



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία, Βιοδραστικές Ενώσεις»

*Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων εν δυνάμει
εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του
φαρμακευτικού σκευάσματος της Τιβοζανίμπης (Tivozanib), για τη
θεραπεία νεοπλασιών*

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Χρονοπούλου Ιωάννα
Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής: Κωνσταντίνος Σκομπρίδης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	3
Ευχαριστίες	6
Περίληψη	9
Abstract	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι	12
Εισαγωγή	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ	13
2.1 Κυτταρικός κύκλος	14
2.1.1 Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου	15
2.1.2 Μεταγωγή σήματος	16
2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες	18
2.2.1 Φωσφορυλίωση	19
2.2.2 Δομή Πρωτεϊνικών Κινασών	20
2.2.3.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης (STKs)	24
2.2.3.1.1 Κινάσες Εξαρτώμενες από Κυκλίνη (CDK)	25
2.2.3.1.2 Ενεργοποιημένες από Μιτογόνο Πρωτεϊνικές Κινάσες (MAPKs)	26
2.2.3.1.3. Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)	28
2.2.3.1.4. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)	29
2.2.3.1.5 Πρωτεϊνική κινάση B (PKB) ή Akt	32
2.2.3.1.6 Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το σύμπλοκο Ca ²⁺ /καλμοδουλίνη	33
2.2.3.1.6.1 Κινάση της Φωσφορυλάσης (PhK)	34
2.2.3.1.6.1 CaM κινάση II	35
2.2.3.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες Τυροσίνης (TKs)	36
2.2.3.2.1 Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες	37
2.2.3.2.1.1 Υποδοχείς Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGFR) ..	41
2.2.3.2.1.2 Υποδοχείς Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR)	43
2.2.3.2.2 Μη Υποδοχικές Τυροσινικές Κινάσες (NRTKs)	45
2.2.3.2.2.1 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης c-AbI	46
2.3 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	47
2.3.1 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	48

2.3.2 Χαρακτηριστικά αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	51
2.4 Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC)	52
2.5 Αγγειογένεση	54
2.6 Αναστολείς της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR	54
2.6.1 Τινοζανιβ	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III	61
3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων	61
3.1.1 Μοριακή μοντελοποίηση του Τινοζανιβ και του αναλόγων αυτού (T1) στην VEGFR2 πρωτεϊνική κινάση (AUTODOCKVINA)	62
3.2 Ολική πορεία σύνθεσης νέων αναλόγων του Τινοζανιβ	65
3.3 Σύνθεση νέων αναλόγων του Lenvatinib	68
3.3.1 Σύνθεση της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση 3	68
3.3.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση 3 68	
3.3.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση 3 70	
3.3.2 Σύνθεση της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4	72
3.3.2.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4	72
3.3.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4	74
3.3.3 Σύνθεση της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση 5	76
3.3.3.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση 5	76
3.3.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση 5	77
3.3.4 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tertβουτυλεστέρα, ένωση 7	79
3.3.4.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του (2-χλωρο-4- υδροξυφαινυλο) καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7	79
3.3.4.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)- καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7	81
3.3.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλ-εστέρα (ένωση 8)	84

3.3.5.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του του (2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλ-εστέρα (ένωση 8)	84
3.3.6 Σύνθεση της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9	85
3.3.6.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9	85
3.3.6.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9	86
3.3.7 Σύνθεση τελικής ένωσης	89
3.3.7.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του T1	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV	93
4.1 Συνθέσεις	93
4.1.1 Σύνθεση της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση 3	93
4.1.2 Σύνθεση της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4	93
4.1.3 Σύνθεση της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση 5	94
4.1.4 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tertβουτυλεστέρα, ένωση 7	95
4.1.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλ-εστέρα (ένωση 8)	95
4.1.6 Σύνθεση της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9	96
4.1.7 Σύνθεση του T1	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98

Ευχαριστίες

Το παρόν Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης αφορά στο σχεδιασμό, στη σύνθεση, στο χαρακτηρισμό αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος του Τινοζανιβ, ως εν δυνάμει δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των εν λόγω ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ3-210 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά τη χρονική περίοδο Οκτώβριος 2022 – Ιούνιος 2024, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου.

Η ολοκλήρωση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης ιδιαίτερα στην Οργανική Χημεία, απαιτεί κόπο, αφοσίωση, επιμονή και υπομονή. Αρκετές είναι οι στιγμές απογοήτευσης, καθώς κατά περιόδους οι αποτυχίες είναι περισσότερες από τις επιτυχίες. Όταν όμως οι κόποι αποδίδουν καρπούς επικρατεί χαρά και υπερηφάνεια για τα αποτελέσματά, αφήνοντας έτσι το δικό μας λιθαράκι στα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα. Σαφώς, ο καθένας μας σε κάθε του προσπάθεια έχει δίπλα του ανθρώπους που τον στηρίζουν, τον βοηθούν και τον εμπυχώνουν να συνεχίσει την προσπάθεια αυτή.

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη σε όλους εκείνους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, η οποία δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγησή τους.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Επίσης για την πολύτιμη καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη και τις χρήσιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της έρευνάς μου. Η βαθιά του γνώση, η εμπειρία και η αφοσίωσή του με ενέπνευσαν και με καθοδήγησαν σε κάθε βήμα της εργασίας αυτής και με ώθησαν να προσπαθώ περισσότερο ώστε να ολοκληρώσω με επιτυχία την ερευνητική μου προσπάθεια. Ήταν τιμή μου να συνεργαστώ με ένα Καθηγητή που χαρακτηρίζεται όχι μόνο από πολλές και σε εις βάθος γνώσεις, σε όλους του τομείς, αλλά και από ήθος και ανθρωπιά.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Λάζαρο Χατζηαράπογλου για τις συμβουλές του και την αποδοχή εκ μέρους του να συμμετάσχει στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Δημήτρη Αλίβερτη που δέχθηκε ευχαρίστως να είναι στην συμβουλευτική εξεταστική επιτροπή μου και να αξιολογήσει την ερευνητική μου προσπάθεια.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους φίλους και συναδέλφους μου στο ερευνητικό εργαστήριο Μαρία Ζώτου, Ελένη Κοσταντίνι, Κική Χατζηαγγελίδου, Ήρα Σδούκου, Ελεονώρα Σταλικά, Παντελή Αλασώνα, Φωτεινή Πεπονίδου, Λεμονιά Καραγιάννη και Γεροντίτη Ιωάννη για την άριστη συνεργασία μας, την ψυχολογική υποστήριξη και τις ευχάριστες στιγμές που μοιραστήκαμε. Με στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο και με ενέπνευσαν να συνεχίσω την προσπάθειά μου, ακόμα και στις δύσκολες στιγμές. Η συντροφικότητά τους, οι συζητήσεις και οι προτροπές τους αποτέλεσαν πηγή έμπνευσης και κίνητρο για να προχωρήσω.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο κέντρο NMR του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη φασμάτων ^1H NMR και ^{13}C NMR.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου για την ατελείωτη αγάπη, την υπομονή και την ενθάρρυνσή τους. Η υποστήριξή τους, τόσο σε ηθικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο, ήταν ανεκτίμητη κατά τη διάρκεια αυτής της απαιτητικής περιόδου. Τους ευχαριστώ που είναι πάντα δίπλα μου σε κάθε μου προσπάθεια και για τις θυσίες που έκαναν για να εκπονήσω την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

Σε όλους εσάς, απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά σας. Αυτή η εργασία είναι το αποτέλεσμα της συλλογικής μας προσπάθειας και αντιπροσωπεύει τη συνεργασία και την αφοσίωσή μας στην έρευνα και την επιστήμη.

Στην οικογένεια μου...

Περίληψη

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του κυττάρου, συμμετέχοντας σε πολλές σηματοδοτικές οδούς, επάγοντας την φωσφορυλίωση από το ATP. Τυχόν μεταλλάξεις των μορίων των πρωτεϊνικών κινασών οδηγούν στην αυτόνομη και μη ελεγχόμενη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων, διαταράσσοντας τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη διαίρεση, την επιβίωση και την απόπτωση των κυττάρων. Η αναστολή αυτών των παθολογικών πρωτεϊνικών κινασών μέσω μορίων μικρού μοριακού βάρους, που ανταγωνίζονται τη θέση πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο της κινάσης, έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι συμβάλλει σημαντικά στην αντιμετώπιση και τη θεραπεία των νεοπλασιών. Ακριβώς για το λόγο αυτό, επικρατεί μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για την ανάπτυξη και παραγωγή νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίοι θα δρουν εκλεκτικά, αναστέλλοντας τη δράση της παθολογικής πρωτεϊνικής κινάσης.

Το Tivozanib, ένα φαρμακευτικό σκεύασμα εγκεκριμένο από τον FDA μόλις το Μάρτιο του 2021, είναι ένας ισχυρός εκλεκτικός αναστολέας νέας γενιάς του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) και χορηγείται σε ασθενείς για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) μετά από δύο ή περισσότερες προηγούμενες συστηματικές θεραπείες.

Στο εργαστήριο, κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος, επετεύχθη η σύνθεση αναλόγων/παραγώγων του Tivozanib αντικαθιστώντας την δομή της ουρίας με εκείνη του αμιδικού δεσμού καθώς και του 5-μεθυλο ισοξαζολίου με τη δομή του φουρανίου. Οι εν λόγω στοχευμένες τροποποιήσεις είναι αποτέλεσμα μοριακής μοντελοποίησης, έτσι ώστε οι νέοι εν δυνάμει αναστολείς να δρουν αποτελεσματικότερα κατά του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 (VEGFR2), με στόχο την εκλεκτική αναστολή αυτού.

Abstract

Protein kinases are enzymes that play an important role in cell function, participating in many signalling pathways, inducing phosphorylation by ATP. Any mutations in protein kinase molecules lead to autonomous and uncontrolled behaviour of cancer cells, disrupting the mechanisms that regulate cell division, survival and apoptosis. The inhibition of these abnormal protein kinases by small molecular weight molecules that compete for the ATP binding site on the kinase active site has been shown by studies to contribute significantly to the treatment and therapy of neoplasms. Precisely for this reason, there is great interest in the scientific community in the development and production of new protein kinase inhibitors that will act selectively by inhibiting the activity of the abnormal protein kinase.

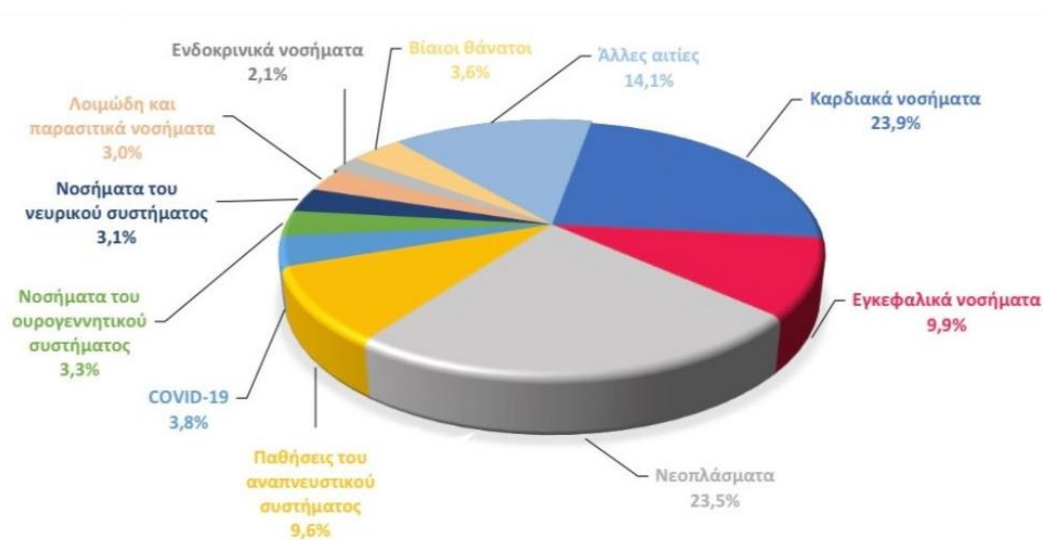
Tivozanib is an oral, once-daily, next-generation vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) tyrosine kinase inhibitor (TKI). It is a potent, selective inhibitor of VEGFRs 1, 2, and 3 with a long half-life designed to improve efficacy and tolerability. AVEO received U.S. Food and Drug Administration approval for Tivozanib in March 2021 for the treatment of adult patients with relapsed or refractory advanced renal cell carcinoma (RCC) following two or more prior systemic therapies.

In the laboratory, during the preparation of the Master's thesis, the synthesis of Tivozanib analogues/paralogs was achieved by replacing the urea structure with that of the amide bond and the 5-methyl isoxazole with the furan structure. These targeted modifications are the result of molecular modelling, so that the new potential inhibitors act more effectively against the vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), with the aim of selectively inhibiting it.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

Εισαγωγή

Μεγάλος αριθμός επιστημόνων στις μέρες μας πασχίζει για την ανακάλυψη καινοτόμων, βιοδραστικών και εκλεκτικών φαρμάκων στους τομείς της Ιατρικής, Βιολογίας, Χημείας, Βιοχημείας και Φαρμακολογίας. Τεράστιο επιστημονικό ενδιαφέρον συναντάται για την κατανόηση του καρκίνου και της θεραπείας του. Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες, καθιστώντας έτσι την αντικαρκινική φαρμακευτική αγωγή έναν από τους κυριότερους οικονομικούς στόχους της Παγκόσμιας Βιομηχανίας Φαρμάκων. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες¹.



Εικόνα 1. Ποσοστιαία κατανομή θανάτων κατα κυριότερες κατηγορίες αιτιών θανάτου (2020)²

Η ασθένεια αυτή είναι πολυσταδιακή και αξίζει να σημειωθεί πως δεν είναι μία, αλλά πολλές ασθένειες, που χαρακτηρίζονται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων, καθεμία με διακριτά χαρακτηριστικά και ειδικές θεραπευτικές απαιτήσεις. Μία πληθώρα βιοχημικών μονοπατιών εντοπίζεται στα καρκινικά κύτταρα, που διαφοροποιούνται σε σχέση με τα φυσιολογικά, με αποτέλεσμα να αποτελούν μοριακούς στόχους των αντικαρκινικών φαρμάκων. Επομένως, αντικειμενικός σκοπός είναι πλέον η ανακάλυψη νέων θεραπευτικών

στοχευμένων παραγόντων, που θα κατευθύνονται επιλεκτικά σε μοριακούς στόχους που εμπλέκονται στη μοριακή παθολογία του εκάστοτε τύπου καρκίνου.

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τρόποι θεραπείας του καρκίνου. Οι πιο συνηθισμένοι είναι χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, και ορμονική θεραπεία. Μερικές από τις προαναφερθείσες θεραπείες καταστρέφουν όχι μόνο τα καρκινικά, αλλά και τα υγιή κύτταρα. Συνεπώς, σημαντική είναι η σύνθεση και ανάπτυξη τροποποιημένων και βελτιωμένων φαρμάκων που στοχεύουν εκλεκτικά σε μοριακό επίπεδο, αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς.³

Η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου είναι κρίσιμη για την ορθολογική ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων στηριζόμενων σε μοριακούς μηχανισμούς με επιλεκτική επαγωγή της αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης ή της απόπτωσης. Ο μακροπρόθεσμος στόχος είναι να κατανοηθεί η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης, αλλά και να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί που συμβάλλουν στην απορρύθμισή τους.

Όσο προχωράει η έρευνα για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης καρκίνου αλλά και για την έρευνα αποτελεσματικότερης θεραπείας, αποδείχτηκε ο καθοριστικός ρόλος των κινασών στην καρκινογένεση και στην μετάσταση. Νέα βιοδραστικά μόρια με ισχυρή και εκλεκτική ανασταλτικότητα έναντι διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών, αναμένεται να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για την περαιτέρω διασάφηση της λειτουργίας του κυτταρικού κύκλου, να συνεισφέρουν στη διευκρίνηση των απαραίτητων δομικών χαρακτηριστικών υποψήφιων αναστολέων για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση με τη θέση πρόσδεσης του ATP του ενζύμου, και να συμβάλλουν πιθανώς στην κλινική αντιμετώπιση νόσων, όπως διάφορων μορφών καρκίνου.⁴

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Θεωρητικό μέρος

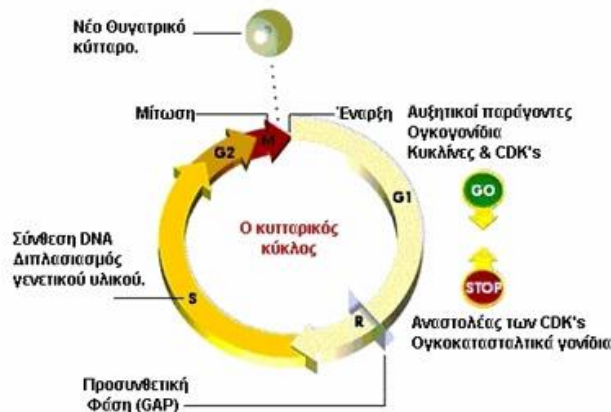
2.1 Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος, δηλαδή ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης του κυττάρου, αποτελεί το βασικό μηχανισμό με τον οποίο αναπαράγονται όλα τα έμβια όντα. Κατά τον κυτταρικό κύκλο επιτελούνται τέσσερις συντονισμένες διεργασίες: η κυτταρική ανάπτυξη, η αντιγραφή του DNA, η κατανομή των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα και η κυτταρική διαίρεση.⁵

Σε κυτταροκαλλιέργεια, ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο διαιρείται κάθε 24 περίπου ώρες. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται δύο κύρια τμήματα: η **μίτωση** (mitosis) και η **μεσόφαση** (interphase). Η μίτωση (πυρηνική διαίρεση) αποτελεί το πιο εντυπωσιακό στάδιο του κυτταρικού κύκλου, αντιστοιχεί στο διαχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων και συνήθως καταλήγει σε κυτταρική διαίρεση (κυτταροκίνηση, cytokinesis). Ωστόσο, η μίτωση και η κυτταροκίνηση διαρκούν μόλις μία ώρα και επομένως το 95% περίπου της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου καλύπτεται από τη μεσόφαση, η οποία είναι η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές μιτώσεις. Κατά τη μεσόφαση, τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και καταλαμβάνουν ολόκληρο τον πυρήνα, ο οποίος εμφανίζει σχετικά ομοιόμορφη μορφολογία. Σε μοριακό επίπεδο, η μεσόφαση είναι η περίοδος κατά την οποία διεξάγεται, με μεγάλη τάξη και οργάνωση, τόσο η κυτταρική αύξηση όσο και η αντιγραφή του DNA καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για την επικείμενη διαίρεση.⁶

Κατά τη μεσόφαση, η κυτταρική αύξηση γίνεται με σταθερό ρυθμό ώστε τα περισσότερα διαιρούμενα κύτταρα να διπλασιάζονται σε μέγεθος ανάμεσα σε δύο μιτώσεις. Αντίθετα, η σύνθεση του DNA γίνεται μόνο κατά τη διάρκεια ενός τμήματος της μεσόφασης. Έτσι, η χρονική περίοδος της σύνθεσης του DNA χωρίζει τον κύκλο των ευκαρυωτικών κυττάρων σε τέσσερις διακριτές φάσεις. Η φάση M (M phase) του κύκλου αντιστοιχεί στη μίτωση, η οποία συνήθως ακολουθείται από την κυτταροκίνηση. Μετά τη φάση M ακολουθεί η φάση G1 (G1 phase, Gap 1 phase: φάση 1ου διαστήματος), η οποία αντιστοιχεί στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ της μίτωσης και της έναρξης της αντιγραφής του DNA. Κατά την G1, το

κύτταρο είναι μεταβολικά ενεργό και αυξάνεται συνεχώς χωρίς να αντιγράφεται το DNA του. Η G1 ακολουθείται από τη φάση S (S phase, Synthesis phase: φάση σύνθεσης), κατά την οποία διεξάγεται η αντιγραφή του DNA. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA ξεκινά η φάση G2 (G2 phase, Gap 2 phase: φάση 2ου διαστήματος), κατά την οποία συνεχίζεται η κυτταρική αύξηση και συντίθενται πρωτεΐνες καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μίτωση.⁷



Εικόνα 2 "Ο κυτταρικός κύκλος" Παρουσιάζονται οι κυριότερες φάσεις του κυτταρικού κύκλου καθώς και τα σημεία δράσης των αυξητικών παραγόντων, των ογκογονιδίων, των κυκλινών και τέλος των CDKs⁸



Εικόνα 3 Σχηματική παράσταση των βασικότερων σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου⁸

2.1.1. Έλεγχος του κυτταρικού κύκλου

Το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιεί κατά καθορισμένη τάξη και ακολουθία τα ένζυμα και τις απαιτούμενες πρωτεΐνες που διεκπεραιώνουν την κάθε διεργασία και στη συνέχεια, πάλι κατά καθορισμένη τάξη και ακολουθία, τα απενεργοποιεί μόλις τελειώσει η αντίστοιχη διεργασία. Όλα αυτά μάλιστα γίνονται

κάτω από τη δεδομένη επήρεια συνθηκών και σημάτων ενδοκυτταρίων και εξωκυτταρίων τόσο σε πολυκύτταρους οργανισμούς όσο και στις καλλιέργειες.

Η «καθοδήγηση» του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στη φωσφορυλίωση κρίσιμων πρωτεϊνών που επάγουν, αναστέλλουν ή ρυθμίζουν την αντιγραφή του DNA, τη μίτωση και την κυτταροκίνηση. Η φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελούν έναν από τους πιο κοινούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για τη μεταβολή της δραστηριότητας μιας πρωτεΐνης. Οι αντιδράσεις φωσφορυλίωσης επιτελούνται από ειδικές ομάδες πρωτεϊνικών κινασών που καταλύουν τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από το ATP στην πλευρική αλυσίδα ενός συγκεκριμένου αμινοξέος της πρωτεΐνης-στόχου. Η αποφωσφορυλίωση γίνεται από άλλη ομάδα πρωτεϊνών, τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Τα πλεονεκτήματα των αντιδράσεων αυτών αποτελούν η ταχύτητα διεξαγωγής τους καθώς και η αφθονία του ATP στο κύτταρο.⁹

Το σύστημα ελέγχου στηρίζεται σε «μοριακά φρένα» που σταματούν τον κύκλο στα σημεία ελέγχου (checkpoints). Το σύστημα λειτουργεί με «όργανα» τα λειτουργικά συμπλέγματα κυκλίνης-κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης, δηλαδή την εκάστοτε ενεργοποίηση κινάσης από την αντίστοιχη κυκλίνη. Οι κυκλίνες (cyclins) αποτελούν ομάδα πρωτεϊνών του συστήματος ελέγχου που ευθύνεται για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνικών κινασών στις κατάλληλες χρονικές στιγμές του κυτταρικού κύκλου. Το όνομά τους προέρχεται από το γεγονός ότι το επίπεδο των κυκλινών δεν είναι σταθερό αλλά κυμαίνεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Στο σύμπλοκο, η κυκλίνη παίζει το ρόλο του ρυθμιστή και η κυκλινοεξαρτώμενη κινάση ή κινάση εξαρτώμενη από τις κυκλίνες (cycline-dependent kinase, CDK) το ρόλο του μιτωτικού καταλύτη. Τόσο οι κυκλίνες όσο και οι CDKs κωδικοποιούνται από ειδικά γονίδια.¹⁰

2.1.2 Μεταγωγή σήματος

Ο κυτταρικός πληθυσμός εξαρτάται κυρίως από εξωκυττάρια σήματα που προσλαμβάνονται μέσω υποδοχέων και πολύ λιγότερο από σήματα που πρωτογενώς έχουν ενδοκυττάρια προέλευση. Η μετατροπή του σήματος σε απάντηση περνά από το φαινόμενο της μεταγωγής σήματος. Τα αποτελέσματα των ερευνών της μεταγωγής σήματος ή σηματομεταγωγής (signal transduction, ST) αποτελούν το

σημαντικότερο βήμα των τελευταίων ετών στη διευκρίνιση της πληροφορικής των διακυτταρικών, των διαμεμβρανικών *in vivo* σχέσεων, των ενδοκυτταρικών οδών μετάδοσης και ενίσχυσης πληροφοριών και του μεταβολισμού, και αφορούν τους μηχανισμούς του πώς τα κύτταρα δέχονται και επεξεργάζονται και εν συνεχεία απαντούν σε ερεθίσματα από το περιβάλλον τους. Η σηματομεταγωγή από τον υποδοχέα μέχρι τον πυρήνα ακολουθεί διαφόρους δρόμους η διακοπή των οποίων με αντισηματομεταγωγικά φάρμακα άνοιξε νέους ορίζοντες στη θεραπευτική του καρκίνου.¹¹

Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος περιλαμβάνουν:

1. την ανίχνευση και πρόσληψη της πληροφορίας - ερεθίσματος μέσω κάποιου υποδοχέα και εν συνεχεία την επεξεργασία της. Οι υποδοχείς αυτοί είναι κυρίως πρωτεΐνες της επιφάνειας των κυττάρων με ένα εξωκυττάριο τμήμα που παίζει το ρόλο του υποδοχέα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που ξεκινάει τη μεταγωγή σήματος. Στην επεξεργασία γίνεται
2. ενίσχυση και πολλαπλασιασμός του σήματος (amplification),
3. ολοκλήρωση (integration) του σήματος ώστε να έχει μία ολοκληρωμένη λειτουργική αποτελεσματικότητα και
4. τερματισμός και αξιοποίηση του σήματος μέσω απάντησης (response) προς αυτό π.χ. μεταβολές στη δραστητικότητα ενζύμων, στην έκφραση γονιδίων.

Αναλυτικότερα:

(1) Η ουσία (συνδέτης, ligand) η μεταφέρουσα την πληροφορία προσκολλάται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Η πρώτη αυτή σηματοδότηση ή πρώτος αγγελιοφόρος (primary messenger), η αλληλεπίδραση συνδέτη και υποδοχέα, έχει ως συνέπεια την αλλαγή της τρίτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής του ενδοκυτταρίου τμήματος του υποδοχέα (αλλοστερική τροποποίηση), που όμως ποσοτικά δεν επαρκεί για να προκαλέσει βιοχημικές μεταβολές στο κύτταρο, καθώς ο αριθμός των υποδοχέων δεν είναι μεγάλος.

(2) Οι δεύτεροι αγγελιοφόροι (second messengers), διάφορα μικρά μόρια όπως π.χ. το cAMP και τα ιόντα ασβεστίου πολλαπλασιάζουν την ένταση του σήματος.

(3) Οι περισσότεροι δεύτεροι αγγελιοφόροι αξιοποιούν τη δραστηριότητά τους μέσω ενεργοποίησης πρωτεϊνικών κινασών, ενζύμων που μεταφέρουν φωσφορικές ρίζες από ATP προς ορισμένες ρίζες σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης στις πρωτεΐνες. Οι ίδιες οι κινάσες αντίστροφα, προκαλούν μεταβολές στους δεύτερους αγγελιαφόρους.

(4) Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι εν μέρει αναστρέψιμη με τη δράση των πρωτεϊνικών φωσφατασών οι οποίες και προκαλούν τον τερματισμό της διεργασίας της μεταγωγής σήματος.

Για τη λογική της θεραπευτικής προσέγγισης νόσων όπου πρέπει μέσω αναστολής της μεταγωγής σήματος να επιτευχθεί αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, είναι φανερό ότι προσφέρονται τέσσερις δρόμοι:

α) να μην υπάρχει συνδέτης: Ως κλασικό παράδειγμα αναφέρονται οι ενδοκρινικές θεραπείες του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου του προστάτου.

β) κατάληψη του υποδοχέα που ξεκινά τη σηματομεταγωγή

γ) κατάληψη ή τροποποίηση ενδοκυτταρίου υποδοχέα από ανταγωνιστή ορμόνης (κλασικό το παράδειγμα των αντιοιστρογόνων και των αντιανδρογόνων στους παραπάνω αναφερόμενους όγκους)

δ) διακοπή του μηχανισμού μέσα από την κυτταρική μεμβράνη, κυρίως με προσβολή των κινασών.¹²

Έτσι, αφού στη δράση του οποιουδήποτε ερεθίσματος για σηματομεταγωγή μεσολαβεί υποδοχέας και το κύριο ενδοκυτταριο τμήμα του υποδοχέα είναι λειτουργικά οι κινάσες, είναι απαραίτητο να περιγραφούν τα αντίστοιχα θέματα.

2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες

Όσο προχωράει η έρευνα για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης καρκίνου αλλά και για την εύρεση αποτελεσματικότερης θεραπείας, αποδείχτηκε ο καθοριστικός ρόλος των κινασών στην καρκινογένεση και στην μετάσταση. Δεδομένης της ικανότητας των περισσότερων κινασών να επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική επιβίωση και την μετανάστευση είναι φανερό ότι σε

περίπτωση υπερέκφρασης των γονιδίων που τις κωδικοποιούν προάγεται η ογκογένεση.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν μία από τις πιο γνωστές οικογένειες ενζύμων. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν βρεθεί 518 γονίδια κινασών (1,7% του συνόλου των γονιδίων, η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων), καθώς και περισσότερα από 100 ανενεργά ψευδογονίδια. Για το λόγο αυτό, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν έναν ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη νέων ενώσεων, που θα αναστέλλουν τη δράση τους.¹³

2.2.1 Φωσφορυλίωση

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση είναι η πλέον διαδεδομένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της δομής των πρωτεϊνών και επηρεάζει τουλάχιστον το 1/3 όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών. Είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αρχή για τη ρύθμιση της δραστηριότητας των ενζύμων και των σηματοδοτικών πρωτεϊνών. Μέσω αυτής της λειτουργίας, οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες παίζουν βασικούς ρόλους στη ρύθμιση του μεταβολισμού, στην έκφραση γονιδίων, στην κυτταρική ανάπτυξη, διαίρεση και διαφοροποίηση.

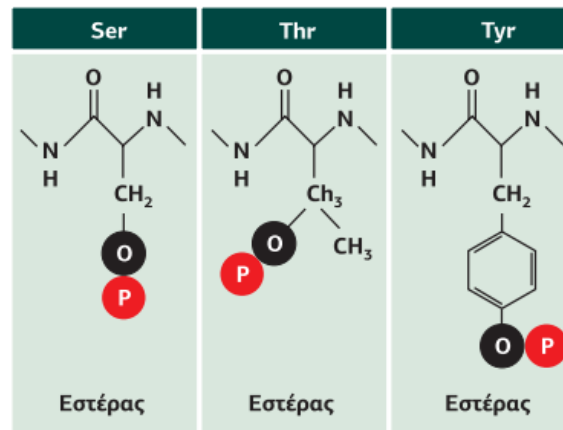
Πρόκειται για ένα ρυθμιστικό σήμα που λειτουργεί ως διακόπτης στα σηματοδοτικά μονοπάτια. Ο φωσφορικός εστέρας που δημιουργείται στις πρωτεΐνες με τη δράση κινασών είναι μια σταθερή τροποποίηση που δημιουργεί αλλαγή στη διαμόρφωση και, συνεπώς, στη δραστηριότητα των κυτταρικών πρωτεϊνών. Εξαιτίας της σταθερότητας των φωσφορικών εστέρων απαιτείται δράση πρωτεϊνικών φωσφατασών για την αποκοπή τους. Το υψηλό επίπεδο ρύθμισης των κινασών και των φωσφατασών χρησιμοποιείται από το κύτταρο, για να δημιουργήσει ένα τοπικά και χρονικά περιορισμένο σήμα, που επηρεάζει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών με πολύ εξειδικευμένο τρόπο.

Τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση αυτή είναι οι κινάσες και μεταφέρουν μιας φωσφορική ομάδα (PO_3^{2-}) από ένα δότη υψηλής ενέργειας, όπως ATP ή GTP σε μια πρωτεΐνη και συγκεκριμένα σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης. Αξίζει να σημειωθεί πως οι πρωτεϊνικές κινάσες δεν φωσφορυλιώνουν ελεύθερα αμινοξέα, το αμινοξύ που μπορεί να φωσφορυλιωθεί είναι ενσωματωμένο σε μια σύντομη

ακολουθία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, αυτή η προσθήκη καθιστά την πρωτεΐνη από υδρόφοβη (άπολη) σε υδρόφιλη (πολική), επιτρέποντάς της να αλλάξει τη διαμόρφωσή της και να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια. Η παραπάνω διαδικασία αντιστρέφεται από τη δράση των φωσφατάσεων, επομένως οι κινάσες και οι φωσφατάσες λειτουργούν ως διακόπτες συγκεκριμένων οδών μεταγωγής σήματος.¹⁴



Εικόνα 4. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών

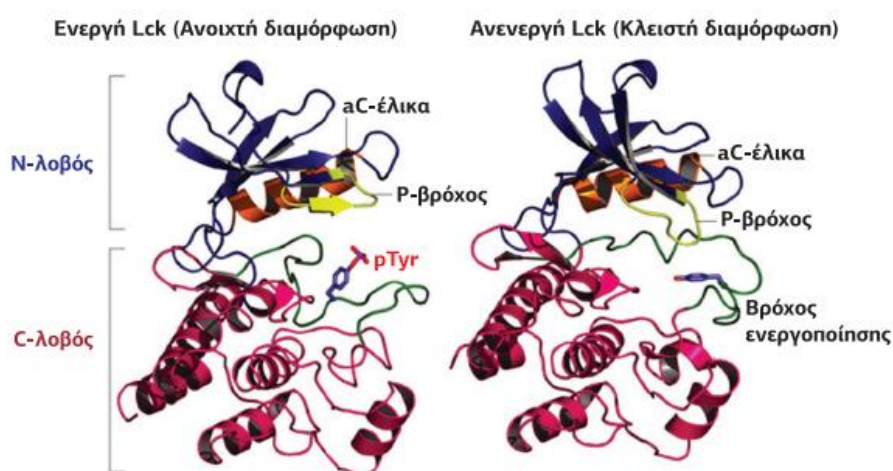


Εικόνα 5. Κατάλοιπα αμινοξέων που φωσφορυλιώνονται

2.2.2 Δομή Πρωτεϊνικών Κινασών

Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες είναι η μεγαλύτερη και ίσως η αρχαιότερη οικογένεια κινασών. Η καταλυτική περιοχή τους δημιουργείται από περίπου 250 αμινοξέα και διαθέτει μια χαρακτηριστική δομή. Η δομή αυτή διευκρινίστηκε για πρώτη φορά το 1990 με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ στην εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Περαιτέρω μελέτες σε πολλές άλλες κινάσες απέδειξαν ότι αυτή η δομή είναι αντιπροσωπευτική των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών. Τα κυρίαρχα δομικά χαρακτηριστικά είναι δύο λοβοί (lobes), ο N- και ο C-λοβός, που συνδέονται με αλληλουχία εύκαμπτης άρθρωσης (hinge) και οι οποίοι δημιουργούν την καταλυτική σχισμή η οποία αποτελεί την θέση πρόσδεσης τριφωσφορικής

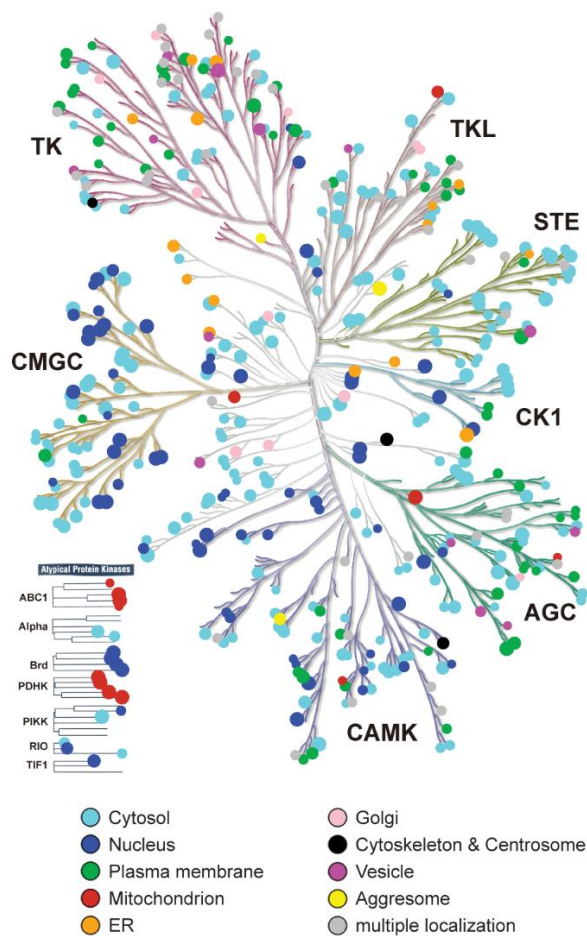
αδενοσίνης (ATP). Η δομή αυτή ανοίγει και κλείνει με τη θέση δέσμευσης για το ATP να εντοπίζεται μέσα σε μια υδρόφοβη περιοχή, ενώ η θέση δέσμευσης για την πρωτεΐνη υποστρώμα να εντοπίζεται στο εξωτερικό άκρο όπου γίνεται η μεταφορά της φωσφορυλομάδας. Ο N-τελικός λοβός (αποτελείται από περίπου 90 αμινοξέα) συνίσταται από ένα β-πτυχωτό φύλλο, με 5 αντιπαράλληλους κλώνους και περιέχει τη θέση δέσμευσης του ATP, ενώ ο μεγαλύτερος C-τελικός λοβός αποτελείται κυρίως από α-έλικες που είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση της πρωτεΐνης υποστρώματος και για την αντίδραση φωσφομεταφοράς. Στον N-λοβό υπάρχει ο καλά συντηρημένος P-βρόχος, ο οποίος σχηματίζει την οροφή του ενεργού κέντρου και συμβάλλει στη σύνδεση της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP. Χαρακτηριστικό δομικό στοιχείο του C-λοβού αποτελεί ο εξαιρετικά εύκαμπτος βρόχος ενεργοποίησης (activation loop), 20-30 αμινοξέων, επίσης γνωστός ως T-βρόχος (επειδή περιέχει ένα στρατηγικό κατάλοιπο Thr), ο οποίος λειτουργεί ως πλατφόρμα δέσμευσης για το υποστρώμα. Στοιχείο κλειδι της διαδικασίας είναι ένα ή δύο μεταλλικά ιόντα Mg^{2+} που συντονίζουν τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP και βοηθούν να στερεωθεί το ATP. Στην ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης ο βρόχος ενεργοποίησης κρατά κλειστή τη σχισμή εμποδίζοντας την πρόσδεση του υποστρώματος, ενώ η φωσφορυλίωση ενός ή περισσότερων καταλοίπων του, ανοίγει τη σχισμή και επιτρέπει την πρόσδεση του υποστρώματος. Οι κινάσες Tyr διαφέρουν από τις κινάσες Ser/Thr, καθώς περιέχουν μια βαθύτερη καταλυτική σχισμή, η οποία είναι σε θέση να φιλοξενήσει την ογκωδέστερη αρωματική πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου τυροσίνης.¹⁵



Εικόνα 6. Δομή πρωτεϊνικής κινάσης σε ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση

2.2.3 Ταξινόμηση Πρωτεϊνικών Κινασών

Σύμφωνα με τους Hanks και Hunter, οι πρωτεϊνικές κινάσες διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τις τυπικές ePK κινάσες (eukaryotic Protein Kinases) και τις άτυπες aPK κινάσες (atypical Protein Kinases). Ο διαχωρισμός των κινασών, έγινε με βάση την ομοιότητα που εμφανίζουν στην καταλυτική περιοχή, στην ύπαρξη άλλων συμπληρωματικών περιοχών στη δομή τους και τις βιολογικές λειτουργίες τους.



Εικόνα 7. Δενδρόγραμμα τυπικών και ατυπικών πρωτεϊνικών κινασών¹⁶

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ταξινομούνται, επίσης, με βάση τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνουν. Έτσι, διακρίνονται σε κινάσες τυροσίνης (tyrosine kinases, TKs) που φωσφορυλιώνουν την τυροσίνη και σε κινάσες σερίνης – θρεονίνης που φωσφορυλιώνουν τη σερίνη ή τη θρεονίνη. Και οι δύο κατηγορίες διαθέτουν έναν κοινό καταλυτικό πυρήνα που περιέχει μία αμινοτελική θέση πρόσδεσης του ATP, πλούσια σε γλυκίνη, και ένα κεντρικά τοποθετημένο μόριο ασπαρτικού οξέος που λαμβάνει μέρος στην καταλυτική διαδικασία. Επιπλέον υπάρχουν κινάσες μικτής λειτουργίας που πραγματοποιούν ταυτόχρονα και τις δύο φωσφορυλιώσεις.¹⁷

Οι κινάσες τυροσίνης διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες: στους υποδοχείς και στους μη υποδοχείς. Οι υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με μία εξωκυττάρια περιοχή σύνδεσης του προσδέματος, που είναι συνήθως κάποιος αυξητικός παράγοντας και μία ενδοκυττάρια καταλυτική περιοχή, που λειτουργεί ως κινάση τυροσίνης, ενώ αντίθετα οι μη υποδοχείς δε διαθέτουν διαμεμβρανική περιοχή, αλλά

εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, ή στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και λαμβάνουν μέρος στη μεταγωγή του σήματος.¹⁸

2.2.3.1 Πρωτεϊνικές Κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης (STKs)

Αποτελεί μία από τις πιο μεγάλες κατηγορίες πρωτεϊνικών κινασών και τουλάχιστον 125 από τις 518 έως τώρα ανακαλυφθείσες πρωτεϊνικές κινάσες υπάγονται στην κατηγορία αυτή. Η ονομασία τους έγκειται στο ότι φωσφορυλιώνουν την –OH ομάδα της σερίνης/θρεονίνης. Δε γίνεται διάκριση μεταξύ σερίνης και θρεονίνης, αφού τα δυο αυτά αμινοξέα έχουν παρόμοιες πλευρικές αλυσίδες.

Η φωσφορυλίωση των σερινών/θρεονινών του υποστρώματος δε γίνεται αδιάκριτα, αλλά επιλέγονται συγκεκριμένες θέσεις με βάση τα αμινοξέα που πλαισιώνουν το σημείο πρόσληψης της φωσφορικής ομάδας, και που στο σύνολό τους απαρτίζουν τη λεγόμενη ακολουθία συναίνεσης. Η αλληλουχία των αμινοξέων στην ακολουθία συναίνεσης εξασφαλίζει ουσιαστικά την προσαρμογή του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της κινάσης, κυρίως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και ιοντικών δεσμών ανάμεσα σε κατάλληλα διατεταγμένα αμινοξέα. Επειδή τέτοιες ακολουθίες είναι δυνατό να μην υπάρχουν σε ένα μόνο υπόστρωμα, οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης συνήθως δεν είναι απόλυτα εξειδικευμένες και φωσφορυλιώνουν ολόκληρες οικογένειες υποστρωμάτων, στις οποίες αναγνωρίζουν την απαιτούμενη ακολουθία συναίνεσης. Οι περισσότερες κινάσες μπορούν να υποστούν αναστολή της λειτουργίας τους από ψευδοϋποστρώματα, τα οποία προσδέονται στο ενεργό τους κέντρο όπως και το φυσιολογικό υπόστρωμα, από τα οποία όμως απουσιάζει το προς φωσφορυλίωση αμινοξύ. Με την απομάκρυνση του ψευδοϋποστρώματος αποκαθίσταται η φυσιολογική λειτουργία της κινάσης.¹⁹

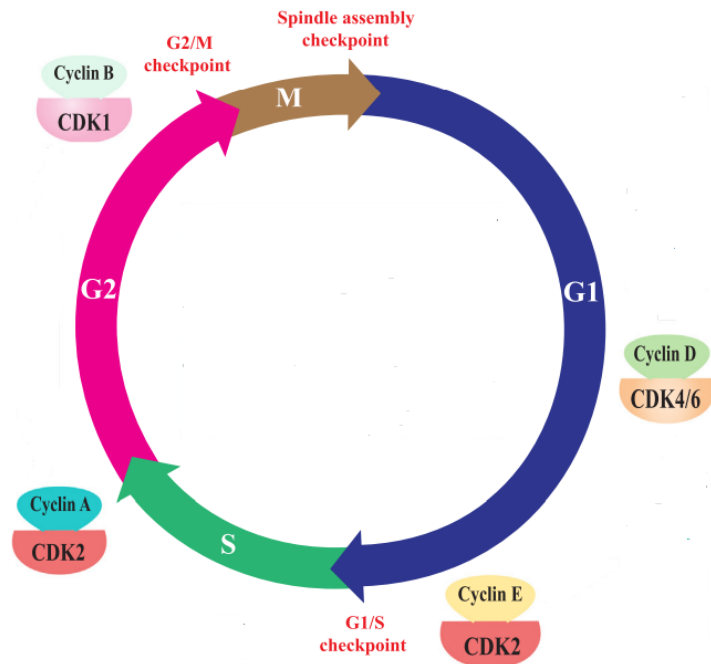
Οι εν λόγω κινάσες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, μέσω της ικανότητάς τους να φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου και μια τεράστια ποικιλία κυτταροπλασματικών και πυρηνικών παραγόντων. Πολλοί τύποι καρκίνου σχετίζονται άμεσα με την απορρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης.²⁰

2.2.3.1.1 Κινάσες Εξαρτώμενες από Κυκλίνη (CDK)

Οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες ή κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (*Cyclin-dependent kinases*, CDK) είναι οι οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών που ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά λόγω του ρόλου τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Είναι σχετικά μικρές πρωτεΐνες, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 34 έως 40 kDa και συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής, στην επεξεργασία του mRNA και στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων. Μια CDK δεσμεύεται με μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που ονομάζεται κυκλίνη. Χωρίς κυκλίνη, η CDK έχει μικρή δραστηριότητα κινάσης και μόνο το σύμπλοκο κυκλίνης-CDK είναι μια ενεργή κινάση. Οι CDK φωσφορυλιώνουν τα υποστρώματά τους σε σερίνες και θρεονίνες ακολουθούμενες από κατάλοιπα προλίνης, επομένως συνιστούν κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Σήμερα είναι γνωστές 10 πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDK1-CDK10), εκ των οποίων μόνο οι 5 συμμετέχουν άμεσα στα σημεία ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, καθώς και 15 κυκλίνες που έχουν ταυτοποιηθεί.²¹

Η καθεμία από τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου χαρακτηρίζεται από την έκφραση διαφορετικών κυκλινών. Στην έναρξη της φάσης G1 εμπλέκονται οι κυκλίνες D1, D2 και D3 καθώς επίσης και οι πρωτεϊνικές κινάσες CDK 4 και 6. Στη δεύτερη φάση S όπου συντίθεται το νέο DNA, συμμετέχει η CDK 2 με τις κυκλίνες E και A. Τέλος, το σύμπλοκο της κινάσης CDK1/B οδηγεί στη φάση G2 και έπειτα στη μίτωση.

Η διαδοχική ενεργοποίηση και απενεργοποίηση τους είναι καίρια για την ασφαλή μετάβαση από την μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη και κατ' επέκταση την ομαλή λειτουργία αυτού. Όταν ενεργοποιηθούν οι CDK οδηγούν το κύτταρο από μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη. Εάν, όμως, συμβεί λάθος κατά την αντιγραφή του DNA, η λειτουργία των CDK αναστέλλεται και συνεπώς το κύτταρο υφίσταται διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Έτσι το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να επιδιορθώσει τα λάθη του DNA πριν πολλαπλασιαστεί. Όπως φαίνεται οι CDK αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του κυτταρικού κύκλου με την απορρύθμιση τους να οδηγεί σε πολλές παθολογικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.²²



Εικόνα 8. Φάσεις κυτταρικού κύκλου και εμπλοκή των CDKs²³

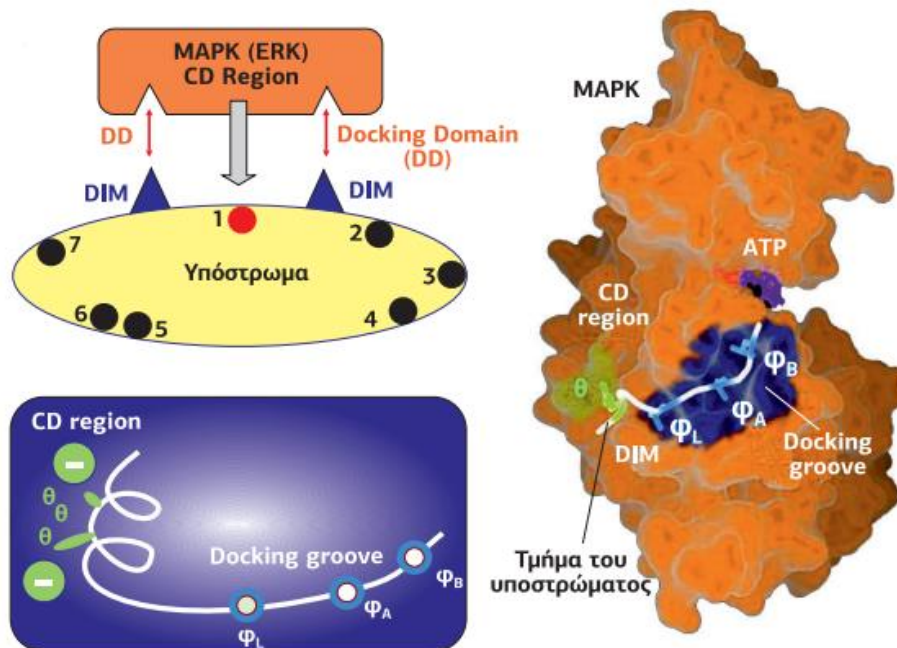
2.2.3.1.2 Ενεργοποιημένες από Μιτογόνο Πρωτεϊνικές Κινάσες (MAPKs)

Είναι και αυτές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, που ανταποκρίνονται σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα όπως μιτογόνα, ωσμωτικό stress, θερμικό shock κλπ. και ρυθμίζουν μια πληθώρα κυτταρικών δραστηριοτήτων όπως η γονιδιακή έκφραση, η μίτωση και η απόπτωση. Η πρώτη MAP που ανακαλύφθηκε ήταν η ERK κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα (ινσουλίνη, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, κ.λπ.) αλλά και από μια ποικιλία εξωκυτταρικών σημάτων, και γι' αυτό ονομάστηκε ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Οι περισσότερες MAPKs συμμετέχουν στην αντιμετώπιση βλαβερών ερεθισμάτων, όπως το αβιοτικό στρες (υπερωσμωτικότητα, οξειδωτικό στρες, βλάβη στο DNA, υποωσμωτικότητα, μόλυνση, κ.λπ.).

Οι MAPKs περιέχουν καλά διατηρημένη την αλληλουχία -Thr-xTyr-, η φωσφορυλίωση της οποίας οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Οι ενεργοποιημένες MAPKs φωσφορυλιώνουν κυρίως κατάλοιπα Ser/ Thr, τα οποία γειτονεύουν με κατάλοιπα προλίνης, και γι' αυτό και χαρακτηρίζονται και ως Proline-directed protein kinases. Αυτή η συναινετική αλληλουχία φωσφορυλίωσης (consensus sequences) Ser/ Thr-Pro που αναγνωρίζουν οι MAPKs είναι άφθονη: υπάρχουν πολλά πιθανά υποστρώματα

μεταξύ των οποίων κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού. Ωστόσο, η κάθε ξεχωριστή MAPK αναγνωρίζει μόνο μια μικρή ομάδα υποστρωμάτων. Αυτή η εξειδίκευση οφείλεται σε επιπλέον ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιοχών αγκυροβόλια (Docking Domains) ή DD ή D-domains, που δεν αποτελούν τμήμα του καταλυτικού κέντρου της κινάσης και των περιοχών των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων που αναγνωρίζουν τις DD, και ονομάζονται DIM (Docking Interacting Motifs). Συνεπώς, για να πραγματοποιηθεί η φωσφορυλίωση του υποστρώματος, χρειάζονται δύο «κλειδιά».

Η περιοχή αγκυροβόλια των MAPKs περιλαμβάνει δύο διακριτές περιοχές: μια κοινή περιοχή αγκυροβόλια (CD, Common Docking) και μια υδρόφοβη περιοχή (μπλε και ανοικτό καφέ, αντίστοιχα). Σε λεπτομέρεια, στο μπλε πλαίσιο διακρίνεται η αύλακα-αγκυροβόλια των MAPKs, όπου συνδέονται τρία υδρόφοβα αμινοξέα σε σειρά (φ_ι, φ_Α και φ_Β).²⁴



Εικόνα 9. Απεικόνιση των MAP κινάσων (δεξιά) και του τρόπου δράσης τους (αριστερά)

2.2.3.1.3. Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)

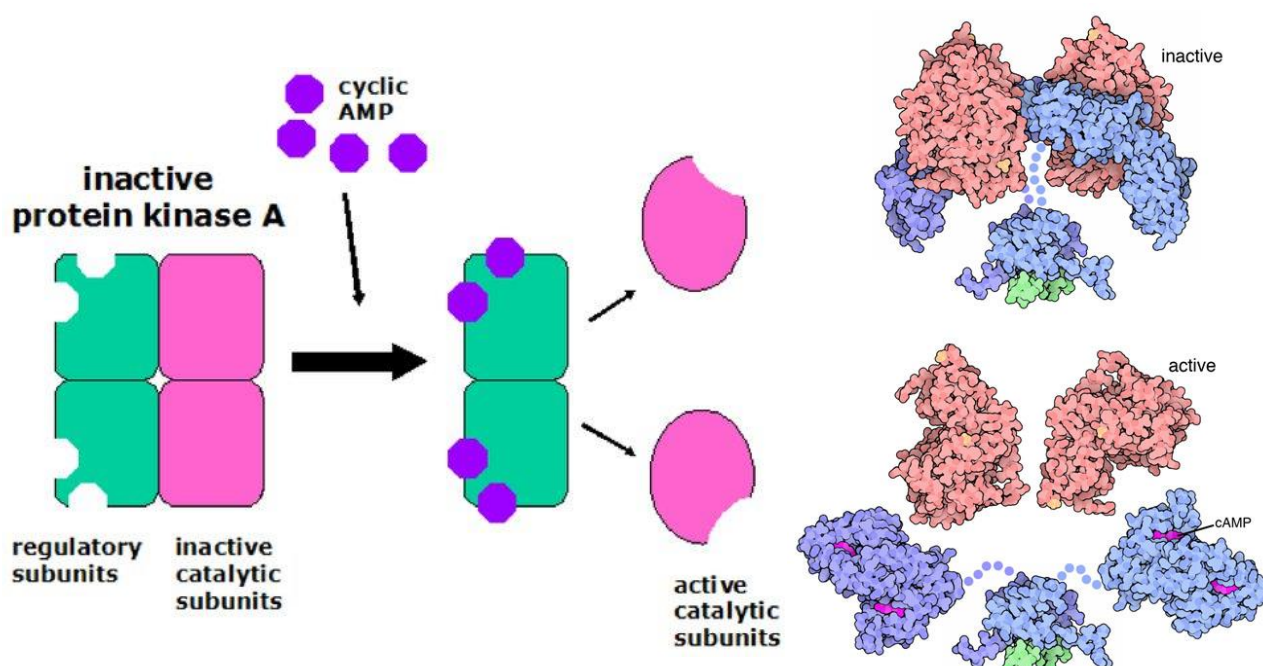
Από τις πρωτεϊνικές κινάσες, η πρωτεϊνική κινάση A (PKA, cAMP-dependent protein kinase) είναι η καλύτερα μελετημένη και χαρακτηρισμένη. Τα υποστρώματά της μπορεί να είναι άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες, κανάλια ιόντων ή ένζυμα του μεταβολισμού. Οι λειτουργίες της είναι ποικίλες καθώς συμμετέχει στη δράση της αδρεναλίνης στη γλυκογονόλυση, στον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων, στην αύξηση του καρδιακού ρυθμού και στη χάλαση των λείων μυϊκών κυττάρων.

Η PKA ανακαλύφθηκε το 1968, μία δεκαετία μετά την ανακάλυψη του cAMP από τον Sutherland, από τους Edwin Krebs και Edmond Fischer, καθιερώνοντας έναν μηχανισμό όχι μόνο για το cAMP, αλλά έναν γενικό μηχανισμό για τη σηματοδότηση των δευτέρων διαβιβαστών μέσα στο κύτταρο. Ο Krebs, επίσης, απέδειξε ότι η PKA αποτελείται από 4 υπομονάδες: δύο ρυθμιστικές και δύο καταλυτικές, καθώς επίσης ότι η σύνδεση του cAMP στις ρυθμιστικές υπομονάδες ελευθερώνει τις καταλυτικές ενεργές υπομονάδες, καθιστώντας τις ικανές να φωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους.²⁵

Απουσία του cAMP στο κυτταρόπλασμα, η PKA υπάρχει ως ένα ετεροτετραμερές που αποτελείται από δύο ρυθμιστικές (R) υπομονάδες, οι οποίες περιέχουν δύο θέσεις σύνδεσης του cAMP η καθεμία, και δύο καταλυτικές (C) υπομονάδες. Η PKA ενεργοποιείται από το cAMP. Η πρόσδεση του cAMP στις R υπομονάδες οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης των R υπομονάδων, με αποτέλεσμα μείωση της συγγένειας ανάμεσα στις R και C υπομονάδες, της τάξης 10⁴-10⁵. Το ολοένζυμο διαχωρίζεται στο διμερές των R υπομονάδων και σε δύο μονομερείς καταλυτικές C υπομονάδες, που μετατρέπονται σε καταλυτικά ενεργές. Πλήρης καταλυτική δραστηριότητα της C υπομονάδας απαιτεί τη φωσφορυλίωση της Thr197 στον βρόχο ενεργοποίησης. Αυτή η φωσφορυλίωση απαιτείται και για την επανασύνδεση των R υπομονάδων.

Στα θηλαστικά, είναι γνωστές τέσσερις ισομορφές της R υπομονάδας (RIα, RIβ, RIIα και RIIβ) και τρεις ισομορφές της C υπομονάδας (Ca, Cβ και Cγ). Η ύπαρξη πολλαπλών R και C υπομονάδων, με ξεχωριστές βιοχημικές ιδιότητες η καθεμία, οδηγεί στη

δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού ολοενζύμων με διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά, γεγονός που συνεισφέρει στην εξειδίκευση και στην ποικιλομορφία της PKA σηματοδότησης μέσα στο κύτταρο. Ανάλογα με τη ρυθμιστική υπομονάδα διακρίνουμε δύο τύπους PKA, την PKA-I, η οποία συναντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και έχει υψηλή συγγένεια για το cAMP, και την PKA-II, η οποία συνδέεται με τις πρωτεΐνες AKAPs (A-Kinase-Anchoring Proteins) και βρίσκεται αγκυροβολημένη σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα κοντά στα υποστρώματά της.²⁶



Εικόνα 10. Ενεργοποίηση της PKA από το cAMP και η ενεργή και ανενεργή διαμόρφωση της.

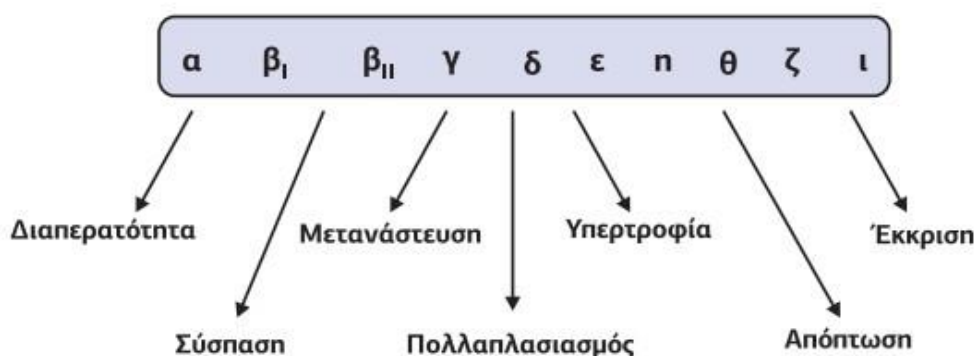
2.2.3.1.4. Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Η PKC απομονώθηκε από την παρεγκεφαλίδα βοοειδών το 1977 από τον Yasutomi Nishizuka στο Department of Biochemistry του Kobe University ως μια κινάση Ser/Thr, η οποία δεν ρυθμίζεται από κυκλικά νουκλεοτίδια. Το 1979 ο Nishizuka έδειξε ότι η κινάση αυτή απαιτεί για να ενεργοποιηθεί Ca^{2+} και διακυλογλυκερόλη (συνεπώς πρέπει να στρατολογηθεί στη μεμβράνη). Σήμερα, η οικογένεια των PKCs είναι πολυπληθής και περιλαμβάνει μια ποικιλία ισομορφών με πολλές ρυθμιστικές ιδιότητες. Οι 10 διαφορετικοί υπότυποι πρωτεϊνικών κινασών C που έχουν

ανακαλυφθεί στα θηλαστικά κατατάσσονται σε 3 υποοικογένειες, με βάση τη δομή του NH₂-τελικού ρυθμιστικού τους άκρου που καθορίζει την ευαισθησία τους στο Ca²⁺ και τη διακυλογλυκερόλη.²⁷

- Οι **κλασικές ή συμβατικές PKCs** (cPKCs, conventional PKCs). Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας (α, β_I, β_{II} και γ) ενεργοποιούνται από το Ca²⁺, τη διακυλογλυκερόλη και τους φορβολεστέρες.
- Οι **καινούριες PKCs** (nPKCs, novel PKCs). Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας (δ, ε, θ και η) δεν αποκρίνονται στο Ca²⁺, αλλά ενεργοποιούνται από τη διακυλογλυκερόλη και τους φορβολεστέρες.
- Οι **άτυπες PKCs** (aPKCs, atypical PKCs). Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας (ζ, λ και ι) δεν εξαρτώνται από το Ca²⁺, τη διακυλογλυκερόλη και τους φορβολεστέρες, αλλά απαιτούν πρωτεΐνες προσαρμογής για την αύξηση της ενζυμικής τους δραστηριότητας.

Εκτός από την απαίτηση των διαφορετικών ενεργοποιητών, τα ισόενζυμα PKC διακρίνονται από τον διαφορετικό κυτταρικό εντοπισμό τους και τους διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, οι α, δ και ζ ισομορφές είναι ευρέως κατανεμημένες σε σχεδόν όλους τους ιστούς, ενώ οι άλλες ισομορφές βρίσκονται μόνο σε ειδικούς ιστούς με εξειδικευμένες λειτουργίες.²⁸



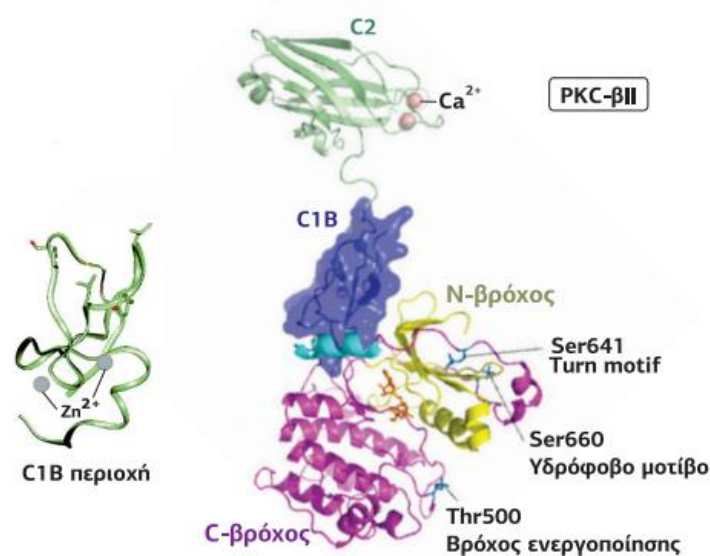
Εικόνα 11. Οι βασικές λειτουργικές δράσεις των διάφορων ισομορφών της PKC

Οι πρωτεϊνικές κινάσες C αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα 68-83 kDa. Περιέχουν μία NH₂-τελική ρυθμιστική περιοχή και μια COOH-τελική καταλυτική περιοχή. Η ρυθμιστική περιοχή αποτελείται από μια περιοχή C1 (C: conserved domain), μια περιοχή C2 και μια αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος με

αυτοανασταλτική λειτουργία, η οποία συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο στη θέση σύνδεσης του υποστρώματος, κρατώντας σε κατάσταση ηρεμίας το ένζυμο σε ανενεργή διαμόρφωση.

Η περιοχή C1 συναντάται μόνο στις κλασικές cPKCs και στις καινούριες nPKCs ισομορφές. Περιέχει δύο μοτίβα πλούσια σε κυστεΐνες (γνωστά και ως C1A και C1B στοιχεία), 50 αμινοξέων το καθένα με δύο προσδεμένα ιόντα Zn^{2+} . Οι άτυπες aPKCs περιέχουν μια C1-like περιοχή με μόνο ένα μοτίβο πλούσιο σε κυστεΐνη. Η περιοχή C2, η οποία συναντάται μόνο στις κλασικές cPKCs, είναι ένα μοτίβο 120 αμινοξέων που συνδέει φωσfolιπίδια της μεμβράνης παρουσία Ca^{2+} , οδηγώντας στην ενεργοποίηση της γειτονικής καταλυτικής περιοχής της κινάσης. Η περιοχή C2 έχει βρεθεί και σε άλλες πρωτεΐνες, εκτός από τις PKCs, όπως η φωσfolιπάση C.

Οι PKCs είναι ιδιοσυστάτα φωσφορυλιωμένες σε τρία καλά συντηρημένα κατάλοιπα της καταλυτικής τους περιοχής, Thr500 στον βρόχο ενεργοποίησης, Ser641 στο “turn motif” και Ser660 στο “hydrophobic motif”. Οι φωσφορυλιώσεις αυτές είναι απαραίτητες για την ωρίμανση της PKC σε ένα καταλυτικά ικανό αλλά ανενεργό ένζυμο σε κλειστή διαμόρφωση, στην οποία το ψευδοϋπόστρωμα καταλαμβάνει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Για τη φωσφορυλίωση της Thr500 είναι υπεύθυνη η κινάση PDK1. Μια εξαίρεση αποτελούν οι άτυπες PKCs, στις οποίες αντί για τη Ser660 στο “hydrophobic motif” περιέχουν ένα φωσφομμητικό κατάλοιπο.²⁹

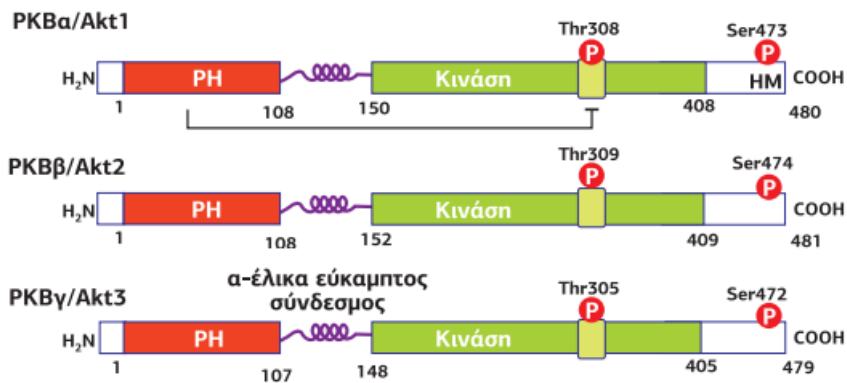


Εικόνα 12. Δομή της PKC²⁹

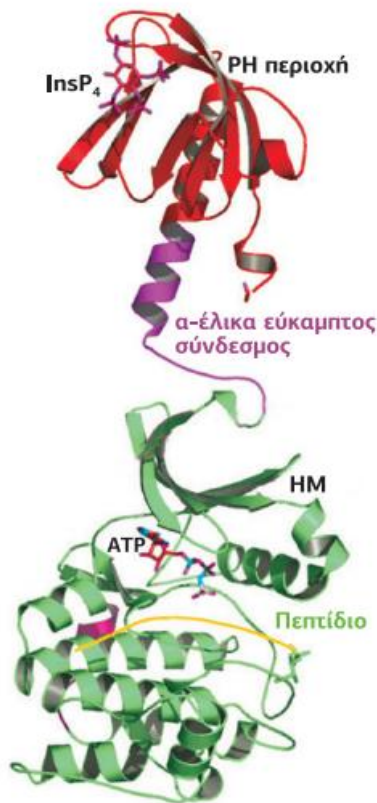
2.2.3.1.5 Πρωτεϊνική κινάση B (PKB) ή Akt

Η πρωτεϊνική κινάση B (PKB), γνωστή και ως Akt, είναι μια κινάση Ser/Thr που συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3K. Έχουν αναγνωρισθεί τρεις ισομορφές των κινάσων Akt. Η **Akt1** συμμετέχει στο μονοπάτι της κυτταρικής επιβίωσης αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης. Είναι, επίσης, ικανή να ενεργοποιεί τη σύνθεση πρωτεϊνών και συνεπώς παίζει ρόλο κλειδί στην υπερτροφία των σκελετικών μυών και γενικά στην αύξηση των ιστών. Το πειραματικό μοντέλο ποντικού με loss-of-function μεταλλάξεις του γονιδίου Akt1 εμφανίζει καθυστερημένη αύξηση και αυξημένη απόπτωση σε ιστούς, όπως ο θύμος και οι όρχεις. Καθώς αναστέλλει την απόπτωση και προωθεί την κυτταρική επιβίωση, η Akt1 είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε πολλούς τύπους καρκίνου. Η **Akt2** είναι ένα σηματοδοτικό μόριο που παίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση της ινσουλίνης. Στο πειραματικό μοντέλο ποντικού που στερείται την Akt1, αλλά εκφράζει την Akt2, η ομοιόσταση της γλυκόζης δεν διαταράσσεται, αλλά τα ζώα είναι μικρότερα, επισημαίνοντας τον ρόλο της Akt1 στην αύξηση. Αντιθέτως, στο πειραματικό μοντέλο ποντικού που εκφράζει την Akt1, αλλά στερείται την Akt2, εμφανίζεται ένας διαβητικός φαινότυπος (αντίσταση στην ινσουλίνη). Οι ισομορφές Akt υπερεκφράζονται σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών όγκων, του γαστρεντερικού συστήματος (Akt1), των ωοθηκών (Akt2), του παγκρέατος (Akt2) και του στήθους (Akt2). Ο ρόλος της **Akt3** είναι λιγότερο ξεκάθαρος και εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο.³⁰

Η PKB/Akt είναι μια ~57 kDa κινάση Ser/Thr, η οποία περιέχει στο NH₂-τελικό της άκρο μια περιοχή PH (Pleckstrin Homology) που συνδέεται στα φωσφοϊνοσιτίδια PtdIns(3,4,5)P₃ με μεγάλη συγγένεια. Η περιοχή PH συνδέεται μέσω ενός συνδέσμου α-έλικας με την καταλυτική περιοχή κινάσης. Στην καταλυτική περιοχή βρίσκεται η Thr308, της οποίας η φωσφορυλίωση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Akt. Δίπλα στην περιοχή κινάσης υπάρχει μια COOH-τελική ρυθμιστική περιοχή που περιέχει ένα υδρόφοβο μοτίβο (HM, Hydrophobic Motif) με μια δεύτερη θέση φωσφορυλίωσης, την Ser473. Αυτές οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης είναι απαραίτητες για την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου.³¹



Εικόνα 13. Διάφορες ισομορφές της PKB³¹



Εικόνα 14. Δομή της PKB³¹

2.2.3.1.6 Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από το σύμπλοκο Ca²⁺/καλμοδουλίνη

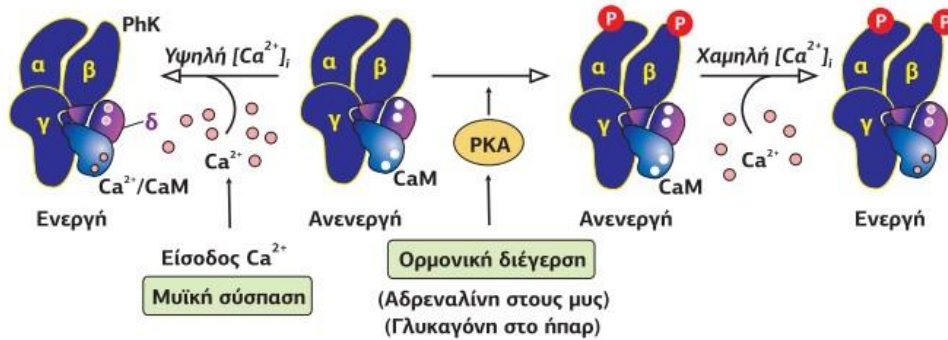
Το Ca²⁺ σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετέχει ως σύμπλοκο Ca²⁺/καλμοδουλίνης, το οποίο προσδένεται εξειδικευμένα σε πρωτεΐνες-τελεστές και

ρυθμίζει τη δράση τους. Οι κινάσες που εξαρτώνται από την καλμοδουλίνη, οι CaMKs (Ca^{2+} / calmodulin-dependent protein kinases), είναι διαδοσμένες και βρίσκονται σε όλα σχεδόν τα κύτταρα των θηλαστικών. Οι CaMKs ταξινομούνται στις εξειδικευμένες και στις πολυλειτουργικές CaM κινάσες:

- Χαρακτηριστικά παραδείγματα **εξειδικευμένων** CaM-εξαρτώμενων κινασών, που φωσφορυλιώνουν έναν συγκεκριμένο στόχο, είναι η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK), η κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK) και η κινάση του ευκαρυωτικού παράγοντα επιμήκυνσης eEF2 (eEF2K), γνωστή και ως CaMK-III.
- Οι **πολυλειτουργικές** CaM-εξαρτώμενες κινάσες είναι η CaMK-I, η CaMK-II και η CaMK-IV, οι οποίες φωσφορυλιώνουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων.³²

2.2.3.1.6.1 Κινάση της Φωσφορυλάσης (PhK)

Η κινάση της φωσφορυλάσης, η PhK (Phosphorylase kinase), είναι μια κινάση Ser/Thr, η οποία φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου σε δύο κατάλοιπα και την ενεργοποιεί. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου καταλύει τη μετατροπή του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη. Παίζει, λοιπόν, σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου. Η PhK είναι ένα δεκαεξαμερές ολοένζυμο 1,3 MDa, που αποτελείται από 4 τετραμερή. Το κάθε τετραμερές αποτελείται από 4 υπομονάδες (α , β , γ και δ) διευθετημένες σε σχήμα πεταλούδας. Η γ είναι η καταλυτική υπομονάδα (η μόνη, της οποίας η κρυσταλλική δομή έχει αποσαφηνιστεί) και οι άλλες τρεις είναι ρυθμιστικές. Η α - και η β -υπομονάδα διατηρούν σε κατάσταση αναστολής την κινάση, ενώ η φωσφορυλίωσή τους από την PKA αναστέλλει τη δράση τους, επιτρέποντας την ενεργοποίηση της PhK. Η δ υπομονάδα είναι η καλμοδουλίνη, η οποία όμως παραμένει συνδεδεμένη στο ολοένζυμο, ακόμη και όταν η συγκέντρωση του Ca^{2+} είναι χαμηλή. Όταν η συγκέντρωση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} αυξάνεται σε 10^{-7} M, το Ca^{2+} συνδέεται με την καλμοδουλίνη οδηγώντας στην αλλαγή της διαμόρφωσής της, που ενεργοποιεί τη δραστηριότητα κινάσης.³³



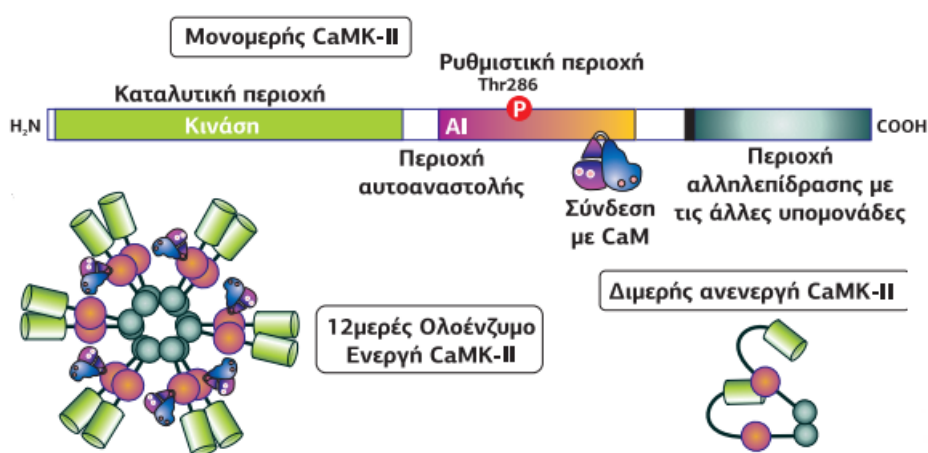
Εικόνα 15. Δομή των υπομονάδων και ρύθμιση της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στους μυς

2.2.3.1.6.1 CaM κινάση II

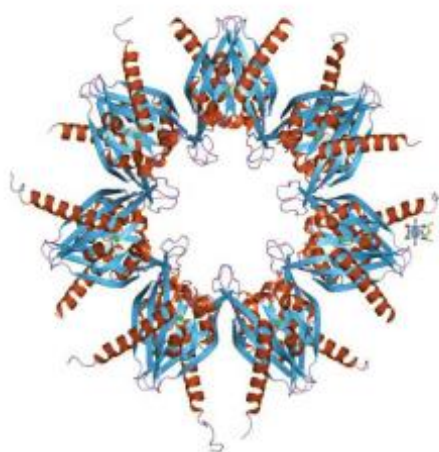
Η καλύτερα μελετημένη Ca^{2+} /καλμοδουλινο-εξαρτώμενη κινάση είναι η CaMKII. Ο λόγος για το ενδιαφέρον είναι ότι αυτό το εξαιρετικό ένζυμο παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης. Από τις τέσσερις ισομορφές της κινάσης, οι CaMK-IIα και CaMK-IIβ βρίσκονται σε μεγάλη συγκέντρωση στον εγκέφαλο και ιδιαίτερα σε περιοχές που εμπλέκονται στη μνήμη και στη μάθηση, όπως ο ιππόκαμπος, όπου αποτελούν το 2% των κυτταρικών πρωτεϊνών. Οι CaMK-IIγ και δ εκφράζονται ευρέως σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένης και της καρδιάς. Στην καρδιά η κυρίαρχη ισομορφή είναι η δ. Αν και εμφανίζουν μεγάλη δομική ομοιότητα με τις μονομερείς CaMK-I και CaMK-IV, οι CaMKs-II έχουν μια επιπλέον περιοχή ολιγομερισμού στο COOH-τελικό τους άκρο που τους επιτρέπει να δημιουργούν διμερείς δομές, οι οποίες επιπλέον συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας ένα 12μερές ολοένζυμο 600 kDa από δύο συνδεδεμένα εξαμερή δαχτυλίδια. Σε αυτή τη δομή, η οποία είναι μοναδική σε όλες τις κινάσες, οφείλεται η χαρακτηριστική τους δράση. Οι CaMKs-II εμφανίζονται να έχουν ενσωματωμένο έναν “διακόπτη μνήμης”, που τους επιτρέπει να διατηρούν ένα διεγερτικό σήμα για μεγάλη χρονική περίοδο και να παραμένουν σε ενεργή κατάσταση, ακόμη και όταν το αρχικό ερέθισμα έχει εξασθενήσει. Χάρη σε αυτήν την ιδιότητα οι CaMKs-II θεωρούνται κύριο στοιχείο στη δημιουργία και στην αποθήκευση της μνήμης στον εγκέφαλο.

Η κρυσταλλική δομή της CaM-εξαρτώμενης κινάσης II ανακαλύφθηκε το 2005. Περιέχει μια NH₂-τελική καταλυτική περιοχή, μια ρυθμιστική περιοχή με τη θέση

σύνδεσης του συμπλόκου Ca^{2+} /καλμοδουλίνης και την αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος-αυτοαναστολής, καθώς και μια COOH-τελική περιοχή αλληλεπίδρασης (association domain), υπεύθυνη για τη δημιουργία της 12μερούς δομής της κινάσης. Η 12μερής δομή της CaMK-II αποτελείται από έξι διμερή (α, β, γ ή δ ισομορφής) που δημιουργούν δύο δαχτυλίδια, με τις καταλυτικές περιοχές προσανατολισμένες προς τα έξω και την περιοχή αλληλεπίδρασης να δημιουργεί το κέντρο του κάθε δαχτυλιδιού. Η συνολική δομή της CaMK-II μπορεί να προκύψει ως ομο-ολιγομερές ή ως ετερο-ολιγομερές συγκροτημένο από διαφορετικές ισομορφές.³²



Εικόνα 16. Περιοχές απο τις οποίες αποτελείται το κάθε μονομερές της CaM κινάσης



Εικόνα 17. Κρυσταλλογραφική δομή της CaMK-II

2.2.3.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες Τυροσίνης (TKs)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης, όπως και οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ενδοκυτταρική μετάδοση

μηνυμάτων και καταλύουν τη φωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης πρωτεϊνών-στόχων χρησιμοποιώντας εξ ολοκλήρου το ATP. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης “πυροδοτείται” κυρίως από σήματα που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Τα εξωκυτταρικά σήματα είναι συνήθως πρωτεϊνικές ορμόνες, οι οποίες αν ασκούν ρυθμιστική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ταξινομούνται ως αυξητικοί παράγοντες. Το ανθρώπινο γονιδίωμα φέρει 90 μοναδικές κινάσες τυροσίνης οι οποίες ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, σε υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) και σε μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (nRTKs). Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες συμμετέχουν στη διαμεμβρανική σηματοδότηση, ενώ οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες συμμετέχουν στη σηματοδότηση προς τον πυρήνα. Οι τυροσινικές κινάσες οδηγούν στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση πρωτεϊνών σε κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Οι μεταβολές στις κινάσες τυροσίνης προκαλούν καρκινικά κύτταρα. Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (PTKs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόοδο, την ανάπτυξη, την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και τον μεταβολισμό.³⁴

2.2.3.2.1 Υποδοχικές τυροσινικές κινάσες

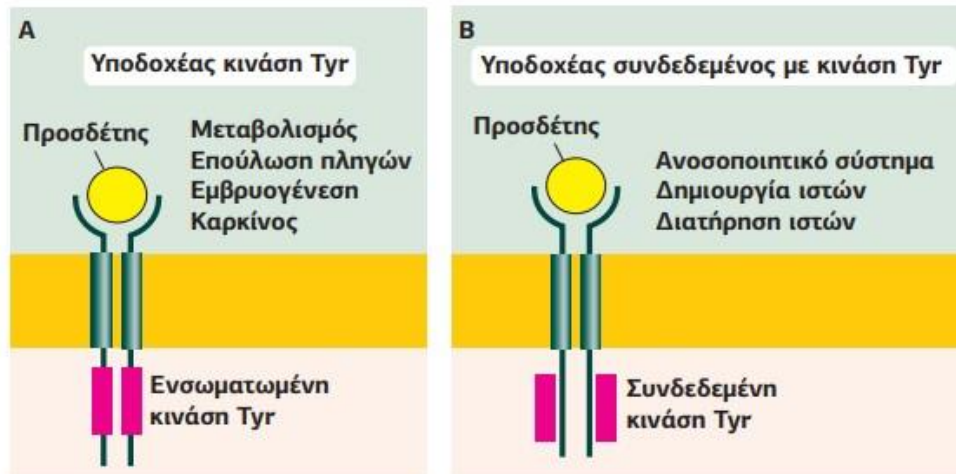
Ενώ οι υποδοχείς κινάσες Ser/Thr αποτελούν εξελικτικά αρχαίους μηχανισμούς διαμεμβρανικής σηματοδότησης, που συναντώνται όχι μόνο στα σπονδυλωτά αλλά και στα ασπόνδυλα και στα φυτά, οι υποδοχείς κινάσες Tyr, αλλά και οι κινάσες Tyr γενικά, είναι πιο σύγχρονοι εξελικτικά μηχανισμοί. Πιο συγκεκριμένα, οι υποδοχείς κινάσες Tyr και οι κινάσες Tyr συναντώνται μόνο στα ζώα, όπου η φωσφορυλίωση Tyr παίζει κύριο ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση των ιστών, στον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος και στον κακοήγη μετασχηματισμό. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 90 κινάσες τυροσίνης, από τις οποίες 58 αποτελούν τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs).

Οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι εμφανίζουν στην εξωκυτταρική τους επιφάνεια θέσεις πρόσδεσης για εξωκυτταρικούς προσδέτες. Όταν αυτοί συνδέονται στον υποδοχέα ενεργοποιούν τη δράση μιας ειδικής κινάσης τυροσίνης που βρίσκεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της φωσφορυλίωσης καταλοίπων

τυροσίνης στον ίδιο τον υποδοχέα αλλά και σε διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Αυτά με τη σειρά τους “πυροδοτούν” τη βιολογική απόκριση του κυττάρου ενεργοποιώντας μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων. Η απόκριση μπορεί να φθάσει μέχρι το επίπεδο του πυρήνα και να ενεργοποιήσει εκεί τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Επίσης μπορεί να επηρεάσει την αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, και τις αντιδράσεις του ενδιάμεσου μεταβολισμού τους, επίσης την κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και μορφογένεση.³⁵

Οι RTKs χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τους υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης και τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς συνδεδεμένους με κινάσες τυροσίνης.

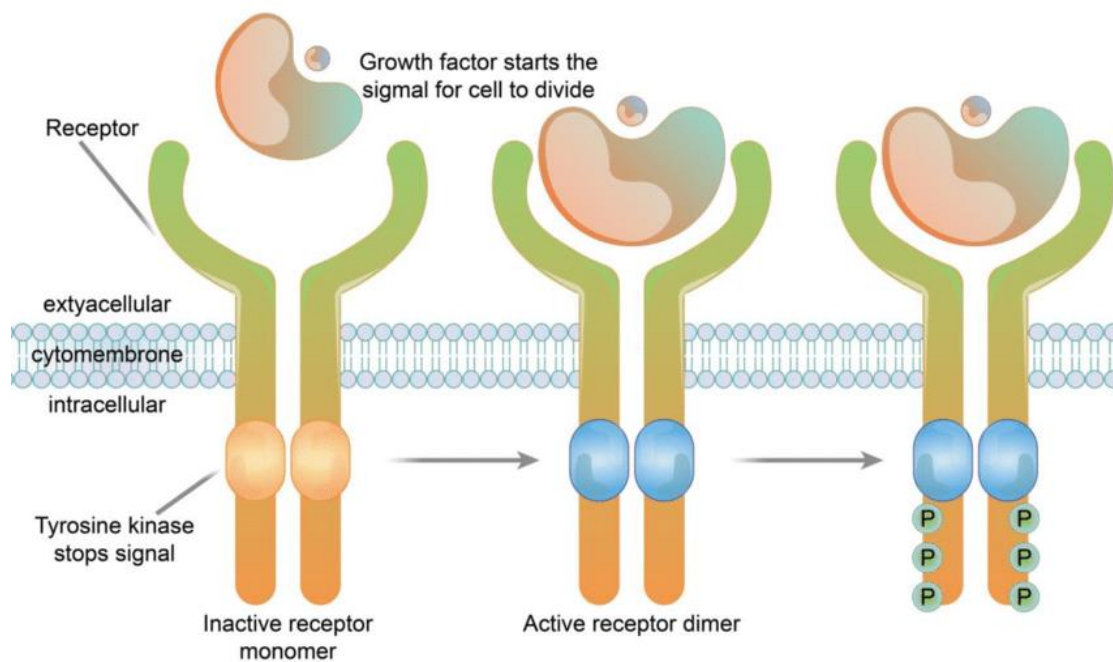
- **Υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης.** Οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης (RTKs, Receptor Tyrosine Kinases) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμφανίζουν στην εξωκυτταρική τους επιφάνεια θέσεις πρόσδεσης για εξωκυτταρικούς προσδέτες. Όταν αυτοί συνδέονται στον υποδοχέα, ενεργοποιούν τη δράση κινάσης τυροσίνης, που βρίσκεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη της φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στον ίδιο τον υποδοχέα, αλλά και σε διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Αυτά με τη σειρά τους “πυροδοτούν” τη βιολογική απόκριση του κυττάρου ενεργοποιώντας μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων. Το χαρακτηριστικό αυτού του τύπου υποδοχέα είναι ότι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη και η περιοχή της κινάσης τυροσίνης αποτελούν τμήματα της ίδιας πρωτεΐνης.
- **Διαμεμβρανικοί υποδοχείς συνδεδεμένοι με κινάσες τυροσίνης.** Οι υποδοχείς αυτοί είναι συνδεδεμένοι στην ενδοκυτταρική τους περιοχή με μία ή περισσότερες κινάσες, οι οποίες ενεργοποιούνται όταν ένας προσδέτης συνδέεται στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα. Η διαφορά είναι ότι η κινάση τυροσίνης και ο υποδοχέας αποτελούν ξεχωριστές πρωτεΐνες.



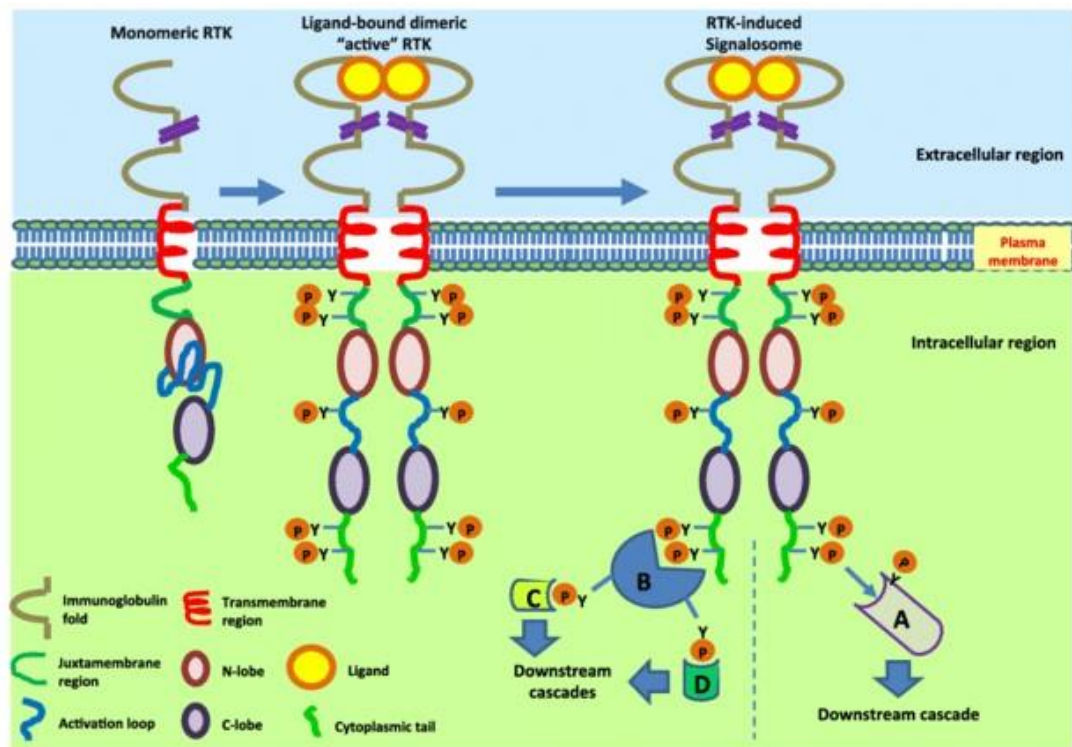
Εικόνα 18. Υποδοχέας με εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης και υποδοχέας συνδεδεμένος με κινάση τυροσίνης

Ως προς τη δομή τους, οι υποδοχείς-κινάσες τυροσίνης κατατάσσονται σε δύο υποκατηγορίες: τους **μονομερείς** (υποδοχείς των EGF, NGF, PDGF κλπ) και τους **πολυμερείς** (υποδοχέας της ινσουλίνης). Οι **μονομερείς** υποδοχείς είναι μονομερείς πρωτεΐνες με μια εξωκυτταρική, μια ενδομεμβρανική και μια ενδοκυτταρική περιοχή. Η εξωκυτταρική περιοχή (αμινοτελικό άκρο) περιέχει τη θέση σύνδεσης του αυξητικού παράγοντα, η ενδομεμβρανική περιοχή συγκρατεί τον υποδοχέα στη μεμβράνη και η κυτταροπλασματική περιοχή (καρβοξυτελικό άκρο) περιέχει την κινάση της τυροσίνης. Πέρα από την κοινή δομή που εμφανίζουν οι υποδοχείς αυτής της κατηγορίας, έχουν ορισμένες δομικές ιδιαιτερότητες, οι οποίες τους κατατάσσουν σε διαφορετικές οικογένειες. Όσον αφορά τους **πολυμερείς** υποδοχείς, καλύτερα μελετημένος υποδοχέας αυτής της κατηγορίας είναι ο υποδοχέας της ινσουλίνης. Αποτελείται από δύο α-υπομονάδες και δύο β-υπομονάδες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς S-S δημιουργώντας ένα τετραμερές $\alpha_2\beta_2$. Οι υπομονάδες αυτές προέρχονται από ένα μονομερές γλυκοσυλιωμένο πολυπεπτίδιο (πρόδρομος-precursor), το οποίο μεταφέρεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο στη συσκευή Golgi, όπου και γλυκοσυλιώνεται εκ νέου, κόβεται από μια πρωτεΐνάση στις υπομονάδες α και β, και κατόπιν μεταφέρεται στην κυτταρική μεμβράνη όπου και παίρνει την τελική του θέση. Οι α-υπομονάδες βρίσκονται εξ ολοκλήρου στην εξωκυτταρική περιοχή, με το καρβοξυτελικό άκρο τους προς την πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Περιέχουν 15-20 θέσεις γλυκοσυλίωσης, καθώς και μια

περιοχή πολύ πλούσια σε κυστεΐνη. Στις α -υπομονάδες βρίσκεται η θέση σύνδεσης της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη με μορφή διμερούς μορίου ενώνεται ταυτόχρονα με τις δύο θέσεις σύνδεσής της, προκαλώντας μια αλλαγή στη διαμόρφωση των α -υπομονάδων, η οποία μεταδίδεται στις β -υπομονάδες που μ' αυτόν τον τρόπο ενεργοποιούνται. Οι β -υπομονάδες διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη έχοντας το αμινοτελικό άκρο στην εξωκυτταρική περιοχή, ενώ το καρβοξυτελικό στο κυτταρόπλασμα. Στο κυτταροπλασματικό τους τμήμα περιέχουν την κινάση.³⁶



Εικόνα 19. Ενεργοποίηση υποδοχικής κινάσης τυροσίνης



Εικόνα 20. Απεικόνιση μονομερούς και πολυμερούς υποδοχέα

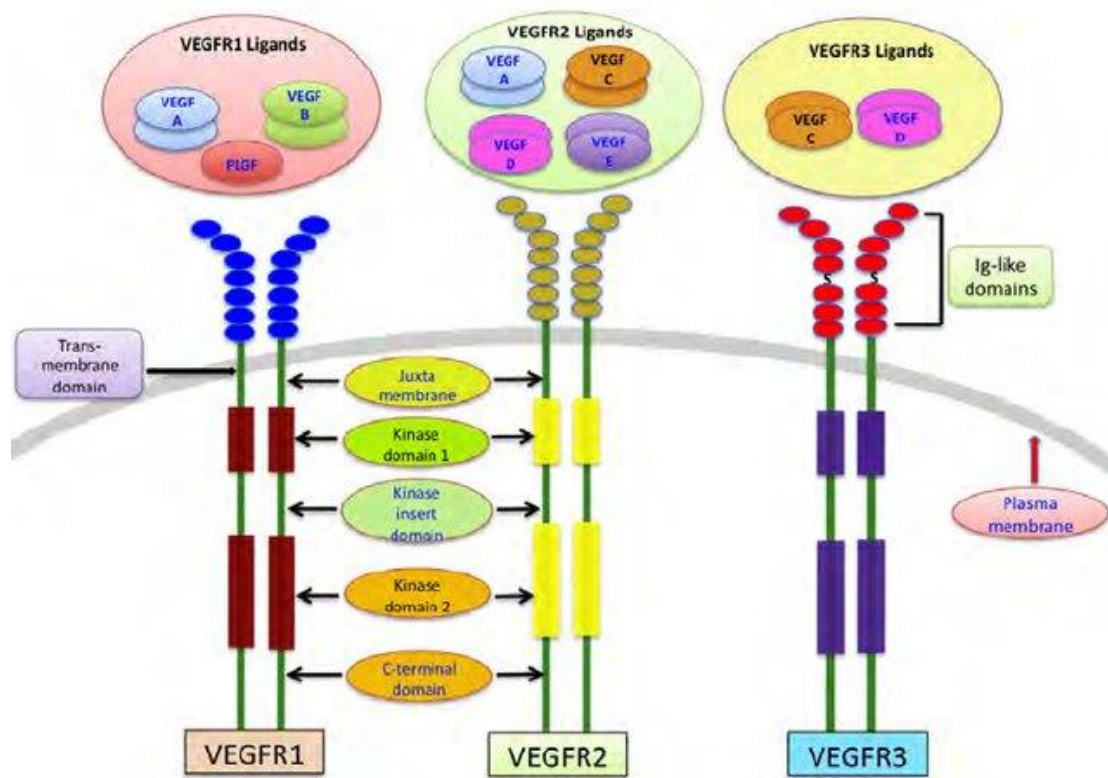
2.2.3.2.1.1 Υποδοχείς Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (VEGFR)

Οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGF) είναι οι κύριοι ρυθμιστές της αγγειογένεσης. Η οικογένεια VEGF στα θηλαστικά αποτελείται από 7 μέλη (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F και PlGF), ενώ τρεις είναι οι κύριοι υποδοχείς του VEGF VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt-4). Ο VEGFR-1 και ο VEGFR-2 ρυθμίζουν την αγγειογένεση και την αγγειακή διαπερατότητα, ενώ ο VEGFR-3 ρυθμίζει κυρίως τη λεμφαγγειογένεση. Όλα τα μέλη είναι ομοδιμερή 34-42 kDa με έναν κοινό VEGF Homology Domain (VHD). Αυτή η κεντρική περιοχή αποτελείται από ένα cystine knot motif, με 6 καλά συντηρημένες Cys, που δημιουργούν 3 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα μονομερή διμερίζονται με αντιπαράλληλο, side-by-side προσανατολισμό, συνδεδεμένα με έναν δισουλφιδικό δεσμό.³⁷

Η VEGFR-2 ως υποδοχική τυροσινική κινάση είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, αναλυτικότερα διαιρείται σε οκτώ τομείς: ένα εξωκυτταρικό τομέα (ECD), ένα διαμεμβρανικό τομέα (TMD), ένα παραμεμβρανικό τομέα (JMD), τον τομέα κινάσης (TKD), συμπεριλαμβανομένου του τομέα δέσμησης του ATP (TKD1), των τομέα

εισαγωγής της κινάσης (KID), τον τομέα φωσφοτρανσφεράσης (TKD2) και τέλος ένα εύκαμπτο COOH-τελικό άκρο (CTD). Ο εξωκυτταρικός τομέας (ECD) αποτελείται από 7 περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Ig-like) , ενώ η περιοχή της κινάσης είναι η πιο καλά διατηρημένη μεταξύ των VEGFRs . Στο NH₂-τελικό άκρο της ενδοκυτταρικής τυροσινικής κινάσης, υφίσταται ένας υδρόφοβος θύλακας που περιέχει τον βρόχο δέσμησης του ATP πλούσιο σε γλυκίνη, ενώ στο COOH-τελικό άκρο, υπάρχει ο καταλυτικός βρόχος και ο βρόχος ενεργοποίησης (A-loop), που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για τις καταλυτικές ιδιότητες της κινάσης.

Η δέσμευση του παράγοντα VEGF στον εκάστοτε υποδοχέα του προκαλεί διμερισμό του δευτέρου, έχοντας ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων υπολειμμάτων τυροσίνης που βρίσκονται τόσο στην ενδοκυτταρική περιοχή, συμπεριλαμβανομένης της παραμεμβρανικής περιοχής όσο στην περιοχή της κινάσης, καθώς και στο COOH-τελικό άκρο.



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση των υποδοχέων VEGF

Διεγείρει την αγγειογένεση με εξειδίκευση στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Είναι μέρος του συστήματος που αποκαθιστά την παροχή οξυγόνου στους ιστούς όταν η κυκλοφορία του αίματος είναι ανεπαρκής, όπως σε συνθήκες υποξίας. Η συγκέντρωση του VEGF στον ορό είναι υψηλή στο βρογχικό άσθμα και στον σακχαρώδη διαβήτη. Φυσιολογική λειτουργία του VEGF είναι η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, νέων αιμοφόρων αγγείων έπειτα από τραυματισμό, και μυών μετά την άσκηση.³⁸

2.2.3.2.1.2 Υποδοχείς Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (EGFR)

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο υποδοχέας του (EGFR) παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Ο EGF είναι μια μονομερής πρωτεΐνη 53 αμινοξέων 6 kDa, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη. Έχει έξι κυστεΐνες που δημιουργούν τρεις δισουλφικούς δεσμούς (Cys6-Cys20, Cys14-Cys31, Cys33-Cys42), οι οποίοι σχηματίζουν τρεις βρόχους απαραίτητους για τη σύνδεση του EGF με τον υποδοχέα του. Ο Α-βρόχος (6-19 αα) έχει δομή α-έλικας, ο Β (20-31 αα) αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους β-κλώνους και ο C (33-42 αα) αποτελεί τμήμα του 2ου β-κλώνου.³⁹

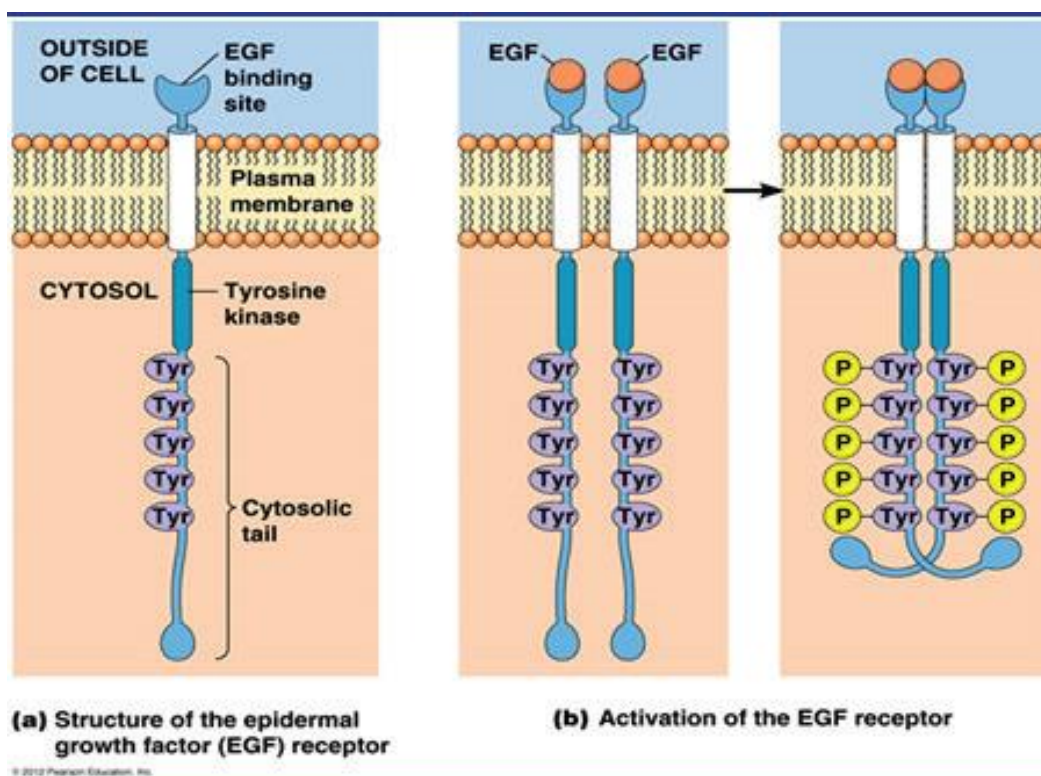
Ο EGFR αποτελείται από έναν εξωκυττάριο τομέα που δεσμεύει τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF), έναν διαμεμβρανικό τομέα και έναν ενδοκυττάριο τομέα με δράση τυροσινικής κινάσης. Ο Εξωκυττάριος Τομέας περιέχει το σημείο δέσμευσης για τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGF) και άλλους σχετικούς αυξητικούς παράγοντες. Η δέσμευση του EGF στον εξωκυττάριο τομέα προκαλεί διαμόρφωση του υποδοχέα και προάγει την ολιγομερίωση (συνήθως διμερισμός) του EGFR. Ο Διαμεμβρανικός Τομέας είναι ένα υδρόφοβο τμήμα που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και σταθεροποιεί τον διμερισμό του υποδοχέα. Ο ενδοκυττάριος τομέας περιέχει τη δραστική περιοχή της τυροσινικής κινάσης, η οποία ενεργοποιείται με την αυτοφωσφορυλίωση. Αυτή η περιοχή είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του σήματος μέσα στο κύτταρο μέσω αυτοφωσφορυλίωσης των τυροσίνων μετά τον διμερισμό.

Η δέσμευση του EGF προκαλεί ολιγομερίωση του EGFR (συνήθως διμερισμός), που φέρνει τις ενδοκυττάρειες τυροσινικές κινάσες σε κοντινή απόσταση, επιτρέποντας

την αυτοφωσφορυλίωση των τυροσίνων. Η αυτοφωσφορυλίωση των τυροσίνων στις θέσεις Y992, Y1045, Y1068, Y1148 και Y1173 δημιουργεί σημεία πρόσδεσης για διάφορες πρωτεΐνες σηματοδότησης. Κάθε φωσφοτυροσίνη μπορεί να δεσμεύει διαφορετικές πρωτεΐνες και να ενεργοποιεί διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης:

- **RAS-RAF-MEK-ERK:** Προάγει την κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμό μέσω ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού.
- **PI3K-AKT:** Προάγει την κυτταρική επιβίωση και μεταβολισμό μέσω ενεργοποίησης του PI3K/AKT μονοπατιού.
- **JAK-STAT:** Προάγει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε κυτταρικές απαντήσεις και ανοσολογικές αποκρίσεις.
- **PLCγ-PKC:** Εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και του μεταβολισμού μέσω της διάσπασης της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGFR ή υπερέκφραση του υποδοχέα συνδέονται με πολλούς καρκίνους, όπως καρκίνο του πνεύμονα, του παχέος εντέρου και του μαστού.⁴⁰



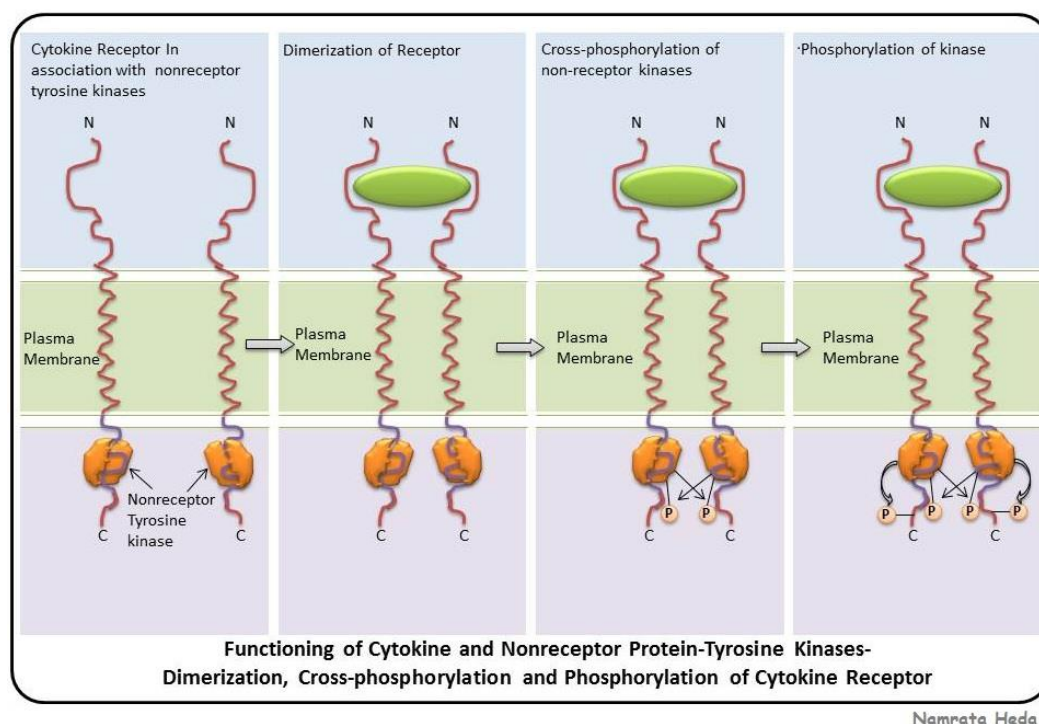
Εικόνα 22. Δομή του EGFR και διμερισμός αυτού

2.2.3.2.2 Μη Υποδοχικές Τυροσινικές Κινάσες (NRTKs)

Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (non-receptor tyrosine kinases, NRTKs) αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ενζύμων που διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η επιβίωση. Σε αντίθεση με τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs), οι NRTKs δεν είναι ενσωματωμένες στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα και ενεργοποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες ή σήματα. Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs) αποτελούν μια μεγάλη και ποικιλόμορφη οικογένεια ενζύμων. Αν και ο αριθμός των NRTKs μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον οργανισμό, στους ανθρώπους, υπάρχουν περίπου 32 γνωστά γονίδια που κωδικοποιούν για NRTKs. Αυτά τα ένζυμα κατατάσσονται σε διάφορες υποοικογένειες βάσει των δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών τους. Βάσει της ομοιότητας στην αλληλουχία τους οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες κατηγοριοποιούνται σε εννέα υποκατηγορίες: Abl, FES, JAK, ACK, SYK, TEC, FAK, Src και CSK.

Οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs) διαθέτουν μια δομή που επιτρέπει την ευέλικτη ρύθμιση και τη συμμετοχή τους σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες. Η βασική δομή των NRTKs αποτελείται από μία περιοχή κινάσης ενώ διαθέτουν πολλές συμπληρωματικές αλληλουχίες σηματοδότησης και περιοχές αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης όπως η SRC ομολογία 2 (SH2) και η SRC ομολογία 3 (SH3). Οι SH2 περιοχές είναι δομικά συντηρημένες αλληλουχίες αμινοξέων και επιτρέπουν την αλληλεπίδραση της κινάσης με φωσφορυλιωμένες τυροσίνες σε άλλες πρωτεΐνες. Οι SH3 περιοχές έχουν κυρίαρχο ρόλο στη δόμηση πρωτεϊνικών συμπλόκων και δεσμεύει πρωτεΐνες πλούσιες σε προλίνη. Η περιοχή της κινάσης δομείται από περίπου 300 κατάλοιπα αμινοξέων και αποτελείται από ένα N-τερματικό λοβό, ο οποίος εμπεριέχει πέντε ελικοειδή β-φύλλα και μια α-έλικα, ενώ ο C-τερματικός λοβός έχει την μορφή μιας μεγάλης α-έλικας. Το ενεργό κέντρο της κινάσης βρίσκεται στη σχισμή μεταξύ των δυο λοβών, ενώ η αλληλουχία αναγνώρισης του υποστρώματος εμπεριέχεται στον C τερματικό λοβό. Στην ανενεργή μορφή της κινάσης, οι λοβοί της είναι διευθετημένοι έτσι ώστε το ATP να μη μπορεί να εισέλθει στο ενεργό κέντρο. Όμως, η αυτοφωσφορυλίωση της θηλιάς ενεργοποίησης έχει ως

αποτέλεσμα την μετακίνηση των δυο λοβών, ανοίγοντας την καταλυτική περιοχή και επιτρέποντας την πρόσδεση του ATP.⁴¹

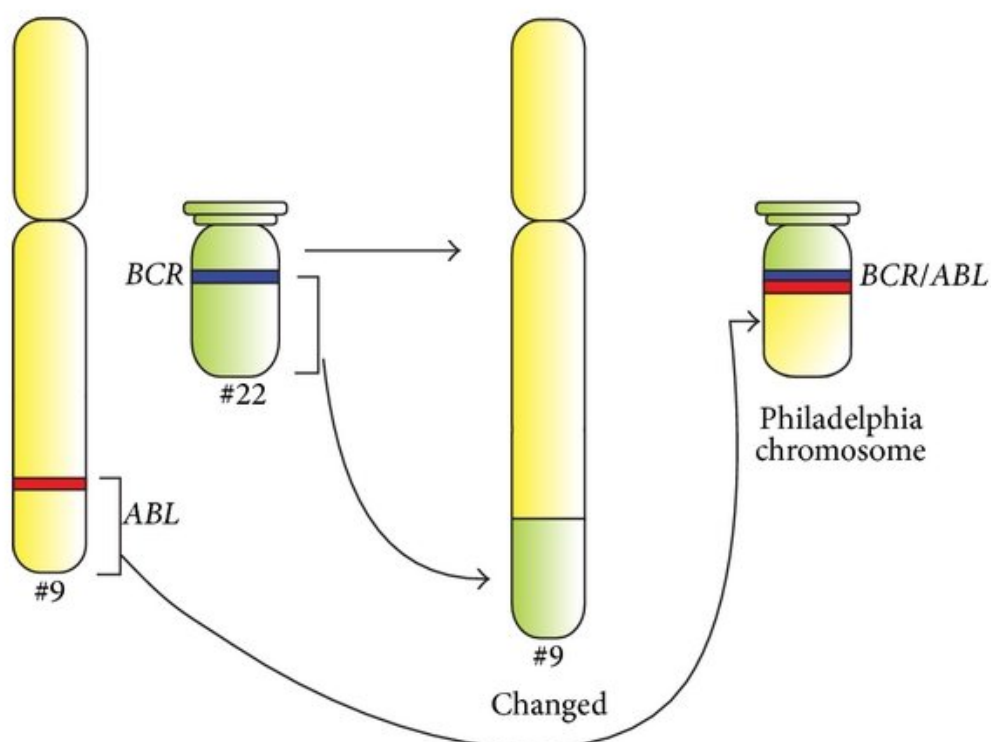


Εικόνα 23. Διμερισμός μη υποδοχικής τυροσινικής κινάσης

2.2.3.2.2.1 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης c-Abl

Η c-Abl (cellular Abelson) είναι μία μη υποδοχική τυροσινική κινάση που παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική μετανάστευση, η προσκόλληση, η απόκριση στο DNA damage και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Η c-Abl ανήκει στην οικογένεια των τυροσινικών κινασών Abl και έχει δύο κύρια μέλη: την c-Abl (Abl1) και την Arg (Abl-related gene, επίσης γνωστή ως Abl2). Η λειτουργία της c-Abl είναι ευέλικτη και εξαρτάται από την υποκυτταρική της θέση, τη ρύθμιση και τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Στα φυσιολογικά κύτταρα η Abl κωδικοποιείται από το Abl γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9. Η Abl κινάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα του κυττάρου, παίζει κρίσιμο ρόλο στην απόκριση του κυττάρου σε βλάβες του DNA, εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ιδιαίτερα στα σημεία ελέγχου που εξασφαλίζουν τη σωστή κατανομή του DNA στα θυγατρικά κύτταρα και μπορεί να συμμετέχει στην απόπτωση σε απόκριση σε διάφορα κυτταρικά σήματα. Αυτή η λειτουργία είναι σημαντική για την απομάκρυνση των κατεστραμμένων ή μη φυσιολογικών κυττάρων.

Η δυσλειτουργία της c-Abl, ιδιαίτερα μέσω γενετικών αναδιατάξεων, μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες όπως ο καρκίνος. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (CML), όπου η χρωμοσωμική μετατόπιση δημιουργεί το χιμαϊρικό μόριο BCR-ABL. Το BCR-ABL παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης και προάγει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων. Το BCR-ABL είναι ο στόχος του φαρμάκου imatinib, ενός αναστολέα τυροσινικής κινάσης που έχει φέρει επανάσταση στη θεραπεία της CML.⁴²

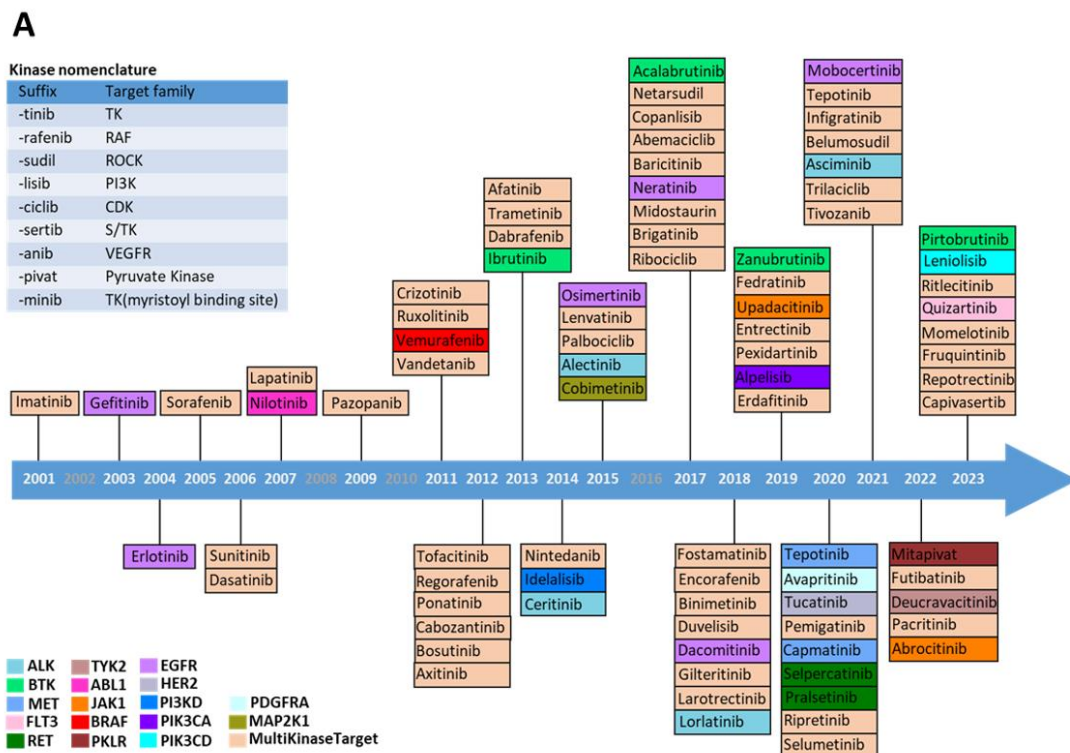


Εικόνα 24. Χρωμοσωμική μετάθεση που οδηγεί στο χρωμόσωμα Philadelphia

2.3 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές διαδικασίες μέσω της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών, δηλαδή της προσθήκης μιας φωσφορικής ομάδας. Αυτή η διαδικασία είναι κρίσιμη για την μεταγωγή σήματος μέσα στα κύτταρα και επηρεάζει πολλές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η διαίρεση και ο θάνατος των κυττάρων. Η απορρυθμισμένη λειτουργία των πρωτεϊνικών κινασών σχετίζεται άμεσα με μεταλλάξεις στο γονίδιο ή την πρωτεΐνη της κινάσης, καθώς και από την ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή την

απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών λειτουργούν εμποδίζοντας τη δράση αυτών των ενζύμων, με αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγωγής σήματος που απαιτείται για την ανάπτυξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Έτσι, μπορούν να βοηθήσουν στον έλεγχο της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης και διαίρεσης των καρκινικών κυττάρων. Η ανάπτυξη και η χρήση αυτών των φαρμάκων αποτελεί σημαντικό τομέα της έρευνας και της θεραπείας στον καρκίνο και σε άλλες ασθένειες.⁴³



Εικόνα 25. Εγκριμένοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών από τον FDA από 2001 έως το 2023

2.3.1 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διαδικασιών. Οι αναστολείς αυτών των κινασών στοχεύουν στο καταλυτικό κέντρο των πρωτεϊνικών κινασών όπου υφίσταται ο θύλακας πρόσδεσης του ATP. Η γενική ταξινόμηση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών μπορεί να γίνει με βάση διάφορα κριτήρια όπως η χημική τους δομή, ο μηχανισμός δράσης τους, η ειδικότητά τους και η βιολογική τους επίδραση. Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, ανάλογα με τον τρόπο αλληλεπίδρασης τους με

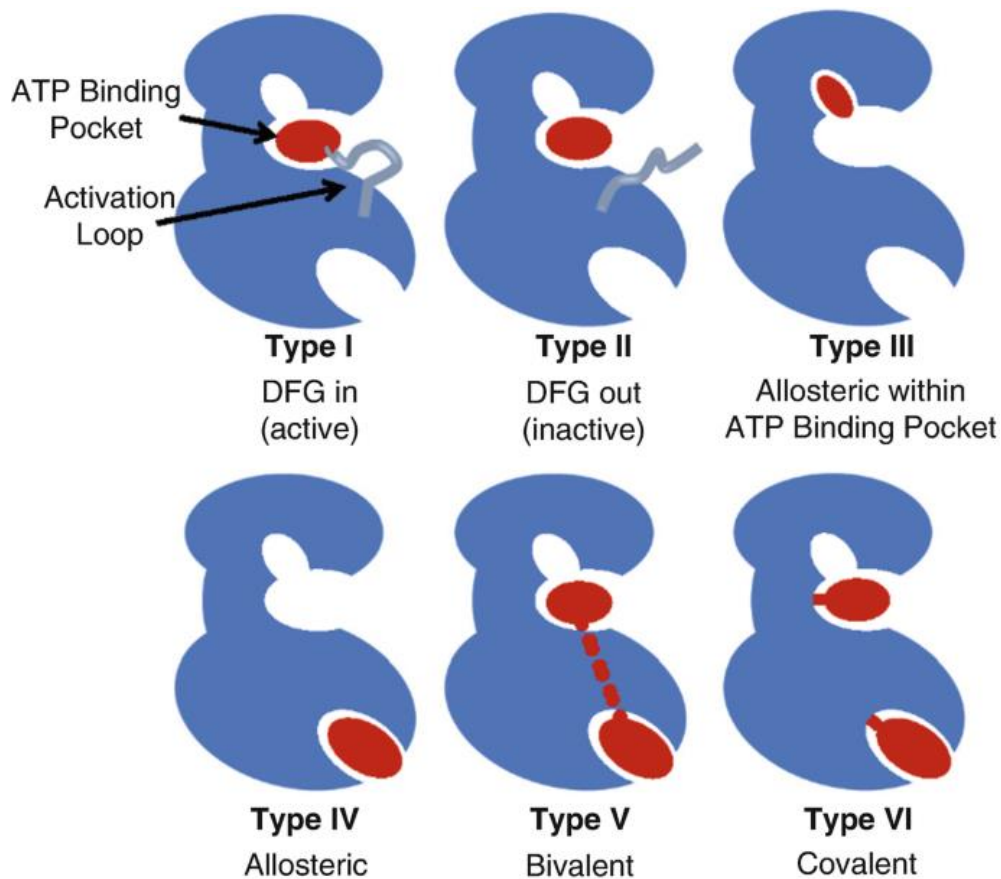
την κινάση μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, σε μη αναστρέψιμους και σε αναστρέψιμους. Οι πρώτοι δεσμεύονται με το ένζυμο μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, όπως υδρογονικούς δεσμούς, Van der Waals δυνάμεις ή ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η δέσμευση είναι δυναμική και προσωρινή, αναστολέας μπορεί να αποσυνδεθεί από το ένζυμο, επιτρέποντας στο ένζυμο να επανακτήσει τη δραστηριότητά του. Οι αναστρέψιμοι αναστολείς δεσμεύονται με το ένζυμο μέσω ομοιοπολικών δεσμών, συνήθως με κάποιο κρίσιμο αμινοξύ της ενεργού θέσης του ενζύμου. Η δέσμευση είναι μόνιμη ή μακροχρόνια, μόλις δεσμευτεί ο αναστολέας, το ένζυμο παραμένει ανασταλμένο και δεν μπορεί να επανακτήσει τη δραστηριότητά του μέσω απλής αποσύνδεσης του αναστολέα.

Οι αναστρέψιμοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικούς τύπους ανάλογα με τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με το ένζυμο και τον συγκεκριμένο μηχανισμό αναστολής.

1. **Αναστολείς τύπου I:** Αυτοί οι αναστολείς δεσμεύονται στην θέση πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο της κινάσης όταν αυτή είναι στην ενεργή (ανοικτή) διαμόρφωση. Συνήθως ανταγωνίζονται με το ATP για την πρόσδεση στην κινάση.
2. **Αναστολείς τύπου I 1/2 :** Δεσμεύονται επίσης στην περιοχή πρόσδεσης του ATP, αλλά απαιτούν ένα συγκεκριμένο προσανατολισμό του ενζύμου που είναι μερικώς ανοιχτό ή σε μια ενδιάμεση διαμόρφωση μεταξύ της ενεργής και ανενεργής κατάστασης. Οι αλληλεπιδράσεις αναστολέα-κινάσης επεκτείνονται και σε κατάλοιπα αμινοξέων που υφίστανται στον πίσω θύλακα του ενεργού κέντρου, όμοιες με αυτές που εμπλέκονται στους αναστολείς τύπου II.
3. **Αναστολείς τύπου II:** Αυτοί οι αναστολείς δεσμεύονται στο ενεργό κέντρο της κινάσης όταν η κινάση είναι σε ανενεργή (κλειστή) διαμόρφωση ωστόσο έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα και με γειτονικές αλλοστερικές περιοχές. Οι αναστολείς αυτοί δεσμεύονται στην ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης με αποτέλεσμα την υψηλή εκλεκτικότητα του εκάστοτε αναστολέα έναντι της κινάσης ως προς αναστολή. Οι αναστολείς

τύπου I έχουν ταχύτερη κινητική σύνδεσης και διάστασης, ενώ οι αναστολείς τύπου II έχουν αργή κινητική σύνδεσης, η οποία οδηγεί σε παρατεταμένο χρόνο παραμονής του αναστολέα στο σύμπλοκο αναστολέα-κινάσης.

4. **Αναστολείς τύπου III:** Αυτοί οι αναστολείς δεσμεύονται σε μια θέση αλλοστερική γειτονική ως προς τη θέση πρόσδεσης του ATP, αλλά δεν κανουν καμία αλληλεπίδραση με αυτή. Προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση της κινάσης που επηρεάζουν την ικανότητά της να δεσμεύει ATP ή υποστρώματα.
5. **Αναστολείς τύπου IV:** Οι αναστολείς τύπου IV δεσμεύονται αποκλειστικά σε μια αλλοστερική θέση απομακρυσμένη από τη θέση πρόσδεσης του ATP, χωρίς να κάνουν καμία αλληλεπίδραση με αυτήν. Οδηγούν σε αλλαγή της διαμόρφωσης της κινάσης αναστέλλοντας τη δραστηριότητά της.
6. **Αναστολείς τύπου V:** Οι αναστολείς τύπου V δεσμεύονται σε δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεϊνικής κινάσης
7. **Αναστολείς τύπου VI:** Οι αναστολείς τύπου VI συνδέονται με την πρωτεϊνική κινάση, στη θέση πρόσδεσης του ATP ή σε αλλοστερική περιοχή, μέσω μιας αντίδρασης συζυγούς προσθήκης τύπου Michael μεταξύ ενός πυρηνόφιλου καταλοίπου κυστεΐνης και μίας α,β -ακόρεστης καρβονυλικής δομής του εκάστοτε αναστολέα.⁴⁴



Εικόνα 26. Τύποι αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

2.3.2 Χαρακτηριστικά αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP σε μια πρωτεΐνη, διαδικασία γνωστή ως φωσφορυλίωση. Ο τρόπος δέσμευσης του ATP στις πρωτεϊνικές κινάσες είναι σημαντικός για την κατανόηση της λειτουργίας τους και της ανάπτυξης αναστολέων. Η ενεργός θέση των πρωτεϊνικών κινασών περιέχει μια θέση δέσμευσης του ATP, η οποία είναι σχεδιασμένη να φιλοξενεί το μόριο του ATP με υψηλή ειδικότητα. Οι κρίσιμες δομικές περιοχές περιλαμβάνουν την "P-loop" (phosphate-binding loop), η οποία αλληλεπιδρά με την τριφωσφορική ομάδα του ATP, και τα καταλυτικά κατάλοιπα όπως η λυσίνη και η ασπαραγίνη, που παίζουν ρόλο στην αναγνώριση και σταθεροποίηση του ATP. Οι περισσότεροι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών περιέχουν πολλά αρωματικούς δακτυλίους με άτομα αζώτου στη δομή τους ώστε να σχηματίσουν πιο ισχυρούς δεσμούς με την περιοχή όπου προσδέεται το ATP, και να την καταλάβουν πλήρως. Στη θέση πρόσδεσης υπάρχουν, επίσης, δύο υδροφοβικές

περιοχές, η περιοχή του σακχάρου και η περιοχή δέσμευσης φωσφορικών. Για να σχεδιαστούν και να συντεθούν νέοι εν δυνάμει αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, είναι απαραίτητο να εκμεταλλευτούμε περιοχές του ενεργού κέντρου όπου το ATP δεν αλληλεπιδρά. Ο στόχος αυτών των διαδικασιών είναι η δημιουργία νέων και ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων στο σύμπλοκο αναστολέα-κινάσης, με σκοπό την αύξηση της εκλεκτικότητας του αναστολέα. Κάθε αναστολέας πρέπει να πληροί ένα σύνολο κανόνων, γνωστό ως κανόνας των 5 ή κανόνας του Lipinski. Αυτοί οι κανόνες θέτουν όρια για διάφορες παραμέτρους, οι οποίες πρέπει να είναι είτε 5 είτε πολλαπλάσιες του 5. Ο κανόνας των πέντε του Lipinski (Lipinski's Rule of Five) είναι ένα σύνολο κατευθυντήριων αρχών που αναπτύχθηκαν από τον Christopher A. Lipinski και τους συνεργάτες του στη Pfizer το 1997. Ο κανόνας των πέντε βασίζεται σε τέσσερα κριτήρια που συνδέονται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων:

1. **Μοριακό βάρος:** Το μοριακό βάρος της ένωσης δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 500 καθώς προσδέεται στη θέση πρόσδεσης του ATP το οποίο έχει μοριακό βάρος 507 g/mol.
2. **LogP (Λογαριθμική κατανομή σε οκτανόλη/νερό):** Το logP, που αντιπροσωπεύει τη λιποφιλικότητα του μορίου, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5. Υψηλότερο logP μπορεί να σημαίνει ότι το μόριο είναι υπερβολικά λιπόφιλο και μπορεί να μην είναι βιοδιαθέσιμο ή να προκαλεί τοξικότητα λόγω συσσώρευσης σε λιπώδεις ιστούς.
3. **Υδρογονικοί δότες (Hydrogen bond donors):** Η ένωση δεν πρέπει να έχει περισσότερους από 5 δότες υδρογόνου. Οι πολλοί δότες υδρογόνου μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.
4. **Υδρογονικοί δέκτες (Hydrogen bond acceptors):** Η ένωση δεν πρέπει να έχει περισσότερους από 10 δέκτες υδρογόνου. Οι πολλοί δέκτες υδρογόνου μπορούν επίσης να επηρεάσουν αρνητικά τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.⁴⁵

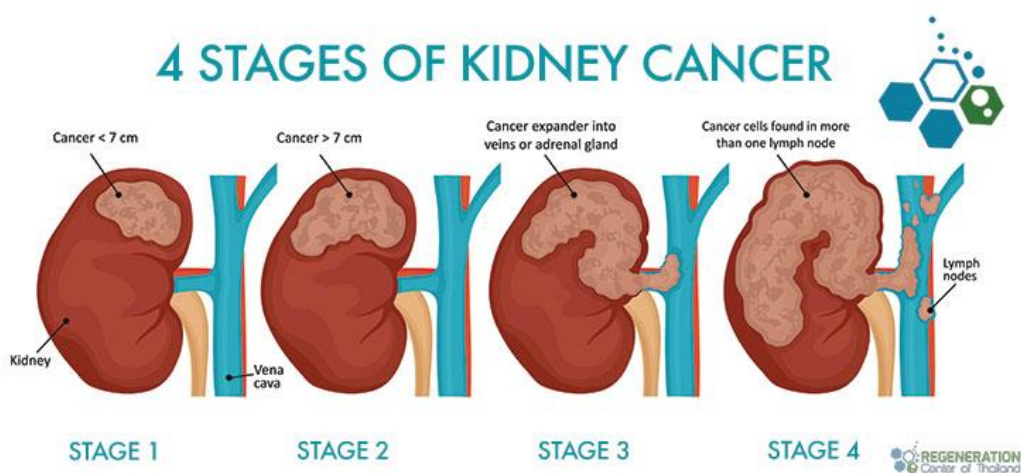
2.4 Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC)

Το νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) εμφανίζεται στην εσωτερική επιφάνεια του εγγύς νεφρικού σωληναρίου, το οποίο αποτελεί μέρος των νεφρών που μεταφέρουν

τα πρωτογενή ούρα. Στους ενήλικες, αυτός είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου των νεφρών. Παράγοντες όπως το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η υπέρταση, η έκθεση σε συγκεκριμένες χημικές ουσίες και η μακροχρόνια χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξή του.

Η θεραπεία του RCC περιλαμβάνει τη μερική ή ολική χειρουργική αφαίρεση του προσβεβλημένου νεφρού. Τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών κυμαίνονται από 65% έως 90%, αλλά μειώνονται σημαντικά όταν ο όγκος έχει κάνει μετάσταση ή έχει προχωρήσει βαθύτερα στους ιστούς των νεφρών. Στα αρχικά στάδια της νόσου τα συμπτώματα είναι λίγα έως ανύπαρκτα, καθιστώντας δύσκολη την έγκαιρη διάγνωση. Σε προχωρημένα στάδια, συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν αίμα στα ούρα, πόνο στην πλάτη, απώλεια βάρους, πυρετό, υψηλή αρτηριακή πίεση, νυχτερινές εφιδρώσεις και αίσθημα αδυναμίας και αδυναμίας.

Η μετάσταση του RCC μπορεί να επηρεάσει σημαντικά όργανα όπως τους λεμφαδένες, τους πνεύμονες, το ήπαρ, τον εγκέφαλο και τα οστά. Τα τελευταία χρόνια, η στοχευμένη θεραπεία έχει αναδειχθεί ως σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπιση του μεταστατικού RCC. Για ασθενείς με προχωρημένο RCC, συνιστάται η στοχευμένη θεραπεία που επικεντρώνεται στην αναστολή των τυροσινικών κινασών, οι οποίες παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και εξάπλωση των όγκων.⁴⁶



Εικόνα 27. Στάδια νεφροκυτταρικού καρκινώματος

2.5 Αγγειογένεση

Η ανάπτυξη του όγκου και η μεταστατική διασπορά απαιτούν προηγούμενο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από ένα υπάρχον αγγειακό δίκτυο, σε μια διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση. Ως συνέπεια της νεοαγγείωσης, τα κύτταρα των συμπαγών όγκων λαμβάνουν το οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την ανάπτυξή τους και επίσης καθίστανται ικανά να μεταναστεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, δημιουργώντας απομακρυσμένες μεταστάσεις. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ιδίως κατά τη διάρκεια του γυναικείου αναπαραγωγικού κύκλου και την επούλωση τραυμάτων, επικρατεί μια λεπτή ισορροπία μεταξύ προ-αγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων. Από την άλλη πλευρά, η παθολογική αγγειογένεση μπορεί να βρεθεί σε διάφορες ασθένειες, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η πολλαπλασιαστική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η αθηροσκλήρωση και η μεταίσχαιμική αγγείωση του μυοκαρδίου. Κυρίως στους συμπαγείς όγκους, η δυναμική ισορροπία μεταξύ προ- και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων διαταράσσεται, με σαφή υπερέκφραση των προ-αγγειογενετικών μεσολαβητών, παρέχοντας ιδανικές συνθήκες για τη νεοαγγείωση και τη μετάσταση του όγκου. Ως εκ τούτου, η αναστολή της αγγειογένεσης έχει καθιερωθεί ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στην ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.⁴⁷

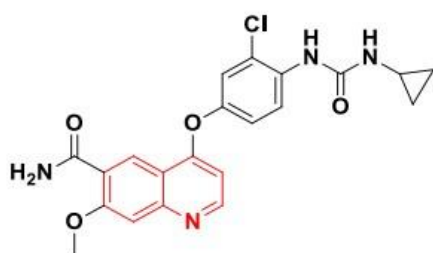
2.6 Αναστολείς της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR

Οι αναστολείς της υποδοχικής τυροσινικής κινάσης VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) είναι μια κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κυρίως στη θεραπεία διάφορων τύπων καρκίνου. Αυτά τα φάρμακα στοχεύουν τους υποδοχείς VEGFR, οι οποίοι παίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης.

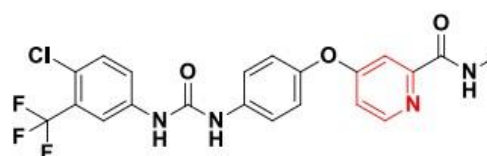
Το γεγονός ότι οι συμπαγείς όγκοι δεν μπορούν να μεγαλώσουν πέρα από τα 2 mm σε διάμετρο και δεν μπορούν να εξαπλωθούν σε άλλες περιοχές χωρίς την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω της αγγειογένεσης, υπογραμμίζει τη σημασία των αναστολέων του VEGFR (VEGFRi) ως θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η αποτελεσματικότητα των VEGFRi έχει επιβεβαιωθεί σε διάφορα προκλινικά μοντέλα και σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Οι θεραπευτικές μέθοδοι για την αναστολή της σηματοδότησης VEGF/VEGFR περιλαμβάνουν μονοκλωνικά

αντισώματα που στοχεύουν τις εξωκυτταρικές περιοχές του VEGFR και μικρομοριακούς αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs).⁴⁸

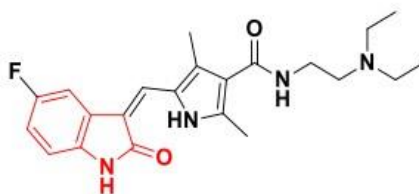
Οι αναστολείς συνδέονται με τους υποδοχείς του αυξητικού παράγοντα αγγειακού ενδοθηλίου (VEGFR) που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Οι κυριότεροι υποδοχείς είναι οι VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3. Μόλις οι αναστολείς συνδεθούν με τους υποδοχείς, εμποδίζουν τη δράση της τυροσινικής κινάσης. Αυτή η μεταγωγή σήματος είναι υπεύθυνη για την προώθηση της αγγειογένεσης. Με την αναστολή της τυροσινικής κινάσης, η διαδικασία της αγγειογένεσης διακόπτεται, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων που θα τροφοδοτούσαν τον όγκο. Πιο συγκεκριμένα, οι αναστολείς του VEGFR2 δρουν καταλαμβάνοντας το ενεργό κέντρο της κινάσης, το οποίο βρίσκεται στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Με αυτόν τον τρόπο, εμποδίζουν την αυτοφωσφορυλίωσή του. Ως αποτέλεσμα, αναστέλλουν την αγγειογένεση και άλλες σημαντικές διαδικασίες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του όγκου. Όλοι οι αναστολείς του VEGFR2 είναι μιμητές του ATP και περιέχουν δύο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, καθώς και αρκετά άτομα αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, όλοι οι εγκεκριμένοι αναστολείς έχουν στη δομή τους ετεροαρωματικούς δακτυλίους, όπως αυτοί της κινολίνης, της ινδολινόνης, της πυριδίνης και της πυριμιδίνης. Μερικά παραδείγματα φαρμάκων που είναι αναστολείς VEGFR αποτελούν το Sunitinib που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως ο νεφροκυτταρικός καρκίνος και οι γαστρεντερικοί στρωματικοί όγκοι, το Sorafenib που χρησιμοποιείται κυρίως για τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο και τον νεφροκυτταρικό καρκίνο και το Lenvatinib το οποίο χρησιμοποιείται για τον νεφροκυτταρικό καρκίνο, τον καρκίνο του θυροειδούς και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.⁴⁹



Lenvatinib



Sorafenib



Sunitinib

Εικόνα 28. Αναστολείς του VEGFR2

2.6.1 Tivozanib

Το Tivozanib διατίθεται από την φαρμακευτική εταιρία AVEO Pharmaceuticals, Inc. με εμπορική ονομασία Fotivda. Είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας τυροσινικής κινάσης (TKI) νέας γενιάς του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR). Είναι ένας ισχυρός, εκλεκτικός αναστολέας των VEGFRs 1, 2 και 3 με μακρύ χρόνο ημίσειας ζωής που έχει σχεδιαστεί για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας και της ανεκτικότητας.

Η AVEO έλαβε έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων για το FOTIVDA τον Μάρτιο του 2021 για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC) μετά από δύο ή περισσότερες προηγούμενες συστηματικές θεραπείες. Το FOTIVDA εγκρίθηκε τον Αύγουστο του 2017 στην Ευρωπαϊκή Ένωση και σε άλλες χώρες στην επικράτεια του εταίρου του EUSA Pharma για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με προχωρημένο RCC. Το Tivozanib έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά την παραγωγή ρυθμιστικών T-κυττάρων σε προκλινικά μοντέλα. Το Tivozanib ανακαλύφθηκε από την Kyowa Kirin.

Η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του FOTIVDA αποδείχθηκε σε μια μεγάλη κλινική μελέτη σε άτομα (350 άτομα συνολικά) με υποτροπιάζοντα ή ανθεκτικό προχωρημένο καρκίνο του νεφρού, όπου τουλάχιστον 2 φάρμακα είχαν σταματήσει να λειτουργούν. Αυτά τα φάρμακα περιλάμβαναν μια ανοσοθεραπεία και άλλες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) (TKIs). Κατά τη διάρκεια της μελέτης, 175 άτομα με προχωρημένο καρκίνο του νεφρού

επιλέχθηκαν τυχαία να λάβουν FOTIVDA. Τα αποτελέσματα έδειξαν 44% αύξηση του χρόνου χωρίς περαιτέρω ανάπτυξη ή εξάπλωση του όγκου, 18% (32/175) μείωση του όγκου, και έλεγχο της νόσου στο 73% (128/172).

Η AVEO και η Bristol-Myers Squibb Company («BMS») συνεργάζονται σε μια κλινική δοκιμή Φάσης 3 που έχει σχεδιαστεί για να αξιολογήσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του tivozanib σε συνδυασμό με το OPDIVO® (nivolumab) σε σύγκριση με το tivozanib ως μονοθεραπεία, σε ασθενείς με RCC που έχουν προχωρήσει μετά από προηγούμενη θεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, γνωστή ως δοκιμή TiNivo-2.

Η AVEO παρουσίασε θετικά δεδομένα από τη Μελέτη Φάσης 1b/2 του tivozanib σε συνδυασμό με το IMFINZI (durvalumab), το ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα της AstraZeneca που στρέφεται κατά του προγραμματισμένου θανάτου-ligand 1 (PD-L1), σε ασθενείς με ανεγχείρητο τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό, προηγουμένως μη θεραπευμένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC). Το σκεπτικό της συνδυαστικής θεραπείας tivozanib συν durvalumab για τη θεραπεία του HCC στηρίζεται στους πιθανούς συνεργιστικούς μηχανισμούς του tivozanib και του durvalumab για την άρση της αναστολής της ανοσολογικής απόκρισης που μεσολαβεί στην αντικαρκινική δράση.

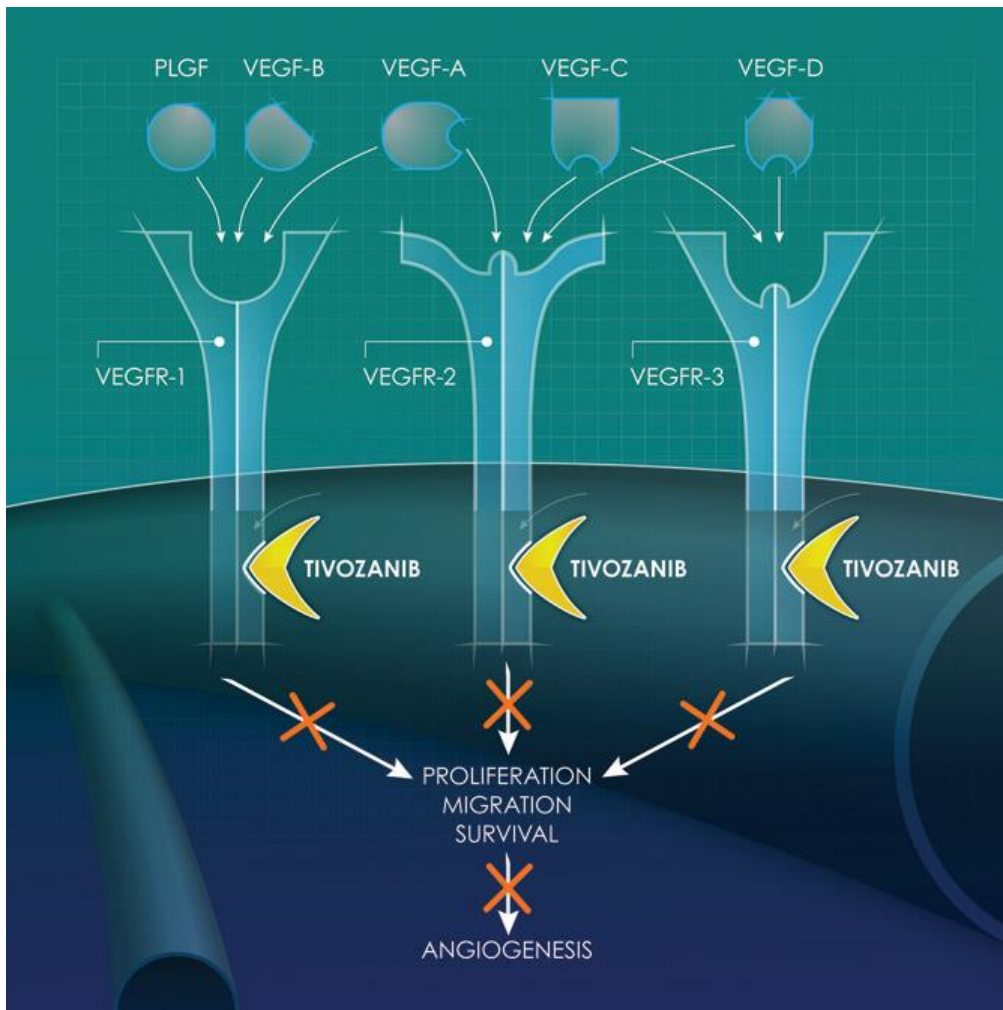
Η AVEO υποστηρίζει μια δοκιμή με το Πανεπιστήμιο της Φλόριντα για τη διεξαγωγή μιας κλινικής δοκιμής Φάσης 1β/2 για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της τιβοζανίμπης σε συνδυασμό με ατεζολιζουμάμπη σε πολλαπλούς ανοσολογικά ψυχρούς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του παγκρέατος, της χοληδόχου κύστης και της χολής. Οι ανοσολογικά ψυχροί όγκοι είναι συμπαγείς όγκοι που στερούνται ή έχουν λίγα λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο και παραμένουν μια κλινική πρόκληση.

Η AVEO έχει συνάψει Συμφωνία Συνεργασίας Έρευνας και Ανάπτυξης με τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας για τη διεξαγωγή κλινικής δοκιμής Φάσης 1/2 που έχει σχεδιαστεί για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της τιβοζανίμπης στο χολαγγειοκαρκίνωμα (CCA). Η δοκιμή είναι μια ανοικτή, μονοκεντρική, μη τυχαιοποιημένη μελέτη, στην οποία εγγράφηκε ο πρώτος ασθενής της τον Μάρτιο

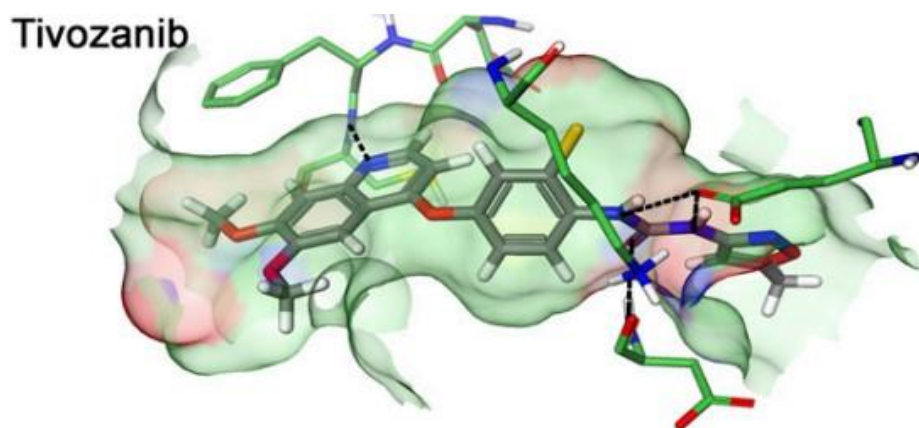
του 2022. Το CCA είναι μια επιθετική κακοήθεια των χοληφόρων οδών που παραμένει μια κλινική πρόκληση με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές και φτωχά ποσοστά επιβίωσης.⁵⁰

Στην ετήσια συνάντηση της ASCO 2019 παρουσιάστηκαν δεδομένα από μια κλινική δοκιμή φάσης 2 της τιβοζανίμπης σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα, ανθεκτικό στην πλατίνα καρκίνο των ωοθηκών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου των σαλπίνγων ή του πρωτοπαθούς καρκίνου του περιτοναίου. Η δοκιμή ήταν μία από τις διάφορες μελέτες που χρηματοδοτήθηκαν από επιχορήγηση που παρείχε η AVEO στο Εθνικό Συνολικό Δίκτυο Καρκίνου και σχεδιάστηκε για να μετρήσει την ασφάλεια και τη δραστηριότητα της τιβοζανίμπης στον καρκίνο των ωοθηκών. Από τις 31 ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη, οι 30 έλαβαν θεραπεία με tivozanib, τέσσερις ασθενείς εμφάνισαν μερική ανταπόκριση και δώδεκα ασθενείς είχαν σταθερή νόσο. Το ποσοστό κλινικού οφέλους (μερική ανταπόκριση συν σταθερή νόσο) αναφέρθηκε σε 53,3%, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τιβοζανίμπη είναι δραστική σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα καρκίνο των ωοθηκών, χωρίς σημαντική τοξικότητα.⁵¹

Το Tivozanib δεσμεύεται στο ATP-binding site των τυροσινικών κινασών των VEGFR, εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων αυτών. Αυτή η δέσμευση εμποδίζει τη μεταφορά του σήματος από τους VEGF στους ενδοκυτταρικούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αγγειογένεση και την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με την αναστολή της ενεργοποίησης των VEGFR, το Tivozanib μειώνει σημαντικά την αγγειογένεση. Η αναστολή της αγγειογένεσης έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της παροχής αίματος στον όγκο, οδηγώντας σε υποξία και τελικά σε απόπτωση (κυτταρικό θάνατο) των καρκινικών κυττάρων λόγω της μειωμένης παροχής οξυγόνου και θρεπτικών ουσιών. Το Tivozanib παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα για τους υποδοχείς VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3, με ελάχιστη δράση σε άλλες τυροσινικές κινάσες. Αυτή η εκλεκτικότητα είναι σημαντική για τη μείωση των παρενεργειών και τη βελτίωση της ανοχής του φαρμάκου από τους ασθενείς.⁵²

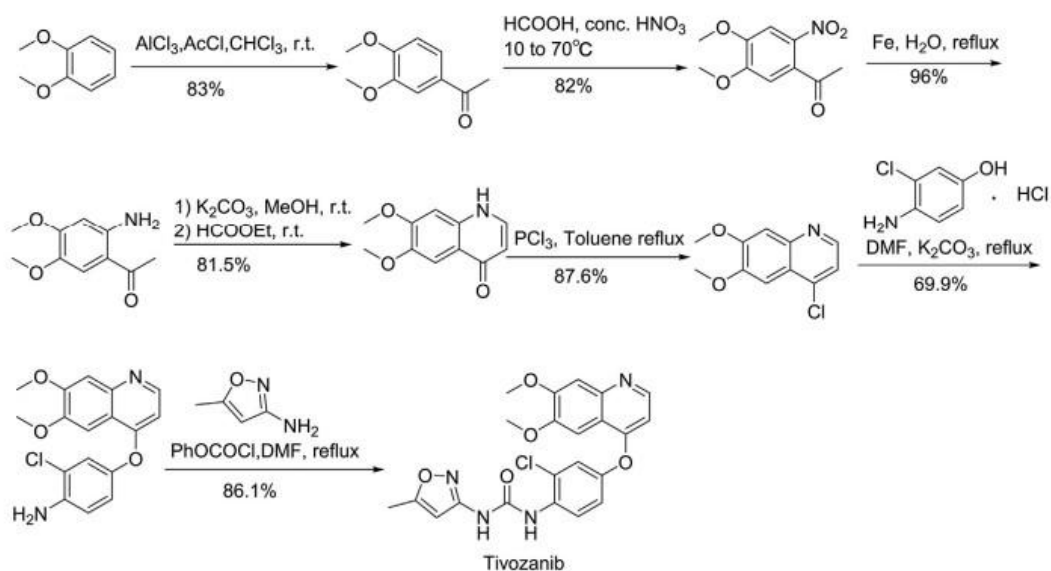


Εικόνα 29.Αναστολή των VEGFR-1, -2 και -3 απο το Tivozanib⁵⁰



Εικόνα 30. Απεικόνιση του Tivozanib στο ενεργο κέντρο της κινάσης VEGFR2

Παρακάτω ακολουθεί η πορεία σύνθεσης του Tivozanib από την AVEO. Λαμβάνοντας ως αρχικό υλικό το 1,2-διμεθοξυβενζόλιο, το tivozanib συντέθηκε σε μια πορεία με επτά στάδια, συμπεριλαμβανομένων της ακυλίωσης FriedelCrafts, της νίτρωσης, της αναγωγής, της κυκλοποίησης, της χλωρίωσης, και σύζευξης C-O και C-N, με συνολική απόδοση 28,1%.⁵³



Εικόνα 31. Συνθετική πορεία του tivozanib από την AVEO⁵³

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

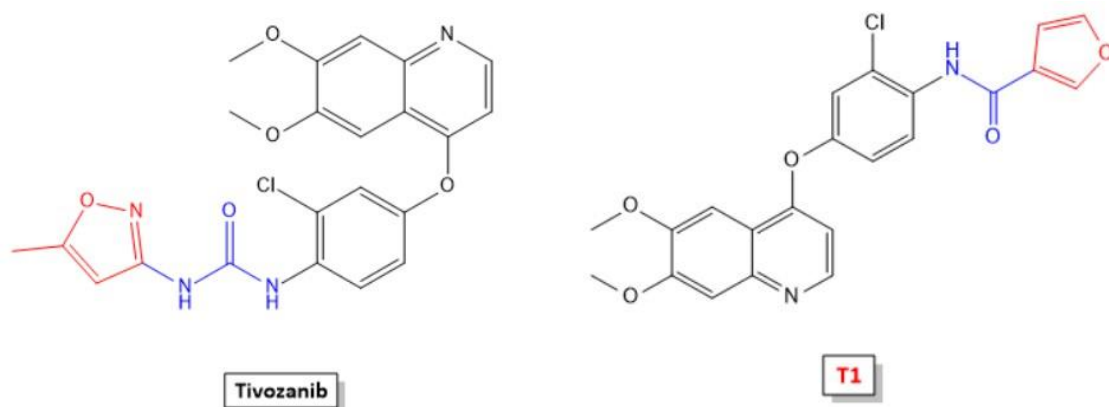
Συζήτηση-Αποτελέσματα

3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων

Το πρώτο βήμα για τη σύνθεση νέων οργανικών βιοδραστικών ενώσεων είναι ο σχεδιασμός τους, δίνοντας έμφαση στα βελτιωμένα τους χαρακτηριστικά, τα οποία θα οδηγήσουν σε αυξημένη και στοχευμένη δράση έναντι των μορίων-στόχων. Μικρές, επουσιώδεις όμως αλλαγές στη μοριακή δομή των φαρμάκων θα μπορούσαν να οδηγήσουν, πιθανόν, σε ουσιαστική αλλαγή της διαμόρφωσης του εν δυνάμει αναστολέα με πιθανό επιθυμητό αποτέλεσμα την αύξηση της ανασταλτικής του δράσης ή και την αναστολή άλλων παθολογικών κινασών. Η μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου κινασών, με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοντελοποίησης ομολογίας και με μοριακούς υπολογισμούς πρόσδεσης του αναστολέα στο ένζυμο, επιτρέπει τη σύγκριση ενώσεων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης με γνωστούς αναστολείς, ενώσεις οδηγούς (lead compounds), καθώς και ανάλογα αυτών. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει το μοντέλο αλληλεπίδρασης αναστολέα-ενζύμου που παρέχει τη δυνατότητα στοιχειοθέτησης ενός «φαρμακοφόρου μοντέλου» με τη συσχέτιση δομής – δραστικότητας των μορίων συμβάλλοντας έτσι στο σχεδιασμό νέων δραστικότερων και εκλεκτικότερων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Πιο συγκεκριμένα, στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στη δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος Tivozanib. Οι στοχευμένες τροποποιήσεις αφορούν την αντικατάσταση της δομής του ισοξαζολίου με εκείνες πενταμελών ετεροαρωματικών δακτυλίων διατηρώντας όλο το υπόλοιπο τμήμα του μορίου ανέπαφο με σκοπό την εκδήλωση νέων και ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων με την αλλοστερική περιοχή. Αναλυτικότερα, στο ανάλογο T1 έγινε εισαγωγή του

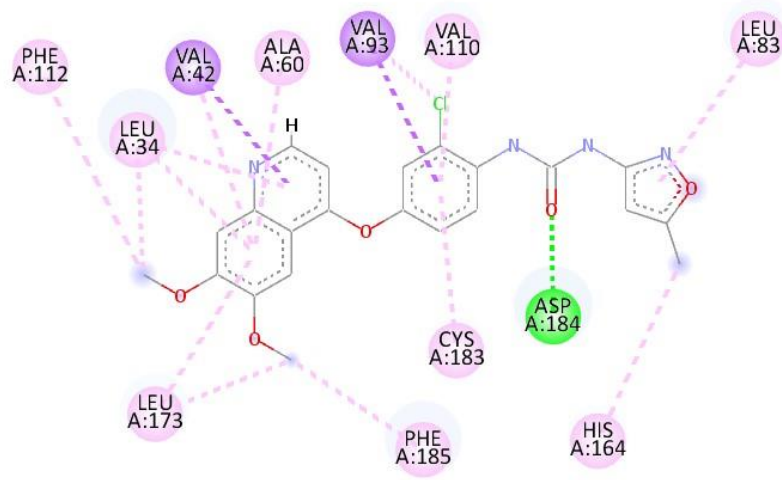
φουρανίου υποκατεστημένο στην 3 θέση. Παράλληλα, έγινε μετατροπή του δεσμού της ουρίας σε εκείνη του αμιδικού δεσμού με σκοπό οι νέοι εν δυνάμει αναστολείς να διατηρήσουν την ικανότητα δέσμευσης στο ενεργό κέντρο της κινάσης.



Εικόνα 32. : Σχηματική απεικόνιση νέου αναλόγου του Τίβοζανίβ που σχεδιάστηκε στο εργαστήριο

3.1.1 Μοριακή μοντελοποίηση του Τίβοζανίβ και του αναλόγων αυτού (T1) στην VEGFR2 πρωτεϊνική κινάση (AUTODOCKVINA)

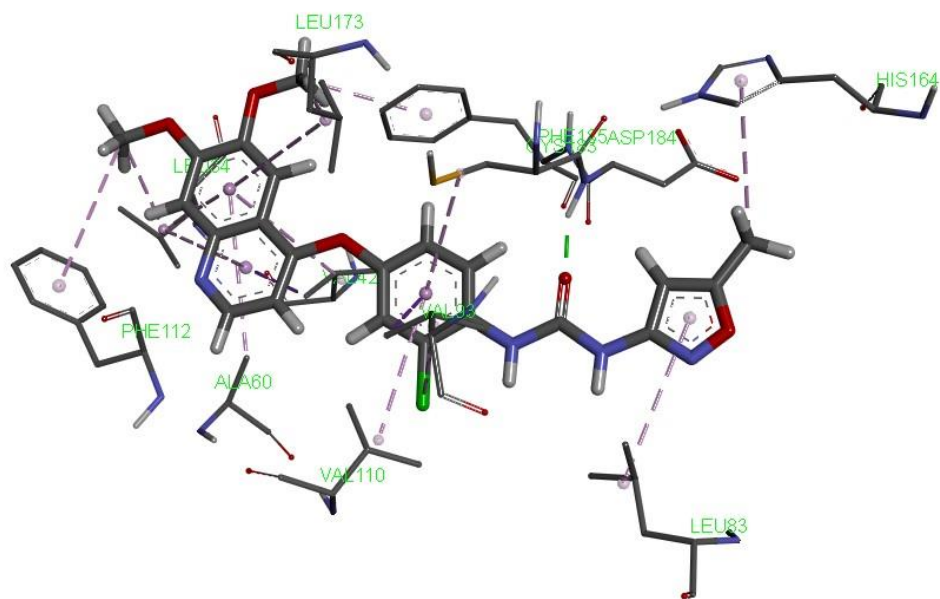
Το Τίβοζανίβ αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της κινάσης VEGFR2 μέσω δεσμών υδρογόνου. Από την Εικόνα 34, η οποία έχει ληφθεί από πειράματα μοριακής μοντελοποίησης με το πρόγραμμα AUTODOCKVINA, φαίνεται ότι το καρβονυλικό οξυγόνο της ουρίας (δέκτης) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το –H του –NHCO– του Asp184. Επίσης, υπάρχουν και δεσμοί σ-π, μεταξύ αρωματικών δακτυλίων και των αμινοξέων του ενεργού κέντρου (μωβ χρώμα).



Interactions

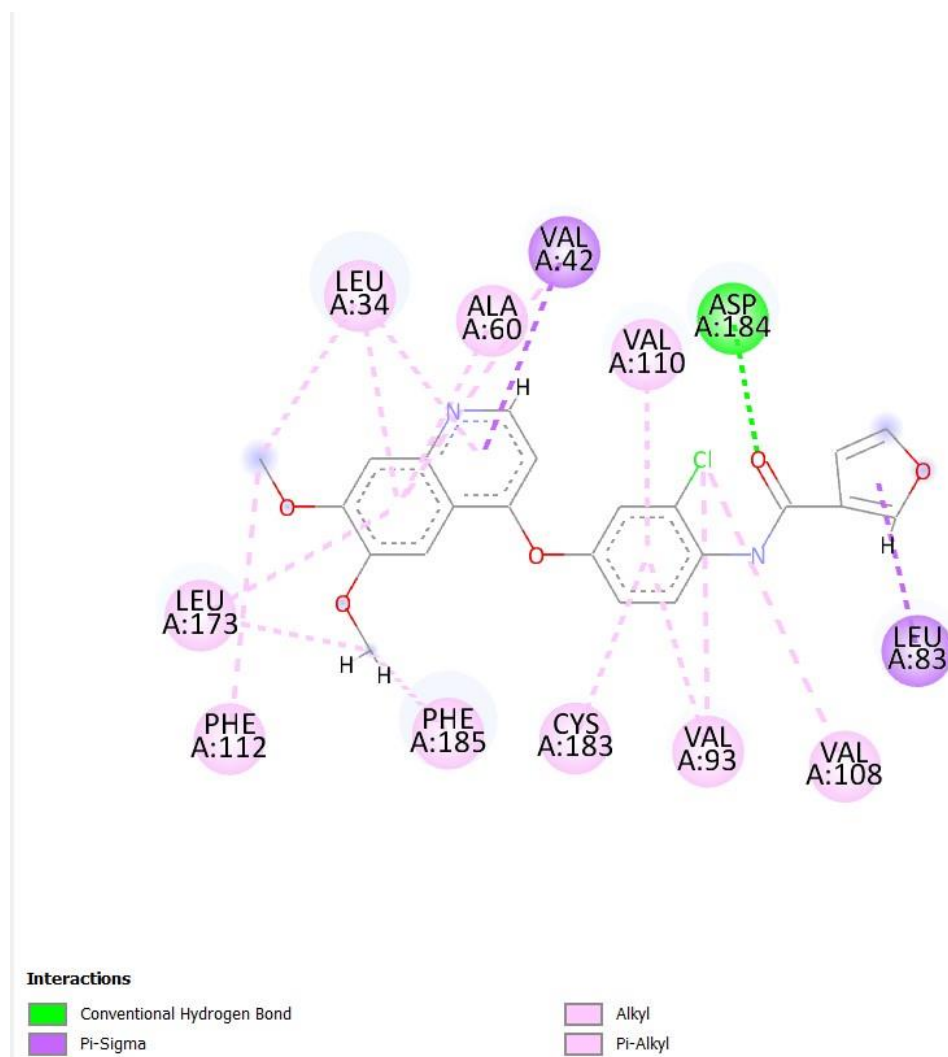
- | | | | |
|---|----------------------------|---|----------|
|  | Conventional Hydrogen Bond |  | Alkyl |
|  | Pi-Sigma |  | Pi-Alkyl |

Εικόνα 33. Δισδιάστατη δομή του Τivozanib και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

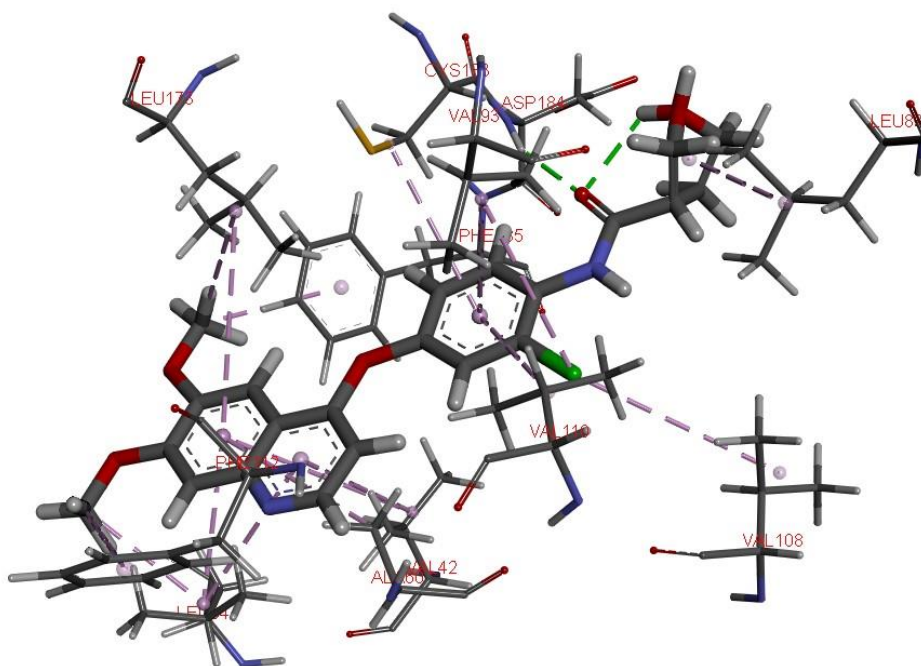


Εικόνα 34. Τρισδιάστατη δομή του Τivozanib και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

Στο T1 εμφανίζεται μια επιπλέον αλληλεπίδραση π-σ μεταξύ του φουρανίου και της Leu83 (μωβ χρώμα).



Εικόνα 35. Δισδιάστατη δομή του αναλόγου T1 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

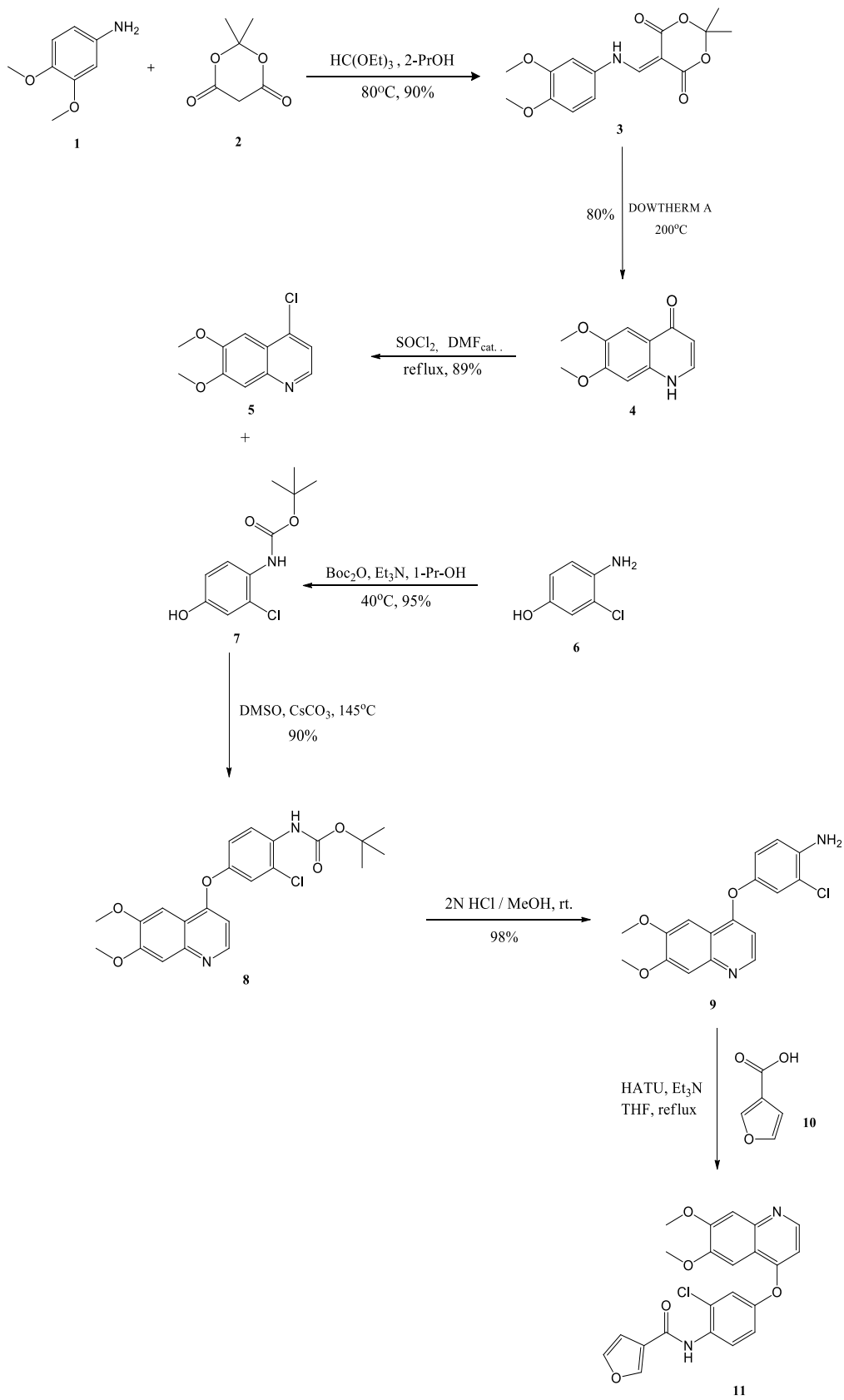


Εικόνα 36. : Τρισδιάστατη δομή του αναλόγου T1 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

3.2 Ολική πορεία σύνθεσης νέων αναλόγων του Tivozanib

Η ολική σύνθεση του νέου αναλόγου του Tivozanib αποτελείται από επτά επιμέρους στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τον σχηματισμό της εναμίνης **3** μέσω σχηματισμού του βινυλο-αιθοξυ παραγώγου του οξέος Meldrum και ταυτόχρονη προσβολή αυτού από την 3,4-διμεθόξυ ανιλίνη **1** μέσω συζυγούς προσθήκης τύπου Michael σε θερμή 2-προπανόλη. Ακολουθεί θερμική διάσπαση του κυκλικού εστέρα της ενδιάμεσης ένωσης **3** στους 200 °C με την χρήση διαλύτη DOWTHERM A με σκοπό τον σχηματισμό της επιθυμητής ενδιάμεσης υποκατεστημένης κινολόνης **4** μέσω ενδομοριακής ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ακολουθώς, με τη χρήση φρέσκο αποσταγμένου θειονυλοχλωριδίου ως αντιδραστηρίου και διαλύτη καθώς και καταλυτικής ποσότητας άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου πραγματοποιείται ταυτόχρονα μετατροπή της υποκατεστημένης κινολόνης **4** στην αντίστοιχη 4-χλωροκινολίνη. Παράλληλα, πραγματοποιείται N-Boc προστασία της αμινομάδας του υδροχλωρικού άλατος της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης **6**, με την χρήση Boc ανυδρίτη σε θερμή ισοπροπανόλη αυστηρά στους 40°C αυξάνοντας

σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης. Ο επιθυμητός διάλυτο αιθέρας **8** παραλαμβάνεται μέσω πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ της N-Boc προστατευμένης 4-αμινο-3- χλωροφαινόλης **7** και της 4-χλωροκινολίνης **5**, σε βασικές συνθήκες με την χρήση ανθρακικού καισίου και διαλύτη άνυδρο διμεθυλοσουλφοξείδιο. Ακολουθεί αποπροστασία της N-Boc προστατευμένης ενδιάμεσης ένωσης **8** σε όξινες συνθήκες. Η ενδιάμεση υποκατεστημένη ανιλίνη **9** που προκύπτει, συζεύγνυται με το 3-φουροϊκό οξύ **10** με την χρήση του κατάλληλου αντιδραστηρίου σύζευξης με σκοπό την παραλαβή της επιθυμητής τελικής ένωσης.



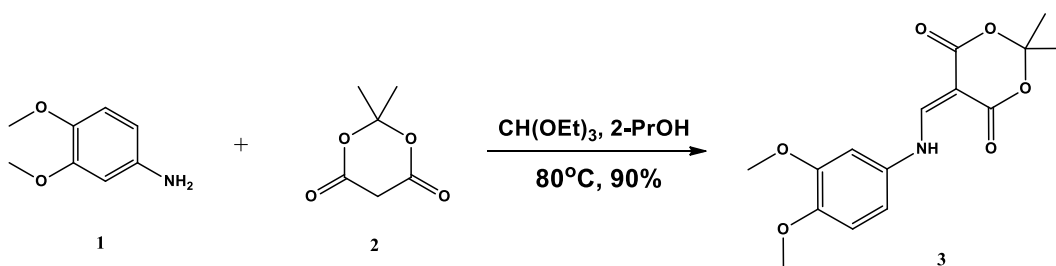
Εικόνα 37. Ολική συνθετική πορεία αναλόγου του Tivozanib

3.3 Σύνθεση νέων αναλόγων του *Lenvatinib*

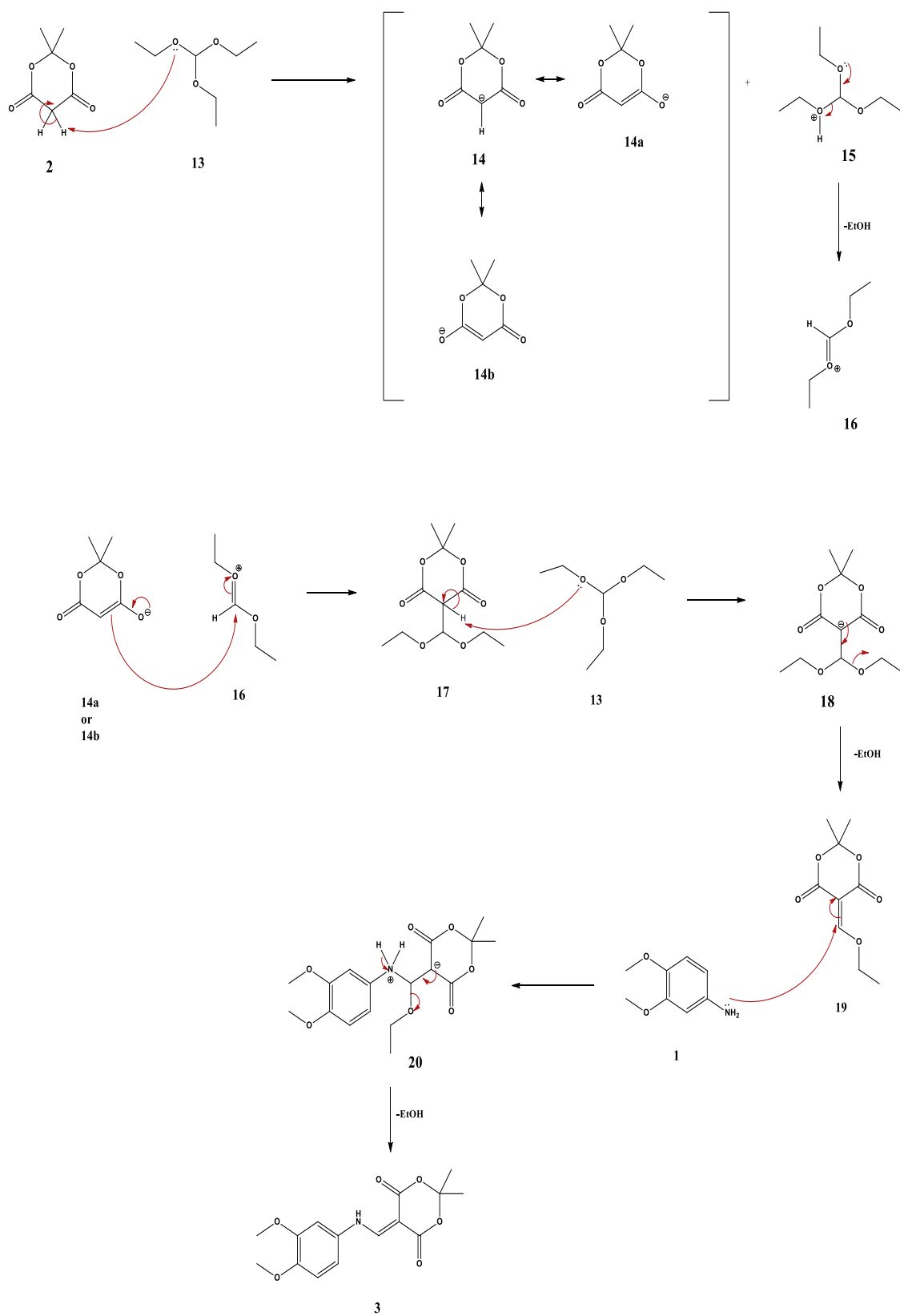
3.3.1 Σύνθεση της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση **3**

3.3.1.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση **3**

Ξεκινώντας από τα διαθέσιμα στο εμπόριο αντιδραστήρια, 3,4-διμεθόξυ ανιλίνη **1**, οξύ Meldrum **2** και ορθοφορμικό αιθύλιο, λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός του βινυλο-αιθόξυ παραγώγου του οξέος Meldrum **19** και ταυτόχρονη προσβολή αυτού από την 3,4-διμεθόξυ ανιλίνη **1** μέσω συζυγούς προσθήκης τύπου Michael σε διαλύτη 2-προπανόλη και θερμοκρασία 80°C, με αποτέλεσμα την παραγωγή της εναμίνης **3**, σε απόδοση 90%.



Όπως φαίνεται και από τον μηχανισμό, η αντίδραση εκκινεί με απόσπαση ενός α υδρογόνου του οξέος Meldrum **2** από τον μυρμηκικό τριαιθυλεστέρα **13** σχηματίζοντας το ενολικό ιόν **14a** και το ενδιάμεσο ιόν οξοκαρβενίου **16** με απομάκρυνση ενός μορίου αιθανόλης. Το πυρηνόφιλο πλέον ενολικό ιόν **14a** προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του ιόντος οξοκαρβενίου **16** οδηγώντας στον σχηματισμό του διαιθόξυ παραγώγου του οξέος Meldrum **18**. Το ενδιάμεσο βινυλο-αιθόξυ παράγωγο του οξέος Meldrum **19** σχηματίζεται μετά από απόσπαση του α υδρογόνου της ενδιάμεσης ένωσης **18** και απομάκρυνση ενός μορίου αιθανόλης. Η επιθυμητή εναμίνη **3** σχηματίζεται μέσω μιας συζυγούς προσθήκης τύπου Michael που λαμβάνει χώρα μεταξύ της 3,4-διμεθόξυ ανιλίνης **1** και βινυλο-αιθόξυ παραγώγου του οξέος Meldrum **19** με αποβολή ενός μορίου αιθανόλης.



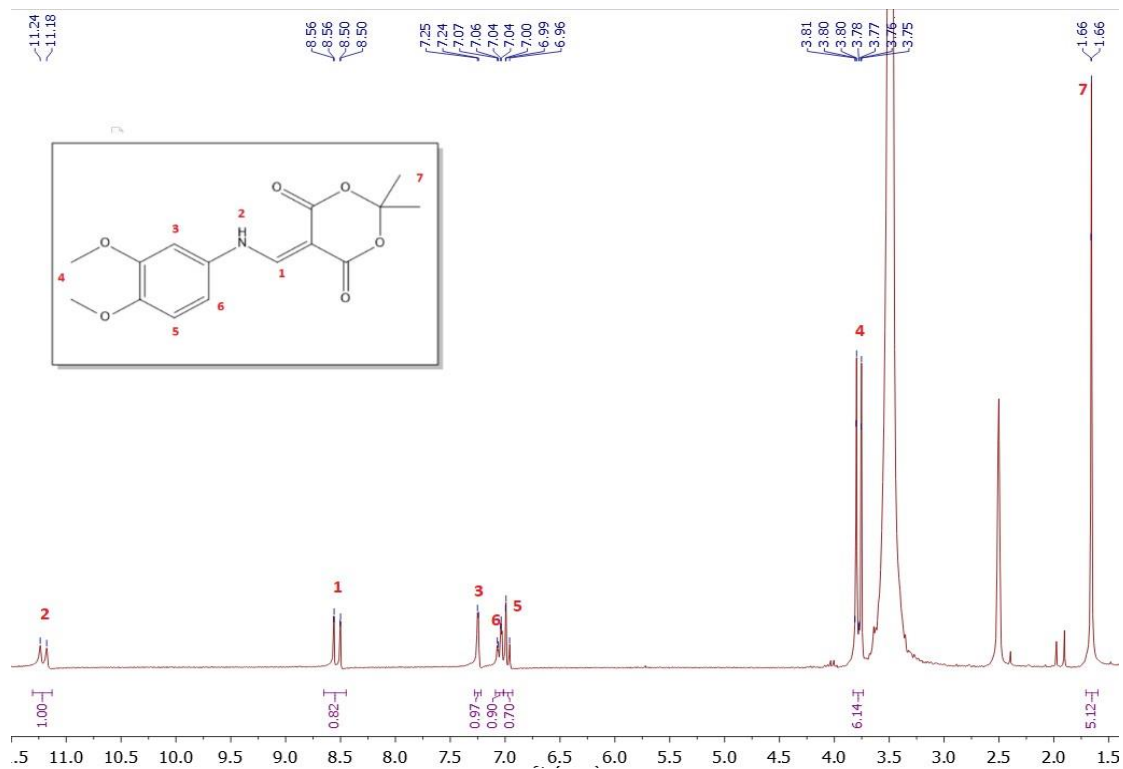
Εικόνα 38. Μηχανισμός σχηματισμού εναμίνης 3

3.3.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση 3

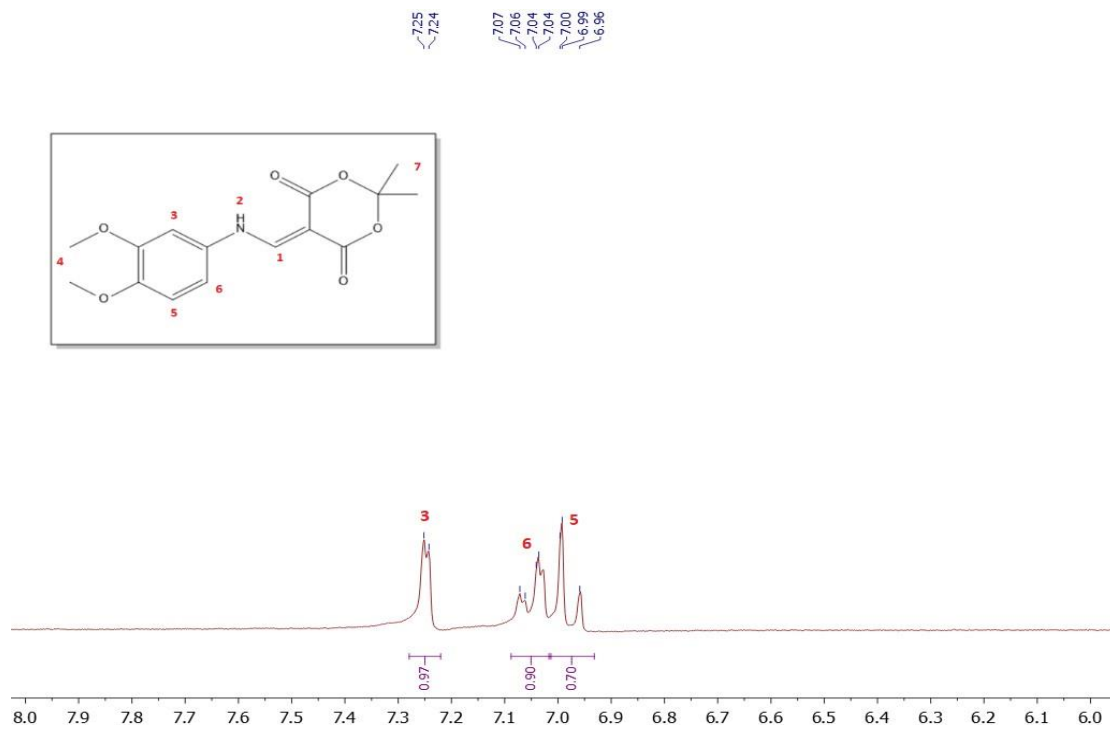
Στο φάσμα ^1H NMR της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, παρατηρείται ότι το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 (H_2), που ανήκει στο άζωτο της εναμίνης, είναι το πλέον πιο αποπροστατευμένο από ηλεκτρονιακή πυκνότητα, συντονίζεται στα 11.22 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (d) με σταθερά σύζευξης $^3J_{2-1}=14.7$ Hz. Το πρωτόνιο αυτό είναι εξαιρετικά αποπροστατευμένο λόγω της εκδηλούμενης εκτεταμένης συζυγίας. Το βινυλικό πρωτόνιο της εναμίνης H_1 , συντονίζεται στα 8.54 ppm και δίνει μία διπλή κορυφή (d) με σταθερά σύζευξης $^3J_{1-2}=14.7$ Hz. Το εν λόγω πρωτόνιο έχει μειωμένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθώς βρίσκεται σε β θέση ως προς το καρβονύλιο, επομένως μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού, συνδέεται σε άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο. Επιπροσθέτως, το πρωτόνιο H_1 απογυμνώνεται περαιτέρω από ηλεκτρονιακή πυκνότητα λόγω της αλληλεπίδρασής του με το γειτονικό οξυγόνο μέσω ψευδοδεσμού υδρογόνου.

Το αρωματικό πρωτόνιο H_3 συντονίζεται στα 7.27 ppm ως μια διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $^4J=2.5$ Hz. Το αρωματικό πρωτόνιο H_6 συντονίζεται στα 7.07 ppm και εμφανίζεται με το μοτίβο διπλής κορυφής με σταθερά σύζευξης $^4J=2.5$ Hz. Τέλος το αρωματικό πρωτόνιο 5 συντονίζεται στα 6.98 ppm ως μια διπλή κορυφή.

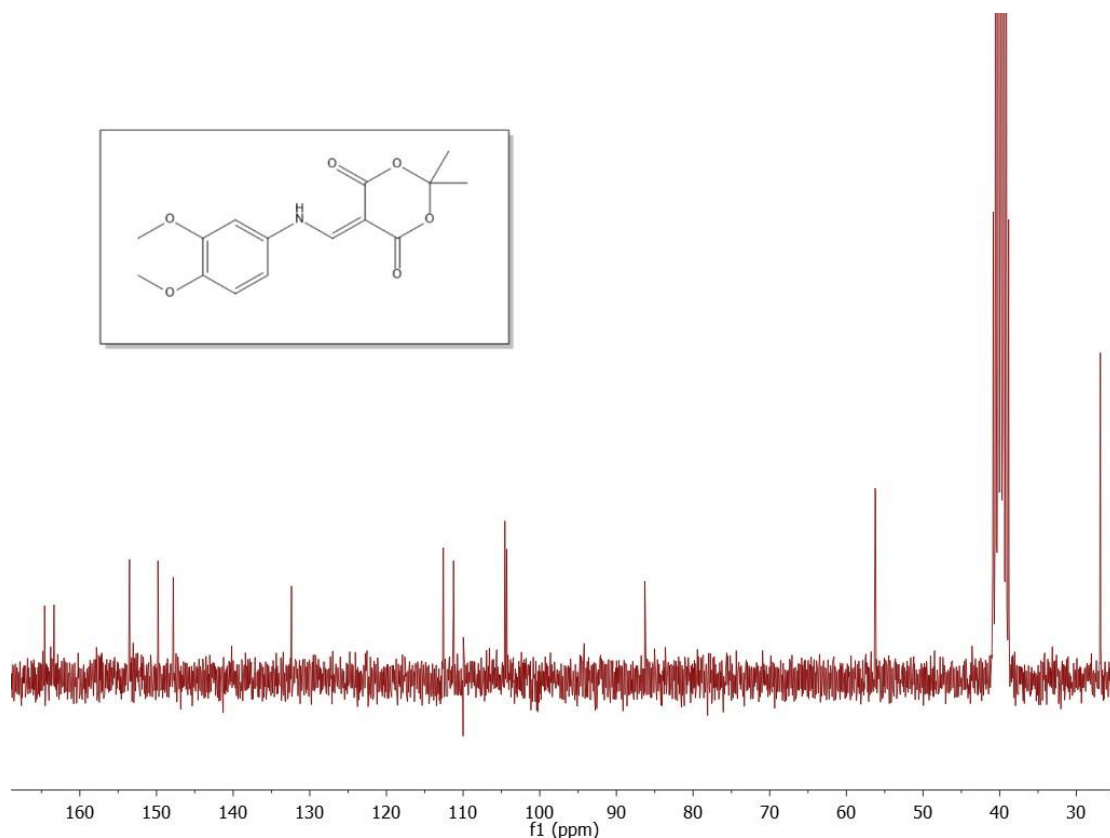
Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 4 των μεθοξυομάδων συντονίζονται στα 3.78 ppm ως μία απλή κορυφή (s), με ολοκλήρωση 6. Τέλος, τα πρωτόνια των δύο μεθυλομάδων (H_7), εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 6 στα 1.67 ppm, καθώς αντλαμβάνονται όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον.



Εικόνα 39. Φάσμα ^1H NMR της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-δίωνης (250 MHz) (ένωση 3) σε DMSO, στους 298 K.



Εικόνα 40. Τμήμα του φάσματος ^1H NMR της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-δίωνης (250 MHz) (ένωση 3) σε DMSO, στους 298 K.

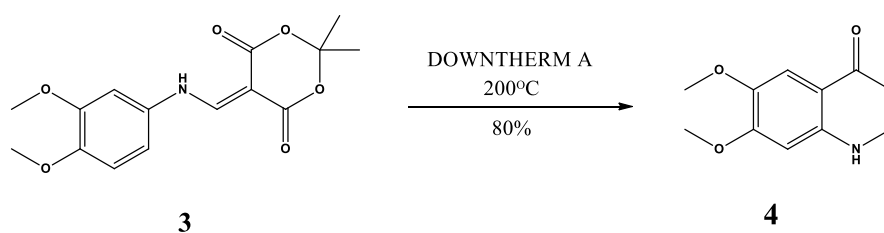


Εικόνα 41. Φάσμα ^{13}C NMR (100 MHz) της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης (ένωση 3) σε DMSO, στους 298 K.

3.3.2 Σύνθεση της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4

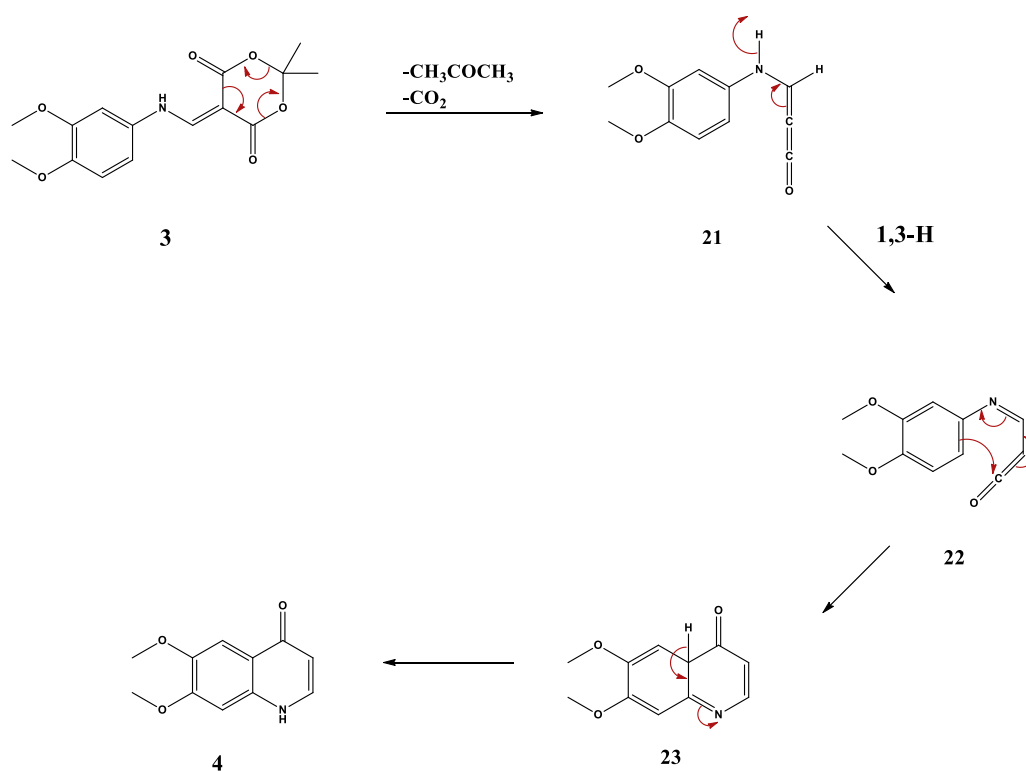
3.3.2.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4

Ο κυκλικός εστέρας της υποκατεστημένης εναμίνης **3** υποβάλλεται σε θερμική διάσπαση στους 200 °C, αποβάλλοντας ακετόνη και διοξείδιο του άνθρακα, προς σχηματισμό της επιθυμητής ενδιάμεσης υποκατεστημένης κινολόνης **4** μέσω ενδομοριακής ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.



Η παραπάνω αντίδραση κυκλοποίησης αποτελεί μια παραλλαγή της αντίδρασης Conrad-Limpach και είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτη, λόγω της θερμοκρασίας και του pH στο οποίο λαμβάνει χώρα. Σύμφωνα με την πειραματική πορεία που προτείνει η εταιρία, η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 200 °C χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το DOWTHERM A.

Σύμφωνα με τον μηχανισμό, η αντίδραση ξεκινά με την θερμική διάσπαση του κυκλικού εστέρα της υποκατεστημένης εναμίνης **3** με αποβολή ενός μορίου ακετόνης και ενός μορίου διοξειδίου του άνθρακα. Στη συνέχεια η σχηματιζόμενη μεθυλενοκετένη **21** μετατρέπεται στην αντίστοιχη υποκατεστημένη ιμινοκετένη **22** μέσω 1,3 σιγματροπικής μετάθεσης. Τέλος η επιθυμητή υποκατεστημένη κινολόνη **4** σχηματίζεται μέσω ενδο-μοριακής ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.



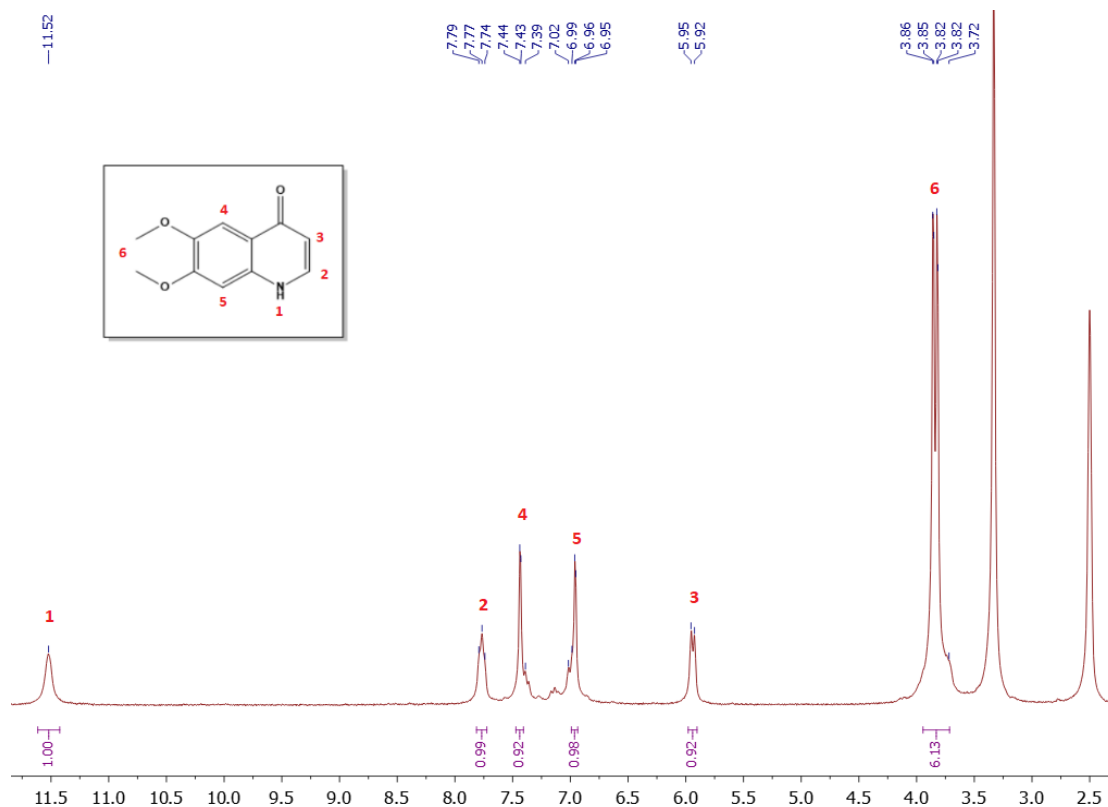
Εικόνα 42. Μηχανισμός σχηματισμού της κινολόνης 4

3.3.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4

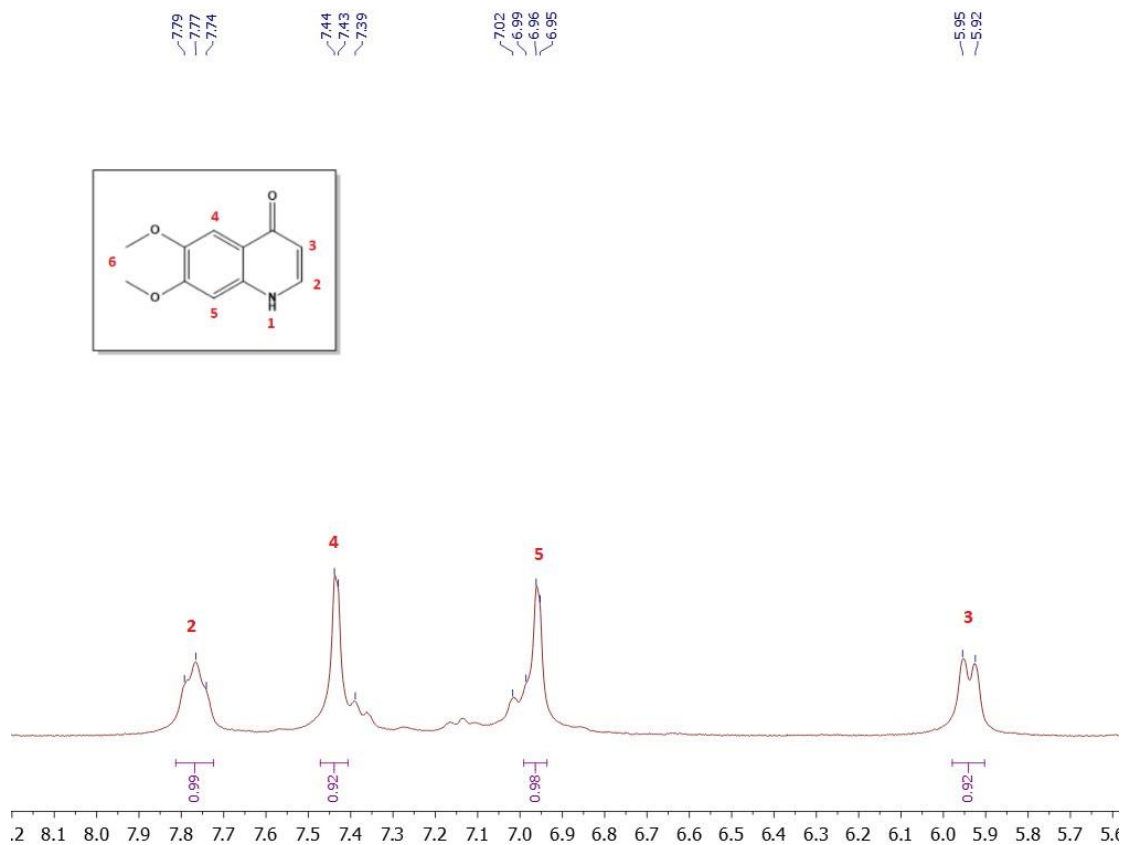
Στο φάσμα ^1H NMR της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, το πιο αποπροστατευμένο παρουσιάζεται το πρωτόνιο του αζώτου της κινολόνης, H_1 , το οποίο συντονίζεται στα 11.52 ppm ως μια απλή (s) διευρυμένη κορυφή. Το πρωτόνιο αυτό είναι εξαιρετικά αποπροστατευμένο λόγω της εκδηλούμενης εκτεταμένης συζυγίας.

Το H_2 συντονίζεται στα 7.78 ppm. Εμφανίζεται ως μία τριπλή κορυφή (t) λόγω των υδρογόνων H_1 και H_3 . Το H_3 συντονίζεται στα 5.94 ppm με $^3J = 7.5$ Hz και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή (d) λόγω του γειτονικού H_2 . Η μεγάλη αυτή διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις οφείλεται στο γεγονός ότι το υδρογόνο H_2 , που βρίσκεται σε β θέση ως προς το καρβονύλιο, μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού, συνδέεται σε άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο.

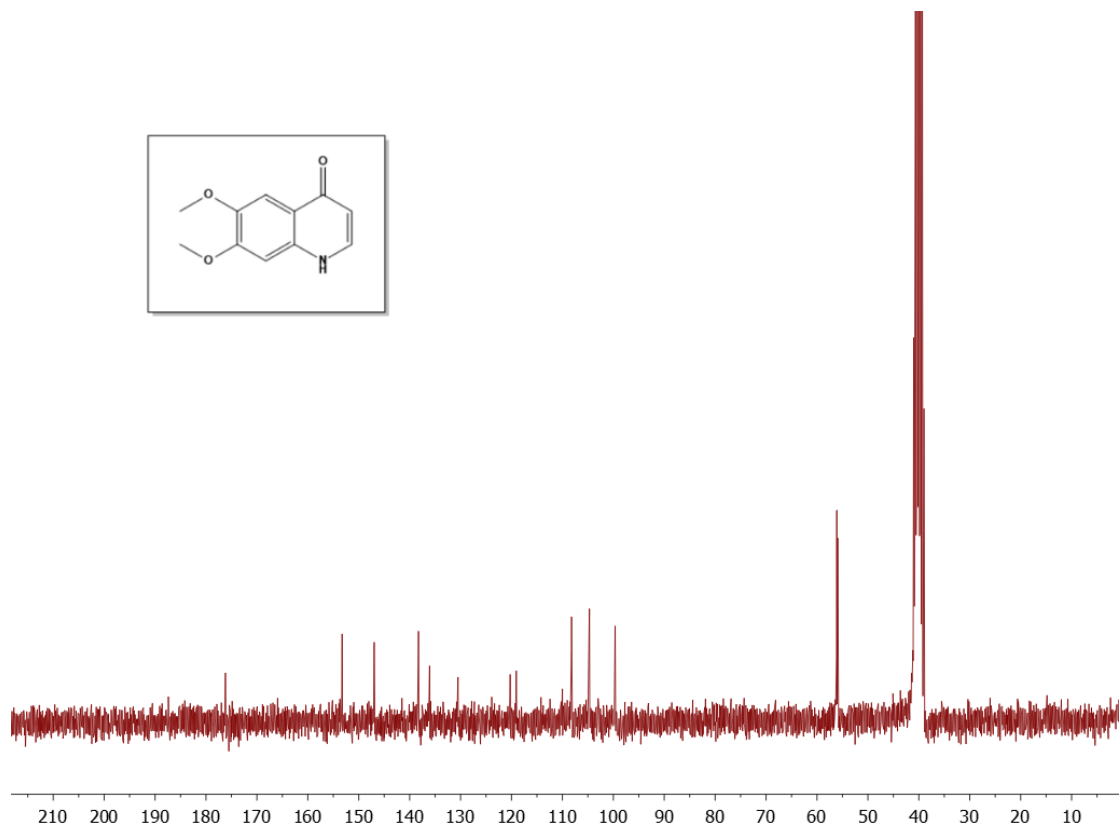
Τα πρωτόνια H_4 και H_5 συντονίζονται στα 7.43 ppm και 6.96 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται με την μορφή δύο απλών (s) κορυφών. Τέλος, τα πρωτόνια H_6 των μεθοξυ-ομάδων εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 6 στα 3.84 ppm.



Εικόνα 43. Φάσμα ^1H NMR της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης (250 MHz) (ένωση 4) σε DMSO, στους 298 K.



Εικόνα 44. Τμήμα του φάσματος ^1H NMR της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης (ένωση 4) σε DMSO, στους 298 Κ.

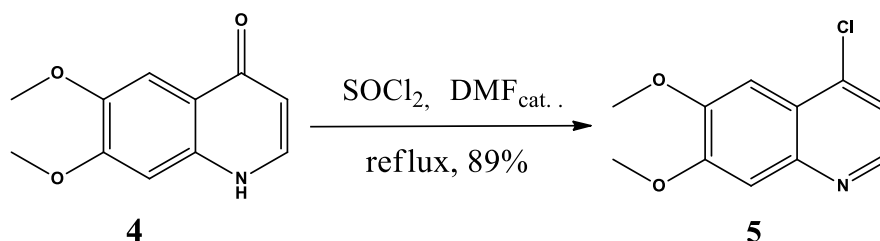


Εικόνα 45. Φάσμα ^{13}C NMR (100 MHz) της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης (ένωση 4) σε DMSO, στους 298 Κ.

3.3.3 Σύνθεση της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση 5

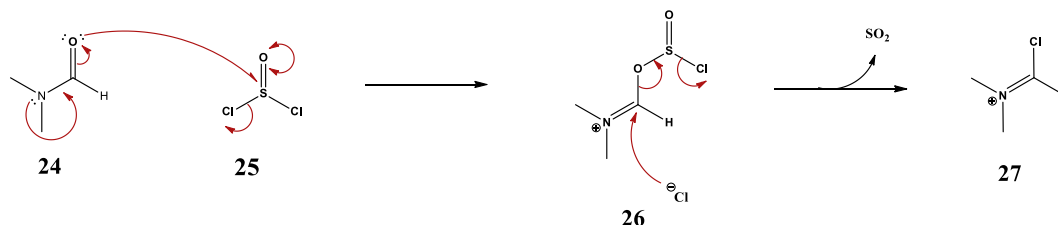
3.3.3.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση 5

Η 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνη **4** μετατρέπεται στην 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνη **5** μέσω αντίδρασης χλωρίωσης. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται, υπό βρασμό με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου ως αντιδραστήριου και ως διαλύτη παρουσία καταλυτικής ποσότητας διμεθυλοφορμαμιδίου. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, μετά το πέρας δυο ωρών, το θειονυλοχλωρίδιο που δεν αντέδρασε απομακρύνεται. Η συνολική απόδοση ανέρχεται στο 89%.



Εικόνα 46. Αντίδραση σχηματισμού 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης (ένωση 5)

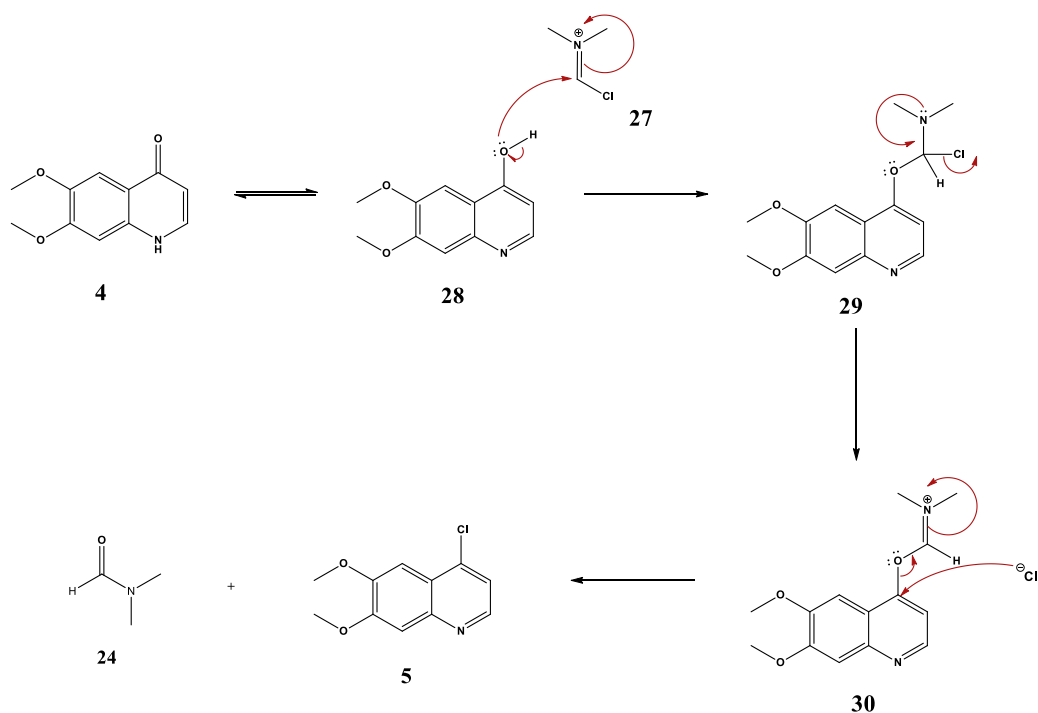
Το διμεθυλοφορμαμίδιο παρουσία θειονυλοχλωριδίου οδηγεί στον σχηματισμό του αντιδραστήριου Vilsmeier-Haack με παράλληλη απομάκρυνση ενός μορίου διοξειδίου του θείου και ενός μορίου υδροχλωρίου. Το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack, που ουσιαστικά είναι άλας το οποίο αποτελείται από ανιόν χλωρίου και κατιόν N,N-διμεθυλμινίου, αποτελεί το μέσο χλωρίωσης.



Εικόνα 47. Μηχανισμός σχηματισμού του αντιδραστήριου Vilsmeier-Haack.

Σύμφωνα με τον μηχανισμό της αντίδρασης το οξυγόνο της 4-υδροξυκινολίνης, που αποτελεί την ταυτομερή μορφή της 4-κινολόνης, προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του κατιόντος μινίου σχηματίζοντας την ενδιάμεση ένωση **30** με

απομάκρυνση ενός μορίου υδροχλωρίου. Η επιθυμητή υποκατεστημένη 4-χλωροκινολίνη σχηματίζεται μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ της ενδιάμεσης ένωσης **30** και ενός ανιόντος χλωρίου με παράλληλη απομάκρυνση ενός μορίου διμεθυλοφορμαμιδίου.

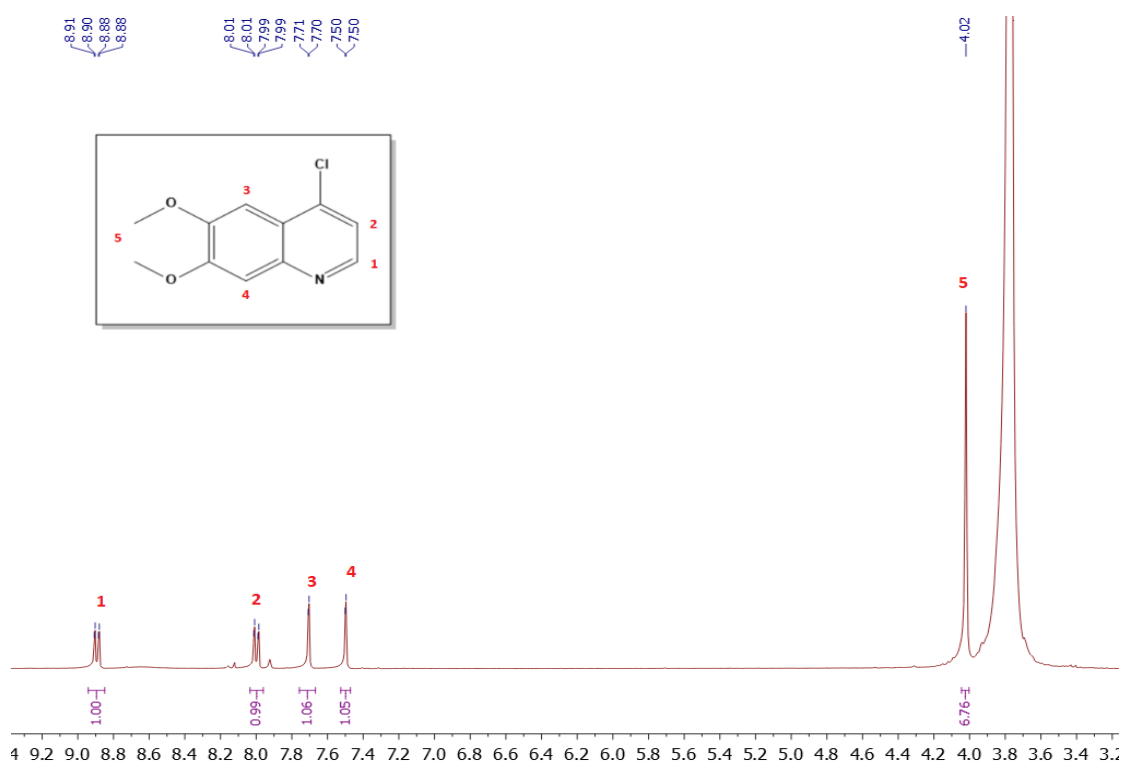


Εικόνα 48. Μηχανισμός σχηματισμού της 4-χλωροκινολίνης.

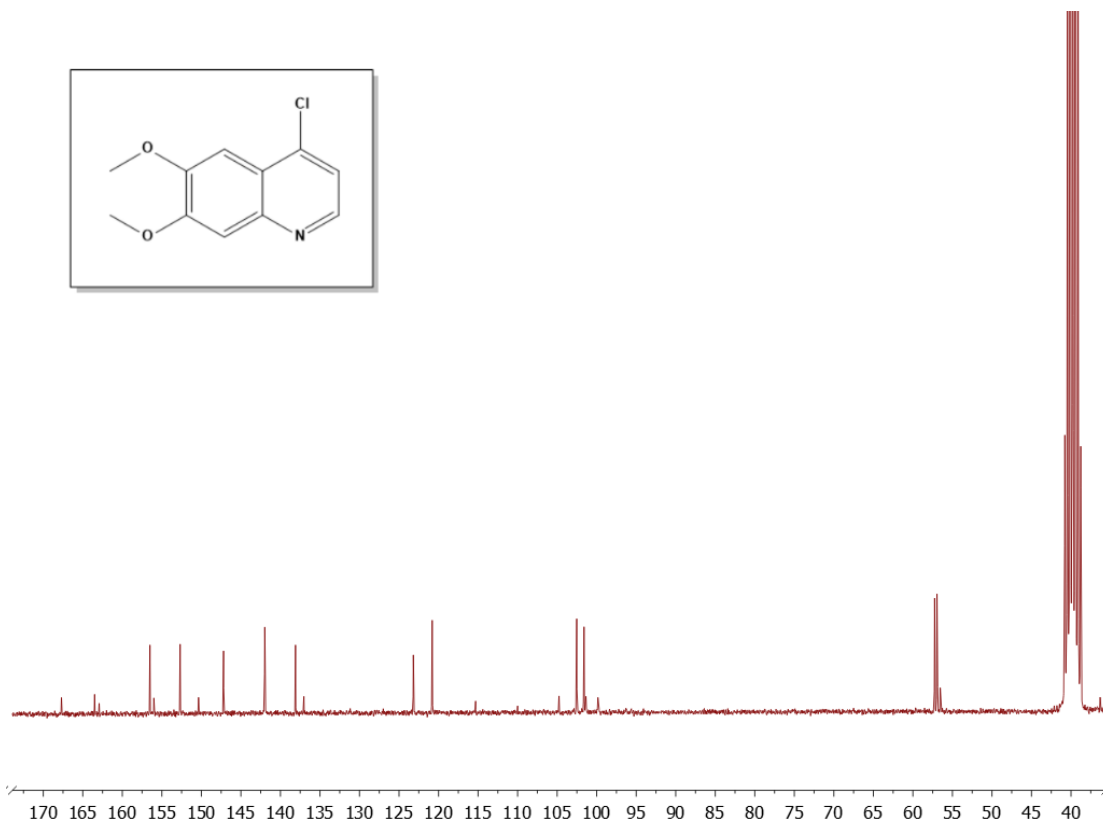
3.3.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση **5**

Στο φάσμα ^1H NMR της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης παρατηρείται πως τα πρωτόνια του πυριδινικού δακτυλίου, δηλαδή τα πρωτόνια H_1 και H_2 , συντονίζονται στα 8.89 ppm και 8.00 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται ως διπλές (d) κορυφές με σταθερά σύζευξης $^3J = 5.9$ Hz. Το πρωτόνιο H_1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο, καθώς βρίσκεται στην 2-θέση του πυριδινικού δακτυλίου, και μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού συνδέεται στον άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο. Τα αρωματικά πρωτόνια H_3 και H_4 συντονίζονται στα 7.76 ppm και 7.53 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται ως απλές (s) κορυφές. Το πρωτόνιο H_3 απογυμνώνεται από ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθώς βρίσκεται στην θέση 5 της κινολίνης, επομένως μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού, συνδέεται σε άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο. Το H_4 είναι το πλέον προστατευμένο καθώς σε ορθο θέση ως προς αυτό βρίσκεται η μεθοξυ-ομάδα που προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τέλος, τα

πρωτόνια υπ' αριθμόν 5 των μεθοξυ ομάδων εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 6 στα 4.02 ppm. Εμφανίζονται αρκετά αποπροστατευμένα, επειδή το οξυγόνο της μεθοξυ ομάδας προσφέρει το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του στο αρωματικό σύστημα.



Εικόνα 49. Φάσμα ¹H NMR (250 MHz) της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης σε DMSO-d₆, στους 298 K.



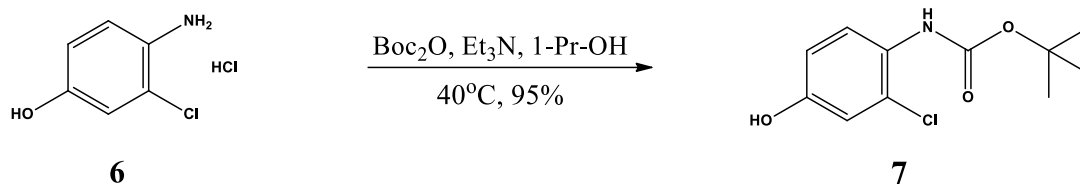
Εικόνα 50. Φάσμα ¹³C NMR της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης (100 MHz) σε DMSO-d₆, στους 298 K.

3.3.4 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού *tert*βουτυλεστέρα, ένωση 7

3.3.4.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του (2-χλωρο-4- υδροξυφαινυλο) καρβαμικού *tert*-βουτυλεστέρα, ένωση 7

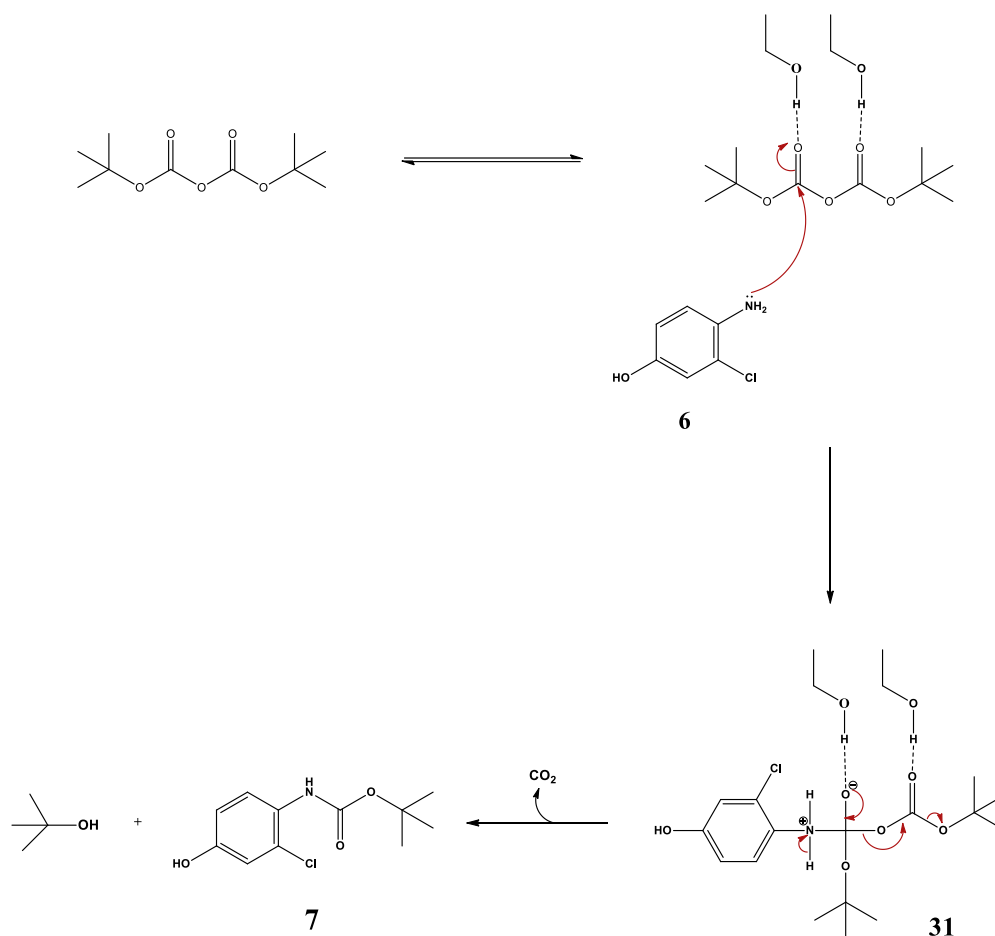
Ο σχηματισμός του υποκατεστημένου διαρυλοαιθερα **8** πραγματοποιείται μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ της υποκατεστημένης 4-χλωροκινολίνης και της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης. Ωστόσο απαιτείται άμινο-προστασία της δεύτερης με σκοπό την αποφυγή σχηματισμού παραπροϊόντων. Η προστασία της αμινομάδας της διαθέσιμης στο εμπόριο 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, ως υδροχλωρικό άλας, πραγματοποιείται με τη χρήση Boc ανυδρίτη. οι συνθήκες με τις οποίες επιτυγχάνεται η εκλεκτική Boc προστασία της αμινομάδας, χωρίς το σχηματισμό παραπροϊόντων, σε εξαιρετική απόδοση (95%) παρουσιάζονται στην εικόνα που ακολουθεί. Αναλυτικότερα, ο χρόνος της

αντίδρασης ανέρχεται στις δυο ώρες σε διαλύτη 1-προπανόλη και σε θερμοκρασία αυστηρά στους 40 °C.



Εικόνα 51. Boc προστασία αμινομάδας

Οι δεσμοί υδρογόνου που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των καρβονυλικών οξυγόνων του Boc ανυδρίτη και της αιθανόλης αυξάνουν σημαντικά την ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα των καρβονυλικών ανθράκων του Boc ανυδρίτη. Με αυτόν τον τρόπο, διευκολύνεται η επακόλουθη πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας στον άνθρακα του καρβονυλίου. Στη συνέχεια, απομακρύνεται διοξείδιο του άνθρακα και tertβουτυλο-αλκοόλη, με αποτέλεσμα να προκύψει το N-Boc προστατευμένο προϊόν.

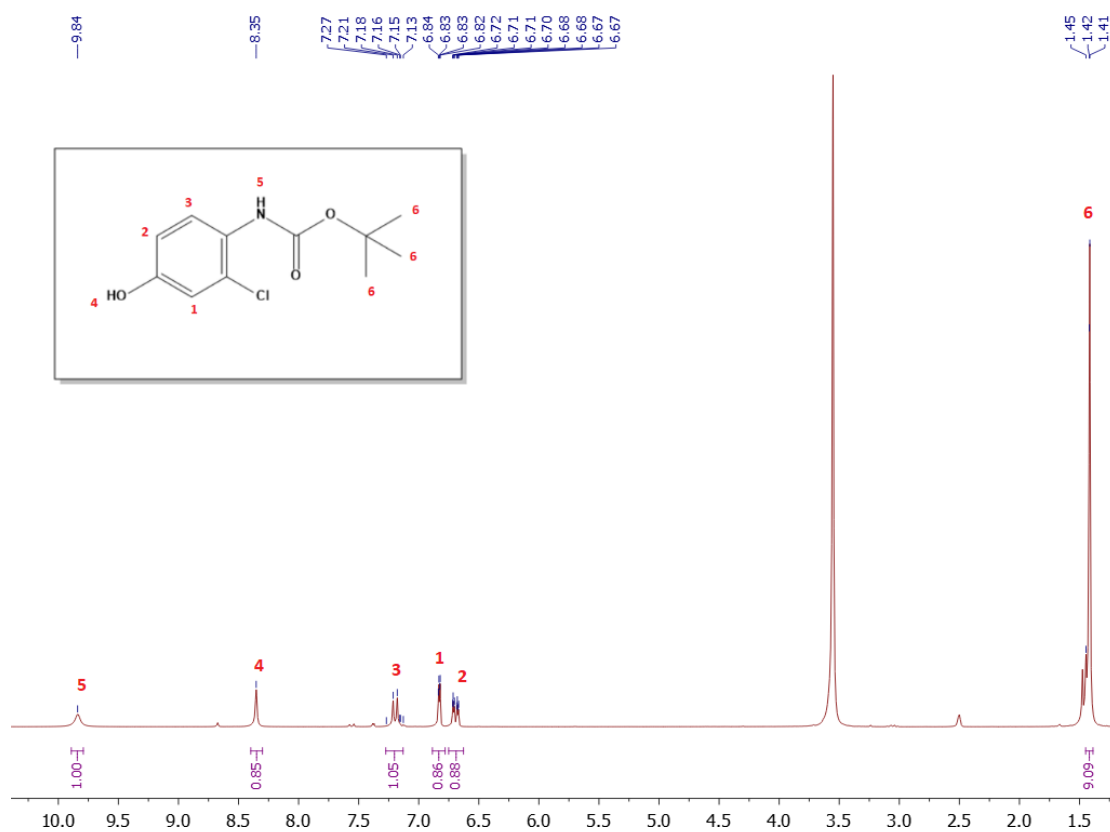


Εικόνα 52. Μηχανισμός N-Boc προστασίας.

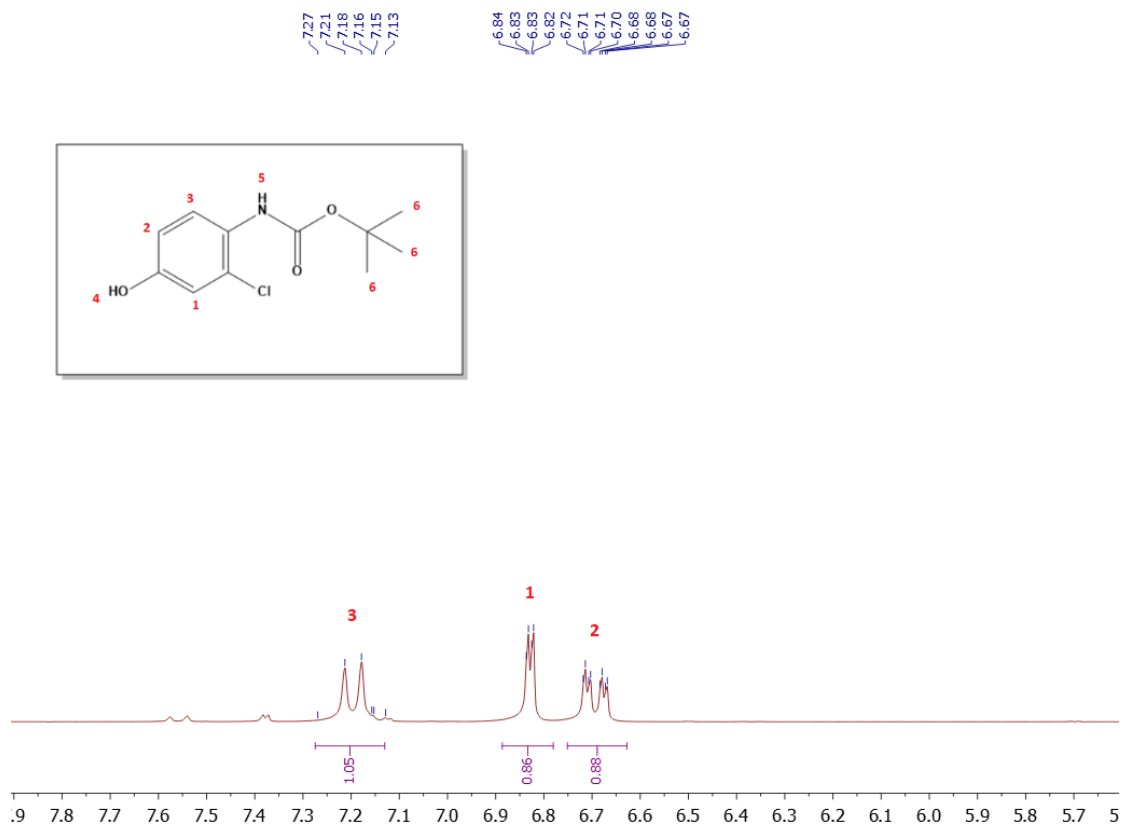
3.3.4.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)- καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 7

Στο φάσμα ¹H NMR του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tertβουτυλεστέρα παρατηρείται πως το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5 και συντονίζεται στα 9.84 ppm, δίνοντας μία απλή κορυφή. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4, δηλαδή της υδροξυλικής ομάδας, εμφανίζεται στα 8.35 ppm ως μία απλή διευρυμένη κορυφή. Η διπλή κορυφή (d) που οφείλεται στον συντονισμό του αρωματικού πρωτονίου H1 εμφανίζεται στα 6.83 ppm με σταθερά σύζευξης 4 J₁₋₂=2,7Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 συντονίζεται στα 6.69 ppm είναι το πλέον προστατευμένο πρωτόνιο, καθώς σε ορθο-θέση ως προς αυτό βρίσκεται ομάδα που

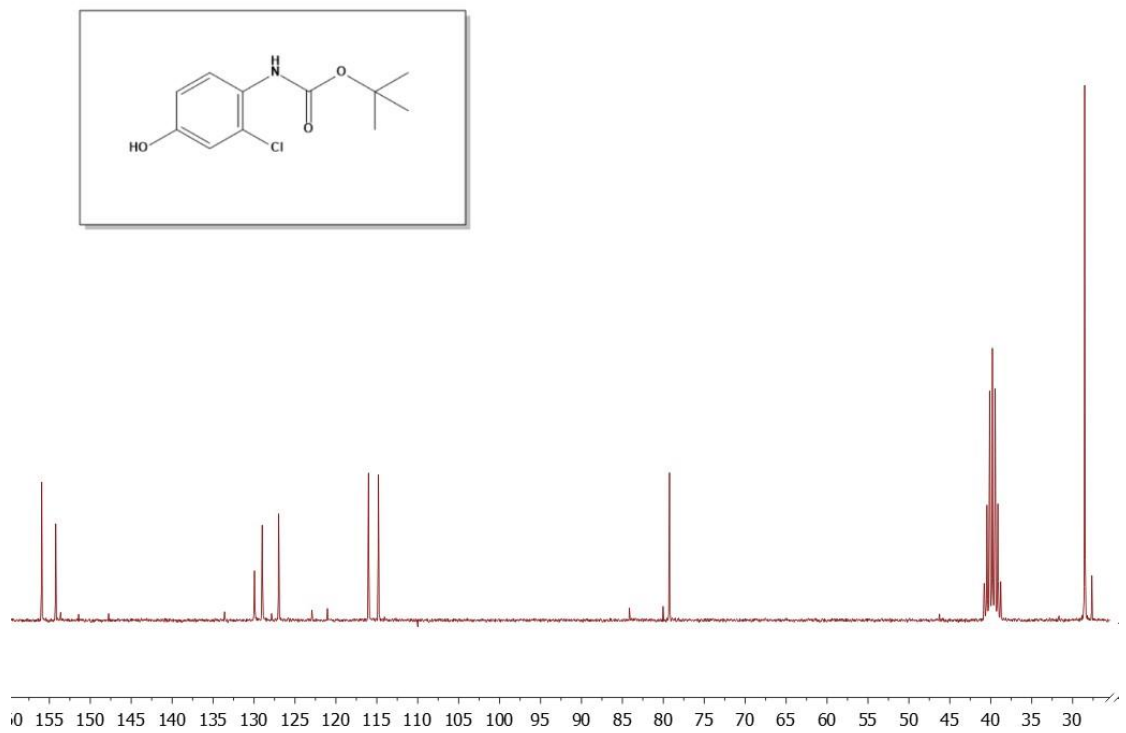
προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον αρωματικό δακτύλιο. Εμφανίζεται ως διπλή της διπλής κορυφή (dd) με σταθερές σύζευξης 3 J₂₋₃=8,7Hz και 4 J₂₋₁=2,7Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 συντονίζεται στα 7.20 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή (d) με σταθερά σύζευξης 3 J₃₋₂=8,7Hz. Τέλος, τα πρωτόνια της tert-βουτυλομάδας υπ' αριθμόν 6 εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 9 στα 1.42 ppm, καθώς αντιλαμβάνονται όμοιο χημικό και μαγνητικό περιβάλλον.



Εικόνα 53. Φάσμα ¹H NMR (250 MHz) του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα σε DMSO-d₆, στους 298 K.



Εικόνα 54. Τμήμα του φάσματος ^1H NMR (250 MHz) του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού *tert*βουτυλεστέρα σε DMSO-d_6 , στους 298 Κ.



Εικόνα 55. Φάσμα ^{13}C NMR του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού *tert*βουτυλεστέρα σε DMSO-d_6 , στους 298 Κ.

3.3.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξικινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)καρβαμικού *tert* βουτυλ-εστέρα (ένωση 8)

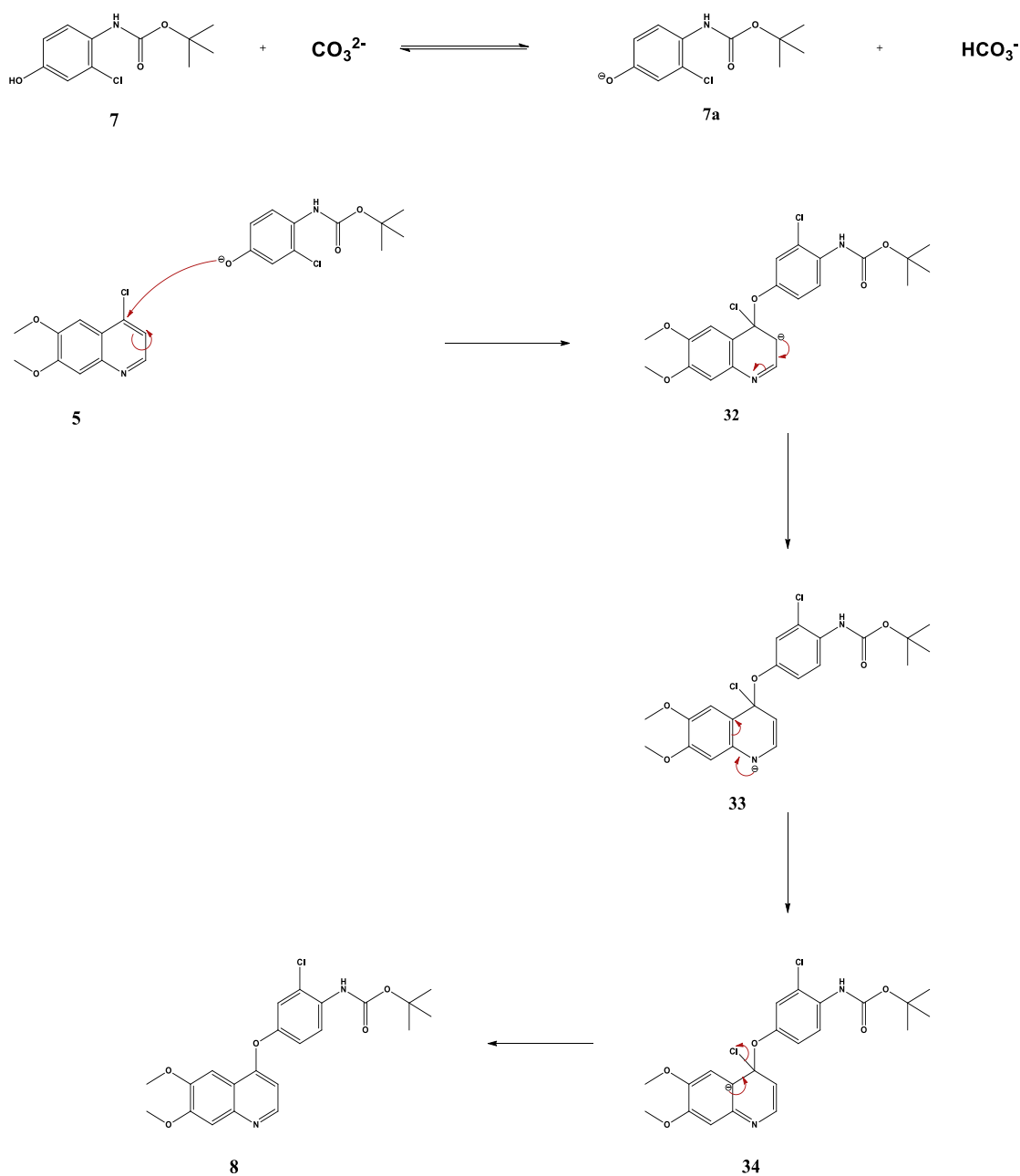
3.3.5.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του του (2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξικινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)καρβαμικού *tert* βουτυλ-εστέρα (ένωση 8)

Ο σχηματισμός του υποκατεστημένου διαρυλ-αιθέρα **8** είναι προϊόν σύζευξης της N-Βoc προστατευμένης 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης **7** και της 4-χλωρουποκατεστημένης κινολίνης **5**, μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Η παραπάνω αντίδραση λαμβάνει χώρα σε βασικές συνθήκες με την χρήση ανθρακικού καισίου και σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο, στους 145 °C επί 5 ώρες.



Εικόνα 56. Σχηματισμός ένωσης **8** μέσω πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η παραπάνω αντίδραση αποτελεί μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση σε βασικές συνθήκες μέσω ενός τυπικού μηχανισμού προσθήκης-απόσπασης. Τα ανθρακικά ανιόντα αποπρωτονιώνουν την ομάδα υδροξυλίου, αυξάνοντας σημαντικά τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της. Ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος σύζευξης **8** ευνοείται, καθώς το πυρηνόφιλο πλέον φαινολικό οξυγόνο προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα που βρίσκεται στη θέση 4 της 4-χλωρο-υποκατεστημένης κινολίνης. Το ενδιάμεσο ανιόν σταθεροποιείται, λόγω του ηλεκτραρνητικού ατόμου του αζώτου της κινολίνης που βρίσκεται στη θέση 1 και στη συνέχεια το ανιόν χλωρίου αποσπάται ως καλή αποχωρούσα ομάδα. Συνεπώς, μέσω του σταθερού αυτού ενδιαμέσου, ευνοείται θερμοδυναμικά το προϊόν **8**.



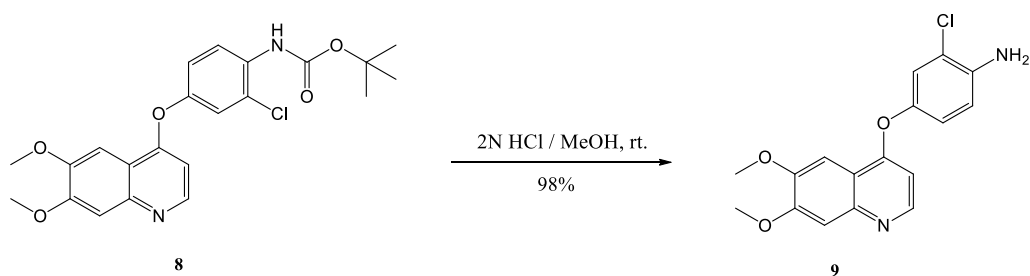
Εικόνα 57. Μηχανισμός σχηματισμού ενδιάμεσης ένωσης 8

3.3.6 Σύνθεση της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9

3.3.6.1 Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9

Τελικό στάδιο για τον σχηματισμό της επιθυμητής υποκατεστημένης ανιλίνης 9, η οποία αποτελεί την ένωση που μέσω σύζευξης με το κατάλληλο παράγωγο καρβοξυλικού οξέος, θα οδηγήσει στον σχηματισμό του τελικού αναλόγου, είναι η

αποπροστασία της αμινομάδας, δηλαδή η απομάκρυνση της Boc ομάδας από το N-τελικό άκρο της προστατευμένης ένωσης **8**. Η απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μεθανολικού διαλύματος υδροχλωρίου, συγκέντρωσης 2N, σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν, το οποίο προκύπτει στη μορφή υδροχλωρικού άλατος, υφίσταται κατεργασία με ανθρακικό νάτριο, μια ασθενή βάση, με σκοπό να προκύψει το επιθυμητό προϊόν.



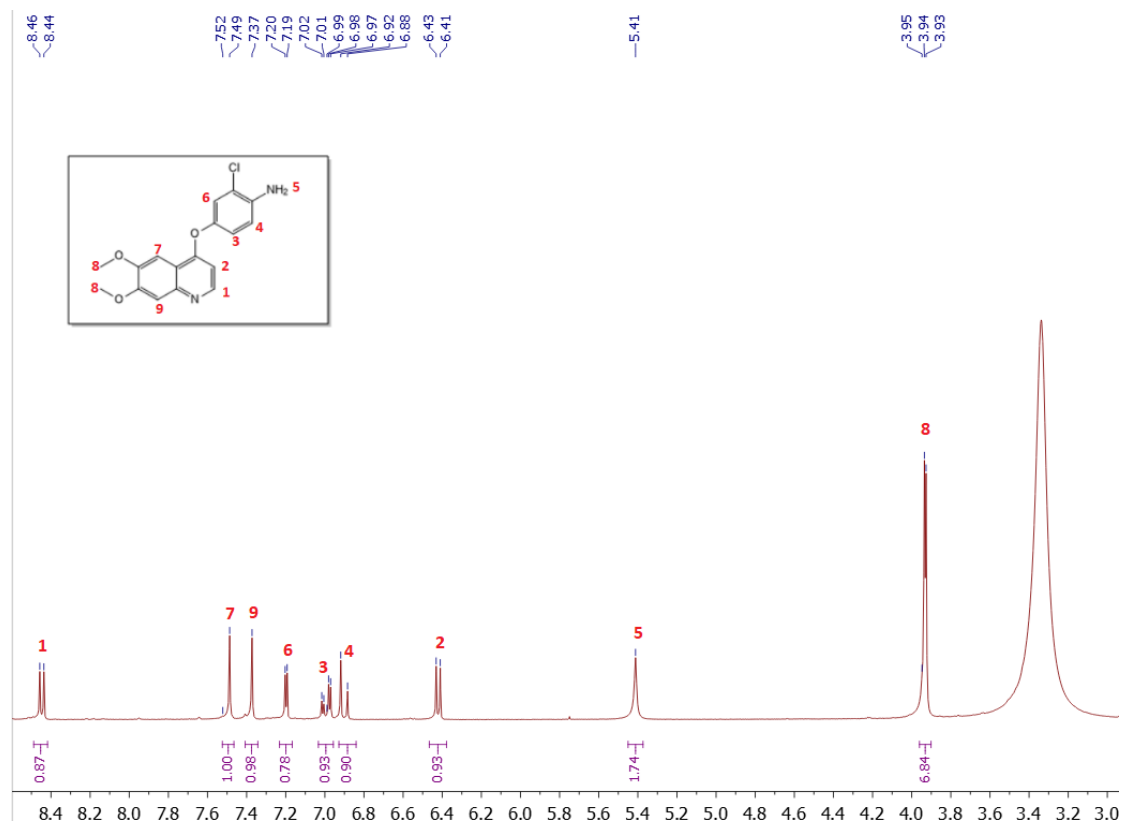
Εικόνα 58. : Boc αποπροστασία αμινομάδας

3.3.6.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9

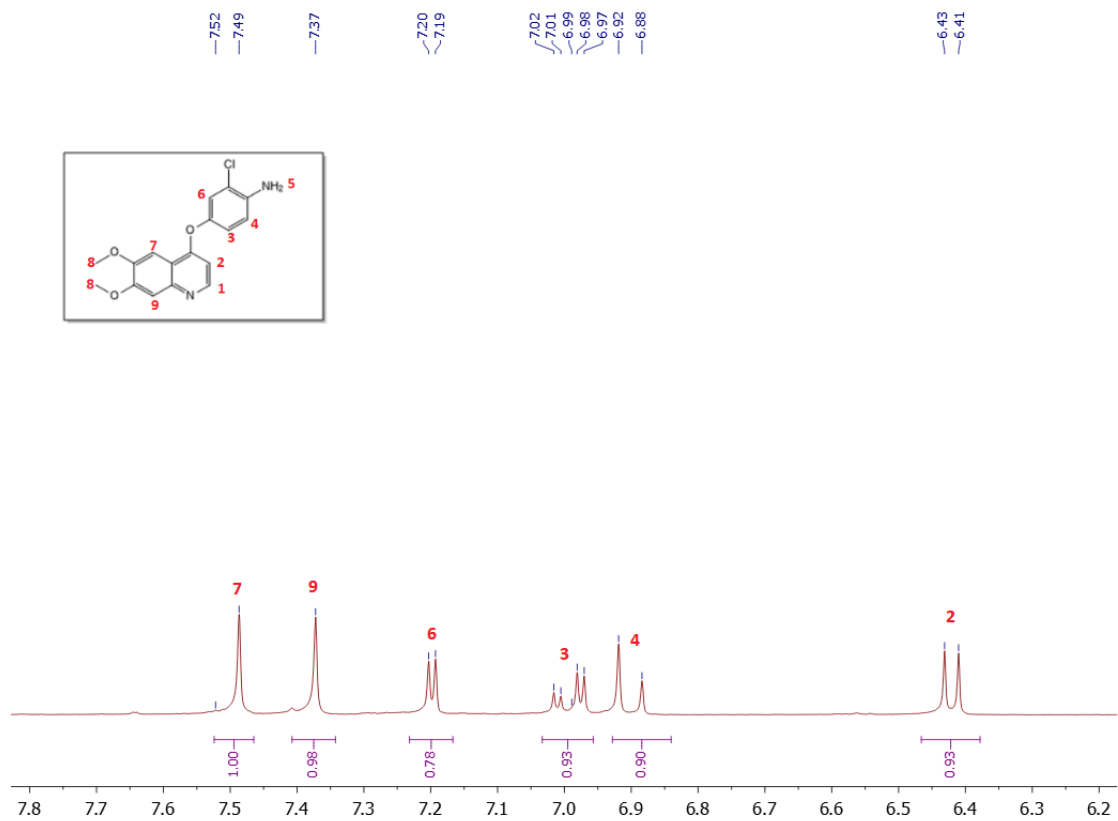
Τα πρωτόνια της ελεύθερης αμινομάδας (H₅) συντονίζονται στα 5.41 ppm και εμφανίζονται ως απλή κορυφή με ολοκλήρωση 2. Με βάση αυτή την κορυφή επιβεβαιώνεται η επιτυχής απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας. Τα πρωτόνια του πυριδινικού δακτυλίου, δηλαδή τα πρωτόνια H₁ και H₂, συντονίζονται στα 8.45 ppm και 6.42 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται ως διπλές (d) κορυφές με σταθερά σύζευξης ³J = 5.3 Hz. Το πρωτόνιο H₁ είναι το πλέον αποπροστατευμένο καθώς βρίσκεται στην 2 θέση του πυριδινικού δακτυλίου, επομένως μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού, συνδέεται στον άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο. Το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 7 (H₇), συντονίζεται στα 7.50 ppm και εμφανίζεται ως απλή κορυφή καθώς δεν έχει γειτονικά πρωτόνια, αντίστοιχα το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 9 (H₉) συντονίζεται στα 7.38 ppm και εμφανίζεται ως απλή κορυφή.

Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 6 (H₆) συντονίζεται στα 7.20 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (d). Η κορυφή σχάζεται, λόγω του γειτονικού H₃ με ⁴J₆₋₃ = 2.6 Hz. Το αρωματικό πρωτόνιο H₃ συντονίζεται στα 7.00 ppm και εμφανίζεται ως μια διπλή της διπλής κορυφή (dd). Αυτό συμβαίνει επειδή η κορυφή σχάζεται από το γειτονικό H₄ σε διπλή,

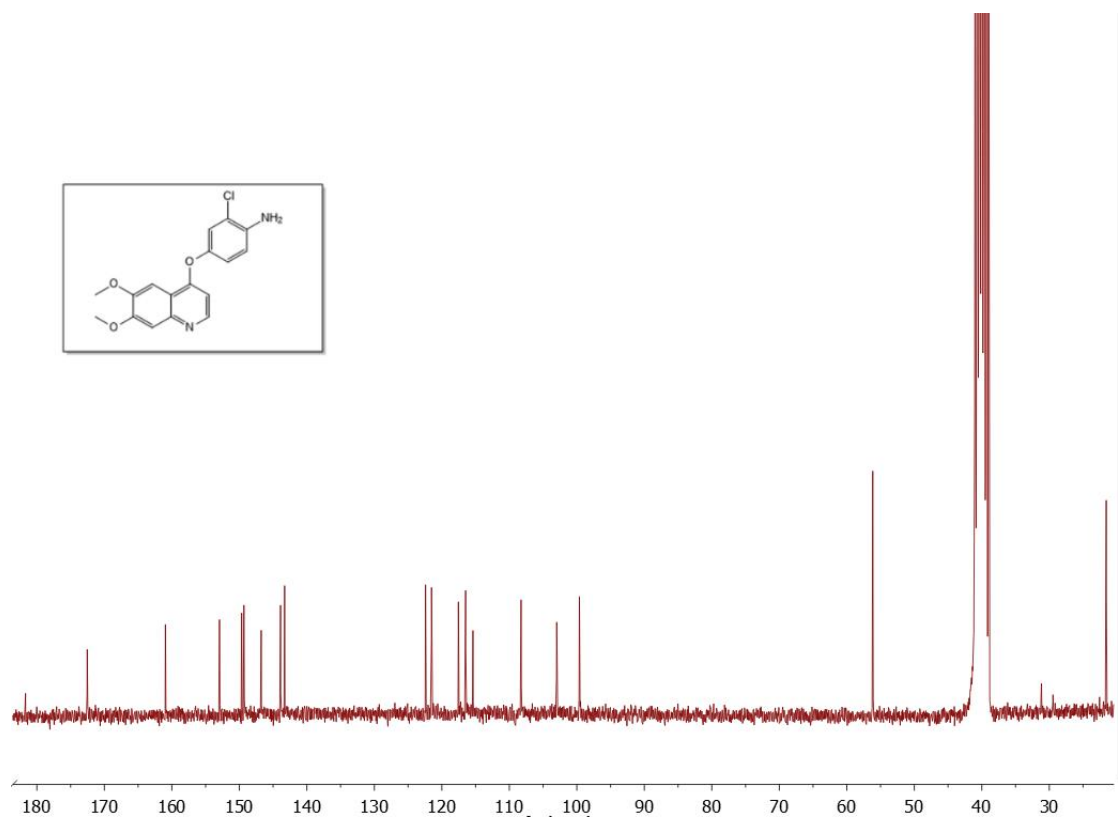
με σταθερά σύζευξη $^3J_{3-4} = 8.7$ Hz. Η διπλή αυτή κορυφή σχάζεται περαιτέρω σε διπλή της διπλής, λόγω αλληλεπίδρασης με το γειτονικό H_6 , με $^4J_{3-6} = 2.6$ Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4 (H_4) συντονίζεται στα 6.90 ppm, η οποία σχάζεται λόγω του γειτονικού πρωτονίου H^4 με $^3J_{4-3} = 8.7$ Hz. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 8 της μεθοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως δυο απλές κορυφές (s) με ολοκλήρωση 6 στα 3.93 ppm.



Εικόνα 59. Φάσμα 1H NMR (250 MHz) της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης σε DMSO- d_6 , στους 298 K.



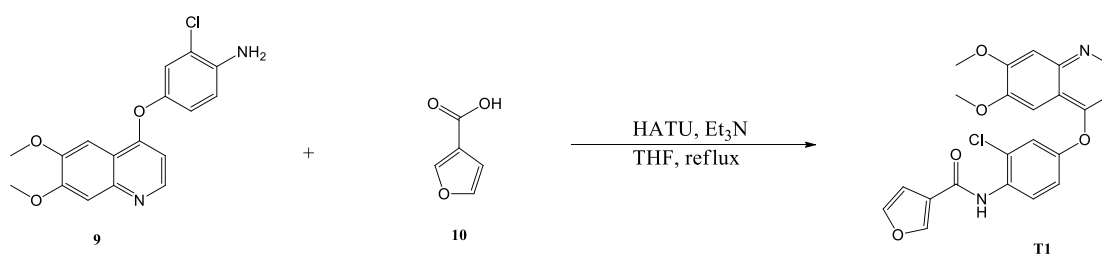
Εικόνα 60. Τμήμα του φάσματος ^1H NMR (250 MHz) της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης σε DMSO-d_6 , στους 298 K.



Εικόνα 61. Φάσμα ^{13}C NMR (100 MHz) της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης σε DMSO-d_6 , στους 298 K.

3.3.7 Σύνθεση τελικής ένωσης

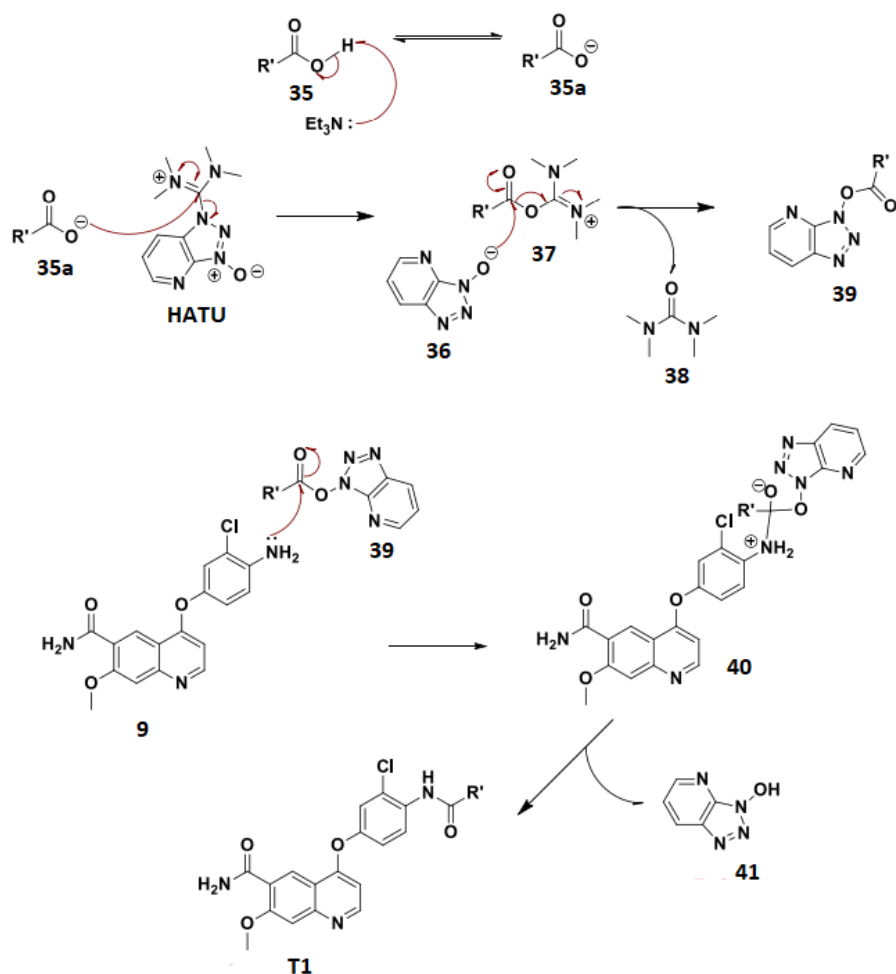
Η σύνθεση της τελικής ένωσης έλαβε χώρα μέσω σύζευξης για τον σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξικινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης **9** και ενός καρβοξυλικού οξέος. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά από δοκιμές αλλάζοντας κάθε φορά το είδος και την ποσότητα του αντιδραστήριο σύζευξης, την ποσότητα του οξέος καθώς και την θερμοκρασία της αντίδρασης. Αρχικά έγινε προσπάθεια σύνθεσης των νέων αναλόγων με την μέθοδο χλωριδίου, με χρήση θειονυλοχλωριδίου, παρουσία τριαιθυλαμίνης και διαλύτη τόσο THF όσο και DMF. Ωστόσο με την παραπάνω μέθοδο η αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε, επιπλέον παρατηρήθηκε η εμφάνιση πολλών παραπροϊόντων. Μετέπειτα έγινε χρήση διαφορετικών αντιδραστηρίων σύζευξης όπως του DCC, DIC, CDI και HATU και διαλύτη τόσο THF όσο και DMF. Οι βέλτιστες συνθήκες περιλαμβάνουν αρχικά τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα του εκάστοτε καρβοξυλικού οξέος παρουσία του αντιδραστήριο σύζευξης HATU (**4eq**) σε βασικές συνθήκες στους 0 °C και διαλύτη άνυδρο τετραϋδροφουράνιο. Εν συνεχεία, η προσθήκη της ανιλίνης **9** (**1 eq**) και η θέρμανση του μίγματος της αντίδρασης στο σημείο βρασμού του διαλύτη οδηγεί στον σχηματισμό των επιθυμητών τελικών ενώσεων σε πολύ καλές αποδόσεις.



Εικόνα 62. Αντίδραση σύνθεσης αναλόγου **T1**

Ακολουθεί ο μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού της τελικής ένωσης **T1**. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία βάσης αυξάνεται σημαντικά η πυρηνοφιλία του οξέος, το οποίο με τη σειρά του προσβάλλει το αντιδραστήριο σύζευξης, δημιουργώντας με αυτόν το τρόπο τον ενδιάμεσο ενεργοποιημένο εστέρα. Ύστερα, το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου της ανιλίνης προσβάλλει την καρβονυλομάδα του

ενεργοποιημένου εστέρα, προκειμένου να σχηματιστεί ο επιθυμητός αμιδικός δεσμός.

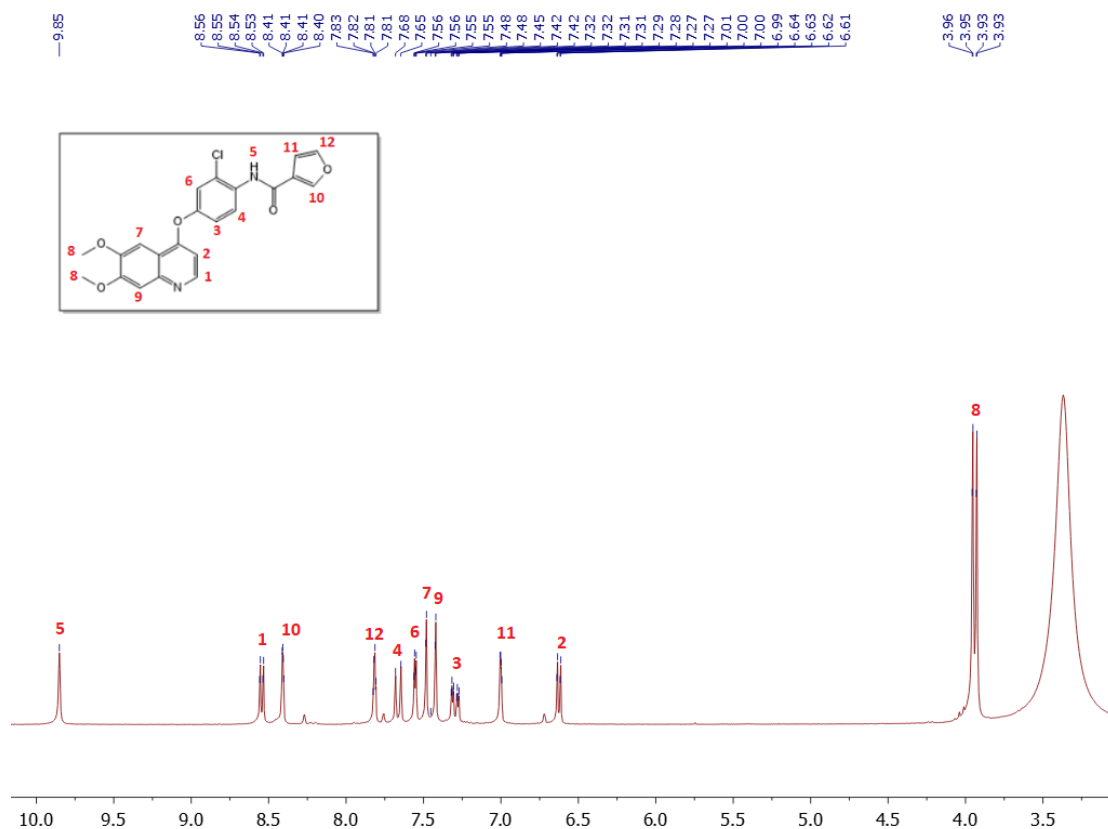


Εικόνα 63. Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με τη χρήση τριαιθυλαμίνης και HATU για τον σχηματισμό της τελικής ένωσης.

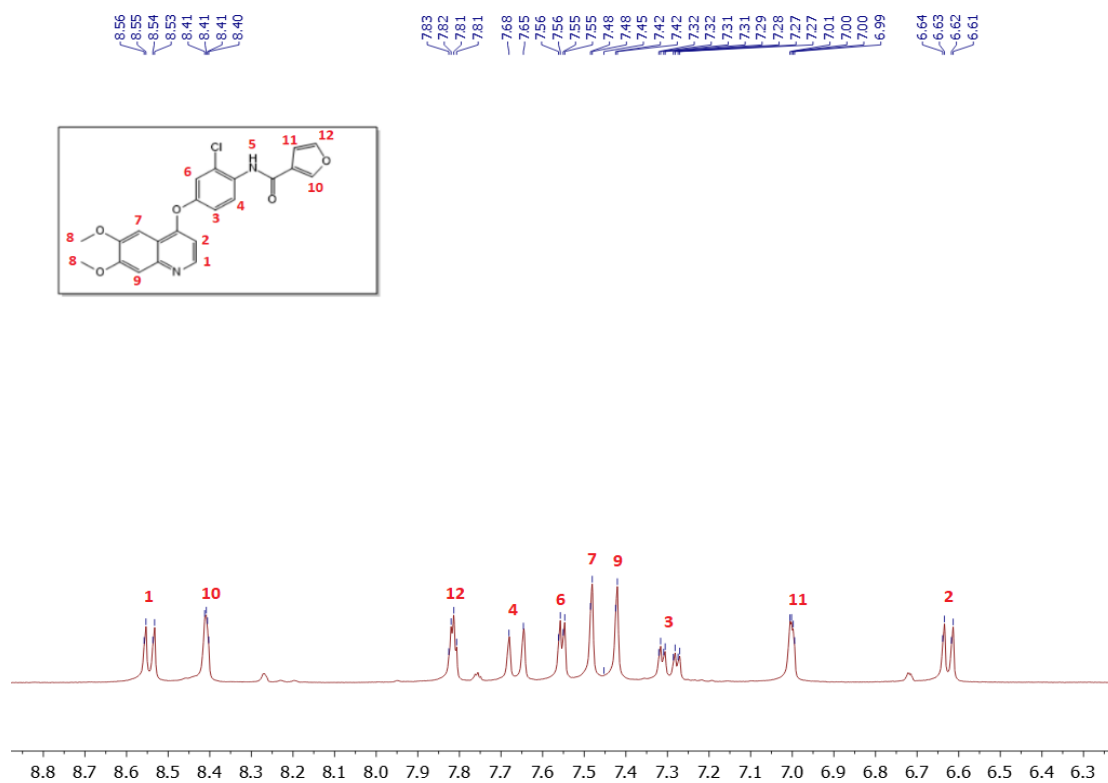
3.3.7.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του T1

Από το φάσμα ¹H NMR του αναλόγου T1 βγαίνει το συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η σύνθεση του αναλόγου, καθώς η απλή κορυφή που συντονίζεται στα 9.85 ppm αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού. Επιπλέον εμφανίζονται όλες οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του φουρανικού δακτυλίου, ενώ παράλληλα διατηρούνται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στα υδρογόνα της ανιλίνης 9. Αναλυτικότερα, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 1 (H₁) και 2 (H₂) συντονίζονται στα 8.55 ppm και 6.63 ppm ως διπλές κορυφές (d) με σταθερά σύζευξης ³J₁₋₂= 5.2 Hz. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 7 (H₇) και 9 (H₉) συντονίζονται στα 7.48 ppm και 7.42 ppm και εμφανίζονται ως απλές κορυφές (s). Το

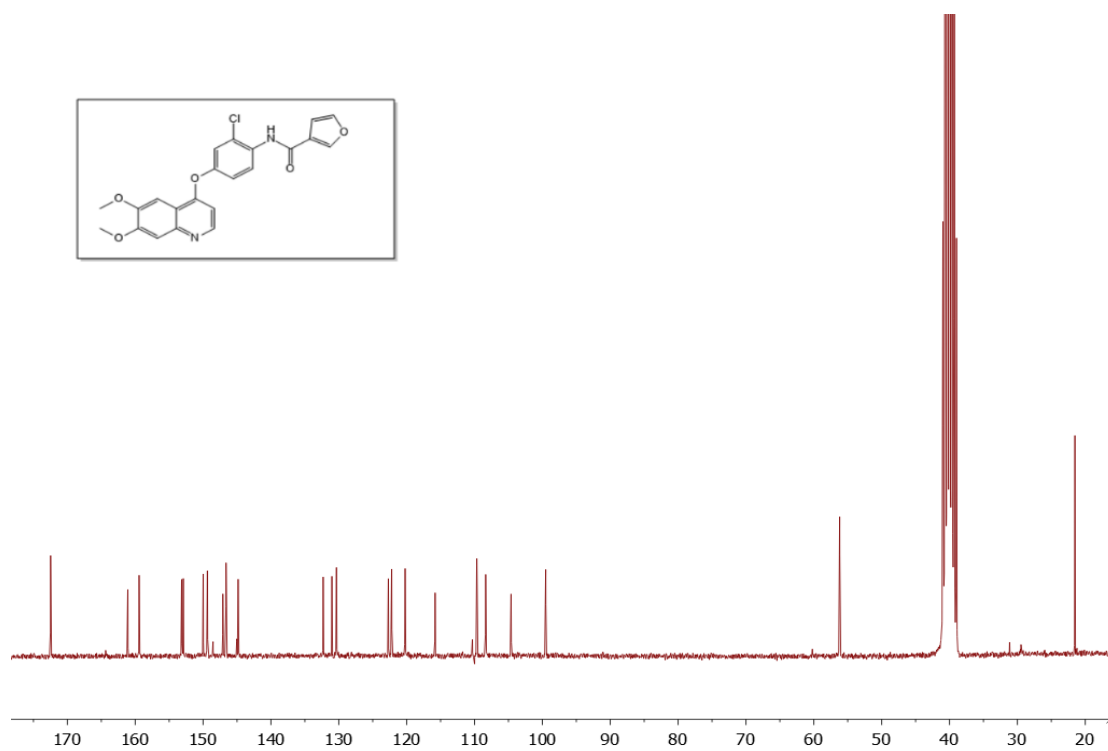
πρωτόνιο υπ' αριθμόν 4 (H₄) συντονίζεται 7.66 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (d) με σταθερά σύζευξης ³J₄₋₃= 8.7 Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 3 (H₃) συντονίζεται στα 7.30 ppm και εμφανίζεται ως κορυφή με το μοτίβο διπλή της διπλής (dd) με σταθερές σύζευξης ³J₃₋₄= 8.7 Hz και ⁴J₃₋₆= 2.8 Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 6 (H₆) συντονίζεται στα 7.55 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή (d) με σταθερά σύζευξης ⁴J₆₋₃= 2.8 Hz. Τα πρωτόνια του φουρανικού δακτυλίου δηλαδή τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 10, 11 και 12 συντονίζονται στα 8.41 ppm, 7.00 ppm και 7.82 ppm. Το πρωτόνιο 10 έχει σταθερά σύζευξης ⁴J=0.9 Hz, όμοια με το 11, ενώ το πρωτόνιο 12 έχει σταθερά σύζευξης ³J=1.9 Hz ίδια με το 11. Τέλος τα πρωτόνια των μεθόξυ ομάδων συντονίζονται στα 3.94 ppm με ολοκλήρωση 6.



Εικόνα 64. Φάσμα 1H NMR (250 MHz) του αναλόγου T1 σε DMSO-d₆, στους 298 K.



Εικόνα 65. Τμήμα του φάσματος ^1H NMR (250 MHz) του αναλόγου T1 σε DMSO- d_6 , στους 298 K.



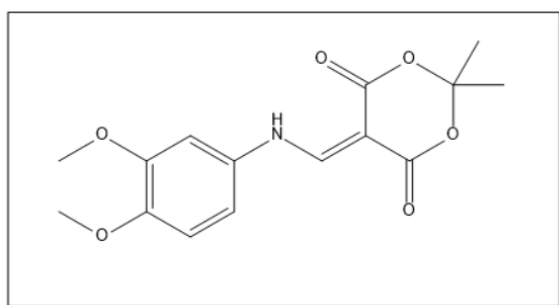
Εικόνα 66. Φάσμα ^{13}C NMR (100 MHz) του αναλόγου 1 σε DMSO- d_6 , στους 298 K.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Πειραματικό μέρος

4.1 Συνθέσεις

4.1.1 Σύνθεση της 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνης, ένωση 3



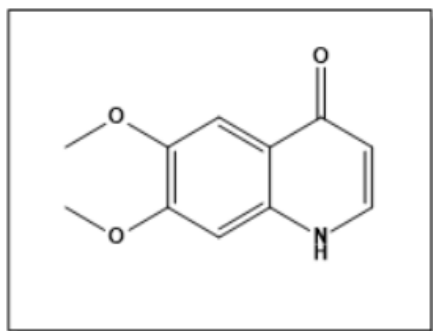
Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται η 3,4 διμεθοξυ ανιλίνη (0.5 g, 3,26 mmol) και προστίθεται η 2-προπανόλη (3 mL). Μόλις πραγματοποιηθεί η διαλυτοποίηση της αρχικής ένωσης ακολουθεί η

προσθήκη του οξέος Meldrum (0,75 g, 4,89 mmol) και του μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα (1,7 g, 11,41 mmol, $d=0.891$ g/mL) υπό ανάδευση. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος της αντίδρασης στους 80 °C με την χρήση κάθετου ψυκτήρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 1 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αυτής αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και παρατηρείται σχηματισμός καφέ ιζήματος. Προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα (20 ml) οδηγεί σε ποσοτική καταβύθιση του ιζήματος, οπότε και ακολουθεί διήθηση και έκπλυση του ιζήματος δύο φορές με ψυχρό διαιθυλαιθέρα (2 x 20 ml) . Μετά από ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν καφέ χρώματος (απόδοση 90%).

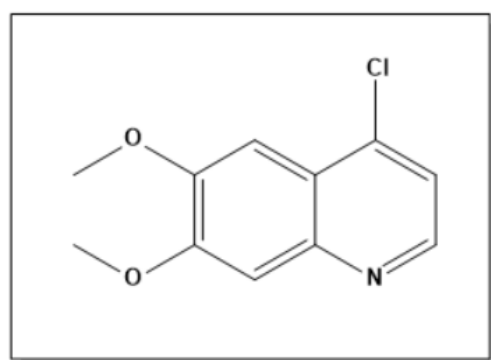
4.1.2 Σύνθεση της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρονται 0,73ml διφαινυλαιθέρα και 0,28g διφαινύλιο (διαλύτης DOWTHERM A). Στη συνέχεια προστίθεται η 5-(((3,4-διμεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλ-1,3-διοξανο-4,6-διόνη , ένωση 3 (0,5 g, 1,62 mmol) και ακολουθεί θέρμανση του διαλύματος υπό ανάδευση στους 200°C με την χρήση κάθετου ψυκτήρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται εντός 1h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί κατεργασία του μίγματος της

αντίδρασης με 50 ml διαλύματος εξανίου, διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με ψυχρό εξάνιο (2 x 20 ml). Μετά από ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν καφέ χρώματος (απόδοση 80%).



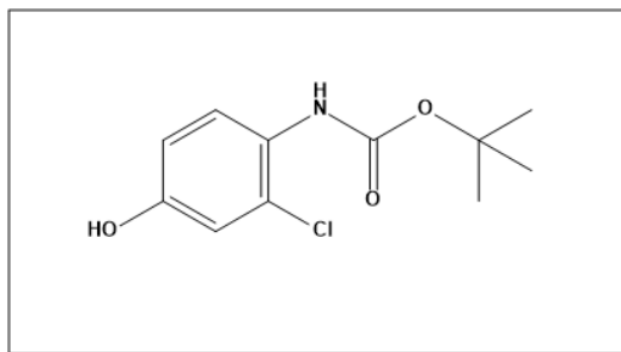
4.1.3 Σύνθεση της 4-χλωρο-6,7-διμεθοξυκινολίνης, ένωση 5



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται το διάλυμα της 6,7-διμεθοξυκινολινο-4(1H)-όνης, ένωση 4 (0,1 g, 0,49 mmol) σε περίσσεια φρέσκα απεσταγμένου θειονυλοχλωριδίου (5 mL) και προστίθεται καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμιδίου (2 σταγόνες). Το

μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται μέχρι βρασμού, για 2 h, με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί συμπύκνωση αυτού υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας θειονυλοχλωριδίου. Ακολουθεί κατεργασία του μίγματος της αντίδρασης με 10 ml διαλύματος οξικού αιθυλεστέρα, διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με οξικό αιθυλεστέρα (2 x 20 ml). Μετά από ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν καφέ χρώματος (απόδοση 89%).

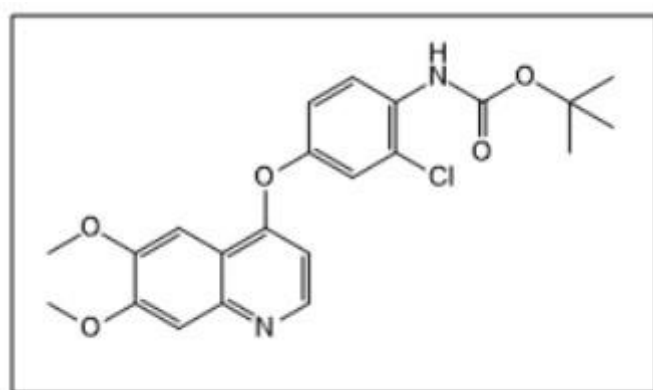
4.1.4 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tertβουτυλεστέρα, ένωση 7



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, φέρεται το υδροχλωρικό άλας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (0,5 g, 2,7 mmol), διαλύεται σε 1-προπανόλη (3 mL) και, υπό ανάδευση, προστίθεται η τριαιθυλαμίνη (0,308 g, 3,05

mmol, $d=0.725$ g/mL). Στη συνέχεια προστίθεται ο Boc-ανυδρίτης (0,668 g, 3,05 mmol, $d=0.95$ g/mL). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται αυστηρά στους 40 °C με την χρήση κάθετου ψυκτήρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί αρχικά εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (50 ml) και νερό (50 ml) και έπειτα έκπλυση της οργανικής φάσης δύο φορές με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (2 x 50 ml). Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού παίρνοντας το προϊόν ως υπόλευκο στερεό (απόδοση 95%).

4.1.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλ-εστέρα (ένωση 8)



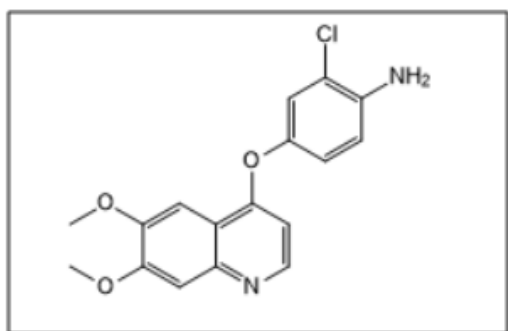
Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)- καρβαμικός-tert-βουτυλεστέρας (0,171 g, 0,7 mmol) σε απόλυτο διμεθυλοσουλφοξείδιο (2 mL) και προστίθενται, υπό ανάδευση, η 4-χλωρο-6,7-

διμεθοξυκινολίνη (0,129 g, 0,58 mmol) και το ανθρακικό καΐσιο (0,507 g, 1,26 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 145 °C με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 5 h με πλήρη κατανάλωση

της αρχικής ένωσης. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται μέσω απόσταξης με την χρήση αντλίας υψηλού κενού. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (100 ml) και νερό (100 ml) και έπειτα έκπλυση της οργανικής φάσης δύο φορές με νερό (2 x 50 ml). Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού παίρνοντας το προϊόν ως σκούρο καφέ στερεό. Η ένωση χρησιμοποιείται απευθείας στην επόμενη αντίδραση χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

4.1.6 Σύνθεση της 2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξο)ανιλίνης, ένωση 9

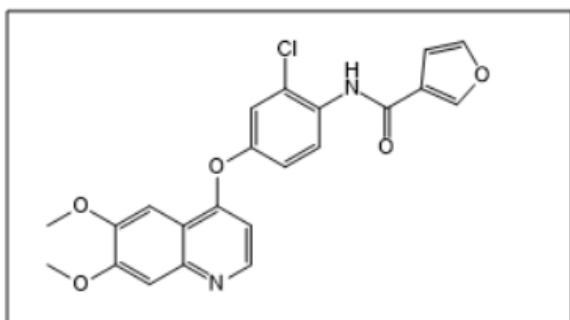
Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο (2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-



υλο)οξο)φαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλεστέρας και προστίθεται το μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρίου, συγκέντρωσης 2N (20 mL). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2 h με πλήρη

κατανάλωση της αρχικής ένωσης. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (100 ml) και κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (100 ml). Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού παίρνοντας το προϊόν ως σκούρο καφέ στερεό. Το προϊόν καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 2/1. Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, απομονώνεται το επιθυμητό στερεό καφέ χρώματος (98 %).

4.1.7 Σύνθεση του T1



Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml, φέρεται υπο ανάδευση διάλυμα του 3-φουροϊκού οξέος (50 mg, 0.45 mmol), σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 ml) και υπό ατμόσφαιρα az_2ntoy . Υπό ανάδευση και στους 0°C προστίθενται

HATU (228 mg, 0.6mmol) και Et₃N (211 mg, 2.06 mmol, d=0.726 g/mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min με σκοπό τον σχηματισμό του ενεργοποιημένου εστέρα. Ακολουθεί η προσθήκη της αμίνης 9 (50 mg, 0.07 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται μέχρι βρασμού με τη χρήση κάθετου ψυκτήρα και υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί αρχικά εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (100 ml) και νερό (100 ml) και έπειτα έκπλυση της οργανικής φάσης δύο φορές με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (2 x 100 ml). Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού παίρνοντας το προϊόν ως υποκίτρινο στερεό. Το προϊόν καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών CH₂Cl₂:CH₃OH 10/0.4 (απόδοση 75%).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Wagle, N. S.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2023. *CA. Cancer J. Clin.* **2023**, *73* (1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>.
- (2) root. *ΕΛΣΤΑΤ: Covid, αυτοκτονίες, καρδιά οι βασικές αιτίες θανάτου των Ελλήνων*. Οικονομικός Ταχυδρόμος - ot.gr. <https://www.ot.gr/2023/02/24/epikairothta/koinonia/elstat-covid-aytoktonies-kardia-oi-vasikes-aities-thanatou-ton-ellinon/> (accessed 2024-03-02).
- (3) Arruebo, M.; Vilaboa, N.; Sáez-Gutierrez, B.; Lambea, J.; Tres, A.; Valladares, M.; González-Fernández, Á. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* **2011**, *3* (3), 3279–3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>.
- (4) Kannaiyan, R.; Mahadevan, D. A Comprehensive Review of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2018**, *18* (12), 1249–1270. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1527688>.
- (5) *The Cell Cycle: A Review - K. A. Schafer, 1998*. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/030098589803500601> (accessed 2024-06-13).
- (6) MURRAY, A. W. The Cell Cycle1. *Am. Zool.* **1989**, *29* (2), 511–522. <https://doi.org/10.1093/icb/29.2.511>.
- (7) *Evidence that the human cell cycle is a series of uncoupled, memoryless phases | Molecular Systems Biology*. <https://www.emboPress.org/doi/full/10.15252/msb.20188604> (accessed 2024-06-13).
- (8) *Iatriki on line*. https://iatrikionline.gr/url_37/04.htm (accessed 2024-03-04).
- (9) Cell Cycle Checkpoints and Their Inactivation in Human Cancer.
- (10) *The cell cycle and cancer - Williams - 2012 - The Journal of Pathology - Wiley Online Library*.

<https://pathsocjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.3022> (accessed 2024-06-13).

(11) *Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy*. - *Consensus*. <https://consensus.app/papers/transduction-pathway-proteins-targets-cancer-therapy-adjei/ba7bc5b3d74755609e8fd20fa0088a3a/?q=cell+signal+transduction+pathways> (accessed 2024-06-13).

(12) Bianco, R.; Melisi, D.; Ciardiello, F.; Tortora, G. Key Cancer Cell Signal Transduction Pathways as Therapeutic Targets. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42* (3), 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.07.034>.

(13) *A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors* - *ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661815001437?via%3Dihub> (accessed 2024-06-13).

(14) *A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation* | *Nature Biotechnology*. https://www.nature.com/articles/nbt0401_375 (accessed 2024-06-13).

(15) *The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification1* - Hanks - 1995 - *The FASEB Journal* - *Wiley Online Library*. <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fasebj.9.8.7768349> (accessed 2024-06-13).

(16) *Kinome Atlas* - *Cell Image Library*. http://cellimagelibrary.org/pages/kinome_atlas (accessed 2024-03-04).

(17) Hunter, T. [1] Protein Kinase Classification. In *Methods in Enzymology; Protein Phosphorylation Part A: Protein Kinases: Assays, Purification, Antibodies, Functional Analysis, Cloning, and Expression*; Academic Press, 1991; Vol. 200, pp 3–37. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)00125-G](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)00125-G).

- (18) Cheek, S.; Zhang, H.; Grishin, N. V. Sequence and Structure Classification of Kinases. *J. Mol. Biol.* **2002**, *320* (4), 855–881. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00538-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00538-7).
- (19) Manuse, S.; Fleurie, A.; Zucchini, L.; Lesterlin, C.; Grangeasse, C. Role of Eukaryotic-like Serine/Threonine Kinases in Bacterial Cell Division and Morphogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40* (1), 41–56. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv041>.
- (20) *Viral Serine/Threonine Protein Kinases | Journal of Virology.* <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.01369-10> (accessed 2024-06-13).
- (21) *Cyclin-dependent kinases | Genome Biology | Full Text.* <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb4184> (accessed 2024-06-13).
- (22) Roskoski, R. Cyclin-Dependent Protein Serine/Threonine Kinase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Pharmacol. Res.* **2019**, *139*, 471–488. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.035>.
- (23) Bury, M.; Calvé, B. L.; Ferbeyre, G.; Blank, V.; Lessard, F. New Insights into CDK Regulators: Novel Opportunities for Cancer Therapy. *Trends Cell Biol.* **2021**, *31* (5), 331–344. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.01.010>.
- (24) Garrington, T. P.; Johnson, G. L. Organization and Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11* (2), 211–218. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80028-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80028-3).
- (25) Institute, N. C. Protein Kinase A. *Qeios* **2020**. <https://doi.org/10.32388/SAUGDN>.
- (26) Sapio, L.; Di Maiolo, F.; Illiano, M.; Esposito, A.; Chiosi, E.; Spina, A.; Naviglio, S. Targeting Protein Kinase A in Cancer Therapy: An Update. **2014**. <https://doi.org/10.17877/DE290R-6736>.
- (27) Spitaler, M.; Cantrell, D. A. Protein Kinase C and Beyond. *Nat. Immunol.* **2004**, *5* (8), 785–790. <https://doi.org/10.1038/ni1097>.

- (28) *The protein kinase C family - AZZI - 1992 - European Journal of Biochemistry - Wiley Online Library*. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17219.x> (accessed 2024-06-13).
- (29) Newton, A. C. Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation (*). *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (48), 28495–28498. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28495>.
- (30) *Protein kinase B/Akt at a glance | Journal of Cell Science | The Company of Biologists*. <https://journals.biologists.com/jcs/article/118/24/5675/28639/Protein-kinase-B-Akt-at-a-glance> (accessed 2024-06-13).
- (31) Scheid, M. P.; Woodgett, J. R. Unravelling the Activation Mechanisms of Protein Kinase B/Akt. *FEBS Lett.* **2003**, 546 (1), 108–112. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00562-3).
- (32) Payne, M. E.; Fong, Y. L.; Ono, T.; Colbran, R. J.; Kemp, B. E.; Soderling, T. R.; Means, A. R. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. Characterization of Distinct Calmodulin Binding and Inhibitory Domains. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (15), 7190–7195. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68626-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68626-0).
- (33) Yuan, C. J.; Huang, C. Y.; Graves, D. J. Phosphorylase Kinase, a Metal Ion-Dependent Dual Specificity Kinase. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268 (24), 17683–17686. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46758-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46758-5).
- (34) *Protein Tyrosine Kinase Structure and Function | Annual Reviews*. <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.biochem.69.1.373> (accessed 2024-06-13).
- (35) *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy | Nature Reviews Cancer*. <https://www.nature.com/articles/nrc1360> (accessed 2024-06-13).
- (36) *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases: Cell*. [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)00114-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400001148%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)00114-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400001148%3Fshowall%3Dtrue) (accessed 2024-06-13).

- (37) *Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor–Associated Hypertension and Vascular Disease | Hypertension.*
<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.10271> (accessed 2024-06-13).
- (38) Shibuya, M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomol Ther (Seoul)* **2014**, 22 (1), 1–9. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2013.113>.
- (39) Talukdar, S.; Emdad, L.; Das, S. K.; Fisher, P. B. Chapter Four - EGFR: An Essential Receptor Tyrosine Kinase-Regulator of Cancer Stem Cells. In *Advances in Cancer Research*; Kumar, R., Fisher, P. B., Eds.; Receptor Tyrosine Kinases; Academic Press, 2020; Vol. 147, pp 161–188. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.04.003>.
- (40) *Cancers | Free Full-Text | EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance.* <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/11/2748> (accessed 2024-06-13).
- (41) *Targeting non-receptor tyrosine kinases using small molecule inhibitors: an overview of recent advances: Journal of Drug Targeting: Vol 24 , No 3 - Get Access.*
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1061186X.2015.1068319> (accessed 2024-06-13).
- (42) *Structural Basis for the Autoinhibition of c-Abl Tyrosine Kinase: Cell.*
[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(03\)00194-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867403001946%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(03)00194-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867403001946%3Fshowall%3Dtrue) (accessed 2024-06-13).
- (43) *Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure | Science.*
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1095920> (accessed 2024-06-13).
- (44) *Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes - ScienceDirect.*
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661815301298?via%3Dihub> (accessed 2024-06-13).
- (45) *Small molecule kinase inhibitors approved by the FDA from 2000 to 2011: a systematic review of preclinical ADME data: Expert Opinion on Drug Metabolism &*

Toxicology: Vol 9 , No 12 - Get Access.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.2013.834046> (accessed 2024-06-13).

(46) *Renal cell carcinoma | Nature Reviews Disease Primers.*

<https://www.nature.com/articles/nrdp20179> (accessed 2024-06-13).

(47) *Angiogenesis in life, disease and medicine | Nature.*

<https://www.nature.com/articles/nature04478> (accessed 2024-06-13).

(48) Yang, J.; Yan, J.; Liu, B. Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00978>.

(49) Roskoski, R. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and VEGF Receptor Inhibitors in the Treatment of Renal Cell Carcinomas. *Pharmacol. Res.* **2017**, *120*, 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.010>.

(50) *Tivozanib | Aveo Oncology.* <https://www.aveooncology.com/product-candidates/tivozanib/> (accessed 2024-06-13).

(51) *Tivozanib Versus Sorafenib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results From a Phase III Trial | Journal of Clinical Oncology.* <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2012.47.4940> (accessed 2024-06-13).

(52) Chang, E.; Weinstock, C.; Zhang, L.; Fiero, M. H.; Zhao, M.; Zahalka, E.; Ricks, T. K.; Fourie Zirkelbach, J.; Qiu, J.; Yu, J.; Chen, X. H.; Bhatnagar, V.; Goldberg, K. B.; Tang, S.; Kluetz, P. G.; Pazdur, R.; Ibrahim, A.; Beaver, J. A.; Amiri-Kordestani, L. FDA Approval Summary: Tivozanib for Relapsed or Refractory Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2022**, *28* (3), 441–445. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2334>.

(53) *Tivozanib - an overview | ScienceDirect Topics.*

<https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/tivozanib> (accessed 2024-06-13).