



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

**«Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων οργανικών -
βιοδραστικών ενώσεων, ενδιάμεσων ενώσεων αναλόγων του
φαρμακευτικού σκευάσματος Dacomitinib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών
αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών για τη θεραπεία νεοπλασιών»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΧΑΤΖΗΑΓΓΕΛΙΔΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Τμήμα Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Κατεύθυνση: «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Βιοδραστικές Ενώσεις»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Χατζηαγγελίδου Κυριακή

A.M. 1433

Επιβλέπων: Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χατζηαράπογλου Λάζαρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

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

Ιωάννινα

09/10/2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία για το Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης εκπονήθηκε στο διάστημα μεταξύ Οκτωβρίου 2022 και Οκτωβρίου 2024, στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στην κατεύθυνση «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Βιοδραστικές Ενώσεις». Αφορά το μοριακό σχεδιασμό, τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό ενδιάμεσων ενώσεων των αναλόγων του Dacomitinib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Τα πειράματα της εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο ερευνητικό εργαστήριο X3-210 του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την αμέριστη στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας επιλύοντας οποιοδήποτε εμπόδιο παρουσιάστηκε και τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Η ολοκλήρωση της ερευνητικής μου προσπάθειας και εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του. Η αφοσίωση και η εμπειρία του στον επιστημονικό τομέα αλλά και το ήθος του ως άνθρωπος αποτελούν πρότυπο και νιώθω ευγνώμων που αποτελώ μέλος της ερευνητικής του ομάδας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα μέλη ΔΕΠ, τον Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Χατζηαράπογλου Λάζαρο και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών κ. Αλίβερατη Δημήτρη που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς εξεταστικής μου επιτροπής και για τη βοήθεια και στήριξη που μου πρόσφεραν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου στο εργαστήριο.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Ομότιμο Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Βαρβούνη Γεώργιο και στο διδακτορικό του φοιτητή Γεροντίτη Ιωάννη, για την άψογη συνεργασία και βοήθεια κάθε φορά που την χρειάστηκα.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στους φίλους και συνεργάτες μου στο ερευνητικό εργαστήριο Ζώτου Μαρία-Νίκη, Χρονοπούλου Ιωάννα, Κοσταντίνι Ελένη, Σδούκου Ήρα, Σταλικά Ελεονόρα, Πεπονίδου Φωτεινή, Καραγιάννη Λεμονιά και Αλασώνα Παντελή για την άψογη συνεργασία και βοήθεια κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στο εργαστήριο αλλά και για την ψυχολογική υποστήριξη, πράγμα πολύ σημαντικό για την επίτευξη των στόχων μου. Η συντροφιά τους και η καθημερινή τους υποστήριξη σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα ήταν αξιοσημείωτη.

Τέλος, ξεχωριστές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Δημήτρη και Παγώνα και την αδερφή μου Μαρία, οι οποίοι με στηρίζουν αδιάκοπα για την πραγματοποίηση των ονείρων μου όλα αυτά τα χρόνια. Η συμπαράσταση και η βοήθειά τους, σε όλα τα επίπεδα, αποτέλεσαν κίνητρο στην ερευνητική μου προσπάθεια. Η αφιέρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ελάχιστη αναγνώριση των θυσιών τους για την απόκτησή της.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract.....	6
Κεφάλαιο 1	8
1.1 Εισαγωγή.....	8
1.2 Σκοπός.....	11
Κεφάλαιο 2	13
2.1 Κυτταρικός κύκλος	13
2.1.1 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.....	14
2.2 Φωσφορυλίωση.....	14
2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες	15
2.3.1 Δομή πρωτεϊνικών κινασών	16
2.3.2 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών.....	18
2.3.2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης.....	19
2.3.2.1.1 Πρωτεϊνική κινάση A (PKA).....	19
2.3.2.1.2 Πρωτεϊνική κινάση C (PKC).....	20
2.3.2.1.3 Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (Cyclin Dependent Kinases, CDKs).....	21
2.3.2.1.4 Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPK)	21
2.3.2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης.....	22
2.3.2.2.1 Υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (RTKs)	22
2.3.2.2.1.1 Υποδοχέας Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – VEGFR).....	23
2.3.2.2.2 Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRTKs)	24
2.3.2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες που μοιάζουν με κινάσες τυροσίνης (TKL)	24
Κεφάλαιο 3	25
3.1 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	25
3.1.1 Μηχανισμός δράσης αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	25
3.1.2 Θέση δέσμευσης του ATP	26
3.1.3 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.....	26
3.1.4 Εγκεκριμένοι αναστολείς μέχρι σήμερα.....	28
3.2 Παράγωγα κιναζολινών ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	29
3.2.1 Τρόποι σύνθεσης παραγώγων κιναζολινών.....	30
Κεφάλαιο 4	32

4.1 Οι μεταλλάξεις των πρωτεϊνικών κινασών στην καρκινογένεση	32
4.2 Καρκίνος του πνεύμονα	33
4.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο του πνεύμονα	35
4.4 Στοχευμένη θεραπεία	35
4.5 Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR).....	36
4.5.1 Δομή του EGFR.....	36
4.5.2 EGFR και καρκίνος του πνεύμονα	37
4.6 Αναστολείς EGFR πρώτης γενιάς.....	38
4.6.1 Gefitinib.....	38
4.6.2 Erlotinib	39
4.6.3 Icotinib.....	39
4.7 Αναστολείς EGFR δεύτερης γενιάς	39
4.7.1 Afatinib.....	40
4.7.2 Dacomitinib	40
4.8 Αναστολείς EGFR τρίτης γενιάς.....	41
4.8.1 Osimertinib	41
4.8.2 Almonertinib.....	41
4.9 Αναστολείς EGFR τέταρτης γενιάς	42
4.10 Το Dacomitinib ως αναστολέας του EGFR 2 ^{ης} γενιάς.....	42
4.11 Ολική πορεία σύνθεσης Dacomitinib.....	45
Κεφάλαιο 5.....	48
5.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων του EGFR	48
5.2 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dacomitinib	48
5.3 Ανάλογα του Dacomitinib ως εν δυνάμει αναστολείς του EGFR	50
5.4 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για τα ανάλογα του Dacomitinib	51
5.4.1 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac1	51
5.4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac2	53
5.4.3 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac3	54
5.4.4 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac4	56
5.4.5 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac5	57
5.4.6 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac6	58
5.5 Ολική πορεία σύνθεσης νέων ενώσεων-αναλόγων του Dacomitinib	60
Κεφάλαιο 6.....	62

6.1 Πειράματα με αρχικό υπόστρωμα 2-άμινο-4-φθοροβενζοϊκό οξύ για τη σύνθεση αναλόγων Dac1 και Dac2.....	62
6.1.1 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνη (3α)	62
6.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνη (3α)	63
6.1.3 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνη (4α)	64
6.1.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνη (4α).....	66
6.2 Πειράματα με αρχικό υπόστρωμα 2-άμινο-βενζοϊκό οξύ για τη σύνθεση αναλόγων Dac3 και Dac4.....	66
6.2.1 Σύνθεση της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνη (3β).....	66
6.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνη (3β)	68
6.2.3 Σύνθεση της ένωσης 6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη (4β).....	69
6.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη (4β).....	70
6.2.5 Σύνθεση της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκιναζολίνη (5β).....	72
6.2.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκιναζολίνη (5β)	72
6.2.7 Σύνθεση της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθόξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνη (8)	74
6.2.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθόξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνη (8)	75
6.2.9 Σύνθεση της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκιναζολιν-4-αμίνη (9)	76
6.2.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκιναζολιν-4-αμίνη (9)	77
6.2.11 Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης N ⁴ -(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)-N ⁴ -(3,4-διμεθοξυβενζυλ)κιναζολίνη-4,6-διαμίνη (11)	78
6.3 Πειράματα σύνθεσης ενδιάμεσων ενώσεων για τη σύνθεση των αναλόγων Dac4 και Dac5	79
6.3.1 Σύνθεση της ένωσης 8-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη (17).....	79
6.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 8-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη (17).....	80
6.3.3 Σύνθεση της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκιναζολίνη (18).....	81
6.3.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκιναζολίνη (18)	82
6.3.5 Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-8-νιτροκιναζολίν-4-αμίνη (19)	84
Κεφάλαιο 7.....	85
7.1 Περιγραφή επόμενων αντιδράσεων της πορείας που δεν πραγματοποιήθηκαν	85
7.1.1 Δημιουργία αμιδικού δεσμού	85
7.1.2 Πυρηνόφιλη υποκατάσταση για τη σύνθεση αναλόγου	86

7.1.3 Αντίδραση αποπροστασίας.....	87
Κεφάλαιο 8.....	89
8.1 Συσκευές και όργανα	89
8.2 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνη (3α).....	89
8.3 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνη (4α).....	89
8.4 Σύνθεση της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνη (3β)	90
8.5 Σύνθεση της ένωσης 6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη (4β).....	90
8.6 Σύνθεση της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκιναζολίνη (5β).....	91
8.7 Σύνθεση της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθόξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνη (8) ...	92
8.8 Σύνθεση της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκιναζολιν-4-αμίνη (9)	92
8.9 Σύνθεση της ένωσης 8-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη (17).....	93
8.10 Σύνθεση της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκιναζολίνη (18).....	93
Συμπεράσματα.....	95
Βιβλιογραφία	96

Περίληψη

Μία από τις σοβαρότερες ασθένειες που απασχολεί τον άνθρωπο είναι ο καρκίνος. Η ραγδαία αύξηση των ασθενών και τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας έστρεψαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στην ανακάλυψη στοχευμένων θεραπειών του, οι οποίες είναι αποτελεσματικές και μειώνουν τις παρενέργειες έναντι των άλλων μεθόδων θεραπείας. Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται ταχύτατα προσβάλλοντας γειτονικούς ιστούς. Βλάβες στο DNA που είναι αποτέλεσμα διάφορων παραγόντων προκαλούν αλλαγές στα γονίδια επηρεάζοντας άμεσα τις κυτταρικές διαδικασίες (διαίρεση, πολλαπλασιασμό, απόπτωση). Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP στα πρωτεϊνικά τους υποστρώματα. Με αυτό τον τρόπο, φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε όλες τις διεργασίες του κυττάρου και πολλές σηματοδοτικές οδούς. Μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των πρωτεϊνικών κινασών απορρυθμίζουν τη λειτουργία τους, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και να μετατρέπονται σε καρκινικά. Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι μικρά μόρια που συνδέονται στις μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές κινάσες εμποδίζοντας τη σύνδεση τους με το ATP, αναστέλλοντας έτσι τη φωσφορυλίωση μεταλλαγμένων πρωτεϊνικών κινασών και την εξάπλωση του καρκίνου. Η ανακάλυψη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών εντάθηκε μετά την έγκριση του Imatinib από τον FDA το 2001 για τη θεραπεία των θετικών στο χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας χρόνιων μυελογενών λευχαιμιών. Το 2018 εγκρίθηκε από τον FDA μεταξύ άλλων αναστολέων το Dacomitinib για τη θεραπεία του προχωρημένου/μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), στοχεύοντας στον υποδοχέα αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR). Σχεδιάστηκε και προτάθηκε από την εταιρεία Pfizer. Οι συνηθέστερες μεταλλάξεις του EGFR που εμφανίζονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι η διαγραφή εξονίου 19, η υποκατάσταση της λευκίνης από αργινίνη στη θέση 858 (L858R) και μια δευτερογενής μετάλλαξη, η υποκατάσταση της θρεονίνης από μεθειονίνη στη θέση 790 (T790M), η οποία οδήγησε στην ανακάλυψη μιας νέας γενιάς αναστολέων, μεταξύ των οποίων και το Dacomitinib, με σκοπό την αναστολή της. Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα παρουσιαστεί ο σχεδιασμός ενώσεων, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Dacomitinib με στόχο την αναστολή του EGFR και η σύνθεση ενδιάμεσων ενώσεων της πορείας τους. Η σύνθεση των αναλόγων αυτών, βασίστηκε στη βελτιωμένη συνθετική πορεία του φαρμάκου. Επιπροσθέτως, για τη σύνθεση τεσσάρων από των έξι αναλόγων, έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της πειραματικής τους πορείας, με στόχο την αύξηση της απόδοσης και τη μείωση του χρόνου των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας οικονομικότερα και φιλικότερα προς το περιβάλλον αντιδραστήρια. Τα ανάλογα σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο τροποποιώντας τη δομή του Dacomitinib ώστε να αυξηθεί η ανασταλτική δράση, ως απόρροια θεωρητικών πειραμάτων docking. Οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$.

Abstract

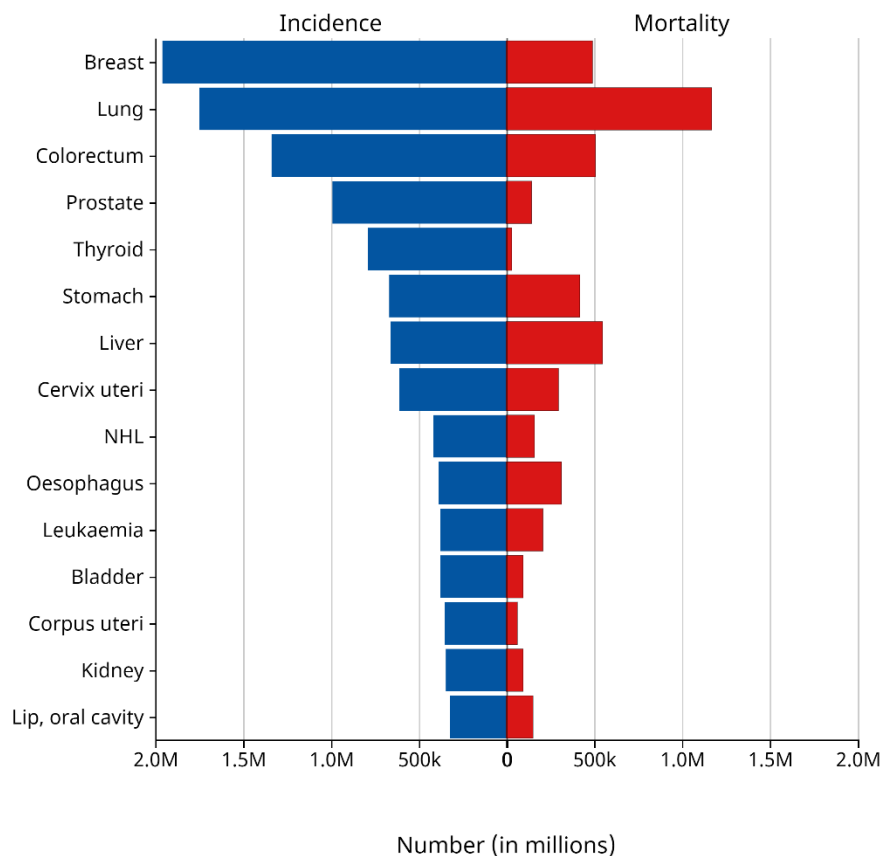
One of the most serious diseases affecting humans is cancer. The rapid increase in patients and high mortality rates have turned the interest of the scientific community to the discovery of its targeted therapies, which are effective and reduce side effects compared to other treatment methods. Cancer cells grow uncontrollably and spread rapidly, attacking neighboring tissues. DNA damage resulting from various factors causes changes in genes directly affecting cellular processes (division, proliferation, apoptosis). Protein kinases are enzymes that catalyze the transfer of the γ -phosphate group from ATP to their protein substrates. In this way, they phosphorylate proteins that participate in all cell processes and many signaling pathways. Mutations in the genome of protein kinases deregulate their function, causing cells to grow uncontrollably and become cancerous. Protein kinase inhibitors are small molecules that bind to mutated protein kinases preventing their binding to ATP, thereby inhibiting the phosphorylation of mutated protein kinases and the spread of cancer. The discovery of new protein kinase inhibitors intensified after the FDA approval of Imatinib in 2001 for the treatment of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemias. In 2018, Dacomitinib was approved by the FDA, among other inhibitors, for the treatment of advanced/metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC), targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR). It was designed and recommended by Pfizer. The most common EGFR mutations occurring in lung cancer are exon 19 deletion, leucine to arginine substitution at position 858 (L858R) and a secondary mutation, threonine to methionine substitution at position 790 (T790M), which led to the discovery of a new generation of inhibitors, including Dacomitinib. In this thesis, the design of compounds, analogues of Dacomitinib with the aim of inhibiting EGFR and the synthesis of precursor compounds of their procedure will be presented. The synthesis of these analogues was based on the drug's optimized synthetic procedure. In addition, an attempt was made to optimize the experimental synthesis of four out of the six analogues so as to increase the yield and reduce the reaction time, using more economical and environmentally friendly reagents. The analogs were designed in the laboratory by modifying the structure of Dacomitinib to increase the inhibitory activity, as a result of theoretical docking experiments. The compounds were identified by ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopic techniques.

Κεφάλαιο 1

1.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που απασχολεί τη σύγχρονη κοινωνία και αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου, μετά τις καρδιοπάθειες, όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και διεθνώς. Μάλιστα, έρευνες στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, τον κατατάσσουν ως κύριο λόγο θανάτου ανθρώπων κάτω των 85 ετών. Η ραγδαία αύξηση των ασθενών τα τελευταία χρόνια οφείλεται σε πλήθος παραγόντων μεταξύ των οποίων και η πανδημία της νόσου του κορονοϊού. Η Covid-19 καθυστέρησε τόσο την έγκαιρη διάγνωση όσο και τη θεραπεία με αποτέλεσμα τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας του καρκίνου να πολλαπλασιαστούν.¹ Πρόκειται για μία ασθένεια στην οποία τα κύτταρα του σώματος αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται ταχύτατα σε πολλά σημεία του σώματος. Σε φυσιολογικές συνθήκες, μη καρκινικές, τα κύτταρα ακολουθούν έναν κύκλο διαδικασιών κατά τον οποίο αναπτύσσονται, διαιρούνται με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τους ώστε να επιτελέσουν τις διάφορες λειτουργίες του οργανισμού και τέλος πεθαίνουν (απόπτωση) εφόσον δεν είναι πλέον λειτουργικά. Ωστόσο, απορρύθμιση αυτού του κύκλου, που είναι αποτέλεσμα πολλών παραγόντων, οδηγεί στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μη φυσιολογικών κυττάρων και κατά συνέπεια τη δημιουργία όγκων. Οι όγκοι ονομάζονται καλοήθεις όταν δεν προσβάλλουν κοντινούς ιστούς και εφόσον αφαιρεθούν συνήθως δεν εμφανίζονται ξανά. Από την άλλη, οι κακοήθεις (καρκινικοί) εξαπλώνονται ανεξέλεγκτα σε άλλα μέρη του σώματος σχηματίζοντας νέους όγκους (μετάσταση). Προκαλούνται από αλλαγές γονιδίων, τα οποία ελέγχουν και ρυθμίζουν τις κυτταρικές διαδικασίες (διαίρεση, πολλαπλασιασμό), και μπορεί να είναι τυχόν βλάβες στο DNA λόγω έκθεσης σε επιβλαβείς περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως διάφορες χημικές ουσίες, οι υπεριώδεις ακτίνες του ηλίου και φυσικά κληρονομικά αίτια. Ο καρκίνος σε κάθε άνθρωπο παρουσιάζει μοναδικό συνδυασμό γενετικών αλλαγών, ο οποίος με την εξέλιξη της ασθένειας μπορεί να αλλάξει, περιλαμβάνοντας περισσότερες και διαφορετικές γενετικές αλλαγές μεταξύ τους. Μία τελευταία παρατήρηση για την εμφάνιση της ασθένειας σε μεγαλύτερα ηλικιακά άτομα είναι πως η ικανότητα του σώματος να αποβάλλει κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη στο DNA τους είναι αντιστρόφως ανάλογη της ηλικίας. Αυτό σημαίνει πως με την αύξηση της ηλικίας του ατόμου, η ικανότητα αυτή εξασθενεί. Παρόλα αυτά, η εμφάνιση της ασθένειας και σε νεαρές ηλικίες καταρρίπτει την αντίληψη αυτή δημιουργώντας την ανάγκη για αναζήτηση των κύριων αιτιών εμφάνισης και την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους. Υπάρχουν περισσότεροι από 100 τύποι καρκίνου, οι οποίοι ονομάζονται ανάλογα το όργανο ή τον ιστό που προσβάλλουν. Επίσης, μπορεί να ονομαστούν από το κύτταρο από το οποίο σχηματίστηκαν, για παράδειγμα επιθηλιακό.² Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν και δημοσιεύτηκαν από το International Agency for Research on Cancer στο World Health Organization (WHO) για το 2022 έδειξαν την Ευρώπη δεύτερη στην κατάταξη ανάμεσα σε όλο τον κόσμο σε ποσοστό εμφάνισης καρκίνου και θνησιμότητας επίσης. Επομένως, η θεραπεία του καρκίνου αποτελεί κύριο θέμα απασχόλησης της επιστημονικής κοινότητας για πολλές δεκαετίες. Δεδομένα του ίδιου οργανισμού ανέδειξαν τον καρκίνο του μαστού ως συχνότερο τύπο εμφάνισης καρκίνου ενώ ο τύπος καρκίνου που ευθύνεται για τους περισσότερους θανάτους είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, τόσο στην Ελλάδα όσο και παγκοσμίως.³ Πιο συγκεκριμένα,

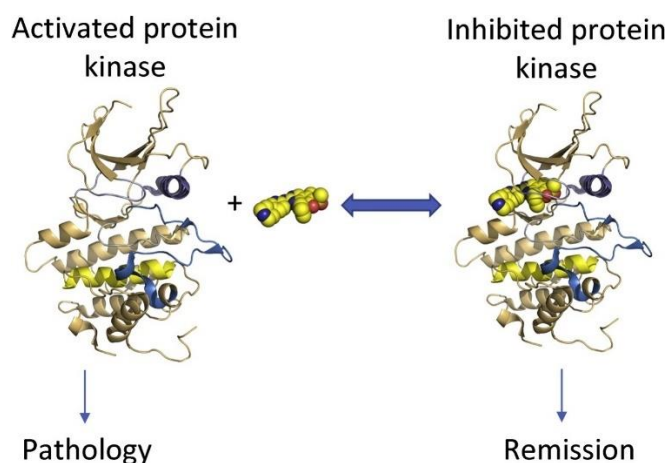
στην Ελλάδα, για πολλές δεκαετίες ο καρκίνος του πνεύμονα επηρέαζε τους άνδρες κυρίως, ωστόσο με την αύξηση του καπνίσματος άρχισε να εμφανίζεται και στις γυναίκες. Πλέον, αποτελεί κύρια αιτία θανάτου των ανδρών και δεύτερη κύρια αιτία Ελληνίδων γυναικών μετά τον καρκίνο του μαστού.⁴



Εικόνα 1.1i: Ποσοστά εμφάνισης καρκίνου ανά τύπο αριστερά και ποσοστά θνησιμότητας ανά τύπο καρκίνου δεξιά.³

Ο καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζεται στα κύτταρα των πνευμόνων, όπως υποδηλώνει και το όνομά του, όταν φυσιολογικά κύτταρα υφίστανται μεταλλάξεις στο DNA τους, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται σε καρκινικά και να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα είναι ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC). Η πλειονότητα των καρκίνων του πνεύμονα είναι NSCLC, περίπου το 80% έως 85%. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) περιλαμβάνει περίπου το 10% έως 15% όλων των καρκίνων του πνεύμονα. Αυτός ο τύπος είναι περισσότερο επιθετικός, αναπτύσσεται και εξαπλώνεται ταχύτερα από το NSCLC. Η θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα εξαρτάται από τον τύπο καρκίνου, το ποσοστό εξάπλωσης, το μέρος του πνεύμονα που έχει προσβληθεί και άλλους παράγοντες. Έτσι, οι τρόποι θεραπείας περιλαμβάνουν τη χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και στοχευμένη θεραπεία. Η στοχευμένη θεραπεία επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα μειώνοντας τις παρενέργειες που εμφανίζουν οι άλλοι τρόποι θεραπείας λόγω της χρήσης εξειδικευμένων φαρμάκων που στοχεύουν στις μεταλλάξεις που έχουν προκαλέσει την εμφάνισή του.⁵ Τέτοια φάρμακα είναι οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών. Οι

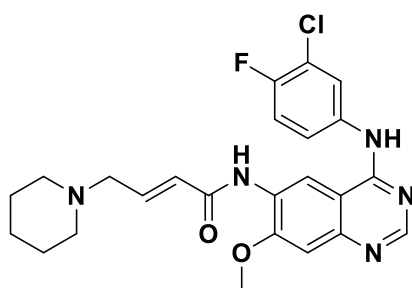
πρωτεϊνικές κινάσες και οι φωσφατάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικής ομάδας μεταξύ των υποστρωμάτων τους. Μια πρωτεϊνική κινάση καταλύει τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP στα πρωτεϊνικά του υποστρώματα ενώ μια πρωτεϊνική φωσφατάση καταλύει τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από μια φωσφοπρωτεΐνη. Οι πρωτεϊνικές κινάσες ανάλογα το υπόστρωμα πρωτεΐνης που φωσφορυλιώνουν χωρίζονται σε επιμέρους κατηγορίες, με κυριότερες τις κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τις κινάσες τυροσίνης. Παρόλο που και οι δύο ομάδες ενζύμων (κινάσες-φωσφατάσες) είναι φωσφοτρανσφεράσες, καταλύουν αντίθετες αντιδράσεις για να ρυθμίσουν τις δομές και τις λειτουργίες πολλών κυτταρικών πρωτεϊνών σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα.⁶ Η φωσφορυλίωση και η αποφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι από τις σημαντικότερες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τις λειτουργίες των πρωτεϊνών σε πολλές κυτταρικές διεργασίες μεταξύ των οποίων η κυτταρική ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η μεταγωγή σημάτων και η απόπτωση. Ωστόσο, διάφορες μεταλλάξεις στο γονιδίωμα των πρωτεϊνικών κινασών απορρυθμίζουν τη λειτουργία τους, με αποτέλεσμα τα κύτταρα με βλάβη στο DNA τους να αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και να μετατρέπονται σε καρκινικά. Λύση στο πρόβλημα αυτό έδωσε η ανακάλυψη αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών, τα οποία είναι μικρά μόρια που συνδέονται στις μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές κινάσες εμποδίζοντας τη σύνδεση τους με το ATP, αναστέλλοντας έτσι τη φωσφορυλίωση μεταλλαγμένων πρωτεϊνικών κινασών και την εξάπλωση του καρκίνου.⁷



Εικόνα 1. Iii: Αναστολή μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης από τον αντίστοιχο αναστολέα της.⁸

Το επιστημονικό ενδιαφέρον για τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών ως αντικαρκινικά φάρμακα εντάθηκε περισσότερο με την έγκριση του Imatinib από τον FDA το 2001 για τη θεραπεία των θετικών στο χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας χρόνιων μυελογενών λευχαιμιών. Συγκεκριμένα, το Imatinib αναστέλλει τη δράση της πρωτεϊνικής-τυροσινικής κινάσης BCR-Abl.⁸ Μέχρι σήμερα, έχουν εγκριθεί 80 αναστολείς για περισσότερες από 20 διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες στοχεύοντας σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, επίσης. Το 2018 εγκρίθηκε μεταξύ άλλων αναστολέων το Dacomitinib για τη θεραπεία του προχωρημένου/μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), στοχεύοντας στον υποδοχέα αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR).⁹ Ο EGFR, ανήκει στην οικογένεια ErbB, υφίσταται με τη μορφή μονομερούς και αποτελείται από τρεις περιοχές, την

εξωκυττάρια, τη διαμεμβρανική και την ενδοκυττάρια που έχει δράση τυροσινικής κινάσης. Με την πρόσδεση του σήματος, της πρωτεΐνης EGF, προκαλείται διμερισμός του υποδοχέα EGFR και ενεργοποίησή του. Αυτοφωσφορυλιώνονται τα κατάλοιπα τυροσίνης του υποδοχέα και στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε πολλές σηματοδικές οδούς του κυττάρου μεταφέροντας το σήμα από την εξωκυττάρια περιοχή έως τον πυρήνα. Μεταλλάξεις στον EGFR με συνηθέστερες τη διαγραφή εξονίου 19 και υποκατάσταση της λευκίνης από αργινίνη στη θέση 858 (L858R) έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Μια δευτερογενής μετάλλαξη, η υποκατάσταση της θρεονίνης από μεθειονίνη στη θέση 790 (T790M) εμφανίστηκε αργότερα με αποτέλεσμα οι μέχρι τότε εγκεκριμένοι αναστολείς του EGFR να αδυνατούν να την αναστείλουν. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη νέας γενιάς αναστολέων, μεταξύ των οποίων και το Dacomitinib, τα οποία είναι δραστικά και αποτελεσματικά για την αναστολή της δευτερογενούς αυτής μετάλλαξης.¹⁰ Το Dacomitinib σχεδιάστηκε και προτάθηκε από την εταιρεία Pfizer.



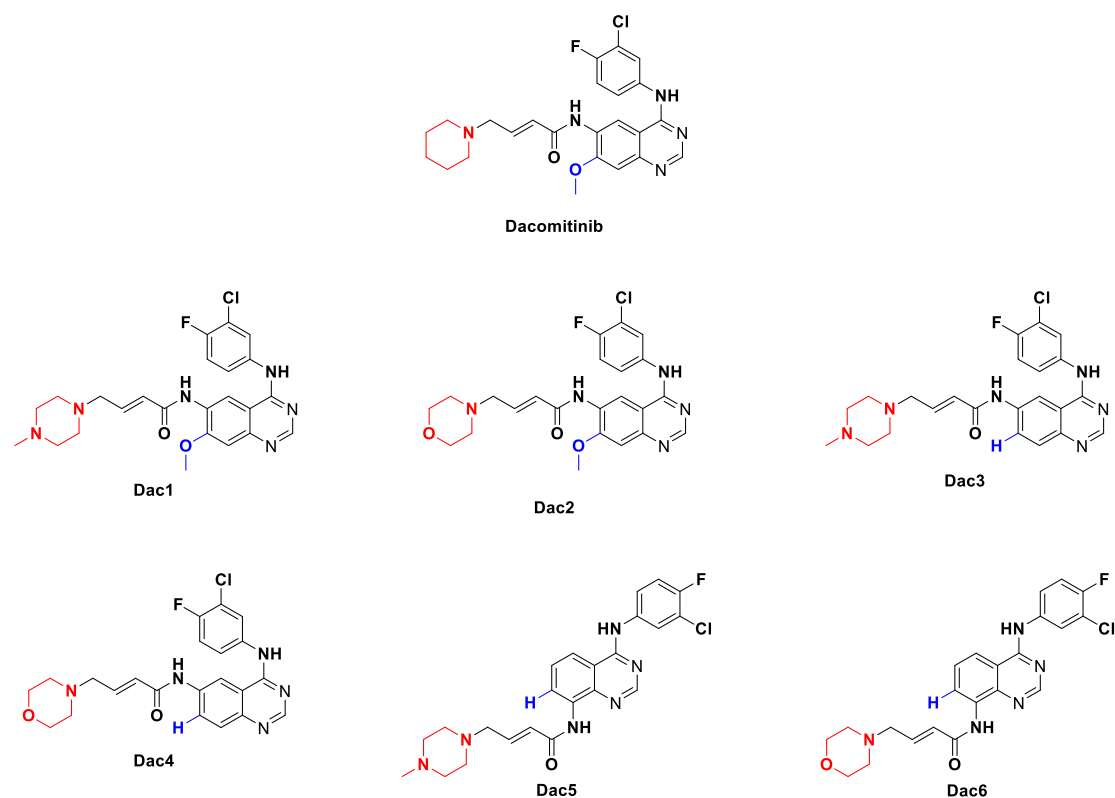
Εικόνα 1.iii: Χημική δομή Dacomitinib.

Όπως φαίνεται και στη χημική δομή του, περιλαμβάνει 3 υποκατεστημένους αρωματικούς δακτυλίους (οι 2 αποτελούν δομή κινάζολίνης), αμιδικό δεσμό και έναν πιπεριδινικό δακτύλιο. Η δομή του, του επιτρέπει να αλληλεπιδρά με το μεταλλαγμένο EGFR σχηματίζοντας δεσμούς αναστέλλοντας τη δράση του. Συγκεκριμένα, από κρυσταλλογραφικά δεδομένα και πειράματα μοριακής μοντελοποίησης προκύπτει πως ο αναστολέας συνδέεται μέσω ομοιοπολικού δεσμού με ένα κατάλοιπο κυστεΐνης 797, κάνοντας τη σύνδεση του με τον EGFR μη αναστρέψιμη. Επιπροσθέτως, σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου και πολλές αλκυλ και π-άλκυλ αλληλεπιδράσεις που αναλύονται παρακάτω στο αντίστοιχο κεφάλαιο.⁸

1.2 Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση ενώσεων αναλόγων του Dacomitinib, ως εν δυνάμει αναστολέων της πρωτεϊνικής κινάσης EGFR, με σκοπό την αύξηση της δραστικότητας σε σύγκριση με το υφιστάμενο φάρμακο. Διενεργήθηκε μοριακός σχεδιασμός μέσω προγραμμάτων docking, με βάση την πρωτεϊνική κινάση EGFR. Για τη μοριακή μοντελοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Autodock Vina και το UCSF Chimera. Έχει αποδειχτεί πως μικρές τροποποιήσεις, οδηγούν ακόμη και σε ουσιαστική αλλαγή της διαμόρφωσης του εν δυνάμει αναστολέα και σε ορισμένες περιπτώσεις επιφέρουν αντίθετα αποτελέσματα από τα αναμενόμενα. Κύριος στόχος, λοιπόν, των αλλαγών που πραγματοποιήθηκαν είναι ο σχηματισμός ισχυρότερων διαμοριακών ή/και

περισσότερων αλληλεπιδράσεων των εν δυνάμει αναστολέων με την πρωτεϊνική κινάση EGFR. Επιπρόσθετα, εκτός από τη σύνθεση αναλόγων, είναι σημαντική και οποιαδήποτε προσπάθεια βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας, είτε μέσω αύξησης της απόδοσης επιμέρους αντιδράσεων είτε μέσω εξοικονόμησης αντιδραστηρίων αλλά και χρόνου. Λόγω έλλειψης χρόνου, οι προσπάθειες για αύξηση των αποδόσεων των αντιδράσεων δεν πραγματοποιήθηκαν, ωστόσο, έγινε σχεδιασμός και σύνθεση αναλόγων χρησιμοποιώντας ένα αρχικό αντιδραστήριο πιο οικονομικά προσιτό, μειώνοντας έτσι και ένα στάδιο της αντίδρασης (εξηγείται στην περιγραφή της ολικής πορείας σύνθεσης που ακολουθείται στο εργαστήριο). Επίσης, λόγω έλλειψης χρόνου, η σύνθεση αναλόγου δεν επιτεύχθηκε όμως έγινε μελέτη των συνθηκών των αντιδράσεων ενδιάμεσων ενώσεων της συνθετικής πορείας, τα οποία απομονώθηκαν καθαρά σε ικανοποιητικές ποσότητες για την συνέχιση της πορείας, ταυτοποιήθηκαν και θα εξηγηθούν στα παρακάτω κεφάλαια εκτενώς.



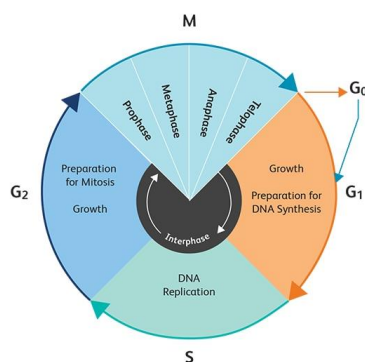
Εικόνα 1.2: Σχεδιασμός ενώσεων αναλόγων του Dacomitinib που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο, ως εν δυνάμει αναστολέων της πρωτεϊνικής κινάσης EGFR.

Κεφάλαιο 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια σειρά διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για κυτταρική διαίρεση. Αποτέλεσμα του κυτταρικού κύκλου είναι ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου μέσω της αντιγραφής του γονιδιώματός του και της διαίρεσής του σε δύο νέα κύτταρα, που ονομάζονται θυγατρικά.¹¹ Αποτελείται από 4 φάσεις κατά τις οποίες επιτελούνται συντονισμένες διεργασίες: η κυτταρική ανάπτυξη, η αντιγραφή του DNA, η κατανομή των διπλασιασμένων χρωμοσωμάτων στα θυγατρικά κύτταρα και τέλος η κυτταρική διαίρεση. Πιο αναλυτικά, στη φάση G1 (Gap 1) το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος και συντίθενται όλες οι απαραίτητες πρωτεΐνες, RNA και μακρομόρια προετοιμάζοντας το κύτταρο για τη σύνθεση του DNA στο επόμενο στάδιο. Ακολουθεί η φάση S (DNA Synthesis), κατά την οποία τα χρωμοσώματα αντιγράφονται και διπλασιάζονται. Το επόμενο στάδιο είναι το G2 (Gap 2) κατά το οποίο το κύτταρο συνεχίζει να αναπτύσσεται και να ετοιμάζεται για διαίρεση. Τα τρία στάδια αυτά αποτελούν τη μεσόφαση, η οποία αντιπροσωπεύει το διάστημα μεταξύ των κυτταρικών διαιρέσεων. Το τελευταίο στάδιο είναι η M (Mitosis) που γίνεται η κυτταρική διαίρεση και προκύπτουν δύο νέα ξεχωριστά κύτταρα. Η μίτωση χωρίζεται σε πέντε επιμέρους στάδια: την πρόφαση, την προμετάφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση και ακολουθείται αμέσως από κυτταροκίνηση, κατά την οποία διαιρείται το κυτταρόπλασμα και η κυτταρική μεμβράνη στα δύο κύτταρα.¹²



Εικόνα 2.1: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου.¹³

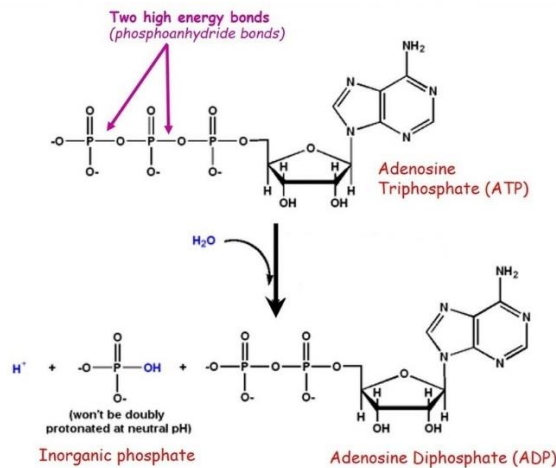
Η φάση G0, ή αλλιώς φάση ηρεμίας, είναι η κατάσταση στην οποία μπορεί να εισέλθει το κύτταρο σε περίπτωση που υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών για να συνεχίσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στη φάση αυτή τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς να πολλαπλασιαστούν, εκτός αν διεγερθούν από κατάλληλους αυξητικούς παράγοντες ή εξωκυτταρικά σήματα με σκοπό τον πολλαπλασιασμό τους. Ακόμη, τα κύτταρα μπορούν να εξέλθουν από τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης και της γήρανσης, ενώ άλλα που είτε δεν διαιρούνται είτε σπάνια διαιρούνται, παραμένουν μόνιμα σε φάση G0.¹¹

2.1.1 Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Για την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας του κυτταρικού κύκλου είναι απαραίτητη η ύπαρξη ρυθμιστών του.¹¹ Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται σε συγκεκριμένα σημεία από διαφορετικές κυτταρικές πρωτεΐνες και στηρίζεται στη φωσφορυλίωση.¹⁴ Τα δύο βασικά σημεία ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου βρίσκονται στις μεταβάσεις μεταξύ των φάσεων G1 και S και μεταξύ των φάσεων G2 και M. Στα σημεία αυτά (cell cycle checkpoints) ελέγχεται και διασφαλίζεται η ολοκλήρωση του κάθε σταδίου πριν ξεκινήσει το επόμενο από πολύπλοκους μηχανισμούς. Υπάρχουν επίσης μηχανισμοί που ανιχνεύουν τυχόν βλάβη στο DNA. Σε τέτοια περίπτωση διακόπτουν τον κυτταρικό κύκλο και επιδιορθώνουν το DNA πριν την έναρξη της διαδικασίας της μίτωσης. Παρουσία εκτεταμένης βλάβης του DNA οδηγεί σε απόπτωση. Στο τέλος της μίτωσης, υπάρχει το σημείο ελέγχου συγκρότησης της ατράκτου, το οποίο διασφαλίζει τη σωστή κατανομή των χρωμοσωμάτων σε κάθε θυγατρικό κύτταρο.^{11,15} Βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταρικού κύκλου είναι οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (Cyclin-dependent kinases, CDKs). Πρόκειται για μια οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης, των οποίων η δομή και ο μηχανισμός δράσης θα αναλυθεί παρακάτω. Οι κυκλίνες είναι πρωτεΐνες που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της μεσόφασης και αποικοδομούνται στο τέλος κάθε μίτωσης. Οι CDKs ενεργοποιούνται μετά από σύνδεση με μια υπομονάδα κυκλίνης σχηματίζοντας αντίστοιχα σύμπλοκα κυκλίνης-CDK στη φάση G2. Μέχρι σήμερα έχουν γίνει γνωστές 20 υποοικογένειες CDK. Οι CDK 1, 4 και 5 εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο ενώ οι CDK 7, 8, 9 και 11 σχετίζονται με τη μεταγραφή.¹⁶ Ωστόσο, πολλές φορές μπορεί να παρατηρηθεί απορρυθμισμό του κυτταρικού κύκλου. Η απορρυθμισμό αυτή οδηγεί σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων, ένα από τα χαρακτηριστικά του καρκίνου. Διάφοροι τύποι καρκίνου έχουν συσχετιστεί με την απορρυθμισμένη ενεργοποίηση των CDKs, κάτι που θα εξηγηθεί εκτενέστερα σε επόμενη ενότητα.¹²

2.2 Φωσφορυλίωση

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι η κύρια πηγή ενέργειας του κυττάρου. Είναι ένας τριφωσφορικός νουκλεοζίτης, που αποτελείται από μια αζωτούχα βάση (αδενίνη), ένα σάκχαρο ριβόζης και τρεις συνδεδεμένες φωσφορικές ομάδες. Το ATP απελευθερώνει ενέργεια όταν διασπάται ο δεσμός μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης φωσφορικής ομάδας (υδρόλυση) μέσω μεταβολικών διεργασιών μετατρέποντας το ATP σε ADP. Με περαιτέρω υδρόλυση προκύπτει AMP και ελεύθερες ανόργανες φωσφορικές ομάδες. Ωστόσο ενεργειακά ευνοείται η διαδικασία υδρόλυσης του ATP σε ADP.¹⁷

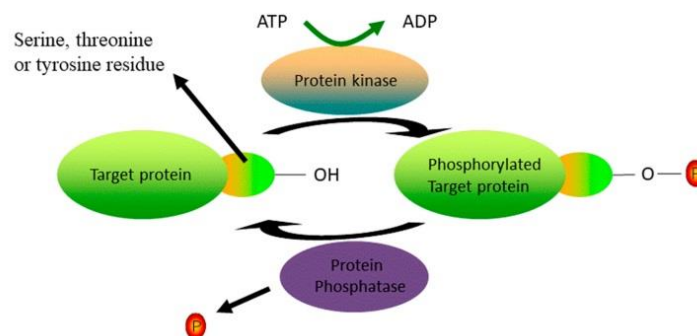


Εικόνα 2.2: Διαδικασία υδρόλυσης του ATP σε ADP.¹⁸

Η αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή η μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας σε ένα οργανικό μόριο ονομάζεται φωσφορυλίωση. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας (PO_4^{3-}) στην πολική ομάδα διαφόρων αμινοξέων μέσω πρωτεϊνικών κινάσων. Με αυτό τον τρόπο η πρωτεΐνη τροποποιείται με αποτέλεσμα να αλλάζει διαμόρφωση όταν αλληλεπιδρά με άλλα μόρια. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελεί μία από τις πιο κοινές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ρυθμίζει σημαντικές κυτταρικές διεργασίες όπως η πρωτεϊνική σύνθεση, η κυτταρική διαίρεση, η μεταγωγή σήματος, η κυτταρική ανάπτυξη ενώ ακόμη πολλά ένζυμα ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών. Η αποφωσφορυλίωση καταλύεται από φωσφατάσες. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιλαμβάνει περίπου 568 πρωτεϊνικές κινάσες και 156 πρωτεϊνικές φωσφατάσες.¹⁹

2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση φωσφορυλίωσης. Ανήκουν σε μια οικογένεια φωσφοτρανφερασών καθώς μεταφέρουν τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP στο υδοξύλικό κατάλοιπο του υποστρώματος της πρωτεΐνης.²⁰



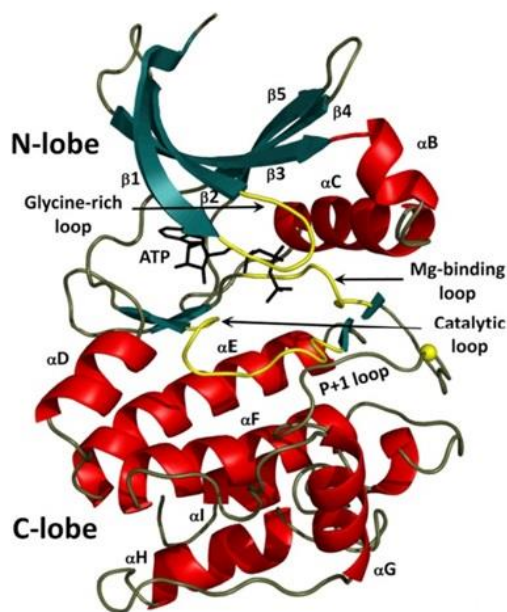
Εικόνα 2.3: Ο καταλυτικός κύκλος για τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης από μια πρωτεϊνική κινάση.²¹

Με αυτόν τον τρόπο οι πρωτεΐνες ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται απευθείας. Δεδομένου ότι τα γεγονότα φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης που προκαλούνται από διαφορετικές κινάσες και φωσφατάσες ενεργοποιούν και απενεργοποιούν πολλά ένζυμα και υποδοχείς, η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελεί ρυθμιστικό μηχανισμό στην πρωτεϊνική σύνθεση, την κυτταρική διαίρεση, την ανάπτυξη και γήρανση κυττάρων ενώ παράλληλα η πλειονότητα των κυτταρικών οδών, ειδικότερα εκείνων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος ρυθμίζονται από κινάσες.²² Διάφορες αλλαγές στις λειτουργίες των ενζύμων αυτών μπορεί να είναι η αιτία εμφάνισης ασθενειών. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται σε διάφορες παθολογικές διεργασίες, με κυριότερες τις κακοήθειες. Απορρύθμιση διαφορετικών πρωτεϊνικών κινασών εντοπίζονται σε διάφορα είδη καρκίνου.²³

2.3.1 Δομή πρωτεϊνικών κινασών

Η δομή των πρωτεϊνικών κινασών που περιέχονται στο ανθρώπινο γονιδίωμα εμφανίζει μια κοινή πτυχή που αποτελείται από δύο λοβούς: έναν N-τελικό λοβό, που αποτελείται από ένα πεντακλωνικό β-φύλλο με μια α-έλικα που ονομάζεται C έλικα και έναν C τερματικό λοβό που περιλαμβάνει έξι α-έλικες.²⁴ Ο N-λοβός είναι ο μικρότερος. Ο βρόχος αC-β4 είναι το μόνο τμήμα του N-λοβού που είναι λειτουργικά προσκολλημένο στον C-λοβό. Εντός των τριών πρώτων β-κλώνων είναι ενσωματωμένα δύο μοτίβα αλληλουχίας. Μεταξύ β1 και β2 κλώνου είναι το πρώτο μοτίβο (GxGxxG), το οποίο είναι ο βρόχος πλούσιος σε γλυκίνη. Ο ρόλος του βρόχου αυτού είναι να διπλώνει πάνω από το νουκλεοτίδιο και να προσανατολίζει τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP για πρόσδεση και είναι το πιο εύκαμπτο τμήμα του N-λοβού. Το άλλο μοτίβο, (AxK), βρίσκεται στον β3 κλώνο. Από αυτό το μοτίβο η Lys72 συνδέει τις φωσφορικές ομάδες του ATP με την C-έλικα. Πιο αναλυτικά, η C-έλικα περιέχει το κατάλοιπο Glu91 που γεφυρώνεται με τη Lys72 στο β3-κλώνο.²⁵ Όταν σχηματίζεται η γέφυρα άλατος, η πλευρική αλυσίδα της λυσίνης σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με άτομα οξυγόνου των α και β φωσφορικών ομάδων του ATP.²⁴ Ο μεγάλος λοβός, C, περιέχει κυρίως έλικες και ένα β-φύλλο. Το ελικοειδές τμήμα είναι εξαιρετικά σταθερό, σχηματίζει τον πυρήνα της κινάσης και λειτουργεί σαν επιφάνεια πρόσδεσης για υποστρώματα πρωτεΐνης/πεπτιδίου. Το β φύλλο περιλαμβάνει τέσσερις κοντές β αλυσίδες 6-9 και αποτελεί μεγάλο μέρος του καταλυτικού μηχανισμού που σχετίζεται με τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας του ATP στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα (ειδικότερα ο καταλυτικός βρόχος που γεφυρώνει τους κλώνους β6 και β7). Οι β8 και β9 πλαισιώνουν το μοτίβο DFG, όπου το Asp184 είναι κρίσιμο για την αναγνώριση ενός από τα συνδεδεμένα με ATP ιόντα Mg²⁺. Το τμήμα ενεργοποίησης εκτείνεται από το μοτίβο DFG έως το Asp220 στην αρχή της F έλικας και είναι υπεύθυνο για την ακριβή ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της κινάσης. Σε κάθε ενεργή κινάση βρέθηκε ένα μοτίβο, το οποίο απουσίαζε από τις ανενεργές. Αυτό το μοτίβο περιλαμβάνει τέσσερα μη διαδοχικά υδρόφοβα κατάλοιπα, δύο από τον N-λοβό: Leu106 από τον κλώνο β4 και Leu91 από την C-έλικα και δύο από τον C-λοβό: Phe185 από τον βρόχο ενεργοποίησης και Tyr164 από τον καταλυτικό βρόχο. Μπορεί να θεωρηθεί ως μια υδρόφοβη «σπονδυλική στήλη» που συνδέει τους δύο λοβούς. Επειδή το μεσαίο τμήμα αυτού του μοτίβου, η C-έλικα και ο βρόχος ενεργοποίησης, μπορεί να είναι πολύ ευκίνητα, η υδρόφοβη σπονδυλική στήλη μπορεί να συναρμολογηθεί ή να

αποσυναρμολογηθεί ρυθμίζοντας έτσι τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης. Αυτή η σπονδυλική στήλη χαρακτηρίστηκε επομένως ως ρυθμιστική σπονδυλική στήλη (Regulatory Spine). Εκτός από αυτήν, βρέθηκε και άλλη μία υδρόφοβη σπονδυλική στήλη που ονομάστηκε καταλυτική σπονδυλική στήλη (Catalytic Spine). Η διαφορά της με την πρώτη είναι πως σε αυτήν τα κατάλοιπα (Val57 στο β2 και Ala70 από το μοτίβο "AxK" στο β3 στο N-λοβό και Leu173 στο C-λοβό) προσαρτώνται απευθείας στο δακτύλιο αδενίνης του ATP. Ο ρόλος της είναι να συμβάλλει στην τοποθέτηση του ATP σε σχέση με τον άκαμπτο υδρόφοβο πυρήνα του C-λοβού. Η F έλικα συντονίζει τις R και C σπονδυλικές στήλες με το υπόλοιπο μόριο. Είναι μια αρκετά υδρόφοβη έλικα που αποτελεί το οργανωτικό στοιχείο για ολόκληρο τον πυρήνα της κινάσης.²⁵ Οι δύο λοβοί συνδέονται με μια εύκαμπτη περιοχή, στο μέσο της οποίας υπάρχει η θέση δέσμευσης του ATP.²⁴ Η ενεργή θέση περιλαμβάνει πολλά δομικά στοιχεία και αποτελείται από έναν σύντομο «βρόχο δέσμευσης μαγνησίου» με το μοτίβο DFG στο N-άκρο του. Στην ενεργή διαμόρφωση, το μοτίβο DFG Asp είναι σε θέση και προσανατολισμό να δεσμεύει ένα ιόν μαγνησίου που αλληλεπιδρά απευθείας με ένα άτομο οξυγόνου της β φωσφορικής ομάδας του ATP. Ακολουθεί ο βρόχος ενεργοποίησης, που περιέχει την κύρια θέση φωσφορυλίωσης. Είναι τυπικά 20 έως 30 κατάλοιπα σε μήκος που ξεκινά με ένα μοτίβο DFG (συνήθως Asp-Phe-Gly) και εκτείνεται μέχρι ένα μοτίβο APE.^{24,25} Σε δομές ενεργού κινάσης, αυτός ο βρόχος σχηματίζει μια σχισμή που δεσμεύει το υπόστρωμα.²⁴ Ο βρόχος P+1 παρέχει μια θέση σύνδεσης για το υδρόφοβο κατάλοιπο P+1 στο πεπτίδιο, ενώ τα άλλα κατάλοιπα σε αυτόν τον βρόχο συνεισφέρουν το καθένα σε διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με το υπόστρωμα πεπτιδίου.²⁵ Το δεσμευμένο πεπτίδιο υποστρώματος σχηματίζει ειδικές αλληλεπιδράσεις με το μοτίβο HRD (συνήθως His-Arg-Asp) που εμφανίζεται στον καταλυτικό βρόχο της πρωτεΐνης.²⁴



Εικόνα 2.3.1: Δομή του πυρήνα μιας πρωτεϊνικής κινάσης.²⁵

Σε κάποιες περιπτώσεις, η αποσυναρμολόγηση της R σπονδυλικής στήλης μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη τοποθέτηση του μοτίβου DFG εμποδίζοντας έτσι στερικά τη

σύνδεση του ATP. Αυτό έχει χαρακτηριστεί ως διαμόρφωση «DFG-out». Ωστόσο, η ανοιχτή ή η κλειστή διαμόρφωση DFG δεν αποτελεί ποτέ κριτήριο για την αξιολόγηση του εάν μια κινάση είναι ενεργή ή ανενεργή. Όλες οι κινάσες με διαμόρφωση "DFG-out" θα είναι ανενεργές, αλλά κάθε διαμόρφωση «DFG-in» πρέπει να εξεταστεί για την κατάσταση της R σπονδυλικής στήλης.²⁵

2.3.2 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες: τις τυπικές ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (ePKs) και τις άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs).²⁶ Οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε περαιτέρω κατηγορίες είτε ανάλογα με τη φύση του αμινοξέος που φωσφορυλιώνουν είτε λόγω της ομοιότητας τους στην αλληλουχία των καταλυτικών τους περιοχών.²³ Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο ταξινόμησης, οι πρωτεϊνικές κινάσες διακρίνονται σε πέντε κατηγορίες:

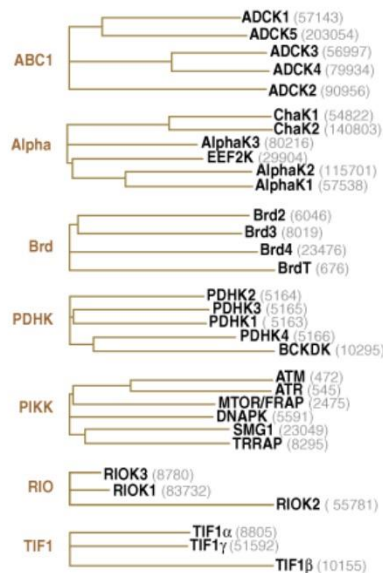
- Κινάσες σερίνης/θρεονίνης: φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης της πρωτεΐνης στόχου, παράγοντας φωσφορικούς εστέρες.
- Κινάσες τυροσίνης: φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα στο αρωματικό σύστημα τυροσίνης της πρωτεΐνης στόχου, παράγοντας φωσφορικούς εστέρες.
- Κινάσες ιστιδίνης: φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα ιστιδίνης, αργινίνης, λυσίνης, παράγοντας φωσφορικά αμίδια στην 1 ή 3 θέση της ιστιδίνης, στην ομάδα γουανιδίνης της αργινίνης ή στην αμινομάδα της λυσίνης.
- Κινάσες κυστεΐνης: φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα κυστεΐνης παράγοντας φωσφορικούς θειοεστέρες.
- Ασπάρτυλο ή γλουτάμυλο κινάσες: το υπόστρωμά τους είναι μία άκυκλο ομάδα και μετά τη φωσφορυλίωση παράγουν μικτούς ανυδρίτες φωσφορικού-καρβοξυλικού οξέος.²⁷

Σύμφωνα με το δεύτερο τρόπο ταξινόμησης, οι τυπικές ευκαρυωτικές κινάσες χωρίζονται σε εννέα περαιτέρω κατηγορίες ανάλογα τις ομοιότητες που παρουσιάζουν στην καταλυτική τους περιοχή. Οι κατηγορίες αυτές είναι:

- TK: κινάσες τυροσίνης.
- TKL: κινάσες που μοιάζουν με κινάσες τυροσίνης.
- STE: σχετίζεται με κινάσες ζυμομυκήτων.
- CK1: κινάσες καζεΐνης.
- AGC: περιλαμβάνει τις πρωτεϊνικές κινάσες A,G,C (PKA, PKG και PKC).
- CAMK: κινάσες εξαρτώμενες από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη.
- CMGC: περιλαμβάνει κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (Cyclin Dependent Kinases,CDK), ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases,MAPK), κινάσες συνθάσης γλυκογόνου (Glycogen Synthase Kinases,GSK) και κινάσες που μοιάζουν με κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (Cyclin Dependent Kinases Like, CDKL).
- RGC: περιλαμβάνει υποδοχείς γουανυλικών κυκλασών (Receptor Guanylate Cyclase, RGC).

- Στην υποκατηγορία αυτή εντάσσονται οι υπόλοιπες πρωτεϊνικές κινάσες που δεν ανήκουν στις παραπάνω.

Από τις 518 πρωτεϊνικές κινάσες που περιέχει το ανθρώπινο γονιδίωμα, οι 478 ανήκουν στις ευκαρυωτικές κινάσες και εντάσσονται στις παραπάνω κατηγορίες. Οι υπόλοιπες 40, ενώ έχουν δράση κινάσης δεν παρουσιάζουν ομοιότητες στην αλληλουχία τους με τις ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες και για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες.²⁸



Εικόνα 2.3.2: Ταξινόμηση των άτυπων πρωτεϊνικών κινασών σε οικογένειες.²⁹

2.3.2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης

Η πλειονότητα των πρωτεϊνικών κινασών ανήκουν στην κατηγορία αυτή (385).³⁰ Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι κινάσες A,C, κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (CDK) και ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPK), των οποίων ο ρόλος και ο μηχανισμός δράσης θα εξηγηθούν παρακάτω.²²

2.3.2.1.1 Πρωτεϊνική κινάση Α (PKA)

Το cAMP είναι ένας β αγγελιοφόρος που παίζει ρόλο στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σήματος διαφόρων ερεθισμάτων. Μια κύρια λειτουργία του cAMP είναι η ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από cAMP πρωτεϊνικής κινάσης (PKA). Η PKA είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών σερίνης/θρεονίνης.³¹ Αποτελείται από καταλυτικές και ρυθμιστικές υπομονάδες. Συγκεκριμένα, αποτελείται από ένα τετραμερές δύο καταλυτικών (C) και δύο ρυθμιστικών (R) υπομονάδων, το οποίο είναι ανενεργό. Η PKA ενεργοποιείται όταν το cAMP δεσμεύεται στις ρυθμιστικές υπομονάδες και διασπά το ολοένζυμο σε ελεύθερες ρυθμιστικές και ελεύθερες καταλυτικές ενεργές υπομονάδες. Έχουν βρεθεί τρεις ισομορφές της υπομονάδας C και τέσσερις της υπομονάδας R. Οι τρεις υπομονάδες C, που ονομάζονται Ca, Cβ και Cγ, φωσφορυλιώνουν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών φυσιολογικού υποστρώματος. Οι τέσσερις υπομονάδες R αποτελούνται από δύο μορφές πρωτεϊνών τύπου I και τύπου II

η καθεμία. Η δραστηριότητα της PKA είναι παρούσα σε όλο το κύτταρο από την πλασματική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα έως και τον πυρήνα. Ενώνεται με πρωτεΐνες αγκύρωσης, που ονομάζονται πρωτεΐνες αγκύρωσης κινάσης A (AKAPs). Ειδικότερα, οι AKAPs συνδέονται με τις υπομονάδες RIIα και RIIβ της πρωτεϊνικής κινάσης. Με αυτό τον τρόπο μεταφέρουν αυτές τις ρυθμιστικές υπομονάδες και τις δεσμευμένες καταλυτικές τους υπομονάδες σε συγκεκριμένες υποκυτταρικές θέσεις.³² Η PKA ελέγχει μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών. Λόγω της εμπλοκής της στην εμφάνιση και τον πολλαπλασιασμό πολλών όγκων, αποτελεί στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου.³¹

2.3.2.1.2 Πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Η πρωτεϊνική κινάση C εξαρτάται από Ca^{2+} και ενεργοποιείται από το Ca^{2+} σε συνδυασμό με διακυλογλυκερόλη DAG και φωσφατιδυλοσερίνη. Στην ανενεργή του μορφή υπάρχει ως μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη του οποίου η ρυθμιστική περιοχή συνδέεται με την καταλυτική του περιοχή αναστέλλοντας τη δράση του. Κατά την ενεργοποίηση από Ca^{2+} ή DAG, το ένζυμο μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη, όπου συνδέεται με πρωτεΐνες που ονομάζονται υποδοχείς για ενεργοποιημένη C κινάση (RACK). Οι RACK λειτουργούν όπως και οι AKAP για την PKA ώστε να κατευθύνουν τα ένζυμα σε υποκυτταρικές θέσεις όπου απαιτείται η δραστηριότητά τους.³² Υπάρχουν τρεις υποοικογένειες της PKC:

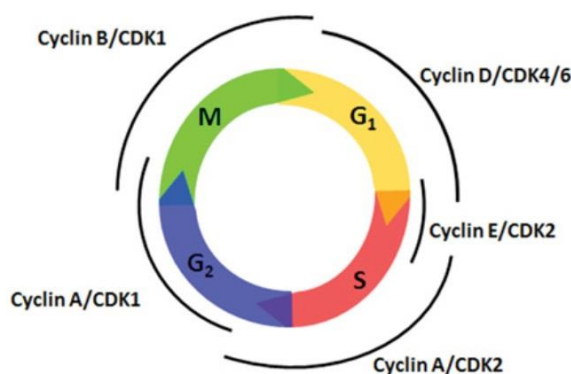
- Η πρώτη υποοικογένεια περιλαμβάνει τις συμβατικές ισομορφές PKC, οι οποίες διαθέτουν δύο λειτουργικές δομές ψευδαργύρου πλούσιες σε κυστεΐνη κοντά στο αμινοτελικό άκρο της cPKC και μια μεμονωμένη γειτονική περιοχή C2 που δεσμεύει τα φωσφολιπίδια.
- Η δεύτερη υποοικογένεια περιλαμβάνει τις νέες ισόμορφες PKC, οι οποίες διαθέτουν επίσης τομείς C1 και C2, αλλά με αντίθετη σειρά. η περιοχή C2 βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο.
- Η τρίτη υποοικογένεια περιλαμβάνει άτυπες PKC που δεν απαιτούν ούτε Ca^{2+} ούτε DAG για τη δραστηριότητά τους.

Η ενεργοποίηση της PKC υπό φυσιολογικές συνθήκες πραγματοποιείται από εξωκυτταρικά σήματα, όπως αυξητικούς παράγοντες, ορμόνες ή αντιγόνα. Στη συνέχεια, η πρόσδεση του σήματος ξεκινά την ενεργοποίηση μορίων, όπως η φωσφολιπάση C (PLC) που σχετίζεται με τη μεμβράνη, η οποία υδρολύει το φωσφολιπίδιο της μεμβράνης 4,5-διφωσφατική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP2) για να σχηματίσει δύο υδρολυτικά προϊόντα: DAG, 1,4,5-τριφωσφορικό (IP3). Η αύξηση της συγκέντρωσης του ελεύθερου Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα συμβαίνει με την αλληλεπίδραση IP3 με τους υποδοχείς τριφωσφορικής ινοσιτόλης (InsP3R), οι οποίοι προάγουν την ταχεία απελευθέρωση Ca^{2+} από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER). Η αύξηση στο DAG και τα επίπεδα Ca^{2+} προκαλούν μετατόπιση της PKC από το κυτοσόλιο στη μεμβράνη του πλάσματος, σύνδεσή της με τις RACK ώστε να ενεργοποιηθεί και να ξεκινήσει η φωσφορυλίωση κοντινών υποστρωμάτων για την επίτευξη κυτταρικών λειτουργιών.³³ Οι εστέρες φορβόλης δυνητικά παράγουν όγκους. Λόγω της ταυτοποίησης ορισμένων μελών της οικογένειας

AGC, συγκεκριμένα της PKC, ως ενδοκυτταρικοί υποδοχείς των εστέρων φορβόλης, η PKC θεωρήθηκε πιθανός στόχος για τη θεραπεία καρκινογένεσης.³²

2.3.2.1.3 Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (Cyclin Dependent Kinases, CDKs)

Οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDKs) έχουν μια δομή δύο λοβών: N-άκρο που έχει β φύλλα και C-άκρο που αποτελείται από α έλικες. Ο N-τερματικός λοβός περιέχει βρόχο G (πλούσιο σε γλυκίνη) και το C-τελικό περιέχει τμήμα ενεργοποίησης που περιλαμβάνει κατάλοιπα φωσφορυλίωσης. Η ενεργοποίηση των CDK πραγματοποιείται μέσω της δέσμευσής τους με τις αντίστοιχες κυκλίνες με μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με σκοπό την εξασφάλιση της πρόσβασης του ATP στην καταλυτική θέση για φωσφορυλίωση της θρεονίνης. Ορισμένες από τις CDK δεν απαιτούν κυκλίνη για ενεργοποίηση. Οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDKs) παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Πιο αναλυτικά, η κυκλίνη A σχηματίζει σύμπλοκο με τις CDK1 και CDK2 και ρυθμίζει τη φάση S. Η κυκλίνη B σχηματίζει σύμπλοκο με τη CDK1 και ελέγχει τη φάση M του κυτταρικού κύκλου. Η κυκλίνη D σε σύμπλοκο με CDK4 και CDK6 ελέγχει τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Η κυκλίνη E σχηματίζει σύμπλοκο με τη CDK2 και ελέγχει τη φάση G1-S.¹⁶

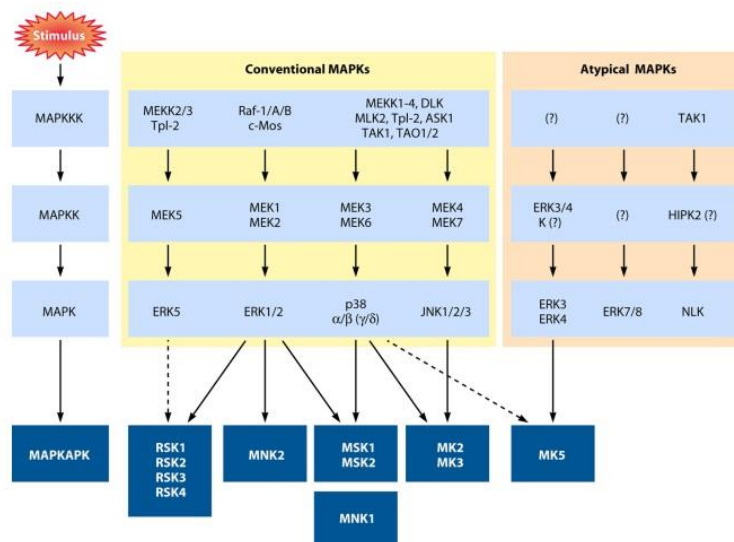


Εικόνα 2.3.2.1.3: Τα σύμπλοκα CDK-κυκλίνες στα στάδια του κυτταρικού κύκλου.³⁴

2.3.2.1.4 Πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPK)

Οι ενεργοποιημένες από μιτογόνο πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs), ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνικών κινάσων σερίνης/θρεονίνης, είναι από τις αρχαιότερες οδούς μεταγωγής σήματος και χρησιμοποιούνται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση. Οι συμβατικές MAPK περιλαμβάνουν τις εξωκυτταρικές κινάσες 1 και 2 που ρυθμίζονται με σήμα (ERK1/2), τις αμινοτελικές κινάσες c-Jun 1 έως 3 (JNK1 έως -3), τις p38 (α, β, γ, και δ), και οικογένειες ERK5. Υπάρχουν και οι άτυπες MAPK, όπως οι ERK3/4, ERK7/8 και κινάσες τύπου Nemo (NLK). Κάθε ομάδα συμβατικών MAPK αποτελείται από τρεις κινάσες που δρουν διαδοχικά: μια MAPK, μια MAP2K

(MAPKK) και μια MAP3K (MAPKKK). Οι MAP3Ks ενεργοποιούνται αφού αλληλεπιδράσουν μέσω φωσφορυλίωσης με μια GTPάση (μικρή πρωτεΐνη της οικογένειας Ras). Η ενεργοποίηση MAP3K οδηγεί στη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση μιας MAP2K, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί μια MAPK μέσω διπλής φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα Thr και Tyr εντός ενός μοτίβου Thr-X-Tyr που βρίσκεται στον βρόχο ενεργοποίησης στην περιοχή της κινάσης. Οι άτυπες MAPK δεν έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τις συμβατικές. Μια βασική διαφορά τους είναι η απουσία τριών κινασών που δρουν διαδοχικά στις άτυπες. Επίσης το μοτίβο Thr-X-Tyr μπορεί να απουσιάζει ή ακόμα και να διαφέρει. Οι MAPK, τόσο οι συμβατικές όσο και οι άτυπες, μέσω της φωσφορυλίωσης ρυθμίζουν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των κινασών πρωτεΐνης ενεργοποιημένες με MAPK (MAPKAPKs). Οι MAPKAPKs χωρίζονται σε πέντε υποοικογένειες: η ριβοσωμική κινάση S6 p90 (RSK), η κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο και το στρες (MSK), η κινάση που αλληλεπιδρά με MAPK (MNK), η ενεργοποιημένη από MAPK πρωτεϊνική κινάση 2/3 (MK2/3) και MK5 (επίσης γνωστή ως ρ38-ρυθμιζόμενη/ενεργοποιημένη κινάση πρωτεΐνης [PRAK]). Τα ένζυμα αυτά ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων.³⁵



Εικόνα 2.3.2.1.4: Σχηματική απεικόνιση των οικογενειών των MAPK και των μονοπατιών που ακολουθούν για φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των MAPKAPK.³⁵

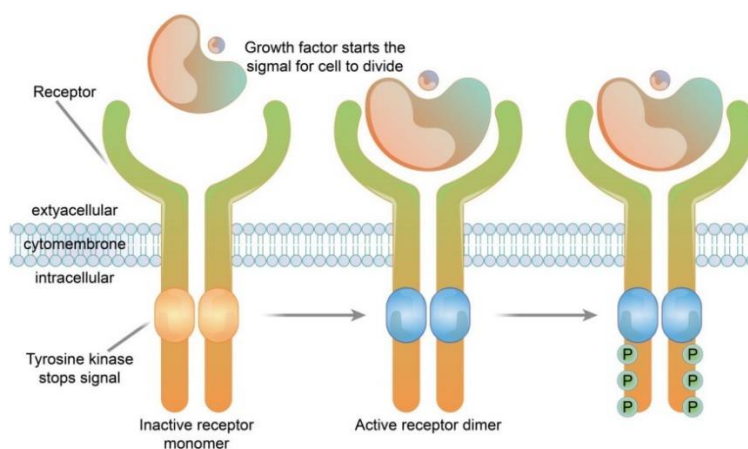
2.3.2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (90) χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (RTK), οι οποίες είναι περισσότερες (58) και τις μη υποδοχικές (NRTK) στις οποίες εντάσσονται 32.²⁶

2.3.2.2.1 Υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (RTKs)

Οι υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης έχουν μια μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή που περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης του σήματος, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή με καταλυτική δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης.

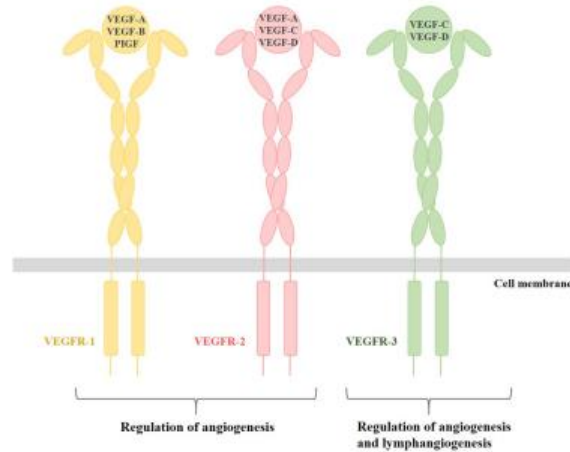
Απουσία σήματος υφίστανται με τη μορφή μονομερούς ενώ μετά την πρόσδεση οι υποδοχείς διμερίζονται με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση των ενδοκυττάρων τμημάτων τους και στη συνέχεια τη φωσφορυλίωση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών για τη διαβίβαση του σήματος ως τον πυρήνα. Η μετάδοση των σημάτων γίνεται μέσω PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, PLCγ/PKC και άλλων οδών σηματοδότησης. Οι RTKs μεταξύ άλλων περιλαμβάνουν τον υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), τον υποδοχέα ινσουλίνης (IR), τον υποδοχέα αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR), τον υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) και τους υποδοχείς αυξητικού παράγοντα που προέρχονται από αιμοπετάλια (PDGFR). Ο EGFR βοηθά στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης ενώ η υπερέκφρασή του εντοπίζεται σε πολλά καρκινικά κύτταρα, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω.²⁶



Εικόνα 2.3.2.2.1: Η δομή ενός υποδοχέα κινάσης τυροσίνης και η ενεργοποίησή του με την πρόσδεση του εξωκυττάριου σήματος.³⁶

2.3.2.2.1.1 Υποδοχέας Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor – VEGFR)

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) είναι ο κύριος ρυθμιστής της αγγειογένεσης. Απομονώθηκε αρχικά από ένα υγρό που εκκρίθηκε από έναν όγκο. Η οικογένεια VEGF, στους ανθρώπους, περιλαμβάνει πέντε μέλη VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και PlGF (πλακουντιακός αυξητικός παράγοντας), ενώ τρεις είναι οι κύριοι υποδοχείς του VEGF: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt-4). Οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGFs) και οι υποδοχείς τους (VEGFRs) ρυθμίζουν τόσο την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων από πρόδρομα κύτταρα κατά την πρώιμη εμβρυογένεση όσο και τον σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία σε μεταγενέστερο στάδιο. Πιο συγκεκριμένα, ο VEGF-A και οι υποδοχείς του VEGFR-1 και VEGFR-2 παίζουν κύριο ρόλο στη φυσιολογική και στην παθολογική αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένης της αγγειογένεσης όγκου, ενώ οι VEGF-C/D και ο υποδοχέας τους VEGFR-3 κυρίως ρυθμίζουν τη λεμφαγγειογένεση.³⁷



Εικόνα 2.3.2.2.1.1: Σχηματική απεικόνιση των VEGF και των υποδοχέων τους.³⁸

Οι VEGFRs είναι τυπικοί υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (TKRs) που αποτελούνται από μια εξωκυτταρική περιοχή για πρόσδεση του υποδοχέα, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική περιοχή, συμπεριλαμβανομένης μιας περιοχής κινάσης τυροσίνης 60 έως 70 αμινοξέων. Η δέσμευση του παράγοντα VEGF στον εκάστοτε υποδοχέα του προκαλεί διμερισμό του VEGFR, έχοντας ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων υπολειμμάτων τυροσίνης ενεργοποιώντας έτσι τα σηματοδοτικά μονοπάτια και οδηγώντας τελικά στην αγγειογένεση.³⁷

2.3.2.2.2 Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (NRTKs)

Οι μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες (NRTKs) περιλαμβάνουν εννέα πρωτεϊνικές κινάσες, τις: ABL, ACK, CSK, FAK, FES, JAK, SRC, SYK και TEC. Σε αντίθεση με τις υποδοχικές, δεν έχουν καμία καταλυτική περιοχή. Το σήμα μεταφέρεται μέσω ελεύθερα κινούμενων πρωτεϊνών που φωσφορυλιώνονται από την πρωτεϊνική κινάση. Η οικογένεια κινασών Abelson (ABL) περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες ABL1 και ABL2, ενώ η οικογένεια JAK αποτελείται από τέσσερα μέλη και συγκεκριμένα τις JAK1, JAK2, JAK3 και TYK2. Οι αναστολείς της κινάσης FES δρουν αποτελεσματικά στις κακοήθειες των λεμφοειδών, στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.²⁶

2.3.2.3 Πρωτεϊνικές κινάσες που μοιάζουν με κινάσες τυροσίνης (TKL)

Τα μέλη της οικογένειας αυτής έχουν αλληλουχίες που μοιάζουν με αυτές των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης ωστόσο οι ίδιες είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Στην οικογένεια αυτή εντάσσονται οι κινάσες RAF, η κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα ιντερλευκίνης-1 (IL-1) (IRAK), η κινάση της περιοχής LIM (LIMK) και οι υποδοχείς βήτα του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (TGFβ).²⁸

Κεφάλαιο 3

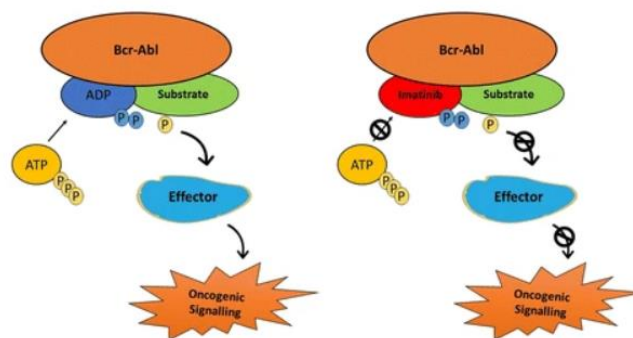
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Η διαδικασία της φωσφορυλίωσης επιφέρει δομικές αλλαγές στο υπόστρωμα με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ικανότητα συσχέτισης του με άλλα μόρια και η καταλυτική του δράση. Οι πρωτεϊνικές κινάσες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσω της φωσφορυλίωσης ελέγχουν και ρυθμίζουν πολύπλοκες κυτταρικές διεργασίες όπως η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση.³⁹ Η υπερέκφραση ή/και διάφορες μεταλλάξεις των πρωτεϊνικών κινασών έχουν ως αποτέλεσμα την απορρύθμιση της δραστηριότητάς τους οδηγώντας στην εμφάνιση παθολογιών και νεοπλασιών. Κατά συνέπεια, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν σημαντικό στόχο για ανακάλυψη φαρμάκων, μάλιστα το 25-33% των προσπαθειών ανακάλυψης νέων φαρμάκων στοχεύουν σε αυτές. Ως αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών χαρακτηρίζονται τα μόρια που εμποδίζουν την δράση των πρωτεϊνικών κινασών. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν 80 εγκεκριμένοι από τον FDA αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που στοχεύουν σε περισσότερες από 20 διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες και περίπου 180 βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές παγκοσμίως. Ο πρώτος εγκεκριμένος αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών είναι το Imatinib για τη θεραπεία των θετικών στο χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας χρόνιων μυελογενών λευχαιμιών το 2001. Συγκεκριμένα, το Imatinib αναστέλλει τη δράση της πρωτεϊνικής-τυροσινικής κινάσης BCR-Abl, η οποία προκαλεί αυτές τις λευχαιμίες.³⁰

3.1.1 Μηχανισμός δράσης αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Ο τρόπος με τον οποίο δρουν οι αναστολείς είναι γνωστός. Σε περίπτωση μετάλλαξης, συνδέονται αυτοί με τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εμποδίζοντας έτσι της σύνδεσή της με το ATP. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φωσφορυλίωσης μεταλλαγμένων πρωτεϊνών και κατ' επέκταση την εξάπλωση του καρκίνου. Πιο αναλυτικά, το ATP δεσμεύεται στη σχισμή που σχηματίζεται μεταξύ των N- και C-λοβών. Η σύνδεση αυτή ελέγχεται από ένα βρόχο ενεργοποίησης που ξεκινά με μια αλληλουχία αμινοξέων Asp-Phe-Gly (DFG).⁴⁰

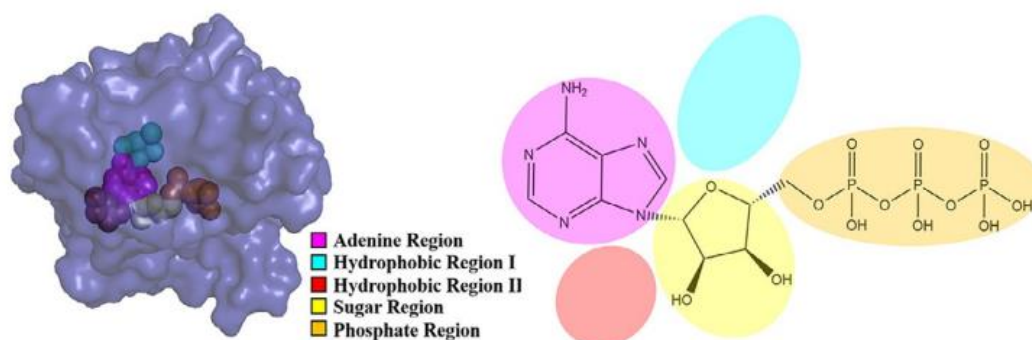


Εικόνα 3.1.1: Μηχανισμός δράσης του Imatinib στην πρωτεϊνική κινάση Bcr-Abl.⁴¹

Ανάλογα τον τρόπο δέσμευσης του αναστολέα με την πρωτεϊνική κινάση, οι αναστολείς ταξινομούνται σε κατηγορίες που θα αναλυθούν παρακάτω.⁴⁰

3.1.2 Θέση δέσμευσης του ATP

Η θέση δέσμευσης του ATP είναι μια εύκαμπτη περιοχή που ενώνει το N και C λοβό όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.3.1 και αποτελείται από πέντε περιοχές: περιοχή της αδενίνης, περιοχή του σακχάρου, φωσφορική περιοχή, υδρόφοβη περιοχή I και II.⁴²



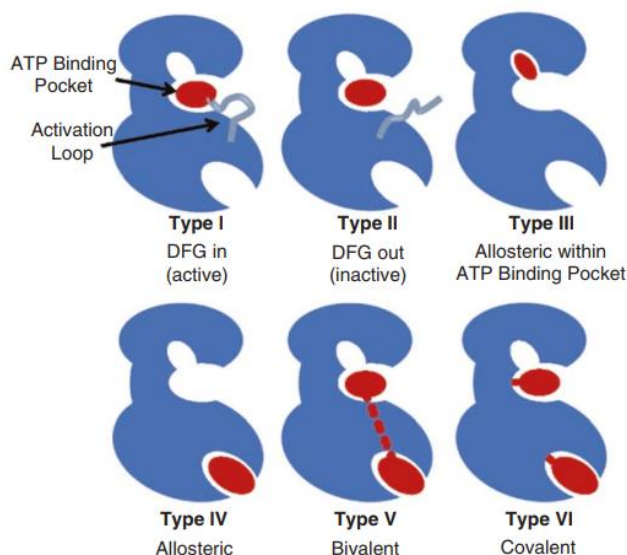
Εικόνα 3.1.2: Η θέση δέσμευσης του ATP.⁴²

Η περιοχή της αδενίνης περιλαμβάνει έναν επίπεδο ετεροκυκλικό δακτύλιο, ο οποίος σχηματίζει μη πολικές αλληλεπιδράσεις και τουλάχιστον δύο δεσμούς υδρογόνου με κατάλοιπα αμινοξέων. Η περιοχή του σακχάρου περιλαμβάνει τη ριβόζη του ATP, η οποία μέσω των δύο ομάδων OH σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με κατάλοιπα αμινοξέων. Οι επιστήμονες εκμεταλλεύτηκαν τις αλληλεπιδράσεις αυτής της περιοχής για την ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων και ταυτόχρονα η περιοχή αυτή θεωρήθηκε κατάλληλη για την ανάπτυξη αναστολέων τύπου 6 που συνδέονται ομοιοπολικά, όπως θα αναλυθούν στην επόμενη ενότητα. Η φωσφορική περιοχή περιλαμβάνει το μοτίβο DFG τον βρόχο πλούσιο σε Gly, το οποίο είναι αρκετά ευκίνητο και προσανατολίζεται ανάλογα ώστε να ταιριάζει με την ένωση με την οποία συνδέεται. Οι υδρόφοβες περιοχές I και II ονομάζονται επίσης «κρυμμένη περιοχή» και «περιοχή προσβάσιμη από διαλύτη». Όσον αφορά την περιοχή I, παρουσιάζει ποικιλία αμινοξέων και θεωρείται ότι προσφέρει εκλεκτικότητα σε έναν νέο εν δυνάμει αναστολέα για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς του. Όλοι οι ανταγωνιστικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα, εκδηλώνουν 1-3 αλληλεπιδράσεις υδρογόνου με τα βασικά κατάλοιπα στην περιοχή της αδενίνης στην κινάση στόχο, ενώ όλες οι υπόλοιπες περιοχές χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά για την βελτίωση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων του αναστολέα.⁴²

3.1.3 Ταξινόμηση αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Οι δύο μεγάλες κατηγορίες των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών είναι οι αναστρέψιμοι και οι μη αναστρέψιμοι. Οι πρώτοι χωρίζονται περαιτέρω σε πέντε τύπους. Οι αναστολείς τύπου I είναι ανταγωνιστικοί αναστολείς που δεσμεύονται στη θέση του ATP στην ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου, όπου το κατάλοιπο του ασπαρτικού είναι προσανατολισμένο προς την καταλυτική θέση της κινάσης, δηλαδή

προς την κοιλότητα δέσμευσης του ATP. Οι αναστολείς τύπου II συνδέονται στην ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης όπου το κατάλοιπο του ασπαρτικού είναι προσανατολισμένο προς τα έξω, μακριά από τη θέση δέσμευσης του ATP. Οι αναστολείς τύπου III δεν προσδένονται στη θέση του ATP, αλλά σε γειτονική αλλοστερική θέση. Οι αναστολείς τύπου IV συνδέονται και αυτοί σε αλλοστερική θέση, αλλά μακριά από το θύλακα δέσμευσης του ATP. Τέλος, οι αναστολείς τύπου V είναι μόρια που εκτείνονται σε δύο περιοχές της πρωτεϊνικής κινάσης, στη θέση δέσμευσης του ATP και σε μια αλλοστερική θέση μακριά από αυτήν. Οι μη αναστρέψιμοι αναστολείς (ή αλλιώς αναστολείς τύπου VI) συνδέονται ομοιοπολικά με την κινάση μέσω ενός καταλοίπου κυστεΐνης εντός ή γύρω από την ενεργή θέση αποτρέποντας τη σύνδεση του ATP. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι μια αντίδραση Michael, όπου η κυστεΐνη, ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τη β θέση μιας α, β ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απόφραξη της θέσης ATP και τη μη αναστρέψιμη αναστολή. Οι εν λόγω αναστολείς είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί.⁴⁰



Εικόνα 3.1.2: Η ταξινόμηση των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών σχηματικά.⁴³

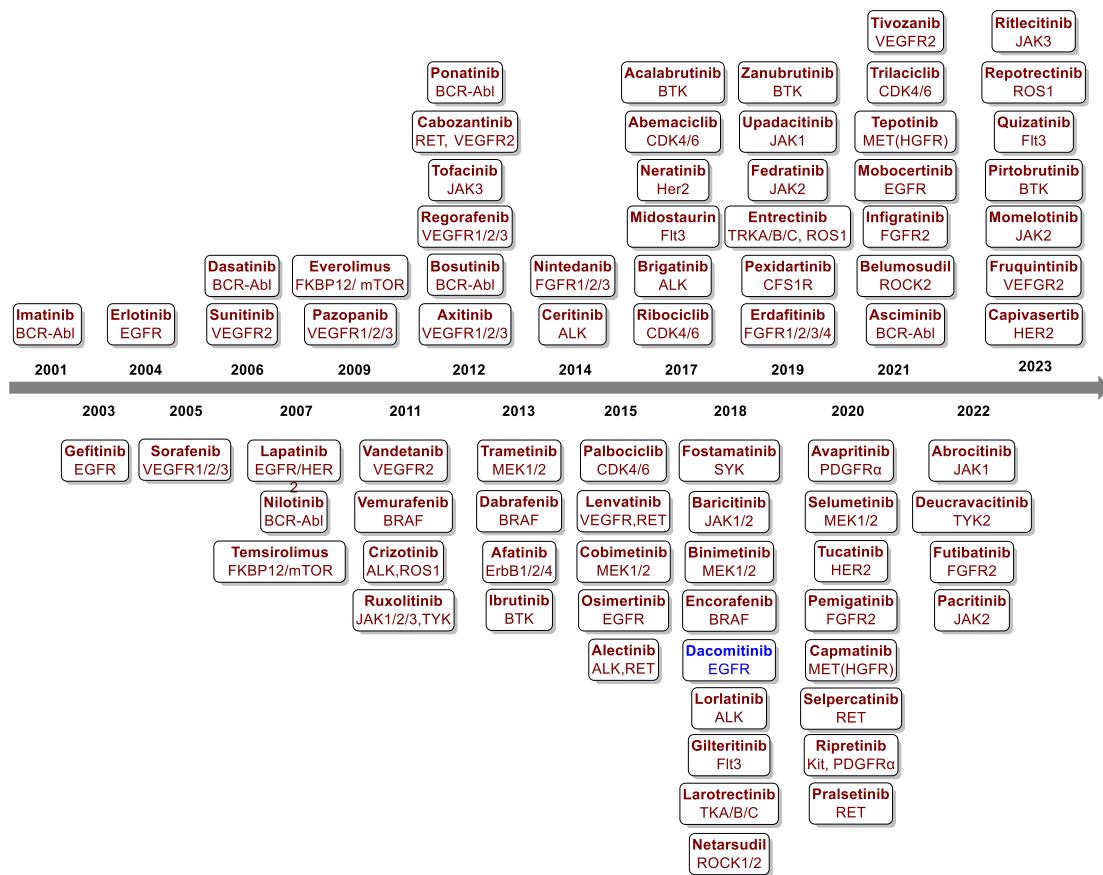
Πολλές φορές οι αναστολείς τύπου II χωρίζονται σε υπό τύπους Α και Β. Γενικά, στην κατηγορία Α εντάσσονται αυτοί στους οποίους η αλληλεπίδραση εκτείνεται κατά μήκος της σχισμής των δύο λοβών, ενώ στη Β δεν παρατηρείται περαιτέρω αλληλεπίδραση.³⁰ Σύμφωνα με το παραπάνω κριτήριο, παρουσιάζεται ένας πίνακας κατηγοριοποίησης των διάφορων τύπων αναστολέων στους υποτύπους τους.

Τύπος αναστολέα	Ιδιότητες
I	Δεσμεύεται μέσα και γύρω από τον θύλακα δέσμευσης ATP ενός ενεργού ενζύμου
I_{1/2} A/B	Δεσμεύεται μέσα και γύρω από τον θύλακα δέσμευσης ATP ενός ανενεργού ενζύμου DFG-in
I_{1/2} A	Εκτείνεται κατά μήκος της σχισμής των δύο λοβών
I_{1/2} B	Δεν εκτείνεται κατά μήκος της σχισμής των δύο λοβών
II A/B	Συνδέεται μέσα και γύρω από τη θέση δέσμευσης ATP ενός ανενεργού ενζύμου DFG-out
II A	Εκτείνεται κατά μήκος της σχισμής των δύο λοβών
II B	Δεν εκτείνεται κατά μήκος της σχισμής των δύο λοβών
III	Αλλοστερικός αναστολέας δεσμευμένος δίπλα στη θέση δέσμευσης ATP
IV	Αλλοστερικός αναστολέας δεσμευμένος μακριά από τη θέση δέσμευσης ATP
V	Αναστολέας που εκτείνεται σε δύο περιοχές περιοχής κίνησης
VI	Ομοιοπολικός αναστολέας

Πίνακας 3.1.3: Περαιτέρω ταξινόμηση των αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών σε υποτύπους.⁹

3.1.4 Εγκεκριμένοι αναστολείς μέχρι σήμερα

Όπως ήδη αναφέρθηκε, μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί 80 αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που στοχεύουν σε 20 διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες. Από αυτά, τα 13 στοχεύουν σε πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, τα 20 στις μη υποδοχικές τυροσινικές πρωτεϊνικές κινάσες, τα 43 αναστέλλουν τις υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης ενώ μόνο 4 είναι αποτελεσματικά στην αναστολή του ρόλου πρωτεϊνικών κινασών διπλής ειδικότητας. Πολλά από τα εγκεκριμένα φάρμακα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών ενώ πλειονότητά τους (69) χορηγούνται για τη θεραπεία νεοπλασιών. Έξι φάρμακα (Abrocitinib, Baricitinib, Deucravacitinib, Ritlecitinib, Tofacitinib, Upadacitinib) εμφανίζουν σημαντικά αποτελέσματα στη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών όπως ατοπική δερματίτιδα, ρευματοειδής αρθρίτιδα, ψωρίαση, γυροειδής αλωπεκία και ελκώδης κολίτιδα. Με εξαίρεση το Netarsudil, το Temsirolimus και το Trilaciclib όλα τα υπόλοιπα φάρμακα λαμβάνονται από το στόμα.⁹ Παρακάτω στο σχήμα παρουσιάζονται όλοι οι εγκεκριμένοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών από το 2001 μέχρι και σήμερα, η πρωτεϊνική κινάση στην οποία στοχεύουν και το έτος έγκρισής τους από τον FDA. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι αναστολείς εγκρίνονται λόγω της στοχευμένης θεραπείας και του υψηλού ποσοστού αναστολής που προσφέρουν. Με διαφορετικό χρώμα εντοπίζεται ο αναστολέας που μελετάται αναλυτικότερα στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.



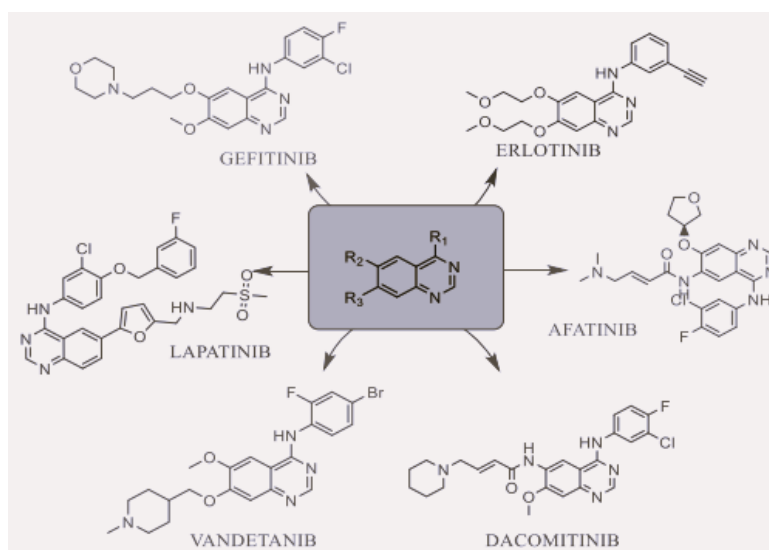
Σχήμα 3.1.4: Όνομα αναστολέα, έτος έγκρισης και πρωτεϊνική κινάση στόχευσης.

3.2 Παράγωγα κινάζολινών ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Οι κινάζολίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις που περιέχουν άζωτο και αποτελούνται από έναν βενζολικό δακτύλιο ενωμένο με έναν δακτύλιο πυριμιδίνης.⁴⁴ Το πρώτο φυσικό αλκαλοειδές με βάση την κινάζολίνη, η πεγανίνη, ανακαλύφθηκε το 1888, ωστόσο η βιβλιογραφία σχετικά με τη χημεία της κινάζολίνης ξεκίνησε μόλις τη δεκαετία του 1940.⁴⁵ Οι κινάζολίνες όπως και οι κινάζολινόνες, οι οξειδωμένες κινάζολίνες, είναι πολλά υποσχόμενες ενώσεις με ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων. Συγκεκριμένα, παρουσιάζουν αντικαρκινικές, ανοσοτροπικές, υπολιπιδαιμικές, αντιαμοπεταλιακές, υποτασικές, αντιμυκητιακές, αντιμικροβιακές και αντισπασμωδικές δράσεις.⁴⁴ Όσον αφορά τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες, παράγωγα κινάζολινών εμφανίζουν την ικανότητα να αναστέλλουν την υπερέκφραση πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης που σχετίζονται με διαφορετικούς τύπους κακοηθειών όπως ο καρκίνος του προστάτη, του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα, του στομάχου και των ωοθηκών. Τέτοιες πρωτεϊνικές τυροσινικές κινάσες είναι μεταξύ άλλων:

1. Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)
2. Ο υποδοχέας αυξητικού παράγοντα που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGFR)
3. Ο υποδοχέας αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) και
4. Ο υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR).⁴⁶

Δεν είναι τυχαίο που στη δομή πολλών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, ειδικότερα των τυροσινικών, υπάρχει δακτύλιος κιναζολίνης.⁴⁷



Εικόνα 3.2: Εγκεκριμένοι αναστολείς τυροσινικών κινασών με δακτύλιο κιναζολίνης στη δομή τους.⁴⁷

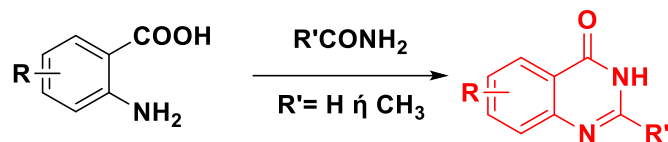
Όπως φαίνεται και στην εικόνα, σε όλους τους αναστολείς τυροσινικών κινασών που περιέχουν στο μόριό τους κιναζολίνη έχει γίνει υποκατάσταση στις θέσεις 6 ή/και 7 του δακτυλίου. Αυτό οδήγησε σε περεταίρω μελέτες και κρυστάλλωση παραγώγων κιναζολινών με πρωτεϊνικές κινάσες όπως τη CDK2 και την p38, προκειμένου να γίνουν σαφείς οι αλληλεπιδράσεις της δομής αυτής με την πρωτεΐνη. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα έδειξαν τη σύνδεση του τμήματος κιναζολίνης των παραγώγων αυτών με τη θέση δέσμευσης του ATP μέσω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται στο N1 (δέκτης) και εμφάνιση αλληλεπιδράσεων των H στις θέσεις 2 και 8 της κιναζολινικής δομής με κάποιο αντίστοιχο καρβονυλικό οξυγόνο της πρωτεϊνικής δομής.⁴⁶ Μεταξύ άλλων αναστολέων με δακτύλιο κιναζολίνης είναι και το Dacomitinib, το οποίο αναστέλλει την υποδοχική τυροσινική κινάση EGFR και θα αναλυθεί παρακάτω.

3.2.1 Τρόποι σύνθεσης παραγώγων κιναζολινών

Λόγω των πολλαπλών ιδιοτήτων των ενώσεων αυτών όπως περιγράφηκε στο παραπάνω κεφάλαιο, έγιναν πολλές προσπάθειες σύνθεσης ενώσεων παραγώγων της κιναζολίνης, όπως είναι οι κιναζολινόνες. Οι ακόλουθες συνθετικές αντιδράσεις δείχνουν μερικές κοινές παραδοσιακές μεθόδους παρασκευής τους:

1) Σύνθεση Niementowski

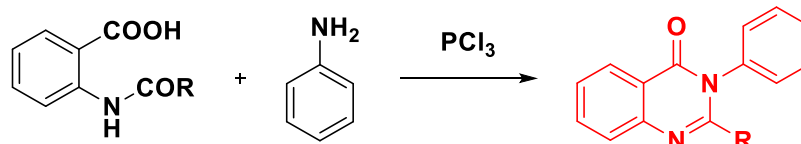
Το 3 ή 4-υποκατεστημένο ανθρακικό οξύ αντιδρά με φορμαμίδιο στους 125-130°C δίνοντας 3,4-διυδρο-4-οξοκιναζολίνη.⁴⁸



Σχήμα 3.2.1₁: Αντίδραση Niementowski.

2) Σύνθεση Grimmel, Guinther και Morgan

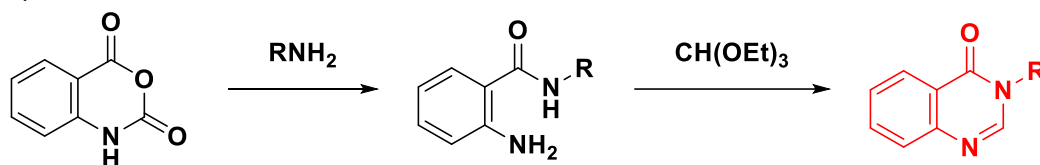
Τα ο-αμιδοβενζοϊκά οξέα θερμαίνονται με μια 3^ο ταγή αμίνη μαζί με τριγλωριούχο φώσφορο σε τολουόλιο για δύο ώρες δίνοντας 2,3-διυποκατεστημένες 3,4-διυδρο-4-οξοκιναζολίνες.⁴⁸



Σχήμα 3.2.1₂: Αντίδραση Morgan.

3) Σύνθεση από Ισατοϊκό Ανυδρίτη

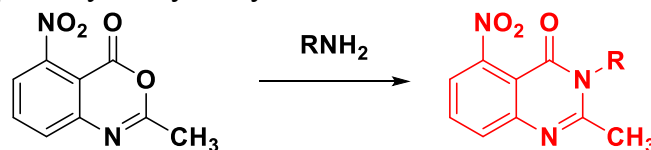
Ο ισατοϊκός ανυδρίτης αντιδρά εύκολα με αμίνες δίνοντας διυδρο-4-οξοκιναζολίνες σε συνθήκες βρασμού υπό επαναρροή χρησιμοποιώντας ορθομυρμηγκικό αιθυλεστέρα για 1-6 ώρες χωρίς απομόνωση του ενδιάμεσου αμιδίου.⁴⁸



Σχήμα 3.2.1₃: Αντίδραση σύνθεσης από ισατοϊκό ανυδρίτη.

4) Σύνθεση από 3,1,4-Βενοξαζόνες και Αμίνες

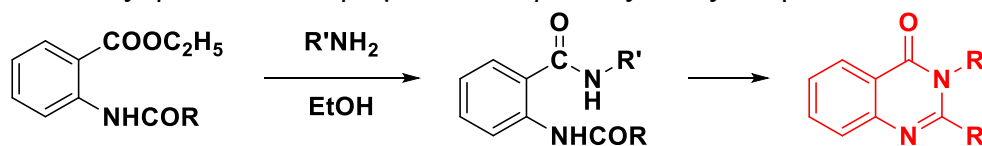
Οι 3,1,4-βενοξαζόνες αντιδρούν με αμίνες για να δώσουν 3,4-διυδρο-4-οξοκιναζολίνες. Πρωτογενείς αλειφατικές αμίνες και ανιλίνες αντιδρούν με 2-μεθυλο-5-νιτρο-4-οξοκιναζολίνες.⁴⁸



Σχήμα 3.2.1₄: Αντίδραση σύνθεσης από 3,1,4-Βενοξαζόνες και Αμίνες.

5) Σύνθεση από 2-ακεταμιδο-5-νιτροβενζοϊκό αιθύλιο

Αίθυλο-2-ακεταμιδο-5-νιτροβενζόλιο και αλκοολική αμμωνία όταν θερμανθούν δίνουν ως προϊόν 3,4-διυδρο-μεθυλ-6-νιτρο-4-οξοκιναζολίνη.⁴⁸



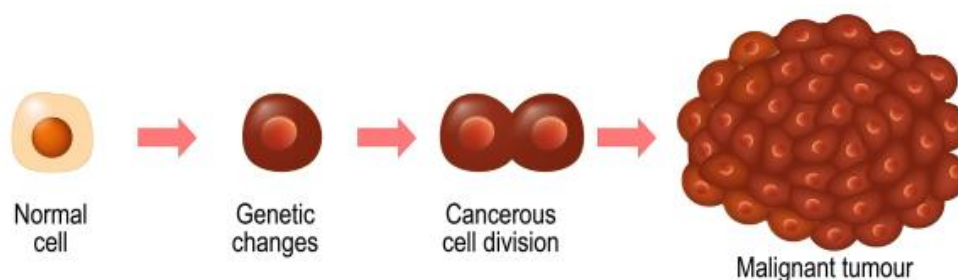
Σχήμα 3.2.1₅: Αντίδραση σύνθεσης από 2-ακεταμιδο-5-νιτροβενζοϊκό αιθύλιο.

Κεφάλαιο 4

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Οι μεταλλάξεις των πρωτεϊνικών κινασών στην καρκινογένεση

Στα προηγούμενα κεφάλαια αναλύθηκε ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών και δόθηκε έμφαση στην ανάπτυξη αναστολέων τους καθώς η απορρύθμισή τους είναι η αιτία εμφάνισης παθολογιών. Η απορρύθμιση αυτή μπορεί να οφείλεται σε αδυναμία διακοπής της φωσφορυλίωσης άρα υπερέκφρασή τους ή σε μεταλλάξεις στο γονιδίωμά τους. Και στις δύο περιπτώσεις, το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση κάποιου όγκου. Οι καλοήθεις όγκοι είναι μη καρκινικοί και δεν εξαπλώνονται, πράγμα που σημαίνει ότι δεν επηρεάζουν άλλους ιστούς. Ωστόσο, ορισμένοι καλοήθεις όγκοι αλλάζουν και γίνονται κακοήθεις ή καρκινικοί. Αυτοί, δεν περνούν από κανονικούς κύκλους ζωής των κυττάρων όμως συνεχίζουν να αντιγράφουν τον εαυτό τους χωρίς κανένα όριο και ταυτόχρονα επηρεάζουν τα κοντινά υγιή κύτταρα για να σχηματίσουν αιμοφόρα αγγεία που φέρνουν θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο στον όγκο με σκοπό αυτός να αναπτυχθεί. Το αποτέλεσμα είναι η βλάβη του οργανισμού.⁴⁹



Εικόνα 4.1: Μη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη.⁴⁹

Παρά τις σοβαρές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, περίπου το 24% των πρωτεϊνικών κινασών είναι ακόμα υπό μελέτη, ενώ μόνο το 8% έχει αποτελέσει στόχο θεραπείας. Γι' αυτό, η μελέτη των μεταλλάξεων των πρωτεϊνικών κινασών κρίθηκε επιτακτική ανάγκη. Γενικότερα, με τον όρο μετάλλαξη περιγράφονται αλλαγές στο γονιδίωμα τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων. Οι γονιδιωματικές αυτές μεταλλάξεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: την υποκατάσταση βάσης, τη μετατόπιση και τη χρωμοσωμική μετάλλαξη. Στην πρώτη κατηγορία, ένα νουκλεοτίδιο υποκαθίσταται λανθασμένα από ένα άλλο, το οποίο είτε μπορεί να επηρεάσει την λειτουργικότητα της κινάσης είτε όχι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί το μεταλλαγμένο γονίδιο BRAF (που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη B-Raf), το οποίο μεταλλάσσεται στο Val-600. Η μετάλλαξη αυτή επιφέρει μελάνωμα, καρκίνο στο θυροειδή ή μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου RAS ευθύνονται επίσης για περίπου 10-20% των καρκίνων του θυροειδούς. Στη δεύτερη κατηγορία, είναι πιθανό τα γονίδια να φέρουν χιλιάδες εισαγωγές ή διαγραφές σε διαδοχικές επαναλήψεις. Οι περισσότερες από τις αλλαγές αυτές συμβαίνουν σε ιντρονικές περιοχές, ενώ λίγες μπορεί να συμβούν και στις περιοχές των εξονίων, αλλάζοντας πολλά από τα κωδικόνια, οδηγώντας σε μεταλλάξεις μετατόπισης. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι πιθανό να ευθύνονται για την εμφάνιση κάποιας ογκογένεσης. Στην τρίτη κατηγορία, στις

χρωμοσωμικές μεταλλάξεις, ολόκληρα γονίδια ή τμήματα γονιδίων μετατοπίζονται το ένα πάνω στο άλλο, προκαλώντας εκτεταμένη βλάβη. Ένα από τα πιο γνωστά παραδείγματα χρωμοσωμικών μεταλλάξεων είναι το χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας, το οποίο φέρει ένα νέο γονίδιο, αποτελούμενο από μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου Bcr και μέρος της αλληλουχίας του γονιδίου Abl σχηματίζοντας το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL1. Το γονίδιο αυτό συναντάται στο 95% των ατόμων με χρόνια μυελογενή λευχαιμία και στο 25% με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και παράγει μια υβριδική πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης, η οποία όταν ενεργοποιείται οδηγεί σε ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση επηρεάζοντας τη φυσιολογική λειτουργία οδών σηματοδότησης των κυττάρων. Το ίδιο γονίδιο σύντηξης είναι επίσης υπεύθυνο για την αντίσταση στο Imatinib. Ακόμη, η αναδιάταξη και η σύντηξη του γονιδίου RET έχει επίσης συσχετιστεί με αρκετούς εξαρτώμενους από RET καρκίνους όπως είναι το 10-20% των καρκινωμάτων του θυρεοειδούς. Επομένως, σύμφωνα με όλα τα παραπάνω δεδομένα, είναι απαραίτητη η γονιδιωματική μελέτη των πρωτεϊνικών κινασών, η οποία περιλαμβάνει την ακριβή ταυτοποίηση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την εκάστοτε πρωτεϊνική κινάση, την αλληλουχία τους και, τέλος, τη σύγκριση των υγιών κινωμάτων με τα αντίστοιχα των καρκινικών κυττάρων. Ακολουθώντας, η εφαρμογή στατιστικών αναλυτικών εργαλείων στις μεταλλάξεις μπορεί να εντοπίσει τυχόν επαναλαμβανόμενο μοτίβο.⁵⁰

4.2 Καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένας τύπος καρκίνου που εμφανίζεται στους πνεύμονες όταν τα μη φυσιολογικά κύτταρα αναπτύσσονται με ανεξέλεγκτο τρόπο.⁵¹ Το βρογχογενές καρκίνωμα, όπως αλλιώς λέγεται ο καρκίνος του πνεύμονα, αναφέρεται σε όγκους που προέρχονται από το πνευμονικό παρέγχυμα ή μέσα στους βρόγχους. Παρόλο που στις αρχές του 20^{ου} αιώνα θεωρούνταν μια σχετικά σπάνια ασθένεια, υπήρξε δραματική άνοδος τις επόμενες δεκαετίες κυρίως λόγω της αύξησης του καπνίσματος τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, ενώ σήμερα φαίνεται να αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο στις Ηνωμένες Πολιτείες.⁵² Ακόμη, σύμφωνα με εκτιμήσεις της Διεθνούς Υπηρεσίας Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC), οι θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα ανέρχονται στους 1,8 εκατομμύρια (18%) το 2020.⁵¹ Παρόλο που το 90% των περιπτώσεων εμφάνισης καρκίνου αποδίδεται στο κάπνισμα, η ασθένεια εμφανίζεται και στους μη καπνιστές. Το παθητικό κάπνισμα μπορεί να αυξήσει κατά 20 έως 30% τις πιθανότητες εμφάνισής του. Άλλοι παράγοντες κινδύνου είναι η έκθεση σε επαγγελματικούς κινδύνους (όπως ο αμίαντος, το ραδόνιο και ορισμένες χημικές ουσίες όπως τα μέταλλα χρώμιο, νικέλιο, αρσενικό και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες), η ατμοσφαιρική ρύπανση, τα κληρονομικά καρκινικά σύνδρομα και προηγούμενες χρόνιες πνευμονικές παθήσεις όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση.^{51,52} Ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε 4 στάδια, ανάλογα την ανάπτυξή του και την εξάπλωση του όγκου.⁵³

- Στο στάδιο 1 ο όγκος περιορίζεται σε ένα μικρό κομμάτι του πνεύμονα και είναι μικρότερος από 3 εκ.
- Στο στάδιο 2 ο όγκος μεγαλώνει καταλαμβάνοντας μεγαλύτερο μέρος του πνεύμονα.

- Στο στάδιο 3 ο όγκος εξαπλώνεται στους λεμφαδένες που περιβάλλουν τον πνεύμονα.
- Στο στάδιο 4 ο καρκίνος εξαπλώνεται σε άλλα όργανα (μετάσταση).⁵³

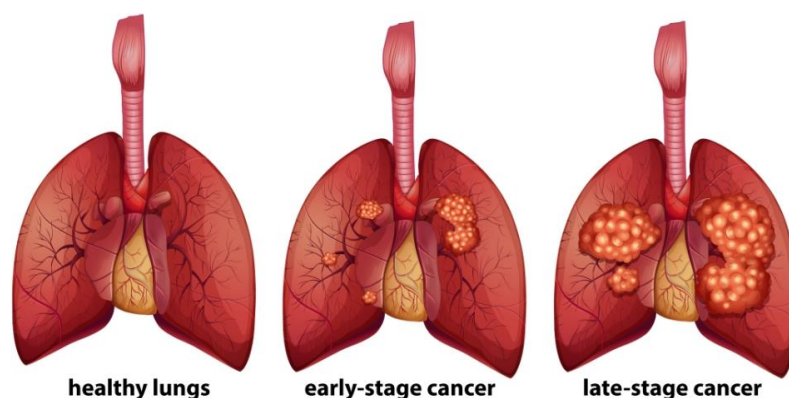
Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να προκαλέσει πολλά συμπτώματα, μεταξύ των οποίων: βήχας που δεν υποχωρεί, πόνος στο στήθος, δυσκολία στην αναπνοή, βήχας με αίμα (αιμόπτυση), κούραση, απώλεια βάρους χωρίς γνωστή αιτία και διάφορες πνευμονικές λοιμώξεις που επανέρχονται συνεχώς. Ωστόσο, τα πρώιμα συμπτώματα μπορεί να είναι ήπια ή να παραληφθούν⁵¹ (καθώς αυτά αρχίζουν να εμφανίζονται στην αρχή του σταδίου 2 και κλιμακώνονται στο στάδιο 3⁵³) οδηγώντας σε καθυστερημένη διάγνωση.⁵¹ Η διάγνωση περιλαμβάνει τη φυσική εξέταση, ακτινογραφίες θώρακος, αξονική τομογραφία και μαγνητική τομογραφία, εξέταση του εσωτερικού του πνεύμονα με βρογχοσκόπηση, λήψη δείγματος ιστού (βιοψία) για ιστοπαθολογική εξέταση και ορισμό του συγκεκριμένου τύπου και μοριακός έλεγχος για τον εντοπισμό συγκεκριμένων γενετικών μεταλλάξεων ή βιοδεικτών. Οι εξειδικευμένες εξετάσεις αυτές βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση του υποβάθρου του καρκίνου και την επιλογή της καλύτερης θεραπευτικής μεθόδου στον εκάστοτε ασθενή. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα είναι ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC) και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Small Cell Lung Cancer, SCLC).⁵¹ Η πλειονότητα των καρκίνων του πνεύμονα είναι NSCLC, περίπου το 80% έως 85%. Οι κύριοι υπότυποι του τύπου αυτού είναι το αδενοκαρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα. Αυτοί οι υπότυποι, παρόλο που ξεκινούν από διαφορετικούς τύπους πνευμονικών κυττάρων, ομαδοποιούνται ως NSCLC επειδή η θεραπεία τους είναι παρόμοια. Πιο αναλυτικά:

- Αδενοκαρκίνωμα: Το αδενοκαρκίνωμα αποτελεί τον πιο κοινό υπότυπο του NSCLC και ξεκινά από κύτταρα του πνεύμονα που παράγουν βλέννα, τα επιθηλιακά κύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα επικαλύπτουν την επιφάνεια των πνευμόνων. Εμφανίζεται τόσο σε καπνιστές όσο και σε μη καπνιστές και είναι πιο συχνός στις γυναίκες και σε νέους ανθρώπους.
- Πλακώδες καρκίνωμα: Το καρκίνωμα αυτό ξεκινά από τα πλακώδη κύτταρα, τα οποία είναι κύτταρα που καλύπτουν το εσωτερικό των αεραγωγών στους πνεύμονες. Συχνά προκαλείται από το κάπνισμα και εντοπίζονται στο κεντρικό τμήμα των πνευμόνων, κοντά σε έναν κύριο αεραγωγό (βρόγχο).
- Μεγαλοκυτταρικό (αδιαφοροποίητο) καρκίνωμα: Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε μέρος του πνεύμονα. Πήρε το όνομα του από τον τρόπο που φαίνονται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο. Τείνει να αναπτύσσεται και να εξαπλώνεται γρήγορα, γεγονός που μπορεί να κάνει πιο δύσκολη τη θεραπεία. Ένας υποτύπος μεγαλοκυτταρικού καρκινώματος, γνωστός ως μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα (LCNEC), είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος καρκίνος που μοιάζει πολύ με τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Οι υπόλοιποι υπότυποι του NSCLC είναι λιγότερο συχνοί.⁵⁴ Στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) οι πιο κοινές γενετικές μεταλλάξεις που ευθύνονται για αυτόν είναι οι μεταλλάξεις στον EGFR, KRAS και p16.⁵² Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) περιλαμβάνει περίπου το 10% έως 15% όλων των

καρκίνων του πνεύμονα. Αυτός ο τύπος αναπτύσσεται και εξαπλώνεται ταχύτερα από το NSCLC, με αποτέλεσμα τη στιγμή της διάγνωσης, τις περισσότερες φορές, να έχει ήδη κάνει κάποια μετάσταση. Ανταποκρίνεται αποτελεσματικά στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία, όμως δυστυχώς στους περισσότερους ανθρώπους ο καρκίνος θα επιστρέψει κάποια στιγμή.⁵⁴ Οι πιο κοινές γενετικές μεταλλάξεις που ευθύνονται για την ανάπτυξή του είναι οι MYC, BCL2 και p53.⁵² Εκτός από τους κύριους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, μπορούν να αναπτυχθούν και άλλοι τύποι όγκων του πνεύμονα. Αυτοί μπορεί να είναι:

- Καρκινοειδείς όγκοι του πνεύμονα: αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% των όγκων του πνεύμονα. Οι περισσότεροι από αυτούς αναπτύσσονται αργά.
- Άλλοι όγκοι του πνεύμονα: όπως τα αδenoειδή κυστικά καρκινώματα, τα λεμφώματα και τα σαρκώματα, καθώς και οι καλοήθεις όγκοι του πνεύμονα είναι σπάνιοι. Για αυτούς απαιτείται διαφορετική θεραπεία από τους υπόλοιπους.
- Καρκίνοι που κάνουν μετάσταση στους πνεύμονες: Οι καρκίνοι που ξεκινούν από άλλα όργανα (όπως το στήθος, το πάγκρεας, τα νεφρά ή το δέρμα) μπορεί μερικές φορές να κάνουν μετάσταση στους πνεύμονες. Η θεραπεία για τον μεταστατικό καρκίνο στους πνεύμονες βασίζεται στην περιοχή του πρωτογενούς καρκίνου.⁵⁴



Εικόνα 4.2: Απεικόνιση του φυσιολογικού πνεύμονα, του πνεύμονα με καρκίνο στα αρχικά στάδια και του πνεύμονα με καρκίνο σε προχωρημένο στάδιο.⁵⁵

4.3 Θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο του πνεύμονα

Ανάλογα τον τύπο του καρκίνου, το ποσοστό εξάπλωσης και το ιατρικό ιστορικό του ατόμου αποφασίζεται η κατάλληλη θεραπεία για την αντιμετώπιση της ασθένειας. Αυτή μπορεί να είναι χειρουργική επέμβαση, σε περίπτωση αρχικού σταδίου εάν δεν υπάρχει μετάσταση, ακτινοθεραπεία ή χημειοθεραπεία για τη συρρίκνωση του όγκου, στοχευμένη θεραπεία ή ανοσοθεραπεία.⁵¹

4.4 Στοχευμένη θεραπεία

Σε περίπτωση αλλαγής στο DNA του όγκου, η θεραπεία που χρησιμοποιείται είναι διαφορετική. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να είναι μεταλλάξεις, προσθήκες, αναδιατάξεις

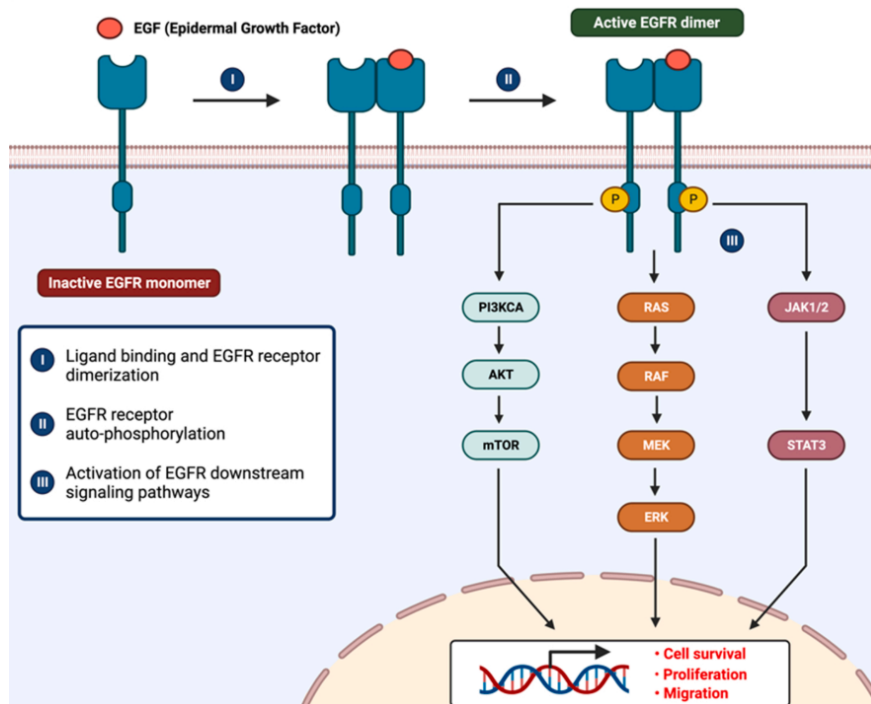
ή διαγραφές στην αλληλουχία του DNA και εντοπίζονται μέσω δοκιμών με βιοδείκτες. Οι θεραπείες αυτές επικεντρώνονται στην αντιμετώπιση αυτών των αλλαγών άμεσα, στοχεύοντας στη βλάβη των καρκινικών κυττάρων, δίχως να σκοτώνουν ταυτόχρονα και τα φυσιολογικά υγιή κύτταρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, λιγότερες παρενέργειες στον ασθενή. Ωστόσο, η στοχευμένη θεραπεία δεν επιλέγεται σε κάθε περιστατικό, καθώς πρέπει να εξεταστεί η κάθε περίπτωση ξεχωριστά ώστε η θεραπεία να επιφέρει και τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Υπάρχουν εγκεκριμένες από τον FDA στοχευμένες θεραπείες για όγκους καρκίνου του πνεύμονα που εμφανίζουν δράση σε αλλαγές στους EGFR, ALK, ROS-1, NTRK, MET, RET, BRAF V600E.⁵⁶

4.5 Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor – EGFR)

Η οικογένεια των υποδοχέων ErbB αποτελείται από τέσσερα μέλη: τον EGFR/ ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 και ErbB4/HER4. Ο EGFR ήταν ο πρώτος υποδοχέας από την οικογένεια ErbB που ταυτοποιήθηκε το 1970 και αμέσως μετά αναγνωρίστηκε η δραστηριότητά του. Οι υποδοχείς ErbB συνδέθηκαν με τον καρκίνο στον άνθρωπο όταν ο ιός όγκου ερυθροβλάστωσης των πτηνών βρέθηκε ότι κωδικοποιεί μια μορφή του EGFR πριν από περίπου 30 χρόνια. Ακόμη, η ενεργοποίηση των υποδοχέων ErbB συνδέεται με πολλές πρωτεΐνες σηματοδότησης επομένως ελέγχει πολλές σηματοδοτικές οδούς.⁵⁷

4.5.1 Δομή του EGFR

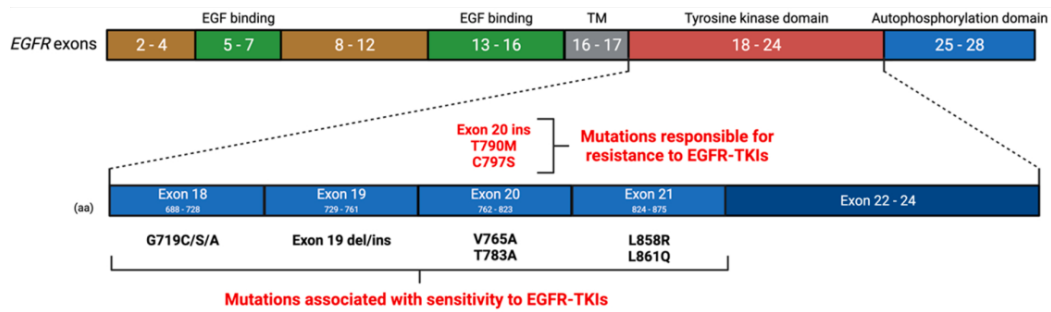
Ο EGFR είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η εξωκυττάρια περιοχή (622 αμινοξέα) έχει δύο περιοχές πλούσιες σε κυστεΐνη υπεύθυνες για την πρόσδεση του σήματος. Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από ένα πεπτίδιο με α έλικες 23 καταλοίπων. Η ενδοκυτταρική περιοχή αποτελείται από 542 αμινοξέα και έναν πυρήνα πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης 250 αμινοξέων καταλήγοντας σε μια C τελική περιοχή 229 καταλοίπων με ρυθμιστικά κατάλοιπα τυροσίνης. Η ενεργοποίηση του EGFR ξεκινά με την πρόσδεση της πρωτεΐνης EGF (σήμα) στον υποδοχέα EGFR εξωκυτταρικά οδηγώντας στο διμερισμό του EGFR. Ο διμερισμός έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης του EGFR και την αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων του υποδοχέα στο κυτταροπλασματικό τμήμα. Στη συνέχεια, η αλληλεπίδραση των θέσεων αυτοφωσφορυλίωσης με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σηματοδότησης οδηγεί στο σχηματισμό μεγάλων συμπλόκων σηματοδότησης τα οποία ενεργοποιούν σηματοδοτικές οδούς για τη διαβίβαση του σήματος έως τον πυρήνα και τον έλεγχο κυτταρικών διεργασιών όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαίρεση και η απόπτωση των κυττάρων.⁵⁷



Εικόνα 4.5.1: Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του EGFR και των σηματοδοτικών οδών που συμμετέχει.⁵⁸

4.5.2 EGFR και καρκίνος του πνεύμονα

Η καρκινογένεση έχει συνδεθεί με τον EGFR καθώς η υπερέκφρασή του και μεταλλάξεις στο γονιδιόμά του έχουν εντοπιστεί σε διάφορους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, με κυριότερο τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).⁵⁹ Η περιοχή τυροσινικής κινάσης στον EGFR κωδικοποιείται από τα εξόνια 18 έως 24. Οι δύο συνηθέστεροι τύποι μεταλλάξεων είναι η μετάλλαξη L858R στο εξόνιο 21 κατά την οποία γίνεται υποκατάσταση της λευκίνης στο κωδικόνιο 858 από αργινίνη και η διαγραφή του εξονίου 19. Οι δύο αυτές μεταλλάξεις αποτελούν το 90% περίπου του συνόλου των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στον EGFR στον NSCLC. Οι μεταλλάξεις αυτές αφού διαγνωστούν και εντοπιστούν αντιμετωπίζονται με αναστολείς EGFR-τυροσινικής κινάσης (TKIs) 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς, οι οποίες θα γνωστοποιηθούν στην επόμενη ενότητα όπου θα αναλυθούν εκτενώς. Μάλιστα, μετά από κλινικές δοκιμές η θεραπεία αυτή έδειξε υψηλά ποσοστά (60 - 80%) ανταπόκρισης στις μεταλλάξεις, τα οποία ήταν διπλάσια από αυτά της χημειοθεραπείας. Μία άλλη μετάλλαξη που συναντάται στον EGFR είναι η T790M στο εξόνιο 20 κατά την οποία γίνεται υποκατάσταση της μεθειονίνης στο κωδικόνιο 790 από θρεονίνη. Η μετάλλαξη αυτή είναι γνωστή ως «gate keeper» και ευθύνεται σε ποσοστό 30-60% για την εμφάνιση δευτερογενών μεταλλάξεων EGFR σε ασθενείς με NSCLC. Με άλλα λόγια, εμφανίζεται σε ασθενείς με NSCLC που παρουσίασαν αντίσταση τους EGFR-TKIs 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς ή σε ασθενείς με NSCLC που δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία με EGFR-TKIs. Η μετάλλαξη αυτή οδήγησε στην ανακάλυψη μιας 3^{ης} γενιάς αναστολέων EGFR για την αποτελεσματική θεραπεία της.⁶⁰ Οι «άτυπες» μεταλλάξεις του EGFR περιλαμβάνουν τις μεταλλάξεις G719X (~3%), L861Q (~1%), S768I (~1%) και εισαγωγές στο εξόνιο 20 (~6%).⁵⁸



Εικόνα 4.4.2: Δομή του γονιδίου του EGFR, μεταλλάξεις στα αντίστοιχα εξόνια και κατηγοριοποίησή τους ανάλογα την αντίστασή τους στους EGFR-TKIs.⁵⁸

Παρακάτω φαίνονται μερικοί από τους εγκεκριμένους αναστολείς EGFR για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα και το στάδιο του καρκίνου που έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν:

- Afatinib (εγκεκριμένο για καρκίνο του πνεύμονα σταδίου 4)
- Dacomitinib (εγκεκριμένο για καρκίνο του πνεύμονα σταδίου 4)
- Erlotinib (εγκεκριμένο για καρκίνο του πνεύμονα σταδίου 4)
- Gefitinib (εγκεκριμένο για καρκίνο του πνεύμονα σταδίου 4)
- Osimertinib (εγκεκριμένο για καρκίνο του πνεύμονα σταδίου 1-4)⁶¹

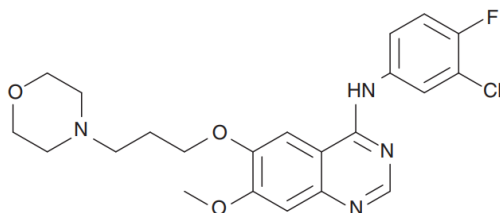
Ανάλογα την αναστολή της μετάλλαξης και το τρόπο σύνδεσης με το υπόστρωμα, οι EGFR-TKIs κατηγοριοποιούνται σε γενιές.

4.6 Αναστολείς EGFR πρώτης γενιάς

Οι αναστολείς αυτοί είναι χαμηλού μοριακού βάρους και συνδέονται αναστρέψιμα με το υπόστρωμα αναστέλλοντας την ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση του EGFR. Η ανάπτυξή τους ξεκίνησε πριν την ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταλλάξεων και μέχρι σήμερα υπάρχουν εγκεκριμένοι τρεις EGFR-TKIs πρώτης γενιάς: το Gefitinib, το Erlotinib και το Icotinib.⁵⁸

4.6.1 Gefitinib

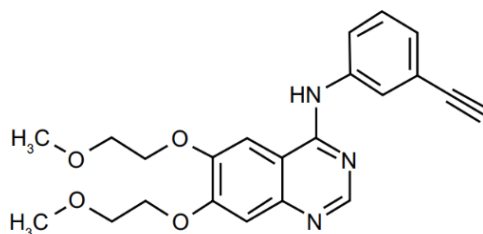
Το Gefitinib προτάθηκε από την εταιρεία AstraZeneca ως θεραπεία ασθενών με NSCLC σε προχωρημένο στάδιο. Μελέτες έδειξαν ότι παρουσιάζει βελτίωση του PFS (Progression-free survival), δηλαδή του χρόνου κατά τον οποίο ο ασθενής ζει με την ασθένεια χωρίς αυτή να επιδεινώνεται, από 6,3 μήνες σε 9,5 μήνες έναντι εναλλακτικών θεραπειών. Αυτό οδήγησε στην έγκριση του φαρμάκου τόσο από τον FDA όσο και από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Ιατρικής (EMA) ως θεραπεία σε προχωρημένο ή μεταστατικό NSCLC με μεταλλάξεις στον EGFR.⁵⁸



Εικόνα 4.6.1: Η χημική δομή του Gefitinib.⁶²

4.6.2 Erlotinib

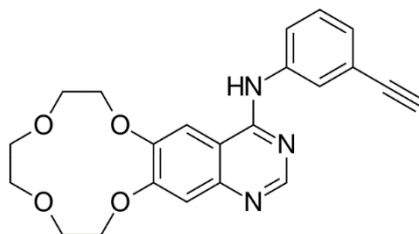
Το Erlotinib προτάθηκε από την εταιρεία F. Hoffman-La Roche. Παρουσίασε σημαντικά αποτελέσματα στο PFS έναντι της χημειοθεραπείας με πλατίνα μειώνοντας την τοξικότητα της θεραπείας. Έτσι, εγκρίθηκε από τον FDA και τον EMA ως θεραπεία για προχωρημένο/μεταστατικό NSCLC με μεταλλάξεις στον EGFR.⁵⁸



Εικόνα 4.6.2: Η χημική δομή του Erlotinib.⁶³

4.6.3 Icotinib

Το Icotinib προτάθηκε από την εταιρεία Zhejiang Beta Pharmaceutical Co Ltd. Αρχικά εγκρίθηκε από την Εθνική Υπηρεσία Ιατρικών Προϊόντων της Κίνας (CNMPA) εφόσον αποδείχθηκε ότι παρουσιάζει παρόμοια δράση με το Gefitinib με λιγότερες όμως παρενέργειες. Έτσι, η CNMPA επέκτεινε την έγκριση του Icotinib ώστε να χρησιμοποιείται ευρέως ως θεραπεία ασθενών με προχωρημένο/μεταστατικό NSCLC με μεταλλάξεις στον EGFR.⁵⁸



Εικόνα 4.6.3: Η χημική δομή του Icotinib.⁵⁸

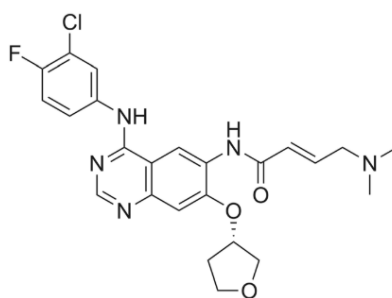
4.7 Αναστολείς EGFR δεύτερης γενιάς

Παρά τα θετικά αποτελέσματα που παρουσίαζαν οι EGFR-TKIs της 1^{ης} γενιάς, οι ασθενείς με NSCLC που υποβλήθηκαν σε αυτή εμφάνιζαν αντοχή στις ενώσεις αυτές

λόγω της εμφάνισης μιας δευτερογενούς μετάλλαξης, της EGFR-T790M. Η ανάγκη αναστολής αυτής της μετάλλαξης οδήγησε στην ανακάλυψη μιας δεύτερης γενιάς EGFR-TKIs με περισσότερα πλεονεκτήματα αυτή τη φορά. Συγκεκριμένα, οι αναστολείς αυτοί παρουσιάζουν αύξηση στην αναστολή λόγω της μη αναστρέψιμης πρόσδεσης με το υπόστρωμα της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης και μεγαλύτερη δράση καθώς αναστέλλουν αποτελεσματικά όλη την οικογένεια υποδοχέων ErbB (pan-ErbB). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι εγκεκριμένοι αναστολείς Afatinib και Dacomitinib για τη θεραπεία του προχωρημένου/μεταστατικού NSCLC.⁵⁸

4.7.1 Afatinib

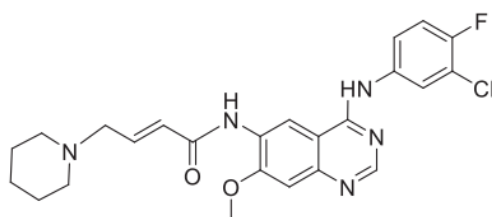
Το Afatinib προτάθηκε από την εταιρεία Boehringer Ingelheim και ήταν ο πρώτος μη αναστρέψιμος αναστολέας του EGFR 2^{ης} γενιάς που εγκρίθηκε για τη θεραπεία προχωρημένου/μεταστατικού NSCLC με μεταλλάξεις στον EGFR. Μετά από μελέτες και συγκρίσεις με χημειοθεραπεία με cisplatin-remetrexed και cisplatin-gemcitabine αποδείχθηκε ότι το Afatinib είχε αξιόλογα αποτελέσματα πετυχαίνοντας μεγαλύτερο PFS. Ακόμη, παρουσίασε ικανοποιητική αναστολή σε ασθενείς που φέρουν άτυπες μεταλλάξεις EGFR όπως L861Q, G719X ή S768I.⁵⁸



Εικόνα 4.7.1: Η χημική δομή του Afatinib.⁶⁴

4.7.2 Dacomitinib

Το Dacomitinib προτάθηκε από την εταιρεία Pfizer και εγκρίθηκε από τον EMA και τον FDA για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο/μεταστατικό NSCLC με μεταλλάξεις στον EGFR. Μέσα από μελέτες διαπιστώθηκε ότι έχει αποτελεσματικότητα σε μεταλλάξεις που ενεργοποιούν τον EGFR σε σύγκριση με το Erlotinib, ενώ ακόμη είχε οφέλη στο PFS σε σύγκριση με το Gefitinib αν και με περισσότερες παρενέργειες. Μελέτες στην Κίνα και την Ιαπωνία απέδειξαν ότι το Dacomitinib είναι πιο δραστικό στις εγκεφαλικές μεταστάσεις από ότι οι αναστολείς 1^{ης} γενιάς ωστόσο λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων για μελέτες, η αποτελεσματικότητά του σε βλάβες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια.⁵⁸



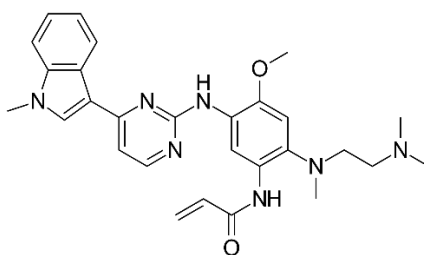
Εικόνα 4.7.2: Η χημική δομή του Dacomitinib.⁶⁵

4.8 Αναστολείς EGFR τρίτης γενιάς

Παρόλο που η 2^η γενιά αναστολέων σχεδιάστηκε για να αντιμετωπίζει τη μετάλλαξη T790M, η δόση που απαιτείται από τις ενώσεις αυτές για τη θεραπεία των ασθενών είναι αρκετά τοξική. Αυτό οδήγησε στην ανακάλυψη μιας 3^{ης} γενιάς EGFR-TKIs που φέρουν σημαντικά αποτελέσματα έναντι της T790M σχηματίζοντας ένα μη αναστρέψιμο δεσμό με το μεταλλαγμένο υπόστρωμα. Οι αναστολείς αυτής της κατηγορίας που έλαβαν έγκριση είναι το Osimertinib και το Almonertinib.⁵⁸

4.8.1 Osimertinib

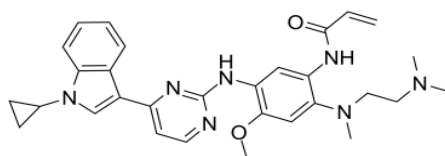
Το Osimertinib προτάθηκε από την εταιρεία AstraZeneca και εγκρίθηκε από τον EMA και τον FDA ως ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας του EGFR για τον NSCLC. Εμφάνισε αναστολή των μεταλλάξεων του EGFR, συμπεριλαμβανομένης και της μετάλλαξης T790M που εμφάνιζαν ασθενείς που ακολουθούσαν θεραπεία με EGFR-TKIs 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς. Το Osimertinib παρουσίασε μεγαλύτερο PFS σε σχέση με τη χημειοθεραπεία με πλατίνα (cisplatin/carboplatin και pemetrexed) και παρά το μεγάλο χρονικό διάστημα έκθεσης των ασθενών σε αυτό, οι παρενέργειες μειώθηκαν συγκριτικά με αυτές των EGFR-TKIs 1^{ης} γενιάς. Τέλος, σημαντικό ρόλο έπαιξε και στις βλάβες του ΚΝΣ καθώς παρουσίασε σημαντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις.⁵⁸



Εικόνα 4.8.1: Η χημική δομή του Osimertinib.⁵⁸

4.8.2 Almonertinib

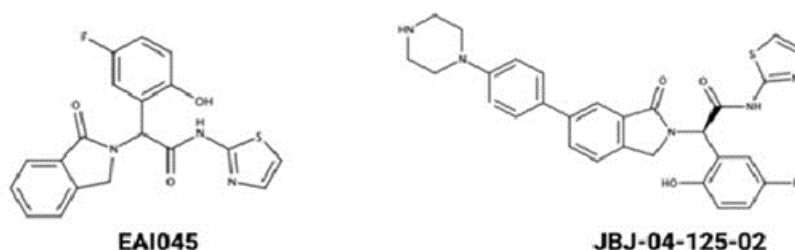
Το Almonertinib προτάθηκε από τη εταιρεία Hansoh Pharmaceutical Group και εγκρίθηκε ως αναστολέας 3^{ης} γενιάς του EGFR και συγκεκριμένα της μετάλλαξης EGFR-T790M. Παρουσίασε αύξηση του PFS και λιγότερο τοξικό προφίλ για τους ασθενείς με NSCLC. Επίσης, έδειξε αποτελεσματική δράση σε θεραπείες για τις μεταστάσεις στο ΚΝΣ.⁵⁸



Εικόνα 4.8.2: Η χημική δομή του Almonertinib.⁵⁸

4.9 Αναστολείς EGFR τέταρτης γενιάς

Παρά την έγκριση 3^{ov} γενιών αναστολέων για την αντιμετώπιση πρωτογενών ή δευτερογενών μεταλλάξεων του EGFR στον NSCLC, υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης μιας τριτογενούς μετάλλαξης εντός διαστήματος ενός έτους, της EGFR-C797S. Έτσι, αναπτύχθηκε μια 4^η γενιά αναστολέων ιδιαίτερα εκλεκτικών, οι οποίοι βρίσκονται σε προ κλινικό στάδιο. Οι αναστολείς αυτοί ονομάζονται αλλοστερικοί επειδή στοχεύουν στην αλλοστερική θέση του EGFR μακριά από τη θέση δέσμευσης του ATP. Ο πρώτος αλλοστερικός αναστολέας είναι το EAI045 και στοχεύει αποτελεσματικά στις μεταλλάξεις EGFR-T790M και EGFR-C797S. Το JBJ-04-125-02 είναι ένας ακόμα αλλοστερικός αναστολέας πιο δραστικός από το EAI045 για τις μεταλλάξεις L858R/T790M/ C797S. Μελέτες αναφέρουν πως ο συνδυασμός ενός κλασικού EGFR-TKI με έναν αλλοστερικό EGFR αναστολέα θα μπορούσε να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και να αποτρέψει την εμφάνιση νέας μετάλλαξης.⁵⁸

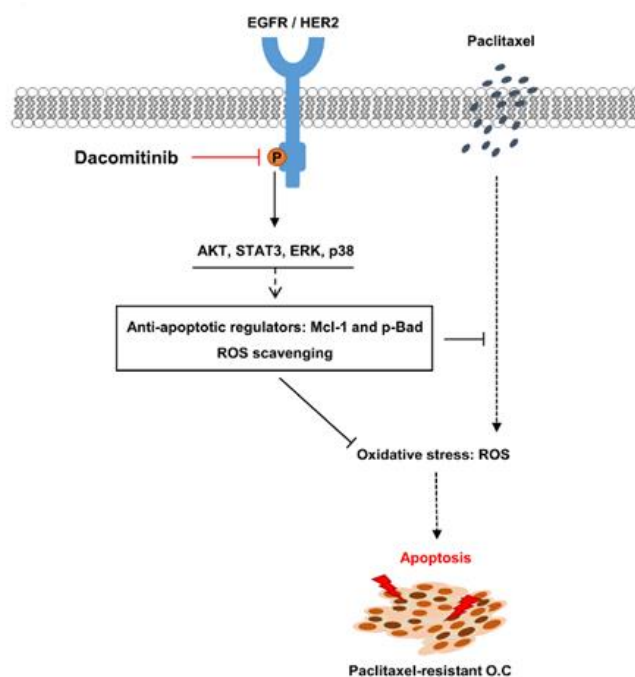


Εικόνα 4.9: Η χημική δομή των αλλοστερικών αναστολέων EAI045 και JBJ-04-125-02.⁵⁸

4.10 Το Dacomitinib ως αναστολέας του EGFR 2^{ης} γενιάς

Το Dacomitinib, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι ένας αναστολέας pan-HER, με δράση κυρίως στον EGFR, HER2 και HER4, 2^{ης} γενιάς που αναπτύχθηκε από την Pfizer.^{66,67} Εγκρίθηκε για πρώτη φορά παγκοσμίως από τον FDA στις ΗΠΑ στις 27 Σεπτεμβρίου 2018 ως θεραπεία πρώτης γραμμής ασθενών με προχωρημένο/ μεταστατικό NSCLC με μεταλλάξεις στον EGFR (διαγραφή εξονίου 19, L858R στο εξόνιο 20 ή T790M).⁶⁶ Πιο συγκεκριμένα, είναι δραστικό στις μεταλλάξεις del19 και L858R ενώ πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν ικανοποιητική δράση του για τη δευτερογενή μετάλλαξη T790M.⁶⁷ Χορηγείται σε μορφή χαπιού (από του στόματος

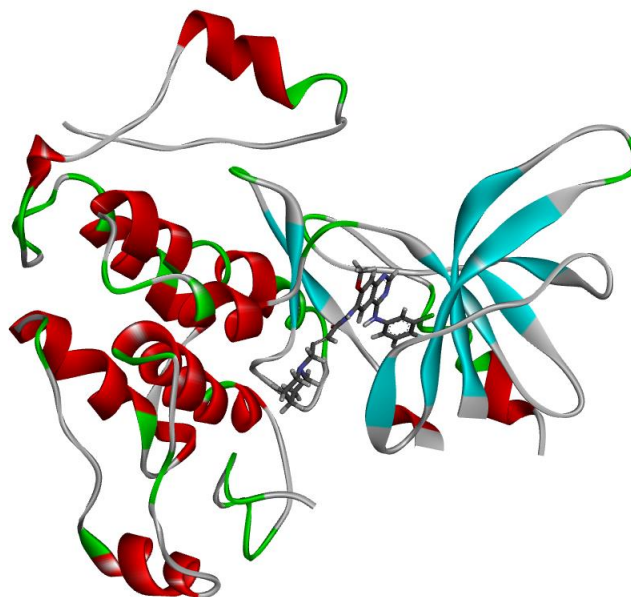
θεραπεία) και διατίθεται εμπορικά με την ονομασία Vizimpro. Λαμβάνεται μία φορά την ημέρα με ή χωρίς τροφή, με συνιστώμενη αρχική δόση τα 45 mg. Η θεραπεία διαρκεί μέχρι την παρατήρηση εξέλιξης στην νόσο ή διακόπτεται άμεσα σε περίπτωση εμφάνισης τοξικών παρενεργειών.⁶⁶ Τέτοιες μπορεί να είναι η διάρροια ή κάποιο δερματικό εξάνθημα που μοιάζει με ακμή, παρόμοιες με αυτές άλλων αναστολέων.³⁹ Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το Dacomitinib συνδέεται με την ανενεργή διαμόρφωση του EGFR ή του HER2, δηλαδή όταν η υποδοχική τυροσινική κινάση υφίσταται με τη μορφή του μονομερούς αναστέλλοντας τη δράση της.⁶⁸ Εκτός από τις πρωτεΐνες της οικογένειας ErbB αναστέλλει επίσης το ρόλο πολλών σηματοδοτικών πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων οι AKT, STAT3, ERK και p38 εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωσή τους όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.⁶⁸



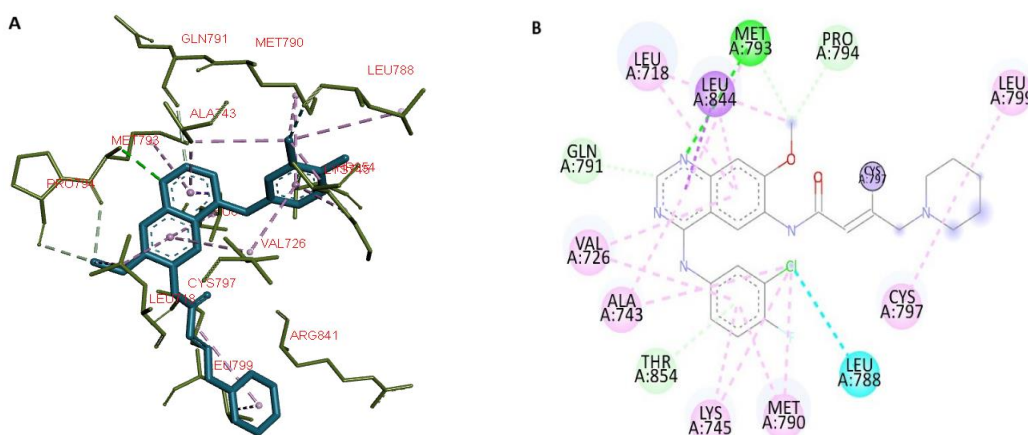
Εικόνα 4.9: Αναστολή σηματοδοτικών πρωτεϊνών από το Dacomitinib.⁶⁸

Μελέτες φάσης III έδειξαν μεγαλύτερο PFS σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με Dacomitinib σε σύγκριση με το Erlotinib.⁶⁷ Ακόμη, κλινικές δοκιμές φάσης II ερευνούν την αποτελεσματικότητα του Dacomitinib σε άλλους τύπους καρκίνου όπως διάφορα καρκινώματα του δέρματος, του οισοφάγου, καρκίνο του στομάχου και γλοιοβλάστωμα.⁶⁶ Όσον αφορά τη δομή του, έχει μικρό μοριακό βάρος <500 (όπως προβλέπει ο εμπειρικός κανόνας των 5 του Lipinski για μόρια αναστολέων) και η ισχυρή ανασταλτική του δράση οφείλεται στη μη αναστρέψιμη σύνδεσή του με τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα του αναστολέα με τον EGFR που έχει υποστεί μετάλλαξη T790M, έδειξαν πως το Dacomitinib σχηματίζει σημαντικούς δεσμούς με την ανενεργή διαμόρφωση της κινάσης. Το άζωτο στη θέση 1 της κιναζολίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την αμινομάδα (-NH) της μεθειονίνης (Met793).⁶⁹ Δημιουργούνται, ακόμη, αλληλεπιδράσεις με αρκετά αμινοξέα που προκαλούνται από το νερό, όπως ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του αζώτου της ανιλίνης και των αμινοξέων Asn842 και Asp855.^{39,69} Τέλος, και πιο σημαντικό, η ομάδα 4-πιπεριδιν-1-υλ-βουτ-2-εναμιδίου στη θέση 6 της 4-ανιλνοκιναζολίνης δρα ως δέκτης Michael και συνδέεται με το θείο της κυστεΐνης στη θέση 797 (Cys797) του EGFR

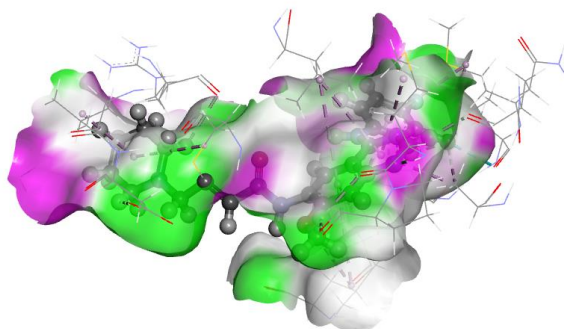
σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό και αναστέλλοντας μη αναστρέψιμα το ρόλο της κινάσης.⁶⁹ Ο τρόπος δέσμευσης και οι αλληλεπιδράσεις του Dacomitinib (όπως περιγράφηκαν παραπάνω) στην περιοχή κινάσης EGFR που έχει υποστεί μετάλλαξη T790M (pdb: 4I24) απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 4.10i: Κρυσταλλογραφική δομή του EGFR με το Dacomitinib. Στο μόριο του αναστολέα οι ανθρακικές αλυσίδες παρουσιάζονται με γκρι χρώμα, τα άτομα οξυγόνου με κόκκινο, τα άτομα αζώτου με μπλε, το άτομο φθορίνιο με ανοιχτό μπλε, το άτομο χλωρίνιο με πράσινο και τέλος, τα υδρογόνα με λευκό.



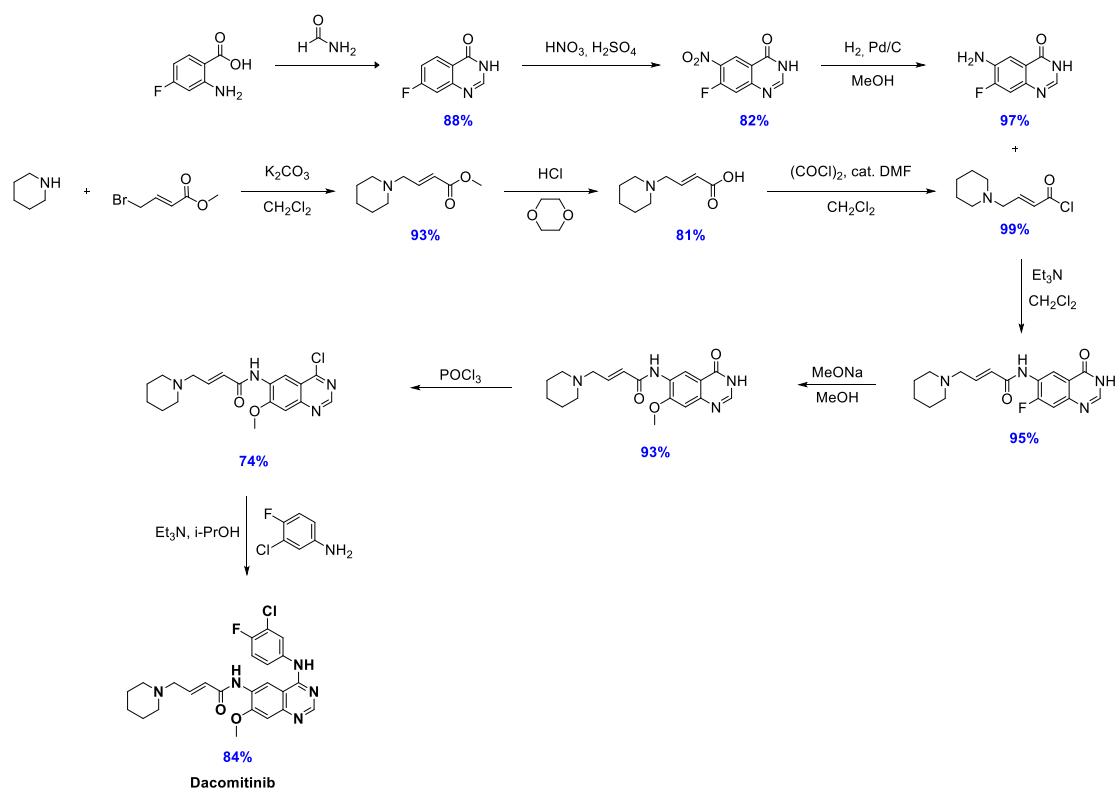
Εικόνα 4.10ii: A) Τρισδιάστατη κρυσταλλογραφική απεικόνιση του Dacomitinib με τις αλληλεπιδράσεις του με τα αμινοξέα του EGFR. B) Οι δισδιάστατες αλληλεπιδράσεις του Dacomitinib με τον EGFR. Φαίνεται η ομοιοπολική σύνδεση με το κατάλοιπο Cys797, ο δεσμός υδρογόνου του N1 του κινολινικού δακτυλίου με την Met793, δεσμός αλογόνου του Cl με τη Leu788, αλληλεπιδράσεις C-H με Pro794 και Gln791 και διάφορες πάλκνλ αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 4.10iii: Σχηματική απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζει το Dacomitinib με τα αμινοξέα του EGFR. Οι δέκτες δεσμών υδρογόνου εμφανίζονται με πράσινο και οι δότες με μωβ χρώμα.

4.11 Ολική πορεία σύνθεσης Dacomitinib

Η πρώτη πορεία σύνθεσης του αναστολέα Dacomitinib είναι μία συγκλίνουσα πορεία 10 σταδίων, η οποία φαίνεται αναλυτικά με τις αποδόσεις παρακάτω.

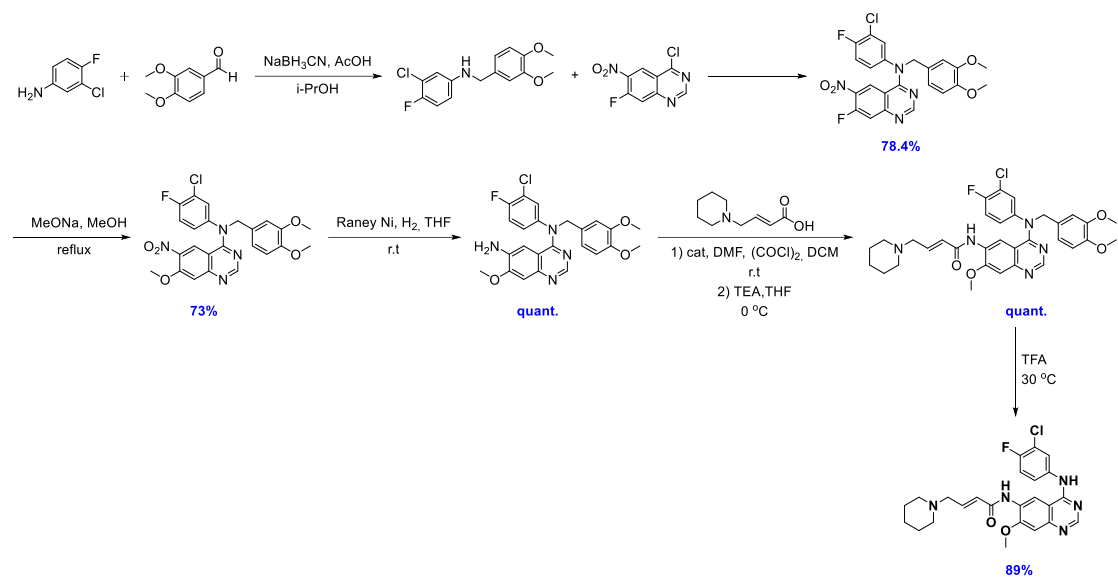


Εικόνα 4.11i: Η πατέντα του Dacomitinib [CN103304492A].

Ωστόσο, η πορεία αυτή γρήγορα τροποποιήθηκε σε μία συνθετική μέθοδο 8 σταδίων πραγματοποιώντας τις εξής αλλαγές:

- Η αντίδραση σχηματισμού της 7-φθόροκιναζολιν-4-(3H)-όνης πραγματοποιήθηκε με φορμαμίδίνη αντί φορμαμίδιου σε διαλύτη 2-μεθόξυαιθανόλη αυξάνοντας την απόδοση της αντίδρασης στο 90%.
- Στη συνέχεια έγινε νίτρωση του υποστρώματος στη θέση 6 με μίγμα $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, η οποία ακολουθήθηκε από χλωρίωση χρησιμοποιώντας SOCl_2 και καταλυτική ποσότητα DMF, αντί του POCl_3 .
- Έπειτα, έγινε μια πυρηνόφιλη υποκατάσταση μεταξύ της 4-χλωρο-7-φθορο-6-νιτροκιναζολίνης και της 3-χλώρο-4-φθόροανιλίνης χρησιμοποιώντας Et_3N σε διαλύτη ισοπροπανόλη, αντί CH_2Cl_2 , η οποία σε θερμοκρασία δωματίου έδωσε το επιθυμητό προϊόν σε απόδοση 91%.
- Ακολούθησε μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης του φθορίου στη θέση 7 από μεθόξυ ομάδα χρησιμοποιώντας MeOH , NaH σε διαλύτη THF, η οποία ακολουθήθηκε από μια αντίδραση αναγωγής της νίτροσε άμινο- ομάδας με αέριο H_2 , καταλύτη Ni σε διαλύτη THF, αντί του Pd/C σε διαλύτη MeOH της αρχικής πατέντας.
- Η αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού μεταξύ της N^4 -(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ)-7-μεθοξυκιναζολινο-4,6-διαμίνης και του (E)-4-βρωμοβουτ-2-ενοϊκού οξέος πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο χρησιμοποιώντας $(\text{COCl})_2$, καταλυτική ποσότητα DMF σε διαλύτη CH_2Cl_2 αρχικά, τα οποία σε θερμοκρασία δωματίου μετατρέπουν το οξύ στο αντίστοιχο χλωρίδιο, το οποίο στη συνέχεια συμμετέχει σε μια πυρηνόφιλη υποκατάσταση με την N^4 -(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ)-7-μεθοξυκιναζολινο-4,6-διαμίνη χρησιμοποιώντας Et_3N σε διαλύτη THF στους 0°C δίνοντας το επιθυμητό προϊόν.
- Η πορεία σύνθεσης ολοκληρώθηκε μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης του (E)-4-βρωμο-N-(4-((3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ)(3,4-διμεθοξυβενζυλ)αμινο)-7-μεθοξυκιναζολιν-6-υλ)βουτ-2-εναμίδιου και της πιπεριδίνης χρησιμοποιώντας Et_3N σε διαλύτη DMA στους 0°C που έδωσε το Dacomitinib.⁶⁵

Παρόλα αυτά, λίγα χρόνια αργότερα η ομάδα του Fakhoury πρότεινε μια εναλλακτική βελτιωμένη πορεία σύνθεσης του φαρμάκου 6 σταδίων, που φαίνεται αναλυτικά παρακάτω με τις αποδόσεις κάθε αντίδρασης⁷⁰:



Εικόνα 4.11ii: Η βελτιωμένη πορεία σύνθεσης του Dacomitinib.⁷⁰

Η πορεία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο είναι ένας συνδυασμός των μεθόδων που περιγράφηκαν παραπάνω και όπως θα αναλυθεί παρακάτω έχει τροποποιηθεί σε μερικά συνθετικά στάδια ώστε να επιτευχθεί η σύνθεση των αναλόγων. Η πειραματική πορεία, οι ακριβείς ποσότητες και οι αποδόσεις των επιμέρους αντιδράσεων περιγράφονται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα.

Κεφάλαιο 5

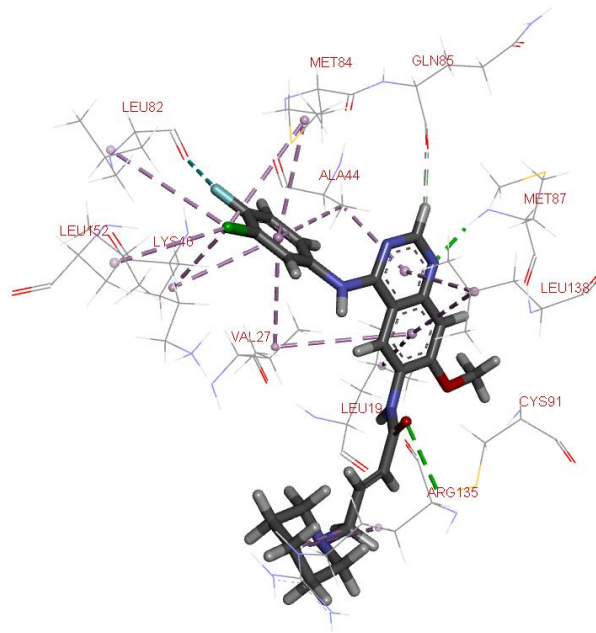
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων του EGFR

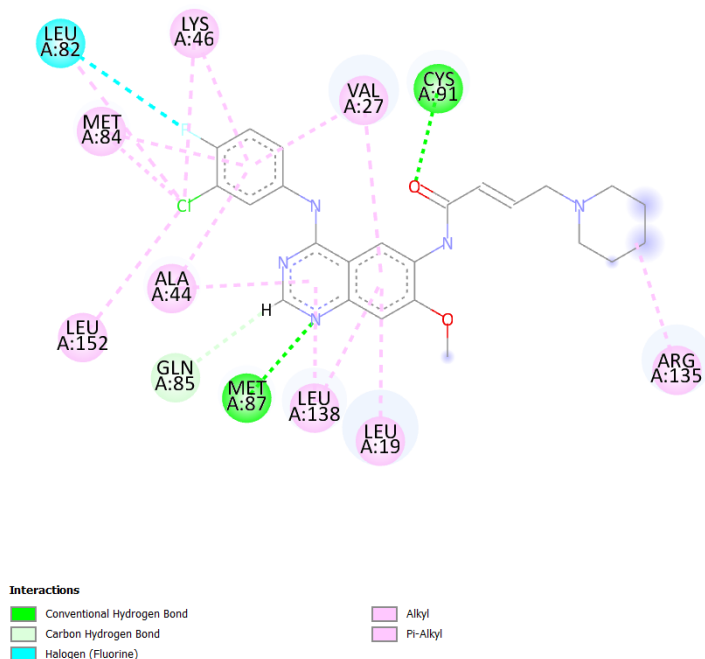
Κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός νέων μορίων μικρού μοριακού βάρους αναλόγων του Dacomitinib, ως εν δυνάμει αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών EGFR/HER2/HER4. Η σύνθεση αυτών των αναλόγων έγινε με σκοπό την αύξηση της δραστηριότητάς τους και της εκλεκτικότητας τους έναντι των EGFR/HER2/HER4 σε σχέση με το Dacomitinib. Το πρώτο βήμα για τη σύνθεση νέων οργανικών βιοδραστικών ενώσεων είναι ο σχεδιασμός τους, δίνοντας έμφαση στα βελτιωμένα τους χαρακτηριστικά, τα οποία θα οδηγήσουν σε αυξημένη δράση έναντι των μορίων-στόχων. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν, αρχικά, μέσω ηλεκτρονικών πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με τη βοήθεια των προγραμμάτων AutoDock Vina, Chimera και Discovery Studio. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων έγινε μοντελοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης EGFR, που έχει υποστεί μετάλλαξη, και στη συνέχεια ακολούθησε ο λογικός σχεδιασμός αναλόγων του Dacomitinib, με βάση το μοριακό σκελετό του φαρμάκου. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, η απομόνωση και η ταυτοποίηση των ενδιαμέσων της πορείας του Dacomitinib. Όλες οι ενδιάμεσες ενώσεις μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών.

5.2 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dacomitinib

Για την εξαγωγή αποτελεσμάτων έγινε μοντελοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης EGFR με το ίδιο το φάρμακο, το Dacomitinib, ως ένωση αναφοράς. Κατά τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης εξαλείφθηκαν τα μόρια νερού από τη κρυσταλλογραφική δομή, προστέθηκαν φορτία όπου αυτό ήταν απαραίτητο, καθώς και τα άτομα υδρογόνου. Τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης στο κάθε ανάλογο πραγματοποιήθηκαν με βάση τη δομή του Dacomitinib και του EGFR. Το ΔG (ελεύθερη ενέργεια Gibbs) για το Dacomitinib με τον EGFR είναι $-9,2$ kcal/mol, σύμφωνα με το AutoDock Vina. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν, φαίνεται πως το Dacomitinib συνδέεται με τον EGFR μέσω δύο δεσμών υδρογόνου. Στην εικόνα 5.2ii, η οποία έχει ληφθεί από πειράματα μοριακής μοντελοποίησης με το πρόγραμμα AutoDock Vina, φαίνεται πως το N στη θέση 1 του κιναζολινικού δακτυλίου (δέκτης) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη Met84. Ο δεύτερος δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ του O του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού (δέκτης) και της Cys91. Ακόμη, σχηματίζεται ένας δεσμός αλογόνου μεταξύ του F και της Leu82, καθώς και αλκυλ και π-αλκυλ αλληλεπιδράσεις λόγω της ύπαρξης σ και π δεσμών των αρωματικών δακτυλίων με αμινοξέα του EGFR. Τέλος, σχηματίζεται ένας δεσμός C-H μεταξύ του H στη θέση 2 του κιναζολινικού δακτυλίου με τη Gln85.



Εικόνα 5.2i: Τρισδιάστατη δομή του Dacomitinib και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.



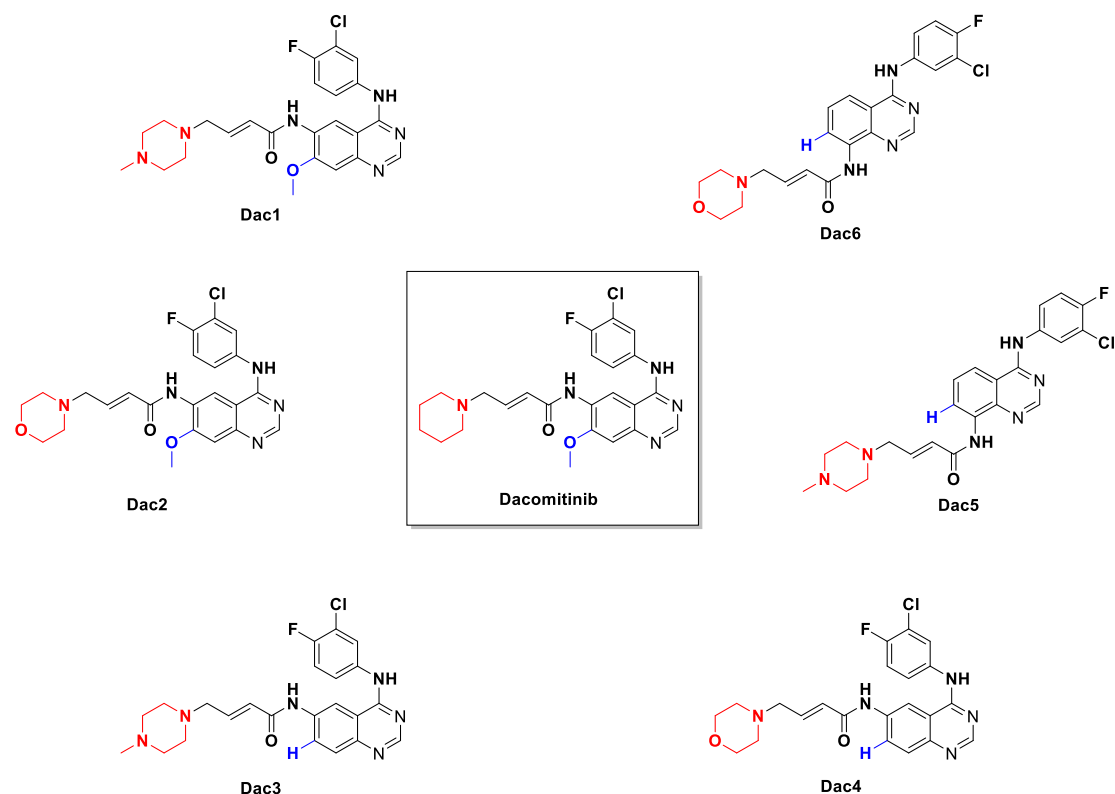
Εικόνα 5.2ii: Δισδιάστατη δομή του Dacomitinib και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

Παρατηρώντας τις αλληλεπιδράσεις και το σκελετό του μορίου είναι ξεκάθαρο πως οι περιοχές με τις περισσότερες αλληλεπιδράσεις πρέπει να διατηρηθούν, όπως επίσης και η α,β ακόρεστη καρβονυλική ένωση καθώς μέσω αυτής επιτυγχάνεται η ομοιοπολική σύνδεση του αναστολέα με την πρωτεϊνική κινάση. Έτσι, διαπιστώνεται

εύκολα πως αφού το τμήμα του πιπεριδινικού δακτυλίου και της μεθόξυ ομάδας εμφανίζουν ελάχιστες ή και καθόλου αλληλεπιδράσεις με την πρωτεϊνική κινάση, αυτές οι δύο περιοχές είναι κατάλληλες για στόχευση των αλλαγών.

5.3 Ανάλογα του Dacomitinib ως εν δυνάμει αναστολείς του EGFR

Σαν πρώτη σκέψη στη σχεδίαση των στοχευμένων τροποποιήσεων είναι η αντικατάσταση του πιπεριδινικού δακτυλίου. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε διαδοχικά η N-μέθυλο πιπεραζίνη και η μορφολίνη διατηρώντας το υπόλοιπο τμήμα του μορίου ανέπαφο με σκοπό την εκδήλωση νέων και ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων με την πρωτεϊνική κινάση. Επιπροσθέτως, η περιορισμένη διαθεσιμότητα του αρχικού αντιδραστήριου (2-άμινο-4-φθοροβενζοϊκό οξύ) σε συνδυασμό με την απουσία αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στη μεθόξυ ομάδα και στον EGFR οδήγησαν στη σχεδίαση αναλόγων από τα οποία η μεθόξυ ομάδα απουσιάζει εντελώς. Για τη σύνθεση τέτοιων αναλόγων είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί διαφορετικό αρχικό υπόστρωμα, όπως θα εξηγηθεί και παρακάτω. Τέλος, η σκέψη για τη σύνθεση αναλόγων χρησιμοποιώντας διαφορετικό ισομερές της υποκατεστημένης κιναζολίνης οδήγησε στο σχεδιασμό δύο επιπλέον αναλόγων, τα οποία θα υποβληθούν σε πειράματα μοριακής μοντελοποίησης για να διαπιστωθεί αν εμφανίζουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τον EGFR. Συμπερασματικά, τα 6 ανάλογα που προτάθηκαν παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα, στο οποίο με διαφορετικό χρώμα υποδεικνύονται οι τροποποιήσεις που έχουν συμβεί στο μόριο.



Σχήμα 5.3: Σχηματική απεικόνιση των αναλόγων του Dacomitinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο.

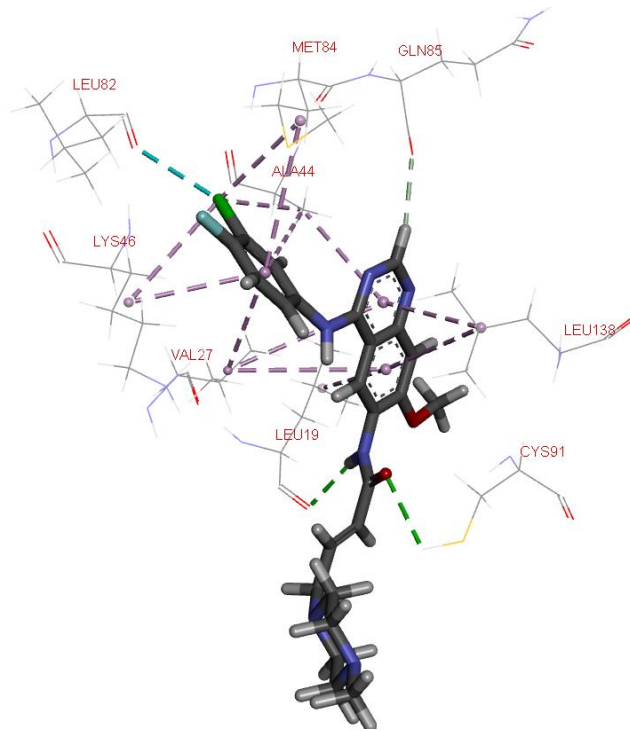
	Τροποποίηση
Dac1	Αντικατάσταση του πιπεριδινικού δακτυλίου από N-μέθυλοπιπεραζίνη
Dac2	Αντικατάσταση του πιπεριδινικού δακτυλίου από μορφολίνη
Dac3	Αντικατάσταση της μεθόξυ ομάδας από υδρογόνο και αντικατάσταση του πιπεριδινικού δακτυλίου από N-μέθυλοπιπεραζίνη
Dac4	Αντικατάσταση της μεθόξυ ομάδας από υδρογόνο και αντικατάσταση του πιπεριδινικού δακτυλίου από μορφολίνη
Dac5	Υποκατάσταση της κιναζολίνης στη θέση 8 και αντικατάσταση του πιπεριδινικού δακτυλίου από N-μέθυλοπιπεραζίνη
Dac6	Υποκατάσταση της κιναζολίνης στη θέση 8 και αντικατάσταση του πιπεριδινικού δακτυλίου από μορφολίνη

Πίνακας 5.3: Περιγραφή της τροποποίησης κάθε αναλόγου ξεχωριστά.

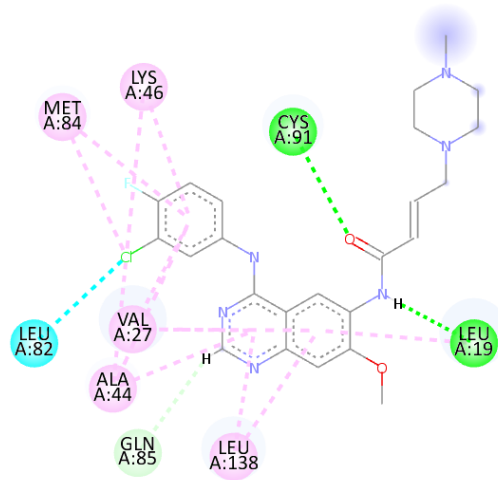
5.4 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για τα ανάλογα του Dacomitinib

5.4.1 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac1

Συγκριτικά με το Dacomitinib, το Dac1 διατηρεί το δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του O του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού (δέκτης) και της Cys91, ενώ ο δεύτερος δεσμός υδρογόνου τώρα σχηματίζεται ανάμεσα στο H του N του αμιδικού δεσμού (δότης) και τη Leu19 αντί για το N στη θέση 1 του κιναζολινικού δακτυλίου (δέκτης) με τη Met84. Ακόμη, ο δεσμός αλογόνου μεταξύ του F και της Leu82 αντικαθίσταται από δεσμό αλογόνου του Cl με τη Leu82. Ο δεσμός C-H μεταξύ του H στη θέση 2 του κιναζολινικού δακτυλίου με τη Gln85 διατηρείται όπως και οι αλκυλ και π-αλκυλ αλληλεπιδράσεις λόγω της ύπαρξης σ και π δεσμών των αρωματικών δακτυλίων με αμινοξέα του EGFR.



Εικόνα 5.4.1i: Τρισδιάστατη δομή του Dac1 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.



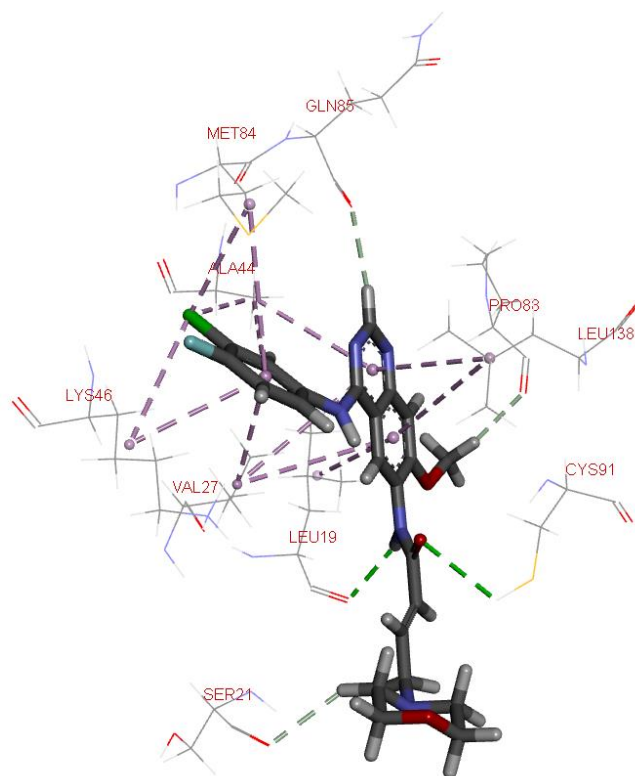
Interactions

■ Conventional Hydrogen Bond	 Alkyl
 Carbon Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl
■ Halogen (Cl, Br, I)	

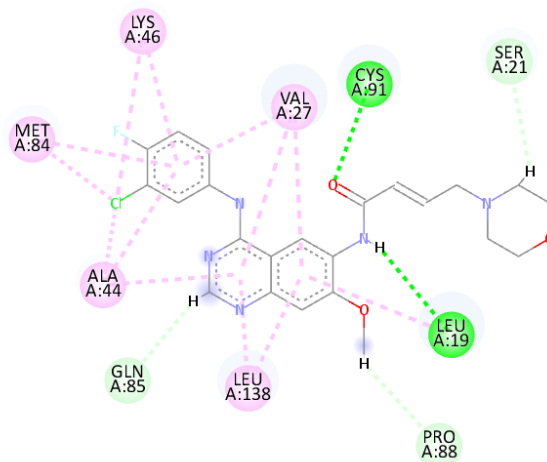
Εικόνα 5.4.1ii: Δισδιάστατη δομή του Dac1 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

5.4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac2

Συγκριτικά με το Dacomitinib, το Dac2 διατηρεί το δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του O του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού (δέκτης) και της Cys91, ενώ ο δεύτερος δεσμός υδρογόνου τώρα σχηματίζεται ανάμεσα στο H του N του αμιδικού δεσμού (δότης) και τη Leu19 αντί για το N στη θέση 1 του κιναζολινικού δακτυλίου (δέκτης) με τη Met84. Ο δεσμός αλογόνου μεταξύ του F και της Leu82 δεν σχηματίζεται όμως σχηματίζονται τρεις δεσμοί C-H. Ο δεσμός C-H μεταξύ του H στη θέση 2 του κιναζολινικού δακτυλίου με τη Gln85 διατηρείται και επιπλέον σχηματίζεται δεσμός C-H ανάμεσα στα H της -CH₃ της μεθύξυ ομάδας με την Pro88 και δεσμός C-H ανάμεσα στο H του πιπεριδινικού δακτυλίου με τη Ser21. Οι αλκυλ και π-αλκυλ αλληλεπιδράσεις λόγω της ύπαρξης σ και π δεσμών των αρωματικών δακτυλίων με αμινοξέα του EGFR διατηρούνται.



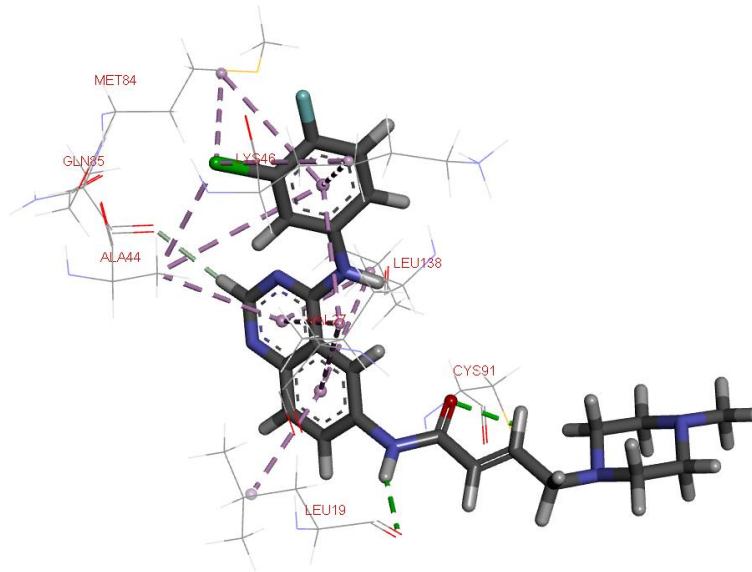
Εικόνα 5.4.2i: Τρισδιάστατη δομή του Dac2 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.



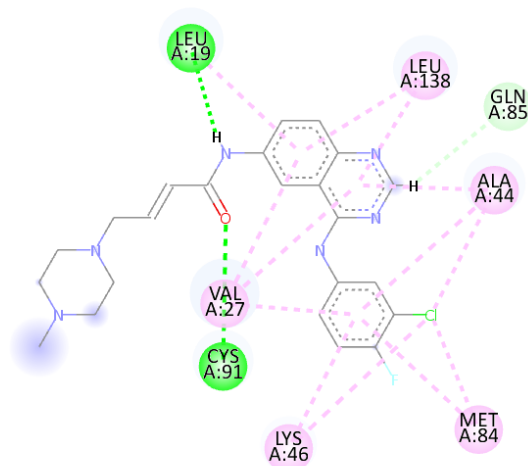
Εικόνα 5.4.2ii: Δισδιάστατη δομή του Dac2 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

5.4.3 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac3

Συγκριτικά με το Dacomitinib, το Dac3 διατηρεί το δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του O του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού (δέκτης) και της Cys91, ενώ ο δεύτερος δεσμός υδρογόνου τώρα σχηματίζεται ανάμεσα στο H του N του αμιδικού δεσμού (δότης) και τη Leu19 αντί για το N στη θέση 1 του κιναζολινικού δακτυλίου (δέκτης) με τη Met84. Ο δεσμός αλογόνου μεταξύ του F και της Leu82 δεν σχηματίζεται. Ο δεσμός C-H μεταξύ του H στη θέση 2 του κιναζολινικού δακτυλίου με τη Gln85 διατηρείται. Επίσης, οι αλκυλ και π-αλκυλ αλληλεπιδράσεις λόγω της ύπαρξης σ και π δεσμών των αρωματικών δακτυλίων με αμινοξέα του EGFR διατηρούνται.



Εικόνα 5.4.3i: Τρισδιάστατη δομή του Dac3 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.



Interactions

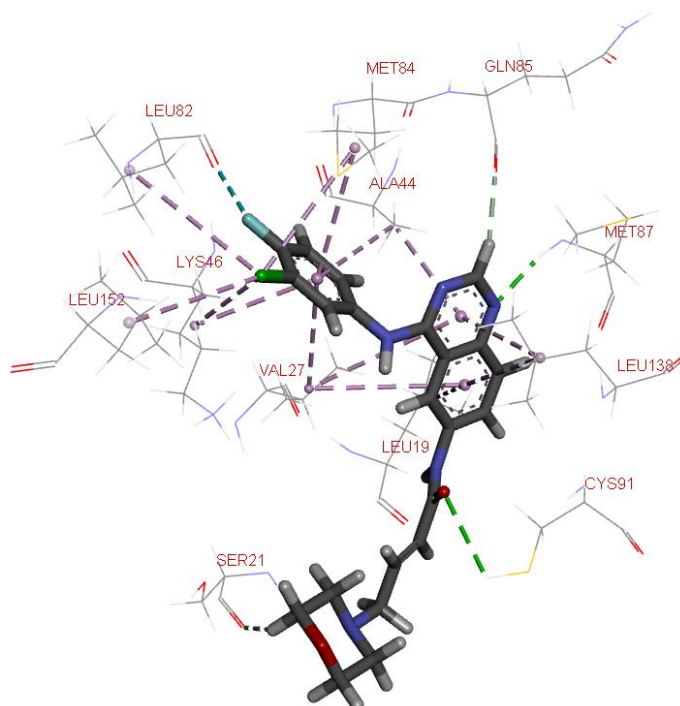
Conventional Hydrogen Bond
Carbon Hydrogen Bond

Alkyl
Pi-Alkyl

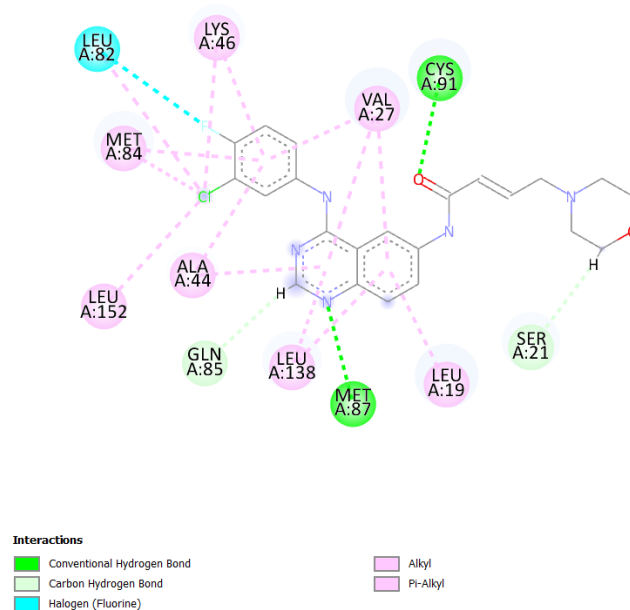
Εικόνα 5.4.3ii: Δισδιάστατη δομή του Dac3 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

5.4.4 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac4

Συγκριτικά με το Dacomitinib, το Dac4 διατηρεί το δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ του Ο του καρβονυλίου του αμιδικού δεσμού (δέκτης) και της Cys91 και το δεύτερο δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται ανάμεσα στο Ν στη θέση 1 του κιναζολινικού δακτυλίου (δέκτης) με τη Met84. Ο δεσμός αλογόνου μεταξύ του F και της Leu82 διατηρείται όμως τώρα σχηματίζονται δύο δεσμοί C-H. Ο δεσμός C-H μεταξύ του Η στη θέση 2 του κιναζολινικού δακτυλίου με τη Gln85 διατηρείται και επιπλέον σχηματίζεται δεσμός C-H ανάμεσα στο Η του πιπεριδινικού δακτυλίου με τη Ser21. Οι αλκυλ και π-αλκυλ αλληλεπιδράσεις λόγω της ύπαρξης σ και π δεσμών των αρωματικών δακτυλίων με αμινοξέα του EGFR επίσης διατηρούνται.



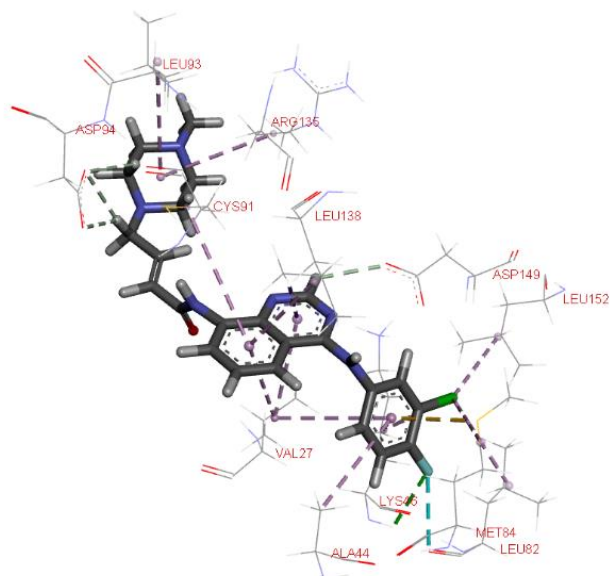
Εικόνα 5.4.4i: Τρισδιάστατη δομή του Dac4 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.



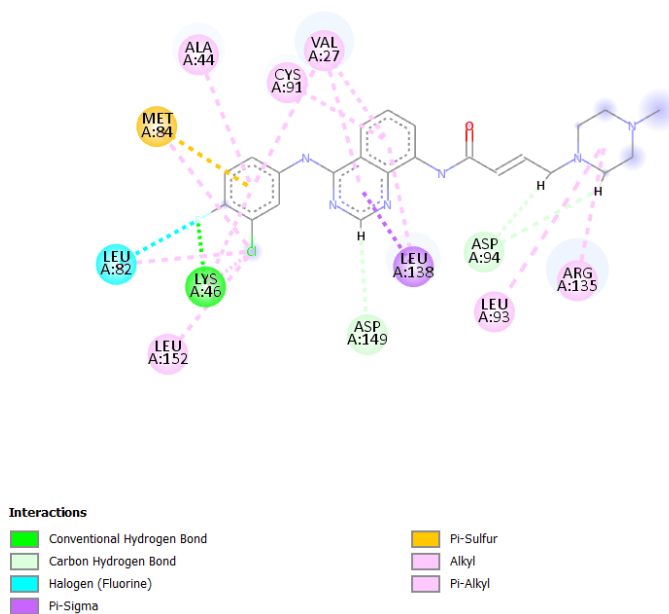
Εικόνα 5.4.4ii: Δισδιάστατη δομή του Dac4 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

5.4.5 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac5

Συγκριτικά με το Dacomitinib, το Dac5 εμφανίζει διαφορετικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες διαφέρουν αρκετά και με αυτές των υπόλοιπων αναλόγων. Συγκεκριμένα, στο ανάλογο αυτό χάνεται ένας δεσμός υδρογόνου και ο μοναδικός δεσμός υδρογόνου που σχηματίζεται είναι ανάμεσα στο F (δέκτης) και τη Lys46. Ο δεσμός αλογόνου ανάμεσα στο F και τη Leu82 διατηρείται και σχηματίζονται επιπλέον δεσμοί C-H. Ωστόσο, όπως φαίνεται, δημιουργούνται πλέον διάφοροι αλκυλ, π-αλκυλ, π-σουλφο και π-σίγμα αλληλεπιδράσεις που δεν συναντώνται στον εγκεκριμένο αναστολέα.



Εικόνα 5.4.5i: Τρισδιάστατη δομή του Dac5 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

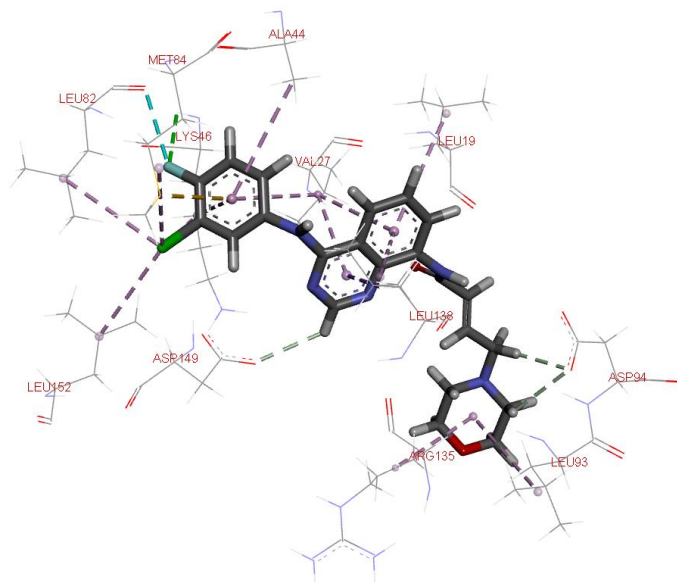


Εικόνα 5.4.5ii: Δισδιάστατη δομή του Dac5 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

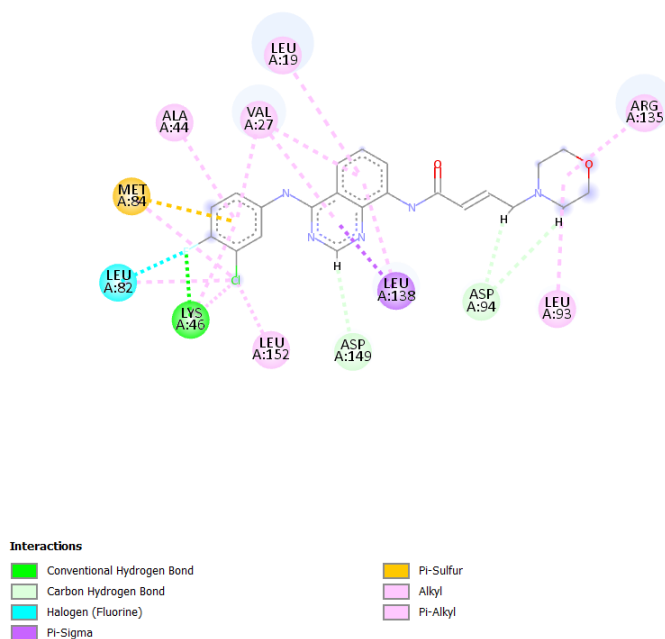
5.4.6 Αποτελέσματα πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης για το Dac6

Το Dac6 εμφανίζει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με το Dac5, κάτι που είναι αναμενόμενο λόγω της ομοιότητάς τους στο μεγαλύτερο μέρος του μορίου. Έτσι,

συγκριτικά με το Dacomitinib κι αυτό, εμφανίζει έναν μοναδικό δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται ανάμεσα στο F (δέκτης) και τη Lys46. Ο δεσμός αλογόνου ανάμεσα στο F και τη Leu82, ο οποίος υπάρχει και στο φάρμακο, διατηρείται και σχηματίζονται επιπλέον δεσμοί C-H. Τέλος, δημιουργούνται διάφοροι αλκυλ, π-αλκυλ, π-σουλφο και π-σίγμα αλληλεπιδράσεις που δεν συναντώνται στον εγκεκριμένο αναστολέα. Η μόνη διαφορά με το Dac5 είναι σε μια π-αλκυλ αλληλεπίδραση στην οποία συμμετέχει η Leu19 αντί της Cys91 που υπάρχει στο Dac5.



Εικόνα 5.4.6i: Τρισδιάστατη δομή του Dac6 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.



Εικόνα 5.4.6ii: Δισδιάστατη δομή του Dac6 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης EGFR.

Από τα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης προκύπτουν ακόμη τα θεωρητικά αποτελέσματα των ελεύθερων ενεργειών Gibbs (Kcal/mol) κατά την πρόσδεση, των νέων εν δυνάμει αναστολέων, στον EGFR. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να προβλέψουν, σε θεωρητικό τουλάχιστον επίπεδο, πως όσο περισσότερη ενέργεια εκλύεται (μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή ΔG), τόσο καλύτερη είναι η πρόσδεση στην κινάση. Το αποτέλεσμα της ενέργειας αυτής, είναι συνάρτηση των επιμέρους ηλεκτροστατικών, Van der Waals, περιστροφικών συνεισφορών και συνεισφορών από δεσμούς υδρογόνου και φαινόμενα επιδιалύτωσης, μεταξύ πρωτεΐνης-αναστολέα και δίνεται ως το άθροισμα: $\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{es}} + \Delta G_{\text{hb}} + \Delta G_{\text{tor}} + \Delta G_{\text{desolv}}$.⁷¹

Σύμπλοκο	$\Delta G_{\text{binding}}$ (Kcal/mol)
Dacomitinib - EGFR	-9.2
Dac1 - EGFR	-9.3
Dac2 - EGFR	-9.5
Dac3 - EGFR	-9.3
Dac4 - EGFR	-9.1
Dac5 - EGFR	-8.7
Dac6 - EGFR	-8.4

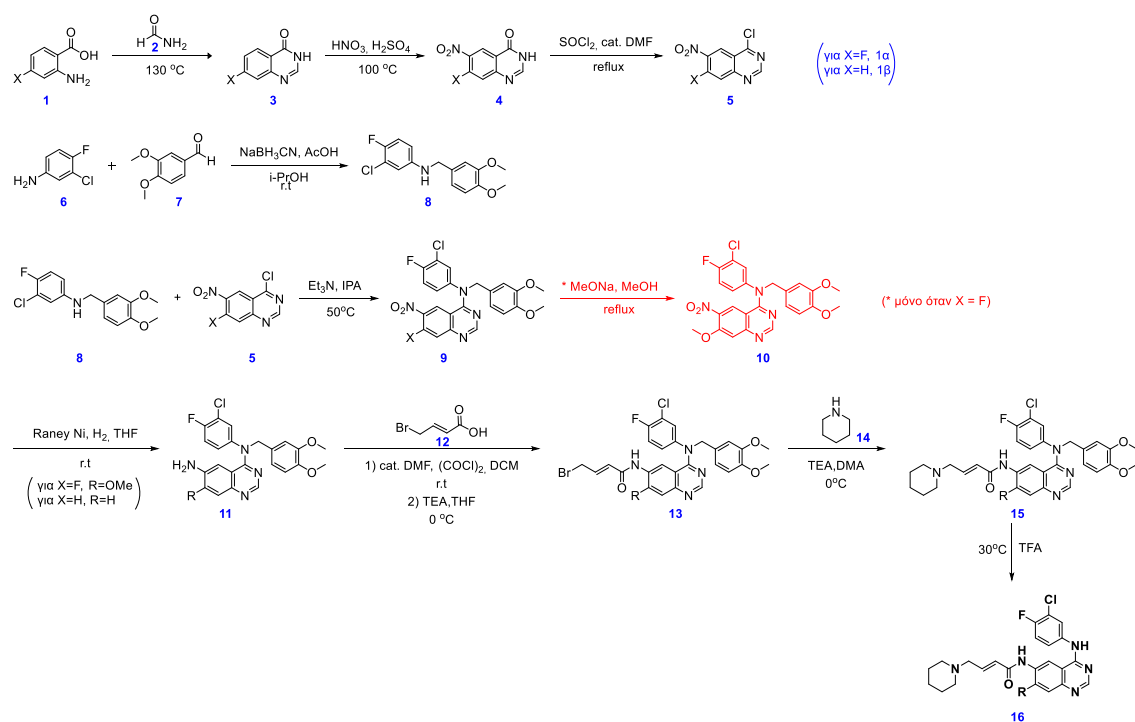
Πίνακας 5.4.6 : Αποτελέσματα ελεύθερης ενέργειας Gibbs του κάθε συμπλόκου.

Παρατηρώντας τις τιμές των ελεύθερων ενεργειών του κάθε αναλόγου με τον EGFR και συγκρίνοντας τες με αυτή του αναστολέα, διαπιστώνεται πως το Dac 2, έχοντας τη μικρότερη ελεύθερη ενέργεια, δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά τη δέσμευσή του με την κινάση. Μετά από αυτό, τα Dac1 και Dac3 εμφανίζουν επίσης μικρότερη ελεύθερη ενέργεια σε σύγκριση με τον αναστολέα, προβλέποντας θεωρητικά καλύτερη πρόσδεση με τον EGFR. Από την άλλη, το Dac4 εμφανίζει μεγαλύτερη ελεύθερη ενέργεια από αυτή του αναστολέα, κάτι μη αναμενόμενο καθώς παρουσιάζει παραπλήσιες αλληλεπιδράσεις και στα ίδια τμήματα του μορίου με τις αντίστοιχες του αναστολέα με την κινάση. Τέλος, τα Dac5 και Dac6 εμφανίζουν αρκετά μεγαλύτερη ελεύθερη ενέργεια από αυτή του αναστολέα με τον EGFR. Αυτό εξηγείται, καθώς στα ανάλογα αυτά αλλάζει μεγάλο μέρος του σκελετού του μορίου και είναι αναμενόμενο η πρόσδεση και οι αλληλεπιδράσεις να διαφοροποιούνται. Στα ανάλογα αυτά, επίσης, απουσιάζει ένας δεσμός υδρογόνου που βοηθάει πολύ στη δέσμευση του αναλόγου στην κινάση, ενώ δημιουργούνται διαφορετικοί δεσμοί, οι οποίοι περιγράφηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια αναλυτικά.

5.5 Ολική πορεία σύνθεσης νέων ενώσεων-αναλόγων του Dacomitinib

Σύμφωνα, λοιπόν, με τις βελτιωμένες συνθετικές πορείες που αναφέρθηκαν παραπάνω και τα αποτελέσματα των πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης, εκτός από το 2-άμινο-4-φθοροβενζοϊκό οξύ χρησιμοποιείται και το ανθρανιλικό οξύ ως αρχικό υπόστρωμα, κάτι που επηρεάζει άμεσα το στάδιο 9. Στην περίπτωση που η πορεία ξεκινά με ανθρανιλικό οξύ η αντίδραση 9 παραλείπεται. Ακόμη, έχει προστεθεί μια αντίδραση προστασίας της αμινομάδας της 3-χλώρο-4-φθόρο ανιλίνης. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μία αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης (1^ο ταγής σε 2^ο ταγής αμίνη) ώστε

να αυξηθεί η απόδοση της πυρηνόφιλης υποκατάστασης που ακολουθεί. Τέλος, για το σχηματισμό του προϊόντος 11 δε χρησιμοποιείται οξύ που φέρει πιπεριδινικό δακτύλιο καθώς στο δακτύλιο της πιπεριδίνης στοχεύουν οι αλλαγές ώστε να αυξηθεί η εκλεκτικότητα και η ανασταλτική δράση του φαρμάκου. Συνεπώς, στο στάδιο αυτό, δημιουργείται ο αμιδικός δεσμός χρησιμοποιώντας (E)-4-βρωμοβουτ-2-ενοϊκό οξύ και έπειτα ακολουθεί μια πυρηνόφιλη υποκατάσταση με το εκάστοτε υπόστρωμα και τέλος η απομάκρυνση της βένζυλο ομάδας ώστε να ολοκληρωθεί η σύνθεση του αναλόγου. Ο τρόπος σχηματισμού αμιδικού δεσμού στο μόριο του αναλόγου του αναστολέα, επίσης, μπορεί να είναι διαφορετικός.



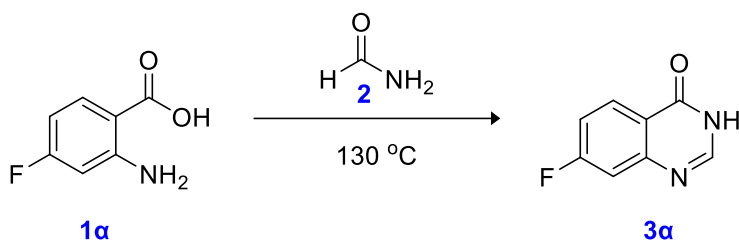
Εικόνα 5.5: Η πορεία σύνθεσης του Dacomitinib που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο για τη σύνθεση αναλόγων.

Κεφάλαιο 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

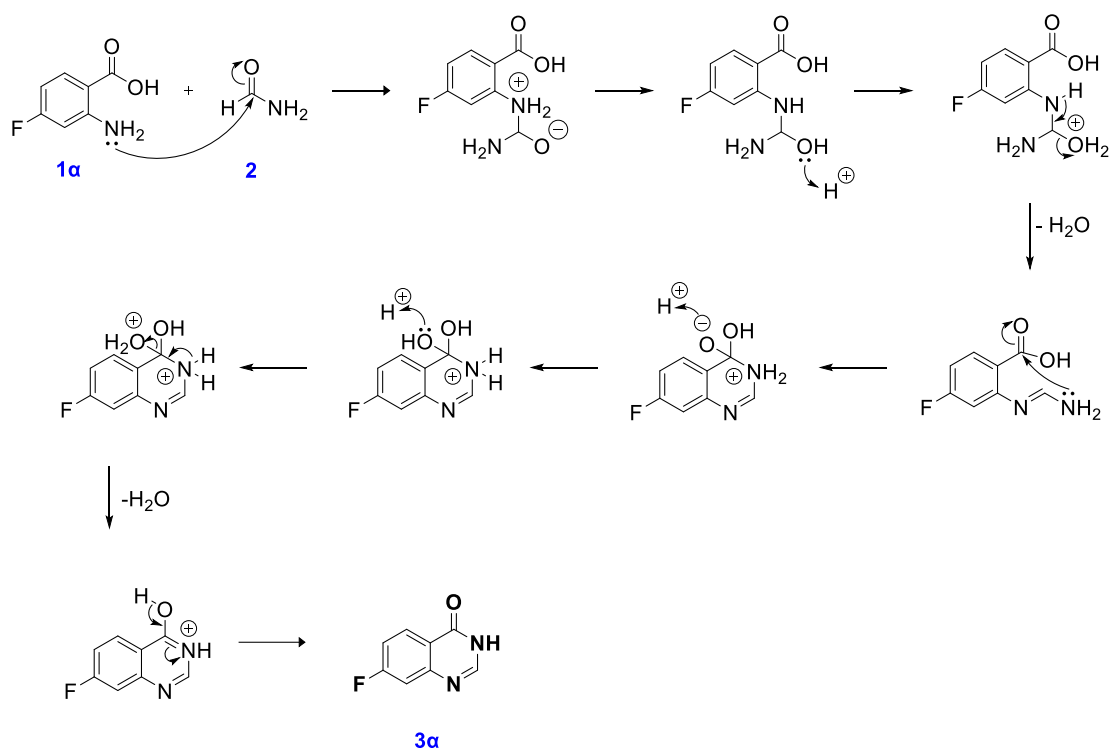
6.1 Πειράματα με αρχικό υπόστρωμα 2-άμινο-4-φθοροβενζοϊκό οξύ για τη σύνθεση αναλόγων Dac1 και Dac2

6.1.1 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνη (3α)



Εικόνα 6.1.1: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνης (3α).

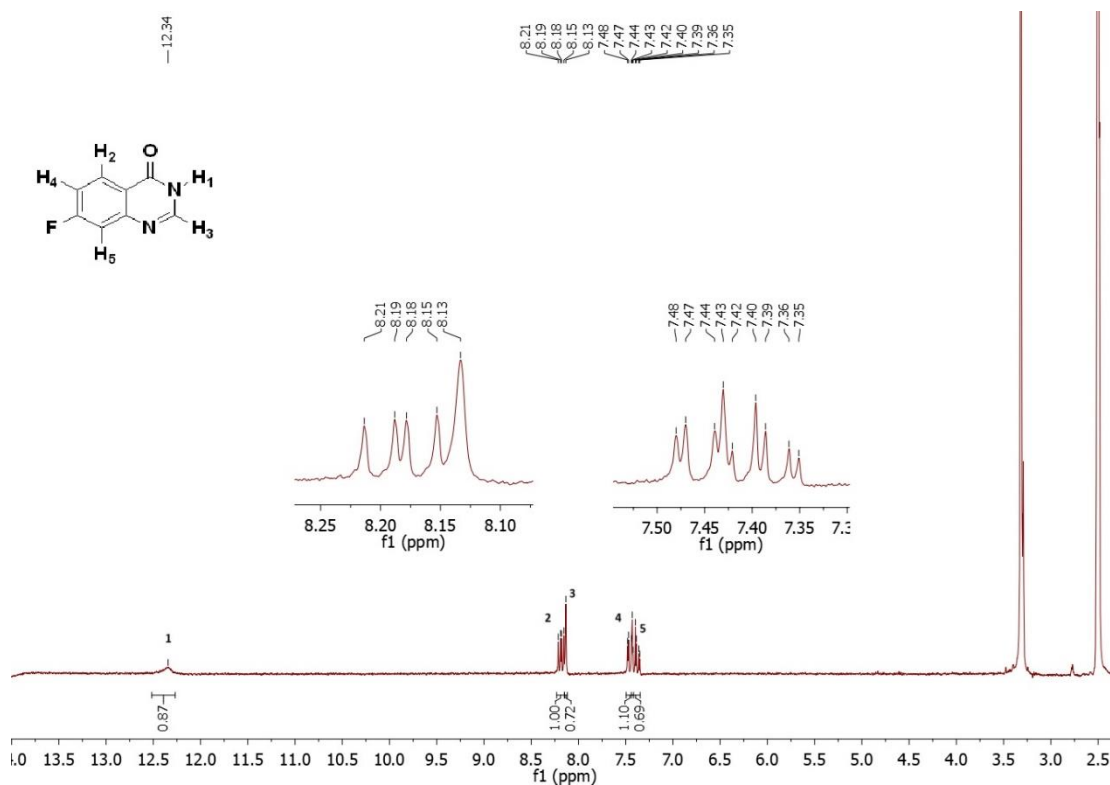
Αντιδράσεις αυτού του τύπου αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1895 από τον Niementowski. Πρόκειται για το σχηματισμό μιας 4-κετο-3,4-διυδροκιναζολίνης μέσω ενός ανθρανιλικού οξέος και ενός αμιδίου. Η αντίδραση απαιτεί υψηλή θερμοκρασία και αρκετό χρόνο αναμένοντας υψηλή απόδοση χρησιμοποιώντας φορμαμίδιο ή ακεταμίδιο, ενώ η απόδοση μειώνεται με τη χρήση αμιδίου υψηλότερης τάξης. Έκτοτε, αναφέρεται ως αντίδραση Niementowski.⁷² Η αντίδραση περιλαμβάνει ως πρώτο βήμα την πυρηνόφιλη προσβολή του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του N της αμινομάδας του 4-φθόρο-2-άμινοβενζοϊκού οξέος (1α) στον καρβονυλικό C του φορμαμιδίου (2) δημιουργώντας θετικό φορτίο στο N που προαναφέρθηκε και αρνητικό στο O της καρβονυλομάδας του φορμαμιδίου. Ακολουθεί αποπρωτονίωση του θετικά φορτισμένου N και πρωτονίωση του αρνητικά φορτισμένου O, το οποίο με επιπλέον πρωτονίωση μετατρέπεται σε καλή αποχωρούσα ομάδα. Με απόσπαση ενός πρωτονίου και απομάκρυνση ενός μορίου H₂O σχηματίζεται διπλός δεσμός N=C. Ακολουθεί πυρηνόφιλη προσβολή του μονήρους ζεύγους του N της αμινομάδας του 2 στον καρβονυλικό C του οξέος του 1α και δημιουργία αρνητικού φορτίου στο O της καρβονυλομάδας του οξέος. Το αρνητικά φορτισμένο O πρωτονιώνεται και με επιπλέον πρωτονίωση μετατρέπεται σε καλή αποχωρούσα ομάδα αποβάλλοντας ένα δεύτερο μόριο H₂O. Ακολουθεί απόσπαση πρωτονίου προς σχηματισμό διπλού δεσμού. Τέλος, απόσπαση του πρωτονίου της υδροξυλομάδας του 1α προς σχηματισμό καρβονυλίου δίνει το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 6.1.1: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνης (3α).

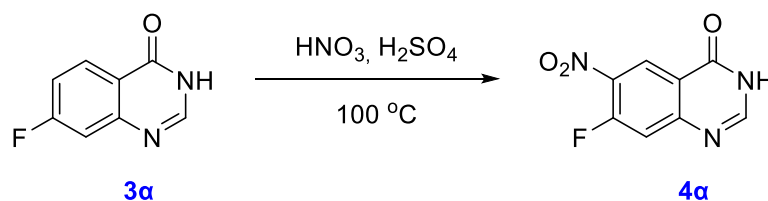
6.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνης (3α)

Το πιο αποπροστατευμένο H είναι το αμιδικό (H₁ στη θέση 3) το οποίο δίνει μία ευρεία, s κορυφή στα 12.34 ppm. Η κορυφή dd στα 8.18 ppm αντιστοιχεί στο H₂ στη θέση 5 καθώς εμφανίζει ³J = 8.8 Hz λόγω ύπαρξης H σε ορθο-θέση και ⁴J = 6.4 Hz που φανερώνει ύπαρξη F σε μετα-θέση. Η s κορυφή στα 8.13 ppm αντιστοιχεί στο H₃ στη θέση 2, ενώ η m κορυφή στα 7.50-7.42 ppm οφείλεται στο H₄ στη θέση 6 το οποίο σχάζεται από το H και το F σε ορθο-θέσεις ως προς αυτό και από ένα H σε μετα-θέση. Η dd κορυφή στα 7.37 ppm οφείλεται στο H₅ στη θέση 8, καθώς εμφανίζει ³J = 8.7 Hz λόγω F σε ορθο-θέση και ⁴J = 2.6 Hz λόγω H σε μετα-θέση ως προς αυτό.



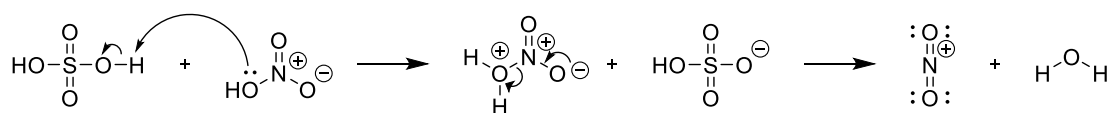
Εικόνα 6.1.2: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 7-φθόροκινάζολιν-4(3H)-όνης (3α).

6.1.3 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκινάζολιν-4(3H)όνη (4α)



Εικόνα 6.1.3: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκινάζολιν-4(3H)όνης (4α).

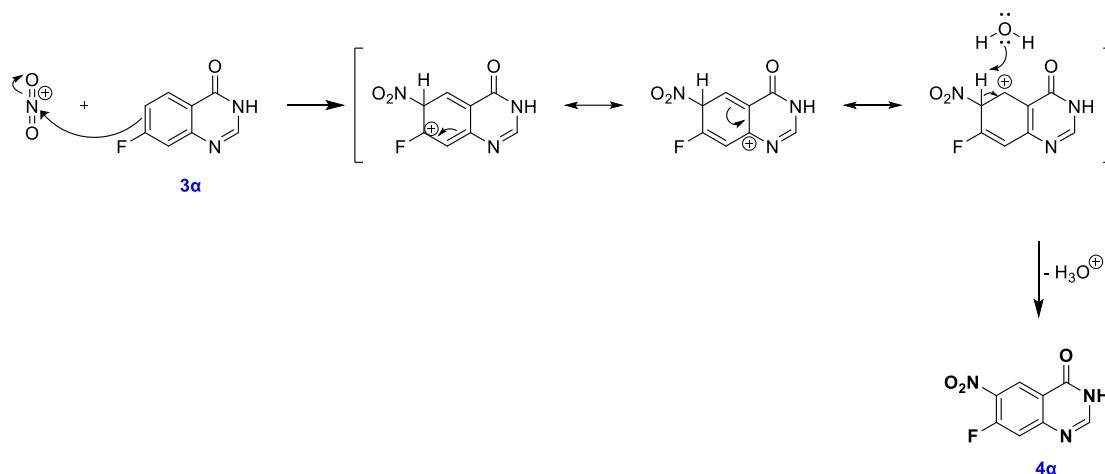
Η εισαγωγή μιας νιτροομάδας στον κινάζολινικό δακτύλιο επιτυγχάνεται με μια αντίδραση νίτρωσης. Για την αντίδραση χρησιμοποιείται μίγμα $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ σε αναλογία που θα αναφερθεί παρακάτω, τα οποία με αποβολή HSO_4^- και ενός μορίου H_2O σχηματίζουν το ιόν νιτρωνίου.



Σχήμα 6.1.3i: Δημιουργία ιόντος νιτρωνίου.

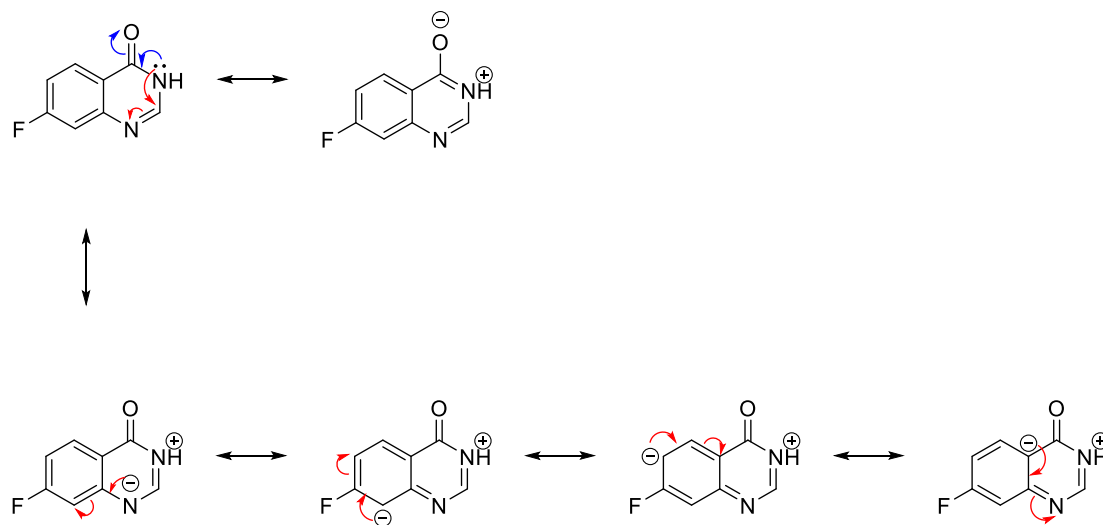
Στη συνέχεια, το ιόν νιτρωνίου προσβάλλεται από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του κινάζολινικού δακτυλίου μέσω μια αντίδρασης ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής

υποκατάστασης. Αποσπάται το πρωτόνιο από τη θέση εισαγωγής της νιτροομάδας στο σίγμα σύμπλοκο ώστε να αποκατασταθεί η αρωματικότητα του δακτυλίου δίνοντας το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 6.1.3ii: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκινναζολίν-4(3H)όνης (4α).

Η συγκεκριμένη αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα σε δύο θέσεις του κινναζολικού δακτυλίου όπως φαίνεται παρακάτω στις δομές συντονισμού.

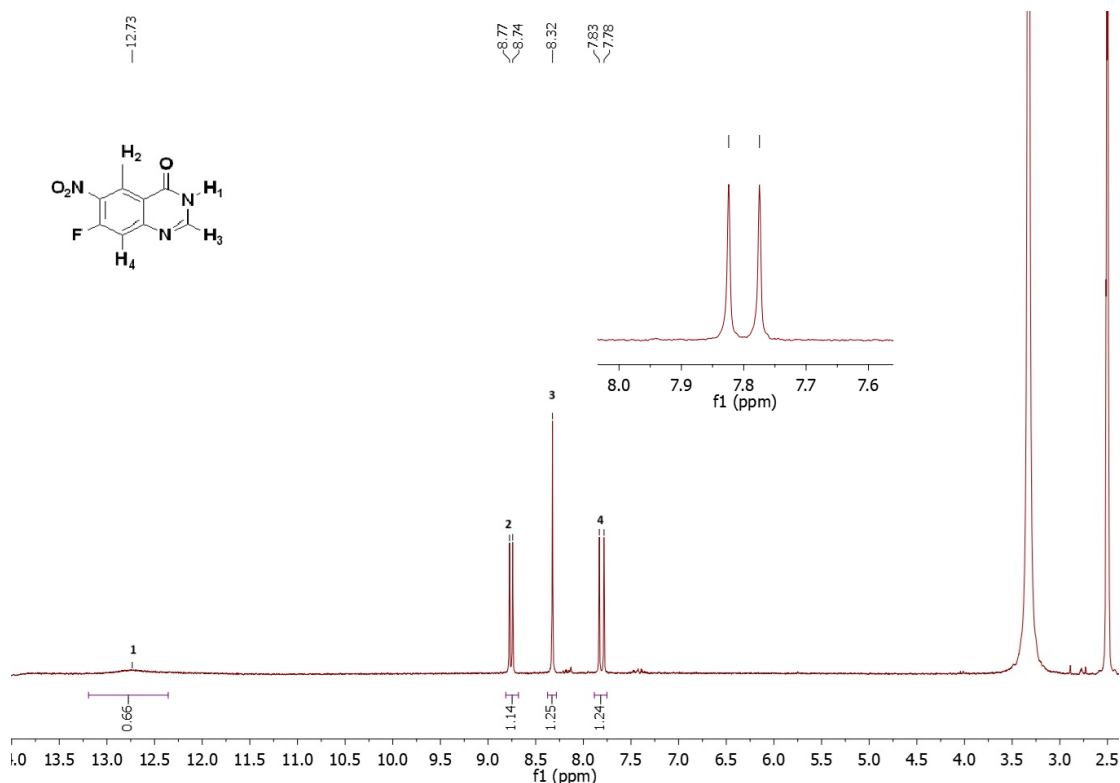


Σχήμα 6.1.3iii: Δομές συντονισμού της ένωσης 7-φθόροκινναζολίν-4(3H)-όνης (3α).

Οι θέσεις 6 και 8 είναι πλούσιες ηλεκτρονιακά που τις καθιστά ικανές να συμμετέχουν σε αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Παρακάτω μελετήθηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης ώστε να σχηματιστεί το επιθυμητό προϊόν σε ικανοποιητική απόδοση και μετά το πέρας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης για το διαχωρισμό των ισομερών.

6.1.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνη (4α)

Το πιο αποπροστατευμένο H είναι το αμιδικό (H₁ στη θέση 3) το οποίο δίνει μία ευρεία, s κορυφή στα 12.73 ppm. Η κορυφή d στα 8.76 ppm αντιστοιχεί στο H₂ στη θέση 5 καθώς εμφανίζει $^3J = 8.3$ Hz λόγω ύπαρξης F σε μετα-θέση. Η απλή κορυφή στα 8.32 ppm αντιστοιχεί στο H₃ στη θέση 2, ενώ η d κορυφή στα 7.81 ppm οφείλεται στο H₄ στη θέση 8, καθώς εμφανίζει $^3J = 12.4$ Hz λόγω F σε ορθο-θέση ως προς αυτό.

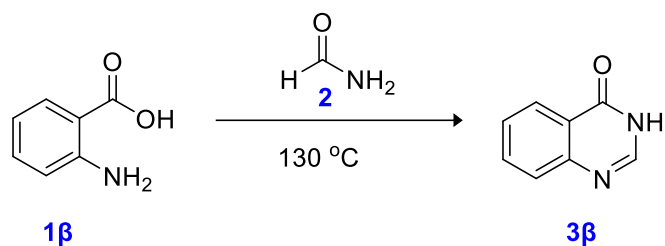


Εικόνα 6.1.4: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνης (4α).

Ωστόσο, η απόδοση της συγκεκριμένης αντίδρασης ήταν χαμηλή κάτι που σε συνδυασμό με την περιορισμένη διαθεσιμότητα της ένωσης 1α οδήγησε στην αλλαγή της πειραματικής πορείας με σκοπό τη χρήση διαφορετικού αρχικού υποστρώματος για την αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης και τη συνέχιση της πειραματικής πορείας για τη σύνθεση αναλόγου του φαρμάκου.

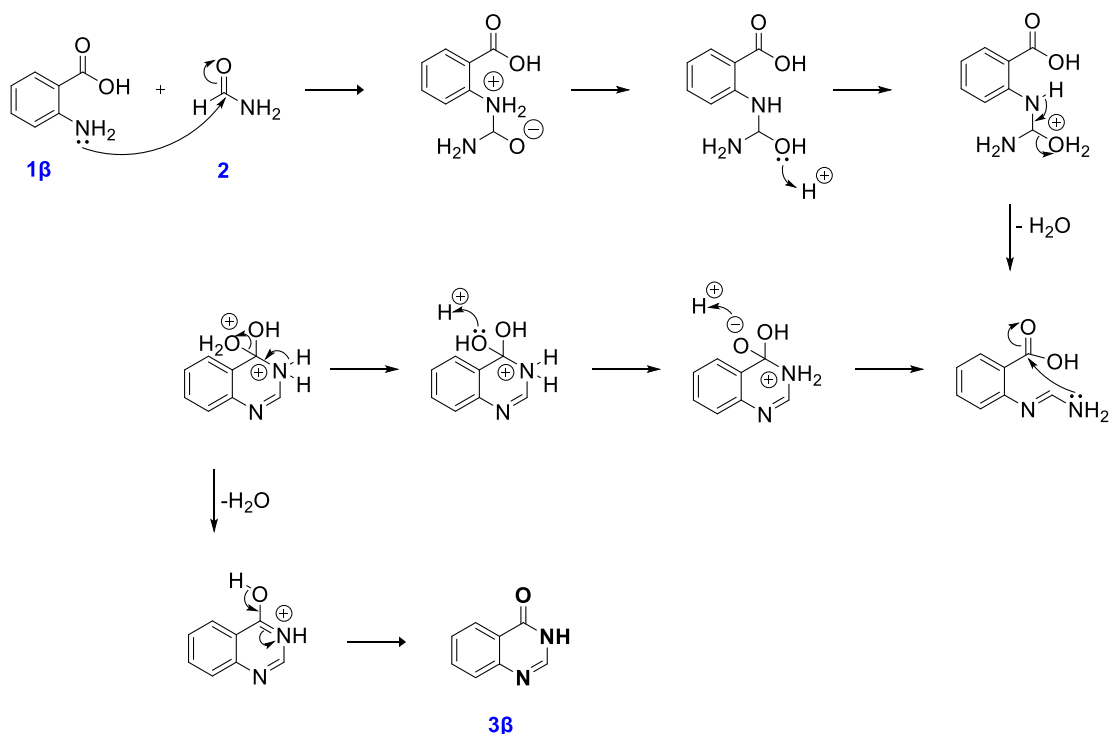
6.2 Πειράματα με αρχικό υπόστρωμα 2-άμινο-βενζοϊκό οξύ για τη σύνθεση αναλόγων Dac3 και Dac4

6.2.1 Σύνθεση της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνη (3β)



Εικόνα 6.2.1: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνης (3β).

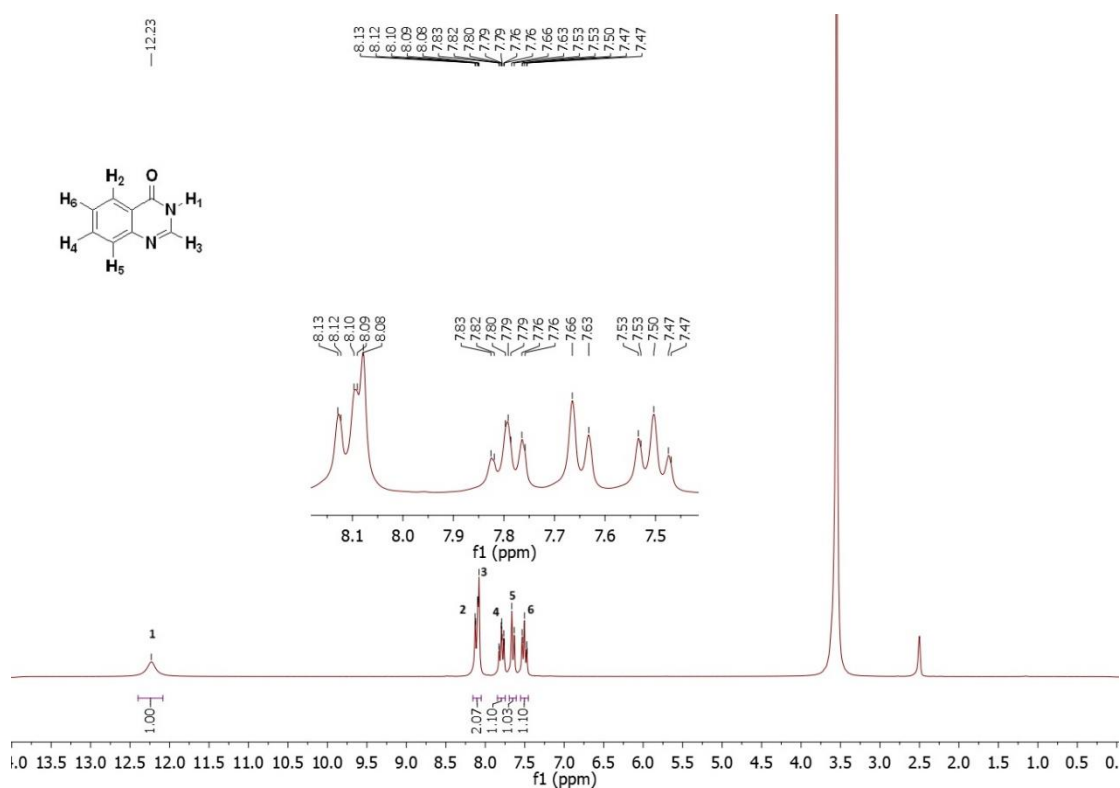
Η αντίδραση είναι χαρακτηριστική αντίδραση κυκλοποίησης Niementowski. Ο μηχανισμός της είναι ίδιος με αυτού στο κεφάλαιο 6.1.1. Τα βήματα είναι τα εξής: i) πυρηνόφιλη προσβολή του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του N της αμινομάδας του 4-φθόρο-2-άμινοβενζοϊκού οξέος (1β) στον καρβονυλικό C του φορμαμιδίου (2) δημιουργώντας θετικό φορτίο στο N που προαναφέρθηκε και αρνητικό στο O της καρβονυλομάδας του 2, ii) αποπρωτονίωση του θετικά φορτισμένου N και πρωτονίωση του αρνητικά φορτισμένου O, το οποίο με επιπλέον πρωτονίωση μετατρέπεται σε καλή αποχωρούσα ομάδα, iii) απόσπαση ενός πρωτονίου και απομάκρυνση ενός μορίου H₂O σχηματίζοντας διπλό δεσμό N=C, iv) πυρηνόφιλη προσβολή του μονήρους ζεύγους του N της αμινομάδας του 2 στον καρβονυλικό C του οξέος του 1β και δημιουργία αρνητικού φορτίου στο O της καρβονυλομάδας του οξέος, v) πρωτονίωση του αρνητικά φορτισμένου O το μετατρέπει σε καλή αποχωρούσα ομάδα και ακολουθεί απόσπαση πρωτονίου προς σχηματισμό διπλού δεσμού και αποβολή ενός δεύτερου μορίου H₂O, vi) απόσπαση του πρωτονίου της υδροξυλομάδας του 1β προς σχηματισμό καρβονυλίου δίνει το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 6.2.1: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνης (3β).

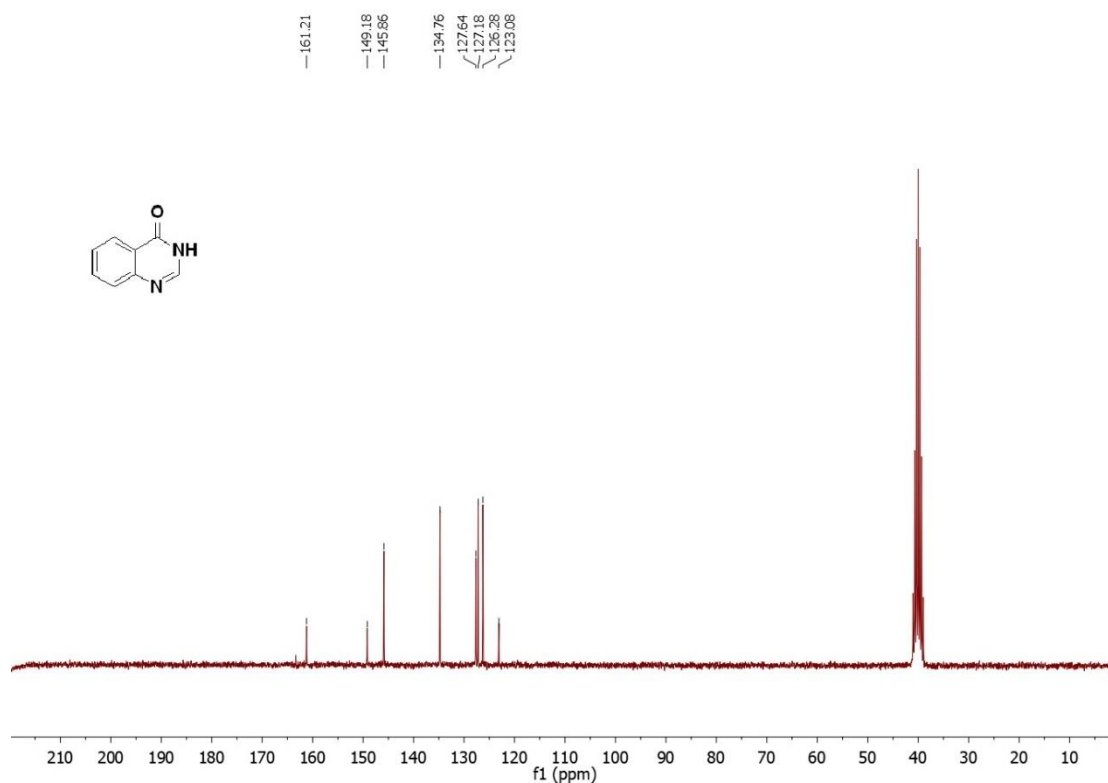
6.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνη (3β)

Το πιο αποπροστατευμένο H είναι το αμιδικό (H₁ στη θέση 3) το οποίο δίνει μία ευρεία, s κορυφή στα 12.23 ppm. Η m κορυφή στα 8.16-8.05 ppm αντιστοιχεί σε 2 H. Πρόκειται για τα H₂ στη θέση 5 και H₃ στη θέση 2 καθώς τα H αυτά είναι τα πιο αποπροστατευμένα ωστόσο οι κορυφές τους αλληλεπικαλύπτονται δίνοντας μια m κορυφή. Η ddd κορυφή στα 7.79 ppm οφείλεται στο H₄ στη θέση 7 καθώς εμφανίζει $^3J = 8.4$ Hz και $^3J = 7.1$ Hz, κάτι που φανερώνει ύπαρξη 2 διαφορετικών H σε ορθο-θέση και $^4J = 1.6$ Hz που δείχνει την ύπαρξη H σε μετα-θέση. Η d κορυφή στα 7.65 ppm οφείλεται στο H₅ στη θέση 8 καθώς έχει $^3J = 8.1$ Hz που φανερώνει την ύπαρξη H σε ορθο-θέση και μάλιστα παραπλήσια με αυτή του H₄ δείχνοντας πως αυτά τα δύο H είναι γειτονικά. Τέλος, η t κορυφή στα 7.5 ppm οφείλεται στο H₆ στη θέση 6 καθώς το H έχει δύο γειτονικά H σε ορθο-θέση και τιμή $^3J = 7.5$ Hz παραπλήσια με αυτή του H₄, άρα είναι γειτονικό με το H₄.



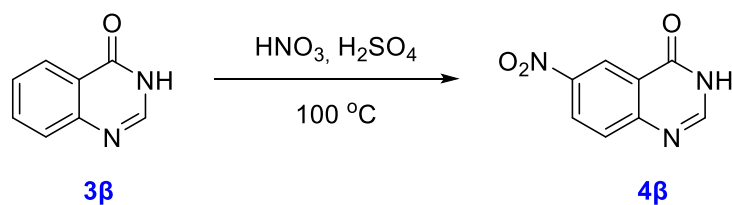
Εικόνα 6.2.2i: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνης (3β).

Στο φάσμα ¹³C υπάρχουν 7 σήματα που δηλώνουν 7 C sp² και 1 σήμα στα 161.21 ppm το οποίο οφείλεται στον καρβονυλικό C₄.



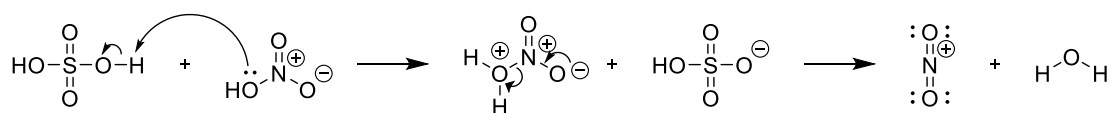
Εικόνα 6.2.2ii: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνης (3β).

6.2.3 Σύνθεση της ένωσης 6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνη (4β)



Εικόνα 6.2.3: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 6-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνης (4β).

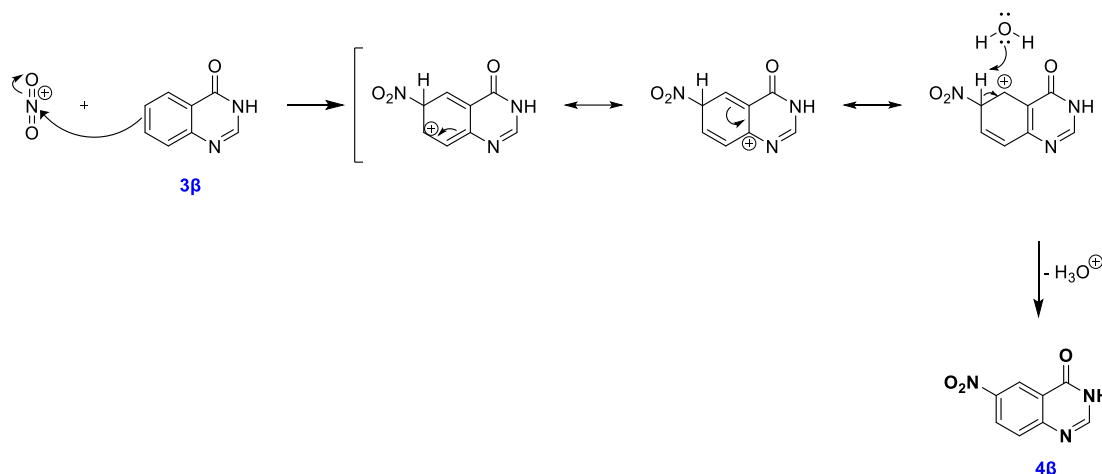
Η εισαγωγή μιας νιτροομάδας στον κιναζολινικό δακτύλιο επιτυγχάνεται με μια αντίδραση νίτρωσης όπως ακριβώς περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6.1.3. Χρησιμοποιείται μίγμα $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ τα οποία με αποβολή HSO_4^- και ενός μορίου H_2O σχηματίζουν το ιόν νιτρωνίου.



Σχήμα 6.2.3i: Δημιουργία ιόντος νιτρωνίου.

Στη συνέχεια, το ιόν νιτρωνίου προσβάλλεται από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του κιναζολινικού δακτυλίου μέσω μια αντίδρασης ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής

υποκατάστασης. Απόσπαση του πρωτονίου από τη θέση εισαγωγής της νιτροομάδας στο σίγμα σύμπλοκο αποκαθιστά την αρωματικότητα του δακτυλίου δίνοντας το επιθυμητό προϊόν.

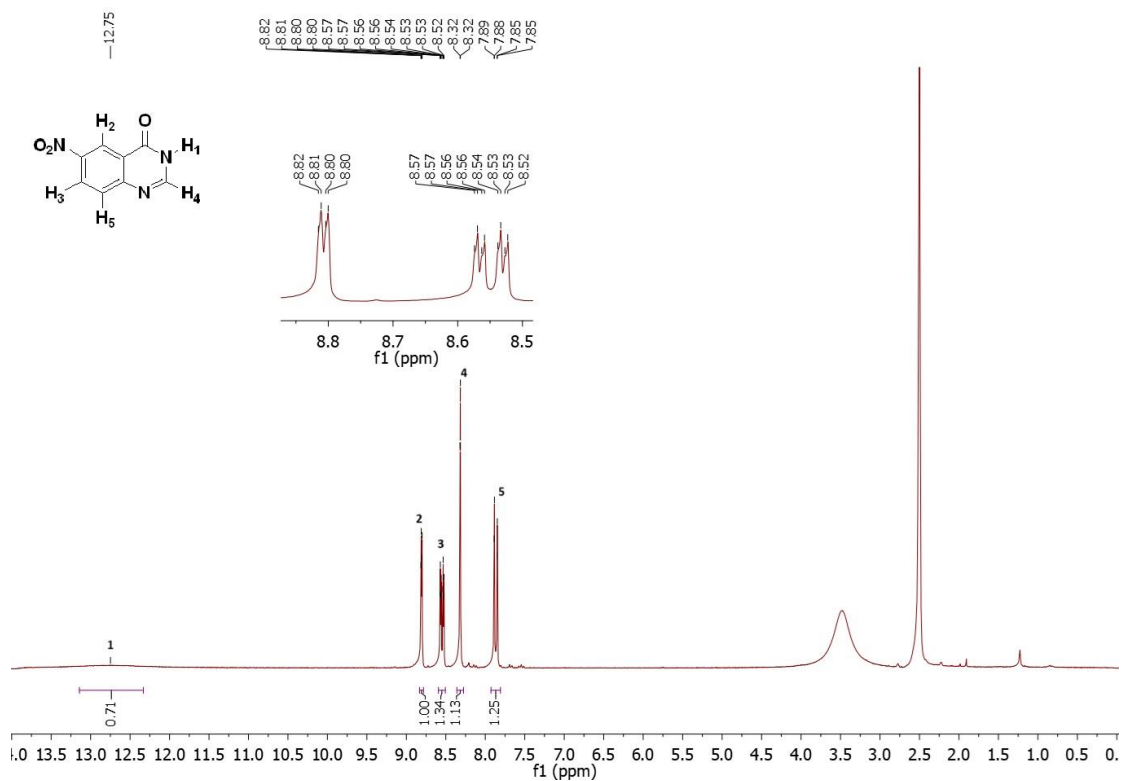


Σχήμα 6.2.3ii: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 6-νιτροκινναζολίν-4(3H)όνης (4β).

Η αντίδραση αυτή, επίσης μπορεί να λάβει χώρα σε δύο θέσεις του κινναζολικού δακτυλίου όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 6.1.3 μέσα από τις δομές συντονισμού. Οι θέσεις 6 και 8 είναι πλούσιες ηλεκτρονιακά που τις καθιστά ικανές να συμμετέχουν σε αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Επομένως, και σε αυτήν περίπτωση, έπρεπε να μελετηθούν οι συνθήκες της αντίδρασης ώστε να σχηματιστεί το επιθυμητό προϊόν σε ικανοποιητική απόδοση και μετά το πέρας της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης για το διαχωρισμό των ισομερών.

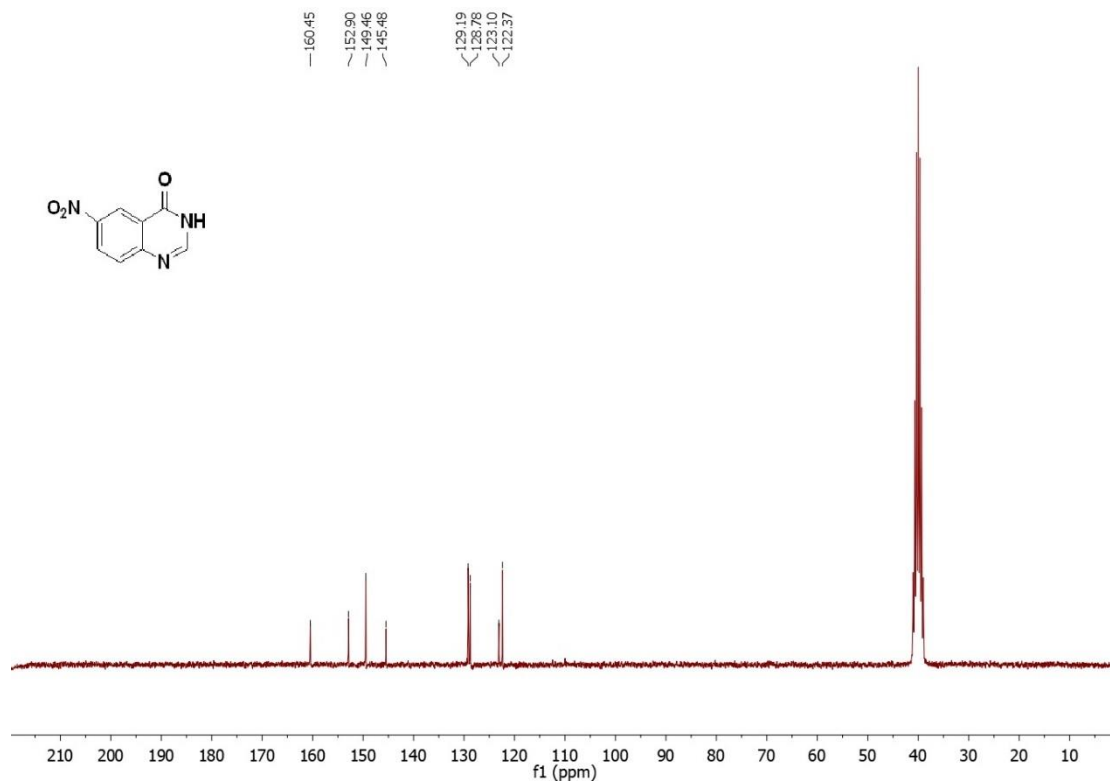
6.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 6-νιτροκινναζολίν-4(3H)-όνη (4β)

Το πιο αποπροστατευμένο H είναι το αμιδικό (H₁ στη θέση 3) το οποίο δίνει μία ευρεία, s κορυφή στα 12.75 ppm. Η dd κορυφή στα 8.81 ppm αντιστοιχεί στο H₂ στη θέση 5, καθώς εμφανίζει ⁴J = 2.8 Hz που οφείλεται σε H σε μετα-θέση και ⁵J = 1.0 Hz που οφείλεται σε H σε παρα-θέση. Η ddd κορυφή στα 8.55 ppm οφείλεται στο H₃ στη θέση 7 καθώς εμφανίζει ³J = 9.0 Hz λόγω ύπαρξης H σε ορθο-θέση, ⁴J = 2.8 Hz που φανερώνει ύπαρξη H σε μετα-θέση, ίδια με αυτή του H₂ και ⁵J = 1.1 Hz. Η d κορυφή στα 8.32 ppm οφείλεται στο H₄ στη θέση 2. Τέλος, η dd κορυφή στα 7.87 ppm οφείλεται στο H₅ στη θέση 8 καθώς παρουσιάζει τιμή ³J = 9.0 Hz παραπλήσια με αυτή του H₃, άρα είναι γειτονικό με το H₃ σε ορθο-θέση και ⁵J = 1.0 Hz, ίδιο με αυτή του H₂ που σημαίνει ότι τα H₂ και H₅ βρίσκονται σε παρα-θέση μεταξύ τους.



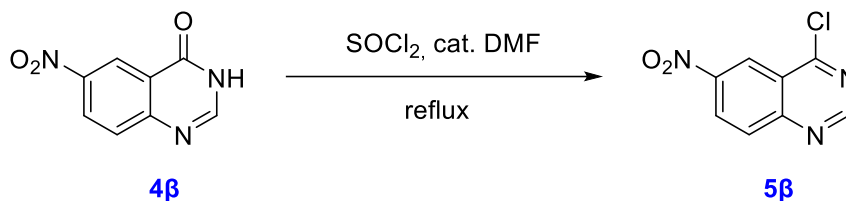
Εικόνα 6.2.4i: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνης (4β).

Στο φάσμα ¹³C υπάρχουν 7 σήματα που δηλώνουν 7 C sp² και 1 σήμα στα 161.21 ppm το οποίο οφείλεται στον καρβονυλικό C4.



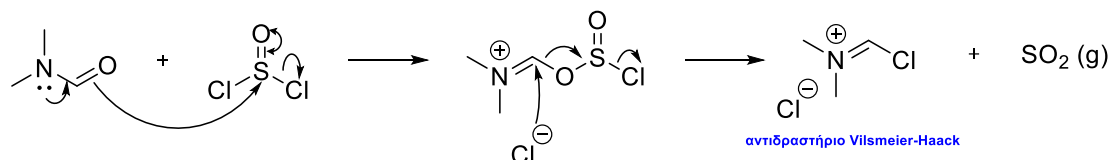
Εικόνα 6.2.4ii: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 6-νιτροκιναζολιν-4(3H)-όνης (4β).

6.2.5 Σύνθεση της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκινναζολίνη (5β)



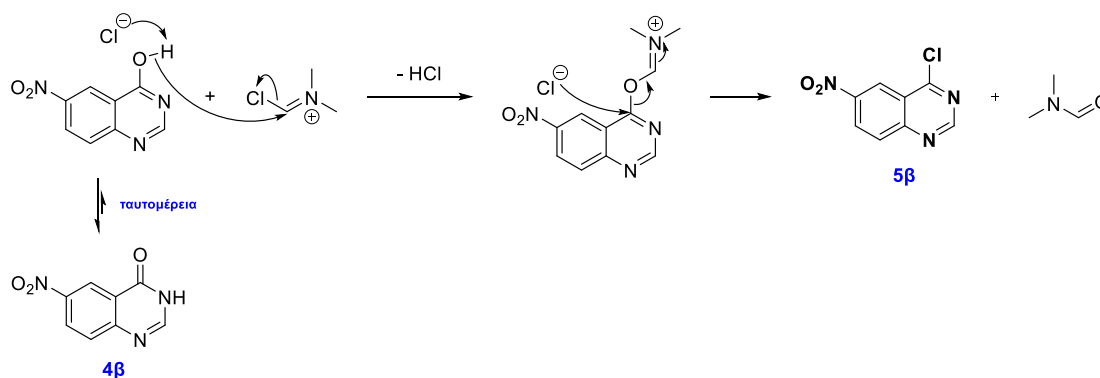
Εικόνα 6.2.5: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκινναζολίνης (5β).

Το θειόνυλο χλωρίδιο αντιδρά με την καταλυτική ποσότητα του DMF σχηματίζοντας το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack απελευθερώνοντας αέριο SO_2 .



Σχήμα 6.2.5i: Δημιουργία αντιδραστηρίου Vilsmeier-Haack.

Το αρνητικά φορτισμένο Cl πρωτονιώνεται από το H της υδροξυλομάδας της ενολικής μορφής της ένωσης 4β, που σχηματίζεται μέσω ταυτομερείωσης, φεύγοντας ως HCl. Το αρνητικά φορτισμένο O προσβάλλει το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack απελευθερώνοντας ένα άτομο Cl, το οποίο σε επόμενο βήμα προσβάλλει τον C4 του υποστρώματος δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 5β και το αντιδραστήριο DMF.

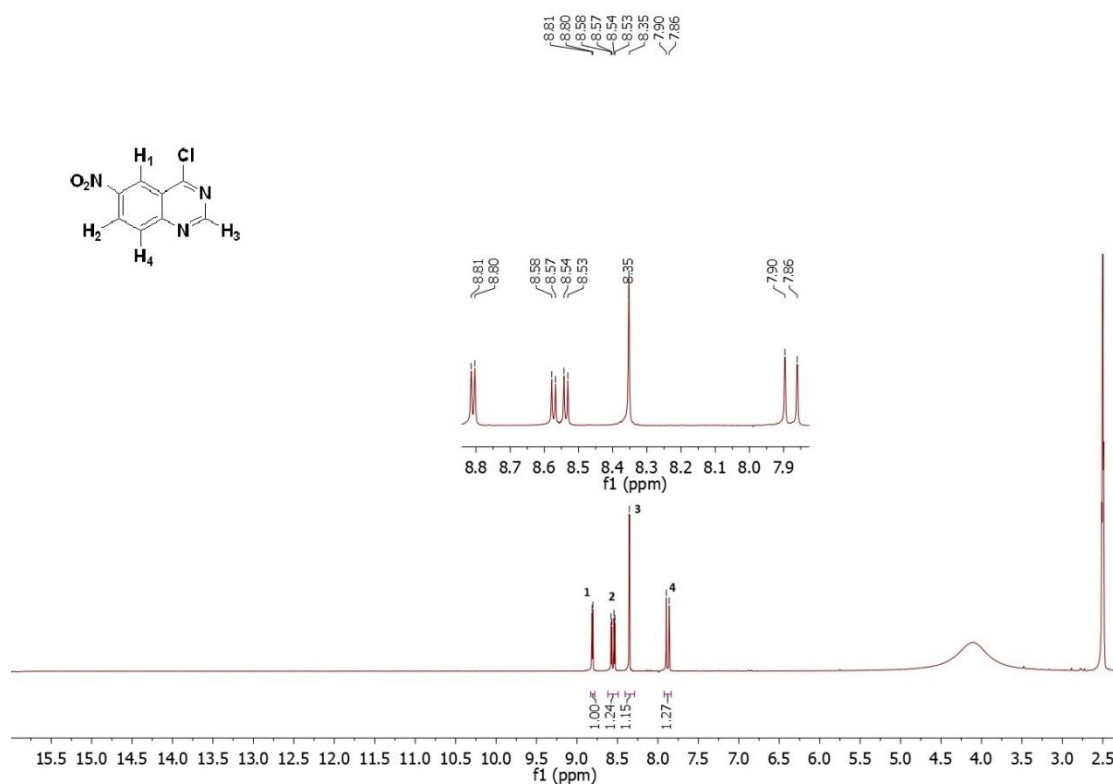


Σχήμα 6.2.5ii: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκινναζολίνης (5β).

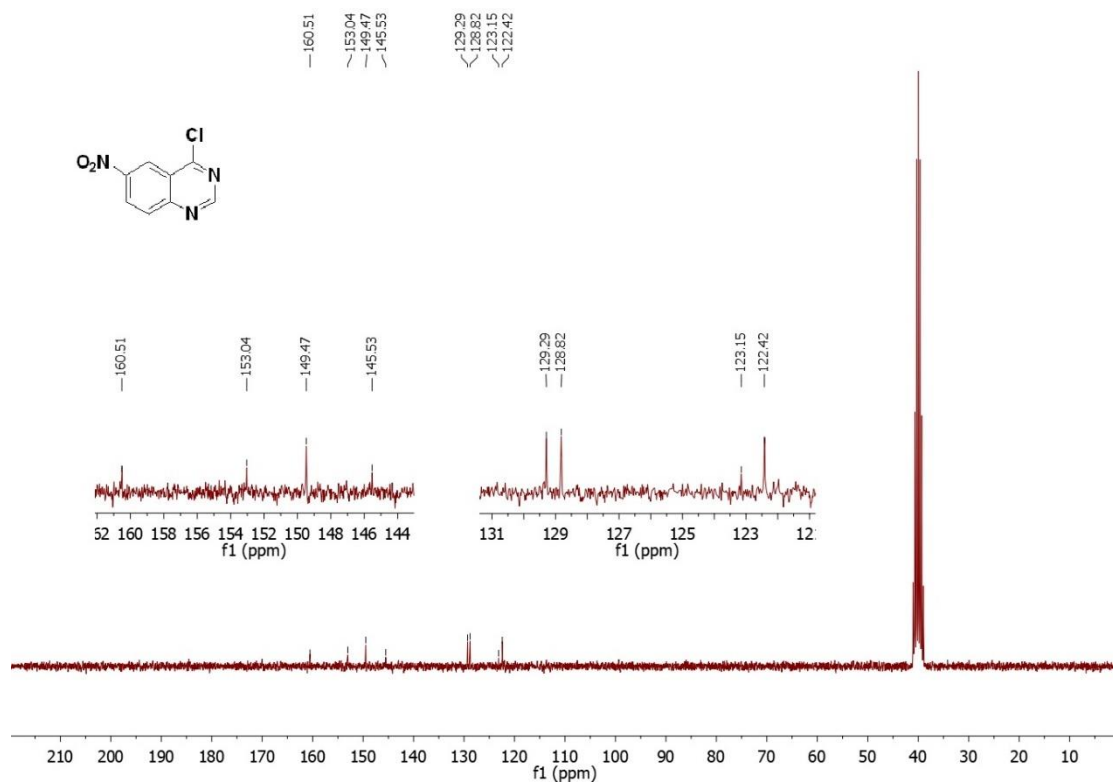
6.2.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκινναζολίνη (5β)

Η d κορυφή στα 8.81 ppm αντιστοιχεί στο H_1 στη θέση 5, καθώς εμφανίζει $^4J = 2.7$ Hz που οφείλεται σε H σε μετα-θέση. Η dd κορυφή στα 8.56 ppm οφείλεται στο H_2 στη θέση 7 καθώς εμφανίζει $^3J = 9.0$ Hz λόγω ύπαρξης H σε ορθο-θέση και $^4J = 2.7$ Hz που

φανερώνει ύπαρξη Η σε μετα-θέση, ίδια με αυτή του Η₁. Η s κορυφή στα 8.35 ppm οφείλεται στο Η₃ στη θέση 2. Τέλος, η d κορυφή στα 7.88 ppm οφείλεται στο Η₄ στη θέση 8 καθώς παρουσιάζει τιμή ³J = 9.0 Hz ίδια με αυτή του Η₂, άρα είναι γειτονικό με το Η₂ σε ορθο-θέση.

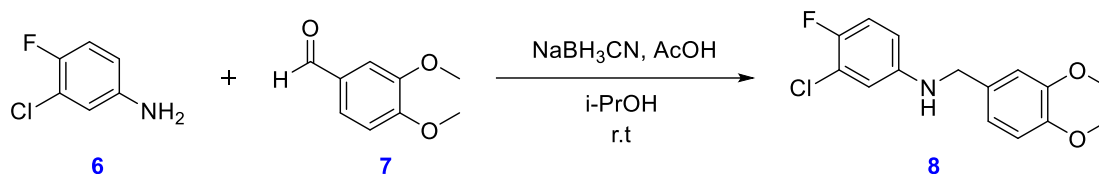


Εικόνα 6.2.6ι: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκιναζολίνης (5β).



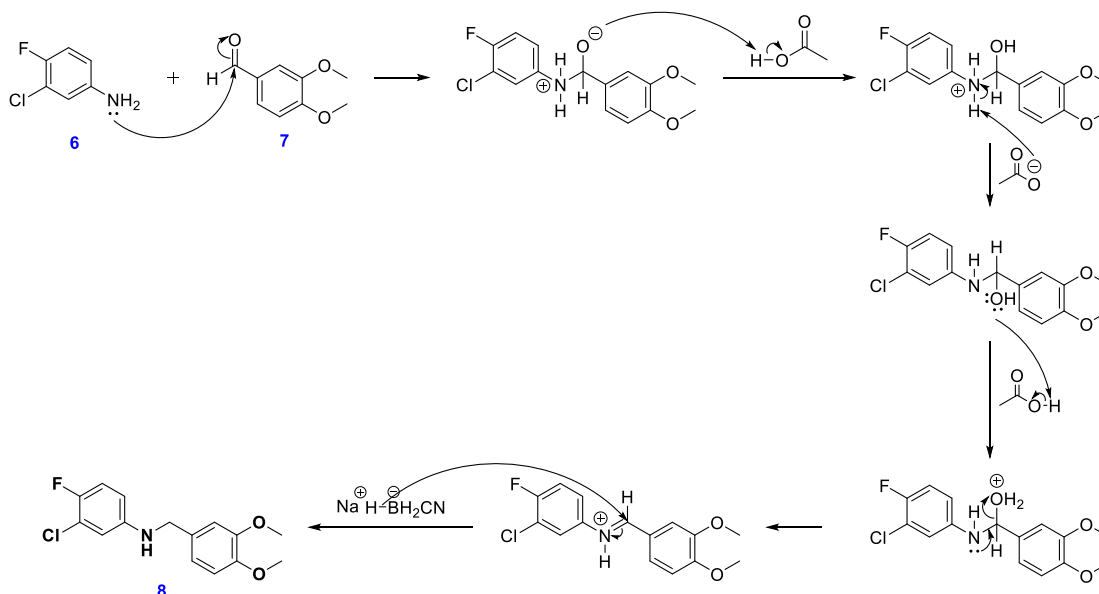
Εικόνα 6.2.6ii: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκιναιζολίνης (5β).

6.2.7 Σύνθεση της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνη (8)



Εικόνα 6.2.7: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνης (8).

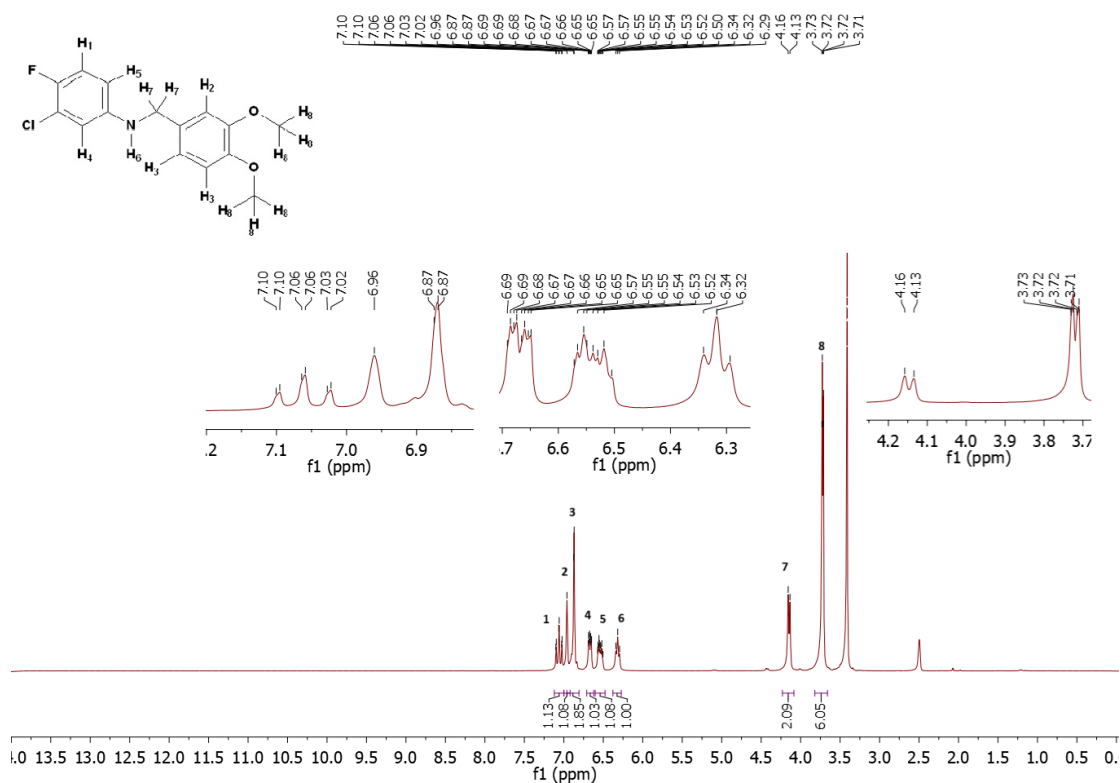
Η ένωση 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνη σχηματίζεται μέσω μιας αντίδρασης αναγωγικής αμίνωσης. Το μονήρες ζεύγος του N της ένωσης 6 προσβάλλει τον καρβονυλικό C της ένωσης 7 σχηματίζοντας θετικό φορτίο στο N και αρνητικό φορτίο στο O, το οποίο στη συνέχεια πρωτονιώνεται από το H του AcOH. Η παρουσία AcOH στην αντίδραση επιφέρει όξινες συνθήκες (pH=3-4) στις οποίες έχει βρεθεί ότι η αντίδραση πραγματοποιείται στη βέλτιστη απόδοση. Ακολουθεί αποπρωτονίωση του θετικά φορτισμένου N και πρωτονίωση της υδροξυλομάδας με σκοπό τη μετατροπή της σε καλή αποχωρούσα ομάδα. Ακολουθεί σχηματισμός διπλού δεσμού μεταξύ N=C και αποβολή ενός μορίου H_2O . Τέλος, μεταφορά ενός υδριδίου από το αναγωγικό αντιδραστήριο NaBH_3CN ανάγει το διπλό δεσμό δίνοντας το τελικό προϊόν 8. Είναι μία αντίδραση αναγωγής της αμινομάδας (από 1^ο ταγής σε 2^ο ταγής) ενώ ταυτόχρονα η εισαγωγή της υποκατεστημένης βένζυλο ομάδας λειτουργεί σαν προστατευτική ομάδα στην ανιλίνη ώστε να αξηθεί η δραστηρότητά της με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της επερχόμενης αντίδρασης.



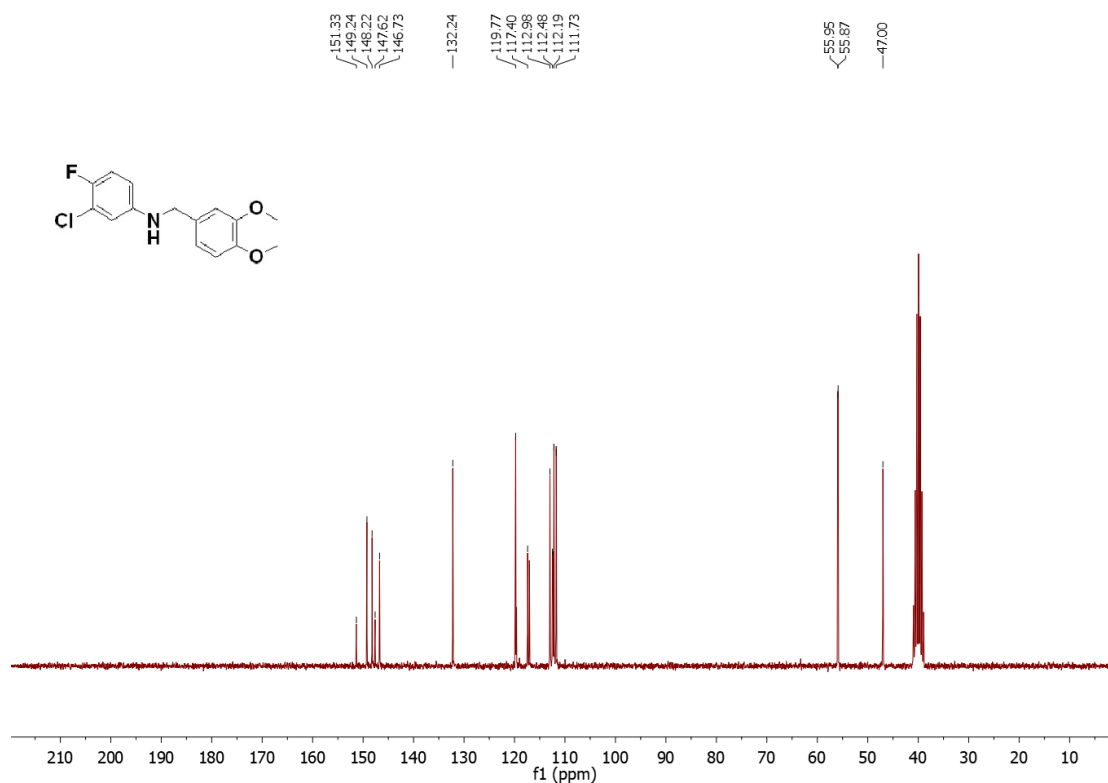
Σχήμα 6.2.7: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνης (8).

6.2.8 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθόξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνη (8)

Το πιο αποπροστατευμένο H είναι το H₁ το οποίο δίνει μία td κορυφή στα 7.06 ppm καθώς σχάζεται από 1 H και 1 F σε ορθο-θέση ως προς αυτό δίνοντας μια $^3J = 9.1$ Hz και $^5J = 1.3$ Hz που οφείλεται σε H σε παρα-θέση. Η s κορυφή στα 6.96 ppm οφείλεται στο H₂ καθώς δεν έχει γειτονικά H. Η d στα 6.87 ppm αντιστοιχεί σε 2 H και συγκεκριμένα οφείλεται στα H₃. Η ddd κορυφή στα 6.67 ppm οφείλεται στο H₄ το οποίο παρουσιάζει $^4J = 6.4$ Hz λόγω ύπαρξης F σε μετα-θέση, $^4J = 2.8$ Hz λόγω παρουσίας H σε μετα-θέση και $^5J = 1.3$ Hz, ίδια με αυτή του H₁, κάτι που φανερώνει H σε παρα-θέση. Η dq κορυφή στα 6.54 ppm οφείλεται στο H₅, το οποίο εμφανίζει $^3J = 11.1$ Hz λόγω παρουσίας H σε ορθο-θέση, $^4J = 3.5$ Hz λόγω ύπαρξης F σε μετα-θέση και $^4J = 2.5$ Hz από το H, επίσης, σε μετα-θέση ως προς αυτό. Η t κορυφή στα 6.32 ppm οφείλεται στο H₆ το οποίο σχάζεται από τα 2 γειτονικά του H με $^3J = 5.9$ Hz. Η d κορυφή στα 4.15 ppm οφείλεται στα 2 H₇ καθώς σχάζονται μόνο από το γειτονικό H₆ με $^3J = 5.9$ Hz. Τέλος, η dd κορυφή στα 3.72 ppm αντιστοιχεί σε 6 H και οφείλεται στα H των 2 μεθόξυ ομάδων.

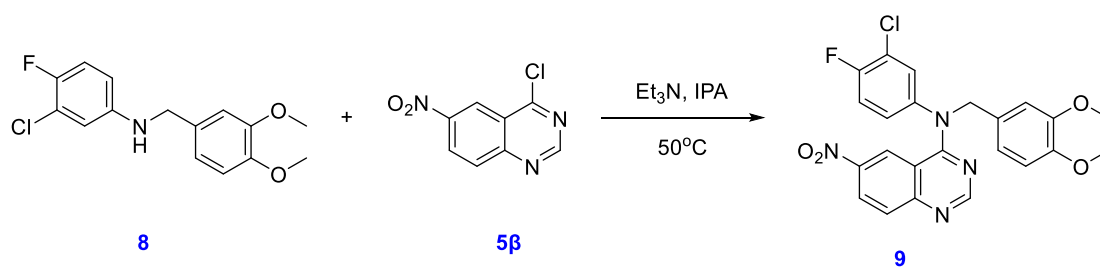


Εικόνα 6.2.8i: Φάσμα 1H NMR της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθόξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνης (8).



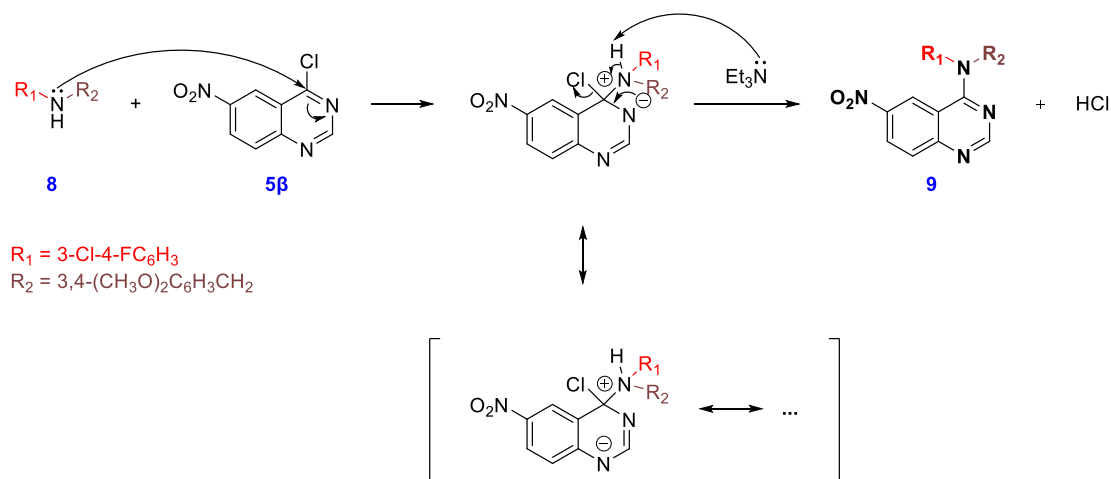
Εικόνα 6.2.8ii: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 3-χλώρο-*N*-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνης (8).

6.2.9 Σύνθεση της ένωσης *N*-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-*N*-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκινναζολιν-4-αμίνη (9)



Εικόνα 6.2.9: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης *N*-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-*N*-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκινναζολιν-4-αμίνης (9).

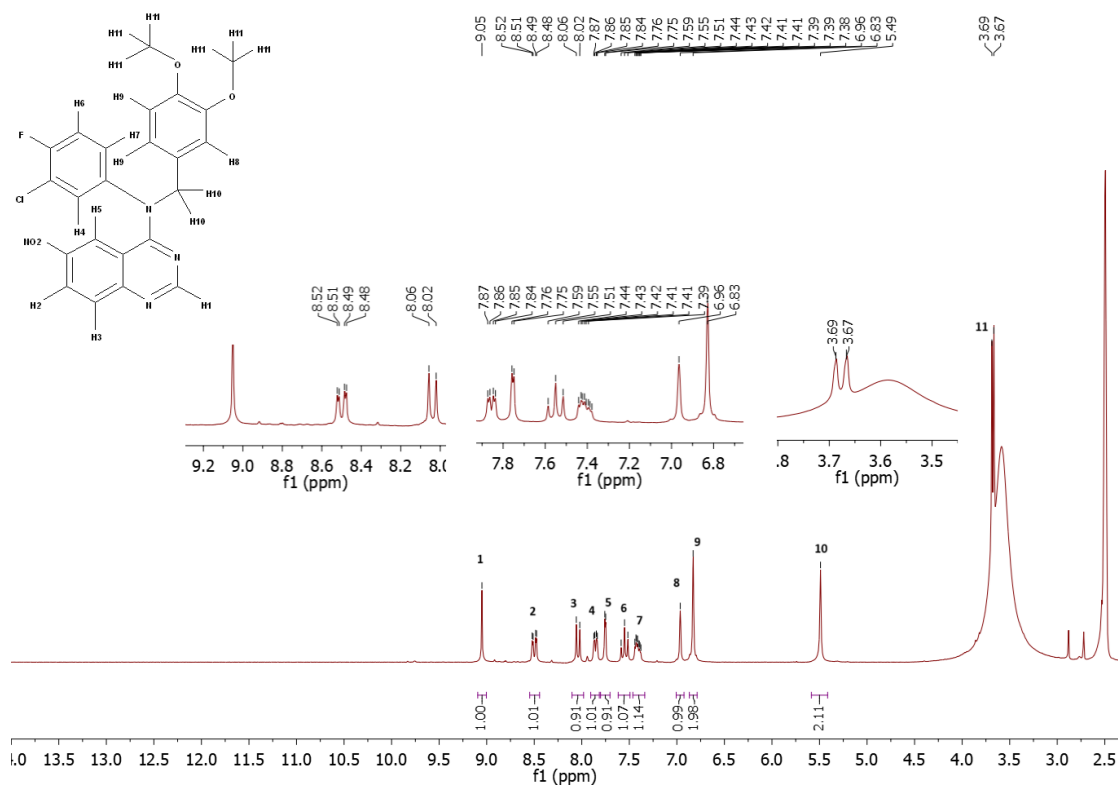
Πρόκειται για αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του N της ένωσης 8 προσβάλλει τον C4 της ένωσης 5β, δημιουργώντας θετικό φορτίο στο προαναφερόμενο N και αρνητικό στο N στη θέση 3 του κινναζολινικού δακτυλίου. Η προσθήκη βάσης (Et_3N) αποσκοπεί στην αποπρωτονίωση του θετικά φορτισμένου N, ενώ ταυτόχρονα η κατανομή του αρνητικού φορτίου στον κινναζολινικό δακτύλιο μέσω των δομών συντονισμού οδηγεί στην απομάκρυνση της αποχωρούσας ομάδας (Cl) ως HCl δίνοντας το τελικό προϊόν 9.



Σχήμα 6.2.9: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης *N*-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-*N*-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκιναζολιν-4-αμίνης (9).⁷³

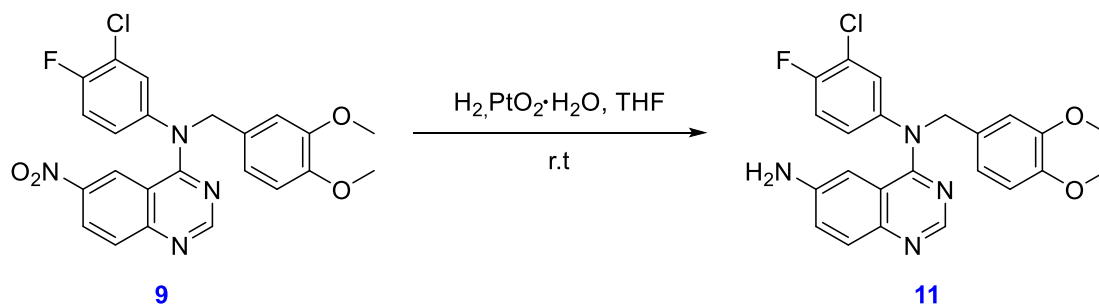
6.2.10 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης *N*-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-*N*-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκιναζολιν-4-αμίνη (9)

Το πιο αποπροστατευμένο H είναι το H₁ το οποίο δίνει μία s κορυφή στα 9.05 ppm. Η dd κορυφή στα 8.50 ppm οφείλεται στο H₂ καθώς εμφανίζει ³J = 9.2 Hz λόγω παρουσίας H σε ορθο-θέση και ⁴J = 2.5 Hz λόγω ύπαρξης H σε μετα-θέση. Η d κορυφή στα 8.04 ppm οφείλεται στο H₃ καθώς εμφανίζει ³J = 9.1 Hz, παραπλήσια τιμή με αυτή του H₂, φανερώνοντας πως το H₃ είναι γειτονικό σε ορθο-θέση με το H₂. Η dd κορυφή στα 7.85 ppm οφείλεται στο H₄ καθώς έχει ⁴J = 6.6 Hz λόγω ύπαρξης F σε μετα-θέση και ⁴J = 2.6 Hz από το H, επίσης, σε μετα-θέση ως προς αυτό. Η d στα 7.75 ppm οφείλεται στο H₅, το οποίο εμφανίζει ⁴J = 2.4 Hz, παραπλήσια τιμή με αυτή του H₂, άρα το H₅ βρίσκεται σε μετα-θέση ως προς το H₂. Η t κορυφή στα 7.55 ppm οφείλεται στο H₆ καθώς σχάζεται από 1 H και 1 F σε ορθο-θέση ως προς αυτό δίνοντας μια ³J = 8.9 Hz. Η ddd κορυφή στα 7.41 ppm οφείλεται στο H₇ το οποίο παρουσιάζει ³J = 8.8 Hz λόγω ύπαρξης H σε ορθο-θέση, ⁴J = 4.4 Hz λόγω παρουσίας F σε μετα-θέση και ⁴J = 2.7 Hz, παραπλήσια με αυτή του H₄, κάτι που φανερώνει πως τα H₄ και H₇ βρίσκονται σε μετα-θέση μεταξύ τους. Η s κορυφή στα 6.96 ppm οφείλεται στο H₈ καθώς δεν έχει γειτονικά H. Η s στα 6.83 ppm αντιστοιχεί σε 2 H και συγκεκριμένα οφείλεται στα H₉. Η s κορυφή στα 5.49 ppm οφείλεται στα 2 H₁₀ καθώς δεν βρίσκονται σε αρωματική περιοχή και δεν σχάζονται από γειτονικό H. Τέλος, η d κορυφή στα 3.68 ppm αντιστοιχεί σε 6 H και οφείλεται στα H των 2 μεθόξυ ομάδων. Ωστόσο, δεν γίνεται η ολοκλήρωση τους επειδή η κορυφή αυτή συμπίπτει με την κορυφή του νερού οπότε η τιμή της ολοκλήρωσης επηρεάζεται.



Εικόνα 6.2.10: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης N -(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)- N -(3,4-διμεθοξυβενζύλ)-6-νιτροκινναζολιν-4-αμίνης (9).

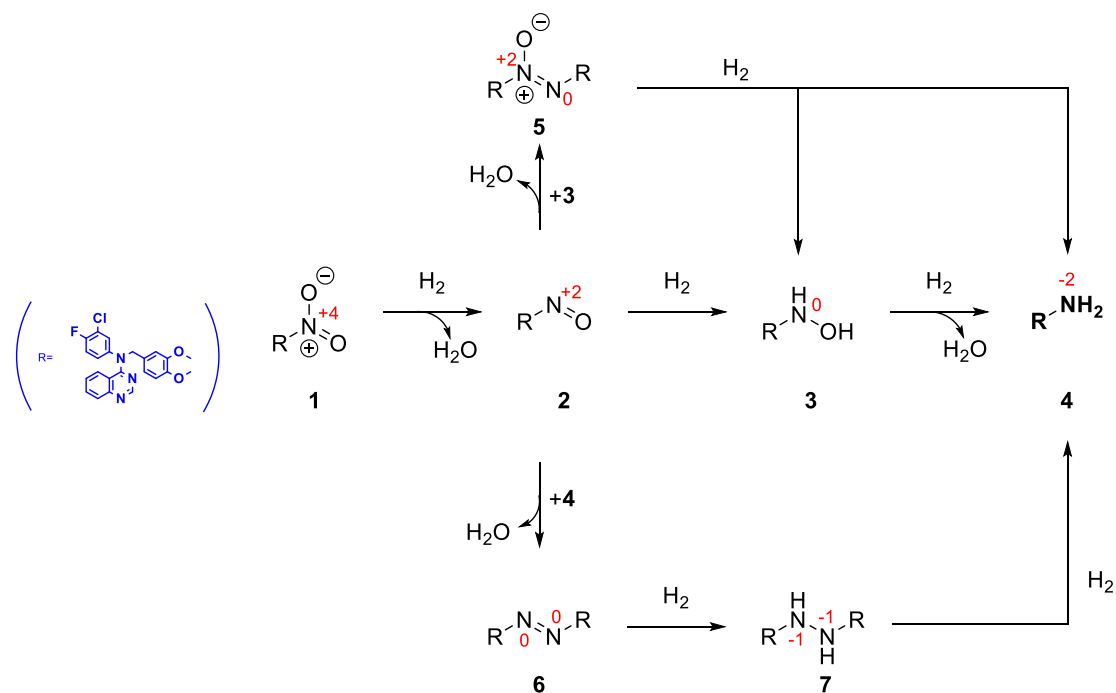
6.2.11 Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης N^4 -(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)- N^4 -(3,4-διμεθοξυβενζύλ)κινναζολίνη-4,6-διαμίνης (11)



Εικόνα 6.2.11: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης N^4 -(3-χλώρο-4-φθοροφαίνυλ)- N^4 -(3,4-διμεθοξυβενζύλ)κινναζολίνη-4,6-διαμίνης (11).

Πρόκειται για μία αντίδραση καταλυτικής υδρογόνωσης της ένωσης 8 με τη χρήση του αντιδραστήριου Adams ($\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) και μπαλόνι υδρογόνου. Ο καταλύτης Adams δεν είναι ενεργός για υδρογόνωση από μόνος του. Παρουσία υδρογόνου μετατρέπεται στη δραστήκη του μορφή (ανηγμένη μορφή) που ονομάζεται Platinum black, λόγω του μαύρου χρώματος που λαμβάνει η πλατίνα στην οξειδωτική κατάσταση μηδέν, Pt (0). Στην επιφάνεια του Pt (0) λαμβάνει χώρα η εκλεκτική αναγωγή της νιτρο-ομάδας σε αμινο-ομάδα σε ουδέτερες συνθήκες και σε απρωτικό διαλύτη όπως το τετραϋδροφουράνιο. Όπως φαίνεται και από το μηχανισμό, η νιτροένωση 1 ανάγεται

πρώτα στο νιτροζο ενδιάμεσο 2, μετά στην υδροξυλαμίνη 3 και τέλος στην αμίνη 4 μέσω της διάσπασης του δεσμού N–O. Ωστόσο, πέρα από τις διαδοχικές αναγωγές, πραγματοποιούνται αντιδράσεις μεταξύ των ενδιάμεσων προϊόντων που προκύπτουν, δίνοντας προϊόντα, τα οποία επίσης με αναγωγή δίνουν την αμίνη 4. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η αντίδραση να ολοκληρώνεται με ποσοτική μετατροπή της ένωσης 9 στην ένωση 11.

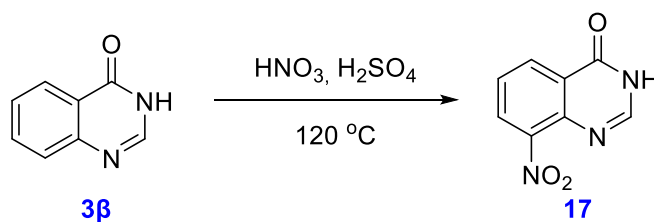


Σχήμα 6.2.11: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης N^{\oplus} -(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)- N^{\oplus} -(3,4-διμεθοξυβένζυλ)κιναζολίνη-4,6-διαμίνης (11).⁷⁴

Ωστόσο, παρόλο που η αντίδραση ολοκληρώθηκε, λόγω έλλειψης χρόνου το μίγμα της αντίδρασης δεν επεξεργάστηκε ώστε να γίνει απομόνωση της σχηματιζόμενης κηλίδας και ταυτοποίησή της.

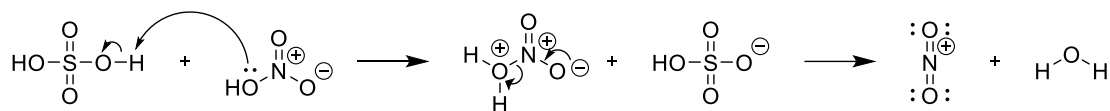
6.3 Πειράματα σύνθεσης ενδιάμεσων ενώσεων για τη σύνθεση των αναλόγων Dac4 και Dac5

6.3.1 Σύνθεση της ένωσης 8-νιτροκιναζολίν-4(3H)-όνης (17)



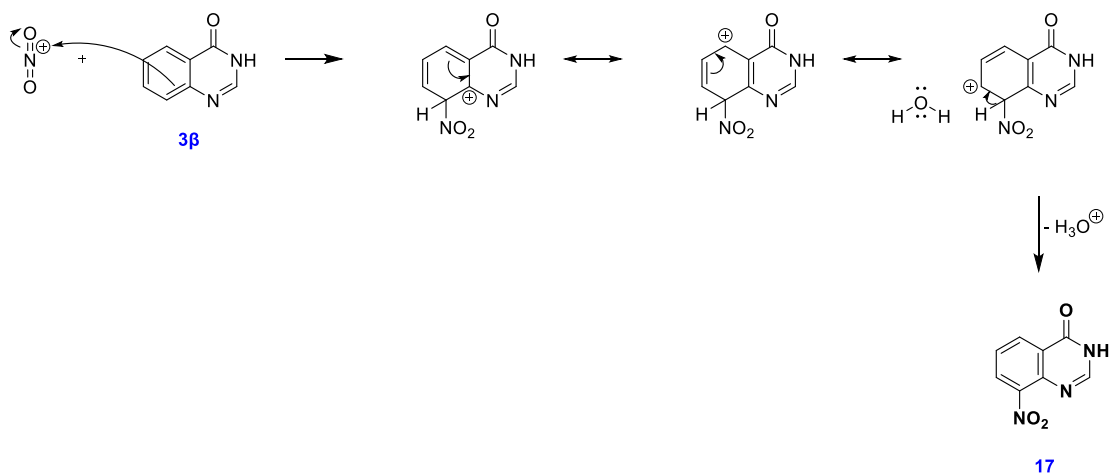
Εικόνα 6.3.1: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης 8-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνης (17).

Η εισαγωγή μιας νιτροομάδας στον κιναζολινικό δακτύλιο επιτυγχάνεται με μια αντίδραση νίτρωσης. Χρησιμοποιείται μίγμα $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ τα οποία με αποβολή HSO_4^- και ενός μορίου H_2O σχηματίζουν το ιόν νιτρωνίου.



Σχήμα 6.3. Ii: Δημιουργία ιόντος νιτρωνίου.

Στη συνέχεια, το ιόν νιτρωνίου προσβάλλεται από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του κιναζολινικού δακτυλίου μέσω μια αντίδρασης ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Αποσπάται το πρωτόνιο από τη θέση εισαγωγής της νιτροομάδας στο σίγμα σύμπλοκο αποκαθιστώντας την αρωματικότητα του δακτυλίου δίνοντας το επιθυμητό προϊόν.

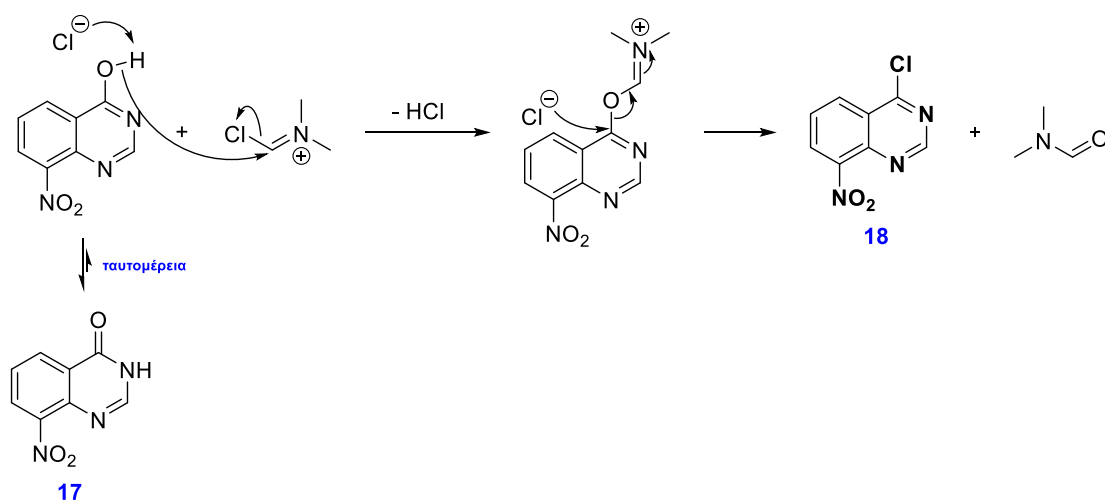


Σχήμα 6.3. Iii: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 8-νιτροκιναζολίν-4(3H)-όνης (17).

6.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 8-νιτροκιναζολίν-4(3H)-όνη (17)

Το πιο αποπροστατευμένο H είναι το αμιδικό (H_1 στη θέση 3) το οποίο δίνει μία ευρεία, s κορυφή στα 12.71 ppm. Η dd κορυφή στα 8.35 ppm αντιστοιχεί στο H_2 στη θέση 5, καθώς εμφανίζει $^3\text{J} = 8.0 \text{ Hz}$ που οφείλεται σε H σε ορθο-θέση και $^4\text{J} = 1.5 \text{ Hz}$ που οφείλεται σε H σε μετα-θέση. Η dd κορυφή στα 8.29 ppm οφείλεται στο H_3 στη θέση 7 καθώς εμφανίζει $^3\text{J} = 7.8 \text{ Hz}$ λόγω ύπαρξης H σε ορθο-θέση και $^4\text{J} = 1.5 \text{ Hz}$ που φανερώνει ύπαρξη H σε μετα-θέση, ίδια με αυτή του H_2 . Η d κορυφή στα 8.24 ppm οφείλεται στο H_4 στη θέση 2. Τέλος, η td κορυφή στα 7.67 ppm οφείλεται στο H_5 στη θέση 6 καθώς έχει δύο γειτονικά H και παρουσιάζει τιμή $^3\text{J} = 7.9 \text{ Hz}$ παραπλήσια με αυτή του H_3 , άρα είναι γειτονικό με το H_3 σε ορθο-θέση και $^4\text{J} = 1.3 \text{ Hz}$.

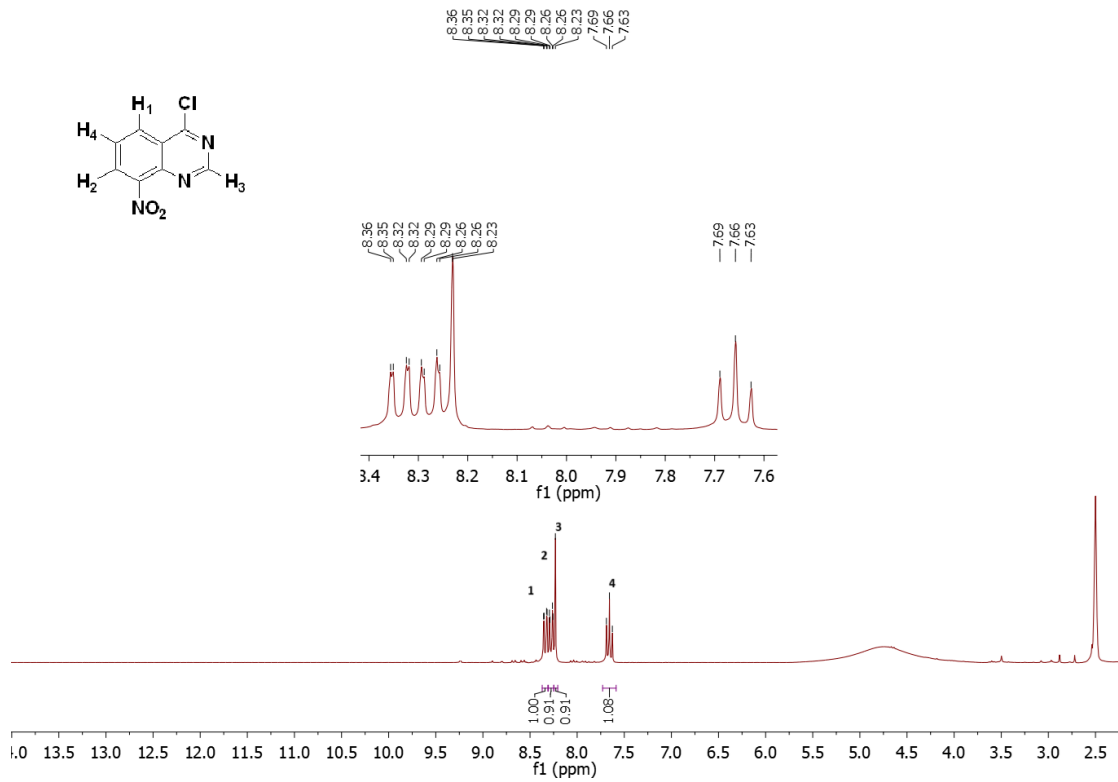
απελευθερώνοντας ένα άτομο Cl, το οποίο σε επόμενο βήμα προσβάλλει τον C4 του υποστρώματος δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 18 και το αντιδραστήριο DMF.



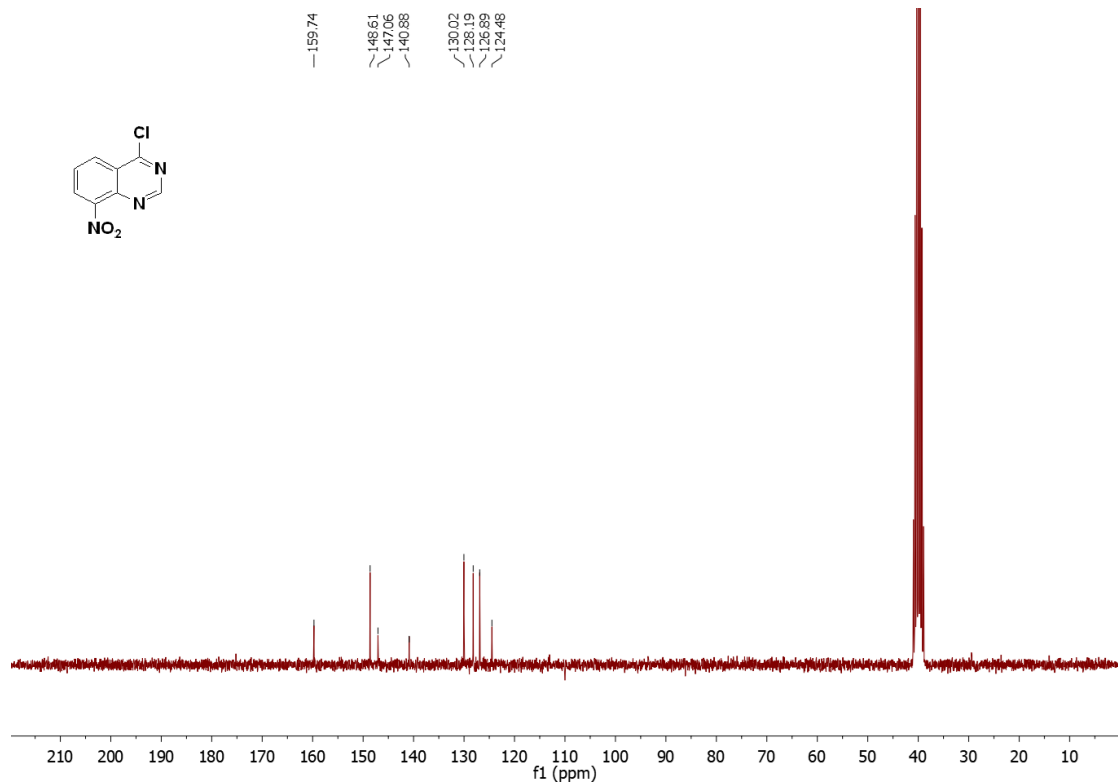
Σχήμα 6.3.3ii: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκιναζολίνης (18).

6.3.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκιναζολίνη (18)

H dd κορυφή στα 8.34 ppm αντιστοιχεί στο H₁ στη θέση 5, καθώς εμφανίζει ³J = 8.0 Hz που φανερώνει ύπαρξη H σε ορθο-θέση και ⁴J = 1.4 Hz που οφείλεται σε H σε μετα-θέση. H dd κορυφή στα 8.28 ppm οφείλεται στο H₂ στη θέση 7 καθώς εμφανίζει ³J = 7.9 Hz λόγω ύπαρξης H σε ορθο-θέση και ⁴J = 1.5 Hz που φανερώνει ύπαρξη H σε μετα-θέση, ίδια με αυτή του H₁. H s κορυφή στα 8.23 ppm οφείλεται στο H₃ στη θέση 2. Τέλος, η t κορυφή στα 7.66 ppm οφείλεται στο H₄ στη θέση 6 καθώς έχει 2 γειτονικά H και παρουσιάζει τιμή ³J = 7.9 Hz ίδια με αυτή του H₂, άρα είναι γειτονικό με το H₂ σε ορθο-θέση.

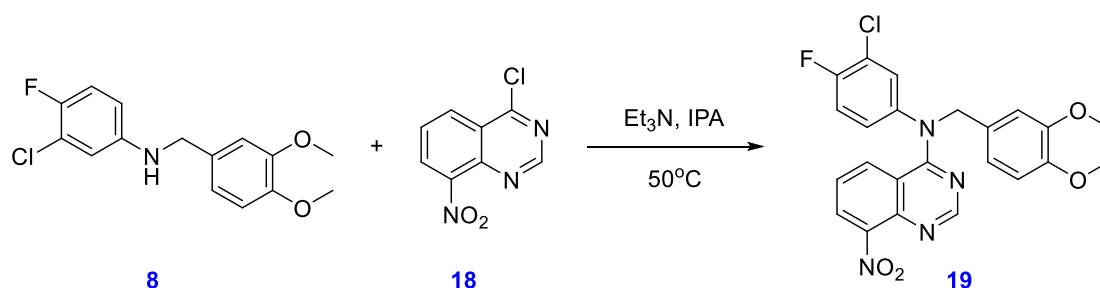


Εικόνα 6.3.3i: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκινναζολίνης (18).



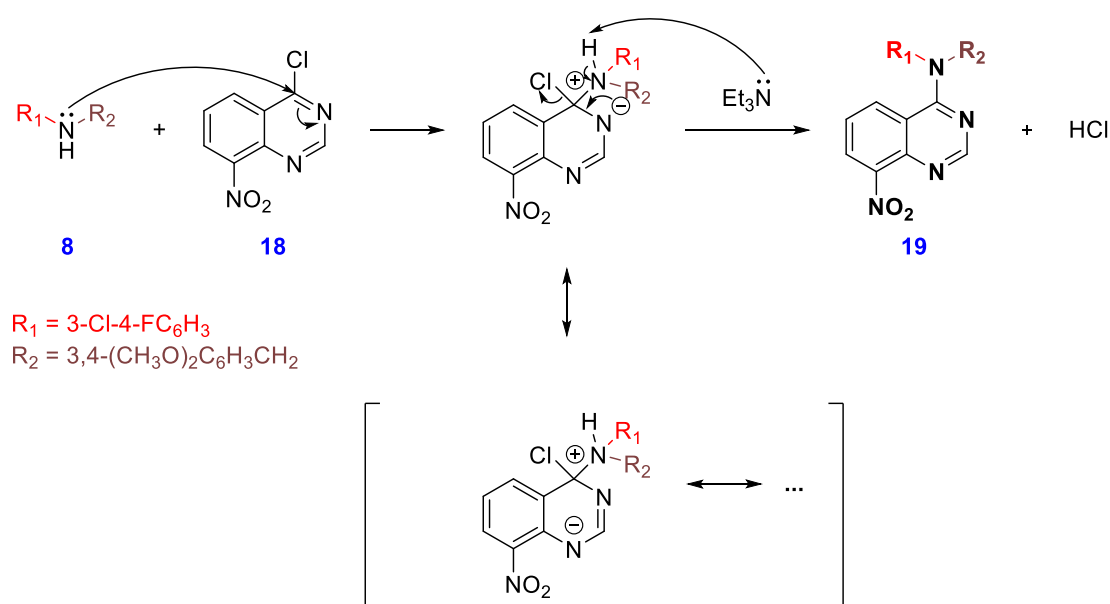
Εικόνα 6.3.4ii: Φάσμα ¹³C NMR της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκινναζολίνης (18).

6.3.5 Προσπάθεια σύνθεσης της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβένζυλ)-8-νιτροκιναζολίν-4-αμίνη (19)



Εικόνα 6.3.5: Αντίδραση σχηματισμού της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβένζυλ)-8-νιτροκιναζολίν-4-αμίνης (19).

Πρόκειται για αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του N της ένωσης 8 προσβάλλει τον C4 της ένωσης 18, δημιουργώντας θετικό φορτίο στο προαναφερόμενο N και αρνητικό στο N στη θέση 3 του κιναζολινικού δακτυλίου. Η προσθήκη βάσης (Et_3N) αποσκοπεί στην αποπρωτονίωση του θετικά φορτισμένου N, ενώ ταυτόχρονα η κατανομή του αρνητικού φορτίου στον κιναζολινικό δακτύλιο μέσω των δομών συντονισμού οδηγεί στην απομάκρυνση της αποχωρούσας ομάδας (Cl) ως HCl δίνοντας το τελικό προϊόν 19.



Σχήμα 6.3.5: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβένζυλ)-8-νιτροκιναζολίν-4-αμίνης (19).⁷³

Λόγω έλλειψης χρόνου παρόλο που η αντίδραση ολοκληρώθηκε, δεν έγινε επεξεργασία του μίγματος της αντίδρασης ώστε να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί η κηλίδα του προϊόντος.

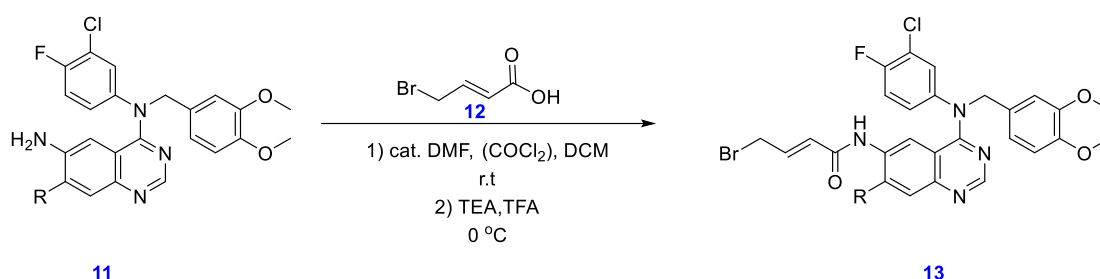
Κεφάλαιο 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Περιγραφή επόμενων αντιδράσεων της πορείας που δεν πραγματοποιήθηκαν

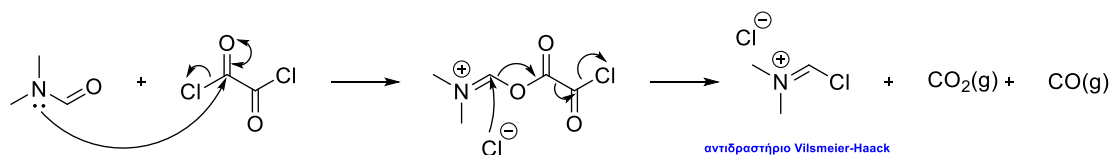
Οι παρακάτω αντιδράσεις δεν πραγματοποιήθηκαν λόγω έλλειψης χρόνου. Παρακάτω θα παρουσιαστούν οι συνθήκες πραγματοποίησής τους και θα αναλυθούν οι μηχανισμοί τους όπως προτείνονται από τις βελτιωμένες πορείες σύνθεσης του φαρμάκου. Ωστόσο, είχαν σχεδιαστεί τρόποι βελτιστοποίησής τους χωρίς όμως αυτοί να προλάβουν να δοκιμαστούν.

7.1.1 Δημιουργία αμιδικού δεσμού



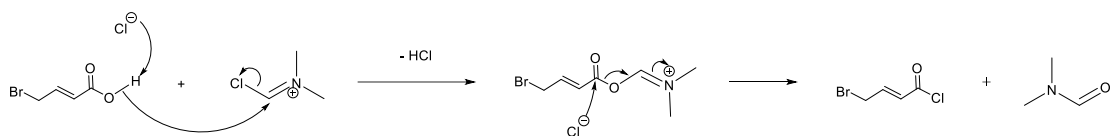
Εικόνα 7.1.1: Αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού.

Η σύνθεση του 11 γίνεται μέσω μιας *one pot* αντίδρασης κατά την οποία, σε πρώτο στάδιο γίνεται μετατροπή ενός οξέος στο αντίστοιχο χλωρίδιο και στη συνέχεια το χλωρίδιο αντιδρά μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης με την ανιλίνη 10 για τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος. Η μετατροπή του οξέος σε χλωρίδιο γίνεται χρησιμοποιώντας καταλυτική ποσότητα DMF, (COCl_2) και διαλύτη διχλωρομεθάνιο σε θερμοκρασία δωματίου. Το (COCl_2) αντιδρά με την καταλυτική ποσότητα του DMF σχηματίζοντας το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack απελευθερώνοντας αέρια CO_2 και CO .



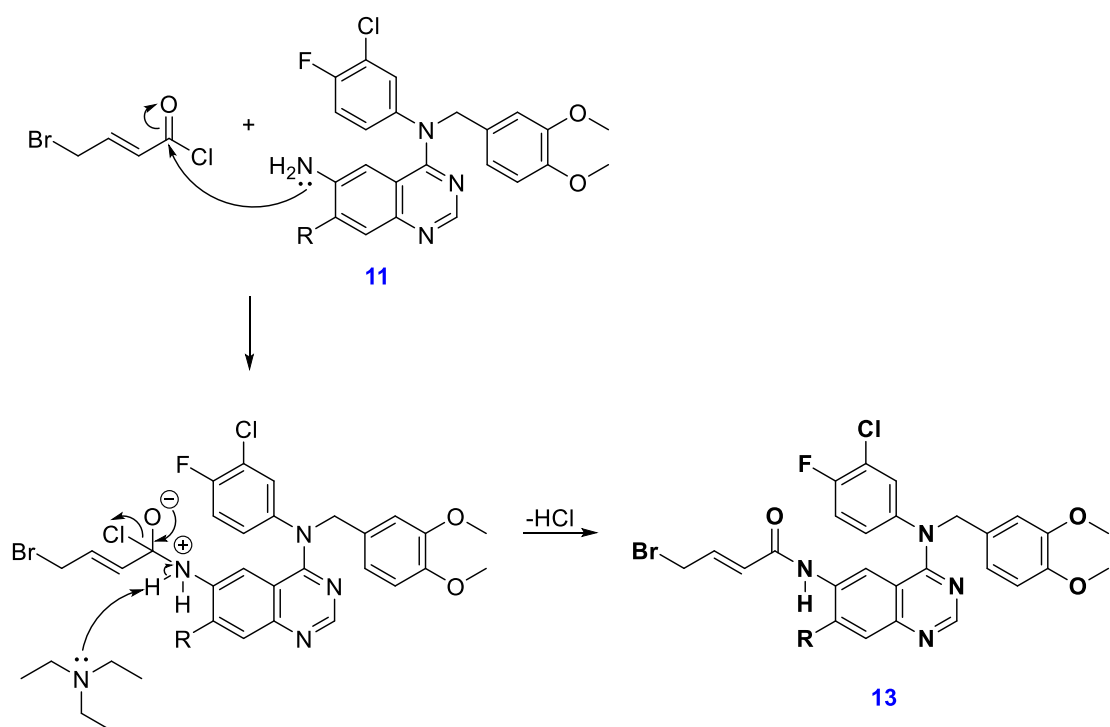
Σχήμα 7.7.1i: Δημιουργία αντιδραστήριου Vilsmeier-Haack.

Το αρνητικά φορτισμένο Cl πρωτονιώνεται από το H της καρβοξυλομάδας του οξέος φεύγοντας ως HCl . Το αρνητικά φορτισμένο O προσβάλλει το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack απελευθερώνοντας ένα άτομο Cl, το οποίο σε επόμενο βήμα προσβάλλει τον C1 του υποστρώματος δίνοντας το επιθυμητό χλωρίδιο και το αντιδραστήριο DMF.



Σχήμα 7.7.1ii: Μηχανισμός μετατροπής οξέος σε χλωρίδιο.

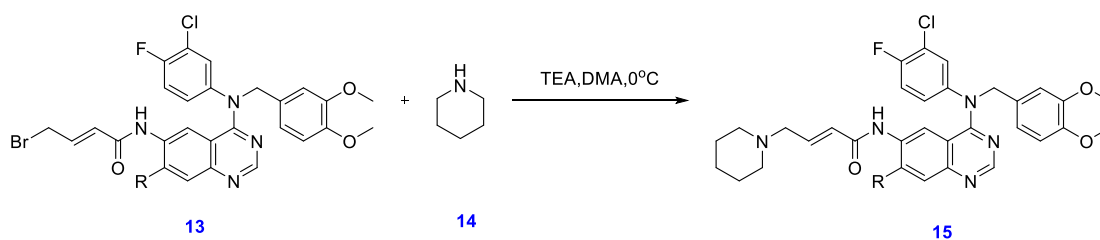
Αμέσως μετά, το παραγόμενο χλωρίδιο αντιδρά με την ανιλίνη 11 παρουσία Et_3N σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο στους 0°C . Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την προσβολή του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του N της ένωσης 11 στον Cl του χλωριδίου, δημιουργώντας θετικό φορτίο στο προαναφερόμενο N και αρνητικό στο O του καρβονυλίου. Η προσθήκη βάσης (Et_3N) αποσκοπεί στην αποπρωτονίωση του θετικά φορτισμένου N, ενώ ταυτόχρονα ο σχηματισμός διπλού δεσμού $\text{C}=\text{O}$ οδηγεί στην απομάκρυνση της αποχωρούσας ομάδας (Cl^-) ως HCl δίνοντας το τελικό προϊόν 13.



Σχήμα 7.1.1iii: Μηχανισμός πυρηνόφιλης υποκατάστασης για το σχηματισμό της ένωσης 13.

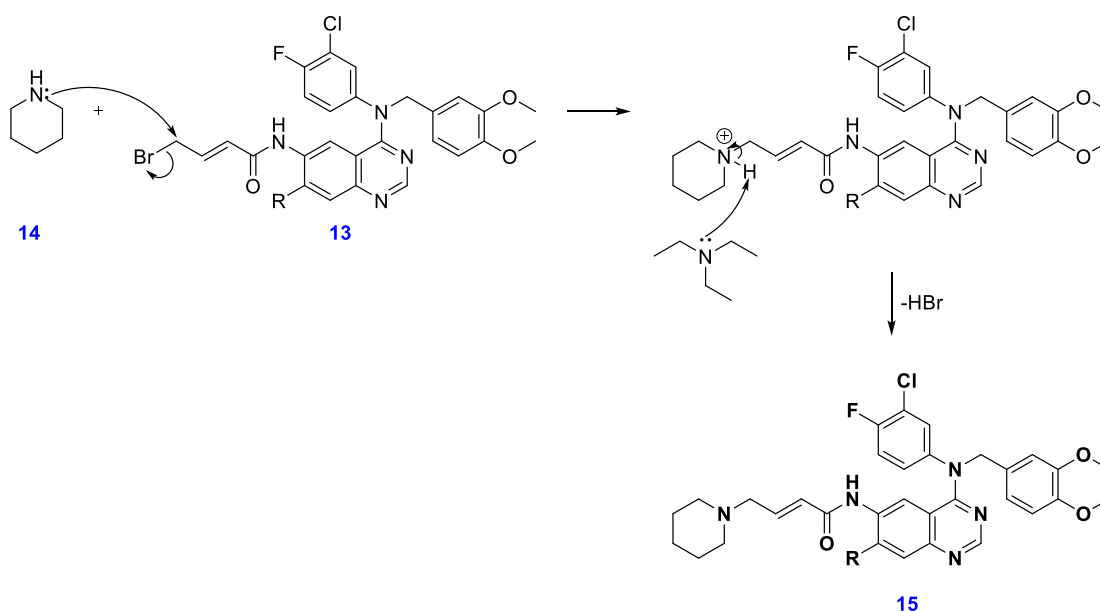
7.1.2 Πυρηνόφιλη υποκατάσταση για τη σύνθεση αναλόγου

Η πορεία του φαρμάκου περιλαμβάνει την αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης με την πιπεριδίνη, ωστόσο για τη σύνθεση αναλόγων όπως περιγράφηκε και στο κεφάλαιο 5 χρησιμοποιούνται N-μεθυλοπιπεραζίνη και μορφολίνη. Ο μηχανισμός της αντίδρασης θα δείχτεί χρησιμοποιώντας πιπεριδίνη, όμως είναι ο ίδιος και για τα δύο άλλα αντιδραστήρια.



Εικόνα 7.1.2: Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 15.

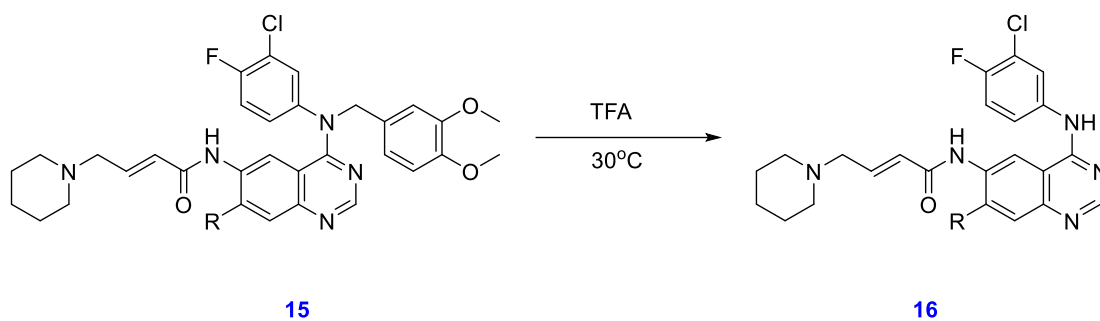
Πρόκειται για μία αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης S_N2 καθώς το πρωτοταγές βρωμίδιο ευνοεί αυτό το μηχανισμό. Το μονήρες ζεύγος του N της πιπεριδίνης (πυρηνόφιλο) προσβάλλει τον C1 ως προς το βρώμιο, ενώ ταυτόχρονα γίνεται η απομάκρυνση της αποχωρούσας ομάδας (Br^-), δημιουργώντας θετικό φορτίο πάνω στο N της πιπεριδίνης. Η Et_3N αποπρωτονιώνει το θετικά φορτισμένο N, δίνοντας το προϊόν 11 και αποβάλλοντας HBr .



Σχήμα 7.1.2: Μηχανισμός πυρηνόφιλης υποκατάστασης S_N2 για τη σύνθεση της ένωσης 15.

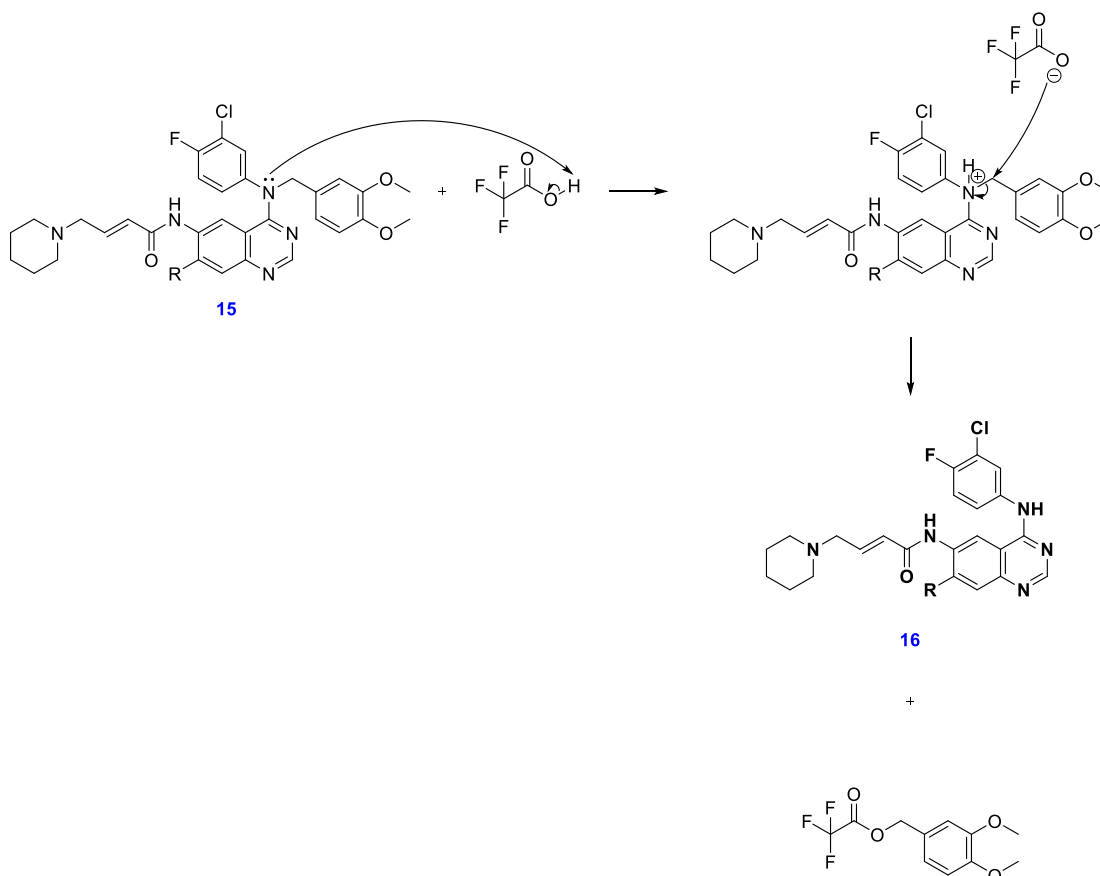
7.1.3 Αντίδραση αποπροστασίας

Το τελευταίο στάδιο της πορείας σύνθεσης περιλαμβάνει μία αντίδραση απομάκρυνσης της προστατευτικής ομάδας με τη χρήση τριφθοροξικού οξέος στους $30^\circ C$.



Εικόνα 7.1.3: Αντίδραση αποπροστασίας.

Το μονήρες ζεύγος του N της ένωσης 15 προσβάλλει το H του τριφθοροξικού οξέος, δημιουργώντας θετικό φορτίο στο N και αρνητικό στο O του TFA. Στη συνέχεια, το αρνητικό φορτίο του O προσβάλλει τον γειτονικό C ως προς το N, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν 16, όπως φαίνεται και στο σχήμα.



Σχήμα 7.1.3: Μηχανισμός απομάκρυνσης της προστατευτικής ομάδας για τη σύνθεση του τελικού προϊόντος 16.

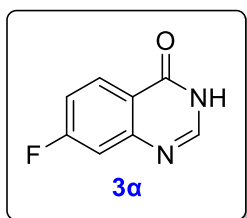
Κεφάλαιο 8

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.1 Συσκευές και όργανα

Τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας X3-210. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικές ενώσεις για την διεξαγωγή των πειραμάτων προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma Aldrich, Alfa Aesar Fluorochem και Carbosynth, ήταν υψηλής καθαρότητας και δεν επεξεργάστηκαν πριν χρησιμοποιηθούν. Οι διαλύτες, που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των αντιδράσεων, προμηθεύτηκαν από τις ίδιες εταιρείες και είτε χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία είτε κατέστησαν απόλυτοι-άνυδροι όπου ήταν απαραίτητο. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται, επίσης, από τις παραπάνω εταιρείες. Ο έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων γινόταν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), με πλάκες silica gel F₂₅₄ ms των εταιρειών Merck και Fluorochem. Ο καθαρισμός και η απομόνωση των ενώσεων με χρωματογραφία στήλης γινόταν, επίσης, με Silica gel F₂₅₄ της εταιρείας Fluorochem. Οι ενδιάμεσες ενώσεις που συντέθηκαν, ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) σε φασματογράφο Bruker AV 250 MHz.

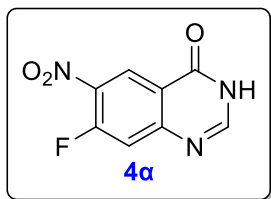
8.2 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόροκιναζολιν-4(3H)-όνη (3α)



Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml φέρονται 0.50 g της ένωσης 2-άμινο-4-φθοροβενζοϊκό οξύ (3.22 mmol) και 5.00 ml φορμαμίδιου. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται στους 130°C μέχρι κατανάλωσης της αρχικής ένωσης. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιείται Οξικός Αιθυλεστέρας : Διχλωρομεθάνιο (5:1). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 6h. Μετά την ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, εκχυλίζεται με EtOAc/H₂O. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθούνται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης Οξικό Αιθυλεστέρα : Διχλωρομεθάνιο (1:1). Το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται και ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 0.38 g προϊόντος ως λευκό στερεό (72 %).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 12.34 (s, 1H), 8.18 (dd, J = 8.8, 6.4 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.50 – 7.42 (m, 1H), 7.37 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H).

8.3 Σύνθεση της ένωσης 7-φθόρο-6-νιτροκιναζολίν-4(3H)όνη (4α)

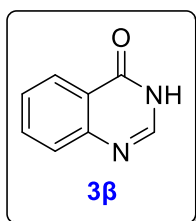


Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml φέρονται 3.80 ml HNO₃ ml και 6.08 ml H₂SO₄ υπό πάγο. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.38 g της ένωσης 7-φθοροκιναζολίν-4(3H)-όνης (2.31 mmol) σε δόσεις. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και έπειτα θερμαίνεται στους 100°C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Ως σύστημα

ανάπτυξης χρησιμοποιείται Εξάνιο : Οξικός Αιθυλεστέρας (1:1, 4 αναπτύξεις). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 4h. Μετά την ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 50 ml υδατικού διαλύματος NaOH 2N για την εξουδετέρωση των οξέων και γίνεται εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθούνται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης Οξικό Αιθυλεστέρα : Εξάνιο (1:1). Το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται και ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 0,18 g ως σκούρο κίτρινο στερεό (37 %).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 12.73 (s, 1H), 8.76 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.81 (d, J = 12.4 Hz, 1H).

8.4 Σύνθεση της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνη (3β)



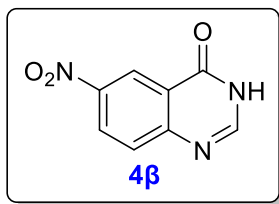
Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρονται 3.00 g της ένωσης 2-άμινοβενζοϊκό οξύ (21.87 mmol) και 20 ml φορμαμίδιου. Το μίγμα αναδεύεται και θερμαίνεται στους 125°C μέχρι κατανάλωσης της αρχικής ένωσης. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιείται Οξικός Αιθυλεστέρας : Διχλωρομεθάνιο (5:1). Η αντίδραση

ολοκληρώνεται στις 6h. Μετά την ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται μικρή ποσότητα παγωμένης MeOH και αφήνεται στο παγόνερο ώστε το στερεό προϊόν να καθιζάνει σαν ίζημα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό σε ηθμό Hirsch και το ίζημα ξεπλένεται με MeOH. Γίνεται ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 2.53 g προϊόντος ως λευκό στερεό (79 %).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 12.23 (s, 1H), 8.16 – 8.05 (m, 2H), 7.79 (ddd, J = 8.4, 7.1, 1.6 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 7.5 Hz, 1H).

¹³C NMR (62.5 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 161.21, 149.18, 145.86, 134.76, 127.64, 127.18, 126.28, 123.08.

8.5 Σύνθεση της ένωσης 6-νιτροκιναζολίν-4(3H)-όνη (4β)



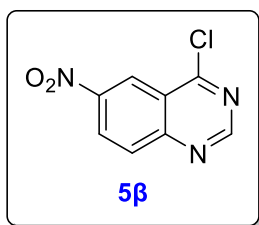
Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml φέρονται 14.75 ml HNO₃ ml και 16.00 ml H₂SO₄ υπό πάγο. Στη συνέχεια, προστίθενται 2.53 g της ένωσης κιναζολίν-4(3H)-όνης (17.30 mmol) σε δόσεις. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και έπειτα θερμαίνεται στους 100°C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC.

Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιείται Εξάνιο : Οξικός Αιθυλεστέρας (2:1, 4 αναπτύξεις). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 4h. Μετά την ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 50 ml υδατικού διαλύματος NaOH 2N για την εξουδετέρωση των οξέων και γίνεται εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθούνται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης Οξικό Αιθυλεστέρα : Διχλωρομεθάνιο (1:1). Το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται και ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 1.75 g ως κίτρινο στερεό (53 %).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 12.75 (s, 1H), 8.81 (dd, *J* = 2.8, 1.0 Hz, 1H), 8.55 (ddd, *J* = 9.0, 2.8, Hz, 1H), 8.32 (d, 1H), 7.87 (dd, *J* = 9.0, 1.0 Hz, 1H).

¹³C NMR (62.5 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 160.45, 152.90, 149.46, 145.48, 129.19, 128.78, 123.10, 122.37.

8.6 Σύνθεση της ένωσης 4-χλώρο-6-νιτροκιναζολίνη (5β)



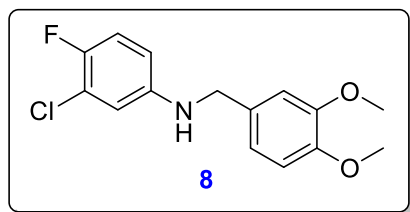
Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 1.75 g της ένωσης 6-νιτροκιναζολίν-4(3H)-όνης (8.35 mmol), 55 ml SOCl₂ και 50 μl (καταλυτική ποσότητα) DMF. Το μίγμα αναδεύεται και φέρεται σε συνθήκες βρασμού υπό επαναρροή (reflux). Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιείται

Εξάνιο : Οξικός Αιθυλεστέρας (2:1). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 2h. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και η περίσσεια ποσότητα του SOCl₂ διώχνεται με τη βοήθεια υδραντλίας. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με EtOAc/H₂O. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθούνται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το ίζημα ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 1.38 g ως κίτρινο στερεό (79 %).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 8.81 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.56 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H).

¹³C NMR (62.5 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 160.51, 153.04, 149.47, 145.53, 129.29, 128.82, 123.15, 122.42.

8.7 Σύνθεση της ένωσης 3-χλώρο-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-4-φθοροανιλίνη (8)



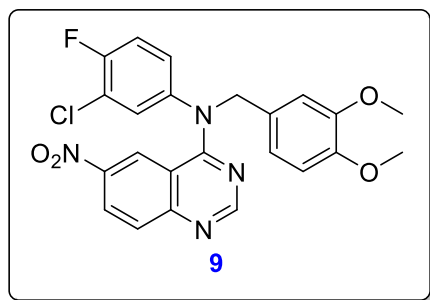
Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθενται 10 ml ισοπροπανόλης, και υπό ανάδευση διαλύονται 0.50 g 3-χλώρο-4-φθοροανιλίνη (3.43 mmol), 196.00 μl οξικό οξύ (3.43 mmol) και 0.57 g 3,4-διμεθοξυβενζυλαλδεΰδη (3.43 mmol) σιγά σιγά υπό πάγο. Στη συνέχεια, προστίθεται επίσης υπό πάγο

0.43 g NaBH_3CN (6.86 mmol) διαλυμένο σε 3 ml ισοπροπανόλη. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC με σύστημα διαλυτών Εξάνιο : Οξικός Αιθυλεστέρας : Διχλωρομεθάνιο (1:1:3). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 5h. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη και βασική εκχύλιση με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 και ίσο όγκο EtOAc . Οι ενωμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na_2SO_4 , διηθούνται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το στερεό ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 0.89 g προϊόντος ως καφέ στερεό (88 %).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , 298K) δ 7.06 (td, $J = 9.1, 1.3$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.87 (d, 2H), 6.67 (ddd, $J = 6.4, 2.8, 1.3$ Hz, 1H), 6.54 (dq, $J = 11.1, 3.5, 2.5$ Hz, 1H), 6.32 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.72 (dd, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (62.5 MHz, DMSO-d_6 , 298K) δ 151.33, 149.24, 148.22, 147.62, 146.73, 132.24, 119.77, 117.40, 112.98, 112.48, 112.19, 111.73, 55.95, 55.87, 47.00.

8.8 Σύνθεση της ένωσης N-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλ)-N-(3,4-διμεθοξυβενζυλ)-6-νιτροκιναζολιν-4-αμίνη (9)



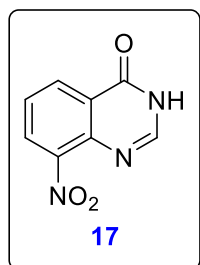
Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθενται 10 ml ισοπροπανόλης, και υπό ανάδευση διαλύονται 0.53 g 4-χλώρο-6-νιτροκιναζολίνη (2.51 mmol), 0.89 g 3,4-διμεθοξυβενζυλαλδεΰδη (3.01 mmol) και 1.39 ml Et_3N (10.04 mmol). Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και ήπια θέρμανση (50°C). Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με TLC με σύστημα διαλυτών

Διχλωρομεθάνιο : Οξικός Αιθυλεστέρας (1:0.1). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 12h. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη και εκχύλιση με $\text{EtOAc}/\text{H}_2\text{O}$. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται με Na_2SO_4 , διηθούνται και ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης Διχλωρομεθάνιο : Οξικό Αιθυλεστέρα (1:0.1). Το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται και ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 0.67 g ως κίτρινο στερεό (57 %).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6 , 298K) δ 9.05 (s, 1H), 8.50 (dd, $J = 9.2, 2.5$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 6.6, 2.6$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.55

(t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.41 (ddd, $J = 8.8, 4.4, 2.7$ Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.83 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 3.68 (d, 6H).

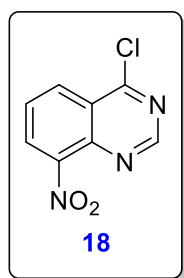
8.9 Σύνθεση της ένωσης 8-νιτροκινναζολιν-4(3H)-όνη (17)



Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml φέρονται 2.00 ml HNO₃ ml και 3.20 ml H₂SO₄ υπό πάγο. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.20 g της ένωσης κινναζολίν-4(3H)-όνης (1.37 mmol) σε δόσεις. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και έπειτα θερμαίνεται στους 120°C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιείται Εξάνιο : Οξικό Αιθυλεστέρας (2:1, 4 αναπτύξεις). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 4h. Μετά την ψύξη του μίγματος της αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 50 ml υδατικού διαλύματος NaOH 2N για την εξουδετέρωση των οξέων και γίνεται εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθούνται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης Οξικό Αιθυλεστέρα : Διχλωρομεθάνιο (1:1). Το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται και ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 0.13 g ως υποκίτρινο στερεό (48 %).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 12.71 (s, 1H), 8.35 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 8.29 (dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, 1H), 8.24 (d, 1H), 7.67 (td, $J = 7.9$, 1H).

8.10 Σύνθεση της ένωσης 4-χλώρο-8-νιτροκινναζολίνη (18)



Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml και υπό ατμόσφαιρα αζώτου φέρονται 0.13 g της ένωσης 6-νιτροκινναζολίν-4(3H)-όνης (0.68 mmol), 4 ml SOCl₂ και 1 σταγόνα (καταλυτική ποσότητα) DMF. Το μίγμα αναδεύεται και φέρεται σε συνθήκες βρασμού υπό επαναροή (reflux). Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC. Ως σύστημα ανάπτυξης χρησιμοποιείται Εξάνιο : Οξικό Αιθυλεστέρας (2:1). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 2h. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και η περίσσεια ποσότητα του SOCl₂ διώχνεται με τη βοήθεια υδραντλίας. Το υπόλειμμα εκχυλίζεται με EtOAc/H₂O. Οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθούνται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το ίζημα ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Παραλαμβάνονται 0.11 g ως υποκίτρινο στερεό (75 %).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 8.34 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H), 8.28 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.66 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H).

¹³C NMR (62.5 MHz, DMSO-d₆, 298K) δ 159.74, 148.61, 147.06, 140.88, 130.02, 128.19, 126.89, 124.48.

Συμπεράσματα

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

- Έγινε σχεδιασμός και μοριακή μοντελοποίηση νέων εν δυνάμει αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Dacomitinib. Οι αλλαγές περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στον πιπεριδινικό δακτύλιο, τη μεθόξυ ομάδα του μορίου και υποκατάσταση της θέσης 8 της κιναζολινικής δομής.
- Οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτές έδωσαν καλύτερα θεωρητικά αποτελέσματα, από την αντίστοιχη ένωση του Dacomitinib, καθώς εμφάνισαν μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή ΔG και πολύ καλές αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα του EGFR που έχει υποστεί μετάλλαξη T790M.
- Για τη σύνθεση της ενδιάμεσης ένωσης 3 (α και β) χρησιμοποιήθηκε φορμαμίδιο (όπως και στην πατέντα του φαρμάκου) σαν αντιδραστήριο και διαλύτης αντί της φορμαμιδίνης σε διαλύτη 2-μεθόξυ-αιθανόλης, λαμβάνοντας το επιθυμητό προϊόν σε ικανοποιητική απόδοση, εξοικονομώντας έτσι αντιδραστήρια και διαλύτες.
- Για τη σύνθεση των αναλόγων Dac3, Dac4, Dac5 και Dac6 χρησιμοποιήθηκε ως αρχική ένωση 2-αμινοβενζοϊκό οξύ, η οποία είναι πιο προσιτή οικονομικά σε σύγκριση με το 2-άμινο-4-φθοροβενζοϊκό οξύ μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος σύνθεσης των αναλόγων αυτών και εξοικονομώντας χρόνο, αντιδραστήρια και διαλύτες εφόσον παραλείπεται μία ενδιάμεση αντίδραση (στάδιο 10).
- Επιτεύχθηκε η σύνθεση ενδιάμεσων ενώσεων των πειραματικών πορειών κυρίως για τα ανάλογα Dac3, Dac4, Dac5 και Dac6. Μελετήθηκαν οι καλύτερες συνθήκες ώστε να απομονωθούν τα προϊόντα καθαρά και σε ποσότητες ικανές για τη συνέχιση της πειραματικής πορείας (3 αντιδράσεις για τα ανάλογα Dac3, Dac4 και 4 αντιδράσεις για τα Dac5, Dac6) και τη λήψη των αντίστοιχων τελικών προϊόντων.
- Οι ενώσεις που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν μέσω φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ και αναμένονται αποτελέσματα και από τον χαρακτηρισμό τους με HRMS καθώς και των αντίστοιχων τελικών προϊόντων τους εφόσον συνεχιστεί η σύνθεσή τους στο εργαστήριο.

Βιβλιογραφία

1. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(1):12-49. doi:10.3322/caac.21820
2. What Is Cancer? National Cancer Institute (NCI) at the National Institutes of Health (NIH). Published October 11, 2021. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
3. Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Published 2022. https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&populations=903_904_905_908_909_935&multiple_populations=1&types=0_1&sort_by=value1&key=total&age_end=14
4. Mountzios G, Gkiozos I, Stratakos G, et al. Lung Cancer in Greece. *Journal of Thoracic Oncology*. 2021;16(7):1058-1066. doi:10.1016/j.jtho.2020.11.024
5. Lung Cancer. Cleveland Clinic. Published October 31, 2022. <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/4375-lung-cancer>
6. Cheng HC, Qi RZ, Paudel H, Zhu HJ. Regulation and function of protein kinases and phosphatases. *Enzyme Res*. 2011;2011(1). doi:10.4061/2011/794089
7. Singha M, Pu L, Srivastava G, et al. Unlocking the Potential of Kinase Targets in Cancer: Insights from CancerOmicsNet, an AI-Driven Approach to Drug Response Prediction in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023;15(16). doi:10.3390/cancers15164050
8. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res*. 2019;144:19-50. doi:10.1016/j.phrs.2019.03.006
9. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update. *Pharmacol Res*. 2024;200. doi:10.1016/j.phrs.2024.107059
10. Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. Published online 2021. doi:10.3390/cancers
11. Geoffrey M.Cooper & Robert E. Hausman. *Το Κύτταρο: Μια Μοριακή Προσέγγιση*. Έβδομη έκδοση.; 2016.
12. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. *The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer*. Vol 36.; 2003.
13. Cell cycle. BD Biosciences. Published 2024. <https://www.bdbiosciences.com/en-us/learn/research/cell-biology/cell-cycle>
14. Johnson LN, Lewis RJ. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev*. 2001;101(8):2209-2242. doi:10.1021/cr000225s
15. Van den Heuvel S. Cell-cycle regulation. *WormBook*. Published online 2005:1-16. doi:10.1895/wormbook.1.28.1

16. Kalra S, Joshi G, Munshi A, Kumar R. Structural insights of cyclin dependent kinases: Implications in design of selective inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2017;142:424-458. doi:10.1016/j.ejmech.2017.08.071
17. Meurer F, Do HT, Sadowski G, Held C. Standard Gibbs energy of metabolic reactions: II. Glucose-6-phosphatase reaction and ATP hydrolysis. *Biophys Chem.* 2017;223:30-38. doi:10.1016/j.bpc.2017.02.005
18. A level biology: Component 1. Loreto college. <https://loretocollegebiology.weebly.com/atp-structure--function.html>
19. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio L Lo. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med.* 2017;40(2):271-280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036
20. Alain Enjalbert and Caroline le Pechon-Vallee. *Protein Kinases.* (Helen L. Henry Anthony W. Norman, ed.); 2003. doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-341103-3/00258-8>
21. Li T, Wang N, Zhang T, et al. A systematic review of recently reported marine derived natural product kinase inhibitors. *Mar Drugs.* 2019;17(9). doi:10.3390/md17090493
22. Theivendren P, Kunjiappan S, Mariappa Hegde Y, et al. Importance of Protein Kinase and Its Inhibitor: A Review. In: ; 2021. doi:10.5772/intechopen.98552
23. Nečas E. *Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and Other Diseases.*; 2014. <https://www.researchgate.net/publication/6707181>
24. Modi V, Dunbrack RL. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. doi:10.5281/zenodo.2580462
25. Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: Evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(2):65-77. doi:10.1016/j.tibs.2010.09.006
26. Negi P, Cheke RS, Patil VM. Recent advances in pharmacological diversification of Src family kinase inhibitors. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* 2021;22(1). doi:10.1186/s43042-021-00172-x
27. Hunter Tony. Protein kinase classification. In: *Methods in Enzymology.* Vol 200. ; 1991. doi:10.1016/0076-6879(91)00125-g
28. Duong-Ly KC, Peterson JR. The human kinome and kinase inhibition. *Curr Protoc Pharmacol.* 2013;(SUPPL.60). doi:10.1002/0471141755.ph0209s60
29. Atypical Protein kinases. Cell Signaling Technology. <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/protein-kinases/atypical-protein-kinases>
30. Roskoski R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2022 update. *Pharmacol Res.* 2022;175. doi:10.1016/j.phrs.2021.106037

31. Naviglio S, Caraglia M, Abbruzzese A, et al. Protein kinase A as a biological target in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(1):83-92. doi:10.1517/14728220802602349
32. Eric J Nestler and Paul Greengard. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. (George J Siegel, Bernard W Agranoff, R Wayne Albers, Stephen K Fisher, Michael D Uhler, eds.); 1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28112/>
33. Isakov N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol*. 2018;48:36-52. doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.012
34. Suryadinata R, Sadowski M, Sarcevic B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. *Biosci Rep*. 2010;30(4):243-255. doi:10.1042/BSR20090171
35. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2011;75(1):50-83. doi:10.1128/membr.00031-10
36. He Y, He G, He T. Specifically targeted transport of plasma membrane transporters: From potential mechanisms for regulating cell health or disease to applications. *Membranes (Basel)*. 2021;11(10). doi:10.3390/membranes11100736
37. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2(12):1097-1105. doi:10.1177/1947601911423031
38. Park SA, Jeong MS, Ha KT, Jang SB. Structure and function of vascular endothelial growth factor and its receptor system. *BMB Rep*. 2018;51(2):73-78. doi:10.5483/BMBRep.2018.51.2.233
39. Ayala-Aguilera CC, Valero T, Lorente-Macías Á, Baillache DJ, Croke S, Unciti-Broceta A. Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995–2021): Medical Indication, Pharmacology, and Synthesis. *J Med Chem*. 2022;65(2):1047-1131. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00963
40. Wu P, Nielsen TE, Clausen MH. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(7):422-439. doi:10.1016/j.tips.2015.04.005
41. Bhullar KS, Lagarón NO, McGowan EM, et al. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. *Mol Cancer*. 2018;17(1). doi:10.1186/s12943-018-0804-2
42. Li M, Rehman AU, Liu Y, Chen K, Lu S. Dual roles of ATP-binding site in protein kinases: Orthosteric inhibition and allosteric regulation. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Vol 124. Academic Press Inc.; 2021:87-119. doi:10.1016/bs.apcsb.2020.09.005

43. Martinez R, Defnet A, Shapiro P. Avoiding or Co-Opting ATP Inhibition: Overview of Type III, IV, V, and VI Kinase Inhibitors. In: *Next Generation Kinase Inhibitors: Moving Beyond the ATP Binding/Catalytic Sites*. Springer International Publishing; 2020:29-59. doi:10.1007/978-3-030-48283-1_3
44. Alsibae AM, Al-Yousef HM, Al-Salem HS. Quinazolinones, the Winning Horse in Drug Discovery. *Molecules*. 2023;28(3). doi:10.3390/molecules28030978
45. Marzaro G, Guiotto A, Chilin A. Quinazoline derivatives as potential anticancer agents: A patent review (2007 - 2010). *Expert Opin Ther Pat*. 2012;22(3):223-252. doi:10.1517/13543776.2012.665876
46. Zayed MF. Medicinal Chemistry of Quinazolines as Anticancer Agents Targeting Tyrosine Kinases. *Sci Pharm*. 2023;91(2). doi:10.3390/scipharm91020018
47. NaranjannSDhalla Rcs. *Biomedical Translational Research Drug Design and Discovery*.
48. Asif M. Chemical Characteristics, Synthetic Methods, and Biological Potential of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives. *Int J Med Chem*. 2014;2014:1-27. doi:10.1155/2014/395637
49. What is cancer? National Cancer Foundation. <https://www.cancerfoundation.org.au/what-is-cancer-.html>
50. Niloy Sarkar, Amit Singh, Pankaj Kumar, Mahima Kaushik. Protein kinases: Role of their dysregulation in carcinogenesis, identification and inhibition. *Thieme*. Published online February 23, 2023. doi:10.1055/a-1989-1856
51. Lung Cancer. World Health Organization. Published June 26, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lung-cancer>
52. Faraz Siddiqui, Sarosh Vaqar, Abdul H. Siddiqui. Lung Cancer. In: Statpearls; 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>
53. Harsha Prakashan S. Lung cancer: When the cells turn rogue. Published March 24, 2023. <https://www.happiesthealth.com/articles/cancer/lung-cancer-when-the-cells-turn-rogue>
54. Lung Cancer. American Cancer Society. Published January 19, 2024. <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/about/what-is.html>
55. Benjamin J. Moeller. What Are the Stages of Lung Cancer? Sero, care in action. Published July 8, 2022. <https://treatcancer.com/blog/what-are-the-stages-of-lung-cancer/>
56. Targeted Therapies for Lung Cancer. American Lung Association. Published June 7, 2024. <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/treatment/types-of-treatment/targeted-therapies>
57. Wang Z. ErbB receptors and cancer. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1652. Humana Press Inc.; 2017:3-35. doi:10.1007/978-1-4939-7219-7_1

58. Papini F, Sundaresan J, Leonetti A, et al. Hype or hope – Can combination therapies with third-generation EGFR-TKIs help overcome acquired resistance and improve outcomes in EGFR-mutant advanced/metastatic NSCLC? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;166. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103454
59. Gillian Bethune, Drew Bethune, Neale Ridgway, Zhaolin Xu. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J Thorac Dis*. 2010;2.
60. Hsu PC, Jablons DM, Yang CT, You L. Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway, yes-associated protein (YAP) and the regulation of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Int J Mol Sci*. 2019;20(15). doi:10.3390/ijms20153821
61. EGFR and Lung Cancer. American Lung Association. Published June 2024. <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/symptoms-diagnosis/biomarker-testing/egfr>
62. Hegi ME, Diserens AC, Bady P, et al. Pathway analysis of glioblastoma tissue after preoperative treatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib - A phase II trial. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(6):1102-1112. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0048
63. Hirte H. Profile of erlotinib and its potential in the treatment of advanced ovarian carcinoma. *Onco Targets Ther*. Published online April 2013:427. doi:10.2147/ott.s30373
64. Slobbe P, Windhorst AD, Stigter-van Walsum M, et al. A comparative PET imaging study with the reversible and irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitors [11C]erlotinib and [18F]afatinib in lung cancer-bearing mice. *EJNMMI Res*. 2015;5(1):1-12. doi:10.1186/s13550-015-0088-0
65. Wang S, Yuan XH, Wang SQ, Zhao W, Chen XB, Yu B. FDA-approved pyrimidine-fused bicyclic heterocycles for cancer therapy: Synthesis and clinical application. *Eur J Med Chem*. 2021;214. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113218
66. Shirley M. Dacomitinib: First Global Approval. *Drugs*. 2018;78(18):1947-1953. doi:10.1007/s40265-018-1028-x
67. Patel HM, Pawara R, Surana SJ. Introduction. In: *Third Generation EGFR Inhibitors*. Elsevier; 2019:1-24. doi:10.1016/b978-0-08-102661-8.00001-9
68. Lim YJ, Kim HS, Bae S, So KA, Kim TJ, Lee JH. Pan-EGFR Inhibitor Dacomitinib Resensitizes Paclitaxel and Induces Apoptosis via Elevating Intracellular ROS Levels in Ovarian Cancer SKOV3-TR Cells. *Molecules*. 2024;29(1). doi:10.3390/molecules29010274
69. Hossam M, Lasheen DS, Abouzid KAM. Covalent EGFR Inhibitors: Binding Mechanisms, Synthetic Approaches, and Clinical Profiles. *Arch Pharm (Weinheim)*. Published online August 1, 2016:573-593. doi:10.1002/ardp.201600063

70. Liang X, Yang Q, Wu P, et al. The synthesis review of the approved tyrosine kinase inhibitors for anticancer therapy in 2015–2020. *Bioorg Chem.* 2021;113. doi:10.1016/j.bioorg.2021.105011
71. Αλαγιάννης Μιχάλης. Σχεδιασμός, Σύνθεση Και Βιολογικός Έλεγχος Νέων Αναλόγων Του Φαρμακευτικού Σκευάσματος *Lenvatinib* Ως Εν Δυνάμει Αναστολέων Του Υποδοχέα Του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα 2 (VEGFR2) Και Βελτιστοποίηση Της Συνθετικής Του Πορείας. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; 2022.
72. Zerong Wang. Niementowski Reaction. In: *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. John Wiley & Sons, Inc; 2010. doi:10.1002/9780470638859
73. Smith MB. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*. 8th ed. (John Wiley & Sons, ed.); 2020.
74. Campbell CD, Stewart MI. Reflections on the Teaching Practices for the Reduction of Nitroarenes: Updating Methodologies and Considerations of the Mechanism. *J Chem Educ.* 2023;100(9):3171-3178. doi:10.1021/acs.jchemed.3c00283

