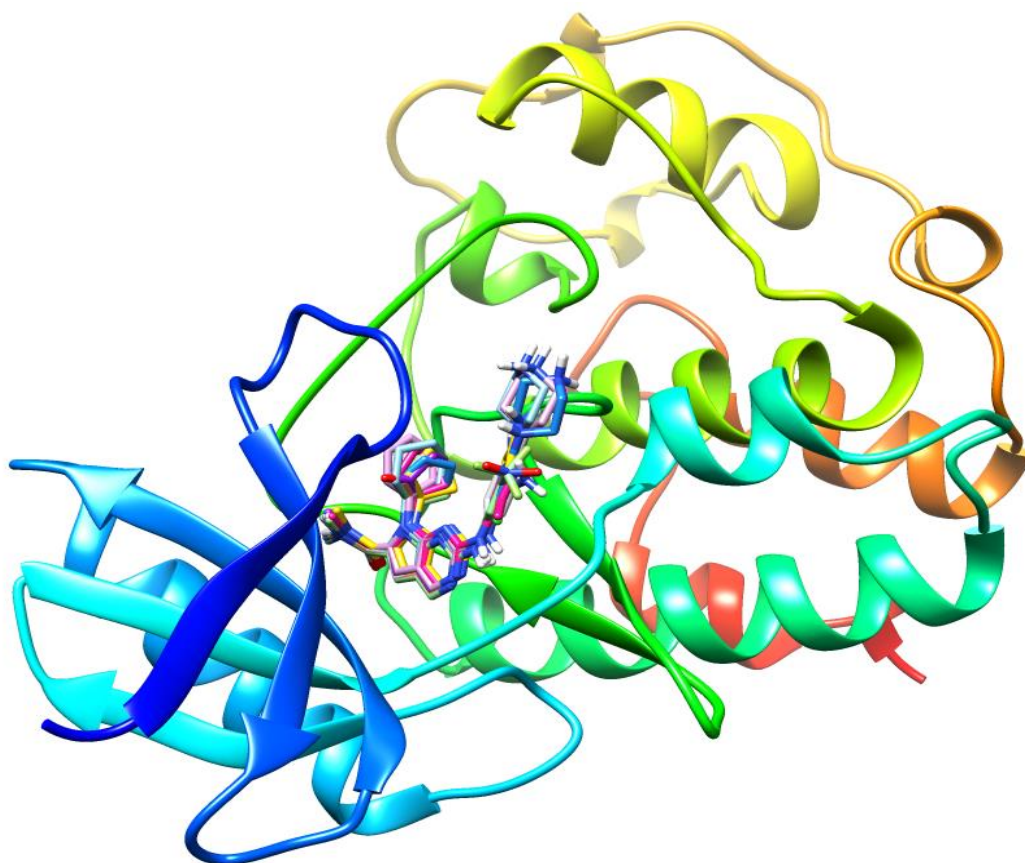




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«Μοριακός σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική δράση εν δυνάμει
αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών»**



ΜΠΡΕΝΤΑΣ ΑΛΕΞΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ ΧΗΜΕΙΑ
ΜΕ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ “ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ-ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ”

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

Μπρέντας Αλέξιος

A.M.: 60

Τριμελής εξεταστικής επιτροπής:

Επιβλέπων καθηγητής: Κωσταντίνος Σκομπρίδης

Μέλη:

Σίσκος Μιχαήλ

Αλίβερτης Δημήτριος

Επταμελής Εξεταστικής Επιτροπής

1. Καθηγητής Κωνσταντίνος Σκομπρίδης
2. Καθηγητής Μιχαήλ Σίσκος
3. Επίκουρος Καθηγητής Δημήτρης Αλίβερτης
4. Καθηγητής Λάζαρος Χατζηαράπογλου
5. Αναπληρωτής Καθηγητής Δημοσθένης Φωκάς
6. Αναπληρωτής καθηγητής Δημήτριος Τάσης
7. Επίκουρος Καθηγητής Γεώργιος Παρασκευόπουλος

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Διδακτορικών Σπουδών του Τμήματος Χημείας κατά την περίοδο 2018-2023. Αφορά στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τον έλεγχο της βιολογικής δράσης του φαρμακευτικού σκευάσματος του Ribociclib ως δραστικών, εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Τα πειράματα και οι συνθέσεις των συγκεκριμένων αναλόγων διετελέστηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης του Τμήματος Χημείας στο πλαίσιο του Αναμορφωμένου Προγράμματος Σπουδών.

Η εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, ήταν μία πολύ σημαντική εμπειρία στην ζωή μου. Το κυνήγι της γνώσης, η ευφροσύνη της ανακάλυψης, η μελέτη της επιστήμης της Χημείας αποτέλεσαν βασικά εφόδια για την διαμόρφωση της προσωπικότητάς μου. Θεωρώ τον εαυτό μου ευγνώμων που κατάφερα να σπουδάσω στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων παρά τις οικονομικές δυσχέρειες και τις διάφορες προκλήσεις που αντιμετώπισαν όλοι (όπως και εγώ) κυρίως μετά το 2010. Ολοκληρώνω τις διδακτορικές μου σπουδές πολύ πιο ώριμος, γεμάτος, έμπειρος και ολοκληρωμένος.

Προφανώς, σε όλο αυτό το ταξίδι, κεντρική σημασία και ρόλο έπαιξαν και τα πρόσωπα που με συντρόφεψαν, με συμβούλευσαν, με ενθάρρυναν και με κατεύθυναν (πως θα μπορούσε άλλωστε να είναι διαφορετικά). Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ και την εκτίμησή μου στον επιβλέποντά μου Κ. Σκομπρίδη. Αποτέλεσε για μένα κάτι παραπάνω από διδάσκοντα, ένα πρότυπο ανθρώπου και ερευνητή. Παρά τις δυσκολίες που αντιμετώπισα ήταν πάντα δίπλα μου για να με εμπνεύσει και να με κατευθύνει. Η συνεργασία μας, τα τελευταία 8 χρόνια, ήταν κάτι παραπάνω από εξαιρετική. Ήταν ο κύριος λόγος που ασχολήθηκα με την οργανική Χημεία αλλά και ο λόγος που αποφάσισα να ασχοληθώ με την διδασκαλία της χημείας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τριμελή μου επιτροπή για τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και το σύνολο του διδακτικού προσωπικού του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αρχικά ευχαριστώ την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Βασιλική Θεοδώρου που, παρά το γεγονός ότι είχε συνταξιοδοτηθεί συνέχισε να μου προσφέρει απλόχερα τις γνώσεις της και την καθοδήγησή της. Τον καθηγητή κ. Γεώργιο Βαρβούνη, για την στήριξη του όλα αυτά τα χρόνια. Τον Καθηγητή κ. Μιχάλη Σίσκο, μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, για τις γνώσεις και τις συμβουλές που μου μετέδωσε τόσο κατά την διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής, όσο και κατά την διάρκεια εκπόνησης του επικουρικού μου έργου στα φοιτητικά εργαστήρια Οργανικής Χημείας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον

Καθηγητή κ. Λάζαρο Χατζηαράπογλου, τον αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Αλίβερτη, τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Φωκά, τον Καθηγητή κ. Λάζαρο Χατζηαράπογλου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Φωκά, τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Δημήτριο Τάση και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γεώργιο Παρασκευόπουλο που δέχθηκαν να είναι στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή μου και να αξιολογήσουν την ερευνητική μου προσπάθεια.

Σημαντική και ανεκτίμητη συνεισφορά στην ερευνητική μου πορεία είχαν οι συμφοιτητές-συνάδελφοι μου στο εργαστήριο, με ποικίλους τρόπους. Το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας αποτελεί ίσως έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για μία επιτυχημένη ερευνητική εργασία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συνεργάτες μου Αντώνη Κουσαξίδη και Χριστίνα Καραμέτου που συνεισέφεραν καταλυτικά για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Χωρίς την συνεισφορά τους δεν θα ήταν δυνατός αυτός ο όγκος αποτελεσμάτων που παρουσιάζεται στην εν λόγω διατριβή. Ευχαριστώ, επίσης, τους Διδάκτορες Νικολέτα Ντέμου, Πηνελόπη Βούλγαρη, Μιχάλη Αλαγιάνη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γεωργία Μπαζάνου για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφεραν σε όλα τα επίπεδα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε πολύπλευρα όλα αυτά τα χρόνια σπουδών (οικονομικά, ψυχολογικά, ηθικά). Δεν αμφέβαλαν ούτε μια στιγμή για τις ικανότητες και δυνατότητες μου και επιδοκίμασαν όλες μου τις επιλογές.

**Αφιερωμένο στην οικογένειά μου, τους
φίλους και τους συνοδοιπόρους.**

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	10
1. Εισαγωγή	12
2. Θεωρητικό μέρος	19
2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες	19
2.1.1 Δομή πρωτεϊνικών κινασών.	20
2.1.2 Το ενεργό κέντρο	22
2.1.3 Εκλεκτικότητα των πρωτεϊνικών κινασών.....	23
2.1.4 Ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση.	25
2.1.5 Ο ρόλος τους στις κυτταρικές διαδικασίες	27
2.1.6 Ρύθμιση πρωτεϊνικών κινασών.....	28
2.1.7 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών.	30
2.2 Κινάσες τυροσίνης	33
2.2.1 Υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσίνης (RKTS)	34
2.2.2 Υποδοχέας επιδερμικών αυξητικών παραγόντων Her1 ή EGF-R.	37
2.2.3. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)	37
2.2.4. Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης C-MET	39
2.2.5. Υποδοχέας Ινσουλίνης	41
2.2.6. Μη υποδοχικές κινάσες τυροσίνης.....	43
2.2.7 Υπο-οικογένεια κινάσης Abl.....	44
2.2.8 Κινάση c-Abl.....	44
2.2.9 Η υπο-οικογένειας Src κινασών	46
2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης.....	48
2.3.1 Κινάσες Raf.....	49
2.3.2 Κινάσες σερίνης-θρεονίνης JNK.....	50
2.3.3. Κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDK).....	52
2.4 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.	55
2.4.1. Κατηγοριοποίηση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	58
2.4.2. Imatinib	59
2.4.3. Σύνθεση του Imatinib.....	61
2.4.4. Nilotinib.....	63
2.4.5. Σύνθεση του Nilotinib	65
2.4.6 Gefitinib.....	66
2.4.7.Σύνθεση του Gefitinib	67
2.5. Αναστολείς CDK κινασών.	68

2.5.1. Pablociclib:	70
2.5.2. Σύνθεση του Pablociclib	72
2.5.3 Abemaciclib	74
2.5.4 Σύνθεση του Abemaciclib:	77
2.5.5 Ribociclib	78
2.5.6. Σύνθεση του Ribociclib.....	80
2.6 Καρκίνος.....	81
2.7. Καρκίνος του μαστού	83
3. Συζήτηση αποτελέσματα	85
3.1 Μοριακή μοντελοποίηση.....	88
3.2 Θεωρητική προσέγγιση -υποθέσεις εργασίας	90
3.2.1 Μελέτη της δομής συγκρυστάλλωσης CDK6/Ribociclib.....	90
3.2.2 Μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς (Docking)	93
3.3 Συνθετική πορεία των ενώσεων:	104
3.3.1 Σύνθεση ανάλογων με βάση την ένωση 54	112
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 49.....	112
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 51.....	114
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 52.....	116
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 54.....	118
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 58.....	120
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 59.....	122
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 65.....	123
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 68.....	125
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC1	127
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC5	131
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC7	134
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC8	139
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC9.	144
3.3.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός αναλόγων με βάση την ένωση 78	148
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 75.	148
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 76.....	149
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 77.....	151
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 78.....	153
Σύνθεση και χαρακτηρισμός του RibB1.....	154
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC2	157
3.3.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός αναλόγων με βάση την ένωση 36	159

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 81.....	159
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 82.	161
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 83.....	162
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 84.....	163
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibB2	165
3.4 Βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας του Ribociclib	170
4. Συνθέσεις-φασματοσκοπικά δεδομένα	175
4.1 Πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση	175
Σύνθεση της ένωσης 49 (5-βρωμο-2-χλωρο- <i>N</i> -κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη).....	175
Σύνθεση της ένωσης 75 (5-βρωμο-2,4- διχλωροπυριμίδινη).....	176
Σύνθεση της ένωσης 81 (5-βρωμο-2-χλωρο- <i>N</i> -φαινυλοπυριμιδιν-4-αμίνη)	177
4.2 Αντιδράσεις Sonogashira	178
Σύνθεση της ένωσης 51 (3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλοπροπ-2-υν-1-ολη)...178	
Σύνθεση της ένωσης 76 (3-(2-χλωρο-4-(κυκλοεξυναμινο)πυριμιδιν-5-υλοπροπ-2-υν-1-ολη).	179
Σύνθεση της ένωσης 82 (3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλοπροπ-2-υν-1-όλη).	180
4.3 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης.	181
Σύνθεση της ένωσης 52 (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη)..181	
Σύνθεση της ένωσης 77 (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη).....	182
Σύνθεσης της ένωσης 83 (2-χλωρο-7-φαινυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη).	183
4.4 Αντιδράσεις οξειδωτικής προσθήκης.	184
Σύνθεση της ένωσης 54 (2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλοαιθανόνη).	184
Σύνθεση της ένωσης 78 (2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλοαιθανόνη).	185
Σύνθεση της ένωσης 84 (2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-φαινυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλ)αιθανόνη).	186
4.5 Σύνθεση παραγώγων ανιλίνης.....	187
Σύνθεση της ένωσης 58 (<i>tert</i> -βουτυλεστέρα 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβοξυλικό οξύ).....	187
Σύνθεση της ένωσης 59 (<i>tert</i> -βουτυλεστερα 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβοξυλικό οξύ).....	188
Σύνθεση της ένωσης 64 <i>tert</i> -βουτυλεστέρα-4-(4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος.	189
Σύνθεσης της ένωσης 65 (<i>tert</i> -βουτυλεστέρας του 4-(4-άμινο-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος).	190
Σύνθεσης της ένωσης 71 (<i>tert</i> -βουτυλεστέρα του 4-(4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος).	191
4.5 Σύνθεση τελικών προϊόντων (σύζευξη Buchwald-Hartwig)	192

Σύνθεση της ένωσης RibC1 (7-κυκλοπεντυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλο-2-((3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο ..	192
Σύνθεση της ένωσης RibC2 (7-κυκλοεξυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλο-2-((3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο)	193
Σύνθεση της ένωσης RibC5 (7-κυκλοπεντυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλο-2-((4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d] πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο).	194
Σύνθεση της ένωσης RibC7 (7-κυκλοπεντυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλο-2-((4-(πιπεραζιν-1-υλο)-2-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d] πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο).	195
Σύνθεση της ένωσης RibC8 (7-κυκλοπεντυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλο-2-((4-(πιπεραζιν-1-υλο)-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d] πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο)	196
Σύνθεση της ένωσης RibC9 (7-κυκλοπεντυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλ-2-((3-(πιπεραζινο-1-υλο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d] πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο).	197
Σύνθεση της ένωσης RibB1 4-(6-((7-κυκλοπεντυλο-6-(διμεθυλκαρβαμοϋλο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)πυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβαξαμίδιο.	198
Σύνθεσης της ένωσης RibB2 (<i>N,N</i> -διμεθυλ0-7-φαινυλο-2-((5-(πιπεραζιν-1-υλο)πυριδιν-2-υλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη- 6-καρβοξαμίδιο)	200
5. Συμπεράσματα	201
6. Βιβλιογραφία	202
Παράρτημα	214

Περίληψη

Οι πρωτεϊνικές κινάσες, οι κύριοι μεταγωγοί σημάτων, εμπλεκόμενες σε όλες τις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου, ως γνωστόν, επηρεάζουν τις κυτταρικές διεργασίες με την ενζυματική φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Τυχόν μεταλλάξεις των μορίων των πρωτεϊνικών κινασών οδηγούν, λόγω της απορρύθμισης των οδών μεταγωγής σημάτων, ενίοτε στην αυτόνομη, μη ελεγχόμενη συμπεριφορά των κυττάρων, παραβλέποντας τις εξωκυττάρια εντολές και διαταράσσοντας ουσιαστικά τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη διαίρεση, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την απόπτωση των κυττάρων, καθώς και την ανοσολογική απόκριση. Πολλές μορφές καρκίνου, αυτοάνοσων νοσημάτων, του σακχαρώδους διαβήτη κ.ά., οφείλονται σε τέτοιου είδους μεταλλάξεις.

Ο καρκίνος του μαστού, παρά την πρόοδο στην έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία, εξακολουθεί να παραμένει μια σημαντική αιτία θανάτου των γυναικών. Ο κυτταρικός κύκλος των θηλαστικών επάγεται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ κυκλίνης και εξαρτώμενων από τις κυκλίνες κινασών (CDK). Η δυσλειτουργία αυτής της διεργασίας είναι μία από τις αιτίες εμφάνισης του καρκίνου του μαστού. Παράλληλα, έρευνες έχουν καταδείξει ότι η οδός κυκλίνης D-κυκλίνης-εξαρτώμενης κινάσης (CDK) 4/6-Rb εμφανίζεται και έχει κρίσιμο ρόλο σε πολλά είδη καρκίνου.

Το Ribociclib είναι ένας εκλεκτικός, από του στόματος βιοδιαθέσιμος αναστολέας των CDK4 και CDK6, ο οποίος έλαβε έγκριση από την FDA τον Μάρτιο του 2017 και έχει προστεθεί στο δυναμικό θεραπείας μαζί με άλλους αναστολείς έναντι της CDK 4/6.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αύξηση της δραστηριότητας και της εκλεκτικότητας αναλόγων του Ribociclib μέσω επιλεκτικών τροποποιήσεων, καθώς και η βελτιστοποίηση της συνθετικής τους πορείας.

Abstract

Protein kinases, the major signal transducers involved in all signaling pathways of the cell, are known to influence cellular processes by enzymatic protein phosphorylation. In cases, mutations in protein kinase molecules, due to the deregulation of signal transduction pathways, lead to autonomic, uncontrolled cell behavior, ignoring extracellular commands and effectively disrupting the mechanisms that regulate the division, differentiation, cells, as well as the immune response. Many forms of cancer, autoimmune diseases, diabetes, etc., are due to such mutations.

Breast cancer, despite advances in early detection and treatment, remains a major cause of death in women. The mammalian cell cycle is induced by a complex interaction between cyclin and cyclin-dependent kinases (CDKs). Dysfunction of this process is one of the causes of breast cancer. At the same time, research has shown that the 4-6-Rb cyclin D-cyclin-dependent kinase (CDK) pathway occurs and plays a critical role in many versions of cancer.

Ribociclib is a selective, oral bioavailable inhibitor of CDK4 and CDK6, which was approved by the FDA in March 2017 and has been added as a potential treatment along with other inhibitors against CDK 4/6.

The aim of the present work is to increase the activity and selectivity of analogues of Ribociclib through selective modifications, as well as the optimization of the synthetic route.

1. Εισαγωγή

Η χρήση φαρμάκων από τον άνθρωπο καταγράφεται ήδη από τον 18^ο αιώνα για την πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών. Σύμφωνα με τον ορισμό του παγκόσμιου οργανισμού υγείας, φάρμακο χαρακτηρίζεται: «Κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών, που παράγεται, προσφέρεται προς πώληση, ή παρουσιάζεται για χρήση στη διάγνωση, στη θεραπεία, στον μετριασμό ή στην πρόληψη νόσου, μη φυσιολογικής φυσικής κατάστασης, ή των συμπτωμάτων τους στον άνθρωπο ή στα ζώα, καθώς και για χρήση στην αποκατάσταση, την διόρθωση, ή την μεταβολή οργανικών λειτουργιών στον άνθρωπο ή τα ζώα».

Η ανακάλυψη και η χρήση φαρμάκων είχε ευεργετικά αποτελέσματα για το σύνολο της ανθρωπότητας, βελτιώνοντας εντυπωσιακά την ποιότητα ζωής μέσω της εξάλειψης ασθενειών, καταπράυνσης συμπτωμάτων, αύξηση του προσδόκιμου ζωής κ.ά. Το 1900, το ένα τρίτο όλων των θανάτων στις ΗΠΑ οφείλετε στις τρεις γενικές αιτίες που σήμερα είναι σπάνιες, καθότι μπορούν να προληφθούν ή και να θεραπευτούν, ήτοι η πνευμονία, η φυματίωση και η διάρροια. Μέχρι το 1940, η πιθανότητα θανάτου από αυτές τις τρεις αιτίες ήταν 1/11. Έως το 2000, οι πιθανότητες μειώθηκαν στο 1/25. Άλλοι παράγοντες όπως η βελτίωση της υγιεινής και ο εμβολιασμός έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής κατά τον εικοστό αιώνα.

Τα πρώτα σκευάσματα προέρχονται από φυτά και χρησιμοποιούνται κυρίως ως παυσίπονα (όπιο το 1000 π.χ., σαλικυλικό οξύ 1874 κ.ά.). Η σύνθεση οργανικών ενώσεων ως πιθανών υποψηφίων φαρμάκων γνώρισε πραγματική έκρηξη στις αρχές του 20^{ου} αιώνα με την ανάπτυξη της χημικής βιομηχανίας, ως απότοκο της βιομηχανικής επανάστασης και της ραγδαίας εξέλιξης όλων των επιστημών.⁽¹⁾

Η οργανική σύνθεση είναι ο ειδικός κλάδος της χημικής σύνθεσης που αφορά την παρασκευή οργανικών ενώσεων μέσω επιλεγμένων και κατάλληλων οργανικών αντιδράσεων. Οι ενώσεις του άνθρακα που έχουν απομονωθεί, παρασκευαστεί, μελετηθεί και έχουν βρει τουλάχιστον μία εφαρμογή, είναι σήμερα πάνω από 10 εκατομμύρια και άρα είναι περισσότερες ακόμη και από όλες τις άλλες ενώσεις όλων των άλλων χημικών στοιχείων μαζί. Αυτό συμβαίνει επειδή τα άτομα του άνθρακα παρουσιάζουν μια μοναδική δυνατότητα στο σχηματισμό αλυσίδων ή και δακτυλίων σύνδεσης. Τα άτομα του άνθρακα, μπορούν επίσης να σχηματίσουν δεσμούς με άτομα αζώτου (N), οξυγόνου (O), υδρογόνου (H) ή και άλλων στοιχείων δημιουργώντας μια τεράστια ποικιλία μορίων.⁽²⁾

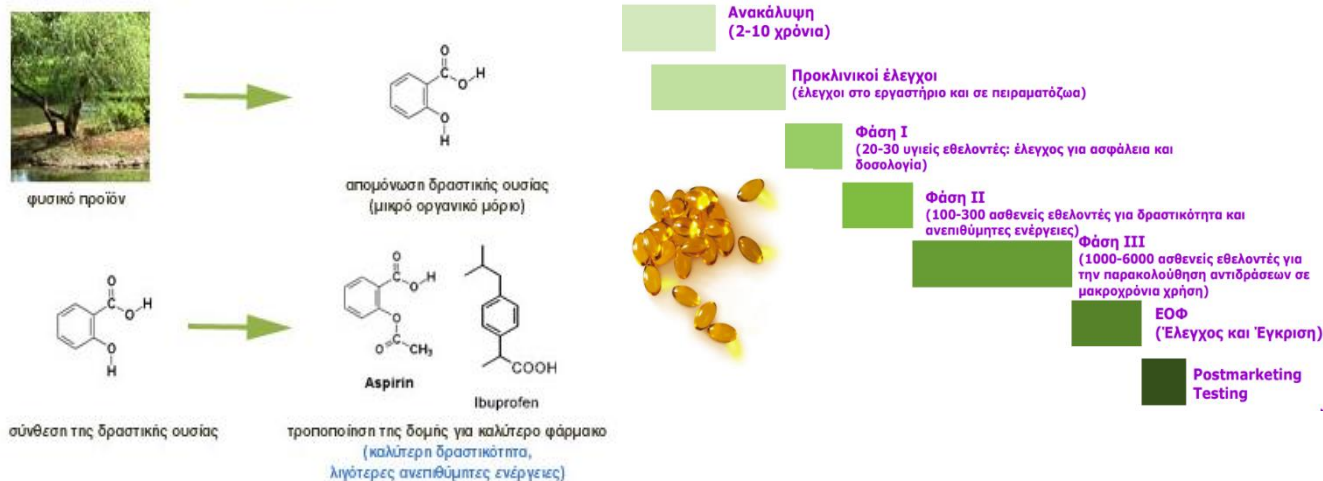
Ο πλέον αναπτυσσόμενος κλάδος της οργανικής σύνθεσης και συνολικά της οργανικής χημείας είναι αυτός της ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Ο σχεδιασμός φαρμάκων, είναι η διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων με βάση ενός βιολογικού στόχου. Το φάρμακο είναι συνήθως ένα οργανικό μόριο μικρού μοριακού βάρους που ενεργοποιεί ή αναστέλλει τη λειτουργία ενός βιομορίου. Επι τον πλείστων, ο σχεδιασμός φαρμάκων περιλαμβάνει τον σχεδιασμό μορίων που είναι συμπληρωματικά σε σχήμα και μέγεθος με το ενεργό κέντρο του βιομοριακού στόχου με τον οποίο αλληλοεπιδρούν και ως εκ τούτου συνδέονται με αυτόν.⁽³⁾ Παρά την πρόοδο στη βιοτεχνολογία και την κατανόηση των βιολογικών συστημάτων, η ανακάλυψη φαρμάκων εξακολουθεί να είναι μια μακρά, δαπανηρή και δύσκολη διαδικασία.⁽⁴⁾

Ιστορικά, τα φάρμακα ανακαλύφθηκαν ως επί το πλείστων με τον εντοπισμό δραστικών συστατικών από παραδοσιακά φυτικά φάρμακα ή καθαρά τυχαία, μέσω εργαστηριακών παρατηρήσεων. Η κλασική φαρμακολογία ασχολήθηκε αρχικά με την δημιουργία χημικών βιβλιοθηκών που περιλαμβάνουν μικρά μόρια, φυσικά προϊόντα ή φυτικά εκχυλίσματα με σκοπό την ανακάλυψη θεραπευτικών σκευασμάτων. Κυρίως, μετά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο γνωρίζει ανάπτυξη η παρασκευή μη φυσικών φαρμάκων, καθώς στο μεταξύ τα βακτήρια είχαν αρχίσει να αναπτύσσουν αντίσταση στις φυσικές πενικιλίνες. Η συνθετική χημεία έδωσε την λύση μέσω της παρασκευής αναλόγων (με τον φυσικό πυρήνα β-λακτάμης αλλά που φέρουν μη φυσική πλευρική αλυσίδα) με δράση έναντι ανθεκτικών στελεχών.⁽⁵⁾ Καθώς η οργανική σύνθεση εξελίσσονταν προοδευτικά, ανέλαβε πρωταγωνιστικό ρόλο στην ανάπτυξη φαρμάκων, ιδιαίτερα στη βελτίωση της δραστικότητας γνωστών φαρμάκων.

Βασικό ρόλο για την πρόοδο της συνθετικής χημείας έπαιξαν οι διάφορες προσεγγίσεις-μέθοδοι για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Η πιο διαδεδομένη μέχρι και την ανακάλυψη θεωρητικών και υπολογιστικών μοντέλων, ήταν αυτή που πρότεινε ο Paul Ehrlich: αρχικά προσδιορίζεται η ένωση-οδηγός που φέρει τη φαρμακοφόρο δομή, το σύνολο, δηλαδή, των χαρακτηριστικών που είναι απαραίτητα για την επίτευξη των βέλτιστων αλληλεπιδράσεων με ένα συγκεκριμένο στόχο και την πρόκληση βιολογικού αποτελέσματος. Μετά την αποσαφήνιση της δομής μιας νέας βιοδραστικής ένωσης ακολουθεί η εργαστηριακή σύνθεση του βασικού μορίου, καθώς και παραγώγων της ένωσης (βιβλιοθήκες βιοδραστικών παραγώγων) με στόχο τη βελτίωση ή τη διερεύνηση της δράσης του. Οι συνθετικές βιοδραστικές ενώσεις που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα προκρίνονται για κλινικές μελέτες. Όλα τα νέα παρασκευάσματα μελετώνται βιοχημικά και τοξικολογικά, ενώ τα τελικά προϊόντα δοκιμάζονται *in vitro* και ακολούθως *in vivo* σε πειραματόζωα και τέλος σε εθελοντές. Τα στάδια αυτά της διαδικασίας ανάπτυξης φαρμάκων είναι γνωστά ως Φάση I, Φάση II κλπ. Μετά την επιτυχή δοκιμασία σε όλες αυτές τις φάσεις, ακολουθεί

η κατάθεση φακέλου στον αντίστοιχο Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων της χώρας διάθεσης του φαρμάκου για την απόκτηση άδειας κυκλοφορίας (lisencing). ⁽⁶⁾

Παραδοσιακή μέθοδος ανακάλυψης φαρμάκων



Σχήμα 1: Ανάπτυξη φαρμάκων με τον παραδοσιακό τρόπο.

Συνολικά οι επικρατέστερες μέθοδοι ανάπτυξης φαρμάκων είναι οι εξής:

1. Ανακάλυψη χωρίς την ύπαρξη ένωσης-οδηγού: Η ανακάλυψη ενός φαρμάκου από την παρατήρηση τυχαίων και απρόοπτων γεγονότων (Π.χ. πενικιλίνη-Φλέμινγκ). Αντίστοιχα συμβαίνει και με όλα τα φυτικά φαρμακευτικά σκευάσματα. Ουσιαστικά με αυτή την μέθοδο εντοπίζουμε την ένωση-οδηγό, που στη συνέχεια δια μέσου σειράς διαδικασιών ανάλογα αυτήν την ένωση-οδηγό αναπτύσσονται σε φάρμακο. Για τον εντοπισμό της ένωσης-οδηγού μπορεί να χρησιμοποιήσουμε το τυχαίο screening, το μη τυχαίο screening, μελέτες μεταβολισμού, καθώς και κλινικές παρατηρήσεις.

2. Ανακάλυψη βασισμένη σε ένωση-οδηγό: Κατηγορίες φαρμάκων που είχαν ανακαλυφθεί τυχαία παίζουν τον ρόλο της ένωσης-οδηγού. Πραγματοποιώντας μετατροπές στη δομή και το σκελετό του μορίου, προσπαθούμε να βελτιώσουμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες του. Για παράδειγμα η τυχαία ανακάλυψη και χρήση του ηρεμιστικού Librium, οδήγησε στην ανακάλυψη του Valium που είναι 10 φορές τουλάχιστον πιο ισχυρό. Όσο αφορά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με βάση την ένωση-οδηγό, υπάρχουν δύο κύριοι τύποι σχεδιασμού φαρμάκων. Ο πρώτος αναφέρεται ως σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τους υποκαταστάτες και ο δεύτερος, σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή.

⁽⁷⁾

2.1 Με βάση το υποκαταστάτη: Ο σχεδιασμός φαρμάκων που βασίζονται στον υποκαταστάτη (ή ο έμμεσος σχεδιασμός φαρμάκων) βασίζεται στη γνώση άλλων μορίων που προσδένονται στον υπό διερεύνηση βιολογικό στόχο. Αυτά τα άλλα μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ενός φαρμακοφόρου μοντέλου που καθορίζει τα ελάχιστα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει ένα μόριο για να συνδεθεί με την πρωτεΐνη στόχο. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον σχεδιασμό νέων οργανικών ενώσεων που θα αναστέλλουν-αλληλοεπιδρούν με τον στόχο.⁽⁸⁾

2.2 Με βάση τη δομή: Ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή (ή ο άμεσος σχεδιασμός φαρμάκου) βασίζεται στη γνώση της τρισδιάστατης δομής του βιολογικού στόχου που λαμβάνεται με μεθόδους όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ή η φασματοσκοπία NMR. Εάν μια πειραματική δομή ενός στόχου δεν είναι διαθέσιμη, μπορεί να είναι δυνατή η δημιουργία ενός ομολογικού μοντέλου του στόχου, με βάση τη δομή μιας σχετικής πρωτεΐνης. Χρησιμοποιώντας τη δομή του βιολογικού στόχου, τα υποψήφια φάρμακα που προβλέπεται ότι συνδέονται με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα στον στόχο, μπορούν να σχεδιαστούν χρησιμοποιώντας διαδραστικά γραφικά και τη διαίσθηση ενός συνθετικού οργανικού χημικού. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες αυτοματοποιημένες υπολογιστικές διαδικασίες, ώστε να προταθούν νέα υποψήφια φάρμακα.^{(9) (10)}

Οι τρέχουσες μέθοδοι για το σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες:

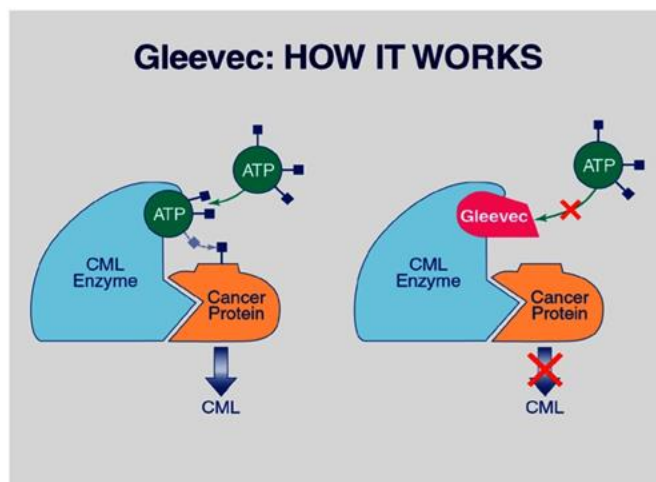
Η πρώτη μέθοδος είναι η ταυτοποίηση νέων υποκαταστατών για έναν δεδομένο υποδοχέα με αναζήτηση μεγάλων βάσεων δεδομένων τρισδιάστατων δομών μικρών μορίων που προσδένονται στο ενεργό κέντρο, χρησιμοποιώντας προσεγγιστικά προγράμματα σύνδεσης. Αυτή η μέθοδος είναι γνωστή ως μοριακή μοντελοποίηση. Μια δεύτερη κατηγορία είναι ο σχεδιασμός de novo νέων υποκαταστατών. Σε αυτή τη μέθοδο, το φάρμακο αναπτύσσεται βήμα-βήμα ανάλογα με την ανασταλτικότητα που αναπτύσσει. Αυτά τα κομμάτια μπορεί να είναι είτε μεμονωμένα άτομα είτε μοριακά θραύσματα. Το βασικό πλεονέκτημα μιας τέτοιας μεθόδου είναι ότι μπορούν να προταθούν νέες δομές, που δεν περιέχονται σε καμία βάση δεδομένων. Μια τρίτη μέθοδος είναι η βελτιστοποίηση των γνωστών υποκαταστατών με την αξιολόγηση των προτεινόμενων αναλόγων εντός του ενεργού κέντρου από την μελέτη της δομής συγκρουσάλλωσης.^{(11), (12)}

Οι κινάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των φωσφοτρανσφερασών, καταλύοντας δε τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Έχουν βασικό ρυθμιστικό ρόλο σχεδόν σε κάθε πτυχή της Βιολογίας του Κυττάρου. Μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος, ρυθμίζουν την απόπτωση, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου,

καθώς και άλλες λειτουργίες του κυττάρου. Οι μεταλλάξεις σε γονίδια κινάσης ευθύνονται για πολλές ασθένειες, ιδίως σε αναπτυξιακές και μεταβολικές διαταραχές, καθώς και, επί το πλείστον, σε ορισμένους τυπούς καρκίνου. Γι' αυτό το λόγο αντιπροσωπεύουν σήμερα τους πιο ελκυστικούς στόχους για την ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων για τη στοχευμένη καταπολέμηση πολλών μορφών καρκίνου. ⁽¹³⁾

Η εκλεκτική αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών, μέσω της σύνθεσης-ανάπτυξης αναστολέων αυτών, έχει καθιερωθεί πλέον ως μία από τις πλέον υποσχόμενες θεραπευτικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση ασθενειών, όπως ο καρκίνος, δεδομένου ότι οι εξειδικευμένες αυτές σηματοδοτικές διαδικασίες, στις οποίες εμπλέκονται οι πρωτεϊνικές κινάσες, αποτελούν την «Αχίλλειο Πτέρνα» των καρκινικών κυττάρων.

Η ιματινίβη είναι το πρώτο φάρμακο με στοχευμένη δράση σε μοριακό στόχο και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ενάντια στην ασθένεια της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML). Λειτουργεί ως ανταγωνιστής του ATP για την μεταλλαγμένη χιμαιρική πρωτεΐνη BCR-ABL. Έκτοτε, η ανάπτυξη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών για την αντιμετώπιση νεοπλασιών και άλλων ασθενειών γνωρίζει ραγδαία ανάπτυξη. Από το 2001 μέχρι και σήμερα έχουν εγκριθεί πάνω από 35 φαρμακευτικά σκευάσματα που αφορούν μόρια μικρού μοριακού βάρους, με ανασταλτική δράση πρωτεϊνικής κινάσης. ⁽¹⁴⁾

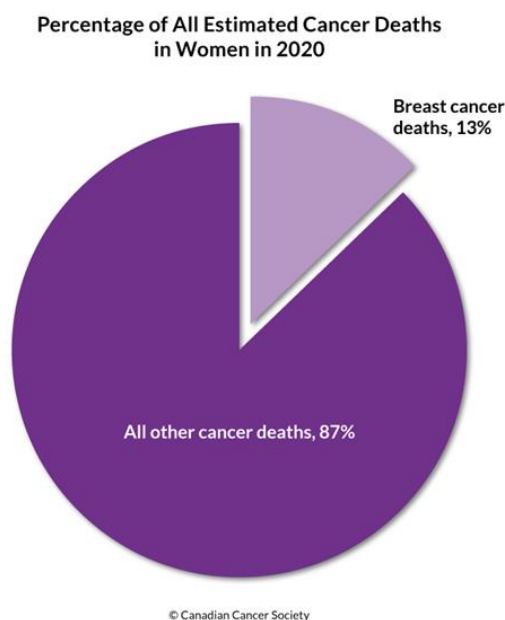


Σχήμα 2: Η δράση του Imatinib. Συνδέεται στην θέση δέσμευσης του ATP εμποδίζοντας την περαιτέρω φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών αναστέλλοντας την κυτταρική σηματοδότηση.

Ο όρος «καρκίνος του μαστού» αναφέρεται στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού με ετήσια επίπτωση σε άνω των 1,3 εκατομμυρίων, γεγονός που αντιπροσωπεύει πάνω από το 23% όλων των κακοηθειών. ⁽¹⁵⁾ Αποτελεί μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου παγκοσμίως και είναι η πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων στον γυναικείο πληθυσμό. Προκαλείται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων, με συνέπεια τον

σχηματισμό κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα εξάπλωσης σε γειτονικούς ιστούς, με εξαιρετικά δυσάρεστες επιπτώσεις για ολόκληρο τον οργανισμό και ως εκ τούτου η καταπολέμησή του να συνιστά σημαντική ερευνητική πρόκληση.

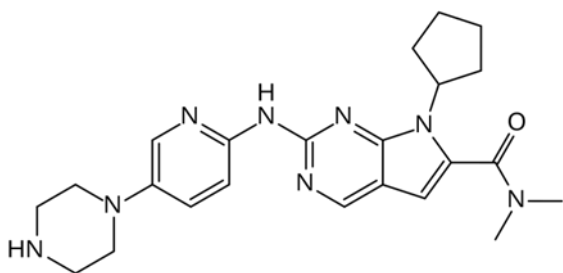
(16)



Σχήμα 3: Το ποσοστό θανάτων από καρκίνο του μαστού ως ποσοστό των συνολικών θανάτων από Καρκίνο. (Canadian Cancer Society).

Ως μόριο οδηγός στην εν λόγω διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το Ribociclib. Το Ribociclib (LEE011) είναι ένας δια του στόματος βιοδιαθέσιμος, εκλεκτικός αναστολέας μικρού μοριακού βάρους, που στοχεύει εκλεκτικά στις κινάσες CDK4/6, εμποδίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου προκαλώντας τη διακοπή φάσης G1. Αναπτύχθηκε από την Novartis και την Astex Pharmaceuticals και εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) τον Μάρτιο του 2017 για τη θεραπεία HR-θετικών, HER2-αρνητικών προχωρημένων ή μεταστατικών καρκίνων του μαστού, σε συνδυασμό με έναν αναστολέα αρωματάσης. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης χωρίς εξέλιξη του όγκου ήταν 23,8 μήνες με το Ribociclib σε σύγκριση με 13,0 μήνες με το εικονικό φάρμακο, το δε ποσοστό ανταπόκρισης ήταν σημαντικά υψηλότερο 51% έναντι 36%. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι το Ribociclib εμφανίζει μεγαλύτερη ανασταλτική δράση και εκλεκτικότητα έναντι των πρωτεϊνών CDK 4/6 και καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε σχέση με τους υπόλοιπους αναστολείς CDK 4/6, το Pablociclib και το Amemaciclib. Ανάλογα του Ribociclib, το Trilaciclib και το Ierociclib βρίσκονται αυτήν τη στιγμή υπό κλινικές μελέτες για την

θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και την θεραπεία του καρκίνου του μαστού.^{(17) (18)}



Σχήμα 4: Το μόριο του *Ribociclib*

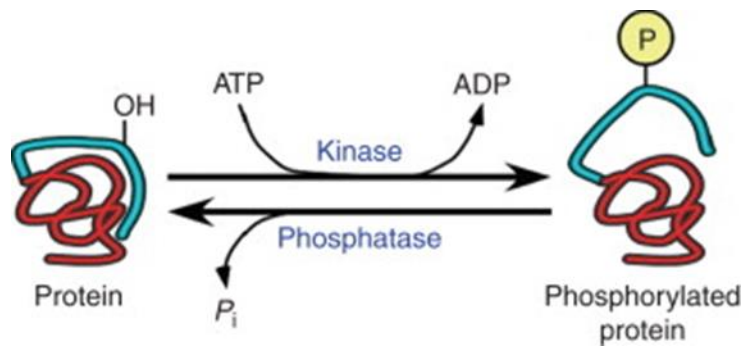
2. Θεωρητικό μέρος

2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ορίζονται ως ένζυμα που μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από μία ένωση-δότη φωσφορικού άλατος σε ένα αμινοξύ δέκτη της πρωτεΐνης στόχου. Ετυμολογικά, όρος κινάση αποδόθηκε σε αυτήν την κατηγορία ενζύμων διότι κινούν - μετακινούν, μια φωσφορική ομάδα σε συγκεκριμένο αμινοξύ μιας άλλης πρωτεΐνης. Συνήθως η φωσφορική ομάδα του ATP, ή άλλο μόριο τριφωσφορικού νουκλεοσιδίου, χρησιμοποιείται ως δότης. Η φωσφορυλίωση καταλήγει σε μια λειτουργική αλλαγή της πρωτεΐνης-στόχου (υπόστρωμα) μεταβάλλοντας τη δραστηριότητα του ενζύμου, την κυτταρική θέση ή τη συσχέτισή της με άλλες πρωτεΐνες.

Η φωσφορυλίωση φυτικής πρωτεΐνης εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε φύλλα κινεζικών λάχανων, μετά την επεξεργασία τους με την φυτική ορμόνη κυτοκίνη. Αργότερα, μελέτες έδειξαν ότι τα ριβοσώματα φυτών φωσφορυλιώνονται σε υπολείμματα σερίνης. Την ίδια χρονιά, καθарίστηκε και απομονώθηκε η πρώτη φυτική κινάση πρωτεΐνης από μπιζέλι. Ωστόσο, μόνο στα τέλη της δεκαετίας του 1980 και στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ήταν διαθέσιμες οι πρώτες λίγες ακολουθίες φυτικών πρωτεϊνικών κινάσεων. Η τρίτη φυτική πρωτεϊνική κινάση που απομονώθηκε, η ZmPK1, βρέθηκε ότι περιέχει μια N-τερματική διαμεμβρανική περιοχή στην καταλυτική περιοχή κινάσης και μια μεγάλη υποθετική εξωκυτταρική περιοχή. Ένα άλλο σημαντικό πρώιμο εύρημα ήταν ο προσδιορισμός της αλληλουχίας, μέσω της αποικοδόμησης Edman, που έδωσε την δυνατότητα στους ερευνητές να αποκωδικοποιήσουν δομικά τις πρωτεϊνικές κινάσες και να προσδιορίσουν την δράση τους. ^{(19) (20) (21)}

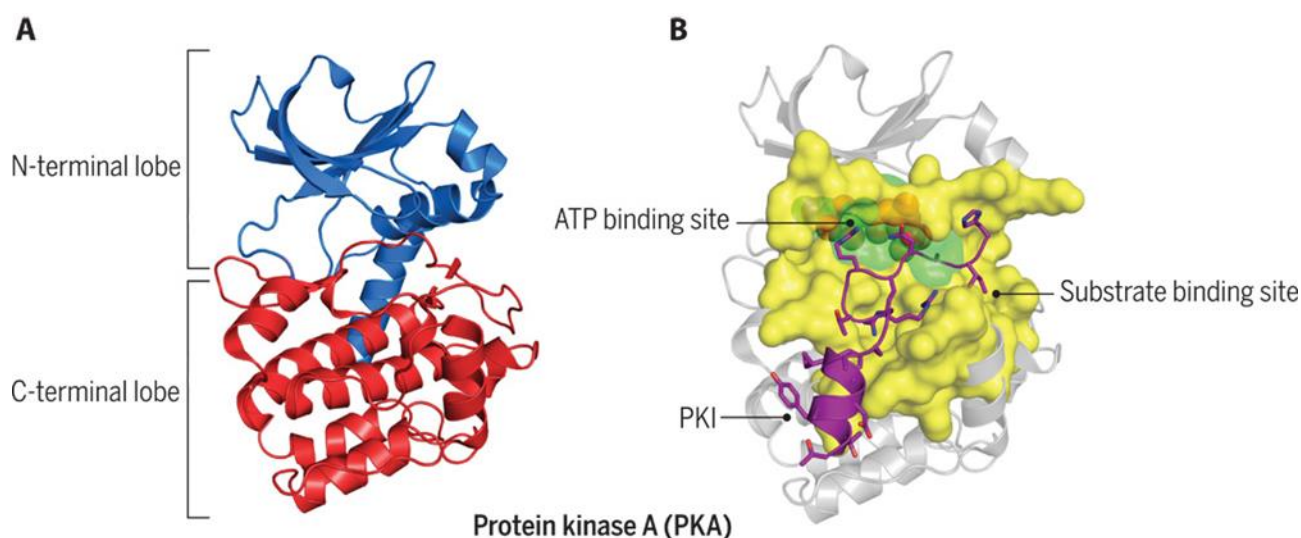
Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι πρωτεϊνικής κινάσης. Η μεγάλη πλειοψηφία είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις υδροξυλικές ομάδες σερίνων και θρεονινών στους στόχους τους και η άλλη κατηγορία είναι κινάσες τυροσίνης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες βρίσκονται επίσης σε βακτήρια και φυτά. Έως και 30% όλων των ανθρώπινων πρωτεϊνών μπορεί να τροποποιηθούν από τη δραστηριότητα κινάσης καθώς ρυθμίζουν την πλειοψηφία των κυτταρικών οδών, ειδικά εκείνων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος. ⁽²²⁾



Σχήμα 5: Η δράση των πρωτεϊνικών κινασών: μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας από το μορίου του ATP, μέσω της φωσφορυλίωσης, στην πρωτεΐνη στόχο.

2.1.1 Δομή πρωτεϊνικών κινασών.

Όπως προαναφέρθηκε, οι ευκαρυωτικές κινάσες πρωτεΐνης ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: σε κινάσες α) Θρεονίνης/Σερίνης και β) Τυροσίνης, ανάλογα με τα κατάλοιπα αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν σε πρωτεΐνες στόχους. Ωστόσο, και οι δύο ομάδες έχουν παρόμοιες τρισδιάστατες δομές, που περιλαμβάνουν δύο λοβούς, με το ενεργό κέντρο να εντοπίζεται μεταξύ των λοβών. Τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από δύο λοβούς και 11 διακριτές περιοχές. Οι 11 αυτές περιοχές περιέχουν μοτίβα αμινοξικής αλληλουχίας τα οποία είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα στο σύνολο των κινασών. Ο μικρότερος, N-τερματικός (N-) λοβός περιέχει κυρίως δομή β-πτυχωτού φύλλου και μία α-έλικα που ονομάζεται C-τελικός λοβός. Ο μεγαλύτερος C-τελικός λοβός (C-) περιλαμβάνει τις ιδιαίτερα διατηρημένες E και F έλικες. Σημαντικά δομικά μοτίβα αποτελούν ο βρόχος σύνδεσης φωσφορικών (P-), ο οποίος περιέχει ένα μοτίβο πλούσιο σε γλυκίνη και εμπλέκεται στη δέσμευση ATP και ο βρόχος ενεργοποίησης (A-), που συχνά περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης και παρέχει μια θέση για τη δέσμευση πεπτιδικού υποστρώματος. Το ενεργό κέντρο εντοπίζεται στην σχισμή που σχηματίζεται μεταξύ των δύο λοβών, δηλαδή γύρω από την hinge περιοχή.⁽²³⁾



Σχήμα 6: Η δομή της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). A) Με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται ο C-τερματικός λοβός, ενώ με μπλε το N-τερματικός λοβός. B) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται η περιοχή δέσμευσης και με πράσινο η περιοχή δέσμευσης του ATP.

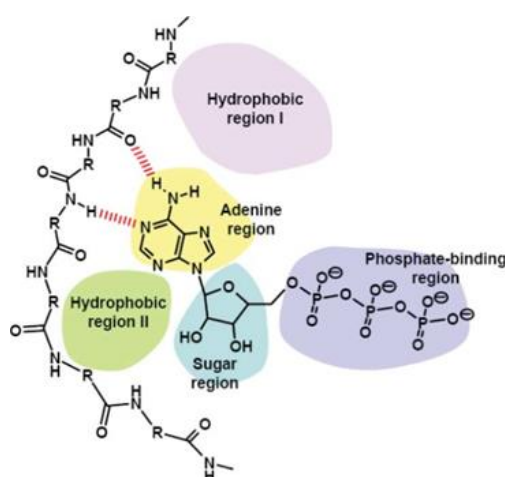
Όλες οι κινάσες υιοθετούν επίσης εντυπωσιακά παρόμοιες δομές όταν βρίσκονται στην ενεργή μορφή. Η ενεργός δομή εξασφαλίζει ότι τα υποστρώματα και ο καταλυτικός μηχανισμός κινάσης προσανατολίζονται κατάλληλα. Αντίθετα, οι ανενεργές δομές διαφορετικών κινάσων δείχνουν αξιοσημείωτη ποικιλία. Οι μηχανισμοί ρύθμισης πραγματοποιούνται από αλλοστερικό έως ενδοστερικό τρόπο και χρησιμοποιούνται για τη διαμόρφωση των διαμορφώσεων του βρόχου A και του βρόχου P, τη θέση της έλικας C, την πρόσβαση σε θέσεις δέσμευσης ATP και υποστρώματος, και ο σχετικός προσανατολισμός των δύο λοβών. Η ρύθμιση πραγματοποιείται από εσωτερικές περιοχές των καταλυτικών περιοχών κινάσης, από τμήματα που πλαισιώνουν τον καταλυτικό τομέα και/ή πρόσθετες υπομονάδες ή πρωτεΐνες. Αυτές οι περιοχές ή πρωτεΐνες μπορούν ρυθμίζονται με την σειρά από δεύτερους αγγελιοφόρους, η έκφρασή τους μπορεί να ελεγχθεί από τη λειτουργική κατάσταση του κυττάρου, μπορούν να στοχεύσουν την κινάση σε διαφορετικά υποστρώματα ή υποκυτταρικές θέσεις ή να αναστείλουν τη δραστηριότητα της κινάσης. Αυτές οι πιθανές ρυθμιστικές τοποθεσίες αλληλοεπηρεάζονται, με αποτέλεσμα ένα ευρύ φάσμα πιθανών ρυθμιστικών οδών.

2.1.2 Το ενεργό κέντρο

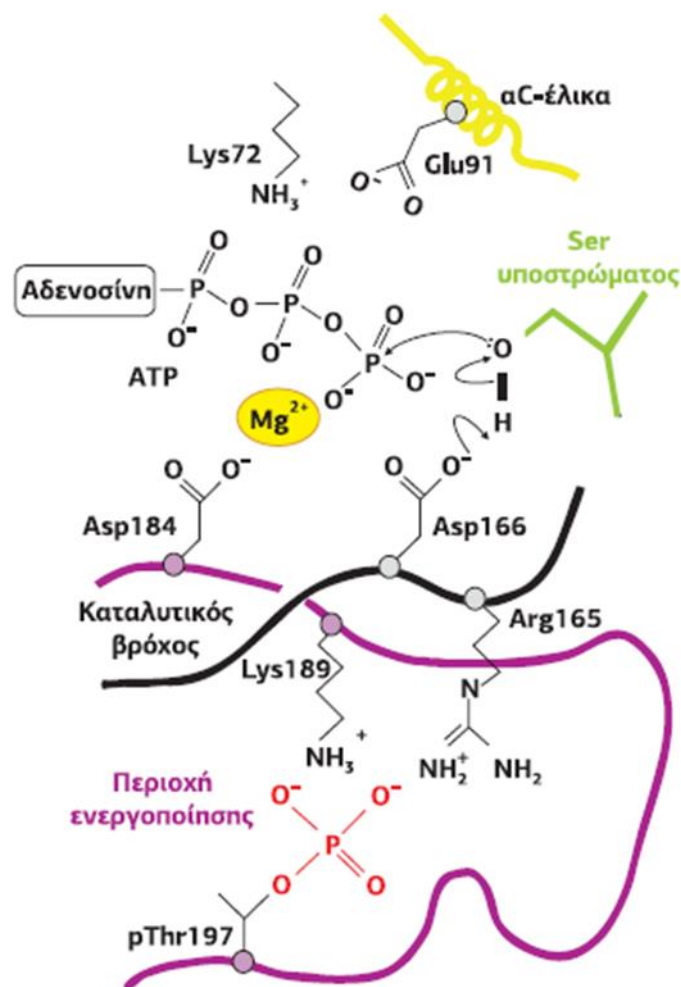
Η τριτοταγής δομή και η συνολική αναδίπλωση της καταλυτικής περιοχής κινάσης διατηρείται σε μεγάλο βαθμό σε όλη την οικογένεια κινάσης και περιέχει περίπου 300 αμινοξέα. Η πρώτη κρυσταλλική δομή του PKA σε σύμπλοκο με ATP και ψευδοϋπόστρωμα το 1991 άνοιξε το δρόμο για την καλύτερη κατανόηση του καταλυτικού μηχανισμού, της σύνδεσης συμπαράγοντων και της ρύθμισης της κινάσης.

Το μόριο του ATP εισέρχεται στην σχισμή με την γ-φωσφορική ομάδα προσανατολισμένη προς τα έξω. Η αδενίνη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου στη hinge περιοχή. Η ριβόζη και τριφωσφορική ομάδα του ATP συνδέονται στο υδρόφιλο κανάλι που επεκτείνεται μέχρι τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος. Ο καταλυτικός βρόχος βρίσκεται στη βάση του ενεργού κέντρου και περιέχει ένα καλά συντηρημένο Asp (D166), το οποίο θεωρείται ως το καταλυτικό αμινοξύ. Στην C-έλικα, στον NH₂-τελικό λοβό, στην ενεργή διαμόρφωση των πρωτεϊνικών κινάσων, το κατάλοιπο E91 δημιουργεί μια γέφυρα άλατος (salt bridge) για τον ευνοϊκότερο προσανατολισμό των φωσφορικών ομάδων του ATP. Ρυθμιστικοί μηχανισμοί συχνά μεταβάλλουν τη δραστηριότητα της κινάσης τροποποιώντας τη διαμόρφωση της C-έλικας.

Το αμινοξύ “gatekeeper” : Το αμινοξύ αυτό ονομάζεται έτσι γιατί το μέγεθος της αλυσίδας του καθορίζει την πρόσβαση στην υδρόφοβη «κοιλότητα» 2 που βρίσκεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του ATP.



Σχήμα 7: Απεικόνιση του ενεργού κέντρου πρωτεϊνικών κινάσων. Παρατηρούμε την υδροφοβική περιοχή I, την περιοχή δέσμευσης της Αδενίνης με κίτρινο χρώμα, την υδροφοβική περιοχή II με πράσινο χρώμα, και την περιοχή δέσμευσης των φωσφορικών αλάτων.



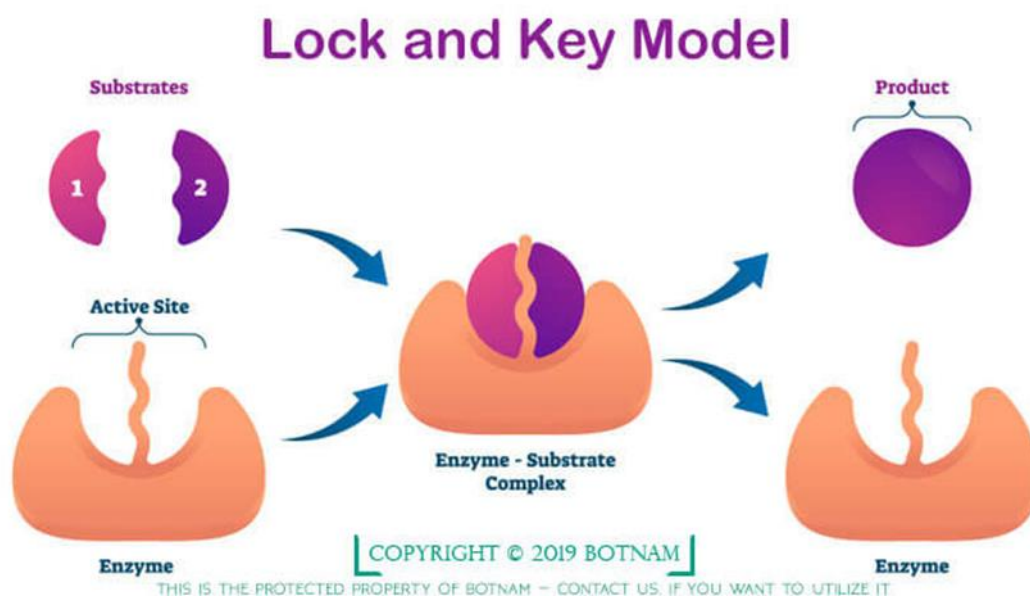
Σχήμα 8: Η κατάλυση της φωσφορυλίωσης στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης.

2.1.3 Εκλεκτικότητα των πρωτεϊνικών κινάσεων

Οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης τόσο στην αντίδραση που καταλύουν, όσο και στην επιλογή των υποστρωμάτων. Η εξειδίκευση αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση του υποστρώματος και του ενζύμου. Η ακρίβεια είναι αποτέλεσμα της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής της ενζυμικής πρωτεΐνης. ⁽²⁴⁾

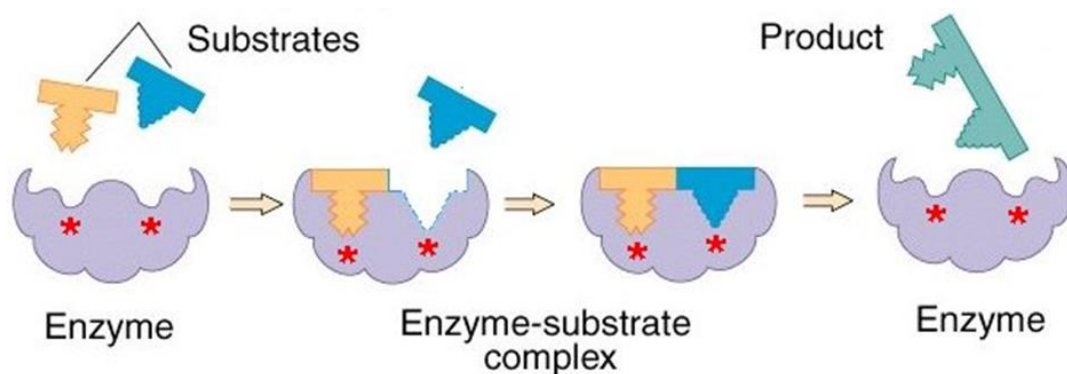
Η εξειδίκευση της πρόσδεσης εξαρτάται από την επακριβώς καθορισμένη τοποθέτηση των αμινοξέων στο ενεργό κέντρο. Επειδή το ένζυμο και το υπόστρωμα αλληλεπιδρούν με δυνάμεις μικρής εμβέλειας, οι οποίες απαιτούν κοντινή επαφή, το υπόστρωμα πρέπει να έχει το κατάλληλο σχήμα για να μπορέσει να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο. Συνεπώς, υπάρχει διάκριση μεταξύ όμοιων υποστρωμάτων. Με αυτό τον μηχανισμό οι κινάσες εμφανίζουν χημειοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα και στεροεκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα.

Για να εξηγήσει την εκλεκτικότητα των ενζύμων, το 1894 ο Emil Fischer πρότεινε ότι τόσο το ένζυμο όσο και το υπόστρωμα διαθέτουν συγκεκριμένα συμπληρωματικά σχήματα που ταιριάζουν επακριβώς μεταξύ τους. Αυτό το μοντέλο ονομάστηκε "κλειδαριά και κλειδί", διότι η πρόσδεση του υποστρώματος με το ένζυμο προσομοιάζει με τον μηχανισμό λειτουργίας του κλειδιού και της κλειδαριάς. Αυτό το πρώιμο μοντέλο, αποδείχτηκε ανεπαρκές με βάση τα σύγχρονα δεδομένα, διότι δεν εξηγεί τη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης που επιτυγχάνουν τα ένζυμα. ⁽²⁵⁾



Σχήμα 8: Το μοντέλο κλειδαριά και κλειδί που προτάθηκε από τον Fischer για να περιγράψει την ενζυμική δράση.

Για την καλύτερη ερμηνεία της εκλεκτικότητας των ενζύμων, προτάθηκε το 1958 από τον Daniel Koshland το μοντέλο «επαγόμενης προσαρμογής»: δεδομένου ότι τα ένζυμα έχουν εύκαμπτες τριτοταγής δομές, το ενεργό κέντρο τροποποιείται συνεχώς αλληλεπιδρώντας με το υπόστρωμα και αντιστοίχως το υπόστρωμα αναδιαμορφώνεται αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη. Η σύνδεση δηλαδή, δεν είναι μία στατική διαδικασία. Οι πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων του ενεργού κέντρου προσανατολίζονται στις ακριβείς θέσεις που επιτρέπουν στο ένζυμο να εκτελέσει την καταλυτική του λειτουργία. Το ενεργό κέντρο συνεχίζει να αλλάζει μέχρι να δεσμευτεί πλήρως το υπόστρωμα, και καθορίζεται το τελικό σχήμα και η κατανομή φορτίου. ^{(26), (27), (28)}

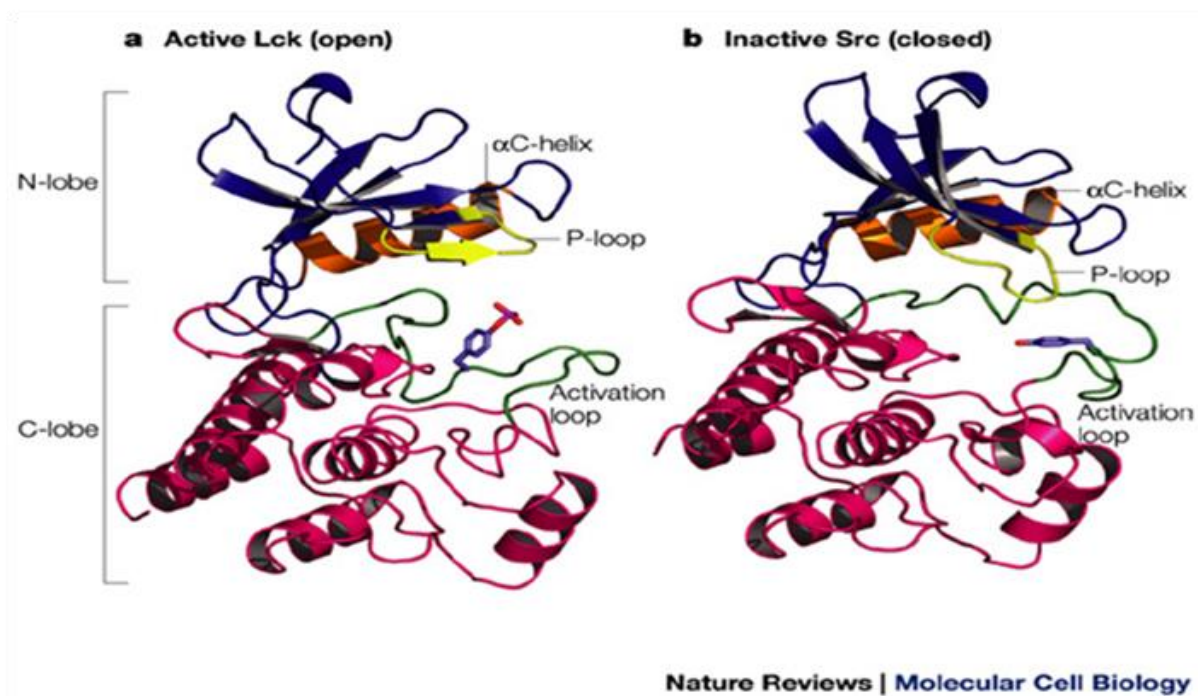


Σχήμα 9: Το μοντέλο επαγόμενης προσαρμογής. Το ενεργό κέντρο τροποποιείται διαμορφωτικά και προσανατολίζεται κατάλληλά ώστε να πραγματοποιήσει την καταλυτική του δράση.

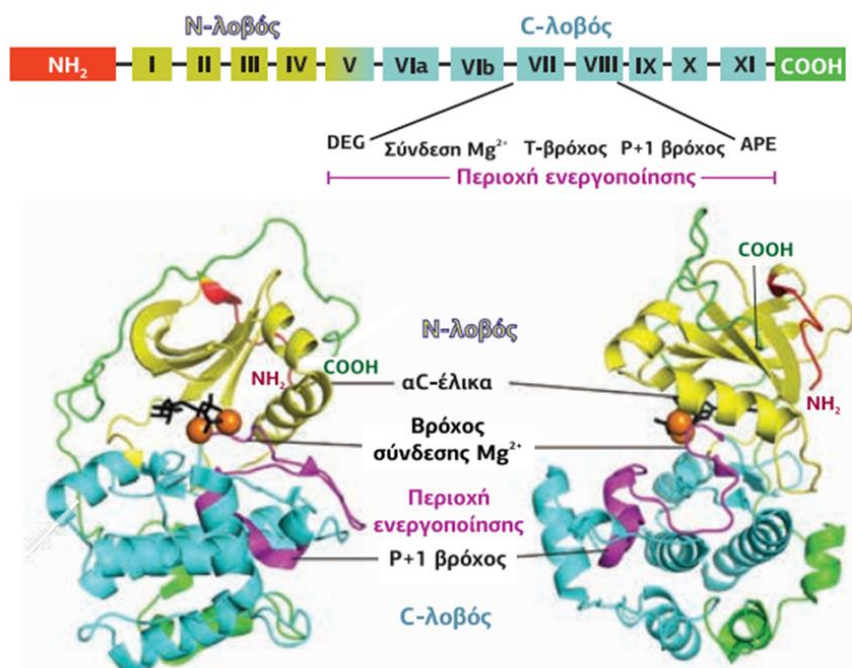
2.1.4 Ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση.

Όλες οι κινάσες έχουν μια συντηρημένη θηλιά ενεργοποίησης που χαρακτηρίζεται από τα δομικά μοτίβα DGF και APE στην αρχή και το τέλος της θηλιάς. Η πρωτοταγής δομή των περιοχών ενεργοποίησης καθορίζεται ως η περιοχή ανάμεσα σε δύο συντηρημένα τριπεπτίδια (DEG και APE) μέσα στον μεγάλο λοβό. Δευτερογενή δομικά στοιχεία στην περιοχή ενεργοποίησης είναι ο βρόχος, όπου συνδέεται το Mg^{2+} , ο βρόχος ενεργοποίησης (ονομάζεται T-βρόχος στις κυκλικό-εξαρτώμενες κινάσες, CDKs) και ο P+1 βρόχος, που συμμετέχει στη σύνδεση του υποστρώματος.

Ο βρόχος ενεργοποίησης έχει μια «ενεργή» διαμόρφωση που είναι καταλυτικά ενεργή και συνήθως φωσφορυλιωμένη και μια «αδρανή» διαμόρφωση που παρεμποδίζει τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος. Ο βρόχος ενεργοποίησης εμφανίζει μεγάλη δομική ποικιλομορφία και πλαστικότητα διαμόρφωσης και είναι ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία ρύθμισης της δραστηριότητας των κινάσων. Σε πολλές κινάσες αποτελεί θέση φωσφορυλίωσης ή αλληλεπίδρασης με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Κατάλοιπα Ser, Thr και Tyr του βρόχου μπορεί να φωσφορυλιωθούν ως απόκριση σε σήματα ενεργοποίησης, προωθώντας την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης. Σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, ο βρόχος ενεργοποίησης συνδέεται και φράζει το ενεργό κέντρο εμποδίζοντας τη σύνδεση του ATP, αλλά και του υποστρώματος. Η φωσφορυλίωση απομακρύνει τον βρόχο ενεργοποίησης από το ενεργό κέντρο οδηγώντας στην ανοιχτή - ενεργή διαμόρφωση. Σε ορισμένες πρωτεϊνικές κινάσες, όπως στις MAPKs, η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης διευκολύνει τον αυτοδιμερισμό της κινάσης που απαιτείται για την τοποθέτηση του ενζύμου στον πυρήνα. ^{(29) (30)}



Σχήμα 10: Αριστερά απεικονίζεται η ενεργή διαμόρφωση, ενώ δεξιά η ανενεργή διαμόρφωση της πρωτεϊνικής κινάσης. Στην ανενεργή διαμόρφωση ο βρόχος ενεργοποίησης (απεικονίζεται με πράσινο χρώμα), αλλά και P-βρόχος, φράζουν την είσοδο του ενεργού κέντρου εμποδίζοντας την είσοδο του ATP. Αντίστοιχα, στην ενεργή διαμόρφωση τα δύο αυτά δομικά στοιχεία απομακρύνονται από την είσοδο του ενεργού κέντρου.



Σχήμα 11: Τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνικών κινάσεων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση του ενζύμου.

2.1.5 Ο ρόλος τους στις κυτταρικές διαδικασίες

Τα κύτταρα μπορούν να αντιδράσουν στις περιβαλλοντικές αλλαγές με μεταγωγή εξωκυτταρικών σημάτων, για να παράγουν ενδοκυτταρικές αποκρίσεις. Τα μόρια-σήματα αναγνωρίζονται από υποδοχείς, οι οποίοι εντοπίζονται στη μεμβράνη πλάσματος του κυττάρου. Η δέσμευση ενός υποκαταστάτη μπορεί να οδηγήσει σε διέγερση μιας εσωτερικής ενζυματικής δραστηριότητας του υποδοχέα ή στη διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης μεταγωγής. Η ενεργοποίηση μίας ή περισσότερων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών μπορεί τελικά να οδηγήσει στην ενεργοποίηση ή αναστολή μιας «πρωτεΐνης τελεστού». Σε πολλές περιπτώσεις, αυτό οδηγεί επίσης σε τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση. Η φωσφορυλίωση από πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένας από τους πιο συνηθισμένους και σημαντικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς στη μεταγωγή της κυτταρικής σηματοδότησης. ⁽³¹⁾

Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης λειτουργεί ως ρυθμιστής στην επαγωγή ή μη, διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών. Η δημιουργία του φωσφορικού εστέρα οδηγεί στην αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεϊνικής κινάσης και συνεπώς, επηρεάζει και την δραστηριότητα της. Ο φωσφορικός εστέρας είναι αρκετά σταθερός με αποτέλεσμα να απαιτείται η καταλυτική δράση των φωσφατασών για την αποκοπή του. Επομένως, μέσω της ρύθμισης των κινασών και των φωσφατασών, την φωσφορυλίωση και την αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών, επάγονται σήματα, για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και έτσι καθορίζονται σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου.

Ανάλογα με τις πρωτεΐνες στόχους, της φωσφορυλιωτικής διαδικασίας, επηρεάζονται-ρυθμίζονται και διαφορετικές λειτουργίες:

- Ένζυμα ως στοιχεία σηματοδοτικών αλυσίδων και ένζυμα του ενδιάμεσου μεταβολισμού.
- Πρωτεΐνες προσαρμογής.
- Μεταγραφικοί παράγοντες.
- Κανάλια ιόντων.
- Διαμεμβρανικοί υποδοχείς.
- Ριβοσωμικές πρωτεΐνες (ριβοσωμική πρωτεΐνη S6).
- Δομικές πρωτεΐνες.
- Μεταφορικές πρωτεΐνες. ⁽³²⁾

2.1.6 Ρύθμιση πρωτεϊνικών κινασών

Για να λειτουργούν ως διακόπτες ελέγχου σε όλες αυτές τις διαδικασίες, οι κινάσες πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά. Η απορύθμιση οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου και διάφορων άλλων σημαντικών παθογενειών. Η ρύθμιση είναι αναπόσπαστο μέρος της πρωτεϊνικής κινάσης και ελέγχει το χρόνο της καταλυτικής δραστηριότητας και εκλεκτικότητα του υποστρώματος.⁽³³⁾

Η πρωτεϊνική κινάση μπορεί να ρυθμιστεί με διάφορους τρόπους: μεταγραφικό έλεγχο μέσω υποκυτταρικού εντοπισμού και υποστρωμάτων (με τη χρήση αγκυρώσεων, προσαρμογέων και πρωτεϊνών ή δένδρομερή, έως δομικές και χημικές τροποποιήσεις των ίδιων των πρωτεϊνών.) κ.ά.⁽³⁴⁾ Οι κύριοι τρόποι ρύθμισης των πρωτεϊνικών κινασών είναι οι εξής:

A) Φωσφορυλίωση βρόχου ενεργοποίησης:

Ένας από τους πιο καλά χαρακτηρισμένους μηχανισμούς με τους οποίους ενεργοποιούνται οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι η φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης (που ονομάζεται επίσης βρόχος T), του εύκαμπτου πολυπεπτιδικού τμήματος που συνδέει τους λοβούς N και C της κινάσης. Η διαμόρφωση του βρόχου ενεργοποίησης αλλάζει με την κατάσταση φωσφορυλίωσης του (όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.3. Η διαμορφωτική μετατόπιση ελέγχει την κατάσταση δραστηριότητας της κινάσης, είτε απαλείφοντας το στερικό εμπόδιο των υποστρωμάτων στη δραστική θέση, είτε ευθυγραμμίζοντας τα καταλυτικά κατάλοιπα, είτε και με τους δύο τρόπους.⁽³⁵⁾

B) Φωσφορυλίωση έξω από το βρόχο ενεργοποίησης:

Πολλές κινάσες ρυθμίζονται με φωσφορυλίωση σε θέσεις έξω από τους βρόχους ενεργοποίησης. Σε αντίθεση με τη φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης, η οποία οδηγεί σχεδόν πάντα σε ενεργοποίηση, η φωσφορυλίωση έξω από τον βρόχο ενεργοποίησης μπορεί είτε να διεγείρει είτε να αναστείλει μια κινάση.

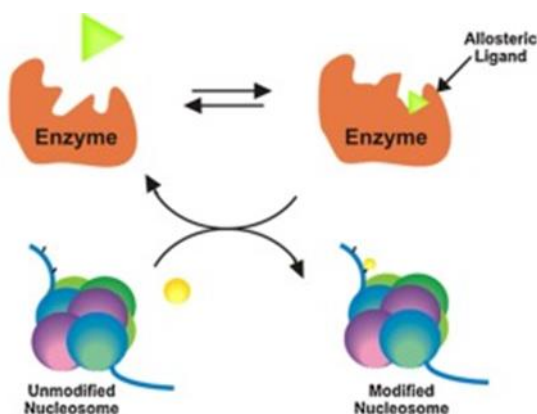
Γ) Αποφωσφορυλίωση:

Η αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνικών κινασών μέσω φωσφατασών έχει ρυθμιστικές συνέπειες και μπορεί είτε να ενεργοποιεί είτε να απενεργοποιεί την πρωτεΐνη στόχο. Η CDK Cdc28 είναι ένα εξαιρετικό παράδειγμα και των δύο μορφών ρύθμισης (αποφωσφορυλίωση,

φωσφορυλίωση). Η ενεργοποίηση του Cdc28 απαιτεί τόσο τη φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης του από το Cak1 όσο και την αποφωσφορυλίωση της θέσης Tyr19 στο N άκρο της από τη φωσφατάση διπλής ειδικότητας Mih1. ⁽³⁶⁾

Η αλλοστερική ρύθμιση :

Είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μηχανισμός ελέγχου της πρωτεϊνικής λειτουργίας. Τα ρυθμιστικά μόρια συνδέονται με τοποθεσίες της πρωτεΐνης που εντοπίζονται σε διαφορετική θέση από ενεργό κέντρο, προκαλώντας συνήθως αλλαγές στη διαμόρφωση και κατ' επέκταση στη δραστηριότητα της κινάσης. Η αλλοστερική ρύθμιση μπορεί να επιτευχθεί μέσω πλευρικών αλληλουχιών ή ξεχωριστών υπομονάδων/ πρωτεϊνών. Μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενός μεγάλου αριθμού μηχανισμών, αλλά συνηθέστερα επηρεάζουν τη διαμόρφωση του βρόχου A.



Σχήμα 12: Ο μηχανισμός αλλοστερικής ρύθμισης. Το αλλοστερικό ρυθμιστικό μόριο προσδένεται σε μία περιοχή διαφορετική από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και προκαλεί αλλαγές-τροποποιήσεις στη δομή του επηρεάζοντας της δραστηριότητα του.

Σύνδεση πρωτεΐνης:

Η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης είναι ένα άλλο σημαντικό ρυθμιστικό μοτίβο που ελέγχει τις δραστηριότητες των πρωτεϊνικών κινασών. Τα μέλη κάθε κύριας ομάδας πρωτεϊνικών κινασών ρυθμίζονται με την αλληλεπίδραση τους με άλλες πρωτεϊνικές περιοχές, είτε σε cis είτε trans διαμόρφωση. Η συσχέτιση με εταίρους δέσμευσης πρωτεΐνης μπορεί να τροποποιήσει τις καταστάσεις ενεργοποίησης των κινασών με πολλαπλούς τρόπους. Δομικές μελέτες έχουν διευκρινίσει τον τρόπο με τον οποίο η σύνδεση με πρωτεΐνες υπαγορεύει τις δραστηριότητες πολλών κινασών. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι κυκλινο-εξαρτώμενες

πρωτεϊνικές κινάσες (CDK). Η ενεργοποίηση των CDK κινασών εξαρτάτε από την αλληλεπίδραση τους με μία πρωτεΐνη που ονομάζεται κυκλίνη. Χωρίς την κυκλίνη εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα κινάσης, ανεξάρτητα αν έχουν φωσφορυλιωθεί στο βρόγχο ενεργοποίησης.⁽³⁷⁾

2.1.7 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών.

Σήμερα έχει αποκωδικοποιηθεί η δόμη περισσότερων από 600 κινάσες. Οι πρωτεϊνικές κινάσες κατατάσσονται βάσει της ομολογίας τους σε 25 διαφορετικές οικογένειες. Η κατάταξη των κινασών γενικά είναι δύσκολη, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια πληθώρα μεθόδων κατηγοριοποίησης καθιστώντας την ταξινόμηση τους προβληματική. Ανεξάρτητα βέβαια από τις επιμέρους διαφορές των, αποτελούν μια συμπαγή ομάδα πρωτεϊνών με υψηλό βαθμό ομοιότητας, τόσο στις λειτουργικές τους ιδιότητες όσο και στα δομικά τους χαρακτηριστικά.⁽³⁸⁾

Σύμφωνα με την επικρατούσα μέθοδο κατηγοριοποίησης των πρωτεϊνικών κινασών, η διάκριση πραγματοποιείται με γνώμονα το είδος των αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν στις πρωτεΐνες στόχους. Η υπεροικογένεια ευκαρυωτικής πρωτεϊνικής κινάσης (ePK) χωρίζεται σε δύο κύριες κατηγορίες: α) τις κινάσες τυροσίνης και β) τις κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Οι δύο αυτές οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών εμπεριέχουν μικρότερες υποκατηγορίες ανάλογα με την δράση τους, την τρισδιάστατη δομή του ενεργού κέντρου, καθώς και τον μηχανισμό ρύθμισής τους από άλλα μόρια. Υπάρχουν πολλές άλλες πρωτεϊνικές κινάσες διπλής εξειδίκευσης, που φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα Ser/Thr και Tyr. Επίσης, είναι γνωστές κινάσες Ser/Thr που αποτελούν ενδογενές τμήμα διαμεμβρανικών υποδοχέων και καναλιών ιόντων, όπως ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGFβ-R. Ορισμένα μέλη των καναλιών ιόντων TRPM, π.χ. το TRPM7, έχουν δραστηριότητα πρωτεϊνικής κινάσης στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία τους. Ωστόσο, αυτή η περιοχή κινάσης δεν εμφανίζει ομοιότητα στην αλληλουχία αμινοξέων με τις κλασικές πρωτεϊνικές κινάσες, αν και η τρισδιάστατη διαμόρφωση είναι παρόμοια. Δύο πιο μικρές κατηγορίες, που συναντώνται κυρίως σε προκαρυωτικούς οργανισμούς είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες ιστιδίνης και ασπαρτικού/γλουταμινικού οξέος.

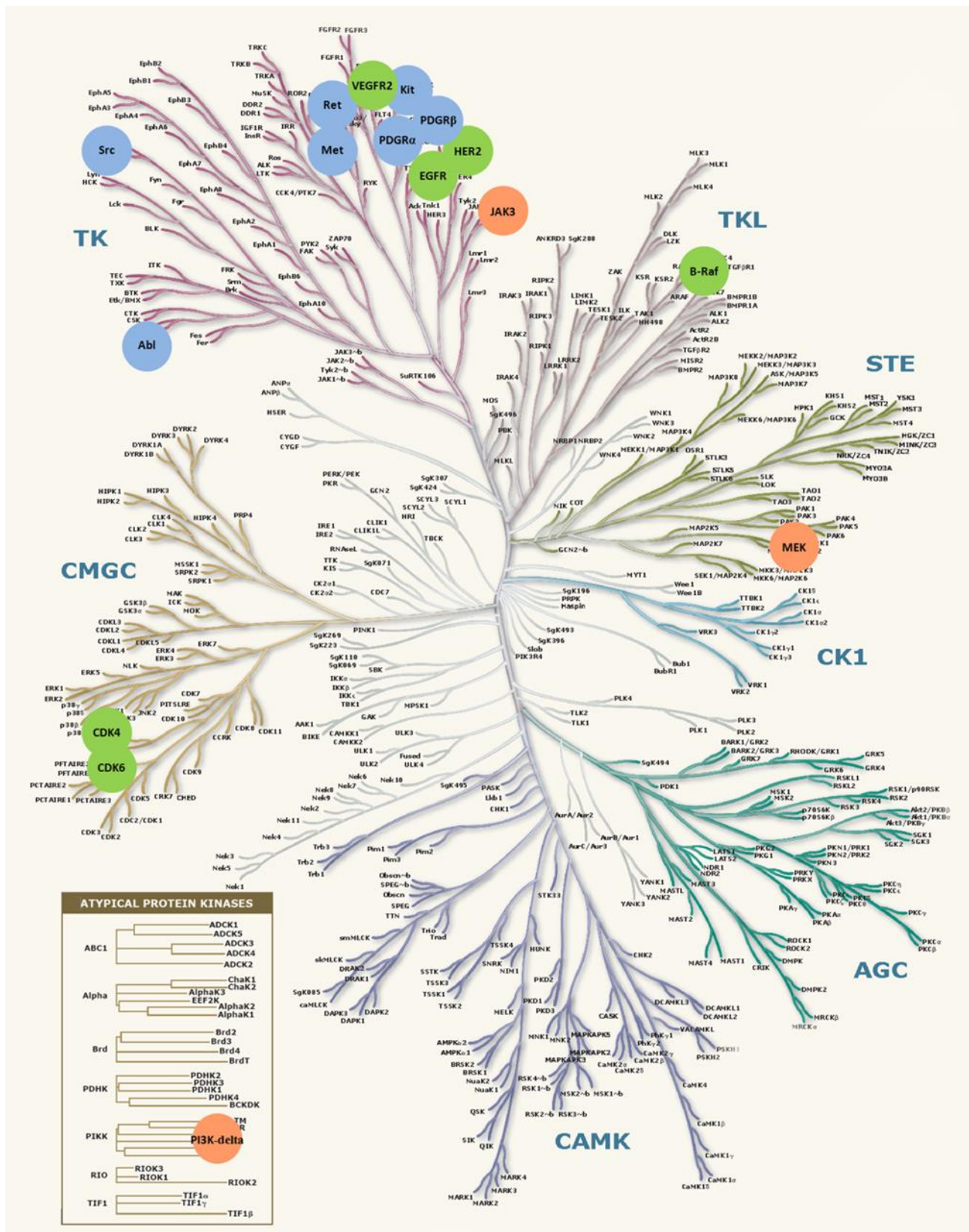
Η σύγκριση των περιοχών κινάσης τόσο εντός, όσο και μεταξύ των ειδών εμφανίζει σημαντική ποικιλία, η οποία περιπλέκεται περαιτέρω από τις μη καταλυτικές λειτουργικές περιοχές των κινασών που σχετίζονται με τη ρύθμιση, την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή τον υποκυτταρικό εντοπισμό των κινασών. Η ποικιλομορφία στις καταλυτικές και μη καταλυτικές

περιοχές εξηγεί σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργική διαφοροποίηση των κινασών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Με βάση, λοιπόν, την ομοιότητα των καταλυτικών περιοχών και τον τρόπο ρύθμισή τους, οι ευκαρυωτικές κινάσες ταξινομούνται τώρα γενικά σε επτά μεγάλες ομάδες:

- τις κυκλικές νουκλεοτιδικές και Ca^{2+} -/φωσφολιπιδικές εξαρτώμενες κινάσες,
- τις εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες,
- κινάσες ενεργοποιημένες με μιτογόνο,
- κινάσες συνθετάσης γλυκογόνου,
- οι εξαρτώμενες από καλμοδουλίνη κινάσες,
- η ομάδα κινάσης καζεΐνης 1 και
- η ομάδα STE που περιλαμβάνει τα ένζυμα που δρουν ανάντη των κινασών που ενεργοποιούνται με μιτογόνο.

Ειδικότερα, αυτού του είδους η ταξινόμηση, είναι κρίσιμης σημασίας για την κατανόηση της βιολογίας και παθολογίας για τη θεραπεία ασθενειών. ^{(39), (40)}

Αξίζει επίσης να αναφερθούμε σε μία προσπάθεια χαρακτηρισμού και ταξινόμησης του συνόλου των κινασών του ανθρώπινου οργανισμού, το οποίο έχει ονομαστεί κίνωμα. Η ταξινόμηση αυτή ξεκίνησε με την συγκριτική μελέτη και ταξινόμηση των ερευνητών Hanks και Hunter. Συμπληρώνεται και εξελίσσεται μέχρι και σήμερα από πληθώρα δεδομένων που προκύπτουν από βιολογικά πειράματα και μεθόδους βιοπληροφορικής. Ο σκοπός της αναζήτησης είναι να εντοπιστούν και να χαρακτηριστούν οι ακολουθίες του ανθρώπινου γονιδιώματος που κωδικοποιούν κινάσες καθώς και οι εξελικτικές συγγένειες και συσχετίσεις που προκύπτουν από την σύγκριση όλων των αμινοξικών ακολουθιών. Η ερευνητική αυτή προσπάθεια κατέληξε στην δημιουργία δένδροδιαγράμματος στο οποίο καταγράφηκε η φυλογενετική σχέση κάθε μέλους της οικογένειας των πρωτεϊνικών κινασών. Με βάση αυτόν τον διαχωρισμό, οι κινάσες ταξινομούνται σε εννέα μεγάλες ομάδες, οι οποίες στην συνέχεια διαιρούνται σε άλλες μικρότερες υποομάδες και κατηγορίες όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα. ⁽⁴¹⁾



Σχήμα 13: Το κίνομα των ανθρώπινων πρωτεϊνικών κινασών.

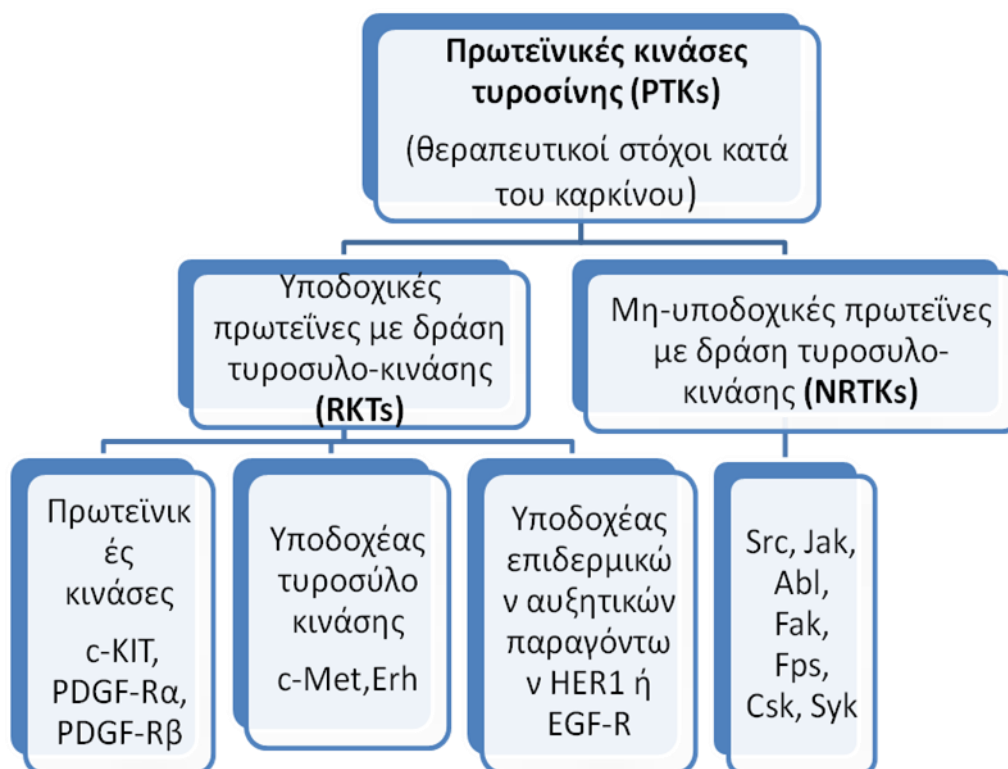
2.2 Κινάσες τυροσίνης

Οι κινάσες τυροσίνης είναι μια ομάδα περίπου 90 ενζύμων, ικανών να φωσφορυλιώνουν αμινοξέα τυροσίνης άλλων πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές και τυπικά στην ενεργοποίηση αυτής της πρωτεΐνης. Αντιπροσωπεύουν την μεγαλύτερη οικογένεια κινασών στο ανθρώπινο «κίνημα», με 518 μέλη. Χωρίζονται σε υποδοχικές κινάσες τυροσίνης που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια και δεσμεύουν εξωκυττάρια σήματα (αυξητικούς παράγοντες και συγγενείς υποκαταστάτες), καθώς και στις μη υποδοχικές κινάσες τυροσίνης που λειτουργούν ως ενδοκυτταρικοί μετατροπείς σήματος και την μεταφορά της εξωκυττάριας πληροφορίας μέσω των μονοπατιών σηματοδότησης. Η φωσφορυλίωση σε υπολείμματα τυροσίνης ελέγχει ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων σε πρωτεΐνες, όπως η δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης, ο υποκυτταρικός εντοπισμός και η αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων. Είναι ένας σημαντικός μηχανισμός απόκρισης σημάτων εντός ενός κυττάρου και έχει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της κυτταρικής δραστηριότητας. Οι κυτταρικές δραστηριότητες αφορούν στην κυτταρική διαίρεση, κυτταρική διαφοροποίηση, κυτταρική ανάπτυξη, κυτταρική μετανάστευση, στον κυτταρικό μεταβολισμό και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης στον πυρήνα περιλαμβάνει έλεγχο κυτταρικού κύκλου και ιδιότητες παραγόντων μεταγραφής. ^{(42), (43)}

Οι κινάσες τυροσίνης ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες:

1. τις υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση κινάσης τυροσίνης (RKTs)
2. και τις μη-υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (NRTKs)

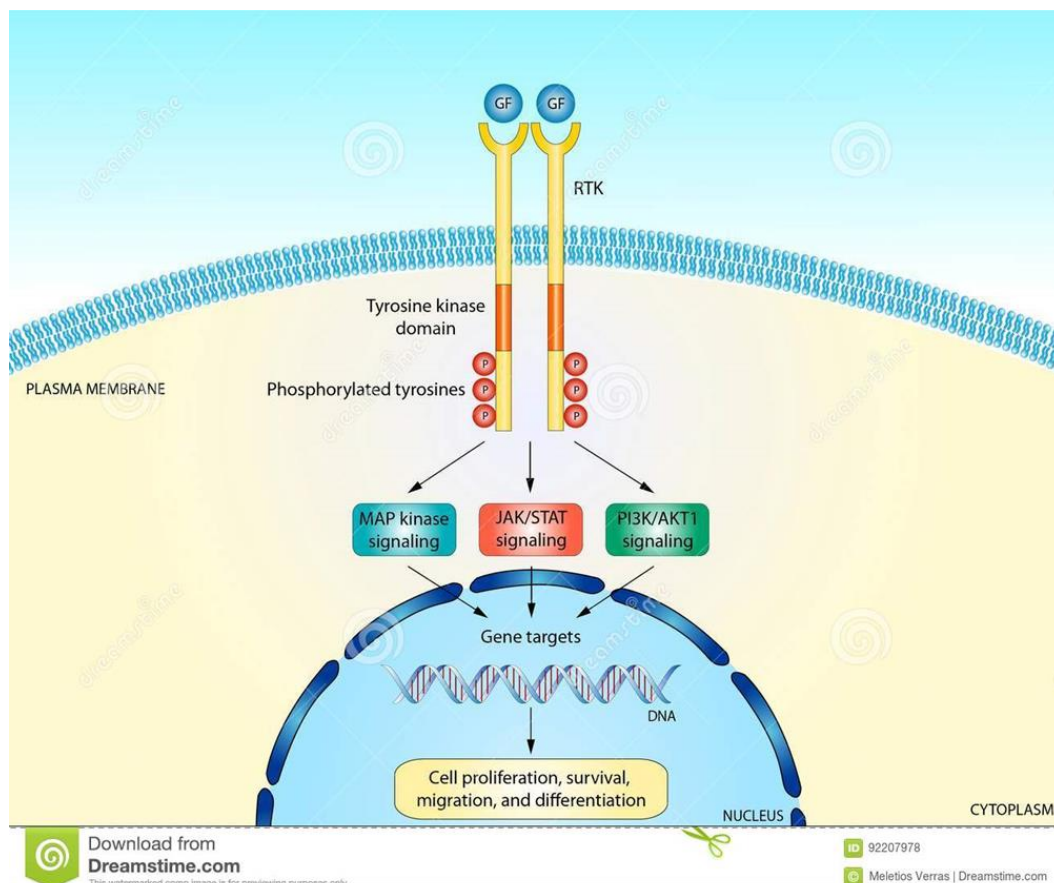
Οι ως άνω δύο κύριες ομάδες χωρίζονται στην συνέχεια σε μικρότερες υποομάδες.



Σχήμα 14: Η ταξινόμηση των κινάσων τυροσίνης.

2.2.1 Υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσίνης (RTKS)

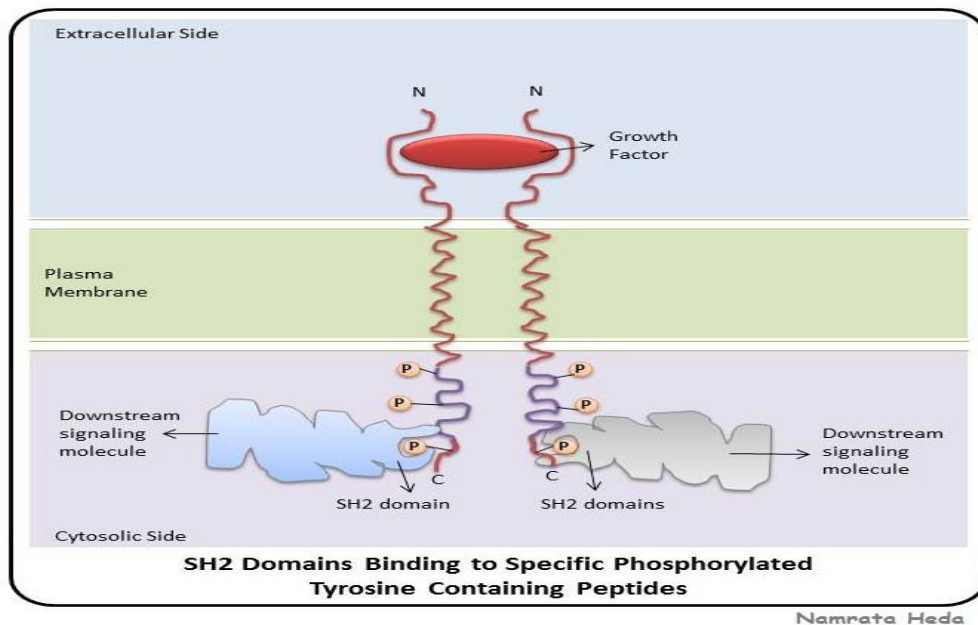
Οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs) είναι οι υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας υψηλής συγγένειας για πολλούς παράγοντες ανάπτυξης, όπως είναι τα πολυπεπτιδία, οι κυτοκίνες και οι ορμόνες. Από τα 90 μοναδικά γονίδια κινάσης τυροσίνης που εντοπίστηκαν στο ανθρώπινο γονιδίωμα, 58 κωδικοποιούν υποδοχικές κινάσες τυροσίνης. Οι RTKs αποτελούν κόμβους πολύπλοκων δικτύων σηματοδότησης που περιλαμβάνουν εκατοντάδες σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Αυτά τα δίκτυα σηματοδότησης έχουν ουσιαστικές λειτουργίες σχεδόν σε όλες τις πτυχές της ανάπτυξης, και διαφοροποίησης των ζωικών κυττάρων. Έχουν αποδειχθεί ότι δεν είναι μόνο βασικοί ρυθμιστές φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, αλλά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου. Μεταλλάξεις σε κινάσες τυροσίνης υποδοχέα οδηγούν σε ενεργοποίηση καταρρακτών σηματοδότησης, με πλήθος συνεπειών στην έκφραση πρωτεϊνών. Η απορύθμιση αυτών των δικτύων έχει εμπλακεί σε νεοπλασματικές και άλλες ασθένειες ^{(44), (45)}.



Σχήμα 15: Υποδοχική πρωτεϊνική κινάση (RTK). Αποτελούν δέκτες εξωκυττάρων σημάτων. Μέσω της φωσφορυλίωσης επάγουν σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν κυτταρικές διαδικασίες.

Κάθε μονομερές υποδοχικής κινάσης τυροσίνης αποτελείται από τέσσερις κύριες περιοχές:

α) Η εξωκυτταρική N-τελική περιοχή που παρουσιάζει μια ποικιλία συντηρημένων στοιχείων, συμπεριλαμβανομένων των τομέων που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνη (Ig) ή του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF), επαναλήψεις ινονεκτίνης τύπου III, ή περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη που είναι χαρακτηριστικές για κάθε υποοικογένεια RTK. Είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του μορίου-σηματοδότη και τη λήψη του εξωτερικού σήματος, π.χ. έναν συγκεκριμένο αυξητικό παράγοντα ή ορμόνη. (β) Μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή που αποτελείται από 25 έως 38 αμινοξέα και συνδέει τις εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές περιοχές. (γ) μία ενδοκυττάρια τερματική περιοχή που προκαλεί την βιολογική απόκριση και μεταδίδει το σήμα ενδοκυτταρικά. Εμφανίζει το υψηλότερο επίπεδο διατήρησης και περιλαμβάνει καταλυτικές περιοχές υπεύθυνες για τη δραστηριότητα κινάσης. Καταλύουν την αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων και τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης των υποστρωμάτων RTK. Η περιοχή αυτή αποτελείται από τερματική ουρά –COOH και πολλές θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης. Επιπλέον, (δ) περιλαμβάνει μια παραμεμβρανική περιοχή διαχωρίζει τον πυρήνα της κινάσης από την μεμβράνη. ^{(46), (47), (48)}



Σχήμα 16: Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης. Αποτελείται από 4 βασικά τμήματα, το εξωκυττάριο, το διαμεμβρανικό και το ενδοκυττάριο τμήμα και μια παραμεμβρανική περιοχή.

Η δέσμευση του μορίου-σηματοδότη προκαλεί διμερισμό των περισσότερων RTK. Η πρωτεϊνική κινάση κάθε μονομερούς, φωσφορυλιώνει στη συνέχεια ένα ξεχωριστό σύνολο υπολειμμάτων τυροσίνης στην κυτταροσολική περιοχή του διμερούς εταίρου της, μια διαδικασία που ονομάζεται αυτοφωσφορυλίωση. Η αυτοφωσφορυλίωση παραγματοποιείται σε δύο στάδια. 1. Αρχικά φωσφορυλιώνονται τα υπολείμματα τυροσίνης που εντοπίζονται στην καταλυτική θέση επάγοντας διαμορφωτικές αλλαγές στην δομή της πρωτεΐνης που διευκολύνουν τη σύνδεση του ATP σε υποδοχείς (π.χ., τον υποδοχέα ινσουλίνης) καθώς και τη σύνδεση των υποστρωμάτων πρωτεΐνης σε άλλους υποδοχείς (π.χ., υποδοχέα FGF). 2. Η υποδοχική κινάση φωσφορυλιώνει στη συνέχεια άλλες θέσεις στην κυτταροσολική περιοχή. Οι προκύπτουσες φωσφοτυροσίνες χρησιμεύουν ως θέσεις σύνδεσης για άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος με τη μεσολάβηση των RTKs. ⁽⁴⁹⁾

RTKs περιλαμβάνουν 20 υποοικογένειες οι οποίες κατατάσσονται σε 4 κατηγορίες: στην κατηγορία I που μεταξύ άλλων περιλαμβάνει τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, στην κατηγορία II που συμπεριλαμβάνει μεταξύ άλλων τον υποδοχέα ινσουλινοειδή αυξητικού παράγοντα (IGF1), στην κατηγορία III που συμπεριλαμβάνει μεταξύ άλλων τον PDGF υποδοχέα (PDGFR), γ-FMS, o-KIT, και FLT3R και στην κατηγορία IV, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών. ⁽⁵⁰⁾

2.2.2 Υποδοχέας επιδερμικών αυξητικών παραγόντων Her1 Ή EGF-R.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, ο υποδοχέας EGF-R είναι μια κινάση που ανήκει στην οικογένεια ERBb. Στην ERBb ανήκουν επίσης και άλλοι τρεις σημαντικοί υποδοχείς ο Her2 (Neu, ErbB2), ο Her3 (ErbB3), ο Her4 (ErbB4). Το γονίδιο EGFR είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των πόρων των μαστικών αδένων. Η οικογένεια των HER πρωτεϊνών υποδοχέων παίζει βασικό ρόλο στην ογκογένεση αλλά και σε άλλες ασθένειες.

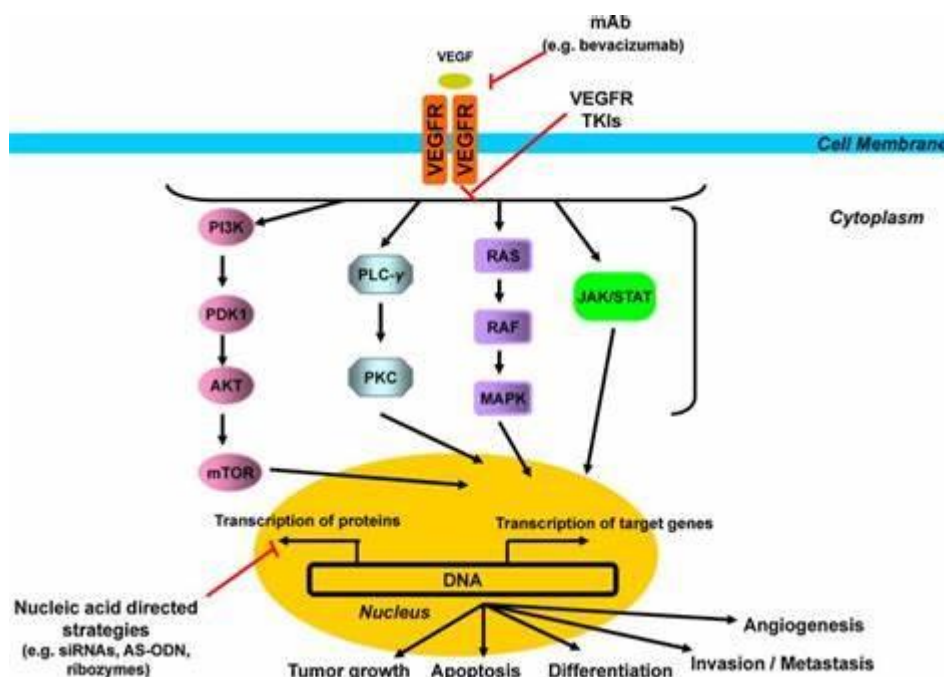
Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε υπερέκφραση ή υπερδραστηριότητα του EGFR έχουν συσχετιστεί με έναν μεγάλο αριθμό καρκίνων, όπως το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (80% των περιπτώσεων), τον καρκίνο του πρωκτού, το γλοιοβλάστωμα (50%) και επιθυλιακούς όγκους της κεφαλής και του τραχήλου (80-100%). Στο γλοιοβλάστωμα παρατηρείται συχνά μια περισσότερη ή λιγότερη συγκεκριμένη μετάλλαξη του EGFR, που ονομάζεται EGFRvIII. Τα ποντίκια που υφίστανται νοκ-άουτ ErbB-2 και ErbB-4 πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της κατάποσης και οδηγούνται σε ανεπαρκή καρδιακή λειτουργία που σχετίζεται με έλλειψη τραμπεκουλίας του μυοκαρδίου. Τα μεταλλαγμένα ποντίκια υποδοχέα ErbB-3, εμφανίζουν λιγότερο σοβαρά ελαττώματα στην καρδιά και έτσι μπορούν να επιβιώσουν περισσότερο καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Η έλλειψη ωρίμανσης κυττάρων Schwann οδηγεί σε εκφυλισμό κινητικών και αισθητηριακών νευρώνων. Η υπερβολική σηματοδότηση ErbB σχετίζεται με την ανάπτυξη μιας ευρείας ποικιλίας τύπων στερεών όγκων. Οι μεταλλάξεις του EGFR και της οικογένειας HER εμπλέκονται περίπου στο 30% όλων των επιθηλιακών καρκίνων και σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Αντίθετα η ανεπαρκής σηματοδότηση του EGFR σε ανθρώπους σχετίζεται με την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας και η νόσος του Alzheimer. Τα ErbB-1 και ErbB-2 εντοπίζονται σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους και η υπερβολική σηματοδότησή τους αποτελούν κρίσιμους παράγοντες στην ανάπτυξη και την κακοήθεια αυτών των όγκων. ^{(51), (52)}

2.2.3. Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF ή VEGF-A) είναι το πρωτότυπο και το καλύτερα περιγραφόμενο μέλος μιας οικογένειας τουλάχιστον έξι ενδοθηλιακών, κυρίως δεσμευτικών για την ηπαρίνη, αγγειογόνων παραγόντων. Τα μέλη της οικογένειας VEGF είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική ανάπτυξη και διατήρηση του αγγειακού και λεμφικού

συστήματος. Ο VEGF διεγείρει τα ενδοθηλιακά κύτταρα για να πολλαπλασιαστούν, να μεταναστεύσουν και να σχηματίσουν σωλήνες, λειτουργώντας ως παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο VEGF αυξάνει επίσης την αγγειακή διαπερατότητα, με αποτέλεσμα να καθιερωθεί η εναλλακτική ονομασία: παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας. Τα μέλη της οικογένειας VEGF ασκούν τη δράση τους μέσω αλληλεπιδράσεων με μια οικογένεια τριών υποδοχέων VEGF και με δύο συν-υποδοχείς γνωστούς ως νευροπιλίνες. Οι διαφορετικοί συνδυασμοί των μελών των νευροπολινών και των υποδοχέων VEGF προκαλούν επιδράσεις που σχετίζονται με τον ιστό. Η έκφραση του VEGF στο αναπτυσσόμενο πνευμονικό επιθήλιο είναι ένας σημαντικός παράγοντας της φυσιολογικής πνευμονικής αγγειακής ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Η τοπική αύξηση της παραγωγής VEGF οδηγεί σε αυξημένη διαρροή αγγείων και οίδημα, ενώ αντίθετα μια συνολική μείωση της αφθονίας του VEGF, που συμπίπτει με την απώλεια μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, σχετίζεται με την ανάπτυξη οξείων πνευμονικών βλάβων. Η υπερέκφραση VEGF στους καρκίνους του πνεύμονα είναι ένας σημαντικός μηχανισμός με τον οποίο οι καρκίνοι προβάλλουν νέα αγγεία, επιτρέποντάς τους να αναπτυχθούν, να εισβάλλουν στον γειτονικό ιστό οδηγώντας σε μεταστάσεις.⁽⁵³⁾

Στους ανθρώπους, η οικογένεια VEGF αποτελείται από πολλά μέλη: VEGF-A (που έχει διαφορετικές ισομορφές), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (viral VEGF), VEGF-F (δηλητήριο φιδιού VEGF), αυξητικός παράγοντας πλακούντα (PlGF), και, πρόσφατα, σε αυτήν την οικογένεια έχει προστεθεί αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από ενδοκρινείς αδένες (EG-VEGF). Ο VEGF δεσμεύεται στους κυτταρικούς υποδοχείς τυροσίνης κινάσης (VEGFRs): VEGFR-1, VEGFR-2, και VEGFR-3. Ενώ οι VEGFR-1 και VEGFR-2 εκφράζονται κυρίως στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ο VEGFR-3 εκφράζεται ειδικά στα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Το VEGFR-2 έχει την ισχυρότερη προ-αγγειογόνο δράση και υψηλότερη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης από το VEGFR-1. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν επίσης συν-υποδοχείς, όπως η νευροπιλίνη-1 (NP-1) και η νευροπιλίνη-2 (NP-2), οι οποίοι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης. Τόσο ο VEGF όσο και ο VEGFR εκφράζονται όχι μόνο σε ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα. Ακριβώς λόγω της λειτουργίας του, ο αποκλεισμός της αγγειογένεσης στον καρκίνο ή σε άλλες παθολογικές διαδικασίες, χρησιμοποιώντας θεραπείες αντι-VEGF και αντι-VEGFR, θεωρείται εξαιρετικά σημαντικός.⁽⁵⁴⁾



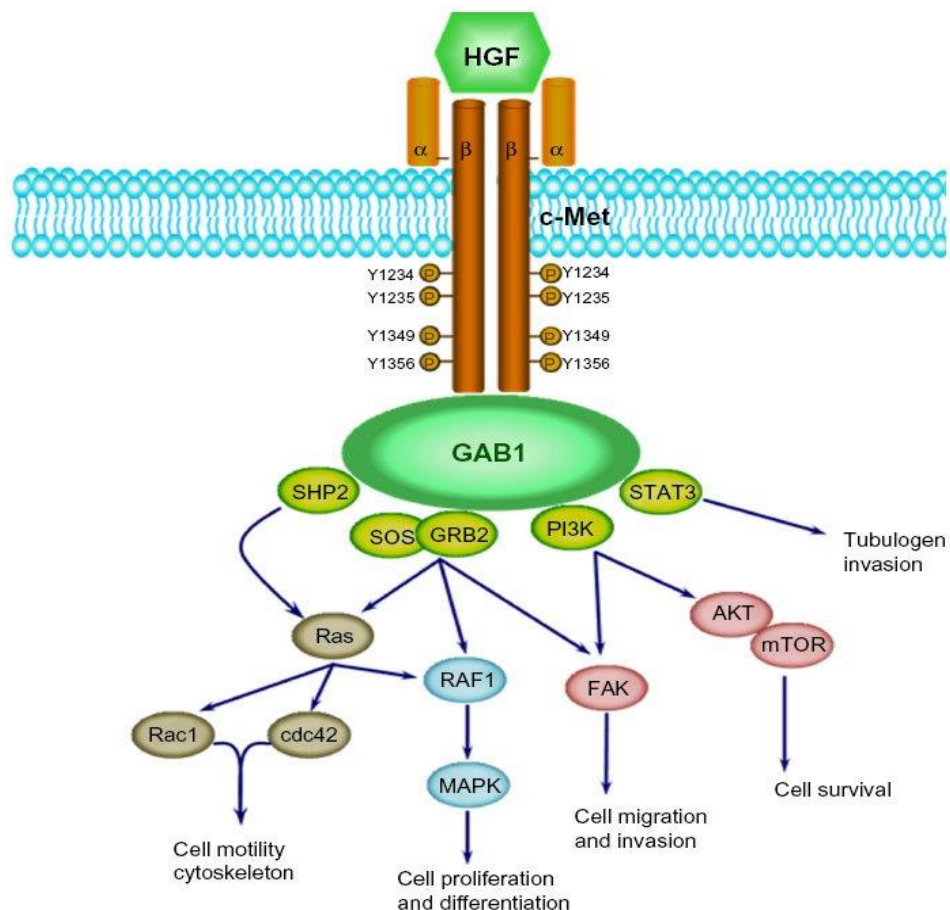
Σχήμα 17: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της VEGFR.

2.2.4. Υποδοχέας κινάσης τυροσίνης C-MET

Το c-Met, που ονομάζεται επίσης κινάση τυροσίνης-πρωτεΐνης Met ή υποδοχέας αυξητικού ηπατοκυττάρου (HGFR), είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο MET. Η πρωτεΐνη διαθέτει δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Η πρωτεύουσα πρόδρομη πρωτεΐνη μονής αλυσίδας διασπάται μετά τη μετάφραση για να παραγάγει τις άλφα και βήτα υπομονάδες, οι οποίες συνδέονται με δισουλφίδιο για να σχηματίσουν τον ώριμο υποδοχέα. Η MET εκφράζεται κανονικά από κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης. Όταν το HGF/SF δεσμεύει τον συγγενή του υποδοχέα MET προκαλεί τον διμερισμό του, μέσω ενός ακόμη μη πλήρως κατανοητού μηχανισμού, που οδηγεί στην ενεργοποίησή του. Ο υποδοχέας κινάσης τυροσίνης c-MET και το μόριο σηματοδότης του, ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF), ρυθμίζουν πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες που διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την εισβολή και την αγγειογένεση. Είναι απαραίτητος για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την επισκευή των ιστών. ^{(55), (56)}

Βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 7 (7q21-q31) που περιλαμβάνει 21 εξόνια και 20 εσώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεγέθους περίπου 120 kDa. Το μεταφρασμένο προϊόν υποβάλλεται σε επεξεργασία για να σχηματίσει ένα ετεροδιμερές που συνδέεται με την εξωκυτταρική αλυσίδα α και τη διαμεμβρανική αλυσίδα β. Η διαμεμβρανική αλυσίδα αποτελείται από έναν τομέα SEMA έναν τομέα PSI (πλεξίνη-σεμαφορίνη-ιντεγκρίνη), τέσσερις τομείς IPT

(περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνη σε πλεξίνες και παράγοντες μεταγραφής), μια διαμεμβρανική περιοχή, μια παραμεμβρανική περιοχή, περιοχή κινάσης τυροσίνης και θέση σύνδεσης c-τερματικού (καρβοξυλικός ακροδέκτης · CT). Το SEMA είναι το σημείο όπου το HGF συνδέεται απευθείας με το c-Met και το PSI μπορεί να σταθεροποιήσει αυτήν την αλληλεπίδραση. Όταν ο HGF δεσμεύει το c-Met, η τυροσίνη-1234 και 1235 στην περιοχή της ενδοκυτταρικής κινάσης τυροσίνης υφίστανται αυτοφωσφορυλίωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση της τυροσίνης 1349 και 1356 στη θέση σύνδεσης του C-τερματικού λοβού. Αυτό διευκολύνει την στρατολόγηση ενδοκυτταρικών μορίων τελεστών όπως η πρωτεΐνη 2 (GRB2), SRC, PI3K και GAB1, συνδεδεμένη με τον υποδοχέα παράγοντα ανάπτυξης, και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση διαδρομών σηματοδότησης.⁽⁵⁷⁾ Στην συνέχεια ο c-Met επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια που οφείλονται για πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών όπως είναι η μεταγραφή, κυτταρική διαφοροποίηση, κυτταρική επιβίωση.



Σχήμα 18: Ο διμερισμός της c-Met και η επαγωγή του εξωγενούς σήματος του HGF στο εσωτερικό του κυττάρου.

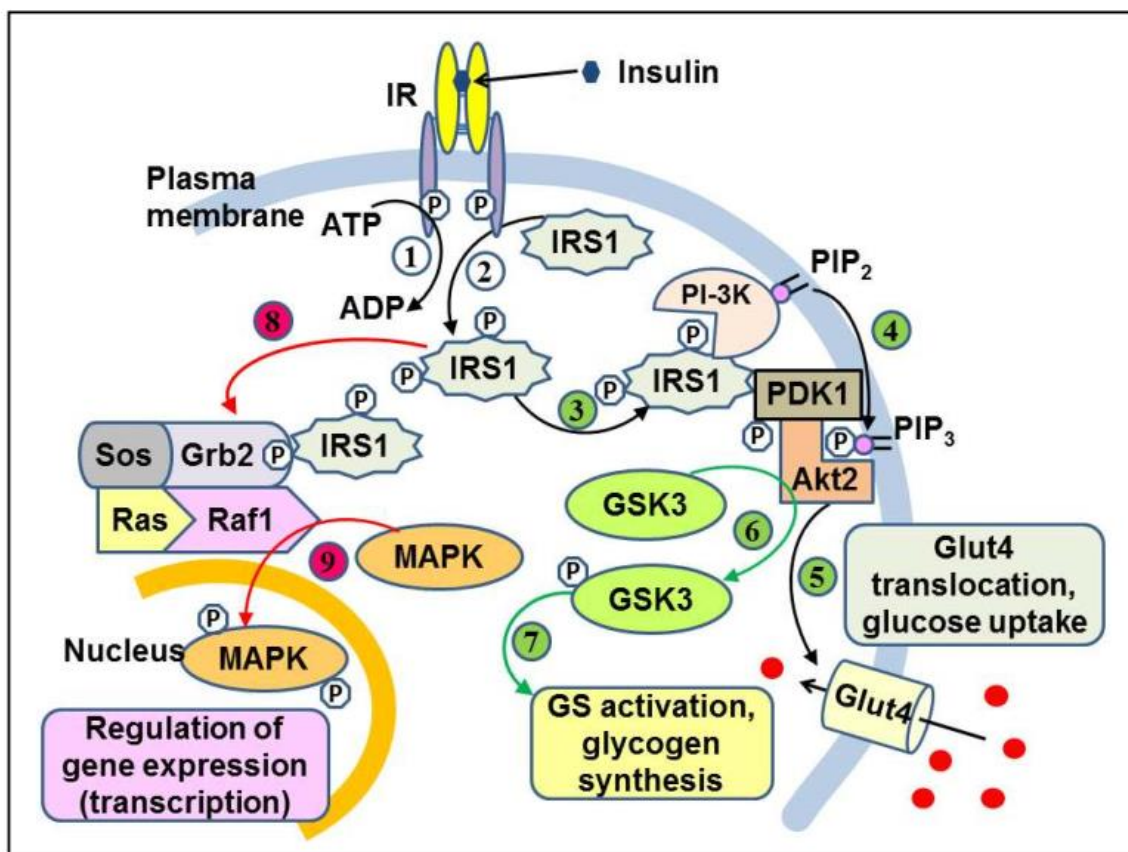
2.2.5. Υποδοχέας Ινσουλίνης

Ο υποδοχέας ινσουλίνης είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, σημαντικοί ρυθμιστές της κυτταρικής διαφοροποίησης, ανάπτυξης και μεταβολισμού, που συνδέονται με διαμεμβρανικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Ο υποδοχέας ινσουλίνης έχει μια σειρά από μοναδικές φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες που τον διακρίνουν από τα άλλα μέλη αυτής της μεγάλης μελετημένης οικογένειας υποδοχέων. Ο κύριος φυσιολογικός ρόλος του υποδοχέα ινσουλίνης φαίνεται να είναι η μεταβολική ρύθμιση, ενώ όλες οι άλλες κινάσες τυροσίνης υποδοχέα εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης ή και διαφοροποίησης. Ρυθμίζονται αλλοστερικά από τους συγγενείς τους συνδέτες και λειτουργούν ως διμερή. Σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από τον υποδοχέα ινσουλίνης (και 2 στενά συνδεδεμένους υποδοχείς), τα διμερή συνδέονται μη ομοιοπολικά, αλλά οι υποδοχείς ινσουλίνης διατηρούνται ομοιοπολικά διμερή μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Η αρχική απόκριση στον συνδέτη είναι η αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα. Στις περισσότερες υποδοχικές κινάσες, αυτή η διαδικασία οδηγεί στην επαγωγή υποδοχικών μορίων τελεστού, που έχουν μοναδικές περιοχές αναγνώρισης για υπολείμματα φωσφοτυροσίνης και οδηγούν σε βιολογική απόκριση. Ο υποδοχέας ινσουλίνης, αντιθέτως, φωσφορυλιώνει μια μεγάλη πρωτεΐνη υποστρώματος που, με τη σειρά της, επάγει μόρια τελεστές. Οι μελέτες για τον εν λόγω υποδοχέα είναι αρκετά ενδελεχής, κυρίως λόγω πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων στον διαβήτη με τη χρήση παραγώγων ινσουλίνης.⁽⁵⁸⁾

Ο υποδοχέας ινσουλίνης έχει μια δομοστοιχειωτή δομή, κωδικοποιημένη από ένα γονίδιο, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, με 22 εξόνια και 21 εσώνια. Το μικρό εξόνιο 11 που κωδικοποιεί μια ακολουθία 12-αμινοξέων παράγει δύο ισομορφές υποδοχέων (Α και Β) που διαφέρουν ελαφρώς σε συνάφεια με την ινσουλίνη. Η ισομορφή Β συνδέει τους IGF με τουλάχιστον 100 φορές μικρότερη συγγένεια από την ινσουλίνη, ενώ η ισομορφή Α έχει σημαντικά υψηλότερη συγγένεια από την ισομορφή Β για IGF-I και ιδιαίτερα IGF-II (30) και μπορεί να παίξει ρόλο στην ογκογένεση. Ο υποδοχέας IGF-I συνδέει τον IGF-II με χαμηλότερη συγγένεια από τον IGF-I και την ινσουλίνη με 500 φορές χαμηλότερη συγγένεια. Οι υποδοχείς συντίθενται ως προ-υποδοχείς μονής αλυσίδας που υποβάλλονται σε επεξεργασία από ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που μοιάζει με φουρίνη. Γλυκοζυλιώνεται, διπλώνεται και διμερίζεται για να δώσει τον ώριμο α2β2 υποδοχέα. Σε κύτταρα που εκφράζουν τόσο υποδοχείς ινσουλίνης όσο και IGF-I, σχηματίζονται υβριδικοί υποδοχείς αποτελούμενοι από το ήμισυ του καθενός.

Η συγκριτική ανάλυση αλληλουχίας των υποδοχέων ινσουλίνης/IGF-I και του σχετικού υποδοχέα EGF είχε οδηγήσει τους Bajaj et al. για να προτείνει ότι το N-τερματικό μισό αποτελείται

από δύο μεγάλες ομόλογες σφαιρικές περιοχές, L1 και L2, χωρισμένες από μια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη, η οποία αργότερα προβλέπεται να αποτελείται από μια σειρά ενοτήτων που συνδέονται με δισουλφίδιο παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται στο υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF) και λαμινίνη. Το C-τερματικό μισό των υποδοχέων είχε προβλεφθεί ότι αποτελείται από τρεις περιοχές ινονεκτίνης τυπού III (FnIII). Ο δεύτερος τομέας FnIII περιέχει ένα μεγάλο πεδίο εισαγωγής (120 υπολείμματα) άγνωστης δομής που περιέχει τη θέση διάσπασης μεταξύ των α - και β - υπομονάδων. Ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ κάθε α - και β - υπομονάδας περιλαμβάνει τις κυστεΐνες C647 και C860. Επιπλέον, υπάρχουν δεσμοί α - α δισουλφιδίου στο C524 στους τομείς FnIII-1 και μεταξύ της τριπλέτας C682-C683 και C685 στην περιοχή εισαγωγής. Το ενδοκυττάριο τμήμα της α -υπομονάδας περιέχει το πεδίο κινάσης πλαισιωμένο από δύο ρυθμιστικές περιοχές, μια περιοχή παραμεμβρανική που εμπλέκεται στη δέσμευση υποστρωμάτων υποδοχέων ινσουλίνης (IRS) και Shc, καθώς και μία εσωτερική περιοχή που περιλαμβάνει τον C-τερματικού λοβό. Ο υποδοχέας IGF-I έχει παρόμοια αρθρωτή οργάνωση. ^{(59), (60)}



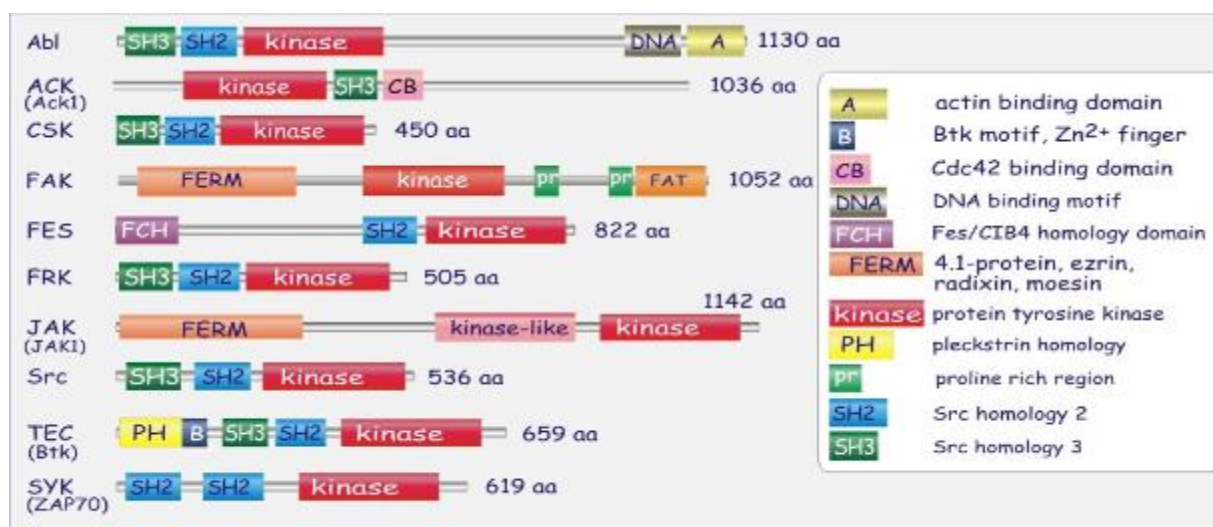
Σχήμα 19: το σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα ινσουλίνης.

2.2.6. Μη υποδοχικές κινάσες τυροσίνης

Σε αντίθεση με τις υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs), η δεύτερη υποομάδα μη-υποδοχικών κινάσων τυροσίνης (nRTKs) είναι κυτταροπλασματικά ένζυμα και εντοπίζονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Όπως και οι υπόλοιπες κινάσες τυροσίνης, συμμετέχουν καθοριστικά στην σηματοδοτική διαδικασία που προκαλείται από τις υποδοχικές κινάσες τυροσίνης ή από άλλους κυτταρικούς υποδοχείς. ⁽⁶¹⁾

Η σηματοδότηση από πολλούς υποδοχείς εξαρτάται από τα nRTK, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων T-κυττάρων (TCR), υποδοχέων B-κυττάρων (BCR), υποδοχέων IL-2 (IL-2R), υποδοχέων Ig, ερυθροποιητίνης (EpoR) και υποδοχέων προλακτίνης. Οι υποδοχείς CD4 και CD8 στα T-λεμφοκύτταρα χρησιμοποιούν για τη σηματοδότησή τους, το μέλος της οικογένειας Src, Lck. Ένα άλλο μέλος της οικογένειας Src, Lyn εμπλέκεται στη σηματοδότηση που επάγει ο υποδοχέας B-κυττάρων. ⁽⁶²⁾ Η απορρύθμιση τους, εξαιτίας του σημαντικότητας ρόλου που έχουν στην κυτταρική σηματοδότηση ευθύνεται για μία σειρά παθογενειών και νεοπλασιών, για αυτό και η μελέτη τους τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών και καινοτόμων φαρμακευτικών εταιριών.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν τριάντα δύο γονίδια που κωδικοποιούν μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης που χωρίζονται σε 10 υπο-οικογένειες με βάση δομή και την δραστηριότητά τους: Src, Jak, Abl, Fak, Fps, Csk, Syk, Pyk2, Btk, Ack. ⁽⁶³⁾.



From Cell Biology

Σχήμα 20: Οι υποοικογένειες των μη υποδοχικών κινάσων τυροσίνης.

2.2.7 Υπο-οικογένεια κινάσης Abl

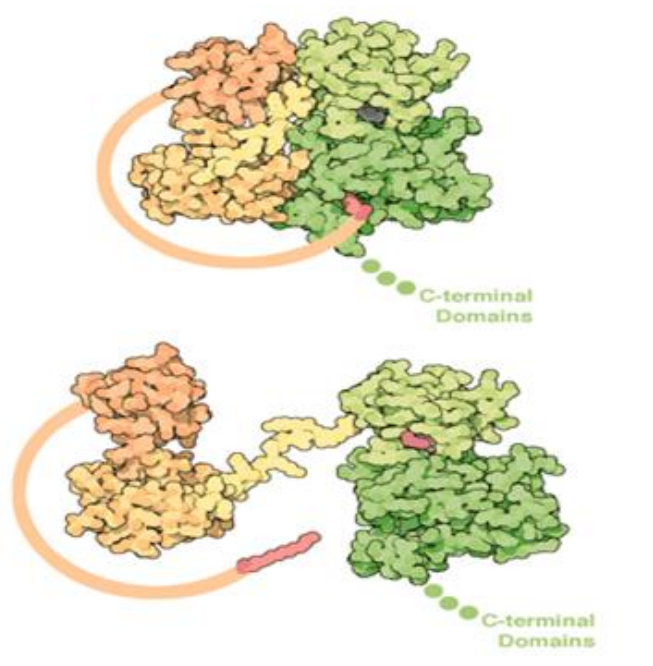
Αυτή η υποοικογένειας περιλαμβάνει δύο μέλη, τις c-Abl και Arg που εντοπίζονται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηρίζονται από ένα μοναδικό N-άκρο που ακολουθείται από μία περιοχή SH3, μια περιοχή SH2 και την καταλυτική περιοχή του ενεργού κέντρου. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας ABL περιλαμβάνουν έναν από τους καλύτερα διατηρημένους κλάδους των κινασών τυροσίνης. Κάθε πρωτεΐνη ABL περιέχει μία ομολογία SH3-SH2-TK (Src homology 3 – Src homology 2 – tyrosine kinase), η οποία επιτρέπει την αυτορύθμιση της δραστηριότητας της κινάσης κινάσης και είναι κοινή μεταξύ των μη υποδοχικών κινασών τυροσίνης.

Δύο πρόδρομοι σπονδυλωτών, ABL1 και ABL2, έχουν εξελιχθεί για να εκτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες. Το ABL1 περιλαμβάνει σήματα πυρηνικού εντοπισμού και ένα πεδίο σύνδεσης DNA μέσω του οποίου μεσολαβεί στις λειτουργίες επιδιόρθωσης βλαβών DNA, ενώ το ABL2 έχει πρόσθετη ικανότητα δέσμευσης για ακτίνη και μικροσωληνίσκους που ενισχύουν τις κυτταροσκελετικές λειτουργίες. Διάφοροι τυποί μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων ελέγχουν την καταλυτική δραστηριότητα ABL, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη σταθερότητα, με συνέπειες τόσο για τις κυτταροπλασματικές όσο και για τις πυρηνικές λειτουργίες ABL. Οι δεσμευτικοί εταίροι παρέχουν πρόσθετη ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας ABL, της ειδικότητας του υποστρώματος και της μεταγενέστερης σηματοδότησης. Οι πληροφορίες για τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς ABL παρέχουν νέες θεραπευτικές στρατηγικές ενάντια στις αιματοποιητικές κακοήθειες που προκαλούνται από το BCR-ABL1 και τις σχετικές λευκογενετικές πρωτεΐνες. ⁽⁶⁴⁾

2.2.8 Κινάση c-Abl

Η c-Abl παίζει διακριτούς ρόλους, καθώς οι επιδράσεις του c-Abl μεσολαβούνται από πολλαπλές αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-DNA και της περιοχής κινάσης τυροσίνης. ⁽⁶⁵⁾. Χρησιμοποιεί μια σύνθετη διαμορφωτική αλλαγή για την μετατροπή της από ανενεργή σε ενεργή μορφή. Αποτελείται από πολλές περιοχές που συνδέονται με εύκαμπτα μόρια-υποκαταστάτες, καθώς και δύο μικρές ρυθμιστικές περιοχές. Μια μεγαλύτερη περιοχή κινάσης, και διάφορες πρόσθετες περιοχές που είναι υπεύθυνες για την δεσμευσή τους με το DNA και την ακτίνη. Στην αδρανή μορφή, η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται σε μια σφιχτή μπάλα. Οι ρυθμιστικές περιοχές βρίσκονται στο πίσω μέρος της κινάσης. Οι κινάσες πρέπει να ανοίξουν κατά τη διάρκεια των καταλυτικών κύκλων για να επιτρέψει τα υποστρώματα να εισέλθουν στο ενεργό κέντρο. Η

συμπαγής ανενεργή μορφή διακόπτει τη λειτουργία του ενζύμου. Η c-Abl ενεργοποιείται από άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με της ρυθμιστικές περιοχές και να την απελευθερώσουν την ανενεργή μορφή. ⁽⁶⁶⁾



Σχήμα 21: Η c-Abl κινάση τυροσίνης. Η ανενεργή c-Abl φαίνεται στην κορυφή, με τα ρυθμιστικά πεδία να αποκονίζονται με μαύρο χρώμα. Στο κάτω μέρος εμφανίζεται η ενεργή μορφή της κινάσης

Η δυσλειτουργία της κινάσης λόγω μεταλλάξεων οδηγεί σε μια σειρά διαταραχών. Η απουσία της πρωτεΐνης προκαλεί θνησιμότητα των παιδιών μετά τον τοκετό, λεμφοπενία και οστεοπόρωση ενώ η υπερέκφραση ή υπερδραστηριότητα προκαλεί καρκίνο. ⁽⁶⁷⁾ Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις στο γονίδιο ABL1 σχετίζονται με Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (ΧΜΛ). Στη ΧΜΛ, το γονίδιο μεταλλάσσεται μετατοπίζοντας το γονίδιο BCR (περιοχή ομαδοποίησης σημείου διακοπής) στο χρωμόσωμα 22. Το νέο χιμαιρικό γονίδιο που σχηματίζεται ονομάζεται χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια και κωδικοποιεί μια μη ρυθμιζόμενη κινάση τυροσίνης που δρα στο κυτταρόπλασμα και επιτρέπει στα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται χωρίς να ρυθμίζονται από κυτοκίνες. Αυτό, με τη σειρά του, μετατρέπει το κύτταρο σε καρκινικό.

Η μεταγραφή BCR-ABL, επί της ουσίας κωδικοποιεί μια κινάση τυροσίνης, η οποία ενεργοποιεί τους μεσολαβητές του συστήματος ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, οδηγώντας σε μια κλωνική διαταραχή μυελοπολλαπλασιασμού. Η πρωτεΐνη BCR-ABL μπορεί να ανασταλεί από διάφορα μικρά μόρια. Ένας τέτοιος αναστολέας είναι η μεσυλική Ιματινίβη, η οποία καταλαμβάνει το ενεργό κέντρο της κινάσης τυροσίνης και αναστέλλει την επίδραση του BCR-ABL στον κυτταρικό κύκλο. ⁽⁶⁸⁾

2.2.9 Η υπο-οικογένειας Src κινασών

Η οικογένεια Src πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος που προκαλείται από κυτταρικούς υποδοχείς σε ποικίλα κυτταρικά περιβάλλοντα. Έχει αναπτύξει πολλές έξυπνες μοριακές στρατηγικές για τη σύζευξη υποδοχέων με τον κυτταροπλασματικό μηχανισμό σηματοδότησης. Ρυθμίζει θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης, του κυτταρικού σχήματος, της μετανάστευσης, της επιβίωσης. Οι πλειοτροπικές λειτουργίες των μελών της οικογένειας Src υπογραμμίζουν τη σημασία αυτών των κινασών και εξηγούν γιατί πολλά από τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν ταυτοποιηθεί ως κυτταρικά ογκογίδια. ⁽⁶⁹⁾

Περιλαμβάνει εννέα μέλη την Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Yes και Yrk. Οι κινάσες Src μοιράζονται μια καλά διατηρημένη δομή, που αποτελείται από διαδοχικούς περιοχές SH3, SH2 και κινάσης τυροσίνης (SH1). Όλα τα μέλη της οικογένειας περιέχουν επίσης μια περιοχή στόχευσης μεμβράνης SH4 στο N-άκρο τους, η οποία είναι πάντα μυριστοϋλιωμένη και μερικές φορές παλμιτοϋλιωμένη. Η περιοχή SH4 ακολουθείται από έναν «μοναδικό» τομέα 50-70 υπολειμμάτων, ο οποίος αποκλίνει μεταξύ των διαφόρων μελών της οικογένειας.

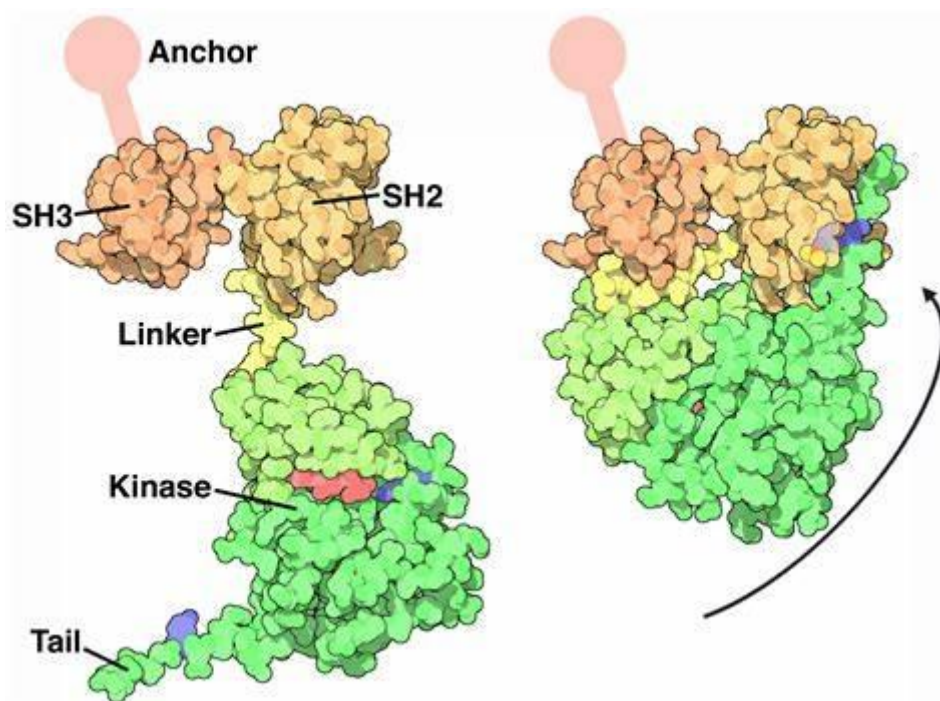
Χαρακτηριστικό γνώρισμα των κινασών Src είναι μια σύντομη ουρά C-τερματικού, η οποία φέρει μια θέση αναστολής φωσφορυλίωσης (τυροσίνη 527). Όπως και οι περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες, τα μέλη της οικογένειας Src απαιτούν φωσφορυλίωση εντός ενός τμήματος της περιοχής κινάσης που ονομάζεται βρόχος ενεργοποίησης για αναπτύξουν πλήρη καταλυτική δραστηριότητα. Στην οικογένεια Src, αυτή η θέση αυτοφωσφορυλίωσης είναι η Τυροσίνη 416 (χρησιμοποιούμε αριθμηση Src-κοτόπουλου). In vivo, οι κινάσες Src φωσφορυλιώνονται είτε στην τυροσίνη 416 είτε στην τυροσίνη 527 (στην ανενεργή κατάσταση). Η αδρανοποιητική φωσφορυλίωση στην τυροσίνη 527 πραγματοποιείται από την ειδική για Src κινάση ή την ομόλογη Chk. Η φωσφορυλίωση της ουράς C-τερματικού προάγει τη αναδιάταξη των τομέων SH2, SH3 σε μια αυτοανασταλμένη διαμόρφωση που διατηρείται με στενές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των περιοχών. ⁽⁷⁰⁾

Οι κινάσες Src μεταδίδουν σήματα που σχετίζονται με κυτταρικές διεργασίες όπως πολλαπλασιασμός, διαφοροποίηση, κινητικότητα και πρόσφυση. Η ενεργοποίηση της κινάσης Src οδηγεί σε αύξηση αυτών των διαδικασιών, με την λειτουργικότητα του Src κατά τη συνέπεια συνδέεται με την ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο. Για αυτό η αναστολή των κινασών Src είναι συχνά στόχος των αντικαρκινικών φαρμάκων.

Μετατροπείς σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφής (STATs) ενεργοποιούνται από κινάσες της οικογένειας Src επιπλέον των υποδοχέων αυξητικού παράγοντα. Η ενεργοποίηση του STAT από

τις κινάσες της οικογένειας Src συχνά επάγει τον καταρράκτη του υποδοχέα αυξητικού παράγοντα. Έχει αποδειχθεί ότι η δραστηριότητα Src κινάσης ενεργοποιεί την σηματοδότηση EGF. Η ενεργοποίηση του STAT αποτελεί προϋπόθεση για τον πολλαπλασιασμό του όγκου.

Το 70% των καρκινικών κυττάρων του μαστού υπερεκφράζουν κινάσες τυροσίνης (συγκεκριμένα c-Src). Ένας συνδυασμός της c-Src και EGFR συχνά εκφράζονται σε όγκους μεταγενέστερου σταδίου. Αυτή η συν-έκφραση οδηγεί σε συνεργιστική αύξηση της μιτογένεσης, του μετασχηματισμού και της ογκογένεσης. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η τυροσίνη 845 στον καταλυτικό τομέα του EGFR δεν φωσφορυλιώνεται αυτόματα, αλλά απαιτεί την παρεμβολή της c-Src κινάσης. ^{(71), (72)}



Σχήμα 22: Η δομή των κινασών της οικογένειας της Src.

2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης είναι ένζυμα που φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα των αμινοξέων σερίνης ή θρεονίνης. Η πρώτη πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή ήταν η κινάση της φωσφορυλάσης του μυός, το 1959. Εκτοτέ αποδείχθηκε ότι περισσότερες από 125 από τις ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες έχουν δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης. ⁽⁷³⁾

Χωρίζονται σε 8 υπο-οικογένειες: **1.** Πρωτεϊνικές κινάσες AGC **2.** Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη **3.** Κινάσες των GPCRs (GRKs) **4.** Κινάση II της καζεΐνης **5.** Κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου **6.** Κινάσες CDKs (κυκλino-εξαρτώμενες κινάσες, τα κεντρικά στοιχεία της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου). **7.** Κινάσες που προωθούν τη μίτωση, MAP κινάσες (οι MAP κινάσες συμμετέχουν στη μεταγωγή των σημάτων που προάγουν την αύξηση). **8.** Πρωτεϊνικές κινάσες Mos/Raf (οι πρωτεϊνικές κινάσες Mos/Raf επίσης συμμετέχουν στη μεταγωγή των σημάτων των αυξητικών παραγόντων).

Ενώ όλες οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης στα υποστρώματά τους, επιλέγουν συγκεκριμένα κατάλοιπα για να φωσφορυλιωθούν με βάση τα υπολείμματα που πλαισιώνουν στην περιοχή των φωσφοδεκτών. Δεδομένου ότι τα κατάλοιπα αλληλουχίας ενός υποστρώματος στόχου έρχονται μόνο σε επαφή με πολλά βασικά αμινοξέα μέσα στην καταλυτική σχισμή της κινάσης (συνήθως μέσω υδρόφοβων δυνάμεων και ιοντικών δεσμών), μια κινάση συνήθως δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα για ένα μόνο υπόστρωμα, αλλά μπορεί να φωσφορυλιώσει μία ολόκληρη "οικογένεια υποστρώματος" που μοιράζονται κοινές ακολουθίες αναγνώρισης. Ενώ η καταλυτική περιοχή αυτών των κινασών διατηρείται σε μεγάλο βαθμό, η παραλλαγή αλληλουχίας που παρατηρείται στο κίνωμα παρέχει αναγνώριση διακριτών υποστρωμάτων. Οι περισσότερες κινάσες αναστέλλονται από ένα ψευδοϋπόστρωμα που συνδέεται με την κινάση ως ένα πραγματικό υπόστρωμα, αλλά δεν έχει το αμινοξύ για να φωσφορυλιωθεί. Όταν αφαιρείται το ψευδοϋπόστρωμα, η κινάση μπορεί να εκτελέσει τη φυσιολογική της λειτουργία. ^{(74), (75)}

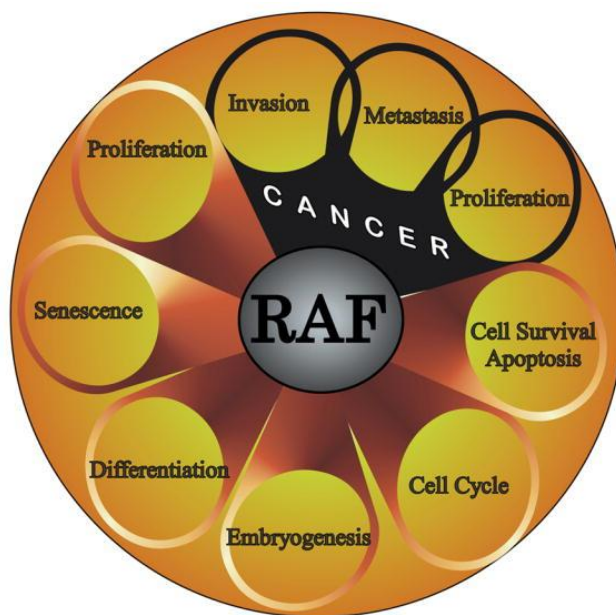
2.3.1 Κινάσες Raf

οι πρωτεΐνες Raf και η οδός MAPK έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν βασικό ρόλο σε διάφορες «φυσιολογικές» διεργασίες, όπως ο κυτταρικός μεταβολισμός, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, ο κυτταρικός θάνατος και η νευρολογική λειτουργία. Μεγάλο μέρος της κατανόησής μας για τη λειτουργία Raf προέρχεται από μελέτες που χρησιμοποιούν μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας, και δεδομένα από μοντέλα ζώων.

Οι κινάσες Raf είναι μια οικογένεια τριών πρωτεϊνικών κινασών σερίνη/θρεονίνη που σχετίζονται με ρετροϊκά ογκογονίδια. Ο ιός σαρκώματος ποντικού 3611 περιέχει ογκογονίδιο σχετιζόμενο με κινάση Raf που ενισχύει την επαγωγή ινοσαρκώματος. Το αρκτικόλεξο RAF μεταφράζεται ως ταχέως επιταχυνόμενο ινοσάρκωμα^{(76), (77)}. Υπάρχουν τρεις γνωστές ισομορφές Raf θηλαστικών: A, B και C-Raf που ονομάζονται επίσης Raf-1 ή c-Raf-1. Οι Raf κινάσες συμμετέχουν στον μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAS-RAF-MEK-EKK, που αναφέρεται επίσης ως μονοπάτι της κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνο (MAPK). Η ενεργοποίηση των Raf κινασών απαιτεί αλληλεπίδραση με RAS-GTPases.⁽⁷⁸⁾

Το πρώτο μέλος της οικογένειας Raf, το C-Raf-1 (επίσης γνωστό ως Raf-1), εντοπίστηκε σε ένα πείραμα παγίδευσης ογκογονιδίου. Η καταλυτική του περιοχή βρέθηκε συγχωνευμένη με την ρετροϊκή πρωτεΐνη Gag. Τέσσερα χρόνια αργότερα, η B-Raf ανακαλύφθηκε με ένα παρόμοιο πείραμα. Μέσα σε 10 χρόνια από την ανακάλυψή του, η C-Raf αναγνωρίστηκε ως συνεργάτης αλληλεπίδρασης και ενεργοποιητής της κινάσης πρωτεΐνης ενεργοποιημένης με μιτογόνο (MAPK)/κινάση ERK (MEK). Πληθώρα μελετών οδήγησαν σε ένα ευρέως αποδεκτό μοντέλο για την ενεργοποίηση των Raf.⁽⁷⁹⁾

Η δυσλειτουργία των Raf κινασών λόγω γενετικών μεταλλάξεων σχετίζεται με ένα μεγάλο αριθμό όγκων. Αυτό οδήγησε σε εντατικοποίηση των προσπαθειών ανάπτυξης αντικαρκινικών φαρμάκων με στόχο της εκλεκτικής αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών Raf. Για σχεδόν 2 δεκαετίες, η έρευνα επικεντρώθηκε στην Raf-1 ως το κρίσιμο Ras τελεστή της οικογένειας Raf. Ωστόσο, η κατεύθυνση άλλαξε όταν ο Davies et al. περιέγραψαν ότι μεταλλάξεις του B-Raf εντοπίζονται στο 66% των μελανωμάτων και σε χαμηλότερη συχνότητα σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων στερεών καρκινικών όγκων. Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε ότι περίπου το 2% του ανθρώπινων κακοηθειών φέρουν μια μετάλλαξη στη B-Raf. Υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης παρατηρήθηκε σε μελανώματα και σε καρκινώματα του παχέος εντέρου, του θυρεοειδούς αδένος, των ωοθηκών, και των χοληφόρων οδών. Σήμερα, περισσότερες από 100 διαφορετικές μεταλλάξεις B-Raf έχουν περιγράψει, με την V600E (πρώην χαρακτηρισμένα ως V599E) να αποτελεί μακράν την κυρίαρχη



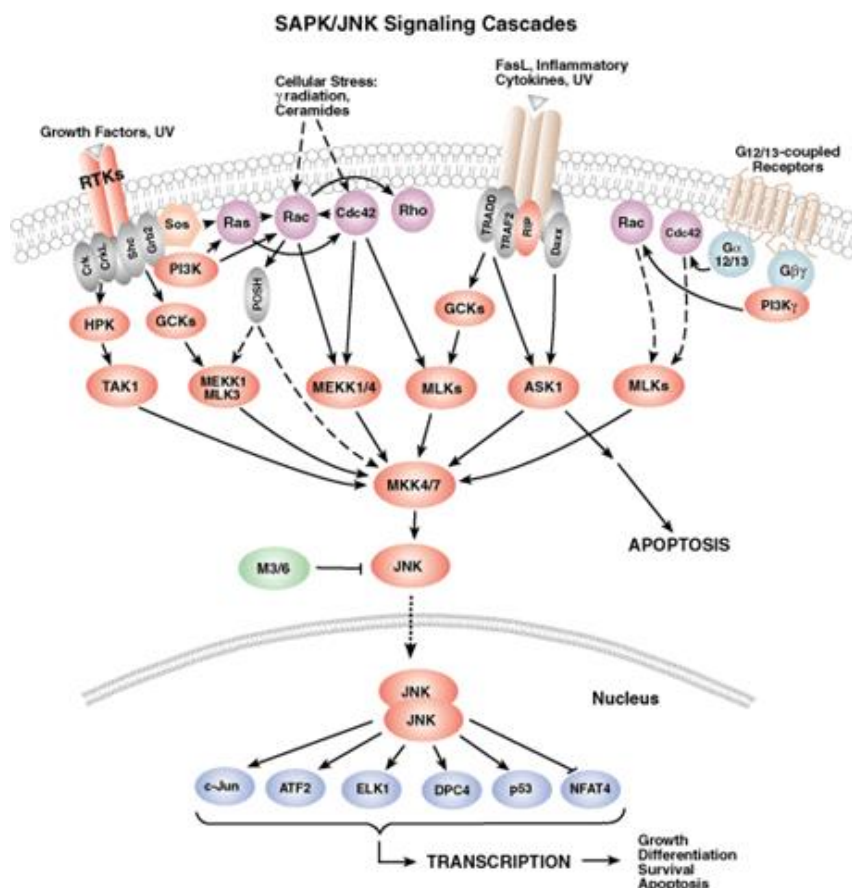
Σχήμα 23: Οι πρωτεΐνες Raf και η οδός MAPK διαδραματίζουν βασικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός, ο κυτταρικός κύκλος, ο κυτταρικός θάνατος και η νευρολογική λειτουργία κ.ά.

2.3.2 Κινάσες σερίνης-θρεονίνης JNK

Από την ανακάλυψή τους πριν από 20 χρόνια η οικογένεια των c-Jun N-τερματικών κινάσων (JNK) παραμένουν μέχρι και σήμερα ένα αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος. Γίνονται συνεχής έρευνες για την εκτίμηση των βιοχημικών λειτουργιών τους και της ρύθμισής τους, καθώς και για τη συμβολή τους σε κυτταρικές λειτουργίες υπό φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Η οικογένεια των κινάσων JNK είναι ένα από τα τρία μέλη της κατηγορίας των ενεργοποιημένων από το μιτογόνο πρωτεϊνικών κινάσων (MAPK). Οι JNK κινάσες αποτελούνται από τρεις πρωτεΐνες την JNK1 την JNK2 και την JNK3 που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια. Οι JNK1 και JNK2 έχουν μια ευρεία κατανομή στους ιστούς, ενώ η JNK3 εντοπίζεται κυρίως σε νευρώνες και σε μικρότερο βαθμό στην καρδιά και στους όρχεις. ⁽⁸²⁾

Πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει ότι η c-Jun N-τερματικές κινάσες (JNKs), που ονομάζεται επίσης και ενεργοποιημένες από το στρες πρωτεϊνικές κινάσες (SAPKs), συμμετέχουν σε κυτταρικές αποκρίσεις που επάγονται από περιβαλλοντικά σήματα. Μπορεί να ενεργοποιηθούν από ερεθίσματα όπως είναι το υπεριώδες φως, η γ-ακτινοβολία, οι αναστολείς πρωτεϊνικής σύνθεσης, το κεραμίδιο, τα φάρμακα που βλάπτουν το DNA, χημειοπροληπτικά φάρμακα, το TNF-

α και η ιντερλευκίνη 1. Επιπλέον, η δραστηριότητα των JNK επάγεται σε μικρότερο βαθμό από μιτογόνα σήματα συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων ανάπτυξης, τους ογκογόνους Ras, το CD40 πρόσδεσης και σήματα ενεργοποίησης των T-κυττάρων. Όταν ενεργοποιηθούν οι JNKs στην συνέχεια με την σειρά τους μέσω της φωσφορυλίωσης, τροποποιούν τη δραστηριότητα πολλών πρωτεϊνών που εντοπίζονται στον μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα ενεργούν στον πυρήνα. Τα μόρια που ενεργοποιούνται από JNK είναι η c-Jun, ATF2, ELK1, Smad4, p53 και HSF1 και τα μόρια που αναστέλλονται είναι NFAT4, NFATC1 και STAT3. Με την ενεργοποίηση και την αναστολή άλλων μικρών μορίων με αυτόν τον τρόπο, η δραστηριότητα της JNK ρυθμίζει αρκετές σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης, διαφοροποίησης, την επιβίωση και απόπτωση. (83), (84)



Σχήμα 24: Οι (SAPK) / C-Jun N-τερματικές κινάσες (JNK) είναι μέλη της οικογένειας των MAPK που ενεργοποιούνται από μία ποικιλία περιβαλλοντικών στρες, από φλεγμονώδεις κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και αγωνιστές GPCR. Τα σήματα στρες μεταφέρονται σε αυτόν τον καταρράκτη μεταγωγής σήματος από τα μέλη των μικρών GTPασών της οικογένειας Rho (Rac, Rho, Cdc42). SAPK / JNK μεταφέρονται στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν τη δραστηριότητα πολλών παραγόντων μεταγραφής όπως c-jun, ATF2, p53, κ.λπ. (85)

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει το επίκεντρο στρατηγικών για την ανάπτυξη επιλεκτικών αναστολέων μιας και μελέτες έχουν δείξει τον κρίσιμο ρόλο τους στην ανάπτυξη μεγάλου αριθμού ασθενειών, όπως ο διαβήτης, ο νευροεκφυλισμός που σχετίζεται με την ασθένεια του Parkinson και του alzheimer, την ασθένεια του ήπατος και την ογκογένεση. Τα ποντίκια στα οποία έχει ανασταλεί η λειτουργία της JNK3 παρουσιάζουν βελτίωση στον νευροεκφυλισμό στην νόσο του Πάρκινσον και του Αλτσχάιμερ. Η JNK1 φωσφορυλιώνει την IRS-1, ένα βασικό μόριο στο μονοπάτι ανίσχευσης της ινσουλίνης που ρυθμίζει την σηματοδότηση της ινσουλίνης. Η JNK2, συχνά σε συνεργασία με JNK1, έχει ενοχοποιηθεί για την παθολογία των αυτοάνοσων διαταραχών, όπως είναι η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το άσθμα. Μία πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι JNK2 μπορεί επίσης να παίζει έναν ρόλο σε αγγειακές νόσους και την αθηροσκλήρωση.

Η JNK κινάσες αποτελούνται από μία N-τερματική και μια C-τερματική περιοχή μία σχισμή του ενεργού κέντρου. Το N-τερματικό πεδίο αποτελείται από επτά β-πτυχωτά φύλα ($\beta 1L0$, $\beta 2L0$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ και $\beta 5$) και δύο α -έλικες (αO και $\alpha L16$), ενώ η C-τερματικής περιοχής περιέχει κυρίως α έλικες (αo , αE , αP , $\alpha \gamma$, αH , αi , $\alpha L12$, $\alpha L14$, $\alpha 2L14$, $\alpha 3L14$ και $\alpha iL16$,) με πέντε σύντομες α -έλικες και τρία β-πτυχωτά φύλα ($\beta L5$, $\beta 7$, $\beta 8$). Οι δύο περιοχές συνδέονται με τις λεγόμενες περιοχές άρθρωσης. Μια βαθιά σχισμή στη διεπιφάνεια μεταξύ του N-τερματικού πεδίου και της C-τερματικής περιοχής περιέχει την θέση σύνδεσης ATP. ⁽⁸⁶⁾

2.3.3. Κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDK)

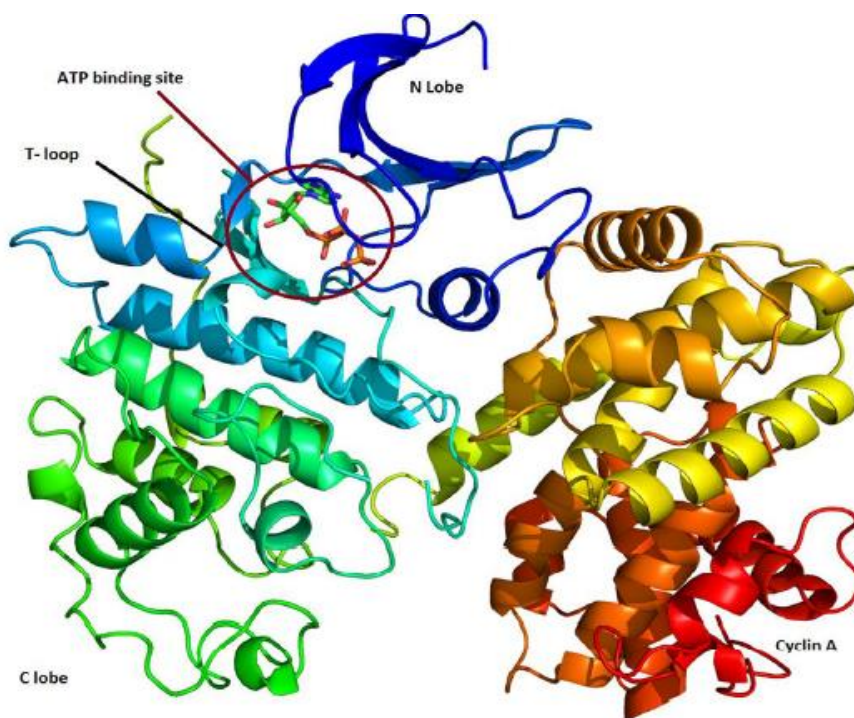
Οι εξαρτώμενες από κυκλίνες κινάσες (CDK) είναι οι οικογένειες πρωτεϊνικών κινάσων που ανακαλύφθηκαν για το ρόλο τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η ανακάλυψη του κεντρικού ρυθμιστικού ρόλου τους στην κυτταρική διαίρεση οδήγησε στην απονομή του Νόμπελ φυσιολογίας το 2001. Συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση της μεταγραφής, της επεξεργασίας του mRNA και της διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων. Υπάρχουν σε όλους τους γνωστούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς και η ρυθμιστική τους λειτουργία στον κυτταρικό κύκλο έχει διατηρηθεί εξελικτικά.

Είναι σχετικά μικρές πρωτεΐνες, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 34 έως 40 kDa και περιέχουν μία περιοχή κινάσης. Εξ ορισμού, μία CDK δεσμεύει μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που ονομάζεται κυκλίνη. Χωρίς κυκλίνη, η CDK έχει μειωμένη δραστηριότητα κινάσης. Το σύμπλοκο κυκλίνης-CDK ενεργοποιεί την φωσφορυλιωτική ικανότητα των εν λόγω πρωτεϊνών, αλλά η δραστηριότητά του, μπορεί τυπικά να ρυθμιστεί περαιτέρω με φωσφορυλίωση και άλλες πρωτεΐνες δέσμησης, όπως η P27. Οι CDK φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματά τους σε κατάλοιπα

σερίνης και θρεονίνης, επομένως ανήκουν στην οικογένεια των κινάσων σερίνης-θρεονίνης. ^{(87), (88)}.

Μέχρι σήμερα, είναι γνωστές 20 υποοικογένειες των CDK. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τρία CDKs διαφάσης (CDK2, CDK4, CDK6), ένα μιτωτικό CDK (CDK1, προηγουμένως γνωστό ως CDC2) και έναν αριθμό ρυθμιστικών CDKs, όπως το CDK7, ένα συστατικό του συμπλόκου ενεργοποίησης CDK και μεταγραφικά CDKs (CDK8, CDK9). Σε αντίθεση με τα CDKs, οι κυκλίνες είναι μια εξαιρετικά διαφορετική οικογένεια πρωτεϊνών, υποδιαιρούμενες σε τέσσερις κατηγορίες (A-, B-, D-, E-τύπου κυκλίνες) που δρουν ως ρυθμιστικές υπομονάδες του ολοενζύμου CDK-κυκλίνης.

Όλες οι CDK έχουν δομή δύο λοβών, έναν N-τερματικό που αποτελείται από β-πτυχωτά φύλλα και έναν C-τερματικό αποτελούμενο από α-έλικες. Ο N-τερματικός λοβός περιέχει ανασταλτικό G-βρόγο (πλούσιο σε γλυκίνη), και το τερματικό C περιέχει τμήμα ενεργοποίησης που επίσης περιλαμβάνει κατάλοιπα προς φωσφορυλίωση. Η ενεργοποίηση του CDK συνεπάγεται τη σύνδεση με τις αντίστοιχα κυκλίνες στο C-τερματικό λοβό μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και μέσω της επαγωγής δομικών αλλαγών επιτρέπει την πρόσβαση του ATP στην καταλυτική θέση για φωσφορυλίωση του θρεονίνης. ⁽⁸⁹⁾



Σχήμα 25: Η δομή συγκρυσταλλώσεως του συμπλόκου CDK2-Κυκλίνη A.

Ο ρόλος τους στον κυτταρικό κύκλο:

Η πρωτεΐνη p53, που είναι ένας σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας των σημείων ελέγχου G1/S και G2/M, αλληλεπιδρά με την κυκλίνη B και την CDK1. Με αυτήν την διαδικασία το κύτταρο εισέρχεται στην πρώιμη φάση G1, η οποία εξαρτάται από το μητογόνο και ενεργοποιείται από CDK 4 και 6 που συζεύγνυται με την κυκλίνη D. Μόλις η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ξεπερνά το σημείο περιορισμού, τα μιτογόνα δεν είναι πλέον απαραίτητα για την εξέλιξή του. ⁽⁹⁰⁾ Το σύμπλοκο κυκλίνης D με τις CDK4 και 6 είναι αυτό που πλέον προάγει και εξασφαλίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, φωσφορυλιώνοντας και αναστέλλοντας έτσι το ρετινοβλάστωμα (RB), το οποίο επιτρέπει τη μεταγραφή γονιδίου S-φάσης με τη μεσολάβηση E2F. Το κύτταρο εισέρχεται στη φάση S όπου πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA. Στην συνέχεια το σύμπλοκο κυκλίνης A με τις CDK1, 2 παίζουν ζωτικό ρόλο στη φάση S. ⁽⁹¹⁾ Ορισμένες από τα CDK δεν απαιτούν κυκλίνη για ενεργοποίησή τους. ⁽⁹²⁾

Ο ρόλος τους στις νεοπλασίες:

Οι μεταβολές στους μηχανισμούς που διέπουν τον κυτταρικό κύκλο θεωρούνται «χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου» και οδηγούν σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Επομένως εξαιτίας του πολύ σημαντικού ρόλου που έχουν οι CDK στις εν λόγω διαδικασίες, πρόσφατες έρευνες έχουν καταδείξει ότι η δυσλειτουργία της οδού κυκλίνης D – CDK4/6 – Rb – E2F εμφανίζεται σε πολλά είδη καρκίνου. Ο CDK6 και άλλοι ρυθμιστές της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου είναι γνωστό ότι είναι απορριθμισμένοι σε περισσότερο από 80-90% των όγκων. Η δυσλειτουργία του άξονα κυκλίνης D1: CDK4 / 6 φαίνεται να είναι ένα πρώιμο βήμα στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού, δεδομένου ότι η «υπερέκφραση» της κυκλίνης D1 βρίσκεται συχνά ήδη από το καρκίνωμα του ποδιού και διατηρείται σε μεταστατικές βλάβες.

CDK	Βιολογικός ρόλος	κυκλίνη	καρκίνος
CDK1	Ρύθμιση της φάσης M	B	Μαστού, πνεύμονα, ουροδόχου κύστης
CDK2	Ρύθμιση της φάσης G1-S	E	Μαστού, Μελάνωμα
CDK3	Διόρθωση του DNA	C	Renal, σικώτη, πνεύμονα
CDK4	Ρυθμιστής της φάσης G1	D	Δέρματος, μελάνωμα, μαστού, πνεύμονες κ.

CDK5	Λειτουργία των νευρώνων	P35, P39	Πνεύμονας, νευροβλάστωμα
CDK6	Ρύθμιση της φάσης G1-S	D	Στομάχου, πνεύμονα, μαστού, δέρματος, ουροδόχου κύστης
CDK7	Ενεργοποίηση των CDKs, μεταγωγή σήματος	H	Δέρματος, πνεύμονα.
CDK9	Επαγωγή της ETS2	T	Μαστού, πνεύμονα, Cervical
CDK11	Ανασυνδιασμός του RNA	L	εγκεφάλου, Λαιμού, ουρητήρα, παχέως εντέρου.
CDK12	Επαγωγή του RNA II, διόρθωση του DNA	K	Μελάνωμα, λαιμού, εγκεφάλου πάγκρεας, λέμφωμα, καρκίνωμα.
CDK13	Επαγωγή του RNA II	K	Καρκίνωμα, παχέως εντέρου.

Πίνακας 1: Ο ρόλος των CDK κινασών στις κυτταρικές διεργασίες, η συσχέτιση τους με τις κυκλίνες καθώς και ο ρόλος τους στην ανάπτυξη παθογενειών.

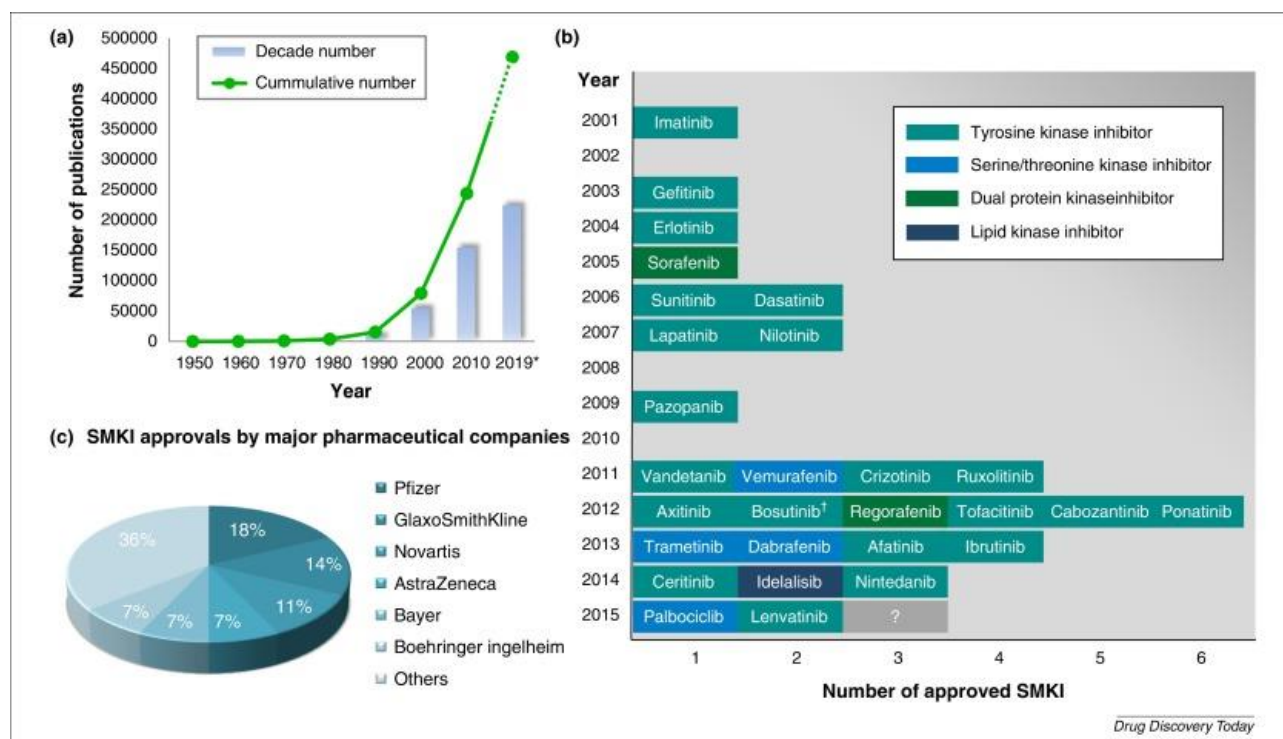
2.4 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.

Όπως αναδείχθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, οι κινάσες διαδραματίζουν κομβικό-καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση μέσω της φωσφορυλίωσης και εμπλέκονται με όλες τις σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου: μεταγωγής σήματος, ρυθμίζουν την απόπτωση, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τις κυτταροσκελετικές αναδιατάξεις, την διαφοροποίηση, την ανάπτυξη, την ανοσολογική απόκριση, την λειτουργία του νευρικού συστήματος, και την μεταγραφή. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, έχουν διαπιστωθεί ότι πολλαπλές ανθρώπινες κακοήθειες (ο καρκίνος, ο διαβήτης, αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές και φλεγμονώδεις ασθένειες καθώς και νευρικές διαταραχές), σχετίζονται με τη διαμόρφωση και τη δυσλειτουργία των πρωτεϊνικών και λιπιδικών κινασών και απενεργοποιημένων φωσφατασών λόγω χρωμοσωμικού ανασχηματισμού και γενετικών μεταλλάξεων. ⁽⁹³⁾

Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι ουσιαστικά μόρια μικρού μοριακού βάρους που αναστέλλουν τη λειτουργία των ενζύμων και χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για μία σειρά παθογενειών. Επίσης, συνιστούν ένα πολύτιμο εργαλείο με το οποίο μπορούν οι ερευνητές να διερευνήσουν τους φυσιολογικούς ρόλους των πρωτεϊνικών κινασών, μέσω της αναστολής της ενδογενούς δραστηριότητας κινάσης σε φυσιολογικά κύτταρα και ιστούς, καθώς και μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές. ⁽⁹⁴⁾

Δεν αποτελεί παράδοξο το γεγονός ότι τόσο η ακαδημαϊκή έρευνα όσο και καινοτόμες βιομηχανίες φαρμάκων έχουν επικεντρωθεί στην προσπάθεια για τον προσδιορισμό των φυσιολογικών και παθολογικών λειτουργιών των μονοπατιών μεταγωγής σήματος των

πρωτεϊνικών κινασών κατά τη διάρκεια των τελευταίων 45 ετών. Η έγκριση -ορόσημο του πρώτου αναστολέα κινάσης, της ιματινίμπης, το 2001 από τον FDA, ακολουθήθηκε από μια αργή αλλά σταθερή έγκριση αναστολέων κινάσης στα πρώτα 10 χρόνια αυτού του αιώνα με σχεδόν μία νέα έγκριση ετησίως κατά μέσο όρο. Ταυτόχρονα, η κατανόησή μας για τα δίκτυα σηματοδότησης κινάσης και την παθολογία ασθενειών αυξήθηκε σταθερά, με αποκορύφωμα την έγκριση 15 νέων αναστολέων κινάσης μικρού μορίου από τον Ιανουάριο του 2012 έως τον Φεβρουάριο του 2015- ένα απaráμιλλο επίτευγμα στην ιστορία της φαρμακευτικής έρευνας. Οι πρωτεϊνικές κινάσες αντιπροσωπεύουν τους πιο ελκυστικούς στόχους για την ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών. Οι έρευνες για την ανάπτυξη αναστολέων κινασών αντιπροσωπεύουν το ένα τέταρτο όλων των τρεχουσών προσπάθειών για την ανάπτυξη φαρμάκων. ⁽⁹⁵⁾



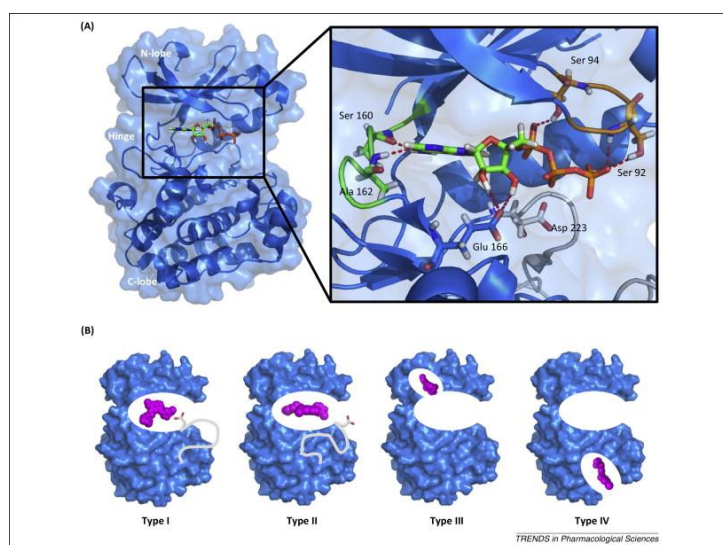
Σχήμα 26: α) οι δημοσιεύσεις σε εγκεκριμένα επιστημονικά περιοδικά που αφορούν τους αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών σε σχέση με την χρονιά. β) Ο αριθμός των εγκεκριμένων αναστολέων ανά χρονιά έγκρισης. γ) Το ποσοστό των εγκρίσεων που έλαβαν φαρμακοβιομηχανίες για αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.

ΣΤΟΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ	ΕΙΔΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	ΦΑΡΜΑΚΟ
ALK	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΝΑΙ	Crizotinib, ceritinib
BCR-ABL	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΟΧΙ	Bosutinib, dasatinib, Imatinib, Nilotinib, ponatinib
EGFR	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΝΑΙ	Gefitinib, erlotinib, lapatinib, vandetanib, afatinib
PDGFR α/β	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΝΑΙ	Axitinib, gefitinib, Imatinib, lenvatinib, nintedanib, pazopanib, regoRafenib, soRafenib, sunitinib
VEGFR	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΝΑΙ	Axitinib, lenvatinib, nintedanib, regoRafenib, pazopanib, soRafenib, sunitinib
c-Met	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΝΑΙ	Crizotinib, cabozantinib
RET	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΝΑΙ	Vandetanib
BTK	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΟΧΙ	Ibrutinib
JAK	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΟΧΙ	Ruxolitinib, tofacitinib
Src	ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΗ	ΟΧΙ	Bosutinib, dasatinib, ponatinib, vandetanib
CDK	ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ	ΟΧΙ	Palbociclib, soRafenib
B-Raf	ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ	ΟΧΙ	VemuRafenib, dabRafenib
MEK1/2	ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ/ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ	ΟΧΙ	Trametinib

Πίνακας 2: Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων που έχουν εγκριθεί από τον FDA σε σχέση με τις πρωτεΐνες-κινάσες στόχους.

2.4.1. Κατηγοριοποίηση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων

Οι Dar και Shokat καθόρισαν τρεις κύριες κατηγορίες αναστολέων πρωτεϊνικής κινάσης, τους οποίους χαρακτήρισαν τους τυπούς I, II και III, ανάλογα με την περιοχή της πρωτεΐνης με την οποία συνδέονται. Με βάση αυτή την κατηγοριοποίηση ως αναστολείς τυπού I ορίζονται τα «μόρια που συνδέεται με τη ενεργή διαμόρφωση της κινάσης στον θύλακα ATP », ως τυπού II τα «μόρια που συνδέεται με μια ανενεργή (συνήθως DFG-OUT) διαμόρφωση μιας κινάσης» και ως τυπού III αναστολείς τα μόρια που συνδέονται με μια περιοχή εκτός του ενεργού κέντρου του ενζύμου (αλλοστερική θέση). Η πρόοδος της έρευνας στην μελέτη των δομών συγκρυστάλλωσης πρωτεϊνών-αναστολέων οδήγησε στο προσδιορισμό αναστολέων που εμφανίζουν παραπάνω συνδυαστική δράση των κύριων κατηγοριών. Ο Zuccotto εισήγαγε τους αναστολείς τυπού I½ ως ενώσεις που συνδέονται με την «περιοχή της αδενίνης όπως οι ενώσεις τυπού I και στη συνέχεια εκτείνονται στην πίσω κοιλότητα της θέσης ATP και εμφανίζουν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα που σχετίζονται με το φαρμακοφόρο τυπού II». ⁽⁹⁶⁾ Στην συνέχεια Ο Γκάβριν και ο Σάγια χώρισαν τους αλλοστερικούς αναστολείς σε δύο κατηγορίες (III και IV) όπου οι αναστολείς τυπού III συνδέονται εντός της σχισμής μεταξύ του μικρού και του μεγάλου λοβού δίπλα στον θύλακα δέσμευσης ATP και οι αναστολείς τυπού IV δεσμεύονται έξω από τη σχισμή, στην περιοχή πρόσδεσης των φωσφορικών. ⁽⁹⁷⁾ Ο Lamba και ο Gosh σημείωσαν μόρια που συνδέονται με δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεϊνικής κινάσης ως αναστολείς τυπού V . Οι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο στόχο χαρακτηρίζονται αναστολείς τυπού V. ⁽⁹⁸⁾

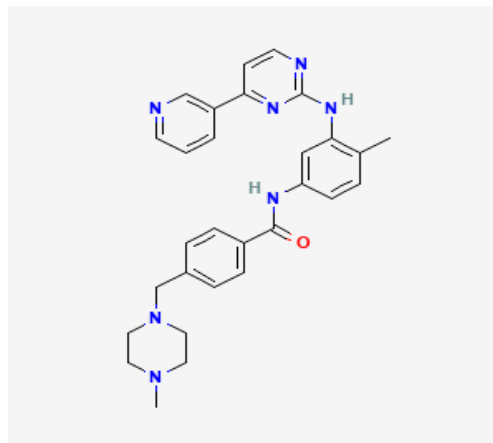


Σχήμα 27: Οι διαφορετικοί τύποι αναστρέψιμων αναστολέων κινάσης μικρού μοριακού βάρους. (Α) Συγκρυσταλλική δομή του PDK1 με ATP (Β) Οι τέσσερις τύποι αναστολέων. Οι αναστολείς τυπού I συνδέονται με την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης Οι αναστολείς τυπού II δεσμεύουν και σταθεροποιούν την ανενεργή

διαμόρφωση της κινάσης Οι αναστολείς τυπού III καταλαμβάνουν έναν αλλοστερικό θύλακα που βρίσκεται δίπλα στον θύλακα δέσμησης του ATP αλλά δεν επικαλύπτεται με αυτόν. Οι αναστολείς τυπού IV συνδέονται με έναν αλλοστερικό θύλακα μακριά από τον θύλακα που δεσμεύει το ATP ⁽⁹⁹⁾

2.4.2. Imatinib

Το Imatinib (Gleevec®, Glivec®) είναι ένας συνθετικός αναστολέας κινάσης τυροσίνης που χορηγείται στη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) και αναπτύχθηκε από εταιρεία NOVARTIS. Εφευρέθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 από τον βιοχημικό Lyndon και από τον χημικό Jürg Zimmermann που τότε εργαζόταν για την Ciba-Geigy (νυν Novartis), και χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ΧΜΛ από τον Brian Druker, έναν ογκολόγο στο Ινστιτούτο Dana-Farber. Η πρώτη κλινική δοκιμή της Ιματινίβης έλαβε χώρα



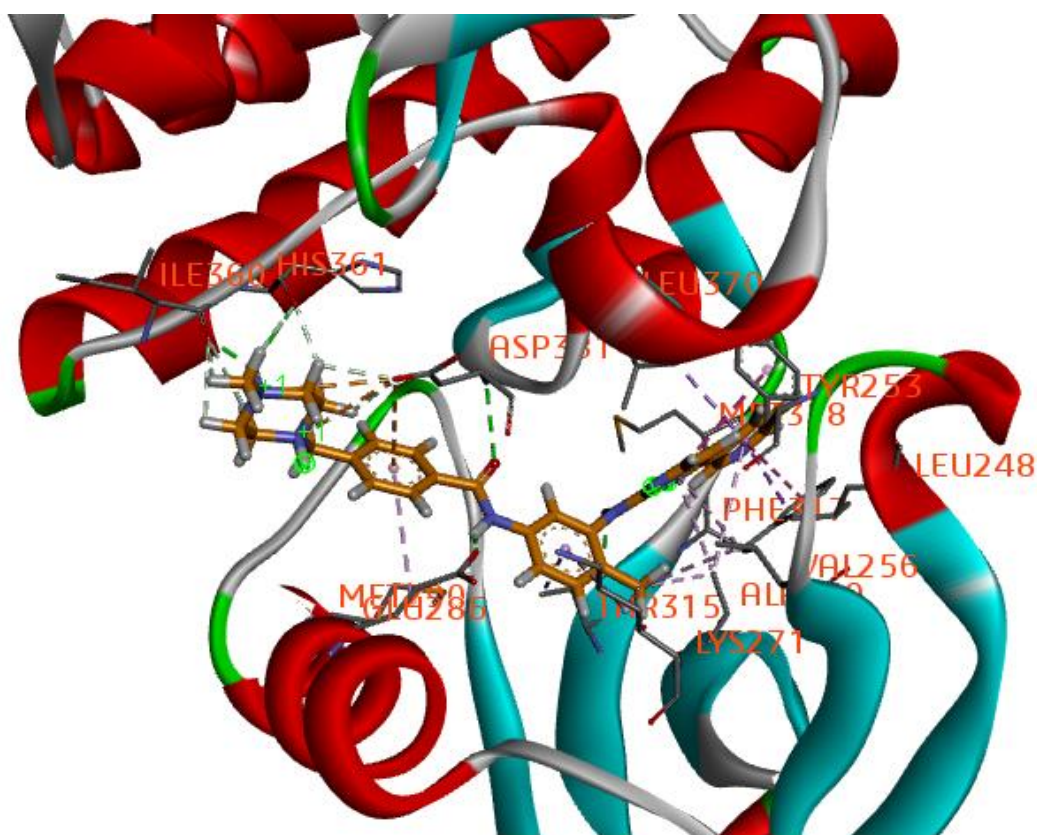
Σχήμα 28: Το Imatinib

το 1998 και το φάρμακο που έλαβε έγκριση από τον FDA το Μάιο του 2001. Μέχρι τον Μάιο του 2001, το Imatinib είχε εισέλθει σε δοκιμές φάσης II για μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, καρκίνο του προστάτη και γλοίωμα. Το Imatinib κυκλοφόρησε σε περισσότερες από 35 χώρες, συμπεριλαμβανομένων των ΗΠΑ, της Βραζιλίας, της Ελβετίας, της Αυστραλίας και του Ηνωμένου Βασιλείου. ⁽¹⁰⁰⁾

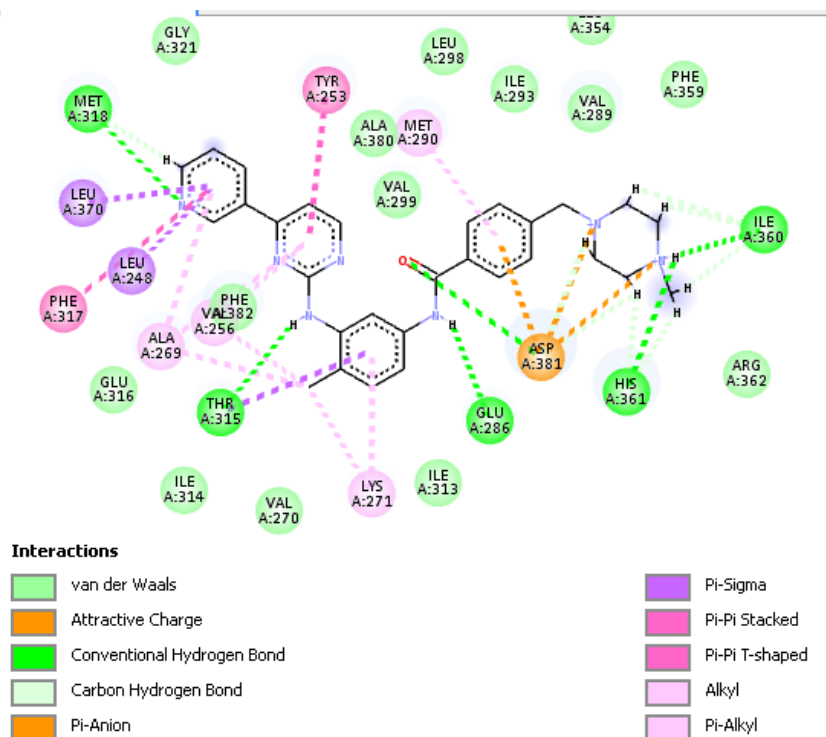
Έχει σχεδιαστεί ειδικά για να αναστέλλει την μεταλλαγμένη χιμαιρική πρωτεΐνη (BCR) - (ABL), που προκύπτει από μία χρωμοσωμική ανωμαλία, γνωστή ως χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια. Η ΧΜΛ οδηγεί σε απορρύθμιση του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών, συμπεριλαμβανομένου και της αύξησης του αριθμού των κοκκωδών λευκοκυττάρων. ⁽¹⁰¹⁾ Το φάρμακο είναι επίσης δραστικό έναντι άλλων μη φυσιολογικών κινάσων τυροσίνης, όπως της c-kit που η απορρύθμιση της οδηγεί σε μεταστατικούς κακοήθους γαστρεντερικούς στρωματιούς όγκους (GIST). ⁽¹⁰²⁾ Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι αναστέλλει υποδοχείς αυξητικού παράγοντα (PDGF) που προέρχονται από αιμοπετάλια. ⁽¹⁰³⁾ Ανάλογα του Imatinib μελετούνται για την θεραπεία μίας σειράς ασθενειών όπως είναι το Πάρκινσον, καρκίνο του προστάτη, μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, κ.ά.

Το Imatinib λειτουργεί ως ανταγωνιστικός αναστολέας του ATP, κλειδώνοντας την πρωτεΐνη στην ανενεργή διαμόρφωση (αναστολέας τυπού II). Συγκεκριμένα, σχηματίζει 5 δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Abl και ένα πλούσιο πλέγμα άλκυλο και π-σίγμα αλληλεπιδράσεων που επιτρέπουν την ισχυρή πρόσδεση του αναστολέα στην πρωτεϊνική κινάση

(Σχήμα 29, 30). Αυτή η διαδικασία σταματάει την ανεξέλεγκτη φωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, κάτι που οδηγεί τελικά σε «διακοπή λειτουργίας» του καταρράκτη σηματοδότησης που προωθεί την λευχαιμογένεση. Το Imatinib αναστέλλει επίσης την πρωτεΐνη Abl των μη-καρκινικών κυττάρων, αλλά τα κύτταρα αυτά έχουν συνήθως πρόσθετες κινάσες τυροσίνης που τους επιτρέπουν να συνεχίσει να λειτουργούν ακόμη και αν κινάση της τυροσίνης Abl ανασταλλεί. ⁽¹⁰⁴⁾ Με την ανάπτυξη του Imatinib και των σχετικών φαρμάκων, αυξήθηκε το ποσοστό επιβίωσης των ανθρώπων που πάσχουν από χρόνια μυελογενή λευχαιμία από 31% το 1993 σε 59% το 2003-2009. ⁽¹⁰⁵⁾



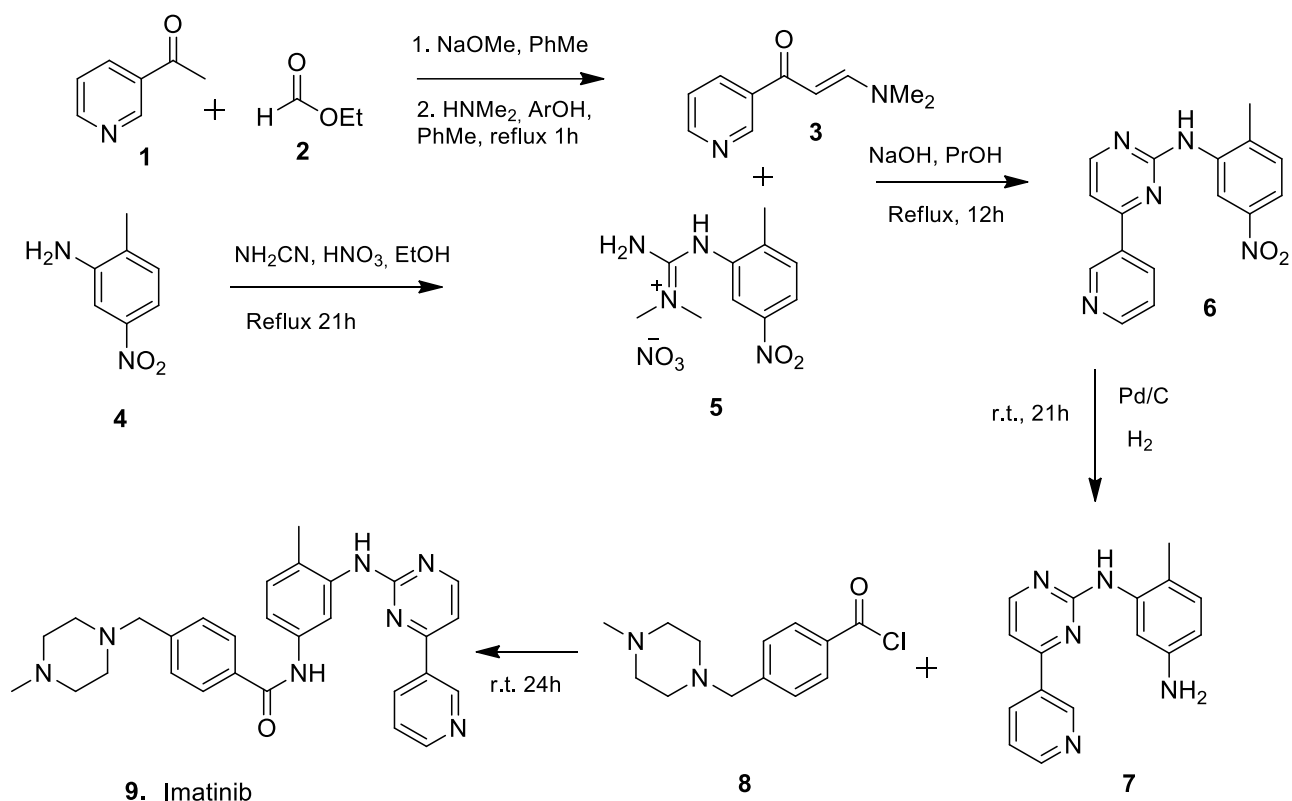
Σχήμα 29: Το Imatinib (πορτοκαλί χρώμα) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου Abl. Με διακεκομμένες γραμμές συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις με το αμινοξέα του ενεργού κέντρου.



Σχήμα 30: Οι αλληλεπιδράσεις του *Imatinib* με το ενεργό κέντρο του ενζύμου της *Abl*. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι δεσμοί υδρογόνου. Με ρόζ οι Π-άλκυλ αλληλεπιδράσεις. Με μοβ οι Π-σίγμα και με καφε οι αλληλεπιδράσεις φορτίου.

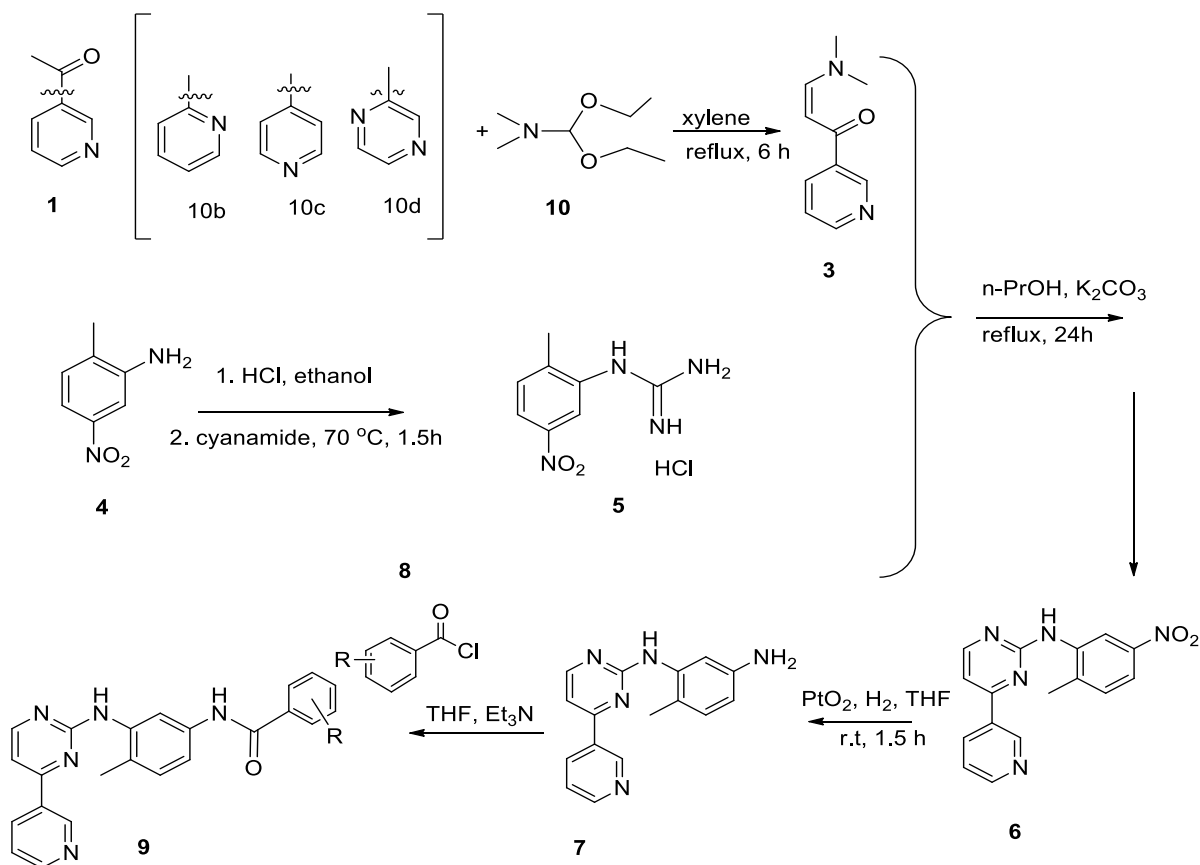
2.4.3. Σύνθεση του Imatinib

Η σύνθεση του *Imatinib* όπως αναπτύχθηκε από τον Zimmerman το 1993 περιλαμβάνει μία συγκλίνουσα συνθετική πορεία 5 σταδίων. Το 1^ο στάδιο αφορά την σύνθεση του παραγώγου της φαινυλογουανιδίνης με την προσθήκη κυαναμιδίου παρουσία ισχυρής βάσης NaOMe. Στο 2^ο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση της εναμιनोंης με την χρήση μεταλλικού νατρίου, 3- ακέτυλο πυριδίνη διμεθυλαμίνη. Το 3^ο Στάδιο περιλαμβάνει μία αντίδραση συμπύκνωσης της εναμιनोंης και του παραγώγου της φαινυλογουανιδίνης παρουσία καυστικού νατρίου και διαλύτη προπανόλη. Στο 4^ο στάδιο πραγματοποιείται η αναγωγή της νιτρο-ομάδας του υποκατεστημένου παραγώγου της 2-αμινοπυριμιдино-πυριδίνης με καταλύτη Pd/C υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. Τέλος, στο 5^ο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση του *Imatinib* με την σύζευξη της ένωσης **7** και **8** με μία αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης σε χλωρίδιο του οξέος για τον σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Ωστόσο, η συνολική απόδοση της συνθετικής πορείας που ανέπτυξε Zimmerman ήταν αρκετά χαμηλή.



Σχήμα 31: Σύνθεση κατά Zimmerman. ⁽¹⁰⁶⁾

Λόγω της μικρής απόδοσης της πορείας που πρότεινε ο Zimmerman αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα των Κ. Σκομπρίδης και Β. Θεοδώρου μία βελτιστοποιημένη πορεία σύνθεσης του Imatinib. Στο στάδιο παρασκευής του αλάτος της γουανιδίνης με την χρήση του κυαναμιδίου και HNO₃ αντικαταστάθηκε με τηγμα κυαναμιδίου χωρίς την χρήση διαλύτη μειώνοντας δραστικά τον χρόνο αντίδρασης από 21h σε 1,5h και αυξάνοντας την απόδοση του προϊόντος **11**. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε το υδροχλωρικό άλας του παραγώγου της ανιλίνης αντί του τοξικού νιτρικού αλάτος που προκύπτει από την πορεία της Novartis. Στο 2^ο στάδιο παρασκευής της εναμιनोंης, η χρήση αντί για μεθυλαμίνη του 1,1-διεθοξυ-*N,N*-διμεθυλαμίνης, αντίστοιχα μείωσε τον χρόνο αντίδρασης και αύξησε την απόδοση της αντίδρασης. Στην συνέχεια στο 3^ο στάδιο η ενώσεις συμπυκνώνονται με την ένωση **11** για τον σχηματισμό της ένωσης **6**. Αντί της ισχυρής βάσης καυστικού νατρίου χρησιμοποιήθηκε το ανθρακικό κάλιο που οδηγώντας σε αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Στο 4^ο στάδιο η αναγωγή της νίτρο ομάδας πραγματοποιήθηκε με την χρήση διοξειδίου της πλατίνης (καταλύτης adams) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει μία αντίδραση σύζευξης για τον σχηματισμό της τελικής ένωσης παρουσία βάσης Et₃N και διαλύτη THF.



Σχήμα 32: Σύνθεση Imatinib κατά Skobridis K, Theodorou V. ⁽¹⁰⁷⁾

2.4.4. Nilotinib

Το Nilotinib, που διατίθεται με την εμπορική ονομασία Tasigna από τη Novartis, είναι ένας αναστολέας τυπού 2, 2^{ης} γενιάς που χορηγείται για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ), τόσο σε αρχικές περιπτώσεις χρόνιας φάσης ΧΜΛ όσο και σε επιταχυνόμενη και χρόνια φάση ΧΜΛ που δεν έχει ανταποκριθεί στο Imatinib. Εγκρίθηκε για ιατρική χρήση αρχικά στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2007.

Παρά τη θετική επίδραση του Imatinib, σχεδόν το 20% των ασθενών που λαμβάνουν το φάρμακο δεν έχουν πλήρη κυτταρογενετική ανταπόκριση, ενώ κάποιοι εμφανίζουν παρενέργειες ή αντοχή στα φάρμακα με την πάροδο του χρόνου. Ένα μέρος των νοσούντων εμφανίζουν απώλεια απόκρισης και μετασχηματισμός σε προχωρημένη νόσο τα πρώτα 3 χρόνια θεραπείας με Imatinib και το ποσοστό συνολικής επιβίωσης είναι φτωχό. Επιπλέον, η υπολειπόμενη νόσος, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με ποσοτική ανάλυση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RQ-PCR) σε πραγματικό χρόνο, είναι μετρήσιμη στους περισσότερους ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με

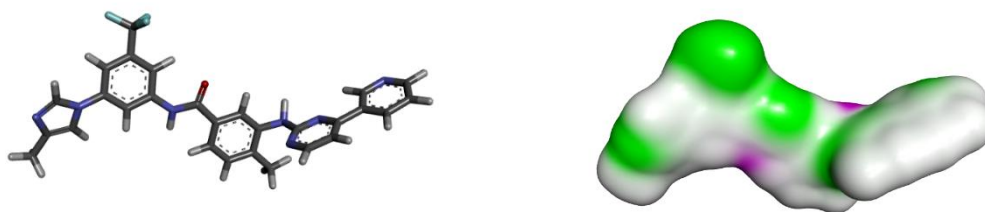
Imatinib. Έτσι, αναπτύχθηκε βελτιωμένη θεραπεία πρώτης γραμμής. ⁽¹⁰⁸⁾

Αυτήν ακριβώς την πρόκληση έρχεται να αντιμετωπίσει η ανακάλυψη του Nilotinib σαν αναστολέας δεύτερης γενιάς της Bcr-Abl. Είναι ένα παράγωγο αμινοπυριμιδίνης που έχει ορθολογικά σχεδιαστεί για να είναι πιο επιλεκτικό κατά της κινάσης τυροσίνης Bcr-Abl σε σχέση με το Imatinib. Όπως και το Imatinib, δρα ανταγωνιστικά ως προς το ATP, προσδένεται στο ενεργό κέντρο και εμποδίζει την πρόσδεση του ATP στην BCR-ABL, αναστέλλοντας έτσι την ενζυμική της δράση. Είναι 10-30 φορές πιο ισχυρό από το Imatinib στην αναστολή της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης BCR-ABL και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που εκφράζουν Bcr-Abl. Επιπλέον, Nilotinib εμφανίζει αποτελεσματική αναστολή για 32 από 33 μεταλλάξεις της ABL-BCR που έχουν χαρακτηριστεί. Εξαίρεση αποτελεί η σημειακή μετάλλαξη T315I. ⁽¹⁰⁹⁾

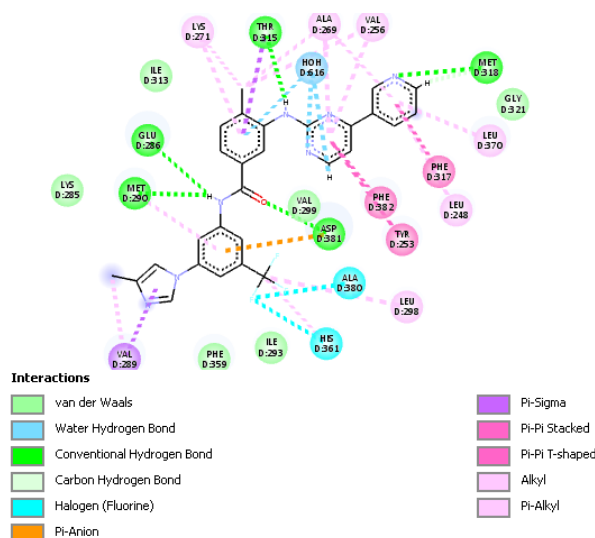
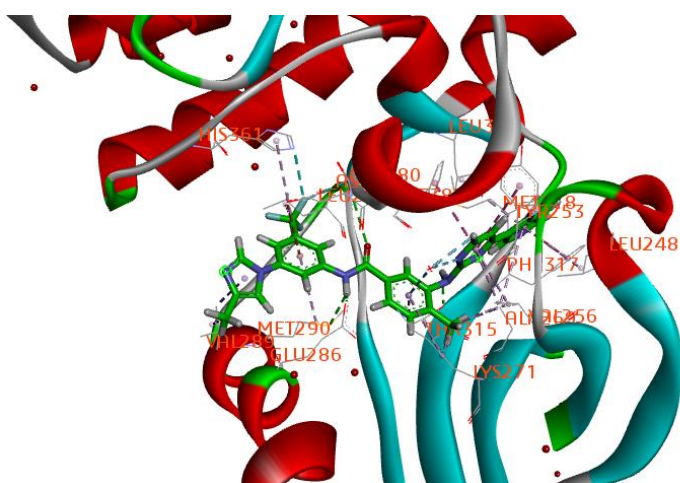
Το Nilotinib έχει μια σειρά από ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως πονοκέφαλο, κόπωση, γαστρεντερικά προβλήματα όπως ναυτία, έμετος, διάρροια και δυσκοιλιότητα, πόνους στους μύες και τις αρθρώσεις, εξάνθημα και άλλες δερματικές παθήσεις, συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη και μειωμένο αριθμό αιμοσφαιρίων. Λιγότερο τυπικές παρενέργειες είναι αυτές του καρδιαγγειακού συστήματος, όπως υψηλή αρτηριακή πίεση, διάφοροι τυπικοί αρρυθμιών. Μπορεί επίσης να επηρεάσει την ισορροπία των ηλεκτρολυτών και της γλυκόζης του σώματος.

Το Nilotinib αναστέλλει τις κινάσες BCR-ABL, KIT, LCK, EphA3, EphA8, DDR1, DDR2, PDGFRB, MAPK11 και ZAK. Δομικά σχετίζεται με το Imatinib. χρησιμοποιείται στη θεραπεία πρώτης γραμμής των γαστρεντερικών στρωματικών όγκων. Η χρήση χαμηλών δόσεων Nilotinib ερευνάται για την θεραπεία της νόσου του Parkinson, και της νόσου του Alzheimer, καθώς και για την ALS, την άνοια και την νόσο του Huntington. ⁽¹¹⁰⁾

Το Nilotinib είναι ένα μόριο μικρού μοριακού βάρους πλούσιο σε ομάδες δέκτες και δότες δεσμών υδρογόνου (σχήμα 33). Σχηματίζει συνολικά 4 δεσμούς υδρογόνου, έναντι 5 του Imatinib, με αμινοξέα του ενεργού κέντρου της κινάσης c-Abl. Ωστόσο σχηματίζει πρόσθετες αλληλεπιδράσεις αλογόνου εξαιτίας της τριφθόρο-μέθυλο ομάδα που αυξάνουν συνολικά την ανασταλτική δράση του μορίου. Εμφανίζει συνολικά καλύτερη στερική συμπληρωματικότητα με το ενεργό κέντρο του ενζύμου της κινάσης c-Abl (σχήμα 34).



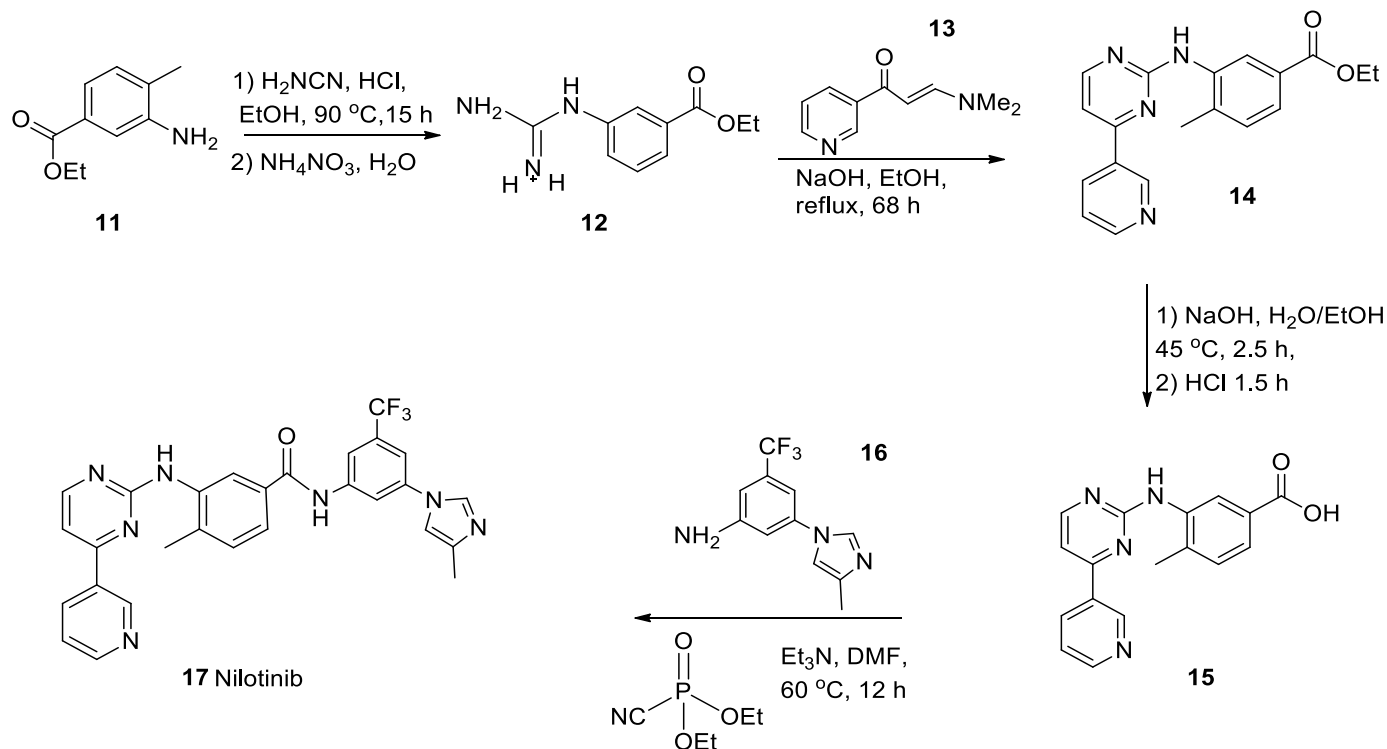
Σχήμα 33: Στα δεξιά απεικονίζεται η τρισδιάστατη δομή του Nilotinib και στα αριστερά η επιφάνεια δεσμών υδρογόνου. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές που περιέχουν ομάδες-δέκτες δεσμών υδρογόνου ενώ με μωβ χρώμα οι περιοχές με δότες δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 34: Δεξιά απεικονίζεται η δομή συγκρυστάλωσης του Nilotinib (πράσινο χρώμα) με το ενεργό κέντρο του ενζύμου Abl. Με διακεκομμένες γραμμές συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις με το αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Αριστερά απεικονίζεται το δυσδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του Nilotinib με το ενεργό κέντρο του ενζύμου της Abl. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι δεσμοί υδρογόνου. Με ρόζ οι Π-άλκυλ αλληλεπιδράσεις. Με μωβ οι Π-σίγμα και με καφέ οι αλληλεπιδράσεις φορτίο.

2.4.5. Σύνθεση του Nilotinib

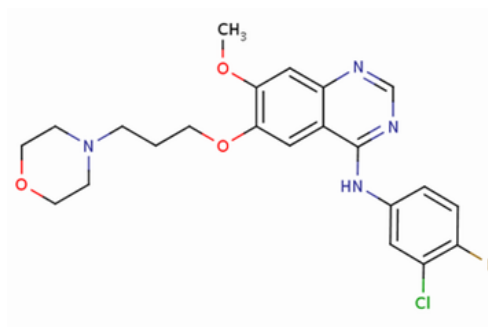
Η σύνθεση του Nilotinib όπως προτάθηκε από την εταιρεία Novartis περιλαμβάνει μία συνθετική πορεία τεσσάρων σταδίων. Το 1^ο στάδιο αφορά την σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος παραγώγου φαινυλογουανιδίνης με την προσθήκη κυαναμιδίου παρουσία υδροχλωρίου. Το 2^ο στάδιο περιλαμβάνει την συμπύκνωση του άλατος της γουανιδίνης με την εναμινόνη **13** για τον σχηματισμό του εστέρα **14**. Στο 3^ο στάδιο πραγματοποιείται η υδρόλυση της ένωσης **14** προς τον σχηματισμό της ένωσης **15**. Το τελικό στάδιο αφορά μία αντίδραση σύζευξης του **15** με το **16** με τον σχηματισμό αμιδικού δεσμού.



Σχήμα 35: Η σύνθεση του Nilotinib όπως προτάθηκε από την Novartis ⁽¹¹¹⁾

2.4.6 Gefitinib

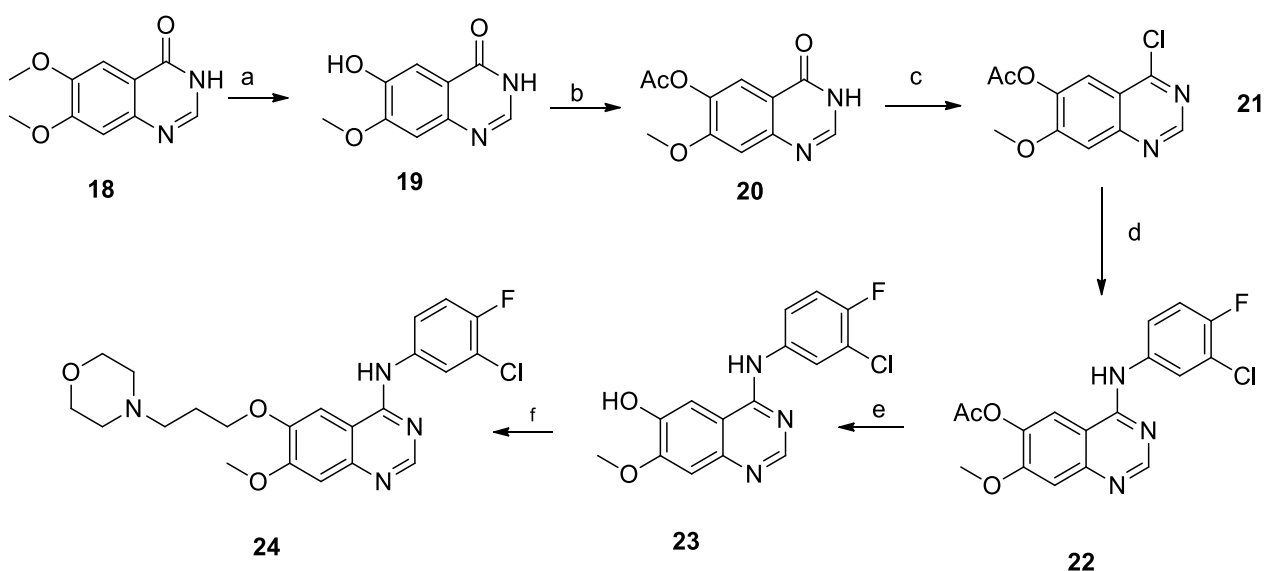
Το Gefitinib (Iressa®, ZD1839), είναι ένας δια στόματος χορηγούμενος αναστολέας κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Εγκρίθηκε το Μάιο του 2003 για τους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC)⁽⁹²⁾. Έρευνες έχουν δείξει ότι στα κύτταρα ορισμένων τύπων ανθρώπινων καρκινωμάτων υπερεκφράζεται ο EGFR, όπως είναι για παράδειγμα ο καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού. Η υπερέκφραση αυτή που οφείλεται στην μετάλλαξη του γονιδίου οδηγεί σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του αντιαποπτωτικού Ras καταρράκτη σηματοδότησης, οδηγώντας τελικά σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το Gefitinib αναστέλλει τον EGFR με την πρόσδεση του στη θέση πρόσδεσης του ATP του ενζύμου. Έτσι η μεταγωγής σήματος στον Ras καταρράκτη αναστέλλεται, και τα κακοήγη κύτταρα πεθαίνουν ⁽¹¹²⁾, ⁽¹¹³⁾.



Σχήμα 36: Η δομή του Gefitinib.

2.4.7.Σύνθεση του Gefitinib

Η σύνθεση του Gefitinib όπως προτάθηκε από τον Gibson και τους συνεργάτες του περιλαμβάνει 6 στάδια. Το 1^ο στάδιο αφορά την υδρόλυση της αιθερικής ομάδας για τον σχηματισμό του **19**. Το 2^ο στάδιο την προστασία της υδροξυλομάδας με την χρήση οξικού ανυδρίτη. Στο 3^ο στάδιο παραλήφθηκε το προϊόν **21** με την προσθήκη θειονυλο χλωριδίου και διαλύτη DMF. Στην συνέχεια πραγματοποιείται μία πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με την 3-χλωρο-4-φθορο ανιλίνη για τον σχηματισμό της ένωσης **22**. Στο 5^ο στάδιο πραγματοποιείται η αποπροστασία της υδροξυλομάδας με πυκνή υδατική αμμωνία. Το τελικό στάδιο αφορά την σύζευξη της ένωσης **23** με την ένωση N-μορφολινοπροπυλο-χλωρίδιο (Σχήμα 37).

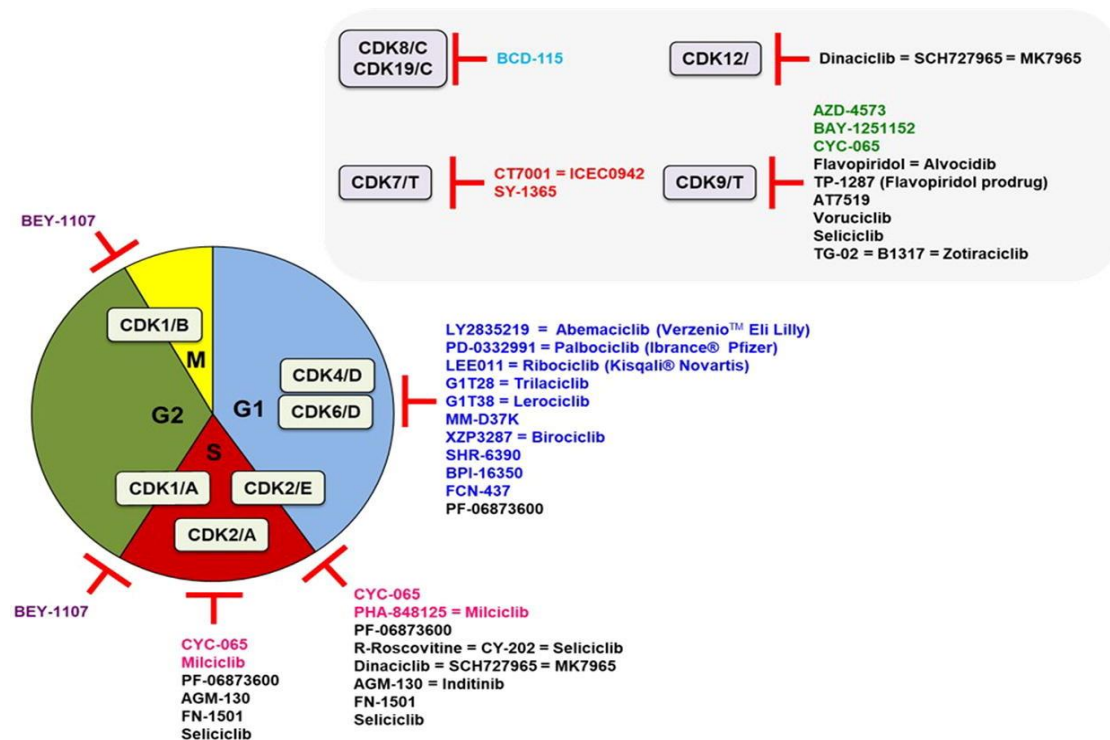


Σχήμα 37: Σύνθεση κατά Gibson. a) $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ L-μεθυονίνη b) πυριδίνη, οξικός ανυδρίτης c) θειονυλο χλωρίδιο, DMF d) 3-χλωρο-4-φθορο ανιλίνη, DIPEA και IPA e) υδροξύδιο του αμμωνίου και μεθανόλη f) DMF/ανθρακικό νάτριο και N-μορφολινοπροπυλο-χλωρίδιο. ⁽¹¹⁴⁾

2.5. Αναστολείς CDK κινασών.

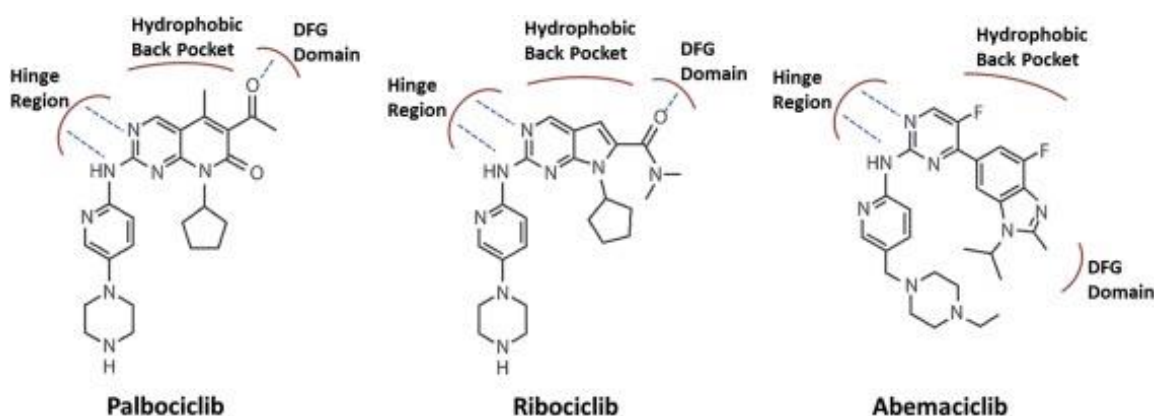
Όπως αναφέραμε στο κεφάλαιο 2.3.3., η οικογένεια των CDK κινασών διαδραματίζει εξέχοντα ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση και στην επαγωγή του κυτταρικού κύκλου, επηρεάζοντας όλες τις βασικές λειτουργίες του κυττάρου. Η απορρύθμιση τους σχετίζεται με μία σειρά ασθενειών. Αυτά τα χαρακτηριστικά τους καθιστούν ελκυστικούς στόχους για την ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Τα τελευταία χρόνια συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων παγκοσμίως, αλλά και καινοτόμων φαρμακευτικών εταιριών (Astra Zeneca, Novartis κ.ά/). Οι ερευνητικές προκλήσεις για εκλεκτική επιδιόρθωση της ανώμαλης ενδοκυτταρικής σηματοδότησης κινάσης, την χαμηλή κυτταροτοξικότητα και την ασθενή αναστολή των πρωτεϊνικών στόχων, παρά την σημαντική πρόοδο που έχει σημειωθεί στο εν λόγω πεδίο, παραμένουν ζητούμενα.

Προκλινικά στοιχεία που έδειξαν τον ρόλο της οδού κυκλίνης D-CDK4/6-p16-Rb στην ανάπτυξη νεοπλασιών οδήγησαν στην ανάπτυξη μιας πρώτης γενιάς αναστολέων ran-CDK ευρείας δράσης. Ο πρώτος αναστολέας που προάχθηκε σε κλινικές δοκιμές ήταν η φλαβοπιριδόλη. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν χαμηλή αποτελεσματικότητα, πολύπλοκη φαρμακοκινητική (PK) και υψηλή τοξικότητα λόγω χαμηλής εκλεκτικότητας στις πρωτεΐνες στόχους. Την δεκαετία του 1990, αρχές της δεκαετίας του 2000 αναπτύχθηκαν αναστολείς CDK δεύτερης γενιάς, με εκλεκτική αναστολή στις CDK1 και CDK2 και αυξημένη δραστηριότητα (dinaciclib, AT7519, R547, SNS-032, BMS-387032, AZD5438, AG-024322). Το πιο αποτελεσματικό αποδείχθηκε το dinaciclib, ένας αναστολέας των CDK1, CDK2, CDK5 και CDK9, που μελετήθηκε εκτενέστερα σε επόμενες κλινικές μελέτες. Ωστόσο, οι δοκιμές Φάσης II έδειξαν περιορισμένη αποτελεσματικότητα (Στην φάση I, το 60% των ασθενών παρουσίασαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες στην φάσης II το ποσοστό αυξήθηκε στο 74%.) Πιο πρόσφατα, αναστολείς ειδικοί για CDK4 και CDK6 εισήλθαν σε κλινικές δοκιμές δίνοντας σημαντικά αποτελέσματα. Οι αναστολείς δεν σταματούν τη δράση CDK2, αποφεύγοντας την αναστολή της γενικής δραστηριότητας της φάσης S, επιτρέποντας την στοχευόμενη δράση σε καρκινικά κύτταρα που εντοπίζεται μία υπερδραστηριότητα των CDK4/6. (σχήμα 38, 39, 40)

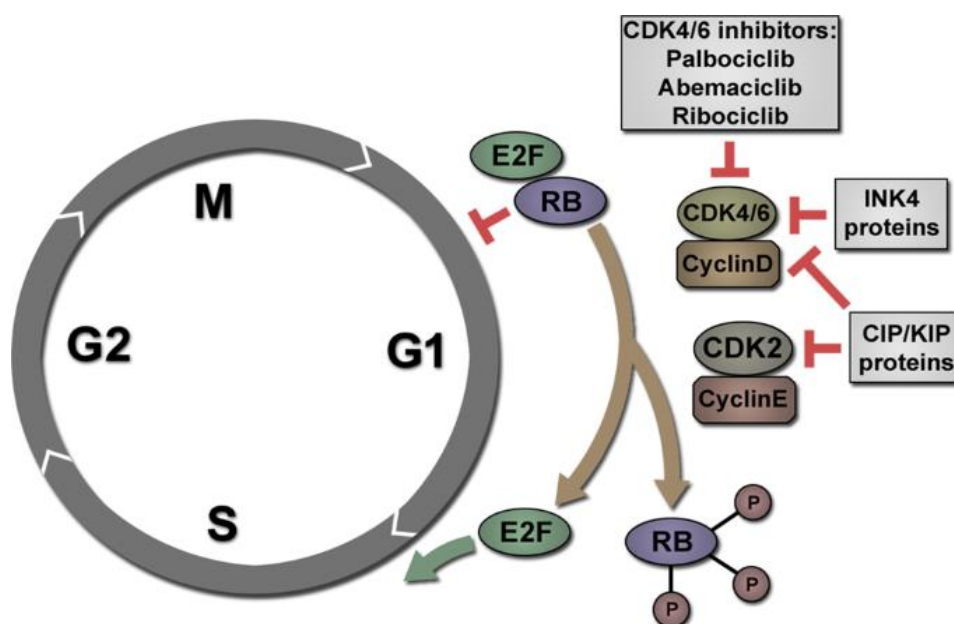


Σχήμα 38: Οι αναστολείς των CDK κινασών που αναπτύχθηκαν, ανάλογα με την πρωτεΐνη στόχο και την φάση του κυτταρικού κύκλου την οποία αναστέλλουν. ⁽¹¹⁵⁾

Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί και εγгриθεί από τον FDA τρεις επιλεκτικοί αναστολείς CDK4/6: Το Ribociclib (LEE011, Novartis), το palbociclib (Ibrance®; PD-0332991; Pfizer), και το abemaciclib (LY-2835219, Eli Lilly). Το Palbociclib σε συνδυασμό με την λετροζόλη ή Το fulvestrant έχει αποδείξει αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού HR+ και έχει εγκριθεί στις ΗΠΑ και την Ευρώπη για χρήση με αυτούς τους συνδυασμούς. Το abemaciclib έχει δείξει αποτελεσματικότητα ως μεμονωμένος παράγοντας και σε συνδυασμό με ενδοκρινικές θεραπείες σε ασθενείς με HR+ ABC, και έχει εισέλθει στη φάση III ανάπτυξης, από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA). ^{(116), (117)}



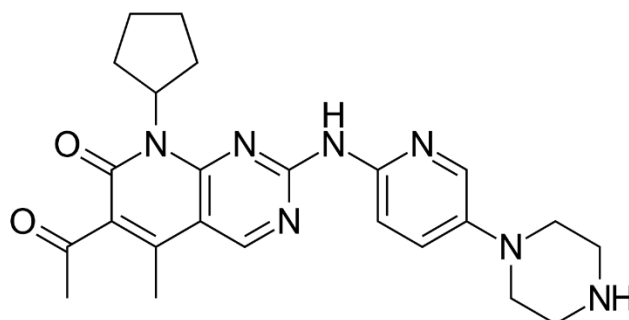
Σχήμα 39: Οι εκλεκτικοί αναστολείς, δεύτερης γενιάς CDK4/6, Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib, που εγκρίθηκαν από τον FDA για την αντιμετώπιση ασθενειών που αυτές επάγουν. ⁽¹¹⁸⁾



Σχήμα 40: Η δράση των CDK4/6 αναστολέων. Με την αναστολή της δράσης των πρωτεϊνικών κινασών CDK4/6 σταματάει η φωσφορυλίωση του RB και διακόπτεται η επαγωγή της φάσης G1/S με αποτέλεσμα να οδηγούνται τα καρκινικά κύτταρα σε θάνατο. ⁽¹¹⁹⁾

2.5.1. Palbociclib:

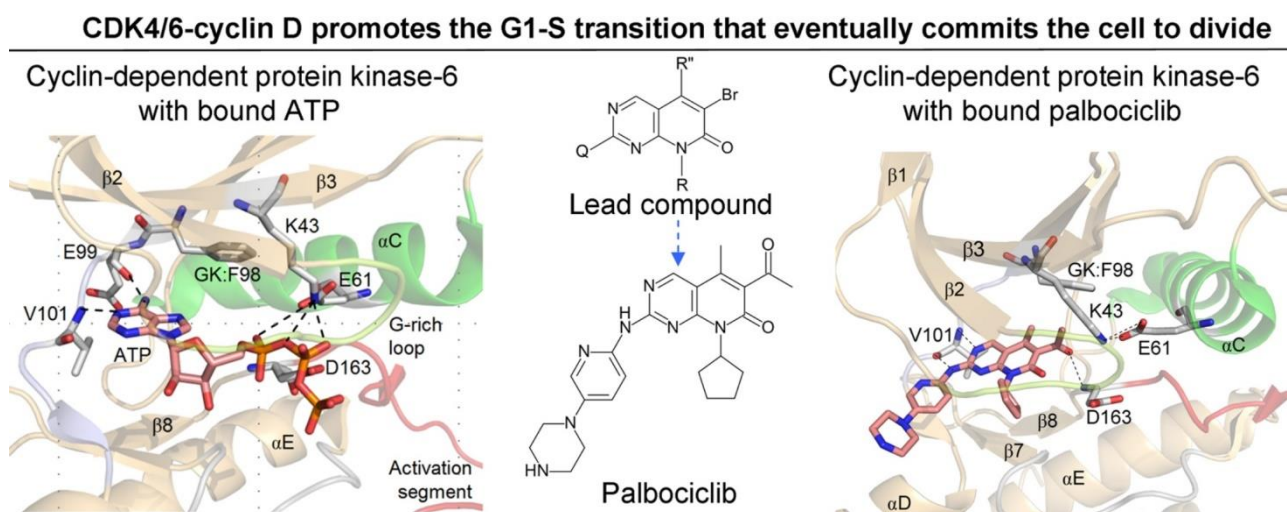
Το Palbociclib, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της ενδοκρινικής ανθεκτικότητας MBC σε συνδυασμό με Ετραζόλη, λαμβάνοντας υπόψη την αποτελεσματικότητά τους στην παράταση της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη (PFS), την αύξηση του ποσοστού κλινικού οφέλους (CBR) και του ποσοστού ανταπόκρισης (RR). Το Palbociclib (Ibrance, Pfizer) είναι ένας δια στόματος βιοδιαθέσιμος μικρομοριακός αναστολέας με υψηλό επίπεδο εκλεκτικότητας για CDK4 και CDK6 έναντι άλλων κινασών εξαρτώμενες από κυκλίνη, που ρυθμίζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.



Σχήμα 41: Η δυσδιάστατη δομή του Palbociclib.

Οι CDK 4/6 όταν ενεργοποιούνται από την έκφραση των κυκλινών τυπού D, ξεκινούν τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης καταστολής όγκου του ρητινοβλαστώματος (pRb), με επακόλουθη απελευθέρωση παραγόντων μεταγραφής από την οικογένεια E2F. Αυτοί οι παράγοντες

συντονίζουν ένα μονοπάτι γονιδιακής έκφρασης που απαιτείται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, της αντιγραφής του DNA και της μίτωσης. Οι αναστολείς CDK 4/6 εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση του CDK 4/6, οδηγώντας σε υποφωσφορυλίωση του pRb και παρεμποδίζουν έτσι την ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής, απαραίτητους για την είσοδο στη φάση S. Καθορίζουν επίσης τη διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, αποτρέποντας τη σύνθεση του DNA που απαιτείται για την κυτταρική αντιγραφή. ^{(120), (121)}



Σχήμα 42: Αριστερά επεικονίζεται το ATP στο ενεργό κέντρο της CDK-6 κινάσης, ενώ δεξιά το Palbociclib ως ανταγωνιστικός αναστολέας ⁽¹²²⁾.

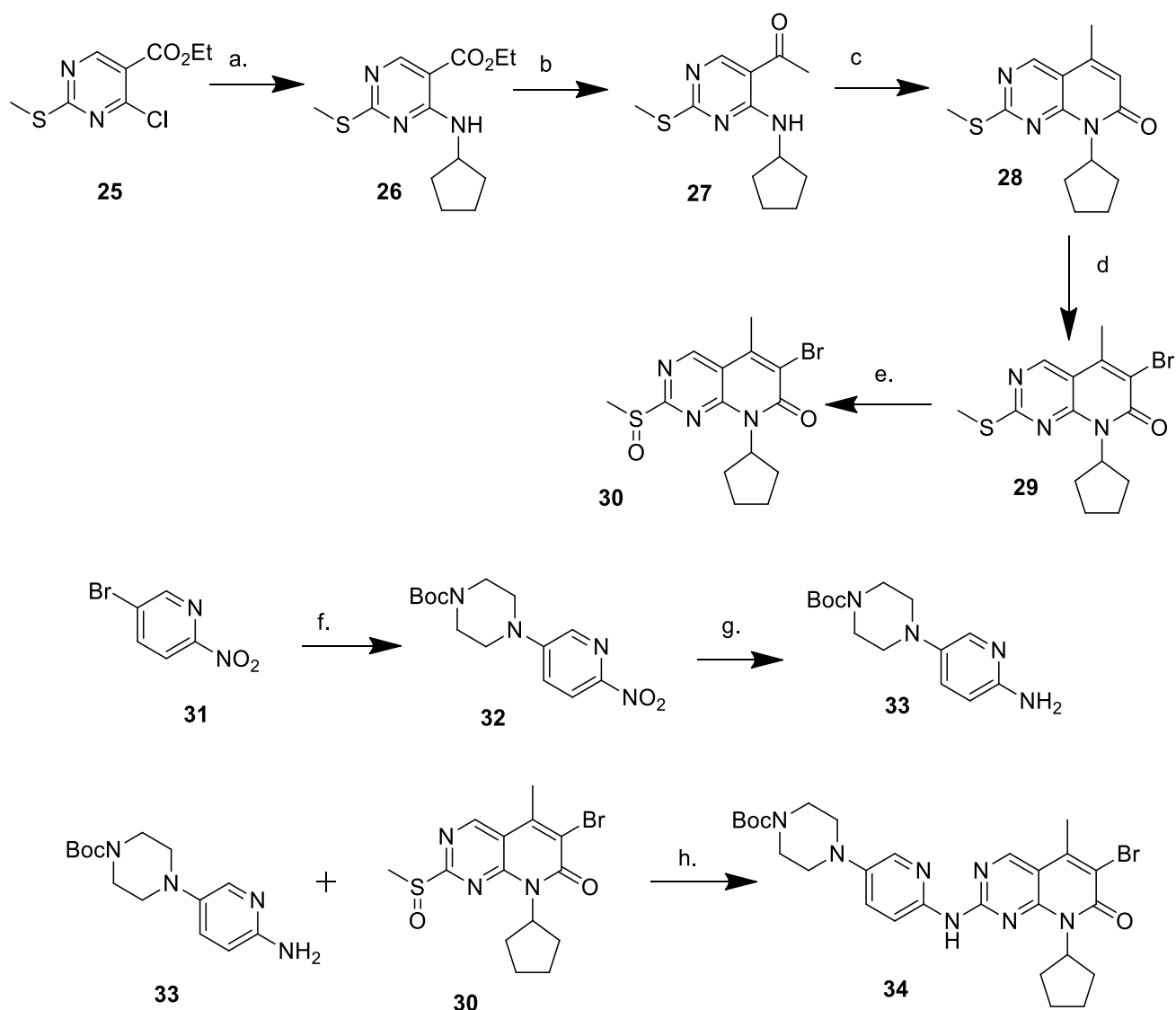
Σε κλινικές μελέτες φάσης II στην οποία συμμετείχαν ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσμένο μεταστατικό καρκίνο του μαστού θετικού σε HR και του Her 2-αρνητικού, το Palbociclib σε συνδυασμό με λετροζόλη συσχετίστηκε με σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση του ασθενούς χωρίς να παρατηρηθεί εξέλιξη του όγκου σε σχέση με τη μονοθεραπεία με Λετροζόλη. Η δοκιμή PALOMA3 αξιολόγησε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού Palbociclib και Fulvestrant σε προεμμηνοπαυσιακές ή μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού θετικού σε ορμονικούς υποδοχείς, που προχώρησε κατά τη διάρκεια προηγούμενης ενδοκρινικής θεραπείας. Τον Μάρτιο του 2017, ο FDA χορήγησε τακτική έγκριση στο palbociclib για ασθενείς με καρκίνο του μαστού θετικούς στον ορμονικό υποδοχέα (HR), αρνητικό προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού στον υποδοχέα ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (Her2), σε συνδυασμό με έναν αναστολέα αρωματάσης. ⁽¹²³⁾

Η πλειονότητα των ασθενών που λαμβάνουν Palbociclib εμφανίζουν ουδετεροπενία, μια κατάσταση κατά την οποία ένας ασθενής έχει ασυνήθιστα χαμηλό αριθμό ουδετερόφιλων. Αυτή η παρενέργεια επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα και, επομένως, είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη

δεύτερη πιο συχνή ενέργεια, τη συχνή μόλυνση. Η λευκοπενία και η αναιμία είναι επίσης συχνές μεταξύ των ασθενών που λαμβάνουν Palbociclib. Περισσότερο από το 10% των ασθενών εμφανίζουν επίσης ανεπιθύμητες ενέργειες όπως κόπωση, ναυτία, διάρροια, λοίμωξη του αναπνευστικού, πονοκέφαλο, θρομβοπενία, έμετο και μειωμένη όρεξη. Ο FDA υποδεικνύει επίσης ότι οι ασθενείς πρέπει να είναι σε εγρήγορση για να παρακολουθούν τον εαυτό τους για τυχόν σημάδια πνευμονικής εμβολής. Ο FDA προειδοποιεί περαιτέρω ότι οι γυναίκες πρέπει να γνωρίζουν ότι το φάρμακο μπορεί να έχει επιβλαβή επίδραση σε ένα έμβρυο, και επομένως δεν πρέπει να λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. ^{(124), (125), (126)}

2.5.2. Σύνθεση του Palbociclib

Η συνθετική πορεία έτσι όπως προτείνεται από την εταιρεία περιλαμβάνει 8 στάδια. Ξεκινάει με την πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση της κυκλοπεντιλαμίνης στην αρχική ένωση **25**. Στην συνέχεια ακολουθεί μία αντίδραση αναγωγής της εστερομάδας και ακολούθως μία αντίδραση Grignard για τον σχηματισμό της κετόνης **27**. Στο 3^ο στάδιο με την προσθήκη $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{COOEt}$ παρελήφθησαν η ένωση **28**. Το 4^ο στάδιο αφορά μία αντίδραση εισαγωγής βρωμίου με την χρήση NBS. Ο σχηματισμός του ενδιάμεσου προϊόντος **30**, ήτοι του σουλφοξειδίου πραγματοποιείται με την οξείδωση του σουλφιδίου της ένωσης **29**. Στην συνέχεια το ενδιάμεσο προϊόν **33** παρελήφθηκε με μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης του **31** με boc-πιραζίνη και την αναγωγή της νιτρο-ομάδας της ένωσης **29** (Σχήμα 43).

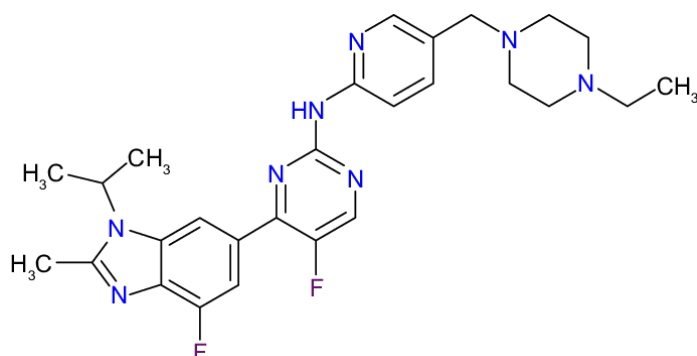


Σχήμα 43: α) κυκλοπεντυλαμίνη, Et₃N, THF, 76%; β) 1. LiAlH₄, THF; 2. MnO₂, DCM; 3. MeMgBr, THF; 4. TPAP, NMO, 59% (4 στάδια); γ) (EtO)₂P(O)CH₂COOEt, NaH, THF, 66%; δ) NBS, DMF, 66%; ε) Αντιδραστήριο Davis, DCM, 78%; ς) 1. πιπεραζίνη, TBAI, K₂CO₃, DMSO; 2. Boc₂O, NaHCO₃, THF, H₂O, 62% (2 στάδια) ή Boc-πιπεραζίνη, Et₃N, DMSO, 79%; ζ) H₂ (50 psi), Ni-Raney, MeOH, 83% ή 20% Pd(OH)₂/C, H₂, iPrOH, 84%; 2. toluene, reflux, 38%; η) 1. τριβούτυλ(1-εθοξυβινυλ)κασίτερος, Pd(PPh₃)₄, toλουόλιο, 80%; 2. HCl(g), DCM, 91%.

2.5.3 Abemaciclib

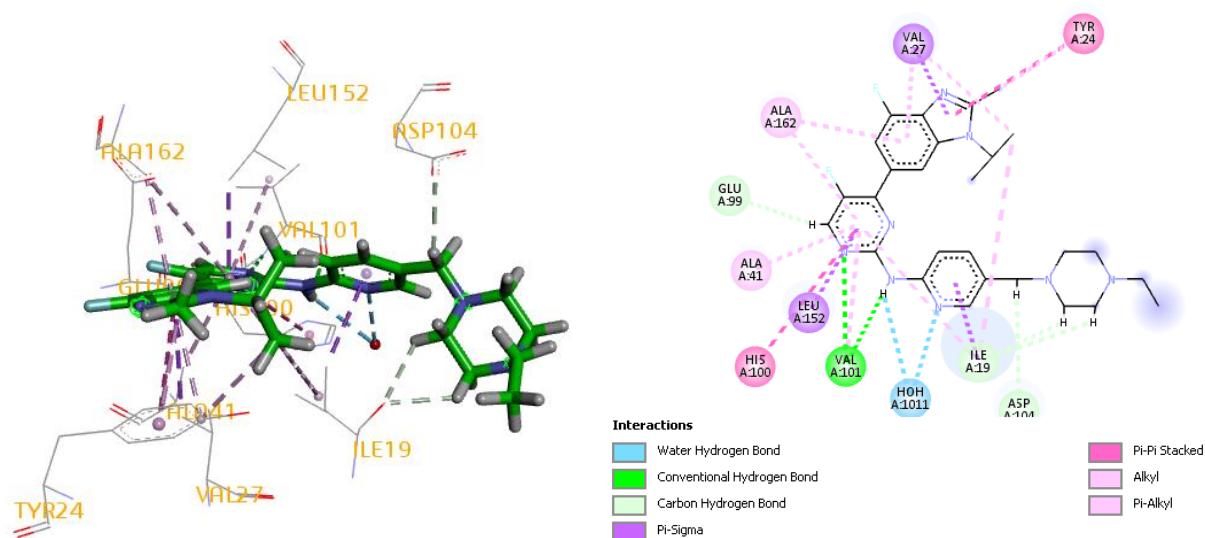
Το Abemaciclib είναι ο τρίτος βιοδιαθέσιμος από το στόμα αναστολέας μικρού μοριακού βάρους των CDK4 και CDK6 που προχώρησε με επιτυχία από την προκλινική, στην κλινική φάση. Είναι δομικά διαφορετικό από το Palbociclib και το Ribociclib, καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για το CDK4 in vitro. Η in vitro και in vivo δραστηριότητα του Abemaciclib σε μοντέλα ανθρώπινου καρκίνου του μαστού HR+ χαρακτηρίστηκε πρόσφατα, ότι μειώνει τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Rb και συνολικά τον παρατηρούμενο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, πιο αποτελεσματικά σε σχέση με το Palbociclib. Μια ακόμα σημαντική διαφοροποίηση αποτελεί το γεγονός ότι ενώ η αναστολή του κυτταρικού κύκλου βρέθηκε να εξαρτάται από την πρωτεΐνη Rb, τόσο στο abemaciclib όσο και στο Palbociclib, το Abemaciclib επάγει κυτταρικό θάνατο σε κύτταρα με έλλειψη Rb. ⁽¹²⁶⁾

Η θεραπεία των καρκινικών κυττάρων του μαστού ER+ οδήγησε επίσης σε απόκριση γήρανσης, όπως υποδεικνύεται από τη συσσώρευση β-γαλακτοσιδάσης, το σχηματισμό εστιών ετεροχρωματίνης που σχετίζονται με τη γήρανση και τη μείωση των θετικών FOXM1 κυττάρων. Η συνεχής έκθεση στο Abemaciclib άλλαξε τον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού προκαλώντας απόπτωση. Σε ένα μοντέλο ξеноμοσχεύματος καρκίνου του μαστού ER+, η μονοθεραπεία με abemaciclib προκάλεσε υποχώρηση της ανάπτυξης του όγκου. Συνολικά αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το Abemaciclib είναι ένας αναστολέας CDK4 και CDK6 που, ως μεμονωμένος παράγοντας, αναστέλλει την εξέλιξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού και μετά από μακροχρόνια θεραπεία, μπορεί να οδηγήσει σε παρατεταμένες αντικαρκινικές επιδράσεις μέσω της πρόκλησης γήρανσης, απόπτωσης και μεταβολής του κυτταρικού μεταβολισμού. ^{(127), (128)}.



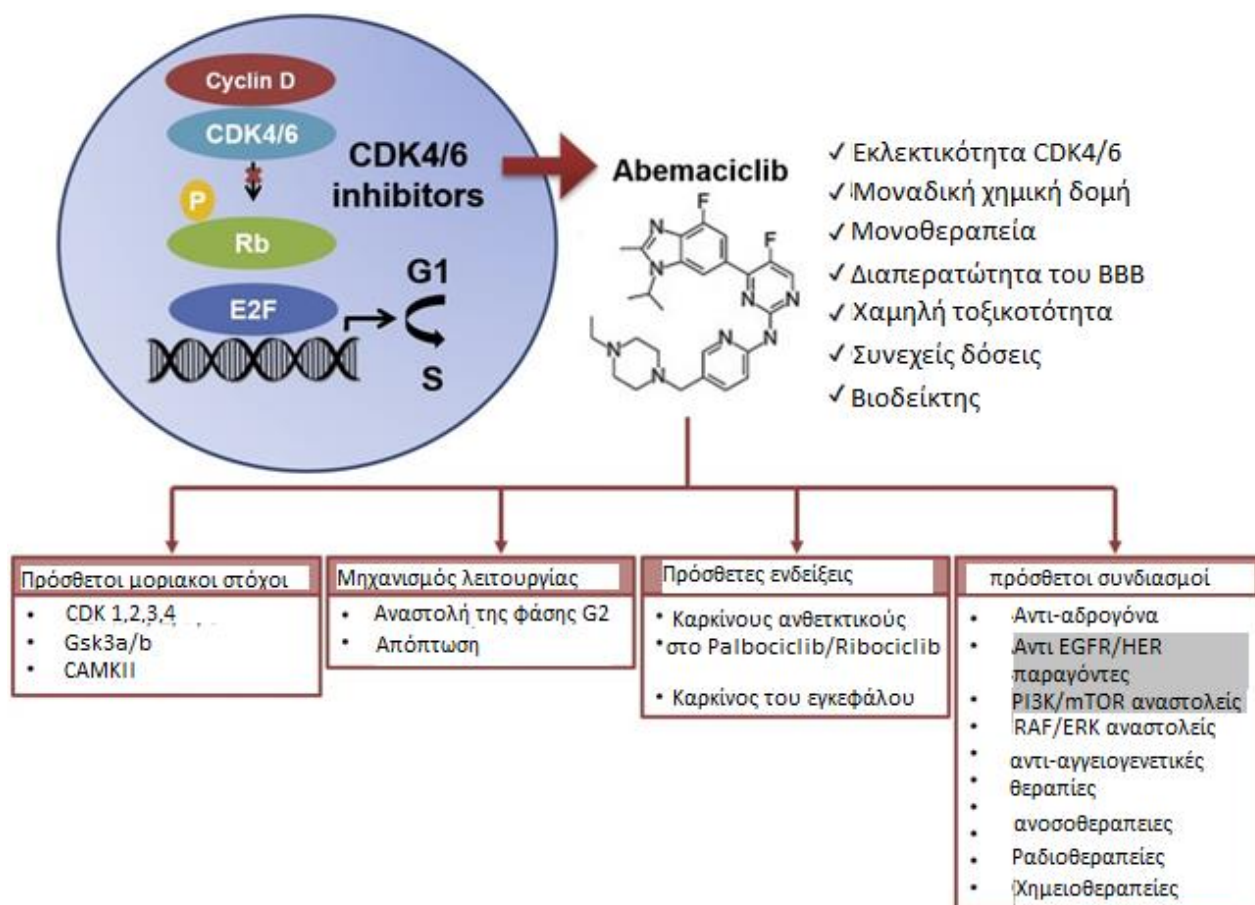
Σχήμα 44: Η δυσδιάστατη δομή του Abemaciclib

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίστηκαν στο 20% ή περισσότερους των ασθενών ήταν διάρροια, ναυτία και έμετος, λευκοπενία (χαμηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων) συμπεριλαμβανομένης της ουδετεροπενίας, αναιμία (χαμηλός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων), θρομβοπενία (χαμηλός αριθμός αιμοπεταλίων), πόνος στο στομάχι, λοιμώξεις, κόπωση, μειωμένη όρεξη και πονοκέφαλος. ⁽¹²⁹⁾



Σχήμα 45: Αριστερά απεικονίζεται η δομή συγκρυστάλλωσης του *Abemaciclib* (πράσινο χρώμα) με το ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK-6. Με διακεκομμένες γραμμές συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις με το αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Δεξιά απεικονίζεται το δυσδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του *Abemaciclib* με το ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK-6. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι δεσμοί υδρογόνου. Με ρόζ οι Π-άλκυλ αλληλεπιδράσεις. Με μωβ οι Π-σίγμα και με καφέ οι αλληλεπιδράσεις φορτίο.

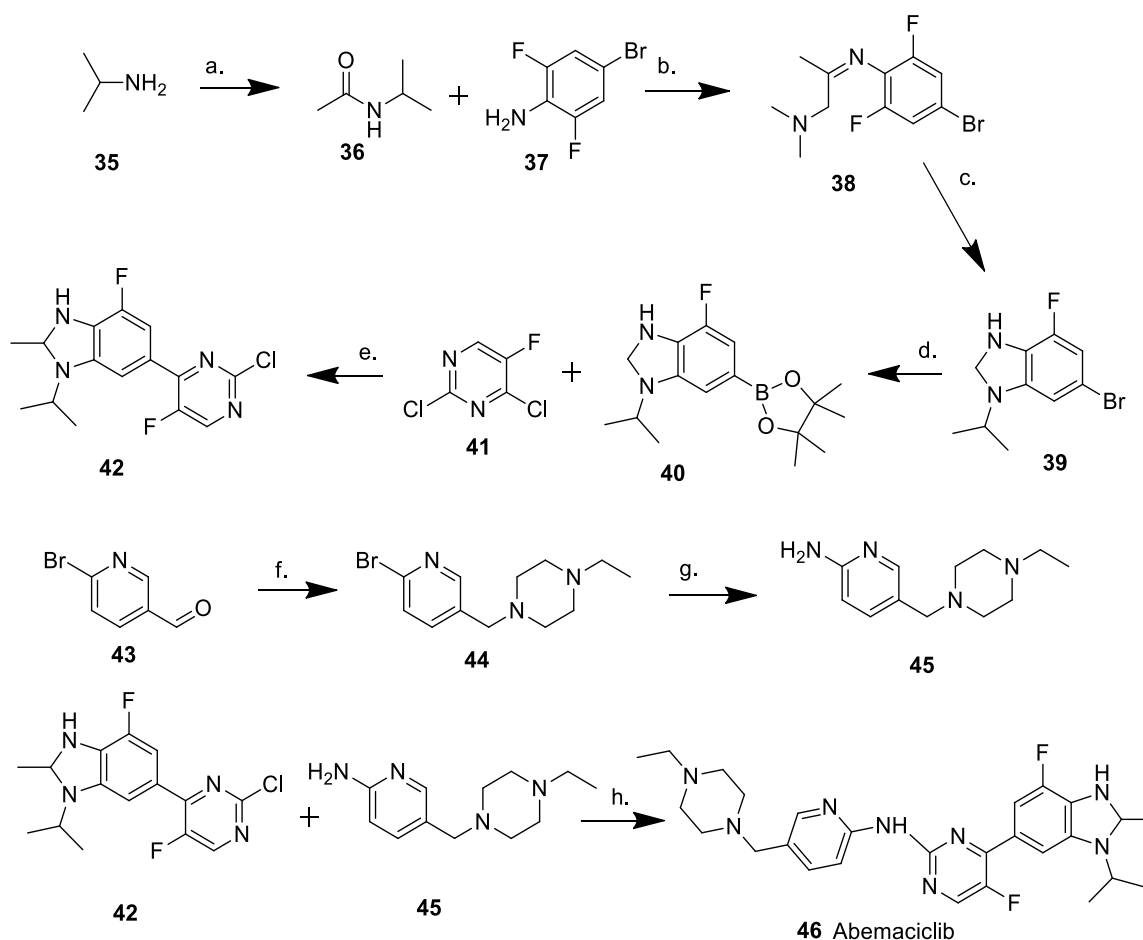
Επιτυχείς δοκιμές Φάσης I και Φάσης II κατά του καρκίνου του μαστού ανακοινώθηκαν τον Μάιο και τον Δεκέμβριο του 2014, αντίστοιχα. Από τις αρχές του 2016, το *Abemaciclib* συμμετείχε σε 3 κλινικές δοκιμές Φάσης III: Η μελέτη JUNIPER σύγκρινε το *Abemaciclib* με το *erlotinib* σε ασθενείς με στάδιο IV μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Η μελέτη MONARCH 2 διερευνά την αποτελεσματικότητα του *Abemaciclib* σε συνδυασμό με το *Fulvestrant* για γυναίκες με καρκίνο του μαστού. Τον Μάρτιο του 2017, η Eli Lilly ανακοίνωσε ότι είχε επιτύχει το κύριο καταληκτικό σημείο της ανώτερης επιβίωσης χωρίς εξέλιξη (PFS) έναντι του εικονικού φαρμάκου συν *Fulvestrant* σε ασθενείς με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων και αρνητικό HER2 προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Αυτό το αποτέλεσμα οδήγησε στην έγκριση του FDA τον Σεπτέμβριο του 2017. Η μελέτη MONARCH 3 διερεύνησε την αποτελεσματικότητα του *Abemaciclib*, συν είτε της αναστροζόλης είτε της λετροζόλης, ως θεραπεία πρώτης γραμμής για γυναίκες με καρκίνο του μαστού.



Σχήμα 46: Τα κλινικά χαρακτηριστικά του Abemaciclib ⁽¹³⁰⁾

2.5.4 Σύνθεση του Abemaciclib:

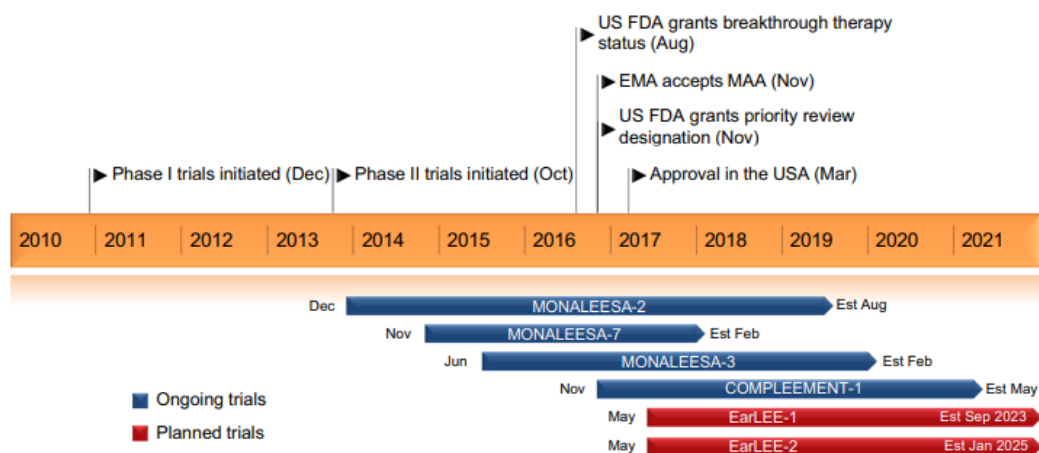
Η Σύνθεση του Abemaciclib πραγματοποιείται μέσω μίας συνθετικής πορείας 8 σταδίων. Η πορεία ξεκινάει με τον σχηματισμό της ένωσης **38** μέσω μίας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης των ενώσεων **36** και **37**. Το 3^ο στάδιο αφορά μια αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης για τον σχηματισμό της ένωσης **39**. Στο 4^ο στάδιο πραγματοποιείται μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης για τον σχηματισμό της ένωσης **40**. Το ενδιάμεσο προϊόν **42** παραλήφθηκε με μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ των ενώσεων **40** και **41**. Το ενδιάμεσο **45** σχηματίζεται με μία αντίδραση συμπύκνωσης για τον σχηματισμό της ένωσης **44** και στην συνέχεια μία με μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Το τελικό προϊόν σχηματίζεται με μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ της ένωσης **43** και **45**.



Σχήμα 47: a) Ac_2O , Et_3N , CH_2Cl_2 , b) POCl_3 , Et_3N , τολουόλιο, c) KOtBu , N-μέθυλοφορμαμίδιο d) δις-(πινακολάτο)δικαβρονύλιο, τρικυκλοεχυλοφωσφίνη, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, KOAc , DMSO , 73% e) $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}$ 2M, 1,2-διμέθυλοεξυλαιθέριο, f) 1-αιθυλπιπεραζίνη, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, CH_2Cl_2 , g) LiHMDS , δικυκλοεξυλφωσφινόδιφαινύλιο, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, THF , απόδοση 56% ή NH_3 , CuO , MeOH , 54%; h) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, XantPhos , Cs_2CO_3 , διοξάνιο,

2.5.5 Ribociclib

Το Ribociclib (LEE011) είναι ένας δια του στόματος βιοδιαθέσιμος, εκλεκτικός αναστολέας μικρού μοριακού βάρους, που στοχεύει στις κινάσες CDK4/6, εμποδίζοντας έτσι την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω της διακοπής της φάσης G1. Αναπτύχθηκε από την Novartis και την Astex Pharmaceuticals και εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) τον Μάρτιο του 2017 για τη θεραπεία HR-θετικών, Her2-αρνητικών προχωρημένων ή μεταστατικών καρκίνων του μαστού σε συνδυασμό με έναν αναστολέα αρωματάσης (όπως η λετροζόλη). Η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη του όγκου ήταν 23,8 μήνες με το Ribociclib σε σύγκριση με 13,0 μήνες με το εικονικό φάρμακο, το δε ποσοστό ανταπόκρισης ήταν σημαντικά υψηλότερο 51% έναντι 36%. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι το Ribociclib εμφανίζει μεγαλύτερη ανασταλτικότητα και εκλεκτικότητα έναντι των πρωτεϊνών CDK 4/6 και καλύτερα κλινικά αποτελέσματα σε σχέση με τους υπόλοιπους αναστολείς CDK 4/6, το Pablociclib, και το Amemaciclib.

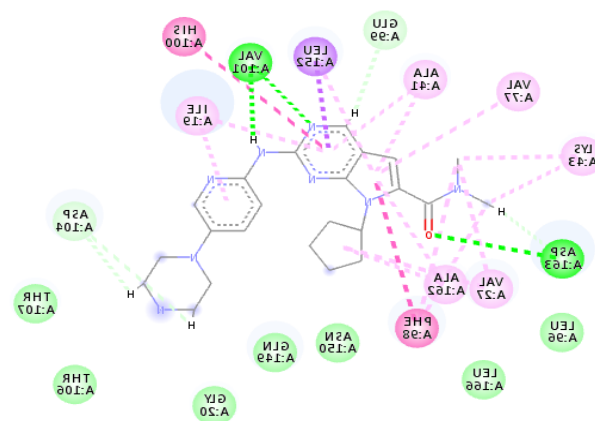
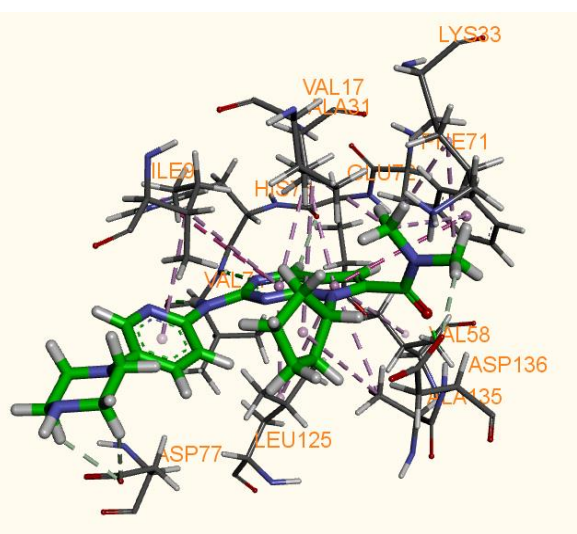


Σχήμα 48: Χρονικό των κλινικών δοκιμών του Ribociclib.

Το Ribociclib είναι εξαιρετικά εκλεκτικό έναντι της CDK4/6 σε σχέση με άλλα CDK ή μη CDK. Στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, το Ribociclib ανέστειλε Φωσφορυλίωση Rb (τιμές IC₅₀ 51–89 nmol/L) και κύτταρικό πολλαπλασιασμό (τιμές IC₅₀ 200–260 nmol/L). Σε μοντέλο ξενομοσχεύματος, παρατηρήθηκε μειωμένη ποσότητα ριβοκυλίνης, η οποία συσχετίζεται με τη φωσφορυλίωση του Rb. Σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων καρκίνου του μαστού που προέρχονται από ασθενής, ER-θετικούς, ο συνδυασμός της Ribociclib και ενός αντιοιστρογόνου παράγοντα (Λετροζόλη ή Fulvestrant) ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου με μεγαλύτερη διάρκεια από

οποιοδήποτε φάρμακο μόνο του. Όταν ένας αναστολέας της 3-κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) προστέθηκε σε αυτόν τον συνδυασμό, η αναστολή της ανάπτυξης του όγκου αυξήθηκε. Τα αντικαρκινικά αποτελέσματα του Ribociclib έχουν επίσης αποδειχθεί *in vitro* σε κύτταρα λευχαιμίας.⁽¹³¹⁾ Η συνιστώμενη δόση έναρξης του Ribociclib είναι 600 mg μία φορά την ημέρα για 21 ημέρες. Ακολουθεί θεραπεία με Ribociclib επτά ημερών. Ένας αναστολέας αρωματάσης πρέπει να λαμβάνεται κάθε μέρα για 28 ημέρες.

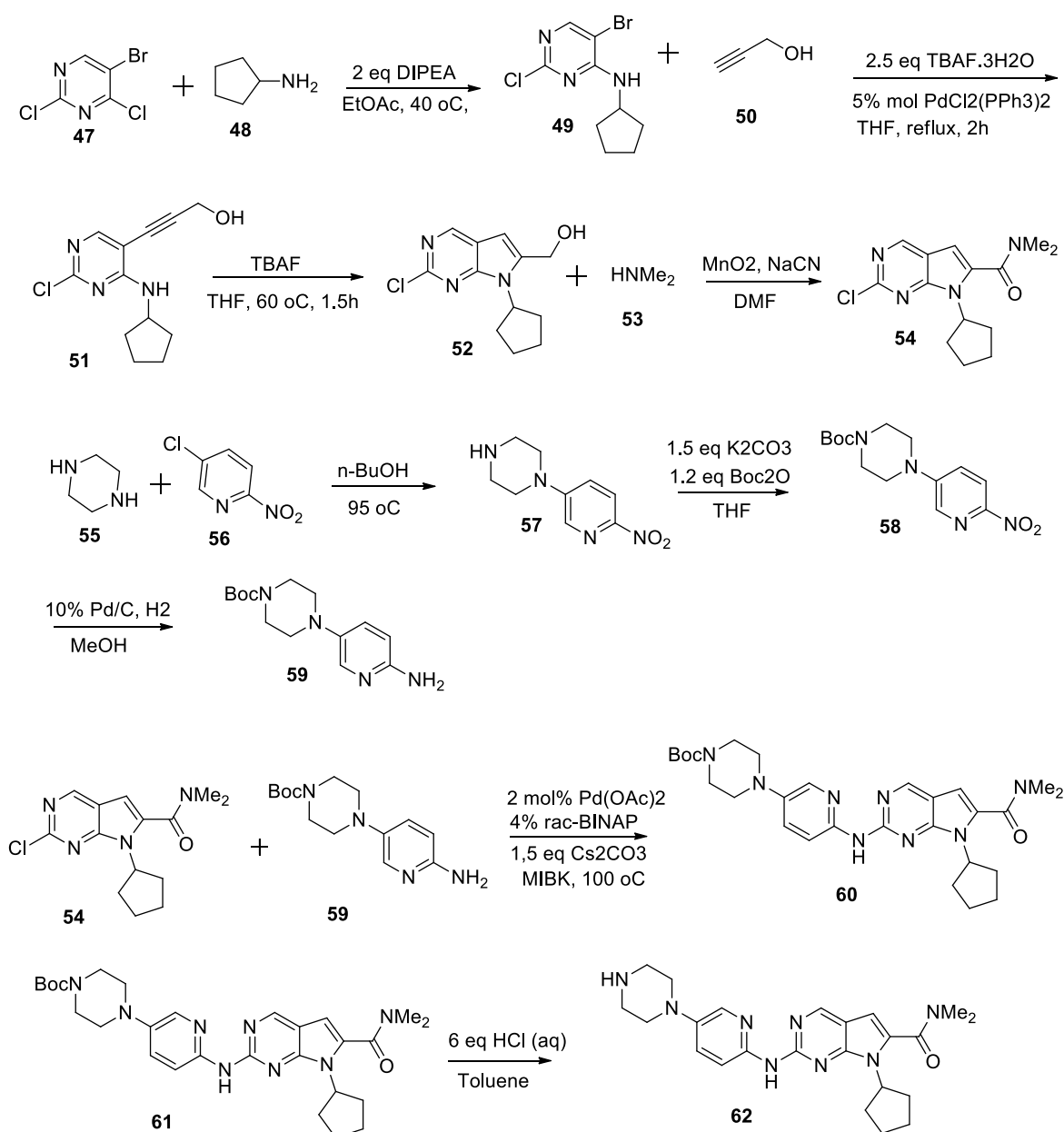
Οι πιο συχνά αναφερόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες με το Ribociclib είναι: ουδετεροπενία (76,9%), ναυτία (53,3%), κόπωση (41,3%), διάρροια (38,3%), αλωπεκία (34,4%), λευκοπενία (32,9%), έμετος (33,5%), δυσκοιλιότητα (27,8%), εξάνθημα (22,2%) και πόνος στην πλάτη (24,3%).² Η ουδετεροπενία είναι συχνά σοβαρή (βαθμός 3 ή 4). Η ηπατοχολική τοξικότητα εμφανίστηκε στο 24% των ασθενών. Όσον αφορά τις καρδιακές επιδράσεις, το 7,5% των ασθενών εμφάνισαν σύνδρομο μακρού QT σε τουλάχιστον μία περίπτωση. Στο 0,9% η δόση του Ribociclib προσαρμόστηκε ή διακόπηκε λόγω της εμφάνισης συνδρόμου μακρού QT ή συγκοπής.⁽¹³²⁾



Σχήμα 49: Αριστερά απεικονίζεται η δομή συγκρυστάλλωσης του Ribociclib (πράσινο χρώμα) με το ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK-6. Με διακεκομμένες γραμμές συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις με το αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Δεξιά απεικονίζεται το δυσδιάστατο διάγραμμα αλληλεπιδράσεων του Ribociclib με το ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK-6. Με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι δεσμοί υδρογόνου. Με ρόζ οι Π-άλκυλ αλληλεπιδράσεις. Με μωβ οι Π-σίγμα και με καφέ οι αλληλεπιδράσεις φορτίο.

2.5.6. Σύνθεση του Ribociclib

Η σύνθεση του Ribociclib αφορά μία συγκλίνουσα συνθετική πορεία 9 σταδίων. Στο 1^ο στάδιο πραγματοποιείται μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Το 2^ο στάδιο αφορά μία αντίδραση σύζευξης sonogashira για τον σχηματισμό της **54**. Στην συνέχεια ακολουθεί μία ενδομοριακή κυκλοποίηση και μία ταυτόχρονη οξειρωτική προσθήκη διμεθυλαμίνης για την παραλαβή της **54**. Ο σχηματισμός της ένωσης **58** πραγματοποιείται με μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, ακολουθεί μία αντίδραση προστασίας της αμινο-ομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου και τέλος, μία αντίδραση αναγωγής της νιτρο-ομάδας της ένωσης **57**. Το 9^ο στάδιο αφορά μία αντίδραση Buchwald-Hartwig για τον σχηματισμό του Ribociclib.

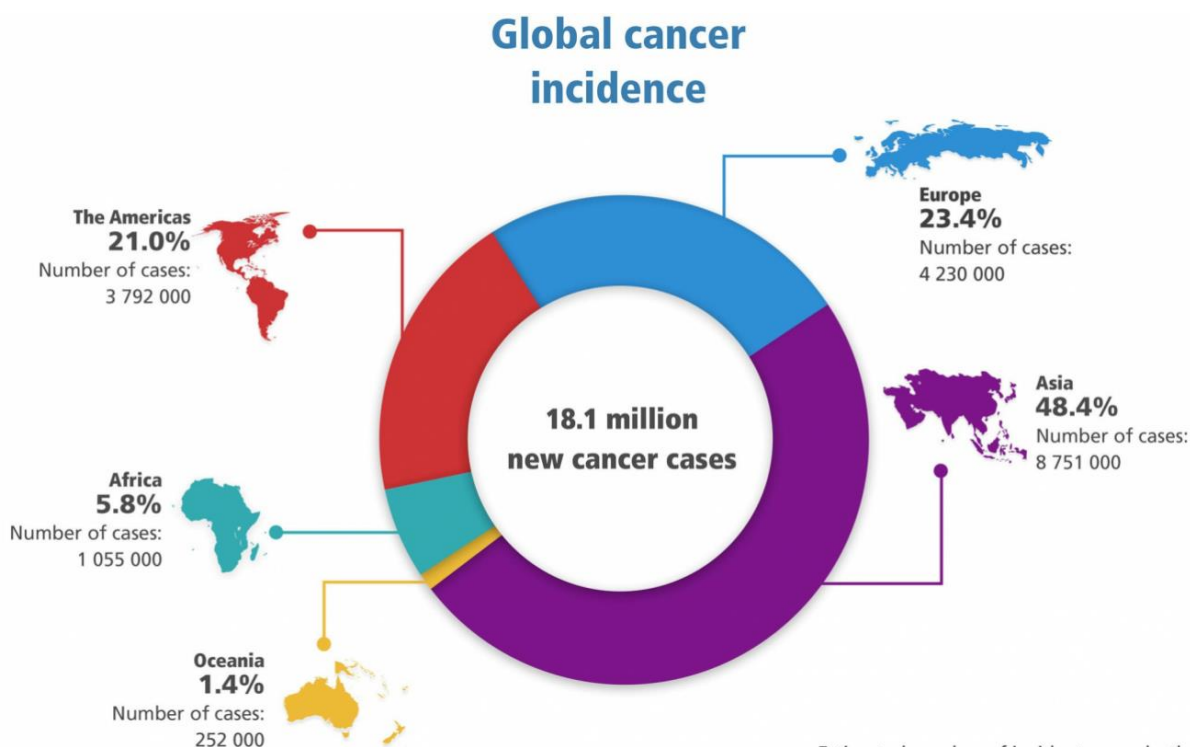


Σχήμα 50: Η σύνθεση του Ribociclib όπως προτάθηκε από την εταιρεία Novartis.

2.6 Καρκίνος:

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που καταγράφονται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Οι άνθρωποι ερευνούν την αιτία του καρκίνου εδώ και αιώνες. Το όνομά του προέρχεται από την παρατήρηση του Ιπποκράτη πριν από 2.300 χρόνια ότι οι μακριές, διατεταγμένες φλέβες που εκπέμπονται από ορισμένους όγκους του μαστού μοιάζουν με τα άκρα ενός καβουριού. Από αυτή την παρατήρηση προήλθε ο όρος καρκίνωμα στα ελληνικά και αργότερα cancer στα λατινικά. Με το έργο του Hooke το 1600, και στη συνέχεια του Virchow το 1800, αποδείχθηκε ότι οι ζωντανοί ιστοί αποτελούνται από κύτταρα και ότι όλα τα κύτταρα προκύπτουν ως άμεσοι απόγονοι άλλων κυττάρων. Ωστόσο, αυτή η κατανόηση δημιούργησε παραπάνω ερωτήματα σχετικά με τον καρκίνο από όσα απάντησε. Επομένως, τα επιστημονικά ερωτήματα ειδικεύτηκαν και εξελίχθηκαν. Οι ερευνητές άρχισαν να μελετούν από ποια είδη φυσιολογικών κυττάρων προκύπτουν καρκινικά κύτταρα, πώς διαφέρουν τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά, αντίστοιχα, και ποια γεγονότα προωθούν τον πολλαπλασιασμό αυτών των μη φυσιολογικών κυττάρων. Αντίστοιχα με αυτήν την εξέλιξη στην Ιατρική έρευνα, ξεκίνησε η προσπάθεια για την πρόληψη και την θεραπεία του Καρκίνου. ⁽¹³³⁾

Οι στατιστικές δείχνουν ότι ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Το 2020, διαγνώστηκαν 1.806.590 νέες περιπτώσεις καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες και 606.520 άνθρωποι πεθάναν από τη νόσο. Οι πιο συχνές μορφές καρκίνου (αναφέρονται με φθίνουσα σειρά σύμφωνα με εκτιμώμενα νέα κρούσματα το 2020) είναι ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του πνεύμονα και του βρόγχου, ο καρκίνος του προστάτη, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του ορθού, το μελάνωμα του δέρματος, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης, το λέμφωμα non-Hodgkin, καρκίνος στα νεφρά, καρκίνος της λεκάνης, καρκίνο του ενδομητρίου, λευχαιμία, καρκίνος του παγκρέατος, καρκίνος του θυρεοειδούς και καρκίνος του ήπατος. Το ποσοστό θνησιμότητας (θνησιμότητα από καρκίνο) κυμαίνεται στα 158,3 ανά 100.000 άνδρες και γυναίκες ετησίως (με βάση τους θανάτους 2013–2017). ⁽¹³⁴⁾



Σχήμα 51: Οι νέες διεγνωσμένες περιπτώσεις καρκίνου ανά ήπειρο, ως ποσοστό το 2020 ⁽¹³⁵⁾

Ο καρκίνος ξεκινά όταν ένα κύτταρο απελευθερώνεται από τους φυσιολογικούς περιορισμούς της κυτταρικής διαίρεσης και αρχίζει να πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. Ενώ η αύξηση των φυσιολογικών κυττάρων ρυθμίζεται προσεκτικά, τα καρκινικά κύτταρα συνεχίζουν να αναπτύσσονται, διαιρούνται και αντί να πεθαίνουν, διαιρούνται εκ νέου σχηματίζοντας νέα ανώμαλα κύτταρα με άμεση συνέπεια να διηθούν στους φυσιολογικούς ιστούς και να παρεμβάλλονται στη λειτουργία τους. Όλα τα κύτταρα που παράγονται από τη διαίρεση αυτού του πρώτου, προγονικού κυττάρου και των απογόνων του, εμφανίζουν επίσης ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Ένας όγκος, ή μάζα κυττάρων, που σχηματίζεται από αυτά τα ανώμαλα κύτταρα μπορεί να παραμείνει εντός του ιστού από τον οποίο προήλθε (μια κατάσταση που ονομάζεται *in situ* καρκίνος) ή μπορεί να αρχίσει να εισβάλλει σε γειτονικούς ιστούς (διηθητικός καρκίνος). Ένας διηθητικός όγκος λέγεται ότι είναι κακοήθης όταν τα κύτταρα που διαχέονται στο αίμα ή τη λέμφο μπορούν να σχηματίζουν νέους όγκους (μεταστάσεις) σε όλο το σώμα. Οι όγκοι απειλούν τη ζωή ενός ατόμου όταν η ανάπτυξή τους διαταράσσει τους ιστούς και τα όργανα που είναι απαραίτητα για την επιβίωση. ^{(136), (137), (138)}

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που προκαλούν τον καρκίνο είναι η απουσία ή παρουσία συγκεκριμένων γονιδίων (ογκογονίδια). Τα ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση και απουσία αυτών των πρωτεϊνών το κύτταρο αναπτύσσεται χωρίς φυσικό περιορισμό. Έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα 100 διαφορετικά ογκογονίδια.

Η θεραπεία γίνεται με διάφορους τρόπους, όπως με : χημειοθεραπεία, με ακτινοβολία του όγκου, με ανοσοθεραπεία, με ενήληση, με στοχευμένη θεραπεία, κ.ά.

2.7. Καρκίνος του μαστού

Ο όρος «καρκίνος του μαστού» αναφέρεται στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού με ετήσια επίπτωση σε άνω των 1,3 εκατομμυρίων γυναικών, γεγονός που αντιπροσωπεύει πάνω από το 23% όλων των κακοηθειών. ⁽¹⁴⁰⁾ Αποτελεί μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου παγκοσμίως και είναι η πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων στο γυναικείο πληθυσμό. Προκαλείται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων, που ως αποτέλεσμα προκαλούν το σχηματισμό κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα εξάπλωσης σε γειτονικούς ιστούς με δυσάρεστες συνέπειες για ολόκληρο τον οργανισμό, οπότε η καταπολέμησή του συνιστά σημαντική ερευνητική πρόκληση. ⁽¹⁴¹⁾

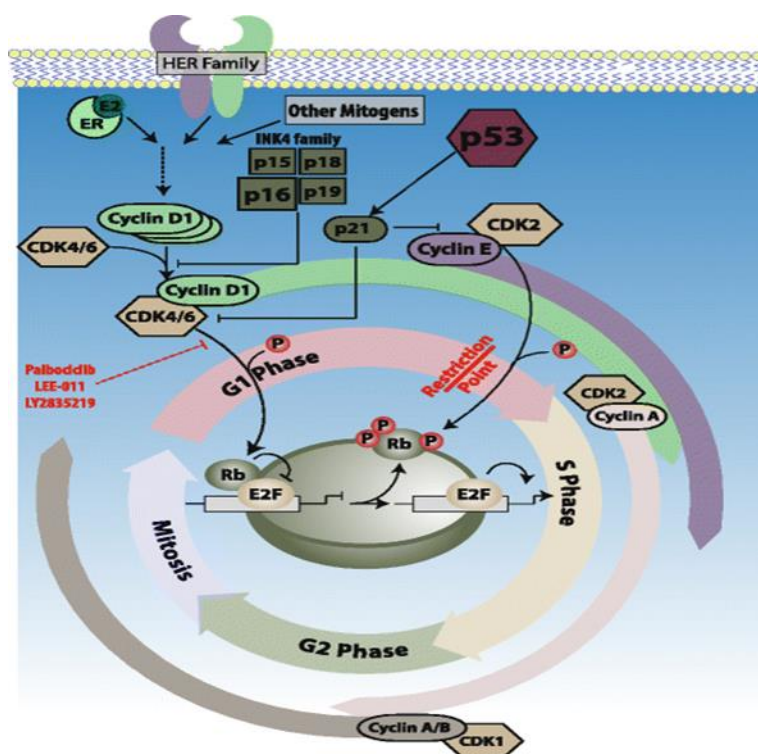
Περίπου το 80% των καρκίνων του μαστού προκαλούνται από την απορρύθμιση των υποδοχέων οιστρογόνων, των υποδοχέων προγεστερόνης ή και των δύο. Οι ενδοκρινικές θεραπείες, με αναστολή των υποδοχέων ορμονών και παρεμπόδιση της οδού του ER, αποτελούν τον πυρήνα της θεραπείας για αυτού του είδους καρκίνους, θετικούς σε υποδοχείς ορμονών (HR-positive). Όμως η αποτελεσματικότητά τους περιορίζεται λόγω των υψηλών ποσοστών της υποτροπής που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Μόνο το 30% των ασθενών με μεταστατική νόσο έχουν αντικειμενική υποχώρηση του όγκου με αρχική ενδοκρινική θεραπεία, ενώ άλλα 20% έχουν παρατεταμένη σταθερή ασθένεια. ⁽¹⁴²⁾

Οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες 4 και 6 (CDK4 και CDK6), οι οποίες ενεργοποιούνται από κυκλίνες τυπού D, προάγουν μέσω της φωσφορυλίωσης της Rb (πρωτεΐνη του αμφιβληστροειδούς), τη μετάβαση από τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες για την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Κανονικά, αυτό το σημείο μετάβασης είναι αυστηρά ρυθμισμένο. Έρευνες έχουν υποδείξει ότι πολλαπλά ογκογονικά σήματα (που στην ουσία είναι υπεύθυνα για την υποτροπή της νόσου) στον καρκίνο του μαστού με θετικό ορμονικό υποδοχέα συγκλίνουν για να προάγουν την έκφραση της κυκλίνης D1 (υπερεκφράζεται σε ποσοστό μέχρι 50%), η οποία στην συνέχεια οδηγεί στην ενεργοποίηση των CDK4 και CDK6. Τα προκύπτοντα συμπλέγματα δραστικής κυκλίνης D-CDK4 / 6

φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη Rb, σταματώντας την καταστολή των παραγόντων μεταγραφής E2F. Το απελευθερούμενο E2F ενεργοποιεί συνεπώς τη μεταγραφή των γονιδίων που απαιτείται για την μετάβαση G1-S και την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. ^{(143), (144)}

Με βάση τις έως σήμερα έρευνες, η οδός κυκλίνης D-κυκλίνης-εξαρτώμενης από κινάση (CDK) 4/6-Rb διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την διατήρηση πολλών τύπων όγκων, πέρα του καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένου του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), το μελάνωμα, το γλοιοβλάστωμα, τον παγκρεατικό καρκίνο και τον ορθοκολικό καρκίνο. ⁽¹⁴⁵⁾

Η αναστολή του κόμβου CDK4 / 6, αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική, τόσο για την θεραπεία του HR θετικού προχωρημένου καρκίνου του μαστού στους οποίους η ασθένεια προχώρησε, ενώ έλαβαν ενδοκρινική θεραπεία, όσο και για πολλά είδη καρκίνου.



Σχήμα 52: Ο ρόλος των HER πρωτεϊνικών κινάσων και των CDK4/6 στην δημιουργία καρκίνου του Μαστού: Οι πρωτεϊνικές κινάσες των HER οικογένειας λειτουργούν ανεξέλεγκτα προάγοντας τον κυτταρικό κύκλο και προκαλώντας τον διαρκή πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ταυτόχρονα διάφορα ογκογονικά σήματα οδηγούν στην έκφραση της κυκλίνης D1 που με την σειρά της οδηγεί στην υπερέκφραση των κινάσων CDK4/6 που προάγουν επίσης τον κυτταρικό κύκλο. Μία συνδυαστική αναστολή των HER πρωτεϊνών και των CDK 4/6, επομένως, αποτελεί μία αποτελεσματική στρατηγική για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού HR θετικού.

3. Συζήτηση αποτελέσματα

Στο θεωρητικό μέρος αναδείχθηκε με πλήθος επιστημονικών δεδομένων, ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες διαδραματίζουν έναν εξέχοντα ρόλο στην λειτουργία του κυττάρου, μέσω της ρύθμισης/επαγωγής των κυτταρικών λειτουργιών. Η απορρύθμιση τους, με την υπερέκφραση ή την υπολειτουργία, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στο σύνολο του οργανισμού δημιουργώντας σοβαρές παθολογίες. Μια σειρά ασθενειών, ανάμεσά τους και ο καρκίνος σχετίζονται με την λειτουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινάσεων. Δεν είναι τυχαίο λοιπόν που συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον ερευνητικών ομάδων και καινοτόμων εταιριών με στόχο την αποκωδικοποίηση της λειτουργίας τους αλλά και την αναστολή τους. Ειδικά, μετά την ανακάλυψη του πρώτου αναστολέα πρωτεϊνικών κινάσεων, του Imatinib, ξεκίνησε μία γοργή, εκθετική ανακάλυψη μορίων μικρού μοριακού βάρους ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσεων.

Στη συγκεκριμένη έρευνα το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στους αναστολείς της οικογένειας των CDK κινάσεων, συγκεκριμένα στις κινάσες CDK 4/6. Στόχος της εν λόγω ερευνητικής δραστηριότητας είναι μέσω στοχευμένων τροποποιήσεων στη δομή του εκλεκτικού αναστολέα CDK 4/6, Ribociclib, να αναπτυχθούν στο εργαστήριο νέοι (εν δυνάμει) πιο δραστικοί και εκλεκτικοί αναστολείς. Καταλήξαμε στο Ribociclib διότι εκδηλώνει καλύτερη ανασταλτική δράση, ικανοποιητικά φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά και εκλεκτικότητα σε σχέση με τους υπάρχοντες αναστολείς CDK4/6.

Το Ribociclib εκδηλώνει μακρύ χρόνο ημιζωής σε σύγκριση με το Palbociclib και το Abemaciclib.⁽¹⁴⁶⁾ Ο μέσος χρόνος ημιζωής του Palbociclib είναι 29 (+/- 5) ώρες, του Ribociclib 32 ώρες, του δε Abemaciclib 18,3 ώρες. Το Palbociclib και το Ribociclib έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από το Abemaciclib και, ως εκ τούτου, χορηγούνται ημερησίως μία φορά. Το Abemaciclib χορηγείται δύο φορές ημερησίως. Η διαφορά στα δοσολογικά σχήματα επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των φαρμάκων στον ορό του πλάσματος. Ο μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής, >> 24 ωρών, του Palbociclib και του Ribociclib, σε συνδυασμό με την ημερήσια δόση, μπορεί να οδηγήσουν σε συσσώρευση του φαρμάκου (Σχήμα 53).⁽¹⁴⁶⁾

Τα φαρμακοκινητικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι το Ribociclib μπορεί να ληφθεί με ή χωρίς τροφή, ενώ το Palbociclib πρέπει να χορηγείται με τροφή. Επίσης το Ribociclib απορροφάται πιο γρήγορα από το Palbociclib και το Abemaciclib.

	Palbociclib	Ribociclib	Abemaciclib
Half-life	29 (+/-5) hours	32 hours	18.3 hours
Primary site of metabolism	Hepatic	Hepatic	Hepatic
Cell Cycle Arrest Targets	G1 phase CDK4 and CDK6	G1 Phase CDK4 and CDK6	G1, G2 phase CDK1, CDK2, CDK4, CDK5 CDK6, CDK 9, CDK14, CDKs16-18
Dosing	125mg once daily for 21 days followed by 7 days off	600mg one daily for 21 days	150mg twice day continuously
Myelosuppression	++	++	+
GI toxicity	+	+	++
LFT abnormalities	-	+	+
Pneumonitis	+ (rare)	+ (rare)	+ (rare)

Πίνακας 3: Φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Χρόνος ημιζωής, μεταβολική οδός, πρωτεΐνες στόχοι, κυτταρικός κύκλος, δοσολογία, GI τοξικότητα κá.

Και τα τρία φάρμακα αναστέλλουν τη δραστηριότητα της κινάσης CDK 4 και CDK 6, ωστόσο το Abemaciclib αναστέλλει επιπλέον πολλές άλλες κινάσες, ενώ δεν εμφανίζει μεγάλη εκλεκτικότητα, κάτι που μπορεί να δημιουργήσει πρόσθετες παρενέργειες στους ασθενείς. Το Palbociclib έχει παρόμοια ισχύ έναντι της κυκλίνης D1/CDK4 και της κυκλίνης D2/CDK6. Τα Abemaciclib και Ribociclib αναφέρεται ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ισχύ/εκλεκτικότητα έναντι του CDK4 από το CDK 6. ^{(147), (148)}

Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων, η δοκιμή PALOMA-2 έδειξε ότι το palbociclib + letrozole βελτίωσε το PFS (επιβίωση του ασθενούς χωρίς ανάπτυξη του όγκου) σε σύγκριση με τη λετροζόλη, σε 24,8 μήνες έναντι 14,5 μηνών, αντίστοιχα. Το PALOMA-3 επιβεβαίωσε βελτίωση στο διάμεσο PFS (9,5 μήνες έναντι 4,6 μηνών HR: 0,46, 0,36–0,59, $p<0.0001$). Το Ribociclib εγκρίθηκε από τον FDA το 2017 για γυναίκες πριν, μετά και κατά την εμμηνόπαυση, σε συνδυασμό με AI, είτε σε συνδυασμό με fulvestrant για μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή για εκείνες που έχουν προχωρήσει σε προηγούμενη ενδοκρινική θεραπεία. Οι MONALEESA-2, MONALEESA-3 και MONALEESA-7 ήταν όλες μελέτες φάσης III που έδειξαν στατιστικά σημαντική βελτίωση στο PFS. ⁽¹⁴⁹⁾

Name of the studies	Phase	Line of therapy	Treatment arms	Sample Size	PFS	Median OS
Palbociclib						
PALOMA-1	II	First line	Palbociclib/Letrozole vs. Letrozole	165	20.2months vs. 10.2 months (HR 0.488, 0.319-0.748; p=0.0004) (66)	Not significant 37.5 vs 34.5 mo (HR 0.897 95% CI 0.623-1.294) (67)
PALOMA-2	III	First line	Palbociclib/Letrozole vs. Letrozole	666	27.6mo vs. 14.5mo (HR 0.563; 0.461-0.687 p<0.0001) (1)	Pending
PALOMA-3	III	Second line	Palbociclib/Fulvestrant vs. Fulvestrant	521	9.5 months vs. 4.6 months (HR 0.46, 0.36-0.59, p<0.0001) (68)	Not significant 34.9 months vs. 28 months (HR 0.81; 95% CI 0.64 – 1.03) (3)
Ribociclib						
MONALEESA-2	III	First line	Ribociclib/Letrozole vs. Letrozole	668	25.3 months versus 16 months (HR 0.568; 0.457-0.704; P = 9.63 × 10 ⁻⁸) (69)	Not reached vs. 33 mo (HR 0.746; CI 0.517-1.078) (69)
MONALEESA-3	III	First and 2nd line	Ribociclib/Fulvestrant vs. Fulvestrant	725	20.5 months versus 12.8 months (HR 0.593; 0.480 to 0.732; P < .001)	Statistically significant Not reached vs. 40.0 mo (HR=0.74; 95% CI, 0.568-0.924; P=.00455) (70)
MONALEESA-7	III	First line	Ribociclib/OFS/AI or tamoxifen vs. OFS/AI or tamoxifen	672	23.8 months versus 13 months (HR 0.55; 0.44-0.69; p<0.0001) (6)	Statistically significant Not Reached vs 40.9 mo (HR, 0.712, 0.54-0.95; p = 0.00973) (17)
Abemaciclib						
MONARCH-1	II	Later lines	Abemaciclib	132	6 months (58)	17.7 mo (58)
MONARCH-2	III	Second line	Abemaciclib/Fulvestrant vs. Fulvestrant	669	16.4 months versus 9.3 months (HR 0.553; 0.449 to 0.681; P < .001) (7)	Statistically significant. 46.7 vs. 37.3 mo (HR=0.757; 95% CI, 0.606- 0.945; P=.0137) (71)
MONARCH-3	III	First line	Abemaciclib/AI vs. Abemaciclib	493	28.18 versus 14.76 months; (HR 0.540; 0.418-0.698; p = .000002) (5)	Pending

Πίνακας 4: Κλινικά χαρακτηριστικά του Ribociclib, Palbociclib και Abemaciclib, όπως αυτά προκύπτουν από πραγματοποιηθείσες κλινικές μελέτες. ⁽¹⁴⁷⁾

Προκλινικά, Το Ribociclib φαίνεται να παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα κατά μονοπύρηνων κύτταρων του μυελού των οστών σε σύγκριση με το Palbociclib και το Abemaciclib. Το Abemaciclib ωστόσο, εμφανίζει την μικρότερη αιματολογική τοξικότητα. Αιματολογικές τοξικότητες αναφέρθηκαν για το Ribociclib με λετροζόλη στην κλινική μελέτη MONALEESA-2 και για το Palbociclib με λετροζόλη στην κλινική μελέτη PALOMA-2. Διαφορές στην επιλεκτικότητα στόχου οδηγούν, επίσης, σε διακυμάνσεις της σχετικής ασφάλειας. Το Abemaciclib δείχνει αυξημένη συχνότητα γαστρεντερικών ανεπιθύμητων παρενεργειών (ΑΕς) έναντι των Ribociclib ή Palbociclib. Το Ribociclib έχει γενικά καλά ανεκτές ΑΕς, εύκολα διαχειρίσιμες με προσαρμογή δόσης ή θεραπείας. Τελικά, τα προκλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι τόσο το Ribociclib όσο και το Abemaciclib μπορούν εισέλθουν μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, και ως εκ τούτου ενδείκνυνται για περαιτέρω διερεύνηση ως φάρμακων έναντι των όγκων του κεντρικού νευρικού συστήματος. ^{(151), (152)}

Συμπερασματικά, το Ribociclib είναι ένας πολλά υποσχόμενος, εκλεκτικός αναστολέας CDK4/6 στο πρώτο στάδιο της κλινικής ανάπτυξης επιδεικνύοντας προκλινική και κλινική δραστηριότητα σε μια σειρά τύπων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού HRb. Το κλινικό προφίλ του Ribociclib σε μια ποικιλία τύπων όγκων το καθιστούν σημαντική προσθήκη στην κατηγορία των αναστολέων CDK4/6. Δεδομένης της επιλεκτικότητας του Ribociclib ως προς το CDK4/6, η προσθήκη του σε υφιστάμενες αντικαρκινικές θεραπείες ως διπλό ή τριπλό συνδυασμό, αποδείχθηκε επιτυχής, ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπειών με ελάχιστη αύξηση της τοξικότητας σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Αυτό το αποτέλεσμα διερευνάται εκτενώς σε μια σειρά τύπων όγκων και σε συνδυασμό με μια ποικιλία

αντικαρκινικών παραγόντων. Ένας πλήρης και ισχυρός φάκελος κλινικών μελετών συνεργιακών θεραπειών που περιέχουν το Ribociclib είναι πιθανόν να διαμορφώσει το μελλοντικό τοπίο της θεραπείας του καρκίνου. ⁽¹⁵³⁾

3.1 Μοριακή μοντελοποίηση

Για την ανάπτυξη αναστολέων, μέσω της επιλεκτικής-στοχευμένης τροποποίησης της μοριακής δομής του Ribociclib χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα μοριακής μοντελοποίησης. Η κρυσταλλογραφία και οι τεχνικές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, που αναπτύχθηκαν ραγδαία τα τελευταία χρόνια, συνέβαλαν στην ανακάλυψη πολλών δομικών λεπτομερειών των πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων. Η μοριακή μοντελοποίηση περιλαμβάνει όλες τις μεθόδους, θεωρητικές και υπολογιστικές, που χρησιμοποιούνται για τη μοντελοποίηση ή τη μίμηση της συμπεριφοράς των μορίων. Οι ως άνω μέθοδοι χρησιμοποιούνται στους τομείς της υπολογιστικής χημείας, του σχεδιασμού φαρμάκων, της υπολογιστικής βιολογίας και της επιστήμης των υλικών για τη μελέτη μοριακών συστημάτων που κυμαίνονται από μικρά χημικά συστήματα έως μεγάλα βιολογικά μόρια και συγκροτήματα υλικών. Οι απλούστεροι υπολογισμοί μπορούν να γίνουν με το χέρι, αλλά αναπόφευκτα απαιτούνται υπολογιστές για την εκτέλεση μοριακής μοντελοποίησης οποιουδήποτε συστήματος λογικού μεγέθους. Το κοινό χαρακτηριστικό των μεθόδων μοριακής μοντελοποίησης είναι η περιγραφή σε ατομικό επίπεδο των μοριακών συστημάτων. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει την αντιμετώπιση των ατόμων ως τη μικρότερη μεμονωμένη μονάδα (προσέγγιση μοριακής μηχανικής) ή τη μοντελοποίηση πρωτονίων, νετρονίων με τα κουάρκ, τα αντι-κουάρκ και τα γκλουόνια, τα δε ηλεκτρόνια με τα φωτόνιά τους (προσέγγιση κβαντικής χημείας). ⁽¹⁵⁵⁾

Η Μοριακή μοντελοποίηση είναι μια τεχνική που μπορεί να βοηθήσει στον υπολογισμό και την πρόβλεψη των φυσικοχημικών και βιοχημικών ιδιοτήτων υπο διερεύνηση μορίων και να παράσχει πληθώρα στοιχείων που μπορούν να βοηθήσουν στην περαιτέρω μελέτη τους. Συνιστά επί της ουσίας μία γέφυρα μεταξύ της θεωρίας, δηλαδή των υπάρχοντων επιστημονικών δεδομένων και υποθέσεων, και της πράξης, μέσω νέων πειραμάτων και έρευνας.

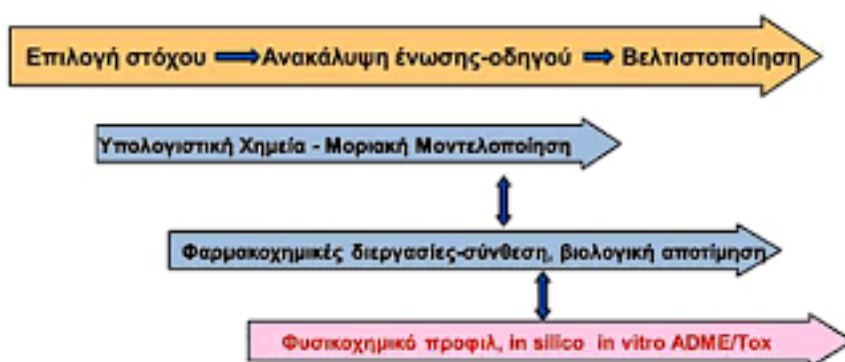
Περιλαμβάνει τις εξής λειτουργίες:

- Τρισδιάστατη αναπαράσταση της μοριακής δομής
- Χρήση μοριακών γραφικών για το χειρισμό του συστήματος
- Υπολογισμό και ελαχιστοποίηση της ενέργειας του συστήματος

- Διαμορφωτική Ανάλυση
- Προσομοίωση μοριακού συστήματος
- Υπολογισμό μοριακών ιδιοτήτων
- Υπέρθεση μοριακών συστημάτων
- Μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς (docking)
- Μελέτη σχέσης δομής δράσης (QSAR) ⁽¹⁵⁶⁾

Ο συνδιασμός των ως άνω εργαλείων μπορεί να καθοδηγήσει τον ερευνητή στην μελέτη ενός συστήματος. Στην συγκεκριμένη εργασία, μέσα από την τρισδιάστατη αναπαράσταση και μελέτη της δομής συγκρουσάλλωσης του Ribociclib και της CKD6 πρωτεΐνης, τον υπολογισμό των μοριακών ιδιοτήτων του Ribociclib και τη μελέτη του ενεργού κέντρου του ενζύμου σχεδιάστηκαν ως ανάλογα του Ribociclib. Στη συνέχεια, με προγράμματα εύρεσης πρωτεϊνών στόχων, προσδιορίστηκε μία σειρά πρωτεϊνών στις οποίες τα ανάλογα είχαν να επιδείξουν μία πιθανή ανασταλτική δράση. Τέλος μέσω προγραμμάτων docking (μελέτη πρόσδεσης υποδοχέων) στον πρωτεϊνικών κινάσων, συνεχίστηκε η σύνθεση των αναλόγων με την καλύτερη ανασταλτική δράση.

Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Discovery Studio 1.5 για την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δομών (οπτικοποίηση των κρυσταλλογραφικών δομών, διαχωρισμός του αναστολέα και της πρωτεΐνης, απομάκρυνση των μορίων νερού που βρίσκονται γύρω από την πρωτεΐνη). Επίσης, το πρόγραμμα Chimera 11r.c με το οποίο διορθώθηκαν τις ατέλειες των κρυσταλλογραφικών δομών, προστίθενται άτομα υδρογόνου, μετρήθηκαν τα φορτία στα αμινοξέα της πρωτεΐνης, καθώς και στα άτομα του αναστολέα.

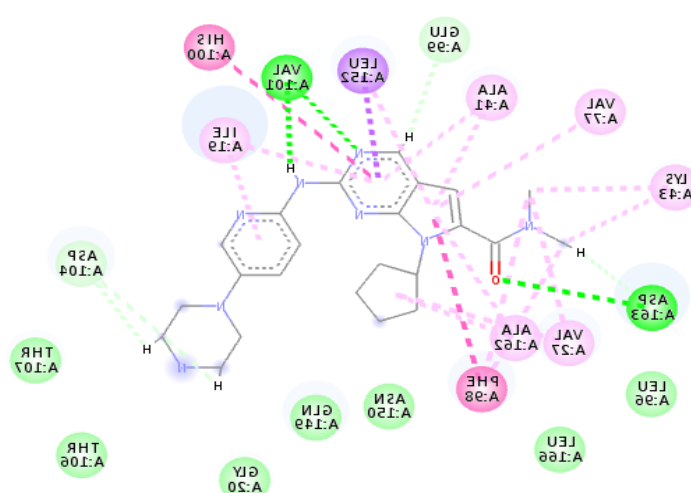
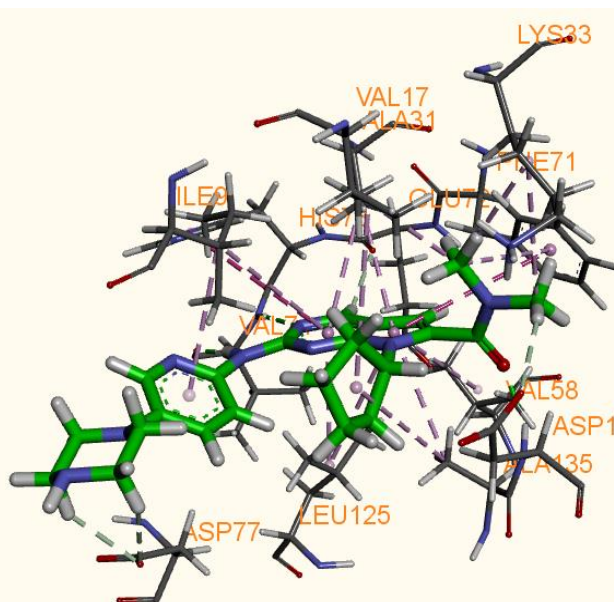


Σχήμα 53: Μοριακή μοντελοποίηση και συνθετική οργανική χημεία.

3.2 Θεωρητική προσέγγιση -υποθέσεις εργασίας

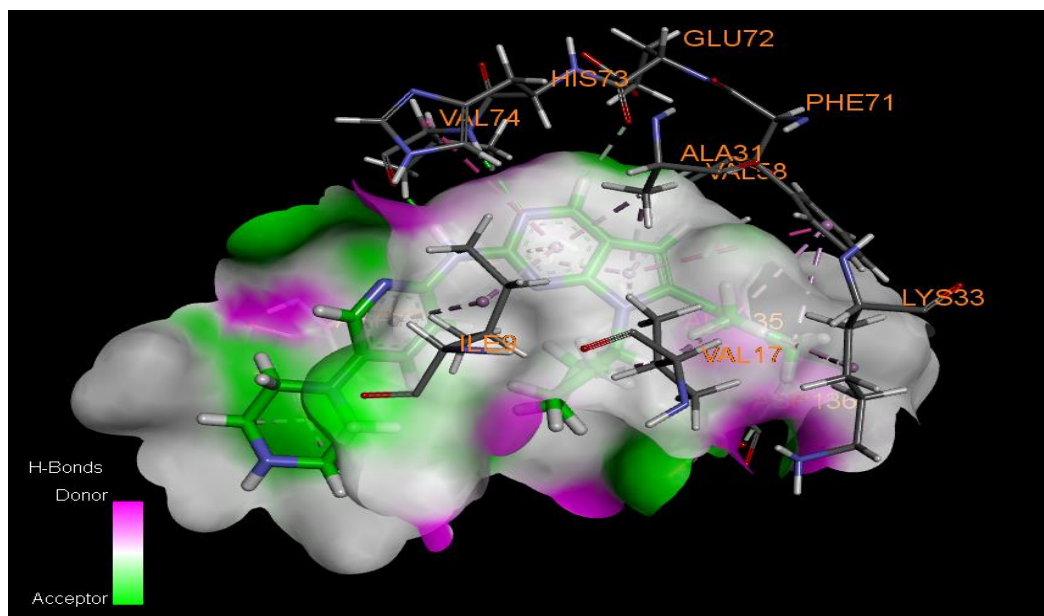
3.2.1 Μελέτη της δομής συγκρυστάλλωσης CDK6/Ribociclib

Από την μελέτη της δομής συγκρυστάλλωσης της CDK 6 και του Ribociclib παρατηρήθηκε ότι ο πυριδινικός δακτύλιος καθώς και ο πιπεραζινικός δακτύλιος δεν συνεισφέρουν στην ανασταλτική δράση του μορίου μέσω αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Επιπλέον ο πιπεραζινικός δακτύλιος μπορεί μεν να συνεισφέρει στην φαρμακοκινητική του μορίου αλλά εστιάζεται έκτος του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης. Θεωρήθηκε ότι η επιλεκτική τροποποίηση των εν λόγω δομικών στοιχείων θα μας οδηγήσει σε καλύτερα ανασταλτικά αποτελέσματα.



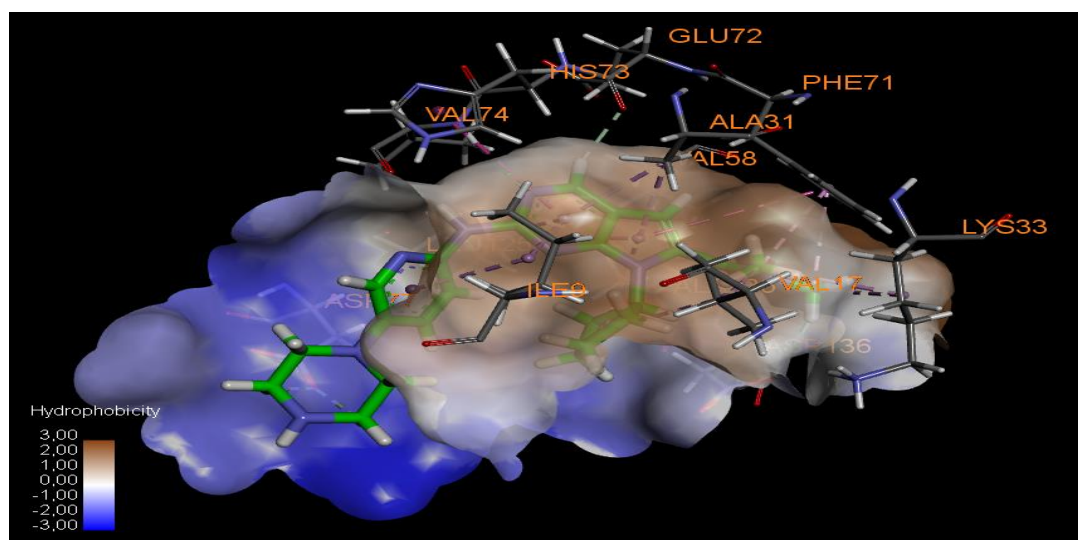
Σχήμα 54: Αριστερά απεικονίζεται το τριδιάστατο διάγραμμα του Ribociclib στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και δεξιά το διάγραμμα δύο διαστάσεων.

Από την αναπαραγωγή της επιφάνειας των αμινοξέων της πρωτεΐνης του ενεργού κέντρου που μπορούν να δράσουν ως δέκτες και ως δότες δεσμών υδρογόνου, παρατηρήθηκε ότι γύρω από τους πυριδινικό και πιπεραζινικό δακτύλιο υπάρχει επιφάνεια πλούσια σε δέκτες και δότες. Αποφασίστηκε αρχικά να τροποποιηθούν οι δύο δακτύλιοι με εισαγωγή ομάδων που μπορούν να αυξήσουν την ανασταλτική δράση του μορίου, μέσω του σχηματισμού αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου.



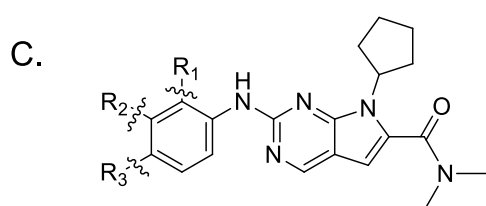
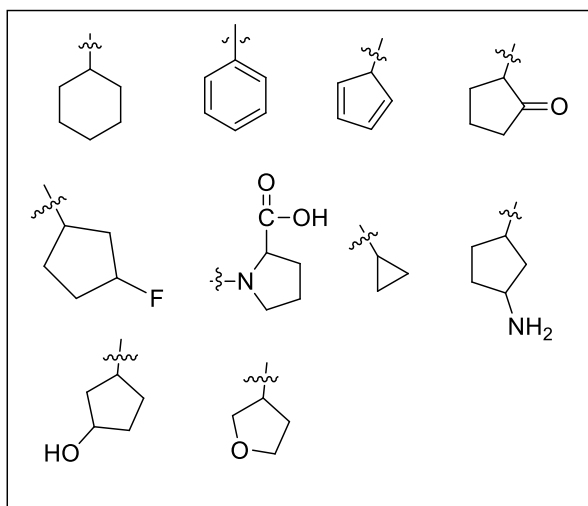
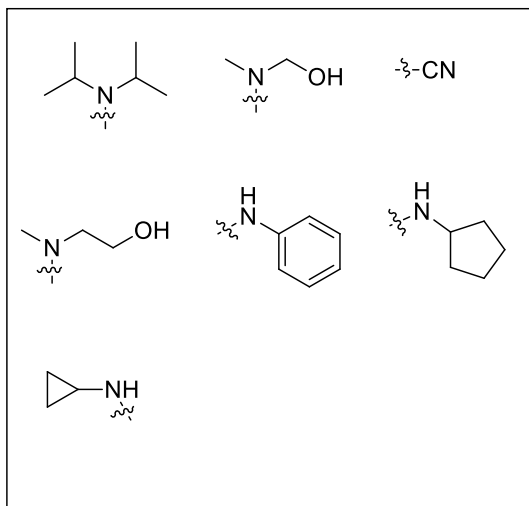
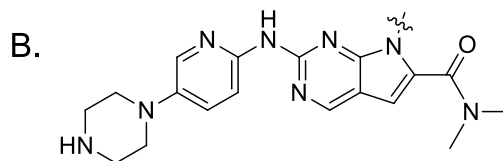
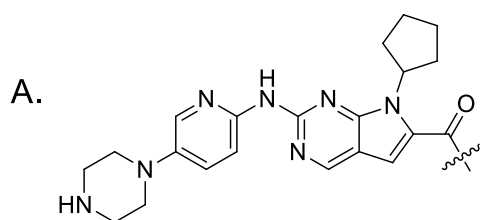
Σχήμα 55: Αναπαράγωγή της επιφάνειας δεσμών υδρογόνου γύρω από τον αναστολέα *Ribociclib*

Η περιοχή γύρω από τον πυριδινικό δακτύλιο είναι υδρόφιλη, οπότε προστίθενται υδρόφιλες ομάδες για την αύξηση της ανασταλτικότητας του μορίου, όπως $-OH$, $-COOH$, NH_2 κ.ά., που θα λειτουργούν ταυτόχρονα και ως δότες και ως δέκτες δεσμών υδρογόνου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η αντικατάσταση των μεθυλομάδων της διμεθυλαμίνης με πιο ογκώδεις αλκυλομάδες, επίσης, η αντικατάσταση του πενταμελούς δακτυλίου με έναν εξαμελή ή βενζολικό δακτύλιο πιθανόν να βελτιώσει την στερική συμπληρωματικότητα του αναστολέα στο υδρόφοβο κανάλι του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

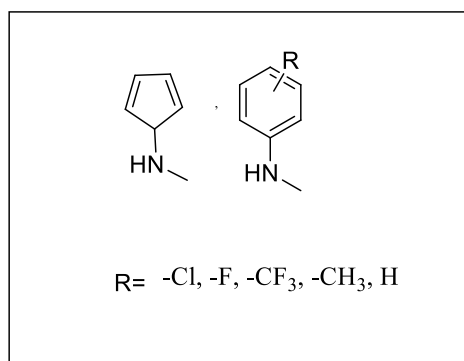
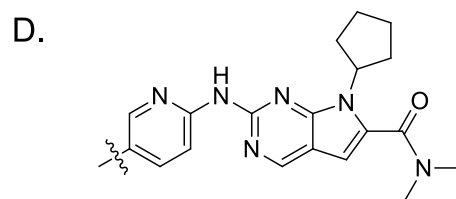


Σχήμα 56: Αναπαράγωγή της επιφάνειας υδροφοβικότητας του ενεργού κέντρου του ενζύμου *CDK6* γύρω από τον αναστολέα *Ribociclib*.

Με βάση τις ως άνω υποθέσεις σχεδιάστηκαν μία σειρά αναστολέων με τις παρακάτω τροποποιήσεις:



-C	R ₁	R ₂	R ₃
1	-H	-CF ₃	-H
2	-H	-NO ₂	-CH ₃
3	-H	-NH ₂	-CH ₃
4	-CF ₃	-H	-Br
5	-Cl	-H	-NO ₂
6	-Cl	-H	-NH ₂
7	-CF ₃	-H	-NO ₂
8	-CF ₃	-H	-NH ₂
9			



Σχήμα 57: Τροποποιήσεις στη δομή του Ribociclib ως απόρροια της μελέτης της δομής συγκρουστάλλωσης με την CDK6.

3.2.2 Μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς (Docking)

Στον τομέα της μοριακής μοντελοποίησης, η μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς είναι μια μέθοδος που προβλέπει τον προτιμώμενο προσανατολισμό ενός μορίου όταν ένας αναστολέας προσδένεται σε μία πρωτεΐνη στόχο προς σχηματισμό ενός σταθερού σύμπλεγματος. Η γνώση του προτιμώμενου προσανατολισμού ακολουθώντας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ισχύος του συσχετισμού ή της συγγένειας δέσμευσης μεταξύ δύο μορίων, χρησιμοποιώντας συναρτήσεις βαθμολόγησης.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιολογικών μορίων, όπως οι πρωτεΐνες, τα πεπτίδια, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδατάνθρακες και τα λιπίδια, παίζουν κεντρικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος. Επιπλέον, ο σχετικός προσανατολισμός των δύο εταίρων που αλληλεπιδρούν μπορεί να επηρεάσει τον τυπό του παραγόμενου σήματος (π.χ. αγωνιστής, έναντι ανταγωνιστού). Επομένως, η πρόβλεψη της ισχύος της σύνδεσης με την μέθοδο docking είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη τόσο της ισχύος αναστολής, όσο και το τυπού του παραγόμενου σήματος.

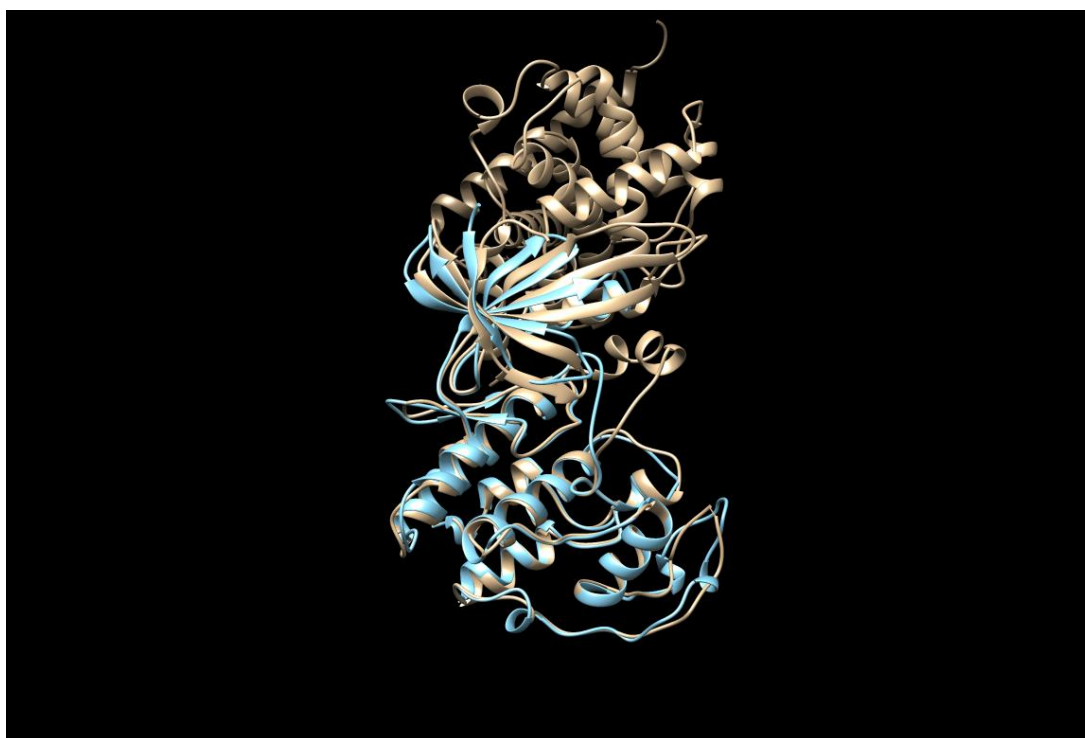
Η μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους στον σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή, λόγω της ικανότητάς της να προβλέπει τη διαμόρφωση και τη σύνδεση αναστολέων μικρού μοριακού βάρους στην κατάλληλη θέση δέσμευσης στόχου. Ο χαρακτήρας της δέσμευσης παίζει σημαντικό ρόλο στον ορθολογικό σχεδιασμό των φαρμάκων, καθώς και στην αποσαφήνιση θεμελιωδών βιοχημικών διεργασιών.⁽¹⁵⁷⁾

Μπορεί κάποιος να σκεφτεί τη μέθοδο docking ως ένα πρόβλημα «κλειδαριάς-κλειδιά», στο οποίο θέλει να βρει τον σωστό σχετικό προσανατολισμό του «κλειδιού» που θα ανοίξει την «κλειδαριά». Εδώ, η πρωτεΐνη μπορεί να θεωρηθεί ως «κλειδαριά» και ο αναστολέας μπορεί να θεωρηθεί ως «κλειδί». Η μοριακή σύνδεση μπορεί να οριστεί ως ένα πρόβλημα βελτιστοποίησης, το οποίο θα περιέγραφε τον προσανατολισμό «βέλτιστης προσαρμογής» ενός αναστολέα που συνδέεται με μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη στόχο. Ωστόσο, δεδομένου ότι τόσο ο αναστολέας όσο και η πρωτεΐνη είναι εύκαμπτα, μία αναλογία "χέρι-σε-γάντι" είναι πιο κατάλληλη από την μέθοδο "κλειδαριά και κλειδί". Με την μέθοδο «χέρι σε γάντι», ο αναστολέας και η πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σύνδεσης, προσαρμόζουν τη διαμόρφωσή τους για να επιτύχουν μια συνολική "βέλτιστη προσαρμογή" και αυτό το είδος διαμορφωτικής προσαρμογής που οδηγεί στη συνολική δέσμευση αναφέρεται ως "επαγόμενη προσαρμογή". Η εν λόγω μέθοδος, όμως, απαιτεί πολύ πιο πολύπλοκα υπολογιστικά μοντέλα για την θεωρητική μελέτη της σύνδεσης, πιο απαιτητικά υπολογιστικά συστήματα, καθώς και τις ανάλογες γνώσεις χειρισμού συστημάτων-προγραμμάτων. Η μέθοδος docking, απεναντίας, είναι εύκολα προσβάσιμη προς κάθε νέο

ερευνητή που θέλει να αποκτήσει μια πρώτη θεωρητική εικόνα της ανασταλτικής δράσης του μορίου-αναστολέα, του προσανατολισμού του στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης στόχου και των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει.

Η έρευνα για τη μοριακή σύνδεση εστιάζει στην υπολογιστική προσομοίωση της διαδικασίας μοριακής αναγνώρισης. Στοχεύει στην επίτευξη βελτιστοποιημένης διαμόρφωσης τόσο της πρωτεΐνης όσο και του αναστολέα, καθώς και το σχετικό προσανατολισμό μεταξύ πρωτεΐνης και αναστολέα, έτσι ώστε η ελεύθερη ενέργεια του συνολικού συστήματος να ελαχιστοποιείται.

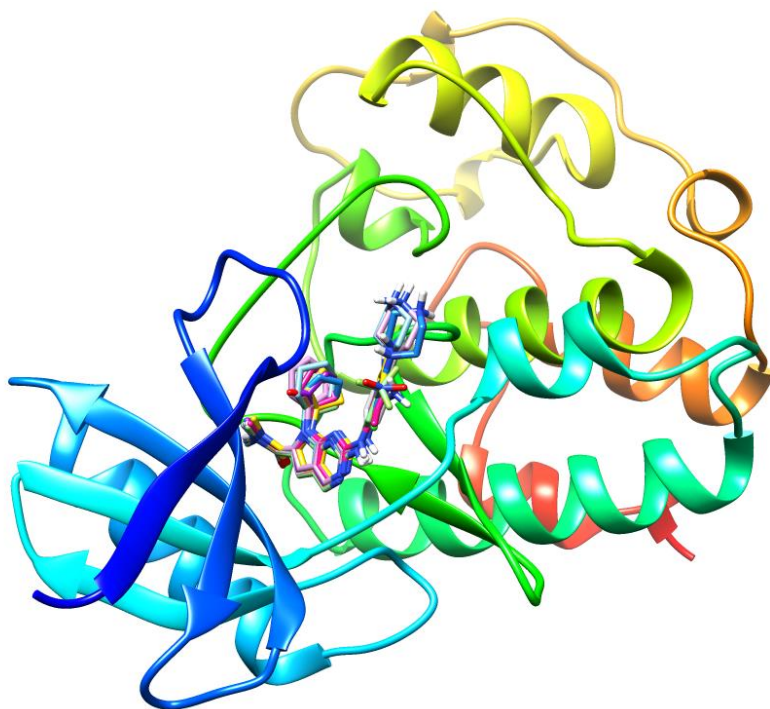
Στην παρούσα διδακτορική διατριβή διενεργήθηκαν αναλύσεις docking ενώσεων στο ενεργό κέντρο της CDK 6 (YHH), προκειμένου να εκτιμηθεί σε θεωρητικό επίπεδο η ανασταλτική τους δράση. Το docking πραγματοποιήθηκε με τρία προγράμματα: autodockvina, maestro glide, swissdock, ενώ η μοριακή απεικόνιση από τα προγράμματα Chimera 1.11c και Discovery studio visualiser. Από βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς και από το πρόγραμμα swisstargetprediction, παρατηρήσαμε ότι το συγκεκριμένο δομικό στοιχείο του αζα-ινδολικού δακτυλίου επαναλαμβάνεται σχεδόν σε όλους τους αναστολείς των CDKs κινασών. Οπότε επεκτάθη η ανάλυση docking και σε άλλες CDK πρωτεΐνες προκειμένου να εκτιμηθεί τόσο η ανασταλτικότητα, όσο και η εκλεκτικότητα των αναλόγων που σχεδιάστηκαν σε άλλους πρωτεϊνικούς στόχους. Στο εργαστήριο συντέθηκαν τα ανάλογα με τα καλύτερα θεωρητικά αποτελέσματα.



Σχήμα 57: Υπέρθεση της CDK4 και της CDK 6 πρωτεϊνικής κινάσης. Από την ανάλυση της αλληλουχίας προέκυψε ότι το ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών ταυτίζεται σε μεγάλο ποσοστό της, τάξης του 80%.

ΑΠΟΤΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ DOCKING

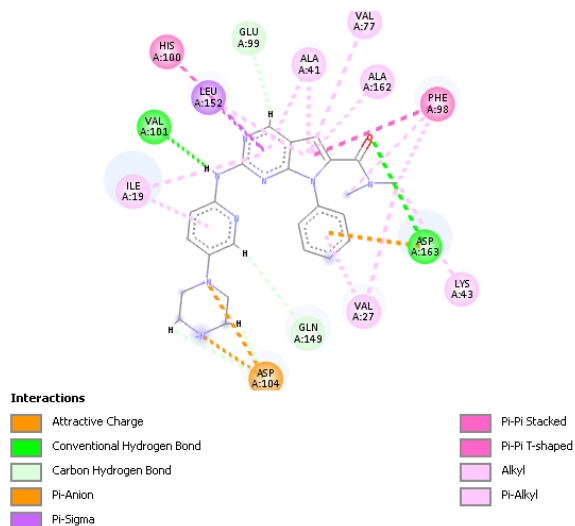
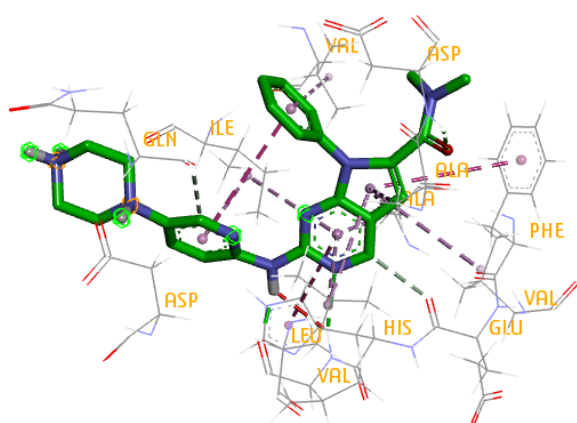
Ανάλυση docking των αναλόγων στην πρωτεΐνη CKD6



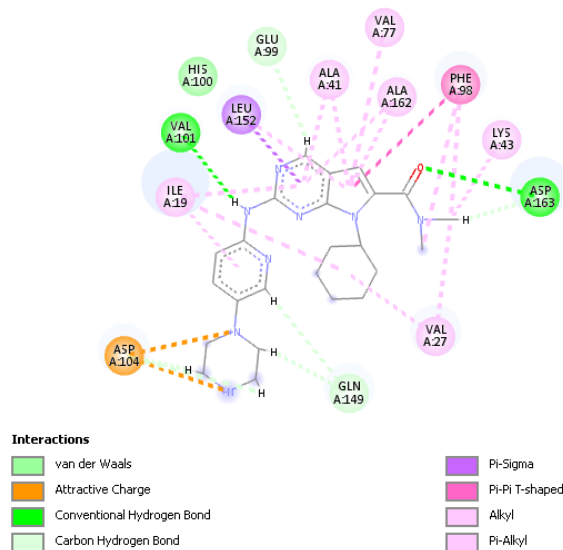
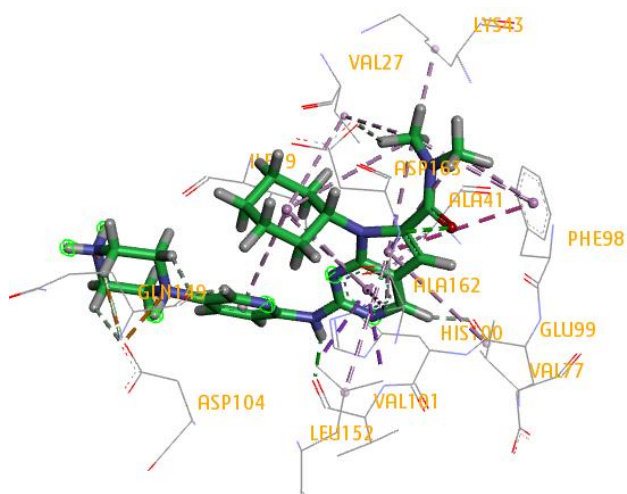
Σχήμα 58: Τα αποτελέσματα docking των αναλόγων που σχεδιάστηκαν στο Εργαστήριο, σε υπέρθεση με το ενεργό κέντρο της CKD6 κινάσης. Όπως παρατηρήθηκε, οι διαφοροποιήσεις στην διαμόρφωση των μορίων εντοπίζονται κυρίως στο πιπεραζινικό και στο πυριδινικό δακτύλιο.

Ενωση	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)
Ribociclib	-11,0
RibC1	-10,1
RibC2	-11,4
RibB1	-11,2
RibB2	-11,1
RibC5	-10,5
RibC6	-10,7
RibC7	-12
RibC8	-11
RibC9	-11,3
RibC10	-10,8

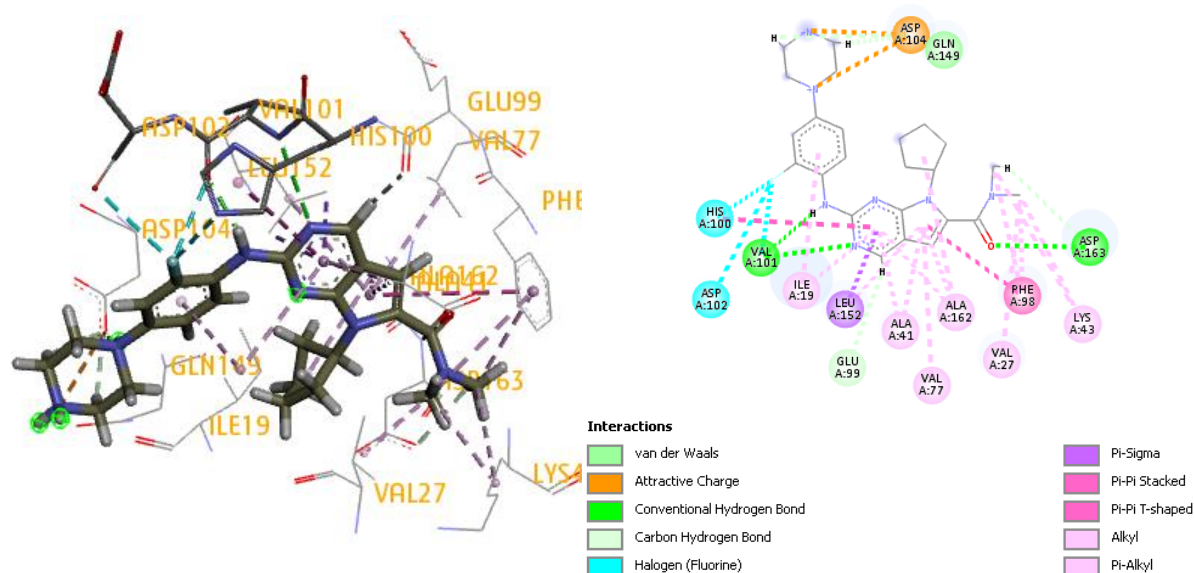
Πίνακας 5: Καταγράφονται οι θεωρητικές τιμές ΔG° μέσω του προγράμματος autodock vina, για την μελέτη πρόσδεσης των αναλόγων στο ενεργό κέντρο της CDK6.



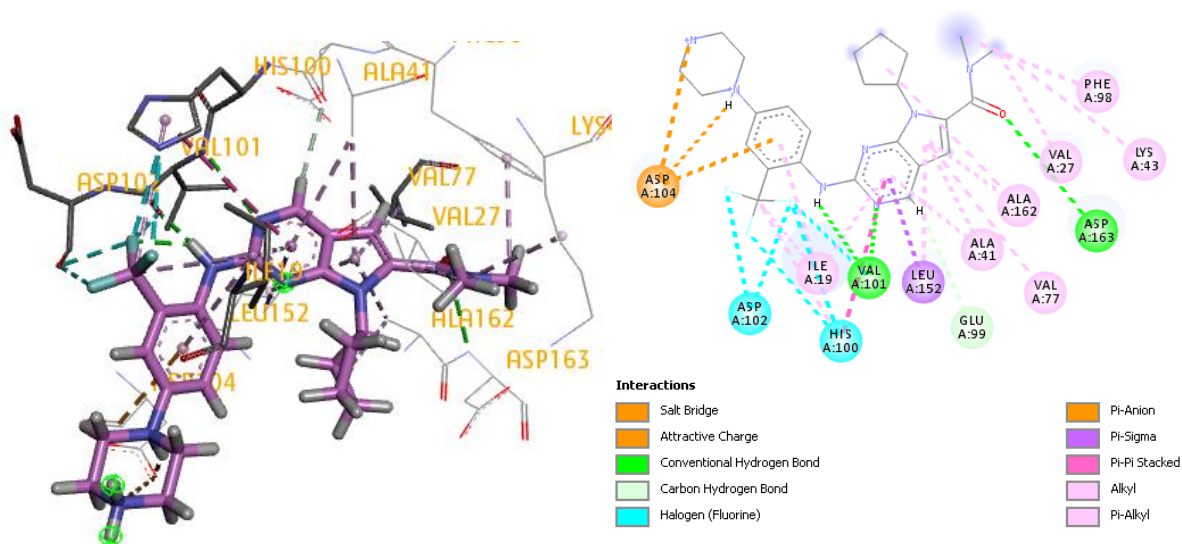
Σχήμα 59: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) docking του RibB2 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK6. Παρατηρούνται πρόσθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βενζολικού δακτυλίου και των αμινοξέων Asp 163, Val 27 που αυξάνουν την ανασταλτική δράση του μορίου.



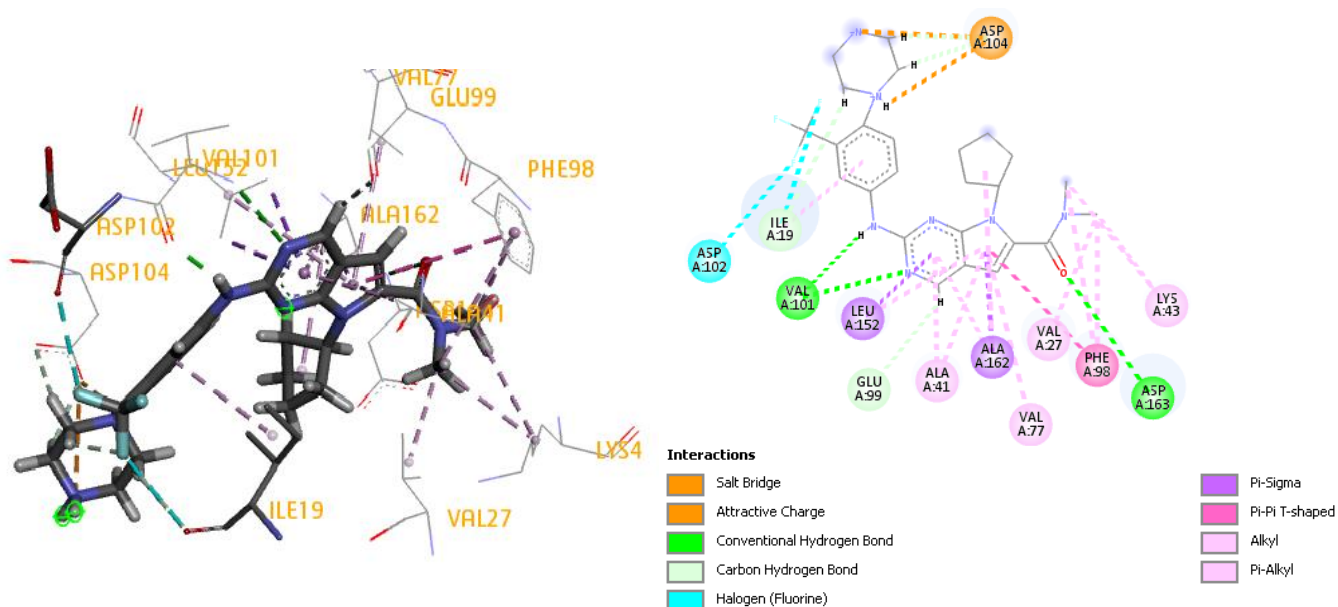
Σχήμα 60: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του RibB1 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK6. Παρατηρούνται πρόσθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυκλοξανικού δακτυλίου και των αμινοξέων Val 27, Ile 19.



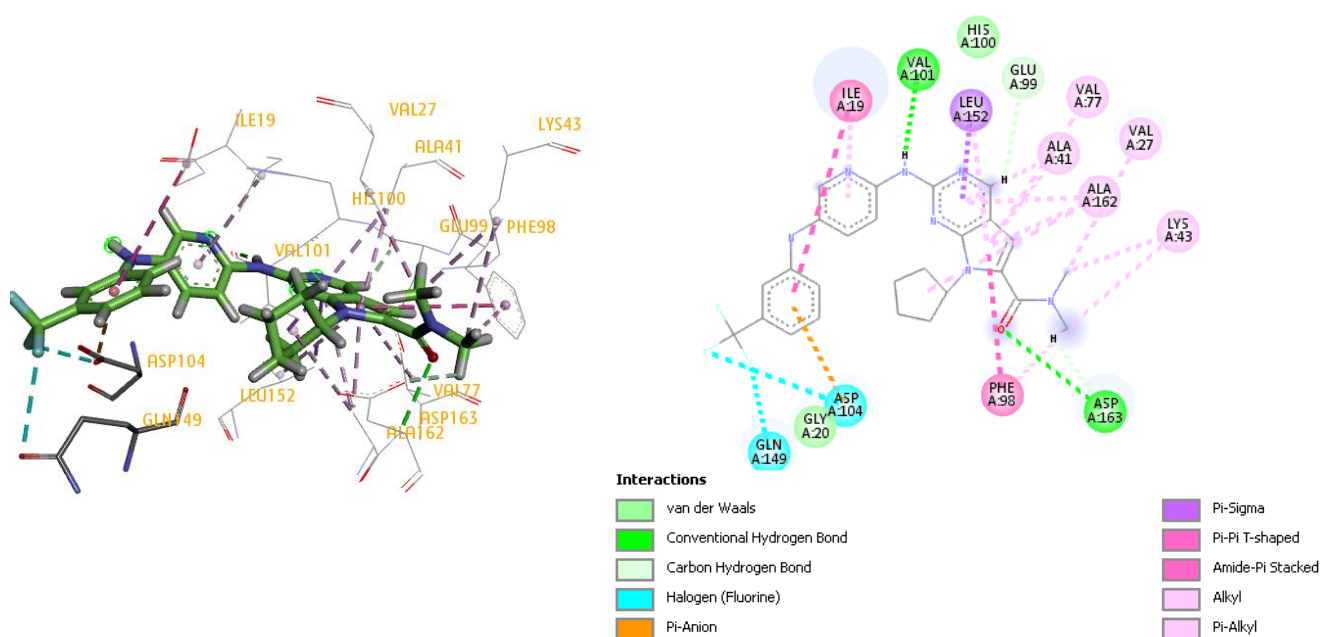
Σχήμα 61: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του RibC11 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK6. Παρατηρούνται πλούσιες αλληλεπιδράσεις αλογόνου μεταξύ και των αμινοξέων His 105, Val 101, Asp 102 και της τριφθορομέθυλο ομάδας. Ταυτόχρονα διατηρούνται όλες οι αλληλεπιδράσεις του RIBOCICLIB.



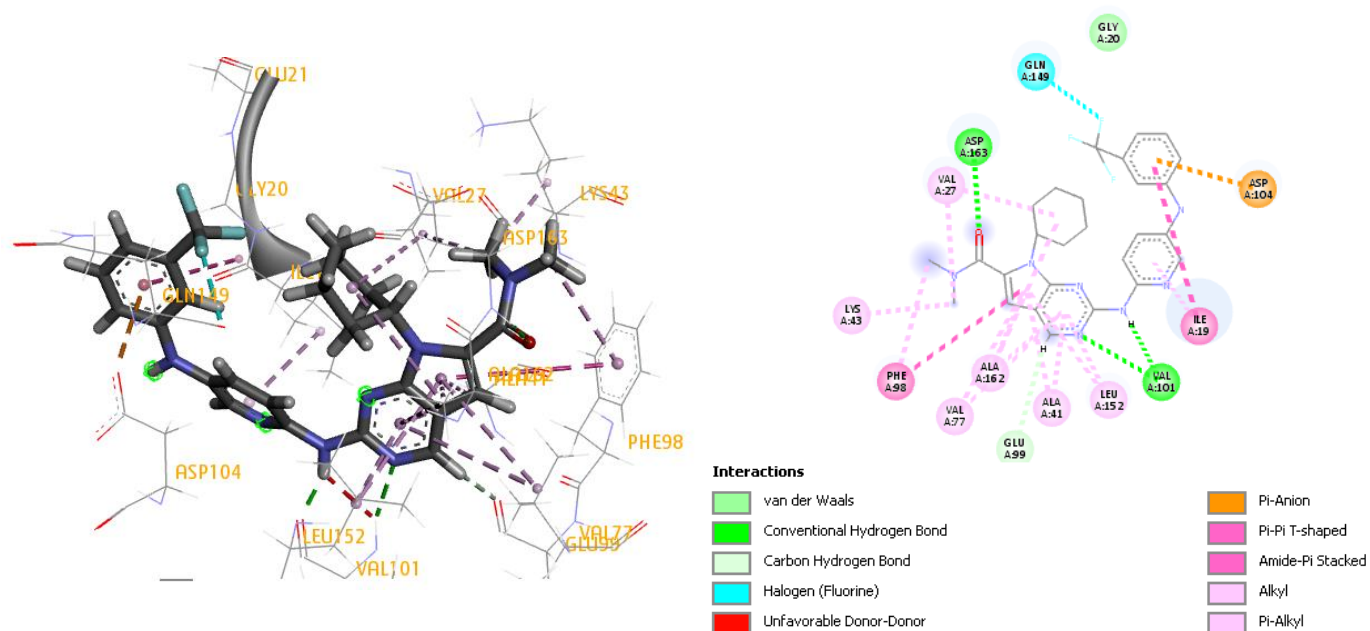
Σχήμα 62: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του RibC7 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK6. Παρατηρούνται πλούσιες πρόσθετες αλληλεπιδράσεις αλογόνου της τριφθορο-μέθυλο ομάδας και των αμινοξέων His 105, Val 101, Asp 102.



Σχήμα 63: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η διδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του RibC8 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK6. Παρατηρούνται πρόσθετες αλληλεπιδράσεις αλογόνου μεταξύ της τριφθορομεθυλο ομάδας και των αμινοξέων Asp 102, Ile19

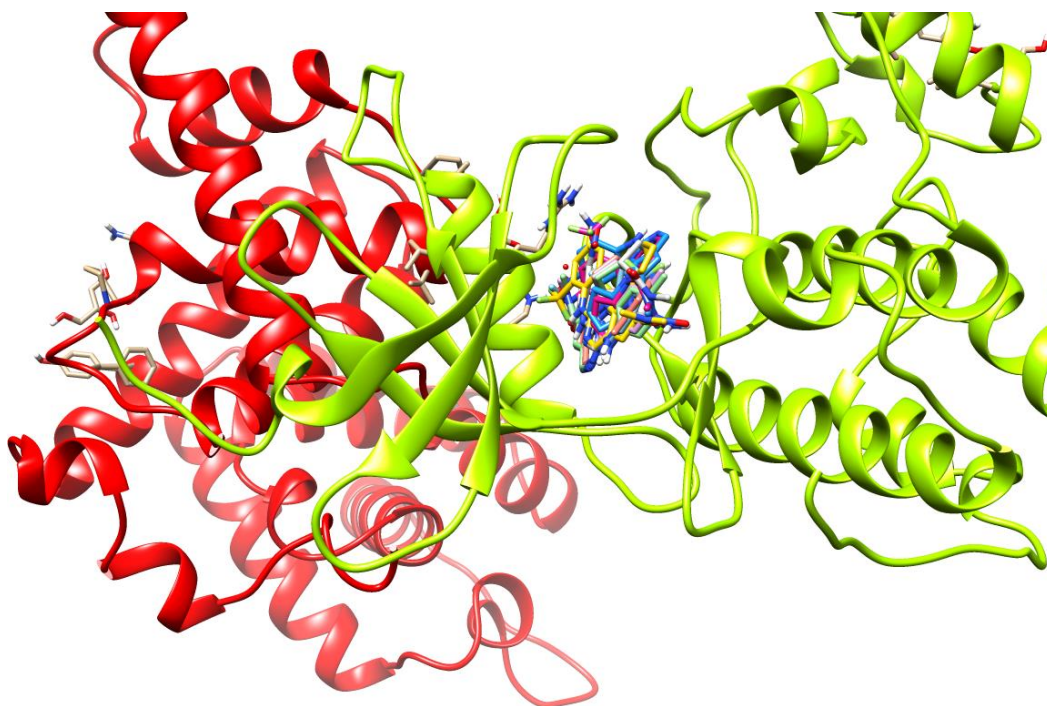


Σχήμα 64: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η διδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του αποτελέσματος docking για το RibC1 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK6. Παρατηρούνται πρόσθετες αλληλεπιδράσεις αλογόνου μεταξύ της τριφθορομεθυλο-ομάδας και των αμινοξέων Asp 104, Gln 149.



Σχήμα 65: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του RibC2 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK6. Παρατηρούνται πρόσθετες αλληλεπιδράσεις αλογόνου μεταξύ του βενζολικού δακτυλίου και του αμινοξέος Gln 189, π-ανιονικός δεσμός με το Ile 19 και το Asp 104.

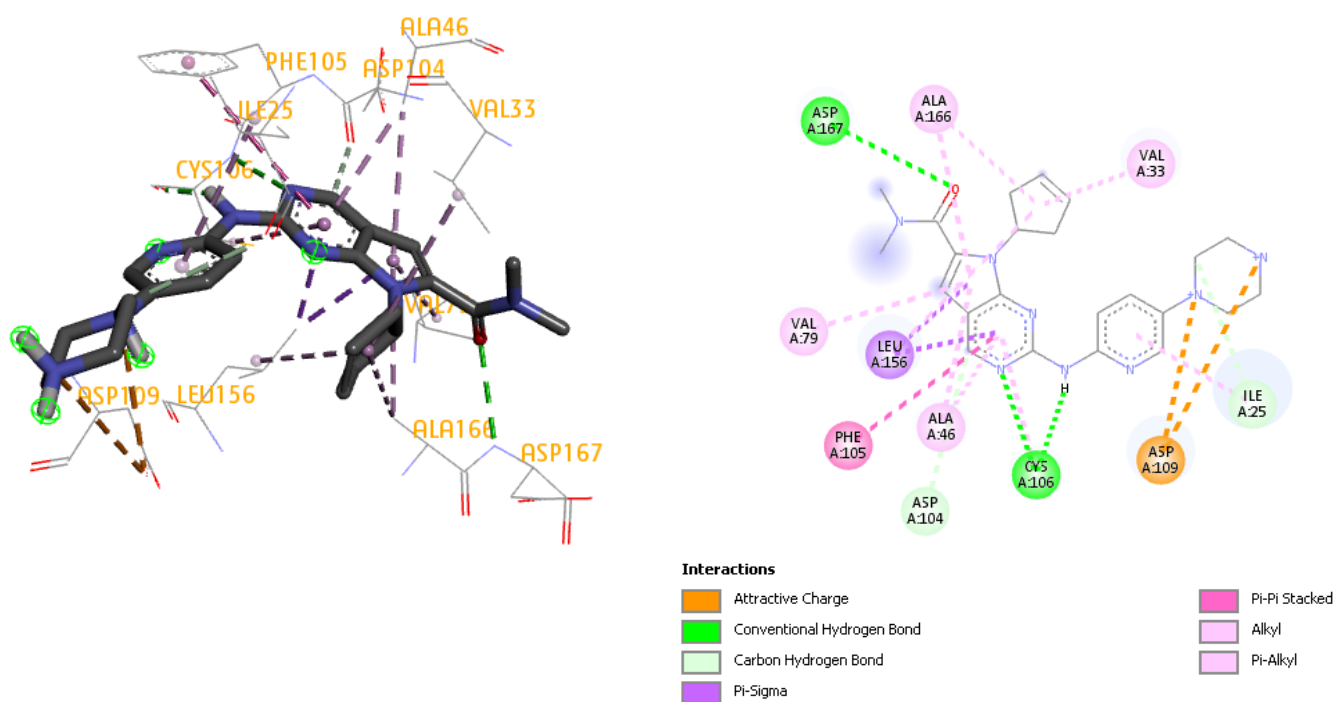
Ανάλυση docking των αναλόγων στην CDK9 Πρωτεϊνική Κινάση.



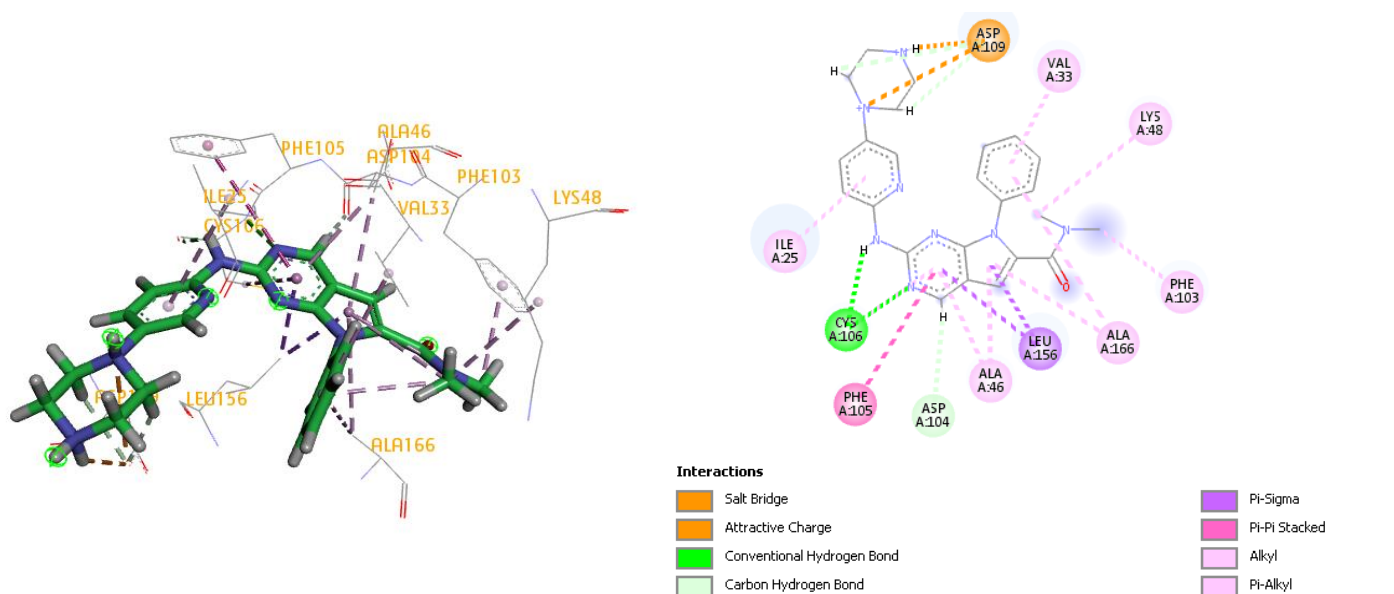
Σχήμα 66: Τα αποτελέσματα docking, σε υπέρθεση, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK9.

Ένωση	$\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)
Ribociclib	-10,5
RIB-C1	-10,1
RIB-C2	-10,4
RIB-B1	-10,5
RIB-B2	-10,6
RIB-C5	-9,9
RIB- C6	-11,3
RIB-C7	-11,1
RIB-C8	-10,8
RIB-C9	-10,1
RIB-C10	-10

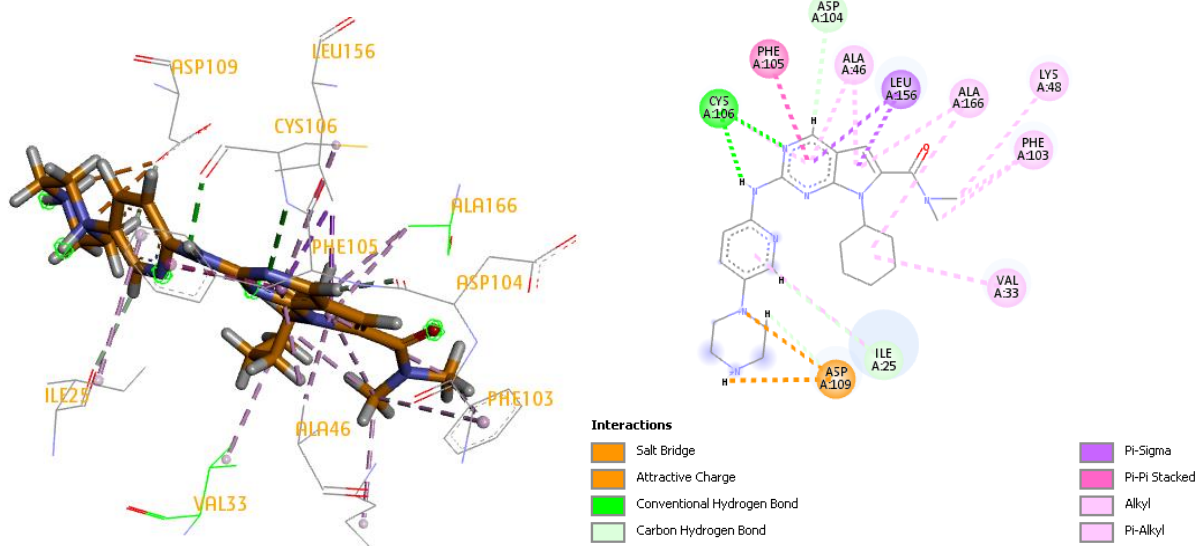
Πίνακας 6: Καταγράφονται οι Θεωρητικές τιμές ΔG° μέσω του πρόγραμματος autodock vina για την μελέτη πρόσδεσης των αναλόγων στο ενεργό κέντρο της CDK9.



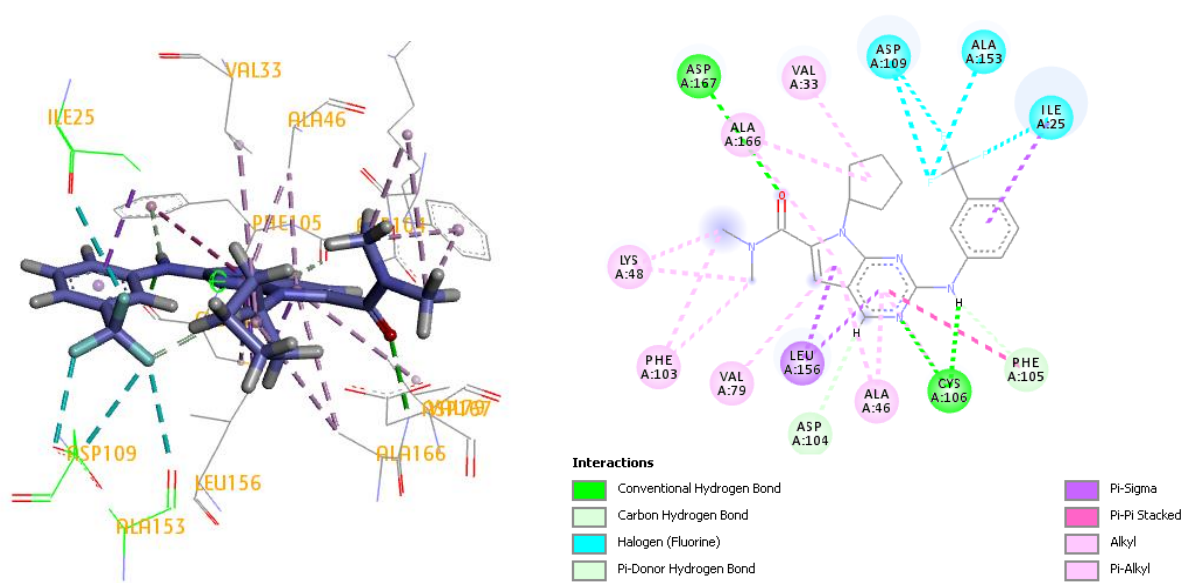
Σχήμα 67: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του *Ribociclib* στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK9. Οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις εντοπίζονται ως δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της Cys 106 και του αμινοξέως του άζω ινδόλιο του *Ribociclib*, καθώς και ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της Asp 167 και του καρβονυλίου του αμινοξέως του *Ribociclib*.



Σχήμα 68: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του *RibB2* στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK9. Παρατηρούνται πρόσθετες αλκυλο-αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βενζολικού δακτυλίου και των αμινοξέων Val 33, Ala 166, που αυξάνουν την ανασταλτική δράση του μορίου.

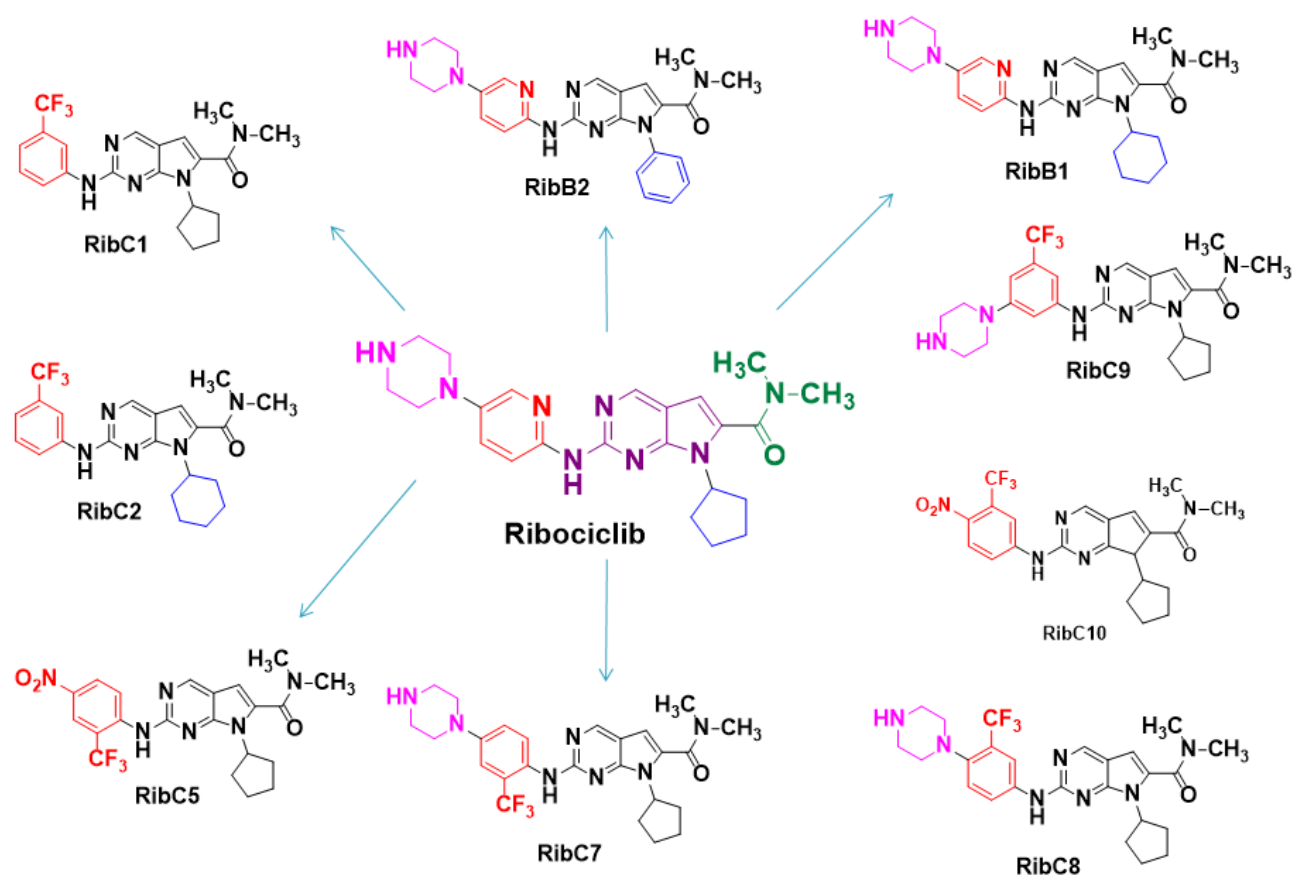


Σχήμα 69: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του RibB1 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK9. Παρατηρούνται πρόσθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βενζολικού δακτυλίου και των αμινοξέων Val 33, Ala 166.



Σχήμα 70: Η τρισδιάστατη (αριστερά) και η δισδιάστατη (δεξιά) απεικόνιση του RIB-C2 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου CDK9. Παρατηρούνται πρόσθετες αλληλεπιδράσεις αλογόνου μεταξύ της τριφθορομεθυλοομάδας και των αμινοξέων ASP:109, ALA:153, ILE:25 που αυξάνουν την ανασταλτική δράση του μορίου.

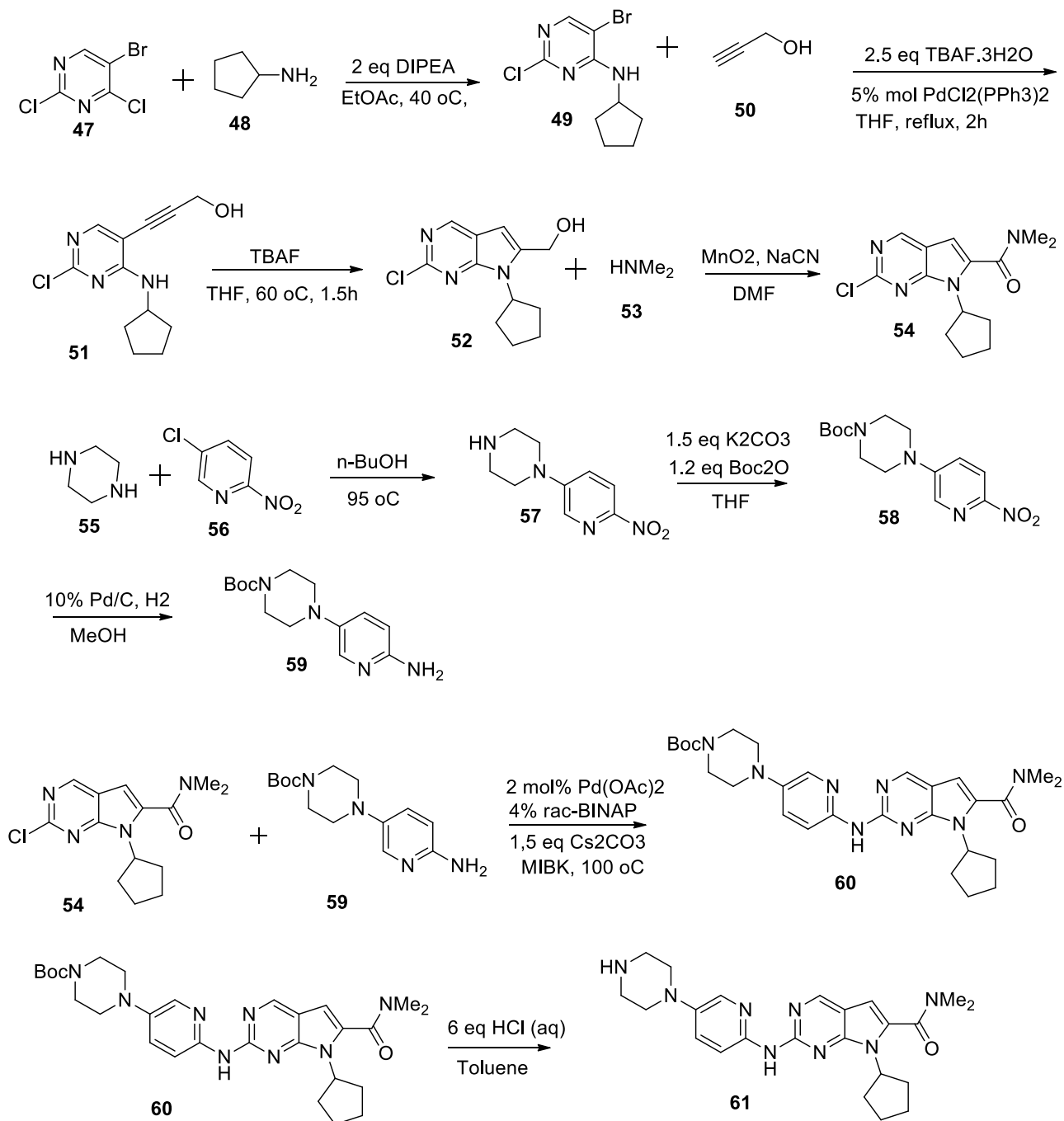
Με βάση την μελέτη μοντελοποίησης καταλήξαμε στην σύνθεση των εξής αναλόγων που αναμένεται να εμφανίσουν καλύτερη ανασταλτική δράση σε θεωρητικό επίπεδο.



Σχήμα 71: Σχεδιασθέντα ανάλογα του Ribociclib τα οποία και συντέθηκαν

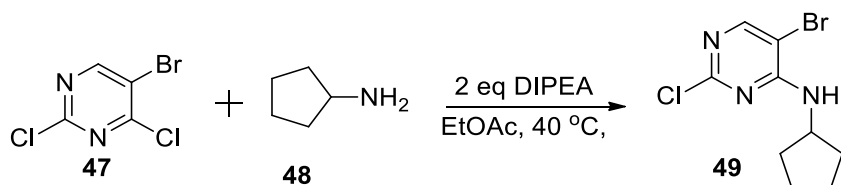
3.3 Συνθετική πορεία των ενώσεων:

Για την παρασκευή των αναλόγων ακολουθήθηκε στο εργαστήριο τη κατοχυρωθείσα συνθετική πορεία της εταιρείας Novartis, όπως παρατίθεται παρακάτω:



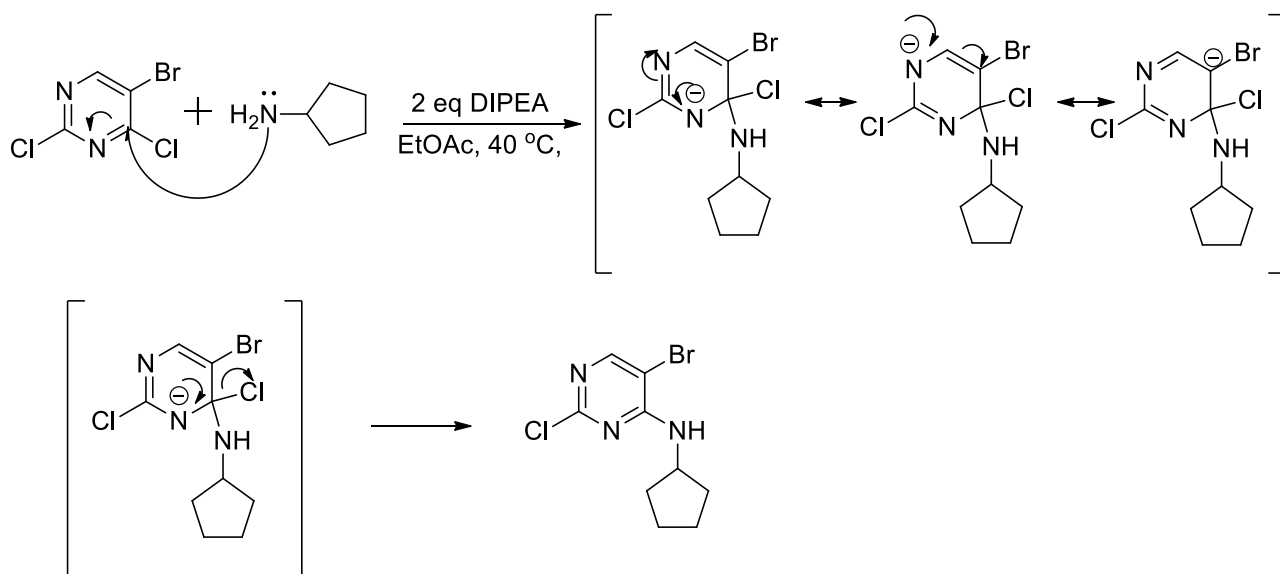
Σχήμα 72: Η συγκλίνουσα συνθετική πορεία 9 συνολικά σταδίων, όπως κατοχυρώθηκε από την εταιρεία NOVARTIS ⁽¹⁴⁾.

Το 1^ο στάδιο αφορά μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής προσβολής στην 5-βρώμο-2,4-διχλωροπυριδίνης παρουσία της βάσης δισοπροπυλο αιθυλαμίνης από την κυκλοπεντυλαμίνη και του διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα. Το προϊόν 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδινο-4-αμίνη παραλήφθηκε σε απόδοση 90%.



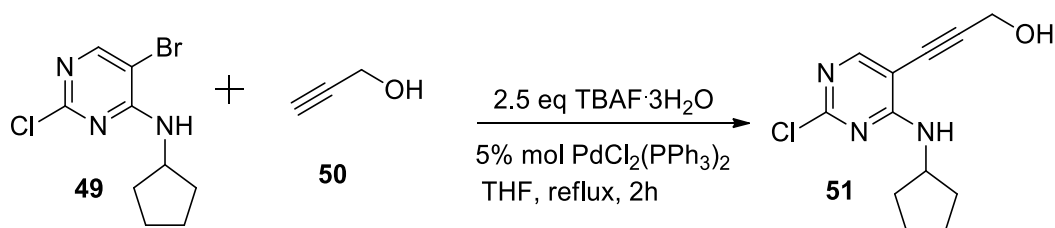
Σχήμα 73: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος **49** μέσω μίας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματική υποκατάστασης.

Η πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση πραγματοποιήθηκε μέσω του μηχανισμού προσθήκης απόσπασης, με το ανιονικό ενδιάμεσο να σταθεροποιείται μέσω του απεντοπισμού του αρνητικού του φορτίου στο 1,3-διαζα-βενζόλιο.



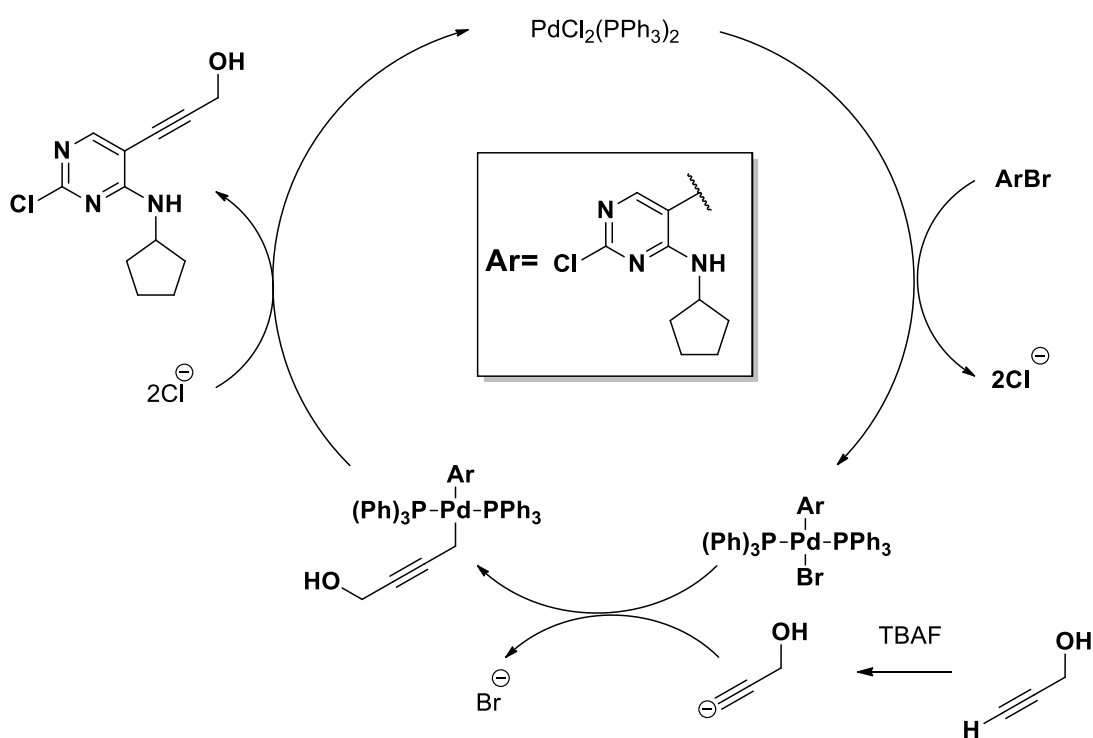
Σχήμα 74: Μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης **49**.

Το 2^ο στάδιο περιλαμβάνει μία αντίδραση τυπού sonogashira διασταυρούμενης σύζευξης της προπαργυλικής αλκοόλης με την 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσω του καταλύτη $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ σε διαλύτη THF όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 75). Το TBAF χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης μεταφοράς φάσης και ως ενεργοποιητής του τριπλού δεσμού. Η απόδοση της αντίδρασης είναι περίπου 40%.



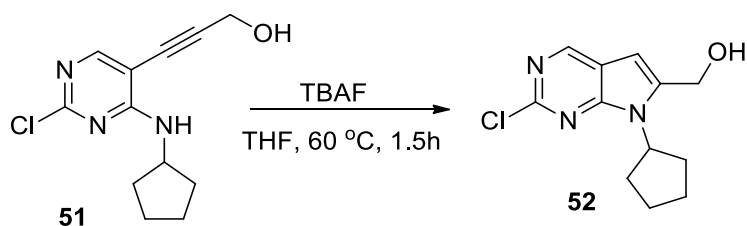
Σχήμα 75: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **51**.

Ο καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης Sonogashira περιλαμβάνει, την οξειδωτική προσθήκη της ένωσης 2 στο καταλύτη $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$. Η αποπρωτονίωση της προπαργυλικής αλκοόλης από τα ιόντα φθορίου προκαλεί σχηματισμό υδροφθορικού οξέος και ενός σύμπλοκου του παλλαδίου. Αυτό με με το ανιόν του αλκινίου υφίσταται αναγωγική απόσπαση για να σχηματίσει το προϊόν **51** και το αρχικό ενεργό καταλυτικό είδος $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$.



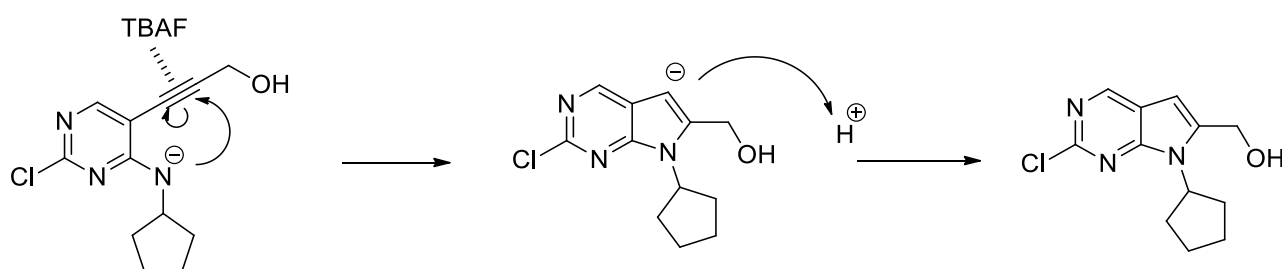
Σχήμα 76: Ο καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης Sonogashira.

Στο 3^ο στάδιο λαμβάνει χώρα μία ενδομοριακή κυκλοποίηση της ένωσης **51**, δηλαδή της 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη, προς μία διαζαπυριδίνη. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται το THF.



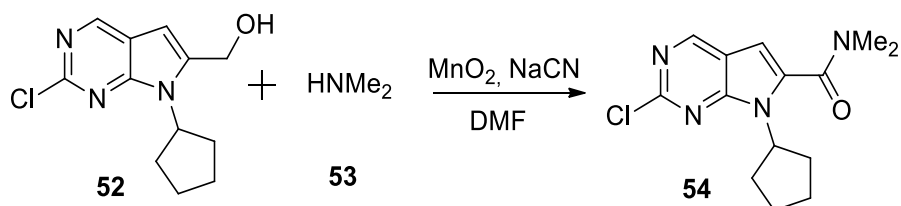
Σχήμα 77: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **52** (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης.

Το TBAF χρησιμοποιείται ως καταλύτης μεταφοράς φάσης, παρέχει ανιόντα φθορίου ως βάσης για την αποπρωτονίωση του NH και ενεργοποιεί τον τριπλό δεσμό. Η προπαργυλική αλκοόλη **51** αποπρωτονιώνεται στο άτομο αζώτου από ιόντα φθορίου που προέρχονται από το TBAF. Ακολουθεί πυρηνόφιλη προσβολή στον άνθρακα του αλκινίου από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου και πρωτονίωση στην 3-θέση του πυρρολικού δακτυλίου



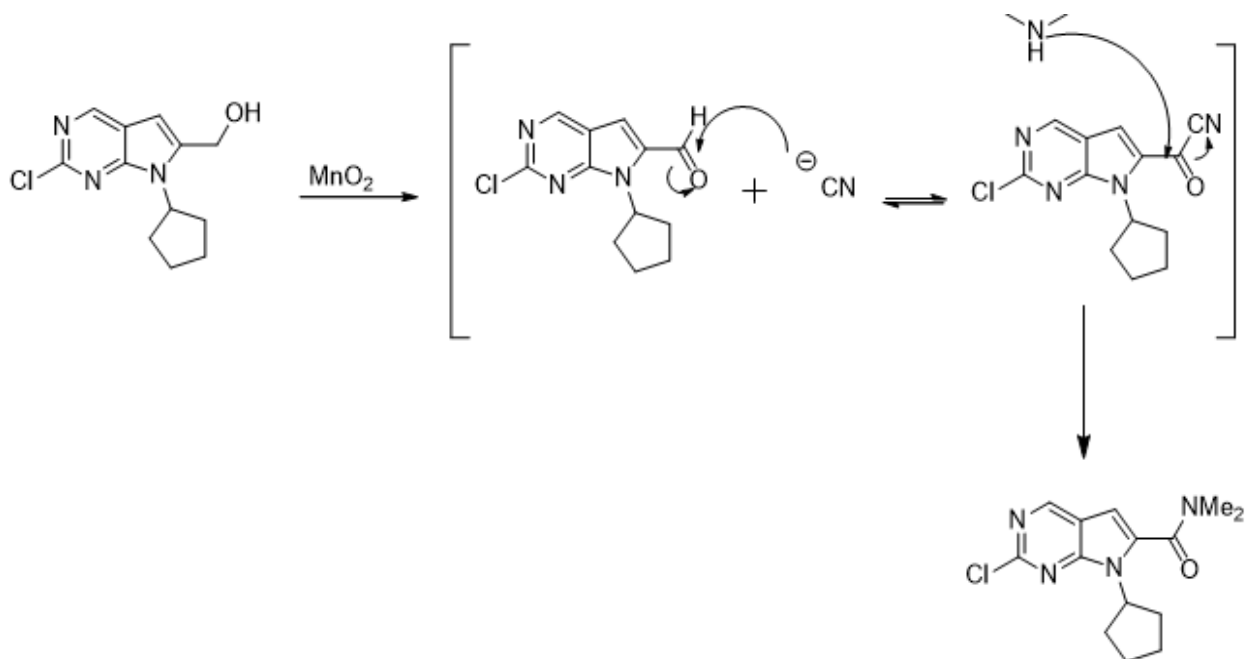
Σχημα 80: Μηχανισμός σύνθεσης του 5,7-Διαζαϊνδολικού δακτυλίου.

Στο 5^ο στάδιο πραγματοποιείται οξειδωτική αμίνωση της ένωσης **52**, δηλαδή της (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης. Ως οξειδωτικό μέσο χρησιμοποιείται το διοξείδιο του μαγγανίου, ως καταλύτης το κυανιούχο νάτριο και ως διαλύτης χρησιμοποιείται άνυδρο DMF.



Σχήμα 78: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **54**, 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο.

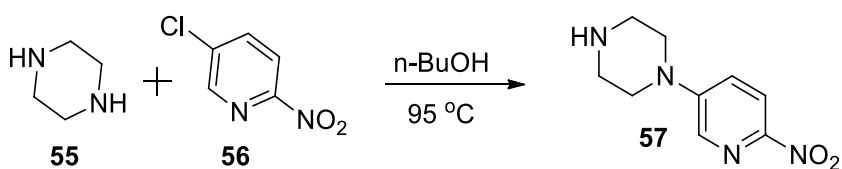
Ο μηχανισμός της αντίδρασης πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ενός κυανικού ενδιάμεσου που στην συνέχεια προσβάλλεται από την διμεθυλαμίνη και μέσω μιας ακυλο-υποκατάστασης κετονιτριλίου οδηγείται στον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού.



Σχήμα 79: Μηχανισμός σύνθεση της ένωσης **54**.

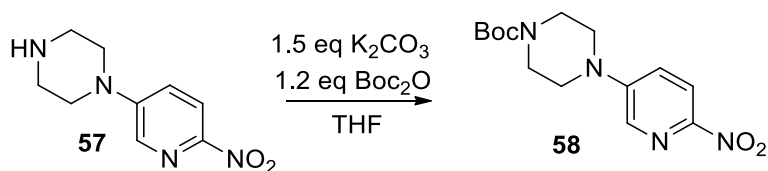
Το 6^ο, 7^ο και 8^ο στάδιο περιλαμβάνει τον σχηματισμό της ένωσης του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού-*tert*-βουτυλεστέρα, ο οποίος αντιδρά με την ένωση **54** για τον σχηματισμό του τελικού προϊόντος.

Στο 6^ο στάδιο πραγματοποιείται μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης της πιπεραζίνης. Το άζωτο της πιπεραζίνης προσβάλλει την 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη για τον σχηματισμό της 1-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζίνης. Ως διαλύτης χρησιμοποιείται η *n*-βουτανόλη. Η απόδοση της αντίδρασης είναι περίπου 80%.



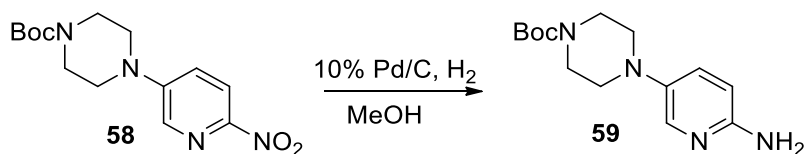
Σχήμα 80: Αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **57**.

Στην συνέχεια στο στάδιο 7^ο ακολουθεί η Boc προστασία του ελεύθερου -NH της 1-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζίνης με την χρήση του Boc-ανυδρίτη. Ως βάση χρησιμοποιείται το ανθρακικό κάλιο και ως διαλύτης το τετραϋδροφουράνιο.



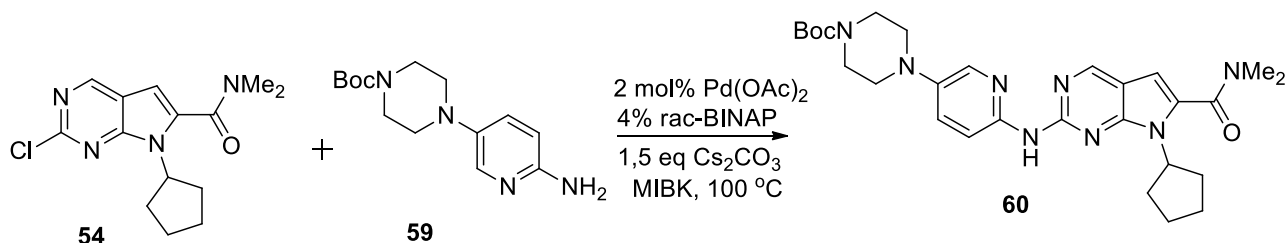
Σχήμα 81: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **58**.

Τέλος, στο 8^ο στάδιο πραγματοποιείται η αναγωγή της ένωσης **58** για τον σχηματισμό του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού-*tert*-βουτυλεστέρα **59** παρουσία 10% Pd/C, διαλύτη μεθανόλη, σε ατμόσφαιρα υδρογόνου.



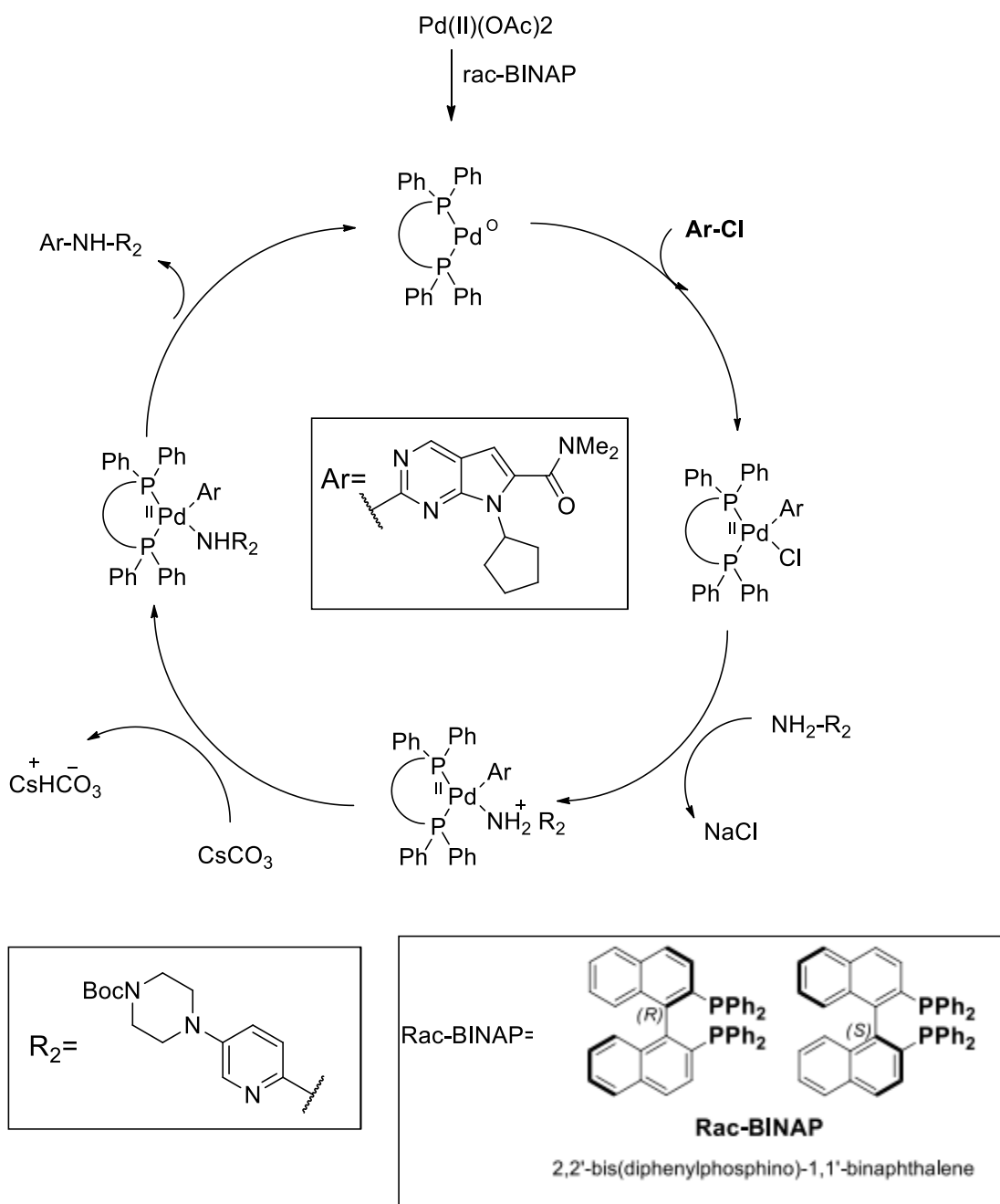
Σχήμα 82: Αντίδραση αναγωγής της ένωσης **58** προς τον σχηματισμό της **59**.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η σύζευξη της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-*N,N*-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο **54** και του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού-*tert*-βουτυλεστέρα **59** μέσω μίας σύζευξης Buchwald-Hartwig για τον σχηματισμό του Ribociclib (ένωση **60**).



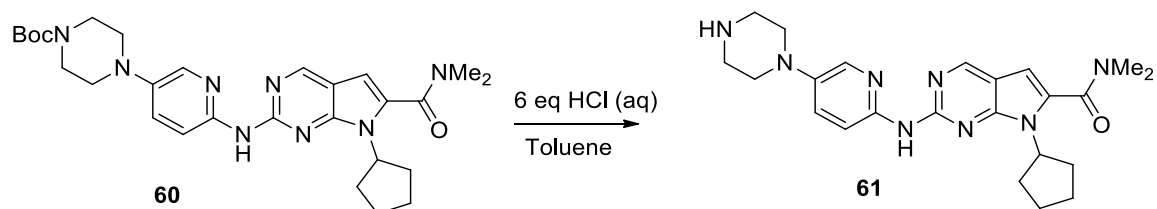
Σχήμα 83: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **60** (Boc-προστατευμένου Ribociclib) μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig.

Ο μηχανισμός περιλαμβάνει αρχικά την συμπλοκοποίηση του Pd(II) με το BINAP μέσω των δύο ατόμων φωσφόρου. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο υφίσταται οξειδωτική προσθήκη του αρυλοαλογονιδίου ($X = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}, \text{OTf}$) και μεταβαίνει στην οξειδωτική βαθμίδα II. Ακολούθως, πραγματοποιείται συναρμογή της αμίνης με ταυτόχρονη εξουδετέρωση του υδραλογόνου που σχηματίζεται από την βάση. Τέλος, μέσω μίας αντίδρασης αναγωγικής απόσπασης, παραλαμβάνεται το τελικό προϊόν σύζευξης Buchwald-Hartwig.



Σχήμα 84: Ο καταλυτικός κύκλος της τροποποιημένης αντίδρασης Buchwald-Hartwig

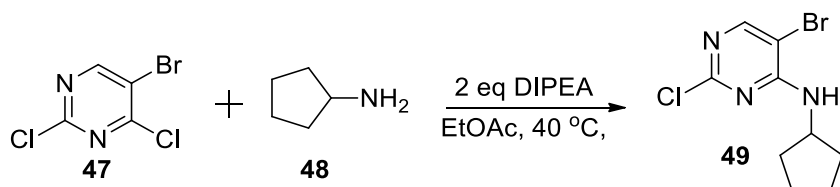
Στο τελικό στάδιο πραγματοποιείται η αποπροστασία της Boc-ομάδας της πιριμιδίνης υπό όξινες συνθήκες, 6N HCl, και διαλύτη τολουόλιο.



Σχήμα 85: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **61** (*Ribociclib*) .

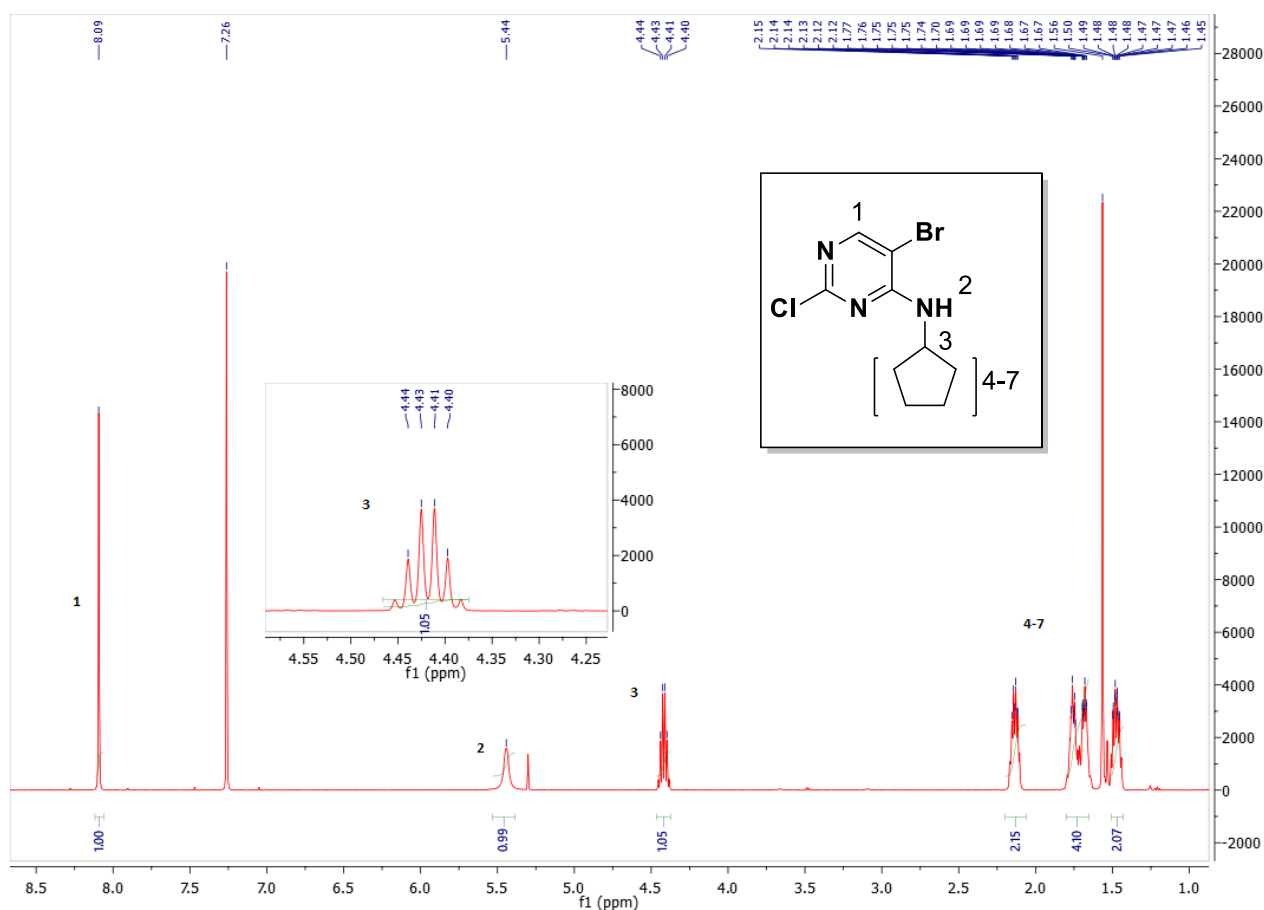
3.3.1 Σύνθεση ανάλογων με βάση την ένωση 54

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 49



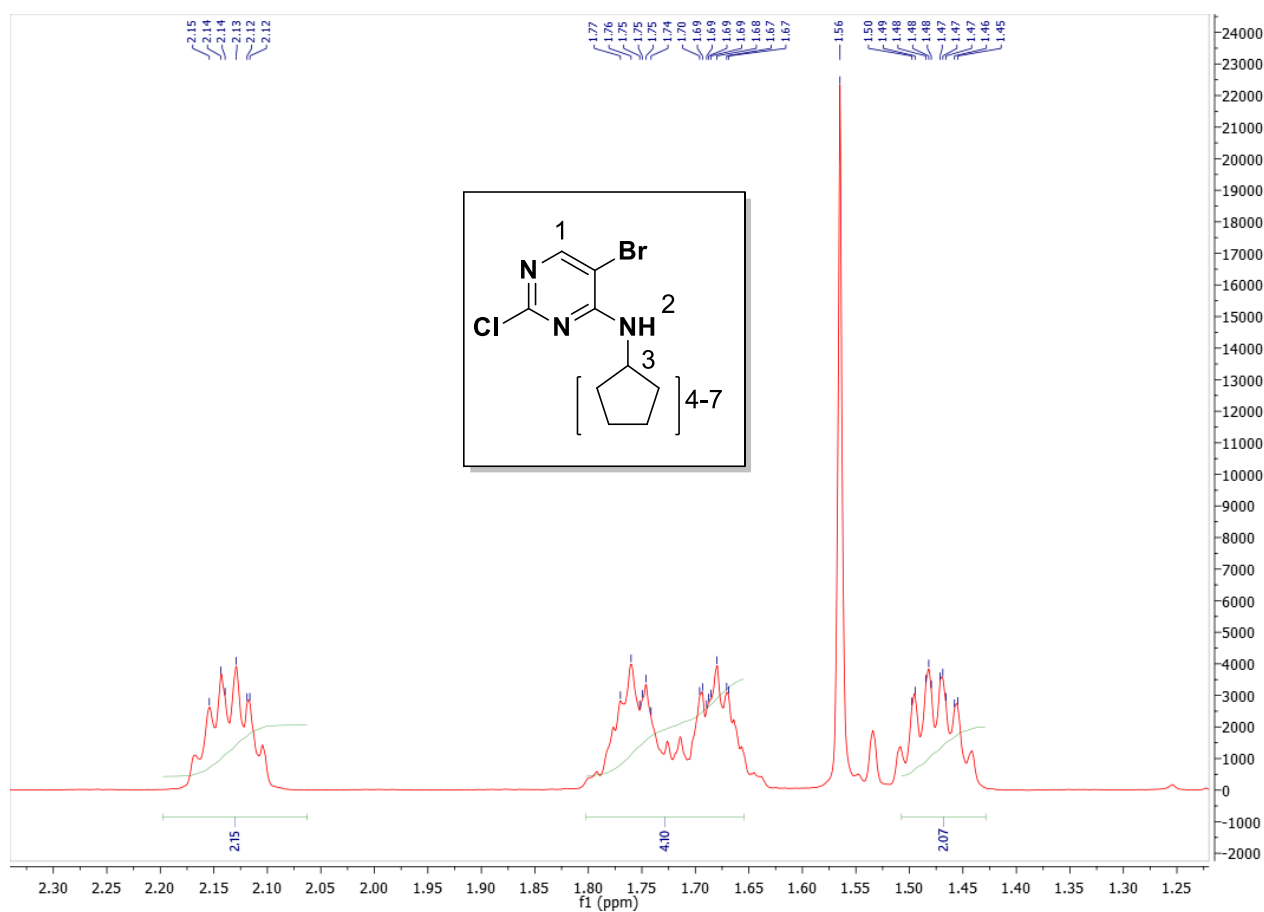
Σχήμα 86: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **49**.

Για την σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη ακολουθήθηκε η πορεία της εταιρείας. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 6h. Η ένωση **49** καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR.



Σχήμα 87: Φάσμα ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **49**.

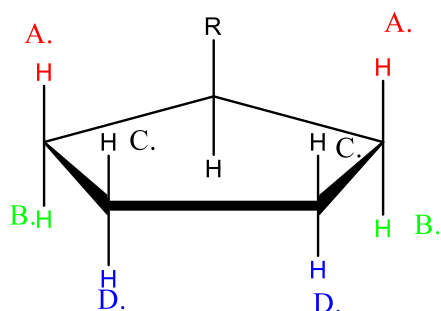
Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 εντοπίζεται στα 8.09 ppm ως απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H3, το πλέον αποπροστατευμένο από τα αλειφατικά καταγράφεται ως πολλαπλή κορυφή στα 4.2 ppm.



Σχήμα 88: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **49**.

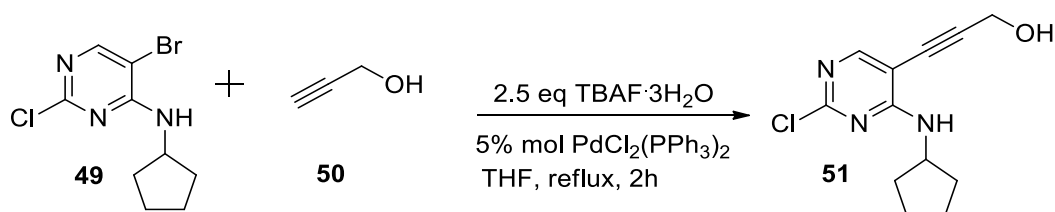
Μεταξύ των 1.45 μέχρι τα 2.17 ppm εντοπίζονται τα πρωτόνια H4-7 του πενταμελούς δακτυλίου ως τέσσερις χαρακτηριστικές πολλαπλές κορυφές λόγω των μη χημικά μαγνητικά ισοδύναμων ισημερινών και αξονικών πρωτονίων του πενταμελούς δακτυλίου.

Η κατάλληλη κατηγοριοποίηση των πρωτονίων ανάλογα με το χημικό περιβάλλον, φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



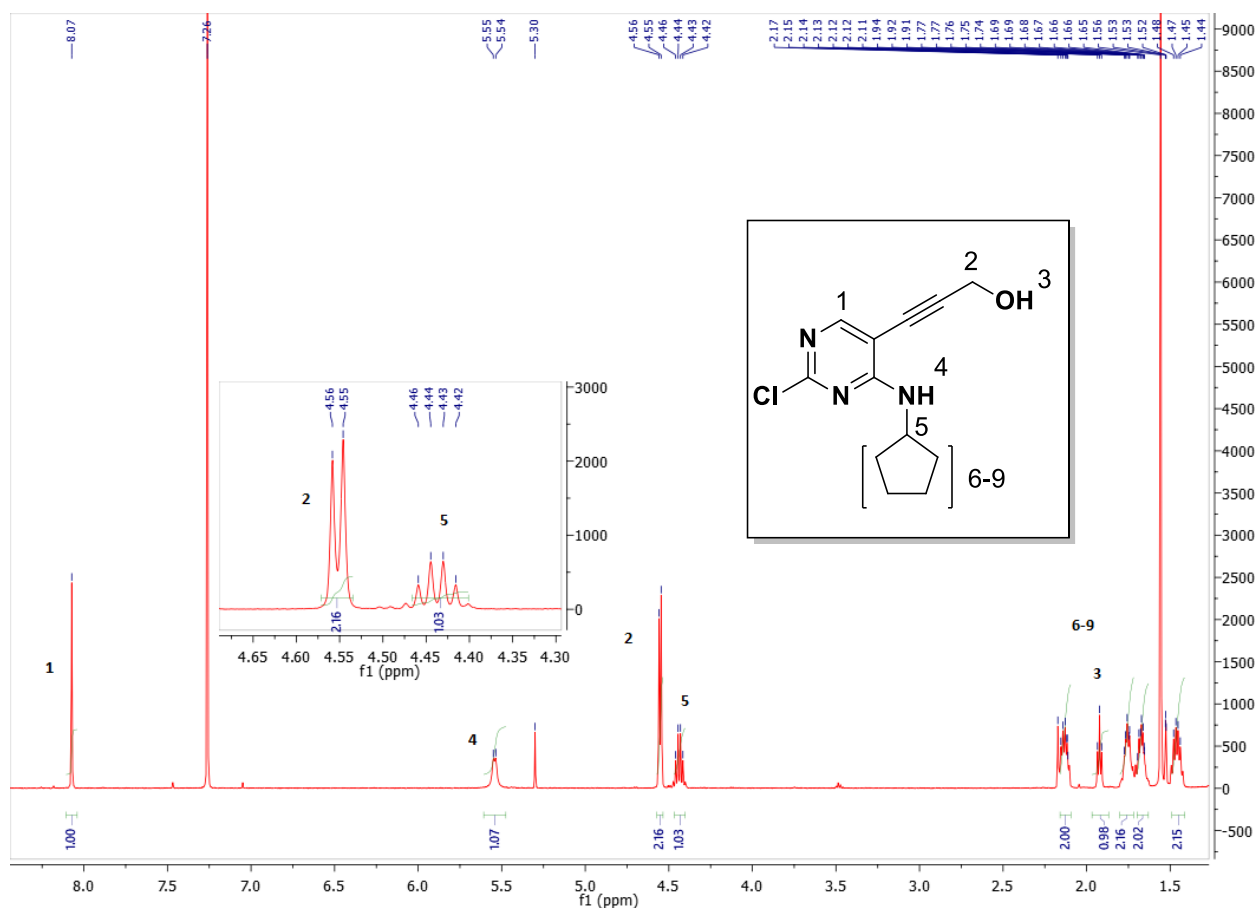
Σχήμα 89: Η κατηγοριοποίηση των υδρογόνων του πενταμελούς δακτυλίου με βάση το χημικό τους περιβάλλον.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 51



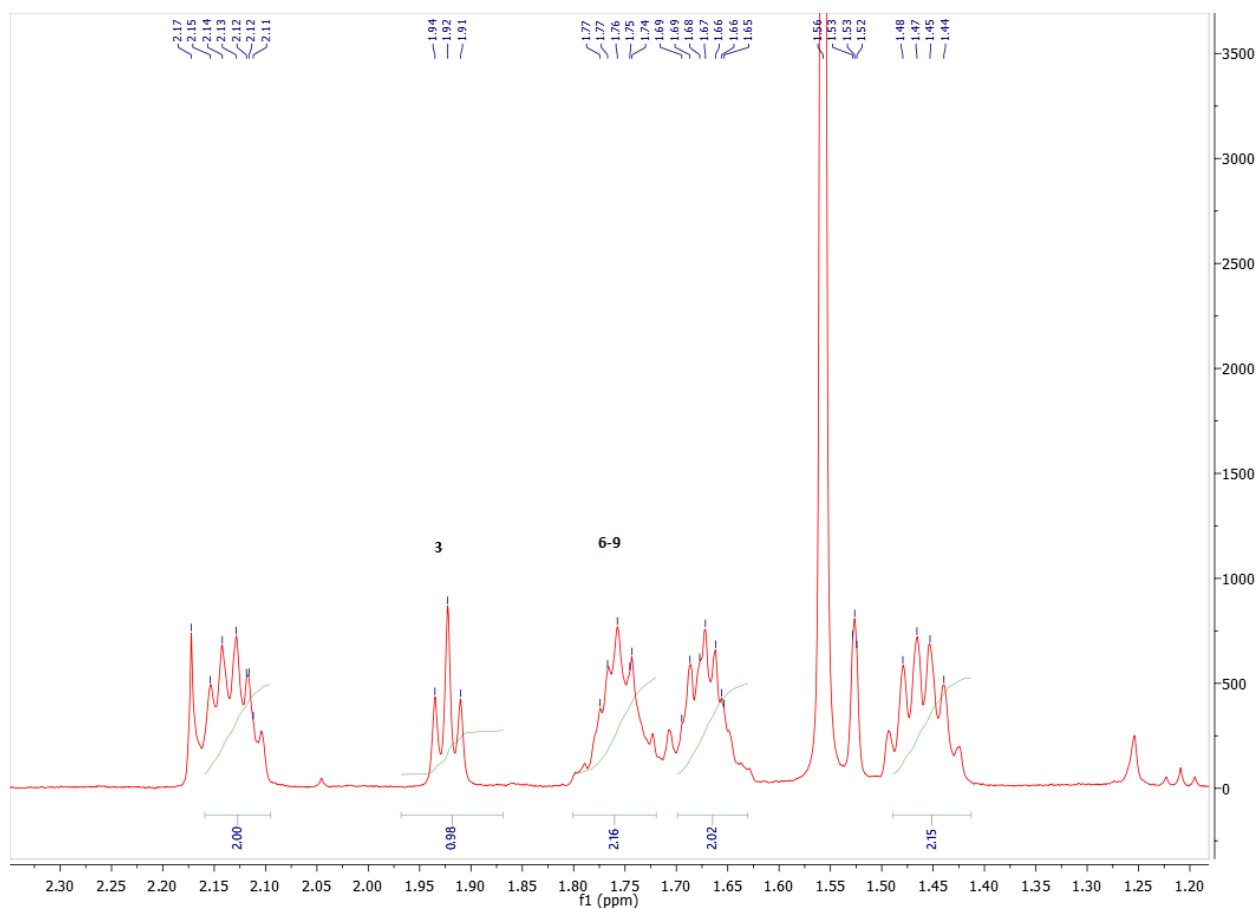
Σχήμα 90: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **51**.

Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με την χρήση καταλύτη PdCl₂(PPh₃)₂ σε διαλύτη THF. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης τον Pd(PPh₃)₄, που όμως οδήγησε σε μικρότερη απόδοση (30%). Το προϊόν **51** χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία ¹H NMR.



Σχήμα 91: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **51**.

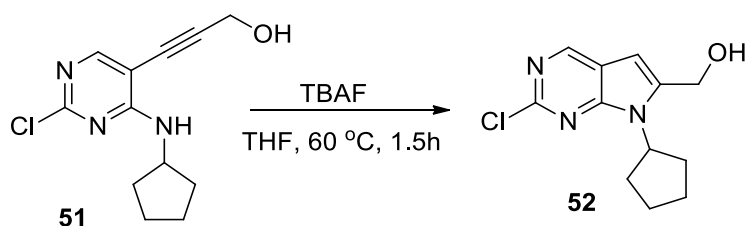
Το πιο αποπροστατευμένο H1 εντοπίζεται στα 8.09 ppm ως απλή κορυφή. Το H4 της αμινομάδας εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με $^3J = 7.47$. Τα πρωτόνια H2 εντοπίζεται ως διπλή κορυφή στα 4.55 ppm με $^3J = 6.2$ Hz. Η σχάση οφείλεται στην παρουσία του H3 της υδροξυλομάδας. Το συγκεκριμένο πρωτόνιο H3 σε CDCl_3 αναμένετο να είναι ανταλλάξιμο. Στην προκειμένη περίπτωση, υποτίθεται ότι η ένωση **5** λαμβάνει μία τέτοια διαμόρφωση που στερεοχημικά δεν επιτρέπει την ανταλλαγή της υδροξυλομάδας κι ως εκ τούτου καταγράφονται οι πολλαπλότητες των μεθινικών υδρογόνων ($-\text{CH}_2-$) και της υδροξυλομάδας ως μία διπλή κορυφή και μία τριπλή κορυφή, αντίστοιχα.



Σχήμα 92: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **51**.

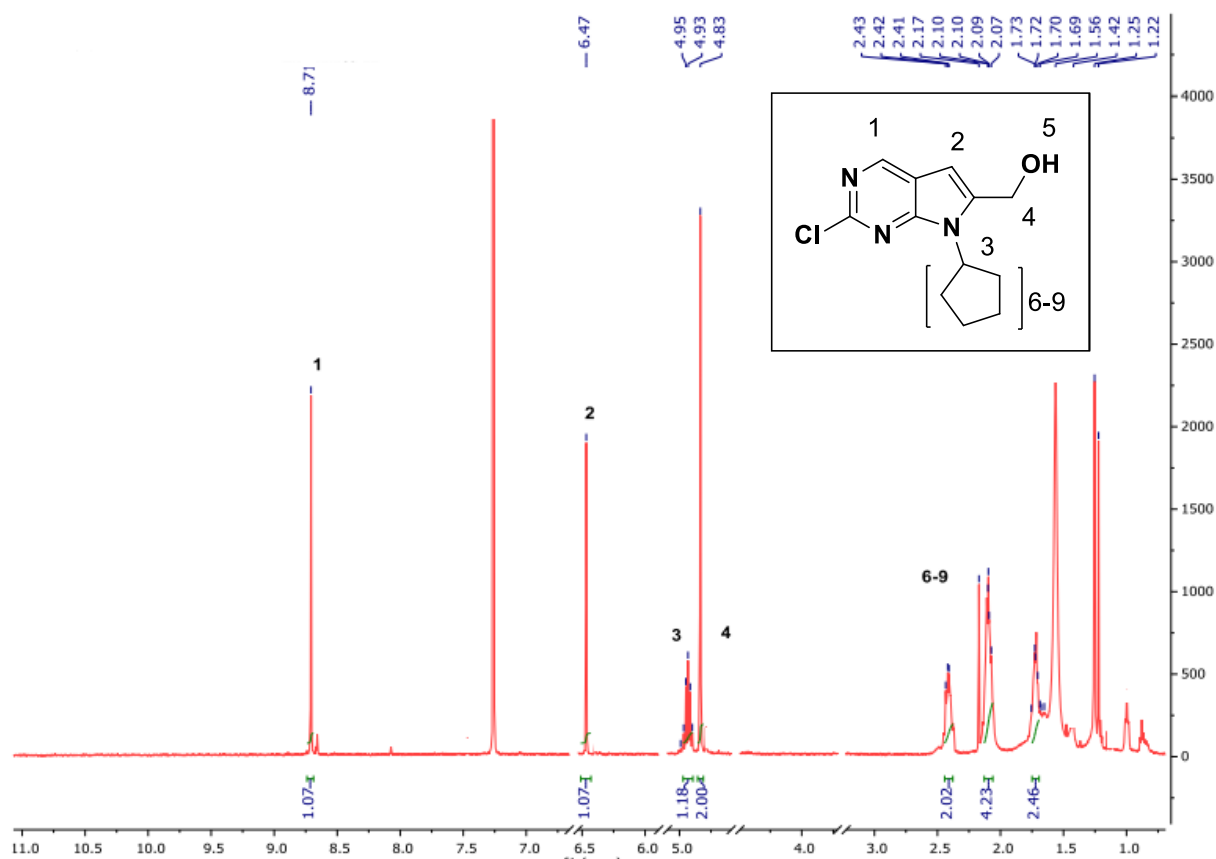
Τα πρωτόνια H6-8 εντοπίζονται ως πολλαπλές κορυφές στα 2.14 ppm, 1.76 ppm, 1.66 ppm και 1.46 ppm. Το πρωτόνιο H3, της υδροξυλομάδας καταγράφεται ως μία τριπλή κορυφή στα 1.92 ppm.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 52



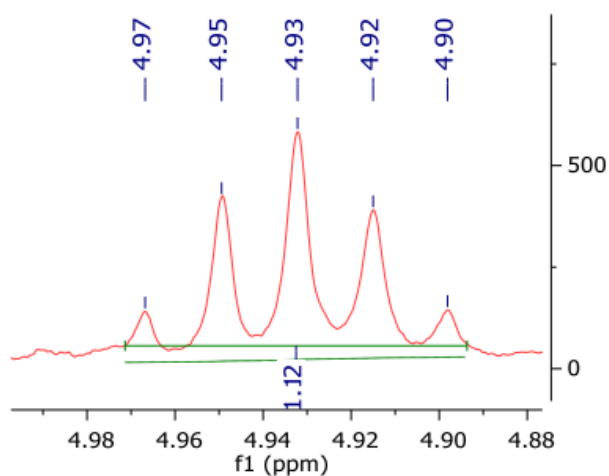
Σχήμα 93: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **52**.

Η ένωση **51** και περίσσεια $\text{TBAF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ σε διαλύτη THF θερμαίνεται και υπό ανάδευση επί 1.5 h. Το προϊόν **52** παρελαμβάνεται σε ικανοποιητική απόδοση, μεγαλύτερη του 80%.



Σχήμα 94: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **52**.

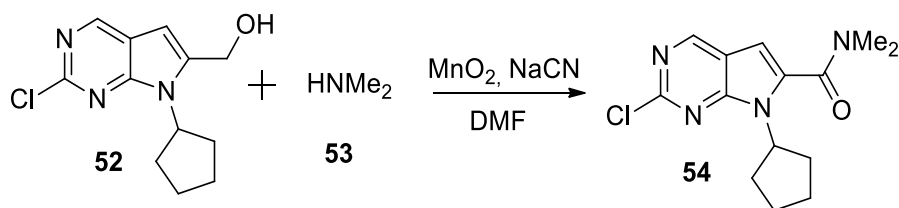
Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8.71 ppm και το πρωτόνιο H2 του πυρρολικού δακτυλίου στα 6.47 ppm ως απλές κορυφές. Τα πρωτόνια H6-9 του κυκλοπεντυλικού δακτυλίου συντονίζονται στα 2.43-1.22 ppm ως χαρακτηριστικές πολλαπλές κορυφές.



Σχήμα 95: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **52**.

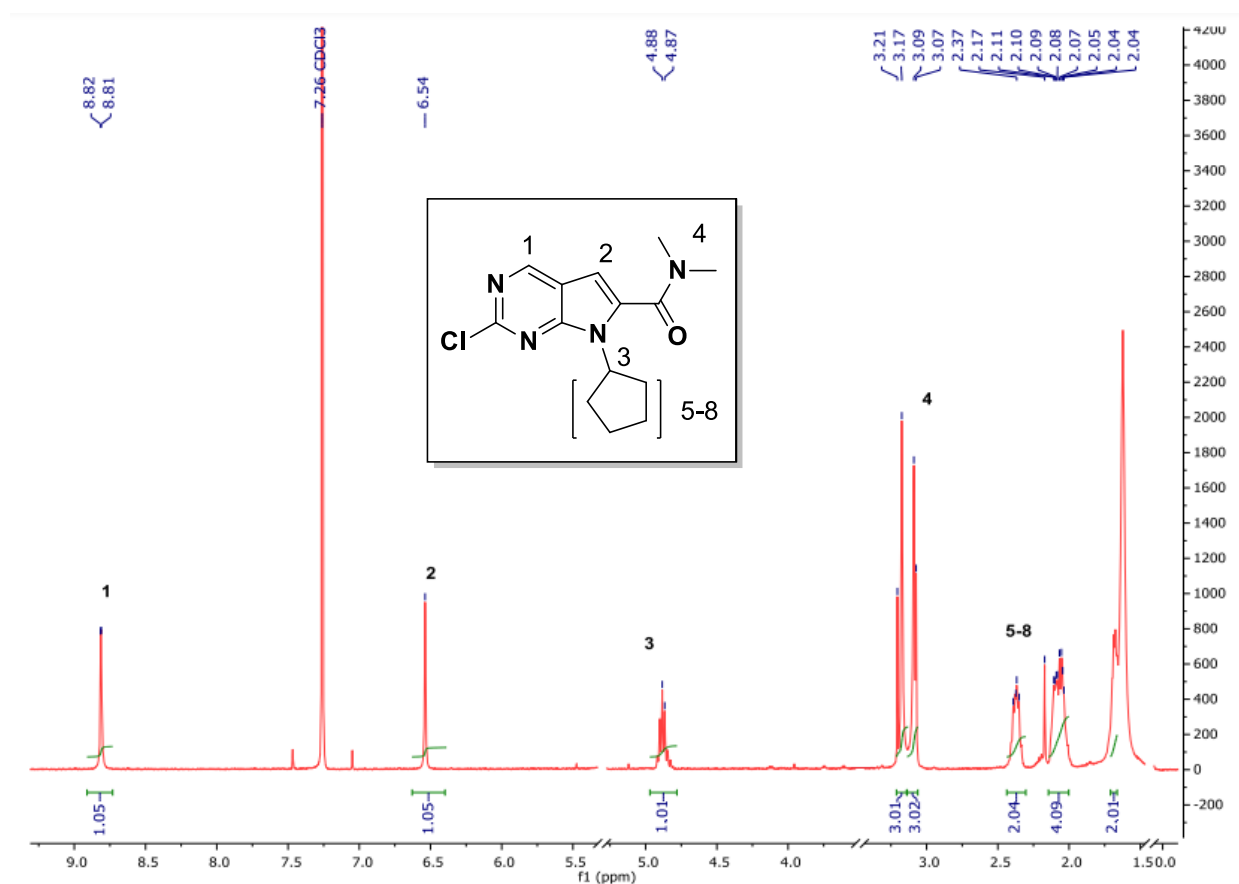
Το πρωτόνιο H3 καταγράφεται ως πολλαπλή κορυφή στα 4.93 ppm.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 54

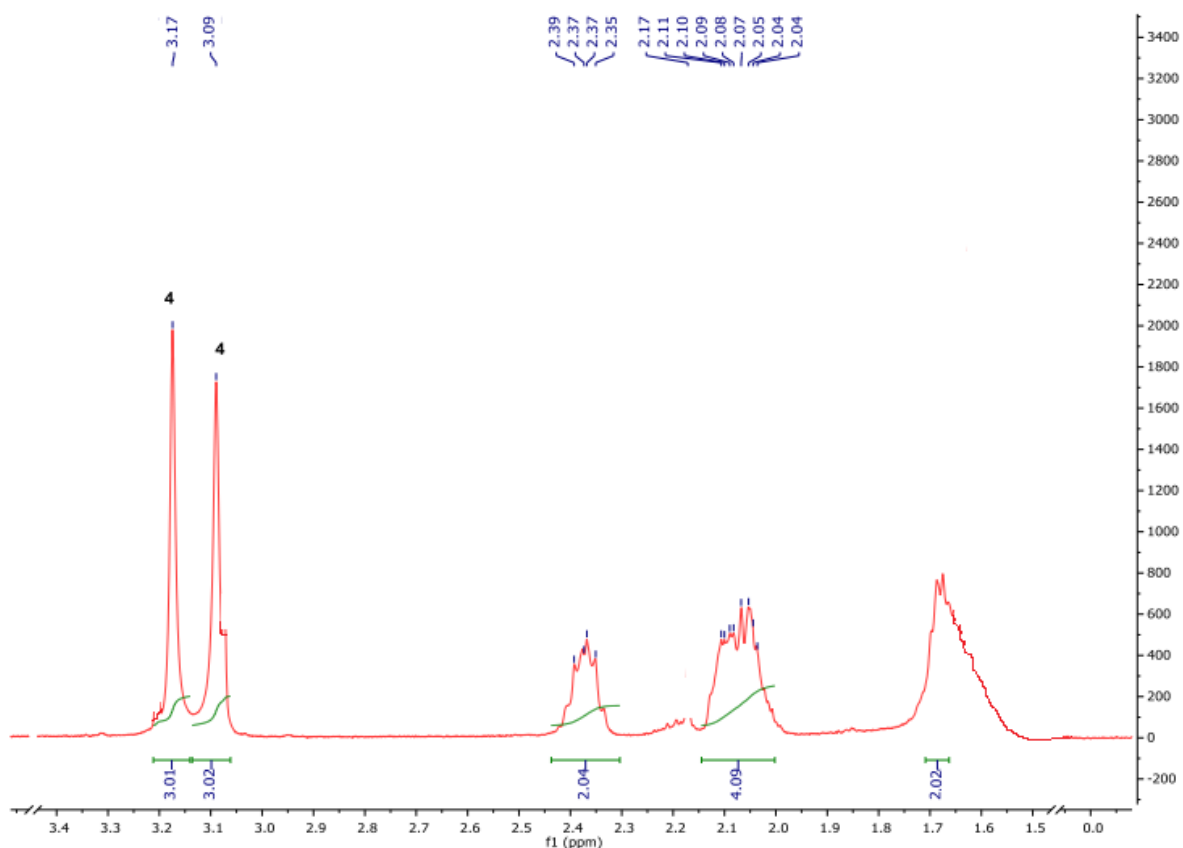


Σχήμα 96: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 54.

Για την σύνθεση της ένωσης 54 η ένωση 52 αντέδρασε παρουσία διμεθυλαμίνης σε τετραϋδροφουράνιο, καταλυτικής ποσότητας κυανιούχου καλίου και μεγάλης περίσσειας του οξειδωτικού MnO₂, σε διαλύτη άνυδρο DMF και θερμοκρασία δωματίου. Η ένωση 54 παραλήφθηκε μετά από 1,5 h με απόδοση περίπου 40%.



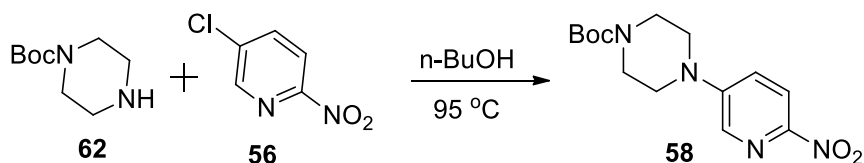
Σχήμα 97: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης 54.



Σχήμα 98: Τμήμα του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **54**.

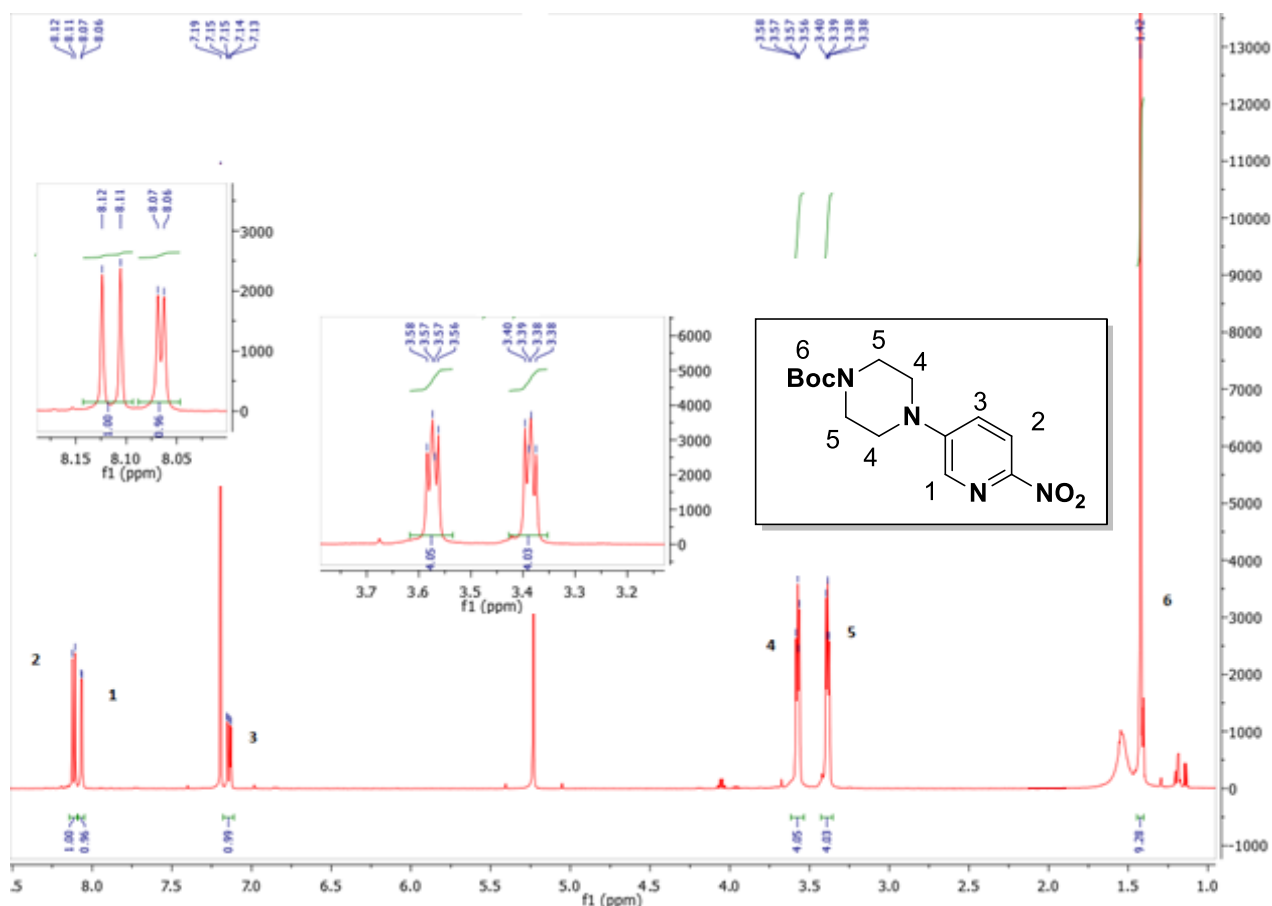
Ο σχηματισμός της ένωσης **54** επαληθεύεται από την καταγραφή των πρωτονίων H4 που εμφανίζονται ως δύο απλές κορυφές, με ολοκλήρωση 3 η κάθε μία, στα 3.17 ppm και 3.09 ppm, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα πρωτόνια συντοζίζονται σε παρόμοια ppm με αυτά της ένωσης **52**. Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 εμφανίζεται στα 8.81 ppm και το πρωτόνιο H2 του πυρρολικού δακτυλίου στα 6.54 ppm αμφότερα ως απλές κορυφές. Το πρωτόνιο H3 συντονίζεται, ως το πλέον αποπροστατευμένο του πενταμελούς δακτυλίου, στα 4,87 ppm ως πολλαπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H6-9 του κυκλοπεντυλικού δακτυλίου καταγράφονται στα 2.43-1.22 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 58



Σχήμα 99: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **58**.

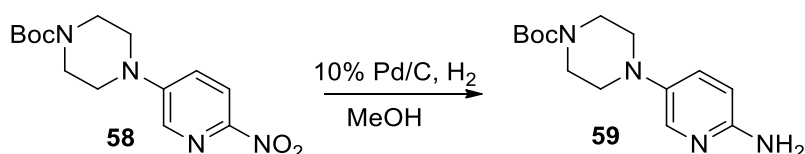
Η ένωση **56** αντιδρά παρουσία 1-Boc-πιπεραζίνης μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης προς τον σχηματισμό της ένωσης **58** (*tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε συνολικά σε περίπου 24h. Σύμφωνα με την πορεία που προτείνει η εταιρεία Novartis το προϊόν παραλαμβάνεται σε δύο στάδια όπως περιεγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη υπο-ενότητα. Χρησιμοποιώντας αντί για της πιπεραζίνης, την Boc-πιπεραζίνη, αποφεύχθηκε το στάδιο της Boc-προστασίας και κατ'επέκταση εξοικονομήθηκαν σημαντικές ποσότητες αντιδραστήριων, διαλυτών, αλλά και χρόνου (24h έναντι 30h με βάση την πειραματική πορεία της εταιρείας). Το προϊόν πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης λαμβάνεται ως ελεύθερη βάση, αντί του υδροχλωρικού άλατος, σε απόδοση περίπου 64%.



Σχήμα 100: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **58**.

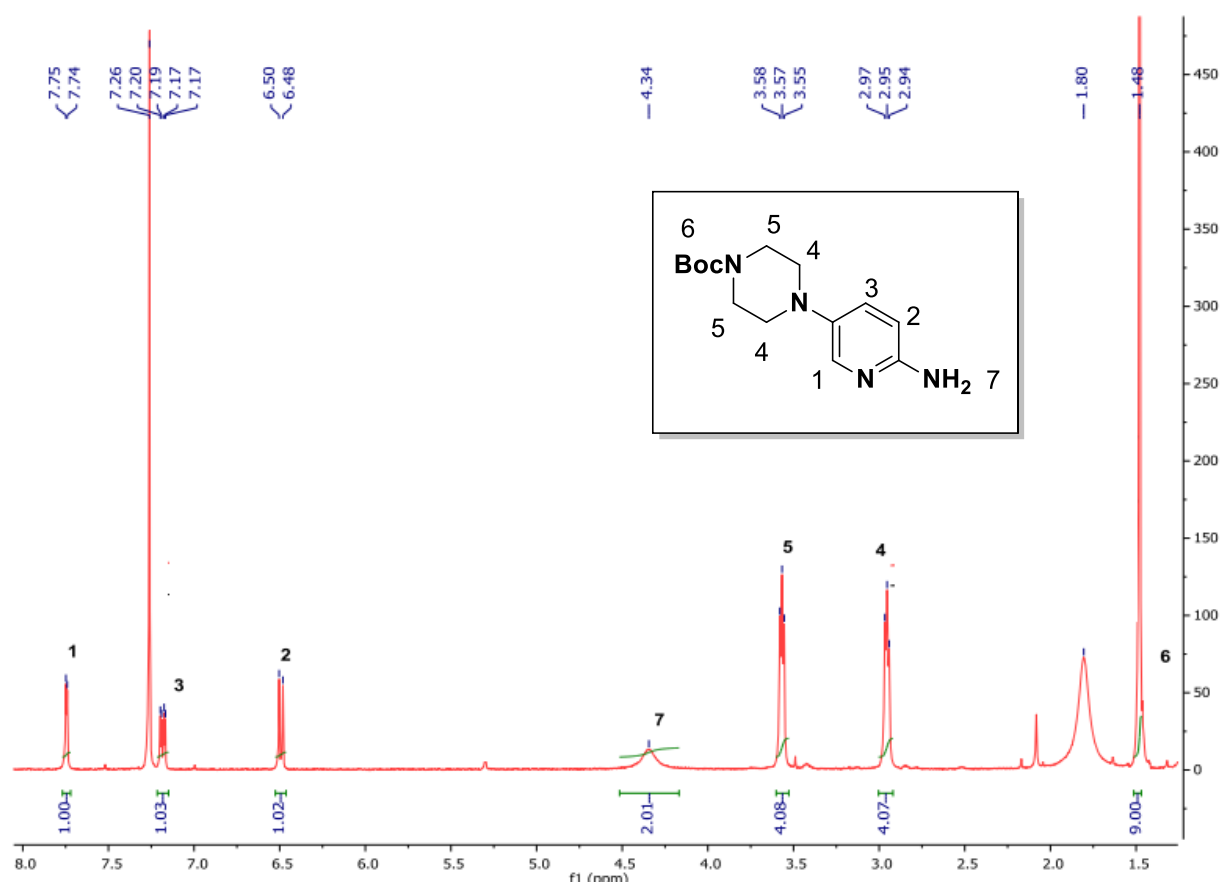
Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο, το H2, ήτοι αυτό της ορθο-θέσης ως προς την νιτρο-ομάδα, λόγω του $-I$ επαγωγικού και $-M$ συζυγιακού φαινομένου, συντονίζεται στα 8,18 ppm ως μια διπλή κορυφή, με $^3J = 9,14$ Hz. Το πρωτόνιο H1 συντονίζεται σε υψηλά ppm λόγω της αποπροστασίας που ασκεί το άτομο αζώτου του πυριδίνης και της πιπεραζίνης μέσω του $-I$ επαγωγικού φαινομένου, συντονίζεται στα 8,13 ppm ως διπλή κορυφή, με $^4J = 3,00$ Hz. Το αρωματικό πρωτόνιο H3 συντονίζεται στα 7,15 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή με $^3J = 9,13$ Hz, $J^4 = 3,07$ Hz). Αποτελεί το πιο προστατευμένο αρωματικό πρωτόνιο λόγω του $+M$ επαγωγικού φαινομένου που ασκεί το άτομο αζώτου του πιπεραζινικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια H5, H4 του πιπεραζινικού δακτυλίου συντονίζονται στα 3,57 ppm και στα 3,45 ppm, αντίστοιχα, ως μια πολλαπλή κορυφή, έκαστη με ολοκλήρωση 4 και τα πρωτόνια H6 της *tert*-βουτυλομάδας στα 1,49 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 59



Σχήμα 101: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **59**.

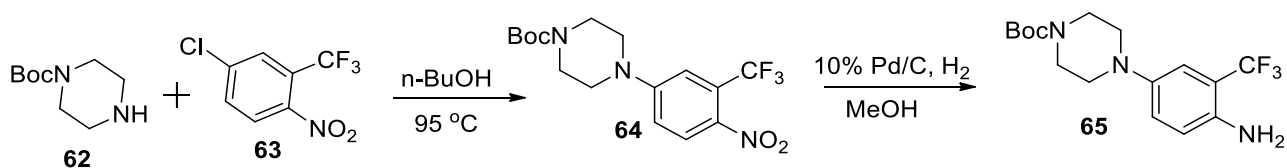
Η σύνθεση της ένωσης **59** πραγματοποιείται με καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης **58**, με τη χρήση καταλύτη Pd/C, σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο, υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου και υπό έντονη ανάδευση. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε περίπου 1h, με ποσοτική απόδοση (σχεδόν 100%). Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με τη μέθοδο αναγωγής του αντίστοιχου υποστρώματος της εταιρείας Novartis, ως προς τον χρόνο που χρειάζεται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης.



Σχήμα 102: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **59**.

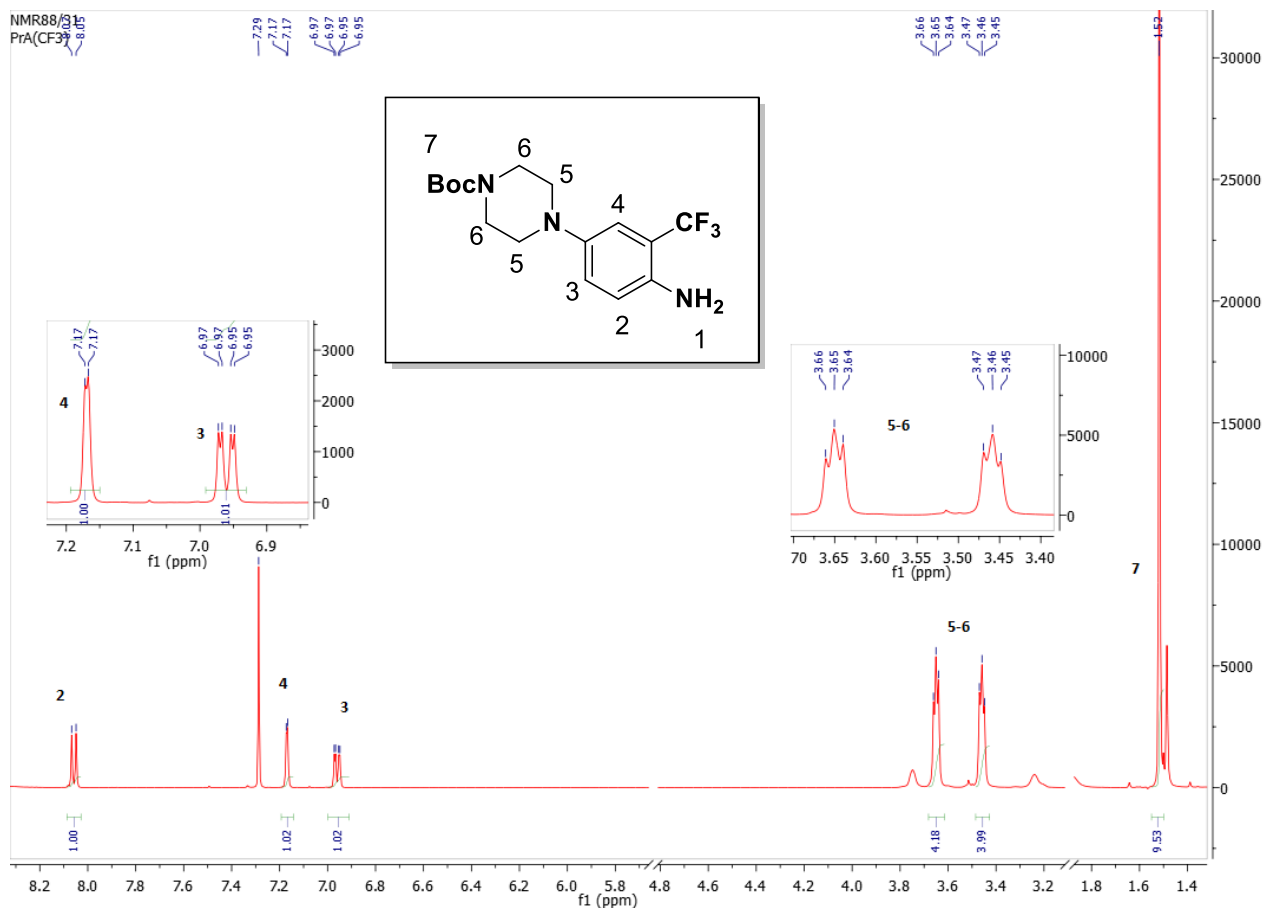
Επιβεβαιώνεται η μετατροπή της νιτρο-ένωσης στο προϊόν αναγωγής **58** με την παρουσία μίας ευρείας κορυφής στα 4,34 ppm με ολοκλήρωση 2, που οφείλεται στα πρωτόνια H της αμινομάδας. Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H1 λόγω του -I επαγωγικού φαινομένου του αζώτου του πυριδινικού δακτυλίου. Καταγράφεται στα 7,75 ppm ως μια διπλή κορυφή με $^4J = 2,94$ Hz. Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,49 ppm ως μία διπλή κορυφή με $^3J = 8,83$ Hz. Προστατεύεται ισχυρά λόγω του +M συζυγιακού φαινομένου που εκδηλώνεται από το άτομο του αζώτου, της αμινομάδας, του πυριδινικού δακτυλίου δακτυλίου. Το πρωτόνιο H3 συντονίζεται στα 7,19 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή με $^3J = 8,80$ Hz και $^4J = 2,87$ Hz. Τα πρωτόνια H5, H4 του πιπεραζινικού δακτυλίου συντονίζονται στα 3,57 ppm και 2,95 ppm, αντίστοιχα, ως μια πολλαπλή κορυφή, εκάστη με ολοκλήρωση 4. Τα πρωτόνια H6 της *tert*-βουτυλο-ομάδας συντονίζονται στα 1,48 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 65



Σχήμα 103: Πορεία σύνθεσης της ένωσης **65**.

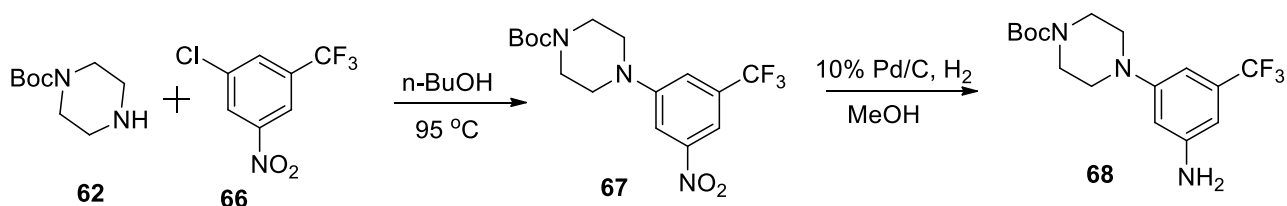
Η ένωση **63** αντιδρά παρουσία 1-Boc-πιπεραζίνης μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης προς σχηματισμό της ένωσης **64**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε περίπου 24h Το προϊόν πυρηνόφιλης υποκατάστασης λαμβάνεται ως ελεύθερη βάση αντί του υδροχλωρικού άλατος, σε απόδοση περίπου 76%. Στην συνέχεια, η σύνθεση της ένωσης **65** πραγματοποιείται με καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης **64** με τη χρήση καταλύτη Pd/C, σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο, υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου και έντονη ανάδευση. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε διάστημα περίπου 1h, με ποσοτική αναγωγή της νιτρο-ομάδας με απόδοση σχεδόν μεγαλύτερη του 90%.



Σχήμα 104: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **65**.

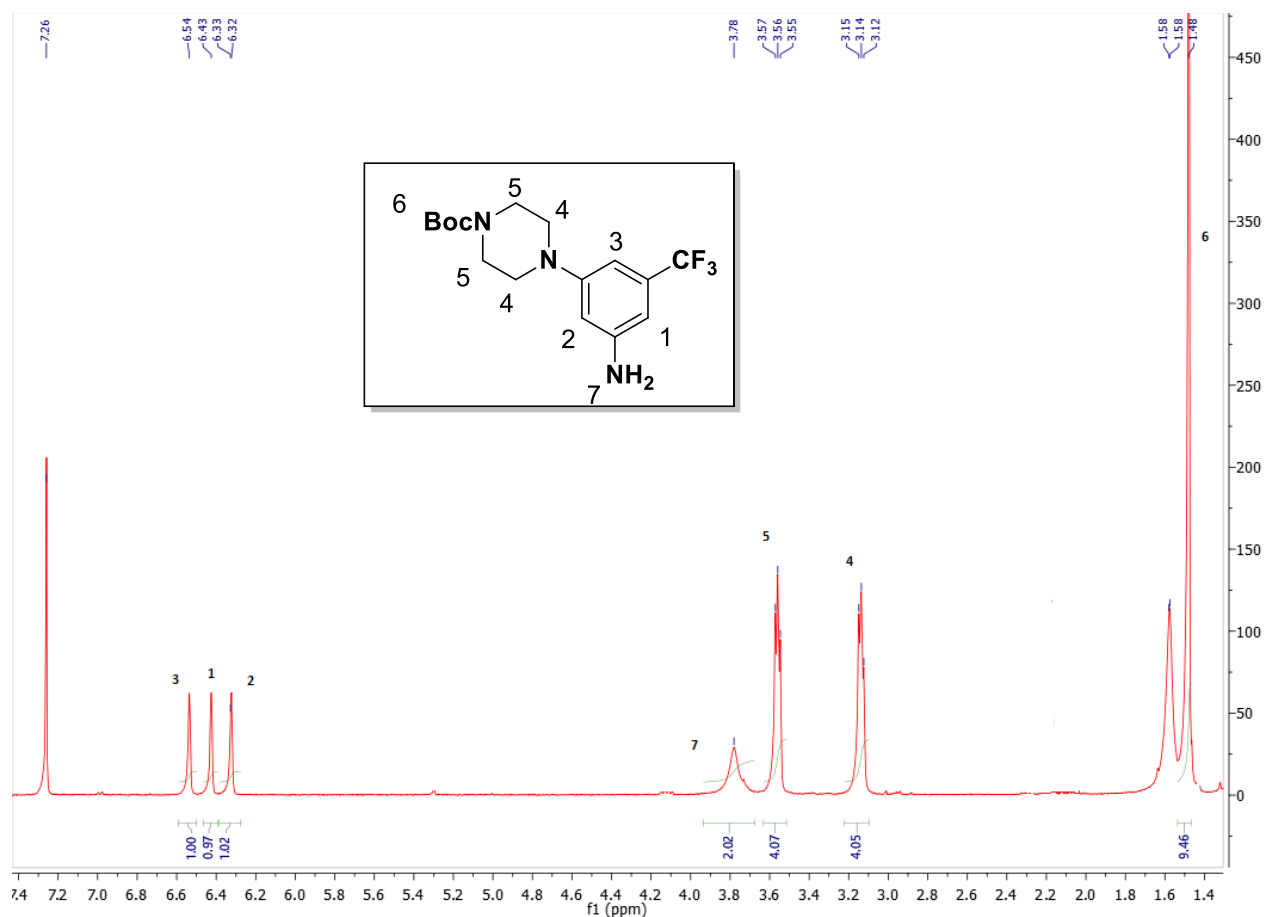
Στο φάσμα ¹H-NMR καταγράφεται το πρωτόνιο H2 στα 8,03 ppm ως μια διπλή κορυφή με $^3J = 9,21$ Hz. Το πρωτόνιο H4 συντονίζεται ως μια διπλή κορυφή με σχέση μακράς απόστασης $^4J = 2,72$ Hz. Το πρωτόνιο H3 συντονίζεται στα 6,93 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή με $^3J = 9,24$ Hz, $^4J = 2,77$ Hz. Τα πρωτόνια H5 και H6 του πιπεραζινικού δακτυλίου καταγράφονται ως τριπλές κορυφές στα 3,62 και 3,43 ppm, αντίστοιχα. Τέλος, τα πρωτόνια H7 της *tert*-βουτυλο-ομάδας συντονίζονται στα 1,49 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 68



Σχήμα 105: Πορεία σύνθεσης της ένωσης **68**.

Η ένωση **66** αντιδρά παρουσία 1-Boc-πιπεραζίνης μέσω μιας αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης προς τον σχηματισμό της ένωσης **67**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε περίπου 24h. Το προϊόν πυρηνόφιλης υποκατάστασης λαμβάνεται ως ελεύθερη βάση, αντί του υδροχλωρικού άλατος, σε απόδοση περίπου 76%. Στην συνέχεια η σύνθεση της ένωσης **68** πραγματοποιείται με καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης **67** με τη χρήση καταλύτη Pd/C, σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο, υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου και έντονη ανάδευση. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε διάστημα 1h, με ποσοτική αναγωγή της νιτρο-ομάδας με απόδοση > 90%.

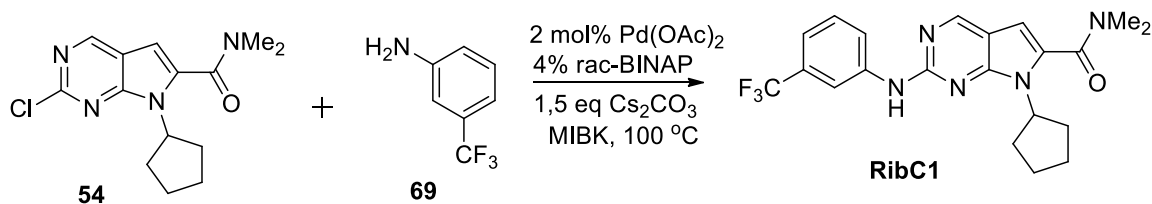


Σχήμα 106: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **68**.

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ το πρωτόνιο H3 καταγράφεται στα 6,54 ppm ως μια απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H1 στα 6,43 ppm, επίσης, ως μια απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 είναι το πλέον προστατευμένο του βενζολικού δακτυλίου λόγω του +M εφαγωνικού φαινομένου που ασκεί τόσο η αμινομάδα του βενζολικού δακτυλίου, όσο και η αμινομάδα του πιπεραζινικού. Συντονίζεται στα 6,32 ppm ως μια απλή κορυφή. Τα πρωτόνια H7 της αμινομάδας καταγράφονται ως μια ευρεία κορυφή στα 3,78 ppm. Τα πρωτόνια H4 και H5 του πιπεραζινικού δακτυλίου εμφανίζονται ως τριπλές κορυφές στα 3,56 ppm και 3,14 αντίστοιχα. Τέλος, τα πρωτόνια H6 της *tert*-βουτυλομάδας συντονίζονται στα 1,48 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9.

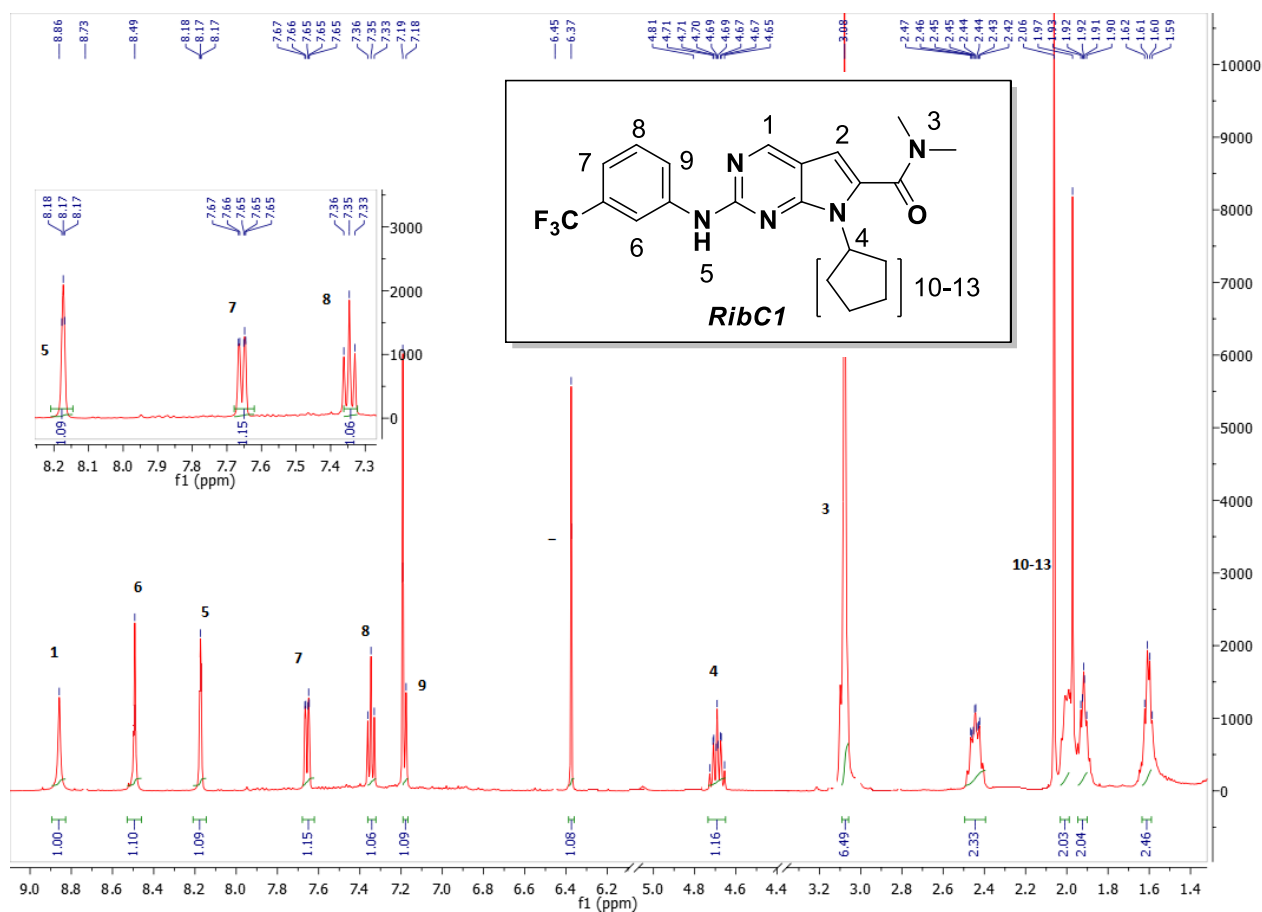
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC1

Η σύνθεση της ένωσης **RibC1** πραγματοποιείται μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig της ένωσης **54** με την m-τριφθορομεθυλοανιλίνη. Ως καταλύτες χρησιμοποιήθηκαν 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%-mol rac-BINAP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού κασίου σε διαλύτη μεθυλοίσοβουτυλοκετόνη (MIBK).



Σχήμα 107: Αντίδραση σχηματισμού του **RibC1**.

Η τελική ένωση RibC1 ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία ¹H-NMR

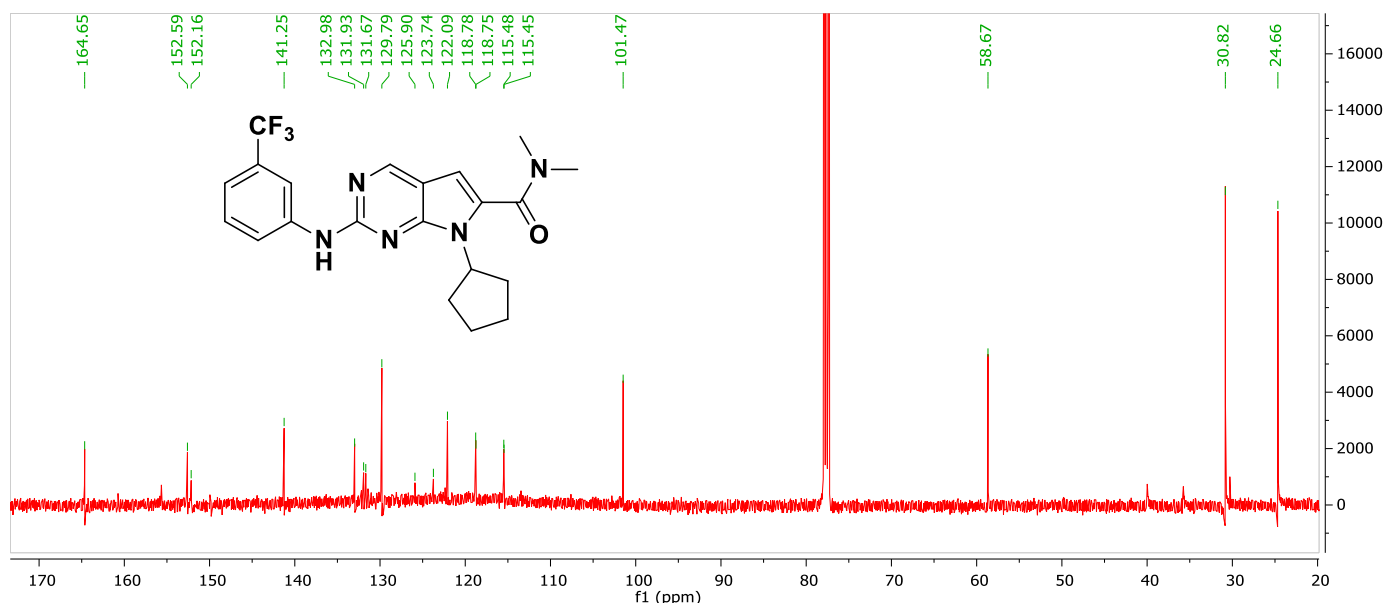


Σχήμα 108: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **RibC1**.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **RibC1** το πυριμιδινικό πρωτόνιο H1 ως το πλέον αποπροστατευμένο, συντονίζεται στα 8,93 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 καταγράφεται στα 6,44 ppm επίσης ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H6 είναι το πλέον αποπροστατευμένο του βενζολικού δακτυλίου λόγω της γειτνίασης με την $-\text{CF}_3$ ομάδα, και συντονίζεται στα 8,56 ppm ως μια απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H7 εντοπίζεται στα 7,65 ppm ως μία διπλή της διπλής κορυφή με $^3J = 8,01$ και $^4J = 2,86$. Το αμινικό πρωτόνιο H5 καταγράφεται στα 8,24 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H8 εμφανίζεται ως μία τριπλή κορυφή με $^3J = 7,93$ Hz. Το πρωτόνιο 9 εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στα 7,19 ppm, τα πρωτόνια H4 στα 4,69 ppm ως πολλαπλή κορυφή, τα πρωτόνια H3 της διμέθυλο-αμινομάδας του αμιδικού δεσμού στα 3,08 ppm, ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6. Τέλος τα πρωτόνια H10 και H13 συντονίζονται στα 1,55-2,45 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Η σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται επιπλέον από την λήψη φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$, COSY-NMR, HMQC-NMR, HMBC-NMR και φάσματος μάζας.

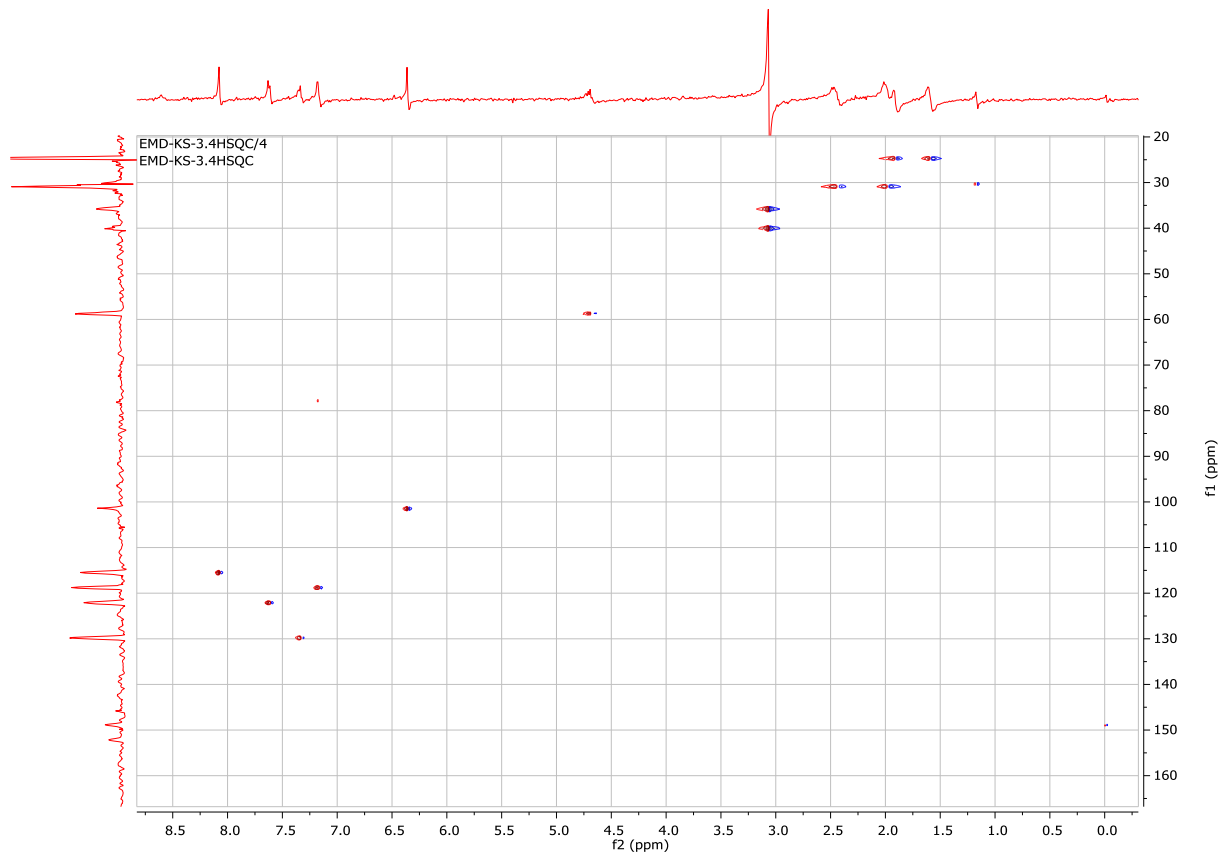
Λήφθηκε φάσμα μάζας του **RibC1** με διαλύτη MeOH και 0.1% HCOOH 0.1%. Η μοριακή μάζα του **RibC1** με μοριακό τυπό $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ είναι 417.18. Στο φάσμα το m/z του μοριακού ιόντος και ταυτοχρόνως βασικής κορυφής είναι 418.0 λόγω πρωτονίωσης και αντιστοιχεί στο μοριακό τυπό $[\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}+\text{H}]^+$.



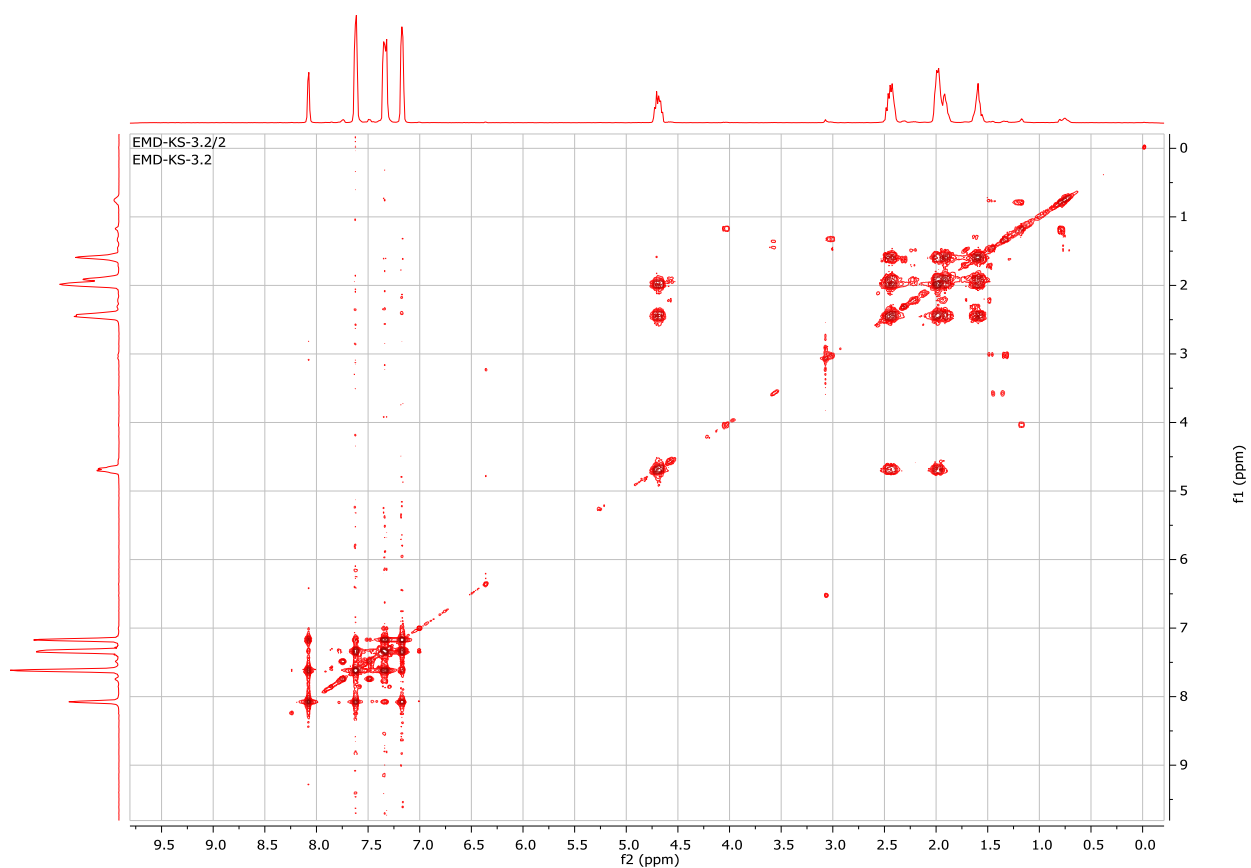
Σχήμα 109: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibC1**.



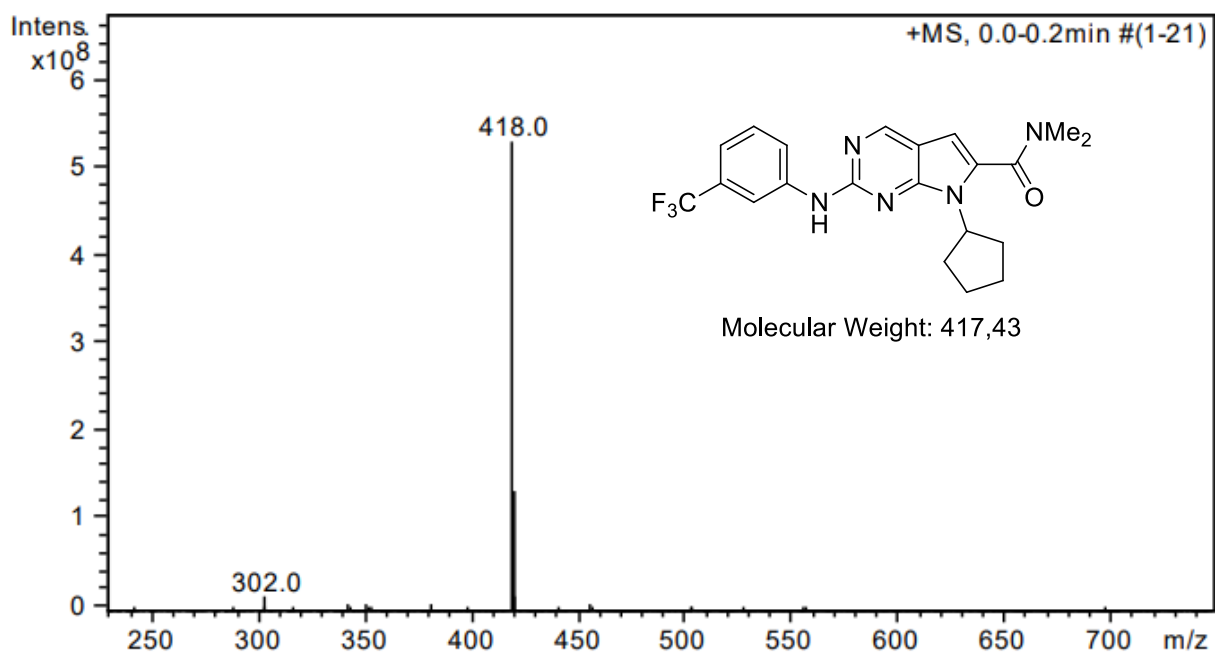
Σχήμα 100: Φάσμα HMBC-NMR της ένωσης *RibC1*



Σχήμα 111: Φάσμα HMQC-NMR της ένωσης *RibC1*



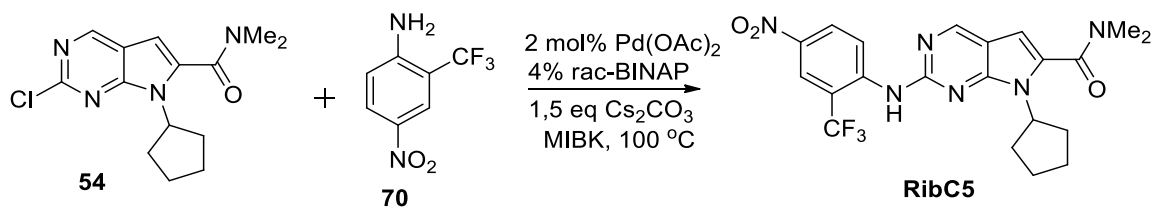
Σχήμα 112: Φάσμα COSY-NMR της ένωσης **RibC1**



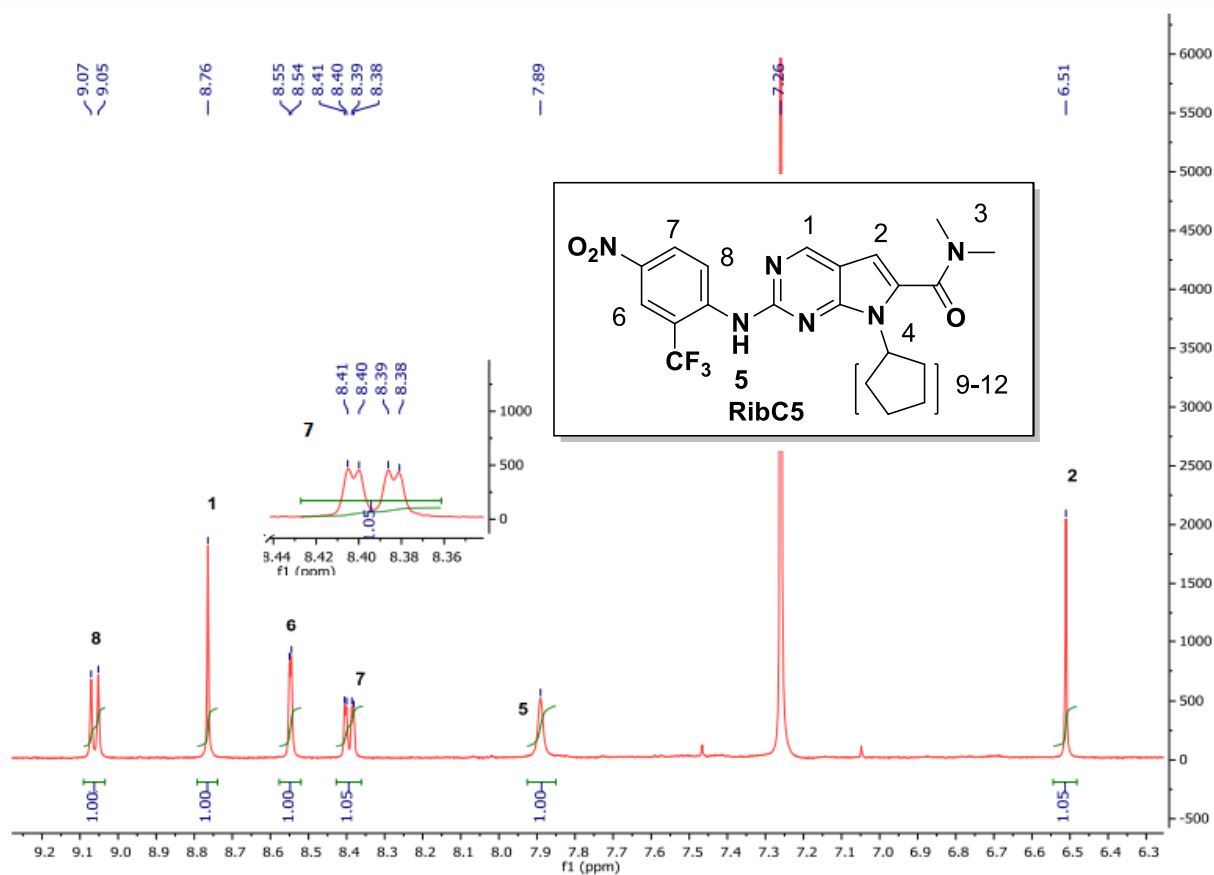
Σχήμα 113: Φάσμα μάζα της ένωσης **RibC1**.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC5

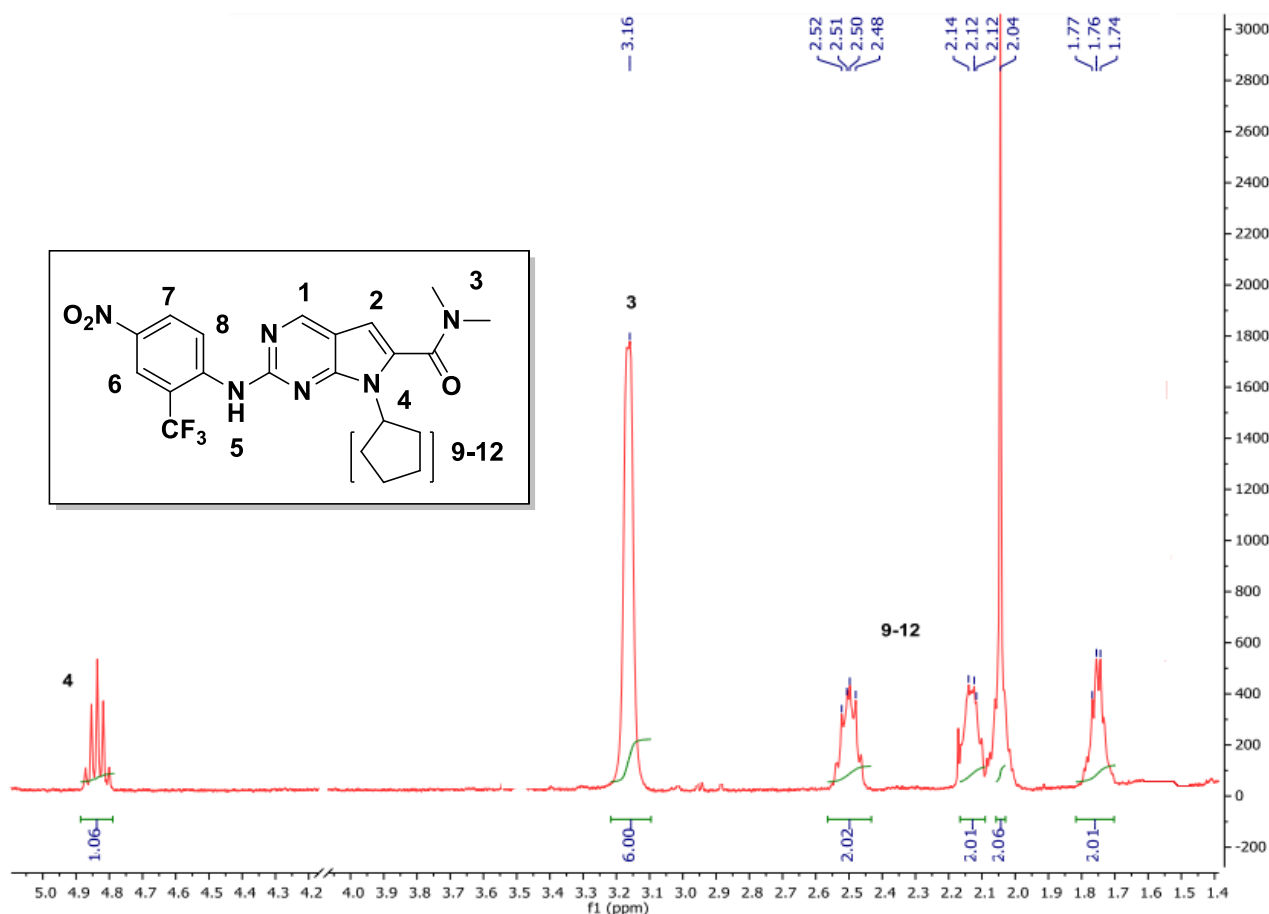
Η σύνθεση της ένωσης **RibC5** πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης Buchwald-Hartwig των ενώσεων **7** και **23**. Ως καταλύτες χρησιμοποιήθηκαν 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%-mol rac-BINAP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καυσίου σε διαλύτη 4-μεθυλ-2-πεντανόνη (MIBK).



Σχήμα 114: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **RibC5**.



Σχήμα 115: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης (500 MHz, CDCl₃) **RibC5**.

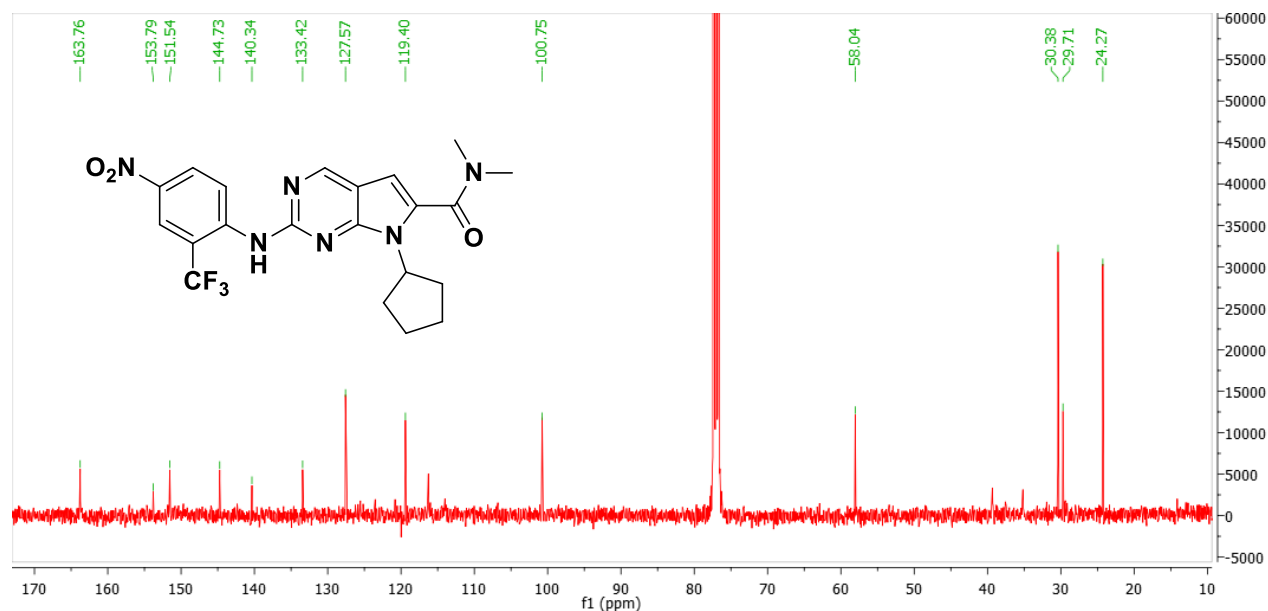


Σχήμα 116: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (500 MHz, CDCl_3) **RibC5**.

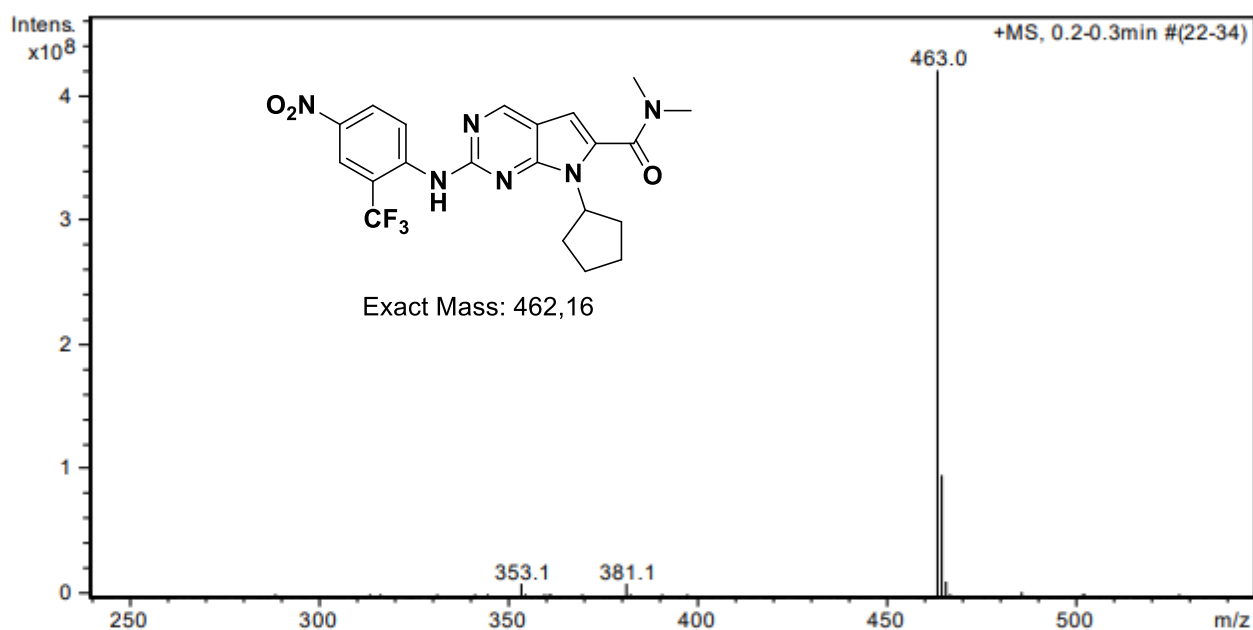
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **RibC5** το πρωτόνιο H8, ως το πλέον αποπροστατευμένο, συντονίζεται στα 9,06 ppm ως διπλή κορυφή, καθότι η δευτεροταγής αμίνη ($-\text{NH}_2-$) εκδηλώνει ένα ισχυρότατο -I επαγωγικό φαινόμενο προς την πλευρά του φαινυλικού δακτυλίου, ενώ το θετικό φαινόμενο συντονισμού +M εκδηλώνεται αποκλειστικά προς τον πυριμιδινικό δακτύλιο. Ταυτόχρονα το πρωτόνιο H8 σχηματίζει έναν ψευδοδεσμό υδρογόνου με τα πυριδινικά άζωτα. Το πυριμιδινικό πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8,76 ppm ως απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 καταγράφεται στα 6,51 ppm επίσης ως απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H6 αποπροστατεύεται ισχυρά λόγω της γειννίας με την $-\text{CF}_3$ ομάδα και συντονίζεται στα 8,55 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H7 συντονίζεται στα 8,39 ppm ως μία διπλή της διπλής κορυφή με $^3J = 8,01$ και $^4J = 2,86$, το αμινικό πρωτόνιο H5 στα 7,89 ppm ως μία ευρεία κορυφή, το πρωτόνιο H3 συντονίζεται στα 4,69 ppm ως πολλαπλή κορυφή και τα πρωτόνια H3 της διμεθυλο-αμινομάδας του αμιδικού δεσμού στα 3,16 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6. Τέλος, τα πρωτόνια H9-12 συντονίζονται στα 1,2-1,45 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Η Σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται από την λήψη φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ και φάσματος μάζας

Λήφθηκε φάσμα μάζας του **RibC5** με διαλύτη MeOH και 0.1% HCOOH. Η μοριακή μάζα του **RibC5** με μοριακό τυπό $C_{21}H_{21}F_3N_6O_3$ είναι 462.16, βρέθηκε δε ότι το m/z του μοριακού ιόντος και ταυτόχρονα βασικής κορυφής είναι 463.0 καθώς αντιστοιχεί στο μοριακό τυπό $[C_{21}H_{21}F_3N_6O_3+H]^+$ λόγω της πρωτονίωσης.

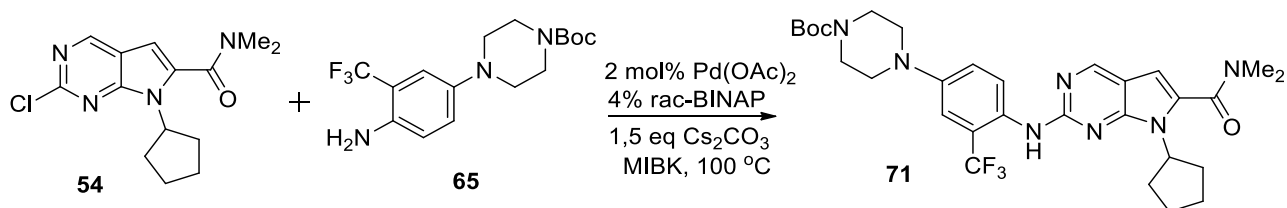


Σχήμα 117: Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης (500 MHz, $CDCl_3$) **RibC5**.



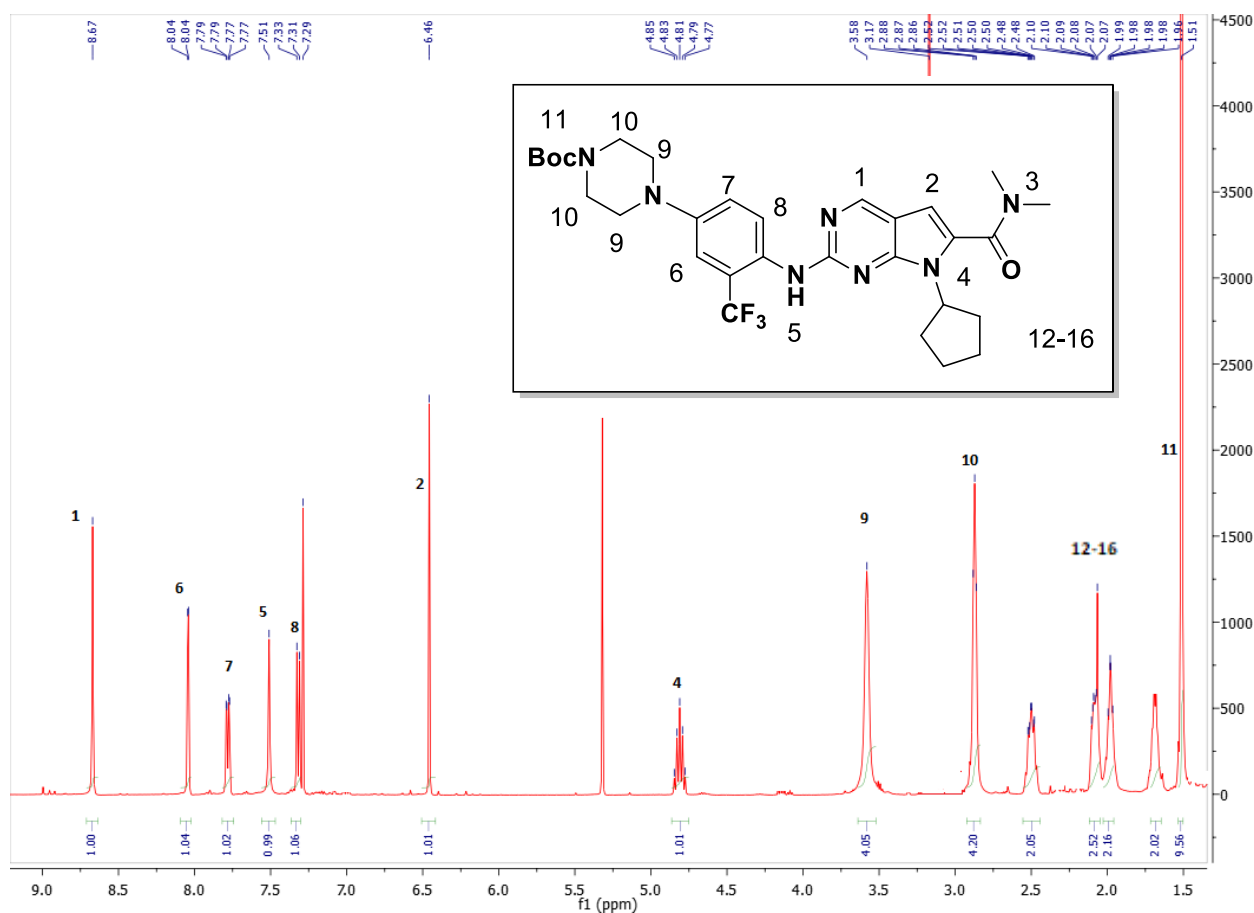
Σχήμα 118: Φάσμα μάζας της ένωσης **RibC5**.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC7

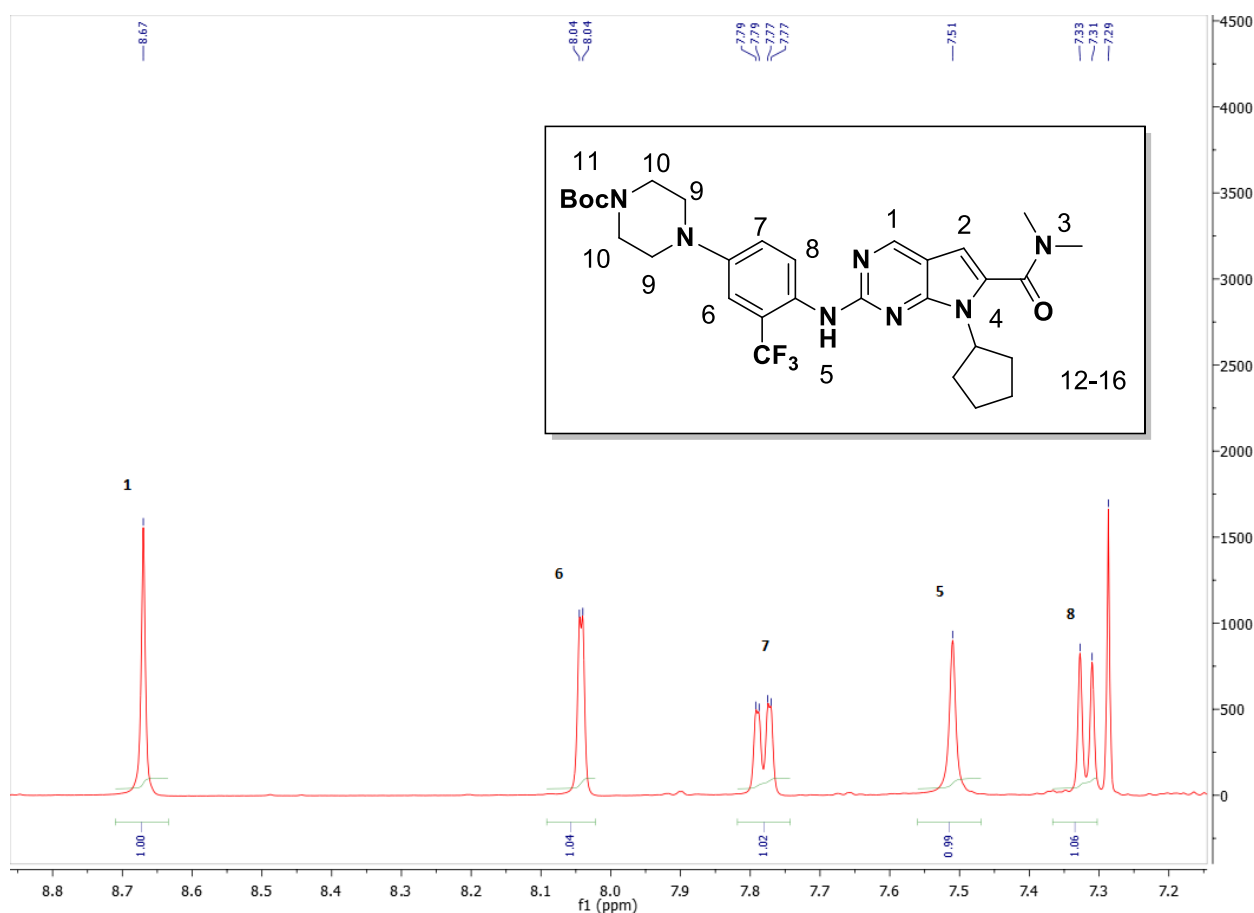


Σχήμα 119: Αντίδραση σύνθεσης της ενδιάμεσης ένωσης **71**.

Η σύνθεση της ένωσης **71** πραγματοποιήθηκε μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig της ένωσης **54** με την ανιλίνη **65**. Ως καταλύτες χρησιμοποιήθηκαν 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%-mol rac-BINAP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καυσίου σε διαλύτη 4-μεθυλ-2-πεντανόνη (MIBK).



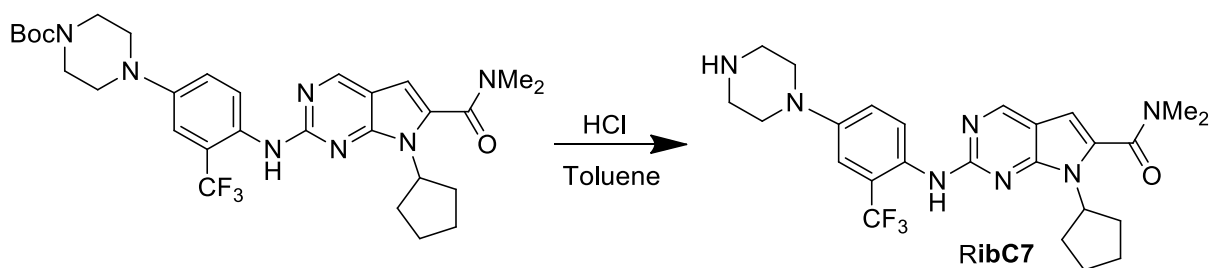
Σχήμα 120: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **71**.



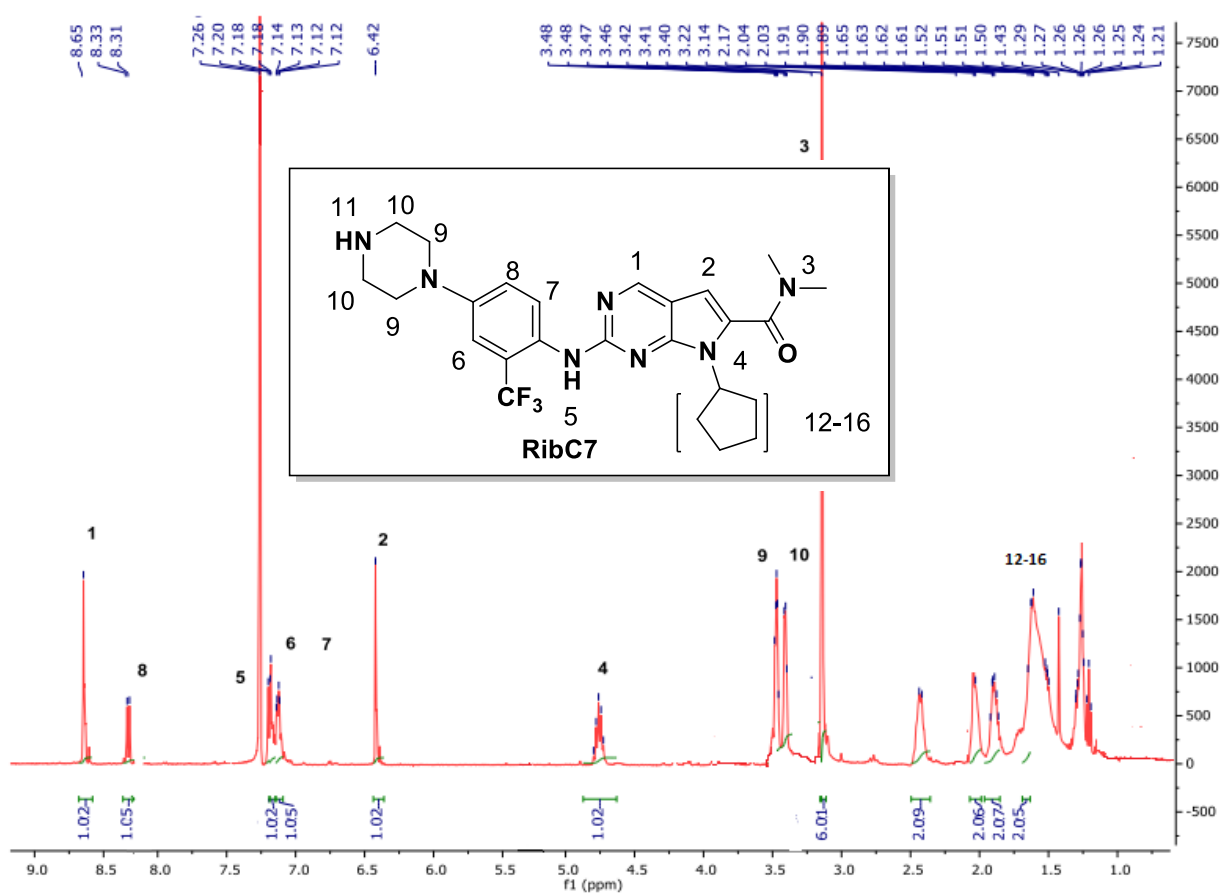
Σχήμα 121: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **71**.

Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 του πυριμιδινικού δακτυλίου καταγράφεται στα 8,64 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,43 ppm ως μία απλή κορυφή, το αμινικό πρωτόνιο H5 στα 7,51 ppm ως απλή κορυφή, το πρωτόνιο H8 στα 7,31 ppm ως μία διπλή κορυφή με $^3J = 8,64$ Hz, το πρωτόνιο H6 στα 8,02 ppm ως μια διπλή κορυφή με $^4J = 2,50$ Hz, και το H7 συντονίζεται στα 7,78 ppm ως μια διπλή της διπλής με $^3J = 8,66$ Hz και $^4J = 2,50$ Hz. Επίσης τα πρωτόνια H4 συντονίζονται στα 4,81 ppm ως πολλαπλή κορυφή, τα πρωτόνια H3 της διμέθυλο-αμινομάδας του αμιδικού δεσμού καταγράφονται στα 3,08 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6, ενώ τα πρωτόνια H9 και H10 του πιπεραζινικού δακτυλίου καταγράφονται στα 3,58 και 2,85 ppm, αντίστοιχα, ως πολλαπλές κορυφές με ολοκλήρωση 4. Τέλος, τα πρωτόνια H12-16 εμφανίζονται στα 1,2-2,7 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Το **RibC7** παραλήφθηκε ποσοτικά με την Boc-αποπροστασία της αμινο-ομάδας της πιπεραζίνης, υπό όξινες συνθήκες ως άλας σε διαλύτη τολουόλιο



Σχήμα 122: Αντίδραση σχηματισμού του **RibC7**.

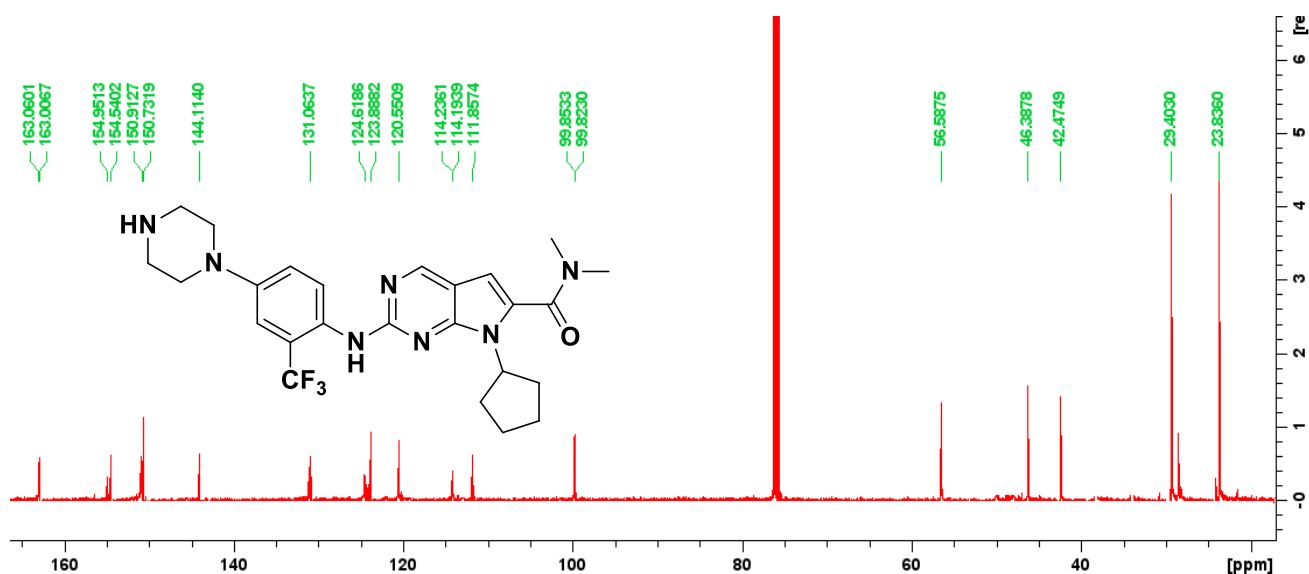


Σχήμα 123: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) του **RibC7**.

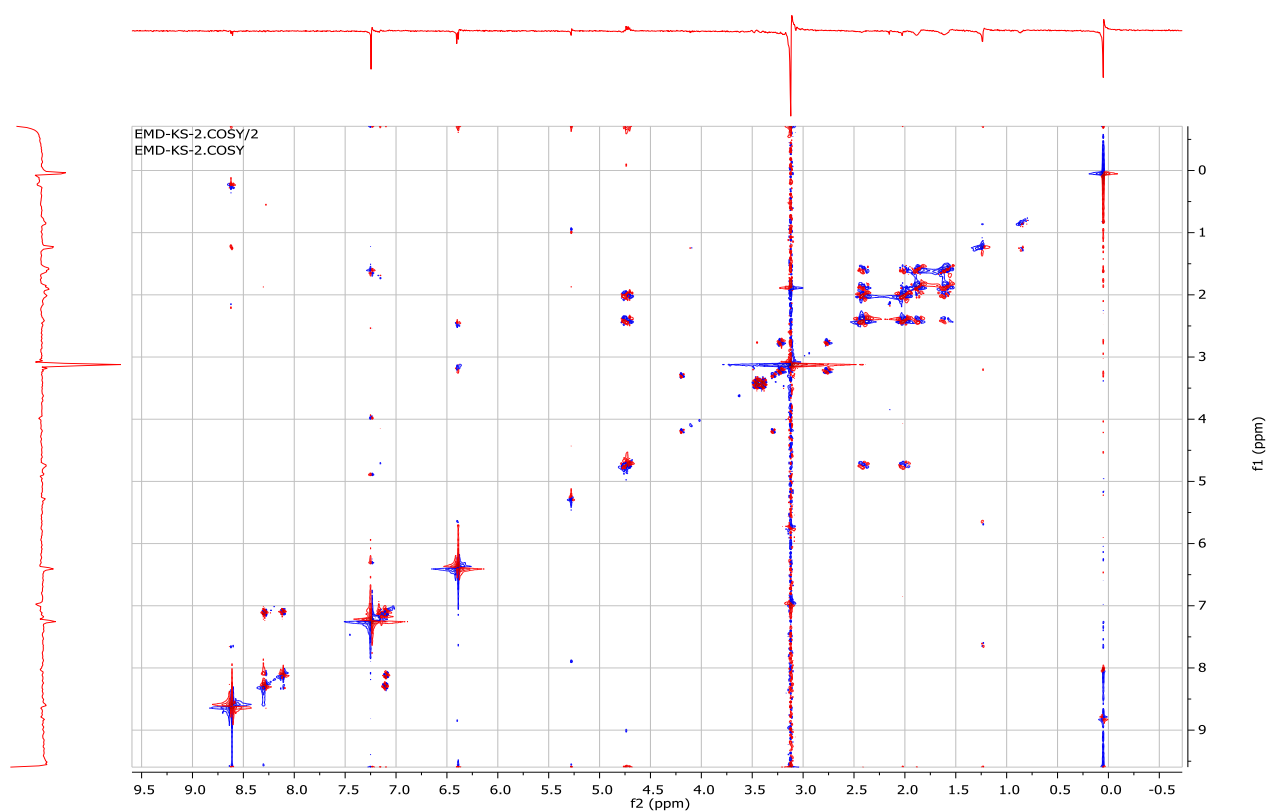
Ο σχηματισμός της ένωσης **RibC7** επιβεβαιώνεται από την απουσία της κορυφής που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της Boc-ομάδας.

Η Σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται επίσης από την λήψη φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$, COSY-NMR, NOESy-NMR και φάσματος μάζας.

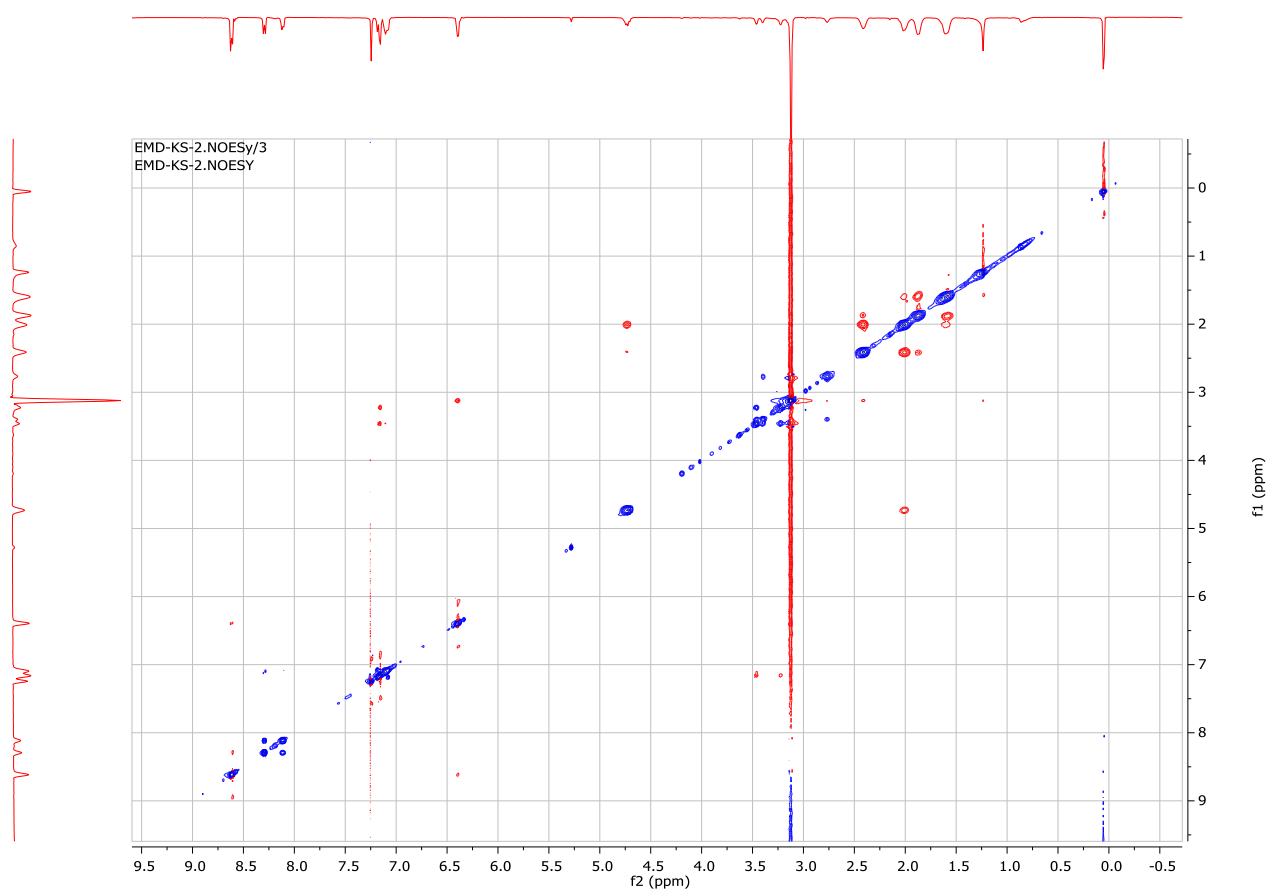
Το φάσμα μάζας του **RibC7** σε διαλύτη σε MeOH, με 0.1% HCOOH αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 501.25 καθώς αντιστοιχεί στον μοριακό τυπό $C_{25}H_{30}F_3N_7O$ είναι 501.25. Στο φάσμα παρατηρείται το μοριακό ιόν με m/z 502.1 λόγω πρωτονίωσης αντιστοιχεί στον μοριακό τυπό $[C_{25}H_{30}F_3N_7O+H]^+$.



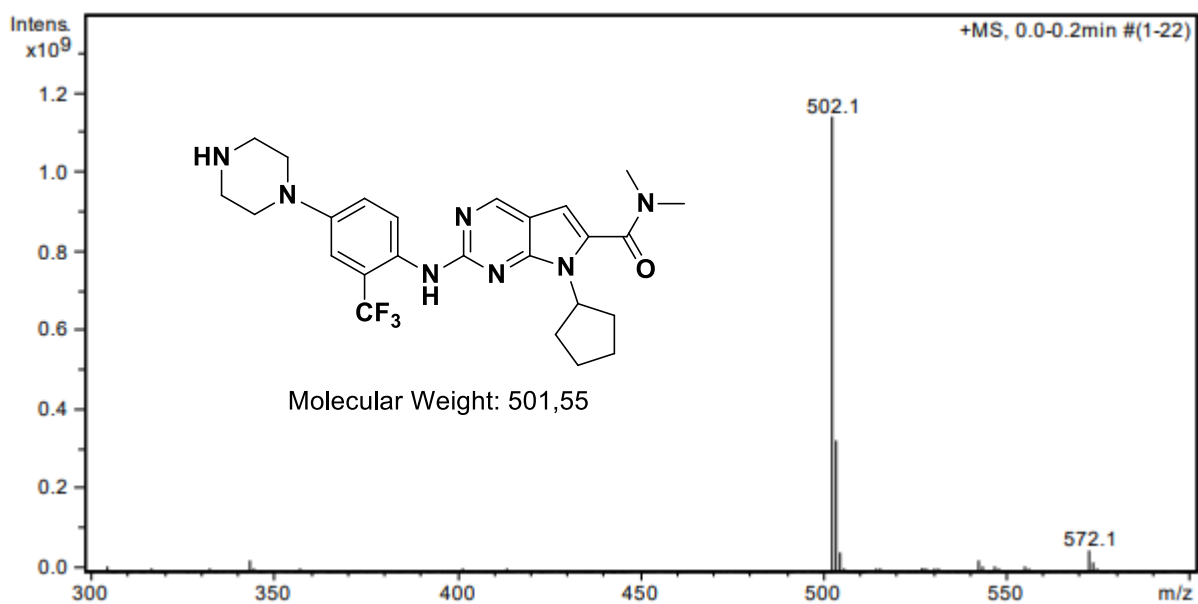
Σχήμα 124: Φάσμα ^{13}C -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) του **RibC7**.



Σχήμα 125: Φάσμα COSY-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) του **RibC7**.

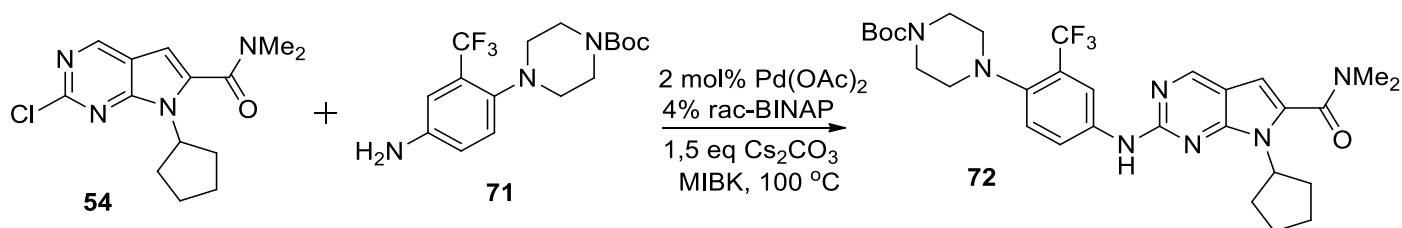


Σχήμα 126: Φάσμα NOESy-NMR (500 MHz, CDCl_3) του **RibC7**.



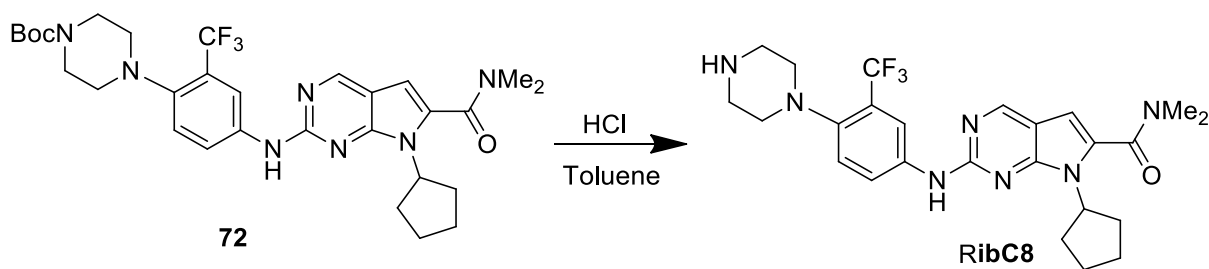
Σχήμα 127: φάσμα μάζας της ένωσης **RibC7**.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC8



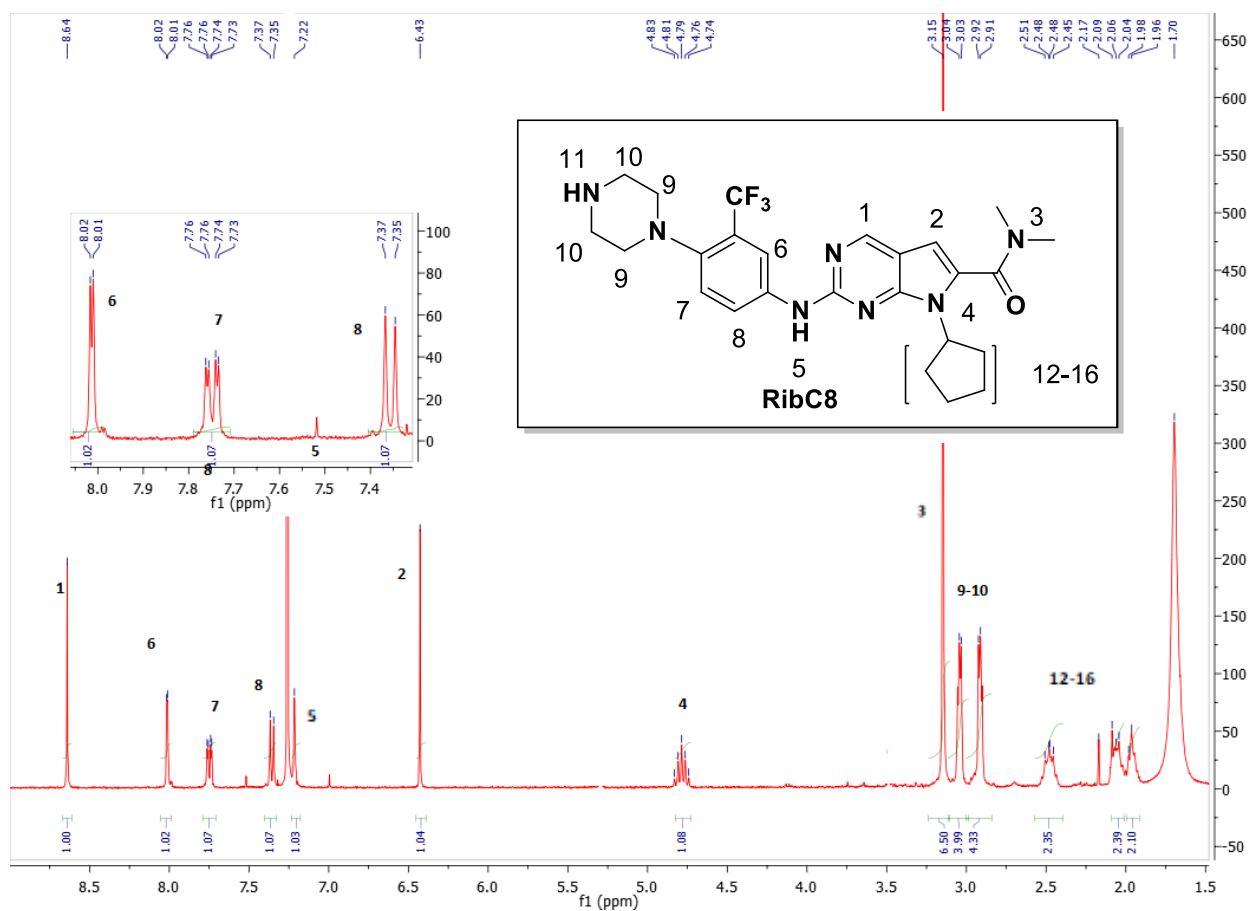
Σχήμα 128: σύνθεση της ένωσης **72**.

Η σύνθεση της ένωσης **72** επιτυγχάνεται μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig της ένωσης **54** με το παράγωγο της ανιλίνης **71**. Ως καταλύτες χρησιμοποιήθηκαν 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%-mol rac-BINAP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καυσίου σε διαλύτη 4-μεθυλ-2-πεντανόνη (MIBK).

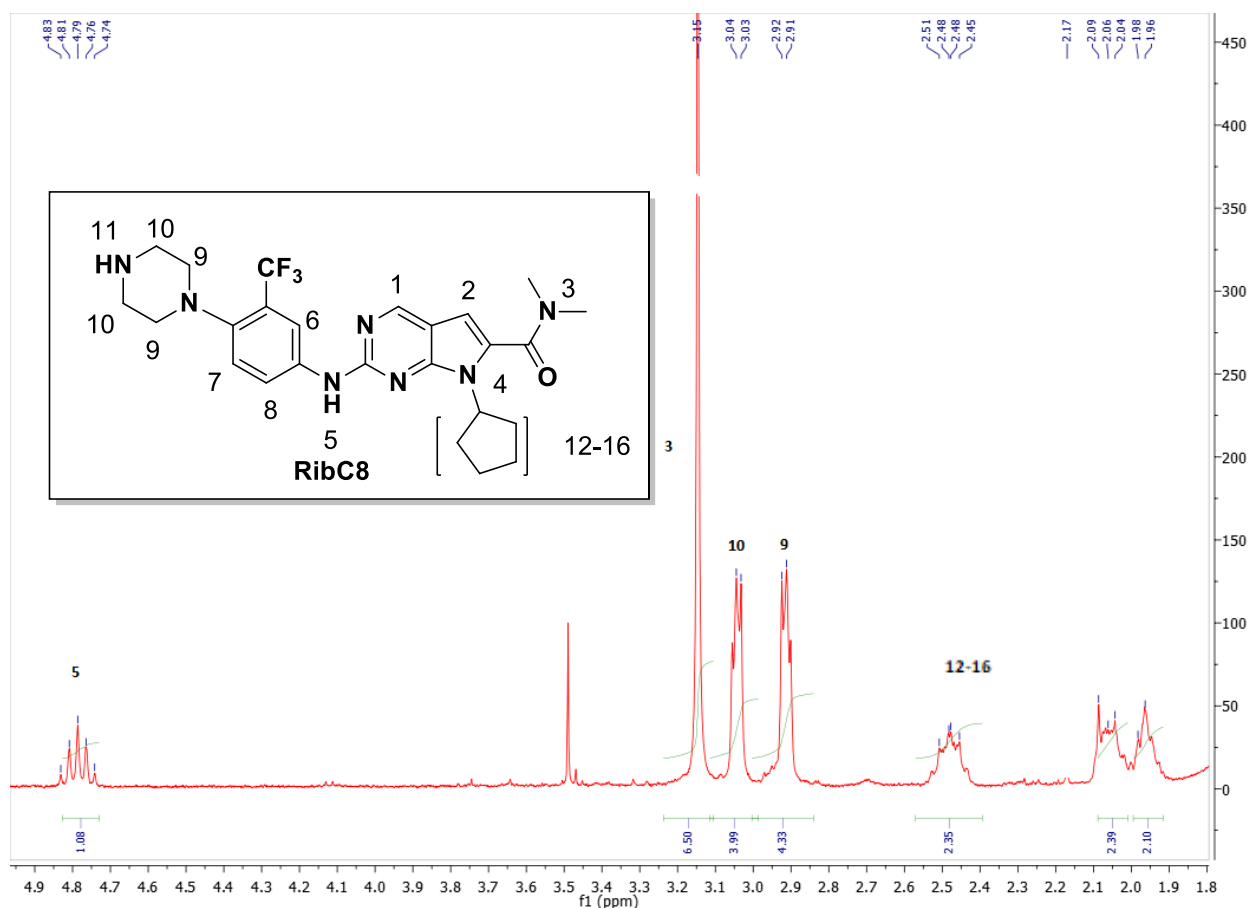


Σχήμα 129: Σύνθεση της ένωσης **RibC8**.

Το **RibC8** παραλήφθηκε ποσοτικά με την Boc-αποπροστασία της αμινο-ομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου, υπό όξινες συνθήκες και διαλύτη τολουόλιο.



Σχήμα 130: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **RibC8**.

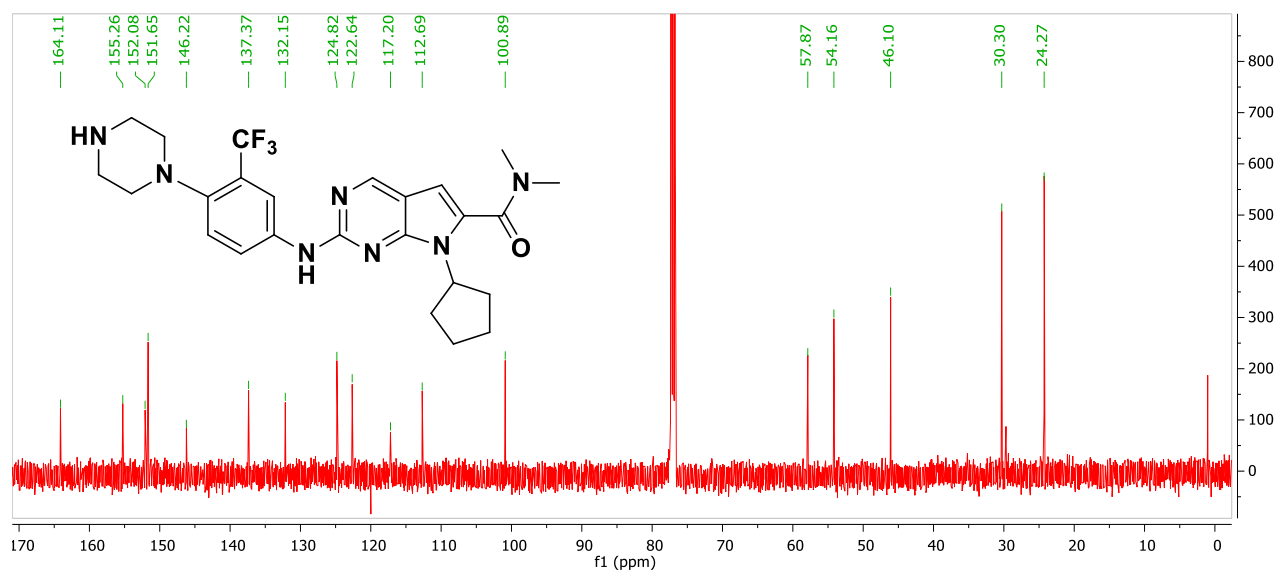


Σχήμα 131: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibC8**.

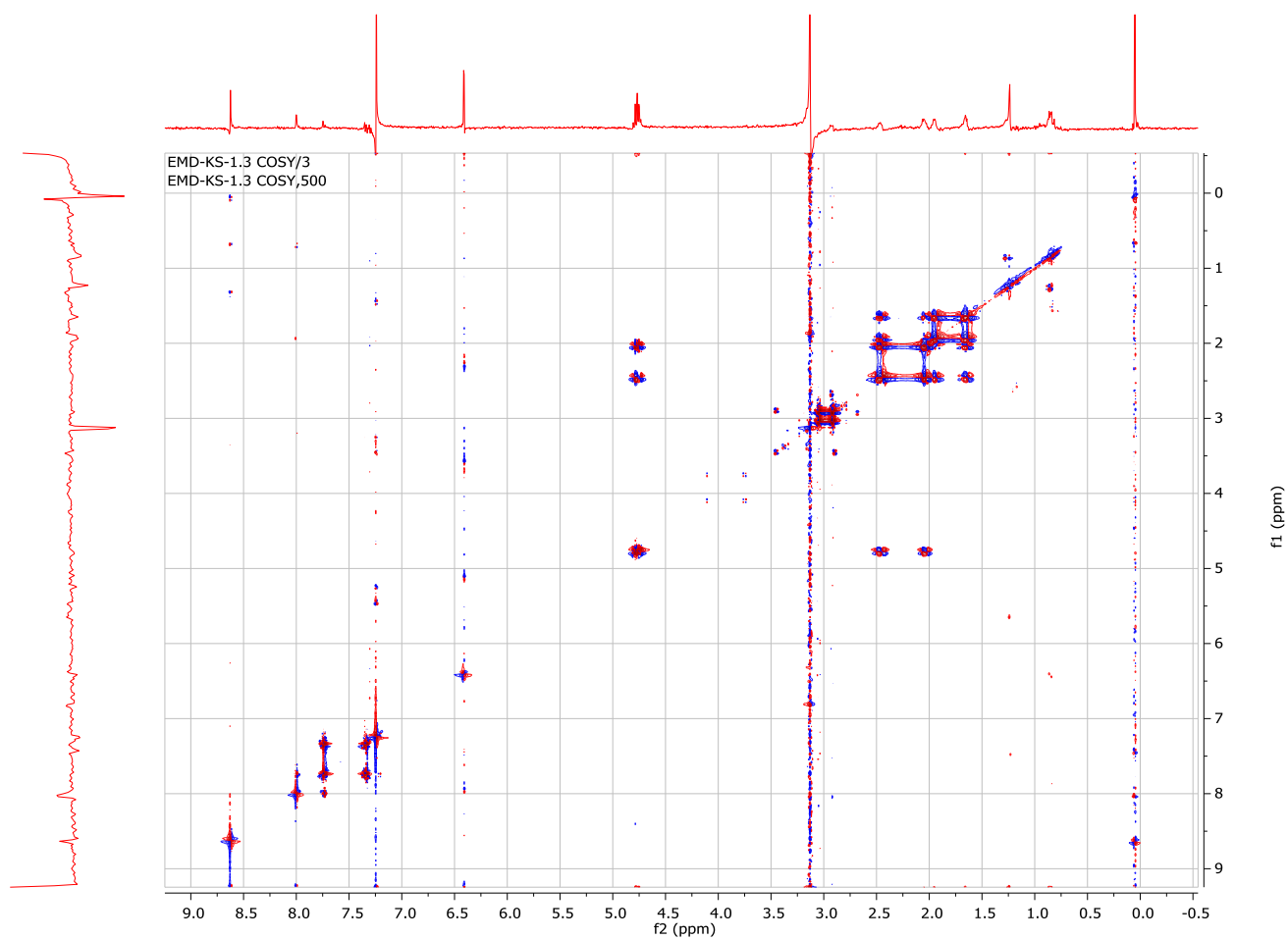
Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 της πυριμιδίνης καταγράφεται στα 8,64 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,43 ppm ως μια απλή κορυφή, το H6 στα 8,02 ppm ως μία διπλή κορυφή με $^4J = 2,50$ Hz, το δε αμινικό πρωτόνιο H5 στα 7,22 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H7 καταγράφεται στα 7,75 ppm ως μια διπλή της διπλής με $^3J = 8,66$ Hz και $J^4 = 2,50$ Hz, το πρωτόνιο H8 στα 7,36 ppm ως διπλή κορυφή με $J^3 = 8,92$ Hz, το πρωτόνιο H4 στα 4,81 ppm ως μία πολλαπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H3 της διμεθυλ-αμινομάδας του αμιδικού δεσμού στα 3,15 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6. Τα πρωτόνια H9 και H10 του πιπεραζινικού δακτυλίου καταγράφονται στα 3,02 και 2,92 ppm, αντίστοιχα, ως πολλαπλές κορυφές με ολοκλήρωση 4. Τέλος τα πρωτόνια H12-16 συντονίζονται στα 2,51-1,39 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Η σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται επιπλέον από την λήψη φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$, COSY-NMR και NOESy-NMR.

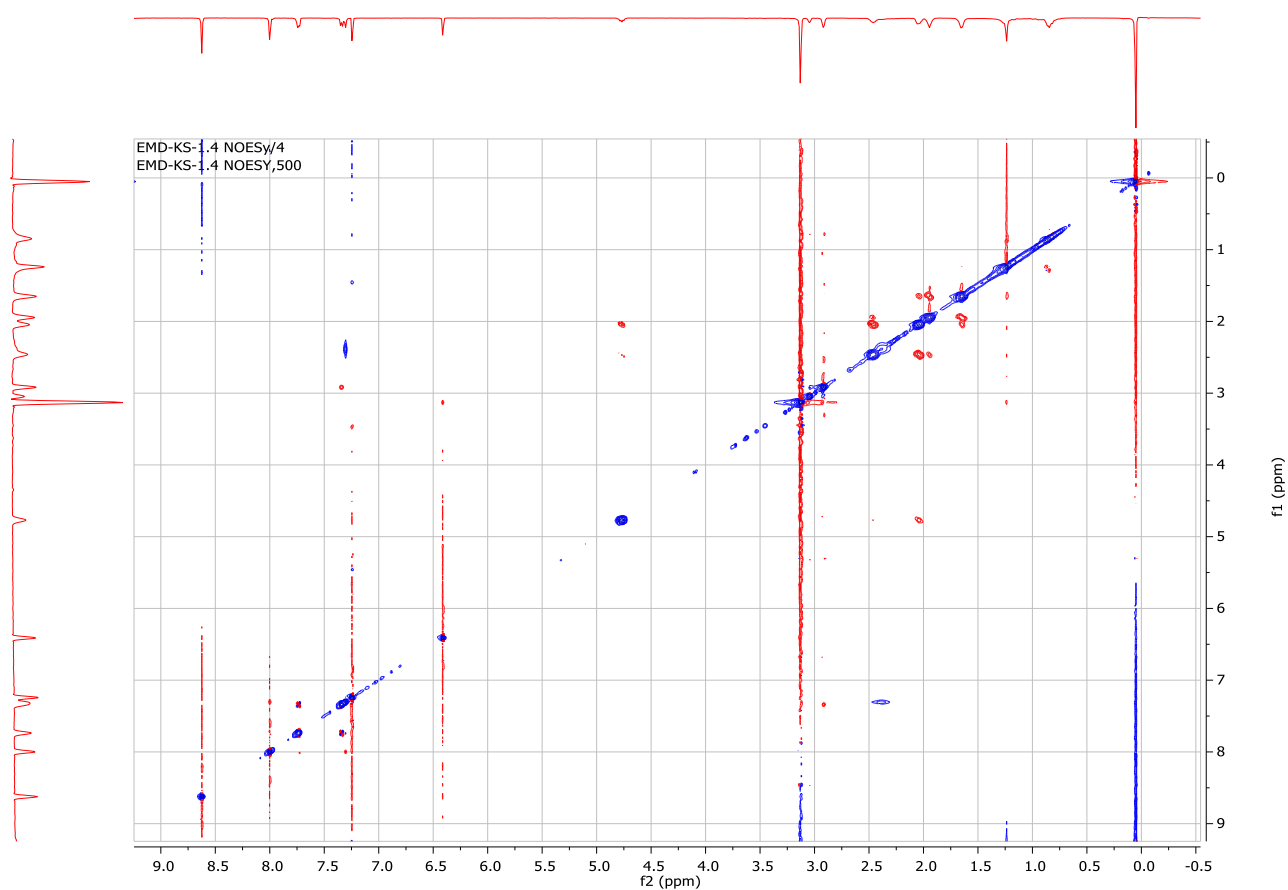
Λήφθηκε φάσμα μάζας του **RibC8** σε διαλύτη MeOH με 0.1% HCOOH. Η σχετική μάζα του **RibC8** με μοριακό τυπό $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}$ είναι 501.25. Στο φάσμα παρατηρείται η πρωτονιωμένη μορφή με m/z 502.1 που αντιστοιχεί στο μοριακό τυπό $[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}+\text{H}]^+$.



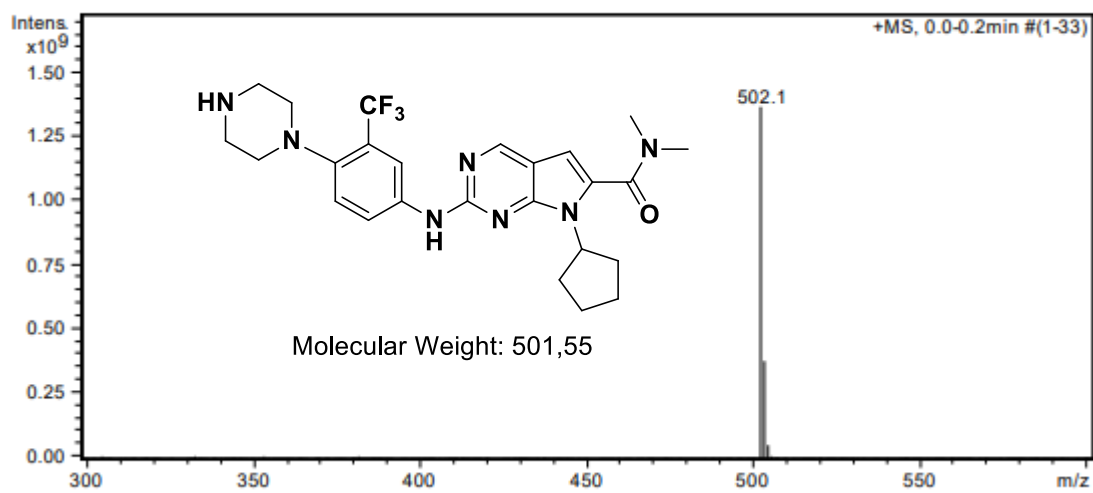
Σχήμα 132: Φάσμα ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibC8**.



Σχήμα 133: Φάσμα COSY-NMR της ένωσης **RibC8**

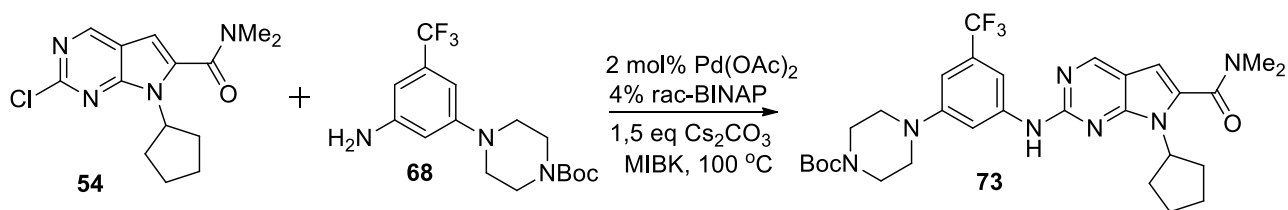


Σχήμα 134: Φάσμα NOESy-NMR του *RibC8*



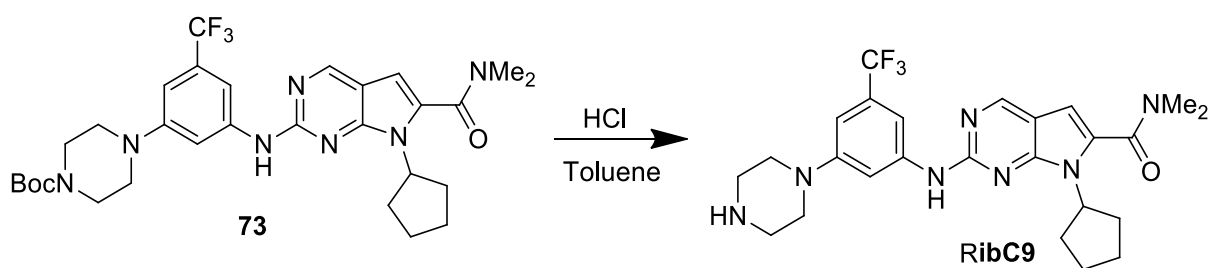
Σχήμα 135: φάσμα μάζας της ένωσης *RibC8*

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC9.



Σχήμα 136: Αντίδραση σύνθεσης ένωσης **73**.

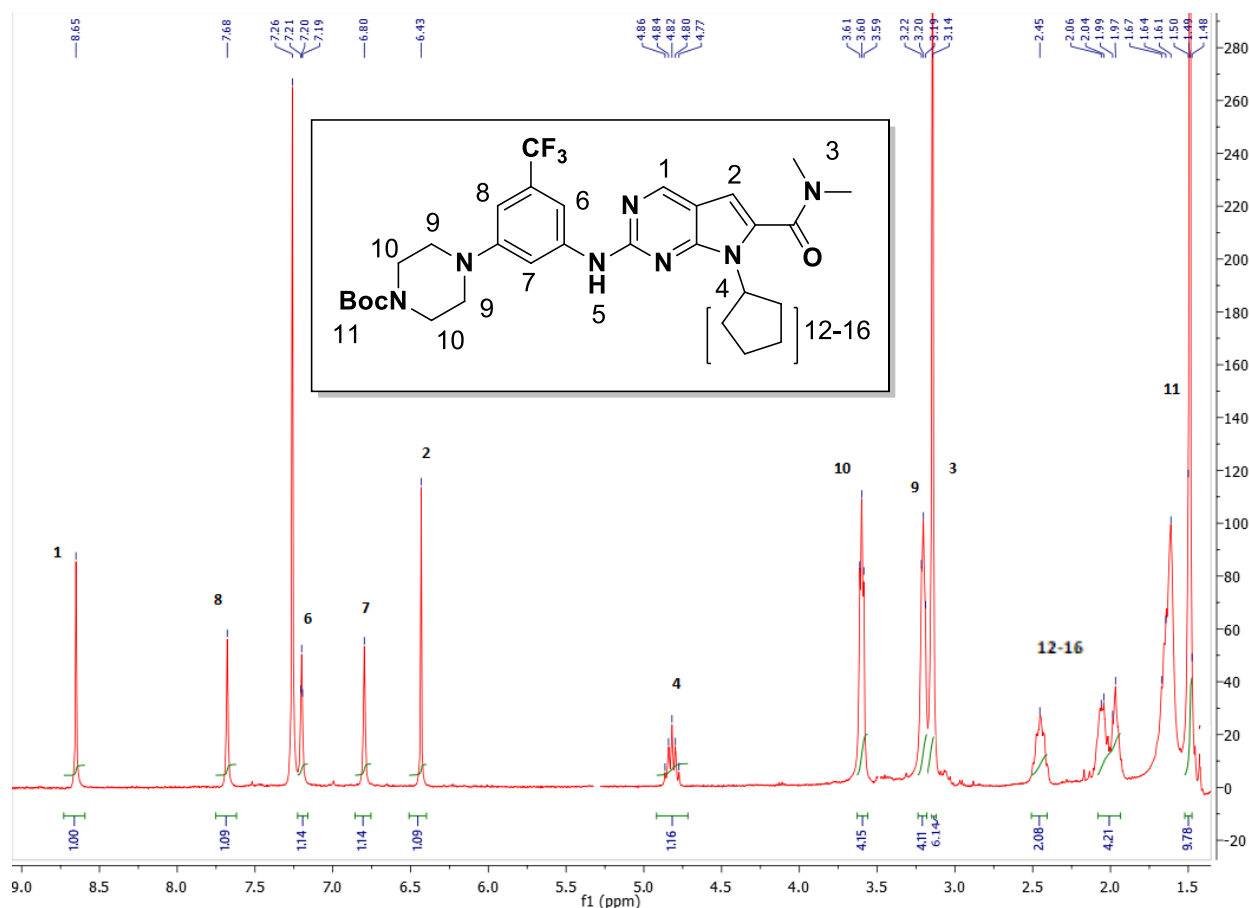
Η σύνθεση της ένωσης **73** πραγματοποιήθηκε μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig της χλωροπυριμιδίνης **54** με την ανιλίνη **68**. Ως καταλύτες χρησιμοποιήθηκαν 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%- mol rac-BINAP. Η αντίδραση διενέργηθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καϊσίου σε διαλύτη 4-μεθυλ-2-πεντανόνη (MIBK).



Σχήμα 137: αντίδρασης σύνθεσης του **RibC9**.

Το **RibC9** παραλήφθηκε ποσοτικά μετά από Boc-αποπροστασία της ένωσης **27**, υπό όξινες συνθήκες και διαλύτη τολουόλιο.

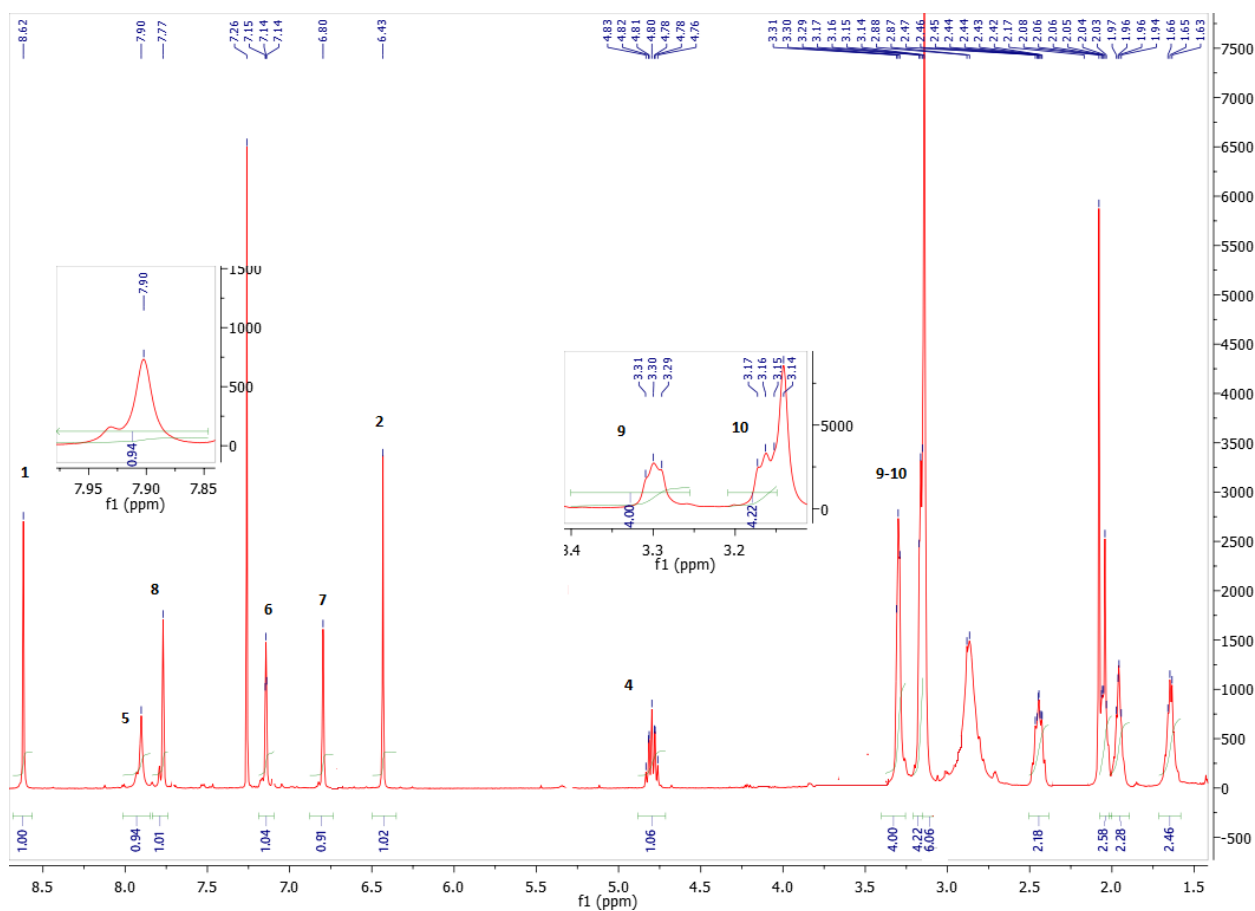
Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **73**:



Σχήμα 138: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **73**.

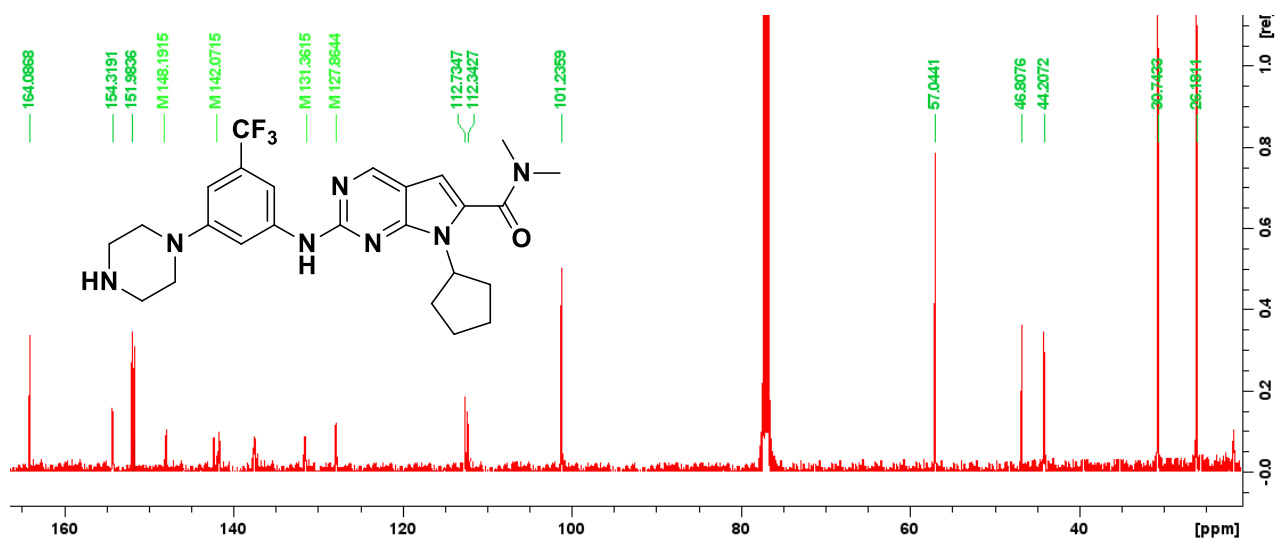
Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 της πυριμιδινικού δακτυλίου καταγράφεται στα 8,65 ppm ως μία απλή κορυφή, το πρωτόνιο H2 στα 6,43 ppm ως μία απλή κορυφή. το πρωτόνιο H8 στα 7,68 ppm ως μία απλή κορυφή, το πρωτόνιο H6 στα 7,20 ppm ως απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H7 καταγράφεται στα 6,80 ppm ως μια απλή κορυφή, το πρωτόνια H4 στα 4,81 ppm ως μία πολλαπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H3 της διμεθυλο-αμινομάδας του αμιδικού δεσμού στα 3,14 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6, ενώ τα πρωτόνια H9-10 του πιπεραζινικού δακτυλίου συντονίζονται στα 3,60 και 3,20 ppm αντίστοιχα, ως πολλαπλές κορυφές με ολοκλήρωση 4. Τέλος, τα πρωτόνια H12-16 καταγράφονται στα 2,45-1,2 ppm ως πολλαπλές κορυφές και τα πρωτόνια H11 της Boc-ομάδας στα 1,5 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9.

Φασματοσκοπικά δεδομένα της τελικής ένωσης **RibC9**

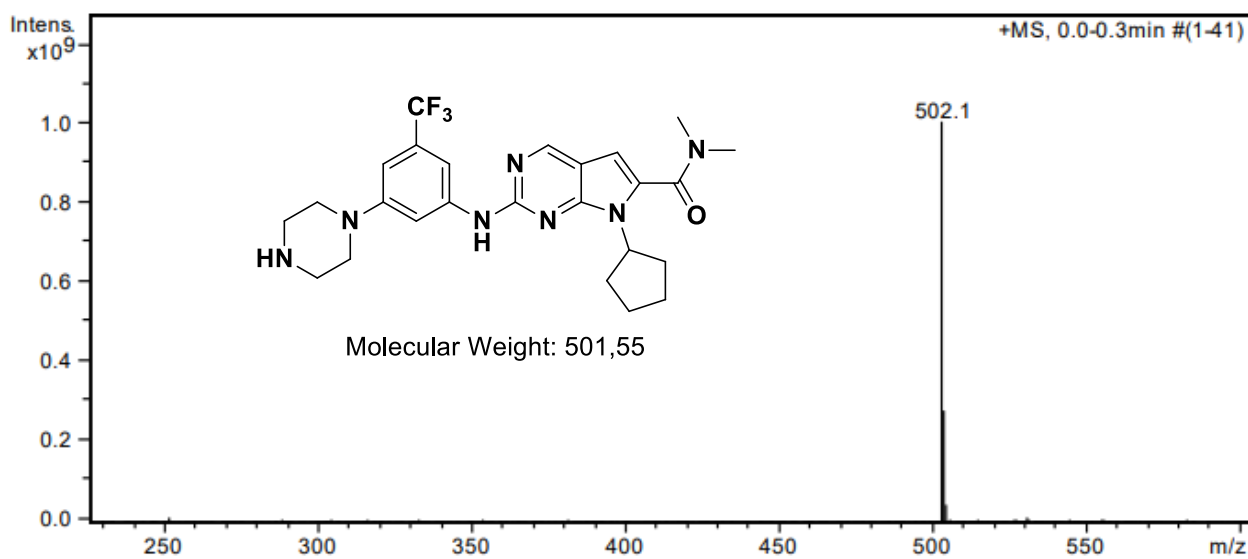


Σχήμα 139: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibC9**.

Ο σχηματισμός της ένωσης **RibC9** επιβεβαιώνεται από την απουσία της κορυφής στα 1,5 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της Boc-ομάδας. Η σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται επιπλέον από την λήψη φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ και φάσματος μάζας. Στο φάσμα μάζας του **RibC9** σε διαλύτη MeOH με 0.1% HCOOH, παρατηρείται η πρωτονιωμένη μορφή με m/z 502.1 που αντιστοιχεί στο μοριακό τυπό $[\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_3+\text{H}]^+$.



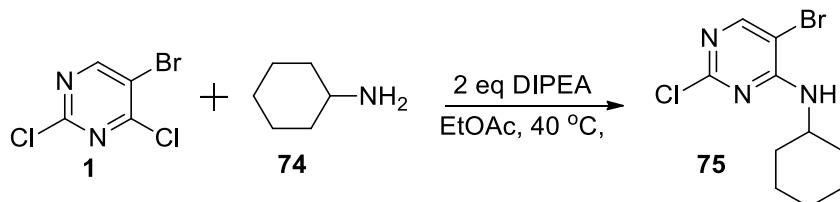
Σχήμα 140: Φάσμα ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibC9**.



Σχήμα 141: φάσμα μάζας της ένωσης **RibC9**.

3.3.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός αναλόγων με βάση την ένωση 78

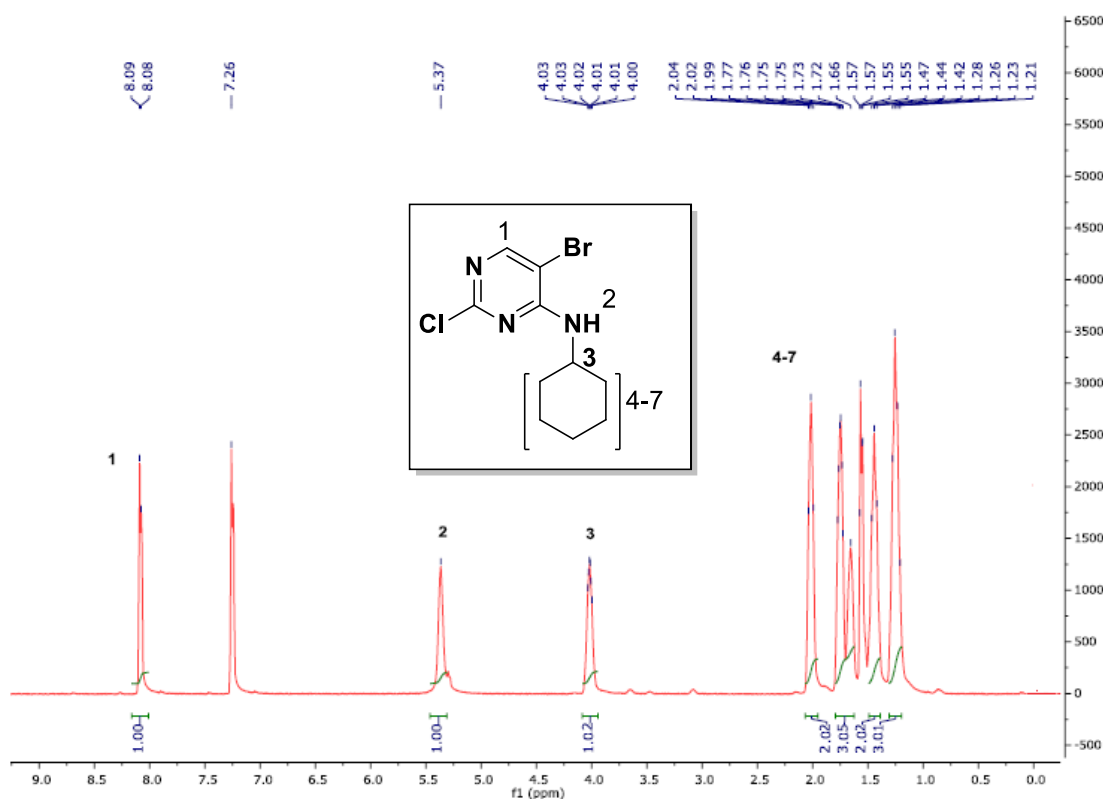
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 75.



Σχήμα 142: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 75.

Πρόκειται για μία πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση όπου η κυκλοεξυλαμίνη, ένωση **28**, προσβάλλει την 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριδίνη βάσης διισοπροπυλοαιθυλαμίνης σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Παραλήφθηκε το προϊόν **75** σε απόδοση 90%. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 6h. Η ένωση **29** καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε ακολούθως με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 75:

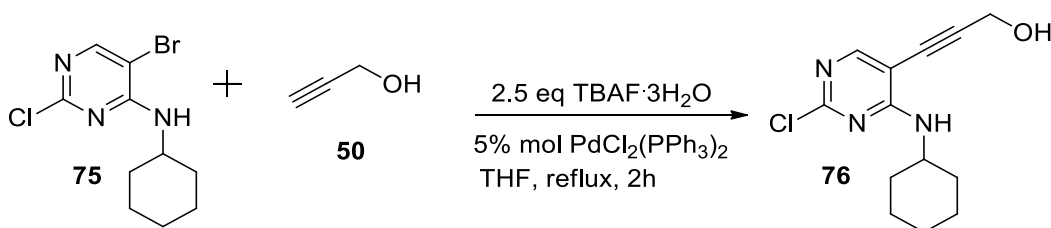


Σχήμα 143: Φάσμα ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης 75.

Το πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8,09 ppm, το πρωτόνιο H2 στα 5,37 ppm, ενώ το χαρακτηριστικό πρωτόνιο H3 του κυκλοεξανικού δακτυλίου στα 4,02 ppm. Τα πρωτόνια H4-7 του κυκλοεξανικού δακτυλίου, ως είναι αναμενόμενο, διαφοροποιούνται και δίνουν τέσσερα σήματα στην περιοχή 1,1 – 2,1 ppm, με συνολική ολοκλήρωση 10.

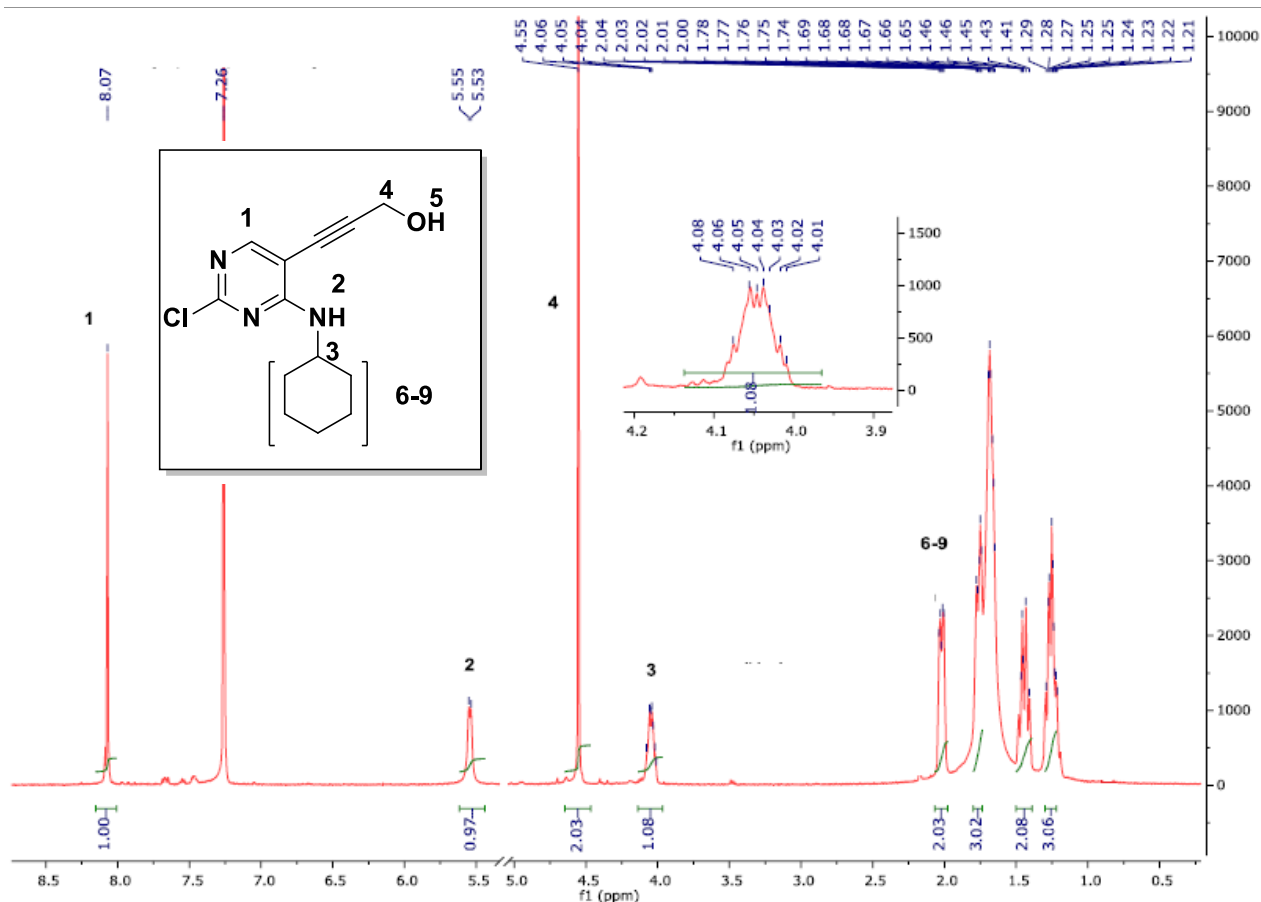
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 76

Το 2^ο στάδιο περιλαμβάνει μία αντίδραση τυπού sonogashira με στόχο την σύζευξη της προπαργυλικής αλκοόλης με την ένωση 29 προς τον σχηματισμό της ένωσης **30**. Η αντίδραση ολοκληρώνεται με χρήση του καταλύτη $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ σε διαλύτη THF, όπως φαίνεται στο παρακάτω. Το TBAF χρησιμοποιείται ως καταλύτης μεταφοράς φάσης και ως ενεργοποιητής του τριπλού δεσμού. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1.5h.



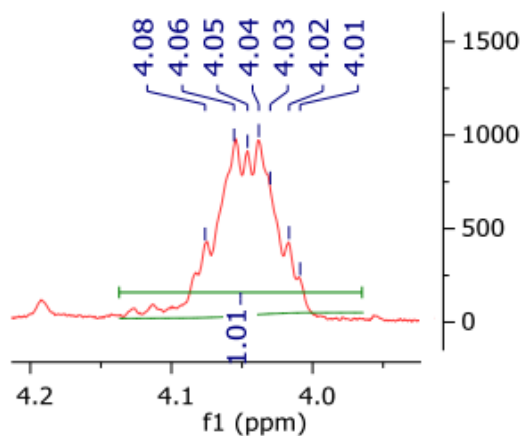
Σχήμα 144: αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **76**.

Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **76**:



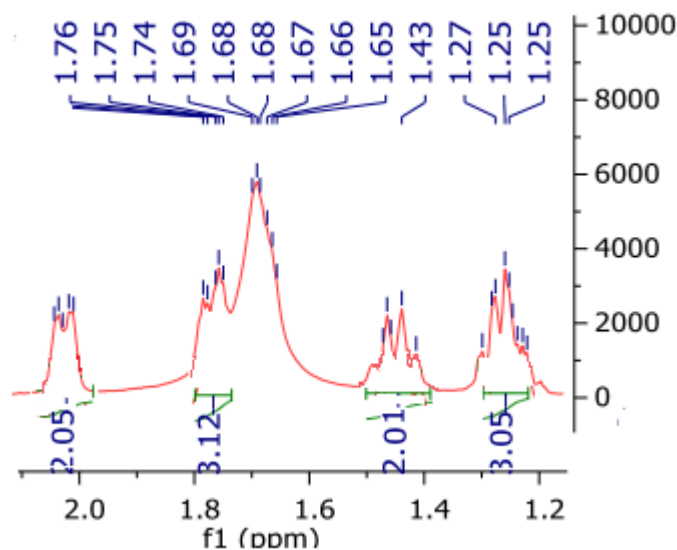
Σχήμα 145: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **30**.

Το πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8.07 ppm και είναι το πλέον αποπροστατευμένο. Το αμινικό πρωτόνιο H2 καταγράφεται στα 5.54 ppm ως μία απλή κορυφή, δε τα πρωτόνια H4 της μεθυλενομάδας στα 4.55 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2.



Σχήμα 146: Τμήμα του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **76**.

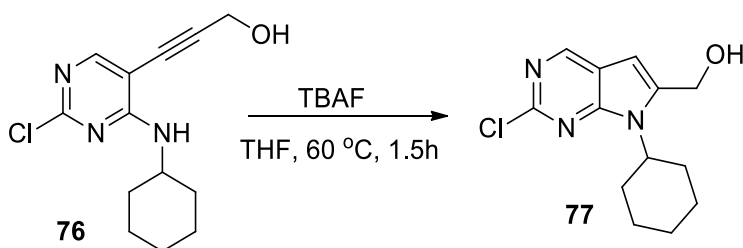
Το χαρακτηριστικό πρωτόνιο του κυκλοεξανικού δακτυλίου H3 συντονίζεται στα 4.04 ppm ως μία πολλαπλή κορυφή με ολοκλήρωση 1.



Σχήμα 147: Τμήμα του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **76**.

Τα πρωτόνια H6-9 του κυκλοεξανίου συντονίζονται στη περιοχή 1,2 – 2,2 ppm ως πολλαπλές κορυφές. Όπως και στην περίπτωση του κυκλοπεντανικού δακτυλίου αυτές οι σχάσεις οφείλονται στην διαμόρφωση του κυκλοεξανικού δακτυλίου. Ο εντοπισμός του σε ισημερινές και αξονικές θέσεις στον εξαμελή διακύτλιο έχει ως αποτέλεσμα τα πρωτόνια να διαφοροποιούνται και κατά συνέπεια να εμφανίζουν διαφορετικές κορυφές και πολλαπλές σχάσεις.

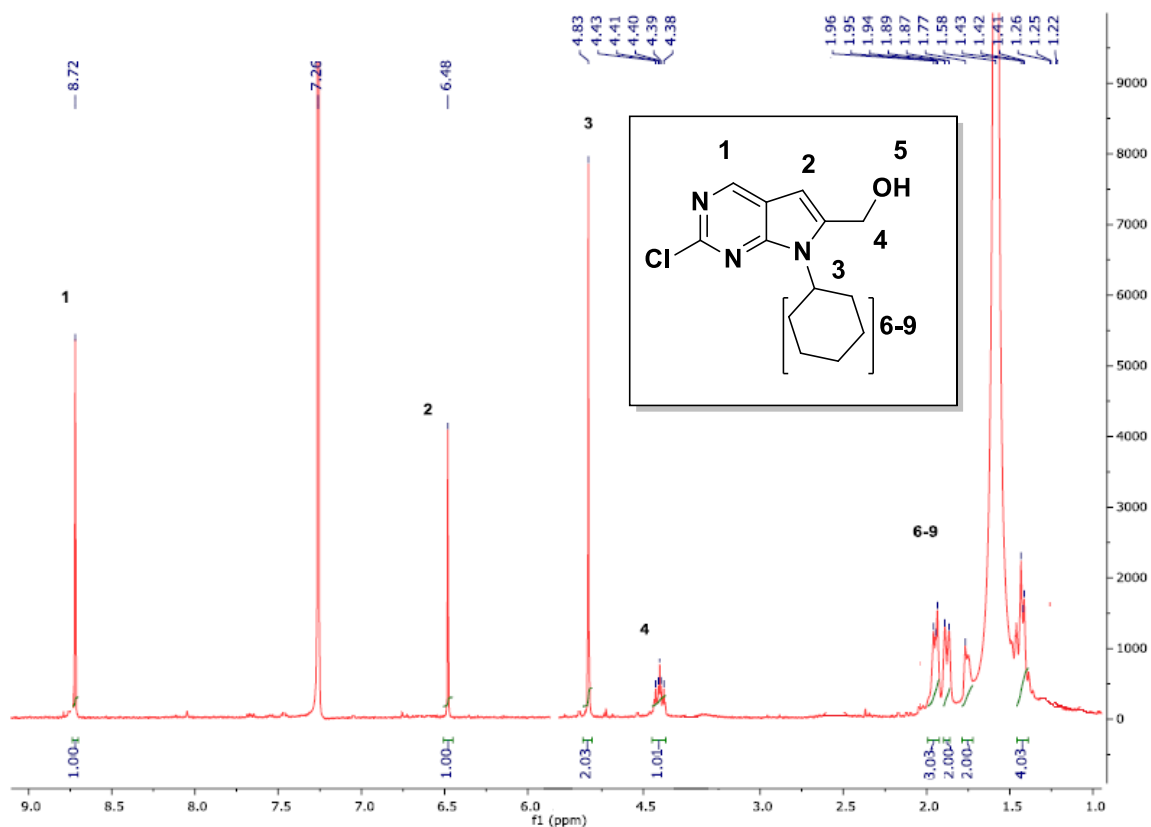
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης **77**



Σχήμα 148: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **77**.

πρόκειται για μία αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης της ένωσης **76** με σχηματισμό του πυρρολικού δακτυλίου. Η ένωση **76** και περίσσεια TBAF·3H₂O σε διαλύτη THF θερμαίνεται και αναδεύεται για περίπου 1.5 h. Το προϊόν **77** παραλήφθηκε ποσοτικά με απόδοση που ξεπερνά το 80%.

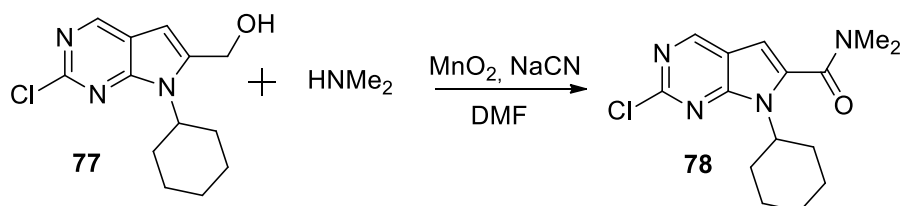
Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **31**:



Σχήμα 149: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **31**.

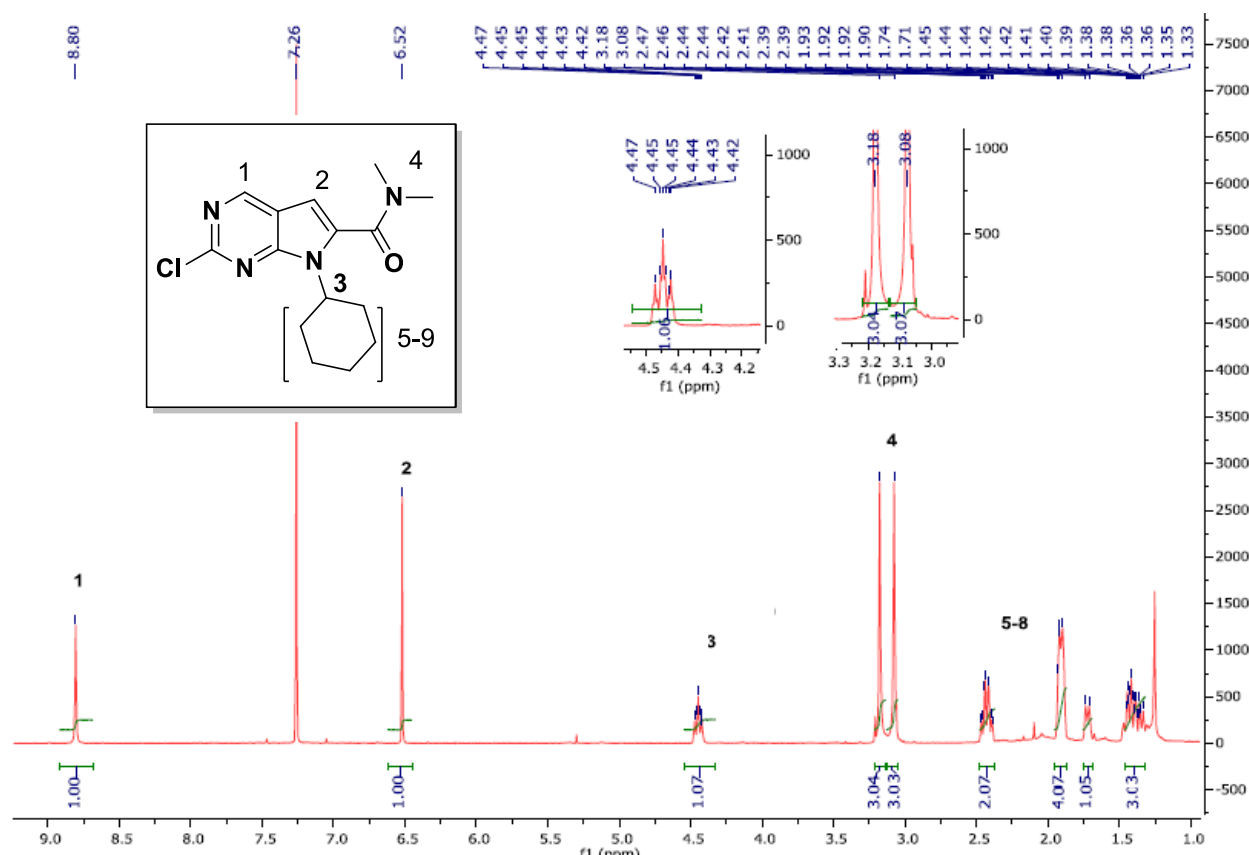
Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 καταγράφεται στα 8.72 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 του πυρρολικού δακτυλίου συντονίζεται στα 6.48 ppm ως απλή κορυφή, το H4 ως χαρακτηριστική πολλαπλή κορυφή κορυφη στα 4.40 ppm. Η ισχυρή προστασία οφείλεται στην περίσσεια ηλεκτρονίων του πυρρολικού δακτυλίου του διαζα-ινδολίου. Τα πρωτόνια H6-9 του κυκλοεξανοϊκού δακτυλίου καταγράφονται στα 2.00-1.2 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 78



Σχήμα 150: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 78.

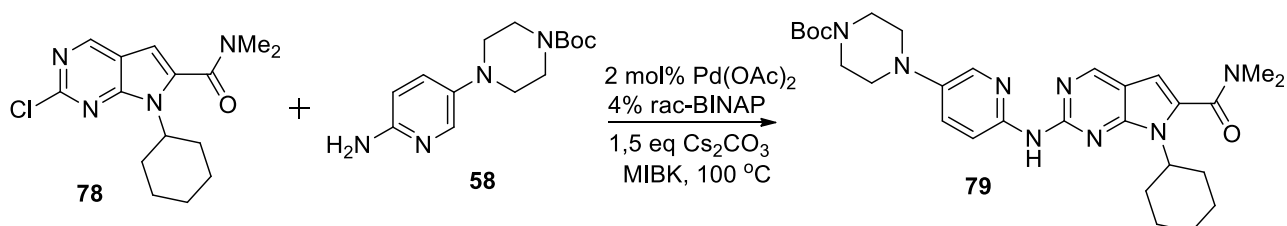
Η ένωση **77** αφήνεται να αντιδράσει με διμεθυλαμίνη σε τετραϋδροφουράνιο (THF), παρουσία καταλυτικής ποσότητας κυανιούχου καλίου (KCN) και μεγάλης περίσσειας του οξειδωτικού MnO_2 , σε διαλύτη άνυδρο DMF και θερμοκρασία δωματίου. Η ένωση **78** παραλήφθηκε μετά από 1,5 h με απόδοση περίπου 40%



Σχήμα 151: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης 78.

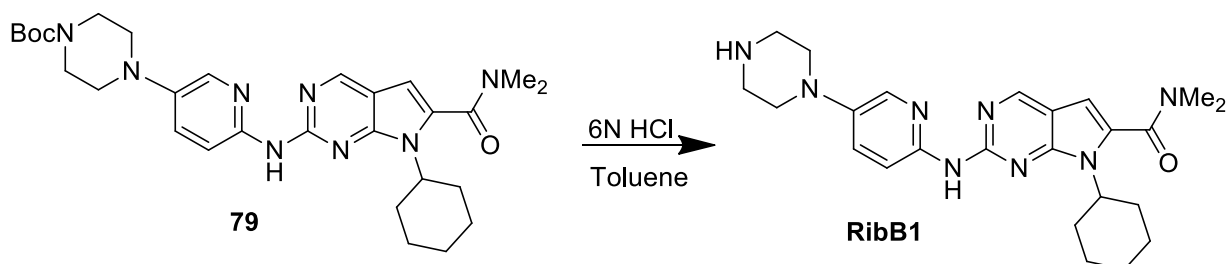
Το χαρακτηριστικό πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8,72 ppm ως μία απλή κορυφή, το δε H2 του πυρρολικού δακτυλίου στα 6,52 ppm ως μία απλή κορυφή. Ο σχηματισμός της ένωσης **5** επαληθεύεται από την εμφάνιση των πρωτονίων H4 στα 3,12 ppm ως δύο απλές διακριτές κορυφές, με ολοκλήρωση 3 η κάθε μία. Το πρωτόνιο H3 καταγράφεται στα 4,45 ppm ως μία πολλαπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H6-9 του κυκλοεξανοϊκού δακτυλίου εμφανίζονται στα 2.43-1.22 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός του RibB1



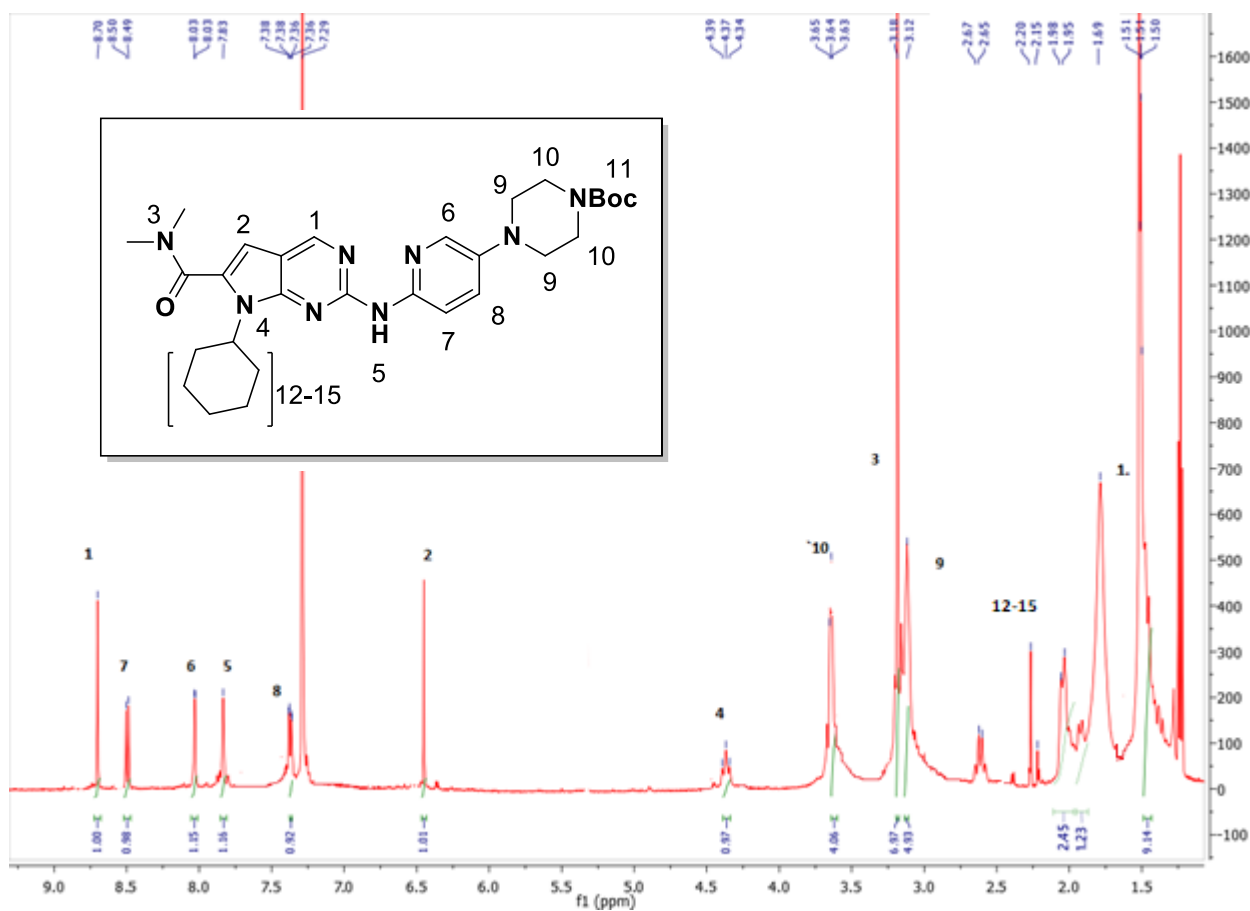
Σχήμα 152: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **79**.

Η σύνθεση της ένωσης **79** πραγματοποιήθηκε μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig της ένωσης **78** και της **58**. Ως καταλύτες χρησιμοποιήθηκαν 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%-mol rac-BINAP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καισίου σε διαλύτη 4-μεθυλ-2-πεντανόνη (*MIBK*).

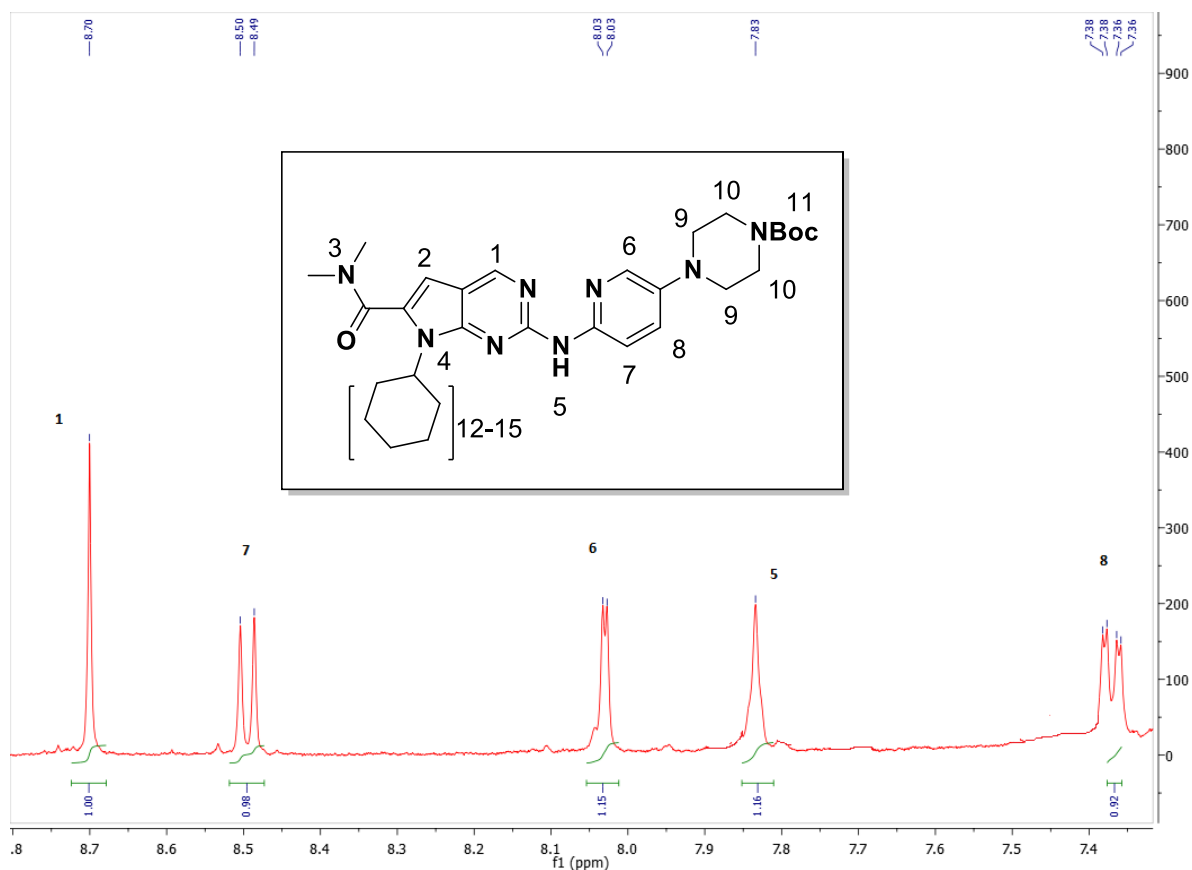


Σχήμα 153: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **RibB1**.

Το RibB1 παραλήφθηκε ποσοτικά με την Boc-αποπροστασία της αμινο-ομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου, υπό όξινες συνθήκες και διαλύτη τολουόλιο.



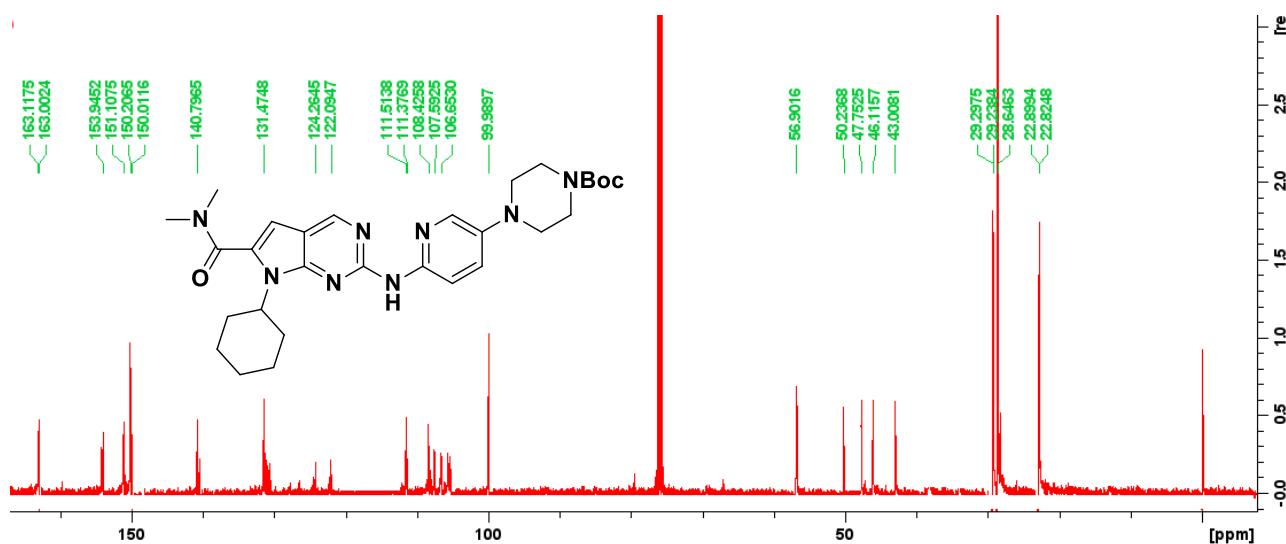
Σχήμα 154: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **79**.



Σχήμα 143: Τμήμα του Φάσματος ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **79**.

Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 του πυριμιδινικού δακτυλίου καταγράφεται στα 8,7 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 του πυρρολικού δακτυλίου συντονίζεται στα 6,43 ppm ως μια απλή κορυφή. Το αμινικό πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 7,83 ppm ως μια απλή κορυφή, και το H7 στα 8,50 ppm ως μια διπλή κορυφή με $^3J = 9,07$ Hz. Το H6 στα 8,02 ppm ως μια απλή κορυφή με $^4J = 2,50$ Hz, το πρωτόνιο H8 στα 7,36 ppm ως διπλή κορυφή με $^4J = 2,80$ Hz. Το πρωτόνιο H4 καταγράφεται στα 4,37 ppm ως πολλαπλή κορυφή, τα πρωτόνια H3 της διμεθυλοαμινομάδας του αμιδικού δεσμού στα 3,18 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6. Τέλος, τα πρωτόνια H12-15 καταγράφονται στα 2,7-1,2 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

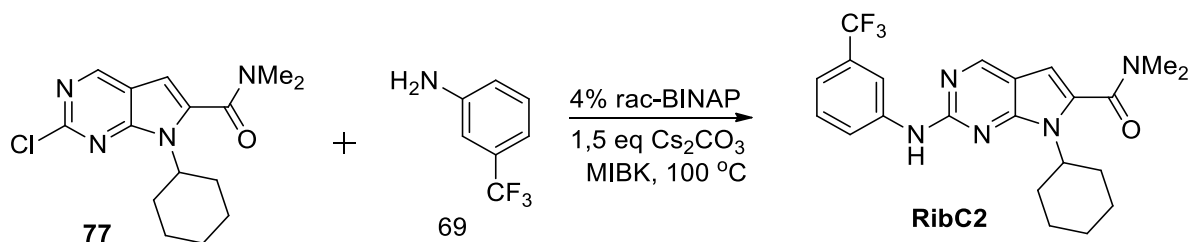
Η σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται και από την λήψη φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$.



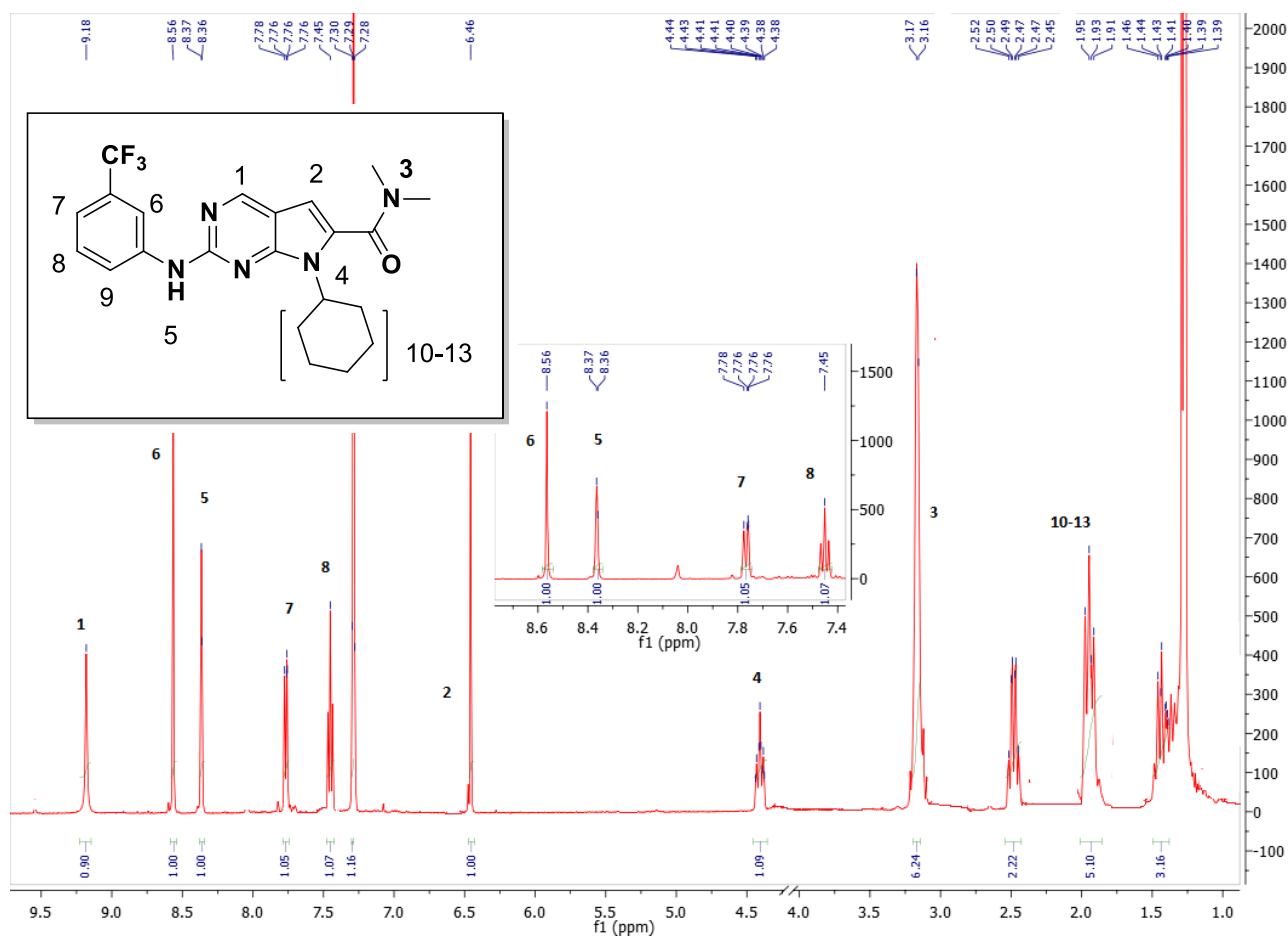
Σχήμα 155: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **79**.

Συνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibC2

Η σύνθεση της ένωσης **RibC1** πραγματοποιήθηκε μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig μεταξύ των ενώσεων **34** και **22** και καταλύτες 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%-mol rac-BINAP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καυσίου σε διαλύτη μεθυλοϊσοβουτυλοκετόνη (*MIBK*).



Σχήμα 156: Σύνθεση της ένωσης *RibC2*.

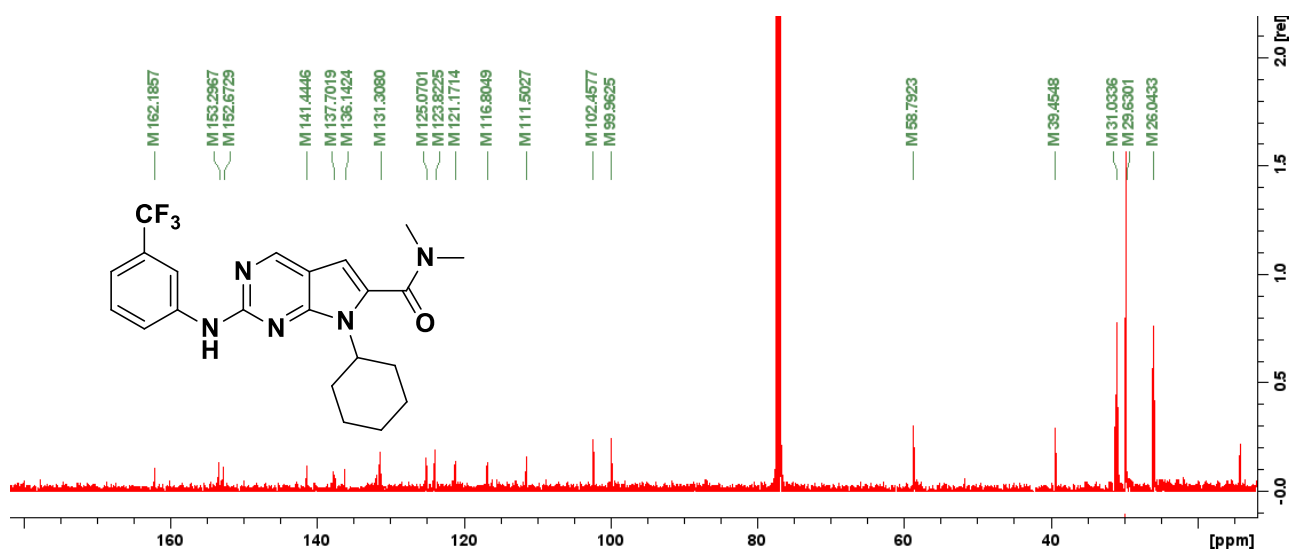


Σχήμα 157: Φάσμα ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibC2**.

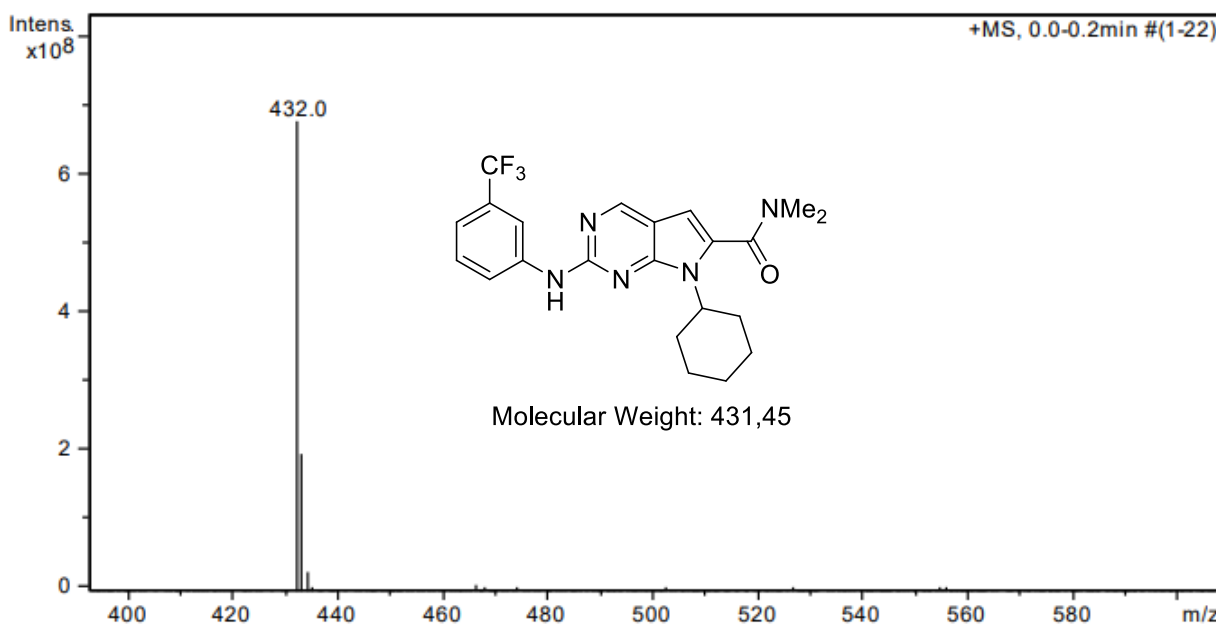
Στο φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **RibC2** το πρωτόνιο H1 του πυριμιδινικού δακτυλίου, ως το πλέον αποπροστατευμένο, συντονίζεται στα 9,18 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H2 καταγράφεται στα 6,46 ppm, επίσης ως μία απλή κορυφή, το δε H6 του βενζολικού δακτυλίου λόγω της γειτνίασης με την $-\text{CF}_3$ ομάδα συντονίζεται στα 8,56 ppm ως μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο H7 καταγράφεται στα 7,76 ppm ως μία διπλή της διπλής κορυφή με $^3J = 8,01$ και $^4J = 2,86$. Το αμινικό πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 8,36 ppm ως απλή μία κορυφή, το H8 ως μία τριπλή κορυφή με $^3J = 7,93$ Hz, το πρωτόνιο H9 ως μία διπλή κορυφή στα 7,19 ppm, το πρωτόνιο H4, ως το πλέον αποπροστατευμένο του κυκλοεξανοϊκού δακτυλίου, στα 4,39 ppm ως πολλαπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H4 της διμεθυλοαμινομάδας του αμιδικού δεσμού στα 3,16 ppm ως μία απλή κορυφή με ολοκλήρωση 6. Τέλος, τα πρωτόνια H10-13 καταγράφονται στα 1,45-1,7 ppm ως πολλαπλές κορυφές.

Η σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται επιπροσθέτως από την λήψη φάσματος ^{13}C -NMR και φάσματος μάζας.

Στο φάσμα μάζας του RibC2 σε διαλύτη MeOH με HCOOH 0.1%. το m/z του μοριακού ιόντος καταγράφεται στα 432.0 m/z και αντιστοιχεί στο μοριακό τυπό $[\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_5\text{O} + \text{H}]^+$. Το μοριακό βάρος του **RibC1** με μοριακό τυπό $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ είναι 431.45.



Σχήμα 158: Φάσμα ^{13}C -NMR (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibC2**

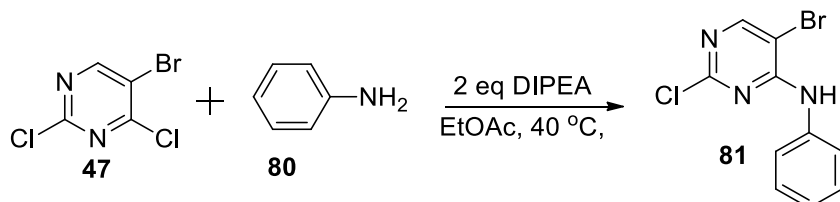


Σχήμα 159: Φάσμα μάζας της ένωσης **RibC2**.

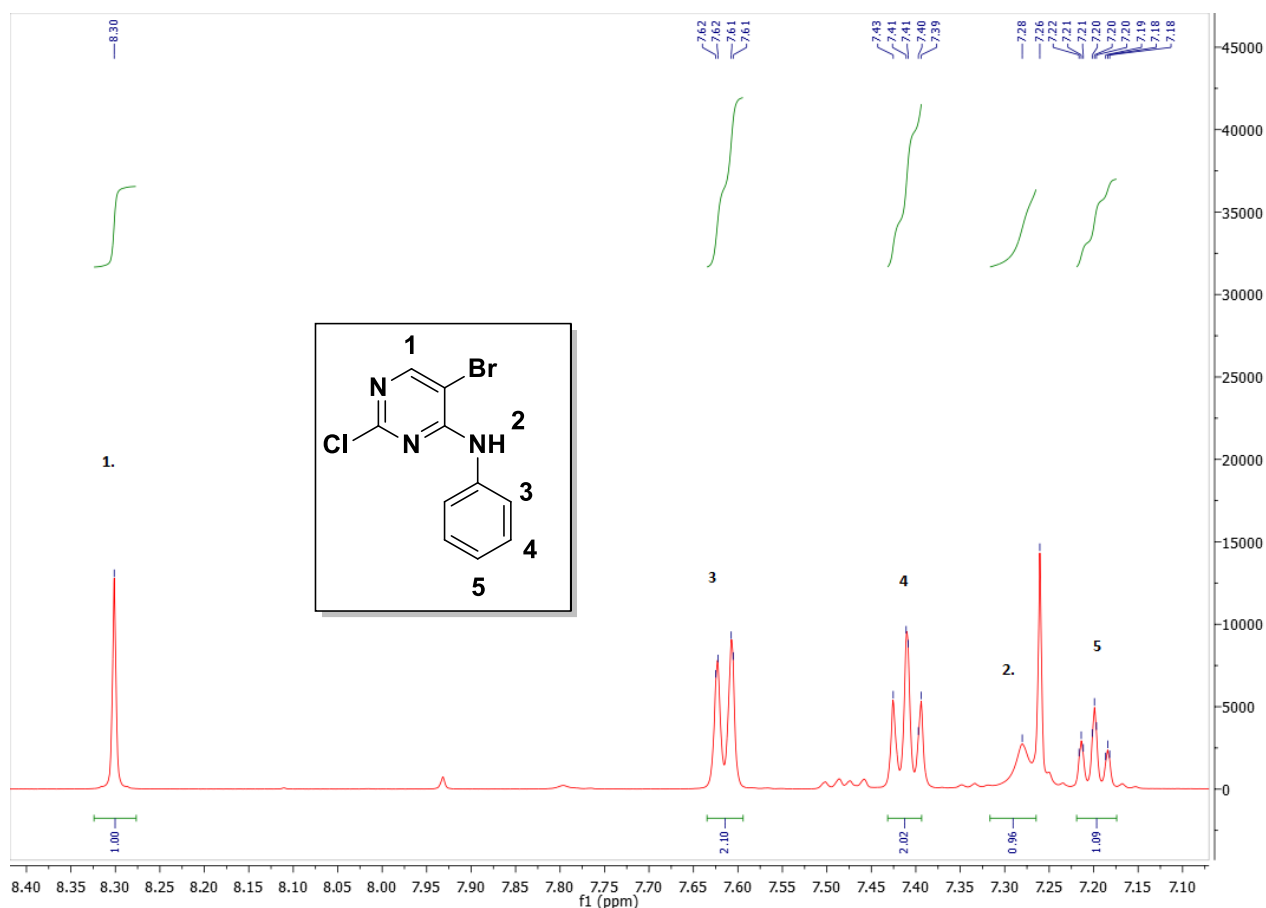
3.3.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός αναλόγων με βάση την ένωση 36

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 81

Το 1^ο στάδιο αφορά μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με προσβολή της ανιλίνης στην 5-βρωμο-2,4-δichλωροπυριδίνη παρουσία βάσης διισοπροπυλοαιθυλαμίνης και διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Παραλήφθηκε το προϊόν **36** σε απόδοση περίπου 90%. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 6h. Η ένωση **36** καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR.

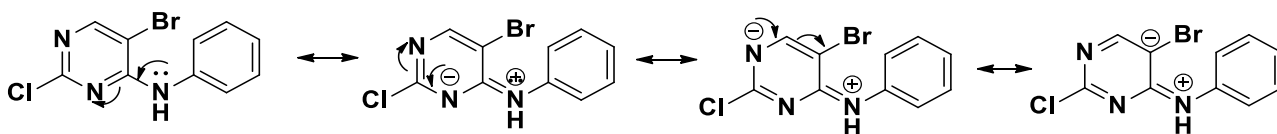


Σχήμα 160: Σύνθεση της ένωσης **81**.



Σχήμα 161: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **81**.

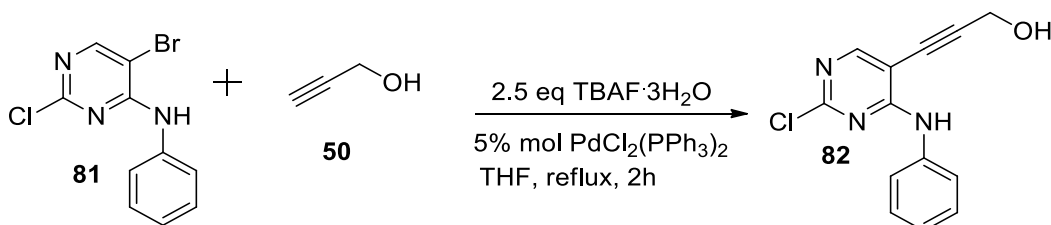
Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1, συντονίζεται στα 8,30 ppm ως μία απλή κορυφή. Το αμινικό πρωτόνιο H2 καταγράφεται στα 7,28 ppm ως μία ευρεία κορυφή. Τα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου H3, H4 και H5 εμφανίζουν, ωστόσο, μία ιδιαιτερότητα. Ενώ θα αναμέναμε το πρωτόνιο H3 και H4 να είναι τα πιο προστατευμένα λόγω του εκδηλωμένου +M συζυγιακού φαινομένου της (-NH-) ομάδας, αυτό δεν καταγράφεται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$. Το +M συζυγιακό φαινόμενο εκδηλώνεται κατά βάση προς τον πυριμιδινικό λόγω της έλειψης ηλεκτρονίων που προκαλούν τα δύο άζωτα, του εν λόγω αρωματικού δακτυλίου. Επομένως η αμινο-ομάδα του αμινικού δεσμού εκδηλώνει ουσιαστικά αποκλειστικά το -I φαινόμενο ως προς τον βενζολικό δακτύλιο.



Σχήμα 162: Το θετικό συζυγιακό φαινόμενο (+M) της δευτεροταγού αμίνης εκδηλώνεται κυρίως προς τον πυριμιδινικό δακτύλιο.

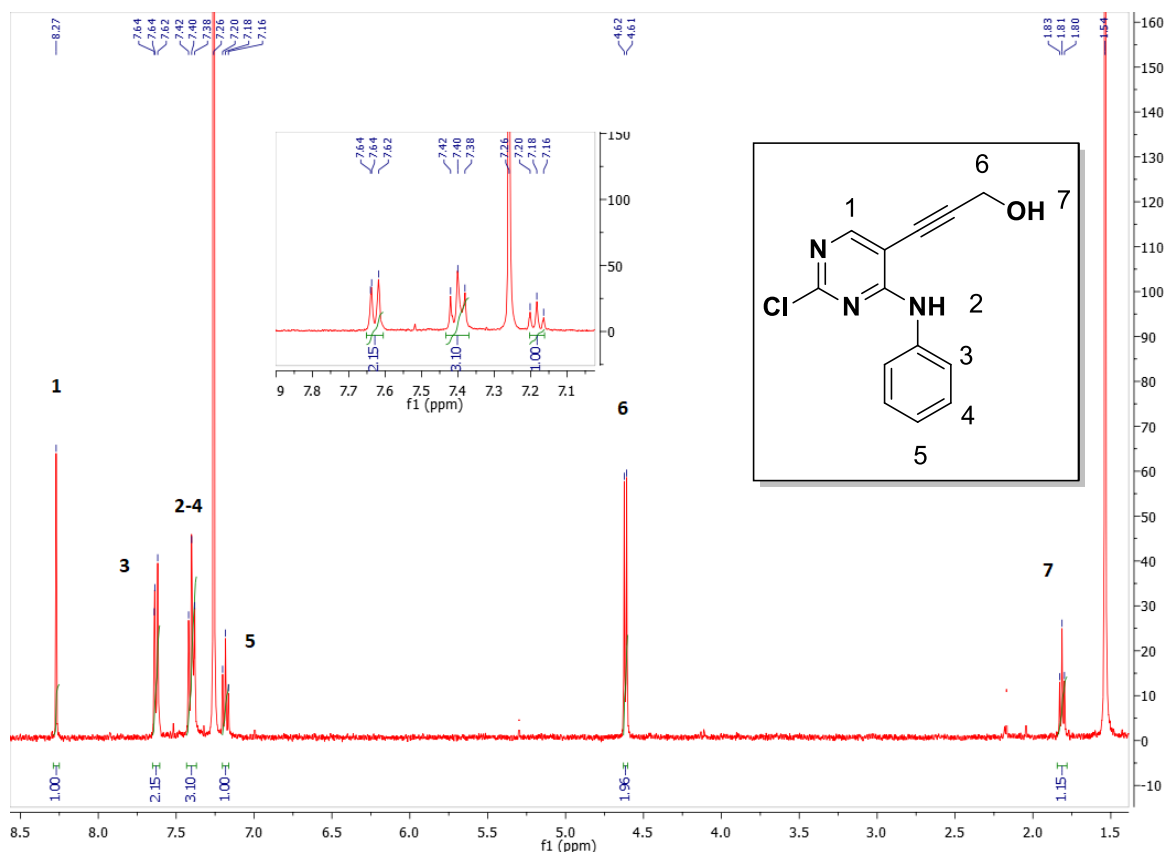
Το πρωτόνια H3 συντονίζεται στα 7,61 ppm ως μία διπλή κορυφή με ολοκλήρωση 3 και $^3J = 7,43$ Hz. Το πρωτόνιο H4 συντονίζονται στα 7,41 ppm ως μία τριπλή κορυφή με $^3J = 7,88$ Hz. Τέλος το πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 7,20 ppm ως μία τριπλή κορυφή με $^3J = 7,44$ Hz, 7,44 Hz.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 82.



Σχήμα 163: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 82.

Το 2^ο στάδιο αφορά μία αντίδραση τυπού Sonogashira ενσωμάτωσης της προπαργυλικής αλκοόλης στην 5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλοπυριμιδιν-4-αμίνη. Η αντίδραση διενεργήθηκε με την χρήση του καταλύτη $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ σε διαλύτη THF. Το TBAF χρησιμοποιείται ως καταλύτης μεταφοράς φάσης και ως ενεργοποιητής μέσω αποπρωτονίωσης του άνθρακα του τριπλού δεσμού.

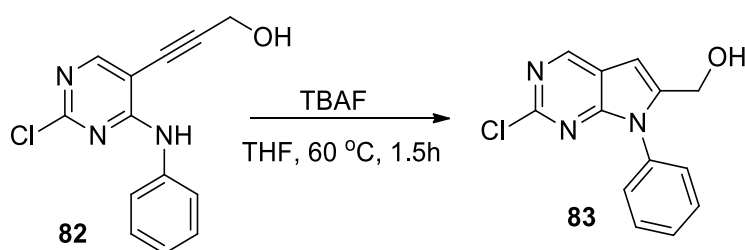


Σχήμα 164: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης 82.

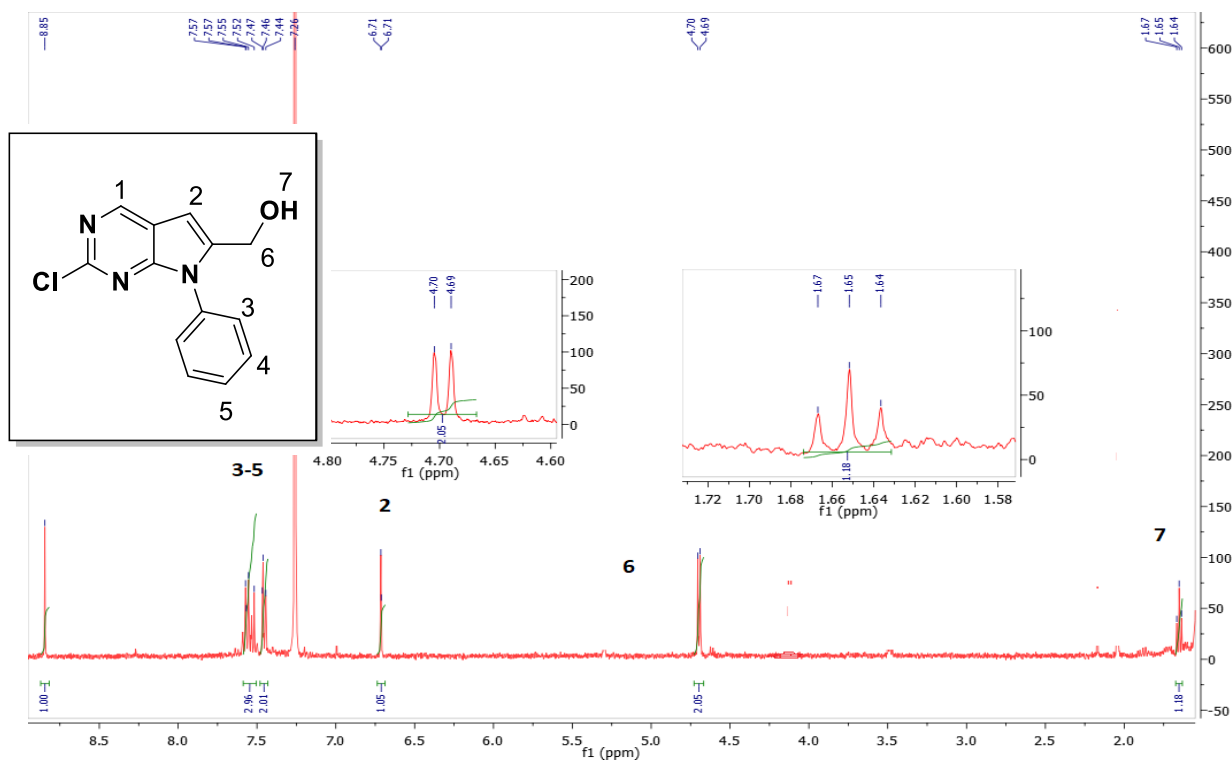
Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8,26 ppm. Το πρωτόνιο του αμινικού δεσμού H2 συντονίζεται στα 8,46 ppm ως ευρεία κορυφή αλληλεπικαλυπτόμενης με τα πρωτόνια H4 τα οποία συντονίζονται επίσης στα 8,46 ppm ως τριπλή κορυφή με $^3J = 7,88$ Hz. Τα πρωτόνια H3 συντονίζονται στα 7,64 ppm ως μία διπλή κορυφή με $^3J = 8,03$ Hz. Τέλος το πρωτόνιο H5 καταγράφεται στα 7,16 ppm, επίσης, ως μία τριπλή κορυφή με $^3J = 7,42$ Hz.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 83

Στο 3^ο στάδιο πραγματοποιείται η ενδομοριακή κυκλοποίηση της ένωσης **82** προς το διαζαινδόλιο **83**. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το THF.



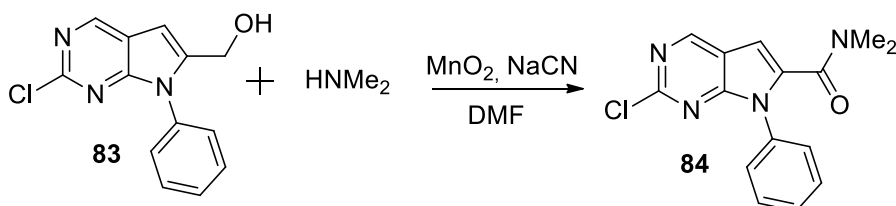
Σχήμα 165: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **83**.



Σχήμα 166: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **83**.

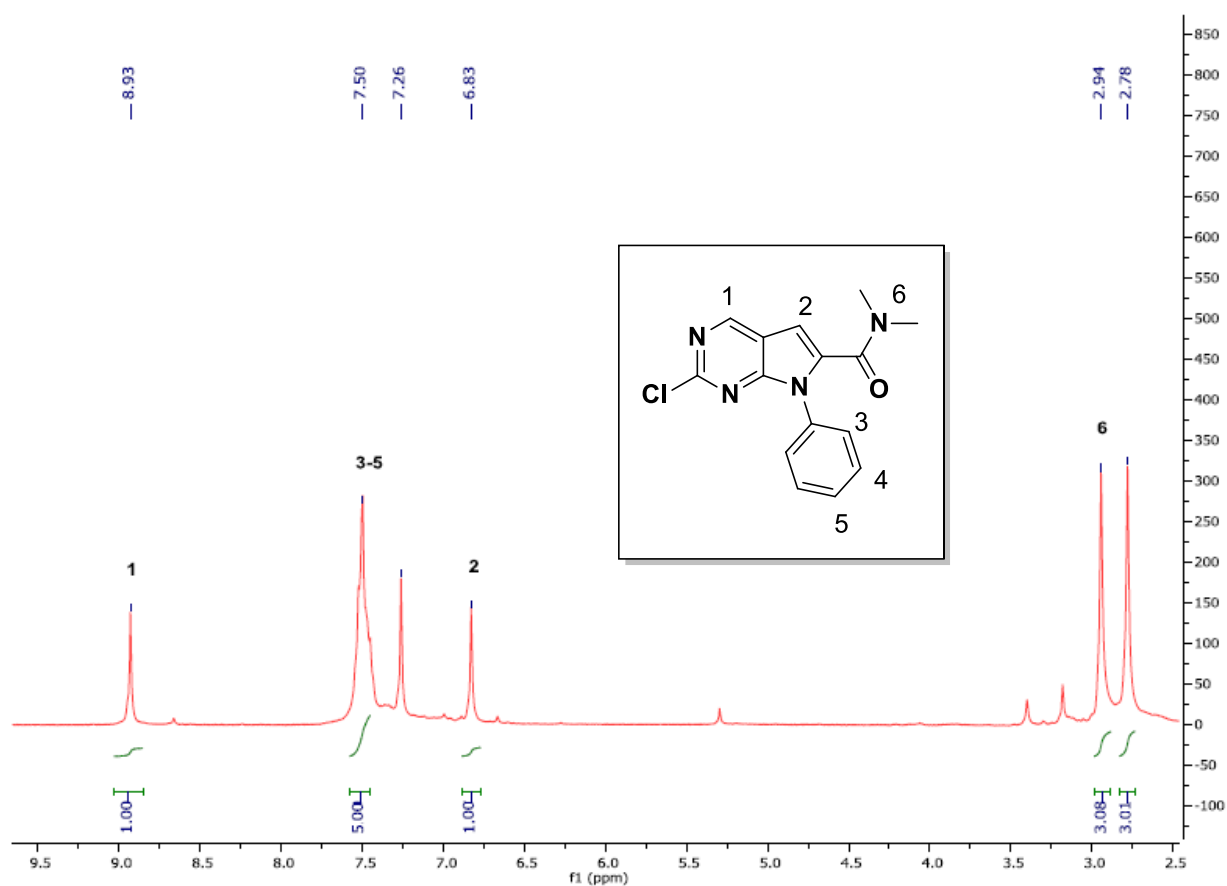
Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8,85 ppm. Το πρωτόνιο H2 του πυρολικού δακτυλίου του διαζα-ινδολίου συντονίζεται στα 6,71 ppm ως μία απλή κορυφή. Τα πρωτόνια H3-5 καταγράφεται στα 7,6-7,2 ppm ως πολλαπλές κορυφές ενώ τα πρωτόνια H6 της μεθυλενομάδας στα 4,70 ppm ως διπλή κορυφή με $^3J = 5,70$ Hz. Το πρωτόνιο H7 της υδροξυλομάδας καταγράφεται στα 1,65 ppm ως τριπλή κορυφή.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης 84



Σχήμα 167: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **84**.

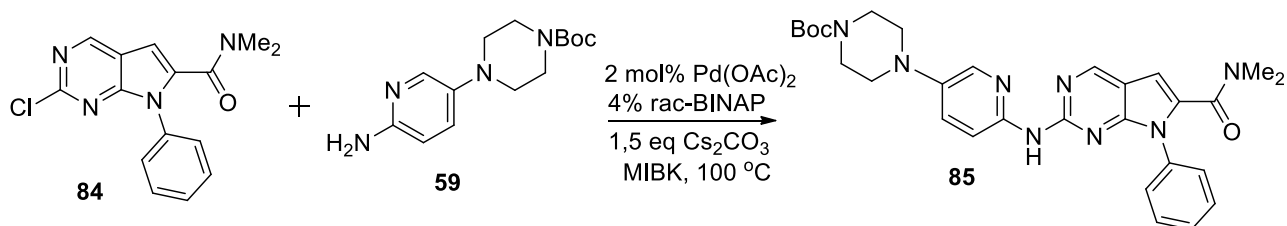
Διενεργήθηκε η αντίδραση της ένωσης **83**, παρουσία διαλύματος διμεθυλαμίνης σε τετραϋδροφουράνιο, καταλυτικής ποσότητας κυανιούχου καλίου και μεγάλης περίσσειας του οξειδωτικού μέσου MnO_2 (διοξείδιο του μαγγανίου), σε διαλύτη άνυδρο DMF και θερμοκρασία δωματίου. Η ένωση **84** παραλήφθηκε μετά από 1,5 h με απόδοση περίπου 40%.



Σχήμα 168: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **84**.

Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8,93 ppm. Το πρωτόνιο H2 του διάζαϊνδολίου συντονίζεται στα 6,83 ppm ως απλή μία απλή κορυφή. Τα πρωτόνια H3-5 καταγράφονται στα 7,6-7,2 ppm ως πολλαπλές κορυφές ενώ τα πρωτόνια H6 των μεθυλομάδων του αζώτου του αμιδικού δεσμού αποτυπώνονται ως δύο διακριτές απλές κορυφές στα 2,9 ppm.

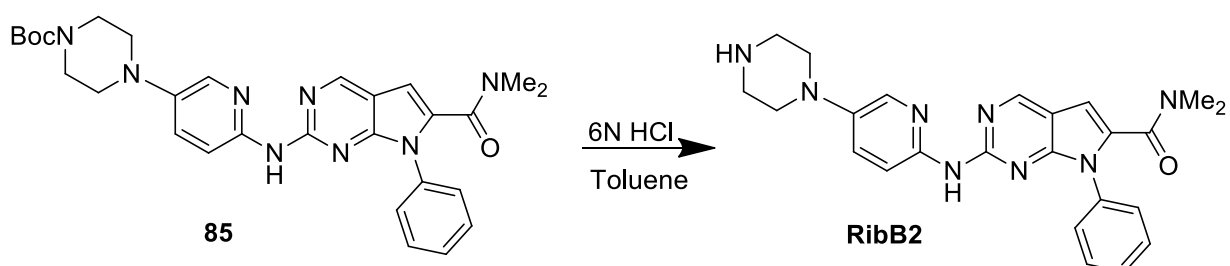
Σύνθεση και χαρακτηρισμός της ένωσης RibB2



Σχήμα 269: Αντίδραση σύνθεσης της ενδιάμεσης ένωσης **85**.

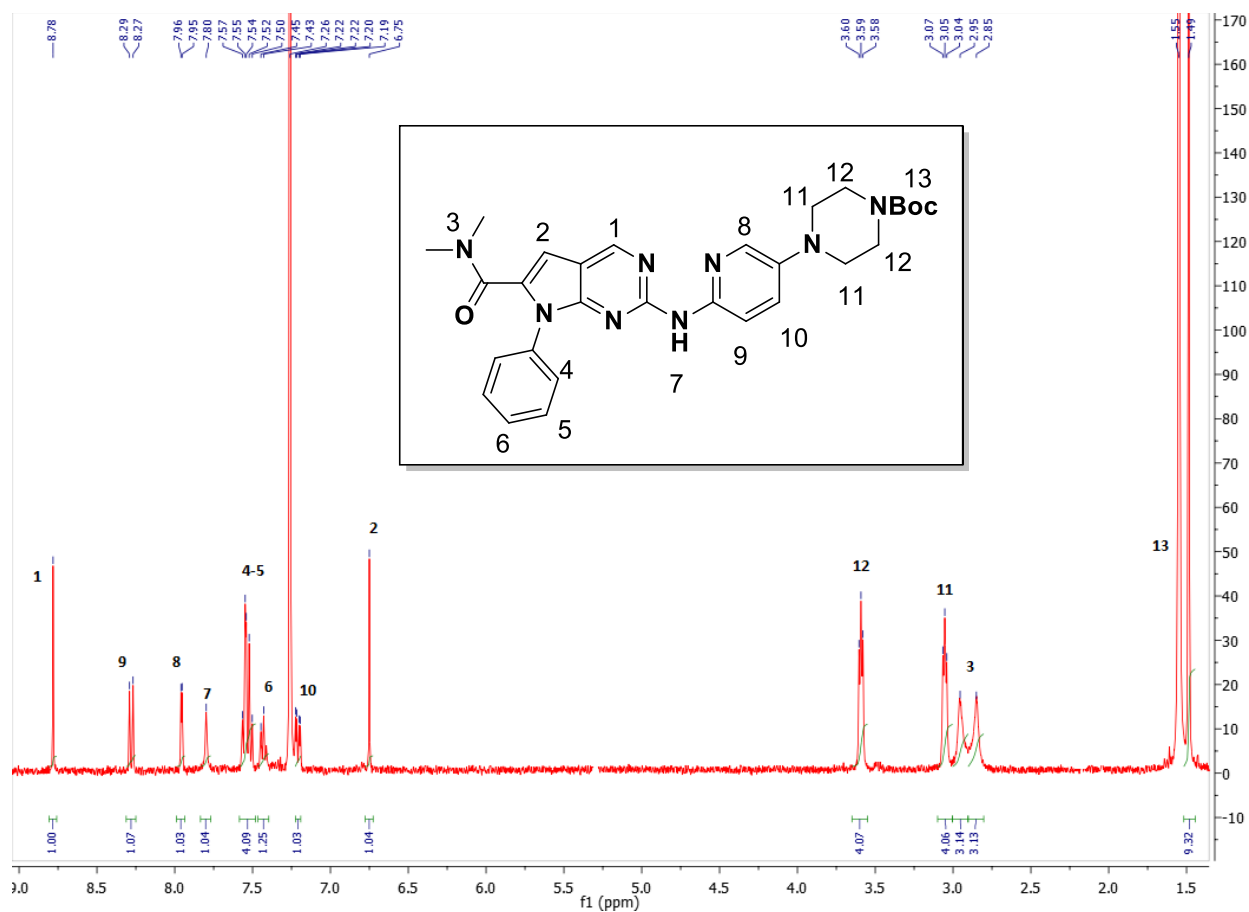
Η σύνθεση της ένωσης **85** πραγματοποιήθηκε μέσω μίας αντίδρασης Buchwald-Hartwig της ένωσης **84** και **59** με καταλύτες 2%- mol Pd(OAc)₂ και 4%-mol rac-BINAP. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καισίου σε διαλύτη 4-μεθυλ-2-πεντανόνη (*MIBK*).

Το **RibB2** παραλήφθηκε ποσοτικά με την Boc-αποπροστασία της αμινομάδας του πιπεραζινικού δακτυλίου, σε όξινες συνθήκες και διαλύτη τολουόλιο

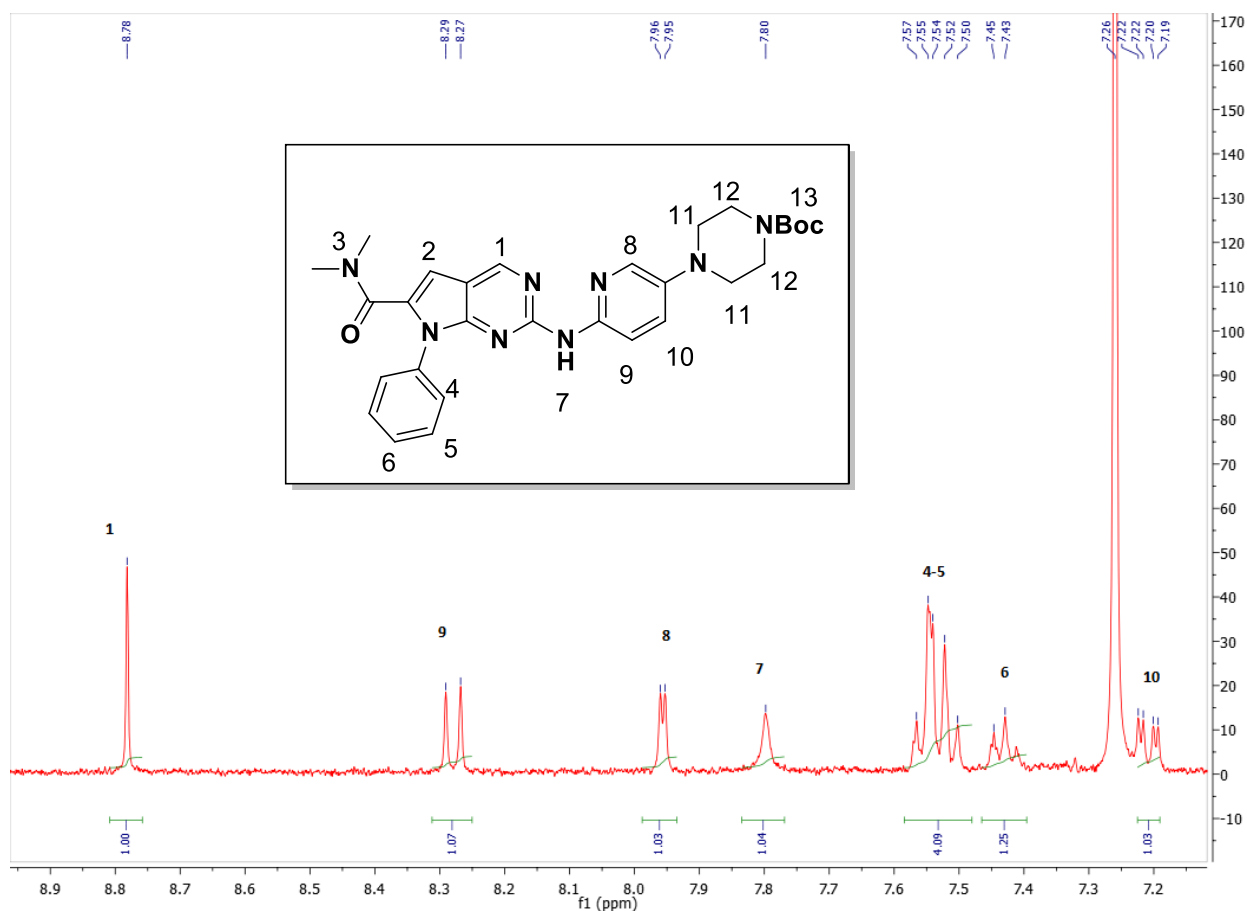


Σχήμα 170: Αντίδραση σχηματισμού του **RibB2**.

Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 85:



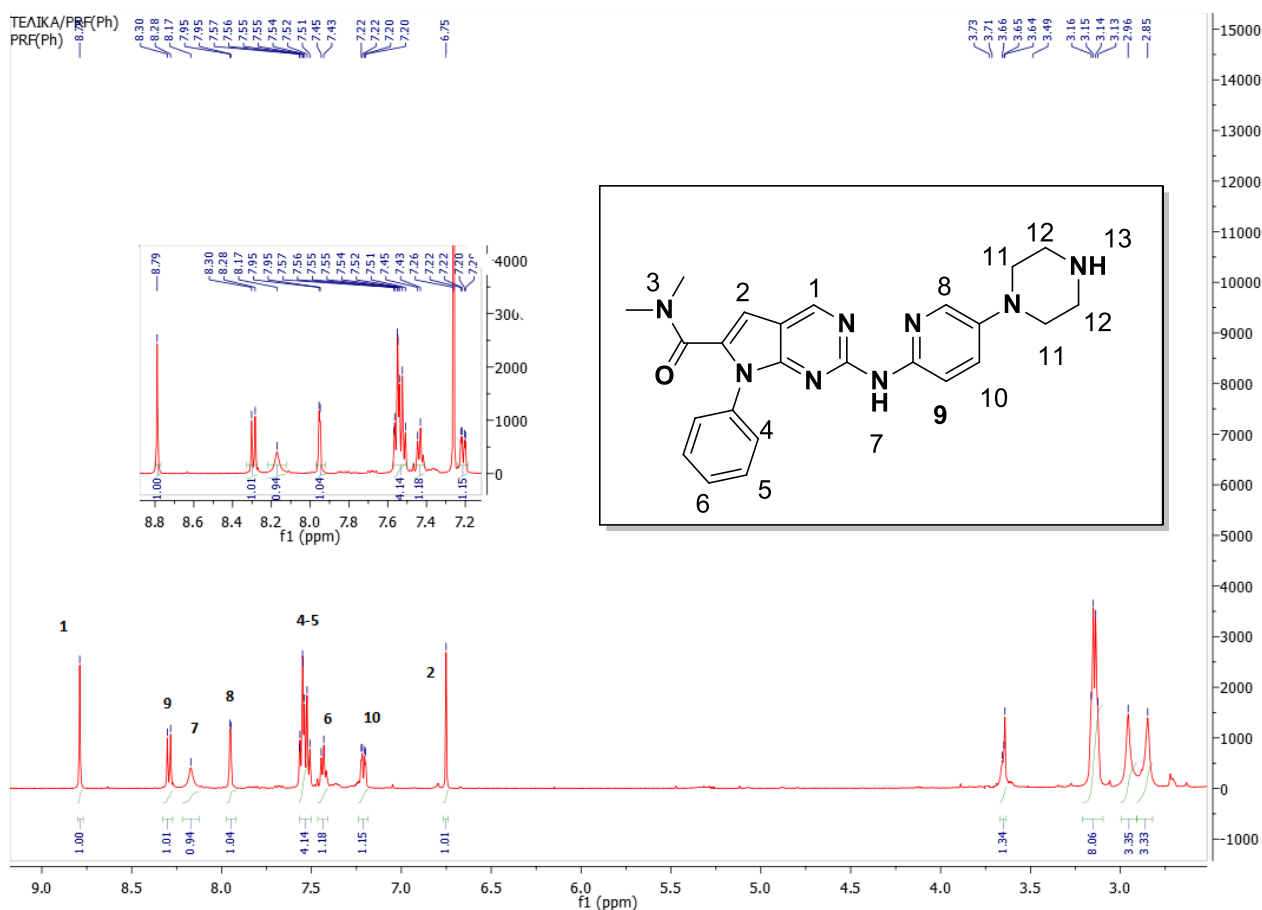
Σχήμα 171: Φάσμα ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης 85.



Σχήμα 172: Τμήμα του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **85**.

Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο H1 συντονίζεται στα 8,78 ppm, το H2 του πυρολικού δακτυλίου του διάζα-ινδολίου στα 6,75 ppm ως μία απλή κορυφή. Τα πρωτόνια H3-6 καταγράφονται στα 7,6-7,4 ppm ως πολλαπλές κορυφές. το H9 στα 8,28 ppm ως διπλή κορυφή με $^3J = 9,11$ Hz. Το πρωτόνιο H8 καταγράφεται στα 7,96 ppm ως μία διπλή κορυφή με $^4J = 2,91$ Hz, το H10 στα 7,21 ppm ως μία διπλή της διπλής κορυφή με $^4J = 3,01$ Hz και $^3J = 9,22$ Hz. Το αμινικό πρωτόνιο H7 εντοπίζεται ως μία ευρεία κορυφή στα 7,80 ppm, τα H3 των μεθυλομάδων του αζώτου του αμιδικού δεσμού εμφανίζονται ως δύο διακριτές απλές κορυφές στα 2,85 και 2,96 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια του πιπεραζινικού δακτυλίου H11 και H12 συντονίζονται στα 3,05 και 3,59 ppm, αντίστοιχα, ως πολλαπλές κορυφές. Τέλος, τα πρωτόνια της Boc-ομάδας εντοπίζονται στα 1,5 ppm ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9.

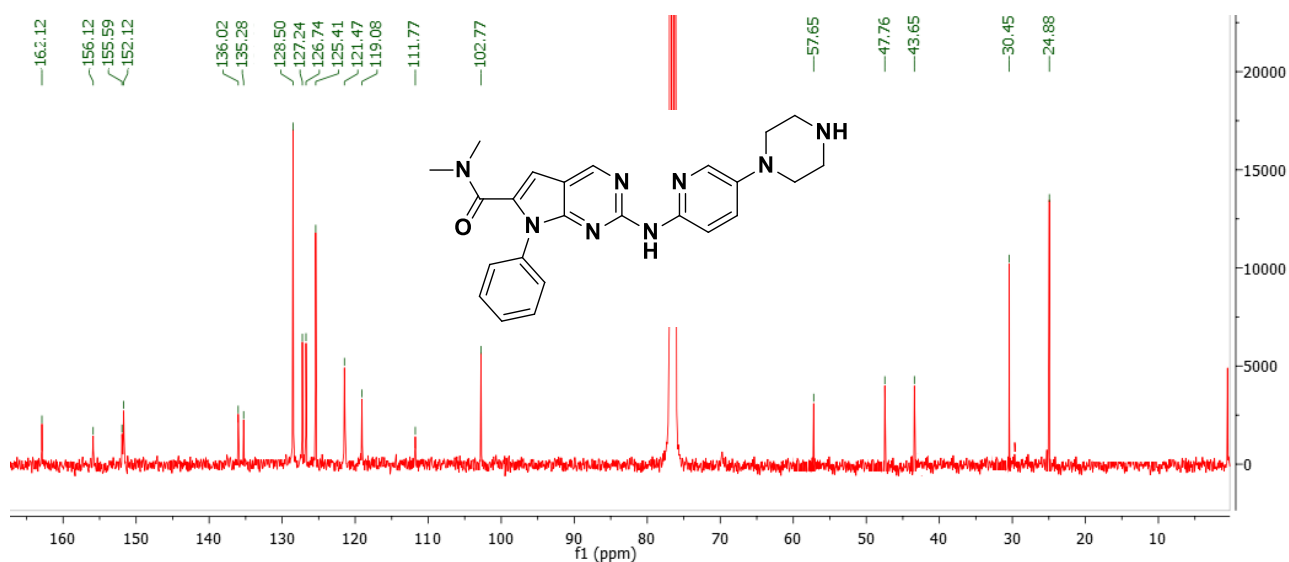
Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης **RibB2**:



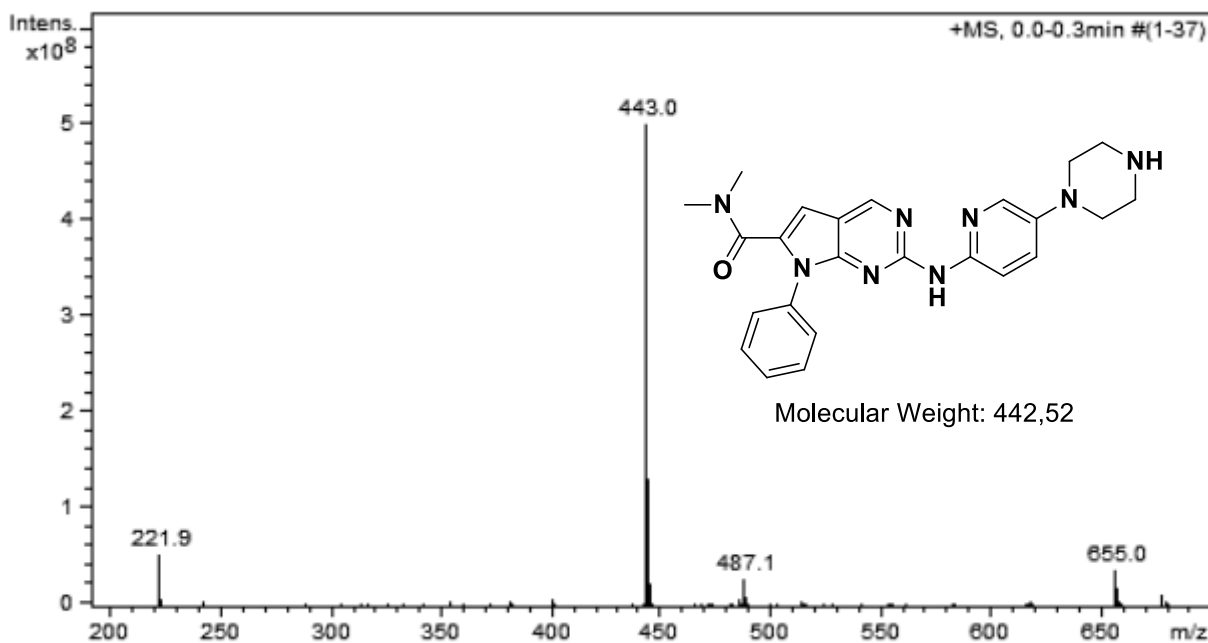
Σχήμα 173: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) της ένωσης **RibB2**.

Τα πρωτόνια της *tert*-βουτυλο-ομάδας απουσιάζουν από το φάσμα στη περιοχή 1,49 ppm, οπότε συμπεραίνουμε ότι η Boc-αποπροστασία ολοκληρώθηκε ποσοτικά. Οι υπόλοιπες κορυφές παραμένουν στα ίδια περίπου ppm με αυτές της ένωσης **85**.

Η σύνθεση της ένωσης επιβεβαιώνεται επιπροσθέτως από την λήψη φάσματος $^{13}\text{C-NMR}$ και μάζας. Λήφθηκε φάσμα μάζας σε διαλύτη MeOH με 0.1% HCOOH . Το m/z του μοριακού ιόντος καταγράφεται στα 443 που αντιστοιχεί στο ιόν $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_8\text{O}+\text{H}]^+$.



Σχήμα 174: Φάσμα ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **RibB2**

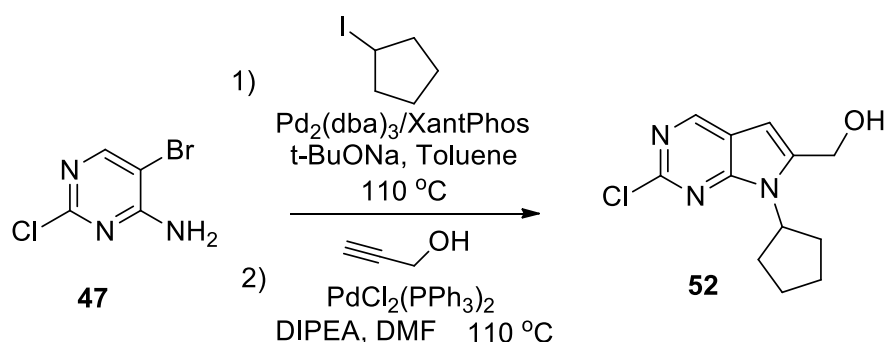


Σχήμα 175: Φάσμα μάζας της ένωσης **RibB2**.

3.4 Βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας του Ribociclib

Πέραν της σύνθεσης νέων αναλόγων με αναμενόμενη ανασταλτική, ένας ακόμη ερευνητικός στόχος, στο πλαίσιο της παρούσης διδακτορικής διατριβής, ήταν η βελτιστοποίηση της ήδη υπάρχουσας συνθετικής πορείας ως προς τα στάδια, το κόστος, το χρόνο και την απόδοση. Η συνθετική πορεία του Ribociclib, όπως προτάθηκε από την εταιρεία Novartis, παρόλο που είναι μία σχετικά χαμηλή σε κόστος πορεία, έχει σχετικά χαμηλή συνολική απόδοση 20%. Ειδικότερα τα στάδια 2 και 4 έχουν απόδοση 40% έκαστο. Εστιάζοντας κυρίως σε αυτά και μελετώντας την υπάρχουσα βιβλιογραφία σύνθεσης ινδολικών δακτυλίων, αποφασίστηκε η ανάπτυξη νέων συνθετικών πορειών.

1) Η πρώτη τροποποίηση εστιάζεται στον σχηματισμό της ένωσης με μία one-pot reaction σχηματισμού του αζα-ινδολίου

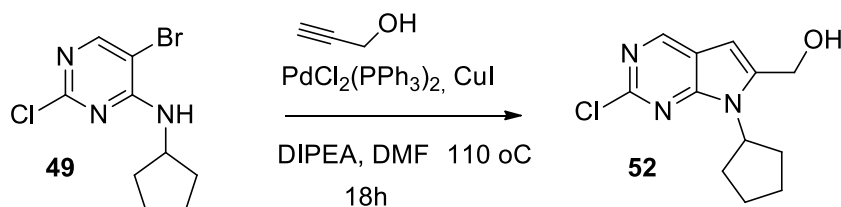


Σχήμα 176: Τροποποιημένη πορεία σύνθεσης της ένωσης **52**.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιείται αρχικά μια αλκυλίωση της αμινομάδας της ένωσης **1** αντί της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης που ακολουθεί η εταιρεία, και στη συνέχεια μία αντίδραση τύπου Sonogashira που ακολουθείται από κυκλοποίηση και σχηματισμό του διάζα-ινδολίου. Η διαφοροποίηση στην αντίδραση έγκειται στην αντικατάσταση του TBAF και του THF με DMF και DIPEA. Με αυτόν τον τρόπο, θεωρητικά, μπορούν να συγχωνεύθούν 3 στάδια σε ένα και επομένως να εξοικονομηθεί χρόνος, διαλύτες λόγω της επεξεργασίας κάθε σταδίου και, φυσικά, να μειωθεί το κόστος λόγω της περιορισμένης χρήσης διαλυτών και αντιδραστηρίων. Τέλος, αναμέναμε να αυξηθεί η απόδοση σε σχέση με την μέθοδο της εταιρείας. Η συνολική απόδοση της αντίδρασης για τον σχηματισμό της ένωσης **52** είναι μικρότερη του 30%, ενώ τα βιβλιογραφικά δεδομένα της εν λόγω αντίδρασης έδιναν αποδόσεις μέχρι και 60%. Παρά τις

προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν, με διάφορες παραλλαγές, η αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε.

2) Μία δεύτερη, επίσης άξια λόγου τροποποίηση, αντιπαραθετική με την πρώτη, στοχεύει στον σχηματισμό της ένωσης **52** κατευθείαν από το την ένωση **49** με μία one-pot αντίδραση.



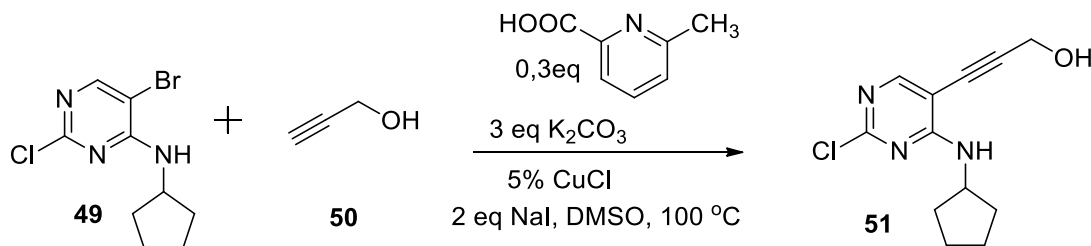
Σχήμα 177: Τροποποιημένη πορεία σύνθεσης της ένωσης **52**.

Στην προκειμένη περίπτωση προστέθηκε ο καταλύτης CuI, η βάση DIPEA και χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης DMF αντί του THF. Αυτή η μέθοδος μας επιτρέπει να παρακάμψουμε το στάδιο της κυκλοποίησης. Επιπλέον αναμέναμε με επιπρόσθετες τροποποιήσεις της αντίδραση να αυξηθεί η χαμηλή απόδοση της αντίδρασης. Βιβλιογραφικά δεδομένα δίνουν αποδόσεις ως και 70%, ωστόσο και η συγκεκριμένη προσπάθεια δεν απέδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα.

	Προπαργυλική αλκόολη	TBAF	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Απόδοση
1	1,3 eq	2,5 eq	5%	Dioxane	101 °C	-
2	1,3 eq	6 eq	5%	Dioxane	80 °C	-
3	1,3 eq	2,5 eq	5%	DMF	110 °C	5%
4	2,5 eq	2,5 eq	10%	MIBK	110 °C	-
5	1,3 eq	2,5 eq	5%	DMAc	110 °C	-

Πίνακας 7: Εναλλακτικές συνθήκες διενέργειας της αντίδρασης.

3) Η Τρίτη τροποποίηση στοχεύει στην βελτιστοποίηση σχηματισμού της ένωσης **5** με μία αντίδραση τυπού Ullman.



Σχήμα 178: Τροποποιημένη πορεία σύνθεσης της ένωσης **51** με μία αντίδραση τυπού *Ullman*.

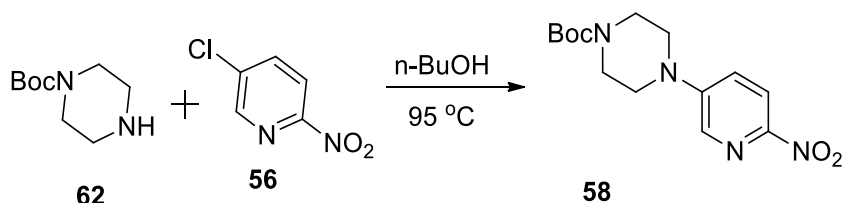
Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η προσθήκη της προπαργυλικής αλκόολης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μιας αντίδρασης Ullmann με πολύ υψηλές αποδόσεις. Ως καταλύτης χρησιμοποιείται το πικολινικό οξύ σε συνδιασμό με τον CuCl και διαλύτη DMSO. Μετά από αλληπάλληλες προσπάθειες, συντέθηκε το επιθυμητό προϊόν **51** με απόδοση της τάξης του 80%. Επιπλέον, σε σύγκριση με τον καταλύτη PdCl₂(PPh₃)₂, που χρησιμοποιεί η εταιρεία Novartis, το καταλυτικό ζεύγος της τροποποιημένης αντίδρασης που αναπτύξαμε στο εργαστήριο είναι χαμηλού κόστους. Το μόνο μειονέκτημα συνιστά το γεγονός ότι ο καταλύτης CuCl είναι αρκετά ευαίσθητος και ασταθής σε συνθήκες ατμοσφαιρικού αέρα. Οπότε χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση υπό ατμόσφαιρα αργού και με απαερωμένους διαλύτες.

Στον παρακάτω πίνακα καταγράφονται οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο:

	Διαλύτης (dry)	Θερμοκρασία °C	Συνθήκες διαλύτη	Απόδοση
1	Dioxane	120	Απαέρωση	-
2	MIBK	120	Απαέρωση	-
3	DMF	120	Απαέρωση	60%
4	DMSO	120	-	10%
5	DMSO	120	Απαέρωση	80%
6	Glyme	120	Απαέρωση	-
7	DMAc	150	Απαέρωση	-
8	Xylene	120	Απαέρωση	-

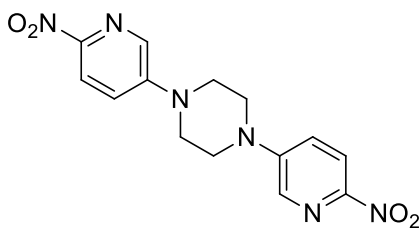
Πίνακας 8: Εναλλακτικές συνθήκες διενέργειας της αντίδρασης Ullmann.

4) Μία τέταρτη τροποποίηση αφορά την αντικατάσταση της πιπεραζίνης από Boc-πιπεραζίνη.



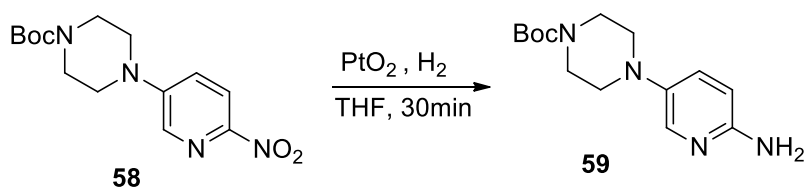
Σχήμα 179: Η τροποποιημένη αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **58** που αναπτύχθηκε στο Εργαστήριο.

Η διαφορά της τιμής της Boc-πιπεραζίνης και της πιπεραζίνης στο εμπόριο είναι ανεπέσθητα μικρή και επιτρέπει την παράκαμψη του σταδίου προστασίας με την Boc-προστατευτική ομάδα (δηλαδή να εξοικονομηθούν διαλύτες και αντιδραστήρια, απώλειες κατά τον καθαρισμό) και την βελτίωση απόδοση μιας και δεν υπάρχει περίπτωση διυποκατάστασης, όπως στην περίπτωση της κατοχύρωσης από την εταιρεία Novartis ως κάτωθι. Η απόδοση της ένωσης **58** αυξήθηκε στο 80% από 72% σύμφωνα με την πειραματική πορεία της εταιρίας Novartis.



Σχήμα 180: Παραπροϊόν της αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **58** που προκύπτει μέσω της αντίδρασης που ακολουθεί η εταιρεία Novartis.

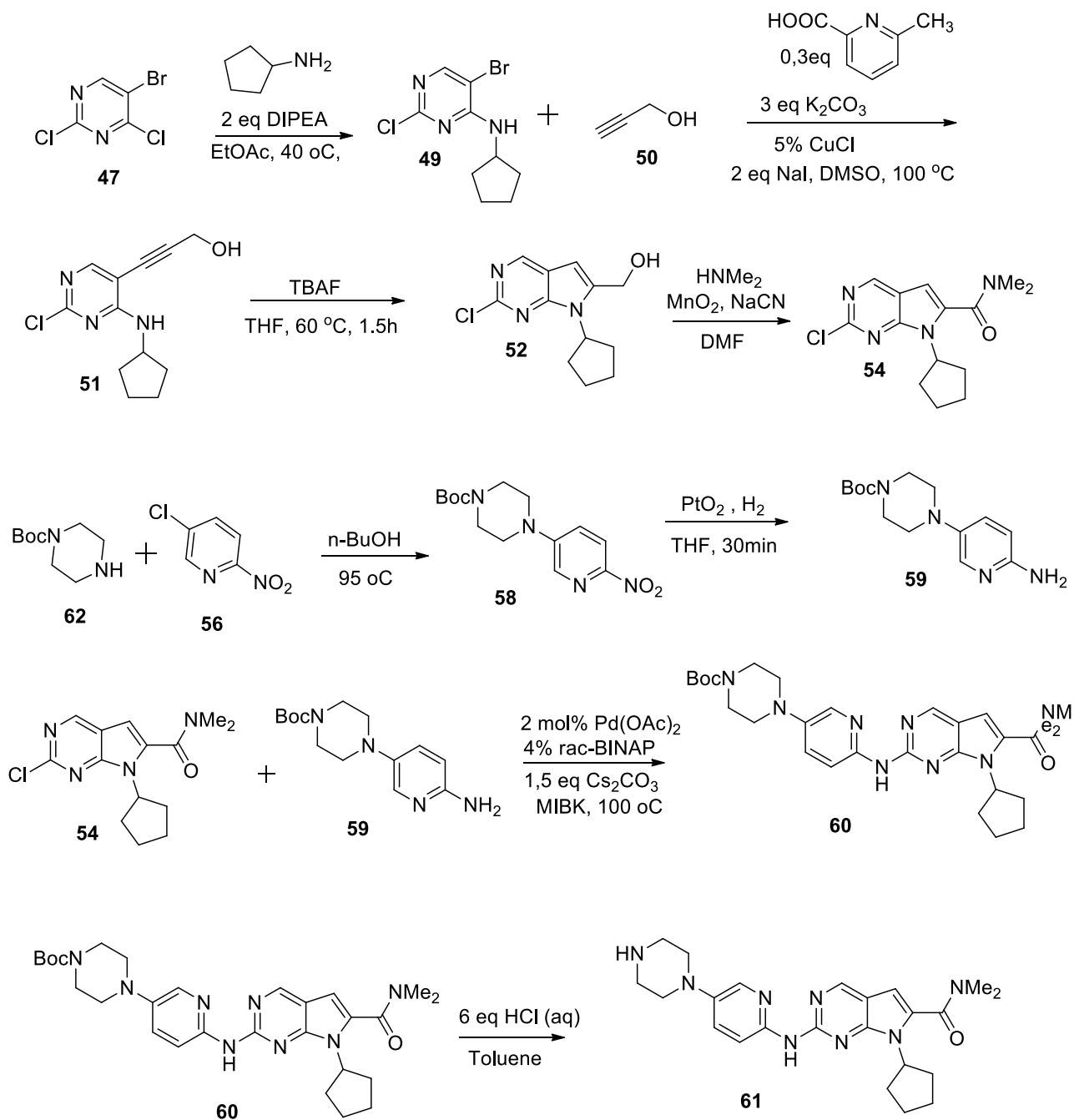
5) Μία πέμπτη τροποποίηση αφορά το στάδιο αναγωγής της νιτρο-ομάδας του πυριδινικού δακτυλίου της ένωσης **6** για τον σχηματισμό της ένωσης



Σχήμα 181: Η τροποποιημένη Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **59**.

Αντί του καταλύτη Pd/C σε μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε διοξείδιο του λευκοχρύσου (καταλύτης adams) και THF. Είναι μία αντίδραση γρήγορη και πολύ αποδοτική (περίπου 100%), ενώ ο καταλύτης απομακρύνεται εύκολα με μία απλή διήθηση.

Παρακάτω παρουσιάζεται συνολικά η εναλλακτική πορεία που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο:

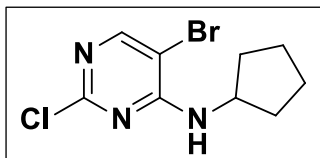


Σχήμα 182: Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Ribociclib που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

4. Συνθέσεις-φασματοσκοπικά δεδομένα

4.1 Πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση

Σύνθεση της ένωσης 49 (5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη).

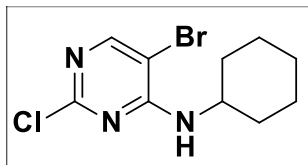


Σε υπό ανάδευση διάλυμα υπό αδρανείς συνθήκες προστίθενται 2,50 g της ένωσης 5-βρωμο- 2,4-διχλωροπυριμιδίνης (11 mmol), σε 12,5 mL οξικού αιθυλεστέρα υπό ανάδευση. Στην συνέχεια προστίθενται

περίπου 4,0 mL DIPEA (22 mmol) και στάγδην 1.3 mL κυκλοπεντυλαμίνης (12,1 mmol) διαλυμένα σε 12,5ml οξικού αιθυλεστέρα, σε διάστημα 60 λεπτών. Το μείγμα θερμαίνεται στους 40 °C επί τουλάχιστον 6 ώρες μέχρι να καταναλωθεί η αρχική ένωση (έλεγχος TLC). Αφού ψυχθεί η φιάλη προστίθεται νερό (15 mL) και το περιεχόμενο αφήνεται υπό ανάδευση για τουλάχιστον 15 min, έως ότου επέλθει πλήρης διαχωρισμός των δύο φάσεων. Το μείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη και προστίθενται επιπλέον 15 ml οξικού αιθυλεστέρα και εκπλένεται με νερό (2x15ml). Λαμβάνεται έλαιο κίτρινου χρώματος, το οποίο υφίσταται επεξεργασία με θερμό εξάνιο υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ακολούθως ψύχεται στους 4 °C επί 2 ώρες. Με διήθηση παρελήφθηκε λευκό ίζημα το οποίο εκπλήθηκε με 1-2 mL ψυχρού εξανίου. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, παραλήφθηκε 2.53 g προϊόντος. (82.5 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d): δ 8.09 (s, 1H), 5.44 (s, 1H), 4.42 (q, ³J= 7.0 Hz, 1H), 2.15 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.45 (m, 2H).

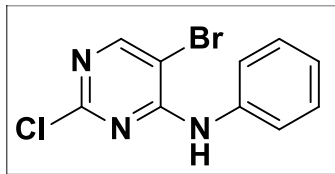
Σύνθεση της ένωσης 75 (5-βρωμο-2,4- διχλωροπυριμίδινη).



Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml και υπό αδρανείς συνθήκες Προστίθενται υπό ανάδευση 2,5 g της ένωσης 5-βρωμο- 2,4- διχλωροπυριμίδινης (11 mmol), σε 12,5 ml οξικού αιθυλεστέρα υπό ανάδευση. Στην συνέχεια προστίθενται περίπου 4,0 mL DIPEA (22 mmol) και στάγδην 1,1 mL κυκλοπεξυλαμίνης (12,1 mmol) διαλυμένα σε 12,5mL οξικού αιθυλεστέρα, σε διάστημα 60 λεπτών. Το μείγμα θερμάνθηκε στους 40 °C επί τουλάχιστον 6 ώρες μέχρι να καταναλωθεί η αρχική ένωση (έλεγχος TLC). Αφού ψυχθεί η φιάλη προστίθενται νερό (15 mL) και το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης αφέθηκε υπό ανάδευση για τουλάχιστον 15 min έως ότου επέλθει πλήρης διαχωρισμός των δύο φάσεων. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και προστέθηκαν επιπλέον 15ml οξικού αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλύθηκε με νερό (2x15ml). Λαμβάνεται έλαιο κίτρινου χρώματος, το οποίο υφίσταται επεξεργασία με θερμό εξάνιο υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ακολούθως ψύχεται στους 4 °C επί 2 ώρες. Με διήθηση λαμβάνεται λευκό ίζημα το οποίο εκπλύθηκε με 1-2 mL ψυχρού εξανίου. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, παρελήφθησαν 2,32 g προϊόντος. (77 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d): δ 8.06 (m, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.04 (td, ³J= 7.5, ⁴J=3.9 Hz, 1H), 2.05 (d, ³J = 10.8 Hz, 3H), 1.77 (dq, ³J = 14.7, ⁴J=4.7 Hz, 3H), 1.67 (d, ³J = 11.1 Hz, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.45 (q, ³J = 12.2 Hz, 3H), 1.26 (q, ³J = 11.5 Hz, 4H).

Σύνθεση της ένωσης 81 (5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλοπυριμιδιν-4-αμίνη)

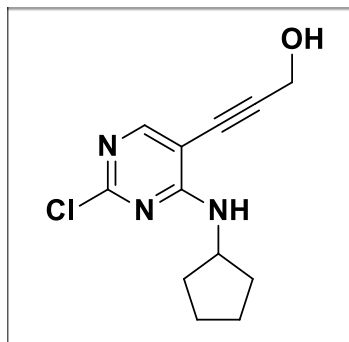


Σε δίκαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml και υπό αδρανείς συνθήκες προστίθενται 1 g της ένωσης 5-βρωμο-2,4- διχλωροπυριμιδίνης (4,4 mmol), σε 6 mL οξικού αιθυλεστέρα υπό ανάδευση. Στην συνέχεια προστίθενται περίπου 1,5 mL DIPEA (8,8 mmol) και στάγδην 400 μ L (4,4 mmol) ανιλίνης διαλυμένα σε 6ml οξικού αιθυλεστέρα, σε διάστημα 30 λεπτών. Το μείγμα θερμαίνεται στους 40 °C επί τουλάχιστον 6 ώρες μέχρι να καταναλωθεί η αρχική ένωση (έλεγχος TLC). Αφού ψυχθεί η φιάλη προστίθεται νερό (15.0 mL) και το περιεχόμενο της σφαιρικής φιάλης αφήνεται υπό ανάδευση για τουλάχιστον 15 min έως ότου επέλθει πλήρης διαχωρισμός των δύο φάσεων. Το μείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη, προστίθενται 15 ml νερού και επιπλέον 15ml οξικού αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση εκπλύθηκε με νερό (2x15ml). Λαμβάνεται έλαιο κίτρινου χρώματος, το οποίο υφίσταται επεξεργασία με θερμό εξάνιο υπό ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ακολούθως ψύχεται στους 4 °C επί 2 ώρες. Με διήθηση λαμβάνεται λευκό ίζημα το οποίο εκπλύθηκε με 1-2 mL ψυχρού εξανίου. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, παρελήφθησαν 0.9 g προϊόντος (73.6 %)

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$): δ 8.30 (s, 1H), 7.61 (d, $^3J = 7.4$ Hz, 2H), 7.41 (t, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.20 (t, $^3J = 7.4$ Hz, 1H).

4.2 Αντιδράσεις Sonogashira

Σύνθεση της ένωσης 51 (3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλοπροπ-2-υν-1-ολη).



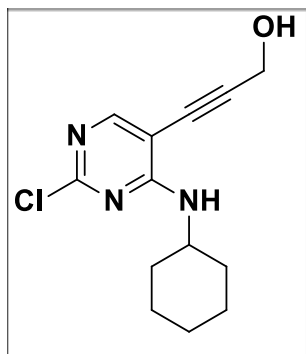
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml, υπό αδρανείς συνθήκες, προστίθενται 2,5 g (9 mmol, 1,0 ισοδ.) 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνη (9.05 mmol) και 30 mL τετραϋδροφουράνιο. Στην συνέχεια προστίθενται 680 μ L (11,8 mmol, 1,3 ισοδύναμα) προπαργυλικής αλκοόλης, 14 g (22,6 mmol, 2,5 ισοδ.) τριένυδρο φθοριούχο τετραβουτυλο-αμμώνιο (TBAF) και 524 mg (453

mmol, 0,05 ισοδ.) $\text{Pd(PPh}_3)_4$. Το μείγμα θερμάνθηκε υπό ανάδευση στους 67 °C επί 2 ώρες ή έως ότου μικρή ποσότητα της αρχικής ένωσης, να μην έχει αντιδράσει (έλεγχος TLC). Το μείγμα ψύχθηκε στους 25 °C και απομακρύνθηκε υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστή ο διαλύτης THF. Στην συνέχεια προστίθενται 30ml οξικού αιθυλεστέρα, ακολούθως συμπυκνώθηκε, στον περιστροφικό συμπυκνωτή.

Το υπόλειμμα εκχυλίσθηκε με 120 mL οξικού αιθυλεστέρα και 40 mL υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου 4%. Η οργανική φάση πλύθηκε μία φορά με 30 mL νερό. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθηθήκε και συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα ανακρυσταλώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα και ακετόνη. Το ίζημα διηθηθήκε και εκπλύθηκε δύο φορές με 1mL ψυχρής (4 °C) ακετόνης. Μετά την ξήρανση του ιζήματος λήφθηκε 1.10 g προϊόντος (48.0 %).

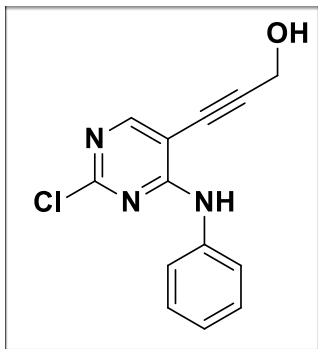
$^1\text{H NMR}$ ((400 MHz, CDCl_3 -d): δ 8.0 (s, 1H), 5.54 (d, 3J = 7.5 Hz, 1H), 4.55 (d, 3J = 6.2 Hz, 2H), 4.44 (h, 3J = 7.3 Hz, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.92 (t, 3J = 6.2 Hz, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.67 (dt, 3J = 9.1, 4J = 4.6 Hz, 1H), 1.46 (dq, 3J = 13.9, 3J =7.0 Hz, 2H).

Σύνθεση της ένωσης 76 (3-(2-χλωρο-4-(κυκλοεξυναμινο)πυριμιδιν-5-υλοπροπ-2-υν-1-ολη).



Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 600mg (2,34 mmol, 1,0 ισοδ.) 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοεξυλοπυριμιδιν-4-αμίνης και 3 mL τετραϋδροφουράνιου. Στην συνέχεια προστέθηκαν 171 mg (3 mmol, 176 μl, 1,3 ισοδύναμα) προπαραγλυκικής αλκοόλης, 1,53 gr TBAF (5,85 mmol, 2,5 ισοδ.) και 82 mg (0,117 mmol, 0,05 ισοδ.) $\text{Pd(PPh}_3)_2\text{Cl}_2$. Το μείγμα θερμάνθηκε υπό ανάδευση (67 ° C) επί 2 ώρες έως ότου μικρή ποσότητα της αρχικής ένωσης να μην έχει αντιδράσει (έλεγχος TLC). Το μείγμα ψύχθηκε στους 25 ° C και απομακρύνθηκε υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστή το τετραϋδροφουράνιο. Προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας και ακολούθως συμπυκνώθηκε. Το υπόλειμμα εκχυλίστηκε με 30 mL οξικού αιθυλεστέρα και διάλυμα 63 g ανθρακικού νατρίου διαλυμένο σε 20 mL ύδατος. Η οργανική (άνω) φάση πλύθηκε μία φορά με 15 mL νερό, ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα ανακρυσταλώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα και ακετόνη. Το ίζημα διηθήθηκε και εκπλύθηκε δύο φορές με 1mL ψυχρής (4 ° C) ακετόνης. Μετά την ξήρανση του ιζήματος παραλήφθησαν 1.10 g προϊόντος (40.0 %).

Σύνθεση της ένωσης 82 (3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλοπροπ-2-υν-1-όλη).

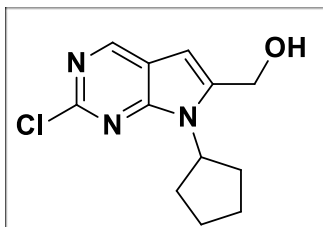


Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 500mg (1.76 mmol, 1,0 ισοδ.) 5-βρωμο-2-χλωρο-N-φαινυλοπυριμιδιν-4-αμίνη και 5 mL τετραϋδροφουράνιου. Στην συνέχεια προστέθηκαν 132 μ l (2,3 mmol, 176 μ l, 1,3 ισοδύναμα) προπαργυλικής αλκοόλης, 1,4 gr (4,4 mmol, 2,5 ισοδ.) TBAF και 100 mg (0,088 mmol, 0,05 ισοδ.) Pd(PPh₃)₄. Το μείγμα, θερμάνθηκε υπό ανάδευση (67 ° C) επί 2 ώρες έως ότου μικρή ποσότητα της αρχικής ένωσης να μην έχει αντιδράσει (έλεγχος TLC). Το μείγμα ψύχθηκε στους 25 ° C και απομακρύνθηκε υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστή το THF. Το υπόλειμμα εκχυλίσθηκε με 30 mL οξικού αιθυλεστέρα και ένα διάλυμα 63 g ανθρακικού νατρίου διαλυμένο σε 20 mL ύδατος. Η οργανική (άνω) φάση πλύθηκε μία φορά με 15 mL νερό, ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα ανακρυσταλώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα και ακετόνη. Το ίζημα διηθήθηκε και εκπλύθηκε δύο φορές με 1mL ψυχρής (4 ° C) ακετόνης. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος παραλήφθηκαν 122 mg προϊόντος (27 %).

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-d): δ 8.26 (s, 1H), 7.63 (d, ³J = 8.0 Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.39 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H), 7.18 (t, ³J = 7.4 Hz, 1H), 4.61 (s, 2H).

4.3 Αντιδράσεις ενδομοριακής κυκλοποίησης.

Σύνθεση της ένωσης 52 (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη)



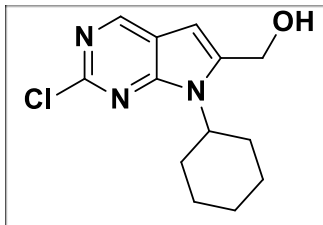
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100ml προστέθηκαν 1,1 g (4,4 mmol 1,0 ισοδ.) 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλο) προπ-2-υν-1-όλη, 10 ml THF, ελεύθερο από υπεροξείδια και διάλυμα TBAF 1M 10 ml (3,02 g TBAF σε 10 ml THF), (9,6 mmol, 2.2 ισοδ.). Το μείγμα αναδεύθηκε

στους 25 ° C για 10 λεπτά και στη συνέχεια αυξήθηκε η θερμοκρασία στους 60 ° C και διατηρ επί 1,5 ώρα μέχρις ότου η αρχική ένωση καταναλωθεί.

Το προκύπτον διάλυμα ψύχθηκε κάτω από 30 ± 3 ° C και αποστάχθηκε υπό ελαττωμένη πίεση προς απομάκρυνση του THF. Προστέθηκαν 2ml 2-προπανόλης. Το μείγμα αναδεύθηκε για 15 λεπτά και προστέθηκαν σταδιακά 20ml ύδατος οπότε καταβυθίστηκε ίζημα. Αναδεύθηκε στους 20 ± 3 ° C επί 30 λεπτά και στη συνέχεια διηθήθηκε. Το ίζημα εκπλύθηκε δύο φορές με 10ml (2 x 5 mL) ύδατος. Τα στερεά αφήνονται σε ξηραντήρα για περίπου 1 μέρα ώστε να απομακρυνθούν ίχνη υγρασίας. Παραλήφθηκε 1.027 g προϊόντος (92.8 %).

¹H NMR (500 MHz, Chloroform-d): δ 8.71 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.93 (p, ³J = 8.6 Hz, 1H), 4.83 (s, 2H), 2.47 – 2.36 (m, 1H), 2.14 – 2.06 (m, 5H), 1.78 – 1.70 (m, 2H).

Σύνθεση της ένωσης 77 (2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη).

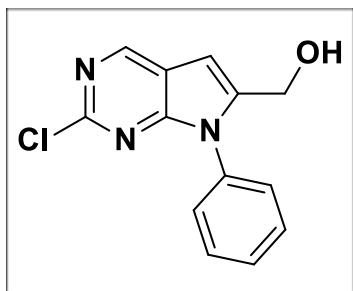


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50ml προστίθενται 262 mg (1 mmol 1,0 ισοδ.) της ένωσης 30, 3 ml THF ελεύθερο από υπεροξείδια και 2,2 ml διαλύματος TBAF 1M (575mg TBAF σε 2,2 ml THF), (2,2 mmol). Το μείγμα αναδεύθηκε στους 25 ° C για 10 λεπτά και στη συνέχεια αυξήθηκε η

θερμοκρασία στους 60 ° C και διατηρήθηκε επί 1,5 ώρα μέχρις ότου η αρχική ένωση καταναλωθεί. Το προκύπτον διάλυμα ψύχθηκε κάτω από 30 ± 3 ° C και αποστάχθηκε υπό ελαττωμένη πίεση προς απομάκρυνση του THF. Προστέθηκαν 2ml 2-προπανόλης. Το μείγμα αναδεύθηκε για 15 λεπτά και προστέθηκαν σταδιακά 20ml ύδατος οπότε καταβυθίστηκε ίζημα. Αναδεύθηκε στους 20 ± 3 ° C επί 30 λεπτά και στη συνέχεια διηθήθηκε. Το ίζημα εκπλύθηκε δύο φορές με 10ml (2 x 5 mL) ύδατος. Τα στερεά αφήνονται σε ξηραντήρα για περίπου 1 μέρα ώστε να απομακρυνθούν ίχνη υγρασίας. Παρελήφθησαν 100mg στερεού.

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ : 8.72 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 4.83 (s, 2H), 4.40 (tt, $^3J = 12.3$, $^4J = 3.8$ Hz, 1H), 2.55 (q, $^3J = 12.1$, 11.7 Hz, 3H), 1.95 (d, $^3J = 11.4$ Hz, 3H), 1.88 (d, $^3J = 12.4$ Hz, 2H), 1.76 (m, 1H).

Σύνθεσης της ένωσης 83 (2-χλωρο-7-φαινυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη).



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50ml προστίθενται 121,4 mg (0,47 mmol 1,0 ισοδ.) 3-(2-χλωρο-4-(φαινυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη, 2 ml THF ελεύθερο από υπεροξείδια και 1 ml διαλύματος TBAF 1M (325 mg TBAF σε 1 ml THF), (1,02 mmol, 2). Το μείγμα αναδεύθηκε στους 25 ° C για 10 λεπτά και στη συνέχεια

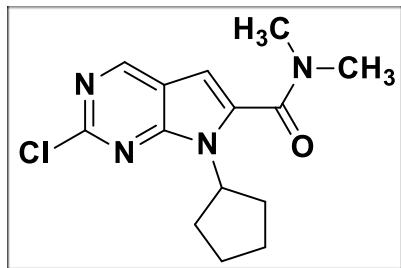
αυξήθηκε η θερμοκρασία στους 60 ° C και διατηρήθηκε επί 1,5 ώρα μέχρις ότου η αρχική ένωση καταναλωθεί. Το προκύπτον διάλυμα ψύχθηκε κάτω από 30 ± 3 ° C και αποστάχθηκε υπό ελαττωμένη πίεση προς απομάκρυνση του THF. Προστέθηκαν 2ml 2-προπανόλης. Το μείγμα αναδεύθηκε για 15 λεπτά και προστέθηκαν σταδιακά 20ml ύδατος οπότε καταβυθίστηκε ίζημα. Αναδεύθηκε στους 20 ± 3 ° C επί 30 λεπτά και στη συνέχεια διηθήθηκε. Το ίζημα εκπλύθηκε δύο φορές με 4ml (2 x 2 mL) ύδατος. Τα στερεά αφήνονται σε ξηραντήρα για περίπου 1 μέρα ώστε να απομακρυνθούν ίχνη υγρασίας. Παραλήφθησαν 100mg στερεού.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 8.98 (s, 1H), 7.58 (m, 5H), 6.81 (s, 1H), 5.45 (t, *J*³ = 5.4 Hz, 1H), 4.50 (dd, *J*³ = 5.4, *J*⁴ = 1.0 Hz, 2H).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*) δ: 8.87 (s, 1H), 7.63 – 7.53 (m, 3H), 7.48 (dd, ³*J* = 6.9, ⁴*J* = 1.8 Hz, 2H), 6.74 (s, 1H), 4.72 (d, ³*J* = 5.7 Hz, 2H), 1.68 (t, ³*J* = 6.1 Hz, 1H).

4.4 Αντιδράσεις οξειδωτικής προσθήκης.

Σύνθεση της ένωσης 54 (2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-6,7-διδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλοαιθανόνη).

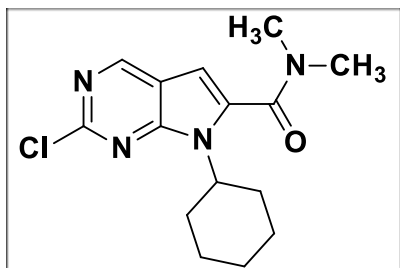


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 10mg (0,15mmol) κυανιούχου καλίου, 200 mg (0,76mmol) 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνης, 1,5mL διαλύματος διμεθυλαμίνης 2M σε THF (137mg, 3mmol) και 3ml άνυδρου DMF. Το μείγμα αναδεύθηκε στους $20 \pm 3^\circ \text{C}$ επί 15

λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,06 g οξειδίου του μαγγανίου (IV). Το μείγμα αναδεύθηκε για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστέθηκαν επιπλέον 940mg οξειδίου του μαγγανίου (IV) σε τρεις δόσεις κάθε 30 λεπτά (1η δόση: 150mg, 2η δόση: 310mg και 3η δόση: 460mg). Αφού προστέθηκε και η τελευταία δόση, και αφέθηκε για 1 ώρα και ακολούθως προστέθηκε επιπλέον 460 mg οξύδιο μαγγανίου (IV) και αφέθηκε για 1 ώρα υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC και διαπιστώθηκε, ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Το μείγμα της αντίδρασης στη συνέχεια διηθήθηκε με celite για να απομακρυνθεί το οξύδιο του μαγγανίου (IV). Το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστή προς απομάκρυνση του THF, της διμεθυλαμίνης και του οξικού αιθυλεστέρα και δε ακολούθως στην αντλία υψηλού κενού για το DMF. Το προκύπτον σκούρο διάλυμα πλύθηκε με υδατικό διάλυμα θειικού σιδήρου (1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε 14 mL νερού), 15ml νερού και τέλος 15mL υδατικού διαλύματος NaCl 10%. Οι φάσεις διαχωρίστηκαν μετά από κάθε έκπλυση. Η οργανική φάση αποστάχθηκε για την αζεοτροπική απομάκρυνση του νερού. Το προκύπτον ακάθαρμο σκούρο, παχύ, ημιστερεό υπόλειμμα χρησιμοποιείται απευθείας στο επόμενο στάδιο.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 8.81 (d, $^3J = 2.2$ Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.88 (p, $^3J = 9.8, 9.2$ Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 2.43 – 2.32 (m, 3H), 2.14 – 1.97 (m, 2H), 1.68 (q, $^3J = 6.6$ Hz, 3H).

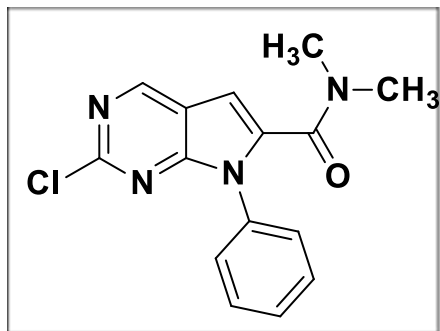
Σύνθεση της ένωσης 78 (2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλοαιθανόνη).



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 15mg (0,23mmol) κυανιούχου Καλίου, 305 mg (1,15mmol) 2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης, 2,5 ml διαλύματος διμεθυλαμίνης 2M σε THF (4.6 mmol) και 4ml άνυδρου DMF. Το μείγμα αναδεύθηκε στους $20 \pm 3^\circ \text{C}$ επί 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 240 mg οξειδίου του μαγγανίου (IV). Το μείγμα αναδεύθηκε για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστέθηκαν επιπλέον 1,44g οξειδίου του μαγγανίου (IV) σε τρεις δόσεις κάθε 30 λεπτά (1η δόση: 240mg, 2η δόση: 470mg και 3η δόση: 725 mg). Αφού προστέθηκε και η τελευταία δόση, και αφέθηκε για 1 ώρα και ακολούθως προστέθηκε επιπλέον 460 mg οξείδιο μαγγανίου (IV) και αφέθηκε για 1 ώρα υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC και διαπιστώθηκε, ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Το μείγμα της αντίδρασης στη συνέχεια διηθήθηκε με celite για να απομακρυνθεί το οξείδιο του μαγγανίου (IV). Το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστή προς απομάκρυνση του THF, της διμεθυλαμίνης και του οξικού αιθυλεστέρα και δε ακολούθως στην αντλία υψηλού κενού για το DMF. Το προκύπτον σκούρο διάλυμα πλύθηκε με υδατικό διάλυμα θειικού σιδήρου (1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε 14 mL νερού), 15ml νερού και τέλος 15mL υδατικού διαλύματος NaCl 10%. Οι φάσεις διαχωρίστηκαν μετά από κάθε έκπλυση. Η οργανική φάση αποστάχθηκε για την αζεοτροπική απομάκρυνση του νερού. Το προκύπτον ακάθαρμο σκούρο, παχύ, ημιστερεό υπόλειμμα χρησιμοποιείται απευθείας στο επόμενο στάδιο.

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 8.80 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.45 (tt, $J^3 = 12.4, 3.7$ Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 2.43 (qd, $J^3 = 13.1, 12.6, 3.7$ Hz, 2H), 1.91 (d, $J^3 = 10.7$ Hz, 4H), 1.72 (d, $J^3 = 12.3$ Hz, 1H), 1.38 (m, 3H).

Σύνθεση της ένωσης 84 (2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-φαινυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλ)αιθανόνη).



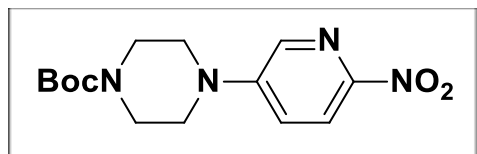
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml προστίθενται 9,2mg (0,14mmol) κυανιούχου Καλίου, 184 mg (0,7mmol) 2-χλωρο-7-φαινυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης, 1,4 ml διαλύματος διμεθυλαμίνης 2M σε THF (2,8 mmol) και 3ml

άνυδρου DMF. Το μείγμα αναδεύεται στους $20 \pm 3^\circ \text{C}$ επί 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 148 mg οξειδίου του μαγγανίου (IV). Το μείγμα αναδεύεται για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστίθενται επιπλέον 884mg οξειδίου του μαγγανίου (IV) σε τρεις δόσεις κάθε 30 λεπτά (1η δόση: 148mg, 2η δόση: 290mg και 3η δόση: 446 mg). Αφού προστέθηκε και η τελευταία δόση, και αφέθηκε για 1 ώρα και ακολούθως προστέθηκαν επιπλέον 460 mg οξείδιο μαγγανίου (IV) και αφέθηκε για επιπλέον 1 ώρα υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC και διαπιστώθηκε, ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Το μείγμα της αντίδρασης στη συνέχεια διηθήθηκε με celite για να απομακρυνθεί το οξείδιο του μαγγανίου (IV). Το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστή προς απομάκρυνση του THF, της διμεθυλαμίνης και του οξικού αιθυλεστέρα και δε ακολούθως στην αντλία υψηλού κενού για το DMF. Το προκύπτον σκούρο διάλυμα πλύθηκε με υδατικό διάλυμα θειικού σιδήρου (1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε 14 mL νερού), 15ml νερού και τέλος 15mL υδατικού διαλύματος NaCl 10%. Οι φάσεις διαχωρίστηκαν μετά από κάθε έκπλυση. Η οργανική φάση αποστάχθηκε για την αζεοτροπική απομάκρυνση του νερού. Το προκύπτον ακάθαρμο σκούρο, παχύ, ημιστερεό υπόλειμμα χρησιμοποιείται απευθείας στο επόμενο στάδιο.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.93 (s, 1H), 8.58 – 7.40 (m, 5H), 6.83 (s, 1H), 2.94 (s, 3H), 2.78 (s, 3H).

4.5 Σύνθεση παραγώγων ανιλίνης.

Σύνθεση της ένωσης 58 (*tert*-βουτυλεστέρα 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβοξυλικό οξύ)

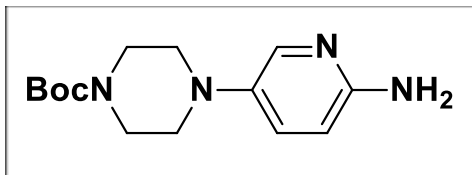


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται 500 mg 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνης (3,24 mmol), 5 mL βουτανόλη, 1.175 g 1-Boc-πιπεραζίνης (6,48

mmol, 2 ισοδύναμα), και 167 mg (1.577 mmol) ανθρακικού νατρίου. Το μείγμα θερμάνθηκε στους 100 °C για 24h. Όταν καταγραφεί η κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC) το μείγμα αφήνεται να ψυχθεί και ακολούθως απομακρύνεται η βουτανόλη στον περιστροφικό εξατμιστή και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε με 20ml διχλωρομεθάνιο και 20 mL νερό. Η οργανική φάση εκχυλίστηκε άλλες δύο φορές με 20 mL νερό. Μετά την ξήρανση της οργανικής φάσης με Na₂SO₄ και την απομάκρυνση του διαλύτη, προστίθενται στο στερεό υπόλειμα 3-4 mL ισοπροπανόλης. Το μείγμα ψύχθηκε στους 4 °C για 6 ώρες, ακολούθως διηθήθηκε υπό κενό και το ίζημα εκπλύθηκε με ψυχρό οξικό διαιθυλεστέρα. Το προϊόν ξηράνθηκε σε αντλία υψηλού κενού. Παραλήφθηκαν 703 mg προϊόντος (72.3 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ:: 8.18 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H), 8.13 (d, ³J = 3.0 Hz, 1H), 7.21 (dd, ³J = 9.1, ⁴J = 3.1 Hz, 1H), 3.64 (m, 4H), 3.45 (m, 4H), 1.49 (s, 9H).

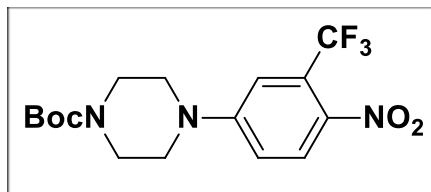
Σύνθεση της ένωσης 59 (tert-βουτυλεστερα 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβοξυλικό οξύ)



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου φέρονται 100 mg της ένωσης του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος (0,32 mmol), 4 mL THF και 50 mg PtO₂ (καταλύτης Adams). Το μείγμα αφήνεται υπό ισχυρή ανάδευση για περίπου 30 min μέχρι να καταναλωθεί πλήρως η αρχική ένωση (έλεγχος TLC). Ακολούθως απομακρύνεται ο καταλύτης είτε με διήθηση μέσω διπλού πτυχωτού ηθμού, είτε με διήθηση σε στρώμα σελίτη. Για την έκπλυση χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας. Το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση με εξάνιο και αιθέρα. Το μείγμα αφήνεται υπο ψύξη στους 4 °C για περίπου 3 ώρες. Το ίζημα διηθήθηκε υπό κενό, το εκπλύθηκε με αιθέρα και ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παρελήφθησαν 63 mg καθαρού προϊόντος (69.8 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ: 7.44 (d, ⁴J = 2.9 Hz, 1H), 7.18 (dd, ³J = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 6.49 (d, ³J = 8.8 Hz, 1H), 4.34 (s, 2H), 3.60 – 3.53 (m, 4H), 2.95 (t, ³J = 5.0 Hz, 4H), 1.48 (s, 9H).

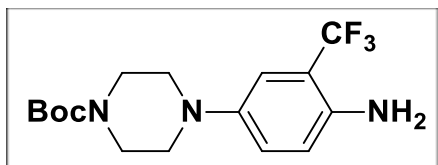
Σύνθεση της ένωσης 64 tert-βουτυλεστέρα-4-(4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος.



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται 268 μ L 5-φθόρο-2-νιτροτριφθοροβενζόλιο (400 mg, 1,56 mmol), 4 mL βουτανόλη, και 715 mg 1-Boc-πιπεραζίνης (3,8 mmol). Το μείγμα θερμάνθηκε στους 100 °C για

24h. Όταν καταγραφεί η κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC), το μείγμα αφήνεται να ψυχθεί και ακολούθως απομακρύνεται η βουτανόλη στον περιστροφικό εξατμιστή και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε με 20ml διχλωρομεθάνιο και 20 mL νερό. Η οργανική φάση εκχυλίστηκε άλλες δύο φορές με 20 mL νερό. Μετά την ξήρανση της οργανικής φάσης με Na_2SO_4 και την απομάκρυνση του διαλύτη, προστίθενται στο στερεό υπόλειμα 3-4 mL ισοπροπανόλης. Το μείγμα ψύχθηκε στους 4 °C για 6 ώρες, ακολούθως διηθήθηκε υπό κενό και το ίζημα εκπλύθηκε με ψυχρό οξικό διαιθυλεστέρα. Το προϊόν ξηράνθηκε σε αντλία υψηλού κενού. Παρελήφθησαν 1 g προϊόντος (85.5 %).

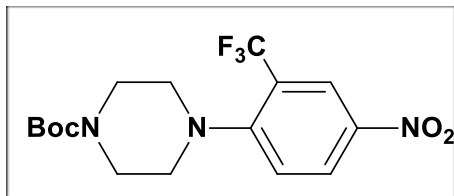
Σύνθεσης της ένωσης 65 (*tert*-βουτυλεστέρας του 4-(4-άμινο-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος).



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου φέρονται 400 mg της ένωσης του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(4-νίτρο-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (1,12 mmol), 6 mL THF (dry) και 36 mg καταλύτη Pd/C 10%. Το μείγμα αφέθηκε υπό ισχυρή ανάδευση για περίπου 30 min μέχρι να καταναλωθεί πλήρως η αρχική ένωση (έλεγχος TLC). Ακολούθως απομακρύνθηκε ο καταλύτης είτε με διήθηση μέσω διπλού πτυχωτού ηθμού, είτε με διήθηση σε στρώμα σελίτη. Για την έκπλυση χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας. Το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση με εξάνιο και αιθέρα. Το μείγμα αφέθηκε υπο ψύξη στους 4 °C για περίπου 3 ώρες. Το ίζημα διηθήθηκε υπο κενό, το εκπλήθηκε με αιθέρα και το ξηραίνθηκε σε αντλία υψηλού κενού. Παρελήφθησαν 102 mg λευκού προϊόντος (55.4 %).

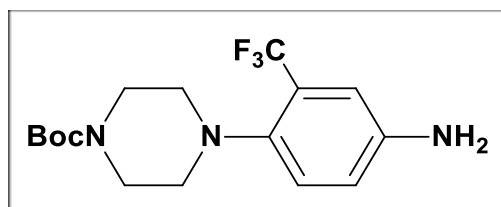
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ: 8.03 (d, ³J = 9.2 Hz, 1H), 7.14 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H), 6.93 (dd, ³J = 9.2, ⁴J = 2.8 Hz, 1H), 3.62 (t, ³J = 5.3 Hz, 4H), 3.43 (t, ³J = 5.3 Hz, 4H), 1.49 (s, 9H).

Σύνθεσης της ένωσης 71 (*tert*-βουτυλεστέρα του 4-(4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος).



Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αργού προστέθηκαν 134 μ L 2-φθόρο-5-νιτροτριφθοροβενζόλιο (200 mg, 0.95 mmol) και 2 mL 1-προπανόλη. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση προστέθηκαν

υπό ανάδευση 356 mg 1-Boc-πιπεραζίνης (1.91 mmol). Το μείγμα θερμάνθηκε στους 100 °C για 24h. Όταν καταγράφηκε η κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης το μείγμα αφέθηκε να ψυχθεί και ακολούθως απομακρύνθηκε η βουτανόλη στον περιστροφικό εξατμιστή και στην συνέχεια μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίστηκε με 20ml διχλωρομεθάνιο και 20 mL νερό. Η οργανική φάση εκχυλίστηκε άλλες δύο φορές με 20 mL νερό. Μετά την ξήρανση της οργανικής φάσης με Na_2SO_4 , απομακρύνθηκε ο διαλύτης και προστέθηκαν στο στερεό υπόλειμα 3-4 mL ισοπροπανόλης. Το μείγμα ψύχθηκε στους 4 °C για 6 ώρες, ακολούθως διηθήθηκε υπό κενό και το ίζημα εκπλύθηκε με ψυχρό οξικό διαιθυλεστέρα. Το προϊόν ξηράνθηκε σε αντλία υψηλού κενού.

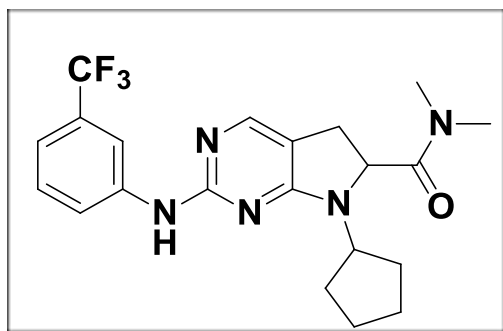


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου φέρονται 100 mg της ένωσης του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(4-νίτρο-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος. (0,27 mmol),

2 mL THF (dry) και 15 mg καταλύτη Pd/C 10%. Το μείγμα αφέθηκε υπό ισχυρή ανάδευση για περίπου 30 min μέχρι να καταναλωθεί πλήρως η αρχική ένωση (έλεγχος TLC). Ακολούθως απομακρύνθηκε ο καταλύτης είτε με διήθηση μέσω διπλού πτυχωτού ηθμού, είτε με διήθηση σε στρώμα σελίτη. Για την έκπλυση χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας. Το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και πραγματοποιήθηκε ανακρυστάλλωση με εξάνιο και αιθέρα. Το μείγμα αφέθηκε υπο ψύξη στους 4 °C για περίπου 3 ώρες. Το ίζημα διηθήθηκε υπο κενό, το εκπλήθηκε με αιθέρα και το ξηραίνθηκε σε αντλία υψηλού κενού. Παρελήφθησαν 90 mg λευκού προϊόντος (97.8 %).

4.5 Σύνθεση τελικών προϊόντων (σύζευξη Buchwald-Hartwig)

Σύνθεση της ένωσης RibC1 (7-κυκλοπεντυλο-*N,N*-διμεθυλο-2-((3-τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο



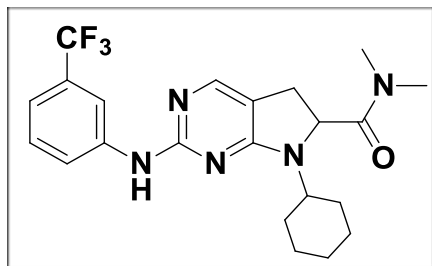
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστέθηκαν 41 mg 2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)αιθανόνη (0,141 mmol, 1 ισοδύναμο), 20 μ L 3-Τριφθορομεθυλο ανιλίνης, (25mg, 0,183 mmol, 1,3 ισοδ.). Στην συνέχεια προστέθηκαν 5 mg (0,003 mmol)

οξικού παλλαδίου (II), 10 mg (6,0 mmol) ($\pm$)-μεθυλοπυριδιν-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφινό) -1,1'-διναφθαλένιο, $\pm$ BINAP και 1mL (MIBK). Το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους 40 ± 3 °. Στη συνέχεια προστέθηκαν 75 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους 100 ± 3 ° C για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους 70 ± 3 ° C και προστέθηκαν 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μέτα το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάντριο (Na_2SO_4). Το υπόλειμμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετόνη: διχλωρομεθάνιο 1:7. Το προϊόν παραλήφθηκε ως στερεό αχνού κίτρινου χρώματος (10.0 mg, 17.0 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -d) δ : 8.93 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.24 (t, $^4J = 1.9$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $^3J = 8.1$, $^3J = 2.4$ Hz, 1H), 7.41 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.76 (tt, $^3J = 10.0$, 8.1 Hz, 1H), 3.15 (s, 7H), 2.58 – 2.47 (m, 2H), 2.08 – 2.05 (m, 2H), 2.01 – 1.96 (m, 1H), 1.68 (dq, $^3J = 10.3$, 6.1, 4.3 Hz, 3H).

^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3 -d) δ : 164.65, 152.40, 141.25, 132.98, 131.80, 129.79, 125.90, 123.74, 122.09, 118.76, 115.46, 101.47, 58.67, 30.82, 24.66.

**Σύνθεση της ένωσης RibC2 (7-κυκλοεξυλο-*N,N*-διμεθυλο-2-((3-
(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-
d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο)**



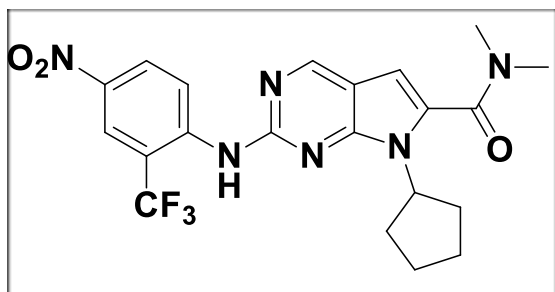
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθενται 25 mg 2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-υλο)αιθανόνη (0,081 mmol, 1 ισοδύναμο), 10 μ L 3-τριφθορομεθυλοανιλίνης, (14mg, 0,09 mmol, 1,3 ισοδ.). Στην συνέχεια

προστέθηκαν 5 mg (0,003 mmol) οξικού παλλαδίου (II), 10 mg (6,0 mmol) ($\pm$)-μεθυλοπυριδινό-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφινό) -1,1'-διναφθαλένιο, $\pm$ BINAP και 1 mL MIBK. Το προκύπτον εναιώρημα αφείχθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους $40 \pm 3^\circ$. Ακολούθως προστέθηκαν 40 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους $100 \pm 3^\circ \text{C}$ για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους $70 \pm 3^\circ \text{C}$ και προστέθηκαν 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάντριο (Na_2SO_4). Το υπόλειμμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετόνη: διχλωρομεθάνιο 1:7. Το προϊόν παρελήφθηκε ως στερεό κίτρινου χρώματος (5 mg, 28.4 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 9.15 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), . 4 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1H), 7.42 (t, $^3J = 7.9$ Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.38 (ddt, $^3J = 12.4, 7.5, 3.8$ Hz, 1H), 3.14 (s, 6H), 2.46 (tt, $^3J = 13.1, 6.6$ Hz, 3H), 1.92 (dd, $^3J = 19.6, 11.8$ Hz, 6H), 1.73 (d, $^3J = 12.4$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 162.18, 163.29, 141.44, 137.70, 136.14, 131.30, 125.07, 123.82, 121.17, 116.80, 111.50, 102.45, 99.96, 58.79, 39.45, 31.03, 29.63, 26.04.

Σύνθεση της ένωσης RibC5 (7-κυκλοπεντυλο-*N,N*-διμεθυλο-2-((4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο).



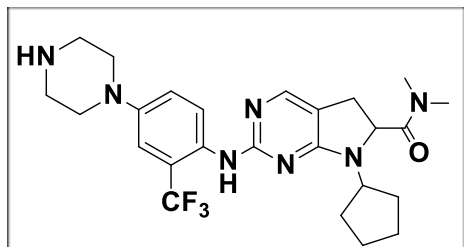
Σε δίλαιομη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθενται 30 mg 2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)αιθανόνη (0,103 mmol, 1 ισοδύναμο), 24 mg 4-νιτρο-2-(τριφθορομέθυλο) ανιλίνης (0,113

mmol, 1,1 ισοδ.). Στην συνέχεια προστέθηκαν 5 mg (0,003 mmol) οξικού παλλαδίου (II), 10 mg (6,0 mmol) (±) -μεθυλοπυριδιν-3-2,2'-δης (διφαινυλοφωσφινό) -1,1'-διναφθαλένιο, ± BINAP και 1 mL MIBK. Το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους $40 \pm 3^\circ$. Στη συνέχεια προστίθενται 75 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου προστίθενται σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους $100 \pm 3^\circ \text{C}$ για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους $70 \pm 3^\circ \text{C}$ και προστίθενται 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάντριο (Na_2SO_4). Το υπόλειμμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετόνη: διχλωρομεθάνιο 1:7. Το προϊόν παραλήφθηκε ως καθαρό ίζημα έντονου κίτρινου χρώματος (17.4 mg, 36.5 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 9.06 (d, $^3J = 9.4$ Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.55 (d, $^3J = 2.6$ Hz, 1H), 8.39 (dd, $^3J = 9.5, 2.6$ Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.84 (p, $^3J = 9.0$ Hz, 1H), 3.17 (s, 6H), 2.14 (dt, $^3J = 8.9, 5.6$ Hz, 1H), 2.04 (d, $^3J = 5.9$ Hz, 3H), 1.81 – 1.69 (m, 2H), 0.96 – 0.76 (m, 2H).

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 163.76, 153.79, 151.54, 144.73, 140.34, 133.42, 127.57, 119.40, 100.75, 58.04, 30.38, 29.71, 24.27

Σύνθεση της ένωσης RibC7 (7-κυκλοπεντυλο-*N,N*-διμεθυλο-2-((4-(πιπεραζιν-1-υλο)-2-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d] πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο).

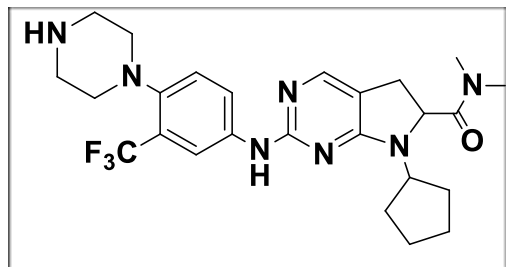


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστέθηκαν 100 mg 2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)αιθανόνη (0,342 mmol, 1 ισοδύναμο), 137 mg *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(4-άμινο-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (0,396 mmol, 1,1 ισοδ.). Στην συνέχεια προστίθενται 9,5 mg οξικού παλλαδίου (II), 14,5 mg ($\pm$) -μεθυλοπυριδιν-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφινό) -1,1'-διναφθαλένιο, $\pm$ BINAP και 1 mL MIBK. Το προκύπτον εναίωρημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους 40 ± 3 °. Ακολούθως προστέθηκαν 75 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους 100 ± 3 ° C για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους 70 ± 3 ° C και προστέθηκαν 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάντριο (Na₂SO₄). Το υπόλειμμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετόνη: διχλωρομεθάνιο 1:7. Το προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως στερεό κίτρινης απόχρωσης (67 mg, 32.6 %). Ακολούθως, μεταφέρθηκε σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και προστέθηκαν 2-4 mL υδατικού διαλύματος HCl 6N, για περίπου 1 ώρα. Στο μείγμα προστέθηκε αιθέρας και αφέθηκε υπό ανάδευση έως ότου διαχωρισθούν οι δύο φάσεις. Το μείγμα εκχυλίστηκε και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού καυστικού νατρίου έως ότου το pH φθάσει περίπου στο 10 – 12. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε τουλάχιστον 4 φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την ποσοτική απομόνωση της τελικής ένωσης στην οργανική φάση. Η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό νάτριο, διηθήθηκε και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Ελήφθησαν 45 mg μπεζ ιζήματος (30 %).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃-d) δ : 8.64 (s, 1H), 8.02 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H), 7.75 (dd, ³J = 8.7, ⁴J = 2.5 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.29 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.78 (p, ³J = 9.0 Hz, 1H), 3.55 (s, 4H), 3.14 (s, 6H), 2.84 (t, ³J = 5.0 Hz, 4H), 2.47 (td, ³J = 9.1, ⁴J = 4.2 Hz, 2H), 2.10 – 2.03 (m, 2H), 2.00 – 1.89 (m, 2H), 1.66 (q, ³J = 6.2 Hz, 2H).

¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃-d) δ : 163.06, 154.96, 154.54, 150.91, 150.73, 144.11, 131.06, 124.61, 123.88, 120.55, 114.23, 11.87, 99.84, 56.58, 46.38, 42.47, 29.40, 23.83.

Σύνθεση της ένωσης RibC8 (7-κυκλοπεντυλο-*N,N*-διμεθυλο-2-((4-(πιπεραζιν-1-υλο)-3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d] πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο)



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστέθηκαν 75 mg 2,2-διαμινο-1-(2

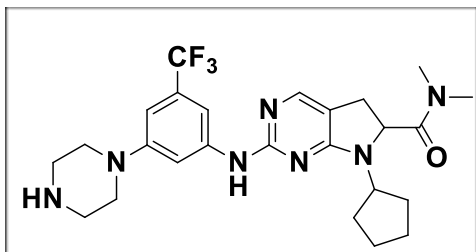
χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)αιθανόνη (0,256 mmol, 1 ισοδύναμο), 90 mg *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(4-άμινο-2-

(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (0,261 mmol, 1,1 ισοδ.). Στην συνέχεια προστέθηκαν 5 mg οξικού παλλαδίου (II), 10 mg ($\pm$)-μεθυλοπυριδιν-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφιν) -1,1'-διναφθαλένιο, $\pm$ BINAP και 1 mL MIBK. Το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους $40 \pm 3^\circ$. Ακολούθως προστέθηκαν 122 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους $100 \pm 3^\circ \text{C}$ για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους $70 \pm 3^\circ \text{C}$ και προστέθηκαν 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μέτα το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάντριο (Na_2SO_4). Το υπόλειμμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετόνη: διχλωρομεθάνιο 1:7. Το προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως στερεό κίτρινης απόχρωσης (67 mg, 32.6 %). Ακολούθως, μεταφέρθηκε σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και προστέθηκαν 2-4 mL υδατικού διαλύματος HCl 6N, για περίπου 1 ώρα. Στο μείγμα προστέθηκε αιθέρας και αφήνεται υπό ανάδευση έως ότου διαχωρισθούν οι δύο φάσεις. Το μείγμα εκχυλίστηκε και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού καυστικού νατρίου έως ότου το pH φθάσει περίπου στο 10 – 12. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε τουλάχιστον 4 φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την ποσοτική απομόνωση της τελικής ένωσης στην οργανική φάση. Η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό νάτριο, διηθήθηκε και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Ελήφθησαν 70 mg μπεζ ιζήματος (98.8 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 -d) δ : 8.64 (s, 1H), 8.01 (d, $^4J = 2.7$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $^3J = 8.7$, 2.7 Hz, 1H), 7.36 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.79 (p, $^3J = 9.0$ Hz, 1H), 3.04 (t, $^3J = 4.7$ Hz, 4H), 2.91 (t, $^3J = 4.8$ Hz, 4H), 2.56 – 2.42 (m, 2H), 2.12 – 2.00 (m, 2H), 1.97 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 0.95 – 0.77 (m, 2H).

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 -d) δ : 164.11, 155.26, 152.08, 151.65, 137.37, 132.15, 124.82, 122.64, 117.20, 112.69, 100.89, 57.87, 54.16, 46.10, 30.30, 24.27.

**Σύνθεση της ένωσης RibC9 (7-κυκλοπεντυλο-*N,N*-διμεθυλ-2-((3-
(πιπεραζινο-1-υλο)-5-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-6,7-διωδρο-5H-
πυρρολο[2,3-d] πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο).**



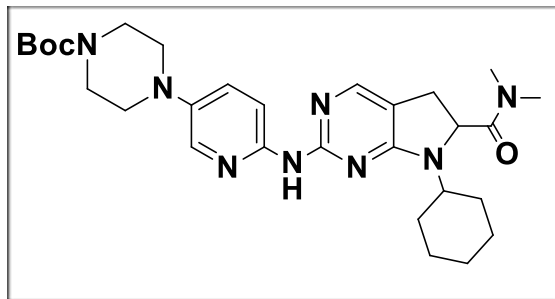
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστίθενται 45 mg 2,2-διαμινο-1-(2χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-6,7-διωδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλ)αιθανόνη (0,150 mmol, 1 ισοδύναμο), 62 mg *tert*-βουτυλεστέρα του 4-

(4-άμινο-2-(τριφθορομεθυλο) φαινυλο) πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (0,180 mmol, 1,1 ισοδ.). Στην συνέχεια προστίθενται 5 mg οξικού παλλαδίου (II), 10 mg (±) -μεθυλοπυριδιν-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφιν) -1,1'-διναφθαλένιο, ± BINAP και 1 mL MIBK. Το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους 40 ± 3 °. Ακολούθως προστέθηκαν 122 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους 100 ± 3 ° C για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους 70 ± 3 ° C και προστέθηκαν 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάντριο (Na₂SO₄). Το προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως στερεό κίτρινης απόχρωσης (67 mg, 62.6 %). Ακολούθως, μεταφέρθηκε σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και προστίθενται 2-4 mL υδατικού διαλύματος HCl 6N, για περίπου 1 ώρα. Στο μείγμα προστέθηκε αιθέρας και αφέθηκε υπό ανάδευση έως ότου διαχωρισθούν οι δύο φάσεις. Το μείγμα εκχυλίστηκε και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού καυστικού νατρίου έως ότου το pH φθάσει περίπου στο 10 – 12. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε τουλάχιστον 4 φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την ποσοτική απομόνωση της τελικής ένωσης στην οργανική φάση. Η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό νάτριο, διηθήθηκε και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Ελήφθησαν 2 mg κίτρινου ιζήματος (96.1 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ: 8.62 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.14 (d, ⁴J = 2.0 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.80 (ddd, ³J = 18.0, 9.8, 8.1 Hz, 1H), 3.30 (t, ³J = 4.9 Hz, 4H), 3.17 (d, ³J = 5.5 Hz, 4H), 3.14 (s, 8H), 2.51 – 2.39 (m, 2H), 2.03 (d, ³J = 10.3 Hz, 2H), 1.96 (h, ³J = 7.8 Hz, 2H), 1.64 (q, ³J = 6.0 Hz, 2H).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃-d) δ: 164.09, 154.32, 151.96, 148.19, 142.07, 131.36, 127.96, 112.73, 112.34, 101.23, 57.04, 46.80, 44.20, 30.74, 26.10.

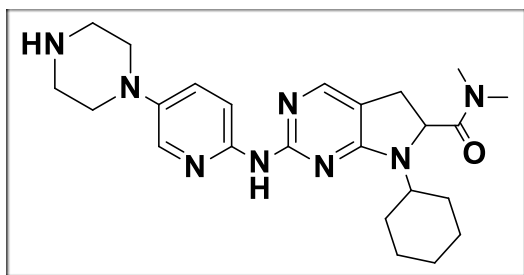
Σύνθεση της ένωσης RibB1 4-(6-((7-κυκλοπεντυλο-6-(διμεθυλκαρβαμοϋλο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-2-υλο)αμινο)πυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβαξαμίδιο.



Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστέθηκαν 132 mg 2,2-διαμινο-1-(2-χλωρο-7-κυκλοεξυλο-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-υλο)αιθανόνη (0,43 mmol, 1 ισοδύναμο), 132 mg 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-καρβοξυλικός

tert-βουτυλεστέρας (0,47 mmol, 1,1 ισοδ.). Στην συνέχεια προστέθηκαν 5 mg οξικού παλλαδίου (II), 10 mg ($\pm$) -μεθυλοπυριδινό-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφινό) -1,1'-διναφθαλένιο, $\pm$ BINAP και 1 mL MIBK. Το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους $40 \pm 3^\circ$. Ακολούθως προστέθηκαν 150 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους $100 \pm 3^\circ \text{C}$ για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους $70 \pm 3^\circ \text{C}$ και προστέθηκαν 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάντριο (Na_2SO_4). Το υπόλειμμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετόνη: διχλωρομεθάνιο 1:7. Το προϊόν παραλήφθηκε καθαρό ως στερεό κίτρινης απόχρωσης (50 mg, 37.0 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 8.67 (s, 1H), 8.47 (d, $^3J = 9.1 \text{ Hz}$, 1H), 8.00 (d, $^4J = 2.9 \text{ Hz}$, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.34 (dd, $^3J = 9.1$, $^4J = 2.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.38 – 4.29 (m, 1H), 3.61 (t, $^3J = 5.2 \text{ Hz}$, 4H), 3.16 (s, 6H), 3.12 – 3.06 (m, 18H), 2.63 (q, $^3J = 12.3$, 11.4 Hz, 2H), 1.93 (d, $^3J = 13.2 \text{ Hz}$, 5H), 1.81 (d, $^3J = 12.7 \text{ Hz}$, 1H), 1.49 (s, 10H).



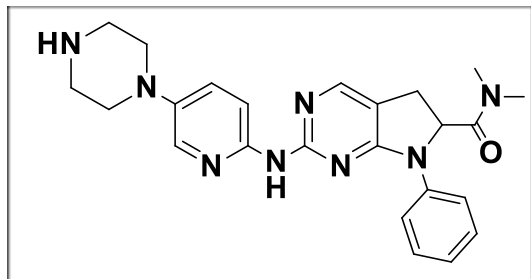
50 mg της ένωσης 4-(6-((7-κυκλοεξυλ-6-(διμεθυλκαρβαμοϋλο)-6,7-διυδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-2-υλο)αμινο πυριδιν-3-υλο) πιπεραζινο-1-tertβουτυλικός εστέρας, προστέθηκαν σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη μαζί με 2-4 mL υδατικού διαλύματος HCl

6N, για περίπου 1 ώρα. Στο μείγμα προστέθηκε αιθέρας και αφήνεται υπό ανάδευση έως ότου διαχωρισθούν οι δύο φάσεις. Ακολούθως, εκχυλίσθηκε και πραγματοποιήθηκε αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού καυστικού νατρίου έως ότου το pH φθάσει περίπου στο 10 – 12. Η υδατική φάση εκχυλίσθηκε τουλάχιστον 4 φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την απομόνωση της τελικής ένωσης στην οργανική φάση. Μετά από την διήθηση λήφθηκαν 20 mg κίτρινου ιζήματος (34 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 8.67 (s, 1H), 8.47 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 1H), 8.00 (d, $^4J = 2.9$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.34 (dd, $^3J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 4.38 – 4.29 (m, 1H), 3.61 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 4H), 3.16 (s, 6H), 3.12 – 3.06 (m, 18H), 2.63 (q, $^3J = 12.3, 11.4$ Hz, 2H), 1.93 (d, $^3J = 13.2$ Hz, 5H), 1.81 (d, $^3J = 12.7$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 163.11, 153.94, 151.10, 150.20, 150.01, 140.79, 131.47, 124.26, 122.09, 111.51, 108.42, 107.59, 106.65, 99.98, 56.90, 50.23, 47.75, 46.11, 43.01, 29.29, 28.64, 22.85.

Σύνθεσης της ένωσης RibB2 (N,N-διμεθυλο-7-φαινυλο-2-((5-(πιπεραζιν-1-υλο)πυριδιν-2-υλο)αμινο)-6,7-διωδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη-6-καρβοξαμίδιο)



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, προστέθηκαν 50 mg 2-χλωρο-N,N-διμεθυλο-7-φαινυλο-6,7-διωδρο-5H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο (0,166 mmol, 1 ισοδύναμο), 50 mg 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικός τριτ-βουτυλεστέρα (0,183

mmol, 1,1 ισοδ.). Στην συνέχεια προστέθηκαν 8 mg οξικού παλλαδίου (II), 10 mg ($\pm$) -μεθυλοπυριδινό-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφινό) -μεθυλοπυριδινό-3-2,2'-δισ (διφαινυλοφωσφινό) -1,1'-δυναφθαλένιο, $\pm$ BINAP και 1 mL MIBK. Το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση στους $40 \pm 3^\circ$. Ακολούθως προστέθηκαν 80 mg (0,2 mmol, 1,5 ισοδ.) ανθρακικού καυσίου σε 5 δόσεις σε διάστημα 15 λεπτών. Το υπό ανάδευση διάλυμα θερμάνθηκε στους $100 \pm 3^\circ \text{C}$ για 3 ώρες. Το μείγμα ψύχθηκε στους $70 \pm 3^\circ \text{C}$ και προστέθηκαν 3 mL ύδατος σε διάρκεια 5 λεπτών. Μέτα το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα εκχυλίστηκε με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάντριο (Na_2SO_4). Το υπόλειμμα χρωματογραφήθηκε σε στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετόνη: διχλωρομεθάνιο 1:7. Το προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως στερεό κίτρινης απόχρωσης (67 mg, 32.6 %). Ακολούθως μεταφέρθηκε σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και προστέθηκαν 2-4 mL υδατικού διαλύματος HCl 6N, για περίπου 1 ώρα. Στο μείγμα προστέθηκε αιθέρας και αφέθηκε υπό ανάδευση έως ότου διαχωρισθούν οι δύο φάσεις. Το μείγμα εκχυλίστηκε και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού καυστικού νατρίου έως ότου το pH φθάσει περίπου στο 10 – 12. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε τουλάχιστον 4 φορές με οξικό αιθυλεστέρα για την ποσοτική απομόνωση της τελικής ένωσης στην οργανική φάση. Η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό νάτριο, διηθήθηκε και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Ελήφθησαν 19,2 mg κίτρινου ιζήματος (42.0 %).

^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}$) δ : 8.79 (s, 1H), 8.29 (d, $^3J = 9.1 \text{ Hz}$, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (d, $^4J = 2.9 \text{ Hz}$, 1H), 7.59 – 7.50 (m, 4H), 7.47 – 7.40 (m, 1H), 7.21 (dd, $^3J = 9.2$, $^4J = 2.9 \text{ Hz}$, 1H), 6.75 (s, 1H), 3.15 (p, $^3J = 5.9$, 4.9 Hz , 8H), 2.96 (s, 3H), 2.85 (s, 3H).

5. Συμπεράσματα

- Συντέθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 10 ανάλογα του φαρμακευτικού σκευάσματος Ribociclib.
- Βελτιστοποιήθηκε η πειραματική πορεία σύνθεσης του Ribociclib που έχει προταθεί από την εταιρεία Novartis. Βελτιώθηκε η απόδοση της ολικής σύνθεσης από 15% στα 25%. Μείωθηκε το κόστος της ολικής σύνθεσης του Ribociclib.
- Πραγματοποιήθηκε ανάλυση Docking για την θεωρητική μελέτη πρόσδεσης στις πρωτεΐνες CDK4/6, CDK2, CDK9. Τα θεωρητικά αποτελέσματα υποδεικνύουν καλύτερη εν δυνάμει αναστατική δράση για τα ανάλογα που συντέθηκαν στο εργαστήριο σε σχέση με το Ribociclib.
- Αναμένονται τα βιολογικά αποτελέσματα.

Conclusions

- Synthesized and identified 10 analogues of the pharmaceutical formulation Ribociclib.
- Optimized the experimental course of synthesis of Ribociclib proposed by the company Novartis. Improved total composition yield from 15% to 25%. Reduced the cost of Ribociclib's overall synthesis.
- Docking analysis was performed for the theoretical study of binding to CDK4/6, CDK2, CDK9 proteins. Theoretical results indicate better potential disruptive activity for the laboratory-synthesized analogs than Ribociclib.
- Biological results are awaited.

6. Βιβλιογραφία

1. ΒΑΣΙΛΗΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας ANNA ΤΣΑΝΤΙΛΗ-ΚΑΚΟΥΛΙΔΟΥ Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Χημείας Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων.
2. Slabaugh., R.Spencer L. Seager, Michael. *Chemistry for Today: general, organic, and biochemistry*. s.l. : Thomson Brooks/Cole.
3. Reynolds CH, Merz KM, Ringe D, eds. Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches. Cambridge, UK: Cambridge University Press. ISBN 978-0521887236., 2010, Τόμ. (1 ed.).
4. Zhong², Shu-Feng Zhou¹ and Wei-Zhu. Drug Design and Discovery: Principles and Applications . *Molecules*. 2017 Feb 13, Τόμ. doi: 10.3390/molecules22020279 .
5. Pandey, Abhay. Learning Center Drug Discovery and Development Process. Jun 2020.
6. Reynolds CH, Merz KM, Ringe D, eds. Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches. Cambridge UK. Cambridge University Press. ISBN 978-0521887236., 2010, Τόμ. (1 ed.).
7. Maria Batool, Bilal Ahmad, and Sangdun Choi*. A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci*. 20(11): 2783. Published online 2019 Jun 6. doi: 10.3390/ijms20112783 PMCID: PMC6601033 PMID: 31174387, 2019 Jun; .
8. Harish Kumar Dhingra, Prabhat Nath Jha, Pratima Bajpai. *Current Topics in Biotechnology & Microbiology: STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN APPROACHES IN DRUG DISCOVERY*. s.l. : LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co, 2011.
9. Mauser H, Guba W. "Recent developments in de novo design and scaffold hopping". *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. . May 2008, Τόμ. 11 (3): 365–74. PMID 18428090.
10. 1307935, Jorgensen WL (Mar 2004). "The many roles of computation in drug discovery". *Science*. 303 (5665): 1813–8. Bibcode:2004Sci...303.1813J. doi:10.1126/science.1096361. PMID 15031495. S2CID.
11. Leach, Andrew R. και Harren, Jhoti (2007). *Structure-based Drug Discovery*. Berlin: Springer. ISBN 978-1-4020-4406-9.
12. Wang R, Gao Y, Lai L (2000). "LigBuilder: A Multi-Purpose Program for Structure-Based Drug Design". *Journal of Molecular Modeling*. 6 (7–8): 498–516. doi:10.1007/s0089400060498. S2CID 59482623.
13. Piya Lahiry, Ali Torkamani†, Nicholas J. Schork† and Robert A. Hegele*. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype–phenotype relationships .
14. Nida Iqbal 1, * and Naveed Iqbal 2. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer .

15. American cancer society-breast cancer.
16. Schiff, C Kent Osborne and Rachel. MECHANISMS OF ENDOCRINE RESISTANCE IN BREAST CANCER.
17. Nicholas C. Turner, M.D., Ph.D., Jungsil Ro, M.D., Fabrice André, M.D., Ph.D., Sherene Loi, M.D., Ph.D., Sunil Verma, M.D., Hiroji Iwata, M.D., Nadia Harbeck, M.D., Sibylle Loibl, M.D., C. "Palbociclib in Hormone-Receptor–Positive Advanced Breast Cancer’.
18. Geoffrey I. Shapiro, MD, PhD. CDK4/6 Inhibitors: Where They Are Now and Where They Are Headed in the Future.
19. Shiu, D. Lehti-Shiu and Shin-Han. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily.
20. Ralph R. K., McCombs P. J., Tener G.& Wojcik S. J. Evidence for modification of protein phosphorylation by cytokinins. *Biochem.* 130, 901–911., 1972 .
21. A., Trewavas. The phosphorylation of ribosomal protein in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* PubMed , 1973, doi:10.1104/pp.51.4.760 (doi:10.1104/pp.51.4.760).
22. A) Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002). "The protein kinase complement of the human genome". *Science*. 298 (5600): 1912–1934. Bibcode:2002Sci...298.1912M. doi:10.1126/science.1075762. PMID 12471243. S2CID 26554314. b) Alberts, Br.
23. Bossemeyer, Dirk. "Protein kinases — structure and function”.
24. Savir Y, Tlusty T (2007). Scalas E, ed. "*Conformational proofreading: the impact of conformational changes on the specificity of molecular recognition*."
25. GM, Cooper. *Chapter 2.2: The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts". The Cell: a Molecular Approach* . s.l. : Washington (DC): ASM Press. ISBN 0-87893-106-6., (2000). 2.
26. DE, Koshland. (February 1958). "*Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 44 (2): 98–104. Bibcode:1958PNAS...44...98K. doi:10.1073/pnas.44.2.98. PMC .
27. Vasella A, Davies GJ, Böhm M. (October 2002). "*Glycosidase mechanisms*". *Current Opinion in Chemical Biology*. 6(5): 619–29. doi:10.1016/S1367-5931(02)00380-0. PMID 12413546.
28. R, Boyer. "*Chapter 6: Enzymes I, Reactions, Kinetics, and Inhibition*". *Concepts in Biochemistry (2nd ed.)*. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.: John Wiley & Sons, Inc. pp. 137–8. ISBN 0-470-00379-0. OCLC 51720783. 2002.
29. . R. S. K. Vijayan, Peng He, Vivek Modi, Krisna C. Duong-Ly, Haiching Ma, Jeffrey R. Peterson, Roland L. Dunbrack, Jr., and Ronald M. Levy. "*Conformational Analysis of the DFG-Out Kinase Motif*

and Biochemical Profiling of Structurally Validated Type II Inh.

30. Daniel K. Treiber Neil P. Shah. "Ins and Outs of Kinase DFG Motifs".
31. • Schenk P W, et al. *Signal perception and transduction: the role of protein kinases*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1999, 1449(1): 1-24.
32. Πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr και Πρωτεϊνικές φωσφατάσες Ser/Thr κεφάλαιο 7.
33. Kobe, B., & Kemp, B. E. (2010). *Principles of Kinase Regulation. Handbook of Cell Signaling*, 559–563. doi:10.1016/b978-0-12-374145-5.00074-7.
34. Pawson T, Scott JD. *Signalling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science* 1997;278:2075–80.
35. Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh. 2004. *Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. Mol. Cell*15:661-675. Crossref. PubMed.
36. Russell, P., S. Moreno, and S. I. Reed. 1989. *Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts.*
37. Schmidt*, Eric M. Rubenstein and Martin C. Mechanisms Regulating the Protein Kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *MINIREVIEW*. Volume 6 Issue 4 <https://doi.org/10.1128/EC.00026-07>, April 2007 .
38. Krebs, EG. (Jul 5, 1983). "Historical perspectives on protein phosphorylation and a classification system for protein kinases.". *Philosophical transactions of the Royal Society of London*.
39. 12. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S.. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002;27(10):514–520.
40. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome".
41. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam,. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome".
42. VOLLENHOVEN, RONALD FRITS VAN. Kinase inhibition: a new therapeutic principle in rheumatology .
43. Mukhopadhyay, Manash K. Paul and Anup K. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci*. 2004; 1(2): 101–115.
44. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. "The protein tyrosine kinase family of the human genome". *Oncogene*. 19 (49): 5548–57. doi:10.1038/sj.onc.1203957. PMID 11114734. (November 2000).
45. Hubbard SR, Till JH. "Protein tyrosine kinase structure and function". *Annual Review of Biochemistry*. 69: 373–98. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.373. PMID 10966463. (2000).
46. Miller, Stevan R. Hubbard and W. Todd. "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation

and signaling”.

47. Zwick E, Bange J, Ullrich A. "Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies". *Endocrine-Related Cancer*. 8 (3): 161–73. doi:10.1677/erc.0.0080161. PMID 11566607. (September 2001). .
48. Du, Z., Lovly, C.M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. . *Mol Cancer* 17, 58 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
49. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Section 20.4 Receptor Tyrosine Kinases and Ras. [συγγρ. βιβλίου] W. H. Freeman. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York : s.n., 2000.
50. Itaru Matsumura, Masao Mizuki and Yuzuru Kanakura1. “Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies” .
51. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. "EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy". *Endocrine-Related Cancer*. (June 2001). .
52. Chan R, Hardy W, Laing M, Muller W. . “The Catalytic Activity of the ErbB-2 Receptor Tyrosine Kinase Is Essential for Embryonic Development”. *Molecular Cell Biology*. 22: 1073-1078 doi: 10.1128/MCB.22.4.10731078.2002. (2017).
53. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mihiu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mihiu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-467. PMID: 30173249.
54. —. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-467. PMID: 30173249.
55. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. "Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product". . (February 1991). .
56. Faoro L, Cervantes GM, El-Hashani E, Salgia R. MET receptor tyrosine kinase. *J Thorac Oncol*. 2009;4(11 Suppl 3):S1064-S1065. doi:10.1097/01.JTO.0000361752.86918.09.
57. Zhang, Y., Xia, M., Jin, K. et al. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer* 17, 45. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0796-y>. (2018).
58. Pediatr., Kaplan SA. The insulin receptor. *J*. 1984 Mar;104(3):327-36. doi: 10.1016/s0022-3476(84)81090-2. PMID: 6368773.
59. P., De Meyts. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. [Updated 2016 Apr 27]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih>.

60. Ward CW, Lawrence MC. (April 2009). "Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor". *BioEssays*. 31 (4): 422–34.
61. 54. Gavi, S., και συν., και συν. 'Trends in Endocrinology and Metabolism.'.
62. Weiss A, Littman DR. "Signal transduction by lymphocyte antigen receptors". . *Cell*. 76 (2): 263–74. doi:10.1016/0092-8674(94)90334-4. PMID 8293463. S2CID 13225245. (January 1994).
63. AY, Tsygankov. *Non-receptor protein tyrosine kinases*. *Front Biosci*. ;8:s595-635. doi: 10.2741/1106. PMID: 12700079. 2003 May 1.
64. J., Colicelli. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity [published correction appears in *Sci Signal*. 2011 Aug 30;4(188):er4]. *Sci Signal*. 2010;3(139):re6. Published 2010 Sep 14. doi:10.1126/scisignal.3139re6.
65. Shaul, Y. c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ* 7, 10–16 (2000). <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400626>.
66. "Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells".
67. Audrey Sirvent, Christine Benistant, Serge Roche. "Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells" .
68. Shah, N. P. "Overriding Imatinib Resistance with a Novel ABL Kinase Inhibitor". *Science*. 305 (5682): 399–401. Bibcode:2004Sci...305..399S. doi:10.1126/science.1099480. ISSN 0036-8075. PMID 15256671. S2CID 34972913. (2004-07-16).
69. Parsons, S., Parsons, J. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906–7909 (2004). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>.
70. Boggon, T., Eck, M. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918–7927 (2004). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208081>.
71. Irby RB, Yeatman TJ. (November 2000). "Role of Src expression and activation in human cancer". *Oncogene*. 19 (49): 5636–42. doi:10.1038/sj.onc.1203912. PMID 11114744.
72. Paul MK, Mukhopadhyay AK. (2004). "Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer". *International Journal of Medical Sciences*. 1 (2): 101–115. doi:10.7150/ijms.1.101. PMID 15912202.
73. Nowakowski, J., και συν., και συν. "Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography". *Structure*. 10 (12): 1659–1667. doi:10.1016/S0969-2126(02)00907-3. PMID 12467573.
74. al., Capra et. "Frequent Alterations in the Expression of Serine/Threonine Kinases in Human Cancers". *Cancer Research*. 2006.
75. Damuni Z, Reed LJ . (1988). "Purification and properties of a protamine kinase and a type II

casein kinase from bovine kidney mitochondria". Arch. Biochem. Biophys. 262 (2): 574–84. doi:10.1016/0003-9861(88)90408-0. PMID 2835010.

76. Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW. . "Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase". Proc Natl Acad Sci USA. 86 (18): 6940–3. doi:10.1073/pnas.86.18.6940. PMC 297966. (1989).

77. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms". Science. 286 (5443): 1358–62. doi:10.1126/science.286.5443.1358. PMID . (1999).

78. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, et al. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. . *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1196-1212. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.05.001.

79. Maurer, G., Tarkowski, B. & Baccarini, M. Raf kinases in cancer—roles and therapeutic opportunities. *Oncogene* 30, 3477–3488 (2011). <https://doi.org/10.1038/onc.2011.160>.

80. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1196-212. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.05.001. Epub 2007 May 22. PMID: 17555829; .

81. Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J. et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov* 11, 873–886 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrd3847>.

82. Yarza, Ramon & Vela, Silvia & Solas, Maite & Ramírez, María. . . c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*. 6. 10.3389/fphar.2015.00321. (2016).

83. Oltmanns U, Issa R, Sukkar MB, John M, Chung KF. Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*. 139(6):1228-1234. DOI: 10.1038/sj.bjp.07053. 2003 Jul;.

84. Yi-Rong Chen, Xiaoping Wang, Dennis Templeton, Roger J. Davis, Tse-Hua Tan,. The Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Apoptosis Induced by Ultraviolet C and γ Radiation: DURATION OF JNK ACTIVATION MAY DETERMINE CELL DEATH AND PROLIFERATION*,. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 271, Issue 50, Pages 31929-31936, ISSN 0021-9258, <https://doi.org/10.1074/jbc.271.50.31929>. 1996,.

85. RJ., Davis. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Soc Symp*. 64:1-12. doi: 10.1515/9781400865048.1. PMID: 10207617. 1999;.

86. Zhang T, Inesta-Vaquera F, Niepel M, Zhang J, Ficarro SB, Machleidt T, Xie T, Marto JA, Kim N, Sim T, Laughlin JD, Park H, LoGrasso PV, Patricelli M, Nomanbhoy TK, Sorger PK, Alessi DR, Gray NS. "Discovery of potent and selective covalent inhibitors of JNK" *Chem Biol*. 2012 Jan 27;19(1):140-

54. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.11.010. PMID: 22284361; PMCID: PMC3270411.
87. DO, Morgan. *The Cell Cycle: Principles of Control* (1st ed.). London: New Science Press. ISBN 978-0-87893-508-6. (2007). .
88. Lee MG, Nurse P. "Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*". *Nature*. 327 (6117): 31–5. Bibcode:1987Natur.327...31L. doi:10.1038/327031a0. PMID 3553962. S2CID 4300190. (1987). .
89. A.R. Nebreda. CDK activation by non-cyclin proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.* 18.
90. A.S. Lundberg, R.A. Weinberg. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk, complexes, *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998) 753e761.
91. H.L. Ford, A.B. Pardee,. The S phase: beginning, middle, and end: a perspective *J. Cell. Biochem.* 72 (1998) 1e7.
92. Sourav Kalra a, Gaurav Joshi b, Anjana Munshi a, **, Raj Kumar b, *. Structural insights of cyclin dependent kinases: Implications in design of selective inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.071>. (2017).
93. 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>.
94. Jenny Bain, Lorna Plater, Matt Elliott, Natalia Shpiro, C. James Hastie, Hilary Mclauchlan, Iva Klevernic, J. Simon C. Arthur, Dario R. Alessi, Philip Cohen. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 15 December 2007; 408 (3): 297–315. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20070797>.
95. Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 2015 Jul;36(7):422-39. doi: 10.1016/j.tips.2015.04.005. Epub 2015 May 12. PMID: 25975227.
96. Zuccotto F, Ardini E, Casale E, Angiolini M. Through the "gatekeeper door":exploiting the active kinase conformation. *J Med Chem* 2010;53:2681–94.
97. Gavrín LK, Saiah E. Approaches to discover non-ATP site inhibitors. *Med Chemallosteric and bivalent inhibitors. Curr Pharm Des* 2012;18:2936–45. .
98. Roskoski, R. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological Research*, 103, 26–48. doi:10.1016/j.phrs.2015.10.021.
99. Peng Wu, Thomas E. Nielsen, Mads H. Clausen,. FDA-approved small-molecule kinase

- inhibitors,. *Trends in Pharmacological Sciences*,. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>., 2015, Τόμ. Volume 36, Issue 7,.
100. Lyseng-Williamson, K., & Jarvis, B. Imatinib. *Drugs*, 61(12), 1765–1774.
doi:10.2165/00003495-200161120-00007. (2001) .
 101. Moen, M.D., McKeage, K., Plosker, G.L. et al. Imatinib. *Drugs* 67, 299–320 (2007).
<https://doi.org/10.2165/00003495-200767020-00010>.
 102. IR., Radford. Imatinib. Novartis. *Current Opinion in Investigational Drugs* (London, England : 2000). 2002 Mar;3(3):492-499. PMID: 12054102.
 103. Pantazi, Despoina & Ntemou, Nikoleta & Brentas, Alexios & Alivertis, Dimitrios & Skobridis, Konstantinos & Tselepis, Alexandros. (2019). Molecular Requirements for the Expression of Antiplatelet Effects by Synthetic Structural Optimized Analogues of the Anticancer Drugs Imatinib and Nilotinib. *Drug design, development and therapy*. 13. 4225-4238. 10.2147/DDDT.S211907. .
 104. Iqbal N, Iqbal N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract*. 2014;2014:357027. doi:10.1155/2014/357027.
 105. <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-myeloid-cml/statistics>.
 106. J.Zimmermann. EU Pat., 0564409, 1993.
 107. . Kinigopoulou, M. Filippidou, M. Gogou, A. Giannousi, P. Fouka, N. Demou, D. Alivertis, C. Georgis, A. Brentas, V. Polychronidou, P. Voulgari, V. Theodorou and K. Skobridis,. An optimized approach in the synthesis of Imatinib intermediates and its analogues. *RSC Adv.* 6.
10.1039/C6RA09812F. .
 108. Kantarjian, H.M., Hughes, T.P., Larson, R.A. et al. Long-term outcomes with frontline Nilotinib versus Imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 10-year analysis. *Leukemia* 35, 440–453 (2021). <https://doi.org/10.1038/s4>.
 109. Jabbour, E., Cortes, J. και Kantarjian, H. "Nilotinib for the treatment of chronic myeloid leukemia: An evidence-based review". *Core Evidence*. 4: 207–213. doi:10.2147/CE.S6003. PMC 2899790. PMID 20694077. (2009). .
 110. Pagan, F., και συν., και συν. "Nilotinib Effects in Parkinson's diseaseand Dementia with Lewy bodies". *Journal of Parkinson's Disease*. 6 (3): 503–17. doi:10.3233/JPD-160867. PMC 5008228. PMID 27434297. 2016.
 111. Benjamin J. Deadman, a Mark D. Hopkin,a Ian R. Baxendaleb and Steven V. Ley*. The synthesis of Bcr-Abl inhibiting anticancer pharmaceutical agents Imatinib, Nilotinib and dasatinib. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Issue 11, , 2013.
 112. Sebastian M, Schmitt A, Reck M. "First-line treatment of EGFR-mutated nonsmall cell lung

- cancer: critical review on study methodology". *European Respiratory Review*. 23 (131): 92–105. doi:10.1183/09059180.00008413. PMID 24591666. (March 2014).
113. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. . "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib" (PDF). *The New England Journal of Medicine*. 350 (21): 2129–39. doi:10.1056/nejmoa040938. PMID 15118073. (May 2004).
114. W.Breitenstein, P.Furet, S.Jacob P.W. Manley. , World Pat., 2004005281,2004.
115. Concepción Sánchez-Martínez, María José Lallena, Sonia Gutiérrez Sanfeliciano, Alfonso de Dios,. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015–2019). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 29, Issue 20, 126637, ISSN 0960-894X, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.126637>. 2019.
116. Tripathy D, Bardia A, Sellers WR. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2017 Jul 1;23(13):3251-3262. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-315.
117. Chen P, Lee NV, Hu W, Xu M, Ferre RA, Lam H, Bergqvist S, Solowiej J, Diehl W, He YA, Yu X, Nagata A, VanArsdale T, Murray BW. Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. *Mol Cancer Ther*. 2016 Oct;15(10):2273-2281. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0300. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27496135.
118. Qing-Yun Chong, Ze-Hui Kok, Ngoc-Linh-Chi Bui, Xiaoqiang Xiang, Andrea Li-Ann Wong, Wei-Peng Yong, Gautam Sethi, Peter E. Lobie, Lingzhi Wang, Boon-Cher Goh,. A unique CDK4/6 inhibitor: Current and future therapeutic strategies of abemaciclib, *Pharmacological Research*, Volume 156, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104686>. . 2020,.
119. Wagner, V., Gil, J. Senescence as a therapeutically relevant response to CDK4/6 inhibitors. *Oncogene* 39, 5165–5176 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1354-9>.
120. Serra F, Lapidari P, Quaquarini E, Tagliaferri B, Sottotetti F, Palumbo R. Palbociclib in metastatic breast cancer: current evidence and real-life data. *Drugs Context*. 2019;8:212579. Published 2019 Jul 16. doi:10.7573/dic.212579.
121. Finn, RS, και συν., και συν. (2009). "PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro". *Breast Cancer Research*. 11 (5): R77. doi:10.1186/bcr2419. PMC 2790859. .
122. Robert Roskoski. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacological Research*, Volume 107, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.012>. 2016,.

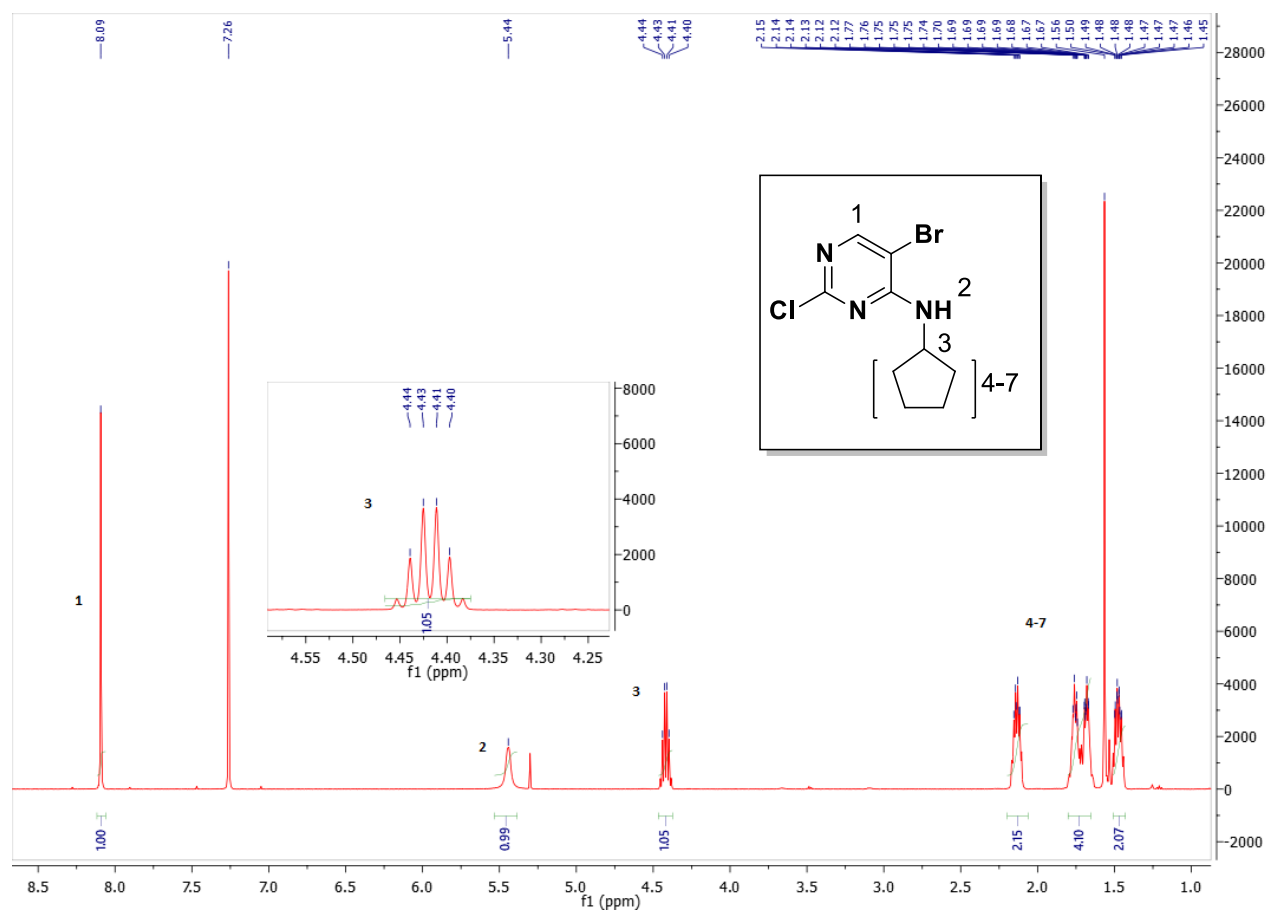
123. "Updated Data from Phase 3 Trial of IBRANCE (palbociclib) Plus Letrozole in HR+, HER2-Metastatic Breast Cancer Confirm Improvement in Progression-Free Survival | Pfizer: One of the world's premier biopharmaceutical companies". Pfizer.
124. "FDA Approves Palbociclib for Metastatic Breast Cancer". OncLive. 3 February 2015.
125. Turner, Nicholas C., και συν., και συν. (16 July 2015). "Palbociclib in Hormone-Receptor–Positive Advanced Breast Cancer". *New England Journal of Medicine*. 373 (3): 209–219. .
126. Research, Center for Drug Evaluation and. "Approved Drugs - Palbociclib (IBRANCE)". www.fda.gov. Retrieved 16 December 2017.
127. Torres-Guzmán R, Calsina B, Hermoso A, et al. Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(41):69493-69507. Published 2017 May 10. doi:10.18632/oncotarget.17778.
128. Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH. "The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle". *Cell*. 67 (2): 293–302. doi:10.1016/0092-8674(91)90181-w. PMID 1655277. S2CID 12990398. (October 1991).
129. "Highlights of Prescribing Information for Verzenio" (PDF). September 2017.
130. Qing-Yun Chong, Ze-Hui Kok, Ngoc-Linh-Chi Bui, Xiaoqiang Xiang, Andrea Li-Ann Wong, Wei-Peng Yong, Gautam Sethi, Peter E. Lobie, Lingzhi Wang, Boon-Cher Goh,. A unique CDK4/6 inhibitor: Current and future therapeutic strategies of abemaciclib, *Pharmacological Research*, Volume 156, ISSN 1043-6618, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104686>. 2020,.
131. Syed, Y.Y. Ribociclib: First Global Approval. *Drugs* 77, 799–807 (2017). <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0742-0>.
132. Ribociclib for breast cancer. *Aust Prescr*. 2018;41(5):172. doi:10.18773/austprescr.2018.058.
133. National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. *NIH Curriculum Supplement Series* [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK203>.
134. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>.
135. uicc.org/news/global-cancer-data-globocan-2018.
136. World Cancer Report 2014.. World Health Organization. 2014, Chapter 1.1. ISBN 9283204298.
137. 'M.Dollinger, E.Rosenbaum, G.Cable eds,. "Ο Καρκίνος. Διάγνωση και πρόληψη, θεραπεία και καθημερινή αντιμετώπιση: Ένας οδηγός για όλους, 1997.'.
138. National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study.
139. A., Sudhakar. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 2009 Dec 1;1(2):1-4. doi: 10.4172/1948-5956.100000e2. PMID: 20740081.

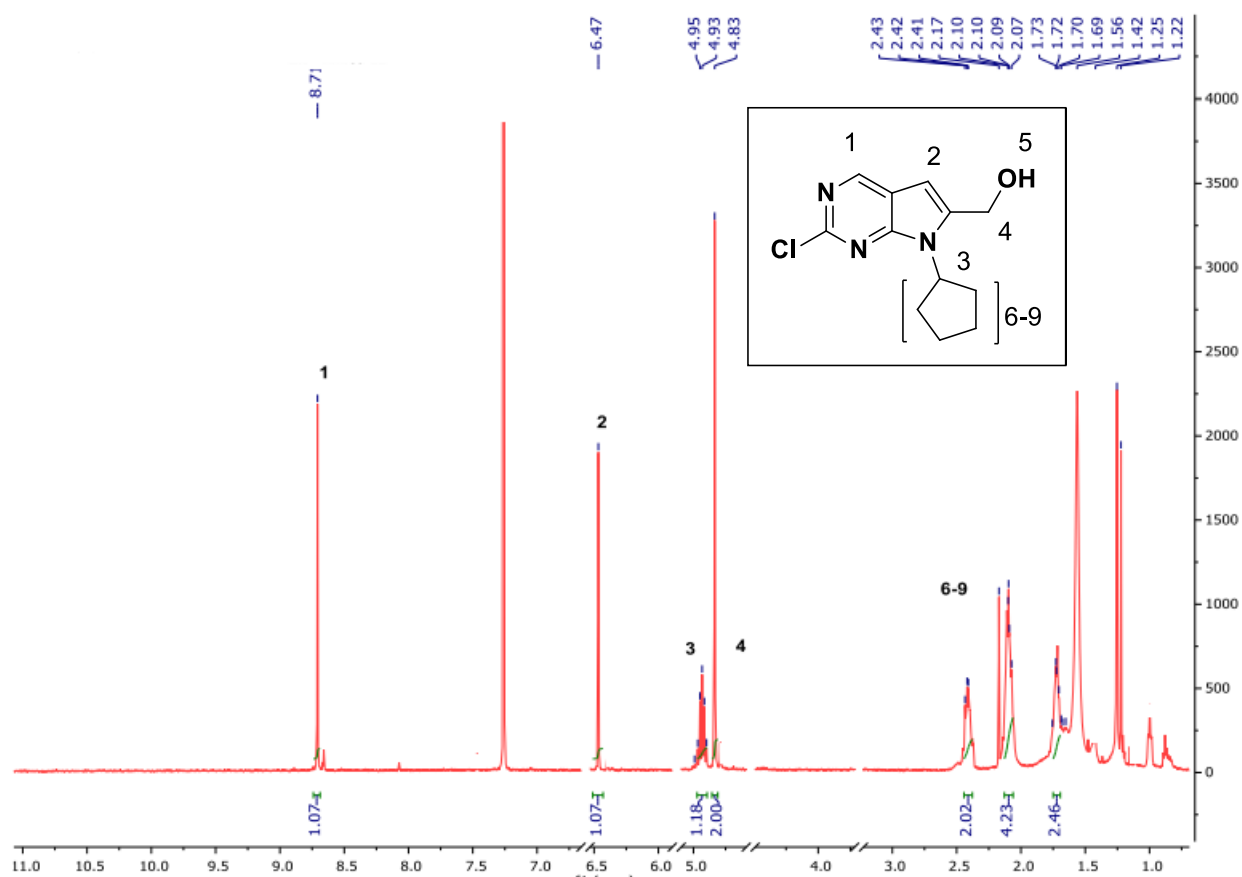
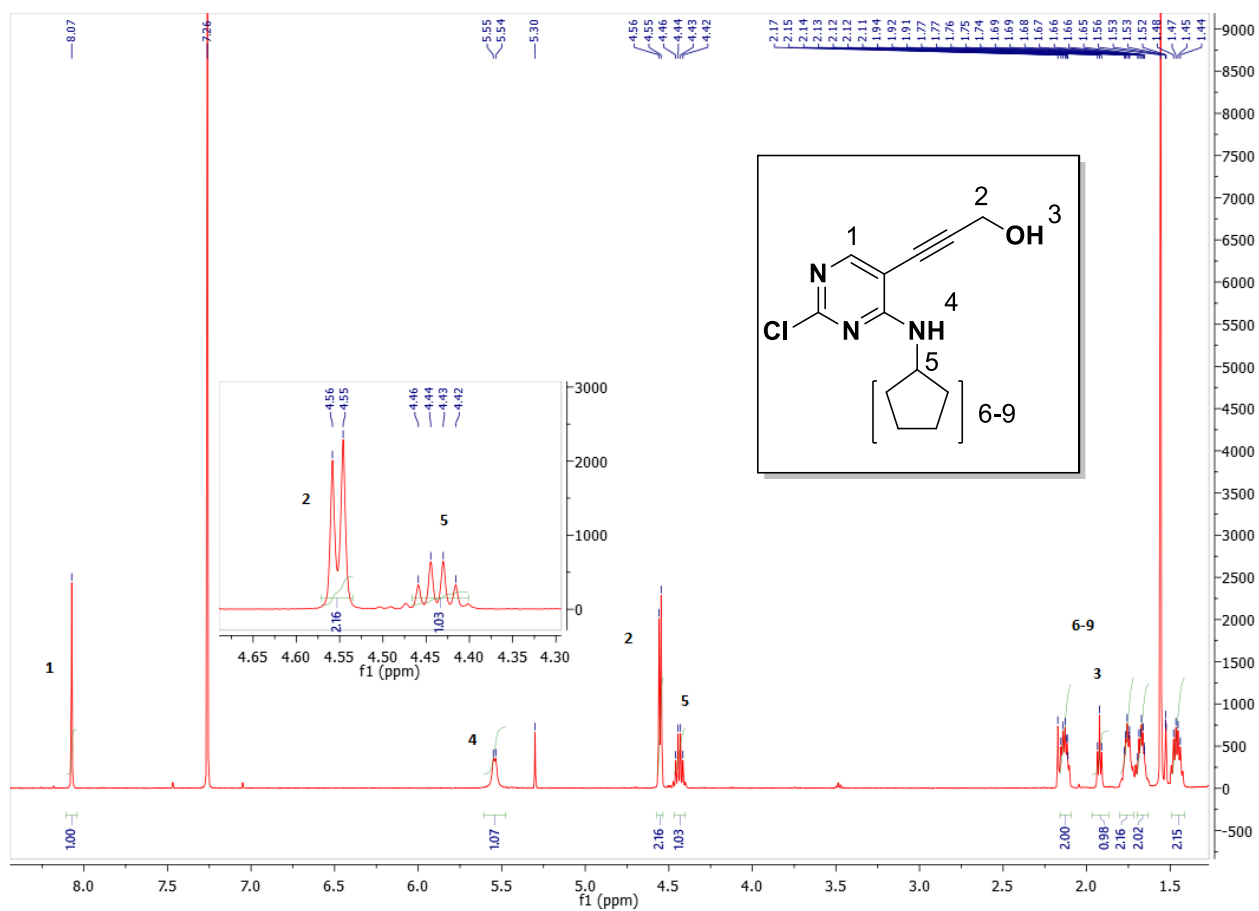
140. American cancer society-breast cancer .
141. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*. 2011;62:233-47. doi: 10.1146/annurev-med-070909-182917. PMID: 20887199; PMCID: PMC3656649.
142. Turner NC, Ro J, André F, Loi S, Verma S, Iwata H, Harbeck N, Loibl S, Huang Bartlett C, Zhang K, Giorgetti C, Randolph S, Koehler M, Cristofanilli M. PALOMA3 Study Group. Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Jul 16;373(3):209-19. doi: 10.1056/NEJMoa1505270. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26030518.
143. "Novartis LEE011 (Ribociclib) granted FDA Priority Review for first-line treatment of HR+/HER2- advanced breast cancer". Novartis.
144. CDK4/6 Inhibitors: Where They Are Now and Where They Are Headed in the Future, A Conversation With Geoffrey I. Shapiro, MD, PhD.
145. Tripathy D, Bardia A, Sellers WR. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2017 Jul 1;23(13):3251-3262. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3157. Epub 2017 Mar 28. PMID: 2835192.
146. eorge Mridula A., Qureshi Sadaf, Omene Coral, Toppmeyer Deborah L., Ganesan Shridar. "Clinical and Pharmacologic Differences of CDK4/6 Inhibitors in Breast Cancer". *Frontiers in Oncology*. //www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.693104 , 2021, 11.
147. No results for ". Spencer L. Seager, Michael R. Slabaugh. *Chemistry for Today: general, organic, and biochemistry*. s.l. : Thomson Brooks/Cole.
148. ., Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov 26;324(4):1155-64. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.171. PMID: 15504335.
149. Jr., Roskoski R. Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol Res*. 2016 Jan;103:26-48. doi: 10.1016/j.phrs.2015.10.021. Epub 2015 Oct 31. PMID: 26529477.
150. Tripathy D, Bardia A, Sellers WR. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2017 Jul 1;23(13):3251-3262. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-315.
151. Wagner, V., Gil, J. Senescence as a therapeutically relevant response to CDK4/6 inhibitors. *Oncogene* 39, 5165–5176 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1354-9>.
152. McCartney A, Moretti E, Sanna G, Pestrin M, Risi E, Malorni L, Biganzoli L, Di Leo A. The role of abemaciclib in treatment of advanced breast cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2018 May

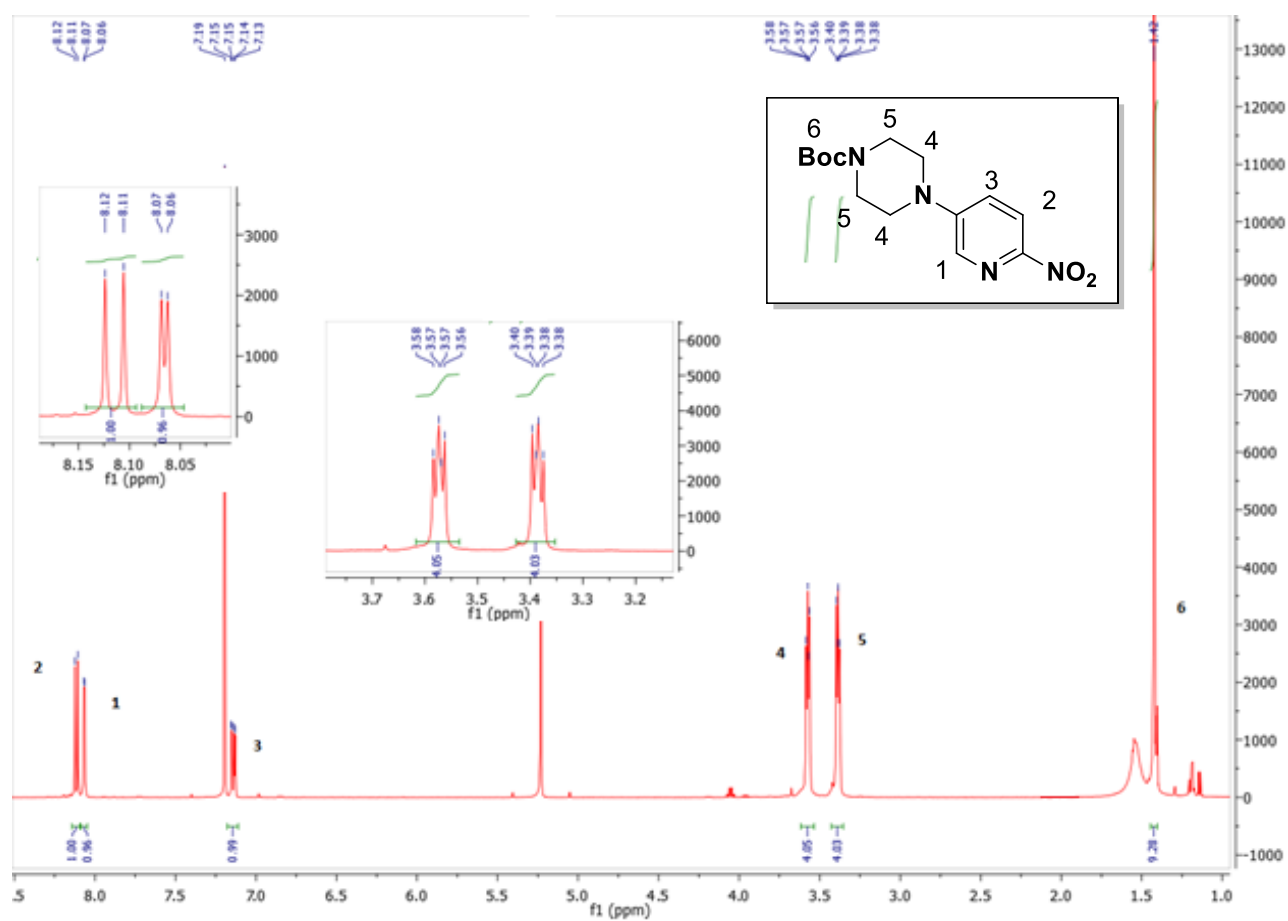
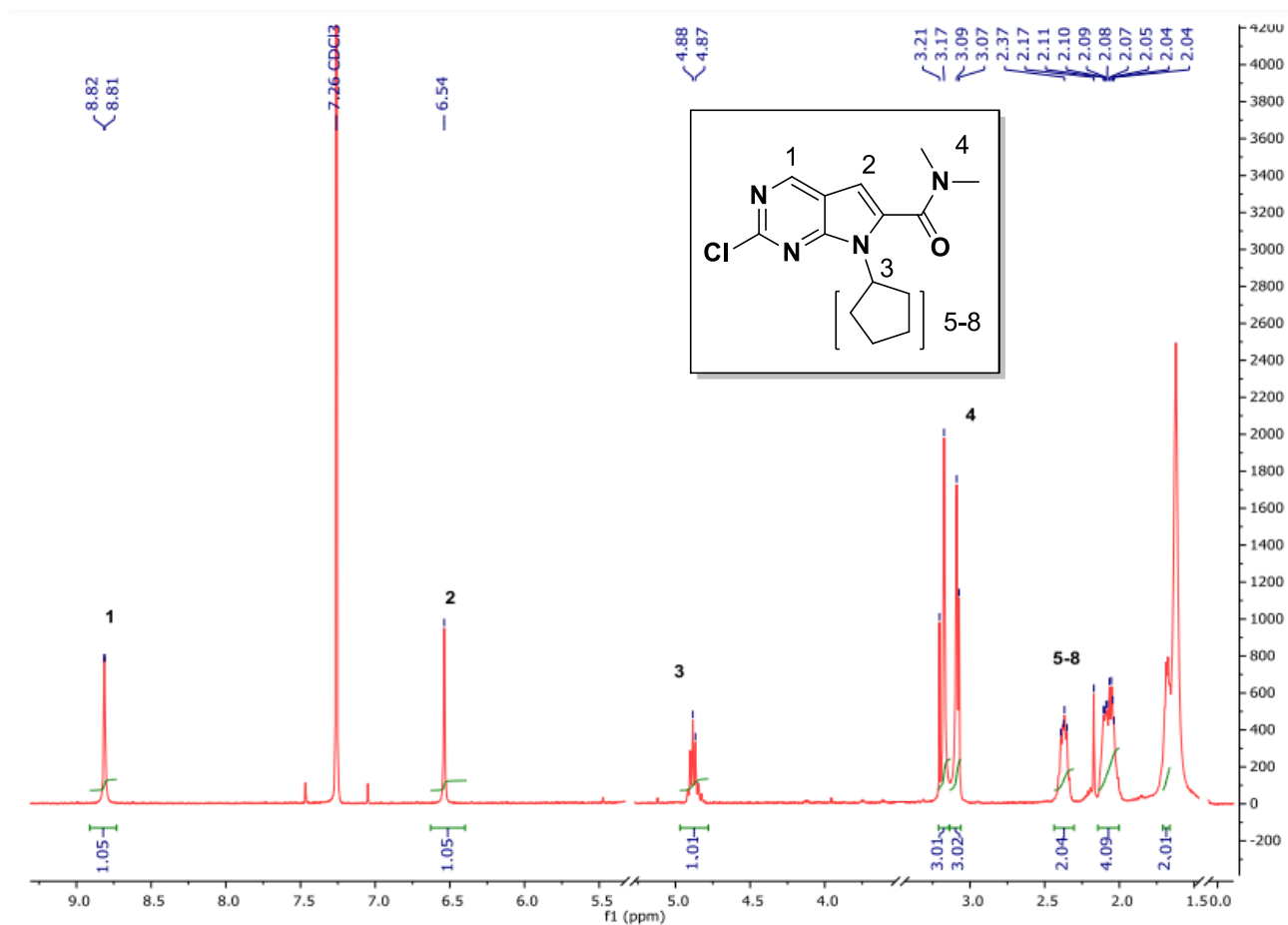
31;10:1758835918776925. doi: 10.1177/1758835918776925. PMID: 29899762; PMCID.

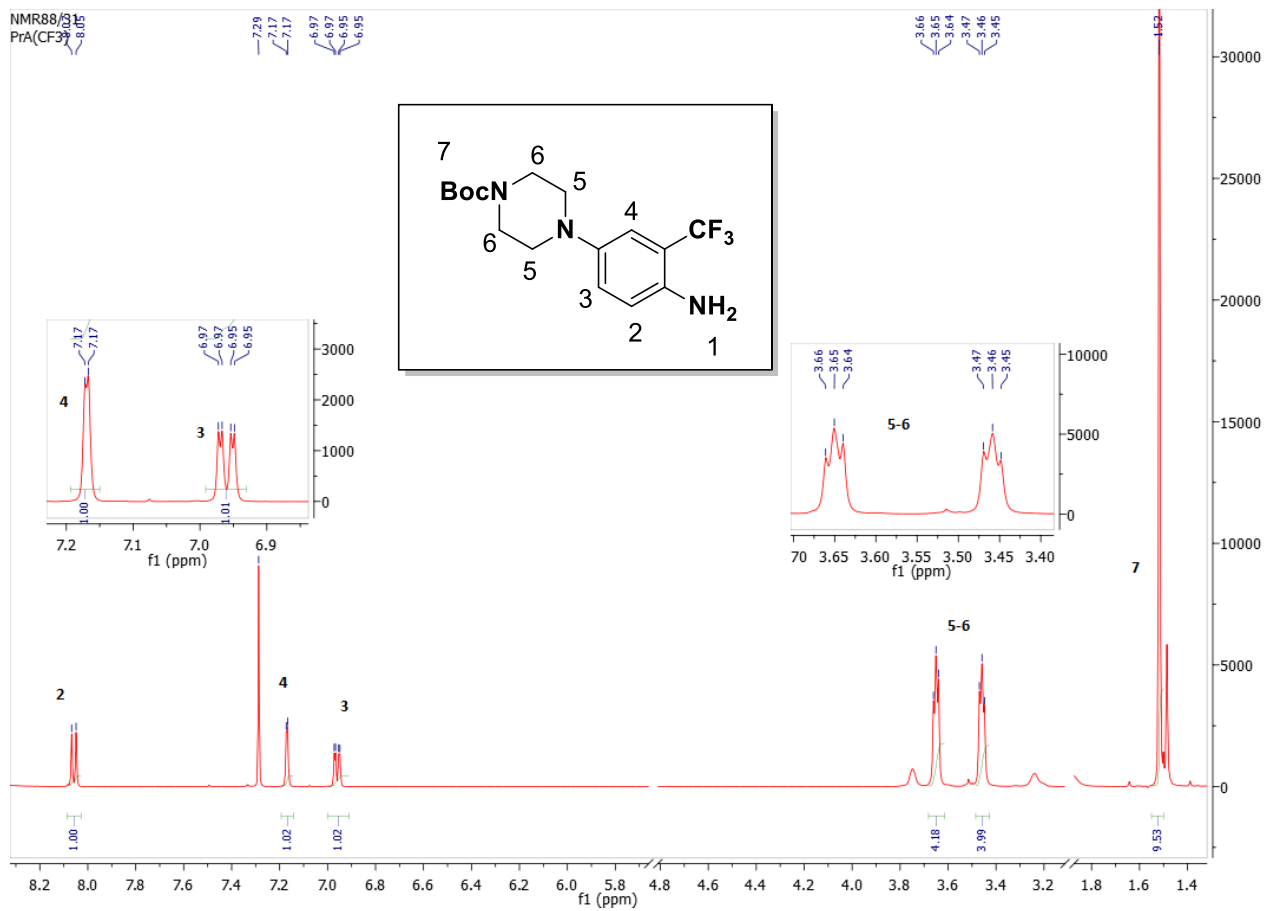
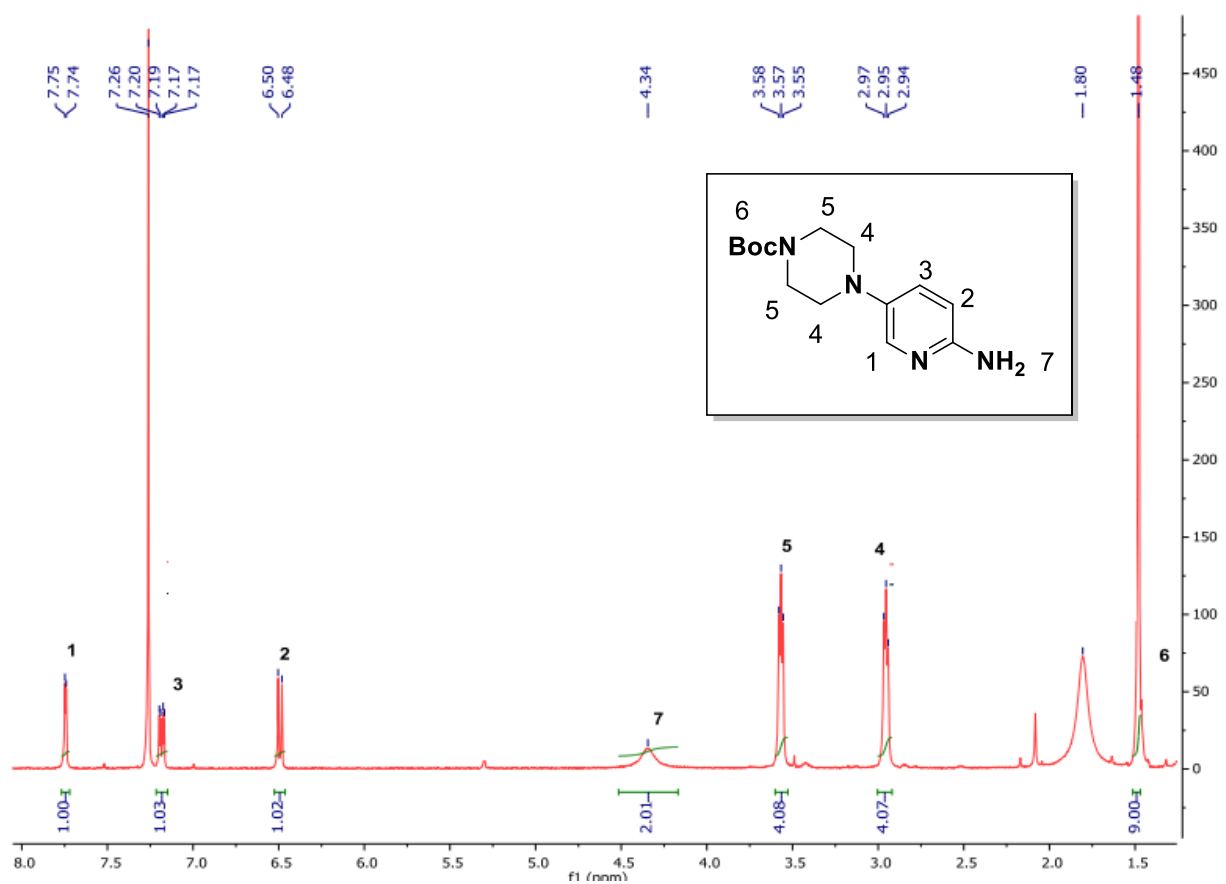
153. Hortobagyi, G.N. Ribociclib for the first-line treatment of advanced hormone receptor-positive breast cancer: a review of subgroup analyses from the MONALEESA-2 trial. *Breast Cancer Res* 20, 123 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1050-7>.

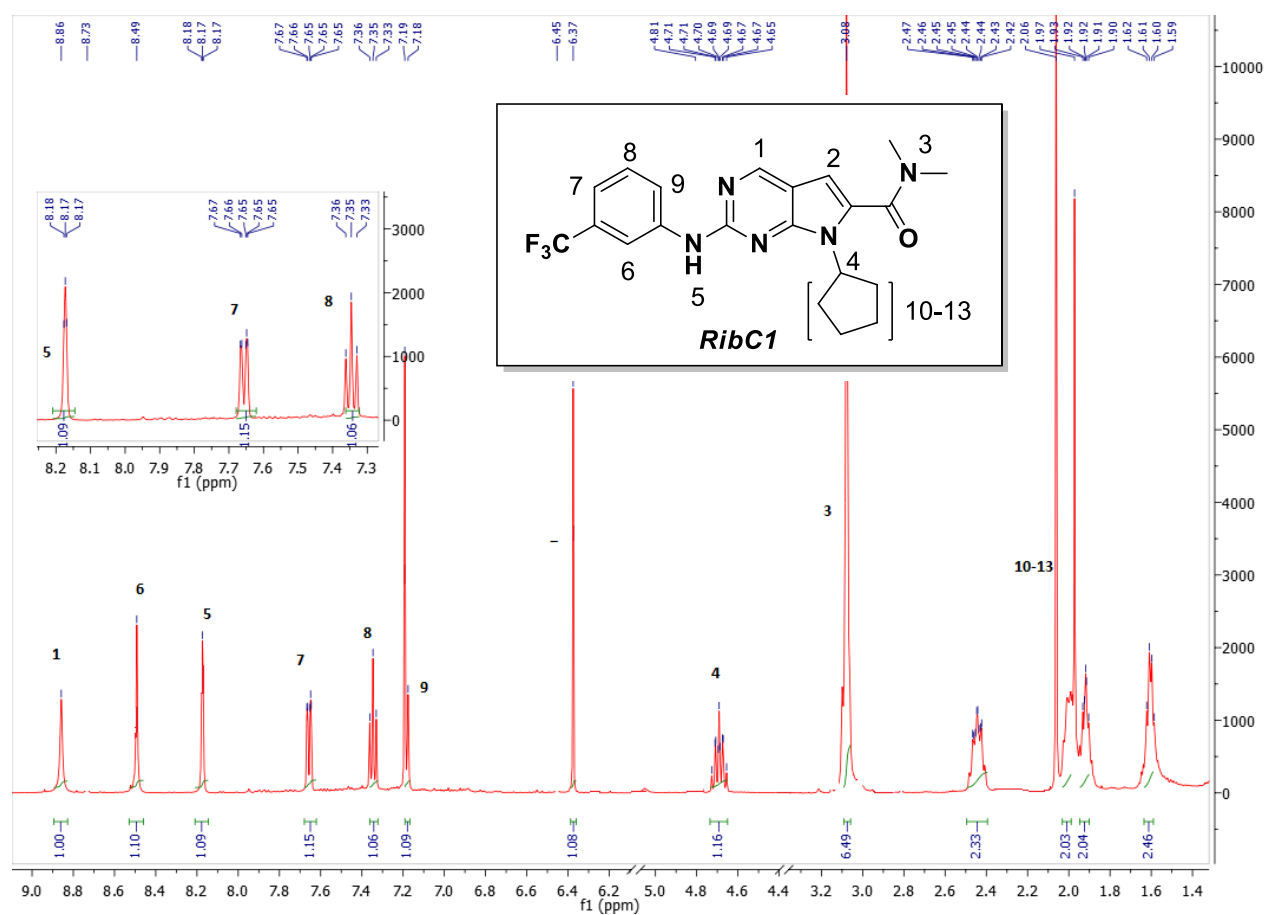
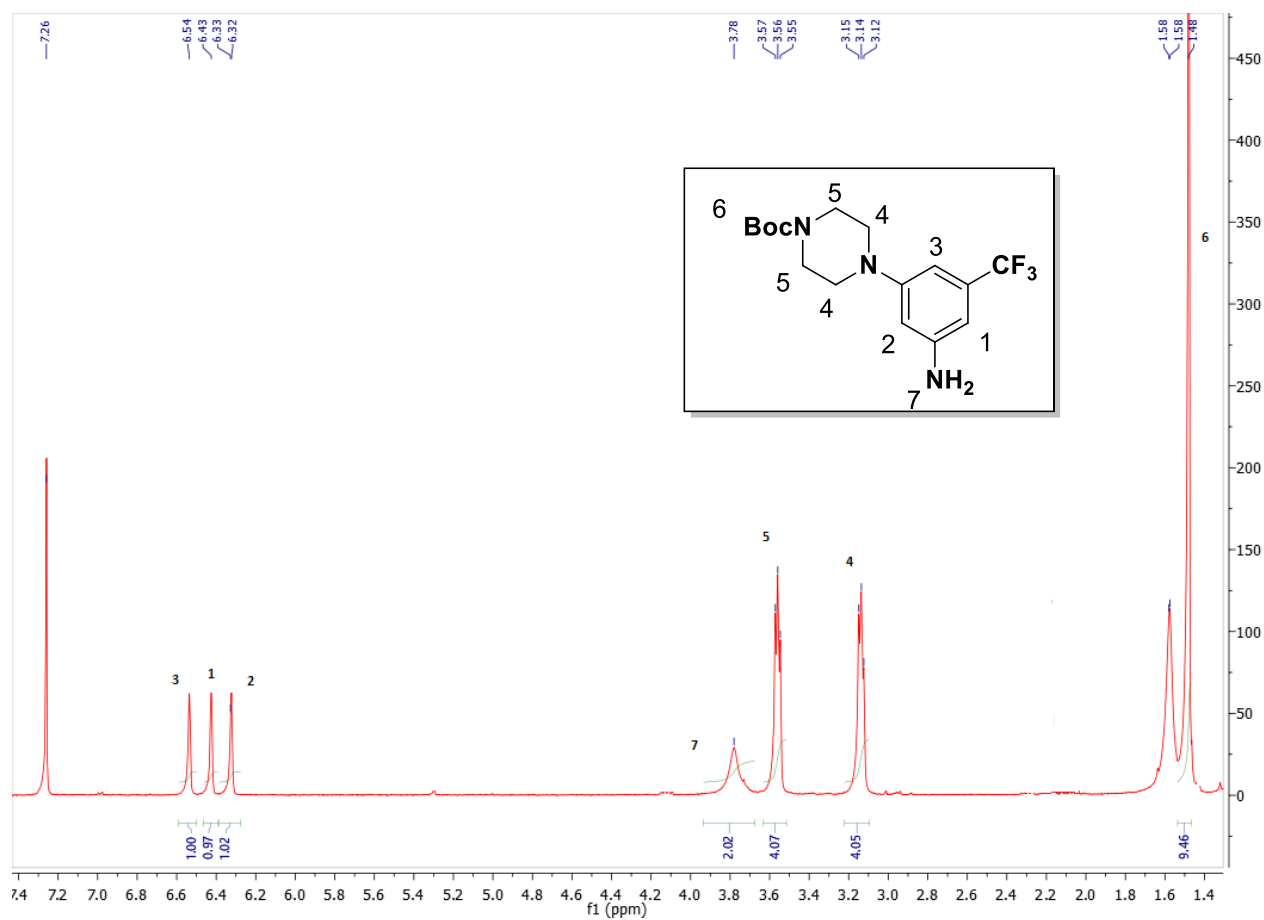
Παράρτημα

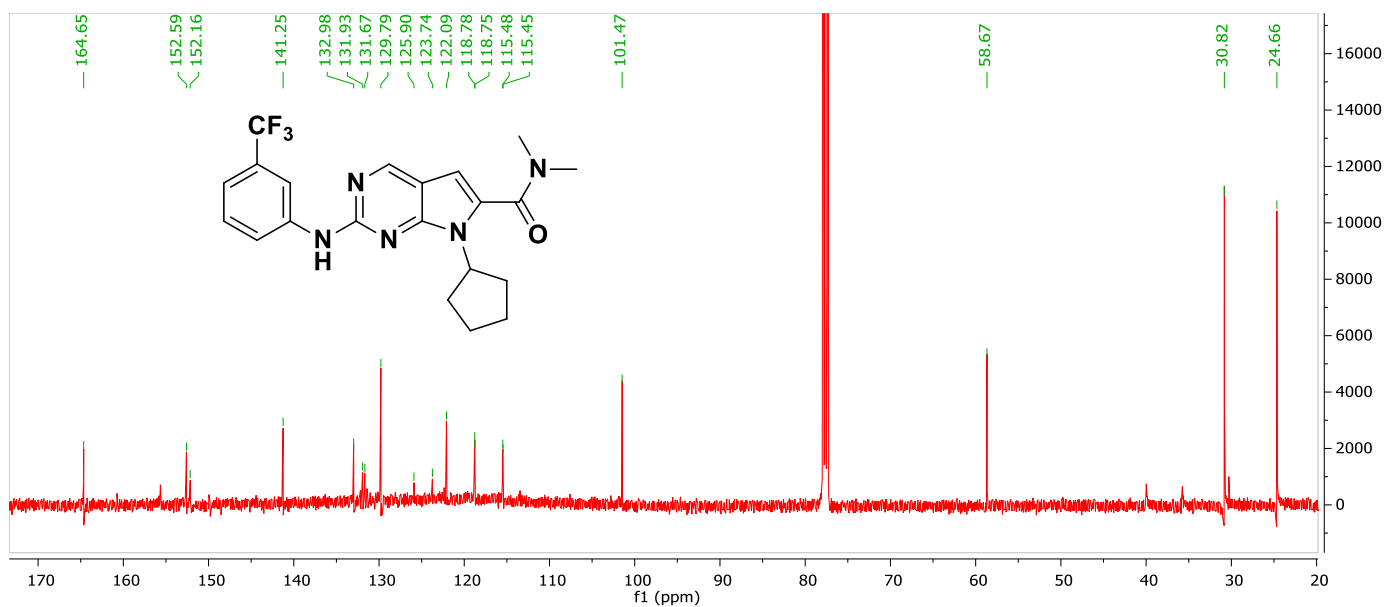


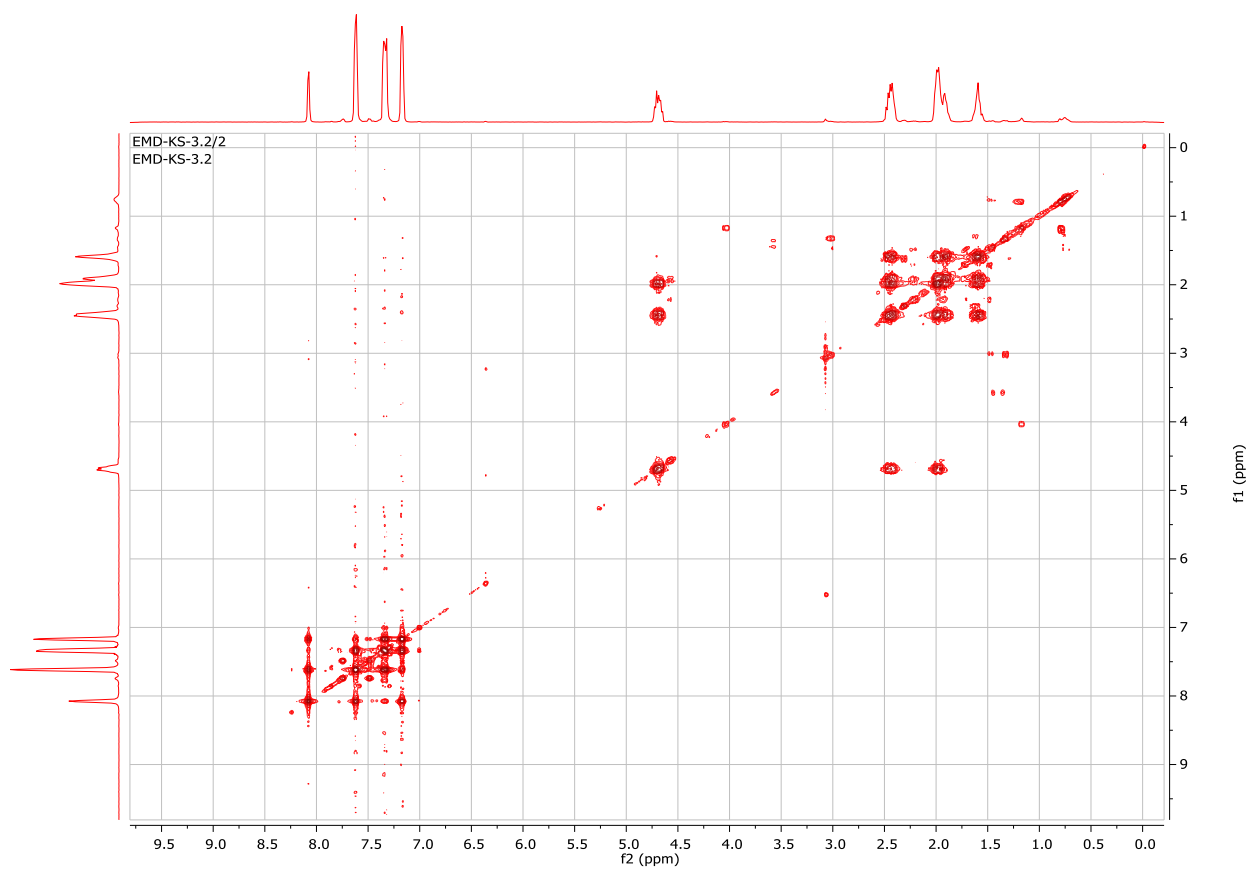
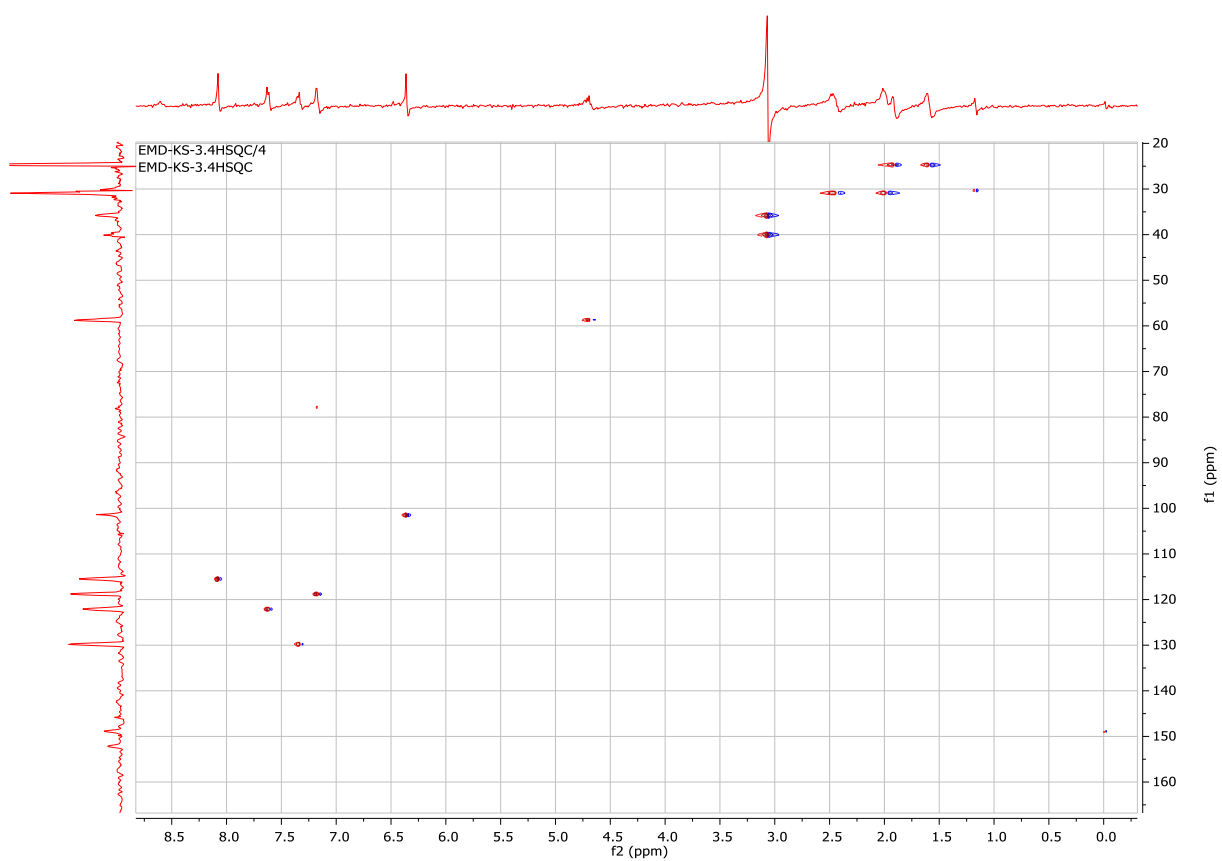


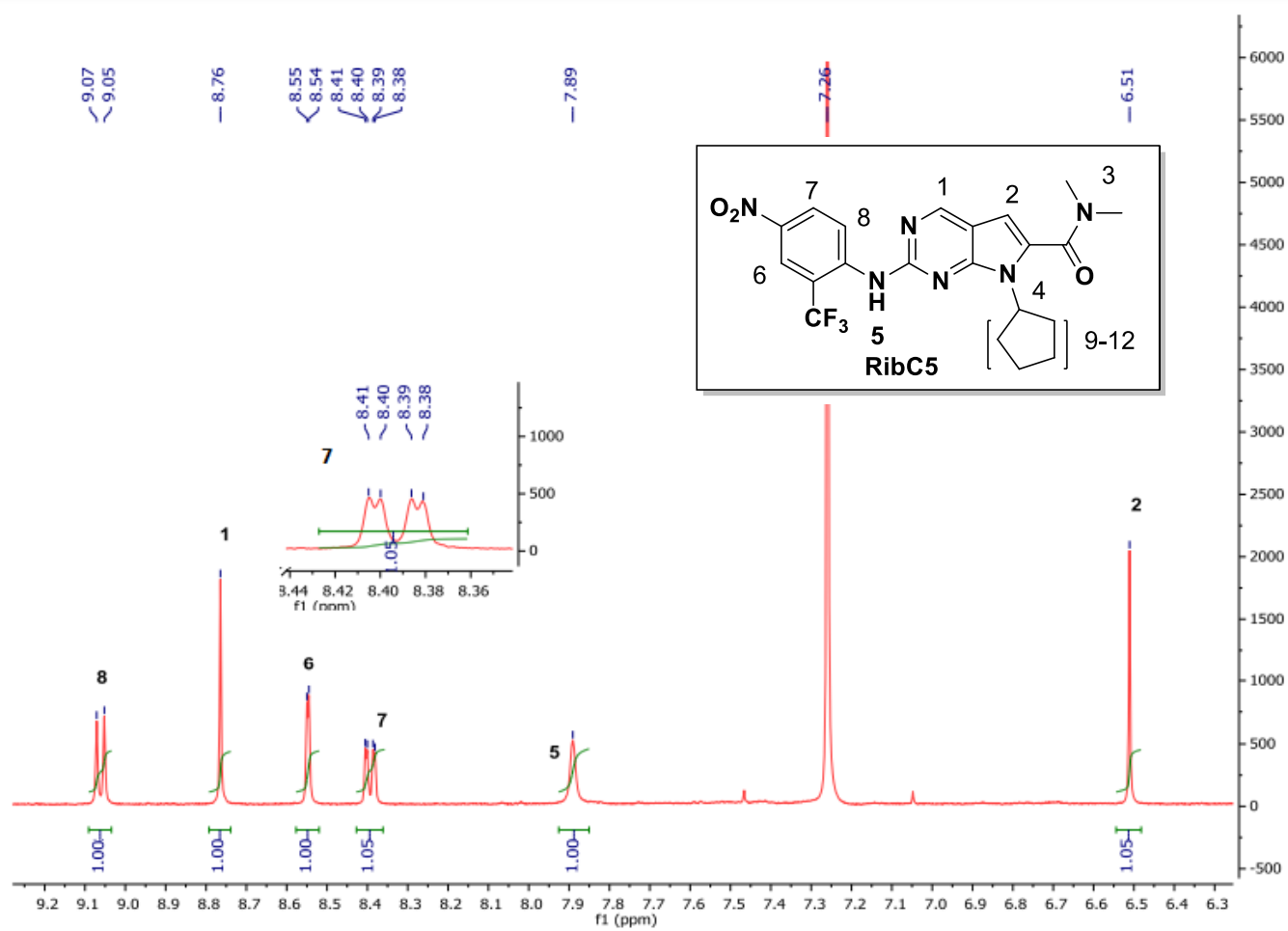
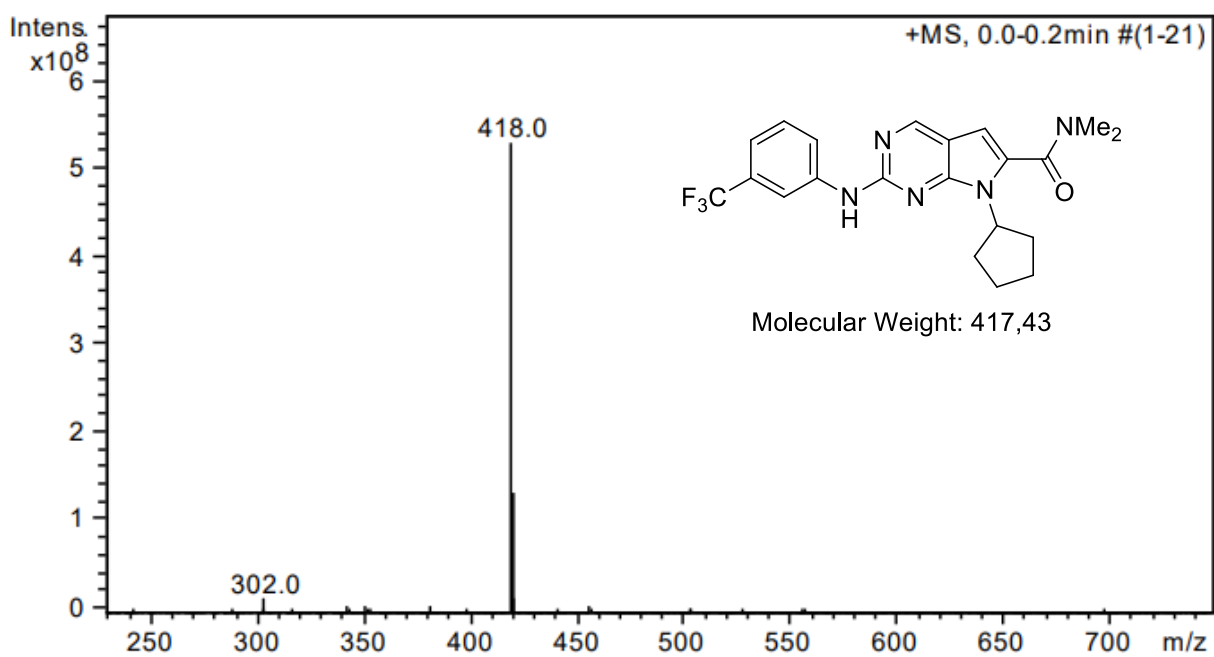


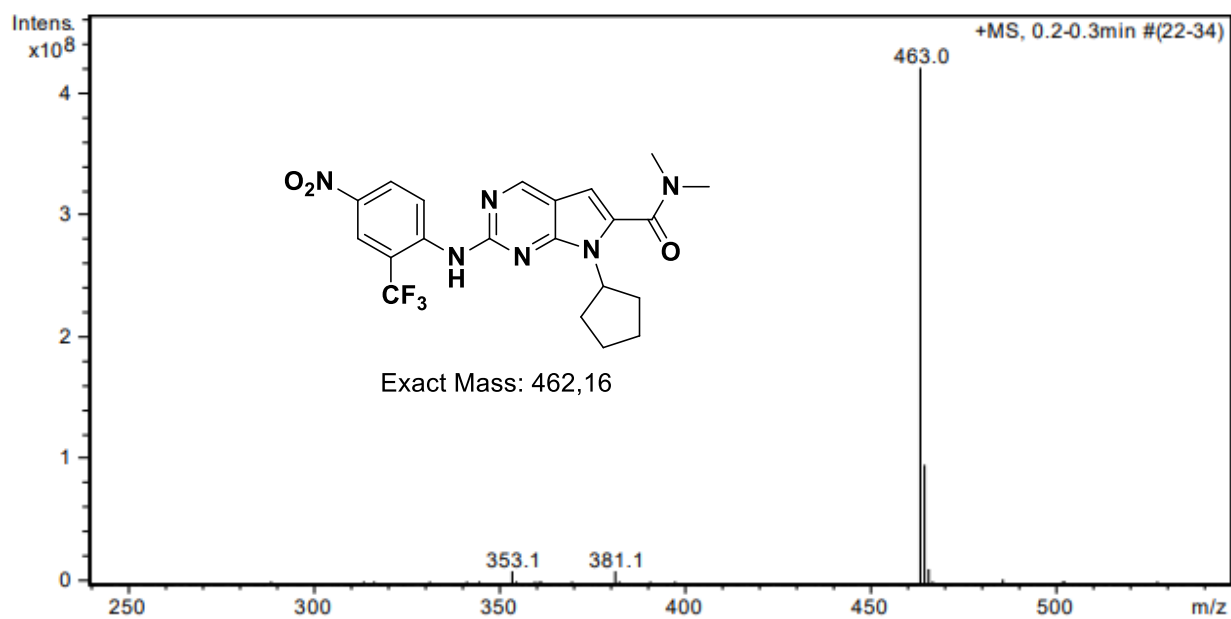
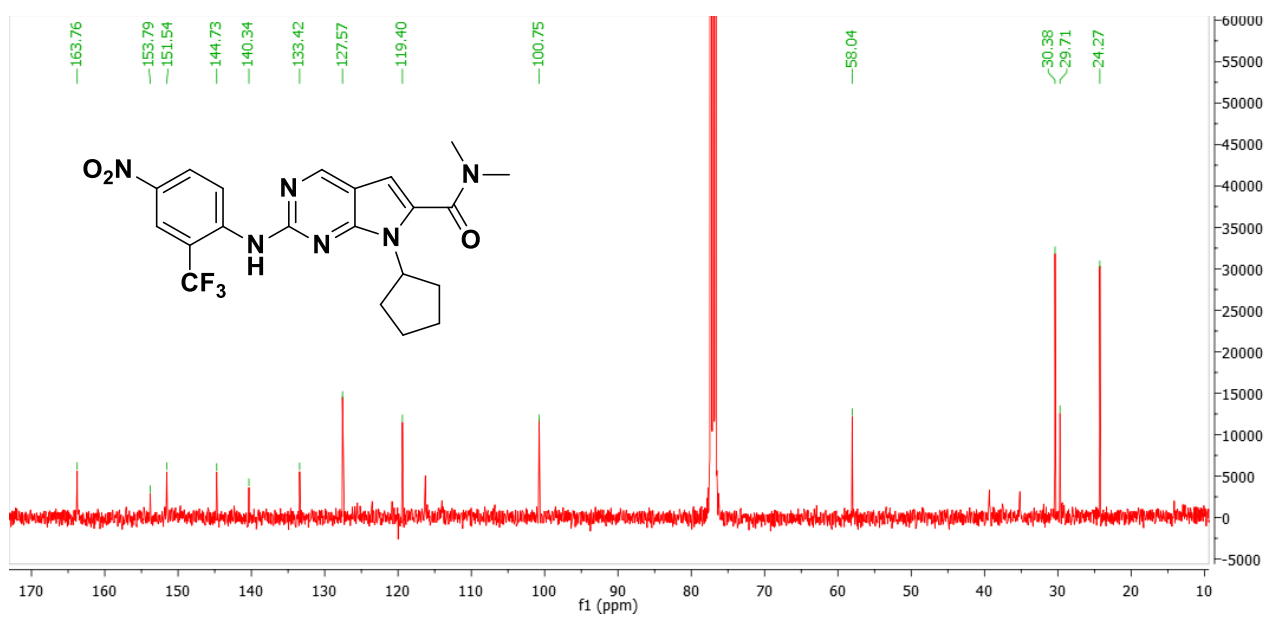


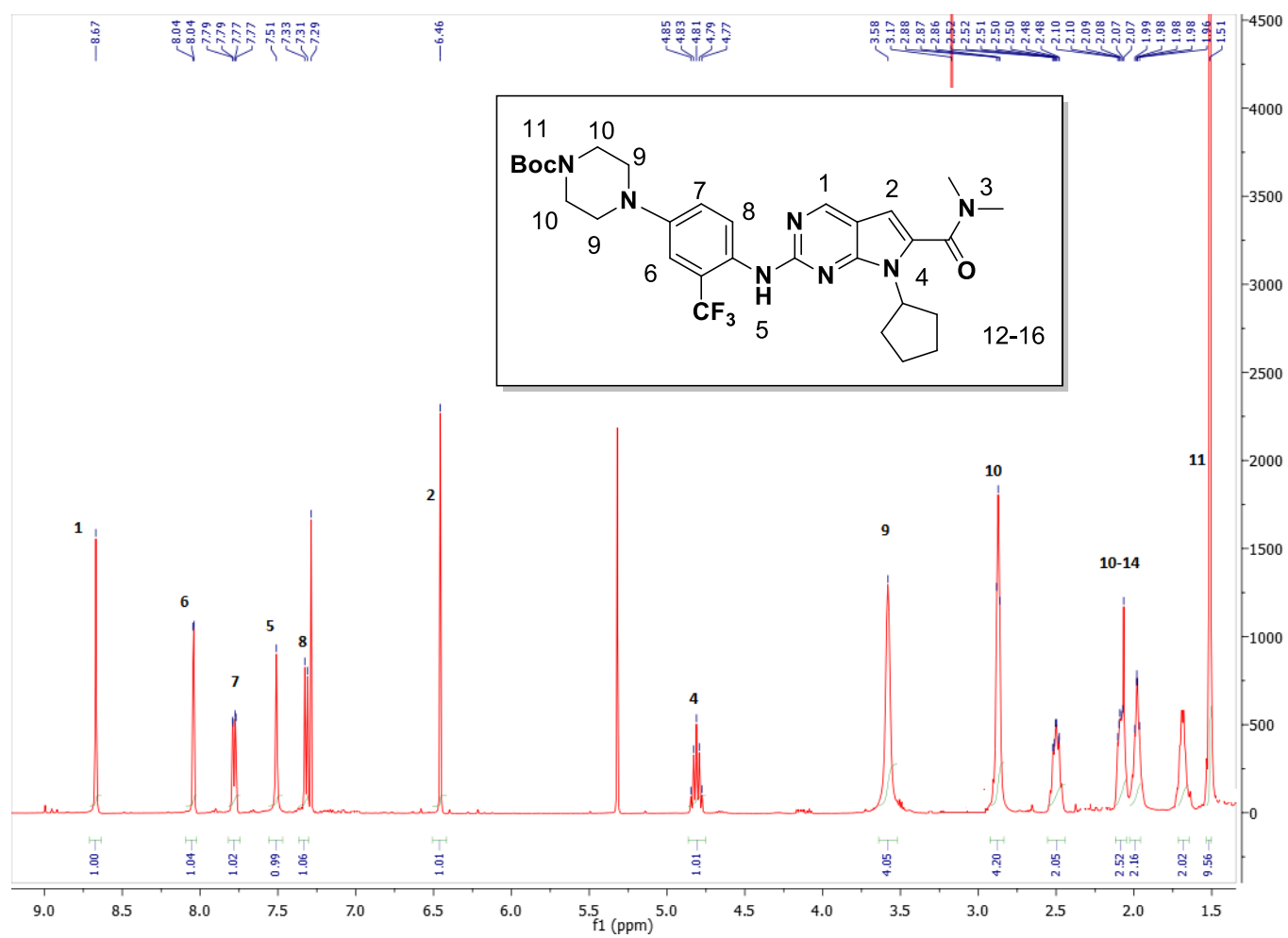


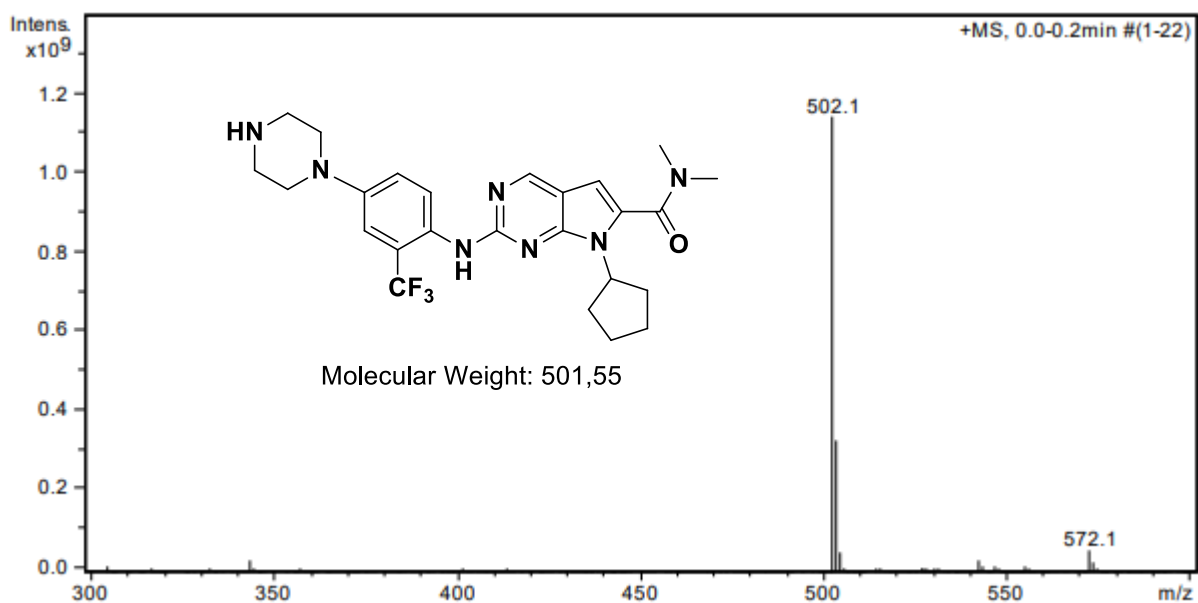
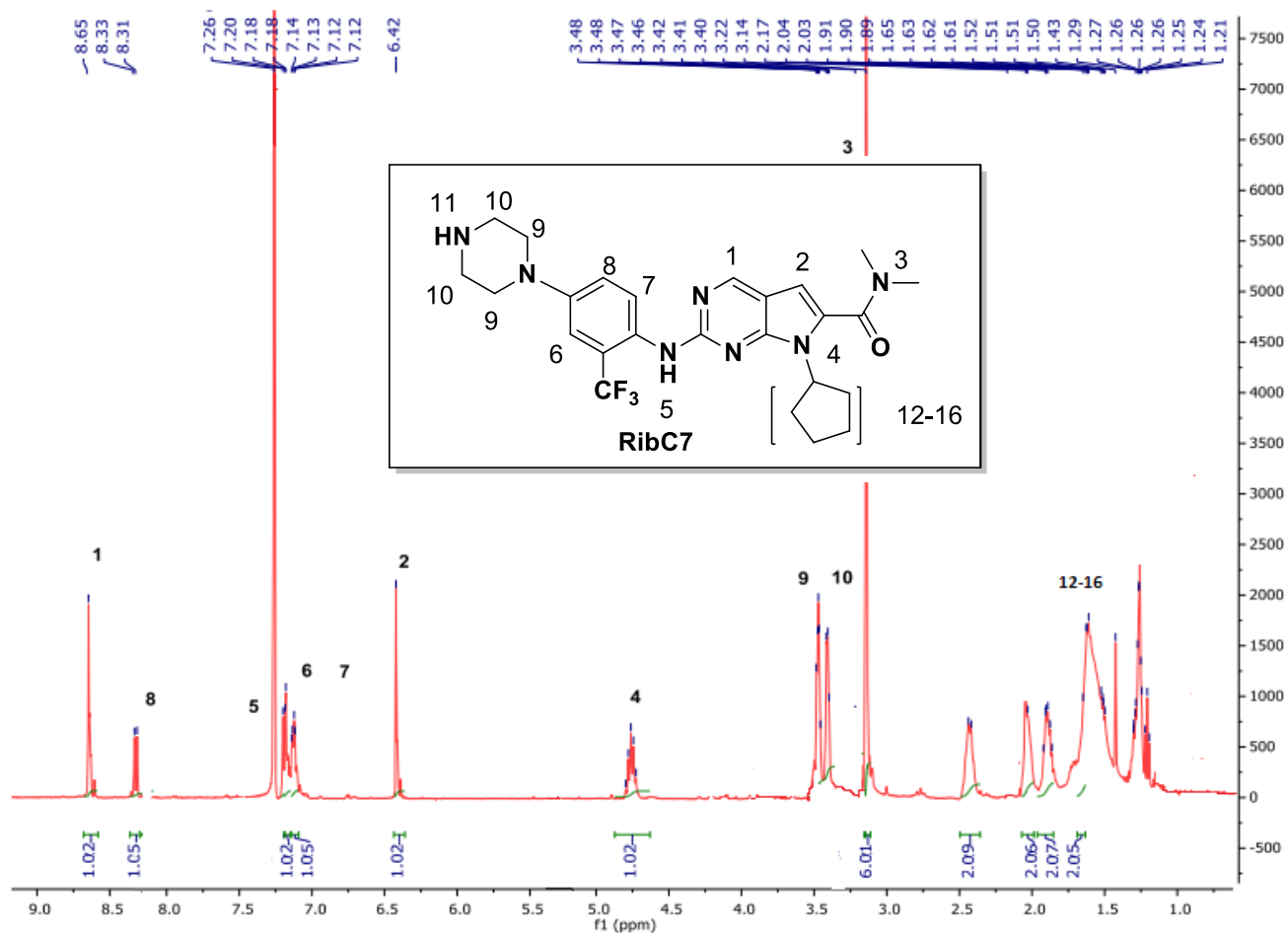


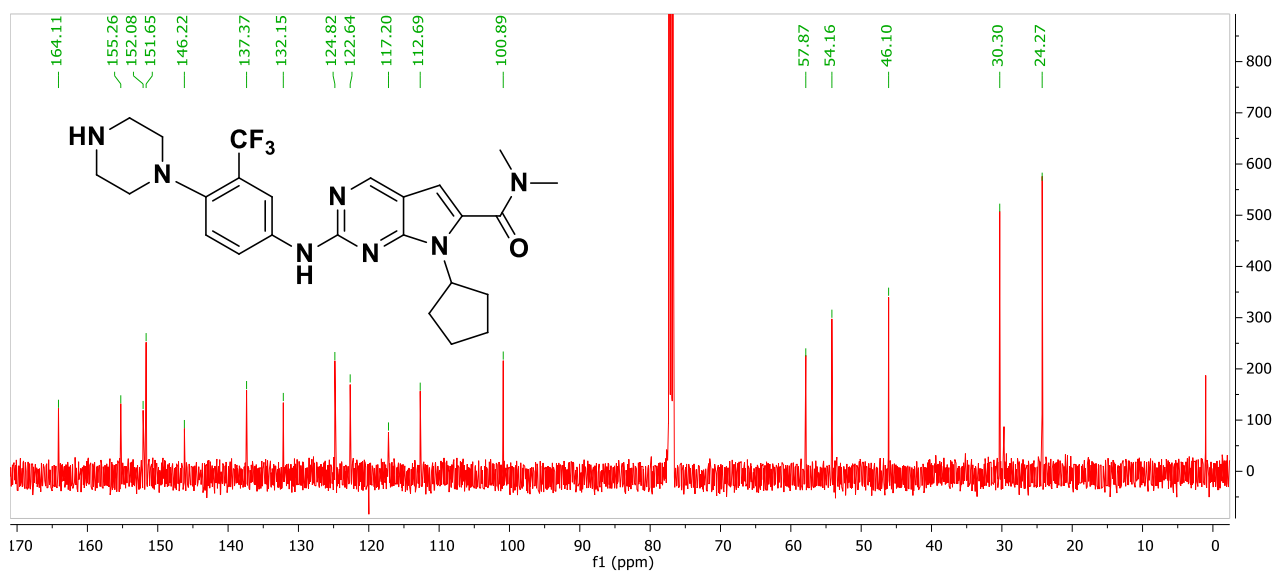
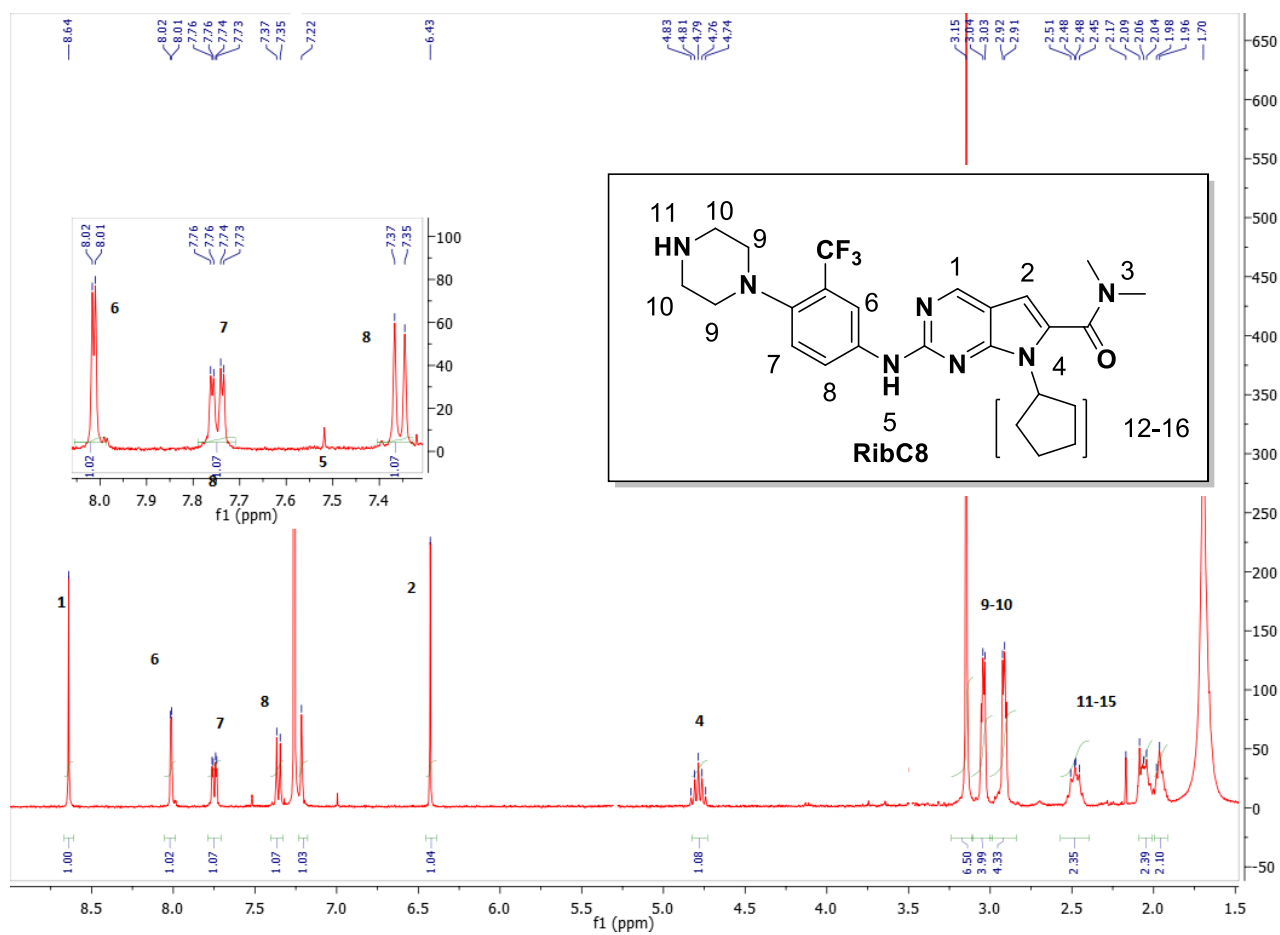


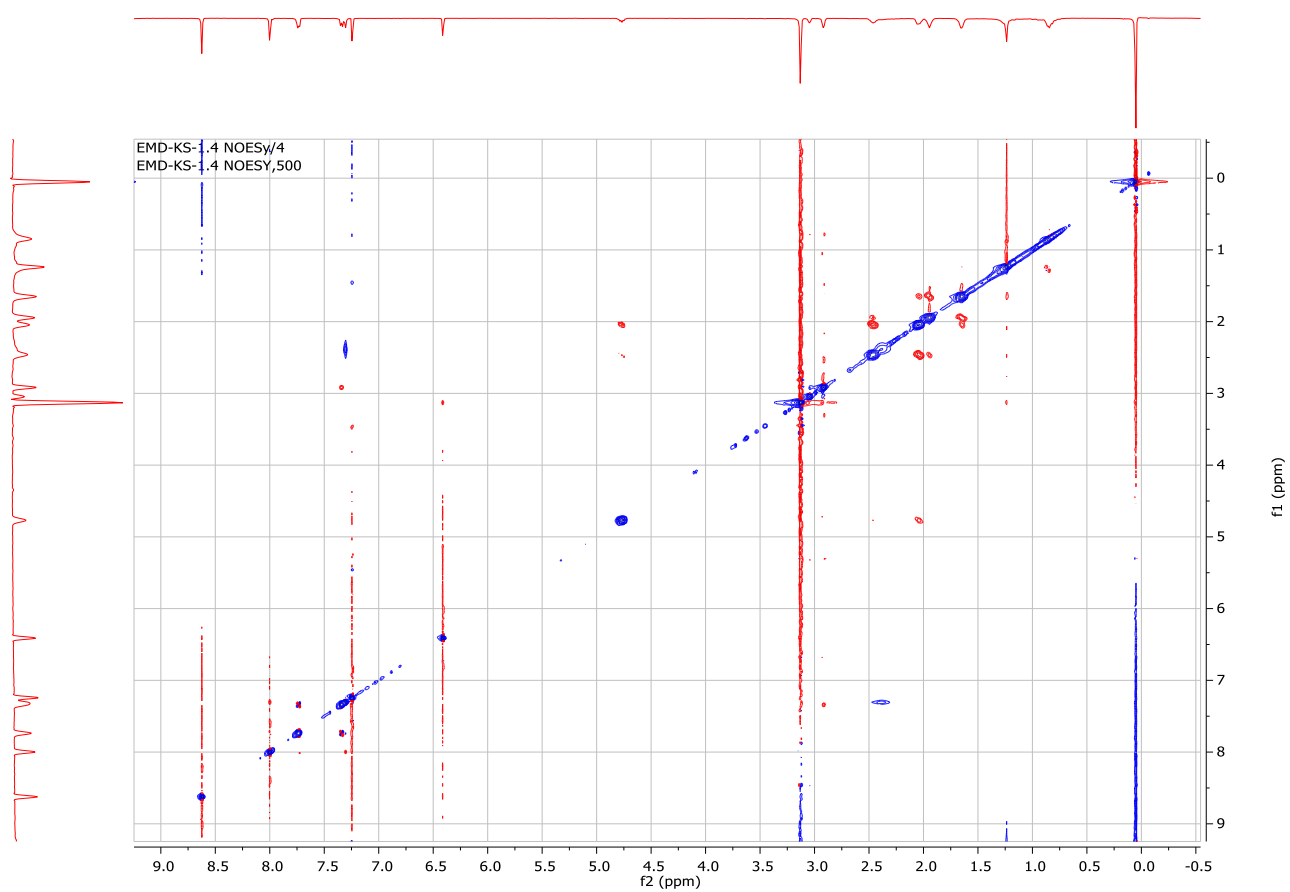
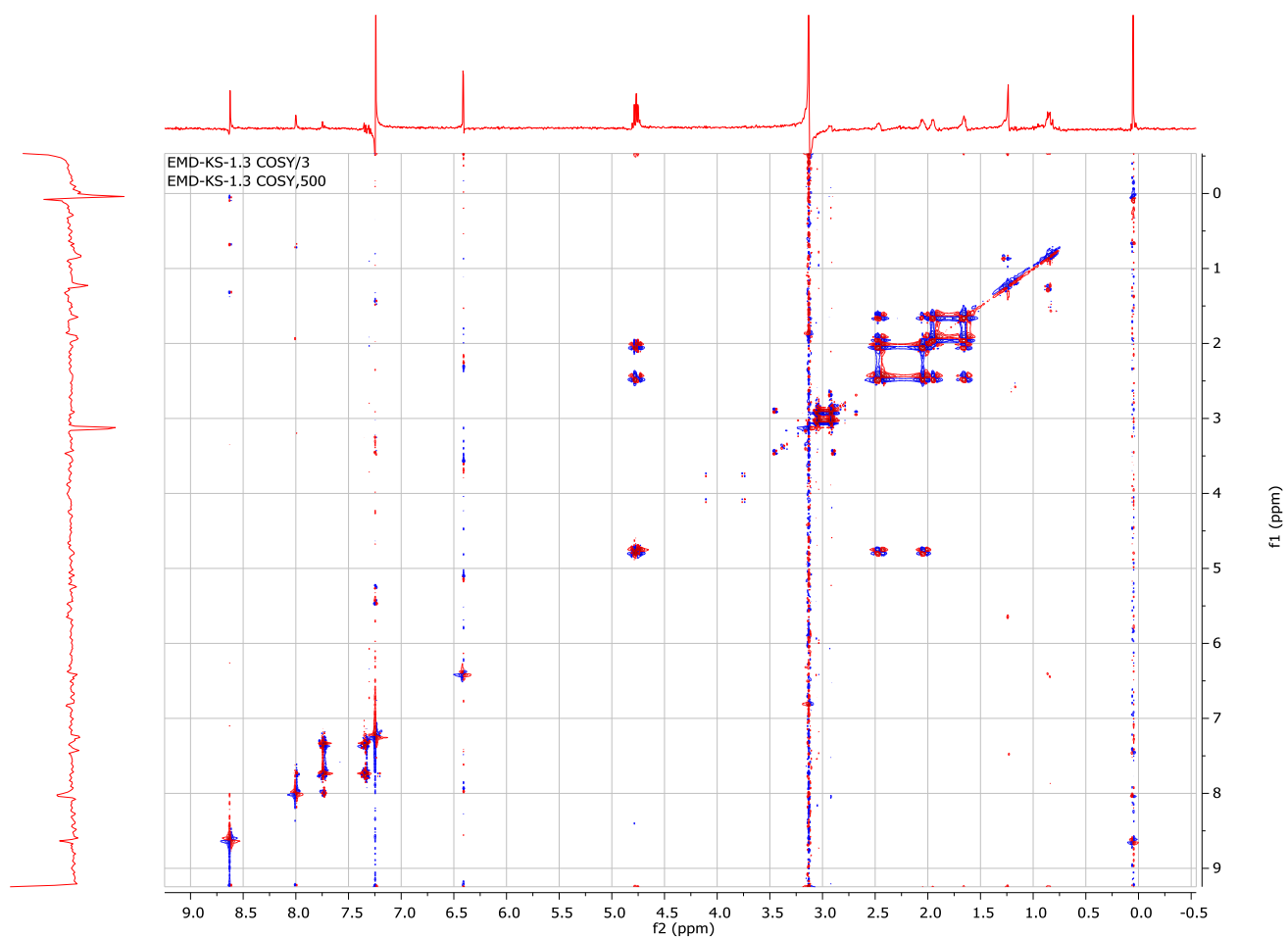


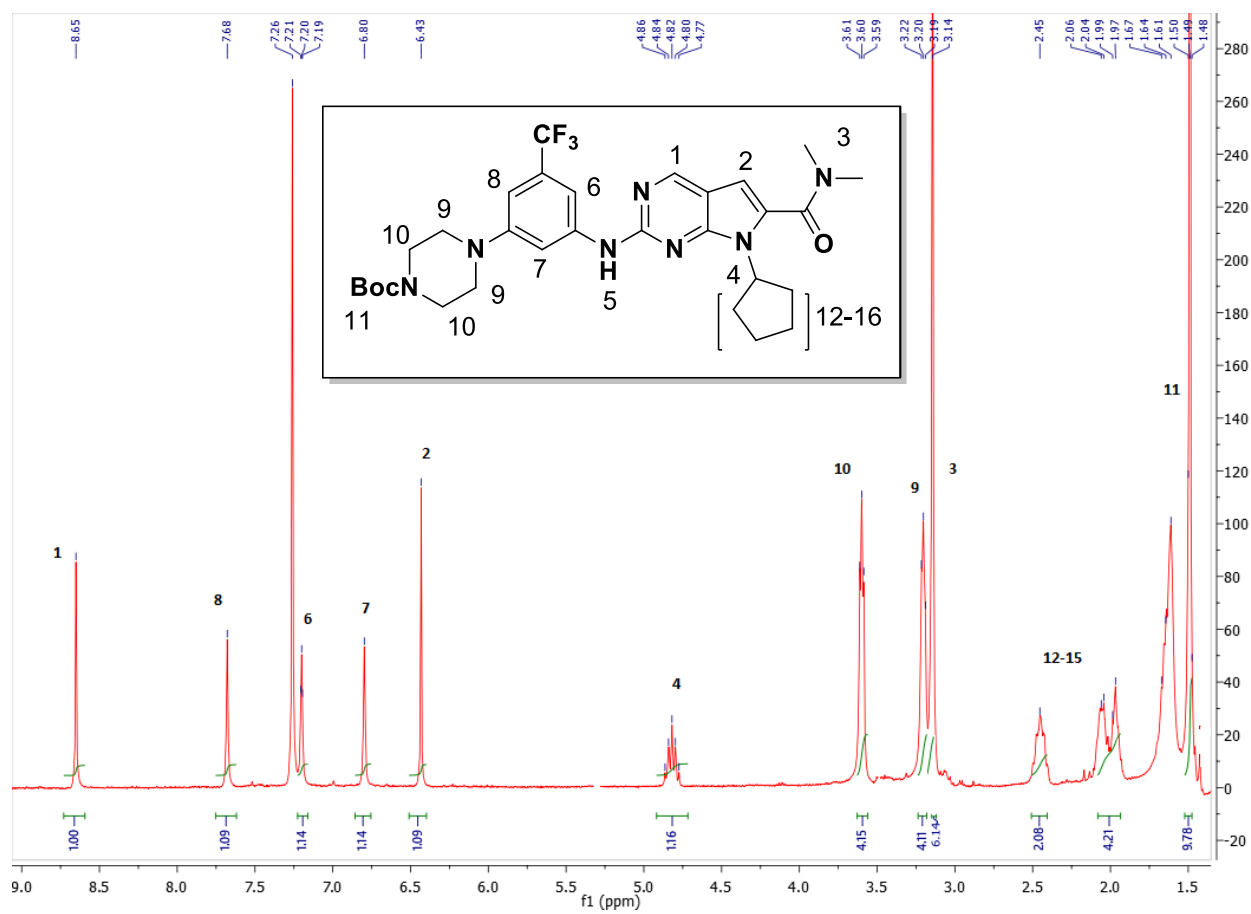
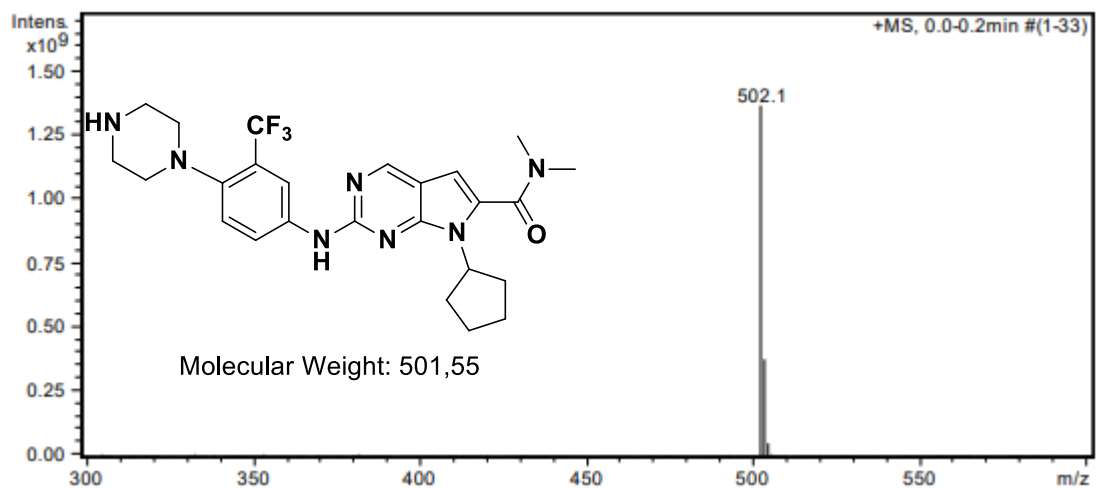


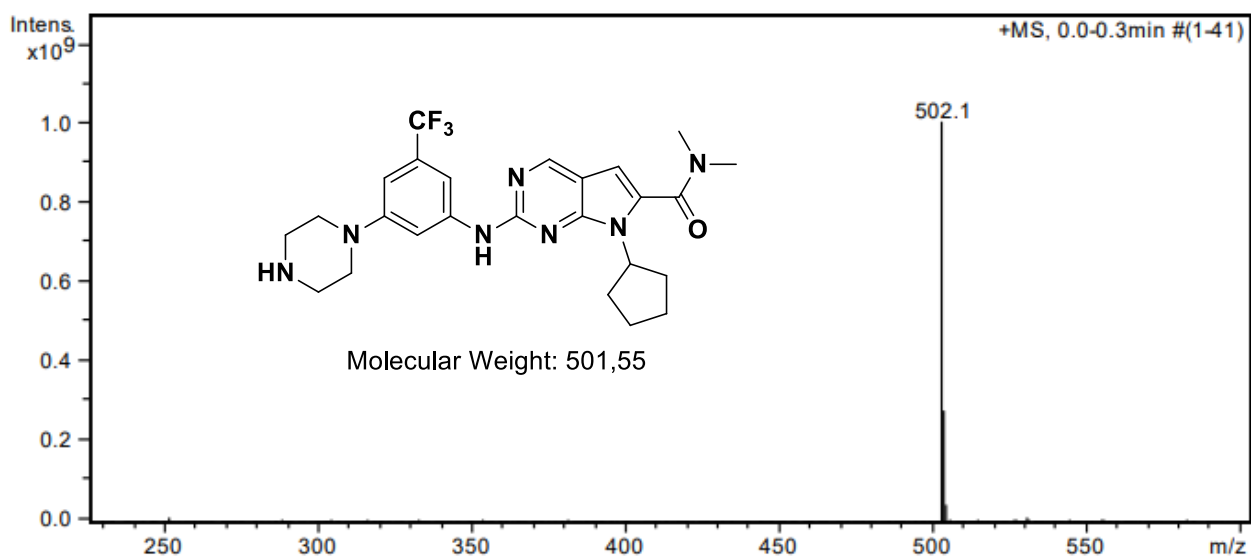
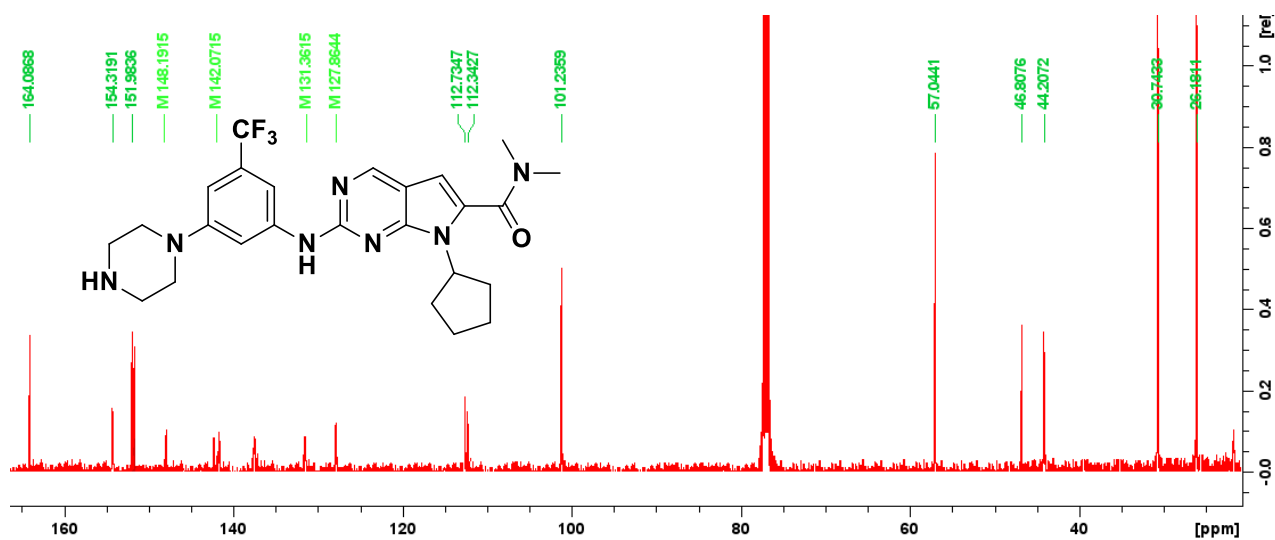


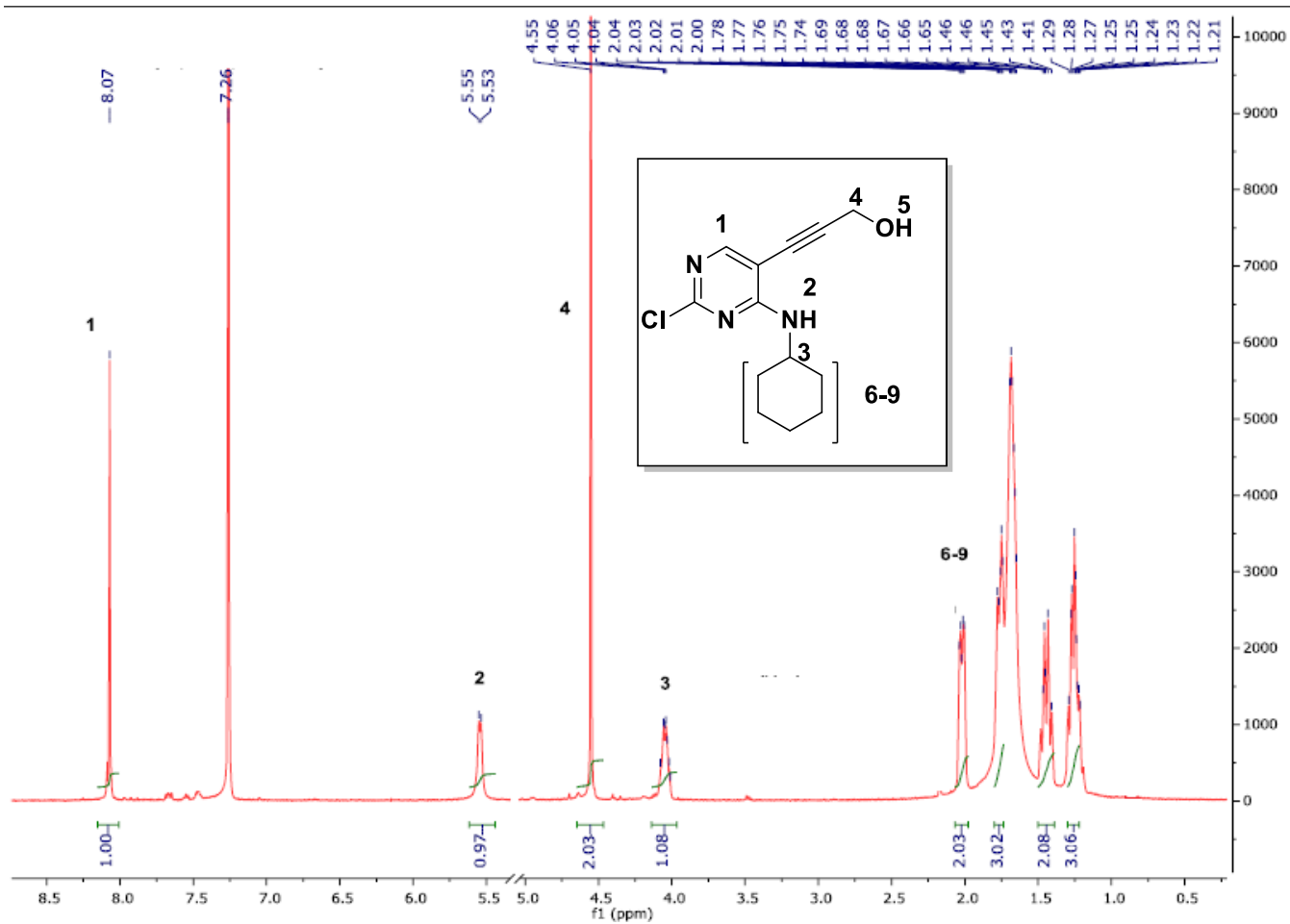
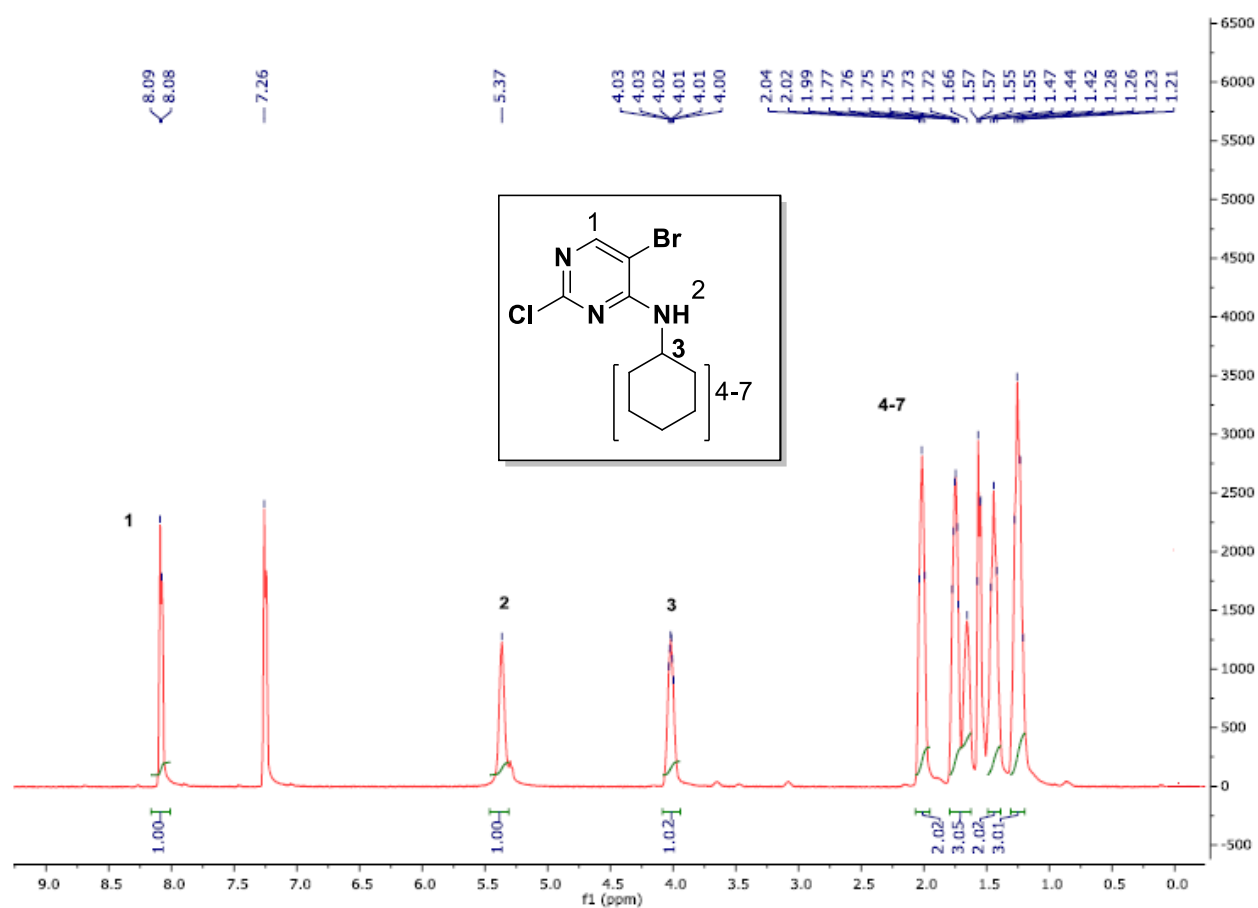


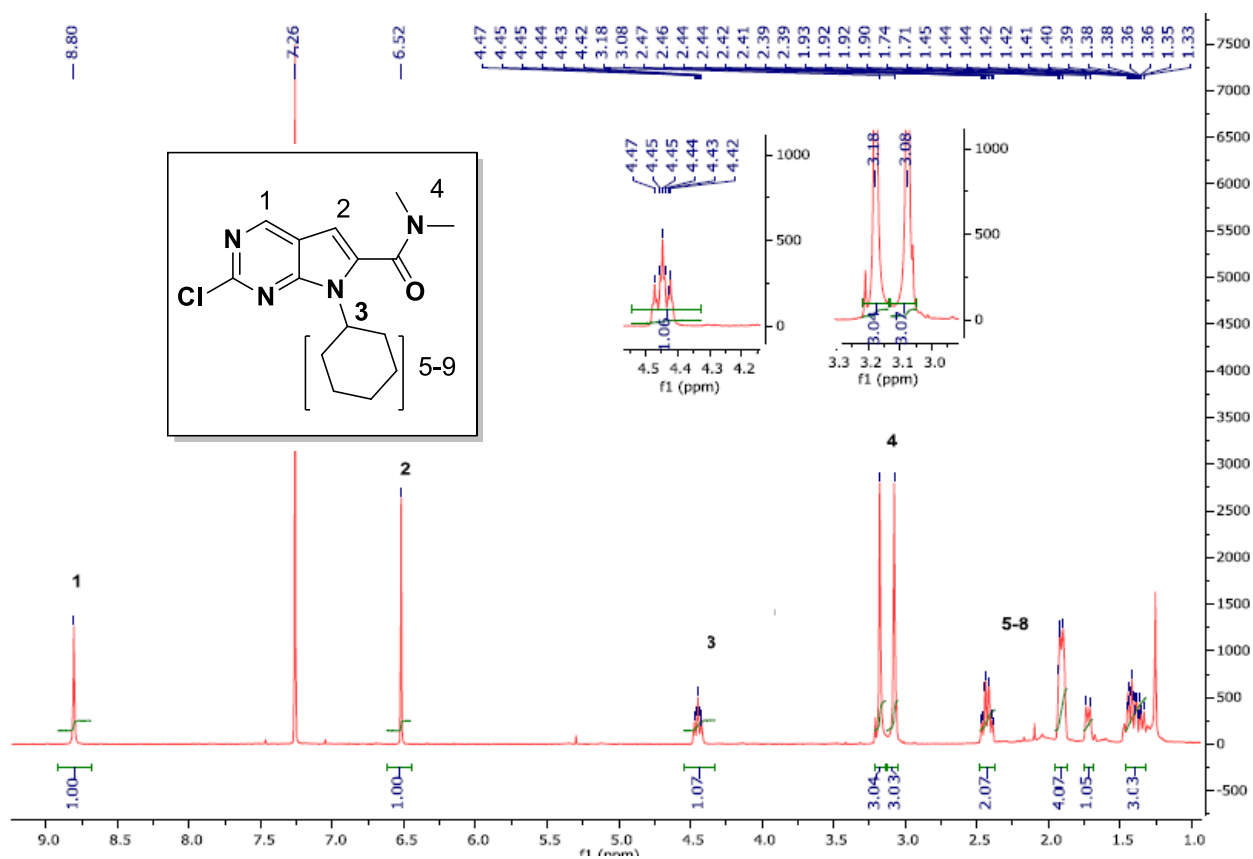
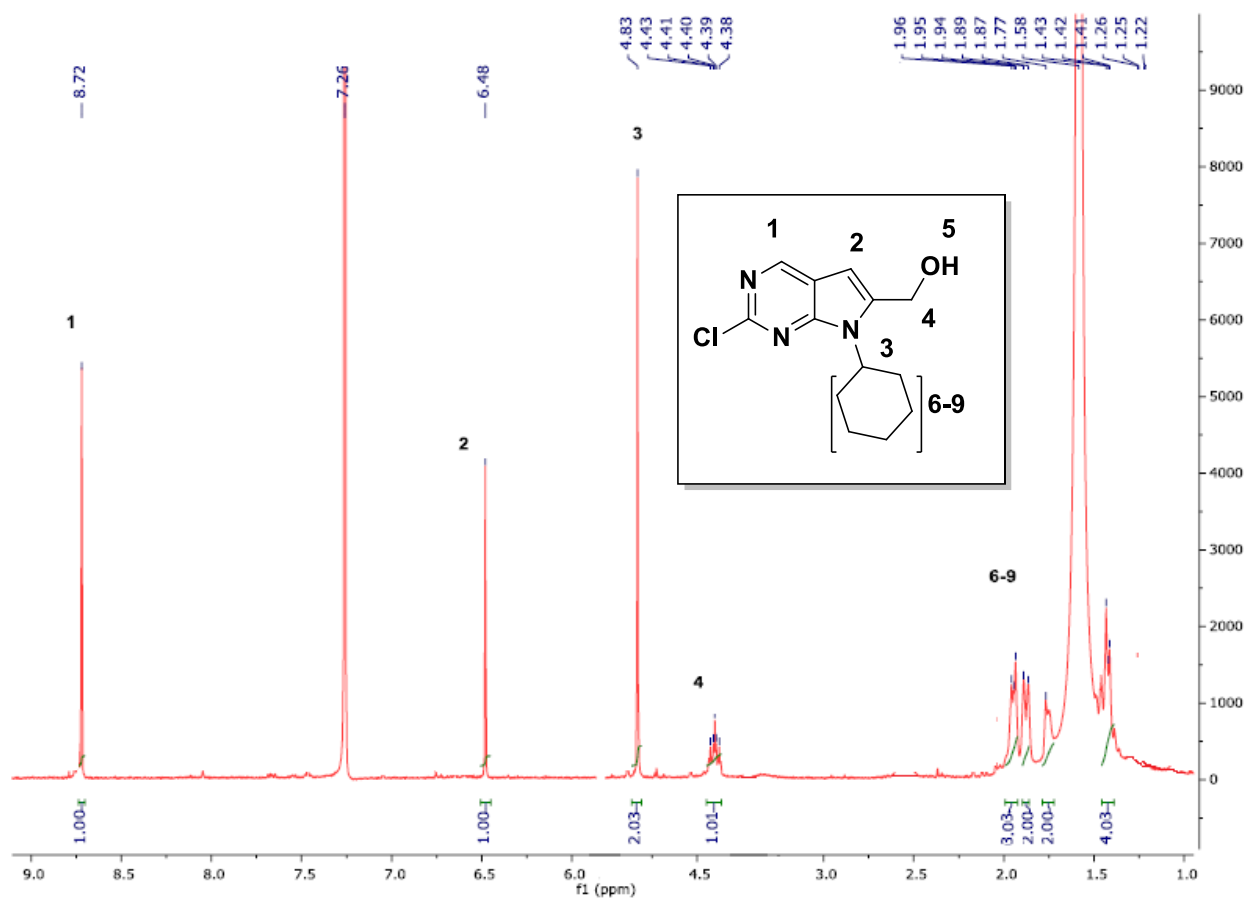


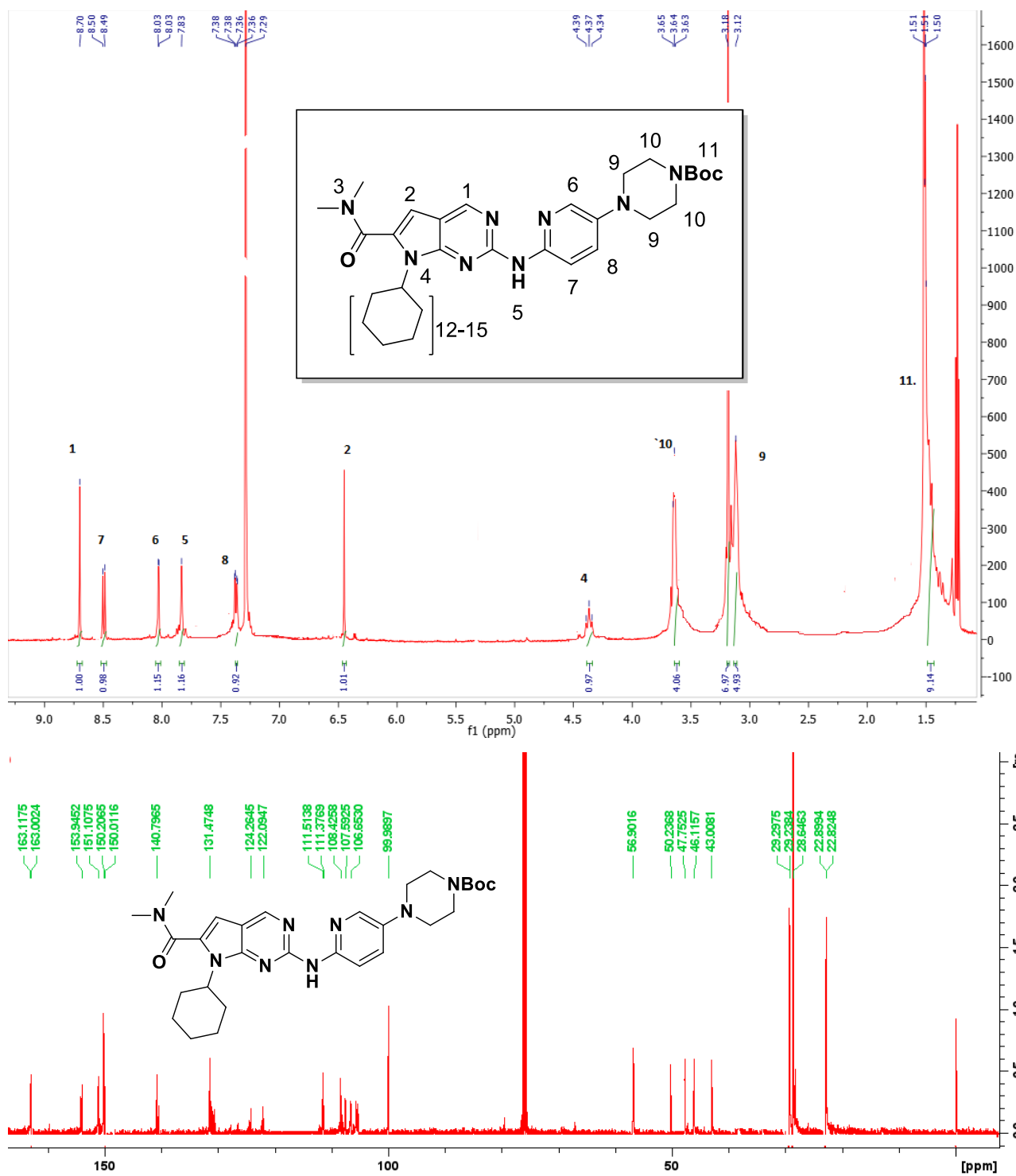












Σχήμα 142: Φάσμα ¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃) της ένωσης **79**

