



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

Σύνθεση και χαρακτηρισμός ενδιάμεσων προϊόντων κατά τη βελτιστοποίηση της συνθετικής πορείας του φαρμακευτικού σκευάσματος Tucatinib και μοριακός σχεδιασμός νέων βιοδραστικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, αναλόγων του Tucatinib, ως εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Κοσταντίνι Ελένη

Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΟΣΤΑΝΤΙΝΙ ΕΛΕΝΗ Α.Μ.: 1432

Επιβλέπων καθηγητής: Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σίσκος Μιχάλης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας- Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

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

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ:

08/10/2024

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματεύεται τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό ενδιάμεσων ενώσεων προς την τελική σύνθεση του φαρμακευτικού σκευάσματος Tucatinib, έχοντας προχωρήσει στη βελτιστοποίηση των συνθηκών ορισμένων βημάτων της συνθετικής πορείας. Παράλληλα, ασχοληθήκαμε με τον μοριακό σχεδιασμό νέων βιοδραστικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, αναλόγων του Tucatinib ως εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των εν λόγω ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ3-210 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο διάστημα μεταξύ Νοεμβρίου 2022 και Μαΐου 2024, στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Χημείας, στην κατεύθυνση "Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία- Βιοδραστικές Ενώσεις", υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου.

Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια ορισμένων ανθρώπων, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, ο οποίος από την πρώτη στιγμή που εκδήλωσα το ενδιαφέρον μου, με εμπιστεύτηκε ώστε να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα και να εκπληρώσω έναν από τους προπτυχιακούς μου στόχους, να ασχοληθώ και να διευρύνω τις γνώσεις μου στον τομέα αυτό της οργανικής χημείας και σύνθεσης. Ο κ. Σκομπρίδης αποτελεί για μένα μέντορας και πρότυπο επιστήμονα καθώς ήδη από τα προπτυχιακά μου χρόνια, επιβεβαίωσε την αγάπη μου για την οργανική χημεία και έπειτα κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών, πάντα ήταν διατεθειμένος να μας βοηθήσει και να μας καθοδηγήσει, παρέχοντάς απλόχερα τις γνώσεις και την εμπειρία του.

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

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την άψογη συνεργασία και για το ωραίο κλίμα που επικρατούσε πάντα, πάρα τις δυσκολίες που μπορεί να προέκυπταν κατά τη διάρκεια της έρευνας. Πρώτ' από όλα, θέλω να πω ένα ευχαριστώ στους Παντελή Αλασώνα, Λεμονιά Καραγιάννη και Φωτεινή Πεπονίδου που συνέβαλαν στην ομαλή ένταξη μας στο εργαστήριο και μας καθοδήγησαν με τις γνώσεις τους. Τεράστιο ευχαριστώ αξίζει στα κορίτσια, Μαρία Ζώτου, Κική Χατζηαγγελίδου, Ιωάννα Χρονοπούλου που πάντα αποτελούσαμε

στήριγμα η μία της άλλης, διατεθειμένες να βοηθήσουν έμπρακτα, είτε με τις ιδέες και γνώσεις τους, είτε ψυχολογικά. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ήρα Σδούκου και Ελεονώρα Σταλικά που ήταν σημαντικό μέρος του εργαστηρίου αυτή τη χρονιά, με τη θετική ενέργεια και την προθυμία τους. Ακόμη ένα ευχαριστώ αξίζει και το εργαστήριο του κ. Βαρβούνη και ο διδακτορικός του φοιτητής Γεροντίτης Ιωάννης που πάντα είχε τη διάθεση να προσφέρει τη βοήθεια του.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στην κολλητή και φίλη μου Φωτεινή που πάντα αποτελούσε στήριγμα στη διάρκεια όλων αυτών των ετών και ήταν δίπλα μου σε κάθε δυσκολία. Μαζί έχουμε περάσει αμέτρητες στιγμές, οι οποίες με καθόρισαν σαν άνθρωπο.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην συμπεριλάβω σε όλο αυτό την οικογένεια μου. Ένα μόνο ευχαριστώ σίγουρα δεν αρκεί για όλα αυτά που μου έχουν προσφέρει στη διάρκεια της ζωής μου. Θα ήθελα να τους εκφράσω λοιπόν την ευγνωμοσύνη μου για την οικονομική και ψυχολογική τους στήριξη, την συμπαράσταση σε οποιαδήποτε απόφαση μου, καθώς και για τις θυσίες και τα πράγματα που οι ίδιοι στερήθηκαν για να βρίσκομαι εγώ εδώ, γεγονός που μου δίδαξε πολλά και με έκανε καλύτερο άνθρωπο.

Περίληψη

Η λέξη καρκίνος σημαίνει κάβουρας. Το όνομα της πάθησης οφείλεται στον Ιπποκράτη (460-377 π.Χ.), ο οποίος ήταν ο πρώτος που προσπάθησε να περιγράψει τη νόσο, παρομοιάζοντάς την μορφολογικά με την εικόνα του κάβουρα. Ως καρκίνο λοιπόν, ορίζουμε μια ομάδα ασθενειών περισσότερων από 100, που προκαλούνται όταν φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού αρχίζουν να διαιρούνται και να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, με πιθανότητα εξάπλωσης σε άλλα μέρη του σώματος (μετάσταση). Όταν τα μη φυσιολογικά κύτταρα σχηματίζουν μια μάζα, τότε μιλάμε για κακοήγη όγκο.

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, αντιπροσωπεύοντας περίπου 9.6 εκατομμύρια θανάτους ή 1 στους 6 θανάτους, το 2018. Ο καρκίνος του μαστού, για τον οποίο γίνεται λόγος στην παρούσα εργασία, είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου στις γυναίκες, με την Ελλάδα να μετρά πάνω από 5000 νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο, ενώ είναι η 2^η αιτία θανάτου των γυναικών.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP σε ένα υπόστρωμα πρωτεΐνης ή πεπτιδίου. Η αντίδραση αυτή, η αναστρέψιμη πρωτεϊνική φωσφορυλίωση από κινάσες και φωσφατάσες είναι ένας θεμελιώδης κυτταρικός ρυθμιστικός μηχανισμός, σημαντικός για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια βασικών κυτταρικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η απόπτωση.

Περίπου, το 15% έως 20% των όγκων του μαστού έχουν υψηλότερα επίπεδα μιας πρωτεΐνης, γνωστής ως HER2. Αυτός ο τύπος καρκίνου ονομάζεται HER2 θετικός καρκίνος του μαστού. Η πρωτεΐνη HER2 είναι μέλος της οικογένειας των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTK), οι οποίοι βοηθούν στον έλεγχο του τρόπου με τον οποίο ένα κύτταρο μαστού αναπτύσσεται, διαιρείται και επιδιορθώνεται. Υπερέκφραση λοιπόν, της πρωτεΐνης HER2 οδηγεί τα κύτταρα σε ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων του.

Τα τελευταία χρόνια η πρωτεΐνη HER2 έχει γίνει σημαντικός βιοδείκτης και στόχος θεραπείας για το 30% περίπου των ασθενών με καρκίνο μαστού. Έχουν εγκριθεί διάφορες θεραπείες που στοχεύουν την πρωτεΐνη HER2, συμπεριλαμβανομένου των μονοκλωνικών αντισωμάτων, των συζευγμάτων αντίσωμα-φάρμακο (ADC) και των μικρομοριακών αναστολέων κινάσης τυροσίνης (TKIs). Οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης μικρού μοριακού βάρους έχουν προσελκύσει την περισσότερη προσοχή και έχει γίνει μια αλματώδης πρόοδος όσον αφορά την ανάπτυξη τέτοιων αναστολέων. Ως τώρα, τέσσερις αναστολείς HER2 έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση: lapatinib, neratinib, pyrotinib, tucatinib. Κατά την εκπόνηση του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, ασχοληθήκαμε με τον αναστολέα tucatinib.

Το tucatinib είναι ένας αναστρέψιμος, χορηγούμενος δια του στόματος αναστολέας κινάσης τυροσίνης (TKI), σε μεγάλο βαθμό εκλεκτικός προς τον τομέα κινάσης HER2, με ελάχιστη αναστολή στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα.

Συνδέεται ανταγωνιστικά στη θέση δέσμευσης του ATP, στην περιοχή κινάσης του HER2, εμποδίζοντας την μεταγωγή της ογκογενούς σηματοδότησης. Το tucatinib εγκρίθηκε από τον FDA των ΗΠΑ τον Απρίλιο του 2020 για τη θεραπεία του HER2 θετικού μεταστατικού καρκίνου του μαστού και έδειξε αποτελεσματικότητα σε προκλινικά μοντέλα ως μονοθεραπεία και σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και τραστοζουμάμπη.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα παρουσιαστεί η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός πρόδρομων ενώσεων προς τη σύνθεση της τελικής επιθυμητής ένωσης tucatinib. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ο θεωρητικός σχεδιασμός ενώσεων, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος tucatinib, με στόχο την αυξημένη εκλεκτικότητα προς τον HER2. Η σύνθεση βασίστηκε στην κατοχυρωθείσα συνθετική πορεία της εταιρείας Seattle Genetics. Επιπροσθέτως, έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της πειραματικής πορείας, με στόχο την αύξηση της απόδοσης και τη μείωση του χρόνου της αντίδρασης, καθώς και στη χρήση οικονομικότερων και φιλικότερων προς το περιβάλλον αντιδραστηρίων. Τα ανάλογα σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο τροποποιώντας επιλεκτικά τη δομή του Tucatinib ώστε να αυξηθεί η ανασταλτική δράση ως απόρροια θεωρητικών πειραμάτων docking. Οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$.

Abstract

The word cancer means crab. The name of the disease is due to Hippocrates (460-377 BC), who was the first to describe the disease, likening it morphologically to the image of a crab. Cancer, then, is defined as a group of more than 100 diseases caused when normal cells in the body begin to divide and multiply uncontrollably, with the possibility of spreading to other parts of the body (metastasis). When the abnormal cells form a mass, it is called a malignant tumor.

Cancer is the second leading cause of death worldwide, accounting for about 9.6 million deaths, or 1 in 6 deaths, in 2018. Breast cancer, which is discussed in this paper, is the most common type of cancer in women, with Greece counting over 5000 new cases every year, and is the 2nd cause of death in women.

Protein kinase is a family of enzymes that catalyzes the transfer of a phosphate group from ATP to a protein or peptide substrate. Reversible protein phosphorylation by kinases and phosphatases is a fundamental cellular regulatory mechanism, important for controlling protein activity during key cellular processes such as cell cycle, cell growth, differentiation, movement, metabolism and apoptosis. The aberrant activation of these enzymes can lead to the uncontrolled cell growth that is typical of cancer.

About 15% to 20% of breast tumors have higher levels of a protein known as HER2. These cancers are called HER2-positive breast cancers. HER2 proteins are receptors on breast cells. HER2 is a member of the receptor tyrosine kinase (RTK) family which help control how a breast cell grows, divides, and repairs itself. So, HER2 protein overexpression, makes breast cells grow and divide in an uncontrolled way.

In recent years HER2 protein has become an important biomarker and target of therapy for approximately 30% of breast cancer patients. A variety of HER2-targeted therapies have been approved, including monoclonal antibodies, antibody-drug conjugates (ADCs), and small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs). More druggable small molecule TKIs have attracted more attention and there has been a leap forward in the development of such inhibitors. Currently, four HER2 inhibitors, Lapatinib, Neratinib, Pyrotinib and Tucatinib, have been approved for clinical use. During the preparation of this master's degree, we dealt with tucatinib, as an inhibitor.

Tucatinib is a reversible, oral tyrosine kinase inhibitor (TKI) highly selective for the kinase domain of HER2, with minimal inhibition of epidermal growth factor receptor. Inhibitors like tucatinib competitively bind to the ATP-binding site of the HER2 kinase domain and thus block the transduction of downstream tumorigenic signaling. Tucatinib was approved by the US FDA in April of 2020 for the treatment of HER2 + metastatic BC, and showed efficacy in preclinical models as monotherapy and in combination with chemotherapy and trastuzumab.

In this thesis, the synthesis and characterization of precursor compounds towards the synthesis of the final desired compound tucatinib will be presented. In parallel, the

theoretical design of compounds, analogues of the pharmaceutical formulation tucatinib, aiming at increased selectivity towards HER2 was carried out. The synthesis was based on the patented synthetic pathway of Seattle Genetics. In addition, an effort was made to optimize the experimental course to increase the yield and reduce the reaction time, as well as to use more economical and environmentally friendly reagents. Analogues were designed in the laboratory by selectively modifying the structure of Tucatinib to increase the inhibitory activity as a consequence of theoretical docking experiments. The compounds were characterized by ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopic techniques.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	1
Abstract	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.2.ΣΚΟΠΟΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	16
2.1. Φωσφορυλίωση	16
2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ	20
2.2.1. ΓΕΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	20
2.2.2 ΔΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	21
2.2.3. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ	23
2.2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ.....	25
2.2.4.1. ΥΠΟΔΟΧΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ.....	26
2.2.4.2. ΜΗ ΥΠΟΔΟΧΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ	28
2.2.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΙΚΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	28
2.2.6. ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	33
3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	33
3.2. ΣΤΑΔΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ.....	34
3.2.1. ΜΕΣΟΦΑΣΗ	34
3.3.2. ΜΙΤΩΣΗ.....	36
3.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ.....	37
3.3.1. ΚΥΚΛΙΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΝΕΣ	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	40
4.1. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	40
4.2. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ErbB.....	43
4.3. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ErbB ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	43
4.4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ.....	44
4.4.1. ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	45
4.4.1.1. ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	45
4.4.2. ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	46
4.5. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ	47
4.6. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	49
4.6.1. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	49

4.6.2. ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ- ΦΑΡΜΑΚΩΝ (ADC)	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	52
5.1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	52
5.2. ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ	55
5.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ 2 ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (Η HER2)	58
5.4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ.....	60
5.5. TUCATINIB (ΤΟΥΚΑΤΙΝΙΜΠΗ)	62
5.5.1. Κυτταρικές, προκλινικές και κλινικές μελέτες του tucatinib και προσεγγίσεις συνδυασμού του tucatinib με άλλους παράγοντες	63
5.6. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ TUCATINIB.....	65
5.6.1. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ARRAY ΒΙΟΦΑΡΜΑ	65
5.6.2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΠΟ ΤΗΝ SEATTLE GENETICS	67
5.6.3. ΜΕΤΑΓΕΝΕΣΤΕΡΕΣ ΝΕΕΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΟΔΟΙ.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	74
6.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ HER2	74
6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ TUCATINIB	74
6.3. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ TUCATINIB ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ HER2.....	79
6.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ DOCKING ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ TUCATINIB	80
6.4.1. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 1.....	80
6.4.2. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 2.....	81
6.4.3. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 3.....	82
6.4.4. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 4.....	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	84
7.1. ΣΥΝΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΤΕΛΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ TUCATINIB.....	84
7.1.1. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (2).....	84
7.1.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (2).....	87
7.1.3. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπυριδινό-2-αμίνη (3).....	90
7.1.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλωροπυριδινό-2-αμίνη (3).....	92
7.1.5. Σύνθεση της ένωσης N'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιο (10)	94
7.1.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης N'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιο (10)	95
7.1.7. Σύνθεση της ένωσης N'-(4-αμινο-2-κυανοφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιο (11)	97
7.1.8. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης N'-(4-αμινο-2-κυανοφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιο (11)	98

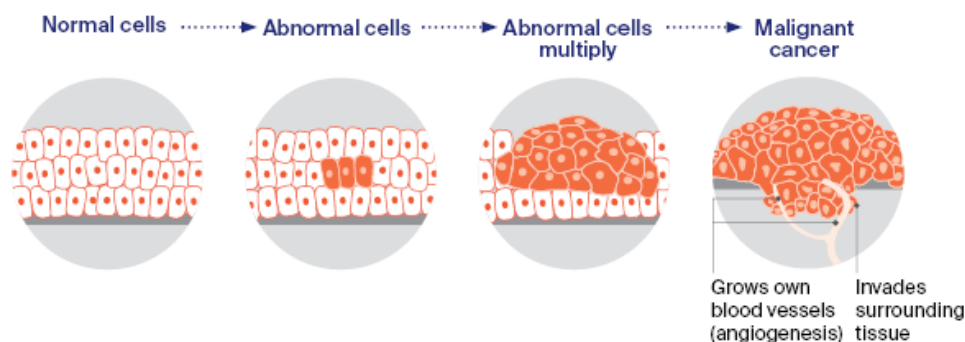
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	100
8.1.ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ.....	100
8.2. Βελτιστοποιημένη σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (2).....	100
8.3. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (2)	102
8.4. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπυριδινό-2-αμίνη (3).....	102
8.5. Σύνθεση της ένωσης Ν'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-Ν,Ν-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιο (10)	103
8.6. Σύνθεση της ένωσης Ν'-(4-αμινο-2-κυανοφαινυλο)-Ν,Ν-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιο (11)	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	105
9.1. Σύνθεση της ένωσης 2-αμινο-4-υδροξυπυριδίνη (4).....	105
9.2. Σύνθεση της ένωσης Ν'-(2-κυανο-4-(3-(1-υδροξυ-2-μεθυλοπροπαν-2- υλ)θειουριδο)φαινυλο)-Ν,Ν-διμεθυλοφορμιμιδαμίο (ένωση 12)	108
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	111

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια των κυττάρων του σώματος.[1] Η βασική ανωμαλία που οδηγεί στην ανάπτυξη του καρκίνου είναι ο συνεχής και ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κυττάρων τα οποία δεν ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στα σήματα που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων.[2] Τα μη φυσιολογικά αυτά κύτταρα έπειτα, μπορούν να σχηματίσουν μια μάζα που ονομάζεται όγκος, και ενδεχομένως να εξαπλωθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε φυσιολογικούς ιστούς και όργανα σχηματίζοντας δευτερογενή καρκίνο ή μετάσταση.[1], [2] Η έλλειψη μηχανισμών ελέγχου του πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί στη συσσώρευση βλαβών στα διάφορα ρυθμιστικά συστήματα των κυττάρων.



Εικόνα 1.1.: Ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων[1]

Η πρώτη καταγεγραμμένη περιγραφή του καρκίνου βρέθηκε σε έναν αιγυπτιακό πάπυρο του 300πΧ. Πιστεύεται ότι ο Ιπποκράτης εισήγαγε τον όρο “καρκίνος”. Λέγεται ότι το σχήμα των όγκων του θύμιζε καβούρι και έτσι χρησιμοποιούσε τις λέξεις “καρκίνωμα” και “καρκίνος” (που σημαίνει “κάβουρας”) για να τους περιγράψει.

Παρόλο που ο καρκίνος υπήρχε σε όλη τη διάρκεια της ιστορίας της ανθρωπότητας, αποτέλεσε κύρια αιτία θανάτου μόνο κατά τον τελευταίο αιώνα. Οι τέσσερις πιο κοινά τύποι καρκίνου, που αποτελούν σχεδόν τις μισές περιπτώσεις καρκίνου, είναι του μαστού, των πνευμόνων, του προστάτη και του παχέος εντέρου. Ο καρκίνος των πνευμόνων, ο πλέον θανατηφόρος τύπος καρκίνου, ευθύνεται για περισσότερο από το 25% περίπου των θανάτων από καρκίνο.[2]

Στοιχεία αποδεικνύουν ότι ο αριθμός των ατόμων παγκοσμίως που διαγιγνώσκονται με καρκίνο έχει αυξηθεί κατά σχεδόν 80% μέσα σε τρεις δεκαετίες.

Τα παγκόσμια κρούσματα καρκίνου αυξήθηκαν από 1,82 εκατομμύρια το 1990 σε 3,26 εκατομμύρια το 2019, ενώ οι θάνατοι από καρκίνο ενηλίκων ηλικίας 40, 30 ετών ή νεότερων αυξήθηκαν κατά 27%.

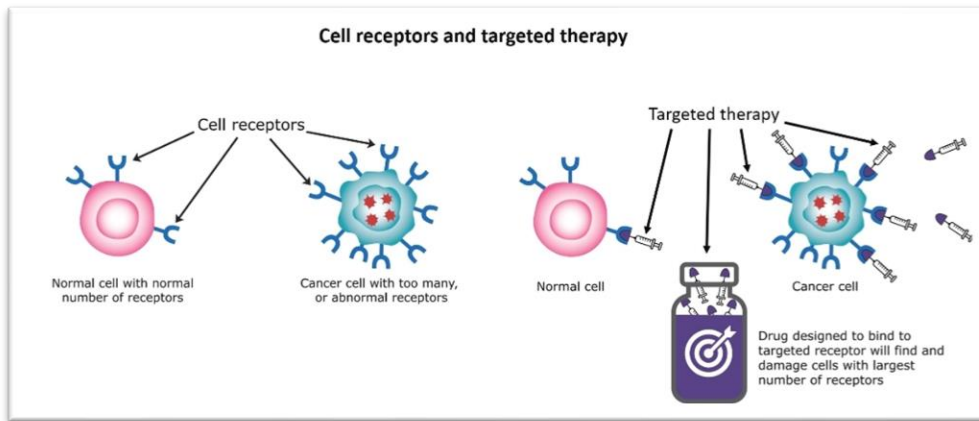
Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης του καρκίνου είναι η πρόληψη, καθώς και η έγκαιρη διάγνωση των προκαρκινικών σταδίων ανάπτυξης του όγκου, κατά τα οποία μπορεί να επιτευχθεί θεραπεία. Πολλοί όγκοι αντιμετωπίζονται επιτυχώς με τοπική θεραπεία όπως εγχείρηση ή ακτινοβολία, προτού όμως εξαπλωθούν σε όλο το σώμα με μεταστάσεις.[3]

Όσον αφορά άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις, τα περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου είτε προκαλούν βλάβες στο DNA, είτε εμποδίζουν την αντιγραφή του, με αποτέλεσμα να είναι τοξικά τόσο προς τα καρκινικά κύτταρα όσο και ως προς τα φυσιολογικά. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μη ειδική τοξικότητα αυτών των φαρμάκων, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία κατά του καρκίνου. [2]

Εναλλακτική θεραπεία του καρκίνου αποτελεί η χρήση φαρμάκων που, αντί να επιδρούν άμεσα στα καρκινικά κύτταρα, επικεντρώνεται στις γενετικές αλλαγές ή μεταλλάξεις που μετατρέπουν τα υγιή κύτταρα σε καρκινικά, χωρίς τα υγιή να βλάπτονται.[4] Αυτή αποτελεί την στοχευμένη θεραπεία, η οποία είναι ένα είδος θεραπείας του καρκίνου που στοχεύει πρωτεΐνες που ελέγχουν τον τρόπο με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται, διαιρούνται και εξαπλώνονται. Καθώς οι ερευνητές μαθαίνουν περισσότερα για τις αλλαγές στο DNA και τις πρωτεΐνες που προκαλούν καρκίνο, είναι σε θέση να σχεδιάζουν καλύτερα θεραπείες που στοχεύουν τις πρωτεΐνες αυτές.

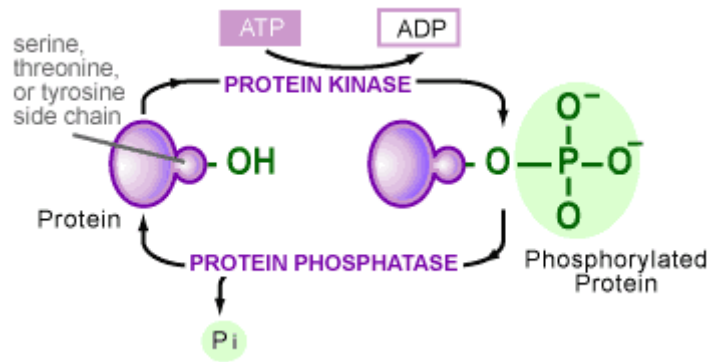
Οι περισσότερες στοχευμένες θεραπείες χορηγούνται είτε ως φάρμακα μορίων μικρού μοριακού βάρους (χάπια ή κάψουλες) είτε ως μονοκλωνικά αντισώματα, ενδοφλέβια. [5]

Η παρούσα εργασία λοιπόν, εστιάζει στη χρήση μορίων μικρού μοριακού βάρους που αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες και πρόκειται για αναστολείς μεταγωγής σήματος, οι οποίοι διαταράσσουν το σύστημα μηνυμάτων των καρκινικών κυττάρων για ανάπτυξη και επιβίωση. Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν έναν υποδοχέα πρωτεΐνης που ονομάζεται υποδοχέας σηματοδότησης για να στείλουν μηνύματα σε άλλες πρωτεΐνες μέσα στο κύτταρο. Οι πρωτεΐνες αυτές με τη σειρά τους, λαμβάνουν οδηγίες σχετικά με τη διαίρεση, το θάνατο και άλλα βήματα που εμπλέκονται με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό. [4]



Εικόνα 1.2.: Στοχευμένη θεραπεία καρκίνου.[4]

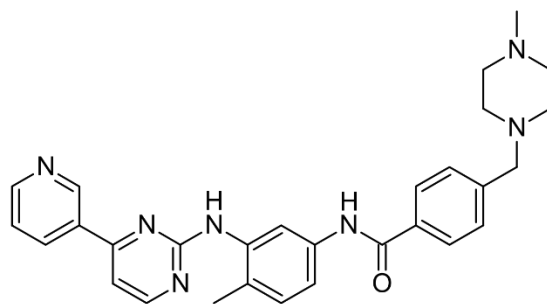
Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων που καταλύουν τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών.[6] Η φωσφορυλίωση είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία μετα-μεταφραστικής τροποποίησης που εξαρτάται εξ ολοκλήρου από την δράση των πρωτεϊνικών κινασών (PTKs). Οι PTKs του ανθρώπινου γονιδιώματος συμμετέχουν στη φωσφορυλίωση προσθέτοντας μια φωσφορική ομάδα (PO_4^-) στην πολική ομάδα R διαφόρων τύπων αμινοξέων. Η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας σε αυτή τη θέση προκαλεί το γεγονός ότι η προηγουμένως υδρόφοβη άπολη πρωτεΐνη γίνεται πλέον υδρόφιλη και πολική. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι κρίσιμη για πολλές φυσιολογικές διεργασίες που ρυθμίζουν το καρδιαγγειακό, το γαστρεντερικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και για τη ρύθμιση πολλών κυτταρικών διεργασιών, όπως ο κυτταρικός κύκλος, ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η απόπτωση και τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος.[7] Οι απορρυθμισμένες πρωτεϊνικές κινάσες είναι ζωτικής σημασίας για την προώθηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων και την καθοδήγηση της σηματοδότησης των κακοήθων κυττάρων.[8] Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους οι κινάσες μπορούν να εμπλακούν σε καρκίνους: λανθασμένη έκφραση ή/και ενίσχυση, ανώμαλη φωσφορυλίωση, μετάλλαξη, χρωμοσωμική μετατόπιση και επιγενετική ρύθμιση. [7] Έτσι λοιπόν οι κινάσες αποτελούν ουσιαστικούς στόχους για τη θεραπεία του καρκίνου λόγω της συμμετοχής τους στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, με αποτέλεσμα περισσότερα από 150 φάρμακα να βρίσκονται σήμερα σε κλινικές δοκιμές και περισσότερα από 30 να έχουν ήδη εγκριθεί για θεραπείες καρκίνου.[9]



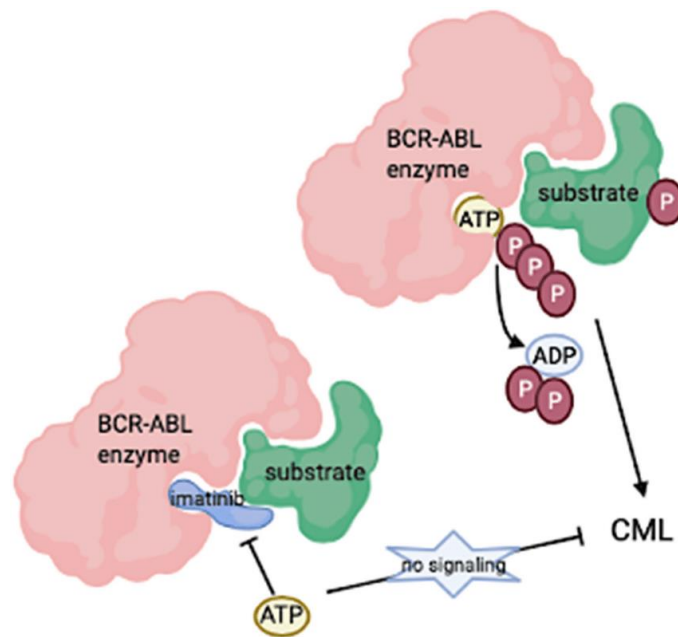
Εικόνα 1.3.: Προσθήκη φωσφορικής ομάδας σε αμινοξύ.[10]

Οι περισσότεροι αναστολείς συνδέονται με τη θέση δέσμευσης του μορίου ATP των ενζύμων-στόχων τους και επεκτείνονται σε κοντινούς υδρόφοβους θύλακες.[11]

Το imatinib είναι αντικαρκινικό φάρμακο που χρησιμοποιείται κυρίως στη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (ΧΜΛ). Ήταν ο πρώτος αναστολέας που εγκρίθηκε από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων το 2001 με την εμπορική ονομασία Gleevec για τη θεραπεία της ΧΜΛ. Τον επόμενο χρόνο εγκρίθηκε για τη θεραπεία προχωρημένων γαστρεντερικών όγκων (GIST), οι οποίοι είναι σπάνιοι καρκίνοι που προσβάλλουν τα διάμεσα κύτταρα που ρυθμίζουν την αυτόνομη νευρική λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα. Σε εξέλιξη βρίσκονται κλινικές δοκιμές που διερευνούν την αποτελεσματικότητα του imatinib έναντι άλλων τύπων καρκίνου. Η επιτυχία του imatinib κλινικά αποτέλεσε σημαντικό ορόσημο για την πρόοδο της θεραπείας του καρκίνου, καθώς κατέδειξε ότι οι στοχευμένες θεραπείες μπορούν να είναι πιο αποτελεσματικές και ασφαλείς από τους παραδοσιακούς μη επιλεκτικούς αντικαρκινικούς παράγοντες. Το imatinib αναστέλλει την πρωτεϊνική κινάση BCR-Abl, το οποίο εμφανίζεται μόνο σε κύτταρα ΧΜΛ που φέρουν ένα γενετικό ελάττωμα γνωστό ως χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας. [12]



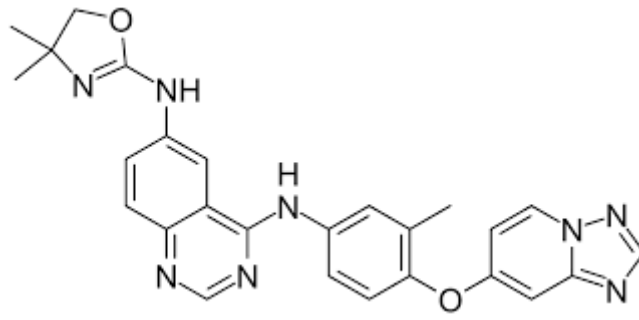
Εικόνα 1.4.: Δομή του Imatinib.



Εικόνα 1.5.: Μηχανισμός δράσης του Imatinib. Το Imatinib δεσμεύεται στη θέση πρόσδεσης του ATP της BCR-ABL και αποτρέπει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης τυροσίνης, αναστέλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης. [13]

Ένας από τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινάσων που αναπτύχθηκε πρόσφατα, είναι και το Tucatinib. Το Tucatinib είναι μια ένωση μικρού μοριακού βάρους και αποτελεί έναν εκλεκτικό αναστολέα της κινάσης της τυροσίνης που στοχεύει τον υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2) και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλους αντισεπλασματικούς παράγοντες στη θεραπεία του ανθεκτικού, προχωρημένου ή μεταστατικού HER2 θετικού καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του HER2 και του HER3 και τη μεταγωγή σήματος μέσω των μονοπατιών MAPK και PI3K.

Το tucatinib σε συνδυασμό με την τραστοζουμάμπη και την καπεσιταβίνη αναπτύχθηκε από την Settle Genetics και έλαβε επιταχυνόμενη έγκριση στις Ηνωμένες Πολιτείες το 2020 για ενήλικες με προχωρημένο ή μεταστατικό HER2 θετικό καρκίνο του μαστού μετά από αποτυχία προηγούμενων αντι-HER2-βασισμένων σχημάτων. [14]

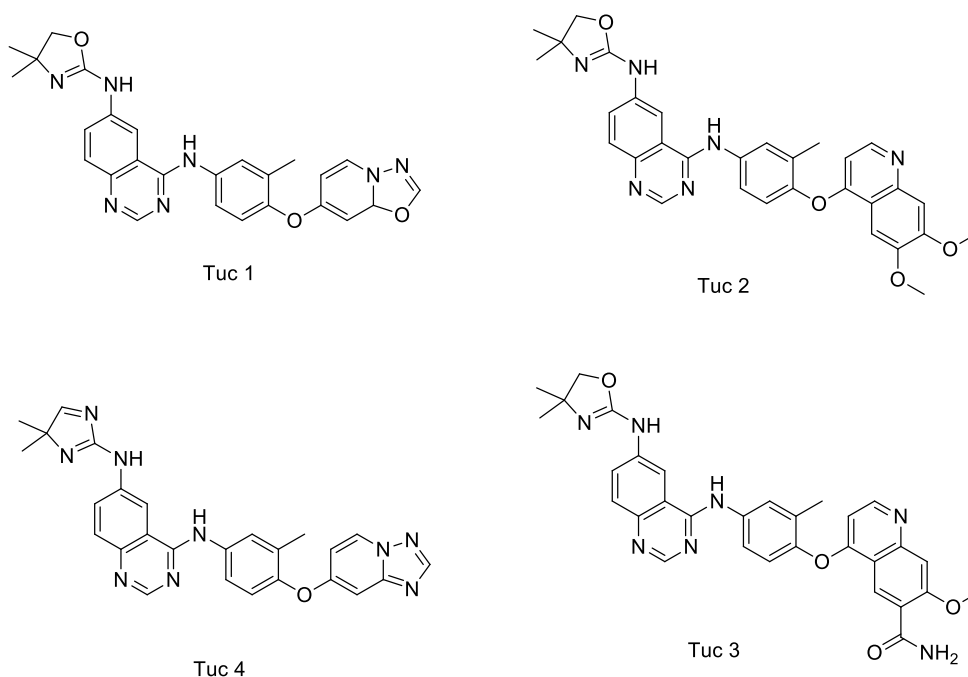


Εικόνα 1.6.: Δομή του *Tucatinib*.

1.2.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι αρχικά η σύνθεση του tucatinib στο εργαστήριο και έπειτα ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση ενώσεων αναλόγων του tucatinib, ως εν δυνάμει αναστολέων των πρωτεϊνικών κινάσων HER2 και HER3, με σκοπό την αύξηση της δραστηριότητας σε σύγκριση με το υφιστάμενο φάρμακο. Διενεργήθηκε μοριακός σχεδιασμός μέσω προγραμμάτων docking, με βάση το ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης HER2. Για τη μοριακή μοντελοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Autodock Vina και το UCSF Chimera. Κύριος στόχος των αλλαγών που πραγματοποιήθηκαν είναι ο σχηματισμός ισχυρότερων διομοριακών αλληλεπιδράσεων των εν δυνάμει αναστολέων με το ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης.

Επιπρόσθετα, έγιναν προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση της ολικής συνθετικής πορείας που προτείνεται από την εταιρεία Settle Genetics. Πιο συγκεκριμένα, στόχο μας αποτέλεσε η μείωση των σταδίων της συνθετικής πορείας του Tucatinib, καθώς και η εξοικονόμηση αντιδραστηρίων αλλά και χρόνου.



Εικόνα 1.7.: Σχεδιασθέντα ανάλογα του Tucatinib, ως απόρροια πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφορυλίωση

2.1. Φωσφορυλίωση

Ήδη από τον 19ο αιώνα ήταν γνωστό ότι τα φωσφορικά άλατα έχουν την ικανότητα να συνδέονται με πρωτεΐνες. Τα περισσότερα παραδείγματα αυτών των «φωσφοπρωτεϊνών» βρέθηκαν στο γάλα (καζεΐνες) και στον κρόκο του αυγού (φωσβιτίνη) και θεωρήθηκαν απλώς μια βιολογική μέθοδος παροχής φωσφόρου ως θρεπτικό συστατικό. Ως εκ τούτου, η ύπαρξη των φωσφοπρωτεϊνών θεωρήθηκε συνέπεια μεταβολικών αντιδράσεων και τίποτε περισσότερο, για σχεδόν έναν αιώνα μετά την ανακάλυψή τους.[15]

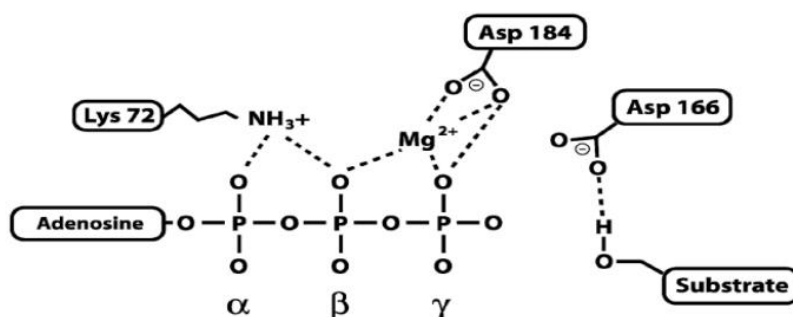
Τη δεκαετία του 1950 ωστόσο, οι φωσφοπρωτεΐνες άρχισαν να αναδεικνύονται ως βασικοί ρυθμιστές της κυτταρικής ζωής. Αφορμή γι' αυτό στάθηκε το 1954, η παρατήρηση μιας ενζυμικής δραστηριότητας που μετέφερε ένα φωσφορικό άλας σε μια άλλη πρωτεΐνη - μια βιολογική αντίδραση που ονομάζεται φωσφορυλίωση. Η υπεύθυνη πρωτεΐνη ήταν ένα ηπατικό ένζυμο που καταλύει τη φωσφορυλίωση της καζεΐνης και έγινε γνωστή ως πρωτεϊνική κινάση, η πρώτη του είδους της που ανακαλύφθηκε. Ένα χρόνο αργότερα, ο ρόλος της φωσφορυλίωσης έγινε πιο ενδιαφέρων καθώς οι Fischer και Krebs, και οι Wosilait και Sutherland⁴, έδειξαν ότι ένα ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του γλυκογόνου ρυθμιζόταν με την προσθήκη ή την αφαίρεση ενός φωσφορικού άλατος, υποδηλώνοντας ότι η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση θα μπορούσε να ελέγχει τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η ιδέα αυτή αποδείχθηκε αργότερα ότι ήταν αληθινή και έχει πλέον εισχωρήσει σε κάθε σχεδόν πτυχή της κυτταρικής βιολογίας.[10]

Η αναστρέψιμη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, κυρίως σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης, είναι μία από τις πιο σημαντικές και καλά μελετημένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTM). Η φωσφορυλίωση διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση τόσο της λειτουργίας των πρωτεϊνών όσο και πολλών κυτταρικών διεργασιών, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η ανάπτυξη, η απόπτωση και τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Αν και η φωσφορυλίωση έχει παρατηρηθεί σε βακτηριακές πρωτεΐνες, είναι περισσότερο διαδεδομένη στα ευκαρυωτικά κύτταρα, με το ένα τρίτο των πρωτεϊνών του ανθρώπινου πρωτεώματος αποτελούν υποστρώματα φωσφορυλίωσης.

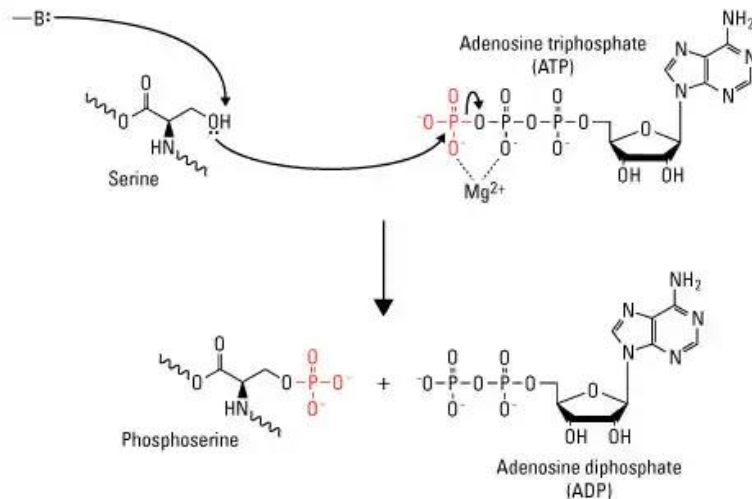
Παρόλο που η φωσφορυλίωση είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμβαίνει μόνο στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων, σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη, στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτά τα αμινοξέα διαθέτουν μια πυρηνόφιλη υδροξυλομάδα (-OH) που προσβάλλει την τελική φωσφορική ομάδα ($\gamma\text{-PO}_3^{2-}$) στον καθολικό δότη φωσφορικής ομάδας, τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), με αποτέλεσμα τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας στην πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος. Η μεταφορά αυτή διευκολύνεται από το μαγνήσιο (Mg^{2+}), το οποίο χηλικοποιεί τις γ - και β -φωσφορικές ομάδες. Η

αντίδραση αυτή είναι μονόδρομη λόγω της μεγάλης ποσότητας ελεύθερης ενέργειας που απελευθερώνεται όταν διασπάται ο δεσμός φωσφορικού-φωσφορικού άλατος στο ATP για να σχηματιστεί διφωσφορική αδενοσίνη (ADP).[16] Στοιχεία κλειδιά αυτής της αντίδρασης είναι:

- Όξινα αμινοξέα (Asp, Glu), τα οποία απαιτούνται για τη μεταβατική κατάσταση και την ενεργοποίηση της υδροξυλομάδας του αμινοξέος δέκτη για την πυρηνόφιλη προσβολή στην γ-φωσφορική ομάδα.
- Ένα ή δύο μεταλλικά ιόντα που συντονίζουν τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP και βοηθούν να στερεωθεί το ATP, καθώς και να σταθεροποιηθούν τα αρνητικά φορτία στη μεταβατική κατάσταση.
- Βασικά αμινοξέα (Arg, Lys, His) που χρησιμεύουν στη σταθεροποίηση των αρνητικών φορτίων στη μεταβατική κατάσταση.[17]

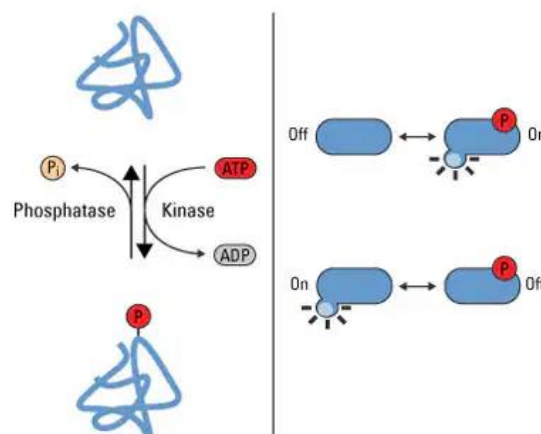


Εικόνα 2.1: Διαγραμματική απεικόνιση των καταλοίπων που συμμετέχουν στη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας. Το Asp184 αλληλεπιδρά με το Mg^{2+} , το οποίο είναι υπεύθυνο για τον σωστό προσανατολισμό της γ-φωσφορικής ομάδας και την κάλυψη του φορτίου της ώστε να μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις που θα δεχτεί το υδροξύλιο του υποστρώματος. Η Lys72 διευκολύνει τη μεταφορά και σταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις με τις α και β φωσφορικές ομάδες του ATP. Το Asp166 βοηθάει στην σωστή τοποθέτηση του υδροξυλίου της πρωτεΐνης-υποστρώματος, μέσω της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου.[18]



Εικόνα 2.2.: Διάγραμμα της φωσφορυλίωσης της σερίνης. Η ενζυμικά καταλυόμενη μεταφορά πρωτονίων από την ομάδα (-OH) της σερίνης διεγείρει την πυρηνόφιλη προσβολή της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP, με αποτέλεσμα τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας στη σερίνη για το σχηματισμό φωσφοσερίνης και ADP. Το (-B:) υποδεικνύει τη βάση του ενζύμου που ξεκινά τη μεταφορά πρωτονίων.[16]

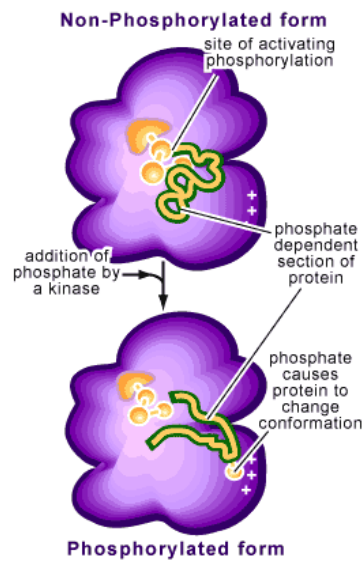
Κατά τη φωσφορυλίωση προκαλούνται αλλαγές στη διαμόρφωση της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να επηρεάσουν την πρωτεΐνη με δύο τρόπους. Πρώτον, οι αλλαγές διαμόρφωσης ρυθμίζουν την καταλυτική δραστηριότητα της πρωτεΐνης, συνεπώς μια πρωτεΐνη μπορεί είτε να ενεργοποιηθεί είτε να απενεργοποιηθεί με τη φωσφορυλίωση. Δεύτερον, οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες στρατολογούν γειτονικές πρωτεΐνες οι οποίες διαθέτουν δομικά συντηρημένες περιοχές που αναγνωρίζουν και προσδένονται στις φωσφορυλιωμένες. Η ικανότητα αυτή των φωσφοροπρωτεϊνών να προσδένονται με άλλες πρωτεΐνες είναι κρίσιμη για τη μεταγωγή σήματος.[16]



Εικόνα 2.3.: Αριστερά, οι πρωτεϊνικές κινάσες μεσολαβούν στην αντίδραση φωσφορυλίωσης και οι φωσφατάσες αναστρέφουν τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών υδρoλύοντας τη φωσφορική ομάδα. **Δεξιά,** η φωσφορυλίωση προκαλεί

αλλαγές διαμόρφωσης στις πρωτεΐνες που είτε ενεργοποιούν (πάνω) είτε αδρανοποιούν (κάτω) τη λειτουργία των πρωτεϊνών.

Η αντιστρεπτή αντίδραση της φωσφορυλίωσης ονομάζεται αποφωσφορυλίωση. Η πρωτεΐνη επανέρχεται στην αρχική της διαμόρφωση όταν απομακρυνθεί ο φώσφορος. Εάν αυτές οι δύο διαμορφώσεις παρέχουν στην πρωτεΐνη διαφορετικές δραστηριότητες (δηλαδή είναι ενζυμικά ενεργή στη μία διαμόρφωση αλλά όχι στην άλλη), η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης θα λειτουργήσει ως μοριακός διακόπτης, ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας τη δραστηριότητα. [10]



Εικόνα 2.4.: Αλλαγές στη διαμόρφωση που προκαλούνται από τη φωσφορυλίωση. [10]

2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες παίζουν σημαντικό ρόλο σχεδόν σε κάθε πτυχή της κυτταρικής λειτουργίας. Συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, στη λειτουργία του νευρικού συστήματος, και ελέγχουν το μεταβολισμό, τη μεταγραφή, την κυτταρική διαίρεση και κίνηση, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, καθώς και τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος μέσω της φωσφορυλίωσης. Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη δράση των πρωτεϊνικών κινασών και των φωσφοπρωτεϊνικών φωσφατασών που καθιστούν τη φωσφορυλίωση-αποφωσφορυλίωση μια συνολικά αναστρέψιμη διαδικασία. Επιπλέον, η απορρύθμιση των πρωτεϊνικών κινασών εμφανίζεται σε πολλές ασθένειες συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των φλεγμονωδών διαταραχών.[19]

Ο Manning και η ομάδα του ανέφεραν ότι η οικογένεια γονιδίων της ανθρώπινης πρωτεϊνικής κινάσης αποτελείται από 518 μέλη μαζί με 106 ψευδογονίδια. Η οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών είναι η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια ενζύμων και η πέμπτη μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων στον άνθρωπο. Η χρωμοσωμική χαρτογράφηση αποκάλυψε ότι 244 από τα 518 γονίδια πρωτεϊνικών κινασών σχετίζονται με ασθένειες, όπως ο καρκίνος, αποτέλεσμα που υπογραμμίζει περαιτέρω τη σημασία των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ως δυνητικών φαρμακευτικών στόχων. [11]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την ακόλουθη αντίδραση:[9]



Για την αντίδραση απαιτείται ένα δισθενές κατιόν όπως το Mg^{2+} , το οποίο είναι σε μεγάλη συγκέντρωση στα κύτταρα. [11]

Από τις ποικίλες πρωτεϊνικές κινάσες, οι κινάσες Ser/Thr και Tyr έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα. Η σερίνη και η θρεονίνη περιέχουν μια αλκοολική πλευρική αλυσίδα, ενώ η τυροσίνη περιέχει φαινολική πλευρική αλυσίδα. Με βάση την φύση της φωσφορυλιωμένης ομάδας -OH (αλκοόλη ή φαινόλη), οι εν λόγω πρωτεΐνες ταξινομούνται ως κινάσες πρωτεΐνης-σερίνης/θρεονίνης (385 μέλη), κινάσες πρωτεΐνης-τυροσίνης (90 μέλη) και πρωτεΐνες που μοιάζουν με τυροσινικές κινάσες (43 μέλη). Από τις 90 πρωτεϊνικές τυροσινικές κινάσες, 58 είναι πρωτεΐνες-υποδοχείς και 32 μη υποδοχείς.[19]

2.2.1. ΓΕΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή ήταν η κινάση Ser/Thr της φωσφορυλάσης του μυός το 1959 από τον Edwin Gerhard Krebs. Ακολούθησε, η ανακάλυψη των κινασών Tyr από τον Ray Erikson, το 1978, στις οποίες αποδόθηκε σύντομα μια κεντρική λειτουργία στις διαδικασίες της ανάπτυξης

και διαφοροποίησης. Επιπλέον, είναι γνωστές και πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν άλλα αμινοξέα, όπως His και Asp/Glu, οι οποίες συναντώνται κυρίως στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και έχουν μικρή σημασία στη σηματοδότηση των ευκαρυωτικών οργανισμών.

Με βάση τη φύση των αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν, οι κινάσες μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες:

- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr** δημιουργούν έναν φωσφορικό εστέρα με την αλκοολική υδροξυλομάδα R-OH των καταλοίπων Ser και Thr.
- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες Tyr** δημιουργούν έναν φωσφορικό εστέρα με τη φαινολική υδροξυλομάδα OH των καταλοίπων Tyr.
- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες His** δημιουργούν ένα φωσφορικό αμίδιο με το N της 1ης ή 3ης θέσης της His (R-CO-NH₂). Τα μέλη αυτής της οικογένειας ενζύμων φωσφορυλιώνουν, επίσης, κατάλοιπα Lys και Arg/Glu.
- Οι **πρωτεϊνικές κινάσες Asp** δημιουργούν έναν μεικτό φωσφορικό-καρβοξυλικό ανυδρίτη. [17]

2.2.2 ΔΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Η δομή των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών αποτελείται από μη συντηρημένες ρυθμιστικές περιοχές και μια καλά διατηρημένη καταλυτική περιοχή που συγκροτείται από περίπου 250 αμινοξέα. [20] Η καταλυτική περιοχή (πυρήνας) όλων των κινασών Ser/Thr και Tyr, χαρακτηρίζεται από μια κοινή διαμόρφωση και έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα υποστρώματα και να είναι υπεύθυνη για την κατάλυση της φωσφορυλίωσης. [17] [20] Η ανάλυση της αλληλουχίας της καταλυτικής περιοχής, αποκάλυψε την ύπαρξη 12 διατηρημένων υποομάδων, αναφερομένων με λατινικούς αριθμούς I-XI. [21] Η δομή του πυρήνα λοιπόν, περιλαμβάνει έναν μικρό και έναν μεγάλο λοβό (lobe) με το ενεργό κέντρο να σχηματίζεται στη σχισμή ανάμεσα στους δύο λοβούς. Οι δύο λοβοί συνδέονται με μια εύκαμπτη περιοχή (hinge region). Ο μικρός N-τελικός λοβός αποτελείται από πέντε β-κλώνους και μια α-έλικα, που ονομάζεται αC-έλικα. Αντιθέτως, ο μεγαλύτερος C-τελικός λοβός αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Περιλαμβάνει 4 δεσμίδες α-ελίκων, επιπλέον α-έλικες και δύο μικρούς β-κλώνους. Ο N-λοβός περιέχει τη θέση σύνδεσης για το ATP και ο C-λοβός τα καταλυτικά κατάλοιπα και μια επιφάνεια αγκυροβόλιο για το πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Το άνοιγμα και το κλείσιμο της σχισμής του ενεργού κέντρου είναι βασικό βήμα της κατάλυσης. Τα παρακάτω δομικά στοιχεία έχουν βρεθεί να παίζουν κύριο ρόλο στη διαδικασία της κατάλυσης και στη ρύθμιση των κινασών:

- **Βρόχος πλούσιος σε Gly, στον N-λοβό.** Αυτός ο βρόχος (ονομάζεται P-βρόχος) και απαιτείται για την αγκυροβόληση των φωσφορικών ομάδων του ATP.
- **αC-έλικα στον N-λοβό.** Στην ενεργή διαμόρφωση των πρωτεϊνικών κινασών το κατάλοιπο Glu91 της αC-έλικας δημιουργεί μια γέφυρα άλατος (salt

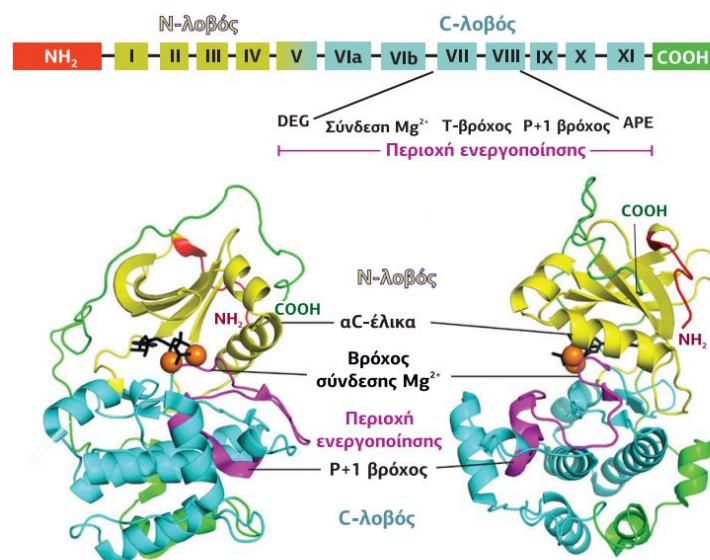
bridge) για τον ευνοϊκότερο προσανατολισμό των φωσφορικών ομάδων του ATP.

- **Καταλυτικός βρόχος.** Ο καταλυτικός βρόχος βρίσκεται στη βάση του ενεργού κέντρου και περιέχει ένα καλά συντηρημένο Asp166, το οποίο θεωρείται ως το καταλυτικό αμινοξύ. [17]
- **Περιοχή ενεργοποίησης (Activation segment).** Είναι αρκετά διατηρημένη, και χαρακτηρίζεται από δυο πεπτιδικά μοτίβα τα οποία είναι γνωστά ως DFG (Asp-Phe-Gly) και APE (Ala-Pro-Glu) μέσα στον μεγάλο λοβό και περιλαμβάνει 20-35 αμινοξέα.[22] Η περιοχή ενεργοποίησης αποτελείται από:

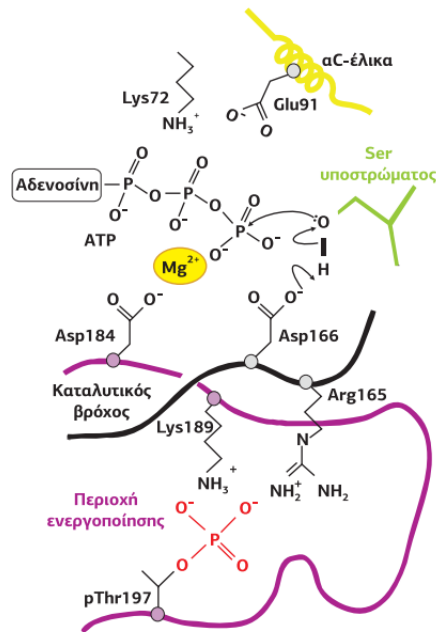
A. Τον βρόχο όπου συνδέεται το Mg^{2+} .

B. Τον βρόχο ενεργοποίησης (activation loop). Εμφανίζει μεγάλη δομική ποικιλομορφία και πλαστικότητα διαμόρφωσης και είναι ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία ρύθμισης της δραστηριότητας των κινασών. Στην ανοικτή διαμόρφωση, ο βρόχος ενεργοποίησης είναι στραμμένος μακριά από το ενεργό κέντρο του μορίου, επιτρέποντας τη δέσμευση του ATP. Στην κλειστή διαμόρφωση, ο βρόχος ενεργοποίησης καλύπτει το ενεργό κέντρο της κινάσης, με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή της.[23]

Γ. Τον P+1 βρόχο που συμμετέχει στη σύνδεση του υποστρώματος.[17]



Εικόνα 2.5.: Η καταλυτική περιοχή των πρωτεϊνικών κινασών έχει δομή δύο λοβών. [17]



Εικόνα 2.6.: Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων αλληλεπιδράσεων στην περιοχή ενεργοποίησης και στον καταλυτικό βρόχο της κινάσης PKA. Η καρβοξυλομάδα του Asp166 λειτουργεί ως βάση και ενεργοποιεί την Ser-OH (του υποστρώματος) για μια πυρηνόφιλη προσβολή στη γ-φωσφορική ομάδα του ATP. Η φωσφορυλίωση της Thr197 είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης. Η pThr197 δημιουργεί έναν δεσμό υδρογόνου με την Arg165 σταθεροποιώντας την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου. [24]

2.2.3. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΣΕΡΙΝΗΣ/ΘΡΕΟΝΙΝΗΣ

Οι 385 από τις 518 έως τώρα ανακαλυφθείσες πρωτεϊνικές κινάσες υπάγονται στην κατηγορία των κινασών σερίνης/θρεονίνης [25]. Οι πρωτεϊνικές αυτές κινάσες εξαιτίας της πολυπλοκότητας και του αριθμού των υποοικογενειών παρουσιάζονται παρακάτω μόνο επιλεγμένες υποοικογένειες των πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr στα σπονδυλωτά.

1. Πρωτεϊνικές κινάσες AGC

- Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από κυκλικά νουκλεοτίδια: PKA, PKG
- Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από τη DAG / Ca²⁺: PKC (10 ισομορφές
- PKB / Akt κινάση

2. Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από Ca²⁺/καλμοδουλίνη

Εξειδικευμένες ως προς το υπόστρωμά τους

- Κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου
- Κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK)
- Κινάση του eEF2 (eEF2K), γνωστή και ως CaMK-III

Πολυλειτουργικές

- Πρωτεϊνική κινάση I εξαρτώμενη από Ca²⁺/καλμοδουλίνη (CAMK-I)
- Πρωτεϊνική κινάση II εξαρτώμενη από Ca²⁺/καλμοδουλίνη (CAMK-II)
- Πρωτεϊνική κινάση IV εξαρτώμενη από Ca²⁺/καλμοδουλίνη (CAMK-IV)

3. Πρωτεϊνική κινάση της S6 ριβοσωμικής υπομονάδας (S6K)

4. Κινάσες των GPCRs (GRKs)

- Κινάση του β-αδρενεργικού υποδοχέα (βARK)
- Κινάση της ροδοψίνης (RhK ή GRK1)

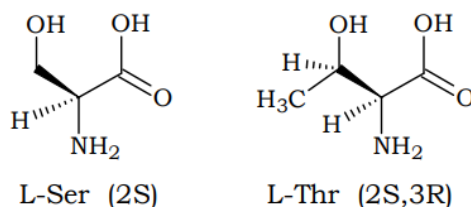
5. Κινάση II της καζεΐνης (CK2)

6. Κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου

7. Κινάσες CDKs (κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, τα κεντρικά στοιχεία της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου)

Εικόνα 2.7.: Υποοικογένειες των πρωτεϊνικών κινασών Ser/Thr [17]

Οι πρωτεϊνικές αυτές κινάσες πήραν το όνομα τους από τα κατάλοιπα των αμινοξέων που φωσφορυλιώνουν. Τα δύο αυτά αμινοξέα, η σερίνη και η θρεονίνη, έχουν παρόμοιες πλευρικές αλυσίδες, συνεπώς δεν υφίσταται διάκριση μεταξύ τους.[26] 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.[27] 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.



Εικόνα 2.8.: Δομή αμινοξέων σερίνη και θρεονίνη.

Οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης μπορούν να λειτουργούν ως υποδοχείς ή ως ενδοκυττάρια πεπτίδια/πρωτεΐνες διαβίβασης σήματος, με αποτέλεσμα να παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), της κυτταρικής διαφοροποίησης και της εμβρυϊκής ανάπτυξης, και να εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνων.[25]

2.2.4. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Οι τυροσινικές κινάσες έχουν μελετηθεί σε βάθος ως κύρια στοιχεία σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη διαδικασία μεταγωγής σήματος, και επομένως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση, το μεταβολισμό και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.[28] Η πρώτη κινάση τυροσίνης ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια μελετών που αφορούσαν την ογκογόνο πρωτεΐνη του ιού του σαρκώματος του Rous, γεγονός που συνέδεσε με άμεσο τρόπο τη φωσφορυλίωση τυροσίνης με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.[2] Οι κινάσες τυροσίνης είναι μια οικογένεια ενζύμων, η οποία καταλύει τη φωσφορυλίωση επιλεγμένων καταλοίπων τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, χρησιμοποιώντας ATP. Αυτή η ομοιοπολική μετα-μεταφραστική τροποποίηση αποτελεί κεντρικό συστατικό της φυσιολογικής κυτταρικής επικοινωνίας και της διατήρησης της ομοιόστασης. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της κινάσης τυροσίνης συνήθως αποτρέπουν τον απορρυθμισμένο πολλαπλασιασμό ή συμβάλλουν στην ευαισθησία έναντι αποπτωτικών ερεθισμάτων. Αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης συχνά τροποποιούνται γενετικά ή επιγενετικά στα καρκινικά κύτταρα για να προσδώσουν πλεονέκτημα επιλογής στα καρκινικά κύτταρα.[28]

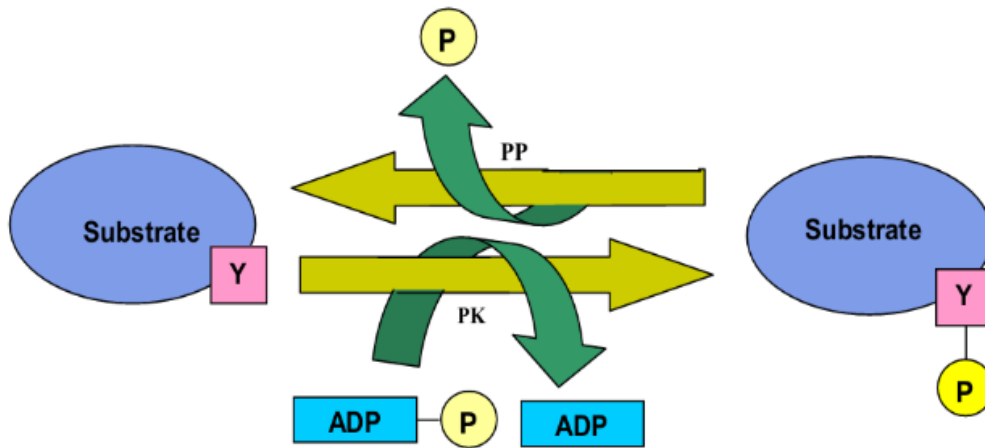
Με την αποκρυπτογράφηση του Προγράμματος Ανθρώπινου Γονιδιώματος ανακαλύφθηκαν περισσότερες από 90 κινάσες τυροσίνης.

Η σπουδαιότητα των κινάσων τυροσίνης στη μεταγωγή του σήματος έγκειται στο ότι μπορούν να δρουν:

α) Ως κυτταροπλασματικές κινάσες, ρυθμίζοντας μέσω φωσφορυλίωσης τη δραστηριότητα άλλων πρωτεϊνών. Από τις 90 γνωστές κινάσες τυροσίνης που κωδικοποιεί το ανθρώπινο γονιδίωμα, οι 32 ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία

β) Ως κινάσες με ρόλο διαμεμβρανικών υποδοχέων (RTKs). Οι υπόλοιπες 58 κινάσες τυροσίνης εμπίπτουν στην κατηγορία των RTKs και ταξινομούνται σε 20 υποοικογένειες.[25]

Η κινάση τυροσίνης υποδοχέα λειτουργεί στη διαμεμβρανική σηματοδότηση, ενώ η κινάση τυροσίνης μη υποδοχέα εντός του κυττάρου λειτουργεί στη μεταγωγή σήματος προς τον πυρήνα. Η δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης στον πυρήνα περιλαμβάνει τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και τις ιδιότητες των μεταγραφικών παραγόντων.[29]

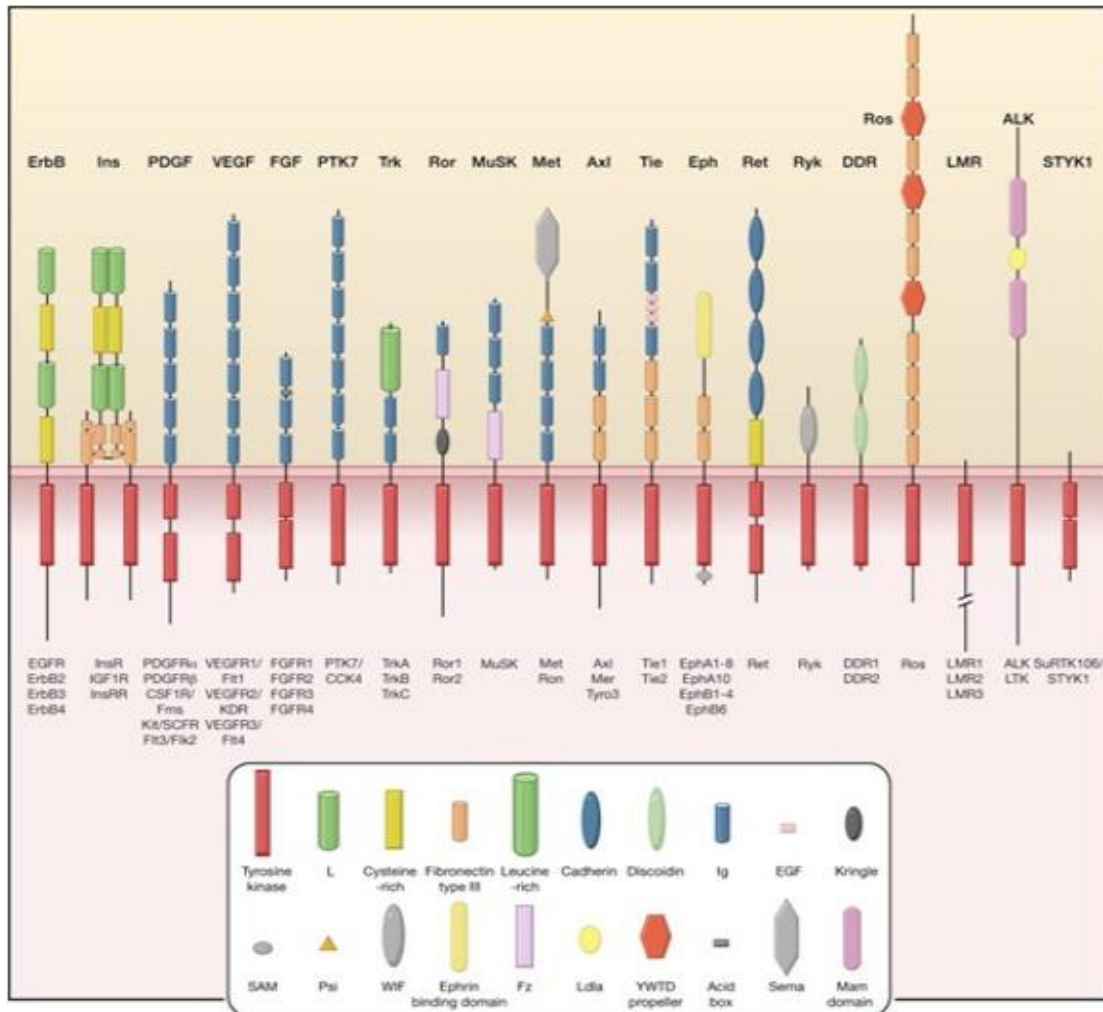


Εικόνα 2.9.: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας της κινάσης τυροσίνης.[29]

2.2.4.1. ΥΠΟΔΟΧΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs) είναι μια ομάδα διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που δρουν ως υποδοχείς για κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες και άλλα μόρια σηματοδότησης.

Οι RTKs αποτελούνται από την οικογένεια υποδοχών του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFRs), την οικογένεια υποδοχών του αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από τα αιμοπετάλια (PDGFRs), την οικογένεια υποδοχών του παράγοντα διέγερσης αποικιών των σαρκοφάγων (MCSFRs), την οικογένεια υποδοχών του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα-1 (IGF1Rs), οικογένεια υποδοχών ινσουλίνης (INSR), οικογένεια υποδοχών του αυξητικού παράγοντα των νεύρων (NGFRs), οικογένεια υποδοχών του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFRs), οικογένεια υποδοχών του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFRs) και οικογένεια υποδοχών του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGFRs). [29]



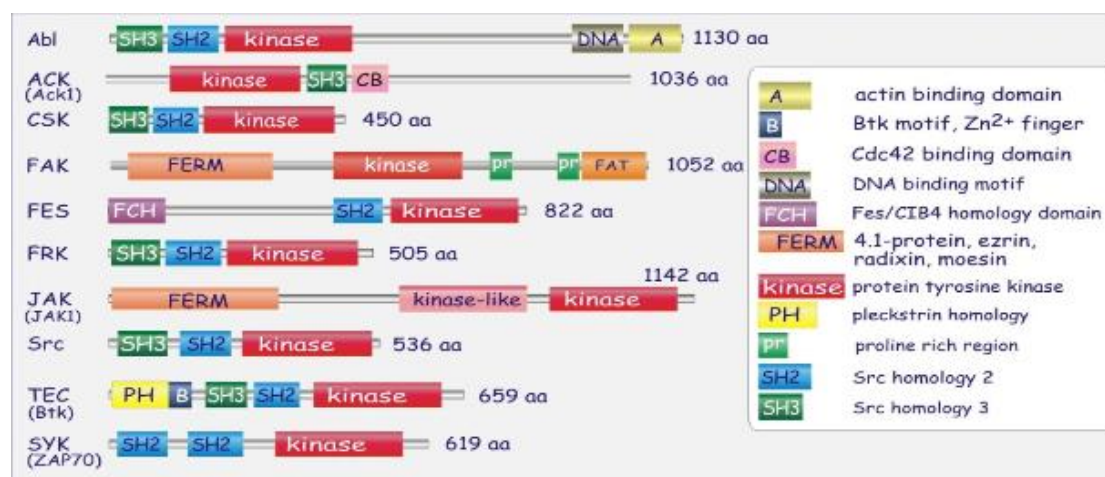
Εικόνα 2.10: Η δομή των 20 οικογενειών RTKs στον άνθρωπο.[29]

Η RTK περιέχει συνήθως μια διαμεμβρανική περιοχή, η οποία διαπερνά τη μεμβράνη με τη μορφή α-έλικας[17] Οι RTKs ενεργοποιούνται από συνδέτες- ligand που προσδένονται στην εξωκυτταρική τους περιοχή. Οι συνδέτες αυτοί, οι οποίοι είναι εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια, μπορούν να επάγουν τον διμερισμό του υποδοχέα. Η C-τελική περιοχή στο κύτταρο είναι υψηλά συντηρημένη και περιέχει καταλυτικές περιοχές. Αυτές οι καταλυτικές περιοχές είναι υπεύθυνες για τη δραστηριότητα κινάσης αυτών των υποδοχέων, οι οποίες καταλύουν την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα και τη φωσφορυλίωση υποστρώματος τυροσίνης.[28], [29]

Έχει αποδειχθεί ότι οι υποδοχικές κινάσες τυροσίνης διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η αγγειογένεση, καθώς και στην ανάπτυξη και εξέλιξη πολλών τύπων καρκίνου. Φαίνεται ότι η αναστολή των κινάσων τυροσίνης υποδοχέα είναι αποτελεσματικά μέτρα στη θεραπεία του καρκίνου.[29]

2.2.4.2. ΜΗ ΥΠΟΔΟΧΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ

Οι μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης, επίσης γνωστές ως κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης, είναι μια υποοικογένεια των κινάσων τυροσίνης οι οποίες στερούνται διαμεμβρανικής περιοχής και βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Οι μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης ταξινομούνται περαιτέρω σε 10 υποοικογένειες, συμπεριλαμβανομένων των ABL, ACK, CSK, FAK, FES, FRK, JAK, SRC, TEC και SYK. Εκτός από την περιοχή κινάσης, οι μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης διαθέτουν επίσης διάφορες περιοχές σηματοδότησης ή αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, όπως οι περιοχές SH2 και PH.[29]

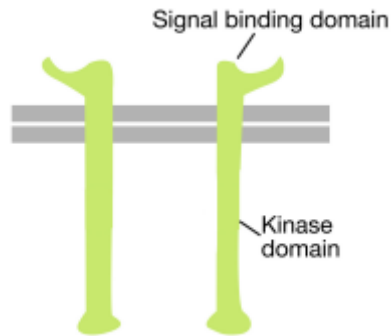


Εικόνα 2.11.: Κύριες οικογένειες των NRTKs.[29]

Οι μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης ρυθμίζουν πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση. Σε σύγκριση με την υποδοχική κινάση τυροσίνης, οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των μη-υποδοχικών κινάσων τυροσίνης είναι πιο περίπλοκοι.[29]. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται μέσω ποικίλων ενδομοριακών σημάτων με την απομάκρυνση αναστολέων, την πρόσληψή τους σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς, προκαλώντας ολιγομερισμό, αυτοφωσφορύλιωση και την τρανς-φωσφορύλιωση από άλλες κινάσες. Οι NRTKs δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με τα εξωκυττάρια σήματα, όμως είναι στενά συνδεδεμένες με τους σηματοδοτικούς καταρράκτες πολλών υποδοχικών κινάσων.[30]

2.2.5. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΥΠΟΔΟΧΙΚΩΝ ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

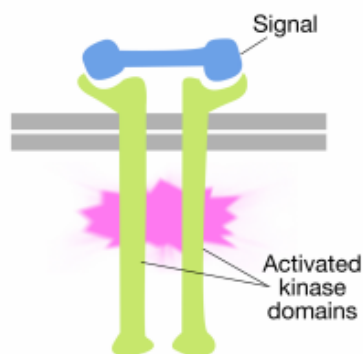
Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες δεσμεύουν ένα σήμα και στη συνέχεια μεταβιβάζουν το μήνυμα μέσω μιας σειράς ενδοκυτταρικών μορίων, το τελευταίο από τα οποία δρα στις πρωτεΐνες-στόχους για να αλλάξει την κατάσταση του κυττάρου.



Εικόνα 2.12.: Υποδοχέας τυροσινικής κινάσης πριν τη δέσμευση κάποιου σήματος.[31]

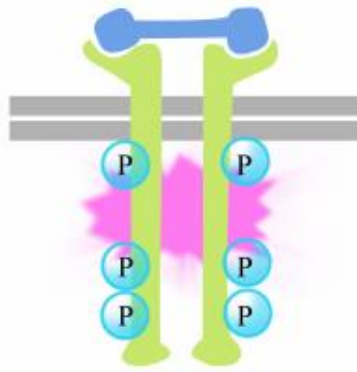
Όπως προαναφέρθηκε, μια υποδοχική κινάση τυροσίνης είναι ένας υποδοχέας κυτταρικής επιφάνειας που έχει επίσης δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης.

Η πρόσδεση σηματοδοτικών μορίων στην εξωκυτταρική περιοχή των υποδοχικών τυροσινικών κινασών προκαλεί διμερισμό (συνένωση και συσχέτιση) δύο μορίων υποδοχέα. Αυτό φέρνει τις κυτταροπλασματικές ουρές των υποδοχέων κοντά η μία στην άλλη προκαλώντας ενεργοποίηση της δραστηριότητας της κινάσης τυροσίνης αυτών των ουρών. Οι ενεργοποιημένες ουρές φωσφορυλιώνουν η μία την άλλη σε διάφορα κατάλοιπα τυροσίνης. Αυτό ονομάζεται αυτοφωσφορυλίωση.



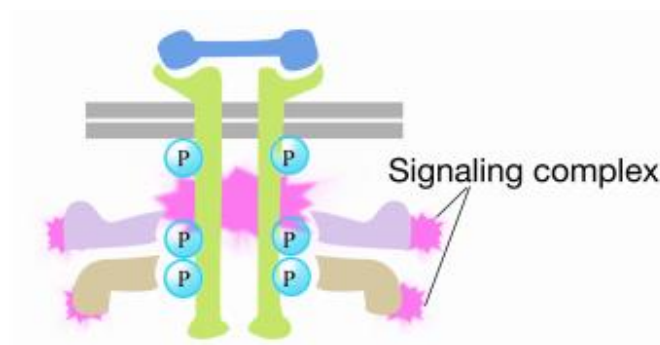
Εικόνα 2.13.: Η δέσμευση σήματος προκαλεί διμερισμό του υποδοχέα και ενεργοποίηση των περιοχών κινάσης τυροσίνης.[31]

Η φωσφορυλίωση των τυροσινών στις ουρές των υποδοχέων πυροδοτεί τη συγκρότηση ενός ενδοκυτταρικού σηματοδοτικού συμπλόκου στις ουρές. Οι νέες φωσφορυλιωμένες τυροσίνες χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης για σηματοδοτικές πρωτεΐνες που στη συνέχεια μεταδίδουν το μήνυμα σε άλλες πρωτεΐνες. Μια σημαντική πρωτεΐνη που ενεργοποιείται στη συνέχεια από τα σηματοδοτικά σύμπλοκα στις κινάσες τυροσίνης των υποδοχέων είναι η Ras, μια μονομερής πρωτεΐνη δέσμευσης νουκλεοτιδίων γουανίνης. Η Ras είναι ενεργή όταν δεσμεύεται σε αυτήν το GTP και ανενεργή όταν δεσμεύεται σε αυτήν το GDP. Επίσης, η Ras μπορεί να υδρολύσει το GTP σε GDP.



Εικόνα 2.14.: Οι ενεργοποιημένες περιοχές τυροσινικής κινάσης φωσφορυλιώνουν η μια την άλλη.[31]

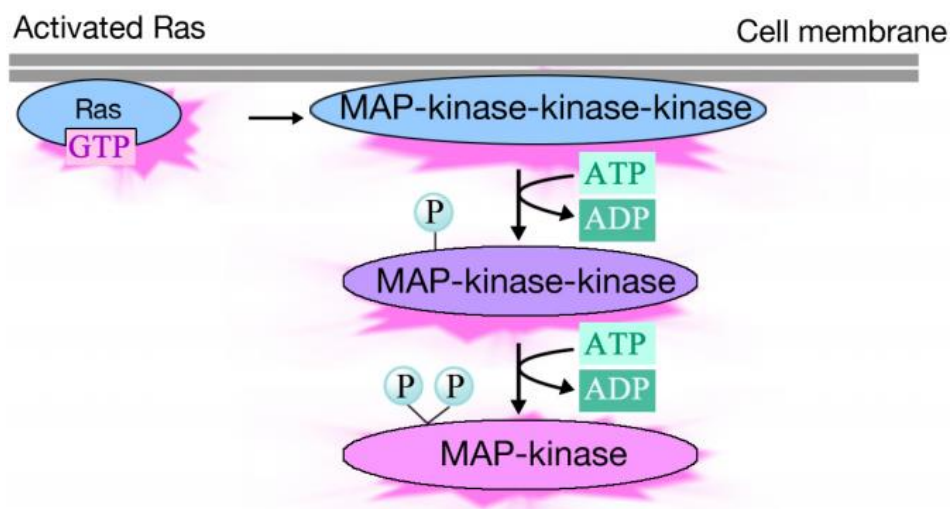
Όταν ένα σήμα φτάνει στην κινάση τυροσίνης του υποδοχέα, τα μονομερή του υποδοχέα ενώνονται και φωσφορυλιώνουν η μία την τυροσίνη της άλλης, προκαλώντας τη συγκρότηση ενός συμπλόκου πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική ουρά του υποδοχέα. Μία από τις πρωτεΐνες αυτού του συμπλόκου αλληλεπιδρά με το Ras και διεγείρει την ανταλλαγή του GDP που είναι δεσμευμένο στο ανενεργό Ras με ένα GTP. Αυτό ενεργοποιεί το Ras.



Εικόνα 2.15.: Ο σχηματισμός του συμπλόκου πρωτεϊνών.[31]

Το ενεργοποιημένο Ras πυροδοτεί έναν καταρράκτη φωσφορυλίωσης τριών πρωτεϊνικών κινάσεων, οι οποίες μεταδίδουν και διανέμουν το σήμα. Αυτές οι πρωτεϊνικές κινάσεις είναι μέλη μιας ομάδας που ονομάζεται κινάσες MAP (Mitogen Activated Protein Kinases). Η τελευταία κινάση σε αυτόν τον καταρράκτη φωσφορυλιώνει διάφορες πρωτεΐνες-στόχους, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων και ενεργοποιητών της μεταγραφής που ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση.

Η φωσφορυλίωση διαφόρων ενζύμων μπορεί να μεταβάλει τις δραστηριότητές τους και να πυροδοτήσει νέες χημικές αντιδράσεις στο κύτταρο, ενώ η φωσφορυλίωση των ενεργοποιητών της μεταγραφής μπορεί να αλλάξει τα γονίδια που εκφράζονται. Το συνδυασμένο αποτέλεσμα των αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών μεταβάλλει τη φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου.[31]



Εικόνα 2.16.: Ενεργοποίηση του καταρράκτη Ras.[31]

2.2.6. ΤΥΡΟΣΙΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Ο ρόλος των τυροσινικών κινασών στη μοριακή παθογένεια του καρκίνου είναι τεράστιος και πρόσφατα οι κινάσες έχουν γίνει δημοφιλείς ως πιθανοί στόχοι αντικαρκινικών φαρμάκων, με αποτέλεσμα να κυκλοφορούν στην αγορά μερικά αντικαρκινικά φάρμακα. Η πολυπλοκότητα και ο αριθμός των κινασών τυροσίνης έχουν αυξηθεί σημαντικά, παρέχοντας έτσι περισσότερες ευκαιρίες για την ανακάλυψη φαρμάκων.[28]

Μέχρι τα τέλη του 1980 υπήρχαν ενδείξεις για αναστολείς τυροσινικών κινασών χαμηλού μοριακού βάρους. Η αναστολή της δραστηριότητας των κινασών τυροσίνης με ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους ικανές να παρεμποδίζουν είτε τη δέσμευση του συνδέτη (στην περίπτωση των υποδοχικών τυροσινικών κινασών) είτε το πρωτεϊνικό υπόστρωμα (στην περίπτωση των μη υποδοχικών τυροσινικών κινασών) αποδείχθηκε δύσκολη. [32] Η προσέγγιση των αναστολέων διυποστρώματος προσέφερε υποσχέσεις, αλλά με πολύ μικρή πρακτική πρόοδο. Οι προσεγγίσεις για τη δημιουργία μη ανταγωνιστικών ή αλλοστερικών αναστολέων έχουν επίσης αποτύχει. Οι ανταγωνιστικοί αναστολείς ATP φαίνεται να είναι ο στόχος επιλογής.[28]

Το ATP προσδέεται σε μια βαθιά σχισμή που σχηματίζεται μεταξύ των δύο λοβών της περιοχής κινάσης τυροσίνης. Αν και η περιοχή πρόσδεσης ATP είναι ιδιαίτερα συντηρημένη, η αρχιτεκτονική στις περιοχές που βρίσκονται πλησίον της περιοχής πρόσδεσης ATP παρέχει κάποια βασική ποικιλομορφία για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων και έχει πιθανή εφαρμογή στην ανακάλυψη φαρμάκων.

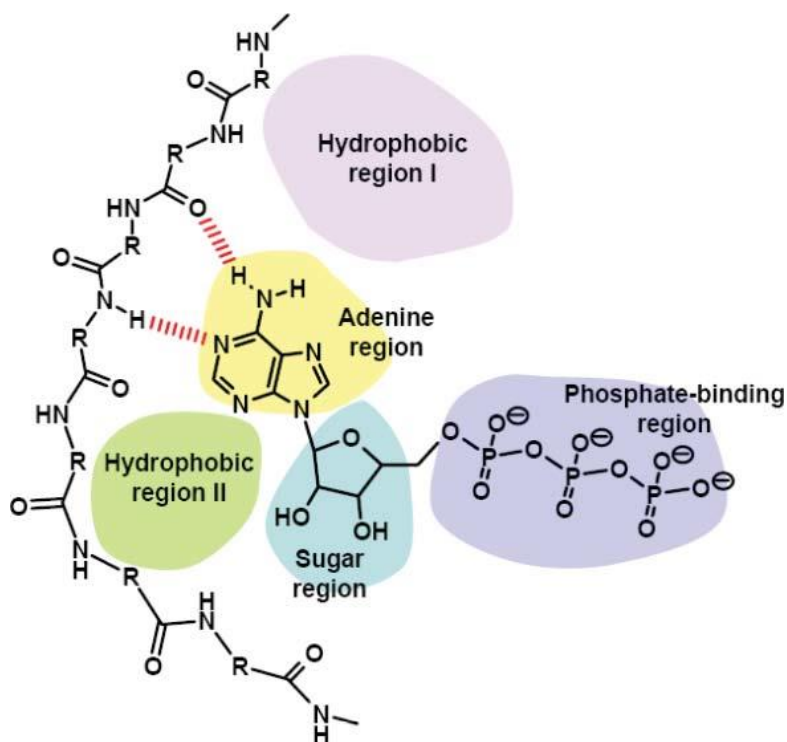
Οι περιοχές πρόσδεσης ATP έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

α) **Περιοχή αδενίνης** - περιέχει δύο βασικούς δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση των αμινομάδων N-1 και N-6 του δακτυλίου αδενίνης. Πολλοί ισχυροί αναστολείς χρησιμοποιούν έναν από αυτούς τους δεσμούς υδρογόνου.

β) **Περιοχή σακχάρων** - μια υδρόφιλη περιοχή, εκτός από λίγες, π.χ. EGFR. Υδρόφοβος θύλακας - αν και δεν χρησιμοποιείται από το ATP, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα των αναστολέων.

γ) **Υδρόφοβο κανάλι** - δεν χρησιμοποιείται από το ATP και μπορεί να αξιοποιηθεί για την εξειδίκευση του αναστολέα.

δ) **Περιοχή δέσμευσης φωσφορικών** - μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας του αναστολέα.[28]



Εικόνα 2.17.: Απεικόνιση της θέσης πρόσδεσης ATP στο ενεργό κέντρο πρωτεϊνικής κινάσης.[33]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

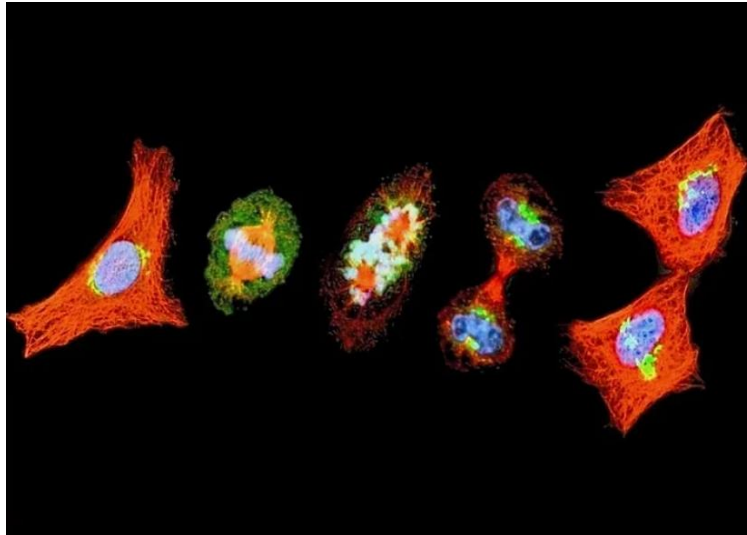
Ο κυτταρικός κύκλος

3.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Οι κινάσες έχουν κεφαλαιώδη σημασία και για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου γνώρισε ένα είδος σκοτεινού αιώνα μεταξύ 1920 και 1950. Το 1953, η ανακάλυψη της δεξιόστροφης διπλής έλικας του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA), του μορίου της ζωής, το οποίο περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη και τη λειτουργία ενός οργανισμού, από τους James Watson και Francis Crick αποτέλεσε σημείο καμπής για την επιστήμη (1953), παρέχοντας εικόνα του γενετικού κώδικα και της πρωτεϊνοσύνθεσης, θέτοντας τα θεμέλια για την ανάπτυξη νέων και ισχυρών επιστημονικών τεχνικών στις δεκαετίες του 1970 και 1980. [34]

Την ίδια χρονιά, ωστόσο, μια μελέτη, με πρωτοπόρους τους Alma Howard και Stephen R. Pelc σχετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις ρίζες φασολιών, άνοιξε το δρόμο για την ανακάλυψη του μοντέλου του κυτταρικού κύκλου όπως το γνωρίζουμε σήμερα. Οι Howard και Pelc ήταν οι εφευρέτες της αυτοραδιογραφίας και οι πρώτοι που απέδωσαν με επιτυχία ένα χρονικό πλαίσιο στη ζωή ενός κυττάρου, δηλαδή ανακάλυψαν τον κυτταρικό κύκλο. Χρησιμοποιώντας ένα βοτανικό πειραματικό σύστημα, τη ρίζα φασολιού *Vicia faba*, παρατήρησαν ότι η αντιγραφή του DNA λαμβάνει χώρα μόνο σε μια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου, σαφώς διακριτή από τη μίτωση. Ονόμασαν αυτό το στάδιο S-φάση από τη σύνθεση του DNA, που σήμερα αναγνωρίζεται ως μεσοφάση, κατά τη διάρκεια της οποίας το κύτταρο αναπτύσσεται, διπλασιάζει το DNA του και προετοιμάζεται για τη μίτωση. Αυτό άνοιξε το δρόμο για τον περαιτέρω προσδιορισμό των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και έτσι γεννήθηκε η έννοια του κυτταρικού κύκλου.[35]



Εικόνα 3.1.: Ένα κύτταρο που διανύει τον κύκλο ζωής του, αποτελεί τον κυτταρικό κύκλο.[35]

Όλα τα έμβια όντα αποτελούνται από μια ποικιλόμορφη συλλογή κυττάρων, τη θεμελιώδη μονάδα της ζωής. Τα κύτταρα λειτουργούν είτε αυτόνομα, είτε μη αυτόνομα, για να εξασφαλίσουν τη ζωή και να επιτελέσουν βασικές λειτουργίες όπως η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Κάθε κύτταρο, είτε πρόκειται για μονοκύτταρο οργανισμό (π.χ. πρωτόζωα) είτε για πολυκύτταρο οργανισμό (π.χ. άνθρωπος), υφίσταται τον εξελικτικά διατηρημένο κυτταρικό κύκλο της ζωής. [35]

3.2. ΣΤΑΔΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Ο κύριος στόχος του κυτταρικού κύκλου είναι, κάθε κύτταρο να αντιγράψει όλο του το γενετικό υλικό και να παράγει γενετικά πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό, ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από δύο διακριτές φάσεις:

- τη μεσοφάση και
- τη μιτωτική φάση.

Εντός της μεσοφάσης, υπάρχουν επιπλέον υποφάσεις G1 (Gap 1), S (Σύνθεση) και G2 (Gap 2).

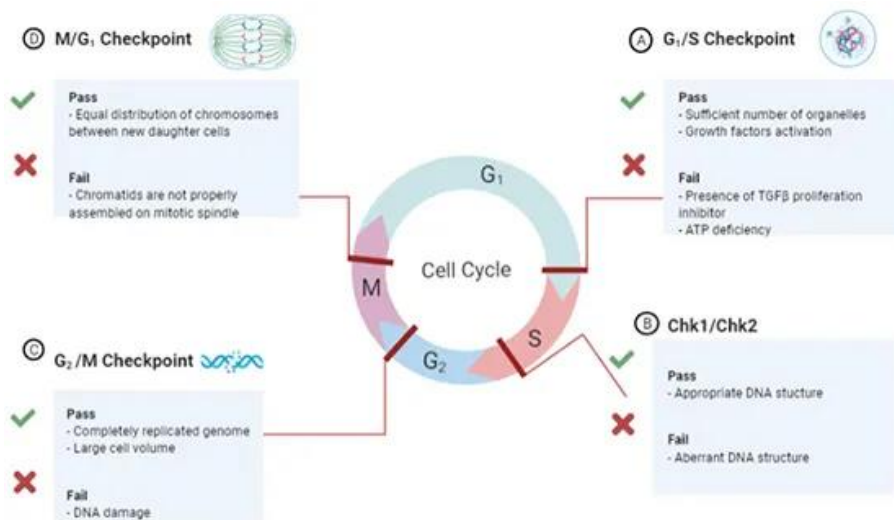
Ομοίως, η μιτωτική φάση διαιρείται περαιτέρω σε P (πρόφαση), M (μετάφαση), A (ανάφαση) και T (τελόφαση). Κάθε φάση και υποφάση χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα μοριακά γεγονότα.[36]

3.2.1. ΜΕΣΟΦΑΣΗ

Κατά την **μεσόφαση** λαμβάνει χώρα η κυτταρική ανάπτυξη και η σύνθεση του DNA, ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν κυτταρικά σημεία ελέγχου για να διασφαλιστεί η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, η μεταγραφή και η μετάφραση κρίσιμων συστατικών του κυτταρικού κύκλου και η ακριβής αντιγραφή του DNA για την πρόοδο μέσω του κυτταρικού κύκλου. Αυτά τα σημεία ελέγχου είτε αναστέλλουν

την είσοδο στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου είτε επιτρέπουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου.

- **G1:** είναι η πρώτη υποφάση της μεσοφάσης. Το κύτταρο προετοιμάζεται για να διαιρεθεί ξανά συσσωρεύοντας ενέργεια και παράγοντας πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA. Το σημαντικότερο σημείο ελέγχου σε αυτό το στάδιο είναι το G1/S, που εξασφαλίζει ότι το κύτταρο έχει δημιουργήσει επαρκή οργανίδια και αυξητικούς παράγοντες για την αντιγραφή και τη διαίρεση. Το κύτταρο θα αποτύχει να περάσει αυτό το σημείο ελέγχου εάν υπάρχει ανεπαρκής ποσότητα ATP ή βλάβη του DNA.
- **S:** Στην υποφάση σύνθεσης, το κύτταρο συνθέτει ένα νέο αντίγραφο του DNA. Τα σημαντικά σημεία ελέγχου στη φάση S ελέγχουν τη δομή του DNA. Η φάση S διακόπτεται εάν ανιχνευθεί μια ανώμαλη δομή του DNA.
- **G2:** είναι η φάση κατά την οποία το κύτταρο οργανώνει/συμπυκνώνει το γενετικό υλικό και προετοιμάζεται για διαίρεση. Το κύτταρο συνεχίζει επίσης να αναπτύσσεται, να συσσωρεύει θρεπτικά συστατικά και να διασφαλίζει τη σωστή αντιγραφή/σύνθεση του DNA. Το κύριο σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που εμπλέκεται είναι το σημείο ελέγχου G2/S, το οποίο αξιολογεί το μέγεθος του κυττάρου, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και την ακεραιότητα του DNA. Εάν το κύτταρο παρουσιάσει βλάβη στο DNA ή ανεπαρκή όγκο, το κύτταρο συλλαμβάνεται στη φάση G2 και δεν είναι υποψήφιο για κυτταρική διαίρεση.[36]



Εικόνα 3.2.: Τα κύρια σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.[36]

3.3.2. ΜΙΤΩΣΗ

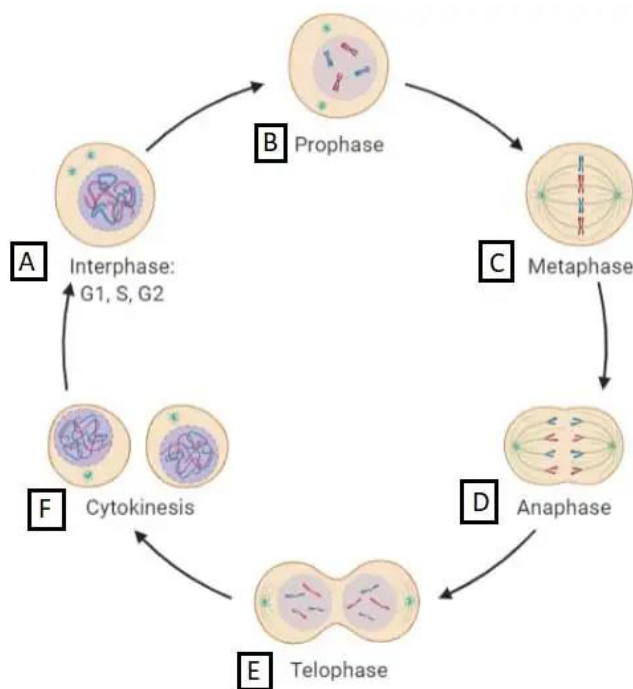
Στη **μιτωτική φάση** λαμβάνει χώρα η διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης. Το κύτταρο έρχεται αντιμέτωπο με το σημείο ελέγχου M, το οποίο είναι το τελευταίο σημείο ελέγχου που αξιολογεί τη διάταξη των αντιγραμμένων χρωμοσωμάτων ώστε να διευκολυνθεί η διαίρεση σε δύο θυγατρικά κύτταρα.

P: Στην **πρόφαση**, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται, διαιρούνται σε δύο χρωματίδες που ενώνονται με το κεντρομερίδιο και κινούνται προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου. Το κεντριόλιο διαιρείται επίσης και μεταναστεύει προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου.

M: Η **μετάφαση** χαρακτηρίζεται από τις χρωματίδες που παρατάσσονται κατά μήκος της μεταφασικής πλάκας αγκυροβολημένα από το αντίστοιχο κεντριόλιο τους μέσω μικροσωληνίσκων έτοιμα να απομακρυνθούν.

A: Στην **ανάφαση**, οι μικροσωληνίσκοι που συνδέονται με τις χρωματίδες σταδιακά βραχύνονται, χωρίζοντας έτσι τις χρωματίδες σε δύο αδελφές χρωματίδες που θα αποτελέσουν τα χρωμοσώματα των θυγατρικών κυττάρων.

T: Η **τελόφαση** χαρακτηρίζεται από την επαγωγή δύο νέων πυρηνικών περιβλημάτων που σχηματίζονται γύρω από τα χρωμοσώματα και σχηματίζουν δύο διαφορετικούς θυγατρικούς πυρήνες. Στη συνέχεια, η κυτταροκίνηση χωρίζει το κυτταρόπλασμα και τα οργανίδια σε δύο πανομοιότυπα και ξεχωριστά θυγατρικά κύτταρα.[36]



Εικόνα 3.3.: Σύνοψη κυτταρικού κύκλου. [36]

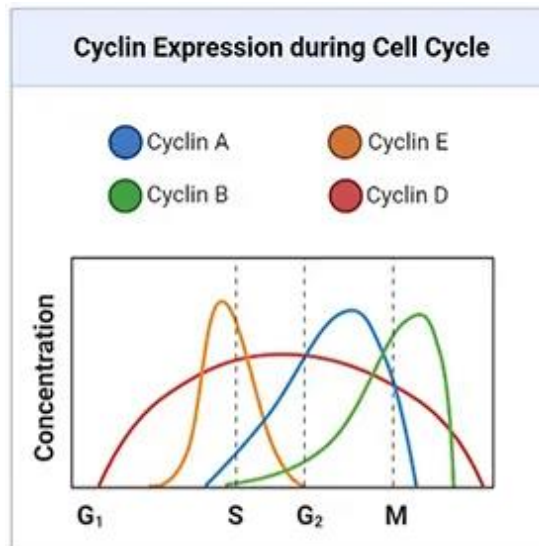
Ενώ ορισμένα κύτταρα διαιρούνται συνεχώς, άλλα είναι σε ηρεμία. Αυτά τα κύτταρα εξέρχονται από την G1 και εισέρχονται σε μια **κατάσταση ηρεμίας** που ονομάζεται **G0**. Στην G0, ένα κύτταρο εκτελεί τη λειτουργία του χωρίς να προετοιμάζεται ενεργά για διαίρεση. Είναι μια μόνιμη κατάσταση για ορισμένα κύτταρα, ενώ άλλα μπορεί να ξεκινήσουν εκ νέου τη διαίρεση εάν λάβουν τα κατάλληλα σήματα.[37]

3.3. ΡΥΘΜΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Η πρόοδος των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο ελέγχεται από διάφορα σημεία ελέγχου σε διάφορα στάδια. Αυτά ανιχνεύουν εάν ένα κύτταρο περιέχει κατεστραμμένο DNA και διασφαλίζουν ότι τα κύτταρα αυτά δεν αναπαράγονται και δεν διαιρούνται. Το σημείο περιορισμού (R) βρίσκεται στο G1 και αποτελεί βασικό σημείο ελέγχου. Η συντριπτική πλειονότητα των κυττάρων που περνούν από το σημείο R καταλήγει να ολοκληρώσει ολόκληρο τον κύκλο. Άλλα σημεία ελέγχου βρίσκονται στις μεταβάσεις μεταξύ G1 και S και G2 και M.[38]

Εάν ανιχνευθεί κατεστραμμένο DNA σε οποιοδήποτε σημείο ελέγχου, η ενεργοποίηση του σημείου ελέγχου έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή της πρωτεΐνης p53. [38] Η p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που σταματά την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στο σημείο ελέγχου G1/S ενεργοποιώντας την παραγωγή πρωτεϊνών αναστολέων CDK (CKI) και ξεκινά μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κατεστραμμένου DNA. Οι πρωτεΐνες CKI δεσμεύονται στα σύμπλοκα κυκλίνης-CDK και εμποδίζουν τη δραστηριότητά τους, ώστε το κύτταρο να μπορεί να επιτύχει την επιδιόρθωση του DNA μέσω της ενεργοποίησης των ενζύμων επιδιόρθωσης του DNA. Εάν η βλάβη του DNA είναι ανεπανόρθωτη, η p53 ξεκινά την απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) για να αποφύγει τη μεταβίβαση του κατεστραμμένου DNA. Η απόπτωση είναι ένα κρίσιμο συστατικό του κυτταρικού κύκλου για την απαλλαγή του οργανισμού από δυνητικά επικίνδυνα κύτταρα, ώστε να μην συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται

Ο κύκλος ρυθμίζεται επίσης στενά από τις κυκλίνες, οι οποίες ελέγχουν την κυτταρική πρόοδο ενεργοποιώντας τα ένζυμα της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης (CDK). Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDK) φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες-στόχους για να τις ενεργοποιήσουν. Οι κυκλίνες και οι CDKs είναι εξελικτικά συντηρημένες και υπάρχουν σε πολλά είδη. Συγκεκριμένες κυκλίνες και CDKs εκφράζονται σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πρωτεϊνών που απαιτούνται για την πρόοδο της συγκεκριμένης φάσης του κυτταρικού κύκλου.[36]



Εικόνα 3.4.: Διαγραμματική απεικόνιση που δείχνει τις διαφορετικές κυκλίνες που εκφράζονται σε κάθε υπο-φάση του κυτταρικού κύκλου.[36]

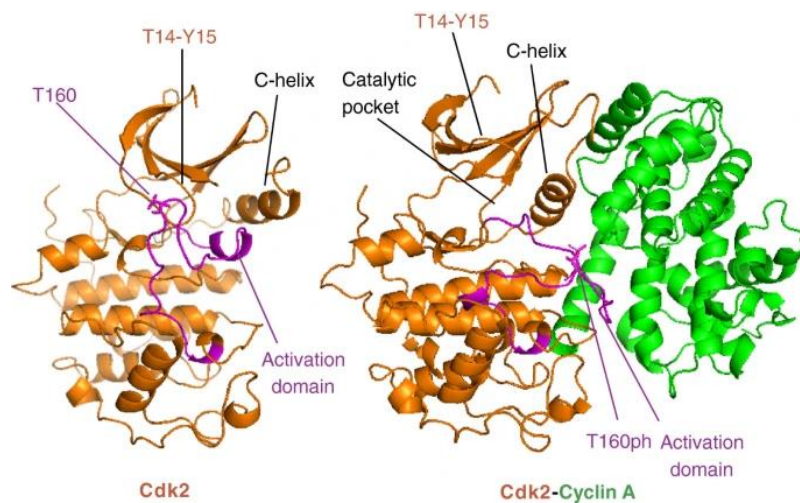
3.3.1. ΚΥΚΛΙΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ ΚΥΚΛΙΝΕΣ

Οι CDKs ή κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες είναι ετερομερείς κινάσες σερίνης/θρεονίνης που ελέγχουν την πρόοδο μέσω του κυτταρικού κύκλου, τη μεταγραφή, τη νευρωνική λειτουργία και την ανάπτυξη. Η δραστηριότητα των CDKs εξαρτάται από τις ρυθμιστικές τους υπομονάδες, τις κυκλίνες. Υπάρχουν 20 γνωστές CDKs στον άνθρωπο, οι οποίες χωρίζονται σε ομάδες με βάση τις εξελικτικές και λειτουργικές τους σχέσεις και ρυθμίζονται από 29 κυκλίνες. Ο κυτταρικός κύκλος ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από τις υποοικογένειες CDK1, CDK4 και CDK5, ενώ άλλες CDKs παίζουν ρόλο στη μεταγραφή και δεν ρυθμίζονται με τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό κύκλο.[39] Τα σύμπλοκα Cdk/κυκλίνης εμπλέκονται για πρώτη φορά στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου με βάση πρωτοποριακές εργασίες στη ζύμη, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι μία μόνο Cdk (Cdc28 στην εκκολαπτόμενη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*- Cdc2 στη ζύμη σχάσης *Schizosaccharomyces pombe*) προάγει τις μεταβάσεις μεταξύ των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού κύκλου μέσω των αλληλεπιδράσεών της με διάφορες κυκλίνες. Κατά συνέπεια, οι Cdk θεωρούνται ως η "μηχανή" που κινεί την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, ενώ οι κυκλίνες θεωρούνται ως τα "γρανάζια" που αλλάζουν για να βοηθήσουν τη μετάβαση μεταξύ των φάσεων του κύκλου. Η δραστηριότητα κινάσης των συμπλόκων Cdk/κυκλίνης ρυθμίζεται στενά από μια πληθώρα αναστολέων Cdk (CKIs), οι οποίοι λειτουργούν ως "φρένα" για να σταματήσουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου υπό δυσμενείς συνθήκες.[40]

Οι κυκλίνες είναι μια ετερογενής οικογένεια πρωτεϊνών που έχουν μια κοινή αλληλουχία 100 αμινοξέων η οποία ονομάζεται κουτί κυκλίνης. Ο μοναδικός κυτταρικός τους ρόλος είναι η ενεργοποίηση των CDKs και η έκφρασή τους κυμαίνεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία συμμετέχουν.[39]

Οι CDKs κυμαίνονται σε μέγεθος από 250 αμινοξικά κατάλοιπα, που αποτελούνται μόνο από την καταλυτική περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης, έως πάνω από 1500 αμινοξικά κατάλοιπα με N- και C-τελικές επεκτάσεις μεταβλητού μήκους. Όλες οι CDK έχουν δομή δύο λοβών, με β-φύλλα στο N-τελικό άκρο και α-έλικες στο C-τελικό άκρο, και ενεργό κέντρο μεταξύ των λοβών. Μια περιοχή στον C-τελικό λοβό, που ονομάζεται βρόχος T, περιέχει κατάλοιπα ευαίσθητα στη φωσφορυλίωση. Στις ανενεργές, ελεύθερες κυκλίνης CDKs ο βρόχος T μπλοκάρει την καταλυτική σχισμή εμποδίζοντας την ενζυμική δραστηριότητα. Η πλειονότητα των CDKs βρίσκεται στον πυρήνα. [39]

Οι CDKs και οι κυκλίνες ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, μετά από εξωκυτταρικά μιτογόνα ερεθίσματα και ενεργοποιούνται με τη σύνδεση με μια κυκλίνη. Οι ακριβείς δομικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη δέσμευση κυκλίνης ποικίλλουν για τις διάφορες CDKs. Για παράδειγμα, η πρόσδεση της κυκλίνης A στην CDK2 λαμβάνει χώρα τόσο στον N- όσο και στον C-λοβό της, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της CDK4 και της κυκλίνης D περιορίζονται στον N-λοβό.[41]



Εικόνα 3.5.: Τρισδιάστατη δομή των CDK και η ενεργοποίησή τους.[41]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και καρκίνος

4.1. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ: ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη και την ομοίωση των πολυκυτταρικών οργανισμών. Δρώντας μέσω υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων, οι αυξητικοί παράγοντες απαιτούνται για την επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου που διέπει την κυτταρική επιβίωση, την απόπτωση, την εξειδίκευση των ιστών και την κυτταρική μετανάστευση. Οι υποδοχείς των αυξητικών παραγόντων μεταδίδουν εξωκυτταρικά σήματα μέσω της ενεργοποίησης ενδοκυτταρικών αγγελιοφόρων ή άμεσα μέσω της μετατόπισης του υποδοχέα στον πυρήνα. Από τις κινάσες τυροσίνης των υποδοχέων (RTKs), η οικογένεια των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (EGF) των RTKs, που ονομάζεται επίσης ErbB ή HER υποδοχείς, είναι ένας από τους από τις πιο εκτενώς μελετημένες για το ρόλο της στην ανάπτυξη, τη φυσιολογία και τον καρκίνο του ανθρώπου.[42]

Η οικογένεια RTK του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα αποτελείται από τέσσερα μέλη: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) και ErbB4 (HER4). Αυτοί οι δομικά συγγενείς υποδοχείς είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από μια εξωκυττάρια περιοχή δέσμησης συνδέτη, μια διαμεμβρανική περιοχή, μια περιοχή κινάσης τυροσίνης και ένα C-τελικό άκρο που περιέχει τυροσίνη.[42] Τα πεπτίδια της οικογένειας EGF δεσμεύουν τους υποδοχείς ErbB και με βάση την εξειδίκευση των υποδοχέων τους χωρίζονται σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τον EGF, τον μετασχηματιζόμενο αυξητικό παράγοντα (TGF)- α , την αμφιρεγουλίνη (AR) και την επιγενίνη (EPG), τα οποία δεσμεύονται ειδικά στον EGFR- η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τη β -κυτταρίνη (BTC), τον EGF που δεσμεύει ηπαρίνη (HB-EGF) και την επιρεγουλίνη (EPR), τα οποία παρουσιάζουν διπλή ειδικότητα, δεσμεύοντας τόσο τον EGFR όσο και τον ErbB4. Η τρίτη ομάδα, οι νευρεγουλίνες (NRGs), σχηματίζει δύο υποομάδες με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν τον ErbB3 και τον ErbB4 (NRG-1 και NRG-2) ή μόνο τον ErbB4 (NRG-3 και NRG-4).[43]

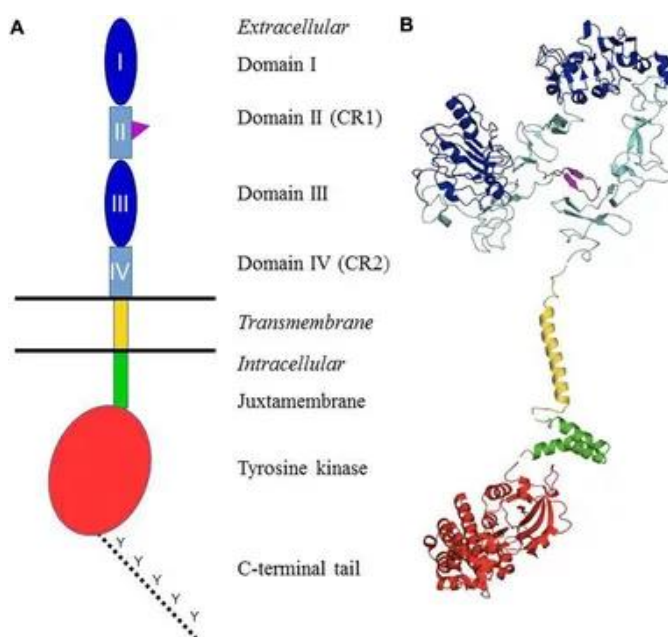
Δέσμευση ενός συνδέτη στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα προάγει το σχηματισμό όμο- και ετεροδιμερών μεταξύ των υποδοχέων. Ο διμερισμός του υποδοχέα είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής περιοχής κινάσης τυροσίνης και της φωσφορυλίωσης του C-τελικού άκρου. Κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης ενεργοποιούν στη συνέχεια, είτε άμεσα είτε μέσω πρωτεϊνών -προσαρμογών, μεταγενέστερα συστατικά σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων των Ras/MAPK, PLC γ 1/PKC, PI(3)κινάση/Akt και τα μονοπάτια STAT.[42]

Οι EGFR και ErbB4 μπορούν να θεωρηθούν ως πλήρως λειτουργικοί υποδοχείς με την ικανότητα τόσο να δεσμεύουν συνδέτες όσο και να αυτοφωσφορυλιώνουν τα C-

τελικά άκρα μέσω λειτουργικών ενδοκυτταρικών περιοχών κινάσης τυροσίνης. Ο ErbB2, ωστόσο, είναι μοναδικός στο ότι δεν έχει κανένα γνωστό συνδέτη αλλά είναι ο προτιμώμενος εταίρος διμερισμού για άλλους EGFRs. Η ErbB3 είναι επίσης μοναδική, καθώς δεν διαθέτει ενδογενή κινάση με δραστηριότητα τυροσίνης, αλλά μπορεί να μεταδίδει σήματα μέσω αλληλεπίδρασης με υποδοχείς με ενεργό κινάση, δηλαδή EGFR, ErbB2 και ErbB4. [42]

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες των μελών της οικογένειας EGFR παρείχαν περαιτέρω πληροφορίες για τη βιολογία των υποδοχέων και συνέβαλε στη διαλεύκανση της δομικής βάσης για τις διαφορές στη λειτουργία των υποδοχέων.[43]

Η εξωκυτταρική N-τελική περιοχή πρόσδεσης συνδέτη αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες που ονομάζονται: L1 (ή Domain I, πλούσια σε λευκίνη), CR1 (πλούσια σε κυστεΐνη), L2 (Domain III) και CR2. Οι υπομονάδες L1 και L2 αλληλεπιδρούν άμεσα με το συνδέτη. Η υπομονάδα CR1 περιέχει τον βρόγχο διμερισμού που είναι υπεύθυνος για την αλληλεπίδραση υποδοχέα-υποδοχέα. Μια διαμεμβρανική υπομονάδα συνδέει την εξωκυττάρια περιοχή με την περιοχή τυροσινικής κινάσης και το C-τελικό άκρο.[42]

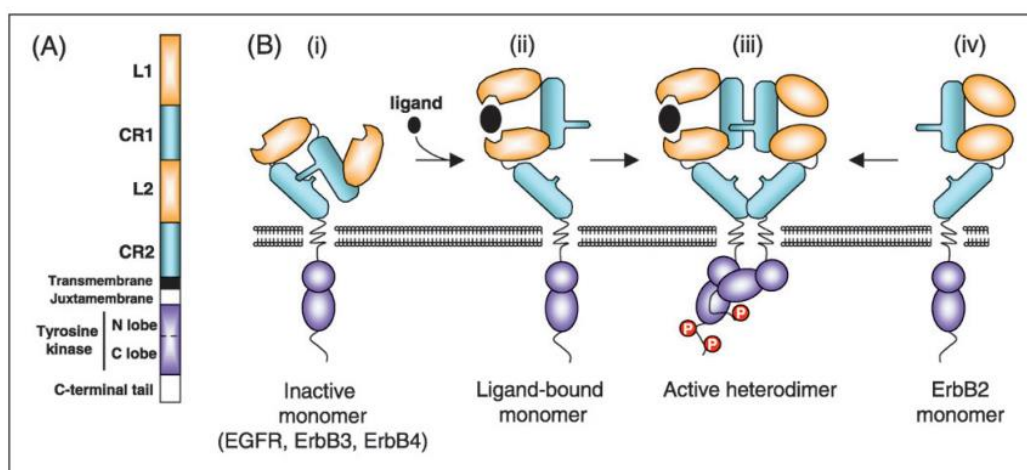


Εικόνα 4.1.: (A) Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων τομέων. Το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων αποτελείται από τέσσερις τομείς: I και III -περιοχή πρόσδεσης συνδέτη (μπλε), II και IV-περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη (γαλάζιο). Η περιοχή II περιέχει τον βραχίονα διμερισμού (μωβ). Ακολουθεί η απλή διαμεμβρανική περιοχή (κίτρινο), μια παραμεμβρανική περιοχή (πράσινο), η περιοχή κινάσης τυροσίνης (κόκκινο) και ένα C-τελικό άκρο, όπου περιέχει τις κύριες τυροσίνες που φωσφορυλιώνονται κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα (διακεκομμένη γραμμή). (B) Παρουσιάζονται οι δομές των διαφόρων περιοχών του ανθρώπινου EGFR οι

οποίες έχουν καθοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ ή RMN διαλύματος.[44]

Οι κρυσταλλικές δομές των ErbB3 και ErbB4 δείχνουν ότι, στην ανενεργή μορφή, χωρίς συνδέτες, η εξωκυτταρική περιοχή λαμβάνει μια «προσδεδεμένη» διαμόρφωση στην οποία ο β-τριχοειδής βρόγχος του CR1 αλληλεπιδρά με τον CR2, απομονώνοντας τον βρόγχο διμερισμού. Οι δομές του EGFR με EGF καταδεικνύουν ότι η πρόσδεση του συνδέτη στις περιοχές L1 και L2 οδηγεί σε μια αλλαγή διαμόρφωσης κατά την οποία ο υποδοχέας παίρνει μια εκτεταμένη μορφή που εκθέτει αυτόν τον βρόγχο διμερισμού και επιτρέπει τον όμο- και ετεροδιμερισμό του υποδοχέα. Ένα σύμπλοκο 2:2 σχηματίζεται από αυτή την αλληλεπίδραση στην οποία οι συνδέτες είναι στραμμένοι προς την εξωτερική πλευρά.

Σύμφωνα με την αδυναμία εντοπισμού ενός συνδέτη για τον ErbB2, η κρυσταλλική δομή αποκαλύπτει ότι ο υποδοχέας έχει σταθερά μια εκτεταμένη διαμόρφωση ώστε να αλληλεπιδρά με άλλους υποδοχείς. [42]

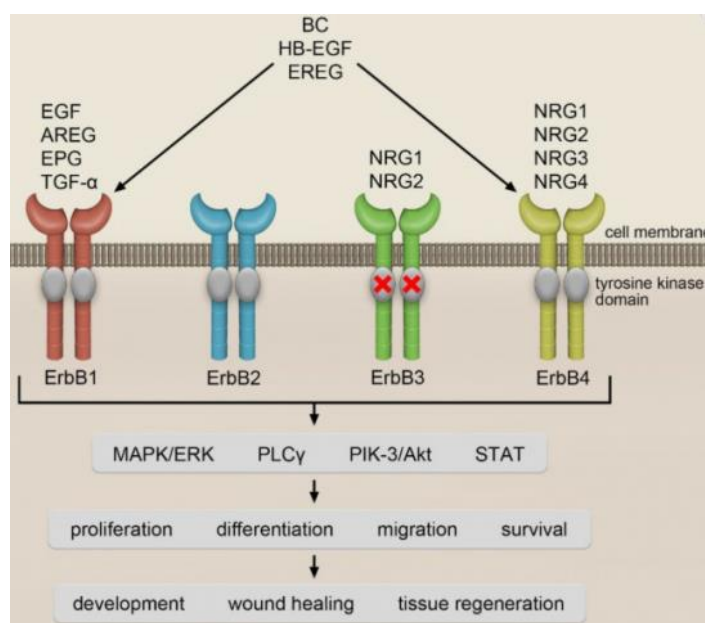


Εικόνα 4.2.: Δομή των ErbB υποδοχέων (A) γραμμική απεικόνιση των τμημάτων ενός ErbB υποδοχέα, (B) διμερισμός και ενεργοποίηση υποδοχέα ErbB.[42]

Πρόσδεση συνδέτη και διμερισμός του υποδοχέα ErbB επάγει αλλαγές στη διαμόρφωση της ενδοκυττάριας περιοχής της τυροσινικής κινάσης που οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα. Ο διμερισμός του υποδοχέα συνδέει το N- λοβό της κινάσης τυροσίνης του ενός υποδοχέα με τον C- λοβό του εταίρου του, οδηγώντας σε C-τελική φωσφορυλίωση τυροσίνης, δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης φωσφοτυροσίνης, για τη σύνδεση προσαρμογέων, σηματοδοτικών μορίων και ρυθμιστικών πρωτεϊνών. [42]

4.2. ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ErbB

Πολλαπλές οδοί μεταγωγής σήματος βρίσκονται κατάντη των ενεργοποιημένων EGFRs. Μέλη της οικογένειας EGFR ενεργοποιούν τα Ras/MAPK, PI(3)K/Akt, PLCg1/PKC, STAT. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης του EGFR δημιουργεί θέσεις δέσμησης για τον αυξητικό παράγοντα Grb2 και την πρωτεΐνη Shc2 στην περιοχή κινάσης, οι οποίες ενεργοποιούν το μονοπάτι Ras/Raf/MAPK. Άλλοι υποδοχείς ErbB ενεργοποιούν επίσης το Ras/MAPK μονοπάτι. Το μονοπάτι PI(3)K/Akt είναι σημαντικό για την επιβίωση των κυττάρων. Η υψηλού επιπέδου ενεργοποίηση αυτής της οδού μέσω της άμεσης σύνδεσης της υπομονάδας p85 του PI(3)K με το ενεργοποιημένο υποδοχέα συμβαίνει με τους ErbB3 και ErbB4 καθώς αυτοί οι υποδοχείς περιέχουν θέσεις δέσμησης της p85. Ο EGFR μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει ασθενώς το μονοπάτι PI(3)K μέσω της πρωτεΐνης προσαρμογέα Gab-1. Ο EGFR είναι επίσης σε θέση να ενεργοποιήσει την PLCg, οδηγώντας σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, που ακολουθείται από την ενεργοποίηση της c-Jun και της MAPK που ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.[42]



Εικόνα 4.3.: Τα μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται οι υποδοχείς ErbB.[45]

4.3. ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ErbB ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οι φαινότυποι των ποντικών με ελαττωματικά μέλη ErbB καταδεικνύουν τον εκτεταμένο ρόλο που διαδραματίζουν αυτοί οι υποδοχείς στην ανάπτυξη και τη διατήρηση πολλών ιστών στα θηλαστικά. Η μη ομαλή σηματοδότηση μέσω της οικογένειας των υποδοχέων EGF εμπλέκεται σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες.

Η ψωρίαση για παράδειγμα μπορεί να οφείλεται εν μέρει σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του EGFR.

Το *Mycobacterium leprae* μπορεί να συνδεθεί άμεσα με τον ErbB2, ενεργοποιώντας τον υποδοχέα και τη σηματοδότηση MAPK. Ανεξάρτητα από τον διμερισμό με άλλους υποδοχείς ErbB, η ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί σε απομυελίνωση των νευρών και σε περιφερικές νευροπάθειες που είναι χαρακτηριστικές της λέπρας.

Η οικογένεια των RTKs EGFR έχει πλέον εμπλακεί σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων κακοηθειών. Η υπερέκφραση και η μετάλλαξη των μελών της οικογένειας ErbB και των συνδεδετών τους έχουν εντοπιστεί σε καρκίνους του μαστού, του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του στομάχου, του παγκρέατος, των ωοθηκών, του εγκεφάλου, του προστάτη και των νεφρών. [42]

Gene	Malignancy	Alteration	Frequency
EGFR	Breast cancer	Gene amplification	5%
	Glioblastoma multiforme	Extracellular domain deletions and mutations Gene amplification	40–60%
	Non-small cell lung cancer	Kinase domain mutations	5–10% non-East Asian 30–50% East Asian
	Others	Gene amplification	Uncommon
ErbB2/HER2	Breast cancer	Gene amplification	20–30%
	Non-small cell lung cancer	Kinase domain mutation	4%
ErbB3	None reported		
ErbB4	Multiple	Kinase domain mutations	1–2% East Asian

Πίνακας 4.1.: Συσχετισμός της οικογένειας ErbB με τύπους καρκίνων στον άνθρωπο. [42]

Οι ErbB2 και EGFR έχουν εμπλακεί στην ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου στον άνθρωπο. Μερικές γενετικές αλλαγές που έχουν ανιχνευθεί στους ανθρώπινους όγκους περιλαμβάνουν γονιδιακή ενίσχυση που οδηγεί σε υπερέκφραση του υποδοχέα, μεταλλάξεις περιοχής ενεργοποίησης της κινάσης κυρίως στον EGFR, αλλά και στον ErbB2. Κάθε μεταβολή προάγει την συστηματική ενεργοποίηση του υποδοχέα, μια διαδικασία που οδηγεί στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η ενίσχυση του ErbB2, η οποία περιγράφηκε πριν από 20 χρόνια είναι η πρώτη σταθερή αλλοίωση που βρέθηκε στον καρκίνο του μαστού και εμφανίζεται σε περίπου 20% των σποραδικών όγκων. [43]

4.4. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού είναι ένας από τους συχνότερους καρκίνους που προσβάλλει τις γυναίκες και προκύπτει όταν τα κύτταρα του μαστού μεταλλάσσονται και γίνονται καρκινικά τα οποία πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν όγκους. Περίπου το 80% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού είναι μεταστατικοί, πράγμα που σημαίνει ότι ο όγκος μπορεί να εξαπλωθεί από το μαστό σας σε άλλες περιοχές του σώματός σας.

Ο καρκίνος του μαστού προσβάλλει συνήθως γυναίκες ηλικίας 50 ετών και άνω, αλλά μπορεί επίσης να προσβάλλει γυναίκες που είναι νεότερες ή ακόμη και οι άνδρες μπορεί να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού.[46]

4.4.1. ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η κατηγοριοποίηση του καρκίνου μαστού σε διάφορους τύπους και υποτύπους, συμβάλλει στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας, με όσο το δυνατόν λιγότερες δυνατές παρενέργειες. Οι συνήθεις τύποι καρκίνου του μαστού περιλαμβάνουν:[46]

- *Διηθητικός πορογενής καρκίνος του μαστού (IDC)*: Συναντάται στο 70-80% περιπτώσεων καρκίνου του μαστού. Τα καρκινικά κύτταρα που αρχικά σχηματίζονται στους γαλακτοφόρους πόρους, εξαπλώνονται και σε άλλα μέρη του ιστού του μαστού.
- *Λοβώδης καρκίνος του μαστού*: Ξεκινά από τους λοβούς (αδένες γάλακτος) του μαστού και συχνά εξαπλώνεται προς τον περιβάλλοντα ιστό του μαστού ή ακόμη και σε άλλα μέρη του σώματος. Είναι ο δεύτερος πιο συχνός καρκίνος του μαστού, και εμφανίζεται σε ποσοστό 10%.
- *Μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα in situ (DCIS)*: Αυτός ο τύπος καρκίνου ξεκινά στους γαλακτοφόρους πόρους του μαστού, όμως δεν εξαπλώνεται περαιτέρω. [47]

Στους λιγότερο συνηθισμένους τύπους καρκίνου του μαστού περιλαμβάνονται:[46]

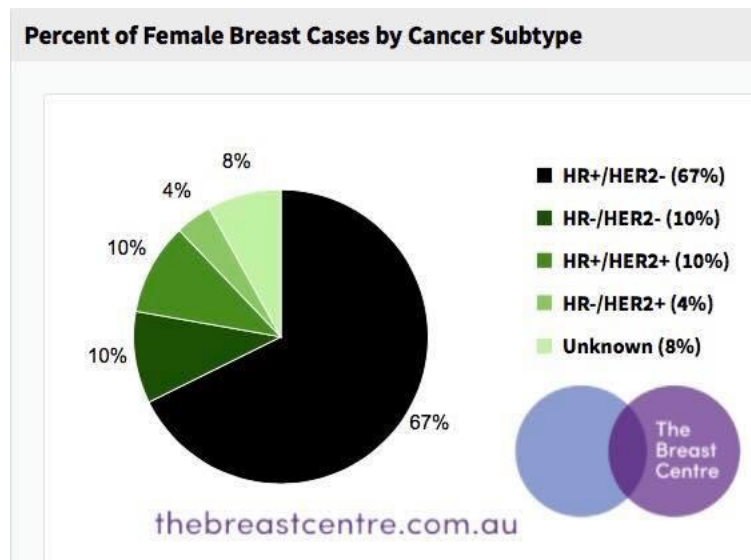
- *Τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC)*: ο οποίος είναι επιθετικός και εξαπλώνεται ταχύτερα από άλλους καρκίνους του μαστού.
- *Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού (IBC)*: εμφανίζεται όταν τα καρκινικά κύτταρα διεισδύουν στο δέρμα και στα λεμφαγγεία του μαστού. Αυτός ο σπάνιος, ταχέως αναπτυσσόμενος καρκίνος μοιάζει με εξάνθημα στο στήθος.
- *Νόσος του Paget του μαστού*: Αυτός ο σπάνιος καρκίνος προσβάλλει το δέρμα της θηλής και μπορεί να μοιάζει με εξάνθημα. Λιγότερο από το 4% όλων των καρκίνων του μαστού αποτελούν τη νόσο του Paget.[47]

4.4.1.1. ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Προκειμένου να αποτυπωθεί πλήρως η ετερογένεια του καρκίνου του μαστού, εφαρμόζεται μια περαιτέρω ταξινόμηση σε υποτύπους, με βάση την κατάσταση των υποδοχέων των κυττάρων. Οι υποδοχείς είναι πρωτεϊνικά μόρια στην επιφάνεια των κυττάρων. Μπορούν να προσελκύσουν ή να προσκολληθούν σε ορισμένες ουσίες στο αίμα, συμπεριλαμβανομένων ορμονών όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη. Τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να αναπτυχθούν. Η διαπίστωση εάν τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης βοηθά στο σχεδιασμό της κατάλληλης θεραπείας του καρκίνου του μαστού.[46], [48]

Οι διάφοροι υποτύποι περιλαμβάνουν:

- ER-θετικός (ER+) καρκίνος του μαστού έχει υποδοχείς οιστρογόνων, είναι ένας από τους κύριους παράγοντες της πλειονότητας των καρκίνων του μαστού, καθώς εκφράζεται στο 75% των καρκίνων του μαστού συνολικά.
- PR-θετικός (PR+) καρκίνος του μαστού έχει υποδοχείς προγεστερόνης.
- HR-θετικός (HR+) καρκίνος του μαστού έχει υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης.
- HR-αρνητικός (HR-) καρκίνος του μαστού δεν έχει υποδοχείς οιστρογόνων ή προγεστερόνης.
- HER2-θετικός (HER2+) καρκίνος του μαστού, ο οποίος έχει υψηλότερα από το φυσιολογικό επίπεδα της πρωτεΐνης HER2. Αυτή η πρωτεΐνη βοηθά τα καρκινικά κύτταρα να αναπτυχθούν. Περίπου το 15% έως 20% όλων των καρκίνων του μαστού είναι HER2-θετικοί, και μαζί με τον EGFR, είναι οι πιο συνηθισμένοι υποδοχείς που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα του μαστού. [48]



Εικόνα 4.4.: Ποσοστά των υποτύπων καρκίνου μαστού. [49]

4.4.2. ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος εμφανίζει μια σημαντική επιπλοκή και αυτή είναι η μετάστασή του, με αποτέλεσμα να ξαπλώνεται σε άλλες περιοχές του σώματός, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, των οστών, του ήπατος και των πνευμόνων. Μελέτες δείχνουν ότι περίπου 1 στις 3 γυναίκες που έχουν καρκίνο σε πρώιμο στάδιο αναπτύσσουν αργότερα μεταστατικό καρκίνο του μαστού. [46]

Ο καρκίνος του μαστού διέρχεται από διάφορα στάδια. Αυτό συμβάλλει στον σχεδιασμό κατάλληλης θεραπείας και εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος του

καρκίνου του μαστού, το μέγεθος και τη θέση του όγκου καθώς και από το αν ο καρκίνος έχει κάνει μετάσταση. Τα στάδια λοιπόν του καρκίνου του μαστού είναι:

Στάδιο 0: Η ασθένεια δεν έχει εξαπλωθεί ακόμη από τους πόρους του μαστού σε άλλα μέρη του μαστού.

Στάδιο I: Σε αυτό το στάδιο παρατηρούνται καρκινικά κύτταρα σε κοντινό ιστό από τον μαστό.

Στάδιο II: Τα καρκινικά κύτταρα έχουν σχηματίσει όγκο ή όγκους. Ο όγκος είναι είτε μικρότερος από 2 εκατοστά σε διάμετρο και έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες της μασχάλης είτε μεγαλύτερος από 5 εκατοστά σε διάμετρο αλλά δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες της μασχάλης. Οι όγκοι σε αυτό το στάδιο μπορεί να έχουν διάμετρο μεταξύ 2 και 5 εκατοστών και μπορεί να επηρεάσουν ή να μην επηρεάσουν τους κοντινούς λεμφαδένες.

Στάδιο III: Το στάδιο III αναφέρεται συνήθως ως τοπικά προχωρημένος καρκίνος του μαστού.

Στάδιο IV: Ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί από τον μαστό σας σε περιοχές όπως τα οστά, το ήπαρ, οι πνεύμονες ή ο εγκέφαλος.[46]

4.5. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ

Η χειρουργική επέμβαση είναι η κύρια θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Οι χειρουργικές επεμβάσεις για τον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν:

Μαστεκτομή: Η μαστεκτομή είναι μια χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση μέρους ή όλου του ιστού του μαστού. Αποτελεί τόσο θεραπεία όσο και πρόληψη για τον καρκίνο του μαστού.

Ογκεκτομή: Η χειρουργική αυτή επέμβαση είναι μια κοινή θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού. Σε αντίθεση με τη μαστεκτομή (η οποία αφαιρεί ολόκληρο τον μαστό), η ογκεκτομή αφαιρεί τα καρκινικά κύτταρα και ένα μικρό περιθώριο υγιούς ιστού του μαστού. Μετά την επέμβαση μπορεί να χρειαστεί ακτινοβολία ή κάποια άλλη θεραπεία.[46]

Οι χειρουργική επέμβαση μπορεί να συνδυαστεί με μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες θεραπείες:

Χημειοθεραπεία: Η χημειοθεραπεία είναι μια κοινή θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού. Λειτουργεί με τη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων στο μαστό ή όπου έχουν εξαπλωθεί από το μαστό. Οι ογκολόγοι χρησιμοποιούν συχνά χημειοθεραπεία πριν ή/και μετά από χειρουργική επέμβαση για τον καρκίνο του μαστού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποιο χημειοθεραπευτικό φάρμακο, συνδυασμός φαρμάκων ή να χρησιμοποιηθεί η χημειοθεραπεία με άλλες θεραπείες.

Η χημειοθεραπεία για τον καρκίνο του μαστού προκαλεί παρενέργειες, ορισμένες από τις οποίες μπορεί να μην εμφανιστούν παρά μόνο πολύ καιρό μετά το τέλος της θεραπείας.

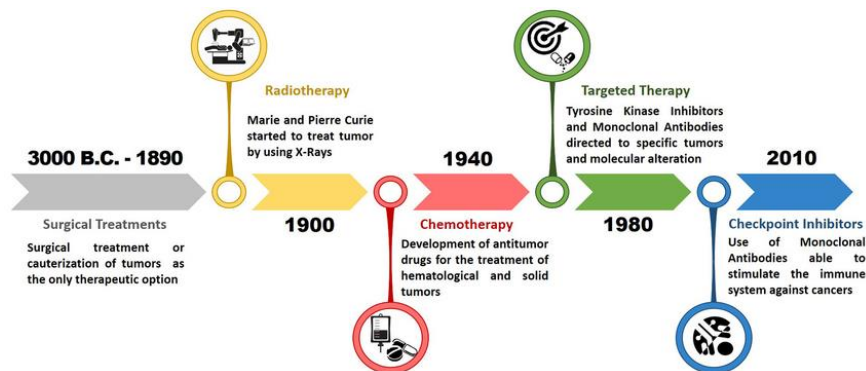
Ακτινοθεραπεία: Η ακτινοθεραπεία για τον καρκίνο του μαστού χρησιμοποιεί υψηλής ισχύος ακτίνες Χ για να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα στο μαστό. Η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται μετά τη χειρουργική επέμβαση για την εξάλειψη των εναπομεινάντων καρκινικών κυττάρων. Τα άτομα με μεταστατικό καρκίνο του μαστού μπορεί να υποβληθούν σε αυτή τη θεραπεία για την ανακούφιση των συμπτωμάτων του καρκίνου του μαστού ή των συμπτωμάτων από άλλες περιοχές του σώματός τους.

Ανοσοθεραπεία: Η ανοσοθεραπεία για τον καρκίνο του μαστού είναι μια θεραπεία που βοηθά το ανοσοποιητικό σύστημα να επιτεθεί και να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Χρησιμοποιείται πλέον για τη θεραπεία του ιάσιμου (πρώιμου σταδίου) και μεταστατικού τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού υψηλού κινδύνου. Επίσης χρησιμοποιείται ως θεραπεία για τον HER2-θετικό και ER-θετικό καρκίνο του μαστού.

Ορμονοθεραπεία: Η ορμονοθεραπεία (που ονομάζεται επίσης ενδοκρινική θεραπεία) είναι μια κοινή θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς (HR+). Η ορμονοθεραπεία για τον καρκίνο του μαστού λειτουργεί: (i) αποκλείοντας την πρόσβαση των καρκινικών κυττάρων στα οιστρογόνα και την προγεστερόνη, (ii) μειώνοντας τα επίπεδα οιστρογόνων. Τα καρκινικά κύτταρα σταματούν να αναπτύσσονται όταν δεν λαμβάνουν αρκετά οιστρογόνα.

Στοχευμένη θεραπεία: Είναι η θεραπεία του καρκίνου που στοχεύει στις γενετικές αλλαγές ή μεταλλάξεις που μετατρέπουν τα υγιή κύτταρα σε καρκινικά κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο τα καρκινικά κύτταρα αντιμετωπίζονται χωρίς να βλάπτουν τα υγιή κύτταρα.

Η στοχευμένη θεραπεία εφαρμόζεται ως πρώτη γραμμή ή αρχική θεραπεία. Επίσης μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες θεραπείες.[50]



Εικόνα 4.5.: Χρονοδιάγραμμα εξέλιξης τεχνικών για τη θεραπεία του καρκίνου μαστού.[51]

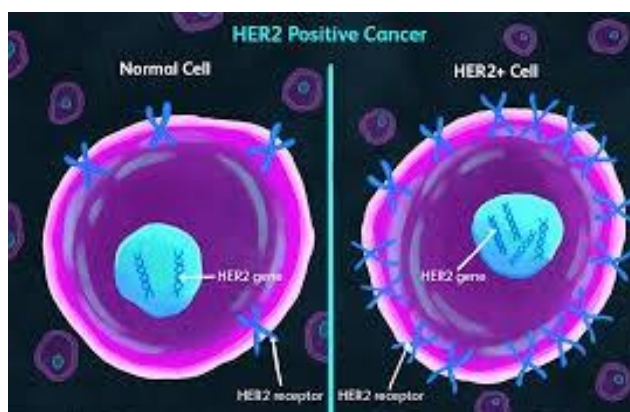
4.6. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η στοχευμένη θεραπεία χρησιμοποιεί φάρμακα που στοχεύουν στις πρωτεΐνες των καρκινικών κυττάρων του μαστού, οι οποίες τα βοηθούν να αναπτυχθούν, να εξαπλωθούν και να επιβιώσουν περισσότερο. Τα στοχευμένα φάρμακα από την άλλη, δρουν καταστρέφοντας τα καρκινικά κύτταρα ή επιβραδύνοντας την ανάπτυξή τους, με παρενέργειες διαφορετικές από τη χημειοθεραπεία.[51]

Τα μονοκλωνικά αντισώματα, μια από τις μορφές στοχευμένης θεραπείας, αλλά και ανοσοθεραπείας, εφόσον ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, λειτουργούν με περισσότερους από έναν τρόπους για τον έλεγχο των καρκινικών κυττάρων.

Βασικό πλεονέκτημα των φαρμάκων αυτών είναι ότι εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και προσεγγίζουν σχεδόν όλες τις περιοχές του σώματος, καθιστώντας τα ιδιαίτερα χρήσιμα κατά των καρκίνων που έχουν εξαπλωθεί και έχουν κάνει μετάσταση. Ορισμένα επίσης φάρμακα στοχευμένης θεραπείας δρουν συνεργατικά με άλλους τύπους θεραπείας για να επιτευχθούν καλύτερα αποτελέσματα, όπως η χημειοθεραπεία.[52]

Σε περίπου 15% έως 20% των καρκίνων του μαστού, τα καρκινικά κύτταρα υπερεκκρίνουν μια πρωτεΐνη που προάγει την ανάπτυξη και είναι γνωστή ως HER2. Αυτοί οι καρκίνοι, γνωστοί ως HER2-θετικοί καρκίνοι του μαστού, τείνουν να αναπτύσσονται και να εξαπλώνονται πιο επιθετικά από τους HER2-αρνητικούς καρκίνους του μαστού. Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι φαρμάκων που στοχεύουν την πρωτεΐνη HER2.[53]



Εικόνα 4.6.: Αντιπαράθεση ενός καρκινικού HER2+ κυττάρου (δεξιά) με ένα φυσιολογικό (αριστερά).[54]

4.6.1. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

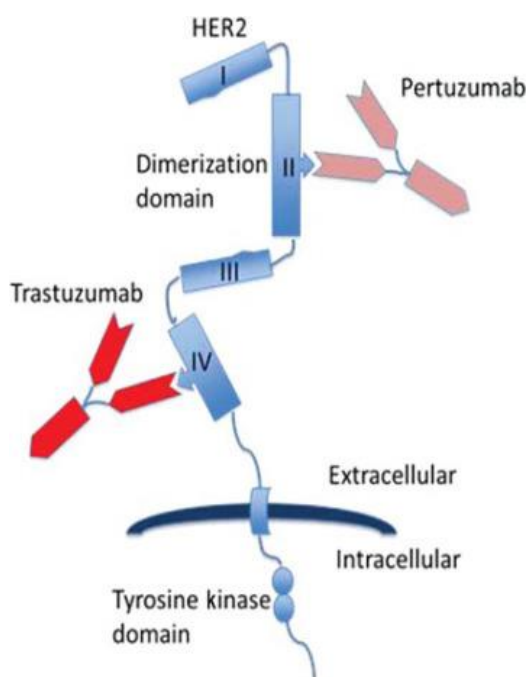
Ο μηχανισμός δράσης των υποδοχών ErbB όπως έχει προαναφερθεί, εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις των εξωκυττάρων περιοχών τους, οι οποίες μπορεί να είναι προσβάσιμες σε μονοκλωνικά αντισώματα με αποτέλεσμα να διαταραχθεί η λειτουργία τους.[42]

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι τεχνητές εκδοχές των πρωτεϊνών του ανοσοποιητικού συστήματος (αντισώματα) που έχουν σχεδιαστεί για να προσκολλώνται σε έναν συγκεκριμένο στόχο. Στην προκειμένη περίπτωση, προσκολλώνται στην πρωτεΐνη HER2 στα καρκινικά κύτταρα, η οποία μπορεί να συμβάλει στη διακοπή της ανάπτυξης των κυττάρων.[52]

Κάποια από τα μονοκλωνικά αντισώματα που εγκρίθηκαν για κλινική χρήση και στοχεύουν του υποδοχείς ErbB2:

Τραστοζουμάμπη (Herceptin): Η τραστοζουμάμπη προσδένεται απευθείας στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα ErbB2 και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία τόσο του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο όσο και του προχωρημένου καρκίνου του μαστού, προκαλώντας υποχώρηση του όγκου στο 11-26% των ασθενών. Αυτό το φάρμακο χορηγείται συχνά με χημειοθεραπεία, αυξάνοντας την επιβίωση. Το φάρμακο αυτό χορηγείται συνήθως για 6 μήνες έως ένα έτος. Για τον προχωρημένο καρκίνο του μαστού, η θεραπεία συχνά χορηγείται για όσο διάστημα το φάρμακο είναι χρήσιμο (χορηγείται σε μια ενδοφλέβια).

Περτουζουμάμπη (Perjeta): Η περτουζουμάμπη έχει την ικανότητα να προσδένεται στον βραχίονα διμερισμού στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα ErbB2, παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση μέσω διμερισμού του. Μπορεί να χορηγηθεί με τραστοζουμάμπη και χημειοθεραπεία, είτε πριν είτε μετά από χειρουργική επέμβαση για τη θεραπεία καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο, ή για τη θεραπεία προχωρημένου καρκίνου του μαστού (χορηγείται ενδοφλέβια).[42], [52]



Εικόνα 4.7.: Τρόπος δράσης της τραστοζουμάμπης και της περτουζουμάμπης στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα ErbB2.[55]

Margetuximab (Margenza): Αυτό το μονοκλωνικό αντίσωμα HER2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με χημειοθεραπεία για τη θεραπεία του προχωρημένου καρκίνου του μαστού, συνήθως αφού έχουν δοκιμαστεί τουλάχιστον τα άλλα δύο φάρμακα που στοχεύουν το HER2 (ενδοφλέβια χορήγηση).[52]

4.6.2. ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ- ΦΑΡΜΑΚΩΝ (ADC)

Ζητήματα όπως η προσβασιμότητα στους ιστούς, η φαρμακοκινητική και οι αλληλεπιδράσεις με το ανοσοποιητικό σύστημα δημιούργησαν την ανάγκη εκμετάλλευσης νεότερων, ασφαλέστερων και αποτελεσματικότερων στοχευμένων θεραπειών.

Μια καινοτόμος θεραπευτική προσέγγιση, γνωστή ως συζεύγματα αντισωμάτων-φαρμάκων (ADC), χρησιμοποιήθηκε πριν 40 χρόνια για τη θεραπεία προχωρημένου καρκίνου. Τα ADC είναι μια κατηγορία φαρμακολογικών ενώσεων που συνδυάζουν την ισχύ των αντικαρκινικών φαρμάκων με την εξειδίκευση των αντισωμάτων στη θέση του όγκου, συνδυάζοντας έτσι χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Αποτελούνται συνεπώς από τρία μέρη, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, έναν συνδέτη και ένα κυτταροτοξικό φάρμακο. Μερικά πλεονεκτήματα της στρατηγικής αυτής είναι, σταθερότητα του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος, κυτταροτοξικότητα ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μειωμένες επιδράσεις εκτός στόχου.[53]

Σε αυτή την περίπτωση, το αντίσωμα κατά του HER2 δρα σαν σήμα εντοπισμού, προσκολλώντας στην πρωτεΐνη HER2 των καρκινικών κυττάρων, φέρνοντας τη χημειοθεραπεία απευθείας σε αυτά.

Ado-τραστοζουμάμπη emtansine (Kadcyla): Αυτό το σύζευγμα αντισώματος-φαρμάκου συνδέει το αντίσωμα του HER2 με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο emtansine. Χρησιμοποιείται από μόνο του για τη θεραπεία καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο μετά από χειρουργική επέμβαση ή για τη θεραπεία προχωρημένου καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που έχουν ήδη υποβληθεί σε θεραπεία με τραστοζουμάμπη και χημειοθεραπεία (χορηγείται σε φλέβα).

Fam-τραστοζουμάμπη deruxtecan (Enhertu): Αυτό το σύζευγμα αντισώματος-φαρμάκου συνδέει το αντίσωμα HER2 με ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο deruxtecan. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνο του για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού που δεν μπορεί να αφαιρεθεί με χειρουργική επέμβαση ή που έχει εξαπλωθεί (μετάσταση) σε άλλο μέρος του σώματος, αφού έχει δοκιμαστεί τουλάχιστον 1 άλλο στοχευμένο φάρμακο κατά του HER2 (ενδοφλέβια χορήγηση). [52]

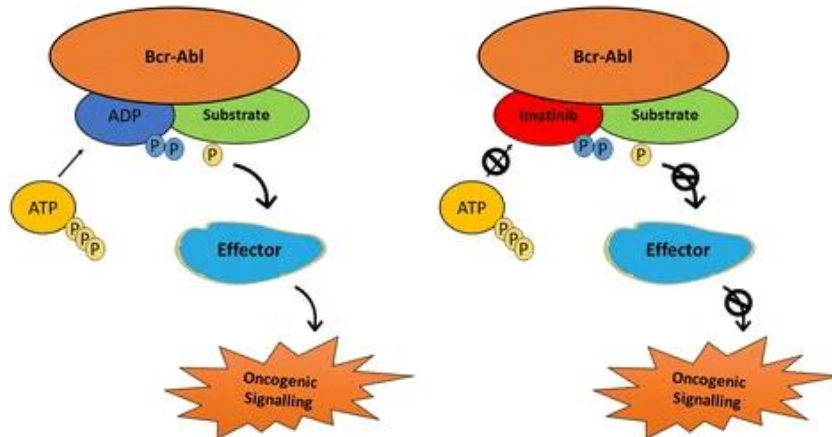
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

5.1. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Η ανάπτυξη αναστολέων κινάσης για τη θεραπεία ανθρώπινων καρκίνων ξεκίνησε στα μέσα της δεκαετίας του 1970. Το 1978 βρέθηκε ότι το πρώτο ογκογονίδιο ήταν μια πρωτεϊνική κινάση. Τα επόμενα χρόνια συντέθηκαν οι σουλφοναμίδες ναφθαλίνης, οι πρώτοι αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης, οι οποίοι αποτέλεσαν πρότυπα για την ανάπτυξη περαιτέρω μορίων. Η σταυροσπορίνη επιπλέον, ένα αντιμυκητιακό φάρμακο, αποδείχθηκε ότι είναι νανομοριακός αναστολέας της PKC. Αυτό το φάρμακο χρησιμοποιήθηκε αργότερα ως μητρική ένωση για τη σύνθεση διαφόρων αναλόγων, δυνητικών αναστολέων της PKC. Το 1991 αποσαφηνίστηκε η τρισδιάστατη δομή της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και έγινε φανερό ότι τα κατάλοιπα που εμπλέκονται στη δέσμευση του ATP διατηρούνται από κινάση σε κινάση.[9]

Τελικά, η επανάσταση έγινε το 2001, όταν εγκρίθηκε το imatinib (ιματινίμπη), ένα παράγωγο φαινυλο-αμινο-πυριμιδίνης που στοχεύει στην ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης ABL1, για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Η κλινική στόχευση του γονιδίου BCR-ABL, που σχηματίζεται από τη σύντηξη του γονιδίου ABL από το χρωμόσωμα 9 με το γονίδιο BCR στο χρωμόσωμα 22, που ονομάζεται επίσης χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας, βελτίωσε την κλινική αντιμετώπιση των ασθενών με λευχαιμία. Λόγω του ευρέος φάσματος της ιματινίμπης έχει έκτοτε εγκριθεί για διάφορες άλλες ογκολογικές ενδείξεις. [56]



Εικόνα 5.1.: Η διακοπή της οδού Bcr-Abl μπορεί να επιτευχθεί με το Gleevec (imatinib).[9]

Μετά την έγκριση του imatinib από τον FDA, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες στρατηγικές για την ανάπτυξη αναστολέων κινάσης για τη θεραπεία του καρκίνου. [9]

Μέχρι σήμερα, ο FDA έχει εγκρίνει 80 θεραπευτικούς αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους. Από τα 80 εγκεκριμένα φάρμακα, σαράντα τρία στοχεύουν σε πρωτεϊνικές κινάσες-υποδοχείς τυροσίνης, είκοσι αναστέλλουν μη-υποδοχικές κινάσες πρωτεΐνης-τυροσίνης, δεκατρία ανταγωνίζονται πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τέσσερα στοχεύουν σε πρωτεϊνικές κινάσες διπλής εξειδίκευσης (MEK1/2). Τα δεδομένα δείχνουν ότι 69 από αυτούς τους αναστολείς έχουν εγκριθεί για τη διαχείριση στερεών και μη στερεών νεοπλασιών. Επίσης, επειδή η εξειδίκευση πολλών από τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών δεν έχει αξιολογηθεί αυστηρά, είναι πιθανό ότι πολλοί ακόμη αποτελούν αναστολείς πολυκινασών. Η ταυτόχρονη αναστολή πολλών πρωτεϊνικών κινασών έχει πιθανά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Έντεκα από τους εγκεκριμένους από τον FDA ανταγωνιστές πρωτεϊνικών κινασών χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μη νεοπλασματικών ασθενειών. Οκτώ από τους εγκεκριμένους από τον FDA αναστολείς κινασών, σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τα ένζυμα-στόχους τους και κατά συνέπεια ταξινομούνται ως TCIs (ομοιοπολικοί αναστολείς στόχευσης), όπως είναι το neratinib. Οι στενά συνδεδεμένες EGFR και ErbB4 της οικογένειας των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα ErbB1/2/3/4 είναι οι συχνότερες πρωτεϊνικές κινάσες που φέρουν μεταλλάξεις σε όλους τους καρκίνους.

Από τους 80 εγκεκριμένους από τον FDA αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, οι είκοσι επτά συνταγογραφούνται για τη θεραπεία περισσότερων από μία ασθενειών. Παραδείγματος χάριν, το imatinib έχει εγκριθεί για τη διαχείριση οκτώ διαφορετικών παθήσεων.[57]

Drug	Code	Company	Trade name	Year approved	Primary targets ^a	Therapeutic indications ^b
Abemaciclib	LY2835219	Lilly	Verzenio	2017	CDK4/6	HER2-positive breast cancer, both monotherapy and combination therapy
Abrocitinib	PF-04965842	Pfizer	Cibinqo	2022	JAK1	Atopic dermatitis
Acalabrutinib	ACP-196	Acerta Pharma	Calquence	2017	BTK	Mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma
Afatinib	BIBW 2992	Boehringer Ingelheim	Tovok	2013	ErbB1/2/4	NSCLC (non-small cell lung cancer) and squamous NSCLC
Alectinib	CH5424802	Roche	Alecensa	2015	ALK, RET	Third-line Ph ⁺ chronic myelogenous leukemia (CML) and CML with T315I mutations
Asciminib	ABL001	Novartis	Scemblix	2021	BCR-Abl	Ph ⁺ CML
Avapritinib	BLU285	Blueprint Medicines	Ayvakit	2020	PDGFR α	Gastrointestinal stromal tumors with a PDGFR α exon 18 mutation
Axitinib	AG-013736	Pfizer	Inlyta	2012	VEGFR1/2/3	Advanced renal cell carcinoma
Baricitinib	LY 3009104	Lilly	Olumiant	2018	JAK1/2	Rheumatoid arthritis
Belumosudil	KD025	Kadmon Pharma	Rezurock	2021	ROCK2	Graft vs. host disease
Binimetinib	MEK162	Array BioPharma	Mektovi	2018	MEK1/2	Melanoma with BRAF V600E or V600K mutations with encorafenib
Bosutinib	SKI-606	Pfizer	Bosulif	2012	BCR-Abl	Ph ⁺ chronic myelogenous leukemia
Brigatinib	AP 26113	Ariad Pharm	Alumbrig	2017	ALK	ALK-positive NSCLC
Cabozantinib	BMS-907351	Exelixis	Cometriq & Cabometyx	2012	RET, VEGFR2	Advanced medullary thyroid cancer, renal cell and hepatocellular carcinomas
Capivasertib	AZD5363	AstraZeneca	Truqap	2023	HER2	Hormone receptor (HR)-positive, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-negative breast cancer
Capmatinib	INC-280	Novartis	Tabrecta	2020	MET (HGFR)	NSCLC with MET exon 14 skipping mutations
Ceritinib	LDK378	Novartis	Zykadia	2014	ALK	ALK-positive NSCLC resistant to crizotinib
Cobimetinib	GDC-0973	Genentech	Cotellic	2015	MEK1/2	BRAF V600E or V600K mutation positive melanomas in combination with vemurafenib
Crizotinib	PF 2341066	Pfizer	Xalkori	2011	ALK, ROS1	ALK- or ROS1-positive NSCLC
Dabrafenib	GSK2118436	GSK	Tafinlar	2013	BRAF	BRAF mutation positive melanoma, NSCLC with BRAF V600E mutations, anaplastic thyroid cancer with BRAF V600E mutations
Dacomitinib	PF-00299804	Pfizer	Visimpro	2018	EGFR	EGFR-mutant NSCLC
Dasatinib	BMS-354825	Bristol Myers Squibb	Sprycel	2006	BCR-Abl	Ph ⁺ chronic myelogenous leukemia or acute lymphoblastic leukemia
Deucravacitinib	BMS-986165	Bristol Myers Squibb	Sotyktu	2022	TYK2	Psoriasis
Encorafenib	LGX818	Array BioPharma	Braftovi	2018	BRAF	BRAF V600E or V600K mutation positive melanoma with binimetinib; BRAF V600E mutation positive colorectal cancer with cetuximab
Entrectinib	RXDX-101	Genentech	Rozlytrek	2019	TRKA/B/C, ROS1	Solid tumors with NTRK fusion proteins, ROS1-positive NSCLC
Erdafitinib	JNJ-42756493	Jansen Pharm	Balversa	2019	FGFR1/2/3/4	Urothelial bladder cancer
Erlotinib	OSI-774	Genentech	Tarceva	2004	EGFR	NSCLC, pancreatic cancer
Everolimus	RAD001	Novartis	Afinitor	2009	FKBP12/mTOR	HER2-negative breast cancer, pancreatic neuroendocrine tumors, RCC, angiomyolipoma, subependymal giant cell astrocytoma
Fedratinib	TG101348	Celgene	Inrebic	2019	JAK2	Myelofibrosis
Fostamatinib	R788	Rigel Pharma	Tavalisse	2018	SYK	Chronic immune thrombocytopenia
Fruquintinib	HMPL013	Takeda	Fruzaqla	2023	VEGFR2	Metastatic colorectal cancer
Futibatinib	TAS_120	Tiaho Pharma	Lytgobi	2022	FGFR2	Bile duct cancers (cholangiocarcinomas) with FGFR2 fusion proteins or other rearrangements
Gefitinib	ZD1839	AstraZeneca	Iressa	2003	EGFR	NSCLC with exon 19 deletions or exon 21 substitutions
Gilteritinib	ASP2215	Astellas Pharma	Xospata	2018	Flt3	FLT3-mutation positive acute myeloid leukemia
Ibrutinib	PCI-32765	Johnson & Johnson	Imbruvica	2013	BTK	Chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, marginal zone lymphoma, graft vs. host disease, Waldenström macroglobulinemia
Imatinib	STI571	Novartis	Gleevec	2001	BCR-Abl	Ph ⁺ chronic myelogenous leukemia or acute lymphoblastic leukemia, aggressive systemic mastocytosis, chronic eosinophilic leukemia, dermatofibrosarcoma protuberans, hypereosinophilic syndrome, gastrointestinal stromal tumors, myelodysplastic/myeloproliferative disease
Infigratinib	BGJ 398	QED Therapeutics	Truseltiq	2021	FGFR2	Cholangiocarcinomas with FGFR2 fusions or other rearrangement
Lapatinib	GW572016	GSK	Tykerb	2007	EGFR, ErbB2/HER2	HER2-positive breast cancer
Larotrectinib	LOXO-101	Bayer	Vitrakvi	2018	TRKA/B/C	Solid tumors with NTRK fusion proteins
Lenvatinib	AK175809	Easai Co.	Lenvima	2015	VEGFR, RET	Differentiated thyroid cancer, hepatocellular carcinoma, renal cell carcinoma, endometrial carcinoma
Lorlatinib	PF-06463922	Pfizer	Lorbrena	2018	ALK	ALK-positive NSCLC
Midostaurin	CPG 41251	Novartis	Rydapt	2017	Flt3	FLT3 mutation positive AML, mastocytosis, mast cell leukemia
Mobocertinib	TAK-788	Takeda Pharm.	Exkivity	2021	EGFR	NSCLC with EGFR-positive exon 20 insertions
Momelotinib	CYT 387	GSK	Ojjaara	2023	JAK2	Myelofibrosis patients with anemia

Drug	Code	Company	Trade name	Year approved	Primary targets ^b	Therapeutic indications ^c
Neratinib	HKI-272	Puma Biotech	Nerlynx	2017	ErbB2/ HER2	HER2-positive breast cancer
Netarsudil	AR11324	Aerie Pharma	Rhopressa	2018	ROCK1/2	Glaucoma
Nilotinib	AMN107	Novartis	Tasigna	2007	BCR-Abl	Ph ⁺ chronic myelogenous leukemia
Nintedanib	BIBF-1120	Boehringer Ingelheim	Vargatef	2014	FGFR1/2/3	Idiopathic pulmonary fibrosis
Osimertinib	AZD-9292	AstraZeneca	Tagrisso	2015	EGFR	NSCLC with exon 19 or exon 21 substitutions (L858R) or T790M mutations
Pacritinib	SB1518	CTI BioPharma	Vonjo	2022	JAK2	Myelofibrosis
Palbociclib	PD-0332991	Parke-Davis	Ibrance	2015	CDK4/6	Breast cancer (HER2-positive or negative) combination therapy
Pazopanib	GW786034	GSK	Votrient	2009	VEGFR1/2/ 3	Renal cell carcinoma, soft tissue sarcomas
Pemigatinib	INC054828	Incyte Corp.	Pemazyre	2020	FGFR2	Advanced cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or rearrangements
Pexidartinib	PLX3397	Plexxikon Inc	Turalio	2019	CSF1R	Tenosynovial giant cell tumors
Pirtobrutinib	LOXO-305	Lilly	Jaypirca	2023	BTK	Mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma
Ponatinib	AP 24534	Ariad Pharm	Iclusig	2012	BCR-Abl	Ph ⁺ chronic myelogenous leukemia, acute lymphoblastic leukemia
Pralsetinib	Blu-667	Blueprint Medicines	Gavreto	2020	RET	RET-fusion protein NSCLC, RET mutant medullary thyroid cancer, RET fusion thyroid cancer
Quizartinib	ASP-2869	Daichi Sankyo	Vanflyta	2023	Flt3	FLT3 internal tandem duplication positive acute myelogenous leukemia in combination with cytarabine and daunorubicin
Regorafenib	BAY 73-4506	Bayer	Stivarga	2012	VEGFR1/2/ 3	Colorectal cancer, hepatocellular carcinoma, gastrointestinal stromal tumors
Repotrectinib	TX-0005	Bayer	Augtyro	2023	ROS1	ROS1-positive NSCLC
Ribociclib	LEE011	Novartis	Kisqali	2017	CDK4/6	Breast cancer (HER2-positive or negative) combination therapy
Ripretinib	DCC-2618	Decipera Pharma.	Qinlock	2020	Kit, PDGFR α	Fourth-line treatment for gastrointestinal stromal tumors
Ritlecitinib	PF06651600	Pfizer	Litfalo	2023	JAK3	Alopecia areata
Ruxolitinib	INC0-018424	Incyte Corp.	Jakafi	2011	JAK1/2/3, TYK	Myelofibrosis, polycythemia vera, graft vs. host disease, atopic dermatitis (applied topically)
Selpercatinib	CEGM9YBNG	Lilly	Retevmo	2020	RET	RET fusion NSCLC, RET fusion solid tumors, RET fusion thyroid cancers and RET mutant medullary thyroid cancer
Selumetinib	AZD6224	AstraZeneca	Koselugo	2020	MEK1/2	Neurofibromatosis type I
Sitrolimus	AY 22989	Wyeth, LLC	Rapamycin	1999	FKBP12/ mTOR	Kidney transplant, lymphangioleiomyomatosis
Sorafenib	BAY 43-9006	Bayer	Nexavar	2005	VEGFR1/2/ 3	Hepatocellular carcinoma, renal cell carcinoma, differentiated thyroid cancer
Sunitinib	SU11248	Pfizer	Sutent	2006	VEGFR2	Gastrointestinal stromal tumors, renal cell carcinoma, pancreatic neuroendocrine tumors
Temsirolimus	CCI-779	Wyeth, LLC	Torisel	2007	FKBP12/ mTOR	Advance renal cell carcinoma
Tepotinib	EMD 1214063	EMD Serono Inc.	Tepmetko	2021	MET (HGFR)	MET-mutant NSCLC
Tivozanib	AV951	AVEO Pharma	Fotvida	2021	VEGFR2	Third-line treatment of renal cell carcinoma
Tofacitinib	CP-690550	Pfizer	Tasocitinib	2012	JAK3	Rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ulcerative colitis
Trametinib	GSK1120212	GSK	Mekinist	2013	MEK1/2	Melanoma with BRAF V600E or V600K mutations with dabrafenib; NSCLC with BRAF V600E mutations with dabrafenib
Trilaciclib	G1T28	G1 Therapeutics	Cosela	2021	CDK4/6	Chemotherapy-induced myelosuppression when administered prior to a platinum/etoposide-containing regimen or topotecan-containing regimen for extensive-stage small cell lung cancer
Tucatinib	ONT-380	Seattle Genetics	Tukysa	2020	ErbB2/ HER2	HER2-positive breast cancer and colon cancer
Upadacitinib	ABT-494	AbbVie	Rinvoq	2019	JAK1	Second-line treatment for rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, atopic dermatitis
Vandetanib	ZD6474	Sanofi	Zactima	2011	VEGFR2	Medullary thyroid cancer
Vemurafenib	PLX-4032	Genentech	Zelboraf	2011	BRAF	BRAF V600E or V600K mutation positive melanoma with cobimetinib; Chester-Erdheim disease
Zanubrutinib	BGB3111	BeiGene	Brukinsa	2019	BTK	Mantle cell lymphoma

Πίνακας 5.1.: Εγκεκριμένοι από τον FDA αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους.[57]

5.2. ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

Οι αναστολείς κινασών είναι αποτελεσματικοί για τη θεραπεία του καρκίνου, ιδίως στοχεύοντας σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις που οδηγούν κυρίως στην καρκινογένεση. Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την ικανότητά τους να καταλύουν τη μεταφορά του τελικού φωσφορικού άλατος του ATP στα υποστρώματα που συνήθως περιέχουν ένα κατάλοιπο σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης ή και ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους.

Αρχικά, οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες ονομάστηκαν αναστολείς κινάσης τύπου I, II και III. Οι Dar και Sakot όρισαν τον αναστολέα κινάσης τύπου I ως "ένα μικρό μόριο που προσδέεται στην ενεργό διαμόρφωση μιας κινάσης στον θύλακα του ATP", τον

αναστολέα τύπου II ως "ένα μικρό μόριο που προσδένεται σε μια ανενεργή (συνήθως Asp-Phe-Gly (DFG)-OUT) διαμόρφωση μιας κινάσης" και τον αναστολέα τύπου III ως "έναν μη ανταγωνιστικό ATP αναστολέα" ή αλλοστερικό αναστολέα. Αργότερα, εισήχθησαν νέα κατηγορίες αναστολέων κινάσης και πλέον οι αναστολείς έχουν κατηγοριοποιηθεί σε επτά τύπους. [58], [59]

Οι **αναστολείς τύπου I** προσδένονται στο καταλυτικό κέντρο μιας κινάσης-στόχου σε ενεργό διαμόρφωση, όπου το συντηρημένο μοτίβο Asp-Phe-Gly (DFG) του βρόγχου ενεργοποίησης είναι προσανατολισμένο προς το εσωτερικό της κινάσης και ευθυγραμμίζεται με την περιοχή δέσμευσης του ATP (διαμόρφωση DFG-in). Ένας υποτύπος του αναστολέα τύπου I, ο τύπος 1½, δεσμεύεται στην περιοχή πρόσδεσης του ATP και επεκτείνεται στον πίσω θύλακα (διαμόρφωση DFG-in και C-έλικα προς τα έξω). Υπάρχουν πολλοί εγκεκριμένοι από τον FDA αναστολείς τύπου I για τη θεραπεία του καρκίνου, όπως το crizotinib, dasatinib, erlotinib και vemurafenib. Ένα παράδειγμα ενός αναστολέα τύπου 1½ που βρίσκεται σήμερα σε κλινική χρήση είναι το lapatinib.

Οι **αναστολείς τύπου II**, από την άλλη, προσδένονται αντιστρεπτά στην κινάση-στόχο σε ανενεργή διαμόρφωση, όπου το μοτίβο DFG απομακρύνεται από τη θέση πρόσδεσης ATP (διαμόρφωση DFG-out). Η αλληλεπίδραση των αναστολέων με την κινάση οδηγεί στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, προσδίδοντας υψηλό βαθμό επιλεκτικότητας. Παραδείγματα αυτού του τύπου αναστολέα είναι το imatinib και το sorafenib.

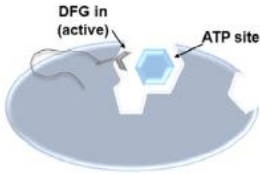
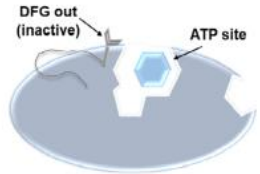

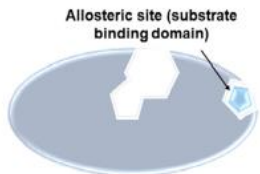
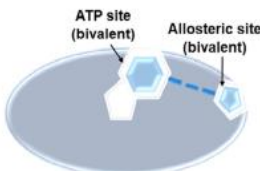
Οι **αναστολείς τύπου III** προσδένονται μακριά από την καταλυτική θέση πρόσδεσης του ATP, με αποτέλεσμα να τροποποιούν τη δραστηριότητα της κινάσης με αλλοστερικό τρόπο. Ταξινομούνται επίσης σε δύο υποτύπους: α) αναστολείς τύπου IIIA, οι οποίοι προσδένονται σε μια θέση στον θύλακα δέσμευσης αδενίνης δίπλα από τη θέση πρόσδεσης ATP και (β) οι αναστολείς τύπου IIIB που δεσμεύονται αλλού. Ορισμένοι από τους καλά χαρακτηρισμένους αναστολείς τύπου III είναι οι αναστολείς της MEK1/2 που προσδένονται σε μια συγκεκριμένη κοιλότητα δίπλα στη θέση δέσμευσης ATP. Παραδείγματα αυτού του τύπου αναστολέα που έχει εγκρίνει ο FDA περιλαμβάνουν το trametinib και το cobimetinib.

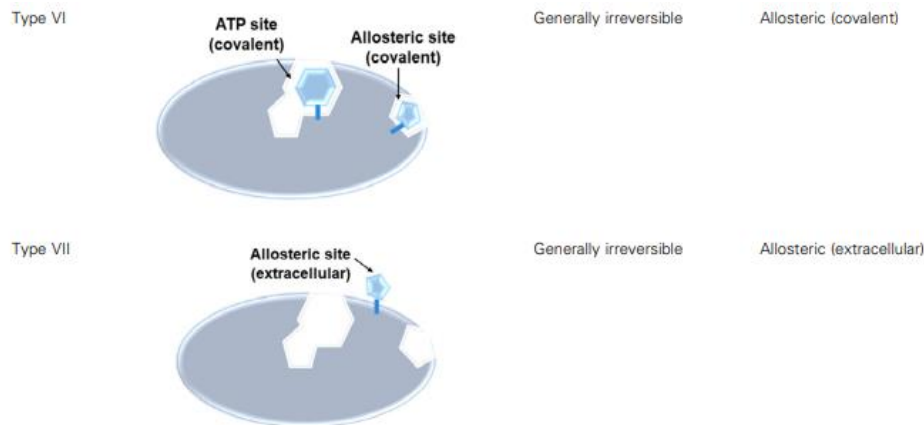
Αναστολείς τύπου IV είναι αλλοστερικοί αναστολείς που στοχεύουν περιοχές εκτός των περιοχών δέσμευσης ATP αλλά δεν ταυτίζονται με τους αναστολείς τύπου III. Παραδείγματα εγκεκριμένων από τον FDA τύπου IV αναστολέων είναι το everolimus, το sirolimus και το temsirolimus.

Οι **αναστολείς τύπου V** είναι δισθενείς αναστολείς που δεσμεύονται μη αντιστρεπτά στις ενεργές περιοχές κινάσης και στα πεπτιδικά μοτίβα που αντιπροσωπεύουν το υπόστρωμα στο οποίο στοχεύει η κινάση. Καθώς στοχεύουν τόσο στη θέση πρόσδεσης ATP όσο και στο μοναδικό δομικό χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης κινάσης, οι αναστολείς αυτοί είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί και ισχυροί. Αυτός ο τύπος αναστολέα βρίσκεται ωστόσο ακόμη υπό έρευνα και δεν έχει ακόμη εγκριθεί για κλινική εφαρμογή.

Οι **αναστολείς τύπου VI** προσδένονται ομοιοπολικά στο στόχο μέσω της αλληλεπίδρασης του ενεργών ηλεκτρονιόφιλων ομάδων των αναστολέων κυρίως με τις πυρηνόφιλες κυστεΐνες. Το afatinib, το dacomitinib και το neratinib είναι εγκεκριμένοι από τον FDA αναστολείς τύπου VI που στοχεύουν την οικογένεια EGFR.

Οι **αναστολείς τύπου VII** ορίζονται ως μη κλασικοί αλλοστερικοί αναστολείς που στοχεύουν την εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης. Αυτοί οι αναστολείς είναι μικρότεροι από άλλους αναστολείς και δεν εμποδίζουν άμεσα την δέσμευση στην περιοχή της κινάσης (σημείο πρόσδεσης του προσδέτη-πολυπεπτιδίου).[60]

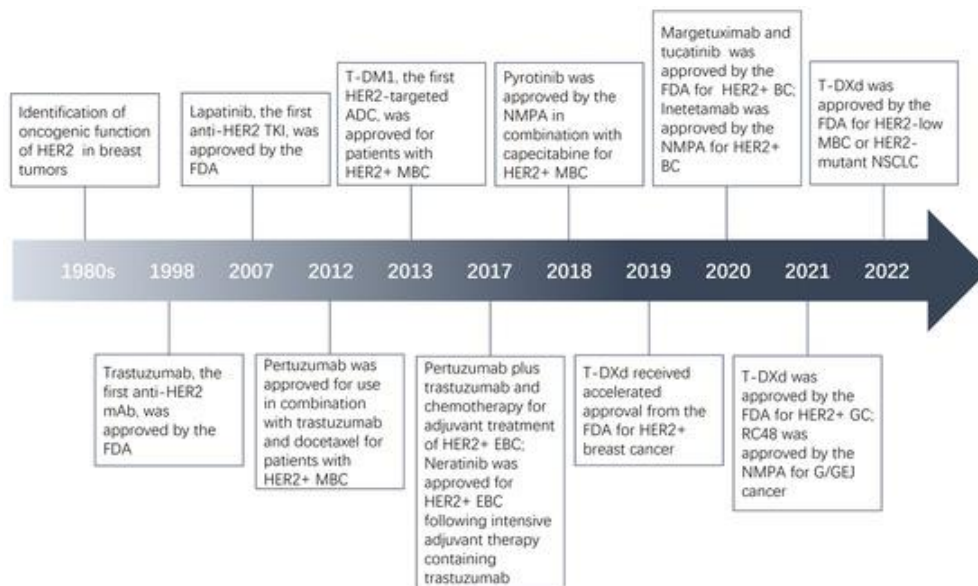
Type of kinase inhibitor	Type of binding	Binding site
Type I 	Reversible	ATP site (active)
Type II 	Reversible	ATP site and DFG pocket (inactive)
Type III 	Reversible	Allosteric (within ATP pocket)
Type IV 	Reversible	Allosteric (substrate-binding domain)
Type V 	Reversible	Allosteric (bivalent)



Πίνακας 5.2.: Τα χαρακτηριστικά των διαφορετικών τύπων αναστολέων κινάσης. [60]

5.3. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ 2 ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (Η HER2)

Το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI) ορίζει τους αναστολείς HER2 ως «οποιοδήποτε παράγοντα που αναστέλλει τον υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2 HER-2, ERBB2)».



Εικόνα 5.2.: Χρονοδιάγραμμα ανάπτυξης αναστολέων HER2. [61]

Lapatinib (Tykerb)

Το lapatinib (ή λαπατινίμη) είναι ο πρώτος αναστολέας με στόχο το HER2 που εγκρίθηκε, ο οποίος ανταγωνίζεται αντιστρεπτά το ATP ως προς τη θέση πρόσδεσης στην περιοχή της κινάσης τυροσίνης και αναστέλλει τα μεταγενέστερα μονοπάτια και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Η συνδυαστική θεραπεία (lapatinib συν καπεσιταβίνη) παρέτεινε τη διάρκεια ζωής (8,4 έναντι 4,4 μηνών) σε

μια μεγάλη μελέτη φάσης III για HER2-θετικού ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Προς το παρόν, το lapatinib έχει δείξει καλή αντικαρκινική αποτελεσματικότητα μόνο στον καρκίνο του μαστού, αλλά μελέτες σε άλλους όγκους βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη, όπως το γλοίωμα.

Neratinib (Nerlynx, HKI-272)

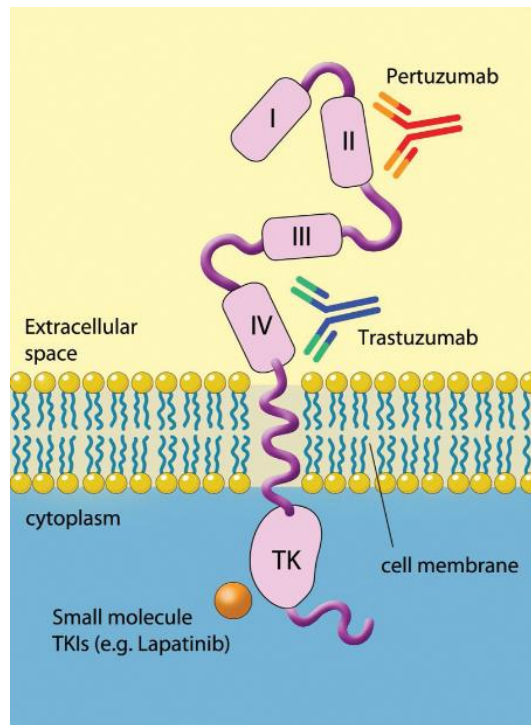
Το neratinib (ή νερατινίμη) είναι ένας μη αναστρέψιμος, παν-HER αναστολέας του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μειώνοντας την αυτοφωσφορυλίωση του EGFR και του HER2 και αναστέλλοντας τα μεταγενέστερα μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων των MAPK και AKT. Θετικά αποτελέσματα πάρθηκαν από το συνδυασμό του neratinib με καπεσιταβίνη για τη θεραπεία του HER2-θετικού καρκίνου του μαστού και των μεταστάσεων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Με βάση αυτά τα ευρήματα, ο FDA χορήγησε έγκριση για το neratinib τον Ιούλιο του 2017 για HER2-θετικούς ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε εντατική επικουρική θεραπεία που περιείχε τραστοζουμάμπη, ενώ εγκρίθηκε επίσης σε συνδυασμό με καπεσιταβίνη τον Φεβρουάριο του 2020 για ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό HER2-θετικό καρκίνο του μαστού που έχουν λάβει προηγουμένως δύο ή περισσότερα σχήματα κατά του HER2.

Tucatinib

Το Tucatinib είναι ένας εξαιρετικά εκλεκτικός αναστολέας που στοχεύει το HER2 χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τον EGFR. Έχει επιδείξει θεραπευτική δράση τόσο μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή άλλους αναστολείς του HER2. Η χρήση τού σε συνδυασμό με τραστοζουμάμπη και καπεσιταμπίνη βελτίωσε την διάρκεια ζωής (21,6 έναντι 12,5 μηνών) σε ασθενείς με HER2-θετικό μεταστατικό καρκίνο μαστού. Με βάση αυτά τα ευρήματα, το tucatinib έλαβε την έγκριση του FDA το 2020 για τη θεραπεία του HER2-θετικού μεταστατικού καρκίνου μαστού, συμπεριλαμβανομένων των εγκεφαλικών μεταστάσεων.

Pyrotinib

Το Pyrotinib είναι ένας μη αναστρέψιμος διπλός ErbB αναστολέας και εφαρμόζεται και διερευνάται προς το παρόν μόνο στην Κίνα. Τον Αύγουστο του 2018, το pyrotinib συν την καπεσιταβίνη χρησιμοποιήθηκε για HER2-θετικό προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Το pyrotinib συν την καπεσιταβίνη έδειξε δραστηριότητα και ασφάλεια μεγαλύτερη του lapatinib συν καπεσιταβίνη σε ασθενείς με HER2-θετικό μεταστατικό καρκίνο του μαστού. [61]



Εικόνα 5.3.: Διπλή αναστολή του HER2 εξωκυτταρικά από τραστοζουμάμπη-περτουζουμάμπη και ενδοκυτταρική στόχευση στην περιοχή τυροσινικής κινάσης από αναστολέα μικρού μοριακού βάρους.[62]

5.4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΪΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Προκειμένου να αναπτύσσονται όλο και πιο αποτελεσματικοί εκ του στόματος βιοδιαθέσιμοι φαρμακευτικοί παράγοντες, μελετώνται οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές αφορούν και τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και περιλαμβάνουν:

- Ο κανόνας των 5 του Lipinski (Ro5):

Χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της διαπερατότητας των μεμβρανών, της διαλυτότητας και της αποτελεσματικότητας στο πλαίσιο της ανάπτυξης φαρμάκων. Τα κριτήρια Lipinski βασίστηκαν σε δεδομένα που αποδεικνύουν ότι τα περισσότερα εκ του στόματος αποτελεσματικά φάρμακα είναι συγκριτικά μικρά και μετρίως λιπόφιλα μόρια.

Ο Ro5 υποδηλώνει ότι:

1. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (LogP) πρέπει να είναι μικρότερος του 5
2. Ο αριθμός των δοτών δεσμού υδρογόνου πρέπει να είναι μικρότερος από 5
3. Ο αριθμός των δεκτών δεσμού υδρογόνου πρέπει να είναι μικρότερος από 10

4. Το μοριακό βάρος δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 500, ώστε η δραστική ένωση να είναι ικανή να προσδεθεί στη θέση δέσμευσης του ATP, το οποίο έχει μοριακό βάρος 507.18 g/mol.

Η τιμή P αντικατοπτρίζει την υδροφοβικότητα ενός φαρμάκου, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή P, τόσο μεγαλύτερη είναι η υδροφοβικότητα. Ο αριθμός των δοτών δεσμών υδρογόνου είναι το άθροισμα των -NH και -OH ομάδων. Ο αριθμός των δεκτών δεσμών υδρογόνου αποτελείται από οποιοδήποτε ουδέτερο ετεροάτομο με εξαίρεση τα άτομα αζώτου του πυρρολίου, τα άτομα αλογόνου, τα ετεροαρωματικά άτομα οξυγόνου και θείου, και τις υψηλότερες καταστάσεις οξείδωσης του αζώτου, φωσφόρου και θείου. Τέλος, το μέσο μοριακό βάρος (MW) που έχουν εγκριθεί από τον FDA είναι 482 και κυμαίνεται από 306 (ruxolitinib) έως 615 (trametinib).

- *Λιποφιλική αποτελεσματικότητα (LipE)*

Η λιποφιλική αποτελεσματικότητα ή LipE, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό στην ανακάλυψη φαρμάκων, το οποίο συνδυάζει τη δραστικότητα και τη δέσμευση λόγω λιποφιλικότητας του φαρμάκου, ως στρατηγική για την αύξηση της αποτελεσματικότητας της δέσμευσης.

Υψηλή λιποφιλικότητα σημαίνει και η σύνδεση ενός φαρμάκου σε τυχαίους στόχους, γεγονός που μπορεί να αυξήσει την τοξικότητα και τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Στόχος κατά την ανακάλυψη φαρμάκων είναι η αύξηση της δραστικότητας χωρίς ταυτόχρονη αύξηση της λιποφιλικότητας. Η μείωση της λιποφιλικότητας και η αύξηση της δραστικότητας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης φαρμάκων παράγει γενικά φάρμακα με καλύτερες φαρμακολογικές ιδιότητες. Προτάθηκε ότι οι αποδεκτές τιμές της λιποφιλικής αποτελεσματικότητας είναι μεγαλύτερες από ~ 5.

- *Αποδοτικότητα συνδέτη (LE)*

Η αποτελεσματικότητα του συνδέτη (LE) συσχετίζει τη δραστικότητα ή τη συγγένεια πρόσδεσης με τον αριθμό των βαρέων ατόμων ενός φαρμάκου. Η απόδοση (LE) θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,3 kcal ανά mol βαρέος ατόμου

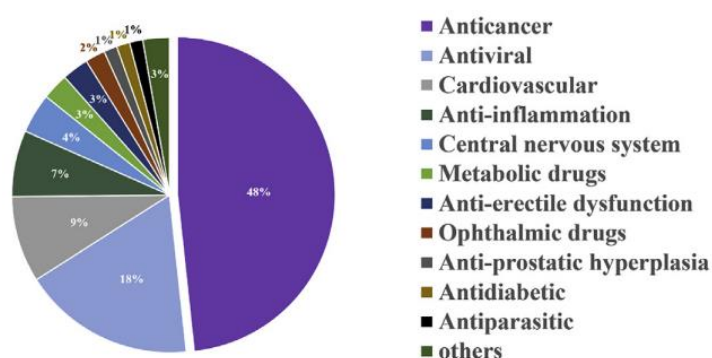
- *Διαλυτότητα*

Με διαλυτότητα στο νερό, 100 µg/ml ή μικρότερη υπάρχει ένας αυξημένος κίνδυνος αποτυχίας κατά τη διάρκεια κλινικών δοκιμών και ανάπτυξης φαρμάκων. Η μέτρηση της διαλυτότητας εγκεκριμένων από τον FDA αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσων στο νερό, απέδειξε ένα εύρος από 0,36 µg/ml (vemurafenib) έως 420 µg/ml για το abrocitinib, με μέση τιμή περίπου 50 µg/ml.[57]

5.5. TUCATINIB (ΤΟΥΚΑΤΙΝΙΜΠΗ)

Η βιολογική δραστηριότητα των ενώσεων γενικά, εξαρτάται από τις μοριακές τους δομές. Οι ετεροκυκλικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στην φαρμακευτική χημεία λόγω της εφαρμογής τους στο σχεδιασμό και την ανακάλυψη φαρμάκων. Οι ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν πυριμιδινικούς δικυκλικούς δακτυλίους έχουν δείξει αποτελεσματικές βιολογικές ιδιότητες, με πολλά πυριμιдино-συντηρημένα δικυκλικά ετεροκυκλικά φάρμακα να εφαρμόζονται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, ως αντικαρκινικά, αντιικά, αντιφλεγμονώδη, καρδιαγγειακά και αντιδιαβητικά φάρμακα.

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν συνολικά 147 πυριμιдино-συντηρημένα δικυκλικά ετεροκυκλικά φάρμακα εγκεκριμένοι ή υπό έγκριση, εκ των οποίων 57 παράγωγα έχουν εγκριθεί για την κλινική θεραπεία διαφόρων ασθενειών και 90 παράγωγα βρίσκονται επί του παρόντος σε διάφορες κλινικές φάσεις. Από τα 57 παράγωγα, 22 από αυτά εγκρίθηκαν για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου.[63]

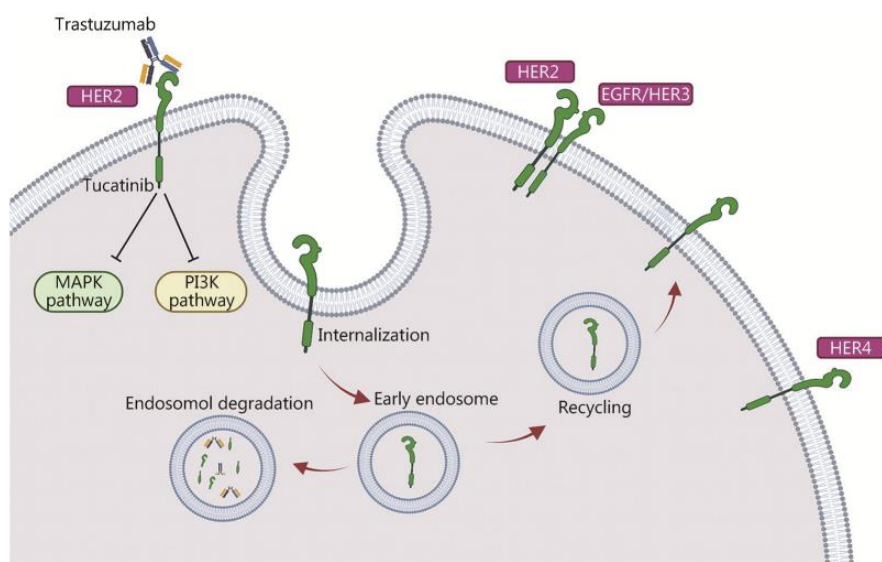


Εικόνα 5.4.: Επισκόπηση των 147 πυριμιдино-συντηρημένων δικυκλικών ετεροκυκλικών ενώσεων που έχουν εγκριθεί. [63]

Το *Tucatinib* (επίσης γνωστό ως Irbinitinib, ONT-380 και ARRY-380, Tukysa, Seattle Genetics) είναι ένας εκ του στόματος χορηγούμενος, εξαιρετικά επιλεκτικός αναστρέψιμος αναστολέας του HER2 (μέλος της οικογένειας HER (EGFR, ErbB) που υπερεκφράζεται στο 20% περίπου όλων των καρκίνων του μαστού. Αρχικά, αναπτύχθηκε από την Array BioPharma (μια θυγατρική της Pfizer) και στη συνέχεια αναπτύχθηκε από την Seattle Genetics. Αυτό το φάρμακο, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο με την εμπορική ονομασία Tukysa, έλαβε την πρώτη του έγκριση από τον FDA τον Απρίλιο του 2020, για τη θεραπεία του προχωρημένου ανεγχείρητου ή μεταστατικού καρκίνου του μαστού, στη συνέχεια έλαβε την αποδοχή του από την Ελβετία τον Μάιο του 2020 και βρίσκεται επίσης υπό κανονιστική εξέταση στην Αυστραλία, τον Καναδά και τη Σιγκαπούρη στο πλαίσιο του Project Orbis. [64] Σε προκλινική μελέτη και σε κλινικές δοκιμές φάσης I, το tucatinib έδειξε υποσχόμενη δραστηριότητα ως μεμονωμένος παράγοντας, με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή τραστουζουμάμπη. Η κατανόηση του μηχανισμού σηματοδότησης έδειξε ότι σε αντίθεση με άλλους αναστολείς, όπως το lapatinib και

το neratinib, οι οποίες δρουν ως διπλοί αναστολείς τόσο για τον EGFR όσο και για τον HER2, το tucatinib είναι ένας ειδικός και αναστρέψιμος αναστολέας της δραστηριότητας της πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης (PTK) της HER2 και ασκεί ελάχιστη αναστολή του EGFR.[65]

Μια *in silico* μελέτη πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μοριακής βάσης του συνεργισμού μεταξύ tucatinib και τραστοζουμάμπης. Η τραστοζουμάμπη δρα μέσω της πρόσδεσης της στον εξωκυτταρικό τομέα του HER2, επομένως αυτό που διερευνήθηκε ήταν η δράση του tucatinib, εξετάζοντας ειδικότερα κατά πόσον δεσμεύεται στην ενδοκυττάρια κινάση τυροσίνης HER2. Η συνδυαστική θεραπεία επιτυγχάνεται όταν το ένα φάρμακο δεσμεύεται στην εξωκυτταρική περιοχή και το άλλο στον ενδοκυτταρικό τομέα του υποδοχέα HER2. Αποδείχθηκε ότι το tucatinib δεσμεύεται στην περιοχή κινάσης τυροσίνης με σημαντική σταθερότητα και ενέργεια σύνδεσης. Έτσι, επιβεβαιώθηκε ο συνεργισμός μεταξύ της τραστοζουμάμπης και tucatinib, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της κλινικής ανταπόκρισης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού HER2+.[65]



Εικόνα 5.5.: Μηχανισμός δράσης tucatinib και τραστοζουμάμπης σε ένα HER2 υποδοχέα. [65]

5.5.1. Κυτταρικές, προκλινικές και κλινικές μελέτες του tucatinib και προσεγγίσεις συνδυασμού του tucatinib με άλλους παράγοντες

Αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει τις επιδράσεις του tucatinib και του συνδυασμού του με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες σε διάφορα πειραματικά μοντέλα καρκίνου του μαστού HER2+.

Διαπιστώθηκε ότι το tucatinib αναστέλλει όχι μόνο την ενεργοποίηση του υποδοχέα HER2 αλλά και τη σύνδεση με τον ετεροδιμερή εταίρο του HER3 υποδοχέα, καθώς και τους μεταγενέστερους καταρράκτες σηματοδότησης, όπως ο

MARK και PI3K/AKT. Η μειωμένη φωσφορυλίωση της AKT, καθώς και η επαγωγή της απόπτωσης, διαπιστώθηκε ότι έχουν προσθετικά αποτελέσματα σε συνδυασμό με την τραστοζουμάμπη. Μάλιστα, προκλινικά δεδομένα υπέδειξαν ότι το tucatinib εμφανίζει δυνατότητα εφαρμογής σε διάφορα HER2+ ογκολογικά μοντέλα, όπως ο γαστρικός και ο οισοφαγικός καρκίνος, με περαιτέρω αντικαρκινική αποτελεσματικότητα στην περίπτωση συνδυασμού tucatinib με ανοσοθεραπεία ή χημειοθεραπεία.

Όμοια, στη συνέχεια συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητα των τριών αναστολέων, όσον αφορά την φαρμακευτική ανταπόκριση και τον γονιδιακό πολλαπλασιασμό χρησιμοποιώντας διαφορετικές καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού. Συγκρίθηκαν λοιπόν, οι επιδράσεις και οι τιμές IC50 του neratinib, του lapatinib και του tucatinib με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες. Το προφίλ του tucatinib βρέθηκε να είναι παρόμοιο με αυτό της τραστοζουμάμπης όσον αφορά την εκλεκτικότητα HER2. Το neratinib παρουσίασε τη μεγαλύτερη δραστηριότητα, αν και το tucatinib παρουσίασε υψηλή εκλεκτικότητα για κυτταρικές σειρές με πολλαπλασιασμό HER2 αλλά ελάχιστη επίδραση σε μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές HER2.[66]

Στοιχεία από κλινικές μελέτες: Αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του tucatinib με ή χωρίς άλλους παράγοντες σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού HER2+ που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία με στοχευμένες θεραπείες HER2.

Μελέτες έχουν διερευνήσει την αποτελεσματικότητα του tucatinib σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ή ανοσοθεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού HER2+ που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε στοχευμένες θεραπείες προς τον HER2.

Σε μελέτη φάσης I, αξιολογήθηκε η μέγιστη ανεκτή δόση (MTD), η αντικαρκινική δραστηριότητα και οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες του tucatinib. Η MTD βρέθηκε να είναι 600 mg δύο φορές ημερησίως, με μέγιστη δόση λόγω τοξικότητας στα 800 mg δύο φορές ημερησίως. Επιπλέον, το tucatinib είχε ευνοϊκό φαρμακοκινητικό προφίλ.[67]

Στη μελέτη HER2CLIMB, προσδιορίστηκαν οι θεραπευτικές αποκρίσεις του tucatinib σε ασθενείς που έλαβαν προηγούμενες θεραπείες που περιλάμβαναν τραστοζουμάμπη, περτουζουμάμπη και τραστοζουμάμπη-εμανσίνη και παρουσίασαν εξέλιξη της νόσου. Οι ασθενείς κατανεμήθηκαν τυχαία σε δύο ομάδες:

Η πρώτη ομάδα έλαβε συνδυαστική θεραπεία tucatinib με τραστοζουμάμπη και καπεσιταβίνη και η δεύτερη ομάδα έλαβε ένα εικονικό φάρμακο σε συνδυασμό με τραστοζουμάμπη και καπεσιταβίνη. Η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) στο χρονικό πλαίσιο ενός έτους, στην περίπτωση της συνδυαστικής θεραπείας με tucatinib βρέθηκε να είναι 33,1% με διάμεση PFS 7,8 μηνών, ενώ στην περίπτωση

της συνδυαστικής θεραπείας με εικονικό φάρμακο η PFS βρέθηκε 12,3% με διάμεση τιμή 5,7 μήνες. Ακόμη η διάμεση συνολική επιβίωση OS, μετά από 2 έτη ήταν 44,9%, με μια διάμεση OS 21,9 μηνών στην ομάδα συνδυαστικής θεραπείας με tucatinib, σε σύγκριση με 26,6% και 17,4 μήνες στην ομάδα συνδυαστικής θεραπείας με εικονικό φάρμακο.

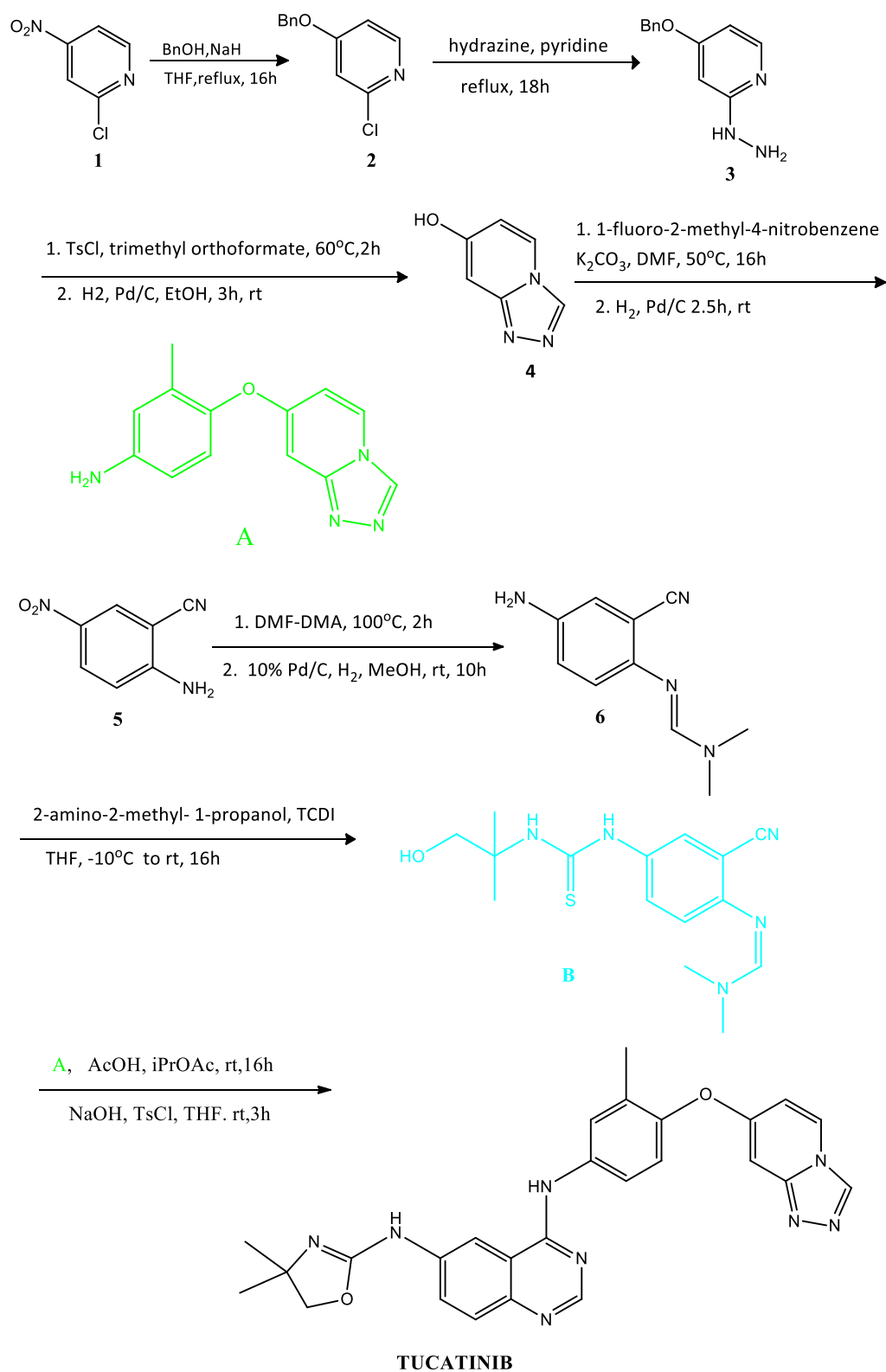
Συνολικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το tucatinib σε συνδυασμό με τραστοζουμάμπη και καπεσιταβίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τον κίνδυνο εξέλιξης της νόσου ή να αυξήσει τα οφέλη επιβίωσης σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού HER2+ με ή χωρίς εγκεφαλική μετάσταση.[68]

5.6. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ TUCATINIB

5.6.1. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ARRAY ΒΙΟΦΑΡΜΑ

Η πρώτη κατοχυρωμένη πατέντα για το Tucatinib προήλθε από την εταιρεία Array BioPharma Inc., θυγατρική εταιρεία της Pfizer, κυκλοφόρησε το 2020 και σύμφωνα με την αρχική αυτή συνθετική οδό, απαιτείται η παρασκευή δύο ενδιάμεσων προϊόντων.

Το ενδιάμεσο A συντίθεται ξεκινώντας από την 2-χλωρο-4-νιτροπυριμιδίνη ως πρώτη ύλη. Αρχικά, η θέση 4- βενζυλιώνεται και το άτομο του χλωρίου υποκαθίσταται με υδραζίνη. Ο πυρήνας της τριαζολοπυριδίνης προκύπτει στη συνέχεια με κατεργασία με τριμεθυλορθοφορμικό και 4-τολουολοσουλφονυλοχλωρίδιο. Η βενζυλική ομάδα αφαιρείται και το απροστάτευτο ενδιάμεσο προϊόν συνδέεται με 1- φθορο-2-μεθυλο-4-νιτροβενζόλιο, του οποίου η νιτρο-ομάδα υδρογονώνεται για να παραχθεί το ενδιάμεσο A. Παράλληλα, το ενδιάμεσο B παρασκευάζεται ξεκινώντας από 2-αμινο-4-νιτρο-5-νιτροβενζόλιο και συμπύκνωση με N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο-διμεθυλοακετάλη, ακολουθούμενη από αναγωγή της νιτροομάδας και επακόλουθη αντίδραση με 2-αμινο-2-μεθυλο-1-προπανόλη και θειοκαρβονυλοδιμιδαζόλιο (TCDI). Κυκλο-συμπύκνωση των ενδιάμεσων A και B υπό όξινες συνθήκες παρέχει την 4-αμινοκιναζολίνη. Τέλος, ο δακτύλιος οξαζολίνης παρασκευάζεται με κατεργασία με υδροξείδιο του νατρίου και τολουολοσουλφονυλοχλωρίδιο (TsCl), παρέχοντας την τελική ένωση, Tucatinib.[69]

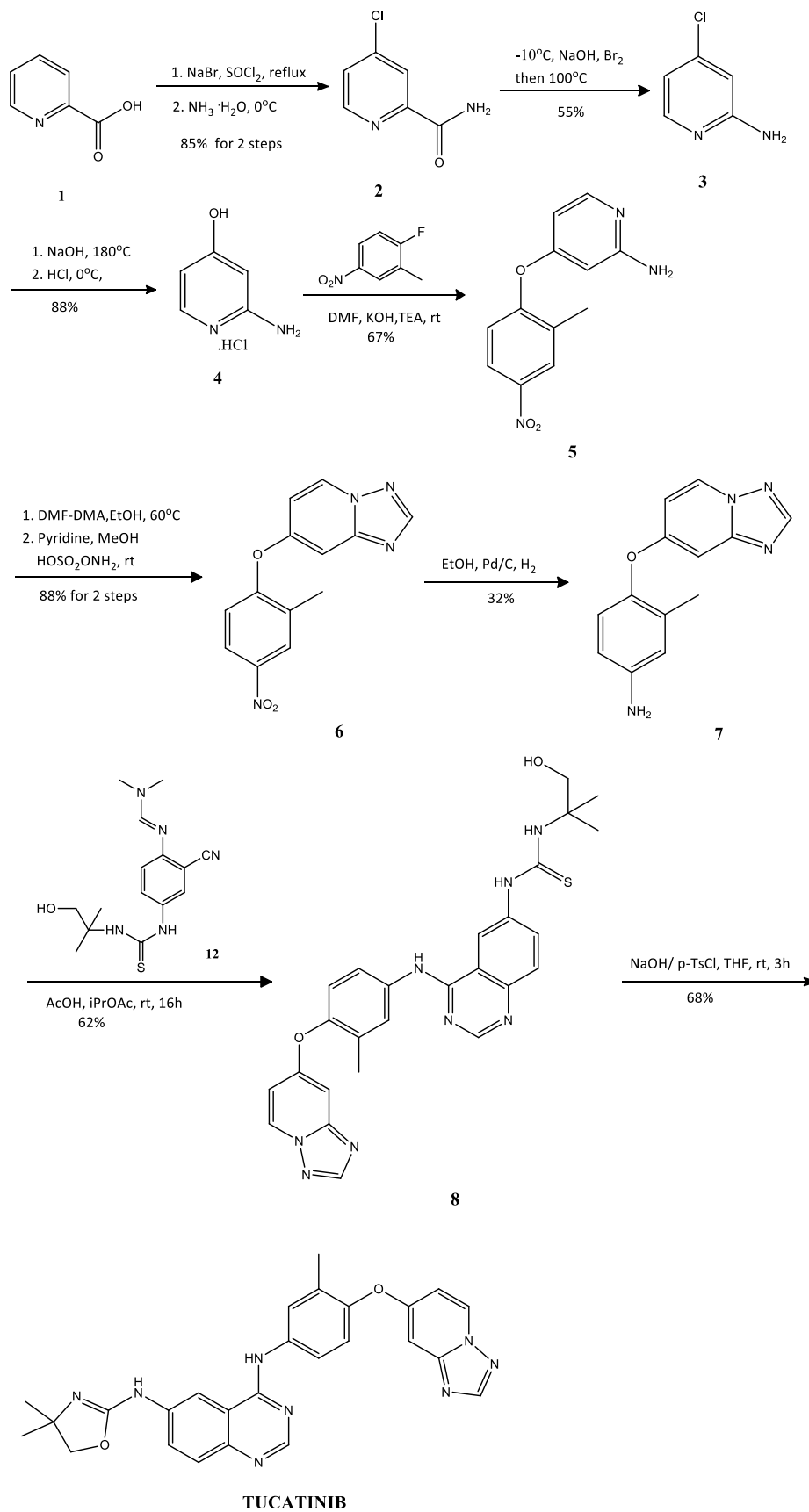


Εικόνα 5.6.: Συνθετική πορεία του Tucatinib, κατοχυρωμένη από την εταιρεία Array BioPharma.

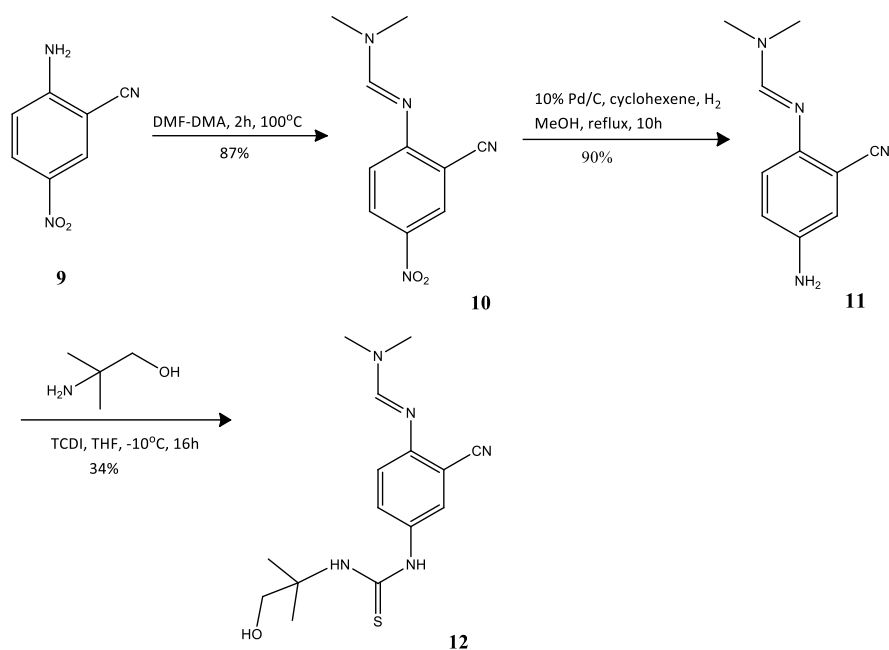
5.6.2. ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΑΠΟ ΤΗΝ SEATTLE GENETICS

Παρόλο που η αρχική σύνθεση από την Array BioPharma, οδήγησε στην ανακάλυψη του Tucatinib, δεν ήταν κατάλληλη για παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε μια πιο πρακτική συνθετική πορεία διευκολύνοντας την παραγωγή του φαρμάκου σε μεγαλύτερη κλίμακα. Αυτή η ανακάλυψη προήλθε από την εταιρεία Seattle Genetics και η συνθετική πορεία αυτού του φαρμάκου σε κλίμακα γραμμαρίου επιδεικνύεται παρακάτω.

Ξεκινώντας από το πικολινικό οξύ (1), μια χλωρίωση με θειονυλοχλωρίδιο ακολουθούμενη από υποκατάσταση με υδροξείδιο του αμμωνίου έδωσε το 4-χλωροπικολιναμίδιο (2) σε απόδοση 85%. Με την επακόλουθη αναδιάταξη Hofmann που υφίσταται η ένωση 2, προκύπτει η 4-χλωροπυριδινό-2-αμίνη (3) με απόδοση 55%, η οποία υπέστη υδρόλυση και υποκατάσταση με το 1-φθορο-2-μεθυλο-4-νιτροβενζόλιο για να δώσει το ενδιάμεσο προϊόν 5 σε απόδοση 67%. Η κυκλοποίηση του 5 με χρήση DMF-DMA έδωσε την ένωση 6 σε ποσοστό 88%, η οποία ανήχθηκε έπειτα σε μια αμίνη (7). Η ενδιάμεση ένωση 12 συντέθηκε από το 2-αμινο-5-νιτροβενζονιτρίλιο (9) σε τρία στάδια και με συνολική απόδοση 34%, η οποία στη συνέχεια υποβλήθηκε σε μια αντίδραση διαμοριακής [5+1] κυκλοπροσθήκης με την ένωση 7, δίνοντας την ένωση 8 σε απόδοση 62%. Επακόλουθη αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης παρέχει το Tucatinib, σε συνολική απόδοση 68%. [70]



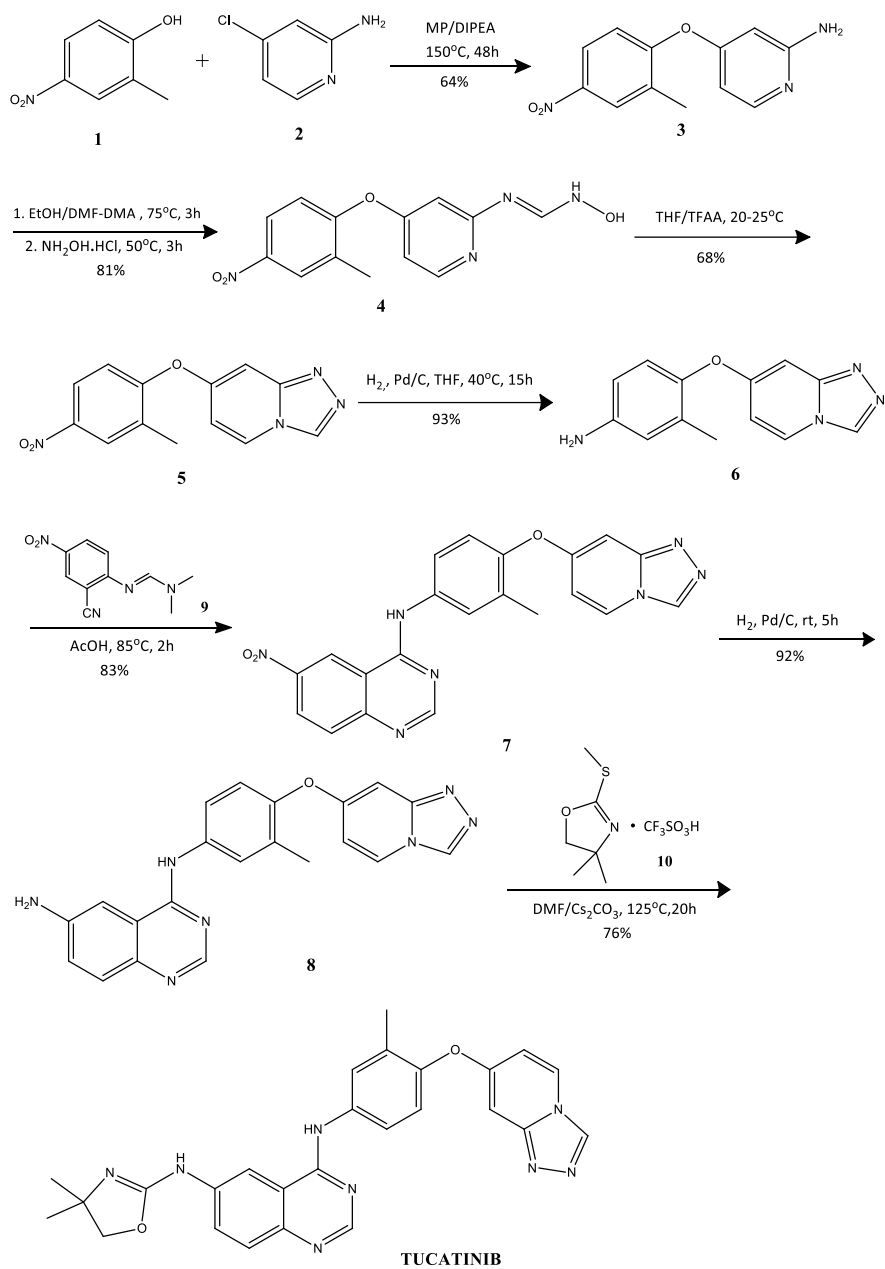
Εικόνα 5.7.: Συνθετική πορεία του Tucatinib, κατοχυρωμένη από την εταιρεία Seattle Genetics (WO2018201016A1).



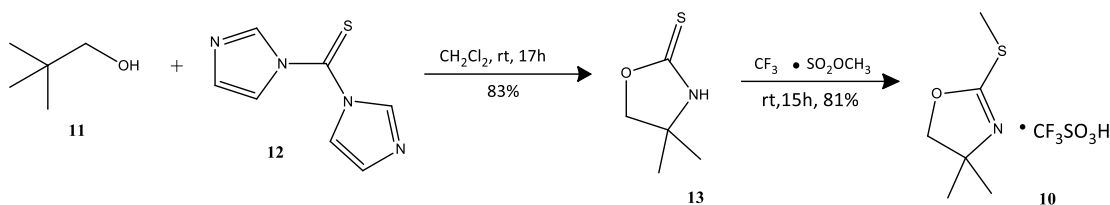
Εικόνα 5.8.: Η σύνθεση του ενδιάμεσου 12 πραγματοποιείται μέσω της παραπάνω πορείας 3 σταδίων.

5.6.3. ΜΕΤΑΓΕΝΕΣΤΕΡΕΣ ΝΕΕΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΟΔΟΙ

Μια νέα, βελτιωμένη συνθετική οδός σχεδιάστηκε από τους L. Yip και την ομάδα του, η οποία όπως θα αποτυπωθεί παρακάτω περιλαμβάνει τρία βασικά ενδιάμεσα προϊόντα, προς την σύνθεση του τελικού, επιθυμητού Tucatinib.



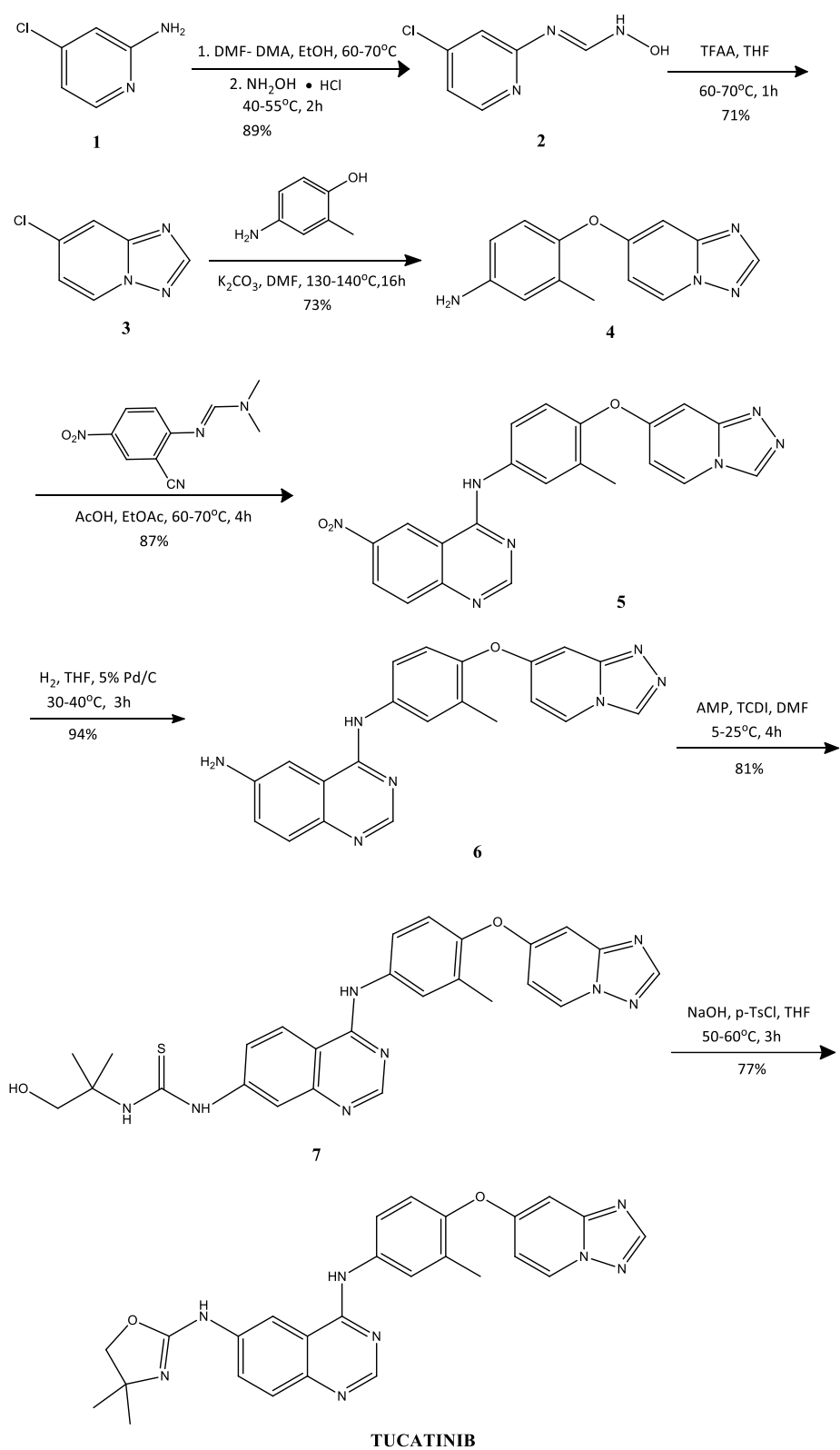
Εικόνα 5.9.: Συνθετική πορεία του Tucatinib, η οποία προτάθηκε από την ομάδα του L. Yün και την ομάδα του.



Εικόνα 5.10 : Σύνθεση του ενδιάμεσου 10 με βάση τη συνθετική πορεία της ομάδας του L.Yin.

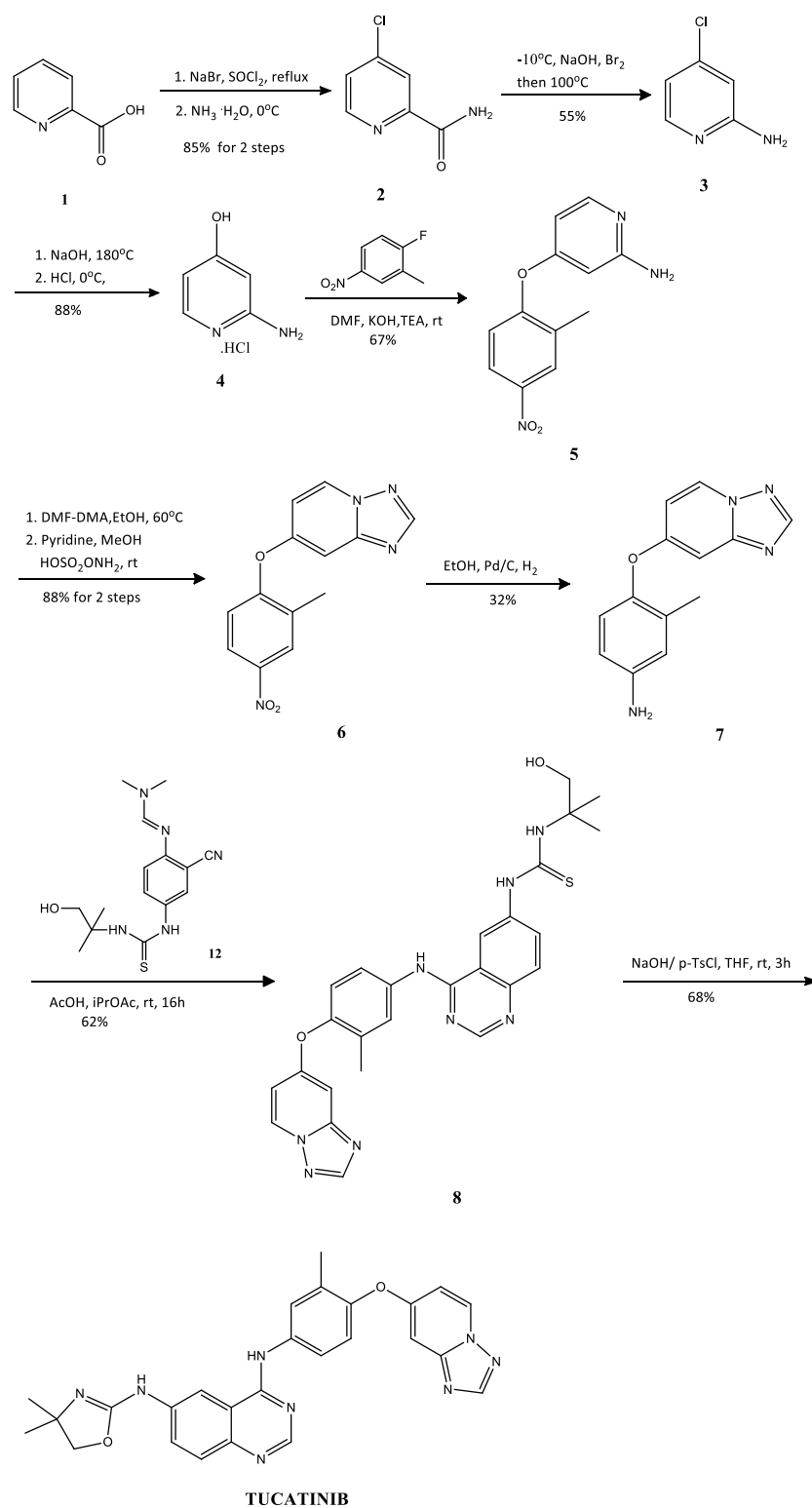
Μια ακόμη πρακτική διαδικασία παρασκευής του tucatinib σχεδιάστηκε και παρουσιάζεται παρακάτω.

Η 4-χλωροπυριδιν-2-αμίνη (1) αντιδρά με διμεθυλοακετάλη N,N-διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF-DMA), και στη συνέχεια με υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, για να ληφθεί η αντίστοιχη ένωση N-υδροξυ-φορμιμιδαμίδιο (2) σε 89%. Η ένωση αυτή κατεργάστηκε με τριφθοροοξικό ανυδρίτη (TFAA) για να προκύψει η ένωση 3 της τριαζολο[1,5-a]πυριδίνης σε απόδοση 71%. Η εμπορικά διαθέσιμη 4-αμινο-2-μεθυλοφαινόλη και η ένωση 3 θερμάνθηκαν σε DMF/K₂CO₃ για να προκύψει το βασικό ενδιάμεσο προϊόν 4 σε απόδοση 73%. Η επακόλουθη αντίδραση σχηματισμού δακτυλίου πραγματοποιήθηκε με θέρμανση των 7 και 8 με οξικό οξύ για να προκύψει η ένωση 5, και στη συνέχεια η αντίστοιχη αμίνη (6) μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης. Η ένωση 6 της ανιλίνης αντέδρασε διαδοχικά με TCDI και AMP σε DMF σε θερμοκρασία 5-25°C για να ληφθεί η αντίστοιχη ένωση θειουρίας (7), οποία τέλος κατεργάστηκε με NaOH και p-TsCl για να προκύψει το Tucatinib σε απόδοση 77%. [71]



Εικόνα 5.11.: Μια πιο πρακτική πορεία σύνθεσης του Tucatinib.

Η πορεία σύνθεσης του tucatinib που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο καθώς και ο σχεδιασμός των εν δυνάμει αναλόγων, ήταν με βάση αυτή που πρότεινε η εταιρεία Seattle Genetics.



Εικόνα 5.12.: Ολική πορεία σύνθεσης του Tucatinib εργαστηριακά (Seattle Genetics).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Συζήτηση αποτελεσμάτων

6.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ HER2

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

Η σύνθεση αυτών των νέων αναλόγων έγινε με σκοπό την αύξηση της δραστικότητάς τους και της εκλεκτικότητας τους έναντι της HER2 πρωτεΐνης σε σχέση με το Tucatinib. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν, αρχικά, μέσω ηλεκτρονικών πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με τη βοήθεια των προγραμμάτων AutoDock Vina, Chimera και Discovery Studio.

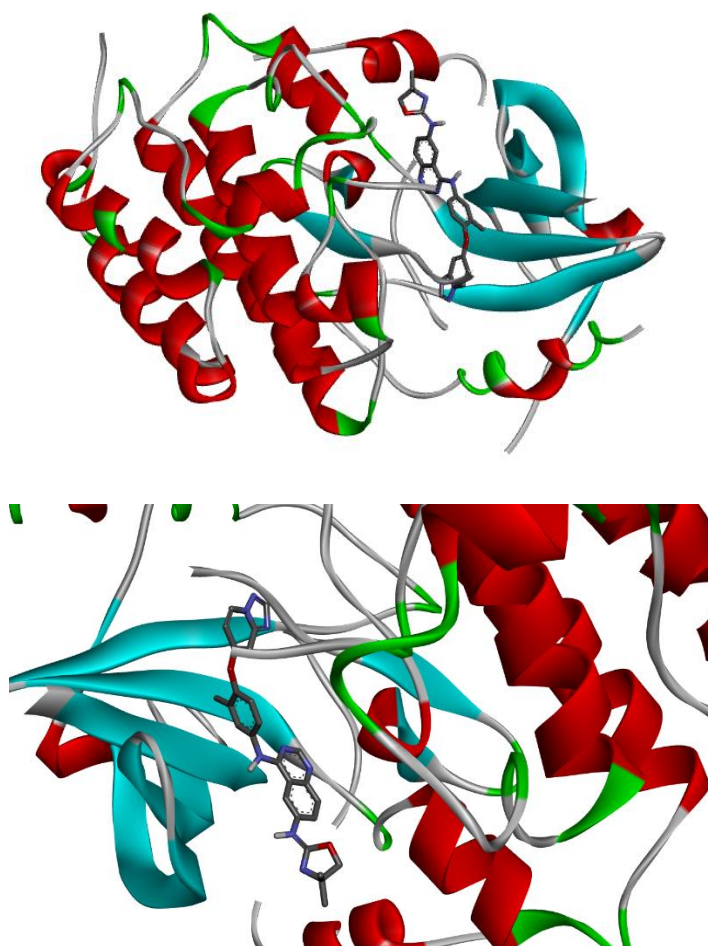
Για την εξαγωγή συμπερασμάτων έγινε μοντελοποίηση του ενεργού κέντρου πρωτεϊνικής κινάσης και στη συνέχεια ακολούθησε ο λογικός σχεδιασμός αναλόγων του Tucatinib, με βάση το μοριακό σκελετό του φαρμάκου. Τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης στο κάθε ανάλογο πραγματοποιήθηκαν με βάση τη δομή του Tucatinib και της HER2. Ωστόσο, εργαστηριακά η σύνθεση, η απομόνωση καθώς και η ταυτοποίηση των ενδιαμέσων της πορείας και αναλόγων του Tucatinib, δεν πραγματοποιήθηκε λόγω χρονικού περιορισμού.

6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ TUCATINIB

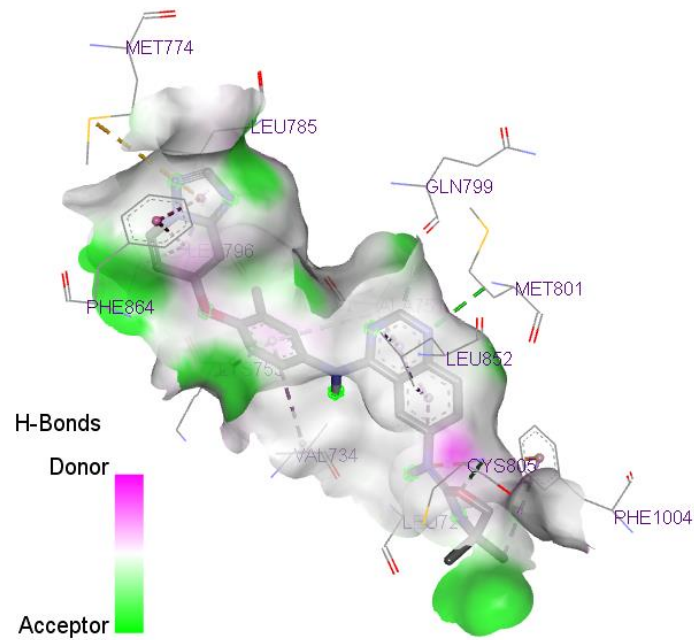
Προκειμένου να εκτελεστούν τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης, η τρισδιάστατη 3D δομή της πρωτεΐνης λήφθηκε από την ηλεκτρονική πηγή Protein Data Bank (PDB: <https://www.rcsb.org/>). Ωστόσο, επειδή στη Βάση Δεδομένων Πρωτεϊνών δεν υπήρχαν δεδομένα όσον αφορά την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HER2 συγκεκριμένα με αναστολέα το Tucatinib, λάβαμε αρχικά την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης μαζί με τον αναστολέα TAK-285, και έπειτα σχεδιάστηκε η δομή του Tucatinib χειροκίνητα στο BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020, ακολουθούμενη από απαλοιφή των μορίων νερού της πρωτεΐνης και αποθήκευση αυτής σε μορφή pdb, ενώ στο μόριο του αναστολέα έγινε προσθήκη ατόμων

υδρογόνου και αποθήκευση αυτού σε μορφή mol2. Για τον υπολογισμό της συγγένειας και της ενέργειας πρόσδεσης μεταξύ της πρωτεΐνης και του αναστολέα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα UCSF Chimera 1.14 Molecular Visualization με χρήση του AutoDock Vina. Η περαιτέρω ανάλυση του τρόπου σύνδεσης και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο μορίων και, στη συνέχεια, η απεικόνισή τους διενεργήθηκε μέσω του προγράμματος BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020. Η τροποποίηση της δομής του αναστολέα εισάγοντας διαφορετικές ομάδες έγινε στην μορφή mol2 χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόγραμμα, ώστε στη συνέχεια να εκτιμηθεί η ικανότητα πρόσδεσης στην πρωτεΐνη. Συνεπώς, εκείνα τα φάρμακα με υψηλότερες τιμές πρόσδεσης, δηλαδή με τις μικρότερες τιμές ενέργειας κατά Gibbs, $\Delta G_{binding}$, επιλέχθηκαν για περαιτέρω έρευνα.

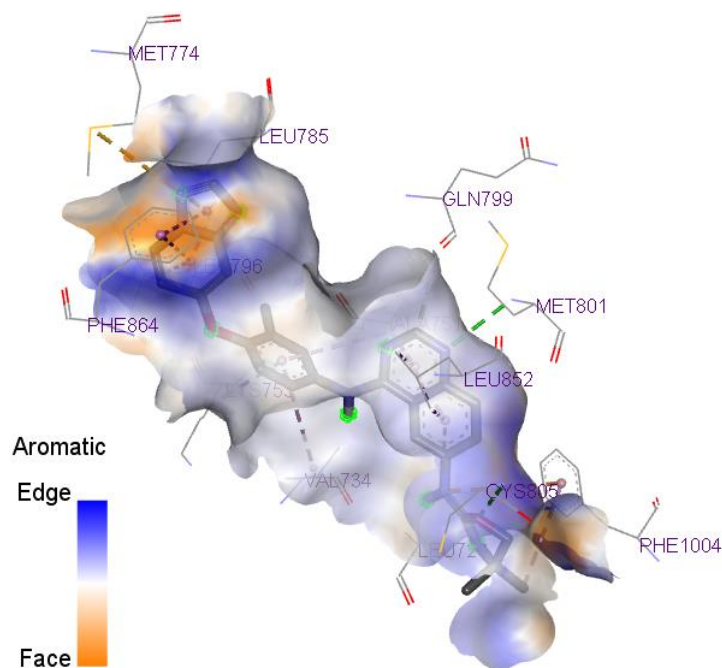
Το ΔG (ελεύθερη ενέργεια Gibbs) για το Tucatinib με τη HER2 είναι $-10,5$ kcal/mol, σύμφωνα με το AutoDock Vina.



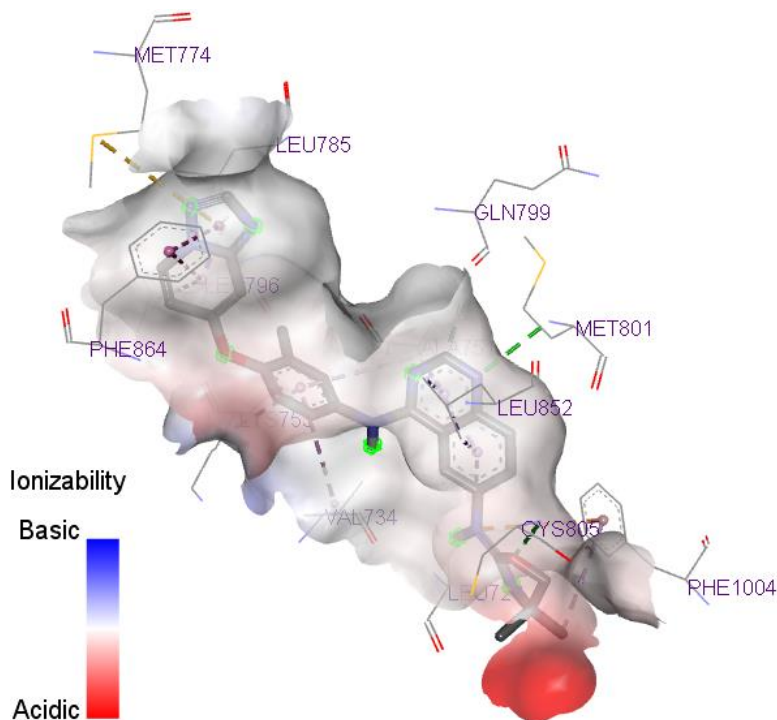
Εικόνα 6.1.: Κρυσταλλογραφική δομή της HER2 με το Tucatinib.



Εικόνα 6.2.: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει το Tucatinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της HER2, όπου δίνονται οι επιφάνειες του ενεργού κέντρου με αμινοξέα δέκτες (πράσινο) και δότες (μωβ) δεσμών υδρογόνου.



Εικόνα 6.3.: Σχηματική απεικόνιση της αρωματικότητας που εμφανίζει το Tucatinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της HER2, όπου δίνονται οι επιφάνειες του ενεργού κέντρου με αμινοξέα που εμφανίζουν αρωματικότητα (μπλε) και αυτά που δεν εμφανίζουν αρωματικότητα (καφέ-πορτοκαλί).

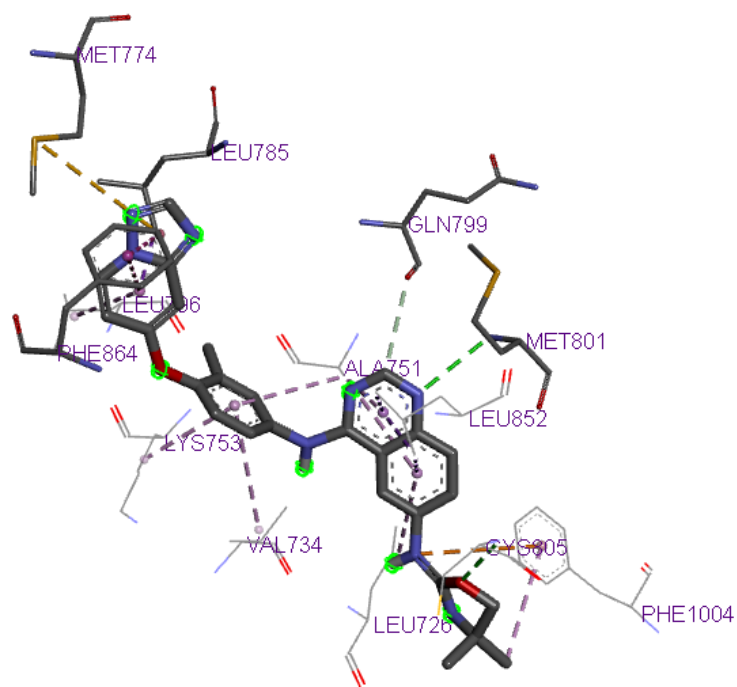


Εικόνα 6.4.: Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας του φορτίου που εμφανίζει το Tucatinib με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της HER2 όπου δίνονται οι επιφάνειες του ενεργού κέντρου με τα αμινοξέα που εμφανίζουν ηλεκτροθετικότητα (κόκκινο) και αυτά που εμφανίζουν ηλεκτραρνητικότητα (μπλε).

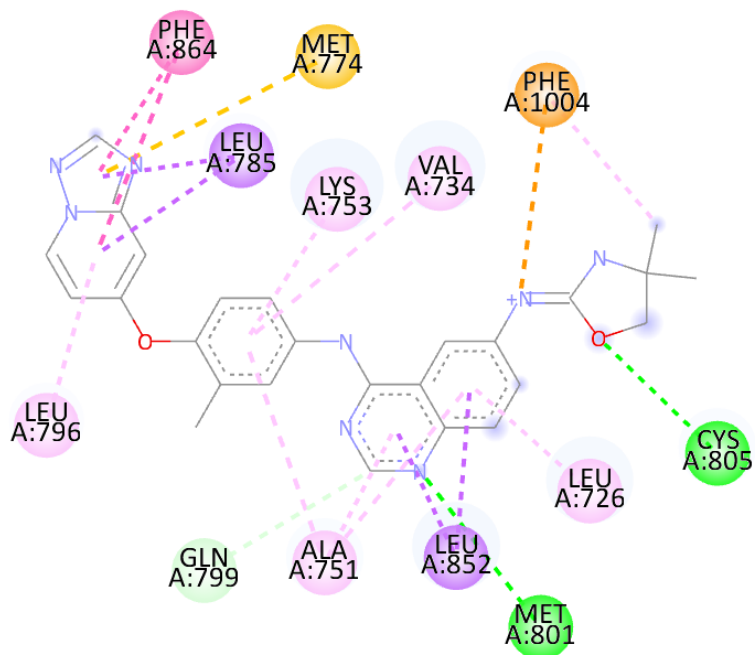
Παρατηρείται ότι γύρω από τον οξαζολικό δακτύλιο και γύρω από την τριαζολο-πυριδίνη υπάρχει επιφάνεια πλούσια σε δέκτες δεσμών υδρογόνου. Έτσι, η πρώτη σκέψη όσον αφορά τα ανάλογα του φαρμάκου, ήταν ότι μπορούν να πραγματοποιηθούν στους δακτυλίους αυτούς προσθήκες ομάδων που δύνανται να σχηματίσουν πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου.

Το Tucatinib αλληλεπιδρώντας με το ενεργό κέντρο της HER2 εμφανίζει μερικές από τις εξής χαρακτηριστικές αλληλεπιδράσεις:

- 2 δεσμούς υδρογόνου (πράσινο χρώμα): το άτομο οξυγόνου του οξαζολικού δακτυλίου δρα ως δέκτης δεσμού υδρογόνου και σχηματίζει δεσμό με την υδροθειομάδα της κυστεΐνης (Cys805). Επίσης, το πυριμιδινικό άτομο αζώτου δρα επίσης ως δέκτης δεσμού υδρογόνου και σχηματίζει δεσμό με την αμινομάδα της μεθειονίνης (Met801).
- 1 Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του καρβοξυλικού ανιόντος της φαινυλαλανίνης (Phe1004) με την αμινική ομάδα.
- 5 π-π ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.
- 1 μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση του θείου της μεθειονίνης (Met774) με το π-σύστημα της τριαζολοπυριδίνης.
- 1 π-π stacking (επιστοίβαγμα) ασθενής ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων της φαινυλαλανίνης (Phe864) και της τριαζολοπυριδίνης.



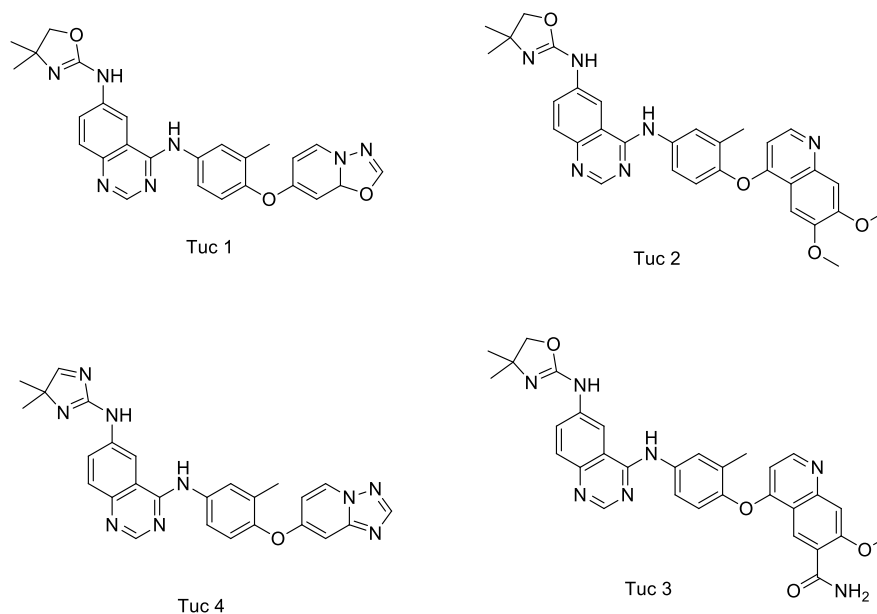
Εικόνα 6.5.: Οι προκύπτουσες 3D αλληλεπιδράσεις του Tucatinib με την HER2 από μοριακή μοντελοποίηση.



Εικόνα 6.6.: Οι 2D αλληλεπιδράσεις του Tucatinib με την HER2 μετά από μοριακή μοντελοποίηση.

6.3. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ TUCATINIB ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ HER2

Για τον σχεδιασμό των αναλόγων του Tucatinib βασιστήκαμε στα παραπάνω πειράματα μοριακής μοντελοποίησης. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν αλλαγές στην περιοχή της τριαζολοπυριδίνης και του οξαζολικού δακτυλίου.



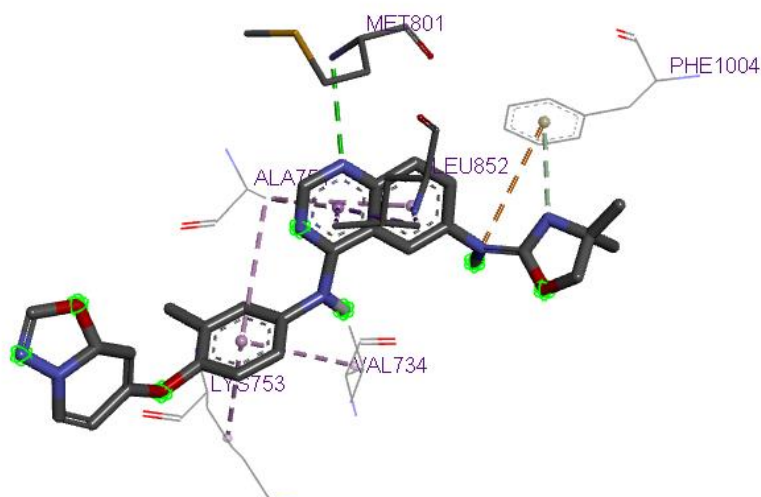
Εικόνα 6.7.: Σχεδιασθέντα ανάλογα του Tucatinib.

Ανάλογο	ΔG (kcal/mol)
Tucatinib 1 (Tuc 1)	-10.9
Tucatinib 2 (Tuc 2)	-11
Tucatinib 3 (Tuc 3)	-11.2
Tucatinib 4 (Tuc 4)	-10.7

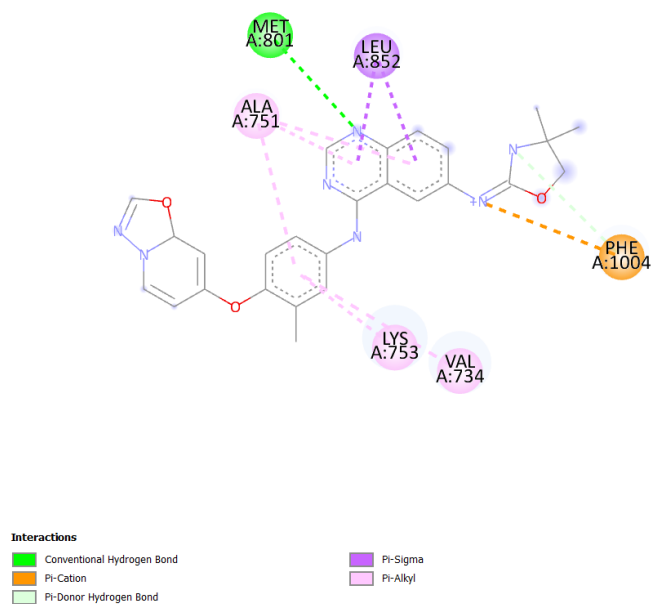
Πίνακας 6.1.: Θεωρητικές τιμές ελεύθερης ενέργειας Gibbs, $\Delta G_{binding}$, του κάθε συμπλόκου (ανάλογο-πρωτεΐνη).

6.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ DOCKING ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥ TUCATINIB

6.4.1. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 1

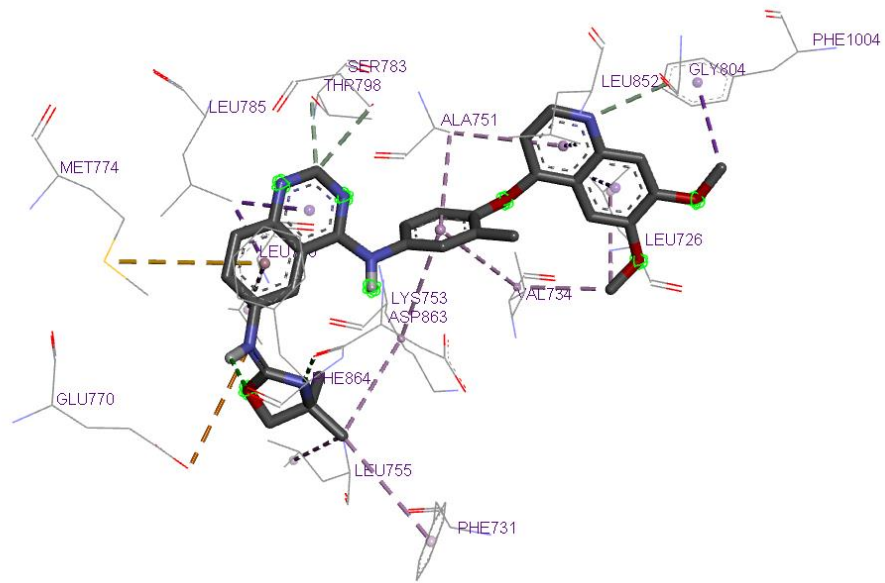


Εικόνα 6.8.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 1.

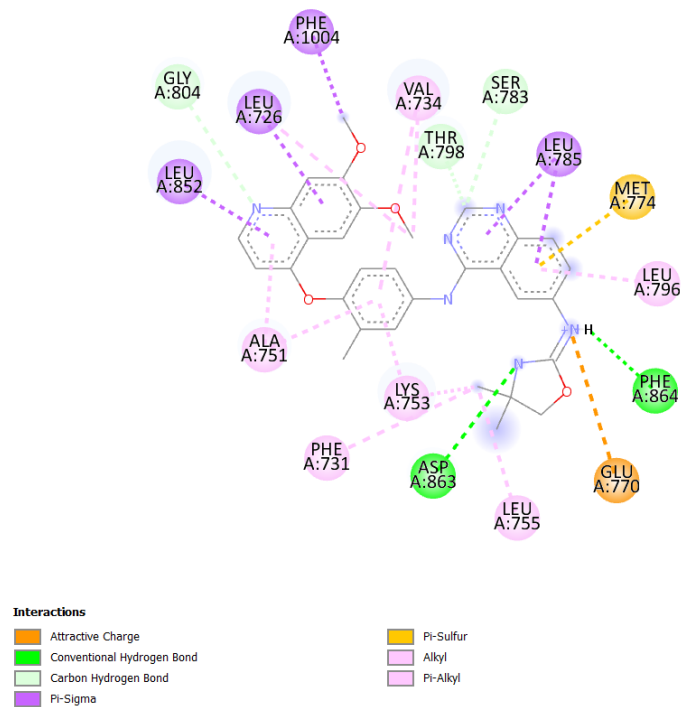


Εικόνα 6.9.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 1.

6.4.2. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 2

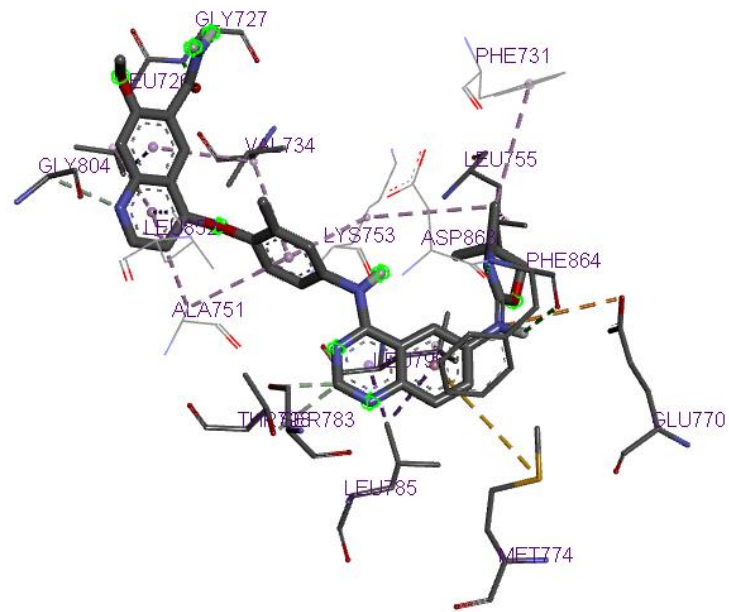


Εικόνα 6.10.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 2.

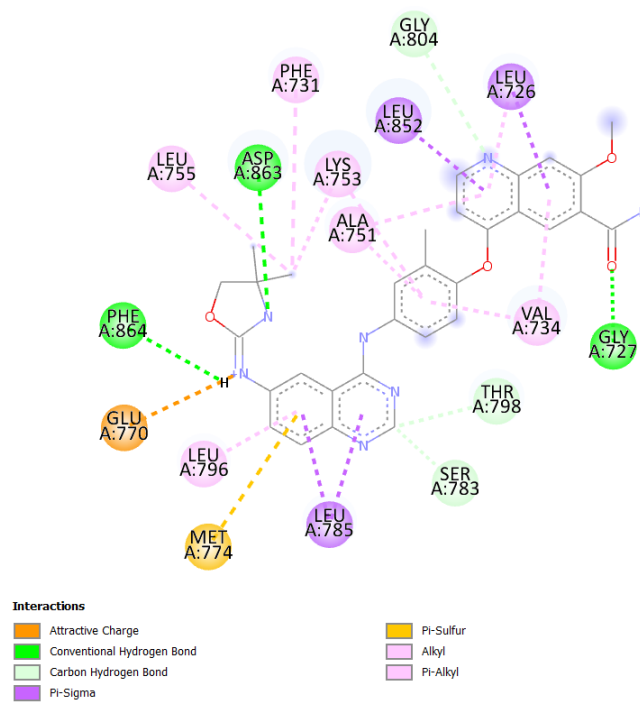


Εικόνα 6.11.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 2.

6.4.3. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 3

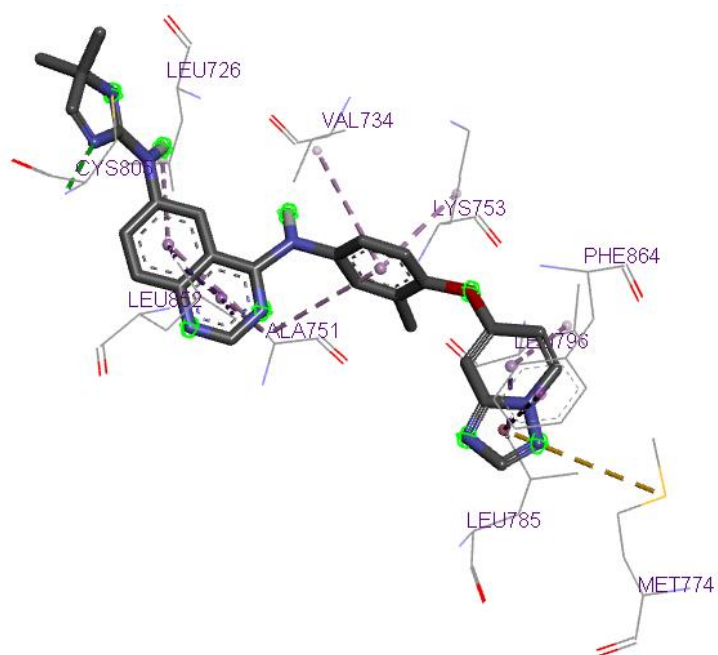


Εικόνα 6.12.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 3.

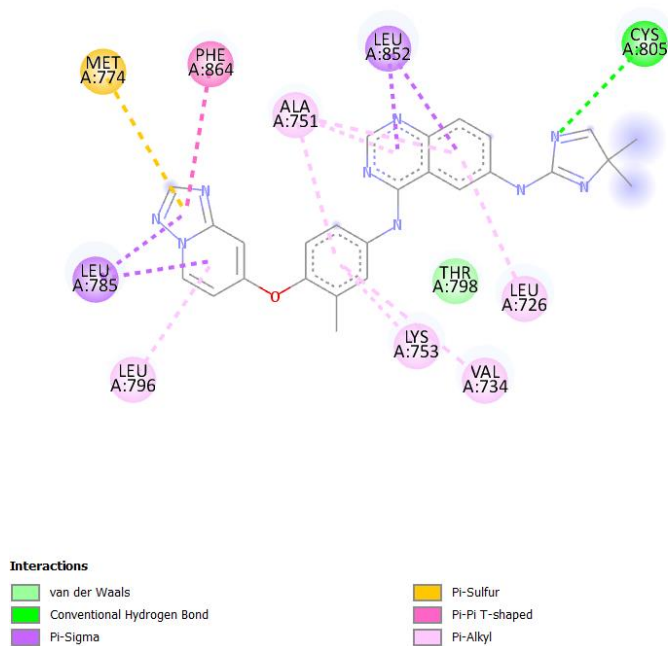


Εικόνα 6.13.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 3.

6.4.4. Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης της ένωσης Tuc 4



Εικόνα 6.14.: 3D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 4.



Εικόνα 6.15.: 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων της HER2 με το Tuc 4.

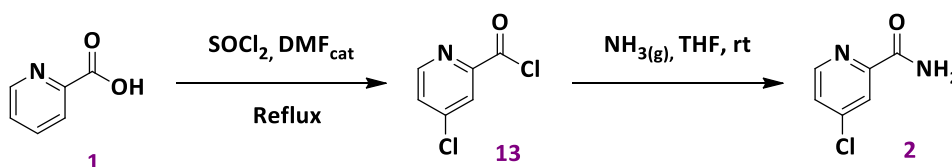
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Συνθέσεις

7.1. ΣΥΝΘΕΣΕΙΣ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΤΕΛΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ TUCATINIB

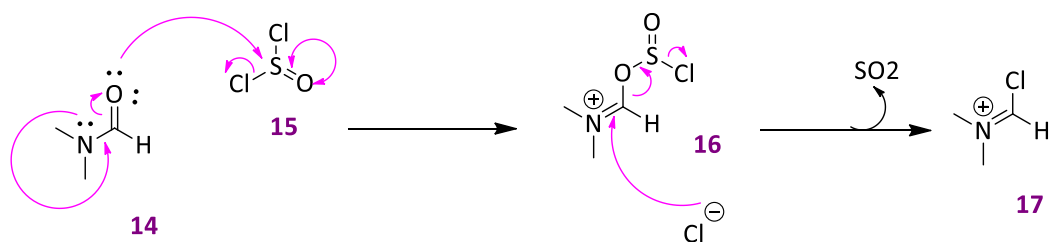
7.1.1. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (2)

Η αντίδραση σύνθεσης του 4-χλωροπικολιναμίδιου (2) από το πικολινικό οξύ, πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τον σχηματισμό του χλωριδίου του καρβοξυλικού οξέος (1) με ταυτόχρονη χλωρίωση του πυριμιδινικού δακτυλίου στην C4 θέση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται υπό βρασμό με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου (SOCl_2) ως αντιδραστήριου και ως διαλύτη παρουσία καταλυτικής ποσότητας διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF). Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, μετά το πέρας δυο ωρών, το θειονυλοχλωρίδιο που δεν αντέδρασε απομακρύνεται. Στη συνέχεια, το επιθυμητό αμίδιο (2) σχηματίζεται μέσω μιας πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης, που λαμβάνει χώρα μεταξύ του χλωριδίου του καρβοξυλικού οξέος (1) και της αμμωνίας.



Σχήμα 7.1: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 2.

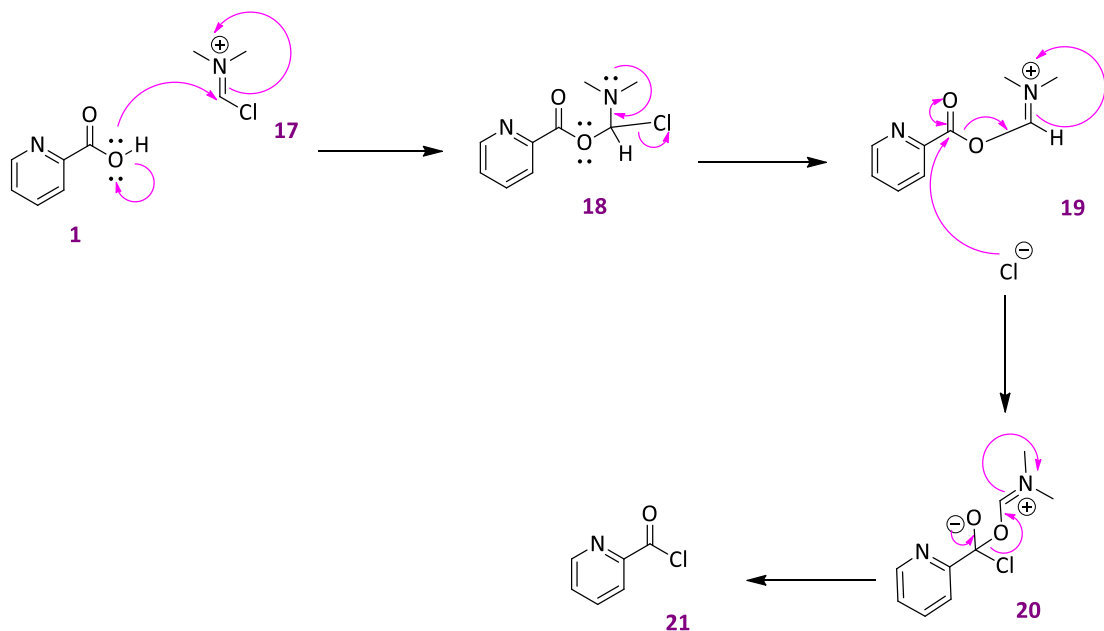
Όπως είναι γνωστό και από την βιβλιογραφία, οι αντιδράσεις σχηματισμού ακυλοχλωριδίων καταλύονται παρουσία διμεθυλοφορμαμίδιου. Το διμεθυλοφορμαμίδιο παρουσία θειονυλοχλωριδίου οδηγεί στον σχηματισμό του αντιδραστήριου Vilsmeier-Haack με παράλληλη απομάκρυνση ενός μορίου διοξειδίου του θείου και ενός μορίου υδροχλωρίου, όπως αποτυπώνεται παρακάτω. Το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack, που ουσιαστικά είναι άλας το οποίο αποτελείται από ανιόν χλωρίου και κατιόν N,N-διμεθυλμιμίνιου αποτελεί το μέσο χλωρίωσης.



Σχήμα 7.2: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού αντιδραστήριου Vilsmeier- Haack.

Η αντίδραση μετατροπής του πικολινικού οξέος σε 4-χλωρο-πικολινικό οξύ, καθώς και η αντίδραση σχηματισμού του άκυλο-χλωριδίου, λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα. Παρακάτω θα αναλυθούν ξεχωριστά.

Τα στάδιο σχηματισμού του άκυλο χλωριδίου περιλαμβάνει την προσβολή του οξυγόνου του καρβοξυλικού οξέος **1**, στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του κατιόντος ιμινίου, σχηματίζοντας την ενδιάμεση ένωση **19** με αποβολή ενός μορίου υδροχλωρίου. Το άκυλο-χλωρίδιο σχηματίζεται μέσω μηχανισμού ακυλο-υποκατάστασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ του ηλεκτρονιόφιλου καρβονυλικού άνθρακα της ενδιάμεσης ένωσης **19** και ενός ιόντος χλωρίου, που δρα ως πυρηνόφιλο. Σχηματίζεται αρχικά το τετραεδρικό ενδιάμεσο **20** και στη συνέχεια, με απομάκρυνση ενός μορίου διμεθυλοφορμαμιδίου το άκυλο χλωρίδιο **21**.



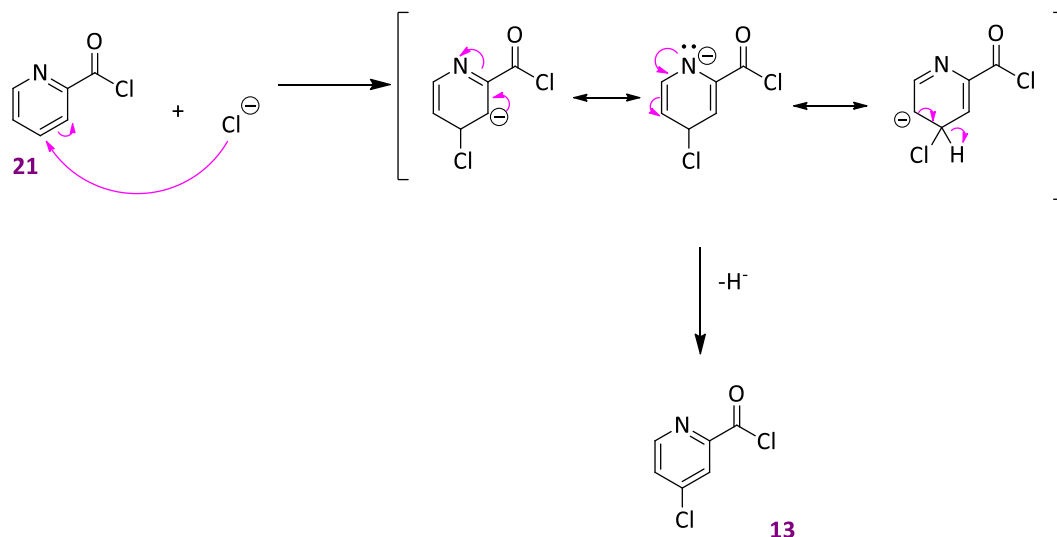
Σχήμα 7.3: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού του άκυλο χλωριδίου **21**.

Στο μείγμα της αντίδρασης, λόγω του ότι το θειονυλοχλωρίδιο λειτουργεί σαν αντιδραστήριο χλωρίωσης αλλά και ως διαλύτης, τα ιόντα χλωρίου είναι σε περίσσεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ευνοείται μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, με το ιόν χλωρίου να λειτουργεί ως πυρηνόφιλο ενώ το πυριδινικό υπόστρωμα λόγω του ατόμου N υποστηρίζει επίσης αποτελεσματικά πυρηνόφιλες υποκαταστάσεις λόγω της χαμηλότερης ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου της πυριδίνης. Η υποκατάσταση σε αυτήν την περίπτωση ευνοείται στις θέσεις 2- και 4- λόγω σταθερότερων δομών που προκύπτουν κατά τον συντονισμό.

Ο μηχανισμός της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης περιλαμβάνει 2 στάδια:

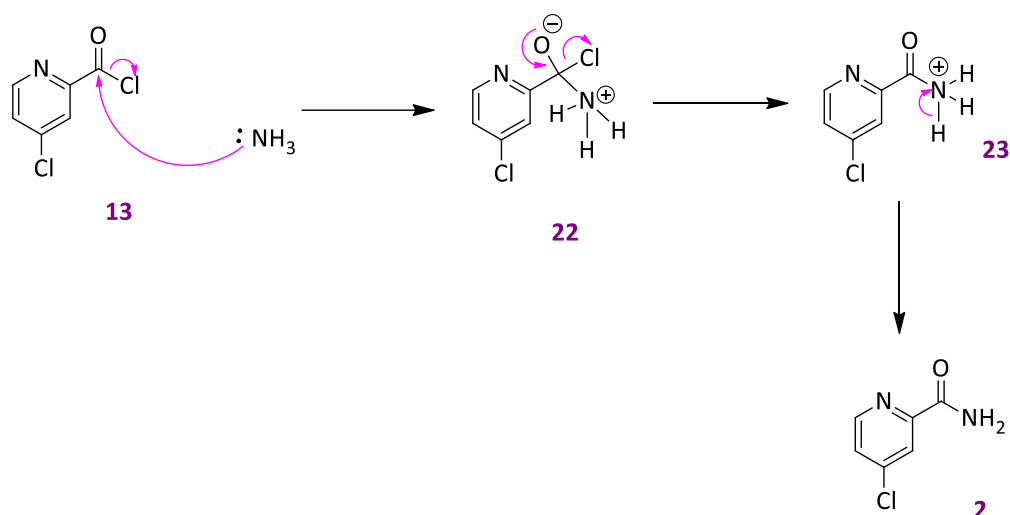
A) Την προσβολή του 2-πυριδινοκαρβονυλοχλωριδίου (**21**) από το πυρηνόφιλο ιόν χλωρίου

B) Την αποχώρηση ενός ανιόντος υδριδίου (H^-).



Σχήμα 7.4: Μηχανισμός πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης σχηματισμού της ένωσης **13**.

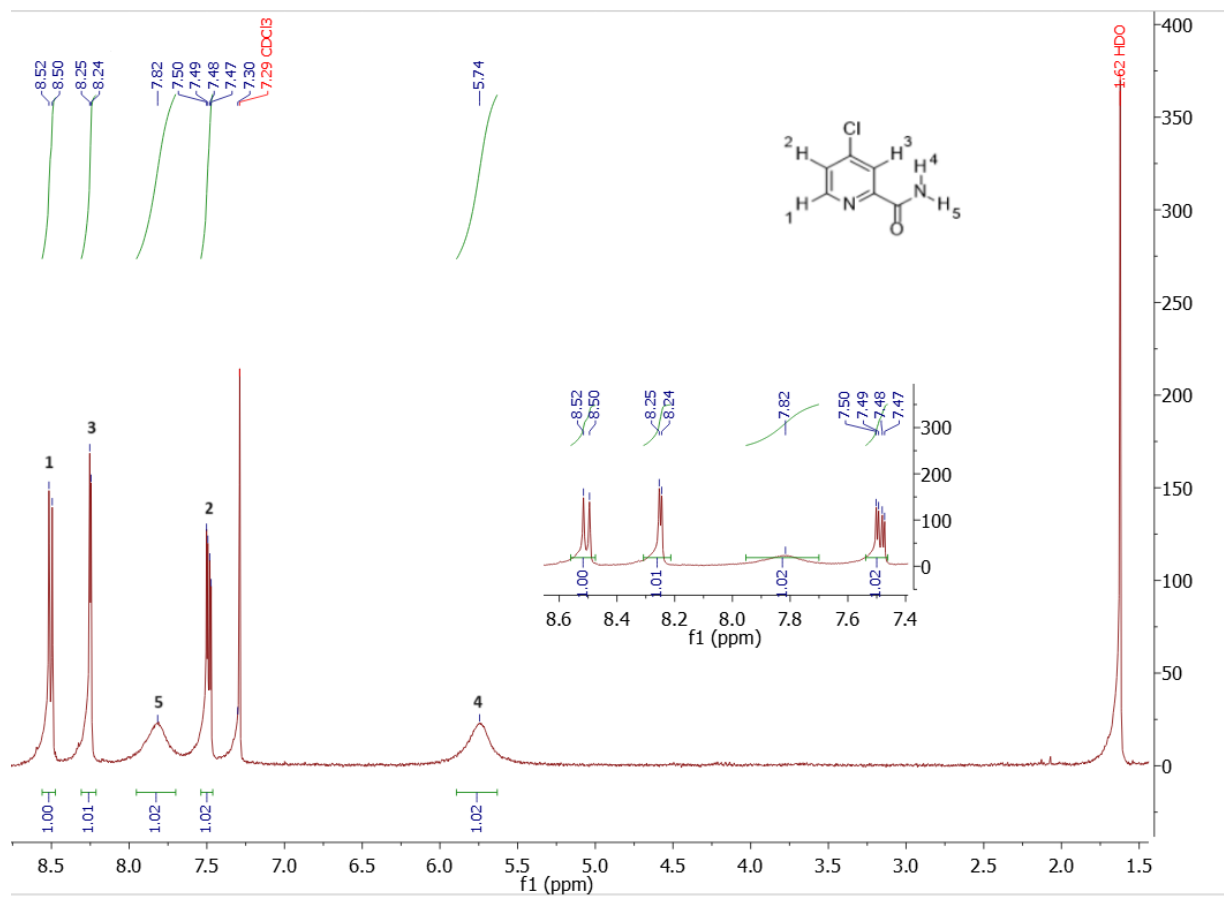
Το αμίδιο **2** σχηματίζεται μέσω μιας ακυλο-υποκατάστασης που λαμβάνει χώρα μεταξύ της αμμωνίας και του 4-χλωρο-2-πυριδινιοακυλοχλωριδίου (**13**). Πιο συγκεκριμένα, η αμμωνία δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας τον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα του ακυλο-χλωριδίου, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο το τετραεδρικό ενδιάμεσο (**23**). Τέλος, το επιθυμητό αμίδιο **2** σχηματίζεται μετά από απομάκρυνση ενός μορίου υδροχλωρίου.



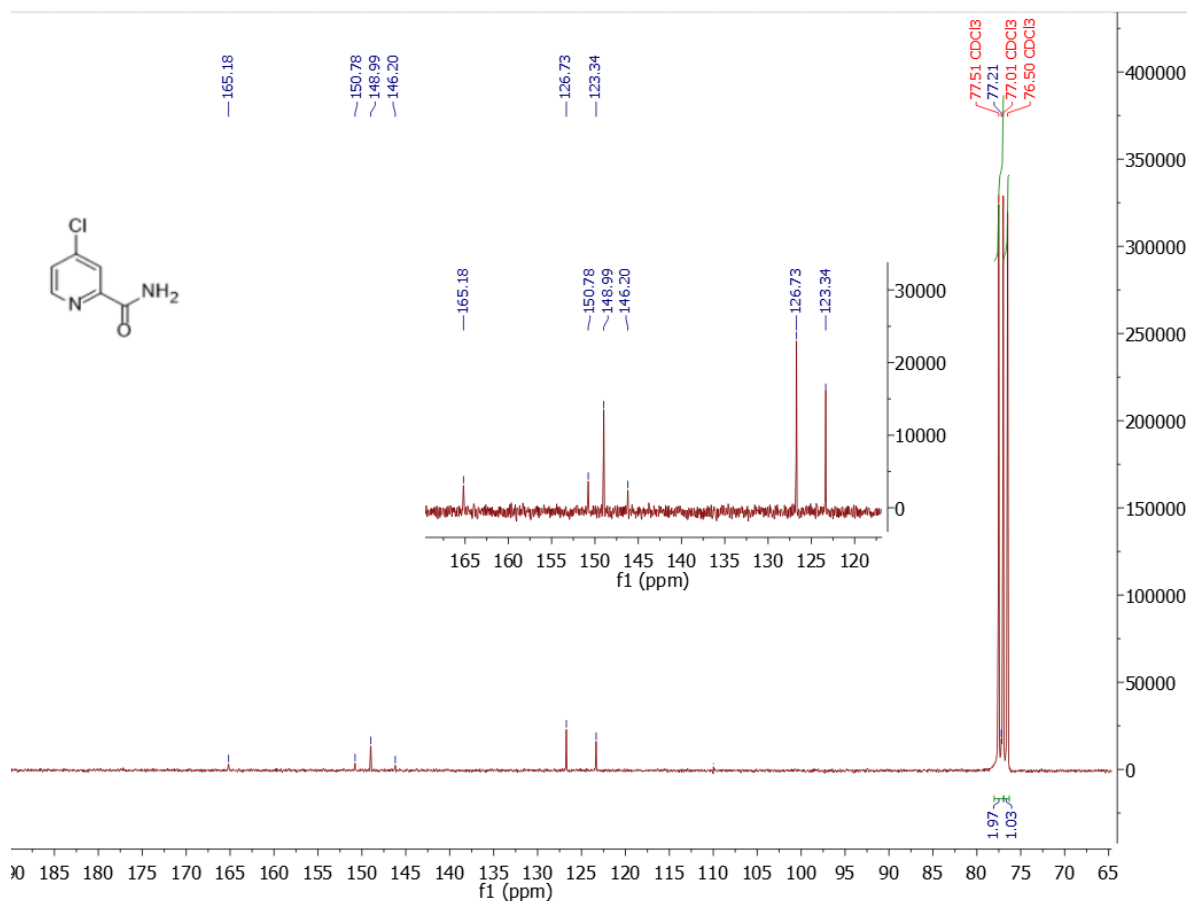
Σχήμα 7.5: Μηχανισμός ακυλο-υποκατάστασης σχηματισμού της ένωσης **2**

7.1.2. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (**2**)

Σύμφωνα με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **2**, το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο λόγω του γειτονικού ηλεκτραρνητικού ατόμου αζώτου της πυριδίνης που έλκει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα προς το μέρος του, και η κορυφή του εμφανίζεται στα 8.51 ppm ως διπλή με $J^3=5.2$ Hz (και $J^5=0.6$ Hz) καθώς έχει ένα γειτονικό πρωτόνιο. Η πολλαπλότητα στη σχάση οφείλεται στο ότι εμφανίζονται αλληλεπιδράσεις λόγω σχάσης spin-spin μακράς απόστασης με το H2 και με το H3. Ακολουθεί, το αρωματικό πρωτόνιο H3, λόγω της γειτονικής ηλεκτραρνητικής ομάδας $-\text{CONH}_2$, στα 8.25 ppm ως απλή που τείνει να γίνει διπλή λόγω του πιο απομακρυσμένου H2 με $J^4=2.1$ Hz (και $J^5=0.6$ Hz). Η ευρεία κορυφή στα 7.82 ppm αντιπροσωπεύει το ένα από τα δύο αμιδικά πρωτόνια, συγκεκριμένα το H5, και αυτό είναι συνέπεια του χαρακτήρα διπλού δεσμού του δεσμού C-N όπως προκύπτει από τον συντονισμό έχοντας ως αποτέλεσμα την περιορισμένη και αργή περιστροφή του δεσμού και τη διαφορετική στερεοχημική αλληλεπίδραση τελικά κάθε αμιδικού πρωτονίου με την καρβonyλομάδα. Το πρωτόνιο H2 συντονίζεται στα 7.49 ppm ως διπλή της διπλής αφού υπάρχει το γειτονικό πρωτόνιο H1 (με $J^3=5.2$ Hz) και επιπλέον εμφανίζει αλληλεπίδραση με το H3 ($J^4=2.1$ Hz). Τέλος, στα 5.74 ppm εντοπίζεται το δεύτερο αμιδικό πρωτόνιο H4 ως ευρεία κορυφή, ως το πιο προστατευμένο.



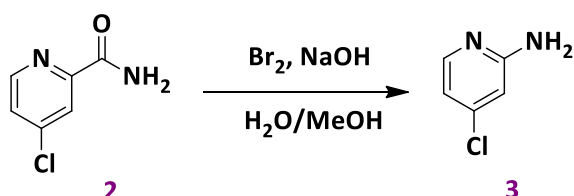
Σχήμα 7.6: Φάσμα ¹H-NMR (250 MHz σε CDCl₃) της ένωσης 2.



Σχήμα 7.7: Φάσμα ^{13}C -NMR (250 MHz σε CDCl_3) της ένωσης **2**. Η ένωση διαθέτει 6 άτομα άνθρακα και ο καθένας συντονίζεται σε διαφορετική τιμή ppm, με αποτέλεσμα την εμφάνιση 6 διαφορετικών κορυφών.

7.1.3. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπυριдино-2-αμίνη (3)

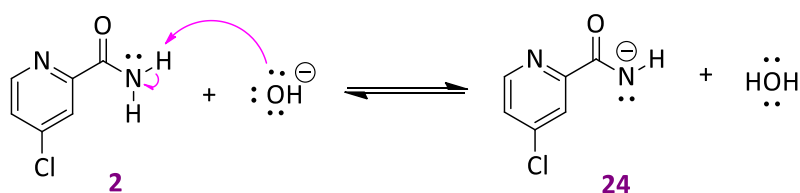
Η σύνθεση της 4-χλωροπυριдино-2-αμίνης πραγματοποιήθηκε μέσω μιας ειδικής αντίδρασης αλογόνωσης, της μετάθεσης Hofmann, κατά την οποία ένα πρωτοταγές αμίδιο παρουσία μιας βάσης μετατρέπεται στην αντίστοιχη πρωτοταγή αμίνη, αποβάλλοντας την καρβονυλική του ομάδα, με αποτέλεσμα να περιέχει ένα άτομο άνθρακα λιγότερο.



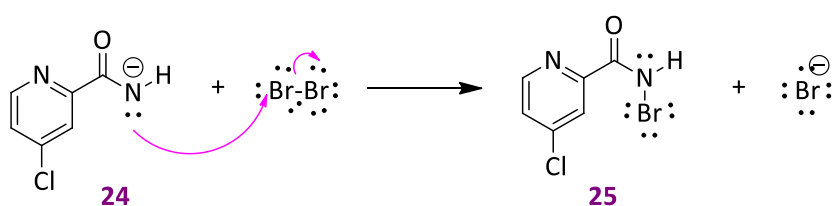
Σχήμα 7.8: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 3.

Η μετάθεση Hofmann αρχίζει με την αποπρωτονίωση του αζώτου προς σχηματισμό ενός αμιδικού ιόντος (στάδιο 1). Ακολουθεί η αλογόνωση του αζώτου (στάδιο 2) και στη συνέχεια, το δεύτερο πρωτόνιο του αζώτου αποσπάται από την περίσσεια βάσης και δίνει ένα N-αλογονοαμιδικό ιόν (στάδιο 3). Η χημική αυτή οντότητα, που έχει έναν ασθενή δεσμό αζώτου-αλογόνου και μία καλή εν δυνάμει αποχωρούσα ομάδα χάνει ένα ιόν αλογονιδίου ενώ ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα μετανάστευση της ομάδας R από τον καρβονυλικό άνθρακα στο άζωτο (στάδιο 4). Το προϊόν αυτής της αναδιάταξης είναι ένας ισοκυανικός εστέρας, R-N=C=O , αζωτούχο ανάλογο του διοξειδίου του άνθρακα. Ο sp-υβριδισμένος καρβονυλικός άνθρακας στον ισοκυανικό εστέρα έχει ισχυρό ηλεκτρονιόφιλο χαρακτήρα και προσβάλλεται από το νερό δίνοντας ένα ασταθές καρβαμικό οξύ. Τέλος, το καρβαμικό οξύ αποσυντίθεται προς διοξείδιο του άνθρακα και την αμίνη (στάδιο 5).

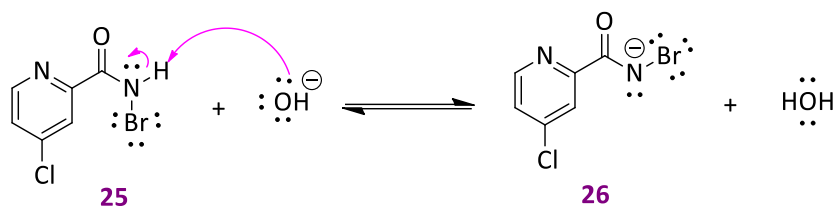
Στάδιο 1: Σχηματισμός αμιδικού ιόντος



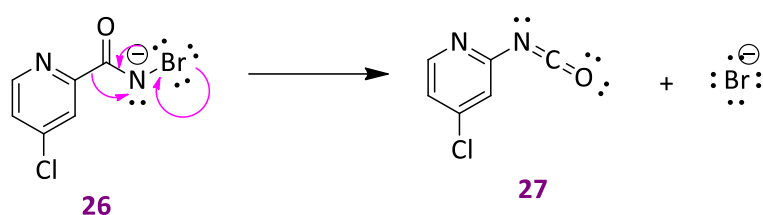
Στάδιο 2: Αλογόνωση



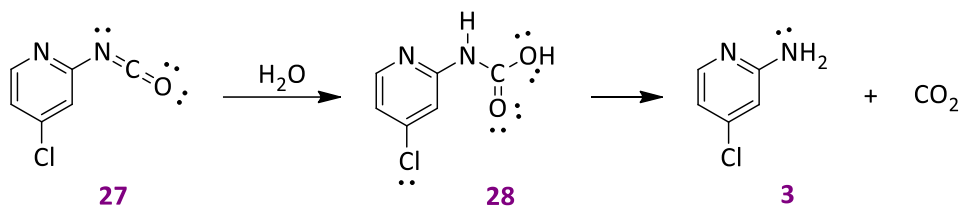
Στάδιο 3: Σχηματισμός N-αλογονοαμιδικού ιόντος



Στάδιο 4: Αναδιάταξη με απόσπαση ιόντος αλογονιδίου



Στάδιο 5: Ενουδάτωση προς καρβαμικό οξύ και διάσπαση

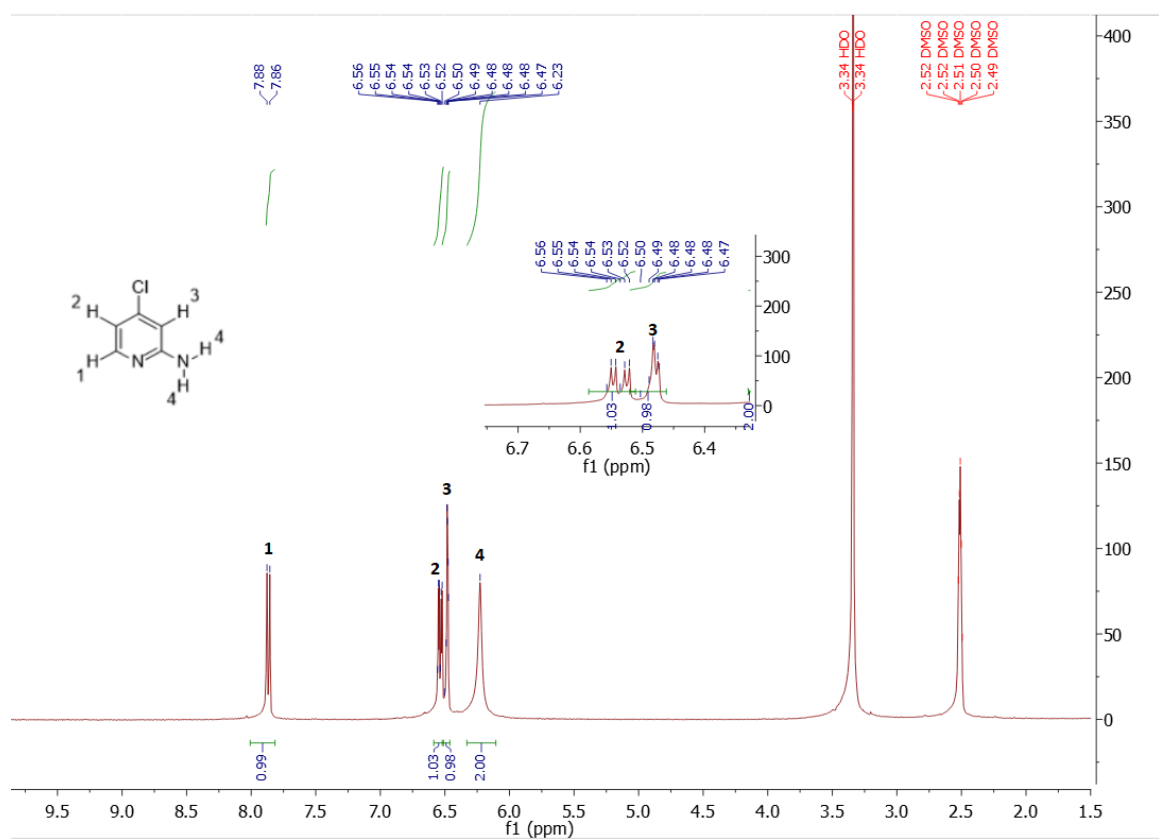


Σχήμα 7.9: Μηχανισμός μετάθεσης Hofmann σχηματισμού ένωσης **3**.

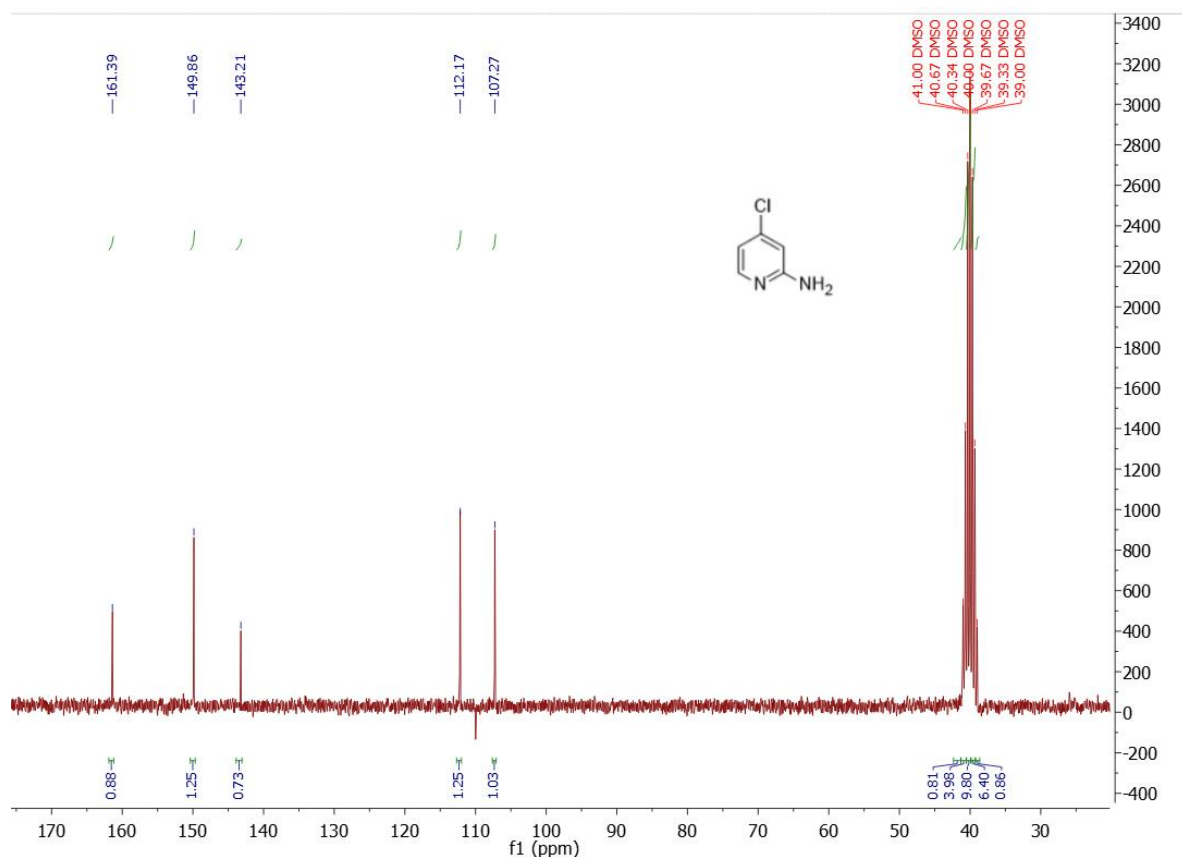
Κατά την αναδιάταξη, καθώς αποχωρεί το ιόν αλογονιδίου, η αλκυλομάδα “γλιστρά” από τον καρβονυλικό άνθρακα στο άζωτο, διατηρώντας ως προς το άζωτο την ίδια “όψη”, με την οποία ήταν πριν συνδεδεμένη με τον άνθρακα.

7.1.4. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλωροπυριδινό-2-αμίνη (3)

Σύμφωνα με το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **3**, το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι πιο αποπροστατευμένο λόγω του γειτονικού ηλεκτραρνητικού ατόμου αζώτου της πυριδίνης και η κορυφή του εμφανίζεται στα 7.87 ppm ως διπλή με $J^3=5.5$ Hz (και $J^5=0.6$ Hz) καθώς έχει ένα γειτονικό πρωτόνιο. Ακολουθεί το πρωτόνιο H2, το οποίο συντονίζεται στα 6.54 ppm ως διπλή της διπλής αφού υπάρχει το γειτονικό πρωτόνιο H1 (με $J^3= 5.5$ Hz) και επιπλέον εμφανίζει αλληλεπίδραση με το H3 ($J^4= 1.9$ Hz). Το πρωτόνιο H3, ως το πιο προστατευμένο από τα αρωματικά πρωτόνια, παρατηρείται στα 6.48 ppm ως απλή κορυφή που τείνει ωστόσο να γίνει διπλή λόγω του πιο απομακρυσμένου γειτονικού πρωτονίου H2 (γι' αυτό ισχύει $J^4=1.9$ Hz και $J^5=0.6$ Hz). Τέλος, η απλή ευρεία κορυφή στα 6.23 ppm η οποία με ολοκλήρωση της δίνει 2 πρωτόνια, αντιπροσωπεύει τα 2 πρωτόνια της αμινομάδας, τα οποία συντονίζονται στην ίδια συχνότητα, καθώς το χημικό τους περιβάλλον είναι ίδιο.



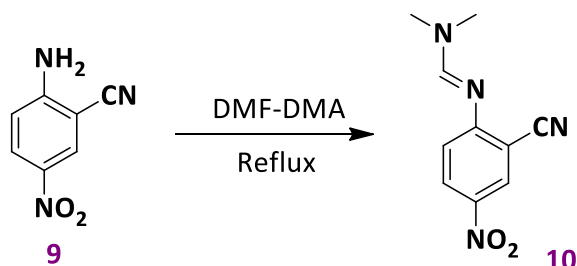
Σχήμα 7.10: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε DMSO) της ένωσης **3**.



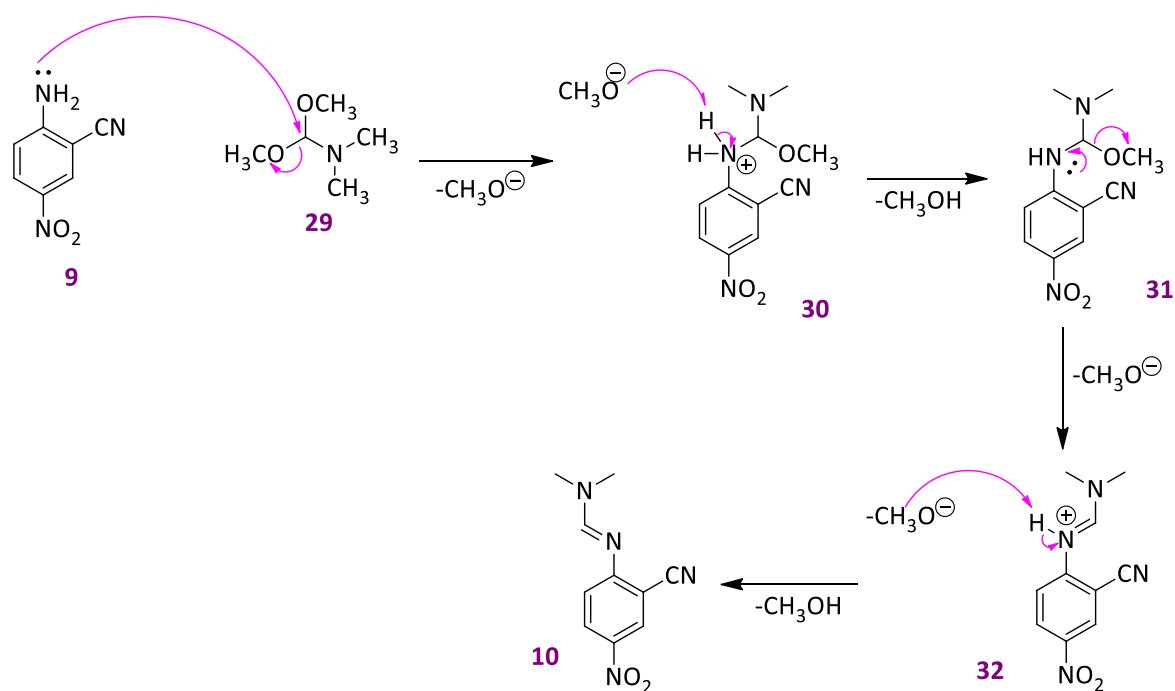
Σχήμα 7.11: Φάσμα ^{13}C -NMR (250 MHz σε DMSO) της ένωσης **3**. Η ένωση διαθέτει 5 άτομα άνθρακα και ο καθένας συντονίζεται σε διαφορετική τιμή ppm, με αποτέλεσμα την εμφάνιση 5 διαφορετικών κορυφών.

7.1.5. Σύνθεση της ένωσης N'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιο (10)

Η σύνθεση του N'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιμιδαμίδιου από το 2-αμινο-5-νιτροβενζόλιο πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης με το αντιδραστήριο DMF-DMA, όπου η αμινομάδα μετασχηματίζεται σε μια ιμίνη. Όσον αφορά τον μηχανισμό της αντίδρασης, το άζωτο της αμινομάδας ως πυρηνόφιλο προσβάλλει το μερικώς θετικά φορτισμένο άνθρακα του αντιδραστηρίου DMF-DMA, με αποτέλεσμα να προκύπτει η ομάδα ιμίνης.



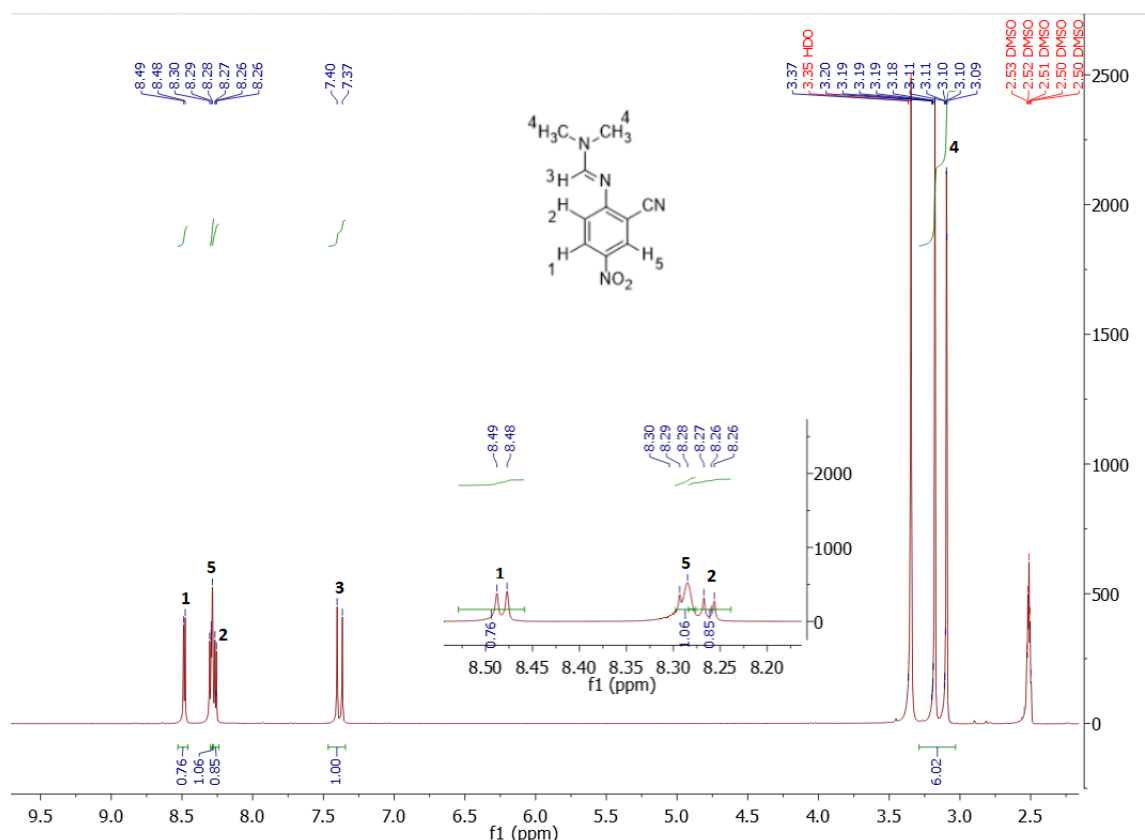
Σχήμα 7.12: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 10.



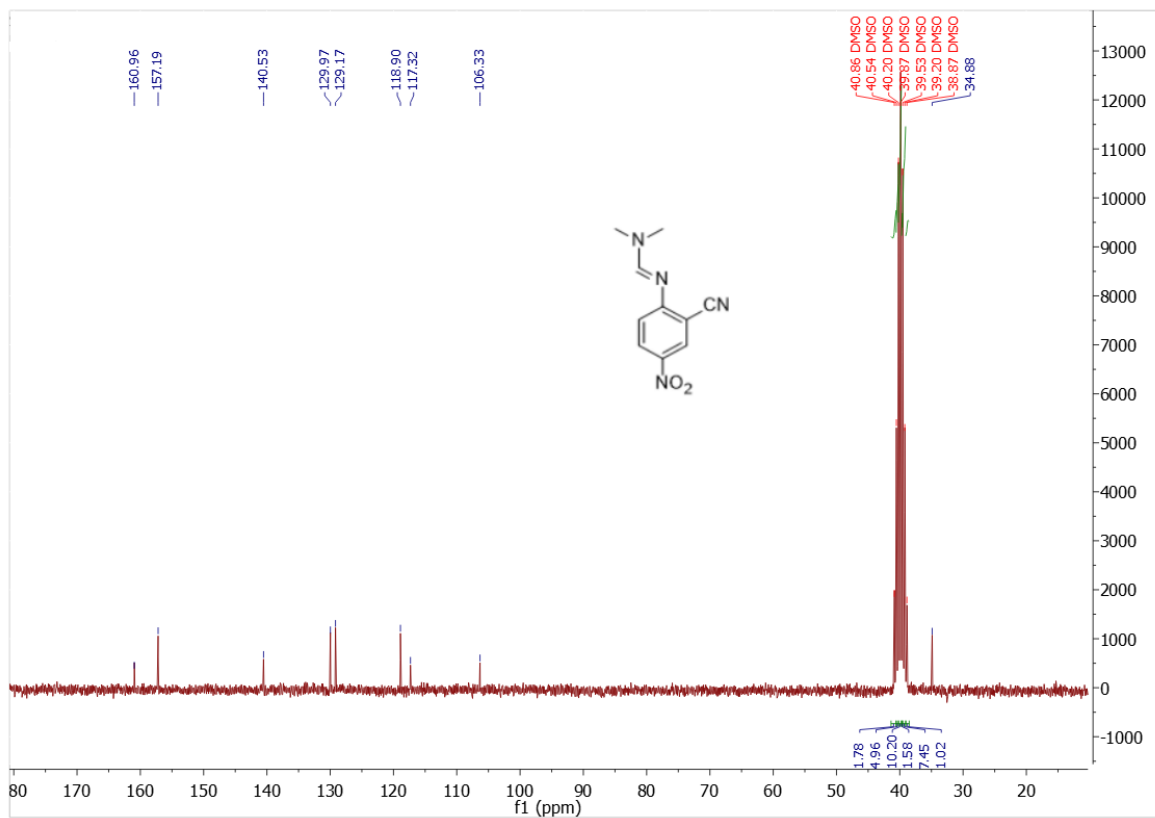
Σχήμα 7.13: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης 10.

7.1.6. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης N'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιδαμίδιο (10)

Με βάση το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **10**, το αρωματικό πρωτόνιο H1 είναι πιο αποπροστατευμένο και συντονίζεται στα 8.48 ppm ως διπλή κορυφή εφόσον έχει ένα γειτονικό πρωτόνιο με $J^3 = 4.4$ Hz (και $J^4 = 2.8$ Hz). Σε συχνότητα 8.29 ppm συναντάται η απλή κορυφή του πρωτονίου H5, το οποίο εμφανίζει ένα $J^4 = 2.8$ Hz. Από τα αρωματικά πρωτόνια τέλος, το H2 ως διπλή κορυφή, συντονίζεται στα 8.26 ppm με $J^3 = 4.4$ Hz λόγω του γειτονικού H1. Ακολουθεί σε λίγο χαμηλότερη συχνότητα, στα 7.38 ppm, το H3 της ιμίνης, το οποίο δίνει αυτή τη χαρακτηριστική διπλή κορυφή αν και δεν υπάρχει κάποιο γειτονικό πρωτόνιο, καθώς μπορεί να λάβει είτε την E-, είτε την Z- διαμόρφωση λόγω του διπλού δεσμού και την μη ελεύθερη περιστροφή των ατόμων του άνθρακα γύρω από αυτόν. Μάλιστα, ο λόγος που οι δύο αυτές κορυφές διαφέρουν ως προς το ύψος είναι η αναλογία E/Z που στη φύση απαντάται ως 60/40, με την E- διαμόρφωση να ευνοείται λόγω των λιγότερων στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Πράγματι, το πρωτόνιο H3 στην E- διαμόρφωση είναι περισσότερο αποπροστατευμένο λόγω της στερεοχημικής θέσης του πρωτονίου σε σχέση με τον βενζολικό δακτύλιο. Τέλος, σε συχνότητα 3.12 ppm συντονίζονται τα αλειφατικά πρωτόνια H4, τα οποία δίνουν το ίδιο σήμα, διότι βρίσκονται στο ίδιο χημικό περιβάλλον. Η μορφή της κορυφής και σε αυτή την περίπτωση είναι διπλή λόγω της E/Z διαμόρφωσης και η με ολοκλήρωσή της δίνει 6 πρωτόνια .



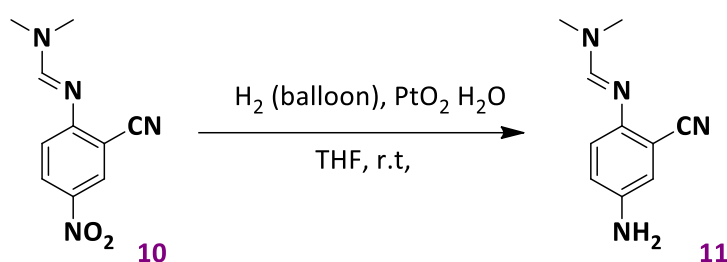
Σχήμα 7.14: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε DMSO) της ένωσης **10**



Σχήμα 7.15: Φάσμα ^{13}C -NMR (250 MHz σε DMSO) της ένωσης **10**. Η ένωση διαθέτει 9 άτομα άνθρακα και ο καθένας συντονίζεται σε διαφορετική τιμή ppm, με αποτέλεσμα την εμφάνιση 9 διαφορετικών κορυφών.

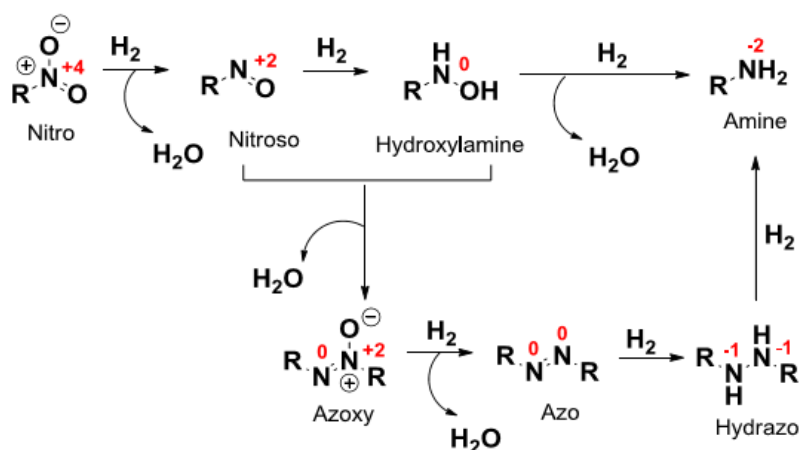
7.1.7. Σύνθεση της ένωσης N'-(4-αμινο-2-κυανοφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιδαμίδιο (11)

Η σύνθεση της ένωσης **11** πραγματοποιείται με καταλυτική υδρογόνωση της ένωσης **10** με τη χρήση του αντιδραστηρίου Adams ($\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) σε διαλύτη THF, μπαλόνι υδρογόνου και έντονη ανάδευση. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε διάστημα 2h, με ποσοτική μετατροπή (σχεδόν 100%) της νιτροομάδας σε αμίνη. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με τη μέθοδο αναγωγής του αντίστοιχου υποστρώματος της εταιρίας Seattle Genetics, στον χρόνο που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.



Σχήμα 7.16: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **11**.

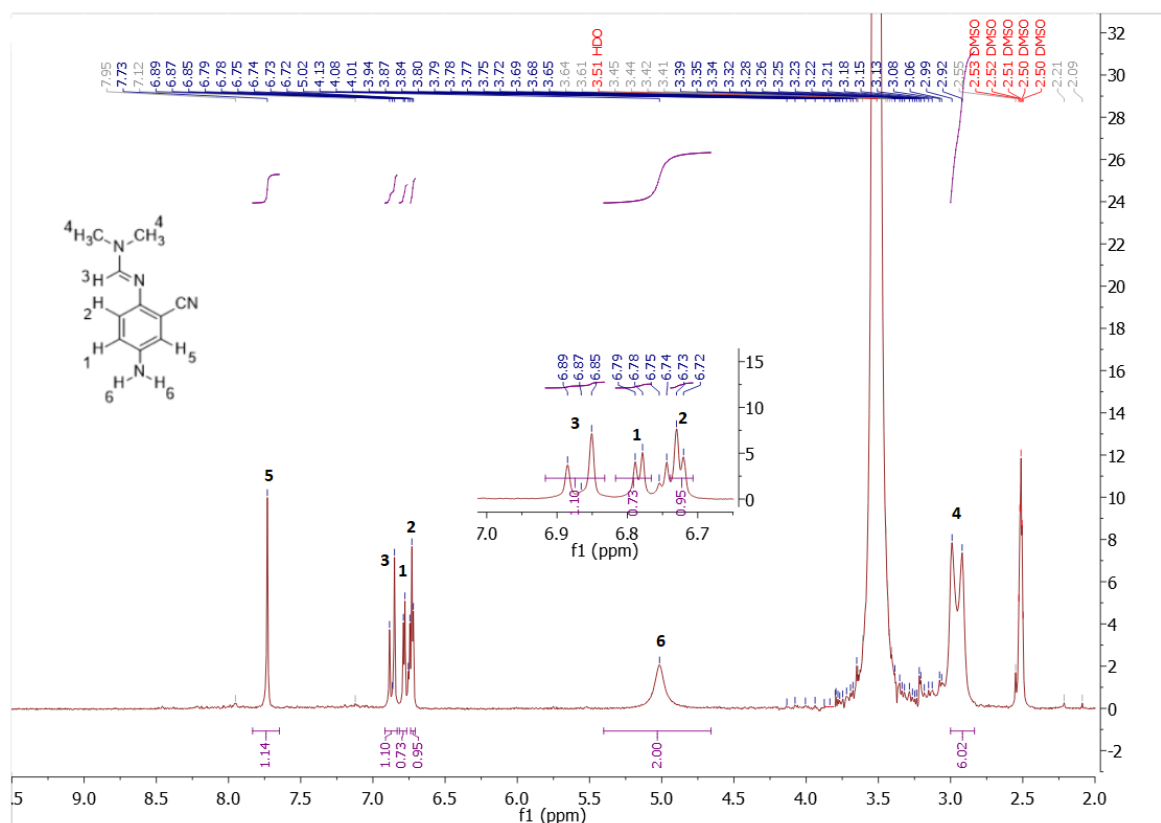
Ο καταλύτης Adams δεν είναι ενεργός για υδρογόνωση από μόνος του. Παρουσία υδρογόνου μετατρέπεται στη δραστική του μορφή (ανηγμένη μορφή) που ονομάζεται Platinum black, λόγω του μαύρου χρώματος που λαμβάνει η πλατίνα στην οξειδωτική κατάσταση μηδέν, $\text{Pt}(0)$. Στην επιφάνεια του $\text{Pt}(0)$ λαμβάνει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



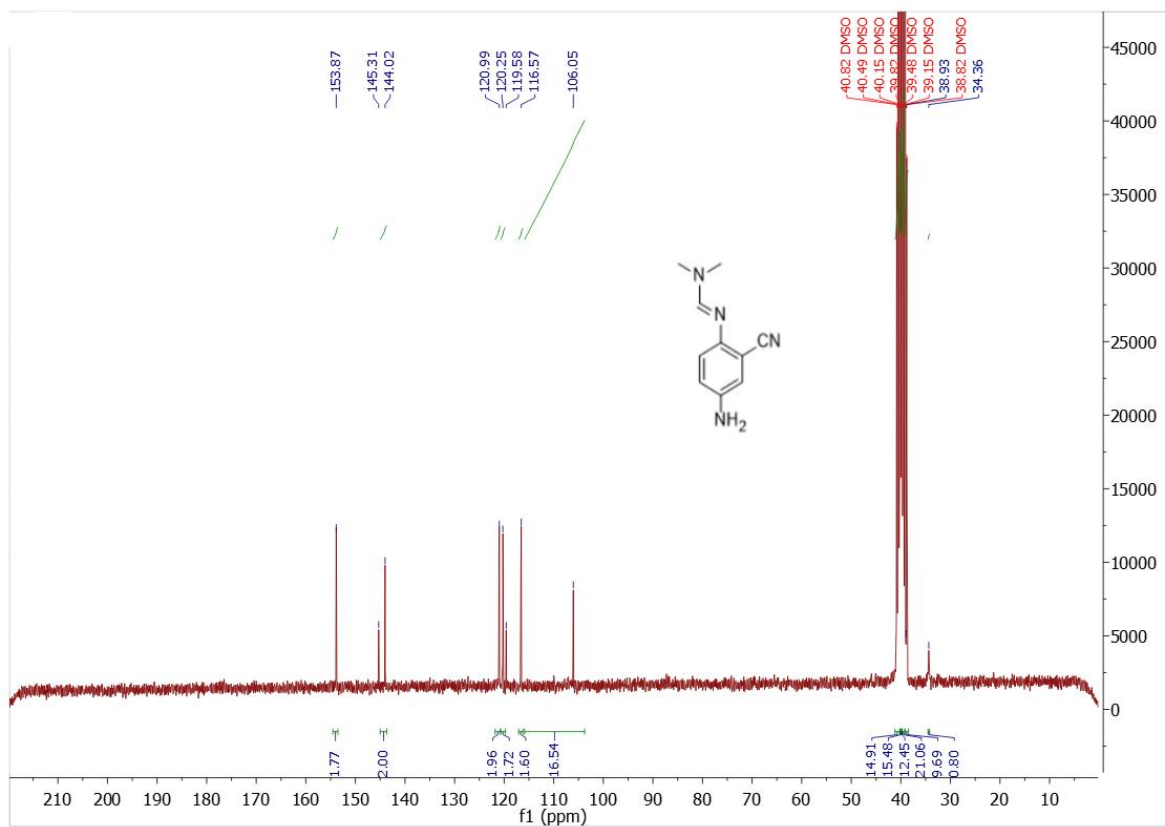
Σχήμα 7.17: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης ένωσης **11**.

7.1.8. Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης N'-(4-αμινο-2-κυανοφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιδαμίδιο (11)

Από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που πάρθηκε για την ένωση **11**, παρατηρείται ότι το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H5, το οποίο όπως φαίνεται συντονίζεται στα 7.73 ppm δίνοντας μια απλή κορυφή, από τη στιγμή που δεν έχει κάποιο γειτονικό πρωτόνιο. Αμέσως μετά, στα 6.87 ppm, εντοπίζεται το πρωτόνιο H3 της ιμίνης με τη μορφή της διπλής χαρακτηριστικής κορυφής λόγω των διαμορφώσεων E- και Z- που μπορεί να λάβει. Σε συχνότητα 6.78 ppm, εμφανίζεται το πρωτόνιο H1 ως διπλή κορυφή με $J=2.6$ Hz, ενώ στα 6.73 ppm το πρωτόνιο H2 ως διπλή και εξίσου με $J=2.6$ Hz. Τα δύο πρωτόνια της αμινομάδας συντονίζονται στα 5.02 ppm, ως μια ευρεία κορυφή, καθώς έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον. Τέλος, στα 2.95 ppm συντονίζονται τα αλειφατικά πρωτόνια H4, τα οποία δίνουν το ίδιο σήμα, διότι βρίσκονται στο ίδιο χημικό περιβάλλον, ενώ η μορφή της κορυφής και σε αυτή την περίπτωση είναι διπλή λόγω της E/Z διαμόρφωσης και η με ολοκλήρωσή της δίνει 6 πρωτόνια.



Σχήμα 7.18: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε DMSO) της ένωσης **11**.



Σχήμα 7.19: Φάσμα ^{13}C -NMR (250 MHz σε DMSO) της ένωσης **11**. Η ένωση διαθέτει 9 άτομα άνθρακα και ο καθένας συντονίζεται σε διαφορετική τιμή ppm, με αποτέλεσμα την εμφάνιση 9 διαφορετικών κορυφών.

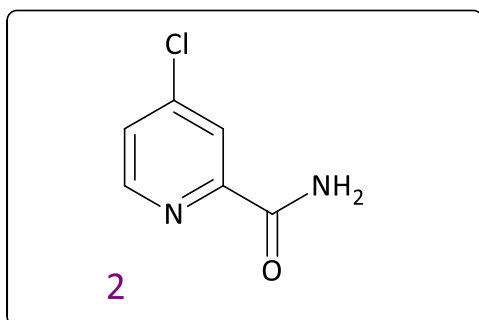
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Πειραματικό μέρος

8.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Η λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AV 250 MHz.
- Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Aldrich, Merck, Alfa Aesar όπου χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία.
- Οι δευτεριωμένοι διαλυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται, επίσης, από τις παραπάνω εταιρείες.
- Οι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν για την αναλυτική επεξεργασία των αντιδράσεων προέρχονται, επίσης, από τις προαναφερθείσες εταιρείες και, όπου ήταν απαραίτητο, κατέστησαν απόλυτοι και έπειτα διατηρήθηκαν σε αδρανές περιβάλλον.
- Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F254 ms της Merck, ενώ ο καθαρισμός των ενώσεων έγινε με χρωματογραφία στήλης, όπου χρησιμοποιήθηκε 9385 silica gel F254 της Merck.

8.2. Βελτιστοποιημένη σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (2)

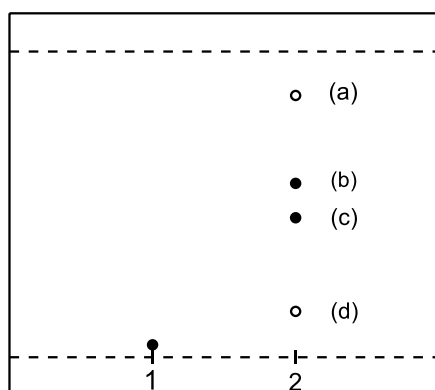


Σε μια σφαιρική φιάλη των 50mL, η οποία αρχικά "καίγεται" υπό κενό και αφήνεται για 10min, φέρονται 800mg (6.49mmol) της ένωσης πικολινικό οξύ (ένωση 1) σε περίσσεια φρέσκα απεσταγμένου θειονυλοχλωριδίου 20 mL και προστίθεται και καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμίδιου (2 σταγόνες). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται μέχρι

βρασμού, για 2h, 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. Απομονώνεται έτσι το 4-χλωροπικολινούλο-χλωρίδιο, ένωση 13, ως καφέ σκούρο στερεό. Το προκύπτον χλωρίδιο διαλύεται αμέσως σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (8 mL), υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στο διάλυμα αυτό, σε θερμοκρασία 0°C εφαρμόζεται συνεχής παροχή ξηρής αέριας αμμωνίας (0.23 mol) με την χρήση σωλήνα χλωριούχου ασβεστίου. Αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η εμφάνιση φυσαλίδων στο μίγμα της αντίδρασης καθώς και την εμφάνιση σκούρου

πράσινου στερεού. Η αέρια αμμωνία παράγεται με την προσθήκη στάγδην υδατικού διαλύματος καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 12 N (18 mL) σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, η οποία περιέχει χλωριούχο αμμώνιο (12 g). Η παροχή αέριας αμμωνίας συνεχίζεται στο μίγμα της αντίδρασης και σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το αρχικό ακυλο-χλωρίδιο ή/και το καρβοξυλικό οξύ (έλεγχος μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί αρχικά εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (100 ml) και νερό (100 ml) προσθέτοντας χλωριούχο νάτριο για τα γαλακτώματα που σχηματίζονται και έπειτα έκπλυση της υδατικής φάσης τρεις φορές καθώς ένα μέρος του αμιδίου μεταφέρεται και στην υδατική φάση. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και ξηραίνονται με Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα και συλλέγεται ένα σκούρο πράσινο στερεό.

Κατά την ανάπτυξη του στερεού προϊόντος που λαμβάνεται, διαλυμένου σε οξικό αιθυλεστέρα, σε πλάκα TLC, με σύστημα ανάπτυξης 1 οξικό: 1 εξάνιο: 0,1 μεθανόλη, διαπιστώθηκε η ύπαρξη 2 πολύ έντονων κηλίδων και 2 πολύ αχνών κηλίδων, όπως φαίνεται παρακάτω:



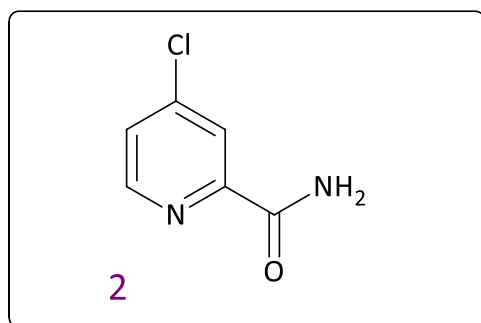
Σχήμα 7.20: Αριστερά αποτυπώνεται η κηλίδα της ένωσης **1** και δεξιά οι κηλίδες του προϊόντος που λάβαμε μετά από ανάπτυξη της πλάκας. Οι κηλίδες **(b)** και **(c)** που βρίσκονται στη μέση κατά μήκος της πλάκας είναι οι δύο βασικές και έντονες κηλίδες.

Ακολούθησε λοιπόν καθαρισμός του μίγματος της αντίδρασης με χρωματογραφία στήλης και με σύστημα διαλυτών έκλουσης 1 οξικό: 1 εξάνιο: 0,1 μεθανόλη. Απομονώθηκαν ξεχωριστά οι κηλίδες, συμπυκνώθηκαν στον περιστροφικό εξατμιστήρα και έγινε ξήρανση τους σε αντλία υψηλού κενού.

Διαπιστώθηκε μέσω της λήψης φάσματος NMR ^1H και ^{13}C ότι η κηλίδα που αποτελεί την επιθυμητή ένωση (**2**) είναι η κηλίδα **(c)**, η οποία είχε ένα αχνό κίτρινο χρώμα και απομονώθηκε σε ποσότητα 0.7124 g (4.55 mmol) και σε απόδοση 70%.

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3 , 298K) δ 8.51 (d, $J = 5.2, 0.6$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 2.1, 0.6$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.49 (dd, $J = 5.2, 2.1$ Hz, 2H), 5.74 (s, 1H).

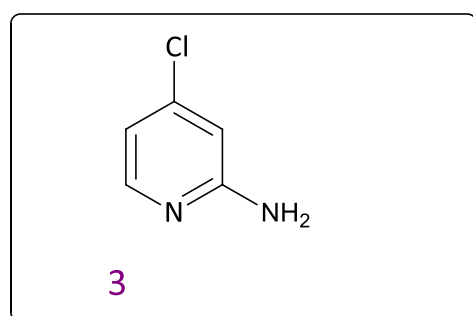
8.3. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (2)



Σε μια σφαιρική φιάλη των 50mL, η οποία αρχικά “καίγεται” υπό κενό και αφήνεται για 10min, φέρονται 800mg (6.49mmol) της ένωσης πικολινικό οξύ (ένωση 1) σε περίσσεια φρέσκα απεσταγμένου θειονυλοχλωριδίου 20 mL και προστίθεται και καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμίδιου (2 σταγόνες). Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται μέχρι

βρασμού, για 2h, 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 και υπό ελαφριά θέρμανση στους 30-40°C μέχρι ξηρού, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας θειονυλοχλωριδίου. Απομονώνεται έτσι το 4-χλωροπικολινοϋλοχλωρίδιο, ένωση 13, ως καφέ σκούρο στερεό. Το προκύπτον χλωρίδιο διαλύεται αμέσως σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (8 mL), υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Στο διάλυμα αυτό, σε θερμοκρασία 0°C προστίθεται υπο ανάδευση ποσότητα υδατικής αμμωνίας 30% (2 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται overnight για περίπου 16h μέχρι την πλήρη κατανάλωση του αρχικού ακυλο-χλωριδίου (έλεγχος μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ακολουθεί αρχικά εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (100 ml) και νερό (100 ml) προσθέτοντας χλωριούχο νάτριο για τα γαλακτώματα που σχηματίζονται και έπειτα έκπλυση της υδατικής φάσης τρεις φορές καθώς ένα μέρος του αμιδίου μεταφέρεται και στην υδατική φάση. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα και συλλέγεται ένα σκούρο πράσινο στερεό (0.478 g, 3.05 mmol, 47%).

8.4. Σύνθεση της ένωσης 4-χλωροπυριδινό-2-αμίνη (3)



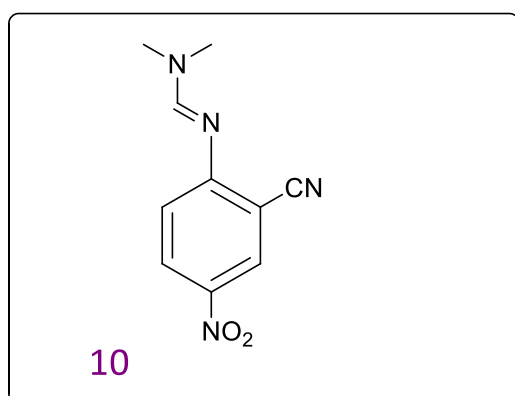
Σε μια σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρονται 0.7124g της ένωσης 4-χλωροπικολιναμίδιο (ένωση 2) και διαλύονται σε 7 mL αιθανόλης. Η σφαιρική έπειτα τοποθετείται μέσα σε ένα παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται σταθερά στους 0-10°C. Στη συνέχεια, προστίθενται σταδιακά 5 mL

διαλύματος NaOH συγκέντρωσης 5M καθώς και 230 μL Br₂ σταδιακά και υπό ανάδευση, διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή. Αφού προστεθεί και η ποσότητα του Br₂, το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου αρχικά και έπειτα

θερμαίνεται μέχρι 50-60°C. Μετά από έλεγχο της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και σύστημα ανάπτυξης 10% MeOH σε οξικό αιθυλεστέρα, διαπιστώθηκε η ολοκλήρωση της αντίδρασης στις 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιείται εξουδετέρωση της περίσσειας βάσης με υδατικό διάλυμα HCl 2N μέχρι το pH να γίνει ουδέτερο. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (100 ml) και νερό (100 ml) προσθέτοντας χλωριούχο νάτριο για τα γαλακτώματα που σχηματίζονται και έπειτα έκπλυση της υδατικής φάσης. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα, όπου λαμβάνεται στερεό καφέ χρώματος. Το μίγμα καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών έκλουσης 10% MeOH σε οξικό αιθυλεστέρα, από την οποία παραλήφθηκε στερεό ανοιχτού καφέ χρώματος και έπειτα από ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού, παραλήφθηκαν 0,384 g στερεού (3 mmol, 66%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 7.87 (d, *J* = 5.5, 0.6 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 5.5, 1.9 Hz, 2H), 6.48 (d, *J* = 1.9, 0.6 Hz, 1H), 6.23 (s, 2H)

8.5. Σύνθεση της ένωσης N'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιδαμίδιο (10)

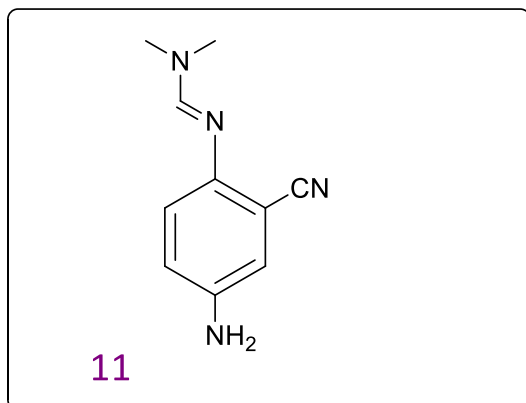


Σε μια σφαιρική φιάλη των 50mL, η οποία αρχικά "καίγεται" υπό κενό και αφήνεται για 10min, φέρονται 0,996g της ένωσης 2-αμινο-5-νιτροβενζονιτρίλιο (ένωση 9) σε 7 mL DMF-DMA. Το μείγμα θερμαίνεται στους 100°C και παραμένει υπό ανάδευση και αναρροή σε ατμόσφαιρα αζώτου, έως ώτου καταναλωθεί η αρχική ένωση για 1.30h. Το σύστημα ελέγχου με TLC για την πορεία της αντίδρασης είναι

εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (1:2). Το μίγμα ψύχεται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα για την απομάκρυνση του διαλύτη DMF-DMA. Στη συνέχεια, ακολούθησε εκχύλιση του ιζήματος αρχικά με οξικό αιθυλεστέρα (100 ml) και νερό (100 ml) και έπειτα εκπλύσεις της οργανικής φάσης τρεις φορές. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και ξηραίνονται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα και συλλέγεται ένα στερεό κίτρινου χρώματος. Έπειτα και από ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού, παραλήφθηκαν 1.2374 g στερεού (5.67 mmol, 93%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 8.48 (d, *J* = 4.4, 2.8 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.38 (d, 1H), 3.12 (d, 6H).

8.6. Σύνθεση της ένωσης N'-(4-αμινο-2-κυανοφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιδαμίδιο (11)



Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL η οποία αρχικά “καίγεται” και αφήνεται για 10min υπό κενό, φέρονται υπό ατμόσφαιρα αζώτου 1.2374g της ένωσης N'-(2-κυανο-4-νιτροφαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιδαμίδιο (ένωση **10**) και διαλύτης THF μέχρι να διαλυθεί η ένωση (περίπου 10 mL), υπό ανάδευση. Ακολουθεί, επίσης υπό ατμόσφαιρα αζώτου, η προσθήκη 0.209g καταλύτη Adams (PtO₂·H₂O), το 15% της

ποσότητας σε mol του προς αναγωγή αντιδραστηρίου, και αμέσως εφαρμόζεται κενό για 1 min. Πραγματοποιούνται 2 εκτονώσεις στο σύστημα υπό ατμόσφαιρα αζώτου και αμέσως τοποθετείται μπαλόνι H₂, κάνοντας άλλη μια φορά εκτόνωση και εφαρμόζοντας έντονη ανάδευση, χωρίς θέρμανση και παραμένει στις συνθήκες αυτές έως ώτου καταναλωθεί η αρχική ένωση αλλά και όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα από τα οποία διέρχεται η αντίδραση αναγωγής. Το σύστημα ελέγχου με TLC για την πορεία της αντίδρασης είναι 5% MeOH σε οξικό αιθυλεστέρα και η διάρκεια της αντίδρασης ήταν 2h. Μέτα την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μπαλόνι H₂ αφαιρείται και ο διαλύτης THF απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Αμέσως, ακολουθεί η απομάκρυνση του καταλύτη με celite αφού πρώτα το στερεό ίζημα που παραλήφθηκε, διαλυτοποιήθηκε σε ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και ακολούθησε διήθηση υπό κενό. Στο διήθημα που παραλήφθηκε, στο οποίο βρίσκεται η ένωση μας διαλυμένη σε οξικό αιθυλεστέρα, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με νερό (100 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με Na₂SO₄. Το ξηραντικό διηθείται σε πτυχωτό ηθμό και ο διαλύτης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα και συλλέγεται ένα στερεό χρώματος. Έπειτα και από ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού, παραλήφθηκαν 1.003 g στερεού (5.33 mmol, 94%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO, 298K) δ 7.73 (s, 1H), 6.87 (d, 1H), 6.78 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 2.95 (d, 6H).

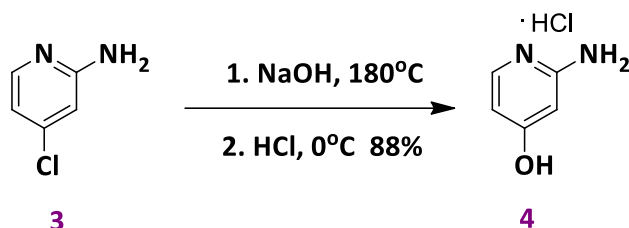
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Δοκιμαστικά πειράματα- προσπάθειες αντιδράσεων

Στο κεφάλαιο αυτό της εργασίας θα αναφερθούν οι προσπάθειες που έγιναν για ορισμένες αντιδράσεις που δεν πρόλαβαν να ολοκληρωθούν.

9.1. Σύνθεση της ένωσης 2-αμινο-4-υδροξυπυριδίνη (4)

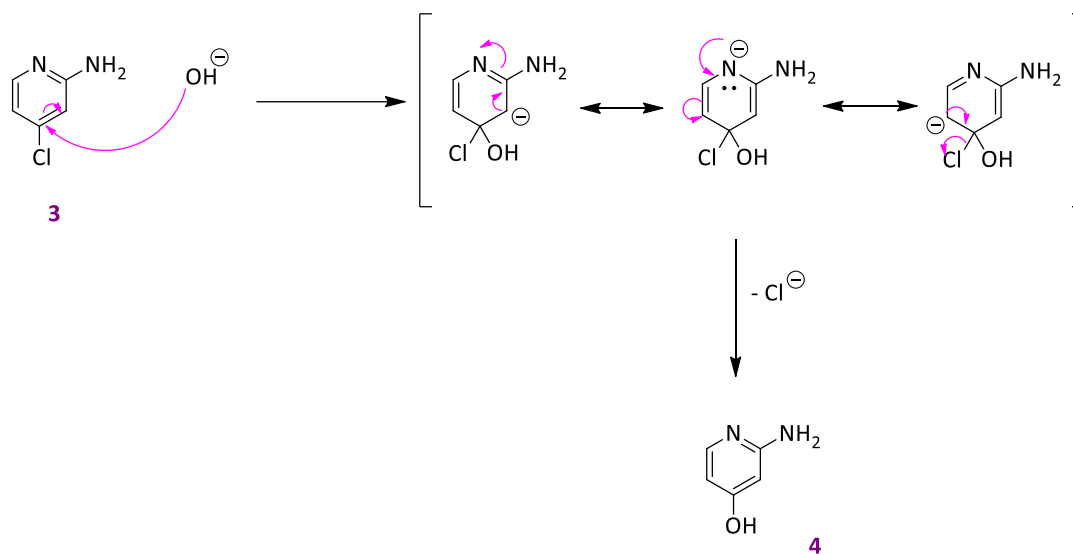
Η αντίδραση σύνθεσης της 2-αμινο-4-υδροξυπυριδίνης αποτελεί μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, όπου σε πρώτο στάδιο η αρχική ένωση κατεργάζεται με το πυρηνόφιλο ανιόν υδροξειδίου σε υψηλή θερμοκρασία, ικανή να ενεργοποιήσει το υπόστρωμα, και σε δεύτερο στάδιο η περίσσεια βάσης εξουδετερώνεται με διάλυμα HCl.



Σχήμα 9.1: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 4.

Ο μηχανισμός της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο βήμα αποτελεί η προσβολή του πυρηνόφιλου σε ένα υπόστρωμα “φτωχό” ηλεκτρονικά, όπως στην περίπτωση μας είναι ο πυριδινικός δακτύλιος, με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα αρνητικά φορτισμένο ενδιάμεσο. Το ενδιάμεσο αυτό σταθεροποιείται λόγω του ατόμου N της πυριδίνης, το οποίο υποστηρίζει αποτελεσματικά πυρηνόφιλες υποκαταστάσεις λόγω της χαμηλότερης ηλεκτρονιακής πυκνότητας γύρω από τα άτομα άνθρακα του δακτυλίου. Η ύπαρξη βέβαια στον δακτύλιο της ομάδας -NH₂ που επαγωγικά προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα, πιθανότατα μειώνει τη δραστηριότητα του σε μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, γι’ αυτό έγιναν διάφορες δοκιμές ως προς τις συνθήκες επίτευξης της αντίδρασης. Το δεύτερο βήμα στην πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση είναι η αποβολή της αποχωρούσας ομάδας.

Το καθοριστικό βήμα για την ταχύτητα της αντίδρασης είναι το πρώτο. Όπως φαίνεται σε μια εκ των δομών συντονισμού, το αρνητικό φορτίο μετατοπίζεται στο άζωτο του πυριδινικού δακτυλίου, γεγονός που προσφέρει σταθεροποίηση.



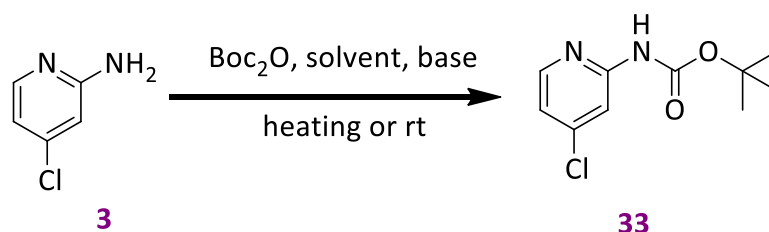
Σχήμα 9.2: Μηχανισμός πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης σχηματισμού της ένωσης **4**.

Τα δοκιμαστικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα. Αξιοσημείωτη είναι η 4^η περίπτωση, όπου ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η γλυκερίνη, η οποία έχει την ικανότητα να αναπτύσσει πολύ υψηλό σημείο ζέσης (290^oK), επιθυμητό για να επιτευχθεί η ενεργοποίηση του υποστρώματος. Ωστόσο, η ιδιότητα αυτή ταυτόχρονα δυσκολεύει την απομάκρυνση του διαλύτη για την απομόνωση του προϊόντος, όπως και στην περίπτωση μας που όπως αποδείχτηκε από έλεγχο της αντίδρασης με TLC, ενώ το αντιδρών **3** καταναλώθηκε σχετικά γρήγορα και σε ποσοστό σχεδόν 100%, στην πορεία δεν μπορέσαμε να απομακρύνουμε τη γλυκερίνη.

Πείραμα	2-αμινο-4-υδροξυπυριδίνη	Διαλύτης	Πυρηνόφιλο	Θερμοκρασία	h	Απόδοση
1	1eq	H ₂ O	6eq NaOH/H ₂ O 7.5M	180°C	48	0%
2	1eq	Dowtherm	6eq NaOH/H ₂ O 5M	200°C	48	0%
3	1eq	DMF	6eq NaOH/H ₂ O 5M	180°C	24	0%
4	1eq	Γλυκερίνη	4eq KOH	180°C	4	-

Πίνακας : Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, σύνθεσης της ένωσης **4**.

Ακολούθησε στην πορεία, μια δεύτερη σειρά πειραμάτων, κατά τις οποίες σκεφτήκαμε να προστατεύσουμε την αμινομάδα της 4-χλωροπυριδινό-2-αμίνης, προκειμένου οι συνθήκες πειράματος να είναι λιγότερο δραστικές. Η προστασία της αμινομάδας πραγματοποιείται με τη χρήση Boc ανυδρίτη.



Σχήμα 9.3: Αντίδραση προστασίας της αμινομάδας της ένωσης **3**.

Κατά την σειρά αυτή πειραμάτων δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες και πραγματοποιήθηκαν διάφορες μεταβολές στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη, τη βάση, τη θερμοκρασία και τον αριθμό των ισοδύναμων ποσοτήτων, με στόχο την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών που θα οδηγούν στην εκλεκτική προστασία της αμινομάδας.

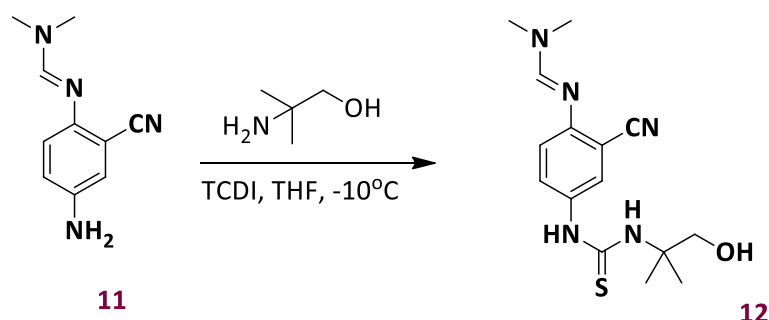
Πείραμα	Διαλύτης	Βάση	Boc	Θερμοκρασία	h	Απόδοση	Καταλύτης
1	1-PrOH	1.1eq Et ₃ N	1.1	30°C	6	10%	DMAP
2	CH ₃ CN	1.5eq Et ₃ N	1.5	40°C	4	10%	DMAP
3	CH ₂ Cl ₂	1.5eq Et ₃ N	1.5	40°C	4	13%	-
4	THF	1.5eq Et ₃ N	1.5	40°C	4	20%	DMAP

Πίνακας: : Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την αντίδραση προστασίας της αμινομάδας της ένωσης **3**.

Από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, όπως παρατηρείται οι αποδόσεις που πάρθηκαν είναι πολύ χαμηλές, μάλιστα κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων και τον έλεγχο τους με TLC, παρατηρούνταν πλήθος κηλίδων και επομένως παραπροϊόντων που δυσκόλευε την απομόνωση και την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος.

9.2. Σύνθεση της ένωσης N'-(2-κυανο-4-(3-(1-υδροξυ-2-μεθυλοπροπαν-2-υλ)θειουριδο)φαινυλο)-N,N-διμεθυλοφορμιμιδαμίο (ένωση **12**)

Η αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **12** αποτελεί μια αντίδραση πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης, κατά την οποία η αρχική ένωση κατεργάζεται με αμινομεθυλοπροπανόλη και 1,1-θειοκαρβονυλοδιιμιδαζόλιο (TCDI), ένα αντιδραστήριο που αντιδρά με διάφορα πυρηνόφιλα και χρησιμοποιείται για την εισαγωγή θειοκαρβαμιδικών και άλλων λειτουργικών ομάδων που περιέχουν θείο.



Σχήμα 9.4: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **12**.

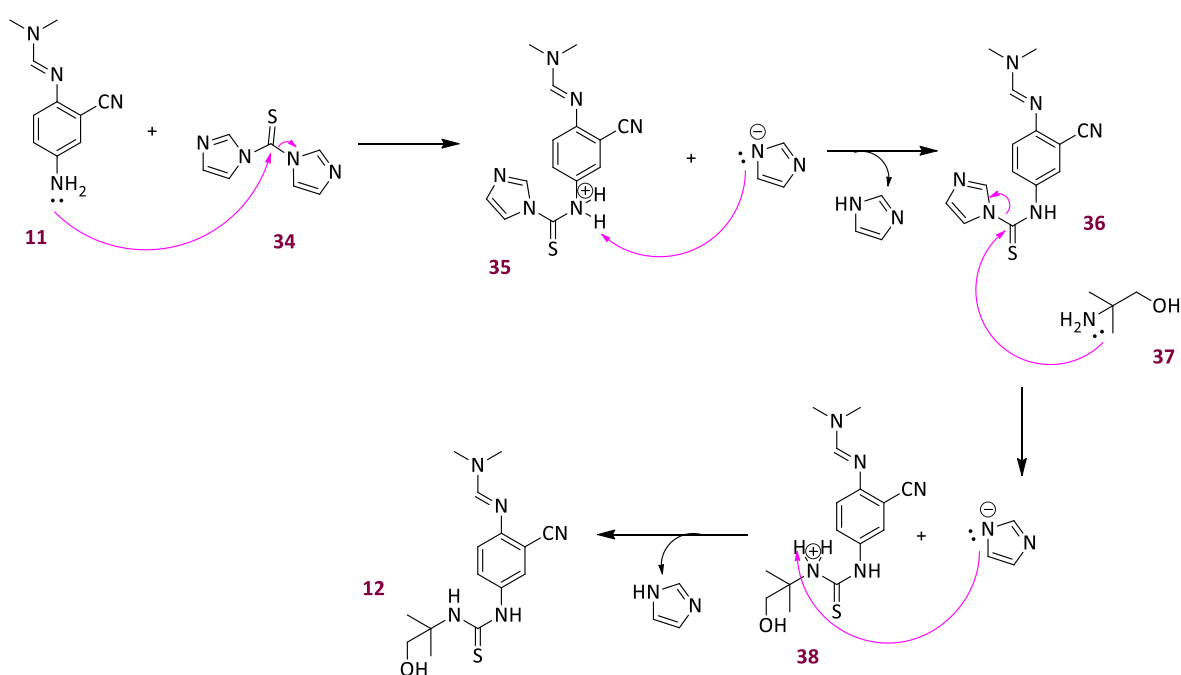
Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει αρχικά την πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας που λειτουργεί σαν πυρηνόφιλο, στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του παράγοντα ακυλίωσης (TCDI). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του

τετραεδρικού ενδιάμεσου **35**, το οποίο είναι ασταθές και εύκολα με αποπρωτονίωση μετατρέπεται στο ιμιδαζολικό ενδιάμεσο **36**. Στη συνέχεια, το ενδιάμεσο αυτό (**36**) υπόκειται σε μια δεύτερη αντίδραση πυρηνόφιλης προσβολής με την αμινομεθυλοπροπανόλη, ώστε να προκύψει τελικά η αντίστοιχη επιθυμητή θειουρία (**12**).

	TCDI	Αμινο- μεθυλοπροπανόλη	Διαλύτης	Θερμοκρασία /ώρες	Απόδοση
1	1.5eq	1eq	THF	-5°C για 40 min και έπειτα rt για 16h	27%

Πίνακας: Συνθήκες αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης **12**.

Η αντίδραση με τις παραπάνω αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ολοκληρώθηκε με επιτυχία καθώς τα ισοδύναμα του TCDI θα έπρεπε να είναι αυστηρά 1:1 προς την ένωση **11**, καθώς σε μεγαλύτερη αναλογία, το TCDI αντιδρά και με το αντιδραστήριο αμινομεθυλοπροπανόλη, παράγοντας παραπροϊόντα που μειώνουν την απόδοση της αντίδρασης.



Σχήμα 9.5: Μηχανισμός σχηματισμού της ένωσης **12**.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

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

- Έγινε σχεδιασμός και μοριακή μοντελοποίηση νέων εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκεύασματος Tucatinib.
- Οι αλλαγές συμπεριλαμβάνουν τροποποιήσεις στην περιοχή του οξαζολικού δακτυλίου καθώς και στο άλλο άκρο του μορίου, στην περιοχή της τριαζολο-πυριδίνης.
- Οι ενώσεις αυτές έδωσαν λίγο καλύτερα θεωρητικά αποτελέσματα (υψηλότερες τιμές πρόσδεσης, δηλαδή μικρότερες τιμές ενέργειας κατά Gibbs, $\Delta G_{\text{binding}}$) από την αντίστοιχη ένωση του Tucatinib, όπως φάνηκε από τη μοριακή μοντελοποίηση, καθώς εμφάνισαν πολύ καλές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της HER2.
- Κατέστη δυνατή η ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης μεθόδου για την σύνθεση της ένωσης **2** (αμιδίου) μέσω μιας κατεργασίας με SOCl_2 και έπειτα μέσω μιας πυρηνόφιλης ακυλο- υποκατάστασης του ενδιαμέσου χλωριδίου με αέρια αμμωνία.
- Κατά την αντίδραση αναγωγής, όπου προκύπτει η ένωση **11**, χρησιμοποιήθηκε ο καταλύτης PtO_2 αντί για Pd/C , που χρησιμοποιεί η Settle Genetics, κάνοντας τη διαδικασία λίγο οικονομικότερη.
- Αναμένεται, η ολοκλήρωση της πορείας σύνθεσης του φαρμάκου, με τη σύνθεση και των υπολοίπων ενδιαμέσων- πρόδρομων ενώσεων, προς την τελική ένωση του Tucatinib.
- Ακόμη, τα θεωρητικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης θα πρέπει να διασταυρωθούν πειραματικά στο εργαστήριο, συνθέτοντας και ταυτοποιώντας τις ενώσεις- ανάλογα του Tucatinib.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Cancer Council Australia staff, "What is cancer?," Cancer Council Australia website. Accessed: Jul. 29, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.org.au>
- [2] Geoffrey M. Cooper, *Το Κύτταρο, μια Μοριακή Προσέγγιση*, 8η., vol. 19ο κεφάλαιο. Αθήνα: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα, 2021.
- [3] Andrew Gregory, "Cancer cases in under- 50s up worldwide by nearly 80% in three decades, study finds," *The Guardian*.
- [4] Cleveland Clinic, "Targeted Therapy." Accessed: Jul. 30, 2024. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org>
- [5] National Cancer Institute, "Targeted Therapy to Treat Cancer."
- [6] J. Cienas, E. Zalyte, A. Bairoch, and P. Gaudet, "Kinases and cancer," 2018. doi: 10.3390/cancers10030063.
- [7] Benedette Cuffari, "What is Protein Phosphorylation?"
- [8] M. Singha *et al.*, "Unlocking the Potential of Kinase Targets in Cancer: Insights from CancerOmicsNet, an AI-Driven Approach to Drug Response Prediction in Cancer," *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 16, 2023, doi: 10.3390/cancers15164050.
- [9] K. S. Bhullar *et al.*, "Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions," 2018. doi: 10.1186/s12943-018-0804-2.
- [10] David Secko, "Protein Phosphorylation: A Global Regulator of Cellular Activity," Jul. 2003.
- [11] R. Roskoski, "A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors," 2015. doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.010.
- [12] P. W. Manley *et al.*, "Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor," 2002. doi: 10.1016/s0959-8049(02)80599-8.
- [13] N. Karasu *et al.*, "Detection of mutations in CML patients resistant to tyrosine kinase inhibitor: imatinib mesylate therapy," *Medical Oncology*, vol. 38, no. 10, 2021, doi: 10.1007/s12032-021-01571-1.
- [14] Drug Bank, "Tucatinib: Uses, Interactions, Mechanism of action." Accessed: Jul. 30, 2024. [Online]. Available: <https://go.drugbank.com>
- [15] P. J. Butterworth, "Book review: Protein phosphorylation. F. Marks (Ed.). VCH, Weinheim. xxiii + 381 pages, DM198.00 (1996).," *Cell Biochem Funct*, vol. 15, no. 2, 1997, doi: 10.1002/(sici)1099-0844(19970601)15:2<141::aid-cbf716>3.0.co;2-k.
- [16] Thermo Fischer Scientific, "Phosphorylation ," Protein Biology Resource Library. Accessed: Jul. 31, 2024. [Online]. Available: <https://www.thermofischer.com>
- [17] Αιμιλία Ζίφα, *Διακυτταρική Επικοινωνία- Μεταγωγή Σήματος* , 1st ed. Βόλος : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2016.
- [18] Βάσια Μεραντζή, "Υπολογιστική Ανάλυση Οικογένειας Κινασών," Αθήνα, 2018.

- [19] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, "The protein kinase complement of the human genome," 2002. doi: 10.1126/science.1075762.
- [20] S. S. Taylor, M. M. Keshwani, J. M. Steichen, and A. P. Kornev, "Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches," 2012. doi: 10.1098/rstb.2012.0054.
- [21] S. K. Hanks, A. M. Quinn, and T. Hunter, "The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains," *Science (1979)*, vol. 241, no. 4861, 1988, doi: 10.1126/science.3291115.
- [22] K. C. Duong-Ly and J. R. Peterson, "The human kinome and kinase inhibition," *Curr Protoc Pharmacol*, no. SUPPL.60, 2013, doi: 10.1002/0471141755.ph0209s60.
- [23] N. Brooijmans, Y. W. Chang, D. Mobilio, R. A. Denny, and C. Humblet, "An enriched structural kinase database to enable kinome-wide structure-based analyses and drug discovery," *Protein Science*, vol. 19, no. 4, 2010, doi: 10.1002/pro.355.
- [24] L. N. Johnson, M. E. M. Noble, and D. J. Owen, "Active and inactive protein kinases: Structural basis for regulation," 1996. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81092-2.
- [25] Κωνσταντίνος Δανιηλίδης, "Σχεδιασμός και Σύνθεση Νέων Πουρινικών Αναλόγων με Πιθανή Ανασταλτική Δράση έναντι Κυτταρικών Κινασών," Αθήνα, 2011.
- [26] M. Capra *et al.*, "Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers," *Cancer Res*, vol. 66, no. 16, 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3489.
- [27] P. J. Kennelly and E. G. Krebs, "Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 24, 1991, doi: 10.1016/s0021-9258(18)98436-x.
- [28] M. K. Paul and A. K. Mukhopadhyay, "Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer," *Int J Med Sci*, 2012, doi: 10.7150/ijms.1.101.
- [29] Sino Biological, "Tyrosine Kinase." Accessed: Aug. 01, 2024. [Online]. Available: <https://www.sinobiological.com>
- [30] K. Neet and T. Hunter, "Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families," *Genes to Cells*, vol. 1, no. 2, 1996, doi: 10.1046/j.1365-2443.1996.d01-234.x.
- [31] I. R. Kevin Ahern, *Biochemistry Free and Easy, Receptor Tyrosine Kinases (RTKs)*. LibreTexts, 2024.
- [32] S. R. Hubbard, "Protein tyrosine kinases: Autoregulation and small-molecule inhibition," 2002. doi: 10.1016/S0959-440X(02)00383-4.
- [33] L. Le Corre *et al.*, "Synthesis and biological evaluation of a triazole-based library of pyrido[2,3-d]pyrimidines as FGFR3 tyrosine kinase inhibitors," *Org Biomol Chem*, vol. 8, no. 9, 2010, doi: 10.1039/b923882d.
- [34] A. A. Durmaz, E. Karaca, U. Demkow, G. Toruner, J. Schoumans, and O. Cogulu, "Evolution of genetic techniques: Past, present, and beyond," 2015. doi: 10.1155/2015/461524.

- [35] Maria Ines Marreiros, "Cell Cycle:History and Discovery," By Arcadia.
- [36] Enzo Life Sciences, "The Cell Cycle Explained, and How to Study It," Enzo.
- [37] V. J. , H. P. W. , & T. L. H. Tannoch, "Cell cycle control. In Adnances in Experimental Medicine and Biology," 2000.
- [38] Kamashi Pandirajan, "The Cell Cycle," Apr. 2024. Accessed: Aug. 02, 2024. [Online]. Available: <https://teachmephysiology.com>
- [39] T. Bio-techne, "Cyclin-Dependent Kinases (CDKs)."
- [40] P. K. Shuhui Lim, "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation," Singapore, 2013.
- [41] M. Malumbres, "Cyclin-dependent kinases," *Genome Biol*, vol. 15, no. 6, 2014, doi: 10.1186/gb4184.
- [42] M. J. Wieduwilt and M. M. Moasser, "The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics," 2008. doi: 10.1007/s00018-008-7440-8.
- [43] N. E. Hynes and G. MacDonald, "ErbB receptors and signaling pathways in cancer," 2009. doi: 10.1016/j.ceb.2008.12.010.
- [44] A. Appert-Collin, P. Hubert, G. Crémel, and A. Bennisroune, "Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion," 2015. doi: 10.3389/fphar.2015.00283.
- [45] Any Genes, "ErbB Signaling Pathway," Any Genes biomarker signaling pathway profiler.
- [46] "About Breast Cancer," Breastcancer.org. Accessed: Aug. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.breastcancer.org>
- [47] "Types of Breast Cancer ," National Breast Cancer Foundation Inc. Accessed: Aug. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.nationalbreastcancer.org>
- [48] N. Cho, "Molecular subtypes and imaging phenotypes of breast cancer," 2016. doi: 10.14366/usg.16030.
- [49] "Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes," National Cancer Institute . Accessed: Aug. 03, 2024. [Online]. Available: <https://seer.cancer.gov>
- [50] J. Wang and S. G. Wu, "Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives," 2023. doi: 10.2147/BCTT.S432526.
- [51] L. Falzone, S. Salomone, and M. Libra, "Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium," 2018. doi: 10.3389/fphar.2018.01300.
- [52] The American Cancer Society medical and editorial content team, "Targeted Drug Therapy for Breast Cancer," American Cancer Society. Accessed: Aug. 03, 2024. [Online]. Available: <https://www.cancer.org>
- [53] Schott A., "Systemic treatment for HER2-positive metastatic breast cancer," In Vora SR, ed. UpToDate. Waltham. Accessed: Aug. 04, 2024. [Online]. Available: <https://www.uptodate.com>

- [54] Lynne Eldridge MD, "HER2 Testing for Breast Cancer and What the Results mean," Very Well Health.
- [55] Z. W. Kwong Glover, L. Gennaro, S. Yadav, B. Demeule, P. Y. Wong, and A. Sreedhara, "Compatibility and stability of pertuzumab and trastuzumab admixtures in i.v. infusion bags for coadministration," *J Pharm Sci*, vol. 102, no. 3, 2013, doi: 10.1002/jps.23403.
- [56] M. D. Hopkin, I. R. Baxendale, and S. V. Ley, "A flow-based synthesis of Imatinib: The API of Gleevec," *Chemical Communications*, vol. 46, no. 14, 2010, doi: 10.1039/c001550d.
- [57] R. Roskoski, "Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update," 2024. doi: 10.1016/j.phrs.2024.107059.
- [58] A. C. Dar and K. M. Shokat, "The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling," *Annu Rev Biochem*, vol. 80, 2011, doi: 10.1146/annurev-biochem-090308-173656.
- [59] R. Roskoski, "Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes," 2016. doi: 10.1016/j.phrs.2015.10.021.
- [60] P. Y. Lee, Y. Yeoh, and T. Y. Low, "A recent update on small-molecule kinase inhibitors for targeted cancer therapy and their therapeutic insights from mass spectrometry-based proteomic analysis," 2023. doi: 10.1111/febs.16442.
- [61] X. Xia, C. Gong, Y. Zhang, and H. Xiong, "The History and Development of HER2 Inhibitors," 2023. doi: 10.3390/ph16101450.
- [62] R. Bartsch *et al.*, "Updated Austrian treatment algorithm in HER2+ metastatic breast cancer," *Wien Klin Wochenschr*, vol. 134, no. 1–2, 2022, doi: 10.1007/s00508-021-01987-9.
- [63] S. Wang, X. H. Yuan, S. Q. Wang, W. Zhao, X. B. Chen, and B. Yu, "FDA-approved pyrimidine-fused bicyclic heterocycles for cancer therapy: Synthesis and clinical application," 2021. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113218.
- [64] T. Cristina Mendonça Nogueira and M. Vinicius Nora de Souza, "New FDA oncology small molecule drugs approvals in 2020: Mechanism of action and clinical applications," 2021. doi: 10.1016/j.bmc.2021.116340.
- [65] A. T. and R. P. S. Zaid Sirhan, "The efficacy of tucatinib- based therapeutic approaches for HER2-positive breast cancer," *Mil Med Res*, 2022.
- [66] A. Kulukian *et al.*, "Preclinical activity of HER2-selective tyrosine kinase inhibitor tucatinib as a single agent or in combination with trastuzumab or docetaxel in solid tumor models," *Mol Cancer Ther*, vol. 19, no. 4, 2020, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0873.
- [67] S. L. Moulder *et al.*, "Phase I study of ONT-380, a HER2 inhibitor, in patients with HER2+-advanced solid tumors, with an expansion cohort in HER2+ Metastatic Breast Cancer (MBC)," *Clinical Cancer Research*, vol. 23, no. 14, 2017, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1496.

- [68] R. K. Murthy *et al.*, "Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 382, no. 7, 2020, doi: 10.1056/nejmoa1914609.
- [69] A. L.-M. D. J. B. S. C. Cecilia C. Ayala- Aguilera. Teresa Valero, "Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995-2021): Medical Indication, Pharmacology and Synthesis," 1047–1131, 2022.
- [70] S. Yuan, Y. Q. Luo, J. H. Zuo, H. Liu, F. Li, and B. Yu, "New drug approvals for 2020: Synthesis and clinical applications," 2021. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113284.
- [71] Y. Lyu, L. Huang, X. Zhu, S. Lu, and Y. Mao, "A Practical Alternate Synthesis of Tucatinib," *Org Prep Proced Int*, vol. 53, no. 6, 2021, doi: 10.1080/00304948.2021.1983341.