

Σχεδιασμός Μοριακή Μοντελοποίηση Σύνθεση και Ταυτοποίηση Νέων Οργανικών Βιοδραστικών Ενώσεων – Αναστολέων Πρωτεϊνικών Κινασών ως Ανταγωνιστές της Τριφωσφορικής Αδενοσίνης

Παντελής Αλασώνας (Α.Μ.: 294)

Χημικός

Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης

ΔΠΜΣ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Σκομπρίδης

Ιωάννινα 2023

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το παρόν Μεταπτυχιακό δίπλωμα εστιάζει στον σχεδιασμό και τη σύνθεση μίας νέας σειράς οργανικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους βασισμένη στην τροποποίηση ενός φυσικού προϊόντος, της μεριδιανίνης, με στερική συμπληρωματικότητα και συμπληρωματικότητα αλληλεπιδράσεων και αναμενόμενη ισχυροποίηση της αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένες πρωτεϊνικές κινάσες και κατ' επέκτασην αντικαρκινική δράση.

Τα πειράματα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας διεξήχθησαν στο εργαστήριο οργανικής χημείας X3-210 του πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κύριο Κωνσταντίνο Σκομπρίδη.

Η εκπόνηση μιας μεταπτυχιακής εργασίας για την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, και δη στο στον τομέα οργανικής σύνθεσης, είναι αντικειμενικά μια διαδικασία αρκετά επίπονη η οποία απαιτεί υπομονή, αφοσίωση και επιμονή. Κατά κανόνα, οι πειραματικές αποτυχίες διαδέχονται η μία την άλλη και ως εκ τούτου αποτελούν την μερίδα του λέοντος. Γι' αυτό τον λόγο η αποφασιστικότητα η ψυχραιμία και η υπομονή δοκιμάζονται καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας. Ωστόσο, αυτή η αέναη δοκιμασία είναι αυτή, η οποία εν τέλει προσφέρει ευχαρίστηση, ηθική ικανοποίηση και υπερηφάνεια για το αποτελέσματα τα οποία εξάγονται. Πέρα, όμως, από το καθαρά ερευνητικό κομμάτι για εμένα το εργαστήριο ήταν ένα περιβάλλον στο οποίο συναναστράφηκα με ανθρώπους οι οποίοι μαζί με τους πρωταγωνιστές της προσωπικής μου ζωής σημάδεψαν τα δύο τελευταία χρόνια.

Για όλους τους παραπάνω λόγους και αρχίζοντας από το εργασιακό περιβάλλον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή οργανικής χημείας του πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου και εμπνευστή του θέματος κύριο Κωνσταντίνο Σκομπρίδη. Η αφοσίωση του, το γνωστικό του υπόβαθρο, η συνεχής καθοδήγηση του και η προθυμία για επίλυση πάσης φύσεως εμποδίων που στάθηκαν στο διάβα μου ήταν καίριας σημασίας κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Ωστόσο, πέρα από την επαγγελματική του ακεραιότητα ο κύριος Σκομπρίδης αποτελεί και ένα ηθικό πρότυπο για εμένα καθώς η συμβολή και η καθοδήγηση του δεν περιορίζονται στα πλαίσια του εργαστηρίου, αλλά προθυμοποιείται να συνδράμει τόσο στην επαγγελματική αποκατάσταση των φοιτητών του όσο και στη λήψη αποφάσεων, αφού αφουγκράζεται όλες τις ανησυχίες που τους απασχολούν.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Μιχαήλ Σίσκο καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Δημήτρη Αλίβερτη, οι οποίοι δέχθηκαν με προθυμία να αποτελέσουν μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής και με την εμπειρία τους συνέβαλαν στην τελική μορφή της εργασίας μου.

Θα ήθελα, ακολούθως, να ευχαριστήσω ξεχωριστά και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον διδάκτορα και επιστήθιο φίλο και συνεργάτη Μιχάλη Αλαγιάννη ο οποίος όντας ο κεντρικός πυλώνας του εργαστηρίου επωμίσθηκε με αυταπάρνηση την ομαλή προσαρμογή μου στο εργαστήριο και μοιράστηκε μαζί μου την εμπειρία και τις γνώσεις του.

Δεν θα μπορούσα να φανταστώ ότι το κλίμα που θα αφιέρωνα τόσες ώρες θα ήταν τόσο και ευχάριστο και δημιουργικό αυτό οφείλεται στα άτομα με τα οποία μοιράστηκα τον χώρο εργασίας μου. Γι' αυτό ευχαριστώ ιδιαίτερα τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Γεωργία Μπαζάνου, Φωτεινή Πεπονίδου και Λεμονιά Καραγιάννη με τις οποίες μοιράστηκα πολλά εντός και εκτός του εργαστηρίου και με βοήθησαν ιδιαίτερα ηθικά και ψυχολογικά όποτε υπήρξε έστω και ελάσσονα ανάγκη. Εύχομαι από καρδιάς να πραγματοποιήσουν όλους τους στόχους τους, να ανταμειφθούν οι κόποι τους και να αναγνωριστούν οι ικανότητες τους.

Ευχαριστώ, επίσης, τον υποψήφιο διδάκτωρα Γιάννη Γεροντίτη, τον Ομότιμο Καθηγητή Οργανικής Χημείας Γεώργιο Βαρβούνη και τον Καθηγητή Οργανικής χημείας Λάζαρο Χατζηαράπογλου οι οποίοι ανταποκρίθηκαν σε ότι χρειάστηκα κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους φίλους εκτός του εργαστηρίου στους οποίους γνωρίζω ότι μπορώ να βασιστώ ανά πάσα στιγμή.

Τέλος, δεν μπορώ να ευχαριστήσω αρκετά την οικογένειά μου, τον αδερφό μου Αλέξανδρο και τους γονείς μου, οι αφανείς ήρωες αυτής της ιστορίας, Γεώργιο και Παναγιώτα για την αέναη υποστήριξη, την τυφλή εμπιστοσύνη προς το πρόσωπο μου και τις θυσίες που κάνουν εδώ και 25 χρόνια για να αποκτήσω όσα εφόδια χρειάζομαι προκειμένου να εισέλθω πλέον δυναμικά στην αναζήτηση εργασίας.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
ABSTRACT	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες	15
2.1.1. Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνικών κινασών	15
2.1.1.1. Τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)	15
2.1.1.2. Μηχανισμός λειτουργίας πρωτεϊνικών κινασών	16
2.1.2. Δομή πρωτεϊνικών κινασών	
2.1.4. Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών	19
2.1.4.1. Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STK)	20
2.1.4.2. Κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο (MAPKs)	21
2.1.4.3. Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (TKs)	22
2.1.4.4. Υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs)	22
2.1.4.5. Μη Υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRTKs)	24
2.2 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	24
2.2.1. Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	26
2.2.2.Παραδείγματα εγκεκριμένων αναστολέων από τον FDA	
2.2.2.1.Osimertinib	
2.2.2.Sorafenib	
2.2.2.3. Mobocertinib	
2.3 Αναφορά στην σύνθεση και στην βιολογική συνεισφορά των επιμέρους δομικών μον	άδων των
σχεδιασθέντων μορίων	
2.3.1. Ινδόλιο	
2.3.1.1. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer	
2.3.1.2. Σύνθεση ινδολίου κατά Mori-Ban	
2.3.1.3. Σύνθεση ινδολίου κατά Hemetsburger	
2.3.1.4. Σύνθεση ινδολίου κατά Kanematsu	
2.3.2. Το ινδόλιο ως δομικό στοιχείο φυσικών προϊόντων και βιοδραστικών μορίων	45

2.3.2.1. Εγκεκριμένα φάρμακα των οποίων η βιοδραστική ουσία φέρει ινδολικό δακτύλιο	45
2.3.2.2. Φυσικά προϊόντα που φέρουν ινδόλιο των οποίων η βιοδραστική αξία βρίσκεται υπό	5
διερεύνηση	46
2.3.3. Υβρίδια ινδολίου πυριμιδίνης (indole-pyrimidine hybrids)	47
2.4 Μεριδιανίνες	49
2.4.1. Σύνθεση μεριδιανινών κατά Bredereck	50
2.4.2. Σύνθεση μεριδιανών κατά Müller και Jiang	51
2.4.3. Σύνθεση μεριδιανών κατά Υu	51
2.4.4.Σύνθεση μεριδιανινών κατά Penoni	52
2.5 Η συμβολή του δεσμού της ουρίας σε αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	.56
3.1 Σύνθεση νέων αναστολέων	56
3.2 Μοριακή μοντελοποίηση	59
3.2.1. Αλληλεπιδράσεις των Τ1, Τ4α, Τ5 και Τ6 με τον EGFR	62
3.2.2. Αλληλεπιδράσεις των Τ1, Τ4a και Τ6 με τον FGFR	64
3.3. Συνθετική πορεία ανάλογων μεριδιανίνης	66
3.3.1. Σύνθεση των ανάλογων μεριδιανίνης: Σχόλια και συμπεράσματα	69
3.3.2. Προσπάθειες βελτιστοποίησης σύνθεσης ανάλογων μεριδιανίνης	72
3.3.3. Σύνθεση μεριδανινών κατά Bredereck	75
3.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα πρόδρομων ενώσεων	78
3.4.1. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων μεθυλίωσης	78
3.4.1.1. <i>Ν</i> -μεθυλοϊνδόλιο (12)	78
3.4.1.2. <i>Ν</i> -μέθυλο-5-νιτροϊνδόλιο (69)	80
3.4.1.3. <i>Ν</i> -μεθυλο-6-φθοροϊνδόλιο (73)	81
3.4.1.4. <i>Ν</i> -μεθυλο-3-ακετυλο-7-αζαϊνδόλιο (66)	82
3.4.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων ακυλίωσης	83
3.4.2.1. 3-ακετυλο-Ν-μεθυλο-ινδόλιο (62)	84
3.4.2.2. <i>Ν</i> -μέθυλο-5-νίτρο ινδόλιο (70)	86
3.4.2.3. 3-ακετυλο-7-αζα-ινδόλιο (65)	88
3.4.2.4. Ν-μέθυλο-3-ακέτυλο-6-φθοροϊνδόλιο (74)	90
3.4.3. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων σχηματισμού εναμινόνης	92
3.4.3.1. 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη (63)	93
3.4.3.2. 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-7-αζα-ινδολο-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη (67)	94

3.4.3.3. 3- (διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλ-5-νιτρο-1Η-ινδολ-3-υλ) προπ-2-εν-1-όνη (71)	.95
3.4.3.4. 3-(διμεθυλαμινο)-1-(6-φθορο-1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη (75)	.97
3.4.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων κυκλοποίησης	.98
3.4.4.1. 4-(1-μεθυλο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (49G)	. 99
3.4.4.2. 3-(2-χλωροπυριμιδινο-4-υλο)-1-μεθυλοϊνδόλio (4)	101
3.4.4.3. 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνη (49I)	102
3.4.4.4. 4-(1-μεθυλο-7-αζα-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνη (49J)	105
3.4.4.5. 4-(1-μεθυλο-6-φθόρο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (49K)	106
3.5 Σύνθεση τελικών ποοϊόντων	107
3.5.1. Μηχάνισμός αντίδρασης σύνθεσης τελικών προϊόντων	111
3.5.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα τελικών ποοϊόντων	111
3.5.2.1. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης Τ1	112
3.5.2.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης Τ2	114
3.5.2.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα για το T3	117
3.5.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης Τ4	121
3.5.2.5. Φασματοσκοπικά δεδομένα για το T5	122
3.5.2.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα για το Τ6	123
3.6 Ανακεφαλαίωση-Συμπερασματα	124
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:1	L27
4.1: ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	127
4.2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ1	144

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος είναι μια από τις πιο διαδεδομένες και θανάσιμες ασθένειες παγκοσμίως. Συνήθως, τα καρκινικά κύτταρα δημιουργούνται από μεταλλάξεις που φέρει το γονιδίωμα μιας πολύ σημαντικής κατηγορίας βιομορίων, οδών μεταγωγής σήματος, που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες. Αυτός είναι ο λόγος ο οποίος οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν έναν πολύ διάσημο φαρμακευτικό στόχο καθώς η αναστολή ή ο περιορισμός της λειτουργίας των κινασών που φέρουν μεταλλάξεις μπορούν να περιορίσουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων ακόμα και να τον καταστείλουν. Ο μηχανισμός λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών περιλαμβάνει την πρόσδεση της τελικής φωσφορικής ομάδας η οποία παραχωρείται από ένα μόριο τριφωσφορικής αδενοσίνης (ΑΤΡ) σε κάποιο αμινοξικό κατάλοιπο που φέρει μια υδροξυλομάδα και μεταφορά αυτού σε μια άλλη πρωτεΐνη στόχο ώστε εκείνη να επιτελέσει τον βιολογικό της ρόλο. Ο τρόπος επέμβασης στην λειτουργία των πρωτεϊνικών κινασών έγκειται στη σύνθεση οργανικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που αναστέλλουν την λειτουργία τους καθώς δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο των απορρυθμισμένων πρωτεϊνικών κινασών δρώντας ανταγωνιστικά με το ATP.

Στις μέρες μας η ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών έχει σημειώσει αλματώδη πρόοδο, καθώς, πλέον, μέχρι και το 2021 έχουν εγκριθεί από τον παγκόσμιο οργανισμών τροφίμων και φαρμάκων (FDA) 68 μόρια τα οποία μπορούν και αναστέλλουν τη δράση 24 διαφορετικών πρωτεϊνικών κινασών [1].

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας για την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης διεξήχθησαν στο εργαστήριο οργανικής χημείας προσπάθειες σύνθεσης μιας νέας σειράς βιοδραστικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους βασισμένα δομικά στο φυσικό προϊόν «μεριδιανίνες», το οποίο έχει βρεθεί ότι μπορεί να αναστείλει την λειτουργία πρωτεϊνικών κινασών, ωστόσο όχι σε ικανοποιητικό βαθμό. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της

10

σύνθεσης μεριδιανίνης κατά Bredereck φέρουσα αλλαγές στο τμήμα του ινδολικού δακτυλίου του ο οποίος έχει αντικατασταθεί είτε από τις ισοστερικές ενώσεις του 7-αζα ινδολίου είτε από ινδολικό δακτύλιο που φέρει στις θέσεις 5 και 6 υποκαταστάτες οι οποίοι είναι δέκτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας κυρίως μέσω της εκδήλωσης αρνητικού συζυγιακού φαινομένου. Η νέα σειρά αυτών των μορίων περιλαμβάνει προσάρτηση δεσμού ουρίας στην αμινομάδα του πυριμιδινικού δακτυλίου της μεριδιανίνης ενώ η δεύτερη αμινομάδα συνδέεται με αρωματικά συστήματα, όπως για παράδειγμα δι-υποκατεστημένους βενζολικούς δακτυλίους. Όλα τα μόρια που συντέθηκαν ταυτοποιήθηκαν με τις σύγχρονες φασματοσκοπικές μεθόδους πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η NMR, ¹³CNMR, NOESY, HMBC, HSQC

ABSTRACT

Protein kinases play a key role in the life and function of cells. The transfer of phosphate group from ATP to the free hydroxyl group of serine, threonine and tyrosine residues to the respective target proteins are signal transduction pathways and, by extension, regulators of many cellular processes such as division, apoptosis, differentiation, etc. Mutations carried in their genome cause deregulation of their action resulting in the creation of neoplasms. In the last twenty-five years, the scientific community has succeeded, in many cases, in limiting their action through the administration of low molecular weight organic compounds that act competitively with ATP, by limiting the hyperphosphorylation of the target proteins. Today, more than 70 protein kinase inhibitors have been approved by the FDA, and interest is now turning to the discovery of molecules that act selectively against the action of specific kinases.

In the organic chemistry laboratory, the synthesis, characterization and molecular modeling of new molecules, potential protein kinase inhibitors that carry 3 specific structural parts: indole ring, pyrimidine and urea bond took place. Their synthesis was made with the aim of optimizing the bioactivity of the natural product meridianins, a natural indole-pyrimidine hybrid which has been shown to inhibit the activity of protein kinases.

All the precursors and final molecules produced were identified by means of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H NMR, ¹³C NMR).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα, και δη αυτή του τομέα της υγείας, έχει επικεντρώσει εδώ και πολλά χρόνια ένα μεγάλο μέρος της προσοχής της στην καταπολέμηση του καρκίνου, καθώς ο καρκίνος ως αιτία θανάτου γίνεται όλο και πιο συνήθης. Συγκεκριμένα, σε έρευνα που πραγματοποίησε ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) σε 112 χώρες, ο καρκίνος είναι η πρώτη ή η δεύτερη αιτία θανάτου σε άτομα κάτω των 70 ετών ενώ σε άλλες 23 χώρες κατατάσσεται ως Τρίτη ή τέταρτη αιτία (εικόνα 1.1) [2]. Ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό καρκίνου οφείλεται σε βλάβη που φέρουν στο γονιδίωμα τους βιομόρια που αποτελούν οδούς μεταγωγής σήματος μεταξύ αυτών και οι πρωτεϊνικές κινάσες. Ως φυσικό επακόλουθο αυτού του γονιδιακού σφάλματος, οι πρωτεϊνικές κινάσες ευθύνονται για την εκδήλωση καρκίνου καθώς προάγουν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό κύκλο ζωής, καθώς απαιτούν πολύ υψηλότερα ποσά ενέργειας για την ανάπτυξή τους ενώ ταυτόχρονα επιδεικνύουν υψηλή



Εικόνα 1.1: Κατάταξη του καρκίνου ως αίτια θανάτου σύμφωνα με έρευνα του ΠΟΥ [2]. Η χημειοθεραπεία είναι μια από τις πλέον συνήθεις μεθόδους καταπολέμησης του καρκίνου η οποία εφαρμόζεται σε περιπτώσεις μεταστατικού όγκου, δηλαδή όγκου ο οποίος έχει παραπάνω από δυο εστίες λόγω είτε λεμφαδενικής είτε αιματολογικής μετάστασης και δεν μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά. Ωστόσο, μια τέτοιου είδους θεραπεία συνοδεύεται από πολλές παρενέργειες και εγκυμονεί κινδύνους καθώς κατά την διεξαγωγή της εκτός των καρκινικών κυττάρων θανατώνονται και πολλά υγιή. Για αυτόν τον λόγο η σύνθεση εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών κρίνεται απαραίτητη και υψίστης σημασίας για τη αντιμετώπιση της επάρατης νόσου [1]. Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι μία ελκυστική και, επί του παρόντος, η πλέον ενδεδειγμένη στρατηγική καταπολέμησης πολλών νεοπλασιών που οφείλονται στην απορρύθμιση των πρωτεϊνικών κινασών. Ο ρόλος των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών είναι είτε η πρόσδεση τους στο ενεργό κέντρο, δηλαδή η ανταγωνιστική του δράση έναντι της θέσης πρόσδεσης του ΑΤΡ, είτε η αλληλεπίδραση με αυτήν με σκοπό το «κλείδωμα» αυτής στην ανενεργή της μορφή ώστε να μην μπορεί να προσδεθεί το ΑΤΡ στο ενεργό κέντρο της.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια πολύ σημαντική κατηγορία βιομορίων στον ανθρώπινο οργανισμό. Ο βιολογικός τους ρόλος περιλαμβάνει την ρύθμιση πολλών από τις λειτουργίες του κυττάρου, όπως ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η απόπτωση κ.ά. Μπορούμε, έτσι, να συμπεράνουμε ότι αποτελούν τα σημαντικότερα μέσα μεταγωγής σήματος, καθώς η δράση τους επεκτείνεται σε ένα «ευρύ φάσμα» από την πρωτογενή διαμεμβρανική σηματοδότηση μέχρι την ρύθμιση της μεταγραφής και του κυτταρικού κύκλου. Μολονότι κατά την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος έχουν ταυτοποιηθεί σχεδόν εξακόσιες διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες με διαφορετική δράση και ειδικότητα, ο μηχανισμός ρύθμισης των διεργασιών του κυττάρου είναι κοινός για όλες και βασίζεται στην μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας.

2.1.1. Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνικών κινασών

2.1.1.1. Τριφωσφορική αδενοσίνη (ΑΤΡ)

Είναι γνωστό από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα ότι η βιολογική σημασία της τριφωσφορικής αδενοσίνης είναι καίρια για τον ανθρώπινο οργανισμό. Αν και αρχικά, στα 1929, το μόριο αυτό συσχετίστηκε άμεσα με την συστολή μυών πλέον γνωρίζουμε ότι πρόκειται για το «ενεργειακό νόμισμα» του οργανισμού καθώς ένα τεράστιο ποσοστό των διεργασιών που διατηρούν την ομοιόσταση και προάγουν την ανάπτυξη των κυττάρων είναι η παραγωγή και η κατανάλωση ATP [3]. Άλλο ένα στοιχείο το οποίο μαρτυρά το πόσο σημαντική είναι η συνεισφορά αυτού του μορίου είναι ότι η παραγωγή του πραγματοποιείται και ελέγχεται σε πολλά μέρη του κυττάρου. Κατά κύριο λόγο η παραγωγή γίνεται είτε στο κυτταρόπλασμα μέσω της γλυκόλυσης είτε στα μιτοχόνδρια κατά την διεξαγωγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Στο κύτταρο λόγω της διαλυτότητας του στο νερό το ATP δεν

μπορεί εύκολα να αποθηκευτεί γι' αυτό και η περιεκτικότητα του μπορεί να μεταβληθεί ακαριαία. Ως εκ τούτου, ο οργανισμός αποθηκεύει τις δομικές μονάδες από τις οποίες συντίθεται το ATP, τα τριγλυκερίδια και το γλυκογόνο (εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Σύνθεση και ρύθμιση ΑΤΡ εντός και εκτός του μιτοχονδρίου [3].

2.1.1.2. Μηχανισμός λειτουργίας πρωτεϊνικών κινασών

Όπως αναφέρεται και παραπάνω η λειτουργικότητα των πρωτεϊνικών κινασών απορρέει από την πρόσδεση του ATP σε αυτήν και δη στο ενεργό της κέντρο. Ο σκοπός της πρόσδεσης του ATP είναι η εναπόθεση της τελικής φωσφορικής ομάδας αυτού στην πρωτεϊνική κινάση η οποία λαμβάνει χώρα σε ένα κατάλοιπο αμινοξέως το οποίο φέρει μια υδροξυλομάδα. Η πρώτη χαρτογράφηση φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών έγινε το 1906 σε υπολείμματα σερίνης ενώ το 1979 σε υπολείμματα τυροσίνης. Έκτοτε, έχουν παρατηρηθεί πάνω από 500.000 θέσεις φωσφορυλίωσης σε 7000 πρωτεΐνες μόνο στον άνθρωπο, με το 85% να αφορά φωσφορυλιώσεις σερίνης το 11,8% θρεονίνης και το 1,8% τυροσίνης. Δεδομένου ότι υπάρχουν τόσα πολλά διαφορετικά υποστρώματα στα οποία μπορεί να λάβει χώρα μια φωσφορυλίωση εξάγεται, με λογική αναγκαιότητα, το συμπέρασμα ότι η διαδικασία είναι αρκετά πολύπλοκη. Γενικά, η φωσφορυλίωση μπορεί να λάβει χώρα είτε σε τακτοποιημένα στερεοχημικά υποστρώματα είτε σε διαταραγμένα. Ως τακτοποιημένα υποστρώματα θεωρούνται αυτά που μπορούν να υποδεχτούν αυθόρμητα την πρόσδεση του ΑΤΡ στο μόριο τους, ενώ ως διαταραγμένα ορίζονται υποστρώματα τα οποία δεν μπορούν αυθόρμητα να αλληλοεπιδράσουν από μόνα τους αλλά μέσω ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης με άλλη πρωτεΐνη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα των τελευταίων είναι οι υποδοχείς πρωτεϊνών που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και φωσφορυλιώνονται σε κατάλοιπο τυροσίνης. Στην συνέχεια η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η οποία έχει προκύψει μετά από αφαίρεση της μίας φωσφορικής ομάδας, εξέρχεται του βιομορίου και ακολούθως η πρωτεϊνική κινάση μεταφέρει την φωσφορική ομάδα σε ένα υπόστρωμα άλλης πρωτεΐνης σε κάποιο αμινοξύ-δέκτη, ώστε να πραγματοποιηθεί η μεταγωγή σήματος [4, 5].

2.1.2. Δομή πρωτεϊνικών κινασών

Παρότι ήδη γνωρίζουμε ότι υπάρχουν πάρα πολλές διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες που βρίσκονται στο ευκαρυωτικό κύτταρο και μέσω της φωσφορυλίωσης ελέγχουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών παρατηρείται ότι η δομή τους παρουσιάζει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Ιδιαίτερα το καταλυτικό τους τμήμα, δηλαδή αυτό στο οποίο προσδένεται το ΑΤΡ, φαίνεται και από κρυσταλλικές δομές ότι είναι αρκετά συντηρημένο. Χαρακτηριστικό τμήμα αποτελεί ο βρόγχος γλυκίνης (G-loop) ο οποίος όντας αρκετά εύκαμπτος και ανάλογα με την διαμόρφωση είναι το τμήμα στο οποίο προάγεται ή εμποδίζεται η πρόσδεση του ΑΤΡ. Πρόκειται για μια αλληλουχία τύπου GxGxxG όπου τα αμινοξέα x είναι αυτά τα οποία φέρουν το τμήμα πρόσδεσης του ΑΤΡ για αυτό και πολλές φορές αποτελείται από αμινοξέα σερίνης θρεονίνης ή τυροσίνης. Ένα παράδειγμα είναι οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDK) οι οποίες διατηρούν την ανενεργή διαμόρφωση τους λόγω φωσφορυλίωσης των κατάλοιπων τυροσίνης και θρεονίνης στον βρόγχο γλυκίνης, ή αλλιώς βρόγχος ενεργοποίησης, και προκείμενου να ενεργοποιηθούν απαιτείται αλληλεπίδραση με κυτταρικές φωσφατάσες οι οποίες θα αποφωσφορυλιώσουν το συγκεκριμένο τμήμα και με αυτόν τον τρόπο θα προάγουν την ενεργή διαμόρφωση των CDK.



Εικόνα 2.2: Κρυσταλλική δομή αλληλεπίδρασης της ΡΚΑ με τον αναστολέα ΡΚΙ. Α: Με μπλε απεικονίζεται η αλληλουχία προς το *Ν*-τελικό άκρο ενώ με κόκκινο προς το C-τελικό άκρο.

B: Το ΑΤΡ και η PKI εισάγονται στο ενεργό κέντρο της PKA. Παρατηρείται το πόσο στενό είναι το «πέρασμα» έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί φωσφορυλίωση του υπολείμματος σερίνης του βρόγχου G της PKA.

C: Αποτύπωση της αλληλουχίας του βρόγχου G για διαφορετικές κινάσες [6].

Έτσι, διαπιστώνεται ότι οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) έχουν μια δυναμική δομή την οποία απέκτησαν εξελικτικά έτσι ώστε να μπορούν να ανταποκριθούν στον ρόλο του μοριακού ρυθμιστή.

Το ενεργό κέντρο των πρωτεϊνικών κινασών ουσιαστικά συρρικνώνεται ανάμεσα σε δυο λοβούς, τον *N*-τερματικό και τον C-τερματικό λοβό οι οποίοι διαφέρουν ως προς την δομή τους. Ο *N*-τερματικός λοβός διαθέτει την μορφή β-πτυχωτού φύλλου ο οποίος αποτελείται από πέντε «πλεξούδες» ενώ ο C-τερματικός λοβός έχει κυρίως μορφή α-ελίκων, ωστόσο διαθέτει και βρόγχους. Οι δύο τερματικοί λοβοί συνδέονται μεταξύ τους με μία αλληλουχία στην οποία αλληλεπιδρούν υδρόφοβα τμήματα των δύο λοβών[7]. Άλλο ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των δομών των πρωτεϊνικών κινασών είναι ότι ενώ οι δομές της ενεργής διαμόρφωσης η οποία επιτρέπει την είσοδο του ATP είναι παρόμοιες και πολλές φορές ταυτόσημες και χαρακτηρίζονται από ευθύγραμμη στοίχιση των καταλυτικών τους τμημάτων, εντούτοις οι ανενεργές διαμορφώσεις παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία. Ως απόρροια των διαφορετικών τμημάτων ελέγχου που τις διέπουν και που εκτείνονται από κάποια αλλοστερική θέση του μορίου μέχρι κάποια ενδοστερική. Τα τμήματα ελέγχου ρυθμίζουν την χωρική διαμόρφωση που έχουν οι τερματικοί λοβοί της κινάσης ώστε να αποκόπτουν το ενεργό της κέντρο από το μικροπεριβάλλον του. Οι μηχανισμοί αυτοί ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ερεθίσματα ώστε να προάγουν την διάταξη της ανενεργής διαμόρφωσης για διαφορετική κινάση. Μπορεί να είναι είτε από διαφορετικές περιοχές κοντά στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης που να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους είτε τμήματα της κινάσης να αλληλεπιδρούν με δευτερογενείς αγγελιοφόρους, όπως άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες εκφράζονται όταν το κύτταρο βρίσκεται σε συγκεκριμένη λειτουργική κατάσταση [8].

2.1.4. Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών

Μία διαπίστωση η οποία απορρέει με λογική αναγκαιότητα και αφορά την πολυπλοκότητα της λειτουργίας τους, αλλά επίσης διευκρινίζει το πόσο καίριας σημασίας βιομόρια αποτελούν οι πρωτεϊνικές κινάσες στην μεταγωγή σήματος είναι ότι παρόλο που γνωρίζουμε ότι υπάρχουν τουλάχιστον 600 διαφορετικές εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου κάθε μία από αυτές δεν επιδρά σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα πρωτεΐνης-στόχου αλλά σε πληθώρα αυτών. Γι' αυτό τον λόγο η Επιτροπή Ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημικών το 1989 ταξινόμησε τις πρωτεϊνικές κινάσες με γνώμονα το αμινοξύ-δέκτη του υποστρώματος στο οποίο επιδρούν και όχι με βάση το υπόστρωμα αυτό καθ' αυτό. Με βάση αυτήν την

ταξινόμηση προέκυψαν οι εξής κατηγορίες ή αλλιώς, οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών:

 Κινάσες σερίνης-θρεονίνης των οποίων το αμινοξύ-δέκτης είναι υδροξυλομάδα αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης

Κινάσες τυροσίνης οι οποίες φωσφοριλιώνουν επίσης υδροξυλομάδες οι οποίες ωστόσο βρισκόνται στο αρωματικό σύστημα της τυροσίνης.

3. Κινάσες ιστιδίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα ιστιδίνης, αργινίνης, λυσίνης όπου η υποκατάσταση πραγματοποιείται στα άτομα 1 ή 3 του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, στην ομάδα γουανιδίνης της λυσίνης και στην αμινομάδα της λυσίνης.

Κινάσες κυστεΐνης όπου δημιουργούνται, μετά την υποκατάσταση,
φωσφορικοί θειοεστέρες

 Ασπάρτυλο ή γλουτάμιλο κινάσες των οποίων το υπόστρωμα είναι μια άκυλο ομάδα

Στις δύο πρώτες κατηγορίες ανήκει η συντριπτική πλειοψηφία των πρωτεϊνικών κινασών και συγκεκριμένα 478 από τις 518 οι οποίες ονομάστηκαν ευκαρυωτικές καθώς φέρουν κοινά χαρακτηριστικά στην αλληλουχία των αμινοξέων τους

2.1.4.1. Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STK)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης αποτελούν την μία εκ των δύο μεγάλων οικογενειών των πρωτεϊνικών κινασών. Η ονομασία τους προκύπτει από το γεγονός ότι στο ενεργό κέντρο το ATP προσδένεται σε υδροξυλομάδες σερίνης και θρεονίνης. Πρόκειται για δύο αμινοξέα των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες είναι μεταξύ τους πανομοιότυπες γι' αυτό και ταξινομούνται σε κοινή οικογένεια. Ωστόσο, ανάλογα με τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν επιδέχονται επιμέρους ταξινόμηση.

2.1.4.2. Κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο (MAPKs)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνο (MAPKs) αποτελούν μια κατηγορία κινασών σερίνης/θρεονίνης οι οποίες εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση [9]. Μια κατηγορία αυτών είναι οι ERK οι οποίες ανταποκρίνονται σε εξωκυτταρικά σήματα τα οποία σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση την γήρανση και την απόπτωση, ενώ μία άλλη είναι οι JNK οι οποίες ενεργοποιούνται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες, επάγοντας την ενεργοποίηση κασπάσης η οποία προάγει προαποπτωτικά γονίδια (εικόνα 2.3). Γενικά, οι MAPKs συμμετέχουν επίσης στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο καρδιαγγειακό σύστημα στο ουρολογικό κ.ά. [10].



SURVIVAL SIGNALS

Εικόνα 2.3: Ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σήματα που επάγουν ή καταστέλλουν τα μονοπάτια της απόπτωσης με συμμετοχή των JNK και ERK [9].

2.1.4.3. Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (TKs)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης αποτελούν την δεύτερη μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών. Όπως και στις κινάσες σερίνης θρεονίνης η ονομασία της οικογένειας αποδίδεται στο ότι η σύνδεση της φωσφορικής ομάδας του ATP πραγματοποιείται σε υδροξυλομάδα τυροσίνης η οποία βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Βρίσκονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στην πλασματική μεμβράνη και βάση αυτής της διάκρισης χωρίζονται σε υποδοχικές (RTKs) και μη υποδοχικές (NRTKs). Αλληλεπιδρούν με εξωκυτταρικά σήματα και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο κατά την εμβρυική ανάπτυξη καθώς είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού και του αγγειακού συστήματος [11].

2.1.4.4. Υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs)

Οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνες των οποίων ο βιολογικός ρόλος έγκειται στην δέσμευση συγκεκριμένων (συγγενών) υποστρωμάτων που βρίσκονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και μεταφέρουν το σήμα. Κατά την δέσμευσή τους η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται σε υπολείμματα τυροσίνης τόσο σε πρωτεΐνεςστόχους όσο και στην ίδια την κινάση (αυτοφωσφορυλίωση) ενεργοποιώντας πληθώρα οδών σηματοδότησης. Μία πολύ σημαντική κατηγορία RTKs, οι οποίοι αποτελούν και φαρμακευτικούς στόχους είναι οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF), ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο αυξητικός παράγοντας vεύρων (NGF).

Η δομή του υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών (Εικόνα 2.4) αποτελείται από τρία κύρια μέρη: το εξωκυτταρικό τμήμα στο οποίο συνδέεται το συγγενές εξωκυτταρικό υπόστρωμα που μεταφέρει το σήμα, το ενδοκυτταρικό τμήμα στο οποίο λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση και επομένως διαθέτει το καταλυτικό τμήμα της κινάσης και στην διαμεμβρανική έλικα η οποία συνδέει τα δύο τμήματα. Το ενδοκυτταρικό τμήμα χαρακτηρίζεται από μία απλή, τηρουμένων των αναλογιών, οργάνωση οι οποία περιλαμβάνει την παραμεμβρανική περιοχή, η οποία ακολουθεί την διαμεμβρανική έλικα, την καταλυτική περιοχή και την καρβοξυτελική περιοχή. Στις

22

περισσότερες υποδοχικές κινάσες τυροσίνης η καταλυτική περιοχή αποτελείται από αλληλουχία 100 αμινοξέων ενώ οι παραμεμβρανική και η καρβοξυτελική περιοχή διαφέρουν σε μήκος. Σε περιπτώσεις αυτοφωσφορυλίωσης τα υπολείμματα τυροσίνης μπορεί να βρίσκονται είτε στην καρβοξυτελική είτε στην παραμεμβρανική περιοχή. Αντίθετα το εξωκυτταρικό τοίχωμα οργανώνεται με πιο περίπλοκο τρόπο. Συγκεκριμένα αποτελείται από διακριτά επιμέρους τμήματα τα οποία μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνη, ινονεκτίνη τύπου 3 EGF, και περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη [11].



Εικόνα 2.4: Οργάνωση δομής επιλεγμένων υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης [11].

2.1.4.5. Μη Υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRTKs)

Οι μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες δεν συμμετέχουν στην μεταγωγή σήματος από εξωκυτταρικό ερέθισμα άλλα συμβάλλουν καθοριστικά στην σηματοδότηση εντός του κυττάρου. Οι περισσότερες βρίσκονται ελεύθερες στο κυτταρόπλασμα, ωστόσο κάποιες βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, προσκολλημένες στην κυτταροπλασματική πλευρά. Η προσκόλληση πραγματοποιείται με τροποποίηση που λαμβάνει χώρα στην αμινοτελική περιοχή (μυριστουλίωση, παλμιτοϋλίωση) η οποία προκαλεί αποκόλληση από τον αντίστοιχο υποδοχέα. Γενικά οι δομή τους, όπως και σε πολλές άλλες οικογένειες πρωτεϊνών περιλαμβάνει μια αρθρωτό οικοδόμημα με περιοχές που υπηρεττούν τον βιολογικό τους ρόλο και αλληλουχίες που διαδραματίζουν τον ρόλο του συνδέτη, Διαθέτουν ένα τμήμα το οποίο δρα σαν διαμεσολαβητής προκειμένου να πραγματοποιηθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-DNA και πρωτεΐνης-λιπιδίου. Το καταλυτικό κέντρο των μη υποδοχικών κινασών τυροσίνης εμπεριέχει 275 αμινοξέα και τοπολογικά μοιάζει με την διλωβική μορφή του ενεργού κέντρου των κινασών της οικογένειας σερίνης/θρεονίνης [11, 12].

2.2 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως ο καρκίνος, αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιοαγγειακά νοσήματα κ.ά. οφείλουν την δημιουργία και την ανάπτυξη τους στην υπερέκφραση πρωτεϊνικών κινασών οι οποίες έχουν υποστεί αλλαγές στο γονιδίωμά τους όπως μεταλλάξεις και μετατοπίσεις. Γι΄ αυτό τον λόγο οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν έναν, καίριας σημασίας, φαρμακευτικό στόχο και η μελέτη αναστολής τους είναι ενδελεχής. Υπολογίζεται ότι το ένα τέταρτο των προσπαθειών ανακάλυψης νέων φαρμάκων γίνεται με σκοπό την αναστολή πρωτεϊνικών κινασών.

Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι οργανικά μόρια μικρού μοριακού βάρους και η δράση τους έγκειται στην ένταξη τους στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής

κινάσης η οποία πραγματοποιείται μέσω διαμοριακών και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης, με σκοπό την αποτροπή της ένταξης του ATP και ακολούθως την ανεξέλεγκτη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στόχων. Η δράση τους μπορεί να είναι είτε ανταγωνιστική με το ATP, δηλαδή να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη στο ενεργό της κέντρο, είτε να δρα σε διαφορετική θέση η οποία κλειδώνει στερικά την πρωτεΐνη ώστε να μην μπορεί να υποδεχθεί το ATP στο ενεργό της κέντρο [13].

2.2.1. Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Η γνώση της καίριας σημασίας του ρόλου των πρωτεϊνικών κινασών σε πολλές παθολογικές καταστάσεις καθώς και η επιτυχία του πρώτου αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών, της ιματινίβης (imatinib), το 2001 για την καταπολέμηση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας είχε ως παρεπόμενο η επιστημονική κοινότητα να εστιάσει στην σύνθεση νέων αναστολέων. Η ανάπτυξη είναι μέχρι της μέρες μας ραγδαία καθώς πλέον έχουν εγκριθεί από τον FDA 68 αναστολείς. Η ταξινόμηση τους γίνεται με γνώμονα την αλληλεπίδραση που αναπτύσσουν με την πρωτεϊνική κινάση. Όπως παρατίθεται στον Πίνακα 2.1 αυτή η αλληλεπίδραση είναι μια συνισταμένη παραγόντων όπως το πού λαμβάνει χώρα, ως προς την δομή της πρωτεΐνης, ποια είναι η διαμόρφωση που πρέπει να φέρει η πρωτεΐνη για να λάβει χώρα η αλληλεπίδραση καθώς και το είδος της αλληλεπίδρασης.

ΤΥΠΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ
I	Δέσμευση στην θέση πρόσδεσης του ΑΤΡ στην ενεργή διαμόρφωση της πρωτεΐνης
11/2	Δέσμευση στην θέση πρόσδεσης του ΑΤΡ στην ανενεργή διαμόρφωση DFG-D _{in} της πρωτεΐνης
1½ A	Περαιτέρω αλληλεπίδραση κατά μήκος της σχισμής μεταξύ των δύο λοβών
I½ B	Χωρίς περαιτέρω αλληλεπίδραση κατά μήκος της σχισμής μεταξύ των δύο λοβών
II	Δέσμευση στην θέση πρόσδεσης του ΑΤΡ στην ανενεργή διαμόρφωση DFG-D _{out} της πρωτεΐνης
IIA	Περαιτέρω αλληλεπίδραση κατά μήκος της σχισμής μεταξύ των δύο λοβών
II B	Χωρίς περαιτέρω αλληλεπίδραση κατά μήκος της σχισμής μεταξύ των δύο λοβών
111	Αλληλεπίδραση σε αλλοστερική θέση κοντά στην περιοχή δέσμευσης του ΑΤΡ
IV	Αλληλεπίδραση σε αλλοστερική θέση μακριά από την περιοχή πρόσδεσης του ΑΤΡ
V	Ταυτόχρονη αλληλεπίδραση σε δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης
VI	Ομοιοπολική δέσμευση (μη αντιστρεπτή)

Πίνακαα	2.1: Κατη	νοριοποίηση	αναστολέων π	ιοωτεϊνικών κ	ινασών
intranaç	212.1000				

Μέσω της κατηγοριοποίησης των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών γίνεται αντιληπτό ότι μπορεί να προκύψουν πολλές στρατηγικές μέθοδοι από τις οποίες μπορεί να συντεθούν μόρια που θα αναστέλλουν την λειτουργία τους. Ωστόσο, η πρόοδος των τελευταίων ετών επιβάλλει στην επιστημονική κοινότητα την εστίαση

στην δημιουργία αναστολέων κυρίως τύπου 3, 4, 5 και 6 λόγω της εκλεκτικότητας την οποία λογικά θα παρουσιάζουν. Αυτό γιατί, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, η θέση πρόσδεσης του ATP για τις κινάσες είναι αρκετά συντηρημένες, δηλαδή παρουσιάζουν ομοιομορφία. Επομένως, είναι σημαντικό για τα μελλοντικά σκευάσματα να επιδρούν και σε αλλοστερικές θέσεις στο υπόλοιπο της αμινοξικής αλληλουχίας αυτών, το οποίο δεν είναι συντηρημένο έτσι ώστε να δρουν εκλεκτικά σε αυτές. Επιπροσθέτως, η εκλεκτικότητα αυτών των μορίων θα ενισχύεται όχι μόνο μεταξύ των διάφορων κινασών του κυττάρου αλλά και μεταξύ μορίων ίδιας κινάσης εκ των οποίων κάποια θα φέρουν συγκεκριμένα σφάλματα στην αμινοξική τους αλληλουχία η οποία ενδεχομένως επηρεάζει και την τρισδιάστατη μορφή τους και θα ευννοεί την αλληλεπίδραση με τον αναστολέα μακριά από το ενεργό κέντρο του.



Εικόνα 2.5: Τρόποι αλληλεπίδρασης αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

2.2.2.Παραδείγματα εγκεκριμένων αναστολέων από τον FDA

2.2.2.1.Osimertinib

Το Osimertinib είναι ο πρώτος εγκεκριμένος αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης τρίτης γενιάς ο οποίος εγκρίθηκε από τον FDA το 2015 και η δράση του οποίου στοχεύει στην αναστολή του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Στους αναστολείς τρίτης γενιάς ταξινομούνται οι αναστολείς τυροσινικών κινασών οι οποίοι τόσο σε κλινικές όσο και προ-κλινικές μελέτες έδειξαν αυξημένη εκλεκτικότητα στα κύτταρα τα οποία έφεραν την μετάλλαξη T790M σε σχέση με τα υγιή. Το Osimertinib χορηγείται σε ασθενείς με μεταστατικό μεταλλαγμένο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) που φέρουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η δράση του Osimertinib έγκειται στην ομοιοπολικής φύσεως αλληλεπίδραση και εντούτοις μη αναστρέψιμη, με την κυστεΐνη 797 (Εικόνα 2.5) του EGFR στην θέση δέσμευσης του ATP ενώ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή εκλεκτικότητα του έναντι των υγειών κυττάρων καθώς και η αδυναμία αναστολής για μετάλλαξη διαφορετική της T790M. Ωστόσο, εκτός από την αλληλεπίδραση με την κυστεΐνη φαίνεται ότι η πρόσδεση του μορίου επάγεται και από διαμοριακούς δεσμούς με άλλα αμινοξέα [14].



Εικόνα 2.6: Αλληλεπιδράσεις του Osimertinib με τον EGFR [15].

Αν και το Osimertinib εγκρίθηκε από τον FDA λόγω της αναστολής του EGFR πλέον διεξάγονται κλινικές μελέτες για την βιοδραστικότητα του και σε ασθενείς που έχουν υποστεί μεταλλάξεις στον εγκέφαλο καθώς το μόριο μπορεί και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό των οποίων τα αποτελέσματα είναι πολύ ενθαρρυντικά. Τέλος, αν και σε αρκετές περιπτώσεις ασθενείς αναπτύσσουν αντίσταση στην θεραπεία τους με Osimertinib έχει επέλθει μεγάλη πρόοδος στον εντοπισμό αυτών των μηχανισμών αντίστασης και οι οποίοι, ως επί το πλείστον, είναι και αυτοί στοχεύσιμοι [16].

Σύνθεση του Osimertinib

Όπως διαπιστώνεται από τις κλινικές μελέτες, η βιοδραστική αξία του Osimertinib είναι ήδη πολύ σημαντική για την αντιμετώπιση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα κι ως εκ τούτου το συγκεκριμένο σκεύασμα συνεχίζει να απασχολεί την ερευνητική κοινότητα σχετικά με περαιτέρω βιολογική δράση. Γι' αυτό και από την έγκριση του και μετά η πρόοδος όσο αναφορά την πορεία σύνθεσης του είναι αλματώδης καθώς το ζητούμενο είναι τόσο η μείωση του κόστους παραγωγής του όσο και η χρήση αντιδραστηρίων φιλικότερων προς το περιβάλλον. Η πρώτη πατέντα για την σύνθεση του Osimertinib κατοχυρώθηκε από την εταιρεία Astra Zeneca. Πρόκειται για μία συνθετική πορεία 7 αντιδράσεων των οποίων η συνολική απόδοση υπολογίζεται σε 56% (Εικόνα 2.6) [17].



Εικόνα 2.7: Πρώτη κατοχυρωμένη σύνθεση του Osimertinib από την Astra Zeneca [17].

Η συνθετική πορεία περιλαμβάνει αρχικά αντίδραση κατά την οποία πραγματοποιείται υποκατάσταση της 2,4 διχλωροπυριμιδίνης **2** στην θέση 3 του ινδολικού δακτυλίου **1** το οποίο βρίκσκεται σε μορφή ανιόντος η οποία έχει επέλθει με την χρήση οργανομαγνησιακού αντιδραστηρίου σχηματίζοντας το προϊόν **3** σε απόδοση 46%. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μεθυλίωση στη θέση 1 του ινδολικού δακτυλίου μέσω αποπρωτονίωσής του με υδρίδιο του νατρίου και χρήση του ιωδομεθάνιου ως μεθυλιωτικό μέσο παράγοντας την ένωση **4**. Ακολούθως η ένωση **4** αντιδρά με την υποκατεστημένη ανιλίνη **6** σε όξινες συνθηκες με την χρήση pτολουοσουλφονικού οξέος σε διαλύτη διοξάνιο πραγματοποιώντας υποκατάσταση του ατόμου χλωρίου προς την ένωση **7**. Ακολουθεί αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης της ένωσης **7** με την διαμίνη **8** με τη χρήση μικροκύματών. Το προϊόν απομονώνεται σε απόδοση 62%. Ακολουθεί αναγωγή της νιτρομάδας της ένωσης **9** προς την αντίστοιχη αμινομάδα με καταλυτική χρήση σιδήρου σε νερό σχηματίζοντας την ένωση **10** σε απόδοση 85%. Τέλος, το Osimertinib παράγεται με δημιουργία αμιδικού δεσμού στην αμινομάδα της ένωσης **10** με χρήση του χλωριδίου του ακρυλικού οξέος **11** σε απόδοση 39%. Η συνολική απόδοση της παραπάνω συνθετικής πορείας υπολογίζεται σε 8%

Η δεύτερη συνθετική πορεία που κατοχυρώθηκε από την Astra Zeneca (Εικόνα 2.7) περιλαμβάνει βελτιστοποιήσεις στην πρώτη συνθετική πορεία η οποία αυξάνει την ολική απόδοση σύνθεσης του Osimertinib στο 56% ενώ, αξιοποιούνται ταυτόχρονα αντιδραστήρια τα οποία είναι φιλικότερα προς το περιβάλλον.

Η διαφοροποίηση στην πορεία σύνθεσης διεξάγεται σε τέσσερα στάδια. Συγκεκριμένα, η υποκατάσταση στην 3 θέση του *N*-μεθυλοϊνδολίου με υποκαταστάτη την ένωση **2** γίνεται με την χρήση καταλύτη FeCl₃ σε διαλύτη DME με απόδοση 81%. Κατά την υποκατάσταση του δεύτερου ατόμου χλωρίου για την παραγωγή της ένωσης **7** χρησιμοποιείται ως διαλύτης της αντίδρασης η 2προπανόλη στους 105 °C με απόδοση 95%. Επίσης κατά την αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης για την παραγωγή της ένωσης **9** δεν γίνεται η χρήση μικροκυμάτων με αλλαγή του διαλύτη από TFE σε DMA με το προϊόν να απομονώνεται με ανακρυστάλλωση σε ποσοστό 96%. Τέλος, το τελευταίο στάδιο αντικαθίσταται από δύο επιμέρους αντιδράσεις υψηλότερης συνολικής απόδοσης όπου η αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού λαμβάνει χώρα με χρήση του 3-χλωρο-προπανοϋλοχλωριδίου **13** με χρήση K₂CO₃ (95%) και ακολούθως απόσπαση HCl με την επίδραση Et₃N σε MeCN (94%).

31



Εικόνα 2.8: Δεύτερη κατοχυρωμένη συνθετική πορεία από την Astra Zeneca [17].

Άξια αναφοράς είναι και μια εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Osimertinib η οποία αναπτύχθηκε από κινέζους ερευνητές (Εικόνα 2.8) της οποίας η τελική απόδοση

ανέρχεται στο 60%. Πρόκειται για μία σειρά έξι αντιδράσεων της οποίας η κύρια διαφοροποίηση της έγκειται στην προσάρτηση της ένωσης **3** στο τελευταίο στάδιο της σύνθεσης του Osimertinib. Συγκεκριμένα, αρχικά λαμβάνει χώρα προστασία της αμινοομάδας της ανιλίνης **6** μέσω αντίδρασης με Boc ανυδρίτη **14** και στην συνέχεια αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης του προστατευμένου προϊόντος **15** με την χρήση της διαμίνης **8**. Ακολουθεί αναγωγή της νιτροομαδας της ένωσης **17** προς την αντίστοιχη άμινο και αφαίρεση της προστατευτικής ομάδας σε όξινες συνθήκες. Το παράγων προϊόν **18** αντιδρά με το χλωρίδιο του ακρυλικού οξέος για τον σχηματισμό αμιδικού δεσμού του προϊόντος **18**. Τέλος, η προσάρτηση της ένωσης **4** παράγει το Osimertinib [18].



Εικόνα 2.9: Κατοχυρωμένη εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Osimertinib

2.2.2.Sorafenib

Το Sorafenib (επιστημονική ονομασία BAY-43-9006) αποτελεί έναν από τους πρώτους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, καθώς εγκρίθηκε από τον FDA το 2005 και διατίθεται στην αγορά με την ονομασία Nevaxar. Ταξινομείται στην κατηγορία αναστολέων τυροσινικών κινασών και χορηγείται για την αντιμετώπιση του ηπατοκυτταρικού καρκινόματος (HCC), ενώ συνδέεται και με την καταπολέμηση του

καρκίνου των νεφρών [19]. Έχει αποδειχθεί ότι το Sorafenib είναι ένας αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών πολλαπλών στόχων καθώς η χορήγησή του έχει επιφέρει μείωση του ρυθμού αγγειογένεσης καθώς του ρυθμού του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων σε ασθενείς με HCC. Η μείωση του πολλαπλασιασμού έγκειται στην αναστολή της κινάσης Raf-1 και B-Raf με αποτέλεσμα την απορρύθμιση των μονοπατιών σηματοδότησης Ras/Raf/MEK/ERK. Η δράση του Sorafenib εκτείνεται στην δέσμευση και, κατά επέκταση, στην αναστολή της λειτουργίας τόσο του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFR-β), του υποδοχέα ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR2, Εικόνα 2.9) και του υποδοχέα του ηπατοκυτταρικού παράγοντα (c-KIT). Ωστόσο, ένα ιδιαίτερα σύνηθες πρόβλημα που προκύπτει σε ασθένεις με HCC είναι ότι σε αρκετές περιπτώσεις επιγενετικές τροποποιήσεις, ήτοι αλλαγές στην έκφραση γονιδίων χωρίς μεταβολή της αλληλουχίας του DNA, οι οποίες είτε κληρονομούνται είτε δημιουργούνται μέσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλάζουν τον μηχανισμό λειτουργίας διεργασιών των κυττάρων συμπεριλαμβανομένων τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μηχανισμοί αντίστασης του οργανισμού ως προς το Sorafenib [20].



Εικόνα 2.10: Αλληλεπιδράσεις του Sorafenib με τον VEGFR2

Σύνθεση του Sorafenib

Η σύνθεση του Sorafenib αναπτύχθηκε από τον Bankston (Εικόνα 2.10) και τους συνεργάτες του οι οποίοι συνέθεσαν το Sorafenib μέσα από μια πειραματική πορεία 4 βημάτων με πολύ καλές αποδόσεις. Αναλυτικότερα το πικολινικό οξύ **20** αντιδράει με θειονυλοχλωρίδιο σε διαλύτη *N*,*N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) υπό άνυδρες συνθήκες παράγοντας το υποκατεστημένο χλωρίδιο του πικολινικού οξέος **21** σε απόδοση 89%. Στην συνέχεια η ένωση **21** αντιδρά με μεθυλαμίνη παρουσία βάσης ανθρακικού καλίου σε τετραϋδροφουράνιο (THF) προς σχηματισμό αμιδικού
δεσμού της ένωσης **22**. Ακολούθως πραγματοποιείται αντίδραση S_NAr για την δημιουργία του διάρυλοαιθέρα **23** και τέλος το Sorafenib σχηματίζεται ως προϊόν της αντίδρασης της ένωσης **23** και του υποκατεστημένου φαίνυλο-ισοκυανικού **24** σε διχλωρομεθάνιο σχηματίζοντας δεσμό ουρίας.



Εικόνα 2.11: Κατοχυρωμένη σύνθεση του Sorafenib [19]

Ο Zhang και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια εναλλακτική σύνθεση κατά την οποία ο καρβαμιδικός φαινυλεστέρας **25** αντιδρά με την ανιλίνη **23** παρουσία ασθενούς βάσης (π.χ. πυριδίνη) από τα οποία προκύπτει το Sorafenib σε απόδοση 48,2%. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι η μέθοδος αυτή προτείνεται για παραγωγή μεγάλης κλίμακας[19].



Εικόνα 2.12: εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Sorafenib [19]

2.2.2.3. Mobocertinib

To Mobocertinib (Εικόνα 2.12) αποτελεί έναν τον μόλις πρόσφατα εγκεκριμένο αναστολέα του υποδοχέα του EGFR, καθώς εγκρίθηκε στις 15 Σεπτεμβρίου του 2021, επίσης για την αντιμετώπιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Ανήκει στην κατηγορία αναστολέων τύπου 6. καθώς αναπτύσσει ομοιπολικό δεσμό με την κυστεΐνη 797 του EGFR. Χορηγείται δια στόματος σε ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από NSCLC των οποίων οι μεταλλάξεις φέρονται στην περιοχή του εξονίου 20 του γονιδίου του EGFR (EGFRex20ins). Πρόκειται για λιγότερο συνήθεις μεταλλάξεις οι οποίες, ωστόσο, προκαλούν αντίσταση σε άλλους αναστολείς του EGFR (κυρίως πρώτης ή δεύτερης γενιάς) καθώς προάγουν διαμορφωτικές αλλαγές που μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης επιφέρουν τόσο αποτροπή της δέσμευσης του φαρμάκου στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα όσο και τον παρεμποδισμό της ανενεργής διαμόρφωσής της με αποτέλεσμα την χημειοανθεκτικότητα και την ραγδαία αύξηση του όγκου. Η μοριακή σχεδίαση του Mobocertinib, το οποίο κατατάσσετσαι στους αναστολείς τρίτης γενιάς, στοχεύει αμιγώς σε μεταλλάξεις στο εξόνιο 20 (και συγκεκριμένα τα αμινοξέα 767-774) του EGFR. Διεξήχθη με γνώμονα τη σύνθεση μορίου το οποίο θα αναστέλλει τον EGFR ο

οποίος θα φέρει τόσο την συνήθη μετάλλαξη Τ790Μ όσο και την L858R. Όπως διαπιστώθηκε, απαραίτητη για την εκλεκτικότητα έναντι της μετάλλαξης T790M ήταν η παρουσία ενός πυριμιδινικού δακτυλίου υποκατεστημένου με αμινομάδα στην 2-θέση και συνδεδεμένη με ινδολικό δακτύλιο στην 4-θέση, αλλά και για την υψηλή δραστικότητα (χαμηλό IC₅₀) η παρουσία υποκατεστημένου ακρυλαμιδίου του οποίου η συνεισφορά είχε ήδη αναφερθεί από τους ήδη εγκεκριμένους τότε αναστολείς Afatinib και Dacomitinib. [21, 22]



Εικόνα 2.13: Δομή του Mobocertinib. Με κόκκινο χρώμα ο υποκατεστημένος πυρημιδινικός δακτύλιος και με μπλε το υποκατεστημένο ακρυλαμίδιο.

Σύνθεση του Mobocertinib

Το Mobocertinib αναπτύχθηκε από την Ariad pharmaceuticals, ενώ η σύνθεση του αναπτύχθηκε από την εταιρεία Takeda Pharmaceuticals. Η πειραματική πορεία σύνθεσής του συνοψίζεται σε 6 βήματα. Συγκεκριμένα κατά το πρώτο στάδιο ο 2,4διχλωροπυριμιδινο-5-καρβοξυλικός 26 μεθυλεστέρας αντιδρά με το Νμεθυλοϊνδόλιο 12 παρουσία οξέος κατά Lewis AlCl3 ως καταλύτη για την σύνθεση του ενδιάμεσου 27. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται υποκατάσταση και του δεύτερου ατόμου χλωρίου του πυριμιδινικού δακτυλίου με χρήση της τετραϋποκατεστημένης ανιλίνης 6 παρουσία ρ-τολουολοσουλφονικού οξεός σε διαλύτη διοξάνιο για την παραγωγή της ένωσης 28 η οποία αντιδράει με την διαμίνη 8 σε με ακετονιτρίλιο παρουσία ανθρακικού καλίου παράγοντας την ένωση **29**. H ένωση 29 παρουσία ισχυρής βάσης διοχετεύεται σε περίσσεια ισοπροπανόλης. Το προκύπτον προϊόν 30 υφίσταται αναγωγή της νίτρομάδας του προς την αντίστοιχη αμινο-ένωσης **31.** Τέλος, το Mobocertinib παράγεται με τν σχηματισμό αμιδικού δεσμού με τη χρήση ακρυλικού οξέος παρουσία της βάσης DIPEA και αντιδραστηρίου σύζευξης EDCL [23].



Εικόνα 2.14: Σύνθεση του Mobocertinib από την Takeda Pharmaceuticals [23].

2.3 Αναφορά στην σύνθεση και στην βιολογική συνεισφορά των επιμέρους δομικών μονάδων των σχεδιασθέντων μορίων.

2.3.1. Ινδόλιο



Εικόνα 2.15: Δομή ινδολίου

Το ινδόλιο είναι ένα δικυκλικό μόριο το οποίο προκύπτει από την συνένωση ενός μορίου βενζολίου και ενός μορίου πυρρολίου. Πρόκειται για ένα εκτενές συζυγιακό σύστημα 10π ηλεκτρονίων το οποίο σύμφωνα με τον κανόνα του Hückel καθίσταται και αρωματικό. Λόγω του sp² υβριδισμού τόσο των ατόμων άνθρακα όσο και του ετεροατόμου, του αζώτου, συμπεραίνεται ότι το μόριο εκτείνεται σε ένα επίπεδο. Κατά την αρίθμηση των θέσεων η θέση ένα περιλαμβάνει την θέση που βρίσκεται το ετεροάτομο και συνεχίζει κυκλικά απαριθμώντας πρώτα τα άτομα άνθρακα του πυρρολικού δακτυλίου. Από τους τύπους συντονισμού (Εικόνα 2.16) καθίσταται σαφές ότι η πλέον δραστική θέση για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης είναι η θέση 3 ενώ παράλληλα η συνεισφορά του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου καθιστά το άτομο του υδρογόνου όξινο και συνεπώς, ιδιαίτερα δραστικό σε αντιδράσεις υποκατάστασης σε βασικές συνθήκες.



Εικόνα 2.16: Δομές συντονισμού ινδολίου

Η σύνθεση του ινδολικού δακτυλίου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχουν δημοσιευθεί πληθώρα μεθόδων των οποίων τα προϊόντα επιτυγχάνουν την δημιουργία υποκατεστημένων ή μη ινδολίων.

2.3.1.1. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer

Η παρακάτω σύνθεση αναπτύχθηκε από τους Fischer και Jourdan το 1883 (Εικόνα 2.17). Πρόκειται για μία εκ των, μέχρι και σήμερα, θεμελιωδών μεθόδων σύνθεσης ινδολίου ή παραγώγων αυτού και περιλαμβάνει συμπύκνωση μίας αρυλοϋδραζίνης με καρβονυλικές ενώσεις παρουσία οξέος είτε κατά Bronsted (HCl, CH₃COOH κλπ.) είτε κατά Lewis (π.χ. NiCl₂) [24].



Εικόνα 2.17: Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer [24].

2.3.1.2. Σύνθεση ινδολίου κατά Mori-Ban

Το 1977 οι Miwako Mori, Katsumi Chiba και ο Yoshio Ban (Εικόνα 2.18) δημοσίευσαν μία σειρά από αντιδράσεις σύνθεσης ινδολικού δακτυλίου οι οποίοι προκύπτουν από μια καταλυόμενη από παλλάδιο ενδομοριακή αντίδραση ενός αρυλαλογονιδίου το οποίο φέρει ολεφινικό δεσμό [25].



Εικόνα 2.18: Σύνθεση ινδολίου κατά Mori-Ban .

2.3.1.3. Σύνθεση ινδολίου κατά Hemetsburger

Η σύνθεση κατά Hemetsburger (Εικόνα 2.18) περιλαμβάνει σύνθεση του 2-καρβόξυ υποκατεστημένου ινδολίου μέσω ενδομοριακής θερμόλυσης α-αζιδοκινναμικών εστέρων σε διαλύτη ξυλόλιο σε πολύ καλές αποδόσεις [26].



Εικόνα 2.19: Σύνθεση ινδολίου κατά Hemetsburger [26].

2.3.1.4. Σύνθεση ινδολίου κατά Kanematsu

Η σύνθεση ινδολίου κατά Kanematsu (Εικόνα 2.19) αφορά μια εναλλακτική συνθετική πορεία σύνθεσης ινδολίου όπου αρχικά παράγεται τετραϋδροινδόλιο ως προϊόν ενδομοριακής αντίδρασης Diels-Alder και στην συνέχεια αφυδρογόνωση του προς τον σχηματισμό ινδολικού δακτυλίου [27].



Εικόνα 2.20: Σύνθεση κατά Kanematsu [27].

2.3.2. Το ινδόλιο ως δομικό στοιχείο φυσικών προϊόντων και βιοδραστικών μορίων

2.3.2.1. Εγκεκριμένα φάρμακα των οποίων η βιοδραστική ουσία φέρει ινδολικό δακτύλιο

Η βιολογική δράση των μορίων που φέρουν ινδόλιο αποτελεί αντικείμενο διερεύνησης για πάνω από 40 χρόνια. Ανέκαθεν, κατά την ορθολογική ανάπτυξη και μελέτη βιοδραστικών ενώσεων οι επιστήμονες προσπαθούν να βρουν θεμελιώδεις χημικές δομές από τις οποίες θα ξεκινούσε ο σχεδιασμός και θα πραγματοποιείται η περαιτέρω ανάπτυξη τους. Οι ετεροκυκλικές δομές συμπεριλαμβανομένου του ινδολικού δακτυλίου αποδείχθηκαν μία εξαιρετική βάση σχεδιασμού φαρμάκων καθώς αποτελούν ομοεπίπεδα μόρια ο συνδυασμός των οποίων μπορεί να δημιουργήσει πολυκυκλικές δομές οι οποίες διαμορφώνονται στο χώρο με τάξη και επομένως, εγγυόνται σαφή και συγκεκριμένη βιολογική εξειδίκευση. Έκτοτε έχουν αναπτυχθεί φάρμακα που φέρουν ινδόλιο και στοχεύουν στην καταπολέμηση πολλών παθογενειών όπως αντικαρκινικά, όπως ο αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών Cediranib ο οποίος αναστέλλει τον απορρυθμισμένο ενδοθηλειακό παράγοντα (VEGFR). Επιπροσθέτως με βάση το ινδόλιο έχουν αναπτυχθεί ανοσοτροποιητικά όπως το Oglufanide το οποίο καταπολέμα την ηπατίτιδα C, αγγειοδιασταλτικά, όπως το Viscamine, αντιυπερτασικά, όπως το Reserpine του οποίου 0 μηχανισμός δράσης έγκειται στην άρση της αποθήκευσης νευροδιαβιβαστών σε κυστίδιο και εν συνεχεία μεταβολισμό τους από την αντίστοιχη υπεροξειδάση, αντικαταθληπτικά όπως το indalpine του οποίου ο μηχανισμός δράσης δεν έχει εξακριβωθεί και αντιικά με χαρακτηριστικό παράδειγμα το arbidol που συνιστά ένα εκ των θεμελιωδών φαρμάκων για λοιμώξεις του αναπνευστικού. Τέλος, το Atevirdine φαίνεται να περιορίζει την δράση του ιού του ΗΙV αφού συνδέεται στην ανάστροφη μεταγραφάση του ιού και αναστέλλει την δράση των RNA και DNA πολυμερασών (Εικόνα 2.21) [28].



Εικόνα 2.21: Παραδείγματα βιοδραστικών ενώσεων με βάση το ινδόλιο

2.3.2.2. Φυσικά προϊόντα που φέρουν ινδόλιο των οποίων η βιοδραστική αξίαβρίσκεται υπό διερεύνηση

Μία μεγάλη κατηγορία φυσικών προϊόντων τα οποία φέρουν κατά κόρων το ινδόλιο στην δομή τους και έχουν απασχολήσει την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα λόγω της βιοδραστικότητάς τους είναι τα φυσικά αλκαλοειδή. Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες που απαντώνται σε πολλές φυσικές πηγές τα μοριακά τους τμήματα, παρουσιάζουν εξαιρετική ποικιλία ενώ κάποια έχει αποδειχθεί κλινικά ότι σχετίζονται άμεσα με την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων [29]. Η δισλευκονοθίνη **42**, η βιολασίνη **43** και το 3,3 διινδολομεθάνιο **44** (Εικόνα 2.22) είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών αλκαλοειδών των οποίων οι δομή φέρει δακτύλιο ινδολίου και έχουν κλινικά αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση [30-32].



Εικόνα 2.22: Δομές δισλευκονοθίνης Α, βιολασίνης και 3,3-διινδολομεθανίου. Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται τα τμήματα ινδολίου.

2.3.3. Υβρίδια ινδολίου πυριμιδίνης (indole-pyrimidine hybrids)

Ο δακτύλιος της πυριμιδίνης είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές δομικές μονάδες των βιομορίων. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι αζωτούχες βάσεις οι οποίες φέρουν δακτύλιο πυριμιδίνης στο μόριο τους. Συμπερασματικά, η πυριμιδίνη συμμετέχει ενεργά σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως η αντιγραφή του DNA, η σύνθεση RNA κλπ. Η κομβική συμβολή της πυριμιδίνης στην κυτταρική λειτουργία κατηύθυνε την επιστημονική κοινότητα ώστε να εξετάσει ενδελεχώς το ενδεχόμενο η συγκεκριμένη δομική μονάδα να συνεισφέρει στην ικανότητα συνθετικών βιοδραστικών μορίων να δεσμεύονται σε πρωτεΐνες και να αλληλεπιδρούν με αυτές. Ανατρέχοντας στους, εγκεκριμένους από τον FDA, αναστολείς πρωτεΐνικών κινασών και όχι μόνο, συμπεραίνεται ότι η πυριμιδίνη είναι ενσωματομμένη αρκετούς αναστολείς πιστοποιώντας τη σπουδαιότητα της.

Γνωρίζοντας την ιδιότητα του ινδολίου και της πυριμιδίνης να αλληλεπιδρούν με βιομόρια έχουν αναπτυχθεί πληθώρα υβριδίων (Εικόνα 2.23) που φέρουν και τις δυο αυτές δομικές μονάδες στο μόριο τους. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα το οποίο αναφέρεται λεπτομερώς παραπάνω είναι το Osimertinib το οποίο εγκρίθηκε το 2015 για την αντιμετώπιση του T790M μη θετικού μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, έχουν συντεθεί αρκετά ακόμα υβρίδια ινδολίου-πυριμιδίνης των οποίων η βιοδραστικότητα εξετάζεται ακόμα σε προκλινικό στάδιο (in vivo, in vitro) και των οποίων τα αποτελέσματα είναι άκρως ενθαρρυντικά.





Εικόνα 2.23: Ενδεικτικά παραδείγματα υβριδίων ινδολίου πυριμιδίνης με σημαντική in vivo αντικαρκινική δράση.

Ενδεικτικά το υβρίδιο **45** επέδειξε in vitro αντικαρκινική δράση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές PC3 και HepG2, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους μέσω προαγωγής της αυτοφαγίας μετά από διακοπή του κυτταρικού κύκλου τους, ενώ ταυτόχρονα έχει δείξει συνεργατική δράση με τον αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών gefitinib έναντι του EGFR (Εικόνα 2.24) [33]. Το υβρίδιο **46** παρουσίασε αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση των κινασών EGFR, VEGFR-1, VEGFR-2 PDGFR-β της κυτταρικής σειράς A43.[34] Το υβρίδιο **47** έδειξε υψηλή δραστικότητα έναντι της κινάσης ATR σε κυτταρική σειρά HT29 που φέρουν αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και τέλος, ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης της MLL AF9, λευχαιμικής κυτταρικής σειράς, έλαβε χώρα με την χορήγηση του υβριδίου 48[35, 36].



Εικόνα 2.24: Δομή του Gefitinib

2.4 Μεριδιανίνες

Οι μεριδιανίνες (Εικόνα 2.25) αποτελούν μια κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν στα φυσικά αλκαλοειδή και εκκρίνονται από τον θαλάσσιο οργανισμό Aplidium Meridianum διαδραματίζοντας αμυντικό μηχανισμό πιθανότατα για την απώθηση θηρευτών. Οι μεταβολίτες αυτοί φέρουν στο μόριό τους έναν δακτύλιο ινδολίου ο οποίος φέρει ομάδα υδροξυλίου ή/και άτομο βρωμίου στο βενζολικό του τμήμα βενζολίου ενώ η 3-θέση είναι υποκατεστημένη με μία 2αμινοπυριμιδίνη. Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί 8 δομές (με ονομασία Α-Η) αυτών των μεταβολιτών (Εικόνα 2.25) των οποίων η δομή σχετίζεται και με άλλα φυσικά αλκαλοειδή όπως οι βαριολίνες και οι μεριλιονίνες [37]. Από την απομόνωσή και ταυτοποίηση τους και έπειτα οι μεριδιανίνες συνιστούν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αντικείμενο διερεύνησης καθώς πολλές από τις δομές τους έχουν δείξει αξιόλογη βιολογική δράση έναντι της αναστολής πλήθους πρωτεϊνικών κινασών (CDK1, CDK5, PKA, PKG, GSK3)[38].



Εικόνα 2.25: Δομή μεριδιανίνων

Meridianine	R ₁	R ₂	R ₃	R_4
А	OH	Н	Н	Н
В	ОН	Н	Br	Н
С	Н	Br	Н	Н
D	Н	Н	Br	Н
E	OH	Н	Н	Br
F	Н	Br	Br	Н
G	Н	Н	Н	Н
Н	ОН	Br	Н	Br

2.4.1. Σύνθεση μεριδιανινών κατά Bredereck

Η μέθοδος Bredereck (Εικόνα 2.26) είναι η πιο διαδεδομένη συνθετική πορεία για την σύνθεση μεριδιανών, ενώ είναι αυτή που ενδείκνυται για τη σύνθέση των μεριδιανίνων C, D και G. Πρόκειται για μία σύνθεση τεσσάρων βημάτων όπου αρχικά γίνεται προστασία του όξινου πρωτονίου του ινδολίου με τοσυλοχλωρίδιο σε απόδοση πάνω από 90%, ενώ στο δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα μια αντίδραση ακυλίωσης κατά Friedel-Crafts με ακετυλοχλωρίδιο και SnCl₄ ως καταλύτη (οξύ κατά Lewis) παράγοντας την ένωση **51**. Στη συνέχεια, η ένωση αντιδράει με την ακετάλη του DMF σε ο-ξυλένιο για να δώσει την αντίστοιχη εναμινόνη **52**, η οποία, έπειτα, αντιδρά ακολούθως με το υδροχλωρικό άλας μη υποκατεστημένης γουανιδίνης παρουσία ανθρακικού καλίου σε 1-προπανόλη δημιουργώντας το κυκλοποιημένο προϊον **53** απόμακρύνοντας, παράλληλα, προστατευτική ομάδα στην 1-θέση του ινδολίου [37].



Εικόνα 2.26: Σύνθεση μεριδιανών κατά Bredereck

2.4.2. Σύνθεση μεριδιανών κατά Müller και Jiang

Οι Müller και Jiang ανέπτυξαν δύο παρόμοιες συνθετικές πορείες για την παραγωγή μεριδιανινών και αναλόγων αυτών (Εικόνα 2.27). Το βασικό και κοίνο χαρακτριστικό είναι η επίδραση καταλυτικού παλλαδίου σε αρχικό υπόστρωμα ινδολίου το οποίο φέρει ατην 3-θέση ομάδα βορονικού. Συγκεκριμένα ο Jiang αναφέρει μια κλασική αντίδραση Suzuki μεταξύ του συγκεκριμένου υποστρώματος με της 4-χλωρο-2αμινοπυριμιδίνης. Αντίστοιχα, ο Müller περιγράφει μία «one-pot» σύνθεση MBSC (Masuda Borylation-Suzuki Coupling) [37, 39].



Εικόνα 2.27: Σύνθεση μεριδιανινών κατά Jiang (πάνω) και Muller (κάτω) [37].

2.4.3. Σύνθεση μεριδιανών κατά Υυ

Η σύνθεση που αναπτύχθηκε από τον Yu (Εικόνα 2.28) επισημαίνει μία σύνθεση μεριδιανινών μη καταλυόμενη από μέταλλο. Για την ακρίβεια, στο πρώτο στάδιο παράγεται από *Ν*-άκυλο υποκατεστημένο ινδόλιο το αντίστοιχο α,β-ακόρεστο καρβονυλικό προϊόν με την χρήση καρβόνυλο-θειοακετάλης και στην συνέχεια κυκλοποίηση με νιτρικό άλας μη υποκατεστημένης γουανιδίνης παρουσία καυστικού καλίου και αιθανόλης. Τέλος η αποπροστασία του ετεροατόμου του

ινδολίου πραγματοποιείται με χρήση tert-βουτοξειδίου του καλίου σε διαλύτη DMSO [40].



Εικόνα 2.28: Σύνθεση μεριδιανών κατά YU [40].

2.4.4.Σύνθεση μεριδιανινών κατά Penoni

Η σύνθεση κατά Penoni (Εικόνα 2.29) περιγράφει μια οικονομική μέθοδο σύνθεσης μεριδιανών από το αντίστοιχο 2-χλώρο κυκλοποιημένο προϊόν με χρήση υγρής αμμωνίας σε κλειστό σύστημα στους 80 °C, το οποίο προκύπτει από θερμική διάσπαση νιτροαρενίων με 2-χλωρο-4-αιθυνυλοπυριμιδίνης [37].



Εικόνα 2.29: Σύνθεση μεριδιανών κατά Penoni [37].

2.5 Η συμβολή του δεσμού της ουρίας σε αναστολείς

πρωτεϊνικών κινασών.

Η ουρία ως τμήμα βιοδραστικών ενώσεων αποτελεί προϊόν έντονης μελέτης. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια έχουν σημειωθεί αξιοσημείωτα αποτελέσματα τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο σε δοκιμές μορίων που φέρουν το συγκεκριμένο μοριακό τμήμα. Δεν είναι τυχαίο ότι από το 2015 μέχρι και το 2021 έχουν εγκριθεί από τον FDA οκτώ από τους 10 αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που φέρουν το συγκεκριμένο μοριακό οικοδόμημα (Εικόνα 2.30).



Εικόνα 2.30: Εγκεκριμένοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που φέρουν τμήμα υποκατεστημένης ουρίας [41].

Ο λόγος που η ουρία ερευνάται ενδελεχώς για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων είναι η «ευελιξία» που την χαρακτηρίζει. Συγκεκριμένα αν και, αρχικά, παρατηρείται μία εξασθένηση της ικανότητας δημιουργίας δεσμών υδρογόνου με τα αμιδικά άτομα αζώτου λόγο της συνεισφοράς του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων προς το καρβονυλικό τμήμα, εντούτοις παρατηρείται προσαρμογή ανάλογα με την φύση των υποκαταστατών που φέρει (αρωματικοί ή αλειφατικοί). Επίσης, το ίδιο φαινόμενο φαίνεται από κρυσταλλικά δεδομένα ότι ευνοεί διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με αρωματικά τμήματα αμινοξέων των πρωτεϊνών (π.χ. τρυπτοφάνη). Η αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα σε περιπτώσεις όπου το τμήμα ουρίας του μορίου βρίσκεται κάθετα σε σχέση με τα αρωματικά υποστρώματα των αμινοξέων έτσι ώστε τα πρωτόνια των αμιδικών ατόμων αζώτου να προσανατολίζονται προς αυτά [42].

Ωστόσο, η συνεισφορά της ομάδας ουρίας στους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι κατά μείζονα λόγο η δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου τόσο μέσω των αμιδικών πρωτονίων όσο και μέσω του καρβονυλίου. Δύο χαρακτηριστικά

53

παραδείγματα είναι το Sorafenib και το Lenvatinib τα οποία εισχωρούν στον υποδοχέα του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR2). Το μοριακό τμήμα ουρίας στα δύο σκευάσματα είναι καίριο στην αναγνώριση της ενεργής διαμόρφωσης της αλληλοεπιδρώντας με το Asp1046, και την πλευρική αλυσίδα του Glu885. Τελευταία μελετάται σε κλινικό επίπεδο ένας νέος εν δυνάμει αναστολέας με την κωδική ονομασία BIRB 796 (εικόνα 2.31) ο οποίος δεσμεύεται στον ενεργό κέντρο της κινάσης P38 (για την οποία δεν έχει εγκριθεί κανένα φάρμακο) κατά την οποία συμμετέχουν ένα εκ των δύο αμιδικών πρωτονίων (με την Glu71) και το οξυγόνο του καρβονυλίου (με το Asp 168) [41].



Εικόνα 2.31: Δομή του BIRP 796



Εικόνα 2.32 Αλληλεπιδράσεις του BIRP796 με τον P38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναφέρθηκε η τεράστια συνεισφορά και η μεγάλη συμμετοχή των πρωτεϊνικών κινασών σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών (πολλαπλασιασμός, απόπτωση κλπ). Επίσης αναδείχθηκε η αναγκαιότητα της εκτενούς τους μελέτης με απώτερο στόχο την ρύθμισή τους, γεγονός που απορρέει από την καρκινογένεση που μπορεί να προκαλέσει η απορρύθμισή των είτε αυτή οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες (σφάλμα στο γονιδίωμά τους) είτε σε επιγενετικούς παράγοντες (περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα). Την τελευταία εικοσαετία η επιστημονική κοινότητα έχει κάνει άλματα προόδου και έχει καταφέρει σε πολλές περιπτώσεις να περιορίσει ή ακόμα και να αναχαιτίσει την καρκινογένεση που οφείλεται στις απορρυθμισμένες κινάσες μέσω της σύνθεσης οργανικών μορίων μικρού μοριακού βάρους τα οποία δρουν ως ανταγωνιστές του ΑΤΡ εμποδίζοντας την μεταφορά της φωσφορικής ομάδας στις πρωτεΐνες στόχους και επομένως την ενεργοποίηση μεταβολικών μονοπατιών. Κάποια παραδείγματα εξ αυτών αναφέρθηκαν εκτενώς τόσο ως προς τον τρόπο αλληλεπίδρασης με το υπόστρωμα της εκάστοτε πρωτεΐνης όσο και ως προς τον τρόπο σύνθεσης τους. Επιπροσθέτως, επισημάνθηκε η σημασία των φυσικών προϊόντων και δη η βιοσυμβατότητα των δευτερογενών μεταβολιτών τους η οποία μπορεί να αποτελέσει οδηγό για την ανάπτυξη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών αλλά και εν γένει βιοδραστικών ενώσεων.

3.1 Σύνθεση νέων αναστολέων

Στο τέλος του προηγούμενου κεφαλαίου έγινε αναφορά σε τρεις χαρακτηριστικές ομάδες-τμήματα οργανικών μορίων οι οποίες παρατηρούνται σε πληθώρα εγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών, συγκεκριμένα του ινδολίου της πυριμιδίνης και, πιο συγκεκριμένα, της μονοϋποκατεστημένης 2-αμινοπυριμιδίνης, καθώς και της ουρίας. Οι προσπάθειες σύνθεσης περιλαμβάνουν μόρια που φέρουν και τα τρία μοριακά τμήματα, ενώ αντί του απλού ινδολίου φέρουν και διαφορετικά ινδολικά υποστρώματα όπως το 7-αζαϊνδόλιο, 6-φθοροϊνδόλιο και 5 νίτροϊνδόλιο. Παράλληλα, στο πλαίσιο σύνθεσης των νέων αναστολέων έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας της μεριδιανίνης G, οι οποίες δεν επέφεραν κάποιο ενθαρρυντικό αποτέλεσμα. Επίσης, διεξήχθη μία αξιολόγηση για την πορεία σύνθεσης των αναλόγων μεριδιανίνης με την μέθοδο Bredereck και κατά πόσο αυτή είναι μια προτεινόμενη μέθοδος σύνθεσης για τα διαφορετικά ινδολικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ή αν αξίζει να επιλεγούν άλλες μέθοδοι σύνθεσης γι' αυτά τα ανάλογα.



49G





Εικόνα 3.1: Μεριδιανίνη G και ανάλογα αυτής που συντέθηκαν στο εργαστήριο

Μετά την σύνθεση των αναλόγων, το ενδιαφέρον εστιάστηκε στον σχηματισμό δεσμού ουρίας μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης προσβολής. Τα 6 τελικά μόρια που συντέθηκαν, αξιολογήθηκαν ως προς την ενδεχόμενη βιολογική τους δράση με βάση τους κανόνες Lipinski και κρίθηκαν για το αν και με ποιο τρόπο μπορεί, ενδεχομένως να βελτιωθεί περαιτέρω η βιοδραστικότητα τους.



Εικόνα 3.2: Δομή των τελικών μορίων εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών που συντέθηκαν

Τα τελικά μόρια σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο με γνώμονα τους κανόνες Lipinski τους οποίους και ακολουθούν. Συγκεκριμένα, διαθέτουν 2-3 δότες δεσμού υδργόνου και 4-5 δέκτες δεσμών υδρογόνου όταν συνιστάται να έχουν έως 5 και 10 αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, το μοριακό τους βάρος είναι κατά προσέγγιση 500 και η τοπολογική πολική επιφάνεια είναι μεταξύ 100-115 όταν οι προτεινόμενες τιμές σύμφωνα με τους κανόνες Lipinski είναι 40-130.

Συμπερασματικά, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάδειξη και η αξιολόγηση της βελτιστοποίησης του φυσικού προϊόντος των μεριδιανινών ως αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, καθώς επίσης και η ανάπτυξη αυτών μέσω της αξιοποίησης δομικών μονάδων οι οποίες υφίστανται σε ήδη εγκεκριμένους αναστολείς.

3.2 Μοριακή μοντελοποίηση

Η μοριακή μοντελοποίηση αποτελεί έναν κλάδο της βιοπληροφορικής μέσω της οποίας προβλέπεται η διαμοριακή αλληλεπίδραση βιοδραστικών ενώσεων με πρωτεΐνες. Βασίζεται στην γνώση της αλληλουχίας των αμινοξέων της πρωτεΐνης, εν προκειμένω πρωτεϊνικής κινάσης, στην γνώση της τρισδιάστατης δομής της και την δομή του υπό διερεύνηση βιοδραστικού μορίου. Συνιστά ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο κατά τον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων καθώς βελτιστοποίησης ήδη εγκεκριμένων φαρμάκων αποτελώντας κατευθυντήριο οδηγό για την εκάστοτε παρέμβαση στη δομή αυτών.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η γνώση της αλληλουχίας των αμινοξέων του ενεργού κέντρου καθώς και της διάταξής τους στο χώρο συνιστά μέσο αξιολόγησης των νέων σχεδιασθέντων μορίων χωρίς την ανάγκη λήψης πειραματικών δεδομένων (π.χ. XRD, NMR).

Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των νέων σχεδιασθέντων μορίων. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος σε τέσσερις πρωτεϊνικές κινάσες και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά των ήδη εγκεκριμένων αναστολέων (για τον P38 δεν έχει εγκριθεί κάποιο σκεύμασμα ωστόσο έχει απομονωθεί η κρυσταλλογραφική δομή με το Sorafenib). Η σύγκριση έγκειται στην ενέργεια Gibbs που υπολογίζεται από το πρόγραμμα και εκφράζει το πόσο ισχυρή είναι η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης μορίου.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3):

ΔG	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ			
ΠΡΩΤΕΙΝΗ	EGFR	P38	CFSR1	FGFR
LIGAND	8,5	11,5	12,7	10,2
T1	9,1	9,6	5,9	10,3
Т3	8,4	8,4	7,2	9,7
Τ4α	10,2	7,3	10,3	11.5
T5	9,3	8,7	6,1	8,9
Т6	8,9	9,5	5,8	10,4

Πίνακας 3: Τιμές ΔG αλληλεπίδρασης των T1, T3, T4α ,T5 και T6 συγκριτικά με τις τιμές ΔG των αναστολέων των κρυσταλλογραφικών δεδομένων για κάθε πρωτεϊνική κινάση

Τα "ligands" που αξιοποιήθηκαν ως δομές αναφοράς για την εκάστοτε πρωτεϊνική κινάση είναι το Osimertinib για τον EGFR, το Sorafenib για τον P38, το Pexidartinib για τον CFSR1, και το Lenvatinib για τον FGFR (Εικόνα 3.3) ενώ, το T4α αποτελεί τελική ένωση η οποία σχεδιάστηκε αλλά η σύνθεση του δεν επετεύχθη κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων (Εικόνα 3.4).

Από τα αποτελέσματα στοιχεία του πίνακα παρατηρείται ότι τα τελικά μόρια τα T1, T4α, T5 και T6 επέδειξαν πιο ισχυρή αλληλεπίδραση με το ενεργό κέντρο του EGFR συγκριτικά με το Osimertinib ενώ, τα T1, T5 και T6 επέδειξαν ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τον FGFR έναντι του Lenvatinib. Τέλος, τα αποτελέσματα για το p38 και CFSR1 δεν ήταν το ίδιο ενθαρρυντικά.



Εικόνα 3.3: Δομές των Osimertinib, Sorafenib, Lenvatinib και Pexidartinib



Εικόνα 3.4: Δόμή του Τ4α

Το πρόγραμμα που μέσω του οποίου εξήχθησαν τα θεωρητικά αποτελέσματα και αξιολογήθηκαν τα τελικά μόρια ήταν το AutodockVina ενώ, η απεικόνιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μορίων-πρωτεϊνικών κινασών πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Discovery Studio.

3.2.1. Αλληλεπιδράσεις των Τ1, Τ4α, Τ5 και Τ6 με τον EGFR

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μοριακής μοντελοποίησης του πίνακα 3 τα T1, T4α, T5 και T6 παρουσιάζουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τον EGFR έναντι του Osimertinib. Οι επιμέρους διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των τελικών μορίων παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 3.5-3.8



Εικόνα 3.5: Αλληλεπιδράσεις του T1 με τον EGFR

Παρατηρώντας τις αλλεπιδράσεις του T1 με τον EGFR παρατηρείται ότι τόσο ο ινδολικός όσο και ο πυριμιδινικός δακτύλιος αλληλεπιδρούν με αρκετά αμινοξέα κυρίως με την μορφή σ-π αλληλεπιδράσεων (Val31, Leu145) αλλά και με γειτονικές πλευρικές αλυσίδες (Met91, Ala48) το οποίο δεν προκαλεί έκπληξη καθώς το συγκεκριμένο μοριακό τμήμα υφίσταται και στο Osimertinib. Εντούτοις η ένταξη του δεσμού της ουρίας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς απεικονίζεται αλληλεπίδραση δύο δεσμών υδρογόνου του διαμιδίου με την Met94. Τέλος, ο βενζολικός δακτύλιος καταγράφει αλληλεπίδραση με την Leu23 και η τριφθορομέθυλο ομάδα με την Gly97.



Εικόνα 3.6: Αλληλεπιδράσεις του Τ4α με τον EGFR.

Όσο αναφορά το Τ4α παρατηρείται ότι κανένα από τα 3 αμιδικά πρωτόνια δεν δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα γειτονικά αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Ωστόσο, ο πυρημιδινικός δακτύλιος σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το Asp101. Το ινδόλιο διατηρεί π αλληλεπιδράσεις με γειτονικά αμινοξέα ενώ, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος επίσης διατηρεί παρόμοιες αλληλεπιδράσεις. Τέλος, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ δύο εκ των ατόμων φθορίου της τριφθορομεθυλο ομάδας με το Asp146.



Εικόνα 3.7: Αλληλεπιδράσεις του T5 με τον EGFR

Το Τ5 κατέγραψε τέσσερις δεσμούς υδρογόνου τους περισσότερους για καθένα από τα τελικά μόρια οι τρεις εκ των οποίων σχηματίζονται με την Met94 και ένας ακόμη χάρη στο άτομο φθόριο του ινδολικού δακτυλίου που αλληλεπιδρά με την Lys50 του. Επίσης παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις του πυριμιδινικού αλλά και του βενζολικού δακτυλίου δακτυλίου παρόμοιες με αυτές του T1, ωστόσο φαίνεται να έχουν εξασθενίσει οι αλληλεπιδράσεις του ινδολικού δακτυλίου με το βιομόριο.



Εικόνα 3.8: Αλληλεπιδράσεις του T6 με τον EGFR

Αναφορικά για το T6 παρατηρήθηκε ισχυρή αλληλεπίδραση του ινδολικού δακτυλίου με το Asp101 ενώ, η Met94 διατήρησε τον δεσμό υδρογόνου μόνο με ενός εκ των ατόμων αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου συγκριτικά με το T5. Η τριφθορομέθυλο ομάδα κατέγραψε αλληλεπιδράσεις με 2 αμινοξέα (Asp156, Asn143) ενώ ο βενζολικός δακτύλιος αλληλεπιδρά πλευρικά με την Val31.

3.2.2. Αλληλεπιδράσεις των T1, T4a και T6 με τον FGFR

Συγκρίνοντας τις τιμές ΔG των τελικών μορίων T1, T4a και T6 με την αντίστοιχη του Lenvatinib παρατηρείται ότι η πρόσδεση αυτών ευνοείται στο ενεργό κέντρο του FGFR σε σύγκριση με το φαρμακευτικό σκεύασμα. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι επιμέρους διαμοριακές αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 3.9:Αλληλεπιδράσεις του T1 με τον FGFR

Το Τ1 σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου μέσω του ενός αμιδικού πρωτονίου και ενός ατόμου αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου με τα αμινοξέα Ser99 και ALA98, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, παρατηρείται ισχυρή αλληλεπίδραση του ινδολικού δακτυλίου με το φορτισμένο Glu105. Ο βενζολικός δακτύλιος αλληλεπιδρά με τις πλευρικές αλυσίδες τριών αμινοξέων (Leu146, Val95, Ala49). Τέλος, παρουσιάζεται και μία μη επιθυμητή αλληλεπίδραση μεταξύ ενός αμιδικού πρωτονίου και της Ala98.



Εικόνα 3.10: Αλληλεπιδράσεις του T4α με τον FGFR

Το Τ4α έδειξε την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τον FGFR (μικρότερη τιμή ΔG) και αυτό πιστοποιείται και από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Καταγράφονται τέσσερις δεσμοι υδρογόνου δύο εκ των οποίων μεταξύ των αμιδικών πρωτονίων της ουρίας και του Glu105 ενώ, στους άλλους δύο συμμετέχουν ένα άτομο αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου (με την Lys51 και η τριφθορομέθυλο ομάδα (με την Tyr97). Ακολούθως, τα π τροχιακά και των τεσσάρων δακτυλίων συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις τόσο με τις πλευρικές ομάδες γειτονικών αμινοξέων όσο και με αμιδικούς δεσμούς πάνω στην αλληλουχία των αμινοξέων (Lys100).



Εικόνα 3.11: Αλληλεπιδράσεις του T6 με τον FGFR

Το Τ6 φαίνεται να διαμορφώνει τις ίδιες αλληλεπιδράσεις με το Τ1 γεγονός που δεν αποτελεί έκπληξη καθώς τα δύο μόρια είναι σχεδόν ταυτόσημα.

3.3. Συνθετική πορεία ανάλογων μεριδιανίνης

Για τα τελικά μόρια που συντέθηκαν ακολουθήθηκε μία αποκλίνουσα πειραματική πορεία σύνθεσης η οποία βασίζεται στην μέθοδο σύνθεσης μεριδιανών Bredereck. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινώντας από το εκάστοτε ινδολικό παράγωγο (είτε το ινδόλιο αυτό καθ' αυτό) διεξήχθη μία μεθυλίωση στο πυρρολικό άζωτο του ινδολικού

δακτυλίου χρησιμοποιώντας ως μεθυλιωτικό αντιδραστήριο το μέθυλοϊωδίδιο. Στη σύνεχεια, πραγματοποιήθηκε μία ακυλίωση κατά Friedel-Crafts με καταλύτη το οξύ κατά Lewis FeCl₃ χρησιμοποιώντας ως ακυλιωτικό αντιδραστήριο τον οξικό ανυδρίτη, έναντι του πιο ευρέως χρησιμοποιούμενου ακετυλοχλωριδίου. Η ακυλίωση έλαβε χώρα σχεδόν αποκλειστικά στην 3-θέση του υποστρώματος. Ακολουθήσε μία αντίδραση σύνθεσης του αντίστοιχου προϊόντος υποκατεστημένης εναμινόνης με τη χρήση της διμέθυλοακετάλης του DMF. Τέλος, η κυκλοποίηση της εναμινόνης έγινε με αντίδραση μη υποκατεστημένης γουανιδίνης ώστε να σχηματιστεί η 4-υποκατεστημένη 2-αμινοπυριμιδίνη. Στην συνέχεια και δεδομένου ότι στο υπόστρωμα της 2-άμινοπυριμιδίνης δεν περιγράφεται στην παγκόσμια βιβλιογραφία αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής προς τον σχηματισμό δεσμού ουρίας πραγματοποιήθηκαν πολλές προσπάθειες μέχρι την επίτευξη της σύνθεσης τους.



Εικόνα 3.12: Σύνθεση κατά Bredereck με αρχικό υπόστρωμα μη υποκατεστημένο ινδόλιο



Εικόνα 3.13: Σύνθεση ανάλογου μεριδιανίνης κατά Bredereck με αρχικό υπόστρωμα μη υποκατεστημένο 7-αζαϊνδόλιο



Εικόνα 3.14: Σύνθεση ανάλογου μεριδιανίνης κατά Bredereck με αρχικό υπόστρωμα το 5νιτροϊνδόλιο



Εικόνα 3.15: Πορεία σύνθεσης ανάλογου μεριδιανίνης με αρχικό υπόστρωμα το 6-φθοροϊνδόλιο

3.3.1. Σύνθεση των ανάλογων μεριδιανίνης: Σχόλια και

συμπεράσματα

Γενικά για την σύνθεση ανάλογων μεριδιανίνης παρατηρείται ότι χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ινδολικά υποστρώματα, αρχικά τα οποία χαρακτηρίζονται από ένα κοινό χαρακτηριστικό, ότι δηλαδή είναι πιο φτωχά ηλεκτρονιακά συγκριτικά με το μη υποκατεστημένο ινδόλιο. Δεδομένου ότι όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα αποτελούν μόρια τα οποία διαθέτουν ένα εκτενές αρωματικό σύστημα, διαπιστώνεται ότι τόσο το ετεροάτομο του αζώτου όσο και η νιτρομάδα μπορούν να επηρεάσουν τις αποδόσεις των αντιδράσεων των ανάλογων μεριδιανίνης. Όπως αναφέρεται και παραπάνω ένας από τους σκοπούς της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση της μεθόδου Bredereck για τη σύνθεση των εν λόγω ανάλογων μεριδιανίνης. Στους παρακάτω πίνακες αναγράφεται η πειραματική διαδικασία των επιμέρους αντιδράσεων με τις υψηλότερες αποδόσεις των επιθυμητών προϊόντων.

Μεθυλίωση	Απόδοση	Eq NaH	Eq CH₃l	Χρόνος (λ.)
Ινδόλιο	98%	2	2	25
7-αζαϊνδόλιο	98%	2	2	30
5-νιτροϊνδόλιο	98%	2,5	2,5	45
6-φθοροϊνδόλιο	98%	2,5	2,5	30

Πίνακας 3.1: Αντίδραση μεθυλίωσης για τα 4 υποστρώματα

Για την αντίδραση μεθυλίωσης παρατηρούμε ότι το αρχικό υπόστρωμα δεν επηρεάζει ιδιαίτερα την αντίδραση, καθώς η απόδοση αγγίζει το 100%. Η χρήση 2 ισοδύναμων NaH για τα υποστρώματα του 7-αζαϊνδολίου και του 5-νίτροϊνδολίου φαίνεται ότι σχημάτιζαν το επιθυμητό προϊόν ωστόσο η αντίδραση ήταν αρκετά πιο αργή καθώς ακόμα και μετά από 2 ώρες κατά τον έλεγχο TLC αποτυπωνόταν ποσότητα της αρχικής ένωσης. Με χρήση 2,5 ισοδύναμων η αντίδραση ολοκληρωνόταν σε λιγότερο από 45 λεπτά και για τα 4 υποστρώματα.

Ακυλίωση	Απόδοση (%)	Eq AlCl₃	Eq (Ac ₂)O	Time (h)
Ινδόλιο	64%	2	1,2	4
7-αζαϊνδόλιο	89%	3	1,3	2
5-νιτροϊνδόλιο	71%	3	1,3	4
6-φθοροϊνδόλιο	66%	3	1,3	3

Πίνακας 3.2: Πίνακας αντιδράσεων ακυλίωσης κατά Friedel-Crafts για τα 4 υποστρώματα

Με μία πρώτη προσέγγιση μπορεί να υποθέσει κάποιος ότι, εφόσον το ετεροάτομο του αζώτου και η νίτρομάδα αφαιρούν ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον ινδολικό δακτύλιο, η απόδοση της αντίδρασης για το μη υποκατεστημένο ινδόλιο θα έπρεπε να είναι η μεγαλύτερη αφού εξαρτάται και από τον ισχύ της πυρηνοφιλίας της 3θέσης του ινδολίου. Εντούτοις, για το μη υποκατεστημένο ινδόλιο η απόδοση ήταν μικρότερη. Κατά την διεξαγωγή των αντιδράσεων παρατηρήθηκε ότι για το ινδόλιο υπήρχε τάση δημιουργίας περισσότερων παραπροϊόντων, ακόμα και όταν η αντίδραση διενεργήθηκε και σε θερμοκρασία υπό του μηδενός. Η δε χρήση του ακετυλοχλωριδίου το οποίο είναι πιο δραστικό ηλεκτρονιόφιλο από τον οξικό ανυδρίτη επέτεινε το παραπάνω πρόβλημα. Αντίθετα, στα άλλα δυο υποστρώματα το επιθυμητό προϊόν, ήτοι η ακετυλίωση στη 3-θέση του ινδολίου, πραγματοποιήθηκε ευκολότερα και με πολύ καλή απόδοση σε σχέση με αυτή του απλού ινδολίου. Σημειώνεται ότι το AlCl₃ χρειάστηκε να βρίσκεται σε μεγαλύτερη περίσσεια κι αυτό ενδεχομένως οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις αυτού με το ετεροάτομο του αζώτου και την νίτρο ομάδα αντίστοιχα.

Εναμινόνη Απόδοση (%)		Eq DMF-DMA	Χρόνος (h)	
Ινδόλιο	81%	5	36	
7-αζαϊνδόλιο	65%	3	72	
5-νιτροϊνδόλιο	75%	3	60	
6-φθοροϊνδόλιο	23%	8	72	

Πίνακας 3.3: Αντίδραση σχηματισμού εναμινόνης για τα 4 υποστρώματα

Η συγκεκριμένη αντίδραση παρουσίασε μεγάλη διακύμανση στις αποδόσεις της, ακόμα και της τάξεως του 25-30%. Πρόκειται για μία αντίδραση η οποία απαιτεί μεγάλη ενέργεια ενεργοποίησης δεδομένου ότι διεξάγεται στους 140 °C και απαιτεί αρκετές ώρες για να μπορέσει να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν στην μέγιστη δυνατή απόδοση καθότι η δραστική μορφή του αρχικού δεν είναι η καρβονυλική αλλά η ενολική μορφή η οποία βρίσκεται σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Ωστόσο, η επανάληψη των πειραμάτων οδήγησε σε ασφαλέστερα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα, η χρήση μεγαλύτερης περίσσειας από αυτή των 3 ισοδύναμων ακετάλης για το 7-αζαϊνδόλιο και το 5-νιτροϊνδόλιο οδηγούσε σε παραπροϊόντα και δεν αύξανε την απόδοση της αντίδρασης, παρά του ότι παρατηρούνταν περαιτέρω κατανάλωση του αρχικού. Για το μη υποκατεστημένο ινδόλιο δεν παρατηρήθηκε το συγκεκριμένο φαινόμενο. Τέλος, το 6-φθόρο ινδόλιο φαίνεται να μην προσφέρεται ιδιαίτερα για την διενέργεια της συγκεκριμένης αντίδρασης

Κυκλοποίηση	Απόδοση (%)	Eq guanidine hydrochloride	Eq K₂CO₃	Χρόνος (h)
Ινδόλιο	78%	2	3	12
7-αζαϊνδόλιο	91%	2,5	3	18
5-νιτροϊνδόλιο	59%	3	4	36
6-φθοροϊνδόλιο	64%	3	4	36

Πίνακας 3.4: Αντίδραση κυκλοποίησης για τα 4 υποστρώματα

Η κυκλοποίηση είναι το τελικό στάδιο για την δημιουργία των ανάλογων μεριδιανίνης όπου σχηματίζεται ο δακτύλιος της 2-αμινοπυριμιδίνης. Σύμφωνα με τον μηχανισμό της αντίδρασης η προσβολή γίνεται στον *θ*-ολεφινικό άνθρακα ως προς το καρβονύλιο της αρχικής ένωσης. Για τον λόγο αυτό τα συμπεράσματα που σχετικά με την επίδραση των διαφορετικών ινδολίων στην απόδοση της αντίδρασης είναι επισφαλή. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η απόδοση της συγκεκριμένης αντίδρασης παρουσίασε ικανοποιητική επαναληψιμότητα.

3.3.2. Προσπάθειες βελτιστοποίησης σύνθεσης ανάλογων

μεριδιανίνης

Αν και η μέθοδος Bredereck αποτελεί μία υψηλής συνολικής απόδοσης εργαστηριακή μέθοδο σύνθεσης μεριδιανών στο εργαστήριο έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης της σύνθεσης τους. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε ήταν, αρχικά, η μείωση των βημάτων της πειραματικής πορείας από τέσσερα σε τρία (εικόνα 3.6). Τα πρώτα 2 στάδια είναι τα ίδια με αυτά με τα οποία ξεκινά η σύνθεση του Osimertinib. Στην συνέχεια έγιναν προσπάθειες απευθείας υποκατάστασης του ατόμου του Cl με μία αμινομάδα. Διενεργήθηκαν τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις στις οποίες το αρχικό διοχετεύτηκε σε υγρή αμμωνία, ακολούθως σε διάλυμα 1,4-διοξανίου όπου προστέθηκε εν τω γεννάσθαι αέρια αμμωνία, η οποία
στην τρίτη σε διαλύμα του αρχικού σε 1,2 διμεθοξυαιθάνιο (DME) και 1,4-διοξανίου προστέθηκε NaNH₂, ωστόσο σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις δεν απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν σε οποιεσδήποτε συνθήκες.



Εικόνα 3.16: Στρατηγική βελτιστοποίησης σύνθεσης μεριδιανίνης G.

Εφόσον οι παραπάνω προσπάθειες δεν απέδωσαν κάποιο ουσιαστικό αποτέλεσμα, τον ενδιαφέρον εστιάστηκε στα επιμέρους βήματα της πορείας Bredereck με σκοπό οι τροποποιήσεις να αυξήσουν την απόδοση, τον χρόνο ή τις συνθήκες των αντιδράσεων. Στο εργαστήριο έχει ήδη αναπτυχθεί μία μέθοδος σύνθεσης της υποκατεστημένης εναμίνης κατά το οποίο η διμεθυλοακετάλη του DMF χρησιμοποιείται τόσο ως αντιδραστήριο όσο και ως διαλύτης και επομένως βρίσκεται σε μεγάλη περίσσεια. Αν και τα αποτελέσματα για το μη υποκατεστημένο ινδόλιο ήταν άκρως ικανοποιητικά, καθώς έδειξαν τόσο αύξηση της απόδοσης όσο και μείωση της θερμοκρασίας διεξαγωγής της αντίδρασης από τους 140 °C στους 101 °C (Εικόνα 3.17) τα αποτελέσματα των άλλων 3 υποστρωμάτων δεν ήταν ανάλογα. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε δυσκολία του αντιδραστηρίου της ακετάλης να διαλύσει επαρκώς τόσο το ακετυλιωμένο 7-αζα και 5-νιτροϊνδόλιο ακόμα και στην θερμοκρασία βρασμού του. Αυτό προκάλεσε τόσο παρεμπόδιση της αντίδρασης όσο και φθορά της αρχικής ένωσης λόγω της παρατεταμένης έκθεσης σε τόσο μεγάλη θερμοκρασία. Θεωρείται ότι η αύξηση της πολικότητας που προσδίδουν και το ετεροάτομο του αζώτου, η νίτρομάδα και το άτομο φθορίου επέφερε την δυσδιαλυτότητά τους στην ακετάλη [43]. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην συνέχεια όταν αντικαταστάθηκε η διμέθυλοακετάλη του DMF από την αντίστοιχη διαίθυλο (Πίνακας 5) προκειμένου να αυξηθεί η προσφερόμενη ενέργεια στο σύστημα, καθώς η διαίθυλοακετάλη έχει υψηλότερο σημείο ζέσεως (133°C έναντι 101°C).

73



Εικόνα 3.17: Βελτιστοποίηση σύνθεσης της εναμίνης 63 [43].

Εναμινόνη χωρίς διαλύτη	DMF-DMA Απόδοση (%)	DMF-DEA Απόδοση (%)	
7-αζαϊνδόλιο	33%	31%	
5-νιτροϊνδόλιο	46%	34%	
6-φθοροϊνδόλιο	<10	<10	

Πίνακαα	3.5: П	οοσπάθειες	βελτιστοπ	οίησης	σύνθεση	ς της ένο	πινόνης.
muunuy		ρουπαυειες	pentioton	σαιοτης	0000201	ις της ένο	ιμινονης.

Στην συνέχεια, το ενδιαφέρον εστιάστηκε στο στάδιο της κυκλοποίησης της εναμίνης προς τον σχηματισμό του πυριμιδινικού δακτυλίου. Στο συγκεκριμένο στάδιο οι προσπάθειες βελτιστοποίησης της αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν μόνο για την εναμίνη που έφερε το μη υποκατεστημένο ινδόλιο και εστιάστηκε στην επιλογή του διαλύτη. Οι διαλύτες που επιλέχθηκαν βασίστηκαν στην επιλογή του ήδη προτεινόμενου (1-προπανόλη) και αντ' αυτού χρησιμοποιήθηκαν η ισοπροπανόλη η 1-βουτανόλη και η 1-πεντανόλη. Και οι τρεις διαλύτες δεν απέφεραν κάποιο ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Πίνακας 3.6 Αποτελέσματα τω	ν πειραμάτων βελτιστοποίησης	του τελικού σταδίου για την
	σύνθεση της μεριδιανίνης G.	

Διαλύτης κυκλοποίησης	Σημείο βρασμού(°C)	Απόδοση (%)
n-προπανόλη	97	78%
2-προπανόλη	82	62%
1-βουτανόλη	117,7	57%
1-πεντανόλη	138	<20%

3.3.3. Σύνθεση μεριδανινών κατά Bredereck.

Μεθυλίωση ινδολίου (Εικόνα 3.19). Πρόκειται για μία συνήθη αντίδραση κατά την οποία το όξινο πρωτόνιο της του ινδολίου αποπρωτονιώνεται με την χρήση υδριδίου του νατρίου σε απόλυτο τεραϋδροφουράνιο. Το απορωτονιωμένο άζωτο προσβάλει στη συνέχεια την μέθυλομάδα του ιωδομεθανίου προς σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος.



Εικόνα 3.18: Μεθυλίωση του ινδολίου

Για την προσάρτηση της άκυλο-ομάδας στον ινδολικό δακτύλιο χρησιμοποιήθηκε ο οξικός ανυδρίτης ως αλκυλιωτικό μέσο παρουσία καταλύτη οξέως κατά Lewis το AlCl₃ σε απόλυτο CH₂Cl₂.



Εικόνα 3.20: Ακυλίωση ινδολίου κατά Friedel Crafts.

Σύνθεση υποκατεστημένης εναμινόνης (Εικόνα 3.21). Αν και στην πραγματικότητα η αντιδρούσα ένωση φαίνεται να είναι μια καρβονυλική ένωση διαπιστώνεται ότι αυτή είναι η ταυτομερή της, ήτοι η ενολική, αν και βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσοστιαία αναλογία σε σχέση με την καρβονυλική. Συγκεκριμένα, ο άνθρακας του διπλού δεσμού της ενολικής μορφής, έχοντας πυρηνόφιλο χαρακτήρα προσβάλει τον άνθρακα που φέρει τις μεθόξυ ομάδες της διμεθυλοακετάλης του DMF, ο οποίος έχει αντίστοιχα ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα. Ταυτόχρονα, η μία από τις μεθοξυομάδες της ακετάλης αμομακρύνεται σχηματίζοντας μόριο μεθανόλης και μία ενδιάμεση ένωση. Ακολούθως, με την απόσπαση δεύτερου μορίου μεθανόλης προκύπτει η εναμινόνη.



Εικόνα 3.21: Μηχανισμός σύνθεσης εναμινόνης.

Κυκλοποίηση προς σχηματισμό του πυριμιδινικού δακτυλίου (Εικόνα 3.22). Το άτομο αζώτου της γουανιδίνης προσβάλει όντας πυρηνόφιλο τον *β* ως προς το καρβονύλιο άνθρακα του διπλού δεσμού, υποκαθιστώντας από την εναμινόνη ένα μόριο διμεθυλαμίνης. Στη συνέχεια, μία από τις πρωτοταγείς αμινομάδες της προσαρτημένης στο μόριο γουανιδίνης προσβάλει τον καρβονυλικό άθρακα ενδομοριακά. Ο πυριμιδινικός δακτύλιος σχηματίζεται μετά από αυθόρμητη απόσπαση ενός μορίου νερού.



Εικόνα 3.22: Μηχανισμός σύνθεσης πυριμιδινικού δακτυλίου.

3.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα πρόδρομων ενώσεων

3.4.1. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων μεθυλίωσης

3.4.1.1. *Ν*-μεθυλοϊνδόλιο (12)

Η κορυφή η οποία επιβεβαιώνει την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι αυτή με μετατόπιση στα 3,79 ppm, η οποία αντιστοιχεί στην μεθυλομάδα του ατόμου του αζώτου. Οι κορυφές του πυρολικού δακτυλίου εμφανίζονται ως δύο διπλές κορυφές στα 6,44 και 7,31 ppm με σταθερά σύζευξης ${}^{3}J$ = 3,1 Hz.. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω η 3-θέση είναι η δραστικότερη ως προς μια αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης και ως εκ τούτου η πιο προστατευμένη στην απεικόνιση του φάσματος ¹H NMR. Συμπερασματικά, η μετατόπιση στα 6,44 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 3 του πυρολικού δακτυλίου και η κορυφή στα 7,31 στην θέση 2. Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο εμφανίζεται στα 7,57 ppm ως διπλή διπλής κορυφή και αντιστοιχεί σε αυτό της 4-θέσης του ινδολίου και εμφανίζει κοινή σταθερά σύζευξης ³J με την τριπλή κορυφή στα 7,17 ppm και ⁴J με την τριπλή κορυφή στα 7,05 ppm με σταθερές σύζευξης 7,8 και 1,1 Hz αντίστοιχα. Ο λόγος που το πρωτόνιο της 4-θέσης του ινδολίου είναι και το πιο αποπροστατευμένο συγκριτικά με αυτό της 7-θέσης είναι ότι κατά τις δομές συντονισμού το τελευταίο σταθεροποιεί καλύτερα το αρνητικό φορτίο και επομένως φέρει μεγαλύτερο ηλεκτρονιακό νέφος. Επομένως η τριπλή διπλής κορυφή στα 7,05 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5 του ινδολίου, ενώ η αντοίστοιχη στα 7,17 σε αυτό της θέσης 6 Τέλος η κορυφή με μετατόπιση 7,43 ppm, η οποία έχει επίσης μορφή κορυφής διπλή της διπλής, αντοιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 7 του ινδολίου με στάθερά σύζευξης 8,1 Hz.



Εικόνα 3.23: Φάσμα ¹Η NMR του (250 MHz) *Ν*-μεθυλοϊνδολίου σε διαλύτη DMSO-d6.

Το φάσμα ¹³C NMR πιστοποιεί επίσης την σύνθεση της ένωσης καθώς προκύπτει σήμα στην περιοχή ισχυρού πεδίου του φάσματος και συγκεκριμένα στα 32,88 ppm.



Εικόνα 3.24: Φασμα ¹³C NMR (63 MHz) του *Ν*-μέθυλοϊνδολίου σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.1.2. *Ν*-μέθυλο-5-νιτροϊνδόλιο (69)

Γενικά, η νιτρομάδα είναι ένας από τους ισχυρότερους δέκτες ηλεκτρονίων όντας υποκαταστάτες σε αρωματικά και εν γένει συζυγιακά συστήματα. Άρα, αναμένεται όλα και δη τα γειτονικά ως προς την συγκεκριμένη ομάδα πρωτόνια να αποπροστατεύονται και ο συντονισμός τους να μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες τιμές ppm.

Στο φάσμα ¹Η NMR το πρωτόνιο της 4-θέσης του ινδολίου είναι το πλέον αποπροστατευμένο καθώς εμφανίζεται στα 8,59 ppm και εμφανίζει κοινή σταθερά σύζευξης ⁴J (2,3 Hz) με την διπλή διπλής κορυφή στα 8,10 ppm η οποία επομένως αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 6 του ινδολίου. Τα πρωτόνια της 2- και 3-θέσης του πυρολικού δακτυλίου με μετατοπίσεις στα 7,53 και 6,77 ppm αντίστοιχα παρουσιάζουν κοινή σταθερά σύζευξης ³J = 3,2 Hz. Το πρωτόνιο της 7-θέσης του ινδολίου δίνει σήμα στα 7,62 ppm και έχει κοινή σταθερά σύζευξης ³J με το πρωτόνιο της 6-θέσης (9.0 Hz). Η κορυφή στα 3,97 πιστοποιεί ότι η αντίδραση έλαβε χώρα καθώς αντοιστοιχεί στην μεθυλομάδα του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου. Σχόλιο: Παρατηρείται πράγματι αποπροστασία όλων των πρωτονίων του αρωματικού συστήματος (ακόμα και της μεθυλομάδας) λόγω της νιτρομάδας



Εικόνα 3.25: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) *Ν*-μέθυλο-5-νίτροϊνδολίου σε διαλύτη acetone-d6.

3.4.1.3. *Ν*-μεθυλο-6-φθοροϊνδόλιο (73)

Γενικά, η παρουσία του φθορίου στα μόρια παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την απεικόνισή τους στο φάσμα ¹Η NMR. Αυτό γιατί, πέρα από το γεγονός ότι το φθόριο έχει σπιν ½ άρα και μαγνητικές ιδιότητες, έχει τόσο μικρή ατομική ακτίνα που «ξεγελάει» το όργανο λόγω σχάσης spin-spin με τα γειτονικά πρωτόνια σαν να ήταν και αυτό άτομο υδρογόνου. Ως υποκαταστάτης το φθόριο επαγωγικά έλκει ηλεκτρόνια από τα αρωματικά συστήματα ως το πλέον ηλεκτραρνητικό στοιχείο ωστόσο συζυγιακά λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων. Από τα δύο αντικρουόμενα ως προς την ηλεκτρονιακή συνεισφορά φαινόμενα, υπερισχύει το επαγωγικό.

3.4.1.4. Ν-μεθυλο-3-ακετυλο-7-αζαϊνδόλιο (66)

Στο φάσμα η διπλή διπλής κορυφή στα 8,56 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 3 (4θέση κατά την αρίθμηση του ινδολικού δακτυλίου), η κορυφή στα 8,39 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 5, ενώ η απλή κορυφή στα 8,33 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 2. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4 αντιστοιχεί στην διπλή διπλής κορυφή με χημική μετατόπιση τα 7,27 ppm, τα πρωτόνια της μεθυλομάδας που πιστοποιούν την ένωση αντιστοιχούν στην απλή κορυφή στα 3,96 ppm και τέλος, τα πρωτόνια του μεθυλίου της ακετυλομάδας δίνουν απλή κορυφή στα 2,47 ppm.



Εικόνα 3.26: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) του 3-ακέτυλο *Ν*-μέθυλο-7-άζαϊνδολίου σε διαλύτη ακετόνη-d6.

Στο φάσμα ¹³C NMR (εικόνα 3.27) η κορυφή στα 31,89 ppm πιστοποιεί επίσης την προσάρτηση της ακετυλομάδας.



Εικόνα 3.27: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) του 3-ακετυλο-*Ν*-μεθυλο-7-αζαϊνδολίου σε διαλύτη DMSOd6.

3.4.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων ακυλίωσης

Η ακετυλομάδα και, εν γένει, οποιαδήποτε ακυλομάδα αποτελεί έναν υποκαταστάτη ο οποίος έλκει ηλεκτρόνια από τα αρωματικά συστήματα λόγω του εκδηλωμένου συζυγιακού φαινομένου του καρβονυλίου. Επομένως, αναμένεται μία ήπια (πιο ισχυρή για τις γειτονικές ως προς την υποκατάσταση) μετατόπιση των αρωματικών πρωτονίων προς μεγαλύτερες τιμές ppm. Επίσης, εκτός από την επίδραση του συζυγιακού φαινομένου, είναι πιθανό η αποπροστασία των πρωτονίων των θέσεων 2 (ισχυρότερα) και 4 (ασθενέστερα) του ινδολικού δακτυλίου να είναι εντονότερη λόγω αλληλεπίδρασης με το οξυγόνο του καρβονυλίου με την μορφή ενός ενδομοριακού δεσμόυ υδρογόνου (εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.28: Αλληλεπίδραση των πρωτονίων των 2 και 4 του ινδολικού δακτυλίου με το οξυγόνο του καρβονυλίου.

3.4.2.1. 3-ακετυλο-Ν-μεθυλο-ινδόλιο (62)

Η διαφοροποίηση ως προς το φάσμα της αρχικής ένωσης (*N-μεθυλο*-1H-ινδόλιο) έγκειται αρχικά στην απουσία του σήματος του πρωτονίου της θέσης 3 του ινδολίου στο οποίο πραγματοποιείται η υποκατάσταση. Επίσης, το σήμα του πρωτονίου 2 δεν σχάζεται καθώς δεν διαθέτει γειτονικά πρωτόνια ενώ παρατηρείται και μετατόπιση του προς μεγαλύτερες τιμές ppm (8,32) λόγω της ύπαρξης ενός ισχυρού δέκτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην 3-θέση. Επιπροσθέτως ενδέχεται να οφείλεται και σε αλληλεπίδραση του πρωτονίου με το οξυγόνο της καρβονυλομάδας με μορφή ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου γεγονός που αποπροστατεύει έτι περισσότερο το αρωματικό πρωτόνιο. Ακόμα, τα πρωτόνια του μεθυλίου της ακετυλομάδας εμφανίζουν σήμα στα 2,44 ppm. Η πενταπλή κορυφή με ολοκλήρωση 2 οφείλεται σε μερική αλληλοεπικάλυψη των πρωτονίων 4 και 5 ενώ το πρωτόνιο 3 δίνει σήμα διπλή διπλής στα 8,20 ppm και η αντίστοιχη του πρωτονίου 6 στα 7,53 ppm.



Εικόνα 3.29: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) του 3-ακέτυλο-*Ν*-μεθυλοϊνδολίου σε διαλύτη DMSO-d6.

Στο φάσμα ¹³C εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή του άνθρακα του καρβονυλίου στα 192,51 ppm και του άνθρακα του μεθυλίου της ακετυλομάδας στα 27,69 ppm.



Εικόνα 3.30: Φάσμα ¹³C NMR (100 MHz) του 3-ακετυλο-*Ν*-μεθυλοϊνδολίου σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.2.2. *Ν-μεθυλο*-5-νίτρο ινδόλιο (70)

Το πρωτόνιο 3 καταγράφεται ως διπλή κορυφή με ⁴J 2,4 Hz, μετατοπιζόμενη πέρα από τις τυπικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων (8,99 έναντι των συνήθων 6,5-8,5 ppm), κάτι που οφείλεται στην ένταξη ενός υποκαταστάτη δέκτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και αφετέρου σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις τόσο με το οξυγόνο της καρβόνυλικής ομάδας όσο και με αυτό της νιτρομάδας. Τα πρωτόνια του μεθυλίου της καρβονυλικής ομάδας (6) που υπάρχει στην 3-θέση του ινδολίου δίνουν απλή κορυφή στα 2,47 ppm με ολοκλήρωση 3, ωστόσο υπάρχει αλληλεπικάλυψη με υπόλειμμα μη δευτεριωμένου διαλύτη εξ αυτού του λόγου και η απλή κορυφή δεν είναι ευκρινής. Τέλος, το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 μετατοπίζεται στα 8,58 ppm και δεν σχάζεται καθώς δεν διαθέτει γειτονικά πρωτόνια. Το πρωτόνιο 4 συντονίζεται στα 8,14 ppm ως διπλή διπλής κορυφή και δίνει σταθερές σύζευξης ³J και ⁴J 9.0 και 2,4 Hz αντίστοιχα και το πρωτόνιο 5 εμφανίζεται ως διπλη κορυφή με σταθερά σύζευξης ³J = 9,0 Hz.



Εικόνα 3.31: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) του 3-ακετυλο-*Ν*-μεθυλο-5-νιτροϊνδολίου σε διαλύτη DMSO-d6.

Από το φάσμα ¹³C διακρίνεται χαρακτηριστικά το σήμα του καρβονυλικού άνθρακα στα 193 ppm και της μεθυλομάδας στα 27,75 ppm



Εικόνα 3.32: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) του 3-ακετυλο-*Ν*-μεθυλο-5-νιτροϊνδολίου σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.2.3. 3-ακετυλο-7-αζα-ινδόλιο (65)

Το σήμα που πιστοποιεί την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι η απλή κορυφή στα 2,50 ppm η οποία αντιστοιχεί στο μεθύλιο της εισαχθείσας καρβονυλικής ομάδας. Επίσης, διακρίνεται και η απλή κορυφή στα 8,37 ppm που αντοιστοιχεί στο πρωτόνιο 2 και ισχνά η κορυφή του όξινου πρωτονίου του ινδολίου στα 11,40 ppm. Από αυτά τα δυο δεδομένα προκύπτει ότι η υποκατάσταση έλαβε χώρα αποκλειστικά στην 3-θέση. Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το 4 στα 8,58 ppm το οποίο σχάζεται σε διπλή διπλής κορυφή με σταθερες σύζευξης ³J 7,9 Hz και ⁴J 1,7 Hz. Στα 8,35 ppm εμφανίζει σήμα το πρωτόνιο 6 με σχάση διπλή διπλής και σταθερές σύζευξης ³J = 4,9 Hz και ⁴J = 1,7 Hz και τέλος στα 7,25 ως διπλή διπλής το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4.



Εικόνα 3.33: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) του 3-ακετυλο-7-αζαϊνδολίου σε διαλύτη acetone-d6.

Αντίστοιχα στο φάσμα ¹³C NMR χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές που αντιστοιχούν στον άνθρακα του καρβονυλίου και του μεθυλίου της ακετυλομάδας με χημικές μετατοπίσεις 193,36 ppm και 27,39 ppm.



Εικόνα 3.34: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) του 3-ακετυλο-7-αζαϊνδολίου σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.2.4. Ν-μεθυλο-3-ακέτυλο-6-φθοροϊνδόλιο (74)

Στο φάσμα ¹Η NMR της ένωσης καταγράφεται η κορυφή με μετατόπιση 2,43 ppm που στα πρωτόνια του μεθυλίου της ακετυλομάδας. Παρατηρείται αποπροστασία του πρωτονίου 2 λόγω της προσάρτησης της ακέτυλο ομάδας στην 3-θέση και για αυτόν τον λόγο, πλέον, εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8,33 ppm. Η κορυφή στα 8,16 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 3 το οποίο σχάζεται λόγω του πρωτονίου 4 και του ατόμου του φθορίου, γι' αυτό και αποτυπώνεται ως διπλή διπλής κορυφή. Οι τιμές των σταθερών συζευξης ³J και ⁴J είναι 8,7 και 5,6 Hz. Το πρωτόνιο υπ'αριθμόν 5 σχάζεται ώς διπλη διπλής λόγω του ατόμου του φθορίου και του πρωτονίου 4 με μετατόπιση 7,44 ppm και τιμές σταθερών σύζευξης ³J και ⁴J 10 Hz και 2,4 Hz αντίστοιχα. Η κορυφή του πρωτονίου 4 δίνει σχάση ³J τόσο με το άτομο του φθορίου (³J = 8,7 Hz) όσο και με το πρωτόνιο 3 (³J = 10 Hz) και ⁴J με το πρωτόνιο 5 (⁴J = 2,4 Hz). Γι αυτόν τον λόγο εμφανίζεται ως πολλαπλή κορυφή στα 7,08 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια της μεθυλομάδας του ετεροατόμου του ινδολικού δακτυλίου δίνουν σήμα με ολοκλήρωση 3 στα 3,84 ppm.



Εικόνα 3.35: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) του 3-ακετυλο-Ν-μεθυλο-7-αζαϊνδολίου σε διαλύτη DMSOd6.

Στο φάσμα ¹³C NMR παρατηρείται οι κορυφή του καρβονυλικού άνθρακα στα 192,54 ppm και του μεθυλίου της ακετυλομάδας στα 27,54 ppm, καθώς και οι συζεύξεις του φθορίου τόσο με τον άνθρακα που τον φέρει η οποία έχει σταθερά σύζευξης J = 237 Hz, όσο και με τους άνθρακες και σε απόσταση 2 και 3 δεσμών.





3.4.3. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων σχηματισμού

εναμινόνης

Οι συντεθείσες υποκατεστημένες εναμινόνες συνιστούν ένα εκτενές συζυγιακό σύστημα, με το ενδιαφέρον εστιάζεται στα ολεφινικά πρωτόνια τα οποία δίνουν χαρακτηριστικούς συντονισμούς στο φάσμα ¹Η NMR. Από τις δομές συντονισμού διαπιστώνεται ότι το συζυγιακό φαινόμενο εκδηλώνεται περισσότερο προς τον αρωματικό δακτύλιο και έτσι το πρωτόνιο του α-άνθρακα ως προς το καρβονύλιο προστατύεται όσο αναφορά την ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε άντίθεση με το πρωτόνιο του άνθρακα *β* το οποίο αποπροστατεύεται για τον ίδιο λόγο. Η στερεοχημεία των προϊόντων είναι, επίσης, ένα ζήτημα καθώς τα μόρια μπορεί να έχουν είτε *Ε*- είτε *Ζ*- διαμόρφωση. Αν και ένα φάσμα NOESY θα ήταν ιδιαίτερα κατατοπιστικό προκειμένου να διαπιστωθεί η στερεοχημεία των προϊόντων, εντούτοις μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα και με βάση το μονοδιάστατο φάσμα με γνώμονα την σταθερά σύζευξης των δύο σημάτων. Οι τιμές των

σταθερών σύζευξης είναι της τάξης των 12-13 Ηz και επομένως συνάγεται ότι υφίστανται και οι δύο γρήγορα εναλασσόμενες διαμορφώσεις Ε και Ζ.

3.4.3.1. 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη (63)

Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο, το οποίο δίνει σήμα στα 8,28 ppm και σχάζεται σε διπλή κορυφή είναι το υπ' αριθμόν 3. Το πρωτόνιο 2 δίνει ως σήμα απλή κορυφή στα 8,15 ppm. Οι χαρακτηριστικές κορυφές των ολεφινικών πρωτονίων 7 και 8 δίνουν σήματα με σταθερά σύζευξης ${}^{3}J$ = 12,5 Hz στα 5,71 και 7,54 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια 5 και 6 εμφανίζουν σήμα τριπλής και διπλής κορυφής αντίστοιχα με χημικές μετατοπίσεις 7,14 και 7,47 ppm και σταθερά σύζευξης ${}^{3}J$ = 8,1 Hz. Η κορυφή στα 3,83 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου του ετεροατόμου του ινδολικού δακτυλίου με ολοκλήρωση 3 και τέλος οι μεθυλομάδες του αζώτου της εναμίνης (9,10) αλληλεπικαλύπτονται και δίνουν μια ευρεία κορυφή στα 2,98 ppm με ολοκλήρωση 6.

Σημείωση: Η μέτρια ομογενοποίηση του μαγνητικού πεδίου κατά την λήψη του φάσματος δεν επέτρεψε την ανίχνευση σταθερών σύζευξης ⁴J.



Εικόνα 3.37: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.3.2. 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-7-αζα-ινδολο-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνη (67)

Το πρωτόνιο 3 είναι το πιο αποπρστατευμένο και δίνει σήμα στα 8,55 ppm ως διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης ${}^{3}J = 7,9$ Hz και ${}^{4}J = 1,7$ Hz. Το σήμα του πρωτονίου 4 εμφανίζεται ως διπλή διπλής και όχι ως τριπλή ως αναμενόταν λόγω της μεγάλης διαφοράς των τιμών της σταθεράς σύζευξης οι οποίες είναι ${}^{3}J_{1} = 7,9$ Hz και ${}^{3}J_{2} = 4,7$ Hz. Το πρωτόνιο 5 εμφανίζεται επίσης ως διπλή διπλής κορυφή με σταθερές σύζευξης ${}^{3}J = 4,7$ Hz και ${}^{4}J = 1,7$ Hz. Τα ολεφινικά 6 και 7 πρωτόνια καταγράφονται ως διπλές κορυφές με κοινή σταθερά σύζευξης ${}^{3}J = 12,4$ Hz και χημικές μετατοπίσεις 5,73 ppm και 7,58 ppm, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο 2 εμφανίζει σήμα ως απλή κορυφή στα 8,35 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια του μεθυλίου του ετεροατόμου του αζώτου δίνουν σήμα στα 3,86 ppm, ενώ αντίστοιχα τα πρωτόνια 8,9 εμφανίζονται ως μια ενιαία ευρεία κορυφή με ολοκλήρωση 6 και χημική μετατόπιση 2,99 ppm.



Εικόνα 3.38: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-7-αζα-ινδολο-3υλ)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.3.3. 3- (διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλ-5-νιτρο-1Η-ινδολ-3-υλ) προπ-2-εν-1-όνη (71) Στο φάσμα ¹Η NMR (Εικόνα 3.39) το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το υπάριθμόν 3 το οποίο δίνει σήμα ως μια διπλή κορυφή η σχάση της οποίας οφείλεται στο πρωτόνιο 4 με το οποίο συσχετίζεται μέσω σταθεράς σύζευξης ⁴J = 2,4 Hz. Το πρωτόνιο 4 σηματοδοτείται ως διπλή διπλής κορυφή λόγω της σχάσης με το πρωτόνιο 3 (⁴J = 2,4 Hz) καθώς και με το πρωτόνιο 5 (³J = 9,1 Hz) και η χημική μετατόπιση του είναι 8,10 ppm. Το πρωτόνιο 2 εμφανίζεται ως το μοναδικό σήμα το οποίο δεν παρουσιάζει σχάση στα 8,43 ppm ενώ το πρωτόνιο 5 δίνει σήμα στα 7,71 ppm. Τα ολεφινικά πρωτόνια 6 και 7 εμφανίζονται ως διπλές κορυφές με μετατοπίσεις 5,75 ppm και 7,63 ppm με σταθερά σύζευξης ³J = 12,4 Hz. Η κορυφή των πρωτονίων του μεθυλίου του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου δίνει σήμα στα 3,92 ppm ενώ οι μεθυλομάδες του αζώτου της εναμίνης δίνουν μια ευρεία κορυφή στα 3,02 ppm με ολοκλήρωση 6.



Εικόνα 3.39: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) της 3- (διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλ-5-νιτρο-1Η-ινδολ-3-υλ) προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO-d6.

Από το φάσμα ¹³C NMR της παραπάνω ένωσης παρατηρείται η χημική μετατόπιση του σήματος του καρβονυλικού άνθρακα προς χαμηλότερες τιμές ppm (182.81 ppm) λόγω του εκδηλωμένου συζυγιακού φαινομένου προς αυτόν από το διπλό δεσμό των ανθράκων *α* και *θ* ως προς αυτόν (C_α και C_β) γεγονός που τον καθιστά πιο προστατευμένο ηλεκτρονιακά. Ο ολεφινικός άνθρακας C_α ο οποίος δίνει σήμα στα 93,07 όντας ο πιο πυκνός ηλεκτρονιακά σε σχέση με τον C_β του οποίου το σήμα λόγω του συζυγιακού φαινομένου μετατοπίζεται προς μεγαλύτερες τιμές ppm.



Εικόνα 3.40: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) της 3- (διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλ-5-νιτρο-1Η-ινδολο-3-υλ) προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.3.4. 3-(διμεθυλαμινο)-1-(6-φθορο-1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη (75)

Στο φάσμα ¹Η NMR της ένωσης το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το υπ' αριθμόν 3 το οποίο συντονίζεται στα 8,27 ppm ως μια διπλή διπλής κορυφή λόγω της σχάσης του με το γειτονικό πρωτόνιο 4 και το άτομο του φθορίου με σταθερά σύζευξης ³J = 8,8 Hz και ⁴J = 5,8 Hz, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο 4 εμφανίζεται ως διπλή τριπλής κορυφή καθώς το σήμα του παρουσιάζει σχάση με το προαναφερθέν πρωτόνιο 4, το άτομο του φθορίου καθώς και με το πρωτόνιο 5 (⁴J = 2,4 Hz). Το πρωτόνιο 5 καταγράφεται ως διπλή διπλής κορυφή στα 7,36 ppm λόγω της σχάσης του με το άτομο του φθορίου καθώς και με το πρωτόνιο 4. Το πρωτόνιο 2 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8,17 ppm ενώ τα ολεφινικά πρωτόνια 6 και 7 συντονίζονται στα 5,71 ppm και 7,56 ppm με σταθερά σύζευξης ³J = 12,5 Hz). Τέλος, τα πρωτόνια του μεθυλίου του ινδολικού δακτυλίου καταγράφονται με χαρακτηριστική ολοκλήρωση 3 στα 3,81 ppm ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου συντονίζονται ως μια ευρεία κορυφή στα 2,98 ppm με ολοκλήρωση 6.



Εικόνα 3.41: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(6-φθορο-1-μεθυλ-1Η-ινδολ-3υλ)προπ-2-εν-1-όνης σε DMSO-d6.

3.4.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα προϊόντων κυκλοποίησης

Τα κυκλοποιημένα προϊόντα αποτελούν ανάλογα των μεριδιανινών με ένα εκτεταμένο αρωματικό σύστημα στο οποίο σχηματίζεται ο δακτύλιος της 2-αμινο πυριμιδίνης ο οποίος στην 4-θέση φέρει δεσμό με την 3-θέση του εκάστοτε ινδολικού υποστρώματος. Γενικά μέσω του επαγωγικού φαινομένου τα ετεροάτομα του αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου έλκουν ηλεκρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο τον οποίο και καθιστούν «φτωχότερο» ηλεκτρονικά. Ως εκ τούτου, παρατηρείται μετατόπιση των 2 πρωτονίων του πυριμιδινικού δακτυλίου και ιδιαίτερα αυτού που βρίσκεται κοντά στο ένα εκ των δυο ατόμων αζώτου αυτού να δίνουν σήματα σε μεγάλες τιμές ppm όπως και των πρωτονίων της άμινο ομάδας. Ωστόσο, αν και μελετώντας την δομή των συγκεκριμένων μορίων εικάζεται ότι τα πυρημιδινικά πρωτόνια θα είναι τα πλέον αποπροστατευμένα, παρατηρείται ότι τα

πιο αποπροστατευμένα είναι, ως επί το πλείστον αυτά της θέσης 2 και 4 του ινδολικού δακτυλίου γεγονός που μαρτυρά ενδομοριακή χωρική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και του πυριμιδινικού δακτυλίου δεδομένου ότι υφίστανται ελεύθερη περιστροφή αυτού (Εικόνα 3.42).



Εικόνα 3.42: Ενδομοριακή αλληλεπίδραση των πρωτονίων των θέσεων 2 και 4 του ινδολικού δακτυλίου και σχηματισμός δεσμού 3 κέντρων 2 ηλεκτρονίων ο οποίος αποπροστατεύει τα αρωματικά πρωτόνια.

3.4.4.1. 4-(1-μεθυλο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (49G)

Στο φάσμα ¹Η NMR το πρωτόνιο 3 είναι το πιο αποπροστατευμένο με μετατόπιση 8,59 ppm, ένω η κορυφή του καταγράφεται ως διπλή διπλής λόγω σχάσης ³*J* με το πρωτόνιο 4 και ⁴*J* με το πρωτόνιο 5 και σταθερές σύζευξης 7,5 Hz και 1,2 Hz, αντίστοιχα. Το πρωτόνιο 4 σχάζεται σε διπλή τριπλής κορυφή λόγω της σχάσης ³*J* με τα πρωτόνια 3 και 5 (εντάσεις 7,5 Hz και 8,2 Hz αντίστοιχα) και ⁴*J* με το πρωτόνιο 6 (ένταση 1,3 Hz). Από την πολλαπλότητα συμπεραίνεται ότι η άλλη διπλή τριπλής κορυφή ανήκει στο πρωτόνιο 5. Τα πρωτόνια του πυριμιδινικού δακτυλίου 7 και 8 καταγράφονται ως διπλές κορυφές στα 6,95 και 8,11 ppm, αντίστοιχα, με σταθερά σύζευξης ³*J* = 5,3 Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 καταγράφεται ως απλή κορυφή στα 8,19 ppm, ενώ τα πρωτόνια του μεθυλίου του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου δίνουν σήμα με ολοκλήρωση 3 στα 3,86 ppm και της άμινο ομαδας 2 στα 6,41 ppm



Εικόνα 3.43: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) της 4-(1-μεθυλο-ινδολ-3-υλ)πυριμιδιν-2-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d6.

Στο φάσμα ¹³C NMR παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει πλέον το σήμα στα 180 ppm που αντιστοιχούσε στον καρβονυλικό άνθρακα και του α ολεφινικού ως προς αυτόν στα 80-100 ppm, ενώ υπάρχουν σήματα στην περιοχή 160-170 ppm που αντιστοιχούν στους άνθρακες του πυριμιδινικού δακτυλίου.



Εικόνα 3.44: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) της 4-(1-μεθυλο-ινδολ-3-υλ)πυριμιδινο-2-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.4.2. 3-(2-χλωροπυριμιδινο-4-υλο)-1-μεθυλοϊνδόλιο (4)

Στο φάσμα 1Η NMR της ένωσης (Εικόνα 3.45) η πολλαπλή κορυφή στα 8,54 ppm αφορά τα πρωτόνια υπ'αριθμόν 2 και 3 τα οποία αλληλεπικαλύπτονται. Αντίστοιχη αλληλεπικάλυψη υφίστανται και τα πρωτόνια 4 και 5 τα οποία καταγράφονται ως πενταπλή κορυφή. Γι' αυτόν τον λόγο τα δύο σήματα παρουσιάζουν και ολοκλήρωση 2. Τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στον πυρημιδινικό δακτύλιο εντοπίζονται ως σήματα διπλών κορυφών στα 7,31 ppm για το πρωτόνιο 7 και 8,42 ppm για το πρωτόνιο 8 συσχετίζονται μέσω σταθεράς σύζευξης ³*J* = 5,3 Hz. Τέλος, τα πρωτόνια του μεθυλίου του ινδολικού δακτυλίου καταγράφουν σήμα με μετατόπιση 3,91 ppm και χαρακτηριστική ολοκλήρωση 3.



Εικόνα 3.45: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) της σε διαλύτη DMSO-d6

3.4.4.3. 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνη (49Ι)

Στο φάσμα ¹Η NMR (Εικόνα 3.46) του μορίου το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το 3 το οποίο δίνει σήμα στα 9,43 ppm και σχάζεται σε διπλή κορυφή λόγω του πρωτονίου 4 με σταθερά σύζευξης ⁴J = 2,3 Hz. Το πρωτόνιο 4 εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή με σχάση λόγω του πρωτονίου 3 (⁴J = 2,3 Hz) και του πρωτονίου 5 (³J = 9,1 Hz) στα 8,20 ppm . Το πρωτόνιο 5 εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στα 7,74 ppm. Το πρωτόνιο 3 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8,46 ppm, ενώ τα δύο πρωτόνια του πυριμιδινικού δακτυλίου 6 και 7 εμφανίζονται στα 7,00 ppm και 8,20 ppm με σταθερά σύζευξης ³J = 5,3 Hz. Τέλος, το σήμα με ολοκλήρωση 2 και μετατόπιση 6,57 ppm καταγράφονται τα πρωτόνια του μεθυλίου του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου.



Εικόνα 3.46: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολ-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d6.

Το φάσμα NOESY (Εικόνα 3.47) επιβεβαιώνει τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων 2 και 3 σε μεγάλες τιμές ppm. Συγκεκριμένα, το πρωτόνιο 3 υφίσταται χωρική συσχέτιση με τα πρωτόνια 6 και 7 του πυριμιδινικού δακτυλίου [(9,43, 7,01) και (9,43, 8,13) όπως επίσης και με τα πρωτόνια της αμινομάδας. Από αυτές τις συσχετίσεις πιστοποιείται η αλληλεπίδραση με τον πυριμιδινικό δακτύλιο και η δημιουργία ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Αυτό το φαινόμενο συνδυαστικά και με την παρουσία της νίτρο ομάδας σε γειτονική θέση στον ινδολικό δακτύλιο, η οποία επηρεάζει την μετατόπιση τόσο συζυγιακά όσο και στερεοχημικά αιτιολογεί την μετατόπιση του συγκεκριμένου πυρήνα. Αντίστοιχα για το πρωτόνιο 2 καταγράφονται 2 συσχετίζοντα σήματα και συγκεκριμένα με αυτά του μεθυλίου του αζώτου του ινδολίου (8,46,3,94), καθώς και με το πρωτόνιο 6 (8,46,7,00) όπου το τελευταίο καταδεικνύει αλληλεπίδραση με τον πυριμιδινικό δακτύλιο.



Εικόνα 3.47: Φάσμα NOESY (500 MHz) της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d6.

Από το φάσμα ¹³C NMR (Εικόνα 3.48) διακρίνονται τα σήματα στην περιοχή 160-170 ppm τα οποία αντιστοιχούν σε άτομα άνθρακα του πυριμιδινικού δακτυλίου.



Εικόνα 3.48: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολ-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.4.4. 4-(1-μεθυλο-7-αζα-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνη (49J)

Στο φάσμα ¹Η NMR του μορίου (Εικόνα 3.49) το σήμα με την πλέον μεγαλύτερη μετατόπιση είναι αυτό που καταγράφει το πρωτόνιο 3 στα 8,92 ppm το οποίο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης ³J = 7,9 Hz. Το πρωτόνιο 4 εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή στα 7,23 ppm με σταθερές σύζευξης ³J = 7,9 Hz και ³J = 4,6 Hz. Στην σχετικά μεγάλη απόκλιση των τιμών των σταθερών σύζευξης οφείλεται το γεγονός ότι αν και το συγκεκριμένο πρωτόνιο φέρει 2 γειτονικά πρωτόνια το σήμα του δεν καταγράφεται ως τριπλή κορυφή. Το πρωτόνιο 5 έχει μετατόπιση 8,35 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης ³J = 4,6 Hz. Τα πρωτόνια του πυριμιδινικού δακτυλίου 6 και 7 φέρουν το σήμα τους στα 6,99 και 8,15 ppm με κοινή σταθερά σύζευξης ³J = 5,3 Hz. Το πρωτόνιο 2 καταγράφεται ως απλή κορυφή στα 8,41 ppm. Τέλος, το σήμα των πρωτονίων της αμινο ομάδας καταγράφεται στα 6,50 ppm με χαρακτηριστική ολοκλήρωση 2 και τα πρωτόνια του μεθυλίου του 7-άζα ινδολικού δακτυλίου στα 3,89 με ολοκλήρωση 3.



Εικόνα 3.49: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) της 4-(1-μεθυλο-7-αζα-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d6.

3.4.4.5. 4-(1-μεθυλο-6-φθόρο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (49K)

Στο φάσμα ¹Η NMR (Εικόνα 3.50) του μορίου το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το υπ' αριθμόν 3 το οποίο εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή στα 8,62 ppm και το σήμα του σχάζεται λόγω του πρωτονίου 4 (³J = 8,8 Hz) και του ατόμου του φθορίου. Η πολλαπλή κορυφή στα 7,01 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 4 το οποίο εξ όψεως καταγράφεται ως διπλή τριπλής κορυφή λόγω της σχάσης με τα πρωτόνια 3 και 5 καθώς και με το άτομο του φθορίου. Το πρωτόνιο 5 εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή στα 7,39 ppm και το σήμα του σχάζεται λόγω του ατόμου του φθορίου και του πρωτονίου 4. Το σήμα του πρωτονίου 2 καταγράφεται ως απλή κορυφή στα 8,20 ppm ενώ, τα πρωτόνια 6 και 7 αντιστοιχούν σε αυτά του πυριμιδινικού δακτυλίου και έχουν μετατόπιση 6,94 ppm και 7,39 ppm με σταθερά σύζευξης 5,3 Hz. Τέλος, τα πρωτόνια της άμινο ομάδας καταγράφονται στα 6,54 ppm με ολοκλήρωση 2 ως απλή κορυφή και τα πρωτόνια 1 στα 3,83 ppm με ολοκλήρωση 3.



Εικόνα 3.50: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) της 4-(1-μεθυλο-6-φθόρο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2αμίνης σε διαλύτη DMSO-d6.

3.5 Σύνθεση τελικών προϊόντων

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η βελτιστοποίηση της δραστικότητας του φυσικού προϊόντος των μεριδιανινών ως προς την ικανότητα αναστολής πρωτεϊνικών κινασών με την προσάρτηση ενός τμήματος ουρίας στην άμινο ομάδα του πυριμιδινικού δακτυλίου. Ανατρέχοντας στην παγκόσμια βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά δεδομένα που αφορούν την παραπάνω αντίδραση. Ο κοινός παρονομαστής τους είναι ότι αποτελούν αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσβολής όπου ως πυρηνόφιλο αξιοποιείται το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου της άμινο ομάδας. Στην περίπτωση των αλειφατικών αμινών (Εικόνα 3.51) η συγκεκριμένη αντίδραση λαμβάνει χώρα δίνοντας πολύ καλές αποδόσεις καθώς στο συγκεκριμένο υπόστρωμα το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου προσφέρεται εξ ολοκλήρου και δρα ως ισχυρό πυρηνόφιλο. Χαρακτηριστικό είναι ότι στις περισσότερες περιπτώσεις δεν απαιτείται η παρουσία βάσης.



Εικόνα 3.51: Απεικόνιση αντίδρασης αλειφατικών αμινών με ισοκυανικό.

Όσο αναφορά τις αρωματικές αμίνες τα περισσότερα στοιχεία που αντλούνται από την παγκόσμια βιβλιογραφία, για την συγκεκριμένη αντίδραση, είναι λιγότερα και περιορίζονται, ως επί το πλείστον, στις αντιδράσεις υποκατεστημένων και μη ανιλίνων (Εικόνα 3.52). Στο συγκεκριμένο αμινικό υπόστρωμα το ασύζευκτο ζεύγος της άμινο ομάδας δεν προσφέρεται καθώς λόγω του εκδηλωμένου συζυγιακού φαινομένου το μονήρες ζεύγος προσφέρεται στον αρωματικό δακτύλιο. Γι' αυτόν τον λόγο, για την πραγματοποίηση της παραπάνω αντίδρασης στην περίπτωση των ανιλινών, απαραίτητη είναι η παρουσία βάσης (συνήθως Et₃N) η οποία θα αποπρωτονιώσει την άμινο ομάδα έτσι ώστε να επαναφέρει των πυρηνόφιλο χαρακτήρα της.



Εικόνα 3.52: δομές συντονισμού ανιλινών-εξασθένηση πυρηνόφιλου χαρακτήρα του αζώτου της αμινομάδας.

Ωστόσο, τα στοιχεία που υπάρχουν για αμίνες συνδεδεμένες σε ετεροκυκλικούς αρωματικούς δακτυλίους είναι ελάχιστα. Στο εργαστήριο οργανικής χημείας, και δη στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγιναν προσπάθειες ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της παραπάνω αντίδρασης όπου η αμινομάδα βρίσκεται στην 2-θέση πυριμιδινικού δακτυλίου. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα είναι έτι πιο αδρανές από την ανιλίνη, καθώς πέρα από το εκδηλόμενο θετικό συζυγιακό
φαινόμενο λαμβάνει χώρα και η επίδραση του επαγωγικού φαινομένου των ατόμων του αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου τα οποία αφαιρούν επίσης ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο.

Οι προσπάθειες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα, όπου ως αρχικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ένωση **49** με χρήση του εμπορικώς διαθέσιμου 3τριφθορομεθυλο-4-χλωρο-φαίνυλοισοκυανικό.

Διαλύτης	Βάση	Θερμοκρασία	Βάση Eq	Αποδοση
THF	Et₃N	reflux	Excess	8%
THF	Pyridine	Reflux	Excess	0
DMF	Pyridine	120 ^o C	Excess	0
DMF	Et3N	120 ⁰ C	Excess	0
DMSO	Et₃N	140 ⁰ C	Excess	0
DMSO	NaH	140 ⁰ C	Excess	0
DCM	Pyridine	r.t.	Excess	<10%
DCM	Et3N	r.t.	5	28%
DCM	NaH	r.t.	4	41%
DCM	DBU	r.t.	Excess	0
Acrylonitrile	NaH	Reflux	Excess	0

Πίνακας 3.7: Προσπάθειες σύνθεσης του Τ1.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η επαναφορά του πυρηνόφιλου χαρακτήρα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση κρίνεται απαραίτητη η παρουσία μίας πολύ ισχυρής βάσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω (Πίνακας 3.7) επιτεύχθηκε ο σχηματισμός των 6 τελικών προϊόντων (Εικόνα 3.53).

















NaH DCM























Εικόνα 3.53: Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων.

3.5.1. Μηχάνισμός αντίδρασης σύνθεσης τελικών προϊόντων

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, η σύνθεση των τελικών προϊόντων προκύπτει από αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής κατά την οποία το άζωτο της άμινο ομάδας του πυριμιδινικού δακτυλίου προσβάλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του ισοκυανικού. Η δραστικότητα της άμινο ομάδας υποβοηθάται από μία ισχυρή βάση η οποία το αποπρωτονιώνει ώστε να ενισχύσει των πυρηνόφιλο χαρακτήρα του αζώτου.



Εικόνα 3.54: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης των τελικών μορίων.

3.5.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα τελικών προϊόντων

Τα τελικά προϊόντα που συντέθηκαν φέρουν όλα δεσμό ουρίας και συνιστούν όλα ένα εκτενές συζυγιακό σύστημα. Εντούτοις, είναι βέβαιο ότι τα μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων των ατόμων αζώτου αυτού του διαμιδίου θα διατίθενται προς τους δακτυλίους με αποτέλεσμα την έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και επομένως

της αποπροστασίας των πρωτονίων τους. Γι' αυτό, όπως παρατηρείται και φασματοσκοπικά, τα πρωτόνια της ουρίας είναι τα πλέον αποπροστατευμένα.

3.5.2.1. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης Τ1

Από το φάσμα ¹Η NMR (Εικόνα 3.55) εξάγεται το συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε η αντίδραση σύνθεσης της ουρίας από τις δύο απλές κορυφές των πρωτονίων 9 και 10 με μετατοπίσεις 12,10 και 10,35 ppm, αντίστοιχα. Όσο αναφορά τα αρωματικά πρωτόνια τα υπ' αριθμόν 1-8 έχουν ερμηνευτεί κατά την επεξεργασία των φασματικών δεδομένων της πρόδρομης ένωσης 49. Το πρωτόνιο 11 καταγράφεται ως απλή διπλής κορυφή με σταθερά σύζευξης ⁴J = 2,6 Hz και μετατόπιση 8,19 ppm, αρκετά αποπροσταυμένο τηρουμένων των αναλογιών, το οποίο ωστόσο είναι λογικό καθώς το συγκεκριμένο πρωτόνιο βρίσκεται κοντά σε άνθρακα που φέρει τριφθορομέθυλο ομάδα η οποία λόγω του ισχυρά εκδηλωμένου επαγωγικού φαινομένου των ατόμων φθορίου αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο. Επίσης, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο χωρικής αλληλεπίδρασης του πρωτονίου 11 με τα άτομα του φθορίου. Το πρωτόνιο 12 εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή, καθώς το σήμα του σχάζεται τόσο από το πρωτόνιο 11 (${}^{4}J$ = 2,6 Hz) όσο και από το πρωτόνιο 13 (${}^{3}J$ = 8,8 Hz) στα 7,89 ppm. Το πρωτόνιο 13 που παρουσιάζει την ίδια σταθερά σύζευξης με το πρωτόνιο 12 αποτυπώνεται ως διπλή κορυφή στα 7,68 ppm.



Εικόνα 3.55: Φάσμα ¹Η NMR (400 MHz) του T1 σε διαλύτη DMSO-d6.

Από το φάσμα ¹³C NMR (Εικόνα 3.56), αν και δεν είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικό, αποτυπώνεται η αύξηση του αριθμού των σημάτων στην αρωματική περιοχή. Σημειώνεται ότι λόγω του προαναφερθέντος ισχυρού επαγωγικού φαινομένου που εκδηλώνεται στον άνθρακα που φέρει την τριφθορομέθυλο ομάδα το σήμα του μετατοπίζεται προς την αρωματική περιοχή.



Εικόνα 3.56: Φάσμα ¹³C NMR (100 MHz) του T1 σε διαλύτη DMSO-d6.

3.5.2.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης Τ2

Στο φάσμα ¹Η NMR (Εικόνα 3.57) της ένωσης T2 τα πρωτόνια 9 και 10 πιστοποιούν την σύνθεση του διαμιδίου και το σήμα απλών κορυφών με μετατοπίσεις 10,15 ppm και 11,72 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια 1-8 έχουν αναλυθεί στην επεξεργασία του φάσματος της ένωσης. Όσο αναφορά τα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου παρατηρείται ότι λόγω της συμμετρικότητας τους τα πρωτόνια 11,14 και 12,13 είναι ισοδύναμα μεταξύ τους. Τα πρωτόνια 11,14 αν και βρίσκονται σε μακρινότερη θέση σε σχέση με τα 12,13 πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν μέσω του χώρου με το καρβονυλικό οξυγόνο της ουρίας και επομένως στερούνται ηλεκτρονιακή πυκνότητα και εντούτοις μετατοπίζονται προς μεγαλύτερες τιμές ppm. Αυτή η εικασία ισχυροποιείται και από το γεγονός ότι αν και τα δυο πρωτόνια υφίστανται αλληεπικάλυψη στο σήμα τους η σχάση του σήματος αποδίδει μια διπλή διπλής κορυφή από τα γειτονικά τους πρωτόνια γεγονός που δείχνει ότι δεν σχάζονται και από το άτομο του φθορίου και επομένως δεν βρίσκονται σε γειτονικούς άνθρακες. Το σήμα τους καταγράφεται στα 7,62 ppm και έχει ολοκλήρωση 2. Τέλος, τα πρωτόνια 11,14 αλληλεπικαλύπτονται σε μια πολλαπλή κορυφή μαζί με το πρωτόνιο 4 στα 7,19 ppm με ολοκλήρωση 3.



Εικόνα 3.57: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) του T2 σε διαλύτη DMSO-d6.

Από το φάσμα ¹³C NMR (Εικόνα 3.58) μπορούμε να διαπιστώσουμε την αύξηση του αριθμού των σημάτων στην αρωματική περιοχή τα οποία αντιστοιχούν σε 20 λόγω της σύζευξης άνθρακα φθορίου του άνθρακα του βενζολικού δακτυλίου που φέρει το φθόριο.



Εικόνα 3.58: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) του T2 σε διαλύτη DMSO-d6.

Για την περαιτέρω ταυτοποίηση κάποιον ατόμων άνθρακα αλλά και γι την επαλήθευση κάποιων εκ των συμπερασμάτων που εξήχθησαν από το μονοδιάστατα φάσματα πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος HMBC (Εικόνα 3.59). Συγκεκριμένα μπορούμε πλέον να αποφανθούμε με μεγαλύτερη βεβαιότητα για το ότι αν και το πρωτόνιο 9 της ουρίας βρίσκεται κοντά σε πυρημιδινικό δακτύλιο και αναμενόταν ως το πλέον αποπροστατευμένο, φαίνεται ότι το πρωτόνιο 10 καταγράφει το σήμα του στην μεγαλύτερη τιμή ppm αφού η συσχέτιση 10,15-156,41 αφορά αλληλεπίδραση με τον πυρημιδινικό δακτύλιο. Επίσης, για τον ινδολικό δακτύλιο αποδεικνύεται ότι το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι αυτό της θέσης 3 και όχι της 7, καθώς δίνει τριες συσχετίσεις HMBC [(8,78-112,15), (8,78-138,36), (8,78-122,89)], ενώ αντίστοιχα το πρωτόνιο 6 δίνει δυο [(7,56-122,89), (7,56-125,90)]. Τέλος, επαληθεύεται και η αρχική διαπίστωση ότι η τριπλή κορυφή ανήκει στο πρωτόνιο 5 και όχι στο 4, καθώς έχει κοινή αλληλεπίδραση με τα πρωτόνια 2 και 3 που αντιστοιχούν στον άνθρακα 7*β* κατά την επίσημη αρίθμηση του ινδολικού δακτυλίου.



Εικόνα 3.59: Φάσμα HMBC (500 MHz) του T2 σε διαλύτη DMSO-d6.

3.5.2.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα για το Τ3

Συγκρίνοντας την δομή του μορίου με αυτήν του T2 η μόνη διαφοροποίηση που παρατηρείται είναι η ύπαρξη 7-αζα-ινδολικού δακτυλίου. Γι' αυτό μπορεί να γίνει μία απευθείας σύγκριση με το πρωτονιακό φάσμα του T2 από όπου οι αλλαγές που παρατηρούνται είναι η μετατόπιση του πρωτονίου 5 προς μεγαλύτερες τιμες ppm (8,39), καθώς και η αλλαγή στην σχάση από τριπλή σε διπλή διπλής λόγω της γειτνίασης με τα πρωτόνια 3 και 4. Η μετατόπιση είναι καθ' όλα εύλογη αφού ο άνθρακας ο οποίος φέρει το πρωτόνιο 5 είναι σε γειτονική θέση με το ετεροάτομο αζώτου το οποίο λόγω του επαγωγικού φαινομένου αφαιρεί από αυτό ηλεκτρόνια.



Εικόνα 3.60: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) του T3 σε διαλύτη DMSO-d6.

Στο φάσμα ¹³C NMR (Εικόνα 3.61) παρατηρείται η αύξηση του αριθμού των σημάτων στην αρωματική περιοχή και σχάση άνθρακα φθορίου στον βενζολικό δακτύλιο (*J* = 239,2 Hz).



Εικόνα 3.51: Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) του T3 σε διαλύτη DMSO-d6.

Από το φάσμα HMBC (Εικόνα 3.62) επαληθεύει εκ νέου το γεγονός ότι το αμιδικό πρωτόνιο που συνδέεται με τον βενζολικό δακτύλιο είναι το πλέον αποπροστατευμένο, καθώς υπάρχει κοινή συσχέτιση αυτού με τα πρωτόνια 10 και 11 των οποίων το σήμα αλληλεπικαλύπτεται [(11,66-122,03), (7,63-122,03)]. Επίσης, η κοινή συσχέτιση των πρωτονίων 2,3 και 5 (εικόνα 3.63) πιστοποιεί ότι πράγματι η διπλής κορυφή που απεικονίζεται στα 8,39 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 5 και ο κοινός άνθρακας είναι αυτός της θέσης 7*8* του ινδολίου, κατά την επίσημη αρίθμηση των θέσεών του.



Εικόνα 3.62: Φάσμα HMBC (500 MHz) του T3 σε διαλύτη DMSO-d6.



Εικόνα 3.63: Συσχέτιση ΗΜΒC των πρωτονίων 2,3 και 5.

Από το φάσμα HSQC (εικόνα 3.64) αποδεικνύεται ότι το πρωτόνιο 3 αποπροστατεύεται, καθώς το σήμα του άνθρακα που το φέρει δεν είναι

μετατοπισμένο σε ιδιαίτερα υψηλές τιμές ppm. Επίσης η μετατόπιση του πρωτονίου 5 σε μεγαλύτερες τιμές ppm (σε σχέση με το T2) αποδίδεται πράγματι στο επαγωγικό φαινόμενο που ασκείται από το άζωτο της θέσης 7 του ινδολικού δακτυλίου στον άνθρακα που φέρει το συγκεκριμένο πρωτόνιο καθώς και αυτό έχει μετατοπιστεί προς μεγαλύτερες τιμές ppm (144,14).



Εικόνα 3.64: Φάσμα HSQC (500 MHz) του T3 σε διαλύτη DMSO-d6.

3.5.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης Τ4

Το Τ4 λόγω της εξαιρετικά χαμηλής απόδοσης της αντίδρασης αντίδραση σύνθεσης της (10%) υπήρξε δυσκολία κατά την διάρκεια της απομόνωσης της και λόγω της ελάχιστης ποσότητας που ταυτοποιήθηκε μόνο μέσω φάσματος ¹Η NMR (Εικόνα 3.65) απ' όπου προκύπτει ότι δεν είναι απόλυτης καθαρότητας. Ωστόσο, η ταυτοποίηση της ένωσης είναι δυνατή καθώς καταγράφονται ξεκάθαρα τα σήματα των πρωτοίνων της ουρίας με μετατοπίσεις 11,56 ppm και 10,45 ppm Επίσης όπως και στο T3, το πρωτόνιο 4 (για το T3 το πρωτόνιο υπ'αριθμόν 5) μετατοπίζεται προς μεγαλύτερες τιμές ppm λόγω της γειτονικής νίτρο ομάδας η οποία μέσω του συζυγιακού φαινομένου έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα από το δακτύλιο, ενώ πιθανή είναι και η μέσω του χώρου αλληλεπίδραση του πρωτονίου 4 με την νιτρομάδα, γεγονός που το αποπροστατεύει ακόμα περισσότερο. Τα υπόλοιπα πρωτόνια έχουν αναλυθεί στην ανάλυση των προηγούμενων τελικών μορίων.



Εικόνα 3.65: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) του T4 σε διαλύτη DMSO-d6.

3.5.2.5. Φασματοσκοπικά δεδομένα για το T5

Στο φάσμα πρωτονίου του T5 (Εικόνα 3.66) η ταυτοποίηση των αρωματικών πρωτονίων καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη καθώς υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των σημάτων απόρροια της χαμηλής διακριτικής ικανότητας του οργάνου (250 MHz), καθώς επίσης και της επιπλέον σχάσης που προκαλείται από τα 2 άτομα φθορίου. Ωστόσο, μπορεί να ειπωθεί χωρίς επιφύλαξη ότι το τελικό μόριο συντέθηκε, ωστόσο δεν ταυτοποιούνται όλα τα πρωτόνια καθώς επίσης και ότι μπορεί να διεξαχθεί μία αποτελεσματικότερη απομόνωση του. Στο φάσμα ¹Η NMR (Εικόνα 3.66) αποτυπώνονται τα δύο πρωτόνια της ουρίας (8,9) με μετατοπίσεις 10,20 ppm και 11,68 ppm. Επίσης, το πρωτόνιο 5 υφίστανται μια μετατόπιση με αποτέλεσμα το σήμα που καταγράφει να αλληλεπικαλύπτεται με το πρωτόνιο 6.



Εικόνα 3.66: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) του T5 σε διαλύτη DMSO-d6.

3.5.2.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα για το Τ6

Παρατηρείται ότι σε σχέση με την δομή του T1 η δομή του T6 διαφοροποιείται μόνο στην θέση του 7α ινδολικού δακτυλίου όπου ο άνθρακας έχει αντικατασταθεί από ένα μόριο αζώτου. Επομένως συγκρίνοντας το φάσμα ¹Η NMR (εικόνα 3.67) με αυτό του T1 παρατηρείται η αποπροστασία του πρωτονίου 5 το οποίο μετατοπίζεται προς υψηλότερες τιμές ppm λόγω της ύπαρξης του ετεροατόμου του αζώτου. Για τον ίδιο λόγο το σήμα που καταγράφεται σχάζεται σε διπλή διπλής κορυφή έναντι της τριπλής κορυφής που καταγράφεται στο T1.



Εικόνα 3.67: Φάσμα ¹Η NMR (250 MHz) του Τ6 σε διαλύτη DMSO-d6.

3.6 Ανακεφαλαίωση-Συμπεράσματα

Ανακεφαλαιώνοντας, στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση 3 ανάλογων μεριδιανίνης με την μέθοδο Bredereck για κάθε μια από τις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό ένα διαφορετικό ινδολικό παράγωγο. Τα αποτελέσματα των επιμέρους αντιδράσεων, καθώς και η συνολική απόδοση της σύνθεσης τους παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 3.9):

BREDERECK							
	Μεθυλίωση	Ακυλίωση	Εναμινόνη	Κυκλοποίηση	Απόδοση		
Ινδόλιο	98%	64%	81%	74%	37,6%		
7-αζαϊνδόλιο	98%	89%	65%	95%	53,9%		
5-νιτροϊνδόλιο	98%	71%	75%	59%	30,8%		
6-φθοροϊνδόλιο	98%	66%	24%	64%	9,9%		

Πίνακας 3.9: Σύνοψη συνθετικής πορείας σύνθεσης αναλόγων μεριδιανίνης.

Από τον παραπάνω πίνακα μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η μέθοδος Bredereck για το 7-αζαϊνδόλιο και το 5-νιτροϊνδόλιο αποτελεί την κατάλληλη μέθοδο για την σύνθεση των δύο ανάλογων μεριδιανίνης, δεδομένου ότι η συνολική απόδοση είναι συγκρίσιμη με αυτήν του απλού ινδολίου. Ωστόσο το 6φθοροίνδόλιο φαίνεται να μην προσφέρεται τόσο για την σύνθεση του αντίστοιχου ανάλογου καθώς η συνολική απόδοση δεν ξεπερνά το 10%.

Η αποδόσεις της σύνθεσης των τελικών προϊόντων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Τελικό μόριο	Yield
T1	41%
T2	46%
Т3	44%
T4	9%
T5	24%
Т6	48%

Πίνακας 3.10: Αποδόσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων.

Από τα παραπάνω δεδομένα, τα συμπεράσματα που απορρέουν είναι ότι τα ανάλογα μεριδιανίνης που έφεραν το μη υποκατεστημένο ινδόλιο καθώς και το 7αζαϊνδόλιο αποτέλεσαν τα καλύτερα υποστρώματα για την διεξαγωγή της αντίδρασης σχηματισμού ουρίας. Αντίθετα το ανάλογο που έφερε ως ινδολικό τμήμα το 5-νιτροϊνδόλιο φάνηκε ότι δεν προσφέρεται, παρά ελάχιστα για την συγκεκριμένη αντίδραση. Αξίζει να αναφερθεί ότι έγινε προσπάθεια αύξησης της προσφερόμενης ενέργειας κατά την διάρκεια της αντίδρασης με αντικατάσταση του διαλύτη από DCM (σ.ζ.: 39°C), που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις όλων των υπόλοιπων τελικών μορίων, σε DCE (σ.ζ.: 83,5 °C) ωστόσο δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά. Η μικρή απόδοση της τελικής αντίδρασης σχηματισμού του T4 δεν επέτρεψε την περαιτέρω κατεργασία του με σκοπό την σύνθεση του Τ4α. Συγκριτικά με την αξιολόγηση των τελικών μορίων αναφορικά με τους κανόνες Lipinski όλα τα μόρια φέρουν τον κατάλληλο αριθμό δοτών και δεκτών δεσμού υδρογόνου το μοριακό βάρος τους είναι κοντά στο 500. Αυτό μπορεί, ενδεχομένως, να σημαίνει ότι η βιοδραστικότητα των μορίων να είναι ικανοποιητική, ωστόσο εφόσον το μοριακό βάρος είναι σχετικά μικρό μπορούν να προσαρτηθούν και νέες δομικές μονάδες σε αυτά τα μόρια που θα μπορέσουν να τα καταστίσουν ακόμα πιο βιοδραστικά.

Τα αποτελέσματα μοριακής μοντελοποίησης ήταν αρκετά ενθαρρυντικά για τους EGFR και FGFR συγκριτικά με αναστολείς που έχουν ήδη εγκριθεί για τους δύο υποδοχείς (Osimertinib, Lenvatinib). Πιο συγκριμένα, η προσθήκη δεσμού και δη τα αμιδικά πρωτόνια συνεισφέρουν στον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με το ενεργό κέντρο των παραπάνω υποδοχέων ενώ, το καρβονυλικό οξυγόνο δεν συμμετείχε. Εν κατακλείδι, τα θεωρητικά αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης ήταν πολύ ενθαρρυντικά για την βιολογική δράση των τελικών προϊόντων στους υποδοχείς αλλά και ενθαρρύνουν την δοκιμή τους και σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες στο πλαίσιο μοριακής μοντελοποίησης

Επιπροσθέτως, το φθόριο που φέρουν τα T2, T3, T4, T5 αποτελεί καλή αποχωρούσα ομάδα σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης και επομένως μπορούν να ενσωματωθούν πληθώρα μοριακών δομών που ενδεχομένως να αυξήσουν την βιολογική τους δράση ενώ αντίστοιχη ευκινησία διαθέτει και η νιτρομάδα του T4 από τν οποία, πέρα από το T4α, μπορούν να συντεθούν πληθώρα ενώσεων βασισμένο στην χημεία των αμινών.. Έχει σχεδιαστεί πλάνο σύνθεσης νεών τελικών μορίων παράγωγα των ενώσεων T2, T3, T4, T5.

126

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:

4.1: ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας X3-210. Κατά την διεξαγωγή των αντιδράσεων ο έλεγχος της πορείας τους γινόταν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και συγκεκριμένα με πλάκες silica gel F₂₅₄ ms των εταιρειών Merck και Fluorochem. Ο διαχωρισμός και η απομόνωση των ενώσεων με χρωματογραφία στήλης έγινε επίσης με Silica gel F₂₅₄ ms της εταιρείας Fluorochem.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως πρόδρομες ενώσεις για την διεξαγωγή των πειραμάτων προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma Aldrich, Alfa Aesar Fluorochem και Carbosynth και ήταν υψηλής καθαρότητας και δεν επεξεργάστηκαν πριν χρησιμοποιηθούν. Οι διαλύτες των αντιδράσεων οι οποίοι προμηθεύτηκαν από τις ίδιες εταιρείες είτε χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία είτε κατέστησαν απόλυτοι-άνυδροι όπου ήταν απαραίτητο.

Οι προκύπτουσες ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) σε φασματογράφο Bruker AV 250, 400, 500 MHz. Τα φάσματα μίας διάστασης λήφθηκαν από τα AV 250 και AV 400, ενώ τα φάσματα δυό διαστάσεων στον φασματογράφο AV 500.

4.2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση της 1-(1Η-πυρρολο[2,3-b]πυριδιν-3-υλο)αιθαν-1-όνη: (65)



Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρεται διάλυμα 1Ηπυρρολο[2,3-b]πυριδίνη (2g, 12,48 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (20 mL). Στην συνέχεια στους 0 °C και σε ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται AlCl₃ (5g, 37,45 mmol) σε δώσεις. Το μείγμα

αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά στους 0 °C. Ακολούθως, πραγματοποιείται

στάγδην προσθήκη Ac₂O (1,53 g, 14,98 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC), ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται και ξηραίνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂ και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως υποκίτρινο ίζημα (Απόδοση: **89**%)

1H NMR (400 MHz, Acetone, 298K) δ 11.40 (s, 1H), 8.58 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.35 (dd, J = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 2.50 (s, 3H).
¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 193.36, 149.45, 144.60, 135.12, 130.03, 118.48, 118.06, 115.94, 27.39.

Σύνθεση της 1-(1-μεθυλο-1Η-πυρρολο[2,3-b]πυριδινο-3-υλο)αιθαν-1-όνη: (66)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL διοχετεύεται διάλυμα 1-(1Ηπυρρολο[2,3-b]πυριδιν-3-υλ)αιθαν-1-όνη (1g, 6,24mmol) σε άνυδρο THF(12 mL). Στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50% w/w σε λάδι (599 g 12,48 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 20

λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται στάγδην CH₃I (1,77 gr 12,48 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση απομονώνεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν απομονώνεται ως λευκό ίζημα (Απόδοση **98**%).

¹H NMR (400 MHz, Acetone, 298K) δ 8.56 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.39 (dd, *J* = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.27 (dd, *J* = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.47 (s, 3H).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 192.74, 148.46, 144.42, 138.40, 130.22, 118.71, 31.89, 27.36.

Σύνθεση της (Ε)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1Η-πυρρολο[2,3- b]πυριδιν-3υλο)προπ-2-εν-1-ονης: (67)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL εναποτίθεται διάλυμα του 1-(1-μεθυλο-1Η-πυρρολο[2,3-b]πυριδινο-3-υλο)αιθαν-1όνη (1g, 5,74 mmol) σε ο-ξυλόλιο (10mL) και το μείγμα θερμαίνεται στους 100 °C. Στην συνέχεια προστίθεται DMF-DMA (2,07 gr, 17,37 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 140 °C για 72 ώρες. Μετά το πέρας

της αντίδρασης το μείγμα μεταφέρεται αρχικά στον περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία στην αντλία υψηλού κενού για απομάκρυνση του διαλύτη και του DMF-DMA. Στο υπόλειμμα προστίθεται παγωμένο Et₂O και ακολουθεί διήθηση και απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος (Απόδοση: **65**%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 298K) δ 8.55 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.31 (dd, *J* = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 3.86 (s, 2H), 2.99 (s, 8H).

Σύνθεση της 4-(1-μεθυλο-1Η-πυρρολο[2,3-b]πυριδινο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης:

(491)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης (525 mg, 5,5mmol) και K₂CO₃ (912 mg, 6,6 mmol) σε 1-προπανόλη (6 mL). Το μείγμα θερμαίνεται στους 97°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται (Ε)-3-(διμεθυλαμινο)–1-(1-μεθυλο-

1Η-πυρρολο[2,3- b]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-ονη (500 mg, 2,2 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπο ανάδευση για 18 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ο EtOAc απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 5% MeOH σε CH₂Cl₂ ως κίτρινο ίζημα (Απόδοση: **95**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 8.92 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.35 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.23 (dd, *J* = 8.0, 4.6 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 6.50 (s, 2H), 3.89 (s, 3H).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 164.03, 162.16, 157.90, 143.77, 132.43, 131.37, 118.59, 117.35, 111.73, 105.29, 31.72.

Σύνθεσης του Τ3



Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστίθεται διάλυμα της 4-(1-μεθυλο-1Η-πυρρολο[2,3b]πυριδινο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (40 mg, 0,117 mmol) σε απόλυτο CH₂Cl₂ (2 mL). Στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50% w/w διαλυμένο σε λάδι (43 mg,

0,888 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται 4-φθόρο-φαίνυλο-ισοκυανικό (21 mg, 0,16 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 25% EtOAc σε CH₂Cl₂ (Απόδοση: **44**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 11.68 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 9.21 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 8.52 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.39 (dd, *J* = 4.7, 1.5 Hz, 1H),

7.64 (ddd, *J* = 9.2, 5.1, 1.2 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.32 – 7.12 (m, 3H), 3.92 (s, 1H)

¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 163.31, 158.42 (d, J = 239.3 Hz), 158,42 155.94, 152.48, 148.79, 144.25, 135.51, 135.49 (d, J = 2.6 Hz), 135.47, 134.14, 132.20, 121.75, 121.62, 117.99, 116.07, 115.71, 110.84, 109.58, 31.94.

Σύνθεση του Τ6



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 10 mL προστίθεται διάλυμα της της 4-(1-μεθυλο-1Ηινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (20 mg, 0,09 mmol) σε απόλυτο CH₂Cl₂ (1 mL). Στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται

NaH 50% w/w διαλυμένο σε λάδι (13mg, 0,27mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται το εμπορικώς διαθέσιμο αντιδραστήριο 3-χλώρο-4-(τριφθορομεθυλο)-φαινυλο ισοκυανικό (24 mg, 0,11 mmol).). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται ως λευκό στερεό με διαχωρισμό του υπολλείματος μέσω χρωματογραφίας στήλης σε διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂ (Απόδοση: **48%**).

1H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 12.03 (s, 1H), 10.43 (s, 1H), 9.18 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.54 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.39 (dd, *J* = 4.7, 1.6 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.25 (dd, *J* = 8.0, 4.7 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

Σύνθεση του 1-μεθυλο-ινδολίου: (12)



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL διοχετεύεται διάλυμα ινδολίου (2g, 17,07mmol) σε άνυδρο THF (12 mL). Στους 0°C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50% w/w σε λάδι (1,64 g 34,2 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό

ανάδευση στους 0 °C για 15 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται στάγδην CH₃I (4,85 gr 34,02 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση απομονώνεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό 98%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 7.57 (dd, *J* = 7.8, 1.1 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H).

13C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 136.83, 129.98, 128.49, 121.42, 120.74, 119.32, 110.07, 100.68, 32.88.

Σύνθεση της 1-(1-μεθυλο-ινδολο-3-υλο)αιθαν-1-όνης: (62)



Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρεται διάλυμα 1-μεθυλο-1Ηινδολίου (2g, 15,25 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (18 mL). Στην συνέχεια στους 0 °C και σε ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται AlCl₃ (5,08g, 38,13mmol) σε δώσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 50 λεπτά στους 0 °C. Έπειτα, πραγματοποιείται

στάγδην προσθήκη Ac₂O (1,87 g, 18,3 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και

ξηραίνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂ και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως υποκίτρινο ίζημα (Απόδοση: **64**%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 298K) δ 8.31 (s, 1H), 8.20 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 8.2, 7.1, 1.5 Hz, 1H), 7.23 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 2.44 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO, 298K) δ 192.49, 138.46, 137.75, 126.17, 123.23, 122.46, 121.90, 116.08, 110.99, 33.56, 27.69.

Σύνθεση της (Ε)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης: (63)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL εναποτίθεται διάλυμα της 1-(1-μεθυλο-ινδολο-3-υλο) αιθανο-1-όνης (1g, 5,77 mmol) σε ο-ξυλόλιο (15 mL) και το μείγμα θερμαίνεται στους 100 °C. Στην συνέχεια προστίθεται DMF-DMA (3,44gr, 28,85 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό

ανάδευση στους 140 °C για 36 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μείγμα μεταφέρεται αρχικά στον περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία στην αντλία υψηλού κενού για απομάκρυνση του διαλύτη και του DMF-DMA. Στο υπόλειμμα προστίθεται παγωμένος Et₂O όποτε και καταβυθίζεται καστανέρυθρο ίζημα. Ακολουθεί διήθηση και απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος (Απόδοση: **81**%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 298K) δ 8.28 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.25 – 7.18 (m, 1H), 7.18 – 7.12 (m, 1H), 5.71 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.98 (s, 7H).

Σύνθεση της 4-(1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης: (49G)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης (420 mg, 4,4mmol) και K₂CO₃ (691 mg, 5 mmol) σε 1-προπανόλη (10 mL). Το μείγμα θερμαίνεται στους 97°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλοινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (500 mg, 2,19 mmol) και

το μείγμα αφήνεται υπο ανάδευση για 12 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ο EtOAc απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 5% MeOH σε CH₂Cl₂ ως κίτρινο ίζημα (Απόδοση: **78**%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 298K) δ 8.63 – 8.56 (m, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 1H), 7.25 (t, *J* = 8.2, 7.0, 1.3 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 8.1, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 6.41 (s, 2H), 3.86 (s, 2H).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 164.01, 162.73, 157.57, 137.98, 132.60, 126.20, 122.98, 122.51, 121.00, 113.14, 110.65, 105.63, 33.39.

Σύνθεση του 3-(2-χλωροπυριμιδινο-4-υλο)-1-μεθυλοϊνδολίου: (4)



Σε σφαιρική φιάλη των 25 mL φέρεται διάλυμα 2,4διχλωροπυριμιδίνης (0.25 g, 1,18 mmol) σε άνυδρο διμεθοξυαιθάνιο (DME) (4 mL). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, σε ατμόσφαιρα αζώτου και στην συνέχεια προστίθεται άνυδρος

τριχλωριούχος σίδηρος (0.3 g, 1,87 mmol), σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 20 λεπτά. Στο μείγμα της αντίδρασης προστίθεται *Ν*-μεθυλοϊνδόλιο (0.46 g, 3.54 mmol) και θερμαίνεται στους 55 °C για 12 ώρες. Μετά το πέρας της

αντίδρασης, απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί εκχύλιση του μείγματος με DCM και H2O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na₂SO₄, και διηθείται. Έπειτα ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης DCM και το προϊόν απομονώνεται ως υποκίτρινο στερεό (**81**%).

Σύνθεση του Τ2:



Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστίθεται διάλυμα της 4-(1-μεθυλο-ινδολο-3υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (40 mg, 0,178 mmol) σε απόλυτο CH₂Cl₂ (3 mL). Στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50%

w/w διαλυμένο σε λάδι (34 mg, 0,712 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται 4-φθόρο-φαίνυλοισοκυανικό (29 mg, 0,21 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και εξατμιστήρα και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 25% EtOAc σε CH₂Cl₂ (Απόδοση: **46**%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO, 298K) δ 11.72 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 8.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.66 – 7.58 (m, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.30 (td, *J* = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.19 (td, *J* = 8.5, 4.7 Hz, 3H), 3.90 (s, 3H).

13C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 163.61, 160.32, 158.41, 156.51, 155.79, 152.52, 138.19, 135.53, 135.50, 134.32, 125.99, 123.42, 121.78, 121.66, 116.05, 115.69, 112.24, 110.86, 109.94, 33.66.

Σύνθεση του Τ1:



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 10 mL προστίθεται διάλυμα της της 4-(1-μεθυλοινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης (20 mg, 0,09 mmol) σε απόλυτο CH₂Cl₂ (1 mL). Στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται

NaH 50% w/w διαλυμένο σε λάδι (13mg, 0,27mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται το εμπορικώς διαθέσιμο αντιδραστήριο 3-χλωρο-4-(τριφθορομεθυλο)-φαινυλο ισοκυανικό (24 mg, 0,11 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται ως λευκό στερεό με διαχωρισμό του υπολλείματος μέσω χρωματογραφίας στήλης σε διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂ (Απόδοση: **31%**)

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 298K) δ 12.10 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 8.76 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.19 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.30 (td, J = 8.2, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 7.19 (td, J = 8.2, 6.9 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO, 298K) δ 163.62 158.19, 155.92, 152.59, 152.55, 138.80, 138,20, 134.39, 132.56, 125.96, 124.78, 123.96 123.27, 123.11, 121.84, 112.20, 110.92, 110.22, 33.66

Σύνθεση του: 1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδόλιου: (69)



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL διοχετεύεται διάλυμα 5-νιτρο-ινδολίου (5g, 30,83 mmol) σε άνυδρο THF (35 mL). Στους 0°C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50% w/w σε λάδι (3,7, g 77,08 mmol) σε δόσεις. Το

μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 45 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται στάγδην CH₃I (10,94 g, 77,08 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση απομονώνεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν απομονώνεται ως κίτρινο ίζημα (Απόδοση **98**%).

¹H NMR (400 MHz, Acetone, 298K) δ 8.59 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 3.97 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H).

Σύνθεση του 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1Η-ινδολο-3-υλο)αιθανο-1-όνης: (70)



Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL φέρεται διάλυμα 1-μεθυλο-5-νίτρο-1Η-ινδολίου (4g, 18,33 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (40 mL). Στην συνέχεια στους 0 °C και σε ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται AlCl₃ (7,33g, 55mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 60 λεπτά στους 0 °C. Έπειτα,

πραγματοποιείται προσθήκη Ac₂O (2,43 g, 23,83 mmol) στάγδην και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία προστίθεται κρύο νερο στην σφαιρική φιάλη για την μετατροπή του AlCl₃ σε Al(OH)₃ και αφήνεται υπό ανάδευση για 4 ωρες. ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ξηραίνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂ και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως κίτρινο στερεό (Απόδοση: **71**%). ¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 8.99 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.14 (dd, J = 9.1, 2.4 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.48 (s, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO 298K) δ 193.00, 143.34, 141.93, 140.67, 125.34, 118.59, 118.18, 117.33, 112.11, 34.15, 27.75.

Σύνθεση της (Ε)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1Η-ινδολο-3-υλ)προπ-2-εν-1-όνης: (71)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL εναποτίθεται διάλυμα της 1-(1-μεθυλο-ινδολο-3-υλο) αιθαν-1-όνης (500 mg, 2,29 mmol) σε ο-ξυλόλιο (10 mL) και το μείγμα θερμαίνεται στους 100 °C. Στην συνέχεια προστίθεται DMF-DMA (819 mg, 6,87 mmol) και το

μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 140 °C για 60 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μείγμα μεταφέρεται αρχικά στον περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία στην αντλία υψηλού κενού για απομάκρυνση του διαλύτη και του DMF-DMA. Το επιθυμητό προϊόν διαχωρίζεται από το διάλυμα με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης 5% MeOH σε CH₂Cl₂ (Απόδοση: **75**%)

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 9.20 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.10 (dd, J = 9.1, 2.4 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 5.75 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.02 (s, 6H)

¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 182.81, 152.35, 142.52, 140.38, 137.64, 126.30, 119.13, 117.71, 111.43, 93.07, 33.87.

Σύνθεση της 4-(1-μεθυλ-5-νιτρο-ινδολο-3-υλο)πυριμιδινο-2-αμίνης:



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης (372 mg, 3,9mmol)

και K2CO3 (718 mg, 5,2 mmol) σε 1-προπανόλη (10 mL). Το μείγμα θερμαίνεται στους 97°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται (Ε)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1μεθυλο-5-νιτρο-1Η-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (350 mg, 1,28 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπο ανάδευση για 36 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H2O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ο EtOAc απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 33% EtOAc σε CH₂Cl₂ ως κίτρινο ίζημα (Απόδοση: **59**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 9.43 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.20 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 9.1, 2.3 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 6.57 (s, 2H), 3.95 (s, 3H).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 164.06, 161.63, 158.21, 142.46, 140.77, 136.00, 125.23, 119.59, 117.76, 111.57, 105.88, 33.96.

Σύνθεση του Τ4:



Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστίθεται διάλυμα της 4-(1-μεθυλο – 5 – νιτρο – ινδολ – 3 - υλ)πυριμιδινο-2-αμίνης: (80 mg, 0,297 mmol) σε απόλυτο DCE (2 mL). Στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50%

w/w διαλυμένο σε λάδι (114,1 mg, 2,38 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται 4-φθόρο-φαίνυλοισοκυανικό (45 mg, 0,327 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 25% EtOAc σε CH₂Cl₂ (Απόδοση: **9**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 11.56 (s, 1H), 10.45 (s, 1H), 9.53 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.56 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 8.9, 5.1 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 8.7 Hz, 2H).

Σύνθεση του Ν-μεθυλο-6-φθοροϊνδολίου: (73)



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL φέρεται διάλυμα 6φθοροϊνδολίου (2g, 13,4 mmol) σε άνυδρο THF (35 mL). Στους 0°C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50%

w/w σε λάδι (1,61 g 33,5 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 15 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται στάγδην CH₃I (4,75 gr 33,5 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση απομονώνεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται ώστε να απομακρυνθεί το ξηραντικό. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν απομονώνεται ως υποκίτρινο ίζημα (Απόδοση **98**%).

¹H NMR (400 MHz, Acetone, 298K) δ 7.54 (dd, *J* = 8.6, 5.4 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 10.3, 2.3 Hz, 0H), 6.85 (ddd, *J* = 9.7, 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H), 3.82 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H).

Σύνθεση της 1-(6-φθορο-1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3-υλο)αιθανο-1-όνης: (74)



Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL φέρεται διάλυμα 1-μεθυλο-6-φθόροϊνδολίου (2g, 10,45 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (40 mL). Στην συνέχεια στους 0 °C και σε ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται AlCl₃ (4,18g, 31,35mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 60 λεπτά στους 0 °C. Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη Ac₂O (1,39 g, 13,59 mmol) στάγδην και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία προστίθεται κρύο νερό στην σφαιρική φιάλη για την μετατροπή του AlCl₃ σε Al(OH)₃ και αφήνεται υπό ανάδευση για 3 ώρες. ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ξηραίνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂ και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως υποκίτρινο στερεό (Απόδοση: **61**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 8.33 (s, 1H), 8.16 (dd, *J* = 8.7, 5.6 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 9.7, 2.4 Hz, 1H), 7.08 (ddd, *J* = 9.7, 8.7, 2.4, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(6-φθορο-1-μεθυλο-ινδολο-3-υλ)προπ-2-εν-1όνης: (74)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL εναποτίθεται διάλυμα της 1-(6-φθορο-1-μεθυλο-ινδολο-3-υλο)αιθαν-1-όνης (1g, 4,06 mmol) σε ο-ξυλόλιο (12 mL) και το μείγμα θερμαίνεται στους 100 oC. Στην συνέχεια προστίθεται DMF-DMA (3,87

gr, 32.48 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 140 °C για 72 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μείγμα μεταφέρεται αρχικά στον περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία στην αντλία υψηλού κενού για απομάκρυνση του διαλύτη και του DMF-DMA. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών έκλουσης 2% MeOH σε CH₂Cl₂. (Απόδοση: **24**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 8.28 (dd, *J* = 8.8, 5.8 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 9.8, 2.4 Hz, 1H), 7.00 (ddd, *J* = 9.8, 8.7, 2.4 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.98 (s, 6H). ¹³C NMR (63 MHz, DMSO, 298K) δ 183.34, 159.59 (d, J = 235.6 Hz), 151.73, 137.81, 135.05, 129.02 (d, J = 43.8 Hz), 123.50, 117.50, 109.53 (d, J = 23.9 Hz), 97.14 (d, J = 26.2 Hz), 93.41, 33.48.

Σύνθεση της 4-(6-φθορο-1-μεθυλο-ινδολο-3-υλ)πυριμιδινο-2-αμίνης: (75)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης (236 mg, 2,48mmol) και K₂CO₃ (458 mg, 3,32 mmol) σε 1-προπανόλη (10 mL). Το μείγμα θερμαίνεται στους 97°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται - 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-6-

φθορο-ινδολο-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (200 mg, 0,83 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 36 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H2O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ο EtOAc απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 33% EtOAc σε CH₂Cl₂ ως κίτρινο ίζημα (Απόδοση: **64**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 8.62 (dd, *J* = 8.8, 5.7 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 10.1, 2.4 Hz, 1H), 7.11 – 6.94 (m, 1H), 6.94 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 6.45 (s, 2H).

Σύνθεση του Τ5



Σε σφαιρική φιάλη των 10 mL προστίθεται διάλυμα της 4-(6-φθορο-1-μεθυλο-1Η-ινδολο-3υλ)πυριμιδινο-2-αμίνης (30 mg, 0,133 mmol) σε απόλυτο CH₂Cl₂ (3 mL). Στους 0 °C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50% w/w

διαλυμένο σε λάδι (32 mg, 0,665 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό

ανάδευση για 90 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται 4-φθόρο-φαίνυλοισοκυανικό (20 mg, 0,146 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως λευκό στερεό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 15% EtOAc σε CH₂Cl₂ (Απόδοση: **24**%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 11.68 (s, 1H), 10.20 (s, 1H), 8.85 (dd, *J* = 8.9, 5.7 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.69 – 7.56 (m, 2H), 7.50 – 7.38 (m, 2H), 7.27 – 7.09 (m, 2H), 7.09 – 6.94 (m, 1H), 3.87 (s, 3H).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Roskoski, R., Jr., *Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2022 update.* Pharmacol Res, 2022. **175**: p. 106037.
- Sung, H., et al., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin, 2021. 71(3): p. 209-249.
- 3. Bonora, M., et al., *ATP synthesis and storage*. Purinergic Signal, 2012. **8**(3): p. 343-57.
- 4. Hunter, T., *Protein kinase classification*. Methods Enzymol, 1991. **200**: p. 3-37.
- 5. Schwartz, P.A. and B.W. Murray, *Protein kinase biochemistry and drug discovery*. Bioorg Chem, 2011. **39**(5-6): p. 192-210.
- 6. Steinberg, S.F., *Post-translational modifications at the ATP-positioning G-loop that regulate protein kinase activity.* Pharmacol Res, 2018. **135**: p. 181-187.
- 7. McClendon, C.L., et al., *Dynamic architecture of a protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(43): p. E4623-31.
- 8. Hubbard, S.R., *Handbook of Cell Signaling*. 2010. 413-417.
- 9. Cross, T.G., et al., *Serine/threonine protein kinases and apoptosis.* Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 34-41.
- 10. Sun, Y., et al., Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. J Recept Signal Transduct Res, 2015. **35**(6): p. 600-4.
- 11. Hubbard, S.R. and J.H. Till, *Protein tyrosine kinase structure and function*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 373-98.
- 12. Neet, K. and T. Hunter, *Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families.* Genes Cells, 1996. **1**(2): p. 147-69.
- 13. Roskoski, R., Jr., *Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update.* Pharmacol Res, 2021. **165**: p. 105463.
- 14. Remon, J., et al., *Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients*. Ann Oncol, 2018. **29**(suppl_1): p. i20-i27.
- 15. Tran, L.T.T., *Phytochemicals Derived from Goniothalamus elegans Ast Exhibit Anticancer Activity by Inhibiting Epidermal Growth Factor Receptor.* Biodiversity and Potential of Vietnamese Medicinal Plants, 2022. **1–12**: p. 12.
- 16. Cerbone, L., et al., *An overview of osimertinib as a treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): an update.* Expert Opin Pharmacother, 2021. **22**(7): p. 809-819.
- 17. Hughes, D.L., Patent Review of Manufacturing Routes to Oncology Drugs: Carfilzomib, Osimertinib, and Venetoclax. Organic Proccess Research & Development, 2016: p. 53.
- Haidong Liu, Y.L., Yuan Li, Jin Cai, Junqing Chen, Yu Qin Min Ji, A Novel and Efficient Synthesis of Anti-Cancer Agent, Mereletinib. Journal Of Chemical Research, 2015. 39: p. 318-320.
- 19. Abdelgalil, A.A., H.M. Alkahtani, and F.I. Al-Jenoobi, *Sorafenib.* Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol, 2019. **44**: p. 239-266.
- Tang, W., et al., *The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma:* theoretical basis and therapeutic aspects. Signal Transduct Target Ther, 2020. 5(1): p. 87.
- 21. Markham, A., *Mobocertinib: First Approval.* Drugs, 2021. **81**(17): p. 2069-2074.
- 22. Wang, J., et al., *Discovery of mobocertinib, a new irreversible tyrosine kinase inhibitor indicated for the treatment of non-small-cell lung cancer harboring EGFR exon 20 insertion mutations.* Med Chem Res, 2022. **31**(10): p. 1647-1662.
- 23. Imran, M., et al., *Discovery, Development, Inventions, and Patent Trends on Mobocertinib Succinate: The First-in-Class Oral Treatment for NSCLC with EGFR Exon 20 Insertions.* Biomedicines, 2021. **9**(12).
- 24. Robinson, B., *The Fischer Indole Synthesis*. 1962: p. 23.
- 25. Miwako Mori, K.C., Yoshio Ban, *The Reactions And Syntheses With Organometalllic Compounds. V. A New Synthesis Of Indoles And Isoquinolines By Intramolecular Palladium-Catalyzed Reactions Of Aryl Halides With Olefinic Bonds.* Tetrahedron, 1977. **12**: p. 1037-1040.
- 26. Gribble, G., *Hemetsberger Indole Synthesis*. Indole Ring Synthesis: From Natural Products to Drug Discovery, 2016. **28**: p. 287-295.
- 27. Kenji Hayakawa, T.Y., and Ken Kanematsu*, *A New Approach To The Efficient Indole Synthesis By Allene Intramolecular Cycloaddition.* Tetrahedron, 1986. **27**: p. 1837-1840.
- 28. Kaushik, N.K., et al., *Biomedical importance of indoles.* Molecules, 2013. **18**(6): p. 6620-62.
- 29. Rosales, P.F., et al., *Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities.* Fitoterapia, 2020. **143**: p. 104558.
- 30. Hirasawa, Y., et al., *Bisleuconothine A, an eburnane-aspidosperma bisindole alkaloid from Leuconotis griffithii.* Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(6): p. 2021-4.
- 31. Masuelli, L., et al., *Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by Janthinobacterium lividum, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo.* Tumour Biol, 2016. **37**(3): p. 3705-17.
- 32. Ye, Y., et al., *3,3'-diindolylmethane potentiates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of gastric cancer cells.* Oncol Lett, 2015. **9**(5): p. 2393-2397.
- 33. Lau, H.Y., et al., An improved isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase inhibitor induces cancer cell death and attenuates tumor growth in vivo. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(9): p. 1280-91.
- 34. Gangjee, A., et al., Single agents with designed combination chemotherapy potential: synthesis and evaluation of substituted pyrimido[4,5-b]indoles as receptor tyrosine kinase and thymidylate synthase inhibitors and as antitumor agents. J Med Chem, 2010. **53**(4): p. 1563-78.
- 35. Foote, K.M., et al., *Discovery of 4-4-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl]pyrimidin-2-yl-1H-indole (AZ20): a potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy in vivo antitumor activity.* J Med Chem, 2013. **56**(5): p. 2125-38.
- 36. Song, F., et al., *Indole Alkaloids, Synthetic Dimers and Hybrids with Potential In Vivo Anticancer Activity.* Curr Top Med Chem, 2021. **21**(5): p. 377-403.
- 37. Xiao, L., A Review: Meridianins and Meridianins Derivatives. Molecules, 2022. 27(24).
- 38. Perez, D.I., C. Gil, and A. Martinez, *Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases.* Med Res Rev, 2011. **31**(6): p. 924-54.
- 39. Karpov, A.S., et al., *Concise syntheses of meridianins by carbonylative alkynylation and a four-component pyrimidine synthesis.* Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(42): p. 6951-6.
- 40. Yu, H. and Z. Yu, *Direct alkenylation of indoles with alpha-oxo ketene dithioacetals: efficient synthesis of indole alkaloids meridianin derivatives.* Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(16): p. 2929-33.
- 41. Listro, R., et al., *Urea-based anticancer agents. Exploring 100-years of research with an eye to the future.* Front Chem, 2022. **10**: p. 995351.
- 42. Ghosh, A.K. and M. Brindisi, *Urea Derivatives in Modern Drug Discovery and Medicinal Chemistry.* J Med Chem, 2020. **63**(6): p. 2751-2788.

43. Pinelopi Voulgari, D.A., Konstantinos Skobridis, *Improvements in the Synthesis of the Third-Generation EGFR Inhibitor Osimertinib.* Helvetica Chimica Acta, 2021. **104**(11): p. 15.