



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

**Μοριακός σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων βιοδραστικών ενώσεων
μικρού μοριακού βάρους, αναλόγων του Ribociclib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών
αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών για τη θεραπεία νεοπλασιών.**

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Πεπονίδου Φωτεινή

Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΠΕΠΟΝΙΔΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ Α.Μ.: 1399

Επιβλέπων καθηγητής: Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σίσκος Μιχάλης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας- Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

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

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ: //2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία για το Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης εκπονήθηκε στο διάστημα μεταξύ Νοεμβρίου 2021 και Νοεμβρίου 2023, στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στην κατεύθυνση «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Βιοδραστικές Ενώσεις». Αφορά στο μοριακό σχεδιασμό, τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των νέων αναλόγων του Ribociclib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο X3-210 του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο για την άριστη συνεργασία, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, το ουσιαστικό ενδιαφέρον και την αμέριστη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Νιώθω βαθύτατα ευγνώμων που αποτελώ μέλος της ερευνητικής του ομάδας, καθώς και για όλες τις γνώσεις που έχω αποκομίσει.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα μέλη ΔΕΠ καθηγητή κ. Σίσκο και τον επίκουρο καθηγητή κ. Αλίβερτη που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς μου επιτροπής και βοήθησαν στην επίτευξη των στόχων που έθεσα για τη μεταπτυχιακή μου διατριβή προσφέροντας βοήθεια σε επιστημονικό επίπεδο όποτε αυτή χρειάστηκε καθώς και για την στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ακόμη θα ήθελα να εκφράσω θερμά τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Βαρβούνη Γεώργιο για την βοήθεια, το ενδιαφέρον και τη στήριξή του.

Το εκπαιδευτικό αυτό ταξίδι δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς τους συναδέλφους- μέλη της ερευνητικής ομάδας στο εργαστήριο του κ. Σκομπρίδη. Γι' αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αλαγιάννη Μιχάλη, Μπαζάνου Γεωργία, Καραγιάννη Λεμονιά, Αλασώνα Παντελή, Ζώτου Μαρία, Χατζηαγγελίδου Κυριακή, Χρονοπούλου Ιωάννα και Κωνσταντίνι Έλενα για τη άριστη συνεργασία και την βοήθεια που μου προσέφεραν, καθώς και για το άριστο κλίμα που επικρατεί στο εργαστήριο του κ. Σκομπρίδη, πράγμα πολύ σημαντικό για την επίτευξη των ερευνητικών στόχων μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στο εργαστήριο του κ. Βαρβούνη και τον διδακτορικό του φοιτητή Γερωντίτη Ιωάννη για όλη την βοήθεια κάθε φορά που την χρειάστηκα.

Επιπλέον, θέλω να απευθύνω αμέτρητα ευχαριστώ στις φίλες μου Ελένη και Δήμητρα, που αποτελούν διεύρυνση της οικογένειάς μου, για τις αμέτρητες στιγμές που έχουμε μοιραστεί, οι οποίες με έχουν καθορίσει σε μεγάλο βαθμό. Χωρίς την δική τους στήριξη τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο.

Τέλος, ειδικές ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στην οικογένεια μου που είναι πάντα αρωγός σε κάθε μου προσπάθεια. Η άνευ όρων στήριξη σε κάθε μου όνειρο αποτελούσε ανέκαθεν κινητήριο δύναμη για κάθε τι που έχω πετύχει ως τώρα και για τον λόγο αυτό τους αφιερώνεται η παρούσα διπλωματική.

Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που πλήττουν την σημερινή κοινωνία. Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες, είναι η δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Ο όρος “καρκίνος” αναφέρεται στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, στα οποία η διαίρεση και ο πολλαπλασιασμός πραγματοποιείται υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός οδηγεί στην δημιουργία μιας μάζας κυττάρων, που χαρακτηρίζεται ως όγκος. Γενικά υπάρχουν διάφορα είδη καρκίνου, ένα από αυτά είναι και ο καρκίνος του μαστού, ο οποίος μας απασχόλησε στην παρούσα εργασία.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν μια κατηγορία ενζύμων, που καταλύουν την αντίδραση της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών μέσω μεταφοράς της τελικής φωσφορικής ομάδας ενός μορίου ATP σε συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων (Ser, Thr ή Tyr). Η φωσφορυλίωση είναι μία από τις σημαντικότερες αντιδράσεις που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα του οργανισμού, καθώς οδηγεί στην αλλαγή της δομής των πρωτεϊνών-στόχων, με αποτέλεσμα την μεταβολή της λειτουργικότητάς τους. Όπως είναι φυσικό, λοιπόν, οι πρωτεϊνικές κινάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς συμβάλλουν στη ρύθμιση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολικών οδών, οι οποίες σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό, την αντιγραφή και την μετάφραση.

Η απορρύθμιση της δράσης των ενζύμων αυτών ή η υπερέκφραση τους μπορεί να οδηγήσει σε πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Η συσχέτιση της απορρύθμισης των πρωτεϊνικών κινασών με την δημιουργία καρκινικού όγκου ώθησε την επιστημονική κοινότητα στην ανάπτυξη διάφορων αναστολέων αυτών των πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίοι προσδένονται εκλεκτικά στην θέση πρόσδεσης του ATP, με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των συγκεκριμένων κινασών. Τα τελευταία χρόνια υπήρξε μια αλματώδης πρόοδος όσον αφορά την ανάπτυξη τέτοιων αναστολέων. Ένα παράδειγμα ενός τέτοιου αναστολέα είναι και το Ribociclib, με το οποίο ασχοληθήκαμε κατά την εκπόνηση του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης.

Το Ribociclib είναι ένας εκλεκτικός, χορηγούμενος διά του στόματος αναστολέας των πρωτεϊνικών κινασών CDK4 και CDK6, ο οποίος συντέθηκε από την εταιρεία Novartis και εγκρίθηκε από τον FDA τον Μάρτιο του 2017. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή των κινασών CDK4 και CDK6 μπορεί να οδηγήσει στην αντιμετώπιση του HR θετικού και HR-2 αρνητικού προχωρημένου ή μεταστατικού καρκίνου του μαστού.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα παρουσιαστεί ο σχεδιασμός και η σύνθεση ενώσεων, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Ribociclib με στόχο την εκλεκτική αναστολή των CDK4 και CDK6. Η σύνθεση των αναλόγων αυτών, βασίστηκε

στην κατοχυρωθείσα συνθετική πορεία της εταιρίας Novartis. Επιπροσθέτως, έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της πειραματικής πορείας, με στόχο την αύξηση της απόδοσης και τη μείωση του χρόνου της αντίδρασης, καθώς και στη χρήση οικονομικότερων και φιλικότερων προς το περιβάλλον αντιδραστηρίων. Τα ανάλογα σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο τροποποιώντας επιλεκτικά τη δομή του Ribociclib ώστε να αυξηθεί η ανασταλτική δράση ως απόρροια θεωρητικών πειραμάτων docking. Οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές ^1H -NMR και ^{13}C -NMR καθώς και με φασματομετρία HRMS.

Abstract

Cancer is one of the most serious health problems affecting today's society. According to statistical studies, it is the second most common cause of death after heart diseases. The term "cancer" refers to the uncontrolled proliferation of cancer cells, in contrast to normal cells, in which division and proliferation take place under strictly controlled conditions. The uncontrollable cell proliferation leads to the creation of a mass of cells, characterized as a tumor. In general, there are various types of cancer, one of which is breast cancer.

Protein kinases are enzymes that catalyze the phosphorylation, which is the transfer of the terminal phosphate group of an ATP molecule to specific amino acid residues (Ser, Thr or Tyr). Phosphorylation is one of the most important reactions that takes place in the body's cells, as it leads to a change in the structure of the target proteins, resulting in a change in their functionality. Therefore, protein kinases play an substantial role in the smooth functioning of the human body, as they contribute to the regulation of a large number of metabolic pathways, which are related to cell proliferation, metabolism, replication and translation.

Dysregulation of the action of these enzymes or their overexpression can lead to many diseases, including cancer. The association of the deregulation of protein kinases with the creation of a cancer tumor prompted the scientific community to discover various inhibitors of these protein kinases, which selectively bind to the ATP binding site, resulting in the inhibition of the action of these specific kinases. In recent years there has been a leap forward in the development of such inhibitors. An example of such an inhibitor is Ribociclib, which we dealt with during the preparation of this master's degree.

Ribociclib is a selective, oral inhibitor of the protein kinases CDK4 and CDK6, which was synthesized by Novartis and approved by the FDA in March 2017. Studies have shown that inhibition of the kinases CDK4 and CDK6 can lead to the treatment of HR-positive and HR-2 negative advanced or metastatic breast cancer.

In this thesis, the design and synthesis of Ribociclib analogues, which aim to selectively inhibit CDK4 and CDK6, will be presented. The synthesis of these analogues was based on the one followed by Novartis. In addition, an attempt was made to optimize the experimental process, with the aim of increasing the yield and reducing the reaction time, as well as the use of more economical and environmentally friendly reagents. The analogues were designed in the laboratory by modifying the structure of Ribociclib to increase its inhibitory activity through electronic docking experiments. The compounds were characterized by ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopic techniques as well as HRMS spectrometry.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Abstract	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.2.ΣΚΟΠΟΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	14
2.1. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ.....	14
2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ	15
2.2.1. ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	15
2.2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ.....	17
2.2.3. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ	17
2.2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	21
3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	21
3.2. ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	22
3.3. ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	23
3.4. ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	24
3.5. ΚΥΚΛΙΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ (CDKs)	25
3.6. ΚΥΚΛΙΝΕΣ	26
3.7. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ CDK4/6 ΚΑΙ Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	29
4.1. ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	29
4.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	30
4.3. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	30
4.3.1. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	33
5.1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ.....	33
5.2. ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	36
5.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDKs ΠΡΩΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ.....	37
5.4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDKs ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΕΝΙΑΣ.....	38
5.5. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDKs ΤΡΙΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ.....	39
5.6. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ RIBOCICLIB	42
5.7. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ RIBOCICLIB.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	48
6.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ CDK4/6	48

6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ RIBOCICLIB .	48
6.3. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ RIBOCICLIB ΩΣ ΕΝ ΔΥΜΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDK4/6	53
6.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ DOCKING ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ RIBOCICLIB	54
6.4.1. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 1	54
6.4.2. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 2	55
6.4.3. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 3	56
6.4.4. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 4	57
6.4.5. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 5	58
6.5. ΟΛΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	60
7.1. ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	60
7.1.1. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-(τριφθορομέθυλο)-φαινυλο)πυριμιδινο-4-αμίνη 2α	60
7.1.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-(τριφθορομέθυλο)φαινυλο)πυριμιδινο-4-αμίνη (2α)	62
7.1.3. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(πυριδιν-2-υλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2β)	63
7.1.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(πυριδιν-2-υλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2β)	64
7.1.5. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-χλωροφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2γ)	65
7.1.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-χλωροφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2γ)	66
7.1.7. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2δ)	67
7.1.8. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλ)πυριμιδινο-4-αμίνη (2δ)	68
7.1.9. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-μεθοξυφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2ε)	69
7.1.10. Φασματοσκοπικά δεδομένα ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-μεθοξυφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2ε)	70
7.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ RIBOCICLIB	72
7.2.1. Σύνθεση της 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδινο-4-αμίνης (16)	72
7.2.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη (16)	73
7.2.3. Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλοαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (17)	74
7.2.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (17)	76

7.2.5.Σύνθεση της (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης (18)	77
7.2.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-χλώρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πύρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη (18).....	78
7.2.7.Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-N-κυκλοπροπυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο (19)	79
7.2.8.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-N-κυκλοπροπυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο (19)	80
7.2.9. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδιν-4-αμίνη (20)	81
7.2.10.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδιν-4-αμίνη (20).....	82
7.2.11.Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (21).....	83
7.2.12.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (21)	84
7.2.13. Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(4-μεθοξυφαινυλο)-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (22).....	86
7.2.14.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-χλωρο-7-(4-μεθοξυφαινυλο)-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (22).....	87
7.2.15.Σύνθεση της ένωσης 1-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλο)-2-(διμεθυλαμινο)αιθανόνη (23).....	89
7.2.16.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 1-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλο)-2-(διμεθυλαμινο)αιθανόνη (23)	90
7.2.17.Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζίνη-1-καρβοξυλικού οξέος (24).....	92
7.2.18.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (24)	94
7.2.19.Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(4νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαίνυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος(25).....	95
7.2.20.Φασματοσκοπικά δεδομένα του tert-βουτυλεστέρα του 4-(4νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαίνυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (25).....	96
7.2.21.Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος (26).....	98
7.2.22.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος (26).....	99
7.2.23.Σύνθεση της ένωσης 7-(4-μεθοξυφαινυλ)-N,N-διμεθυλ-2-((4-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ)αμινο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο (Rib1)	101

7.2.24.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-(4-μεθοξυφαινυλ)-N,N-διμεθυλ-2-((4-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ)αμινο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο (Rib1)	102
7.3.ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ	104
7.3.1. Οξείδωση Jones	104
7.3.2.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-κυκλοπεντυλ-2-χλωρο-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξυλικό οξύ (27)	107
7.3.3.Σύνθεση αμιδίου με SOCl ₂	108
7.3.4.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 2-χλώρο-7-κυκλοπέντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο (28)	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	111
8.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	111
8.2. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη (16)	111
8.3. Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (17)	112
8.4. Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη (18)	113
8.5. Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-N-κυκλοπροπυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο (19)	113
8.6. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδινό-4-αμίνη (20)	115
8.7. Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδινό-5-υλ)προπ-2-υν-1-ολη (21)	115
8.8. Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(4-μεθοξυφαινυλο)-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (22)	116
8.9. Σύνθεση της ένωσης 1-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδινό-5-υλ)-2-(διμεθυλαμινο)αιθανόνη (23)	117
8.10. Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (24)	118
8.11. Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(4νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαίνυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (25)	119
8.12. Σύνθεση του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλ)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικός τριτ-βουτυλεστέρα (26)	119
8.13. Σύνθεση της ένωσης 7-(4-μεθοξυφαινυλ)-N,N-διμεθυλ-2-((4-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ)αμινο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο (Rib1)	120
8.14. ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	122
8.14.1. Σύνθεση του 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξυλικού οξέος (27) μέσω οξείδωσης Jones	122
8.14.2. Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμέθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο (28) με τη χρήση SOCl ₂	123

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	124
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	125

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

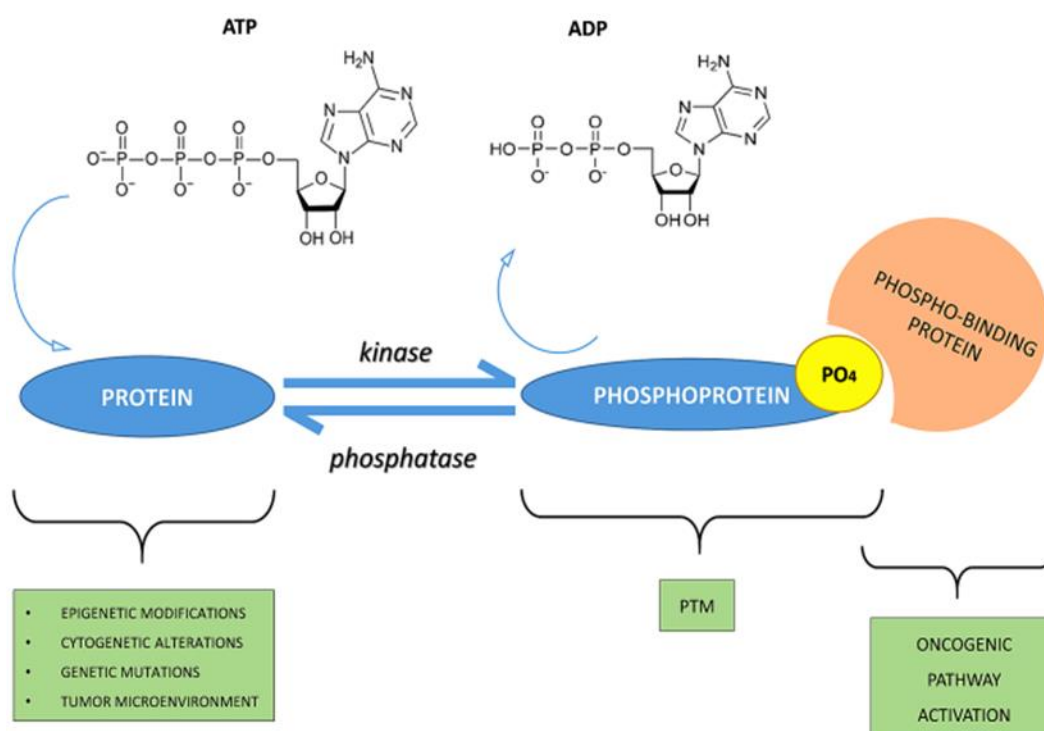
1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια, η οποία απασχολεί σε μεγάλο βαθμό την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια, καθώς αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως. Συγκεκριμένα, το 2019 ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας ανακοίνωσε πως ο καρκίνος αποτελεί την πρώτη ή δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου σε 112 χώρες παγκοσμίως, με τις περισσότερες από αυτές να εντοπίζονται στην Λατινική Αμερική.^[1] Ο όρος “καρκίνος” αναφέρεται στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό με αποτέλεσμα την συσσώρευση μεγάλου αριθμού καρκινικών κυττάρων σε διάφορους ιστούς του οργανισμού. Αυτές οι μάζες κυττάρων είναι γνωστές ως καρκινικοί όγκοι. Πέρα από τα μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας που σχετίζονται με αυτή την ασθένεια, ένα άλλο πρόβλημα είναι και το μεγάλο οικονομικό κόστος που απαιτείται για τις θεραπείες. Το 2007 το εθνικό Ινστιτούτο υγείας υπολόγισε πως το συνολικό κόστος που απαιτείται για τις διάφορες θεραπείες του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των ιατρικών δαπανών, ανερχόταν στα 219.2 δισεκατομμύρια παγκοσμίως.^[2]

Αναφορικά με τις μεθόδους θεραπείας, αυτές εξαρτώνται από το είδος του καρκίνου και από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η εξέλιξη του καρκίνου. Ορισμένοι ασθενείς λαμβάνουν ένα είδος θεραπείας, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις οι ασθενείς λαμβάνουν περισσότερες από μία μέθοδο θεραπείας. Οι πιο κοινές μέθοδοι θεραπείας είναι η εγχείρηση με σκοπό την αφαίρεση του όγκου σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Επίσης, αρκετά συχνά χρησιμοποιείται και η ανοσοθεραπεία και η ορμονοθεραπεία.^[3] Όλες οι προαναφερθείσες θεραπείες, ωστόσο, έχουν το μειονέκτημα ότι μαζί με τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφουν και τα υγιή κύτταρα. Αυτό έχει ως συνέπεια τα αντικαρκινικά φάρμακα να εμφανίζουν πάρα πολλές παρενέργειες. Τα τελευταία χρόνια, μια νέα γενιά θεραπειών του καρκίνου έχει έρθει στο προσκήνιο, οι στοχευμένες θεραπείες για τον καρκίνο.

Όπως οι συμβατικές μέθοδοι, έτσι και οι στοχευμένες θεραπείες καρκίνου χρησιμοποιούν φαρμακολογικούς παράγοντες που αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αυξάνουν την απόπτωση των κυττάρων και περιορίζουν την εξάπλωση του καρκίνου. Όπως υποδηλώνει το όνομα, οι στοχευμένες θεραπείες παρεμβαίνουν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ογκογένεση. Οι στοχευμένες θεραπείες καρκίνου μπορεί να είναι πιο ωφέλιμες θεραπευτικά για πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού, του λεμφώματος και της λευχαιμίας. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι στοχευμένων θεραπειών για τον καρκίνο, τα μονοκλωνικά αντισώματα, οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους και οι ανοσοδοξίνες. Η συγκεκριμένη εργασία εστιάζει στους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.^[4]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες (PKs) αποτελούν μία ομάδα ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση της φωσφορυλίωσης. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών είναι μία από τις πιο κοινές και σημαντικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs). Αυτός ο αναστρέψιμος μηχανισμός συνίσταται στην προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας (PO_4^-) στην πολική ομάδα R διαφόρων αμινοξέων. Κατά συνέπεια, αυτή η προσθήκη τροποποιεί την πρωτεΐνη από υδρόφοβη και άπολη σε υδρόφιλη και πολική, επιτρέποντας στην πρωτεΐνη να αλλάξει τη διαμόρφωση της όταν αλληλεπιδρά με άλλα μόρια.^[5]

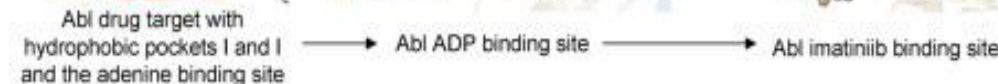


Εικόνα 1.1.: Μηχανισμός φωσφορυλίωσης.^[5]

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι ένας εξαιρετικά σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης καθώς λαμβάνει χώρα στις περισσότερες κυτταρικές διεργασίες όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η κυτταρική διαίρεση, η μεταγωγή σήματος και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Έτσι, λοιπόν, οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι υπεύθυνες για τη σηματοδότηση της κυτταρικής μεταγωγής. Συνεπώς, η απορρύθμισή τους ή η υπερέκφρασή τους μπορεί να οδηγήσει στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στη δημιουργία καρκινικών όγκων. Αυτή η σύνδεση των πρωτεϊνικών κινασών με την δημιουργία καρκίνου ώθησε τους επιστήμονες στην σύνθεση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ως μέθοδος θεραπείας για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου.^[5]

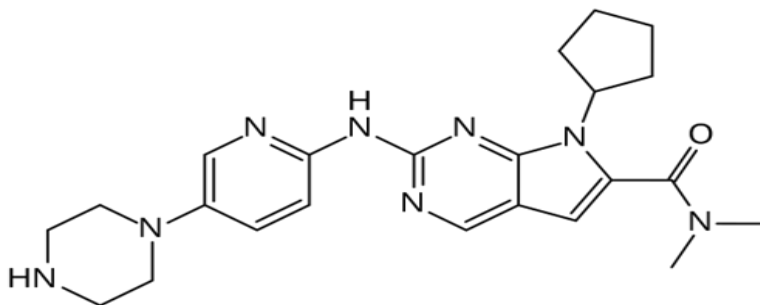
Οι περισσότεροι αναστολείς συνδέονται με τη θέση δέσμευσης του μορίου ATP των ενζύμων-στόχων τους και επεκτείνονται σε κοντινούς υδρόφοβους θύλακες. Το

περισσότεροι αποτελεσματικοί αναστολείς έχουν εγκριθεί από τον FDA.^[6]



Εικόνα 1.2.: μηχανισμός δράσης του Imatinib.^[6]

μαστού.^[7]

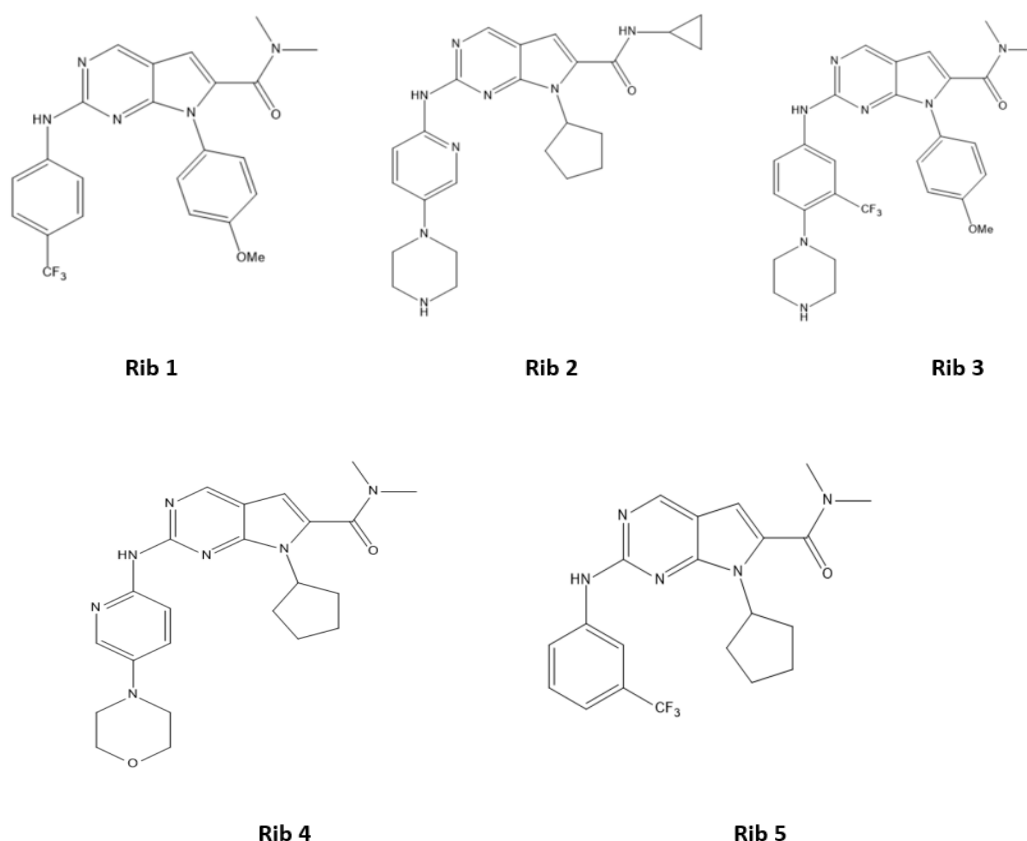


Εικόνα 1.3.: Δομή του Ribociclib.

1.2.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση ενώσεων αναλόγων του Ribociclib, ως εν δυνάμει αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών CDK4 και CDK6, με σκοπό την αύξηση της δραστηριότητας σε σύγκριση με το υφιστάμενο φάρμακο. Διενεργήθηκε μοριακός σχεδιασμός μέσω προγραμμάτων docking, με βάση το ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης CDK6. Για τη μοριακή μοντελοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Autodock Vina και το UCSF Chimera. Κύριος στόχος των αλλαγών που πραγματοποιήθηκαν είναι ο σχηματισμός ισχυρότερων διμοριακών αλληλεπιδράσεων των εν δυνάμει αναστολέων με το ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης.

Επιπρόσθετα, έγιναν προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση της ολικής συνθετικής πορείας που προτείνεται από την εταιρεία Novartis. Πιο συγκεκριμένα, στόχο μας αποτέλεσε η μείωση των σταδίων της συνθετικής πορείας του Ribociclib, καθώς και η εξοικονόμηση αντιδραστηρίων αλλά και χρόνου. Για αυτόν τον σκοπό έγινε προσπάθεια αύξησης της απόδοσης του σταδίου του σχηματισμού αμιδίου μέσω μιας αντίδρασης οξείδωσης Jones της αλκοόλης και, στη συνέχεια, επεξεργασία με SOCl_2 και διμεθυλαμίνη.



Εικόνα 1.4.: Σχεδιασθέντα ανάλογα του Ribociclib, ως απόρροια πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης.

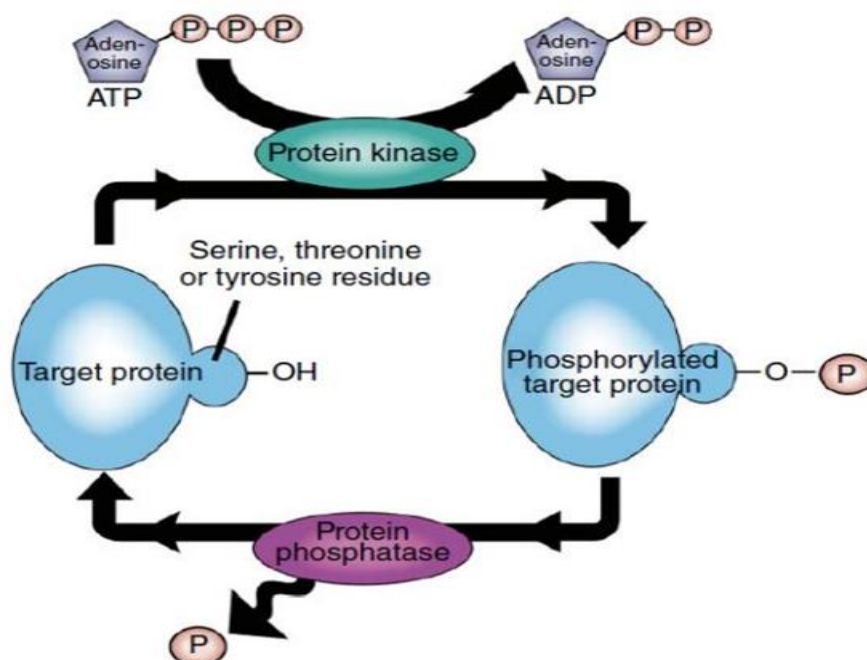
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφορυλίωση

2.1. ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι μια αντιστρεπτή μετά-μεταφραστική διαδικασία που οδηγεί σε αλλαγή της δομής των πρωτεϊνών-στόχων με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται και η λειτουργικότητά τους. Ουσιαστικά πρόκειται για την ομοιοπολική δέσμευση μιας φωσφορικής ομάδας, που προέρχεται από ένα μόριο ATP, σε ένα κατάλοιπο αμινοξέος, συνήθως σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης, των πρωτεϊνών στόχων. Η φωσφορυλίωση καταλύεται από μια ομάδα ενζύμων που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες. Η αντίστροφη διαδικασία ονομάζεται αποφωσφορυλίωση και καταλύεται από τα ένζυμα φωσφατάσες.^[8]

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη ρύθμιση των βασικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον έλεγχο της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, Η φωσφορυλίωση λειτουργεί ως μοριακός διακόπτης για πολλά ρυθμιστικά συμβάντα σε μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν στην κυτταρική διαίρεση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Η απλότητα της αντίδρασης αυτής, το γεγονός ότι είναι αντιστρέψιμη, καθώς και η ευελιξία είναι οι λόγοι που καθιστούν την φωσφορυλίωση ως τον πιο γενικό μηχανισμό ελέγχου του κυττάρου.^[8]



Εικόνα 2.1.: Καταλυτικός κύκλος της φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών.^[9]

2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση της φωσφορυλίωσης. Η προέλευση των πρωτεϊνικών κινασών εντοπίζεται σε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 1955 από τους Fischer και Krebs, που τελικά οδήγησε στην ανακάλυψη της β-φωσφορυλάσης, που ανήκει στην κατηγορία των κινασών σερίνης/θρεονίνης. Οι κινάσες τυροσίνης προστέθηκαν σε αυτήν την κατηγορία ενζύμων με την ανακάλυψη της πρωτεΐνης vSrc, η οποία χαρακτηρίστηκε σωστά ως κινάση τυροσίνης το 1979. Μετά την ανακάλυψη των πρωτεϊνικών κινασών, το πεδίο της έρευνας επεκτάθηκε γρήγορα. Το 1988 υπήρχαν περίπου 100 πρωτεϊνικές κινάσες και ο αριθμός αυτός αυξήθηκε σε 205 έως το 1995. Η μελέτη-ορόσημο των κινασών στο ανθρώπινο γονιδίωμα αποκάλυψε 518 πρωτεϊνικές κινάσες από τις οποίες 478 είχαν καταλυτικές περιοχές με σχετικά πρωτογενείς ακολουθίες. Μια πρόσφατη επανεκτίμηση του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει αποκλείσει τρεις από τις αρχικές 518 κινάσες και πρόσθεσε 23 νέες κινάσες, με αποτέλεσμα ο συνολικός αριθμός των πρωτεϊνικών κινασών να μεταβλήθηκε και να είναι πλέον 538. Γενικά, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν περίπου το 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος.^[10]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες συνήθως μεταφέρουν την φωσφορική ομάδα σε κατάλοιπα των αμινοξέων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Αν και υπάρχουν 90 κινάσες τυροσίνης στο ανθρώπινο γονιδίωμα, η πλειονότητα των πρωτεϊνικών κινασών φωσφορυλιώνει τα υπολείμματα σερίνης ή θρεονίνης.^[10] Συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί πάνω από 500.000 θέσεις φωσφορυλίωσης σε 7000 πρωτεΐνες μόνο στον άνθρωπο, με το 85% να αφορά φωσφορυλίώσεις σερίνης, το 11,8% θρεονίνης και το 1,8% τυροσίνης.^[11]

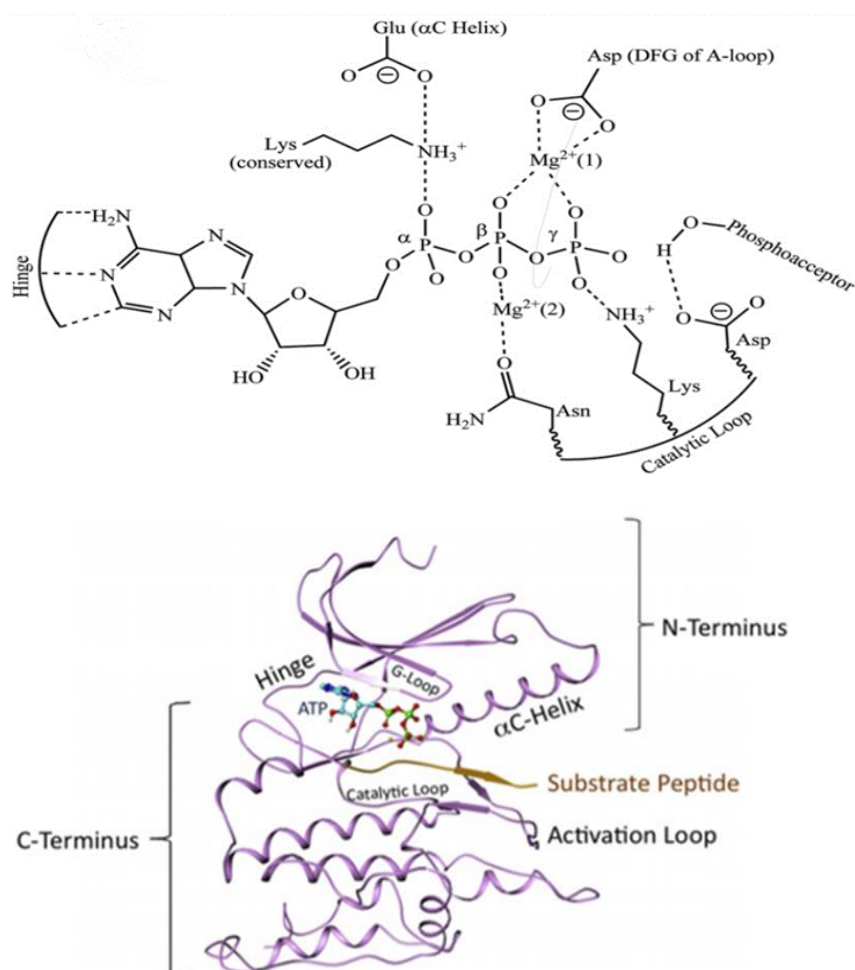
2.2.1. ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Ως συνέπεια της συμμετοχής των πρωτεϊνικών κινασών στην έκφραση μιας μεγάλης οικογένειας γονιδίων, η εξειδίκευση και η ρύθμιση της καταλυτικής δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία. Διάφορες μελέτες έχουν συμβάλει στην κατανόηση των ρυθμιστικών μηχανισμών. Η πρώτη κρυσταλλική δομή τη καταλυτικής περιοχής μιας πρωτεϊνικής κινάσης ήταν αυτή της κινάσης PKA το 1991. Έκτοτε, 1500 δομές 200 πρωτεϊνικών κινασών έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων πρωτεϊνών.^[10]

Το καταλυτικό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης αποτελείται από δύο κύριους λοβούς: έναν μικρότερο N-τερματικό λοβό, που αποτελείται από πέντε β-πτυχωτά φύλλα και μία α-έλικα (αC-έλικα), και ένα μεγαλύτερο C-τερματικό λοβό, που είναι κυρίως α-ελικοειδής. Οι δύο λοβοί συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας πεπτιδικής βάσης, με τη σχισμή που σχηματίζεται μεταξύ των λοβών να αποτελεί το ενεργό κέντρο (hinge περιοχή). Αυτή η σχισμή περιλαμβάνει ένα μπροστινό θύλακα που περιέχει κατάλοιπα, τα οποία εμπλέκονται άμεσα είτε στην κατάλυση είτε στη σύνδεση του

ΑΤΡ, καθώς και έναν οπίσθιο, υδρόφοβο θύλακα, ο οποίος υποστηρίζει ρυθμιστικές λειτουργίες. Οι πρωτεϊνικές κινάσες συνήθως υπάρχουν στον οργανισμό με την ανενεργή μορφή τους. Η ενεργοποίηση του καταλυτικού κέντρου των κινάσων γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης του βρόγχου ενεργοποίησης ή μέσω ενός αλλοστερικού μηχανισμού.^[10]

Ο Ν-τερματικός λοβός αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα οργανωμένα σε β-πτυχωτά φύλλα και εμπλέκεται στη δέσμευση και τον προσανατολισμό του ΑΤΡ. Ο C-τερματικός λοβός διαφέρει σε μέγεθος, αλληλουχία και τοπολογία σε κάθε κινάση, όμως αποτελείται κατά κύριο λόγο από α-έλικες, διάφορα καταλυτικά υπολείμματα και είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του υποστρώματος και την έναρξη της μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας. Επειδή όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες χρησιμοποιούν το ΑΤΡ ως πηγή φωσφορικών, πολλά από τα υπολείμματα αμινοξέων που περιλαμβάνει αυτός ο θύλακας σύνδεσης διατηρούνται.^[12] Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά των κινάσων είναι η G-θηλιά (πλούσια σε γλυκίνη), η αC-έλικα στη Ν-τελική περιοχή, το κατάλοιπο λυσίνης το οποίο σχηματίζει μία γέφυρα άλατος με το κατάλοιπο του γλουταμινικού οξέος, και η θηλιά ενεργοποίησης.^[13]



Εικόνα 2.2.: Δομή πρωτεϊνικής κινάσης και μοριακές αλληλεπιδράσεις με υποστρώματα.^[10]

2.2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Με δεδομένο ότι οι περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες έχουν πολλαπλά υποστρώματα, η ταξινόμηση των πρωτεϊνικών κινασών φαινόταν λογικό να γίνει με βάση το αμινοξύ-αποδέκτη της φωσφορικής ομάδας και όχι με βάση το πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Με βάση, λοιπόν, αυτήν τη λογική, η Επιτροπή Ονοματολογίας της ακόλουθες κατηγορίες:

- 1) *Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης*, που φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης.
- 2) *Κινάσες τυροσίνης*, οι οποίες φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα που βρίσκεται στο αρωματικό σύστημα του αμινοξέος τυροσίνη.
- 3) *Κινάσες ιστιδίνης*, οι οποίες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα ιστιδίνης, αργινίνης και 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.
- 4) *Κινάσες κυστεΐνης*, όπου δρουν σε κατάλοιπα κυστεΐνης και δημιουργούνται, μετά την υποκατάσταση, φωσφορικοί θειοεστέρες.
- 5) *Ασπάρτυλο ή γλουτάμιλο κινάσες* των οποίων το υπόστρωμα είναι μια άκυλο ομάδα.

Οι δύο πρώτες κατηγορίες πρωτεϊνικών κινασών είναι ευρέως διαδεδομένες, διότι αποτελούν την πλειοψηφία των ενζύμων αυτών. Για τον λόγο αυτό θα αναλυθούν περεταίρω παρακάτω. Αντίθετα, οι τελευταίες τρεις κατηγορίες δεν είναι τόσο γνωστές.^[11]

2.2.3. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STKs) είναι μία από τις πιο μεγάλες κατηγορίες πρωτεϊνικών κινασών, καθώς τουλάχιστον 125 από τις 538 ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Τα ένζυμα αυτά φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα (OH^-), που βρίσκεται στην πλευρική αλυσίδα ενός κατάλοιπου σερίνης ή θρεονίνης. Τα δύο αυτά είδη πρωτεϊνικών κινασών ανήκουν στην ίδια κατηγορία, επειδή τα δύο αυτά αμινοξέα έχουν πανομοιότυπες πλευρικές αλυσίδες. Τα ειδικά κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται, επιλέγονται στη βάση της συναινετικής αλληλουχίας των καταλοίπων που πλαισιώνει τη θέση του δέκτη της φωσφορικής ομάδας. Λόγω του εξαιρετικά συντηρημένου καταλυτικού κέντρου, οι κινάσες δεν είναι εκλεκτικές σε ένα μόνο υπόστρωμα, αλλά αντίθετα φωσφορυλιώνουν μία οικογένεια υποστρωμάτων.^[14]

Οι κινάσες σερίνης / θρεονίνης (STK) συμμετέχουν ενεργά στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαίρεση, την απόπτωση των κυττάρων και στην

κυτταρική σηματοδότηση μέσω της ικανότητάς τους να φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και μια τεράστια σειρά κυτταροπλασματικών και πυρηνικών τελεστών. Οι STKs έχουν εμπλακεί και σε διάφορους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα, η εσφαλμένη ρύθμιση των MAPK κινασών, η κινάση Aurora/Ipl1p και οι οικογένειες των κινασών PLK έχουν συσχετιστεί με ανάπτυξη όγκων στον άνθρωπο.^[15]

2.2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Οι κινάσες τυροσίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία μεταγωγής σήματος, που οδηγεί σε πολλαπλασιασμό, κυτταρική διαφοροποίηση και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Οι κινάσες τυροσίνης είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη φωσφορυλίωση επιλεγμένων καταλοίπων τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, χρησιμοποιώντας ένα μόριο ATP. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και διατήρηση της ομοιόστασης. Τα μονοπάτια σηματοδότησης, στα οποία συμμετέχουν οι κινάσες τυροσίνης, κανονικά αποτρέπουν τον απορυθμισμένο πολλαπλασιασμό ή συμβάλλουν στην απόπτωση των κυττάρων. Αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης συχνά μεταβάλλονται γενετικά ή επιγενετικά στα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επομένως, δεν είναι περίεργο που η απορρύθμιση των κινασών τυροσίνης μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία καρκίνου.^[16]

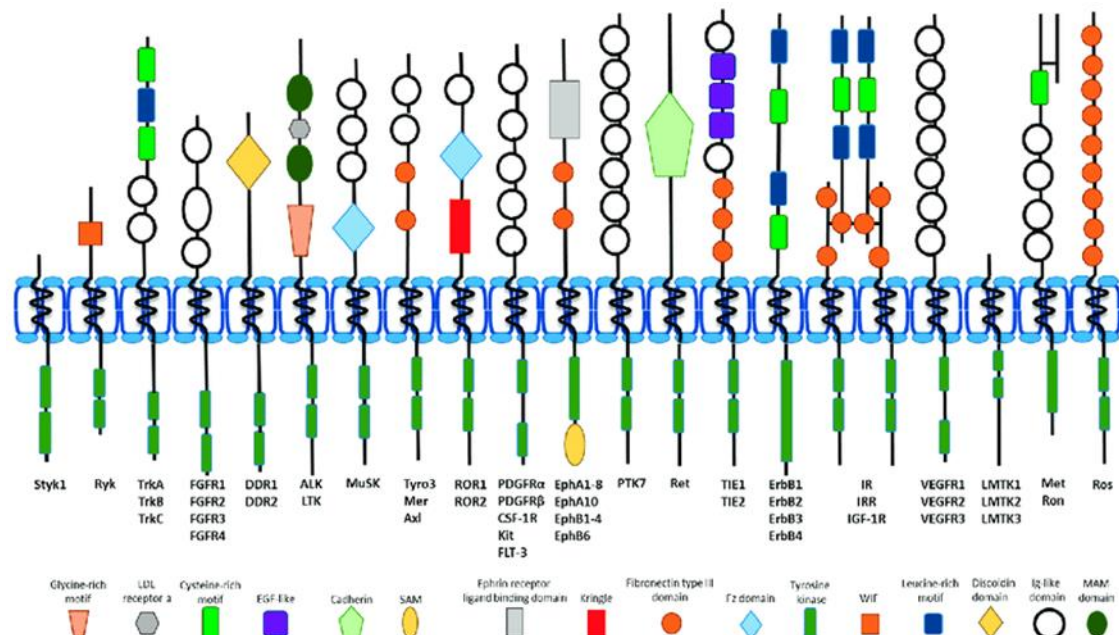
Οι κινάσες τυροσίνης διαιρούνται σε επιπλέον δύο υποκατηγορίες:

- στις υποδοχικές κινάσες τυροσίνης
- στις μη-υποδοχικές.

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν περίπου 90 τυροσινικές κινάσες, οι οποίες χωρίζονται περίπου σε 58 υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) και σε 32 μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs). Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στην διαμεμβρανική σηματοδότηση, ενώ οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στη σηματοδότηση προς τον πυρήνα.

2.2.4.1. ΥΠΟΔΟΧΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) είναι από τις πιο σημαντικές και ευρέως μελετημένες υποομάδες των πρωτεϊνικών κινασών και σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τον καρκίνο. Βάσει της ομόλογης αλληλουχίας και της δομής των εξωκυττάρων περιοχών τους, οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης υποδιαιρούνται σε 20 υποκατηγορίες που παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:^[17]



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση της δομής των 20 οικογενειών RTKs στον άνθρωπο.^[18]

Όλες οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες έχουν παρόμοια μοριακή δομή, η οποία περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του υποκαταστάτη στην εξωκυττάρια περιοχή, μια υδρόφοβη διαμεμβρανική α-έλικα και μια κυτταροπλασματική περιοχή που περικλείει το ένζυμο. Η περιοχή της κινάσης έχει μια ρυθμιστική αλληλουχία τόσο στο N όσο και στο C τερματικό άκρο. Το εξωκυττάριο τμήμα μπορεί να αποτελεί ανεξάρτητο τμήμα, το οποίο συνδέεται με τον υπόλοιπο υποδοχέα με δισουλφιδικό δεσμό.^[16,19]

Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες ενεργοποιούνται με τη σύνδεση του υποκαταστάτη στην εξωκυττάρια τους περιοχή. Τα προσδέματα είναι εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια που επάγουν το διμερισμό του υποδοχέα (εκτός από τους υποδοχείς της ινσουλίνης). Η πρόσδεση του στην εξωκυττάρια περιοχή προκαλεί μια σειρά από δομικές αναδιατάξεις στις RTKs, που οδηγούν στην ενεργοποίησή τους. Ένα πρόσδεμα μπορεί να δεσμεύεται με δύο μόρια υποδοχέα για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο 1:2 (π.χ. αυξητική ορμόνη και υποδοχέα αυξητικής ορμόνης), ενώ σε άλλες περιπτώσεις δύο προσδέματα συνδέονται ταυτόχρονα με δύο υποδοχείς σύμπλοκο υποδοχέα 2:2 και παρέχουν τον απλούστερο μηχανισμό διμερισμού του υποδοχέα (π.χ. VEGF και VEGFR). Ο διμερισμός του υποδοχέα σταθεροποιείται, επίσης, από αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-υποδοχέα.^[16]

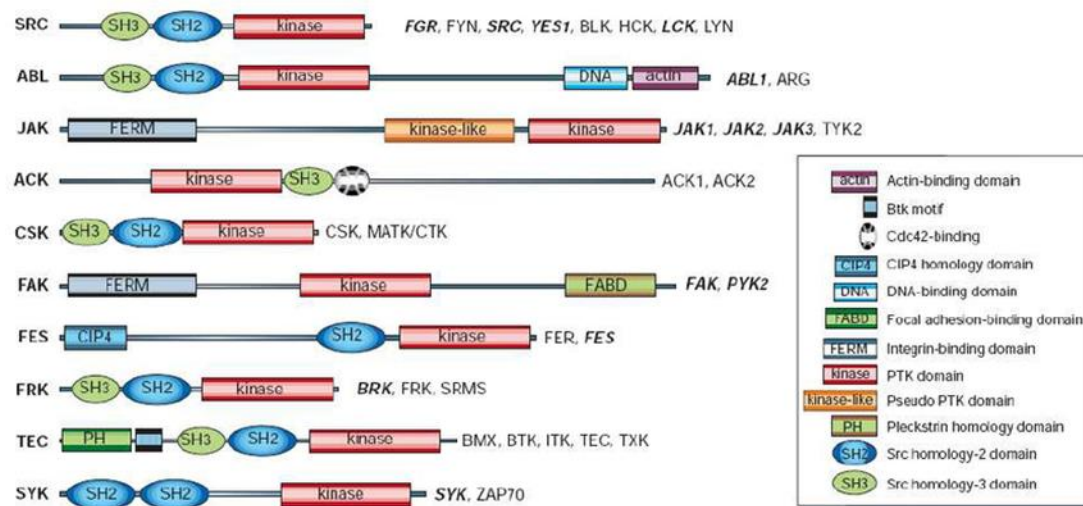
Κατά τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης, ο βρόχος ενεργοποίησης υιοθετεί μια ανοικτή διαμόρφωση που δίνει πρόσβαση στο ATP και στα υποστρώματα με αποτέλεσμα τη μεταφορά του ATP από το Mg-ATP σε κατάλοιπο τυροσίνης στον ίδιο τον υποδοχέα και σε κυτταρικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος.^[19]

Οι κοινές οδοί σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από την ενεργοποίηση των RTKs περιλαμβάνουν τους καταρράκτες RAF/MAP, AKT διάμεσου της PLCγ. Η ενεργοποίηση αυτών των οδών οδηγεί τελικά σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και στον κυτταρικό μεταβολισμό.^[20]

2.2.4.2 ΜΗ-ΥΠΟΔΟΧΙΚΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες είναι πολύ σημαντικές για τις φυσιολογικές διαδικασίες του κυττάρου, όπως η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Η ρύθμιση αυτή των λειτουργιών γίνεται μέσω πολλών οδών σηματοδότησης, όπου τα εξωκυττάρια σήματα μεταφέρονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου.^[21]

Οι NRTKs σε αντίθεση με τις RTKs δεν διαθέτουν διαμεμβρανική περιοχή και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στην εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Η ενεργοποίησή τους γίνεται μέσω ποικίλων ενδομοριακών σημάτων με την απομάκρυνση αναστολέων, την πρόσληψή τους σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς, προκαλώντας ολιγομερισμό, αυτοφωσφορυλίωση και την τρανς-φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες. Οι NRTKs δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με τα εξωκυττάρια σήματα, όμως είναι στενά συνδεδεμένες με τους σηματοδοτικούς καταρράκτες πολλών υποδοχικών κινάσων, με υποδοχείς συνδεδεμένους σε G-πρωτεΐνες, και κυτοκινικούς υποδοχείς (cytokine receptors).^[22]



Εικόνα 2.4.: Κύριες οικογένειες των NRTKs.^[21]

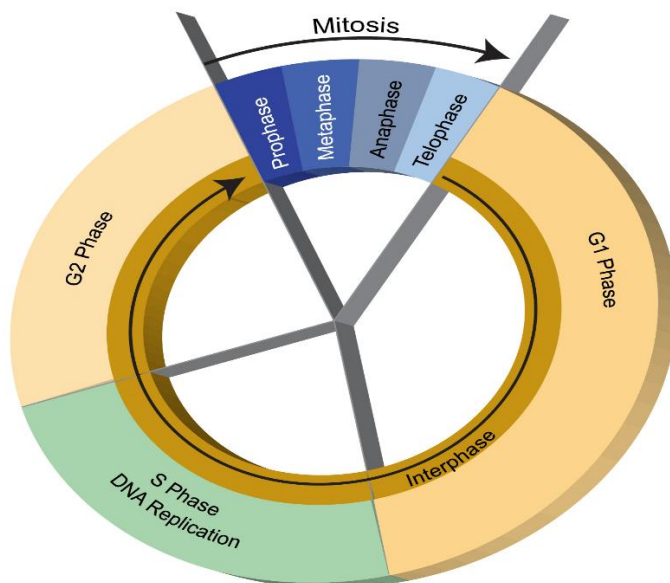
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ο κυτταρικός κύκλος

3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο κυτταρικός κύκλος ανακαλύφθηκε το 1953 από τους ερευνητές Alma Howard και Stephen Pelc, οι οποίοι εκείνη την χρονιά δημοσίευσαν το έργο τους σχετικά με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στις ρίζες του φασολιού *Vicia faba* L. Ανέπτυξαν φυτά με ιχνηθέτηση με ισότοπα φωσφόρου ^{32}P , χρησιμοποιώντας ως πηγή φωσφόρου το φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_3^{32}\text{SO}_4$). Μέσα από τα πειράματα αποδείχτηκε ότι ο φώσφορος ενσωματώθηκε στο DNA στον πυρήνα μόνο κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης φάσης και ότι χρειάστηκαν 12 ώρες από το τέλος της διαίρεσης μέχρι την έναρξη της ενσωμάτωσης ισotόπων σε νέο DNA. Με την ανάλυση ετερογενών πληθυσμών και με τη χρήση της αυτοραδιογραφίας, οι Howard και Pelc κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η σύνθεση του DNA διαρκεί περίπου 6 ώρες και ότι τα κύτταρα εισέρχονται στη πρόφαση της επόμενης μίτωσης μόνο 8 ώρες μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA.^[23]

Οι Howard και Pelc ήταν οι πρώτοι που απέδωσαν ένα χρονικό πλαίσιο στην κυτταρική ζωή και πρότειναν την ύπαρξη τεσσάρων σταδίων στον κυτταρικό κύκλο, που γνωρίζουμε σήμερα: μία περίοδο κυτταρικής διαίρεσης, που είναι γνωστή ως φάση G1, η φάση σύνθεσης DNA που καλείται φάση S και η φάση G2 ή προμιτωτική περίοδος. Το διάστημα κατά το οποίο το κύτταρο αναπτύσσεται ονομάζεται μεσόφαση, ενώ στη συνέχεια η διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης καλείται μίτωση. Έτσι, γεννήθηκε η έννοια του κυτταρικού κύκλου. Έκτοτε, οι έρευνες πάνω στον κυτταρικό κύκλο γνώρισαν μεγάλη άνθιση.^[23]



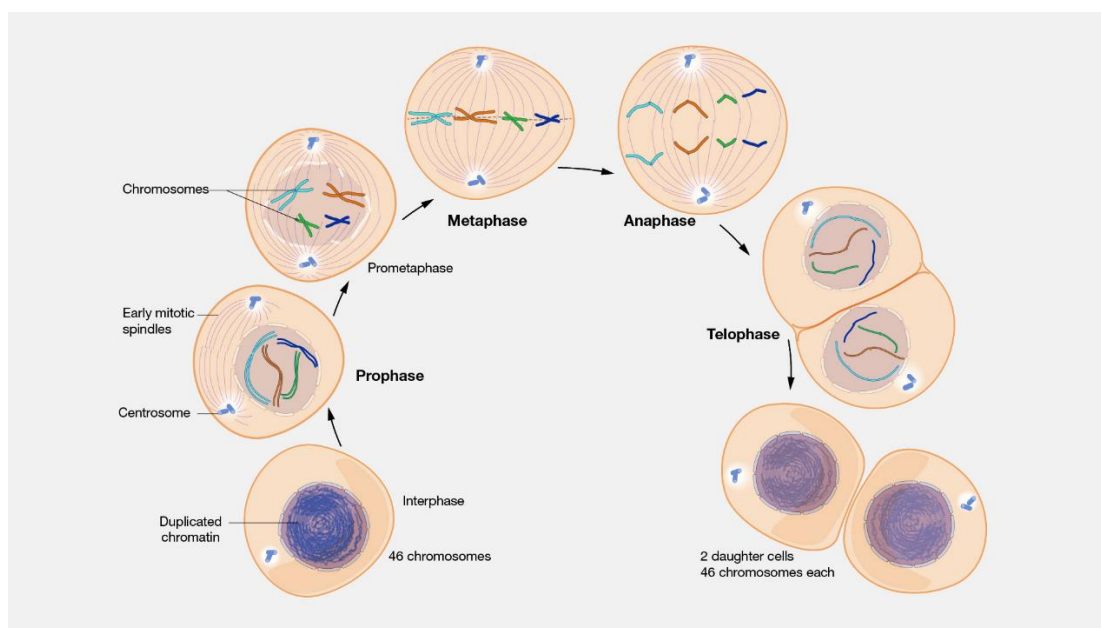
Εικόνα 3.1.: Τα στάδια του κυτταρικού κύκλου.^[24]

3.2. ΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα στάδια του κυτταρικού κύκλου είναι τέσσερα:

- i. Η φάση G1, όπου πραγματοποιείται αύξηση του μεγέθους του κυττάρου
- ii. Η φάση S, στην οποία πραγματοποιείται η αντιγραφή του DNA
- iii. Η φάση G2, όπου γίνεται η προετοιμασία διαίρεσης του κυττάρου
- iv. Η μίτωση (φάση M), όπου λαμβάνει χώρα η διαίρεση

Αναλυτικότερα, κατά την φάση G1 γίνεται η σύνθεση των κυτταρικών πρωτεϊνών, του RNA, των μεμβρανών, καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για τη σύνθεση του DNA που ακολουθεί στο επόμενο στάδιο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται η βιοσύνθεση mRNA, tRNA, ριβοσωμάτων και πρωτεϊνών που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση του γενετικού υλικού. Κατά το στάδιο S, τα χρωμοσώματα αντιγράφονται και διπλασιάζονται. Στη συνέχεια, ακολουθεί η φάση G2, όπου το κύτταρο συνεχίζει να αναπτύσσεται και να προετοιμάζεται για την κυτταρική διαίρεση. Τελευταίο στάδιο του κυτταρικού κύκλου είναι το στάδιο της μίτωσης, όπου το κύτταρο διαιρείται και προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα.^[25] Η φάση της μίτωσης χωρίζεται σε πέντε στάδια: τη πρόφαση, τη προμετάφαση, την μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση (εικόνα 3.2.). Μετά το τέλος της μίτωσης ακολουθεί η κυτταροκίνηση και το κυτταρόπλασμα διαιρείται για να δημιουργηθούν τα νέα κύτταρα.



Εικόνα 3.2.: Τα στάδια της μίτωσης. Διαθέσιμο στο:

<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mitosis>

Δεν εισέρχονται όμως όλα τα κύτταρα σε έναν νέο κυτταρικό κύκλο προκειμένου να διαιρεθούν. Πολλά κύτταρα εξέρχονται από το στάδιο G1 και εισέρχονται σε ένα στάδιο ανάπαυσης G0. Το στάδιο G0 είναι ένα στάδιο ηρεμίας μέχρι να ληφθεί

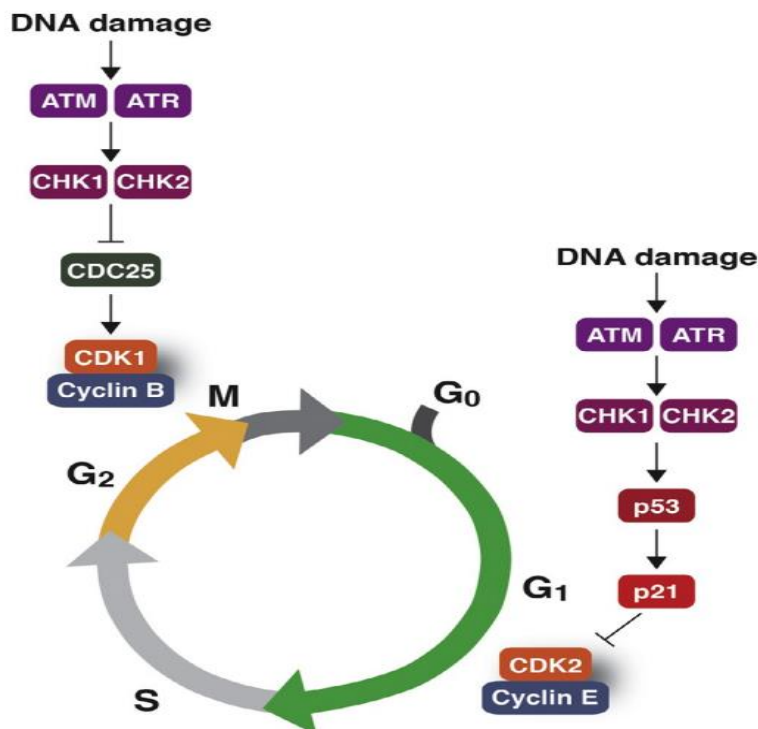
κάποιο εξωκυτταρικό ερέθισμα ή αυξητικός παράγοντας και να σημάνει την είσοδό του ξανά στη φάση G1. Επίσης, τα κύτταρα μπορούν να εξέλθουν από τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διαφοροποίηση και τη γήρανση, ενώ σε άλλες περιπτώσεις άλλα κύτταρα δεν διαιρούνται παραμένοντας στο στάδιο G0 μέχρι να λάβουν το σήμα της απόπτωσης.^[26]

3.3. ΣΗΜΕΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι πολύπλοκοι μηχανισμοί που διασφαλίζουν ότι κάθε στάδιο του κυτταρικού κύκλου ολοκληρώνεται πριν ξεκινήσει το επόμενο στάδιο. Υπάρχουν, επίσης, σημεία ελέγχου για την παρακολούθηση της βλάβης του DNA για να διασφαλιστεί ότι το κατεστραμμένο DNA επιδιορθώνεται πριν από την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η δυσλειτουργία των σημείων ελέγχου μπορεί να μειώσει σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία του κυτταρικού κύκλου σε εξωτερικά σήματα, συναρμολόγηση ατράκτων ή βλάβη στο DNA, προκαλώντας αστάθεια του γονιδιώματος.^[26]

Τα βασικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου είναι τα εξής:

- Σημείο ελέγχου Spindle-Assembly: Τα χρωμοσώματα που δεν είναι συνδεδεμένα με ατράκτους στέλνουν σήματα για να εμποδίσουν την απενεργοποίηση της κυκλίνης B–CDK1 και το διαχωρισμό της αδελφής χρωματίδας. Αυτό το σημείο ελέγχου σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου είναι απαραίτητο για τη διασφάλιση του ίσου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα.
- Σημείο ελέγχου βλάβης του DNA G1: Όταν το κυτταρικό DNA είναι κατεστραμμένο, η συνέχιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου θα οδηγούσε σε επιζήμια μεταλλαξιογένεση του DNA. Τα κατεστραμμένα κύτταρα μπορούν να σταματήσουν τον κυτταρικό κύκλο μέσω μηχανισμών σημείων ελέγχου για να παρέχουν χρόνο για την επισκευή του DNA. Εναλλακτικά, τα ελλατωματικά κύτταρα μπορούν να εξαλειφθούν ενεργοποιώντας την απόπτωση.
- Σημείο ελέγχου βλάβης του DNA G2: Ομοίως με το σημείο ελέγχου βλάβης του DNA G1, το σημείο ελέγχου βλάβης DNA του G2 περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών ATM/ATR ακολουθούμενο από την ενεργοποίηση των CHK1/CHK2. Στη συνέχεια, οι CHK1/CHK2 ενεργοποιούν την WEE1 και απενεργοποιούν και τις τρεις ισομορφές της οικογένειας CDC25 (CDC25A, CDC25B και CDC25C). Μαζί, αυτοί οι μηχανισμοί προάγουν τη φωσφορυλίωση της CDK1Thr14/Tyr15, οδηγώντας σε αδρανοποίηση της κινάσης CDK1 και διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2. (Εικόνα 3.3.)
- Σημείο ελέγχου της αντιγραφής του DNA: Αυτό το σημείο ελέγχου ρυθμίζει την πυροδότηση προέλευσης, την πρόοδο της διχάλας αντιγραφής, καθώς και αποτρέπει την άκαιρη μίτωση. Αυτά παρέχουν στο κύτταρο χρόνο για επανεκκίνηση και επιδιόρθωση των βλαβών.^[26]



Εικόνα 3.3.: Σημείο ελέγχου βλάβης του DNA G2.^[26]

3.4. ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

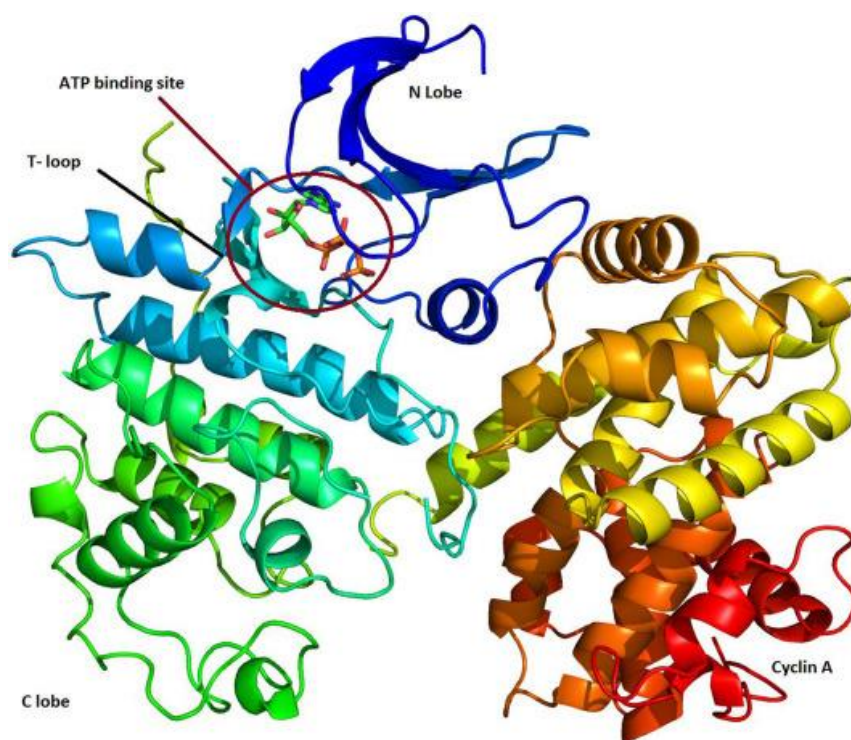
Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στα διάφορα σημεία ελέγχου στηρίζεται στη φωσφορυλίωση σημαντικών πρωτεϊνών που οδηγούν στην επαγωγή, την αναστολή ή την ρύθμιση της αντιγραφής του DNA, της μίτωσης και της κυτταροκίνησης. Η απορυθμισμένη λειτουργία αυτών των παραγόντων στις περισσότερες περιπτώσεις έχει ως συνέπεια τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την δημιουργία καρκινικού όγκου. Για τον λόγο αυτό καθίσταται απαραίτητη η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της κυτταρικής διαίρεσης.^[27]

Μετά από έρευνες σε κύτταρα ζύμης βρέθηκαν δύο σημαντικές διαδικασίες που συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η πρώτη αφορά κυμαινόμενες αλλαγές στη δραστηριότητα του μηχανισμού δράσης του κυτταρικού κύκλου, με τις πρωτεϊνικές κινάσες να είναι το πιο σημαντικό στοιχείο, ενώ η δεύτερη αφορά την εξειδικευμένη πρωτεόλυση των ρυθμιστικών μορίων του κυτταρικού κύκλου. Πλήθος μορίων συμμετέχουν στην ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Μεταξύ αυτών κυρίαρχο ρόλο έχουν οι CDKs (πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη) καθώς και τα μόρια που ενεργοποιούν (Κυκλίνες) ή αναστέλλουν τη δράση τους (αναστολείς των CDKs).^[28]

3.5. ΚΥΚΛΙΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ (CDKs)

Οι κυκλινοεξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (CDKs) ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στη ρύθμιση της μεταγραφής. Σε αντίθεση με άλλες κινάσες, οι CDKs απαιτούν την ύπαρξη μιας υπομονάδας πρωτεΐνης που ονομάζεται κυκλίνη και παρέχει πρόσθετες αλληλουχίες για την ενζυμική δραστηριότητα της κινάσης. Συγκεκριμένα, οι κινάσες δεσμεύονται με τις αντίστοιχες κυκλίνες τους στο καρβοξυτελικό άκρο μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και οδηγεί στην προσβασιμότητα του ATP στην καταλυτική θέση για φωσφορυλίωση. Μέχρι σήμερα, είναι γνωστές 20 υποοικογένειες CDKs. Τρεις από αυτές τις οικογένειες (CDK 1, 4 και 5) εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο και πέντε (CDK 7, 8, 9 και 11) σχετίζονται με τη μεταγραφή.

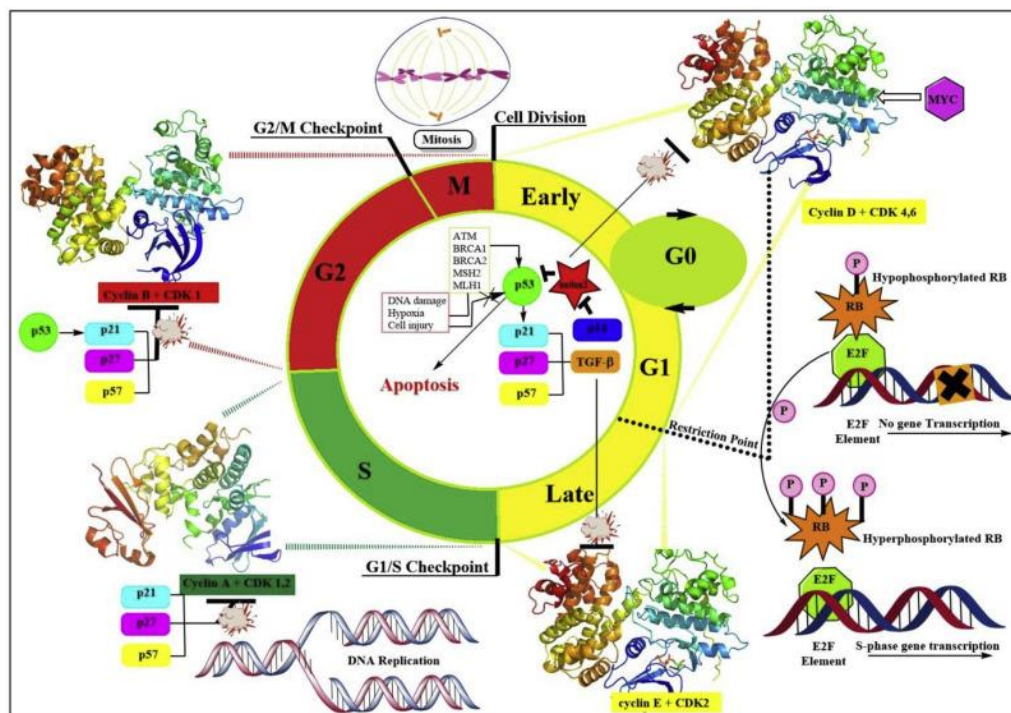
Αναφορικά με την δομή των CDKs, οι κινάσες αυτές αποτελούνται από δύο λοβούς, ένα N-τερματικό λοβό, που έχει β φύλλα και έναν C-τερματικό λοβό που αποτελείται από α-έλικες. Ο N-τερματικός λοβός περιέχει μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη που ονομάζεται G-loop και το C-τελικό άκρο περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης, γνωστή και ως βρόγχος T ενεργοποίησης.^[29]



Εικόνα 3.4.: Απεικόνιση της CDK2 συνδεδεμένη με την κυκλίνη Α.^[29]

3.6. ΚΥΚΛΙΝΕΣ

Οι κυκλίνες είναι ενδογενείς υποκαταστάτες, ο ρόλος των οποίων είναι η ενεργοποίηση των CDKs. Οι κυκλίνες ταξινομούνται στις εξής κατηγορίες: κυκλίνη A, κυκλίνη B, κυκλίνη C, κυκλίνη D, κυκλίνη E, κυκλίνη F, κυκλίνη H, κυκλίνη K, κυκλίνη L και κυκλίνη T. Αυτές οι κυκλίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω ενεργοποίησης της θέσης πρόσδεσης του ATP. Η κυκλίνη A σχηματίζει ένα σύμπλεγμα με τις CDK1 και CDK2 και βοηθά στη ρύθμιση της φάσης S. Η κυκλίνη B, που ονομάζεται επίσης παράγοντας προαγωγής ωρίμανσης ή μίτωσης, σχηματίζει σύμπλοκο με την CDK1 και ελέγχει τη φάση M του κυτταρικού κύκλου. Οι κυκλίνες C και H ενεργοποιούν την CDK8, η οποία με τη σειρά της παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή του RNAPII και επίσης αναστέλλει τη λιπογένεση. Η κυκλίνη D σχηματίζει σύμπλοκο με τις CDK4 και CDK6 και το σύμπλοκο αυτό ελέγχει τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Η κυκλίνη E βοηθά στη μεταγραφή του Rb/E2F μέσω του σχηματισμού ενός συμπλόκου με τη CDK2 και ελέγχει τη φάση G1-S. Η κυκλίνη K βοηθά στη μεταγραφή του RNAPII σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με τις CDK12 και CDK13. Η κυκλίνη L και η CDK11 συνδέονται για να πραγματοποιήσουν μάτισμα του RNA. Η κυκλίνη T συνδεδεμένη με την CDK9 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή του RNAPII. Τέλος, το σύμπλοκο κυκλίνης F/CDK14 σχετίζεται με το μεταβολικό μονοπάτι Wnt/ β -κατενίνης.^[29]

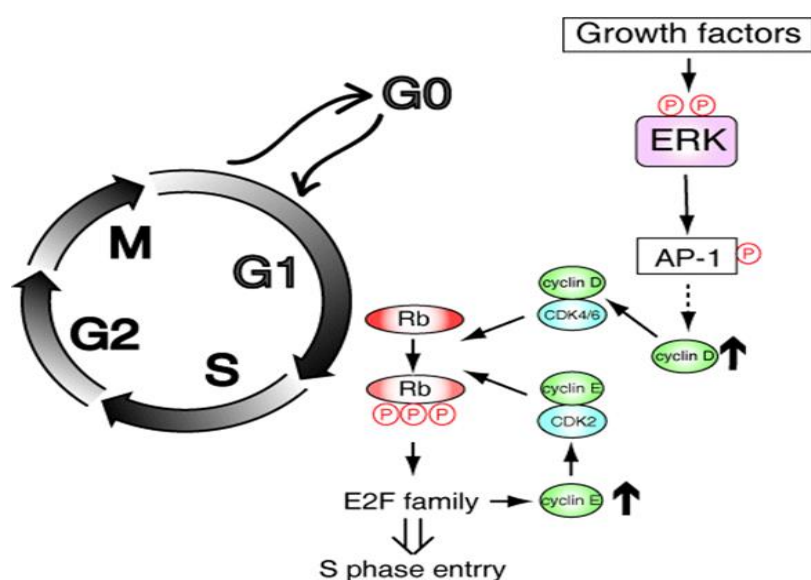


Εικόνα 3.5.: Απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου μαζί με τις CDKs και τις κυκλίνες που συμμετέχουν στην εξέλιξη του.^[29]

3.7. ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ CDK4/6 ΚΑΙ Η ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Στα φυσιολογικά κύτταρα, ο κυτταρικός κύκλος ξεκινά με την διέγερση υποδοχικών αυξητικών παραγόντων, που οδηγούν τα κύτταρα από τη φάση G0 στην είσοδο τους στον ενεργό κυτταρικό κύκλο. Τα κυριότερα μεταβολικά μονοπάτια που συμμετέχουν στην είσοδο των κυττάρων στον κύκλο είναι τα μονοπάτια MAPK και PI3K.

Η ενεργοποίηση του ERK1/2 προάγει τη μεταγραφή των κυκλινών D, συνήθως μέσω της βοήθειας συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων. Στη συνέχεια, οι κυκλίνες αυτές συνδέονται με τις κινάσες CDK4 και CDK6 για να δημιουργήσουν ενεργοποιημένα σύμπλοκα που φωσφορυλιώνουν άμεσα την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb). Συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα CDK4/6-κυκλίνης D και CDK2/κυκλίνης E προωθούν την μετάβαση από τη G1 στην S φάση, φωσφορυλιώνοντας τη πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος. Η σύνδεση των κυκλινών D με τις CDK4/6 επάγει τον σχηματισμό ενεργών συμπλόκων, τα οποία άμεσα μονοφωσφορυλιώνουν την Rb σε ένα από τα 14 σημεία φωσφορυλίωσης της. Το γεγονός αυτό προκαλεί τη διάσπαση των μεταγραφικών παραγόντων HDAC1 και E2F, επιτρέποντας έτσι την ακετυλίωση των ιστονών και την ενεργοποίηση της μεταγραφής πολλών γονιδίων, μεταξύ των οποίων και της κυκλίνης E. Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση του συμπλόκου CDK2/κυκλίνης E οδηγεί στην φωσφορυλίωση των υπόλοιπων θέσεων επί της Rb και την πλήρη απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F. Επίσης, οι CDK4/6 φωσφορυλιώνουν τον μεταγραφικό παράγοντα FOXM1, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή και τη σταθεροποίησή του. Ο FOXM1 έχει παρόμοιες λειτουργίες με τις CDK4/6. Προάγει τη μετάβαση G1/S στο περιοριστικό σημείο R, καταστέλλει τη γήρανση και εμπλέκεται στην ογκογένεση.^[30,31]



Εικόνα 3.6.: Συμμετοχή των κινάσων CDK4/6 και των κυκλινών D στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.^[31]

Η ρύθμιση της έκφρασης του συμπλόκου CDK4/6-κυκλίνη D γίνεται με την βοήθεια ενός ογκοκατασταλτικού παράγοντα, του p16, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην

κυτταρική γήρανση, περιορίζοντας έτσι την αναπαραγόμενη διάρκεια ζωής των κυττάρων.^[32]

Σύμφωνα, λοιπόν, με όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω είναι φυσικό πως οι κινάσες CDK4/6 και οι κυκλίνες D σχετίζονται άμεσα με τον καρκίνο. Πιο αναλυτικά, στον καρκίνο η μεταβολική οδός της κυκλίνης D–CDK4/6–p16–Rb διαταράσσεται συνήθως προς όφελος της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και της συνεχούς ανάπτυξης των κυττάρων με αποτέλεσμα την συσσώρευση μάζας κυττάρων και την δημιουργία όγκων. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του μαστού τύπου HR+, η ενεργοποίηση της οδού CDK4/6 έχει συσχετιστεί με αντίσταση που εμφανίζουν οι ασθενείς στην ενδοκρινική θεραπεία. Ένας άλλος λόγος που μπορεί να οδηγήσει στον καρκίνο είναι η αδρανοποίηση του παράγοντα p16, η οποία μπορεί να προκληθεί μέσα από σημειακές μεταλλάξεις, διαγραφή γονιδίου ή διακοπή της μεταγραφής μέσω μεθυλίωσης. Η υπερέκφραση των CDK4 και CDK6, καθώς και της κυκλίνης D (μέσω μετατοπίσεων ή αναστροφών του χρωμοσώματος 11) είναι, επίσης, συχνές σε ανθρώπινους καρκίνους. Γενικά, οι ανωμαλίες που μπορεί να συμβούν στο συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι ποικίλλουν μεταξύ των διάφορων τύπων καρκίνου. Επομένως, η επιστημονική κοινότητα έστρεψε το ενδιαφέρον προς τον σχεδιασμό αναστολέων που στοχεύουν τις κινάσες CDK4/6, ως στρατηγική θεραπείας διάφορων τύπων καρκίνου.^[32]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Απορρύθμιση κυτταρικού κύκλου και καρκίνος

4.1. ΑΠΟΡΡΥΘΜΙΣΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στις κυκλινεξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες και τις κυκλίνες που τις ενεργοποιούν. Για τον λόγο αυτό η ενεργοποίηση των συμπλόκων CDKs/ κυκλίνες υπό φυσιολογικές συνθήκες γίνεται με αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Ωστόσο, συχνά πραγματοποιείται απορρύθμιση της ενεργοποίησης τους για διάφορους λόγους με αποτέλεσμα την δημιουργία καρκίνου, καθώς αυτή η απορρύθμιση οδηγεί στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κάτι που είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Οι μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την απορρυθμισμένη ενεργοποίηση των CDKs μαζί με τις μεταλλάξεις σε πρωτο-ογκογονίδια αποτελούν δύο από τις κύριες αιτίες εμφάνισης καρκίνου στο ανθρώπινο γονιδίωμα.^[33]

Η δράση των CDKs μπορεί να απορρυθμιστεί με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα με γενετικές ανωμαλίες που οδηγούν στην γονιδιακή ενίσχυση και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης είτε της CDK είτε της αντίστοιχης κυκλίνης.^[33] Συνοπτικά, παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα οι CDKs και η συσχέτισή τους με τον καρκίνο:

CDK subtypes	Biological role	Cyclin partner	Role in type of cancer	Location on chromosome	Crystal structure available
CDK1	Control of M phase of cell cycle [11]	Cyclin B	Breast cancer, Lung cancer, Bladder cancer	10q21.2 13.80 kbp	Yes
CDK2	Control of G1-S phase of cell cycle [12]	Cyclin E	Breast Cancer, Melanoma	12q13.2 4.6 kbp	Yes
CDK2	Control of G1-S phase of cell cycle [12]	Cyclin A	Thymic Carcinoma, Lymphoma	12q13.2 4.6 kbp	Yes
CDK3	DNA damage Repair [13]	Cyclin C	Renal cancer, Lung cancer, Liver cancer	17q25.1 4.0 kbp	No
CDK4	Control of G1 phase of cell cycle and Rb/E2F transcription [14]	Cyclin D	Melanoma, Breast Cancer, Osteosarcoma, Skin cancer, Bladder cancer, Lung cancer	12q14.1 3.2kbp	Yes
CDK5	Neuronal function [15]	p35 and p39	Lung cancer, Neuroblastoma	7q36.1 3.8 kbp	Yes
CDK6	Control of G1 phase of cell cycle and Rb/E2F transcription [14]	Cyclin D	Breast cancer, Skin cancer, Bladder cancer, Stomach cancer	7q21.2 218 kbp	Yes
CDK7	Activates CDKs kinase, Involved in transcription [16]	Cyclin H	Breast cancer, Lung cancer	5q13.2 42.1 kbp	Yes
CDK8	Role in Wnt/ β -catenin pathway and RNAPII transcription [17,18]	Cyclin C	—	13q12.13 149.5 kbp	Yes
CDK9	RNAPII transcription and repair DNA damage [19]	Cyclin T	Breast cancer, Lung cancer, Cervical cancer	9q34.11 3.4 kbp	Yes
CDK10	ETS2 transcription [20]	Cyclin M	—	16q24.3 24.3 kbp	No
CDK11A	RNA splicing [21]	Cyclin L	Urothelial cancer, Colorectal cancer, Head and Neck Cancer	1p36.33 24.61 kbp	No
CDK11B	RNA splicing [21]	Cyclin L	Urothelial cancer, Colorectal cancer, Head and Neck Cancer	1p36.33 24.61 kbp	No
CDK12	RNAPII transcription and DNA damage [22]	Cyclin K	Skin cancer, Pancreatic cancer, Melanoma, Lymphoma, Head and Neck Cancer, Cervical Cancer, Carcinoid	17q12 69.2 kbp	Yes
CDK13	RNAPII transcription [22,23]	Cyclin K	Carcinoid, Colorectal cancer	7p14.1 144.1 kbp	Yes
CDK14	Role in Wnt/ β -catenin pathway [24]	Cyclin Y	Prostate cancer	7q21.13 391.6 kbp	No
CDK15	Antiaoptotic protein [25]	Cyclin Y	Renal cancer, Pancreatic cancer	2q33.1 81.8 kbp	No
CDK16	Spermatogenesis [26]	Cyclin Y	Endometrial cancer, Lymphoma, Ovarian cancer	Xp11.3 5.2 kbp	Yes
CDK17	Phosphorylation of Histone protein [27]	—	Carcinoid, Colorectal cancer, Melanoma, Renal cancer, Thyroid cancer	12q23.1 122.3 kbp	No
CDK18	Signal transduction cascade [28]	—	Melanoma, Thyroid cancer, Cervical cancer, Glioma	1q32.1 8.1 kbp	No
CDK19	Transcriptional activity [18]	—	Head and Neck cancer, Melanoma, Glioma, Prostrate cancer	6q21 131.1 kbp	No
CDK20	Activates CDK2 [29].	—	—	9q22.1 6.9 kbp	No

Εικόνα 4.1.: Η συσχέτιση των CDKs με τον καρκίνο.^[29]

4.2. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου στις γυναίκες και ένας από τους τρεις πιο συχνούς τύπους καρκίνου παγκοσμίως, μαζί με τον καρκίνο του πνεύμονα και του παχέος εντέρου. Το 2012, σχεδόν 1,7 εκατομμύρια άνθρωποι διαγνώστηκαν παγκοσμίως και περίπου μισό εκατομμύριο άνθρωποι πέθαναν από αυτή την ασθένεια. Στατιστικές μελέτες έδειξαν ότι μία στις οκτώ έως δέκα γυναίκες θα εμφανίσουν καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους.^[34]

Ο καρκίνος του μαστού διακρίνεται σε διάφορες υποομάδες με βάση το κωδικοποιημένο γονιδίωμα. Έτσι, διακρίνουμε τον καρκίνο HR+, όπου παρατηρείται η έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (ER+) καθώς και του προγεστερονικού υποδοχέα (PR+), τον HER2+ μοριακό υπότυπο, όπου εμφανίζεται υπερέκφραση των HER2 υποδοχέων και ο τριπλά αρνητικός υπότυπος για τον καρκίνο του μαστού. Σε αυτό τον τύπο καρκίνου του μαστού παρατηρείται έλλειψη έκφρασης των ορμονικών υποδοχέων (οιστρογονικός και προγεστερονικός) καθώς και του HER2-υποδοχέα. Έτσι χαρακτηρίζεται ως τριπλά αρνητικός υπότυπος για τον καρκίνο του μαστού (HER2-, ER-, PR-). Αναφορικά με τους μοριακούς υπότυπους Luminal A και Luminal B, αυτοί εμφανίζονται σε ποσοστό πάνω από το 75% των καρκίνων του μαστού. Στις περιπτώσεις αυτές ο ορμονικός υποδοχέας είναι ενεργός (θετικός) και έτσι παρατηρούμε την έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (ER+) καθώς και του προγεστερονικού υποδοχέα (PR+). Η διαφορά αυτών των δύο υπότυπων έγκειται στο ότι ο υποδοχέας HER2 εκφράζεται μόνο στον Luminal B (HER2+) υπότυπο και όχι στον Luminal A (HER2-).^[35]

4.3. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Υπάρχουν διάφορα είδη θεραπειών για τον καρκίνο του μαστού. Οι πιο διαδεδομένες θεραπείες είναι η αφαίρεση του όγκου με χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η ενδοκρινική θεραπεία. Η επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης για κάθε ασθενή είναι διαφορετική και εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες. Αρχικά, πριν την απόφαση για το ποιο είδος θεραπείας θα ακολουθηθεί είναι απαραίτητη η βιοψία με σκοπό να κατανοηθεί το είδος του καρκινικού όγκου. Μέσα από την βιοψία καθορίζεται και η έκταση της νόσου, δηλαδή σε ποιο στάδιο έχει προχωρήσει ο καρκίνος. Με βάση αυτό καθορίζεται και αν είναι δυνατή η πραγματοποίηση χειρουργικής επέμβασης με σκοπό την αφαίρεση του όγκου. Ο καρκίνος του μαστού που έχει προχωρήσει στο στάδιο IV θεωρείται ανίατος.^[36]

- ❖ Χειρουργική επέμβαση: Η χειρουργική επέμβαση γίνεται με σκοπό την αφαίρεση του καρκινικού όγκου. Πολλές φορές, αν η εξάπλωση του όγκου είναι μεγάλη πραγματοποιείται μαστεκτομή, όπου αφαιρείται το παρέγχυμα του μαστού, η περιοχή της θηλής και το μεγαλύτερο μέρος δέρματος από τον θώρακα, αφήνοντας όμως όσο απαιτείται για να επουλωθεί η τομή. Συνήθως,

η χειρουργική επέμβαση συνδυάζεται με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία πριν ή μετά από την επέμβαση.^[36]

- ❖ Χημειοθεραπεία: Αυτό το είδος θεραπείας συνίσταται για ασθενείς υψηλού κινδύνου. Υπάρχουν διάφορες επιλογές χημειοθεραπείας, που συνήθως περιέχουν τόσο μια ανθρακυκλίνη όσο και μια ταξάνη. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο πιο συχνός συνδυασμός αντικαρκινικών φαρμάκων που χρησιμοποιείται για τον καρκίνο του μαστού είναι η χορήγηση υδροχλωρικής δοξορουβικίνης (Adriamycin) και κυκλοφωσφαμίδης για 4 κύκλους, ακολουθούμενη από θεραπεία με πακλιταξέλη (Taxol) (AC-T).^[36]
- ❖ Ακτινοθεραπεία: Η ακτινοθεραπεία συνδυάζεται συνήθως με χειρουργική επέμβαση με σκοπό την αύξηση της πιθανότητας επιβίωσης των ασθενών. Για την εφαρμογή αυτής της θεραπείας γίνεται χρήση ισχυρής ιονίζουσας ακτινοβολίας, που σήμερα παράγεται από ειδικές συσκευές υψηλής τεχνολογίας τους γραμμικούς επιταχυντές ηλεκτρονίων (παλαιότερα παραγόταν από το ραδιενεργό κοβάλτιο).^[36]
- ❖ Ενδοκρινική θεραπεία: Η ενδοκρινική θεραπεία συνιστάται για τους περισσότερους ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με HR+ καρκίνο του μαστού. Οι ασθενείς μπορεί να λαμβάνουν την ενδοκρινική θεραπεία για 5 έως 10 χρόνια και πιθανώς και περισσότερο. Η χορήγηση της ταμοξιφαίνης (Nolvadex) για 5 χρόνια μειώνει τον κίνδυνο υποτροπής κατά σχεδόν 50% κατά τα έτη 0 έως 4, με συνεχή μείωση του κινδύνου άνω του 30% τα έτη 5 έως 9. Επιπλέον, η ετήσια θνησιμότητα από καρκίνο του μαστού μειώθηκε κατά 30% κατά τα πρώτα 15 χρόνια. Σε ασθενείς που λαμβάνουν το φάρμακο αυτό για 10 χρόνια αντί για 5, η μεγαλύτερη διάρκεια θεραπείας οδήγησε σε περαιτέρω μείωση της υποτροπής (κατά 25%) και της θνησιμότητας (σχεδόν κατά 30%), κυρίως μετά από το δέκατο έτος. Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι μετά από 5 χρόνια ταμοξιφαίνης, η χορήγηση αναστολέων αρωματάσης (AIs) για άλλα 5 χρόνια παρέχουν επιπλέον 40% μείωση του κινδύνου.^[36]

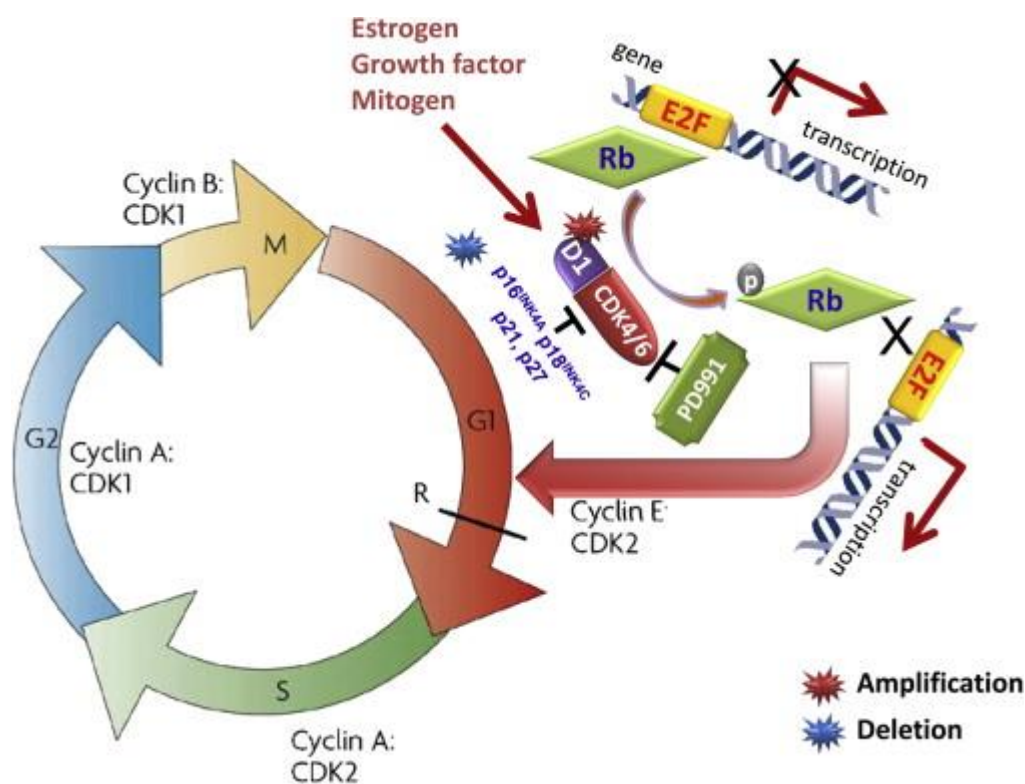
4.3.1. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ανάπτυξη αποτελεσματικής θεραπείας είτε μέσω χημειοθεραπείας (4-6 μήνες) είτε μέσω μακροχρόνιας ορμονοθεραπείας (5 χρόνια) ή και των δύο, βελτίωσε σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών. Ωστόσο, τα ποσοστά πλήρους ύφεσης χωρίς μετάσταση ή επανεμφάνιση μετά από ένα χρονικό διάστημα είναι ακόμη αρκετά χαμηλά. Για τον λόγο αυτό οι επιστημονικές έρευνες εστιάζουν στον εντοπισμό των κύριων μοριακών αλλοιώσεων σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, που βοηθούν την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανάπτυξης συγκεκριμένων στοχευμένων θεραπειών. Το φάρμακο Trastuzumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα του υποδοχέα HER-2, είναι ο πρώτος παράγοντας μοριακής στόχευσης εγκεκριμένος για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού, ικανός να βελτιώσει σημαντικά την κλινική έκβαση σε συνδυασμό με κυτταροτοξική

θεραπεία. Πρόσφατα δεδομένα από τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές υποδηλώνουν ότι το Trastuzumab μειώνει τον κίνδυνο πρώιμης υποτροπής κατά 50% σε ασθενείς με HER-2 θετική νόσο. Άλλες νέες στοχευμένες θεραπείες με πολλά υποσχόμενη δράση, οι οποίες βρίσκονται ακόμη σε κλινική αξιολόγηση, είναι διάφορες αντιαγγειογενετικές ενώσεις (Bevacizumab, sunitinib, vatalanib) και διλειτουργικά φάρμακα όπως η λαπατινίβη.^[37]

Ένα άλλο πεδίο στοχευμένης θεραπείας που έχει μελετηθεί διεξοδικά την τελευταία εικοσαετία και έχει αρκετά υποσχόμενα αποτελέσματα στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, έχουν αναπτυχθεί αναστολείς για την θεραπεία του καρκίνου του μαστού που στοχεύουν ειδικά τις κινάσες CDK4/6.

Οι κινάσες CDK4 και CDK6 ρυθμίζουν την μετάβαση από την φάση G1 του κυτταρικού κύκλου στην φάση S. Οι κινάσες αυτές εξαρτώνται από τις κυκλίνες D για την ενεργοποίησή τους και φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb). Η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 και η απορυθμισμένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb έχει συσχετιστεί με αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία στον καρκίνο του μαστού τύπου ER+. Επομένως, αναστολείς των συγκεκριμένων κινασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στοχευμένη θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού τύπου ER+. Σε αυτή την κατηγορία αναστολέων ανήκει και το Ribociclib.^[38]



Εικόνα 4.2.: Η συμμετοχή των CDK4/6 στη μετάβαση από την φάση G1 στην S.^[38]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

5.1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Η απορρύθμιση του μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου, η οποία έχει συνδεθεί με τη απορρύθμιση των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών (CDKs), είναι ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό του καρκίνου, προάγοντας τελικά τον μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό που τροφοδοτεί την ογκογένεση και την ανάπτυξη της ασθένειας. Από αυτή την άποψη, αρκετοί αναστολείς CDKs (CDKI) έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες (CDKI 1ης, 2ης και 3ης γενιάς) για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.^[40]

Η έννοια της αναστολής κινάσης ξεκίνησε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και του 1960, όταν πραγματοποιήθηκε έρευνα για τον χαρακτηρισμό της κινάσης και την αποσαφήνιση της ταυτοποίησης του καταρράκτη σηματοδότησης κινασών πραγματοποιήθηκε. Η στρατηγική της αναστολής κινάσης ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του 1980, όταν περιγράφηκαν οι αναστολείς έναντι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός αναστολέων κινάσης έχει αναφερθεί. Η έγκριση του πρώτου αναστολέα, του imatinib (Gleevec®, Novartis), από τον FDA το 2001 για τη θεραπεία ασθενών με χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML) δεν ήταν μόνο μια σημαντική ανακάλυψη στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου, αλλά άνοιξε επίσης το δρόμο για την μελλοντική έρευνα στο πεδίο των αναστολέων κινασών.^[41]

Υπάρχουν 72 εγκεκριμένοι από τον FDA αναστολείς που στοχεύουν διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες και τρία από αυτά τα φάρμακα εγκρίθηκαν το 2022. Από τους εγκεκριμένους αναστολείς, δώδεκα στοχεύουν πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, τέσσερις στοχεύουν πρωτεϊνικές κινάσες διπλής ειδικότητας, δεκαέξι στοχεύουν μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες και 40 στοχεύουν υποδοχικές τυροσινικές κινάσες. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι 62 από αυτά τα φάρμακα συνταγογραφούνται για τη θεραπεία νεοπλασμάτων (57 κατά συμπαγών όγκων συμπεριλαμβανομένων του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, δέκα κατά των μη στερεών όγκων όπως η λευχαιμία και τέσσερα κατά των συμπαγών και μη στερεών όγκων).^[42]

Τέσσερα φάρμακα (abrocitinib, baricitinib, tofacitinib, upadacitinib) χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών (ατοπική δερματίτιδα, ψωριασική αρθρίτιδα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος του Crohn και ελκώδης κολίτιδα). Από τα 72 εγκεκριμένα φάρμακα, τα δεκαοκτώ χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλαπλών ασθενειών. Τα ακόλουθα τρία φάρμακα έλαβαν έγκριση από τον FDA το 2022 για τη θεραπεία καθορισμένων ασθενειών: αμπροσιτινίβη (ατοπική

δερματίτιδα), φουτιμπατινίβη (χολαγγειοκαρκίνωμα) και πακριτινίβη (μυελοϊνωση).^[42]

Αν και οι CDKIs 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς έδειξαν αξιοσημείωτη αντικαρκινική αποτελεσματικότητα σε προκλινικές και, σε μικρότερο βαθμό, σε κλινικές μελέτες, αυτοί οι αναστολείς δεν έλαβαν μεγάλη κλινική προσοχή για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο λόγω της χαμηλής εκλεκτικότητάς τους και της υψηλής τοξικότητάς τους. Η ανάπτυξη στρατηγικών συνδυαστικής θεραπείας τα τελευταία χρόνια κατέστησε δυνατή τη μείωση της τοξικότητας και των παρενεργειών των CDKIs παλαιότερης γενιάς, ανοίγοντας τη δυνατότητα χρήσης τους σε κλινικά περιβάλλοντα. Σε σύγκριση με τους CDKIs 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς, έχουν γίνει σημαντικές πρόοδοι από την κλινική πλευρά στην ανάπτυξη CDKIs 3ης γενιάς. Παρακάτω παρουσιάζονται όλοι οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που έχουν εγκριθεί από τον FDA από το 2001 μέχρι το 2022.^[40]

Drug	Code	Company	Trade name	Year approved	Primary targets	Therapeutic indications ^c
Abemaciclib	LY2835219	Lilly	Verzenio	2017	CDK4/6	Combination therapy with (i) an aromatase inhibitor or with (ii) fulvestrant or (iii) as a monotherapy for breast cancer
Abrocitinib	PF-04965842	Pfizer	Gibinqo	2022	JAK1	Atopic dermatitis
Acalabrutinib	ACP-196	Acerta Pharma	Calquence	2017	BTk	Mantle cell lymphomas, CLL, SLL
Afatinib	BIBW 2992	Boehringer Ingelheim	Tovok	2013	ErbB1/2/4	NSCLC, squamous NSCLC
Alectinib	CH5424802	Roche	Alecensa	2015	ALK, RET	ALK-positive NSCLC
Asciminib	ABL001	Novartis	Scemblix	2021	BCR-Abl	Ph ⁺ CML
Avapritinib	BLU285	Blueprint Medicines	Ayvakit	2020	PDGFRα	GIST with <i>PDGFRα</i> exon 18 mutations
Axitinib	AG-013736	Pfizer	Inlyta	2012	VEGFR1/2/3	RCC
Baricitinib	LY 3009104	Lilly	Olumiant	2018	JAK1/2	Rheumatoid arthritis
Belumosudil	KD025	Kadmon Pharma	Rezurock	2021	ROCK2	Graft vs. host disease
Binimetinib	MEK162	Array BioPharma	Mektovi	2018	MEK1/2	Combination therapy with encorafenib for <i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas
Bosutinib	SKI-606	Pfizer	Bosulif	2012	BCR-Abl	Ph ⁺ CML
Brigatinib	AP 26113	Ariad Pharm	Alunbrig	2017	ALK	ALK-positive NSCLC
Cabozantinib	BMS-907351	Exelixis	Cometriq	2012	RET, VEGFR2	Medullary thyroid cancer, RCC, HCC
Capmatinib	INC-280	Novartis	Tabrecta	2020	MET	NSCLC with MET exon 14 skipping
Ceritinib	LDK378	Novartis	Zykadia	2014	ALK	ALK-positive NSCLC resistant to crizotinib
Cobimetinib	GDC-0973	Genentech	Cotellic	2015	MEK1/2	<i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas in combination with vemurafenib
Crizotinib	PF 2341066	Pfizer	Xalkori	2011	ALK, ROS1	ALK or ROS1-positive NSCLC, inflammatory myofibroblastic tumors, anaplastic large cell lymphoma
Dabrafenib	GSK2118436	GSK	Tafinlar	2013	B-Raf	<i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas, <i>BRAF</i> ^{V600E} NSCLC, <i>BRAF</i> ^{V600E} anaplastic thyroid cancers
Dacomitinib	PF-00299804	Pfizer	Visimpro	2018	EGFR	EGFR-mutant NSCLC
Dasatinib	BMS-354825	Bristol Myers Squibb	Sprycell	2006	BCR-Abl	Ph ⁺ CML or ALL
Encorafenib	LGX818	Array BioPharma	Braftovi	2018	B-Raf	Combination therapy with binimetinib for <i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas
Entrectinib	RXDX-101	Ignity, Inc.	Ignitya	2019	TRKA/B/C, ROS1	Solid tumors with NTRK fusion proteins, ROS1-positive NSCLC
Erdafitinib	JNJ-42756493	Jansen Pharm	Balversa	2019	FGFR1/2/3/4	Urothelial bladder cancer
Erlotinib	OSI-774	Genentech	Tarceva	2004	EGFR	NSCLC, pancreatic cancer
Everolimus	RAD001	Novartis	Afinitor	2009	FKBP12/mTOR	HER2-negative breast cancer, pancreatic neuroendocrine tumors, RCC, angiomyolipomas, subependymal giant cell astrocytomas
Fedratinib	TG101348	Celgene	Inrebic	2019	JAK2	Myelofibrosis
Fostatinib	R788	Rigel Pharma.	Tavalisse	2018	Syk	Chronic immune thrombocytopenia
Futibatinib	TAS 120	Tiaho Pharma	Lytgobi	2022	FGFR2	Bile duct cancers (cholangiocarcinomas) with FGFR2 fusions or other rearrangements
Gefitinib	ZD1839	AstraZeneca	Iressa	2003	EGFR	NSCLC with exon 19 deletions or exon 21 substitutions
Gilteritinib	ASP2215	Astellas Pharma	Xospata	2018	Flt3	AML with <i>FLT3</i> mutations
Ibrutinib	PCI-32765	Johnson & Johnson	Imbruvica	2013	BTk	CLL, mantle cell lymphoma, marginal zone lymphoma, graft vs. host disease
Imatinib	STI571	Novartis	Gleevec	2001	BCR-Abl	Ph ⁺ CML or ALL, aggressive systemic mastocytosis, chronic eosinophilic leukemia, dermatofibrosarcoma protuberans, hypereosinophilic syndrome, GIST, myelodysplastic/myeloproliferative disease

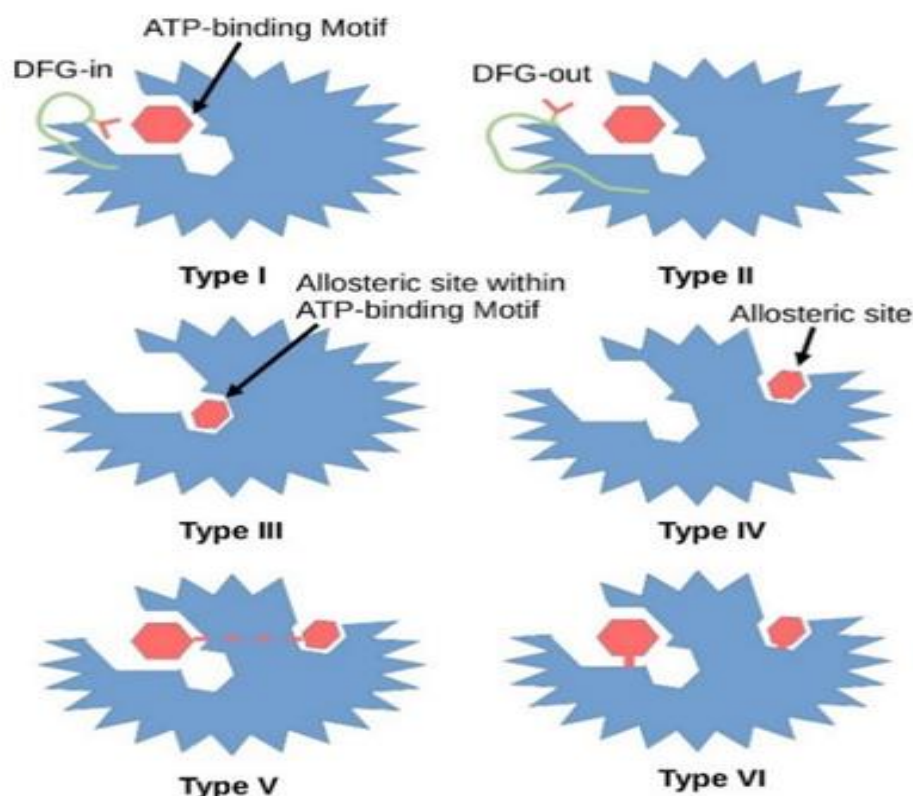
Infigratinib	BGJ 398	QED Therapeutics	Truseltiq	2021	FGFR2	Cholangiocarcinomas with FGFR2 fusions or other rearrangements
Lapatinib	GW572016	GSK	Tykerb	2007	EGFR, ErbB2/HER2	HER2-positive breast cancer
Larotrectinib	LOXO-101	Bayer	Vitrakvi	2018	TRKA/B/C	Solid tumors with NTRK fusion proteins
Lenvatinib	AK175809	Easai Co.	Lenvima	2015	VEGFR, RET	Differentiated thyroid cancer
Lorlatinib	PF-06463922	Pfizer	Lorbrena	2018	ALK	ALK-positive NSCLC
Midostaurin	CPG 41251	Novartis	Rydapt	2017	Flt3	AML, mastocytosis, mast cell leukemia
Mobocertinib	TAK-788	Takeda Pharm.	Exkivity	2021	EGFR	NSCLC with EGFR-positive exon 20 insertions
Neratinib	HKI-272	Puma Biotech	Nerlynx	2017	ErbB2/HER2	HER2-positive breast cancer
Netarsudil	AR11324	Aerie Pharma	Rhopressa	2018	ROCK1/2	Glaucoma
Nilotinib	AMN107	Novartis	Tasigna	2007	BCR-Abl	Ph ⁺ CML
Nintedanib	BIBF-1120	Boehringer Ingelheim	Vargatef	2014	FGFR1/2/3	Idiopathic pulmonary fibrosis
Osimertinib	AZD-9292	AstraZeneca	Tagrisso	2015	EGFR T970M	NSCLC with exon 19 deletions or exon 21 substitutions
Pacritinib	SB1518	CTI BioPharma	Vonjo	2022	JAK2	Myelofibrosis
Palbociclib	PD-0332991	Parke-Davis	Ibrance	2015	CDK4/6	Estrogen receptor- and HER2-positive breast cancers
Pazopanib	GW786034	GSK	Votrient	2009	VEGFR1/2/3	RCC, soft tissue sarcomas
Pemigatinib	INC054828	Incyte Corp.	Pemazyre	2020	FGFR2	Cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or other rearrangements
Pexidartinib	PLX3397	Plexxikon Inc	Turalio	2019	CSF1R	Tenosynovial giant cell tumors
Ponatinib	AP 24534	Ariad Pharm	Iclusig	2012	BCR-Abl	Ph ⁺ CML or ALL
Pralsetinib	Blu-667	Blueprint Medicines	Gavreto	2020	RET	RET-fusion (i) NSCLC, (ii) medullary thyroid cancer, (iii) differentiated thyroid cancer
Regorafenib	BAY 73-4506	Bayer	Stivarga	2012	VEGFR1/2/3	Colorectal cancer, GIST, HCC
R406 active metabolite of fostamatinib		Rigel Pharma.		2018	Syk	Chronic immune thrombocytopenia
Ribociclib	LEE011	Novartis	Kisqali	2017	CDK4/6	Combination therapy with an aromatase inhibitor for breast cancer
Ripretinib	DCC-2618	Deciphera Pharma.	Qinlock	2020	Kit, PDGFR α	Fourth-line treatment for GIST
Ruxolitinib	INC018424	Incyte Corp.	Jakafi	2011	JAK1/2/3, Tyk	Myelofibrosis, polycythemia vera, atopic dermatitis, graft vs. host disease
Selpercatinib	CEGM9YBNG	Lilly	Retevmo	2020	RET	RET fusion NSCLC and thyroid cancers and RET mutant medullary thyroid cancer
Selumetinib	AZD6224	AstraZeneca	Koselugo	2020	MEK1/2	Neurofibromatosis type I
Sirolimus	AY 22989	Wyeth, LLC	Rapamycin	1999	FKBP12/mTOR	Kidney transplants, lymphangioleiomyomatosis
Sorafenib	BAY 43-9006	Bayer	Nexavar	2005	VEGFR1/2/3	HCC, RCC, differentiated thyroid cancer
Sunitinib	SU11248	Pfizer	Sutent	2006	VEGFR2	GIST, pancreatic neuroendocrine tumors, RCC
Temsirolimus	CCI-779	Wyeth, LLC	Torisel	2007	FKBP12/mTOR	RCC
Tepotinib	EMD 1214063	EMD Serono Inc.	Tepmetko	2021	MET	NSCLC with MET mutations
Tivozanib	AV951	AVEO Pharma	Fotvida	2021	VEGFR2	Third-line treatment of RCC
Tofacitinib	CP-690550	Pfizer	Tasocitinib	2012	JAK3	Rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ulcerative colitis
Trametinib	GSK1120212	GSK	Mekinist	2013	MEK1/2	BRAF ^{V600E/K} melanoma, BRAF ^{V600E} NSCLC
Trilaciclib	G1T28	G1 Therapeutics	Cosela	2021	CDK4/6	Chemotherapy-induced myelosuppression
Tucatinib	ONT-380	Seattle Genetics	Tukysa	2020	ErbB2/HER2	Combination second-line treatment for HER2-positive breast cancer
Upadacitinib	ABT-494	AbbVie	Rinvoq	2019	JAK1	Rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, atopic dermatitis
Vandetanib	ZD6474	Sanofi	Zactima	2011	VEGFR2	Medullary thyroid cancer
Vemurafenib	PLX-4032	Genentech	Zelboraf	2011	B-Raf	BRAF ^{V600E} melanomas, Erdheim-Chester disease
Zanubrutinib	BGB3111	BeiGene	Brukina	2019	BTK	Mantle cell lymphomas

Εικόνα 5.1.: Οι εγκεκριμένοι από τον FDA αναστολείς κινάσων, οι κινάσες που στοχεύουν και οι θεραπευτικές εφαρμογές τους.^[42]

5.2. ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Αναστολείς τύπου I: συνδέονται με τον θύλακα αδενίνης της θέσης πρόσδεσης του ATP, με το μοτίβο DFG του βρόχου ενεργοποίησης να υιοθετεί μια διαμόρφωση «in» (ενεργή διαμόρφωση πρωτεΐνης).
- Αναστολείς τύπου II: δεσμεύεται τόσο με την θέση πρόσδεσης του ATP όσο και με μία αλλοστερική περιοχή και η διαμόρφωση του μοτίβου DFG είναι «out» (ανενεργή διαμόρφωση).
- Αναστολείς τύπου III: Αλληλεπιδρούν σε αλλοστερική θέση κοντά στην περιοχή δέσμευσης του ATP.
- Αναστολείς τύπου ½: συνδέονται στην περιοχή δέσμευσης του ATP και το μοτίβο DFG έχει διαμόρφωση «out» (ανενεργή διαμόρφωση).
- Αναστολείς τύπου IV: συνδέονται σε αλλοστερική θέση μακριά από την περιοχή πρόσδεσης του ATP.
- Αναστολείς τύπου V: αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα σε δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεΐνης.
- Αναστολείς τύπου VI: δημιουργούν μία ομοιοπολική δέσμευση (μη αντιστρεπτή) με την πρωτεϊνική κινάση.^[43]



Εικόνα 5.2.: Περιοχή δέσμευσης αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων τύπου I-VI.^[43]

5.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDKs ΠΡΩΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

Μόλις διερευνήθηκε η θεραπευτική δυνατότητα των CDKs σε διάφορους καρκίνους, εξελίχθηκε η έρευνα για την ανάπτυξη των αναστολέων. Αρχικά, πολλοί αναστολείς, που ονομάζονται αναστολείς 1^{ης} γενιάς, συμπεριλαμβανομένων των olomoucine, flavopiridol και roscovitine, αναπτύχθηκαν ως πιθανά θεραπευτικά για τον καρκίνο και δοκιμάστηκαν σε πολυάριθμες κλινικές δοκιμές. Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης συγγένειάς τους σε σύγκριση με τα ανάλογα τους και της σοβαρής τοξικότητάς τους, ορισμένα από αυτά τα CDKIs 1ης γενιάς, όπως το olomoucine, δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην κλινική έρευνα παρά το γεγονός ότι είχαν σημαντική ανασταλτική επίδραση στα καρκινικά κύτταρα σε προκλινικές μελέτες. Αντίθετα, οι άλλοι δύο αναστολείς 1^{ης} γενιάς, έχουν προσελκύσει τη μεγαλύτερη προσοχή από την άποψη της έρευνας και χρησιμοποιούνται σε κλινικές έρευνες φάσης I/II.^[40]

- *Flavopiridol*: Η φλαβοπιριδόλη είναι ο αναστολέας 1^{ης} γενιάς με την πιο εκτεταμένη έρευνα και ήταν, επίσης, ο πρώτος που χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές μελέτες. Η φλαβοπιριδόλη ανακαλύφθηκε, αρχικά, ως αναστολέας των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων καρκίνων σε πολλαπλά πειραματικά μοντέλα. Αργότερα, ωστόσο, η ανασταλτική δράση του φαρμάκου παρατηρήθηκε ότι είναι πιο ισχυρή στις κινάσες CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 και CDK9 από ό,τι στους υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Οι αρχικές κλινικές δοκιμές με φλαβοπιριδόλη ξεκίνησαν το 1994 ως θεραπεία συνδυασμού πρώτης γραμμής για τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και την οξεία μυελογενή λευχαιμία. Έκτοτε, σύμφωνα με τη μεγαλύτερη βάση δεδομένων κλινικών δοκιμών, η φλαβοπιριδόλη έχει δοκιμαστεί σε 67 κλινικές δοκιμές, με το φάρμακο να χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία μιας μεγάλης ποικιλίας καρκίνων, όπως το λέμφωμα, η οξεία μυελογενή λευχαιμία, ο καρκίνος του προστάτη, και τον καρκίνο του στομάχου.^[40]
- *Roscovitine*: αυτός ο αναστολέας έχει αποδείξει την ικανότητά του να δεσμεύει και να αναστέλλει πολλά μέλη της οικογένειας των CDKs, συμπεριλαμβανομένων των CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 και CDK9, ακόμη και σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις. Προκλινικά, μελετήθηκαν οι ανασταλτικές επιδράσεις του φαρμάκου σε μια ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών και μοντέλων ξενομοσχευμάτων και η ανασταλτική δράση του αποδείχθηκε ότι προκαλείται κυρίως μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου και της επαγωγής απόπτωσης. Έκτοτε, έχουν πραγματοποιηθεί μερικές κλινικές δοκιμές Φάσης I και Φάσης II που χρησιμοποιούν το Roscovitine ως μεμονωμένο φάρμακο, αλλά τα αποτελέσματα δεν έχουν αφήσει σημαντική εντύπωση στην επιστημονική κοινότητα.^[40]

5.4. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDKs ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

Λαμβάνοντας υπόψη την κυτταροτοξικότητα και τη χαμηλή εκλεκτικότητα των αναστολέων 1^{ης} γενιάς, αρκετοί αναστολείς 2^{ης} γενιάς έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί σε διάφορες κλινικές μελέτες. Αυτές περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων, όπως τα dinaciclib, AT7519, CYC065, P276–00, TG02, roniciclib, RGB-286638, PHA793887, ZK-304709, P1446A-05, R532328, SNS-200D και PHA-848125. Ωστόσο, δεν προχώρησαν όλες πέρα από τις πρώιμες κλινικές μελέτες και δεν παρήγαγαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε προηγμένες κλινικές έρευνες.^[40]

- *Dinaciclib*: Το Dinaciclib είναι ο πιο διαδεδομένος αναστολέας 2^{ης} γενιάς και βρέθηκε ότι είναι πολύ αποτελεσματικός αναστολέας των CDK1, CDK2, CDK5 και CDK, με μειωμένη δράση έναντι των CDK4, CDK6 και CDK7. Σε πειράματα με βάση τα κύτταρα, το dinaciclib έδειξε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην καταστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Rb σε σύγκριση με τις πρώτες γενιές αναστολέων. Επιπλέον, το dinaciclib απέτρεψε την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου σε περισσότερες από 100 κυτταρικές γραμμές όγκου πολλαπλών τύπων όγκων και προκάλεσε την υποχώρηση των εμφυτευμένων συμπαγών όγκων σε μια ποικιλία μοντέλων ξενομοσχευμάτων.^[40]
- *AT7519*: αυτός ο αναστολέας έδειξε ανασταλτική δράση έναντι των CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6 και CDK9. Παρόμοια με το dinaciclib, αυτός ο αναστολέας έδειξε ενθαρρυντική αποτελεσματικότητα σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, ακόμη και σε νανομοριακές συγκεντρώσεις. Σε μια μελέτη που διερευνούσε τον βιολογικό χαρακτηρισμό του AT7519, το AT7519 αποδείχθηκε ότι προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου και επακόλουθη απόπτωση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα. Στην ίδια μελέτη, παρατηρήθηκε σημαντική υποχώρηση του όγκου σε μοντέλα ξενομοσχευμάτων ανθρώπινου καρκίνου του παχέος εντέρου, επιδεικνύοντας αξιοσημείωτη αντικαρκινική αποτελεσματικότητα.^[40]
- *Fadraciclib*: Το Fadraciclib (CYC065) είναι επίσης ένας αναστολέας 2^{ης} γενιάς που προέρχεται από τη ροσκοβιτίνη και το CCT068127. Αυτός ο αναστολέας έχει δείξει ισχυρή ανασταλτική δράση στις κινάσες CDK2, CDK5 και CDK9. Σε προκλινικά μοντέλα οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, βρέθηκε ότι το CYC065 περιορίζει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυτταρικών σειρών λευχαιμίας αναστέλλοντας την CDK9, η οποία αναστέλλει τη μεταγραφή που προκαλείται από την πολυμεράση II και την έκφραση του MCL1, πυροδοτώντας έτσι την απόπτωση. Επιπλέον, το CYC065 μπορεί να μειώσει την έκφραση του MEIS1, ενός μεταγραφικού συμπαράγοντα που είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και τη διατήρηση λευχαιμικών βλαστοκυττάρων μικτής γενεαλογίας προάγοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και αναστέλλοντας τη διαφοροποίηση.^[40]

5.5. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDKs ΤΡΙΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ

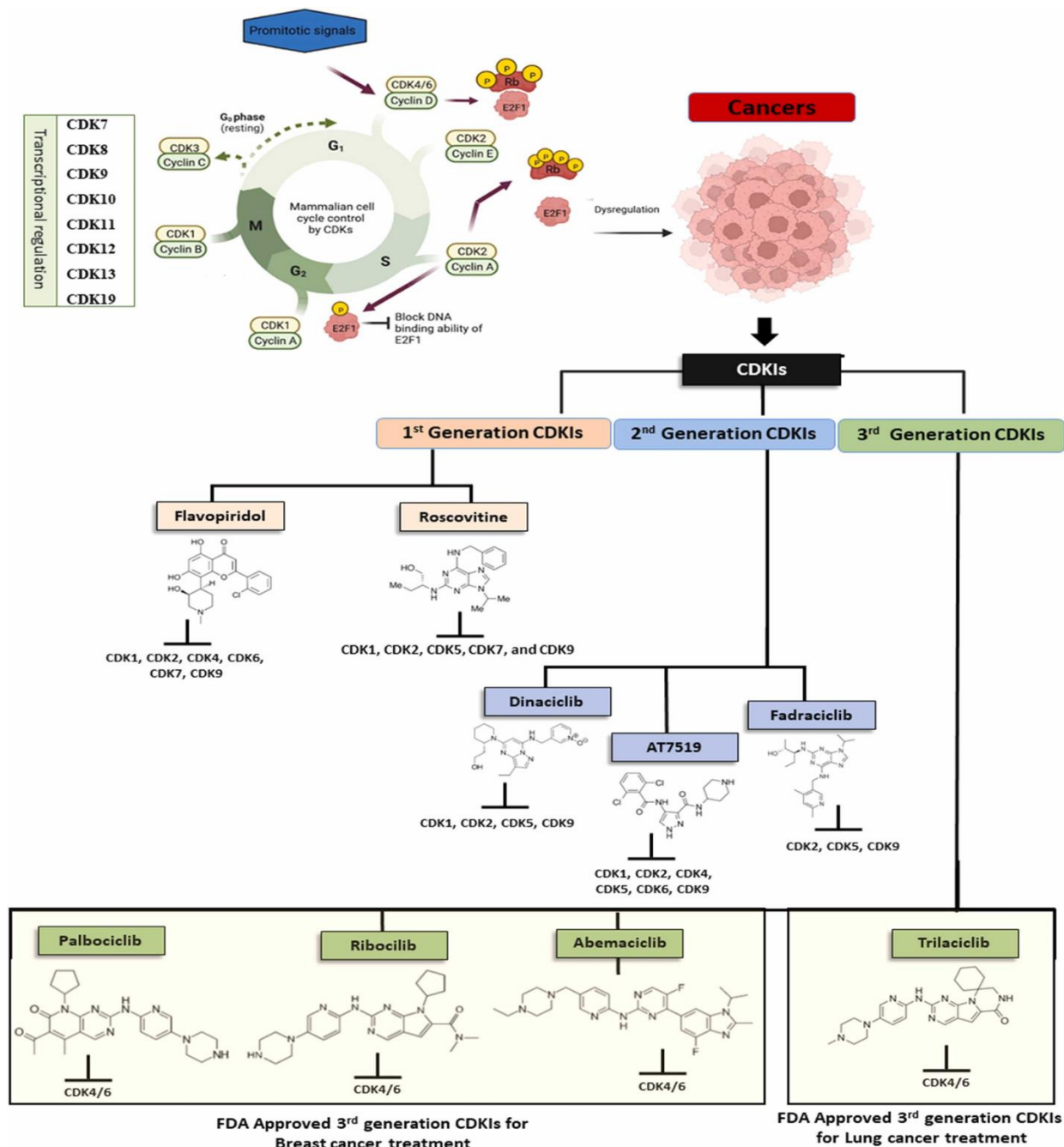
Η συντριπτική πλειονότητα των CDKIs 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς δεν είναι επιλεκτικοί ως προς τους μοριακούς στόχους τους. Το κύριο εμπόδιο για την πλήρη ανάπτυξη αυτών των αναστολέων στο κλινικό μέτωπο ήταν η έλλειψη κατανόησης των μηχανισμών δράσης τους. Όσον αφορά τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα πολλών CDKI 1ης και 2ης γενιάς, είναι ακόμη άγνωστο ποιες CDKs αναστέλλονται σε συνθήκες *in vivo* και με ποιον μηχανισμό. Επιπλέον, επειδή πολλοί από αυτούς τους αναστολείς πρώιμης γενιάς στοχεύουν πολυάριθμες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον φυσιολογικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων, όπως οι CDK1 και CDK9, η περαιτέρω ανάπτυξη αυτών των φαρμάκων στην προηγμένη κλινική έρευνα έχει επίσης περιοριστεί από το γεγονός ότι δεν μπορούν να είναι εκλεκτικοί ως προς τα καρκινικά κύτταρα μόνο και όχι τα υγιή. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκαν πιο εκλεκτικοί και λιγότερο τοξικοί αναστολείς 3^{ης} γενιάς που στοχεύουν ειδικά τις CDK4 και CDK6. Τέτοιοι αναστολείς είναι το palbociclib, το ribociclib, το abemaciclib και το πρόσφατα αναπτυγμένο trilaciclib. Αυτοί είναι όλοι εκλεκτικοί αναστολείς των CDK 4/6 που εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της Rb, προκαλώντας διακοπή του κύκλου στη φάση G1 και τη γήρανση των καρκινικών κυττάρων. Φαίνεται να έχουν παρόμοιες κλινικές δράσεις και παρόμοιες χημικές δομές (Εικόνα 5.3.). Αυτοί οι αναστολείς θεωρούνται ότι είναι η πιο ενδιαφέρουσα και πολλά υποσχόμενη οικογένεια των CDKIs που έχει ανακαλυφθεί μέχρι στιγμής, φέρνοντας επανάσταση στη θεραπεία πολλών επιθετικών μορφών καρκίνου.^[40]

- *Palbociclib*: είναι ο αναστολέας τρίτης γενιάς που έχει ερευνηθεί εκτενέστερα. Εγκρίθηκε από τον FDA τον Φεβρουάριο του 2015 (Εικόνα 5.3.). Το Palbociclib είναι ένας αναστολέας των κινασών CDK4/6 που έχει IC₅₀ (ανασταλτική συγκέντρωση) 9–15 nM/L και δεσμεύεται στον θύλακα πρόσδεσης του ATP. Είναι σημαντικό ότι αυτός ο αναστολέας εμφανίζει εκλεκτικότητα, καθώς δεν παρουσιάζει καμία δράση έναντι άλλων κινασών. Το Palbociclib έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε μια ποικιλία προκλινικών ερευνών σε πολλούς τύπους καρκίνου. Παρόλο που το palbociclib μελετάται σε πολλούς διαφορετικούς καρκίνους, τα πιο ενθαρρυντικά ευρήματα ήταν στον καρκίνο του μαστού.^[40]
- *Abemaciclib*: Οι ερευνητές στα εργαστήρια της Eli Lilly and Company ήταν οι πρώτοι που αναγνώρισαν το abemaciclib ως αντικαρκινικό παράγοντα και αναστολέα των CDK4 και CDK6 (Εικόνα 5.3.). Αργότερα, αποδείχθηκε ότι το abemaciclib είναι ένας ανταγωνιστικός αναστολέας των περιοχών δέσμευσης του ATP των CDK4 και CDK6, με 14 φορές μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι της CDK4 σε σχέση με την CDK6. Το abemaciclib επιλέχθηκε με βάση τη βιολογική του δραστηριότητα και την εξαιρετικά ειδική καταστολή των συμπλεγμάτων CDK4/κυκλίνης D1 και CDK6/κυκλίνης. Παρόμοια με το palbociclib, δεν ανιχνεύθηκε δραστηριότητα έναντι άλλων βασικών κινασών

που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Με τιμή IC_{50} που είναι πέντε φορές χαμηλότερη από αυτή του palbociclib και του ribociclib, το abemaciclib εμφανίζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για το σύμπλεγμα CDK4/κυκλίνη D1. Κατά τον προκλινικό χαρακτηρισμό του abemaciclib σε πολλαπλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του γλοιοβλαστώματος και του αίματος, η Gilbert et al. διαπίστωσε ότι το abemaciclib μπορεί να αναστείλει τη CDK4/6 ακόμη και σε νανομοριακές συγκεντρώσεις αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Rb, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 και βραδύτερο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Εξαιτίας των αξιοσημείωτων κλινικών αποτελεσμάτων του στον προχωρημένο καρκίνο του μαστού τύπου HR+ /HER2, αυτός ο αναστολέας διερευνάται τώρα σε διάφορες κλινικές δοκιμές φάσης I/II/III που βρίσκονται σε εξέλιξη, στοχεύοντας σε πολλαπλές κακοήθειες μόνος ή σε συνδυασμό με άλλες καθιερωμένες θεραπείες καρκίνου.^[40]

- *Trilaciclib*: Το Trilaciclib είναι ο πιο πρόσφατος αναστολέας των CDK4/6 3^{ης} γενιάς που αναπτύχθηκε από την G1 Therapeutics (πρώην G-Zero Therapeutics) για τη μυελοπροστασία, την πιθανή αντικαρκινική του αποτελεσματικότητα και τα οφέλη ασφάλειας σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία για τον καρκίνο, ιδιαίτερα στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και στο TNBC. Το trilaciclib προκαλεί παροδική, αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 σε πολλαπλασιαζόμενα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα στον μυελό των οστών, προστατεύοντάς τα από χημειοθεραπευτική βλάβη. Στις 12 Φεβρουαρίου του 2021, ο FDA ενέκρινε το trilaciclib για πρώτη φορά για να μειώσει τον κίνδυνο μυελοκαταστολής που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία σε ενήλικες όταν χορηγείται πριν από αντικαρκινικά φάρμακα που περιέχουν πλατίνη/ετοποσίδη ή ένα φάρμακο που περιέχει τοποτεκάνη για εκτεταμένου σταδίου μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ES-SCLC). Πολλαπλές μελέτες κατέδειξαν το trilaciclib ως ένα πολύ αποτελεσματικό, εκλεκτικό και αναστρέψιμο αναστολέα των CDK4 και CDK6.^[40]
- *Ribociclib*: Το Ribociclib αναπτύχθηκε από τη φαρμακευτική εταιρεία Novartis και εγκρίθηκε από τον FDA το 2017 για χρήση στη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του μαστού όταν συνδυάζεται με λετροζόλη (Εικόνα 5.3.). Το Ribociclib, όπως και άλλοι αναστολείς CDK 3^{ης} γενιάς, είναι ένας από του στόματος βιοδιαθέσιμος αναστολέας μικρού μοριακού βάρους που στοχεύει ειδικά τις CDK4/6, αναστέλλοντας έτσι τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος, εμποδίζοντας την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και διακόπτοντας τον στη φάση G1. Το Ribociclib έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη συσχέτιση των συμπλεγμάτων κυκλίνης D1 και CDK4 καθώς και συμπλεγμάτων κυκλίνης D3 και CDK6 και ότι είναι τέσσερις φορές πιο

επιλεκτικό στο CDK4 από το CDK6. Μια χημειοπρωτεϊνική μελέτη της δραστηριότητας του αναστολέα CDK4/6 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα έδειξε ότι το Ribociclib είναι πολύ πιο εκλεκτικό στις CDK4 και CDK6 σε σχέση με το Palbociclib.^[40]



Εικόνα5.3: Μια σύνοψη των πιο διαδεδομένων CDKIs 1ης, 2ης και 3ης γενιάς που έχουν αναπτυχθεί όλα αυτά τα χρόνια, η χημική τους δομή και οι CDKs που στοχεύουν.

5.6. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΥ RIBOCICLIB

Το Ribociclib, η εμπορική ονομασία του οποίου είναι Kisqali, είναι ένας δια του στόματος βιοδιαθέσιμος εκλεκτικός αναστολέας των πρωτεϊνικών κινάσων CDK4/6 τύπου ½ ικανός να καταστέλλει τη φωσφορυλίωση του Rb, προκαλώντας έτσι διακοπή της φάσης G1 του κυτταρικού κύκλου.

Το Ribociclib είναι ένα ανάλογο της πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνης όπου φέρει την ίδια πλευρική αλυσίδα της 2-αμινο-5-(πιπεραζιν-1-υλο)πυριδίνης με το Palbociclib. Η χρησιμότητα της πυρρολοπυριμιδίνης για την αναστολή των CDK4/6 κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τη Novartis το 2007. Οι διεκδικούμενες ενώσεις έδειξαν, επίσης, ανασταλτική δράση στη JAK3 και προφίλ χαμηλής επιλεκτικότητας έναντι των μελών των CDKs. Το 2010 η ίδια εταιρεία κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας επιλεκτικούς αναστολείς των CDK4/6, συμπεριλαμβανομένου και του Ribociclib.^[44]

Τα τελευταία χρόνια, η κλινική δραστηριότητα και η ασφάλεια του Ribociclib έχουν διερευνηθεί σε διάφορα περιβάλλοντα μέσω του προγράμματος κλινικών δοκιμών MONALEESA, το οποίο περιλαμβάνει τις δοκιμές MONALEESA-2, MONALEESA-3 και MONALEESA-7.

Η δοκιμή MONALEESA-2 είναι μία κλινική δοκιμή φάσης III για την αξιολόγηση του συνδυασμού του Ribociclib με τη λετροζόλη, έναν αναστολέα αρωματάσης, ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού.

Οι δοκιμές MONALEESA-3 και MONALEESA-7 είναι πιο πρόσφατες δοκιμές που διερευνούν νέες πληθυσμιακές ομάδες ασθενών και τον συνδυασμό αναστολέων των CDK4/6 ως θεραπεία πρώτης και δεύτερης γραμμής. Το MONALEESA-7 είναι μια δοκιμή φάσης III για τη μελέτη αναστολέων των CDK4/6 σε συνδυασμό με ταμοξιφαίνη ή ένα μη στεροειδή αναστολέα αρωματάσης σε πληθυσμό που αποτελείται εξ ολοκλήρου από προ/περ εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Στη δοκιμή MONALEESA-3, οι ερευνητές διερεύνησαν τον συνδυασμό αναστολέων των CDK4/6 με το φάρμακο fulvestrant σε μεικτό πληθυσμό (de novo, πρώτης γραμμής και δεύτερης γραμμής θεραπεία για προχωρημένη νόσο σε μετεμμηνοπαυσιακούς ασθενείς).

Τον Μάρτιο του 2017 εγκρίθηκε από τον FDA ένα δισκίο Ribociclib σε συνδυασμό με τον αναστολέα αρωματάσης letrozole, το οποίο στόχευε στη θεραπεία των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με HR-θετικό και αρνητικό, προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού.^[45]

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών:

Author/Year	Patients	Treatment	Results	Subgroup Analysis of OS (HR, 95% CI)	Subgroup Analysis of PFS (HR, 95% CI)
Slamon et al¹ MONALEESA-3	Postmenopausal HR+/HER2- advanced BC/ 0-1 prior endocrine tx for advanced BC (n=726)	● RIBO 600 mg/die, 21 days on/7 days off + FULV 500 mg im q 28d (n=484) ● PLAC + FULV 500 mg im q 28d (n=242)	Median PFS 20.5 vs 12.8 months (HR=0.59; 95% CI Median follow up 56.3 months: Median OS: 53.7 vs 41.5 months (HR=0.73; 95% CI 0.59-0.90) ORR: 32.4 vs 21.5% CBR: 70.2 vs 62.8%	Line of therapy: first vs second line ● 0.64 (0.46-0.88) vs 0.78 (0.59-1.04) Bone only metastases: yes vs no ● 0.67 (0.42-1.08) vs 0.74 (0.58-0.93) Visceral involvement: yes vs no ● 0.73 (0.55-0.98) vs 0.74 (0.54-1.01) Prior endocrine therapy: naïve vs resistance vs sensitive ● 0.62 (0.41-0.95) vs 0.82 (0.45-1.47) vs 0.73 (0.56-0.96)	Line of therapy: naïve vs second line ● 0.57 (0.41-0.8) vs 0.56 (0.42-0.74) Bone only metastases: yes vs no ● 0.37 (0.23-0.61) vs 0.65 (0.51-0.83) Visceral involvement: yes vs no ● 0.64 (0.48-0.86) vs 0.56 (0.41-0.76) Prior aromatase inhibitors: yes vs no ● 0.67 (0.5-0.88) vs 0.48 (0.34-0.66)
Hortobagyi et al^{2,5,7,8} MONALEESA-2	Postmenopausal HR+/HER2- recurrent/ metastatic BC, no prior systemic therapy (n=668)	RIBO 600 mg, 21 days on 7 days off + LETROZOLE 2.5 mg die (n=334) PLAC + LETROZOLE 2.5 mg die (n=334)	Median follow up 36.4 months ● median PFS 25.3 month vs 16 months HR:0.56 (95% CI: 0.457-0.704) ● ORR 42.5% vs 28.7% ● Median follow up 80 months ● OS (months) 63.9 vs 51.4 months (HR 0.76; 95% CI: 0.63-0.93)	Age: < 65y ≥65 years ● 0.51(0.39-0.68) vs 0.65(0.46-0.92) Liver or Lung mts: NO vs Yes ● 0.59 (0.42-0.83) vs 0.56(0.42-0.74) Bone only disease: NO vs Yes ● 0.55(0.43-0.70) vs 0.64(0.39-1.04) De novo disease: No vs Yes ● 0.57(0.44-0.74) vs 0.56(0.38-0.84) Prior ET: AI vs TAM vs None ● 0.37(0.23-0.59) vs 0.61(0.42-0.89) vs 0.65(0.46-0.90) Prior CT: No vs Yes 0.64(0.47-0.87) vs 0.50(0.36-0.68)	Age: < 65y ≥65 years ● 0.69(0.53-0.90) vs 0.87(0.64-1.17) Liver or Lung mts: NO vs Yes ● 0.71(0.53-0.96) vs 0.81(0.62-1.05) Bone only disease: NO vs Yes ● 0.77(0.61-0.96) vs 0.78(0.50-1.21) De novo disease: No vs Yes ● 0.91(0.72-1.15) vs 0.52(0.36-0.74) Prior ET: AI vs TAM vs None ● 0.63(0.32-1.24) vs 0.86(0.64-1.15) vs 0.69(0.52-0.94) Prior CT: No vs Yes 0.78(0.59-1.03) vs 0.74(0.56-0.98)
Tripathy et al⁴ Yardley et al⁷ Lu et al¹⁰ Harbeck et al¹⁴ MONALEESA-7	Premenopausal HR+/ HER2-, advanced BC (n=672)	● RIBO 600 mg, 21 days on, 7 days off + NSAI (n = 248) ● PLAC + NSAI (n = 247) ● RIBO 600 mg, 21 days on, 7 days off + TAM 20mg/die (n = 87) ● PLAC + TAM 20 mg/die (n = 90) ● All groups: Goserelin (3.6 mg subcutaneous q28)	Median follow up 19.2 months ● median PFS (months): ● -NSAI +RIBO/PLAC: 23.8 vs 13.0 (HR:0.55, 95% CI 0.44-0.69) ● -TAM+RIB/PLAC:22.1 vs 11.0 (HR: 0.59, 95% CI:0.39-0.88) ● ORR 41% RIBO group vs 30% placebo group ● Median follow up 53.5 months Median OS (months): NSAI +RIBO/PLAC 58.7 vs 47.7 (HR 0.80; 95% CI: 0.62-1.04) - TAM+RIBO/PLAC: not estimable vs 49.3 months (HR 0.71, 95% CI:0.45-1.10)	Age: < 40y ≥40 years ● 0.44 (0.29-0.67) vs 0.59(0.45-0.78) Liver or Lung mts: NO vs Yes ● 0.64 (0.45-0.91) vs 0.50(0.38-0.68) Bone only disease: NO vs Yes ● 0.53(0.42-0.69) vs 0.70(0.41-1.19) Prior ET (Neoadj/adj): No vs Yes ● 0.52(0.38-0.70) vs 0.62(0.44-0.89) Prior CT (Neoadj/adj): No vs Yes 0.41(0.28-0.60) vs 0.68(0.48-0.96)	Age: < 40y ≥40 years ● 0.65(0.43-0.98) vs 0.81(0.61-1.06) Liver or Lung mts: NO vs Yes ● 0.70(0.50-0.97) vs 0.83(0.61-1.13) Bone only disease: NO vs Yes ● 0.76(0.59-0.98) vs 0.77(0.47-1.28) Disease free interval: DeNovo vs Recurrent ● 0.52(0.35-0.78) vs 0.94(0.71-1.24) Prior (Neo)adj ET: NO vs Yes ● 0.71(0.52-0.97) vs 0.91(0.65-1.28) Prior (Neo)adj CT: No vs Yes 0.59(0.41-0.86) vs 0.97(0.69-1.36)

Εικόνα5.4.: Οι κλινικές δοκιμές φάσης III του Ribociclib για τη θεραπεία προχωρημένου καρκίνου του μαστού.^[45]

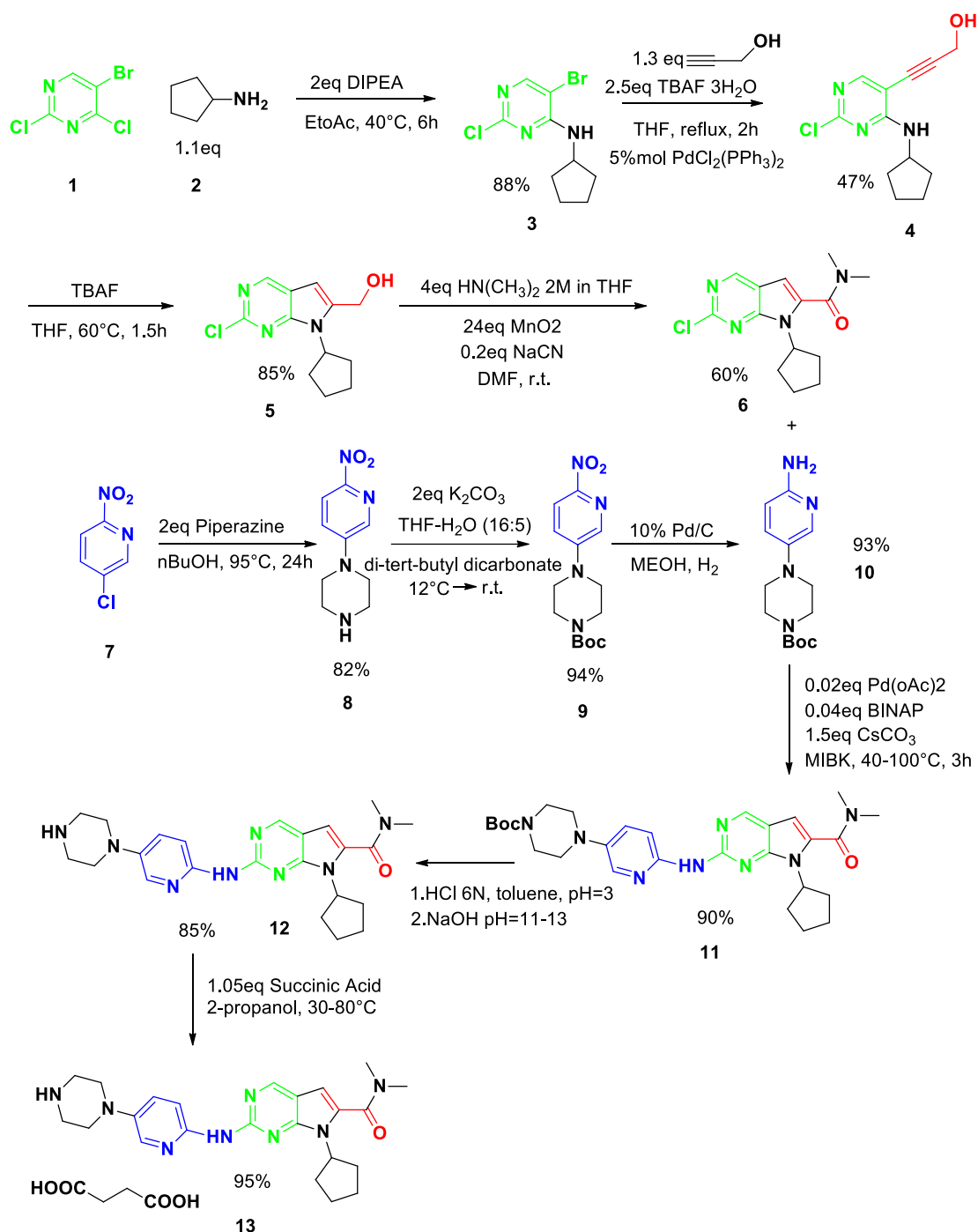
Μια πιο πρόσφατη έρευνα η οποία δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη, υπό την ονομασία HARMONIA επιδιώκει να ελέγξει εάν το Ribociclib βελτιώνει την πορεία του HR+/HER2-aBC αλλάζοντας τη βιολογία του όγκου για να επιτρέψει μια καλύτερη ανταπόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία σε σύγκριση με το Palbociclib. Ο HER2-inrched είναι ένας εγγενής υποτύπος που σχετίζεται με πολύ κακή πρόγνωση και ενδοκρινική αντίσταση, σε σύγκριση με τη νόσο του αυλού. Η παγκόσμια, πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, ανοιχτή κλινική μελέτη Φάσης III έχει ένα πρωτόγνωρα θετικό PFS. Το HARMONIA βρίσκεται σε εξέλιξη με προβλεπόμενη εγγραφή 456 ασθενών.^[46]

5.7. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ RIBOCICLIB

Η πρώτη κατοχυρωμένη πατέντα για το Ribociclib από την εταιρία Novartis κυκλοφόρησε το 2010 και σύμφωνα με αυτή, η ενδιάμεση χλωροπυριμιδίνη συντίθεται με μετατροπή της ακετάλης σε αλδεΐδη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται οξείδωση αλδεΐδης σε οξύ και σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Το Ribociclib προκύπτει τελικά μέσω μιας αντίδρασης σύζευξης Buchwald-Hartwig της χλωροπυριμιδίνης και της αμινοπυριδίνης, ακολουθούμενη από την Boc-αποπροστασία χρησιμοποιώντας HCl σε διοξάνιο (4N).

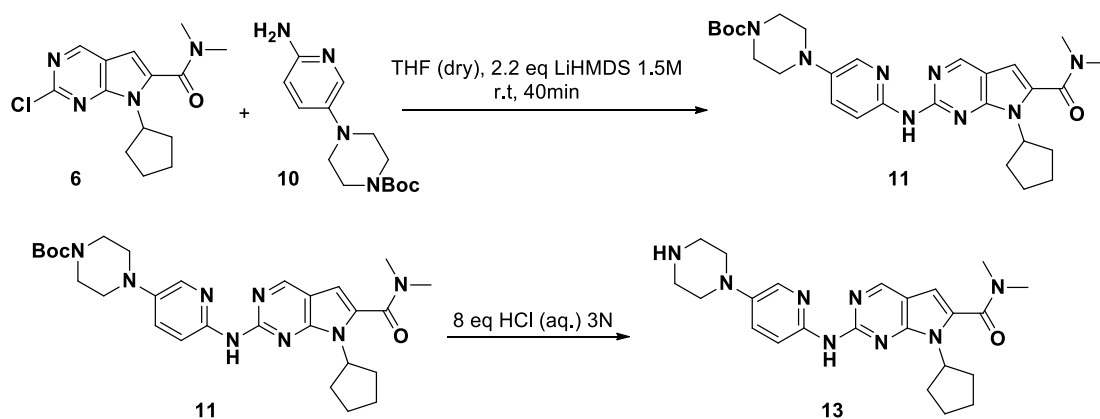
Η δεύτερη κατοχυρωμένη πατέντα από την εταιρία Novartis κυκλοφόρησε το 2011. Σύμφωνα με αυτή, ο σχηματισμός του πυρρολο-[2,3-d-]πυριμιδινικού δακτυλίου προκύπτει μέσω μιας αντίδρασης Sonogashira, η οποία ακολουθείται από μια αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης με τη βοήθεια TBAF ως μια ήπια βάση και σε διαλύτη THF. Το βασικό πλεονέκτημα αυτής της συνθετικής πορείας έναντι της πρώτης είναι η εξοικονόμηση διαλυτών και αντιδραστηρίων, καθώς η χλωροπυριμιδίνη συντίθεται σε λιγότερα στάδια και με λιγότερα αντιδραστήρια.

Η τρίτη κατοχύρωση για το φάρμακο κυκλοφόρησε το 2012 σύμφωνα με την οποία η συνολική απόδοση για τη σύνθεση του Ribociclib ως άλας του ηλεκτρικού οξέος είναι περίπου 15-16% (εικόνα 5.5).



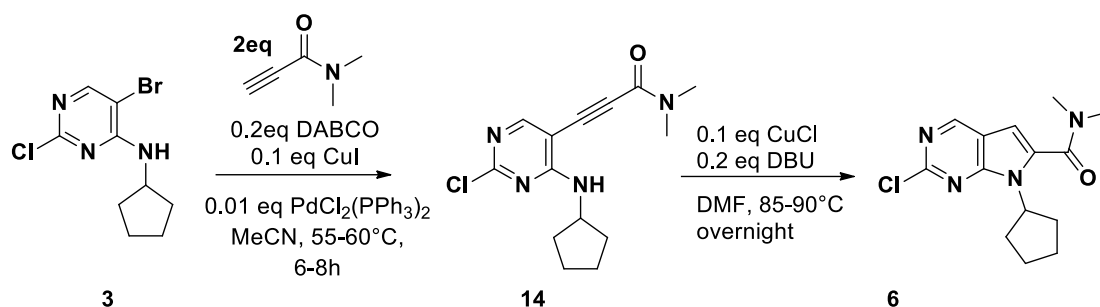
Εικόνα 5.5.: Τρίτη συνθετική πορεία του Ribociclib με κατοχυρωμένη πατέντα από τη Novartis (WO2012064805).

Το 2016 κατοχυρώθηκε η σύνθεση που αφορούσε στη βελτιστοποίηση της αντίδρασης σύζευξης Buchwald-Hartwig χωρίς τη χρήση του καταλύτη του παλλαδίου, αλλά με τη χρήση της ισχυρής βάσης LiHMDS σε THF και την αντίδραση Boc-αποπροστασίας να λαμβάνει χώρα με τη χρήση υδατικού διαλύματος HCl 3N, όπου λαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας του Ribociclib. Με τον τρόπο αυτό μειώθηκε το κόστος σύνθεσης και καθαρισμού, καθώς και ο απαιτούμενος χρόνος της ολικής σύνθεσης (εικόνα 5.6).



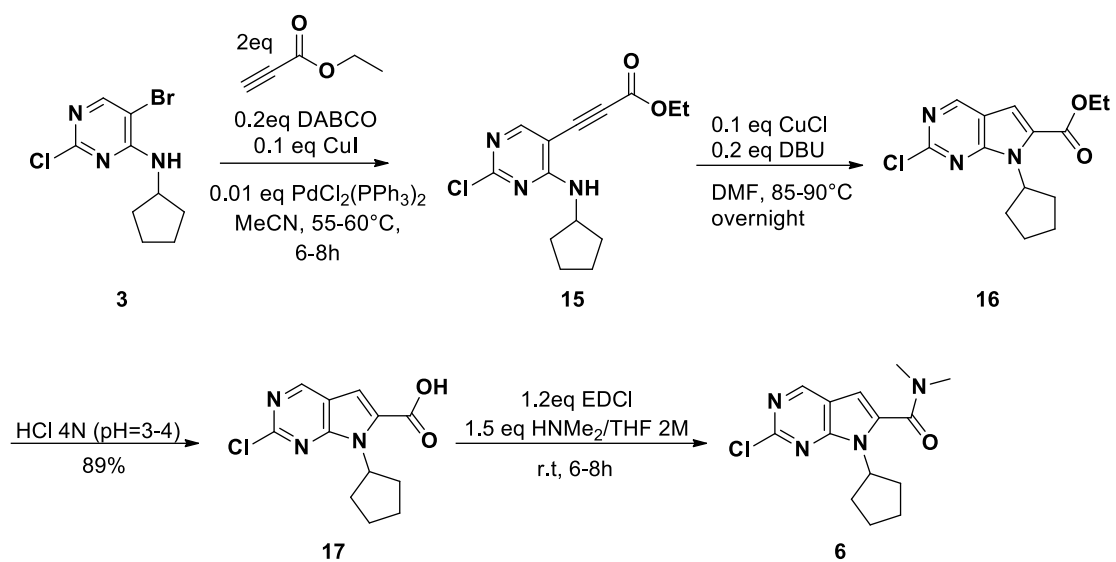
Εικόνα 5.6.: Η κατοχύρωση της Novartis το 2016.

Το 2017 κατοχυρώθηκε από την Suzhou MiracPharma Technology μια ακόμη συνθετική πορεία για το Ribociclib, σύμφωνα με την οποία η χλωροπυριμιδίνη συντίθεται με τη χρήση *N,N*-διμεθυλοπροπαργυλικού αμιδίου και στο επόμενο στάδιο λαμβάνει χώρα μια κυκλοποίηση καταλυόμενη από ιόντα Cu(I). Η απόδοση της συνθετικής πορείας της ένωσης είναι περίπου 71% (εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.7.: Η κατοχύρωση από την Suzhou MiracPharma Technology το 2017 (CN106478641).

Το 2017, η Novartis κατοχύρωσε μια ακόμα μέθοδο, όπου η χλωροπυριμιδίνη συντίθεται με τη χρήση προπαργυλικών εστέρων. Ωστόσο, μετά το στάδιο της κυκλοποίησης απαιτείται αλκαλική υδρόλυση του εστέρα προς καρβοξυλικό οξύ και σύζευξη με διμεθυλαμίνη. Η απόδοση αυτής της συνθετικής πορείας είναι πολύ υψηλή (51%). Θα πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι το κόστος των προπαργυλικών εστέρων σε σχέση με αυτό της προπαργυλικής αλκοόλης είναι πολύ πιο υψηλό.^[47]



Εικόνα 5.8.: Η πατέντα της Novartis το 2017 (CN106478641).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συζήτηση αποτελεσμάτων

6.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ CDK4/6

Κατά τη διατριβή του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός νέων μορίων μικρού μοριακού βάρους αναλόγων του Ribociclib, ως εν δυνάμει αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών CDK4/6. Η σύνθεση αυτών των αναλόγων έγινε με σκοπό την αύξηση της δραστηριότητάς τους και της εκλεκτικότητας τους έναντι των CDK4/6 σε σχέση με το Ribociclib. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν, αρχικά, μέσω ηλεκτρονικών πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με τη βοήθεια των προγραμμάτων AutoDock Vina, Chimera και Discovery Studio.

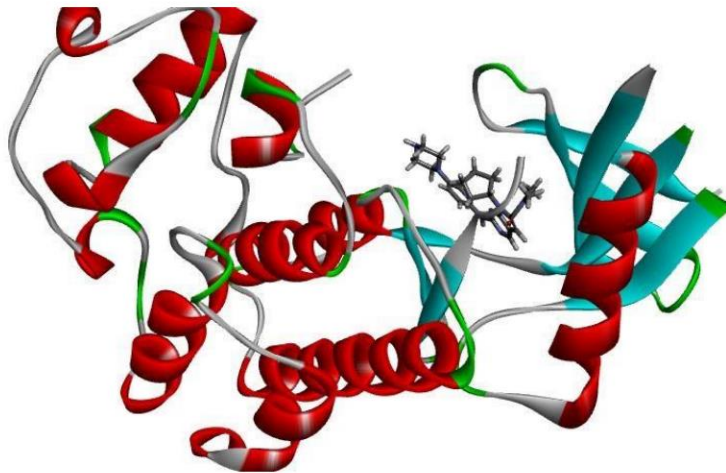
Για την εξαγωγή συμπερασμάτων έγινε μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου πρωτεϊνικών κινασών και στη συνέχεια ακολούθησε ο λογικός σχεδιασμός αναλόγων του Ribociclib, με βάση το μοριακό σκελετό του φαρμάκου. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, η απομόνωση και η ταυτοποίηση των ενδιάμεσων της πορείας και των αναλόγων του Ribociclib. Η συνθετική πορεία του φαρμάκου είναι μια συγκλίνουσα πορεία που χωρίζεται σε δύο μέρη και στη συνέχεια μέσω μιας αντίδρασης σύζευξης προκύπτει η τελική ένωση. Επιπροσθέτως, έγιναν προσπάθειες για βελτιστοποίηση της συνθετικής πορείας του φαρμάκου. Οι ενώσεις, τόσο οι τελικές όσο και όλες οι ενδιάμεσες, μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών.

6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ RIBOCICLIB

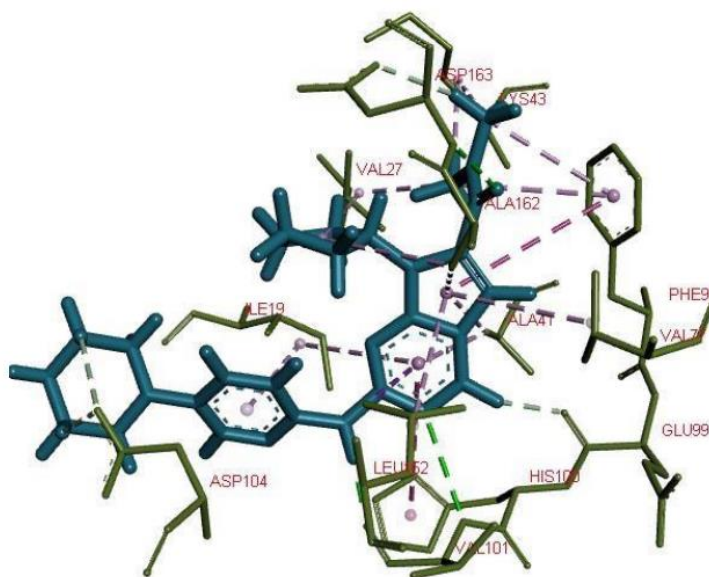
Για την εξαγωγή αποτελεσμάτων έγινε μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης CDK6. Κατά τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης εξαλείφθηκαν τα μόρια νερού από τη κρυσταλλογραφική δομή, προστέθηκαν φορτία όπου αυτό ήταν απαραίτητο, καθώς και τα άτομα υδρογόνου. Τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης στο κάθε ανάλογο πραγματοποιήθηκαν με βάση τη δομή του Ribociclib και της CDK6.

Το ΔG (ελεύθερη ενέργεια Gibbs) για το Ribociclib με τη CDK6 είναι -11,0 kcal/mol, σύμφωνα με το AutoDock Vina. Στα νέα ανάλογα που σχεδιάστηκαν δεν πραγματοποιήθηκαν αλλαγές στον 5,7-διαζαϊνδολικό δακτύλιο, καθώς από την μελέτη της δομής συγκρυστάλλωσης της CDK6 και του Ribociclib, διαπιστώθηκε ότι ο διαζαϊνδολικός δακτύλιος συνεισφέρει στην ανασταλτική δράση του μορίου. Αυτό συμβαίνει διότι το φάρμακο δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου, που είναι ισχυρές αλληλεπιδράσεις, με το ενεργό κέντρο της κινάσης μέσω αυτού του δακτυλίου. Επιπλέον, τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης (docking) έδειξαν πως ο πιπεραζινικός δακτύλιος δεν βοηθά στην αλληλεπίδραση του φαρμάκου με το ενεργό

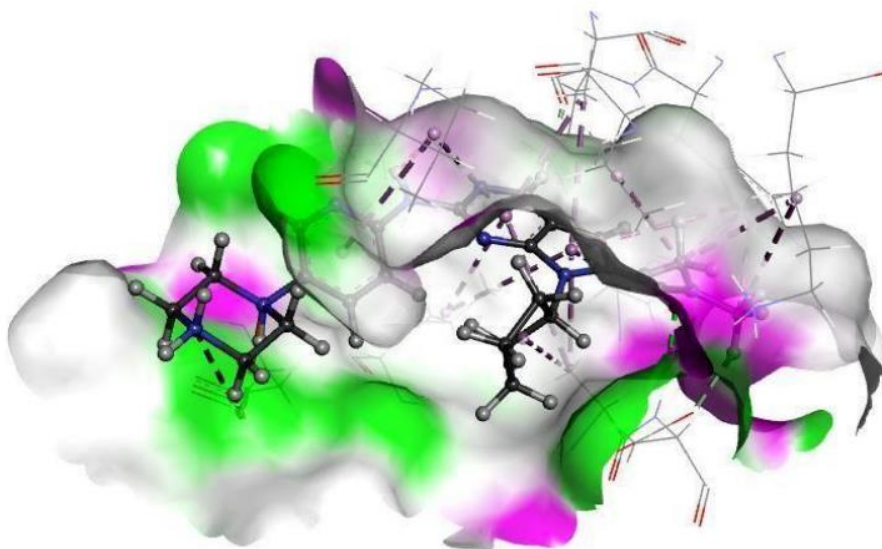
κέντρο και έτσι σε μερικά ανάλογα πραγματοποιήθηκε αλλαγή στο σημείο αυτό, κυρίως με την προσθήκη μιας ανιλίνης.



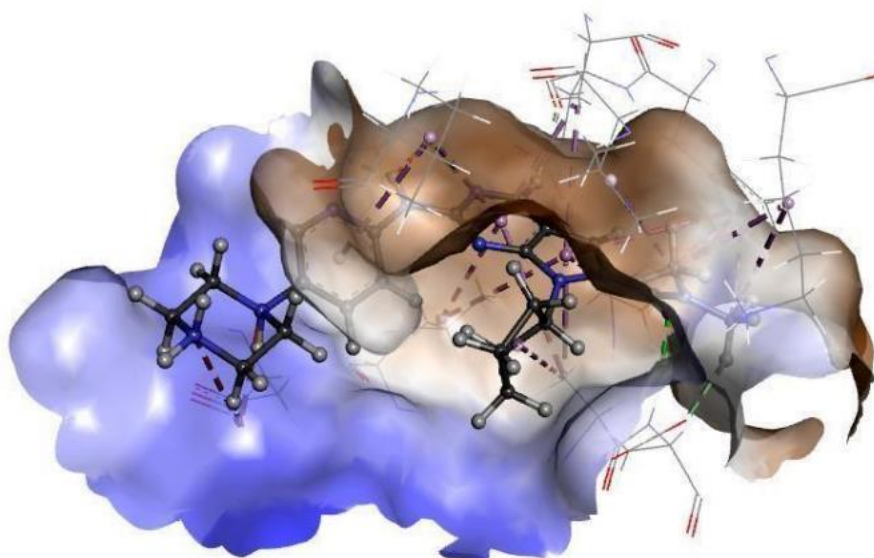
Εικόνα 6.1.: Κρυσταλλογραφική δομή της CDK6 με το Ribociclib.



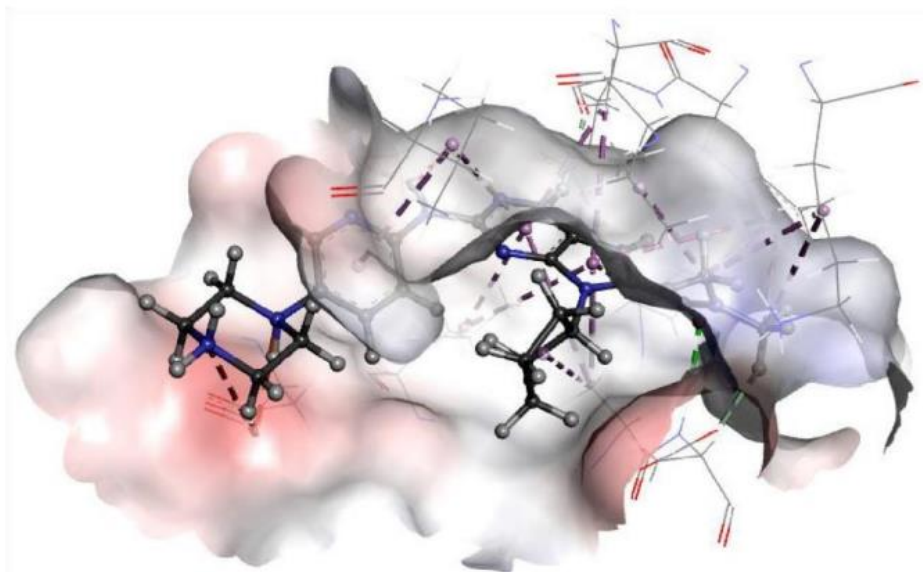
Εικόνα 6.2.: 3D κρυσταλλογραφική απεικόνιση του Ribociclib με τις αλληλεπιδράσεις του με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6.



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



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

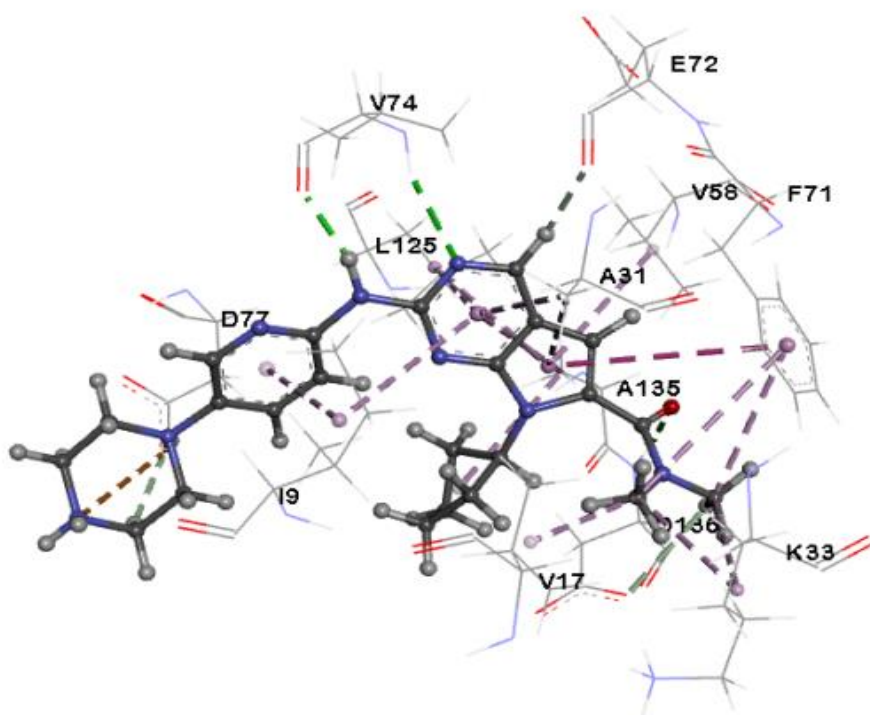


Εικόνα 6.5.: Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας του φορτίου που εμφανίζει το Ribociclib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της CDK6 όπου δίνονται οι επιφάνειες του ενεργού κέντρου με τα αμινοξέα που εμφανίζουν ηλεκτροθετικότητα (κόκκινο) και αυτά που εμφανίζουν ηλεκτραρνητικότητα (μπλε).

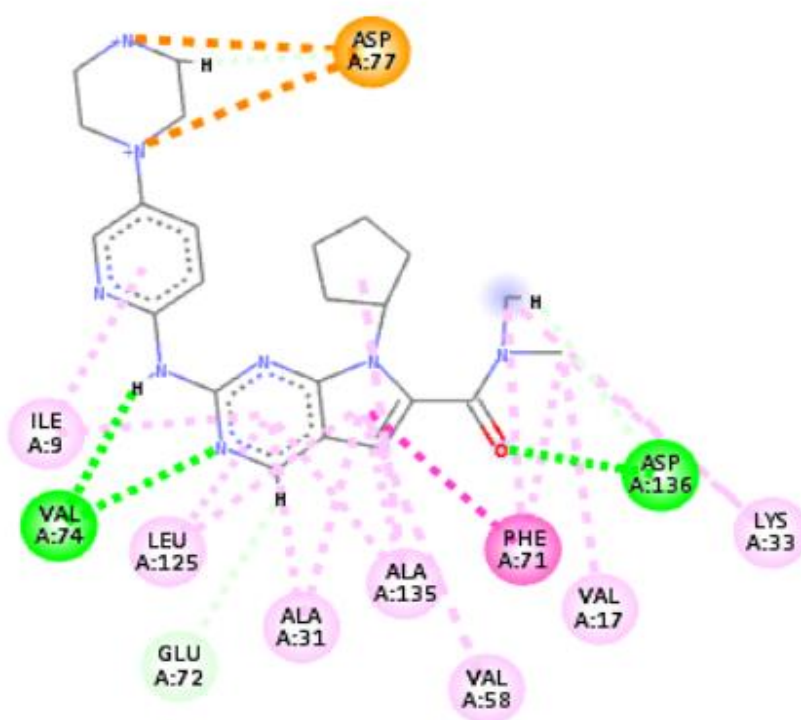
Άλλη μια παρατήρηση είναι ότι γύρω από τον πυριδινικό και τον πιπεραζινικό δακτύλιο υπάρχει επιφάνεια πλούσια σε δέκτες και δότες δεσμών υδρογόνου. Έτσι η επόμενη σκέψη ήταν ότι μπορούν να πραγματοποιηθούν στους δακτυλίους αυτούς προσθήκες ομάδων που δύνανται να σχηματίσουν αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι η περιοχή γύρω από τον πυριδινικό δακτύλιο είναι υδρόφιλη, οπότε θα μπορούσαν να προστεθούν υδρόφιλες ομάδες έτσι ώστε να αυξηθεί η ανασταλτική δράση του μορίου.

Το Ribociclib αλληλεπιδρώντας με το ενεργό κέντρο της CDK6 εμφανίζει τις εξής αλληλεπιδράσεις:

- 3 δεσμούς υδρογόνου (πράσινο χρώμα): το καρβονυλικό οξυγόνο του καρβοξαμιδίου δρα ως δέκτης δεσμού υδρογόνου και σχηματίζει δεσμό με την αμινική ομάδα του ασπαραγινικού οξέος Asp136. Επίσης, η αμινική ομάδα δρα ως δότης δεσμού υδρογόνου και σχηματίζει δεσμό με την καρβοξυλική ομάδα της βαλίνης Val74 και, τέλος, το πυριμιδινικό άτομο αζώτου δρα ως δέκτης δεσμού υδρογόνου και σχηματίζει δεσμό με την αμινομάδα της βαλίνης Val74.
- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του καρβοξυλικού ανιόντος του Asp77 με το δακτύλιο της πιπεραζίνης.
- 9 pi-akyl ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις



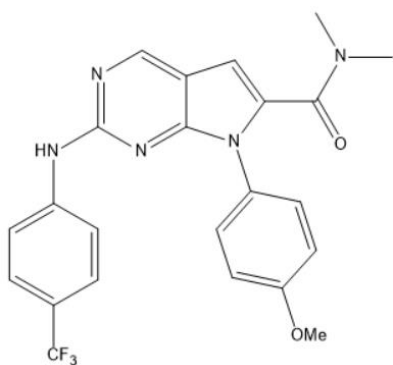
Εικόνα 6.6.: Οι προκύπτουσες 3D αλληλεπιδράσεις του Ribociclib με την CDK6 από μοριακή μοντελοποίηση.



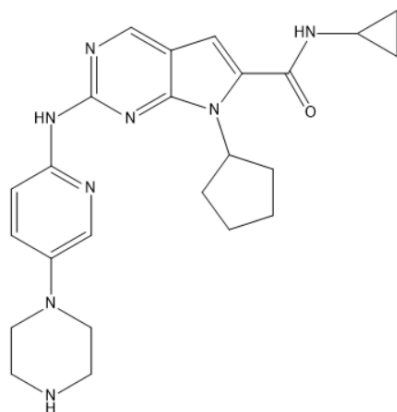
Εικόνα 6.7.: Οι 2D αλληλεπιδράσεις του Ribociclib με την CDK6 μετά από μοριακή μοντελοποίηση.

6.3. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ RIBOCICLIB ΩΣ ΕΝ ΔΥΜΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ CDK4/6

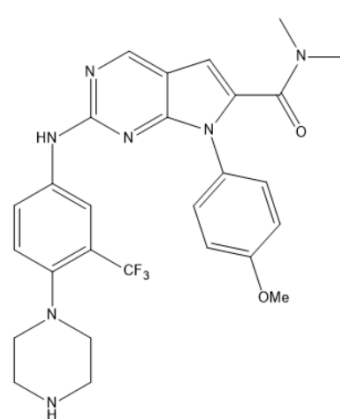
Για τον σχεδιασμό των αναλόγων του Ribociclib βασιστήκαμε στα παραπάνω πειράματα μοριακής μοντελοποίησης. Δεν πραγματοποιήθηκαν αλλαγές στον διάζαινδολικό δακτύλιο και την καρβοξυλική ομάδα, καθώς συνεισφέρουν στην αλληλεπίδραση του φαρμάκου με την πρωτεϊνική κινάση μέσω των δεσμών υδρογόνου. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν την αντικατάσταση των μεθυλομάδων του αμιδίου με άλλους πιο ογκώδεις υποκαταστάτες. Σχεδιάστηκαν, επίσης, ανάλογα με αντικατάσταση του πενταμελούς δακτυλίου με αρωματικούς δακτυλίους (υποκατεστημένοι βενζολικοί δακτύλιοι). Ένα πλήθος στοχευμένων τροποποιήσεων έλαβαν χώρα στον πυριδινικό δακτύλιο. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν είτε την αντικατάσταση του πυριδινικού δακτυλίου με υποκατεστημένη ανιλίνη (-CF₃ ομάδα) και προσάρτηση της πιπεραζίνης, είτε την κατάργηση του πιπεραζινικού δακτυλίου και την αντικατάσταση της πυριδίνης με υποκατεστημένες ανιλίνες. Τέλος, έγινε αντικατάσταση του πιπεραζινικού δακτυλίου με τη μορφολίνη.



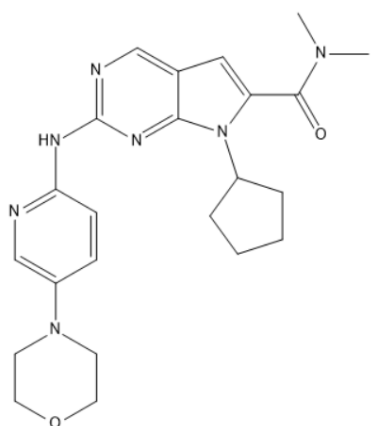
Rib 1



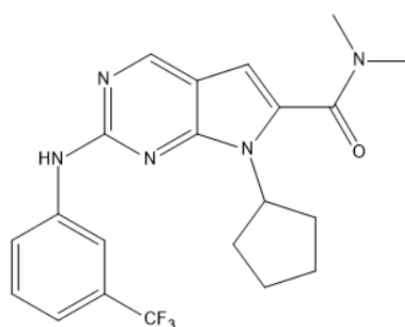
Rib 2



Rib 3



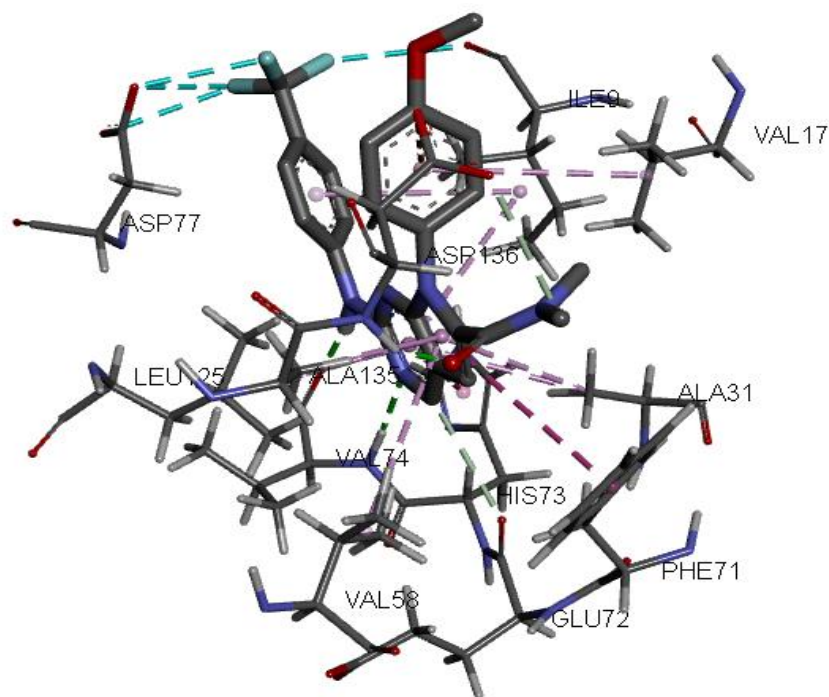
Rib 4



Rib 5

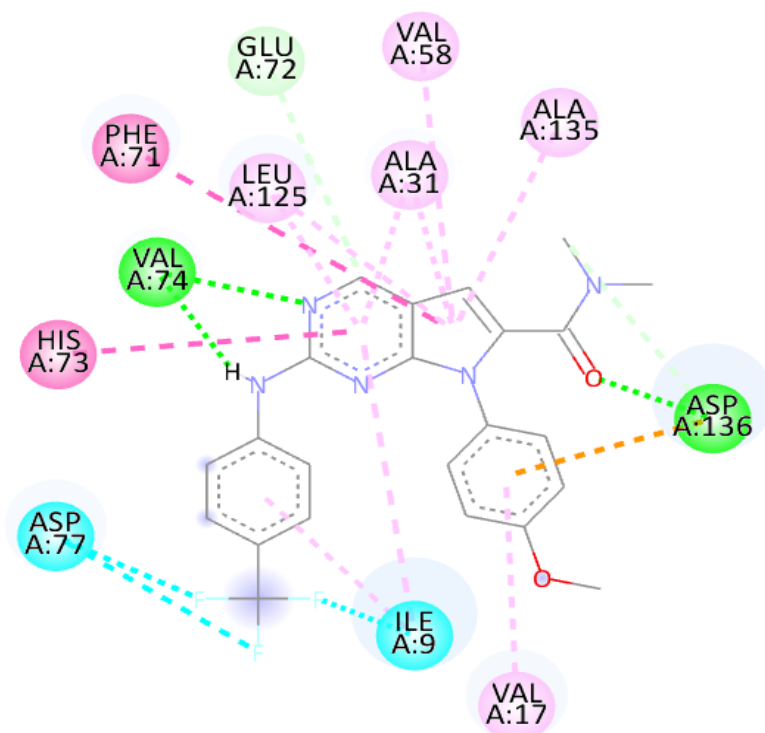
6.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ DOCKING ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ RIBOCICLIB

6.4.1. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 1



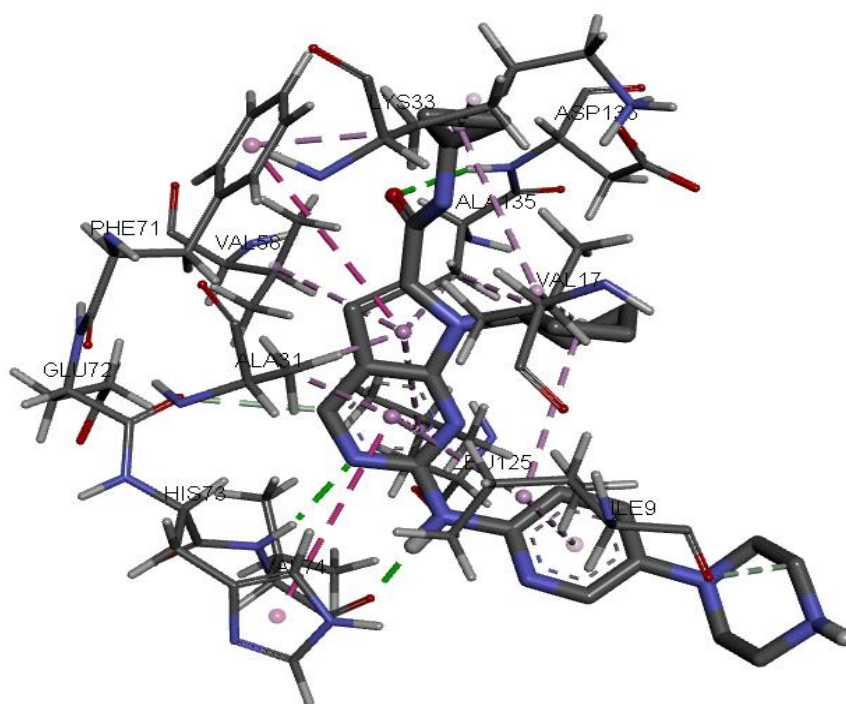
$\Delta G = -11.2 \text{ kcal/mol}$

Εικόνα 6.8.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 1.



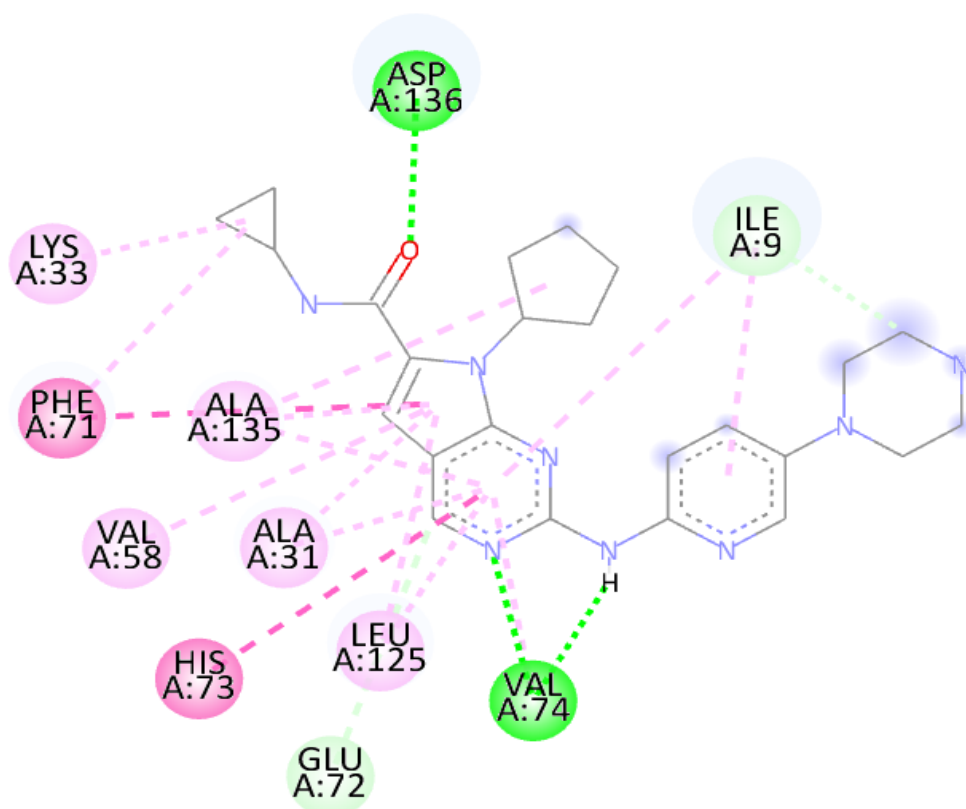
Εικόνα 6.9.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 1.

6.4.2. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 2



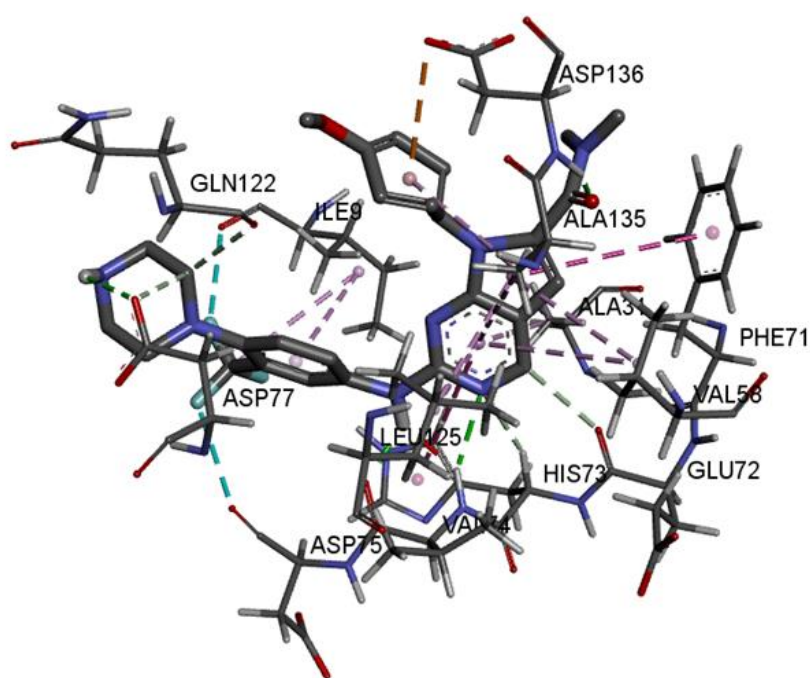
$$\Delta G = -10.8 \text{ kcal/mol}$$

Εικόνα 6.10.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 2.



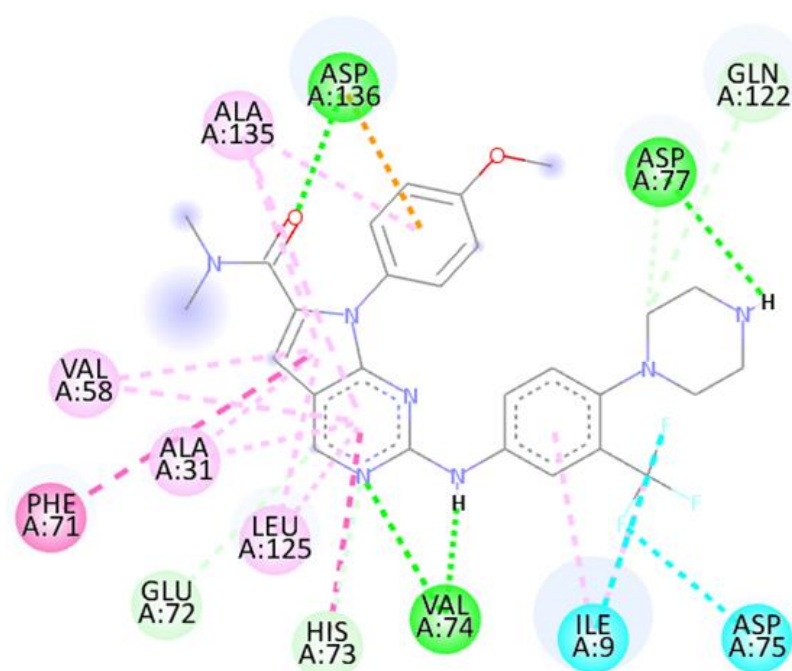
Εικόνα 6.11.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 2.

6.4.3. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 3



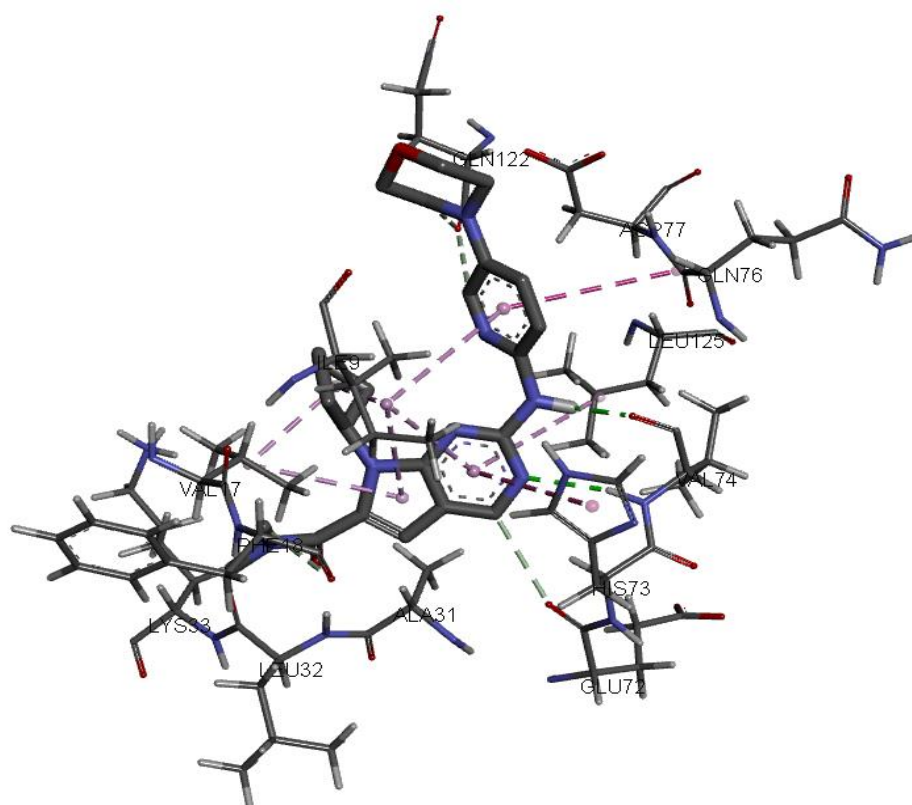
$\Delta G = -11.4 \text{ kcal/mol}$

Εικόνα 6.12.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 3.



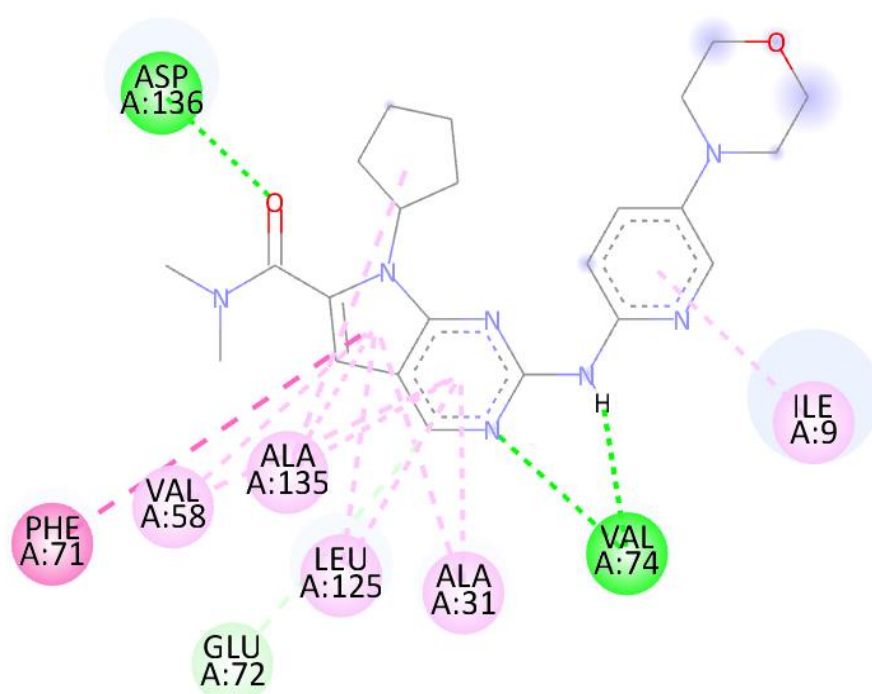
Εικόνα 6.13.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 3.

6.4.4. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 4



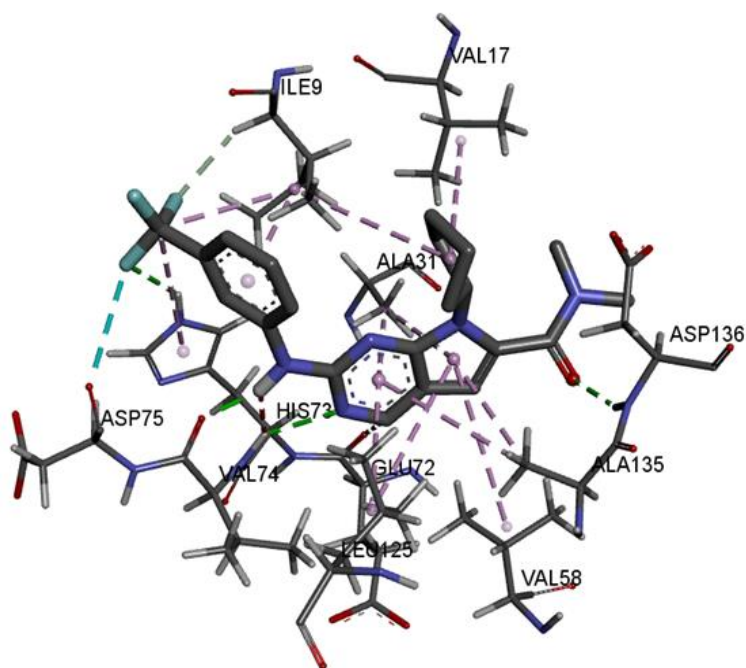
$\Delta G = -10.6 \text{ kcal/mol}$

Εικόνα 6.14.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 4.



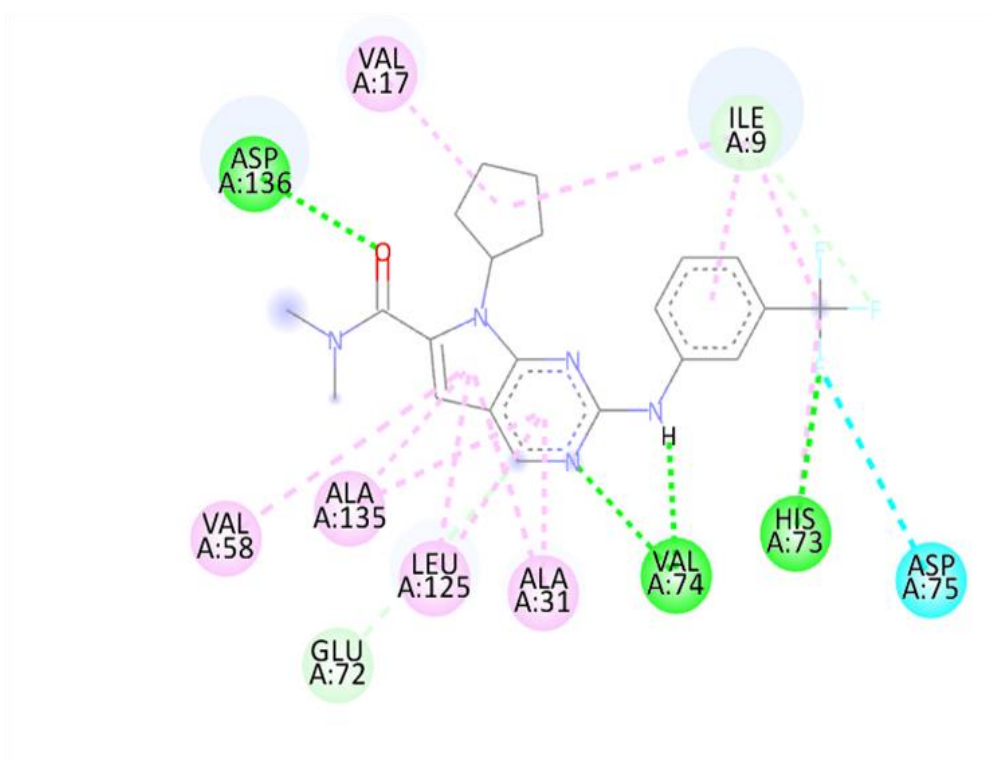
Εικόνα 6.15.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 4.

6.4.5. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Rib 5



$$\Delta G = -10.5 \text{ kcal/mol}$$

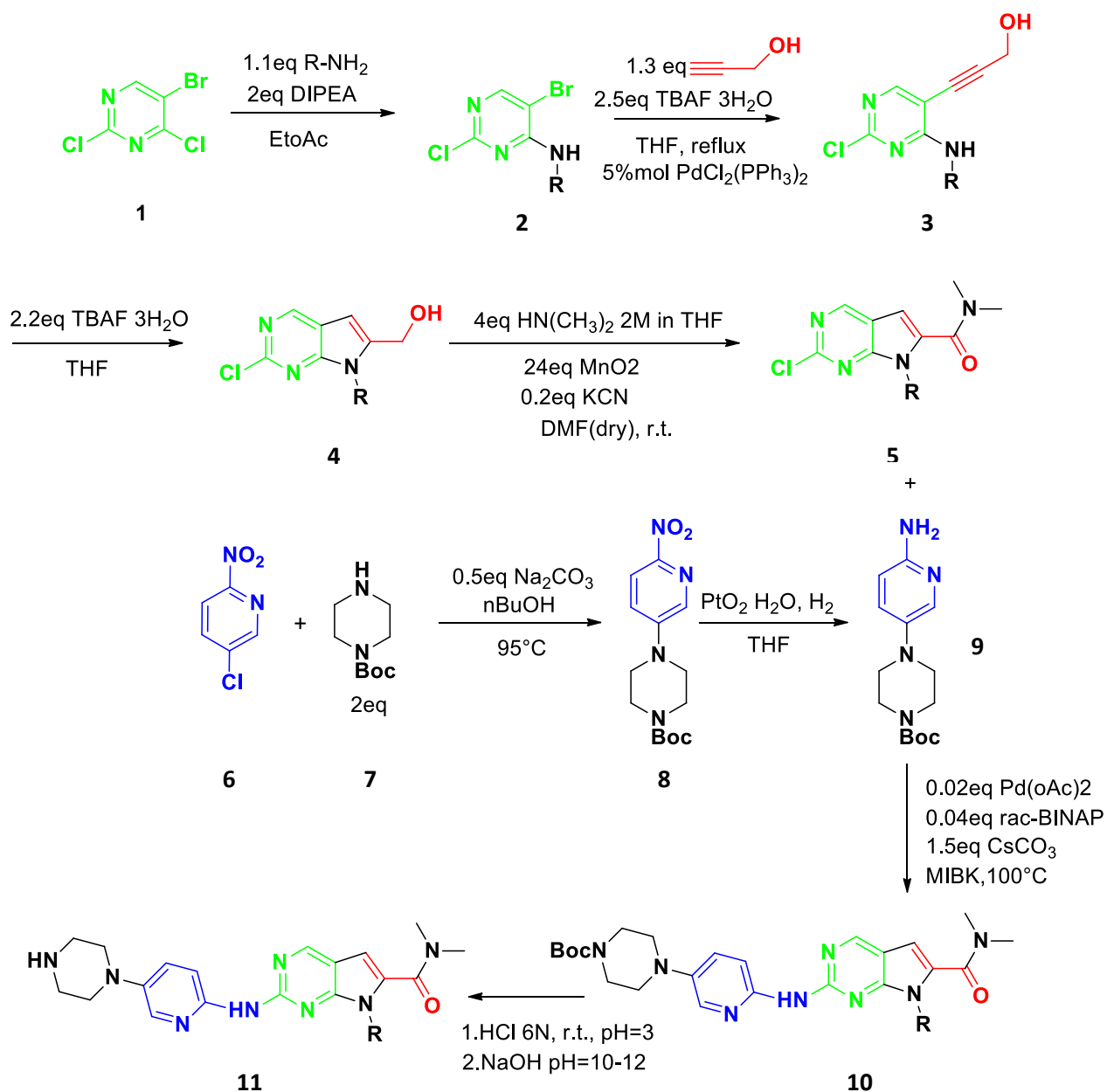
Εικόνα 6.16.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 5.



Εικόνα 6.17.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της CDK6 με το Rib 5.

6.5. ΟΛΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η σύνθεση των αναλόγων έγινε σύμφωνα με την κλασική μέθοδο σύνθεσης που προτείνει η εταιρία Novartis, με μερικές τροποποιήσεις σε κάποια συνθετικά βήματα.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

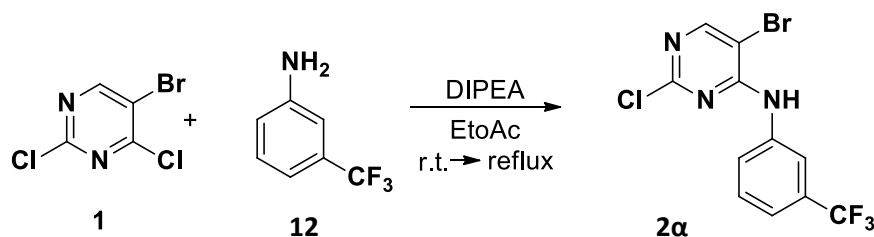
Σύνθεση νέων αναλόγων του Ribociclib

7.1. ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ορισμένα δοκιμαστικά πειράματα για το πρώτο στάδιο σύνθεσης νέων αναλόγων ώστε να επιλεγθεί αυτό με την υψηλότερη απόδοση για τη συνέχιση της πειραματικής πορείας.

7.1.1. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-(τριφθορομεθυλο)-φαινυλο)πυριμιδινο-4-αμίνη 2α

Η αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **2α** είναι μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ως αρχικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν η 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη και η 3-τριφθορομεθυλο-ανιλίνη τα οποία αντιδρούν σε αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση της βάσης DIPEA (N,N-Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά από θερμοκρασία δωματίου έως το σημείο βρασμού του διαλύτη (77.1°C) και ο σχηματισμός του προϊόντος ξεκίνησε ουσιαστικά όταν η θερμοκρασία έφτασε σε συνθήκες βρασμού.

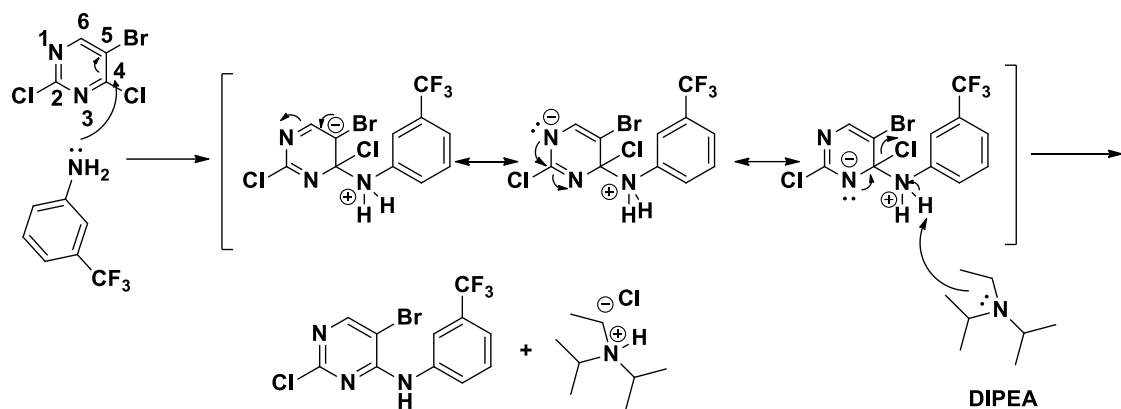


Σχήμα 7.1: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 2α.

Ο μηχανισμός της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης περιλαμβάνει δύο στάδια:

A) την προσβολή του δακτυλίου της 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνης από το πυρηνόφιλο, την 3-τριφθορομεθυλ-ανιλίνη.

B) την αποχώρηση του ατόμου του χλωρίου, καθώς και του πρωτονίου από το άτομο του αζώτου.

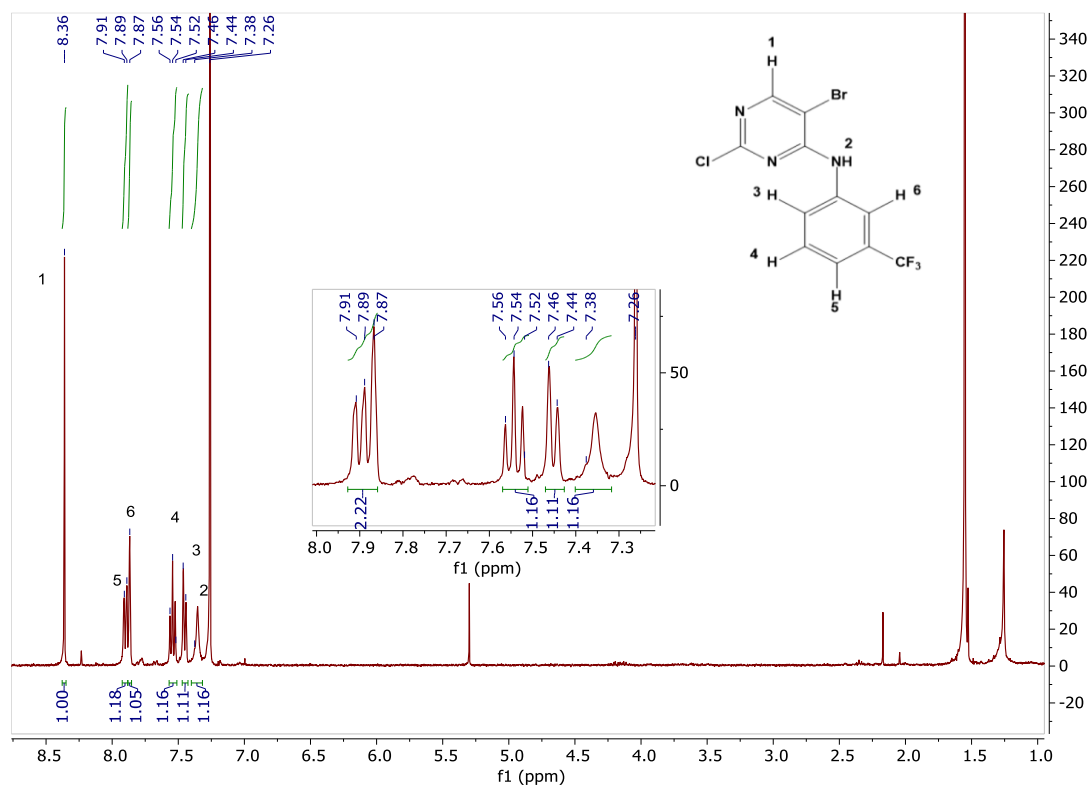


Σχήμα 7.2: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **2α**.

Το χλώριο στην 4-θέση είναι το πλέον καλό αποχωρών άτομο σε αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, καθότι το ενδιάμεσο ανιονικής φύσεως προϊόν πυρηνόφιλης προσθήκης (σύμπλοκο Meisenheimer) σταθεροποιείται ισχυρότερα από ό,τι το αντίστοιχο προϊόν στη 2-θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου.

7.1.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-τριφθορομεθύλο)φαινυλο)πυριμιδino-4-αμίνη (2α)

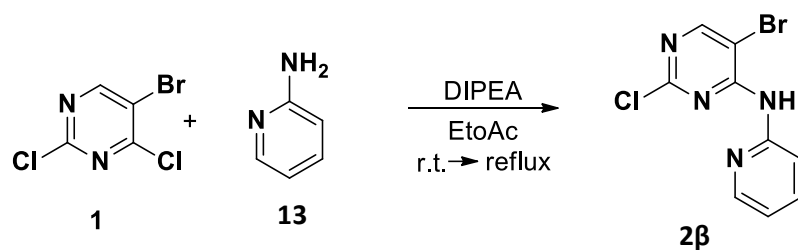
Σύμφωνα με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 28, το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο λόγω του γειτονικού αζώτου της πυριμιδίνης και η κορυφή του εμφανίζεται στα 8.36 ppm ως απλή, καθώς δεν υπάρχουν γειτονικά πρωτόνια. Στα 7.90 ppm και ως διπλή κορυφή με $^3J=7.7$ Hz εντοπίζεται το H5 αφού έχει ένα γειτονικό πρωτόνιο και γειτνιάζει με την τριφθορομεθύλ- ομάδα η οποία μέσω του π -I επαγωγικού φαινομένου έλκει ισχυρά τα ηλεκτρόνια προς το μέρος της αποπροστατεύοντας το H5. Σε αμέσως υψηλότερα πεδία, στα 7.87 ppm εντοπίζεται το H6 και εμφανίζεται στο φάσμα ως απλή κορυφή, καθώς σε γειτονικό άνθρακα δεν υπάρχει κάποιο πρωτόνιο. Ακολουθεί το H4 στα 7.55 ppm ως τριπλή κορυφή $^3J=7.9$ Hz και το H3 ως διπλή κορυφή στα 7.45 ppm με $^3J=7.9$ Hz. Τέλος, το αμινικό πρωτόνιο εμφανίζεται ως ευρεία κορυφή στα 7.38 ppm.



Σχήμα 7.3: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης 2α.

7.1.3. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(πυριδιν-2-υλο)πυριμιδιν-4-αμίνη (2β)

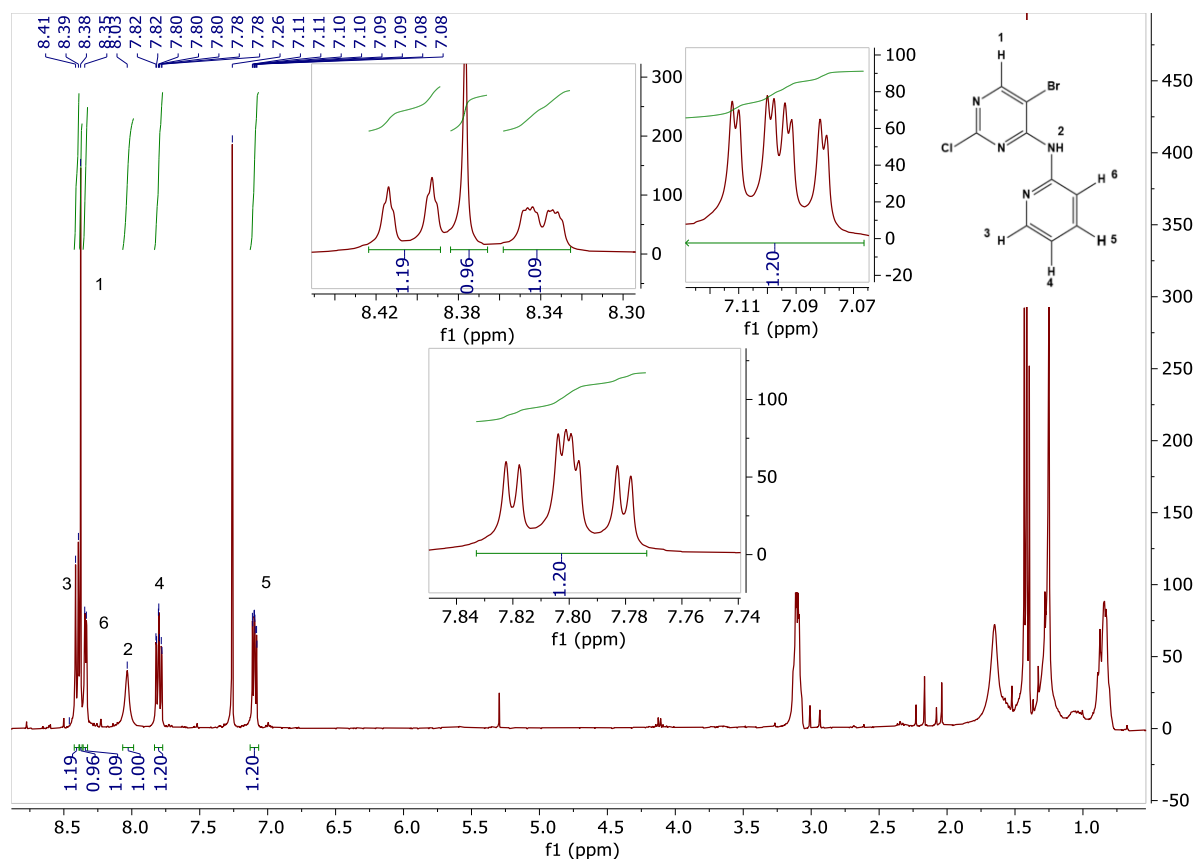
Για τη σύνθεση της ένωσης **2β**, χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικά αντιδραστήρια η 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη και η πυριδιν-2-αμίνη τα οποία αντιδρούν σε αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση DIPEA (*N,N*-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά από θερμοκρασία δωματίου έως το σημείο βρασμού του διαλύτη (77.1 °C) και ο σχηματισμός προϊόντος καταγράφηκε όταν η θερμοκρασία έφτασε σε συνθήκες βρασμού.



Σχήμα 7.4: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **2β**.

7.1.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(πυριδιν-2-υλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2β)

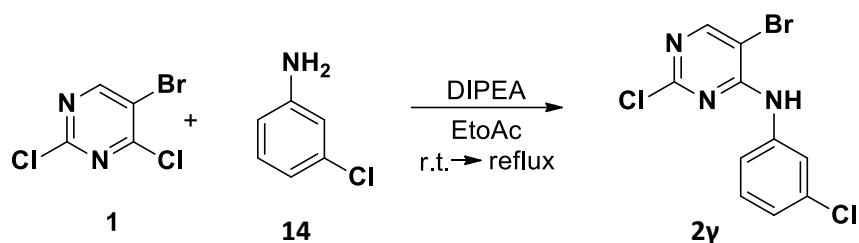
Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης **2β** είναι το αρωματικό πρωτόνιο H3 το οποίο καταγράφεται στα 8.45 ppm ως μια διπλή κορυφή με $J=8.3$ Hz. Στα 8.38 ppm και ως απλή κορυφή συντονίζεται το αρωματικό H1 αφού δεν γειτνιάζει με άλλο πρωτόνιο. Ακολουθεί το πρωτόνιο H6 στα 8.35 ppm ως διπλή κορυφή με $^3J=4.9$ Hz. Η πολλαπλότητα στη σχάση οφείλεται στο ότι εμφανίζει αλληλεπιδράσεις λόγω σχάσης spin-spin μακράς απόστασης με τα H4 και H2. Σε αμέσως υψηλότερα πεδία εντοπίζουμε την ευρεία κορυφή του αμινικού H2 στα 8.03 ppm και το H4 στα 7.80 ppm ως διπλή της διπλής της διπλής λόγω των γειτονικών H3 και H5 και σχάση μακράς απόστασης με το H6 και $J=9.3, 7.3, 1.9$ Hz. Τέλος, το πρωτόνιο H5 συντονίζεται στα 7.10 ppm ως διπλή της διπλής της διπλής αφού υπάρχουν δύο γειτονικά πρωτόνια και επιπλέον εμφανίζει αλληλεπίδραση με το H3.



Σχήμα 7.5: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **2β**.

7.1.5.Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-χλωροφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2γ)

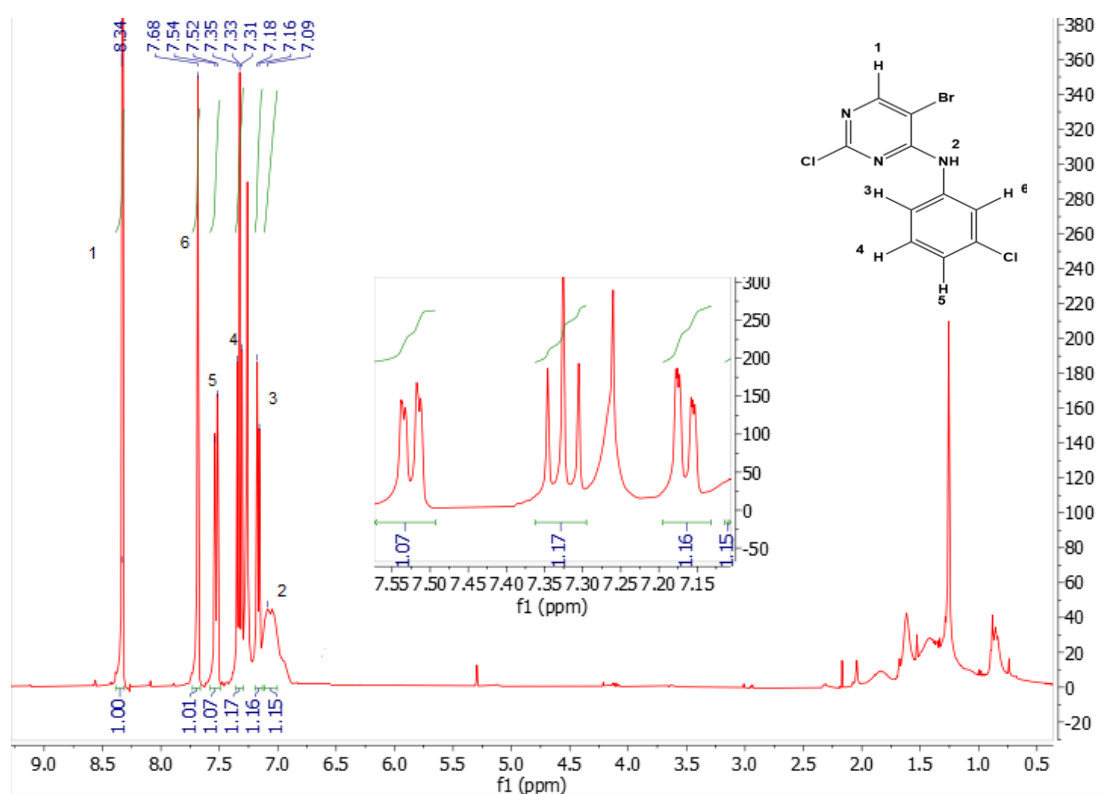
Για τη σύνθεση της ένωσης **2γ** ως αρχικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν η 5-βρώμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη και η 3-χλωρο-ανιλίνη, οι οποίες αντιδρούν σε αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση DIPEA (*N,N*-Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα μέσω ενός μηχανισμού πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά από θερμοκρασία δωματίου έως το σημείο βρασμού του διαλύτη και ο σχηματισμός προϊόντος ξεκίνησε σε συνθήκες βρασμού.



Σχήμα 7.6: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **2γ**.

7.1.6.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-χλωροφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2γ)

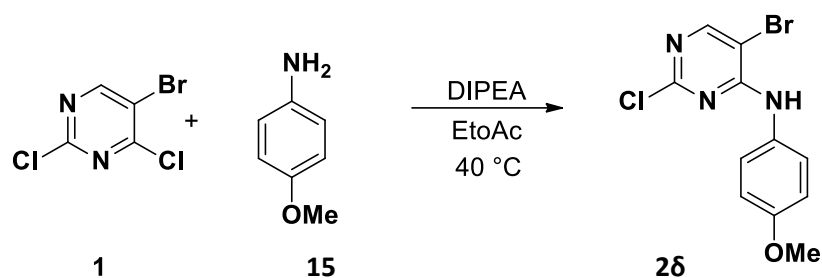
Σύμφωνα με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **2γ**, το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο λόγω του αζώτου της πυριμιδίνης, με το οποίο γειτνιάζει, και συντονίζεται στα 8.34 ppm ως απλή κορυφή αφού δεν υπάρχουν γειτονικά πρωτόνια. Στα 7.68 ppm ως απλή κορυφή εντοπίζεται το H6. Σε αμέσως υψηλότερα πεδία, στα 7.54 ppm, εντοπίζεται το H5 με μια διπλή της διπλής λόγω του γειτονικού H4 $^3J=7.7$ Hz και της αλληλεπίδρασης με το H3 $^4J=1.7$ Hz. Ακολουθεί το H4 ως μια τριπλή κορυφή στα 7.33 ppm και $^3J=8.1$ Hz και το H3 ως μια διπλή της διπλής της διπλής στα 7.16 ppm με $J=8.0, 2.0, 1.0$ Hz. Τέλος, εντοπίζεται το αμινικό πρωτόνιο H2 ως μια ευρεία κορυφή στα 7.09 ppm.



Σχήμα 7.7: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **2γ**.

7.1.7.Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2δ)

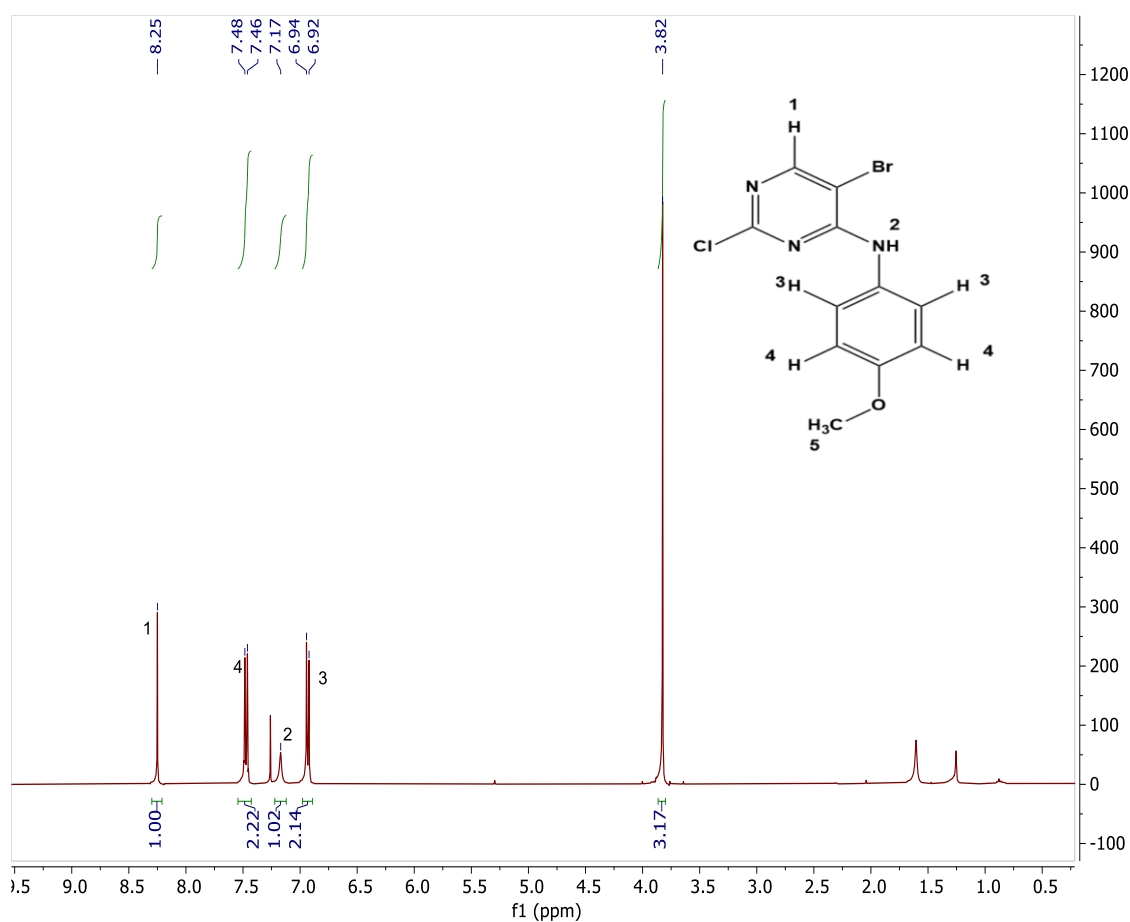
Η σύνθεση της ένωσης **2δ** επιτυγχάνεται με τη χρήση ως αρχικών αντιδραστηρίων της 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνης και της 4-μεθοξυ-ανιλίνης οι οποίες αντιδρούν σε αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση DIPEA (*N,N*-Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα μέσω ενός μηχανισμού πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ο σχηματισμός του προϊόντος είναι σχεδόν ακαριαίος λόγω της αυξημένης πυρηνοφιλίας του παραγώγου της ανιλίνης. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά από θερμοκρασία δωματίου έως 40°C ώστε να ληφθεί το προϊόν σε μεγαλύτερη απόδοση.



Σχήμα 7.8: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **2δ**.

7.1.8.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδινο-4-αμίνη (2δ)

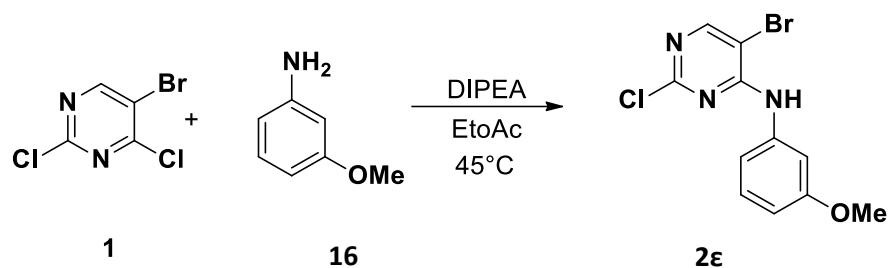
Στο φάσμα της ένωσης **2δ** ως το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο και ως μια απλή κορυφή στα 8.25 ppm εμφανίζεται το H1 της πυριμιδίνης, καθώς το ηλεκροαρνητικό άτομο του αζώτου έλκει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα προς το μέρος του. Οι δύο διπλές κορυφές στα 7.47 ppm $J=9.0$ Hz και 6.93 ppm $J=9.0$ Hz αντιστοιχούν στα πρωτόνια H4 και H3, αντίστοιχα. Η χημική μετατόπιση στα 7.14 ppm αντιστοιχεί στο αμινικό πρωτόνιο H2. Τέλος, τα πρωτόνια H5 της μεθοξυ- ομάδας εντοπίζονται στα 3.82 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 3.



Σχήμα 7.9: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **2δ**.

7.1.9.Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2ε)

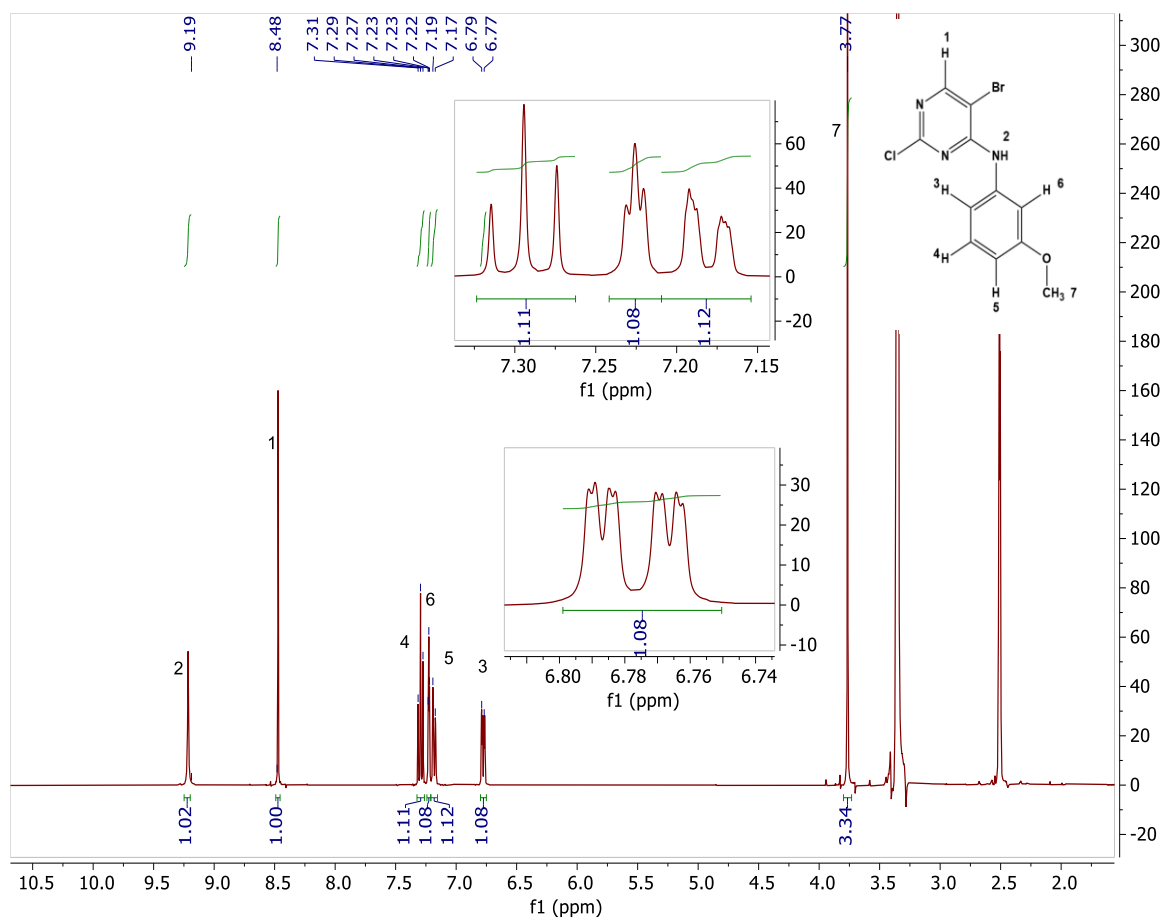
Η σύνθεση της ένωσης **2ε**, λαμβάνει χώρα μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ως αρχικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν η 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη και η 3-μεθοξυ-ανιλίνη, τα οποία αφέθηκαν να αντιδράσουν υπό αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση DIPEA (*N,N*-Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα μέσω ενός μηχανισμού πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ο σχηματισμός του προϊόντος παρατηρείται στους 40-45 °C.



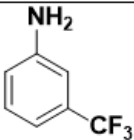
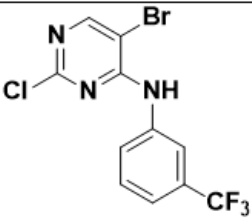
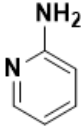
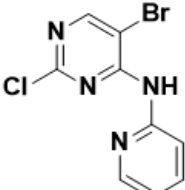
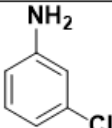
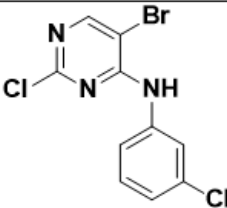
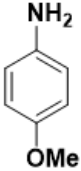
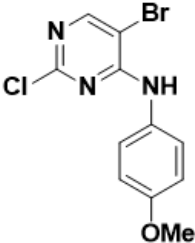
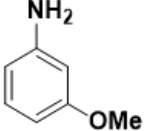
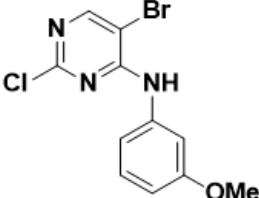
Σχήμα 7.10: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **2ε**.

7.1.10.Φασματοσκοπικά δεδομένα ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3-μεθοξυφαινυλ)πυριμιδίνη-4-αμίνη (2ε)

Στο φάσμα της ένωσης **2ε** συντονίζεται το πρωτόνιο H1 της πυριμιδίνης ως απλή κορυφή στα 8.48ppm. Το αμινικό πρωτόνιο H2 συντονίζεται επίσης, ως μια απλή στα 9.19 ppm. Ακολουθεί το πρωτόνιο H4 ως μια τριπλή κορυφή στα 7.29 ppm με $^3J=8.1$ Hz , αφού γειτνιάζει με τα H3 και H5. Στα 7.23 ppm εμφανίζεται το πρωτόνιο H6 με $^4J=2.3$ Hz λόγω του H5 και H2. Σε ακόμη ισχυρότερο πεδίο στα 7.67 ppm καταγράφεται το H3 ως μια διπλή της διπλής και $^3J=8.0$ Hz $^4J=2.2$ Hz. Τέλος, Η χημική μετατόπιση στα 3.77 ppm αντιστοιχεί στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξο-ομάδας.



Σχήμα 7.11: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης **2ε**.

Υπόστρωμα	Προϊόν	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
		EtOAc	77,1 °C (reflux)	24h	40,25%
		EtOAc DMF Dioxane(dry)	77,1°C (reflux) 85°C→101°C	48h 52h 48h	13% 13% ίχνη
		EtOAc	77,1°C (reflux)	24h	23%
		EtOAc	40°C	20min	98%
		EtOAc	55°C	3h	84%

Εικόνα 7.12: Πίνακας δοκιμαστικών αντιδράσεων του πρώτου σταδίου της ολικής συνθετικής πορείας.

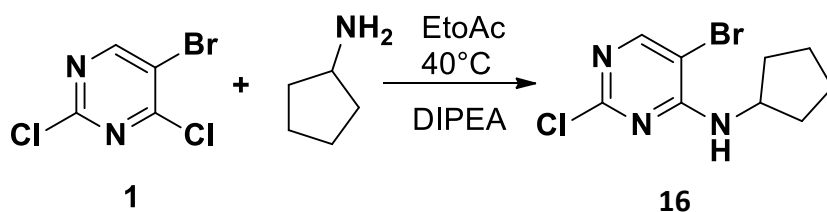
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, λόγω της πολύ καλής απόδοσης και μικρότερου χρόνου αντίδρασης συνεχίστηκαν οι προσπάθειες σύνθεσης αναλόγων του Ribociclib στην μεταπτυχιακή έρευνα χρησιμοποιώντας την 4-μεθόξυ ανιλίνη, ένωση **15**.

7.2.ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ RIBOCICLIB

Στόχο αποτελεί η σύνθεση της τελικής ένωσης **Rib 1**, όπου αντικαταστάθηκε η πιπεραζίνη με την 4-τριφθορομεθυλοανιλίνη και τον πενταμελή δακτύλιο με την υποκατεστημένη ανιλίνη (p-μεθοξυ-ανιλίνη), μέσω μιας απευθείας σύζευξης Buchwald-Hartwig στην χλωροπυριμιδίνη. Παράλληλα, έγιναν προσπάθειες για την βελτιστοποίηση της πειραματικής πορείας στο στάδιο της σύνθεσης του αμιδίου για αύξηση της απόδοσης μέσω οξείδωσης Jones της αλκοόλης στο αντίστοιχο οξύ και στη συνέχεια επεξεργασία με SOCl_2 και $\text{HN}(\text{CH}_3)_2$.

7.2.1.Σύνθεση της 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιдино-4-αμίνης (16)

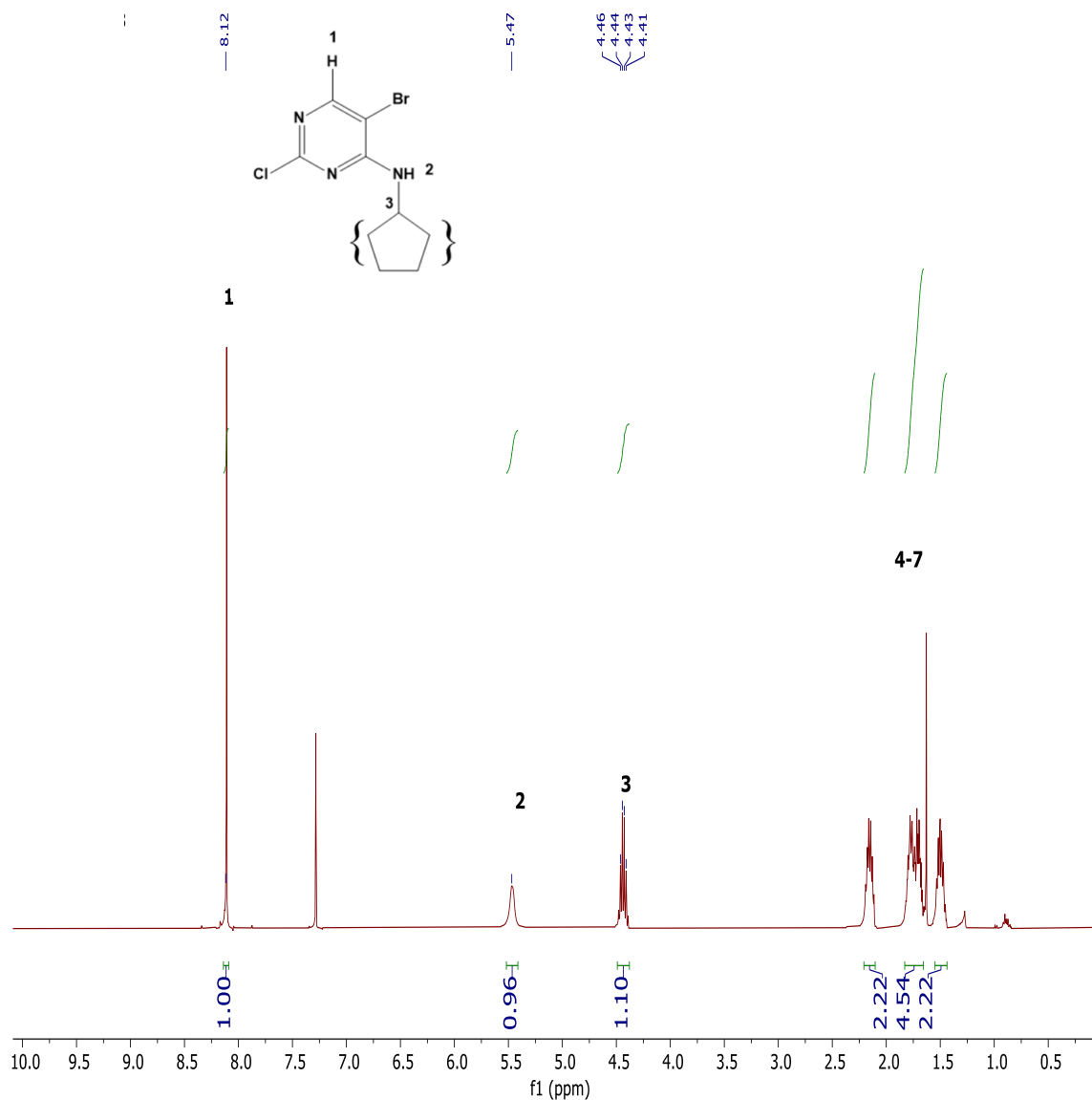
Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης για τη σύνθεση της ένωσης **16**. Ως αρχικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν η 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη και η κυκλοπεντυλαμίνη τα οποία αντιδρούν σε αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση DIPEA (*N,N*-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα στους 40 °C, μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.



Εικόνα 7.13: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης **16**.

7.2.2.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη (16)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **16**, σε ασθενή πεδία εντοπίζεται το αρωματικό H1 στα 8.12 ppm. Στα 5.47 ppm καταγράφεται ως ευρεία κορυφή το αμινικό πρωτόνιο H2. Στα 4.44 ppm συντονίζεται το χαρακτηριστικό πρωτόνιο H3 του πενταμελούς δακτυλίου ως μια εξαπλή κορυφή. Τέλος, τα πρωτόνια H4-H7 του πενταμελούς δακτυλίου εμφανίζονται ως πολλαπλές κορυφές, αλληλεπικαλυπτόμενες στην περιοχή 2.15-1.50 ppm με συνολική ολοκλήρωση 8.

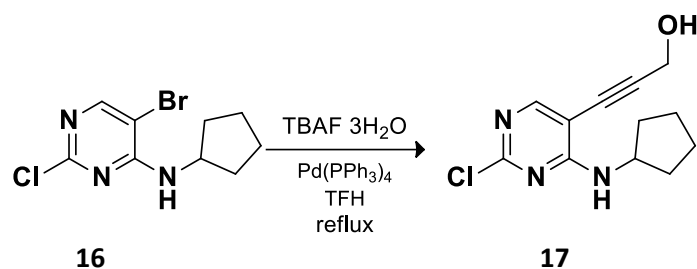


Σχήμα 7.14: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **16**.

7.2.3.Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλοαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (17)

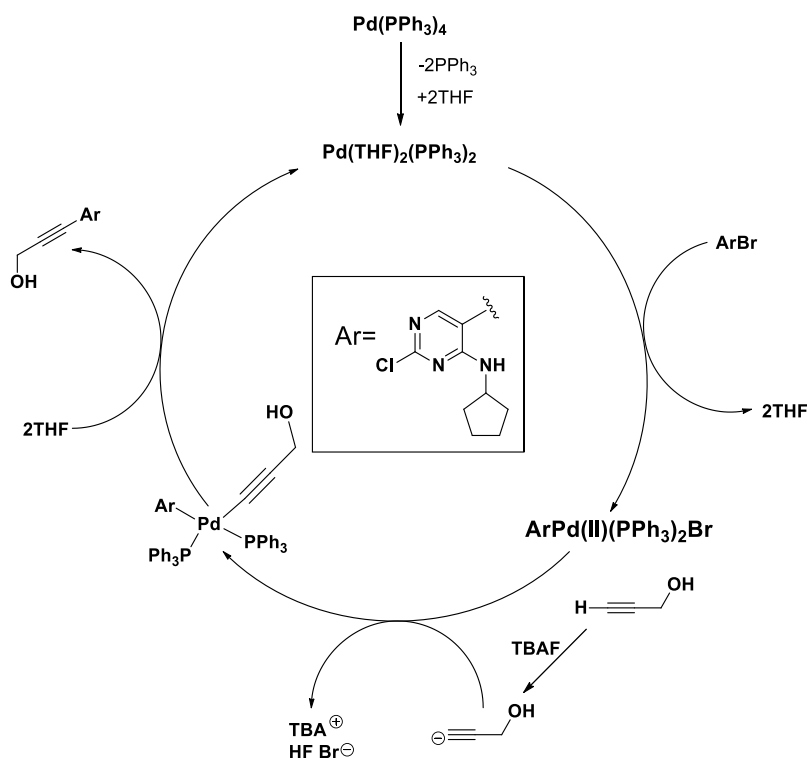
Η σύνθεση της ένωσης **17** πραγματοποιείται μέσω μιας τροποποιημένης αντίδρασης Sonogashira, καθώς ο καταλυτικός της κύκλος δεν περιλαμβάνει κάποιο καταλύτη αλάτων Cu(I) όπως στην κλασική Sonogashira. Το προϊόν Sonogashira συντέθηκε χρησιμοποιώντας ως αρχικά αντιδραστήρια την ένωση **16**, την προπαργυλική αλκοόλη κι έναν καταλύτη παλλαδίου, το $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$.

Αντί για κάποια κλασική βάση για την αποπρωτονίωση του όξινου αλκινικού υδρογόνου όπως κάποια ογκώδης αμίνη, χρησιμοποιήθηκε το $\text{TBAF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ως πηγή ιόντων F^- και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το THF σε συνθήκες βρασμού.^[48,49]



Σχήμα 7.15: Αντίδραση σχηματισμού του προϊόντος Sonogashira **17**.

Κατά τον έλεγχο της αντίδρασης με TLC παρατηρήθηκε ο σχηματισμός αρκετών παραπροϊόντων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι σε ένα μικρό ποσοστό δημιουργείται και το προϊόν κυκλοποίησης λόγω της περίσσειας TBAF σε συνθήκες βρασμού.



Σχήμα 7.16: Καταλυτικός κύκλος τροποποιημένης αντίδρασης Sonogashira.

Διενεργήθηκε μια σειρά δοκιμαστικών αντιδράσεων με σκοπό την αντικατάσταση του TBAF·3H₂O με DIPEA και τριαιθυλαμίνη, χωρίς όμως ενθαρρυντικά αποτελέσματα καθώς στην πρώτη περίπτωση είχαμε σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος σε ίχνη, ενώ στην δεύτερη περίπτωση δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του προϊόντος.

Επιπλέον, έγινε αντικατάσταση του TBAF·3H₂O με διάλυμα TBAF 75% σε νερό. Η αποδόσεις ήταν αντίστοιχες με αυτές κατά τη χρήση του στερεού άλατος TBAF·3H₂O .

Τέλος, έγιναν προσπάθειες αντικατάστασης του καταλύτη παλλαδίου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ο καταλύτης Pd(PPh₃)₂Cl₂, ο οποίος χρησιμοποιείται εναλλακτικά από τον Pd(PPh₃)₄ σύμφωνα με τη Novartis. Διατηρώντας, όμως, τις συνθήκες σταθερές και αλλάζοντας μόνο τον καταλύτη δεν υπήρξε σχηματισμός προϊόντος.

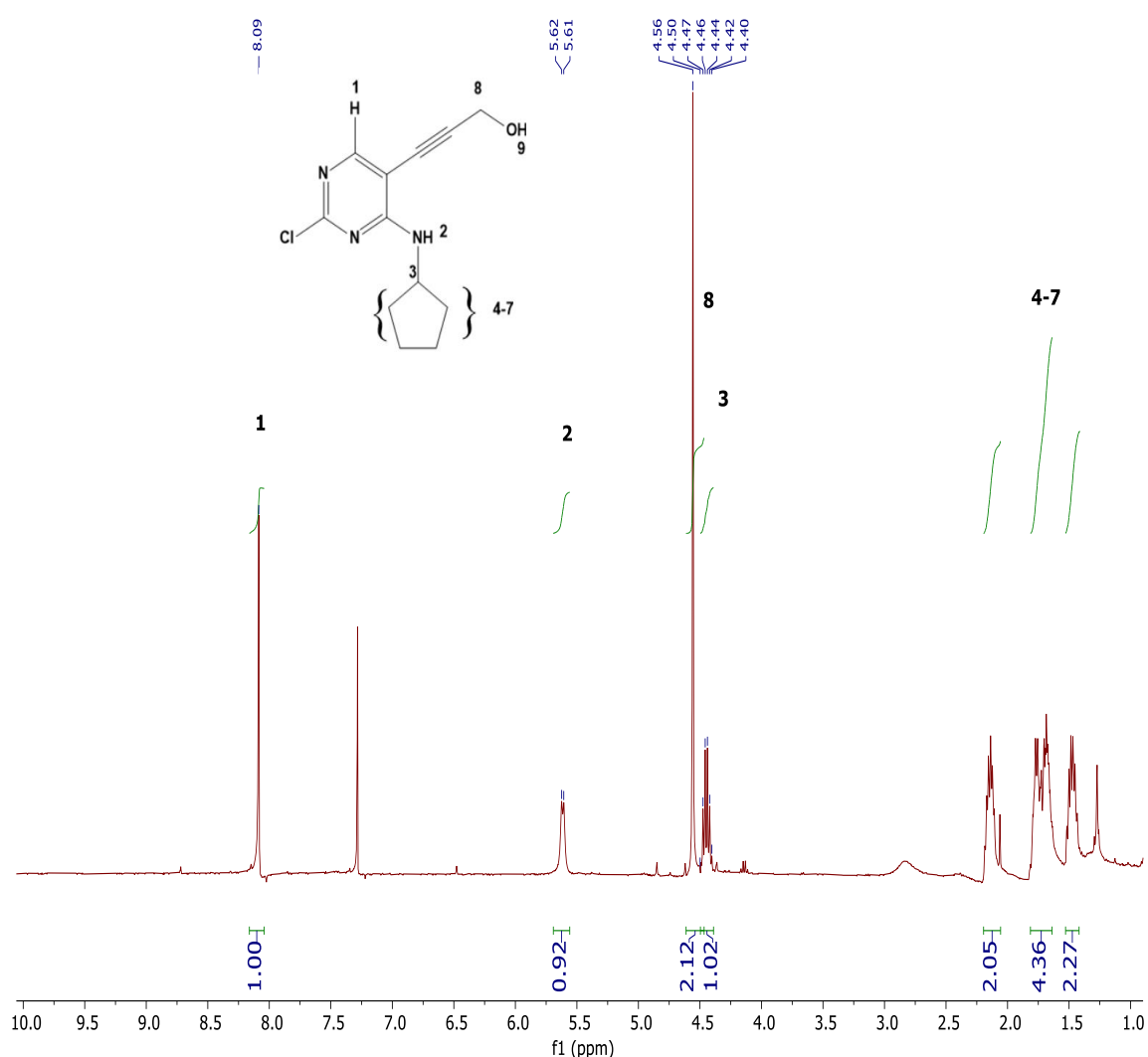
Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι προσπάθειες:

Καταλύτης	Βάση	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Χρόνος	Απόδοση
Pd(PPh ₃) ₄	TBAF·3H ₂ O	THF	66°C	6h	48%
Pd(PPh ₃) ₄	TBAF 75%	THF	66°C	8h	45%
Pd(PPh ₃) ₄	DIPEA	THF	66°C	48h	ίχνη
Pd(PPh ₃) ₄	Triethylamine	THF	66°C	48h	Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος
Pd(PPh ₃) ₄	TBAF 75%	DMF	140°C	48h	ίχνη
Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	TBAF·3H ₂ O	THF	66°C	72h	Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος

Εικόνα 7.17: Πίνακας εναλλακτικών προσπαθειών σύνθεσης της ένωσης **17**.

7.2.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (17)

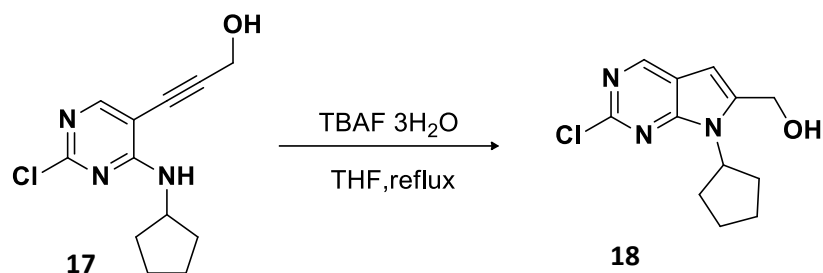
Σύμφωνα με το φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **17**, ως το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο καταγράφεται το αρωματικό H1 στα 8.09 ppm και εμφανίζεται ως απλή κορυφή. Ακολουθεί το αμινικό πρωτόνιο H2 στα 5.61 ppm ως μια ευρεία κορυφή. Στη συνέχεια, εντοπίζονται τα χαρακτηριστικά H8 ως μια διπλή κορυφή με χημική μετατόπιση 4.56 ppm και $^3J=8.0$ Hz. Στα 4.45 ppm ($J=7.2$ Hz) το πρωτόνιο H3 συντονίζεται ως εξαπλή κορυφή. Τα πρωτόνια H4-H7 του πενταμελούς δακτυλίου καταγράφονται στη περιοχή 1,4–2,2 ppm ως μια πολύπλοκη πολλαπλή σχάση. Το πρωτόνιο H9 της υδροξυλομάδας επικαλύπτεται από τα σήματα των πρωτονίων του πενταμελούς δακτυλίου.



Σχήμα 7.18: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **17**.

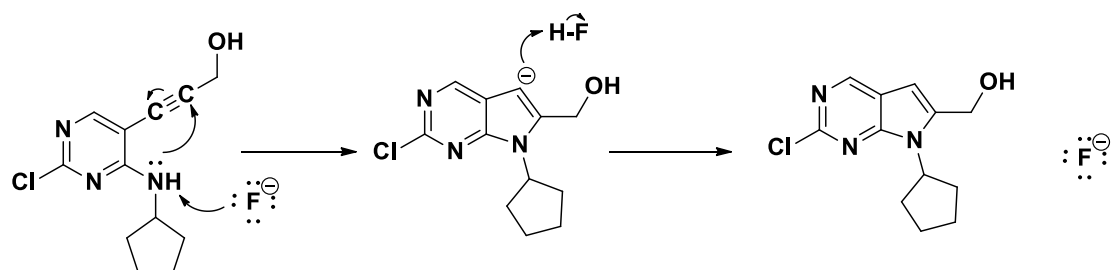
7.2.5.Σύνθεση της (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης (18)

Η επόμενη αντίδραση είναι μία αντίδραση ενδομοριακής πυρηνόφιλης υποκατάστασης, η οποία οδηγεί στη σύνθεση ενός διαζαϊνδολικού δακτυλίου. Ως αρχικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν η ένωση **17** και περίσσεια TBAF·3H₂O σε διαλύτη THF αντί για διάλυμα TBAF 1M σε THF που χρησιμοποιείται κατά τη σύνθεση της ένωσης από την εταιρία.



Εικόνα 7.19: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης **18**.

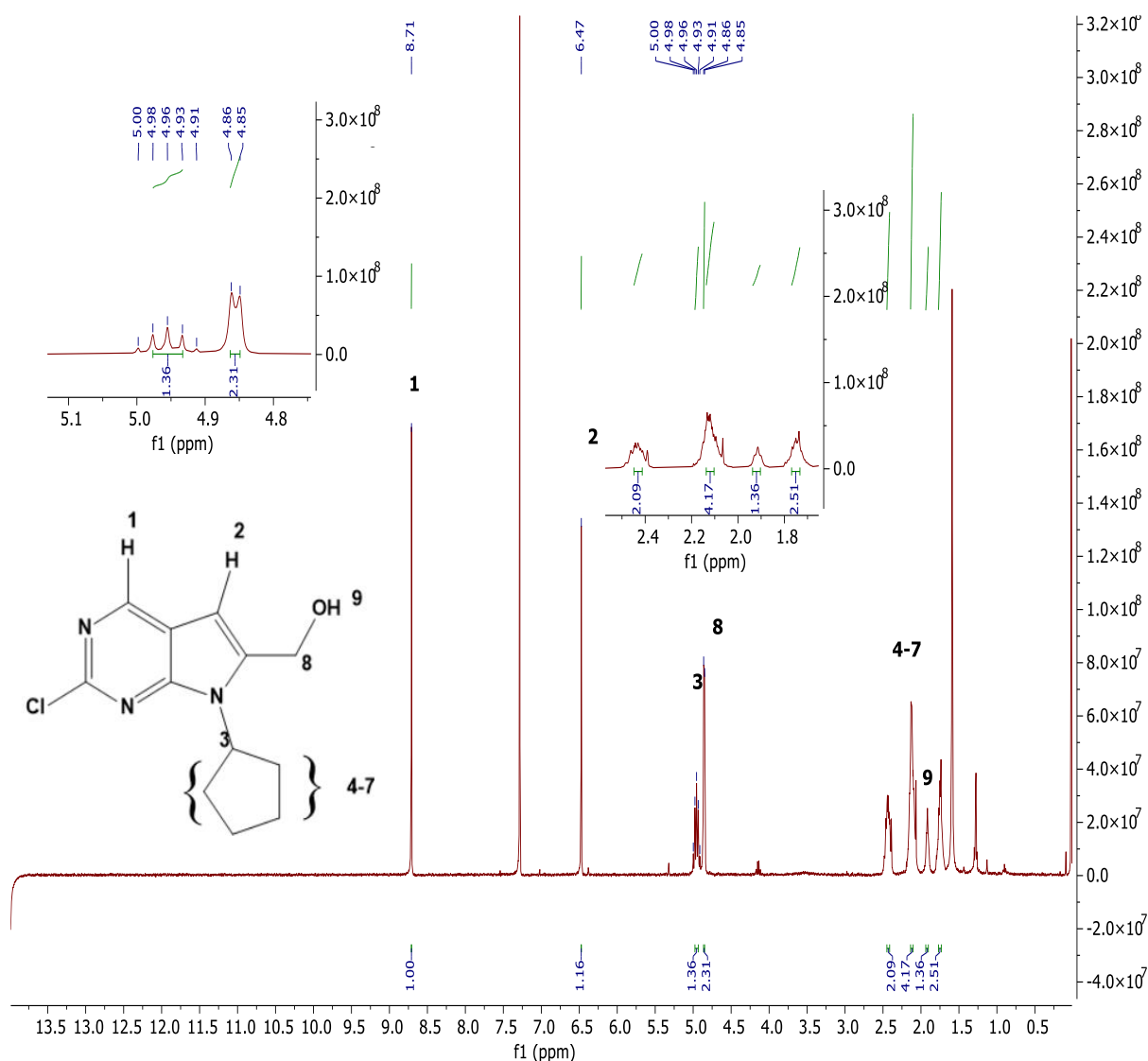
Το TBAF, δρα ως βάση και αποπρωτονιώνει το άτομο αζώτου το οποίο ως ισχυρό πυρηνόφιλο προσβάλλει το άτομο άνθρακα του αλκινίου σχηματίζοντας έναν 5,7-διαζαϊνδολικό δακτύλιο.



Σχήμα 7.20: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **18**.

7.2.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη (**18**)

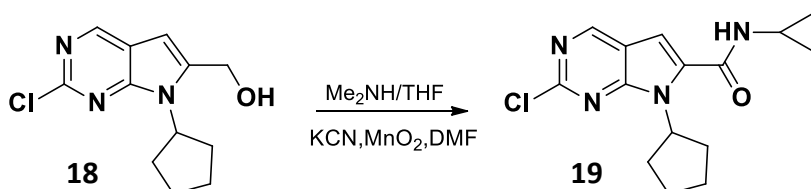
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **18** τα αρωματικά πρωτόνια H1 και H2 συντονίζονται στα 8,71 ppm και 6,47 ppm αντίστοιχα, ως απλές κορυφές. Χαρακτηριστικό αυτής της ένωσης είναι ότι δεν υφίσταται πλέον αμινικό πρωτόνιο. Η χημική μετατόπιση στα 4,95 ppm ($J=8.5$ Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3 ως μια πενταπλή κορυφή πλέον, λόγω της παρουσίας τεσσάρων γειτονικών πρωτονίων. Τα πρωτόνια H8 συντονίζονται στα 4,85 ppm και εμφανίζονται ως διπλή κορυφή στο φάσμα με $^3J=5.3$ Hz και ολοκλήρωση 2. Τα οκτώ πρωτόνια του πενταμελούς δακτυλίου H4-H7 συντονίζονται στην περιοχή 2.42-1.79 ppm, ενώ το πρωτόνιο H9 της υδροξυλομάδας ως μια τριπλή κορυφή στα 1.89 ppm.



Σχήμα 7.21: : Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **18**.

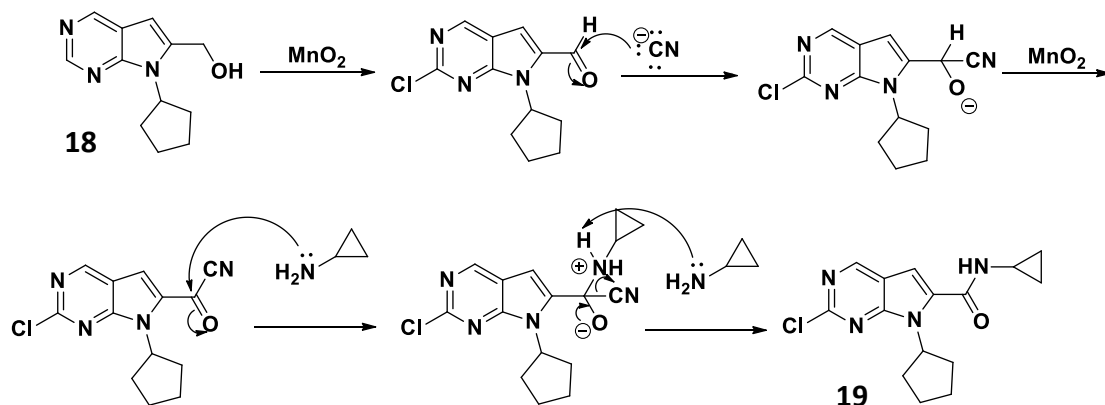
7.2.7.Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-N-κυκλοπροπυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινο-6-καρβοξαμίδιο (19)

Για τη σύνθεση της ένωσης **19** χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό αντιδραστήριο η ένωση **18**, διάλυμα κυκλοπροπυλαμίνης, περίσσεια διοξειδίου του μαγγανίου το οποίο δρα ως οξειδωτικό και καταλυτική ποσότητα κυανιούχου καλίου που χρησιμεύει στη δημιουργία του ενδιάμεσου κετο-νιτρίλιου. Το κετο-νιτρίλιο στη συνέχεια αντιδρώντας με τη κυκλοπροπυλαμίνη δίνει την επιθυμητή ένωση **19**.



Σχήμα 7.22: Αντίδραση σχηματισμού του αμιδίου **19**.

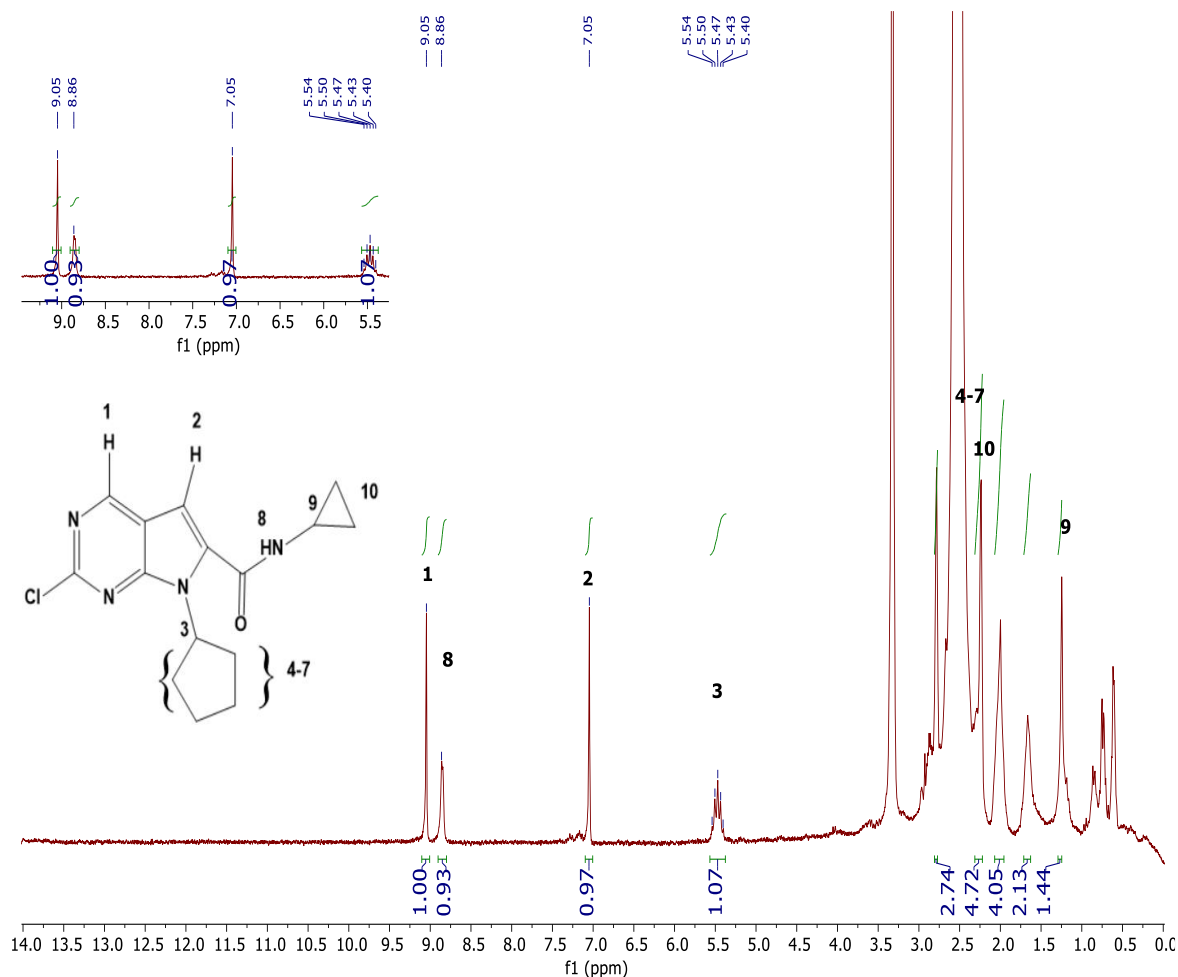
Το MnO_2 δρα ως οξειδωτικό, οξειδώνοντας την αλκοόλη προς αλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια μέσω μιας πυρηνόφιλης προσβολής από τα κυανιούχα ιόντα σχηματίζει ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο που με τη σειρά του οξειδώνεται και σχηματίζει το κετο-νιτρίλιο. Η πυρηνόφιλη προσθήκη της διμεθυλαμίνης στην καρβοξυλομάδα του κετο-νιτρίλιου οδηγεί στο σχηματισμό του τετραεδρικού ενδιάμεσου, το οποίο με απόσπαση κυανιούχου ιόντος και την απώλεια του πρωτονίου από το άζωτο οδηγεί στο σχηματισμό αμιδίου.



Σχήμα 7.23: Μηχανισμός σύνθεσης του αμιδίου **19**.

7.2.8. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-N-κυκλοπροπυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδino-6-καρβοξαμίδιο (**19**)

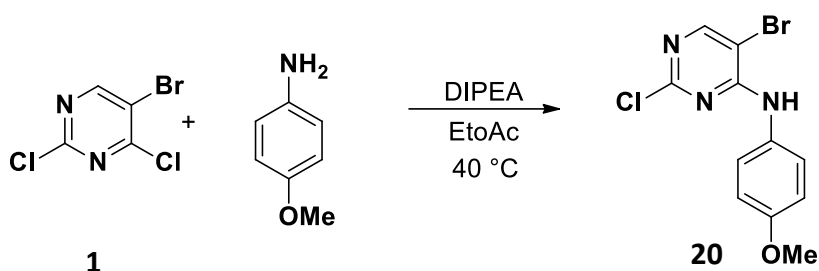
Στο φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **19** το αρωματικό πρωτόνιο H1 εμφανίζεται στο φάσμα ως απλή κορυφή στα 9,05 ppm. Ακολουθεί το H2 στα 7,05 ppm ως απλή κορυφή. Παρατηρείται μεγαλύτερη αποπροστασία στα δυο πρωτόνια, η οποία οφείλεται στη παρουσία του αμιδίου. Χαρακτηριστική κορυφή για τον σχηματισμό της ένωσης αποτελεί η ευρεία κορυφή του πρωτονίου H8 στα 8,86 ppm, κάτι που επιβεβαιώνει το σχηματισμό του αμιδίου. Η χημική μετατόπιση στα 5,47 ppm ($J=8.7$ Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3 και εμφανίζεται ως μια πενταπλή κορυφή. Τέλος, τα πρωτόνια του πενταμελούς δακτυλίου H4-H7 αλληλεπικαλύπτονται με τα πρωτόνια 9 και 10 της κυκλοπροπυλαμίνης και εντοπίζονται στην περιοχή 2,78-1,24 ppm.



Σχήμα 7.24: Φάσμα ^1H -NMR (250 MHz σε DMSO- d_6) της ένωσης **19**.

7.2.9. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδινό-4-αμίνη (20)

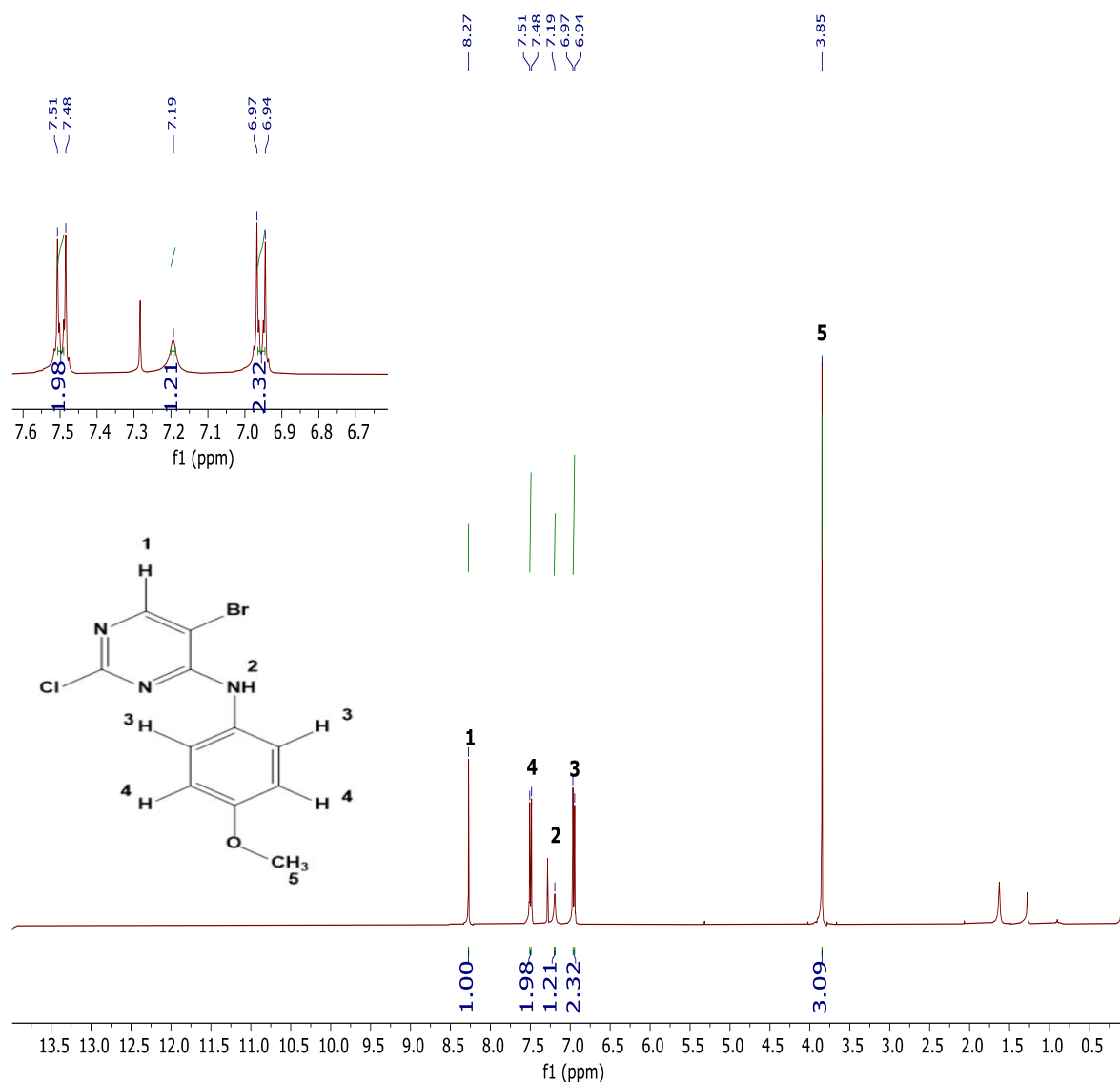
Η σύνθεση της ένωσης **20** επιτυγχάνεται με την χρήση ως αρχικών αντιδραστηρίων της 5-βρώμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνης και της 4-μεθοξυ-ανιλίνης, σε αλκαλικές συνθήκες με τη χρήση DIPEA (*N,N*-Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα μέσω ενός μηχανισμού πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ο σχηματισμός του προϊόντος είναι σχεδόν ακαριαίος. Η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά από θερμοκρασία δωματίου έως 40 °C ώστε να ληφθεί το προϊόν σε μεγαλύτερη απόδοση.



Σχήμα 7.25: Σύνθεση της ένωσης **20**.

7.2.10. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδινο-4-αμίνη (20)

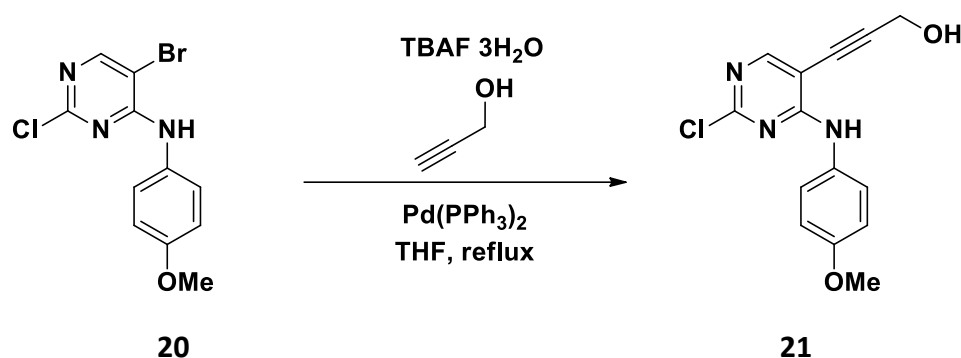
Στο φάσμα της ένωσης **20** το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο και εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8.27 ppm. Ως διπλές κορυφές στα 7.5 ppm και 6.96 ppm εντοπίζονται τα αρωματικά H4 και H3 ως διπλές κορυφές με $^3J=9\text{ Hz}$ η κάθε μία. Τα 3 πρωτόνια H5 της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται στα 3.85 ppm ως απλή κορυφή. Η χημική μετατόπιση στα 7.19 ppm αντιστοιχεί στο αμινικό πρωτόνιο H2 το οποίο εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή.



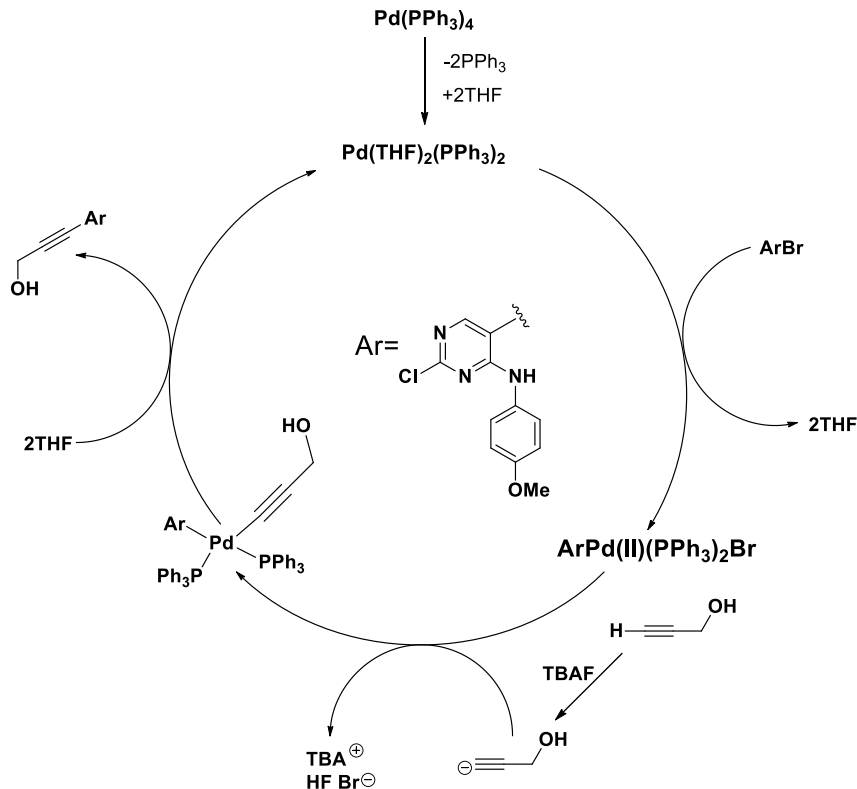
Σχήμα 7.26: Φάσμα ^1H -NMR (250 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **20**.

7.2.11.Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδινο-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (21)

Η σύνθεση της ένωσης **21** επιτυγχάνεται μέσω μιας τροποποιημένης αντίδρασης Sonogashira, καθώς ο καταλυτικός της κύκλος δεν περιλαμβάνει κάποιο καταλύτη αλάτων Cu(I) όπως στην κλασική Sonogashira. Το προϊόν Sonogashira συντέθηκε με τη χρήση της ένωσης **20**, την προπαργυλική αλκοόλη και τον καταλύτη παλλαδίου $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Αντί για κάποια κλασική βάση για την αποπρωτονίωση του όξινου αλκινικού υδρογόνου όπως κάποια ογκώδης αμίνη χρησιμοποιήθηκε $\text{TBAF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ως πηγή ιόντων F⁻ σε διαλύτη THF σε συνθήκες βρασμού.



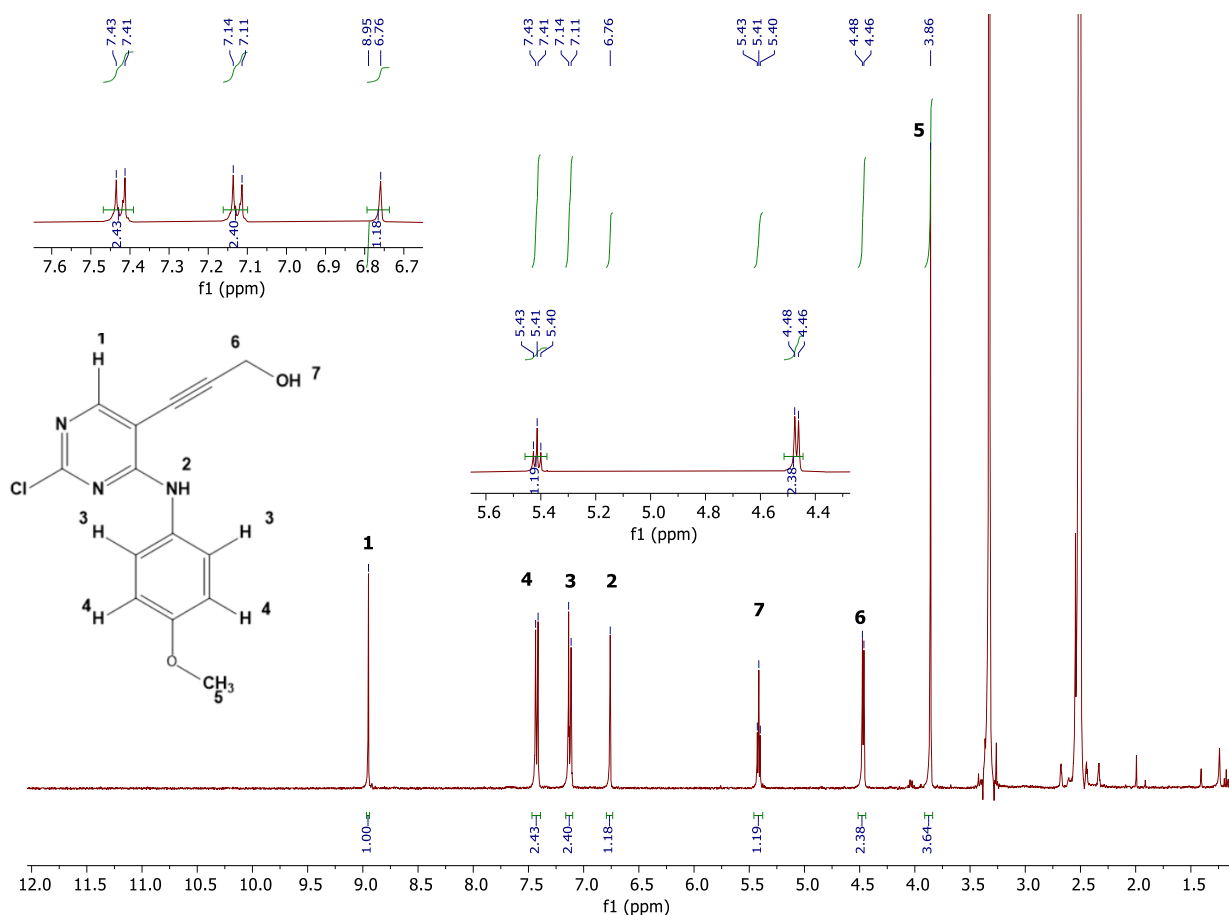
Σχήμα 7.27: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **21**.



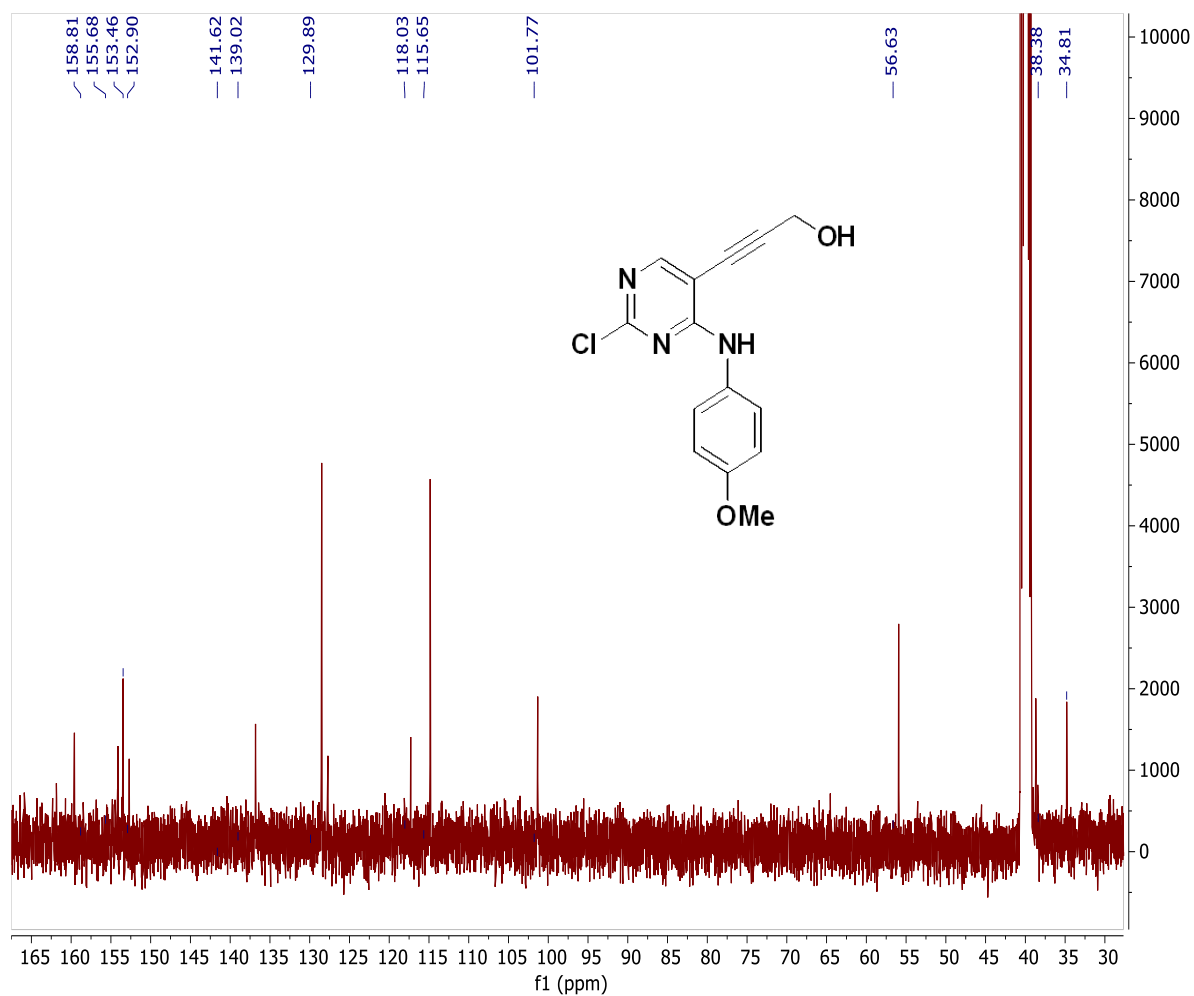
Σχήμα 7.28: Καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης Sonogashira της ένωσης **21**.

7.2.12. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (21)

Στο φάσμα της ένωσης **21** το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο και εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8.95 ppm. Ως διπλές κορυφές στα 7.42 ppm και 7.12 ppm αφορούν τα αρωματικά H4 και H3 με $^3J=9$ Hz η κάθε μία. Τα 3 πρωτόνια H5 της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται στα 3.86 ppm ως απλή κορυφή. Η χημική μετατόπιση στα 6.76 ppm αντιστοιχεί στο αμινικό πρωτόνιο H2 το οποίο εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή. Τα χαρακτηριστικά πρωτόνια H6 εμφανίζονται στα 4,47 ppm ως διπλή κορυφή με $^3J=5.4$ Hz. Το υδροξυλικό πρωτόνιο H7 σε DMSO εμφανίζεται ως τριπλή κορυφή στα 5.41 ppm και $J=5.6$ Hz.



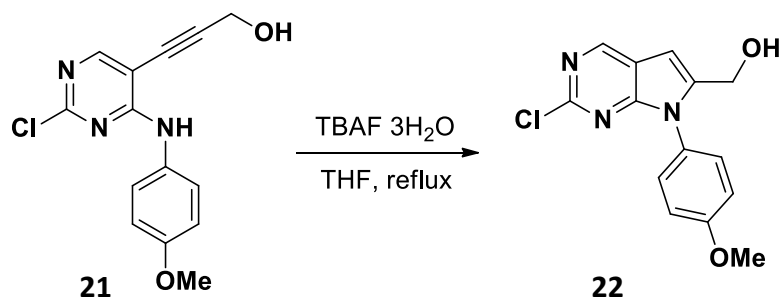
Σχήμα 7.29: Φάσμα ¹H-NMR (400MHz σε DMSO-d₆) της ένωσης **21**.



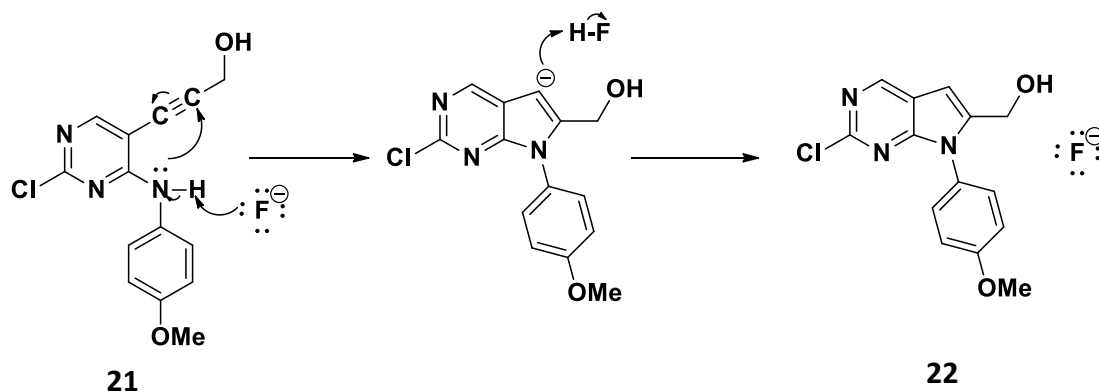
Σχήμα 7.30: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz σε DMSO) της ένωσης **21**.

7.2.13. Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(4-μεθοξυφαινυλο)-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (**22**)

Αυτό το στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει μία αντίδραση ενδομοριακής πυρηνόφιλης προσθήκης, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό πυρρολικού δακτυλίου του διαζαινδολικού δακτυλίου. Ως αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν η ένωση **21** και περίσσεια TBAF·3H₂O σε διαλύτη THF αντί για διάλυμα TBAF 1M σε THF που χρησιμοποιείται κατά την σύνθεση της ένωσης από την εταιρεία. Το TBAF λειτουργεί ως βάση, αποπρωτονιώνει το άτομο αζώτου το οποίο με τη σειρά του δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας το άτομο άνθρακα του αλκινίου σχηματίζοντας το παράγωγο του 5,7-διαναϊνδολίου.



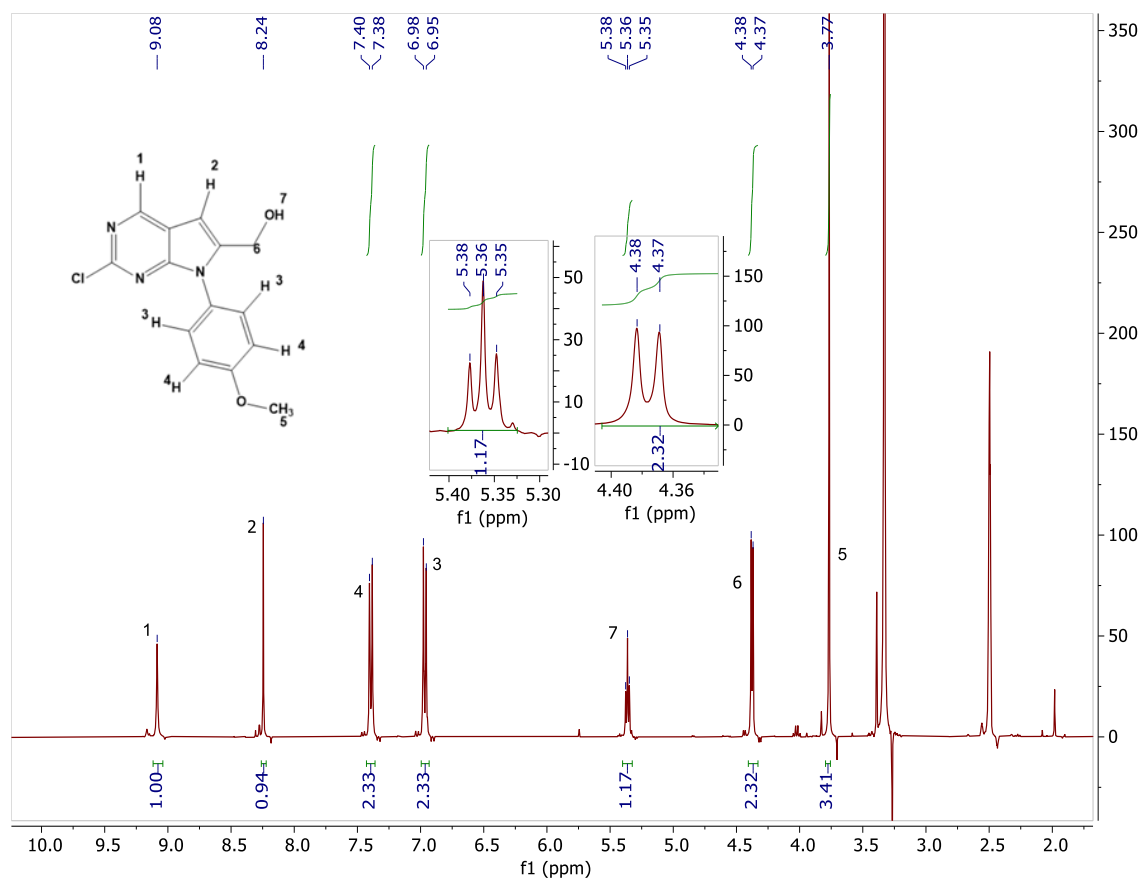
Σχήμα 7.31: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **22**.



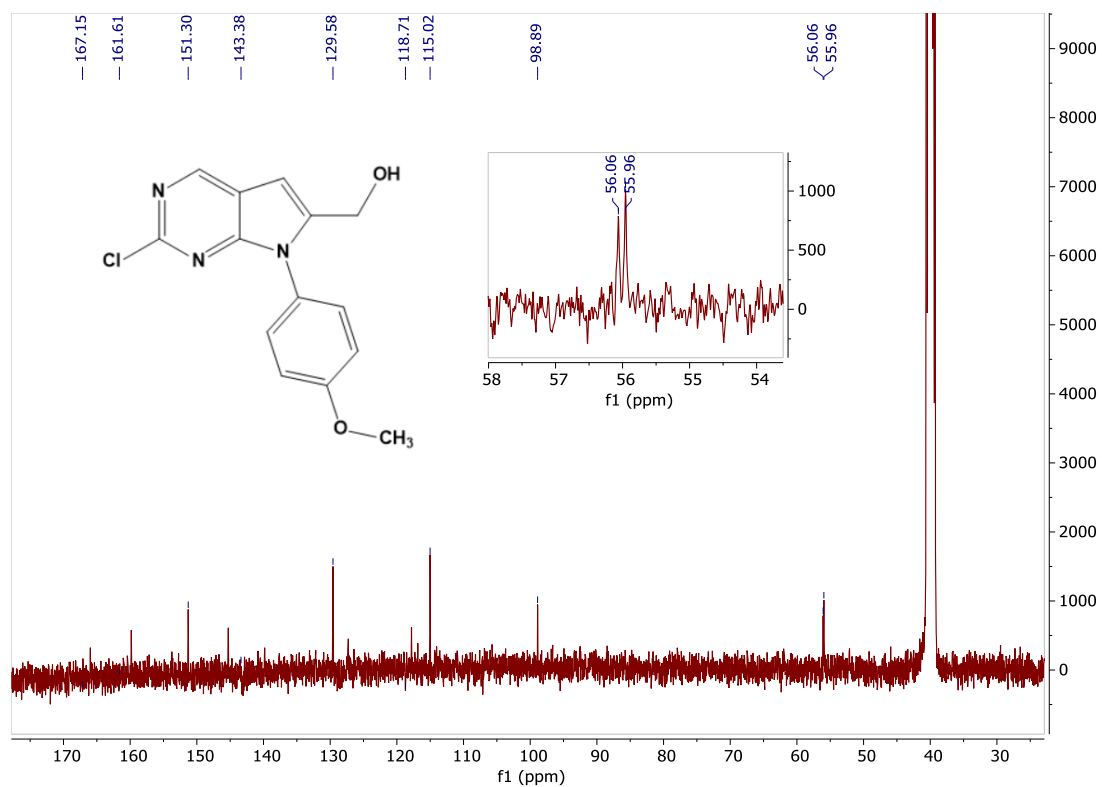
Σχήμα 7.32: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **22**.

7.2.14. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-χλωρο-7-(4-μεθοξυφαινυλο)-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (22)

Στο φάσμα της ένωσης **22** το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο και εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 9.08 ppm. Ακολουθεί το χαρακτηριστικό πρωτόνιο H2 ως απλή κορυφή στα 8.24 ppm. Ως διπλές κορυφές στα 7.39 ppm και 6.97 ppm καταγράφονται τα αρωματικά H4 και H3 ως διπλές κορυφές με $^3J=9$ Hz η κάθε μία. Τα 3 πρωτόνια H5 της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται στα 3.77 ppm ως απλή κορυφή. Η χημική μετατόπιση στα 4.38 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια H6 και εμφανίζονται ως διπλή κορυφή με $^3J=5.9$ Hz. Το υδροξυλικό πρωτόνιο H7 σε DMSO εμφανίζεται ως τριπλή κορυφή στα 5.36 ppm με $J=5.9$ Hz.



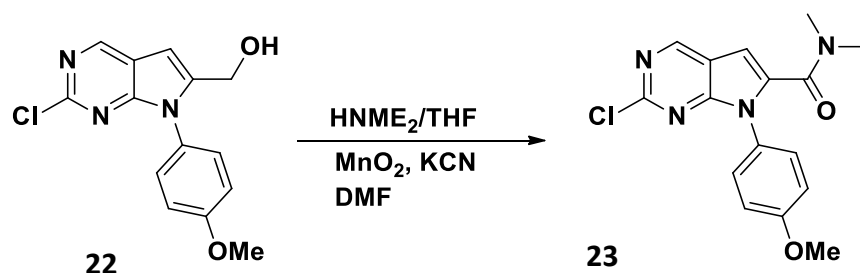
Σχήμα 7.33: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης **22**.



Σχήμα 7.34: Φάσμα ¹³C-NMR (100MHz σε DMSO-d₆) της ένωσης **22**.

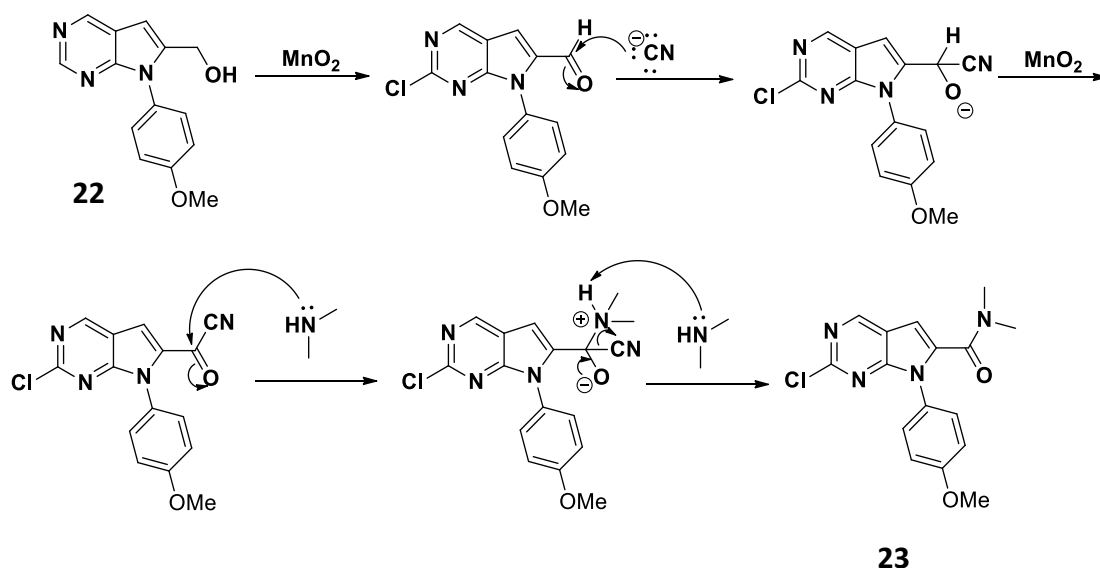
7.2.15.Σύνθεση της ένωσης 1-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδινο-5-υλο)-2-(διμεθυλαμινο)αιθανόνη (23)

Για τη σύνθεση της ένωσης **23** χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό αντιδραστήριο η ένωση (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη (**22**), διάλυμα διμεθυλαμίνης 1M σε THF, περίσσεια του οξειδωτικού διοξειδίου του μαγγανίου και καταλυτική ποσότητα κυανιούχου καλίου για τη δημιουργία του ενδιάμεσου κετο-νιτρίλιου.



Σχήμα 7.35: Αντίδραση σύνθεσης του αμιδίου **23**.

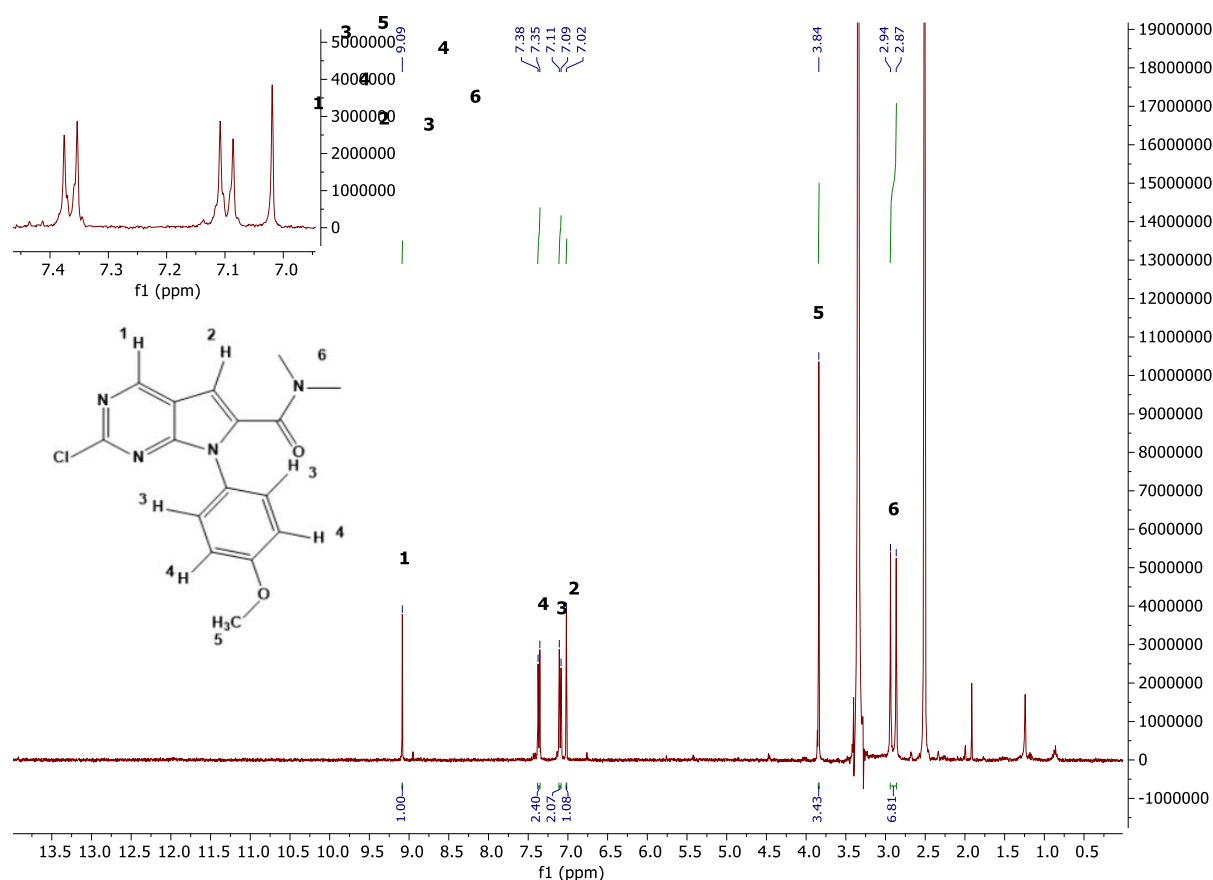
Το MnO_2 δρα ως οξειδωτικό, οξειδώνοντας την αλκοόλη προς αλδεΐδη, η οποία στη συνέχεια μέσω μιας πυρηνόφιλης προσθήκης κυανιούχων ιόντων δίνει το κετο-νιτρίλιο. Η πυρηνόφιλη προσθήκη της διμεθυλαμίνης στην καρβονυλομάδα του κετο-νιτρίλιου οδηγεί στο σχηματισμό του τετραεδρικού ενδιάμεσου, το οποίο με απόσπαση κυανιούχου ιόντος και την απώλεια το πρωτονίου από το άζωτο οδηγεί στο σχηματισμό του αμιδίου.



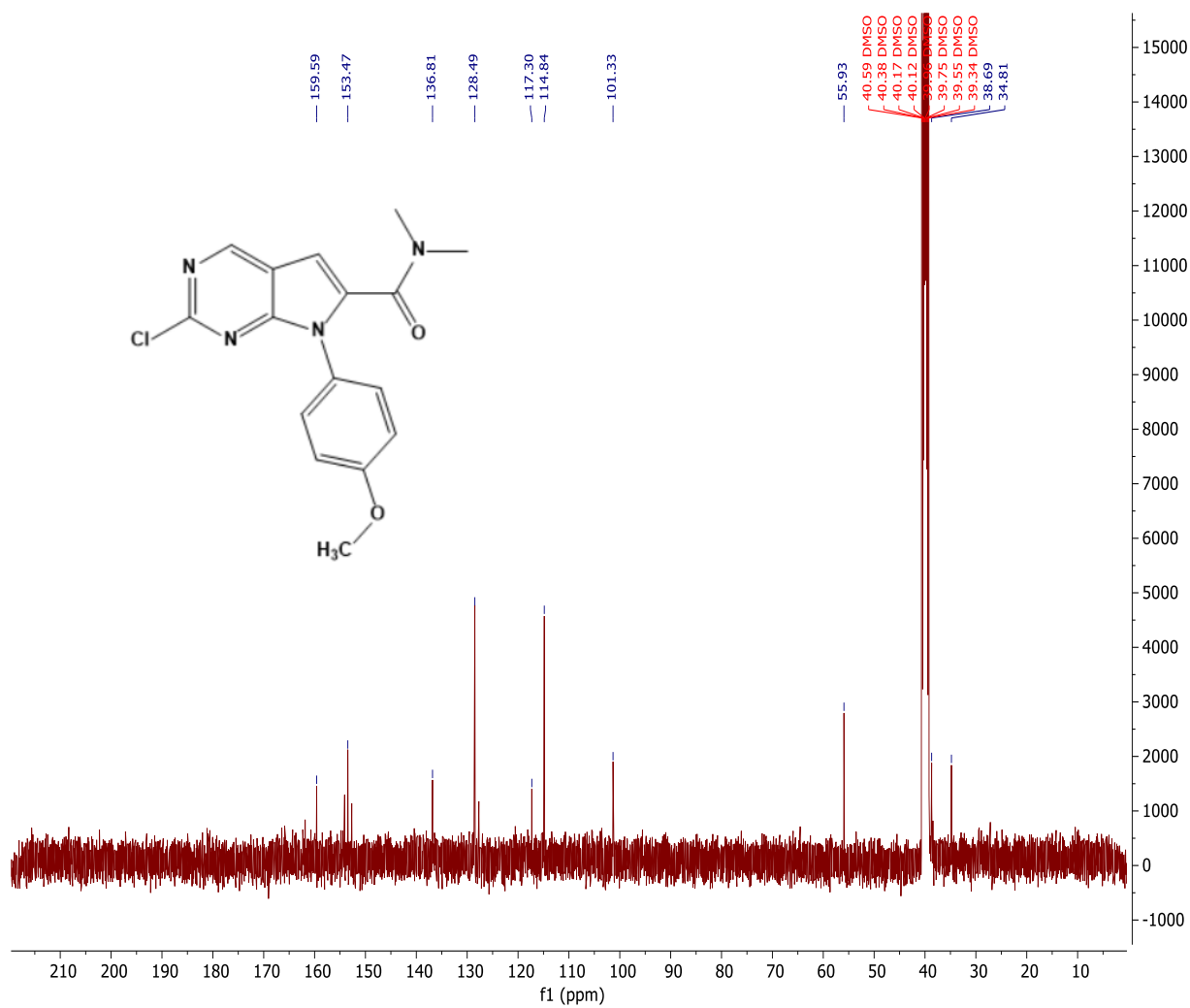
Σχήμα 7.36: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης του αμιδίου **23**.

7.2.16. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 1-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλο)-2-(διμεθυλαμινο)αιθανόνη (23)

Στο φάσμα της ένωσης **23** το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το αρωματικό H1 και εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 9.09 ppm. Ακολουθούν οι δύο διπλές κορυφές που αντιστοιχούν τα πρωτόνια H4 και H3 στα 7.36 ppm ($J=9.0$ Hz) και 7.10 ppm ($J=9.0$ Hz) αντίστοιχα. Σε αμέσως ισχυρότερα πεδία, στα 7.02 ppm, καταγράφεται το αρωματικό H2 ως μια απλή κορυφή. Στα 3.84 ppm και με ολοκλήρωση 3, συντονίζονται τα πρωτόνια H5 της μεθοξυ-ομάδας. Τέλος, στα 2.94 ppm και 2.87 ppm ως απλές κορυφές με συνολική ολοκλήρωση 6 καταγράφονται τα αμιδικά πρωτόνια H6.



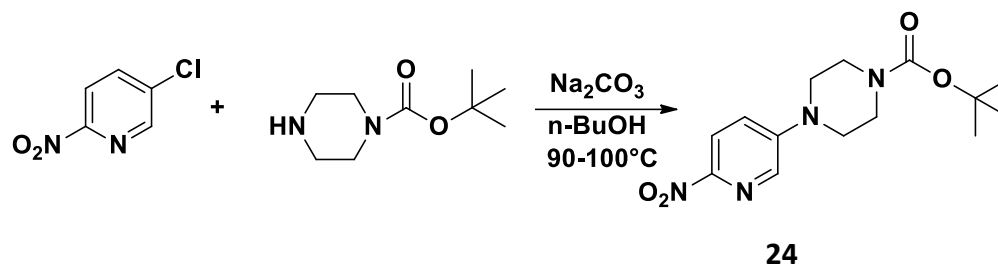
Σχήμα 7.37: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης **23**.



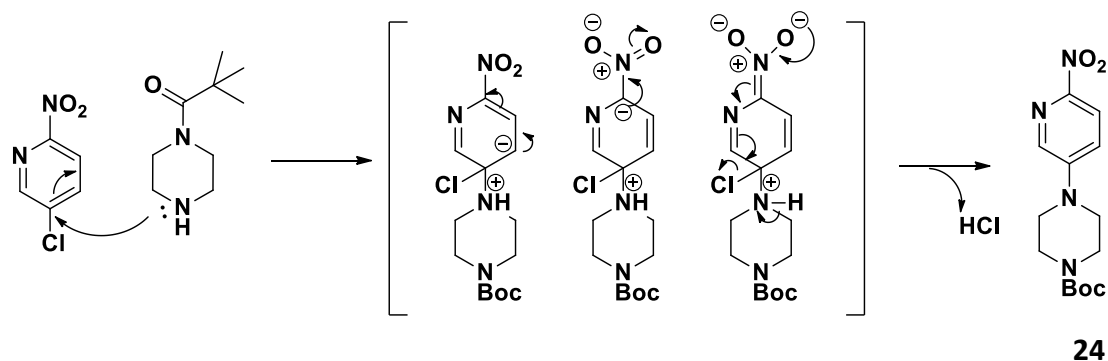
Σχήμα 7.38: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz σε DMSO) της ένωσης **23**.

7.2.17.Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζίνης-1-καρβοξυλικού οξέος (24)

Για τη σύνθεση της ένωσης **24** ως αρχικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν η 5-χλωρο-2-πυριδίνη και η Boc-πιπεραζίνη τα οποία αντιδρούν μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης. Χρησιμοποιώντας την εμπορικά διαθέσιμη Boc-πιπεραζίνη μειώνεται κατά ένα στάδιο η πορεία σύνθεσης, καθώς δεν χρειάζεται να γίνει προστασία της αμινομάδας της πιπεραζίνης, εξοικονομώντας έτσι χρόνο, διαλύτες και αντιδραστήρια.



Σχήμα 7.39: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **24**.



Σχήμα 7.40: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **24**.

1^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης **24**

Αρχικά έγινε προσθήκη 1,2eq Boc-πιπεραζίνης και χρήση διαλύτη n-BuOH. Η αντίδραση μετά από 28h θέρμανσης στους 90-100 °C δεν ολοκληρώθηκε και γι' αυτό έγινε σταδιακή προσθήκη 2 x 0,5eq βάσης Na₂CO₃. Όμως και πάλι, μετά από αναμονή, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος.

2^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης **24**

Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 2eq Boc-πιπεραζίνης και 1eq Na₂CO₃, αλλά και πάλι, μετά από 30h θέρμανσης στους 90-100°C, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος.

3^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 24

Σε αυτήν την προσπάθεια έγινε προσθήκη 4eq 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνης και 2,5eq Na_2CO_3 και καταγράφηκε ικανοποιητικός σχηματισμός προϊόντος στις 30h στους 90-100°C .

4^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 24

Στην προσπάθεια αυτή δοκιμάστηκε ως βάση 0.5eq K_2CO_3 . Το προϊόν σχηματίστηκε σε μη ικανοποιητικό βαθμό.

5^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 24

Στη συγκεκριμένη προσπάθεια βελτιστοποίησης χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το 1,4-διοξάνιο, 4eq 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνης και 2,5eq Na_2CO_3 . Η αρχική ένωση δεν καταναλώθηκε στις 30h στους 90-100°C και ως εκ τούτου σχηματισμός του προϊόντος ήταν σε ίχνη.

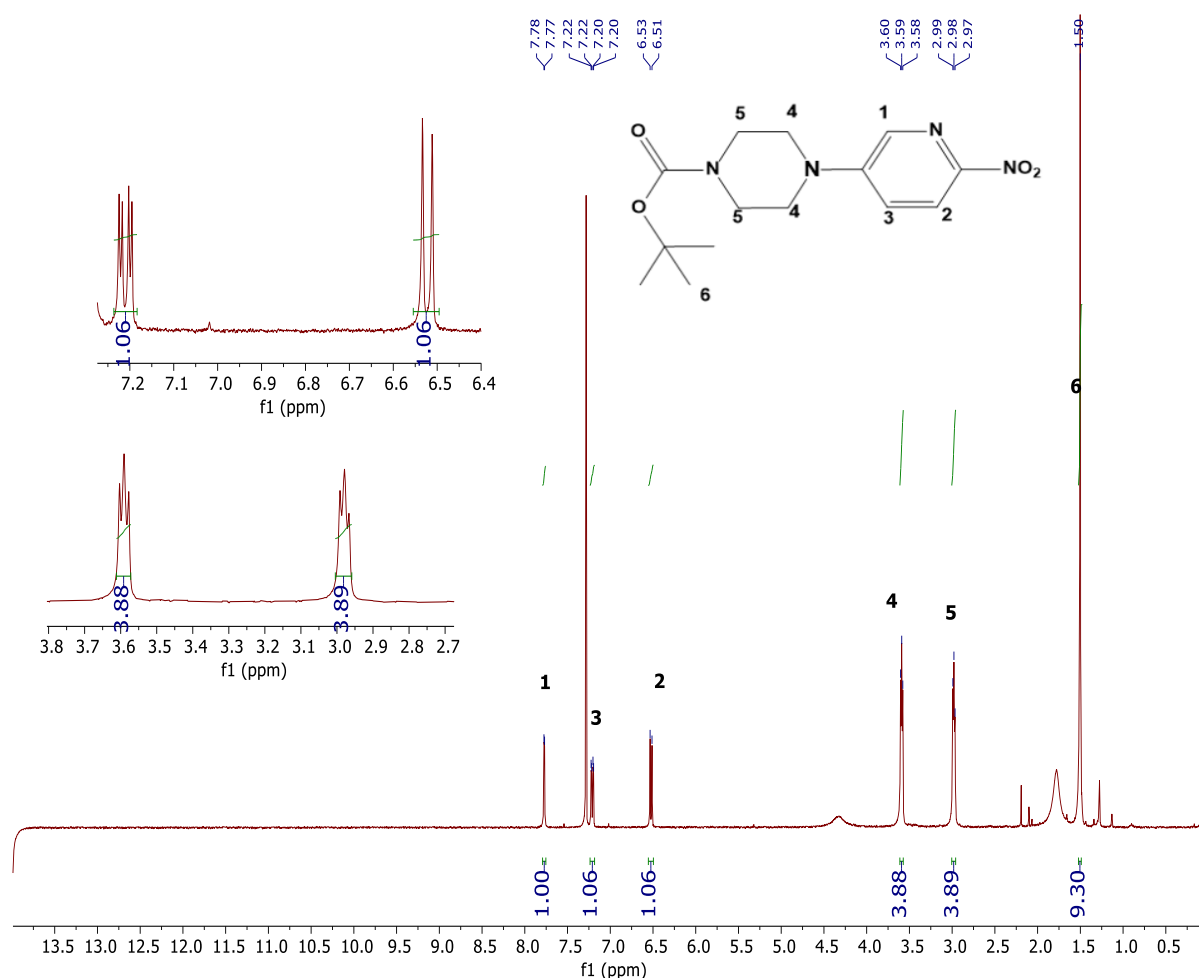
Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι προσπάθειες σύνθεσης:

Πείραμα	5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη	1-Boc-πιπεραζίνη	Βάση	Διαλύτης	Ώρες θέρμανσης	Απόδοση
1	1eq	1,2eq	Na_2CO_3 2x0,5eq	n-BuOH	28h	-
2	1eq	2eq	Na_2CO_3 1eq	n-BuOH	30h	-
3	4eq	1eq	Na_2CO_3 2,5eq	n-BuOH	30h	72%
4	1eq	1,2eq	K_2CO_3 0,5eq	n-BuOH	30h	ίχνη
5	4eq	1,2eq	Na_2CO_3 2,5eq	1,4-Dioxane	30h	ίχνη

Σχήμα 7.41: Εναλλακτικές προσπάθειες σύνθεσης της ένωσης 24.

7.2.18. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης *tert*-βουτυλεστέρας του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (**24**)

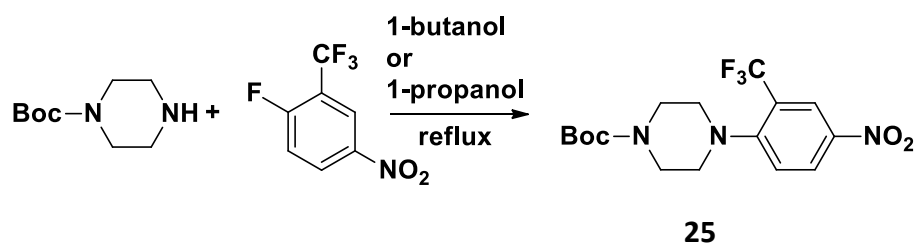
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (**24**) το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H1 στα 7.76 ppm. Το H1 εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή, με $^4J = 2.92$ Hz λόγω της σύζευξης μακράς απόστασης με το πρωτόνιο H3. Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6.52 ppm ως μια διπλή κορυφή με $^3J = 9$ Hz. Το πρωτόνιο H3 συντονίζεται στα 7,21 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής λόγω σύζευξης με το γειτονικό πρωτόνιο H2 ($^3J = 8.88$ Hz) και της σύζευξης μακράς απόστασης με το H1 ($^4J = 2.92$ Hz). Η χημική μετατόπιση στα 3.59 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια H4 του πιπεραζινικού δακτυλίου, τα οποία εμφανίζονται ως τριπλή κορυφή ενώ η χημική μετατόπιση 2.98 ppm αντιστοιχεί στα H5. Τα πρωτόνια H6 της *tert*-βουτυλ-ομάδας συντονίζονται στα 1.50 ppm ως μια απλή κορυφή.



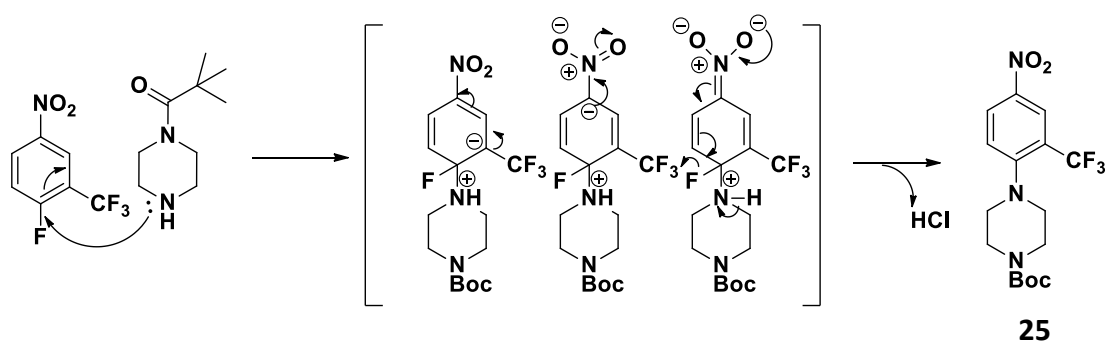
Σχήμα 7.42: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **24**.

7.2.19.Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(4νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος(25)

Η σύνθεση της ένωσης **25** προκύπτει μέσω μία αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Σε αυτήν την προσπάθεια χρησιμοποιήθηκε 1-προπανόλη (b.p. 97°C) ως διαλύτης, αντί για 1-βουτανόλη (b.p 117,7°C) καθώς έχει χαμηλότερο σημείο ζέσης και απομακρύνεται ευκολότερα, ενώ η απόδοση της αντίδρασης παραμένει σταθερή. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24h υπό βρασμό και στις δυο περιπτώσεις.



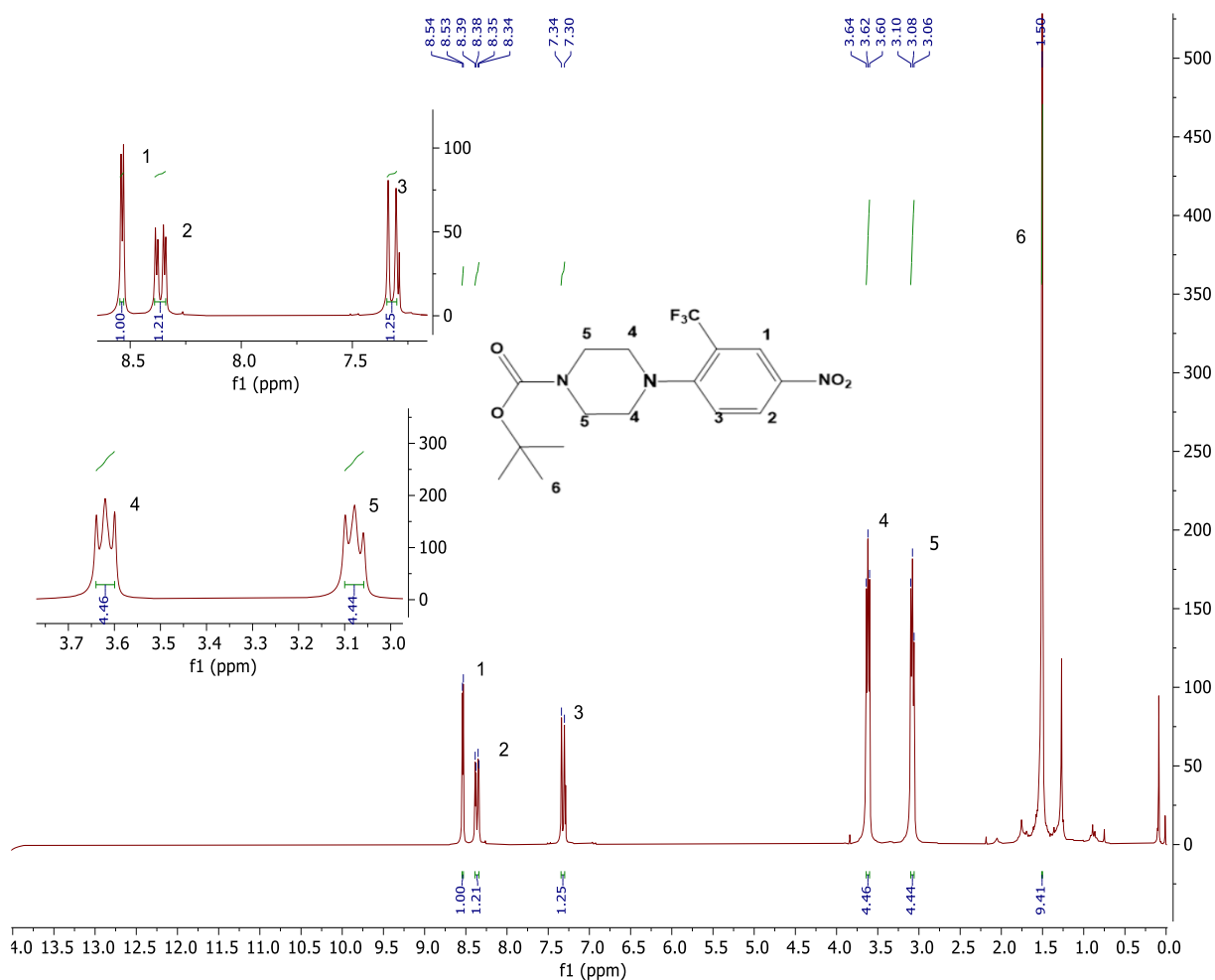
Σχήμα 7.43: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **25**.



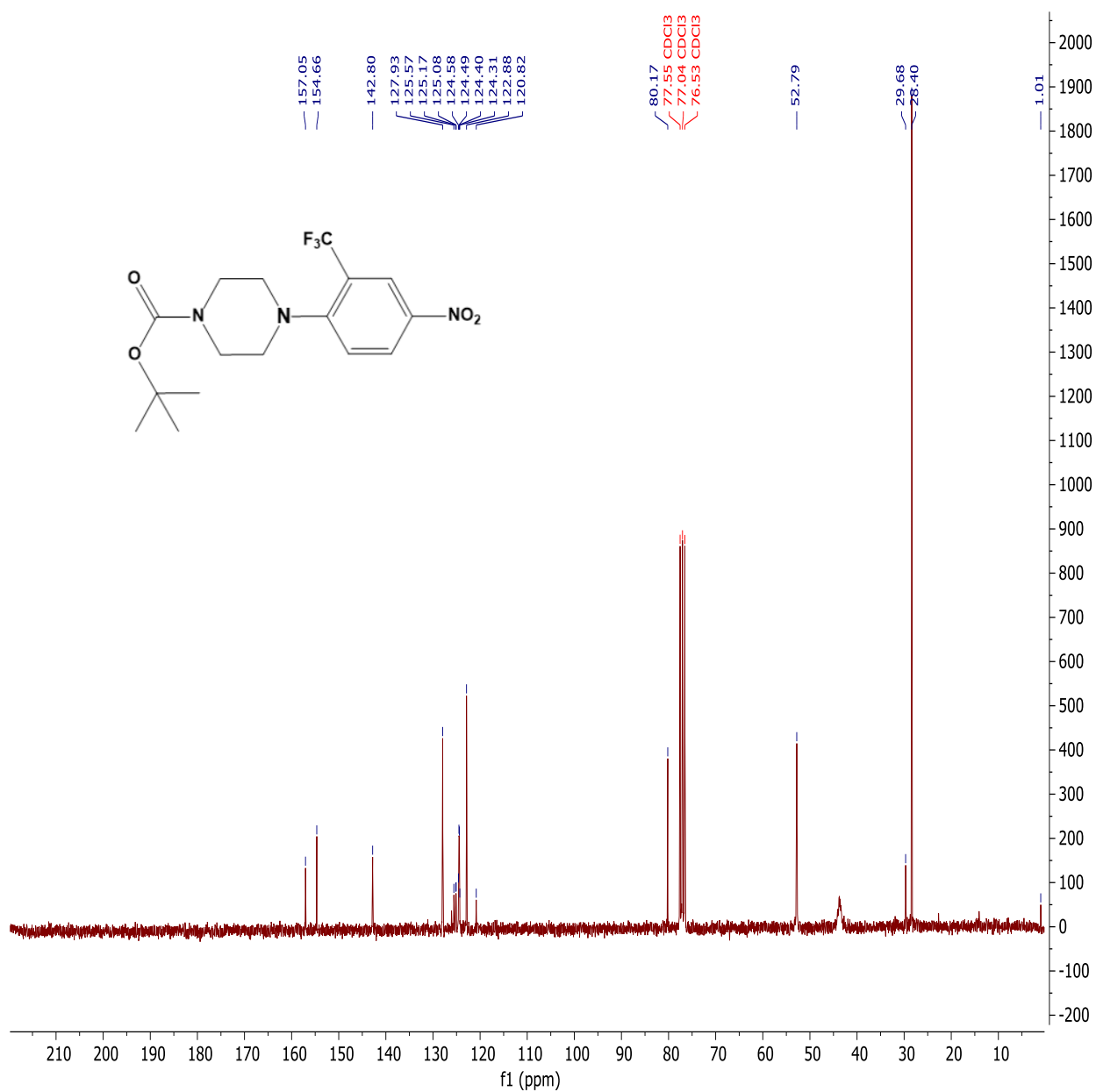
Σχήμα 7.44: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **25**.

7.2.20.Φασματοσκοπικά δεδομένα του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(4νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαίνυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (**25**)

Στο φάσμα της ένωσης **25** το πρωτόνιο H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο και συντονίζεται στα 8.53ppm ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης μακράς απόσπασης $^4J=2.7$ Hz με το H2. Σε αμέσως υψηλότερα πεδία στα 8.36 ppm συντονίζεται το H2 ως μια διπλή της διπλής, με σταθερά σύζευξης $^3J=9$ Hz και $^4J=2.7$ Hz. Η χημική μετατόπιση στα 7.32 ppm αντιστοιχεί στο H3 και είναι μια διπλή με $^3J=9$ Hz. Ακολουθούν τα 8 πρωτόνια του πιπεραζινικού δακτυλίου ως δύο τριπλές κορυφές στα 3.61 ppm και 3.08 ppm με $^3J=5$ Hz η κάθε μια. Τέλος, τα 9 πρωτόνια H6 της Boc-ομάδας συντονίζονται ως μια απλή κορυφή στα 1.50 ppm.



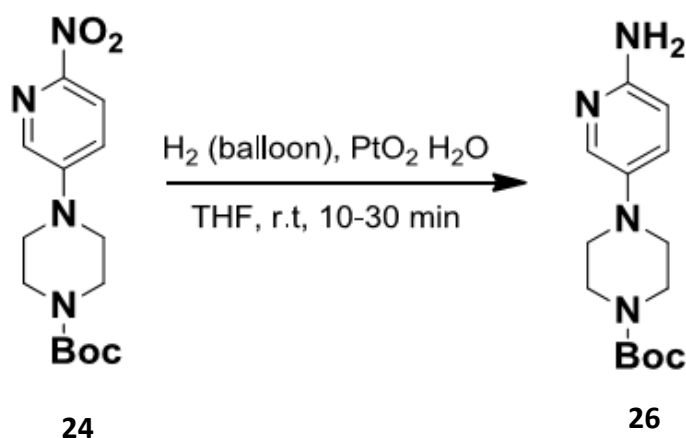
Σχήμα 7.45: Φάσμα ^1H -NMR (250 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **25**.



Σχήμα 7.46: Φάσμα ¹³C-NMR (100 MHz σε CDCl₃) της ένωσης **25**.

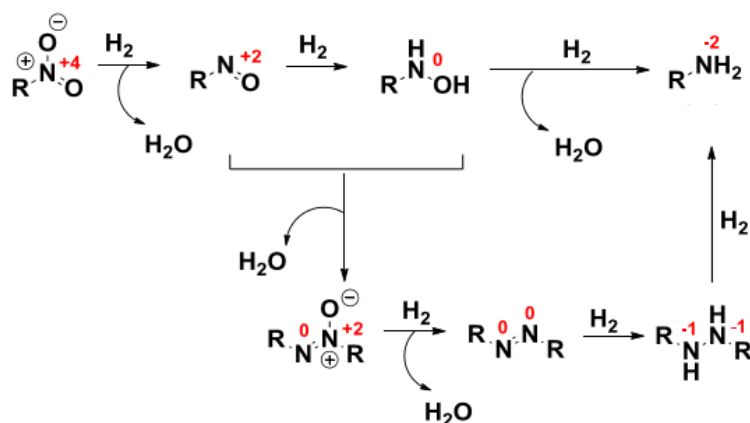
7.2.21.Σύνθεση του tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζινη-1-καρβοξυλικού οξέος (26)

Η σύνθεση της ένωσης **26** πραγματοποιείται με καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης **24** με τη χρήση του αντιδραστήριου Adams ($\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) σε διαλύτη THF, μπαλόνι υδρογόνου και έντονη ανάδευση. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε διάστημα 10–30 min, με ποσοτική μετατροπή (σχεδόν 100%) της νιτροπυριδίνης σε αμινοπυριδίνη. Η μέθοδος αυτή προτιμάται σε σχέση με τη μέθοδο αναγωγής του αντίστοιχου υποστρώματος της εταιρίας Novartis, στον χρόνο που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.



Σχήμα 7.47: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **26**.

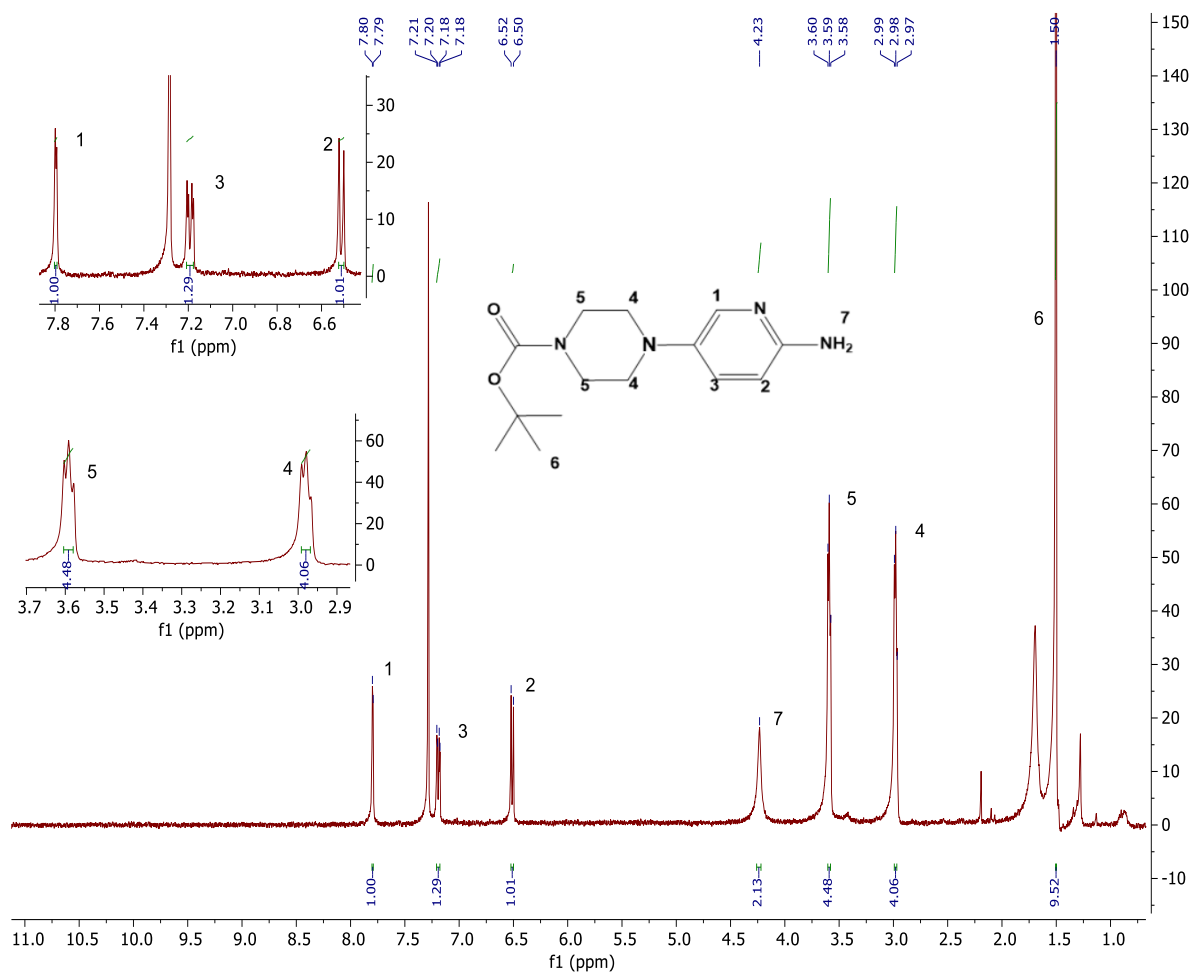
Ο καταλύτης Adams δεν είναι ενεργός για υδρογόνωση από μόνος του. Παρουσία υδρογόνου μετατρέπεται στη δραστική του μορφή (ανηγμένη μορφή) που ονομάζεται Platinum black, λόγω του μαύρου χρώματος που λαμβάνει η πλατίνα στην οξειδωτική κατάσταση μηδέν, $\text{Pt}(0)$. Στην επιφάνεια του $\text{Pt}(0)$ λαμβάνει χώρα η εκλεκτική αναγωγή της νιτρο-ομάδας σε αμινο-ομάδα σε ουδέτερες συνθήκες και σε απρωτικό διαλύτη όπως το τετραϋδροφουράνιο.



Σχήμα 7.48: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **26**.

7.2.22.Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης tert-βουτυλεστέρα του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζιν-1-καρβοξυλικού οξέος (26)

Το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το πρωτόνιο H1 δίπλα από το άτομο αζώτου του πυριδινικού δακτυλίου και συντονίζεται στα 7,8 ppm ως μια απλή κορυφή η οποία εμφανίζει σχάση μακράς απόστασης ($^4J = 2,94$ Hz) με το πρωτόνιο H3. Το πρωτόνιο H3 συντονίζεται στα 7,20 ppm ως μια διπλή της διπλής κορυφή λόγω σχάσης με το γειτονικό H2 ($^3J = 8,80$ Hz) και λόγω σχάσης μακράς απόστασης με το H1 ($^4J = 2,87$ Hz). Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 6,51 ppm αρκετά πιο προστατευμένο σε σχέση με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της αντίστοιχης νίτρο-ένωσης, λόγω της προστασίας της θέσης αυτής από το +M συζυγιακό φαινόμενο του ατόμου αζώτου της πιπεραζίνης προς το πυριδινικό δακτύλιο. Έτσι, εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή λόγω σχάσης με το πρωτόνιο H3 ($^3J = 8,83$ Hz). Τα πρωτόνια H5 της πιπεραζίνης είναι πιο αποπροστατευμένα από τα πρωτόνια H4 και συντονίζονται στα 3,59 ppm ως μια τύπου τριπλή κορυφή με ολοκλήρωση 4. Τα πρωτόνια H4 συντονίζονται στα 2,98 ppm ως μια τύπου τριπλή κορυφή με ολοκλήρωση 4. Τα πρωτόνια H6 της tert-βουτυλο-ομάδας συντονίζονται στα 1,50 ppm ως μια απλή κορυφή με ολοκλήρωση 9. Τέλος, επιβεβαιώνεται η μετατροπή της νίτρο-ένωσης στο προϊόν αναγωγής με τη παρουσία μιας ευρείας κορυφής στα 4,23 ppm με ολοκλήρωση 2, που οφείλεται στα πρωτόνια H7 της αμινομάδας.



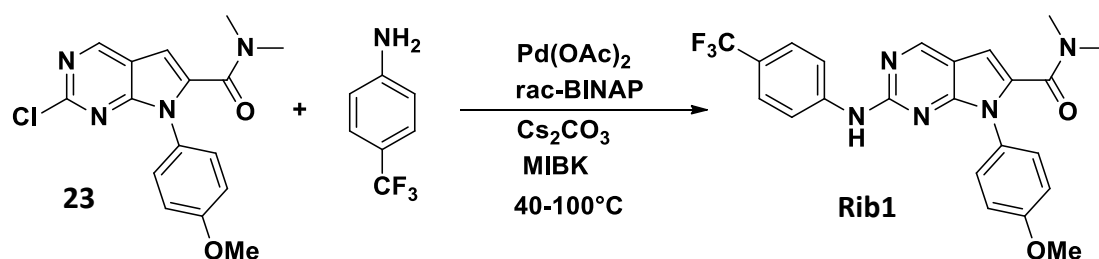
Σχήμα 7.49: Φάσμα ¹H-NMR (400 MHz σε CDCl₃) της ένωσης **26**.

7.2.23. Σύνθεση της ένωσης 7-(4-μεθοξυφαινυλ)-N,N-διμεθυλο-2-((4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινο-6-καρβοξαμίδιο (Rib1)

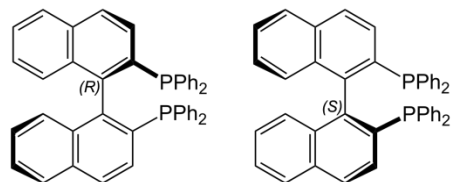
Για τη σύνθεση της τελικής ένωσης **Rib1** πραγματοποιήθηκε μια απευθείας αντίδραση σύζευξης Buchwald-Hartwig της 4-(τριφθορομεθυλο)-ανιλίνης με την χλωροπυριμιδίνη **23**.

Η αντίδραση έλαβε χώρα με τη χρήση του καταλύτη οξικού παλλαδίου και ρακεμικού μείγματος BINAP το οποίο χρησιμεύει στη συμπλοκοποίηση του υποστρώματος με τον καταλύτη σε βασικές συνθήκες οι οποίες ρυθμίζονται με τη χρήση ανθρακικού κεσίου και σε διαλύτη DMF ή MIBK (Μεθυλοϊσοβουτύλιο κετόνη).

Με τη χρήση του διαλύτη MIBK σημειώθηκε μεγαλύτερη απόδοση στην σύνθεση και λιγότερα παραπροϊόντα.



Σχήμα 7.50: Αντίδραση σύνθεσης της τελικής ένωσης **Rib1**.



Εικόνα 7.51: Χημική δομή του ρακεμικού μείγματος BINAP.

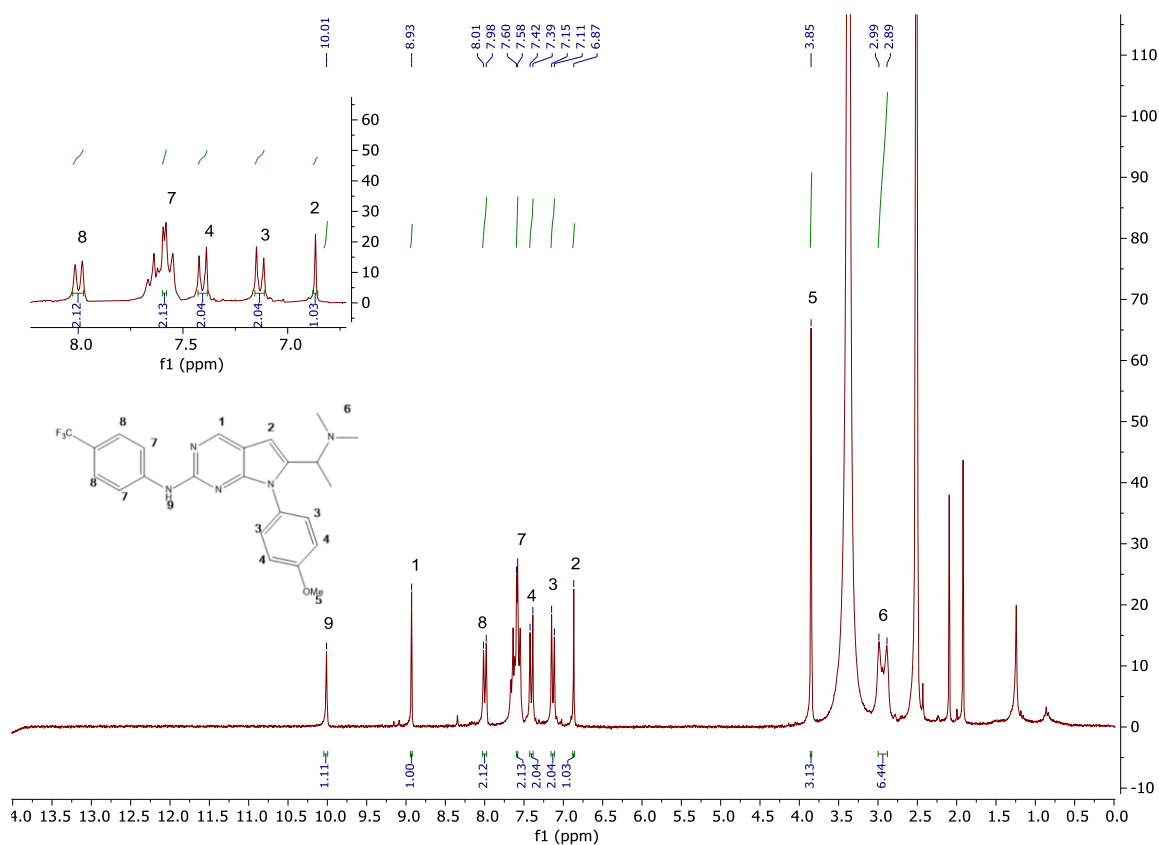
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης χρησιμοποιώντας ως βάση DIPEA και διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα σε συνθήκες βρασμού, χωρίς όμως επιτυχία, καθώς δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του τελικού προϊόντος.

Pd(OAc) ₂	Rac-BINAP	Cs ₂ CO ₃	DMF	140°C	α=32%
Pd(OAc) ₂	Rac-BINAP	Cs ₂ CO ₃	MIBK	100°C	α=40.2%
Pd(OAc) ₂	Rac-BINAP	DIPEA	EtOAc	77.1°C	Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος

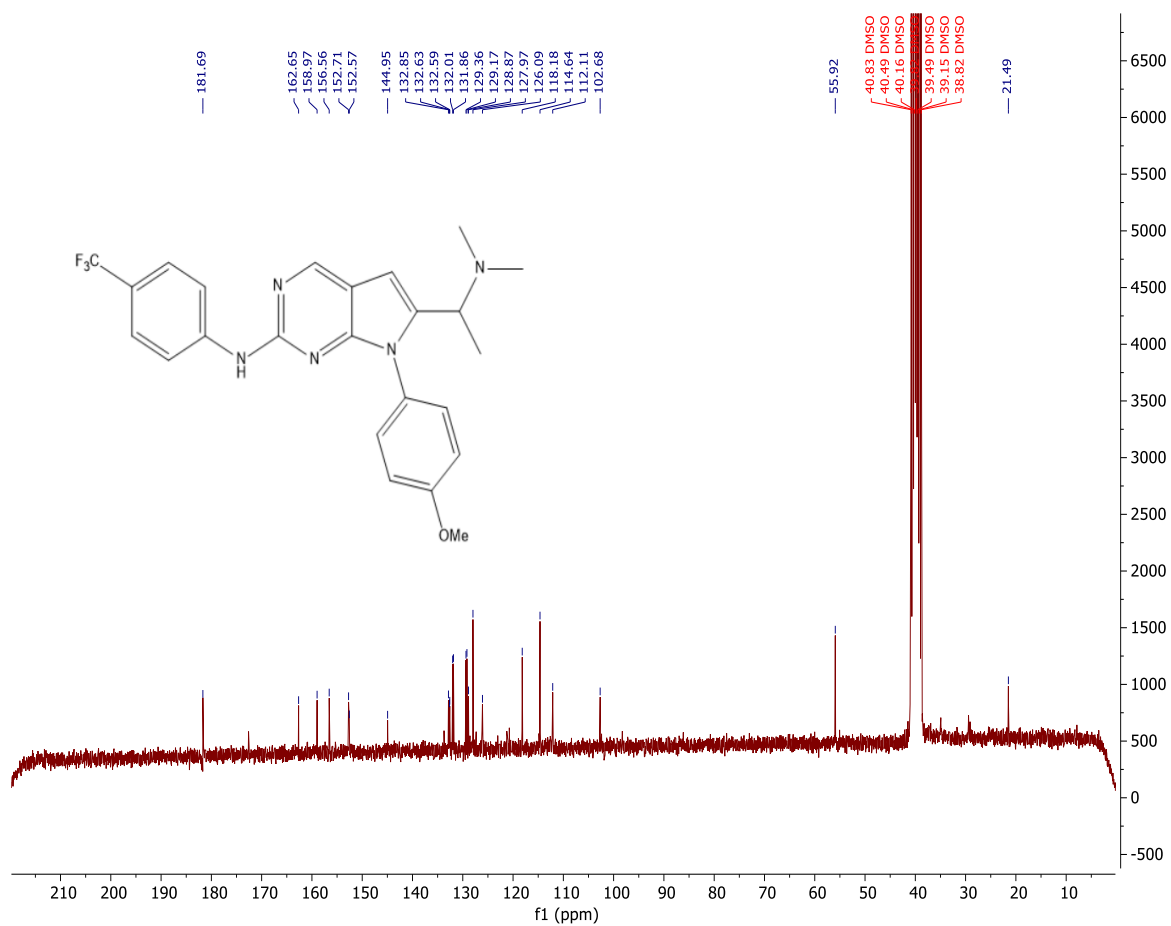
Σχήμα 7.52: Πίνακας προσπαθειών σύνθεσης της ένωσης **Rib1**.

7.2.24. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-(4-μεθοξυφαινυλο)-N,N-διμεθυλο-2-((4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)αμινο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδino-6-καρβοξαμίδιο (Rib1)

Στο φάσμα της τελικής ένωσης **Rib1** το αρωματικό πρωτόνιο H1 εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 8.93 ppm. Ακολουθούν οι δυο διπλές κορυφές που αντιστοιχούν τα πρωτόνια H8 και H7 στα 8.0 ppm ($^3J=8.5$ Hz) και 7.59 ppm ($^3J=8.5$ Hz) αντίστοιχα. Σε αμέσως ισχυρότερα πεδία, στα 7.41 ppm ($J=8.8$ Hz) και 7.13 ppm ($^3J=8.8$ Hz) καταγράφονται τα αρωματικά πρωτόνια H4 και H3 ως δυο διπλές κορυφές. Στα 6.87 ppm συντονίζεται το αρωματικό πρωτόνιο H2. Ακολουθεί η κορυφή στα 3.85 ppm με ολοκλήρωση 3, όπου συντονίζονται τα πρωτόνια H5 της μεθοξυ-ομάδας. Στα 2.99 ppm και 2.89 ppm ως απλές κορυφές με συνολική ολοκλήρωση 6 καταγράφονται τα αμιδικά πρωτόνια H6. Τέλος, η χαρακτηριστική σχετικά ευρεία απλή κορυφή στα 10.01, που δηλώνει και την επιτυχή πραγματοποίηση της αντίδρασης, αντιστοιχεί στο αμινικό πρωτόνιο H9.



Σχήμα 7.53: Φάσμα ^1H -NMR (250 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης **Rib1**.

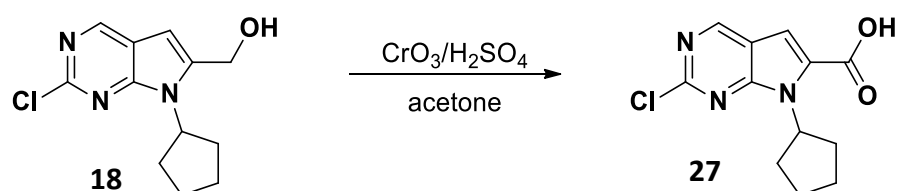


Σχήμα 7.54: Φάσμα ¹³C-NMR (100 MHz σε DMSO-d₆) της ένωσης **Rib1**.

7.3.ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ

7.3.1. Οξείδωση Jones

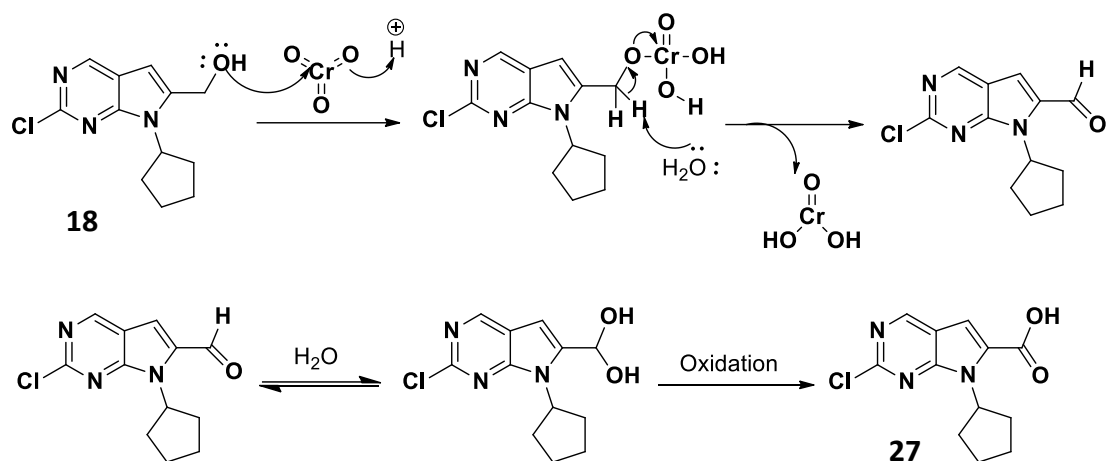
Έγινε μια προσπάθεια βελτιστοποίησης του σταδίου σχηματισμού του αμιδίου. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι μια πορεία δυο σταδίων αντί του ενός, η συνολική απόδοση, ωστόσο, είναι αισθητά αυξημένη. Το πρώτο εκ των δυο σταδίων είναι μια οξείδωση της αλκοόλης προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ με τη χρήση του οξειδωτικού μέσου CrO_3 σε διαλύτη ακετόνη. Η πορεία που ακολουθείται είναι μια αντίστροφη πορεία, δηλαδή προσθέτουμε το αντιδραστήριο στο διάλυμα του καταλύτη, καθότι το αντιδρών θα πρέπει να βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση, δεδομένου ότι περνάει από το στάδιο της αλδεΐδης, ώστε τελικά να οξειδωθεί προς καρβοξυλικό οξύ και να μην αντιδράσει η αλδεΐδη με την αλκοόλη οδηγώντας στον σχηματισμό παραπροϊόντος. Για τον ίδιο λόγο, είναι πολύ σημαντικό η προσθήκη να διενεργείται πολύ αργά υπό ψύξη στους 0°C .



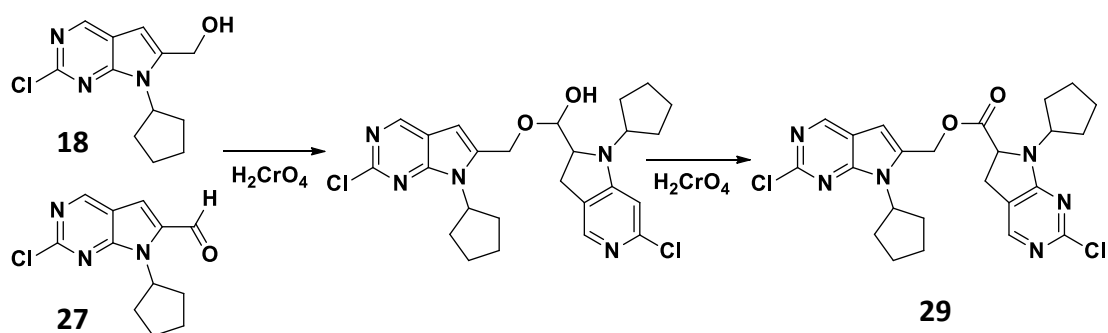
Σχήμα 7.55: Οξείδωση Jones της ένωσης **18** προς το καρβοξυλικό οξύ αυτής (**27**).

Προσπάθεια	CrO_3	Αλκοόλη	Ακετόνη	H_2O	H_2SO_4	$T(^{\circ}\text{C})$	Σχηματισμός Προϊόντος	t(h)
1 ^η	40mg	10mg	80mL	30mL	1M	r.t.	Αρκετό παραπροϊόν	1h
2 ^η	40mg	10mg	80mL	30mL	2M	r.t	Αρκετό παραπροϊόν	1h
3 ^η	80mg	20mg	150mL	50mL	2M	0°C	43%	2h
4 ^η	150mg	50mg	150mL	50mL	4M	r.t	52%	2h
5 ^η	200mg	50mg	300mL	50mL	4M	0°C	76%	3h

Σχήμα 7.56: Πίνακας προσπαθειών σύνθεσης της ένωσης **27**.



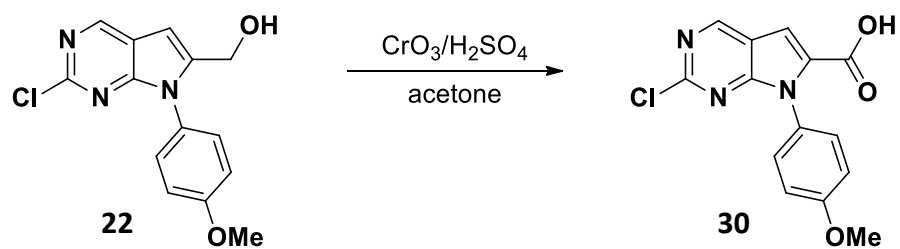
Σχήμα 7.57: Μηχανισμός οξείδωσης κατά Jones της ένωσης **18**.



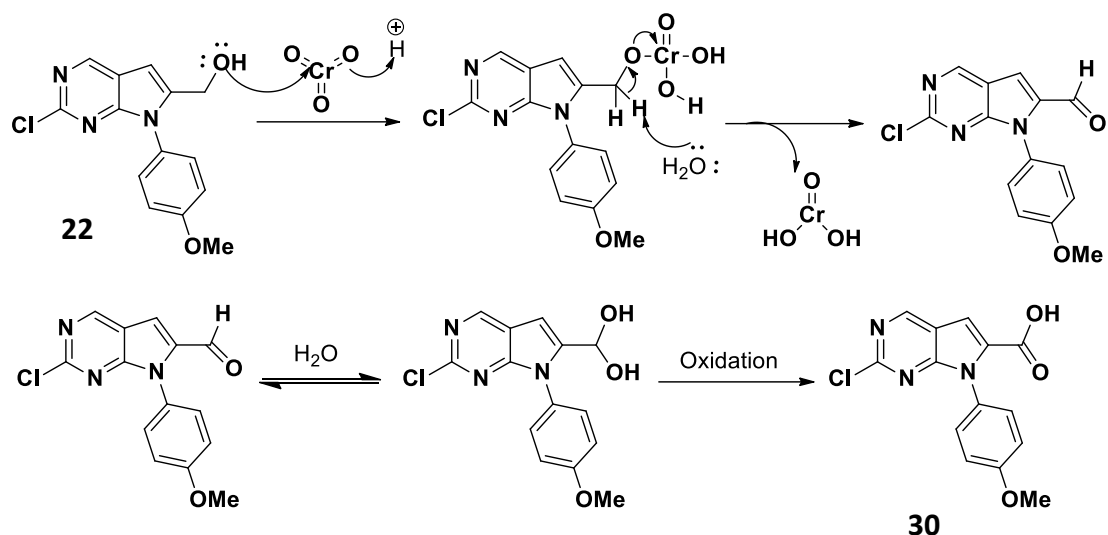
Σχήμα 7.58: Σχηματισμός διμερούς εστέρα **29** (παραπροϊόν).

Η αντίδραση σύνθεσης του καρβοξυλικού οξέος **27** ήταν επιτυχής. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3h με απόδοση μεγαλύτερη του 76%.

Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η προσπάθεια σύνθεσης του καρβοξυλικού οξέος **30**.



Σχήμα 7.59: Οξείδωση κατά Jones της ένωσης **22** προς το καρβοξυλικό οξύ αυτής (**30**).

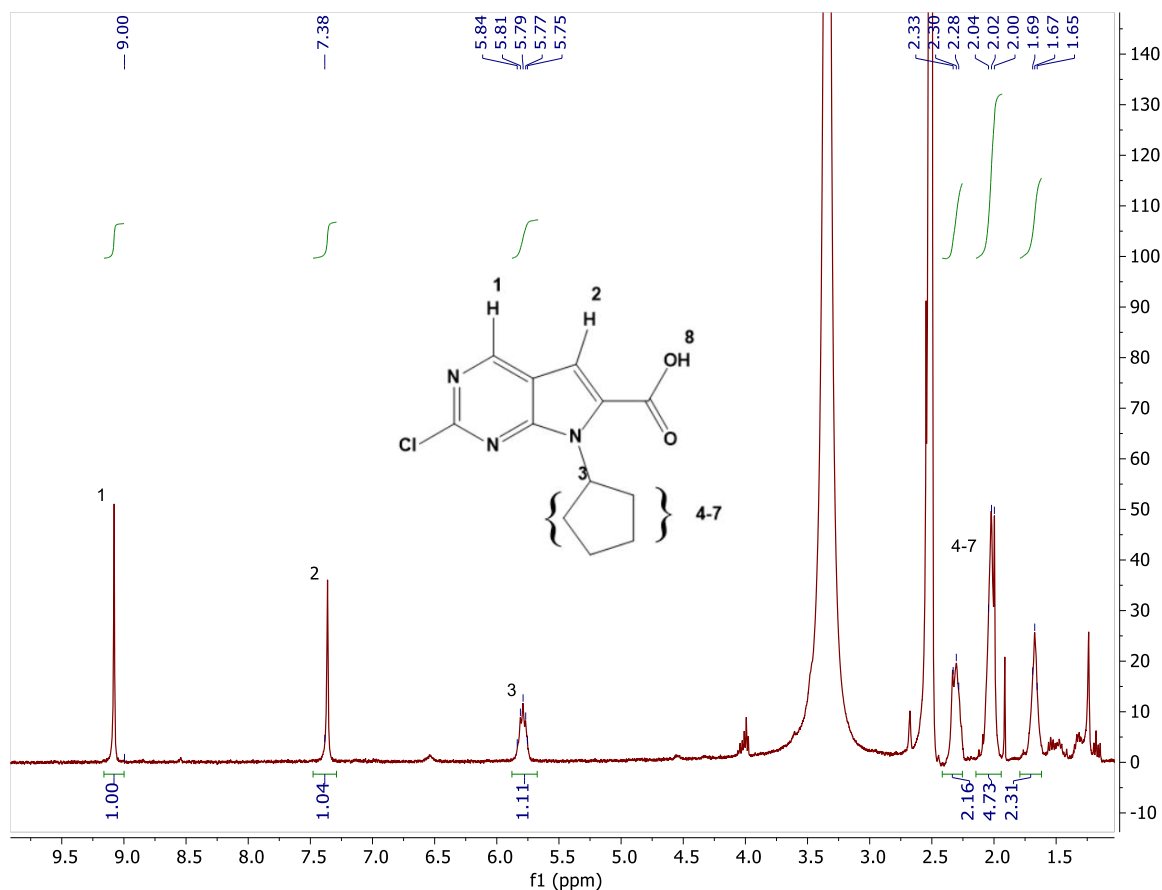


Σχήμα 7.60: Μηχανισμός οξείδωσης κατά Jones της ένωσης **22**.

Στην περίπτωση σύνθεσης της ένωσης **30**, ενώ το καρβοξυλικό οξύ σχηματίστηκε σε μεγάλο βαθμό (διαπίστωση από έλεγχο με TLC), υπήρξε πρόβλημα στην επεξεργασία κατά τις βασικές και όξινες εκχυλίσεις για την απομόνωση του προϊόντος, καθώς το οξύ ήταν ευδιάλυτο και στην υδατική και στην οργανική φάση.

7.3.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-κυκλοπεντυλ-2-χλωρο-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξυλικό οξύ (**27**)

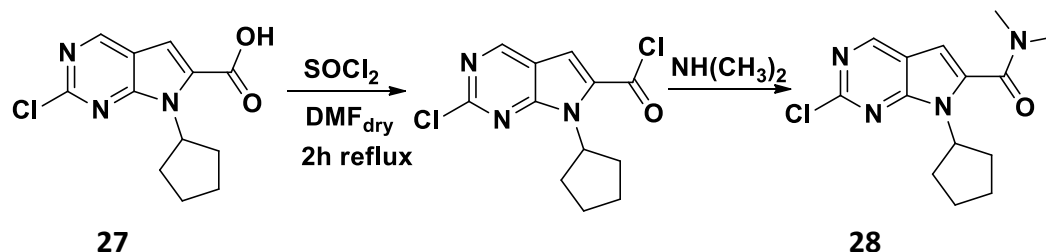
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **27** το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H1 το οποίο συντονίζεται στα 9.00 ppm ως απλή κορυφή. Σε αμέσως ισχυρότερο πεδίο καταγράφεται ως απλή κορυφή το αρωματικό H2 στα 7.38 ppm και το H3 του πενταμελούς δακτυλίου ως πενταπλή κορυφή στα 5.79 ppm. Στην περιοχή 2.33-1.65 ppm συντονίζονται τα 8 πρωτόνια του πενταμελούς δακτυλίου.



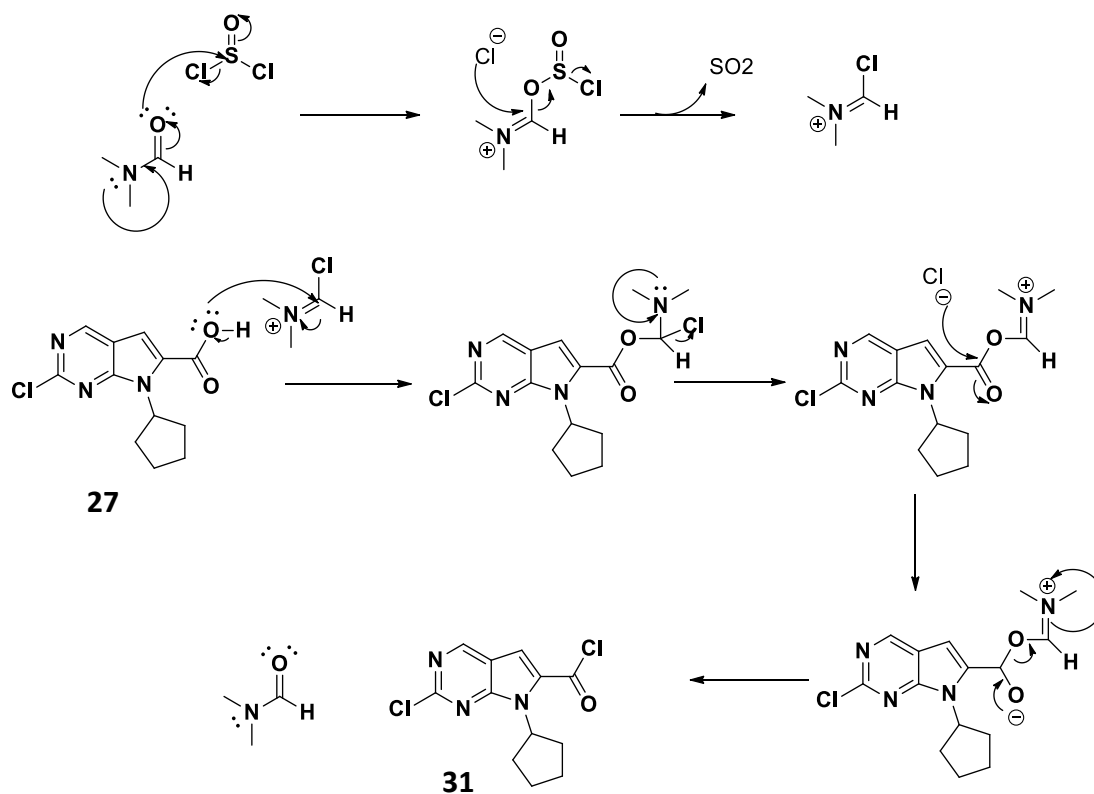
Σχήμα 7.61: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz σε DMSO- d_6) της ένωσης **27**.

7.3.3.Σύνθεση αμιδίου με SOCl₂

Η σύνθεση του αμιδίου **28** μέσω αντίδρασης θειονυλοχλωριδίου γίνεται σε δύο βήματα. Αρχικά προστίθεται στην σφαιρική φιάλη η αρχική ένωση σε SOCl₂ και καταλυτική ποσότητα DMF(dry). Μετά από δύο ώρες σε βρασμό υπό αναρροή προστίθεται η διμεθυλαμίνη και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση.



Σχήμα 7.62: Αντίδραση σύνθεσης αμιδίου **28**.

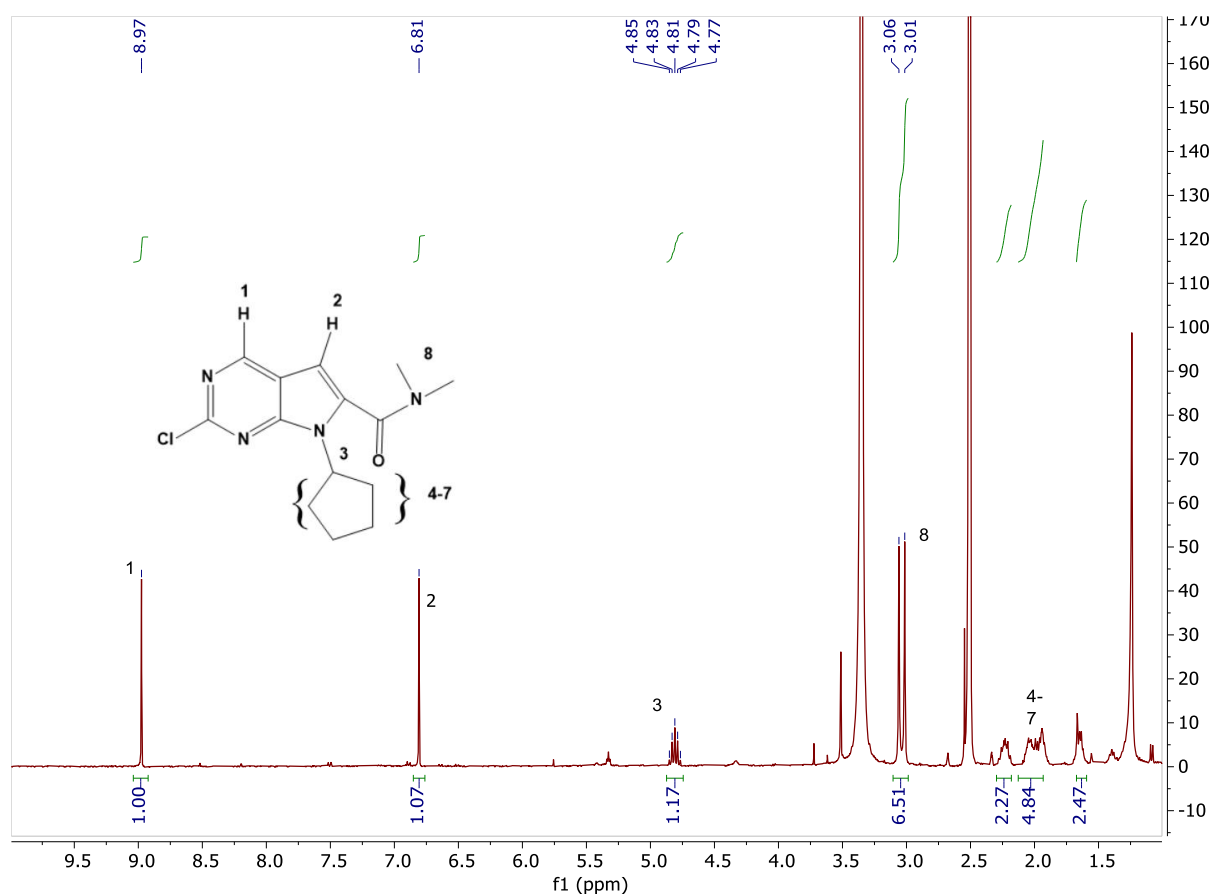


Σχήμα 7.63: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης του χλωριδίου του οξέος **31**.

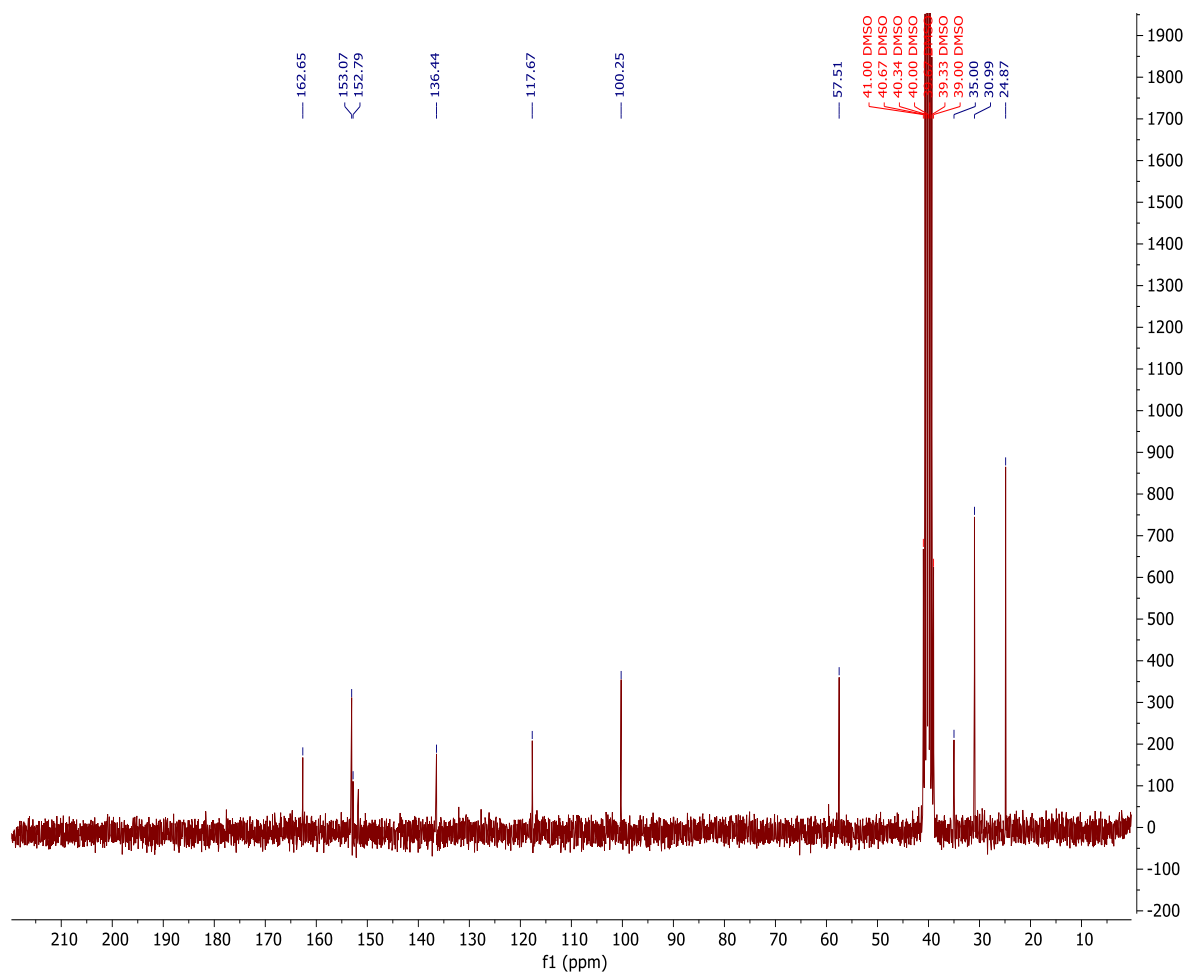
Η απόδοση της αντίδρασης αυτής είναι 63% και έτσι η συνολική αντίδραση σύνθεσης του αμιδίου από την αλκοόλη αγγίζει το 48%, σε σύγκριση με το 39.8% που κατέστη εφικτό να απομονωθεί με την κλασική μέθοδο οξείδωσης με MnO₂.

7.3.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιдино-6-καρβοξαμίδιο (**28**)

Στο φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **28** το H1 καταγράφεται στο φάσμα ως απλή κορυφή στα 8,97 ppm. Ακολουθεί το H2 στα 6,81 ως απλή κορυφή. Χαρακτηριστικές κορυφές που επιβεβαιώνουν τον σχηματισμό της ένωσης αποτελούν οι δυο απλές κορυφές των πρωτονίων H8 των δύο μεθυλομάδων στα 3,06 και 3,01 ppm με ολοκλήρωση τρία η κάθε μια γεγονός που αποδεικνύει το σχηματισμό του αμιδίου. Η χημική μετατόπιση στα 4,81 ppm ($^3J=8.7$ Hz) αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3 και εμφανίζεται ως μια πενταπλή κορυφή. Τέλος, τα πρωτόνια του πενταμελούς δακτυλίου H4-H7 εντοπίζονται στην περιοχή 2,25-1,67ppm.



Σχήμα 7.64: Φάσμα ^1H -NMR (400 MHz σε DMSO- d_6) της ένωσης **28**.



Σχήμα 7.65: Φάσμα ^{13}C -NMR (100MHz σε DMSO) της ένωσης **28**.

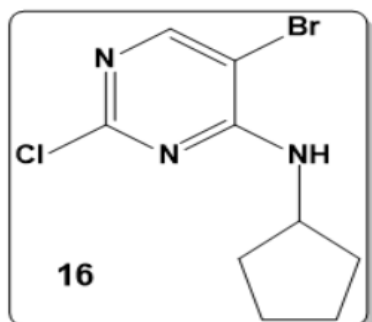
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Πειραματικό μέρος

8.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H -NMR και ^{13}C -NMR έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο AV 400 MHz και σε AV 250 MHz.
- Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Aldrich, Fluorochem, και Carbosynth, όπου χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία.
- Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται, επίσης, από τις παραπάνω εταιρείες.
- Οι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν για την αναλυτική επεξεργασία των αντιδράσεων και, όπου ήταν απαραίτητο, κατέστησαν απόλυτοι και έπειτα διατηρήθηκαν σε αδρανές περιβάλλον.
- Ο καθαρισμός των ενώσεων έγινε με χρωματογραφία στήλης, όπου χρησιμοποιήθηκε 9385 silica gel F254 της Merck, καθώς και με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδος με πλάκες silica gel F254 ms της Merck.

8.2. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλο-πυριμιδιν-4-αμίνη (16)

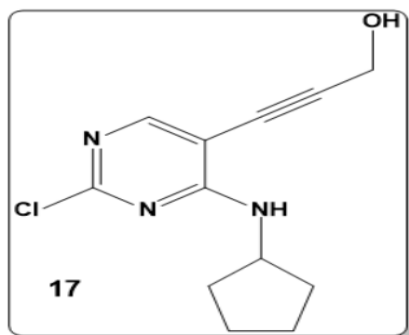


Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρονται 2.0 g της ένωσης 5-βρωμο-2,4- διχλωροπυριμιδίνης (8.77 mmol) και 10.0 mL οξικού αιθυλεστέρα. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί η αρχική ένωση και στη συνέχεια προστίθενται 1.5 mL *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (DIPEA) (1.13 g, 8.77 mmol, $d = 0.742 \text{ g/mL}$). Ακολουθως, προστίθεται στάγδην με μια πιπέτα το διάλυμα της κυκλοπεντυλαμίνης 1.0 mL (10.53 mmol, 0.897 g, $d = 0.863 \text{ g/mL}$) διαλυμένο οξικό αιθυλεστέρα (10.0 mL) σε διάστημα μιας ώρας. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, το μίγμα θερμαίνεται στους 45 °C μέχρι κατανάλωσης της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε Εξάνιο : Διχλωρομεθάνιο (1:2). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 6h. Μετά την ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε εκχύλιση με απεσταγμένο νερό. Η οργανική φάση που λαμβάνεται εκχυλίζεται συνολικά τρεις φορές με νερό (3x20 mL) για την απομάκρυνση των αλάτων. Οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και εκχυλίζονται μια φορά με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα, για την πλήρη απομόνωση του προϊόντος. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na_2SO_4 , διηθείται

και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστή υπό ελαττωμένη πίεση. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, λαμβάνεται έλαιο κίτρινου χρώματος. Το μίγμα καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών έκλουσης Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο (2:1) και ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού. Παραλήφθηκαν 1.94g προϊόντος ως λευκό κρυσταλλικό στερεό (**81 %**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 4.44(six, $J=6.7\text{Hz}$, 1H), 2.06-2.01 (m, 2H), 1.73-1.63 (m, 4H), 1.48-1.42 (m, 2H).

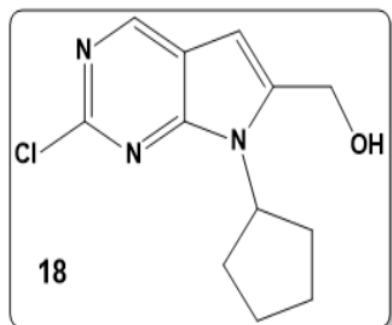
8.3. Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινοπυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-ολη (17)



Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρονται 1.94 g της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-κυκλοπεντυλοπυριμιδιν-4-αμίνης (7.01 mmol) και 8 mL τετραϋδροφουράνιο. Έπειτα, προστίθενται ο καταλύτης τετράκις-τριφαινυλοφωσφίνη παλλάδιο(0) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (524mg, 0.453 mmol), το τριένυδρο φθοριούχο τετραβουτυλ-αμμώνιο ($\text{TBAF} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (14g, 22.64 mmol) και τέλος η προπ-2-υν-1-όλη (680μL, 660 mg, 11.77 mmol, $d = 0.971 \text{ g/mL}$). Το μίγμα θερμαίνεται και παραμένει σε βρασμό υπό αναρροή, έως ότου καταναλωθεί η αρχική ένωση, για περίπου 4 ώρες. Το χρώμα του μίγματος της αντίδρασης αλλάζει από κίτρινο σε καστανό χρώμα, ένδειξη για την πρόοδο της αντίδρασης. Το σύστημα ελέγχου με TLC για την πορεία της αντίδρασης είναι Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Το μίγμα ψύχεται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστή για την απομάκρυνση του THF. Λαμβάνεται ένα καστανόχρωμο ίζημα το οποίο διαλύεται σε 60 mL οξικού αιθυλεστέρα και η φιάλη ξαναφέρεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα για πλήρη απομάκρυνση του THF. Στη συνέχεια, προστίθενται 25 mL υδατικού διαλύματος NaHCO_3 4.2% για την εξουδετέρωση της προπαραγωγικής αλκοόλης και 25mL οξικού αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται τρεις φορές με 20mL απεσταγμένο νερό. Οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και απορρίπτονται. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και προστίθεται άνυδρο Na_2SO_4 ως ξηραντικό, το ξηραντικό διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται. Έτσι, λαμβάνεται λασπώδες ίζημα καστανού χρώματος. Το υπόλειμμα διαλύεται σε μικρή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και διηθείται υπό κενό, με αργό ρυθμό πάνω από στρώμα celite. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Εξάνιο : Οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Παραλήφθηκαν 0.847 g προϊόντος (**48.0 %**).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 4.56 (d, $J=8\text{Hz}$ 2H), 4.45 (six, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 2.17 (m, 2H), 1.75-1.64 (m, 4H), 1.48-1.43 (m, 2H).

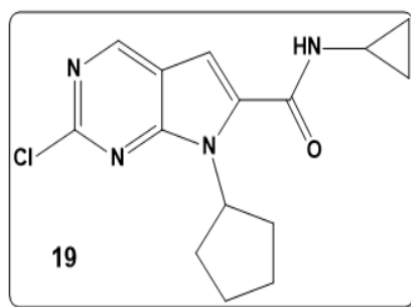
8.4. Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη (18)



Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστίθενται 0.847g (3.37 mmol) της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-(κυκλοπεντυλαμινο)πυριμιδιν-5-υλο)προπ-2-υν-1-όλη και 10 mL THF. Αμέσως μετά τη διαλυτοποίηση της αρχική ένωσης προστίθενται 2.66 g TBAF·3H₂O (8.41 mmol). Το μίγμα φέρεται σε συνθήκες βρασμού υπό αναρροή (reflux) μέχρι να διαπιστωθεί με TCL η πλήρης κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 1.5h. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι Διχλωρομεθάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Στη συνέχεια, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα, προστίθεται ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και οι διαλύτες απομακρύνονται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού για την πλήρη απομάκρυνση του THF. Το προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (1:2). Παραλήφθηκαν 0.78 g προϊόντος (**92.0 %**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.95 (qui, ³J=8.5 Hz, 1H), 4.85 (d, ³J=5.3 Hz, 2H), 2.54-2.37 (m, 2H), 2.13-2.07 (m, 4H), 1.89 (s, 1H), 1.74-1.70 (m, 1H).

8.5. Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-N-κυκλοπροπυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο (19)



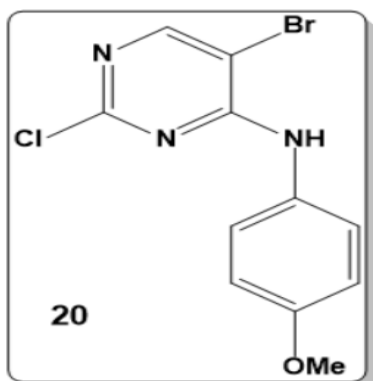
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 0.78 g της (2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πύρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης (3.09 mmol) και 10 mL άνυδρο DMF. Στη συνέχεια προστίθενται 40.3 mg KCN (0.62 mmol) και 855 μL διαλύματος κυκλοπροπυλαμίνης (12.36 mmol, d=0.824 g/mL). Το μίγμα αναδεύεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ξεκινάει η σταδιακή προσθήκη του MnO₂ (0.65 g, 7.43 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 30 min και ακολουθεί προσθήκη συνολικά 3.85 g MnO₂ (44.25 mmol) σε τρία μέρη, ανά μισή ώρα, ως εξής:

- 1^ο μέρος: 0.65 g,
- 2^ο μέρος: 1.26 g και
- 3^ο μέρος: 1.94 g.

Μετά την προσθήκη του 3^{ου} μέρους το μείγμα της αντίδρασης, αφήνεται υπό ανάδευση για 1h και στη συνέχεια προστίθεται επιπλέον 1.94 g MnO₂ (22.28 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου διαπιστωθεί η κατανάλωση της αρχικής ένωσης στο TLC. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι το Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε συνολικά στις 4h. Ακολούθως, το μίγμα της αντίδρασης διηθείται σε ηθμό υπεράνω σελίτη και οξικό αιθυλεστέρα για την απομάκρυνση του MnO₂. Οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το μίγμα ξηραίνεται υπό κενό με τη χρήση αντλίας υψηλού κενού για την απομάκρυνση του DMF. Το άμορφο στερεό, που προκύπτει μετά την ξήρανση του DMF, διαλύεται σε 25 mL οξικού αιθυλεστέρα και πραγματοποιούνται διαδοχικές οι εξής εκχυλίσσεις: αρχικά πραγματοποιείται εκχύλιση με 20 mL υδατικού διαλύματος FeSO₄·7H₂O (1.07 g) για την απομάκρυνση των κυανιούχων ιόντων, καθώς και άλλες δύο εκχυλίσσεις με απιονισμένο H₂O. Οι υδατικές φάσεις συλλέχθηκαν και ξηράθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄. Το ξηραντικό απομακρύνθηκε με διήθηση και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση και παραλήφθηκε ένα παχύρευστο στερεό. Το ακατέργαστο μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης διαλυτών εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Το προϊόν απομονώθηκε καθαρό ως έλαιο αχνού κίτρινου χρώματος. Παραλήφθηκαν 297 mg προϊόντος (**31.4%**).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ 9.05 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 5.47 (qui, ³J=8.7 Hz, 1H), 2.78(m, 2H), 2.23 (m, 4H), 2.0 (m, 4H), 1.66 (m, 2H), 1.29 (m, 1H).

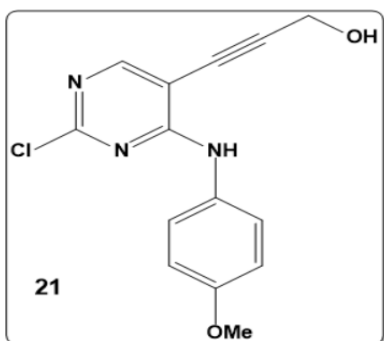
8.6. Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδιν-4-αμίνη (20)



Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρονται 1.50 g της ένωσης 5-βρωμο-2,4- διχλωροπυριμιδίνης (6.58 mmol) και διαλύονται σε 10 mL οξικού αιθυλεστέρα. Στη συνέχεια προστίθενται 1.15 mL DIPEA (0.85 g, 6.58 mmol, $d=0.742$ g/mL), καθώς και στάγδην 0.9 mL 4-μεθοξυανιλίνης (7.9 mmol, 0.973 g, $d = 1.071$ g/mL) διαλυμένα σε οξικό αιθυλεστέρα (10 mL) σε διάστημα 45 λεπτών. Με την ολοκλήρωση της προσθήκης, το μίγμα θερμαίνεται στους 40°C για περίπου 2h ή έως ότου διαπιστωθεί κατανάλωση της αρχικής ένωσης με TLC. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο (2:1). Μετά την ψύξη του μίγματος πραγματοποιούνται διαδοχικές εκχυλίσσεις (3 x 10mL) με απιονισμένο H₂O. Οι υδατικές φάσεις απορρίφθηκαν, ενώ οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ξηράθηκαν με Na₂SO₄. Το ξηραντικό απομακρύνθηκε με διήθηση και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Λήφθηκε έλαιο κίτρινου χρώματος το οποίο καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Εξάνιο:Διχλωρομεθάνιο (2:1). Παραλήφθηκαν 1.946g προϊόντος (97.0 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (s, 1H), 7.5 (d, ³J=9.0 Hz, 2H), 7.19 (s, 1H), 6.96 (d, ³J=9.0 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H)

8.7. Σύνθεση της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλ)προπ-2-υν-1-ολη (21)



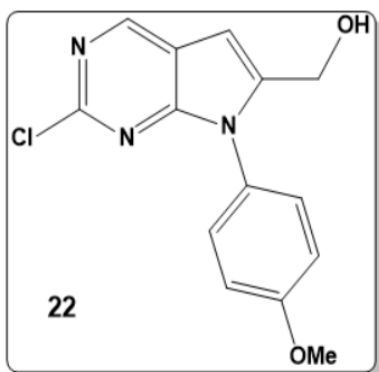
Σε σφαιρική φιάλη των 100mL φέρονται 1.946g (6.18 mmol) της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(4-μεθοξυφαινυλο)πυριμιδίνης-4-αμίνη τα οποία διαλύονται σε 10 mL τετραϋδροφουράνιο. Ακολούθησε προσθήκη 4.88 g TBAF·3H₂O (15.46 mmol), 357.5 mg Pd(PPh₃)₄ (0.31 mmol) και 428 μL προπαργυλικής αλκοόλης (416 mg, 7.43 mmol, $d = 0.9715$ g/mL). Το μίγμα φέρεται σε συνθήκες βρασμού με αναρροή για περίπου 3h ή έως ότου παρατηρηθεί πλήρης κατανάλωση της αρχικής στο TLC. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι οξικός αιθυλεστέρας:εξάνιο (1:1). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και ο διαλύτης απομακρύνεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στο υπόλειμμα προστίθενται 10 mL οξικού αιθυλεστέρα και το μίγμα διαλυτών εξατμίζεται μέχρι

ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την πλήρη απομάκρυνση του THF. Ακολούθησαν εκχυλίσσεις με διάλυση του μίγματος σε 40mL οξικού αιθυλεστέρα και ίσο όγκο υδατικού διαλύματος NaHCO_3 4%, ώστε να εξουδετερωθεί η περίσσεια της προπαργυλικής αλκοόλης. Η οργανική φάση εκχυλίστηκε τρεις φορές με νερό (3x40 mL) και στη συνέχεια ξηράθηκε με Na_2SO_4 . Το μίγμα διηθήθηκε και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Λήφθηκε λασπώδες ίζημα καστανού χρώματος, το οποίο διαλυτοποιήθηκε σε ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και διηθήθηκε σε ηθμό με την χρήση selite για την απομάκρυνση του καταλύτη. Μετά από εξάτμιση του διαλύτη πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της ουσίας με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Παραλήφθηκαν 0.6992 g προϊόντος (**39.0 %**).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.95 (s, 1H), 7.42 (d, $^3J=9.0$ Hz, 2H), 7.12 (d, $^3J=9.0$ Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 5.41 (t, $^3J=5.6$ Hz, 1H), 4.47 (d, $^3J=5.4$ Hz, 2H), 3.86 (s, 3H)

^{13}C -NMR (100MHz, DMSO- d_6) δ : 158.81, 155.68, 153.46, 152.90, 141.62, 139.02, 141.62, 139.02, 129.89, 118.03, 115.56, 101.77, 56.63, 38.38, 34.81

8.8. Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(4-μεθοξυφαινυλο)-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (22)



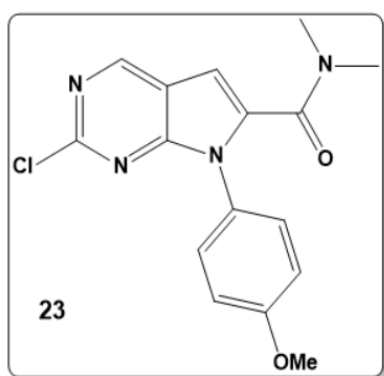
Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρονται 0.6992 g (2.41 mmol) της ένωσης 3-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλ)αμινο)πυριμιδιν-5-υλ)προπ-2-υν-1-ολη και 10 mL τετραϋδροφουράνιο. Ακολούθως, προστίθενται 10.0 mL διαλύματος TBAF·3H₂O (1.90 g, 6.03 mmol) και το μίγμα φέρεται σε συνθήκες βρασμού υπό αναρροή. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1,5h και ως σύστημα ελέγχου της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε οξικός αιθυλεστέρας:εξάνιο (1:1). Το μίγμα της

αντίδρασης ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στο υπόλειμμα προστίθενται 10 mL οξικού αιθυλεστέρα και οι διαλύτες απομακρύνονται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολούθησαν εκχυλίσσεις με διάλυση του μίγματος σε 40mL οξικού αιθυλεστέρα και απιονισμένο νερό. Η οργανική φάση που λήφθηκε, εκχυλίστηκε ακόμα δύο φορές με νερό (2 x 40 mL). Στη συνέχεια ξηράθηκε με Na_2SO_4 , διηθήθηκε, απομακρύνθηκε ο διαλύτης και προέκυψε λασπώδες ίζημα καστανού χρώματος. Το προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα διαλυτών έκλουσης Εξάνιο : Οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Παραλήφθηκαν 0.6852 g προϊόντος (**98.0 %**).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.08 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.39 (d, $^3J=9.0$ Hz, 2H), 6.97 (d, $^3J=9.0$ Hz, 2H), 5.36 (t, $^3J=5.9$ Hz, 1H), 4.38 (d, $^3J=5.6$ Hz, 2H), 3.77 (s, 3H)

^{13}C -NMR (100MHz, DMSO- d_6) δ : 167.15, 161.61, 151.30, 143.38, 129.58, 118.71, 115.02, 98.89, 56.06, 55.96

8.9. Σύνθεση της ένωσης 1-(2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλ)-2-(διμεθυλαμινο)αιθανόνη (23)



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 0.68g (2.07mmol) της ένωσης (2-χλωρο-4-((4-μεθοξυφαινυλο)-7H-πυρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλ)μεθανόλη και 10 mL άνυδρο DMF. Στη συνέχεια προστίθενται 35mg (0.48mmol) KCN και 650μL διαλύματος διμεθυλαμίνης (9.60mmol, $d=0.67$ g/mL). Το μίγμα αναδεύεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ξεκινάει η σταδιακή προσθήκη του MnO_2 .

Αρχικά γίνεται προσθήκη 0.35g (4.12 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για περίπου 30 min και ακολουθεί προσθήκη συνολικά 0.87g MnO_2 (9.99 mmol) σε τρία μέρη, ανά μισή ώρα, ως εξής:

- 1^ο μέρος: 0.35 g,
- 2^ο μέρος: 0.98 g και
- 3^ο μέρος: 1.49 g.

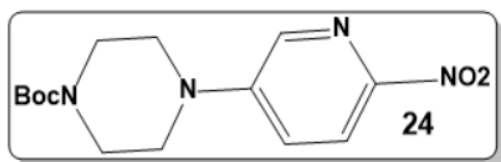
Μετά την προσθήκη του 3^{ου} μέρους το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 1h και στη συνέχεια προστίθεται επιπλέον 1.49 g MnO_2 . Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου διαπιστωθεί η κατανάλωση της αρχικής ένωσης στο TLC. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι το διχλωρομεθάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (1:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε συνολικά στις 3h. Ακολούθως, το μίγμα της αντίδρασης διηθήθηκε σε ηθμό υπεράνω σελίτη και οξικό αιθυλεστέρα για την απομάκρυνση του MnO_2 . Οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το μίγμα ξηραίνεται υπό κενό με τη χρήση αντλίας υψηλού κενού για την απομάκρυνση του DMF. Το στερεό, που προκύπτει μετά την ξήρανση, διαλύεται σε 25 mL οξικού αιθυλεστέρα και πραγματοποιούνται διαδοχικές εκχυλίσσεις, ως εξής: αρχικά πραγματοποιείται εκχύλιση με 20 mL υδατικού διαλύματος $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.07 g) για την απομάκρυνση των κυανιούχων ιόντων, καθώς και άλλες δύο εκχυλίσσεις με απιονισμένο H_2O . Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν και ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 , το οποίο απομακρύνθηκε με διήθηση και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Παραλήφθηκε ένα παχύρευστο στερεό και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλυσης διαλυτών διχλωρομεθάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (2:1) →

διχλωρομεθάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (1:1) . Το προϊόν απομονώθηκε ως έλαιο αχνού κίτρινου χρώματος. Παραλήφθηκαν 260mg προϊόντος (**38.0 %**).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.09 (s, 1H), 7.36 (d, $^3J=9.0$ Hz, 2H), 7.10 (d, $^3J=9.0$ Hz, 2H) 7.02 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 2.87 (s, 3H).

^{13}C -NMR (100MHz, DMSO- d_6) δ : 159.59, 153.47, 136.81, 128.49, 117.30, 114.84, 101.33, 55.93, 38.69, 34.81.

8.10. Σύνθεση του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (24)

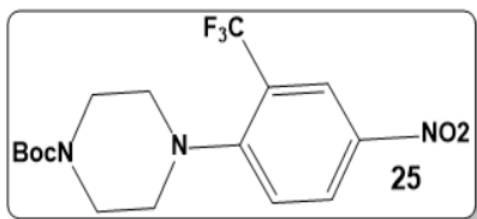


Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρονται 200 mg της ένωσης 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη (1.26mmol) και 10 mL *n*-BuOH. Ακολούθως, προστίθενται 465mg 1-Boc-πιπεραζίνης (2.48 mmol) και 50mg ανθρακικού νατρίου (0.47mmol). Το μίγμα

θερμάνθηκε στους 90-100°C για 30h. Το σύστημα ελέγχου με TLC της αντίδρασης είναι εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης η 1-βουτανόλη απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το μίγμα διαλυτοποιήθηκε εκ νέου σε 20mL οξικού αιθυλεστέρα. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές εκχυλίσσεις με απιονισμένο νερό (3x20mL) . Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ξηράθηκαν με Na_2SO_4 . Έπειτα, πραγματοποιήθηκε διήθηση του ξηραντικού και το διήθημα εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Η απομόνωση του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Παραλήφθηκαν 280mg προϊόντος (**72.0%**).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (s, 1H), 7.21 (dd, $^3J=4.44$ Hz, 1H), 6.52 (d, $^3J=8.68$ Hz, 1H), 3.59 (t, $^3J=4.52$ Hz, 4H), 2.98 (m, 4H), 1.50 (s, 9H)

8.11. Σύνθεση του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(4νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)φαίνυλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (25)

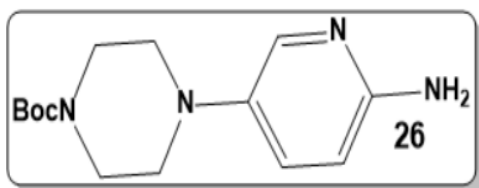


Σε σφαιρική φιάλη των 50mL φέρονται 200 mg της ένωσης 4-νιτρο-1-φθορο-2-(τριφθορομεθυλο)βενζόλιο (0.95 mmol) και 10 mL 1-βουτανόλη. Μετά τη διαλυτοποίηση της αρχικής ένωσης προστίθενται 300 mg 1-Boc-πιπεραζίνης (1.61 mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 95°C για 4h. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:μεθανόλη (5:1:0.1). Μετά την ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου απομακρύνθηκε η 1-βουτανόλη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα διαλυτοποιήθηκε σε 20 mL οξικού αιθυλεστέρα και εκχυλίστηκε 3 φορές με ίσους όγκους απιονισμένου νερού (3x20mL). Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ξηράθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄. Ακολούθησε διήθηση του ξηραντικού και απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Η απομόνωση του προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών έκλουσης εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:μεθανόλη (5:1:0.1). Παραλήφθηκαν 152mg προϊόντος (45.0 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (d, ⁴J=2.7 Hz, 1H), 8.36 (dd, ³J=9.0 Hz, ⁴J=2.7 Hz, 1H), 7.32 (d, ³J = 9.0 Hz, 1H), 3.61 (t, ³J = 5.0 Hz, 4H), 3.08 (t, ³J = 5.0 Hz, 4H), 1.50 (s, 9H).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl₃) δ: 157.05, 154.66, 142.80, 127.93, 125.57, 125.17, 125.08, 124.58, 124.49, 124.40, 124.31, 122.88, 120.82, 80.17, 52.79, 29.68, 28.40.

8.12. Σύνθεση του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλ)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικός τριτ-βουτυλεστέρα (26)

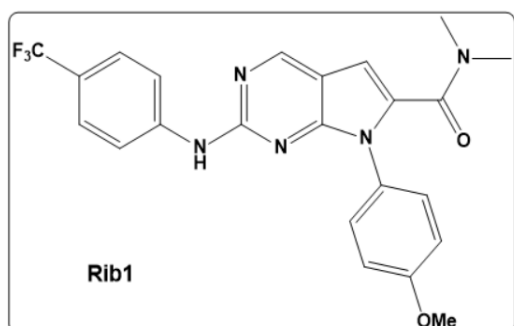


Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 280 mg της ένωσης του *tert*-βουτυλεστέρα του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (0.91 mmol) και 10 mL THF. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό έντονη ανάδευση προστίθενται 46.1 mg καταλύτη Adams (ένυδρο διοξείδιο του λευκοχρύσου) και εφαρμόζεται μπαλόνι υδρογόνου. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC σε διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε περίπου σε 15–30 min με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Γίνεται διήθηση του καταλύτη σε ηθμό από σελίτη πλένοντας τον ηθμό με οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη. Μετά την συμπύκνωση των διαλυτών η αμίνη διαλύεται σε θερμό εξάνιο και με τη βοήθεια των υπερήχων σχηματίζεται ίζημα, στο οποίο προσθέτουμε αιθέρα

για την πλήρη καταβύθιση του προϊόντος. Με περαιτέρω ψύξη του μίγματος στους 4 °C και διήθηση υπό κενό λαμβάνεται κεραμέρυθρο ίζημα, το οποίο εκπλένεται με αιθέρα. Μετά από την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνονται 176.7 mg προϊόντος (**69.8 %**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, *J* = 2.94 Hz, 1H), 7.2 (dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 2.87 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 8.83 Hz, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.60 – 3.53 (m, 4H), 2.98 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 1.50 (s, 9H).

8.13. Σύνθεση της ένωσης 7-(4-μεθοξυφαινυλ)-*N,N*-διμεθυλ-2-((4-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ)αμινο)-7H-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινο-6-καρβοξαμίδιο (Rib1)



Σε μία σφαιρική φιάλη των 25 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 45.5 mg της ένωσης 23 (0.15 mmol) και 20.7μL 4-(τριφθορομεθυλο)-ανιλίνης (26.6 mg, 0.165 mmol) μαζί με 1 mL MIBK. Στη συνέχεια προστίθενται 5 mg Pd(OAc)₂ και 15.7 mg BINAP και το μίγμα θερμάνθηκε στους 40 °C. Στη θερμοκρασία αυτή έγινε

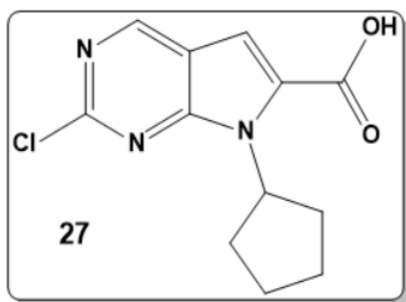
προσθήκη, σε διάστημα 30 λεπτών, 73.3 mg ανθρακικού καυσίτου σε τρία ίσα μέρη. Μετά δε το τέλος των προσθηκών, το μίγμα θερμάνθηκε στους 100- 110 °C επί τουλάχιστον 3 ώρες. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι διχλωρομεθάνιο:ακετόνη (8:1). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 4h. Μετά την ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, ο διαλύτης απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το ακατέργαστο μίγμα διαλυτοποιήθηκε σε 10mL οξικού αιθυλεστέρα. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό σε ηθμό υπεράνω σελίτη για την απομάκρυνση του καταλύτη. Στην συνέχεια έλαβαν χώρα 3 διαδοχικές εκχυλίσσεις με οξικό αιθυλεστέρα και ίσο όγκο απιονισμένου νερού (3 x 20mL) . Η υδατικές φάσεις απορρίφθηκαν. Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ξηράθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄. Ακολούθησε διήθηση του ξηραντικού και απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Τέλος, ακολούθησε καθαρισμός του τελικού προϊόντος και απομόνωση με παρασκευαστική πλάκα TLC, με σύστημα ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο:ακετόνη(7:1). Παραλήφθηκαν 19.8 mg προϊόντος ως στερεό κίτρινου χρώματος (**29%**).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.01 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.00 (d, ³*J*=8.5 Hz, 2H), 7.59 (m, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.41 (d, ³*J*=8.8 Hz, 2H), 7.13 (d, ³*J*=8.8 Hz, 2H) 8.87 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 2.89 (s, 3H).

^{13}C -NMR (100MHz, DMSO- d_6) δ 181.69, 162.65, 158.97, 156.56, 152.71, 152.57, 144.95, 132.85, 132.63, 132.59, 132.01, 131.86, 129.36, 129.17, 128.87, 127.97, 126.09, 118.18, 114.64, 112.11, 102.68, 55.92, 21.49.

8.14. ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

8.14.1. Σύνθεση του 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλ-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξυλικού οξέος (27) μέσω οξείδωσης Jones



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250mL και υπο ψύξη στους 0°C, φέρονται 430mg CrO₃ (4.34mmol) και διαλυτοποιούνται σε 30mL υδατικού διαλύματος H₂SO₄ 4M. Παρασκευάστηκε δεύτερο διάλυμα, όπου 345mg (1.35 mmol) της ένωσης (2-χλώρο-7-κυκλοπεντυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλης διαλυτοποιήθηκαν σε 80mL

ακετόνης. Ακολούθησε η προσθήκη του διαλύματος της αλκόολης στο διάλυμα του CrO₃. Η προσθήκη αυτή ήταν πολύ ελεγχόμενη και διήρκησε περίπου 2h. Μόλις η προσθήκη ολοκληρώθηκε το διάλυμα έμεινε υπό ανάδευση για 30min και στη συνέχεια έγινε προσθήκη 20mL διαλύματος 10% NaHSO₃ για την μετατροπή τυχόν εναπομείνουσας ποσότητας αλδεΐδης σε άλας και την απομάκρυνσή της κατά τη διαδικασία των εκχυλίσσεων. Το μίγμα διηθήθηκε σε ηθμό υπεράνω σελίτη για την απομάκρυνση του CrO₃.

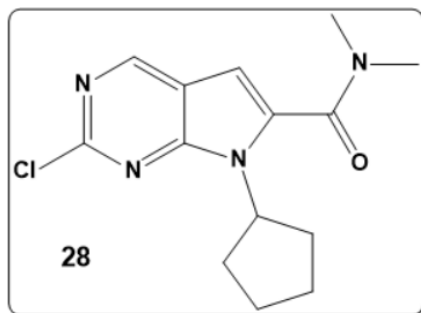
Ακολούθησαν οι εξής διαδοχικές εκχυλίσσεις:

- ❖ Βασική εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα ώστε να απομονωθούν οι οργανικές ενώσεις του διαλύματος. Με τον τρόπο αυτό το οξύ μετατρέπεται στο αντίστοιχο άλας και παραμένει στην υδατική φάση. Πραγματοποιήθηκαν άλλες δύο εκχυλίσσεις με οξικό αιθυλεστέρα ώστε να απομονωθούν και να απομακρυνθούν οι οργανικές ενώσεις. Η οργανική φάση απορρίπτεται.
- ❖ Προσθήκη διαλύματος HCl 2M στην υδατική φάση για την εξουδετέρωση του άλατος, έως το pH του διαλύματος γίνει όξινο. Με αυτόν τον τρόπο το προϊόν είναι ξανά στην όξινη μορφή του. Ακολουθούν 3 εκχυλίσσεις με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα για την πλήρη απομόνωση του προϊόντος.

Τέλος, απομακρύνθηκε ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το ίζημα ξηράνθηκε στην αντλία κενού. Παραλήφθηκαν 269mg προϊόντος ως κίτρινο στερεό (76%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.0 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 5.79 (qui, 1H), 2.33-2.28 (m, 2H), 2.04-2.0 (m, 4H), 1.69-1.65 (m, 2H).

8.14.2. Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-κυκλοπεντυλο-*N,N*-διμεθύλο-7H-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιдино-6-καρβοξαμίδιο (28) με τη χρήση SOCl₂



Σε δίλαιο σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρονται 269 mg (1.01 mmol) της ένωσης **27** και 10mL SOCl₂ ως διαλύτης και ως αντιδραστήριο, καθώς και 2 σταγόνες DMF ως καταλύτη. Η αντίδραση αφήνεται για 2h σε συνθήκες βρασμού με αναρροή ώστε να σχηματιστεί το αμίδιο. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και η περίσσεια του SOCl₂ διώχνεται με τη βοήθεια της

υδραντλίας. Ακολούθησε η προσθήκη 1mL διαλύματος N(CH₃)₂ 2M σε THF ως βάση και ως αντιδραστήριο και η αντίδραση αφήνεται εκ νέου υπό ανάδευση για 2h. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι διχλωρομεθάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (1:1) Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης απομακρύνθηκαν οι διαλύτες και η N(CH₃)₂ στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα διαλυτοποιήθηκε σε 20mL οξικού αιθυλεστέρα και εκχυλίστηκε με απιονισμένο νερό (3 x 20mL). Οι οργανικές φάσεις συνενώθηκαν και ακολούθησε ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄, διήθηση του ξηραντικού και απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (1:1) και έγινε ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού. Παραλήφθηκαν 213.4 mg (0.73 mmol) προϊόντος ως λάδι κίτρινου χρώματος (**72%**).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.97 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 4.85-4.77 (qui, *J*=8.7Hz, 1H), 3.06 (s, 3H), 3.01 (s, 3H), 2.26-2.19 (m, 2H), 2.05-1.94 (m, 4H), 1.67-1.63 (m, 2H).

¹³C-NMR (100MHz, DMSO-d₆) δ 162.65, 153.07, 152.79, 136.44, 117.67, 100.25, 57.51, 35.00, 30.99, 24.87.

Η συνολική απόδοση σύνθεσης του αμιδίου σε σχέση με την κλασική σύνθεση της Novartis ανέρχεται στο **54%** έναντι 35%.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την ολοκλήρωση του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Έγινε σχεδιασμός και μοριακή μοντελοποίηση νέων εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Ribociclib.
- ✓ Οι αλλαγές συμπεριλαμβάνουν τροποποιήσεις στην περιοχή του πιπεραζινικού δακτυλίου, στη θέση του πενταμελούς δακτυλίου, καθώς και στις μεθυλομάδες του αμιδίου.
- ✓ Οι ενώσεις αυτές έδωσαν ανάλογα ή και καλύτερα θεωρητικά αποτελέσματα, από την αντίστοιχη ένωση του Ribociclib, όπως φάνηκε από τη μοριακή μοντελοποίηση, καθώς εμφάνισαν πολύ καλές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της CDK6.
- ✓ Κατέστη δυνατή η ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης μεθόδου για την σύνθεση της ένωσης **28** (αμιδίου) μέσω μιας οξείδωσης Jones της αλκοόλης και κατεργασία στη συνέχεια του ενδιάμεσου με SOCl_2 για τον σχηματισμού του αμιδίου.
- ✓ Κατά τις αντιδράσεις Sonogashira χρησιμοποιήθηκε TBAF· $3\text{H}_2\text{O}$, αντί για TBAF 1M σε THF που χρησιμοποιεί κατά την αντίστοιχη σύνθεση η εταιρεία Novartis, κάνοντας έτσι τη διαδικασία οικονομικότερη.
- ✓ Για τη σύνθεση των ενδιάμεσων ενώσεων **24** και **25** χρησιμοποιήθηκε η 1-Boc-πιπεραζίνη αντί της πιπεραζίνης, αποφεύγοντας έτσι το στάδιο της Boc-προστασίας, εξοικονομώντας έτσι χρόνο, αντιδραστήρια και διαλύτες.
- ✓ Επιτεύχθηκε η σύνθεση ενός αναλόγου του φαρμακευτικού σκευάσματος Ribociclib, η τελική ένωση **Rib1**, και συνεχίζονται τα πειράματα για λήψη μεγαλύτερης ποσότητας των ενώσεων **23** και **28** (scale-up) ώστε να συνδεθούν μέσω μιας αντίδρασης *Buchwald–Hartwig* με τις ενώσεις **25** και **26** προς των σχηματισμό των αντίστοιχων τελικών προϊόντων.
- ✓ Οι τελική ένωση **Rib1** χαρακτηρίστηκε μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ και αναμένονται αποτελέσματα και από τον χαρακτηρισμό της με HRMS.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Patiño-Palma, B. E., López-Montoya, L., Escamilla-Ugarte, R., & Gómez-Rodas, A. (2023). Trends in physical activity research for breast cancer - A bibliometric analysis of the past ten years. *Heliyon*, 9(12).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22499>
- [2] Matthews, D. J., & Gerritsen, M. E. (2010). Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy. In *Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy*.
<https://doi.org/10.1002/9780470555293>
- [3] Institute, 4. Cancer Treatment by National Cancer. (n.d.).
<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>
- [4] A. Baudino, T. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. In *Current Drug Discovery Technologies vol. 12 num.1* (pp. 3-20(18)). Bentham Science Publishers.
- [5] Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Muzio, L. Lo. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 271–280.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>
- [6] Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 100, 1–23.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.010>
- [7] de Groot, A. F., Kuijpers, C. J., & Kroep, J. R. (2017). CDK4/6 inhibition in early and metastatic breast cancer: A review. *Cancer Treatment Reviews*, 60, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.09.003>
- [8] Fraschini, R., Raspelli, E., & Cassani, C. (2012). Protein Phosphorylation is an Important Tool to Change the Fate of Key Players in the Control of Cell Cycle Progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Phosphorylation in Human Health*. <https://doi.org/10.5772/47809>
- [9] Patterson, H., Nibbs, R., McInnes, I., & Siebert, S. (2014). Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 176(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/cei.12248>
- [10] Schwartz, P. A., & Murray, B. W. (2011). Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic Chemistry*, 39(5–6), 192–210.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.07.004>
- [11] Hunter, T. (1991). *[1] Protein Kinase Classification. 200.*
- [12] Stout, T., Foster, P., & Matthews, D. (2005). High-Throughput Structural Biology in Drug Discovery: Protein Kinases. *Current Pharmaceutical Design*, 10(10), 1069–1082. <https://doi.org/10.2174/1381612043452695>
- [13] Barouch-Bentov, R., Che, J., Lee, C. C., Yang, Y., Herman, A., Jia, Y., Velentza, A., Watson, J., Sternberg, L., Kim, S., Ziaee, N., Miller, A., Jackson, C., Fujimoto, M., Young, M., Batalov, S., Liu, Y., Warmuth, M., Wiltshire, T., ... Sauer, K. (2009). A Conserved Salt Bridge in the G Loop of Multiple Protein Kinases Is Important for Catalysis and for In Vivo Lyn Function. *Molecular Cell*, 33(1), 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.024>

- [14] Edelman, A. M., & Krebs, E. G. (1987). *PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES*.
- [15] Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., Boldorini, R., Pallotti, F., Viale, G., Gishizky, M. L., Draetta, G. F., & Di Fiore, P. P. (2006). Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Research*, 66(16), 8147–8154. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3489>
- [17] Robinson, D. R., Wu, Y. M., & Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49), 5548–5557. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203957>
- [18] Critchley, W. R., Pellet-Mary, C., Ringham-Terry, B., Harrison, M. A., Zachary, I. C., & Ponnambalam, S. (2018). Receptor tyrosine kinase ubiquitination and de-ubiquitination in signal transduction and receptor trafficking. *Cells*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/cells7030022>
- [19] Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- [20] Fantl, W. (1993). Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 453–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.62.1.453>
- [21] Espínola, E. E. (2009). *Analysis of c-Src kinase mutants for understanding conformational plasticity*. May, 36.
- [22] Neet, K., & Hunter, T. (1996). Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes to Cells*, 1(2), 147–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.d01-234.x>
- [23] Celebrating 50 years of the cell cycle What Darwin knew. (2003). *Nature*, 426(December), 2003.
- [24] *Cell Cycle*. (2024). National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>
- [25] Huwe, A., Mazitschek, R., & Giannis, A. (2003). Small molecules as inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Angewandte Chemie - International Edition*, 42(19), 2122–2138. <https://doi.org/10.1002/anie.200200540>
- [26] Tannoch, V. J., Hinds, P. W., & Tsai, L. H. (2000). Cell cycle control. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 465, Issue April). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.46.1.317>
- [27] Garrett, M. D. (2001). Cell cycle control and cancer. *Current Science*, 81(5), 515–522. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3111-5_7
- [28] Cooper, G.M. & Hausman, R.E. *The cell: a molecular approach* (Sinaller Associates, 2013)
- [29] Kalra, S., Joshi, G., Munshi, A., & Kumar, R. (2017). Structural insights of cyclin

- dependent kinases: Implications in design of selective inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 424–458.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.071>
- [30] Whittaker, S. R., Mallinger, A., Workman, P., & Clarke, P. A. (2017). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*, 173, 83–105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.008>
- [31] Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., & Nishida, E. (2006). ERK MAP kinase in G1 cell cycle progression and cancer. *Cancer Science*, 97(8), 697–702.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00244.x>
- [32] Tripathy, D., Bardia, A., & Sellers, W. R. (2017). Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*, 23(13), 3251–3262. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3157>
- [33] Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., & Morris, M. C. (2015). Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to peptide inhibitors. *Cancers*, 7(1), 179–237. <https://doi.org/10.3390/cancers7010179>
- [34] Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
- [35] Abdelmalak, M., Singh, R., Anwer, M., Ivanchenko, P., Randhawa, A., Ahmed, M., Ashton, A. W., Du, Y., Jiao, X., & Pestell, R. (2022). The Renaissance of CDK Inhibitors in Breast Cancer Therapy: An Update on Clinical Trials and Therapy Resistance. *Cancers*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/cancers14215388>
- [36] Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clinics*, 13(3), 339–354.
<https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>
- [37] Janni, W. (2016). Targeted therapy of breast cancer. *Oncology Research and Treatment*, 39(3), 100–101. <https://doi.org/10.1159/000444685>
- [38] Mohamed, A., Krajewski, K., Cakar, B., & Ma, C. X. (2013). Targeted therapy for breast cancer. *American Journal of Pathology*, 183(4), 1096–1112.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.07.005>
- [39] Tadesse, S., Yu, M., Mekonnen, L. B., Lam, F., Islam, S., Tomusange, K., Rahaman, M. H., Noll, B., Basnet, S. K. C., Teo, T., Albrecht, H., Milne, R., & Wang, S. (2017). Highly Potent, Selective, and Orally Bioavailable 4-Thiazol-N-(pyridin-2-yl)pyrimidin-2-amine Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6 Inhibitors as Anticancer Drug Candidates: Design, Synthesis, and Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(5), 1892–1915.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01670>
- [40] Mughal, M. J., Bhadresha, K., & Kwok, H. F. (2023). CDK inhibitors from past to present: A new wave of cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 88(December 2022), 106–122. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.12.006>
- [41] Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2016). Small-molecule kinase inhibitors: An analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discovery Today*, 21(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.07.008>
- [42] Roskoski, R. (2023). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase

- inhibitors: A 2023 update. *Pharmacological Research*, 187(November 2022), 106552. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106552>
- [43] Łukasik, P., Baranowska-bosiacka, I., Kulczycka, K., & Gutowska, I. (2021). Inhibitors of cyclin-dependent kinases: Types and their mechanism of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms22062806>
- [44] Poratti, M., & Marzaro, G. (2019). Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 172, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.064>
- [45] Parati, M. C., Pedersini, R., Perego, G., Reduzzi, R., Savio, T., Cabiddu, M., Borgonovo, K., Ghilardi, M., Luciani, A., & Petrelli, F. (2022). Ribociclib in the Treatment of Hormone-Receptor Positive/HER2-Negative Advanced and Early Breast Cancer: Overview of Clinical Data and Patients Selection. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 14(April), 101–111. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S341857>
- [46] Tomás Pascual, D.G. Stover, A. Thuerigen, C.M. Perou, E.M. Ciruelos, A. Casas Fernandez Tejerina, Patty Spears, E. Roux, H. Hu, Y-S. Lu, S.M. Tolaney, A. Partridge, G. Villacampa Javierre, Juan Manuel Ferrero-Cafiero, Lynda Carey, A. P. (2022). 272TiP HARMONIA SOLTI-2101 / AFT-58: A head-to-head phase III study comparing ribociclib (RIB) and palbociclib (PAL) in patients (pts) with hormone receptor-positive/HER2-negative/HER2-enriched (HR+/HER2-/HER2-E) advanced breast cancer (ABC). *Annals of Oncology*, 33, 662. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.07.1856>
- [47] Pellegatti, L., Hafner, A., & Sedelmeier, J. (2016). A Two-Step Continuous-Flow Procedure towards Ribociclib. *Journal of Flow Chemistry*, 6(3), 198–201. <https://doi.org/10.1556/1846.2016.00017>
- [48] Wang, L., Zheng, L., Kong, X., Zhang, W., Chen, G., & Wang, J. (2017). Concise synthesis of pyrrolo[2,3-d]pyrimidine derivatives via the Cu-catalyzed coupling reaction. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 10(1), 42–47. <https://doi.org/10.1080/17518253.2016.1275822>
- [49] Jiang, X., Sun, D., Jiang, Y., & Ma, D. (2015). Efficient synthesis of pyrrolo[2,3-d]pyrimidines via a Cu(I)/6-methylpicolinic acid catalyzed coupling reaction. *Tetrahedron Letters*, 56(23), 3259–3261. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.12.098>

