



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

**Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων οργανικών -
βιοδραστικών ενώσεων, αναλόγων της Νιλοτινίβης (Nilotinib),
ως αντικαρκινικών φαρμάκων**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΜΠΡΑΚΟΥΛΛΙ ΕΛΕΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2021**



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

**«Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων οργανικών -
βιοδραστικών ενώσεων, αναλόγων της Νιλοτινίβης (Nilotinib),
ως αντικαρκινικών φαρμάκων»**

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Μπράκουλλι Ελένη

Χημικός

Επιβλέπων: Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής

Ιωάννινα

Οκτώβριος 2021

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Τμήμα Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Κατεύθυνση: «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Βιοδραστικές Ενώσεις»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Μπράκουλλι Ελένη

A.M. 1299

Επιβλέπων:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σίσκος Μιχάλης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αλίβερτης Δημήτριος, Επίκουρος καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών (ΒΕΤ) - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννινα

20/10/2021

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το διάστημα μεταξύ Νοεμβρίου 2019 και Σεπτεμβρίου 2021 στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στην κατεύθυνση «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Βιοδραστικές Ενώσεις», στο ερευνητικό εργαστήριο X3-210 του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας. Το παρόν μεταπτυχιακό δίπλωμα δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα από την πτυχιακή μου κιόλας εργασία ως προπτυχιακή φοιτήτρια, αλλά και για την συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, τη βοήθεια και την αμέριστη στήριξη και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Τον ευχαριστώ θερμά διότι εκτός από εξαιρετικός επιστήμονας είναι πάνω από όλα εξαιρετικός άνθρωπος.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Μιχάλη Σίσκο, διότι δέχτηκε να αποτελεί μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου και να προβεί στη μελέτη και την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριο Αλίβερτη, όχι μόνο για την αποδοχή του να αποτελεί μέλος της τριμελούς επιτροπής, αλλά και για την πολύτιμη βοήθειά του στο εργαστήριο όποτε αυτό κατέστη αναγκαίο.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την άριστη συνεργασία μας αυτά τα δύο έτη, παρόλες τις δυσκολίες που προέκυψαν. Αρχικά, ευχαριστώ τη διδάκτορα Πηνελόπη Βούλγαρη, αλλά και τον υποψήφιο διδάκτορα Μιχάλη Αλαγιάννη για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις χρήσιμες ιδέες τους. Επιπλέον, θα ήθελα να απευθύνω ιδιαίτερες ευχαριστίες στη συνάδελφο και φίλη μου πλέον Ιωάννα Γιαννακού για τη βοήθεια και τη στήριξη της, τόσο σε συναδελφικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Οφείλω, επίσης, να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα παιδιά του εργαστηρίου, Αλέξη Μπρέντα, Νικολέττα Ντέμου, Αλεξάνδρα Νίκου, Χριστίνα Καραμέτου και Γεωργία Μπαζάνου για την άριστη συνεργασία μας. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Βαρβούνη, αλλά και τους συναδέλφους μου του ερευνητικού του εργαστηρίου, Ειρήνη Τσεμπερλίδου, Παρασκευή Θεοδωρακοπούλου και κυρίως, τον Γιάννη Γεροντίτη για την πολύτιμη βοήθειά του όποτε την χρειάστηκα. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μονάδα ORBITRAP και τη χειριστή του οργάνου κα Μπότη Βασιλική για τη λήψη φασμάτων HRMS.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να αφήσω έξω από όλο αυτό τους γονείς μου. Γνωρίζοντας ότι μόνο ένα ευχαριστώ δεν φτάνει για όλα όσα μου έχουν προσφέρει κατά τη διάρκεια της ζωής μου, θα ήθελα να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, καθώς με την αμέριστη στήριξή τους, την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, αλλά και με τη σωστή καθοδήγηση με βοήθησαν πρώτα από όλα να γίνω καλύτερος άνθρωπος.

Στην οικογένειά μου...

Περίληψη

Οι πρωτεϊνικές κινάσες (PKs) είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε αμινοξέα Ser, Thr ή Tyr σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα, με σκοπό την ενεργοποίησή του. Τα εν λόγω ένζυμα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, συμμετέχοντας σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της επιβίωσης και της διαφοροποίησης. Γενετικές μεταβολές αυτών, που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, υπερέκφραση και απορρύθμιση, οδηγούν σε καρκινογένεση. Συνεπώς, αποτελούν αναμφισβήτητα έναν από τους σημαντικότερους στόχους για θεραπευτική παρέμβαση.

Το γονίδιο σύντηξης Bcr-Abl, γνωστό και ως χρωμόσωμα Philadelphia, είναι το μετασηματισμένο χρωμόσωμα 22, το οποίο προκύπτει από την αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 και θεωρείται υπεύθυνο για τη πρόκληση της χρόνιας μυελογονούς λευχαιμίας (ΧΜΛ). Το μεταλλαγμένο αυτό γονίδιο κωδικοποιεί την αντίστοιχη ογκογόνο πρωτεΐνη BCR-ABL1, η οποία έχει δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Η προκύπτουσα υβριδική πρωτεΐνη BCR-ABL1 ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και άλλα που αναστέλλουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Το Imatinib ήταν ο πρώτος μικρού μοριακού βάρους αναστολέας τυροσινικής κινάσης (TKI) ανταγωνιστής του ATP, που έλαβε έγκριση από τον FDA το 2001 για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογονούς λευχαιμίας (ΧΜΛ), θετική στο χρωμόσωμα Philadelphia. Οι επιπλέον μεταλλάξεις που μπορούν να λάβουν χώρα στην τυροσινική κινάση BCR-ABL1 μπορούν να προσδώσουν σε διαφορετικό βαθμό αντίσταση στο Imatinib. Η ανάπτυξη αναστολέων τυροσινικών κινασών 2^{ης} γενιάς κατάφερε να ξεπεράσει εν μέρει την αντίσταση, με τη σημειακή μετάλλαξη T315I να παραμένει η πιο δύσκολη στη θεραπεία. Το Nilotinib είναι 2^{ης} γενιάς εκλεκτικός αναστολέας τυροσινικής κινάσης, ο οποίος χορηγείται για τη θεραπεία της ΧΜΛ Ph+ σε ενήλικες ασθενείς με αντίσταση στο Imatinib. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία γίνεται προσπάθεια σύνθεσης νέων εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Nilotinib, από το οποίο διαφοροποιούνται στον τελικό βενζολικό δακτύλιο και στον δακτύλιο του μεθυλο-ιμιδαζολίου, με την εισαγωγή διαφόρων ομάδων, οι οποίες έχουν ενσωματωθεί σε άλλα φάρμακα, που έχουν επιδείξει καλή φαρμακευτική δράση. Οι νέες ενώσεις σχεδιάστηκαν μέσω προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης και ελέγχθηκαν για τυχόν πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της τυροσινικής κινάσης Abl αλλά και της υβριδικής πρωτεΐνης BCR-ABL1. Η ταυτοποίηση των πιθανών βιοδραστικών ενώσεων έγινε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H-NMR και ¹³C-NMR και φασματοσκοπία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Mass Spectrometry, HRMS).

Abstract

Protein kinases (PKs) are enzymes that catalyze the transfer of terminal phosphate group of ATP to amino acids Ser, Thr or Tyr on a protein substrate, by changing its activity. These enzymes play a critical role in cell signaling pathways by participating in a variety of cellular functions, including metabolism, cell cycle regulation, survival, and differentiation. Genetic changes, including mutations, chromosomal shifts, overexpression, and deregulation, lead to carcinogenesis. Therefore, they are undoubtedly one of the most important targets for therapeutic intervention.

The BCR-ABL1 fusion gene, also known as Philadelphia chromosome, is the transformed chromosome 22, which results from the reciprocal translocation of genetic material between chromosome 9 and chromosome 22 and is thought to be responsible for causing chronic myelogenous leukemia (CML). This gene encodes for a BCR-ABL1 fusion protein, which has tyrosine kinase activity and activates signaling pathways that promote cell proliferation and others that inhibit apoptosis.

Imatinib was the first small molecule tyrosine kinase inhibitor (TKI), antagonist of ATP, approved by the FDA in 2001 for the treatment of patients with chronic myelogenous leukemia (CML) positive on the Philadelphia chromosome. Imatinib acts through competition for the ATP-binding site in the tyrosine kinase domain of Abl. Despite the therapeutic success of target therapy, additional mutations that may occur in BCR-ABL1 tyrosine kinase may give varying degrees of resistance to Imatinib. The development of 2nd generation TK inhibitors has managed to partially overcome resistance, with the T315I mutation remaining the most difficult to treat. Nilotinib is a 2nd generation selective TK inhibitor indicated for the treatment of Imatinib resistant CML Ph+. In the present master's thesis, an attempt is made to synthesize new potentially selective protein kinase inhibitors, analogues of the drug Nilotinib, by changing the final benzene ring and the ring of methyl imidazole. The new compounds were designed and tested for binding to the active site of Abl tyrosine kinase and BCR-ABL1 fusion protein by using molecular modeling software. Potential bioactive compounds were identified by ^1H -NMR and ^{13}C -NMR Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy and High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS).

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	11
Εισαγωγή – Σκοπός	11
1.1. Εισαγωγή	11
1.2. Σκοπός	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	19
Θεωρητικό μέρος.....	19
2.1. Κυτταρικός κύκλος	19
2.2. Πρωτεϊνικές κινάσες (PKs) – Φωσφορυλίωση	20
2.3. Δομή πρωτεϊνικών κινασών	22
2.4. Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών	24
2.5. Πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr (PSTKs)	27
2.5.1. Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)	27
2.5.2. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC).....	29
2.5.3. Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinase, MAPK)	32
2.6. Πρωτεϊνικές κινάσες Tyr (PTKs).....	35
2.6.1. Υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (RPTKs)	36
2.6.2. Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRPTKs)	38
2.7. Μετάλλαξη BCR-ABL1 – Χρωμόσωμα Philadelphia	35
2.8. Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML)	38
2.9. Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	40
2.9.1. Θέση δέσμησης ATP	43
2.10. Αναστολείς της τυροσινικής κινάσης BCR-ABL1	44
2.10.1. Το Imatinib ως πρώτος αναστολέας PTK	44
2.10.2. Σύνθεση του Imatinib.....	46
2.11. Αντίσταση καρκινικών κυττάρων. Ανάγκη σύνθεσης αναστολέων TK 2 ^{ης} και 3 ^{ης} γενιάς. 48	
2.12. Το Nilotinib ως αναστολέας TK 2 ^{ης} γενιάς.....	50
2.12.1. Σύνθεση του Nilotinib	51
2.13. Επιπλέον αναστολείς της BCR-ABL1 2 ^{ης} και 3 ^{ης} γενιάς	54
2.13.1. Το Dasatinib ως αναστολέας TK 2 ^{ης} γενιάς	54
2.13.2. Το Bosutinib ως αναστολέας TK 2 ^{ης} γενιάς	54

2.13.3. Το Ponatinib ως αναστολέας TK 3 ^{ης} γενιάς.....	55
2.13.4. Αλλοστερικοί αναστολείς.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	59
Συζήτηση – Αποτελέσματα.....	59
3.1. Σχεδιασμός εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων μέσω προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης	59
3.2. Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων του στο ενεργό κέντρο πρωτεϊνικών κινασών.....	62
3.2.1. Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων του στην κινάση BCR-ABL1	62
3.2.2. Μοριακή μοντελοποίηση των αναλόγων του Nilotinib στη μετάλλαξη T315I	68
3.2.3. Μοριακή μοντελοποίηση των αναλόγων του Nilotinib στην πρωτεϊνική κινάση VEGFR2	69
3.3. Ολική πορεία σύνθεσης των νέων εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων – αναλόγων του Nilotinib	71
3.4. Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (ένωση 2).....	74
3.4.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (ένωση 2)	74
3.4.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (ένωση 2).....	75
3.5. Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 47).....	76
3.5.1. Αντίδραση σύνθεσης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 47)	76
3.5.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 47)	77
3.6. Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 48).....	78
3.6.1. Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 48).....	78
3.6.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 48)	79
3.7. Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης (ένωση 19)	80
3.7.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης (ένωση 19).....	80
3.7.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος του μέθυλο 3-γουανιδινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 19)	81
3.8. Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 46)	81

3.8.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 46)	81
3.8.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού προπυλεστέρα (ένωση 49)	83
3.8.3. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 46)	87
3.9. Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος (ένωση 12).....	88
3.9.1. Αντίδραση σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος (ένωση 12)	88
3.9.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος (ένωση 12)	89
3.10. Προσπάθειες σύνθεσης του N-(3-αμινο-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου (ένωση 51).....	89
3.10.1. Σύνθεση της ένωσης 51 με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης	89
3.10.2. Σύνθεση της ένωσης 51 με χρήση SOCl ₂	91
3.10.3. Σύνθεση της ένωσης 51 από εστέρα με χρήση βάσης tert-βουτοξείδιο του καλίου (KO ^t Bu)	93
3.10.4. Σύνθεση της ένωσης 51 από εστέρα με χρήση βάσης n-βούτυλο-λιθίου (n-BuLi)....	95
3.10.5. Φασματοσκοπικά δεδομένα του N-(3-αμινο-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο (ένωση 51)	97
3.11. Σύνθεση των αναλόγων Nil-1, Nil-2, Nil-3, Nil-4 και Nil-5	99
3.11.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση των αναλόγων Nil-1, Nil-2, Nil-3, Nil-4 και Nil-5.....	99
3.11.2. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-3	101
3.11.3. Φασματοσκοπικά δεδομένα της N-(3-αμινο-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-1H-πυρρολιο-3-καρβοξαμίδιο (ένωση 58).....	104
3.11.4. Σύνθεση του 2-καρβοξυ-θειοφαινείου (ένωση 56)	105
3.11.5. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-καρβοξυ-θειοφαινείου (ένωση 56)	106
3.11.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-1	108
3.11.7. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-2	111
3.11.8. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-3	113
3.11.9. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλογου Nil-4	116
3.11.10. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-5.....	119
3.12. Σύνθεση του αναλόγου Nil-6	121
3.12.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του αναλόγου Nil-6.....	121
3.12.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-6	124
3.13. Σύνθεση του αναλόγου Nil-7	126

3.13.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της 4-(2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)μορφολίνης (ένωση 64).....	127
3.13.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 4-(2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)μορφολίνης (ένωση 64).....	129
3.13.3. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της 2-μορφολινο-5-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης (ένωση 65).....	130
3.13.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 2-μορφολινο-5-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης (ένωση 65).....	131
3.13.5. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου Nil-7	131
3.13.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-7	132
3.14. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-8	134
3.14.1. Σύνθεση της (2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση 67).....	135
3.14.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση 67).....	136
3.14.3. Αντίδραση σύνθεσης της (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση 68).....	138
3.14.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση 68).....	140
3.14.5. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου Nil-8.....	141
3.14.6. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-8	142
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	145
Πειραματικό Μέρος.....	145
4.1. Συσκευές και όργανα	145
4.2. Σύνθεση της ένωσης 2	145
4.3. Σύνθεση της ένωσης 47	146
4.4. Σύνθεση της ένωσης 48	146
4.5. Σύνθεση της ένωσης 19	147
4.6. Σύνθεση των ενώσεων 46 και 49	147
4.7. Σύνθεση της ένωσης 12	148
4.8. Σύνθεση της ένωσης 51	149
4.8.1. Σύνθεση της ένωσης 51 με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης HATU.....	149
4.8.2. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 51 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος.....	149
4.8.3. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 51 από εστέρα με χρήση βάσης tert-βουτοξείδιο του καλίου (KO ^t Bu)	150
4.8.4. Σύνθεση της ένωσης 51 από εστέρα με χρήση βάσης n-βούτυλο-λιθίου (n-BuLi)....	150
4.9. Σύνθεση του αναλόγου Nil-1	151
4.10. Σύνθεση του αναλόγου Nil-2	152

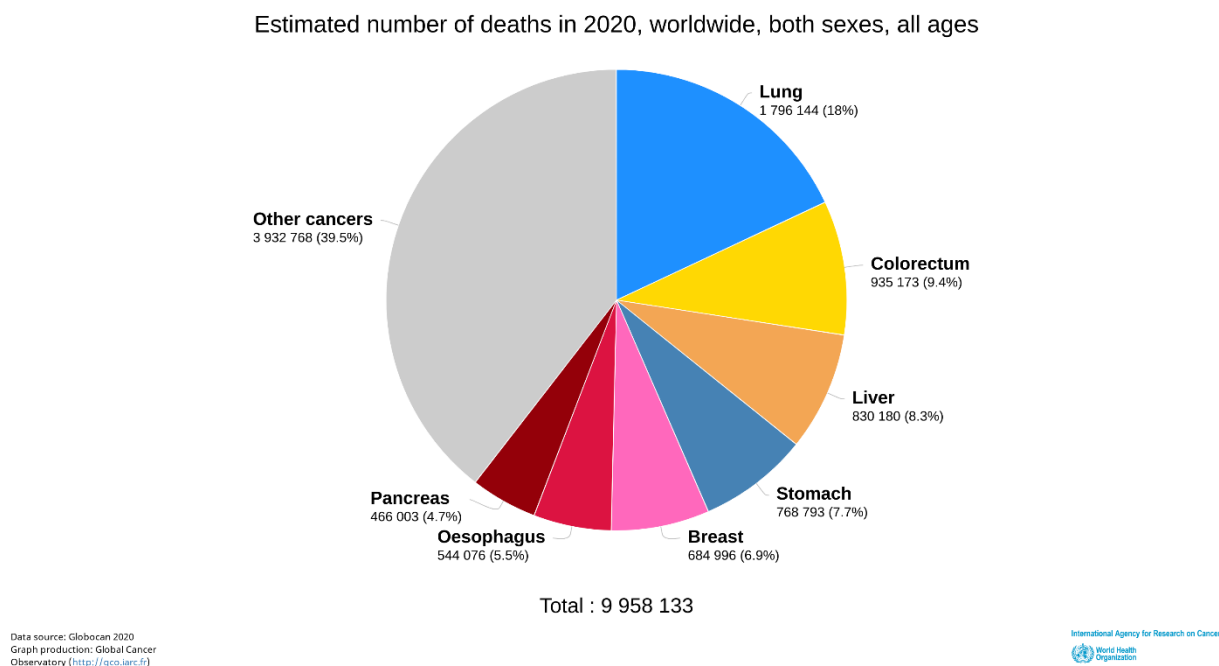
4.11. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-3	153
4.11.1. Σύνθεση του αναλόγου Nil-3 με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης HATU	153
4.11.2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-3 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος	153
4.12. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-3.....	154
4.12.1. Σύνθεση της ένωσης 58	154
4.12.2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-3	155
4.13. Πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-4.....	155
4.13.1. Σύνθεση της ένωσης 56	155
4.13.2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-4	156
4.14. Σύνθεση του αναλόγου Nil-5	157
4.15. Σύνθεση του αναλόγου Nil-6	157
4.16. Πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-7	158
4.16.1. Σύνθεση της ένωσης 64	158
4.16.2. Σύνθεση της ένωσης 65	159
4.16.3. Σύνθεση του αναλόγου Nil-7	159
4.17. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-8	160
4.17.1. Σύνθεση της ένωσης 67	160
4.17.2. Σύνθεση της ένωσης 68	161
4.17.3. Σύνθεση του αναλόγου Nil-8 με αντιδραστήριο σύζευξης HATU	161
4.17.4. Σύνθεση του αναλόγου Nil-8 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος	162
4.18. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-8.....	162
4.18.1. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 71 με αντιδραστήριο σύζευξης HATU.	162
4.18.2. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 71 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος.....	163
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°	165
Συμπεράσματα	165
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°	167
Βιβλιογραφία	167

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Εισαγωγή – Σκοπός

1.1. Εισαγωγή

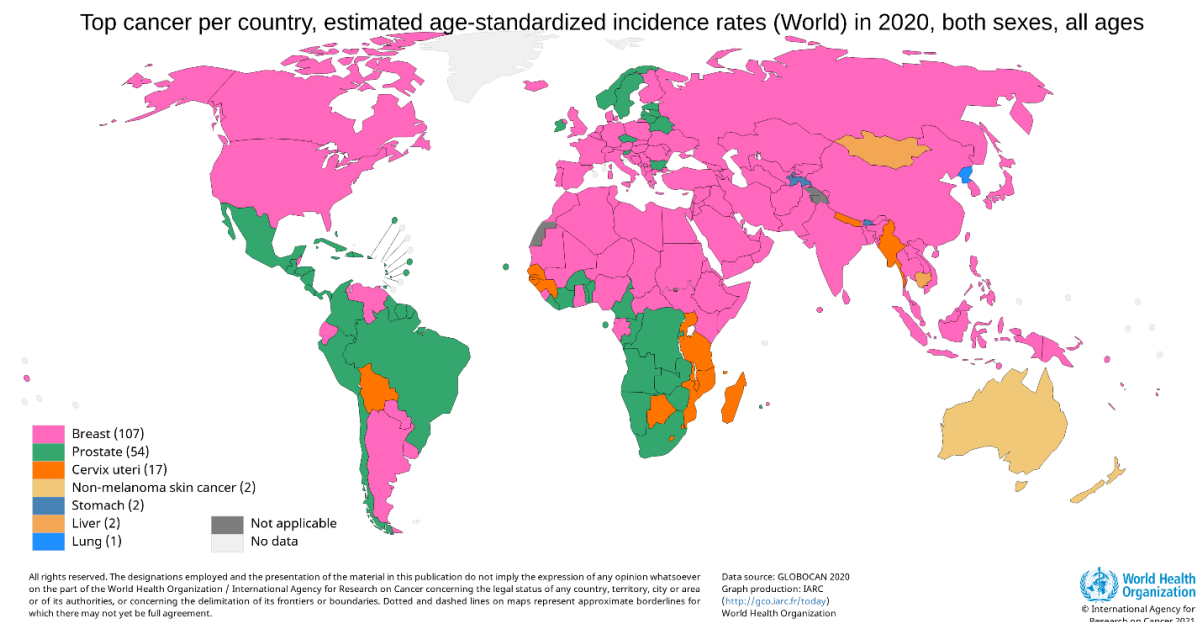
Ο καρκίνος είναι ένας γενικός όρος για μια μεγάλη ομάδα ασθενειών που μπορεί να επηρεάσουν οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας καθώς είναι η δεύτερη κύρια αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως αντιπροσωπεύοντας περίπου 10 εκατομμύρια θανάτους το 2020. Οι συνηθέστεροι τύποι καρκίνου είναι αυτοί του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη, του δέρματος και του στομάχου.¹ Ο καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού είναι η συνηθέστερη αιτία θανάτου στους άντρες και στις γυναίκες, αντίστοιχα. Συνολικά δημιουργεί την υψηλότερη κλινική, κοινωνική και οικονομική επιβάρυνση σε σύγκριση με όλες τις ανθρωπίνες ασθένειες.



Εικόνα 1.1. Οι πιο συχνές αιτίες θανάτου από καρκίνο το 2020.²

Χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των μη φυσιολογικών κυττάρων του σώματος, τα οποία αναπτύσσονται πέρα από τα συνήθη όριά τους οδηγώντας στην ανάπτυξη όγκων. Οι όγκοι μπορεί να είναι κακοήθεις ή καλοήθεις. Οι καρκινικοί όγκοι (κακοήθεις) εξαπλώνονται ή εισβάλουν σε κοντινούς ιστούς και μπορούν να

εξαπλωθούν σε άλλα όργανα. Η τελευταία διαδικασία αναφέρεται ως μετάσταση. Οι μεταστάσεις είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο.^{1,3}



Εικόνα 1.2. Η πιο συνήθης μορφή καρκίνου στην Ελλάδα το 2020 είναι ο καρκίνος του μαστού.²

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης ενός πολυκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού, κάποια κύτταρα είναι αναγκαίο να πεθάνουν. Τα ανεπιθύμητα κύτταρα εξαλείφονται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, της μεταμόρφωσης και της ανάπτυξης των ιστών. Η διαδικασία αυτή καλείται απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και παρέχει ζωτική σημασία για τον έλεγχο του συνολικού αριθμού των κυττάρων. Κατά την απόπτωση το κύτταρο γίνεται πιο συμπαγές, δημιουργούνται αποπτωτικά κυστίδια, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και το DNA κατακερματίζεται. Την ιδιότητα αυτή της απόπτωσης παύουν να έχουν τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία έχουν πλέον την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και να αναπτύσσονται σε μη φυσιολογικές θέσεις, προκαλώντας κατά αυτό τον τρόπο ακόμα και θάνατο του οργανισμού στον οποίο εμφανίζονται.⁴ Ένα κύτταρο όγκου διαφέρει από ένα φυσιολογικό ως προς την αθανатоποίηση του, το μορφολογικό μετασχηματισμό του και κάποιες φορές την ικανότητα δημιουργίας μεταστάσεων.^{4,5}

Υπάρχουν διάφοροι τύποι θεραπείας για τον καρκίνο. Η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας εξαρτάται από το είδος του καρκίνου, από το πόσο προχωρημένος είναι, καθώς και από τις επιλογές του ασθενούς. Κάποιες μορφές καρκίνου μπορούν να αντιμετωπιστούν μόνο με μία θεραπεία. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες απαιτούν έναν συνδυασμό θεραπειών, όπως χειρουργική επέμβαση με χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία. Επιπλέον, στους τρόπους αντιμετώπισης συμπεριλαμβάνονται η ανοσοθεραπεία, η ορμονοθεραπεία,

καθώς και η στοχευμένη θεραπεία.⁶ Η στοχευμένη θεραπεία είναι αυτή που μελετάται στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Στοχευμένη είναι η θεραπεία που χρησιμοποιεί φάρμακα ή άλλες ουσίες για τον εντοπισμό και την επίθεση συγκεκριμένων τύπων καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας λιγότερη βλάβη στα φυσιολογικά κύτταρα. Ορισμένες τέτοιες θεραπείες εμποδίζουν τη δράση ορισμένων ενζύμων, πρωτεϊνών ή άλλων μορίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων και οι περισσότερες εξ αυτών είναι είτε φάρμακα μικρών μορίων είτε μονοκλωνικά αντισώματα. Η στοχευμένη θεραπεία μπορεί να έχει λιγότερες παρενέργειες από άλλους τύπους θεραπείας για τον καρκίνο, όπως οι χημειοθεραπείες.⁷ Η σημαντική αυτή μείωση των παρενεργειών οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη μορίων-φαρμάκων που στοχεύουν σε μακρομόρια που σχετίζονται με τη μεταγωγή σήματος και επηρεάζουν την ανάπτυξη, τη διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Αυτή η διαδικασία βοηθά στην επιβράδυνση της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης του καρκίνου, ενώ ταυτόχρονα οδηγεί και σε καλύτερη ποιότητα ζωής του ασθενούς.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες (PKs) είναι ένζυμα που ρυθμίζουν τη βιολογική δραστηριότητα των πρωτεϊνών με φωσφορυλίωση συγκεκριμένων αμινοξέων με ATP ως πηγή φωσφορικών, προκαλώντας έτσι μια διαμορφωτική αλλαγή από μια ανενεργή σε μια ενεργή μορφή της πρωτεΐνης.⁸ Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι PK, οι οποίοι ταξινομούνται σύμφωνα με την πλευρική αλυσίδα αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν, οι κινάσες τυροσίνης (TKs) που φωσφορυλιώνουν το φαινολικό υδροξύλιο της Tyr, οι κινάσες σερίνης-θρεονίνης που φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα αυτών των δύο αμινοξέων και οι κινάσες ιστιδίνης που φωσφορυλιώνουν το άζωτο των καταλοίπων του.⁸



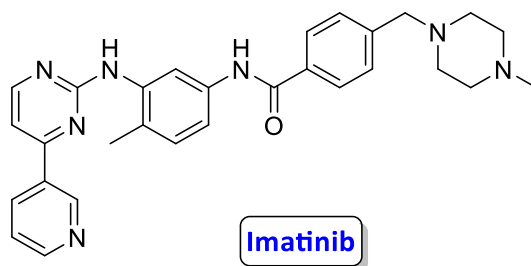
Εικόνα 1.3. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε μία πρωτεΐνη στόχο (υπόστρωμα) με σκοπό την ενεργοποίησή της.⁹

Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών στόχων, όπως και η αποφωσφορυλίωση είναι βασικές διαδικασίες που ρυθμίζουν την κυτταρική λειτουργία. Σχεδόν κάθε διαδικασία μεταγωγής σήματος υπεύθυνη για τη λειτουργία των κυττάρων, συμβαίνει μέσω μιας σειράς γεγονότων μεταφοράς φωσφορικών ομάδων που κινούνται από κινάσες. Λόγω της στενής εμπλοκής τους στη ρύθμιση των βιολογικών διεργασιών, αποτελούν αναμφισβήτητα έναν από τους σημαντικότερους στόχους για θεραπευτική παρέμβαση. Μεταλλάξεις που οδηγούν στην υπερέκφρασή τους και γενικότερα στην απορρύθμιση της λειτουργίας τους συνδέονται

κυρίως με τον καρκίνο, ενώ έχει βρεθεί εμπλοκή αυτών και σε άλλες ασθένειες (π.χ. ανοσολογικές, φλεγμονώδεις, εκφυλιστικές, μεταβολικές, καρδιαγγειακές και μολυσματικές).^{10,12}

Αφού η δυσλειτουργία των πρωτεϊνικών κινασών εμπλέκεται με καρκινογένεση, προκύπτει η ανάγκη ελέγχου της δραστηριότητάς τους αναπτύσσοντας μόρια τα οποία αναστέλλουν τη λειτουργία τους. Η ανακάλυψη των εν λόγω μορίων, τα οποία ονομάζονται αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, οδήγησε σε αλλαγή του τρόπου αντιμετώπισης του καρκίνου, αναπτύσσοντας κατά αυτόν τον τρόπο μια στοχευμένη θεραπεία. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν εγκριθεί από τον FDA αρκετοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.¹³

Το ενδιαφέρον με τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών ξεκίνησε με την έγκριση της Ιματινίβης (Imatinib) το 2001 από τον FDA. Το Imatinib αποτελεί έναν αναστολέα 1^{ης} γενιάς της υβριδικής τυροσινικής κινάσης BCR-ABL1, που παράγεται σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ) (Chronic Myeloid Leukemia, CML), θετικοί στο χρωμόσωμα Philadelphia (Ph+).¹⁴ Παρασκευάζεται από την εταιρεία Novartis και διατίθεται σε δισκία των 100 και 400 mg με το εμπορικό όνομα Gleevec ή Glivec.



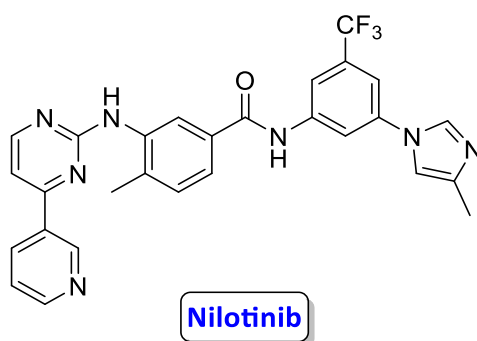
Σχήμα 1.1. Μοριακή δομή του Imatinib.

Η χρόνια μυελογονής λευχαιμία είναι ουσιαστικά καρκίνος των λευκών αιμοσφαιρίων και προκύπτει από την αμοιβαία ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 t(9,22), οδηγώντας στο σχηματισμό του χρωμοσώματος Philadelphia. Αυτή η μεταφορά οδηγεί σε ένα υβριδικό γονίδιο (Bcr-Abl), το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό της αντίστοιχης πρωτεΐνης BCR-ABL1 με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης, η οποία έχει απορυθμισμένη λειτουργία και υψηλή δραστικότητα κινάσης Abl με αποτέλεσμα την παραγωγή υψηλού αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων. Η τυροσινική κινάση περιέχεται στο τμήμα Abl της υβριδικής πρωτεΐνης, γνωστό και ως Abelson, η οποία αποτελεί στόχο για το σχεδιασμό φαρμάκων για τη θεραπεία της ΧΜΛ.⁸

Το εκτιμώμενο συνολικό ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με ΧΜΛ σε 10 χρόνια με θεραπεία πρώτης γραμμής με Ιματινίβη ήταν 83%, πετυχαίνοντας πλήρη κυτταρογενετική απόκριση.^{15,16} Όντας ο πρώτος αναστολέας, αποτέλεσε σημαντική πρόοδο στη θεραπεία του καρκίνου, ενώ παράλληλα άνοιξε το δρόμο προς την ανάπτυξη και άλλων ειδών αναστολέων τυροσινικών κινασών, αντιμετωπίζοντας αποτελεσματικά και άλλες μορφές καρκίνου.

Παρόλα αυτά, η αντίσταση που εμφάνιζαν οι ασθενείς με ΧΜΛ στο Imatinib, καθώς και νέες σημειακές μεταλλάξεις στην BCR-ABL1, οδήγησε στην ανάπτυξη βελτιωμένων 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης, όπως το Nilotinib, το Dasatinib, το Bosutinib.¹⁵ Το Ponatinib χορηγείται σε ασθενείς που εμφανίζουν δυσανεξία ή δεν αποκρίνονται στη θεραπεία με τα δύο πρώτα φάρμακα, ενώ χορηγείται, επιπλέον, σε ασθενείς με γενετική σημειακή μετάλλαξη, γνωστή ως «μετάλλαξη T315I», η οποία καθιστά τους ασθενείς ανθεκτικούς στη θεραπεία με Ιματινίβη, Δασατινίβη ή Νιλοτινίβη.

Το Nilotinib είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας τυροσινικής κινάσης 2^{ης} γενιάς, ο οποίος αναπτύχθηκε από την εταιρία Novartis ώστε να ξεπεράσει την αντίσταση στο Imatinib. Εγκρίθηκε από τον FDA το 2007, με την εμπορική ονομασία Tasigna για τη θεραπεία ασθενών με ΧΜΛ θετικών στο χρωμόσωμα Philadelphia. Πρόκειται για ανάλογο του Imatinib, το οποίο έχει υψηλή χημική συγγένεια και εξειδίκευση για τη BCR-ABL1. Είναι ισχυρότερος αναστολέας συγκριτικά με τον αντίστοιχο 1^{ης} γενιάς και είναι σημαντικά πιο δραστικός έναντι των περισσότερων μεταλλάξεων της BCR-ABL1.⁸



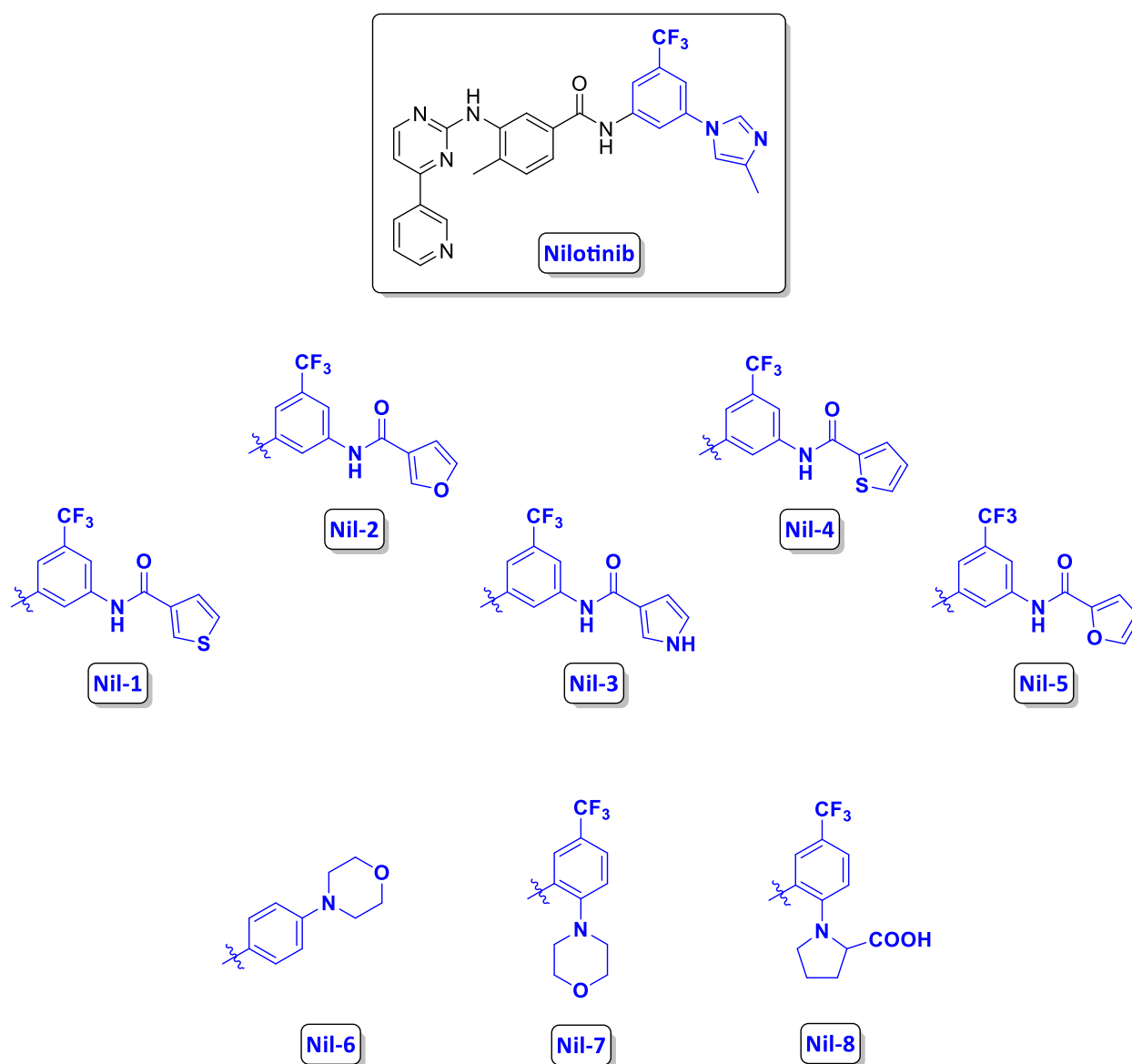
Σχήμα 1.2. Μοριακή δομή του Nilotinib.

1.2. Σκοπός

Καθότι οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της επιβίωσης και της διαφοροποίησης,¹³ οποιαδήποτε απορρύθμισή τους μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και κατά συνέπεια σε καρκινογένεση. Συνεπώς, αποτελούν αναμφισβήτητα έναν στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, λόγω της αντίστασης που παρουσιάζεται στο φαρμακευτικό σκεύασμα του Imatinib, αλλά και λόγω των συνεχών μεταλλάξεων που συμβαίνουν στην BCR-ABL1 σε ασθενείς με ΧΜΛ, προκύπτει έντονη ανάγκη για την ανάπτυξη αναστολέων νεότερης γενιάς, για μια πιο αποτελεσματική στοχευμένη θεραπεία.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι ο μοριακός σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση νέων αναλόγων – βιοδραστικών μορίων του φαρμακευτικού σκευάσματος Nilotinib ως εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων. Ο σχεδιασμός των νέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο με πειράματα μοριακής μοντελοποίησης, με χρήση του προγράμματος AutodockVina. Σχεδιάστηκαν συνολικά οκτώ ενώσεις έχοντας ως πρότυπο φάρμακο το Nilotinib, από το οποίο διαφοροποιούνται στον τελικό βενζολικό δακτύλιο και στον δακτύλιο του μεθυλο-ιμιδαζολίου, με την εισαγωγή διαφόρων ομάδων που συνιστούν δομικά συστατικά άλλων φαρμάκων. Παρακάτω παρουσιάζεται η σειρά αναλόγων που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο, όπως αναφέρεται παραπάνω, ως απόρροια θεωρητικών μελετών – προσεγγίσεων.



Σχήμα 1.3. Ανάλογα του Nilotinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο.

Η πρώτη σειρά αναλόγων που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο, περιλαμβάνει την προσάρτηση στον τελικό βενζολικό δακτύλιο της Νιλοτινίβης αρωματικών ετεροκυκλικών πενταμελών δακτυλίων μέσω ενός αμιδικού δεσμού. Πρόκειται για τα ανάλογα **Nil-1**, **Nil-2**, **Nil-3**, **Nil-4** και **Nil-5**. Μια δεύτερη σειρά αναλόγων που σχεδιάστηκε περιλαμβάνει την προσάρτηση του δακτυλίου της μορφολίνης, καθώς και εκείνου της προλίνης. Στην περίπτωση αυτή πρόκειται για τα ανάλογα **Nil-6**, **Nil-7** και **Nil-8**.

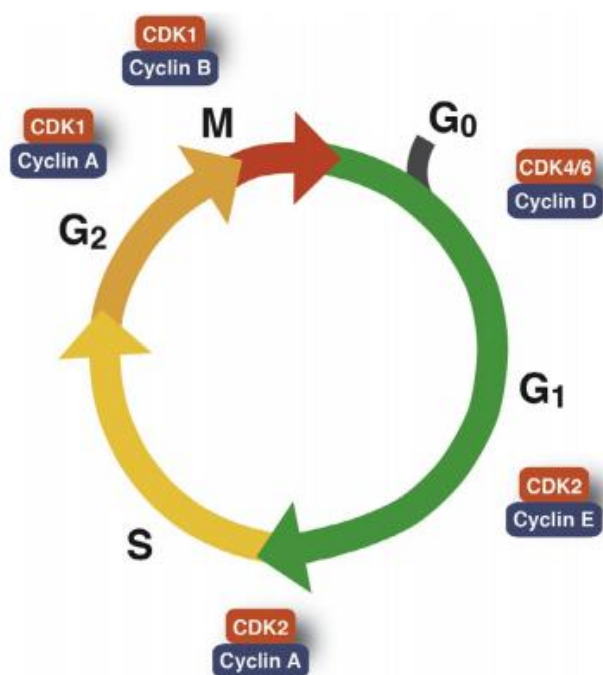
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°

Θεωρητικό μέρος

2.1. Κυτταρικός κύκλος

Ως κυτταρικός κύκλος νοείται το σύνολο των διεργασιών μέσω των οποίων ένα κύτταρο αναπτύσσεται, αντιγράφει το γονιδίωμά του και τελικά διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα μέσω της μίτωσης, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.¹⁷

Ο κυτταρικός κύκλος περιλαμβάνει τέσσερα στάδια, τα οποία ονομάζονται φάσεις G1, S, G2 και M. Το G1 (Gap 1) είναι το στάδιο όπου συντίθενται κυτταρικές πρωτεΐνες, RNA, μεμβράνες και άλλα μακρομόρια, ενώ προετοιμάζεται το κύτταρο για τη σύνθεση του DNA που ακολουθεί στο επόμενο στάδιο. Η φάση S (DNA Synthesis) είναι το στάδιο όπου το DNA αντιγράφεται και διπλασιάζεται. Το αμέσως επόμενο στάδιο, το G2 (Gap 2) είναι το στάδιο κατά το οποίο το κύτταρο συνεχίζει την ανάπτυξη του και προετοιμάζεται για κυτταρική διαίρεση. Τέλος, ακολουθεί η φάση M (Mitosis) όπου το κύτταρο διαιρείται και προκύπτουν δυο θυγατρικά κύτταρα.



Εικόνα 2.1. Κυτταρικός κύκλος. Ταξινομείται σε τέσσερις φάσεις: Gap 1 (G₁), σύνθεση DNA (S), Gap 2 (G₂) και μίτωση (M), ενώ ολοκληρώνεται με διαχωρισμό των δύο θυγατρικών κυττάρων.¹⁹

Ορισμένα κύτταρα δεν εισέρχονται σε έναν νέο κυτταρικό κύκλο προκειμένου να διαιρεθούν, αντί αυτού εξέρχονται από τη φάση ανάπτυξης G1 και εισέρχονται σε ένα στάδιο ανάπαυσης G0. Η φάση G0 θεωρείται ένα στάδιο ηρεμίας για το κύτταρο, έως ότου ένα εξωκυτταρικό ερέθισμα ή αυξητικός παράγοντας σημάνει την είσοδό του ξανά στη φάση G1. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να εξέλθουν από τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και της γήρανσης, ενώ άλλα κύτταρα που είτε δεν διαιρούνται είτε σπάνια διαιρούνται, παραμένουν μόνιμα σε φάση G0.

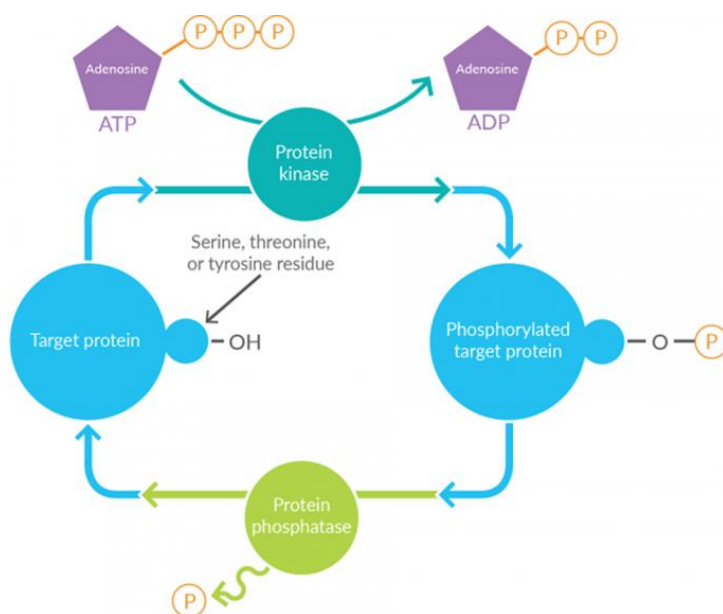
Τα δύο βασικά σημεία ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται στις μεταβάσεις μεταξύ των φάσεων G1 και S και μεταξύ των φάσεων G2 και M. Υπεύθυνες για την ρύθμισή του είναι μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών, που ονομάζονται κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (Cyclin-dependent kinases, CDKs). Πρόκειται για μια οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης που για να καταστούν λειτουργικές απαιτούν σύνδεση κυκλίνης – μιας πρωτεΐνης που ελέγχει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου – σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο κυκλίνης-CDK. Η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν τον έγκαιρο έλεγχο των δύο θεμελιωδών βημάτων του κυτταρικού κύκλου: την αντιγραφή του DNA και τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Τόσο οι κυκλίνες όσο και οι CDK αποτελούν τον πυρήνα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Τα σημεία ελέγχου (checkpoints) είναι μηχανισμοί παρακολούθησης που διασφαλίζουν ότι κάθε στάδιο του κύκλου ολοκληρώνεται πριν πραγματοποιηθεί το επόμενο. Περιλαμβάνουν πολυάριθμα γονίδια που ανιχνεύουν βλάβη στο DNA και προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου και επιδιόρθωση DNA, ή παρουσία εκτεταμένης βλάβης του DNA, απόπτωση.^{18,19,20}

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατέχει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική επιδιόρθωση και αναγέννηση των ιστών. Περιλαμβάνει πολλές οδούς σηματοδότησης που καθορίζουν εάν τα κύτταρα θα πολλαπλασιαστούν, θα παραμείνουν σε ηρεμία, θα σταματήσουν ή θα υποστούν απόπτωση. Η απώλεια της ρύθμισής του είναι το κύριο χαρακτηριστικό του καρκίνου. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι τόσο οι καρκινογόνες όσο και οι μη καρκινογόνες τοξικές ουσίες μπορούν να μεταβάλουν σημαντικά τις ειδικές διεργασίες του κυτταρικού κύκλου.¹⁸

2.2. Πρωτεϊνικές κινάσες (PKs) – Φωσφορυλίωση

Οι πρωτεϊνικές κινάσες (PTKs) είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) σε συγκεκριμένα αμινοξέα μιας πρωτεΐνης στόχου (υπόστρωμα), αλλάζοντας τη διαμόρφωσή της από ανενεργή σε ενεργή. Αντίθετα η απενεργοποίηση του υποστρώματος καταλύεται από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες, οι οποίες αντιστρέφουν τις επιδράσεις των πρωτεϊνικών κινασών, αποφωσφορυλιώνοντας το υπόστρωμα.^{8,9,12}

Οι κινάσες εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της επιβίωσης και της διαφοροποίησης.¹³ Αποτελούν κατά κάποιον τρόπο μοριακούς διακόπτες που ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται ύστερα από πολύ ακριβείς βιολογικές ενδείξεις, που συνήθως ξεκινούν από ένα εξωκυττάριο σήμα όπως ορμόνη, νευροδιαβιβαστής, στέρηση θρεπτικών συστατικών ή κάποιο άλλου είδους στρες.²¹



Εικόνα 2.2. Η ενεργοποίηση μιας πρωτεΐνης στόχου καταλύεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες μέσω φωσφορυλίωσης. Αντίθετα η απενεργοποίηση του υποστρώματος καταλύεται από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες.¹⁰

Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών ανακαλύφθηκε πρώτη φορά ως ρυθμιστικός μηχανισμός από τους Krebs και Fischer στα τέλη της δεκαετίας του 1950, πάνω στη μελέτη τους για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Η ανακάλυψη αυτή αποτέλεσε μια πρώτη απόδειξη ότι η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αποτελεί μια δυναμική διαδικασία που εμπλέκεται στη ρύθμιση της πρωτεϊνικής λειτουργίας.^{21,22} Σήμερα, πλέον, γνωρίζουμε πως η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος με τον οποίο τα ενδοκυτταρικά σήματα ρυθμίζουν κρίσιμες ενδοκυτταρικές διαδικασίες όπως μεταφορά ιόντων, κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση και ορμονικές αποκρίσεις. Έχει βρεθεί πως το 20% των περίπου 32.000 ανθρώπινων γονιδίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών υπάρχουν περισσότερες από 518 πρωτεϊνικές κινάσες, το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 1.7% των γονιδίων του ανθρώπου,²³ και περίπου 150 πρωτεϊνικές φωσφατάσες που ασκούν αυστηρό έλεγχο στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Τα προκλινικά και κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν

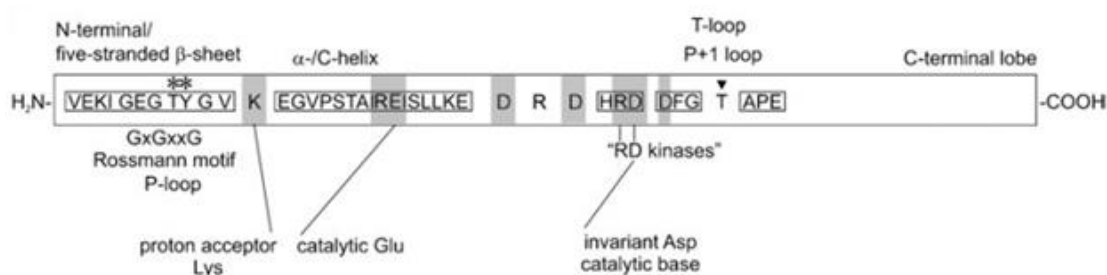
έντονα τη συμμετοχή συγκεκριμένων PTK στο σχηματισμό και στην εξέλιξη ενός υποσυνόλου όγκων.⁸

2.3. Δομή πρωτεϊνικών κινασών

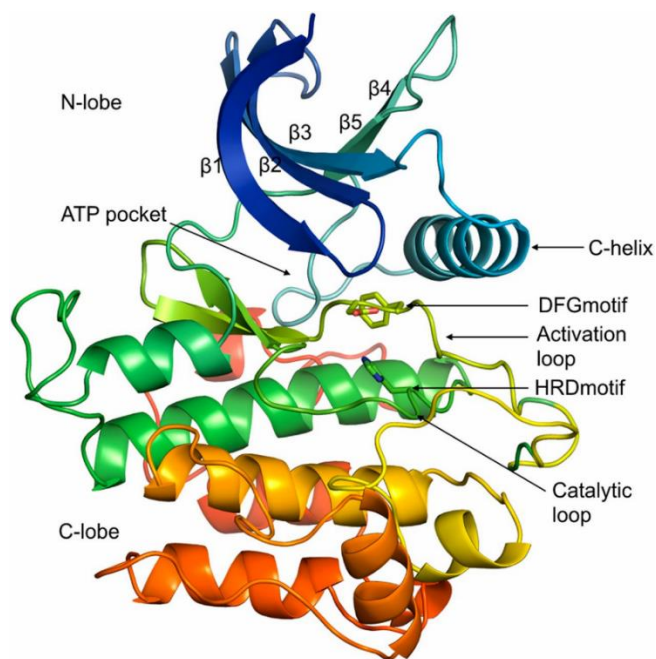
Ανεξάρτητα από τον αριθμό, όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες μοιράζονται μια κοινή δομή. Η καταλυτική τους περιοχή απαρτίζεται από περίπου 250-300 αμινοξέα και αποτελούνται όλες από δύο λοβούς: έναν N-τερματικό λοβό, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την δέσμευση και τον προσανατολισμό του ATP και έναν C-τερματικό λοβό, ο ρόλος του οποίου είναι η σύνδεση με το υπόστρωμα.

Ο C-τερματικός λοβός αποτελείται από έξι α-έλικες, ενώ ο N-τερματικός λοβός αποτελείται από ένα πεντάκλωνο β-φύλλο και μία α-έλικα, η οποία ονομάζεται C-έλικα και περιέχει ένα καταλυτικό γλουταμικό Glu. Επιπλέον, ο N-τερματικός λοβός είναι πλούσιος σε γλυκίνη (G, Gly) με ένα μοτίβο αλληλουχίας της μορφής GxGxxG, γνωστό και ως μοτίβο Rossmann (εικόνα 2.3). Η αλληλουχία αυτή βρίσκεται στο βρόχο P και είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση των α και β-φωσφορικών ομάδων, καθώς και για τον προσανατολισμό της γ-φωσφορικής ομάδας του δεσμευμένου μορίου ATP κατά την κατάλυση.

Οι δύο λοβοί συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας «εύκαμπτης» περιοχής που αποτελεί τη θέση δέσμευσης του ATP. Ο βρόχος ενεργοποίησης (Activation loop) αποτελείται από μια αλληλουχία 20-30 καταλοίπων, η οποία ξεκινά με ένα μοτίβο DFG (Asp-Phe-Gly) και καταλήγει σε ένα μοτίβο APE (Ala-Pro-Glu).



Εικόνα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση καταλυτικών τομέων και καταλοίπων των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών.²⁴

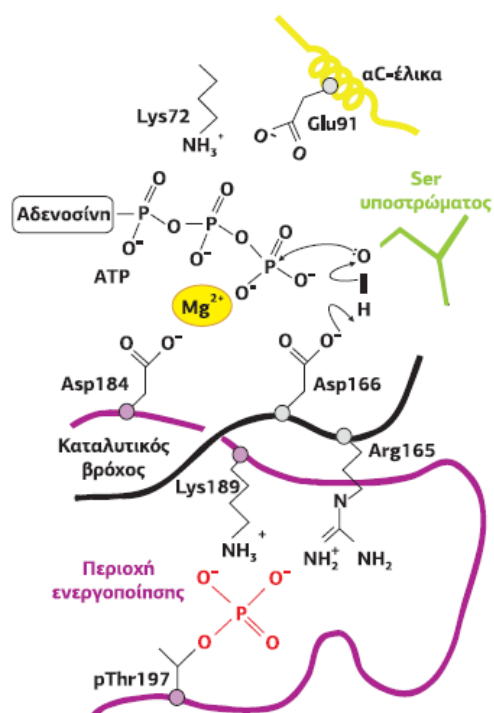


Εικόνα 2.4. Δομή μιας τυπικής πρωτεϊνικής κινάσης.²⁵

Η κινάση στην ενεργή της διαμόρφωση σχηματίζει μια σχισμή που δεσμεύει το υπόστρωμα. Το δεσμευμένο υπόστρωμα σχηματίζει ειδικές αλληλεπιδράσεις με το συντηρημένο μοτίβο HRD (συνήθως His-Arg-Asp) που εμφανίζεται στον καταλυτικό βρόχο της κινάσης (Catalytic loop) (εικόνα 2.4). Το «αμετάβλητο ασπαρτικό» Asp166 (D) (η αρίθμηση αναφέρεται στην εικόνα 2.5 για μια πρωτεϊνική κινάση A, PKA) στο μοτίβο HRD λειτουργεί ως «καταλυτική βάση» και «παγίδα πρωτονίων», πιθανότατα ενεργοποιώντας την εισερχόμενη υδροξυ-ομάδα του υποστρώματος. Η συντηρημένη καταλυτική αλληλουχία RD όπου η αργινίνη προηγείται του ασπαρτικού οδήγησε στην δημιουργία μιας ομάδας κινασών, τις κινάσες RD. Οι περισσότερες κινάσες σερίνης/θρεονίνης και όλες οι κινάσες τυροσίνης ανήκουν σε αυτή την κατηγορία.

Στην ενεργή διαμόρφωση της κινάσης, ο κατάλληλος προσανατολισμός του μοτίβου DFG επιτρέπει στο ασπαρτικό Asp184 (D) να δεσμεύσει ένα ιόν μαγνησίου Mg^{2+} που αλληλεπιδρά με ένα άτομο οξυγόνου της φωσφορικής ομάδας του ATP. Αυτό βοηθά στη στερέωση του ATP, καθώς και στη σταθεροποίηση των αρνητικών φορτίων στη μεταβατική κατάσταση. Επιπλέον, στη διαμόρφωση αυτή το γλουταμινικό Glu91 (E) στην αC έλικα προσανατολίζεται κατάλληλα ώστε να σχηματίζει μια γέφυρα άλατος με ένα κατάλοιπο λυσίνης Lys72 στον κλώνο β3. Με τον σχηματισμό της γέφυρας άλατος, η πλευρική αλυσίδα της λυσίνης σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου των α και β-φωσφορικών ομάδων του ATP, με σκοπό τη σταθεροποίηση αυτών. Σε πολλές ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες ePK, αν όχι σε όλες, το κατάλοιπο θρεονίνης Thr197 στο βρόχο ενεργοποίησης διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη λειτουργική ενεργοποίηση του βρόχου, για αυτό και ονομάζεται βρόχος T. Για να καταστεί πλήρως λειτουργική η κινάση απαιτείται πρωτίστως η φωσφορυλίωση της Thr197. Η φωσφορυλιωμένη Thr197, στη συνέχεια, δημιουργεί έναν δεσμό υδρογόνου με την

Arg165, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της ενεργής διαμόρφωσης του ενζύμου (εικόνα 2.5, στην περίπτωση αυτή αναπαριστάται μια κινάση Ser/Thr).^{21,24-26}



Εικόνα 2.5. Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων αλληλεπιδράσεων στην περιοχή ενεργοποίησης και στον καταλυτικό βρόχο μιας κινάσης Ser/Thr (η αρίθμηση αναφέρεται σε μια πρωτεϊνική κινάση A, PKA).²⁶

Για να μετατραπεί η πρωτεϊνική κινάση στην ενεργή της διαμόρφωση απαιτείται η τήρηση όλων των παραπάνω στοιχείων, και όχι μόνο, ώστε το περιβάλλον να καταστεί ευνοϊκό για την μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP. Αντίθετα, για την ανενεργή κατάσταση δεν υφίστανται οι χημικοί περιορισμοί που απαιτούνται για την εκδήλωση καταλυτικής δραστηριότητας, συνεπώς οι κινάσες εμφανίζουν πολλαπλές ανενεργές διαμορφώσεις. Τυπικά, σε μια ανενεργή διαμόρφωση υφίσταται κατάρρευση του βρόχου ενεργοποίησης στην επιφάνεια της πρωτεΐνης μη επιτρέποντας τη σύνδεση του υποστρώματος. Παρόλα αυτά, επιπλέον ανενεργές διαμορφώσεις περιλαμβάνουν ασυμβίβαστες θέσεις πρόσδεσης του μοτίβου DFG με το ATP και το ιόν Mg^{2+} . Οι διαμορφώσεις του τύπου DFG-Asp in και DFG-Asp out έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων που έχουν αναπτυχθεί έναντι της θέσης ενεργοποίησης αυτών των πρωτεϊνών.²⁵

2.4. Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινάσων

Αν και υπάρχει μια πλούσια ποικιλία δομών, τρόπων ρύθμισης και ειδικότητας υποστρώματος μεταξύ των πρωτεϊνικών κινάσων, υπάρχουν, επίσης, κοινά δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία εξηγούν το πώς αυτά τα ένζυμα είναι σε θέση να μεταφέρουν την φωσφορική ομάδα του ATP στις υδροξυλικές ομάδες των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων τους.²⁷

Με βάση τον ορισμό των πρωτεϊνικών κινασών, περί φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων αμινοξέων στις πρωτεΐνες-στόχους τους, αποτελεί απαραίτητη ανάγκη να γίνει διάκριση τους με βάση το κατάλοιπο του αμινοξέος που φωσφορυλιώνουν. Συνεπώς, σύμφωνα με την πλευρική αλυσίδα αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν, οι πρωτεϊνικές κινάσες ταξινομούνται σε:

1. Κινάσες τυροσίνης (TKs) που φωσφορυλιώνουν το φαινολικό υδροξύλιο της Tyr.
2. Κινάσες σερίνης-θρεονίνης (STKs) που φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα αυτών των δύο αμινοξέων.
3. Κινάσες ιστιδίνης που φωσφορυλιώνουν το άζωτο των καταλοίπων της.⁸

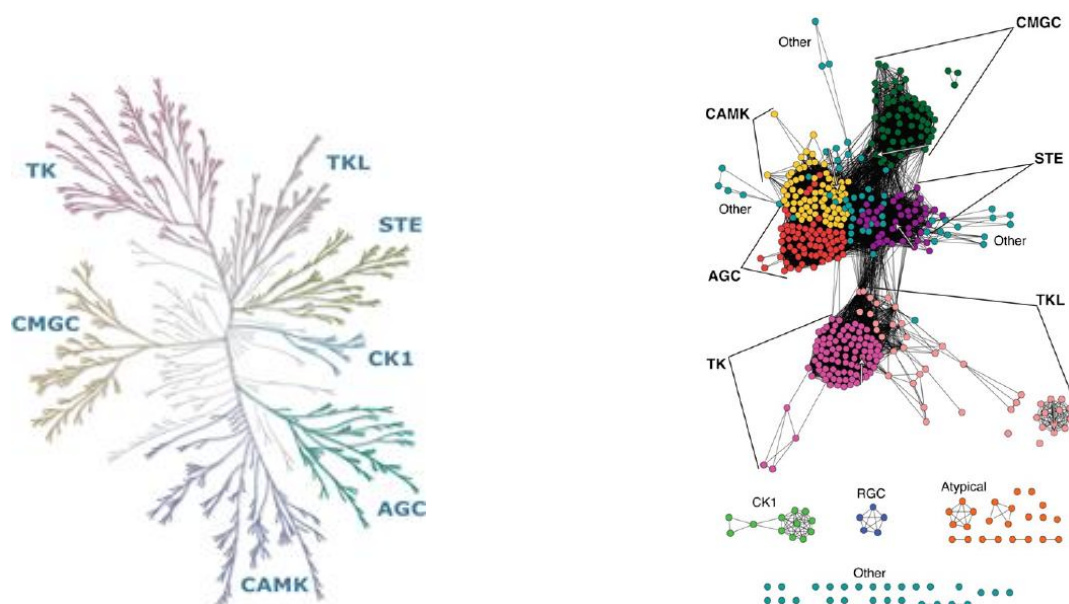
Η ανακάλυψη της τελευταίας κατηγορίας, έγινε σε μεταγενέστερο χρόνο από τις προηγούμενες δύο που αποτελούν τις κύριες κατηγορίες.⁸ Οι κινάσες ιστιδίνης συναντώνται κυρίως στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και έχουν μικρή σημασία στη σηματοδότηση των ευκαρυωτικών οργανισμών, γι' αυτό και δεν θα αναλυθούν στη συνέχεια.

Σε όλους τους οργανισμούς που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα, η φωσφορυλίωση των αμινοξέων των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων δεν συμβαίνει στον ίδιο βαθμό. Ειδικότερα η φωσφορυλίωση σερίνης (86%) εμφανίζεται πολύ πιο συχνά συγκριτικά με τη φωσφορυλίωση θρεονίνης (12%) ή τυροσίνης (2%).²⁴ Επιπλέον, ο καθορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων και των δομικών χαρακτηριστικών που χαρακτηρίζουν το τμήμα εκείνο που είναι υπεύθυνο για την καταλυτική τους δράση, οδήγησε σε μια περαιτέρω ταξινόμηση αυτών. Η σύγκριση αυτών των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε από τους Hanks και Hunter για την ταξινόμηση αυτών των ενζύμων σε εξελικτικά δέντρα που ομαδοποιούν υποοικογένειες όμοιων ενζύμων. Οι δομικές σχέσεις που προκύπτουν από αυτά τα δέντρα οδηγούν σε ομαδοποιήσεις που αντικατοπτρίζουν, επίσης, συναφείς λειτουργίες.²⁷

Ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνικών κινασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, το οποίο ονομάζεται «κίνωμα», αποκάλυψε αρκετές πρωτεΐνες με επιβεβαιωμένη δραστηριότητα κινάσης, των οποίων όμως η αλληλουχία δεν ομοιάζει με αυτή των κλασικών ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών (ePKs). Οι κινάσες αυτές ονομάζονται άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στη ρύθμιση φωσφορυλίωσης μιας ευρείας ποικιλίας κυτταρικών διεργασιών, καθώς και κάποιες για τις οποίες η λειτουργία είναι ακόμη άγνωστη.²⁸ Συνεπώς, η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών μπορεί να χωριστεί σε δύο μεγάλες ομάδες, σύμφωνα με τη μοριακή φυλογένεση τους σε κλασικές ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) και σε άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs).

Οι κλασικές-τυπικές ePKs αποτελούν την μεγαλύτερη κατηγορία και διακρίνονται ακολουθώς σε υποκατηγορίες. Αρχικά ο διαχωρισμός αυτός ήταν σε 5 υποκατηγορίες, έπειτα σε 7 και τέλος σε 8, με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας αμινοξέων στην καταλυτική τους περιοχή. Συνεπώς, οι κλασικές ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs), μπορούν να ταξινομηθούν σε 8 μεγάλες κατηγορίες ως εξής:

1. AGC: περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες A (PKA) (εξαρτώμενες από κυκλικό AMP, cAMP), πρωτεϊνικές κινάσες G (PKG) (εξαρτώμενες από κυκλικό GMP, cGMP), οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών C (PKC)
2. CAMK: περιλαμβάνει οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που ρυθμίζονται από ασβέστιο Ca^{2+}
3. CK1: περιλαμβάνει κινάσες καζεΐνης
4. CMGC: περιλαμβάνει κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (CDK), ενεργοποιούμενες από μιτογόνα πρωτεϊνικές κινάσες (Mitogen-activated protein kinase, MAPK), κινάσες συνθάσης γλυκογόνου 3 (GSK3), οικογένεια κινασών CLK (διπλή πρωτεϊνική κινάση ιδιομορφίας CLK)
5. STE: περιλαμβάνει ομόλογες κινάσες των ζυμομυκήτων.
6. TK: περιλαμβάνει κινάσες τυροσίνης (PTKs)
7. TKL: περιλαμβάνει κινάσες οι οποίες μοιάζουν με κινάσες Tyr (TKL) (Tyr kinase-like)
8. RGC: περιλαμβάνει μια μικρή ομάδα υποδοχικών γουανυλικών κυκλασών (Receptor Guanylate Cyclases, RGCs), με διαφορετικές ιδιότητες από άλλες γνωστές ePK. Οι περιοχές των καταλυτικών περιοχών κινάσης των RGC φαίνεται να είναι καταλυτικά ανενεργές. Θεωρείται πως η ομάδα αυτή ανακαλύφθηκε αργότερα και ενσωματώθηκε στο δενδροδιάγραμμα των ePK.²⁴

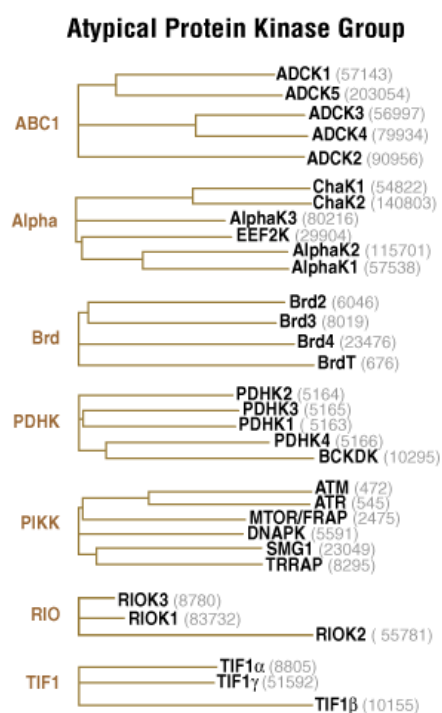


Εικόνα 2.6. Δενδροδιάγραμμα ταξινόμησης πρωτεϊνικών κινασών (ePKs).^{24,29}

Αντίθετα, η ομάδα των άτυπων PKs (aPKs) αποτελείται από λιγότερα μέλη, τα οποία μπορούν ταξινομηθούν σε 13 υποκατηγορίες ή υποομάδες ομολογίας, η κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει από 2 έως 6 μέλη.²⁸

Κατηγορία Κινάσης	Τύπος
A6 K	Tyr
ABC1	ND
Alpha	Ser/Thr
BCR	Ser/Thr
BRD	ND
FAST	Ser/Thr
G11	Ser/Thr
H11	Ser/Thr
PDK	Ser
PIKK	Ser/Thr
RIO	Ser
TAF	Ser/Thr
TIF	Ser/Thr

Πίνακας 2.1. Ταξινόμηση των άτυπων πρωτεϊνικών κινάσων σε 13 υποκατηγορίες.²⁸



Σχήμα 2.1. Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs).³⁰

2.5. Πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr (PSTKs)

Οι κινάσες Ser/Thr και Tyr αποτελούν τις δύο κύριες κατηγορίες και είναι αυτές που έχουν μελετηθεί περισσότερο. Η αλληλουχία των καταλυτικών περιοχών τους όμως, είναι ε-κείνη που τις διαφοροποιεί. Η μεγαλύτερη αφθονία του αμινοξέος σερίνη στη φύση, σε σχέση με την τυροσίνη, εξηγεί τον λόγο που οι κινάσες Ser/Thr είναι περισσότερες από τις αντίστοιχες Tyr.²⁴

Οι πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr καταλύουν τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στο υδροξύλιο των καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης στις πρωτεΐνες-στόχους με σκοπό την ενεργοποίησή τους. Οι εν λόγω κινάσες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, μέσω της ικανότητάς τους να φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου και μια τεράστια ποικιλία κυτταροπλασματικών και πυρηνικών παραγόντων.³¹ Οι περισσότερες κατηγορίες της ευρύτερης οικογένειας των ePKs περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr. Κάποιες από αυτές τις κατηγορίες είναι οι AGC, CAMK, STE, CMGC, CK1 και TKL, που έχουν αναφερθεί παραπάνω, ενώ την ίδια δραστηριότητα παρουσιάζουν, επιπλέον, και πολλές άτυπες PKs.^{24,28} (Πίνακας 2.1)

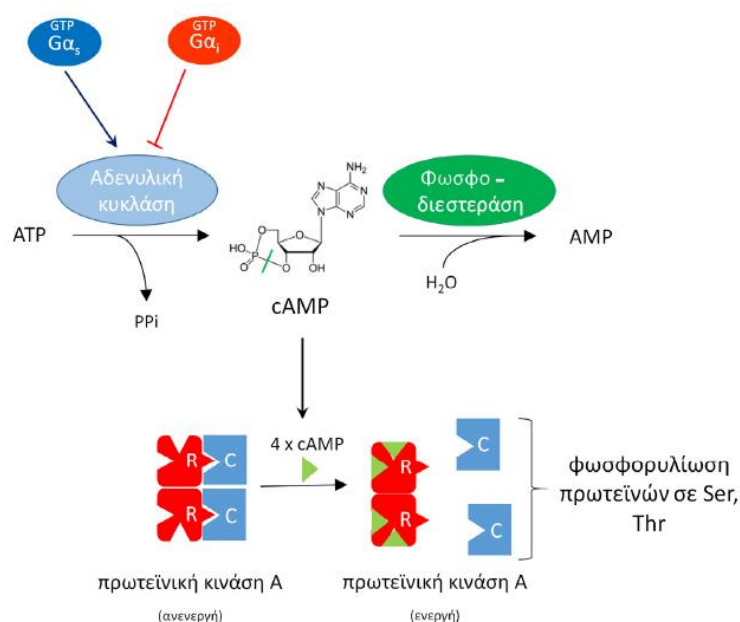
Μελέτες της αλληλουχίας της καταλυτικής περιοχής μεταξύ των κινασών Ser/Thr οδήγησε σε επιπλέον κατάταξη αυτών σε υποκατηγορίες. Σημαντικό ρόλο στην κατάταξη αυτή διαδραματίζει και η γειτονική αλληλουχία του καταλοίπου Ser/Thr που φωσφορυλιώνουν. Συνεπώς, οι κοινές κινάσες της κάθε υποκατηγορίας έχουν διαφορετικές απαιτήσεις και αναγνωρίζουν μόνο τη δική τους κοινή αλληλουχία στις πρωτεΐνες-στόχους αποκτώντας κατά αυτό τον τρόπο εξειδίκευση. Επιπλέον δομικά στοιχεία, τα οποία μπορεί να βρίσκονται μακριά από τη θέση φωσφορυλίωσης του καταλοίπου στο υπόστρωμα, έχουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και στην πρόσδεσή του με τη κινάση. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως αν σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα υπάρχουν περισσότερες από μία αλληλουχίες αναγνώρισης, τότε είναι πιθανή η πολλαπλή και συνεργατική φωσφορυλίωση.²⁶ Κάποιες από τις πιο σημαντικές υποκατηγορίες των πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr θα αναλυθούν εν συντομία στη συνέχεια.

2.5.1. Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)

Η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) ανήκει στην υποκατηγορία των κινασών AGC.²⁴ Πρόκειται για ένα τετραμερές ένζυμο του οποίου η δραστηριότητα εξαρτάται από το κυκλικό AMP (cAMP, β' αγγελιοφόρος). Απαρτίζεται από δύο καταλυτικές (C) και από δύο ρυθμιστικές (R) υπομονάδες, εκ των οποίων οι R περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης του cAMP η κάθε μία. Το τετραμερές αυτό σύμπλεγμα R_2C_2 σε αυτή του τη μορφή, είναι ανενεργό. Με την πρόσδεση του cAMP στις ρυθμιστικές υπομονάδες R προκαλείται διάσπαση του τετραμερούς και απελευθέρωση των ενεργών πλέον καταλυτικών περιοχών. Υπάρχουν τρεις ισομορφές της υπομονάδας C (Ca, Cβ και Cγ) και τέσσερις ισομορφές από τις δύο υπομονάδες R (RIα, RIβ, RIIα και RIIβ). Το γεγονός αυτό της ύπαρξης πολλαπλών ισομορφών, με ξεχωριστές βιοχημικές

ιδιότητες η καθεμία, εξηγεί τον λόγο που οι PKA παρουσιάζουν αρκετά παρόμοια και ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος στην σηματοδότηση μέσα στο κύτταρο. Η δραστηριότητα της PKA είναι παρούσα σε όλο το κύτταρο από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα έως και τον πυρήνα. Ανάλογα με τις υπομονάδες RI και RII διακρίνονται δύο τύποι PKA, οι PKA-I και οι PKA-II. Οι PKA-I βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι PKA-II είναι αγκυροβολημένες με μια σειρά πρωτεϊνών, που ονομάζονται πρωτεΐνες αγκύρωσης AKAPs (A-Kinase-Anchoring Proteins), στην πλασματική ή πυρηνική μεμβράνη. Οι πρωτεΐνες AKAPs δεσμεύονται στις ρυθμιστικές υπομονάδες RIIα και RIIβ της πρωτεϊνικής κινάσης και έτσι μεταφέρουν αυτές τις ρυθμιστικές υπομονάδες και τις δεσμευμένες καταλυτικές τους υπομονάδες σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις. Οι υπομονάδες RIα, RIβ, RIIα και RIIβ διαφέρουν ως προς τη συγγενείά τους με το cAMP και την ικανότητά τους να συνδέονται στις πρωτεΐνες AKAPs.

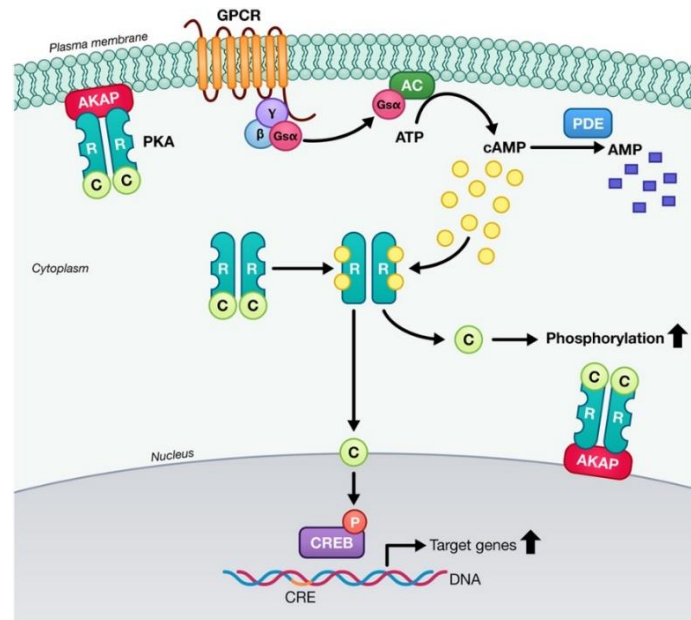
Παρά την πολυπλοκότητά του, υπό φυσιολογικές συνθήκες το σύμπλεγμα PKA ρυθμίζεται στενά από μεταβολές στις συγκεντρώσεις του cAMP. Το cAMP παράγεται από την αδενοσυλική κυκλάση, ενώ μέσω της φωσφοδιεστεράσης διασπάται σε AMP.³²⁻³⁴ (Εικόνα 2.7)



Εικόνα 2.7. Το cAMP συντίθεται από την αδενοσυλική κυκλάση ενώ διασπάται από τη φωσφοδιεστεράση σε AMP. Τέσσερα μόρια cAMP προσδένονται στις ρυθμιστικές υπομονάδες της PKA.²⁶

Η PKA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Χαρακτηριστικά είναι υπεύθυνη για την ενίσχυση των σημάτων από ένα ευρύ φάσμα προσδεμάτων που συνδέονται με τους υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G (GPCRs). Αρχικά με τη σύνδεση ενός εξωκυττάριου σήματος, πχ. μια ορμόνη, όπως η γλυκαγόνη ή η επινεφρίνη, στον υποδοχέα συζευγμένο με πρωτεΐνη G (GPCR), ενεργοποιείται η ετεροτριμερής πρωτεΐνη Gαβγ, ώστε να απελευθερώσει στη συνέχεια την υπομονάδα Gα, που με τη σειρά της διεγείρει την μεμβρανική αδενοσυλική κυκλάση AC προς

παραγωγή cAMP από ATP. Αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP στο κυτόπλασμα οδηγεί σε δέσμευσή του από τις ρυθμιστικές υπομονάδες R της PKA και απελευθέρωση των καταλυτικών υπομονάδων C, οι οποίες καθίστανται ενζυμικά ενεργές. Η υπομονάδα C πλέον, έχοντας δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης καταλύει τη φωσφορυλίωση της -OH μιας Ser ή Thr.³³ (Εικόνα 2.8)



Εικόνα 2.8. Σχηματική αναπαράσταση ενεργοποίησης της PKA από το cAMP, ώστε καταλύσει τη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα CREB, με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής.³³

2.5.2. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

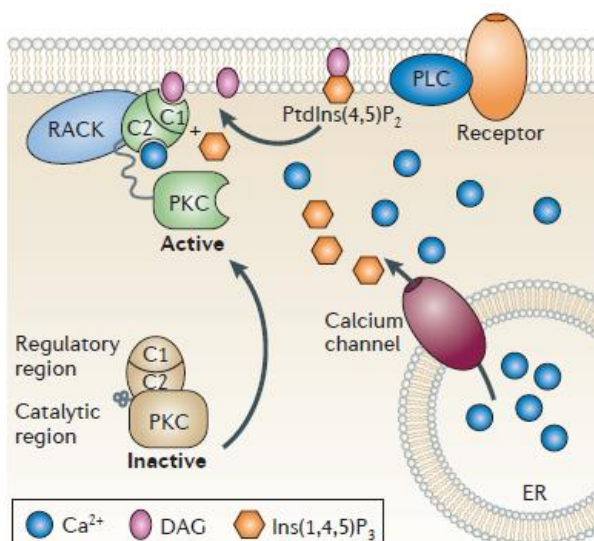
Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) είναι άλλη μια κινάση Ser/Thr που ανήκει στην υποοικογένεια AGC, ενώ η ονομασία της προέρχεται από την εξάρτησή της από το ασβέστιο (Ca^{2+}).³⁶ Αποτελείται από μια ρυθμιστική περιοχή (πεδίο C1 και C2) στο N-τελικό άκρο και μια καταλυτική περιοχή με δραστηριότητα κινάσης στο C-τελικό άκρο. Στην ανενεργή του μορφή, το ένζυμο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όπου η ρυθμιστική περιοχή του συνδέεται με την καταλυτική αναστέλλοντας τη δραστηριότητά του. Το ένζυμο ενεργοποιείται με τη διάσπαση αυτής της ενδομοριακής ανασταλτικής αλληλεπίδρασης με τη πρόσδεση του Ca^{2+} σε συνδυασμό με διακυλογλυκερόλη DAG και φωσφατιδυλοσερίνη.^{32,37} Με την ενεργοποίηση του ενζύμου με Ca^{2+} ή/και DAG υπάρχει μετατόπιση αυτού από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη,^{32,34-36} όπου συνδέεται με μια σειρά πρωτεϊνών της μεμβράνης που ονομάζονται υποδοχείς για ενεργοποιημένη C-κινάση (RACK). Οι πρωτεΐνες RACK λειτουργούν όπως και οι πρωτεΐνες AKAP για τη PKA για να κατευθύνουν αυτά τα ευρέως εκφρασμένα ένζυμα σε υποκυτταρικές θέσεις όπου απαιτείται η δραστηριότητά τους.³²

Υπάρχουν τρεις υποοικογένειες PKC:

1. Οι συμβατικές που απαιτούν τη σύνδεση ασβεστίου με την περιοχή C2 της ρυθμιστικής περιοχής και τη σύνδεση της διακυλογλυκερόλης (DAG) στην περιοχή C1 της ρυθμιστικής περιοχής για ενεργοποίηση.
2. Οι νέες που απαιτούν τη σύνδεση μόνο της διακυλογλυκερόλης (DAG) στην περιοχή C1 της ρυθμιστικής περιοχής για ενεργοποίηση.

Υπάρχει άλλη μία υποοικογένεια, οι άτυπες PKC, οι οποίες όμως δεν ανταποκρίνονται στους ίδιους β' αγγελιοφόρους και διαφέρουν αρκετά ως προς την αλληλουχία τους με τις συμβατικές και νέες PKC. Οι διάφορες μορφές PKC διαφέρουν μεταξύ τους, κυρίως, ως προς τη ρυθμιστική περιοχή C2, ενώ η καταλυτική περιοχή είναι παρόμοια. Επιπλέον, οι PKC θα μπορούσαν να ενεργοποιηθούν και από εστέρες φορβόλης, ένα παράγωγο που συνδέεται στενά με την ανάπτυξη του όγκου στον καρκίνο.³⁶

Η ενεργοποίηση των PKC προϋποθέτει τη πρόσδεση σήματος στον αντίστοιχο υποδοχέα τους. Το σήμα μπορεί να είναι κάποια ορμόνη (π.χ. αδρεναλίνη), αυξητικός παράγοντας (π.χ. επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF), καθώς και νευροδιαβιβαστής (π.χ. ντοπαμίνη, ενδορφίνη). Με τη πρόσδεση του σήματος ενεργοποιούνται τα μέλη της οικογένειας φωσφολιπάσης C (PLC) στη μεμβράνη με αποτέλεσμα την υδρόλυση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης-4,5-διφωσφορικής PIP_2 (PtdIns (4,5) P₂), ενός φωσφολιπιδίου της μεμβράνης, σε DAG και 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη IP_3 (Ins (1,4,5) P₃). Η διακυλογλυκερόλη DAG είναι λιπόφιλο μόριο στη μεμβράνη, ενώ η IP_3 είναι υδατοδιαλυτή. Η IP_3 με τη σειρά της ενεργοποιεί την απελευθέρωση ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), προκαλώντας αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοσολικού ασβεστίου. Η αύξηση των επιπέδων DAG και ασβεστίου οδηγεί στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C και τη μετατόπισή της από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη του πλάσματος καθώς και σε άλλες υποκυτταρικές θέσεις, όπου κάθε ισοένζυμο αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη αγκύρωσης, τον υποδοχέα της ενεργοποιημένης C-κινάσης (RACK). Μόλις συνδεθεί με το RACK και τον δεύτερο ενεργοποιητή αγγελιοφόρου DAG (και ασβέστιο για τα συμβατικά ισοένζυμα PKC), το PKC ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνει αρκετά κοντινά υποστρώματα, οδηγώντας σε ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις.³⁶ (Εικόνα 2.9)



Εικόνα 2.9. Διαδικασίες που οδηγούν σε διάσπαση της ενδομοριακής ανασταλτικής αλληλεπίδρασης στην PKC και σε ενεργοποίηση του ενζύμου.³⁶

2.5.3. Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinase, MAPK)

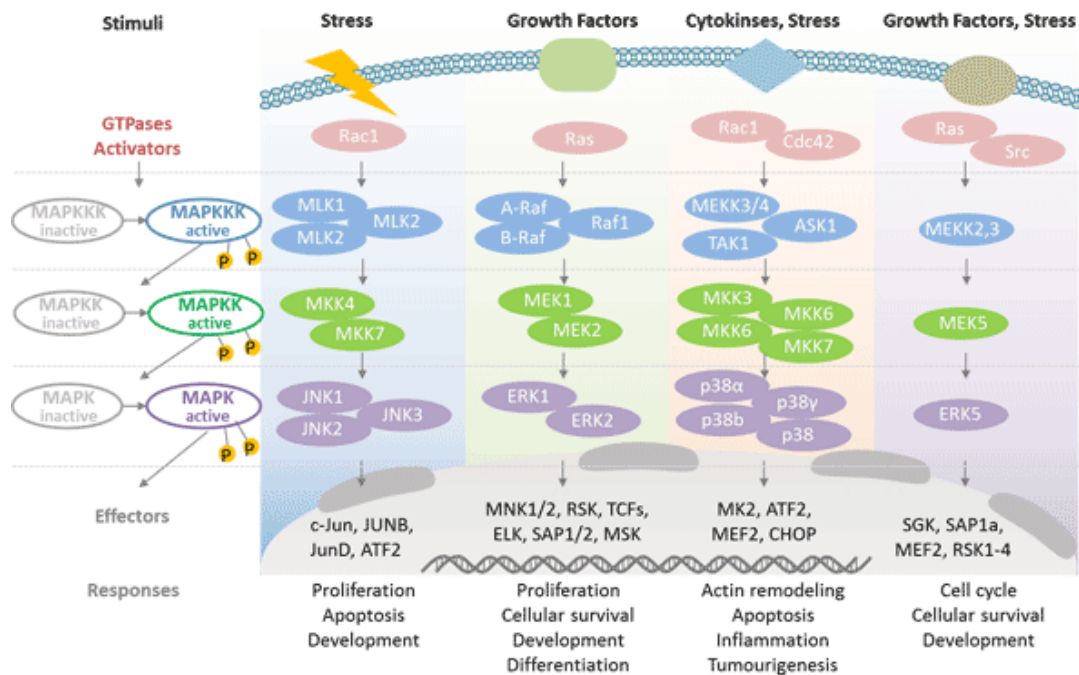
Οι πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνα (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) είναι κινάσες Ser/Thr και ανήκουν στην υποοικογένεια των κινασών CMGC. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη, το μετασχηματισμό και την απόπτωση. Οι MAPK εμπλέκονται στην καθοδήγηση των κυτταρικών αποκρίσεων σε διάφορα ερεθίσματα όπως μιτογόνα, οσμωτικό στρες, θερμικό σοκ και κυτοκίνες.

Κάθε καταρράκτης σηματοδότησης MAPK αποτελείται από τουλάχιστον τρία επίπεδα: MAPKKK, MAPKK και MAPK. Το μονοπάτι MAPK περιλαμβάνει τρεις διαδοχικά ενεργοποιημένες πρωτεϊνικές κινάσες: κινάση κινάσης MAPK (MAPKKK ή MAP3K), κινάση MAPK (MAPKK ή MAP2K) και MAPK, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά του εξωκυττάριου σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου.³⁷⁻⁴²

Η MAP3K ενεργοποιείται ακολούθως από με αλληλεπίδραση με μια μικρή GTPάση (πρωτεΐνη Ras), η οποία είναι συνδεδεμένη με την πλασματική μεμβράνη, ή/και φωσφορυλίωση από υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που διαθέτουν στον κυτταροπλασματικό τους τομέα δραστηριότητα πρωτεϊνικής τυροσίνης κινάσης. Η MAP3K φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη MAP2K, η οποία, με τη σειρά της, ενεργοποιεί τη MAPK με διπλή φωσφορυλίωση ενός διατηρημένου τριπεπτιδικού μοτίβου TxY (Θρεονίνη x Τυροσίνη) στο βρόχο ενεργοποίησης. Μόλις ενεργοποιηθεί, η MAPK φωσφορυλιώνει διάφορα υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα.^{37,38}

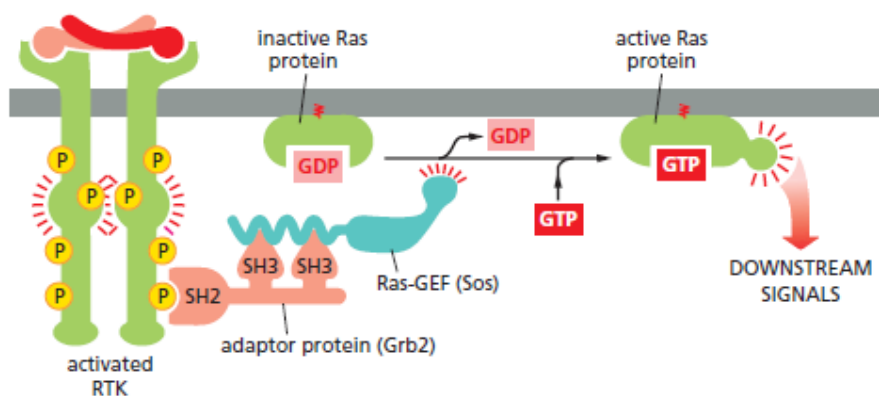
Στα θηλαστικά οι κινάσες MAP (MAPK) μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κύριες οικογένειες: στις κινάσες ERK (κινάσες ρυθμιζόμενες με εξωκυτταρικό σήμα), στις N-τελικές κινάσες Jun (JNK/SAPKs) (αμινοτελικές κινάσες Jun ενεργοποιημένες από στρες) και στις p38 MAPK.³⁷⁻⁴²(Εικόνα 2.10)

Τα μέλη της οικογένειας ERK διαθέτουν ένα μοτίβο TEY (Θρεονίνη-Γλουταμινικό-Τυροσίνη) στο τμήμα ενεργοποίησης, προκειμένου να υποστούν διπλή φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο θρεονίνης και στο κατάλοιπο τυροσίνης. Ανταποκρίνονται κυρίως σε αυξητικούς παράγοντες και μιτογόνα για την πρόκληση κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Αντίθετα, τα μέλη της οικογένειας JNK περιέχουν ένα μοτίβο TPY (Θρεονίνη-Προλίνη-Τυροσίνη) στο τμήμα ενεργοποίησης και περιλαμβάνουν τις δομικές μονάδες JNK1, JNK2 και JNK3. Η μονάδα JNK ενεργοποιείται από περιβαλλοντικές επιδράσεις (ιονίζουσα ακτινοβολία, θερμότητα, οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA), φλεγμονώδεις κυτοκίνες, καθώς και αυξητικούς παράγοντες. Η μονάδα JNK έχει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση, τη φλεγμονή, την παραγωγή κυτοκινών και το μεταβολισμό. Τέλος, τα μέλη της οικογένειας p38 διαθέτουν ένα μοτίβο TGY (Θρεονίνη-Γλυκίνη-Τυροσίνη) στο τμήμα ενεργοποίησης και περιλαμβάνουν τα p38a, p38b, p38g και p38d. Όπως και οι μονάδες JNK, οι μονάδες p38 ενεργοποιούνται έντονα από περιβαλλοντικές επιδράσεις και φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η ενεργοποίηση του p38 συμβάλλει στη φλεγμονή, την απόπτωση, τη διαφοροποίηση των κυττάρων και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.^{37,38}

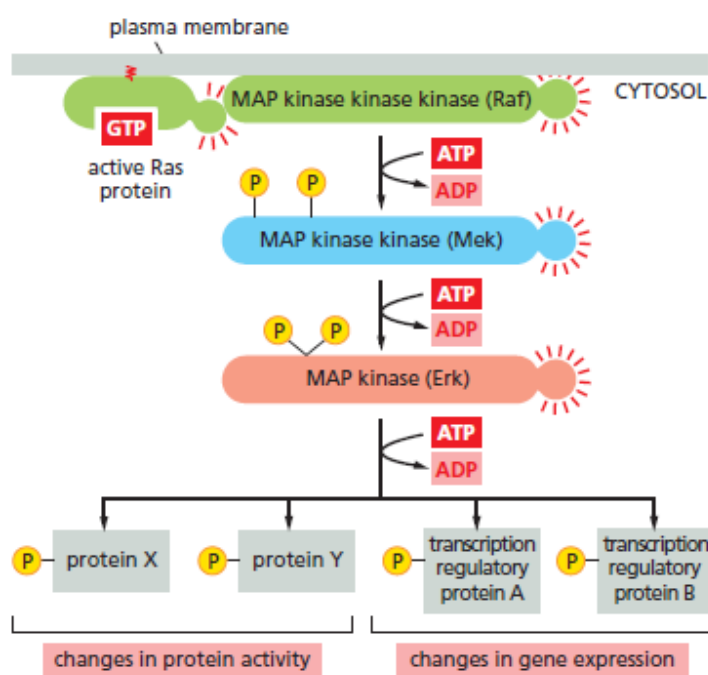


Εικόνα 2.10. Καταρράκτης ρύθμισης της MAPK.⁴¹

Χαρακτηριστικά, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) συνδέεται στον αντίστοιχο υποδοχέα του (EGFR), ενεργοποιώντας την ενδοκυττάρια δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα, η οποία προκύπτει από την προσέγγιση των δύο μονομερών του. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη προσαρμογής Grb2 αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη στον ενεργοποιημένο υποδοχέα μέσω ενός τομέα SH2 και στρατολογεί έναν παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (Sos) μέσω δύο τομέων SH3. Έπειτα η Sos διεγείρει την ανενεργή πρωτεΐνη Ras, μια GTPάση, για να αντικαταστήσει το δεσμευμένο GDP της με GTP, με σκοπό την ενεργοποίησή της και τη μεταφορά του σήματος προς τα κάτω.⁴² (Εικόνα 2.11) Αξίζει να σημειωθεί πως ο μηχανισμός που διέπει την ενεργοποίηση της Ras και των σχετικών πρωτεϊνών με εξωκυτταρικά σήματα είναι αρκετά πολύπλοκος και περιλαμβάνει πολλές «συνδετικές» πρωτεΐνες (Shc, Grb και Sos), που ενεργοποιούνται από το κυτταροπλασματικό τμήμα των υποδοχέων με δραστηριότητα πρωτεϊνικών κινασών.³² Στη συνέχεια η Ras ενεργοποιεί τη Raf (μια MAP3K) η οποία μπορεί να φωσφορυλιωθεί και να ενεργοποιηθεί, με τη σειρά της, τα MEK1 και MEK2 (MAP2K) που με τη σειρά τους ενεργοποιούν την ERK, η οποία αποτελεί μια MAPK. Η MAPK ρυθμίζει έναν αριθμό μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν βασικές λειτουργίες του κυττάρου.⁴² (Εικόνα 2.12)



Εικόνα 2.11. Πρόσδεση του σήματος στον EGFR και ενεργοποίηση της Ras.⁴²



Εικόνα 2.12. Ενίσχυση του σήματος από τις κινάσες MAP.⁴²

Η MEK (MAP2K) φωσφορυλιώνει την ERK (MAPK) στα κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης. Απαιτούνται και οι δύο φωσφορυλιώσεις προκειμένου να ενεργοποιηθεί η ERK. Συνεπώς η MEK (MAP2K) αποτελεί ένα παράδειγμα πρωτεϊνικής κινάσης διπλής λειτουργίας που μπορεί να φωσφορυλιώσει μια πρωτεΐνη υποστρώματος σε αυτούς τους δύο τύπους καταλοίπων. Τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης σε όλες τις γνωστές μορφές ERK διαχωρίζονται με ένα μόνο αμινοξύ, δημιουργώντας τη διατηρημένη αλληλουχία Θρεονίνης-Αμινοξέος-Τυροσίνης (T-X-Y).³²

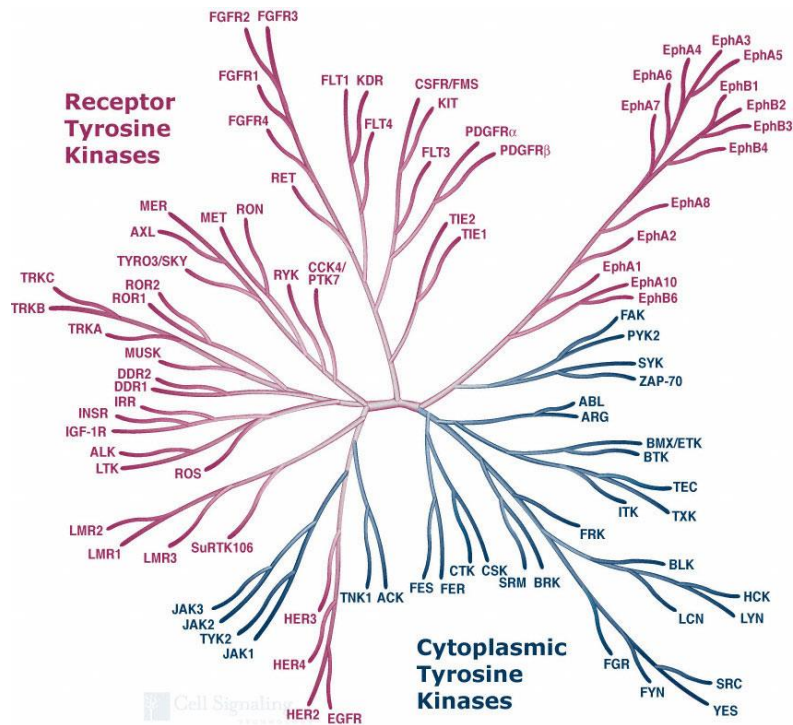
2.6. Πρωτεϊνικές κινάσες Tyr (PTKs)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τον ρόλο της φωσφορυλίωσης των καταλοίπων τυροσίνης αναλαμβάνουν οι τυροσινικές πρωτεϊνικές κινάσες (PTKs), οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας του ATP σε κατάλοιπα τυροσίνης στα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Η φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης ρυθμίζει την ενζυματική δραστηριότητα και δημιουργεί θέσεις δέσμευσης για τη στρατολόγηση των υπολοίπων πρωτεϊνών της οδού σηματοδότησης. Λόγω του κρίσιμου ρόλου που διαδραματίζουν στα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης, η καταλυτική τους δραστηριότητα ρυθμίζεται αυστηρά.⁴³

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (TKs) μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: τις υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs - Receptor Tyrosine Kinases), στις μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (NRTKs - Non Receptor) και σε μια μικρή ομάδα κινασών με διπλή λειτουργικότητα που μπορούν να φωσφορυλιώσουν κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης (DSK).⁴⁴

Οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs) είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς με τη μορφή γλυκοπρωτεϊνών που ενεργοποιούνται μετά από πρόσδεση του συγγενικού εξωκυττάριου σήματος και το διαβιβάζουν στο κυτταρόπλασμα μέσω φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στους ίδιους τους υποδοχείς (αυτοφωσφορυλίωση) και στις επόμενες πρωτεΐνες της οδού σηματοδότησης.⁴³ Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων που προέρχονται από αιμοπετάλια (PDGFR), οι υποδοχείς των αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (VEGFR), η οικογένεια υποδοχέων ινσουλίνης (InsR) και η οικογένεια υποδοχέων ErbB που περιλαμβάνει υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και ανθρώπινο επιδερμικό υποδοχέα αυξητικού παράγοντα-2 (HER2). Αντίθετα, οι μη υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (NRTK) είναι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, στις οποίες συγκαταλέγονται οι οικογένειες των Abl, Ack, Csk, Fak, Fes/Fer, Jak, Src, Syk/Zap70 και Tec. Η παρουσία των NRTK είναι αναπόσπαστη στους καταρράκτες σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από RTK και από άλλους υποδοχείς της μεμβράνης, όπως οι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G. Τέλος, η πιο χαρακτηριστική πρωτεΐνη διττής φύσεως DSK που καταλύει την φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα Ser/ Thr και Tyr είναι η ενεργοποιημένη με μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση κινάσης (MAP2K) (MEK), η οποία συμμετέχει στη σηματοδοτική οδό των MAP κινασών.¹⁴

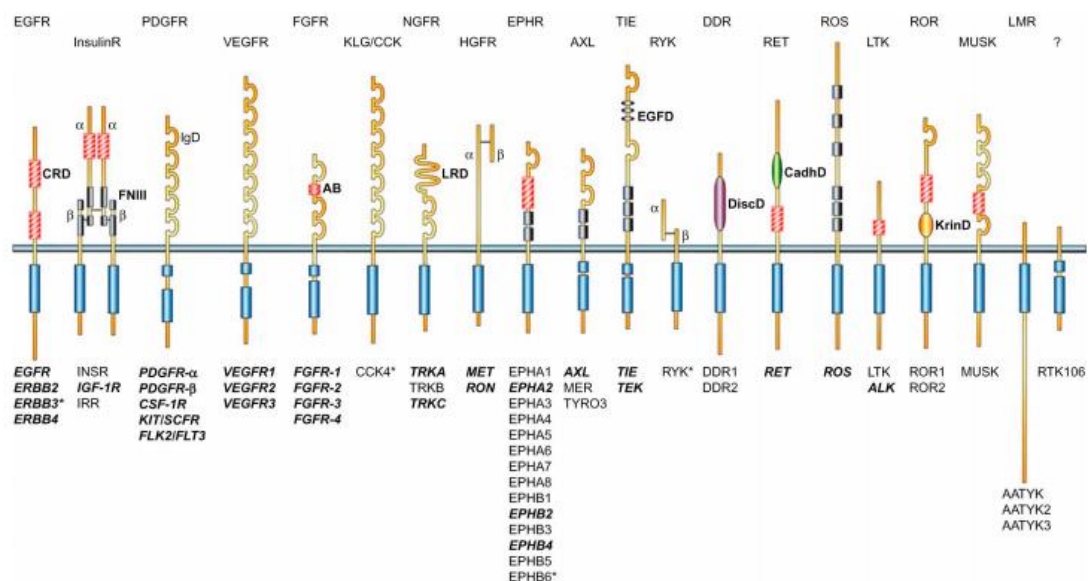
Λόγω της ταυτοποίησης πολυάριθμων ενζύμων TK ως ογκογόνων, προκύπτει έντονα η ανάγκη για αυστηρή ρύθμιση της καταλυτικής τους δραστηριότητας.⁴³



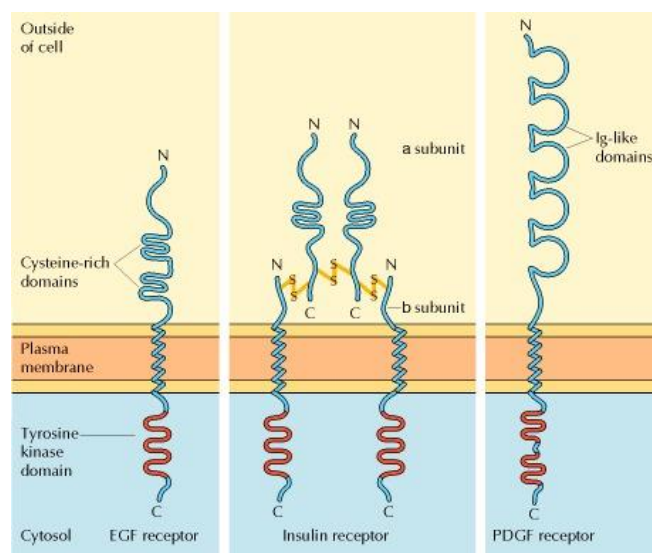
Εικόνα 2.13. Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης: Διαχωρισμός σε υποδοχικές (RPTKs - Receptor Protein Tyrosine Kinases) και σε μη-υποδοχικές (NRPTKs - Non Receptor) ή αλλιώς κυτταροπλασματικές.⁴⁴

2.6.1. Υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (RPTKs)

Οι υποδοχικές PTKs (RTKs) απαρτίζονται από ένα εξωκυττάριο τμήμα στο οποίο προσδέ-νεται το σήμα (προσδέτης), μια διαμεμβρανική έλικα και ένα ενδοκυττάριο – κυτταροπλα-σματικό τμήμα που διαθέτει ενδογενή καταλυτική δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Με βάση τη συνολική δομή τους, οι υποδοχικές PTKs μπορούν να ταξινομηθούν σε 20 υποοικο-γένειες (Εικόνα 2.14).⁴⁵ Η πλειοψηφία των RTKs, απουσία του εξωκυττάριου σήματος, υφί-στανται ως μία μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα με τη μορφή μονομερούς. Εξάιρεση αποτελεί ο υποδοχέας της ινσουλίνης, ο οποίος βερύσκεται με τη μορφή διμερούς συνδεδεμένων μεταξύ τους με δισουλφίδιο, τα οποία υφίστανται διάσπαση κατά την επεξεργασία για να δημιουρ-γήσουν υπομονάδες α και β. Το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα έχει πολύπλοκη μορφή με συγκεκριμένο δομικό μοτίβο (όπως τομείς που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνη (Ig), τομείς τύ-που ινονεκτίνης τύπου III, τομείς πλούσιους σε κυστεΐνη και τομείς που μοιάζουν με EGF) ώστε να αναγνωρίζει τα αντίστοιχα συγγενικά σήματα. Αντίθετα, η μορφή του ενδοκυττά-ριου τμήματος είναι απλούστερη, ενώ είναι παρόμοια μεταξύ των υποοικογενειών. Το εν-δοκυττάριο τμήμα αποτελείται από την καταλυτική περιοχή της τυροσινικής κινάσης και μια τερματική περιοχή καρβοξυλίου. Οι κυτταροπλασματικές περιοχές περιέχουν κατάλοιπα τυ-ροσίνης με αποτέλεσμα να υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση κατά τη σύνδεση του εξωκυτ-τάριου προσδέτη.^{43,45}(Εικόνα 2.15)



Εικόνα 2.14. Οργάνωση ανθρώπινων υποδοχέων PTK σε 20 υποοικογένειες δομικά συγγενών υποδοχέων. Το εξωκυττάριο τμήμα των υποδοχέων βρίσκεται στην κορυφή και το κυτταροπλασματικό τμήμα είναι στο κάτω μέρος. Ορισμένα RTKs περιέχουν μια διακοπτόμενη περιοχή τυροσινικής κινάσης. Οι υποδοχείς που εμπλέκονται σε κακοήθειες είναι γραμμένοι με πλάγια και έντονα γράμματα. Ένας αστερίσκος μετά το όνομα υποδεικνύει ότι ο υποδοχέας PTK έχει έναν ανενεργό τομέα κινάσης.⁴⁵



Εικόνα 2.15. Δομή των RTKs.⁴⁶

Ως επί το πλείστον κάθε υποοικογένεια RPTKs δεσμεύει τους αντίστοιχους συγγενικούς της προσδέτες. Παρόλα αυτά, αυτό δεν είναι πάντα απόλυτο καθώς αρκετοί υποδοχείς δεσμεύουν περισσότερους από έναν προσδέτες και αρκετοί προσδέτες συνδέονται σε περισσότερους από έναν υποδοχείς.

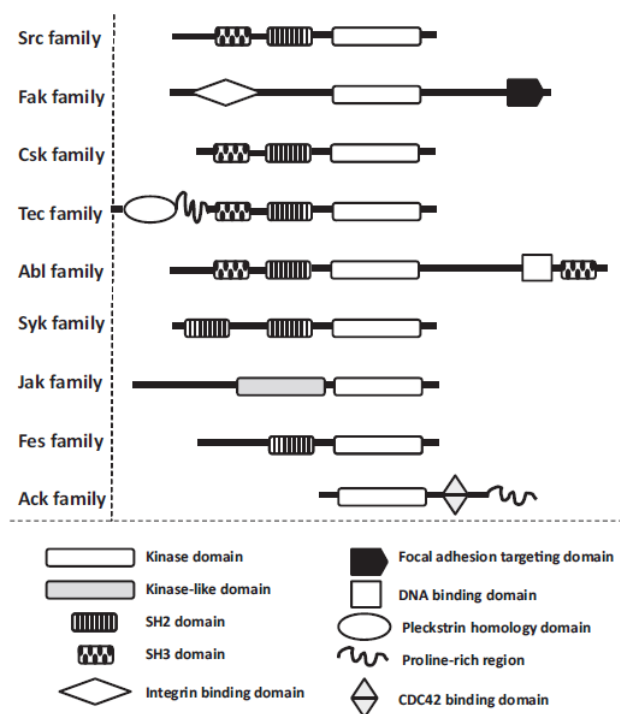
Γενικά, οι RTKs απουσία πρόσδεσης του υποκαταστάτη βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση, ενώ ενεργοποιούνται με διμερισμό κατά την πρόσδεσή του, όπου προσεγγίζουν τα

δύο μονομερή των υποδοχέων. Συνεπώς, η καταλυτική περιοχή κινάσης του ενός μονομερούς πλησιάζει την καταλυτική περιοχή κινάσης ενός δεύτερου, γεγονός που οδηγεί σε trans αυτοφωσφορυλίωση εντός των ενδοκυττάρων τμημάτων των υποδοχέων. Η αυτοφωσφορυλίωση λαμβάνει χώρα σε κατάλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται εντός ή εκτός της περιοχής κινάσης του υποδοχέα. Ορισμένοι υποκαταστάτες είναι με τη μορφή διμερούς συνδεδεμένων με δισουλφίδιο, όπως οι PDGF και VEGF. Η σύνδεση αυτών προκαλεί διμερισμό του υποδοχέα και οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλέγματος που αποτελείται από δύο υποδοχείς και έναν διμερικό υποκαταστάτη.⁴⁵ Αξίζει να σημειωθεί πως, οποιαδήποτε μετάλλαξη στην καταλυτική περιοχή της κινάσης, οδηγεί σε απορρύθμιση των λειτουργιών του κυττάρου.

2.6.2. Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRPTKs)

Οι μη υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (NRTKs) διακρίνονται σε εννέα υποοικογένειες με βάση τις ομοιότητες των αλληλουχιών τους, κυρίως εντός της περιοχής της κινάσης. Οι εν λόγω πρωτεΐνες μπορούν να είναι είτε κυτταροπλασματικές είτε αγκυρωμένες στη μεμβράνη μέσω τροποποίησης της αμινοτελικής περιοχής, όπου ενισχύουν το σήμα που προέρχεται από τους εξωκυτταρικούς υποδοχείς. Κατά συνέπεια είναι σε θέση να ασκούν ρυθμιστική δράση σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου, όπως κυτταρική διαίρεση, πολλαπλασιασμό και επιβίωση, γονιδιακή έκφραση και ανοσοαπόκριση.^{47,48}

Οι υποοικογένειες στις οποίες ταξινομούνται με βάση την αλληλουχία τους είναι οι εξής: ABL, FES, JAK, ACK, SYK, TEC, FAK, SRC και CSK οικογένεια κινασών. Η δομή τους αποτελείται από μια κοινή περιοχή κινάσης αποτελούμενη από περίπου 300 κατάλοιπα αμινοξέων, ένα N-τερματικό τμήμα (πεντάκλωνο β φύλλο και μία α-έλικα) και μια μεγάλη κυτταροπλασματική C-τερματική περιοχή (κυρίως α-ελικοειδής).⁴⁷ Επιπλέον, διαθέτουν τομείς που συντελούν στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-λιπιδίου και πρωτεΐνης-DNA. Οι πιο συχνά περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε NRTK είναι οι περιοχές Src homology 2 (SH2) και 3 (SH3).^{43,47} Ο τομέας SH2 είναι ένας συμπαγής τομέας αποτελούμενος από περίπου 100 κατάλοιπα αμινοξέων που δεσμεύει τα κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης p-Tyr. Ο μικρότερος τομέας SH3 (περίπου 60 κατάλοιπα) δεσμεύει αλληλουχίες που περιέχουν προλίνη ικανές να σχηματίσουν μια έλικα πολυπρολίνης τύπου II. Η καταλυτική περιοχή κινάσης θεωρείται ο τομέας SH1.^{43,48}



Εικόνα 2.16. Ταξινόμηση των NRTK σε εννέα υποοικογένειες με βάση τις ομοιότητες στη δομή του τομέα κινάσης. Το αμινο-τελικό άκρο είναι στα αριστερά και το καρβοξυ-τελικό άκρο στα δεξιά.⁴⁸

Παρόλα αυτά, ορισμένα NRTKs δεν διαθέτουν τομείς SH2 και SH3, αλλά διαθέτουν άλλους τομείς που χρησιμοποιούνται για αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελούν τα μέλη της οικογένειας Jak που διαθέτουν συγκεκριμένους τομείς που στοχεύουν στο κυτταροπλασματικό τμήμα των υποδοχέων κυτοκίνης ώστε να μεταβιβάσουν στη συνέχεια το εξωκυττάριο σήμα. Από την άλλη, η Abl περιέχει ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού και βρίσκεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Επιπροσθέτως, η Abl, εκτός από τους τομείς SH2 και SH3, διαθέτει και ένα πεδίο σύνδεσης F ακτίνης και ένα πεδίο σύνδεσης DNA.⁴³

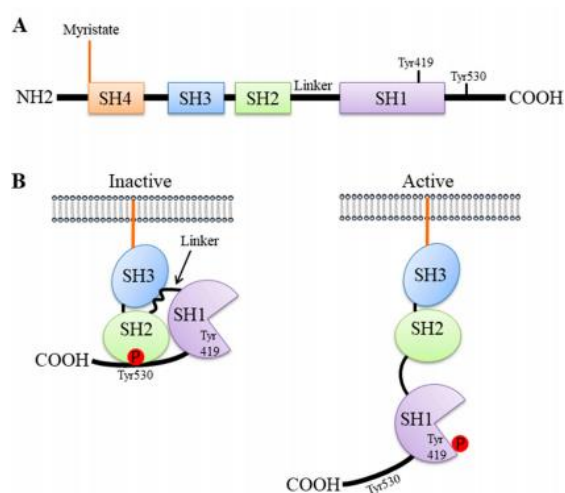
Μελέτες έχουν δείξει ότι οι NRTKs μπορούν να υποστούν δύο τύπους ογκογονικών μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα, μπορεί να συμβούν είτε ενδογενετικές σημειακές μεταλλάξεις, όπως διπλασιασμός, διαγραφή ή εισαγωγή, είτε χρωμοσωμικές ανακατατάξεις, με αποτέλεσμα τη σύντηξη γονιδίων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το υβριδικό γονίδιο Bcr-Abl, που σχετίζεται με την πρόκληση αιματολογικών κακοηθειών, όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ).⁴⁷ Οι εν λόγω μεταλλάξεις οδηγούν σε παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση και σηματοδότηση της κινάσης ή σε συστατική δραστηριότητα αυτής, που σχετίζεται με το σχηματισμό ογκογονιδίων, όπως ABL, FES, SRC και άλλα, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της αιμοποίησης, συμβάλλοντας στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην αθανатоποίηση τους. Παρόλο που ορισμένα ογκογονίδια NRTK εμφανίζουν δομικές, λειτουργικές και κυτταρικές διαφορές, πολλά από αυτά μοιράζονται τα ίδια μοριακά μονοπάτια για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ρύθμιση της βιωσιμότητας.⁴⁷

2.6.2.1. Οικογένεια Src πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη Src ήταν η πρώτη κινάση τυροσίνης που ανακαλύφθηκε και αποτελεί τη μεγαλύτερη υποοικογένεια των NRTK απαριθμώντας 11 μέλη: Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, c-Src, c-Yes, Yrk, Frk (επίσης γνωστή ως Rak) και Srm.^{47,49}

Η οικογένεια των Src (SFKs) είναι NRTKs, που συνδέονται με τη μεμβράνη. Η δομή τους αποτελείται από μια σύντομη N-τερματική περιοχή που συνδέεται με ένα ισχυρά υδρόφοβο λιπαρό οξύ (μυριστικό ή παλμιτικό) (μυριστοϋλιωμένο ή παλμιτοϋλιωμένο πεδίο SH4), ώστε να αγκυρώνει την κινάση στην πλασματική μεμβράνη, έναν τομέα σύνδεσης πεπτιδίων Src homology 3 (SH3) και μια περιοχή ομολογίας SH2, ακολουθούμενη από την καταλυτική περιοχή κινάσης (SH1) και, τέλος, από ένα C-τελικό άκρο. Οι κινάσες αυτής της οικογένειας υπό βασικές συνθήκες βρίσκονται σε μια ανενεργή διαμόρφωση, στην οποία μια φωσφορυλιωμένη τυροσίνη Tyr530 κοντά στο C-τερματικό άκρο συνδέεται με την περιοχή SH2 και η περιοχή SH3 συνδέεται με ένα εσωτερικό πεπτίδιο (linker) με τρόπο που παραμορφώνει τη δραστική θέση του ενζύμου και το καθιστά ανενεργό.^{47,49,50} (Εικόνα 2.17) Συγκεκριμένα προκαλείται αναδιάταξη της δομής της Src, όπου οι τομείς διπλώνουν ο ένας με τον άλλον και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους υιοθετώντας μια κλειστή ανενεργή διαμόρφωση. Αντίθετα, για την πλήρη ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης, απαιτείται η φωσφορυλίωση της Tyr419 στην καταλυτική περιοχή στο βρόχο ενεργοποίησης.⁵³

Η παρουσία της Tyr-530 και η φωσφορυλίωση αυτής είναι απαραίτητη για την αδρανοποίηση της πρωτεΐνης. Σε περίπτωση μετάλλαξης όπου το εν λόγω φωσφορυλιωμένο αμινοξύ δεν εντοπίζεται, επάγεται ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κυττάρων, και κατά συνέπεια η δημιουργία καρκινικών όγκων. Επιπλέον μεταλλάξεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αποτυχημένη αλληλεπίδραση των δύο ομολόγων περιοχών, οδηγώντας πάλι σε διατάραξη της ανενεργής διαμόρφωσης των SFK.⁵³

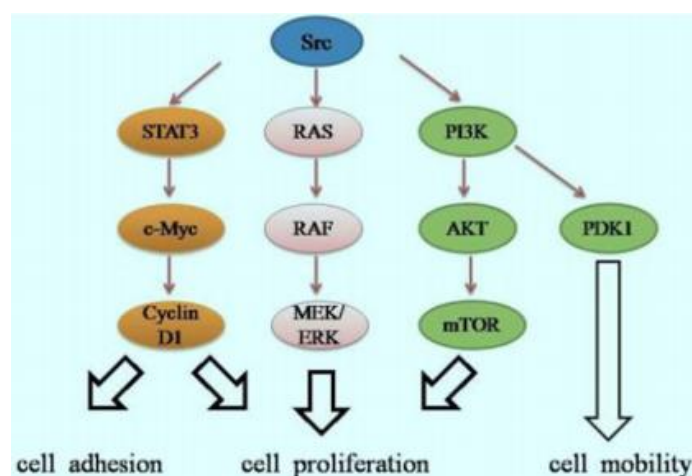


Εικόνα 2.17. Δομή και ενεργοποίηση του Src. Στην ανενεργή μορφή της, η Src φωσφορυλιώνεται στην Tyr530 κοντά στο C-τερματικό άκρο και υιοθετεί μια κλειστή διαμόρφωση. Η αποφωσφορυλίωση της Tyr530 προκαλεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση της περιοχής κινάσης στην Tyr419 και την πλήρη ενεργοποίηση της.⁵¹

Οι SFKs διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο σε μια ποικιλία οδών σηματοδότησης που ενεργοποιούνται μέσω διαφόρων RTKs (PDGF-R, EGF-R, FGF-R, IGF1-R, CSF-R) και συζευγμένων

υποδοχέων G-πρωτεϊνών μέσω πρόσδεσης του τομέα SH2 σε κατάλοιπα τυροσίνης στον ενεργοποιημένο υποδοχέα οδηγώντας σε ενίσχυση του εξωκυττάριου σήματος. Ως εκ τούτου ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών γεγονότων, συμπεριλαμβανομένων της επιβίωσης των κυττάρων, της σύνθεσης του DNA, της κινητικότητας του κυτταροσκελετού της ακτίνης, της μιτογένεσης, και της ενεργοποίησης των T-και B-κυττάρων.^{49,52}

Η Src θεωρείται υπεύθυνη για διάφορες μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου, όπου υπερεκφράζεται και υπερενεργοποιείται, οδηγώντας σε ανεξέλεγκτες κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, η εισβολή και η αγγειογένεση και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Λόγω της στενής σχέσης των SFK με την ανάπτυξη του καρκίνου, η αναστολή των πρωτεϊνών αυτών μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ελκυστικός στόχος για τη σύγχρονη επιστήμη προκειμένου να καταστεί δυνατή η θεραπεία και ο έλεγχος της ασθένειας.^{49,51}

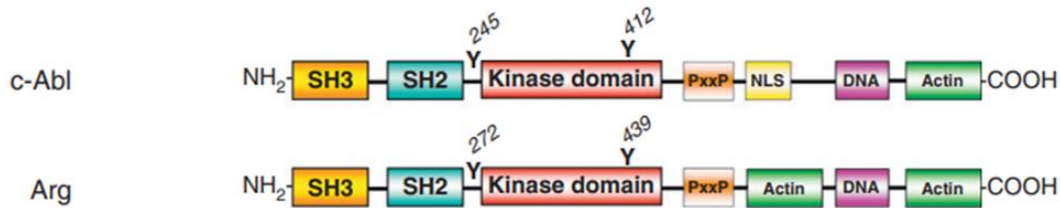


Εικόνα 2.18. Οδοί σηματοδότησης κυττάρων που προκαλούνται από κινάσες Src.⁵⁴

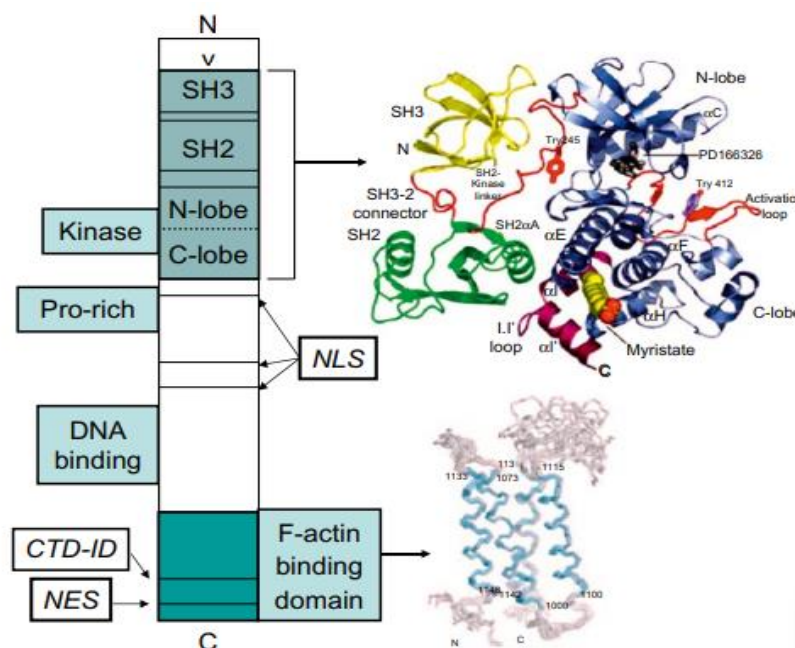
2.6.2.2. Οικογένεια Abl πρωτεϊνών

Η οικογένεια των Abl πρωτεϊνών αποτελείται από δύο μέλη: c-Abl και Arg. Και οι δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στις κυτταρικές μεμβράνες και στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, ενώ η c-Abl εντοπίζεται, επιπλέον, και στον πυρήνα.^{52,54} Τόσο η c-Abl όσο και η Arg πρωτεΐνη παρουσιάζουν μια δομική ομοιότητα μεταξύ τους, η οποία παραπέμπει στην αντίστοιχη ορισμένων μελών της οικογένειας κινάσων Src (SFks). Οι Abl κινάσες αποτελούνται από ένα N-τερματικό άκρο ακολουθούμενο από μια περιοχή ομολογίας 3 Src (SH3), μια περιοχή ομολογίας SH2 και μια περιοχή κινάσης SH1. Μια παραλλαγή στη διαμόρφωση της c-Abl κινάσης περιλαμβάνει μια N-τελική υδρόφοβη θέση μυριστοϋλίωσης. Συγκριτικά με τα SFks, οι Abl διαθέτουν ένα μεγάλο C-τερματικό άκρο, όπου εντοπίζονται αλληλουχίες πλούσιες σε προλίνη με το μοτίβο PxxP, σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μια

περιοχή σύνδεσης με το DNA και μια περιοχή σύνδεσης της ακτίνης.⁵⁵ Στο πεδίο σύνδεσης της ακτίνης, βρίσκεται ένα πυρηνικό σήμα εξαγωγής (NES).^{55,56}



Εικόνα 2.19. Δομή των c-Abl και Arg, μελών της οικογένειας Abl.⁵⁵

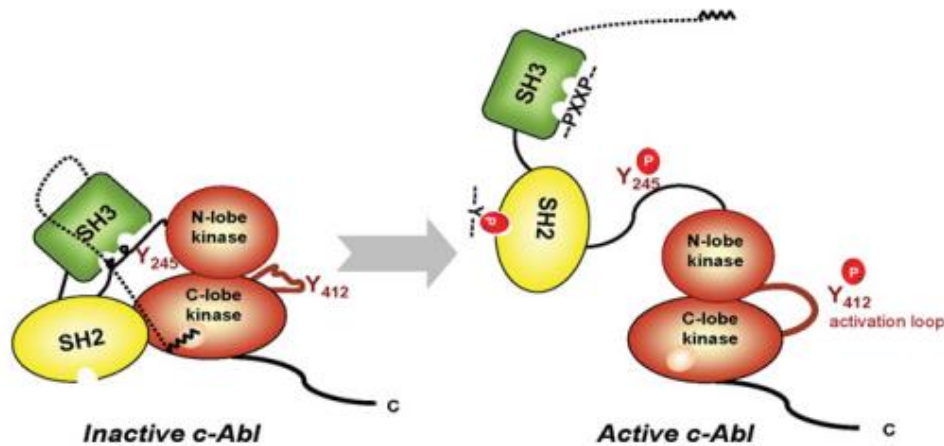


Εικόνα 2.20. Δομή της Abl πρωτεϊνικής κινάσης.⁵⁷

Η ανενεργής διαμόρφωση της κινάσης ρυθμίζεται από ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, όπου η αμινοτελική περιοχή μυριστοϋλίωσης συνδέεται με έναν υδρόφοβο θύλακα που υπάρχει στον τομέα της κινάσης, ενώ η περιοχή SH2 συνδέεται με τον καρβοξυ-τελικό λοβό του ίδιου τομέα, υιοθετώντας μια κλειστή μορφή με αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας της.⁵⁵ Επιπλέον, η ανενεργής διαμόρφωση περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ της περιοχής SH3 και της πλούσιας σε προλίνη αλληλουχίας που υπάρχει στον συνδετήρα SH2-κινάσης.⁵⁸

Όλες αυτές οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις συνδράμουν στην αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης. Το άνοιγμα αυτής της διαμόρφωσης συνεπάγεται και την ενεργοποίηση αυτής, η οποία καταλύεται από τους τομείς SH2 και SH3. Η φωσφορυλίωση του

καταλοίπου τυροσίνης 245 (Y-245) στο εσωτερικό πεπτίδιο (linker) που συνδέει τον τομέα SH2 με την περιοχή κινάσης και του καταλοίπου τυροσίνης 412 (Y-412) στον βρόχο ενεργοποίησης, οδηγεί σε σταθεροποίηση της ανοιχτής και ενεργής διαμόρφωσης της Abl.^{55,58} (Εικόνα 2.21)



Εικόνα 2.21. Ρύθμιση της διαμόρφωσης της c-Abl.⁵⁸

Υπό φυσιολογικές συνθήκες η οικογένεια των Abl κινασών συμμετέχει στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης, της εισβολής και της προσκόλλησης, της απόκρισης σε βλάβη του DNA και της αναδόμησης της ακτίνης μέσω συγκεκριμένων οδών σηματοδότησης. Αρκετοί αυξητικοί παράγοντες, όπως ο PDGF, ο EGF, ο μετασχηματιστής του αυξητικού παράγοντα β και οι υποδοχείς της αγγειοτενσίνης του υποτύπου 1, είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής c-Abl.⁴⁷

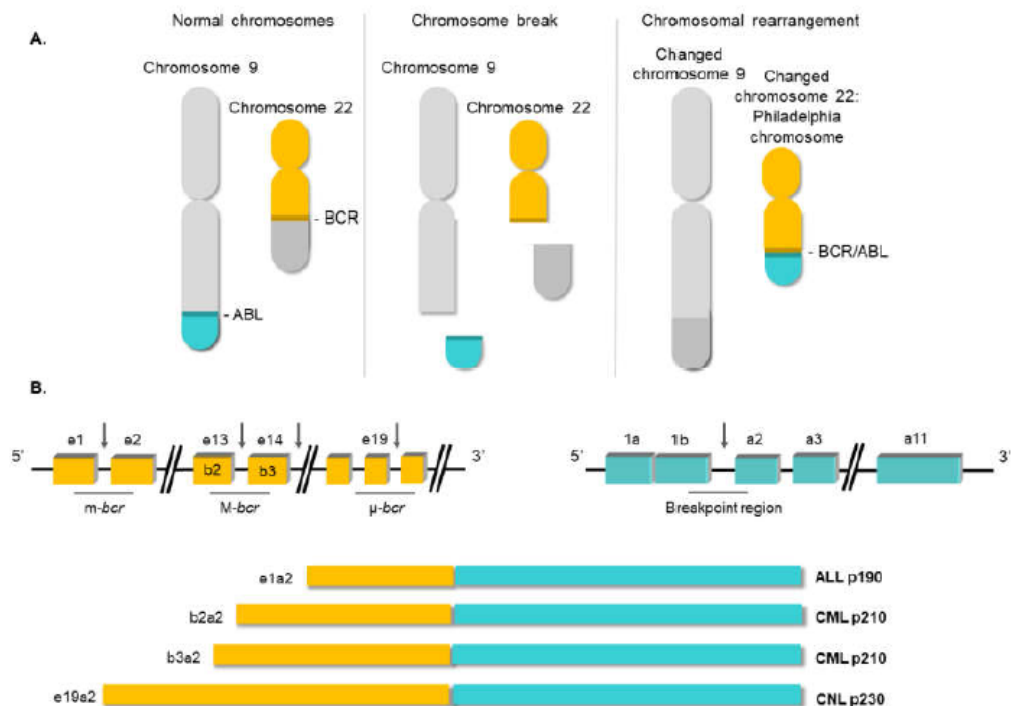
Η δραστηριότητα της c-Abl είναι απαραίτητο να ελέγχεται αυστηρά στα υγιή κύτταρα για να αποφευχθεί η ογκογόνος σηματοδότηση.⁵⁵ Έχει αποδειχτεί πως η περιοχή SH3 της Abl έχει σημαντικό ρόλο στην καταστολή της ενεργοποιημένης διαμόρφωσης της κινάσης. Σημειακές μεταλλάξεις στην εν λόγω περιοχή οδηγούν σε ενεργοποίηση της ογκογόνου Abl και, κατά συνέπεια, σε κυτταρικό μετασχηματισμό.⁴³ Η απορυθμισμένη και η ανεξέλεγκτη έκφραση των κινασών c-Abl έχει συσχετιστεί με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα.⁵²

2.7. Μετάλλαξη BCR-ABL1 – Χρωμόσωμα Philadelphia

Η μετάλλαξη που μπορεί να συμβεί στην c-Abl δεν μπορεί να είναι μόνο σημειακή. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του γονιδίου σύντηξης Bcr-Abl, γνωστό και ως χρωμόσωμα

Philadelphia, το οποίο προκύπτει από χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και εντοπίστηκε για πρώτη φορά το 1960 σε έναν ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ).⁵⁹ Η ταυτοποίηση του υβριδικού αυτού γονιδίου έγινε αργότερα από την Αμερικανίδα γενετιστή Janet Rowley το 1972,⁶⁰ και θεωρείται υπεύθυνο για την πρόκληση της συγκεκριμένης ασθένειας, ενώ συσχετίστηκε και με άλλες κακοήθεις αιματολογικές διαταραχές, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία (ΟΜΛ) και η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ).⁴⁷

Το χρωμόσωμα Philadelphia (Ph) είναι το μετασχηματισμένο χρωμόσωμα 22, το οποίο προκύπτει από την αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 και συμβολίζεται ως t (9; 22) (q34; q11).⁶⁰ Το υβριδικό χρωμόσωμα 22 που προκύπτει είναι βραχύτερο από το αρχικό και περιέχει στο 5' άκρο του το γονίδιο Bcr ενώ στο 3' άκρο του το γονίδιο Abl από το χρωμόσωμα 9. Το μεταλλαγμένο αυτό γονίδιο κωδικοποιεί την αντίστοιχη ογκογόνο πρωτεΐνη BCR-ABL1, η οποία έχει δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Ο τομέας κινάσης περιέχεται στο τμήμα της Abl της εν λόγω πρωτεΐνης.⁶¹

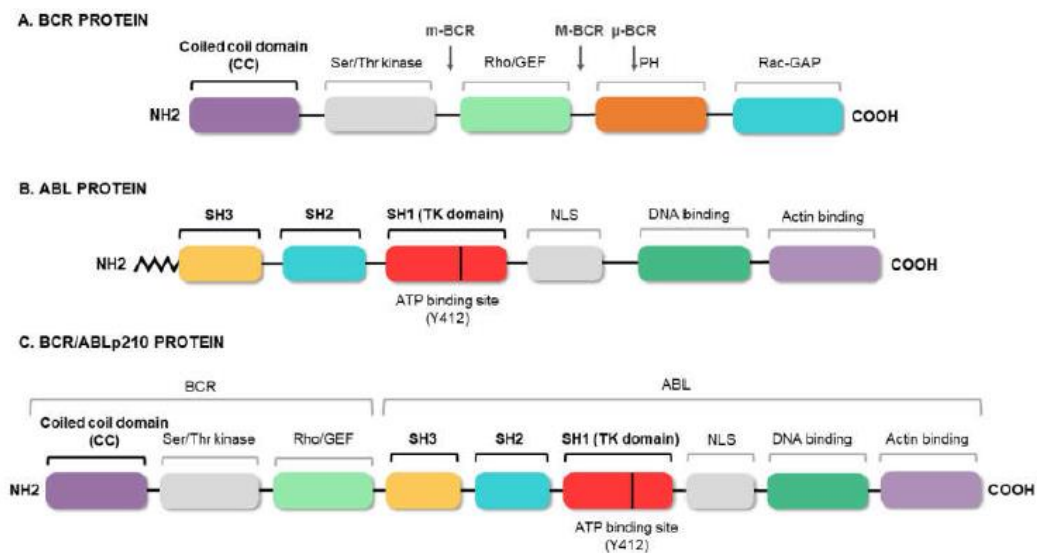


Εικόνα 2.22. Α. Η αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 t (9; 22) παράγει το χρωμόσωμα Philadelphia. **Β.** Διαφορετικοί συνδυασμοί πρωτεϊνών σύντηξης δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα.⁶²

Ανάλογα με τη θέση στην οποία γίνεται η διακοπή (breakpoint) του γονιδίου Bcr στο χρωμόσωμα 22, αλλά και του γονιδίου Abl στο χρωμόσωμα 9, προκύπτουν και διαφορετικού μήκους γονίδια σύντηξης. Παρόλα αυτά στις περισσότερες περιπτώσεις που αντιστοιχούν στην ΧΜΛ, οι δύο περιοχές σημείου διακοπής δημιουργούν μια πρωτεΐνη σύντηξης με μοριακό βάρος 210 kDa, η οποία αποτελεί τη συνηθέστερη μορφή του Bcr-Abl. Σε ορισμένες, βέβαια, περιπτώσεις ΧΜΛ το σημείο διακοπής Bcr βρίσκεται κοντά στο εξόνιο 2 (σημεία m-

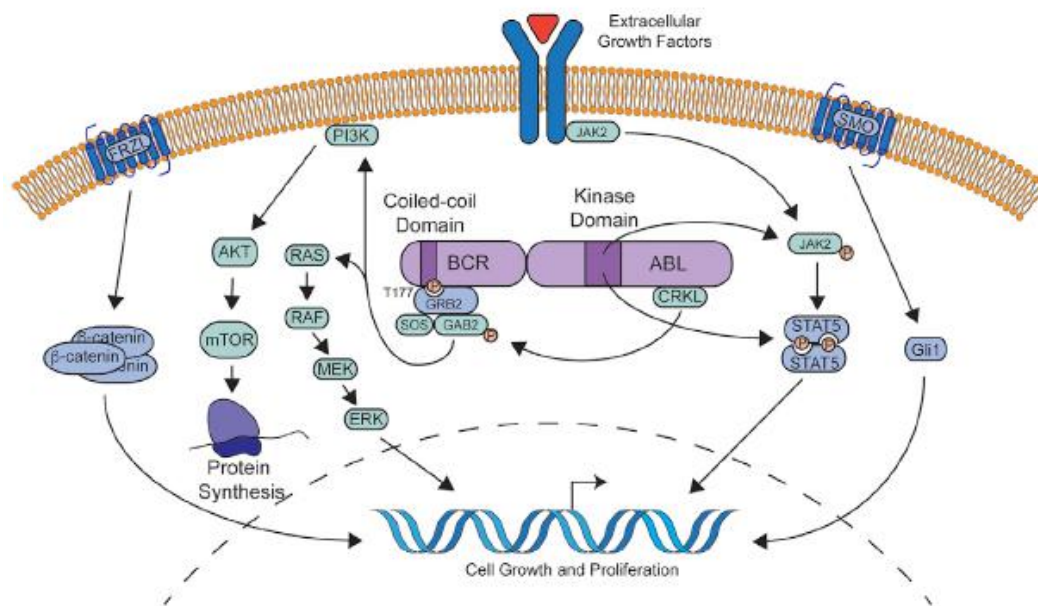
bcr) και το mRNA που προκύπτει κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 190 kDa. Επιπλέον, υπάρχει ακόμα ένα σημείο διακοπής (μ-bcr), μετά το εξώνιο 19 του Bcr, οδηγώντας στην κωδικοποίηση μιας πρωτεΐνης με μοριακό βάρος 230 kDa.⁶²

Η προκύπτουσα πρωτεΐνη σύντηξης 210 kDa περιέχει όλες τις περιοχές της φυσιολογικής c-Abl κινάσης, αλλά διαθέτει επιπλέον την αλληλουχία του Bcr δίπλα από τον τομέα SH3. Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 2.6.2.2, ο τομέας SH3 της Abl κινάσης διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αναστολή της δραστηριότητάς της. Η σύντηξη του Bcr στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, οδηγεί σε κατάργηση της συγκεκριμένης αναστολής με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη δραστηριότητά της, η οποία οδηγεί σε πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών. Κατά συνέπεια, ο υπερβολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων που συσσωρεύεται στην κυκλοφορία του αίματος οδηγεί στην ανάπτυξη της ΧΜΛ.⁶²



Εικόνα 2.23. Απεικόνιση των περιοχών της υβριδικής πρωτεΐνης BCR-ABL1.⁶²

Η αλληλουχία Bcr διαθέτει στο N-άκρο της ένα σπειροειδές πηνίο (CC), το οποίο κατέχει σημαντικό ρόλο στο διμερισμό της υβριδικής πρωτεΐνης με επακόλουθη αυτοφωσφορυλίωση του καταλοίπου Tyr177. Αυτό οδηγεί σε ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού Ras, με τη σύνδεση της πρωτεΐνης του παράγοντα ανάπτυξης 2 (Grb2) και της πρωτεΐνης σκαλωσιάς Gab2, καθώς και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία φαίνονται στην εικόνα 2.24.^{62,63} Η ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης και η απορρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών εξαιτίας της υπερκινητικότητας της BCR-ABL1 κινάσης, συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αναστέλλει τη διαφοροποίηση και προάγει την αντίσταση στην απόπτωση.⁶⁴



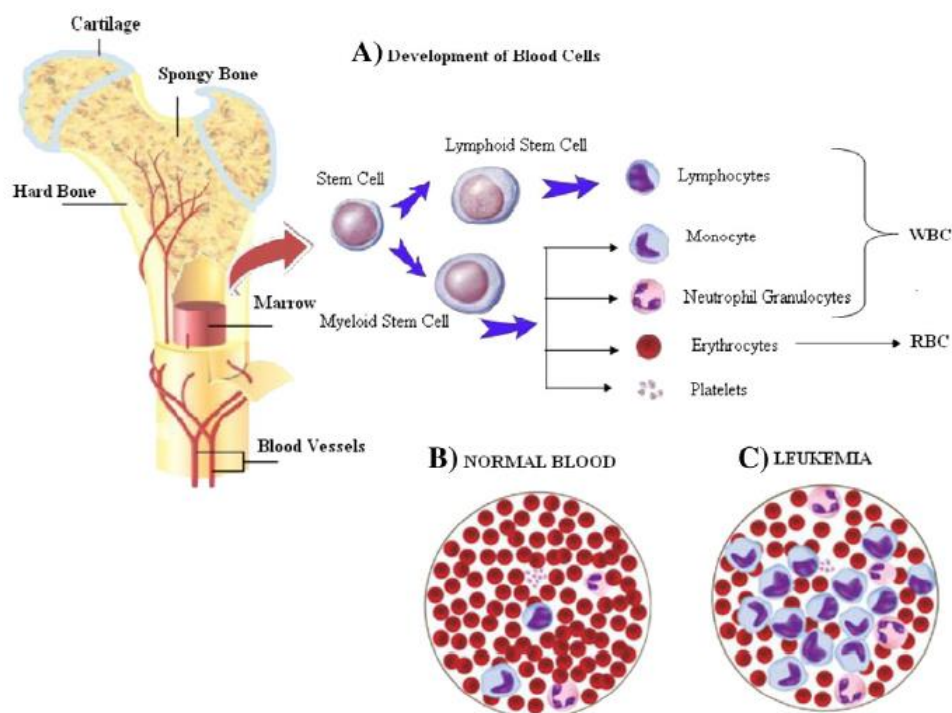
Εικόνα 2.24. Η σύντηξη μεταξύ των γονιδίων Bcr και Abl οδηγεί σε ενεργοποίηση πλήθους σηματοδοτικών οδών.⁶³

2.8. Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML)

Η λευχαιμία είναι μια αιματολογική κακοήθεια, που ξεκινά στα βλαστικά κύτταρα του αίματος στο μυελό των οστών, όπου και παράγονται. Τα βλαστοκύτταρα του αίματος εξελίσσονται είτε σε μυελοειδή βλαστοκύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ερυθρά αιμοσφαίρια που βοηθούν στη μεταφορά οξυγόνου, σε λευκά αιμοσφαίρια που καταπολεμούν τις λοιμώξεις και σε αιμοπετάλια που βοηθούν στη πήξη του αίματος, είτε σε λεμφοειδή βλαστοκύτταρα, τα οποία μετατρέπονται σε λευκά αιμοσφαίρια. (Εικόνα 2.25) Ουσιαστικά η λευχαιμία είναι καρκίνος των λευκών αιμοσφαιρίων, που χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη παραγωγή κυττάρων και συσσώρευση αυτών στο μυελό των οστών, τα οποία στη συνέχεια διαχέονται στην κυκλοφορία του αίματος. Από την κυκλοφορία του αίματος τα λευχαιμικά κύτταρα μπορούν να εισβάλουν και σε άλλα όργανα του σώματος εμποδίζοντας και άλλα κύτταρα να λειτουργήσουν σωστά.⁶⁵

Η λευχαιμία διακρίνεται σε οξεία και χρόνια ανάλογα με την ωριμότητα των παραγόμενων λευχαιμικών κυττάρων. Η οξεία λευχαιμία αναφέρεται στα νεαρά και ανώριμα κύτταρα στο μυελό των οστών, ενώ η χρόνια σχετίζεται με τα πλήρως ανεπτυγμένα κύτταρα, δηλαδή τα ώριμα. Ο χρόνος που απαιτείται για να εκδηλωθούν προβλήματα στον οργανισμό είναι σαφώς μεγαλύτερος στην περίπτωση της χρόνιας λευχαιμίας σε σχέση με την οξεία, ενώ και η θεραπεία σε αυτή την περίπτωση είναι πιο δύσκολη. Επιπλέον η λευχαιμία μπορεί να είναι είτε μυελογενής είτε λεμφοκυτταρική ανάλογα με τα κύτταρα του μυελού των οστών που ξεκινά ο καρκίνος.⁶⁶

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (ΧΜΛ) αφορά 1-2 περιστατικά ανά 100.000 άτομα κάθε χρόνο, ενώ αντιπροσωπεύει το 15-20% των νέων περιστατικών λευχαιμίας σε ενήλικες. Η εκδήλωση της νόσου είναι συχνότερη στους ενήλικες άνω των 55 ετών, απ' ό,τι στα παιδιά όπου η εμφάνισή της είναι σπάνια.^{62,67} Ένα ποσοστό ατόμων >95% με ΧΜΛ, εμφανίζουν τη χαρακτηριστική μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 9 και 22 t (9;22) που οδηγούν στο νέο χρωμόσωμα 22, χρωμόσωμα Philadelphia. Όπως προαναφέρθηκε η προκύπτουσα υβριδική πρωτεΐνη BCR-ABL1 ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και άλλα που αναστέλλουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 2.25. Α. Ανάπτυξη των κυττάρων του αίματος από τον μυελό των οστών. Ένα βλαστοκύτταρο αίματος περνάει από διάφορα στάδια για να γίνει ερυθρό κύτταρο, αιμοπετάλια ή λευκά αιμοσφαίρια. **Β.** Φυσιολογικό αίμα. **Γ.** Αίμα κατά τη λευχαιμία.⁶⁵

Η ΧΜΛ διακρίνεται σε τρεις φάσεις ανάλογα με τον αριθμό των βλαστοκυττάρων (ανώριμα αιμοσφαίρια), που μετατρέπονται σε λευκά αιμοσφαίρια, δηλαδή σε λευχαιμικά κύτταρα, μη επιτρέποντας την παραγωγή υγιών λευκών αιμοσφαιρίων. Συνεπώς υπάρχει η χρόνια φάση όπου λιγότερο από το 10% των κυττάρων του αίματος και του μυελού των οστών είναι βλαστοκύτταρα, η επιταχυνόμενη φάση, όπου το 10% έως 19% των κυττάρων στο αίμα και στον μυελό των οστών είναι βλαστοκύτταρα και η βλαστική φάση, όπου το 20% ή περισσότερα από τα κύτταρα στο αίμα ή στο μυελό των οστών είναι βλαστοκύτταρα. Όταν εμφανίζεται κόπωση, πυρετός και διευρυμένη σπλήνα κατά τη διάρκεια της βλαστικής φάσης, ονομάζεται κρίση έκρηξης.⁶⁸ Τα πιο κοινά κλινικά συμπτώματα της ΧΜΛ περιλαμβάνουν κόπωση, αναιμία, διευρυμένη σπλήνα, κοιλιακό άλγος και υποτροπιάζουσες λοιμώξεις.

Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό ασυμπτωματικών ασθενών διαγιγνώσκεται μετά από άσχετη ιατρική εξέταση.⁶²

Η διάγνωση της ασθένειας στηρίζεται στην ανεύρεση του χρωμοσώματος Philadelphia, και γίνεται είτε μέσω κυτταρογενετικής ανάλυσης, κατά την οποία τα χρωμοσώματα των κυττάρων σε ένα δείγμα αίματος ή μυελού των οστών μετρούνται και ελέγχονται για τυχόν αλλαγές, είτε με FISH (φθορισμός *in situ* υβριδισμός), όπου τμήματα DNA που περιέχουν φθορίζουσες χρωστικές προστίθενται σε δείγμα κυττάρων ή ιστών ασθενούς, είτε με αντίστροφη δοκιμασία αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR).^{62,68}

Στους τρόπους αντιμετώπισης της ΧΜΛ περιλαμβάνονται η στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς τυροσινικής κινάσης, χημειοθεραπεία με ή χωρίς μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων, ανοσοθεραπεία, θεραπεία με ιντερφερόνη, χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση της σπλήνας ή ακόμη και έγχυση λεμφοκυττάρων από κάποιον δότη (DLI). Σε αντιθέσει με τη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία, οι στοχευμένες θεραπείες προκαλούν σημαντικά λιγότερη βλάβη στα φυσιολογικά κύτταρα.⁶⁸

2.9. Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Δεδομένου ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν κρίσιμο ρόλο στους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν τη σηματοδότηση του κυττάρου, γενετικές μεταβολές αυτών, που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις, υπερέκφραση, μετατοπίσεις και απορρύθμιση, οδηγούν σε καρκινογένεση. Παρόλα αυτά, εκτός από τα ογκολογικά ζητήματα, η απορρύθμισή τους έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται και με άλλες διαταραχές, ανοσολογικές, νευρολογικές και μολυσματικές ασθένειες. Ως εκ τούτου, αυτή η κατηγορία ενζύμων αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους φαρμακευτικούς στόχους τις τελευταίες δεκαετίες.

Μετά την επιτυχία που έδειξε το Imatinib το 2001 στη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας με θετικό χρωμόσωμα Philadelphia, τροφοδότησε το ενδιαφέρον των επιστημόνων για ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών για τη στοχευμένη θεραπεία των ανθρώπινων κακοηθειών. Μέχρι τη 1 Ιανουαρίου του 2021 ο FDA έχει εγκρίνει 62 μικρού μοριακού βάρους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, οι περισσότεροι εκ των οποίων στοχεύουν στη θέση δέσμευσης του ATP, ενώ μερικοί από τους μη ανταγωνιστικούς αναστολείς κινάσης στοχεύουν σε νέες αλλοστερικές θέσεις. Από τα εγκεκριμένα φάρμακα, τα 10 είναι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr, τα 4 κατευθύνονται έναντι πρωτεϊνικών κινασών διπλής εξειδίκευσης (MEK1/2), τα 13 είναι αναστολείς μη υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών, ενώ 35 είναι αναστολείς τυροσινικής κινάσης στόχου. Από τα 62 εγκεκριμένα φάρμακα, τα 18 χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλαπλών ασθενειών, όπως το Imatinib, το οποίο έχει εγκριθεί για τη θεραπεία οκτώ διαφορετικών διαταραχών. Ως επί το πλείστον οι συνηθέστεροι φαρμακευτικοί στόχοι των εν λόγω φαρμάκων αφορούν τα BCR-ABL1, B-Raf, υποδοχείς αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR), υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και ALK.⁶⁹

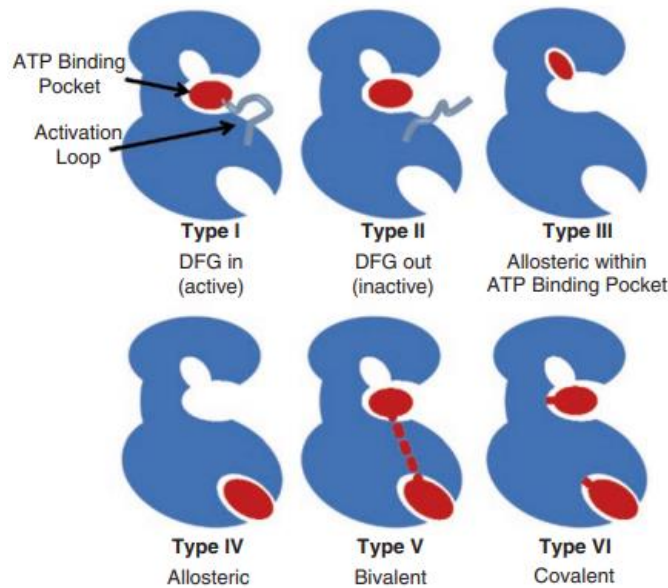
Οι θέσεις δέσμευσης των αναστολέων στην πρωτεϊνική κινάση έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση αυτών σε κατηγορίες. Βιοχημικά οι αναστολείς ταξινομούνται σύμφωνα με την κατάσταση ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης στόχου, όσον αφορά τον προσανατολισμό του μοτίβου DFG-Asp (DFG-Asp in ή out) και της C-έλικας (ενεργή εντός, ανενεργή έξω), καθώς και τη διαμόρφωση του σκελετού του ενζύμου.⁷⁰

Αρχικά οι αναστολείς χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, σε αυτούς που συνδέονται αναστρέψιμα με την κινάση (ομάδες I, I½, II, III, IV και V) και σε αυτούς που συνδέονται μη αναστρέψιμα (ομάδα VI). Ως αναστολείς τύπου I ορίζονται εκείνοι που δεσμεύονται στη θέση του ATP στην ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου DFG-Asp in, όπου το κατάλοιπο του ασπαρτικού είναι προσανατολισμένο προς την καταλυτική θέση της κινάσης, δηλαδή προς την κοιλότητα δέσμευσης του ATP. Οι εν λόγω αναστολείς περιέχουν ένα ετεροκυκλικό σύστημα δακτυλίου που καταλαμβάνει τη θέση της αδενίνης του ATP.

Οι αναστολείς τύπου II συνδέονται στην ανενεργή διαμόρφωση της μη φωσφορυλιωμένης κινάσης DFG-Asp out, όπου το κατάλοιπο του ασπαρτικού είναι προσανατολισμένο προς την εξωτερική πλευρά της κινάσης, μακριά από τη θέση δέσμευσης του ATP. Λόγω της περιστροφής προς τα έξω του μοτίβου DFG, πολλοί αναστολείς τύπου II μπορούν επίσης να εκμεταλλευτούν περιοχές δίπλα στη θέση δέσμευσης ATP που διαφορετικά θα ήταν απρόσιτες. Ως εκ τούτου χωρίζονται σε δύο υποομάδες, IIA και IIB, όπου στους IIA περιλαμβάνονται εκείνοι που επεκτείνονται στην πίσω σχισμή (μετά το Gate Area), ενώ στους IIB εκείνοι που δεν εκτείνονται. (Εικόνα 2.27) Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι οι αναστολείς τύπου A μπορούν να παραμείνουν συνδεδεμένοι με τον στόχο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τους αναστολείς τύπου B. Συγκριτικά με τους αναστολείς τύπου I, οι τύπου II εκδηλώνουν υψηλότερη εκλεκτικότητα ως προς την αναστολή της κινάσης.^{70,71}

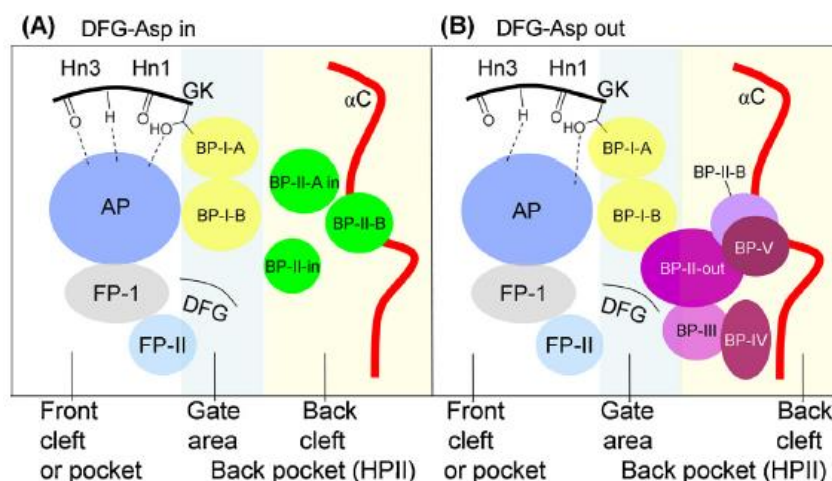
Επιπλέον επιστημονικά δεδομένα εισήγαγαν τους αναστολείς τύπου I½. Πρόκειται για ενώσεις που συνδέονται στη περιοχή δέσμευσης του ATP όπου σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου στη διαμόρφωση DFG-Asp in του ενζύμου, όπως και οι αναστολείς τύπου I, αλλά εκτείνονται στην πίσω κοιλότητα από όπου συνδέεται το ATP, σχηματίζοντας αλληλεπιδράσεις με εκείνα τα κατάλοιπα που σχετίζονται με τους αναστολείς τύπου II.

Εν συνεχεία, ως αναστολείς τύπου III χαρακτηρίζονται εκείνοι οι οποίοι δεν προσδένονται στη θέση του ATP, αλλά σε γειτονική αλλοστερική θέση. Οι αναστολείς τύπου IV συνδέονται και αυτοί σε αλλοστερική θέση, αλλά μακριά από το θύλακα δέσμευσης του ATP, χωρίς να εκδηλώνουν ανταγωνιστική δράση ως προς αυτό. Οι αναστολείς τύπου V είναι μόρια που εκτείνονται σε δύο περιοχές του τομέα της πρωτεϊνικής κινάσης. Τέλος, μια διαφορετική κατηγορία αναστολέων είναι εκείνη που συνδέεται ομοιοπολικά, μη αναστρέψιμα με το ένζυμο στόχο, οι οποίοι είναι γνωστοί ως αναστολείς τύπου VI.^{69,71}



Εικόνα 2.26. Σχηματική αναπαράσταση του τρόπου σύνδεσης των αναστολέων τύπου I, II, III, IV, V και VI.⁷³

Οι αναστολείς τύπου VI ή αλλιώς ομοιοπολικοί αναστολείς συνδέονται μη αναστρέψιμα με την κινάση μέσω ενός καταλοίπου κυστεΐνης εντός ή γύρω από την ενεργή θέση αποτρέποντας τη σύνδεση του ATP. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι μια αντίδραση Michael, όπου η κυστεΐνη, ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τη β θέση μιας α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης. Οι εν λόγω αναστολείς είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί καθώς στοχεύουν σε μια συγκεκριμένη κυστεΐνη στη θέση πρόσδεσης ξεπερνώντας τον ανταγωνισμό με το ATP.^{70, 72}



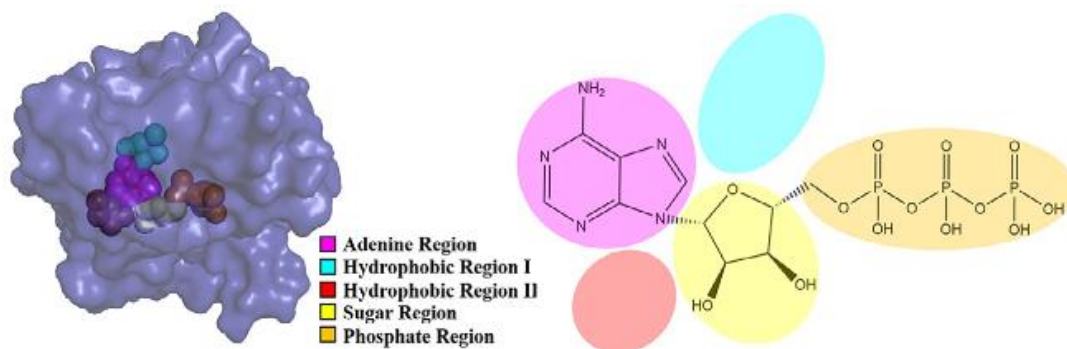
Εικόνα 2.27. Σχηματική αναπαράσταση του θύλακα δέσμευσης ATP(A) σε ενεργή διαμόρφωση DFG-Asp in και (B) σε ανενεργή διαμόρφωση DFG-Asp out.⁷¹ AP: θέση δέσμευσης ATP, BP: πίσω από την θέση ATP, FP: μπροστινή θέση ATP, HP: υδρόφοβη κοιλάδα, GK: Gate Keeper

Τύπος αναστολέα	Περιγραφή	Παράδειγμα
I	Ανταγωνιστές του ATP καταλαμβάνοντας τη θέση του στη δραστική διαμόρφωση DFG-Asp in της κινάσης	<i>Dasatinib, Gefitinib, Vandetanib, Erlotinib, Bosutinib</i>
I½ A/B	Συνδέονται μέσα και γύρω από τη θέση δέσμευσης του ATP ενός ανενεργού ενζύμου με διαμόρφωση DFG-Asp in και αC-έλικα εκτός σχηματισμού.	
I½ A	Εκτείνονται στη πίσω κοιλότητα της θέσης δέσμευσης του ATP ενός ανενεργού ενζύμου	<i>Vemurafenib</i>
I½ B	Δεν εκτείνονται στην πίσω κοιλότητα της θέσης δέσμευσης του ATP ενός ανενεργού ενζύμου	<i>Erlotinib, Sunitinib</i>
II A/B	Συνδέονται μέσα και γύρω από τη θέση δέσμευσης του ATP ενός ανενεργού ενζύμου με διαμόρφωση DFG-Asp out	
IIA	Εκτείνονται στην πίσω σχισμή από τη θέση δέσμευσης του ATP ενός ανενεργού ενζύμου με διαμόρφωση DFG-Asp out	<i>Imatinib, Nilotinib, Ponatinib, Sorafenib</i>
IIB	Δεν εκτείνονται στη πίσω σχισμή από τη θέση δέσμευσης του ATP ενός ανενεργού ενζύμου με διαμόρφωση DFG-Asp out	<i>Bosutinib, Sunitinib</i>
III	Αλοστερικός αναστολέας συνδεδεμένος σε γειτονική θέση δέσμευσης του ATP	<i>Trametinib</i>
IV	Αλοστερικός αναστολέας συνδεδεμένος μακριά από τη θέση δέσμευσης του ATP	<i>ABL001 (Asciminib)</i> (σε κλινική δοκιμή)
V	Δισθενής αναστολέας που εκτείνεται σε δύο περιοχές του πεδίου κινάσης	<i>Lenvatinib</i>
VI	Αναστολέας που συνδέεται ομοιοπολικά με τη κινάση	<i>Afatinib, Osimertinib</i>

Πίνακας 2.2. Ταξινόμηση μικρού μοριακού βάρους αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.^{69,71}

2.9.1. Θέση δέσμευσης ATP

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.3, ο N- και ο C-τερματικός λοβός συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας εύκαμπτης περιοχής που αποτελεί τη θέση δέσμευσης του ATP. Η θέση αυτή χωρίζεται σε 5 τμήματα, οι οποίες αντιστοιχούν στην περιοχή της αδεΐνης, στην περιοχή του σακχάρου, στη φωσφορική περιοχή και στην υδρόφοβη περιοχή I και II (Εικόνα 2.28). Η περιοχή της αδεΐνης στη θέση δέσμευσης του ATP καταλαμβάνεται από έναν επίπεδο ετεροκυκλικό δακτύλιο, ο οποίος μπορεί να σχηματίσει μη πολικές αλληλεπιδράσεις αλλά και δύο τουλάχιστον δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα των αμινοξέων της κοιλότητας. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εκμεταλλεύτηκαν από τους επιστήμονες για την δημιουργία ανταγωνιστικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.



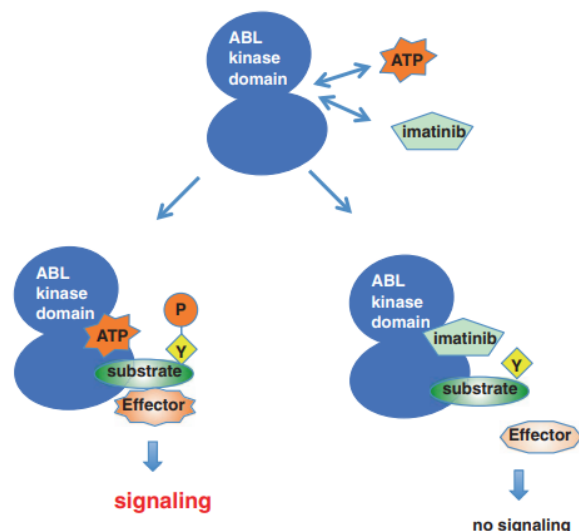
Εικόνα 2.28. Θέση δέσμευση του ATP.⁷⁴

Η ριβόζη του ATP καταλαμβάνει τη περιοχή σακχάρου, ενώ οι δύο υδροξυλομάδες της δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με κατάλοιπα αμινοξέων. Η περιοχή αυτή είναι εξίσου εκμεταλλεύσιμη για την ανάπτυξη ευαίσθητων και εκλεκτικών αναστολέων, ενώ θεωρείται κατάλληλη για τη δέσμευση των ομοιοπολικών αναστολέων τύπου VI. Όσον αφορά τη φωσφορική περιοχή, αυτή περιλαμβάνει το μοτίβο DFG και το βρόχο που είναι πλούσιος σε γλυκίνη, η οποία προσανατολίζεται κατάλληλα ώστε να ταιριάζει με την ένωση που πρόκειται να συνδεθεί, προσφέροντας επιπλέον φαρμακολογικές ιδιότητες στους αναστολείς. Τέλος, η υδρόφοβη περιοχή I και II θεωρείται ως κρυμμένη περιοχή και προσβάσιμη μόνο σε διαλύτες. Όσον αφορά την περιοχή I, αυτή παρουσιάζει ποικιλία αμινοξέων και θεωρείται ότι προσφέρει εκλεκτικότητα σε έναν νέο εν δυνάμει αναστολέα. Όλοι οι ανταγωνιστικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων που έχουν ανακαλυφθεί εκδηλώνουν 1-3 αλληλεπιδράσεις υδρογόνου με τα βασικά κατάλοιπα στην περιοχή πρόσδεσης αδερίνης στην κινάση στόχο, ενώ όλες οι υπόλοιπες περιοχές χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά για την βελτίωση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων του αναστολέα.⁷⁴

2.10. Αναστολείς της τυροσινικής κινάσης BCR-ABL1

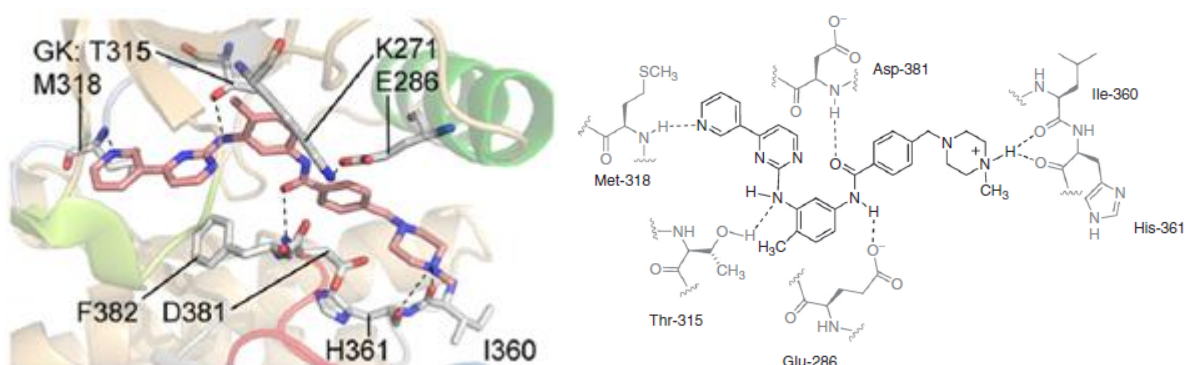
2.10.1. Το Imatinib ως πρώτος αναστολέας PTK

Το Imatinib (STI571) ήταν ο πρώτος μικρού μοριακού βάρους αναστολέας τυροσινικής κινάσης που πήρε έγκριση από τον FDA το 2001 για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΛΜ) θετική στο χρωμόσωμα Philadelphia, ενώ φάνηκε αποτελεσματικό στο περίπου 90% των ασθενών με ΧΜΛ. Το εν λόγω φαρμακευτικό σκεύασμα κυκλοφόρησε από την εταιρία Novartis με την εμπορική ονομασία Glivec ή Gleevec. Το Imatinib είναι ένας αναστολέας τύπου IIA που δρα ανταγωνιστικά με το ATP για τη θέση δέσμευσης στην ογκοπρωτεΐνη BCR-ABL1, αποτρέποντας την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος, προκαλώντας έτσι απόπτωση στο λευχαιμικό κύτταρο. Ως αναστολέας τύπου IIA προσδένεται στην ανενεργή διαμόρφωση του ενζύμου DFG-Asp out και εισχωρεί στην πίσω σχισμή, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.27.⁷¹



Εικόνα 2.29. Διακοπή της οδού σηματοδότησης από το Imatinib.⁷⁵

Όπως προαναφέρθηκε, το μόριο της Ιματινίβης συνδέεται αντιστρεπτά με το θύλακα δέσμευσης του ATP, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα αμινοξέων στην περιοχή. Ειδικότερα το άτομο του αζώτου της πυριδίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την -NH ομάδα του σκελετού στη θέση της μεθειονίνης Met318, ενώ η δευτεροταγής αμινομάδα μεταξύ του δακτυλίου της πυριμιδίνης και του τολουολίου σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με την θρεονίνη Thr315 του Gatekeeper («θυροφύλακα»). Η διαμόρφωση DFG-Asp out στην οποία συνδέεται το φάρμακο, επιτρέπει τον σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του αμιδικού -NH και του γλουταμινικού Glu286 και ενός επιπλέον μεταξύ του καρβονυλικού οξυγόνου και της -NH του ασπαρτικού Asp381. Επιπλέον δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ της πρωτονιωμένης αμινομάδας της μεθυλοπιπεραζίνης με τα κατάλοιπα αμινοξέων ισολευκίνη Ile360 και ιστιδίνης His361, ενώ ταυτόχρονα δημιουργεί πλήθος υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η μεθυλο-φαινυλομάδα καταλαμβάνει τη πίσω υδρόφοβη σχισμή (περιοχή BP-II), ενώ η ομάδα της βενζυλοπιπεριδίνης την υδρόφοβη περιοχή BP-IV, που εμφανίζεται στην διαμόρφωση DFG-Asp out (εικόνα 2.27).^{8,71}

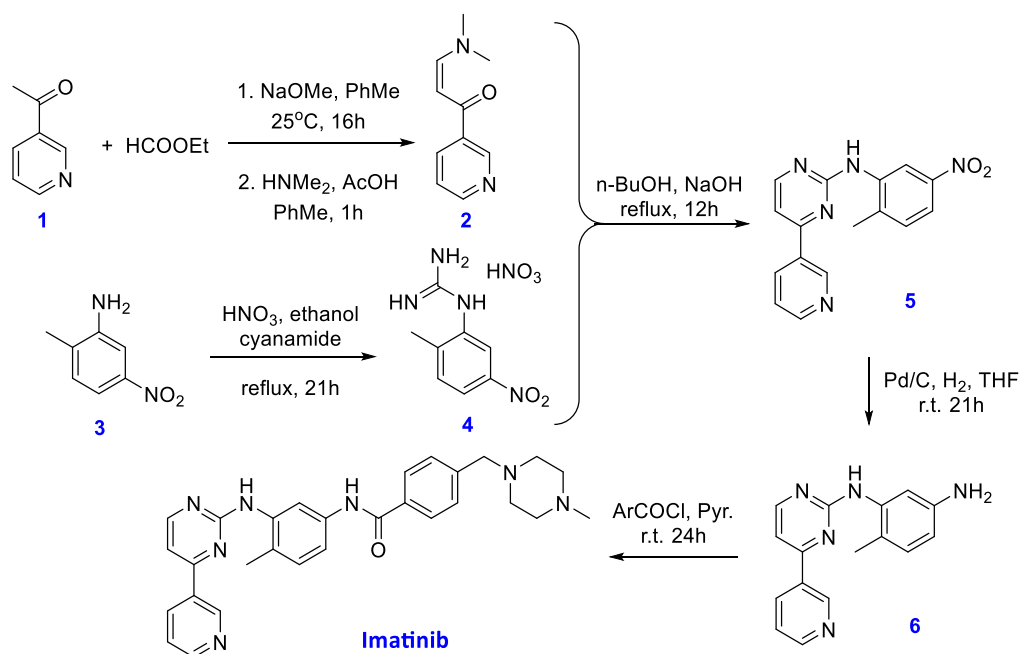


Σχήμα 2.2. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει το μόριο του Imatinib με το ένζυμο.^{8,71}

Εκτός από την BCR-ABL1 κινάση, το Imatinib έχει την ικανότητα να αναστείλει και άλλες τυροσινικές κινάσες συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια PDGFR και της κινάσης KIT. Ο PDGF εμπλέκεται σε καρδιαγγειακές παθήσεις, όπως αθηροσκλήρωση, πνευμονική αρτηριακή υπέρταση, αγγειογένεση και διαβήτης. Η αναστολή του PDGFR από την Ιματινίβη μπορεί να βελτιώσει τις καρδιακές μεταβολικές δυσλειτουργίες.⁷⁵⁻⁷⁷ Στις ασθένειες οι οποίες αντιμετωπίζονται με Imatinib συγκαταλέγονται, επιπλέον, η οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία με Ph+ (ALL), η χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL), η επιθετική συστηματική μαστοκυττάρωση (ASM), ο γαστρεντερικός στρωματικός όγκος (GIST), το δερματοϊνোসάρκωμα protuberans (DFSP), το υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο (HES) και η μυελοδυσπλαστική/μυελοπολλαπλασιαστική νόσος (MDS/MPD).⁷¹

2.10.2. Σύνθεση του Imatinib

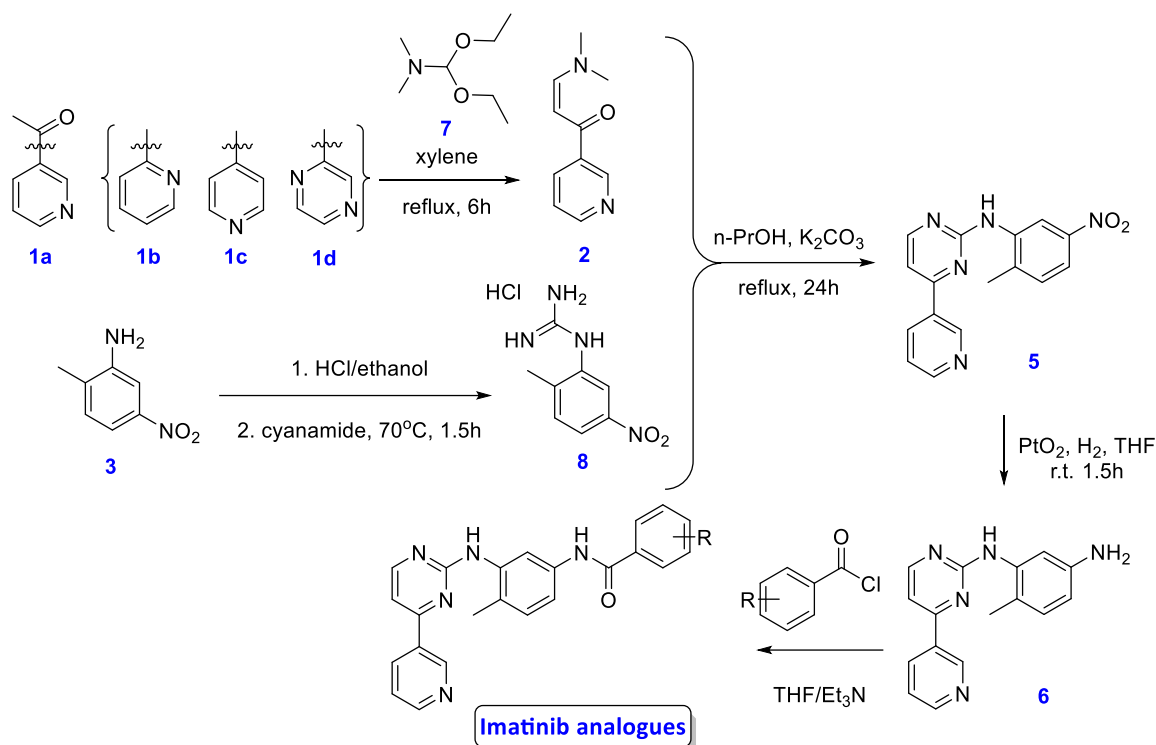
Η πρώτη προσέγγιση για τη σύνθεση του Imatinib παρουσιάστηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τον J. Zimmermann το 1993 (σχήμα 2.3).⁷⁸ Αρχικά, η συνθετική πορεία ξεκινάει με τον σχηματισμό της εναμιनोंης **2** από την 3-ακτελυπυριδίνη **1**, και συνεχίζει με την συμπύκνωση αυτής και του άλατος γουανιδίνης **4**, προς σχηματισμό της ενδιάμεσης ένωσης κλειδί, της φαινυλοαμινοπυριμιδίνης **5**, η οποία αποτελεί και τον πυρήνα ολόκληρου του μορίου. Το άλας γουανιδίνης **4** έχει προκύψει από την ανιλίνη **3** με επίδραση κυαναμίδιου. Αναγωγή του νιτρο-υποκαταστάτη της **5** με την επίδραση υδρογόνου και καταλύτη παλλαδίου οδηγεί στην αντίστοιχη ανιλίνη **6**. Τέλος, ο σχηματισμός του αμιδίου με το κατάλληλο βενζοϋλοχλωρίδιο και η εισαγωγή του υποκαταστάτη *N*-μεθυλο-πιπεραζίνης οδηγεί στο Imatinib. Προκειμένου να αυξηθεί συνολική απόδοση για βιομηχανική χρήση, ορισμένα στάδια της συνθετικής πορείας έχουν βελτιωθεί από την εταιρία Novartis.⁷⁹



Σχήμα 2.3. Προσέγγιση του J. Zimmermann.⁷⁸

Μια βελτιστοποιημένη προσέγγιση για τη σύνθεση του Imatinib αλλά και των αναλόγων του, ως εν δυνάμει εκλεκτικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, έχει δημοσιευτεί από το ερευνητικό μας εργαστήριο (σχήμα 2.4).⁸⁰ Διατηρώντας τη συνθετική πορεία του Zimmermann, ερευνήθηκαν εκ νέου τα βήματα με σκοπό την ανάπτυξη αποδοτικότερων συνθηκών αντίδρασης για μια βελτιστοποιημένη και αποτελεσματικότερη σύνθεση της Ιματινίβης αλλά και των αναλόγων της.

Στα πιο κρίσιμα στάδια όπου έγινε βελτιστοποίηση περιλαμβάνεται η σύνθεση του υποκατεστημένου άλατος γουανιδίνης **8** από την υποκατεστημένη ανιλίνη **3** με επίδραση τηγμένου κυαναμιδίου παρουσία HCl. Αξίζει να σημειωθεί πως με αυτή την εναλλακτική μέθοδο σημειώθηκε σημαντική αύξηση της απόδοσης (έως και 98%), συγκριτικά με την μέθοδο του Zimmermann (έως και 25%), ενώ και χρόνος της αντίδρασης μειώθηκε σημαντικά, από 21h στις 1.5h, αναπτύσσοντας κατά αυτό τον τρόπο μια συντομότερη και οικονομικότερη μέθοδο. Ένα επιπλέον στάδιο στο οποίο επιτεύχθηκε βελτιστοποίηση είναι η συμπύκνωση της εναμιनोंης **2** και του υδροχλωρικού άλατος **7** προς σχηματισμό του επιθυμητού κυκλοποιημένου προϊόντος φαινυλοαμινοπυριμιδίνης **5**. Η χρήση του K₂CO₃ αντί για NaOH, ως βάση, και n-PrOH αντί για n-BuOH, ως διαλύτη, έδωσε σημαντικά υψηλότερη απόδοση (81-86%) και χωρίς τον σχηματισμό παραπροϊόντων, αποφεύγοντας έτσι την ανάγκη καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης. Άλλη μια βελτιστοποίηση έγινε στην καταλυτική υδρογόνωση της νιτρο-ομάδας **5** προς την αντίστοιχη αμινο **6**, όπου χρησιμοποιήθηκε PtO₂ (καταλύτης Adams), συντομεύοντας το χρόνο της αντίδρασης από 21h σε 1.5h. Τέλος, οι πρωτοταγείς αρυλοαμίνες υποβλήθηκαν σε αντίδραση με υποκατεστημένο βενζοϋλοχλωρίδιο τηρώντας τη κλασική μέθοδο σχηματισμού αμιδικού δεσμού που χρησιμοποιήθηκε και στην πρωτότυπη σύνθεση του Imatinib. Η παραπάνω πρακτική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τη σύνθεση νέων αναλόγων του Imatinib ως εν δυνάμει εκλεκτικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, εμφανίζοντας δομικές τροποποιήσεις στο δακτύλιο της πυριδίνης και στον τελικό φαινυλικό δακτύλιο.⁸⁰



Σχήμα 2.4. Βελτιστοποιημένη μέθοδος σύνθεσης του Imatinib, σύμφωνα με το ερευνητικό μας εργαστήριο.⁸⁰

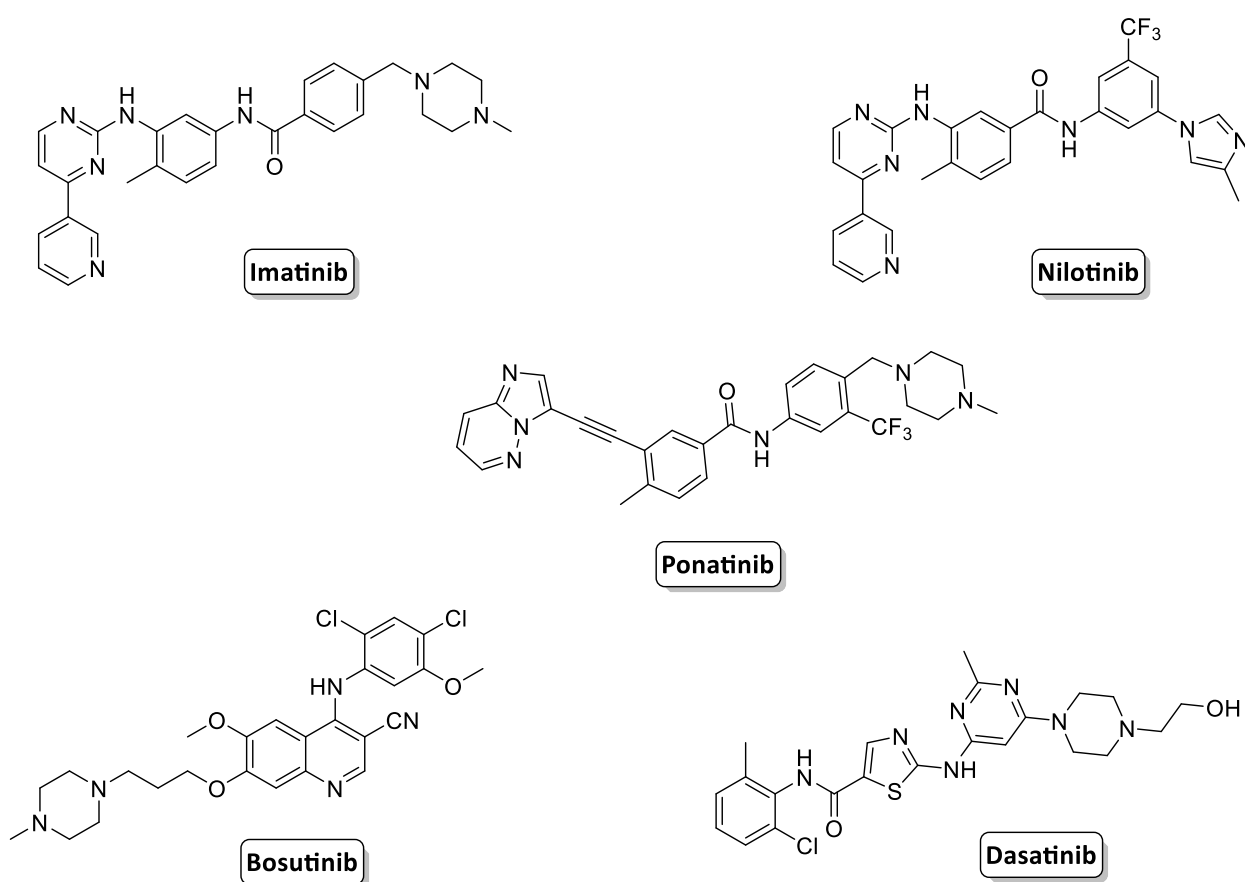
2.11. Αντίσταση καρκινικών κυττάρων. Ανάγκη σύνθεσης αναστολέων TK 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς.

Παρόλο που ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών, σχεδόν 80% με ΧΜΛ, έδειξε πλήρη κυτταρογενετική απόκριση κατά τη θεραπεία 1^{ης} γραμμής με Ιματινίβη, ένα μικρό ποσοστό στη χρόνια φάση (CP) και ένα σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό στην επιταχυνόμενη (AP) και τη βλαστική φάση ή φάση έκρηξης (BP), δεν ανταποκρίθηκε. Αρκετοί είναι οι μηχανισμοί αντίστασης που έχουν αναφερθεί για το Imatinib, συμπεριλαμβανομένων των μηχανισμών που εξαρτώνται από τη BCR-ABL1, όπως μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα αμινοξέα στον τομέα της κινάσης ABL, η υπερέκφραση της ογκογονικής πρωτεΐνης BCR-ABL1, αλλά και μηχανισμών ανεξάρτητων από τη BCR-ABL1, όπως εισαγωγή ή εξαγωγή φαρμάκων, επιπρόσθετες χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και ενεργοποίηση εναλλακτικών οδών σηματοδότησης, όπως κινάση Ras/Raf/MEK, κινάσες STAT ή οικογένειας Src.

Οι επιπλέον μεταλλάξεις που μπορούν να λάβουν χώρα στην τυροσινική κινάση BCR-ABL1 μπορούν να προσδώσουν σε διαφορετικό βαθμό αντίσταση στο Imatinib. Ειδικότερα, στην εν λόγω κινάση έχουν ανιχνευτεί οι εξής μεταλλάξεις: G250, Y253, E255 (στην περιοχή δέσμευσης φωσφορικών αλάτων ή βρόχο P), T315I (στην πύλη “gatekeeper” στη θέση πρόσδεσης του Imatinib), M351, F359 (κοντά στον καταλυτικό τομέα), και H396 (στο βρόχο ενεργοποίησης). Η ανάπτυξη αναστολέων TK δεύτερης γενιάς, Dasatinib και Nilotinib, κατάφερε

να ξεπεράσει την αντίσταση, ενώ φαίνεται πως είναι περισσότερο αποτελεσματικά από την Ιματινίβη στην πρόληψη της εξέλιξης της επιταχυνόμενης και βλαστικής φάσης. Η σημειακή μετάλλαξη στην «πύλη» “gatekeeper” T315I, όπου η θρεονίνη αντικαθίσταται από την ογκώδη και υδρόφοβη ισολευκίνη έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του μορίου του αναστολέα και της κινάσης, ενώ δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί ούτε με τους αναστολείς δεύτερης γενιάς. Επιπλέον, η παρουσία της ογκώδους ισολευκίνης στην «πύλη» αποτρέπει την είσοδο των αναστολέων τύπου II στις εσωτερικές σχισμές BP-I και BP-II. Ως εκ τούτου προέκυψε η ανάγκη ανάπτυξης αναστολέων τρίτης γενιάς, όπως το Ponatinib, το οποίο φαίνεται πως είναι αποτελεσματικό έναντι της μετάλλαξης T315I, αναστέλλοντας την BCR-ABL1.⁷⁵

Υπάρχουν πολλές στρατηγικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να ξεπεραστεί η αντίσταση σε κάποιον αναστολέα TK. Μια πρώτη προσέγγιση περιλαμβάνει την ανάπτυξη αναστολέων που στοχεύουν σε διαφορετική θέση από εκείνη που δεσμεύεται το ATP, ενώ μια άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει μόρια τα οποία μπορούν να «ανεχθούν» πλήθος καταλοίπων στην «πύλη» “gatekeeper”. Επιπλέον, μια εναλλακτική μέθοδος θα μπορούσε να στοχεύσει σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που μπορεί να απαιτούνται για το μετασχηματισμό της κινάσης.⁷⁰



Σχήμα 2.5. Εγκεκριμένοι από τον FDA μικρού μοριακού βάρους ανταγωνιστικοί αναστολείς της ογκοπρωτεΐνης BCR-ABL1 για τη θεραπεία της ΧΜΛ.⁷¹

Όνομα, κωδικός, Εμπορική ονομασία	Επιλεγμένοι στόχοι	Ασθένεια	Έτος έγκρισης	Εταιρία	Τύπος αναστολέα
Imatinib, STI571, Gleevec	BCR-ABL1, Kit, PDGFR	Ph+ CML, Ph+ B-ALL, DFSP, GIST, HES, MDS/MPD, ASM	2001	Novartis	IIA
Dasatinib, BM-354825, Sprycel	BCR-ABL1, Src, Lck, Lyn, Yes, Fyn, Kit, EphA2, PDGFRβ	Ph+ CML, Ph+ ALL	2006	Bristol Myers Squibb	I/I½A
Nilotinib, AMN107, Tasigna	BCR-ABL1, PDGFR, DDR1	Ph+ CML	2007	Novartis	IIA
Ponatinib, AP24534, Iclusig	BCR-ABL1, BCR-ABL1 T315I, VEGFR, PDGFR, FGFR, EphR, Src family kinases, Kit, RET, Tie2, Flt3	Ph+ CML, Ph+ALL	2012	Ariad	IIA
Bosutinib, SKI-606, Bosulif	BCR-ABL1, Src, Lyn, Hck	Ph+ CML	2012	Wyeth	I/IIB

Πίνακας 2.3. Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία της ΧΛΜ Ph+. ⁷¹ (ALL: οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία, ASM: επιθετική συστηματική μαστοκυττάρωση, CML: χρόνια μυελογενής λευχαιμία, CLL: χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, DFSP: δερματοϊνোসάρκωμα *protuberans*, GIST: γαστρεντερικός στρωματικός όγκος, HES: υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο, MDS/MPD: μυελοδυσπλαστική/μυελοπολλαπλασιαστική νόσος)⁷¹

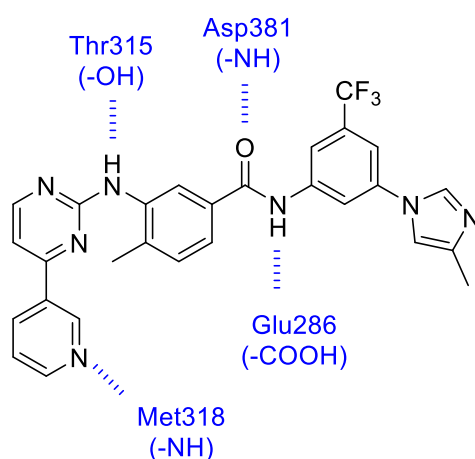
2.12. Το Nilotinib ως αναστολέας TK 2^{ης} γενιάς

Το Nilotinib είναι 2^{ης} γενιάς εκλεκτικός αναστολέας TK, ο οποίος αναπτύχθηκε και κυκλοφόρησε από την εταιρία Novartis με την εμπορική ονομασία Tasigna. Μετά την έγκριση από τον FDA το 2007, χορηγήθηκε για τη θεραπεία της χρόνιας φάσης (CP) και της επιταχυνόμενης φάσης (AP) της ΧΜΛ Ph+ σε ενήλικες ασθενείς με αντίσταση στο Imatinib. Πρόκειται για έναν αναστολέα τύπου II, ο οποίος προσδένεται στην ανενεργή διαμόρφωση του ενζύμου DFG-Asp out και δρα ανταγωνιστικά με το ATP δεσμεύοντας τη θέση του στην ογκογονική τυροσινική κινάση BCR-ABL1. Παρόλο που θεωρείται ως ένα ανάλογο του Imatinib, καθώς μοιάζουν εξαιρετικά οι δομές τους, παρουσιάζει ισχυρότερη δράση από αυτό (περίπου 30 φορές ισχυρότερο), ενώ είναι αποτελεσματικό έναντι των 32 από τις 33 μεταλλάξεις της BCR-

ABL1 που προκαλούν αντίσταση στο Imatinib. Παρόλα αυτά το Nilotinib δεν είναι αποτελεσματικό έναντι της μετάλλαξης T315I, διότι η παρουσία πλέον της ογκώδους ισολευκίνης παρεμποδίζει τη δέσμευση του φαρμάκου στην πίσω υδρόφοβη θέση BP-II.⁸³

Η ισχυρότερη δράση του σε σχέση με την Ιματινίβη πιστεύεται πως οφείλεται στην αυξημένη συγγένειά του με τον τομέα της κινάσης Abl, ενώ θεωρείται πως ταιριάζει καλύτερα στην θέση όπου υπάρχει η αλληλουχία DFG. Ενδεχομένως μια ασθενής ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του τριφθορομεθυλο υποκαταστάτη και του καρβονυλικού άνθρακα της Ala380 να συμβάλει στην αυξημένη αυτή συγγένεια.⁸³

Το Nilotinib σχηματίζει τέσσερις δεσμούς υδρογόνου στον τομέα σύνδεσης της Abl, εκ των οποίων ένας εντοπίζεται μεταξύ του αζώτου της πυριδίνης και της ομάδας -NH της Met318, ένας σχηματίζεται μεταξύ του υδροξυλίου της Thr315 και της αμινομάδας που συνδέει τον δακτύλιο της πυριμιδίνης και τον δακτύλιο του τολουολίου, ένας σχηματίζεται μεταξύ του καρβοξυλίου του Glu286 και του αμιδικού -NH, ενώ το καρβονυλικό οξυγόνο του αμιδικού δεσμού σχηματίζει έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με το Asp381 της αλληλουχίας DFG-Asp out. Επιπλέον, σημειώνονται αρκετές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την δέσμευση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο.⁸⁴



Σχήμα 2.6. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του Nilotinib και των αμινοξέων της θέσης δέσμευσης του ATP.

Αξίζει να σημειωθεί πως κατά τη θεραπεία με Νιλοτινίβη παρουσιάστηκαν εκ νέου μεταλλάξεις, οι οποίες όμως αντιμετωπίστηκαν με μεγαλύτερη δόση φαρμάκου.⁸³

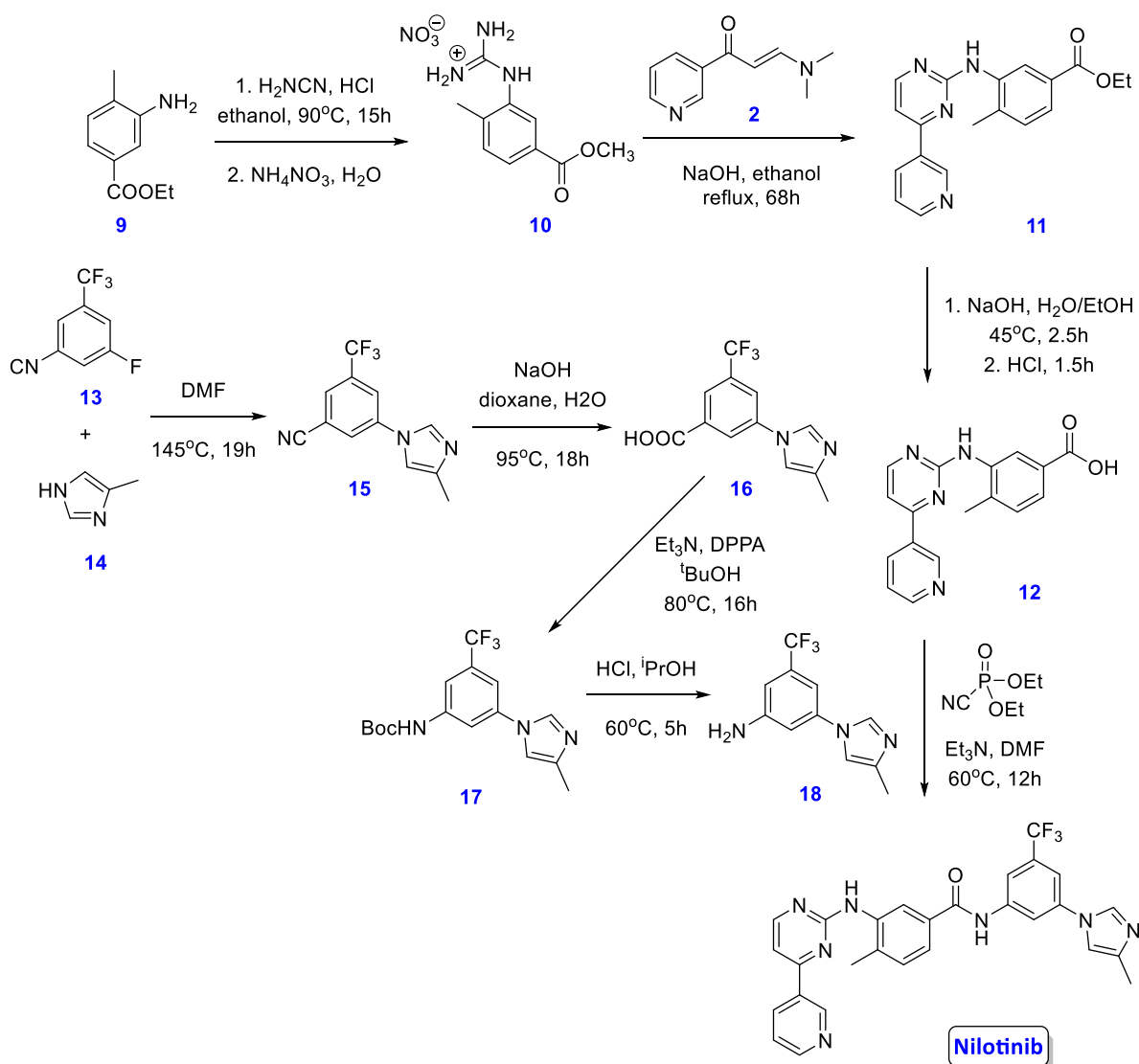
2.12.1. Σύνθεση του Nilotinib

Η σύνθεση του Nilotinib κατοχυρώθηκε από την εταιρία Novartis με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.7, η συνθετική πορεία ξεκινά με τον σχηματισμό του άλατος γουανιδίνης **10**, ενώ στη συνέχεια, ανάλογα με το Imatinib, ακολουθεί συμπύκνωση

αυτού με την εναμινόνη **2** προς σχηματισμό του επιθυμητού κυκλοποιημένου προϊόντος **11**. Αλκαλική υδρόλυση της ομάδας του αιθυλεστέρα της **11** δίνει το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ **12**.

Στο ίδιο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας παρουσιάζεται ακόμη η σύνθεση της ανιλίνης **18** μέσω μιας αλληλουχίας τεσσάρων σταδίων, ξεκινώντας από μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ του 3-φθορο-5-τριφθορομεθυλοβενζονιτριλίου **13** και του 4-μεθυλο-ιμιδαζολίου **14** για να δώσει την ένωση **15**. Υδρόλυση του νιτριλίου ακολουθούμενη από μια αναδιάταξη Curtius σε *t*BuOH έδωσε την Boc προστατευμένη ανιλίνη **17**. Το επιθυμητό προϊόν **18** προκύπτει μετά από αποκοπή της προστατευτικής ομάδας με HCl. Τέλος, αντίδραση μεταξύ του καρβοξυλικού οξέος **12** και της ανιλίνης **18** παρουσία φωσφοροκυανιδικού διαιθυλίου, οδηγεί στο Nilotinib.^{79,85}

Περισσότερες πληροφορίες για τη σύνθεση της **18** αναφέρονται σε νέα διπλώματα ευρεσιτεχνίας της ίδιας εταιρίας παρουσιάζοντας περαιτέρω βελτιστοποιήσεις.^{86,87}

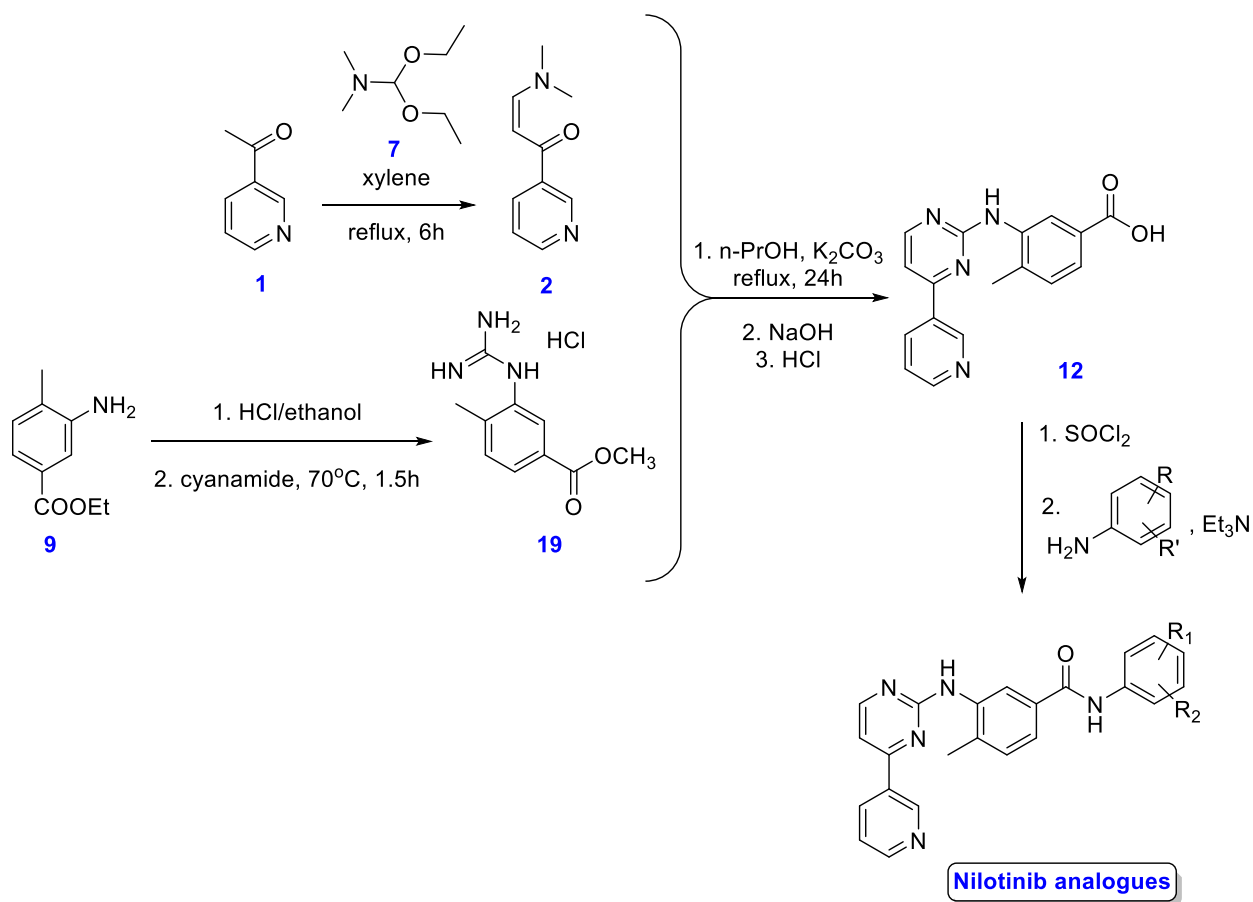


Σχήμα 2.7. Αρχική συνθετική πορεία του Nilotinib σύμφωνα με την εταιρία Novartis.^{79,85}

Η συνθετική πορεία του Nilotinib και ειδικότερα η σύνθεση της ένωσης **18**, διαφοροποιήθηκε από πολλές ερευνητικές ομάδες αλλά και φαρμακευτικές εταιρίες, όπως η Ariad και η Teva.⁷⁹

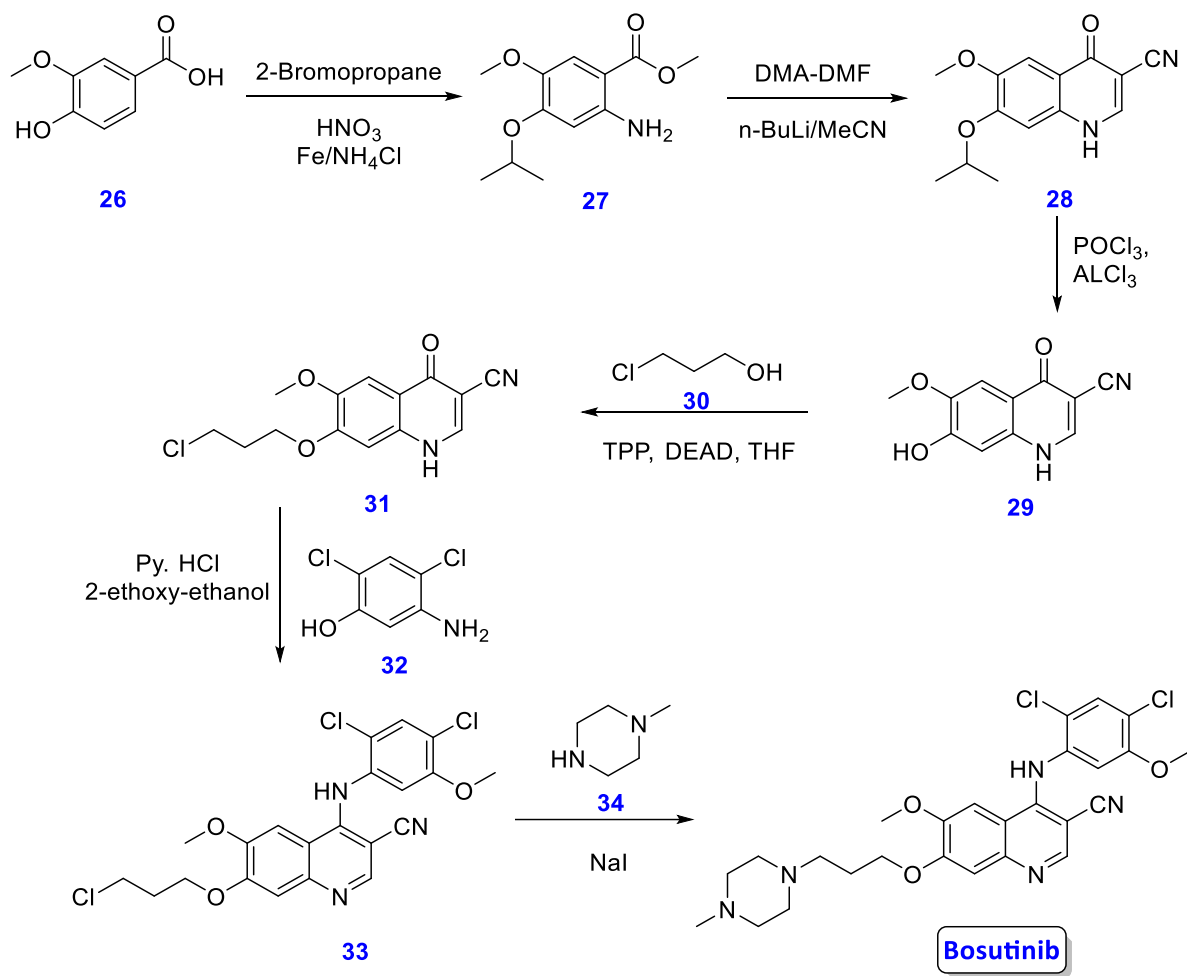
Στηριζόμενοι στη συνθετική πορεία του Imatinib, το ερευνητικό μας εργαστήριο ανέπτυξε μια βελτιστοποιημένη μέθοδο για τη σύνθεση του Nilotinib, αλλά και των αναλόγων του ως εν δυνάμει εκλεκτικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσεων (σχήμα 2.8).⁸⁰

Για το σχηματισμό του κυκλοποιημένου προϊόντος **12** σε υψηλή απόδοση τηρήθηκαν οι ίδιες συνθήκες αντίδρασης με το Imatinib, με μόνη διαφορά την ύπαρξη της ομάδας του αιθυλεστέρα αντί για τη νιτροομάδα. Αλκαλική υδρόλυση της ομάδας του αιθυλεστέρα οδηγεί στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ **12**. Τέλος, σύζευξη του οξέος **12** με υποκατεστημένες ανιλίνες οδηγεί στο σχηματισμό του Nilotinib και των αναλόγων του.



Σχήμα 2.8. Βελτιστοποιημένη μέθοδος σύνθεσης του Nilotinib, σύμφωνα με το ερευνητικό μας εργαστήριο.⁸⁰

χρόνια φάση, επιταχυνόμενη φάση ή φάση έκρηξης σε ασθενείς που παρουσιάζουν αντίσταση σε θεραπείες με προηγούμενους 2^{ης} γενιάς αναστολείς TK. Πλέον αναπτύσσεται και κυκλοφορεί από τη Pfizer. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως το Bosutinib παρόλο που είναι αποτελεσματικό έναντι πλήθους μεταλλάξεων της BCR-ABL1, δεν παρουσιάζει καμία δραστικότητα έναντι των T315I και V299L. Παρόμοια με το Dasatinib, είναι ένας ανταγωνιστικός αναστολέας τύπου I, ο οποίος συνδέεται στην ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου, ενώ παράλληλα αποτελεί ένα φαρμακευτικό σκεύασμα πολλαπλών στόχων.⁸⁸



Σχήμα 2.10. Σύνθεση του Bosutinib από την εταιρία Wyeth.⁸⁹

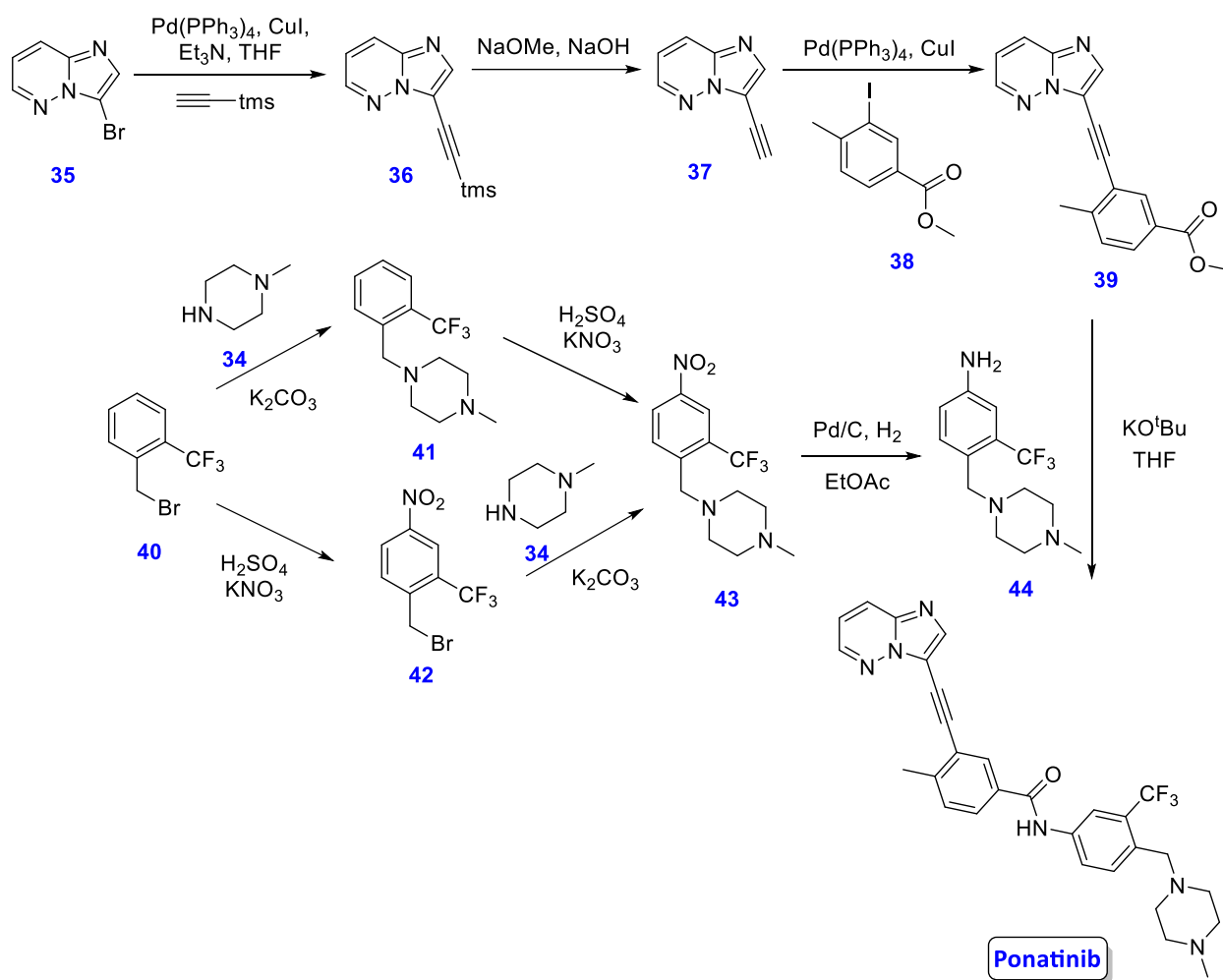
2.13.3. Το Ponatinib ως αναστολέας TK 3^{ης} γενιάς

Παρόλο που η σημειακή μετάλλαξη T315I τακτοποιήθηκε πολύ νωρίς κατά την κλινική χρήση του Imatinib, κανένας από τους 2^{ης} γενιάς αναστολείς δεν κατάφερε να την αντιμετωπίσει αποτελεσματικά. Συνεπώς, η αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης που φέρει τη συγκεκριμένη σημειακή μετάλλαξη εξακολουθεί να αποτελεί μια βασική ιατρική ανάγκη.

Το Ponatinib (Ariad Pharmaceuticals) είναι ένας αναστολέας τύπου IIA 3^{ης} γενιάς, ο οποίος είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός έναντι των μεταλλάξεων της BCR-ABL1, ενώ είναι ο μοναδικός αναστολέας ο οποίος μπορεί να αντιμετωπίσει με επιτυχία την μετάλλαξη T315I. Ο εν λόγω αναστολέας χορηγήθηκε, ύστερα από έγκριση από τον FDA το 2012, για τη θεραπεία της ΧΜΛ Ph+ και ΟΛΛ Ph+ σε ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη T315I και που δεν ανταποκρίνονται στις θεραπείες με προηγούμενους αναστολείς TK. Η επιτυχία του Ponatinib στην συγκεκριμένη μετάλλαξη οφείλεται στο γεγονός ότι δεν παρουσιάζει καμία αλληλεπίδραση με τη θρεονίνη T315 σε αντίθεση με τους προηγούμενους TKI, ενώ η παρουσία του τριπλού δεσμού στο μόριό του επιτρέπει την ελάχιστη στερεοχημική παρεμπόδιση με την ισολευκίνη στη θέση 315 στο μεταλλαγμένο BCR-ABL1. Το Ponatinib θεωρείται ένας αναστολέας πολλαπλών στόχων, καθώς εκτός από την BCR-ABL1, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικός έναντι πολλαπλών τυροσινικών κινασών, συμπεριλαμβανομένων των SRC, ABL, FGFR, PDGFR, VEGFR, FLT3 και c-KIT.⁹⁰

Παρόλα αυτά, μια σειρά γεγονότων για την ασφάλεια των ασθενών που λάμβαναν θεραπεία με Ponatinib, όπως εμφάνιση καρδιαγγειακών θρομβωτικών συμβάντων και στένωση των αγγείων, οδήγησαν σε προσωρινή αναστολή της χρήσης του τον Οκτώβριο του 2013. Αυτή η αναστολή άρθηκε τον Δεκέμβριο του 2013, με μια νέα προειδοποίηση “Black Box”, μαζί με μια Στρατηγική Αξιολόγησης και Μετριάσμου Κινδύνου (REMS),⁸³ Πρόκειται, ουσιαστικά, για προειδοποιήσεις του FDA για την ενημέρωση των καταναλωτών για σοβαρές ή απειλητικές για τη ζωή παρενέργειες που μπορεί να έχει το φάρμακο.

Στο παρακάτω σχήμα αναπαριστάνεται η πορεία σύνθεσης του Ponatinib από την εταιρία Ariad.

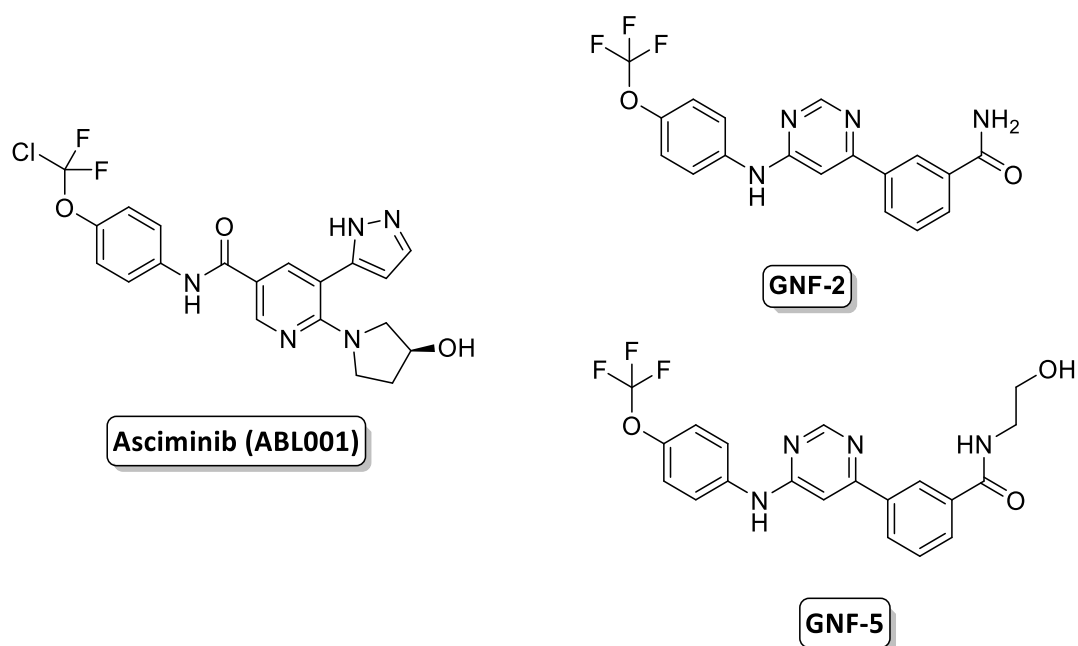


Σχήμα 2.11. Νεότερη κατοχυρωμένη πορεία σύνθεσης του Ponatinib από την εταιρία Ar-
iad.⁹¹

2.13.4. Αλλοστερικοί αναστολείς

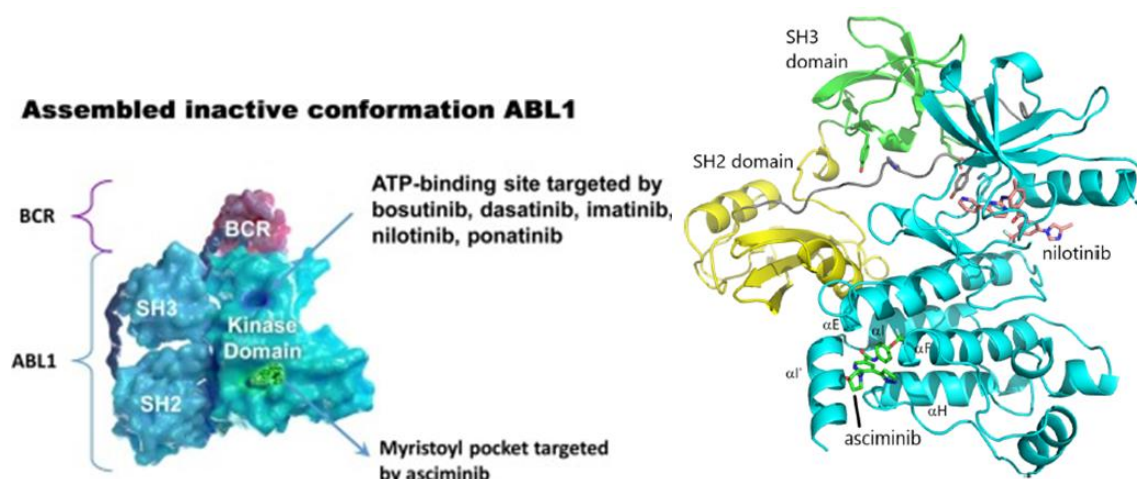
Στη ΧΜΛ οι μεταλλάξεις αποτελούν την πιο κοινή αιτία επίκτητης αντίστασης στους ανταγωνιστικούς αναστολείς ATP της κινάσης BCR-ABL1, με την μετάλλαξη T315I να αποτελεί τη δυσκολότερη στη θεραπεία. Σε μια προσπάθεια εύρεσης εναλλακτικής θεραπευτικής προσέγγισης, οι επιστήμονες της Novartis ανέπτυξαν αναστολείς, οι οποίοι συνδέονται σε αλλοστερική θέση χωρίς να ανταγωνίζονται το ATP. Έτσι αναστέλλουν τη δραστηριότητα της κινάσης και κατά συνέπεια τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα, οι αλλοστερικοί αυτοί αναστολείς μιμούνται τον ρυθμιστικό ρόλο της αμινοτελικής περιοχής μυριστοϋλίωσης, η οποία προσδένεται στον υδρόφοβο θύλακα στον τομέα της κινάσης με σκοπό την κλειστή – ανενεργή διαμόρφωσή της, η οποία απουσιάζει στην μεταλλαγμένη κινάση BCR-ABL1, αφού έχει αντικατασταθεί πλέον από το τμήμα Bcr.^{92,93}

Παρακάτω παρουσιάζονται κάποιοι από τους αλλοστερικούς αναστολείς της Abl που έχουν συντεθεί, με το Asciminib (ABL001) να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία της ΧΜΛ, καθώς βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της ΧΜΛ (Ph+) και της ΟΛΛ (Ph+).



Σχήμα 2.12. Αλλοστερικοί αναστολείς της BCR-ABL1.

Γενικότερα είναι αποδεκτή η αντίληψη ότι οι στρατηγικές συνδυασμού είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στη θεραπεία του καρκίνου. Συνεπώς είναι λογικό ο συνδυασμός ανταγωνιστικών και αλλοστερικών TKI να μπορούν να οδηγήσουν σε πλήρη καταστολή της κινάσης και κατά συνέπεια σε αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου. Δεδομένου της επίτευξης υψηλής εκλεκτικότητας, οι αλλοστερικοί αναστολείς λειτουργούν συμπληρωματικά για την αναστολή της κινάσης σε ήδη υπάρχοντες αναστολείς που στοχεύουν τις θέσεις δέσμευσης ATP.⁹⁴



Εικόνα 2.31. Ανενεργής διαμόρφωση της κινάσης BCR-ABL1. Η θέση πρόσδεσης του ATP έχει καλυφθεί από έναν ανταγωνιστικό TKI, ενώ στη θέση μυριστοϋλίωσης στην Abl έχει προσδεθεί από τον αλλοστερικό αναστολέα Asciminib.⁹²

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Συζήτηση – Αποτελέσματα

3.1. Σχεδιασμός εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων μέσω προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης

Η τεχνολογία της μοριακής μοντελοποίησης αποτελεί μια ερευνητική μέθοδο που αποσκοπεί στον υπολογισμό της συγγένειας σύνδεσης μεταξύ δύο μορίων, όπου με βάση την αρχή σύζευξης «κλειδί-κλειδαριά» μπορούν να αναγνωριστούν οι ενεργές θέσεις μεταξύ αυτών. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετάται ο βαθμός συγγένειας μεταξύ μιας πρωτεϊνικής κινάσης και ενός μικρού μοριακού βάρους αναστολέα. Η ανακάλυψη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του πρωτεϊνικού στόχου μαζί με τον αναστολέα του αποτελεί την πρώτη θεωρητική προσέγγιση για την ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών ενώσεων. Ως εκ τούτου, μπορεί να διαπιστωθεί εάν το μοτίβο δέσμευσης είναι ικανοποιητικό ώστε να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειραματική έρευνα. Ο σχεδιασμός των εν δυνάμει αναστολέων-αναλόγων του Nilotinib έγινε με τη χρήση τέτοιων προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης.

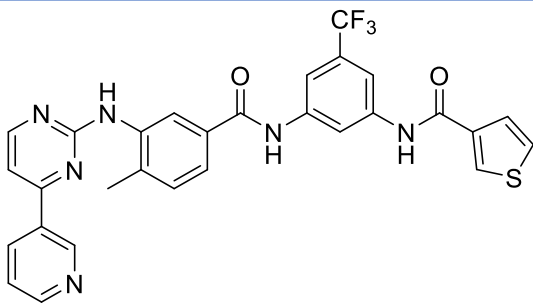
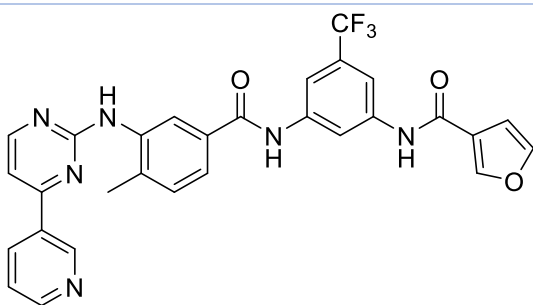
Το γεγονός ότι το Nilotinib είναι ένα ανάλογο του Imatinib αποτελεί απόδειξη, ότι έστω και μικρές τροποποιήσεις στη δομή ενός φαρμάκου μπορούν να επιφέρουν καλύτερη βιολογική δράση. Δεδομένου αυτού και έχοντας ως πρότυπο φάρμακο το Nilotinib, σχεδιάστηκαν συνολικά οκτώ ενώσεις οι οποίες διαφοροποιούνται στον τελικό βενζολικό δακτύλιο και στο δακτύλιο του μεθυλο-ιμιδαζολίου του πρόδρομου φαρμάκου, με την εισαγωγή άλλων ομάδων που έχουν επιδείξει γενικότερα καλή φαρμακολογική δράση σε άλλα φάρμακα. Οι ενώσεις που σχεδιάστηκαν, είναι ανταγωνιστές του ATP και ελέγχθηκαν για τυχόν πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της τυροσινικής κινάσης Abl αλλά και της υβριδικής πρωτεΐνης BCR-ABL1. Επιπλέον, διενεργήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης και σε άλλες πρωτεΐνες, όπως η μεταλλαγμένη BCR-ABL1 T315I αλλά και η υποδοχική κινάση VEGFR2.

Προκειμένου να εκτελεστούν τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης, η τρισδιάστατη 3D δομή των πρωτεϊνών μαζί με τον αναστολέα λήφθηκε από την ηλεκτρονική πηγή Protein Data Bank (PDB: <https://www.rcsb.org/>), ακολουθούμενη από απαλοιφή των μορίων νερού της πρωτεΐνης και αποθήκευση αυτής σε μορφή pdb, ενώ στο μόριο του αναστολέα έγινε προσθήκη ατόμων υδρογόνου και αποθήκευση αυτού σε μορφή mol2. Για τον υπολογισμό της συγγένειας και της ενέργειας πρόσδεσης μεταξύ της πρωτεΐνης και του αναστολέα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα UCSF Chimera 1.14 Molecular Visualization με χρήση του AutoDock Vina, αφού πρώτα έγινε προετοιμασία για την πρωτεΐνη με χρήση του Dock Prep και αποθήκευση αυτής σε μορφή mol2. Η περαιτέρω ανάλυση του τρόπου σύνδεσης και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο μορίων και, στη συνέχεια, η απεικόνισή τους διενεργήθηκε μέσω του προγράμματος BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2019. Η τροποποίηση της δομής του αναστολέα εισάγοντας διαφορετικές ομάδες έγινε στην μορφή mol2 χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόγραμμα, ώστε στη συνέχεια να εκτιμηθεί η ικανότητα πρόσδεσης στην πρωτεΐνη. Συνεπώς, εκείνα τα φάρμακα με υψηλότερες τιμές πρόσδεσης, δηλαδή με τις

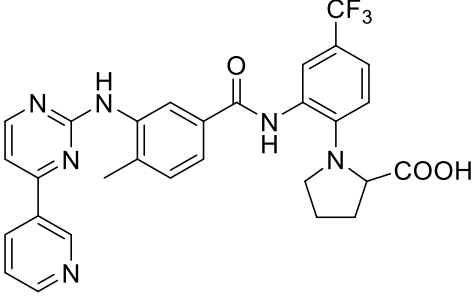
μικρότερες τιμές ενέργειας κατά Gibbs, $\Delta G_{\text{binding}}$, επιλέχθηκαν για περαιτέρω έρευνα. Τέλος, η πρόβλεψη των πιθανών πρωτεϊνικών στόχων των βιοδραστικών μορίων διενεργήθηκε μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>).

Ανάλογο	Πρωτεϊνικός στόχος		
	BCR-ABL1 ΔG (kcal/mol)	Μετάλλαξη T315I ΔG (kcal/mol)	VEGFR2 ΔG (kcal/mol)
	<i>Nilotinib</i> -14.8	<i>Ponatinib</i> -13.7	<i>Sorafenib</i> -12.8
Nil-1	-14.8	-13.3	-11.0
Nil-2	-14.8	-13.3	-10.6
Nil-3	-15.0	-13.2	-10.2
Nil-4	-14.8	-13.2	-10.7
Nil-5	-14.7	-13.2	-10.7
Nil-6	-9.9	-12.1	-10.5
Nil-7	-12.7	-10.2	-9.3
Nil-8	-12.4	-8.5	-9.3

Πίνακας 3.1. Θεωρητικές τιμές ελεύθερης ενέργειας Gibbs, $\Delta G_{\text{binding}}$, του κάθε συμπλόκου (ανάλογο-πρωτεΐνη).

Ανάλογα	Ονοματολογία	Συντακτικός τύπος
Nil-1	<i>N</i> -(3-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)θειο-φαινο-3-καρβοξαμίδιο	
Nil-2	<i>N</i> -(3-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)φουρανο-3-καρβοξαμίδιο	

Nil-3	<i>N</i> -(3-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδιο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-1 ^H -πυρρολιο-3-καρβοξαμίδιο	
Nil-4	<i>N</i> -(3-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδιο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)θειοφαινο-2-καρβοξαμίδιο	
Nil-5	<i>N</i> -(3-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδιο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)φουρανο-2-καρβοξαμίδιο	
Nil-6	4-μεθυλο- <i>N</i> -(4-μορφολινοφαινυλο)-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο	
Nil-7	4-μεθυλο- <i>N</i> -(2-μορφολινο-5-(τριφθορομεθυλο)φινυλο)-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο	

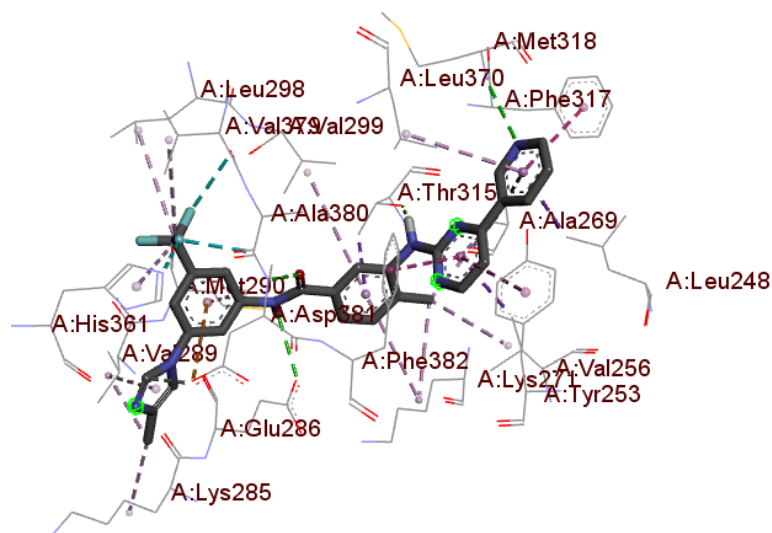
Nil-8	2-(4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδιο)-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πρόλινη	
---------------------	---	--

Πίνακας 3.2. Σειρά αναλόγων του Nilotinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο.

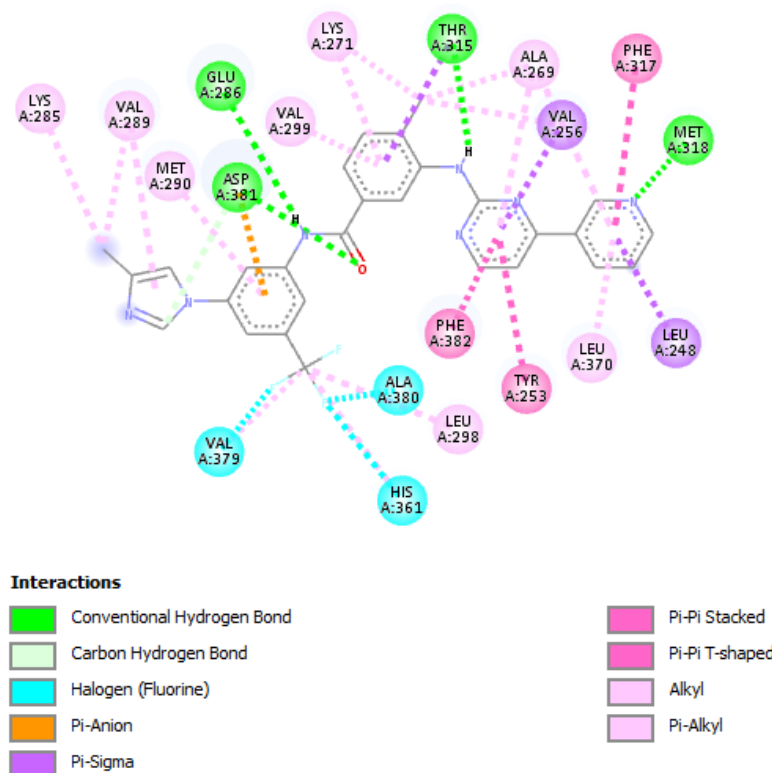
3.2. Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων του στο ενεργό κέντρο πρωτεϊνικών κινασών

3.2.1. Μοριακή μοντελοποίηση του Nilotinib και των αναλόγων του στην κινάση BCR-ABL1

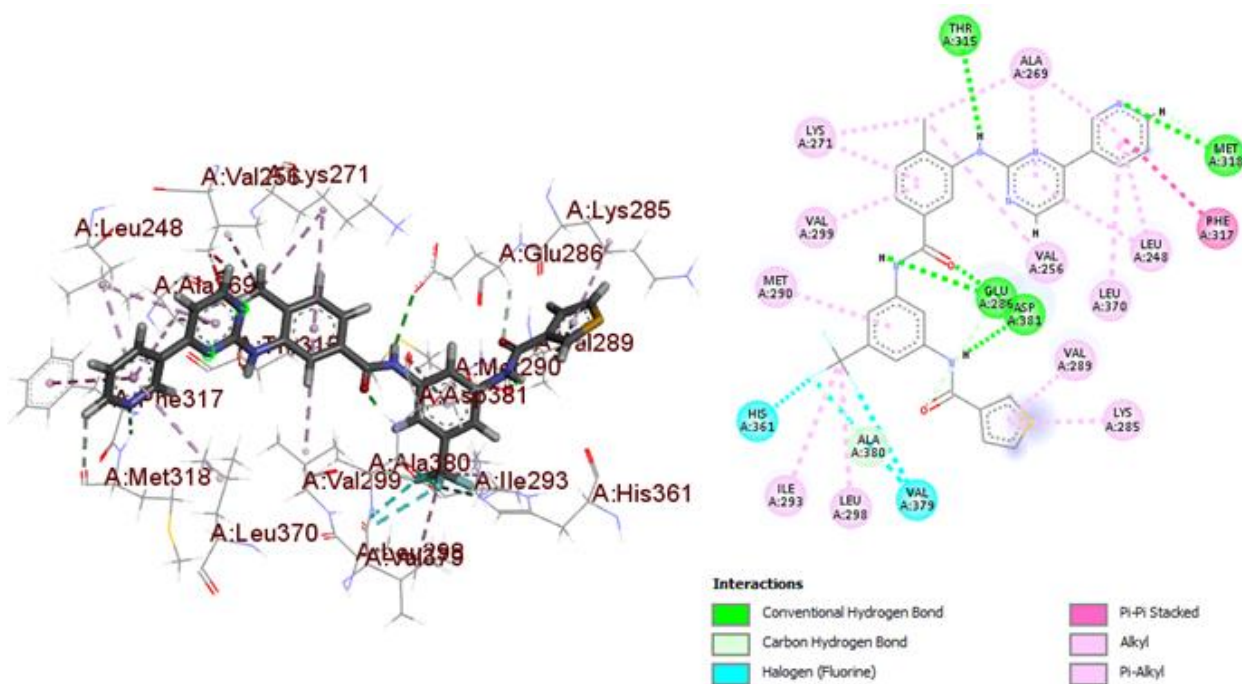
Στα παρακάτω σχήματα αναπαριστούνται οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει το μόριο του Nilotinib με το ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης BCR-ABL1. Φαίνεται πως ο εν λόγω αναστολέας σχηματίζει πλήθος αλληλεπιδράσεων που συντελούν στην ισχυρή πρόσδεσή του στην κοιλότητα που δεσμεύει το ATP. Μεταξύ αυτών των αλληλεπιδράσεων εντοπίζονται τέσσερις δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα των αμινοξέων Met318, Thr315, Glu286 και Asp381. Επιπλέον σημειώνονται αρκετές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ο ρόλος των οποίων είναι σημαντικός για την δέσμευση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο. Ειδικότερα ο δακτύλιος του μεθυλο-ιμιδαζολίου σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Lys285 και Val289, ενώ υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σχηματίζουν και οι δακτύλιοι της πυριμιδίνης και πυριδίνης. Παρόλα αυτά, ο ρόλος της τριφθορομέθυλο-ομάδας φαίνεται πως είναι εξίσου σημαντικός καθώς σχηματίζει αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικού πεδίου με τα αμινοξέα Val379, His361 και Ala380.



Σχήμα 3.1. 3D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει το **Nilotinib** στο ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

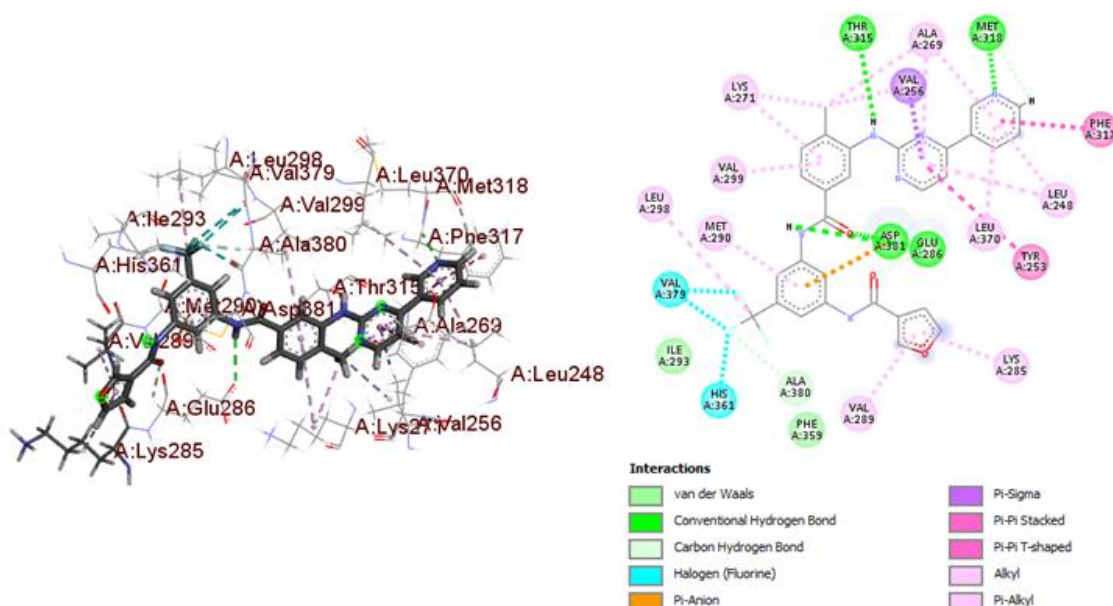


Σχήμα 3.2. 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του **Nilotinib** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

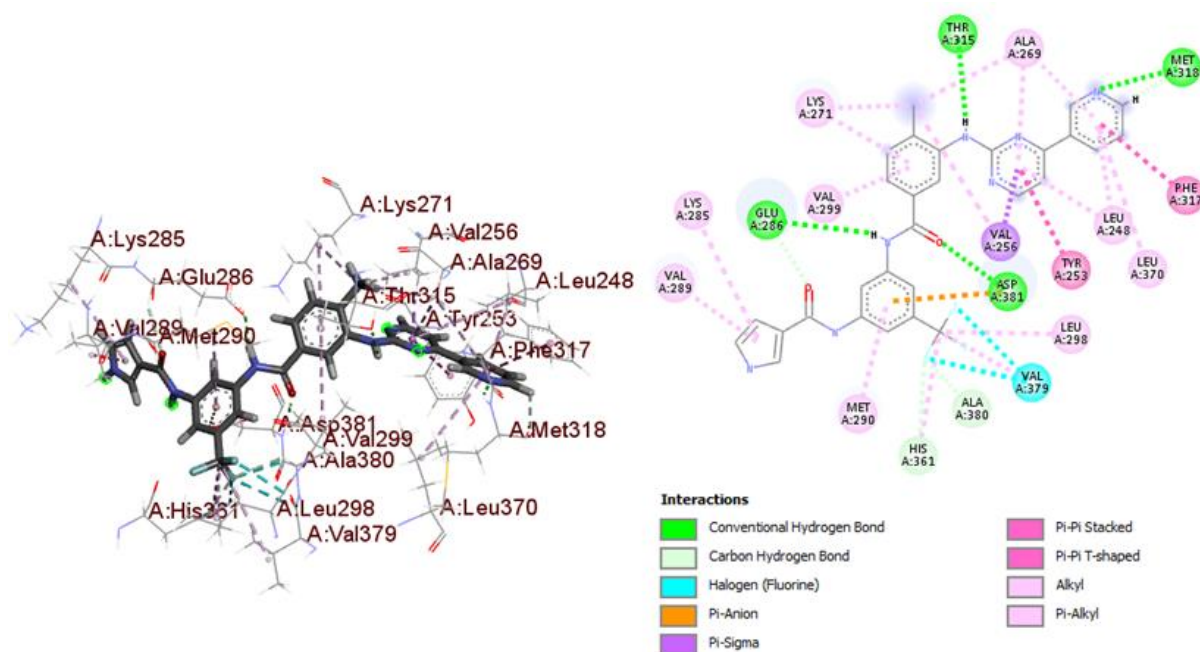


Σχήμα 3.3. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου **Nil-1** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

Κατά την πρόσδεση του αναλόγου **Nil-1** στο ενεργό κέντρο της BCR-ABL1 (σχήμα 3.3), εκτός από τις ήδη υπάρχουσες αλληλεπιδράσεις, εντοπίζεται ένας επιπλέον δεσμός υδρογόνου μεταξύ του νέου αμιδικού πρωτονίου και του Asp381. Επιπλέον, οι π-αλκυλο-αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα των αμινοξέων Lys285 και Val289 συνεχίζουν να υφίστανται παρόλη την διαφοροποίηση του μορίου με τον δακτύλιο του θειοφαινίου πλέον στη θέση του μεθυλο-ιμιδαζολίου.

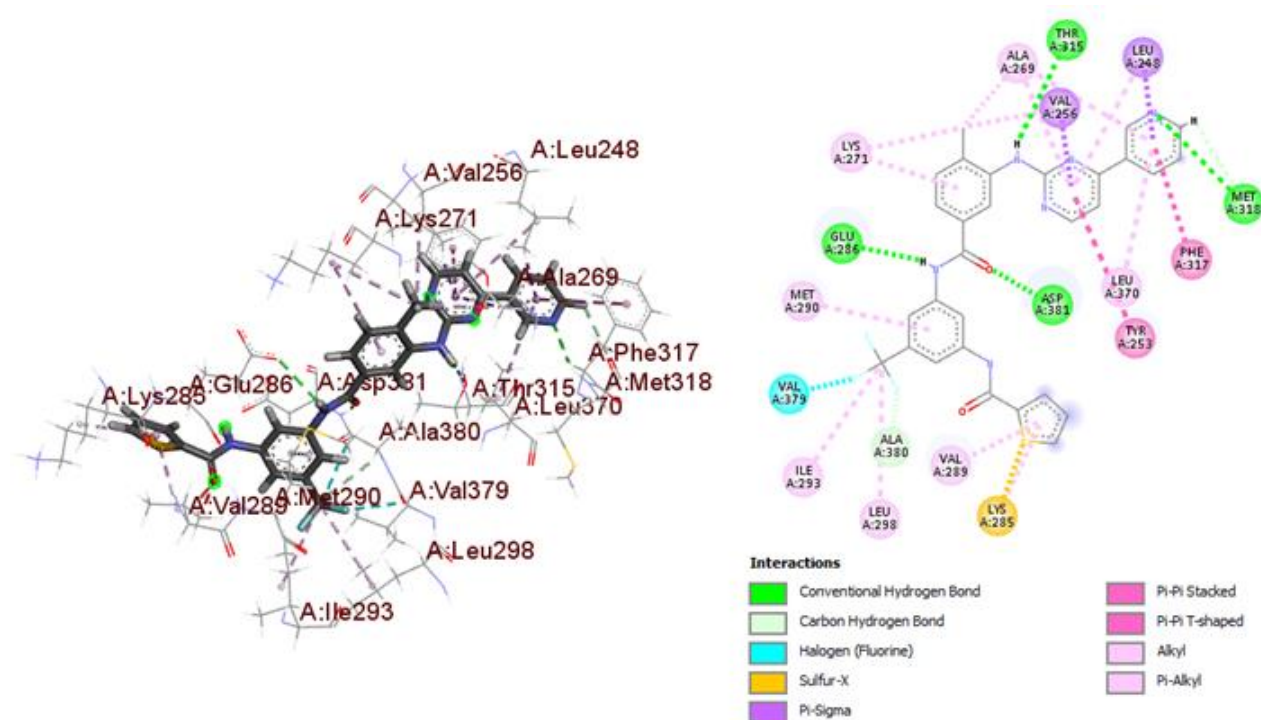


Σχήμα 3.4. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου **Nil-2** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

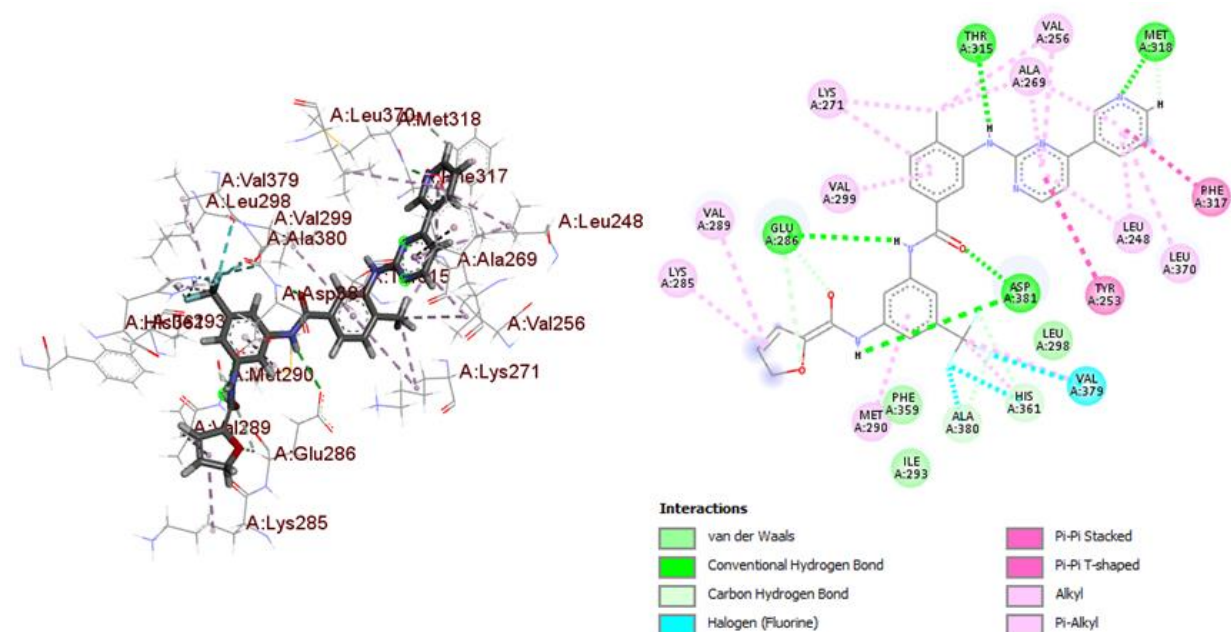


Σχήμα 3.5. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου **Nil-3** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

Στην περίπτωση πρόσδεσης του αναλόγου **Nil-2** (σχήμα 3.4), εκτός από τις ήδη υπάρχουσες αλληλεπιδράσεις, ενδεχομένως λόγω διαφορετικής διαμόρφωσης εντοπίζονται επιπλέον αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Αντίθετα, στην περίπτωση του αναλόγου **Nil-3** (σχήμα 3.5), παρόλη την θεωρητικά ισχυρότερη πρόσδεση που παρουσιάζεται στην πίνακα 3.1, δεν φαίνεται να δημιουργούνται επιπλέον αλληλεπιδράσεις από τις ήδη υπάρχουσες.

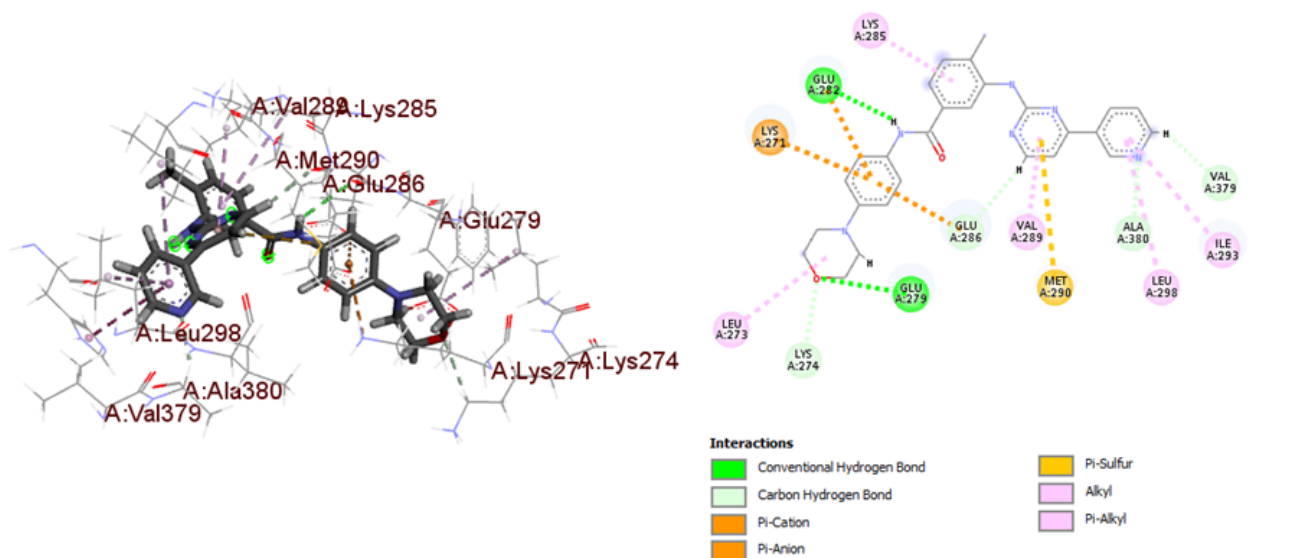


Σχήμα 3.6. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου **Nil-4** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

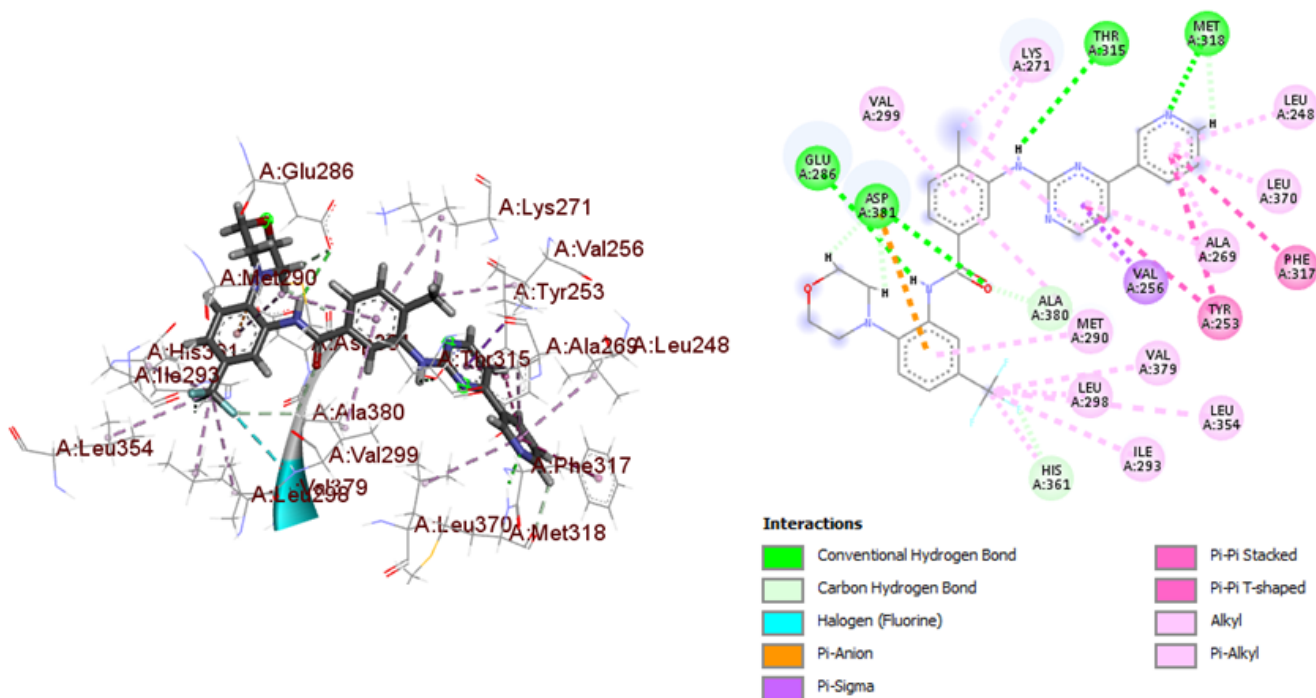


Σχήμα 3.7. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου **Nil-5** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

Στην περίπτωση του αναλόγου **Nil-4** (σχήμα 3.6), εκτός από τις ήδη υπάρχουσες αλληλεπιδράσεις, σχηματίζεται ένας επιπλέον δεσμός μεταξύ του ατόμου θείου του θειοφαινίου και του καταλοίπου της Lys285. Όσον αφορά το ανάλογο **Nil-5** (σχήμα 3.7), φαίνεται πως η διαμόρφωσή του επιτρέπει τη δημιουργία ενός επιπλέον δεσμού υδρογόνου μεταξύ του νέου αμιδικού πρωτονίου και του καταλοίπου του Asp381, ενώ παρατηρούνται επιπλέον υδροφobes αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Η παρουσία των υπολοίπων υδροφobes αλληλεπιδράσεων παραμένει σταθερή.

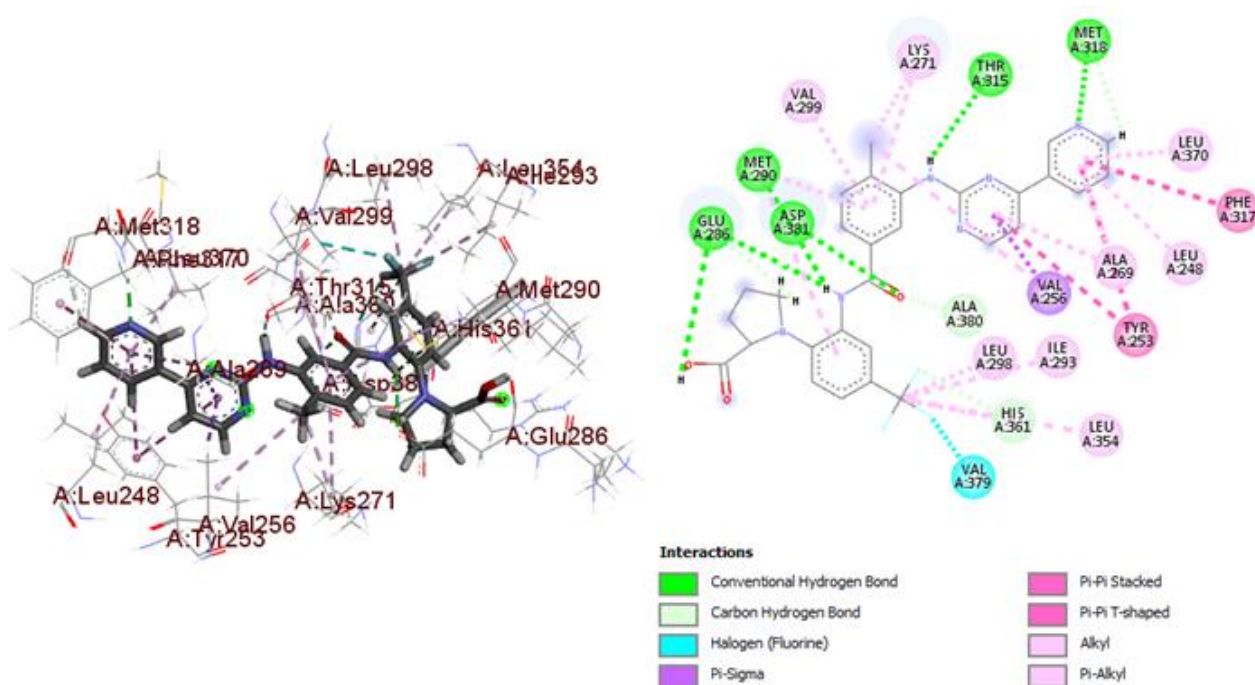


Σχήμα 3.8. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει του αναλόγου **Nil-6** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.



Σχήμα 3.9. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου **Nil-7** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

Το ανάλογο **Nil-6** (σχήμα 3.8) δεν φαίνεται να σχηματίζει επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα των αμινοξέων της κοιλότητας, ενώ και αυτές που υπήρχαν δεν εντοπίζονται πια. Το γεγονός αυτό εξηγείται και από την ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs, η οποία όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.1 είναι αρκετά μικρότερη από τις υπόλοιπες ($\Delta G = -9.9$ kcal/mol). Ως εκ τούτου, το συγκεκριμένο ανάλογο δεν φαίνεται να προσδένεται ισχυρά στο ενεργό κέντρο της BCR-ABL1. Παρόλα αυτά, η προσέγγιση αυτή είναι αμιγώς θεωρητική και ενδεχομένως να μην υφίσταται, κάτι που μένει ναδειχθεί με τα βιολογικά πειράματα. Επιπλέον το γεγονός της αδύναμης πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της συγκεκριμένης κινάσης δεν απαγορεύει την πρόσδεσή του είτε σε αλλοστερική θέση, είτε ακόμα και σε διαφορετική πρωτεϊνική κινάση. Εν αντιθέσει με το **Nil-6**, το ανάλογο **Nil-7** διατηρεί όλες τις αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο της BCR-ABL1, συμπεριλαμβανομένου των δεσμών υδρογόνου και όλων των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

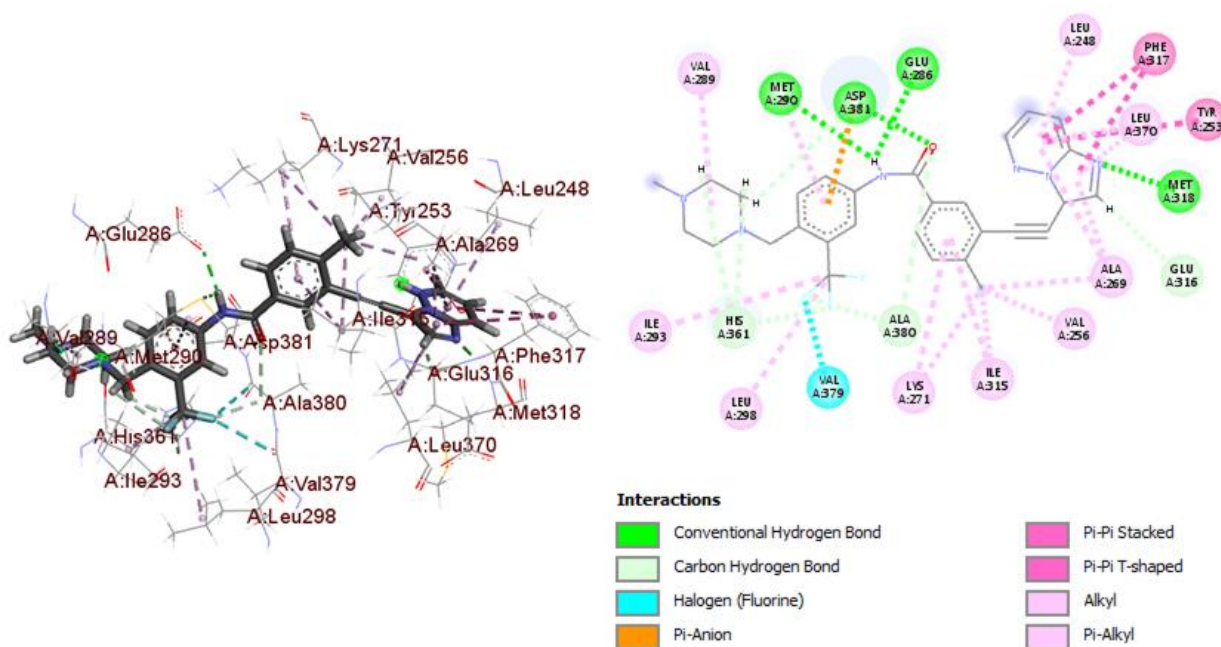


Σχήμα 3.10. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αναλόγου **Nil-8** με το ενεργό κέντρο της BCR-ABL1.

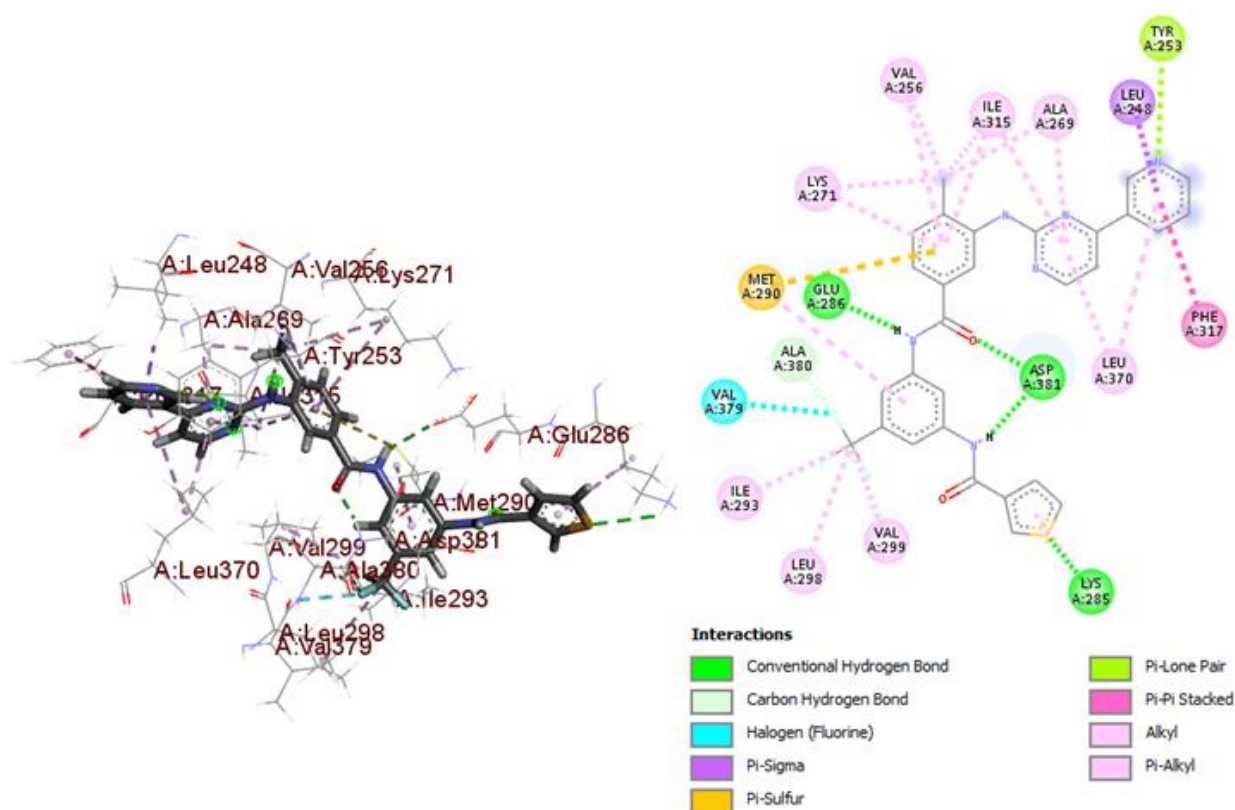
Στην περίπτωση του αναλόγου **Nil-8** (σχήμα 3.10), εκτός από τις ήδη υπάρχουσες αλληλεπιδράσεις, εντοπίζεται ένας επιπλέον δεσμός υδρογόνου μεταξύ της καρβοξυλομάδας της προλίνης και του καταλοίπου Glu286. Επιπλέον, φαίνεται πως το αμιδικό πρωτόνιο μπορεί και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου και με το αμινοξύ Met290. Όσον αφορά τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, η παρουσία αυτών παραμένει σταθερή.

3.2.2. Μοριακή μοντελοποίηση των αναλόγων του Nilotinib στη μετάλλαξη T315I

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, η αντιμετώπιση της σημειακής μετάλλαξης T315I στην ογκογονική πρωτεΐνη BCR-ABL1 εξακολουθεί να αποτελεί βασική ιατρική ανάγκη. Η αντικατάσταση της θρεονίνης με την ογκώδη ισολευκίνη στη θέση 315 έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ενός δεσμού υδρογόνου με το μόριο του Nilotinib, καθιστώντας αδύνατη τη δέσμευσή του στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Το Ponatinib είναι ο μοναδικός αναστολέας που παρέχει αποτελεσματική αντιμετώπιση στη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Παρόλα αυτά, η συσχέτισή του με καρδιακές παθήσεις και η απόσυρσή του για ένα χρονικό διάστημα δημιούργησε αμφιβολίες για τη χρήση του. Κατά συνέπεια, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση νέων αναστολέων που θα αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά την T315I χωρίς να δυσάρεστες παρενέργειες. Στην προσπάθεια αντιμετώπισής της πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των αναλόγων του Nilotinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο στην μεταλλαγμένη BCR-ABL1 T315I. Στον πίνακα 3.1 αναγράφονται όλες οι τιμές ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης ΔG για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έχοντας ως μόριο αναφοράς το Ponatinib με τιμή $\Delta G = -13.7$ kcal/mol. Την πλησιέστερη σε αυτή τιμή παρουσίασαν τα ανάλογα Nil-1 και Nil-2 με τιμές $\Delta G = -13.3$ kcal/mol. Στο σχήμα που ακολουθεί αναπαριστούνται οι αλληλεπιδράσεις του Ponatinib στη μεταλλαγμένη BCR-ABL1 T315I, ενώ ενδεικτικά παρουσιάζονται και οι αλληλεπιδράσεις του αναλόγου **Nil-1** με τη πλησιέστερη τιμή ΔG με εκείνη του φαρμάκου αναφοράς.



Σχήμα 3.11. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει το **Ponatinib** στη μεταλλαγμένη BCR-ABL1 T315I. Σημειώνονται τέσσερις δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα Met318, Glu286, Asp381 και Met290, ενώ εντοπίζεται και πλήθος υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση της αλκυλ-αλληλεπίδρασης που σχηματίζει ο δακτύλιος του τολουολίου με την παράπλευρη αλυσίδα της ισολευκίνης Ile315.



Σχήμα 3.12. 3D και 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει το ανάλογο **Nil-1** στη μεταλλαγμένη BCR-ABL1 T315I. Στην περίπτωση αυτή η παρουσία πλέον της Ile315 συντελεί στη δημιουργία υδρόφοβων αλκυλ-αλληλεπιδράσεων με δακτύλιο του τολουολίου, ενώ η διαμόρφωση του μορίου επιτρέπει τη δημιουργία τεσσάρων δεσμών υδρογόνου μεταξύ **Nil-1** και των καταλοίπων Glu286, Asp381 και Ly285.

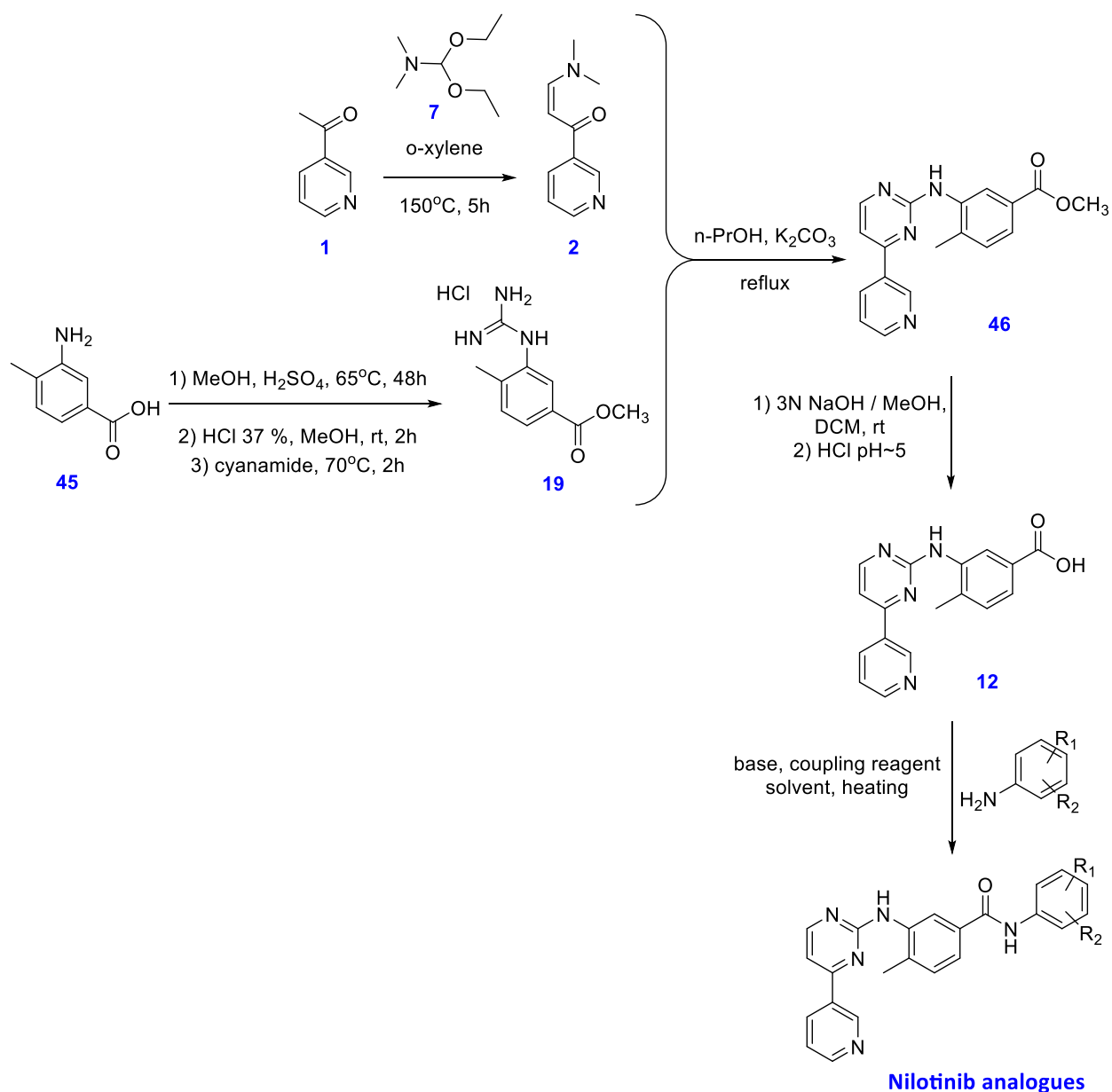
3.2.3. Μοριακή μοντελοποίηση των αναλόγων του Nilotinib στην πρωτεϊνική κινάση VEGFR2

Σύμφωνα με τη διαδικτυακή πλατφόρμα SwissTargetPrediction, στους πιθανούς βιολογικούς στόχους του Nilotinib ανήκει και η υποδοχική κινάση VEGF2 (VEGFR2). Δεδομένου αυτού, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των αναλόγων του Nilotinib στην VEGFR2 χρησιμοποιώντας ως ένωση αναφοράς τον αναστολέα Sorafenib $\Delta G = -12.8$ kcal/mol. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται όλες οι τιμές ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης ΔG των αναλόγων, με το **Nil-1** να παρουσιάζει την ισχυρότερη πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Στο σχήμα που ακολουθεί αναπαριστώνται οι αλληλεπιδράσεις του Sorafenib με τη VEGFR2, ενώ ενδεικτικά παρουσιάζονται και οι αλληλεπιδράσεις του αναλόγου **Nil-1** με τη πλησιέστερη τιμή ΔG με εκείνη του φαρμάκου αναφοράς.

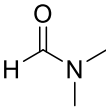
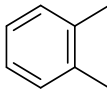
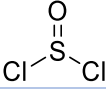
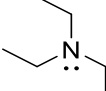
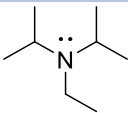
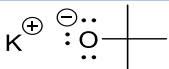
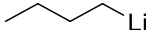
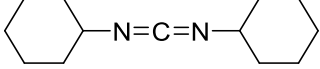
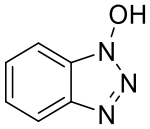
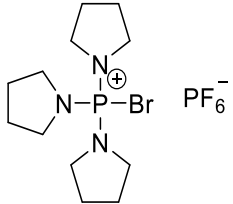
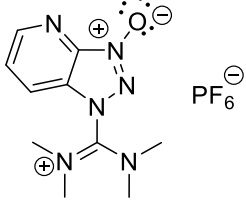
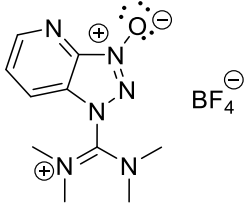
3.3. Ολική πορεία σύνθεσης των νέων εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων – αναλόγων του Nilotinib

Στο παρακάτω σχήμα αναπαριστάται η ολική συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των νέων εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών – πιθανών αντικαρκινικών φαρμάκων – αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Nilotinib. Πρόκειται για μία συγκλίνουσα συνθετική πορεία, η οποία αφορά τη σύνθεση του πυριμιδινικού δακτυλίου, όπως περιγράφεται στη σχετική δημοσίευση του ερευνητικού μας εργαστηρίου.⁸⁰

Πρώτο βήμα της πορείας αποτελεί η σύνθεση της εναμινόνης **2** με αντίδραση της 3-ακετυλοπυριδίνης **1** και της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλης **7** σε διαλύτη ο-ξυλόλιο. Σε ένα επόμενο στάδιο γίνεται εστεροποίηση κατά Fischer στο 3-αμινο-4-μεθυλο-βενζοϊκό οξύ **45** προς σχηματισμό του αντίστοιχου μεθυλεστέρα. Ακολουθεί ο σχηματισμός του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης ανιλίνης, το οποίο με την επίδραση τηγμένου κυαναμιδίου οδηγεί στο σχηματισμό του αντίστοιχου υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης **19**. Συμπύκνωση της εναμινόνης **2** με το υδροχλωρικό άλας γουανιδίνης **19** παρουσία βάσης ανθρακικού καλίου σε διαλύτη 1-προπανόλη, οδηγεί στο σχηματισμό επιθυμητού πυριμιδινικού δακτυλίου, συγκεκριμένα του προϊόντος κυκλοποίησης 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού μεθυλεστέρα **46**, καθώς και του αντίστοιχου προπυλεστέρα. Η συνθετική πορεία συνεχίζει με την αλκαλική υδρόλυση της ομάδας του εστέρα παρουσία μεθανολικού διαλύματος NaOH 2N σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο, απουσία υδατικού διαλύματος, ώστε να παραχθεί το καρβοξυλικό οξύ **12**, όπως περιγράφεται σε σχετική δημοσίευση του ερευνητικού μας εργαστηρίου.⁹⁵ Στη συνέχεια ακολουθεί αντίδραση σύζευξης με υποκαταστημένες ανιλίνες οδηγώντας στο σχηματισμό των τελικών προϊόντων.



Σχήμα 3.15. Ολική πορεία σύνθεσης των αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Nilotinib, όπως πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό μας εργαστήριο.^{80,95}

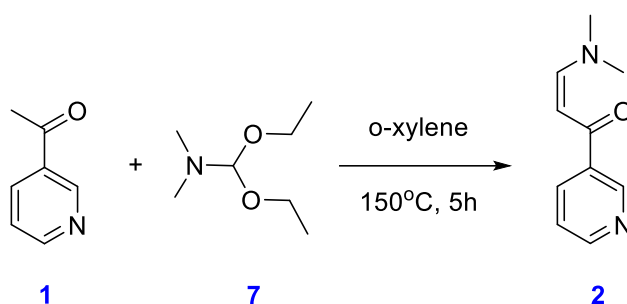
Αντιδραστήριο	Ονοματολογία	Δομή
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο	
THF	Τετραϋδροφουράνιο	
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	
o-xylene	ο-ξυλόλιο	
SOCl ₂	Θειόνυλο χλωρίδιο	
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη	
DIPEA	<i>N,N</i> -δισοπροπυλαιθυλαμίνη ή βάση του Hünig	
KO ^t Bu	tert-βουτοξείδιο του καλίου	
n-BuLi	n-βουτυλολίθιο	
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide	
HOBt	1-hydroxy-1H-benzotriazole	
PyBroP	Bromotri(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate	
HATU	O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3 tetra methyluronium hexafluorophosphate	
TBTU	O-benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate	

Πίνακας 3.3. Διαλύτες και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη σύνθεση των αναλόγων του Nilotinib.

3.4. Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (ένωση 2)

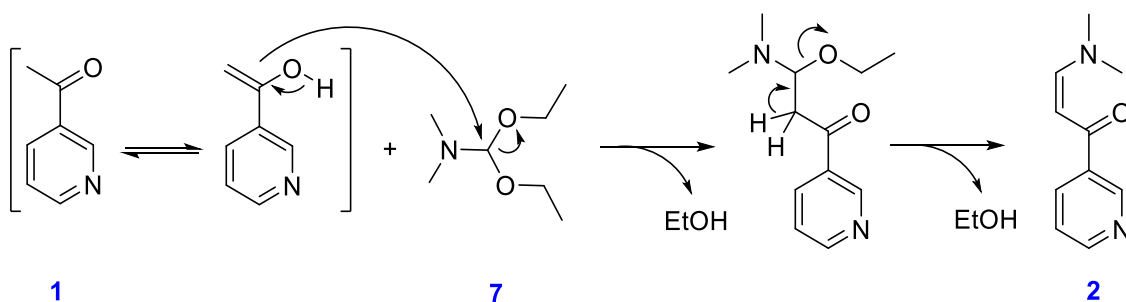
3.4.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (ένωση 2)

Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει μία αντίδραση συμπύκνωσης των εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων της 3-ακετυλοπυριδίνης **1** και της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισυλκετάλης **7** παρουσία διαλύτη ο-ξυλόλιο, με ταυτόχρονη θέρμανση έως τους 150 °C, οδηγώντας στη σύνθεση της εναμιनोंης **2** σε απόδοση 84%.



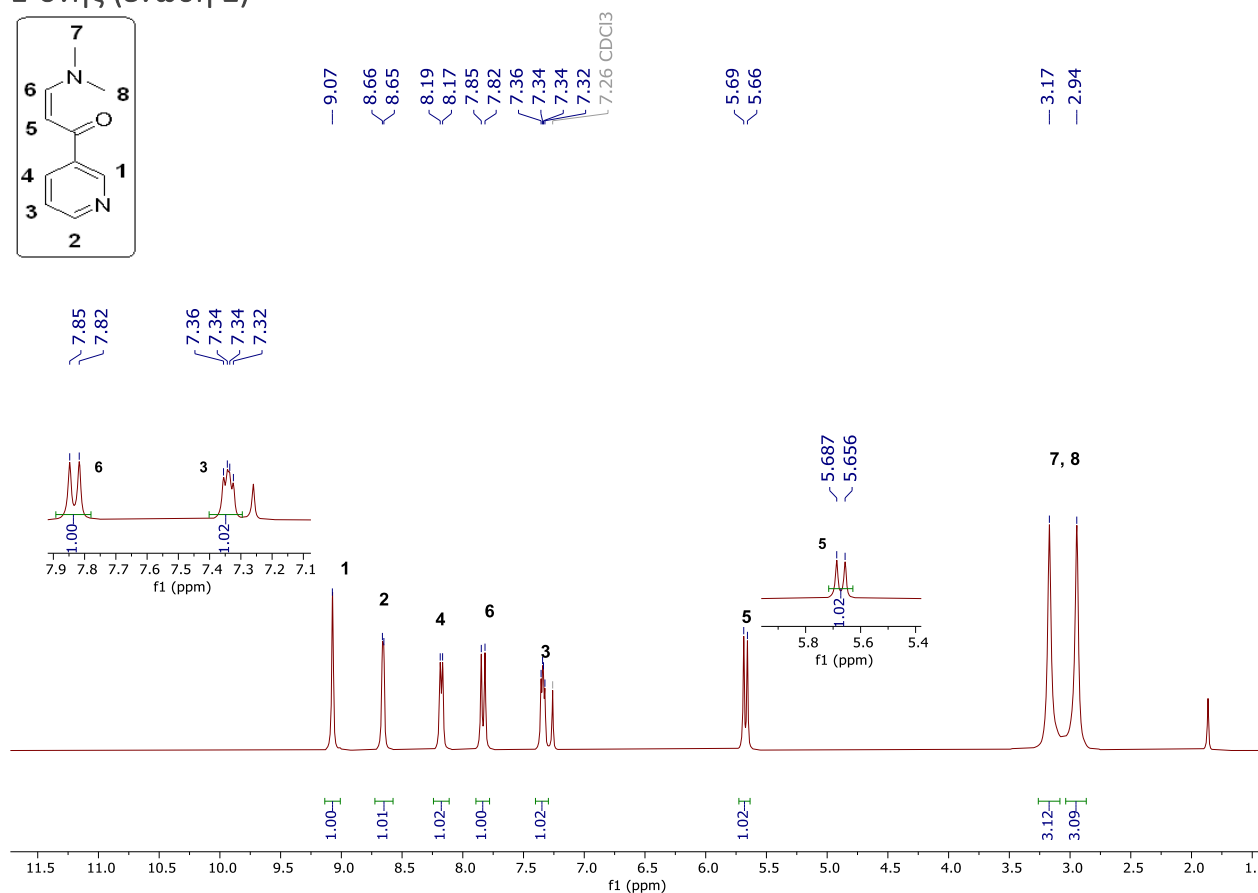
Σχήμα 3.16. Αντίδραση σύνθεσης της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (ένωση 2).

Σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα, η ταυτομερής ενολική μορφή της 3-ακέτυλοπυριδίνης **1** δρα ως πυρηνόφιλο και προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισυλκετάλης **7** αποβάλλοντας ένα μόριο αιθανόλης. Κατά συνέπεια, δημιουργείται ένα ενδιάμεσο μόριο από το οποίο αποσπάται πάλι ένα μόριο αιθανόλης, οδηγώντας στο σχηματισμό του σταθερότερου επιθυμητού προϊόντος εναμιनोंης **2**, μιας α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης.



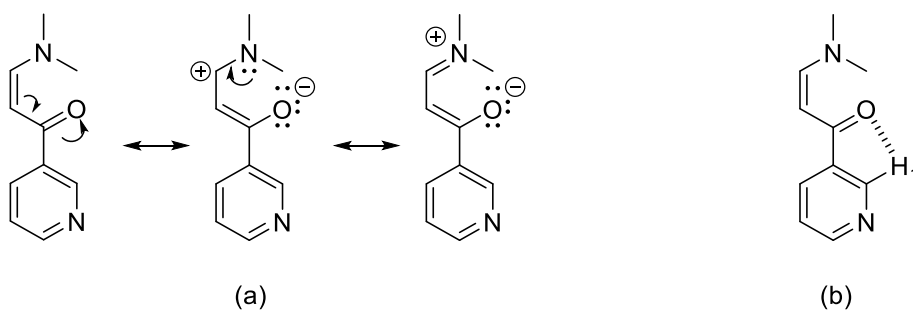
Σχήμα 3.17. Μηχανισμός κατά τη σύνθεση της ένωσης **2**.

3.4.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (ένωση 2)



Εικόνα 3.1. ^1H -NMR της ένωσης **2** σε διαλύτη CDCl_3 στα 400 MHz.

Σύμφωνα με το φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **2**, τα πιο προστατευμένα πρωτόνια είναι τα H_7 και H_8 των δύο μεθυλομάδων, τα οποία εμφανίζονται στα 3.17 και 2.94 ppm, με ολοκλήρωση 3. Όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, ο δεσμός C-N αποκτά φύση διπλού δεσμού και για αυτό το λόγο δεν είναι δυνατή η ελεύθερη περιστροφή του. Κατά συνέπεια τα πρωτόνια των δύο αυτών μεθυλομάδων αντιλαμβάνονται διαφορετικό χημικό περιβάλλον, οπότε εμφανίζονται ως δύο απλές διακριτές κορυφές.



Σχήμα 3.18. a) Εξήγηση αποπροστασίας του πρωτονίου H_6 μέσω δομών συντονισμού. b) Σχηματισμός «ψευδο-δεσμού» μεταξύ του H_1 και του οξυγόνου της καρβονυλομάδας που εξηγεί την αποπροστασία του συγκεκριμένου πρωτονίου.

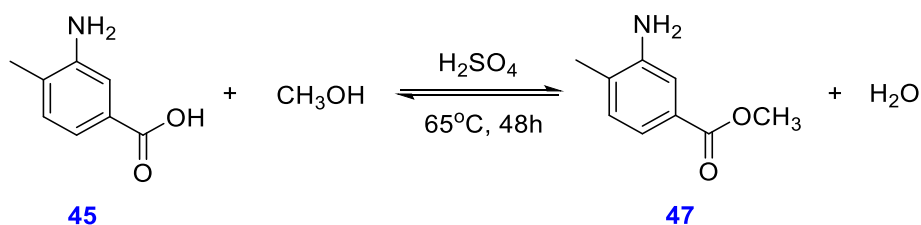
Από τις παραπάνω δομές συντονισμού, εξηγείται και η αποπροστασία του ολεφινικού πρωτονίου H₆ σε σχέση με το γειτονικό του H₅, λόγω έλλειψης ηλεκτρονιακής πυκνότητας στη θέση αυτή. Αυτό αναπαριστάνεται και στο ¹H-NMR φάσμα αφού τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 6 και 5 εντοπίζονται στα 7.85 ppm και στα 5.69 ppm, αντίστοιχα, ως διπλές κορυφές με σταθερά σύζευξης ³J=12.4 Hz, εμφανίζοντας το καθένα ολοκλήρωση 1.

Επιπλέον, εντοπίζονται τα αρωματικά πρωτόνια του δακτυλίου της πυριδίνης με το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 1 στα 9.07 ppm, με ολοκλήρωση 1 να είναι πλέον το πιο αποπροστατευμένο, καθώς γειτνιάζει με το άτομο του αζώτου, αλλά και λόγω σχηματισμού ενός «ψευδοδεσμού» με το οξυγόνο της καρβονυλομάδας. Ακολουθεί λιγότερο αποπροστατευμένο το H₂, το οποίο βρίσκεται και αυτό δίπλα από το άτομο του αζώτου και συντονίζεται στα 8.66 ppm ως μία διπλή κορυφή, με ολοκλήρωση 1, λόγω της σχάσης από το γειτονικό του H₃, με σταθερά σύζευξης ³J=4.8 Hz. Το πρωτόνιο H₄ συντονίζεται στα 8.19 ppm ως μία διπλή κορυφή λόγω της σχάσης από το γειτονικό του H₃ με σταθερά σύζευξης ³J=7.8 Hz και ολοκλήρωση 1. Τέλος, το πρωτόνιο H₃ εμφανίζεται στα 7.36 ppm, με ολοκλήρωση 1, ως μία διπλή της διπλής κορυφή λόγω των γειτονικών του πρωτονίων H₄ (σταθερά σύζευξης ³J=7.9 Hz) και H₂ (με σταθερά σύζευξης ³J=4.8 Hz).

3.5. Σύνθεση του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 47)

3.5.1. Αντίδραση σύνθεσης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 47)

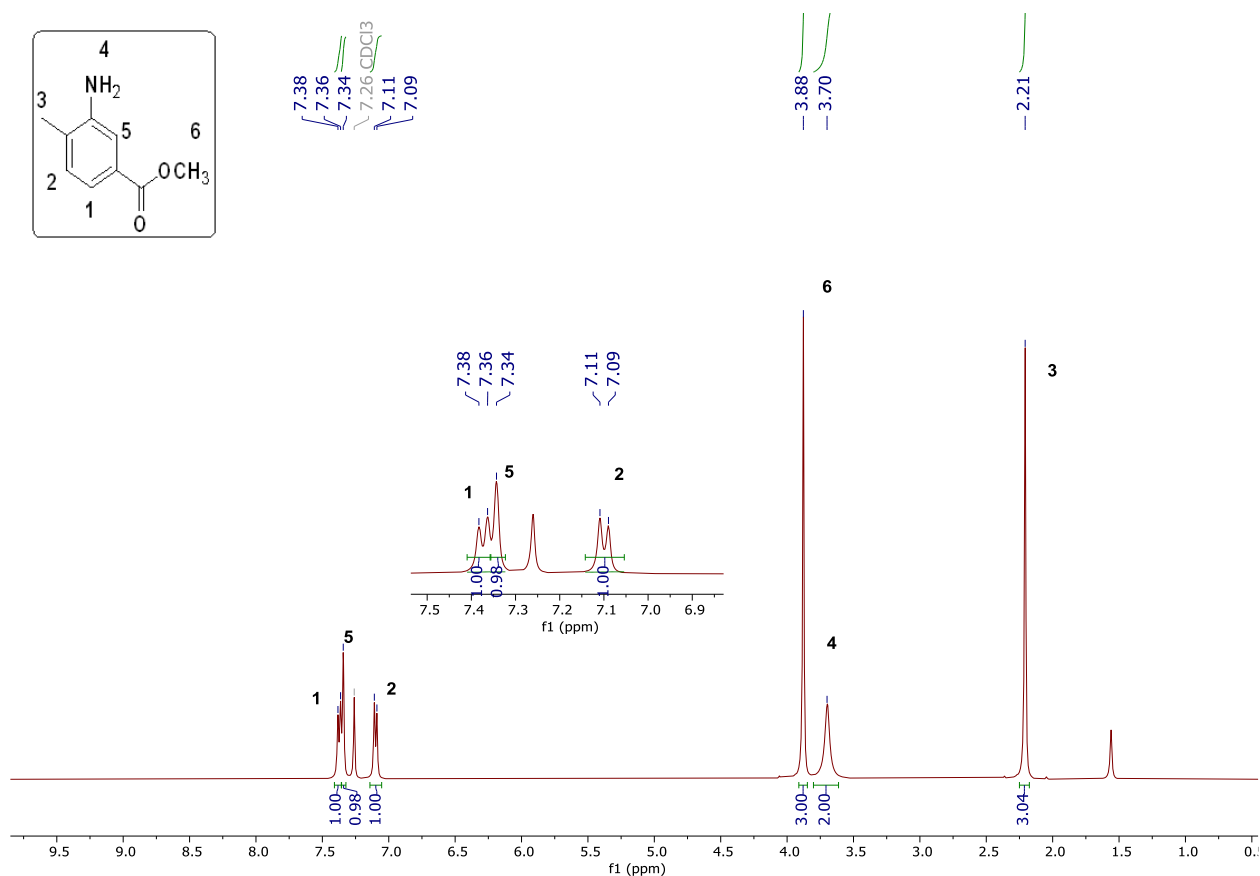
Σε ένα επόμενο στάδιο ακολουθεί η σύνθεση του υποκατεστημένου μεθυλεστέρα μέσω μιας αντίδρασης εστεροποίησης κατά Fischer, η οποία αποσκοπεί στην προστασία της καρβοξυλαμάδας για αποφυγή τυχόν παράπλευρων αντιδράσεων κατά τα επόμενα στάδια. Η συγκεκριμένη αντίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού οξέος **45** και περίσσειας μεθανόλης, με την επίδραση πυκνού H₂SO₄ ως καταλύτη. Μετά τη προσθήκη του καταλύτη, αυξάνεται η θερμοκρασία στους 65 °C. Η μεθανόλη εδώ έχει διπλό ρόλο, δρα, δηλαδή, και ως αντιδραστήριο και ως διαλύτης.



Σχήμα 3.19. Αντίδραση σύνθεσης του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση **47**).

Ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση της ένωσης **47** είναι ο κλασικός μηχανισμός εστεροποίησης κατά Fischer.

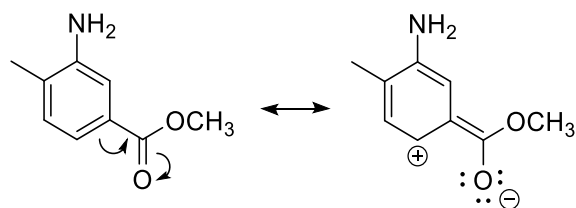
3.5.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 47)



Εικόνα 3.2. ^1H -NMR της ένωσης **47** σε διαλύτη CDCl_3 στα 400 MHz.

Σύμφωνα με το φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **47**, τα πιο προστατευμένα πρωτόνια είναι εκείνα της μεθυλομάδας H_3 , τα οποία εντοπίζονται στα 2.21 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3. Ακολούθως, τα δύο πρωτόνια της αμινομάδας H_4 εμφανίζονται στα 3.70 ppm ως μια απλή ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 2, ενώ ως απλή οξεία κορυφή στα 3.88 ppm με ολοκλήρωση 3 εμφανίζονται τα τρία πρωτόνια H_6 της μεθοξυ-ομάδας.

Στη συνέχεια, στην αρωματική περιοχή παρατηρείται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 στα 7.11 ppm ως μια διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1, λόγω της σχάσης από το γειτονικό του H_1 με σταθερά σύζευξης $^3J=7.7$ Hz. Στην ίδια περιοχή και περισσότερο αποπροστατευμένο, στα 7.34 ppm, εντοπίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5 ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 1. Τέλος, το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης είναι το H_1 , το οποίο συντονίζεται στα 7.38 ppm δίνοντας μια διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1. Λόγω σχάσης από το γειτονικό του H_2 , εμφανίζει σταθερά σύζευξης $^3J=7.8$ Hz. Η αποπροστασία του H_1 οφείλεται στο γεγονός ότι ο εστερικός δεσμός αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από την θέση αυτή, όπως εξηγείται και με τις παρακάτω δομές συντονισμού.

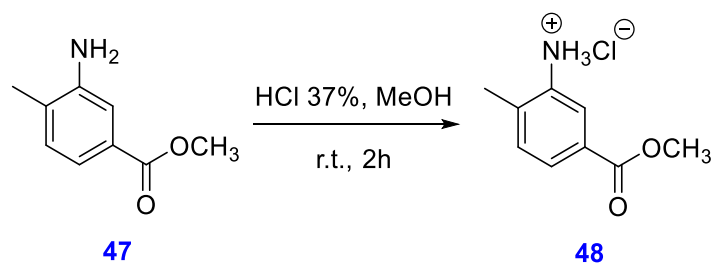


Σχήμα 3.20. Δομές συντονισμού της ένωσης **47** μέσω των οποίων εξηγείται η αποπροστασία του πρωτονίου H₁.

3.6. Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση **48**)

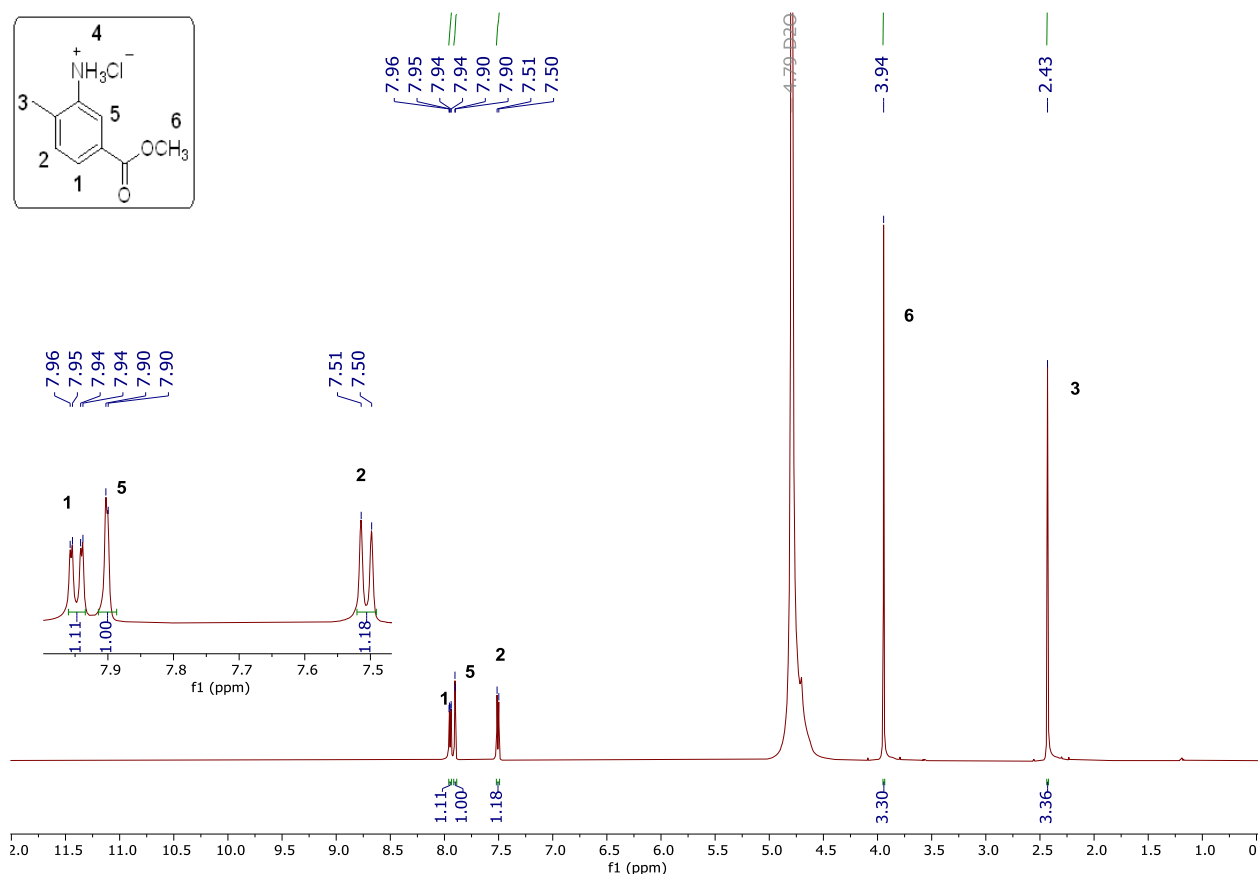
3.6.1. Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση **48**)

Το τρίτο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει τη δημιουργία σχεδόν ποσοτικά (98%) του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης ανιλίνης με την επίδραση HCl 37% στο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό μεθυλεστέρα **47**, παρουσία διαλύτη μεθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου.



Σχήμα 3.21. Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση **48**).

3.6.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 48)



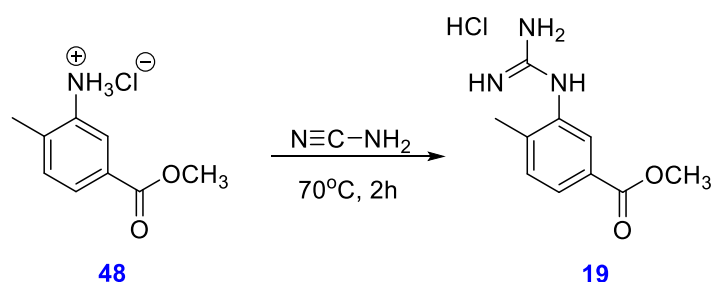
Εικόνα 3.3. ^1H -NMR της ένωσης **48** σε διαλύτη D_2O στα 500 MHz.

Συγκρίνοντας το φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **48** με το αντίστοιχο φάσμα της ένωσης **47**, παρατηρούνται ορισμένες διαφορές ως προς τις μετατοπίσεις των πρωτονίων. Η έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας από το άτομο του αζώτου καθώς με το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του προσβάλλει το πρωτόνιο του HCl , έχει ως αποτέλεσμα την σχετική μετατόπιση των κορυφών των αρωματικών πρωτονίων προς υψηλότερες τιμές ppm. Επιπλέον, καθώς η λήψη του φάσματος έγινε σε διαλύτη D_2O , τα πρωτόνια της ανιλίνης ανταλλάσσονται με δευτέριο D και δεν καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός τους.

3.7. Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης (ένωση 19)

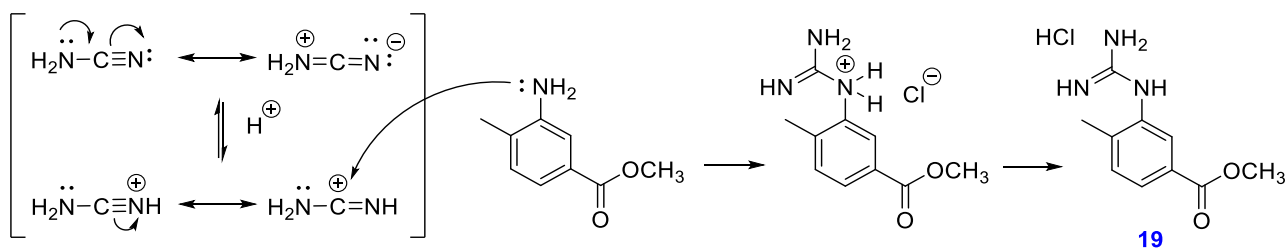
3.7.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης (ένωση 19)

Το αμέσως επόμενο στάδιο μετά τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα **48**, είναι ο σχηματισμός του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης και συγκεκριμένα του υδροχλωρικού άλατος του μεθυλο-3-γουανιδινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα **19**. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα με την επίδραση περίσσειας ποσότητας τηγμένου κυαναμιδίου στο υδροχλωρικό άλας του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα **48**. Το κυαναμίδιο το οποίο έχει διττό ρόλο, δρώντας ως διαλύτης και αντιδραστήριο, αρχικά τήκεται στους 45 °C και, ακολούθως, προστίθεται σε αυτό το υδροχλωρικό άλας ανιλίνης **48**. Με την ολοκλήρωση της προσθήκης, εφαρμόζεται θέρμανση στους 70 °C οδηγώντας στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος σε υψηλή απόδοση 90%.



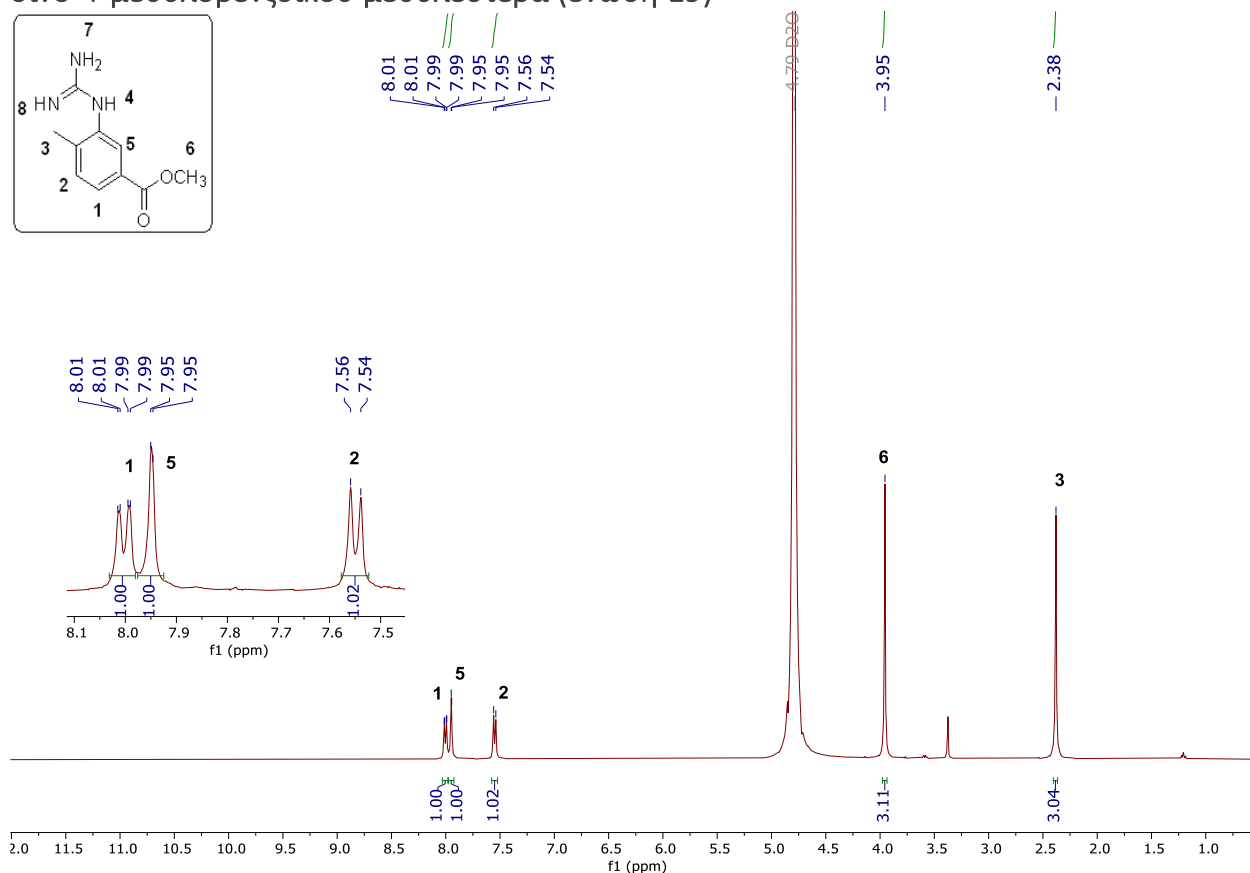
Σχήμα 3.22. Αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης (ένωση **19**).

Στο παρακάτω σχήμα περιγράφεται ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **19**. Ουσιαστικά το επιθυμητό προϊόν προκύπτει μέσω μιας πυρηνόφιλης προσβολής της ανιλίνης στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του κυαναμιδίου.



Σχήμα 3.23. Μηχανισμός κατά τη σύνθεση της ένωσης **19**.

3.7.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του υδροχλωρικού άλατος του μέθυλο 3-γουανιδινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 19)



Εικόνα 3.4. ¹H-NMR της ένωσης **19** σε διαλύτη D₂O στα 400 MHz.

Η λήψη του φάσματος ¹H-NMR της ένωσης **19** έγινε σε διαλύτη D₂O, όπου τα πρωτόνια της γουανιδίνης ανταλλάσσονται με δευτέριο D, με αποτέλεσμα να μην καθίσταται δυνατός ο εντοπισμός τους στο εν λόγω φάσμα. Επιπλέον, παρατηρείται μια σχετική μετατόπιση των αρωματικών πρωτονίων σε σχέση με το φάσμα της ένωσης **48**.

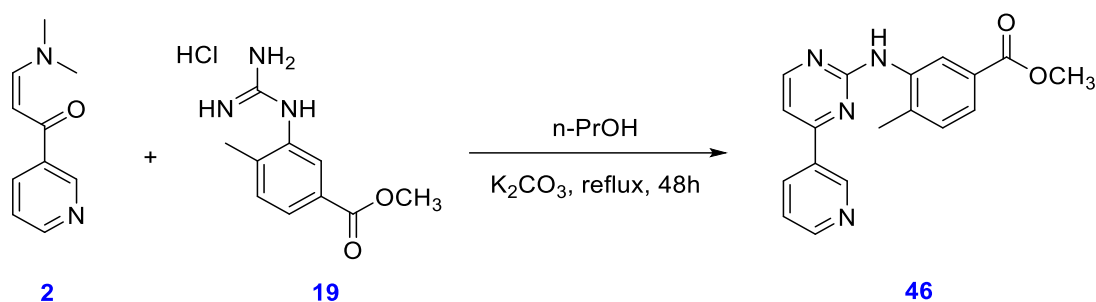
3.8. Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 46)

3.8.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 46)

Στο αμέσως επόμενο στάδιο λαμβάνει χώρα μια αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ της ε-ναμινόνης **2** και του υδροχλωρικού άλατος της υποκατεστημένης φαινυλογουανιδίνης **19** προς σχηματισμό του κυκλοποιημένου προϊόντος **46**. Ο σχηματισμός του πυριμιδινικού δακτυλίου αποτελεί τον πυρήνα του μορίου του Nilotinib, μέσω του οποίου ο αναστολέας

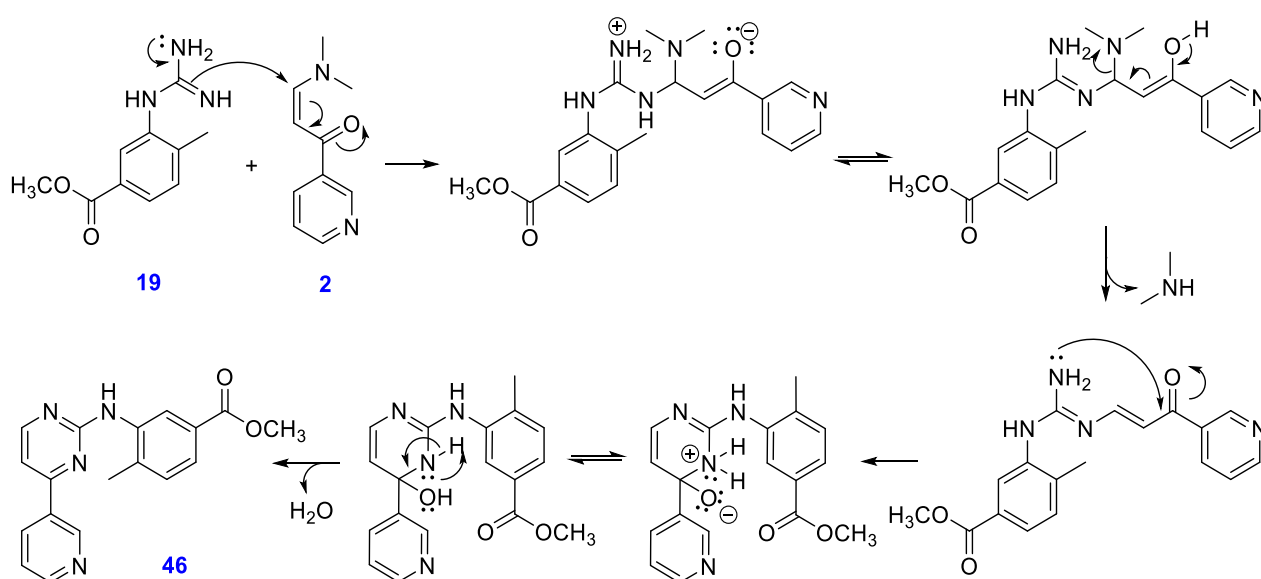
προσδένεται ισχυρά στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης. Ως εκ τούτου, αποτελεί το καθοριστικό βήμα για την μετέπειτα σύνθεση των αναλόγων του.

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα παρουσία διαλύτη 1-προπανόλη, υπό θέρμανση και ατμόσφαιρα αζώτου με την επίδραση περίσσειας βάσης ανθρακικού καλίου, προκειμένου να εξουδετερωθεί το υδροχλωρικό άλας. Επιπλέον, η χρήση της συγκεκριμένης ανόργανης βάσης συγκριτικά με κάποια άλλη ισχυρότερη παρεμποδίζει τον σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων που οφείλονται στην αποπρωτονίωση του όξινου αμινικού πρωτονίου.



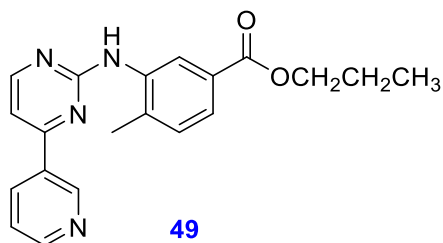
Σχήμα 3.24. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **46**.

Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού του επιθυμητού πυριμιδινικού δακτυλίου. Αρχικά ο μηχανισμός ξεκινά με μία πυρηνόφιλη προσβολή από την υποκατεστημένη φαινυλογουανιδίνη **19** στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της α,β-ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης **2**, η οποία ακολουθείται από την απώλεια ενός μορίου διμεθυλαμίνης. Στη συνέχεια συμβαίνει άλλη μία ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων της αμινομάδας στον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα που οδηγεί στο κυκλοποιημένο ενδιάμεσο, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί, με την απώλεια ενός μορίου νερού, στον επιθυμητό σταθερό πυριμιδινικό δακτύλιο της ένωσης **46**.

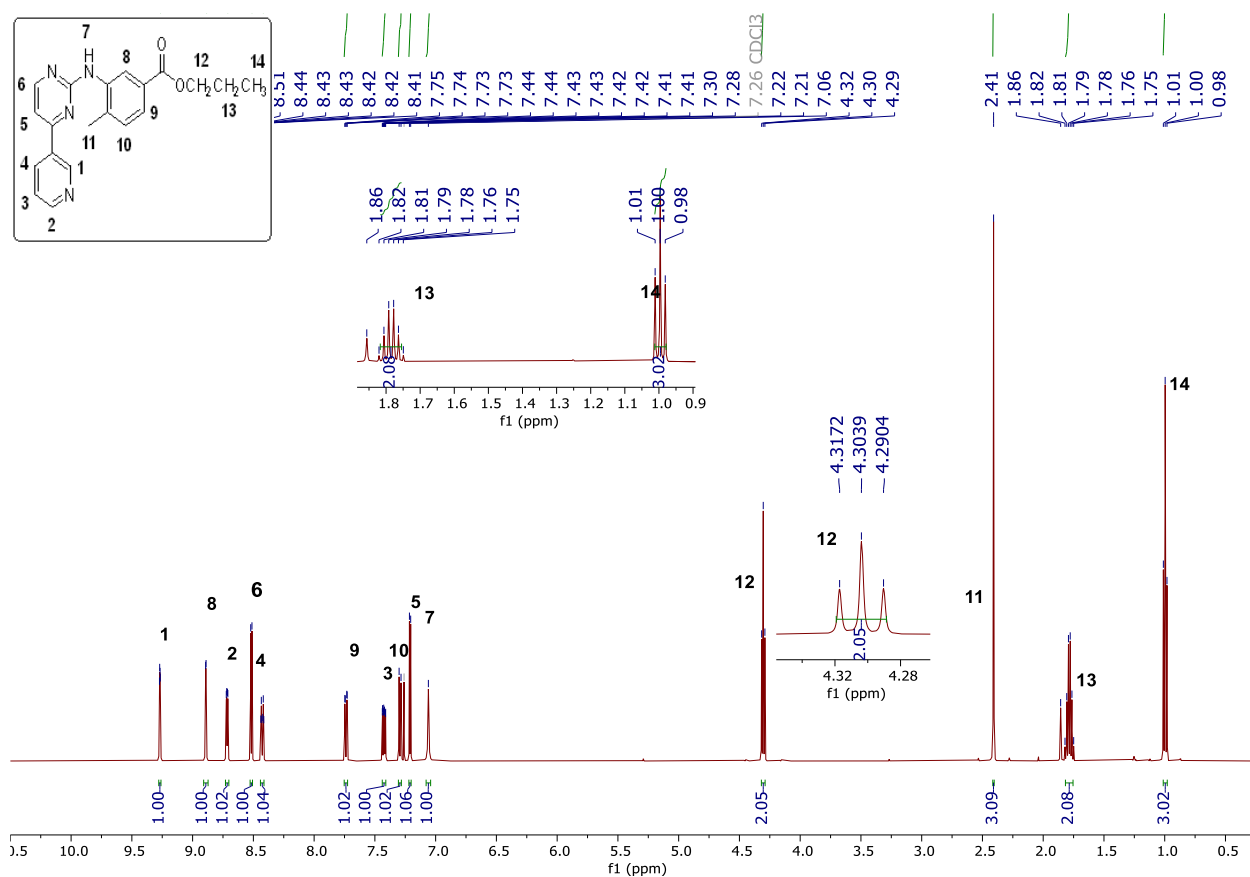


Σχήμα 3.25. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση της ένωσης **46**.

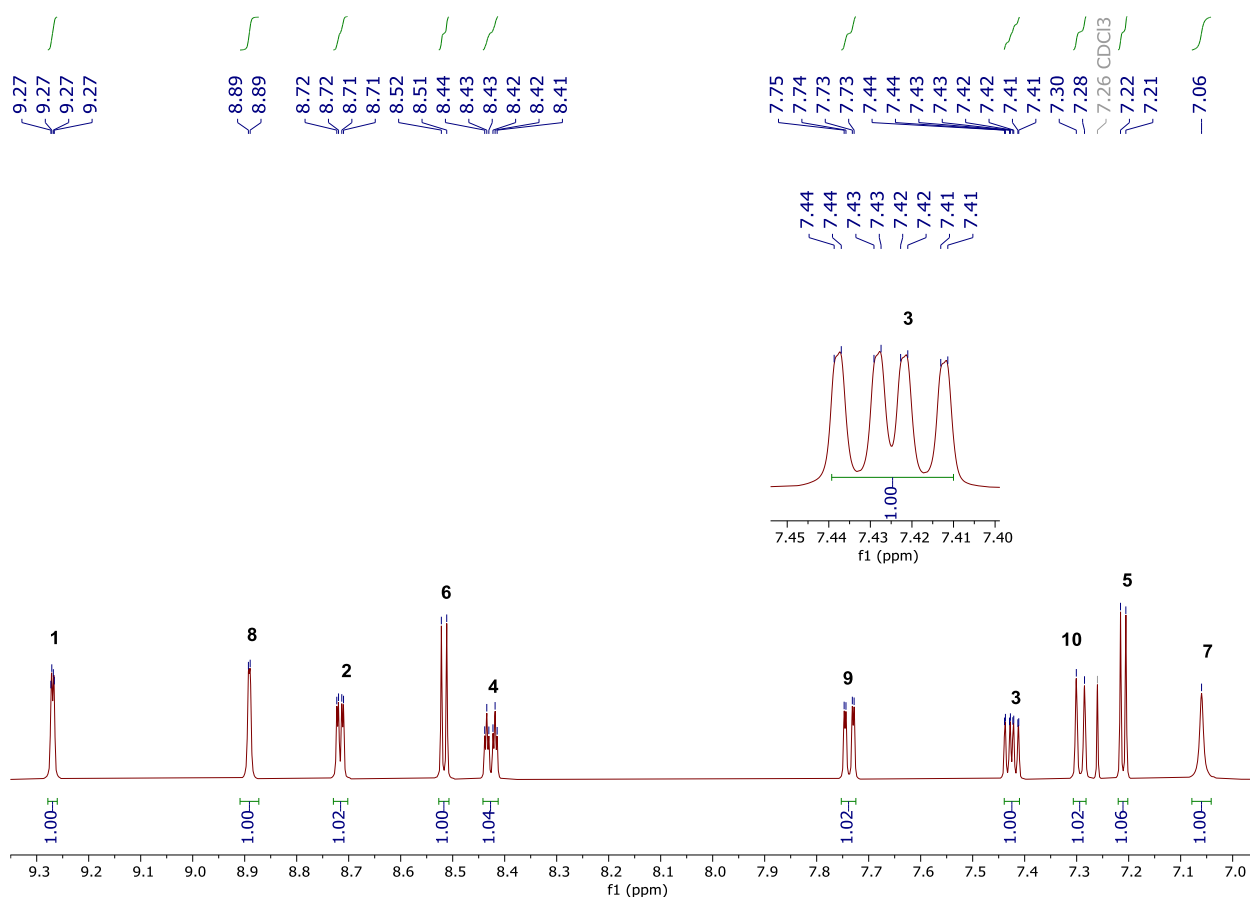
Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί πως, λόγω της χρήσης της 1-προπανόλη ως διαλύτη, ως κύριο προϊόν λήφθηκε ο 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκός προπυλεστέρας (ένωση **49**) με απόδοση 46% αντί για τον επιθυμητό μεθυλεστέρα **46** που η απόδοση με την οποία ανακτήθηκε ήταν μόλις 23%.



3.8.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού προπυλεστέρα (ένωση **49**)

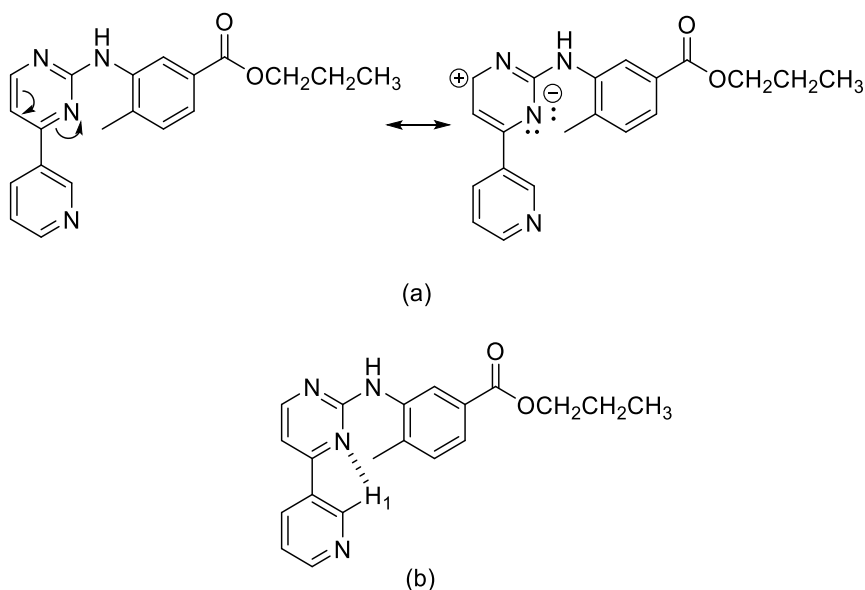


Εικόνα 3.5. ¹H-NMR της ένωσης **49** σε διαλύτη CDCl₃ στα 500 MHz.



Εικόνα 3.6. Εστίαση στην αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H -NMR της ένωσης **49**.

Από το φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **49** προκύπτει με σαφήνεια ο σχηματισμός του πυριμιδινικού δακτυλίου. Οι κορυφές των πρωτονίων H_6 και H_5 του εν λόγω δακτυλίου εντοπίζονται με ολοκλήρωση 1, ως διπλές κορυφές στα 8.52 ppm και στα 7.22 ppm, αντίστοιχα, προκαλώντας σχάση το ένα στο άλλο με σταθερά σύζευξης $^3J=5.1$ Hz. Η προστασία του H_5 σε σχέση με το H_6 οφείλεται στο γεγονός ότι το H_6 γειτνιάζει με ένα άτομο αζώτου το οποίο έλκει επαγωγικά ηλεκτρονιακή πυκνότητα, καθώς και στις παρακάτω δομές συντονισμού.



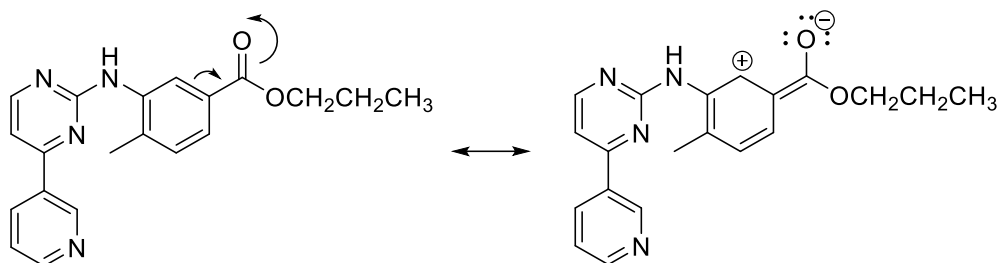
Σχήμα 3.26. α) Δομές συντονισμού μέσω των οποίων εξηγείται η αποπροστασία του H₆ σε σχέση με το H₅. β) Σχηματισμός «ψευδο-δεσμού» μεταξύ του H₁ και του ατόμου αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου που εξηγεί την αποπροστασία του συγκεκριμένου πρωτονίου.

Φαίνεται πως το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης είναι το H₁ του πυριμιδινικού δακτυλίου, καθώς βρίσκεται δίπλα σε άτομο αζώτου, ενώ, παράλληλα, σχηματίζει έναν «ψευδο-δεσμό» με το άτομο αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου (σχήμα 3.26 (b)). Συγκεκριμένα το H₁ συντονίζεται στα 9.27 ppm με ολοκλήρωση 1 εμφανίζοντας σχάση μακράς απόστασης από τα H₂ και H₄ με σταθερά σύζευξης $^4J=2.4$ Hz, αλλά και από το H₃ με σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης $^5J=0.9$ Hz. Ως εκ τούτου, εμφανίζεται ως διπλή της διπλής κορυφή. Από την άλλη, το πρωτόνιο H₂, το οποίο γειτνιάζει και αυτό με το άτομο του αζώτου, εμφανίζεται στα 8.72 ppm ως διπλή της διπλής κορυφή με ολοκλήρωση 1, παρουσιάζοντας σχάση λόγω του γειτονικού του H₃ με σταθερά σύζευξης $^3J=4.8$ Hz, καθώς και σχάση μακράς απόστασης λόγω των H₁ και H₄ με σταθερά σύζευξης $^4J=1.7$ Hz. Παράλληλα το H₄ εντοπίζεται στα 8.44 ppm ως διπλή της τριπλής (dt) κορυφή με ολοκλήρωση 1, καθώς σχάζεται από το γειτονικό του H₃ με $^3J=8.0$ Hz αλλά και από τα πρωτόνια H₁ και H₂ με σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης $^4J=2$ Hz. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμφάνιση του H₃ στα 7.44 ppm ως μια διπλή της διπλής διπλή κορυφή (ddd) με ολοκλήρωση 1. Η εμφάνιση των σχάσεων αυτών οφείλεται στην αλληλεπίδραση του πρωτονίου αυτού με τα H₂ και H₄ με τις αντίστοιχες σταθερές σύζευξης που αναφέρονται παραπάνω, καθώς και με το H₁ με σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης $^5J=0.9$ Hz. Είναι φανερό πως η σταθερά σύζευξης $^3J_{H_2-H_3}$ είναι μικρότερη από την $^3J_{H_3-H_4}$. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το H₂ γειτνιάζει με το άτομο του αζώτου, το οποίο του αφαιρεί ηλεκτρονική πυκνότητα.

Στη συνέχεια, ιδιαίτερα αποπροστατευμένο είναι και το H₈, το οποίο εντοπίζεται στα 8.89 ppm με ολοκλήρωση 1 εκδηλώνοντας σχάση μακράς απόστασης λόγω του πρωτονίου H₉ με σταθερά σύζευξης $^4J=1.7$ Hz. Η αποπροστασία του συγκεκριμένου πρωτονίου οφείλεται σε δύο λόγους. Αρχικά, υπάρχει εστερομάδα στη μια διπλανή θέση η οποία αφαιρεί συζυγικά ηλεκτρονική πυκνότητα από τη θέση στην οποία βρίσκεται το H₈, όπως φαίνεται και στο

παρακάτω σχήμα, ενώ στην άλλη διπλανή θέση υπάρχει δευτεροταγές άτομο αζώτου το οποίο έλκει επαγωγικά ηλεκτρονική πυκνότητα οδηγώντας έτσι σε περαιτέρω αποπροστασία του συγκεκριμένου πρωτονίου. Παράλληλα, τα πρωτόνια H_9 και H_{10} εντοπίζονται στα 7.75 ppm και 7.30 ppm, αντίστοιχα, με ολοκλήρωση 1 εκδηλώνοντας σχάση μεταξύ τους με $^3J=7.9$ Hz. Παρόλα αυτά, το H_9 παρουσιάζει και σχάση μακράς απόστασης από το H_8 με σταθερά σύζευξης $^4J=1.7$ Hz και γι αυτό εμφανίζεται ως διπλή της διπλής κορυφή, σε αντίθεση με το H_{10} που εμφανίζεται απλά ως διπλή κορυφή. Ο λόγος που το H_9 είναι περισσότερο αποπροστατευμένο από το H_{10} είναι διότι το πρώτο βρίσκεται δίπλα σε εστερικό δεσμό ενώ το δεύτερο δίπλα σε μεθυλομάδα, η οποία προσφέρει επαγωγικά ηλεκτρονική πυκνότητα στη θέση του H_{10} . Τα τρία πρωτόνια της μεθυλομάδας H_{11} εμφανίζονται ως μία απλή οξεία κορυφή στα 2.41 ppm με ολοκλήρωση 3.

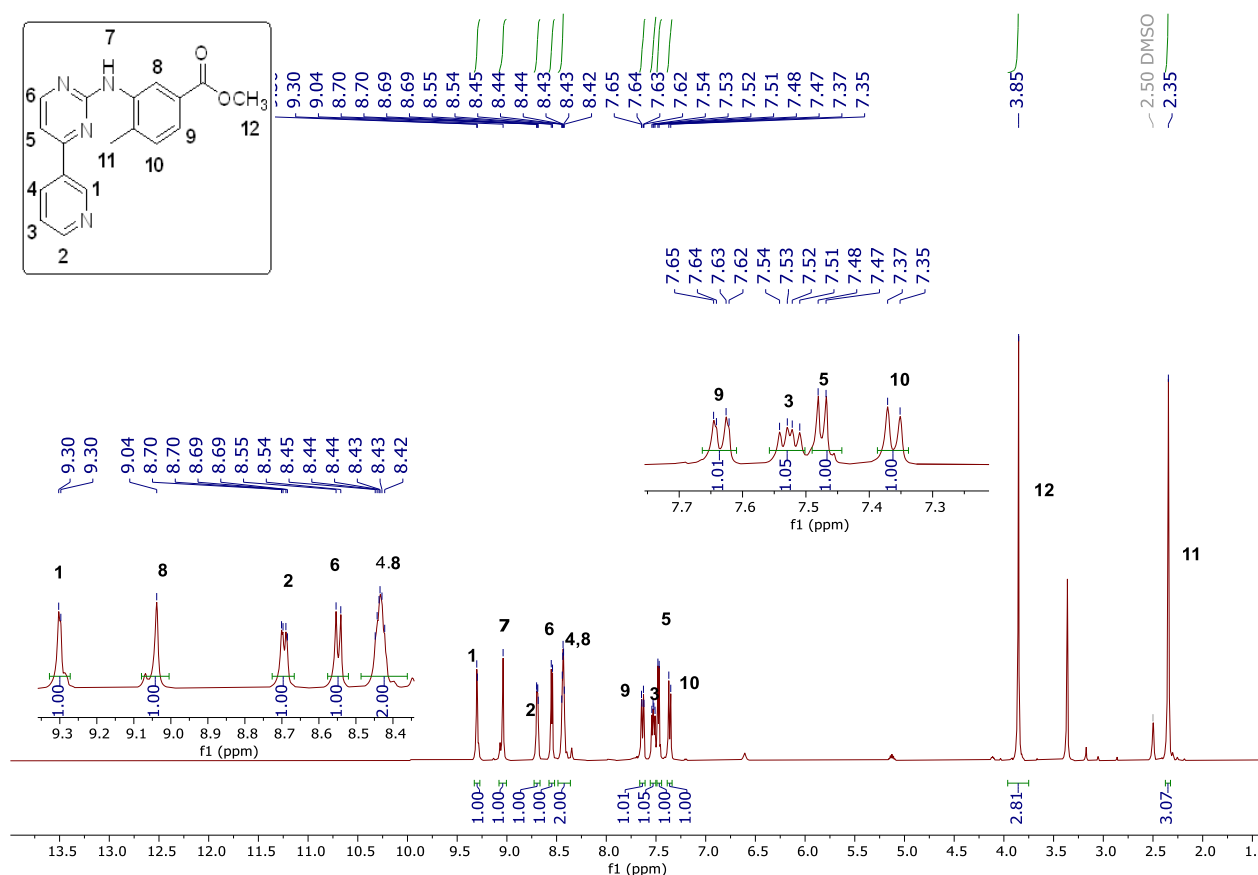
Ακόμη, το πρωτόνιο H_7 του δευτεροταγούς ατόμου αζώτου σε διαλύτη $CDCl_3$ εμφανίζεται ως μια σχετικά ευρεία απλή κορυφή στα 7.06 ppm με ολοκλήρωση 1.



Σχήμα 3.27. Δομές συντονισμού μέσω των οποίων εξηγείται η αποπροστασία του H_8 .

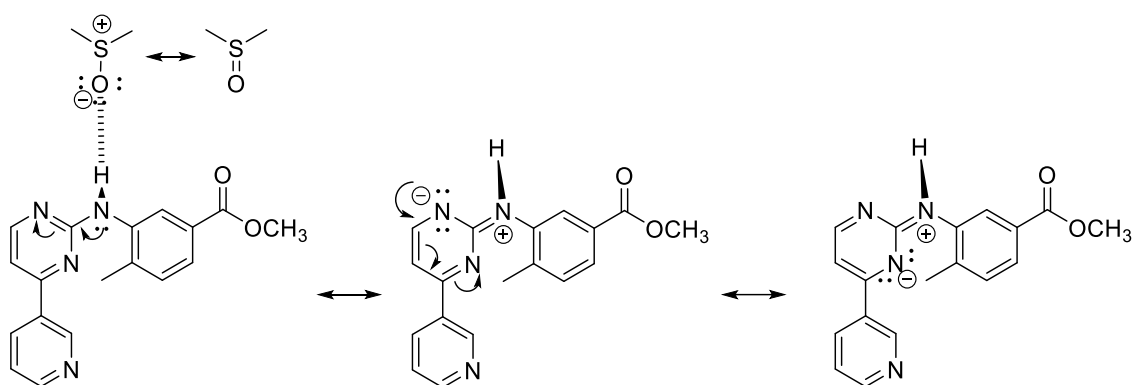
Όπως αναμένεται, τα πρωτόνια του προπυλεστέρα εμφανίζονται στην αλειφατική περιοχή. Συγκεκριμένα τα δύο πρωτόνια H_{12} εμφανίζονται στα 4.30 ppm με ολοκλήρωση 2 ως μια τριπλή κορυφή λόγω σχάσης από τα γειτονικά H_{13} με σταθερά σύζευξης $^3J=6.7$ Hz, ενώ τα H_{13} εντοπίζονται ως μία πολλαπλή (εξαπλή) κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 1.82 ppm παρουσιάζοντας σχάση με σταθερά σύζευξης $^3J=7.2$ Hz λόγω των γειτονικών H_{12} και H_{14} . Τέλος, στα 1.00 ppm εντοπίζονται τα τρία πρωτόνια της μεθυλομάδας H_{14} ως μια τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $^3J=7.4$ Hz και με ολοκλήρωση 3 λόγω των δύο ισοδύναμων πρωτονίων H_{13} .

3.8.3. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού μεθυλεστέρα (ένωση 46)



Εικόνα 3.7. ^1H -NMR της ένωσης **46** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

Συγκρίνοντας τα δύο φάσματα, είναι φανερό πως στο φάσμα του υποκατεστημένου μεθυλεστέρα δεν υπάρχουν οι κορυφές που αντιστοιχούν στην προπυλομάδα του εστέρα, ενώ εντοπίζεται μόνο εκείνη της μεθοξυ-ομάδας στα 3.85 ppm με ολοκλήρωση 3. Εξαιρουμένου της κορυφής που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H_7 , όλες οι υπόλοιπες κορυφές έχουν αναλυθεί και στην προηγούμενο παράγραφο με μια σχετική μετατόπιση, όπως αναμένεται. Αξιοσημείωτη είναι η μετατόπιση του πρωτονίου H_7 από τα 7.06 ppm στα 9.04 ppm λόγω του ότι η λήψη του φάσματος ^1H -NMR έγινε σε διαλύτη DMSO . Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα το DMSO , ως πολικός μη πρωτικός διαλύτης, δρα ως δέκτης δεσμού υδρογόνου και αλληλεπιδρά με το πρωτόνιο H_7 , πολώνοντας έτσι το δεσμό N-H_7 , αφαιρώντας του ηλεκτρονιακή πυκνότητα και οδηγώντας στην αποπροστασία του συγκεκριμένου πρωτονίου. Παράλληλα, το μονήρες ζεύγος του αζώτου απεντοπίζεται μέσω συντονισμού προς τον πυριμιδινικό δακτύλιο με αποτέλεσμα το H_7 να αποπροστατεύεται περαιτέρω (σχήμα 3.28).



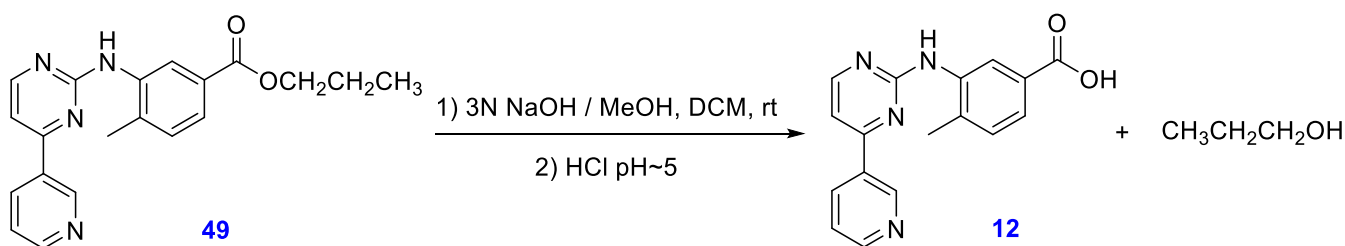
Σχήμα 3.28. Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία του το H₇ και αλληλεπίδραση του πρωτονίου αυτού με τον διαλύτη, ο οποίος δρα ως δέκτης δεσμού υδρογόνου.

3.9. Σύνθεση του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος (ένωση 12)

3.9.1. Αντίδραση σύνθεσης του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος (ένωση 12)

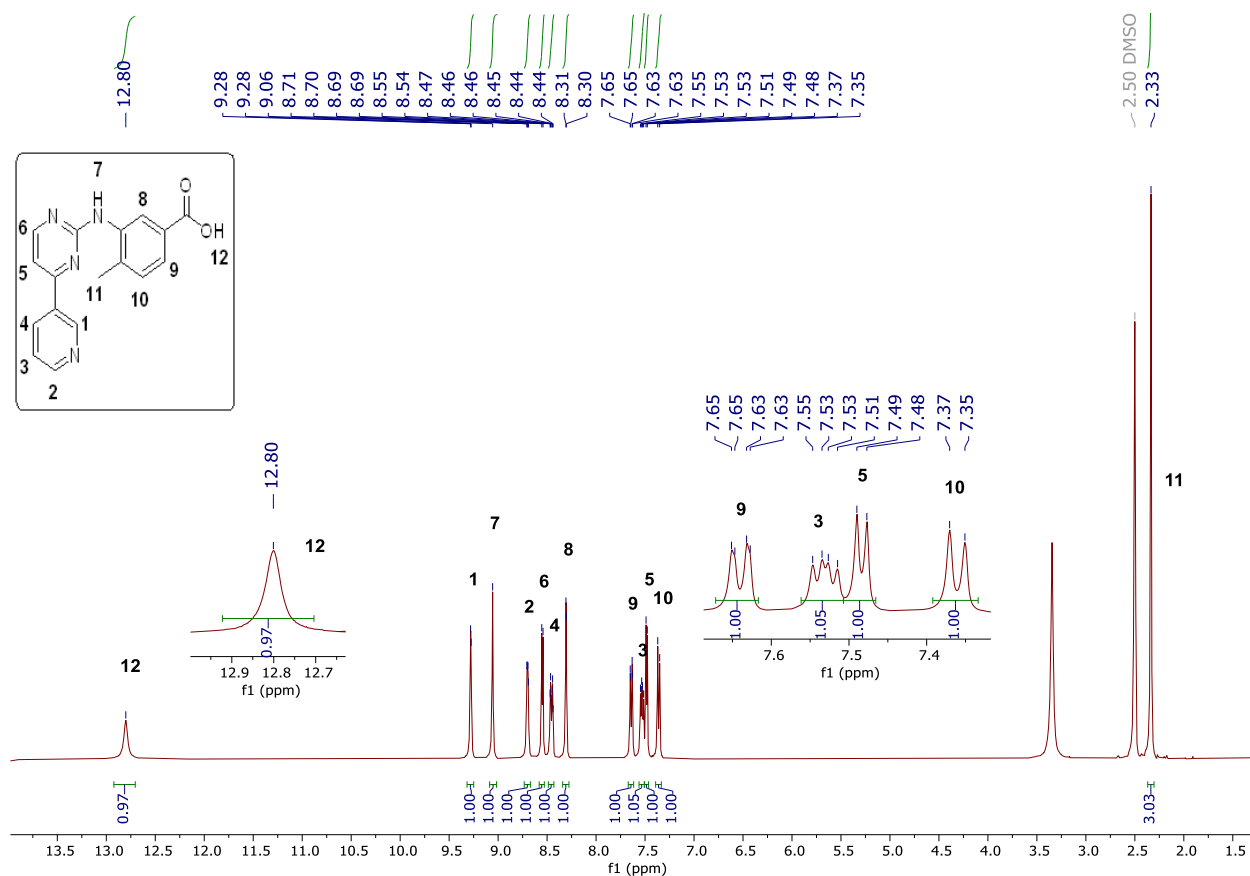
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την αλκαλική υδρόλυση του υποκατεστημένου προπυλεστέρα απουσία υδατικού διαλύματος. Συγκεκριμένα, η υδρόλυση λαμβάνει χώρα παρουσία μεθανολικού διαλύματος NaOH 3N σε διαλύτη MeOH : DCM (1:9) οδηγώντας στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος σε εξαιρετική απόδοση 90%. Η μέθοδος αυτή υπερτερεί ως προς την κλασική σαπωνοποίηση που γίνεται παρουσία υδατικού διαλύματος διότι δεν παρατηρείται ρακεμοποίηση, ισομερισμός ή άλλες ανεπιθύμητες αντιδράσεις που ενδεχομένως να οδηγούσαν σε παραπροϊόντα. Επιπροσθέτως, είναι ανάγκη να επισημανθεί πως η αντίδραση δεν απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες ή έκθεση σε ακραίες τιμές pH.⁹⁵

Σε ένα επόμενο βήμα, ακολουθεί οξίνιση του μετά νατρίου άλατος προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ **12** με υδατικό διάλυμα 2N HCl.



Σχήμα 3.29. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **12**.

3.9.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του του 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκού οξέος (ένωση 12)



Εικόνα 3.8. ¹H-NMR της ένωσης **12** σε διαλύτη DMSO-d₆ στα 400 MHz.

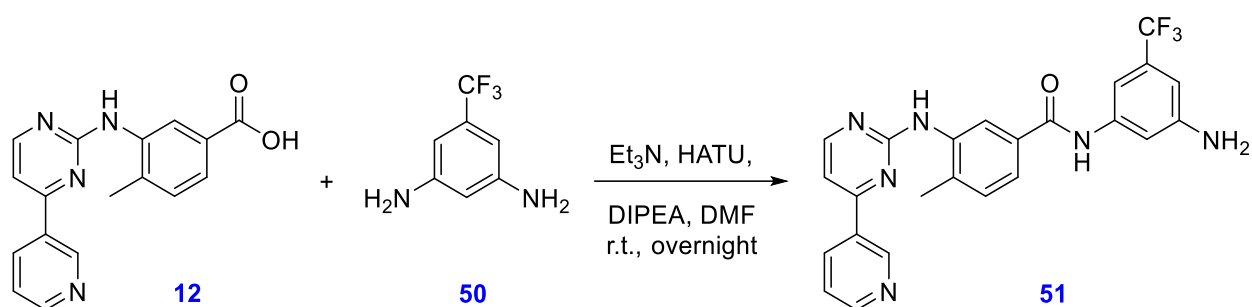
Σύμφωνα με το φάσμα ¹H-NMR, γίνεται αντιληπτή η σύνθεση της επιθυμητής ένωσης **12**, καθώς δεν εντοπίζονται οι κορυφές της ομάδας του προπυλεστέρα στην αλειφατική περιοχή. Επιπλέον, η νέα κορυφή στα 12.80 ppm με ολοκλήρωση 1 υποδηλώνει πως η αντίδραση υδρόλυσης έχει λάβει χώρα με επιτυχία και έχει οδηγήσει στο σχηματισμό του αντίστοιχου καρβοξυλικού οξέος, καθώς η συγκεκριμένη κορυφή αντιστοιχεί στο καρβοξυλικό πρωτόνιο H₁₂. Οι υπόλοιπες κορυφές της ένωσης έχουν αναλυθεί εκτενώς στα προηγούμενα φάσματα.

3.10. Προσπάθειες σύνθεσης του *N*-(3-αμινο-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμιδίου (ένωση 51)

3.10.1. Σύνθεση της ένωσης 51 με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης

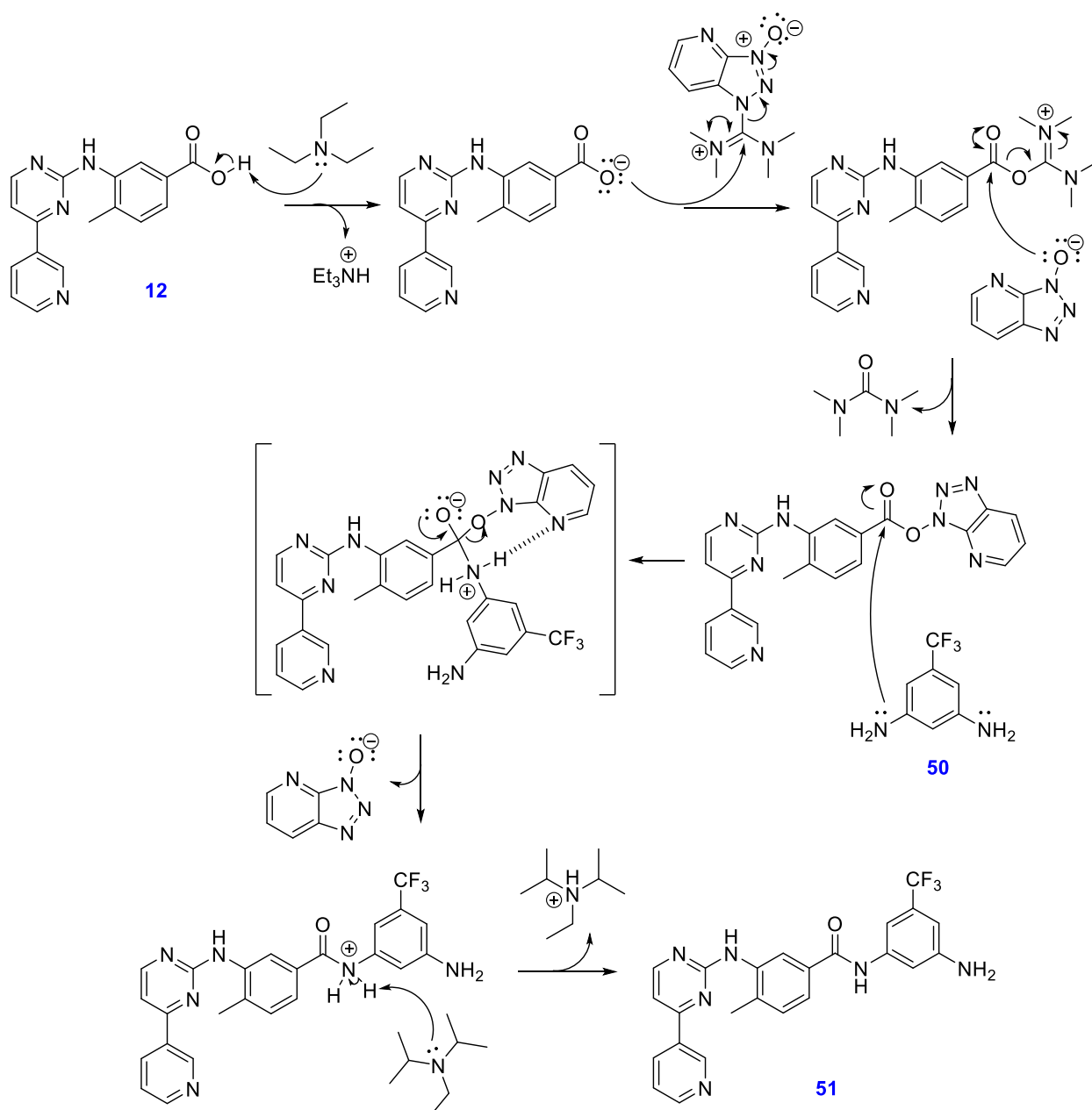
Μια πρώτη προσέγγιση που έγινε για τη σύνθεση της ένωσης **51** περιλαμβάνει τη χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης, συγκεκριμένα του HATU. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε

αδρανείς συνθήκες παρουσία του καρβοξυλικού οξέος σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), τριαιθυλαμίνης και αντιδραστηρίου σύζευξης. Η αντίδραση διενεργήθηκε σε παγόλουτρο στους 0 °C προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος, έγινε προσθήκη του 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50** και βάσης *N,N*-δισοπροπυλοαιθυλαμίνης (DIPEA) για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται σε υψηλή απόδοση (74%).^{79,96}



Σχήμα 3.30. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **51** με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης HATU.

Στο παρακάτω σχήμα αναπαριστάται αναλυτικά ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την ενεργοποίηση του οξέος **12** με το HATU. Η τριαιθυλαμίνη, ως βάση, αποπρωτονώνει το όξινο πρωτόνιο της καρβοξυλομάδας, επιτρέποντας έτσι το ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου να προσβάλει το HATU, απελευθερώνοντας, στη συνέχεια, ένα δυσδιάλυτο μόριο παραγώγου ουρίας. Στη συνέχεια, με την πυρηνόφιλη προσβολή του 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50** στον καρβονυλικό άνθρακα, απομακρύνεται η ογκώδης ομάδα του ενεργοποιημένου εστέρα οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό του επιθυμητού αμιδικού δεσμού.



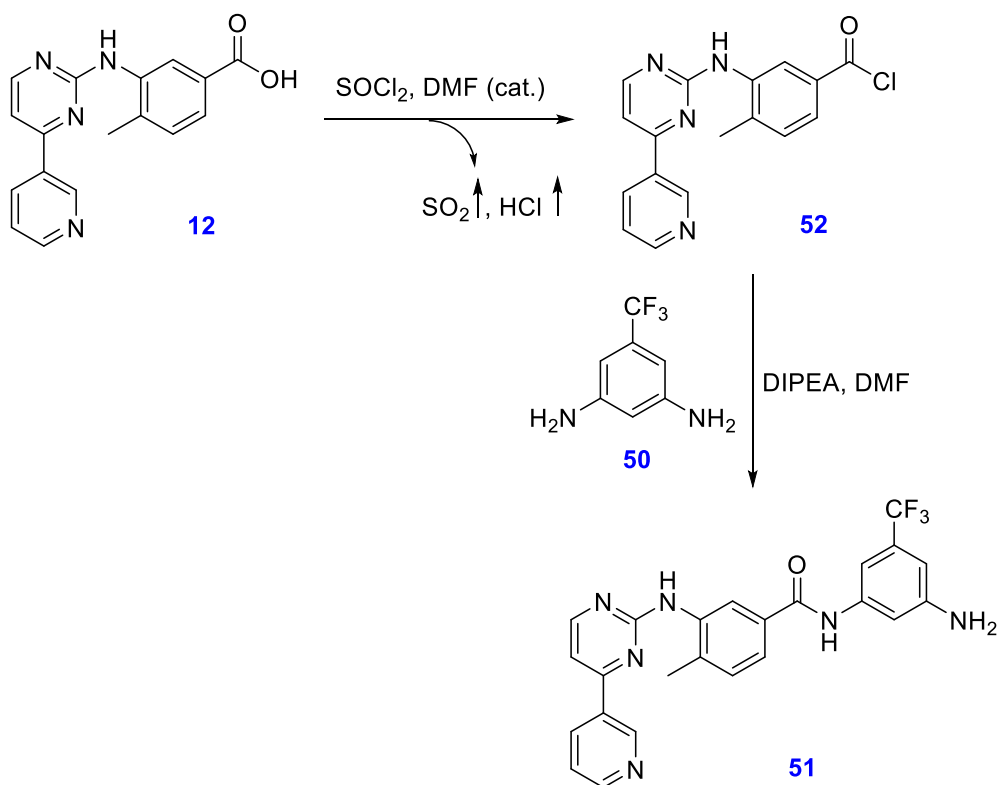
Σχήμα 3.31. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την σύνθεση της ένωσης **51** με αντιδραστήριο σύζευξης HATU.

3.10.2. Σύνθεση της ένωσης **51** με χρήση SOCl_2

Παράλληλα με την προηγούμενη μέθοδο, έγινε προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης **51** και με χρήση άνυδρου θειονυλίου χλωριδίου, SOCl_2 . Η μέθοδος προβλέπει το σχηματισμό χλωριδίου οξέος **52** υπό βρασμό χρησιμοποιώντας καταλυτική ποσότητα DMF. Ταυτόχρονα απελευθερώνεται αέριο SO_2 και HCl . Μετά το σχηματισμό της **52**, η περίσσεια του SOCl_2 απομακρύνεται υπό κενό, ενώ το εναπομείναν χλωρίδιο του οξέος **52** εκπλένεται με άνυδρο διχλωρομεθάνιο. Στη συνέχεια, αφού διαλυθεί σε άνυδρο διαλύτη DMF, γίνεται προσθήκη άνυδρης βάσης DIPEA ώστε να εξουδετερωθεί το παραγόμενο αέριο HCl . Τέλος, το

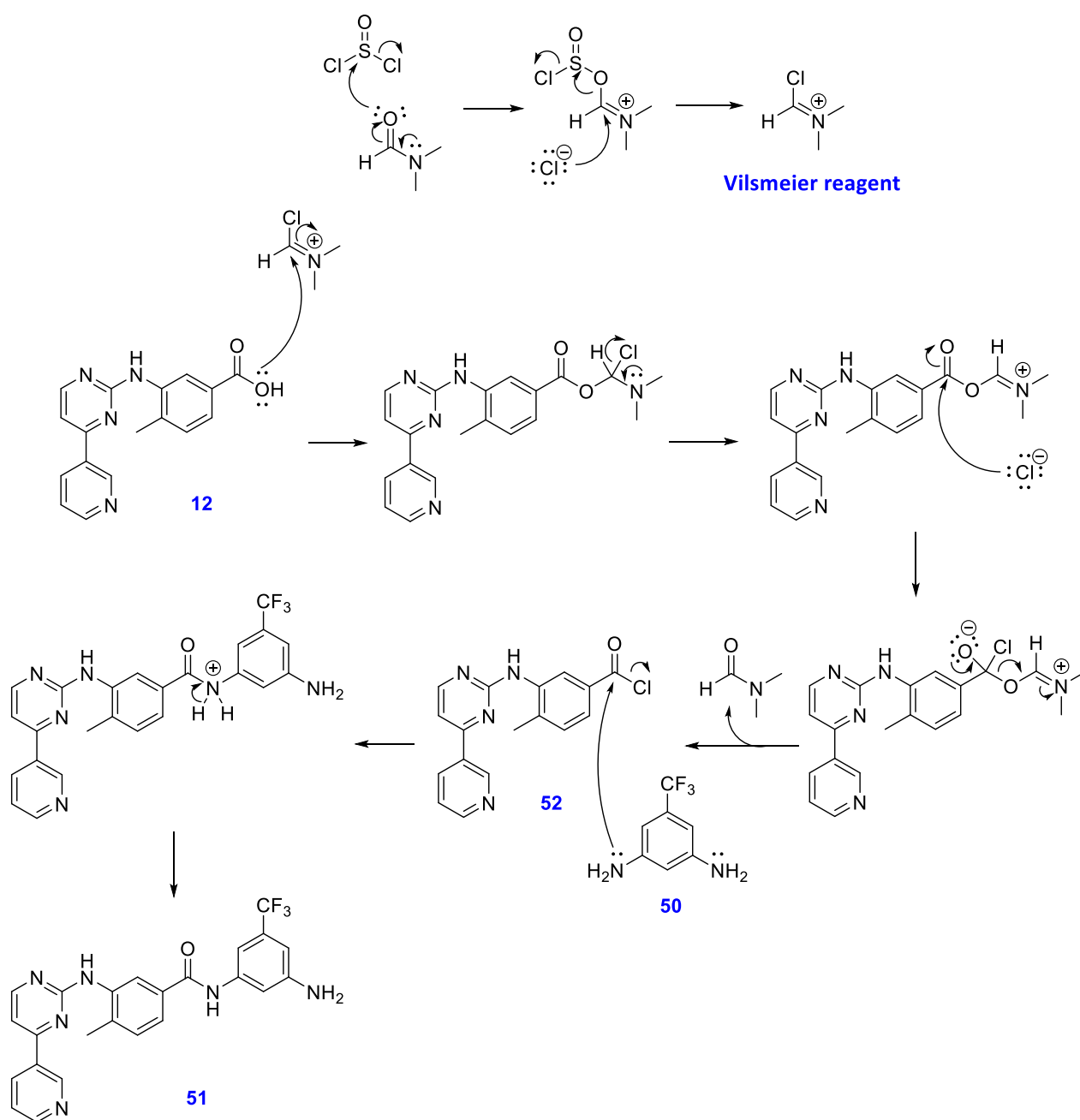
πυρηνόφιλο άτομο αζώτου του 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50** προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα οδηγώντας στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.^{80,97-99}

Με τη μέθοδο αυτή παρατηρούνται μόνο ίχνη σχηματισμού του προϊόντος **51**. Συνεπώς, η πορεία αυτή εγκαταλείφθηκε.



Σχήμα 3.32. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **51** με SOCl_2 .

Το θειόνυλο χλωρίδιο αντιδρά με δευτεροταγή φορμαμίδια και ειδικότερα με το DMF, ώστε να δώσει ιόντα χλωροϊμινίου. Συνεπώς, στον ακόλουθο μηχανισμό, το SOCl_2 αντιδρά με το DMF και ως εκ τούτου σχηματίζεται το αντιδραστήριο Vilsmeier. Πρόκειται για μια ι-διαίτερα δραστική ένωση, η οποία μπορεί να λειτουργήσει καταλυτικά για την μετατροπή του καρβοξυλικού οξέος **12** στο αντίστοιχο χλωρίδιο του οξέος **52**.



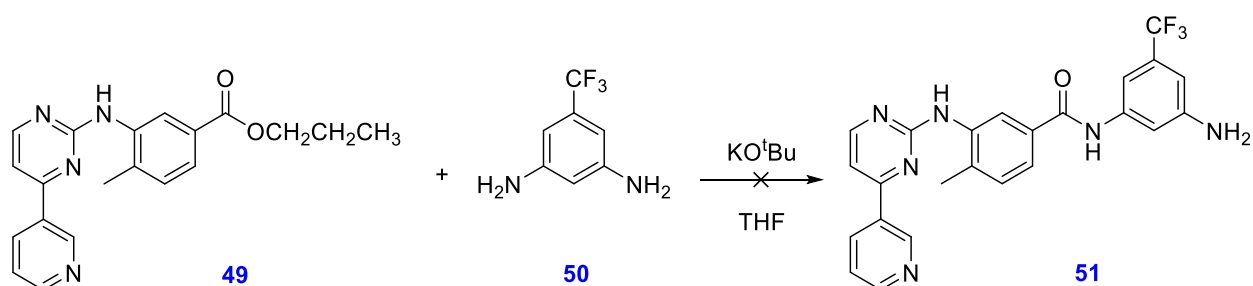
Σχήμα 3.33. Μηχανισμός κατά την σύνθεση της ένωσης **51** με SOCl_2 .

3.10.3. Σύνθεση της ένωσης **51** από εστέρα με χρήση βάσης tert-βουτοξείδιο του καλίου (KO^tBu)

Μια τρίτη προσέγγιση που έγινε για τη σύνθεση της ένωσης **51** ήταν η απευθείας σύζευξη του προπυλεστέρα **49** και της ανιλίνης **50**. Η μέθοδος αυτή προσφέρει τα πλεονεκτήματα της παράλειψης του σταδίου της υδρόλυσης και της ανάγκης ενεργοποίησης του οξέος που απαιτείται στην αρχική πορεία σύνθεσης της Νιλοτινίβης. Ως εκ τούτου, μειώνονται τα έξοδα από τους δαπανηρούς παράγοντες σύζευξης, συντομεύοντας τη συνθετική πορεία του εν λόγω φαρμάκου.

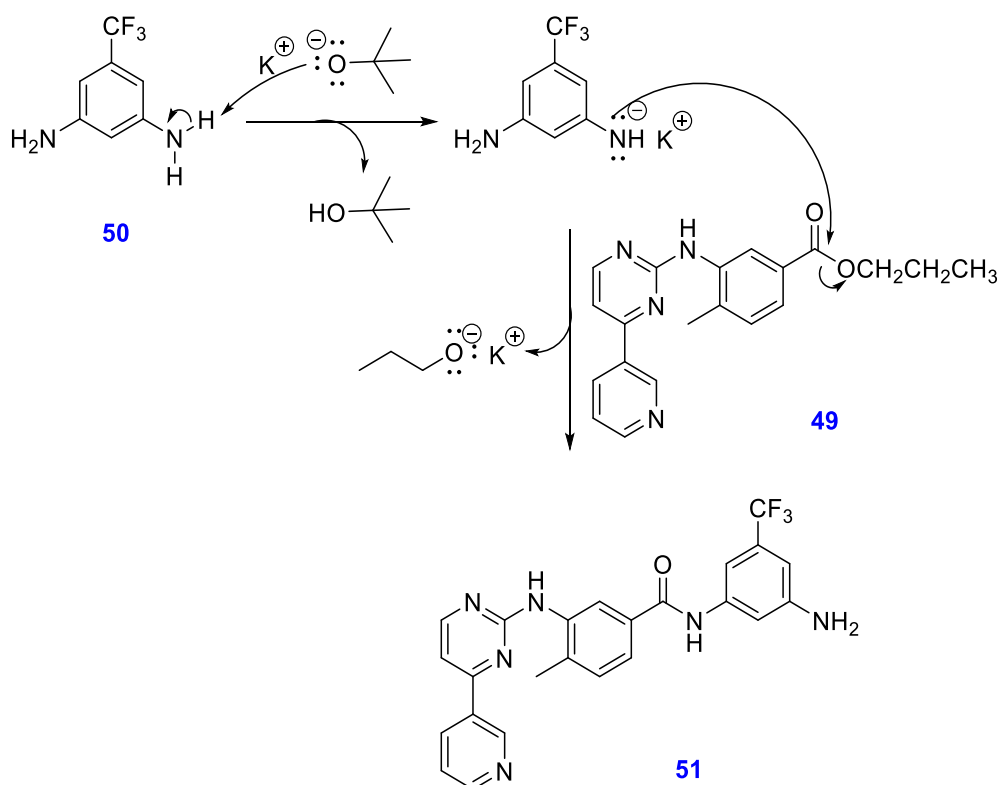
Η μέθοδος περιλαμβάνει την επίδραση του *tert*-βουτοξειδίου του καλίου (KO^tBu) στην ανιλίνη **50** στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου, ακολουθούμενη από στάγδην προσθήκη του υποκατεστημένου προπυλεστέρα **49**.^{79,100,101} Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για έως και 3 ημέρες, χωρίς τελικά να οδηγήσει στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.4, η συγκεκριμένη μέθοδος με τη χρήση του KO^tBu δοκιμάστηκε με τρεις διαφορετικούς τρόπους, χωρίς καμία να αποδώσει στο επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 3.34. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **51** με απευθείας σύζευξη του προπυλεστέρα **49** και της ανιλίνης **50** με χρήση KO^tBu.

Στο ακόλουθο σχήμα αναπαριστάται ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση της ένωσης **51** με απευθείας σύζευξη του προπυλεστέρα **49** και της ανιλίνης **50**. Το KO^tBu δρα ως βάση και αποπρωτονιώνει την ανιλίνη **50**, καθιστώντας την ισχυρότερο πυρηνόφιλο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προσβάλει ευκολότερα τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου, με σκοπό τη δημιουργία του επιθυμητού προϊόντος **51**.

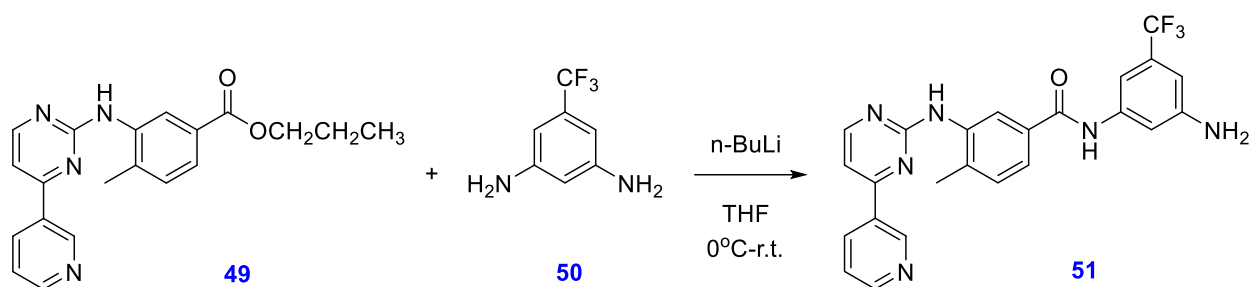


Σχήμα 3.35. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεσης της ένωσης **51** με απευθείας σύζευξη του προπυλεστέρα **49** και της ανιλίνης **50** με χρήση KO^tBu .

3.10.4. Σύνθεση της ένωσης **51** από εστέρα με χρήση βάσης *n*-βουτυλο-λιθίου (*n*-BuLi)

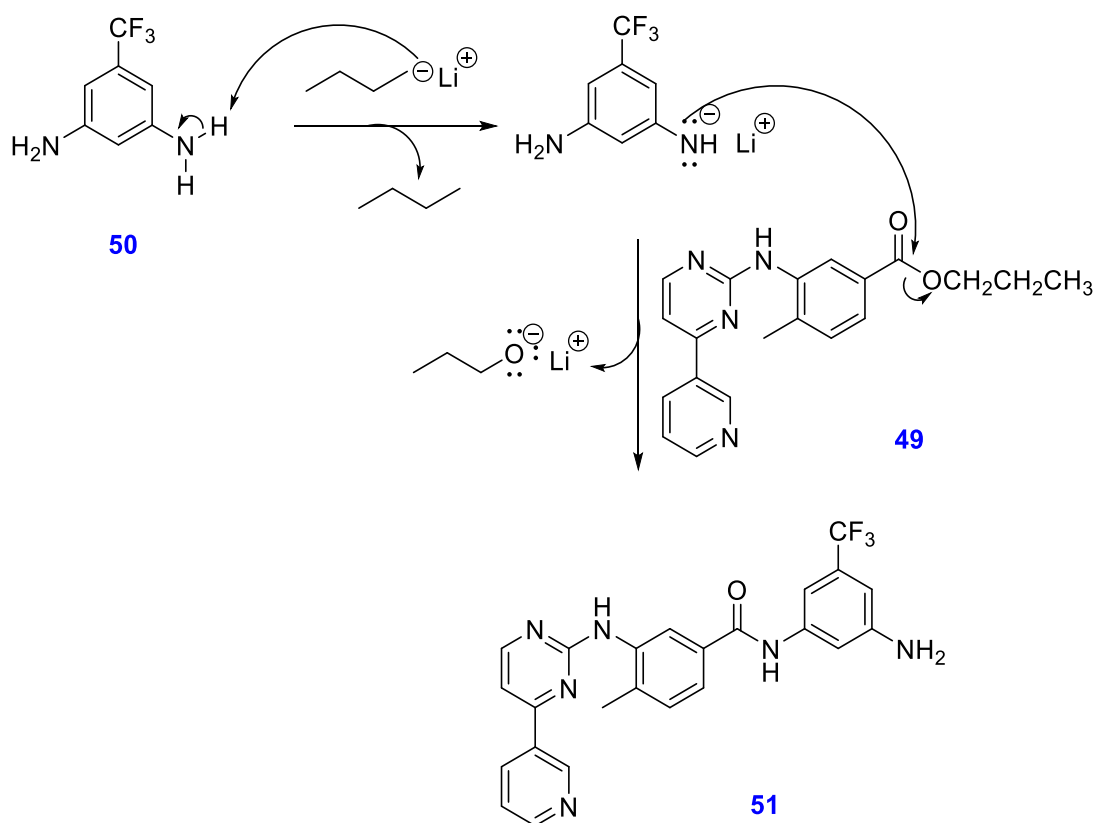
Καθότι η σύνθεση της **51** με χρήση της βάσης *tert*-βουτοξειδίου του καλίου (KO^tBu) απέτυχε, προέκυψε η ανάγκη για μια νέα προσπάθεια σύνθεσης αυτής της ένωσης με μια ισχυρότερη βάση, όπως το *n*-βουτυλο-λίθιο (*n*-BuLi). Ουσιαστικά πρόκειται πάλι για μία απευθείας σύζευξη του προπυλεστέρα **49** και της ανιλίνης **50**, προσφέροντας τα πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Ειδικότερα, η αντίδραση λαμβάνει χώρα με επίδραση του *n*-βουτυλο-λιθίου (*n*-BuLi) στην ανιλίνη **50** στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα αζώτου, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί στάγδην προσθήκη του υποκατεστημένου προπυλεστέρα **49**. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24h.¹⁰² Το επιθυμητό προϊόν δεν ανακτήθηκε με μεγάλη απόδοση όπως θεωρητικά αναμέναμε με τη συγκεκριμένη μέθοδο, αλλά με μόλις 20%.



Σχήμα 3.36. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **51** με απευθείας σύζευξη του προπυλεστέρα **49** και της ανιλίνης **50** με χρήση n-BuLi.

Όπως αναπαριστάται στο ακόλουθο σχήμα, παρόμοια με το KO^tBu , το n-BuLi δρα ως βάση και αποπρωτονιώνει την ανιλίνη **50**, καθιστώντας την ισχυρότερο πυρηνόφιλο ώστε να προσβάλει τον καρβονυλικό άνθρακα του προπυλεστέρα **49**. Ως εκ τούτου, προκύπτει το εν λόγω επιθυμητό προϊόν **51**.

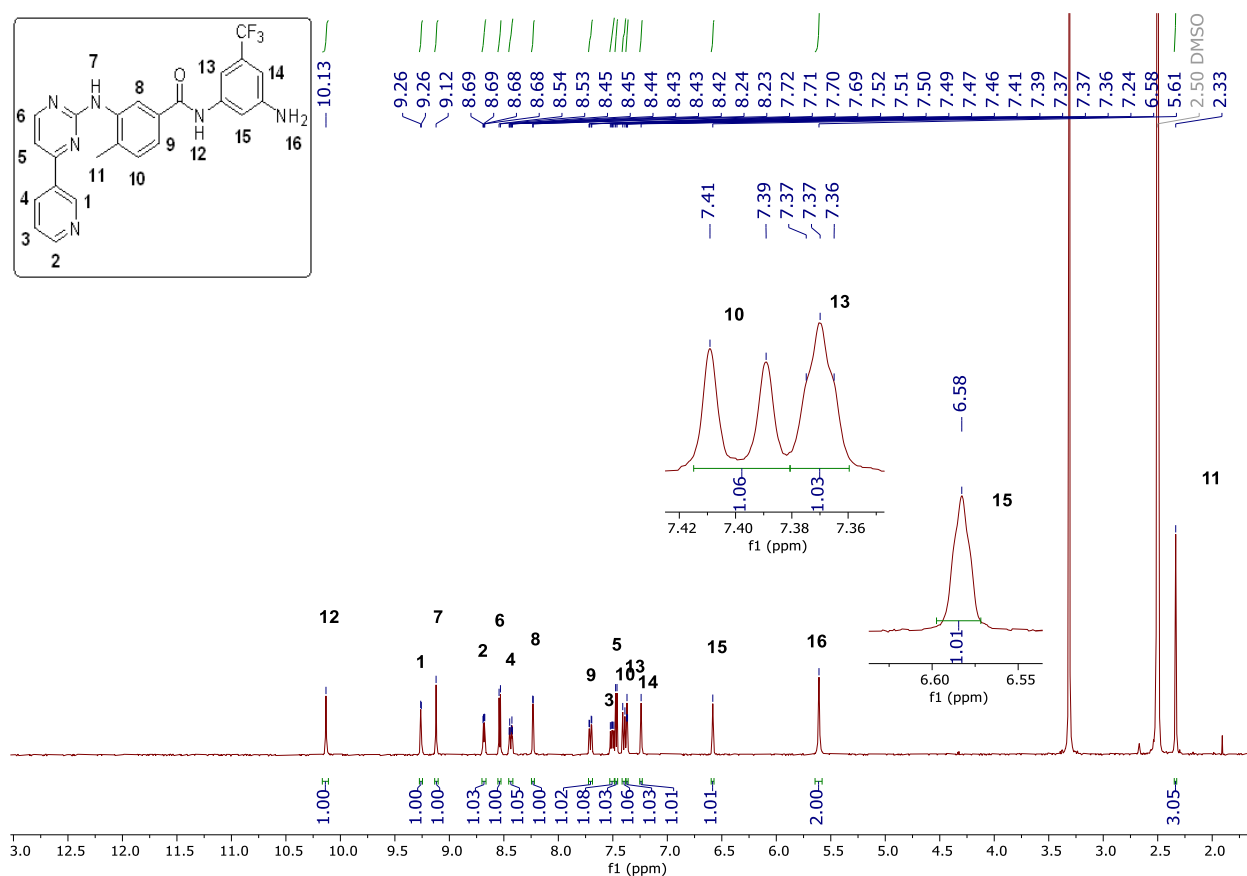


Σχήμα 3.37. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση της ένωσης **51** με απευθείας σύζευξη του προπυλεστέρα **49** και της ανιλίνης **50** με χρήση n-BuLi.

Πείραμα	Οξύ ή εστέρας	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl ₂	Βάση	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	Οξύ 1 eq	1.1 eq	HATU 1.2 eq	Et ₃ N 1.5 eq DIPEA 1.2 eq	Άνυδρο DMF	r.t.	24 h	74%
2	Οξύ 1 eq	1 eq	SOCl ₂ περίσσεια	DIPEA 1 eq	Άνυδρο DMF	r.t. – 80°C	72 h	ίχνη
3	Εστέρας 0.8 eq	1 eq	-	n-BuLi 1.2 eq	Άνυδρο THF	0°C – r.t.	24 h	20%
4	Εστέρας 1 eq	2 eq	-	KO ^t Bu 2 eq	THF	r.t. – 65°C	4 days	-
5	Εστέρας 1 eq	2 eq	-	KO ^t Bu 2 eq	Άνυδρο THF	r.t. – 65°C	4 days	-
6	Εστέρας 1 eq	1.05 eq	-	KO ^t Bu 5.5 eq	Άνυδρο THF	0°C – r.t.	3 days	-

Πίνακας 3.4. Προσπάθειες σύνθεσης της ένωσης **51**.

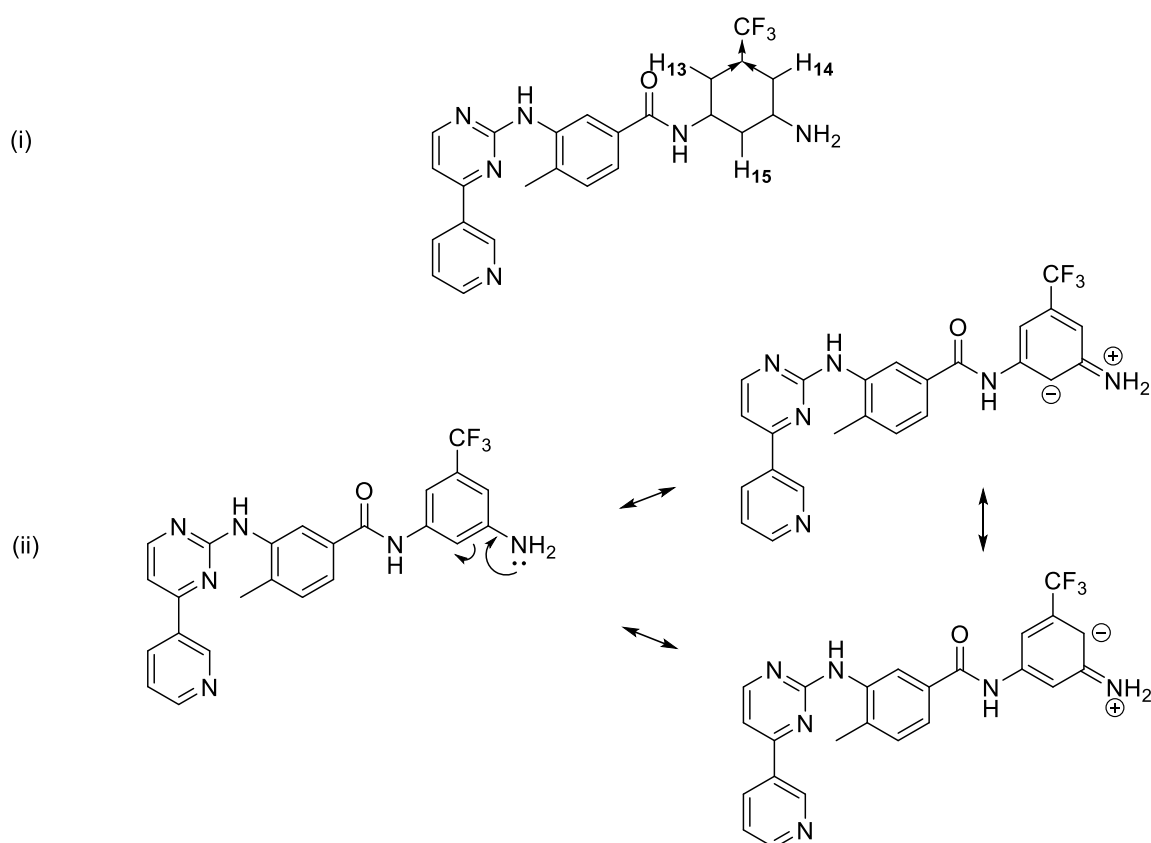
3.10.5. Φασματοσκοπικά δεδομένα του *N*-(3-αμινο-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζαμίδιο (ένωση **51**)



Εικόνα 3.9. ¹H-NMR της ένωσης **51** σε διαλύτη DMSO-d₆ στα 400 MHz.

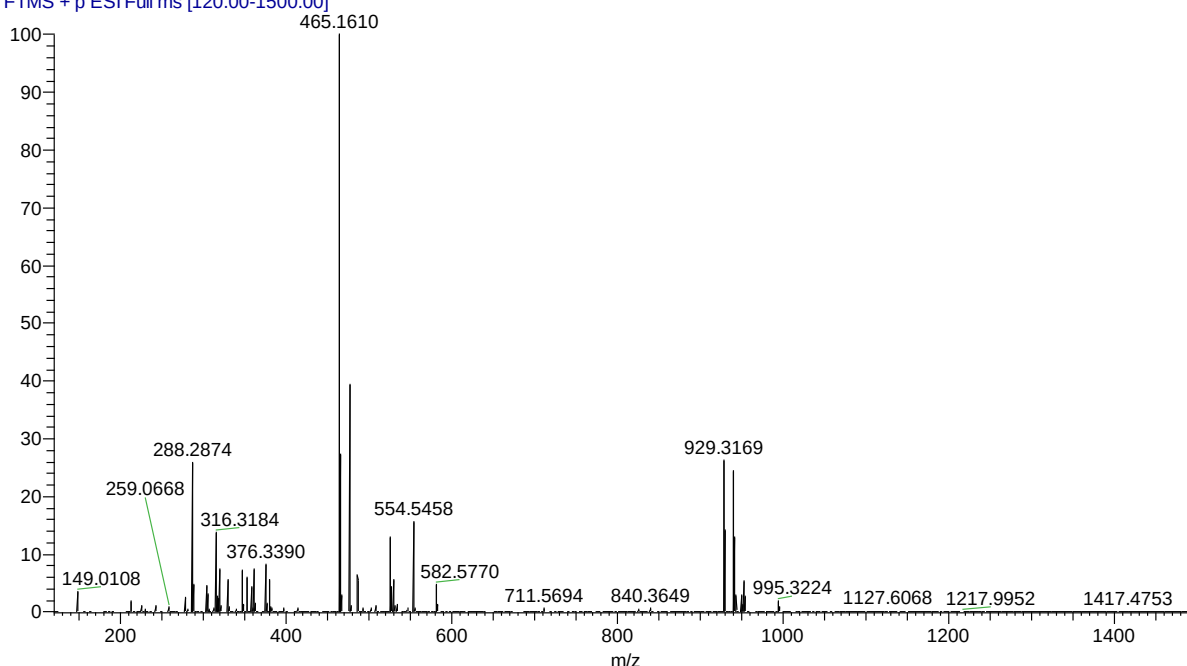
Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που απεικονίζεται στην εικόνα 3.9 προκύπτει πως η επιθυμητή ένωση έχει συντεθεί επιτυχώς, καθώς εντοπίζονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των πρωτονίων της. Αρχικά, η ύπαρξη του αμιδικού πρωτονίου H_{12} ως μια απλή κορυφή στα 10.13 ppm με ολοκλήρωση 1 υποδηλώνει πως η σύζευξη έχει λάβει χώρα. Επιπλέον, εκτός από της υπόλοιπες κορυφές της ένωσης που έχουν αναλυθεί εκτενώς στα φασματοσκοπικά δεδομένα των προηγούμενων ενώσεων, διαπιστώνονται και οι κορυφές των πρωτονίων του 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50**. Συγκεκριμένα, το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 13 εντοπίζεται στα 7.37 ppm με ολοκλήρωση 1 δεχόμενο σχάση μακράς απόστασης από τα πρωτόνια H_{14} και H_{15} με σταθερά σύζευξης $^4J=2$ Hz. Παρόλα αυτά, η σχάση αυτή δεν καθίσταται απολύτως ευδιάκριτη στα 400 MHz όπου έγινε η λήψη του φάσματος. Το -I επαγωγικό φαινόμενο που εμφανίζει η $-\text{CF}_3$ ομάδα είναι ο λόγος για τον οποίο το συγκεκριμένο πρωτόνιο είναι περισσότερο αποπροστατευμένο συγκριτικά με τα υπόλοιπα πρωτόνια του ίδιου δακτυλίου. Παράλληλα τα πρωτόνια H_{14} και H_{15} εντοπίζονται στα 7.24 ppm και στα 6.58 ppm, αντίστοιχα, ως απλές κορυφές με ολοκλήρωση 1. Το θετικό συζυγιακό φαινόμενο **+M** που εκδηλώνει η αμινομάδα προς τον δακτύλιο καθιστούν τα δύο αυτά πρωτόνια περισσότερο προστατευμένα συγκριτικά με το H_{13} .

Τέλος, στα 5.61 ppm παράγουν σήμα τα 2 πρωτόνια της ομάδας της ανιλίνης H_{16} , τα οποία εντοπίζονται ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2.



Σχήμα 3.38. (i) Εξήγηση της αποπροστασία του H_{13} εξαιτίας του αρνητικού επαγωγικού φαινομένου -I που εκδηλώνει η $-\text{CF}_3$, η οποία έλκει επαγωγικά ηλεκτρονιακή πυκνότητα μέσω των σ δεσμών. Εξαιτίας του ίδιου φαινομένου αποπροστατεύεται και το H_{14} . (ii) Δομές συντονισμού που εξηγούν την προστασία του H_{15} και του H_{14} .

EMSK-9_210714110426 #10 RT: 0.14 AV: 1 NL: 6.90E7
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-1500.00]



Εικόνα 3.10. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της ένωσης **51** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Από το παραπάνω φάσμα μάζας συμπεραίνεται ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος **51**, καθώς το θραύσμα που εντοπίζεται σε τιμή m/z 465.1645 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.11. Σύνθεση των αναλόγων Nil-1, Nil-2, Nil-3, Nil-4 και Nil-5

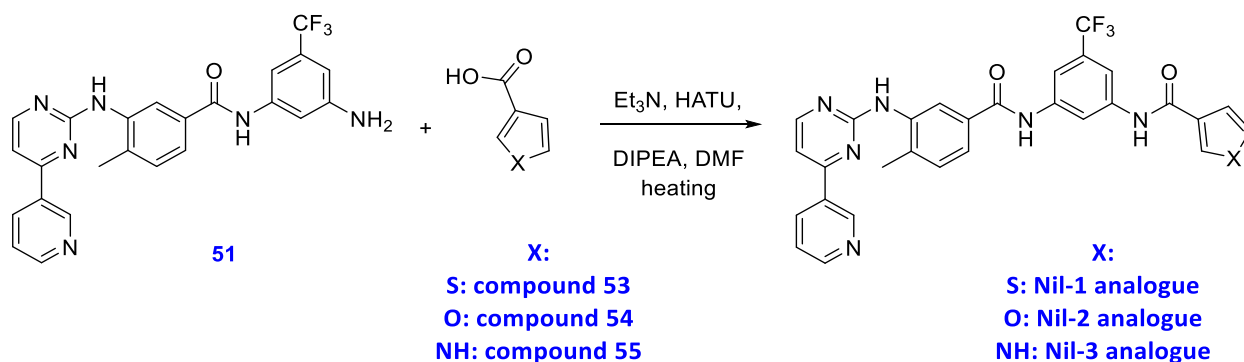
3.11.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση των αναλόγων Nil-1, Nil-2, Nil-3, Nil-4 και Nil-5

Το τελικό στάδιο της παρούσας συνθετικής πορείας είναι η σύζευξη της ανιλίνης **51** με μία σειρά αρωματικών ετεροκυκλικών καρβοξυλικών οξέων (**53**, **54**, **55**, **56**, **57**), με σκοπό τη δημιουργία των αναλόγων του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος.

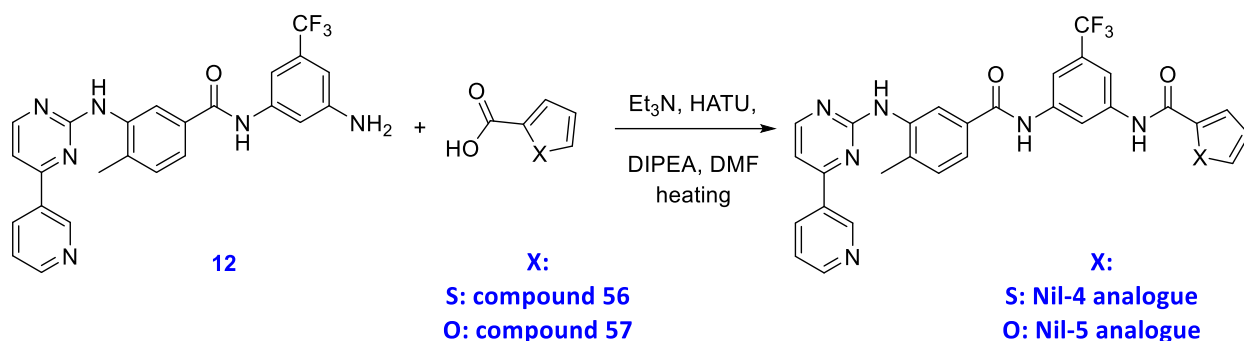
Έχοντας υπόψη τον βέλτιστο τρόπο σύνθεσης της ένωσης **51**, θεωρήθηκε σκόπιμο να δοκιμαστούν οι ακόλουθες συζεύξεις τηρώντας τις ίδιες συνθήκες, γεγονός που εν τέλει οδήγησε επιτυχώς στη σύνθεση των επιθυμητών αναλόγων. Ειδικότερα, η μέθοδος με την οποία συντέθηκαν τα ανάλογα **Nil-1**, **Nil-2**, **Nil-3**, **Nil-4** και **Nil-5** ήταν με τη χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης, συγκεκριμένα HATU, βάσης Et₃N και DIPEA σε άνυδρο διαλύτη DMF υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Όσον αφορά τη συνθετική πορεία, αυτή περιλαμβάνει την επίδραση της βάσης και, ακολούθως, του HATU, στο αρωματικό ετεροκυκλικό καρβοξυλικό οξύ υπό ατμόσφαιρα

αζώτου στους 0 °C προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός παραπροϊόντων, ενώ, στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη της υποκατεστημένης ανιλίνης **51**.

Αξίζει να αναφερθεί πως το 3-καρβοξυθειοφαίνιο **53**, το 3-καρβοξυφουράνιο **54**, το 2-καρβοξυθειοφαίνιο **56** και το 2-καρβοξυφουράνιο **57** έδωσαν υψηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με το 1H-3-καρβοξυπυρρόλιο **55**, το οποίο έδωσε περισσότερα παραπροϊόντα λόγω παράπλευρων αντιδράσεων της -NH του πυρρολίου.

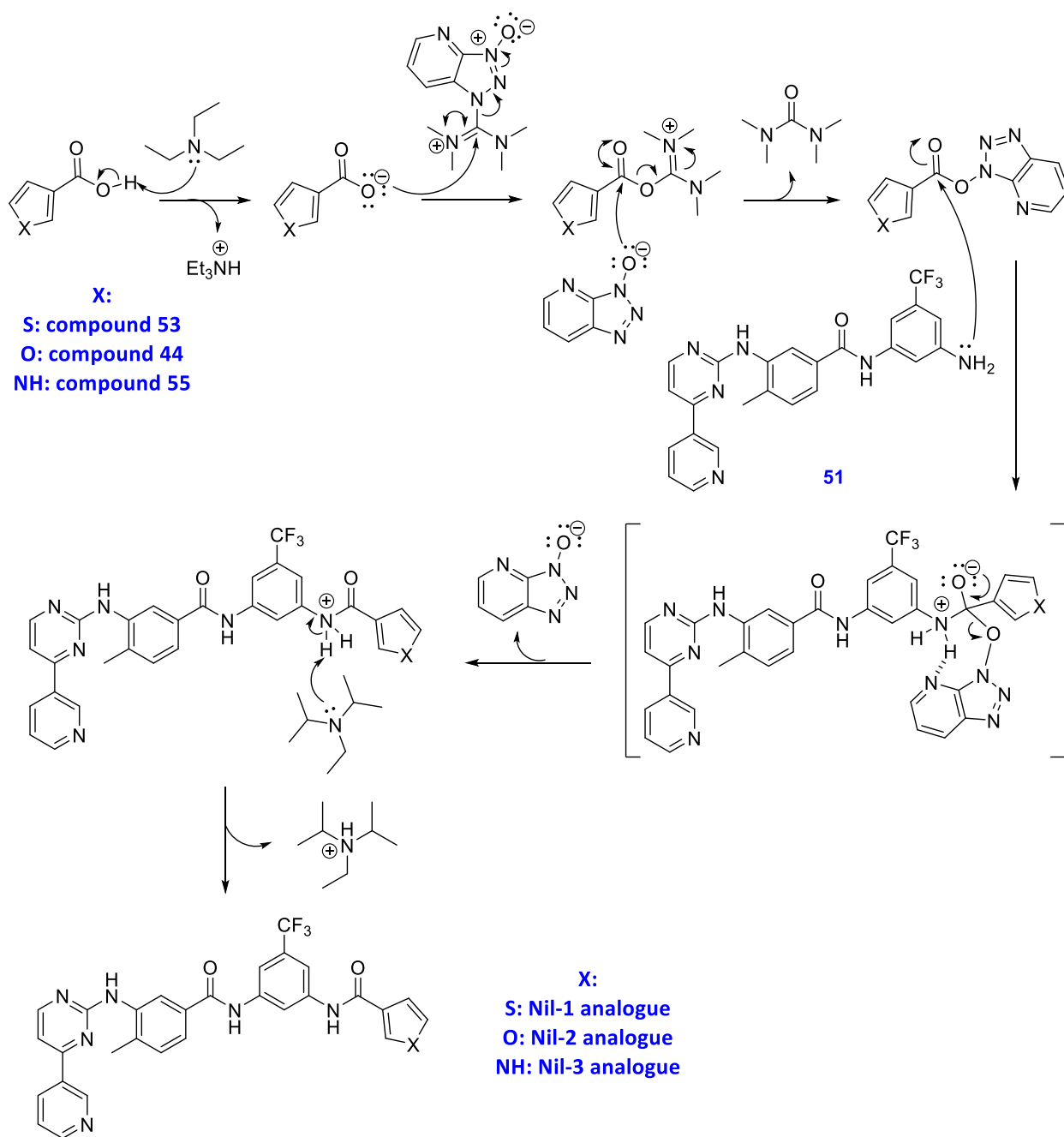


Σχήμα 3.39. Αντίδραση σύνθεσης των αναλόγων **Nil-1**, **Nil-2** και **Nil-3**.



Σχήμα 3.40. Αντίδραση σύνθεσης των αναλόγων **Nil-4** και **Nil-5**.

Στο ακόλουθο σχήμα απεικονίζεται αναλυτικά ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την ενεργοποίηση των αρωματικών ετεροκυκλικών καρβοξυλικών οξέων με το HATU, όπως περιγράφηκε, άλλωστε, και στη σύνθεση της ένωσης **51** με τις ίδιες συνθήκες. Έτσι και εδώ η τριαιθυλαμίνη, ως βάση, αποπρωτονώνει το όξινο πρωτόνιο της καρβοξυλομάδας, επιτρέποντας το ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου να προσβάλει το HATU. Στη συνέχεια απελευθερώνεται ένα δυσδιάλυτο μόριο παραγώγου ουρίας και, ακολούθως, με την πυρηνόφιλη προσβολή της υποκατεστημένης ανιλίνης **51** στον καρβονυλικό άνθρακα, απομακρύνεται η ογκώδης ομάδα του ενεργοποιημένου εστέρα οδηγώντας στο σχηματισμό των επιθυμητών αναλόγων του Nilotinib.



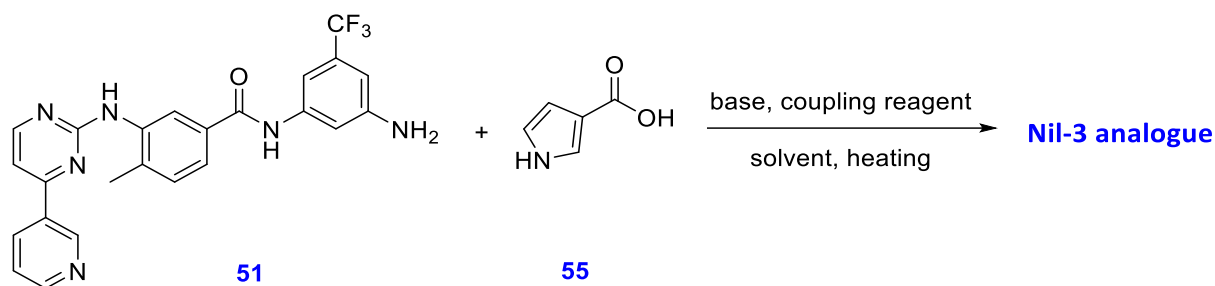
Σχήμα 3.41. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την σύνθεση των αναλόγων **Nil-1**, **Nil-2** και **Nil-3** με αντιδραστήριο σύζευξης HATU.

Εξυπακούεται πως ο ίδιος μηχανισμός λαμβάνει χώρα και κατά τη σύνθεση των αναλόγων **Nil-4** και **Nil-5** με αντιδραστήριο σύζευξης HATU.

3.11.2. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-3

Όπως προαναφέρθηκε, η σύνθεση του αναλόγου **Nil-3** δεν ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική λόγω των επιπλέον παραπροϊόντων και ιδιαίτερα λόγω της δυσκολίας καθαρισμού και

απομόνωσης του τελικού προϊόντος. Στον πίνακα που ακολουθεί απεικονίζονται συγκεντρωτικά όλες οι προσπάθειες που έγιναν για την σύνθεσή του.



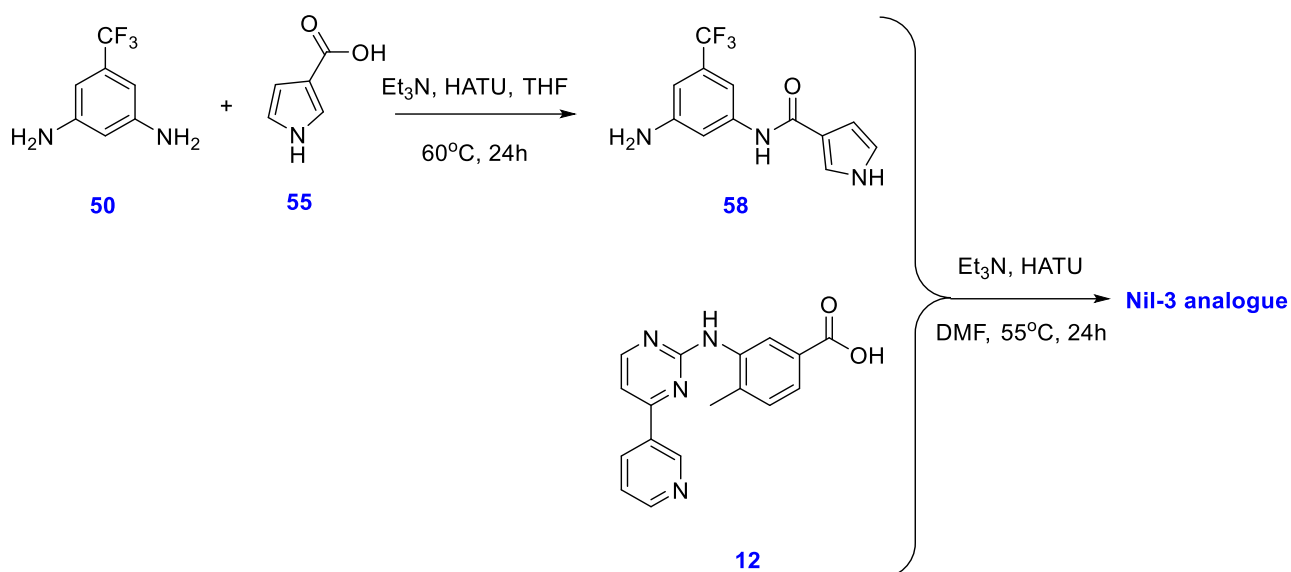
Σχήμα 3.42. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου **Nil-3**.

Πείραμα	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl_2	Βάση	Διαλύτης dry	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	3.5 eq	1 eq	HATU 4 eq	Et_3N 4 eq, DIPEA 1.2 eq	THF	r.t. – 65°C	72 h	ίχνη
2	3.5 eq	1 eq	HATU 4 eq	Et_3N 4 eq, DIPEA 1.2 eq	DMF	r.t. – 65°C	48 h	45%
3	3 eq	1 eq	SOCl_2 περίσσεια	Et_3N 7 eq	THF	r.t. – 65°C	4 days	-
4	3 eq	1 eq	SOCl_2 περίσσεια	Et_3N 7 eq	DMF	r.t. – 50°C	3 days	< 10%

Πίνακας 3.5. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου **Nil-3**.

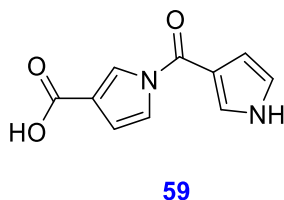
Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.5, οι συνθήκες που οδήγησαν στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος με υψηλότερη απόδοση, ήταν αυτές του *πειράματος 2*.

Ως εκ τούτου, δοκιμάστηκε μία τελευταία εναλλακτική μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει αρχικά τη σύζευξη μεταξύ του 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50** και του 1H-3-καρβοξυπυρρολίου **55** προς το σχηματισμό του *N*-(3-αμινο-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-1H-πυρρολιο-3-καρβοξαμίδιου **58** με χρήση του ίδιου παράγοντα σύζευξης, HATU, και βάσης Et_3N σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF). Μετά τη σύνθεση της ένωσης **58**, το επόμενο στάδιο προβλέπεται να είναι η σύζευξη μεταξύ αυτού και του οξέος **12**, οδηγώντας στο σχηματισμό του αναλόγου **Nil-3**.

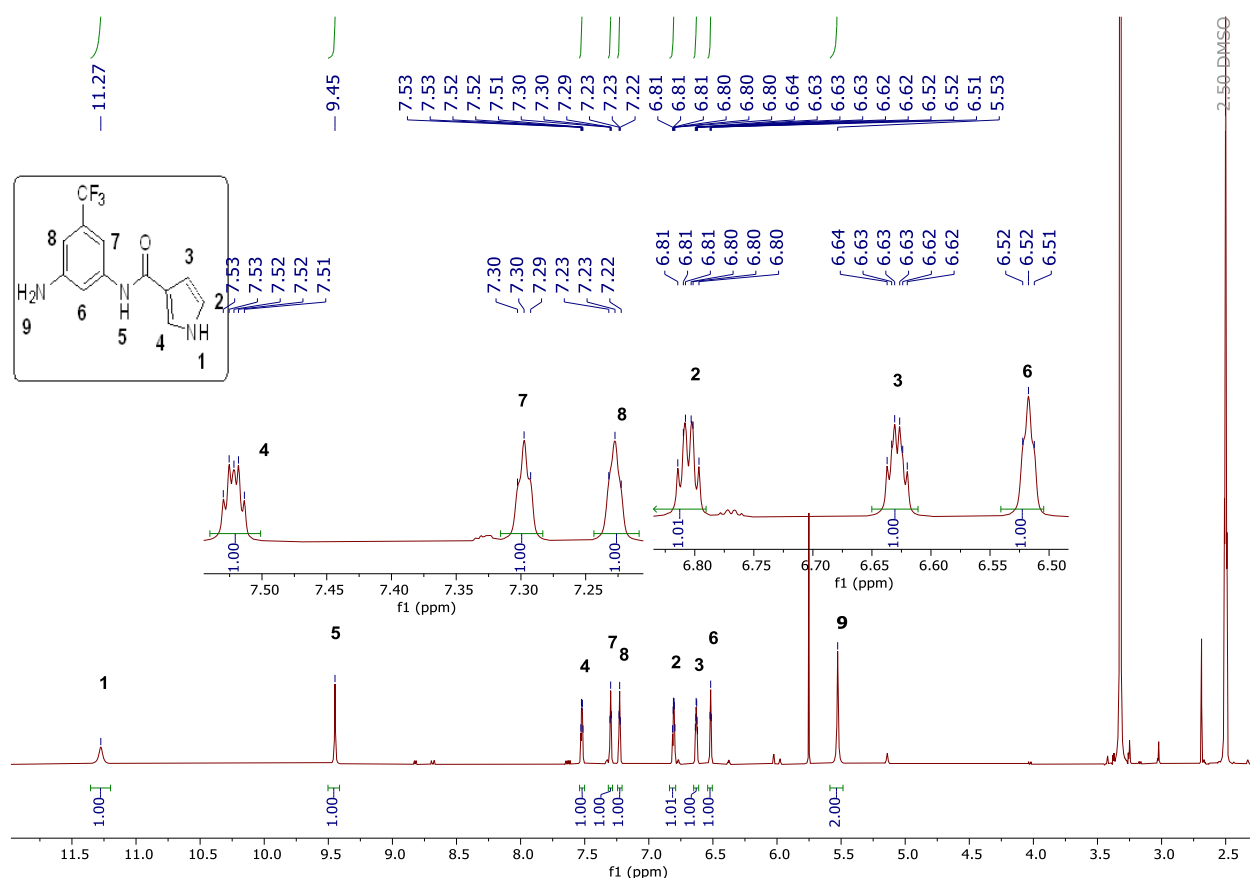


Σχήμα 3.43. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-3.

Παρόλα αυτά, και αυτή η προσπάθεια δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχημένη καθώς σχηματίστηκε σε μεγάλο ποσοστό ως παραπροϊόν η ακόλουθη ένωση 1-(1H-3-καρβονυλοπυρρολίο)-1H-3-καρβοξυπυρρόλιο **59**, που προκύπτει από την σύζευξη μεταξύ δυο μορίων 1H-3-καρβοξυπυρρολίου **55**. Ως εκ τούτου, το επιθυμητό προϊόν **58** απομονώθηκε με απόδοση 40%, δηλαδή αρκετά μικρότερη από την αναμενόμενη. Μια διαφορετική προσέγγιση, ενδεχομένως, να εστίαζε στην προστασία της ομάδας -NH του πυρρολίου.



3.11.3. Φασματοσκοπικά δεδομένα της *N*-(3-αμινο-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-1H-πυρρολίο-3-καρβοξαμίδιο (ένωση 58)



Εικόνα 3.11. ¹H-NMR της ένωσης **58** σε διαλύτη DMSO-d₆ στα 400 MHz.

Σύμφωνα με το φάσμα ¹H-NMR, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός της επιθυμητής ένωσης **58**, καθώς καταγράφονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των πρωτονίων. Αρχικά, παρατηρείται το πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού υπ' αριθμόν 5 στα 9.45 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 1, το οποίο υποδηλώνει ότι η σύζευξη έχει λάβει χώρα, ενώ το πρωτόνιο του αζώτου του πυρρολίου συντονίζεται στα 11.27 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 1.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πρωτόνια του πυρρολίου, με το πλέον αποπροστατευμένο H₄ να εμφανίζεται στα 7.52 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή λόγω σχάσης μακράς απόστασης από το H₃ με ⁴J=1.8 Hz, ενώ παράλληλα σχάζεται και από το γειτονικό του H₁ εμφανίζοντας σχάση ³J=3.2 Hz. Αντίθετα, ως το πιο προστατευμένο πρωτόνιο εμφανίζεται το H₃ ως μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1 στα 6.63 ppm, καταγράφοντας σχάση με σταθερά σύζευξης ³J=2.6 Hz λόγω του H₂, ενώ λόγω του H₄ παρουσιάζει σχάση μακράς απόστασης με σταθερά σύζευξης ⁴J=1.5 Hz. Στα 6.81 ppm συντονίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 ως μία πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1, της οποίας η σχάση οφείλεται στην ύπαρξη του γειτονικού H₁, με το οποίο παρουσιάζει σταθερά σύζευξης ³J=1.9 Hz. Από την άλλη, όμως, δέχεται και επίδραση από το άλλο γειτονικό του πρωτόνιο H₃ με ³J=2.6 Hz. Είναι φανερό πως οι δύο τιμές των σταθερών ³J διαφέρουν, καθώς το άτομο του αζώτου έλκει ηλεκτρονιακή

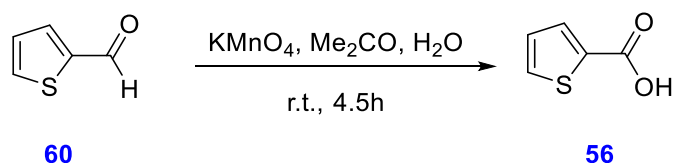
πυκνότητα από τον δεσμό με τον άνθρακα που φέρει το H₂ μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο την τιμή ³J.

Όσον αφορά τα αρωματικά πρωτόνια του υποκατεστημένου δακτυλίου της ανιλίνης, το πιο προστατευμένο είναι το H₆, το οποίο εντοπίζεται στα 6.52 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μία διπλή κορυφή που τείνει να σχαστεί σε τριπλή λόγω της επίδρασης των H₇ και H₈ με τα οποία απέχει τέσσερις δεσμούς εμφανίζοντας σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης ⁴J=1.9 Hz. Αμέσως μετά ακολουθεί το H₈, το οποίο εντοπίζεται στα 7.23 ppm με ολοκλήρωση 1. Το γεγονός πως η ελεύθερη αμινομάδα προσφέρει συζυγιακά ηλεκτρονική πυκνότητα στο δακτύλιο, καθιστά τα δύο αυτά πρωτόνια περισσότερο προστατευμένα συγκριτικά με το H₇ που εμφανίζεται στα 7.30 ppm.

Γενικότερα, ως πλέον τα περισσότερο προστατευμένα πρωτόνια της ένωσης είναι, όπως αναμένεται, τα δύο πρωτόνια της αμινομάδας H₉, τα οποία εμφανίζονται 5.53 ppm ως μια ελαφρώς ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 2.

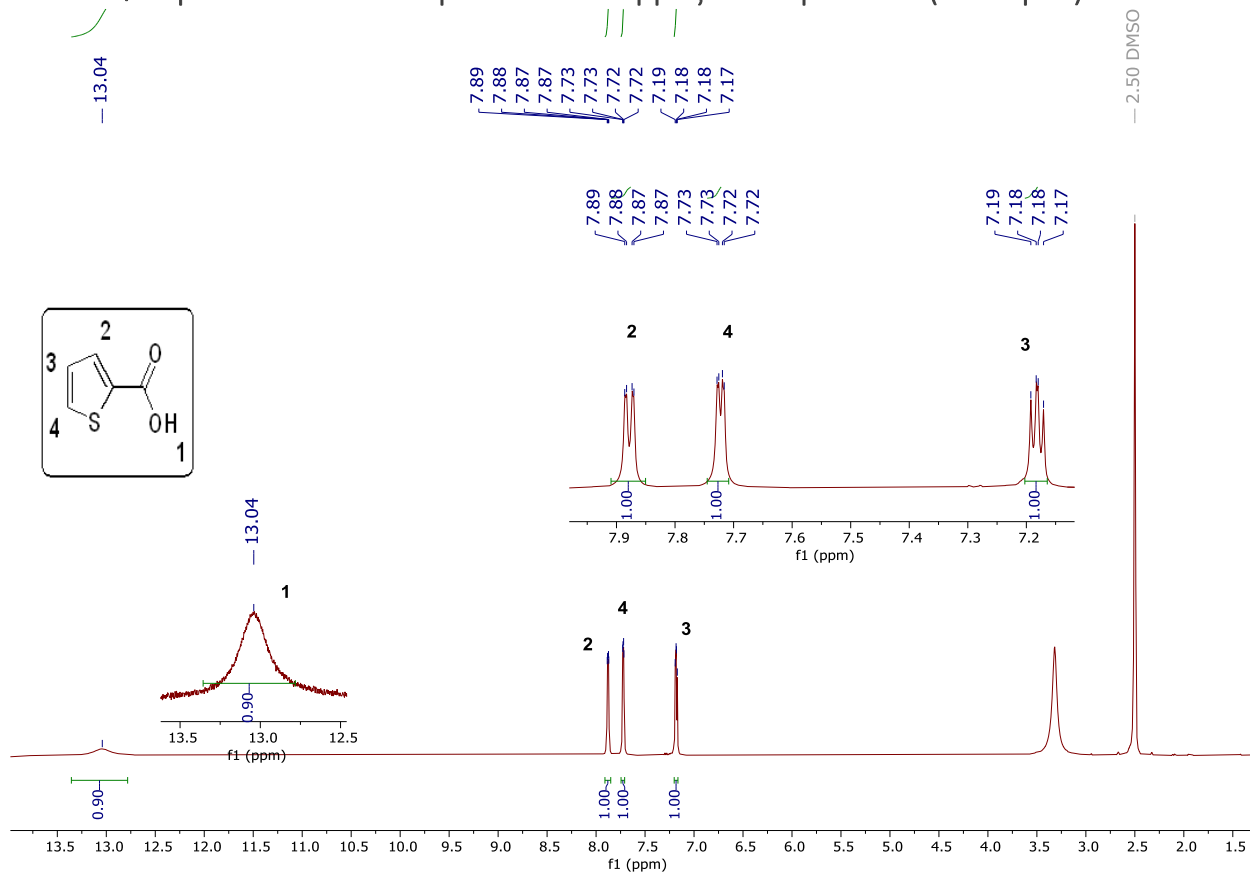
3.11.4. Σύνθεση του 2-καρβοξυ-θειοφαινείου (ένωση 56)

Προκειμένου να λάβει χώρα η σύνθεση του αναλόγου **Nil-4**, προέκυψε η ανάγκη σύνθεσης του 2-καρβοξυ-θειοφαινείου **56**, εξαιτίας της μη διαθεσιμότητάς του, μέσω αντίδρασης οξείδωσης της αλδεΐδης **60**. Η εν λόγω αντίδραση πραγματοποιήθηκε με την επίδραση του οξειδωτικού KMnO₄, διαλυμένο σε 1:1 ακετόνη/νερό, στην θειοφαινο-2-καρβοξαλδεΐδη **60** για τον σχηματισμό του αντίστοιχου καρβοξυλικού οξέος **56**.¹⁰³

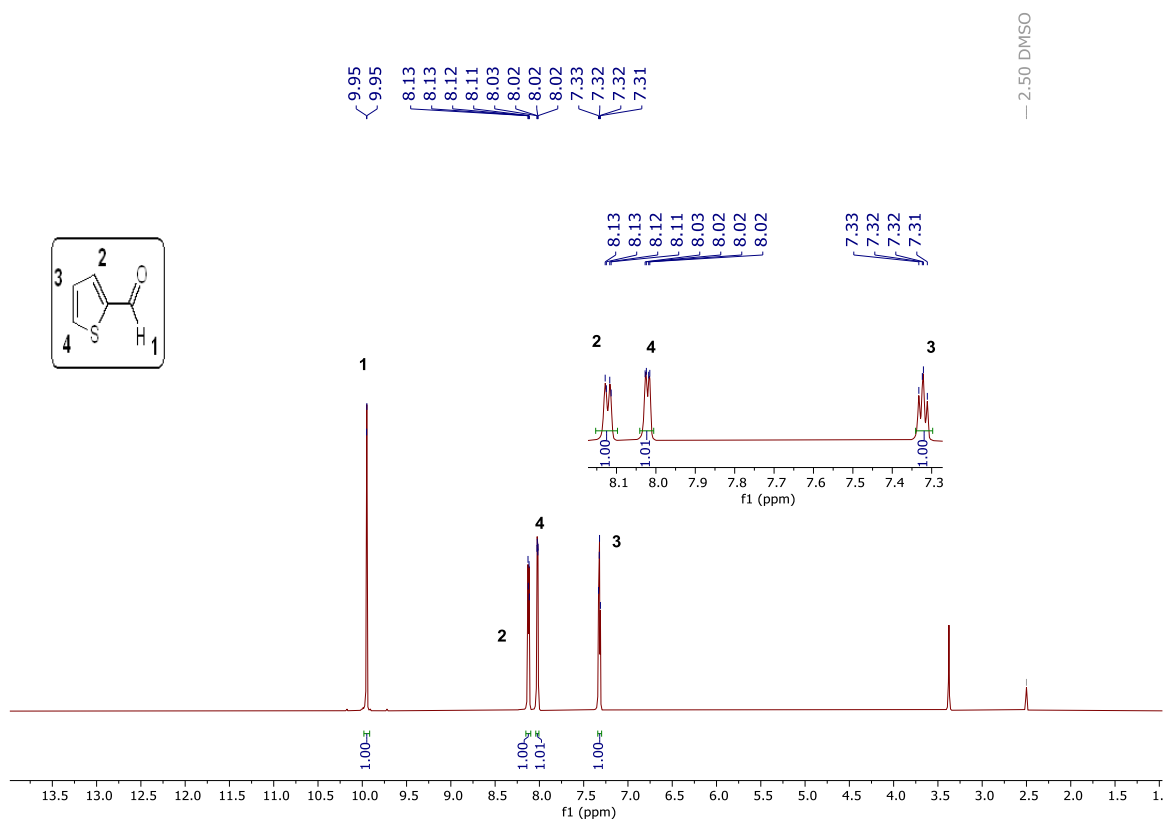


Σχήμα 3.44. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **56**.

3.11.5. Φασματοσκοπικά δεδομένα του 2-καρβοξυ-θειοφαινείου (ένωση 56)

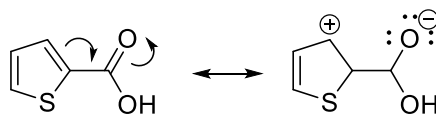


Εικόνα 3.12. ^1H -NMR της ένωσης **56** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.



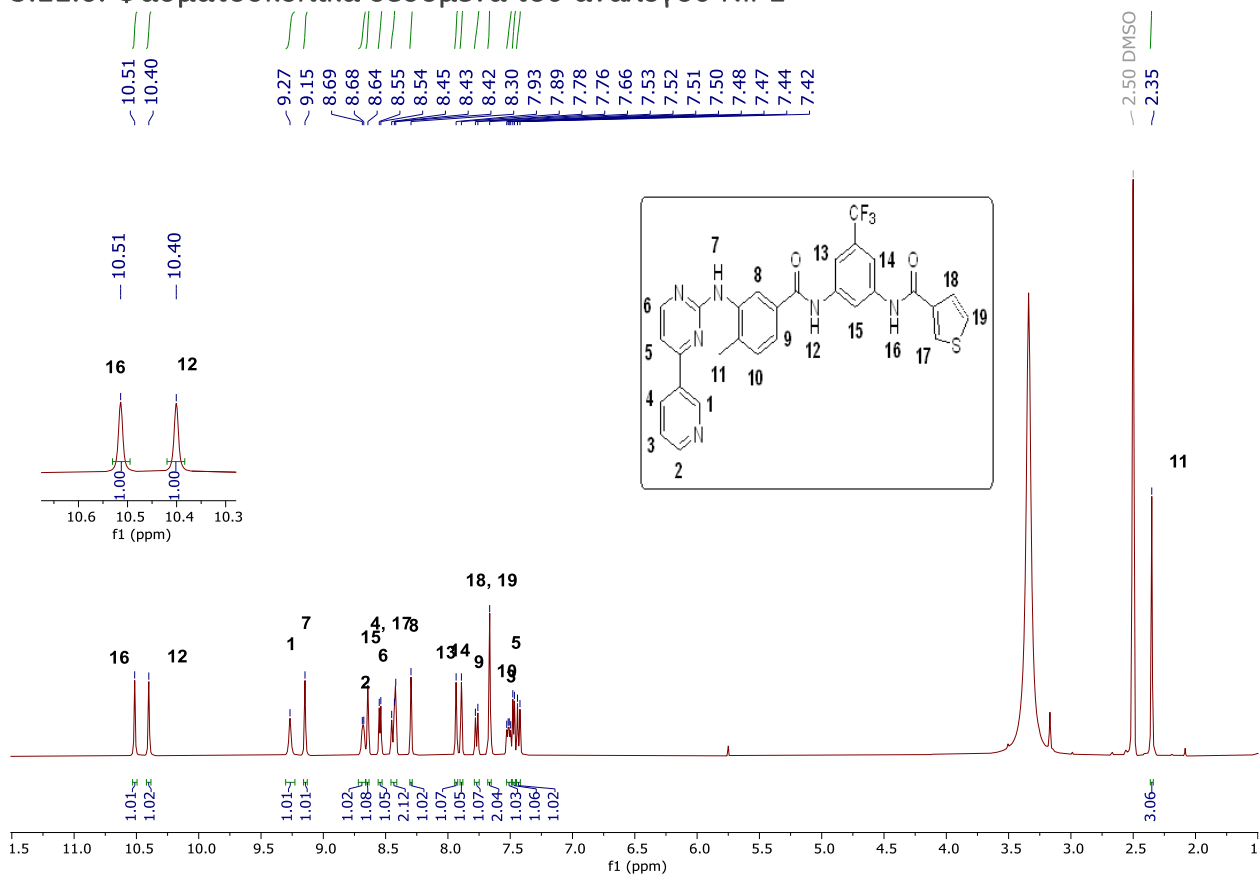
Εικόνα 3.13. ^1H -NMR της αλδεΐδης **60** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ στην εικόνα 3.12 προκύπτει πως ο σχηματισμός της ένωσης **56** έχει λάβει χώρα, καθότι το φάσμα που απεικονίζεται αντιστοιχεί στο επιθυμητό προϊόν. Απόδειξη αποτελεί η μετατόπιση του πρωτονίου της καρβοξυλομάδας H_1 το οποίο εντοπίζεται στα 13.04 ppm ως μια ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 1, ενώ στην περίπτωση της αλδεΐδης **60** το πρωτόνιο εντοπιζόταν στα 9.95 ppm (εικόνα 3.13). Ως μια διπλή της διπλής κορυφή εμφανίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 στα 7.88 ppm με ολοκλήρωση 1, ως το πιο αποπροστατευμένο, καθώς είναι δίπλα σε καρβοξυλομάδα η οποία συζυγιακά αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τη θέση αυτή. Η σχάση που παρουσιάζει οφείλεται στο γειτονικό του H_3 , με το οποίο εκδηλώνει σταθερά σύζευξης $^3J=5.0\text{ Hz}$, ενώ ταυτόχρονα σχάζεται και από το H_4 , με το οποίο απέχει τέσσερις δεσμούς με σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης $^4J=1.3\text{ Hz}$. Το H_4 με τη σειρά του, καθώς γειτνιάζει με το άτομο του θείου, εμφανίζεται στα 7.72 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω του γειτονικού του H_3 ($^3J=3.7\text{ Hz}$) αλλά και του H_2 ($^4J=1.2\text{ Hz}$). Τέλος, το πιο προστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης είναι το H_3 , καθώς εντοπίζεται στα 7.18 ppm και αυτό ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω των γειτονικών του H_4 και H_2 , τα οποία λόγω του διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος δεν είναι ισοδύναμα. Ως εκ τούτου με το H_4 εμφανίζει σχάση με σταθερά σύζευξης $^3J=3.7\text{ Hz}$, ενώ με το H_2 σταθερά σύζευξης $^3J=5.0\text{ Hz}$.

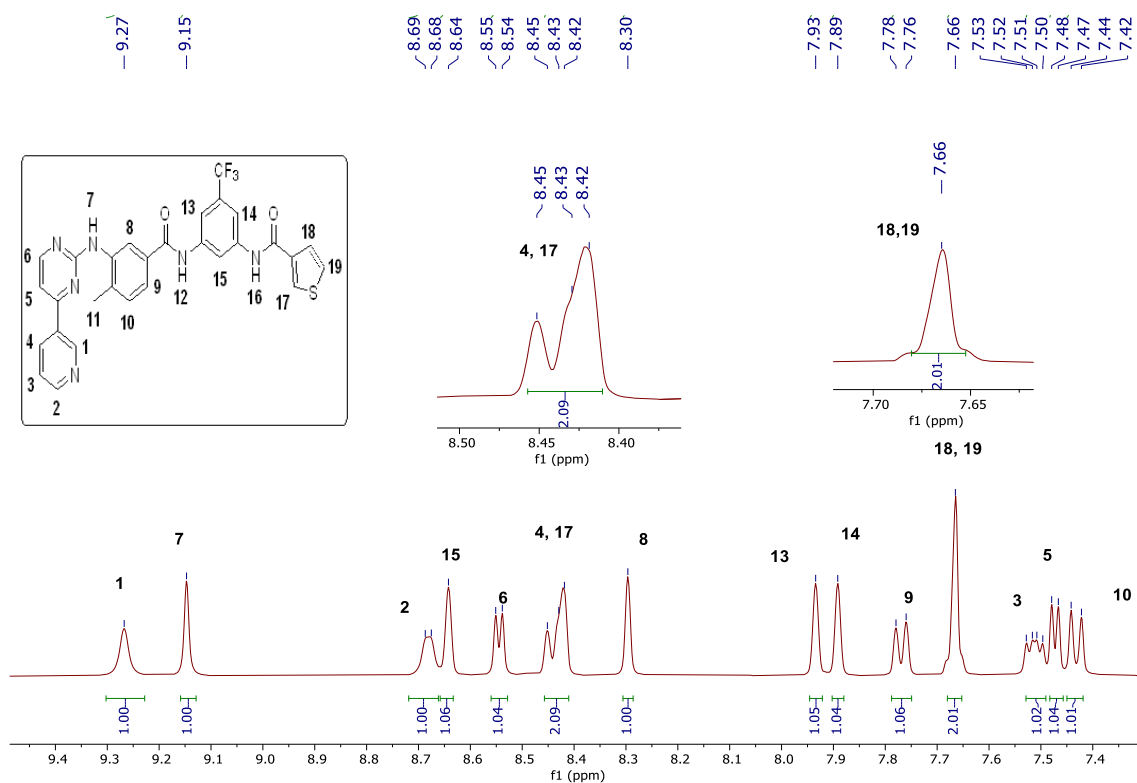


Σχήμα 3.45. Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία του H_2 .

3.11.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-1



Εικόνα 3.14. $^1\text{H-NMR}$ του αναλόγου Nil-1 σε διαλύτη DMSO- d_6 στα 400 MHz.

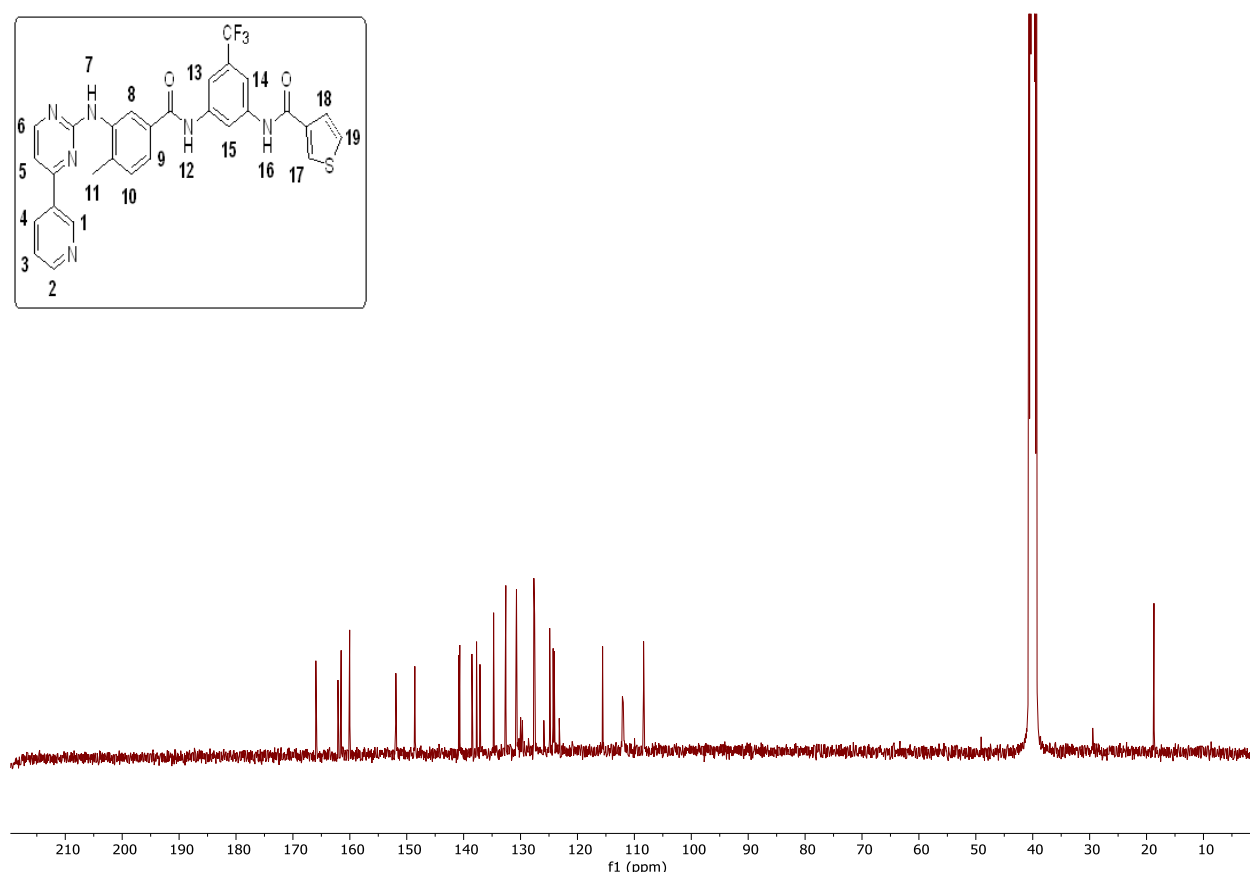


Εικόνα 3.15. $^1\text{H-NMR}$ του αναλόγου Nil-1 σε διαλύτη DMSO- d_6 στα 400 MHz με εστίαση στην αρωματική περιοχή.

Σύμφωνα με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός του επιθυμητού αναλόγου **Nil-1**, καθώς εντοπίζονται όλα τα σήματα των πρωτονίων της εν λόγω ένωσης. Απόδειξη αποτελεί η κορυφή στα 10.51 ppm με ολοκλήρωση 1 που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H_{16} του νέου αμιδικού δεσμού, υποδηλώνοντας πως η σύζευξη έχει λάβει χώρα. Παράλληλα, στα 10.40 ppm με ολοκλήρωση 1 εντοπίζεται και το πρωτόνιο του πρώτου αμιδικού δεσμού H_{12} .

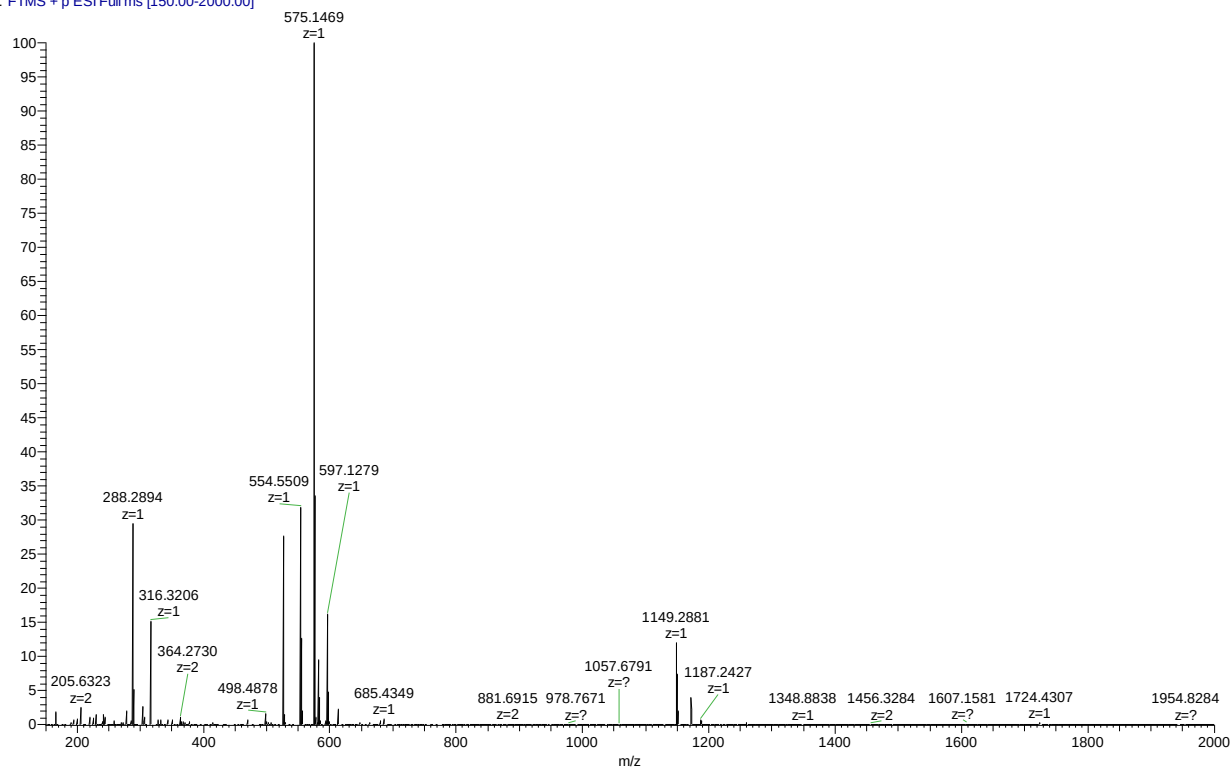
Εκτός από τις υπόλοιπες κορυφές των πρωτονίων, οι οποίες έχουν αναλυθεί στα φασματοσκοπικά δεδομένα των πρόδρομων ενώσεων, σήμα δίνουν και οι κορυφές του δακτυλίου του θειοφαινίου. Ειδικότερα, το πρωτόνιο H_{17} εντοπίζεται στα 8.42 ppm, αλλά συμπίπτει με το πρωτόνιο H_4 και εμφανίζουν μαζί ολοκλήρωση 2. Ταυτόχρονα, όμως, μαζί εντοπίζονται και τα H_{18} και H_{19} στα 7.66 ppm ως μία κορυφή με ολοκλήρωση 2, χωρίς να καθίσταται δυνατή η διάκρισή τους.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αποπροστασία του H_{15} , καθώς λόγω της σύζευξης πλέον το μονήρες ζεύγος του αζώτου απεντοπίζεται περισσότερο προς το καρβονύλιο, δίνοντας χαρακτήρα διπλού δεσμού στον αμιδικό δεσμό, παρά προς τον βενζολικό δακτύλιο, αποπροστατεύοντας έτσι το συγκεκριμένο πρωτόνιο.



Εικόνα 3.16. $^{13}\text{C-NMR}$ του αναλόγου **Nil-1** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

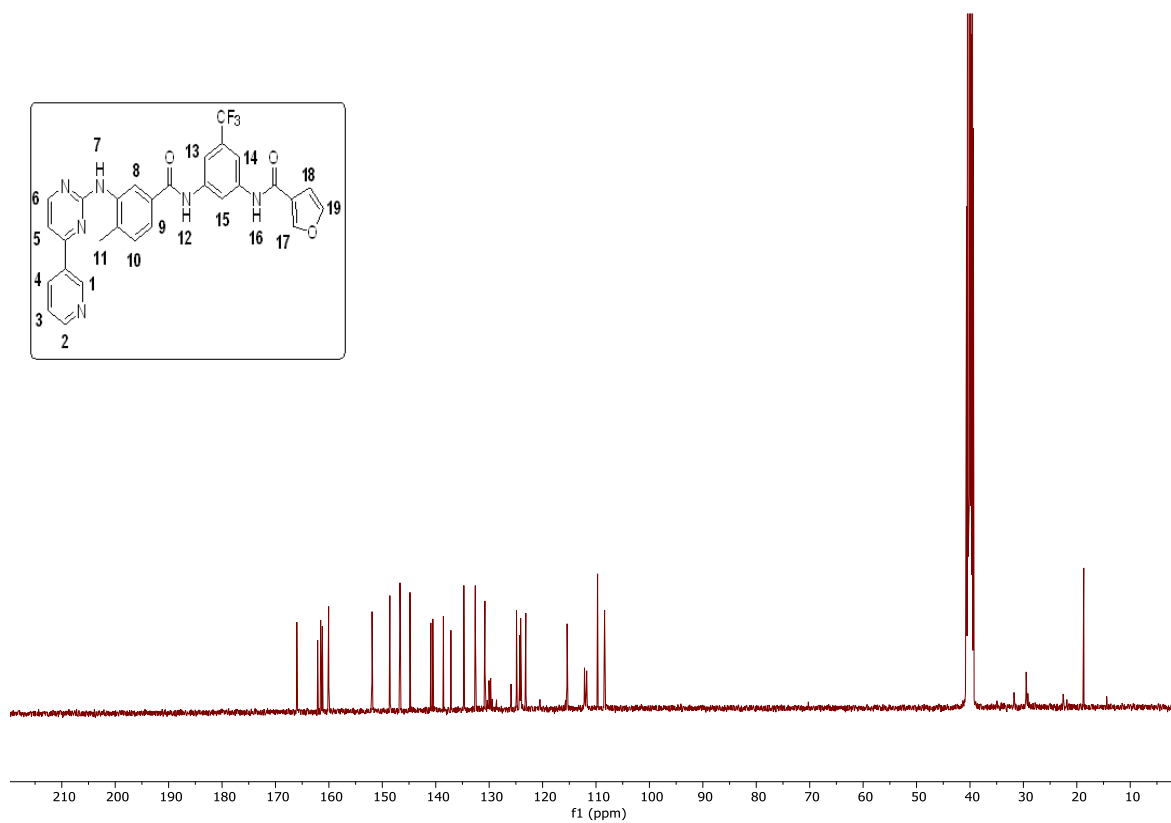
Nil-1 210615114601 #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 6.65E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



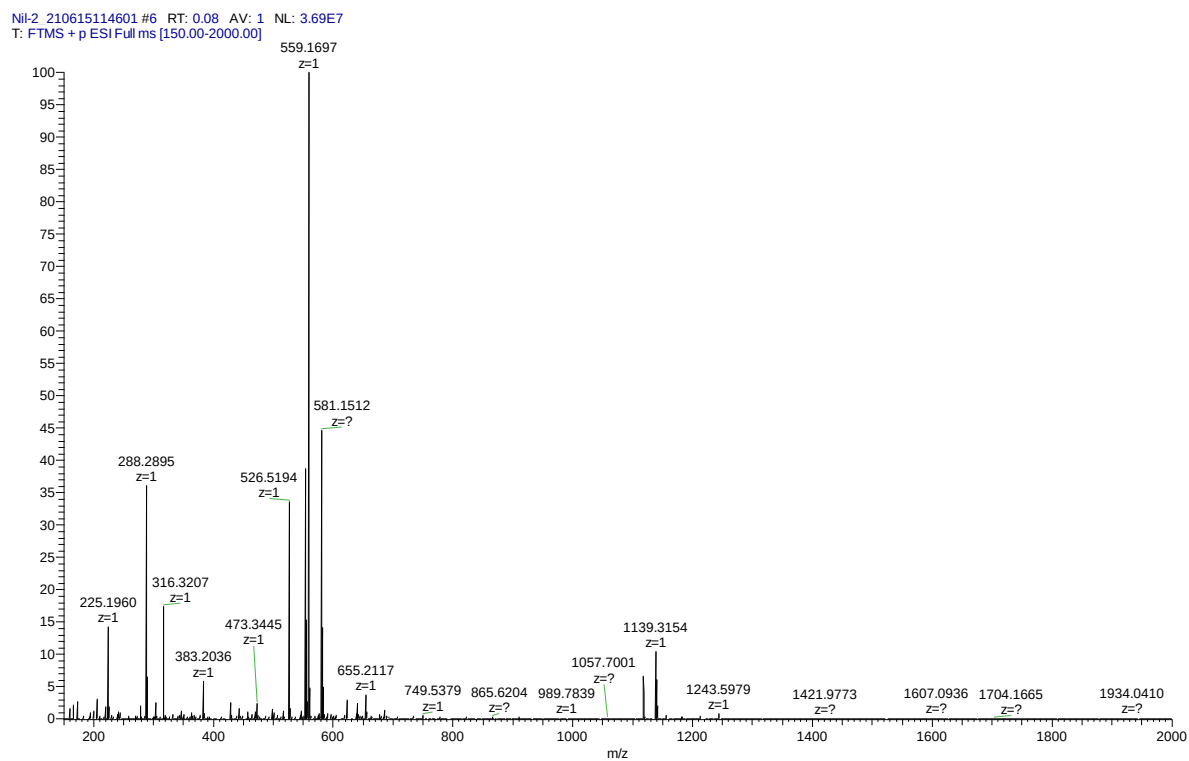
Εικόνα 3.17. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του αναλόγου **Nil-1** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Από το παραπάνω φάσμα μάζας προκύπτει ο σχηματισμός επιθυμητού αναλόγου **Nil-1**, καθώς το θραύσμα που εντοπίζεται σε τιμή m/z 575.1472 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

Από το παραπάνω φάσμα $^1\text{H-NMR}$ προκύπτει πως ο σχηματισμός του αναλόγου **Nil-2** έχει λάβει χώρα, καθώς εντοπίζονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των πρωτονίων της ένωσης. Απόδειξη αποτελεί η δεύτερη κορυφή στα 10.51 ppm με ολοκλήρωση 1, που αντιστοιχεί στο νέο αμιδικό πρωτόνιο H_{16} , ενώ το ήδη υπάρχον H_{12} εντοπίζεται στα 10.27 ppm. Όσον αφορά τα πρωτόνια του δακτυλίου του φουρανίου, το H_{17} εντοπίζεται στα 8.43 ppm ως μια απλή ευρεία κορυφή, η οποία τείνει να σχαστεί σε πολλαπλή λόγω των H_{18} και H_{19} που βρίσκονται σε απόσταση τεσσάρων δεσμών. Η παρουσία του καρβονυλίου και του ατόμου του οξυγόνου στις δύο γειτονικές θέσεις καθιστούν το συγκεκριμένο πρωτόνιο ως το πιο αποπροστατευμένο του φουρανικού δακτυλίου. Στη συνέχεια, το H_{19} εντοπίζεται στα 7.81 ppm με ολοκλήρωση 1, χωρίς όμως η σχάση του να καθίσταται ιδιαίτερα ευδιάκριτη. Τέλος, το H_{18} , ως το πιο προστατευμένο πρωτόνιο του εν λόγω δακτυλίου, εμφανίζεται στα 7.02 ppm με ολοκλήρωση 1, χωρίς πάλι η σχάση να είναι απολύτως φανερή. Οι υπόλοιπες κορυφές της ένωσης έχουν εξηγηθεί σε προηγούμενα φάσματα $^1\text{H-NMR}$.



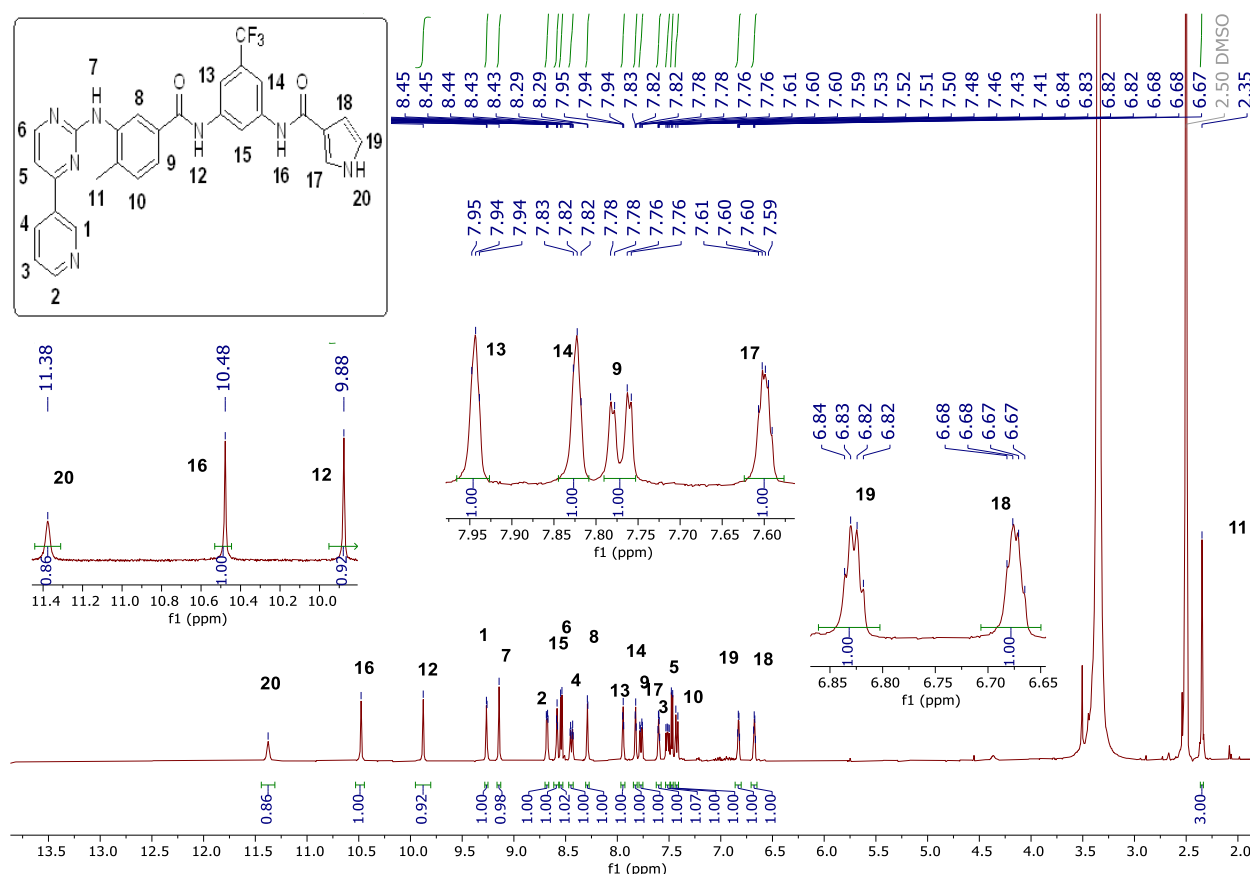
Εικόνα 3.19. ¹³C-NMR του αναλόγου **Nil-2** σε διαλύτη DMSO-d₆ στα 400 MHz.



Εικόνα 3.20. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του αναλόγου **Nil-2** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Από το παραπάνω φάσμα μάζας, αποδεικνύεται ο σχηματισμός του επιθυμητού αναλόγου **Nil-2**, καθώς το θραύσμα που εντοπίζεται σε τιμή m/z 559.1697 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.11.8. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-3



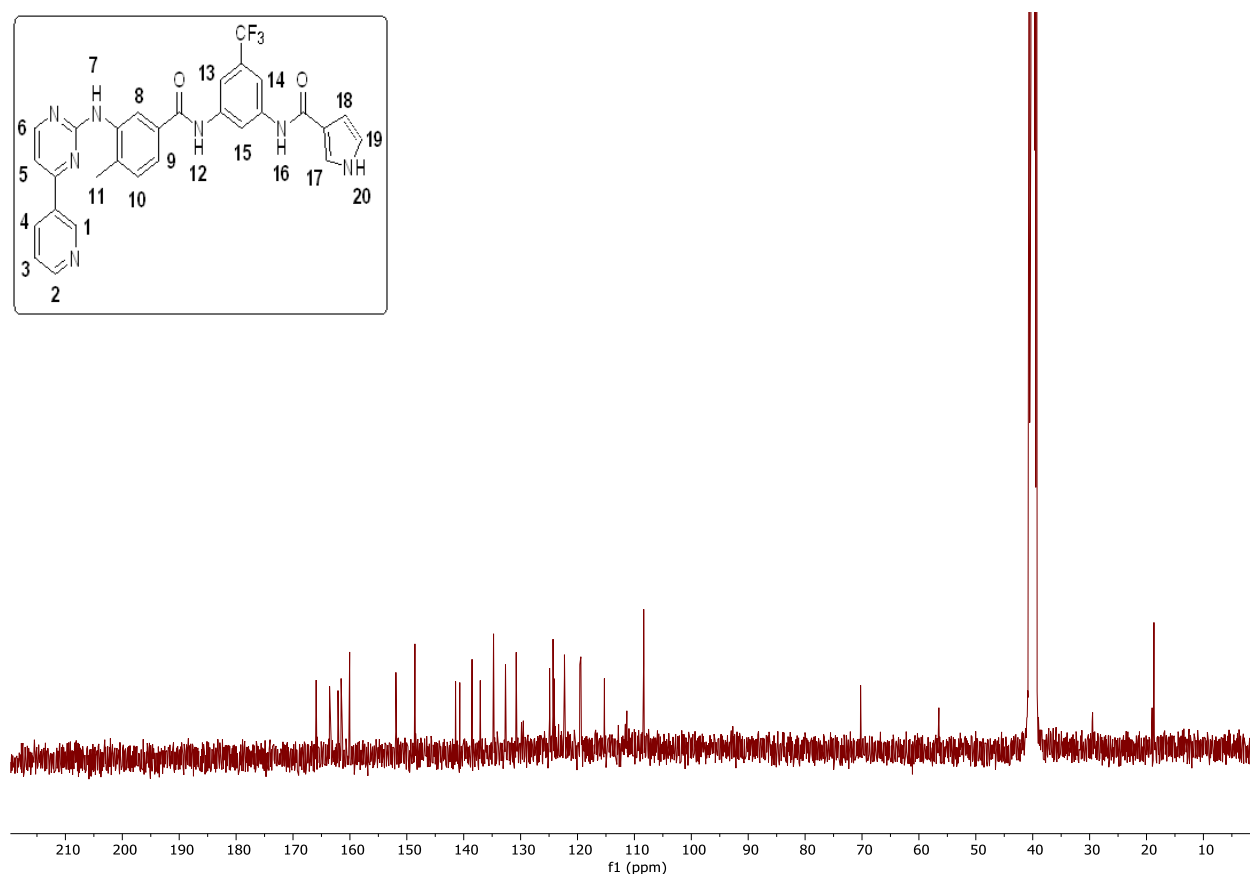
Εικόνα 3.21. ^1H -NMR του αναλόγου **Nil-3** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

Από το παραπάνω φάσμα ^1H -NMR προκύπτει πως έχει λάβει χώρα ο σχηματισμός του επιθυμητού αναλόγου **Nil-3**, καθώς καταγράφονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των πρωτονίων της ένωσης. Η κορυφή στα 11.38 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αμινομάδας του πυρρολίου H_{20} , καθώς και το νέο αμιδικό πρωτόνιο στα 10.48 ppm, επιβεβαιώνουν τη σύνθεση της εν λόγω ένωσης. Ειδικότερα, το H_{20} καταγράφεται ως μια απλή ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 1, ενώ το νέο αμιδικό πρωτόνιο H_{16} εμφανίζεται στα 10.48 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 1. Το ήδη υπάρχον H_{12} εντοπίζεται στα 9.88 ppm.

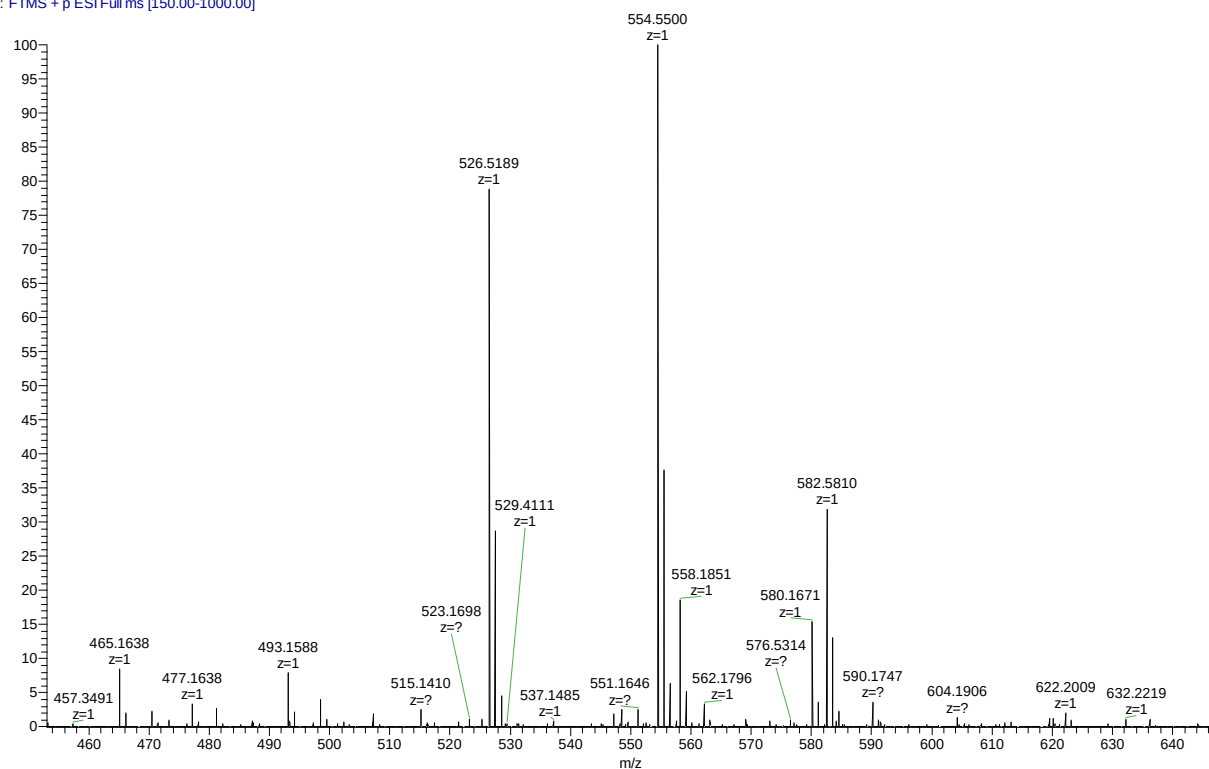
Όσον αφορά τα πρωτόνια του πυρρολικού δακτυλίου, το H_{17} , ως το πιο αποπροστατευμένο, καθώς γειτνιάζει και με το άτομο του αζώτου αλλά και με την καρβονυλική ομάδα, συντονίζεται στα 7.60 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια πολλαπλή κορυφή, εκδηλώνοντας σχάση λόγω της επίδρασης που δέχεται από το γειτονικό του H_{20} ($^3J=3.2$ Hz), αλλά και από το H_{18} εμφανίζοντας σχάση μακράς απόστασης με $^4J=1.8$ Hz. Το H_{19} με τη σειρά του

συντονίζεται στα 6.83 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια πολλαπλή κορυφή, καθώς υφίσταται σχάση από τα γειτονικά του πρωτόνια, με $^3J=2.4$ Hz με το H₁₈. Τέλος, ως το πιο προστατευμένο πρωτόνιο, το H₁₈ εμφανίζει σήμα στα 6.67 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια πολλαπλή κορυφή λόγω των γειτονικών του πρωτονίων, δίνοντας μία σχάση $^3J=2.3$ Hz με το H₁₉.

Οι υπόλοιπες κορυφές της ένωσης έχουν αναλυθεί σε προηγούμενες παραγράφους.



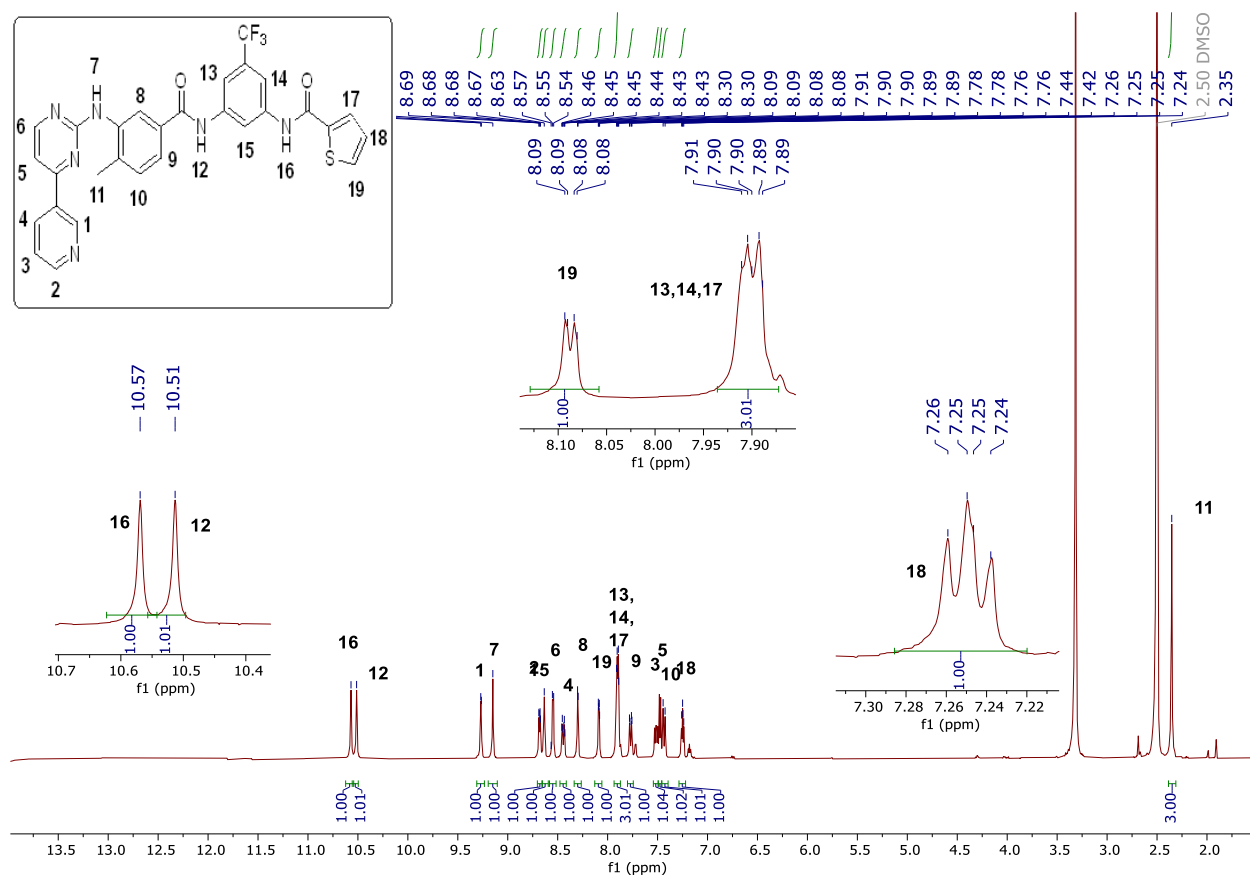
Εικόνα 3.22. ^{13}C -NMR του αναλόγου **Nil-3** σε διαλύτη DMSO- d_6 στα 400 MHz.



Εικόνα 3.23. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του αναλόγου **Nil-3** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Σύμφωνα με το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός της επιθυμητής ένωσης **Nil-3**, καθώς το θραύσμα σε τιμή m/z 558.1851 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.11.9. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλογού Nil-4



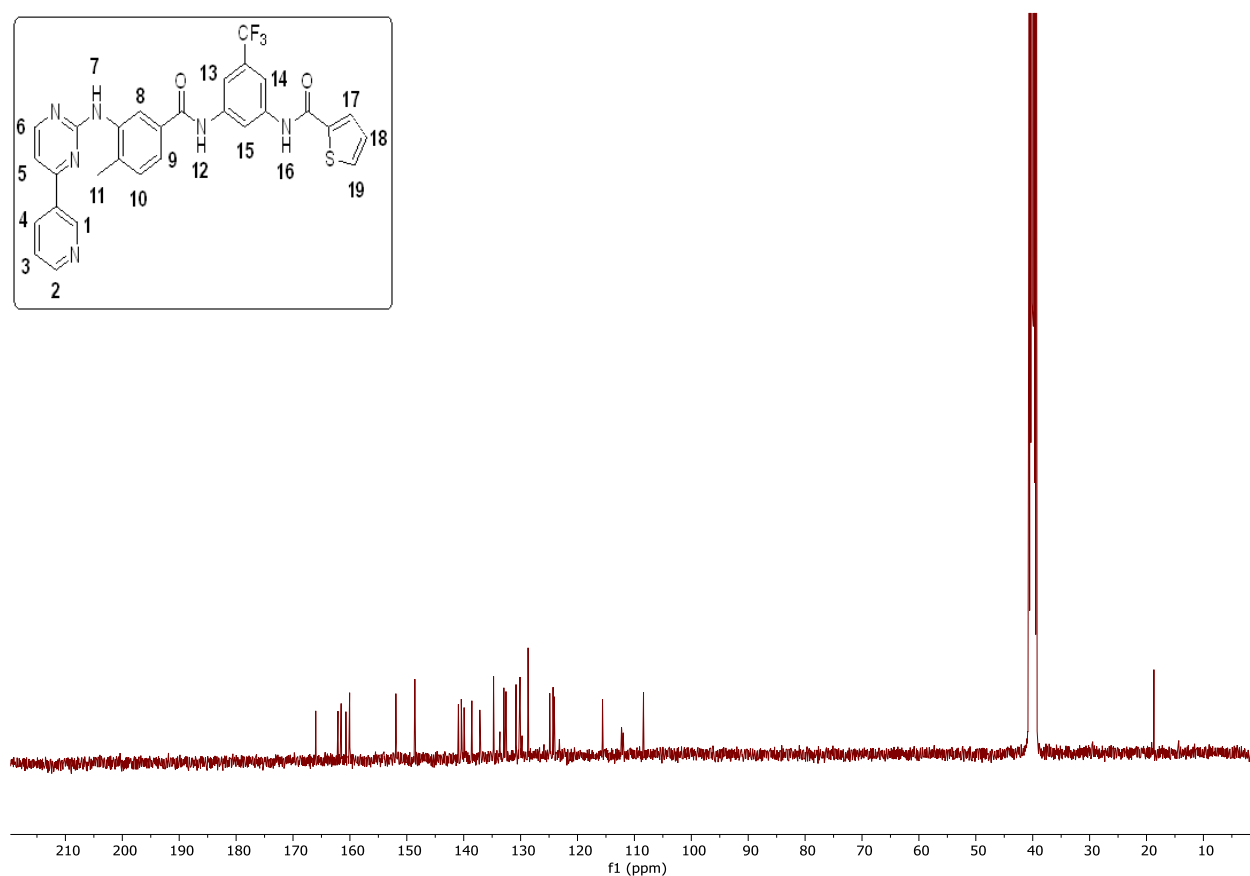
Εικόνα 3.24. ^1H -NMR του αναλόγου **Nil-4** σε διαλύτη DMSO- d_6 στα 400 MHz.

Σύμφωνα με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$, προκύπτει πως η σύνθεση του αναλόγου **Nil-4** έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς, καθώς καταγράφονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των πρωτονίων της ένωσης. Αρχικά, απόδειξη αποτελεί η επιπλέον κορυφή στα 10.57 ppm με ολοκλήρωση 1, που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H_{16} του νέου αμιδικού δεσμού. Επιπροσθέτως, εντοπίζονται και οι κορυφές των πρωτονίων του δακτυλίου του θειοφαινίου, με το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο να είναι εκείνο που γειτνιάζει με το άτομο του θείου, H_{19} , καθώς, ως ηλεκτραρνητικό άτομο, το θείο έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα αποπροστατεύοντας τη γειτονική του θέση. Συγκεκριμένα το H_{19} εμφανίζεται στα 8.09 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή της διπλής κορυφή, λόγω σχάσης από το γειτονικό του H_{18} με $^3J=3.9$ Hz, αλλά και λόγω μακράς απόστασης σχάση από το H_{17} με $^4J=1.2$ Hz. Το H_{17} με τη σειρά του εντοπίζεται σε μικρότερες τιμές δ ως πιο προστατευμένο στα 7.90 ppm. Παρόλα αυτά, η κορυφή του συγκεκριμένου πρωτονίου συμπίπτει με τις κορυφές των πρωτονίων H_{13} και H_{14} και για αυτό το λόγο δεν μπορεί να γίνει ευδιάκριτη η σχάση που παρουσιάζει. Τέλος, το πιο προστατευμένο πρωτόνιο του εν λόγω δακτυλίου είναι το H_{18} , το οποίο εντοπίζεται στα 7.25 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή της διπλής κορυφή, καθώς τα γειτονικά του πρωτόνια H_{19} και H_{17} ανήκουν σε διαφορετικό χημικό περιβάλλον, και ως εκ τούτου δεν είναι ισοδύναμα, οπότε

εκδηλώνουν διαφορετικές τιμές 3J . Ειδικότερα, το H_{18} εκδηλώνει με το H_{19} $^3J=3.6$ Hz, ενώ με το H_{17} $^3J=4.9$ Hz.

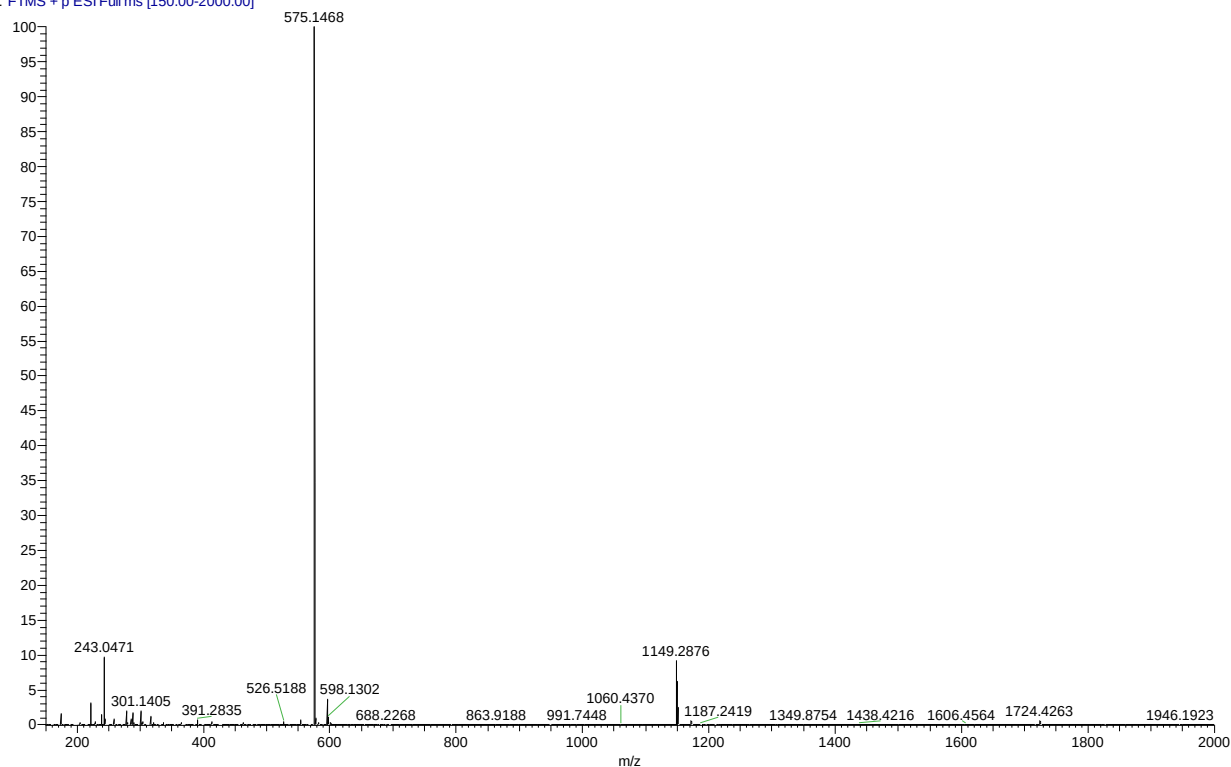
Φανερή είναι επιπλέον η μετατόπιση του H_{15} από τα 6.58 ppm στην ένωση **51** στα 8.63 ppm στο τελικό ανάλογο **Nil-4**. Αυτό είναι λογικό, καθώς πλέον δεν υφίσταται αμινομάδα να προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον δακτύλιο, αλλά δύο αμιδικοί δεσμοί οι οποίοι εκδηλώνουν συζυγία και προς το καρβονύλιο και προς τον βενζολικό δακτύλιο, προστατεύοντας, έτσι, ασθενέστερα το εν λόγω πρωτόνιο.

Τα υπόλοιπα πρωτόνια της ένωσης έχουν αναλυθεί εκτενώς σε προηγούμενα φάσματα 1H -NMR.



Εικόνα 3.25. ^{13}C -NMR του αναλόγου **Nil-4** σε διαλύτη DMSO- d_6 στα 400 MHz.

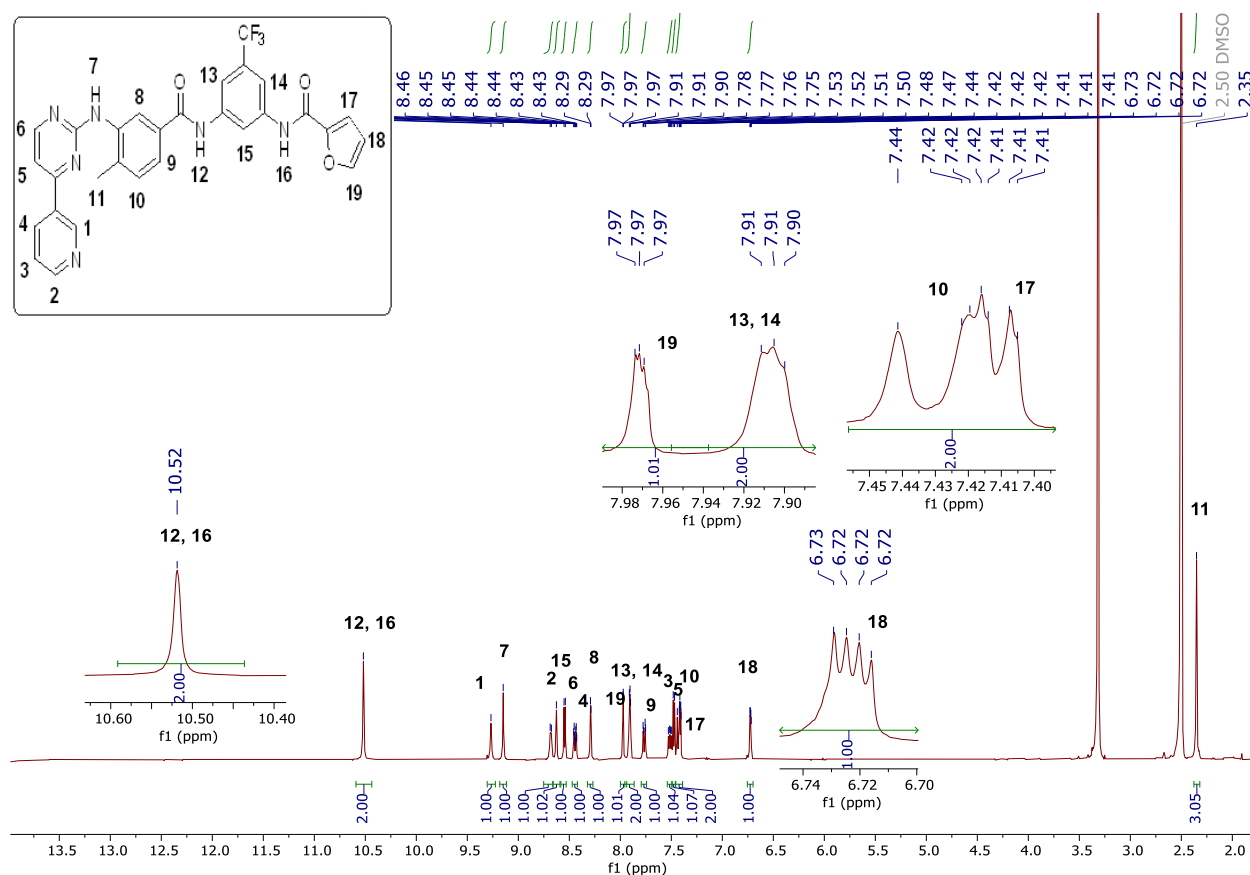
Nil-4 21071203 #7 RT: 0.05 AV: 1 NL: 2.33E8
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



Εικόνα 3.26. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του αναλόγου **Nil-4** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Σύμφωνα με το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός της επιθυμητής ένωσης **Nil-4** καθώς το θραύσμα σε τιμή m/z 575.1468 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.11.10. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-5



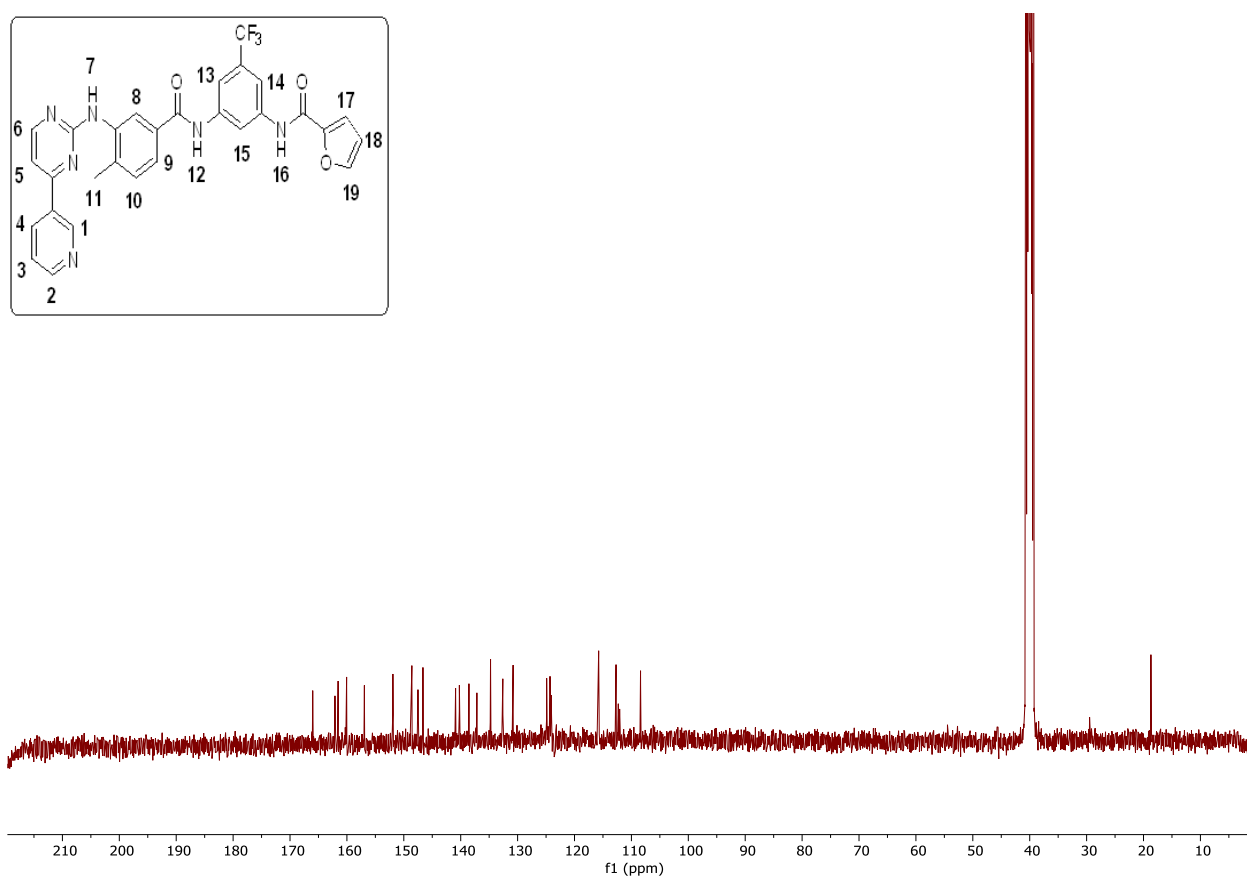
Εικόνα 3.27. ^1H -NMR του αναλόγου **Nil-5** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

Από το παραπάνω φάσμα ^1H -NMR προκύπτει πως η τελική ένωση του αναλόγου **Nil-5** έχει συντεθεί, καθώς εμφανίζονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των πρωτονίων της. Αρχικά παρατηρείται μια κορυφή στα 10.52 ppm με ολοκλήρωση 2, που υποδηλώνει την ύπαρξη δύο πρωτονίων – το H_{12} και το H_{16} – των οποίων οι κορυφές συμπίπτουν. Εφόσον αποτυπώνεται η ύπαρξη δευτέρου αμιδικού πρωτονίου, αυτό συνεπάγεται την ύπαρξη ίσως της επιθυμητής ένωσης.

Επιπλέον, απόδειξη αποτελεί η ύπαρξη των πρωτονίων του δακτυλίου του φουρανίου, με το πιο αποπροστατευμένο H_{19} να εντοπίζεται στα 7.97 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή όπου η σχάση που παρουσιάζει δεν είναι ιδιαίτερα ευδιάκριτη. Η αποπροστασία του εν λόγω πρωτονίου είναι αναμενόμενη καθώς γειτνιάζει με άτομο οξυγόνου, το οποίο του αφαιρεί επαγωγικά ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 17 εντοπίζεται, με τη σειρά του, στα 7.41 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή της διπλής κορυφή, εμφανίζοντας σχάση λόγω του γειτονικού του H_{18} με σταθερά σύζευξης $^3J=3.5$ Hz, αλλά και λόγω του H_{19} με το οποίο έχει απόσταση τεσσάρων δεσμών εκδηλώνοντας σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης $^4J=0.9$ Hz. Τέλος, το πιο προστατευμένο πρωτόνιο του δακτυλίου είναι το H_{18} , το οποίο εντοπίζεται στα 6.72 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μία διπλή της διπλής κορυφή, καθώς δέχεται επίδραση από τα γειτονικά του πρωτόνια H_{17} και H_{19} με σταθερές σύζευξης $^3J=3.6$ Hz και

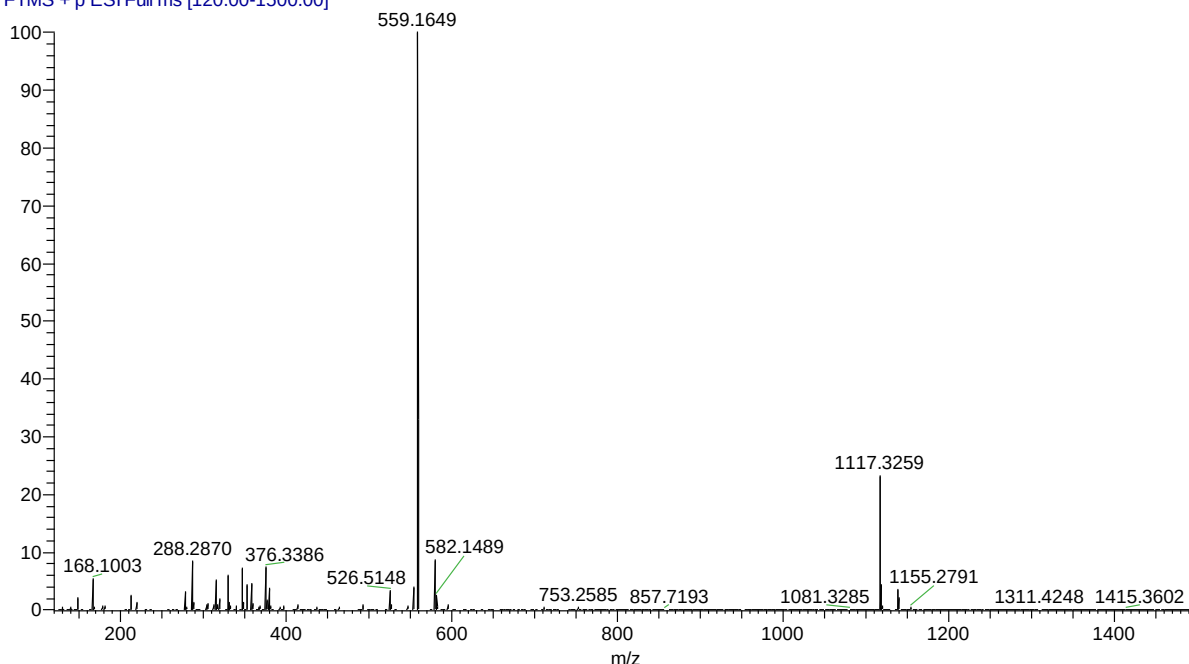
$^3J=1.8$ Hz, αντίστοιχα. Συγκριτικά με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αναλόγου **Nil-4**, διαπιστώνεται η μείωση της σταθεράς σύζευξης που εκδηλώνει το H_{18} με τα γειτονικά του πρωτόνια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το άτομο του οξυγόνου είναι σαφώς πιο ηλεκτραρνητικό από ότι αυτό του θείου, συνεπώς έλκει ισχυρότερα ηλεκτρονιακή πυκνότητα, με συνέπεια να καταγράφονται χαμηλότερες σταθερές σύζευξης.

Όσον αφορά τα πρωτόνια του δακτυλίου που βρίσκονται μεταξύ των δύο αμιδικών δεσμών, για το πρωτόνια H_{15} ισχύει ότι περιγράφηκε παραπάνω, ενώ και εδώ τα πρωτόνια H_{13} και H_{14} ταυτίζονται και εμφανίζονται ως μια κορυφή με ολοκλήρωση 2 στα 7.91 ppm.



Εικόνα 3.28. $^{13}\text{C-NMR}$ του αναλόγου **Nil-5** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

EMSK-53_210714110426 #32 RT: 0.45 AV: 1 NL: 9.64E7
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-1500.00]



Εικόνα 3.29. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του αναλόγου **Nil-5** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Το παραπάνω φάσμα μάζας αποτελεί απόδειξη ότι ο σχηματισμός επιθυμητού αναλόγου **Nil-5** έχει λάβει χώρα επιτυχώς, καθώς το θραύσμα που εντοπίζεται σε τιμή m/z 559.1649 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.12. Σύνθεση του αναλόγου Nil-6

3.12.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση του αναλόγου Nil-6

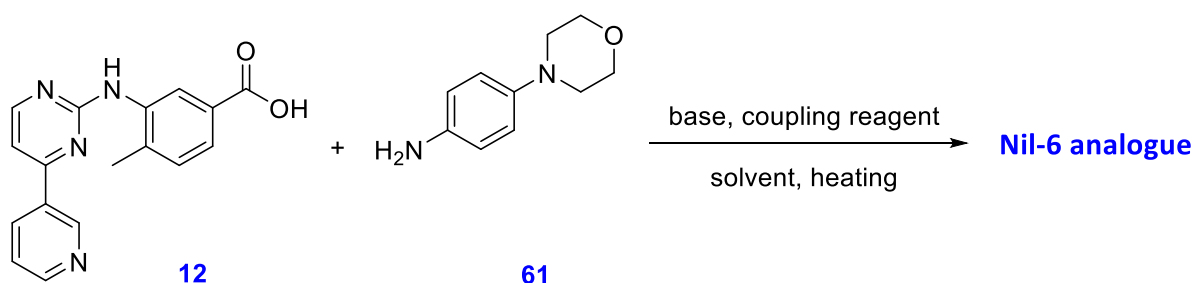
Εκτός από τα αρωματικά ετεροκυκλικά καρβοξυλικά οξέα, επιλέχθηκαν και άλλες ομάδες που θεωρήθηκαν κατάλληλες να αντικαταστήσουν το δακτύλιο του μεθυλο-ιμαδαζολίου στο Nilotinib, δηλαδή ενδεχομένως να προσφέρουν καλύτερη βιολογική δράση.

Μια διαφορετική προσέγγιση από τις προηγούμενες περιλαμβάνει την αντικατάσταση αυτού με το δακτύλιο της μορφολίνης σε διαφορετική θέση από την αντίστοιχη του ιμιδαζολίου στο πρόδρομο φάρμακο. Παρόλα αυτά, στο ανάλογο υπ' αριθμόν **6** (**Nil-6**) που σχεδιάστηκε και συντέθηκε στο εργαστήριο, έγινε προσάρτηση απευθείας της εμπορικά διαθέσιμης ένωσης 4-μορφολινο-ανιλίνης **61**, χωρίς την ύπαρξη της τριφθορομεθυλο-ομάδας σχηματίζοντας αμιδικό δεσμό με το οξύ **12** με τη χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης. Δεδομένου ότι η **61** δεν είναι μια παρεμποδισμένη ανιλίνη και η προσβολή αυτής θεωρείται αρκετά

εύκολη, δοκιμάστηκε η χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων σύζευξης, ξεκινώντας από το ηπιότερο ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα ανεπιθύμητα παραγόμενα παραπροϊόντα.

Ως ένα πρώτο βήμα, δοκιμάστηκε η σύζευξη με τη χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης DCC/HOBt σε διαλύτη άνυδρο DMF, χωρίς ωστόσο να οδηγήσει στη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος. Περαιτέρω προσπάθειες περιλαμβάνουν τη χρήση άλλων αντιδραστηρίων σύζευξης, όπως το TBTU, PyBrop και το HATU, οδηγώντας και τα τρία στο σχηματισμό του επιθυμητού αναλόγου με ικανοποιητική απόδοση.

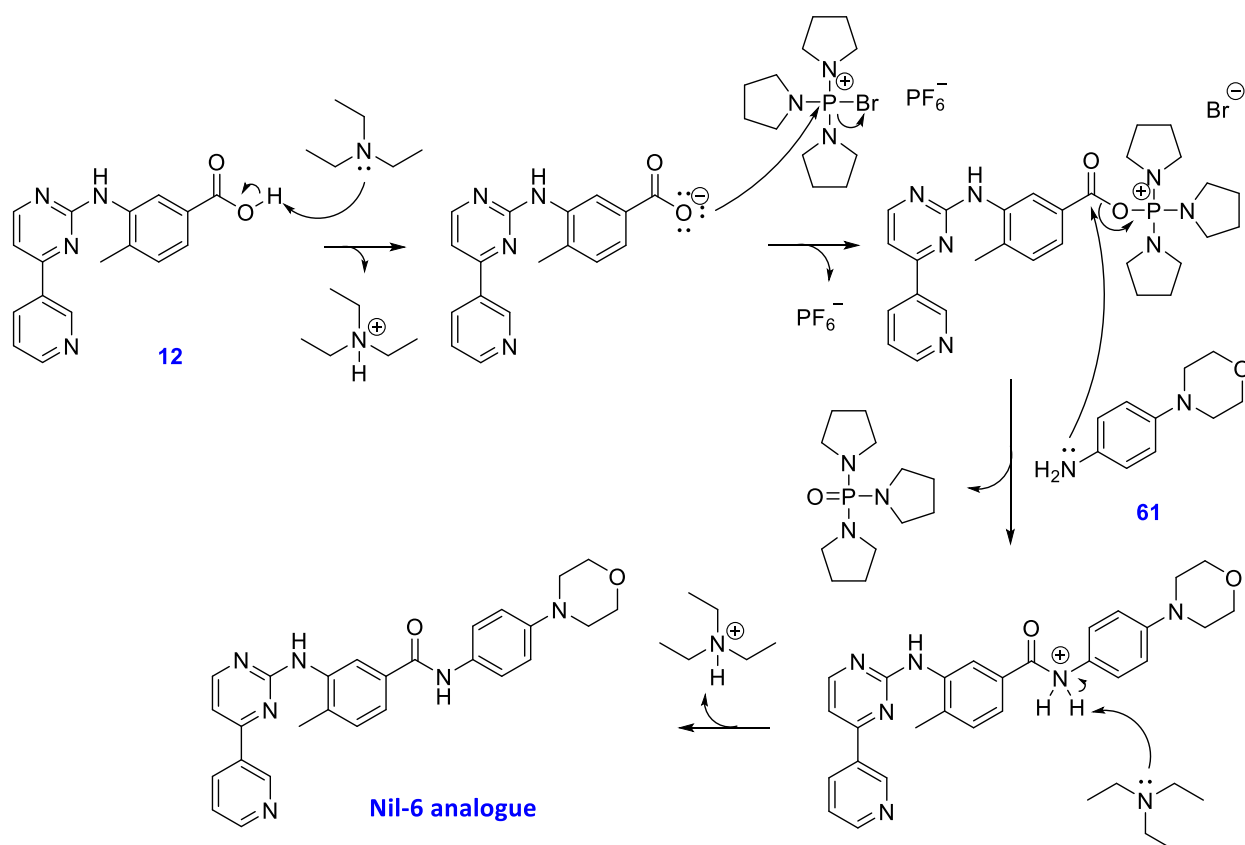
Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει την επίδραση αρχικά της βάσης και, στη συνέχεια, του αντιδραστηρίου σύζευξης στο οξύ **12** υπό αδρανή ατμόσφαιρα και σε παγόλουτρο για την αποφυγή σχηματισμού παραπροϊόντων. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος, ακολουθεί η προσθήκη της **61** και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ αν απαιτείται, εφαρμόζεται ελεγχόμενη θέρμανση (μετά από σχετικό έλεγχο με TLC).



Σχήμα 3.46. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου **Nil-6**.

Στο παρακάτω σχήμα αναπαριστάνεται ο μηχανισμός κατά την ενεργοποίηση του οξέος **12** με αντιδραστήριο σύζευξης PyBrop, προκειμένου να σχηματιστεί το επιθυμητό αναλόγο **Nil-6**.

Όμοια με τον μηχανισμό που λαμβάνει χώρα και στη σύζευξη με το αντιδραστήριο HATU, η τριαιθυλαμίνη, ως βάση, αποπρωτονιώνει το πρωτόνιο του καρβοξυλίου, ώστε να του επιτραπεί μετέπειτα η πυρηνόφιλη προσβολή στο θετικά φορτισμένο άτομο του φωσφόρου του PyBrop, οδηγώντας κατά αυτόν τον τρόπο στο σχηματισμό ενός ενδιάμεσου. Μια πυρηνόφιλη προσβολή από την 4-μορφολινο-ανιλίνη **61** στον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος **Nil-6**, αναλόγου της Νιλοτινίβης.

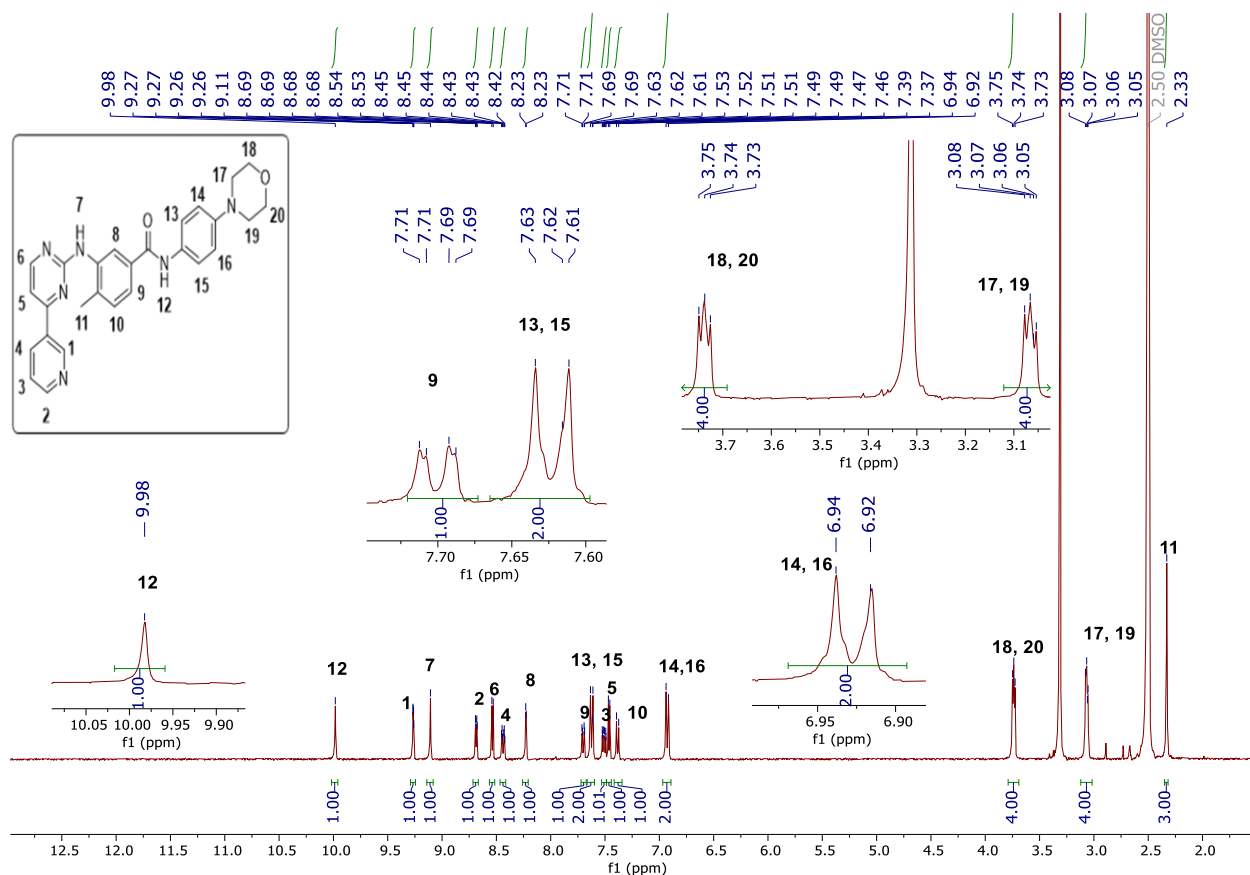


Σχήμα 3.47. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την ενεργοποίηση του οξέος **12** με αντιδραστήριο σύζευξης PyBrop προς σχηματισμό του αναλόγου **Nil-6**.

Πείραμα	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl ₂	Βάση	Διαλύτης dry	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	1 eq	1.5 eq	DCC 1.2 eq HOBT 1.2 eq	Et ₃ N 1.2 eq	DMF	0-75°C	72 h	-
2	1 eq	1.2 eq	TBTU 1.2 eq	Et ₃ N 1.2 eq	DMF	0-50°C	48 h	52%
3	1 eq	1.2 eq	PyBrop 1.1 eq	Et ₃ N 1.5 eq	DMF	0-50°C	48 h	57%
4	1 eq	1.2 eq	HATU 1.1 eq	Et ₃ N 1.5 eq DIPEA 1 eq	DMF	0°C-r.t	24 h	65%

Πίνακας 3.6. Πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του αναλόγου **Nil-6** κατόπιν ενεργοποίησης του οξέος **12** με αντιδραστήριο σύζευξης.

3.12.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-6



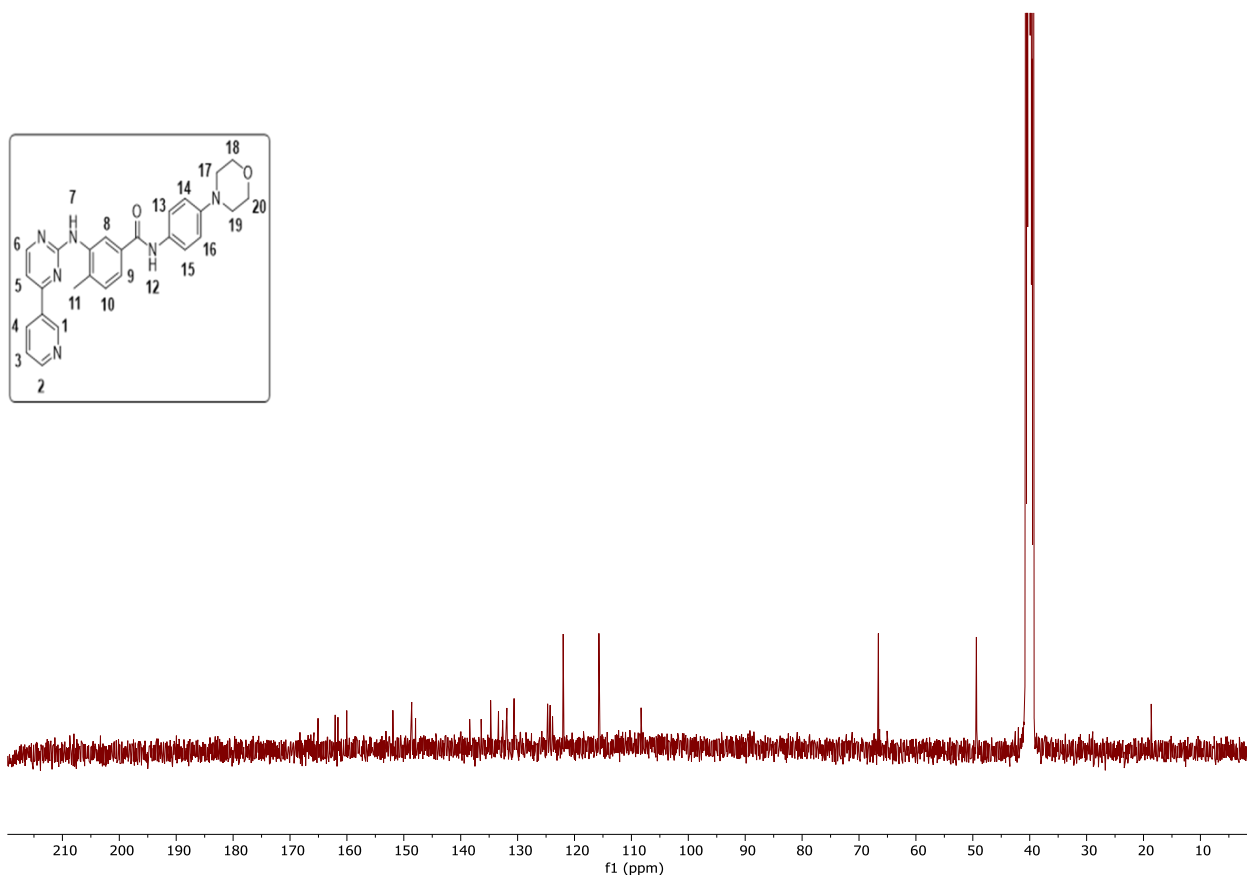
Εικόνα 3.30. ^1H -NMR του αναλόγου **Nil-6** σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$ στα 400 MHz.

Από το παραπάνω φάσμα ^1H -NMR αποδεικνύεται ο σχηματισμός του αναλόγου **Nil-6** καθώς αποτυπώνονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των πρωτονίων της ένωσης. Ένδειξη που καταδεικνύει τον σχηματισμό της εν λόγω ένωσης, αποτελεί η κορυφή στα 9.98 ppm με ολοκλήρωση 1 που αντιστοιχεί στο αμιδικό πρωτόνιο H_{12} .

Επιπλέον, εκτός από τις ήδη υπάρχουσες κορυφές που έχουν αναλυθεί στο φάσμα ^1H -NMR του οξέος **12**, εντοπίζονται και οι κορυφές των πρωτονίων της 4-μορφολινο-ανιλίνης **61**. Συγκεκριμένα, τα πρωτόνια H_{13} και H_{15} συντονίζονται μαζί στα 7.62 ppm με ολοκλήρωση 2 ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης από τα γειτονικά τους H_{14} και H_{16} , αντίστοιχα, με $^3J=9.0$ Hz. Λόγω συμμετρικότητας του μορίου οι κορυφές των δύο αυτών πρωτονίων συμπίπτουν. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των H_{14} και H_{16} , τα οποία εντοπίζονται στα 6.93 ppm ως διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 και με σταθερά σύζευξης $^3J=8.9$ Hz.

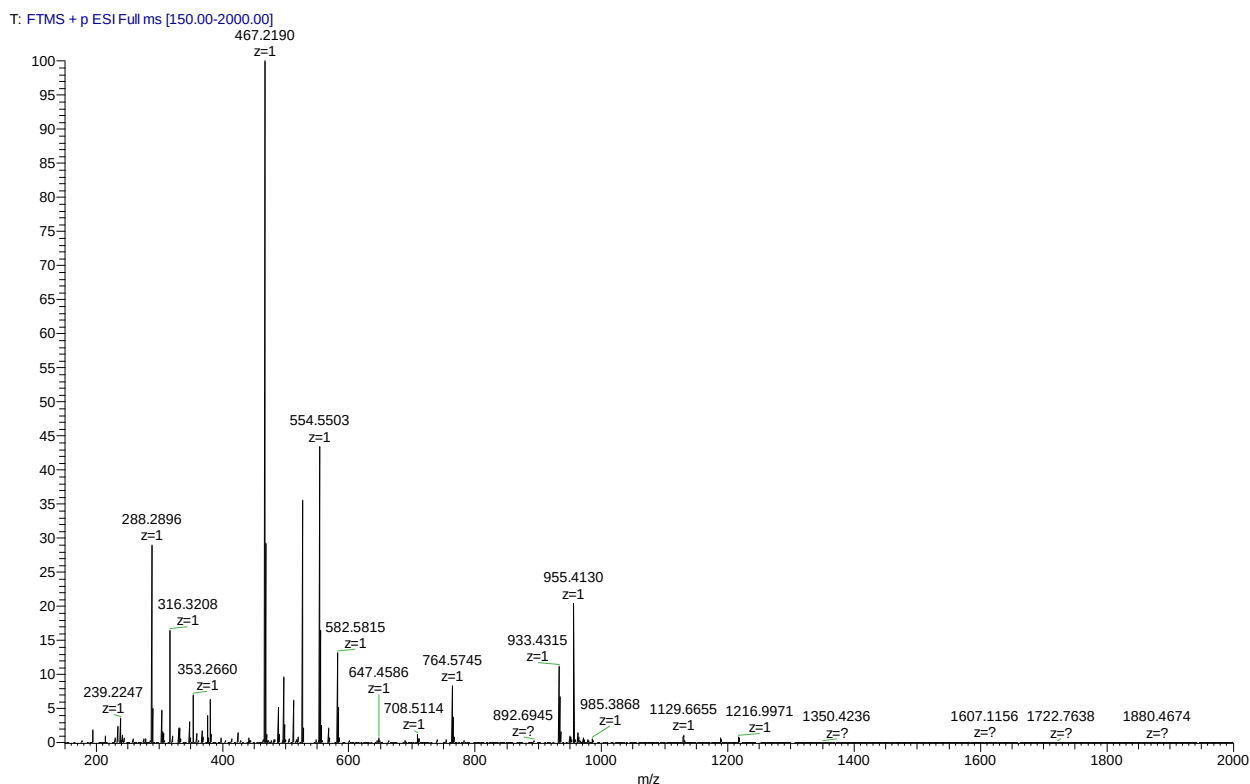
Τέλος, στα 3.74 ppm συντονίζονται τα H_{18} και H_{20} ως μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 4. Ενώ, αντίθετα, τα H_{17} και H_{19} συντονίζονται στα 3.07 ppm ως πολλαπλή κορυφή με

ολοκλήρωση 4. Το γεγονός ότι το οξυγόνο είναι πιο ηλεκτραρνητικό από το άζωτο, εξηγεί την αποπροστασία των H₁₈ και H₂₀ συγκριτικά με τα H₁₇ και H₁₉.



Εικόνα 3.31. ¹³C-NMR του αναλόγου **Nil-6** σε διαλύτη DMSO-d₆ στα 400 MHz.

Στο παραπάνω φάσμα ¹³C-NMR εντοπίζονται όλες οι αναμενόμενες κορυφές των ανθράκων του αναλόγου **Nil-6**, μεταξύ των οποίων και εκείνοι του δακτυλίου της μορφολίνης, στα 66.60 και 49.37 ppm. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι οι ισοδύναμοι άνθρακες της μορφολινο-ανιλίνης εμφανίζονται με μεγαλύτερη ένταση από τους υπολοίπους, καθώς οι κορυφές αυτών συμπίπτουν.



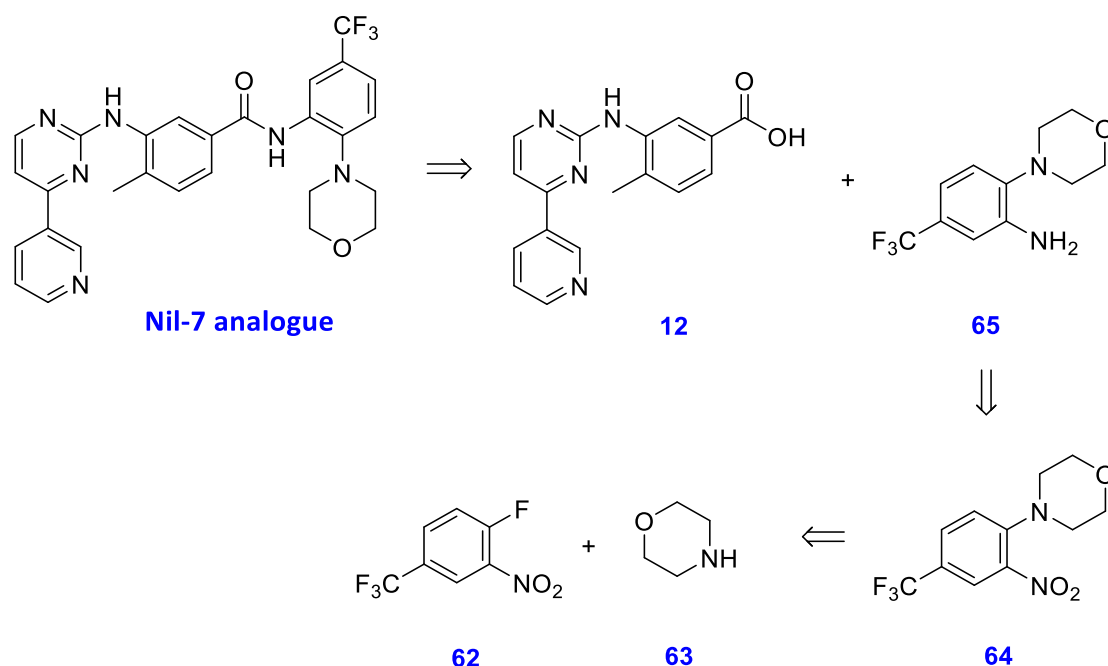
Εικόνα 3.32. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του αναλόγου **Nil-6** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Σύμφωνα με το παραπάνω φάσμα μάζας αποδεικνύεται ο σχηματισμός του επιθυμητού αναλόγου **Nil-6**, καθώς το θραύσμα που εντοπίζεται σε τιμή m/z 467.2190 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.13. Σύνθεση του αναλόγου Nil-7

Ένα επιπλέον ανάλογο που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο (**Nil-7**) περιλαμβάνει τον δακτύλιο της μορφολίνης στη 2-θέση ως προς τον αμιδικό δεσμό, με ενσωματωμένη την τριφθορομεθυλο-ομάδα, η οποία απουσίαζε στο προηγούμενο ανάλογο **Nil-6**.

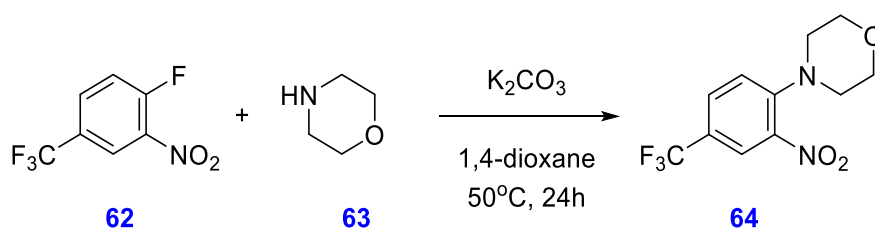
Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, όπου απεικονίζεται η αντίστροφη πορεία σύνθεσης του αναλόγου, το **Nil-7** προκύπτει μέσω μιας αντίδρασης σύζευξης της υποκατεστημένης ανιλίνης **65** και του οξέος **12**. Με τη σειρά της η ανιλίνη **65** προκύπτει με αναγωγή της αντίστοιχης νιτροένωσης **64**, η οποία συντίθεται μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ του 1-φθορο-2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου **62** και της μορφολίνης **63**.



Σχήμα 3.48. Αντίστροφη πορεία σύνθεσης του αναλόγου **Nil-7**.

3.13.1. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της 4-(2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)μορφολίνης (ένωση **64**)

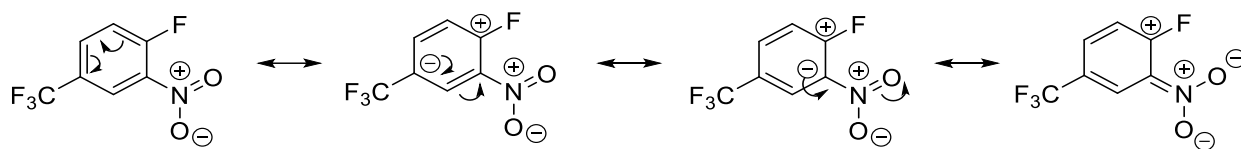
Η σύνθεση της ένωσης **64** λαμβάνει χώρα μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, μέσω μηχανισμού προσθήκης/απόσπασης μεταξύ του 1-φθορο-2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου **62** και της μορφολίνης **63** παρουσία βάσης ανθρακικού καλίου σε διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Μετά από αντίδραση στους 50 °C για 24h λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **64** με αρκετά υψηλή απόδοση (94%).¹⁰⁴



Σχήμα 3.49. Αντίδραση σύνθεσης της **64**.

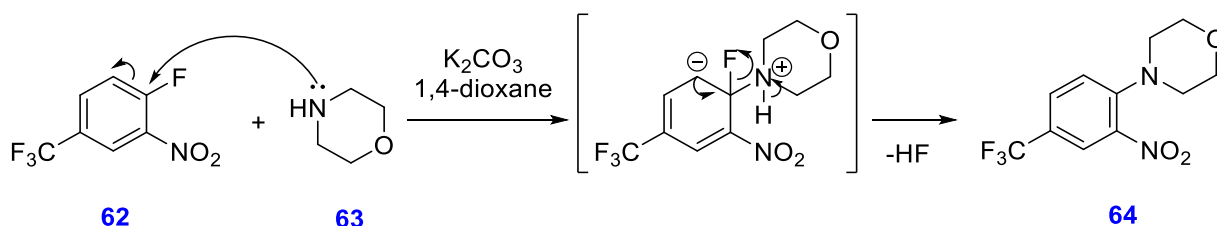
Το υπόστρωμα **62** θεωρείται ενεργοποιημένο ως προς την πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση, καθώς στις θέσεις ortho και para ως προς το άτομο του φθορίου, υπάρχουν ομάδες ενεργοποιητές, οι οποίες αφαιρούν ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο ευνοώντας την πυρηνόφιλη προσβολή της μορφολίνης **63** στη θέση του φθορίου (αποχωρούσα ομάδα). Ειδικότερα, σε ortho θέση ως προς την αποχωρούσα ομάδα, βρίσκεται η νιτρο-

ομάδα, η οποία έλκει ισχυρά ηλεκτρονιακή πυκνότητα τόσο μέσω συζυγιακού φαινομένου όσο και μέσω του αντίστοιχου επαγωγικού. Από την άλλη, σε para-θέση υπάρχει η τριφθορομεθυλο-ομάδα, η οποία μέσω επαγωγικού φαινομένου αφαιρεί εξίσου ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο ενεργοποιώντας τον ώστε να υποστεί μια πυρηνόφιλη προσβολή.



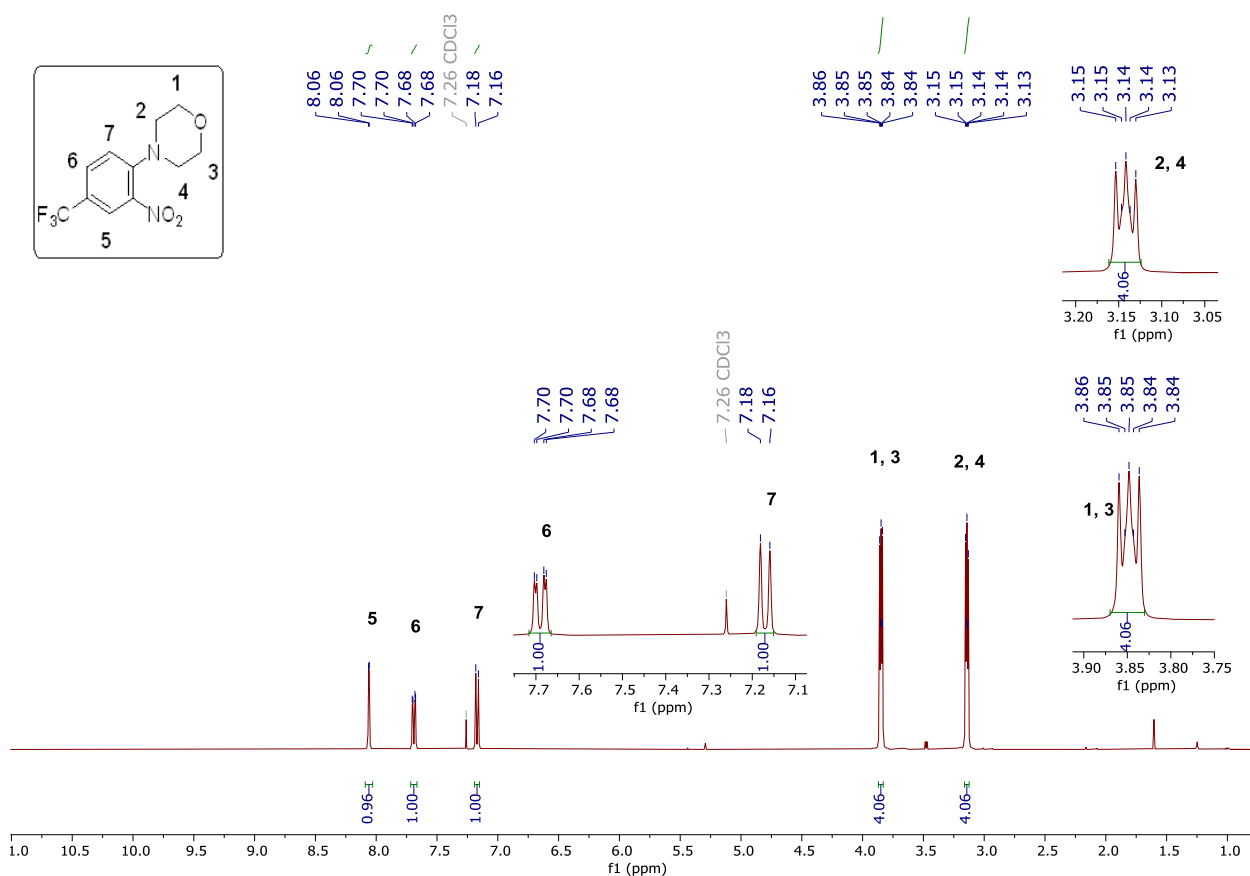
Σχήμα 3.50. Δομές συντονισμού μέσω των οποίων εξηγείται η ευνοϊκή προσβολή της μορφολίνης στη θέση του φθορίου.

Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, όπου αναπαριστάνεται ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την αντίδρασης σύνθεσης της **64**, το μονήρες ζεύγος του αζώτου της μορφολίνης προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα όπου βρίσκεται το άτομο του φθορίου οδηγώντας σε ένα ενδιάμεσο Meisenheimer ανιονικής φύσης. Ακολούθως με την απομάκρυνση ενός μορίου HF προκύπτει το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 3.51. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση της ένωσης **64**.

3.13.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 4-(2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)μορφολίνης (ένωση 64)

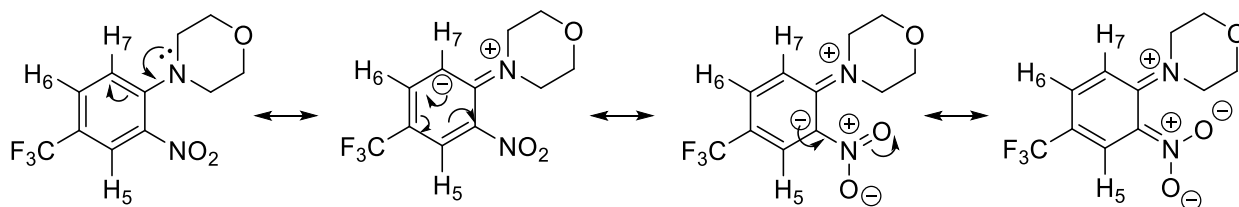


Εικόνα 3.33. ¹H-NMR της ένωσης **64** σε διαλύτη CDCl₃ στα 400 MHz.

Από το παραπάνω φάσμα ¹H-NMR, προκύπτει πως η σύνθεση της επιθυμητής ένωσης **64** έχει λάβει χώρα. Αρχικά, τα πρωτόνια της μορφολίνης εντοπίζονται ως πολλαπλές κορυφές στην αλειφατική περιοχή με ολοκλήρωση 4 ppm. Συγκεκριμένα, τα πρωτόνια H₂ και H₄ ταυτίζονται και συντονίζονται μαζί στα 3.14 ppm, ενώ οι κορυφές των H₁ και H₃ συμπίπτουν στα 3.85 ppm. Επειδή το άτομο του οξυγόνου είναι πιο ηλεκτραρνητικό απ' ό,τι εκείνο του αζώτου, τα H₁ και H₃ είναι πιο αποπροστατευμένα συγκριτικά με τα H₂ και H₄.

Όσον αφορά τον αρωματικό δακτύλιο, ως το περισσότερο αποπροστατευμένο εμφανίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5 λόγω της γειτονικής θέσης που κατέχει από την -NO₂ ομάδα αλλά και από την -CF₃ ομάδα, οι οποίες και οι δύο έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο. Συγκεκριμένα, το H₅ συντονίζεται στα 8.06 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης μακράς απόστασης από το H₆, με σταθερά σύζευξης ⁴J=2.2 Hz. Στη συνέχεια, το H₆ λόγω του ότι γειτνιάζει και αυτό με την -CF₃ ομάδα συντονίζεται αμέσως μετά στα 7.69 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης από το γειτονικό του H₇ με ³J=8.8 Hz, αλλά και λόγω σχάσης μακράς απόστασης από το H₅. Τέλος, το H₇ με τη σειρά του εμφανίζεται στα 7.17 ppm με ολοκλήρωση 1 ως διπλή κορυφή λόγω σχάσης από το γειτονικό του H₆ με ³J=8.7 Hz. Πρόκειται για το πιο προστατευμένο αρωματικό

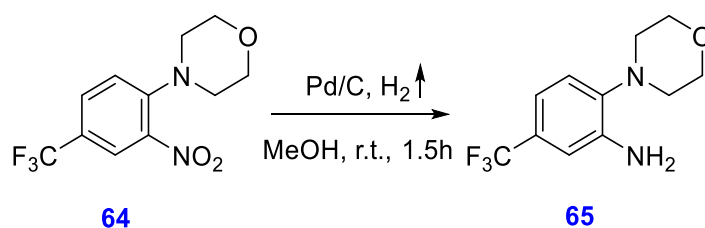
πρωτόνιο, καθώς δέχεται την μικρότερη επίδραση από τους υποκαταστάτες που έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα, ενώ αντιθέτως δέχεται επίδραση από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του αζώτου.



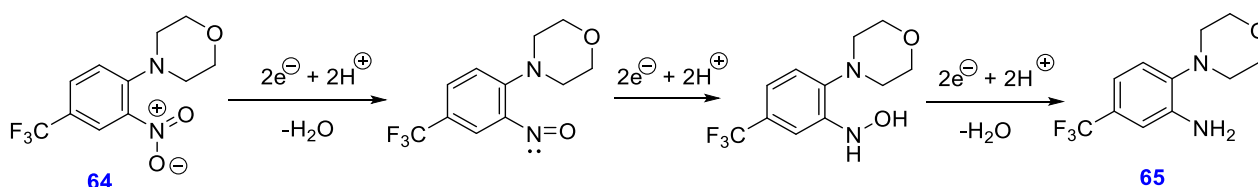
Σχήμα 3.52. Δομές συντονισμού της ένωσης **64** μέσω των οποίων εξηγείται η αποπροστασία των αρωματικών πρωτονίων.

3.13.3. Αντίδραση και μηχανισμός κατά τη σύνθεση της 2-μορφολινο-5-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης (ένωση **65**)

Το επόμενο βήμα μετά την πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση, είναι η μετατροπή της νιτρο-ομάδας της ένωσης **64** σε αμινο-ομάδα, ώστε να λάβει χώρα στο επόμενο στάδιο ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού. Πρόκειται για μια αντίδραση αναγωγής, η οποία συμβαίνει παρουσία υδρογόνου και καταλύτη Pd/C σε διαλύτη μεθανόλη. Μετά από παραμονή της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5h, παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ποσοτικά.

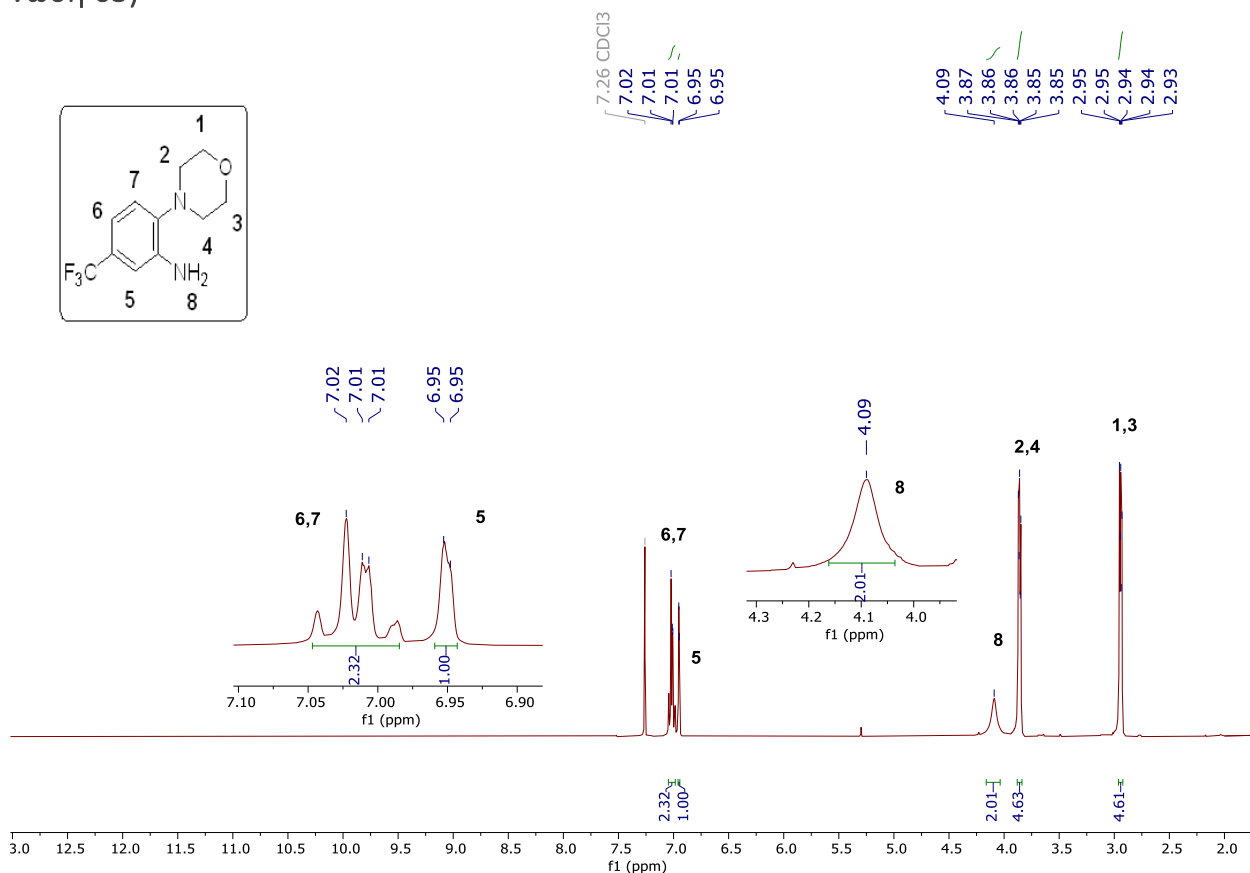


Σχήμα 3.53. Αντίδραση αναγωγής της **64** προς σχηματισμό της **65**.



Σχήμα 3.54. Μηχανισμός μετατροπής της νιτρο-ομάδας σε αμινο-ομάδα.

3.13.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της 2-μορφολινο-5-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης (ένωση 65)



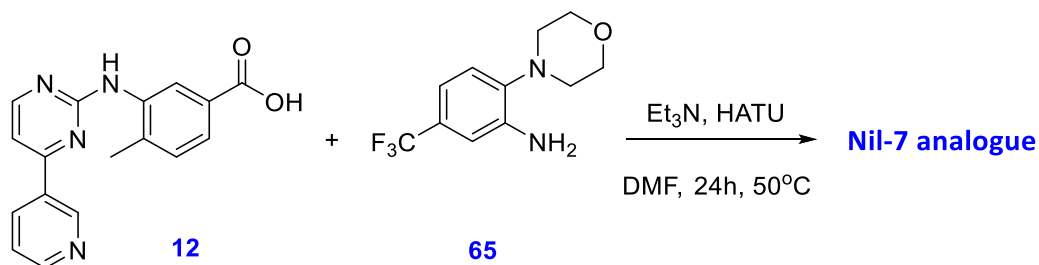
Εικόνα 3.34. ¹H-NMR της ένωσης **65** σε διαλύτη CDCl₃ στα 400 MHz.

Από το παραπάνω φάσμα ¹H-NMR, προκύπτει ότι η αντίδραση αναγωγής έχει οδηγήσει στο επιθυμητό προϊόν **65**. Απόδειξη αποτελεί η ευρεία κορυφή στα 4.09 ppm με ολοκλήρωση 2 που αντιστοιχεί στα δύο πρωτόνια της αμινομάδας H₈. Επιπλέον, παρατηρείται μετατόπιση των κορυφών των αρωματικών πρωτονίων, με το H₅ να είναι πλέον το πιο προστατευμένο αρωματικό πρωτόνιο, το οποίο εντοπίζεται στα 6.95 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια απλή κορυφή που τείνει να γίνει διπλή λόγω σχάσης μακράς απόστασης από το H₆ με σταθερά σύζευξης ⁴J=1.9 Hz. Τέλος, τα πρωτόνια H₆ και H₇ συντονίζονται μαζί στα 7.01 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 χωρίς να καθίσταται δυνατή η διάκρισή τους. Παρόλα αυτά, το H₆ αναμένεται να είναι το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο λόγω του ότι γειτνιάζει με την τριφθορομέθυλο ομάδα.

3.13.5. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου Nil-7

Το τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας του αναλόγου **Nil-7** είναι ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού μεταξύ του οξέος **12** και της ανηγμένης ανιλίνης **65** με χρήση αντιδραστήριου σύζευξης HATU.

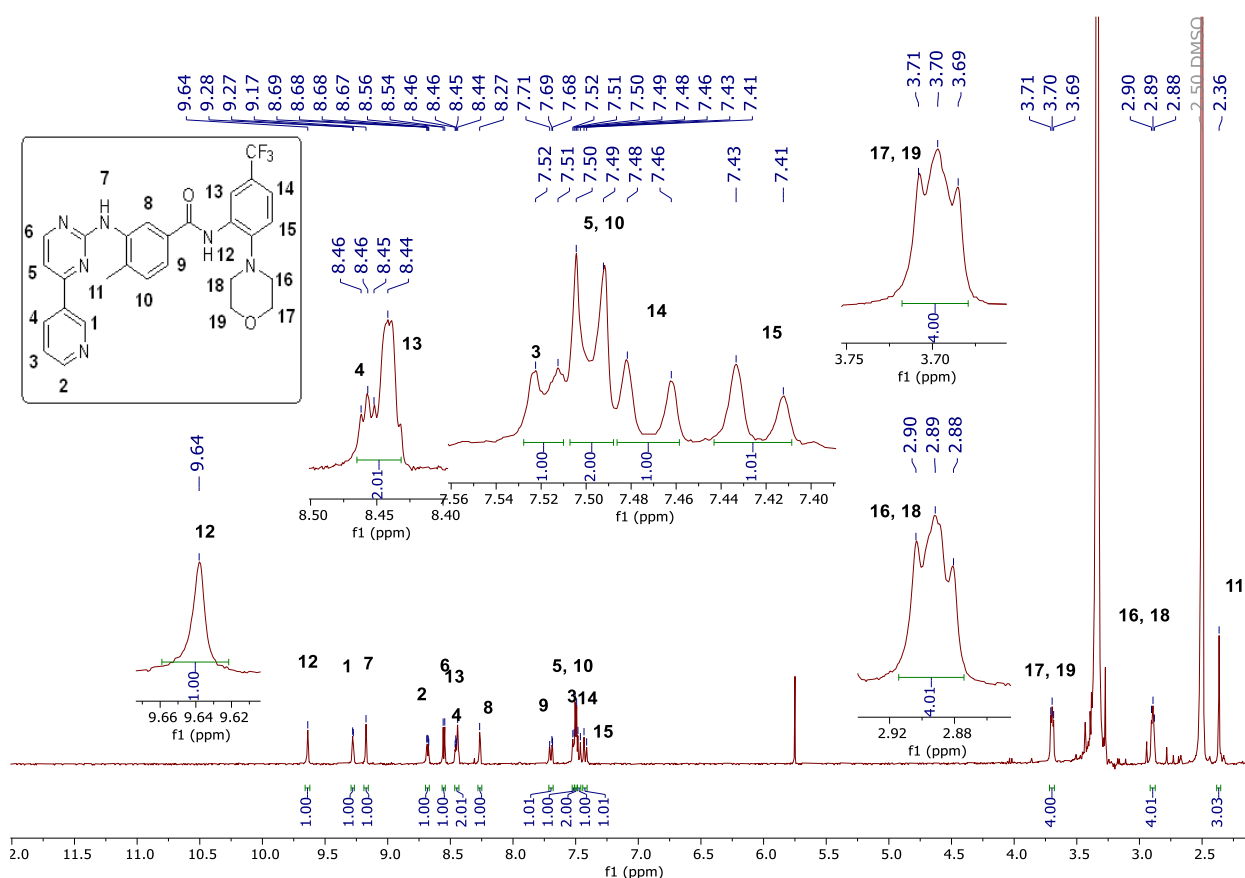
Η σύζευξη λαμβάνει χώρα υπό άνυδρες συνθήκες παρουσία του καρβοξυλικού οξέος σε διαλύτη DMF, τριαιθυλαμίνης και αντιδραστήριου σύζευξης HATU. Η αντίδραση διενεργείται σε παγόλουτρο στους 0 °C προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός παραπροϊόντων. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος, γίνεται προσθήκη της ανιλίνης **65** και η αντίδραση αφήνεται για 24h στους 50 °C.



Σχήμα 3.55. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου Nil-7.

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του οξέος **12** με αντιδραστήριο σύζευξης HATU έχει περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο.

3.13.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα του αναλόγου Nil-7



Εικόνα 3.35. ^1H -NMR του αναλόγου Nil-7 σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

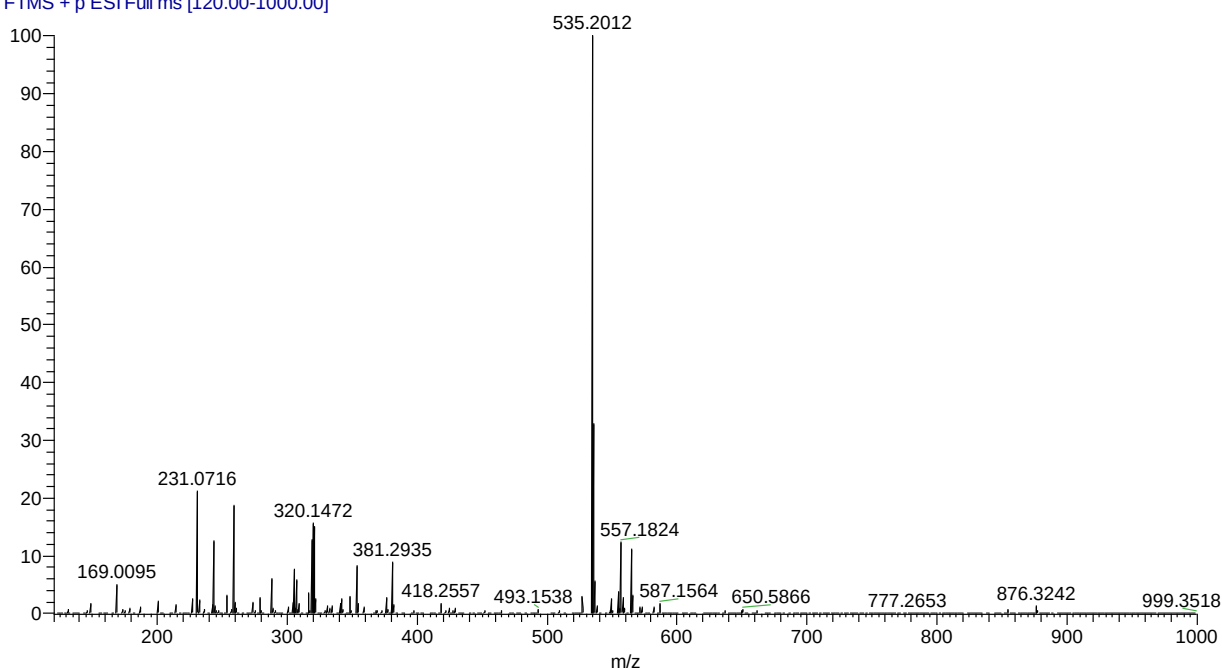
Από το παραπάνω φάσμα $^1\text{H-NMR}$, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού, συνεπώς και ο σχηματισμός του αναλόγου **Nil-7**. Συγκεκριμένα, το αμιδικό πρωτόνιο H_{12} εντοπίζεται στα 9.64 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 1.

Παράλληλα στο φάσμα εμφανίζονται και τα πρωτόνια του δακτυλίου της μορφολίνης σε χαμηλές τιμές δ , με τα πιο προστατευμένα να είναι τα H_{16} και H_{18} , των οποίων οι κορυφές συμπίπτουν στα 2.89 ppm με ολοκλήρωση 4. Από την άλλη, τα H_{17} και H_{19} λόγω του γειτονικού ηλεκτραρνητικού ατόμου του οξυγόνου, συντονίζονται μαζί στα 3.70 ppm με ολοκλήρωση 4.

Επιπλέον, τα γειτονικά μεταξύ τους πρωτόνια H_{14} και H_{15} εντοπίζονται ως δύο διακριτές διπλές κορυφές στα 7.47 και 7.42 ppm, αντίστοιχα, με ολοκλήρωση 1 και σταθερά σύζευξης $^3J=8$ Hz. Είναι λογικό το H_{14} να είναι περισσότερο αποπροστατευμένο από το H_{15} λόγω της γειτονικής $-\text{CF}_3$ ομάδας, η οποία παρουσιάζει -I επαγωγικό φαινόμενο και αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο. Αντίθετα, το H_{15} δέχεται και την επίδραση του ατόμου του αζώτου της μορφολίνης, το οποίο προσφέρει συζυγιακά ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τέλος, το H_{13} αποτελεί το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο του εν λόγω δακτυλίου λόγω της ενδιάμεσης θέσης που κατέχει μεταξύ της $-\text{CF}_3$ ομάδας αλλά και του αμιδικού δεσμού. Το μονήρες ζεύγος του αζώτου του αμιδικού δεσμού απεντοπίζεται προς τον αμιδικό δεσμό αποδίδοντάς του χαρακτήρα διπλού δεσμού, παρά προς τον δακτύλιο. Συνεπώς, το H_{13} εντοπίζεται στα 8.44 ppm, αλλά παρόλα αυτά συντονίζεται δίπλα στο πρωτόνιο H_4 χωρίς να διακρίνεται εύκολα από αυτό, αποδίδοντας μαζί μια πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2.

Οι υπόλοιπες κορυφές έχουν αναλυθεί σε προηγούμενη παράγραφο.

EMSK-44 210714110426 #5 RT: 0.06 AV: 1 NL: 8.27E7
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-1000.00]



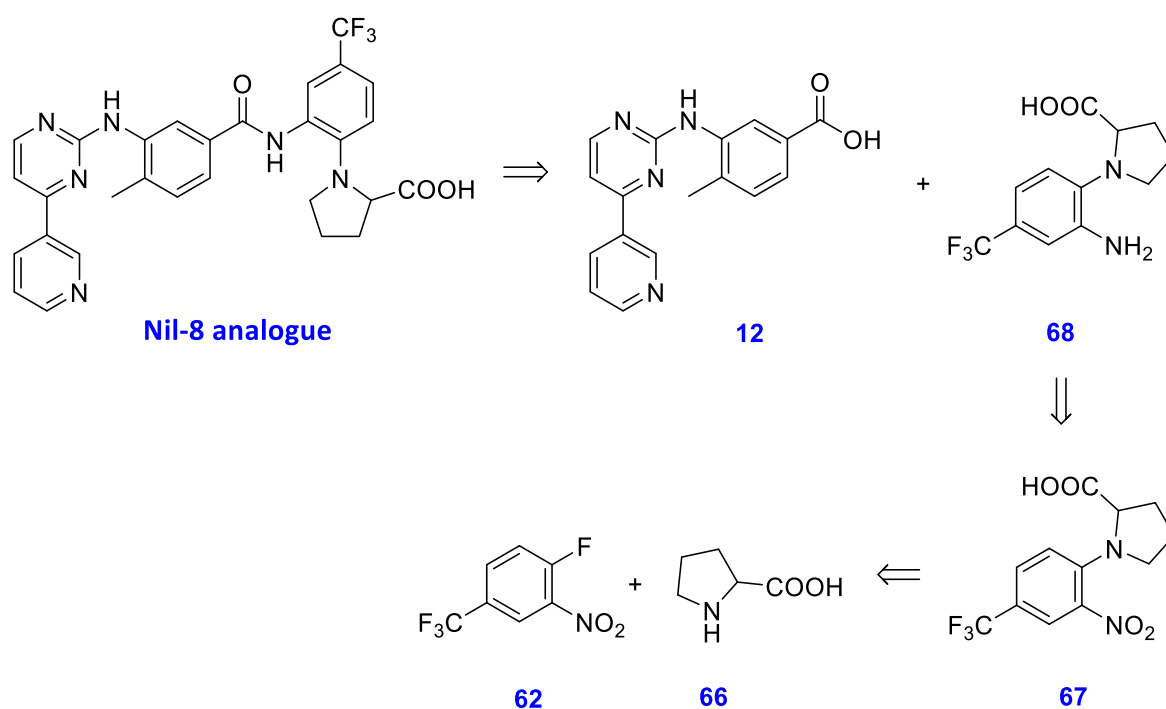
Εικόνα 3.36. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας του αναλόγου **Nil-7** σε 0.1% HCOOH σε MeOH .

Από το παραπάνω φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας αποδεικνύεται η σύνθεση του επιθυμητού αναλόγου **Nil-7**, καθώς το θραύσμα που εντοπίζεται σε τιμή m/z 535.2012 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.14. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-8

Ένα επιπλέον ανάλογο του Nilotinib (**Nil-8**) που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο περιλαμβάνει την προσάρτηση του πενταμελούς δακτυλίου της προλίνης στον τελικό βενζολικό δακτύλιο μέσω του ατόμου αζώτου του αμινοξέος. Όπως κατέδειξαν τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης, το συγκεκριμένο ανάλογο ενδεχομένως να προσδένεται ισχυρότερα στο ενεργό κέντρο της BCR-ABL1 και συνεπώς να παρουσιάζει καλύτερη βιολογική δράση, καθώς σχηματίζει έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου μεταξύ της καρβοξυλομάδας της προλίνης και του Glu286.

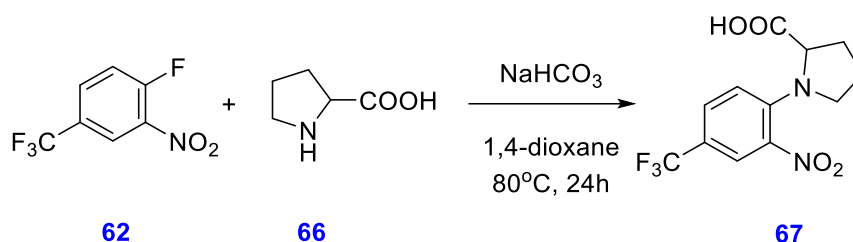
Όπως περιγράφεται και στο παρακάτω σχήμα, προκειμένου να διεξαχθεί η σύνθεση του **Nil-8**, πρωτίστως, είναι απαραίτητη η σύνθεση της ένωσης **68**. Η υποκατεστημένη ανιλίνη **68** προέχεται από την ένωση **67** με αναγωγή της νιτροομάδας στην αντίστοιχη αμινο, ενώ η **67** προκύπτει από μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ του 1-φθορο-2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου **62** και της L-προλίνης **66**.



Σχήμα 3.56. Αντίστροφη πορεία σύνθεσης του αναλόγου **Nil-8**.

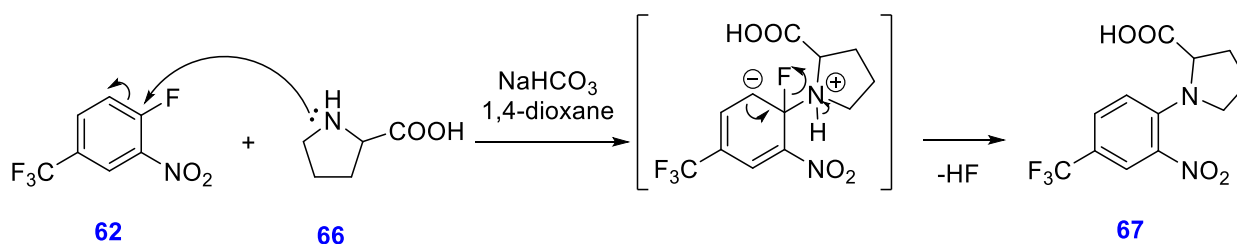
3.14.1. Σύνθεση της (2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση 67)

Η αντίδραση σύνθεσης της νιτρο-ένωσης **67** λαμβάνει χώρα μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με μηχανισμό προσθήκης/απόσπασης, μέσω ενός ενδιάμεσου Meisenheimer ανιονικής φύσης. Ειδικότερα, η εν λόγω αντίδραση διεξάγεται παρουσία του 1-φθορο-2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζολίου **62** και της L-προλίνης **66** με τη χρήση βάσης NaHCO_3 σε διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Μετά από παραμονή αυτής στους 80°C για 24h προκύπτει το επιθυμητό προϊόν σε υψηλή απόδοση (93%).



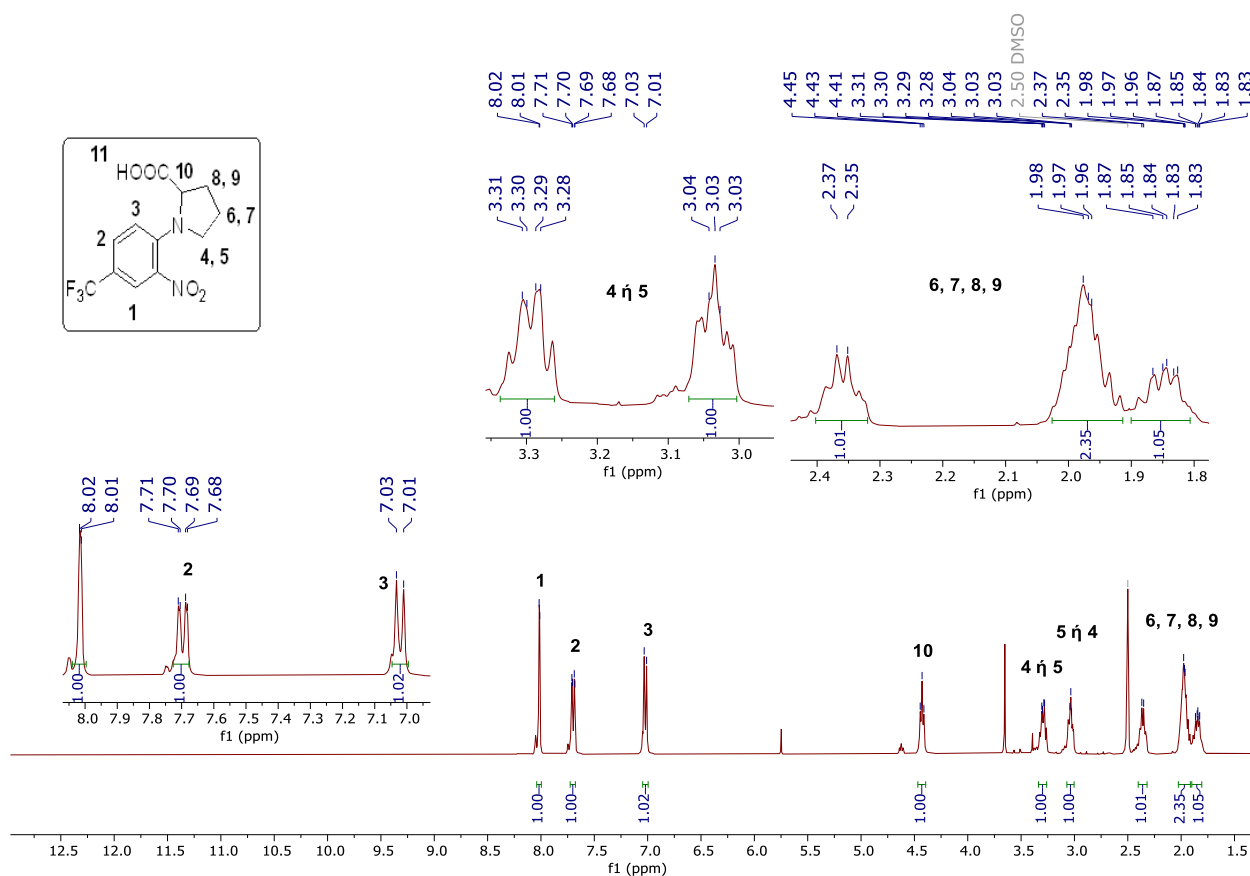
Σχήμα 3.57. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **67**.

Στο παρακάτω σχήμα αναπαριστάται ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση της ένωσης **67**. Αρχικά το μονήρες ζεύγος του αζώτου της προλίνης προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα όπου βρίσκεται το άτομο του φθορίου στην ένωση **62**, οδηγώντας σε ένα ενδιάμεσο Meisenheimer ανιονικής φύσης. Ακολούθως με την απομάκρυνση ενός μορίου HF προκύπτει το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 3.58. Μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση της ένωσης **67**.

3.14.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση 67)

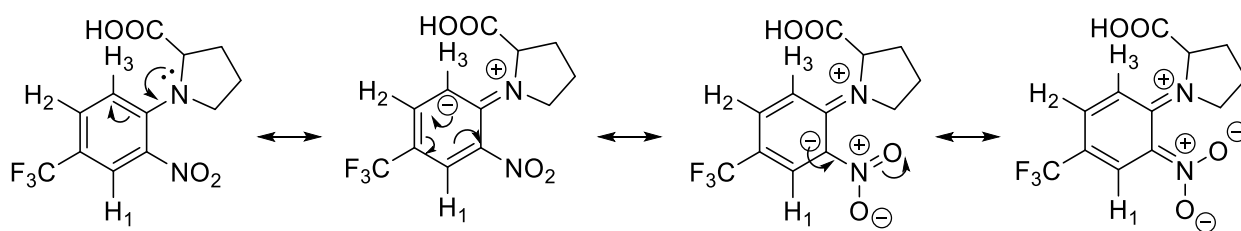


Εικόνα 3.37. ^1H -NMR της ένωσης **67** σε διαλύτη DMSO-d_6 στα 400 MHz.

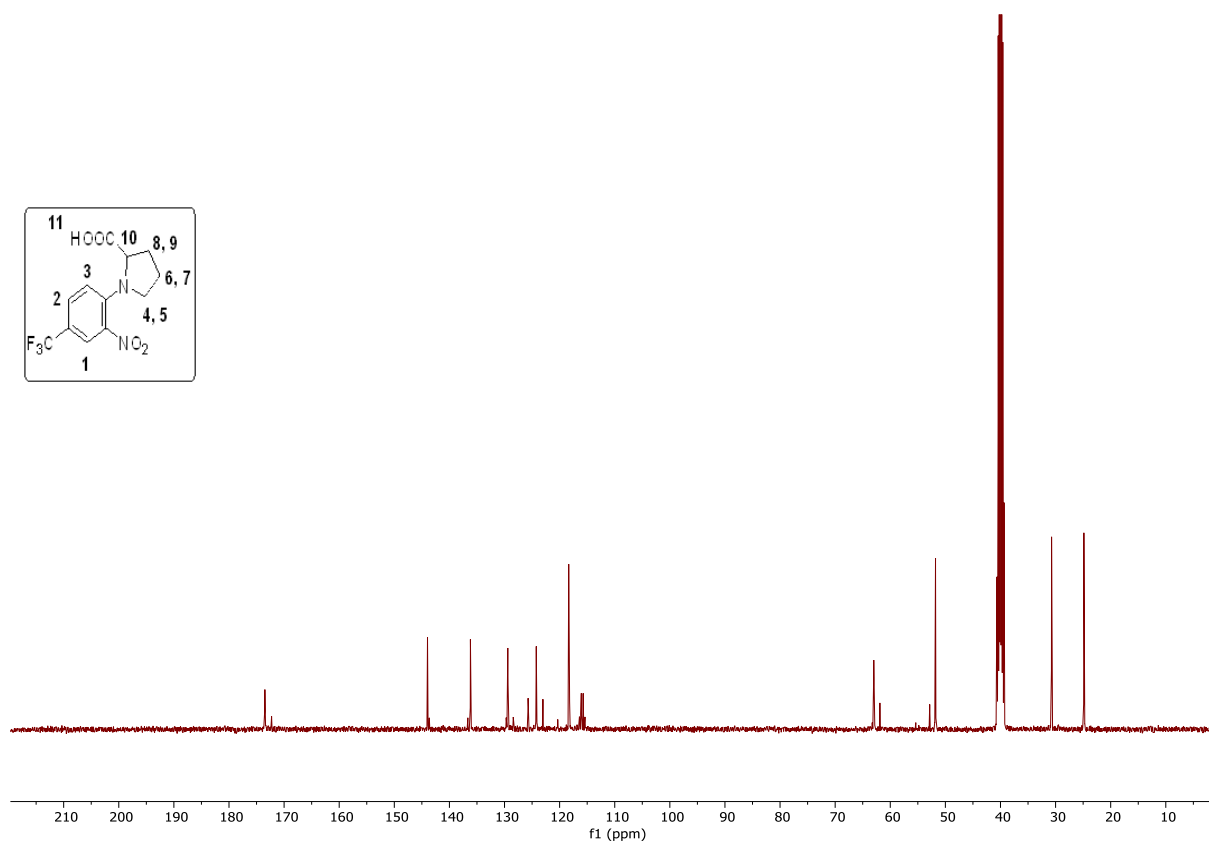
Από το παραπάνω φάσμα ^1H -NMR αποδεικνύεται η προσάρτιση του πενταμελούς δακτυλίου της προλίνης καθώς εντοπίζονται τα πρωτόνια αυτής στην αλειφατική περιοχή ως πολλαπλές κορυφές. Ειδικότερα, στα 4.43 ppm εντοπίζεται το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 10 ως μια τριπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1, λόγω των δύο γειτονικών του πρωτονίων H_8 και H_9 . Η αποπροστασία του συγκεκριμένου πρωτονίου οφείλεται στη διπλανή καρβοξυλομάδα, αλλά και στο άτομο του αζώτου το οποίο έλκει επαγωγικά ηλεκτρονική πυκνότητα. Λιγότερο αποπροστατευμένα εμφανίζονται τα H_4 και H_5 ως πολλαπλές κορυφές με ολοκλήρωση 1 η κάθε μία, χωρίς παρόλα αυτά να καθίσταται δυνατή η διάκρισή τους. Το ίδιο ισχύει και για τα H_6 , H_7 , H_8 και H_9 , τα οποία εμφανίζονται σε χαμηλότερες τιμές δ, ακόμα πιο προστατευμένα. Λόγω της ιδιαίτερης διαμόρφωσης του πενταμελούς δακτυλίου στο χώρο, τα εν λόγω πρωτόνια δεν είναι ισοδύναμα μεταξύ τους και ως εκ τούτου εντοπίζονται ως πολλαπλές κορυφές χωρίς να είναι δυνατό να διακριθούν.

Όσον αφορά τον βενζολικό δακτύλιο, όπως αναμένεται, το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H_1 , καθώς βρίσκεται σε ortho-θέση ως προς τη νιτρο-ομάδα, η οποία εκδηλώνει ένα ισχυρά αρνητικό φαινόμενο συντονισμού ($-\text{M}$). Παράλληλα, σε γειτονικό άνθρακα υπάρχει η τριφθορομεθυλο-ομάδα, η οποία εκδηλώνει ένα ισχυρά αρνητικό επαγωγικό φαινόμενο ($-\text{I}$). Συνεπώς το H_1 εντοπίζεται στα 8.02 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια απλή κορυφή,

η οποία όμως τείνει να σχαστεί σε διπλή λόγω του H₂ με το οποίο απέχει απόσταση τεσσάρων δεσμών, με μία σταθερά σύζευξης μακράς απόστασης $^4J=2.3$ Hz. Εν συνεχεία, λόγω της γειτονικής τριφθορομεθυλο-ομάδας, το H₂ εμφανίζει σήμα στα 7.70 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης από το γειτονικό του H₃ ($^3J=9.1$ Hz), αλλά και σχάσης μακράς απόστασης από το H₁. Τέλος, το H₃ συντονίζεται στα 7.02 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης από το γειτονικό του H₂. Το συγκεκριμένο πρωτόνιο δεν δέχεται επίδραση από τις προαναφερθείσες ομάδες που έλκουν ηλεκτρόνια, αντίθετα δέχεται ηλεκτρονική πυκνότητα από το άτομο του αζώτου της προλίνης, όπως φαίνεται και στις παρακάτω δομές συντονισμού.

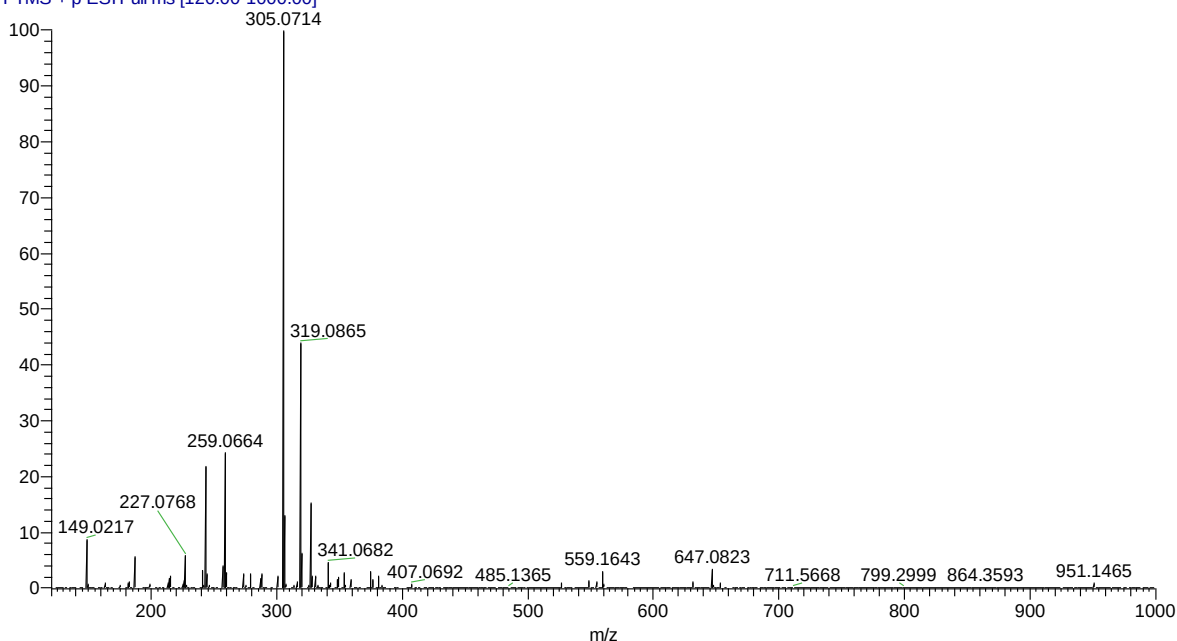


Σχήμα 3.59. Δομές συντονισμού μέσω των οποίων εξηγείται η αποπροστασία των αρωματικών πρωτονίων.



Εικόνα 3.38. ¹³C-NMR της ένωσης **67** σε διαλύτη DMSO-d₆ στα 400 MHz.

EMSK-7_dil_210714110426 #14 RT: 0.19 AV: 1 NL: 5.37E7
T: FTMS + p ESI Full ms [120.00-1000.00]



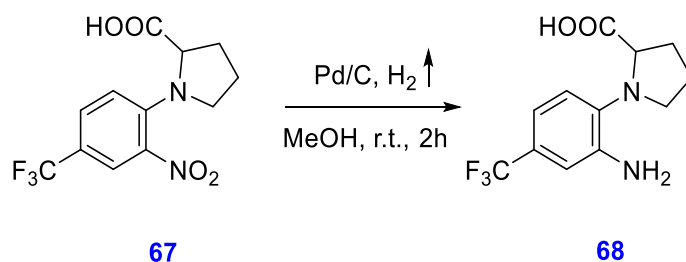
Εικόνα 3.39. Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της ένωσης **67** σε 0.1% HCOOH σε MeOH.

Από το παραπάνω φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός της επιθυμητής ένωσης **67**, καθώς το θραύσμα που εντοπίζεται σε τιμή m/z 305.0714 αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1.

3.14.3. Αντίδραση σύνθεσης της (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση **68**)

Μετά την πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση, το επόμενο βήμα είναι η αναγωγή της νιτρο-ομάδας της ένωσης **67** στην αντίστοιχη άμινο (ένωση **68**). Πρόκειται για μια αντίδραση αναγωγής, η οποία διενεργείται με την επίδραση αερίου υδρογόνου με χρήση καταλύτη Pd/C σε διαλύτη μεθανόλη. Η αντίδραση παραμένει για 2h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να παραληφθεί η ανηγμένη ένωση **68** ποσοτικά.

Η ένωση **68** χρησιμοποιείται απευθείας στην επόμενη αντίδραση σύζευξης, καθώς, ως ευοξείδωτη, κατά την επεξεργασία της εκτεθειμένη στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο οξειδώνεται, ενώ προκύπτουν και παραπροϊόντα, τα οποία, σαφώς, είναι ανεπιθύμητα για την μετέπειτα πορεία σύνθεσης.



Σχήμα 3.60. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **68**.

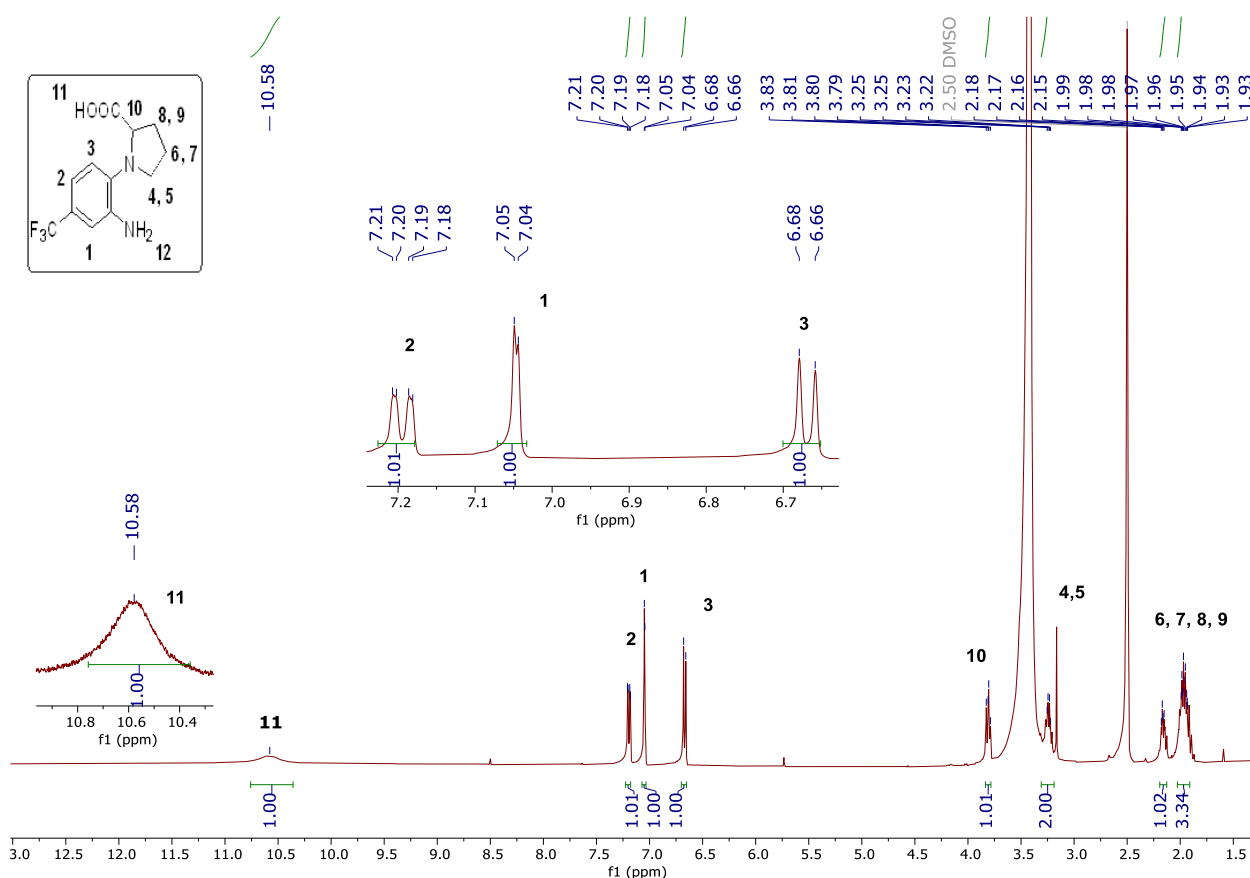
Ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την μετατροπή της νιτρο-ομάδας σε άμινο είναι ίδιος με αυτόν κατά τη σύνθεση της ένωσης **65**.

Η αναγωγή της ένωσης **67** δοκιμάστηκε, επίσης, και με καταλύτη $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ σε διαλύτη αιθανόλη.¹⁰⁵ Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή απορρίφθηκε, διότι κατά την επεξεργασία της αντίδρασης (εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό) η αμίνη οξειδωνόταν και έδινε ανεπιθύμητα παραπροϊόντα.

Πείραμα	Καταλύτης	Διαλύτης	H ₂ ↑	N ₂ ↑	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	Pd/C 2eq	MeOH	✓	-	r.t.	2h	~100%
2	SnCl ₂ ·2H ₂ O 5 eq	EtOH	-	✓	70 °C	20h	Παραπροϊόντα κατά την επεξεργασία

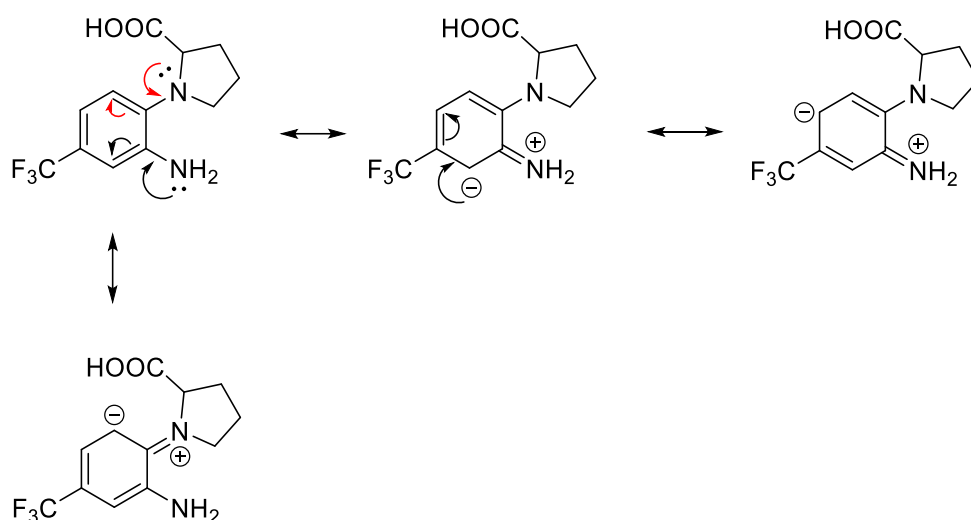
Πίνακας 3.7. Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την αναγωγή της νιτρο-ομάδας της ένωσης **67**.

3.14.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης (ένωση 68)



Εικόνα 3.40. ¹H-NMR της ένωσης 68 σε διαλύτη DMSO-d₆ στα 400 MHz.

Στο παραπάνω φάσμα ¹H-NMR είναι φανερή η μετατόπιση των αρωματικών πρωτονίων σε χαμηλότερες τιμές δ λόγω πλέον της ομάδας -NH₂, η οποία εκδηλώνει ένα ισχυρά θετικό φαινόμενο συντονισμού (+M), προσφέροντας ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο δακτύλιο. Κατά συνέπεια τα πρωτόνια εμφανίζονται πιο προστατευμένα συγκριτικά με την νιτρο-ένωση. Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο πλέον είναι το H₂, το οποίο εντοπίζεται στα 7.19 ppm με ολοκλήρωση 1 ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης από το γειτονικό του H₃ (³J=8.4 Hz) αλλά και λόγω σχάσης μακράς απόστασης από το H₁ (⁴J=2.1 Hz). Στην περίπτωση αυτή, το H₁ εμφανίζεται ως πιο προστατευμένο συγκριτικά με το H₂ πράγμα που δικαιολογείται απόλυτα από τις παρακάτω δομές συντονισμού, ενώ το αντίθετο συνέβαινε στη νιτρο-ένωση 67. Το H₃ εντοπίζεται στα 6.67 ppm ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης από το γειτονικό του H₂, ενώ εμφανίζεται ως πιο προστατευμένο λόγω της επίδρασης του μονήρους ζεύγους του ατόμου αζώτου της προλίνης.

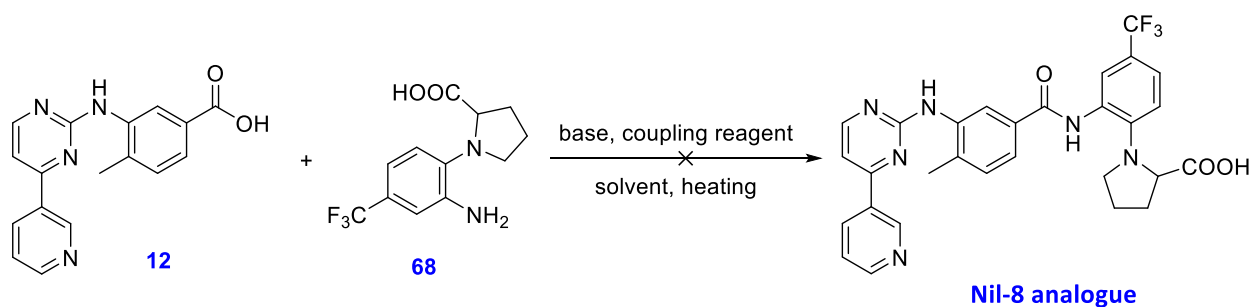


Σχήμα 3.61. Δομές συντονισμού μέσω των οποίων εξηγείται η προστασία των αρωματικών πρωτονίων της ένωσης **68**.

Όσον αφορά τα πρωτόνια της προλίνης, αυτά δίνουν σήμα στην αλειφατική περιοχή ως πολλαπλές κορυφές χωρίς να καθίσταται δυνατή η διάκρισή τους. Τέλος, το πρωτόνιο H₁₁ της καρβοξυλομάδας εντοπίζεται ως μια ευρεία κορυφή στα 10.58 ppm με ολοκλήρωση 1, ενώ τα πρωτόνια της ανιλίνης δεν φαίνονται στο παρόν φάσμα.

3.14.5. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου Nil-8

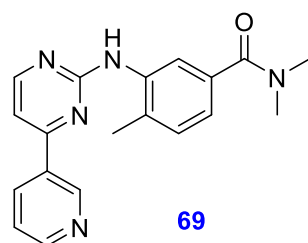
Το επόμενο και τελευταίο στάδιο της πορείας σύνθεσης του αναλόγου **Nil-8** είναι η σύζευξη του οξέος **12** με την ανιλίνη **68**. Όπως και στις προηγούμενες συζεύξεις, απαιτούνται αδρανείς συνθήκες διότι τυχόν ίχνη υγρασίας θα επηρέαζαν την ενεργοποίηση του οξέος και το παράγωγο του εστέρα που σχηματίζεται, με αποτέλεσμα την υδρόλυση αυτού ξανά προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ. Ως εκ τούτου η ενεργοποίηση του οξέος, είτε με αντιδραστήριο σύζευξης είτε με SOCl₂ απαιτεί ατμοσφαιρα αζώτου. Επιπλέον, στην ενεργοποίηση του οξέος **12** με HATU, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο προς αποφυγή σχηματισμού τυχόν παραπροϊόντων.



Σχήμα 3.62. Αντίδραση σύνθεσης του αναλόγου **Nil-8**.

Η σύζευξη δοκιμάστηκε αρχικά με την ενεργοποίηση του οξέος **12** με τη χρήση αντιδραστήριου σύζευξης HATU και βάσης τριαιθυλαμίνη, σε άνυδρο διαλύτη DMF υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η τριαιθυλαμίνη μπορεί να αποσπάσει το όξινο πρωτόνιο της καρβοξυλομάδας, ώστε η αποπρωτονιωμένη καρβοξυλομάδα να προσβάλει με τη σειρά της το αντιδραστήριο σύζευξης προς σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Με την προσθήκη, ακολούθως, της ανιλίνης **68** πραγματοποιείται μια πυρηνόφιλη προσβολή από το άτομο του αζώτου στον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα προς σχηματισμό του επιθυμητού αμιδικού δεσμού, με ταυτόχρονη απόσπαση του αντιδραστήριου σύζευξης. Ο μηχανισμός είναι ο κλασικός μηχανισμός σχηματισμού αμιδικού δεσμού, με χρήση αντιδραστήριου σύζευξης που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο. Από το φάσμα του ^1H NMR δεν διαπιστώθηκε ο σχηματισμός της επιθυμητής ένωσης με την μέθοδο αυτή.

Η εν λόγω αντίδραση σύζευξης δοκιμάστηκε και με ενεργοποίηση του οξέος **12**, με τη χρήση SOCl_2 προς σχηματισμό του αντίστοιχου χλωριδίου οξέος, το οποίο είναι σαφώς πιο δραστικό και ως εκ τούτου θα διευκόλυνε μια πυρηνόφιλη προσβολή από του μονήρες ζεύγος του ατόμου του αζώτου της **68**. Παρόλα αυτά, ούτε με αυτή τη μέθοδο δεν διαπιστώθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος. Παρατηρήθηκε μόνο ο σχηματισμός της ένωσης **69**, η οποία προκύπτει από την σύζευξη του οξέος **12** και της διμεθυλαμίνης, η οποία προέρχεται από τη διάσπαση του DMF.



Πείραμα	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl_2	Βάση	Διαλύτης dry	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	1 eq	1 eq	HATU 1 eq	Et_3N 1 eq	DMF	r.t. - 50°C	24h	-
2	2 eq	1 eq	SOCl_2 περίσσεια	DIPEA 2 eq	DMF	r.t. - 80°C	48h	-

Πίνακας 3.8. Πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του αναλόγου **Nil-8**.

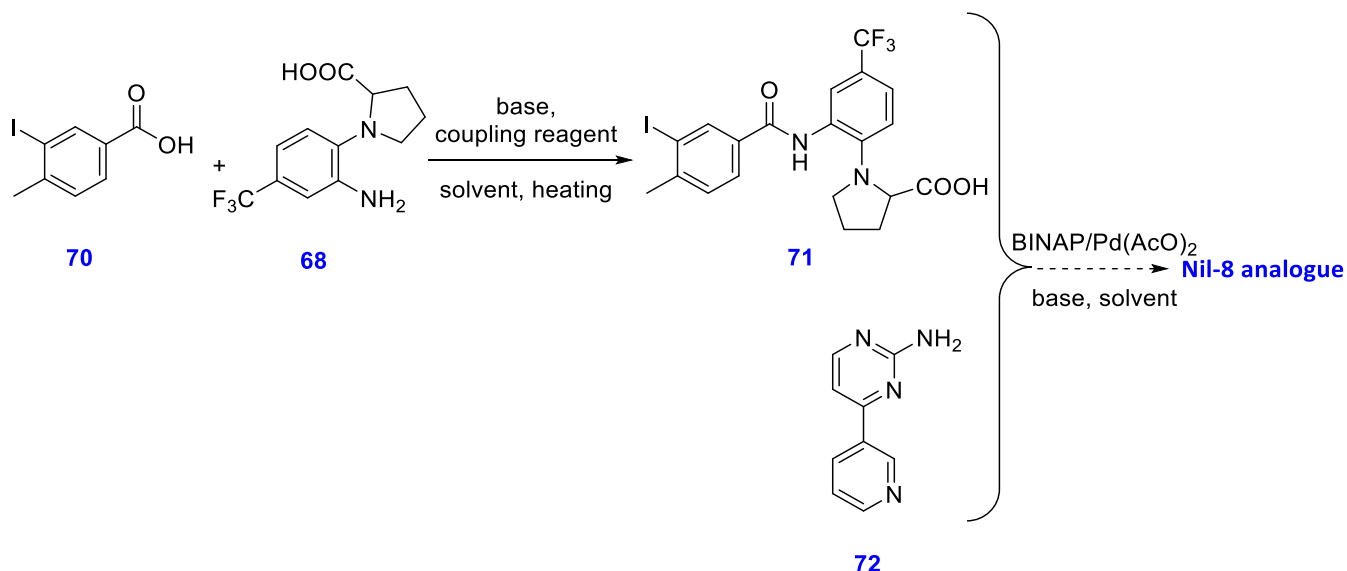
3.14.6. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-8

Εφόσον η σύνθεση του αναλόγου **Nil-8** απέτυχε με την προηγούμενη μέθοδο, θεωρήθηκε σκόπιμο να δοκιμαστεί μια εναλλακτική πορεία σύνθεσης της εν λόγω ένωσης. Η εναλλακτική πορεία περιλαμβάνει αρχικά τη σύνθεση της (2-(3-ιωδο-4-μεθυλοβενζαμιδιο)-4-

(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης **71** από μια κλασική αντίδραση σύζευξης του 3-ιωδο-4-μεθυλο-βενζοϊκό οξύς **70** και της πρόσφατης ανηγμένης ανιλίνης **68**. Πρόκειται για μια κλασική αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού, της οποίας ο μηχανισμός έχει περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο.

Μετά τη σύνθεση της **71**, το επόμενο βήμα της συγκλίνουσας αυτής συνθετικής πορείας περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός δεσμού N-C, μεταξύ της ελεύθερης αμινομάδας της 4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδι-2-αμίνης **72** και του άνθρακα όπου βρίσκεται το ιώδιο στην (2-(3-ιωδο-4-μεθυλοβενζαμιδιο)-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνη **71**. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι μια αντίδραση σύζευξης C-N, καταλυόμενη από Pd, Buchwald-Hartwig.¹⁰⁶

Παρόλα αυτά, σύμφωνα με το φάσμα ¹H-NMR δεν προέκυψε ο σχηματισμός της επιθυμητής ένωσης **71**, οπότε και η επόμενη αντίδραση τύπου Buchwald-Hartwig δεν πραγματοποιήθηκε. Παράλληλα έγινε προσπάθεια σύνθεσης της **71** με ενεργοποίηση του οξέος **70** με SOCl₂ προς σχηματισμό του αντίστοιχου χλωριδίου οξέος, χωρίς ωστόσο να αποδώσει και αυτός ο τρόπος στη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος.¹⁰⁷



Σχήμα 3.63. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-8 μέσω σχηματισμού της **71**.

Πείραμα	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl ₂	Βάση	Διαλύτης dry	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	1 eq	1.1 eq	HATU 1 eq	Et ₃ N 1.5 eq	THF	0°C - 60°C	48h	-
2	1 eq	1.1 eq	HATU 1 eq	Et ₃ N 1 eq	DMF	0°C - 60°C	48h	-
3	1 eq	1 eq	SOCl ₂ περίσσεια	DIPEA 1eq	THF	r.t. - 50°C	72h	-

Πίνακας 3.9. Πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση της **71**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Πειραματικό Μέρος

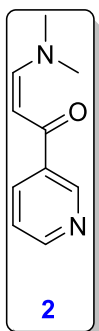
4.1. Συσκευές και όργανα

Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AV 400 MHz και 500 MHz. Η λήψη φασμάτων μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution Mass Spectrometry, HRMS) έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων με τη μέθοδο ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization, ESI) και με τύπο ανιχνευτή Orbitrap.

Η προέλευση των αρχικών ενώσεων είναι από τις εταιρίες Fluorochem, Aldrich, Aesear, Fluka, Alfa και Merck, ενώ η χρήση τους δεν απαιτούσε επεξεργασία. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ προέρχονται από τις προαναφερθείσες εταιρίες. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις, καθώς και την επεξεργασία αυτών προέρχονται από τις ίδιες εταιρίες, ενώ όποτε θεωρήθηκε απαραίτητο κατέστησαν απόλυτοι και διατηρήθηκαν υπό αδρανές περιβάλλον, σύμφωνα με τις μεθόδους των Perri και Armarego.¹⁰⁸

Όσον αφορά τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων, ως επί το πλείστον, αυτός έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC με πλάκες silica gel F₂₅₄ ms της εταιρίας Merck. Για τον καθαρισμό των ενώσεων με χρωματογραφία στήλης μέσης πίεσης χρησιμοποιήθηκε υλικό 9385 silica gel F₂₅₄ της ίδιας εταιρίας, ενώ για τον καθαρισμό με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F₂₅₄ ms της εν λόγω εταιρίας.

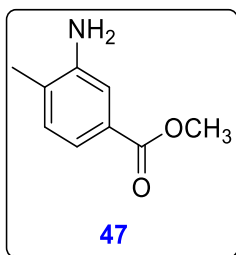
4.2. Σύνθεση της ένωσης 2



Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρονται 5 mL διαλύτη ο-ξυλόλιο και, υπό ανάδευση, η 3-ακετυλοπυριδίνη **1** (4.54 mL, 41.3 mmol). Εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και θέρμανση στους 100 °C, όπου προστίθεται στάγδην η *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-διαιθυλακετάλη **7** (8.48 mL, 49.5 mmol) διαλυμένη σε 5 mL διαλύτη ο-ξυλόλιο. Η αντίδραση αφήνεται στους 150 °C για 5h και η πορεία της ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα συμπυκνώνεται και γίνεται προσθήκη διαιθυλαιθέρα ώστε να καταβυθιστεί το προϊόν σε μορφή ιζήματος. Μετά τη διήθηση και ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται καθαρό το προϊόν ως κίτρινο κρυσταλλικό στερεό (6.107 g, 84%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 9.07 ppm (s, 1H, H₁), 8.66 ppm (d, 1H, H₂, ³J=4.8 Hz), 8.19 ppm (d, 1H, H₄, ³J=7.8 Hz), 7.85 ppm (d, 1H, H₆, ³J=12.4 Hz), 7.35 ppm (dd, 1H, H₃, ³J=7.9 Hz, ³J=4.8 Hz), 5.69 ppm (d, 1H, H₅, ³J=12.4 Hz), 3.17 ppm (s, 3H, H₇), 2.94 ppm (s, 3H, H₈).

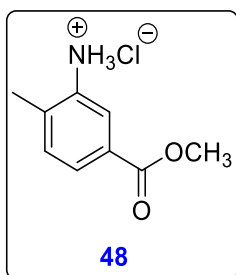
4.3. Σύνθεση της ένωσης 47



Σε δίλαιομη σφαιρική φιάλη των 100 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, προστίθεται το 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ **45** (8.0 g, 52.9 mmol) σε διαλύτη άνυδρη μεθανόλη. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη πυκνού H₂SO₄ (3.2 mL, 59.7 mmol) στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Με την ολοκλήρωση της προσθήκης του H₂SO₄ εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και θέρμανση στους 65 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της (48h), το περιεχόμενο της δίλαιομης φιάλης μεταφέρεται σε αντίστοιχη μονόλαιομη και απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί προσθήκη H₂O και ρύθμιση του pH σε τιμές 7-8 με NaHCO₃ ώστε να εξουδετερωθεί το όξινο pH που οφείλεται στη παρουσία του H₂SO₄, καθώς και το αρχικό οξύ που απέμεινε να μετασχηματιστεί στο αντίστοιχο μετά νατρίου άλας. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, ώστε να παραληφθούν τα άλατα στην υδατική φάση και το επιθυμητό προϊόν στην οργανική. Η οργανική φάση εκπλένεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και, αφού έχει διηθηθεί το Na₂SO₄, συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας αρχικά διχλωρομεθάνιο και, στη συνέχεια, αυξάνοντας πολικότητα με MeOH. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού ως ανοιχτό ροζ στερεό σε μορφή σκόνης (5.5 g, 63%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.38 ppm (d, 1H, H₁, ³J=7.8 Hz), 7.34 ppm (s, 1H, H₅), 7.11 ppm (d, 1H, H₂, ³J=7.7 Hz), 3.89 ppm (s, 3H, H₆), 3.70 ppm (s, 2H, H₄), 2.21 ppm (s, 3H, H₃).

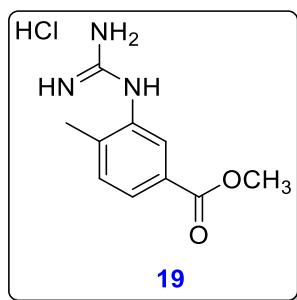
4.4. Σύνθεση της ένωσης 48



Σε μονόλαιομη σφαιρική φιάλη φέρεται ο 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρας **47** (5.5 g, 33.3 mmol) σε διαλύτη μεθανόλη. Ακολουθεί στάγδην προσθήκη HCl 37% w/v (8 mL) σε παγόλουτρο. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου για 2h. Μετά την ολοκλήρωσή της, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το στερεό ξηραίνεται στον ξηραντήρα παρουσία P₂O₅, ώστε να απομακρυνθεί το περιεχόμενο H₂O που οφείλεται στο διάλυμα του HCl 37 % w/v. Το προϊόν λαμβάνεται ως αχνό ροζ στερεό σε μορφή σκόνης (6.6 g, 98%).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ: 7.96 ppm (dd, 1H, H₁, ³J=7.5 Hz, ⁴J=1.5 Hz), 7.90 ppm (d, 1H, H₅, ⁴J=1.5 Hz), 7.51 ppm (d, 1H, H₂, ³J=8 Hz), 3.94 ppm (s, 3H, H₆), 2.43 ppm (s, 3H, H₃).

4.5. Σύνθεση της ένωσης 19

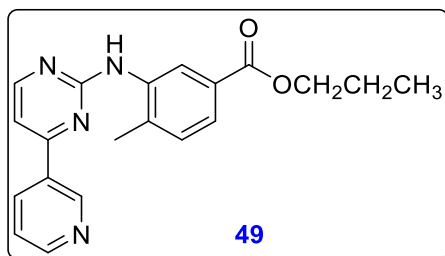
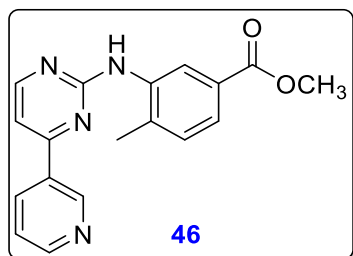


Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το κυαναμίδιο (5.5 g, 0.131 mol) υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ανάδευση. Με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα εφαρμόζεται θέρμανση στους 45 °C. Όταν τήξει το κυαναμίδιο, γίνεται προσθήκη του υδροχλωρικού άλατος του 3-αμινο-4-μεθυλοβενζοϊκού μεθυλεστέρα **48** (6.6 g, 32.7 mmol) και εφαρμόζεται υψηλότερη θερμοκρασία στους 70 °C για 2.5h. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσή της, το μίγμα

της αντίδρασης φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί προσθήκη διαιθυλεθέρα υπό έντονη ανάδευση ώστε να καταβυθιστεί το προϊόν ως ίζημα και να απομακρυνθεί η περίσσεια του κυαναμιδίου στο υπερκείμενο. Ο διαιθυλεθέρας απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με τετραϋδροφουράνιο (THF) αρκετές φορές. Το επιθυμητό προϊόν διηθείται, εκπλένεται με διαιθυλεθέρα και παραλαμβάνεται ως κοκκώδες αχνό ροζ στερεό (7.17 g, 90%).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ: 8.01 ppm (dd, 1H, H₁, ³J=8 Hz, ⁴J=1.8 Hz), 7.95 ppm (d, 1H, H₅, ⁴J=1.8 Hz), 7.56 ppm (d, 1H, H₂, ³J=8 Hz), 3.95 ppm (s, 3H, H₆), 2.38 ppm (s, 3H, H₃).

4.6. Σύνθεση των ενώσεων 46 και 49



Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το υδροχλωρικό άλας της υποκατεστημένης φαι-

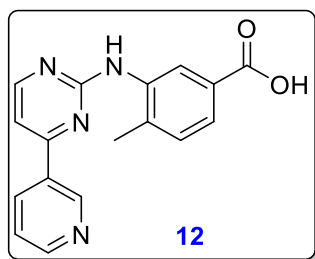
νυλογουανιδίνης **19** (7.6 g, 31.2 mmol) σε διαλύτη 1-προπανόλη (30 mL). Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου γίνεται προσθήκη περίσσειας άνυδρου K₂CO₃ (11.76 g, 85.1 mmol) και, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα, ακολουθεί θέρμανση έως ότου επιτευχθεί βρασμός. Στο σημείο αυτό γίνεται προσθήκη της εναμιनोंης **2** (5.0 g, 28.4 mmol). Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά το πέρας της, η αντίδραση φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στη συνέχεια το μίγμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό ώστε τα άλατα και η περίσσεια του K₂CO₃ να απομακρυνθούν στην υδατική φάση, ενώ το προϊόν να ληφθεί στην αντίστοιχη οργανική. Η οργανική φάση εκπλένεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και, αφού διηθηθεί, συμπυκνώνεται έως ξηρού. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο αυξανόμενης πολικότητας με MeOH. Εκτός από τον υποκατεστημένο μεθυλεστέρα, έχει σχηματιστεί και προπυλεστέρας **49** λόγω αντίδρασης της 1-προπανόλης. Συνεπώς το επιθυμητό προϊόν του μεθυλεστέρα **46** παραλαμβάνεται ως κίτρινο

στερεό (1.83 g, 23%), ενώ ως κύριο προϊόν παραλαμβάνεται ο αντίστοιχος προπυλεστέρας **49** (4.55 g, 46%).

Ένωση 46: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 9.30 ppm (d, 1H, H_1 , $^4J=2.3$ Hz), 9.04 ppm (s, 1H, H_7), 8.70 ppm (dd, 1H, H_2 , $^3J=4.7$ Hz, $^4J=1.6$ Hz), 8.55 ppm (d, 1H, H_6 , $^3J=5.1$ Hz), 8.45-8.42 ppm (m, 2H, H_4, H_8), 7.65 ppm (dd, 1H, H_9 , $^3J=7.9$ Hz, $^4J=1.8$ Hz), 7.53 ppm (dd, 1H, H_3 , $^3J=7.9$, $^3J=4.8$ Hz), 7.47 ppm (d, 1H, H_5 , $^3J=5.0$ Hz), 7.36 ppm (d, 1H, H_{10} , $^3J=7.9$ Hz), 3.85 ppm (s, 3H, H_{12}), 2.35 ppm (s, 3H, H_{11}).

Ένωση 49: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.27 ppm (dd, 1H, H_1 , $^4J=2.4$ Hz, $^5J=0.9$ Hz), 8.89 ppm (d, 1H, H_8 , $^4J=1.7$ Hz), 8.72 ppm (dd, 1H, H_2 , $^3J=4.8$ Hz, $^4J=1.7$ Hz), 8.52 ppm (d, 1H, H_6 , $^3J=5.1$ Hz), 8.44 ppm (dt, 1H, H_4 , $^3J=8$ Hz, $^4J=2$ Hz), 7.75 ppm (dd, 1H, H_9 , $^3J=7.9$ Hz, $^4J=1.7$ Hz), 7.44 ppm (ddd, 1H, H_3 , $^3J=8$ Hz, $^3J=4.8$ Hz, $^5J=0.9$ Hz), 7.30 ppm (d, 1H, H_{10} , $^3J=7.9$ Hz), 7.22 ppm (d, 1H, H_5 , $^3J=5.1$ Hz), 7.06 ppm (s, 1H, H_7), 4.30 ppm (t, 2H, H_{12} , $^3J=6.7$ Hz), 2.41 ppm (s, 3H, H_{11}), 1.82 ppm (m, 2H, H_{13} , $^3J=7.2$ Hz), 1.00 ppm (t, 3H, H_{14} , $^3J=7.4$ Hz).

4.7. Σύνθεση της ένωσης 12



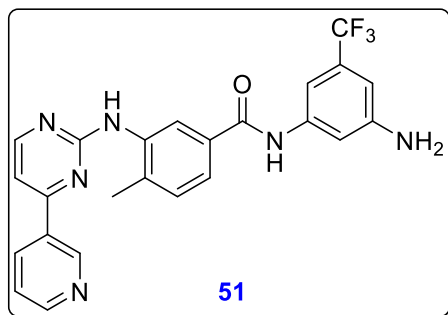
Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL, φέρεται ο υποκατεστημένος προπυλεστέρας **49** (2.74 g, 7.87 mmol) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο (DCM) (6 mL). Ακολουθεί προσθήκη μεθανολικού διαλύματος NaOH 3N (9.85 mL, 29.5 mmol) και η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της υδρόλυσης ελέγχεται με TLC. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και, ακο-

λούθως, διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται με νερό ώστε να απομακρυνθεί το προϊόν που βρίσκεται σε μορφή μετά νατρίου άλατος στην υδατική φάση. Στη συνέχεια ακολουθεί οξίνιση της υδατικής φάσης με διάλυμα HCl 2N έως $\text{pH} \sim 5$, ώστε να προκύψει το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ. Το ίζημα διηθείται και εκπλένεται με νερό. Το περιεχόμενο νερό που απέμεινε στο ίζημα απομακρύνθηκε με το σχηματισμό αζεοτροπικού μίγματος με αιθανόλη στο περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από ξήρανση παρουσία P_2O_5 ως λεπτόκοκκο κίτρινο στερεό (2.17 g, 90%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 12.80 ppm (s, 1H, H_{12}), 9.28 ppm (d, 1H, H_1 , $^4J=2.2$ Hz), 9.05 ppm (s, 1H, H_7), 8.70 ppm (d, 1H, H_2 , $^3J=4.8$ Hz), 8.55 ppm (d, 1H, H_6 , $^3J=5.2$ Hz), 8.45 ppm (d, 1H, H_4 , $^3J=8.0$ Hz), 8.30 ppm (s, 1H, H_8), 7.64 ppm (d, 1H, H_9 , $^3J=7.8$ Hz), 7.53 ppm (dd, 1H, H_3 , $^3J=8.0$ Hz, $^3J=4.8$ Hz), 7.49 ppm (d, 1H, H_5 , $^3J=5.2$ Hz), 7.36 ppm (d, 1H, H_{10} , $^3J=7.9$ Hz), 2.33 ppm (s, 3H, H_{11}).

4.8. Σύνθεση της ένωσης 51

4.8.1. Σύνθεση της ένωσης 51 με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης HATU



Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκό οξύ **12** (0.200 g, 0.653 mmol) σε άνυδρο διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ακολουθεί προσθήκη άνυδρης βάσης τριαιθυλαμίνης (136 μ L, 0.979 mmol) και HATU (0.298 g, 0.784 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε παγόλουτρο

και ατμόσφαιρα αζώτου, καθώς η πορεία της ελέγχεται με TLC. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος γίνεται στάγδην προσθήκη του 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50** (0.126 g, 0.718 mmol) και άνυδρης βάσης *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (136 μ L, 0.784 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Με την ολοκλήρωσή της, το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό αρκετές φορές ώστε να απομακρυνθεί και η περίσσεια του DMF στην υδατική φάση. Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4), το οποίο στη συνέχεια διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Η ελάχιστη ποσότητα του DMF που παραμένει στην οργανική φάση απομακρύνεται με λυοφιλοποίηση. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλη χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας : μεθανόλη (5:5:0.1). Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται, ύστερα από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού ως κιτρινωπό στερεό (0.224 g, 74%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 10.13 (s, 1H, H_{12}), 9.26 (d, 1H, H_1 , $^4J=2.2$ Hz), 9.12 (s, 1H, H_7), 8.68 (dd, 1H, H_2 , $^3J=4.8$ Hz, $^4J=1.6$ Hz), 8.54 (d, 1H, H_6 , $^3J=5.1$ Hz), 8.44 (dt, 1H, H_4 , $^3J=8.0$ Hz, $^4J=2.0$ Hz), 8.23 (d, 1H, H_8 , $^4J=1.8$ Hz), 7.71 (dd, 1H, H_9 , $^3J=7.9$ Hz, $^4J=1.9$ Hz), 7.51 (dd, 1H, H_3 , $^3J=8.0$ Hz, $^3J=4.8$ Hz), 7.47 (d, 1H, H_5 , $^3J=5.1$ Hz), 7.40 (d, 1H, H_{10} , $^3J=8.0$ Hz), 7.37 ppm (d, 1H, H_{13} , $^4J=2.0$ Hz), 7.24 (s, 1H, H_{14}), 6.58 (s, 1H, H_{15}), 5.61 (s, 2H, H_{16}), 2.33 (s, 3H, H_{11}).

4.8.2. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 51 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος

Σε τρίλαιο σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκό οξύ **12** (0.050 g, 0.163 mmol) και περίσσεια άνυδρου θειονυλουχλωριδίου (SOCl_2) (5 mL), το οποίο έχει διπλό ρόλο, δρώντας ως διαλύτης και αντιδραστήριο. Ακολουθεί προσθήκη καταλυτικής ποσότητας άνυδρου DMF (2 σταγόνες) και εφαρμόζεται θέρμανση έως ότου επιτευχθεί βρασμός. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου για 2.5h. Αφού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του χλωριδίου του οξέος, ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας του θειονυλουχλωριδίου στην υδραντλία και το εναπομείναν στερεό εκπλένεται με άνυδρο

διχλωρομεθάνιο ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη από το θειονυλο-χλωρίδιο. Στη συνέχεια το ίζημα της αντίδρασης διαλύεται σε άνυδρο διαλύτη DMF (3 mL) και γίνεται προσθήκη N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (DIPEA) (40 μ L, 0.163 mmol) και 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50** (0.029 g, 0.163 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται ελεγχόμενη θέρμανση έως τους 80 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά από 72h φαίνεται πως η αντίδραση δεν προχωράει καθώς σχηματίζονται ίχνη μόνο προϊόντος και για αυτό το λόγο απορρίπτεται.

4.8.3. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 51 από εστέρα με χρήση βάσης tert-βουτοξείδιο του καλίου (KO^tBu)

Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο **50** (0.020 g, 0.114 mmol) σε άνυδρο διαλύτη THF. Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου γίνεται προσθήκη του KO^tBu (0.013 g, 0.114 mmol) και η αντίδραση αφήνεται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη του υποκατεστημένου εστέρα **49** (0.020 g, 0.057 mmol) και η αντίδραση αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται σταδιακή θέρμανση φτάνοντας εν τέλει τους 65 °C. Η πορεία της ελέγχεται με TLC. Με τη μέθοδο αυτή δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος.

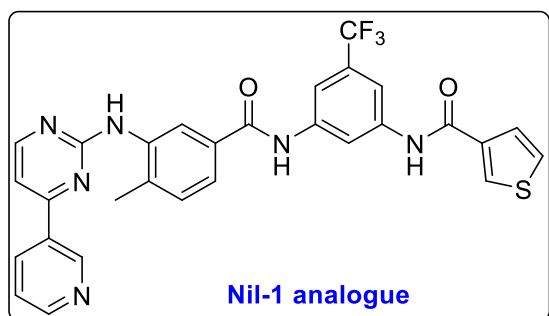
4.8.4. Σύνθεση της ένωσης 51 από εστέρα με χρήση βάσης n-βούτυλο-λιθίου (n-BuLi)

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζόλιο **50** (0.050 g, 0.284 mmol) σε άνυδρο διαλύτη THF. Στους 0 °C, υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου γίνεται προσθήκη του n-βούτυλο-λιθίου (n-BuLi) (230 μ L, 0.341 mmol). Η αντίδραση αφήνεται για 30 min σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια ακολουθεί στάγδην προσθήκη του υποκατεστημένου εστέρα **49** (0.079 g, 0.227 mmol), αφαιρείται το παγόλουτρο και η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η πορεία της ελέγχεται με TLC. Μετά από 24h η αντίδραση τερματίζεται και προστίθεται νερό ώστε να εξουδετερωθεί η περίσσεια του n-BuLi. Το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα, διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x10 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄. Το Na₂SO₄ διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας : μεθανόλη (5:5:0.5). Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται μετά από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού, ως κιτρινωπό στερεό (0.021 g, 20%).

Πείραμα	Οξύ ή εστέρας	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl ₂	Βάση	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	Οξύ 1 eq	1.1 eq	HATU 1.2 eq	Et ₃ N 1.5 eq DIPEA 1.2 eq	Άνυδρο DMF	r.t.	24 h	74%
2	Οξύ 1 eq	1 eq	SOCl ₂ περίσσεια	DIPEA 1 eq	Άνυδρο DMF	r.t. - 80°C	72 h	ίχνη
3	Εστέρας 0.8 eq	1 eq	-	n-BuLi 1.2 eq	Άνυδρο THF	0°C - r.t.	24 h	20%
4	Εστέρας 1 eq	2 eq	-	KO ^t Bu 2 eq	THF	r.t. - 65°C	4 days	-
5	Εστέρας 1 eq	2 eq	-	KO ^t Bu 2 eq	Άνυδρο THF	r.t. - 65°C	4 days	-
6	Εστέρας 1 eq	1.05 eq	-	KO ^t Bu 5.5 eq	Άνυδρο THF	0°C - r.t.	3 days	-

Πίνακας 4.1. Προσπάθειες σύνθεσης της ένωσης **51**.

4.9. Σύνθεση του αναλόγου Nil-1



Σε δίλιμνη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το 3-καρβοξυ-θειοφαίνιο **53** (0.020 g, 0.150 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF (3 mL). Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται άνυδρη τριαιθυλαμίνη (24 μ L, 0.171 mmol) και HATU (0.065 g, 0.171 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε παγόλουτρο, καθώς η πορεία της ελέγ-

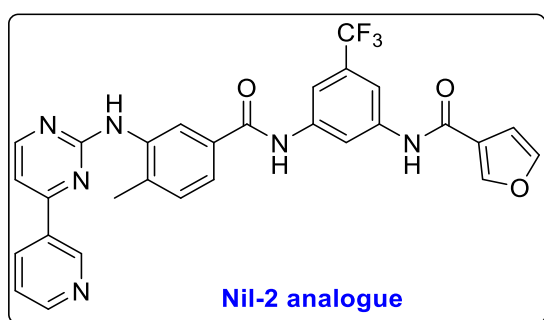
χεται με TLC. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος ακολουθεί προσθήκη της **51** (0.020 g, 0.043 mmol) διαλυμένη σε DMF, καθώς και άνυδρη βάση DIPEA (10 μ L, 0.052 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια, με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται ελεγχόμενη θέρμανση έως τους 70 °C. Μετά την ολοκλήρωσή της (48h), το μίγμα αυτής αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x10 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο θειικό νάτριο. Ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Η ποσότητα του DMF που παραμένει στην οργανική φάση απομακρύνεται με λυοφιλοποίηση. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : ακετόνη : μεθανόλη (10:2:0.1) αυξάνοντας σταδιακά την πολικότητα με μεθανόλη. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ως λευκό στερεό (0.014 g, 55%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.51 (s, 1H, H₁₅), 10.40 (s, 1H, H₁₂), 9.27 (s, 1H, H₁), 9.15 (s, 1H, H₇), 8.68 (d, 1H, H₂, ³J=4.7 Hz), 8.64 (s, 1H, H₁₅), 8.54 (d, 1H, H₁₅, ³J=5.1 Hz), 8.44 (d, 1H, H₄, ³J=8.8 Hz), 8.42 (s, 1H, H₁₇), 8.30 (s, 1H, H₈), 7.93 (s, 1H, H₁₃), 7.89 (s, 1H, H₁₄), 7.77

(d, 1H, H₉, ³J=7.8 Hz), 7.66 (s, 2H, H₁₈, H₁₉), 7.51 (dd, 1H, H₃, ³J=8.1 Hz, ³J=4.6 Hz), 7.47 (d, 1H, H₅, ³J=5.1 Hz), 7.43 (d, 1H, H₁₀, ³J=7.9 Hz), 2.35 (s, 3H, H₁₁).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 165.98, 162.08, 161.60, 161.53, 160.02, 151.91, 148.58, 140.87, 140.68, 138.55, 137.73, 137.13, 134.73, 132.59, 130.72, 129.98, 129.67, 127.66, 127.54, 125.91, 124.88, 124.28, 124.09, 123.20, 115.59, 112.12, 111.93, 108.38, 18.70.

4.10. Σύνθεση του αναλόγου Nil-2



Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το 3-καρβοξυ-φουράνιο **54** (0.048 g, 0.431 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF (3 mL). Ακολουθεί προσθήκη άνυδρης βάσης τριαιθυλαμίνη (67 μL, 0.486 mmol) και αντιδραστηρίου σύζευξης HATU (0.172 g, 0.454 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και ατμό-

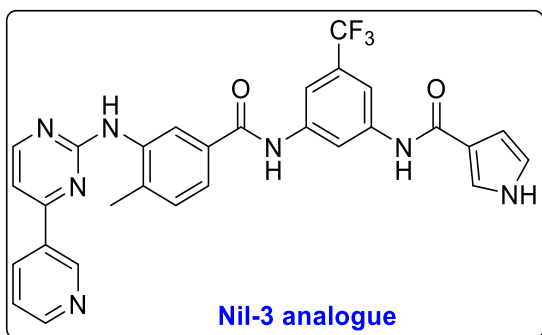
σφαιρα αζώτου σε παγόλουτρο έως την ενεργοποίηση του οξέος (έλεγχος TLC). Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην η ένωση **51** (0.050 g, 0.108 mmol) διαλυμένη σε άνυδρο DMF και κατόπιν προστίθεται άνυδρη βάση DIPEA (22.6 μL, 0.129 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια, με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται θέρμανση έως τους 50 °C. Μετά την ολοκλήρωσή της (48h), ο διαλύτης DMF απομακρύνεται με απόσταξη και το εναπομείναν στερεό διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x15 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθούνται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν λαμβάνεται ύστερα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας : μεθανόλη (5:5:0.1) αυξανόμενης πολικότητας, ως υποκίτρινο στερεό (0.039 g, 65%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.51 (s, 1H, H₁₆), 10.27 (s, 1H, H₁₂), 9.27 (s, 1H, H₁), 9.15 (s, 1H, H₇), 8.68 (d, 1H, H₂, ³J=4.8 Hz), 8.60 (s, 1H, H₁₅), 8.54 (d, 1H, H₆, ³J=5.1 Hz), 8.45 (m, 1H, H₄), 8.43 (s, 1H, H₁₇), 8.29 (d, 1H, H₈, ⁴J=1.9 Hz), 7.91 (s, 1H, H₁₃), 7.87 (s, 1H, H₁₄), 7.81 (t, 1H, H₁₉, ³J=1.7 Hz), 7.77 (dd, 1H, H₉, ³J=7.9 Hz, ⁴J=1.9 Hz), 7.51 (dd, 1H, H₃, ³J=8.0, ³J=4.8 Hz), 7.47 (d, 1H, H₅, ³J=5.2 Hz), 7.43 (d, 1H, H₁₀, ³J=8.0 Hz), 7.02 (m, 1H, H₁₈), 2.35 (s, 3H, H₁₁).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 166.00, 162.10, 161.54, 161.22, 160.04, 151.92, 148.59, 146.70, 144.82, 140.91, 140.54, 138.57, 137.16, 134.74, 132.60, 130.79, 130.03, 129.72, 125.91, 124.89, 124.29, 124.10, 123.14, 115.51, 112.16, 111.77, 109.70, 108.39, 18.70.

4.11. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-3

4.11.1. Σύνθεση του αναλόγου Nil-3 με χρήση αντιδραστηρίου σύζευξης HATU



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, μεταφέρεται το 1H-πυρρόλιο-3-καρβοξυλικό οξύ **55** (0.017 g, 0.151 mmol) σε άνυδρο διαλύτη (3 mL) (πίνακας 4.2). Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται άνυδρη τριαιθυλαμίνη (24 μ L, 0.172 mmol) και HATU (0.065 g, 0.172 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε παγόλουτρο και ατμόσφαιρα αζώτου, καθώς

η πορεία της ελέγχεται με TLC. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος ακολουθεί προσθήκη της **51** (0.020 g, 0.043 mmol) διαλυμένη στον διαλύτη της αντίδρασης, καθώς και DIPEA (10 μ L, 0.052 mmol). Με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα εφαρμόζεται θέρμανση στους 65 $^{\circ}$ C. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα της αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x10 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο θειικό νάτριο. Ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Η ποσότητα του DMF που παραμένει στην οργανική φάση απομακρύνεται με λυοφιλοποίηση. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : μεθανόλη (10:0.1) αυξανόμενης πολικότητας. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ως λευκό στερεό (0.011 g, 45%).

4.11.2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-3 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος

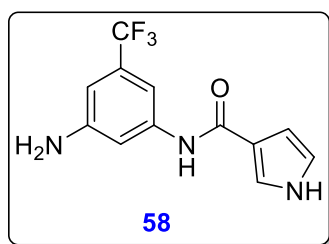
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το 1H-πυρρόλιο-3-καρβοξυλικό οξύ **55** (0.014 g, 0.129 mmol) και περίσσεια άνυδρου θειονυλοχλωριδίου (SOCl_2) (5 mL), το οποίο δρα ως διαλύτης και αντιδραστήριο. Ακολουθεί προσθήκη καταλυτικής ποσότητας άνυδρου DMF (2 σταγόνες) και εφαρμόζεται θέρμανση έως ότου επιτευχθεί βρασμός. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου για 2.5h. Αφού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του χλωριδίου του οξέος, ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας του SOCl_2 στην υδραντλία και το εναπομείναν στερεό εκπλένεται με άνυδρο διχλωρομεθάνιο ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη από το θειονυλοχλωρίδιο. Στη συνέχεια το ίζημα της αντίδρασης διαλύεται σε άνυδρο διαλύτη (3 mL) (πίνακας 4.2), ενώ ακολουθεί προσθήκη τριαιθυλαμίνης (44 μ L, 0.316 mmol) και της υποκατεστημένης αμίνης **51** (0.020 g, 0.043 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται ελεγχόμενη θέρμανση. Με τη μέθοδο αυτή δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος.

Πείραμα	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl ₂	Βάση	Διαλύτης dry	Θερμο- κρασία	Χρόνος	Από- δοση
1	3.5 eq	1 eq	HATU 4 eq	Et ₃ N 4 eq, DIPEA 1.2 eq	THF	r.t. – 65°C	72 h	ίχνη
2	3.5 eq	1 eq	HATU 4 eq	Et ₃ N 4 eq, DIPEA 1.2 eq	DMF	r.t. – 65°C	48 h	45%
3	3 eq	1 eq	SOCl ₂ περίσσεια	Et ₃ N 7 eq	THF	r.t. – 65°C	4 days	-
4	3 eq	1 eq	SOCl ₂ περίσσεια	Et ₃ N 7 eq	DMF	r.t. – 50°C	3 days	< 10%

Πίνακας 4.2. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-3.

4.12. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-3

4.12.1. Σύνθεση της ένωσης 58



Σε τρίλιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το 1H-πυρρόλιο-3-καρβοξυλικό οξύ **55** (0.063 g, 0.568 mmol) σε άνυδρο διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF) (2 mL). Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου γίνεται προσθήκη άνυδρης βάσης τριαιθυλαμίνη (120 μ L, 0.852 mmol) και αντιδραστήριου σύζευξης HATU (0.270 g, 0.710 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε παγόλουτρο και ο έλεγχός της γίνεται με TLC. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος, ακολουθεί στάγδην προσθήκη του 3,5-διαμινο-τριφθορομεθυλοβενζολίου **50** (0.080 g, 0.454 mmol) διαλυμένο σε άνυδρο THF. Η αντίδραση αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια, με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται ελεγχόμενη θέρμανση έως τους 60 °C. Μετά τη ολοκλήρωσή της (24h), ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x20 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄. Ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας : μεθανόλη : οξικό οξύ (8:5:0.2:0.02). Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ως κιτρινωπό στερεό μετά από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού (0.036 g, 40%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.27 (s, 1H, H₁), 9.45 (s, 1H, H₅), 7.52 (m, 1H, H₄, ³J=3.2 Hz, ⁴J=1.8 Hz), 7.30 (d, 1H, H₇, ⁴J=2 Hz), 7.23 (d, 1H, H₈, ⁴J=1.9 Hz), 6.81 (m, 1H, H₂, ³J=2.6 Hz, ³J=1.9 Hz), 6.63 (m, 1H, H₃, ³J=2.6 Hz, ⁴J=1.5 Hz), 6.52 (d, 1H, H₆, ⁴J=1.9 Hz), 5.53 (s, 2H, H₉).

4.12.2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-3

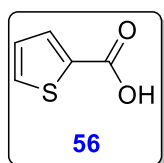
Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το οξύ **12** (0.023 g, 0.074 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF. Ακολουθεί προσθήκη άνυδρης βάσης τριαιθυλαμίνη (21 μ L, 0.148 mmol) και αντιδραστήριου σύζευξης HATU (0.042 g, 0.111 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου σε παγόλουτρο και η πορεία της ελέγχεται με TLC. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος (2h), ακολουθεί στάγδην προσθήκη της ένωσης **58** (0.030 g, 0.111 mmol) διαλυμένη σε άνυδρο DMF και επιπλέον ποσότητα τριαιθυλαμίνης (10 μ L, 0.072 mmol). Στη συνέχεια εφαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και θέρμανση στους 55 °C για 24h. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης (έλεγχος TLC) απομακρύνεται ο διαλύτης DMF με απόσταξη υπό κενό και το μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x10 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται και εκπλένονται με διάλυμα άλμης. Ακολουθεί ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄, διήθηση αυτού και συμπύκνωση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : μεθανόλη : οξικό οξύ (10:0.2:0.02). Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (0.020 g, 50%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11.38 (s, 1H, H₂₀), 10.48 (s, 1H, H₁₆), 9.88 (s, 1H, H₁₂), 9.26 (d, 1H, H₁, ⁴J=2.3 Hz), 9.14 (s, 1H, H₇), 8.68 (dd, 1H, H₂, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz), 8.59 (d, 1H, H₁₅, ⁴J=1.9 Hz), 8.54 (d, 1H, H₆, ³J=5.2 Hz), 8.44 (dt, 1H, H₄, ³J=8.0 Hz, ⁴J=2.0 Hz), 8.29 (d, 1H, H₈, ⁴J=1.9 Hz), 7.95 (d, 1H, H₁₃, ⁴J=1.8 Hz), 7.82 (d, 1H, H₁₄, ⁴J=1.8 Hz), 7.77 (dd, 1H, H₉, ³J=7.9 Hz, ⁴J=1.9 Hz), 7.60 (m, 1H, H₁₇, ³J=3.2 Hz, ⁴J=1.8 Hz), 7.51 (dd, 1H, H₃, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz), 7.47 (d, 1H, H₅, ³J=5.1 Hz), 7.42 (d, 1H, H₁₀, ³J=8 Hz), 6.83 (m, 1H, H₁₉, ³J=2.4 Hz), 6.67 (m, 1H, H₁₈, ³J=2.3 Hz), 2.35 (s, 3H, H₁₁).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 165.93, 163.57, 162.09, 161.55, 160.04, 151.92, 148.58, 141.43, 140.69, 138.53, 137.09, 134.76, 132.66, 132.61, 130.77, 129.83, 129.51, 124.90, 124.30, 124.11, 122.29, 119.59, 119.41, 115.27, 112.80, 111.55, 111.32, 108.37, 18.69.

4.13. Πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-4

4.13.1. Σύνθεση της ένωσης 56

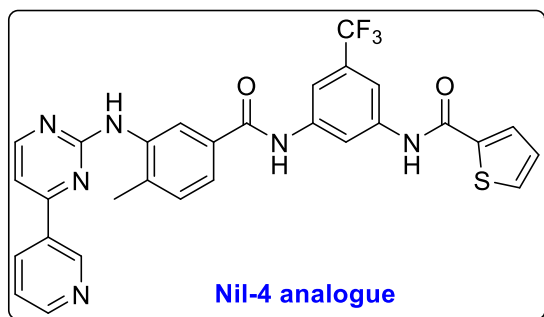


Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL, φέρεται η θειοφαινο-2-καρβοξαλδεΰδη **60** (0.600 g, 5.4 mmol) σε διαλύτη ακετόνη (50 mL). Ακολουθεί στάγδην προσθήκη του διαλύματος KMnO₄ (3.1 g, 19.5 mmol) σε αναλογία διαλυτών ακετόνη : νερό (80 mL, 1:1) για 1.5h. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχόμενη ανάδευση για 3h σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ η πορεία της ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσή της, το μίγμα αυτής διηθείται υπό κενό με celite, ώστε να κατακρατηθεί το δυσδιάλυτο MnO₂. Η ακετόνη απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το εναπομείναν υδατικό διάλυμα οξινίζεται με διάλυμα

HCl 2N έως pH~3, ενώ ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3x20 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, εκπλένονται με brine και ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄. Εν συνεχεία διηθούνται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Μετά από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού, το προϊόν λαμβάνεται με ως λευκό κρυσταλλικό στερεό (0.400 g, 60%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.04 (s, 1H, H₁), 7.88 (dd, 1H, H₄, ³J=5.0 Hz, ⁴J=1.3 Hz), 7.72 (dd, 1H, H₂, ³J=3.7 Hz, ⁴J=1.2 Hz), 7.18 (dd, 1H, H₃, ³J=5.0 Hz, ³J=3.7 Hz).

4.13.2. Σύνθεση του αναλόγου Nil-4



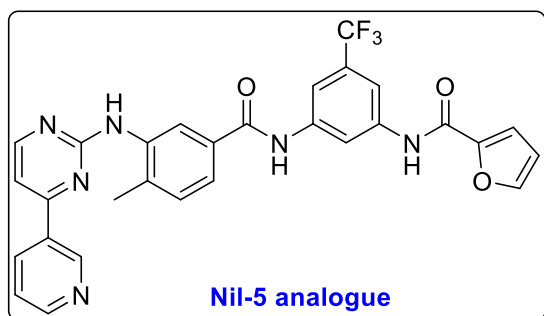
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το 2-καρβοξυ-θειοφαίνιο **56** (0.048 g, 0.108 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF (2 mL). Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου ακολουθεί προσθήκη άνυδρης βάσης τριαιθυλαμίνη (60 μL, 0.432 mmol) και αντιδραστηρίου σύζευξης HATU (0.148 g, 0.389 mmol). Το μίγμα της αντί-

δρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο για την αποφυγή παραπροϊόντων έως την ενεργοποίηση του οξέος (έλεγχος με TLC). Στη συνέχεια, ακολουθεί στάγδην προσθήκη της ένωση **51** (0.050 g, 0.108 mmol) σε διαλύτη DMF και άνυδρης βάσης DIPEA (23 μL, 0.129 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται θέρμανση στους 50 °C. Μετά το πέρας της (48h), το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x15 mL), προκειμένου το DMF να απομακρυνθεί με τις εκχυλίσεις. Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθούνται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από καθαρισμό του μίγματος με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας : μεθανόλη (5:5:0.1) αυξανόμενης πολικότητας, ως υποκίτρινο στερεό (0.037 g, 60%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.57 (s, 1H, H₁₆), 10.51 (s, 1H, H₁₂), 9.27 (d, 1H, H₁, ⁴J=2.3 Hz), 9.15 (s, 1H, H₇), 8.68 (dd, 1H, H₂, ³J=4.8 Hz, ⁴J=1.6 Hz), 8.63 (s, 1H, H₁₅), 8.55 (d, 1H, H₆, ³J=5.1 Hz), 8.44 (dt, 1H, H₄, ³J=8.1 Hz, ⁴J=2.0 Hz), 8.30 (d, 1H, H₈, ⁴J=1.9 Hz), 8.09 (dd, 1H, H₁₉, ³J=3.9 Hz, ⁴J=1.2 Hz), 7.92-7.87 (m, 3H, H₁₃, H₁₄, H₁₇), 7.77 (dd, 1H, H₉, ³J=7.9 Hz, ⁴J=1.9 Hz), 7.51 (dd, 1H, H₃, ³J=8.0 Hz, ³J=4.8 Hz), 7.48 (d, 1H, H₅, ³J=5.1 Hz), 7.43 (d, 1H, H₁₀, ³J=7.9 Hz), 7.25 (dd, 1H, H₁₈, ³J=4.9 Hz, ³J=3.6 Hz), 2.35 (s, 3H, H₁₁).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 166.01, 162.10, 161.54, 160.70, 160.05, 151.92, 148.59, 140.93, 140.43, 139.93, 138.57, 137.17, 134.75, 133.64, 132.94, 132.61, 132.58, 130.81, 130.11, 129.74, 128.69, 124.88, 124.30, 124.10, 115.60, 112.25, 111.97, 108.40, 18.70.

4.14. Σύνθεση του αναλόγου Nil-5



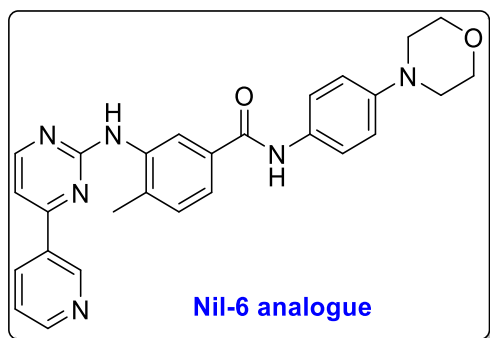
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL από την οποία έχει απομακρυνθεί πρωτίστως η υγρασία, φέρεται το 2-καρβοξυ-φουράνιο **57** (0.025 g, 0.227 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF (3 mL). Ακολουθεί προσθήκη άνυδρης βάσης τριαιθυλαμίνης (36 μ L, 0.257 mmol) και αντιδραστηρίου σύζευξης HATU (0.091 g, 0.068 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό

ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου, καθώς τοποθετείται σε παγόλουτρο έως την ενεργοποίηση του οξέος (έλεγχος με TLC). Μετά την ενεργοποίηση του οξέος, ακολουθεί στάγδην προσθήκη της αμίνης **51** (0.025 g, 0.057 mmol) διαλυμένη σε DMF, καθώς και άνυδρης βάσης DIPEA (12 μ L, 0.068 mmol). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (48h), το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x10mL) ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του DMF στην υδατική φάση μαζί με τα άλατα. Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθούνται και το αντίστοιχο διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : οξικός αιθυλεστέρας : μεθανόλη (5:5:0.1) ως υποκίτρινο στερεό (0.022 g, 68%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 10.52 (s, 2H, H_{12} , H_{16}), 9.27 (s, 1H, H_1), 9.15 (s, 1H, H_7), 8.68 (d, 1H, H_2 , $^3J=4.7$ Hz), 8.63 (s, 1H, H_{15}), 8.55 (d, 1H, H_6 , $^3J=5.2$ Hz), 8.44 (dt, 1H, H_4 , $^3J=8.1$ Hz, $^4J=1.9$ Hz), 8.29 (d, 1H, H_8 , $^4J=1.9$ Hz), 7.97 (m, 1H, H_{19}), 7.91 (m, 2H, H_{13} , H_{14}), 7.76 (dd, 1H, H_9 , $^3J=7.9$ Hz, $^4J=1.9$ Hz), 7.51 (dd, 1H, H_3 , $^3J=8.0$ Hz, $^3J=4.8$ Hz), 7.47 (d, 1H, H_5 , $^3J=5.2$ Hz), 7.43 (d, 1H, H_{10} , $^3J=7.7$ Hz), 7.41 (dd, 1H, H_{17} , $^3J=3.5$ Hz, $^4J=0.9$ Hz), 6.72 (dd, 1H, H_{18} , $^3J=3.6$ Hz, $^3J=1.8$ Hz), 2.35 (s, 3H, H_{11}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 166.01, 162.10, 161.55, 160.05, 156.93, 151.92, 148.58, 147.51, 140.90, 140.24, 138.56, 137.16, 134.76, 132.61, 130.79, 124.89, 124.31, 124.12, 115.76, 115.70, 112.70, 112.31, 112.07, 108.40, 18.70.

4.15. Σύνθεση του αναλόγου Nil-6



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το οξύ **12** (0.050 g, 0.163 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF (3 mL). Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται άνυδρη βάση τριαιθυλαμίνη (34 μ L, 0.244 mmol) και αντιδραστήριο σύζευξης HATU (0.068 g, 0.179 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε παγόλουτρο και η πορεία της ελέγχεται με TLC. Μετά την

ενεργοποίηση του οξέος, ακολουθεί προσθήκη της 4-μορφολινοανιλίνης **61** (0.035 g, 0.196 mmol) και άνυδρης βάσης DIPEA (28.4 μ L, 0.163 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρασμα της αντίδρασης (24h), το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x15 mL) ώστε το DMF να απομακρυνθεί στην υδατική φάση μαζί με τα άλατα. Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθούνται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται ψυχρός διαλύτης διχλωρομεθάνιο και το επιθυμητό προϊόν καταβυθίζεται ως ίζημα. Ύστερα από έκπλυση με ψυχρό διαλύτη και ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού λαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (0.049 g, 65%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.98 (s, 1H, H_{12}), 9.26 (dd, 1H, H_1 , $^4J=2.4$ Hz, $^4J=0.9$ Hz), 9.11 (s, 1H, H_7), 8.68 (dd, 1H, H_2 , $^3J=4.8$ Hz, $^4J=1.6$ Hz), 8.54 (d, 1H, H_6 , $^3J=5.1$ Hz), 8.44 (dt, 1H, H_4 , $^3J=8.0$ Hz, $^4J=2.0$ Hz), 8.23 (d, 1H, H_8 , $^4J=1.8$ Hz), 7.70 (dd, 1H, H_9 , $^3J=8.0$ Hz, $^4J=1.9$ Hz), 7.63-7.61 (d, 2H, H_{13} , H_{15} , $^3J=9.0$ Hz), 7.51 (dd, 1H, H_3 , $^3J=8.0$ Hz, $^3J=4.8$ Hz), 7.46 (d, 1H, H_5 , $^3J=5.1$ Hz), 7.38 (d, 1H, H_{10} , $^3J=8.0$ Hz), 6.94-6.92 (d, 2H, H_{14} , H_{16} , $^3J=8.9$ Hz), 3.74 (m, 4H, H_{18} , H_{20}), 3.06 (m, 4H, H_{17} , H_{19}), 2.33 (s, 3H, H_{11}).

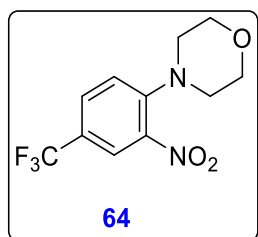
$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165.07, 162.06, 161.58, 160.03, 151.92, 148.61, 147.94, 138.43, 136.41, 134.74, 133.36, 132.62, 131.89, 130.62, 124.72, 124.28, 123.86, 121.99, 115.71, 108.30, 66.60, 49.37, 18.64.

Πείραμα	Οξύ	Αμίνη	Αντιδραστήριο σύζευξης ή SOCl_2	Βάση	Διαλύτης dry	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
1	1 eq	1.5 eq	DCC 1.2 eq HOBt 1.2 eq	Et_3N 1.2 eq	DMF	0-75°C	72 h	-
2	1 eq	1.2 eq	TBTU 1.2 eq	Et_3N 1.2 eq	DMF	0-50°C	48 h	52%
3	1 eq	1.2 eq	PyBrop 1.1 eq	Et_3N 1.5 eq	DMF	0-50°C	48 h	57%
4	1 eq	1.2 eq	HATU 1.1 eq	Et_3N 1.5 eq DIPEA 1 eq	DMF	0°C-r.t	24 h	65%

Πίνακας 4.3. Πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του αναλόγου **Nil-6** κατόπιν ενεργοποίησης του οξέος **12** με αντιδραστήριο σύζευξης.

4.16. Πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-7

4.16.1. Σύνθεση της ένωσης 64

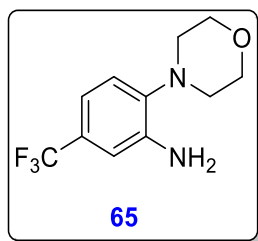


Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, φέρεται το 4-φθορο-3-νιτρο-τριφθοροβενζόλιο **62** (0.050 g, 0.239 mmol) σε διαλύτη 1,4-διοξάνιο (3 mL). Υπό ανάδευση ακολουθεί προσθήκη ανθρακικού καλίου K_2CO_3 (0.05 g, 0.358 mmol) και μορφολίνης **63** (23 μ L, 0.287 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου

και στη συνέχεια, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται σταδιακή θέρμανση έως τους 50 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά την ολοκλήρωσής της (24h), ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το μίγμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται με νερό (3x20 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης διχλωρομεθάνιο. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού ως πορτοκαλί στερεό (0.062 g, 94%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.06 (d, 1H, H₅, ⁴J=2.2 Hz), 7.69 (dd, 1H, H₆, ³J=8.8 Hz, ⁴J=2.3 Hz), 7.17 (d, 1H, H₇, ³J=8.7 Hz), 3.85 (m, 2H, H₁, H₃), 3.14 (m, 2H, H₂, H₄).

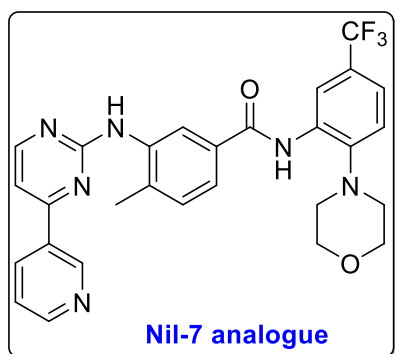
4.16.2. Σύνθεση της ένωσης 65



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, φέρεται η 4-(2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)μορφολίνη **64** (0.028 g, 0.101 mmol) σε διαλύτη μεθανόλη (3 mL). Ακολουθεί προσθήκη καταλύτη Pd/C (0.021 g, 0.203 mmol) και εφαρμόζεται επίθεμα με αέριο υδρογόνο. Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1.5h και η πορεία της ελέγχεται με TLC. Με την ολοκλήρωσής της, διηθείται ο καταλύτης και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού σε απόδοση ~100%, ενώ χρησιμοποιείται απευθείας στην επόμενη αντίδραση.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.02 (m, 2H, H₆, H₇), 6.95 (d, 1H, H₅, ⁴J=1.9 Hz), 4.09 (s, 2H, H₈), 3.86 (m, 4H, H₂, H₄), 2.94 (m, 4H, H₁, H₃).

4.16.3. Σύνθεση του αναλόγου Nil-7



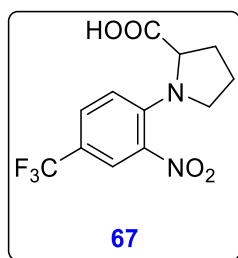
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκό οξύ **12** (0.026 g, 0.085 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF (2 mL), στον οποίο προηγουμένως έχει γίνει απαέρωση. Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται άνυδρη βάση τριαμιθουλαμίνη (17.8 μL, 0.127 mmol) και αντιδραστήριο σύζευξης HATU (0.036 g, 0.094 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε παγόλουτρο για 2h, ενώ η εξέλιξή της ελέγχεται με TLC. Μετά την ενεργοποίηση του οξέος ακολουθεί προσθήκη της 2-μορφολινο-5-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνης **65** (0.025 g, 0.101 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και, έπειτα, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα εφαρμόζεται θέρμανση, η οποία αυξάνεται σταδιακά έως τους 50°C. Μετά την ολοκλήρωσή της (24h), απομακρύνεται

ο διαλύτης με απόσταξη και το μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x10 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθούνται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από καθαρισμό του μίγματος με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : μεθανόλη (10 : 0.1) αυξανόμενης πολικότητας ως υποκίτρινο στερεό (0.028 g, 62%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 9.64 (s, 1H, H_{12}), 9.28 (d, 1H, H_1 , $^4J=2.2$ Hz), 9.17 (s, 1H, H_7), 8.68 (dd, 1H, H_2 , $^3J=4.8$ Hz, $^4J=1.6$ Hz), 8.55 (d, 1H, H_6 , $^3J=5.1$ Hz), 8.46 (m, 1H, H_4), 8.44 (s, 1H, H_{13}), 8.27 (d, 1H, H_8 , $^4J=1.8$ Hz), 7.69 (dd, 1H, H_9 , $^3J=8.0$ Hz, $^4J=1.9$ Hz), 7.52 (m, 1H, H_3), 7.50 (d, 2H, H_5 , H_{10}), 7.47 (d, 1H, H_{14} , $^3J=7.8$ Hz), 7.42 (d, 1H, H_{15} , $^3J=8.4$ Hz), 3.70 (m, 4H, H_{17} , H_{19}), 2.89 (m, 4H, H_{16} , H_{18}), 2.36 (s, 3H, H_{11}).

4.17. Προσπάθειες σύνθεσης του αναλόγου Nil-8

4.17.1. Σύνθεση της ένωσης 67



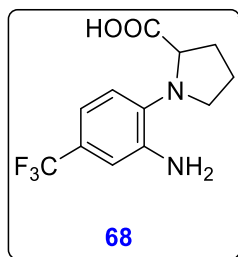
Σε μία δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρεται το 4-φθορο-3-νιτρο-τριφθοροβενζόλιο **62** (1 g, 4.782 mmol) σε διαλύτη 1,4-διοξάνιο (13,5 mL). Υπό ανάδευση ακολουθεί προσθήκη όξινου ανθρακικού νατρίου NaHCO_3 (0.600 g, 7.173 mmol) και L-προλίνης **66** (0.661 g, 5.738 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται σταδιακή θέρμανση έως τους 80 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με

TLC. Με την ολοκλήρωσή της (24h), το περιεχόμενο της δίλαιμης φιάλης μεταφέρεται σε μονόλαιμη και απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό, ενώ ακολουθεί οξίνιση της υδατικής φάσης με 1,2 N HCl έως pH~5. Γίνεται ξανά εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Το επιθυμητό προϊόν διαλύεται μερικώς και στην υδατική φάση. Το νερό απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα με τη δημιουργία αζεotropικού μίγματος με αιθανόλη και το προϊόν λαμβάνεται με διαχωρισμό με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο : μεθανόλη αυξανόμενης πολικότητας. Αντίθετα, η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν λαμβάνεται με διαχωρισμό του μίγματος της οργανικής φάσης με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρα : μεθανόλη αυξανόμενης πολικότητας, ως καφέ ελαιώδες υγρό (ολική ποσότητα 1.357 g, 93%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 8.01 (d, 1H, H_1 , $^4J=2.3$ Hz), 7.70 (dd, 1H, H_2 , $^3J=9.1$ Hz, $^4J=2.4$ Hz), 7.02 (d, 1H, H_3 , $^3J=9.0$ Hz), 4.43 (t, 1H, H_{10} , $^3J=6.9$ Hz), 3.29 (m, 1H, H_4 ή H_5), 3.04 (m, 1H, H_5 ή H_4), 2.36-1.81 (m, 4H, H_6 , H_7 , H_8 , H_9).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 173.49, 143.98, 136.19, 129.41, 125.72, 124.24, 123.03, 118.35, 62.99, 51.79, 30.73, 24.87.

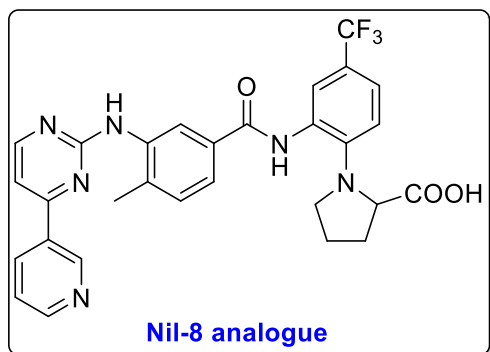
4.17.2. Σύνθεση της ένωσης 68



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, φέρεται η (2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνη **67** (0.032 g, 0.105 mmol) σε διαλύτη μεθανόλη (3 mL). Ακολουθεί προσθήκη του καταλύτη Pd/C (0.022 g, 0.211 mmol) και εφαρμόζεται επίθεμα με αέριο υδρογόνο. Η αντίδραση αφήνεται υπό έντονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2h και η πορεία της ελέγχεται με TLC. Με την ολοκλήρωσή της, διηθείται ο καταλύτης και το διήθημα συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από ξήρανση στην αντλία υψηλού κενού σε απόδοση ~100% και χρησιμοποιείται απευθείας στην επόμενη αντίδραση διότι κατά την παραμονή της η αμίνη οξειδώνεται πολύ εύκολα.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.58 (s, 1H, H₁₁), 7.19 (dd, 1H, H₂, ³J=8.4 Hz, ⁴J=2.1 Hz), 7.05 (d, 1H, H₁, ⁴J=2.1 Hz), 6.67 (d, 1H, H₃, ³J=8.3 Hz), 3.81 (m, 1H, H₁₀), 3.24 (m, 2H, H₄, H₅), 2.98-1.93 (m, 4H, H₆, H₇, H₈, H₉).

4.17.3. Σύνθεση του αναλόγου Nil-8 με αντιδραστήριο σύζευξης HATU



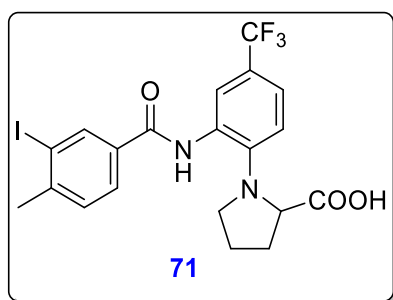
Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, μεταφέρεται το 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκό οξύ **12** (0.036 g, 0.117 mmol) σε άνυδρο διαλύτη DMF. Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου γίνεται προσθήκη άνυδρης βάσης τριαιθυλαμίνης (16.3 μL, 0.117 mmol) και αντιδραστήριου σύζευξης HATU (0.044 g, 0.117 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε παγόλουτρο για 30 min και η πορεία της ενεργοποίησης ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη της (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης **68** (0.032 g, 0.117 mmol) διαλυμένη σε άνυδρο DMF. Η αντίδραση αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου αυξάνοντας σταδιακά τη θέρμανση, με ταυτόχρονη χρήση κάθετου ψυκτήρα. Μετά από 24h η αντίδραση τερματίζεται και μίγμα αυτής αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό, ενώ ακολουθεί οξίνιση της υδατικής φάσης με αραιό διάλυμα HCl 1.2 N. Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και το διήθημα που προκύπτει μετά τη διήθηση του Na₂SO₄, συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ελέγχεται. Οι αντίστοιχες υδατικές φάσεις ελέγχονται και αυτές. Από το φάσμα του ¹H NMR δεν διαπιστώθηκε ο σχηματισμός της επιθυμητής ένωσης.

4.17.4. Σύνθεση του αναλόγου Nil-8 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το 4-μεθυλο-3-((4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)βενζοϊκό οξύ **12** (0.059 g, 0.192 mmol) σε περίσσεια άνυδρου θειονυλου χλωριδίου (SOCl_2) (5 mL) υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου. Ακολουθεί προσθήκη καταλυτικής ποσότητας DMF (2 σταγόνες) και με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται θέρμανση στους 75 °C (3h). Η πορεία της ενεργοποίησης ελέγχεται με TLC. Το SOCl_2 έχει διπλό ρόλο διότι δρα ως διαλύτης και αντιδραστήριο. Αφού ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του χλωριδίου του οξέος, ακολουθεί απομάκρυνση της περίσσειας του θειονυλουχλωριδίου στην υδραντλία και το εναπομείναν στερεό εκπλένεται με άνυδρο διχλωρομεθάνιο ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη από το θειονυλοχλωρίδιο. Στη συνέχεια το ίζημα της αντίδρασης διαλύεται σε άνυδρο διαλύτη DMF (3 mL) και γίνεται προσθήκη άνυδρης βάσης DIPEA (33.4 μL , 0.192 mmol) και (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης **68** (0.026 g, 0.096 mmol) διαλυμένη σε άνυδρο DMF. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα, θερμαίνεται σταδιακά φτάνοντας τους 80 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Μετά από 48h η αντίδραση τερματίζεται και το μίγμα αυτής αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με νερό (3x10 mL). Οι όμοιες οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται και άνυδρο Na_2SO_4 και το διήθημα που προκύπτει μετά τη διήθηση του Na_2SO_4 , συμπυκνώνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Τυχόν ίχνη από το DMF απομακρύνονται με λυοφιλοποίηση. Οι υδατικές φάσεις συμπυκνώνονται και αυτές και ελέγχονται. Εν τέλει δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος με αυτή τη μέθοδο.

4.18. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του αναλόγου Nil-8

4.18.1. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 71 με αντιδραστήριο σύζευξης HATU.



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, από την οποία έχει αφαιρεθεί η υγρασία, φέρεται το 3-ιωδο-4-μεθυλοβενζοϊκό οξύ **70** (0.020 g, 0.076 mmol) σε άνυδρο διαλύτη THF. Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου προστίθενται άνυδρη τριαιθυλαμίνη (15.6 μL , 0.112 mmol) και αντιδραστήριο σύζευξης HATU (0.029 g, 0.076 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε παγόλουτρο (3h) και η πορεία της ελέγχεται με TLC. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη της (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης **68** (0.023 g, 0.084 mmol) σε άνυδρο διαλύτη THF και η αντίδραση θερμαίνεται σταδιακά στους 60 °C με χρήση κάθετου ψυκτήρα. Με τη μέθοδο αυτή δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος.

4.18.2. Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 71 με σχηματισμό χλωριδίου οξέος

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 25 mL, από την οποία έχει απομακρυνθεί η υγρασία, φέρεται το 3-ιωδο-4-μεθυλο-βενζοϊκό οξύ **70** (0.048 g, 0.182 mmol) σε περίσσεια SOCl_2 (3 mL), το οποίο λειτουργεί ως διαλύτης και αντιδραστήριο. Υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αζώτου ακολουθεί προσθήκη καταλυτικής ποσότητας DMF (3 σταγόνες) και, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα, εφαρμόζεται θέρμανση έως ότου επιτευχθεί βρασμός (3h). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και η περίσσεια του SOCl_2 απομακρύνεται στην υδραντλία αυξάνοντας σταδιακά τη θέρμανση. Το απομένον ίζημα αφού εκπλυθεί αρχικά με άνυδρο DCM, διαλύεται, έπειτα, σε άνυδρο και απαερωμένο THF υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στη συνέχεια, η αντίδραση τοποθετείται σε παγόλουτρο και γίνεται προσθήκη άνυδρης βάσης DIPEA (48 μL , 0.273 mmol) και στάγδην προσθήκη της (2-αμινο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)προλίνης **68** (0.050 g, 0.182 mmol) διαλυμένη στον διαλύτη της αντίδρασης. Έπειτα αφαιρείται το παγόλουτρο και η αντίδραση αφήνεται αρχικά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα αυξάνεται σταδιακά η θερμοκρασία έως τους 50°C. Με τη μέθοδο αυτή δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, στο εργαστήριο σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και ταυτοποιήθηκαν ανάλογα του φαρμάκου Nilotinib, οι οποίες διαφοροποιούνται από το πρόδρομο φάρμακο στον τελικό βενζολικό δακτύλιο και στον δακτύλιο του μεθυλο-ιμιδαζολίου, με την εισαγωγή άλλων ομάδων που έχουν επιδείξει γενικότερα φαρμακευτική - βιολογική δράση. Οι ενώσεις που σχεδιάστηκαν λειτουργούν ανταγωνιστά ως προς το ATP και ελέγχθηκαν για τυχόν πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης κινάσης BCR-ABL1, με τη χρήση προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης, ενώ αξιολογήθηκαν και οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν με αυτό. Επιπλέον διενεργήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης και σε άλλες πρωτεΐνες, όπως η μεταλλαγμένη BCR-ABL1 T315I, αλλά και η υποδοχική κινάση VEGFR2.

Το ανάλογο **Nil-3** έδειξε ισχυρή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της BCR-ABL1, με θεωρητική τιμή ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs $\Delta G = -15.0$ kcal/mol, ενώ τα ανάλογα **Nil-1** και **Nil-2** έδειξαν μια ικανοποιητική πρόσδεση στην T315I BCR-ABL1 με $\Delta G = -13.3$ kcal/mol. Τέλος, όσον αφορά τη κινάση VEGFR2, την καλύτερη δράση εκδήλωσε το **Nil-1** με $\Delta G = -11.0$ kcal/mol. Παρόλα αυτά, οι τιμές αυτές είναι θεωρητικές, ενώ η βιολογική δράση των συντιθέμενων αναλόγων θα αξιολογηθεί με τα βιολογικά πειράματα που θα ακολουθήσουν.

Από τα συνολικά οκτώ ανάλογα που σχεδιάστηκαν, στο εργαστήριο επιτεύχθηκε η σύνθεση και ταυτοποίηση των επτά εξ αυτών με αρκετά ικανοποιητική συνολική απόδοση, ενώ όποτε παρουσιάστηκαν δυσκολίες, αυτές αντιμετωπίστηκαν με εναλλακτικές μεθόδους. Όσον αφορά το ανάλογο **Nil-8** δεν κατέστη δυνατή η σύνθεσή του, παρόλες τις προσπάθειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

Βιβλιογραφία

1. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed August 2021).
2. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (2020). Available at: <https://gco.iarc.fr/today> (accessed August 2021).
3. "What Is Cancer?" was originally published by the National Cancer Institute. Updated <05/05/2021>. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> (accessed August 2021).
4. Lewin, B. (2004). Κυτταρικός κύκλος και ρύθμιση της αύξησης. Στο Γ. Σταματογιαννόπουλος (μτφρ. και επιμ.), *GENES VIII* (σ. 1230). Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις (2004).
5. Lewin, B. (2004). Ογκογονίδια και καρκίνος. Στο Γ. Σταματογιαννόπουλος (μτφρ. και επιμ.), *GENES VIII* (σ. 1244-1245). Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις
6. National Cancer Institute. "Cancer Treatment". Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment> (accessed August 2021).
7. "Targeted Therapy to Treat Cancer" was originally published by the National Cancer Institute. Updated <11/03/2020>. Available at: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies> (accessed August 2021)
8. Avendaño C, Menéndez JC. Drugs That Inhibit Signalling Pathways for Tumor Cell Growth and Proliferation.; 2008. doi:10.1016/b978-0-444-52824-7.00009-3
9. "Methods for Detecting Kinase Activity". Available at: <https://www.caymanchem.com/news/methods-for-detecting-kinase-activity> (accessed August 2021).
10. Cayman Chemical. Kinase Inhibitors. Available at: <https://www.caymanchem.com/news/kinase-inhibitors> (accessed August 2021).
11. Nelson, D., & Cox, M. (2011). Βιοσηματοδότηση. Στο Α. Παπαβασιλείου & Κ. Σταματόπουλος (επιμ. & μτφρ.), *Lehninger Βασικές Αρχές Βιοχημείας* (4η έκδοση) (σ. 418-421). Λευκωσία: Broken Hill Publishers LTD
12. Schulman H. Intracellular Signaling. *Fundam Neurosci Fourth Ed*. Published online 2013:189-209. doi:10.1016/B978-0-12-385870-2.00009-3
13. Kannaiyan R, Mahadevan D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. Expert Rev Anticancer Ther. 2018;18(12):1249-1270. doi:10.1080/14737140.2018.1527688
14. Thomson RJ, Moshirfar M, Ronquillo Y. Tyrosine Kinase Inhibitors. [Updated 2021 May 4]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563322/>

15. Minciaccchi, V.R.; Kumar, R.; Krause, D.S. Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past, Present and Future. *Cells* 2021, 10, 117. <https://doi.org/10.3390/cells10010117>
16. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2017;376(10):917-927. doi:10.1056/nejmoa1609324
17. Zhou YH, Cui YH, Wang T, Luo Y. Long Non-Coding RNA HOTAIR in Cervical Cancer: Molecular Marker, Mechanistic Insight, and Therapeutic Target. Vol 97. 1st ed. Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/bs.acc.2019.12.004
18. Yang N, Sheridan AM. *Cell Cycle*. Vol 1. Third Edit. Elsevier; 2014. doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00273-6
19. Poon, Randy Y.C. (2015). Reference Module in Biomedical Sciences || Cell Cycle Control. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.98748-8
20. Bendris N, Lemmers B, Blanchard JM. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle*. 2015;14(12):1786-1798. doi:10.1080/15384101.2014.998085
21. Susan S. Taylor; Alexandr P. Kornev (2011). Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. , 36(2), 65–77. doi:10.1016/j.tibs.2010.09.006
22. Krebs, Edwin G. (1998). AN ACCIDENTAL BIOCHEMIST. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), xiii–xxxii. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.0
23. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* (80-). 2002;298(5600):1912-1934. doi:10.1126/science.1075762
24. Dissmeyer N., Schnittger A. (2011). [Methods in Molecular Biology] Plant Kinases || The Age of Protein Kinases. 10.1007/978-1-61779-264-9(Chapter 2), 7–52. doi:10.1007/978-1-61779-264-9_2
25. Modi V, Dunbrack RL. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(14):6818-6827. doi:10.1073/pnas.1814279116
26. Kinases, P. Ser / Thr-specific Protein Kinases and Protein Phosphatases. *Signal Transduction* 2, (2003).
27. Hanks SK, Hunter T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1 . *FASEB J*. 1995;9(8):576-596. doi:10.1096/fasebj.9.8.7768349
28. LaRonde-LeBlanc N, Wlodawer A. The RIO kinases: An atypical protein kinase family required for ribosome biogenesis and cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2005;1754(1-2):14-24. doi:10.1016/j.bbapap.2005.07.037
29. Cell Signaling Technology. Human Protein Kinases Overview. Available at: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/human-protein-kinases-overview> (accessed August 2021)

30. Cell Signaling Technology. Atypical Protein Kinases. Available at: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/atypical-protein-kinases> (accessed August 2021).
31. Capra M, Nuciforo PG, Confalonieri S, et al. Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Res.* 2006;66(16):8147-8154. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3489
32. Nestler EJ, Greengard P. Protein Serine-Threonine Kinases. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28112/>
33. London E, Bloyd M, Stratakis CA. PKA functions in metabolism and resistance to obesity: Lessons from mouse and human studies. *J Endocrinol.* 2020;246(3):R51-R64. doi:10.1530/JOE-20-0035
34. Edelman AM, Krebs EG. PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES. Published online 1987.
35. Alberts (2008) *Molecular biology of the cell*, 5th edition, pages; 626, 895, 911. Garland Science, Madison Avenue, New York. Available from: https://teaching.ncl.ac.uk/bms/wiki/index.php/Protein_kinase_C
36. Mochly-Rosen D, Das K, Grimes K V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(12):937-957. doi:10.1038/nrd3871
37. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(11):a011254. Published 2012 Nov 1. doi:10.1101/cshperspect.a011254
38. Guo YANJUN, Pan WEIWEI, Liu SB, Shen ZFEI, Xu Y, Hu LL. ERK / MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). Published online 2020:1997-2007. doi:10.3892/etm.2020.8454
39. ZHANG, W., LIU, H. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9–18 (2002). doi:10.1038/sj.cr.7290105
40. Pearson G, Robinson F, Gibson TB, et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions . 2001;22(2):153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
41. Cusabio. "Kinase Classification". Available from: <https://www.cusabio.com/c-16643.html> (accessed August 2021).
42. Alberts et al. (2015). *Molecular biology of the cell*, 6th edition, pages; 855-856. Garland Science, New York.
43. Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:373-98. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.373. PMID: 10966463.
44. Cell Signaling Technology. Tyrosine Protein Kinases. Available at: <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/tyrosine-protein-kinases> (accessed August 2021)
45. Heldin CH. *Protein Tyrosine Kinase Receptor Signaling Overview*. Vol 2. Second Edition. Elsevier Inc.; 2010. doi:10.1016/B978-0-12-374145-5.00059-0
46. RTKs - Receptor Tyrosine Kinases. Available at: <https://flipper.diff.org/app/pathways/info/3126> (accessed August 2021).

47. Azevedo A, Silva S, Rueff J. Non-receptor Tyrosine Kinases Role and Significance in Hematological Malignancies. *Tyrosine Kinases as Druggable Targets Cancer*. Published online 2019. doi:10.5772/intechopen.84873
48. Gocek E, Moulas AN, Studzinski GP. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51(3):125-137. doi:10.3109/10408363.2013.874403
49. Siveen KS, Prabhu KS, Achkar IW, et al. Role of Non Receptor Tyrosine Kinases in Hematological Malignancies and its Targeting by Natural Products. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1-22. doi:10.1186/s12943-018-0788-y
50. Alberts et al. (2015). Molecular biology of the cell, 6th edition, pages; 155-156. Garland Science, New York.
51. Indovina P, Forte IM, Pentimalli F, Giordano A. Targeting SRC family kinases in mesothelioma: Time to upgrade. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1-21. doi:10.3390/cancers12071866
52. Gocek E, Moulas AN, Studzinski GP. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2014;51(3):125-137. doi:10.3109/10408363.2013.874403
53. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 2004;23(48 REV. ISS. 7):7906-7909. doi:10.1038/sj.onc.1208160
54. Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang Y shan. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1-12. doi:10.1186/s12943-018-0801-5
55. Wessler S, Backert S. *Abl Family of Tyrosine Kinases and Microbial Pathogenesis*. Vol 286. Elsevier Inc.; 2011. doi:10.1016/B978-0-12-385859-7.00006-9
56. Blaukat A. Abl kinase. *xPharm Compr Pharmacol Ref*. Published online 2007:1-15. doi:10.1016/B978-008055232-3.62905-8
57. Wang JYJ. *Nuclear and Cytoplasmic Functions of Abl Tyrosine Kinase*. Vol 3. Second Edition. Elsevier Inc.; 2010. doi:10.1016/B978-0-12-374145-5.00266-7
58. Sirvent A, Benistant C, Roche S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell*. 2008;100(11):617-631. doi:10.1042/bc20080020
59. Nowell, C. The minute chromosome (Ph¹) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* **8**, 65–66 (1962). <https://doi.org/10.1007/BF01630378>
60. ROWLEY, J. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973). <https://doi.org/10.1038/243290a0>
61. Alberts et al. (2015). Molecular biology of the cell, 6th edition, page; 1135. Garland Science, New York.
62. Vuelta E, García-Tuñón I, Hernández-Carabias P, Méndez L, Sánchez-Martín M. Future approaches for treating chronic myeloid leukemia: Crispr therapy. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):1-16. doi:10.3390/biology10020118

63. Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell*. 2020;37(4):530-542. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.006
64. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, et al. The philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016;35(1):1-15. doi:10.1186/s40880-016-0108-0
65. Soni G, Yadav KS. Applications of nanoparticles in treatment and diagnosis of leukemia. *Mater Sci Eng C*. 2015;47(April):156-164. doi:10.1016/j.msec.2014.10.043
66. What Is Chronic Myeloid Leukemia?. MD: American Cancer society. Updated <19/06/2018>. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/chronic-myeloid-leukemia/about/what-is-cml.html> (Accessed August 2021).
67. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29. doi:10.3322/caac.21254
68. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Chronic Myelogenous Leukemia Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated <08/04/2021>. Available at: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/cml-treatment-pdq> (Accessed August 2021). [PMID: 26389183]
69. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacol Res*. 2021;165(January):105463. doi:10.1016/j.phrs.2021.105463
70. Bhullar, K.S., Lagarón, N.O., McGowan, E.M. et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer* 17, 48 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0804-2>
71. Roskoski R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol Res*. 2016;103:26-48. doi:10.1016/j.phrs.2015.10.021
72. Roskoski R. Orally effective FDA-approved protein kinase targeted covalent inhibitors (TCIs). *Pharmacol Res*. 2021;165(December 2020):105422. doi:10.1016/j.phrs.2021.105422
73. Martinez R., Defnet A., Shapiro P. (2020) Avoiding or Co-Opting ATP Inhibition: Overview of Type III, IV, V, and VI Kinase Inhibitors. In: Shapiro P. (eds) Next Generation Kinase Inhibitors. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-48283-1_3
74. Li M, Rehman AU, Liu Y, Chen K, Lu S. *Dual Roles of ATP-Binding Site in Protein Kinases: Orthosteric Inhibition and Allosteric Regulation*. Vol 124. 1st ed. Elsevier Inc.; 2021. doi:10.1016/bs.apcsb.2020.09.005
75. Kimura S. (2017) Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib, Ponatinib, and Other TKIs. In: Ueda T. (eds) Chemotherapy for Leukemia. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3332-2_4
76. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2018;93(3):442-459. doi:10.1002/ajh.25011
77. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemother Res Pract*. 2014;2014:1-9. doi:10.1155/2014/357027
78. J. Zimmermann, EP Patent 564, 409, 1993
79. Deadman BJ, Hopkin MD, Baxendale IR, Ley S V. The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents imatinib, nilotinib and dasatinib. *Org Biomol Chem*. 2013;11(11):1766-1800. doi:10.1039/c2ob27003j

80. Kinigopoulou M, Filippidou M, Gogou M, et al. An optimized approach in the synthesis of imatinib intermediates and analogues. *RSC Adv.* 2016;6(66):61458-61467. doi:10.1039/c6ra09812f
81. J. Das, R. Padmanabha, P. Chen, D. J. Norris, A. M. P. Doweyko, J. C. Barrish and J. Wityak, World Pat., 0062778, 2000.
82. Aguilera DG, Tsimberidou AM. Dasatinib in chronic myeloid leukemia: A review. *Ther Clin Risk Manag.* 2009;5(1):281-289. doi:10.2147/tcrm.s3425
83. Mortlock AA, Wilson DM, Kettle JG, Goldberg FW, Foote KM. *Selective Kinase Inhibitors in Cancer.* Vol 5-8. Third Edition. Elsevier; 2017. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12391-1
84. Weisberg E, Manley P, Mestan J, Cowan-Jacob S, Ray A, Griffin JD. AMN107 (nilotinib): A novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer.* 2006;94(12):1765-1769. doi:10.1038/sj.bjc.6603170
85. W. Breitenstein, P. Furet, S. Jacob and P. W. Manley, World Pat., 2004005281, 2004.
86. S. Abel, M. Acemoglu, B. Erb, C. Krell, J. Sclafani, M. Meisenbach, M. Prashad, W.-C. Sheih and S. Xue, World Pat., 2006135640, 2006.
87. M. Acemoglu, B. Schenkel, W.-C. Shieh, S. Xue, E. Widmer, P. G. Fuentes, J. M. Medina and F. V. Banos, World Pat., 2006135619, 2006.
88. Sweet K, Pinilla-Ibarz J, Zhang L. Clinical advances in the management of chronic myelogenous leukemia: Focus on bosutinib and patient considerations. *Patient Prefer Adherence.* 2014;8:981-986. doi:10.2147/PPA.S53160
89. Boschelli DH, Ye F, Wang YD, et al. Optimization of 4-phenylamino-3-quinolinecarbonitriles as potent inhibitors of Src kinase activity. *J Med Chem.* 2001;44(23):3965-3977. doi:10.1021/jm0102250
90. Tan FH, Putoczki TL, Stylli SS, Luwor RB. Ponatinib: A novel multi-tyrosine kinase inhibitor against human malignancies. *Onco Targets Ther.* 2019;12:635-645. doi:10.2147/OTT.S189391
91. Murray C. K., Chaber J. J., Sharma P. and Kazerani S., World Pat., 2014093583A2, 2014.
92. Manley PW, Barys L, Cowan-Jacob SW. The specificity of asciminib, a potential treatment for chronic myeloid leukemia, as a myristate-pocket binding ABL inhibitor and analysis of its interactions with mutant forms of BCR-ABL1 kinase. *Leuk Res.* 2020;98(July):106458. doi:10.1016/j.leukres.2020.106458
93. Lu X, Smaill JB, Ding K. New Promise and Opportunities for Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chemie - Int Ed.* 2020;59(33):13764-13776. doi:10.1002/anie.201914525
94. Wu P, Clausen MH, Nielsen TE. Allosteric small-molecule kinase inhibitors. *Pharmacol Ther.* 2015;156:59-68. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.10.002
95. Theodorou V, Alagiannis M, Ntemou N, et al. Mild alkaline hydrolysis of hindered esters in non-aqueous solution. *Arkivoc.* 2018;2018(7):308-319. doi:10.24820/ark.5550190.p010.673
96. R. Yan, H. Yang, W. Hou and Y. Xu, Chinese Pat., 101985442, 2011
97. Williams JMJ. Acid Halides. *Compr Org Funct Gr Transform.* Published online 1995:1-21. doi:10.1016/b0-08-044705-8/00145-x

98. Aldabbagh F. (2005). Acid Halides. National University of Ireland, Galway, Republic of Ireland. Volume 5, (ISBN 0-08-044257-9); pp 1–17
99. Duveau DY, Hu X, Walsh MJ, et al. Synthesis and biological evaluation of analogues of the kinase inhibitor nilotinib as Abl and Kit inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2013;23(3):682-686. doi:10.1016/j.bmcl.2012.11.111
100. Kim BR, Lee HG, Kang SB, et al. Tert-butoxide-assisted amidation of esters under green conditions. *Synthesis (Stuttg).* 2012;44(1):42-50. doi:10.1055/s-0031-1289622
101. J. McKenna and W.-C. Shieh, World Pat., 2006135641, 2006.
102. Ben Halima T, Vandavasi JK, Shkoor M, Newman SG. A Cross-Coupling Approach to Amide Bond Formation from Esters. *ACS Catal.* 2017;7(3):2176-2180. doi:10.1021/acscatal.7b00245
103. Koriatopoulou K, Karousis N, Varvounis G. Novel synthesis of the pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazocine ring system via a Dieckmann condensation. *Tetrahedron.* 2008;64(42):10009-10013. doi:10.1016/j.tet.2008.07.029
104. Janakiramudu DB, Subba Rao D, Srikanth C, et al. Sulfonamides and carbamates of 3-fluoro-4-morpholinoaniline (linezolid intermediate): synthesis, antimicrobial activity and molecular docking study. *Res Chem Intermed.* 2018;44(1):469-489. doi:10.1007/s11164-017-3114-1
105. Bellamy FD, Ou K. Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* 1984;25(8):839-842. doi:10.1016/S0040-4039(01)80041-1
106. Forero-Cortés PA, Haydl AM. The 25th Anniversary of the Buchwald-Hartwig Amination: Development, Applications, and Outlook. *Org Process Res Dev.* 2019;23(8):1478-1483. doi:10.1021/acs.oprd.9b00161
107. O. Loiseleur, D. Kaufmann, S. Abel, H. M. Buerger, M. Meisenbach, B. Schmitz and G. Sedelmeier, World Pat., 03066613, 2003.
108. Armarego, W. L. F. & Perin, D. D. Purification of Laboratory Chemicals, Fourth Edition. 529 (2000). doi:10.3390/21000152.