



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΡΟΔΡΟΜΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΟΣ TRILACICLIB ΩΣ
ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΥΚΛΙΝΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ
ΚΙΝΑΣΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΝΕΟΠΛΑΣΙΩΝ**

Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης

Ζώτου Μαρία-Νίκη

Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2024

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ (III): ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ
ΕΝΩΣΕΙΣ

Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης

Ζώτου Μαρία-Νίκη

A.M.: 1448

Επιβλέπων:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας – Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας – Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σίσκος Μιχάλης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας – Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αλίβερης Δημήτριος, Επικ. Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και
Τεχνολογιών (ΒΕΤ) – Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

08/10/2024

Ευχαριστίες

Με την παρούσα Διπλωματική Εργασία ολοκληρώνονται οι σπουδές μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με Ειδίκευση «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Βιοδραστικές Ενώσεις». Ο κεντρικός πυλώνας της εργασίας αφορά την μοριακή μοντελοποίηση και τον σχεδιασμό αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Trilaciclib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων των πρωτεϊνικών κινάσων καθώς και τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό πρόδρομων ενώσεων της συνθετικής πορείας τους.

Τα πειράματα στο πλαίσιο αυτής της εργασίας έλαβαν χώρα στο ερευνητικό εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης Χ3-210 του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ Νοεμβρίου 2022 έως Ιουνίου 2024, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο.

Η εν λόγω εργασία συνιστά απόρροια εκτενούς αναζήτησης, πειραμάτων και δοκιμών που ενίοτε οδηγούν σε νέα ερευνητικά δεδομένα και άλλοτε σε ατελέσφορες προσπάθειες. Σε αυτό το πλαίσιο, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όσους συνέβαλλαν στην διεξαγωγή της διπλωματικής μου εργασίας από την αρχή έως το τέλος της.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο για την ανάθεση του θέματος, την επιστημονική του καθοδήγηση και τις ωφέλιμες συμβουλές του που οδήγησαν στην πραγμάτωση της έρευνάς μου και στην συγγραφή αυτής της διπλωματικής εργασίας. Είμαι ευγνώμων για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ολοκλήρωση της πτυχιακής εργασίας μου ως προπτυχιακή φοιτήτρια και της μετέπειτα συμμετοχής μου στην ερευνητική του ομάδα. Ακόμα, τον ευχαριστώ για όλες τις γνώσεις και τις εμπειρίες που αποκόμισα καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων.

Στο ίδιο πλαίσιο ευγνωμοσύνης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Σίσκο Μιχάλη και τον επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Αλίβερτη Δημήτριο που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής μου καθώς και για την βοήθεια που μου προσέφεραν όποτε αυτή χρειάστηκε και για τις συμβουλές και την καθοδήγηση τους σε όλα τα στάδια εκπόνησης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Χατζηαράπογλου Λάζαρο και στον ομότιμο καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Βαρβούνη Γεώργιο για το ενδιαφέρον και τη στήριξη τους καθώς ήταν πάντα πρόθυμοι να λύσουν απορίες μου πάνω στο θέμα.

Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τους φίλους και συναδέλφους μου-μέλη του ερευνητικού εργαστηρίου του κ. Σκομπρίδη, χωρίς την αρωγή των οποίων δε θα ήταν δυνατή η διεξαγωγή των ερευνητικών πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτωρ Σδούκου Ήρα καθώς και το σύνολο των μεταπτυχιακών φοιτητών:

Αλασώνα Παντελή, Καραγιάννη Λεμονιά, Πεπονίδου Φωτεινή, Κοσταντίνι Ελένη, Χρονοπούλου Ιωάννα, Χατζηαγγελίδου Κυριακή και Σταλικά Ελεονώρα για το υπέροχο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο, την άριστη συνεργασία, τους προβληματισμούς και τις σκέψεις που μοιραστήκαμε μαζί αυτά τα χρόνια, αλλά και τις ευχάριστες στιγμές. Επιπλέον, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο εργαστήριο του κ. Βαρβούνη και στον υποψήφιο Διδάκτορα Γεροντίτη Ιωάννη για την υποστήριξη και τη βοήθειά καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω, επίσης, στις φίλες και συμφοιτήτριες μου για την αμέριστη υποστήριξη, κατανόηση και ενθάρρυνση τους σε αυτή την απαιτητική διαδρομή καθώς και για τις υπέροχες φοιτητικές αναμνήσεις με τις οποίες θα πορευτώ. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αδιάκοπη υποστήριξη και την ανεκτίμητη βοήθεια τους σε κάθε συναισθηματικό, πνευματικό και οικονομικό επίπεδο σε όλο το διάστημα των σπουδών μου. Χωρίς την έμπρακτη προσφορά της αγάπης και την συνεχή στήριξη αυτών των ανθρώπων, δεν θα μπορούσα να συνεχίσω τις προσπάθειες μου με σκοπό την περάτωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περίληψη

Ο καρκίνος είναι μια ασθένεια που απασχολεί όλη την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία έτη καθώς ένα από τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά του είναι ότι όλα τα κύτταρα ενός όγκου προέρχονται από ένα αρχικό κύτταρο που πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα. Αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου παγκοσμίως, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα, με περίπου 9.6 έως 10 εκατομμύρια θανάτους για το 2023, επισημαίνοντας την ανάγκη για έγκαιρη διάγνωση και προηγμένη θεραπεία. Η βιολογική ετερογένεια της νόσου, όπως και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έναντι φαρμάκων αποτελούν τροχοπέδη για την απόκτηση πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP στο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της σερίνης, της θρεονίνης ή της τυροσίνης μιας πρωτεΐνης. Ρυθμίζουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μεταγραφή και η διαφοροποίηση. Μεταξύ αυτών, οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του κρίσιμου ρόλου τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, διασφαλίζοντας έτσι την ελεγχόμενη κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμό. Η απορυθμισμένη δράση των CDKs μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη καρκίνου. Επομένως, οι κινάσες αποτελούν στόχο πολλών φαρμάκων για τη στοχευμένη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Το Trilaciclib είναι ένας αναστολέας των CDK4/6 της εταιρίας G1 Therapeutics, όπου έλαβε έγκριση το 2021 ως η πρώτη θεραπεία για την προστασία του μυελού των οστών από βλάβη που προκαλείται κατά τη χημειοθεραπεία. Το Trilaciclib ενδείκνυται για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης μυελοκαταστολής που προκαλείται από χημειοθεραπεία σε ενήλικες ασθενείς πριν από ένα σχήμα που περιέχει πλατίνη/ετοποσιδή ή τοποτεκάνη για μικροκυτταρικό καρκίνου του πνεύμονα εκτεταμένου σταδίου. Πλεονεκτεί χάρη στην ευκολία χορήγησής του ως ενδοφλέβια έγχυση, που χορηγείται πριν από την έναρξη της χημειοθεραπείας, και στα μειωμένα επίπεδα παρενεργειών, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία παρουσιάζεται ο σχεδιασμός και οι προσπάθειες σύνθεσης νέων βιοδραστικών ενώσεων που συνιστούν ανάλογα του φαρμακευτικού σκευάσματος Trilaciclib και έχουν ως σκοπό την εκλεκτική αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών. Τα ανάλογα σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο τροποποιώντας την δομή του Trilaciclib μετά από πειράματα μοριακής μοντελοποίησης, ώστε να αυξηθεί η ανασταλτική δράση του. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε αποτελεί εναλλακτική συνθετική οδό από αυτή που πρότεινε η εταιρία G1 Therapeutics και οι ενώσεις που συντέθηκαν ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$.

Abstract

Cancer is a disease that has concerned the entire scientific community in recent years as one of its fundamental characteristics is that all cells in a tumor originate from an initial cell that proliferates uncontrollably. It is the second most common cause of death worldwide, after cardiovascular diseases, with an estimated 9.6 to 10 million deaths by 2023, highlighting the need for early diagnosis and advanced treatment. The biological heterogeneity of the disease, as well as the development of drug resistance, are obstacles to the acquisition of more effective therapeutic approaches.

Protein kinases catalyze the transfer of the γ -phosphate group of ATP to the hydroxyl of the serine, threonine, or tyrosine side chain of a protein. They regulate various cellular processes such as proliferation, apoptosis, transcription and differentiation. Among them, cyclin-dependent kinases are of particular interest due to their critical role in cell cycle regulation, thereby ensuring controlled cell division and proliferation. Dysregulated activity of CDKs can lead to uncontrolled cell division and cancer development. Therefore, kinases are the target of many drugs for the targeted therapy of various diseases.

Trilaciclib is a CDK4/6 inhibitor from G1 Therapeutics, where it received approval in 2021 as the first treatment to protect bone marrow from damage caused by chemotherapy. Trilaciclib is indicated to reduce the incidence of chemotherapy-induced myelosuppression in adult patients prior to a platinum/etoposide- or topotecan-containing regimen for advanced-stage small cell lung cancer. It has advantages thanks to its ease of administration as an intravenous infusion, given before the start of chemotherapy, and the reduced levels of side effects, improving the quality of life of patients.

In this master's thesis, the design and synthesis efforts of new bioactive compounds that are analogues of the pharmaceutical preparation Trilaciclib are presented and have as their purpose the selective inhibition of protein kinases. The analogues were designed in the laboratory by modifying the structure of Trilaciclib following docking experiments to increase its inhibitory activity. The synthetic route followed is an alternative synthetic route to that proposed by G1 Therapeutics and the synthesized compounds were identified by $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopic techniques.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι	6
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.2 ΣΚΟΠΟΣ	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ	11
2.1 ΤΡΙΦΩΣΦΟΡΙΚΗ ΑΔΕΝΟΣΙΝΗ (ATP)	11
2.2 ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	11
2.3 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	12
2.3.1 Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνικών κινασών	15
2.4 ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	16
2.5 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ	18
2.5.1 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης	20
2.5.2 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης	21
2.6 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	22
2.6.1 Φάσεις του κυτταρικού κύκλου	23
2.6.2 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου	24
2.7 ΚΥΚΛΙΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ (CDKs)	25
2.7.1 Κυκλίνες	26
2.7.2 Δομή των CDKs	27
2.7.3 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τις CDKs	29
2.7.4 Αναστολείς των CDKs (CKIs)	32
2.7.5 Σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA	32
2.7.6 Ρύθμιση της μεταγραφής από τις CDKs	34
2.8 ΑΠΟΡΥΘΜΙΣΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	36
2.9 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	39
2.9.1 Καρκίνος του μαστού	40
2.9.2 Καρκίνος του πνεύμονα	42
2.9.3 Στόχευση CDKs — Θεραπευτική προσέγγιση	44
2.10 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ	44
2.10.1 Χαρακτηριστικά αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών – Κανόνας των 5	46
2.10.2 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	47
2.10.3 Imatinib – πρώτος αναστολέας	51
2.11 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ CDKs ΠΡΩΤΗΣ ΚΑΙ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΕΝΙΑΣ	52
2.12 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ CDKs ΤΡΙΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ	54
2.12.1 Palbociclib	55
2.12.1.1 Σύνθεση του Palbociclib	56
2.12.2 Ribociclib	57
2.12.2.1 Σύνθεση του Ribociclib	57
2.12.3 Abemaciclib	59
2.12.3.1 Σύνθεση του Abemaciclib	59
2.12.4 Trilaciclib	60
2.12.4.1 Σύνθεση του Trilaciclib	63
2.12.5 Σύγκριση Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib και Trilaciclib	64
2.12.6 Μελλοντικοί στόχοι για αποτελεσματικότερη θεραπεία	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ	67
3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΩΝ CDK4/6	67
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗΣ (DOCKING)	69

3.2.1 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου <i>Trilaciclib</i> - CDK6	70
3.2.2 Μοριακή μοντελοποίηση των νέων ενώσεων (<i>T₁-T₅</i>) με την CDK6.....	72
3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ TRILACICLIB.....	74
3.3.1 Ολική πορεία σύνθεσης των νέων ενώσεων.....	74
3.3.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός πρόδρομων ενώσεων της πορείας σύνθεσης αναλόγων του <i>Trilaciclib</i>	76
3.3.2.1 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο- <i>N</i> -(3,4-διμεθοξυφαινυλο)πυριμιδινό-4-αμίνης (3).....	76
3.3.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο- <i>N</i> -(3,4-διμεθοξυφαινυλο)πυριμιδινό-4-αμίνης (3).....	77
3.3.2.3 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7 <i>H</i> -πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδινό-6-υλο) μεθανόλης (5)	80
3.3.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7 <i>H</i> -πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδινό-6-υλο) μεθανόλης (5)	82
3.3.2.5 Σύνθεση της ένωσης <i>N</i> -βενζυλο-5-βρωμο-2-χλωροπυριμιδινό-4-αμίνης (8).....	84
3.3.2.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης <i>N</i> -βενζυλο-5-βρωμο-2-χλωροπυριμιδινό-4-αμίνης (8)	85
3.3.2.7 Σύνθεση της ένωσης <i>tert</i> -βουτυλεστέρας του 4-(6-νιτροπυριδινό-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (17)	87
3.3.2.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης <i>tert</i> -βουτυλεστέρας του 4-(6-νιτροπυριδινό-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (17).....	88
3.3.2.9 Σύνθεση της ένωσης 1-αμινοκυκλοεξανοκαρβονιτρίλιο (20)	89
3.3.2.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 1-αμινοκυκλοεξανοκαρβονιτρίλιο (20)	90
3.3.3 Δοκιμαστικά πειράματα σύνθεσης πρόδρομων ενώσεων	91
3.3.3.1 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)- <i>N,N</i> -διμεθυλο-7 <i>H</i> -πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδινό-6-καρβοξαμίδιο (6).....	91
3.3.3.2 Σύνθεση της ένωσης 3-(4-(βενζυλαμινο)-2-χλωροπυριμιδινό-5-υλο) προπ-2-υν-1-όλης (9).....	92
3.3.3.3 Σύνθεση της ένωσης 1-μεθυλ-4-(6-νιτροπυριδινό-3-υλο)πιπεραζίνης (14)	93
3.3.3.4 Σύνθεση της ένωσης 1-(αμινομεθυλ)κυκλοεξαναμίνης (21).....	95
3.3.4 Σχεδιασμός σύνθεσης μεταβατικών σταδίων της συνθετικής πορείας καθώς και των τελικών ενώσεων	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV.....	99
4.1 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ	99
4.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5-ΒΡΩΜΟ-2-ΧΛΩΡΟ- <i>N</i> -(3,4-ΔΙΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ) ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟ-4-ΑΜΙΝΗΣ (3)	99
4.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ (2-ΧΛΩΡΟ-7-(3,4-ΔΙΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)-7 <i>H</i> -ΠΥΡΡΟΛΟ[2,3- <i>D</i>]ΠΥΡΙΜΙΔΙΝ-6-ΥΛΟ) ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ (5)	100
4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ <i>N</i> -ΒΕΝΖΥΛΟ-5-ΒΡΩΜΟ-2-ΧΛΩΡΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝ-4-ΑΜΙΝΗΣ (8).....	101
4.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ <i>TERT</i> -ΒΟΥΤΥΛΕΣΤΕΡΑΣ ΤΟΥ 4-(6-ΝΙΤΡΟΠΥΡΙΔΙΝ-3-ΥΛΟ)ΠΙΠΕΡΑΖΙΝΟ-1-ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (17)	101
4.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 1-ΑΜΙΝΟΚΥΚΛΟΕΞΑΝΟΚΑΡΒΟΝΙΤΡΙΛΙΟ (20).....	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V	103
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI.....	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	104

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

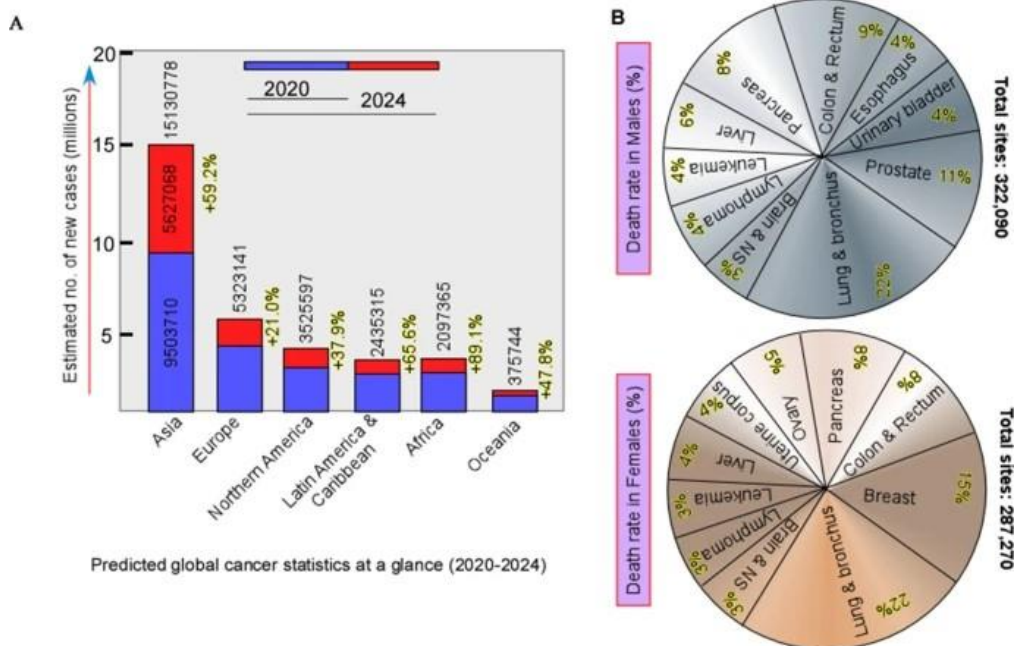
Εισαγωγή – Σκοπός

1.1 Εισαγωγή

Πριν από το 1.900, οι περισσότεροι θάνατοι προέρχονταν από μολυσματικές ασθένειες, όπως η πνευμονία και η φυματίωση, και το προσδόκιμο ζωής δεν υπερέβαινε τα 50 έτη. Ο καρκίνος ήταν μια σπάνια ασθένεια, όμως κατά τον τελευταίο αιώνα αποτελεί κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Η πρώτη καταγεγραμμένη περιγραφή καρκίνου βρέθηκε σε έναν αιγυπτιακό πάπυρο του 3.000 π.Χ. Έχει αναφερθεί πως ο Ιπποκράτης εισήγαγε τον όρο «καρκίνος» διότι το σχήμα των όγκων του θύμιζε καβούρι και έτσι χρησιμοποιούσε τις λέξεις «καρκίνωμα» και «καρκίνος» (που σημαίνει «κάβουρας») για να τους περιγράψει. Με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός οποιουδήποτε είδους κυττάρου του σώματος, με αποτέλεσμα την ύπαρξη περισσότερων από 100 διαφορετικών τύπων καρκίνου οι οποίοι διαφέρουν στην συμπεριφορά και στην απόκριση τους σε θεραπείες.^[1] Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν τους παρακείμενους ιστούς μέσω μιας διαδικασίας που καλείται μετάσταση.^[2]

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, με 1.2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο. Η έλλειψη συμπτωμάτων κατά τα αρχικά στάδια του συμβάλει στη κακή πρόγνωση και επισημαίνει την ανάγκη εύρεσης παραγόντων έγκαιρης διάγνωσης που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών.^[3] Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 15% των νέων διαγνώσεων καρκίνου του πνεύμονα και είναι ένας ιδιαίτερα επιθετικός τύπος καρκίνου σε σχέση με τον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).^[4] Ο καρκίνος του μαστού είναι μια από τις πιο διαδεδομένες κακοήθειες στις γυναίκες παγκοσμίως και αντιπροσωπεύει το 25% όλων των γυναικείων καρκίνων. Ανάλογα με το στάδιο και τα χαρακτηριστικά του όγκου, ο καρκίνος του μαστού αντιμετωπίζεται με συνδυασμό χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας, χημειοθεραπείας, ορμονοθεραπείας και στοχευμένης θεραπείας.^[5]

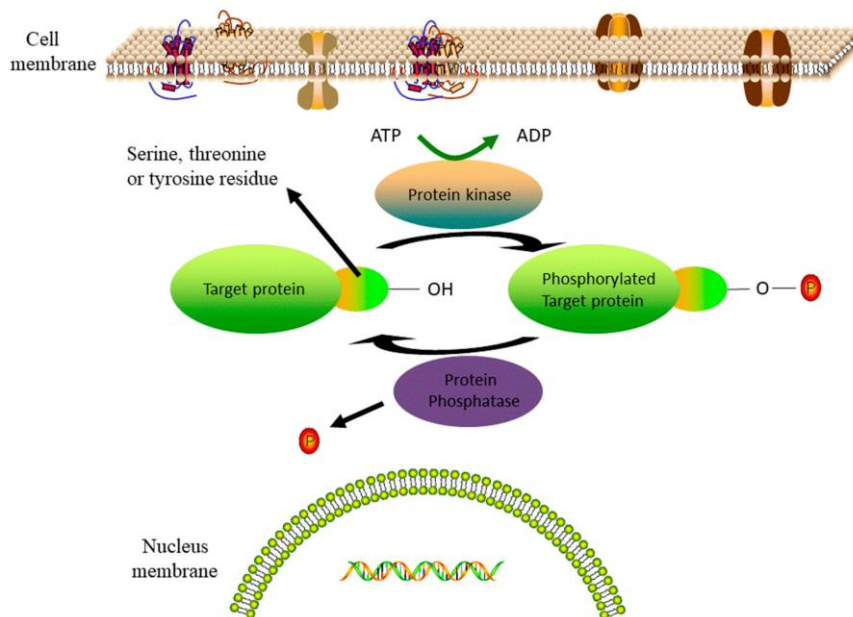
Οι κοινές μέθοδοι θεραπείας του καρκίνου (π.χ. χειρουργική επέμβαση, ακτινοβολία και χημειοθεραπεία) έχει αποδειχθεί ότι στοχεύουν τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα κακοήθη κύτταρα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση τοξικότητας και παρενεργειών. Επομένως, η αναστολή της μη φυσιολογικής κυτταρικής διαίρεσης και πολλαπλασιασμού είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στη θεραπεία κατά του καρκίνου. Οι αναστολείς κινασών μικρού μοριακού βάρους αποτελούν μια κατηγορία φαρμάκων όπου ερευνάται τα τελευταία χρόνια για τη θεραπεία του καρκίνου λόγω της ικανότητάς τους να στοχεύουν ειδικά τις κινάσες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου.^[5,6]



Εικόνα 1.1.: (Α) Στατιστικές παγκόσμιες προβλέψεις για τα ποσοστά καρκίνου για το διάστημα 2020 έως 2024. (Β) Τα ποσοστά θνησιμότητας ασθενών, ανδρών και γυναικών, με καρκίνο για το έτος 2021. Παρατηρείται πως ο καρκίνος του πνεύμονα και του προστάτη συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ποσοστό για τους άνδρες, ενώ στις γυναίκες κυριαρχεί ο καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού.^[7]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες ενζύμων που ανήκουν στην υπεροικογένεια των κινασών. Καταλύουν την μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας (PO_3^{2-}) του ATP στην υδροξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας ενός κατάλοιπου σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης. Διαδραματίζουν κυρίαρχο ρυθμιστικό ρόλο σε σχεδόν κάθε πτυχή της κυτταρικής βιολογίας και μπορούν να τροποποιήσουν τη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Ελέγχουν το μεταβολισμό, τη μεταγραφή, την κυτταρική διαίρεση, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο και συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση και στη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την ενζυμική δραστηριότητα και μπορεί να επηρεάσει άλλες βιολογικές διαδικασίες όπως η μεταγραφή και η μετάφραση. Επιπλέον, ορισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης σε μια πρωτεΐνη είναι διεγερτικές ενώ άλλες είναι ανασταλτικές.^[8,9]

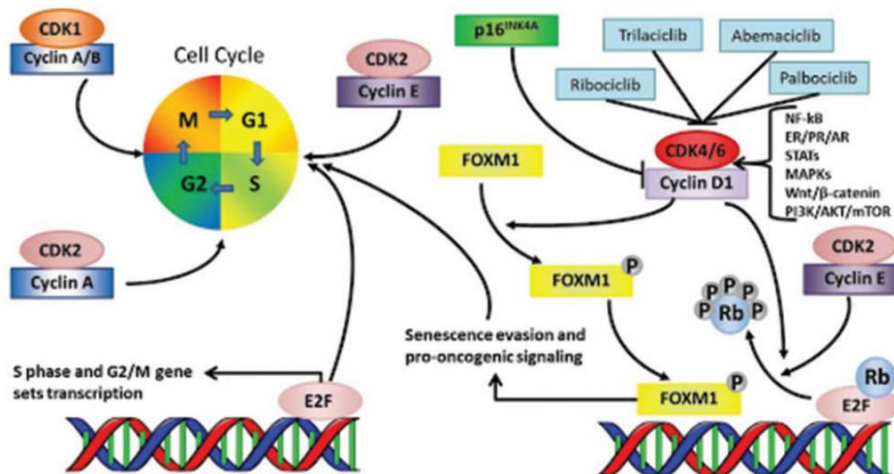
Η απορρύθμιση των οδών σηματοδότησης που συμμετέχουν οι πρωτεϊνικές κινάσες έχει βρεθεί σε πολλές ασθένειες, όπως ο καρκίνος αλλά και σε φλεγμονώδεις, εκφυλιστικές και μολυσματικές ασθένειες. Η έρευνα για τον καρκίνο έχει αποδείξει τον βασικό ρόλο πολλών πρωτεϊνικών κινασών στην ογκογένεση και στην εξέλιξη του καρκίνου, μετατρέποντας αυτά τα μόρια σε υπονήφια για νέες στοχευμένες θεραπείες. Η επακόλουθη ανακάλυψη και έγκριση το 2001 του αναστολέα της πρωτεϊνικής κινάσης BCR-Abl που προκύπτει από το σχηματισμό του χρωμοσώματος Philadelphia, Imatinib, ως στοχευμένη θεραπεία για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία έφερε επανάσταση στην έρευνα για τον καρκίνο και οδήγησε στην ανάπτυξη αναστολέων κινασών μικρού μοριακού βάρους.^[9,10]



Εικόνα 1.2.: Η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης από την αντίστοιχη πρωτεϊνική κινάση.^[11]

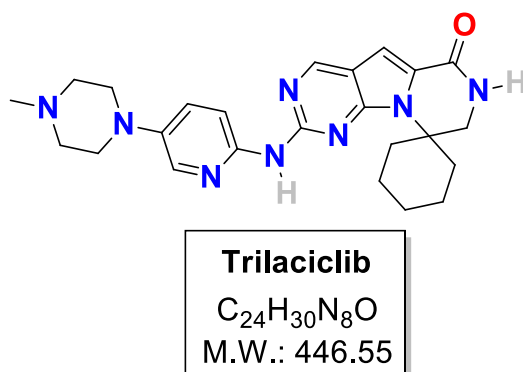
Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι μια θεμελιώδης βιολογική διαδικασία για την εξασφάλιση της ανάπτυξης και της ομοιόστασης του οργανισμού. Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζουν την ακρίβεια, την ακεραιότητα και τη σειρά όλων των σταδίων του. Οι CDKs, κινάσες σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιούνται με τη δέσμευση μίας κυκλίνης, είναι οι κύριοι ενεργοποιητές του κυτταρικού κύκλου μέσω της φωσφορυλίωσης των βασικών υποστρωμάτων που ενισχύουν την εξέλιξη της μίτωσης και της σύνθεσης DNA. Αυξητικοί παράγοντες μέσω ενδοκυτταρικών δικτύων σηματοδότησης ενεργοποιούν τις CDK4 και CDK6 για να οδηγήσουν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου από την φάση G₁ στη φάση S, στην οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Συγκεκριμένα, η κυκλίνη D1 δεσμεύει την CDK4 ή την CDK6 επάγοντας εκκίνηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (RB). Στην συνέχεια, το σύμπλοκο CDK2-κυκλίνη E φωσφορυλιώνει περαιτέρω την RB, επιτρέποντας σε απαραίτητους μεταγραφικούς παράγοντες (E2F) να απελευθερωθούν και να ενεργοποιηθούν ώστε να οδηγήσουν στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω του σημείου ελέγχου G₁/S.^[12,13]

Οι CDKs μελετώνται για την αντικαρκινική θεραπεία με βάση τον ρόλο τους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αυξημένη έκφραση τους σε αρκετούς καρκίνους. Συγκεκριμένα, οι αναστολείς CDKs τρίτης γενιάς μπορούν να αναστείλουν εκλεκτικά τις CDK4/6 και να ρυθμίσουν τον κυτταρικό κύκλο αναστέλλοντας τη μετάβαση G₁/S, επιδεικνύοντας τέλεια ισορροπία μεταξύ της αντικαρκινικής αποτελεσματικότητας και της γενικής τοξικότητας.^[14] Οι αναστολείς CDK4/6 που είναι εγκεκριμένοι από τον FDA για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν το Palbociclib, το Abemaciclib και το Ribociclib. Ο νεότερος αναστολέας CDK4/6, το Trilaciclib, μελετάται στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) και στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC) σε μια προσπάθεια να αντιμετωπιστεί η μυελοκαταστολή που προκαλείται από τη χημειοθεραπεία.^[12,13]



Εικόνα 1.3.: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τα σύμπλοκα CDKs-κυκλίνη. Η δράση του συμπλόκου CDK4/6-κυκλίνη D1 αναστέλλεται από τα φαρμακευτικά σκευάσματα Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib και Trilaciclib.^[15]

Το Trilaciclib (Cosela) είναι ένας αναστολέας μικρού μοριακού βάρους των CDK4/6 που αναπτύχθηκε από την G1 Therapeutics για την μυελοπροστασία και την πιθανή αντικαρκινική του αποτελεσματικότητα σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Οι CDKs διέπουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και το Trilaciclib προκαλεί μια παροδική, αναστρέψιμη διακοπή του κυτταρικού κύκλου των πολλαπλασιαζόμενων αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και προγονικών κυττάρων στον μυελό των οστών, προστατεύοντάς τα έτσι από βλάβη κατά τη χημειοθεραπεία. Τον Φεβρουάριο του 2021, το Trilaciclib έλαβε την πρώτη του έγκριση από τον FDA στις ΗΠΑ για τη μείωση της μυελοκαταστολής που προκαλείται από χημειοθεραπεία σε ενήλικες ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα εκτεταμένου σταδίου (ES-SCLC), όταν χορηγήθηκε πριν από ένα σχήμα που περιέχει πλατίνα/ετοποσιδή ή σχήμα τοποτεκάνης.^[16]



Σχήμα 1.1.: Η δομή του φαρμακευτικού σκευάματος, Trilaciclib.

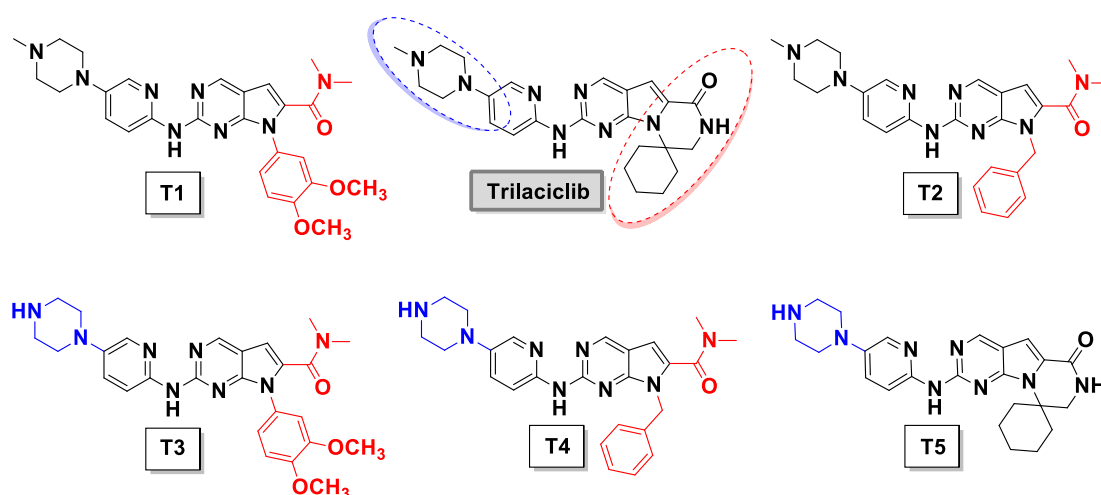
1.2 Σκοπός

Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός ως αποτέλεσμα απορρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της υπερέκφρασης των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Η αναστολή των CDKs είναι μια υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων για πιο αποτελεσματική και στοχευμένη θεραπεία.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι ο μοριακός σχεδιασμός και η σύνθεση αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Trilaciclib ως εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Η δομή που έχει επιτρέπει την περαιτέρω μοριακή τροποποίηση του, ώστε να βελτιωθεί η βιολογική δράση και η ανασταλτική ικανότητα, απαραίτητα στοιχεία ενός φαρμάκου.

Ο ορθολογικός σχεδιασμός των νέων ενώσεων υλοποιήθηκε στο εργαστήριο έπειτα από θεωρητικές μελέτες και πειράματα μοριακής μοντελοποίησης (docking) χρησιμοποιώντας τα προγράμματα AutodockVina και UCSF Chimera. Πραγματοποιήθηκε, επομένως, ο σχεδιασμός πέντε αναλόγων του φαρμάκου με στόχο την αύξηση της δραστηριότητας του και της αναστολής των CDK4/6. Οι μοριακές δομές των αναλόγων που σχεδιάστηκαν και διερευνήθηκε η σύνθεσή τους απεικονίζονται παρακάτω (Σχήμα 1.2.).

Παράλληλα, σχεδιάστηκε η πειραματική πορεία που οδηγεί στην σύνθεση των νέων βιοδραστικών ενώσεων στοχεύοντας σε αύξηση της ολικής απόδοσης και ταυτόχρονη μείωση του χρόνου και του κόστους. Έλαβε χώρα η σύνθεση και η ταυτοποίηση με φασματοσκοπικές μεθόδους πρόδρομων ενώσεων της συνθετικής πορείας.



Σχήμα 1.2.: Ανάλογα του Trilaciclib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και έγινε προσπάθεια σύνθεσής τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

Θεωρητικό Μέρος

2.1 Τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)

Το ανθρώπινο σώμα είναι ένας πολύπλοκος οργανισμός που χρειάζεται ενέργεια για τη σωστή λειτουργία του και η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) αποτελεί την πηγή ενέργειας του. Η δομή του ATP είναι ένας τριφωσφορικός νουκλεοζίτης, που αποτελείται από μια αζωτούχα βάση (αδενίνη), ένα σάκχαρο ριβόζης και τρεις συνδεδεμένες φωσφορικές ομάδες. Το ATP αναφέρεται συνήθως ως το «ενεργειακό νόμισμα» του κυττάρου, καθώς παρέχει εύκολα απελευθερώσιμη ενέργεια στον δεσμό μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης φωσφορικής ομάδας. Εκτός από την παροχή ενέργειας, η διάσπαση του ATP μέσω της υδρόλυσης εξυπηρετεί ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της σηματοδότησης και της σύνθεσης DNA/RNA. Καταναλώνεται για ενέργεια σε διαδικασίες όπως η μεταφορά ιόντων, η μυϊκή σύσπαση, η διάδοση των νευρικών παλμών, η φωσφορυλίωση και η χημική σύνθεση. Μέσω μεταβολικών διεργασιών, το ATP υδρολύεται σε ADP, ή περαιτέρω σε AMP, και σε ελεύθερες ανόργανες φωσφορικές ομάδες.^[17]

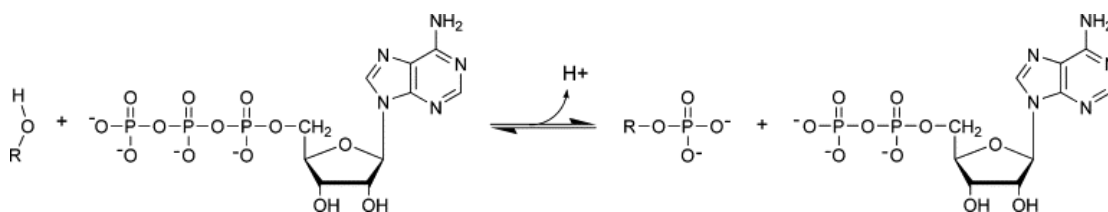
Η μεταγωγή σήματος βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στο ATP, καθώς μπορεί να χρησιμεύσει ως υπόστρωμα για τις κινάσες, την πιο πολυάριθμη πρωτεΐνη που δεσμεύει το ATP. Όταν μια κινάση φωσφορυλιώνει μια πρωτεΐνη, μπορεί να ενεργοποιηθεί ένας καταρράκτης σηματοδότησης, οδηγώντας στη διαμόρφωση διαφορετικών ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης. Η δραστηριότητα της κινάσης είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο και πρέπει να ρυθμίζεται αυστηρά.^[17]

2.2 Φωσφορυλίωση πρωτεϊνών

Η μελέτη της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών ξεκινά με την ανακάλυψη των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών σε κατάλοιπα σερίνης από τους Levene και Alsberg το 1906 και σε κατάλοιπα τυροσίνης από τον Hunter και τους συνεργάτες του το 1979. Από τις αρχικές ανακαλύψεις, η φωσφορυλίωση αποτελούσε μια κοινή μεταμεταφραστική τροποποίηση με 500.000 πιθανές θέσεις και 25.000 φωσφορυλιώσεις που περιγράφονται για 7.000 ανθρώπινες πρωτεΐνες. Τα κατάλοιπα φωσφορυλίωσης κατανέμονται ως εξής: 85% σερίνη, 11,8% θρεονίνη και 1,8% τυροσίνη. Ο αριθμός των καταλοίπων θρεονίνης συσχετίζεται αντιστρόφως με την πολυπλοκότητα ενός οργανισμού, ενώ ο αριθμός των καταλοίπων σερίνης όχι. Ο αριθμός των καταλοίπων τυροσίνης και των κινασών τυροσίνης συσχετίζεται επίσης αντιστρόφως με την πολυπλοκότητα του οργανισμού.^[18]

Η αντίδραση φωσφορυλίωσης χρησιμοποιεί το ATP που είναι πανταχού παρόν και υπάρχει σε υψηλές κυτταρικές συγκεντρώσεις (συνήθως αναφέρεται ότι είναι 1-4 mM, αλλά μπορεί να φτάσει και τα 12 mM). Ενεργειακά, η μεταφορά της φωσφορικής

ομάδας από το ATP στην ομάδα υδροξυλίου ενός φωσφοϋποδοχέα είναι ευνοϊκή ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$, $\Delta G = -7.3 \text{ kcal/mol}$). Έτσι, η πηγή της φωσφορικής ομάδας είναι άμεσα διαθέσιμη και η αντίδραση μεταφοράς είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκή. Μόλις ενσωματωθεί σε μια πρωτεΐνη, μια φωσφορική ομάδα είναι ικανή να δημιουργήσει πολλούς ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου που μπορούν να επηρεάσουν τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, η φωσφορική ομάδα αποτελεί έναν μοριακό «διακόπτη» που επηρεάζει πολύπλοκα δίκτυα σηματοδότησης μέσω ευέλικτων και ταχέων γεγονότων φωσφορυλίωσης που κατευθύνουν το σχηματισμό και την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών.^[18]



Σχήμα 2.1.: Αντίδραση μεταφοράς γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP (R = Ser/Thr/Tyr).^[18]

2.3 Η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών

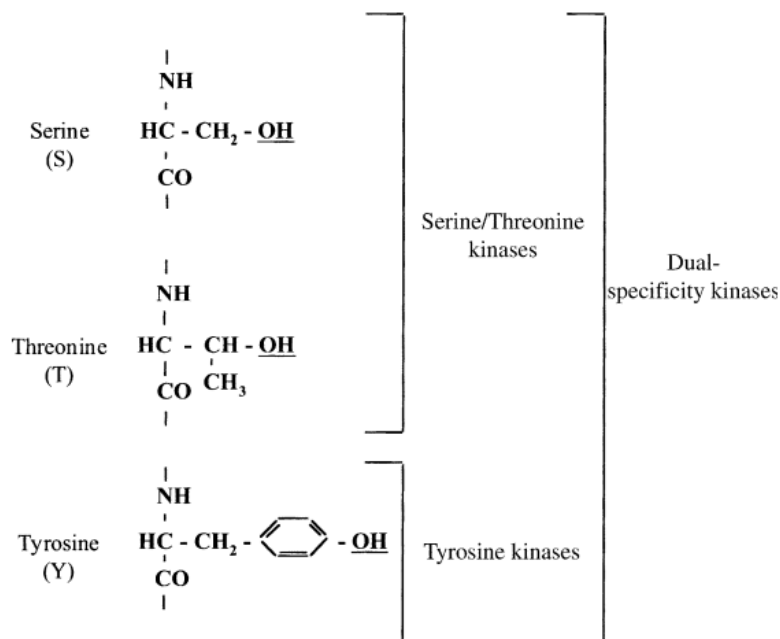
Η ανακάλυψη των πρωτεϊνικών κινασών στη δεκαετία του 1950 οδήγησε στην αποσαφήνιση βιολογικών οδών και μηχανισμών ασθενειών και στην ανάπτυξη θεραπειών.^[19] Οι πρωτεϊνικές κινάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου όπως είναι ο μεταβολισμός, η μεταγραφή, η κυτταρική διαίρεση, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση και στη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η φωσφορυλίωση είναι η πιο κοινή τροποποίηση πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται στη μετάδοση σήματος, επειδή είναι αναστρέψιμη διαδικασία και οι πρωτεϊνικές κινάσες χρησιμοποιούν έναν πανταχού παρόν συμπαράγοντα, το ATP. Η οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών είναι η δεύτερη μεγαλύτερη οικογένεια ενζύμων και η πέμπτη μεγαλύτερη οικογένεια γονιδίων στον άνθρωπο. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την ενζυμική δραστηριότητα της. Μπορεί να σταθεροποιήσει ή να αποσταθεροποιήσει μια πρωτεΐνη ή να προωθήσει τη μετακίνηση μιας πρωτεΐνης από τη μια κυτταρική θέση στην άλλη.^[10]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες, μέλη της οικογένειας των φωσφοτρανσφερασών, είναι ένζυμα που καταλύουν την ακόλουθη αντίδραση όπου η ομάδα φωσφορυλίου (PO_3^{2-}) και όχι η φωσφορική ομάδα (OPO_3^{2-}) μεταφέρεται από το ATP στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα:



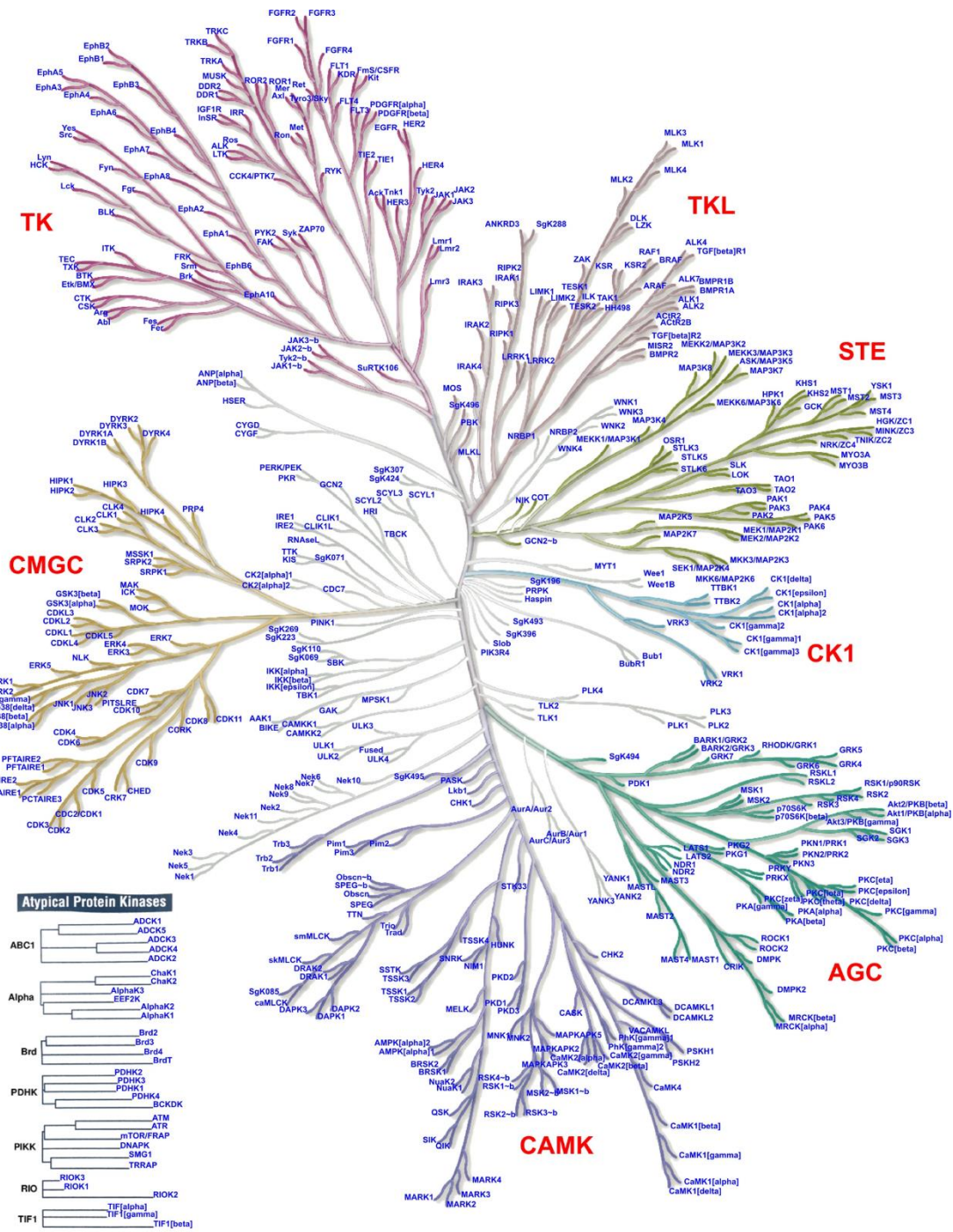
Για την αντίδραση απαιτείται δισθενές κατιόν όπως Mg^{2+} . Η δραστηριότητα ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών *in vitro* είναι μεγαλύτερη με το Mn^{2+} από το Mg^{2+} , αλλά η κυτταρική συγκέντρωση του Mg^{2+} είναι πολύ μεγαλύτερη, έτσι ώστε το κυρίαρχο

υπόστρωμα να είναι το $MgATP^{1-}$. Αυτή η ομοιοπολική αντίδραση λαμβάνει χώρα είτε στην αλκοολική αλειφατική πλευρική αλυσίδα των καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης στην περίπτωση των κινάσων σερίνης/θρεονίνης, είτε στη φαινολική ομάδα καταλοίπων τυροσίνης με κινάσες τυροσίνης και σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης στην περίπτωση κινάσων διπλής εξειδίκευσης.^[10,20]



Σχήμα 2.2.: Οι πρωτεϊνικές κινάσες μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα στο υδροξύλικό άκρο ενός αμινοξέος σύμφωνα με την ειδικότητα της κινάσης.^[20]

Η αντίστροφη διαδικασία καλείται αποφωσφορυλίωση και καταλύεται από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες (PPs) καθορίζοντας την αναλογία φωσφορυλιωμένων και μη φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών. Οι φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης είναι κυτοσωλικές ή πυρηνικές και εντοπίζονται μέσα στο κύτταρο μέσω της δέσμευσής τους σε δομές όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο και ο κυτταροσκελετός (π.χ. PP1, PP2A και PP2B, και μια εξαρτώμενη από μαγνήσιο πρωτεϊνική φωσφατάση, η PP2C). Μια άλλη κατηγορία είναι οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης (PTPs) όπου αποφωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα τυροσίνης, ενώ αντίστοιχα υπάρχουν οι φωσφατάσες διπλής ειδικότητας όπου αποφωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης/θρεονίνης. Ορισμένες πρωτεϊνικές φωσφατάσες έχουν πολύ στενή εξειδίκευση για το υπόστρωμά τους, ενώ άλλες αποφωσφορυλιώνουν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών.^[20,21]



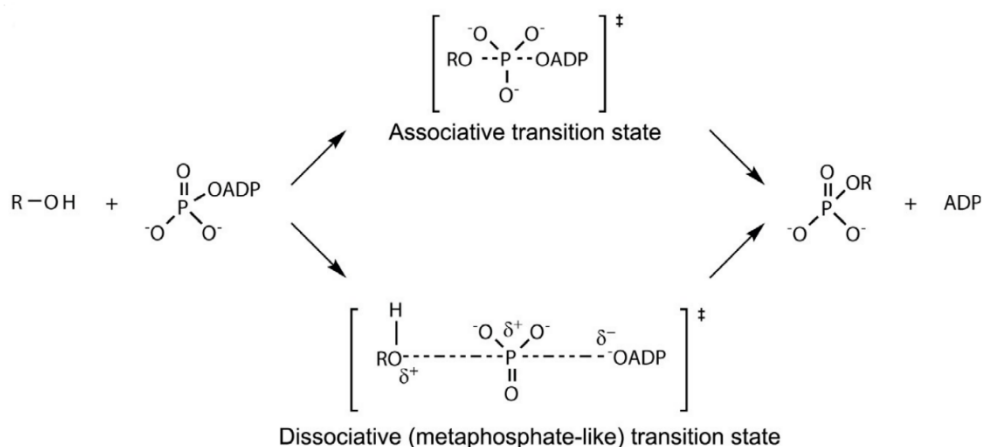
Εικόνα 2.1.: Οι πρωτεϊνικές κινάσες και οι λιπιδικές κινάσες αποτελούν το ανθρώπινο κίνωμα.^[22]

2.3.1 Μηχανισμός δράσης πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες λειτουργούν σε δύο υποστρώματα, τις πρωτεΐνες και το MgATP και παράγουν φωσφοπρωτεΐνες και MgADP. Ένζυμα, όπως οι κινάσες μπορούν να δρουν είτε με μηχανισμούς τριμερούς συμπλόκου, δηλαδή άμεση αντίδραση μεταξύ των δύο υποστρωμάτων για να δώσουν τα δύο προϊόντα είτε με μηχανισμούς πιγκ-πονγκ μέσω ενός ενδιάμεσου ομοιοπολικού ενζύμου. Πειράματα κινητικής σταθερής κατάστασης και στερεοχημικές μελέτες βοήθησαν στον ορισμό της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) ακολουθώντας έναν μηχανισμό τριμερούς συμπλόκου. Στη συνέχεια, μελέτες κινητικής υποστρώματος σε μια ποικιλία κινασών Ser/Thr και Tyr και δομές ακτίνων X επιβεβαίωσαν το αρχικό συμπέρασμα. Επομένως, η πλειονότητα των πρωτεϊνικών κινασών προχωρά στην άμεση μεταφορά φωσφορυλίου μέσω ενός μηχανισμού τριμερούς συμπλόκου, ενώ στο ζήτημα εάν προτιμάται το MgATP ή το πρωτεϊνικό υπόστρωμα να δεσμεύεται πρώτα, τα αποτελέσματα εξαρτώνται από το ένζυμο και την κατάσταση της αντίδρασης. Για παράδειγμα, η PKA εμφανίζει μια σαφή προτίμηση για τη δέσμευση MgATP πριν από το πεπτιδικό υπόστρωμα, η κινάση Csk δεν δείχνει εμφανή προτίμηση δέσμευσης μεταξύ νουκλεοτιδικών ή πεπτιδικών υποστρωμάτων και η κινάση p38 MAP υποδεικνύει μια τυχαία σειρά δέσμευσης υποστρώματος.^[19]

Όσον αφορά τον χημικό μηχανισμό της μεταφοράς της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP στην υδροξυ-ομάδα του υποστρώματος στη δραστική θέση της κινάσης, έχει μελετηθεί διεξοδικά η φύση της μεταβατικής κατάστασης. Οι μελέτες μη ενζυματικών μηχανισμών έδειξαν ότι οι φωσφορικοί μονοεστέρες, όπως τα φωσφορικά άλατα της φαινόλης εμφανίζουν μεταβατικές καταστάσεις διάσπασης όπου ο δεσμός μεταξύ του ατόμου του φωσφόρου και της αποχωρούσας ομάδας σπάει σε μεγάλο βαθμό πριν από το σχηματισμό δεσμού μεταξύ του εισερχόμενου πυρηνόφιλου και του φωσφόρου. Αυτό εξηγείται με βάση τα αρνητικά φορτισμένα μη γεφυροποιημένα οξυγόνα που απωθούν τα πυρηνόφιλα και σταθεροποιούν το μερικό θετικό φορτίο στο ενδιάμεσο. Αντίθετα, οι μη ενζυματικές αντιδράσεις τριεστέρα φωσφορικού άλατος δείχνουν μια μεταβατική κατάσταση όπου το πυρηνόφιλο σχηματίζει δεσμό με τον φώσφορο πριν από την αποχώρηση της ομάδας.^[19]

Οι μεταβατικές καταστάσεις για τις ενζυμικές αντιδράσεις είναι πιο δύσκολο να αναλυθούν λόγω της πολυπλοκότητας του πρωτεϊνικού καταλύτη. Υποστηρίζεται ότι ο μηχανισμός διάσπασης επιλέγεται για τις ~500 ανθρώπινες κινάσες. Ίσως μια εξήγηση για το πως δρουν είναι ότι εστιάζουν το θετικό φορτίο στην αποχωρούσα ομάδα ADP-ανιονικά οξυγόνα για να αποκόψουν τον δεσμό γ-φωσφορυλίου. Αναλύοντας την δραστηριότητα της κινάσης τυροσίνης με μια σειρά αναλόγων τυροσίνης υποκατεστημένα με άτομα φθορίου στον δακτύλιο φαινόλης, διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός μεταφοράς φωσφορυλίου είναι σχεδόν ανεξάρτητος από το πυρηνόφιλο. Ένας αριθμός υπολογιστικών μελετών έχει διεξαχθεί για την εύρεση του μηχανισμού. Πολλές προσομοιώσεις έχουν αναλύσει τη συμβολή συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων ενεργών θέσεων, καθώς και τη γεωμετρία και τις καταστάσεις φορτίου ως συνάρτηση της προόδου μεταφοράς φωσφορυλίου.^[19]



Σχήμα 2.3.: Οι πιθανές μεταβατικές καταστάσεις για την μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP.^[19]

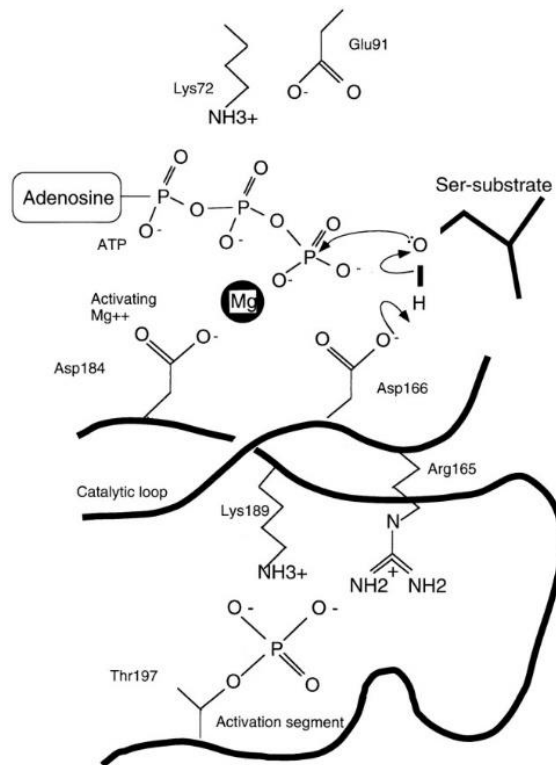
2.4 Δομή πρωτεϊνικών κινασών

Οι κρυσταλλικές δομές των PKs βοηθούν στην κατανόηση των μηχανισμών ενεργοποίησης και αδρανοποίησης των ενζύμων. Η πρώτη κρυσταλλική δομή καταλυτικής περιοχής πρωτεϊνικής κινάσης που επιλύθηκε ήταν της PKA το 1991 και από τότε ~1.500 δομές ~200 κινασών έχουν κατατεθεί στη Βάση Δεδομένων Πρωτεϊνών (PDB) και ο αριθμός συνεχώς αυξάνεται.^[18] Οι κινάσες είναι περισσότερο παρόμοιες μεταξύ τους όταν βρίσκονται σε ενεργή κατάσταση, αλλά είναι διαφορετικές σε μια ανενεργή διαμόρφωση. Κάποιες έχουν την ικανότητα αυτοαναστολής σταθεροποιώντας την ανενεργή διαμόρφωση τους. Τα κύρια σημεία στην δομή των τυπικών (ePKs) αλλά και των άτυπων πρωτεϊνικών κινασών (aPKs) είναι:

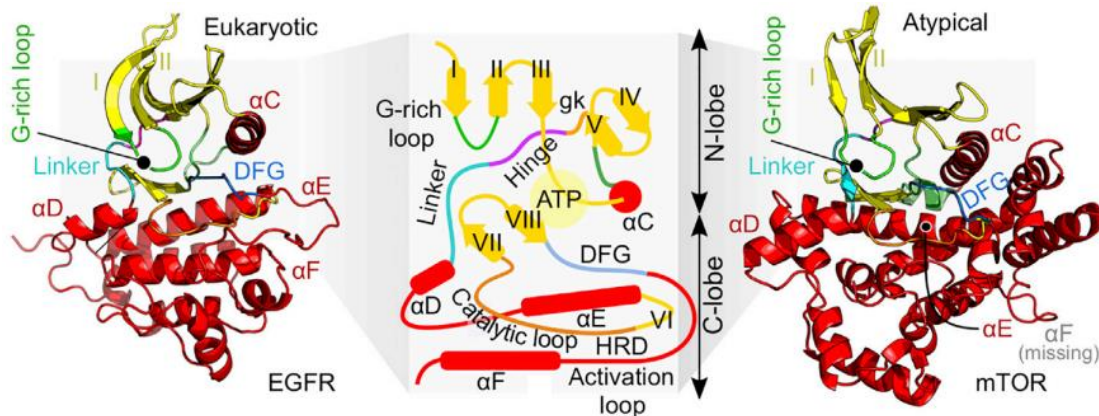
- **N-λοβός και C-λοβός:** Ο μικρότερος N-τελικός λοβός αποτελείται από β-φύλλα (I-V) και την αC-έλικα και ο μεγαλύτερος και πιο άκαμπτος C-τελικός λοβός περιλαμβάνει α-έλικες (αD-αF). Οι δύο λοβοί συνδέονται μεταξύ τους με μια εύκαμπτη περιοχή. Το ενεργό κέντρο σχηματίζεται στη σχισμή ανάμεσα στους δύο λοβούς. Ο N-λοβός περιέχει τη θέση δέσμευσης του ATP και ο C-λοβός καταλυτικά κατάλοιπα και μια επιφάνεια πρόσδεσης του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Το ATP συνδέεται μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου. Οι λοβοί υιοθετούν ανοιχτές και κλειστές διαμορφώσεις: η ανοιχτή μορφή είναι απαραίτητη για να επιτρέπεται η πρόσβαση του ATP στην καταλυτική θέση και η απελευθέρωση του προϊόντος ADP και η κλειστή μορφή για να φέρει τα κατάλοιπα στη σωστή διαμόρφωση για την προώθηση της κατάλυσης.
- **P-βρόχος:** Ο βρόχος έξι αμινοξέων μεταξύ των β-φύλλων I και II στον N-λοβό είναι πλούσιος σε Gly (GxGxxG) και απαιτείται για την πρόσδεση των φωσφορικών ομάδων του ATP.
- **αC-έλικα:** Στην ενεργή διαμόρφωση των πρωτεϊνικών κινασών το κατάλοιπο Glu91 της αC-έλικας του N-λοβού δημιουργεί μια γέφυρα άλατος για τον ευνοϊκότερο προσανατολισμό των φωσφορικών ομάδων του ATP.

- Καταλυτικός βρόχος: Βρίσκεται στη βάση του ενεργού κέντρου και περιέχει ένα καλά συντηρημένο Asp166, το οποίο θεωρείται ως καταλυτικό αμινοξύ.
- Περιοχή ενεργοποίησης: Η περιοχή ενεργοποίησης καθορίζεται ως το τμήμα ανάμεσα σε δύο συντηρημένα τριπεπτίδια (DFG και APE) μέσα στον C-λοβό και περιλαμβάνει 20-35 αμινοξέα. Η περιοχή ενεργοποίησης αποτελείται από τον βρόχο όπου συνδέεται το Mg^{2+} , τον βρόχο ενεργοποίησης και τον P+1 βρόχο που συμμετέχει στη σύνδεση του υποστρώματος.
- Βρόχος ενεργοποίησης: Ο βρόχος ενεργοποίησης ποικίλει στην δομή και την διαμόρφωση του για τις διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα σημεία ρύθμισης της δραστηριότητας τους. Σε πολλές κινάσες ο βρόχος ενεργοποίησης είναι θέση φωσφορυλίωσης ή αλληλεπίδρασης με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Κατάλοιπα Ser, Thr και Tyr μπορεί να φωσφορυλιωθούν ως απάντηση σε σήματα ενεργοποίησης, προωθώντας την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης (π.χ. η φωσφορυλίωση της Thr197 στην PKA είναι απαραίτητη για την πλήρη ενεργοποίηση της κινάσης, η pThr197 δημιουργεί έναν δεσμό υδρογόνου με την Arg165 σταθεροποιώντας την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου). Σε πολλές πρωτεϊνικές κινάσες ο βρόχος ενεργοποίησης συνδέεται και μπλοκάρει το ενεργό κέντρο εμποδίζοντας τη σύνδεση του ATP αλλά και του υποστρώματος. Η φωσφορυλίωση απομακρύνει τον βρόχο ενεργοποίησης από το ενεργό κέντρο οδηγώντας στην ανοιχτή-ενεργή διαμόρφωση.^[23, 24]

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης φωσφορυλίωσης, οι φωσφορικές ομάδες του ATP ευθυγραμμίζονται με αλληλεπιδράσεις με τα άζωτα του P-βρόχου, με αλληλεπιδράσεις με την Lys72 (εντοπίζεται από μια γέφυρα άλατος στο Glu91) και με αλληλεπιδράσεις με ιόντα Mg^{2+} . Το Mg^{2+} δεσμεύεται στις β και γ φωσφορικές ομάδες του ATP και στο Asp184 (τμήμα του μοτίβου DFG). Το καταλυτικό Asp166, το οποίο είναι σταθερό σε όλες τις κινάσες, δρα ως βάση για την απομάκρυνση ενός πρωτονίου από την ομάδα υδροξυλίου του υποστρώματος πρωτεΐνης. Το αλκοολικό ή φαινολικό ιόν που προκύπτει προσβάλλει την γ-φωσφορική ομάδα του ATP.^[24, 25]



Σχήμα 2.4.: Σχηματική αναπαράσταση του ATP και ορισμένων από τα βασικά κατάλοιπα στην καταλυτική θέση του cAPK και το τμήμα ενεργοποίησης του.^[25]



Εικόνα 2.2.: Η δομή των ευκαρυωτικών και άτυπων πρωτεϊνικών κινασών.^[23]

2.5 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ορίζονται ως ένζυμα που μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από έναν δότη φωσφορικών σε ένα αμινοξύ-δέκτη ενός υποστρώματος πρωτεΐνης. Γενικά, η γ-φωσφορική ομάδα του ATP ή άλλος τριφωσφορικός νουκλεοζίτης είναι ο δότης, αλλά μεμονωμένα ένζυμα μπορεί να έχουν άλλους δότες φωσφορικών. Σύμφωνα με την εξειδίκευση των αμινοξέων-δέκτη οι πρωτεϊνικές κινάσες ταξινομούνται ως εξής:

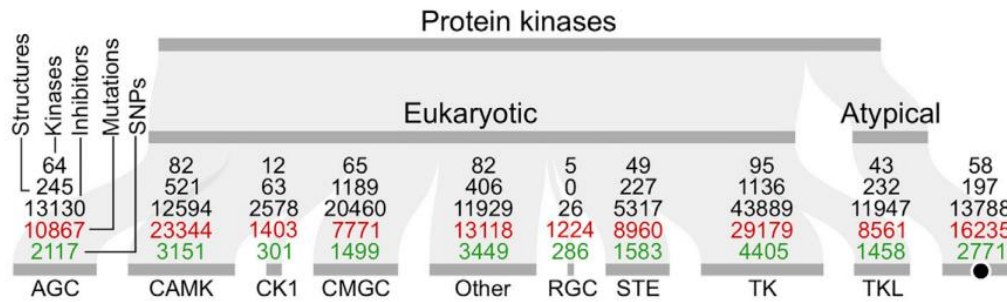
- Φωσφοτρανσφεράσες με μια ομάδα πρωτεϊνικής αλκοόλης ως δέκτη που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες Ser/Thr (δηλαδή, πρωτεϊνικές κινάσες ειδικές για σερίνη και θρεονίνη που δημιουργούν φωσφορικούς εστέρες).
- Φωσφοτρανσφεράσες με μια πρωτεϊνική φαινολική ομάδα ως δέκτη που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες Tyr (δηλαδή, πρωτεϊνικές κινάσες ειδικές για την τυροσίνη που δημιουργούν φωσφορικούς εστέρες).
- Φωσφοτρανσφεράσες με μια ομάδα πρωτεΐνης ιστιδίνης, αργινίνης ή λυσίνης ως δέκτη που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες His/Arg/Lys (δηλαδή, ένζυμα που δημιουργούν φωσφορικά αμίδια στην 1^η ή 3^η θέση της ιστιδίνης, στην ομάδα γουανιδίνης της αργινίνης ή στην ομάδα ε-NH₂ της λυσίνης).
- Φωσφοτρανσφεράσες με μια ομάδα πρωτεΐνης κυστεΐνης ως αποδέκτη που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες Cys (δηλαδή, ένζυμα που δημιουργούν φωσφορικούς θειοεστέρες).
- Φωσφοτρανσφεράσες με μια πρωτεϊνική ακυλ-ομάδα ως δέκτη που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες Asp/Glu (δηλαδή, ένζυμα που δημιουργούν μικτούς ανυδρίτες φωσφορικού-καρβοξυλικού οξέος).^[26]

Τα ένζυμα στις δύο πρώτες κατηγορίες έχουν ερευνηθεί διεξοδικά και θα αναλυθούν περισσότερο παρακάτω, ενώ τα ένζυμα στις τρεις τελευταίες κατηγορίες έχουν μελετηθεί λιγότερο και χρησιμοποιούνται κατά βάση από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Τα 555 μέλη της οικογένειας των ανθρώπινων κινασών έχουν διακριθεί στην κατηγορία των 497 ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών (ePKs) και, λόγω έλλειψης ομοιότητας αλληλουχίας, στην κατηγορία των 58 άτυπων πρωτεϊνικών κινασών (aPKs) στις οποίες εντάσσονται και οι λιπιδικές κινάσες. Η κινάση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, η οποία εμφανίζεται μέσα στο μιτοχόνδριο, είναι ένα παράδειγμα άτυπης κινάσης. Οι πρώτες δομές των aPK αποκάλυψαν ότι αρκετές από αυτές διαθέτουν την πρωτότυπη δομή των ePK με αποτέλεσμα 26 aPK να έχουν περαιτέρω ταξινομηθεί ως όμοιες των πρωτεϊνικών κινασών (PKL). Τα πιο πρόσφατα κρυσταλλογραφικά δεδομένα των aPK περιλαμβάνουν τις δομές των PIK3CD, mTOR και ADCK3. Συνολικά, υπάρχουν περισσότερες από 4.000 μοναδικές δομές ανθρώπινων πρωτεϊνικών κινασών, ενώ 268 ePK και 15 aPK έχουν αποκωδικοποιηθεί πλήρως από τους ερευνητές. Η ομάδα των ePK υποδιαιρείται περαιτέρω σε εννέα ομάδες: AGC, CAMK, CK1, CMGC, Other, RGC, STE, TK και TKL.^[10,23]

- I. Η ομάδα AGC ρυθμίζει την οδό σηματοδότησης των μολυσματικών ασθενειών. Αποτελείται από 63 μέλη και περιλαμβάνει τις οικογένειες PKA, PKG, PKC μαζί με Akt1/2/3 (PKB1/2/3), Aur1/2/3 (κινάση Aurora), PDK1 (εξαρτώμενη από φωσφοϊνσιτίδη κινάση) και RSK1/2/3/4 (ριβωσωματική πρωτεΐνη S6 κινάση).
- II. Η ομάδα CAMK αποτελείται από 74 μέλη και περιέχει πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από ασβέστιο και καλμοδουλίνη, συμπεριλαμβανομένων των CaMK1/2/4, PhKγ1/2 (κινάση φωσφορυλάσης), MAPKAPK2/3/5 (ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες), Nek1–11 και MLCK (κινάσες αλυσίδας μυοσίνης). Οι CHK1 και CHK2 είναι ειδικές κατηγορίες κινασών CAMK και είναι κινάσες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.
- III. Η ομάδα CK1 περιέχει κινάσες Ser/Thr που σχετίζονται με την κυτταροσκελετική λειτουργία και τη μεταγραφή. Αποτελείται από 12 μέλη και περιέχει τις οικογένειες CK1α/γ/δ/ε (κινάση καζεΐνης 1), TTBK1/2 (κινάση tau tubulin) και VRK1/2/3 (κινάση σχετική με τη δαμαλίτιδα).
- IV. Η ομάδα CMGC αποτελείται από 61 μέλη και περιέχει τις CDKs (εξαρτώμενες από κυκλίνη πρωτεϊνικές κινάσες, CDK1-11), MAPK (ERK1-5), GSK3 (κινάση συνθάσης γλυκογόνου) και CDKL (CDKL1-5). Οι CDKs εμπλέκονται στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τη μεταγραφή, οι MAPK συμμετέχουν στον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο και οι GSKs στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και στη φλεγμονή.
- V. Η ομάδα STE περιέχει 47 μέλη και αποτελείται από τις MAPK (Ste7/MAP2K, Ste11/MAP3K και Ste20/MAP4K). Τα MEK1/2/5/7 της οικογένειας Ste7 είναι πρωτεϊνικές κινάσες διπλής ειδικότητας που καταλύουν τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης και στη συνέχεια των καταλοίπων θρεονίνης των κινασών-στόχων ERK/MAP.
- VI. Η ομάδα TK αποτελείται από 90 μέλη που διακρίνονται στις 58 υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (π.χ. EGFR, FGFR, Flt, InsulinR, PDGFR) και στις 32 μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (π.χ. Abl, Eph, JAK και Src). Οι RTKs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που περιέχουν ένα εξωκυτταρικό και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα.

- VII. Η ομάδα TKL περιλαμβάνει κινάσες σερίνης/θρεονίνης με αλληλουχίες παρόμοιες με αυτές της ομάδας TK. Περιέχει 43 μέλη και αποτελείται από τις MLK1–4 (κινάσες μικτής γραμμής), LISK (LIMK/TESK για LIM, Lin-11, Isl-1, Mec-3), IRAK, Raf, RIPK (πρωτεϊνική κινάση που αλληλεπιδρά με υποδοχέα ή RIP) και STRK (υποδοχείς ακτιβίνης και αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού).
- VIII. Η ομάδα RCG περιέχει 5 μέλη και είναι παρόμοια σε αλληλουχίες με τις κινάσες τυροσίνης.
- IX. Η ομάδα OTHER είναι ποικιλόμορφη με 83 μέλη.^[10,22]



Εικόνα 2.3.: Διάγραμμα ροής που απεικονίζει την ταξινόμηση των πρωτεϊνικών κινασών καθώς και τον αριθμό κινασών, δομών, αναστολέων, μεταλλάξεων και SNPs.^[23]

2.5.1 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης

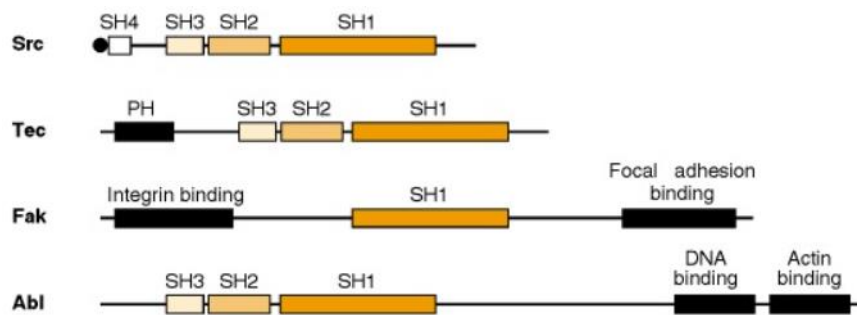
Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STKs) διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην κυτταρική ομοιόσταση και σηματοδότηση μέσω της ικανότητάς τους να φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου και μια τεράστια σειρά κυτταροπλασματικών και πυρηνικών τελεστών.^[27] Οι νευρικοί ιστοί περιέχουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις τριών πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης: PKA, PKC και CaM-KII. Για παράδειγμα, η CaM-KII αποτελεί έως και το 2% της συνολικής πρωτεΐνης σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος.^[28] Ο αριθμός των κινασών S/T στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι σημαντικός, με περισσότερα από 100 γονίδια σε ζυμομύκητες, μύγες και ανθρώπους.^[29] Κάποιες κύριες ομάδες πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης είναι:

- Πρωτεϊνικές κινάσες AGC: πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από κυκλικά νουκλεοτίδια (PKA, PKG), πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από τη DAG / Ca²⁺ (PKC), PKB ή Akt κινάση
- Πρωτεϊνικές κινάσες που ρυθμίζονται από Ca²⁺ / καλμοδουλίνη: κινάση της γ υπομονάδας της φωσφορυλάσης, κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLCK), πρωτεϊνική κινάση II εξαρτώμενη από Ca²⁺ /καλμοδουλίνη (CAMKII)
- Ριβοσωμική S6 πρωτεϊνική κινάση: κινάσες που φωσφορυλιώνουν ειδικά τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S6
- Κινάσες των GPCRs (GRKs): κινάση του β-αδρενεργικού υποδοχέα (βARK)
- Κινάση II της καζεΐνης (CK2)

- Κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου
- Κινάσες CDKs (κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες): ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου
- Κινάσες που προωθούν τη μίτωση (MAP κινάσες): συμμετέχουν στη μεταγωγή των σημάτων που προάγουν την αύξηση
- Πρωτεϊνικές κινάσες Mos/Raf: συμμετέχουν στη μεταγωγή των σημάτων των αυξητικών παραγόντων ^[30]

2.5.2 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης

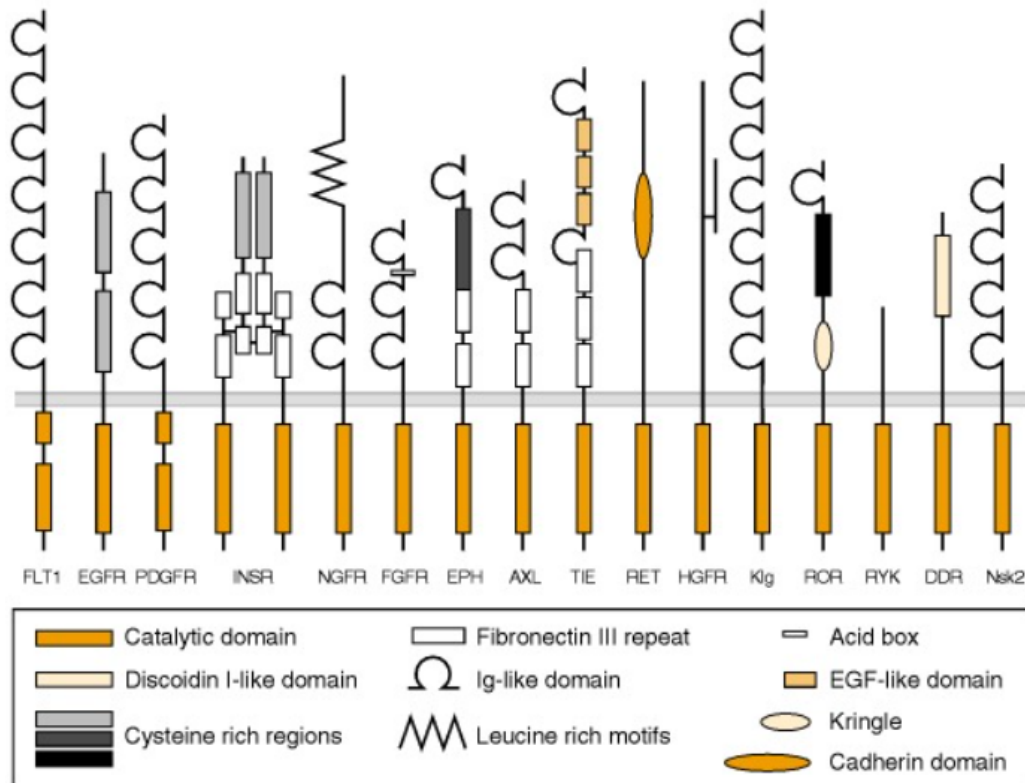
Τα σήματα από κύτταρο σε κύτταρο σχετικά με την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, την κινητικότητα και τον θάνατο, συχνά μεταδίδονται μέσω των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης (PTKs). Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει 90 γονίδια κινάσης τυροσίνης και 5 ψευδογονίδια. Από τις 90 κινάσες τυροσίνης, οι 58 είναι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (RTKs, 20 υποοικογένειες) και οι 32 είναι μη-υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRPTKs, 10 υποοικογένειες). Οι RPTKs είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ οι NRPTKs κατανέμονται σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (όπως το κυτταρόπλασμα, ο πυρήνας και η εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης). Η καταλυτική δραστηριότητα κάθε τύπου μπορεί να επηρεαστεί από εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Γονίδια κινάσης τυροσίνης μπορούν να βρεθούν σε 19 από τα 24 ανθρώπινα χρωμοσώματα.^[31,32] Όσον αφορά τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι προκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (PPTKs) ομαδοποιούνται σε τρεις κύριες οικογένειες: τις BY-κινάσες (BYK, F-τύπου και P-τύπου), τις PPTKs τύπου Hanks (HYK) και τις OYK-PPTKs.^[33]



Εικόνα 2.4.: Παραδείγματα οικογενειών NRPTKs με διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά.^[34]

Οι RPTKs μπορούν να ταξινομηθούν σε 20 οικογένειες, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχών επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), PDGFR, υποδοχέα αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR), υποδοχέα νευρικού αυξητικού παράγοντα (NGFR), υποδοχέα ινσουλίνης (INSR) και υποδοχέα που παράγει ερυθροποιητίνη (EphR) που βρίσκεται στο νευρικό σύστημα κ.α. Σχετικά με την δομή τους, η εξωκυτταρική περιοχή αποτελείται από διαφορετικούς τομείς και περιέχει θέσεις δέσμευσης, η διαμεμβρανική περιοχή είναι ένα υδρόφοβο τμήμα 22 έως 26 αμινοξέων και η ενδοκυτταρική περιοχή αποτελείται κυρίως από την καταλυτική περιοχή και διάφορες θέσεις αυτοφωσφορύλιωσης που ρυθμίζουν την καταλυτική λειτουργία και χρησιμεύουν ως θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, ο EGFR αποτελείται

από μια εξωκυτταρική περιοχή (621 κατάλοιπα), ένα διαμεμβρανικό τμήμα (23 κυρίως υδρόφοβα κατάλοιπα) και μια ενδοκυτταρική περιοχή (542 κατάλοιπα). Οι καταλυτικές περιοχές των RPTKs είναι εξαιρετικά συντηρημένες και παρόμοιες στη δομή με τις καταλυτικές περιοχές των NRPTKs.^[32,34]



Εικόνα 2.5.: Οι RPTKs κατανέμονται σε διαφορετικές οικογένειες ανάλογα με τα δομικά χαρακτηριστικά στον εξωκυτταρικό τομέα. Μετά την εξωκυτταρική περιοχή είναι η διαμεμβρανική και η ενδοκυτταρική περιοχή, η τελευταία περιέχει την καταλυτική δομή.^[34]

2.6 Κυτταρικός κύκλος

Το 1855 ο Virchow οδηγείται στο συμπέρασμα πως τα κύτταρα προκύπτουν μόνο από προϋπάρχοντα κύτταρα και αποτελεί έναυσμα για πολλές νέες έρευνες και ανακαλύψεις. Στις επόμενες δεκαετίες, η άνθηση της μοριακής βιολογίας επέτρεψε σε κυτταρικούς βιολόγους, βιοχημικούς και γενετιστές να κατανοήσουν τη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου ως μια εξαιρετικά ρυθμισμένη αναπτυξιακή ακολουθία που επιφέρει την αναπαραγωγή του κυττάρου στο σύνολο των ευκαρυωτικών οργανισμών.^[35,36] Η κυτταρική ανάπτυξη και η προετοιμασία των κυττάρων για διαίρεση μεταξύ δύο διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων ονομάζεται κυτταρικός κύκλος.^[37] Τα κύτταρα στο μονοπάτι προς την κυτταρική διαίρεση προχωρούν μέσω μιας σειράς επακριβώς χρονομετρημένων και προσεκτικά ρυθμισμένων σταδίων ανάπτυξης, αντιγραφής DNA και διαίρεσης που παράγει δύο πανομοιότυπα κύτταρα. Τα $\sim 10^{14}$ κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού έχουν προκύψει από

επαναλαμβανόμενους κύκλους κυτταρικής αύξησης και διαίρεσης ενός αρχικού κυττάρου, του γονιμοποιημένου ωαρίου.^[1]

2.6.1 Φάσεις του κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε τέσσερις διακριτές φάσεις: την φάση M, την φάση G₁, την φάση S και την φάση G₂. Οι φάσεις G₁, S και G₂ αποτελούν την μεσόφαση.

Μεσόφαση: Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, το κύτταρο υφίσταται διαδικασίες ανάπτυξης και προετοιμάζεται για την κυτταρική διαίρεση που θα ακολουθήσει.

- Φάση G₁ (φάση 1^{ου} μεσοδιαστήματος): Το πρώτο στάδιο της μεσόφασης ονομάζεται φάση G₁ και το κύτταρο είναι αρκετά ενεργό σε βιοχημικό επίπεδο. Συσσωρεύει τα δομικά στοιχεία του χρωμοσωμικού DNA και των σχετικών πρωτεϊνών, καθώς και επαρκή αποθέματα ενέργειας για να ολοκληρώσει το έργο της αντιγραφής κάθε χρωμοσώματος στον πυρήνα.
- Φάση S (φάση σύνθεσης): Στη φάση S, η αντιγραφή του DNA μπορεί να προχωρήσει μέσω των μηχανισμών που έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πανομοιότυπων ζευγών μορίων DNA (αδελφών χρωματίδων).
- Φάση G₂ (φάση 2^{ου} μεσοδιαστήματος): Στη φάση G₂, το κύτταρο αναπληρώνει τις αποθήκες ενέργειας του, συνθέτει πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την φάση της μίτωσης και συνεχίζει την αύξηση του. Οι τελικές προετοιμασίες για την κυτταρική διαίρεση πρέπει να ολοκληρωθούν πριν το κύτταρο εισέλθει στο στάδιο της μίτωσης.

Φάση M (μίτωση): Η φάση της μίτωσης είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων κατά την οποία τα διπλά χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται, διαχωρίζονται και μετακινούνται σε δύο νέα, πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Η μίτωση αποτελείται από μια σειρά φάσεων (πρόφαση, προμετάφαση, μετάφαση, ανάφαση και τελόφαση) που καταλήγουν στη διαίρεση του κυτταρικού πυρήνα. Η κυτταροκίνηση είναι το δεύτερο κύριο στάδιο της μίτωσης κατά την οποία ολοκληρώνεται η κυτταρική διαίρεση μέσω του φυσικού διαχωρισμού των κυτταροπλασματικών συστατικών σε δύο θυγατρικά κύτταρα. Η διαίρεση δεν είναι πλήρης έως ότου τα κυτταρικά συστατικά έχουν κατανεμηθεί και διαχωριστεί πλήρως στα δύο νέα θυγατρικά κύτταρα.

Φάση G₀: Δεν ακολουθούν όλα τα κύτταρα τα στάδια του κυτταρικού κύκλου στον οποίο ένα νεοσχηματισμένο θυγατρικό κύτταρο εισέρχεται αμέσως στις φάσεις της μεσόφασης και έπειτα στην φάση της μίτωσης. Τα κύτταρα στη φάση G₀ δεν προετοιμάζονται να διαιρεθούν, αλλά βρίσκονται σε ένα στάδιο ηρεμίας του κυτταρικού κύκλου. Ορισμένα από αυτά εισέρχονται προσωρινά στην φάση G₀ έως ότου ένα εξωκυτταρικό σήμα ενεργοποιήσει την έναρξη της φάσης G₁, ενώ άλλα κύτταρα δεν διαιρούνται ποτέ και παραμένουν μόνιμα στην φάση G₀ (όπως τα νευρικά κύτταρα).

Σημείο περιορισμού: Στο τέλος της φάσης G₁ υπάρχει το σημείο περιορισμού που καθορίζει εάν τα κύτταρα θα προχωρήσουν στην φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η

ρύθμιση γίνεται από εξωκυτταρικούς αυξητικούς παράγοντες. Αν υπάρχει διαθεσιμότητα αυτών των παραγόντων τα κύτταρα διέρχονται από το σημείο περιορισμού και εισέρχονται στην φάση S, αλλιώς η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου σταματά σε αυτό το σημείο και τα κύτταρα μεταβαίνουν στην φάση G₀. Στην φάση G₀ τα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά, αλλά έχει σταματήσει η αύξηση τους και έχει περιοριστεί η σύνθεση πρωτεϊνών.

Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου είναι πολύ μεταβλητή, ακόμη και μέσα στα κύτταρα ενός μεμονωμένου οργανισμού. Στους ανθρώπους, η συχνότητα του κυτταρικού κύκλου κυμαίνεται από λίγες ώρες στην πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, έως κατά μέσο όρο δύο έως πέντε ημέρες για τα επιθηλιακά κύτταρα και σε μια ολόκληρη ανθρώπινη ζωή που δαπανάται στην φάση G₀ από εξειδικευμένα κύτταρα. Υπάρχει, επίσης, διακύμανση στον χρόνο που ένα κύτταρο περνά σε κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου. Σε τυπικά διαιρούμενα ανθρώπινα κύτταρα με 24ωρο κυτταρικό κύκλο, η φάση G₁ διαρκεί περίπου εννέα ώρες, η φάση S διαρκεί δέκα ώρες, η φάση G₂ διαρκεί περίπου τέσσερις ώρες και η φάση M διαρκεί περίπου μιάμιση ώρα.^[1,36]

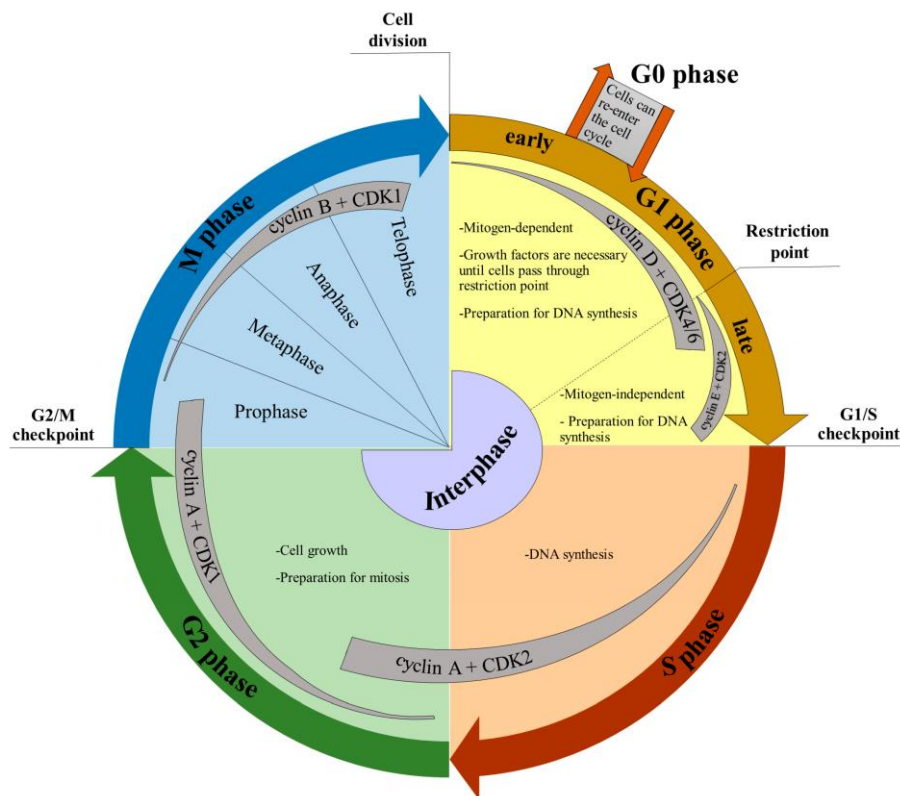
2.6.2 Σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου

Σε κάθε κυτταρικό κύκλο, είναι σημαντικό τα θυγατρικά κύτταρα που παράγονται να είναι ακριβή αντίγραφα του αρχικού κυττάρου, καθώς λάθη στον διπλασιασμό ή την κατανομή των χρωμοσωμάτων οδηγούν σε μεταλλάξεις που μεταδίδονται σε κάθε νέο κύτταρο. Για αυτό το σκοπό, υπάρχουν σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου τα οποία ευνοούν την έναρξη κάθε φάσης αφού πρώτα έχει ολοκληρωθεί η προηγούμενη.

- Σημείο ελέγχου στην φάση G₁: Ελέγχει τα αποθέματα πρωτεϊνών, το μέγεθος των κυττάρων και πιθανές βλάβες στο DNA. Ένα κύτταρο που δεν πληροί όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις δεν επιτρέπεται να προχωρήσει στη φάση S.
- Σημείο ελέγχου στην φάση S: Ελέγχει την ακεραιότητα του DNA πριν την αντιγραφή του και επιδιορθώνει σφάλματα που προκύπτουν κατά την αντιγραφή.
- Σημείο ελέγχου στην φάση G₂: Εμποδίζει την έναρξη της μίτωσης εάν δεν πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις. Όπως και στο σημείο ελέγχου της G₁, ελέγχονται το μέγεθος των κυττάρων και τα αποθέματα πρωτεϊνών. Ωστόσο, ο πιο σημαντικός ρόλος του σημείου ελέγχου της φάσης G₂ είναι να διασφαλίσει ότι όλα τα χρωμοσώματα έχουν αντιγραφεί πλήρως και δεν περιέχονται βλάβες. Εάν οι μηχανισμοί του σημείου ελέγχου εντοπίσουν βλάβες στο DNA, ο κυτταρικός κύκλος διακόπτεται και το κύτταρο επιχειρεί είτε να ολοκληρώσει την αντιγραφή του DNA είτε να επιδιορθώσει όλες τις βλάβες.
- Σημείο ελέγχου στην φάση M: Εμφανίζεται στο τέλος του σταδίου της μετάφασης και είναι γνωστό ως σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου, διότι καθορίζει εάν όλες οι αδελφές χρωματίδες είναι σωστά συνδεδεμένες στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου. Δεδομένου ότι ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων κατά τη διάρκεια της ανάφασης είναι ένα μη αναστρέψιμο βήμα, ο κύκλος δεν θα προχωρήσει έως ότου οι κινητοχώροι των

χρωμοσωμάτων συνδεθούν σταθερά σε τουλάχιστον δύο μικροσωληνίσκους της ατράκτου που προέρχονται από αντίθετους πόλους του κυττάρου.

Η έναρξη αλλά και η καταστολή της κυτταρικής διαίρεσης επηρεάζεται από εξωκυτταρικά σήματα όταν πρόκειται να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής. Κάποια τέτοια παραδείγματα που προάγουν την ανάπτυξη είναι ο θάνατος ενός κοντινού κυττάρου, η απελευθέρωση ορμονών και το μέγεθος του κυττάρου, ενώ ο συνωστισμός των κυττάρων μπορεί να αναστείλει την κυτταρική διαίρεση.^[1,36]



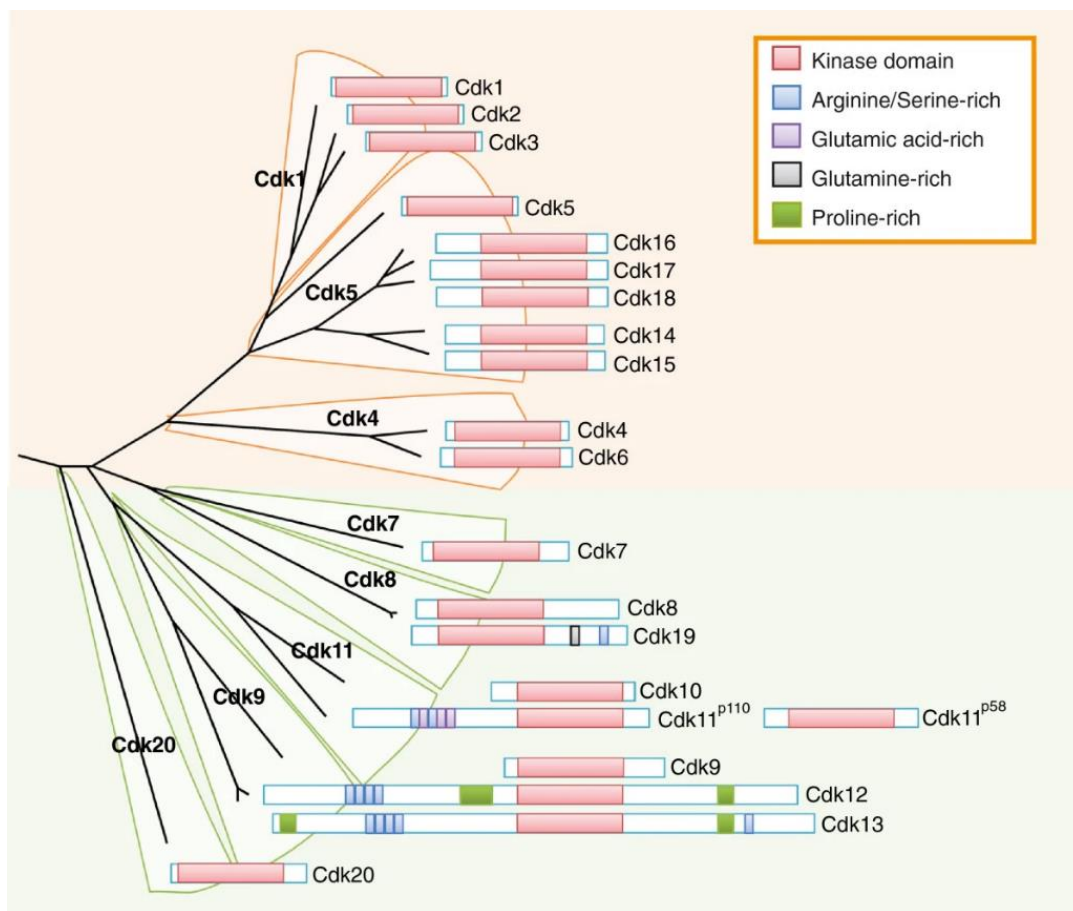
Εικόνα 2.6.: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου.^[37]

2.7 Κυκλινοεξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (CDKs)

Η ταυτοποίηση των κυκλινοεξαρτώμενων πρωτεϊνικών κινασών (CDKs) και των κυκλινών αποτέλεσε αίτιο για την απονομή Βραβείου Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής στους Hartwell, Hunt και Nurse το 2001.^[38] Η καταλυτική υπομονάδα της CDK πρέπει να συσχετιστεί με μια ρυθμιστική υπομονάδα, την κυκλίνη, της οποίας η συγκέντρωση καθορίζεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.^[39] Χωρίς την αντίστοιχη υπομονάδα κυκλίνης, το ένζυμο είναι 40.000 φορές λιγότερο ενεργό από ό,τι στο σύμπλοκο.^[40] Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 26 πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης που σχηματίζουν έναν κλάδο CDKs και τύπου CDKs της υποοικογένειας CMGC του ανθρώπινου κινώματος, από αυτά 21 ταξινομούνται ως CDKs. Οι CDKs έχουν συγκεκριμένους ρόλους σε πολλές πτυχές της κυτταρικής

ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού και μεταγραφικής ρύθμισης ως απόκριση σε εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα.^[38,39]

Οι CDKs μπορούν να χωριστούν σε υποοικογένειες που ρυθμίζουν άμεσα ή έμμεσα τον κυτταρικό κύκλο (CDKs1-6, 11 και 14-18) ή τη γονιδιακή μεταγραφή (CDKs7- 13, 19 και 20). Εκτός από την συμμετοχή τους στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, ανακαλύπτεται συνεχώς πως οι CDKs, οι κυκλίνες και οι CKIs θηλαστικών παίζουν απαραίτητο ρόλο σε διαδικασίες όπως η επιγενετική ρύθμιση (CDK1/2/4), ο μεταβολισμός (CDK5/8), η ανανέωση των βλαστοκυττάρων, οι λειτουργίες των νευρώνων (CDK5/16), η σπερματογένεση (CDK16), η αγγειογένεση, η αιματοποίηση και η επιδιόρθωση του DNA (CDK1/3/9/12). Οι περισσότερες CDKs είναι πρωτεϊνικές κινάσες κατευθυνόμενες από προλίνη που καταλύουν τη φωσφορυλίωση μιας σερίνης ή θρεονίνης κοντά σε ένα κατάλοιπο προλίνης με εξαίρεση την CDK7.^[38,41,42]



Εικόνα 2.7.: Οι υποοικογένειες των CDKs. Απεικονίζεται η συντηρημένη περιοχή πρωτεϊνικής κινάσης και ορισμένες πρόσθετες περιοχές για κάθε CDK που συμμετέχει στον κυτταρικό κύκλο (πορτοκαλί) ή στη μεταγραφή (πράσινο).^[39]

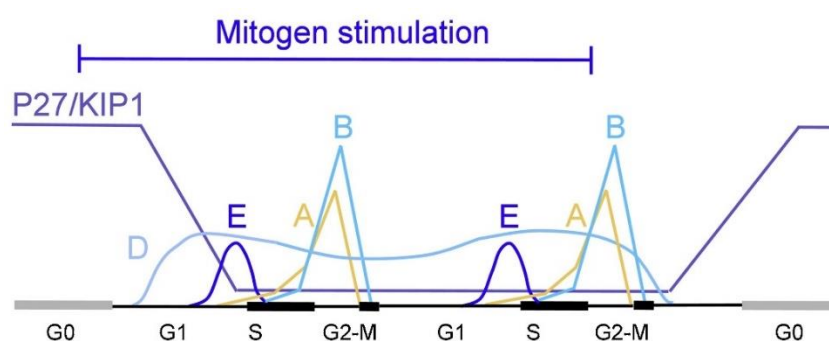
2.7.1 Κυκλίνες

Οι κυκλίνες εκφράζονται σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου και στη συνέχεια αποικοδομούνται από ένα μονοπάτι που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με λιγάσες

ουβικιτίνης (E3s) και πρωτεασώματα. Η έκφραση τους παράγεται από την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων E2F και FOXM που εξαρτώνται από τον κυτταρικό κύκλο. Η αποικοδόμηση των κυκλινών μεσολαβείται από την πρωτεΐνη SCF στην φάση G₁/M και από το σύμπλοκο APC/C που δρα κατά την ανάφαση μέχρι το τέλος της G₁.^[42]

Οι κυκλίνες είναι μια οικογένεια ~30 πρωτεϊνών που ποικίλλουν σε μάζα από 35 έως 90 kDa. Αυτές οι πρωτεΐνες δομούνται από μια περιοχή περίπου 100 κατάλοιπων αμινοξέων που οργανώνονται σε πέντε α-έλικες. Πολλές κυκλίνες έχουν δύο τέτοιες περιοχές (A, B, D, E, F και J), ένα αμινοτελικό τμήμα για σύνδεση με τις CDKs και ένα καρβοξυτελικό τμήμα που συνήθως απαιτείται για τη σωστή αναδίπλωση του μορίου της κυκλίνης. Η περιοχή της κυκλίνης υπάρχει επίσης σε άλλα μόρια, όπως είναι η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (RB) και ο μεταγραφικός παράγοντας TFIIIB τα οποία όμως είναι απίθανο να λειτουργήσουν ως ενεργοποιητές των CDKs. Γενικά, οι κυκλίνες παρουσιάζουν μικρότερη ομοιότητα αλληλουχίας από τις CDKs. Η οικογένεια κυκλινών περιέχει περίπου 29 πρωτεΐνες στον άνθρωπο, συγκεντρωμένες σε 16 υποοικογένειες και τρεις μεγάλες ομάδες.^[39,42]

- ομάδα I (ομάδα κυκλίνης B: A, B, D, E, F, G, J, I και O)
- ομάδα II (ομάδα κυκλίνης Y)
- ομάδα III (ομάδα κυκλίνης C: C, H, K, L και T οι οποίες συμμετέχουν στην μεταγραφή)



Εικόνα 2.8.: Τα επίπεδα των κυκλινών κατά την διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.^[42]

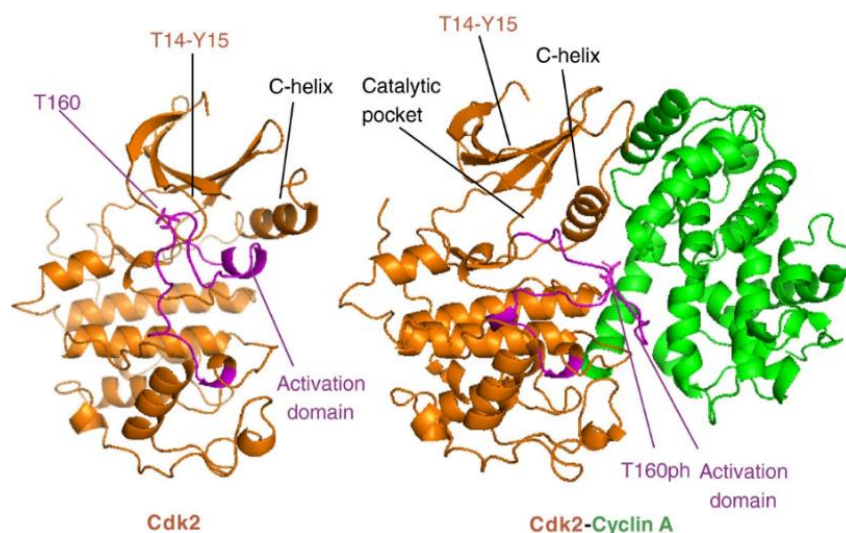
2.7.2 Δομή των CDKs

Οι CDKs κυμαίνονται σε μέγεθος από περίπου 250 κατάλοιπα αμινοξέων (35 kDa) που δομούν την καταλυτική περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης έως πρωτεΐνες με περισσότερα από 1.500 κατάλοιπα, με αμινο- και καρβοξυ- τελικά άκρα μεταβλητού μήκους. Για παράδειγμα, η CDK11 διαθέτει ~800 κατάλοιπα αμινοξέων (110 kDa) και οι CDK12/13 είναι μεγαλύτερες με ~1.500 κατάλοιπα αμινοξέων και μοριακό βάρος περίπου 165 kDa.^[42] Όπως όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες, οι CDKs αποτελούνται από δύο λοβούς όπου ο αμινοτελικός λοβός περιέχει β-φύλλα και ο καρβοξυτελικός λοβός είναι πλούσιος σε α-έλικες, ενώ το ενεργό κέντρο βρίσκεται ενδιάμεσα τους. Ο N-λοβός περιέχει έναν βρόχο πλούσιο σε γλυκίνη και μια κύρια C-έλικα (περιέχει την ακολουθία PSTAIRE στην CDK1). Ο C-λοβός περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης που

εκτείνεται από το μοτίβο DFG (D145 στην CDK2) έως το μοτίβο APE (E172 στην CDK2) και περιλαμβάνει το κατάλοιπο φωσφορυλίωσης (T160 στην CDK2) στον T-Βρόχο. Στην μορφή χωρίς κυκλίνη, η καταλυτική σχισμή της CDK κλείνεται από τον T-βρόχο, αποτρέποντας την ενζυματική δράση της.

Τα μέλη της οικογένειας των CDKs έχουν έναν διατηρημένο καταλυτικό πυρήνα που περιέχει έναν θύλακα δέσμησης ATP, έναν τομέα δέσμησης υπομονάδας κυκλίνης (τύπου PSTAIRE) και ένα μοτίβο ενεργοποίησης T-βρόχου που συμμετέχουν στην ενεργοποίησή τους. Οι CDKs τυπικά απαιτούν σύνδεση με μια υπομονάδα κυκλίνης προκειμένου να γίνουν ενεργές. Η ρύθμιση γίνεται κυρίως μέσω του ελέγχου της παραγωγής και της καταστροφής της κυκλίνης, καθώς η δέσμηση της κυκλίνης εκτοπίζει τον T-βρόχο, εκθέτοντας τη θέση δέσμησης του υποστρώματος και ευθυγραμμίζοντας εκ νέου κρίσιμα κατάλοιπα που ενεργοποιούν την κινάση.^[38,39]

Εκτός από τα ρυθμιστικά αποτελέσματα της δέσμησης κυκλίνης, η φωσφορυλίωση σε συντηρημένα κατάλοιπα θρεονίνης και τυροσίνης συντονίζει, επίσης, τη ενεργότητα των CDKs ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Οι περισσότερες CDKs έχουν κατασταλτικές θέσεις φωσφορυλίωσης στον P-βρόχο που όταν φωσφορυλιώνονται παρεμποδίζουν τη δέσμηση του ATP στην καταλυτική θέση. Οι πρωτεϊνικές κινάσες Wee1 και Myt1 φωσφορυλιώνουν την τυροσίνη-15 και/ή την θρεονίνη-14 της CDK1 και η αποφωσφορυλίωση σε αυτές τις θέσεις από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες της οικογένειας Cdc25 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή της.^[38,39] Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της T161 (T172 στη CDK4 και T160 στη CDK2) του T-βρόχου από κινάσες που ενεργοποιούν τις CDKs (CDK7-κυκλίνη H, CAKs) βελτιώνει τη σύνδεση του υποστρώματος και τη σταθερότητα του συμπλόκου για την πλήρη ενεργοποίηση της CDK. Οι CDK4/6 έχουν στενή εξειδίκευση υποστρώματος, ενώ οι CDK1/2 έχουν ευρεία εξειδίκευση.^[41]



Εικόνα 2.9.: Απεικόνιση της δομής και της ενεργοποίησης μιας CDK. Στην CDK2 (αριστερά) η κύρια C-έλικα (N-λοβός) και η περιοχή ενεργοποίησης είναι κοντά, διασφαλίζοντας ότι ο καταλυτικός θύλακας δεν είναι προσβάσιμος. Κατά τη δέσμηση της κυκλίνης A (δεξιά), η C-έλικα και η περιοχή ενεργοποίησης απομακρύνονται, μια διαμόρφωση που σταθεροποιείται περαιτέρω με φωσφορυλίωση του καταλοίπου T160, καθιστώντας τον καταλυτικό θύλακα προσβάσιμο για ενζυματική δράση.^[39]

2.7.3 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τις CDKs

Ο μηχανισμός για τον έλεγχο της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου περιλαμβάνει περισσότερες από 32.000 αντιδράσεις φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης που καταλύονται από τις πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, όπως αποδεικνύεται με πειράματα φασματομετρίας μάζας.^[42] Η διέλευση από μια φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη καθορίζεται από διαφορετικές κυτταρικές πρωτεΐνες. Οι βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες είναι οι CDKs που ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα σημεία του κυτταρικού κύκλου (G₁: CDK4, CDK6 και CDK2, S: CDK2 και G₂ και M: CDK1). Όταν ενεργοποιηθούν αυτές οι πρωτεϊνικές κινάσες με την σύνδεση τους με τις αντίστοιχες κυκλίνες που αποτελούν ρυθμιστικές υπομονάδες τους, τότε επάγονται φωσφορυλίώσεις επιλεγμένων πρωτεϊνών. Η CDK7 δρα σε συνδυασμό με την κυκλίνη Η ως κινάση ενεργοποίησης (CAK). Τα επίπεδα των CDKs παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, σε αντίθεση με τις κυκλίνες που αυξάνονται ή μειώνονται ώστε να ενεργοποιούν περιοδικά τις CDKs.

Απαιτούνται διαφορετικές κυκλίνες σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Οι κυκλίνες τύπου D (D1, D2, D3) συνδέονται με τις CDK4 και CDK6 και συμμετέχουν στην έναρξη της φάσης G₁. Σε αντίθεση με τις άλλες κυκλίνες, οι κυκλίνες D συντίθεται μετά από διέγερση από αυξητικούς παράγοντες. Μια άλλη κυκλίνη G₁ είναι η κυκλίνη E η οποία συνδέεται με την CDK2 για να ρυθμίσει την μετάβαση από την φάση G₁ στη φάση S. Η κυκλίνη A συνδέεται με την CDK2 στην φάση S. Στο τέλος της φάσης G₂ και στην αρχή της M, η κυκλίνη A συνδέεται με την CDK1 για να προωθήσει την είσοδο στην M. Η μίτωση ρυθμίζεται περαιτέρω από την κυκλίνη B σε σύμπλοκο με την CDK1.^[38,43]

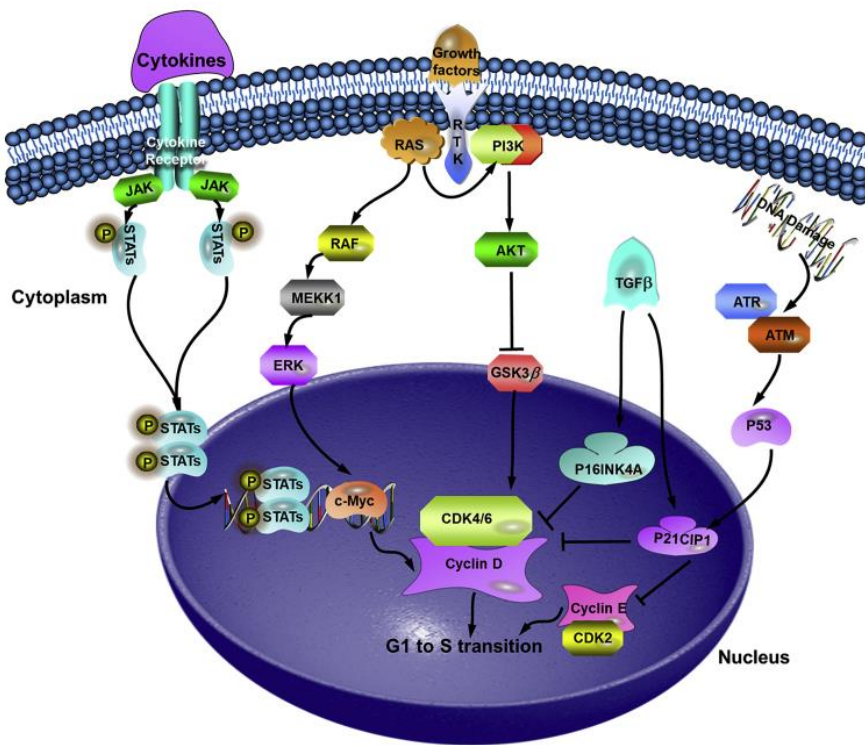
CDK	Cyclin	Cell cycle phase activity
CDK4	Cyclin D1, D2, D3	G ₁ phase
CDK6	Cyclin D1, D2, D3	G ₁ phase
CDK2	Cyclin E	G ₁ /S phase transition
CDK2	Cyclin A	S phase
CDK1 (cdc2)	Cyclin A	G ₂ /M phase transition
CDK1 (cdc2)	Cyclin B	Mitosis
CDK7	Cyclin H	CAK, all cell cycle phases

Πίνακας 2.1.: Τα σύμπλοκα CDK-κυκλίνη που ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα στάδια του κυτταρικού κύκλου.^[43]

Σε φυσιολογικά κύτταρα, ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζεται από αυξητικούς παράγοντες και ορμόνες ωθώντας τα κύτταρα από μια φάση ηρεμίας, G₀, σε κατάσταση ενεργού κύκλου. Η διέγερση των μονοπατιών που εξαρτώνται από τη RAS και τις RHO, η ενεργοποίηση του μονοπατιού mTOR και η ενεργοποίηση υποδοχέων στεροειδών μπορούν να προκαλέσουν έναρξη του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση της ERK1/2 προάγει τη μεταγραφή των κυκλινών D (D1, D2 και D3) που συνδέονται με τις CDK4 και CDK6 για να δημιουργήσουν σύμπλοκα που φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος RB (που κωδικοποιείται από το RB1) καθώς και των

συγγενών πρωτεϊνών p107 (RBL1) και p130 (RBL2). Με αποτέλεσμα, το διαχωρισμό των HDAC1 και των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας E2F από την RB, επιτρέποντας την ακετυλίωση ιστόνης και την ενεργοποιημένη μεταγραφή πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της κυκλίνης E, της κυκλίνης A και της κυκλίνης B.

Η πρωτεΐνη RB υπάρχει σε υποφωσφορυλιωμένη μορφή στα κύτταρα στη φάση ηρεμίας και προσδένεται στους μεταγραφικούς παράγοντες E2F καταστέλλοντας την μεταγραφή των γονιδίων. Από την δράση των συμπλόκων CDK4/6-κυκλίνη D η RB μπορεί να μονοφωσφορυλιωθεί σε οποιαδήποτε από τις 14 πιθανές θέσεις της, ενώ με την ενεργοποίηση του συμπλόκου CDK2-κυκλίνη E φωσφορυλιώνονται και οι υπόλοιπες θέσεις για να επιτραπεί η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου με την RB να παραμένει φωσφορυλιωμένη σε όλες τις φάσεις S, G₂ και M. Στο τέλος της μίτωσης αποφωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (PP1). Η CDK4/6 φωσφορυλιώνει, επίσης, τον μεταγραφικό παράγοντα FOXM1 που απαιτείται για την έκφραση βασικών γονιδίων που ρυθμίζουν την εξέλιξη της φάσης G₁/S, όπως τα CCNE1, CCNE2, E2F2, MCM2, MCM10 και CDT1. Από την άλλη πλευρά, η κυκλίνη C/CDK3 φωσφορυλιώνει την RB για να ωθήσει τα κύτταρα στη φάση S από τη φάση G₀. Τα κύτταρα εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο και εισέρχονται στην αναστρέψιμη ή μόνιμη φάση G₀, που επίσης ρυθμίζεται από την κυκλίνη C/CDK3.^[38,44]

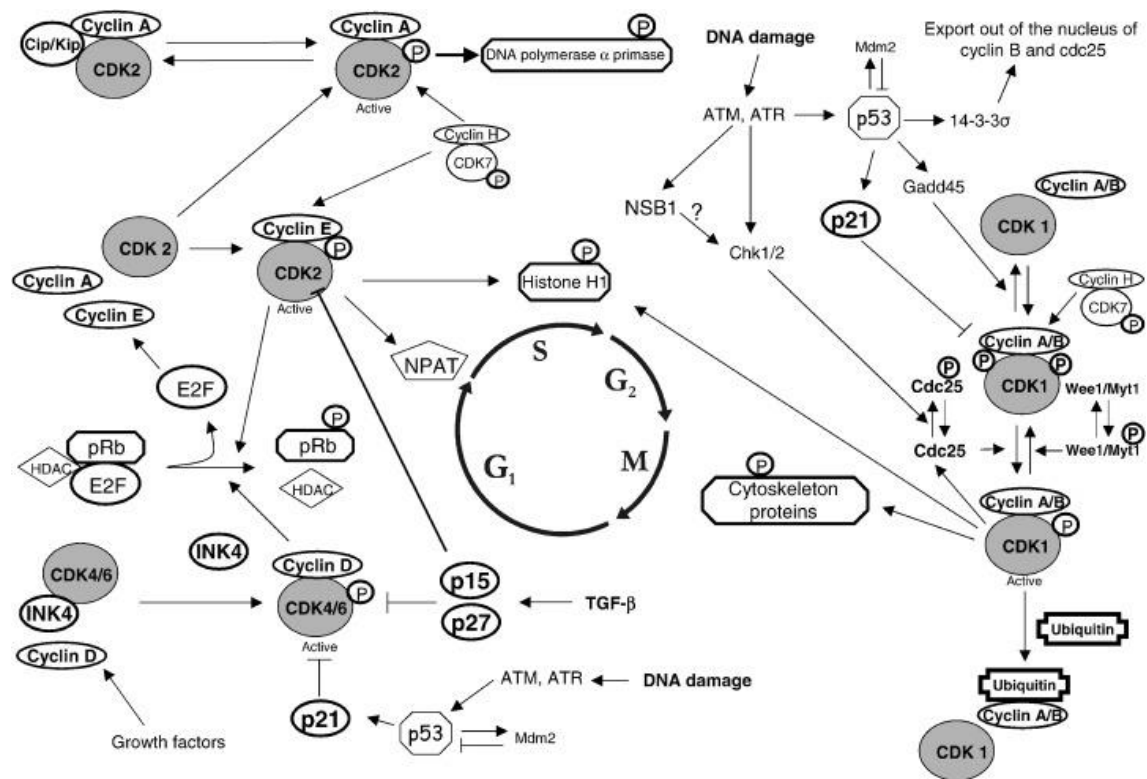


Εικόνα 2.10.: Ρύθμιση του συμπλόκου κυκλίνης D-CDK4/6. Μπορεί να ενεργοποιηθεί από τις οδούς σηματοδότησης JAK–STATs, PI3K–AKT και RAS–RAF–ERK, ενώ μπορεί να ανασταλεί από το P16INK4A και με τη μεσολάβηση της οδού σηματοδότησης P53 μέσω του P21CIP1.^[14]

Με την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων E2F1 και FOXM1 από τις CDK4/6 προκύπτει αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν τις κυκλίνες E1 και E2, οι οποίες σχηματίζοντας σύμπλοκα με την CDK2 φωσφορυλιώνουν περαιτέρω την

RB. Ο E2F1 διεγείρει, επίσης, τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή του DNA, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης της κυκλίνης A, η οποία συσσωρεύεται κατά τη φάση S και γίνεται η κυρίαρχη κυκλίνη που συνδέεται με την CDK2. Η CDK2 φωσφορυλιώνει έναν αριθμό πρόσθετων υποστρωμάτων όπως NPAT, CDC6 και E2F1. Συγκεκριμένα, ενώ τα σύμπλοκα CDK2-κυκλίνης E προάγουν την είσοδο στη φάση S μέσω φωσφορυλίωσης της RB και NPAT, τα σύμπλοκα CDK2-κυκλίνης A βοηθούν στον τερματισμό της φάσης S φωσφορυλιώνοντας τα CDC6 και E2F1.

Στο τέλος της φάσης S/G₂ η κυκλίνη A δημιουργεί σύμπλοκα με την CDK1 που ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες FOXM1 και FOXK2. Αυτή η δράση συνεχίζεται από τα σύμπλοκα CDK1/κυκλίνη B προάγοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην εξέλιξη της μίτωσης. Το mRNA της κυκλίνης B και η πρωτεΐνη αυξάνονται κατά τη φάση G₂ του κυτταρικού κύκλου, αλλά καταστρέφονται κατά τη μίτωση στη μετάβαση μετάφασης-ανάφασης. Τα CDK1-κυκλίνη B φωσφορυλιώνουν τη πυρηνική λαμίνη οδηγώντας σε διάσπαση του πυρηνικού φακέλου και την νουκλεολίνη που ρυθμίζει τον πυρηνικό κατακερματισμό και την οργάνωση. Έτσι, η δράση της CDK1 είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της προόδου του κυτταρικού κύκλου, διασφαλίζοντας ότι τα κρίσιμα συμβάντα συμβαίνουν με τη σωστή σειρά, ώστε η κυτταρική αντιγραφή να προχωρά με υψηλή ακρίβεια. Η CDK1 έχει, επίσης, εμπλακεί στην απόκριση σε βλάβες του DNA.^[38]



Εικόνα 2.11.: Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου από τις CDKs.^[43]

2.7.4 Αναστολείς των CDKs (CKIs)

Η δράση των CDKs ρυθμίζεται από κατασταλτικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου που ονομάζονται αναστολείς των CDKs (CKIs) και συνδέονται με την CDK ή με το σύμπλοκο CDK-κυκλίνης. Έχουν ανακαλυφθεί δύο ξεχωριστές οικογένειες αναστολέων των CDKs, η οικογένεια INK4 και η οικογένεια Cip/Kip. Η οικογένεια INK4 περιλαμβάνει τις p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) και p19 (INK4d) που προσδένονται ειδικά στις CDK4 και CDK6 και καταστέλλουν την φάση G₁. Αυτοί οι CKIs σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με την CDK πριν από τη δέσμευση της κυκλίνης, αποτρέποντας τη σύνδεση με την κυκλίνη D.^[43]

Η οικογένεια Cip/Kip περιλαμβάνει τις p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) και p57 (Kip2) που προσδένονται ταυτόχρονα σε κυκλίνες και κινάσες. Καταστέλλουν τα σύμπλοκα CDK2-κυκλίνη E και CDK2-κυκλίνη A εμποδίζοντας την είσοδο στην φάση S και την εξέλιξη της για την είσοδο στην φάση G₂. Η p21 αναστέλλει, επίσης, τη σύνθεση του DNA δεσμεύοντας και αναστέλλοντας το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA). Η έκφραση της p21 βρίσκεται υπό μεταγραφικό έλεγχο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Ο υποκινητής του γονιδίου p21 περιέχει μια θέση δέσμευσης p53, η οποία επιτρέπει στο p53 να ενεργοποιεί μεταγραφικά το γονίδιο p21. Η έκφραση και η ενεργοποίηση των p15 και p27 αυξάνεται σε απόκριση στον μετασχηματιστικό αυξητικό παράγοντα β (TGF-β), συμβάλλοντας στη διακοπή της ανάπτυξης.^[43]

Καταστολέας (CKI)	Μέλη της οικογένειας	CDK ή σύμπλοκο CDK-κυκλίνης	Φάση του κυτταρικού κύκλου που καταστέλλεται
Οικογένεια INK4	p15, p16, p18, p19	CDK4 και CDK6	G ₁
Οικογένεια Cip/Kip	p21, p27, p57	CDK2-κυκλίνη E CDK2-κυκλίνη A	G ₁ S, G ₂

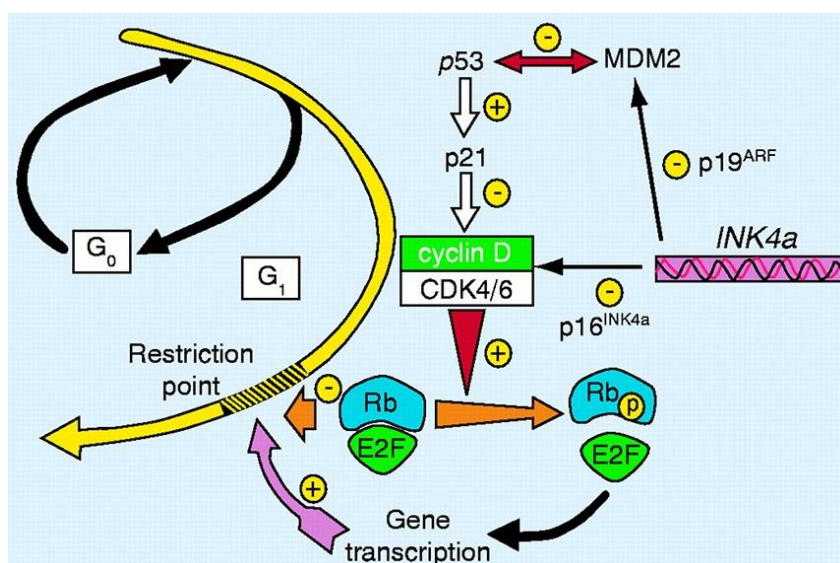
Πίνακας 2.2.: Οι αναστολείς των CDKs (CKIs).^[1,43]

2.7.5 Σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA

Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μπορεί να είναι επιβλαβής για το κύτταρο, εάν το DNA υποστεί βλάβη με οξείδωση, αλκυλίωση ή υδρόλυση των βάσεων του από ενδογενείς διεργασίες ή ως αποτέλεσμα ακτινοβολίας ή θεραπείας με κυτταροτοξικά φάρμακα.^[42] Στον κυτταρικό κύκλο υπάρχουν σημεία ελέγχου για να εξασφαλίζεται η αλληλουχία των γεγονότων του, όπως είναι τα σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA και το σημείο ελέγχου της συγκρότησης της ατράκτου. Ως απόκριση σε βλάβες του DNA, τα σημεία ελέγχου διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο προκειμένου να παρέχουν χρόνο

για την επιδιόρθωση των βλαβών προτού συνεχιστεί η αντιγραφή του DNA ή η κυτταρική διαίρεση. Τα σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA τοποθετούνται πριν το κύτταρο εισέλθει στη φάση S (σημείο ελέγχου G₁/S) ή μετά την αντιγραφή του DNA (σημείο ελέγχου G₂/M), ενώ φαίνεται να υπάρχουν σημεία ελέγχου βλαβών στο DNA κατά τη διάρκεια των φάσεων S και M.

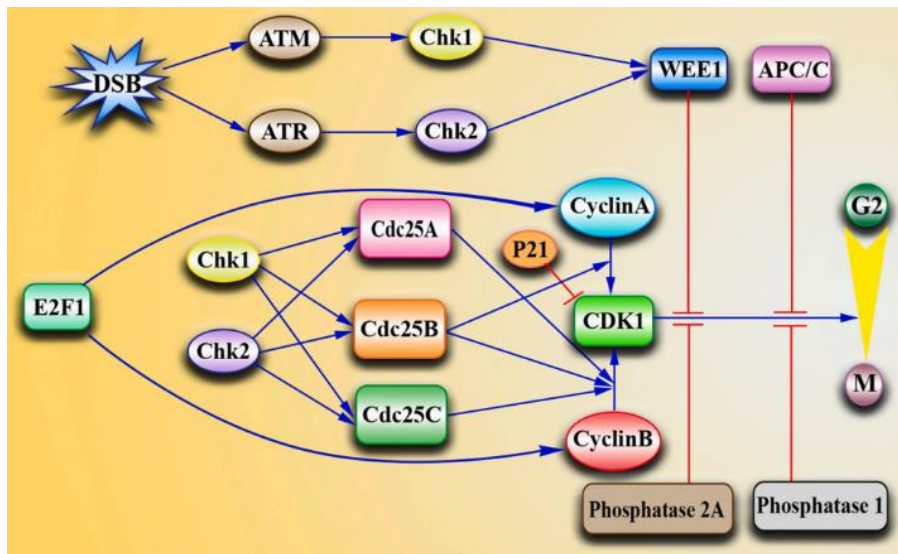
Στο σημείο ελέγχου G₁/S, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από βλάβες του DNA εξαρτάται από την πρωτεΐνη p53. Συνήθως, η συγκέντρωση της p53 είναι χαμηλή αλλά η βλάβη του DNA μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία επαγωγή της δράσης της. Η p53 διεγείρει τη μεταγραφή των γονιδίων *p21*, *Mdm2* και *Bax*. Η επαγωγή της πρωτεΐνης p21, ενός CKI της οικογένειας Cip/Kip, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή των CDK4/6,2 και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, αποτρέποντας την αντιγραφή του κατεστραμμένου DNA. Η καταστολή των κινασών αποτρέπει τη φωσφορυλίωση της RB και το κύτταρο παραμένει στην G₁ μέχρι την επιδιόρθωση του DNA. Η Mdm2 αναστέλλει την p53 και συμβάλλει στην εξαγωγή της από τον πυρήνα και την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της. Ενώ, η πρωτεΐνη p19^{ARF} συνδέεται με την Mdm2 αποτρέποντας την πρωτεόλυση της p53. Στην περίπτωση των κυττάρων που έχουν υποστεί σοβαρή βλάβη, η p53 προκαλεί κυτταρικό θάνατο ενεργοποιώντας γονίδια που συμμετέχουν στην απόπτωση (π.χ. *Bax*, *Fas*). Διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούνται ως απόκριση σε βλάβες στο DNA όπως είναι οι ATM και οι ATR. Αυτές οι κινάσες φωσφορυλιώνουν την p53 με αποτέλεσμα η p21 να προκαλεί διακοπή του κυτταρικού κύκλου.^[43,45]



Εικόνα 2.12.: Η οδός p53-RB στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.^[45]

Η πιο σοβαρή βλάβη που μπορεί να συμβεί είναι οι δίκλωνες ρήξεις του DNA (DSB) που ενεργοποιούν την κινάση ATM. Άλλοι τύποι βλαβών περιλαμβάνουν το σπάσιμο ενός κλώνου (SSB) και αλλαγές στη δομή των νουκλεοτιδίων και ενεργοποιούν την κινάση ATR. Η είσοδος στη μίτωση διακόπτεται με τη διατήρηση της CDK1 στην κατασταλτική της μορφή μέσω κατασταλτικής φωσφορυλίωσης ή με απομόνωση του συμπλόκου CDK1-κυκλίνης B έξω από τον πυρήνα. Αυτό επιτυγχάνεται από τις κινάσες σημείου ελέγχου CHK1 και CHK2, οι οποίες όταν ενεργοποιούνται με

φωσφορυλίωση από τις κινάσες ATM και ATR φωσφορυλιώνουν την Cdc25. Η κατασταλτική φωσφορυλίωση της Cdc25 εμποδίζει την ενεργοποίηση του συμπλόκου CDK1-κυκλίνη B και την είσοδο στην μίτωση. Επιπλέον, οι CHK1 και CHK2 προκαλούν διακοπή του κυτταρικού κύκλου λόγω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της WEE1 που αναστέλλει την CDK1. Οι ATM και ATR θα συνεχίσουν να ενεργοποιούν την WEE1 μέχρι να ολοκληρωθεί η αντιγραφή του DNA. Αυτή η διαδικασία κάνει την καταστολή της φάσης M να εξαρτάται από την ολοκλήρωση της φάσης G₂. Η p53 μπορεί επίσης να παίξει ρόλο στη ρύθμιση του σημείου ελέγχου G₂/M. Η αύξηση της έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη μεταγραφή του p21 και του 14-3-3 σ. Η αυξημένη δέσμευση της κυκλίνης B στην 14-3-3 σ την αποκλείει από τον πυρήνα. Η p53 μεσολαβεί, επίσης, στη διάσπαση του συμπλόκου CDK1-κυκλίνης B1 μέσω επαγωγής του Gadd45.^[43,45]



Εικόνα 2.13.: Ρυθμιστικός μηχανισμός μετάβασης G₂/M.^[46]

2.7.6 Ρύθμιση της μεταγραφής από τις CDKs

Η RNA πολυμεράση II είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Για να πραγματοποιηθεί η μεταγραφή, η RNA πολυμεράση II πρέπει να στρατολογηθεί και στη συνέχεια να εξέλθει από τον υποκινητή του γονιδίου. Αυτή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί τροποποίηση της χρωματίνης, την πρόσληψη μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με την αλληλουχία και την τροποποίηση του μεταγραφικού μηχανισμού μετά τη μετάφραση. Στην καρβοξυτελική επικράτεια της μεγαλύτερης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II επαναλαμβάνεται μια αμινοξική αλληλουχία (CTD). Η CTD περιλαμβάνει διαδοχικές επαναλήψεις (26 στον σακχαρομύκητα και 52 στον άνθρωπο) ενός πεπτιδίου επτά αμινοξέων με αλληλουχία YSPTSPS. Η CTD δεν απαιτείται για την καταλυτική δράση της πολυμεράσης, αλλά παίζει βασικό ρόλο στην επεξεργασία του RNA και στην οργάνωση της χρωματίνης αλληλοεπιδρώντας με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Το επταπεπτίδιο μπορεί να φωσφορυλιωθεί στα Tyr1, Ser2, Thr4, Ser5 και

Ser7 και για αυτό αποτελεί στόχο για πολλές κινάσες, φωσφατάσες και μετα-μεταφραστικά τροποποιητικά ένζυμα.

Όταν η RNA πολυμεράση II στρατολογείται πάνω στον υποκινητή, ακολουθεί φωσφορυλίωση των Ser5 και Ser7 πριν ξεκινήσει η μεταγραφή. Μετά την έναρξη της μεταγραφής, η φωσφορυλίωση της Ser5 μειώνεται, ενώ η φωσφορυλίωση των Ser2 και Tyr1 αυξάνεται. Όταν η μεταγραφή ολοκληρώνεται, η Tyr1 είναι το πρώτο κατάλοιπο που αποφωσφορυλιώνεται, ακολουθούμενο από τα Ser5, Ser7 και Ser2. Παρόμοιο μοτίβο φωσφορυλίωσης εμφανίζεται σε ανώτερους ευκαρυώτες, αν και πιθανώς με εξαίρεση την τροποποίηση της Tyr1. Οι κινάσες που φωσφορυλιώνουν την CTD έχουν ταυτοποιηθεί και περιλαμβάνουν CDKs.

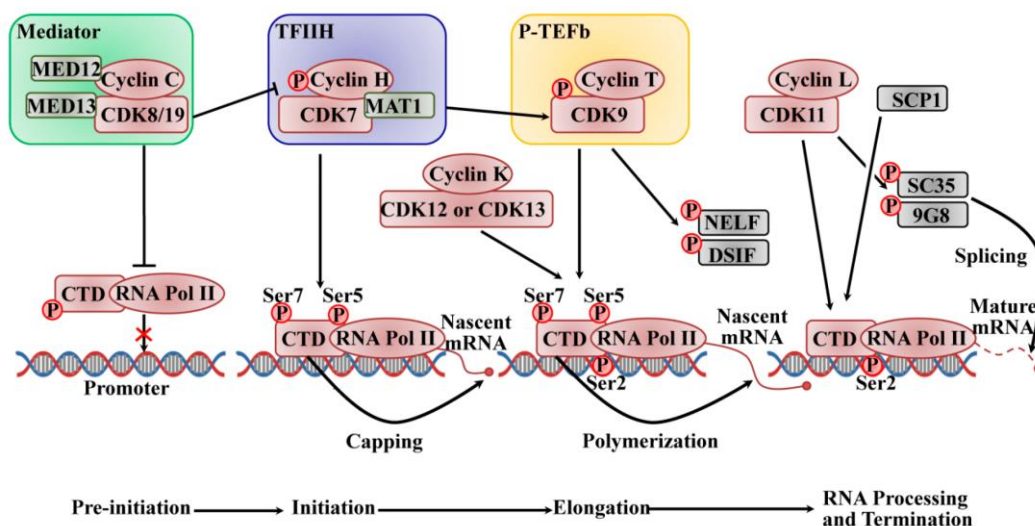
Το ενεργό ένζυμο CDK7 δεσμεύει την κυκλίνη H και μια πρωτεΐνη MAT1 για να σχηματίσει μια υπομονάδα του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIF. Η RNA πολυμεράση II αλληλεπιδρά με γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (Διαμεσολαβητής) στη περιοχή του υποκινητή για την έναρξη της μεταγραφής. Η πρόσδεση του TFIIF στον υποκινητή ξεκινά τον σχηματισμό του μεταγραφικού συμπλόκου που ακολουθείται από την στρατολόγηση επιπρόσθετων γενικών μεταγραφικών παραγόντων και της RNA πολυμεράσης II. Ο TFIIF στρατολογείται τελευταίος και οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του συμπλόκου ώστε να τοποθετηθεί το μονόκλωνο DNA στη δραστική θέση της RNA πολυμεράσης II. Στην συνέχεια, απαιτείται η δράση της κινάσης της υπομονάδας CDK7 του TFIIF για να οδηγήσει στην αποδέσμευση της πολυμεράσης από το προεναρκτήριο σύμπλοκο και την έναρξη της μεταγραφής. Η CDK7 κυρίως φωσφορυλιώνει την Ser5 της CTD, αλλά μπορεί επίσης να φωσφορυλιώσει την Ser7. Η φωσφορυλιωμένη πλέον CTD αλληλοεπιδρά με παράγοντες επιμήκυνσης και ωρίμανσης του mRNA.

Μετά την έναρξη της μεταγραφής, η RNA πολυμεράση II συνθέτει ένα μικρό τμήμα RNA και σταματά κοντά στην αρχή του γονιδίου εξαιτίας αρνητικών ρυθμιστικών παραγόντων. Η συνέχιση της μεταγραφής απαιτεί τον θετικό παράγοντα επιμήκυνσης της μεταγραφής b (p-TEFb). Αυτός ο παράγοντας έχει μια υπομονάδα CDK9 που φωσφορυλιώνει την Ser2 της CTD καθώς και τον αρνητικό παράγοντα επιμήκυνσης (NELF) και τον παράγοντα επαγωγής ευαισθησίας DRB (DSIF) με αποτέλεσμα την συνέχιση της μεταγραφής και την επιμήκυνση του μεταγράφου. Η CDK9 σχηματίζει σύμπλοκα με τις κυκλίνες T1, T2a, T2b και K. Εκτός από τη σύνδεση με μια κυκλίνη, η CDK9 πρέπει να φωσφορυλιωθεί σε ένα κατάλοιπο του βρόχου ενεργοποίησης (Thr186) για να δράσει. Διάφορες κινάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν την CDK9 όπως είναι η CDK7.^[38]

Οι CDK12/13 έχει προταθεί ότι έχουν παρόμοια δράση με την CDK9, ενώ η CDK12 έχει συσχετιστεί με τη ρύθμιση ενός συνόλου γονιδίων που απαιτούνται για την κυτταρική απόκριση σε βλάβες του DNA. Η CDK9 φωσφορυλιώνει την Ser2 νωρίς στη μεταγραφή και στη συνέχεια μεταβιβάζει το ρόλο της στην CDK12 για το μεγαλύτερο μέρος της φάσης επιμήκυνσης. Επίσης, η απώλεια των CDK12 και CDK13 ή του συμπλόκου με την κυκλίνη K εμπόδιζε όχι μόνο την πρόοδο της RNA πολυμεράσης II αλλά και την επεξεργασία του RNA.

Ένα σύμπλοκο τεσσάρων υπομονάδων που περιλαμβάνει CDK8, κυκλίνη C και τις υπομονάδες του Διαμεσολαβητή, MED12 και MED13, συνδέεται με τον Διαμεσολαβητή για τη ρύθμιση της μεταγραφής. Οι CDK8/19 φωσφορυλιώνουν την κυκλίνη H με αποτέλεσμα να ρυθμίζουν αρνητικά τη δράση του TFIID και φωσφορυλιώνουν την CTD της πολυμεράσης για να εμποδίσουν τη δέσμευσή της στο DNA του υποκινητή αναστέλλοντας τον σχηματισμό του προεναρκτηρίου συμπλόκου PIC. Η CDK8 απαιτείται για τη στρατολόγηση παραγόντων επιμήκυνσης και τη δέσμευσή τους στην RNA πολυμεράση II, ώστε συνεχιστεί η μεταγραφή. Η φωσφορυλίωση από την CDK8 μπορεί να αλλάξει άμεσα τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων ή να επισημάνει τους παράγοντες για αποικοδόμηση. Ωστόσο, τα σπονδυλωτά εκφράζουν τις υπομονάδες CDK19, MED12L και MED13L αναλογικά με τις CDK8, MED12 και MED13. Παρά τον υψηλό βαθμό ομοιότητας αλληλουχίας, οι CDK8 και CDK19 μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με διαφορετικά σύμπλοκα *in vitro* και φαίνεται να εκτελούν ορισμένους διακριτούς ρόλους *in vivo*.

Το σύμπλοκο CDK11-κυκλίνη L συμμετέχει στην επιμήκυνση της μεταγραφής μέσω της αλληλεπίδρασης με μια ποικιλία παραγόντων επιμήκυνσης, όπως ELL2, TFIIF και TFIIS. Επιπλέον, εμπλέκεται στη ρύθμιση του ματίσματος RNA μέσω φωσφορυλίωσης παραγόντων ματίσματος του προ-mRNA, όπως SC35 (Srfs2) και 9G8 (Srfs7).^[38,44]



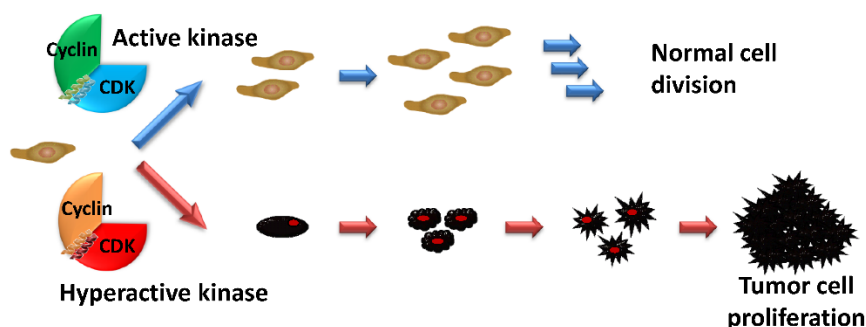
Εικόνα 2.14.: Τα σύμπλοκα CDKs-κυκλίνης ρυθμίζουν τον κύκλο μεταγραφής.^[44]

2.8 Απορυθμισμένη δράση ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου

Οι κινάσες αποτελούν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και δεδομένης της άμεσης σχέσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με την ανάπτυξη του όγκου έχουν εμπλακεί στους περισσότερους τύπους καρκίνου.^[47] Η λανθασμένη ρύθμιση των κινασών του κυτταρικού κύκλου μπορεί να οδηγήσει σε τουλάχιστον δύο αποτελέσματα που σχετίζονται με τον καρκίνο: απρογραμματιστό πολλαπλασιασμό και ανώμαλη κυτταρική διαίρεση που οδηγεί σε γονιδιωματική αστάθεια. Η απορρύθμιση σε κάποιο στάδιο του κυτταρικού κύκλου ή της μεταγραφής, εάν δεν εντοπιστεί και διορθωθεί

άμεσα από τις κινάσες, μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά ασθενειών, όπως ο καρκίνος, νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος Alzheimer και Parkinson) και εγκεφαλικό επεισόδιο.^[40,48,49]

Τα σύμπλοκα CDKs-κυκλίνης είναι απορυθμισμένα σε αρκετούς ανθρώπινους καρκίνους, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε αυξημένη δράση των CDKs έχουν αναφερθεί σε διάφορες μορφές καρκίνου και προκαλούν κυτταρική ανάπτυξη, ενώ μεταλλάξεις που αδρανοποιούν ρυθμιστές σημείων ελέγχου, γονίδια καταστολής όγκου ή CKIs οδηγούν σε απώλεια της καταστολής του κυτταρικού κύκλου. Η ανεξέλεγκτη δράση των συμπλόκων CDKs-κυκλίνης μπορεί να προκύψει από πολλές αιτίες, όπως γονιδιακή υπερέκφραση είτε της υπομονάδας CDK είτε της κυκλίνης. Εάν μια μετάλλαξη επηρεάζει το σύστημα διόρθωσης σφαλμάτων μέσα στο κύτταρο, προκαλεί την ανεξέλεγκτη παραγωγή αλλοιωμένων κυττάρων, τα οποία μεταναστεύουν και διαταράσσουν τα υγιή κύτταρα καταλήγοντας τελικά σε όγκο. Από πολλούς καταστολείς που είναι γνωστό ότι μεταβάλλονται κατά την καρκινογένεση, δύο από αυτούς που φαίνεται να έχουν μεγάλη σημασία είναι τα γονίδια του ρετινοβλαστώματος (RB) και της p53.^[40,49]



Εικόνα 2.15.: Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογικής και μη κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης που ρυθμίζεται από τις CDKs.^[49]

Το σύμπλοκο CDK1-κυκλίνης B είναι μία από τις λιγότερο μεταλλαγμένες κινάσες σε ανθρώπινους καρκίνους. Μία μετάλλαξη της CDK1 έχει αναφερθεί για καρκίνωμα ωοθηκών στη θέση 73 (ασπαρτικό οξύ προς ιστιδίνη). Η υπερέκφραση της έχει αναφερθεί σε λέμφωμα, προχωρημένο μελάνωμα και καρκίνο του πνεύμονα. Η υπερέκφραση της κυκλίνης B1 έχει περιγραφεί σε αρκετούς καρκίνους, όπως μαστού, παχέος εντέρου, στομάχου, προστάτη, θυρεοειδούς και NSCLC.

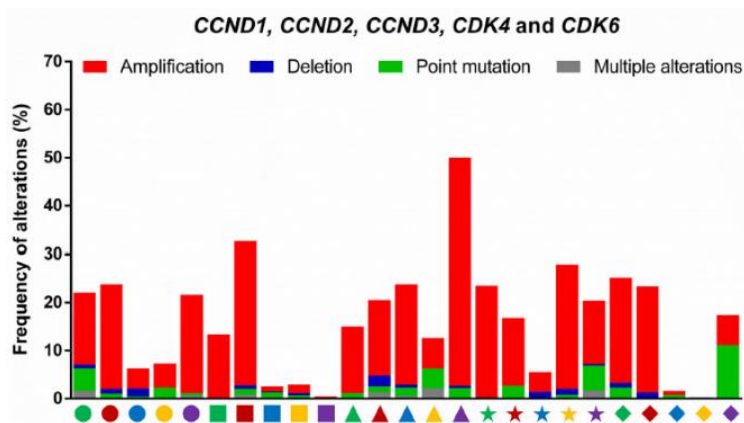
Η υπερέκφραση της CDK2 έχει αναφερθεί σε καρκίνο του λάρυγγα, προχωρημένο μελάνωμα και καρκίνο του μαστού, ενώ 33 μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί για αυτή, οι περισσότερες από τις οποίες είναι μεταλλάξεις στον N-λοβό (θέση 2, 13, 20, 34, 45, 68, 84). Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη δράση της CDK2 σχετίζεται με την υπερέκφραση των κυκλινών A και E σε καρκίνο του μαστού, καρκίνωμα ωοθηκών, καρκίνωμα πνεύμονα, θυρεοειδούς και μελάνωμα. Υψηλά επίπεδα κυκλίνης E στον πυρήνα έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και χαμηλού μοριακού βάρους μορφές κυκλίνης E αναφέρεται ότι είναι υπεύθυνες για την υπερενεργοποίηση της CDK2 στον καρκίνο του μαστού και το μελάνωμα. Η

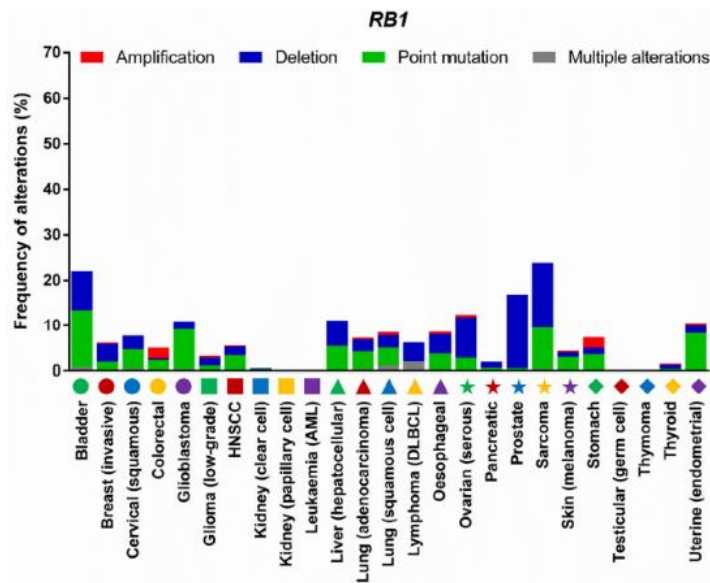
υπερέκφραση της κυκλίνης E έχει περαιτέρω περιγραφεί σε λευχαιμίες, οστεοσάρκωμα, καρκίνο του παγκρέατος και NSCLC.^[49]

Οι κυκλίνες D1, D2 και D3 καθώς και η CDK4 και η CDK6 υπερεκφράζονται σε διάφορους τύπους όγκων. Η απορρύθμιση των CDK4/6 που συνδέονται με κυκλίνες D έχει ως αποτέλεσμα υπερφωσφορυλίωση της RB και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αρκετά μονοπάτια σηματοδότησης, όπως η κινάση janus (JAK) – μετατροπείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STATs), 3-υδροξυκινάση φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) – πρωτεϊνική κινάση B (AKT) και RAS-RAF-εξωκυτταρικές ρυθμιζόμενες πρωτεϊνικές κινάσες (ERK) επάγουν την υπερέκφραση της κυκλίνης D και προάγουν τη δράση των CDK4/6.^[14]

Αντίθετα, η απενεργοποίηση των αναστολέων CDKs αφαιρεί το κύριο ανασταλτικό φρένο στην οδό CDK4/6–RB. Η υπερέκφραση της CDK4 έχει αναφερθεί στο μελάνωμα, στον καρκίνο του πνεύμονα και στο λέμφωμα. Οι γενετικές μεταλλάξεις του μονοπατιού pRB/CDK4/κυκλίνη D/p16^{INK4a} είναι οι πιο κοινές σε περισσότερους από τους μισούς ανθρώπινους όγκους. Η αδρανοποίηση της p16^{INK4a} μετά από διαγραφή ή μετάλλαξη του γονιδίου που κωδικοποιεί αυτόν τον αναστολέα του CDK4-κυκλίνη D είναι μία από τις πιο συχνές μεταλλάξεις σε ανθρώπινους καρκίνους και έχει ως αποτέλεσμα ελαττωματική καταστολή της CDK4. Ομοίως, η μετάλλαξη CDK4 R24C προκαλώντας απώλεια της δέσμευσης της CDK4 στην p16^{INK4a} και κατά συνέπεια ενεργοποίηση της CDK4 εμφανίζεται σε ένα υποσύνολο καρκίνων του πνεύμονα και λεμφωμάτων. Επιπλέον, η οδός CDK4/6–RB συνδέεται με τη οδό σηματοδότησης P53 μέσω της μεταγραφής του P21^{CIP1} που μπορεί να αναστείλει τα σύμπλοκα κυκλίνης D–CDK4/6 και κυκλίνης E–CDK2. Οι μεταλλάξεις στην P53 έχουν ως αποτέλεσμα την κατάργηση του σημείου ελέγχου G₁ και προάγουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό που συμβαίνει συχνά σε προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών.^[49,50]

Η βάση δεδομένων COSMIC αναφέρει 38 μεταλλάξεις στην CDK4, με 25 από αυτές στον N-λοβό (θέσεις 2, 9, 10, 23, 24, 31, 35, 43).^[49] Οι μεταλλάξεις της κυκλίνης D1 είναι σπάνιες, ωστόσο ένα αντίγραφο, η κυκλίνη D1b, στερείται ειδικής θέσης φωσφορυλίωσης που απαιτείται για την πυρηνική εξαγωγή και επομένως συσσωρεύεται στον πυρήνα και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο και έκβαση καρκίνου. Στον καρκίνο του μαστού HR⁺/HER2⁻ η υπερέκφραση της κυκλίνης D είναι συχνή και η απώλεια της λειτουργίας pRB είναι σπάνια.^[40] Η βάση δεδομένων COSMIC αναφέρει 33 μεταλλάξεις στην CDK6 (θέσεις 18, 84, 87, 113, 118 και 139). Τέλος, η διαγραφή του γονιδίου *RBI* εμφανίζεται συχνά σε πολλούς τύπους όγκων και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό ανεξάρτητα από τη δράση του CDK4/6-κυκλίνης D.^[49,50]





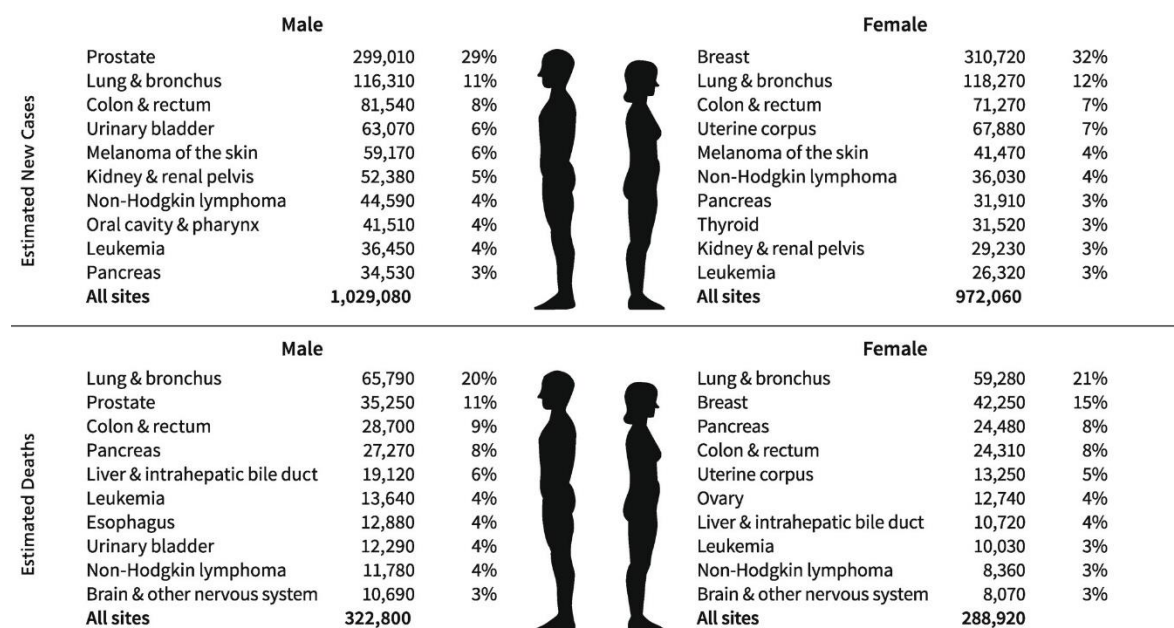
Γράφημα 2.1.: Η απορρύθμιση των γονιδίων της κυκλίνης D1 (*CCND1*), D2 (*CCND2*), D3 (*CCND3*), της CDK4 και CDK6 καθώς και του γονιδίου *RB1* σε 25 τύπους καρκίνου.^[50]

2.9 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα παγκοσμίως και η κύρια αιτία μεταξύ των ατόμων κάτω των 85 ετών.^[51] Χαρακτηρίζεται από απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τα καρκινικά κύτταρα να επηρεάζουν τους παρακείμενους ιστούς μέσω μιας διαδικασίας που καλείται μετάσταση. Η ανακάλυψη φαρμάκων κατά του καρκίνου αποτελεί ένα δύσκολο πεδίο στη φαρμακευτική βιομηχανία λόγω της πολυπλοκότητάς του. Η φαρμακευτική θεραπεία μαζί με την χειρουργική επέμβαση και την ακτινοθεραπεία αποτελούν τους κύριους πυλώνες της θεραπείας. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η χημειοθεραπεία η οποία είναι μια μέθοδος θανάτωσης καρκινικών κυττάρων ή αναστολής της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού τους, ήταν η μόνη θεραπεία του καρκίνου. Το αρνητικό χαρακτηριστικό της είναι η αδυναμία διάκρισης μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων, με αποτέλεσμα υψηλή τοξικότητα και παρενέργειες. Επομένως, τις επόμενες δεκαετίες οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στην θεραπεία με φάρμακα τα οποία μπορούν να στοχεύουν ειδικά τα καρκινικά κύτταρα και να διαφυλάσσουν τα φυσιολογικά εξασφαλίζοντας υψηλή ισχύ και χαμηλή τοξικότητα.^[52,53]

Τα στοχευμένα φάρμακα μπορούν να διακριθούν σε δύο γενικές κατηγορίες: μικρά μόρια και μακρομόρια (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα, πολυπεπίδια, νουκλεϊκά οξέα). Τα στοχευόμενα φάρμακα χαμηλού μοριακού βάρους έχουν πλεονεκτήματα, όπως οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες, το κόστος, η αποτελεσματικότητά στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και η από του στόματος χορήγηση. Οι στόχοι τους καλύπτουν μεγάλο εύρος, όπως κινάσες, ρυθμιστικές πρωτεΐνες, ένζυμα αποκατάστασης βλαβών στο DNA και πρωτεασώματα. Ωστόσο, εξακολουθούν να αντιμετωπίζουν πολλές προκλήσεις, όπως το χαμηλό ποσοστό ανταπόκρισης και την αντίσταση. Με την ταχεία

πρόοδο στην αντικαρκινική έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες, περισσότερα από 100 φάρμακα έχουν ανακαλυφθεί και εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA).^[52,53]



Estimates are rounded to the nearest 10, and cases exclude basal cell and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder. Estimates do not include Puerto Rico or other US territories. Ranking is based on modeled projections and may differ from the most recent observed data.

©2024, American Cancer Society, Inc., Surveillance and Health Equity Science

Εικόνα 2.16.: Δέκα συχνοί τύποι καρκίνου για τις εκτιμώμενες νέες περιπτώσεις καρκίνου και θανάτου ανά φύλο (Ηνωμένες Πολιτείες, 2024). Ο καρκίνος του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου αντιπροσωπεύουν το 48% όλων των περιστατικών στους άνδρες. Για τις γυναίκες, ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου αντιπροσωπεύουν το 51% όλων των νέων διαγνώσεων.^[51]

2.9.1 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνά διαγνωσθείσα κακοήθεια και η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου των γυναικών από καρκίνο παγκοσμίως. Οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού διαγιγνώσκονται αρκετά νωρίς ώστε να αντιμετωπιστούν επιτυχώς με χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή συνδυασμό αυτών, όμως ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών δεν θα ανταποκριθεί σε αυτές τις θεραπείες και θα καταλήξει με μεταστατική νόσο στα οστά, στους πνεύμονες, στο ήπαρ, τον εγκέφαλο ή άλλα όργανα του σώματος, προκαλώντας τελικά τον θάνατο του ασθενούς, γεγονός που δικαιολογεί την αναζήτηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η ορμονοθεραπεία έχει αναπτυχθεί ως μια μη στοχευμένη θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού αλλά προκαλεί επίσης σοβαρές παρενέργειες.^[9,14,54]

Μεταξύ των νέων θεραπειών που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια, οι στοχευμένες θεραπείες αποτελούν ορόσημο στην καταπολέμηση του καρκίνου. Βασίζονται στη χρήση φαρμάκων ή άλλων ουσιών, ειδικά σχεδιασμένων να στοχεύουν σε μόρια που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Ορισμένα στοχευμένα φάρμακα είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα έχουν λάβει έγκριση από

τον FDA για τη θεραπεία διαφορετικών τύπων καρκίνου του μαστού και πολλά από αυτά βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές χωρίς όμως θεραπευτικά αποτελέσματα για ασθενείς με TNBC. Ωστόσο, η αντοχή στα φάρμακα συνεχίζει να εμφανίζεται και η χρήση ενός συν-φαρμάκου που ανταγωνίζεται τον μηχανισμό αντοχής θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανή θεραπεία.^[9,14]

Η ανοσοθεραπεία έχει πρόσφατα θεωρηθεί ως ένα πιθανό θεραπευτικό μέσο για τη στόχευση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης που εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα. Ορισμένοι αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα έχουν ήδη λάβει έγκριση από τον FDA για θεραπεία ασθενών με TNBC. Έχει χαρακτηριστεί σημαντική η ανακάλυψη προγνωστικών βιοδεικτών για την προσαρμογή των ανοσοθεραπειών ώστε να εφαρμοστούν στους διάφορους τύπους καρκίνου του μαστού. Επομένως, η πλήρης κατανόηση του μοριακού, γενετικού και ανοσολογικού ρόλου των καρκινικών κυττάρων καθώς και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου κρίνεται αναγκαία για τον σχεδιασμό θεραπείας.^[54]

Αυτή η ετερογενής νόσος έχει ταξινομηθεί κλινικά σε τουλάχιστον τέσσερις κύριους μοριακούς τύπους καρκίνου του μαστού, σύμφωνα με την έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνου (ER), του υποδοχέα προγεστερόνης (PR) και του υποδοχέα ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) με διαφορετική πρόγνωση και ανταπόκριση στη θεραπεία (HER2-enriched, luminal A, luminal B και basal-like). Ο καρκίνος του μαστού με ορμονικούς υποδοχείς (HR)⁺/HER2⁻ (ER⁺/HER2⁻ ή PR⁺/HER2⁻) είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου αντιπροσωπεύοντας περίπου το 60%-70% των περιπτώσεων.^[9,14]

- Η υποομάδα HER2-Enriched: Οι όγκοι του μαστού που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα τύπου 2 (HER2) έχουν μελετηθεί εκτενώς. Μαζί με τους HER1 (EGFR/ErbB-1), HER3 (ErbB-3) και HER4 (ErbB-4), ο HER2 (ErbB2/neu) είναι μέλος της οικογένειας των μεμβρανικών υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης ErbB και σχετίζεται με τη μεταγραφή σε μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστολή απόπτωσης. Το 20-30% των καρκίνων του μαστού υπερεκφράζουν τον HER2 με αποτέλεσμα αυτή η πρωτεΐνη να αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο. Η εγκεκριμένη θεραπεία είναι το μονοκλωνικό αντίσωμα τραστουζουμάμπης (Herceptin) που δεσμεύεται και αποκλείει την εξωκυτταρική περιοχή του HER2. Όμως, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι ένα επαναλαμβανόμενο πρόβλημα που έχει παρακινήσει την αναζήτηση εναλλακτικών θεραπειών που στοχεύουν αυτόν τον υποδοχέα κινάσης τυροσίνης.
- Η υποομάδα αυλικού τύπου A και B (Luminal A και Luminal B): Αυτές οι υποομάδες αντιπροσωπεύουν έως και το 75% των περιπτώσεων όγκου του μαστού, είναι HR-θετικοί και εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων (ER) και υποδοχείς προγεστερόνης (PR). Στους καρκίνους του μαστού, η ορμόνη οιστρογόνου (17β-οιστραδιόλη) παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της απόπτωσης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της έκφρασης των αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους. Η ενδοκρινική θεραπεία έχει αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα (περίπου 50-60%) με το Tamoxifen

(TMX, Nolvadex) να χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη τις τελευταίες δεκαετίες. Ωστόσο, αν και αυτός ο ανταγωνιστής του υποδοχέα ER έχει δείξει σημαντικά αποτελέσματα, η ύπαρξη σημαντικού αριθμού περιπτώσεων με φυσική ή επίκτητη αντίσταση στην ταμοξιφαίνη μαζί με τις μακροχρόνιες τοξικότητες έχουν παρακινήσει την αναζήτηση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων αντί της ορμονοθεραπείας. Πολλά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες φαίνεται να αλλοιώνονται σε ER-θετικούς όγκους, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη θεραπείας που βασίζεται στη στοχευμένη αναστολή των κινασών.

- Η τριπλά αρνητική υποομάδα (triple negative ή basal like): Η ομάδα των basal-like καρκίνων χαρακτηρίζονται από την απουσία υπερέκφρασης του HER2 και την απουσία ή χαμηλά επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνων. Ο TNBC αποτελεί περίπου το 80% των basal-like όγκων, αντιπροσωπεύει περίπου το 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου και χαρακτηρίζεται από την έλλειψη έκφρασης των δύο ορμονικών υποδοχέων (οιστρογόνο και προγεστερόνη) και του υποδοχέα HER2. Αυτοί οι τύποι καρκίνου του μαστού συνήθως οδηγούν σε μια επιθετική νόσο, με υψηλή πιθανότητα μετάστασης και με κακή πρόγνωση, η οποία οφείλεται, εν μέρει, στην απουσία μιας αποτελεσματικής στοχευμένης θεραπείας.^[9,14]

2.9.2 Καρκίνος του πνεύμονα

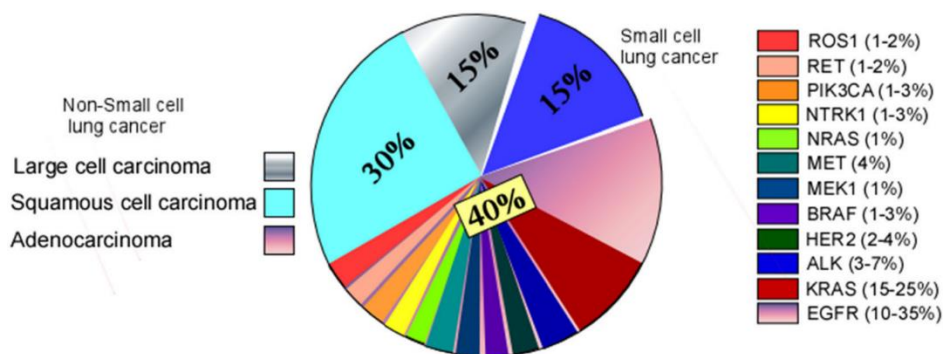
Ο καρκίνος του πνεύμονα (LC), ο δεύτερος πιο διαδεδομένος καρκίνος μετά τον καρκίνο του μαστού, είναι η πιο κοινή αιτία θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο παγκοσμίως και ένας από τους λόγους που βρίσκεται στην κορυφή της λίστας είναι ότι συχνά δεν διαγιγνώσκεται έως ότου ο καρκίνος βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Οι λόγοι για την καθυστερημένη διάγνωση περικλείουν την έλλειψη συμπτωμάτων κατά το πρώιμο στάδιο και την αδυναμία των συνηθισμένων τεχνικών απεικόνισης να τον ανιχνεύσουν. Διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου, όπως οι γενετικές αλλαγές, η επιγενετική ρύθμιση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, οι προϋπάρχουσες ιατρικές καταστάσεις και ο τρόπος ζωής (π.χ. κάπνισμα). Η αποτελεσματική έγκαιρη ανίχνευση και τα κατάλληλα φάρμακα βοηθούν στην αποτελεσματική θεραπεία του. Ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε δύο μεγάλες ομάδες, τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) και τον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).^[55,57]

- SCLC: Ο SCLC περιλαμβάνει το 15-20% όλων των καρκίνων του πνεύμονα και μπορεί να δώσει μετάσταση στον εγκέφαλο, το ήπαρ και τα οστά. Ταξινομείται ως περιορισμένου (LS-SCLC) ή εκτεταμένου σταδίου (ES-SCLC).^[55] Χρησιμοποιείται etoposide και carboplatin (EP) με και χωρίς παράγοντα IO (atezolizumab ή durvalumab) ως θεραπεία πρώτης γραμμής και σχήματα που περιέχουν topotecan ή lurbinectedin ως θεραπεία δεύτερης γραμμής.^[56] Η σύγχρονη ταξινόμηση των ασθενών γίνεται με βάση τη μορφολογία των καρκινικών κυττάρων, το στάδιο της εισβολής και τη θέση της μετάστασης.^[57]

- **NSCLC:** Αποτελεί το 85% των καρκίνων του πνεύμονα και περιλαμβάνει τους υπότυπους: αδenoκαρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα και μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα.^[55]

Η χημειοθεραπεία θεωρείται η κύρια θεραπευτική προσέγγιση για άτομα που έχουν διαγνωστεί με SCLC λόγω της δυσπρόσιτης ανατομικής θέσης και της εμφάνισης πρώιμων και εκτεταμένων μεταστάσεων. Άλλες θεραπευτικές επιλογές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περιλαμβάνουν ακτινοθεραπεία ή συνδυασμό φαρμάκων. Παρόλο που η χημειοθεραπεία είναι επιτυχής στη στόχευση κυττάρων SCLC, είναι σημαντικό να αναγνωριστεί ότι αυτά τα κύτταρα χρησιμοποιούν άλλους μηχανισμούς για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό για να αποφύγουν τις κυτταροτοξικές επιδράσεις της χημειοθεραπείας. Κατά συνέπεια, η αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπειών και των στοχευμένων φαρμάκων δεν έχει δείξει σημαντική δυνατότητα για τη θεραπεία του SCLC. Οι κινάσες έχουν εξέχοντα ρόλο όχι μόνο στη ρύθμιση της χημειοθεραπευτικής απόκρισης, αλλά και στη ρύθμιση των ανοσοαποκρίσεων που προκαλούνται από τη θεραπεία.^[57]

Η χημειοθεραπεία συχνά συσχετίζεται με μυελοκατασταλτικές ανεπιθύμητες ενέργειες, που προκύπτουν από άμεση βλάβη των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και των προγονικών κυττάρων (HSPCs) στον μυελό των οστών ή από έμμεση επίδραση, μειωμένη παραγωγή ερυθροποιητίνης. Η επαγόμενη από τη χημειοθεραπεία μυελοκαταστολή (CIM) συμβαίνει επειδή τα φάρμακα χημειοθεραπείας δεν στοχεύουν μόνο τα καρκινικά κύτταρα αλλά και τα φυσιολογικά HSPCs, τα οποία και τα δύο βρίσκονται σε συνεχή πολλαπλασιασμό. Συχνά εμφανίζεται ως ουδετεροπενία, αναιμία και θρομβοπενία που αποτελούν τα πιο κοινά χαρακτηριστικά για ασθενείς με SCLC. Η CIM οδηγεί σε μείωση της δόσης, καθυστέρηση της θεραπείας ή διακοπή θέτοντας σε κίνδυνο τα αποτελέσματα της θεραπείας. Η αντιμετώπιση της είναι ένα σημαντικό μέρος της θεραπείας του ES-SCLC. Η θεραπεία αποτελείται κυρίως από παράγοντες διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων (G-CSFs) για την ουδετεροπενία και παράγοντες διέγερσης ερυθροποίησης (ESAs) για την αναιμία. Για ασθενείς με σοβαρά μυελοκατασταλτικά ΗΑEs, μπορεί να απαιτηθεί μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) ή αιμοπεταλίων και νοσηλεία. Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι εξακολουθεί να υπάρχει ουσιαστική ανάγκη για νέες θεραπείες που μπορούν να διαχειριστούν αποτελεσματικά την CIM σε ασθενείς με ES-SCLC, να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών και να μειώσουν την οικονομική επιβάρυνση.^[56]



Γράφημα 2.2.: Τύποι καρκίνου του πνεύμονα.^[7]

2.9.3 Στόχευση CDKs — Θεραπευτική προσέγγιση

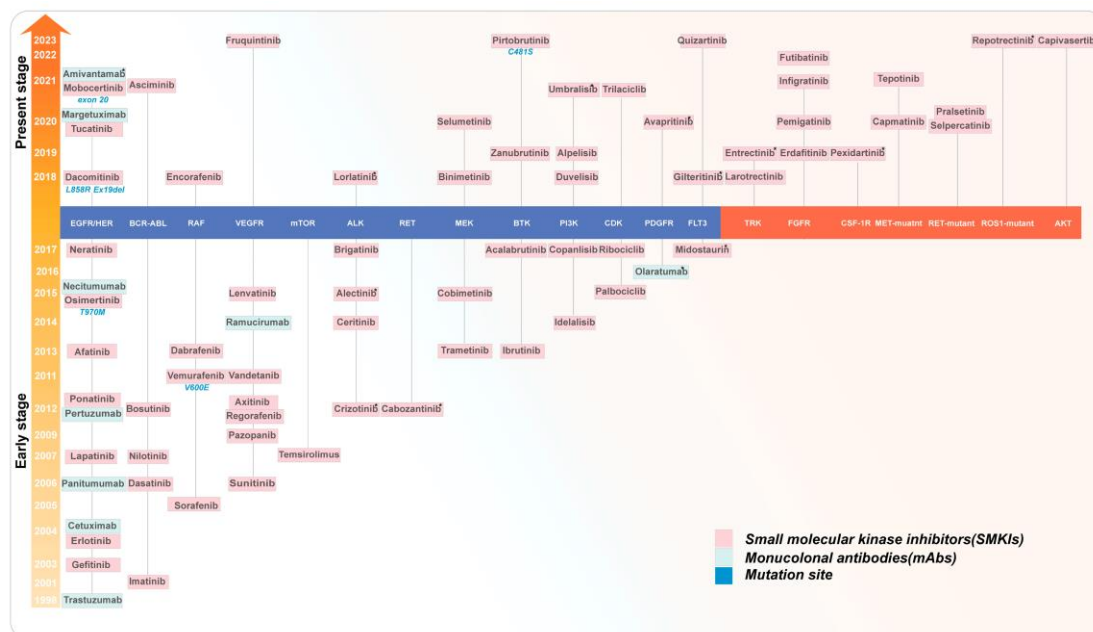
Οι CDKs αποτελούν ελκυστικούς φαρμακολογικούς στόχους για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων από τα τέλη της δεκαετίας του 1980. Οι πιο πρόσφατες στοχευμένες στρατηγικές επικεντρώθηκαν στην ανάπτυξη αναστολέων, καθώς οι κινάσες είναι απαραίτητες και άμεσα υπεύθυνες για τις κυτταρικές απορυθμίσεις. Στρατηγικές που στοχεύουν στο CDK1-κυκλίνη B έχουν προταθεί και έχουν αποδειχθεί ότι εμποδίζουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και όγκων. Ομοίως, η στόχευση των λειτουργιών της CDK2 στην αντιγραφή του DNA και στην εξέλιξη της φάσης S, παρέχει νέες δυνατότητες για τη θεραπεία του καρκίνου. Το σύμπλοκο CDK4/6-κυκλίνη D αποτελεί, επίσης, έναν φαρμακολογικό στόχο σε αρκετές μορφές καρκίνου. Οι κύριες προκλήσεις στην ανακάλυψη φαρμάκων με στόχο τις CDKs είναι η επιλεκτικότητα και οι κακές αποκρίσεις ή η αντίσταση στις θεραπείες. Ωστόσο, οι τελευταίες εξελίξεις παρέχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την ανακάλυψη εξαιρετικών εκλεκτικών και ισχυρών αναστολέων με ευνοϊκές φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Σήμερα, ο κατάλογος των αναστολέων CDKs-κυκλίνης περιλαμβάνει φυσικές ουσίες, συνθετικές ενώσεις ανταγωνιστικές του ATP και μη ανταγωνιστικές με διαφορετικές χημικές δομές, καθώς και πεπτίδια.^[40,49]

2.10 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους

Από τη δεκαετία του 1980, οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν αναγνωρισθεί ως πιθανοί στόχοι φαρμάκων, ιδιαίτερα με βάση τις προόδους στη κατανόηση του καρκίνου και της ανακάλυψης ογκογονιδίων. Ωστόσο, η ανάπτυξη αναστολέων που συνδέονται με τη θέση δέσμευσης του ATP θεωρήθηκε αρχικά ως μια αξεπέραστη πρόκληση λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ATP στο κύτταρο, της έλλειψης κατανόησης του τρόπου ρύθμισης των κινασών και του διατηρημένου θύλακα πρόσδεσης ATP. Η έγκριση του Imatinib από τον FDA το 2001 ήταν μια σημαντική ανακάλυψη στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου και προανήγγειλε την εμφάνιση των αναστολέων κινάσης ως βασική κατηγορία φαρμάκων στον ογκολογικό τομέα και όχι μόνο. Το Imatinib ανακαλύφθηκε στα εργαστήρια της Ciba-Geigy το 1992, αναστέλλει κινάσες τυροσίνης (π.χ. BCR-ABL και PDGFR) και εγκρίθηκε αρχικά για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) και στη συνέχεια για άλλες θεραπείες, όπως η θεραπεία όγκων που καθοδηγούνται από KIT (GISTs).^[58]

Οι τύποι αναστολέων κινάσης που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία όγκων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε αναστολείς κινάσης μικρών μορίων (SMKIs) και μεγαλύτερα μόρια όπως μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs), νανοσώματα και πεπτίδια. Περισσότεροι από 120 αναστολείς κινάσης έχουν εγκριθεί παγκοσμίως, κυρίως για καρκίνο και αυτοάνοσα νοσήματα. Υπάρχουν επί του παρόντος 80 αναστολείς κινασών μικρού μοριακού βάρους (SMKIs) καθώς και δέκα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) που στοχεύουν υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs) που έχουν εγκριθεί από τον FDA και επιπλέον 16 SMKIs και ένα mAb που έχουν εγκριθεί από άλλους φορείς. Αν και η ογκολογία εξακολουθεί να είναι ο κυρίαρχος τομέας για την εφαρμογή τους, το ένα τρίτο των SMKIs στην κλινική ανάπτυξη αντιμετωπίζει διαταραχές πέρα από αυτήν. Όλοι οι εγκεκριμένοι αναστολείς χορηγούνται από το στόμα, με εξαίρεση το

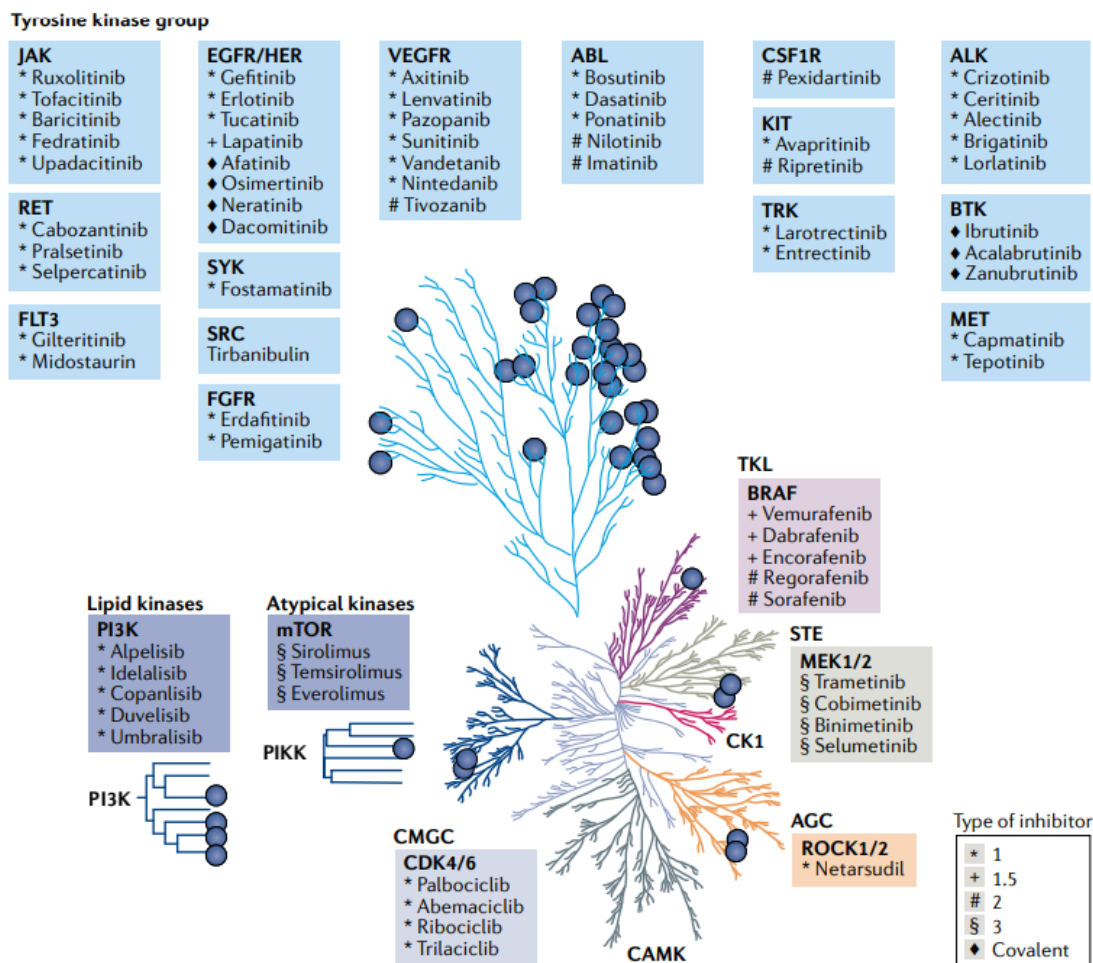
temsirolimus και το trilaciclib (τα οποία χορηγούνται ενδοφλεβίως) και το netarsudil (οφθαλμική σταγόνα).^[58,60]



Εικόνα 2.17.: Πορεία ανακάλυψης εγκεκριμένων από τον FDA αναστολέων κινασών.^[60]

Πληροφορίες σχετικά με κλινικές δοκιμές SMKIs αποκαλύπτουν ότι περίπου 110 νέες κινάσες διερευνώνται ως στόχοι, οι οποίοι μαζί με τους περίπου 45 στόχους των εγκεκριμένων αναστολέων αντιπροσωπεύουν περίπου το 30% του ανθρώπινου κινώματος, υποδεικνύοντας ότι υπάρχουν ακόμη σημαντικές ανεξερεύνητες δυνατότητες για αυτή την κατηγορία φαρμάκων. Οι κινάσες που αποτελούν στόχο των αναστολέων περιλαμβάνουν πέντε από τις οκτώ κύριες ομάδες ePK (TK, TKL, STE, CMGC και AGC), μία οικογένεια άτυπης πρωτεϊνικής κινάσης (PIKK) και μία οικογένεια λιπιδικής κινάσης (PI3K). Συγκεκριμένα, από τα 80 εγκεκριμένα φάρμακα, 43 στοχεύουν υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης, 20 μη-υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης, 13 στρέφονται κατά των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης και 4 κατά των πρωτεϊνικών κινασών διπλής ειδικότητας.^[59] Από τους 80 εγκεκριμένους από τον FDA αναστολείς, οι είκοσι χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία περισσότερων της μιας ασθένειας, για παράδειγμα το imatinib έχει εγκριθεί για τη θεραπεία οκτώ διαφορετικών διαταραχών.^[58,59]

Επιπλέον, έντεκα SMKIs (13% των εγκεκριμένων SMKIs) έχουν εγκριθεί για θεραπείες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα, κυρίως αυτοάνοσες και φλεγμονώδεις διαταραχές. Περισσότερο από το 20% (19 SMKIs και δύο mAbs) των εγκεκριμένων αναστολέων έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), το οποίο είναι σημαντικό δεδομένου ότι ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο και το 80–85% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα είναι NSCLC.^[58,61]



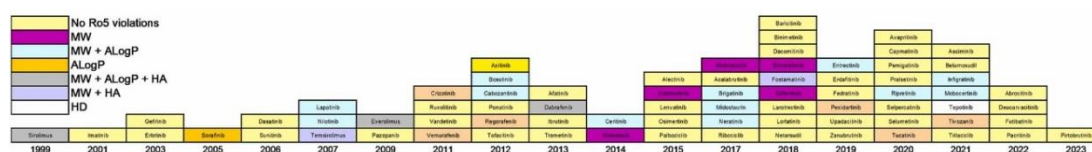
Εικόνα 2.18.: Εγκεκριμένοι από τον FDA αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών χαρτογραφημένοι στο ανθρώπινο κίνωμα.^[58]

2.10.1 Χαρακτηριστικά αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών – Κανόνας των 5

Ο κανόνας των πέντε του Lipinski (2001) είναι μια πειραματική και υπολογιστική διαδικασία που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της διαλυτότητας, της διαπερατότητας της μεμβράνης και της φαρμακολογικής αποτελεσματικότητας στο πλαίσιο της ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Βασίζεται σε τέσσερις παραμέτρους που είναι το μοριακό βάρος, ο αριθμός των δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου και ο συντελεστής κατανομής. Αποτελεί έναν εμπειρικό κανόνα που καθορίζει εάν μια ουσία έχει βέλτιστες ιδιότητες, ώστε να χορηγείται από το στόμα. Τα κριτήρια βασίζονται σε δεδομένα που καταδεικνύουν ότι οι περισσότερες αποτελεσματικές ενώσεις είναι σχετικά μικρού μοριακού βάρους και μέτριου βαθμού λιπόφιλες. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες που μελετώνται από φυσικοχημικούς για την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου είναι το εμβαδόν της πολικής επιφάνειας, ο αριθμός των περιστρεφόμενων δεσμών και των αρωματικών δακτυλίων, ο αριθμός των βαρέων ατόμων και η μοριακή πολυπλοκότητα.^[61]

Τα κριτήρια Ro5 υποδεικνύουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα μειώνεται όταν (i) το Log P υπολογίζεται μεγαλύτερο από 5, όταν (ii) υπάρχουν περισσότεροι από 5 δότες δεσμών υδρογόνου, όταν (iii) υπάρχουν περισσότεροι από 10 δέκτες δεσμών υδρογόνου και όταν (iv) το μοριακό βάρος είναι μεγαλύτερο από 500. Ο συντελεστής κατανομής (P) είναι ο λόγος της διαλυτότητας του μη ιονισμένου φαρμάκου στην οργανική φάση διαιρεμένος με τη διαλυτότητά του στην υδατική φάση ενός μείγματος n-οκτανόλης/νερού. Η τιμή P είναι ανάλογη με την υδροφοβικότητα μιας ένωσης, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή P τόσο μεγαλύτερη είναι η υδροφοβικότητα. Ο αριθμός των δοτών δεσμών υδρογόνου αντιπροσωπεύει το άθροισμα των ομάδων NH και OH. Ο αριθμός των δεκτών δεσμών υδρογόνου είναι ο αριθμός των μη φορτισμένων ετεροατόμων εκτός από τα αλογόνα, τα ετεροαρωματικά άτομα οξυγόνου και θείου, τα άτομα αζώτου του πυρρόλιου και τις υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις του φωσφόρου, του θείου και του αζώτου, αλλά περιλαμβάνει τα άτομα οξυγόνου που είναι συνδεδεμένα με αυτά.^[61]

Το μέσο μοριακό βάρος (MW) των από του στόματος αποτελεσματικών αναστολέων εγκεκριμένων από τον FDA είναι 472 με εύρος από 285 έως 615. Επιπλέον, 18 από τα 80 εγκεκριμένα φάρμακα έχουν ALogP μεγαλύτερο από πέντε. Η μέση τιμή για το ALogP για τα 71 φάρμακα που έχουν εγκριθεί από τον FDA ήταν 4.12 με εύρος από 1.1 έως 6.36 και τυπική απόκλιση 1.23. Συνολικά, 37 από τους 80 εγκεκριμένους από το FDA αναστολείς (40.5%) δεν υπακούουν στον κανόνα του Lipinski και φέρουν την ένδειξη bRo5.^[59,61]



Εικόνα 2.19.: Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που τηρούν ή όχι τον κανόνα των 5 (MW: μοριακό βάρος, AlogP: συντελεστής κατανομής, HA: αριθμός δεκτών δεσμού υδρογόνου, HD: αριθμός δοτών δεσμού υδρογόνου).^[61]

2.10.2 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Η φύση των πρωτεϊνικών κινασών επιτρέπει τον σχεδιασμό αναστολέων που αναγνωρίζουν τις ενεργές ή ανενεργές διαμορφώσεις τους. Η ανενεργή κατάσταση των κινασών είναι ιδιαίτερα δομικά διαφορετική και έχει διερευνηθεί εκτενώς στην ανάπτυξη φαρμάκων. Οι περισσότερες κινάσες εκφράζονται σε μια ανενεργή κατάσταση που ενεργοποιείται από πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς, όπως δομικές αλλαγές που προκαλούνται από μετα-μεταφραστική τροποποίηση ή μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες ή ρυθμιστικές περιοχές. Η διαμόρφωση «DFG-in» αντιπροσωπεύει την ενεργή κατάσταση, ενώ η «DFG-out» υποδεικνύει την ανενεργή κατάσταση. Η αC-έλικα στην κατάσταση «αC-in» βρίσκεται συσσωρευόμενη έναντι του υπόλοιπου τομέα κινάσης, ενώ οι κινάσες εμφανίζουν μια χαλαρά συνδεδεμένη αC-έλικα στην ανενεργή «αC-out» κατάσταση. Μόνο οι κινάσες στις διαμορφώσεις «DFG-in» και «αC-in» θεωρούνται ενεργές. Οποιαδήποτε μετατόπιση της αC-έλικας ή

του μοτίβου DFG από τη θέση «in» διακόπτει τις αλληλεπιδράσεις τους, ανοίγοντας θύλακες μέσα και γύρω από τη θέση πρόσδεσης του ATP διευκολύνοντας τη δέσμευση του αναστολέα.

Η ανταγωνιστική αναστολή της δέσμευσης ATP είναι η πιο συχνή μέθοδος αναστολής της κινάσης και οι περισσότεροι αναστολείς εμπίπτουν σε αυτήν την κατηγορία. Οι ανταγωνιστικοί αναστολείς ATP ταξινομούνται ως τύπου I και τύπου II. Οι αναστολείς τύπου I αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα αναστολέων και στοχεύουν την ενεργή διαμόρφωση πρωτεΐνης. Το κεντρικό τμήμα του αναστολέα συνδέεται με τον θύλακα αδενίνης της θέσης πρόσδεσης του ATP και η α C καθώς και το μοτίβο DFG υιοθετούν ενεργή διαμόρφωση «in». Οι πρόσφατα εγκεκριμένοι SMKIs αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν τα capivasertib, capmatinib, selpercatinib, entrectinib, erdafitinib και gilteritinib.

Οι αναστολείς τύπου 2 συνδέονται σε μια ανενεργή διαμόρφωση κινάσης, η οποία χαρακτηρίζεται από τη διαμόρφωση «DFG-out» ανεξάρτητα από την « α C-in» ή « α C-out». Επειδή η διαμόρφωση της ανενεργής πρωτεϊνικής κινάσης παρουσιάζει μεγαλύτερη δομική μεταβλητότητα από τη διατηρημένη ενεργή διαμόρφωση που δεσμεύεται από αναστολείς τύπου 1, εικάζεται ότι οι αναστολείς τύπου 2 είναι πιο εκλεκτικοί. Quizartinib, pirtobrutinib και repotrectinib αποτελούν αναστολείς τύπου 2. Πρόσφατα, μελετήθηκε και προτάθηκε η ύπαρξη των αναστολέων τύπου 1.5 που αποτελούν ένα ενδιάμεσο τύπο των αναστολέων τύπου 1 και τύπου 2.

Αλλοστερικοί αναστολείς κινάσης καλούνται οι αναστολείς που δεν ανταγωνίζονται το ATP και συνδέονται σε θέσεις εκτός του θύλακα πρόσδεσης ATP (π.χ. binimetinib και asciminib). Ανάλογα με τη θέση των αλλοστερικών θέσεων σε σχέση με τον θύλακα δέσμευσης ATP, αυτοί οι αναστολείς ταξινομούνται ως τύπου III και τύπου IV. Οι αναστολείς τύπου 3 συνδέονται σε μια αλλοστερική θέση κοντά στη περιοχή δέσμευσης ATP σε ένα θύλακα που προκαλείται από μια διαμόρφωση « α C-out» και σε ορισμένες περιπτώσεις από μια ανενεργή διαμόρφωση του A-βρόχου. Το DFG βρίσκεται σε μια ενεργή διαμόρφωση «in», επιτρέποντας την ταυτόχρονη δέσμευση του αναστολέα τύπου 3 και του ATP. Ορισμένοι αναστολείς τύπου 3 σχηματίζουν επίσης πολικές αλληλεπιδράσεις με τη φωσφορική ραχοκοκαλιά του ATP, με αποτέλεσμα έναν μη ανταγωνιστικό τρόπο δράσης για το ATP. Παραδείγματα αναστολέων τύπου 3 είναι το rexidartinib και το selumetinib. Από την άλλη πλευρά, οι αναστολείς τύπου 4 συνδέονται σε αλλοστερικές θέσεις που βρίσκονται μακριά από την περιοχή πρόσδεσης του ATP. Περιλαμβάνουν αντισώματα και τα παράγωγά τους που στοχεύουν εξωκυτταρικές περιοχές υποδοχικών κινασών τυροσίνης (RTKs). Επιπλέον, τα δισθενή μόρια που αλληλοεπιδρούν ταυτόχρονα σε δύο διαφορετικές περιοχές της κινάσης είναι αναστολείς τύπου V.

Οι ομοιοπολικοί αναστολείς αναστέλλουν τις κινάσες σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό με κατάλοιπα πυρηνόφιλων αμινοξέων (κυστεΐνη ή λυσίνη) στη θέση ATP εμποδίζοντας αποτελεσματικά τη δράση του ενζύμου είτε αναστρέψιμα είτε μη αναστρέψιμα. Κάποια παραδείγματα είναι το futibatatinib, mobocertinib, zanubrutinib και dacomitinib. Η μη αναστρέψιμη ομοιοπολική δέσμευση μπορεί να ενισχύσει την εκλεκτικότητα του φαρμάκου, όμως οδηγεί σε αύξηση των παρενεργειών και της

τοξικότητας. Οι αναστρέψιμοι ομοιοπολικοί αναστολείς δεν συνδέονται μόνιμα με τις κινάσες, επιτρέποντας την απελευθέρωση από πρωτεΐνες εκτός στόχου και μειώνοντας τον κίνδυνο δυσμενούς ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος και τοξικότητας εκτός στόχου. Όλοι οι εγκεκριμένοι ομοιοπολικοί αναστολείς εκτός από την ακαλαμπρουτινίμη χρησιμοποιούν μια ομάδα ακρυλαμιδίου ως ηλεκτρονιόφιλο για το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού. Η αντικατάσταση της θέσης άλφα σε ένα ακρυλαμίδιο από μια ομάδα που αποσύρει ηλεκτρόνια όπως μια κυανοομάδα επιτρέπει τον σχεδιασμό αναστρέψιμων ομοιοπολικών αναστολέων.^[58,60]

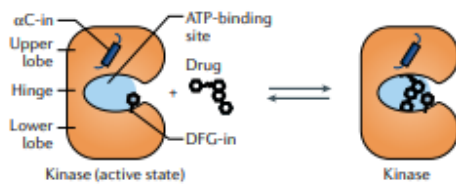
Συμπερασματικά, οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους ταξινομούνται σε επτά κύριες ομάδες, αναστολείς τύπου I, I $\frac{1}{2}$, II, III, IV, V (αναστρέψιμοι) και τύπου VI (ομοιοπολικός μη αναστρέψιμος). Οι ανταγωνιστικοί αναστολείς τύπου I $\frac{1}{2}$ και II διακρίνονται επιπλέον σε υποτύπους A και B με βάση τον χρόνο σύνδεσης με τον ενζυμικό στόχο τους, με τους αναστολείς τύπου A να παρουσιάζουν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής. Τα χαρακτηριστικά του κάθε τύπου παρουσιάζονται στον κάτωθι πίνακα (Πίνακας 2.3.), ενώ ακολουθεί σχηματική αναπαράσταση του τρόπου αναστολής της κινάσης για κάθε τύπο αναστολέα (Εικόνα 2.20.).^[59]

Inhibitor type	Properties
I	Binds in and around the ATP-binding pocket of an active enzyme
I $\frac{1}{2}$ A/B	Binds in and around the ATP-binding pocket of an inactive DFG-D _{in} enzyme
I $\frac{1}{2}$ A	Extends into the back cleft
I $\frac{1}{2}$ B	Does not extend into the back cleft
II A/B	Bind in and around the ATP-binding site of an inactive DFG-D _{out} enzyme
II A	Extends into the back cleft
II B	Does not extend into the back cleft
III	Allosteric inhibitor bound next to the ATP-binding site
IV	Allosteric inhibitor bound away from the ATP-binding site
V	Bivalent inhibitor spanning two kinase domain regions
VI	Covalent inhibitor

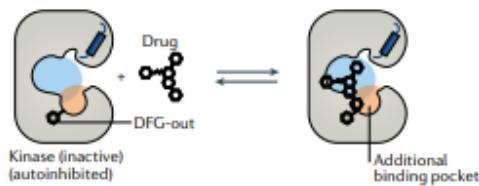
Πίνακας 2.3.: Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους.^[59]

a Kinase inhibition modes

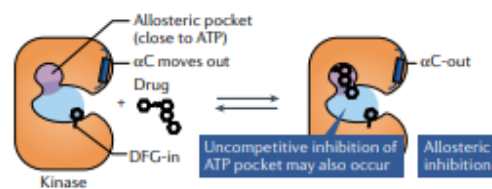
Type 1 inhibitors (ATP mimic)



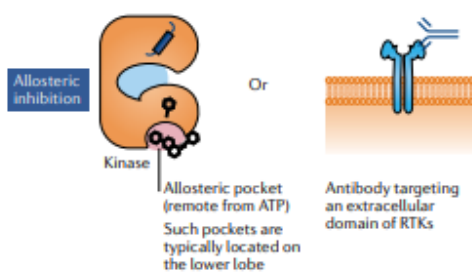
Type 2 inhibitors (ATP mimic)



Type 3 inhibitors (allosteric close to ATP)

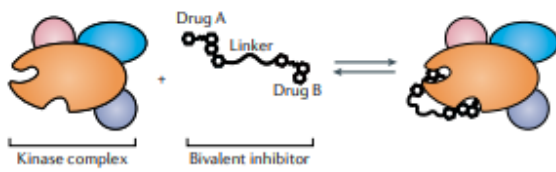


Type 4 inhibitors (allosteric remote from ATP)

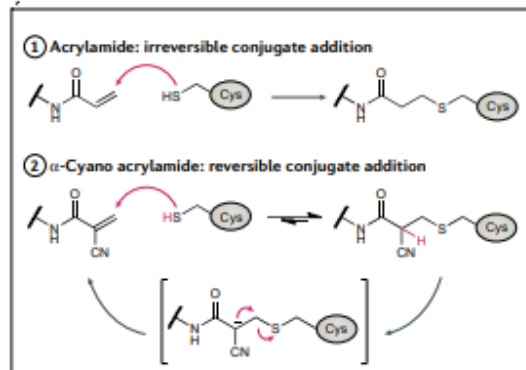
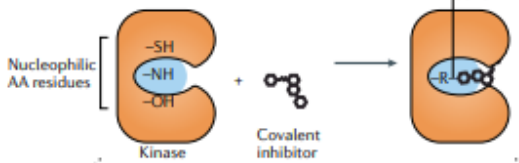


b Additional approaches for kinase targeting

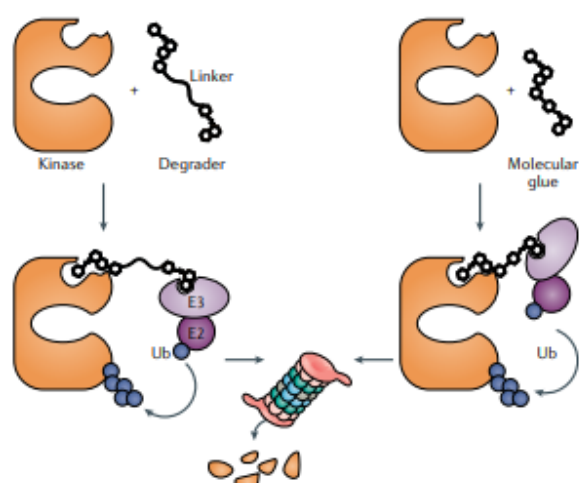
Bivalent inhibitors



Covalent inhibitors



Degraders and molecular glues

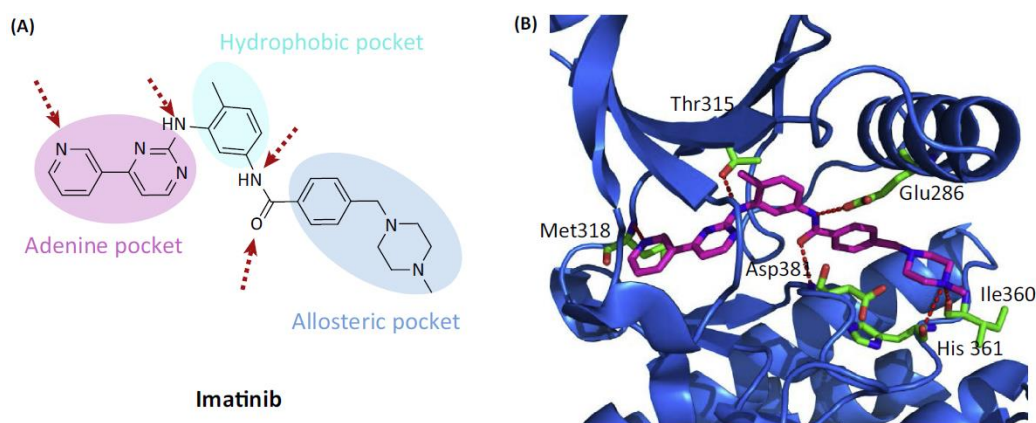


Εικόνα 2.20.: Σχηματική αναπαράσταση τρόπων αλληλεπίδρασης αναστολέα-κινάσης. (Α) Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι αναστολέων κινάσης. (Β) Πρόσθετες προσεγγίσεις για τη στόχευση κινάσης.^[58]

2.10.3 Imatinib – πρώτος αναστολέας

Η χρόνια μυελογενής λευχαιμία (CML) χαρακτηρίζεται από την μετατόπιση του πρωτο-ογκογονιδίου *abl* από το χρωμόσωμα 9 στο χρωμόσωμα 22, σχηματίζοντας τελικά το χρωμόσωμα Philadelphia. Το ογκογονίδιο *bcr-abl* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Bcr-Abl, η οποία αποτελεί μια πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης που ενεργοποιεί πληθώρα μιτογόνων μονοπατιών σηματοδότησης οδηγώντας στην λευχαιμία. Με αποτέλεσμα, να κριθεί επιτακτική ανάγκη η ανάπτυξη ενός ειδικού αναστολέα της ογκοπρωτεΐνης. Το Imatinib (γνωστό ως Gleevec ή Glivec) είναι ένας αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης που έφερε επανάσταση στη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) το 2001. Εφευρέθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1990 από τον βιοχημικό Nicholas Lyndon που εργαζόταν για την Ciba-Geigy (Novartis) και η χρήση του για τη θεραπεία της CML καθοδηγήθηκε από τον Brian Druker. Η πρώτη κλινική δοκιμή του έλαβε χώρα το 1998 και το φάρμακο έλαβε έγκριση από τον FDA τον Μάιο του 2001. Ο Lyndon, ο Druker και οι συνάδελφοί τους βραβεύτηκαν για την ανάπτυξη ενός νέου θεραπευτικού φαρμάκου που στοχεύει σε ειδικά μόρια για τον καρκίνο. Οι επιστήμονες διερεύνησαν την επίδρασή του σε άλλους καρκίνους και βρέθηκε ότι έχει θαυματουργή επίδραση όταν οι κινάσες τυροσίνης υπερεκφράζονται.^[62]

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η απόπτωση ως απόκριση σε εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά ερεθίσματα. Η απορρύθμιση τους έχει αποδειχθεί ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην εμφάνιση του καρκίνου. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι στρωματικοί γαστρεντερικοί όγκοι (GISTs), το δερματοϊνοσάρκωμα (DFSP), το υπερηωζινοφιλικό σύνδρομο (HES) και η χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία. Το Imatinib είναι ένας αναστολέας των ABL, PDGFRA και c-KIT. Αναστέλλει, επίσης, την πρωτεΐνη ABL των μη καρκινικών κυττάρων, αλλά τα κύτταρα έχουν πρόσθετες κινάσες τυροσίνης που τους επιτρέπουν να συνεχίσουν να λειτουργούν ακόμη και αν αναστέλλεται η κινάση τυροσίνης ABL. Επιπλέον, αναστολείς κινάσων τυροσίνης δεύτερης και τρίτης γενιάς έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται στην θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου.^[62]



Σχήμα 2.5.: (A) Η δομή του Imatinib. (B) Κρυσταλλογραφικά δεδομένα με την BCR-Abl.^[63]

2.11 Αναστολείς CDKs πρώτης και δεύτερης γενιάς

Οι αναστολείς των CDKs ταξινομούνται σε πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. Οι αναστολείς πρώτης γενιάς (flavopiridol, roscovitine, seliciclib) δεν έχουν σχεδόν καμία εκλεκτικότητα μεταξύ της οικογένειας των CDKs. Η φλαβοπιριδόλη που ανακαλύφθηκε από τη Sanofi, είναι ο πιο καλά μελετημένος αναστολέας CDKs πρώτης γενιάς και αναστέλλει τις CDK1,2,4,6,7 και 9. Παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα *in vitro*, δεν εμφάνισε μεγάλη δράση *in vivo* και οι κλινικές δοκιμές του σε πολλούς διαφορετικούς τύπους όγκων δεν πέτυχαν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Έγιναν ορισμένες κλινικές δοκιμές της φλαβοπιριδόλης σε σχέση με αιματολογικές κακοήθειες και η ένωση ονομάστηκε orphan drug για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML) στις ΗΠΑ και της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (CLL) στην Ευρώπη.^[14,48]

Το seliciclib αναστέλλει τις CDK2,7 και 9 και ανακαλύφθηκε από την Cyclacel. Στη δοκιμή φάσης I παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως ναυτία, εμετός και εξασθένιση που επιλύθηκαν μετά τη διακοπή του φαρμάκου. Το roscovitine αναστέλλει τις CDK1,2,5,7 και 9 και έχει μελετηθεί σε κλινικές δοκιμές φάσης I και II ως μεμονωμένο φάρμακο χωρίς όμως να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, ο συνδυασμός roscovitine και sapacitibine αυξάνει τη συνολική αποτελεσματικότητά και μειώνει την τοξικότητα, υποδεικνύοντας ότι μελλοντικές στρατηγικές συνδυασμού μπορεί να βελτιώσουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητά τους.^[64]

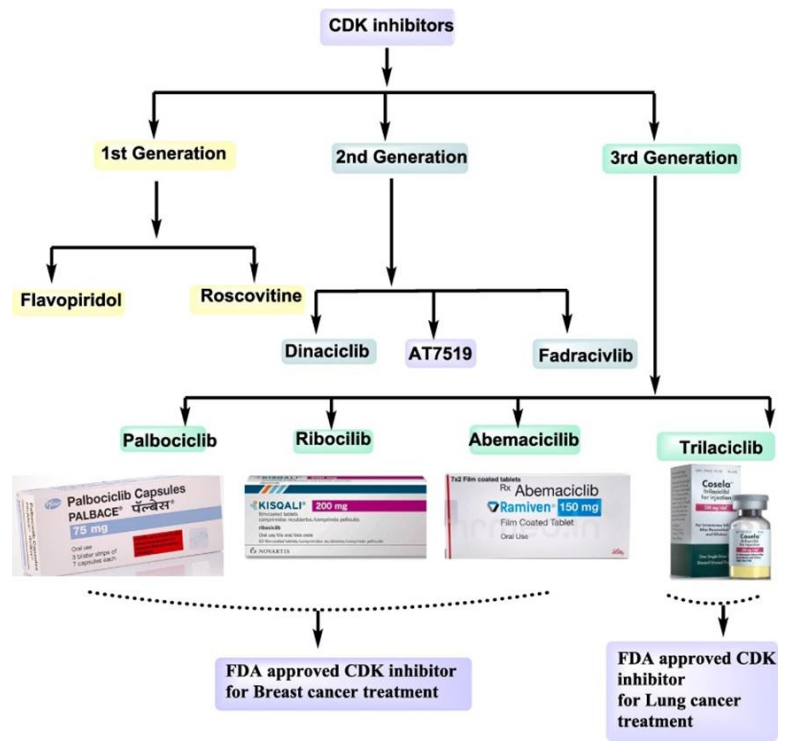
Με βάση τους αναστολείς CDKs πρώτης γενιάς, αναπτύχθηκαν οι αναστολείς CDKs δεύτερης γενιάς με στόχο την αύξηση της εκλεκτικότητας έναντι των CDKs και τη μείωση της τοξικότητας (π.χ. dinaciclib, AT7519, CYC065, P276-00, TG02, roniciclib, RGB-286638, PHA793887, ZK-304709, P1446A-05, R532328, SNS-200D, PHA-848125).^[64] Το dinaciclib που αναπτύχθηκε από τη Merck, αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τις CDK1,2,5 και 9 με τιμές IC_{50} 3, 1, 1 και 4 nmol/L, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι κλινικές δοκιμές φάσης II για τις οξείες λευχαιμίες, τον καρκίνο του μαστού και τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα δεν παρουσίασαν σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Έλαβε, επίσης, χαρακτηρισμό orphan drug για τη θεραπεία της CLL και εμφάνισε θεραπευτικά αποτελέσματα σε μια κλινική δοκιμή φάσης III.

Το roniciclib που αναπτύχθηκε από την Bayer, αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τα CDK1-κυκλίνη B, CDK2-κυκλίνη E, CDK4-κυκλίνη D, CDK7-κυκλίνη H-MAT1 και CDK9-κυκλίνη T1 με τιμές IC_{50} 7, 9, 11, 25 και 5 nmol/L, αντίστοιχα. Έδειξε θεραπευτική δράση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα και ο καρκίνος του μαστού, με παρατηρούμενες τιμές IC_{50} μικρότερες από 100 nmol/L. Ωστόσο, η κλινική δοκιμή φάσης II σε συνδυασμό με σισπλατίνη/ετοποσίδη στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα τερματίστηκε πρόωρα λόγω δυσμενούς θεραπευτικής επίδρασης και σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών.

Το riviciclib που αναπτύχθηκε από την Piramal, αποδείχθηκε ότι αναστέλλει εκλεκτικά τα CDK1-κυκλίνη B, CDK4-κυκλίνη D1 και CDK9-κυκλίνη T1 (IC_{50} = 79, 63 και 20 nmol/L) χωρίς σχεδόν καμία δράση έναντι του CDK2-κυκλίνη E, CDK7-κυκλίνη H.

Μια κλινική δοκιμή φάσης I έδειξε ήπια αποτελεσματικότητα και μια μελέτη φάσης II σε MCL τερματίστηκε, επειδή δεν παρατηρήθηκαν αποκρίσεις σε ασθενείς. Το AZD5438 που αναπτύχθηκε από την AstraZeneca, αποδείχθηκε ότι αναστέλλει τα CDK1-κυκλίνη B1, CDK2-κυκλίνη A, CDK2-κυκλίνη E, CDK5-P25, CDK6-κυκλίνη D3 και CDK9-κυκλίνη T με τιμές IC₅₀ 16, 45, 6, 14, 21 και 20 nmol/L, αντίστοιχα. Μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό καρκίνου με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται από 0,20 έως 1,70 μmol/L, καταστέλλοντας τη σύνθεση του DNA διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G₁, M και G₂/S. Η μελέτη φάσης I ολοκληρώθηκε το 2005, αλλά η επακόλουθη κλινική μελέτη της ανεστάλη λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών σε υψηλές δόσεις.

Αυτοί οι αναστολείς ran-CDKs έδειξαν ανεπαρκή αποτελεσματικότητα ή μη αποδεκτή τοξικότητα σε κλινικές δοκιμές. Επομένως, η ανάπτυξη αναστολέων CDKs που ακολούθησε βασίστηκε στη μείωση της τοξικότητας διατηρώντας την ισχυρή αποτελεσματικότητα. Έτσι, αναπτύχθηκαν οι αναστολείς CDKs τρίτης γενιάς με καλύτερη εκλεκτικότητα για τις CDK4/6. Σε σύγκριση με τους μη ειδικούς αναστολείς CDKs, οι εκλεκτικοί αναστολείς CDK4/6 δεν αναστέλλουν τις CDKs που ρυθμίζουν και ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο των φυσιολογικών κυττάρων, αποφεύγοντας έτσι την τοξικότητα και παρέχοντας ένα συγκεκριμένο θεραπευτικό στόχο. Επιπλέον, κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κυτταρική ευαισθησία στα φάρμακα θα βελτιωθεί με την απώλεια του P16^{INK4A} ή την υπερέκφραση της κυκλίνης D. Επειδή το σύμπλοκο κυκλίνης D-CDK4/6 είναι συνήθως υπερδραστήριο όταν το P16^{INK4A} είναι ανενεργό ή η κυκλίνη D υπερεκφράζεται, τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στους αναστολείς CDK4/6 από τα φυσιολογικά κύτταρα και μπορούν να αποφευχθούν κυτταροτοξικές επιδράσεις.^[14,48]



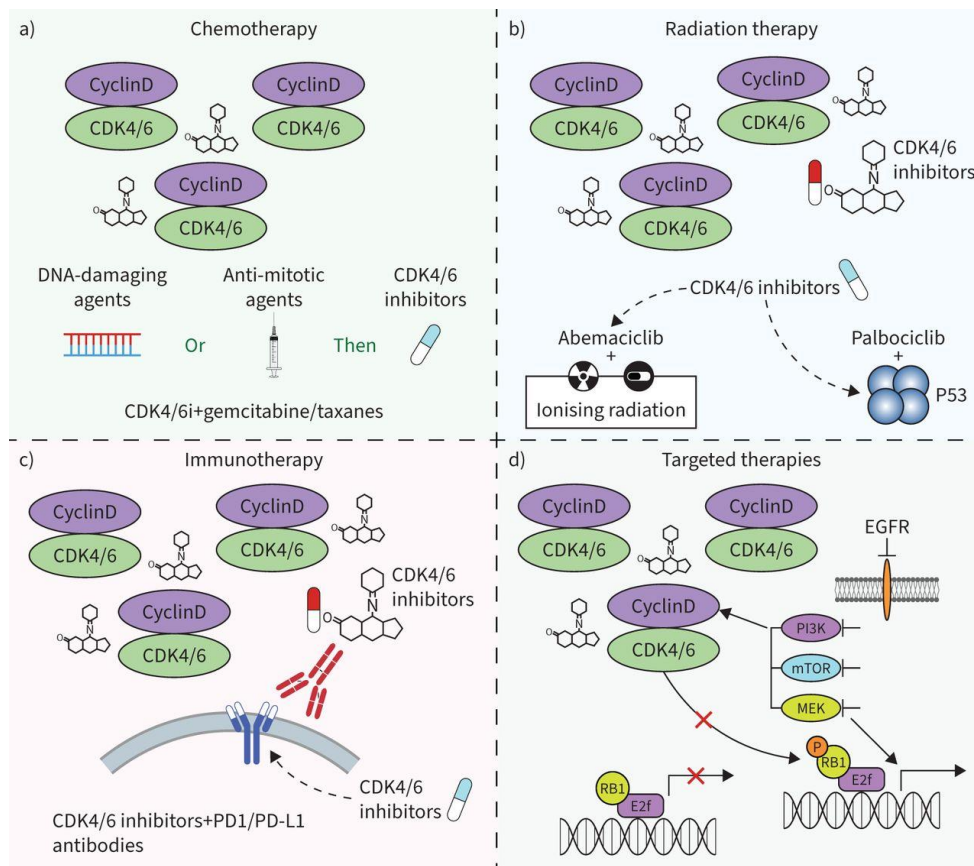
Εικόνα 2.21.: Οι αναστολείς των CDKs ταξινομούνται σε διαφορετικές γενιές με βάση την ανάπτυξή τους.^[65]

2.12 Αναστολείς CDKs τρίτης γενιάς

Οι αναστολείς των CDK4/6 έδειξαν εντυπωσιακά αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές με αποτέλεσμα την έγκρισή τους για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Το Palbociclib, το Ribociclib και το Abemaciclib δοκιμάζονται σε περισσότερες από 300 κλινικές δοκιμές για περισσότερους από 50 τύπους όγκων. Αυτές οι δοκιμές αξιολογούν τους αναστολείς CDK4/6 σε συνδυασμό με ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών ενώσεων που στοχεύουν άλλες οδούς που σχετίζονται με τον καρκίνο. Αρκετές συνδυαστικές θεραπείες αποδείχθηκαν αποτελεσματικές σε προκλινικές μελέτες και θα εισέλθουν σε κλινικές δοκιμές σύντομα. Ένας άλλος αναστολέας CDK4/6, το Trilaciclib, εξετάζεται για την ικανότητά του να προστατεύει τα φυσιολογικά κύτταρα από κυτταροτοξικές επιδράσεις της χημειοθεραπείας. Νέοι αναστολείς CDK4/6 έχουν αναπτυχθεί και αξιολογούνται σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Το κύριο εμπόδιο στη θεραπευτική χρήση των αναστολέων CDK4/6 είναι ότι οι ασθενείς που αρχικά ανταποκρίνονται στη θεραπεία συχνά αναπτύσσουν αντίσταση και τελικά υποκύπτουν στη νόσο.^[14] Περίπου το 10% των ασθενών θα παρουσιάσουν αντίσταση στους αναστολείς CDK4/6, περιορίζοντας τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αντίσταση περιλαμβάνουν την απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την ενεργοποίηση καρκινογόνων οδών μεταγωγής σήματος.^[66]

Name of compound	IC ₅₀	Other known targets	Stage of clinical development
Palbociclib (PD-0332991)	D1-CDK4, 11 nM; D2-CDK6, 15 nM; D3-CDK4, 9 nM		FDA-approved for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer in combination with endocrine therapy; phase 2/3 trials for several other tumor types
Ribociclib (LEE011)	D1-CDK4, 10 nM; D3-CDK6, 39 nM		FDA-approved for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer in combination with endocrine therapy; phase 2/3 trials for several other tumor types
Abemaciclib (LY2835219)	D1-CDK4, 0.6 to 2 nM; D3-CDK6, 8 nM	Cyclin T1-CDK9, PIM1, HIPK2, CDKL5, CAMK2A, CAMK2D, CAMK2G, GSK3α/β, and (at higher doses) cyclin E/A-CDK2 and cyclin B-CDK1	FDA-approved for early (adjuvant) and advanced HR ⁺ /HER2 ⁻ breast cancer in combination with endocrine therapy; FDA-approved as monotherapy in advanced HR ⁺ /HER2 ⁻ breast cancer; phase 2/3 trials for several other tumor types
Trilaciclib (G1T28)	D1-CDK4, 1 nM; D3-CDK6, 4 nM		FDA-approved for small-cell lung cancer to reduce chemotherapy-induced bone marrow suppression; phase 2/3 trials for other solid tumors
Lerociclib (G1T38)	D1-CDK4, 1 nM; D3-CDK6, 2 nM		Phase 1/2 trials for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer and EGFR-mutant non-small-cell lung cancer
SHR6390	CDK4, 12 nM; CDK6, 10 nM		Phase 1/2/3 trials for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer and other solid tumors
PF-06873600	CDK4, 0.13 nM (K _i), CDK6, 0.16 nM (K _i)	CDK2, 0.09 nM (K _i)	Phase 2 trials for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer and other solid tumors
FCN-437	D1-CDK4, 3.3 nM; D3-CDK6, 13.7 nM		Phase 1/2 trials for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer and other solid tumors
Birociclib (XZP-3287)	Not reported		Phase 1/2 trials for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer and other solid tumors
HS-10342	Not reported		Phase 1/2 trials for HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced breast cancer and other solid tumors
CS3002	Not reported		Phase 1 trial for solid tumors

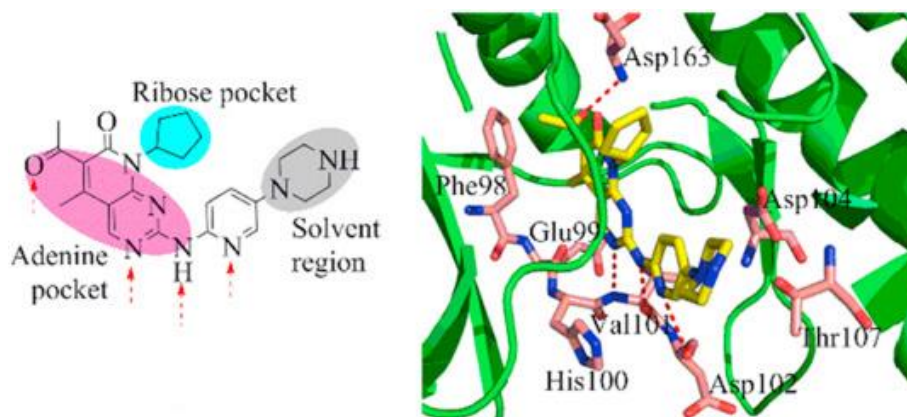
Πίνακας 2.4.: Οι κύριοι αναστολείς των CDK4/6, η συγκέντρωση IC₅₀ για διαφορετικά σύμπλοκα κυκλίνης D-CDK4/6 και το στάδιο κλινικής ανάπτυξης.^[48]



Εικόνα 2.22.: Οι αναστολείς CDK4/6 μπορούν να συνδυαστούν με χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και στοχευμένους παράγοντες όπως αναστολείς EGFR, MEK και mTOR.^[66]

2.12.1 Palbociclib

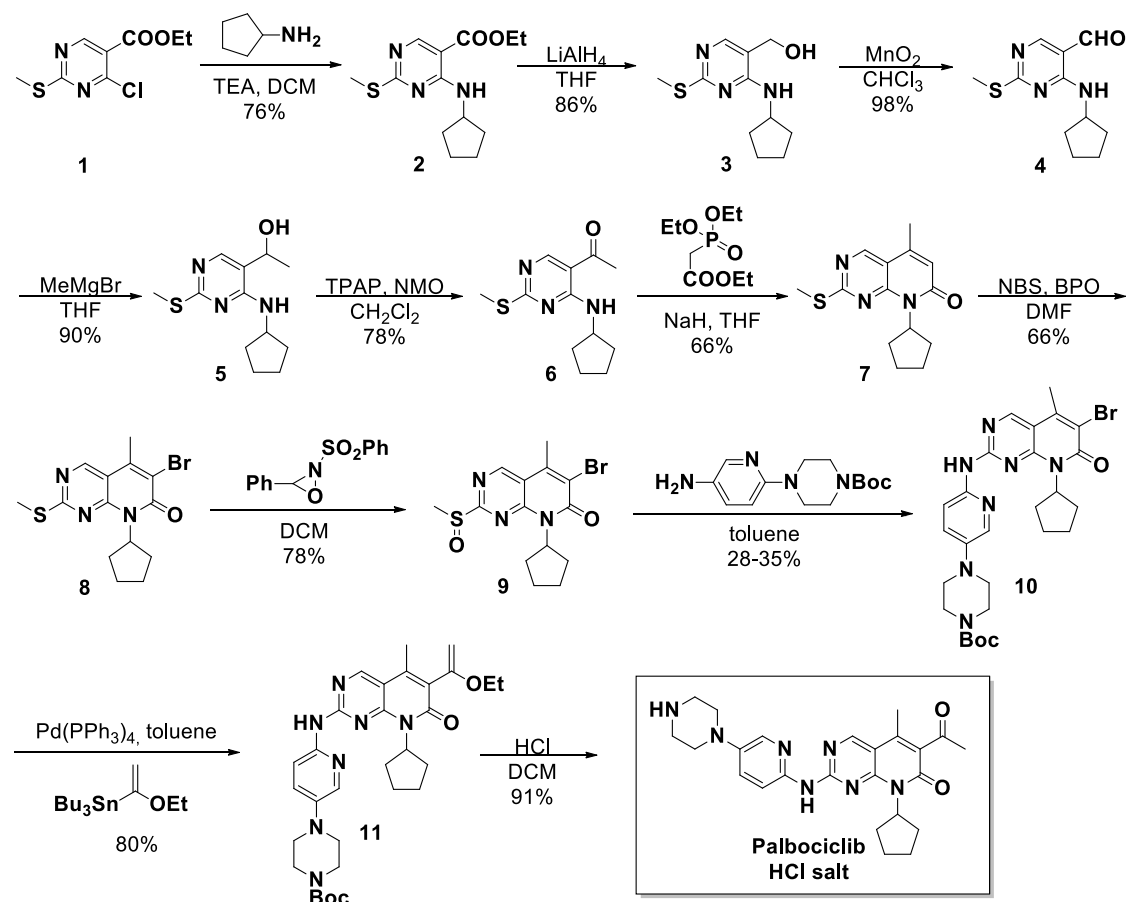
Η Pfizer ανέπτυξε τον πρώτο εκλεκτικό αναστολέα CDK4/6 όπου εγκρίθηκε από τον FDA τον Φεβρουάριο του 2015, σε συνδυασμό με fulvestrant για τη θεραπεία προχωρημένου ή μεταστατικού HR⁺/HER2⁻ καρκίνου του μαστού (εμπορική ονομασία Ibrance). Εγκρίθηκε το 2017 για τη θεραπεία του HR⁺/HER2⁻ προχωρημένου ή μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε συνδυασμό με έναν αναστολέα αρωματάσης ως αρχική ενδοκρινική θεραπεία. Εμφανίζει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των CDK4/6 (IC₅₀ = 9 και 15 nmol/L) και λιγότερη δράση έναντι των CDK1, 2 και 5 με τιμές IC₅₀ όλες πάνω από 10 μmol/L. Η κρυσταλλική δομή αποκάλυψε ότι ο αναστολέας έχει ισχυρές αλληλεπιδράσεις με την CDK6, συμπεριλαμβανομένων δύο δεσμών υδρογόνου με το διατηρημένο κατάλοιπο Val101 και ενός δεσμού υδρογόνου με το διατηρημένο κατάλοιπο Asp163.^[14] Το Palbociclib χορηγείται σε δόση 125 mg (χορηγούμενη από το στόμα) ημερησίως για 3 εβδομάδες ακολουθούμενη από 1 εβδομάδα χωρίς ή 200 mg ημερησίως για 2 εβδομάδες ακολουθούμενη από 1 εβδομάδα χωρίς.^[48] Η τοξικότητα που εμφανίζει περιλαμβάνει ουδετεροπενία, θρομβοπενία και αναιμία.^[14]



Σχήμα 2.6.: Η δομή του Palbociclib (αριστερά) και τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Palbociclib με την CDK6 (δεξιά).^[67]

2.12.1.1 Σύνθεση του Palbociclib

Η συνθετική πορεία του Palbociclib προτάθηκε από την Pfizer το 2005 και περιλάμβανε μια σειρά αντιδράσεων υποκατάστασης, οξειδοαναγωγής, Wittig-Horner, βρωμίωσης, σύζευξης, Stille, αποπροστασίας και υδρόλυσης, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση ως υδροχλωρικό άλας.^[68]

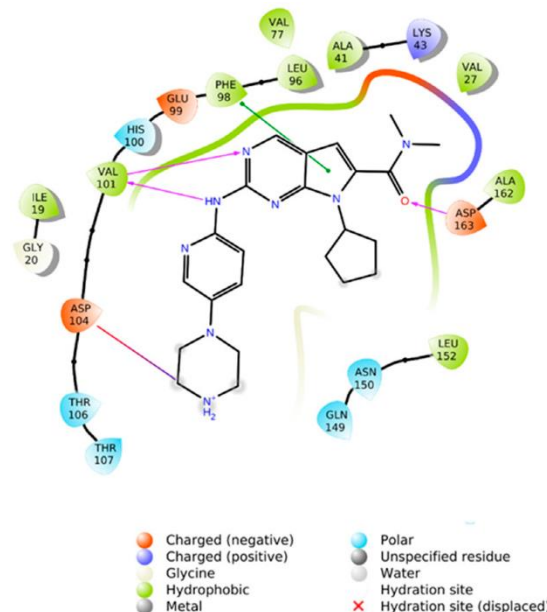


Σχήμα 2.7.: Πορεία σύνθεσης του Palbociclib.^[68]

2.12.2 Ribociclib

Από την εταιρία Novartis κατοχυρώθηκε ο δεύτερος αναστολέας CDK4/6 που εγκρίθηκε από τον FDA τον Μάρτιο του 2017, σε συνδυασμό με έναν αναστολέα αρωματάσης (AIs) για την θεραπεία ασθενών με $HR^+/HER2^-$ προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Το Ribociclib (Kisqali^[69], LEE011) αναστέλλει τις CDK4/6 με τιμές $IC_{50} = 10$ και 39 nmol/L, αντίστοιχα. Η κρυσταλλογραφική απεικόνιση αποκαλύπτει ότι τα κατάλοιπα Val101, Asp163, Asp104 και Thr107 παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης και του αναστολέα.^[14] Έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τα σύμπλοκα κυκλίνης D1-CDK4 και κυκλίνης D3-CDK6, ενώ είναι τέσσερις φορές πιο εκλεκτικό για την CDK4.^[64] Χορηγείται σε δόση 600 mg (χορηγούμενη από το στόμα) ημερησίως για 3 εβδομάδες ακολουθούμενη από 1 εβδομάδα χωρίς.^[48] Οι κύριες τοξικότητες που παρουσιάζει είναι η ουδετεροπενία και η θρομβοπενία.^[14]

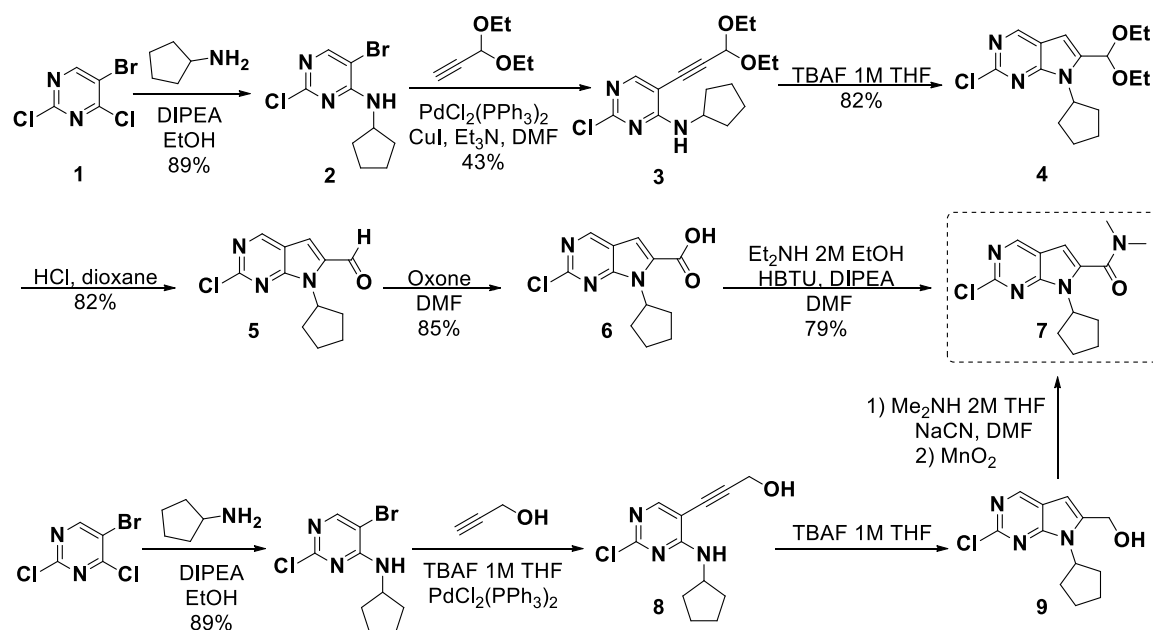
Το Ribociclib σε μελέτες *in vivo* δείχνει αντικαρκινική δράση έναντι διαφόρων όγκων όπως μαστού, μελανώματος, νευροβλαστώματος, πνεύμονα, παγκρέατος και αιματολογικών κακοηθειών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αντικαρκινική δράση όταν συνδυάζεται με στοχευμένους παράγοντες που αναστέλλουν οδούς σηματοδότησης που ρυθμίζουν τα επίπεδα κυκλίνης D, όπως αναστολείς RAF, MEK, PIK3 και mTOR. Σε μοντέλα ER^+ καρκίνου του μαστού η χορήγηση ribociclib σε συνδυασμό με letrozole, fulvestrant και tamoxifen προσφέρει στατιστικά σημαντική, ισχυρή και παρατεταμένη αντινεοπλασματική δράση σε σύγκριση με την ενδοκρινική θεραπεία ή τη χορήγηση ribociclib μόνο.^[14,70]



Σχήμα 2.8.: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Ribociclib με την CDK6.^[71]

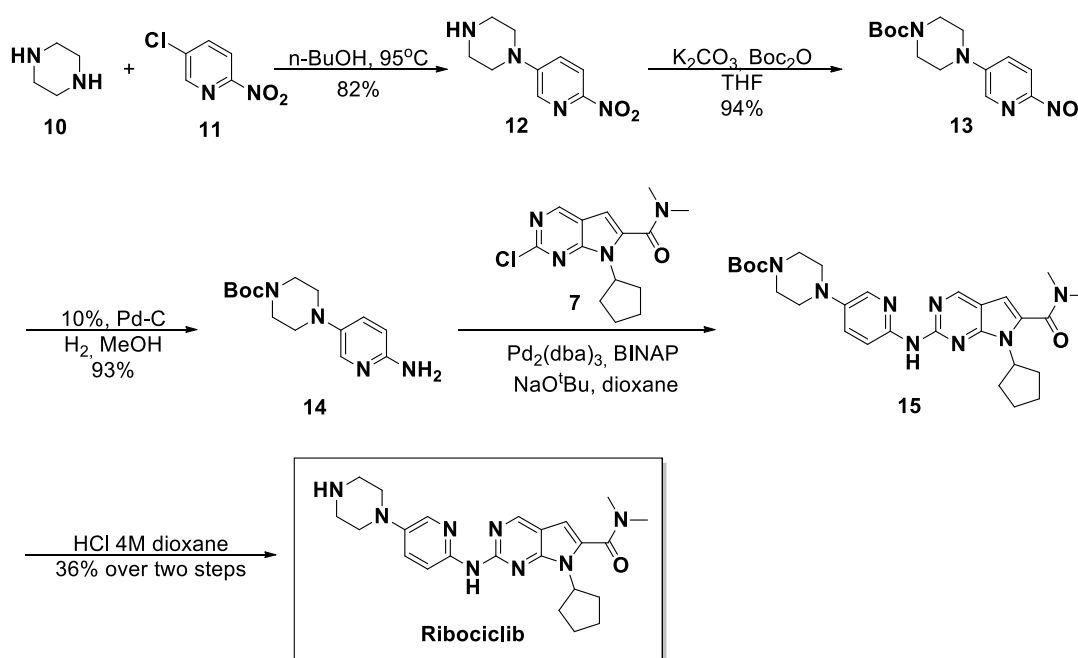
2.12.2.1 Σύνθεση του Ribociclib

Το Ribociclib είναι μια ένωση που φέρει τον χαρακτηριστικό πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινικό σκελετό και το ίδιο τμήμα πυριδοπυραζίνης με το Palbociclib. Η χρησιμότητα του πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινικού δακτυλίου για την αναστολή των CDK4/6 κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από την Novartis το 2007. Το 2010 η ίδια εταιρεία κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας εκλεκτικούς αναστολείς CDK4/6, συμπεριλαμβανομένων του Ribociclib. Ένα άλλο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας της εταιρίας το 2011 αναδείκνυε την αποτελεσματικότητα του Ribociclib. Τα δύο διπλώματα ευρεσιτεχνίας ανέφεραν, επίσης, δύο διαφορετικές συνθετικές πορείες για την απόκτηση του ενδιάμεσου τμήματος χλωροπυριμιδίνης 7 (Σχήμα 2.9).^[69]



Σχήμα 2.9.: Συνθετικές πορείες για την ενδιάμεση χλωροπυριμιδίνη 7 της μοριακής δομής του Ribociclib (WO2010020675-πάνω και WO2011101409-κάτω).^[69]

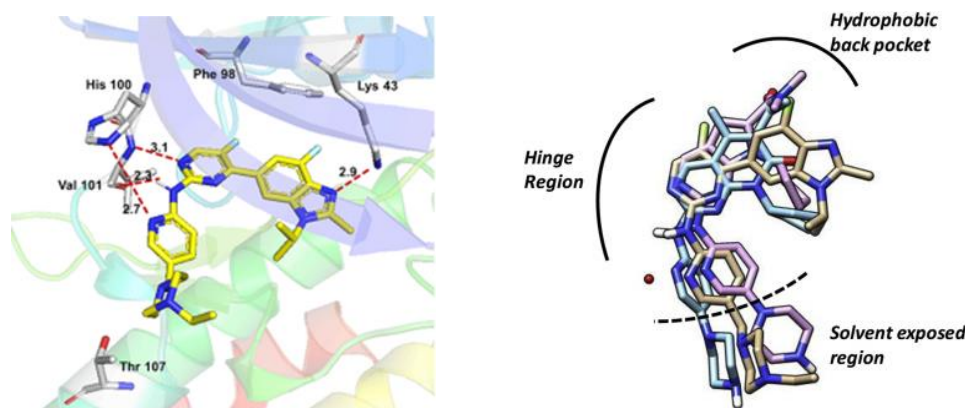
Η ενδιάμεση ένωση 7 προκύπτει και στις δύο περιπτώσεις μετά από σύζευξη Sonogashira και κυκλοποίηση μέσω TBAF. Η συνθετική πορεία που απαιτεί μικρότερο αριθμό βημάτων και αντιδραστηρίων, αντίστοιχα, είναι αυτή που χρησιμοποιείται για την σύνθεση του Ribociclib. Συγκεκριμένα, η μετατροπή του υδροξυμεθυλίου σε διμεθυλοφορμαμίδιο πραγματοποιείται σε ένα στάδιο με επεξεργασία της ένωσης 9 με διμεθυλαμίνη και κυανιούχο νάτριο, ακολουθούμενη από οξείδωση με τη χρήση MnO_2 . Σε κάθε περίπτωση, το τελικό προϊόν προκύπτει μετά από σύζευξη Buchwald του ενδιάμεσου τμήματος 7 με την ένωση 14 και αποκοπή της προστατευτικής ομάδας.^[69,72]



Σχήμα 2.10.: Τελικά στάδια στη σύνθεση του Ribociclib με συνολική απόδοση 36%.^[72]

2.12.3 Abemaciclib

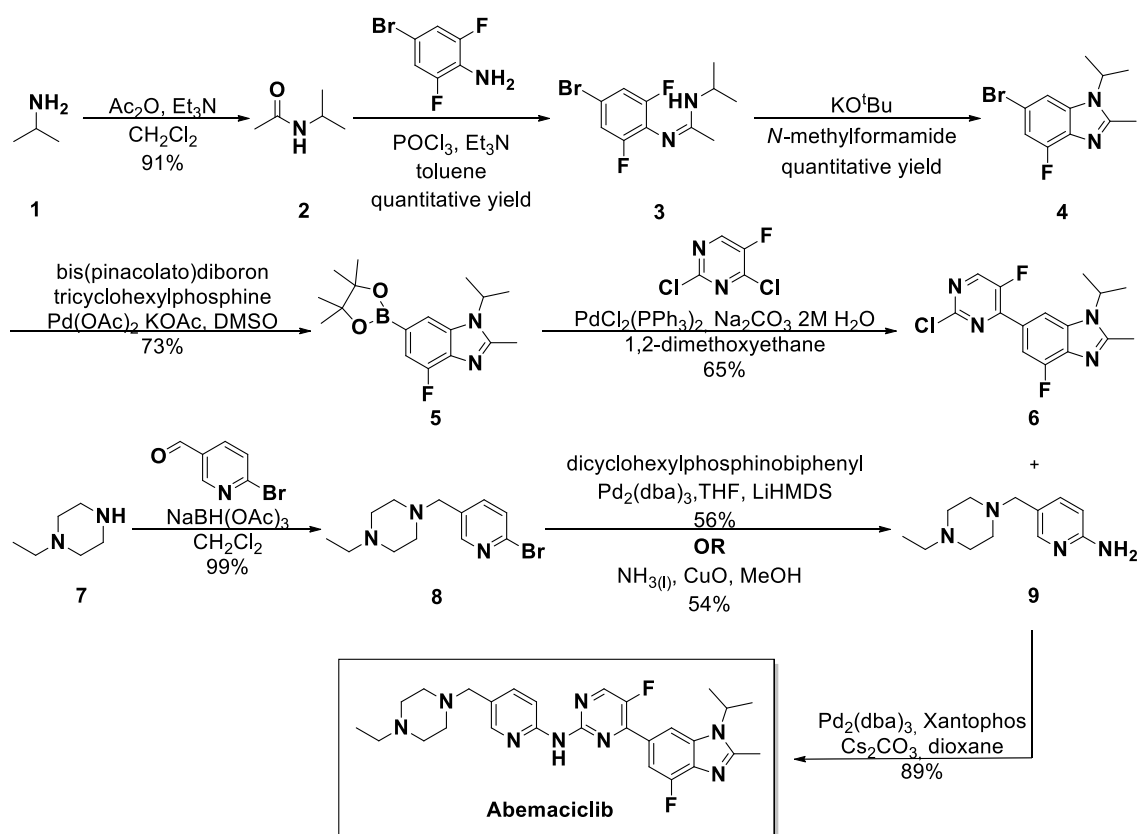
Ο τρίτος εκλεκτικός αναστολέας των CDK4/6 ($IC_{50} = 2$ και 10 nmol/L) εγκρίθηκε από τον FDA τον Σεπτέμβριο του 2017 σε συνδυασμό με fulvestrant για γυναίκες με $HR^+/HER2^-$ προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού με εξέλιξη της νόσου μετά από ενδοκρινική θεραπεία. Επιπλέον, το Abemaciclib εγκρίθηκε ως θεραπεία για γυναίκες και άνδρες με $HR^+/HER2^-$ προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού με εξέλιξη της νόσου μετά από ενδοκρινική θεραπεία και προηγούμενη χημειοθεραπεία σε μεταστατικό περιβάλλον. Πέρα από την αναστολή των CDK4/6, εμφανίζει επίσης αναστολή της CDK9 με τιμή $IC_{50} = 57$ nmol/L. Το τμήμα της αμινοπυριμιδίνης της ένωσης σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Val101 και Lys43, αλλά παρατηρήθηκε επίσης ένα μόριο νερού να γεφυρώνει το κατάλοιπο His100 και το άζωτο της πυριδίνης.^[14] Το Abemaciclib χορηγείται από το στόμα σε δόση 200 mg κάθε 12 ώρες.^[48] Οι παρενέργειες του περιλαμβάνουν διάρροια, ναυτία, κόπωση και ουδετεροπενία.^[14]



Σχήμα 2.11.: Τρισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του Abemaciclib με την CDK6 (αριστερά).^[14] Υπέρθηση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων των αναστολέων CDK4/6 (Palbociclib, Ribociclib και Abemaciclib) σε πλαίσιο με τα κύρια χαρακτηριστικά της θέσης πρόσδεσης του ATP (δεξιά).^[69]

2.12.3.1 Σύνθεση του Abemaciclib

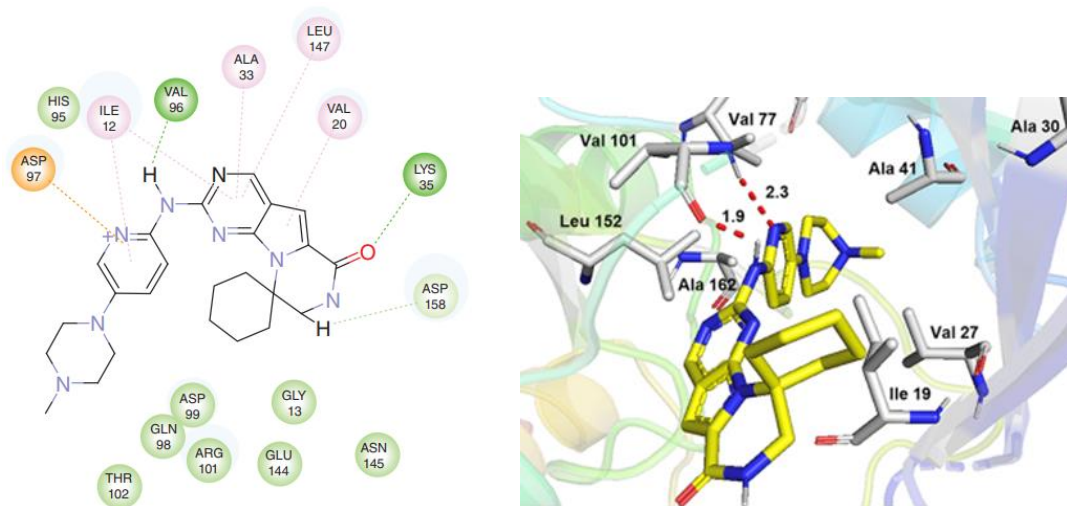
Το Abemaciclib είναι μια ένωση φαινυλοπυριμιδίνης που σχετίζεται δομικά με το Palbociclib και το Ribociclib. Το ετεροκυκλικό ενδιάμεσο τμήμα 4 συντέθηκε μέσω συμπύκνωσης του ακεταμιδίου 2 με 4-βρωμο-2,6-διφθοροανιλίνη ακολουθούμενη από ενδομοριακή κυκλοποίηση. Ο εστέρας 5 αντιδρά με 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνη μέσω σύζευξης Suzuki για να προκύψει η πρόδρομη ένωση 6. Η ενδιάμεση ένωση 8 λαμβάνεται έπειτα από αναγωγική αμίνωση της 2-βρωμο-5-φορμυλοπυριδίνης και της αιθυλοπιπεραζίνης 7. Αντικατάσταση του ατόμου βρωμίου της 8 από αμινομάδα δίνει την ένωση 9 και μετά ακολουθεί σύζευξη Buchwald των 9 και 6 ώστε να συντεθεί το επιθυμητό προϊόν, Abemaciclib.^[69]



Σχήμα 2.12.: Σύνθεση του Abemaciclib, όπως προτάθηκε από την εταιρία Eli-Lilly (US20100160340). Για την σύνθεση της ενδιάμεσης ένωσης 9 υπάρχουν δύο εναλλακτικοί τρόποι με παραπλήσια απόδοση.^[69]

2.12.4 Trilaciclib

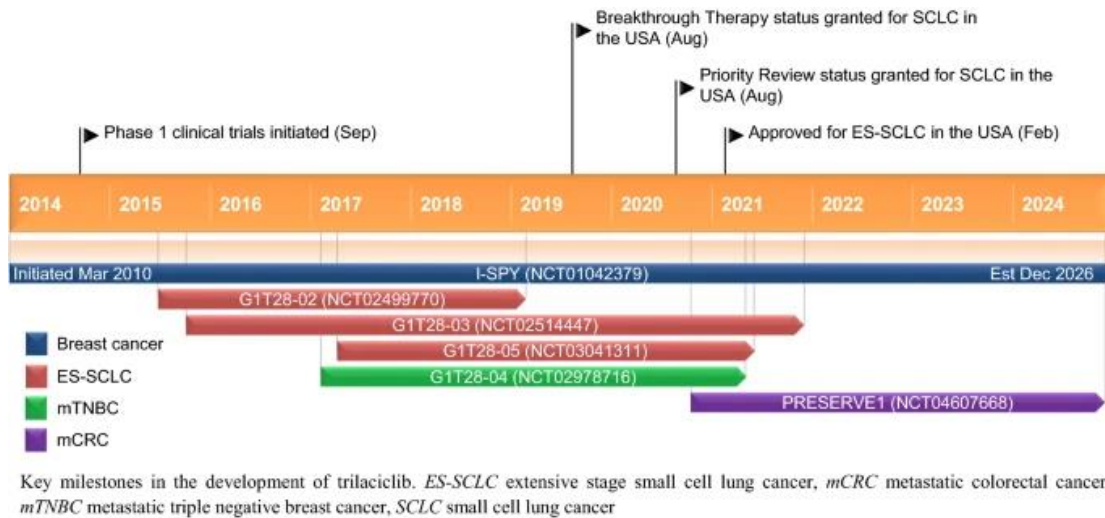
Το Trilaciclib (εμπορική ονομασία Cosela) αναπτύχθηκε από την G1 Therapeutics (πρώην G-Zero Therapeutics) και εγκρίθηκε στις 12 Φεβρουαρίου του 2021 για τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης CIM σε ενήλικες με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα εκτεταμένου σταδίου (ES-SCLC) που λαμβάνουν θεραπεία με πλατίνα/ετοποσιδή ή τοποτεκάνη.^[14,53,56] Η έγκριση του βασίστηκε στα αποτελέσματα τριών κλινικών δοκιμών φάσης II σε ασθενείς με ES-SCLC (NCT03041311, NCT02514447, NCT02499770).^[73] Είναι αναστολέας των CDK4/6 ($\text{IC}_{50} = 1$ και 4 nmol/L) που σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Val101 και παρουσιάζει, επίσης, δράση έναντι της CDK9 ($\text{IC}_{50} = 50 \text{ nmol/L}$). Δεσμεύεται στην θέση πρόσδεσης του ATP για να προστατεύσει τις αιμοποιητικές γραμμές από τη βλάβη του DNA εξαιτίας της χημειοθεραπείας προκαλώντας αναστρέψιμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, διευκολύνοντας έτσι τη μυελοσυντήρηση.^[14] Καθώς το Trilaciclib είναι η πρώτη ένωση που αναπτύχθηκε για αυτή την κατηγορία φαρμάκων έλαβε τον χαρακτηρισμό πρωτοποριακής θεραπείας από τον FDA το 2019.^[74]



Σχήμα 2.13.: Απεικόνιση 2D των αλληλεπιδράσεων CDK4-Trilaciclib (αριστερά).^[75] Απεικόνιση 3D των αλληλεπιδράσεων CDK6-Trilaciclib. Οι δεσμοί υδρογόνου εμφανίζονται ως κόκκινες διακεκομμένες γραμμές και ο αριθμός είναι η απόσταση σε Å (δεξιά).^[14]

Εκτός από την κλινική του αποτελεσματικότητα, το Trilaciclib έχει επίσης αποδειχθεί ότι μειώνει το συνολικό κόστος υγειονομικής περίθαλψης και βελτιώνει την ποιότητα ζωής των ασθενών με ES-SCLC. Τα προκλινικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι, εκτός από την προστασία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, ενεργοποιεί άμεσα την ανοσοποιητική λειτουργία ενισχύοντας την ανοσία των T-κυττάρων.^[73] Σε ασθενείς με SCLC που έλαβαν χημειοθεραπεία, η χορήγηση του Trilaciclib είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση και την ενίσχυση του αριθμού των λεμφοκυττάρων και τη βελτιωμένη ενεργοποίηση των T-κυττάρων, υποδεικνύοντας ότι όχι μόνο διατήρησε αλλά και βελτίωσε τη λειτουργία του ανοσοποιητικού.^[73,76]

Οι αναστολείς CDK4/6 μπορεί να προστατεύουν τόσο τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα όσο και τα καρκινικά κύτταρα από την τοξικότητα της χημειοθεραπείας. Αυτό το πρόβλημα επιλύεται στην περίπτωση του SCLC λόγω της χημειοευαισθησίας του και της απώλειας της πρωτεΐνης RB. Επίσης, ο TNBC είναι κατά κύριο λόγο ανεξάρτητος από τις CDK4/6 λόγω μετάλλαξης ή απώλειας του γονιδίου *RB1* ή χαμηλής έκφρασης της πρωτεΐνης RB. Αποτελέσματα από μελέτες φάσης II σε ασθενείς με ES-SCLC έδειξαν ότι το trilaciclib δεν ανταγωνίζεται την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας.^[73,77] Η συνιστάμενη δόση του είναι 240 mg/m² ανά δόση που πρέπει να χορηγηθεί ως ενδοφλέβια έγχυση διάρκειας 30 λεπτών που ολοκληρώνεται εντός 4 ωρών πριν από την έναρξη της χημειοθεραπείας κάθε ημέρα που χορηγείται η χημειοθεραπεία. Το διάστημα μεταξύ των δόσεων του trilaciclib σε διαδοχικές ημέρες δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 28 ώρες. Μπορεί να απαιτηθεί προσαρμογή της δόσης ή διακοπή της θεραπείας για τη διαχείριση των ανεπιθύμητων ενεργειών.^[16] Η χορήγηση trilaciclib πριν από τη χημειοθεραπεία συσχετίστηκε με μείωση της ουδετεροπενίας (82%), της εμπύρετης ουδετεροπενίας (75%), της αναιμίας (43%) και της θρομβοπενίας (96%) σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία μόνη της.^[78]



Εικόνα 2.23.: Βασικά στάδια της ανάπτυξης του Trilaciclib.^[16]

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε πρόσφατα μια δοκιμή φάσης II για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του trilaciclib σε συνδυασμό με gemcitabine και carboplatin (GC) για τη θεραπεία υποτροπιάζοντος ή μεταστατικού TNBC. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι η προσθήκη trilaciclib στην τυπική θεραπεία GC αυξάνει σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης. Εκτός από αυτές τις δοκιμές, διεξάγονται πρόσθετες κλινικές μελέτες φάσης II/III/IV για προχωρημένο/μεταστατικό καρκίνο της ουροδόχου κύστης (NCT04887831), καρκίνο του μαστού (NCT04799249, NCT05113966, NCT05112536) και καρκίνο του παχέος εντέρου (NCT04607668, NCT04902885).^[64,73]

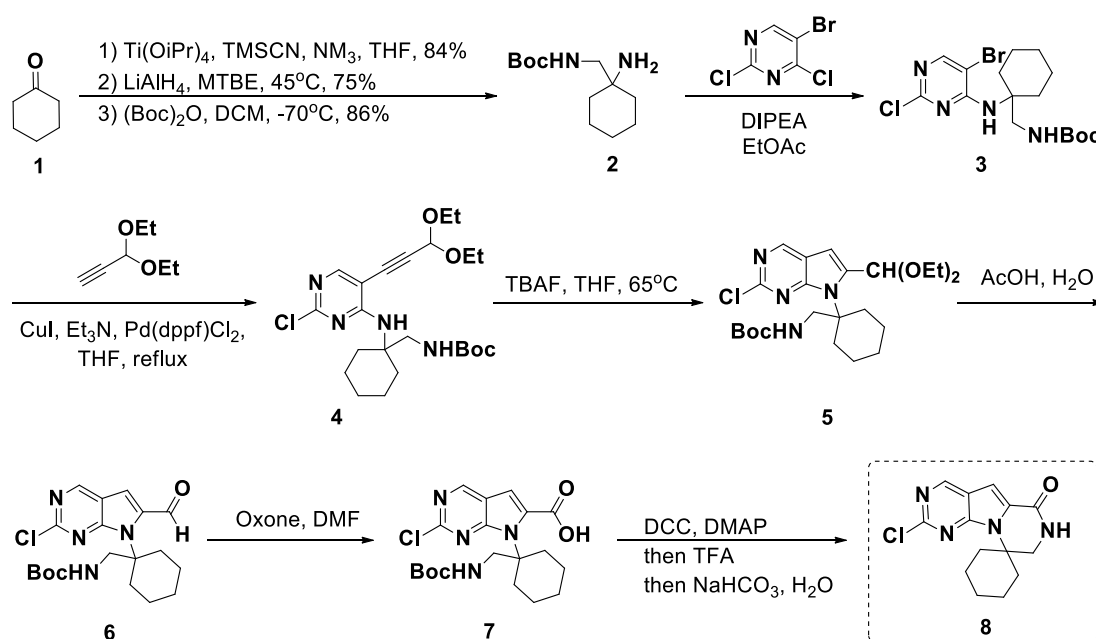
	NCT Number	Status	Conditions	Interventions	Phase	Study Type	Start Date	Completion Date
Trilaciclib	NCT05112536	A, not R	TNBC	Trilaciclib, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Paclitaxel, Carboplatin (Investigator discretion), Biological: Pembrolizumab (Investigator discretion)	II	Interventional	Nov-21	Feb-23
	NCT04799249	R	TNBC	Trilaciclib, Placebo, Gemcitabine, Carboplatin	III		Apr-21	Oct-24
	NCT05113966	R	TNBC	Trilaciclib, Sacituzumab Govitecan-hziy	II		Nov-21	Jul-24
	NCT01042379	R	Breast Neoplasms, Breast Cancer, Breast Tumors, Angiosarcoma, TNBC, HER2 + Breast Cancer, HER2- Breast Cancer, HR+ Tumor, HR-Tumor, Early-stage Breast Cancer, Locally Advanced Breast Cancer	Standard Therapy, AMG 386 with or without Trastuzumab, AMG 479 (Ganitumab) plus Metformin, MK-2206 with or without Trastuzumab, AMG 386 and Trastuzumab, T-DM1 and Pertuzumab, Pertuzumab and Trastuzumab, Ganetespib, ABT-888, Neratinib, PLX3397, Pembrolizumab - 4 cycle, Talazoparib plus Irinotecan, Patritumab and Trastuzumab, Pembrolizumab - 8 cycle, SGN-LIV1A, Durvalumab plus Olaparib, SD-101 + Pembrolizumab, Tucatinib plus trastuzumab and pertuzumab, Cemiplimab, Cemiplimab plus REGN3767, Trilaciclib with or without trastuzumab + pertuzumab, SYD985 (Ivic-) trastuzumab duocarmazine), Oral Paclitaxel + Encequidar + Dostarlimab (TSR-042) + Carboplatin with or without trastuzumab, Oral Paclitaxel + Encequidar + Dostarlimab (TSR-042) with or without trastuzumab, Amcenestrant, Amcenestrant + Abemaciclib, Amcenestrant + Letrozole	II		Mar-10	Dec-31

Note. A= Active, C= Completed, R= Recruiting

Πίνακας 2.5.: Κατάλογος εν εξελίξει προηγμένων κλινικών δοκιμών του Trilaciclib.^[64]

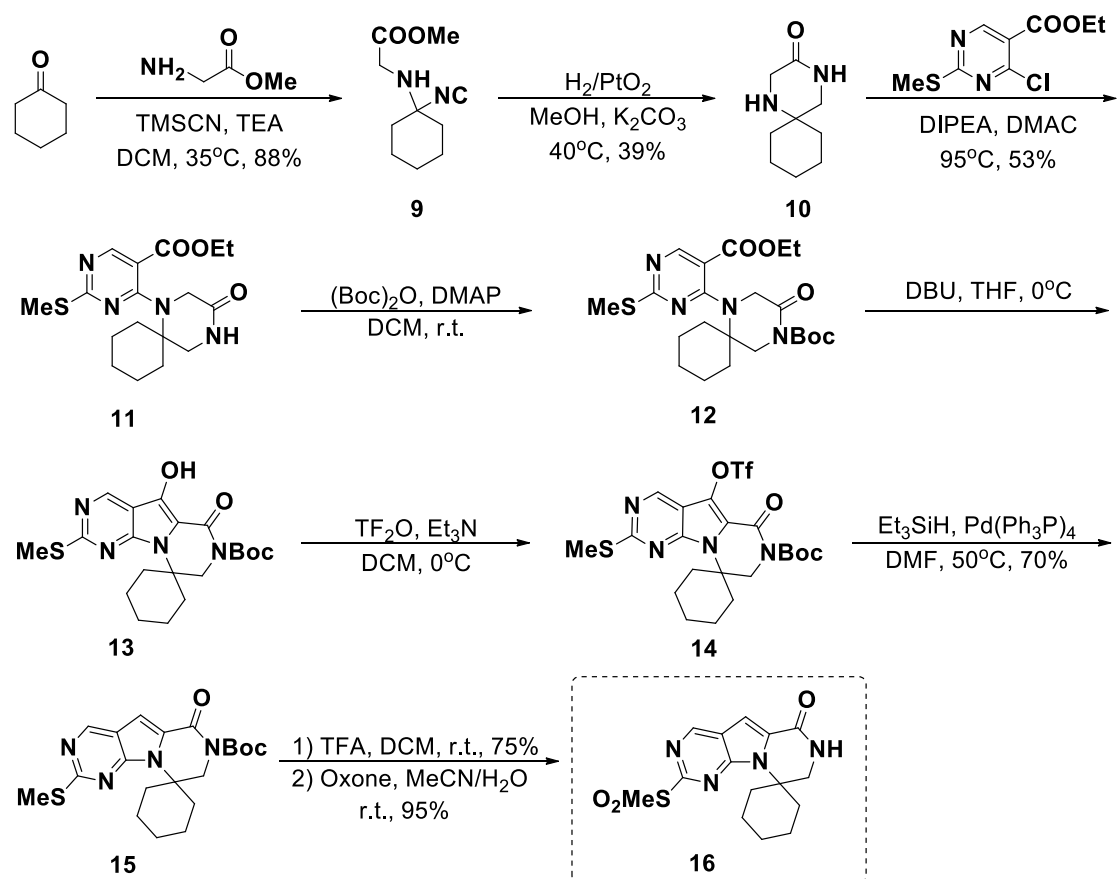
2.12.4.1 Σύνθεση του Trilaciclib

Η σύνθεση του Trilaciclib μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δύο συνθετικών οδών οι οποίες έχουν κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας. Η πρώτη εναλλακτική πορεία ξεκινά με την διαμίνη 2 που σχηματίζεται μέσω τριών σταδίων από κυκλοεξανόνη και αντιδρά μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης με την 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη ώστε να προκύψει η ένωση 3. Ακολουθεί σύζευξη Sonogashira και κυκλοποίηση για να δώσουν την ένωση 5 η οποία οδηγείται σε λακταμοποίηση για να συντεθεί η ενδιάμεση ένωση 8 όπου στην συνέχεια αντιδρά με την ένωση 19 παρουσία καταλύτη-Pd για να σχηματίσει το Trilaciclib (Σχήματα 2.14. & 2.16.).^[79,81]

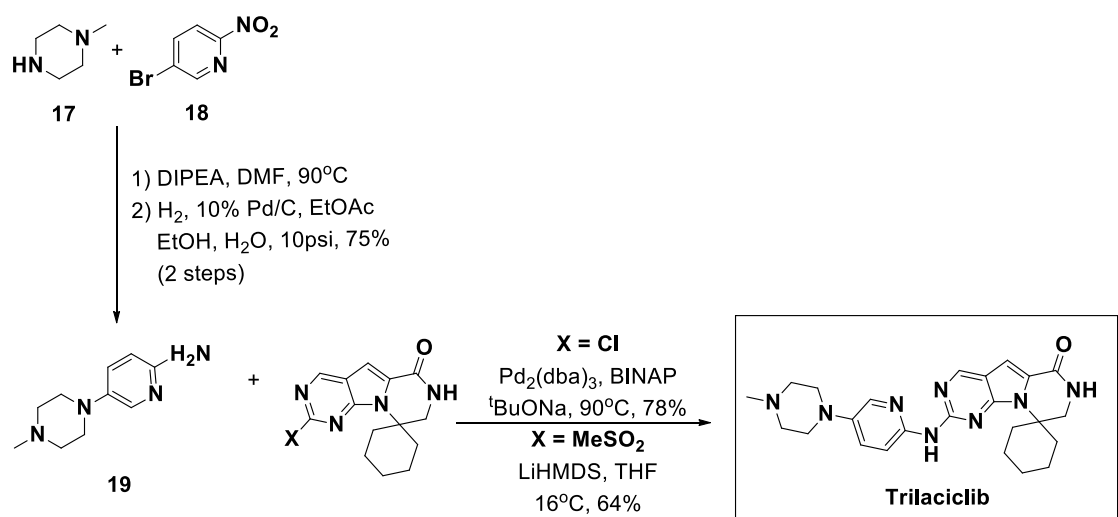


Σχήμα 2.14.: Πορεία σχηματισμού ενδιάμεσης ένωσης 8 για την σύνθεση του Trilaciclib.^[81]

Η δεύτερη πορεία που χρησιμοποιείται περισσότερο στην βιομηχανία ξεκινά με μια αντίδραση Strecker της κυκλοεξανόνης για να προκύψει η ένωση 9 που υποβάλλεται σε αντίδραση υδρογόνωσης και λακταμοποίηση για να δώσει την ένωση 10. Ακολουθεί αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης για προκύψει η ένωση 12 μετά από αντίδραση N-Boc προστασίας. Η επεξεργασία της με DBU στους 0°C σε THF οδηγεί σε ενδομοριακή κυκλοποίηση και δίνει την ένωση 13. Στη συνέχεια, η ομάδα υδροξυλίου απομακρύνεται σε δύο στάδια ώστε τελικά η ένωση 15 μέσω N-Boc αποπροστασίας και οξείδωσης να δώσει την ενδιάμεση ένωση 16. Στο τελικό στάδιο της πορείας αντιδρά η ένωση 16 και η ένωση 19 (που παρασκευάστηκε μέσω αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ των ενώσεων 17 και 18, ακολουθούμενη από καταλυτική υδρογόνωση) παρουσία ισχυρής βάσης ώστε να συντεθεί το Trilaciclib (Σχήματα 2.15. & 2.16.).^[53,74,80,81]



Σχήμα 2.15.: Εναλλακτική προσέγγιση σύνθεσης του παραγώγου της 2-κετοπιπεραζίνης, 16, για τη σύνθεση του Trilaciclib, όπως προτάθηκε από την εταιρία G1 Therapeutics.^[74,81,82]



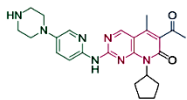
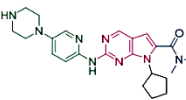
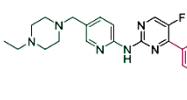
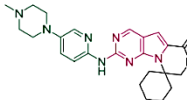
Σχήμα 2.16.: Τελικά στάδια σύνθεσης του Trilaciclib.^[74,81]

2.12.5 Σύγκριση Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib και Trilaciclib

Το Palbociclib και το Ribociclib έχουν παρόμοια δομή με υψηλή εκλεκτικότητα προς τις CDK4/6, ενώ το Abemaciclib έχει διαφορετική χημική δομή που επιτρέπει την

αναστολή άλλων κινασών, όπως της CDK9 χωρίς όμως διακριτά αποτελέσματα σε κυτταρικές σειρές. Το Palbociclib και το Abemaciclib είναι πιο αποτελεσματικά στην αναστολή φωσφορυλίωσης της σερίνης 807 και της σερίνης 780 της RB σε σύγκριση με το Ribociclib. Το Palbociclib και το Ribociclib εμφανίζουν παρόμοια αποτελέσματα, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ΑΙ ως θεραπεία πρώτης γραμμής και σε συνδυασμό με fulvestrant ως επακόλουθη γραμμή θεραπείας σε ασθενείς με HR⁺/HER2⁻ προχωρημένο/μεταστατικό καρκίνο του μαστού. Αντίθετα, το Abemaciclib μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με fulvestrant για τη θεραπεία γυναικών με HR⁺/HER2⁻ προχωρημένο/μεταστατικό καρκίνο του μαστού που είχαν προηγουμένως λάβει ενδοκρινική θεραπεία και ως μονοθεραπεία για ασθενείς που είχαν λάβει προηγουμένως ενδοκρινική θεραπεία και χημειοθεραπεία σε μεταστατικό περιβάλλον. Τοξικότητα παρατηρείται συνήθως και στους τρεις αναστολείς, αλλά ορισμένες αιματολογικές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι πιο συχνές με το Palbociclib και το Ribociclib, για παράδειγμα η ουδετεροπενία βαθμού 3-4 εμφανίζεται στο 66% και στο 60% των ασθενών που λαμβάνουν θεραπεία με Palbociclib και Ribociclib αντίστοιχα, αλλά μόνο στο 22% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με Abemaciclib.^[70]

Το Trilaciclib διαφέρει από τους υπόλοιπους εγκεκριμένους αναστολείς CDK4/6 ως προς τον τρόπο χορήγησής του, τις απαραίτητες δόσεις και την προβλεπόμενη χρήση. Οι εγκεκριμένοι από του στόματος αναστολείς CDK4/6 χορηγούνται χρόνια για να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό όγκων που εξαρτάται από τις CDK4/6, ενώ το Trilaciclib χορηγείται ενδοφλεβίως και σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία για να στοχεύσει φυσιολογικά αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, προγονικά κύτταρα και πληθυσμούς λεμφοκυττάρων.^[83] Στην συνέχεια, παρατίθεται πίνακας όπου συνοψίζει τα κύρια χαρακτηριστικά των τεσσάρων εγκεκριμένων αναστολέων 3^{ης} γενιάς (Πίνακας 2.6.).^[84]

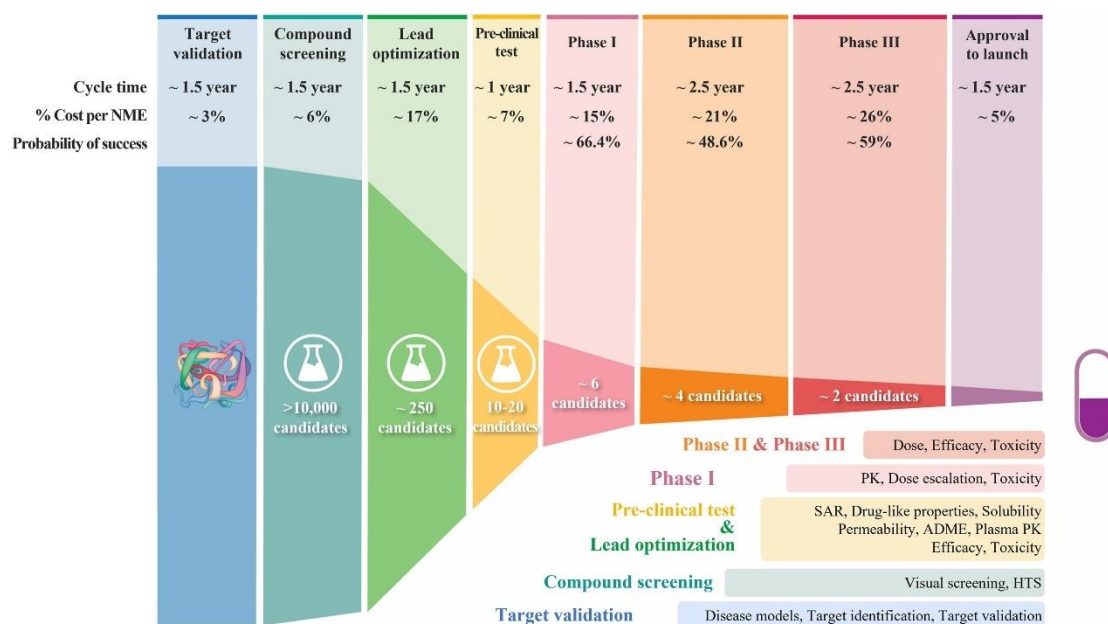
Drug	Palbociclib	Ribociclib	Abemaciclib	Trilaciclib
Structure				
<i>In vitro</i> kinase assay (IC ₅₀)	CDK4/cyclin D: 9-11 nM CDK6/cyclin D: 16 nM	CDK4/cyclin D: 10 nM CDK6/cyclin D: 39 nM	CDK4/cyclin D: 2 nM CDK6/cyclin D: 10 nM	CDK4/cyclin D: 1 nM CDK6/cyclin D: 4 nM
Pharmacokinetic parameters	T _{max} : 4.2-5.5 h t _{1/2} : 25.9-26.7 h	T _{max} : 4.0 h t _{1/2} : 24-36 h	T _{max} : 4-6 h t _{1/2} : 17-38 h	T _{max} : 0.25-4 h t _{1/2} : 3.46-20.9 h
Drug dose	125/200 mg daily: one cycle is 3/2 weeks on, 1 week off	600 mg daily: one cycle is 3 weeks on, 1 week off	200 mg twice a day, continuous administration	240 mg/m ² intravenous infusion on each chemotherapy day
Launch time	February 3, 2015 (FDA)	March 13, 2017 (FDA)	September 28, 2017 (FDA)	February 13, 2021 (FDA)
Indications	Combined with aromatase inhibitors to treat HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced or metastatic breast cancer	Combined with letrozole for the treatment of HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced or metastatic breast cancer	Combined with fulvestrant or administered as a monotherapy to treat HR ⁺ /HER2 ⁻ advanced or metastatic breast cancer	Provides bone marrow protection to patients with late-stage small cell lung cancer receiving chemotherapy
Dose-limiting toxicities	Neutropenia, thrombocytopenia	Neutropenia, thrombocytopenia	Fatigue, gastrointestinal discomfort	Fatigue, phlebitis and thrombophlebitis, pneumonitis

Πίνακας 2.6.: Πληροφορίες για τους εγκεκριμένους αναστολείς CDK4/6.^[84]

2.12.6 Μελλοντικοί στόχοι για αποτελεσματικότερη θεραπεία

Εκλεκτικές ενώσεις που αναστέλλουν την CDK4, αλλά όχι την CDK6 μπορεί να επιτρέψουν αυξημένη δοσολογία, καθώς αναμένεται να μην οδηγήσουν σε τοξικότητα του μυελού των οστών που προκαλείται από την αναστολή της CDK6. Επειδή η δράση της CDK2 αντιπροσωπεύει έναν συχνό μηχανισμό αντίστασης σε αναστολείς CDK4/6, οι ενώσεις που αναστέλλουν τις CDK4/6 και CDK2 μπορεί να αποτρέψουν ή να καθυστερήσουν την ανάπτυξη αντοχής. Οι κυκλίνες D πιθανώς συμμετέχουν ανεξάρτητα από τις CDKs στην ογκογένεση, για παράδειγμα ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων. Ωστόσο, ο ρόλος τους στη βιολογία του όγκου και η χρησιμότητα της στόχευσης αυτών για τη θεραπεία του καρκίνου παραμένει σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητος. Οι ενώσεις που επάγουν πρωτεόλυση της κυκλίνης D μπορεί να έχουν θετικές επιδράσεις, καθώς θα αντιμετωπίζουν τόσο τις εξαρτώμενες από CDK4/6 όσο και τις ανεξάρτητες λειτουργίες των κυκλινών στην ογκογένεση.^[48]

Μια σημαντική πρόκληση είναι η δοκιμή συνδυαστικών θεραπειών που περιλαμβάνουν αναστολείς CDK4/6 για τη θεραπεία διαφορετικών τύπων όγκων, καθώς και η πιθανή χρήση αναστολέων CDK4/6 στη θεραπεία άλλων ασθενειών. Με βάση αυτά, είναι εύλογο το γεγονός ότι η βιολογία των CDK4/6 θα παραμείνει στο κέντρο της έρευνας για αρκετά χρόνια. Τα μέλη της οικογένειας CDKs συνεχίζουν να διερευνώνται εντατικά σε κλινικές δοκιμές, με πέντε νέα SMKIs που στοχεύουν την CDK4 σε κλινικές δοκιμές και άλλα 12 SMKIs που στοχεύουν τις CDK7, CDK8/19, CDK2 και CDK9 είτε εκλεκτικά είτε σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες να βρίσκονται σε δοκιμές φάσης I και II.^[48,58] Συνεπώς, οι αναστολείς CDK4/6 έχουν μεγάλες δυνατότητες ως ευρέως φάσματος αντικαρκινικά φάρμακα με βάση τα θετικά αποτελέσματα από κλινικές εφαρμογές τους στον καρκίνο του πνεύμονα και του μαστού.^[66]



Σχήμα 2.17.: Η διαδικασία ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων καθώς και το ποσοστό αποτυχίας σε κάθε βήμα.^[85]

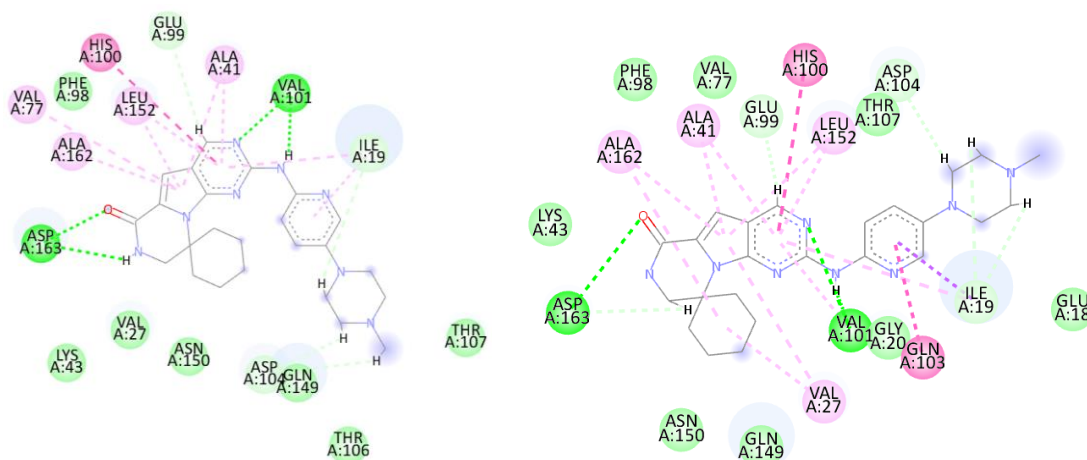
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

Συζήτηση – Αποτελέσματα

Μετά την ολοκλήρωση του θεωρητικού υπόβαθρου όπου αναλύθηκε η πορεία ανακάλυψης των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών και επισημάνθηκε η αναγκαιότητα εύρεσης νέων αναστολέων με καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα, ακολουθεί η συζήτηση των αποτελεσμάτων για τα πειράματα που έλαβαν χώρα. Όπως έχει ήδη καταστεί σαφές σκοπός αυτού του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης είναι ο σχεδιασμός αλλά και η σύνθεση νέων βιοδραστικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Trilaciclib, για την θεραπεία του καρκίνου. Για την επίτευξη του πραγματοποιήθηκαν και παρουσιάζονται πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των αναλόγων που σχεδιάστηκαν καθώς και ένα μέρος από τις αντίστοιχες συνθετικές τους πορείες.

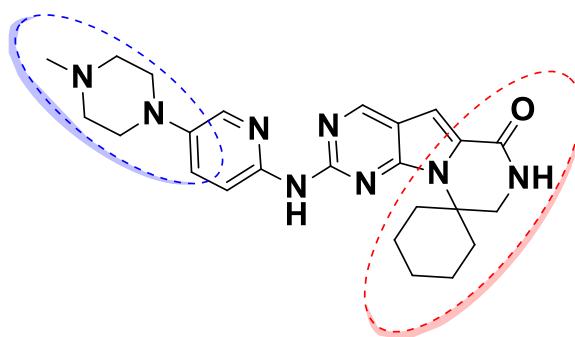
3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων των CDK4/6

Ο σχεδιασμός νέων οργανικών βιοδραστικών ενώσεων, ως το πρώτο βήμα πριν την σύνθεση νέων εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, βασίζεται σε τροποποιήσεις της μοριακής δομής εγκεκριμένων φαρμάκων που στοχεύουν σε καλύτερη ανασταλτική δράση και αυξημένη εκλεκτικότητα έναντι των πρωτεϊνών-στόχων. Αρχικά, μετά από αναζήτηση στην Βάση Δεδομένων για τα τρισδιάστατα δομικά δεδομένα μεγάλων βιολογικών μορίων, όπως οι πρωτεΐνες (RCSB Protein Data Bank) δυστυχώς διαπιστώθηκε πως δεν έχουν αναρτηθεί ακόμα τα αποτελέσματα συγκρυστάλλωσης της CDK4 ή CDK6 και του Trilaciclib. Επομένως, επιλέχθηκαν παλαιότερα κρυσταλλογραφικά δεδομένα για την δομή της CDK6 (PDB ID: 5L2T και PDB ID: 4AUA) και μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις της με την μοριακή δομή του Trilaciclib (ligand). Μετά από σύγκριση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε πως και στις δυο περιπτώσεις το Trilaciclib σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου (πράσινο χρώμα), van der Waals αλληλεπιδράσεις (ανοιχτό πράσινο χρώμα), πi-πi αλληλεπιδράσεις (έντονο ροζ χρώμα) και ένα πλήθος από πi-alkyl αλληλεπιδράσεις (ροζ χρώμα) με τα αμινοξέα της CDK6 (π.χ. Val101, Asp163).



Σχήμα 3.1.: Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Trilaciclib και της CDK6 πριν την μοριακή μοντελοποίηση (Αριστερά: PDB ID: 5L2T και Δεξιά: PDB ID: 4AUA).

Παρατηρήθηκε, λοιπόν, πως ο σπειροκυκλικός δακτύλιος δεν συνεισφέρει στις αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη-στόχο και με βάση αυτό σχεδιάστηκαν ανάλογα στα οποία γίνεται διάνοιξη αυτού του τμήματος, όπως παρουσιάζονται παρακάτω. Πιο αναλυτικά, διατηρήθηκε ανέπαφο το τμήμα του πυριδινικού και πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινικού δακτυλίου καθώς είναι απαραίτητο για τις αλληλεπιδράσεις με την κινάση και έγινε προσθήκη μεθυλομάδων στο αμίδιο που προέκυψε και ταυτόχρονη προσθήκη αρωματικών δακτυλίων στην θέση N1 του 5,7-διαζαϊνδολικού σκελετού (ανάλογα T1 και T2). Σχεδιάστηκε, επίσης, η ταυτόχρονη αντικατάσταση του πιπεραζινικού δακτυλίου με τον μεθυλο-πιπεραζινικό δακτύλιο (ανάλογα T3 και T4). Στο τελευταίο ανάλογο που σχεδιάστηκε διατηρήθηκε η δομή του Trilaciclib ως έχει και τροποποιήθηκε μόνο το τμήμα του πιπεραζινικού δακτυλίου (ανάλογο T5). Σε όλα τα ανάλογα που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης και οι τιμές πρόσδεσης που εμφάνισαν με την CDK6 συσχετίστηκαν με την ένωση αναφοράς, το Trilaciclib.



Σχήμα 3.2.: Τα τμήματα στην δομή του Trilaciclib στα οποία σχεδιάστηκαν τροποποιήσεις.

Ανάλογα	Συντακτικός τύπος	Ονοματολογία
T1		7-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)- <i>N,N</i> -διμεθυλ-2-((5-(4-μεθυλπιπεραζιν-1-υλ)πυριδιν-2-υλ)αμινο)-7 <i>H</i> -πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο C ₂₇ H ₃₂ N ₈ O ₃ (M.W.: 516.59)
T2		7-βενζυλ- <i>N,N</i> -διμεθυλ-2-((5-(4-μεθυλπιπεραζιν-1-υλ)πυριδιν-2-υλ)αμινο)-7 <i>H</i> -πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο C ₂₆ H ₃₀ N ₈ O (M.W.: 470.57)

T3		<p>7-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)-<i>N,N</i>-διμεθυλ-2-((5-(πιπεραζιν-1-υλ)πυριδιν-2-υλ)αμινο)-7<i>H</i>-πυρρολο[2,3-<i>d</i>]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο</p> <p>$C_{26}H_{30}N_8O_3$ (M.W.: 502.57)</p>
T4		<p>7-βενζυλ-<i>N,N</i>-διμεθυλ-2-((5-(πιπεραζιν-1-υλ)πυριδιν-2-υλ)αμινο)-7<i>H</i>-πυρρολο[2,3-<i>d</i>]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο</p> <p>$C_{25}H_{28}N_8O$ (M.W.: 456.54)</p>
T5		<p>2'-((5-(πιπεραζιν-1-υλ)πυριδιν-2-υλ)αμινο)-7',8'-διυδρο-6'<i>H</i>-σπειρο[κυκλοεξαν-1,9'-πυραζινο[1',2':1,5]πυρρολο[2,3-<i>d</i>]πυριμιδιν]-6'-ονη</p> <p>$C_{23}H_{28}N_8O$ (M.W.: 432.52)</p>

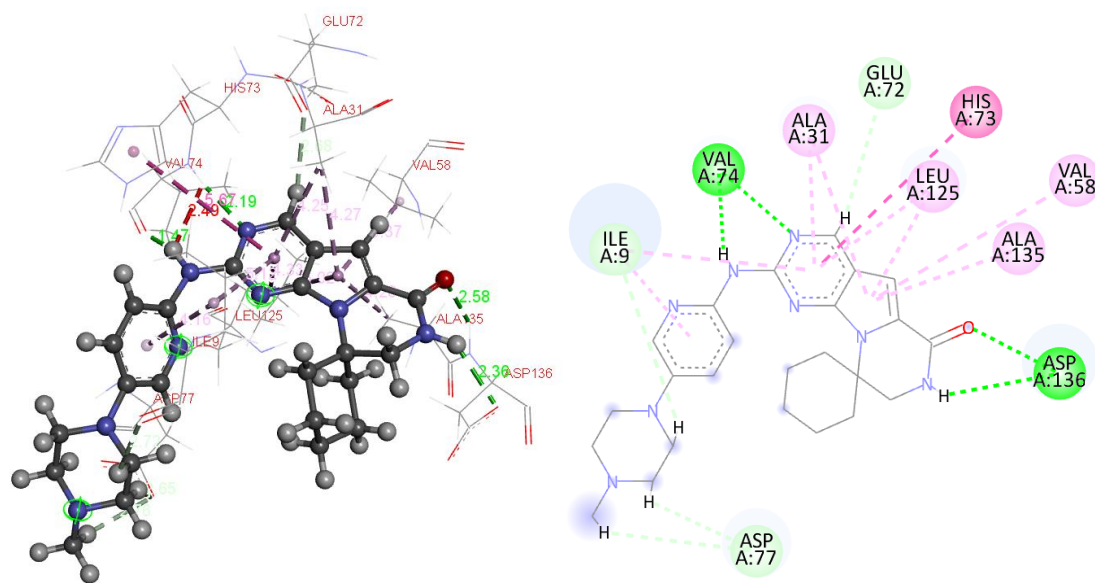
Πίνακας 3.1.: Ανάλογα-παράγωγα του Trilaciclib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο και έλαβε χώρα η προσπάθεια σύνθεσης τους. Όλες οι ενώσεις είναι μικρού μοριακού βάρους και αποτελούνται από μοριακούς σκελετούς που περιέχονται στην δομή αρκετών εγκεκριμένων φαρμάκων.

3.2 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης (docking)

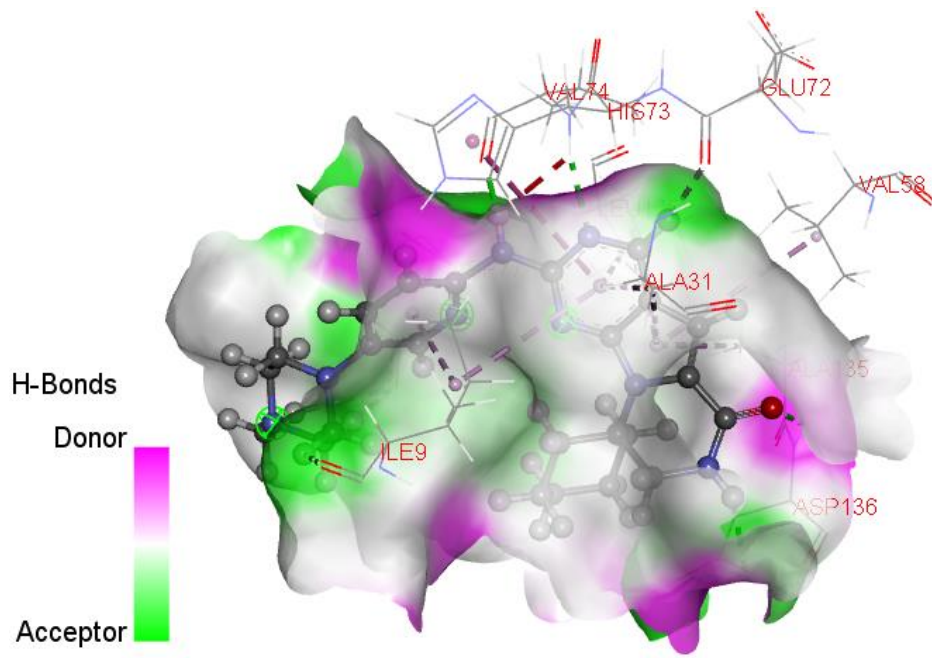
Η μοριακή μοντελοποίηση παρέχει μια πληθώρα αποτελεσμάτων για τις βιολογικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων που μελετώνται και αποτελεί σημαντικό αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Όλα τα ηλεκτρονικά πειράματα docking πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με την χρήση των προγραμμάτων Discovery Studio Visualizer 2021 της εταιρίας BIOVIA, UCSF Chimera 1.16 και AutoDock Vina. Η κρυσταλλογραφική δομή της CDK6 που επιλέχθηκε φέρει τον κωδικό PDB ID: 5L2T, καθώς αυτή παρουσίασε καλύτερα και ακριβέστερα αποτελέσματα. Σε κάθε περίπτωση πριν την λήψη αποτελεσμάτων όλα τα μόρια νερού και άλλων μικρών μορίων αφαιρέθηκαν από την δομή της πρωτεΐνης και έγινε προετοιμασία της, DockPrep, μέσω του προγράμματος Chimera, ενώ οι τιμές για τις ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης είναι σύμφωνα με το πρόγραμμα AutoDock Vina.

3.2.1 Μοριακή μοντελοποίηση του συμπλόκου Trilaciclib - CDK6

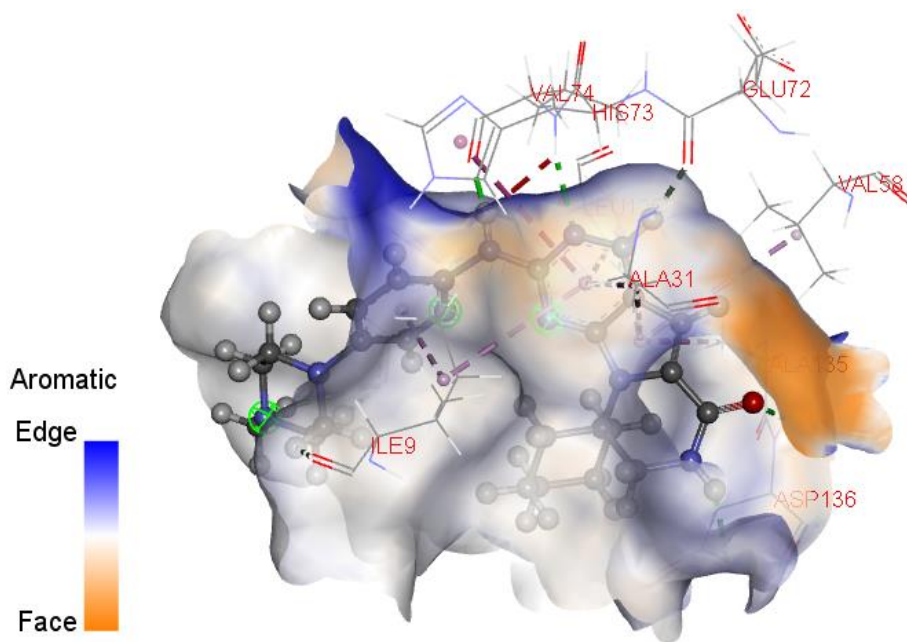
Στο εργαστήριο αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης του Trilaciclib με την CDK6 όπου υπολογίστηκε η τιμή της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs ($\Delta G_{\text{binding}} = -10.0 \text{ kcal/mol}$) ως συνάθροισμα όλων των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ της πρωτεΐνης και του μορίου (ηλεκτροστατικές, van der Waals, περιστροφικές συνεισφορές, δεσμοί υδρογόνου, φαινόμενα επιδιалύτωσης κ.α.). Παρατηρήθηκε ότι σχηματίζονται τέσσερις δεσμοί υδρογόνου, για την ακρίβεια το καρβονυλικό οξύ (δέκτης) και το H του ατόμου αζώτου (δότης) του δακτυλίου της λακτάμης σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με το ασπαραγινικό οξύ Asp136 και η αμινική ομάδα -NH (δότης) καθώς και το άτομο αζώτου της πυριμιδίνης (δέκτης) με το κατάλοιπο της βαλίνης Val74. Επίσης, καταγράφονται οχτώ pi-alkyl ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Ala31, Leu125, Ile9, Val58 και Ala135, μια pi-pi αλληλεπίδραση με το αμινοξύ His73 και τέσσερις δεσμοί άνθρακα-υδρογόνου με τα Asp77, Ile9 και Glu72. Η δομή του πυρρολο[2,3-d]πυριμιδινικού σκελετού εμπλέκεται συνολικά σε δέκα αλληλεπιδράσεις. Τέλος, αξιολογήθηκαν μετά την μοριακή μοντελοποίηση οι επιφάνειες δεσμών υδρογόνου, αρωματικότητας και φορτίων μεταξύ της κινάσης CDK6 και του φαρμάκου, ώστε να σχεδιαστούν οι κατάλληλες τροποποιήσεις στην δομή του που θα ενισχύσουν την ανασταλτική δράση.



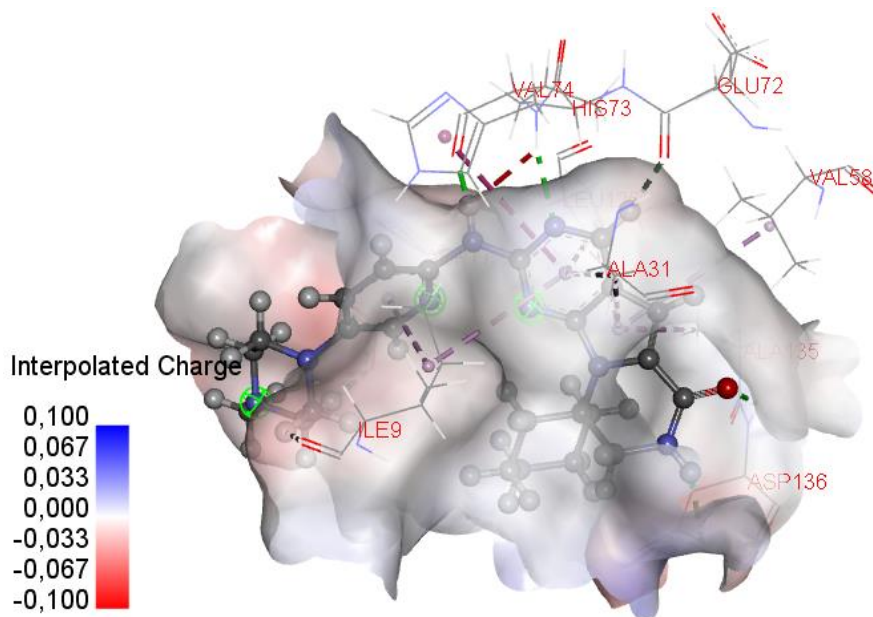
Σχήμα 3.3.: Οι προκύπτουσες αλληλεπιδράσεις του Trilaciclib με την CDK6 μετά από μοριακή μοντελοποίηση (Αριστερά: 3D κρυσταλλογραφική απεικόνιση, όπου με διακεκομμένες γραμμές συμβολίζονται οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται και αναγράφεται η αντίστοιχη απόσταση σε Å και Δεξιά: 2D αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται).



Σχήμα 3.4.: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει το Trilaciclib με την CDK6 (με πράσινο χρώμα απεικονίζονται τα αμινοξέα-δέκτες και με μωβ τα αμινοξέα-δότες δεσμών υδρογόνου).



Σχήμα 3.5.: Σχηματική απεικόνιση της αρωματικότητας που εμφανίζει το Trilaciclib με την CDK6 (με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα αμινοξέα που εμφανίζουν αρωματικότητα και με πορτοκαλί τα αμινοξέα που δεν φέρουν αρωματικότητα).

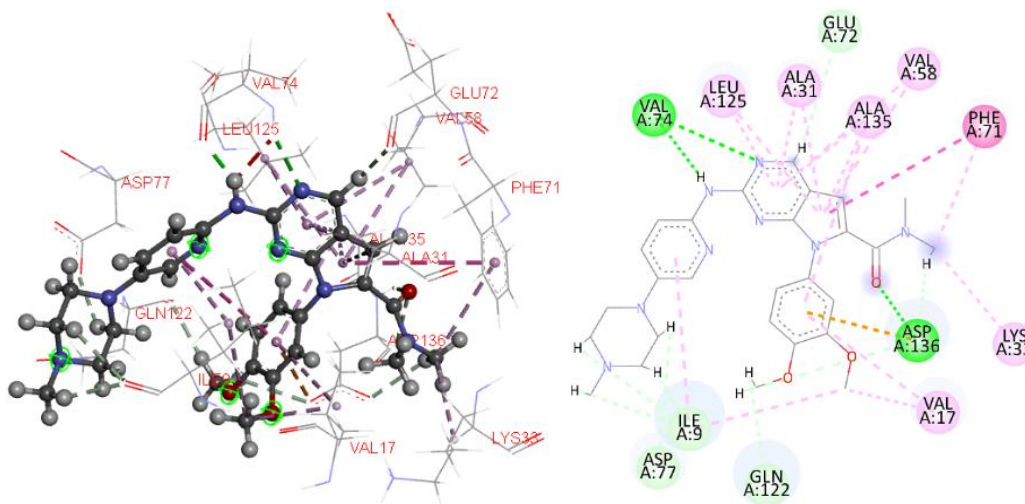


Σχήμα 3.6.: Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας του φορτίου που εμφανίζει το Trilaciclib με τα κατάλοιπα της CDK6 (με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται τα αμινοξέα που εμφανίζουν ηλεκτροθετικότητα και με μπλε απεικονίζονται τα αμινοξέα που εμφανίζουν ηλεκτραρνητικότητα).

3.2.2 Μοριακή μοντελοποίηση των νέων ενώσεων (T1-T5) με την CDK6

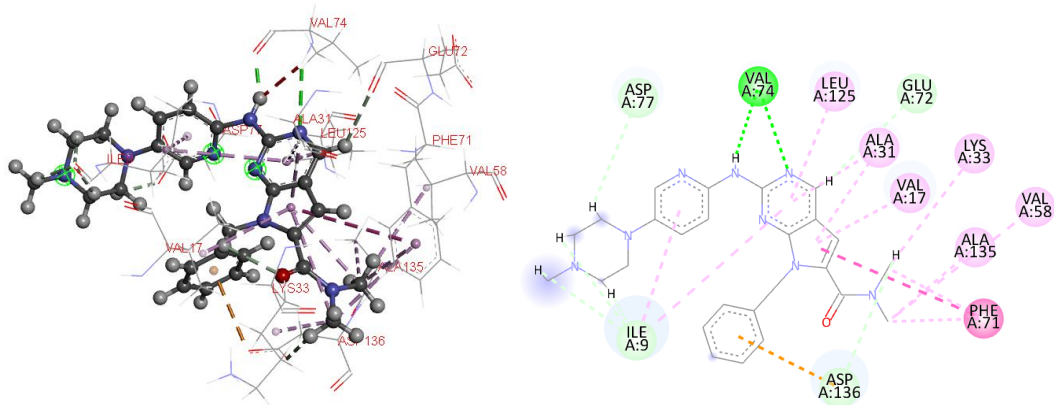
Εδώ, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των νέων ενώσεων που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο, ως ανάλογα του Trilaciclib, σε σύμπλοκο με την κυκλινο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση 6. Οι νέοι αναστολείς επιδιώκουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση και καλύτερη συμπληρωματικότητα με την πρωτεΐνη-στόχο σε σχέση με το Trilaciclib, δηλαδή μικρότερη θεωρητική τιμή $\Delta G_{\text{binding}}$ (σε kcal/mol) ώστε να ευνοείται θερμοδυναμικά ο σχηματισμός του εκάστοτε συμπλόκου. Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs των συμπλόκων φέρουν αρνητικό πρόσημο, διότι η διεργασία γίνεται αυθόρμητα.

$$\triangleright \Delta G_{(T1)} = -10.3 \text{ kcal/mol}$$



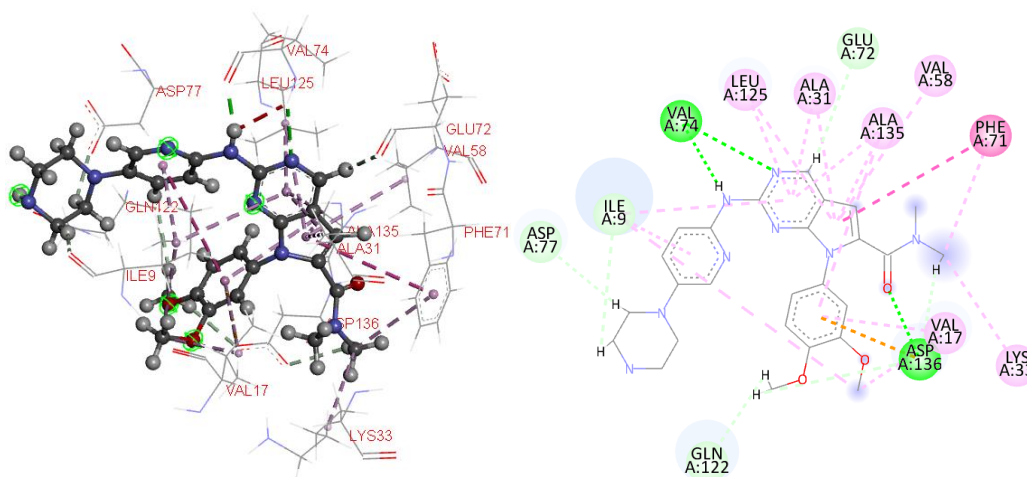
Σχήμα 3.7.: Αλληλεπιδράσεις T1 - CDK6 (Αριστερά: 3D και Δεξιά: 2D απεικόνιση).

➤ $\Delta G_{(T2)} = -9.5 \text{ kcal/mol}$



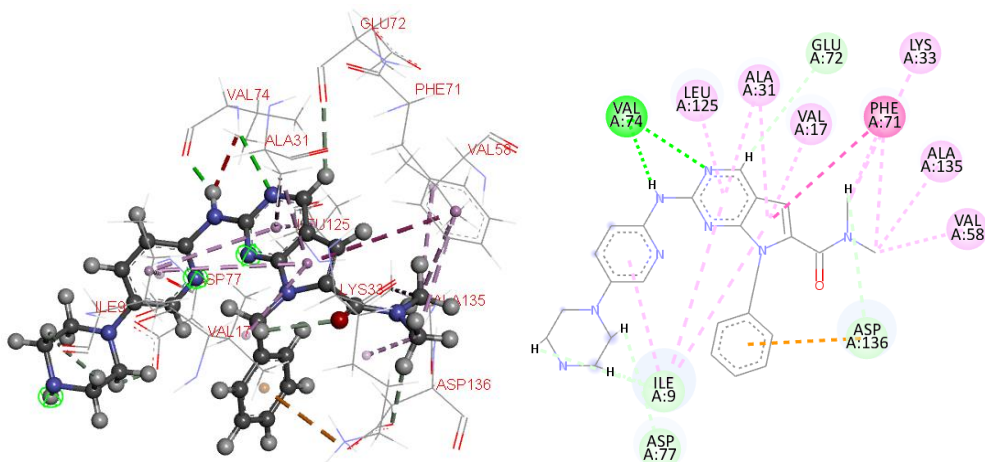
Σχήμα 3.8.: Αλληλεπιδράσεις T2 - CDK6 (Αριστερά: 3D και Δεξιά: 2D απεικόνιση).

➤ $\Delta G_{(T3)} = -10.4 \text{ kcal/mol}$



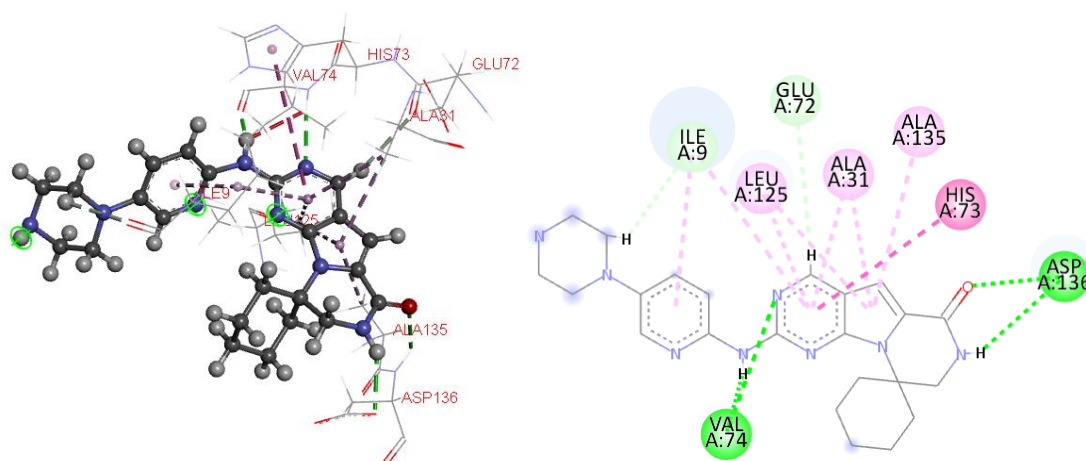
Σχήμα 3.9.: Αλληλεπιδράσεις T3 - CDK6 (Αριστερά: 3D και Δεξιά: 2D απεικόνιση).

➤ $\Delta G_{(T4)} = -9.4 \text{ kcal/mol}$



Σχήμα 3.10.: Αλληλεπιδράσεις T4 - CDK6 (Αριστερά: 3D και Δεξιά: 2D απεικόνιση).

➤ $\Delta G_{(T5)} = -9.9 \text{ kcal/mol}$



Σχήμα 3.11.: Αλληλεπιδράσεις T5 - CDK6 (Αριστερά: 3D και Δεξιά: 2D απεικόνιση).

3.3 Σύνθεση αναλόγων του Trilaciclib

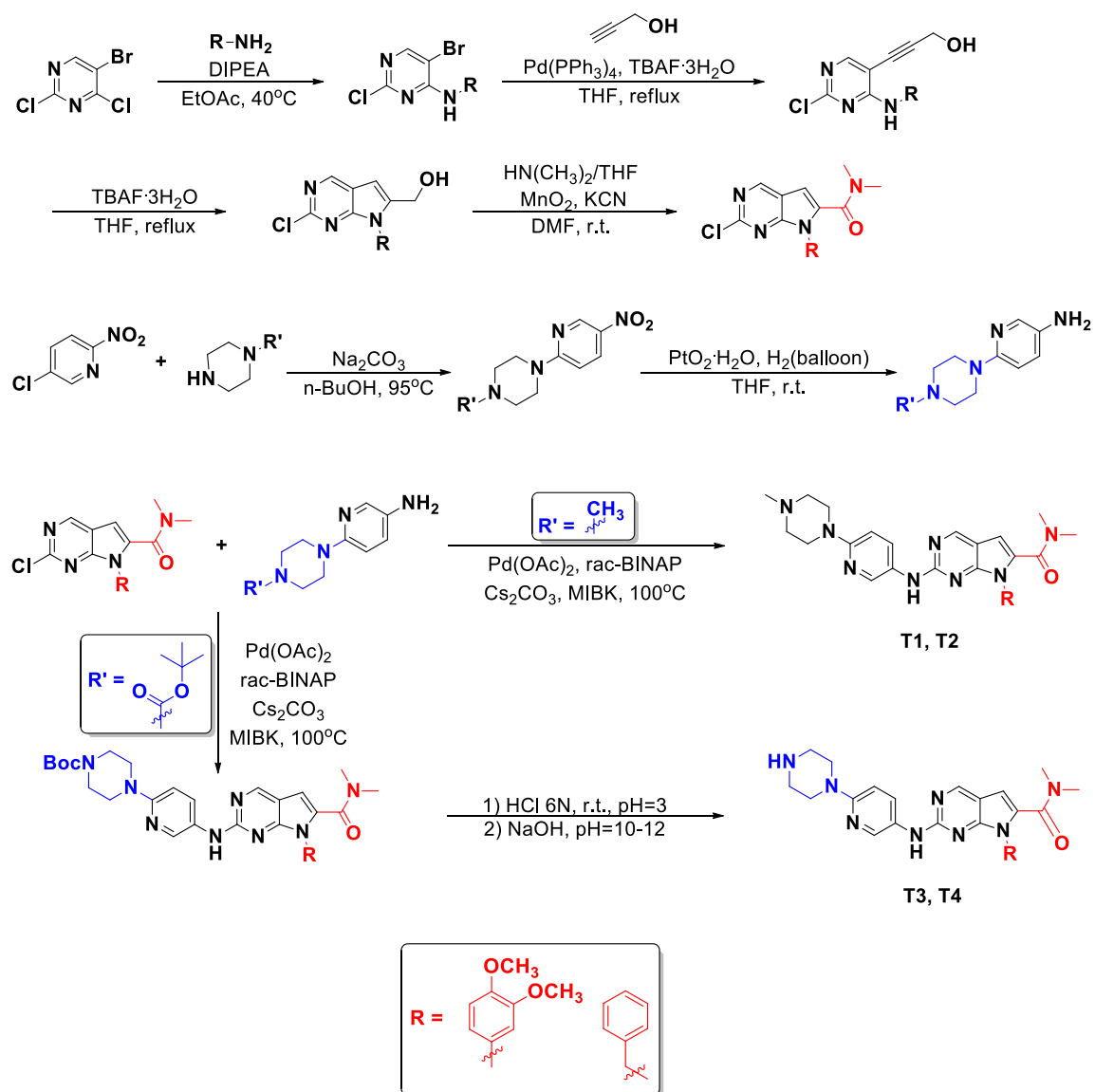
3.3.1 Ολική πορεία σύνθεσης των νέων ενώσεων

Ο σχεδιασμός της πορείας που θα ακολουθηθεί για την σύνθεση των επιθυμητών προϊόντων και των τελικών μορίων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο με βάση αποτελέσματα πειραμάτων που είχαν ήδη διενεργηθεί από παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου και ύστερα από αξιολόγηση όλων των υπάρχοντων αντιδραστηρίων και διαλυτών. Η σύνθεση των νέων αναστολέων, αναλόγων του Trilaciclib, προκύπτει μετά από μία συγκλίνουσα συνθετική πορεία όπου τα αρχικά μέρη της κάθε ένωσης συντίθενται και μετά ακολουθεί μια αντίδραση σύζευξης για να προκύψει το εκάστοτε ανάλογο.

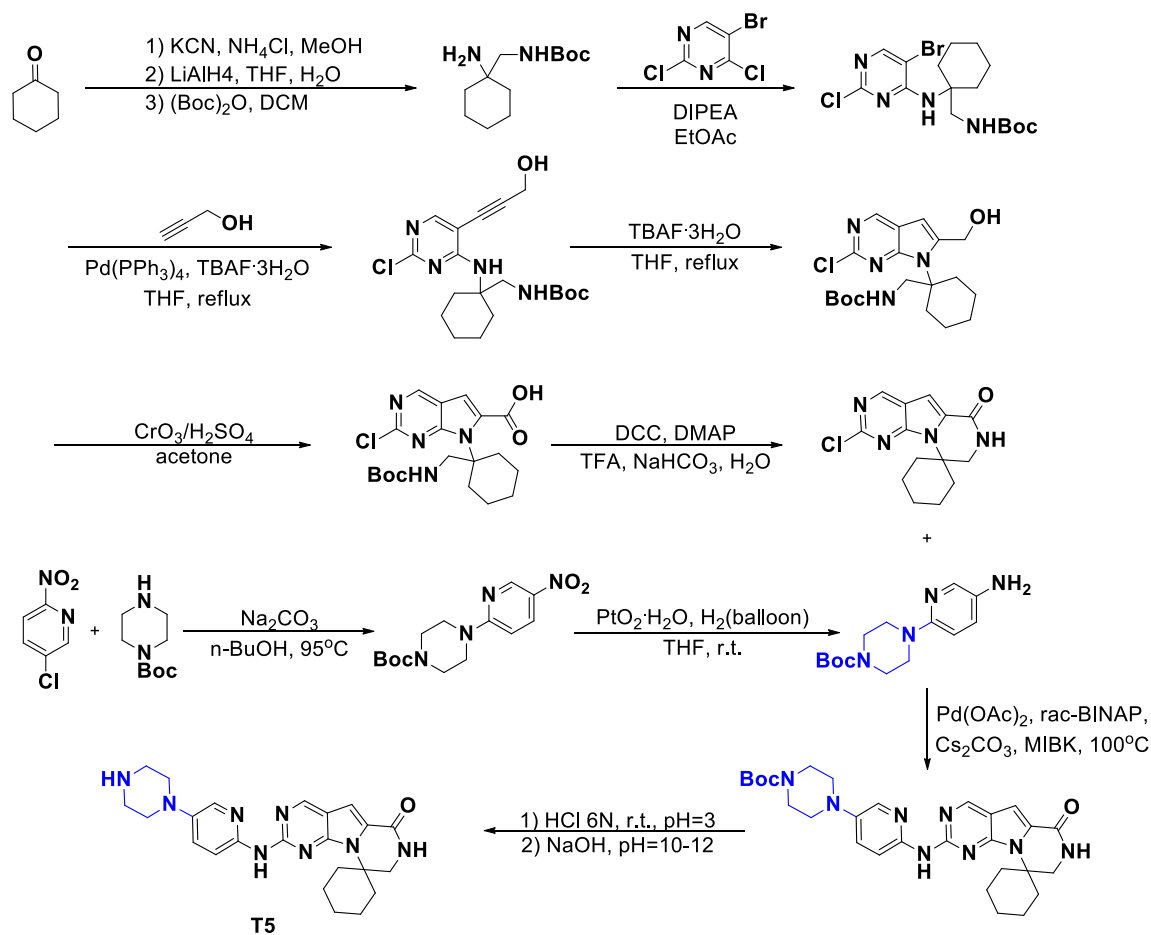
Για την σύνθεση του ενός τμήματος των νέων ενώσεων, στο πρώτο στάδιο της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης χρησιμοποιήθηκε η 3,4-διμεθοξυανιλίνη (για τα ανάλογα T1 και T3) και η βενζυλαμίνη (για τα ανάλογα T2 και T4) και ακολούθησε αντίδραση Sonogashira, αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης και αντίδραση οξειδωτικής αμίνωσης. Για την σύνθεση του άλλου σκέλους των ενώσεων, λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με αρχικά αντιδραστήρια την 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη και είτε την 1-μεθυλοπιπεραζίνη είτε την 1-Boc-πιπεραζίνη και ακολουθεί αναγωγή των νιτρο-ομάδων. Οι τελικές ενώσεις T1, T2, T3 και T4 θα προκύψουν μετά από σύζευξη Buchwald-Hartwig και αποκοπή της προστατευτικής ομάδας στην περίπτωση των αναλόγων T3 και T4.

Για την σύνθεση του ανάλογου T5, προτάθηκε η πορεία που ακολουθεί η εταιρία G1 Therapeutics με κάποιες τροποποιήσεις σε ορισμένα βήματα. Αφού μέσω μιας πορείας τριών σταδίων συντεθεί η προστατευμένη διαμίνη, πραγματοποιείται όπως και προηγουμένως μια σειρά αντιδράσεων που περιλαμβάνει μια πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση με την 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη, μια αντίδραση Sonogashira με χρήση καταλύτη παλλαδίου, μια αντίδραση κυκλοποίησης του μορίου, μια οξείδωση

Jones προς το αντίστοιχο οξύ και τέλος επεξεργασία με DCC/DMAP για να σχηματιστεί το τρικυκλικό σύστημα. Η τελική σπειρο-ένωση προκύπτει μετά από αντίδραση σύζευξης με την αμινο-ένωση και αντίδραση αποπροστασίας. Οι ενώσεις που συντέθηκαν ταυτοποιήθηκαν κυρίως με την μέθοδο του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$) μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους με τις κατάλληλες τεχνικές.



Σχήμα 3.12.: Ολική συνθετική πορεία των ενώσεων T1, T2, T3 και T4.

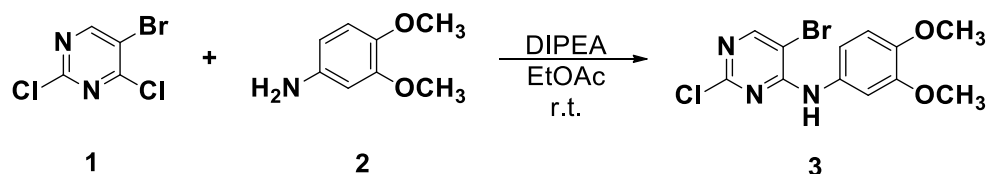


Σχήμα 3.13.: Συνθετική πορεία της ένωσης T5.

3.3.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός πρόδρομων ενώσεων της πορείας σύνθεσης αναλόγων του Trilaciclib

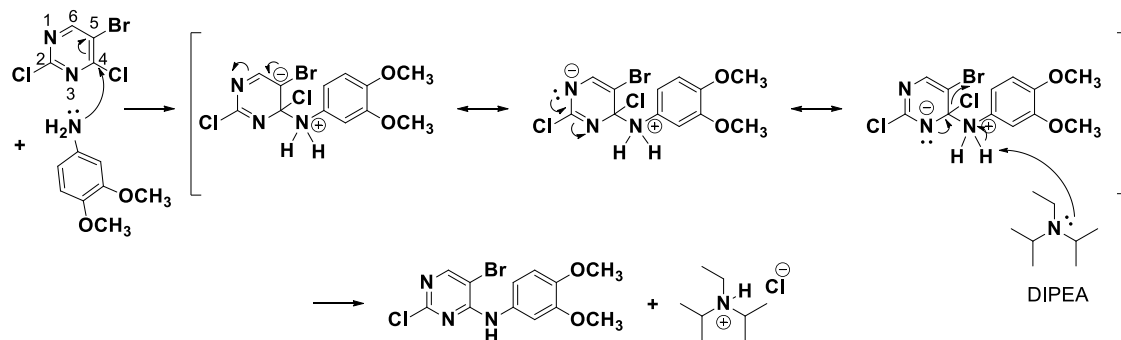
3.3.2.1 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-*N*-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)πυριμιδινο-4-αμίνης (3)

Η σύνθεση της ένωσης 3 πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με αρχικά αντιδραστήρια την 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη και την 3,4-διμεθοξυανιλίνη σε αλκαλικές συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκε ως βάση η *N,N*-διίσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) και ως διαλύτης ο οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc) σε θερμοκρασία δωματίου.



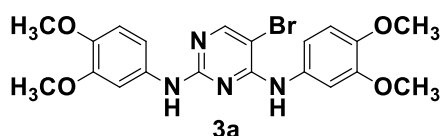
Σχήμα 3.14.: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 3.

Ο μηχανισμός της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο βήμα, ο αρωματικός δακτύλιος της πυριμιδίνης προσβάλλεται από την 3,4-διμεθοξυανιλίνη που δρα ως πυρηνόφιλο σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο το οποίο σταθεροποιείται λόγω δομών συντονισμού (σύμπλοκο Meisenheimer). Στο δεύτερο στάδιο, η αποχωρούσα ομάδα αποβάλλεται (αλογόνο) και η βάση DIPEA αποπρωτονώνει το ενδιάμεσο σύμπλοκο. Έτσι, αποκαθίσταται η αρωματικότητα και σχηματίζεται η τελική ένωση 3.



Σχήμα 3.15.: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 3.

Η πυρηνόφιλη προσβολή πραγματοποιείται στην θέση 4 της 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνης καθώς είναι πιο δραστική σε σχέση με την θέση 2 λόγω καλύτερης σταθεροποίησης του ενδιάμεσου. Ωστόσο κατά την προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης, όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε σταδιακά μέχρι τους 45⁰C παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός παραπροϊόντος το οποίο απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε με ¹H-NMR. Πρόκειται για την ένωση 3a όπου έχει πραγματοποιηθεί διυποκατάσταση στην θέση 4 και 2.



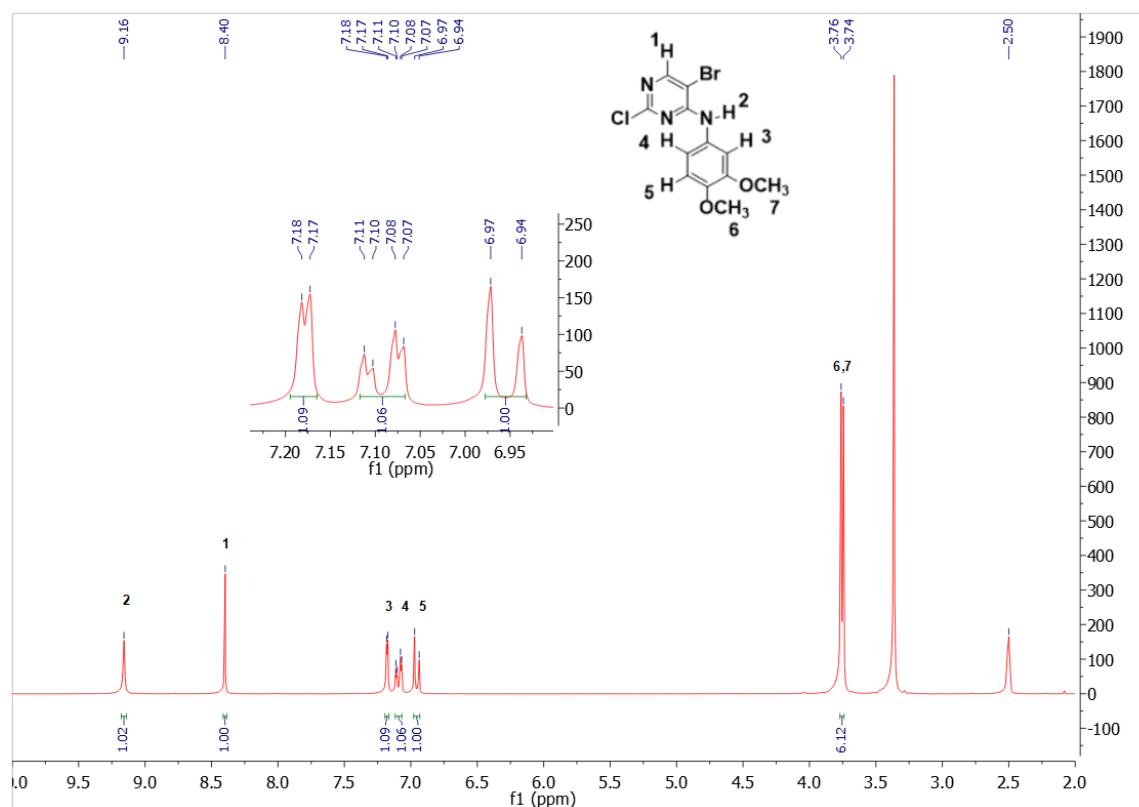
Σχήμα 3.16.: Παραπροϊόν της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης (ένωση 3a).

3.3.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)πυριμιδινό-4-αμίνης (3)

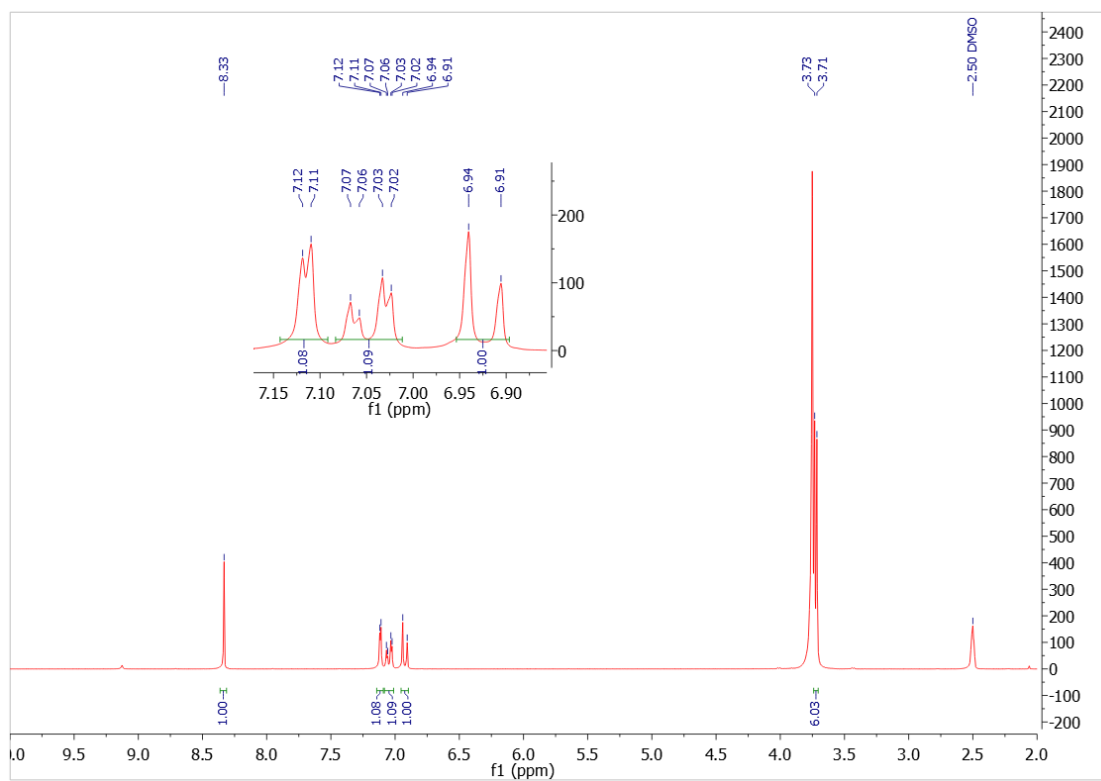
Στο φάσμα της ένωσης 3 το H1 του πυριμιδινικού δακτυλίου εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή στα 8.40 ppm καθώς το γειτονικό άτομο του αζώτου έλκει ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα την αποθωράκιση του. Το H3 εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή στα 7.18 ppm με σταθερά σύζευξης μεγάλης εμβέλειας ⁴J = 2.5Hz. Η χημική μετατόπιση στα 7.09 ppm αντιστοιχεί στην διπλή της διπλής κορυφής του H4 με ³J = 7.5Hz και ⁴J = 2.5Hz που οφείλονται στην αλληλεπίδραση με τα πρωτόνια H5 και H3, αντίστοιχα. Το H5 δίνει μία διπλή κορυφή στα 6.96 ppm με ³J = 7.5Hz εξαιτίας του H4 που γειτνιάζει.

Τέλος, τα πρωτόνια των δύο μεθοξυ-ομάδων εντοπίζονται στα 3.76 ppm και 3.74 ppm ως δυο απλές κορυφές με συνολική ολοκλήρωση 6. Όσον αφορά το αμινικό πρωτόνιο H2, ενώ αναμένονταν σε υψηλότερο πεδίο, από το φάσμα που ακολουθεί φαίνεται πως εντοπίζεται ως μια απλή κορυφή στα 9.16 ppm λόγω του συζυγιακού και επαγωγικού φαινομένου που εκδηλώνεται. Αυτό μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτό εάν συσχετιστεί το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 3 με το φάσμα που λήφθηκε με την προσθήκη μίας σταγόνας D_2O στο δείγμα, παρατηρείται ότι η κορυφή στα 9.16 ppm δεν εμφανίζεται και βεβαιώνει ότι αντιστοιχεί στο αμινικό πρωτόνιο H2 που είναι εύκολα ανταλλάξιμο πρωτόνιο. Ακολουθεί επίσης, το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 3 όπου εμφανίζονται 10 σήματα στην περιοχή 100-160 ppm για τους άνθρακες των δύο δακτυλίων καθώς και 2 σήματα στα ~55 ppm για τους άνθρακες των δύο μεθοξυ-ομάδων.

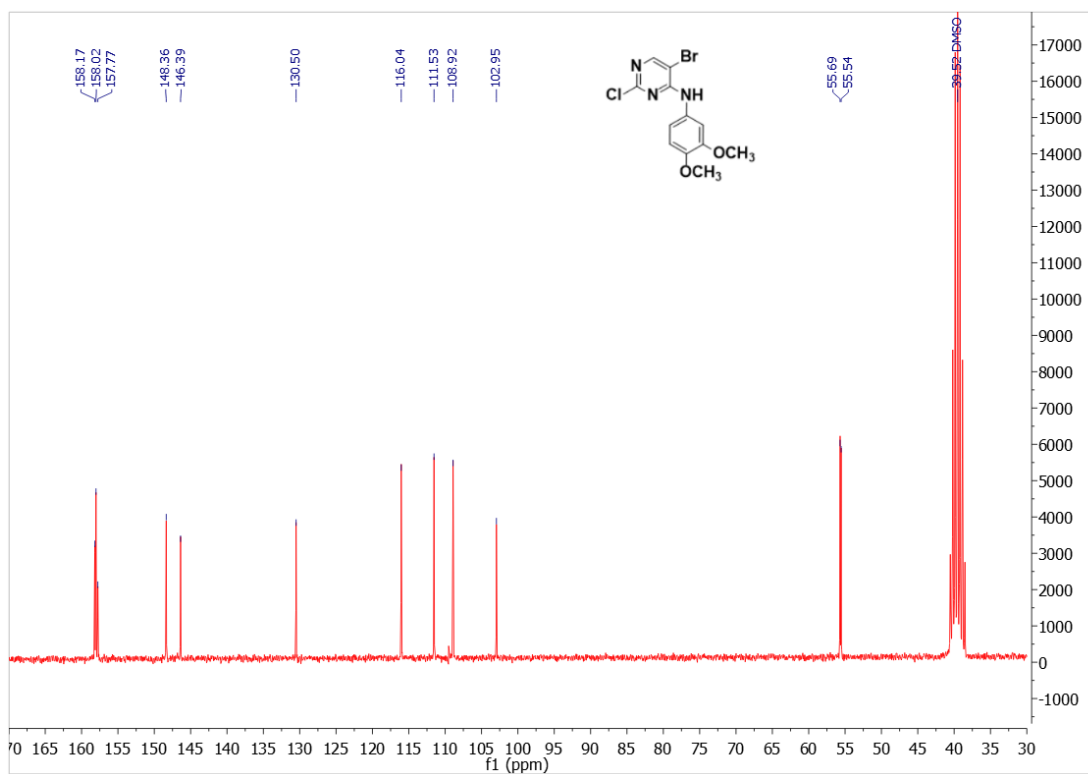
Στο φάσμα της ένωσης 5-βρωμο- N^2,N^4 -δισ(3,4-διμεθοξυφαινυλο)πυριμιδίνη-2,4-διαμίνης (3α), το H1 εμφανίζεται στα 8.14 ppm ως μια απλή κορυφή. Τα αμινικά πρωτόνια H2 και H3 καταγράφονται στα 9.24 ppm και 8.70 ppm, αντίστοιχα. Τα πρωτόνια H4-H7 δίνουν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 7.03-7.13 ppm καθώς οι σχάσεις τους αλληλοεπικαλύπτονται. Τα H8 και H9 συντονίζονται στα 6.89 ppm ($^3J = 10\text{Hz}$) και 6.74 ppm ($^3J = 7.5\text{Hz}$), αντίστοιχα. Τα πρωτόνια που βρίσκονται πλησιέστερα στο άτομο του βρωμίου δέχονται ισχυρότερο επαγωγικό φαινόμενο, με αποτέλεσμα να αποπροστατεύονται και να καταγράφονται σε χαμηλότερο πεδίο. Τέλος, οι κορυφές των πρωτονίων H10 και H11 των μεθοξυ-ομάδων επικαλύπτονται από το σήμα του H_2O στα 3.75 και 3.68 ppm.



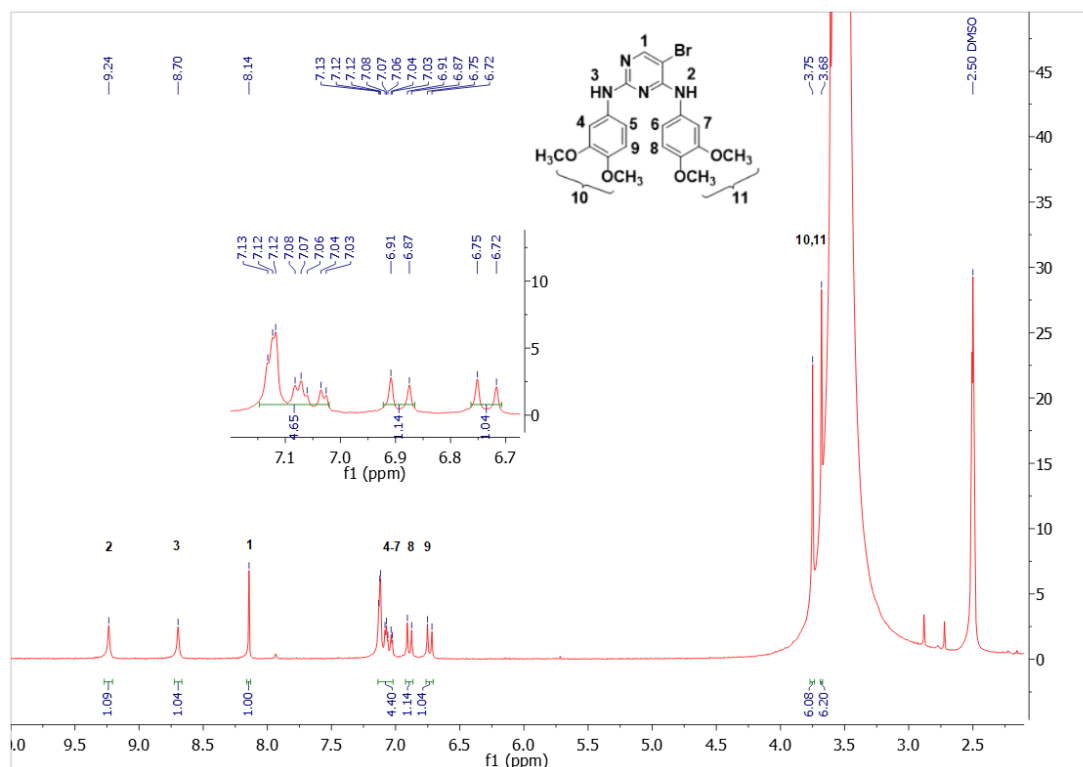
Εικόνα 3.1.: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης 3.



Εικόνα 3.2.: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε DMSO/D₂O) της ένωσης 3.



Εικόνα 3.3.: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz σε DMSO) της ένωσης 3.



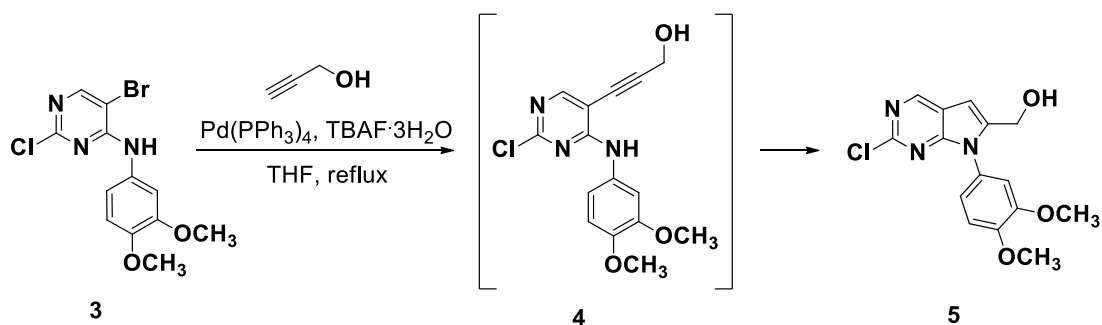
Εικόνα 3.4.: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης 3α.

3.3.2.3 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7*H*-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλης (5)

Η σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7*H*-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλης (5) αρχικά σχεδιάστηκε να πραγματοποιηθεί μέσω δύο σταδίων όπως ακολουθούν οι περισσότερες εταιρίες για να συνθέσουν τον πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινικό σκελετό. Το πρώτο στάδιο είναι μια αντίδραση Sonogashira που απαιτεί την προπαργυλική αλκοόλη ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}$), έναν καταλύτη παλλαδίου (τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνη)παλλάδιο(0), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) και ένα τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας (TBAF) σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF) και συνθήκες reflux, ώστε να προκύψει η ένωση 3-(2-χλωρο-4-((3,4-διμεθοξυφαινυλο)αμινο)πυριμιδιν-5-υλο) προπ-2-υν-1-όλη (4). Στο δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα μια αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης, όπου χρησιμοποιείται το $\text{TBAF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ως πηγή ιόντων φθορίου σε διαλύτη THF και συνθήκες θερμοκρασίας reflux.

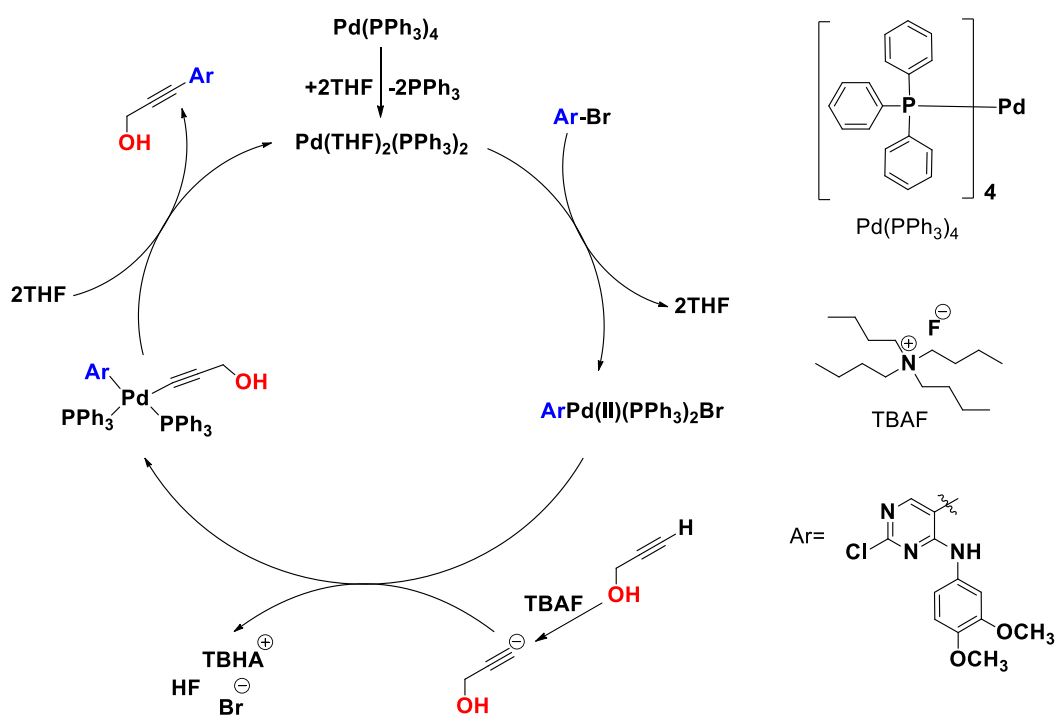
Ωστόσο, κατά την υλοποίηση αυτού του αρχικού πλάνου και στην προσπάθεια βελτιστοποίησης της πειραματικής πορείας ώστε να γίνει εξοικονόμηση των αντιδραστηρίων, των διαλυτών αλλά και του πολύτιμου παράγοντα του χρόνου πραγματοποιήθηκε αντίδραση ενός σταδίου (αντίδραση one pot). Για την ακρίβεια, κατά την εκτέλεση της αντίδρασης Sonogashira παρατηρήθηκε με έλεγχο TLC ο σχηματισμός πολλών ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου της αντίδρασης αλλά και του προϊόντος κυκλοποίησης εξαιτίας της περίσσειας TBAF και της υψηλής

θερμοκρασίας στο μίγμα της αντίδρασης. Επομένως, η σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλης (5) πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης Sonogashira, που δεν διακόπτεται για την απομόνωση και την επεξεργασία του προϊόντος, ακολουθούμενη από την αντίδραση κυκλοποίησης με επιπλέον προσθήκη διαλύτη THF και θέρμανση με τελική απόδοση 40.2%.



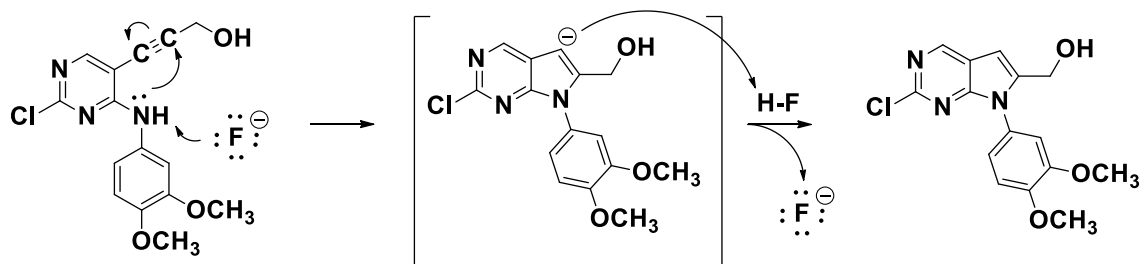
Σχήμα 3.17.: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 5.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης Sonogashira ξεκινά με τον καταλύτη $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ όπου αποβάλλει δύο μόρια τριφαινυλοφωσφίνης και προσλαμβάνει δύο μόρια από τον διαλύτη THF. Το ενδιάμεσο $\text{Pd}(\text{THF})_2(\text{PPh}_3)_2$ που σχηματίζεται δέχεται την προσθήκη της βρωμοπυριμιδίνης με ταυτόχρονη αποβολή δύο μορίων του ετεροκυκλικού αιθέρα με αποτέλεσμα το παλλάδιο να μεταβαίνει σε οξειδωτική βαθμίδα II. Η ταυτόχρονη αποπρωτονίωση της προπαργυλικής αλκοόλης από το TBAF οδηγεί στον σχηματισμό ενός συμπλόκου του παλλάδιου όπου με αναγωγική απόσπαση παράγεται το τελικό προϊόν 4 και ανακτάται το ενδιάμεσο $\text{Pd}(\text{THF})_2(\text{PPh}_3)_2$ ώστε να συνεχιστεί η πορεία του καταλυτικού κύκλου της αντίδρασης.



Σχήμα 3.18.: Καταλυτικός κύκλος αντίδρασης Sonogashira για την σύνθεση της ένωσης 4.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης κυκλοποίησης βασίζεται στην αποπρωτονίωση από τα ιόντα φθορίου του TBAF και στην πυρηνόφιλη προσβολή στο άτομο άνθρακα του αλκυνίου από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου. Σχηματίζεται η ενδιάμεση δομή κυκλοποίησης όπου πρωτονιώνεται από το μόριο του υδροφθορίου με αποτέλεσμα να προκύπτει η τελική ένωση 5 και να ελευθερώνονται ιόντα φθορίου.

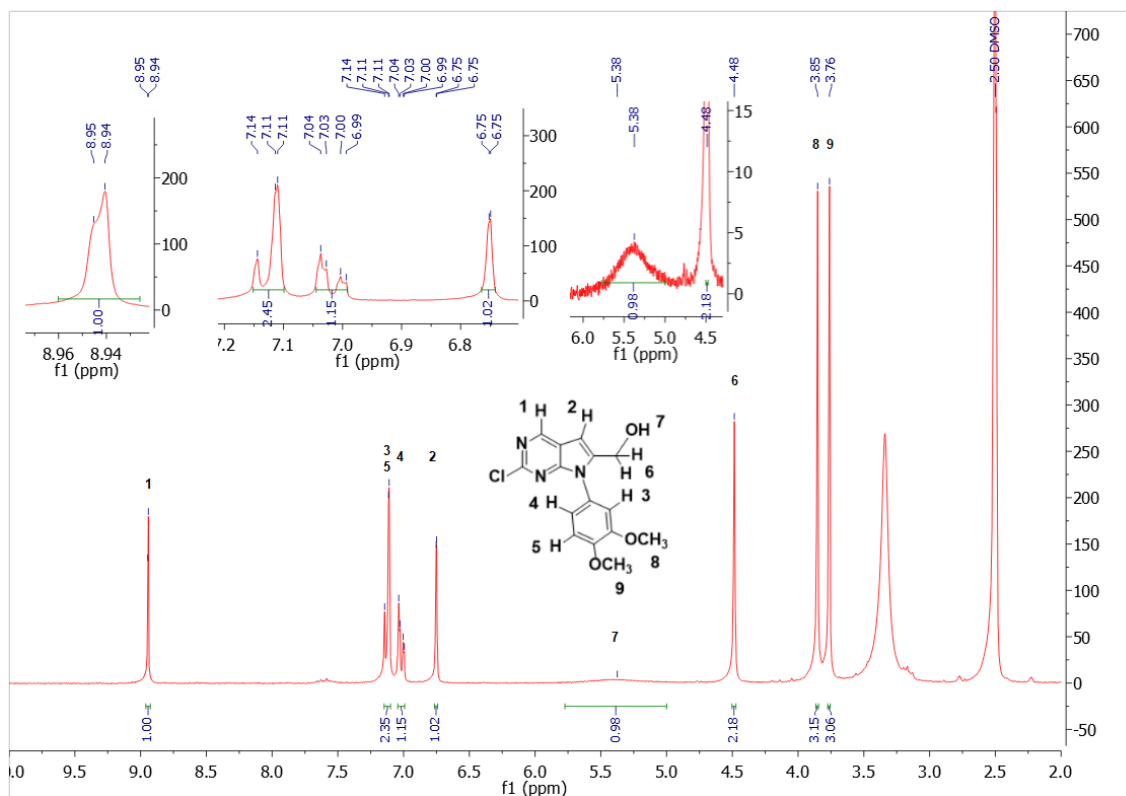


Σχήμα 3.19.: Μηχανισμός αντίδρασης κυκλοποίησης για την σύνθεση της ένωσης 5.

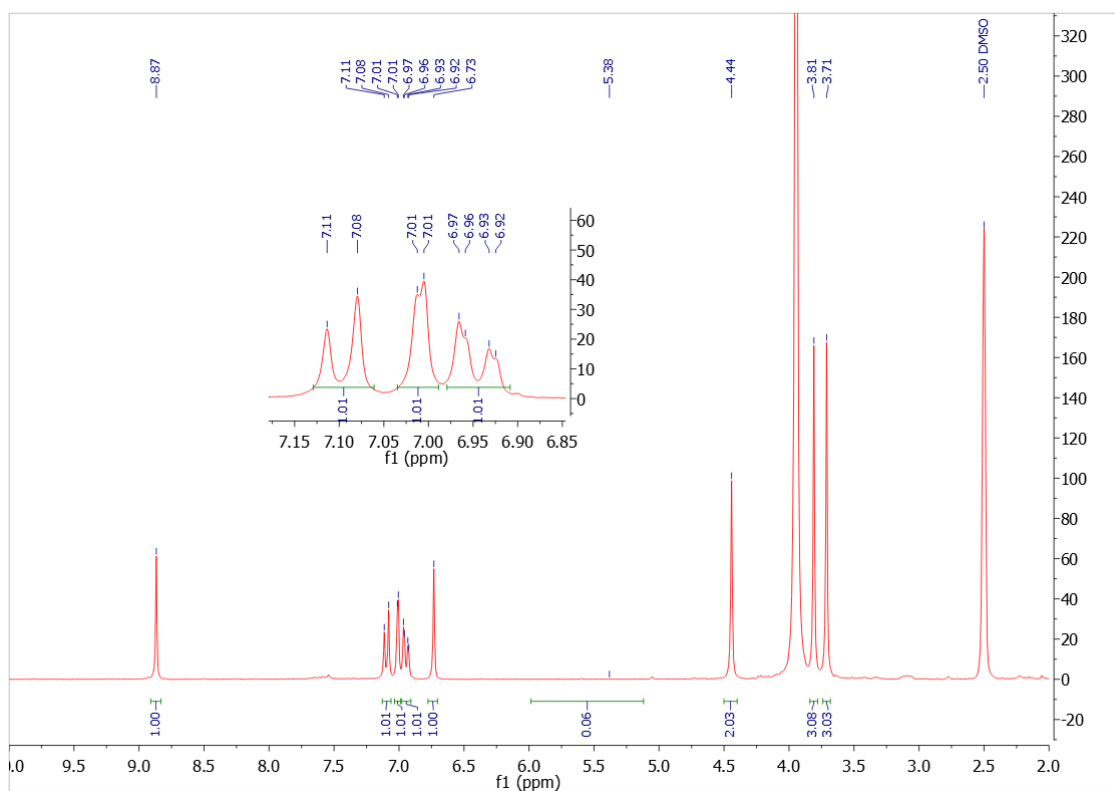
3.3.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλης (5)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 5, το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H1 το οποίο εμφανίζεται στα 8.95 ppm ως μια διπλή κορυφή εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του με το H2 με σταθερά σύζευξης $^4J = 1.2 \text{ Hz}$. Όμοια, το H2 καταγράφεται στα 6.75 ppm ως μια διπλή κορυφή με $^4J = 1.2 \text{ Hz}$. Το H4 εμφανίζεται ως μια dd κορυφή στα 7.02 ppm με $^3J = 8.5 \text{ Hz}$ και $^4J = 2.6 \text{ Hz}$. Οι σχάσεις των πρωτονίων H3 και H5 αλληλοεπικαλύπτονται και καταγράφεται μια πολλαπλή κορυφή στα 7.13 ppm με ολοκλήρωση 2. Τα πρωτόνια H6 εμφανίζονται ως μια απλή κορυφή στα 4.48 ppm, ενώ το υδροξυλικό πρωτόνιο H7 ως μια ευρεία κορυφή στα 5.38 ppm. Τέλος, οι δύο απλές κορυφές στα 3.85 ppm και 3.76 ppm με συνολική ολοκλήρωση 6 ανήκουν στα πρωτόνια H8 και H9 των δύο μεθοξυ-ομάδων.

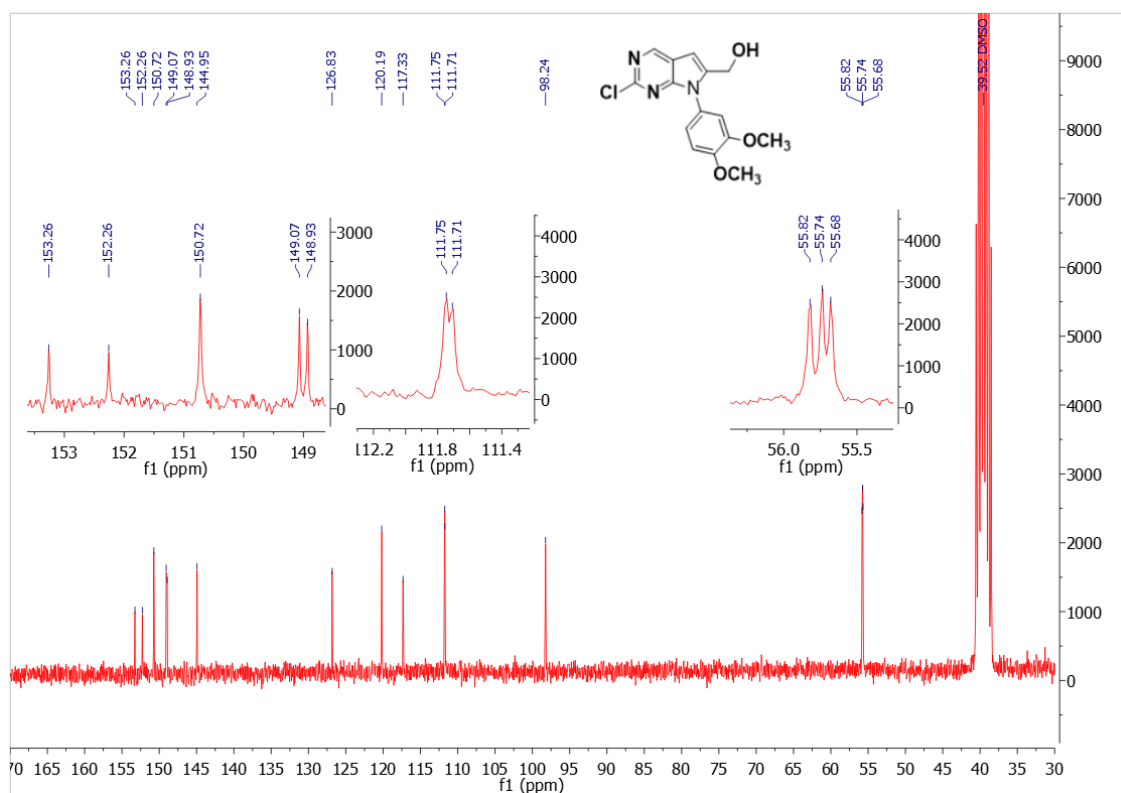
Όταν αυτό το φάσμα παρεμβάλλεται με το φάσμα που λαμβάνεται μετά την προσθήκη μιας σταγόνας D_2O στο δείγμα της ένωσης 5, επιβεβαιώνεται η επιτυχία της αντίδρασης καθώς η μοναδική κορυφή που εξαφανίζεται είναι αυτή του πρωτονίου H7 της υδροξυλομάδας. Δεν υπάρχει πλέον αμινικό πρωτόνιο που εξαφανίζεται με την προσθήκη D_2O , αφού έχει σχηματιστεί ο δακτύλιος του 5,7-διάζαινδολίου. Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι πως σε αυτό το φάσμα διακρίνονται οι κορυφές των πρωτονίων H3, H4, και H5 με ολοκλήρωση 1 η κάθε μία. Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 5, οι αρωματικοί άνθρακες κυμαίνονται μεταξύ 100-150 ppm και καταγράφονται 12 σήματα, ενώ εμφανίζονται 3 σήματα στα ~55 ppm για τους άνθρακες των ομάδων $-\text{OCH}_3$ και $-\text{CH}_2-\text{OH}$.



Εικόνα 3.5.: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης 5.



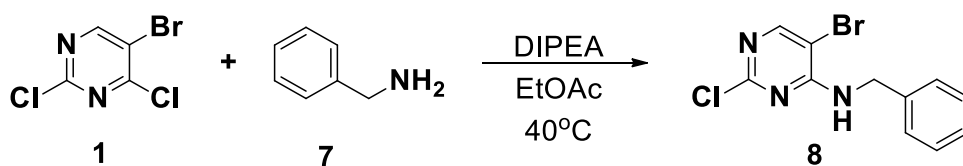
Εικόνα 3.6.: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε $\text{DMSO/D}_2\text{O}$) της ένωσης 5.



Εικόνα 3.7.: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης 5.

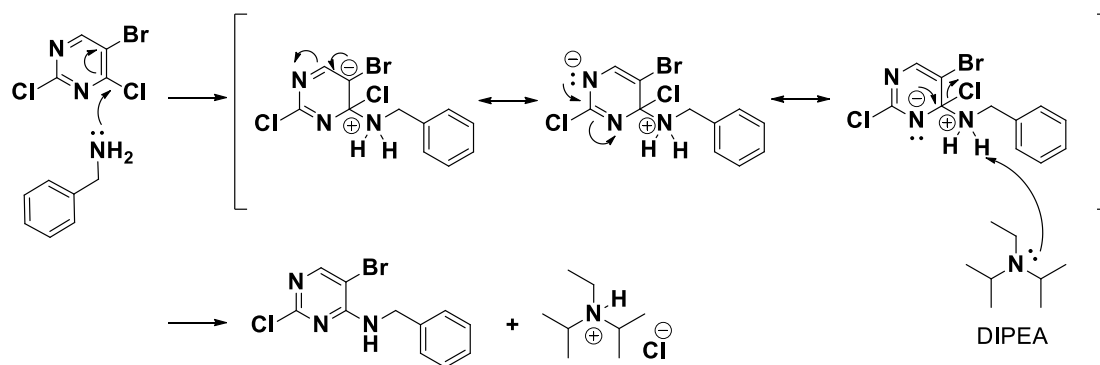
3.3.2.5 Σύνθεση της ένωσης *N*-βενζυλο-5-βρωμο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης (8)

Η σύνθεση της ένωσης 8 πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης παρουσία της βάσης DIPEA (*N,N*-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη) και του διαλύτη οξικού αιθυλεστέρα σε θερμοκρασία 40°C. Τα αρχικά αντιδραστήρια που απαιτούνται είναι η 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνη (1) και η βενζυλαμίνη (7).



Σχήμα 3.20.: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 8.

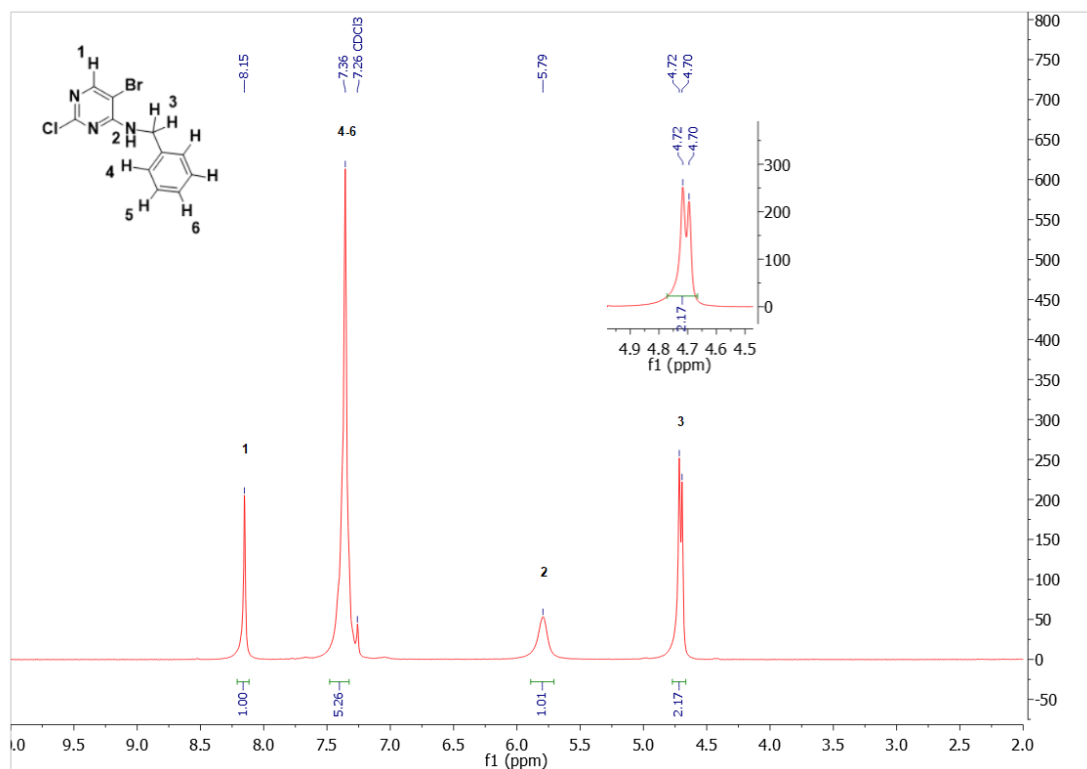
Κατά τον μηχανισμό της πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, ο αρωματικός δακτύλιος προσβάλλεται από την βενζυλαμίνη σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο ανιονικής φύσεως το οποίο σταθεροποιείται μέσω απεντοπισμού του αρνητικού φορτίου (δομές συντονισμού). Έπειτα, η αποχωρούσα ομάδα αποβάλλεται και η *N,N*-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη αποπρωτονιώνει το ενδιάμεσο με αποτέλεσμα να αποκαθίσταται η αρωματικότητα και να σχηματίζεται το τελικό προϊόν.



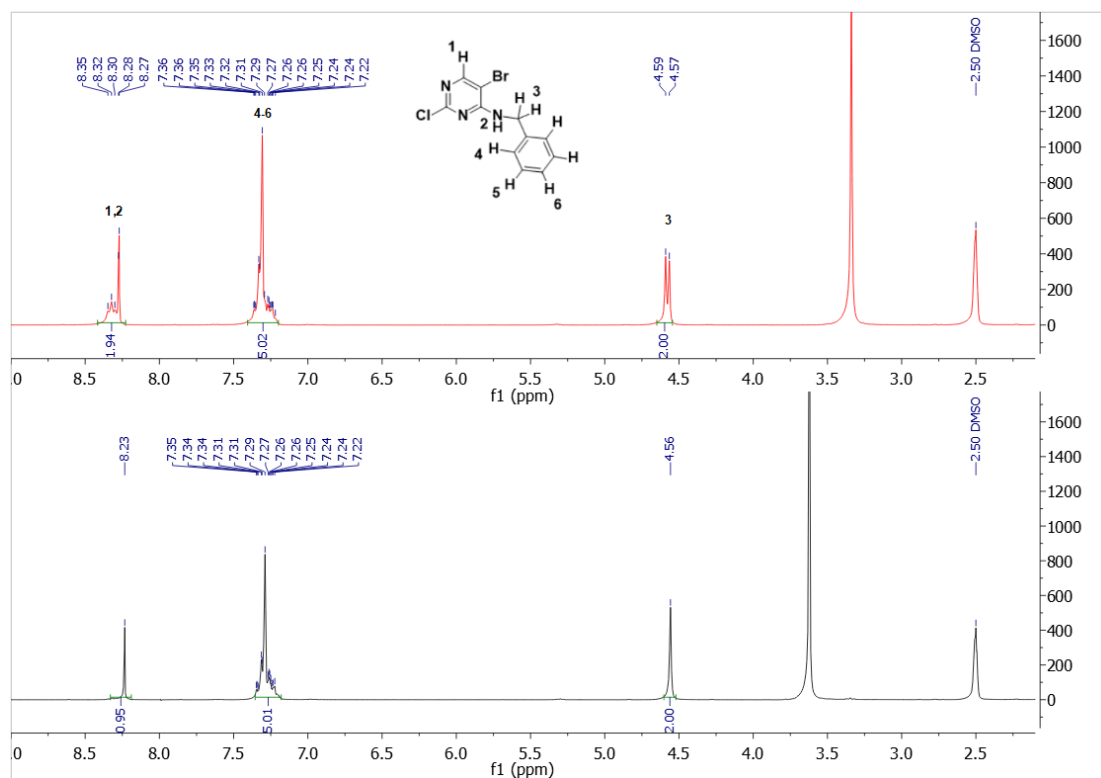
Σχήμα 3.21.: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 8.

3.3.2.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης *N*-βενζυλο-5-βρωμο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης (8)

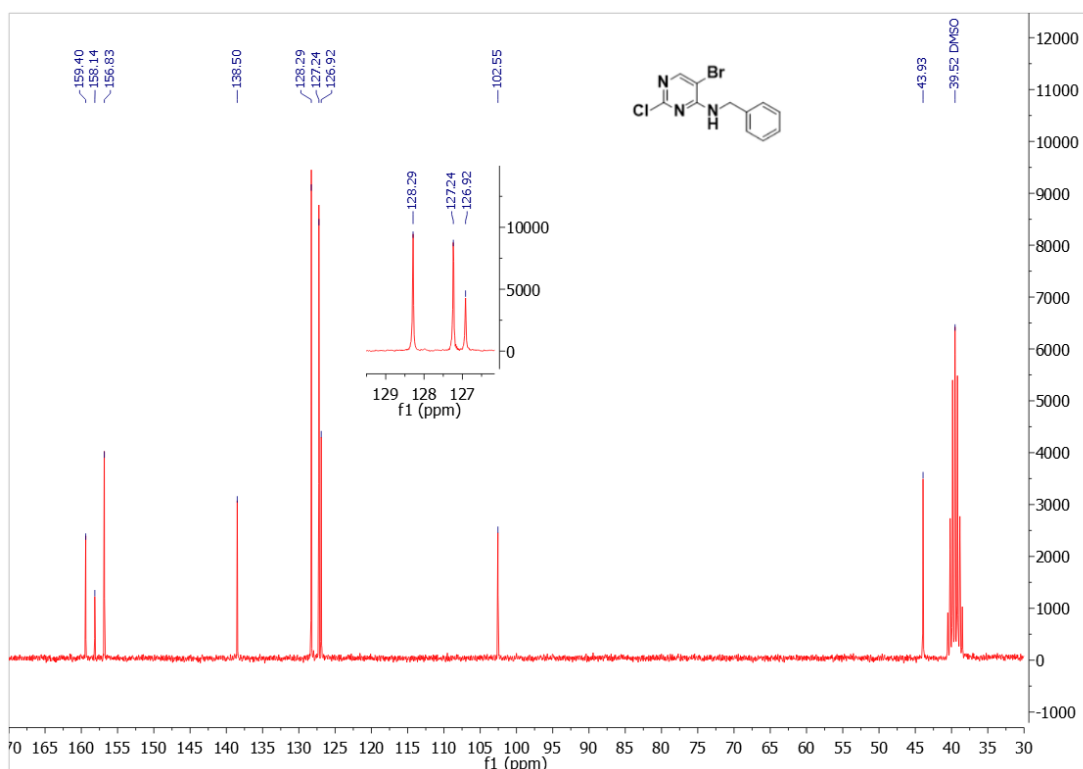
Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε CDCl_3) της άνω ένωσης το πυριμιδινικό H1 είναι το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο και εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή στα 8.15 ppm. Το αμινικό πρωτόνιο H2 δίνει μία ευρεία κορυφή στα 5.79 ppm, ενώ τα γειτονικά του πρωτόνια υπ' αριθμόν 3 συντονίζονται στα 4.71 ppm (διπλή κορυφή με $^3J = 5.4$ Hz). Τέλος, η απλή κορυφή στα 7.36 ppm με ολοκλήρωση 5 αντιστοιχεί στα αρωματικά πρωτόνια H4, H5 και H6. Παρατηρήθηκε πως όταν φάσμα λαμβάνεται σε DMSO-d_6 , το H2 καταγράφεται ως μια τριπλή κορυφή σε αρκετά χαμηλότερο πεδίο (8.32 ppm, $^3J = 5.8$ Hz) εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με μόρια DMSO-d_6 , ενώ οι σχάσεις του αλληλοεπικαλύπτονται με την κορυφή που οφείλεται στο H1 (8.27 ppm). Τα πρωτόνια H3 συντονίζονται στα 4.58 ppm ως μία διπλή κορυφή με $^3J = 6.2$ Hz και τα πρωτόνια H4,5,6 αποτυπώνονται ως μια πολλαπλή κορυφή ολοκλήρωσης 5 στην περιοχή 7.22-7.36 ppm. Στο φάσμα που λήφθηκε μετά την προσθήκη δευτεριωμένου νερού, D_2O , η τριπλή κορυφή που οφείλονταν στο αμινικό πρωτόνιο H2 εξαφανίζεται, ενώ η διπλή κορυφή των H3 αποτυπώνεται ως απλή καθώς το γειτονικό τους πρωτόνιο αντικαταστάθηκε από δευτέριο. Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 8, καταγράφονται 8 σήματα που κυμαίνονται μεταξύ 102.55-159.40 ppm των αρωματικών ανθράκων και ένα σήμα στα 43.93 ppm που αντιστοιχεί στον μη αρωματικό άνθρακα.



Εικόνα 3.8.: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε CDCl_3) της ένωσης 8.



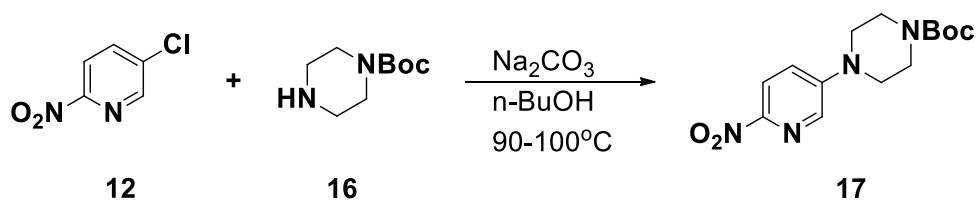
Εικόνα 3.9.: Σύγκριση φασμάτων της ένωσης 8 (Πάνω: φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε DMSO-d_6 και Κάτω: φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε $\text{DMSO/D}_2\text{O}$).



Εικόνα 3.10.: Φάσμα ^{13}C -NMR (62.5 MHz σε DMSO-d_6) της ένωσης 8.

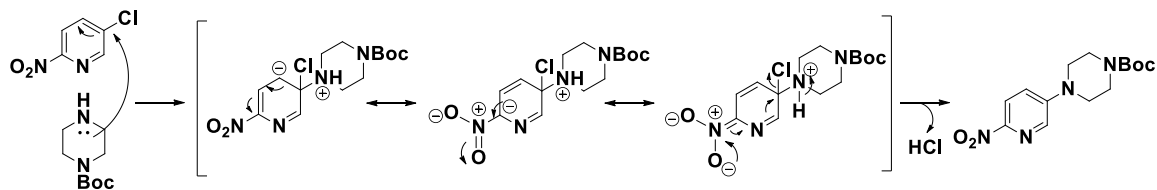
3.3.2.7 Σύνθεση της ένωσης *tert*-βουτυλεστέρας του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (17)

Για την σύνθεση της ένωσης 17 χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικά αντιδραστήρια η 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη (12) και η πιπεραζίνη που φέρει την προστατευτική ομάδα Boc στο ένα άτομο αζώτου (16), εξοικονομώντας χρόνο και αντιδραστήρια από το στάδιο της Boc-προστασίας που θα έπρεπε να ακολουθήσει αργότερα. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα με χρήση ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) ως βάση σε διαλύτη 1-βουτανόλη και θερμοκρασία 90-100°C.



Σχήμα 3.22.: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 17.

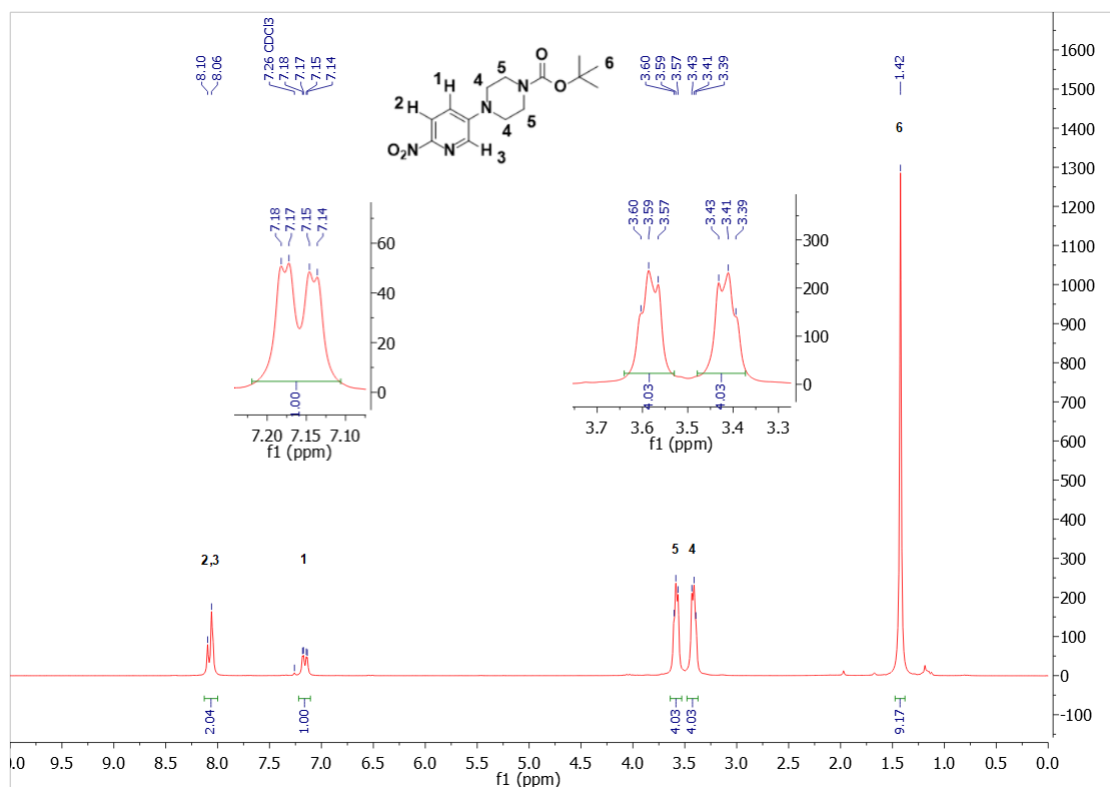
Η σύνθεση πραγματοποιείται μέσω μίας αντίδρασης πυρηνόφιλης υποκατάστασης δύο σταδίων. Στο πρώτο βήμα, γίνεται η προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του ατόμου αζώτου στον αρωματικό δακτύλιο της πυριδίνης που οδηγεί στον σχηματισμό ενδιάμεσου που σταθεροποιείται λόγω συντονισμού ο οποίος επεκτείνεται και εκτός δακτυλίου. Στο δεύτερο βήμα, αποβάλλεται η αποχωρούσα ομάδα και αποπρωτονιώνεται η δομή ώστε να προκύψει το τελικό προϊόν 17.



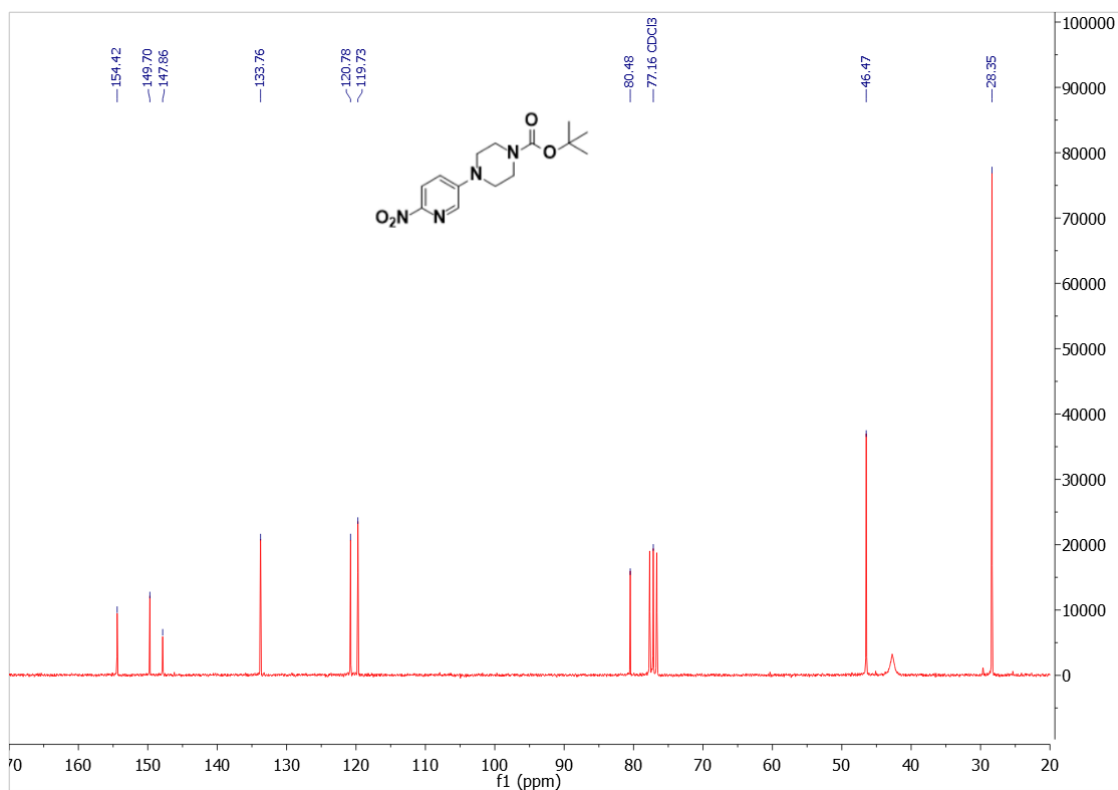
Σχήμα 3.23.: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 17.

3.3.2.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης *tert*-βουτυλεστέρας του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (17)

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 17, το H1 εμφανίζεται ως μία διπλή της διπλής κορυφή στα 7.16 ppm εξαιτίας του πρωτονίου H2 που γειτνιάζει ($^3J = 9.1 \text{ Hz}$) και της σχάσης μακράς απόστασης με το H3 ($^4J = 2.4 \text{ Hz}$). Τα υπόλοιπα πρωτόνια του πυριδινικού δακτυλίου (H2 και H3) δίνουν σήματα στην περιοχή 8.06-8.10 ppm των οποίων οι σχάσεις αλληλοεπικαλύπτονται. Τα πρωτόνια του πιπεραζινικού δακτυλίου συντονίζονται στα 3.41 ppm και 3.59 ppm ως δύο τύπου τριπλές κορυφές με συνολική ολοκλήρωση 8 ($J = 5.2 \text{ Hz}$). Τέλος, τα εννέα πρωτόνια της *tert*-βουτυλο-ομάδας καταγράφονται ως μία απλή κορυφή στα 1.42 ppm. Στο φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης, καταγράφεται το σήμα του αποπροστατευμένου άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας στα 154.42 ppm. Στην περιοχή 120-150 ppm εμφανίζονται 5 σήματα που οφείλονται στους αρωματικούς άνθρακες του πυριδινικού σκελετού. Οι πιπεραζινικοί άνθρακες δίνουν ένα σήμα στα 46.47 ppm, ενώ οι άνθρακες της *tert*-βουτοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως ένα σήμα στα 80.48 ppm για τον άνθρακα πλησίον του οξυγόνου και ένα σήμα μεγάλου ύψους στα 28.35 ppm για τις τρεις μεθυλο-ομάδες.



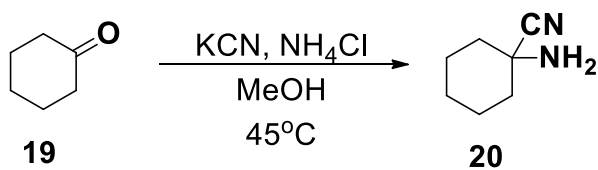
Εικόνα 3.11.: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz σε CDCl_3) της ένωσης 17.



Εικόνα 3.12.: Φάσμα ^{13}C -NMR (62.5 MHz σε CDCl_3) της ένωσης 17.

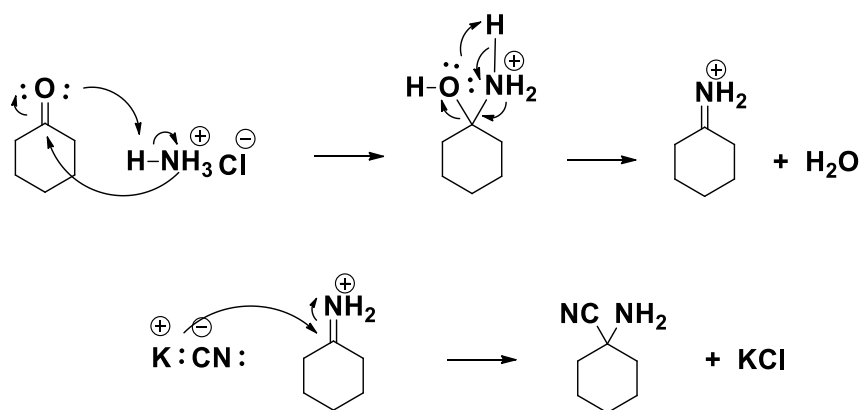
3.3.2.9 Σύνθεση της ένωσης 1-αμινοκυκλοεξανοκαρβονιτρίλιο (20)

Η σύνθεση της ένωσης 20 λαμβάνει χώρα με αρχικό αντιδραστήριο την κυκλοεξανόνη (19) παρουσία κυανιούχου καλίου (KCN) και χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) σε διαλύτη MeOH και θέρμανση στους 45°C .



Σχήμα 3.24.: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 20.

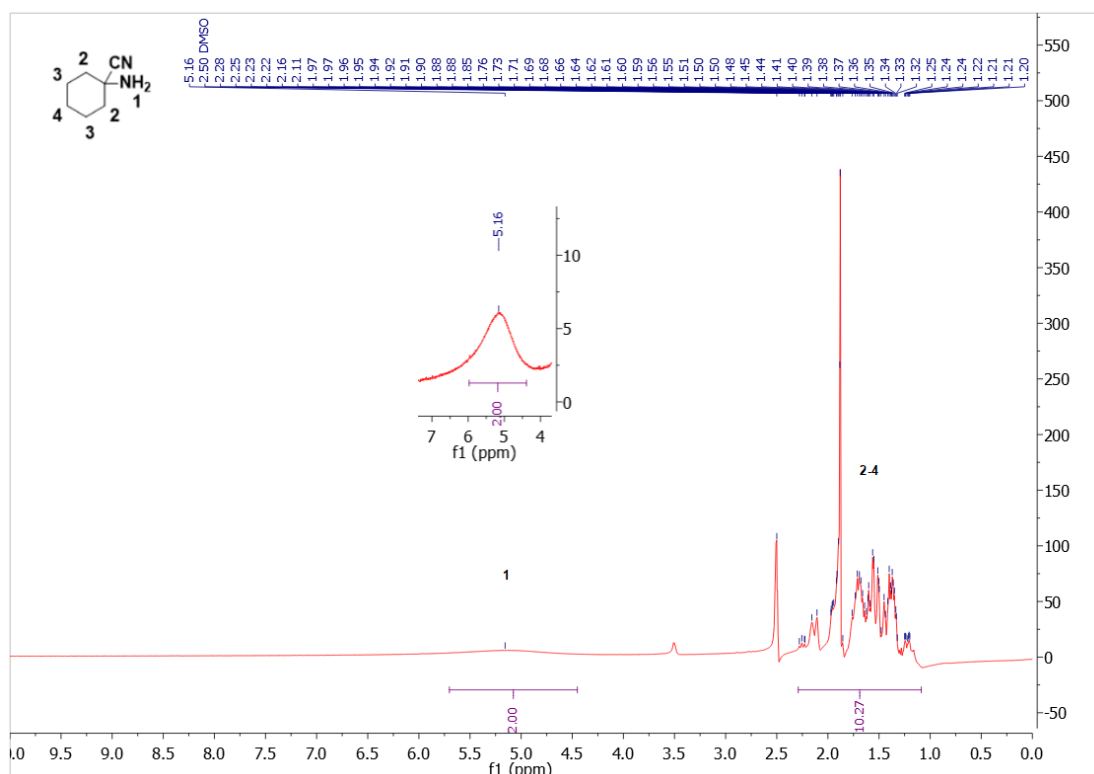
Η σύνθεση του α-αμινονιτρίλιου 20 πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού της αντίδρασης Strecker. Το NH_4Cl δρα ως ήπιο οξύ προσβάλλοντας τον καρβονυλικό δεσμό της κετόνης και σχηματίζοντας την ενδιάμεση ιμίνη που φέρει ως αντισταθμιστικό ιόν το Cl^- με ταυτόχρονη απομάκρυνση μορίου νερού. Στην συνέχεια, το ιόν κυανιδίου δρα ως πυρηνόφιλο και προσβάλλει τον άνθρακα της ιμίνης σχηματίζοντας το τελικό προϊόν.



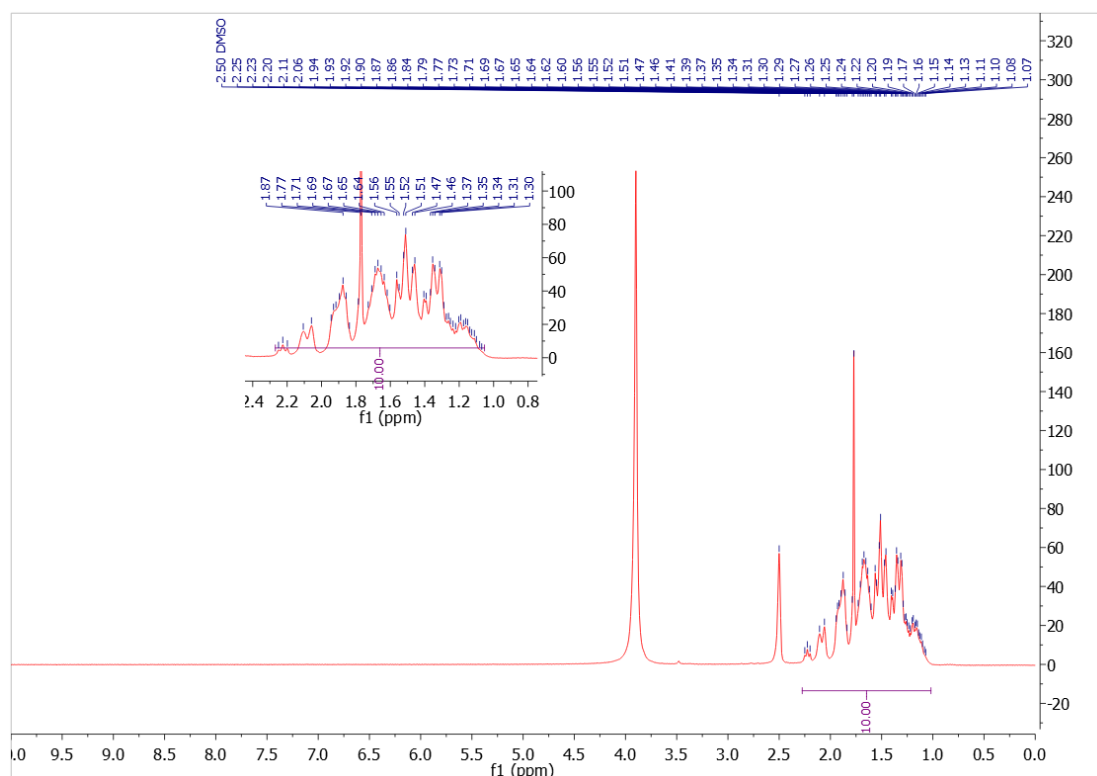
Σχήμα 3.25.: Μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 20.

3.3.2.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 1-αμινοκυκλοεξανοκαρβονιτρίλιο (20)

Στο φάσμα της ένωσης 20, τα πρωτόνια H1 της αμινο-ομάδας εμφανίζονται ως μια ευρεία απλή κορυφή στα 5.16 ppm. Τα πρωτόνια του εξαμελή δακτυλίου (H2, H3 και H4) καταγράφονται στην περιοχή 1.09 έως 2.29 ppm με έναν περίπλοκο αλληλεπικαλυπτόμενο τύπο σχάσης συνολικής ολοκλήρωσης 10, όπως αναμενόταν. Οι κορυφές στα ~2.5 ppm και ~3.3 ppm οφείλονται στο δευτεριωμένο DMSO που χρησιμοποιήθηκε και στο νερό το οποίο περιέχει, αντίστοιχα. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ισοτοπικής ανταλλαγής με την προσθήκη δευτεριωμένου νερού, D₂O, παρατηρείται πως η κορυφή που οφείλονταν στα -NH₂ (5.16 ppm) εξαφανίζεται. Αναμένεται φάσμα ¹³C-NMR, ώστε να γίνει η πλήρης ταυτοποίηση της ένωσης 20.



Εικόνα 3.13.: Φάσμα ¹H-NMR (250 MHz σε DMSO-d₆) της ένωσης 20.



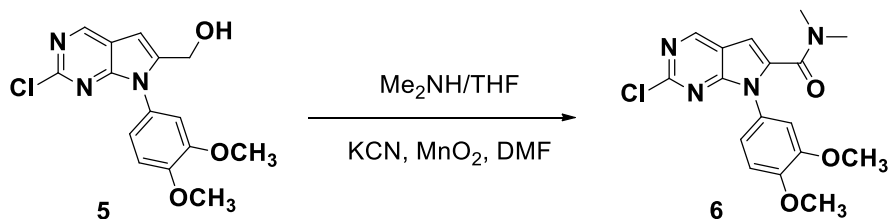
Εικόνα 3.14.: Φάσμα ¹H-NMR (250 MHz σε DMSO/D₂O) της ένωσης 20.

3.3.3 Δοκιμαστικά πειράματα σύνθεσης πρόδρομων ενώσεων

Εδώ, παρουσιάζονται κάποιες προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο για την σύνθεση ενδιάμεσων ενώσεων που δεν οδήγησαν, ωστόσο, στην απομόνωση του τελικού προϊόντος. Η προσπάθεια εύρεσης των κατάλληλων συνθηκών, ώστε να επιτευχθεί η σύνθεσή τους, συνεχίζεται από την ερευνητική ομάδα.

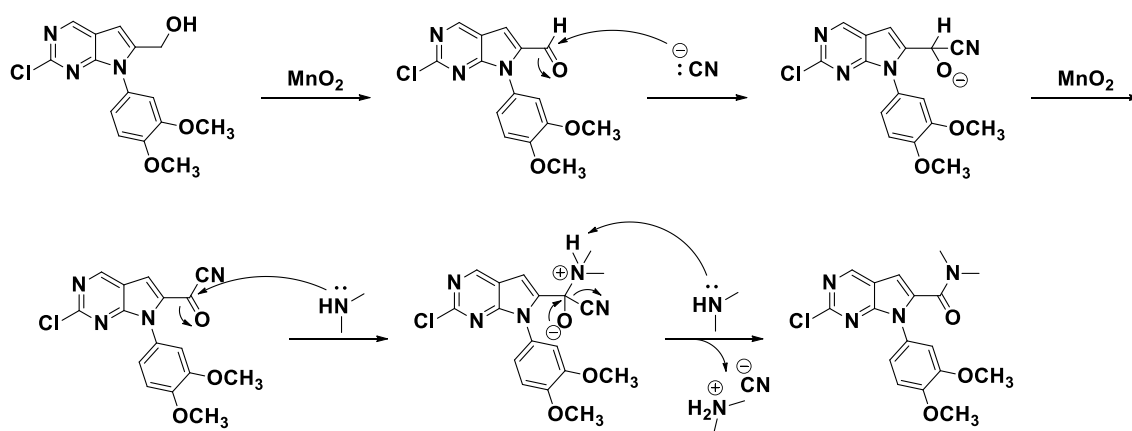
3.3.3.1 Σύνθεση της ένωσης 2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-*N,N*-διμεθυλο-7*H*-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-6-καρβοξαμίδιο (6)

Για την σύνθεση του επιθυμητού αμιδίου (6) χρησιμοποιήθηκε η (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7*H*-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλη (ένωση 5), διάλυμα διμεθυλαμίνης σε THF (4eq Me₂NH), διοξείδιο του μαγγανίου (24eq MnO₂) και κυανιούχο κάλιο (0.2eq KCN) σε διαλύτη άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου για 4h μετά την σταδιακή προσθήκη του οξειδωτικού. Μετά από έλεγχο TLC με σύστημα διαλυτών Διχλωρομεθάνιο : Οξικός Αιθυλεστέρας (2:1) παρατηρήθηκε ο σχηματισμός προϊόντος, ωστόσο δεν υπάρχουν φασματοσκοπικά δεδομένα ακόμα, γιατί γίνονται προσπάθειες απομόνωσης του τελικού προϊόντος.



Σχήμα 3.26.: Σχεδιασμός αντίδρασης οξειδωτικής αμίνωσης για την σύνθεση της ένωσης 6.

Ο μηχανισμός για την σύνθεση της άνω ένωσης περιλαμβάνει την οξείδωση της πρωτοταγούς αλκοόλης από το διοξειδίο του μαγγανίου (MnO_2) που αποτελεί έναν ήπιο οξειδωτικό παράγοντα αποδίδοντας αλδεΐδη μέσω ενός περίπλοκου μηχανισμού που απαιτεί κάποιο ριζικό ενδιάμεσο σχηματισμό. Η αντίδραση είναι εκλεκτική με την ομάδα O-H της αλκοόλης να προστίθεται γρήγορα στο MnO_2 για να δώσει έναν εστέρα και έπειτα το $Mn(IV)$ δέχεται ένα ηλεκτρόνιο για να γίνει $Mn(III)$ και ταυτόχρονα ένα άτομο υδρογόνου μεταφέρεται από τον άνθρακα σε ένα οξυγόνο του οξειδωτικού. Το προϊόν είναι μια ρίζα σταθεροποιημένη λόγω συντονισμού όπου το $Mn(III)$ ανάγεται στο πιο σταθερό $Mn(II)$ και σχηματίζεται το προϊόν της αλδεΐδης. Το οποίο αντιδρά χρησιμοποιώντας διοξειδίο του μαγγανίου και κυανιούχο κάλιο με μια πυρηνόφιλη προσβολή για να παραχθεί το κετο-νιτρίλιο. Αυτό σε μια τελευταία πυρηνόφιλη προσθήκη από την διμεθυλαμίνη σχηματίζει το τελικό προϊόν 6.

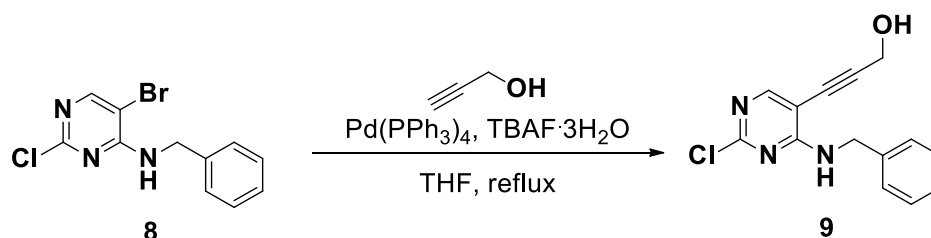


Σχήμα 3.27.: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 6.

3.3.3.2 Σύνθεση της ένωσης 3-(4-(βενζυλαμινο)-2-χλωροπυριμιδινο-5-υλο) προπ-2-υν-1-όλης (9)

Η προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 9 πραγματοποιήθηκε μέσω μιας αντίδρασης Sonogashira με αρχικό αντιδραστήριο την *N*-βενζυλο-5-βρωμο-2-χλωροπυριμιδινο-4-αμίνη (ένωση 8) και την προπαργυλική αλκοόλη (1.2eq C_3H_4O) παρουσία του καταλύτη τετράκις(τριφαινυλοφωσφίνη)παλλάδιο(0) (0.05eq $Pd(P(C_6H_5)_3)_4$) και του τριένυδρου φθοριούχου τετρα-*N*-βουτυλαμμωνίου ως βάση (2.5eq $n-Bu_4NF$) σε διαλύτη άνυδρο THF. Η αντίδραση προχωρά μέσω του μηχανισμού του καταλυτικού

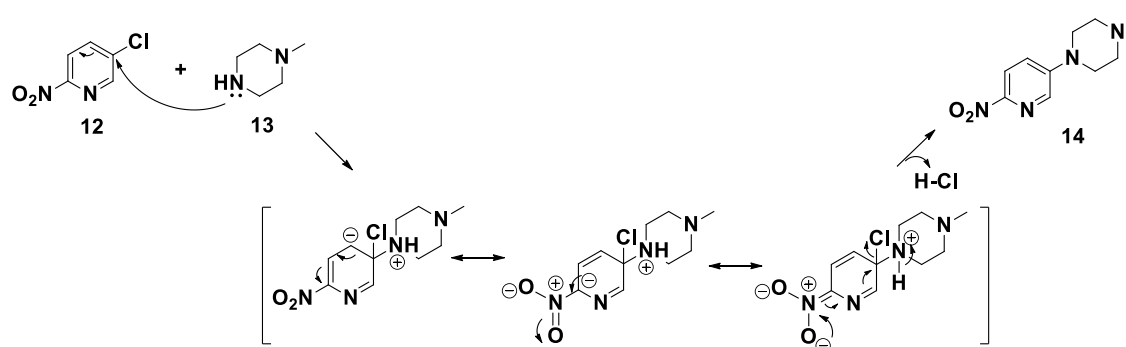
κύκλου της αντίδρασης Sonogashira, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (Σχήμα 3.18.). Μετά το πέρας 10h με θέρμανση σε συνθήκες reflux έγινε επιπλέον προσθήκη 0.05eq του καταλύτη και 0.5eq TBAF·3H₂O καθώς δεν υπήρχε κάποια αλλαγή στην εικόνα της αντίδρασης και η θέρμανση συνεχίστηκε. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ορισμένων ενδιάμεσων του καταλυτικού κύκλου της αντίδρασης, ενώ το επιθυμητό προϊόν ήταν σε πολύ μικρή ποσότητα, μη απομονώσιμη.



Σχήμα 3.28.: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 9 που έγινε προσπάθεια σύνθεσής της στο εργαστήριο.

3.3.3.3 Σύνθεση της ένωσης 1-μεθυλ-4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο) πιπεραζίνης (14)

Για την σύνθεση της ένωσης 14 χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικά αντιδραστήρια η 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη (12) και η 1-μεθυλοπιπεραζίνη (13) παρουσία κάποιας βάσης και υψηλής θερμοκρασίας. Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού της αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης. Στο πρώτο βήμα, γίνεται η προσβολή από το πυρηνόφιλο στον αρωματικό δακτύλιο της πυριδίνης όπου σχηματίζεται το ενδιάμεσο σύμπλοκο που σταθεροποιείται λόγω συντονισμού, ο οποίος επεκτείνεται και εκτός δακτυλίου. Στο δεύτερο στάδιο, αποβάλλεται η αποχωρούσα ομάδα μαζί με ένα πρωτόνιο σχηματίζοντας το HCl με αποτέλεσμα να αποκαθίσταται η αρωματικότητα και να σχηματίζεται το τελικό προϊόν.



Σχήμα 3.29.: Μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης 14.

➤ 1^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 14

Αρχικά, έγινε προσθήκη 2eq N-μεθυλοπιπεραζίνης σε διαλύτη n-BuOH και ακολούθησε θέρμανση για 24h στους 90-100°C χωρίς, όμως, να παρατηρείται σχηματισμός προϊόντος. Έγινε προσθήκη 0,5eq Na₂CO₃ και συνεχίστηκε η θέρμανση μέχρι που σχηματίστηκε προϊόν σε ποσότητα που δεν ήταν ικανοποιητική για απομόνωση και χαρακτηρισμό.

➤ 2^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 14

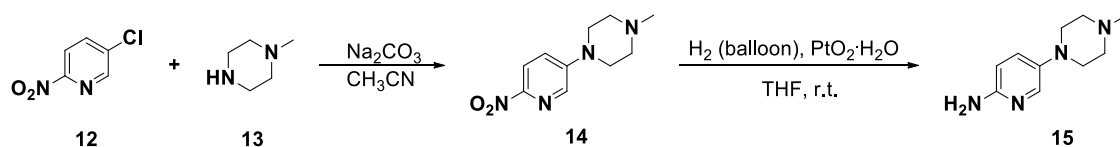
Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 2eq N-μεθυλοπιπεραζίνης και 2eq Na₂CO₃ σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από 60°C έως 90°C μέχρις ότου παρατηρήθηκε κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος TLC). Μετά από στερεή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Διχλωρομεθάνιο : Μεθανόλη (15:1) και χαρακτηρισμό με ¹H-NMR διαπιστώθηκε η σύνθεση διυποκαταστημένου παραπροϊόντος εξαιτίας των δραστικών συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ το επιθυμητό προϊόν λήφθηκε μαζί με προσμίξεις.

➤ 3^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 14

Αυτή τη φορά δοκιμάστηκε ως βάση η *N,N*-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (1.5eq DIPEA) και έγινε προσθήκη 1eq της ένωσης 12 και 1.2eq της ένωσης 13 σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Το μίγμα της αντίδρασης παρέμεινε σε βρασμό υπό αναρροή έως ότου παρατηρήθηκε αλλαγή χρώματος και σχηματισμός προϊόντος. Ωστόσο, κατά την διαδικασία της εκχύλισης το προϊόν παρέμεινε στην υδατική φάση και κρίθηκε αδύνατον η απομόνωση του.

➤ 4^η Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 14

Στην συγκεκριμένη προσπάθεια, χρησιμοποιήθηκαν 1.2eq 1-μεθυλοπιπεραζίνης και 0,5eq Na₂CO₃ σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Μετά το πέρας 30h σε συνθήκες reflux παρατηρήθηκε πως είχε σχηματιστεί μικρό ποσοστό του επιθυμητού προϊόντος και χωρίς να γίνει ο πλήρης καθαρισμός του αποφασίστηκε να εφαρμοστούν οι κατάλληλες συνθήκες υδρογόνωσης, ώστε να συντεθεί η ένωση 5-(4-μεθυλππεραζιν-1-υλο)πυριδιν-2-αμίνη (15). Για την ακρίβεια, η μετατροπή της νιτρο-ομάδας σε αμινο-ομάδα πραγματοποιείται με την χρήση του αντιδραστηρίου Adams (10% PtO₂·H₂O) και μπαλόνι υδρογόνου (H₂) υπό έντονη ανάδευση σε διαλύτη dry THF. Όμως, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος υπό αυτές τις συνθήκες.



Σχήμα 3.30.: Δοκιμαστική προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 15.

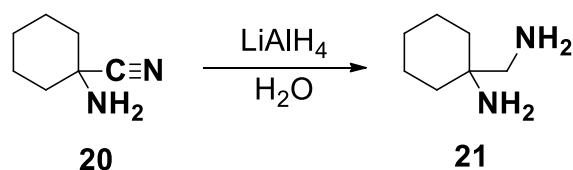
Πείραμα	5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη	1-μεθυλοπιπεραζίνη	Βάση	Διαλύτης	Θέρμανση	Προϊόν
1.	1eq	2eq	Na ₂ CO ₃ 0.5eq	n-BuOH	90-100°C	ίχνη
2.	1eq	2eq	Na ₂ CO ₃ 2eq	DMF	60-90°C	περιείχε προσμίξεις
3.	1eq	1.2eq	DIPEA 1.5eq	CH ₃ CN	80°C	-
4.	1eq	1.2eq	Na ₂ CO ₃ 0.5eq	CH ₃ CN	80°C	σχηματίστηκε σε μικρό ποσοστό και ακολούθησε η αντίδραση αναγωγής

Πίνακας 3.2.: Προσπάθειες σύνθεσης της ένωσης 14 και 15 που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο.

Συνοψίζοντας, το προϊόν (ένωση 14) στις προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο απομονώθηκε σε αρκετά μικρή ποσότητα που δυσκόλεψε την διαδικασία της επεξεργασίας του, ενώ όταν σχηματίστηκε σε ικανοποιητικό βαθμό ήταν ακάθαρμο. Επομένως, διερευνάται ακόμα σχετικά με τις κατάλληλες συνθήκες σχηματισμού του και εναλλακτικές προσπάθειες που έχουν σχεδιαστεί περιλαμβάνουν τη χρήση διαφόρων βάσεων (π.χ. K₂CO₃) σε ένα εύρος θερμοκρασιών ανάλογα τον διαλύτη που θα επιλεγθεί (π.χ. DMSO, THF).

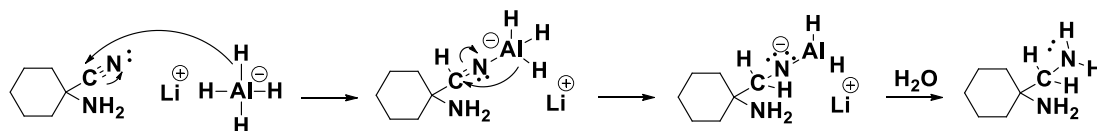
3.3.3.4 Σύνθεση της ένωσης 1-(αμινομεθυλ)κυκλοεξαναμίνης (21)

Για την σύνθεση της ένωσης 21 πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική αντίδραση με το 1-αμινοκυκλοεξανοκαρβονιτρίλιο (ένωση 20), περίσσεια του ισχυρού αναγωγικού παράγοντα LiAlH₄ σε διαλύτη άνυδρο THF και ακολούθησε σταδιακή προσθήκη νερού. Δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός προϊόντος και δεν συνεχίστηκε η επεξεργασία της αντίδρασης.



Σχήμα 3.31.: Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης 21.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης αναγωγής του α-αμινονιτριλίου σε πρωτοταγή αμίνη περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του ιόν υδριδίου στον άνθρακα του νιτριλίου και το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου. Ακολουθεί μια δεύτερη προσθήκη ενός υδριδίου και ο σχηματισμός ενός ενδιάμεσου όπου η υδρόλυση του οδηγεί στο τελικό προϊόν.

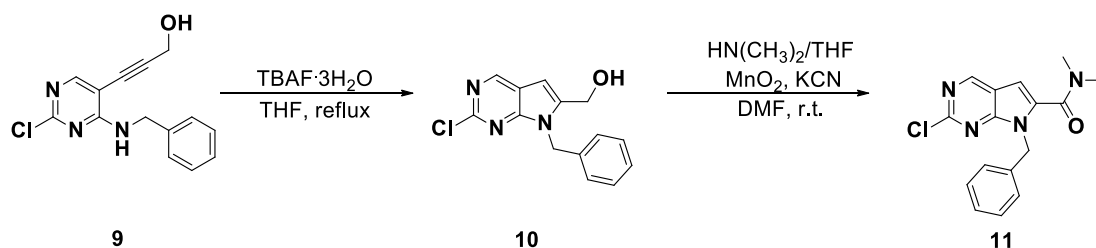


Σχήμα 3.32.: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 21.

3.3.4 Σχεδιασμός σύνθεσης μεταβατικών σταδίων της συνθετικής πορείας καθώς και των τελικών ενώσεων

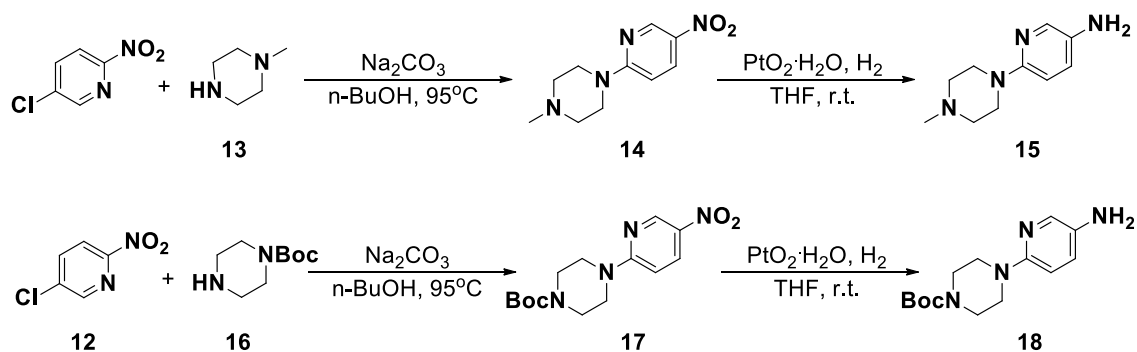
Δυστυχώς, λόγω έλλειψης χρόνου δεν πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των τελικών ενώσεων και δεν θα παρουσιαστεί στα πλαίσια του παρόντος διπλώματος ειδίκευσης, όμως, η μελέτη των αντιδράσεων και οι προσπάθειες σύνθεσης τους συνεχίζονται από την ερευνητική ομάδα στο εργαστήριο. Ωστόσο, αξίζει να γίνει μια αναφορά στις αντιδράσεις των μεταβατικών σταδίων που υπολείπονται και θα οδηγήσουν στην σύνθεση των νέων αναλόγων.

Η ένωση 9, όπως αναφέρθηκε ήδη παραπάνω, προκύπτει μετά από μία αντίδραση Sonogashira και ακολουθεί αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης με την επίδραση περίσσειας TBAF·3H₂O σε συνθήκες reflux για τον σχηματισμό του πυρρολικού σκελετού. Έτσι, η (7-βενζυλο-2-χλωρο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-υλο)μεθανόλη (10) αντιδρά με την διμεθυλαμίνη (Me₂NH), το διοξείδιο του μαγγανίου (MnO₂) και το κυανιούχο κάλιο (KCN) σε διαλύτη άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) για τον σχηματισμό του 7-βενζυλο-2-χλωρο-N,N-διμεθυλο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-6-καρβοξαμιδίου (11).



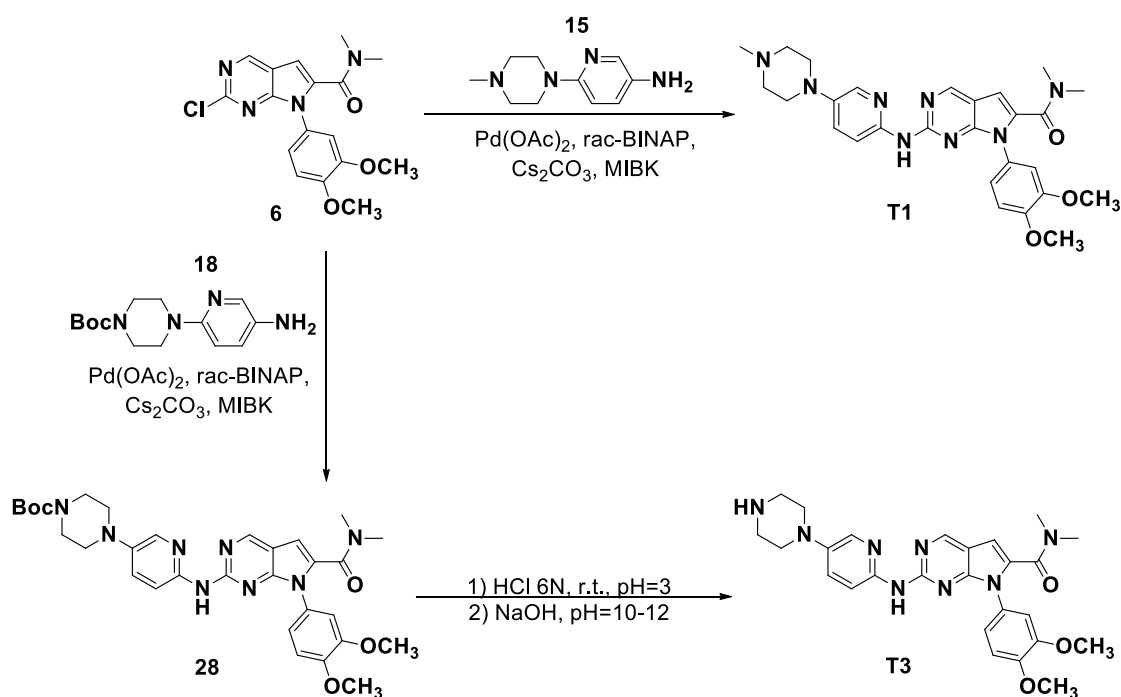
Σχήμα 3.33.: Αντιδράσεις σχηματισμού της ένωσης 11.

Μετά την αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με αρχικά αντιδραστήρια την 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνη (12) και ή την 1-μεθυλοπιπεραζίνη (13) για την σύνθεση της ένωσης 14 ή την 1-Boc-πιπεραζίνη (16) για την σύνθεση της ένωσης 17, ακολουθεί καταλυτική υδρογόνωση των αντίστοιχων προϊόντων. Η αναγωγή της νιτρο-ομάδας σε αμινο-ομάδα σχεδιάζεται να γίνει χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Adams (PtO₂·H₂O) και μπαλόνι υδρογόνου υπό έντονη ανάδευση και διαλύτη THF (dry) για να παραχθεί η 6-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)πυριδιν-3-αμίνη (15) και ο *tert*-βουτυλεστέρας του 4-(6-αμινοπυριδιν-3-υλο) πιπεραζιν-1-καρβοξυλικού οξέος (18).



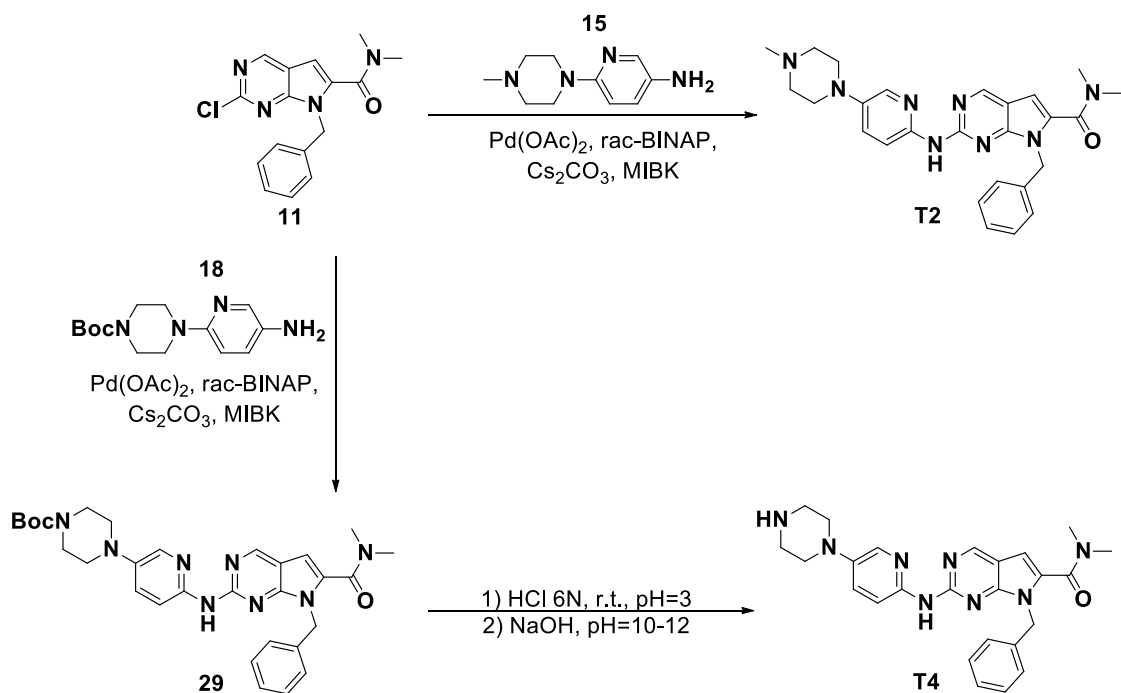
Σχήμα 3.34.: Αντιδράσεις σχηματισμού των ενώσεων 15 και 18.

Ακολουθώντας συγκλίνουσα πορεία σύνθεσης, τα τελικά προϊόντα T1 και T2 προκύπτουν από την σύζευξη καταλυτικού κύκλου παρουσία $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ και *rac*-BINAP σε βασικό περιβάλλον εξαιτίας του ανθρακικού κασίου (Cs_2CO_3) και σε διαλύτη 4-μεθυλοπενταν-2-όνη (MIBK) της ένωσης 15 με τις ενώσεις 6 και 11, αντίστοιχα. Ενώ, τα ανάλογα T3 και T4 σχηματίζονται από σύζευξη της ένωσης 18 με τις ενώσεις 6 και 11, αντίστοιχα. Η σύνθεση αυτών των αναλόγων θα προκύψει μετά από σύζευξη Buchwald-Hartwig η οποία καταλύεται από το σύμπλοκο του παλλαδίου και αποκοπή της προστατευτικής ομάδας Boc σε ένα δεύτερο βήμα.

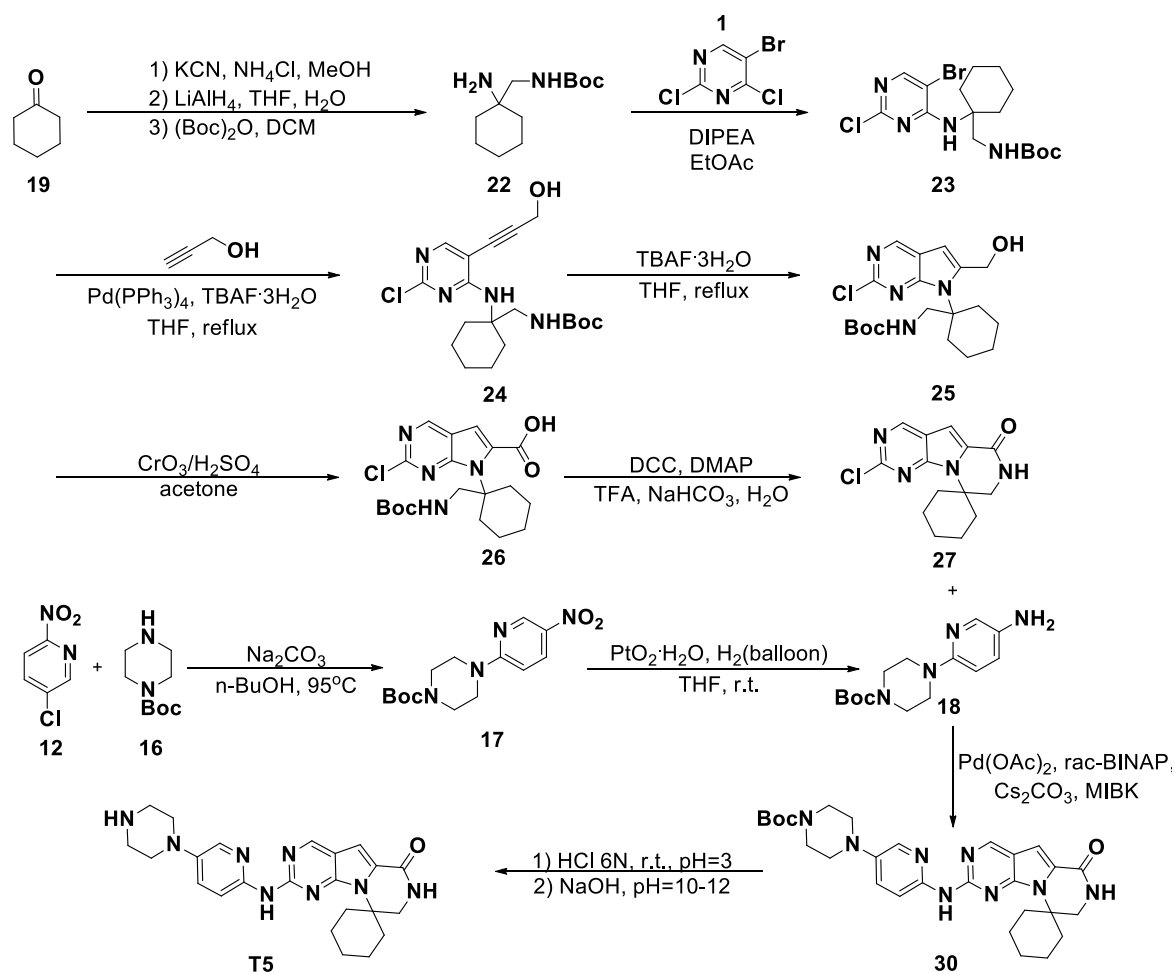


Σχήμα 3.35.: Αντιδράσεις σχηματισμού των τελικών ενώσεων T1 και T3.

Σχετικά με την σύνθεση του ανάλογου T5, αποφασίστηκε να μην διενεργηθούν τα επόμενα στάδια της πορείας που οδηγούν στην σύνθεση του, καθώς το πρώτο βήμα της σύνθεσης του α-αμινονιτριλίου πραγματοποιήθηκε με πολύ χαμηλή απόδοση και θα αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα στις μετέπειτα αντιδράσεις.



Σχήμα 3.36.: Αντιδράσεις σχηματισμού των τελικών προϊόντων T2 και T4.



Σχήμα 3.37.: Πορεία σύνθεσης του ανάλογου T5.

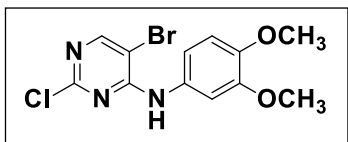
ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Πειραματικό μέρος

4.1 Συσκευές και όργανα

- Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Sigma Aldrich, Merck, Alfa Aesar και Fluorochem και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι διαλύτες προμηθεύτηκαν από τις ίδιες εταιρείες και είτε χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία είτε, όπου ήταν απαραίτητο, κατέστησαν απόλυτοι και διατηρήθηκαν σε άνυδρες συνθήκες.
- Επίσης, από τις παραπάνω εταιρίες προέρχονται οι δευτεριωμένοι διαλύτες (CDCl_3 και DMSO-d_6) όπου χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ($^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$) σε φασματογράφο Bruker AV 250 MHz στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες Silica gel F₂₅₄ ms της εταιρίας Merck, ενώ ο διαχωρισμός των μιγμάτων ενώσεων έγινε με χρωματογραφία στήλης με Silica gel F₂₅₄ ms της εταιρίας Fluorochem.

4.2 Σύνθεση της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-N-(3,4-διμεθοξυφαινυλο) πυριμιδινο-4-αμίνης (3)

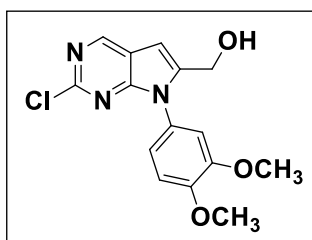


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 2.0 g της ένωσης 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνης (8.78 mmol) και διαλύονται σε 10.0 mL οξικού αιθυλεστέρα. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση προστίθενται 3.06 mL DIPEA (2.27 g, 17.55 mmol, $d = 0.742 \text{ g/mL}$) και στάγδην με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 1.48 g 3,4-διμεθοξυανιλίνης (9.66 mmol) σε οξικό αιθυλεστέρα (10.0 mL) σε διάστημα 60 λεπτών. Μόλις ολοκληρωθεί η προσθήκη, το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου διαπιστωθεί η κατανάλωση της αρχικής ένωσης με TLC. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 5h. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι Διχλωρομεθάνιο : Οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Στην συνέχεια, πραγματοποιούνται διαδοχικές εκχυλίσεις (3 x 20 mL) με απιονισμένο H_2O . Οι υδατικές φάσεις απορρίπτονται, ενώ οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται με πτυχωτό ηθμό και εξατμίζεται ο οξικός αιθυλεστέρας υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστή. Λαμβάνεται έλαιο σκούρου χρώματος το οποίο καθαρίζεται με στερεή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Διχλωρομεθάνιο : Οξικός αιθυλεστέρας (2:1) και ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού. Το προϊόν λαμβάνεται ως υποκίτρινο ίζημα (2.83 gr, 93.5 %).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.16 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.18 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H), 7.09 (dd, ⁴J = 2.5 Hz, ³J = 7.5 Hz, 1H), 6.96 (d, ³J = 7.5 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.74 (s, 3H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO) δ: 158.17, 158.02, 157.77, 148.36, 146.39, 130.50, 116.04, 111.53, 108.92, 102.95, 55.69, 55.54.

4.3 Σύνθεση της ένωσης (2-χλωρο-7-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-7H-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-6-υλο) μεθανόλης (5)

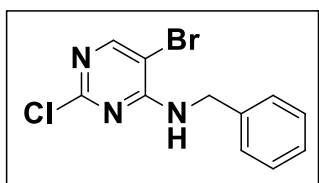


Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 2.83 g της ένωσης 5-βρωμο-2-χλωρο-*N*-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)πυριμιδιν-4-αμίνης (8.21 mmol) μαζί με 15 mL τετραϋδροφουράνιο. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό ανάδευση προστίθενται 6.48 g TBAF·3H₂O (20.53 mmol), 0.95 g Pd(PPh₃)₄ (0.82 mmol) και 568.5 μL προπαργυλικής αλκοόλης (552.34 mg, 9.85 mmol, d = 0.9715 g/mL). Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (reflux) για τουλάχιστον 10 ώρες και αν χρειάζεται γίνεται επιπλέον προσθήκη THF. Το σύστημα ελέγχου TLC για την πορεία της αντίδρασης είναι Οξικός αιθυλεστέρας : Διχλωρομεθάνιο (1:1). Το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ελαττωμένη πίεση για την απομάκρυνση του THF. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μετά την προσθήκη 30 mL οξικού αιθυλεστέρα στο μίγμα της αντίδρασης, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης απομάκρυνση του THF. Στην συνέχεια, διαλύεται στην μικρότερη δυνατή ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα και γίνεται διήθηση υπό κενό με ηθμό από celite για την απομάκρυνση του καταλύτη και μετά εξατμίζεται ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε. Το μίγμα διαλύεται σε 40 mL οξικού αιθυλεστέρα και υπό ανάδευση προστίθενται 20 mL υδατικού διαλύματος NaHCO₃ 4.2% για την εξουδετέρωση της προπαργυλικής αλκοόλης. Η οργανική φάση που λαμβάνεται εκχυλίζεται τρεις φορές με απεσταγμένο νερό (3 x 40 mL), όπου οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και απορρίπτονται. Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται το ξηραντικό και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση με αποτέλεσμα να λαμβάνεται λασπώδες ίζημα καστανού χρώματος. Το προϊόν καθαρίζεται με στερεή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Διχλωρομεθάνιο : Εξάνιο : Οξικός αιθυλεστέρας (1:1:1) και λαμβάνονται 1.055 g υποκίτρινου ιζήματος (40.2 %).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.95 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H), 7.13 (m, 2H), 7.02 (dd, ⁴J = 2.6 Hz, ³J = 8.5 Hz, 1H), 6.75 (d, ⁴J = 1.2 Hz, 1H), 5.38 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.76 (s, 3H).

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO) δ: 153.26, 152.26, 150.72, 149.07, 148.93, 144.95, 126.83, 120.19, 117.33, 111.75, 111.71, 98.24, 55.82, 55.74, 55.68.

4.4 Σύνθεση της ένωσης *N*-βενζυλο-5-βρωμο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης (8)



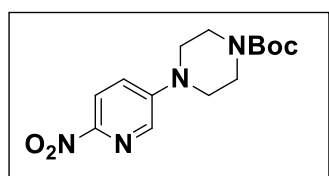
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 1.50 g της ένωσης 5-βρωμο-2,4-διχλωροπυριμιδίνης (6.583 mmol) και διαλύονται σε 7.0 mL οξικού αιθυλεστέρα υπό ανάδευση. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση προστίθενται 2.29 mL DIPEA (1.70 g, 13.166 mmol, $d = 0,742 \text{ g/mL}$)

και στάγδην με μια πιπέτα διάλυμα της βενζυλαμίνης 790.9 μL (7.241 mmol, 0.776 g, $d = 0.981 \text{ g/mL}$) σε οξικό αιθυλεστέρα (5.0 mL) σε διάστημα 30 λεπτών. Μόλις ολοκληρωθεί η προσθήκη, το μίγμα θερμαίνεται στους 40°C για περίπου 2h μέχρι να διαπιστωθεί κατανάλωση της αρχικής ένωσης με έλεγχο TLC (Σύστημα Ελέγχου της αντίδρασης: Διχλωρομεθάνιο). Μόλις ψυχθεί η σφαιρική φιάλη προστίθεται νερό (15.0 mL) υπό ανάδευση για τουλάχιστον 15 min μέχρι να διαχωριστούν πλήρως οι δύο φάσεις. Μετά από εκχύλιση η υδατική φάση φυλάσσεται, ενώ η οργανική φάση εκχυλίζεται άλλες δύο φορές με απεσταγμένο νερό (15.0 mL). Οι υδατικές φάσεις συνενώνονται και εκχυλίζονται άλλη μια φορά με ίσο όγκο οξικού αιθυλεστέρα. Στην συνέχεια, οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται και εξατμίζεται ο οξικός αιθυλεστέρας υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Το ακατέργαστο μίγμα καθαρίζεται με στερεή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Εξάνιο : Διχλωρομεθάνιο (1:3) όπου λαμβάνονται 0.886 g προϊόντος ως λευκό κρυσταλλικό στερεό (45.1 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform- d) δ : 8.15 (s, 1H), 7.36 (s, 5H), 5.79 (s, 1H), 4.71 (d, $^3J = 5.4 \text{ Hz}$, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, DMSO) δ : 159.40, 158.14, 156.83, 138.50, 128.29 (2C), 127.24 (2C), 126.92, 102.55, 43.93.

4.5 Σύνθεση της ένωσης *tert*-βουτυλεστέρας του 4-(6-νιτροπυριδιν-3-υλο)πιπεραζινο-1-καρβοξυλικού οξέος (17)



Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 300 mg της ένωσης 5-χλωρο-2-νιτροπυριδίνης (1.892 mmol) και 5 mL *n*-BuOH. Μόλις διαλυθεί η αρχική ένωση και υπό ανάδευση προστίθενται 704.9 mg 1-Boc-πιπεραζίνης (3.785 mmol) και 100.3 mg ανθρακικού νατρίου (0.946 mmol).

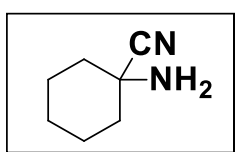
Το μίγμα θερμαίνεται στους 90-100°C για 30h. Το σύστημα ελέγχου της αντίδρασης είναι Εξάνιο : Οξικός αιθυλεστέρας (2:1). Στην συνέχεια, εξατμίζεται η 1-βουτανόλη και το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη όπου εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και απεσταγμένο νερό. Η υδατική φάση εκχυλίζεται άλλες δύο φορές με οξικό αιθυλεστέρα, οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και γίνεται ξήρανση με Na_2SO_4 . Το ξηραντικό διηθείται και γίνεται εξατμωση του οξικού αιθυλεστέρα υπό ελαττωμένη

πίεση μέχρι ξηρού. Το στερεό που προκύπτει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης Εξάνιο : Οξικός αιθυλεστέρας (2:1) και λαμβάνονται 410.7 mg προϊόντος (70.4 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform-d) δ : 8.08 (d, 2H), 7.16 (dd, $J = 9.1$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.59 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 3.41 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 1.42 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, Chloroform-d) δ : 154.42, 149.70, 147.86, 133.76, 120.78, 119.73, 80.48, 46.47 (4C), 28.35 (3C).

4.6 Σύνθεση της ένωσης 1-αμινοκυκλοεξανοκαρβονιτρίλιο (20)



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 mL φέρονται 663.5 mg KCN (10.190 mmol) σε 3.0 mL H₂O και 599.5 mg NH₄Cl (11.208 mmol) υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, προστίθενται διάλυμα 1.06 mL κυκλοεξανόνης (10.190 mmol, 1.00 g, $d = 0.9478$ g/mL) σε 5.0 mL MeOH και το μίγμα αναδεύεται για 3h σε θερμοκρασία 45°C. Μετά την απομάκρυνση των διαλυτών με εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξάτμιστήρα, το μίγμα διαλύεται σε 40 mL οξικού αιθυλεστέρα και ακολουθεί εκχύλιση της οργανικής φάσης αρχικά με 15 mL υδατικού διαλύματος FeSO₄·7H₂O (1.07 g) για την απομάκρυνση των κυανιούχων ιόντων. Στην συνέχεια, με 15 mL απεσταγμένου νερού και τέλος με 15 mL υδατικού διαλύματος NaCl 10%. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται και ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται το ξηραντικό με πτυχωτό ηθμό και ο οξικός αιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το ακατέργαστο μίγμα καθαρίζεται με υγρή χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης 2% MeOH σε DCM και λαμβάνονται 380 mg του επιθυμητού προϊόντος (30.1 %).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d₆) δ : 5.16 (s, 2H), 2.29-1.09 (m, 10H).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την περάτωση του παρόντος Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης συνοψίζονται επιγραμματικά ως κάτωθι:

- Έγινε σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Trilaciclib για την θεραπεία νεοπλασιών, έπειτα από πειράματα docking και εύρεση των κατάλληλων τροποποιήσεων στην μοριακή δομή του.
- Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης των νέων ενώσεων που σχεδιάστηκαν, ώστε να αξιολογηθούν οι αλληλεπιδράσεις που εμφανίζουν με την κυκλινο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση 6. Πράγματι, οι νέοι αναστολείς παρουσίασαν παρόμοια ή και βέλτιστα θεωρητικά αποτελέσματα (τιμές $\Delta G_{\text{binding}}$) σε σχέση με το φάρμακο-αναφορά Trilaciclib.
- Ακολούθησε σχεδιασμός των αντιδράσεων-σταδίων που οδηγούν στην σύνθεση των επιθυμητών ενώσεων, έχοντας ως στόχο την αποδοτικότερη οδό, την μείωση του κόστους και την εξοικονόμηση του χρόνου.
- Επιτεύχθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ πρόδρομων ενώσεων, ενώ έγιναν προσπάθειες για την σύνθεση των υπόλοιπων σταδίων. Στο εργαστήριο, η ερευνητική ομάδα συνεχίζει τις προσπάθειες για την σύνθεση των νέων ενώσεων, αναλόγων του Trilaciclib.
- Αναμένεται η ολοκλήρωση της συνθετικής πορείας και θα ακολουθήσουν βιολογικά πειράματα, ώστε να αξιολογηθεί η ανασταλτική δράση των νέων ενώσεων, όπως αυτή αποτυπώθηκε από τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

Βιβλιογραφία

1. Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2018). Το κύτταρο: Μια μοριακή προσέγγιση. *Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές Εκδόσεις I. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.*
2. Bathula, R., Muddagoni, N., Dasari, M., Nakkala, S., Lanka, G., & Potlapally, S. R. (2023). Synthesis and Molecular Docking Study of Novel Pyrazole-Integrated 1, 3, 4-Oxadiazole Derivatives as Potential Cyclin-Dependent Kinase 2 Inhibitors. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 59(3), 528-535.
3. Wu, A., Wu, B., Guo, J., Luo, W., Wu, D., Yang, H., ... & Yang, Z. (2011). Elevated expression of CDK4 in lung cancer. *Journal of translational medicine*, 9, 1-9.
4. Serzan, M. T., Farid, S., & Liu, S. V. (2020). Drugs in development for small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 12(10), 6298.
5. Bansal, I., Pandey, A. K., & Ruwali, M. (2023). Small-molecule inhibitors of kinases in breast cancer therapy: recent advances, opportunities, and challenges. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1244597.
6. Shi, S. (2023). Targeting Cyclin Dependent Kinase 4/6 for Cancer Therapy. *Transactions on Cancer*, 4(1), 27-42.
7. Upadhyay, P., Ghosh, A., Sarangthem, V., & Singh, T. D. (2023). Nanocarrier mediated co-delivery of phytochemicals and chemo-drugs: an emerging strategy to combat lung cancer in a systemic way. *Phytochemistry Reviews*, 1-43.
8. Vulpetti, A., & Bosotti, R. (2004). Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. *Il farmaco*, 59(10), 759-765.
9. García-Aranda, M., & Redondo, M. (2017). Protein kinase targets in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2543.
10. Roskoski Jr, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological research*, 100, 1-23.
11. Li, T., Wang, N., Zhang, T., Zhang, B., Sajeevan, T. P., Joseph, V., ... & Naman, C. B. (2019). A systematic review of recently reported marine derived natural product kinase inhibitors. *Marine drugs*, 17(9), 493.
12. Susanti, N. M. P., & Tjahjono, D. H. (2021). Cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors in cell cycle dysregulation for breast cancer treatment. *Molecules*, 26(15), 4462.
13. Klein, M. (2023). Targeting Protein-Protein Interactions to Inhibit Cyclin-Dependent Kinases. *Pharmaceuticals*, 16(4), 519.
14. Yuan, K., Wang, X., Dong, H., Min, W., Hao, H., & Yang, P. (2021). Selective inhibition of CDK4/6: A safe and effective strategy for developing anticancer drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(1), 30-54.
15. Parylo, S., Vennepureddy, A., Dhar, V., Patibandla, P., & Sokoloff, A. (2019). Role of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in the current and future eras of cancer treatment. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 25(1), 110-129.
16. Dhillon, S. (2021). Trilaciclib: first approval. *Drugs*, 81(7), 867-874.
17. Dunn, J., & Grider, M. H. (2023). Physiology, adenosine triphosphate.
18. Schwartz, P. A., & Murray, B. W. (2011). Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorganic chemistry*, 39(5-6), 192-210.
19. Wang, Z., & Cole, P. A. (2014). Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods in enzymology*, 548, 1-21.
20. Enjalbert, A., & Le Pechon-Vallee, C. (2003). Protein kinases.

21. Shi, L., Potts, M., & Kennelly, P. J. (1998). The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS microbiology reviews*, 22(4), 229-253.
22. Wang, B., Wu, H., Hu, C., Wang, H., Liu, J., Wang, W., & Liu, Q. (2021). An overview of kinase downregulators and recent advances in discovery approaches. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 423.
23. Kanev, G. K., de Graaf, C., de Esch, I. J., Leurs, R., Würdinger, T., Westerman, B. A., & Kooistra, A. J. (2019). The landscape of atypical and eukaryotic protein kinases. *Trends in pharmacological sciences*, 40(11), 818-832.
24. Rademacher, E. H., & Offringa, R. (2012). Evolutionary adaptations of plant AGC kinases: from light signaling to cell polarity regulation. *Frontiers in Plant Science*, 3, 250.
25. Johnson, L. N., Noble, M. E., & Owen, D. J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85(2), 149-158.
26. Hunter, T. (1991). [1] Protein kinase classification. *Methods in enzymology*, 200, 3-37.
27. Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., ... & Di Fiore, P. P. (2006). Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer research*, 66(16), 8147-8154.
28. Scott, J. D., & Soderling, T. R. (1992). Serine/threonine protein kinases. *Current opinion in neurobiology*, 2(3), 289-295.
29. Park, G., Servin, J. A., Turner, G. E., Altamirano, L., Colot, H. V., Collopy, P., ... & Borkovich, K. A. (2011). Global analysis of serine-threonine protein kinase genes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic cell*, 10(11), 1553-1564.
30. Ζίφα, Α. (2017). Διακυτταρική επικοινωνία-Μεταγωγή σήματος 3η έκδοση. *Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας*.
31. Robinson, D. R., Wu, Y. M., & Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49), 5548-5557.
32. Shchemelinin, I., Seftc, L., & Necas, E. (2006). Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia biologica*, 52(3), 81.
33. Chao, J. D., Wong, D., & Av-Gay, Y. (2014). Microbial protein-tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 289(14), 9463-9472.
34. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. *Philadelphia: Lippincott-Raven*; 1999.
35. Nurse, P., Masui, Y., & Hartwell, L. (1998). Understanding the cell cycle. *Nature medicine*, 4(10), 1103-1106.
36. OpenStax College, *Biology*. OpenStax College. 30 May 2013.
37. Ligasová, A., Frydrych, I., & Koberna, K. (2023). Basic methods of cell cycle analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3674.
38. Whittaker, S. R., Mallinger, A., Workman, P., & Clarke, P. A. (2017). Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 173, 83-105.
39. Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome biology*, 15, 1-10.
40. Łukasik, P., Załuski, M., & Gutowska, I. (2021). Cyclin-dependent kinases (CDK) and their role in diseases development—review. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 2935.
41. Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.
42. Roskoski Jr, R. (2019). Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacological research*, 139, 471-488.

43. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
44. Ding, L., Cao, J., Lin, W., Chen, H., Xiong, X., Ao, H., ... & Cui, Q. (2020). The roles of cyclin-dependent kinases in cell-cycle progression and therapeutic strategies in human breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 1960.
45. Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000). The cell cycle. *The oncologist*, 5(6), 510-513.
46. Vakili-Samiani, S., Khanghah, O. J., Gholipour, E., Najafi, F., Zeinalzadeh, E., Samadi, P., ... & Feizi, A. A. H. (2022). Cell cycle involvement in cancer therapy; WEE1 kinase, a potential target as therapeutic strategy. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 824, 111776.
47. Malumbres, M., & Barbacid, M. (2007). Cell cycle kinases in cancer. *Current opinion in genetics & development*, 17(1), 60-65.
48. Fassl, A., Geng, Y., & Sicinski, P. (2022). CDK4 and CDK6 kinases: From basic science to cancer therapy. *Science*, 375(6577), eabc1495.
49. Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., & Morris, M. C. (2015). Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. *Cancers*, 7(1), 179-237.
50. Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115.
51. Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(1).
52. Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., ... & Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 1-48.
53. Tamatam, R., & Mohammed, A. (2024). Small molecule anticancer drugs approved during 2021-2022: Synthesis and clinical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 116441.
54. Ye, F., Dewanjee, S., Li, Y., Jha, N. K., Chen, Z. S., Kumar, A., ... & Tang, H. (2023). Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer. *Molecular cancer*, 22(1), 105.
55. Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and future development in lung cancer diagnosis. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8661.
56. Goldschmidt, J., Hart, L., Scott, J., Boykin, K., Bailey, R., Heritage, T., ... & Gordan, L. (2023). Real-world outcomes of trilaciclib among patients with extensive-stage small cell lung cancer receiving chemotherapy. *Advances in Therapy*, 40(10), 4189-4215.
57. Tiwari, A., Kumari, B., Nandagopal, S., Mishra, A., Shukla, K. K., Kumar, A., ... & Ahirwar, D. K. (2024). Promises of Protein Kinase Inhibitors in Recalcitrant Small-Cell Lung Cancer: Recent Scenario and Future Possibilities. *Cancers*, 16(5), 963.
58. Attwood, M. M., Fabbro, D., Sokolov, A. V., Knapp, S., & Schiöth, H. B. (2021). Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(11), 839-861.
59. Roskoski Jr, R. (2024). Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update. *Pharmacological research*, 107059.
60. Li, J., Gong, C., Zhou, H., Liu, J., Xia, X., Ha, W., ... & Xiong, H. (2024). Kinase Inhibitors and Kinase-Targeted Cancer Therapies: Recent Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5489.
61. Roskoski Jr, R. (2023). Rule of five violations among the FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacological Research*, 191, 106774.

62. Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemotherapy research and practice*, 2014(1), 357027.
63. Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*, 36(7), 422-439.
64. Mughal, M. J., Bhadresha, K., & Kwok, H. F. (2023, January). CDK inhibitors from past to present: A new wave of cancer therapy. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 88, pp. 106-122). Academic Press.
65. Dubey, R., Makhija, R., Sharma, A., Sahu, A., & Asati, V. (2024). Unveiling the promise of pyrimidine-modified CDK inhibitors in cancer treatment. *Bioorganic Chemistry*, 107508.
66. Lv, S., Yang, J., Lin, J., Huang, X., Zhao, H., Zhao, C., & Yang, L. (2024). CDK4/6 inhibitors in lung cancer: current practice and future directions. *European Respiratory Review*, 33(171).
67. Shan, H., Ma, X., Yan, G., Luo, M., Zhong, X., Lan, S., ... & Li, R. (2021). Discovery of a novel covalent CDK4/6 inhibitor based on palbociclib scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 219, 113432.
68. Li, S. T., Chen, J. Q., Feng, C. L., Yang, W. F., & Ji, M. (2019). A new route for the synthesis of Palbociclib. *Chemical Papers*, 73, 3043-3051.
69. Poratti, M., & Marzaro, G. (2019). Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 172, 143-153.
70. Piezzo, M., Cocco, S., Caputo, R., Cianniello, D., Gioia, G. D., Lauro, V. D., ... & Laurentiis, M. D. (2020). Targeting cell cycle in breast cancer: CDK4/6 inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6479.
71. Ammazalorso, A., Agamennone, M., De Filippis, B., & Fantacuzzi, M. (2021). Development of CDK4/6 inhibitors: a five years update. *Molecules*, 26(5), 1488.
72. Kumar P, Yaman SM, Mazlee MTF, Dhande P, Mhetre S (2022) Synthetic Review of Manufacturing Routes to CDK4/6 Inhibitor Drugs: Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib. *Organic Chem Curr Res*. 11: 254.
73. Goel, S., Tan, A. R., Rugo, H. S., Aftimos, P., Andrić, Z., Beelen, A., ... & O'Shaughnessy, J. (2022). Trilaciclib prior to gemcitabine plus carboplatin for metastatic triple-negative breast cancer: phase III PRESERVE 2. *Future Oncology*, 18(33), 3701-3711.
74. Moshnenko, N., Kazantsev, A., Chupakhin, E., Bakulina, O., & Dar'in, D. (2023). Synthetic routes to approved drugs containing a spirocycle. *Molecules*, 28(10), 4209.
75. Chen, P., Xu, Y., Li, X., Yao, H., & Lin, K. (2020). Development and strategies of CDK4/6 inhibitors. *Future medicinal chemistry*, 12(2), 127-145.
76. Pandey, P., Khan, F., Upadhyay, T. K., & Sharangi, A. B. (2023). Deciphering the immunomodulatory role of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2236.
77. Powell, K., & Prasad, V. (2021). Concerning FDA approval of trilaciclib (Cosela) in extensive-stage small-cell lung cancer. *Translational oncology*, 14(11), 101206.
78. Abraham, I., Onyekwere, U., Deniz, B., Moran, D., Chioda, M., MacDonald, K., & Huang, H. (2021). Trilaciclib and the economic value of multilineage myeloprotection from chemotherapy-induced myelosuppression among patients with extensive-stage small cell lung cancer treated with first-line chemotherapy. *Journal of Medical Economics*, 24(sup1), 71-83.
79. Hiesinger, K., Dar'in, D., Proschak, E., & Krasavin, M. (2020). Spirocyclic scaffolds in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(1), 150-183.

80. Yuan, S., Wang, D. S., Liu, H., Zhang, S. N., Yang, W. G., Lv, M., ... & Liu, H. M. (2023). New drug approvals for 2021: Synthesis and clinical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 245, 114898.
81. Romanelli, M. N., Braconi, L., Gabellini, A., Manetti, D., Marotta, G., & Teodori, E. (2023). Synthetic Approaches to Piperazine-Containing Drugs Approved by FDA in the Period of 2011–2023. *Molecules*, 29(1), 68.
82. McInturff, E. L., France, S. P., Leverett, C. A., Flick, A. C., Lindsey, E. A., Berritt, S., ... & O'Donnell, C. J. (2023). Synthetic approaches to the new drugs approved during 2021. *Journal of Medicinal Chemistry*, 66(15), 10150-10201.
83. Tan, A. R., Wright, G. S., Thummala, A. R., Danso, M. A., Popovic, L., Pluard, T. J., ... & O'Shaughnessy, J. (2019). Trilaciclib plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 2 trial. *The lancet oncology*, 20(11), 1587-1601.
84. Shi, Z., Tian, L., Qiang, T., Li, J., Xing, Y., Ren, X., ... & Liang, C. (2022). From structure modification to drug launch: A systematic review of the ongoing development of cyclin-dependent kinase inhibitors for multiple cancer therapy. *Journal of medicinal chemistry*, 65(9), 6390-6418.
85. Sun, D., Gao, W., Hu, H., & Zhou, S. (2022). Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(7), 3049-3062.