμβάνεται το λευκό ίζημα, το οποίο εκπλένεται με 1-2 mL ψυχρού εξανίου και παρατηρείται σχηματισμός λευκού ιζήματος που παραλαμβάνεται ως λευκό κρυσταλλικό στερεό μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού. Λαμβάνονται 0.96g προϊόντος (73.6 %).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.30 (s, 1H), 7.61 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.41 (t, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.20 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H).

### 8.11 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινοπυριμιδιν -5υλο)προπ-2-υν-1-όλη

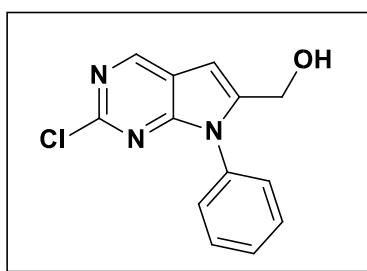


Σε μια δί λαιμη σφαιρική φιάλη των 100ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται η 5 βρωμο-2- χλωρο-N-φαινυλοπυριμιδιν-4αμίνη (500 mg, 1.52 mmol) μαζί με 6.5 mL διαλύματος THF. Στη συνέχεια, προστίθεται ο καταλύτης τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνη) παλλάδιο(0)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (102 mg, 0.088 mmol), έπειτα τριένυδρο φθοριούχο τετραβουτυλοαμμώνιο ( $\text{TBAF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (1.386 g, 4.393 mmol ) και τέλος η προπ-2-υν-1-όλη(132  $\mu\text{L}$ , 128.3 mg, 2.288 mmol,  $d = 0,9715$  g/mL) με αυτόματη πιπέτα. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται μέχρι βρασμού σε συνθήκες reflux για τουλάχιστον 2 ώρες και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σταδιακά, προκύπτει αλλαγή του χρώματος από καστανοκίτρινο σε αρκετά σκούρο καστανό χρώμα. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, γίνεται έλεγχος για το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας(TLC) σε σύστημα διαλυτών εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 2.5 ώρες. Το μείγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του THF, αφού πρώτα έχει μεταφερθεί σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και έχουν προστεθεί 510mL οξικού αιθυλεστέρα. Διαλύεται σε 40 mL οξικού αιθυλεστέρα και στη συνέχεια υπό ανάδευση προστίθενται 20 mL υδατικού διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$  4.2%. Η οργανική φάση εκχυλίζεται τρεις φορές με 20ml απεσταγμένο νερό και οι υδατικές φάσεις απορρίπτονται. Έπειτα, στην οργανική φάση προστίθεται επιπλέον οξικός αιθυλεστέρας και άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , που χρησιμοποιείται ως ξηραντικό και αφήνεται υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, γίνεται διήθηση του ξηραντικού και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό

ελαττωμένη πίεση, όπου λαμβάνεται λασπώδες ίζημα καστανού χρώματος. Το μείγμα διαλύεται σε ελάχιστον οξικό αιθυλεστέρα και διηθείται υπό κενό χρησιμοποιώντας ηθμό από σελίτη για την απομάκρυνση του καταλύτη. Η απομόνωση και ο καθαρισμός του προϊόντος γίνεται με ανακρυστάλλωση από ακετόνη. Έπειτα, από 30 λεπτά από την έναρξη του reflux, διακόπτεται η θέρμανση και το μίγμα ψύχεται αργά σε θερμοκρασία δωματίου. Παρατηρείται καταβύθιση ιζήματος ανοιχτού καστανού χρώματος κατά τη σταδιακή ψύξη του μείγματος και ακολούθως τοποθετείται στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Το ίζημα διηθείται υπό κενό εκπλένοντας τον ηθμό με ελάχιστη ψυχρή ακετόνη. Το προϊόν λαμβάνεται ως ανοιχτό καφέ στερεό. Λαμβάνονται 122 mg προϊόντος (**26.6 %**).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ 8.26 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.39 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.18 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.61 (s, 2H).

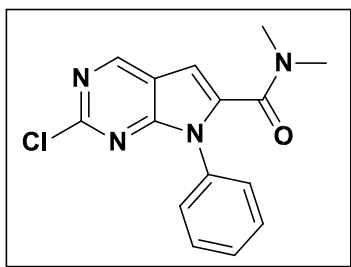
### 8.12 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-φαινυλ-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδιν-6-υλ) μεθανόλη



Σε δίλαμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η ένωση 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη (121.4 mg, 0.4674 mmol) και 1.5 mL THF. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση, προστίθενται υπό ανάδευση 1.0 mL διαλύματος TBAF·3H<sub>2</sub>O (0.325 g, 1.0232 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 2 ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (1:2). Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του THF. Στο μίγμα προστίθενται 5-10 mL οξικού αιθυλεστέρα και εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του THF. Στο μίγμα που λαμβάνεται μετά την συμπύκνωση των διαλυτών, λασπώδες ίζημα καστανοκόκκινου χρώματος, προστίθενται 0.5 mL ισοπροπανόλης και υπό ανάδευση στάγδην περίπου 4-5 mL H<sub>2</sub>O σε διάστημα μισής ώρας. Παρατηρείται καταβύθιση ιζήματος σκούρου καφέ χρώματος, που διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με ελάχιστο νερό, για την απομάκρυνση τυχόν αλάτων. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία, λαμβάνονται 85 mg προϊόντος (**68%**).



### 8.13 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-N,N-διμεθυλ-7-φαινυλ-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδινο-6-καρβοξαμίδιο



Σε δίλιαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται της ένωσης (2-χλωρο7-φαινυλο-7Hπυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη (184 mg, 0.7085 mmol) και 2.5 mL άνυδρο DMF. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση προστίθενται υπό ανάδευση 9.2mg KCN (0.1417 mmol) και 1.4

mL διαλύματος διμεθυλαμίνης (2.834 mmol) σε THF (2M). Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια γίνεται η πρώτη προσθήκη του MnO<sub>2</sub> (0.148 g). Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 30 min και έπειτα προστίθενται 0.884 g MnO<sub>2</sub> σε τρία μέρη κάθε 30 min (1<sup>ο</sup> μέρος: 0.148 g, 2<sup>ο</sup> μέρος: 0.29 g και 3<sup>ο</sup> μέρος: 0.446 g). Μετά την προσθήκη του 3ου μέρους το μίγμα αναδεύεται για επιπλέον 60 min, μετά το τέλος των οποίων, προστίθενται επιπλέον 0.725g MnO<sub>2</sub> και το μίγμα αναδεύεται πάλι σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον άλλα 60 min ή μέχρις ότου διαπιστωθεί αρκετή κατανάλωση της αρχικής ένωσης στο TLC. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε συνολικά στις 4 ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (1:2). Το μίγμα διηθείται σε ηθμό με σελίτη χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα, για την απομάκρυνση του διοξειδίου του μαγγανίου. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών και της διμεθυλαμίνης, με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση, το μίγμα αποστάζεται υπό κενό με τη χρήση αντλίας για την απομάκρυνση του DMF. Το ακατέργαστο μίγμα που λήφθηκε μετά την απόσταξη του DMF διαλύθηκε σε 40 mL οξικού αιθυλεστέρα και έγινε εκχύλιση της οργανικής φάσης:

- με 20 mL υδατικού διαλύματος FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.45 g) για την απομάκρυνση των κυανιούχων ιόντων,
- στην συνέχεια με 20 mL H<sub>2</sub>O,
- και τέλος, με 20 mL υδατικού διαλύματος NaCl 10%.

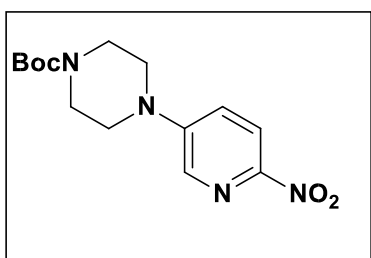
Οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και εκχυλίζονται με 10-15 mL οξικού αιθυλεστέρα, ενώ οι οργανικές φάσεις, αφού συνενωθούν, ξηραίνονται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, το ξηραντικό διηθείται και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, οπότε λαμβάνεται ως στερεό. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία ξηρής στήλης με σύστημα έκλουσης εξάνιο: ακετόνη (5:1), για την απομάκρυνση των αλάτων. Τέλος, γίνεται συμπύκνωση των διαλυτών



και ανακρυστάλλωση του ιζήματος με 1-προπανόλη μέχρι να διαλυθεί και μετά κρυστάλλωση με αρκετό ψυχρό εξάνιο. Το προϊόν λαμβάνεται ως ίζημα (80 mg) μεζ χρώματος (**38%**).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.93 (s, 1H), .58 – 7.40 (m, 5H), 6.83 (s, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.78 (s, 3H).

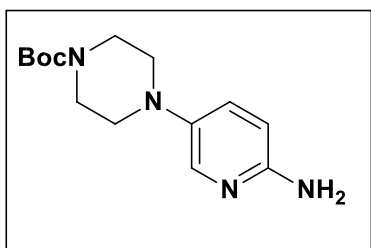
#### 8.14 Σύνθεση της ένωσης *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινη1-καρβοξυλικού οξέος



Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρονται 500 mg της ένωσης 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη (3.154 mmol) και 5 mL 1-βουτανόλη. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό ανάδευση προστίθενται 1.175 g 1-Boc-πιπεραζίνης (0.1417 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 90 - 100°C για 24h. Επειδή στο χρόνο αυτό δεν ολοκληρώθηκε η αντίδραση και είχε παραμείνει ποσότητα της αρχικής ένωσης, έγινε προσθήκη 167 mg (1.577 mmol) ανθρακικού νατρίου και με την παραμονή της θερμοκρασίας στους 100 οC για επιπλέον 6h, παρατηρήσαμε ότι καταναλώθηκε πλήρως η αρχική ένωση. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (3:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 30h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής. Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη παρατηρείται η παρουσία έντονου κίτρινου ιζήματος, ενώ μετά από την εξάτμιση της 1-βουτανόλης, το μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες δύο φορές με διχλωρομεθάνιο και μετά από συνένωση των οργανικών φάσεων γίνεται ξήρανση με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το ξηραντικό διηθείται και εξατμίζεται το διχλωρομεθάνιο υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με 3-4 mL ισοπροπανόλης. Με περαιτέρω ψύξη του μίγματος στους 4°C και διήθηση υπό κενό λαμβάνεται έντονο κίτρινο ίζημα, το οποίο εκπλένεται με αρκετό ψυχρό οξικό αιθυλεστέρα. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνονται 704 mg προϊόντος (**72.3 %**).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  8.18 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 8.13 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 7.21 (dd,  $J = 9.1, 3.1$  Hz, 1H), 3.66 – 3.62 (m, 4H), 3.47 – 3.44 (m, 3H), 1.49 (s, 9H).

### 8.15 Σύνθεση της ένωσης *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος

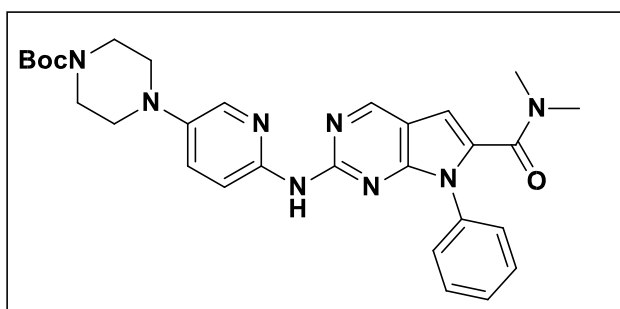


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αργού φέρονται 100 mg της ένωσης του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος (0.35676 mmol) και 4 mL THF. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό έντονη ανάδευση προστίθενται 45 mg

καταλύτη Adams (ένυδρο διοξείδιο του λευκοχρύσου) και εφαρμόζεται μπαλόνι υδρογόνου. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε περίπου σε 15–30 min με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Γίνεται διήθηση του καταλύτη σε ηθμό από σελίτη πλένοντας τον ηθμό με οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη. Μετά την συμπύκνωση των διαλυτών η αμίνη διαλύεται σε θερμό εξάνιο και με τη βοήθεια των υπερήχων σχηματίζεται ίζημα, στο οποίο προσθέτουμε αιθέρα για την πλήρη καταβύθιση του προϊόντος. Με περαιτέρω ψύξη του μίγματος στους 4°C και διήθηση υπό κενό λαμβάνεται κεραμέρυθρο ίζημα, το οποίο εκπλένεται με αιθέρα. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνονται 65 mg προϊόντος (**69.8 %**).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  . 4 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 7.18 (dd,  $J = 8.8, 2.9$  Hz, 1H), 6.49 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.60 – 3.53 (m, 4H), 2.95 (t,  $J = 5.0$  Hz, 4H), 1.48 (s, 9H).

## 8.16 Σύνθεση του προϊόντος σύζευξης Buchwald-Hartwig

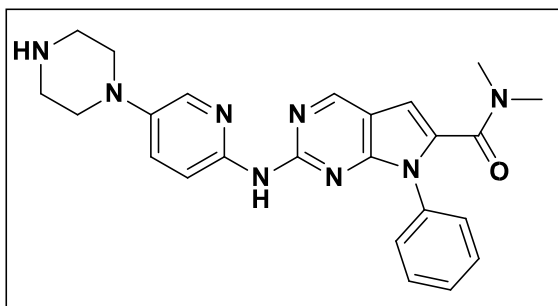


Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 50 mg της χλωροπυριμιδίνης A5c (0.1662 mmol) και 50 mg της αμινοπυριδίνης B3 (0.1828 mmol) μαζί με 2–3 mL μεθυλοϊσοβουτυλοκετόνη (MIBK).

Στη συνέχεια προστίθενται 8 mg Pd(OAc)<sub>2</sub> και 10 mg *rac*-BINAP και το μίγμα θερμαίνεται στους 40°C και σε αυτή τη θερμοκρασία προστίθενται, σε διάστημα 10- 30 min, 80 mg ανθρακικού καυσίου σε δύο ίσα μέρη. Μετά το τέλος των προσθηκών, το μίγμα θερμαίνεται στους 100/110 °C και η θερμοκρασία αυτή διατηρείται για τουλάχιστον 3h. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι Διχλωρομεθάνιο : Ακετόνη (4:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 5.5h με σχεδόν πλήρη κατανάλωση της αμίνης. Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού και στο ακατέργαστο μίγμα γίνεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες τρεις φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την παραλαβή του προϊόντος. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το ξηραντικό διηθείται και εξατμίζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης μεταβαλλόμενης πολικότητας: Διχλωρομεθάνιο : Ακετόνη (2:1). Το προϊόν λαμβάνεται ως στερεό (4 mg) αχνού κίτρινου χρώματος (52.1 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.67 (s, 1H), 8.47 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.34 (dd, J = 9.1, 2.8 Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.38 – 4.29 (m, 1H), 3.61 (t, J = 5.2 Hz, 4H), 3.16 (s, 6H), 3.12 – 3.06 (m, 4H), 2.63 (q, J = 12.3, 11.4 Hz, 2H), 1.93 (d, J = 13.2 Hz, 5H), 1.81 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 1.49 (s, 9H).

### 8.17 Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-02

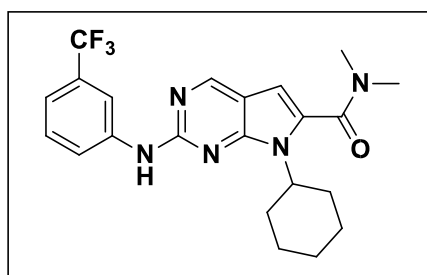


Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη με ανοιχτό το πώμα της φέρονται 4 mg της Boc-ένωσης C1c και υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 0 °C προστίθενται 2-4 mL υδατικού διαλύματος HCl 6N, το οποίο παρασκευάζεται από πυκνό υδροχλωρικό οξύ πριν πραγματοποιηθεί η

αντίδραση. Το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου μετά το τέλος της προσθήκης και παραμένει με έντονη ανάδευση για περίπου 1 ώρα και στο διάστημα αυτό έχει ολοκληρωθεί η Boc αποπροστασία και έχει διαλυθεί το υδροχλωρικό άλας. Στο μίγμα προστίθενται αιθέρας, αφήνεται για ανάδευση, μέχρι να διαχωρισθούν οι δύο φάσεις και εκχυλίζεται. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλη μία φορά με αιθέρα για τον πλήρη καθαρισμό του υδροχλωρικού άλατος. Στη συνέχεια στην υδατική φάση με προσθήκη στερεού καυστικού νατρίου μέχρι το pH φθάσει περίπου στο 12 και μετατραπεί το υδροχλωρικό άλας της πιπεραζίνης στην βασική μορφή της πιπεραζίνης. Η υδατική φάση εκχυλίζεται περίπου 4 φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την απομόνωση της τελικής ένωσης στην οργανική φάση. Μετά την ξήρανση της οργανικής φάσης και διήθηση του ξηραντικού, το προϊόν λαμβάνεται ποσοτικά και καθαρίζεται με ξηρή χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας αρχικά ως διαλύτη έκλουσης των αλάτων ακετόνη και στη συνέχεια το επιθυμητό προϊόν εκλούσθηκε με MeOH με λίγες σταγόνες αμμωνίας 25%. Το προϊόν παραλαμβάνεται μετά την εξάτμιση των διαλυτών ως στερεό κίτρινου χρώματος (**20 mg, 50.0%**).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)** δ 8.79 (s, 1H), 8.29 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.59 – 7.50 (m, 4H), 7.47 – 7.40 (m, 1H), 7.21 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 3.15 (p, J = 5.9, 4.9 Hz, 8H), 2.96 (s, 3H), 2.85 (s, 3H).

### 8.18 Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-03

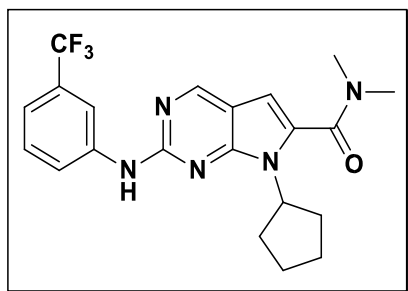


Σε μια δίκαιμη σφαιρική φιάλη των 100mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται η αρχική ένωση 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-N,N-διμεθυλ-7H-πυρρολο[2,3d]καρβοξαμίδιο (41.2 mg, 0.141 mmol) αφού πρώτα

διαλυθεί στο φιαλίδιο που φυλάσσεται με λίγη ποσότητα MIBK(1ml). Στη συνέχεια προστίθενται διαλύτες BINAP (4 mg), το Pd(OAc<sub>2</sub>) (1.7 mg) και στη συνέχεια η ένωση 3(τρίφθορο-μέθυλο)ανιλίνη(25 mg, 0.1828 mmol). Τέλος με συνεχή ανάδευση και σε τρεις δόσεις των 25mg προστίθεται το CsCO<sub>3</sub> με μια καθαρή πιπέτα. Το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 40°C για 45 λεπτά υπό ανάδευση και ύστερα η θέρμανση αυξάνεται στους 100°C. Σταδιακά παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του μίγματος από ανοιχτό καστανό σε κόκκινο. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 6 ώρες. Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται ο διαλύτης στην αντλία υψηλού κενού και στο μίγμα γίνεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες τρεις φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την παραλαβή του προϊόντος. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το ξηραντικό διηθείται, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού και το προϊόν καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (8:1). Το προϊόν παραλαμβάνεται ως 10.0 mg στερεό κίτρινου χρώματος (17.0%).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-d)** δ 8.93 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.24 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 8.1, 2.4 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.76 (tt, J = 10.0, 8.1 Hz, 1H), 3.15 (s, 7H), 2.58 – 2.47 (m, 2H), 2.08 – 2.05 (m, 2H), 2.01 – 1.96 (m, 1H), 1.68 (dq, J = 10.3, 6.1, 4.3 Hz, 3H).

## 8.19 Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-04

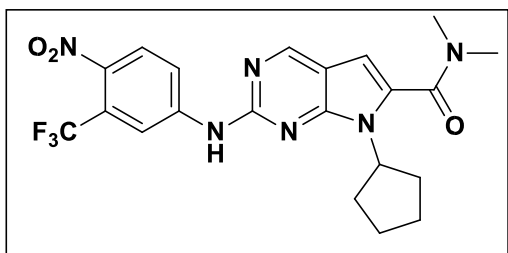


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 25 mg της 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλ-N, N-διμεθυλ-7H-πυρρολο [2,3-d] πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο (0.081 mmol) και 11μL 3(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης (14 mg, 0.0897 mmol) μαζί με 1 mL MIBK. Στη συνέχεια προστίθενται 1 mg Pd(OAc)<sub>2</sub> και 2mg BINAP και το μίγμα θερμαίνεται

στους 40 °C. Στη θερμοκρασία αυτή προστίθενται, σε διάστημα 30 λεπτών, 40 mg ανθρακικού καισίου σε δύο ίσα μέρη, μετά δε το τέλος των προσθηκών, το μίγμα θερμαίνεται στους 100-110 °C επί τουλάχιστον 3 ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι διχλωρομεθάνιο : ακετόνη (8:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 4 ώρες. Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται ο διαλύτης και στο μίγμα γίνεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες τρεις φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την παραλαβή του προϊόντος. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το ξηραντικό διηθείται και εξατμίζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης διχλωρομεθάνιο : ακετόνη (8:1). Το προϊόν λαμβάνεται ως μίγμα με την αρχική ένωση, οπότε ακολούθησε διαχωρισμός με παρασκευαστική TLC με σύστημα ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο : ακετόνη (7:1) και το προϊόν 5.0 mg παραλαμβάνεται ως στερεό κίτρινου χρώματος (**29** %).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)** δ 9.15 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 4 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.42 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.38 (ddt, J = 12.4, 7.5, 3.8 Hz, 1H), 3.14 (s, 6H), 2.46 (tt, J = 13.1, 6.6 Hz, 3H), 1.92 (dd, J = 19.6, 11.8 Hz, 6H), 1.73 (d, J = 12.4 Hz, 1H).

## 8.20 Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-05

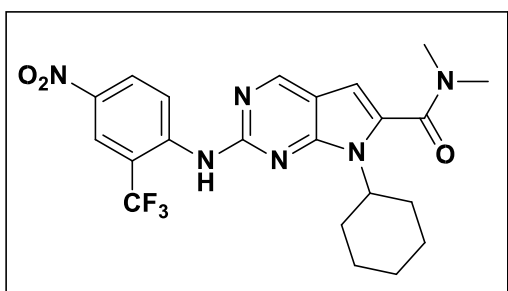


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η 2-χλωρο-7κυκλοπεντυλ-N,N-διμεθυλ-7H-πυρρολο[2,3d]καρβοξαμίδιο (30 mg, 0.103 mmol) και 24 mg 4νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο) ανιλίνης (0.113mmol)

μαζί με 1 mL MIBK. Στη συνέχεια προστίθενται 4 mg Pd(OAc)<sub>2</sub> και 10 mg BINAP και το μίγμα θερμαίνεται στους 40 °C και σε αυτή τη θερμοκρασία προστίθενται, σε διάστημα 10-30 λεπτά, 50 mg ανθρακικού καισίου σε δύο ίσα μέρη. Μετά το τέλος των προσθηκών, το μίγμα θερμαίνεται στους 100-110 °C και η θερμοκρασία αυτή διατηρείται για τουλάχιστον 3ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι διχλωρομεθάνιο : ακετόνη (7:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 4 ώρες. Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται ο διαλύτης και στο ακατέργαστο μίγμα γίνεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες τρεις φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την παραλαβή του προϊόντος. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το ξηραντικό διηθείται και εξατμίζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης με διχλωρομεθάνιο ως διαλύτη έκλουσης. Το προϊόν λαμβάνεται ως καθαρό ίζημα κίτρινου χρώματος (**18 mg, 37 %**).

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-d)** δ 9.06 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.55 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.39 (dd, J = 9.5, 2.6 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.84 (p, J = 9.0 Hz, 1H), 3.17 (s, 6H), 2.14 (dt, J = 8.9, 5.6 Hz, 1H), 2.04 (d, J = 5.9 Hz, 3H), 1.81 – 1.69 (m, 2H), 0.96 – 0.76 (m, 2H).

## 8.21 Σύνθεση της ένωσης Ribociclib-06



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται η ένωση 2-χλωρο-7κυκλοπεντυλ -N,N-διμεθυλ-7H-πυρρολο[2,3d]καρβοξαμίδιο (50 mg, 0.170 mmol) και η 4-νιτρο-3(τριφθορομεθυλο) ανιλίνη (38,77 mg, 0.170 mmol) μαζί με 1 mL MIBK. Στη συνέχεια

προστίθενται 4 mg Pd(OAc)<sub>2</sub> και 10 mg BINAP και το μίγμα θερμαίνεται στους 40 °C. Στη θερμοκρασία προστίθενται, σε διάστημα 10-30 λεπτά, 84 mg ανθρακικού καισίου σε τρία ίσα μέρη και μετά το τέλος των προσθηκών, το μίγμα θερμαίνεται στους 100-110 °C και η θερμοκρασία αυτή διατηρείται για τουλάχιστον 3 ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (7:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 6 ώρες. Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη απομακρύνεται ο διαλύτης και στο ακατέργαστο μίγμα γίνεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες τρεις φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την παραλαβή του προϊόντος και οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το ξηραντικό διηθείται και εξατμίζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το προϊόν καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης και διχλωρομεθάνιο ως διαλύτη έκλουσης. Το προϊόν λαμβάνεται ως καθαρό ίζημα κίτρινου χρώματος (**8 mg, 16 %**).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)** δ 8.74 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.49 (s, 2H), 4.89 – 4.77 (m, 2H), 3.16 (s, 8H), 2.46 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H), 2.15 – 2.06 (m, 3H), 2.03 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.73 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H).



## Βιβλιογραφία

1. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. *The cell : a molecular approach*. (Sinauer Associates, 2013).
2. <https://www.thesgc.org/science/protein-kinases>
3. Fatima Ardito, Michele Giuliani, Donatella Perrone, Giuseppe Troiano and Lorenzo Lo Muzio  
The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy  
(Review) Department of Clinical and Experimental Medicine, Foggia University, I-71122  
Foggia, Italy Received January 17, 2017; Accepted May 11, 2017doi: 10.3892/ijmm.2017.3036.
4. <https://www.chromocyte.com/educate/Reagents-Consumables--Services/Area-ofBiology/Phosphorylation-and-Phospho-Proteins/Phosphorylation-and-Phospho-Proteins>
5. Syed, Y. Y. (2017). *Ribociclib: First Global Approval*. *Drugs*, 77(7), 799–807. doi:10.1007/s40265-017-0742-0.
6. Carioli, G., Malvezzi, M., Rodriguez, T., Bertuccio, P., Negri, E., & La Vecchia, C. (2017). *Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe*. *The Breast*, 36, 89–95. doi:10.1016/j.breast.2017.06.003.
7. de Groot, A. F., Kuijpers, C. J. & Kroep, J. R. 4) Verweis zu PALOMA und MONALEESA CDK4/6 inhibition in early and metastatic breast cancer: A review. *Cancer Treat. Rev.* 60, 130–138 (2017).
8. Hortobagyi, G. N., Stemmer, S. M., Burris, H. A., Yap, Y.-S., Sonke, G. S., Paluch-Shimon, S., O'Shaughnessy, J. (2016). *Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer*. *New England Journal of Medicine*, 375(18), 1738–1748. doi:10.1056/nejmoa1609709.
9. Yli-Kauhaluoma, J., & K. Tuominen, R. (2011). *Editorial [Hot Topic: Current Research on Protein Kinases (Guest Editors: Jari Yli-Kauhaluoma & Raimo K. Tuominen)]*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(11), 1304–1304. Doi: 10.2174/156802611795589557.
10. Melnikova, I., & Golden, J. (2004). *Targeting protein kinases*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(12), 993–994. Doi: 10.1038/nrd1600.

11. Roskoski, R. (2015). *A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors*. *Pharmacological Research*, 100, 1–23. doi:10.1016/j.phrs.2015.07.010.
12. Guerra, B. & Issinger, O.-G. Natural Compounds and Derivatives as Ser/Thr Protein Kinase Modulators and Inhibitors. *Pharmaceuticals* 12, 4 (2019).
13. High-Throughput Structural Biology in Drug Discovery: Protein Kinases T.J. Stout, P.G. Foster and D.J. Matthews, *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10, 1069-1082 1069.
14. Knighton, D., Zheng, J., Ten Eyck, L., Ashford, V., Xuong, N., Taylor, S., & Sowadski, J. (1991). *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphatedependent protein kinase*. *Science*, 253(5018), 407–414. doi:10.1126/science.1862342.
15. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 6818–6827. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814279116>.
16. Kinases, P. Ser/ Thr-specific Protein Kinases and Protein Phosphatases. *Signal Transduction* 2, (2003).
17. Manning, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* (80-. ). 298, 1912–1934 (2002).
18. García-Aranda, M. & Redondo, M. Protein kinase targets in breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.*18, (2017).
19. Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases*. *Cell*, 141(7), 1117–1134. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011.
20. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*. 2000; 19 (49):5548-5557. doi:10.1038/sj.onc.1203957.
21. Paul, M. K., & Mukhopadhyay, A. K. (2004). *Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer*. *International Journal of Medical Sciences*, 101–115. doi:10.7150/ijms.1.101.
22. Neet K, Hunter T (1996). *Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families*. *Genes Cells*. 1 (2): 147–69. doi:10.1046/j.1365-2443.1996.d01-234.

23. Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignances and its Targeting by Natural Products Kodappully S. Siveen, Kirti S. Prabhu, Iman W. Achkar, Shilpa Kuttikrishnan, Sunitha Shyam, Abdul Q. Khan, Maysaloun Merhi, Said Dermime & Shahab Uddin.
24. Huwe, A., Mazitschek, R., & Giannis, A. (2003). *Small Molecules as Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. Angewandte Chemie International Edition, 42(19), 2122– 2138.* doi:10.1002/anie.200200540.
25. <https://www.khanacademy.org/science/biology/cellarmolecularbiology/mitosis/a/cell-cycle-phases>.
26. Marx, V. (2017). *Cell biology: tracking a cell's cycle. Nature Methods, 14(3), 233– 236.* doi:10.1038/nmeth.4186.
27. Sherr, C. J. (1996). *Cancer Cell Cycles. Science, 274(5293), 1672–1677.* doi:10.1126/science.274.5293.1672.
28. Leal-Esteban, L. C., & Fajas, L. (2020). *Cell cycle regulators in cancer cell metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 165715.* doi:10.1016/j.bbadis.2020.165715
29. Elledge, S. J. (1996). *Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. Science, 274(5293), 1664–1672.* doi:10.1126/science.274.5293.1664.
30. Carnero, A. (2006). *CELL CYCLE AND CELL-CYCLE CHECKPOINTS. Encyclopedia of Respiratory Medicine, 347–355.* doi:10.1016/b0-12-370879-6/00064-8.
31. Lim, S., & Kaldis, P. (2013). *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. Development, 140(15), 3079–3093.* doi:10.1242/dev.091744.
32. áchez-Martí ez, C., Gelbert, L. M., Lalle a, M. J. & De Dios, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **25**, 3420–3435 (2015).

33. Kalra, S., Joshi, G., Munshi, A., & Kumar, R. (2017). Structural insights of cyclin dependent kinases: Implications in design of selective inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 424–458. doi:10.1016/j.ejmech.2017.08.071.
35. Elledge SJ (December 1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis". *Science*. 274 (5293): 1664–1672. doi: 10.1126/science.274.5293.1664. PMID 8939848.
36. Mechanism of CDK activated revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex, Jeffrey PD, Russo A, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP (July 1995). *Nature*. 376 (6538):313-320. doi: 10.1038/376313a0. PMID 7630397.
37. Entrez Gene: CDK2 cyclin-dependent kinase 2
38. Entrez Gene: CDK4 cyclin-dependent kinase 4
39. "Identification of G1 Kinase Activity for cdk6, a Novel Cyclin D Partner" Meyerson, M; Harlow, E (1994). *Molecular and Cellular Biology*. 14 (3): 2077–86.
40. Patel, H., Abduljabbar, R., Lai, C.-F., Periyasamy, M., Harrod, A., Gemma, C., ... Ali, S. (2016). *Expression of CDK7, Cyclin H, and MAT1 Is Elevated in Breast Cancer and Is Prognostic in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. Clinical Cancer Research*, 22(23), 5929– 5938. doi:10.1158/1078-0432.ccr-15-1104.
41. Sun B, Mason S, Wilson RC, Hazard SE, Wang Y, Fang R, et al. (January 2020). "Inhibition of the transcriptional kinase CDK7 overcomes therapeutic resistance in HER2-positive breast cancers". *Oncogene*. 39 (1): 50–63. doi: 10.1038/s41388-019-0953-9. PMID 31462705.
42. Entrez Gene: CDK9 cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase) .
43. *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008).
44. Roskoski, R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol. Res.* 107, 249–275 (2015).
45. Malumbres, M., & Barbacid, M. (2005). *Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630–641. doi:10.1016/j.tibs.2005.09.005.
46. *Progress in Cell Cycle Research*, Vol. 3, 99-108 (1997) (Meijer, L., Guidet, S. and Philippe,

M., eds.) Plenum Press, New York, USA chapter 8 The regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) Matthias Peter ISREC, Ch. des Boveresses 155, 1066 Epalinges/VO, Switzerland.

47. Nevins, J. R. (2001). *The Rb/E2F pathway and cancer. Human Molecular Genetics, 10(7), 699–703.* doi:10.1093/hmg/10.7.699.

48. Mok, M. T., Zhou, J., Tang, W., Zeng, X., Oliver, A. W., Ward, S. E., & Cheng, A. S. (2018). *CCRK is a novel signalling hub exploitable in cancer immunotherapy. Pharmacology & Therapeutics, 186, 138–151.*

49. Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M. F. (2007). *The Biology of Cancer Stem Cells. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 23(1), 675–699.* doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154.

50. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(7), 3983–3988.* doi:10.1073/pnas.0530291100.

51. Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet, 389(10074), 1134–1150.* doi: 10.1016/s0140-6736(16)31891-8.

52. Organization, W. H. No Title. (2018). Available at: <http://gco.iarc.fr/today>.

53. Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C. U., Voduc, D., Speers, C. H., Gelmon, K. (2010). *Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. Journal of Clinical Oncology, 28(20), 3271–3277.* doi:10.1200/jco.2009.25.9820.

54. Ademuyiwa, F., Cyr, A., Ivanovich, J., & Thomas, M. (2015). *Managing breast cancer in younger women: challenges and solutions. Breast Cancer: Targets and Therapy, 1.* doi:10.2147/bctt.s68848.

55. Darby, S. C., Ewertz, M., McGale, P., Bennet, A. M., Blom-Goldman, U., Brønnum, D., Hall, P. (2013). *Risk of Ischemic Heart Disease in Women after Radiotherapy for Breast Cancer. New England Journal of Medicine, 368(11), 987–998.* doi: 10.1056/nejmoa1209825.

Roskoski, R. (2019). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2020 update. *Pharmacological Research, 104609.* doi:10.1016/j.phrs.2019.104609.

57. Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E. & Angiolini, M. Through the “gatekeeper door”: Exploiting the active kinase conformation. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 2681–2694 (2010).
58. Kucharczuk, C. R., Ganetsky, A. & Vozniak, J. M. Drug-Drug Interactions, Safety, and Pharmacokinetics of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Adv. Pract. Oncol.* 9, 189–200 (2018).
59. Roskoski, R. (2016). *Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. Pharmacological Research*, 103, 26–48. doi:10.1016/j.phrs.2015.10.021.
60. Tadesse, S., Caldon, E. C., Tilley, W. & Wang, S. Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors in Cancer Therapy: An Update. *J. Med. Chem.* 62, 4233–4251 (2019).
61. Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2015). *FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), 422–439. doi:10.1016/j.tips.2015.04.005.
62. Kwapisz, D. Cyclin-dependent kinase 4 / 6 inhibitors in breast cancer : palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast Cancer Res. Treat.* (2017). doi: 10.1007/s10549-017-43853.
63. Metastatic Breast Cancer Treatment|Verzenio (abemaciclib). Available at: <https://www.verzenio.com/>. (Accessed: 1st August 2019).
64. Corona, S. P. et al. CDK4/6 inhibitors in HER2-positive breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 112, 208–214 (2017).
65. Chen, P., Lee, N. V., Hu, W., Xu, M., Ferre, R. A., Lam, H., Murray, B. W. (2016). *Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. Molecular Cancer Therapeutics*, 15(10), 2273–2281. doi:10.1158/1535-7163.mct-16-0300.
66. Poratti, M. & Marzaro, G. Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *Eur. J. Med. Chem.* 143–153 (2019). doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.064.

67. Lee, H. J. et al. A selective cyclin-dependent kinase 4, 6 dual inhibitor, Ribociclib (LEE011) inhibits cell proliferation and induces apoptosis in aggressive thyroid cancer. *Cancer Lett.* 417, 131–140 (2018).
68. Chen, J. & Cunico, R. F. Synthesis of  $\alpha$ -Ketoamides from a Carbamoylsilane and Acid Chlorides. *J. Org. Chem.* 69, 5509–5511 (2004).
69. Pellegatti, L., Hafner, A. & Sedelmeier, J. A Two-Step Continuous-Flow Procedure towards Ribociclib. (2016). doi:10.1556/1846.2016.00017.
70. Liang, Y., Xie, Y. X. & Li, J. H. Modified palladium-catalyzed Sonogashira cross-coupling reactions under copper-, amine-, and solvent-free conditions. *J. Org. Chem.* 71, 379–381 (2006).
71. Wang, L. et al. Concise synthesis of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives via the Cu-catalyzed coupling reaction. *Green Chem. Lett. Rev.* 10, 42–47 (2017).
72. Jiang, X., Sun, D., Jiang, Y. & Ma, D. Efficient synthesis of pyrrolo[2,3-d]pyrimidines via a Cu(I)/6-methylpicolinic acid catalyzed coupling reaction. *Tetrahedron Lett.* 56, 3259–3261 (2015).
73. Pires, M. J. D., Ri el, R., Santos, A. S. & Marques, M. M. B. One-pot synthesis of 1, 2-disubstituted 4-, 5-, 6-, and 7-azaindoles from amino-o-halopyridines via arylation/sonogashira/cyclization reaction. *Org. Lett.* 19, 5118–5121 (2017).