



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΜΕΡΙΔΙΑΝΙΝΗΣ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΚΑΙ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ – ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΣΕΙΡΑΣ ΕΝΑΜΙΝΟΝΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΣΤΑ ΦΑΣΜΑΤΑ ¹H NMR

ΕΛΕΟΝΩΡΑ ΣΤΑΛΙΚΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2025

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Ορισμός του καρκίνου και βασικά του χαρακτηριστικά	12
1.2 Βασικές θεραπευτικές προσεγγίσεις	14
1.3 Από την κλασική χημειοθεραπεία σε στοχευμένες θεραπείες.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
2.1 Βασικές αρχές φωσφορυλίωσης και παραγωγής ATP	21
2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες	23
2.3 Δομή των πρωτεϊνικών κινασών.....	25
2.4 Ταξινόμηση των πρωτεϊνικών κινασών	27
2.5 Κατηγορίες Πρωτεϊνικών Κινασών	28
2.5.1 Οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης	28
2.5.2 Οικογένεια πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών.....	28
2.5.3 Οικογένεια υποδοχικών τυροσινικών κινασών (RTKs).....	29
2.5.4 Οικογένεια Υποδοχικού Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα	32
2.5.5 Οικογένεια μη υποδοχικών τυροσινικών κινασών (NRTKs).....	35
2.5.6 Δομικά χαρακτηριστικά και οικογένειες NRTKs.....	36
2.5.7 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης c-Abl	37
2.5.8 Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες	38
2.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών των κυττάρων.....	38
2.7 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	40
2.7.1 Ταξινόμηση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	41
2.7.2 Χαρακτηριστικά των αδενινικών μιμητών	44
2.8 Παραδείγματα εγκεκριμένων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών εγκεκριμένων από το FDA και οι συνθετικές τους πορείες.....	47
2.8.1 Osimertinib	47
2.8.2 Σύνθεση του Osimertinib	47
2.8.3 Sorafenib	53

2.8.4	Σύνθεση του Sorafenib.....	54
2.9	Αναφορά στη σύνθεση και στη βιολογική δράση των επιμέρους δομικών μονάδων των σχεδιασμένων μορίων.....	56
2.9.1	Ινδόλιο.....	56
2.9.2	Σύνθεση του ινδολικού δακτυλίου.....	57
2.10	Το ινδόλιο ως βασικό δομικό συστατικό φυτικών προϊόντων και βιοδραστικών μορίων.....	59
2.10.1	Υβρίδια ινδολίου πυριμιδίνης (indole-pyrimidine hybrids)	61
2.11	Μεριδιανίνες	63
2.11.1	Σύνθεση μεριδιανινών κατά Brederick	63
2.11.2	Σύνθεση μεριδιανινών κατά Muller και Jiang	64
2.11.3	Σύνθεση μεριδιανινών κατά Yu	65
2.11.4	Σύνθεση μεριδιανινών κατά Penoni.....	65
2.12	Βιολογική δράση των μεριδιανινών.....	66
2.13	Κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (CDKs) και ρόλος τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου	66
	Σκοπός και στόχοι της εργασίας	70
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ.....	71
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : Μελέτη των Μηχανισμών Αντίδρασης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός των παραγώγων μεριδιανίνης, με παράλληλη θεωρητική διερεύνηση μέσω της υπολογιστικής μεθόδου DFT.....	84
4.1	Αντίδραση 1: Μεθυλίωση του 5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολίου	84
4.1.1	Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης	84
4.1.2	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολίου	85
4.2	Αντίδραση 2: Ακυλίωση του 1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολίου.....	87
4.2.1	Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης	87
4.2.2	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)αιθανόνης	90
4.2.3	Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)αιθανόνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ωB97XD /6-31+G(d).....	91
4.3	Αντίδραση 3: Σχηματισμός της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.....	94
4.3.1	Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης	94

4.3.2	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης	95
4.3.3	Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD /6-31+G(d)	96
4.4	Αντίδραση 4: Σχηματισμός της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης	104
4.4.1	Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης	104
4.4.2	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης	105
4.4.3	Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 4-(1-μεθυλο-5 νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλ)πυριμιδιν-2-αμίνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD /6-31+G(d)	107
4.4.4	Αντίδραση 5: Καταλυτική υδρογόνωση για αναγωγή της νιτροομάδος με H_2 /PtO ₂ (καταλύτης Adams) προς τον σχηματισμό της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-αμίνης	110
4.4.5	Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης	110
4.4.6	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης της 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-αμίνης	112
4.4.7	Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-αμίνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD /6-31+G(d)	115
4.5	Σύνθεση τελικών προϊόντων	118
4.5.1	Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης	118
4.6	Για το προϊόν που προκύπτει από την προσθήκη 4-χλωρο-3-νιτροβενζοϊκού χλωριδίου, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αντιδράσεις:	119
4.6.1	Αντίδραση 6: Δημιουργία αμιδικού δεσμού και σχηματισμός της ένωσης <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο	119
4.6.2	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο	120
4.6.3	Υπολογιστική μελέτη της ένωσης <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο	122
4.6.4	Αντίδραση 7: Αναγωγή της νιτροομάδος του ινδολικού δακτυλίου με καταλύτη διοξειδίου της πλατίνας (PtO ₂) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου για να σχηματιστεί η ένωση 3-αμινο- <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4 χλωροβενζαμίδιο	125

4.6.5	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 3-αμινο- <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4 χλωροβενζαμίδιο	125
4.7	Για το προϊόν που προκύπτει από την προσθήκη 4-νιτροβενζοΐλου χλωριδίου, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αντιδράσεις:	126
4.7.1	Αντίδραση 6: Δημιουργία αμιδικού δεσμού και σχηματισμός της ένωσης <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο	126
4.7.2	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο	127
4.7.3	Υπολογιστική μελέτη της ένωσης <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο	128
4.7.4	Αντίδραση 7: Αναγωγή της νιτροομάδος του ινδολικού δακτυλίου με καταλύτη διοξείδιο της πλατίνας (PtO ₂) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου για να σχηματιστεί η ένωση 4-αμινο- <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο	130
4.7.5	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 4-αμινο- <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο	131
4.8	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΥΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΜΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	132
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : Πειραματική Πορεία και Βιολογική Αξιολόγηση των Συντιθέμενων Ενώσεων σε Καρκινικές Κυτταρικές Σειρές.....		134
5.1	Καλλιέργεια και επίστρωση κυττάρων	134
5.2	Προσθήκη των παραγόντων	134
5.3	Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας – Μέθοδος MTT	135
5.4	Αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας (24–72 h).....	136
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΣΕΙΡΑΣ ΕΝΑΜΙΝΟΝΩΝ		138
6.1	Εναμινόνη 1: (<i>E</i>)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυρρολο[2,3- <i>b</i>]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη [67]	138
6.2	Εναμινόνη 2: (<i>E</i>)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη [70]	154
6.3	Εναμινόνη 3: (<i>E</i>)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη [71]	165
6.4	Εναμινόνη 4: (<i>E</i>)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδόλ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη [67]	170
6.5	Εναμινόνη 5: (<i>E</i>)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1 <i>H</i> -ινδόλ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη	177
6.6	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	182
6.7	ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	186

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	188
7.1 ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	189
7.1.1 Σύνθεση του 1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολίου:.....	189
7.1.2 Σύνθεση της 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)αιθανο-1-όνης: .	189
7.1.3 Σύνθεση της (<i>E</i>)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1 <i>H</i> -ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης:	190
7.1.4 Σύνθεση της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης:	190
7.1.5 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-αμίνης:	191
7.1.6 Σύνθεση των ενώσεων <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο και <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο:	192
7.1.7 Σύνθεση των ενώσεων 3-αμινο- <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)-4-χλωροβενζαμίδιο και 4-αμινο- <i>N</i> -(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο:.....	193
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	194
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	199

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Οργανική Χημεία και ολοκληρώθηκε ύστερα από μία διετή και απαιτητική, αλλά ιδιαίτερα δημιουργική και γόνιμη πορεία στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η συνεχής αυτή δοκιμασία είναι εκείνη που, τελικά, προσφέρει ηθική ικανοποίηση, χαρά και υπερηφάνεια για τα αποτελέσματα που προκύπτουν. Τα πειράματα της παρούσας εργασίας διεξήχθησαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Χ3-210 του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη στη μνήμη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Κωνσταντίνου Σκομπρίδη. Ο Καθηγητής Σκομπρίδης υπήρξε ο πρώτος επιβλέπων της μεταπτυχιακής μου εργασίας, ο άνθρωπος που με ενέπνευσε να αγαπήσω την Οργανική Χημεία και αποτέλεσε για εμένα πρότυπο πανεπιστημιακού δασκάλου. Με το ήθος, το επιστημονικό του κύρος και τη βαθιά του κατανόηση, στάθηκε καθοριστικός παράγοντας τόσο στη διαμόρφωση της ερευνητικής μου σκέψης, όσο και στη στάση μου απέναντι στην επιστήμη. Η απώλειά του, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας, άφησε ένα δυσαναπλήρωτο κενό σε όλους όσοι είχαμε την τιμή να μαθητεύσουμε κοντά του.

Με βαθιά συγκίνηση και ειλικρινή ευγνωμοσύνη αφιερώνω το παρόν Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη μνήμη του.

Μετά την απώλεια του Καθ. Κ. Σκομπρίδη, η επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας αναλήφθηκε από τον Καθηγητή κ. Μιχαήλ Σίσκο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς για την αποδοχή της επίβλεψης σε μια ιδιαίτερα απαιτητική και συναισθηματικά φορτισμένη συγκυρία. Η στήριξη, η καθοδήγηση και η κατανόηση που επέδειξε συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της ερευνητικής προσπάθειας και στη διαμόρφωση της τελικής μορφής της εργασίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Λάζαρο Χατζηαράπογλου και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ. Δημήτριο Αλίβερτη, όχι μόνο για την προθυμία με την οποία αποδέχθηκαν να συμμετάσχουν στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, αλλά και για τη συνεχή βοήθεια, στήριξη και καθοδήγηση που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω επίσης στα μέλη των ερευνητικών τους ομάδων, με τα οποία

συνεργαστήκαμε άψογα και τα οποία ανταποκρίνονταν με προθυμία σε κάθε ανάγκη που προέκυπτε στο πλαίσιο των πειραμάτων.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Ομότιμο Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Γεώργιο Βαρβούνη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Καρούση για τη διαθεσιμότητα και τη βοήθειά τους σε κάθε ζήτημα που προέκυπτε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Γκλίγκα, από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθειά του στη μελέτη των κυτταρικών σειρών, η οποία υπήρξε καθοριστική για την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να φανταστώ ότι ο χώρος στον οποίο θα αφιέρωνα τόσες ώρες θα ήταν τόσο δημιουργικός και ταυτόχρονα τόσο ανθρώπινος. Αυτό οφείλεται στα άτομα με τα οποία μοιράστηκα την καθημερινότητά μου στο εργαστήριο. Θερμά ευχαριστώ τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Ιωάννα Χρονοπούλου, Κυριακή Χατζηαγγελίδου, Μαρία Ζώτου, Ελένη Κωνσταντίνη και Έρα Σδούκου, για την άψογη συνεργασία, τη στήριξη και τις στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός εργαστηρίου. Η ηθική και ψυχολογική τους υποστήριξη, ακόμη και στις πιο μικρές δυσκολίες, υπήρξε καθοριστική για την πορεία μου. Εύχομαι ολόψυχα να πραγματοποιήσουν όλους τους στόχους τους, να ανταμειφθούν οι κόποι τους και να αναγνωριστούν οι ικανότητές τους.

Ευχαριστώ, ακόμη, τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου, στους οποίους γνωρίζω ότι μπορώ να βασιστώ ανά πάσα στιγμή. Η παρουσία τους, η κατανόηση και η υπομονή τους αποτέλεσαν σταθερό σημείο αναφοράς και ισορροπίας καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, δεν μπορώ να μην εκφράσω επαρκώς την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένειά μου· τον αδερφό μου Δημήτριο και τους γονείς μου, τους αφανείς ήρωες αυτής της διαδρομής, Κωνσταντίνο και Μαριάνθη, για την αδιάκοπη στήριξη, την απεριόριστη εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου και τις θυσίες που κάνουν εδώ και 25 χρόνια, προκειμένου να αποκτήσω όλα τα απαραίτητα εφόδια. Χάρη σε αυτούς μπορώ πλέον να διεκδικήσω δυναμικά την επαγγελματική μου πορεία και να κάνω το επόμενο βήμα με αυτοπεποίθηση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις συχνότερες και πλέον θανατηφόρες ασθένειες παγκοσμίως και σε μεγάλο ποσοστό σχετίζεται με μεταλλάξεις πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες αποτελούν κεντρικούς ρυθμιστές των οδών μεταγωγής σήματος και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η απορρύθμιση της λειτουργίας τους οδηγεί σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη, γεγονός που καθιστά τις πρωτεϊνικές κινάσες ιδιαίτερα ελκυστικούς φαρμακευτικούς στόχους. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάπτυξη μικρών οργανικών μορίων που αναστέλλουν ανταγωνιστικά τη δέσμευση του ATP στο ενεργό τους κέντρο αποτελεί βασική στρατηγική της σύγχρονης αντικαρκινικής χημειοθεραπείας.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αναπτύχθηκε μία νέα σειρά βιοδραστικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, δομικά βασισμένων στο φυσικό προϊόν μεριδιανίνες, γνωστό για τη μέτρια ανασταλτική του δράση έναντι πρωτεϊνικών κινασών. Ο σχεδιασμός των ενώσεων βασίστηκε στην αναγωγή της νιτροομάδας στη θέση 5 του ινδολικού δακτυλίου και στην επακόλουθη εισαγωγή αμιδικού δεσμού στην προκύπτουσα αμινομάδα, με στόχο τη βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο των κινασών. Όλες οι συνθετιμένες ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR και ^{13}C NMR).

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των νέων μορίων με τις πρωτεϊνικές κινάσες πραγματοποιήθηκε μέσω μοριακής μοντελοποίησης, με χρήση κατάλληλων υπολογιστικών λογισμικών, σε τρεις διαφορετικούς τύπους κινασών. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ευνοϊκά πρότυπα δέσμευσης και ισχυρές αλληλεπιδράσεις με κρίσιμα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, υποστηρίζοντας τον ορθολογικό σχεδιασμό των ενώσεων. Παράλληλα, η βιολογική αξιολόγηση των ενώσεων σε καρκινικά κύτταρα οστεοσαρκώματος κατέδειξε ενθαρρυντική αντικαρκινική δραστηριότητα.

Η πειραματική φασματοσκοπική μελέτη συμπληρώθηκε από θεωρητικούς υπολογισμούς πυκνότητας (DFT) με τις μεθόδους GIAO-B3LYP και ω B97XD, οι οποίοι επέτρεψαν τη διερεύνηση της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων NMR. Επιπλέον, η θεωρητική μελέτη μίας σειράς εναμινονών ανέδειξε τη συσχέτιση του ενεργειακού φράγματος περιστροφής του δεσμού C-N με τον αριθμό των σημάτων των μεθυλικών πρωτονίων στα φάσματα ^1H

NMR, καθώς και την επίδραση της επιδιалύτωσης στο ύψος του φράγματος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων κατέδειξε συστηματικές συσχετίσεις μεταξύ της τάξης δεσμού Wiberg, του μήκους του δεσμού C–N και του ενεργειακού φράγματος της μεταβατικής κατάστασης, συμβάλλοντας στην πληρέστερη ερμηνεία των πειραματικών φασμάτων και στην εμβάθυνση της κατανόησης των ηλεκτρονιακών χαρακτηριστικών των μελετώμενων ενώσεων.

ABSTRACT

Cancer remains one of the most prevalent and lethal diseases worldwide and is strongly associated with mutations in protein kinases, which act as central regulators of signal transduction pathways and cell proliferation. Dysregulation of kinase activity leads to uncontrolled cellular growth, rendering protein kinases highly attractive therapeutic targets. Within this framework, the development of small organic molecules that competitively inhibit ATP binding at the kinase active site constitutes a fundamental strategy in modern anticancer chemotherapy.

In the present master's thesis, a novel series of low-molecular-weight bioactive compounds was developed, structurally inspired by the natural product meridianins, which are known to exhibit moderate inhibitory activity against protein kinases. The design of the new compounds was based on the reduction of the nitro group at the 5-position of the indole ring, followed by the introduction of an amide linkage at the resulting amino group, aiming to optimize interactions within the kinase active site. All synthesized compounds were fully characterized using modern nuclear magnetic resonance spectroscopic techniques (^1H NMR and ^{13}C NMR).

The interactions of the newly synthesized molecules with protein kinases were investigated through molecular modeling studies employing appropriate computational software on three different types of protein kinases. The results revealed favorable binding modes and strong interactions with key active-site residues, supporting the rationale of the structure-based molecular design. In parallel, the biological evaluation of the compounds against osteosarcoma cancer cell lines demonstrated encouraging anticancer activity.

The experimental spectroscopic analysis was further complemented by density functional theory (DFT) calculations using the GIAO-B3LYP and ω B97XD methods, enabling the investigation of linear correlations between experimental and theoretical NMR chemical shifts. In addition, a theoretical study of a series of enamino ketones elucidated the relationship between the rotational energy barrier of the C–N bond and the number of methyl proton signals observed in the ^1H NMR spectra, as well as the effect of solvation on the magnitude of this barrier. The analysis revealed systematic correlations among the Wiberg bond order, the C–N bond length, and the activation energy of the rotational transition state, contributing to a more comprehensive

interpretation of the experimental NMR data and a deeper understanding of the electronic characteristics of the investigated compounds.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ορισμός του καρκίνου και βασικά του χαρακτηριστικά

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Πρόκειται για νόσο που συνδέεται με τη διαταραχή των μηχανισμών που ρυθμίζουν φυσιολογικά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των κυττάρων και των ιστών. Για να μετατραπεί ένα φυσιολογικό κύτταρο σε καρκινικό, πρέπει να επέλθουν μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν κρίσιμες κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση και η επιδιόρθωση του DNA. Η ανάπτυξη καρκινικών όγκων είναι μια σύνθετη, πολυσταδιακή διεργασία, η οποία περιλαμβάνει διαδοχικές κυτταρικές και μοριακές μεταβολές. Μεταξύ αυτών, είναι οι γενετικές και επιγενετικές μεταβολές, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός και η αδρανοποίηση των μηχανισμών ανοσολογικής απόκρισης, με τελικό αποτέλεσμα την ανώμαλη και ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων. Οι περισσότεροι καρκίνοι στον άνθρωπο έχουν συσχετιστεί με περιβαλλοντικούς, διατροφικούς και συμπεριφορικούς παράγοντες, όπως η έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες, η ακτινοβολία, το κάπνισμα και οι ανθυγιεινές διατροφικές συνήθειες. Η κατανόηση των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε κακοήθες έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει συμβάλει ουσιαστικά στην πρόοδο της ογκολογίας. Ωστόσο, παρά τις σημαντικές αυτές γνώσεις, παραμένουν ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με το μέγεθος και τον τρόπο με τον οποίο η έκθεση σε διάφορους χημικούς και φυσικούς παράγοντες επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στον άνθρωπο.

Οι αλλαγές που οδηγούν ένα φυσιολογικό κύτταρο να μετατραπεί σε νεοπλασματικό κύτταρο έχουν μελετηθεί εκτενώς. Οι Hanahan και Weinberg (2011) περιέγραψαν τα βασικά «χαρακτηριστικά γνωρίσματα» του καρκίνου, δηλαδή τις κύριες αλλαγές που συμβαίνουν στα κύτταρα ώστε να σχηματιστεί ένα νεόπλασμα. Πρότειναν ότι τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν οκτώ βασικές ιδιότητες:

1. ικανότητα για συνεχή, ανεξέλεγκτο **κυτταρικό πολλαπλασιασμό**
2. αντίσταση στον προγραμματισμένο **κυτταρικό θάνατο (απόπτωση)**
3. ικανότητα να προκαλούν σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (**αγγειογένεση**)
4. «**αναπαραγωγική αθανασία**», δηλαδή δυνατότητα απεριόριστων διαιρέσεων
5. ικανότητα εισβολής σε γειτονικούς ιστούς και **δημιουργίας μεταστάσεων**

6. ικανότητα να **παρακάμπτουν σήματα** που κανονικά αναστέλλουν την ανάπτυξη
7. **επαναπρογραμματισμό** του ενεργειακού μεταβολισμού
8. ικανότητα να αποφεύγουν την καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα.

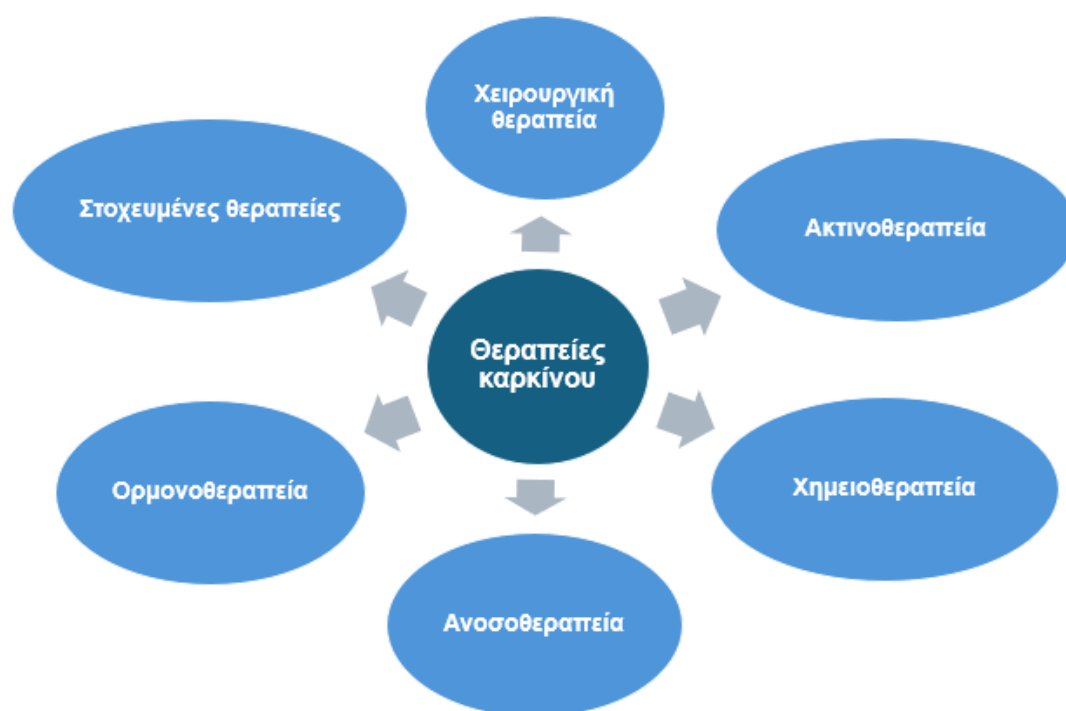
Τα νεοπλάσματα δεν είναι απλώς μια μάζα από όμοια καρκινικά κύτταρα. Αποτελούν έναν σύνθετο ιστό, με πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, που μαζί θυμίζουν τη δομή και τη λειτουργία ενός ξεχωριστού ιστού. Το μικροπεριβάλλον του όγκου – δηλαδή τα κύτταρα και τα στοιχεία που τον περιβάλλουν παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του νεοπλάσματος. Για πρακτικούς σκοπούς, η διαδικασία σχηματισμού καρκίνου συχνά χωρίζεται σε τρία βασικά στάδια: **έναρξη, προώθηση του όγκου και εξέλιξη**, όπως έχει φανεί από εκτενείς πειραματικές μελέτες σε τρωκτικά. Η πρώτη φάση της καρκινογένεσης, η **έναρξη (initiation)**, αποτελεί μια σταθερή, κληρονομήσιμη γενετική αλλαγή στο κύτταρο. Συνήθως προκαλείται από χημικούς καρκινογόνους παράγοντες που, αφού ενεργοποιηθούν μεταβολικά, συνδέονται με το DNA και σχηματίζουν ενώσεις προσθήκης (adduct) με το DNA. Αν η βλάβη αυτή **δεν επιδιορθωθεί πριν από την αντιγραφή του DNA**, η μετάλλαξη «παγιώνεται» και το κύτταρο καθίσταται «ενεργοποιημένο» (initiated). Η έναρξη από μόνη της δεν αρκεί για τον σχηματισμό όγκου. Το ενεργοποιημένο κύτταρο μπορεί είτε να παραμείνει μη διαιρούμενο, είτε να πεθάνει, είτε να διαιρεθεί και να δώσει προνεοπλασματικό κύτταρο, υπό την επίδραση ενδογενών ή εξωγενών παραγόντων. Ο παρατεταμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός μπορεί να ευνοήσει τη δημιουργία μεταλλάξεων και στα νέα κύτταρα. Με επανειλημμένη έκθεση και σε υψηλές δόσεις, ορισμένοι γονοτοξικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν ως **πλήρως καρκινογόνοι**, επηρεάζοντας και τα τρία στάδια της καρκινογένεσης: έναρξη, προώθηση και εξέλιξη. Το δεύτερο στάδιο της καρκινογένεσης είναι η **προαγωγή του όγκου (tumor promotion)** και αφορά τον πολλαπλασιασμό των ήδη αλλοιωμένων (initiated) κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο δρουν χημικές ουσίες και ορμόνες που ονομάζονται **προαγωγοί όγκων**: αυτοί **δεν προκαλούν νέες μεταλλάξεις**, αλλά ενισχύουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή μειώνουν την απόπτωση, οδηγώντας σε αύξηση των προνεοπλασματικών κυττάρων. Η διαδικασία είναι **αναστρέψιμη** δηλαδή, αν σταματήσει η έκθεση η προώθηση περιορίζεται, εξαρτάται από τη δόση και

εκδηλώνεται μόνο όταν ξεπεραστεί μια συγκεκριμένη δόση, και είναι συχνά ειδική για κάθε ιστό και όργανο.

Το τρίτο στάδιο της καρκινογένεσης είναι η **εξέλιξη (progression)**, κατά το οποίο οι προνεοπλασματικές βλάβες μετατρέπονται σε πλήρως νεοπλασματικές. Η έντονη κυτταρική διαίρεση σε αυτό το στάδιο, οδηγεί σε επιπλέον βλάβες στο DNA και χρωμοσωμικές ανωμαλίες, που αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα της εξέλιξης. Οι αλλαγές αυτές είναι **μη αναστρέψιμες** και καταλήγουν σε κύτταρα με **αυτόνομη, ανεξέλεγκτη ανάπτυξη** [1].

1.2 Βασικές θεραπευτικές προσεγγίσεις

Οι κύριες θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο συνοψίζονται στο **Σχήμα 1** και περιλαμβάνουν τη χειρουργική θεραπεία, την ακτινοθεραπεία, τη χημειοθεραπεία, τις στοχευμένες θεραπείες, την ανοσοθεραπεία και την ορμονοθεραπεία.



Σχήμα 1. Βασικές θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο.

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν τις παρακάτω κατηγορίες :

- **Χειρουργική θεραπεία:** Αφορά την αφαίρεση του πρωτοπαθούς (κυρίως) όγκου και, όπου ενδείκνυται, των ορατών μεταστάσεων. Αποτελεί συχνά την πρώτη επιλογή σε εντοπισμένη νόσο σε μια περιοχή.
- **Ακτινοθεραπεία:** Βασίζεται στη χρήση ιονίζουσας ακτινοβολίας με σκοπό την τοπική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων ή/και τη μείωση του όγκου.

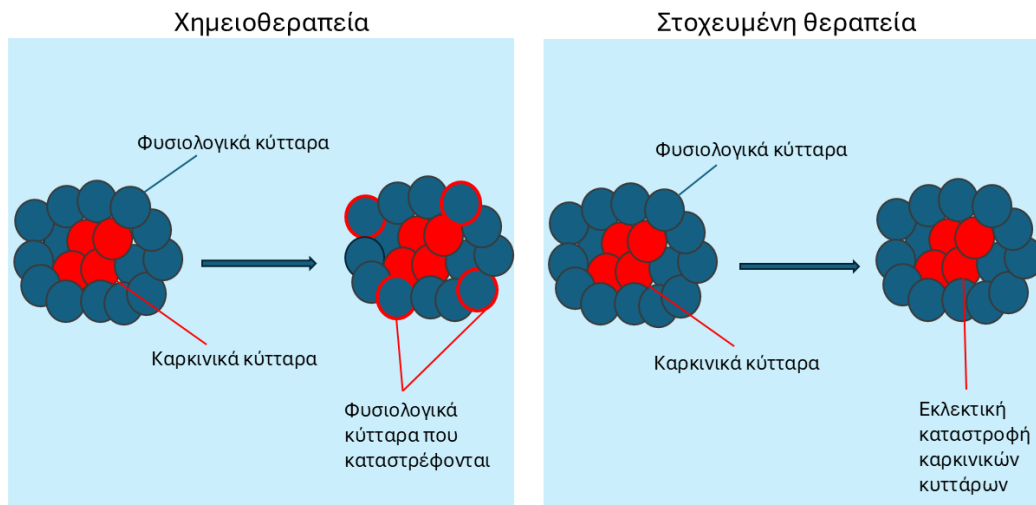
Μπορεί να χορηγηθεί προεγχειρητικά, μετεγχειρητικά ή ως κύρια θεραπεία όταν δεν είναι δυνατή η χειρουργική επέμβαση.

- **Χημειοθεραπεία:** Περιλαμβάνει τη συστηματική χορήγηση κυτταροτοξικών φαρμάκων, τα οποία στοχεύουν κυρίως στα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα. Χρησιμοποιείται είτε μόνη της, είτε σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους.
- **Στοχευμένες θεραπείες:** Περιλαμβάνουν φάρμακα που δρουν σε συγκεκριμένα μοριακά μόρια ή σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως υποδοχείς τυροσινικής κινάσης και πρωτεϊνικές κινάσες, με στόχο την πιο εκλεκτική αναστολή της ανάπτυξης του όγκου.
- **Ανοσοθεραπεία:** Στοχεύει στην ενίσχυση ή τροποποίηση της αντικαρκινικής δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος, ενεργοποιώντας το, ώστε να αναγνωρίζει και να εξουδετερώνει τα καρκινικά κύτταρα.
- **Ορμονοθεραπεία:** Εφαρμόζεται σε όγκους που εξαρτώνται από ορμόνες, όπως ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη, μέσω τροποποίησης ή αναστολής της δράσης συγκεκριμένων ορμονών που προάγουν την ανάπτυξη του όγκου.

1.3 Από την κλασική χημειοθεραπεία σε στοχευμένες θεραπείες

Αν και η χημειοθεραπεία έχει συμβάλει σημαντικά στη μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας από καρκίνο, τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά φάρμακα βλάπτουν και τα υγιή κύτταρα, ιδιαίτερα εκείνα που διαιρούνται και αναπτύσσονται με ταχύ ρυθμό. Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της χημειοθεραπείας είναι η **αντοχή στα φάρμακα**: τα καρκινικά κύτταρα που αρχικά καταστέλλονται από ένα αντικαρκινικό φάρμακο σταδιακά αναπτύσσουν **μηχανισμούς αντοχής**. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως σε μειωμένη πρόσληψη του φαρμάκου από το κύτταρο και σε αυξημένη εκροή του. Συνολικά, η χημειοθεραπεία παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς, όπως δυσκολία στον ακριβή καθορισμό της δοσολογίας, έλλειψη εκλεκτικότητας για τα καρκινικά κύτταρα, ταχύ μεταβολισμό των φαρμάκων και κυρίως σοβαρές και επιβλαβείς παρενέργειες όπως μυелоκαταστολή, γαστρεντερικές διαταραχές και αλωπεκία [2].

Κλασική χημειοθεραπεία έναντι στοχευμένης θεραπείας



Σχήμα 2. Σχηματική σύγκριση κλασικής χημειοθεραπείας και στοχευμένης θεραπείας. Η χημειοθεραπεία δρα **μη εκλεκτικά**, καταστρέφοντας τόσο καρκινικά όσο και φυσιολογικά κύτταρα, ενώ η στοχευμένη θεραπεία εστιάζει σε συγκεκριμένα μοριακά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, περιορίζοντας την τοξικότητα στους υγιείς ιστούς.

Οι στοχευμένες θεραπείες κατά του καρκίνου είναι φαρμακευτικές ή άλλες βιοδραστικές ουσίες, που συχνά αναφέρονται ως «**μοριακά στοχευμένα φάρμακα**», «**μοριακά στοχευμένες θεραπείες**» ή «**θεραπείες ακριβείας**». Ο μηχανισμός δράσης τους βασίζεται στην εκλεκτική παρεμβολή σε μόρια και μονοπάτια που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης και της διασποράς των καρκινικών κυττάρων [3]. Η έναρξη και η εξέλιξη του όγκου καθορίζονται από το μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων (Tumor Microenvironment, TM), το οποίο αποτελείται από μη καρκινικά στοιχεία τα οποία περιβάλλουν τον όγκο όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα, λείες μυϊκές ίνες, ινοβλάστες, διάφορα φλεγμονώδη κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και καρκινικά βλαστοκύτταρα (CSCs). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί και οδοί κυτταρικής σηματοδότησης μέσω των οποίων τα κύτταρα που σχηματίζουν το TM αλληλεπιδρούν δυναμικά με τα καρκινικά κύτταρα, δημιουργώντας συνθήκες που ευνοούν τη διατήρηση σχετικά υψηλού ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Κατά συνέπεια, η αξιοποίηση των συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος του όγκου για τη διαμεσολάβηση αποτελεσματικών στοχευμένων παρεμβάσεων για την αντικαρκινική θεραπεία αποτελεί πεδίο ερευνητικού ενδιαφέροντος [4].

Η εκλεκτική αντιμετώπιση των καρκινικών κυττάρων με την κλασική χημειοθεραπεία είναι δύσκολη, καθώς τα **καρκινικά κύτταρα είναι παρόμοια με τα φυσιολογικά**. Έτσι, τα προβλήματα αυτά αντιμετωπίζονται με κυτταρικούς μηχανισμούς που ενεργοποιούνται από φάρμακα στοχευμένης θεραπείας, όπως είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου, η επαγωγή της απόπτωσης, η αναστολή του πολλαπλασιασμού και η παρέμβαση στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό [5]. Η τροποποίηση του TM και η στόχευσή του για τη χορήγηση φαρμάκων, αποτελούν δύο στρατηγικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου [6]. Τα φάρμακα της στοχευμένης θεραπείας δρουν με διαφορετικούς τρόπους από τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά, καθώς επιτίθενται στα καρκινικά κύτταρα προκαλώντας ταυτόχρονα μικρότερη βλάβη στα φυσιολογικά κύτταρα, στοχεύοντας σε χαρακτηριστικά «προγραμματισμού» που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά, υγιή κύτταρα [7].

Η χρήση στοχευμένων θεραπειών έχει αυξήσει σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης σε ορισμένες νόσους: για παράδειγμα, σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παγκρέατος, η προσθήκη ερλοτινίμπης στη συνήθη χημειοθεραπεία αύξησε την επιβίωση από 17% σε 24%. Η ιματινίμπη είχε εντυπωσιακή επίδραση στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, ενώ τα rituximab, sunitinib και trastuzumab έχουν επαναστατικοποιήσει τη θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκινώματος νεφρικών κυττάρων και του καρκίνου του μαστού, αντίστοιχα [8].

Οι στοχευμένοι θεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να ταξινομηθούν είτε με βάση τον μηχανισμό δράσης τους είτε ανάλογα με το σημείο στο οποίο ασκούν τη δράση τους. Ορισμένα ένζυμα συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που προάγουν την ανάπτυξη και επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Μερικές στοχευμένες θεραπείες αναστέλλουν αυτά τα **ένζυμα-σήματα** και χαρακτηρίζονται ως **αναστολείς ενζύμων**. Η παρεμπόδιση αυτών των σημάτων μεταγωγής εμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξη και διασπορά του καρκίνου [9]. Ορισμένες στοχευμένες θεραπείες, ονομάζονται φάρμακα επαγωγής της απόπτωσης, επειδή στοχεύουν άμεσα τα τμήματα του κυττάρου που ρυθμίζουν αν τα κύτταρα θα ζήσουν ή θα πεθάνουν. Παραδείγματα αποτελούν οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης, όπως η πρωτεϊνική κινάση B (PKB/Akt), η οποία προάγει την κυτταρική επιβίωση, και οι αναστολείς αυτής της πρωτεΐνης βρίσκονται σε προκλινική φάση ανάπτυξης [10]. Οι παράγοντες αυτοί εμποδίζουν τους όγκους να σχηματίζουν νέα αιμοφόρα αγγεία, συμβάλλοντας έτσι στη διακοπή της αιμάτωσής

τους, ώστε οι όγκοι να μην μπορούν να αναπτυχθούν. Επιπλέον, αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου μειώνοντας την παροχή αίματος προς αυτόν μέσω αναστολής αγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο **αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)** ή **οι υποδοχείς του**. Μελέτη έδειξε ότι η επιβίωση ασθενών με προχωρημένο καρκίνωμα παχέος εντέρου παρατάθηκε κατά μήνες με τη χρήση του Avastin (bevacizumab) σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία βασισμένη στη 5-φθοριοουρακίλη [11].

Οι 2 κύριες κατηγορίες των στοχευμένων θεραπειών είναι οι ακόλουθες:

- **Μονοκλωνικά αντισώματα**
- **Αναστολείς μικρού μοριακού βάρους**

Μονοκλωνικά αντισώματα

Τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, σχεδιασμένες ώστε να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν συγκεκριμένα αντιγόνα στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Χορηγούνται αποκλειστικά ενδοφλέβια, καθώς η πρωτεϊνική τους δομή αποδομείται στον γαστρεντερικό σωλήνα.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα ασκούν την αντικαρκινική τους δράση των μέσω πολλαπλών μηχανισμών:

- Προσδένονται στα καρκινικά κύτταρα και ενεργοποιούν τους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος έναντι αυτών ώστε, να αναγνωριστούν από το ανοσοποιητικό σύστημα και να μπορέσει να τα καταστρέψει,
- **Δεσμεύονται στους υποδοχείς** που βρίσκονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων παρεμποδίζοντας τα κρίσιμα μονοπάτια σηματοδότησης, με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η ανάπτυξη του όγκου και να οδηγούνται τα κύτταρα σε απόπτωση.
- Χρησιμοποιούνται ως **φορείς στοχευμένης χορήγησης** κυτταροτοξικών παραγόντων στα καρκινικά κύτταρα (όπως ραδιοϊσότοπα, τοξικές ουσίες ή χημειοθεραπευτικά φάρμακα).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το gemtuzumab, μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο CD33, συζευγμένο με την κυτταροτοξίνη calicheamicin, το οποίο χρησιμοποιείται στη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας.

Οι αναστολείς μικρού μοριακού βάρους (small molecule inhibitors) αποτελούν μικρά συνθετικά χημικά μόρια, τα οποία χορηγούνται κατά κύριο λόγο από του στόματος σε μορφή δισκίου. Το μικρό τους μέγεθος (Μοριακό βάρος ≤ 500 Da) και τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά επιτρέπουν την αποτελεσματική απορρόφησή τους από τον γαστρεντερικό σωλήνα και την ευκολότερη διείσδυσή τους στο εσωτερικό των κυττάρων, σε αντίθεση με τα μονοκλωνικά αντισώματα. Κατά κανόνα, οι μικρομοριακοί αναστολείς παρεμβαίνουν στην ενδοκυττάρια σηματοδότηση, **μπλοκάροντας συγκεκριμένα ένζυμα, τις τυροσινικές κινάσες**, που μεταφέρουν σήματα για να πολλαπλασιάζονται και να επιβιώνουν τα κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο **διακόπτουν σημαντικές σηματοδοτικές οδούς** που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη μετανάστευση και την αγγειογένεση σε φυσιολογικούς και νεοπλασματικούς ιστούς. Ενδεικτικά, οι υποδοχείς **EGFR, HER2/neu** και **VEGFR** αποτελούν χαρακτηριστικά μέλη της οικογένειας των υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης, οι οποίοι, μετά από δέσμευση του αντίστοιχου αυξητικού παράγοντα (EGF, VEGF), ενεργοποιούν ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αγγειογένεση. Σε σύγκριση με τα μονοκλωνικά αντισώματα, οι αναστολείς αυτοί παρουσιάζουν ουσιώδεις φαρμακολογικές και τεχνολογικές διαφορές. Χορηγούνται συνήθως από το στόμα και όχι ενδοφλεβίως, ενώ παράγονται μέσω κλασικών χημικών μεθόδων σύνθεσης, διαδικασία η οποία είναι γενικά λιγότερο δαπανηρή από τη βιοτεχνολογική παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Ωστόσο, εμφανίζουν συχνά χαμηλότερο βαθμό εκλεκτικότητας ως προς τον θεραπευτικό στόχο σε σύγκριση με τα μονοκλωνικά αντισώματα.

Ενδεικτικά παραδείγματα αναστολέων μικρού μοριακού βάρους, των αντικαρκινικών στόχων περιλαμβάνουν το gefitinib, αναστολέα της κινάσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), και το erlotinib, επίσης αναστολέα του EGFR, τα οποία χρησιμοποιούνται σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Το lapatinib, αναστολέας EGFR/ERBB2 (HER2), εφαρμόζεται στη θεραπεία ERBB2-θετικού καρκίνου μαστού, ενώ το sorafenib, αναστολέας της κινάσης του υποδοχέα του αγγειακού επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) και άλλων κινασών, χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων, στη θεραπεία του νεφροκυτταρικού καρκινώματος [7,12].

Πίνακας 1. Ενδεικτικοί αναστολείς μικρού μοριακού βάρους, οι αντίστοιχοι μοριακοί τους στόχοι (υποδοχείς, ένζυμα κ.α.) και οι τύποι καρκίνου στους οποίους χρησιμοποιούνται [7,12].

Φάρμακο	Μοριακός στόχος	Τύπος Καρκίνου
Gefitinib (Iressa)	EGFR	Παγκρέατος
Erlotinib (Tarceva)	EGFR	Πνεύμονα
Lapatinib (Tykerb)	HER2/neu	Μαστού
Sorafenib (Nexavar)	VEGFR	Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα
Sunitinib (Sutent)	VEGFR	Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα
Dasatinib (Sprycel)	BCR-ABL	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

Η στοχευμένη θεραπεία αποτελεί σύγχρονη προσέγγιση στην αντιμετώπιση καρκίνων, όπως το μελάνωμα, ο καρκίνος του μαστού και άλλοι τύποι, βασιζόμενη στην ακριβή μοριακή ταυτοποίηση και τον εντοπισμό συγκεκριμένων στόχων στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η κλινική της εφαρμογή περιορίζεται από την ανάπτυξη **φαρμακοαντοχής** μετά την αρχική ανταπόκριση, γεγονός που οδηγεί συχνά σε επιστροφή σε συμβατικές θεραπείες ή σε χρήση συνδυαστικών θεραπειών με αυξημένο κόστος. Επιπλέον, η θεραπεία δεν είναι απολύτως εκλεκτική, καθώς μόρια-στόχοι όπως ο EGFR και το HER2 **εκφράζονται και σε φυσιολογικούς ιστούς**, προκαλώντας σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (π.χ. δερματικές βλάβες, καρδιαγγειακές επιπλοκές), που συχνά επιβάλλουν μείωση της δόσης ή διακοπή της αγωγής.

Καθοριστικό εμπόδιο αποτελεί και το υψηλό οικονομικό κόστος της στοχευμένης θεραπείας, που συνδέεται με εξειδικευμένες διαγνωστικές εξετάσεις και ακριβά φάρμακα. Όταν το θεραπευτικό όφελος δεν είναι ανάλογο του κόστους και η ποιότητα ζωής του ασθενούς επιβαρύνεται, αρκετά φάρμακα δεν εγκρίνονται ή αποσύρονται από την κυκλοφορία. Η υπέρβαση αυτών των περιορισμών προϋποθέτει την ταυτοποίηση μοριακών στόχων που απαντώνται **αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα**, την καλύτερη κατανόηση **των μηχανισμών αντίστασης** και των **σηματοδοτικών οδών στους όγκους**, καθώς και την ανάπτυξη οικονομικότερων και πιο αποτελεσματικών διαγνωστικών και θεραπευτικών στρατηγικών [13,14].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Βασικές αρχές φωσφορυλίωσης και παραγωγής ATP

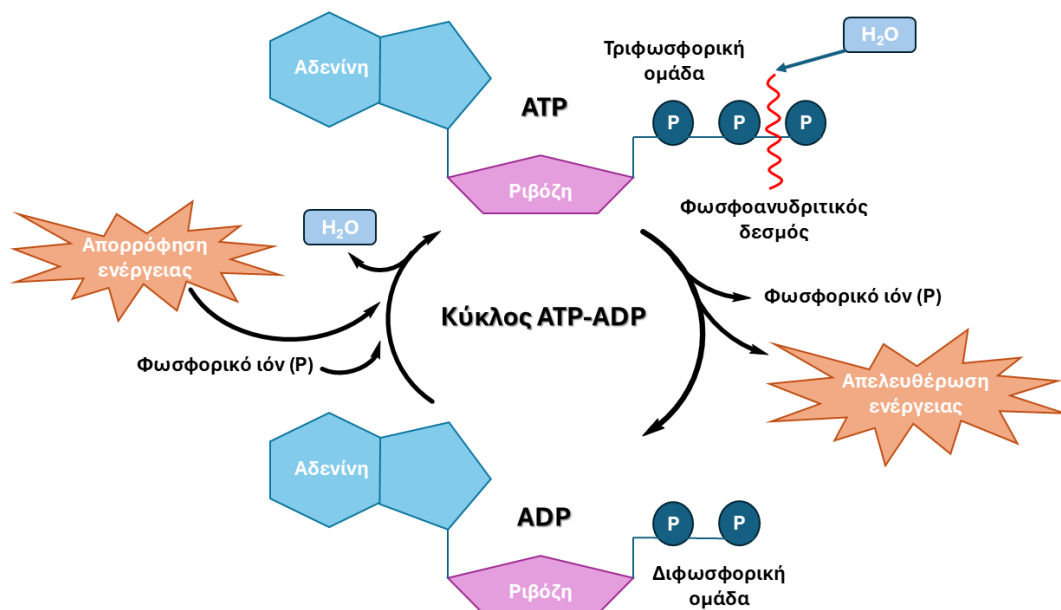
Η φωσφορυλίωση αποτελεί μία από τις κεντρικές βιοχημικές διεργασίες στα ζωντανά κύτταρα, καθώς συνδέεται άμεσα με τη διαχείριση και τη ρύθμιση της χημικής ενέργειας. Με τον όρο φωσφορυλίωση περιγράφεται η προσθήκη μιας **φωσφορικής ή φωσφορυλομάδας** (PO_4^{3-} ή PO_3^{2-}) σε ένα οργανικό μόριο, **υπό την καταλυτική δράση εξειδικευμένων ενζύμων, των κινασών**. Η τροποποίηση αυτή μεταβάλλει τις χημικές και λειτουργικές ιδιότητες του μορίου-στόχου, επηρεάζοντας την ενεργειακή του κατάσταση, τη δομική του σταθερότητα αλλά και τη βιολογική του δραστηριότητα.

Ο κύριος φορέας χημικής ενέργειας στο κύτταρο είναι η **τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)**. Το μόριο αυτό διαθέτει δύο φωσφοανυδριδικούς δεσμούς υψηλής ενέργειας ανάμεσα στις φωσφορικές ομάδες του. Η υδρόλυση του τελικού φωσφοανυδριδικού δεσμού, δηλαδή η μετατροπή του ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ανόργανο φωσφορικό ιόν (P_i), το οποίο μπορεί να απαντά σε διαφορετικές ιοντικές μορφές (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), οδηγεί σε απελευθέρωση ελεύθερης ενέργειας η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί για την κάλυψη ενεργειακά απαιτητικών διεργασιών, όπως η μυϊκή συστολή, η μεταφορά ιόντων διαμέσου βιολογικών μεμβρανών και η βιοσύνθεση μακρομορίων. Παράλληλα, η αντίστροφη διεργασία, η φωσφορυλίωση του ADP προς ATP, επιτυγχάνεται με κατανάλωση ελεύθερης ενέργειας, διαμορφώνοντας έναν **συνεχή κύκλο ATP–ADP**, στον οποίο **φωσφορυλίωση ($\text{ADP} \rightarrow \text{ATP}$)** και **αποφωσφορυλίωση ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$)** συνυπάρχουν και ρυθμίζονται δυναμικά. Η σύνθεση ATP από ADP πραγματοποιείται κυρίως μέσω δύο μηχανισμών: της **οξειδωτικής φωσφορυλίωσης** και της **φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος**.

Στην **οξειδωτική φωσφορυλίωση**, η παραγωγή ATP είναι άμεσα συνδεδεμένη με την **οξείδωση θρεπτικών μορίων**. Καθώς τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από δότες σε τελικούς δέκτες, όπως το μοριακό οξυγόνο, μέσω αλληλουχίας οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων στην ηλεκτρονιομεταφορική αλυσίδα, απελευθερώνεται σταδιακά ενέργεια. Η ενέργεια αυτή αξιοποιείται για τη δημιουργία ηλεκτροχημικής βαθμίδας πρωτονίων κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η παλινδρόμηση των πρωτονίων μέσω του καναλιού της **ATP συνθετάσης** οδηγεί σε περιστροφική κίνηση του ενζύμου, η οποία προκαλεί διαδοχικές διαμορφωτικές αλλαγές στο

καταλυτικό τμήμα του (F_1) και, τελικά, στη σύνθεση ATP από ADP και ανόργανο φωσφορικό ιόν. Η **οξειδωτική φωσφορυλίωση** αποτελεί έναν ιδιαίτερα αποδοτικό μηχανισμό παραγωγής ATP, ωστόσο εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου και λαμβάνει χώρα αποκλειστικά σε **αερόβιες συνθήκες**. Αντίθετα, η **φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος** δεν απαιτεί άμεση σύζευξη με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ή με ηλεκτρονιομεταφορικές αλυσίδες. Σε αυτήν τη διεργασία, η απαραίτητη ενέργεια για τη μετατροπή του ADP σε ATP προέρχεται από τη χημική ενέργεια ενός φωσφορυλιωμένου ενδιάμεσου υποστρώματος. Καθώς το υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόν χαμηλότερης ενέργειας, μία φωσφορική ομάδα μεταφέρεται άμεσα στο ADP, σχηματίζοντας ATP. Φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος παρατηρείται κυρίως στη γλυκόλυση (στο κυτταρόπλασμα) και σε στάδια του κύκλου του Krebs (στα μιτοχόνδρια). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να λειτουργήσει τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, παρέχοντας ταχεία αλλά λιγότερο αποδοτική παραγωγή ATP σε σύγκριση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση.

Συνολικά, η φωσφορυλίωση, είτε μέσω οξειδωτικών μηχανισμών είτε σε επίπεδο υποστρώματος, αποτελεί θεμελιώδη μηχανισμό **μετατροπής και αποθήκευσης ενέργειας**, καθώς και **ρύθμισης της λειτουργίας πρωτεϊνών και μεταβολικών οδών**. Η συνεχής εναλλαγή φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης επιτρέπει στο κύτταρο να προσαρμόζεται άμεσα στις μεταβαλλόμενες ενεργειακές και λειτουργικές του ανάγκες, υποστηρίζοντας έτσι την ομοιόσταση και την επιβίωσή του. Η συνεχής και αυστηρά ελεγχόμενη εναλλαγή φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης επιτρέπει στο κύτταρο να προσαρμόζεται άμεσα σε μεταβαλλόμενες ενεργειακές απαιτήσεις και περιβαλλοντικές συνθήκες, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ομοιόστασης και της κυτταρικής επιβίωσης (<https://www.sciencefacts.net/phosphorylation.html>, <https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphorylation>).

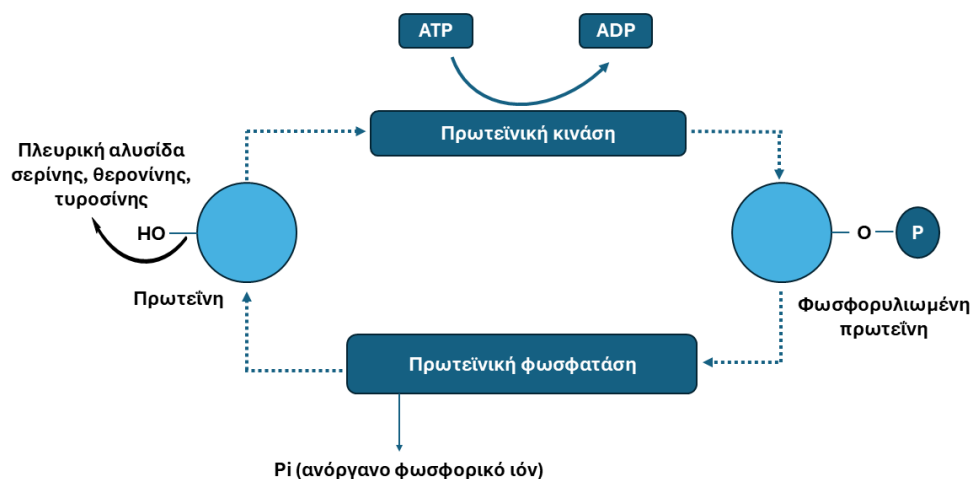


Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της υδρόλυσης του ATP σε ADP και ανόργανο φωσφορικό ιόν (Pi) με απελευθέρωση ενέργειας, καθώς και της αντίστροφης αντίδρασης φωσφορυλίωσης του ADP για τον ανασχηματισμό ATP. (Τροποποιημένο από <https://www.sciencefacts.net/phosphorylation.html>).

2.2 Πρωτεϊνικές κινάσες

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ATP-εξαρτώμενες φωσφοτρανσφεράσες που καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από τη γ-θέση του ATP στις υδροξυλομάδες καταλοίπων σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Για τη δράση τους απαιτείται σχεδόν πάντα η παρουσία δισθενούς κατιόντος, συνήθως Mg^{2+} , το οποίο διευκολύνει τόσο τη δέσμευση του ATP όσο και τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας. Λειτουργεί δηλαδή ως **ένζυμο-καταλύτης**: βοηθά να μεταφερθεί η φωσφορική ομάδα από το ATP στην πρωτεΐνη-στόχο. Η φωσφορυλίωση πρωτεϊνών στο ενεργό κέντρο μιας κινάσης είναι μια **δυναμική και σύνθετη διεργασία** και παρότι, ο μηχανισμός της είναι σχετικά απλός, συνοδεύεται από δομικές αναδιατάξεις και ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις. Αν και ο **εξελικτικά διατηρημένος καταλυτικός πυρήνας** είναι κοινός για όλη την οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών, ο πυρήνας αυτός αλληλεπιδρά συχνά με ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή δομικούς τομείς, οι οποίοι μπορούν είτε να ενισχύσουν είτε να καταστείλουν την καταλυτική του δραστηριότητα [15]. Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες βρίσκονται σε μια βασική (ανενεργή) κατάσταση και ενεργοποιούνται μόνο όταν απαιτείται, μέσω ποικίλων ρυθμιστικών σημάτων και πολύπλοκων μηχανισμών μεταγωγής [16]. Η αναστρέψιμη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών αποτελεί μία από τις σημαντικότερες **μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις** και τον

κεντρικό μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής λειτουργίας. Η φωσφορυλίωση μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τη δραστηριότητα ενζύμων, να επηρεάσει τη μεταγραφή και τη μετάφραση, καθώς και ένα ευρύ φάσμα διεργασιών όπως ο μεταβολισμός υδατανθράκων και λιπιδίων, η βιοσύνθεση νευροδιαβιβαστών, η αντιγραφή του DNA και η κυτταρική διαφοροποίηση. Στο ίδιο πρωτεϊνικό μόριο, ορισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης μπορεί να είναι διεγερτικές και άλλες ανασταλτικές, προσδίδοντας υψηλό επίπεδο ρύθμισης. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 518 πρωτεϊνικές κινάσες, καθώς και επίσης και έναν αριθμό 106 ψευδογονιδίων κινασών. Από τις 518 κινάσες, περίπου 50 στερούνται βασικών αμινοξικών καταλοίπων στο ενεργό κέντρο, τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική τους δράση, και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως ψευδοκινάσες. Οι μη καταλυτικές, αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις κινασών και ψευδοκινασών με άλλες πρωτεΐνες προσθέτουν ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης στην υπεριοικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών. Η κινάση φωσφορυλάση ήταν η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που μελετήθηκε βιοχημικά και η μελέτη της οδήγησε στην ανακάλυψη της **PKA**, η οποία την φωσφορυλιώνει και την ενεργοποιεί. Αυτό το παράδειγμα αποτέλεσε τον πρώτο γνωστό “καταρράκτη” (cascade) πρωτεϊνικών κινασών και χρησιμοποιείται ως βασικό μοντέλο για την κατανόηση των σηματοδοτικών μονοπατιών.



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση της αναστρέψιμης φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών. Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν τη φωσφορυλίωση χρησιμοποιώντας ATP ως δότη φωσφορικής ομάδας, ενώ οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες καταλύουν την αποφωσφορυλίωση με απελευθέρωση ανόργανου φωσφορικού ιόντος (Pi).

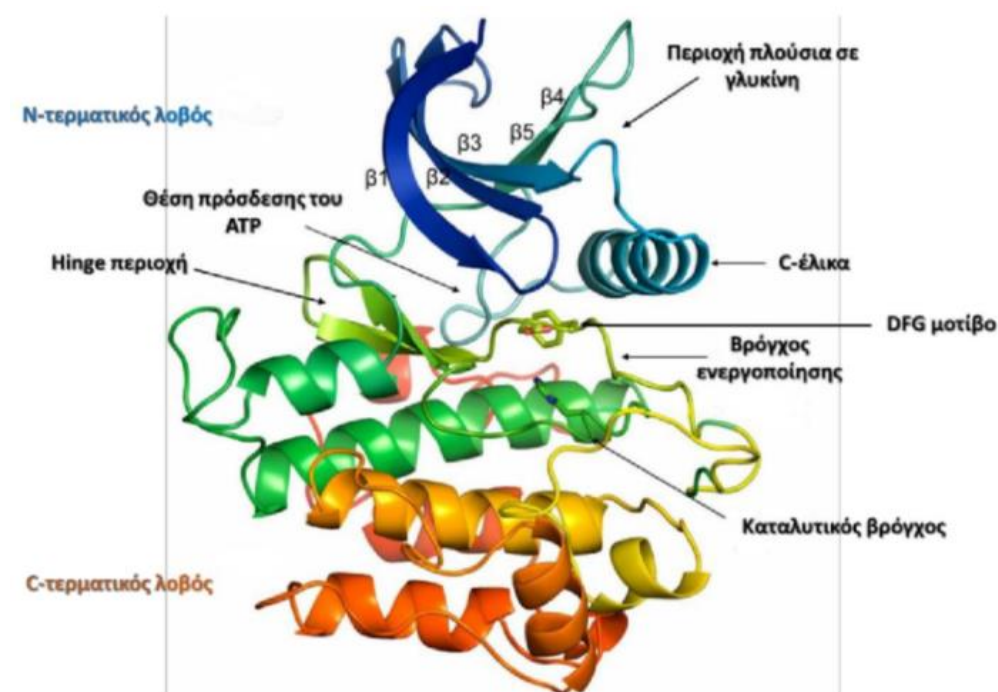
Βασισμένο σε σχήμα της Proteintech Group [17].

2.3 Δομή των πρωτεϊνικών κινασών

Οι ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες (EPKs) είναι ιδιαίτερα δυναμικές και εύκαμπτες πρωτεΐνες. Ο όρος «δυναμικές πρωτεΐνες» αναφέρεται στο γεγονός ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες δεν αποτελούν άκαμπτες δομές, αλλά υφίστανται **συνεχείς διαμορφωτικές μεταβολές** σε διάφορες χρονικές στιγμές. Οι μετακινήσεις των λοβών, βρόχων και ελίκων τους, τους επιτρέπουν να λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, μέσω της εναλλαγής μεταξύ **ενεργών** και **ανενεργών** καταστάσεων και ο ρόλος τους είναι κρίσιμος για τη ρύθμιση της καταλυτικής τους λειτουργίας. Η σε βάθος κατανόηση των μηχανισμών που διέπουν τη λειτουργία και τη ρύθμισή τους, προϋποθέτει τον συνδυασμό πληροφοριών από την αλληλουχία, τη δομή και τη δυναμική τους [18]. Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούνται από δύο δομικά ανόμοιους λοβούς: τον N-τελικό λοβό (N-lobe), ο οποίος φέρει β-πτυχωτό φύλλο με πέντε κλώνους, και τον C-τελικό λοβό (C-lobe), που αποτελείται κυρίως από α-έλικες και βρόχους. Η θέση πρόσδεσης του ATP και η καταλυτική περιοχή βρίσκονται μεταξύ αυτών των δύο λοβών. Το σύνολο των δύο αυτών λοβών, μαζί με τα **διατηρημένα μοτίβα αλληλουχίας** που φέρουν, συγκροτεί τον καταλυτικό πυρήνα της κινάσης, ο οποίος είναι ιδιαίτερα διατηρημένος στις EPKs και περιλαμβάνει όλα τα βασικά δομικά στοιχεία που απαιτούνται για τη δέσμευση του ATP και του πρωτεϊνικού υποστρώματος και για τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας. Ο όρος «διατηρημένα μοτίβα αλληλουχίας» αναφέρεται σε μικρά, χαρακτηριστικά τμήματα της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (λίγα συνεχόμενα αμινοξέα), τα οποία **παραμένουν ιδιαίτερα όμοια μεταξύ διαφορετικών κινασών** λόγω του κρίσιμου δομικού ή λειτουργικού ρόλου τους. Τέτοια μοτίβα, όπως ο Gly-rich loop, το VAIK, το HRD και το DFG, είναι απαραίτητα για τη σωστή δέσμευση του ATP και την καταλυτική διαδικασία. Οι δύο λοβοί συνδέονται μεταξύ τους μέσω μιας εύκαμπτης άρθρωσης (μια πολυπεπτιδική αλυσίδα), η οποία καλείται **hinge περιοχή**. Ο N-τερματικός λοβός της κινάσης αποτελείται από τις υπομονάδες I-V και συνίσταται από 90 αμινοξέα οργανωμένα σε πέντε αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα και μία τουλάχιστον αC έλικα. Αυτός ο λοβός περιέχει τη θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύει το ATP (**Σχήμα 4**). Ο C-τερματικός λοβός αποτελείται από τις V-XI υπομονάδες και συνίσταται κυρίως από α-έλικες και περιέχει τον βρόγχο ενεργοποίησης και τα καταλυτικά κατάλοιπα. Ποικίλει σε μέγεθος και αλληλουχία και είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του υποστρώματος και την έναρξη της φωσφομεταφοράς [19]. Δύο υδρόφοβοι δομικοί άξονες συνδέουν τους δύο

λοβούς: Η **ρυθμιστική ραχοκοκαλιά** (regulatory spine, R-spine) που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της ενεργής μορφής της κινάσης και συναρμολογείται δυναμικά στο πλαίσιο της ρύθμισης, και η **καταλυτική ραχοκοκαλιά** (catalytic spine, C-spine) ολοκληρώνεται με τη δέσμευση του δακτυλίου αδενίνης του ATP. Και οι δύο ραχοκοκαλιές σταθεροποιούνται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την αF-έλικα. Παρότι οι αναλύσεις αυτές συνέβαλαν στον προσδιορισμό των δομικών στοιχείων, πλήθος αλλοστερικών φαινομένων που προκαλούνται από μεταλλάξεις ή από δέσμευση άλλων πρωτεϊνών εξακολουθεί να παραμένει αδιευκρίνιστο.

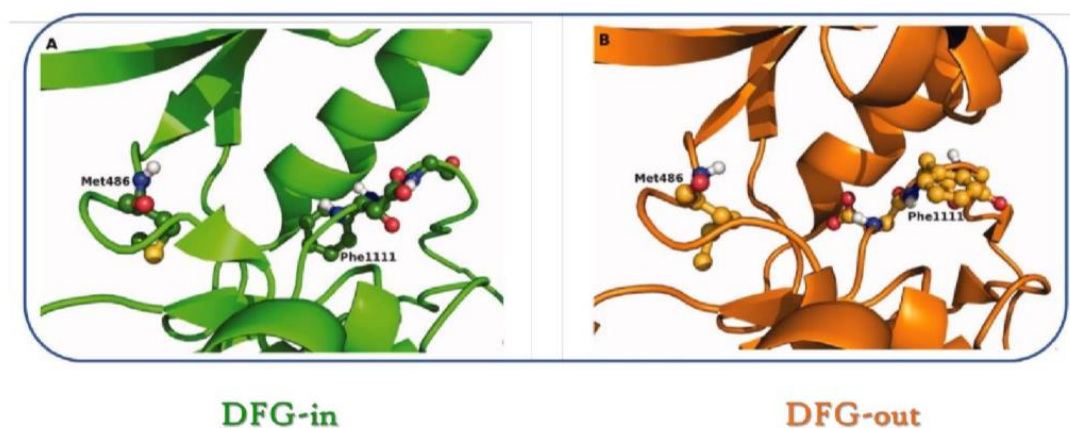
Η θηλιά πρόσδεσης του ATP και το καταλυτικό κέντρο σχηματίζονται στο μεσοδιάστημα των δύο λοβών από ένα πλήθος καταλοίπων, συμπεριλαμβανομένου και του συμπαραγόντα μαγνησίου (Mg^{2+}). Το N-τελικό άκρο πλησίον της λυσίνης είναι πλούσιο σε γλυκίνη και φαίνεται να συμμετέχει στην πρόσδεση του ATP (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Σχηματική απεικόνιση των δομικών περιοχών των πρωτεϊνικών κινασών [20].

Ο **βρόγχος ενεργοποίησης** των πρωτεϊνικών κινασών φέρει δύο διατηρημένα μοτίβα, το **DFG (Asp–Phe–Gly)** στο N-τελικό άκρο και το **APE (Ala–Pro–Glu)**. Το κατάλοιπο του ασπαρτικού του DFG περιέχει το ιόν μαγνησίου το οποίο είναι απαραίτητο για τη σωστή τοποθέτηση της φωσφορικής ομάδας του ATP κατά την

καταλυτική διαδικασία. Στην **ενεργή κατάσταση** η πλευρική αλυσίδα του Asp εκτίθεται, είναι δηλαδή στραμμένη προς το διάλυμα, ενώ της Phe «κρύβεται», επιτρέποντας τη δέσμευση του ATP. Αυτή η διάταξη ονομάζεται **DFG-in**. Στην **ανενεργή μορφή** συμβαίνει το αντίστροφο: η πλευρική αλυσίδα του Asp αποκρύπτεται, ενώ της Phe περιστρέφεται έξω από τη θηλιά και παρεμποδίζει την πρόσβαση του ATP, διάταξη που χαρακτηρίζεται ως **DFG-out** (Σχήμα 5) [21].



Σχήμα 5. Σύγκριση DFG-in και DFG-out διαμορφώσεων [21].

2.4 Ταξινόμηση των πρωτεϊνικών κινασών

Το 2002 ο Gerald Manning και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν μελέτη στην οποία χαρτογραφήθηκε συστηματικά το ανθρώπινο γονιδίωμα, οδηγώντας στην αναγνώριση **518 πρωτεϊνικών** και **20 λιπιδικών κινασών**, δηλαδή περίπου του 2% του συνόλου των γονιδίων. Με βάση τις διεργασίες που επιτελούν στα κύτταρα, οι πρωτεϊνικές κινάσες ταξινομούνται σε επιμέρους οικογένειες. Οι Hanks και Hunter πρότειναν πρώτοι τον διαχωρισμό των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών σε **δύο μεγάλες κατηγορίες**: τις **τυπικές ePKs** (478 μέλη) και τις **άτυπες aPKs** (40). Οι τυπικές ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν την πλειονότητα και **υποδιαιρούνται σε οκτώ** επιπλέον **οικογένειες** (TK, TKL, STE, CSNK1, AGC, CAMK και RGC). Η συγκεκριμένη ταξινόμηση βασίστηκε κυρίως στην ομοιότητα της καταλυτικής τους περιοχής, στην παρουσία επιπρόσθετων δομικών περιοχών και στις βιολογικές λειτουργίες που επιτελούν. Οι πρωτεϊνικές κινάσες ταξινομούνται ακόμη ανάλογα με το υπόστρωμα που φωσφορυλιώνουν, σε **πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης** και **πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης**. Οι δύο αυτές οικογένειες υποδιαιρούνται σε

μικρότερες, ανάλογα με δράση τους και την τρισδιάστατη δομή του ενεργού κέντρου [22].

2.5 Κατηγορίες Πρωτεϊνικών Κινασών

2.5.1 Οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης είναι από τις πιο πολυπληθείς κατηγορίες πρωτεϊνικών κινασών. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον 125 από τις περίπου 500 κινάσες του ανθρώπου ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Πρόκειται για ένζυμα με δράση κινάσης, τα οποία καταλύουν τη φωσφορυλίωση της υδροξυλομάδας καταλοίπων σερίνης ή θρεονίνης. Δεν γίνεται ουσιαστική διάκριση ανάμεσα στα δύο αυτά αμινοξέα, καθώς οι πλευρικές τους αλυσίδες είναι δομικά συγγενείς [23]. Οι υποδοχείς πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης συμμετέχουν καθοριστικά στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής απόπτωσης, της διαδικασίας της διαφοροποίησης, καθώς και της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Χάρη στο ιδιαίτερα διατηρημένο καταλυτικό τους κέντρο, οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης δεν αναγνωρίζουν μία μόνο συγκεκριμένη πρωτεΐνη-στόχο, αλλά ένα ευρύτερο μοτίβο αμινοξέων γύρω από το κατάλοιπο σερίνης/θρεονίνης. Ως αποτέλεσμα, η ίδια κινάση είναι σε θέση να φωσφορυλιώνει πολλαπλά, δομικά συγγενή υποστρώματα, επιτρέποντας τον ταυτόχρονο συντονισμό και τη ρύθμιση διαφορετικών σηματοδοτικών οδών. Μεταβολές στην αλληλουχία των γονιδίων που τις κωδικοποιούν συμβάλλουν στη δημιουργία της αναγκαίας ποικιλομορφίας για την εκλεκτική αναγνώριση των διαφορετικών υποστρωμάτων [24].

Στην κατηγορία των κινασών σερίνης/θρεονίνης εντάσσονται, μεταξύ άλλων, οι **κινάσες MAP** (mitogen-activated protein kinases), όπως οι **p42/44 ERK**, η **p38 MAPK**, η **JNK**, καθώς και οι **PKA**, **PKB** και **PKC**. Η απορρύθμιση της έκφρασης ή της λειτουργίας τέτοιων κινασών έχει συσχετιστεί στενά με την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του προστάτη και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης [25].

2.5.2 Οικογένεια πρωτεϊνικών τυροσινικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές τυροσινικές κινάσες (tyrosine kinases, TKs) αποτελούν καθοριστικούς μεσολαβητές της κυτταρικής μεταγωγής σήματος, μέσω της οποίας τα εξωκυτταρικά ερεθίσματα μεταδίδονται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης προς το κυτταρόπλασμα και συχνά φτάνουν έως τον πυρήνα, ρυθμίζοντας διεργασίες όπως ο κυτταρικός

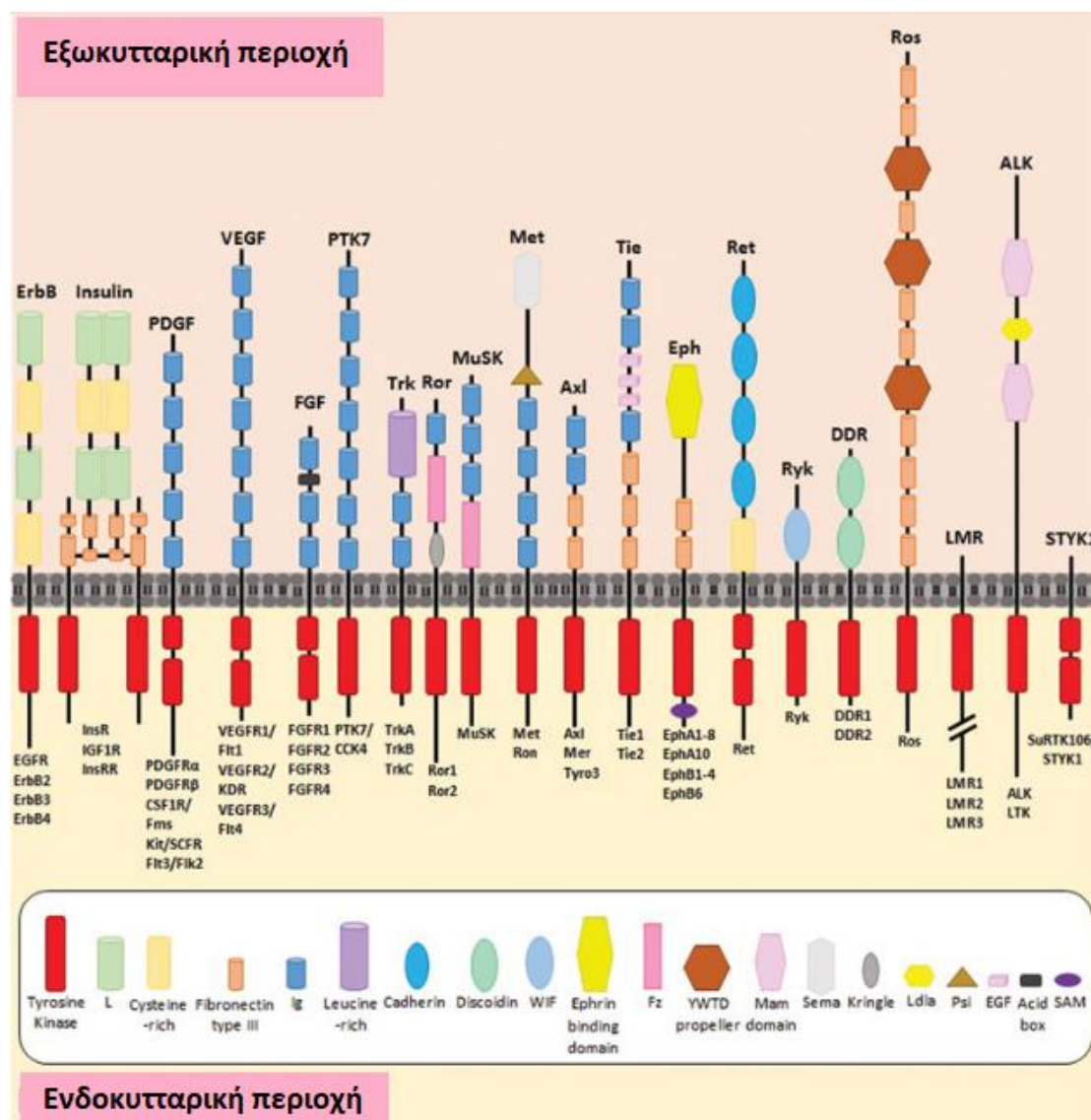
πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, ο κυτταρικός μεταβολισμός και ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Αποτελούν μια εκτεταμένη οικογένεια ενζύμων που, αξιοποιώντας το ATP, καταλύουν τη φωσφορυλίωση επιλεγμένων καταλοίπων τυροσίνης σε πρωτεΐνες-στόχους, διασφαλίζοντας τη φυσιολογική επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και τη διατήρηση της ομοιόστασης. Η υπερέκφραση ή/και απορρύθμιση των τυροσινικών κινασών έχει συσχετιστεί στενά με την ανάπτυξη και εξέλιξη διαφόρων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο, γεγονός που καθιστά τις κινάσες αυτές μία από τις πλέον μελετημένες οικογένειες ενζύμων [26]. Στον άνθρωπο υπολογίζονται περίπου 90 διακριτές τυροσινικές κινάσες, οι οποίες χωρίζονται σε **58 υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (RTKs)** και σε **32 μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες (NRTKs)**. Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στη διαμεμβρανική σηματοδότηση, ενώ οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες λειτουργούν στη σηματοδότηση προς τον πυρήνα [27].

2.5.3 Οικογένεια υποδοχικών τυροσινικών κινασών (RTKs)

Οι περισσότερες κυτταρικές λειτουργίες και δραστηριότητες ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια, τα οποία μεταδίδουν την πληροφορία τους διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης, κυρίως, **μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων**. Οι υποδοχείς αυτοί λειτουργούν ως κύριοι «αισθητήρες» του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος και ενεργοποιούν την μεταγωγή σήματος ενεργοποιώντας τα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Τα μέλη της οικογένειας των υποδοχικών τυροσινικών κινασών, πέραν του ότι αποτελούν **διαμεμβρανικούς υποδοχείς**, διαθέτουν και **ενζυμική δράση κινάσης**, γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα σημαντικές για τη ρύθμιση της κυτταρικής απάντησης και τις συνδέει στενά με την παθογένεση του καρκίνου [26]. Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες ταξινομούνται σε περίπου 20 υποοικογένειες, με κριτήριο την ομολογία αλληλουχία και τη δομική οργάνωση των εξωκυτταρικών τους περιοχών (**Σχήμα 6**). Ενδεικτικά, στις υποοικογένειες αυτές περιλαμβάνονται:

- 1) η οικογένεια **EGFR/ERBB** (Epidermal Growth Factor Receptor Family),
- 2) η οικογένεια **IGF1R** (Insulin Receptor Family),
- 3) η οικογένεια **PDGFR** (Platelet-Derived Growth Factor Receptor Family),
- 4) η οικογένεια **FGFR** (Fibroblast Growth Factor Receptor Family),

- 5) η οικογένεια **VEGFR** (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Family),
- 6) η οικογένεια **HGFR** (Hepatocyte Growth Factor Receptor Family), καθώς και πολλές ακόμη [28].

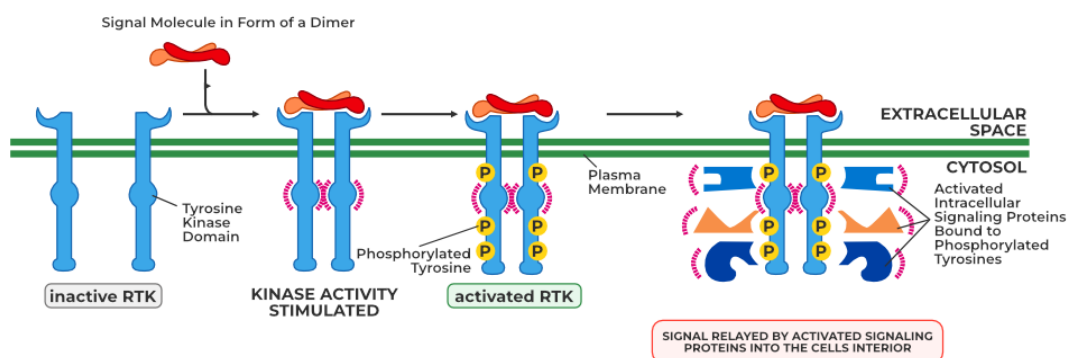


Σχήμα 6. Σχηματική απεικόνιση των κύριων υποοικογενειών υποδοχικών τυροσινικών κινασών (RTKs). Κάθε RTK αποτελεί διαμεμβρανική πρωτεΐνη μίας διέλευσης, με εξωκυτταρικό τμήμα που φέρει ποικίλες δομικές μονάδες για τη δέσμευση προσδετών (υποκαταστατών), μία διαμεμβρανική υδρόφοβη α -έλικα και ενδοκυττάριο τμήμα που περιλαμβάνει τον διατηρημένο καταλυτικό τομέα κινάσης τυροσίνης. Η **ετερογένεια των εξωκυτταρικών δομών** αντικατοπτρίζει τη διαφορετική εξειδίκευση ως προς τους προσδέτες, ενώ ο ενδοκυττάριος δομικός πυρήνας της κινάσης παραμένει διατηρημένος μεταξύ των μελών της οικογένειας [28].

Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες ενεργοποιούνται κατόπιν πρόσδεσης του προσδέτη στην εξωκυτταρική τους περιοχή. Οι προσδέτες αυτοί είναι **εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια** (π.χ. EGF, PDGF κ.ά.), τα οποία στις περισσότερες περιπτώσεις

επάγουν τον διμερισμό του υποδοχέα, με εξαίρεση τους υποδοχείς ινσουλίνης όπου ο διμερισμός προϋπάρχει. Διαφορετικοί προσδέτες χρησιμοποιούν διαφορετικές στρατηγικές για τη σταθεροποίηση της διμερούς μορφής: σε ορισμένες περιπτώσεις **ένα μόριο προσδέτη γεφυρώνει δύο μόρια υποδοχέα**, ενώ **σε άλλες δύο μόρια προσδέτη προσδένονται σε δύο μόρια υποδοχέα**. Η δέσμευση του προσδέτη στην εξωκυτταρική περιοχή σταθεροποιεί το ενεργό διμερές και συνεπάγεται την ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης, η οποία ενισχύεται περαιτέρω από τις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-υποδοχέα.

Ο **ολιγομερισμός των RTKs** αυξάνει τοπικά τη συγκέντρωσή τους στην κυτταρική μεμβράνη, διευκολύνοντας την αποτελεσματική αυτοφωσφορυλίωση καταλοίπων της τυροσίνης στον βρόχο ενεργοποίησης του καταλυτικού τομέα. Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε «ανοιχτή» διαμόρφωση του βρόχου, η οποία επιτρέπει την απρόσκοπτη πρόσβαση του ATP και των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο [24]. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο δίνει το έναυσμα για την έναρξη ενδοκυττάρων σηματοδοτικών καταρρακτών (cascades), που περιλαμβάνουν διαδοχικές φωσφορυλιώσεις ενδοκυττάρων πρωτεϊνών (αντιδράσεις με μικρό φράγμα ενεργοποίησης οι οποίες πραγματοποιούνται πολύ γρήγορα), ενεργοποίηση επιπλέον τυροσινικών κινασών και κινασών σερίνης/θρεονίνης και μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση μέσω μετάδοσης του σήματος μέχρι τον πυρήνα. Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης των υποδοχικών τυροσινικών κινασών απεικονίζεται στο **Σχήμα 7**.



Σχήμα 7. Μηχανισμός ενεργοποίησης των υποδοχικών τυροσινικών κινασών (RTKs). Η πρόσδεση ενός διμερούς προσδέτη στο εξωκυτταρικό τμήμα επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας τυροσινικής κινάσης, με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση υπολειμμάτων τυροσίνης. Οι φωσφορυλιωμένες τυροσίνες λειτουργούν ως σημεία πρόσδεσης για ενδοκυττάριας σηματοδοτικές πρωτεΐνες, οδηγώντας στην αναμετάδοση του σήματος στο εσωτερικό του κυττάρου (<https://www.geeksforgeeks.org/biology/receptor-tyrosine-kinase-signaling/>).

2.5.4 Οικογένεια Υποδοχικού Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα

Οι αυξητικοί παράγοντες συγκροτούν μια εκτεταμένη ομάδα πολυπεπτιδίων, στα οποία έχει αποδοθεί καίριος ρόλος στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της κυτταρικής διαφοροποίησης, τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε κακοήγη κύτταρα. Ένας από τους πρώτους αυξητικούς παράγοντες που ταυτοποιήθηκαν ήταν ο **επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF)**. Μελέτες έδειξαν ότι ο EGF ασκεί τη βιολογική του δράση μέσω ειδικού διαμεμβρανικού υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη, του **υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR)**. Η δέσμευση του EGF στον EGFR οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών, τα οποία οδηγούν είτε σε προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είτε σε επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων. Ο **EGFR** ανήκει στην κατηγορία των **διαμεμβρανικών υποδοχέων τυροσινικής κινάσης** και είναι επίσης γνωστός με τις ονομασίες **ErbB1** ή **HER1**. Διαδραματίζει ουσιώδη ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών, και ρυθμίζει τη διαφοροποίηση κυττάρων και ιστών [29]. Αποτελεί ένα από τα τέσσερα μέλη της οικογένειας υποδοχέων **HER/ErbB**, στην οποία περιλαμβάνονται οι υποδοχείς **EGFR/ErbB1/HER1**, **ErbB2/HER2**, **ErbB3/HER3** και **ErbB4/HER4**.

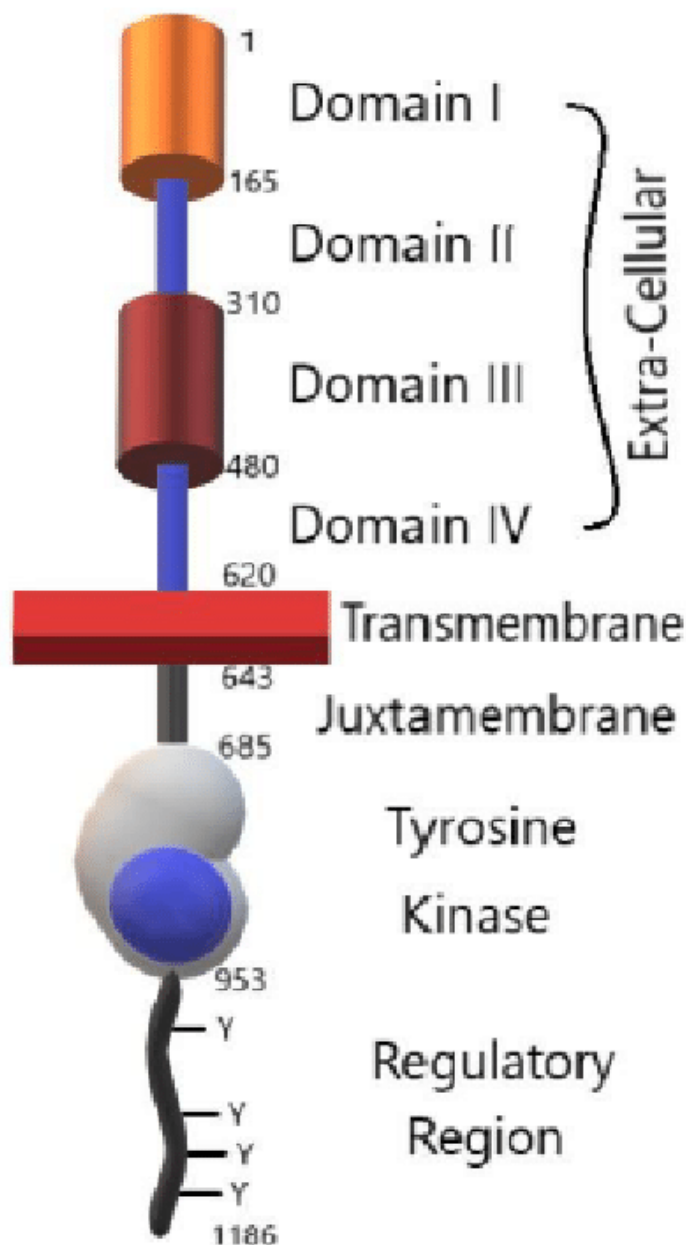
Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί έντεκα διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες—προσδέτες (ligands) της οικογένειας HER, οι οποίοι ταξινομούνται σε τρεις κύριες υποομάδες ανάλογα με το προφίλ συγγένειάς τους έναντι των υποδοχέων:

- 1) εκείνοι που προσδένονται κυρίως στον **EGFR**, όπως ο **EGF**, ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-α (transforming growth factor-α, **TGF-α**) και η αμφιρεγκουλίνη (amphiregulin, **AR**),
- 2) οι προσδέτες που αναγνωρίζονται τόσο από τον **EGFR** όσο και από τον **HER4**, όπως η βητακυτοκίνη (betacellulin, **BTC**), ο αυξητικός παράγοντας που δεσμεύει ηπαρίνη (heparin-binding EGF-like growth factor, **HB-EGF**) και η επιρεγκουλίνη (epiregulin, **EP**), και
- 3) οι νευρορεγκουλίνες (neuregulins, **NRGs**), οι οποίες προσδένονται κυρίως στους **HER3** και **HER4**.

Η ενεργοποίηση του EGFR προϋποθέτει τον σχηματισμό **ομοδιμερών (EGFR–EGFR)** ή **ετεροδιμερών με άλλα μέλη της οικογένειας ErbB**, όπως ο **HER2**. Ο διμερισμός αυτός οδηγεί σε **διασταυρούμενη φωσφορυλίωση** των ενδοκυττάρων

τμημάτων τυροσινικής κινάσης και σε ενεργοποίηση ενός σύνθετου καταρράκτη σηματοδότησης. Η **διασταυρούμενη αυτοφωσφορυλίωση** των υποδοχικών τυροσινικών κινασών λαμβάνει χώρα όταν ο υποδοχέας βρεθεί σε **διμερή ή ολιγομερή μορφή**, καθώς ο διμερισμός φέρνει σε στενή γειτνίαση και κατάλληλο προσανατολισμό τα ενδοκυττάρια τμήματα της κινάσης, επιτρέποντας στο κάθε μονομερές να φωσφορυλιώνει κατάλοιπα τυροσίνης στην ουρά του άλλου. Παρότι για τον HER2 δεν έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα συγκεκριμένος προσδέτης, ο υποδοχέας προτιμάται για ετεροδιμερισμό από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, σχηματίζοντας σταθερά διμερή και ενισχύοντας τη σηματοδοτική τους ικανότητα [30].

Ο EGFR είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας που αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και εκφράζεται στην επιφάνεια της πλειονότητας των φυσιολογικών κυττάρων. Δομικά διακρίνεται σε τρεις κύριες περιοχές: την **εξωκυτταρική περιοχή** δέσμευσης του προσδέτη, το **διαμεμβρανικό τμήμα** και την **ενδοκυττάρια περιοχή** που φέρει τη δραστικότητα τυροσινικής κινάσης. Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από μία υδρόφοβη α-έλικα, μέσω της οποίας ο υποδοχέας διασχίζει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα μία φορά. Το εξωκυτταρικό N-τελικό άκρο μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερις δομικές περιοχές (I–IV), με την περιοχή III να παίζει τον βασικό ρόλο στη δέσμευση του προσδέτη, ενώ η κυτταροπλασματική καρβοξυλική περιοχή είναι υπεύθυνη για τη δράση της τυροσινικής κινάσης του EGFR. Παρόλο που τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων HER παρουσιάζουν παρόμοια δομή, καθένας ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο τη δραστικότητα της τυροσινικής κινάσης, η οποία είναι καθοριστική για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης.



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση της δομής του EGFR. Ο υποδοχέας αποτελείται από τέσσερες εξωκυτταρικά περιοχές (Domain I–IV), ένα διαμεμβρανικό τμήμα, την υπομεμβρανική περιοχή, τον καταλυτικό τομέα τυροσινικής κινάσης και την C-τελική ρυθμιστική ουρά, η οποία φέρει πολλαπλά κατάλοιπα τυροσίνης-στόχους φωσφορυλίωσης [31].

Η πρόσδεση του προσδέτη (ligand) στην εξωκυτταρική περιοχή προκαλεί αλλοστερικές διαμορφωτικές αλλαγές που μεταδίδονται στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα και έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης. Η ενεργοποίηση του EGFR ακολουθεί έναν μηχανισμό τριών σταδίων: αρχικά, η

δέσμευση συγκεκριμένων προσδετών οδηγεί στον σχηματισμό **διμερών συμπλόκων υποδοχέα–προσδέτη**. Ο EGFR μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή με άλλο μόριο EGFR ή ετεροδιμερή με άλλα μέλη της οικογένειας HER. Ο **διμερισμός** φέρνει σε στενή γειτνίαση τα ενδοκυττάρια τμήματα της κινάσης και οδηγεί σε **διασταυρούμενη αυτοφωσφορυλίωση** πέντε κυρίως υπολειμμάτων τυροσίνης (Tyr1173, Tyr1148, Tyr1086, Tyr1068 και Tyr992) στην καρβοξυλική ουρά του υποδοχέα, με την Tyr1173 να αποτελεί την κύρια θέση αυτοφωσφορυλίωσης [32]. **Οι φωσφορυλιωμένες αυτές τυροσίνες λειτουργούν ως σημεία πρόσδεσης για ενδοκυττάρια σηματοδοτικές πρωτεΐνες** και πυροδοτούν την ενεργοποίηση **τριών κύριων σηματοδοτικών οδών**: της οδού **Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK**, της οδού **PI3K/Akt (PKB)/mTOR** και της οδού **JAK/STAT**. Οι καταρράκτες αυτοί ρυθμίζουν κρίσιμες κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η μετανάστευση και η αποκατάσταση βλάβης των κυττάρων.

Σε μεγάλο ποσοστό νεοπλασιών, η φυσιολογική λειτουργία του EGFR διαταράσσεται λόγω υπερέκφρασης και/ή μεταλλάξεων αυτού. Η ενισχυμένη σηματοδότηση μέσω EGFR μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη και κακοήγη φαινότυπο. Επιπλέον, μηχανισμοί ανώμαλης ενεργοποίησης περιλαμβάνουν την υπερέκφραση των προσδετών των υποδοχέων, την απώλεια της φυσιολογικής ρύθμισης των ενδοκυττάριας σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταλλάξεις πρωτο-ογκογονιδίων. Υπερέκφραση του EGFR έχει περιγραφεί σε διάφορους συμπαγείς όγκους, όπως καρκίνο μαστού, ουροδόχου κύστης, τραχήλου μήτρας, νεφρών και ωοθηκών, ενώ σε έως και 93 % των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα έχει καταγραφεί αυξημένη έκφραση ή/και ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του υποδοχέα. Με βάση τα δεδομένα αυτά, ο EGFR έχει αναδειχθεί σε ελκυστικό θεραπευτικό στόχο και η στοχευμένη αναστολή της παθολογικής σηματοδότησής του αποτελεί βασική στρατηγική στη σύγχρονη αντιμετώπιση διαφόρων νεοπλασιών [33].

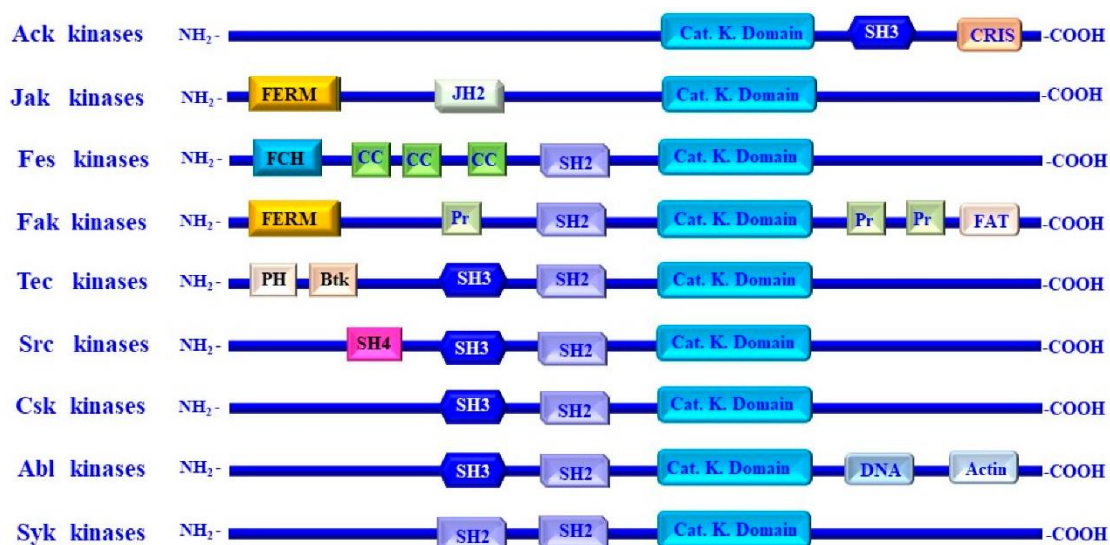
2.5.5 Οικογένεια μη υποδοχικών τυροσινικών κινασών (NRTKs)

Οι **μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες** αποτελούν τη δεύτερη μεγάλη υποκατηγορία της οικογένειας των τυροσινικών κινασών. Αν και αριθμητικά είναι λιγότερες από τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες, διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος και η απορρύθμισή τους έχει συσχετιστεί με πλήθος παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων πολλών τύπων νεοπλασιών. Οι NRTKs δεν διαθέτουν διαμεμβρανική ή εξωκυτταρική περιοχή αλλά, εντοπίζονται αποκλειστικά

στο εσωτερικό του κυττάρου, είτε διαλυτές στο κυτταρόπλασμα, είτε προσδεδεμένες στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης, είτε στον πυρήνα. Ως καθαρά κυτταροπλασματικά ένζυμα, καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε κατάλοιπα τυροσίνης πρωτεϊνών-στόχων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η φωσφορυλίωση της τυροσίνης οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση της εκάστοτε NRTK και σε αύξηση της καταλυτικής της δραστηριότητας [27].

2.5.6 Δομικά χαρακτηριστικά και οικογένειες NRTKs

Δομικά, οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες αποτελούνται από έναν κεντρικό καταλυτικό τομέα κινάσης, ο οποίος περιβάλλεται από διάφορες ρυθμιστικές περιοχές. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι **περιοχές SH2** και **SH3** (Src homology 2 και 3). Η περιοχή SH2 αναγνωρίζει ειδικά φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης σε άλλες πρωτεΐνες, ενώ η περιοχή SH3 προσδένεται σε τμήματα πρωτεϊνών πλούσια σε προλίνη. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, οι **NRTKs σχηματίζουν πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα** και οργανώνουν τις σηματοδοτικές οδούς μέσα στο κύτταρο. Οι τυροσινικές κινάσες αποτελούνται από έναν N-τερματικό λοβό ο οποίος περιλαμβάνει 5 ελικοειδή β-φύλλα και μια α-έλικα, ενώ ο C-τερματικός λοβός είναι μια μεγάλη α-ελικοειδής κυτταροπλασματική περιοχή [26]. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των μη υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών είναι περίπλοκος καθώς περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η trans φωσφορυλίωση. Στην ανενεργή μορφή, οι λοβοί των κινασών είναι ευθυγραμμισμένοι ώστε το ATP να μην μπορεί να εισέλθει στο καταλυτικό κέντρο. Όμως, η αυτοφωσφορυλίωση της θηλιάς ενεργοποίησης μετακινεί τους δύο λοβούς, ανοίγοντας την καταλυτική περιοχή για την πρόσδεση του ATP. Με βάση την αλληλουχία τους, κυρίως στις ρυθμιστικές περιοχές, οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες κατατάσσονται σε **εννέα βασικές οικογένειες**, στις οποίες περιλαμβάνονται οι **Abl, FES, JAK, ACK, SYK, TEC, FAK, Src και CSK κινάσες**.



Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων οικογενειών μη υποδοχικών τυροσινικών κινασών (NRTKs) [34].

2.5.7 Μη υποδοχική κινάση τυροσίνης c-Abl

Ένα από τα πιο μελετημένα μέλη των NRTKs είναι η **κινάση c-Abl**. Η ανθρώπινη πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο ABL, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9. Η c-Abl βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα και συμμετέχει σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η διαφοροποίηση και η απόπτωση, η απόκριση στο οξειδωτικό στρες, η μεταγωγή ενδογενών και εξωγενών σημάτων καθώς και η επιδιόρθωση βλάβης του DNA. Η φυσιολογική της δραστηριότητα ελέγχεται αυστηρά μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων και πρωτεϊνικών συμπλόκων, τα οποία διατηρούν την κινάση σε κλειστή, ανενεργή διαμόρφωση.

Η σοβαρότερη παθολογική διαταραχή της c-Abl αφορά τον σχηματισμό της **χμαιορικής πρωτεΐνης Bcr-Abl**, η οποία προκύπτει από χρωμοσωμική μετατόπιση που συνενώνει τα γονίδια BCR και ABL στο λεγόμενο χρωμόσωμα Philadelphia. Η **Bcr-Abl** διαθέτει **αυξημένη δράση τυροσινικής κινάσης** που βρίσκεται μόνιμα σε ενεργοποιημένη μορφή, παρουσιάζοντας έντονη αυτοφωσφορυλίωση και συνεχές σηματοδοτικό σήμα με σκοπό την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Η συνεχής αυτή ενεργοποίηση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML) και έχει αναδείξει τη Bcr-Abl σε βασικό θεραπευτικό στόχο για την ανάπτυξη στοχευμένων αναστολέων τυροσινικών κινασών.

2.5.8 Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες

Οι **άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (atypical protein kinases)** παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις στην αμινοξική αλληλουχία τους σε σχέση με κάθε ευκαρυωτική πρωτεϊνική κινάση. Παρ' όλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις διατηρούν την καταλυτική δραστηριότητα κινάσης. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μεγάλη πλειονότητα των απαντώμενων ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών διαθέτει στην περιοχή δραστηριότητας της κινάσης έναν **χαρακτηριστικό καταλυτικό πυρήνα**, με τον **N-τελικό λοβό που αποτελείται από το β-φύλλο και την αC-έλικα και τον C-τελικό λοβό κυρίως ελικοειδούς δομής**. Σε αντίθεση με τις τυπικές κινάσες, οι άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες στερούνται αυτού του χαρακτηριστικού δομικού μοτίβου, γεγονός από το οποίο προέρχεται και η ονομασία τους. Οι επιμέρους υποοικογένειες των άτυπων κινασών δεν εμφανίζουν μεταξύ τους σαφή εξελικτική συγγένεια. Το μοναδικό κοινό στοιχείο που τις ενώνει είναι **ακριβώς η απουσία του τυπικού καταλυτικού πλαισίου των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών** [35].

2.6 Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών των κυττάρων

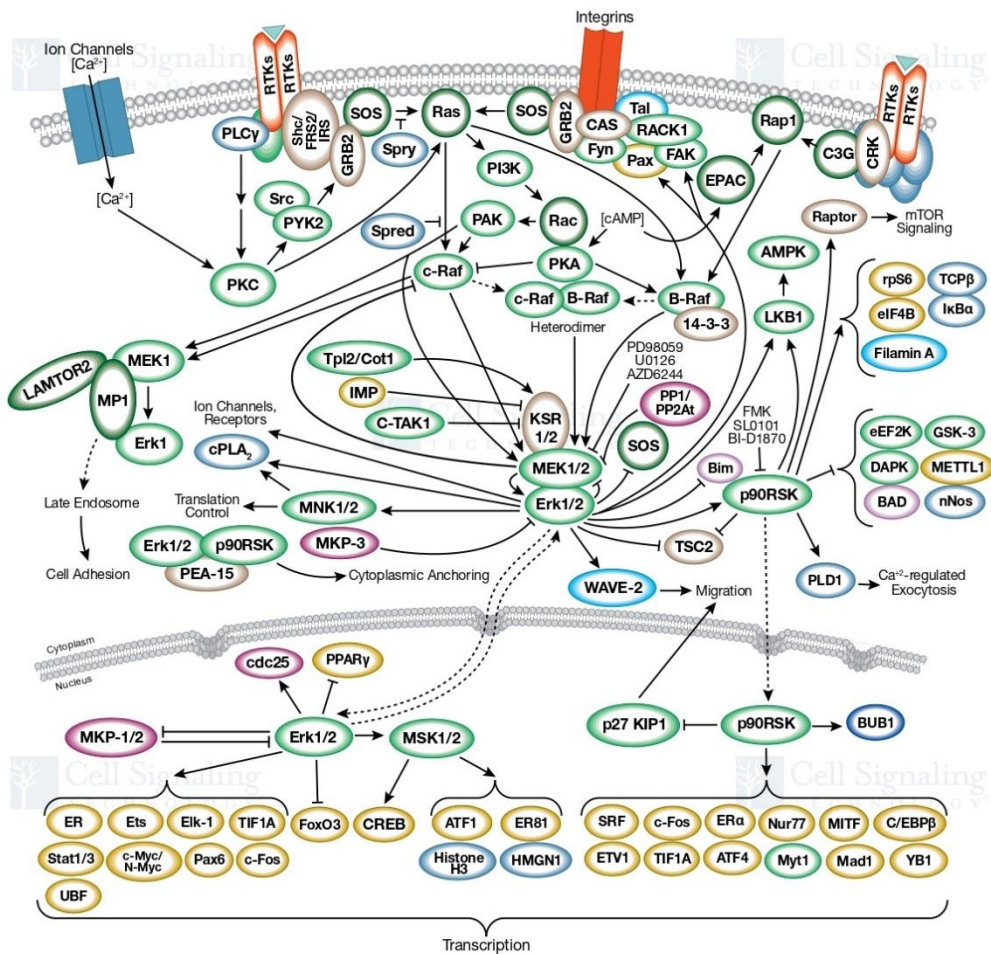
Ο κυτταρικός κύκλος διέπεται από αυστηρούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, η διαταραχή των οποίων οδηγεί σε δημιουργία κακοήθειας. Για να διασφαλιστεί η ακρίβεια και η ομαλή ολοκλήρωση κάθε φάσης, **πολλαπλά σημεία ελέγχου (checkpoints)** δρουν σε διάφορα χρονικά σημεία του κυτταρικού κύκλου. Ανάλογα με τα ερεθίσματα, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης είτε επιτρέπουν τη συνέχιση του κύκλου, είτε ενεργοποιούν μηχανισμούς αναστολής του, προάγοντας, εφόσον απαιτείται, τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), ώστε να αποτραπεί η νεοπλασματική ανάπτυξη. Η **κυτταρική σηματοδότηση** αποτελεί τον βασικό τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα επικοινωνούν τόσο μεταξύ τους όσο και με το μικροπεριβάλλον τους. Τα κύτταρα των πολυκύτταρων οργανισμών χρησιμοποιούν εκατοντάδες διαφορετικά εξωκυττάρια μόρια-σήματα (πρωτεΐνες, πεπτίδια, νουκλεοτίδια, στεροειδή κ.ά.) προκειμένου να αποστέλλουν και να λαμβάνουν πληροφορίες. Τα σήματα αυτά ανιχνεύονται από ειδικούς υποδοχείς στην κυτταρική μεμβράνη ή στο εσωτερικό του κυττάρου και μετατρέπονται σε ενδοκυττάριας απαντήσεις, όπως αλλαγές στον μεταβολισμό, στη γονιδιακή έκφραση, στην κινητικότητα, στον πολλαπλασιασμό ή στην απόπτωση [36].

Οι πρωτεϊνικές κινάσες βρίσκονται στο επίκεντρο αυτών των σηματοδοτικών οδών. Κάθε κινάση εμπλέκεται, με τον δικό της τρόπο, σε κρίσιμες διεργασίες του κυττάρου, όπως η ρύθμιση και η κάλυψη των ενεργειακών αναγκών, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η μεταγραφή των γονιδίων, η αγγειογένεση, η κυτταρική ανάπτυξη, η διαφοροποίηση και η επιβίωση. Δεδομένου ότι απαντώνται σε ουσιαστικά όλες τις γνωστές σηματοδοτικές οδούς, οι **κινάσες** μπορούν να θεωρηθούν ως **βασικοί «αγγελιοφόροι» και ρυθμιστές της κυτταρικής συμπεριφοράς**.

Πιο συγκεκριμένα, η πρόσληψη ενός εξωκυττάριου σήματος από την περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, η μεταβίβασή του μέσω της μεμβράνης και η προώθησή του από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα, πραγματοποιούνται μέσω διαδοχικών γεγονότων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης. Αρχικά, το σήμα προσδένεται στην εξωκυττάρια περιοχή μιας πρωτεϊνικής κινάσης-υποδοχέα, προκαλώντας διαμορφωτικές αλλαγές και συνήθως διμερισμό. Η επαφή των δύο μονομερών πυροδοτεί την αυτοφωσφορυλίωση του ενδοκυττάριου τμήματος της κινάσης και την έναρξη της καταλυτικής της δραστηριότητας. Στη συνέχεια, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσδένονται σε αυτές τις φωσφοτυροσίνες ή φωσφοσερίνες/θρεονίνες, φωσφορυλιώνονται και με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, διαδίδοντας το σήμα σε ολόκληρο το κύτταρο μέσω ενός **καταρράκτη φωσφορυλίσεων** (διαδοχικών, ευνοούμενων θερμικά). Τέλος, για τον **τερματισμό του σήματος** ενεργοποιούνται φωσφατάσες, οι οποίες **αποφωσφορυλιώνουν** τα αντίστοιχα υποστρώματα και επαναφέρουν τα σηματοδοτικά μόρια στη βασική τους κατάσταση.

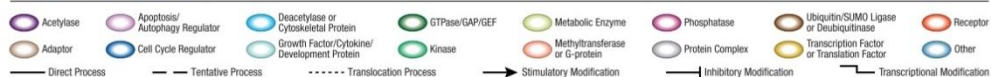
Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζουν πρακτικά κάθε κυτταρική διεργασία [37]. Μεταλλάξεις ή δυσλειτουργίες σε μόρια-κλειδιά των σηματοδοτικών οδών μπορούν να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη, διαφυγή από τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ελέγχου και εμφάνιση νεοπλασιών. Για τον λόγο αυτό, η εις βάθος κατανόηση των μονοπατιών που μεσολαβούν στη δράση των κινασών και η ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων τους αποτελούν κεντρικό στόχο της σύγχρονης αντικαρκινικής θεραπείας. Στο **Σχήμα 10** παρουσιάζεται συνοπτικά το μονοπάτι **MAPK/ERK**, το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό διαδοχικών φωσφορυλίσεων και ρυθμιστικών βρόγχων γεγονός που καταδεικνύει την πολυπλοκότητά του.

MAPK/Erk in Growth and Differentiation



Pathway Diagram Key

rev. 01/14/20
© 2003–2020 Cell Signaling Technology, Inc.



Σχήμα 10. Το σηματοδοτικό μονοπάτι **MAPK/ERK**. Το διάγραμμα απεικονίζει τη μεταφορά εξωκυτταρικών σημάτων από υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης προς τον πυρήνα μέσω της οδού **Ras-Raf-MEK-ERK**, αναδεικνύοντας την δομική και λειτουργική πολυπλοκότητα του μονοπατιού, καθώς και τα πολλαπλά επίπεδα ρύθμισής του (<https://www.cellsignal.com/pathways/mapk-erk-in-growth-and-differentiation>).

2.7 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο, οι πορείες μεταγωγής σήματος είναι εξαιρετικά πολύπλοκες και πολυσταδιακές και, ως εκ τούτου, είναι αναμενόμενο ότι η δυσλειτουργία τους μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις και νόσους. Επειδή, κάθε σηματοδοτική οδός βασίζεται σε **διαδοχικές φωσφορυλιώσεις και αποφωσφορυλιώσεις** δηλαδή, στη δράση πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών, δεν

προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι κινάσες έχουν αναδειχθεί σε ιδιαίτερα ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους [38]. **Μεταλλάξεις** που επηρεάζουν την **έκφραση ή/και τη λειτουργία των πρωτεϊνικών κινασών** αποτελούν συχνή αιτία εμφάνισης νόσων όπως ο καρκίνος, οι φλεγμονώδεις, εκφυλιστικές αλλά και καρδιαγγειακές ασθένειες. Οι διαταραχές αυτές μπορεί να οφείλονται σε:

- 1) γονιδιακές ή χρωμοσωμικές μεταλλάξεις που οδηγούν στον σχηματισμό γονιδίων σύντηξης (fusion genes) και στην παραγωγή χιμαιρικών πρωτεϊνών με παθολογικά ενεργή κινάση, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της Bcr-Abl,
- 2) σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν μόνιμη ενεργοποίηση της κινάσης (activating mutations),
- 3) απορρύθμιση της δραστηριότητας της κινάσης λόγω απώλειας ογκοκατασταλτικών παραγόντων ή ενεργοποίησης ογκογονιδίων και
- 4) υπερέκφραση της ίδιας της κινάσης, η οποία οδηγεί σε υπερβολική σηματοδότηση [39].

Η εις βάθος κατανόηση των μονοπατιών σηματοδότησης έχει αποτελέσει τη βάση για τον ορθολογικό σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Μικρομοριακές ενώσεις που είναι σε θέση να αναστείλουν την παθολογική, ανεξέλεγκτη δράση των πρωτεϊνικών κινασών ονομάζονται **αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών**. Οι αναστολείς αυτοί αντιπροσωπεύουν σήμερα ένα σημαντικό ποσοστό των προσπαθειών ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ουσιών. Από το 2001 και μετά, ο FDA έχει εγκρίνει δεκάδες αναστολείς κινασών μικρού μοριακού βάρους για τη θεραπεία νεοπλασιών, ενώ περισσότερα από 200 ακόμη υποψήφια φάρμακα βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών παγκοσμίως [40].

2.7.1 Ταξινόμηση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με την **περιοχή της κινάσης στην οποία προσδένονται**, είτε αυτή αντιστοιχεί στο ενεργό κέντρο είτε σε απομακρυσμένες περιοχές που δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτό. Η πλειονότητα των αναστολέων που περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι **αδενινικοί μιμητές, δηλαδή μόρια που καταλαμβάνουν τη θέση δέσμευσης του ATP**. Επιπλέον, οι αναστολείς μπορεί να είναι **αντιστρεπτοί ή μη αντιστρεπτοί**, να στοχεύουν **μία μόνο ή πολλαπλές κινάσες**

και, τελικά, **να διακόπτουν τις σηματοδοτικές οδούς** στις οποίες συμμετέχουν οι συγκεκριμένες κινάσες. Από τους διάφορους δυνατούς τρόπους ταξινόμησης, ο πιο διαδεδομένος βασίζεται **στον τρόπο σύνδεσης του αναστολέα με την πρωτεϊνική κινάση**. Με βάση αυτό το κριτήριο, οι αναστολείς διακρίνονται αρχικά σε δύο βασικές κλάσεις: **μη αντιστρεπτούς και αντιστρεπτούς**. Οι **μη αντιστρεπτοί αναστολείς** συνδέονται συνήθως **ομοιοπολικά** με ένα δραστικό πυρηνόφιλο κατάλοιπο, συχνά κυστεΐνης, κοντά στη θέση δέσμευσης του ATP. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε “παγίδευση” της θέσης πρόσδεσης και σε μόνιμη, μη αναστρέψιμη αναστολή της κινάσης. Αντίθετα, **οι αντιστρεπτοί αναστολείς** προσδένονται **μη ομοιοπολικά** και η δράση τους μπορεί να διακοπεί με απομάκρυνση του φαρμάκου. Διακρίνονται περαιτέρω σε τέσσερις κύριους τύπους (**I, II, III και IV**), ανάλογα με τη διαμόρφωση της θέσης πρόσδεσης και την κατάσταση του μοτίβου DFG. Τελευταία, έχουν περιγραφεί επιπλέον τρεις κατηγορίες (τύποι **I ½, V και VI**), οι οποίες αντιπροσωπεύουν πιο εξειδικευμένους τρόπους δέσμευσης [41,42].

➤ **Αναστολείς τύπου I**

Προσεγγίζουν ανταγωνιστικά το ATP και προσδένονται στην ενεργή διαμόρφωση (in conformation) της κινάσης. Το ασπαρτικό του μοτίβου DFG βρίσκεται στραμμένο προς το ενεργό κέντρο (DFG-in), υποστηρίζοντας τη δραστική κατάσταση του ενζύμου.

➤ **Αναστολείς τύπου I ½**

Δρουν επίσης ανταγωνιστικά με το ATP, αλλά αναγνωρίζουν μια ημι-ανενεργή ή ενδιάμεση διαμόρφωση της κινάσης (out conformation), στην οποία το μοτίβο DFG υιοθετεί διαφορετική χωροταξική διάταξη σε σχέση με την πλήρως ενεργή μορφή.

➤ **Αναστολείς τύπου II**

Χαρακτηρίζονται επίσης ως αδενινικοί μιμητές, όμως προσδένονται στην ανενεργή μορφή της κινάσης (out conformation). Σε αυτή την περίπτωση το ασπαρτικό του μοτίβου DFG είναι στραμμένο προς τα έξω, εκτός της θέσης δέσμευσης του ATP (DFG-out), σταθεροποιώντας έτσι μια μη καταλυτική διαμόρφωση.

➤ **Αναστολείς τύπου III**

Δεσμεύονται αποκλειστικά σε μια αλλοστερική θέση, γειτονική αλλά διακριτή από τη θέση πρόσδεσης του ATP, χωρίς να έρχονται σε άμεση επαφή με το νουκλεοτίδιο. Με αυτόν τον τρόπο επιφέρουν δομικές αλλαγές που μειώνουν έμμεσα την καταλυτική ικανότητα της κινάσης.

➤ Αναστολείς τύπου IV

Προσδένονται σε θέση απομακρυσμένη από το ενεργό κέντρο, σε περιοχή δομικά διακριτή από τη θέση δέσμευσης ATP. Η αναστολή επιτυγχάνεται μέσω μακράς εμβέλειας διαμορφωτικών αλλαγών στην πρωτεΐνη.

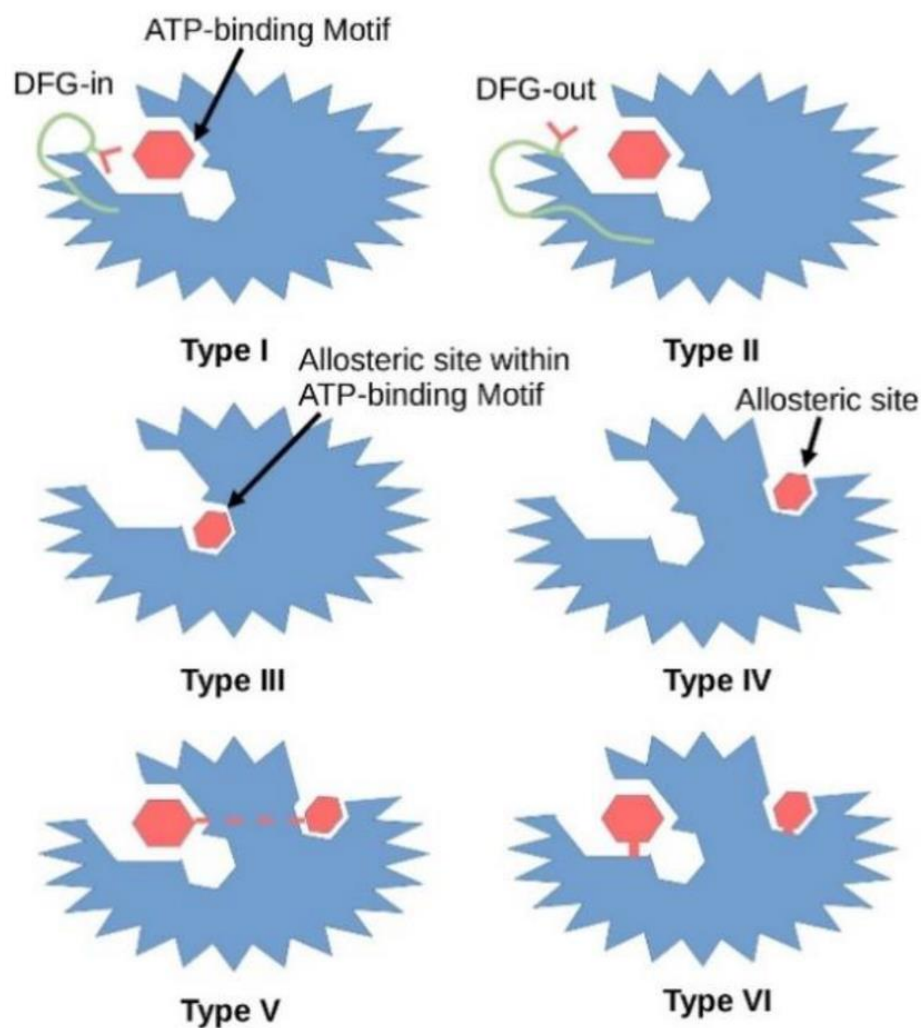
➤ Αναστολείς τύπου V

Αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με δύο διαφορετικές περιοχές του τομέα της κινάσης και για τον λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως **διθεσενείς (bivalent) αναστολείς**. Η διπλή πρόσδεση μπορεί να προσφέρει αυξημένη εκλεκτικότητα και ισχύ.

➤ Αναστολείς τύπου VI

Συνδέονται με την κινάση στη θέση δέσμευσης του ATP μέσω ομοιοπολικής τροποποίησης, συνήθως με μία αντίδραση συζυγιακής προσθήκης τύπου Michael, όπου μια **α,β-ακόρεστη καρβονυλική ομάδα** του αναστολέα αντιδρά με κατάλληλο **πυρηνόφιλο κατάλοιπο της πρωτεΐνης**. Λόγω του τρόπου δέσμευσης, οι αναστολείς αυτοί μπορούν να θεωρηθούν ομοιοπολικά ανάλογα των αναστολέων τύπου I ή II.

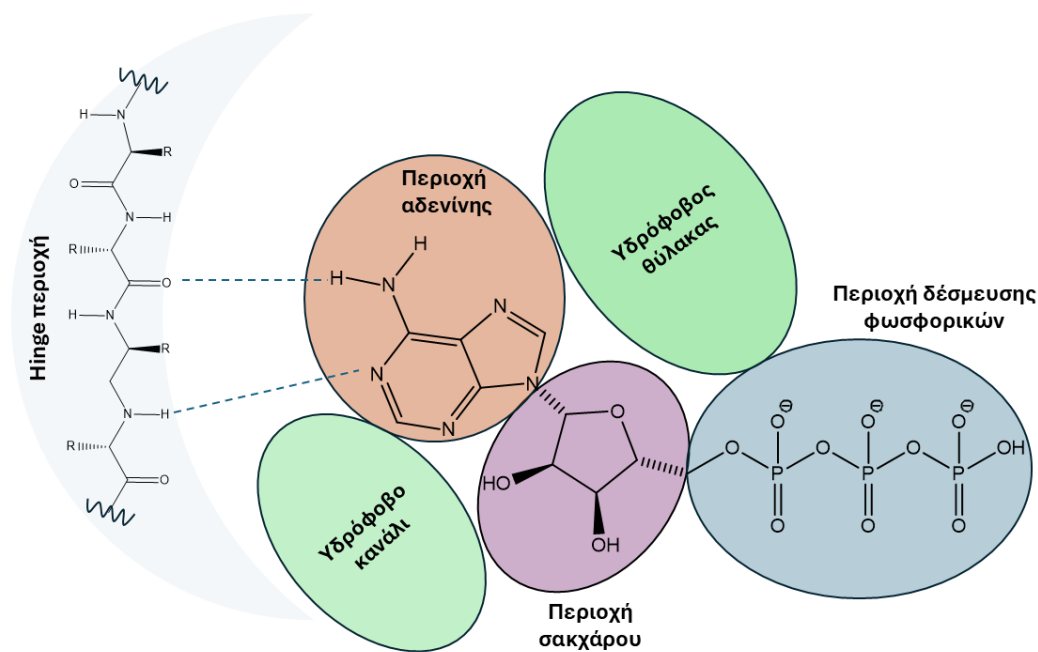
Τα **DFG-in** και **DFG-out** περιγράφουν τις δύο “στάσεις” ενός μικρού μοτίβου αμινοξέων (**Asp-Phe-Gly**) στην κινάση, που καθορίζουν αν το ένζυμο είναι σε **ενεργή ή ανενεργή μορφή** και πώς χωράει το ATP. Στη μορφή **DFG-in** η κινάση είναι **ενεργή** και δέχεται ATP (και αναστολείς τύπου I) καθώς, το D (Asp) του μοτίβου DFG κοιτάζει προς τη θέση δέσμευσης του ATP και μπορεί να συντονίσει τα κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) άρα, να βοηθήσει να τοποθετηθεί σωστά το ATP στο ενεργό κέντρο. Στη μορφή **DFG-out** αλλάζει θέση το μοτίβο, η κινάση γίνεται **ανενεργή** και δημιουργείται ένα **επιπλέον υδρόφοβο «θυλάκιο»** όπου προσδένονται οι αναστολείς τύπου II.



Σχήμα 11. Σχηματική απεικόνιση των τύπων I-VI των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Οι αναστολείς τύπου I δεσμεύονται στη θέση πρόσδεσης του ATP (ATP-binding motif) της ενεργής κινάσης (DFG-in), ενώ οι τύπου II καταλαμβάνουν την ίδια περιοχή αλλά και έναν γειτονικό υδρόφοβο «θύλακα» στην ανενεργή μορφή (DFG-out). Οι τύπου III είναι καθαρά αλλοστερικοί αναστολείς, κοντά αλλά εκτός της θέσης δέσμευσης του ATP. Οι τύπου IV δεσμεύονται σε πιο απομακρυσμένες αλλοστερικές θέσεις ενώ, οι τύπου V είναι διτοπικοί (bivalent) αναστολείς: ένα μακρύτερο μόριο συνδέεται ταυτόχρονα στην θέση ATP και σε αλλοστερική θέση. Οι τύπου VI σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το ένζυμο, οδηγώντας σε πιο μόνιμη αναστολή [43].

2.7.2 Χαρακτηριστικά των αδενινικών μιμητών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πλειονότητα των αναστολέων που περιγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία είναι **μιμητές της αδενίνης**. Η **θέση πρόσδεσης του ATP** στις πρωτεϊνικές κινάσες αποτελεί εξαιρετικά ελκυστικό στόχο για τον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και χρησιμοποιείται ευρέως ως **φαρμακοφόρο μοντέλο** για τη σύνθεση καινούριων αναστολέων. Για τον λόγο αυτό κρίνεται χρήσιμη η συνοπτική παρουσίαση των βασικών δομικών χαρακτηριστικών της συγκεκριμένης θέσης πρόσδεσης [44].



Σχήμα 12. Σχηματική αναπαράσταση της θέσης δέσμευσης του ATP σε πρωτεϊνική κινάση (δικό μας σχήμα, βασισμένο σε σχετική βιβλιογραφία).

1. Περιοχή αδενίνης

Η υδρόφοβη αυτή περιοχή περιλαμβάνει τουλάχιστον **δύο θεμελιώδεις δεσμούς υδρογόνου**, οι οποίοι σχηματίζονται μέσω της αλληλεπίδρασης των ατόμων N1 και N6 του δακτυλίου της αδενίνης με τις **αμινομάδες** και τις **καρβοξυλομάδες της hinge περιοχής** της πρωτεϊνικής κινάσης. Η **hinge περιοχή** είναι μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων που ενώνει τον N- και τον C-λοβό της πρωτεϊνικής κινάσης και σχηματίζει τους βασικούς δεσμούς υδρογόνου με τον δακτύλιο της αδενίνης του ATP ή των αδενινικών αναστολέων. Πολλοί αναστολείς σχεδιάζονται ώστε να εκμεταλλεύονται τουλάχιστον έναν από αυτούς τους δεσμούς, καθώς τα περισσότερα μόριά τους φέρουν ετεροαρωματικούς δακτυλίους που διευκολύνουν την ανάπτυξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα αμινοξέων του ενεργού κέντρου. Παρότι θεωρητικά η αδενίνη θα μπορούσε να υιοθετήσει διάφορους προσανατολισμούς, η γεωμετρία της θέσης δέσμευσης και οι πολλαπλές αλληλεπιδράσεις (υδρόφοβες επαφές, δεσμοί υδρογόνου με τη hinge περιοχή, καθώς και οι αλληλεπιδράσεις των φωσφορικών ομάδων) σταθεροποιούν έναν συγκεκριμένο τρόπο πρόσδεσης. Στο πλαίσιο αυτό, τα άτομα N1 και N6 της αδενίνης ευθυγραμμίζονται βέλτιστα με τους δότες/δέκτες δεσμών υδρογόνου της hinge περιοχής, γεγονός που καθιστά αυτή τη διάταξη ενεργειακά ευνοϊκή και επαναλαμβανόμενη σε κρυσταλλογραφικές δομές.

2. Περιοχή του σακχάρου

Στις περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες η περιοχή αυτή είναι έντονα υδρόφιλη, με χαρακτηριστική εξαίρεση τον EGFR. Η ιδιαιτερότητα αυτή έχει αξιοποιηθεί εκτενώς στον ορθολογικό σχεδιασμό αναστολέων με αυξημένη ισχύ και υψηλή εκλεκτικότητα.

3. Υδρόφοβος θύλακας

Ο θύλακας αυτός δεν καταλαμβάνεται από το ATP, αλλά αποτελεί κρίσιμο δομικό στοιχείο για τους περισσότερους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών. Η κατάλληλη ένωση μαζί του, συμβάλλει αποφασιστικά στην εκλεκτικότητα του αναστολέα έναντι συγκεκριμένων κινασών.

4. Υδρόφοβο κανάλι

Το κανάλι αυτό συνιστά μια σχισμή που επικοινωνεί με το υδατικό περιβάλλον. Παρότι δεν αξιοποιείται από το ATP, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προέκταση του μορίου του αναστολέα προς το διάλυμα, ενισχύοντας έτσι τη συγγένεια δέσμευσης και, σε ορισμένες περιπτώσεις, την εκλεκτικότητα.

5. Περιοχή δέσμευσης φωσφορικών

Η περιοχή αυτή φαίνεται να συμβάλλει λιγότερο στη συνολική συγγένεια δέσμευσης, κυρίως λόγω της μεγάλης έκθεσής της στο υδατικό περιβάλλον. Παρ' όλα αυτά, η κατάλληλη τροποποίησή της μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας όσο και για την περαιτέρω ενίσχυση της πρόσδεσης του αναστολέα [45].

Οι περισσότεροι αναστολείς κινασών που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα είναι **ανταγωνιστικοί ως προς το ATP** και εμφανίζουν **1 έως 3 δεσμούς υδρογόνου** με τα βασικά κατάλοιπα στην περιοχή αδενίνης της στοχευόμενης κινάσης. Άλλες περιοχές του ενζύμου αξιοποιούνται συμπληρωματικά, με στόχο τη βελτίωση των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των αναστολέων. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό γνώρισμα των αδενινικών μιμητών είναι το μοριακό τους βάρος, το οποίο συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 350 και 650 g/mol. Το εύρος αυτό επιτρέπει στα μόρια να «χωρούν» αποτελεσματικά στη θέση δέσμευσης του **ATP**, το οποίο παρουσιάζει μοριακό βάρος **507,17 g/mol**. Αναστολείς με πολύ μεγαλύτερο μοριακό βάρος είναι λιγότερο πιθανό να μπορέσουν να υιοθετήσουν το συγκεκριμένο φαρμακοφόρο πρότυπο και να προσαρμολογούνται ικανοποιητικά στο ενεργό κέντρο της κινάσης.

2.8 Παραδείγματα εγκεκριμένων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών εγκεκριμένων από το FDA και οι συνθετικές τους πορείες

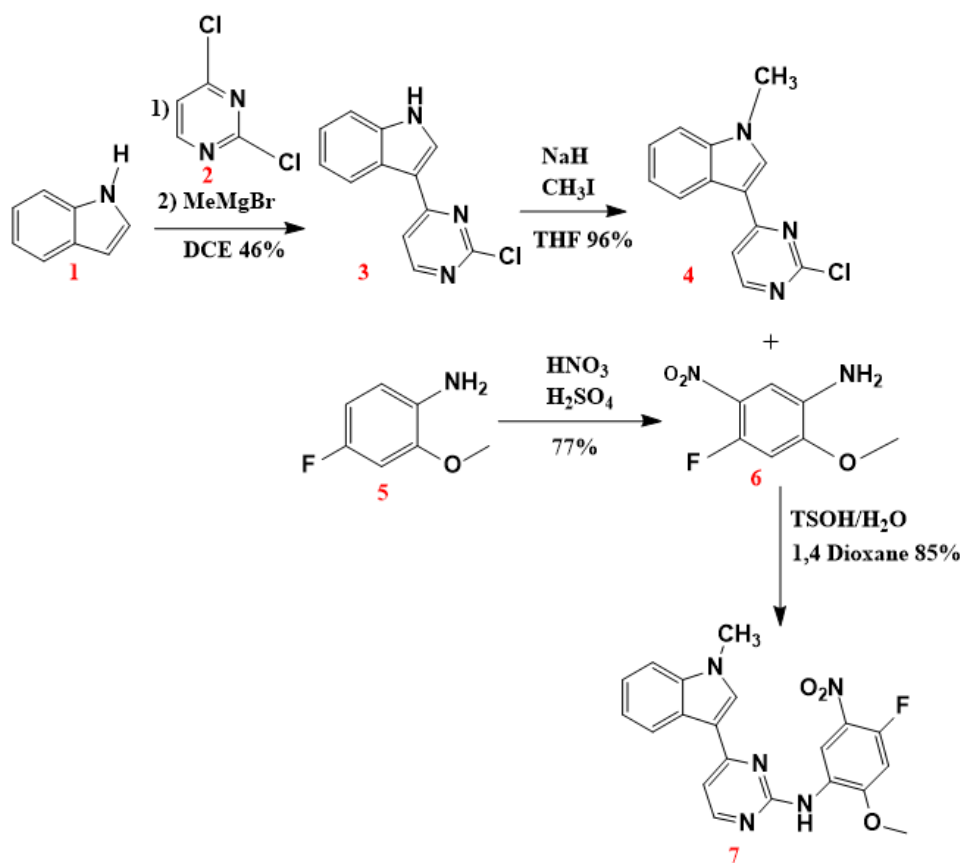
2.8.1 Osimertinib

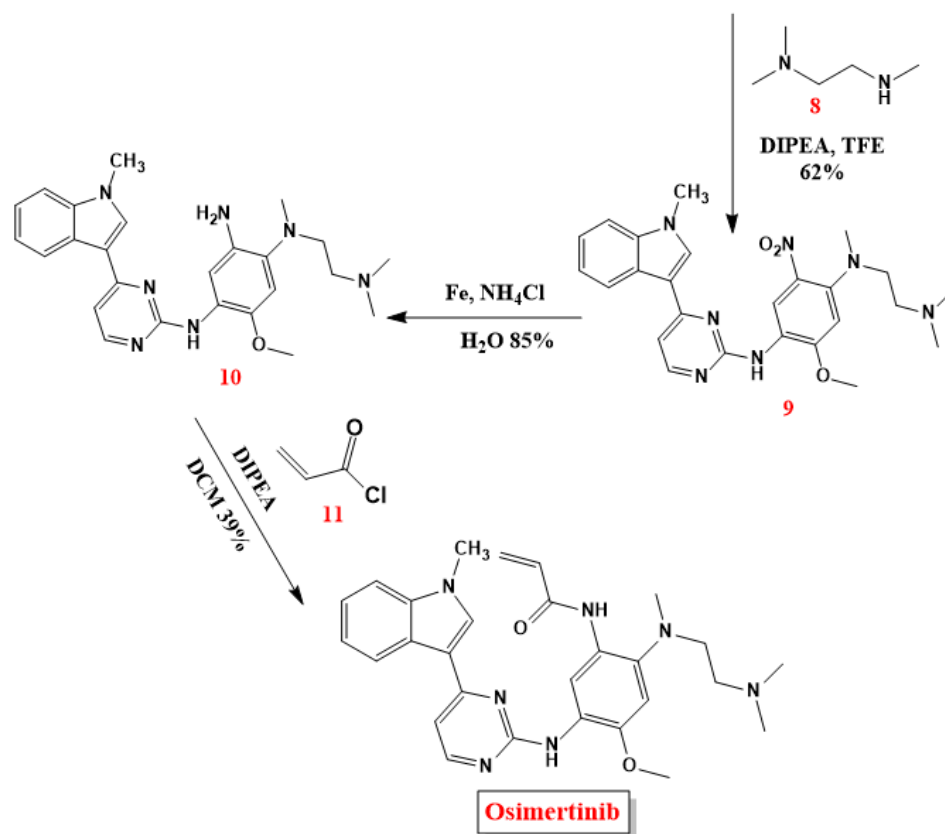
Το Osimertinib είναι ο πρώτος εγκεκριμένος αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης τρίτης γενιάς, ο οποίος εγκρίθηκε από τον FDA το 2015 και η δράση του οποίου στοχεύει στην **αναστολή του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)**. Στους αναστολείς τρίτης γενιάς ταξινομούνται οι αναστολείς τυροσινικών κινασών οι οποίοι τόσο σε κλινικές όσο και προ-κλινικές μελέτες έδειξαν αυξημένη εκλεκτικότητα στα κύτταρα τα οποία έφεραν την μετάλλαξη **T790M σε σχέση με τα υγιά**. Το Osimertinib χορηγείται σε ασθενείς με μεταστατικό μεταλλαγμένο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) που φέρουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η δράση του Osimertinib έγκειται στην ομοιοπολικής φύσεως αλληλεπίδραση και εντούτοις **μη αναστρέψιμη**, με την **κυστεΐνη 797** του EGFR στην θέση δέσμευσης του ATP ενώ, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή εκλεκτικότητα του έναντι των υγείων κυττάρων καθώς και η αδυναμία αναστολής για μετάλλαξη διαφορετική της T790M. Ωστόσο, εκτός από την αλληλεπίδραση με την κυστεΐνη φαίνεται ότι η πρόσδεση του μορίου επάγεται και από διαμοριακούς δεσμούς με άλλα αμινοξέα [46]. Αν και το Osimertinib εγκρίθηκε από τον FDA λόγω της αναστολής του EGFR πλέον διεξάγονται κλινικές μελέτες για την βιοδραστικότητα του και σε ασθενείς που έχουν υποστεί μεταλλάξεις στον εγκέφαλο καθώς το μόριο μπορεί και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, παρουσιάζοντας πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Τέλος, αν και σε αρκετές περιπτώσεις ασθενείς αναπτύσσουν αντίσταση στην θεραπεία τους με Osimertinib έχει επέλθει μεγάλη πρόοδος στον εντοπισμό αυτών των μηχανισμών αντίστασης οι οποίοι, ως επί το πλείστον, είναι και αυτοί στοχεύσιμοι [47].

2.8.2 Σύνθεση του Osimertinib

Όπως διαπιστώνεται από τις κλινικές μελέτες, η βιοδραστική αξία του Osimertinib είναι ήδη πολύ σημαντική για την αντιμετώπιση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα κι ως εκ τούτου το συγκεκριμένο σκεύασμα συνεχίζει να απασχολεί την ερευνητική κοινότητα σχετικά και με περαιτέρω βιολογική δράση. Γι' αυτό και από την έγκριση του και μετά, η πρόοδος όσο αναφορά την πορεία σύνθεσης του είναι αλματώδης καθώς το ζητούμενο είναι τόσο η μείωση του κόστους παραγωγής του όσο και η χρήση αντιδραστηρίων φιλικότερων προς το περιβάλλον. Η πρώτη πατέντα για

την σύνθεση του Osimertinib κατοχυρώθηκε από την εταιρεία Astra Zeneca. Πρόκειται για μία συνθετική πορεία 7 αντιδράσεων, των οποίων η συνολική απόδοση υπολογίζεται σε 56% (**Σχήμα 13**) [48].



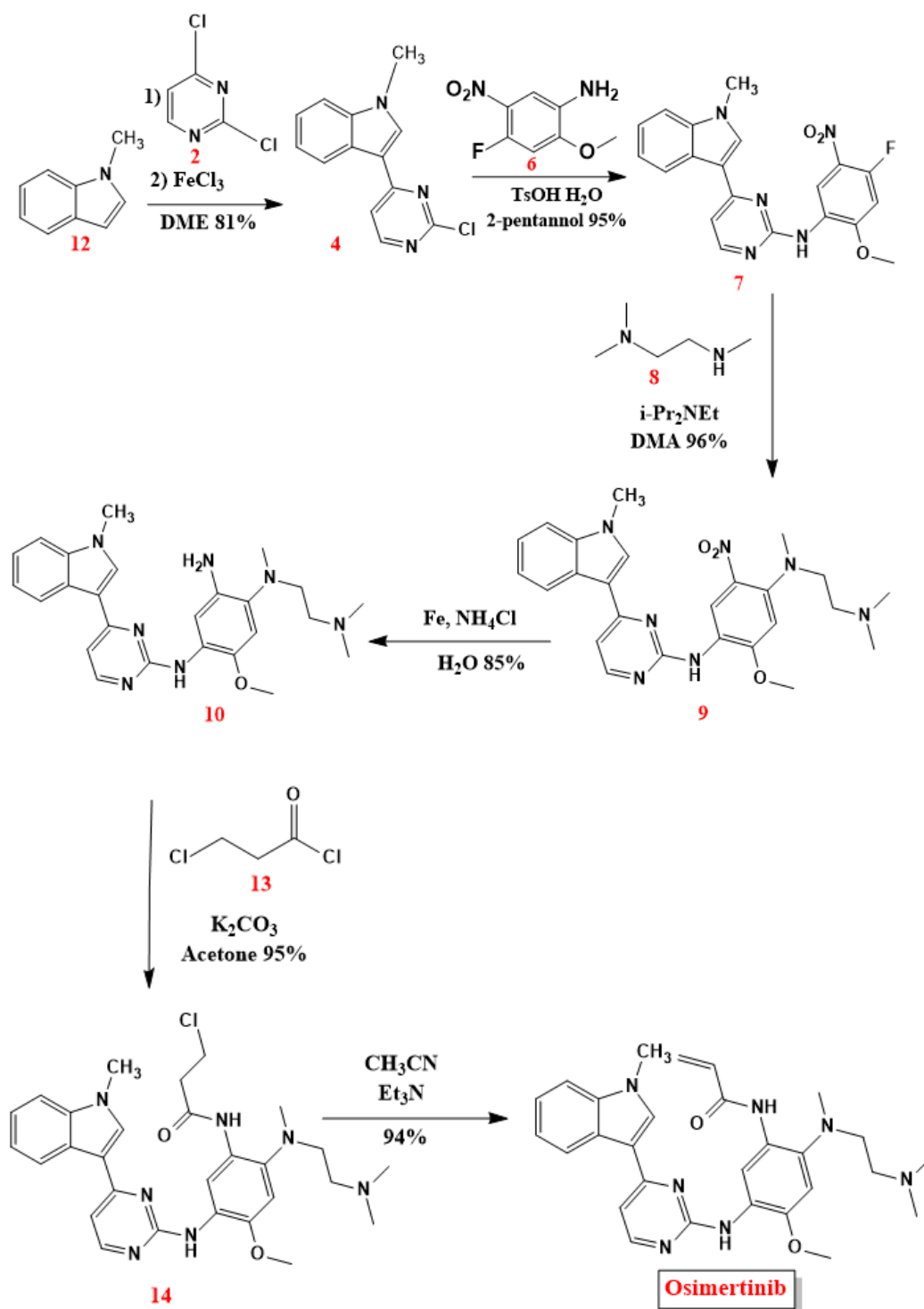


Σχήμα 13. Πρώτη κατοχυρωμένη πορεία σύνθεσης του Osimertinib από την Astra Zeneca [48].

Η συνθετική πορεία περιλαμβάνει αρχικά αντίδραση κατά την οποία πραγματοποιείται υποκατάσταση της 2,4 διχλωροπυριμιδίνης (ένωση 2) στην θέση 3 του ινδολικού δακτυλίου 1 το οποίο βρίσκεται σε μορφή ανιόντος η οποία έχει επέλθει με την χρήση οργανομαγνησιακού αντιδραστήριου σχηματίζοντας το προϊόν 3 σε απόδοση 46%. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μεθυλίωση στη θέση 1 του ινδολικού δακτυλίου μέσω αποπρωτονίωσής του με υδρίδιο του νατρίου και χρήση του ιωδομεθάνιου ως μεθυλιωτικό μέσο παράγοντας για να προκύψει η ένωση 4. Ακολούθως, η ένωση 4 αντιδρά με την υποκατεστημένη ανιλίνη 6 σε όξινες συνθήκες με την χρήση p-τολουοσουλφονικού οξέος σε διαλύτη διοξάνιο πραγματοποιώντας υποκατάσταση του ατόμου χλωρίου προς την ένωση 7. Ακολουθεί αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης της ένωσης 7, με την διαμίνη 8 με τη χρήση μικροκύματων. Το προϊόν απομονώνεται σε απόδοση 62%. Ακολουθεί αναγωγή της νιτρομάδας της ένωσης 9 προς την αντίστοιχη αμινομάδα με καταλυτική χρήση σιδήρου σε νερό σχηματίζοντας την ένωση 10 σε απόδοση 85%. Τέλος, το Osimertinib

παράγεται με δημιουργία αμιδικού δεσμού στην αμινομάδα της ένωσης **10** με χρήση του χλωριδίου του ακρυλικού οξέος **11** σε απόδοση 39%. Η συνολική απόδοση της παραπάνω συνθετικής πορείας υπολογίζεται σε 8%.

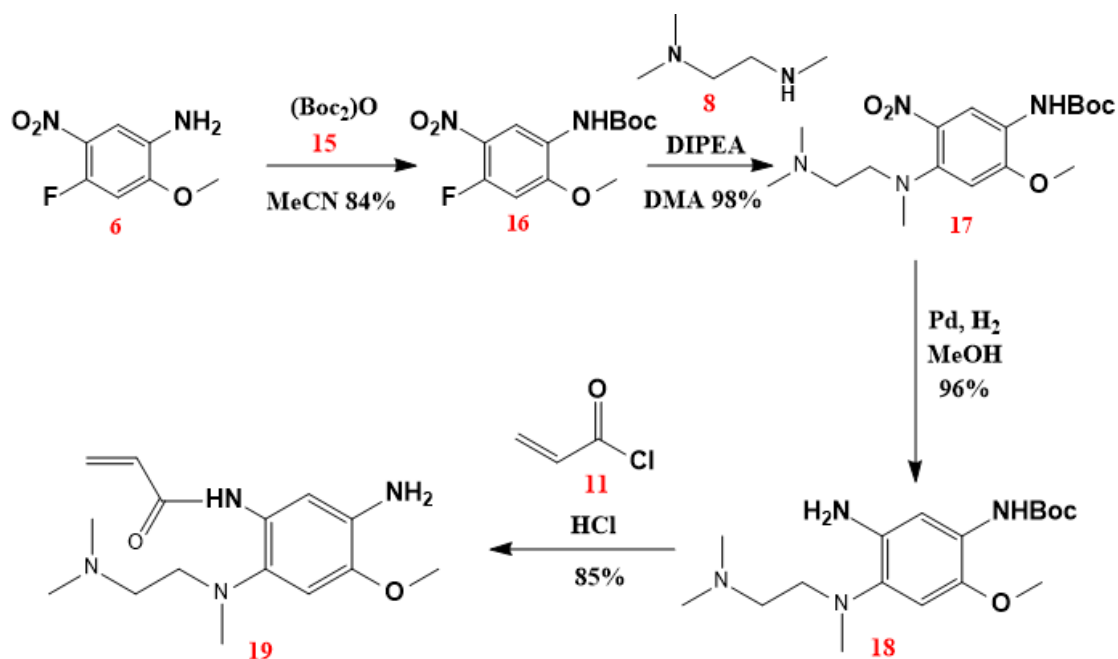
Η δεύτερη συνθετική πορεία που κατοχυρώθηκε από την Astra Zeneca (**Σχήμα 14**) περιλαμβάνει βελτιστοποιήσεις στην πρώτη συνθετική πορεία η οποία αυξάνει την ολική απόδοση σύνθεσης του Osimertinib στο 56% ενώ, αξιοποιούνται ταυτόχρονα αντιδραστήρια τα οποία είναι φιλικότερα προς το περιβάλλον. Η διαφοροποίηση στην πορεία σύνθεσης διεξάγεται σε τέσσερα στάδια. Συγκεκριμένα, η υποκατάσταση στην 3 θέση του *N*-μεθυλοϊνδολίου με υποκαταστάτη την ένωση **2** γίνεται με την χρήση καταλύτη FeCl_3 σε διαλύτη DME με απόδοση 81%. Κατά την υποκατάσταση του δεύτερου ατόμου χλωρίου για την παραγωγή της ένωσης **7** χρησιμοποιείται ως διαλύτης της αντίδρασης η 2-προπανόλη στους 105 °C με απόδοση 95%. Επίσης, κατά την αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης για την παραγωγή της ένωσης **9** γίνεται η χρήση μικροκυμάτων με αλλαγή του διαλύτη από TFE σε DMA με το προϊόν να απομονώνεται με ανακρυστάλλωση σε ποσοστό 96%. Το τελευταίο στάδιο αντικαθίσταται από δύο επιμέρους αντιδράσεις υψηλότερης συνολικής απόδοσης όπου, η αντίδραση σχηματισμού αμιδικού δεσμού λαμβάνει χώρα με χρήση του 3-χλωρο-προπανοϋλοχλωριδίου (**ένωση 13**) με χρήση K_2CO_3 (95%) και ακολούθως απόσπαση HCl με την επίδραση Et_3N σε MeCN (94%).

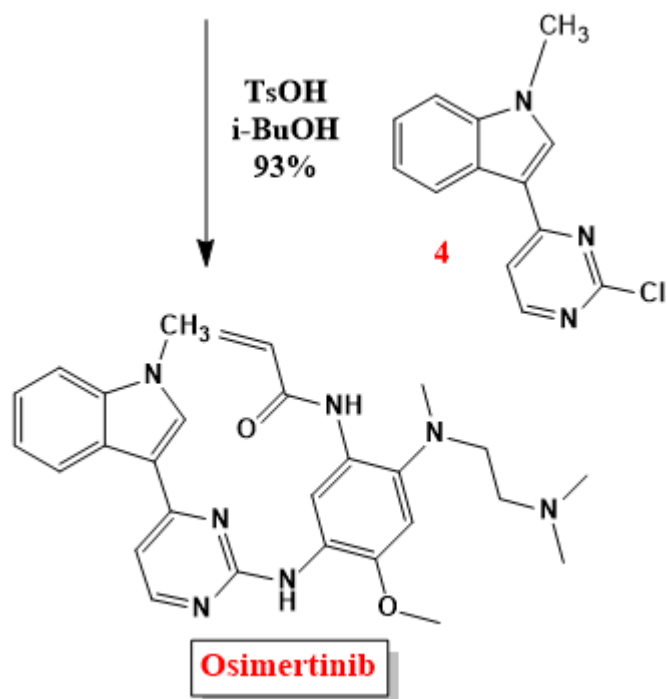


Σχήμα 14. Δεύτερη κατοχυρωμένη πορεία σύνθεσης του Osimertinib από την Astra Zeneca [48].

Άξια αναφοράς είναι και μια εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Osimertinib η οποία αναπτύχθηκε από κινέζους ερευνητές (**Σχήμα 15**) της οποίας η τελική απόδοση

ανέρχεται στο 60%. Πρόκειται για μία σειρά έξι αντιδράσεων της οποίας η κύρια διαφοροποίηση της έγκειται στην προσάρτηση της ένωσης **3** στο τελευταίο στάδιο της σύνθεσης του Osimertinib. Συγκεκριμένα, αρχικά λαμβάνει χώρα προστασία της αμινομάδας της ανιλίνης (**ένωση 6**) μέσω αντίδρασης με Boc ανυδρίτη, **ένωση 14**, και στην συνέχεια αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης του προστατευμένου προϊόντος **15** με την χρήση της διαμίνης **8**. Ακολουθεί αναγωγή της νιτροομάδας της ένωσης **17** προς την αντίστοιχη άμινο και αφαίρεση της προστατευτικής ομάδας σε όξινες συνθήκες. Το **ενδιάμεσο 18**, το οποίο φέρει ελεύθερη αμινομάδα, υφίσταται ακυλίωση με χλωρίδιο του ακρυλικού οξέος, οδηγώντας στον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και του αντίστοιχου ακρυλαμιδικού, **παράγωγο 19**. Τέλος, η σύζευξη του **ενδιάμεσου 19** με την ένωση **4** καταλήγει στο τελικό προϊόν, το Osimertinib [49].





Σχήμα 15. Κατοχυρωμένη εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Osimertinib.

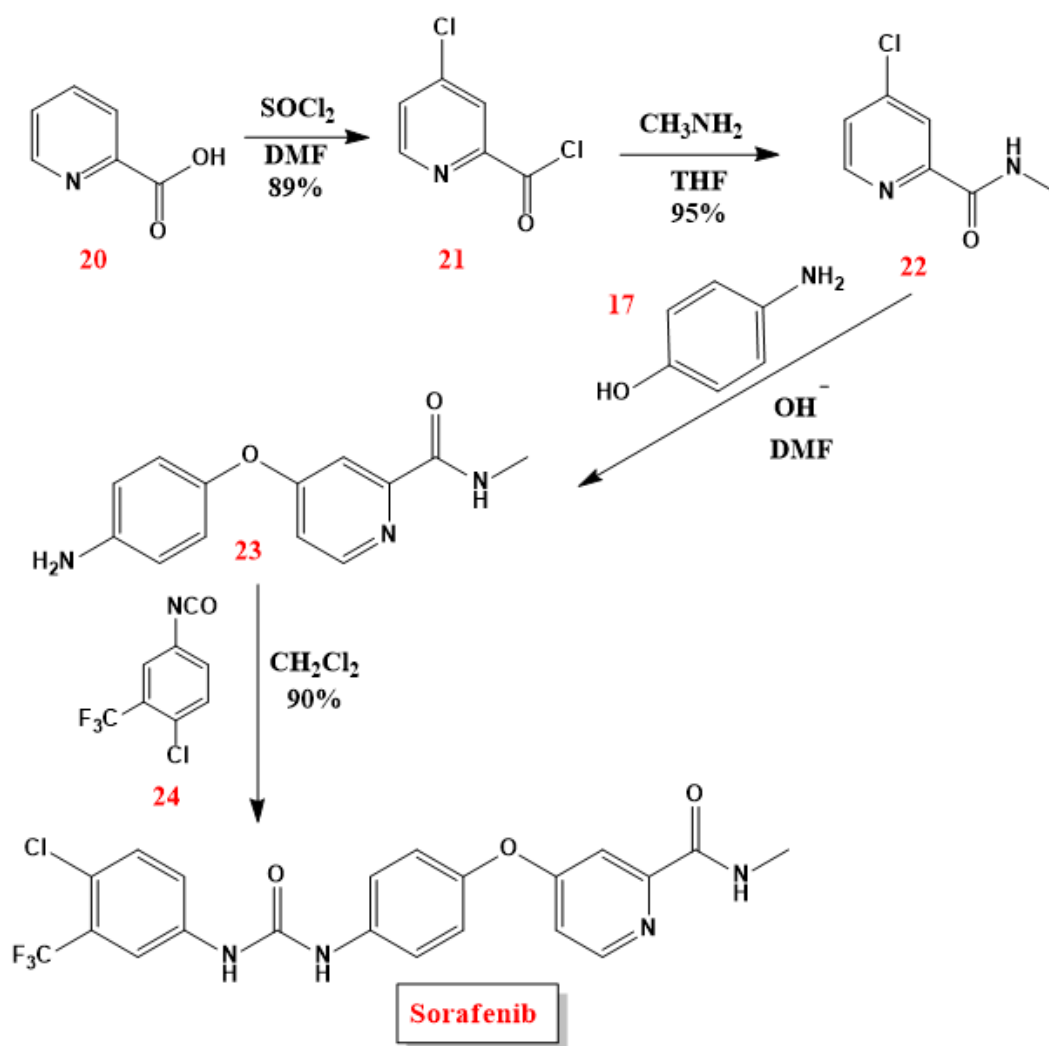
2.8.3 Sorafenib

Το Sorafenib (επιστημονική ονομασία BAY-43-9006) αποτελεί έναν από τους πρώτους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, καθώς εγκρίθηκε από τον FDA το 2005 και διατίθεται στην αγορά με την ονομασία Nexavar. Ταξινομείται στην κατηγορία αναστολέων τυροσινικών κινασών και χορηγείται για την **αντιμετώπιση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC)**, ενώ συνδέεται και με την καταπολέμηση του καρκίνου των νεφρών [50]. Έχει αποδειχθεί ότι το Sorafenib είναι ένας αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών πολλαπλών στόχων, καθώς η χορήγησή του έχει επιφέρει μείωση του ρυθμού αγγειογένεσης αλλά και του ρυθμού του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων σε ασθενείς με HCC. Η μείωση του πολλαπλασιασμού έγκειται στην αναστολή της κινάσης Raf-1 και B-Raf με αποτέλεσμα την απορρύθμιση των μονοπατιών σηματοδότησης **Ras/Raf/MEK/ERK**. Η δράση του Sorafenib εκτείνεται στην δέσμευση και, κατά επέκταση, στην αναστολή της λειτουργίας τόσο του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFR-β), του υποδοχέα ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR2) και του υποδοχέα του ηπατοκυτταρικού παράγοντα (c-KIT). Ωστόσο, ένα ιδιαίτερα σύνηθες πρόβλημα που προκύπτει σε ασθενείς με HCC είναι ότι σε αρκετές περιπτώσεις επιγενετικές τροποποιήσεις, ήτοι αλλαγές στην έκφραση γονιδίων χωρίς μεταβολή της αλληλουχίας του DNA, οι οποίες είτε

κληρονομούνται, είτε δημιουργούνται μέσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλάζουν τον μηχανισμό λειτουργίας διεργασιών των κυττάρων συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μηχανισμοί αντίστασης του οργανισμού ως προς το Sorafenib [51].

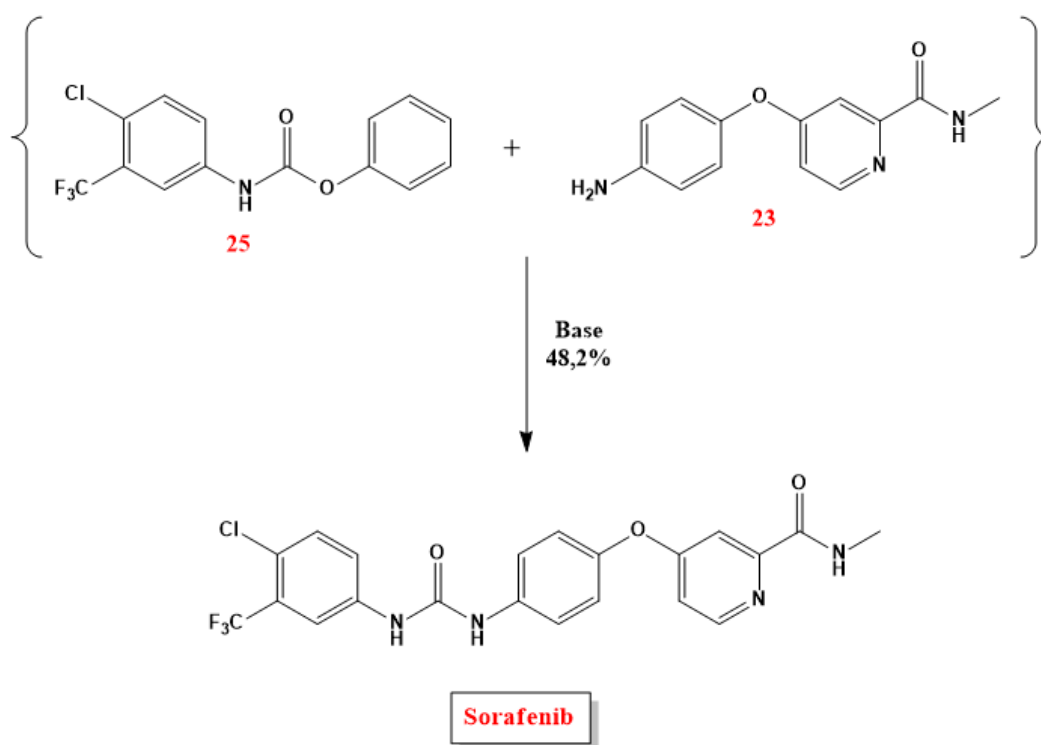
2.8.4 Σύνθεση του Sorafenib

Η σύνθεση του Sorafenib αναπτύχθηκε από τον Bankston και τους συνεργάτες του οι οποίοι συνέθεσαν το Sorafenib μέσα από μια πειραματική πορεία 4 βημάτων με πολύ καλές αποδόσεις. Αναλυτικότερα το πικολινικό οξύ, ένωση **20** αντιδράει με θειονυλοχλωρίδιο σε διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) υπό άνυδρες συνθήκες παράγοντας το υποκατεστημένο χλωρίδιο του πικολινικού οξέος, ένωση **21** σε απόδοση 89%. Στην συνέχεια η ένωση **21** αντιδρά με μεθυλαμίνη παρουσία βάσης ανθρακικού καλίου σε τετραϋδροφουράνιο (THF) προς σχηματισμό αμιδικού 37 δεσμού της ένωσης **22**. Ακολούθως, πραγματοποιείται αντίδραση SNAr για την δημιουργία του διαρυλοαιθέρα **23** και τέλος, το Sorafenib σχηματίζεται ως προϊόν της αντίδρασης της ένωσης **23** και του υποκατεστημένου φαίνυλο-ισοκυανικού **24** σε διχλωρομεθάνιο σχηματίζοντας δεσμό ουρίας.



Σχήμα 16. Κατοχυρωμένη σύνθεση του Sorafenib.

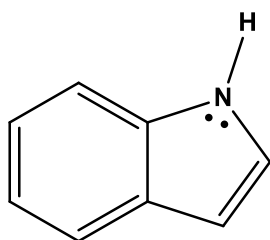
Ο Zhang και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν μια εναλλακτική σύνθεση κατά την οποία ο καρβαμιδικός φαινυλεστέρας, ένωση **25** αντιδρά με την ανιλίνη, ένωση **23** παρουσία ασθενούς βάσης (π.χ. πυριδίνη) από τα οποία προκύπτει το Sorafenib σε απόδοση 48,2%. Αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι η μέθοδος αυτή προτείνεται για παραγωγή μεγάλης κλίμακας [50].



Σχήμα 17. Εναλλακτική κατοχυρωμένη πορεία σύνθεσης του Sorafenib.

2.9 Αναφορά στη σύνθεση και στη βιολογική δράση των επιμέρους δομικών μονάδων των σχεδιασμένων μορίων

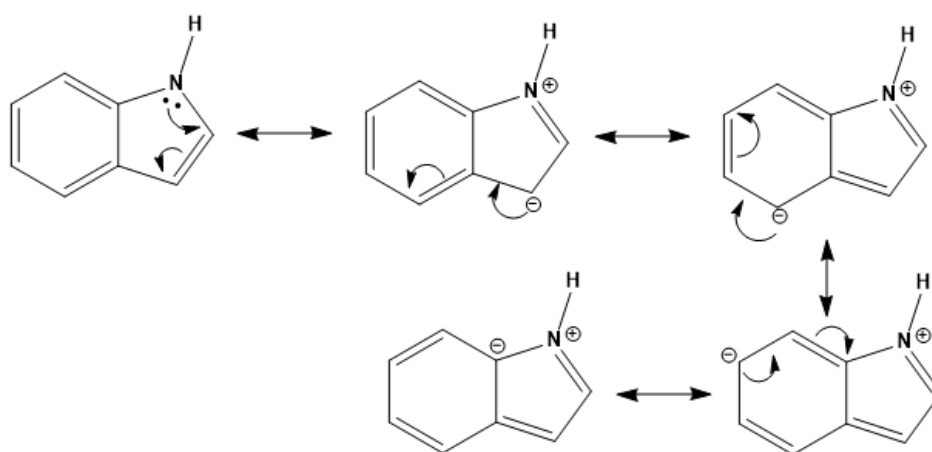
2.9.1 Ινδόλιο



Σχήμα 18. Δομή του ινδολίου.

Το ινδόλιο αποτελεί ένα **δικυκλικό ετεροαρωματικό σύστημα**, το οποίο προκύπτει από τη σύντηξη ενός βενζοϊκού και ενός πυρρολικού δακτυλίου. Το μόριο διαθέτει εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα **10 π-ηλεκτρονίων**, γεγονός που, σύμφωνα με τον κανόνα του Hückel, του προσδίδει αρωματικό χαρακτήρα. Ο sp^2 υβριδισμός τόσο των ατόμων άνθρακα όσο και του ατόμου αζώτου έχει ως αποτέλεσμα το μόριο να είναι επίπεδο. Κατά την τυπική αρίθμηση των θέσεων, η θέση 1 αντιστοιχεί στο άτομο του αζώτου και η αρίθμηση συνεχίζεται κυκλικά, αρχικά κατά μήκος του πυρρολικού

δακτυλίου. Η ανάλυση των δομών συντονισμού (**Σχήμα 19**) καταδεικνύει ότι η πλέον ηλεκτρονιόφιλη δραστική θέση για αντιδράσεις αρωματικής υποκατάστασης είναι η θέση 3. Επιπλέον, η συμμετοχή του ασύζευκτου ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου στο συζυγιακό σύστημα επηρεάζει την οξύτητα του δεσμού N–H, καθιστώντας το πρωτόνιο συγκριτικά πιο όξινο και, κατά συνέπεια, ιδιαίτερα δραστικό σε αντιδράσεις υποκατάστασης υπό βασικές συνθήκες.



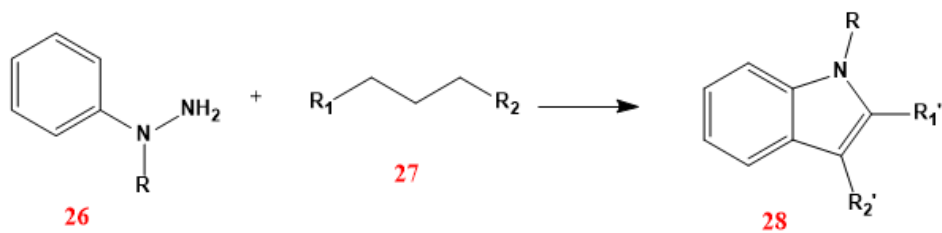
Σχήμα 19. Δομές συντονισμού ινδολικού δακτυλίου.

2.9.2 Σύνθεση του ινδολικού δακτυλίου

Η σύνθεση του ινδολικού δακτυλίου παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έχουν δημοσιευθεί πληθώρα μεθόδων των οποίων τα προϊόντα επιτυγχάνουν την δημιουργία υποκατεστημένων και μη ινδολίων.

2.9.2.1 Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer

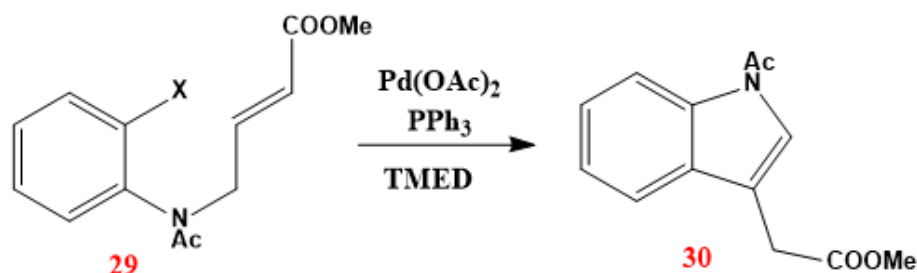
Η παρακάτω σύνθεση αναπτύχθηκε από τους Fischer και Jourdan το 1883 (**Σχήμα 20**). Πρόκειται για μία εκ των, μέχρι και σήμερα, θεμελιωδών μεθόδων σύνθεσης ινδολίου ή παραγώγων αυτού και περιλαμβάνει συμπύκνωση μίας αρυλοϋδραζίνης με καρβονυλικές ενώσεις παρουσία οξέος είτε κατά Bronsted (HCl, CH₃COOH κλπ.) είτε κατά Lewis (π.χ. NiCl₂) [52].



Σχήμα 20. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer.

2.9.2.2 Σύνθεση ινδολίου κατά Mori-Ban

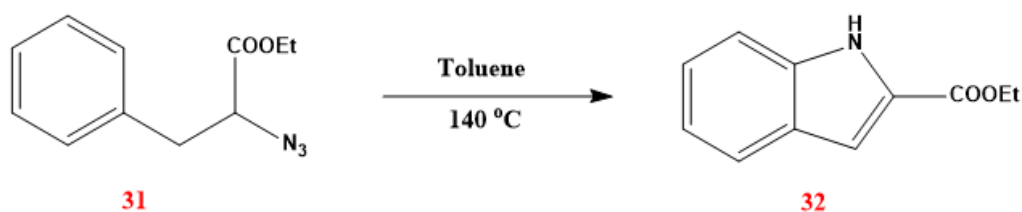
Το 1977 οι Miwako Mori, Katsumi Chiba και ο Yoshio Ban (**Σχήμα 21**) δημοσίευσαν μία σειρά από αντιδράσεις σύνθεσης ινδολικού δακτυλίου οι οποίοι προκύπτουν από μια καταλυόμενη από παλλάδιο ενδομοριακή αντίδραση ενός αρυλαλογονιδίου το οποίο φέρει ολεφινικό δεσμό [53].



Σχήμα 21. Σύνθεση του ινδολίου κατά Mori-Ban.

2.9.2.3 Σύνθεση ινδολίου κατά Hemetsburger

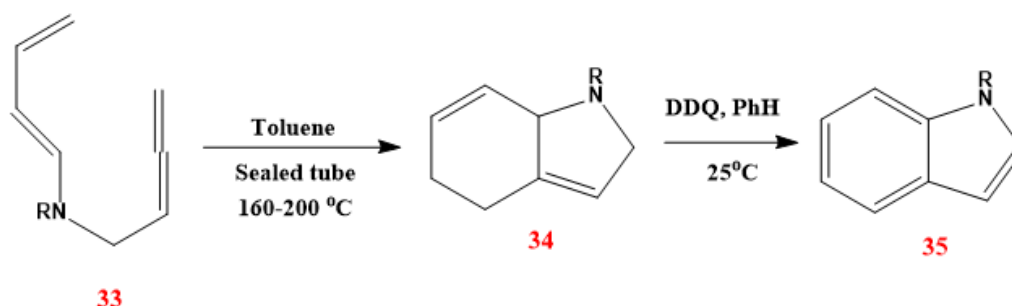
Η σύνθεση κατά Hemetsburger (**Σχήμα 22**) περιλαμβάνει σύνθεση του 2-καρβόξυ υποκατεστημένου ινδολίου μέσω ενδομοριακής θερμόλυσης α-αζιδοκιναμικών εστέρων σε διαλύτη ξυλόλιο σε πολύ καλές αποδόσεις [54].



Σχήμα 22. Σύνθεση του ινδολίου κατά Hemetsburger [54].

2.9.2.4 Σύνθεση ινδολίου κατά Kanematsu

Η σύνθεση ινδολίου κατά Kanematsu (**Σχήμα 23**) αφορά μια εναλλακτική συνθετική πορεία σύνθεσης ινδολίου όπου, αρχικά παράγεται τετραϋδροινδόλιο ως προϊόν ενδομοριακής αντίδρασης Diels-Alder και στην συνέχεια αφυδρογόνωση του προς τον σχηματισμό ινδολικού δακτυλίου [55].

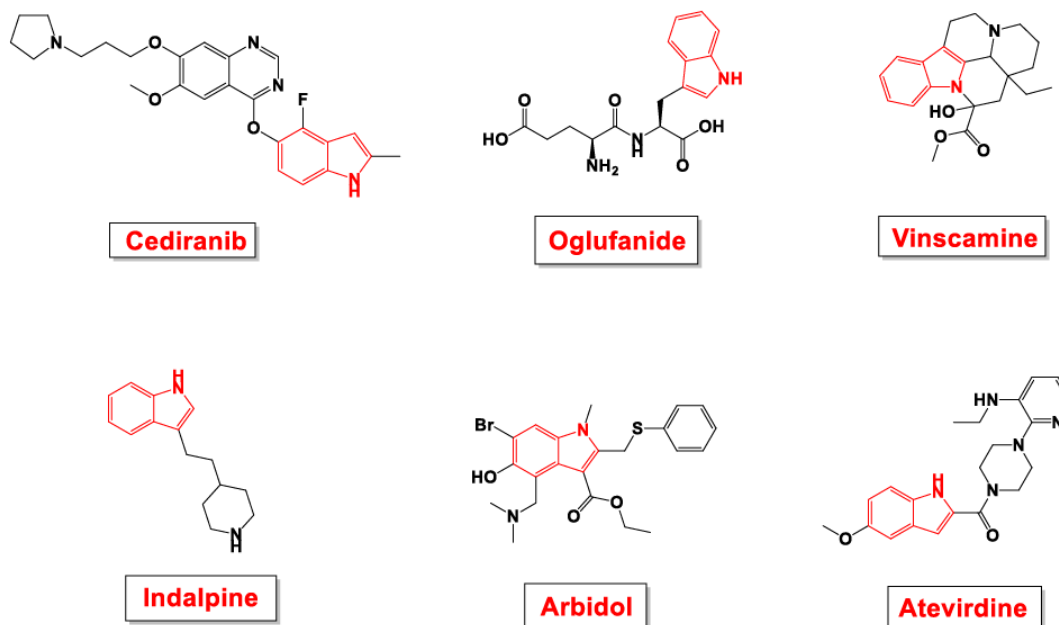


Σχήμα 23. Σύνθεση ινδολίου κατά Kanematsu [55].

2.10 Το ινδόλιο ως βασικό δομικό συστατικό φυτικών προϊόντων και βιοδραστικών μορίων

Το ινδόλιο αποτελεί ευρέως απαντώμενο δομικό συστατικό **πολλών βιοδραστικών και φυτικών προϊόντων**. Η παρουσία του στη φύση σχετίζεται κυρίως με το βασικό αμινοξύ τρυπτοφάνη, από το οποίο προκύπτουν, μέσω βιοσυνθετικών διεργασιών, πλήθος βακτηριακών μεταβολιτών (μόρια που παράγονται από τα βακτήρια) και φυτών. Πολλά από τα φυσικά αυτά παράγωγα προέρχονται από σύζευξη της τρυπτοφάνης με άλλα αμινοξέα και, για τον λόγο αυτό, το **ινδόλιο απαντάται σε αρώματα λουλουδιών, σε φαρμακολογικά ενεργά αλκαλοειδή, καθώς και σε ζωικές ορμόνες, χαρακτηριστικά παραδείγματα των οποίων αποτελούν η σεροτονίνη και η μελατονίνη**. Μερικά φυσικά αλκαλοειδή που φέρουν στο μόριό τους ινδολικό δακτύλιο, όπως η **βινκριστίνη, η βινβλαστίνη, η βιννορελβίνη και η βινδεσίνη**, έχουν λάβει έγκριση για κλινική χρήση ως ισχυροί αντικαρκινικοί παράγοντες. **Εμπνευσμένοι από τις παραπάνω φυσικές ενώσεις**, οι ερευνητές ανέπτυξαν στη συνέχεια μια μεγάλη ποικιλία συνθετικών φαρμάκων, στα οποία ο **ινδολικός σκελετός λειτουργεί ως κεντρικό φαρμακοφόρο μοτίβο**. Στο πεδίο της

ογκολογίας, χαρακτηριστικό παράδειγμα συνθετικού ινδολικού παραγώγου αποτελεί ο αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών **cediranib**, ο οποίος στοχεύει τους υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) και αναστέλλει την παθολογική αγγειογένεση. Με βάση το ινδόλιο έχουν επίσης σχεδιαστεί ανοσοτροποποιητικά, όπως το **oglufanide**, το οποίο έχει μελετηθεί για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C, καθώς και καρδιαγγειακά φάρμακα, όπως το αγγειοδιασταλτικό **viscamine** και το αντιυπερτασικό **reserpine**, του οποίου ο μηχανισμός δράσης συνίσταται στην αναστολή της αποθήκευσης νευροδιαβιβαστών σε συναπτικά κυστίδια και στην επακόλουθη αποδόμησή τους. Επιπλέον, ινδολικά παράγωγα έχουν βρει εφαρμογή και σε άλλες θεραπευτικές κατηγορίες. Το αντικαταθλιπτικό **indalpine** αποτελεί παράδειγμα φαρμάκου με ινδολικό δακτύλιο, αν και ο ακριβής μηχανισμός δράσης του δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Στον χώρο των αντικών φαρμάκων, το **arbidol** χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος, ενώ το **atevirdine** δρα ως μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του ιού HIV, προσδένεται στο ένζυμο και αναστέλλει τη δράση των RNA και DNA πολυμερασών (Σχήμα 25). Συνολικά, η συχνή εμφάνιση του ινδολικού δακτυλίου τόσο σε φυσικά προϊόντα (όπως η τρυπτοφάνη, η σεροτονίνη και η μελατονίνη) όσο και σε εγκεκριμένα ή υπό ανάπτυξη φάρμακα, υπογραμμίζει τον ρόλο του ως **βασικού φαρμακοφόρου σκελετού** με ευρύ φάσμα βιολογικών εφαρμογών [56].

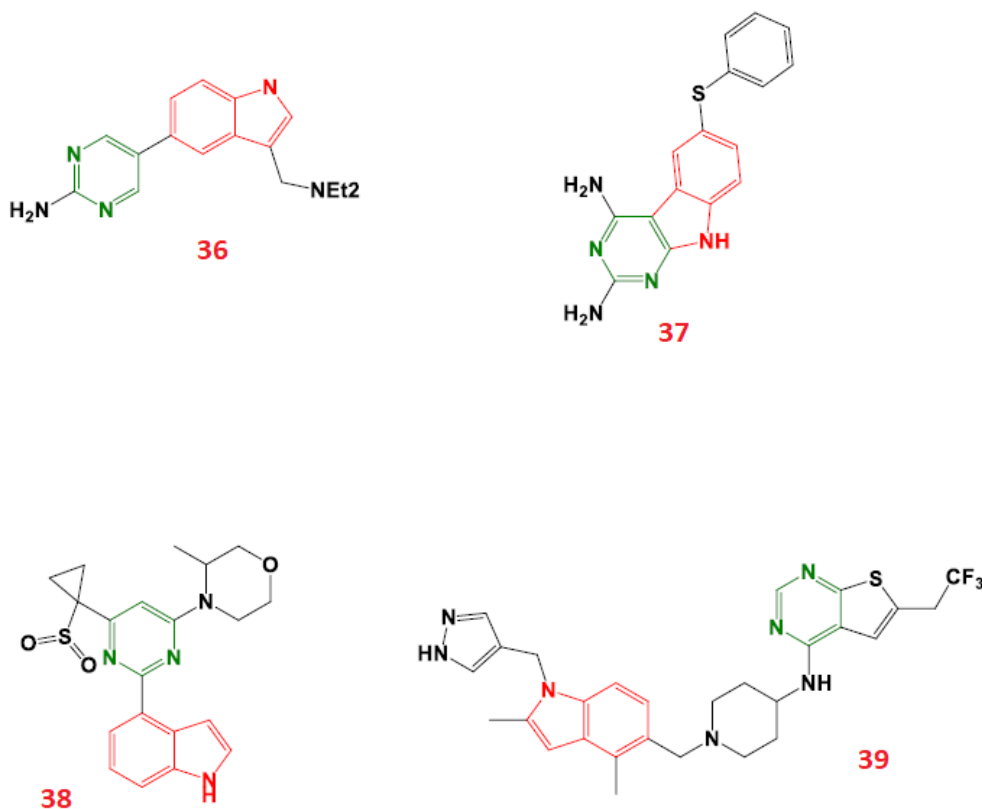


Σχήμα 25. Παραδείγματα εγκεκριμένων φαρμάκων με ινδολικό δακτύλιο.

2.10.1 Υβρίδια ινδολίου πυριμιδίνης (indole-pyrimidine hybrids)

Ο δακτύλιος της πυριμιδίνης είναι μία από τις πιο χαρακτηριστικές δομικές μονάδες των βιομορίων. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι **αζωτούχες βάσεις** οι οποίες φέρουν **δακτύλιο πυριμιδίνης** στο μόριο τους. Συμπερασματικά, η πυριμιδίνη συμμετέχει ενεργά σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως η αντιγραφή του DNA, η σύνθεση RNA κλπ. Η κομβική συμβολή της πυριμιδίνης στην κυτταρική λειτουργία κατήυθνε την επιστημονική κοινότητα ώστε να εξετάσει ενδελεχώς το ενδεχόμενο η συγκεκριμένη δομική μονάδα να συνεισφέρει στην ικανότητα συνθετικών βιοδραστικών μορίων να δεσμεύονται σε πρωτεΐνες και να αλληλεπιδρούν με αυτές. Ανατρέχοντας στους, εγκεκριμένους από τον FDA, αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και όχι μόνο, συμπεραίνεται ότι η **πυριμιδίνη είναι ενσωματωμένη σε αρκετούς αναστολείς πιστοποιώντας τη σπουδαιότητά της**. Γνωρίζοντας την ιδιότητα του ινδολίου και της πυριμιδίνης να αλληλεπιδρούν με βιομόρια έχουν αναπτυχθεί πληθώρα υβριδίων (**Σχήμα 26**) που φέρουν και τις δυο αυτές δομικές μονάδες στο μόριο τους. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα το οποίο αναφέρεται λεπτομερώς παραπάνω είναι το **Osimertinib** το οποίο εγκρίθηκε το 2015 για την αντιμετώπιση του T790M μη θετικού μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, έχουν συντεθεί αρκετά ακόμα **υβρίδια ινδολίου-πυριμιδίνης** των οποίων η βιοδραστικότητα

εξετάζεται ακόμα σε προκλινικό στάδιο (in vivo, in vitro) και των οποίων τα αποτελέσματα είναι άκρως ενθαρρυντικά.



Σχήμα 26. Ενδεικτικά παραδείγματα υβριδίων ινδολίου-πυριμιδίνης με σημαντική in vivo αντικαρκινική δράση.

Ενδεικτικά το υβρίδιο **36** επέδειξε *in vitro* αντικαρκινική δράση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές PC3 και HepG2, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό τους μέσω προαγωγής της αυτοφαγίας μετά από διακοπή του κυτταρικού κύκλου τους, ενώ ταυτόχρονα έχει δείξει συνεργατική δράση με τον αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών gefitinib έναντι του EGFR (**Σχήμα 26**) [57]. Το υβρίδιο **37** παρουσίασε αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση των κινασών EGFR, VEGFR-1, VEGFR-2 PDGFR- β της κυτταρικής σειράς A43 [58]. Το υβρίδιο **38** έδειξε υψηλή δραστηριότητα έναντι της κινάσης ATR σε κυτταρική σειρά HT29 που φέρουν αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και τέλος, ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης της MLL AF9, λευχαιμικής κυτταρικής σειράς, έλαβε χώρα με την χορήγηση του υβριδίου **39** [59,60].

2.11 Μεριδιαννίνες

Οι μεριδιαννίνες (**Σχήμα 27**) αποτελούν κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που ανήκουν στα φυσικά αλκαλοειδή και απομονώθηκαν από τον θαλάσσιο ασκίδιο *Aplidium meridianum*, όπου φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο χημικού αμυντικού μηχανισμού, πιθανότατα για την αποθάρρυνση θηρευτών. Δομικά, οι ενώσεις αυτές φέρουν έναν ινδολικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει ομάδα υδροξυλίου και/ή άτομο βρωμίου στο βενζολικό τμήμα του, ενώ η θέση 3 είναι υποκατεστημένη με μία 2-αμινοπυριμιδίνη. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί οκτώ διακριτές δομές (με ονομασία meridianin A–H, **Σχήμα 27**), οι οποίες παρουσιάζουν δομική συγγένεια με άλλα φυσικά αλκαλοειδή, όπως οι βαριολίνες και οι μεριλιονίνες [61]. Από την αρχική απομόνωση και χαρακτηρισμό τους, οι μεριδιαννίνες έχουν αναδειχθεί σε ιδιαίτερα ελκυστικά μόρια για περαιτέρω μελέτη, καθώς πολλές από τις δομές τους έχουν επιδείξει αξιόλογη βιολογική δράση ως αναστολείς ποικίλων πρωτεϊνικών κινασών, όπως οι **CDK1**, **CDK5**, **PKA**, **PKG** και **GSK3** [62].



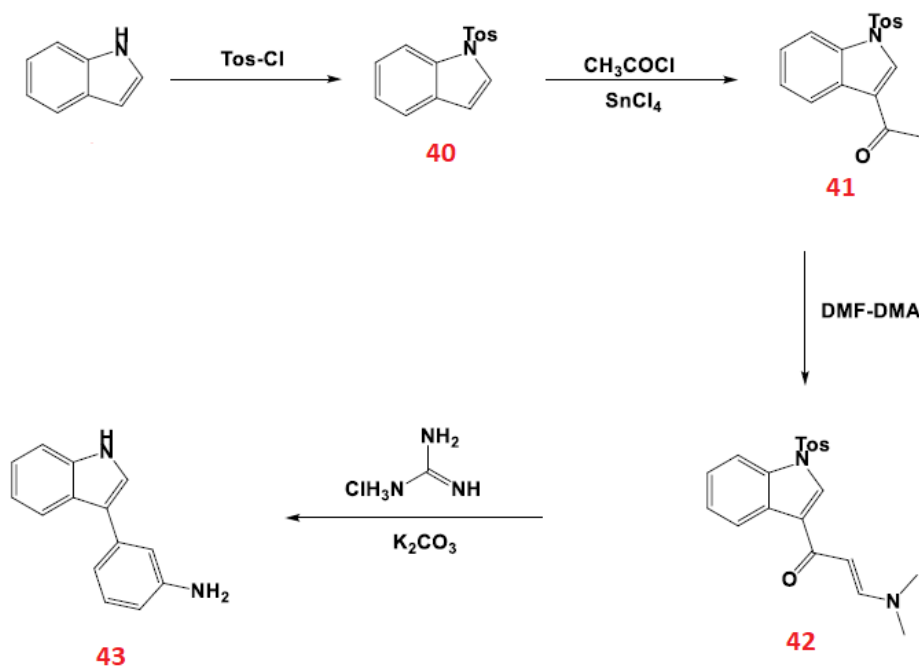
Meridianine	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
A	OH	H	H	H
B	OH	H	Br	H
C	H	Br	H	H
D	H	H	Br	H
E	OH	H	H	Br
F	H	Br	Br	H
G	H	H	H	H
H	OH	Br	H	Br

Σχήμα 27. Γενική δομή των μεριδιαννινών. Ο ινδολικός δακτύλιος μπορεί να φέρει ομάδα υδροξυλίου ή/και άτομα βρωμίου στις θέσεις R₁-R₄, ενώ στη θέση 3 είναι υποκατεστημένος με 2-αμινοπυριμιδίνη.

2.11.1 Σύνθεση μεριδιανινών κατά Bredereck

Η μέθοδος Bredereck (**Σχήμα 28**) είναι η πιο διαδεδομένη συνθετική πορεία για την σύνθεση μεριδιανινών, ενώ είναι αυτή που ενδείκνυται για τη σύνθεση των μεριδιανινών C, D και G. Πρόκειται για μία σύνθεση τεσσάρων βημάτων όπου αρχικά γίνεται προστασία του όξινου πρωτονίου του ινδολίου με τοσυλοχλωρίδιο σε απόδοση πάνω από 90%, ενώ στο δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα μια αντίδραση ακυλίωσης κατά Friedel-Crafts με ακετυλοχλωρίδιο και SnCl₄ ως καταλύτη (οξύ κατά Lewis)

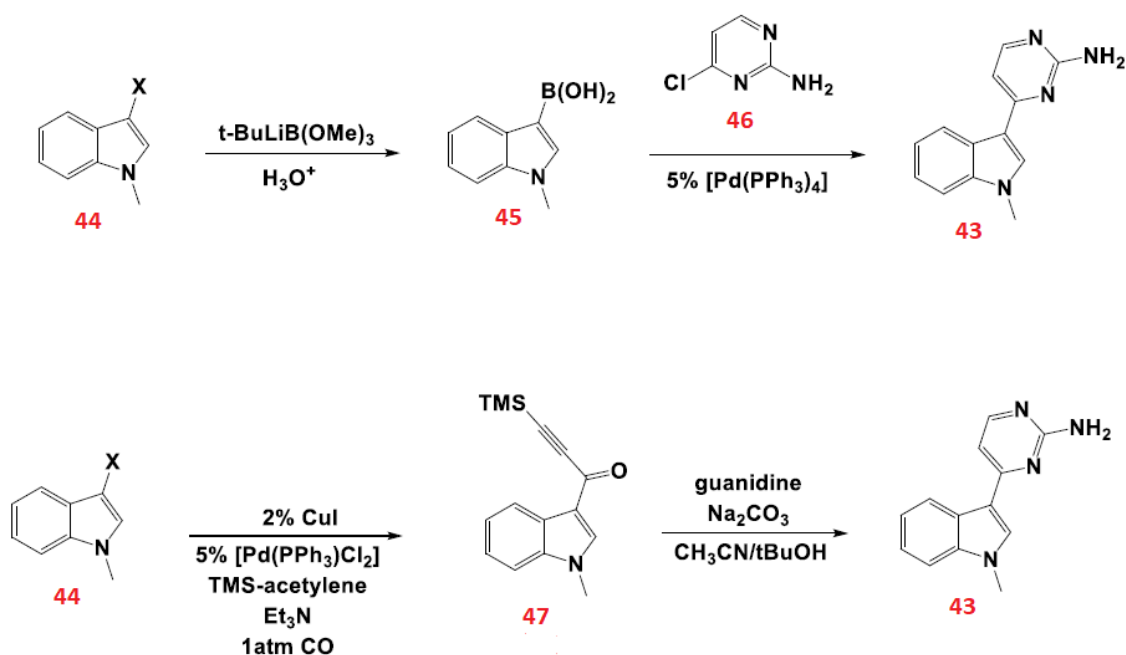
παράγοντας την ένωση **41**. Στη συνέχεια, η ένωση αντιδράει με την ακετάλη του DMF σε ο-ξυλένιο για να δώσει την αντίστοιχη εναμινόνη **42**, η οποία, έπειτα, αντιδρά με το υδροχλωρικό άλας μη υποκατεστημένης γουανιδίνης παρουσία ανθρακικού καλίου σε 1-προπανόλη δημιουργώντας το κυκλοποιημένο προϊόν **43** απομακρύνοντας, παράλληλα, την προστατευτική ομάδα στην 1-θέση του ινδολίου [61].



Σχήμα 28. Σύνθεση μεριδιανινών κατά Brederick.

2.11.2 Σύνθεση μεριδιανινών κατά Muller και Jiang

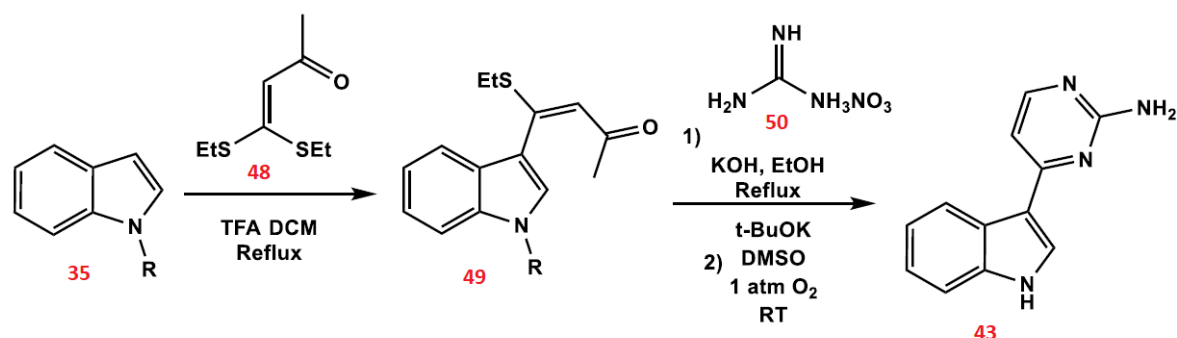
Οι Müller και Jiang ανέπτυξαν δύο παρόμοιες συνθετικές πορείες για την παραγωγή μεριδιανινών και αναλόγων αυτών (**Σχήμα 29**). Το βασικό και κοινό χαρακτηριστικό είναι η επίδραση καταλυτικού παλλαδίου σε αρχικό υπόστρωμα ινδολίου το οποίο φέρει στην 3-θέση ομάδα βορονικού. Συγκεκριμένα, ο Jiang αναφέρει μια κλασική αντίδραση Suzuki μεταξύ του συγκεκριμένου υποστρώματος με της 4-χλωρο-2-αμινοπυριμιδίνης. Αντίστοιχα, ο Müller περιγράφει μία «one-pot» σύνθεση MBSC (Masuda Borylation-Suzuki Coupling) [61, 63].



Σχήμα 29. Σύνθεση μεριδιανινών κατά Jiang (πάνω) και Muller (κάτω).

2.11.3 Σύνθεση μεριδιανινών κατά Yu

Η σύνθεση που αναπτύχθηκε από τον Yu (Σχήμα 30) επισημαίνει μία σύνθεση μεριδιανινών μη καταλυόμενη από μέταλλο. Για την ακρίβεια, στο πρώτο στάδιο παράγεται από *N*-άκυκλο υποκατεστημένο ινδόλιο το αντίστοιχο α,β -ακόρεστο καρβονυλικό προϊόν με την χρήση καρβόνυλο-θειοακετάλης και στην συνέχεια κυκλοποίηση με νιτρικό άλας μη υποκατεστημένης γουανιδίνης παρουσία καυστικού καλίου και αιθανόλης. Τέλος, η αποπροστασία του ετεροατόμου του ινδολίου πραγματοποιείται με χρήση *tert*-βουτοξειδίου του καλίου σε διαλύτη DMSO [64].

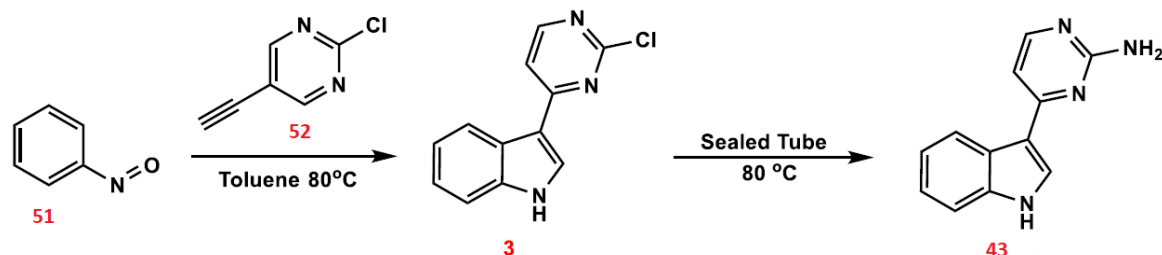


Σχήμα 30. Σύνθεση μεριδιανινών κατά Yu.

2.11.4 Σύνθεση μεριδιανινών κατά Penoni

Η σύνθεση κατά Penoni (Σχήμα 31) περιγράφει μια οικονομική μέθοδο σύνθεσης μεριδιανινών από το αντίστοιχο 2-χλώρο κυκλοποιημένο προϊόν με χρήση υγρής

αμμωνίας σε κλειστό σύστημα στους 80 °C, το οποίο προκύπτει από θερμική διάσπαση νιτροαρενίων με 2-χλωρο-4-αιθυνυλοπυριμιδίνης [61].



Σχήμα 31. Σύνθεση μεριδιανινών κατά Penoni.

2.12 Βιολογική δράση των μεριδιανινών

Σε βιολογικό επίπεδο, οι μεριδιανίνες έχουν αναγνωριστεί ως **ισχυροί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών με παράλληλη αντικαρκινική δράση**. Προσδένονται ανταγωνιστικά στη θέση δέσμευσης του ATP, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου και π-π αλληλεπιδράσεις με αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της κινάσης. Έχουν αξιολογηθεί έναντι μεγάλου φάσματος κινασών, μεταξύ των οποίων οι **Cdk1, Cdk2, Cdk5, PKA, PKG, GSK-3β, CK1, KDR, IGF-1R, c-Met, RET, c-Src, c-Abl, HER-1, Erk2 και Dyrk1A**. Η ευρεία αυτή ανασταλτική δράση, σε συνδυασμό με τις σαφείς **σχέσεις δομής-δραστηκότητας** που έχουν αναδειχθεί για τις διαφορετικές μεριδιανίνες, καθιστά τα μόρια αυτά ιδιαίτερα ελκυστικά ως **μόρια οδηγούς** για τον σχεδιασμό νέων, πιο εκλεκτικών και ισχυρών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, υπογραμμίζοντας την αναγκαιότητα περαιτέρω μελέτης και συνθετικής τροποποίησής τους.

2.13 Κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (CDKs) και ρόλος τους στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου

Με την καθιέρωση του γεγονότος ότι ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από **τις φάσεις G1, S, G2 και M**, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στο πώς ρυθμίζονται οι μεταβάσεις από τη μία φάση στην άλλη. Σε αυτό το πλαίσιο ανακαλύφθηκαν δύο παράγοντες, ο **M phase-promoting factor (MPF)** και ο **S phase-promoting factor (SPF)**, οι οποίοι επιταχύνουν την είσοδο του κυττάρου στη μίτωση και την πρόοδο της S φάσης, αντίστοιχα.

Η εισαγωγή γενετικών προσεγγίσεων από τους ερευνητές, κυρίως σε κύτταρα ζυμών, οδήγησε στην ταυτοποίηση γονιδίων **cell division cycle (CDC)** ως απαραίτητων για την ομαλή εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Χρησιμοποιώντας θερμοευαίσθητες

θανατηφόρες μεταλλάξεις, κατέστη δυνατό να εντοπιστεί το γονίδιο **CDC28** στη ζύμη που πολλαπλασιάζεται με εκβλάστηση, ως καθοριστικό για τον έλεγχο του πρώτου βήματος της φάσης G1, ενώ στη ζύμη που πολλαπλασιάζεται με σχάση, οι πρωτεΐνες **CDC2** βρέθηκαν ότι απαιτούνται για τη μετάβαση από τη φάση G2 στη μίτωση (G2/M). Η πρωτεΐνη αυτή σήμερα είναι γνωστή ως **CDK1**. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στη διατύπωση της έννοιας ότι οι **CDKs** αποτελούν πρωτεϊνικές κινάσες, των οποίων η δραστηριότητα ρυθμίζεται με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση. Οι CDKs δεν είναι αυτόνομα ενεργές, αλλά λειτουργούν ως **σύμπλοκα με τις ρυθμιστικές τους υπομονάδες, τις κυκλίνες**. Η δέσμευση της κατάλληλης κυκλίνης είναι απαραίτητη για τη δομική αναδιάταξη και την ενεργοποίηση της CDK, ενώ η πλήρης ρύθμιση της δραστηριότητάς της απαιτεί επιπλέον μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπίδραση με **αναστολείς των CDKs (CKIs)**. Οι CDKs εμπλέκονται σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις, γεγονός που αναπόφευκτα οδήγησε στην αναζήτηση μικρών μορίων που θα χρησιμοποιούνταν ως αναστολείς της δραστηριότητάς τους. Αφετηρία αυτής της ερευνητικής πορείας αποτέλεσε η ταυτοποίηση του **flavopiridol**, μιας **φλαβόνης** με αντικαρκινική δράση, ως του πρώτου μορίου ικανού να **αναστείλει κυκλίνες–CDKs** που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Αν και το flavopiridol δεν διέθετε την απαιτούμενη εκλεκτικότητα και ισχύ για κλινική αξιοποίηση, η αναγνώρισή του ως αναστολέα CDKs σηματοδότησε την έναρξη μιας νέας εποχής στην αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν ταυτοποιηθεί **21 γονίδια που κωδικοποιούν 20 CDKs**, από **CDK1** έως **CDK20**, με το **CDK11** να αντιστοιχεί σε δύο πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια **CDK11A** και **CDK11B**. **Οι CDKs κατατάσσονται σε τρεις κύριες λειτουργικές ομάδες:**

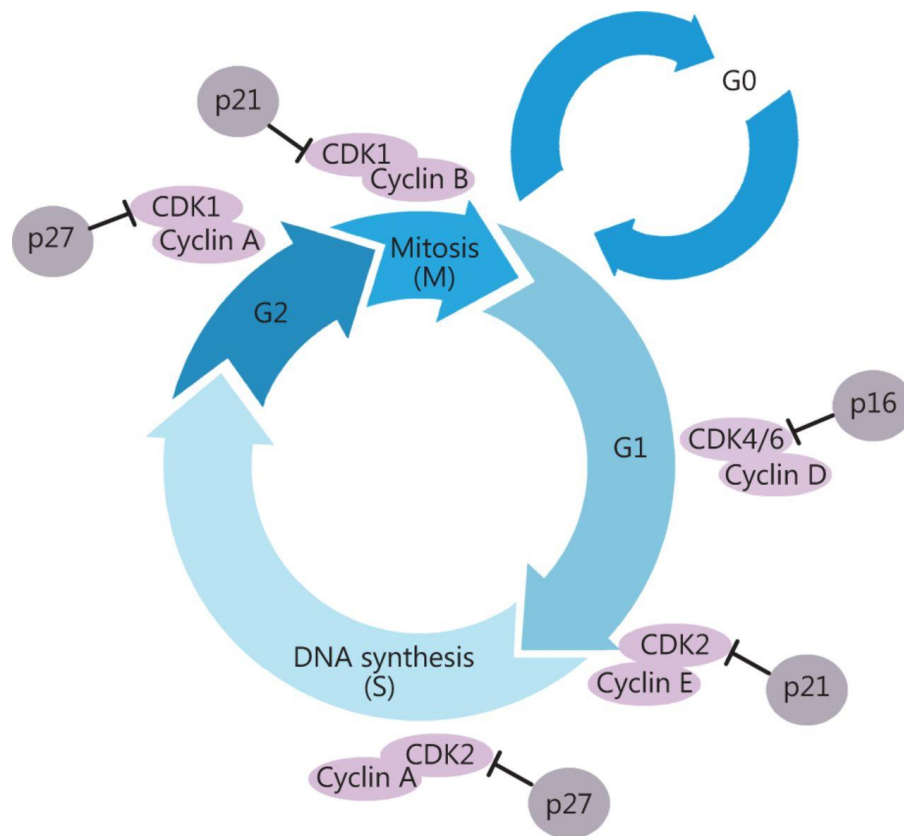
- (1) **CDKs του κυτταρικού κύκλου** (CDK1, 2, 3, 4, 6),
- (2) **CDKs που ρυθμίζουν κυρίως τη μεταγραφή** (CDK7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) και
- (3) **«άτυπες» CDKs** (CDK5, 14–20).

Παρά τον αρχικό χαρακτηρισμό τους ως ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, είναι πλέον σαφές ότι κάθε CDK έχει αποκτήσει επιπλέον, διακριτές λειτουργίες. Μεγάλο μέρος των CDKs (ιδίως οι μεταγραφικές και οι άτυπες, με εξαίρεση το CDK5) παραμένουν ελλιπώς μελετημένες και ανήκουν στην κατηγορία των «Dark Kinases», η οποία περιλαμβάνει περίπου το ένα τρίτο των ανθρώπινων κινασών. Ο ευκαρυωτικός

κυτταρικός κύκλος ορίζεται ως η διαδικασία με την οποία ένα κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα, διασφαλίζοντας την πιστή αντιγραφή του γενετικού υλικού. Στόχος του είναι η ακριβής αντιγραφή του DNA μία φορά κατά τη φάση S και ο ισομερής διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση (M φάση). Η πρόοδος κατά τη διάρκεια των φάσεων **G1, S, G2** και **M** παρακολουθείται στενά μέσω ελεγκτικών μηχανισμών (checkpoints), ώστε η μίτωση να μην εκκινήσει πριν ολοκληρωθεί η φάση S και να μην προχωρήσουν κύτταρα με σοβαρά βλάβες στο DNA. Στον σωματικό κυτταρικό κύκλο παρεμβάλλονται δύο μεταβατικές φάσεις, η **G1** και η **G2**, που χωρίζουν τη μίτωση (M) από την αντιγραφή του DNA (S) και την αντιγραφή του DNA από τη μίτωση, αντίστοιχα. Κατά τη **G1** τα κύτταρα ανταποκρίνονται σε εξωκυτταρικά σήματα και αποφασίζουν αν θα επανεισέλθουν σε **κύκλο διαίρεσης** ή θα εισέλθουν σε **λανθάνουσα κατάσταση (G0)**. Η δέσμευση στην κυτταρική διαίρεση καθίσταται ουσιαστικά μη αναστρέψιμη μετά την υπέρβαση του λεγόμενου “σημείου περιορισμού” (restriction point) στα τέλη της G1, πέρα από το οποίο η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου δεν εξαρτάται πλέον από συνεχή μιτογόνα ερεθίσματα. Αντίστοιχα, μετά την ολοκλήρωση της φάσης S, η παρουσία βλαβών ή μη πλήρους αντιγραμμένου DNA ενεργοποιεί το σημείο ελέγχου G2/M, το οποίο αναστέλλει την έναρξη της μίτωσης έως ότου αποκατασταθεί η ακεραιότητα του γενετικού υλικού. Για να εξασφαλιστεί ότι ο κυτταρικός κύκλος θα προχωρά ή θα σταματά όταν χρειάζεται, **οι CDKs του κυτταρικού κύκλου (CDK1, 2, 3, 4, 6) εκφράζονται στα κύτταρα σε ανενεργή μορφή και η ενεργοποίησή τους ρυθμίζεται μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού**. Αυτός περιλαμβάνει:

- (α) την επίδραση εξωκυτταρικών σημάτων,
- (β) την ελεγχόμενη έκφραση και διαθεσιμότητα των κυκλινών,
- (γ) ενεργοποιητικές ή ανασταλτικές φωσφορυλιώσεις των CDKs και
- (δ) την αναστολή τους από ειδικές πρωτεΐνες-αναστολείς CDKs (CKIS, πχ p21, p27, p16)

Όλα αυτά συνδυαστικά, επιτρέπουν τη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης και θεμελιώνουν τη δυνατότητα στοχευμένης φαρμακολογικής παρέμβασης [65].



Σχήμα 32. Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου και της ρύθμισής του από σύμπλοκα κυκλινών-CDKs. Κάθε φάση του κυτταρικού κύκλου (G1, S, G2, M) ελέγχεται από διαφορετικούς συνδυασμούς CDK/κυκλίνης (μωβ ελλείψεις), ενώ πρωτεΐνες όπως οι p16, p21 και p27 (γκρι μικροί κύκλοι) αναστέλλουν επιλεκτικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ή προάγουν την είσοδο σε λανθάνουσα κατάσταση (G0) [66].

Σκοπός και στόχοι της εργασίας

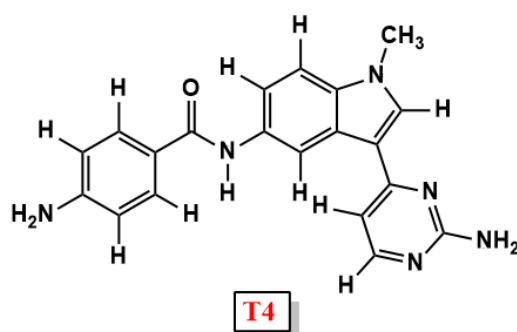
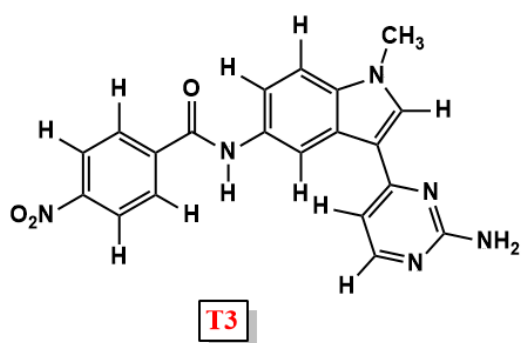
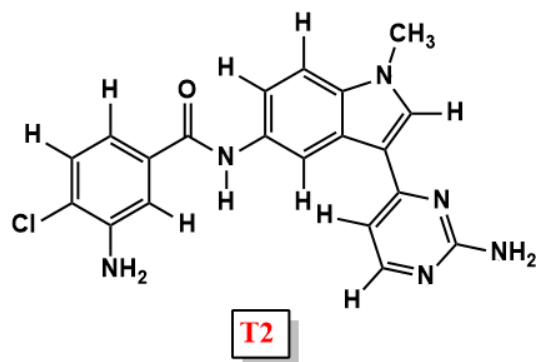
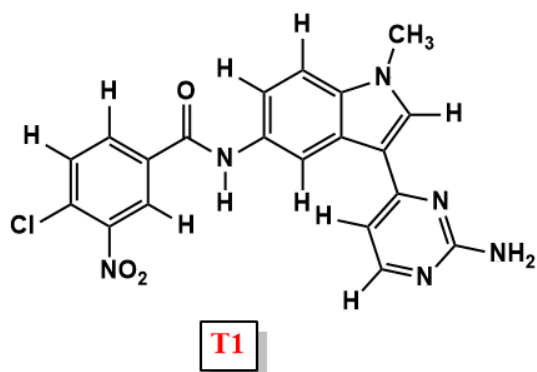
Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι **διττός**. Αφενός, περιλαμβάνει τη σύνθεση και τον πλήρη χαρακτηρισμό νέων οργανικών βιοδραστικών ενώσεων ως εν δυνάμει αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, με δομικό υπόβαθρο το φυσικό συστατικό των μεριδιανινών (παράγωγα αυτών), καθώς και τη θεωρητική μελέτη τόσο των ενδιάμεσων όσο και των τελικών ενώσεων, με απώτερο στόχο την περαιτέρω διερεύνηση και ανάλυση της αντικαρκινικής τους δράσης σε καρκινικές σειρές κυττάρων. Αφετέρου, εστιάζει στη θεωρητική μελέτη μιας σειράς ενώσεων, συγκεκριμένα εναμινονών, με στόχο την ανάδειξη των διαφορών που εμφανίζουν στα φάσματα ^1H NMR, αλλά και την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι διάφοροι υποκαταστάτες που φέρουν επηρεάζουν τα ηλεκτρονικά φαινόμενα και, κατ' επέκταση, τις φασματοσκοπικές και ηλεκτρονικές τους ιδιότητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

Ο κλάδος της μοριακής μοντελοποίησης εντάσσεται στη βιοπληροφορική και στοχεύει στην πρόβλεψη των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ βιοδραστικών ενώσεων και πρωτεϊνών. Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στη γνώση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης-στόχου —στην προκειμένη περίπτωση πρωτεϊνικών κινασών—, της τρισδιάστατης δομής της, καθώς και της χημικής δομής του υπό μελέτη βιοδραστικού μορίου. Αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό εργαλείο στον ορθολογικό σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών ενώσεων, αλλά και στη βελτιστοποίηση ήδη εγκεκριμένων φαρμάκων, λειτουργώντας ως κατευθυντήριο οδηγός για στοχευμένες δομικές τροποποιήσεις. Στο πλαίσιο αυτό, η γνώση της αμινοξικής σύστασης του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης, σε συνδυασμό με τη χωρική διάταξη των καταλοίπων του, καθιστά δυνατό τον σχεδιασμό νέων βιοδραστικών μορίων. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την πρόβλεψη της ικανότητας πρόσδεσης και της ισχύος των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, **χωρίς την άμεση ανάγκη πειραματικού προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης-μορίου**, όπως μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (XRD) ή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής μοντελοποίησης για τα νέα σχεδιασθέντα μόρια. Ο έλεγχος αφορούσε **τρεις διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες την 4Y72 (CDK1 πρωτεϊνική κινάση), την 1Z57 (CLK1 πρωτεϊνική κινάση) και την 8HLT (DYRK2 κινάση διπλής ειδικότητας)** και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά των ήδη υπαρχόντων αναστολέων. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στη **συγγένεια πρόσδεσης (binding affinity) η οποία σχετίζεται με τη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας (ΔG)** σε συνδυασμό με τα **δισδιάστατα διαγράμματα** στα οποία απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις των καταλοίπων με το ενεργό κέντρο οι οποίες αποτυπώνουν την ισχύ της αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης και του υπό μελέτη μορίου.

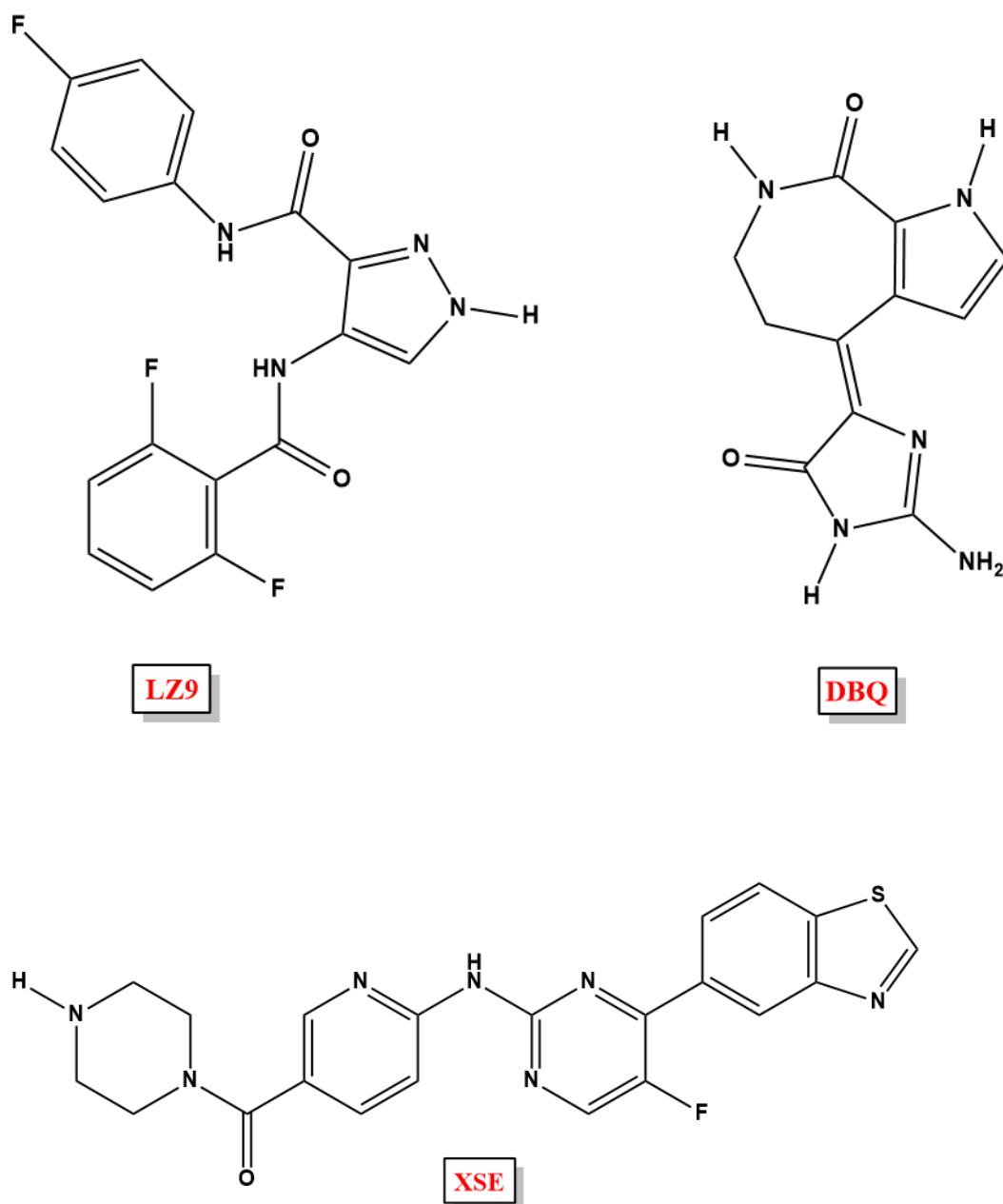
Για την εκτέλεση των πειραμάτων μοριακής μοντελοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά **AutoDock Tools, AutoDock Vina, PyMOL και Discovery Studio**, τα οποία αξιοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δομών, την πραγματοποίηση των υπολογισμών πρόσδεσης και την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Οι χημικές δομές των νεοσχεδιασμένων ενώσεων παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1**.



Σχήμα 1. Χημικές δομές των νεοσχεδιασμένων ενώσεων T1, T2, T3 και T4.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η χημική δομή των υποκαταστατών που ήταν συνδεδεμένοι με τις υπό μελέτη πρωτεΐνες.



Σχήμα 2. Χημικές δομές των υποκαταστατών-αναφοράς.

Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται οι υπολογισθείσες τιμές της **συγγένειας πρόσδεσης (binding affinity)** πρόσδεσης **τόσο των αναστολέων αναφοράς όσο και των νεοσχεδιασμένων ενώσεων** που προέκυψαν από τη συνθετική διαδικασία, για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες-στόχους. Οι τιμές της ενέργειας πρόσδεσης που παρουσιάζονται προκύπτουν από υπολογισμούς μοριακού docking, όπως αυτές υπολογίζονται από το AutoDock Vina, ώστε να διευκολύνεται η συγκριτική αξιολόγηση των ενώσεων. Για κάθε σύμπλοκο επιλέχθηκε το binding mode με τη χαμηλότερη τιμή ενέργειας πρόσδεσης. Μεγαλύτερη ενέργεια πρόσδεσης συνεπάγεται πιο **αρνητικό ΔG** και επομένως πιο ευνοϊκή πρόσδεση του ligand στο ενεργό κέντρο, καθώς σύμφωνα με

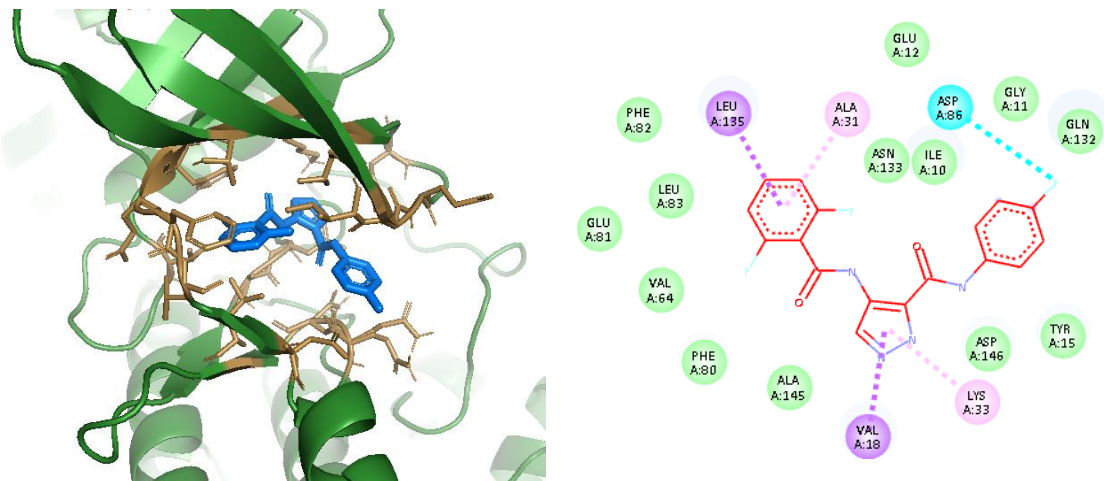
τους θερμοδυναμικούς νόμους, η σταθερότερη κατάσταση ενός συστήματος αντιστοιχεί στη χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια. Τα υπόλοιπα docking modes χρησιμοποιήθηκαν μόνο επικουρικά για τον έλεγχο της σύγκλισης των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 1. Υπολογισθείσες τιμές της ενέργειας πρόσδεσης των υπό μελέτη ενώσεων και των αναστολέων αναφοράς στις αντίστοιχες πρωτεΐνες-στόχους.

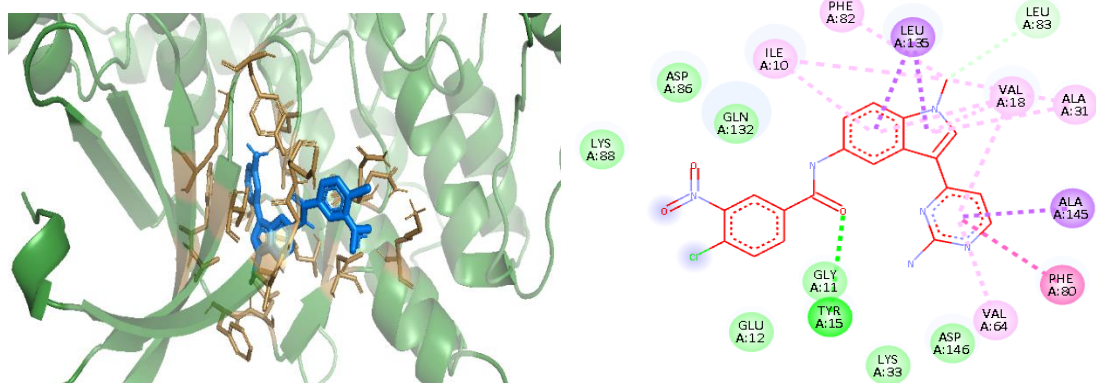
Αναστολέας	Πρωτεΐνη-στόχος	Υπολογισμένη ενέργεια πρόσδεσης (binding affinity/score σε kcal/mol)
LZ9	4Y72	-10,588
T1	4Y72	-11,11
T2	4Y72	-11,15
T3	4Y72	-11,40
T4	4Y72	-11,10
DBQ	1Z57	-8,736
T1	1Z57	-10,68
T2	1Z57	-10,59
T3	1Z57	-10,50
T4	1Z57	-10,78
XSE	8HLT	-9,851
T1	8HLT	- 9,931
T2	8HLT	-9,785
T3	8HLT	-10,12
T4	8HLT	-9,666

Για την καλύτερη κατανόηση της θέσης και του τρόπου πρόσδεσης των υποκαταστατών στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε τρισδιάστατη απεικόνιση των συμπλόκων πρωτεΐνης-υποκαταστάτη που προέκυψαν από τη διαδικασία του μοριακού docking. Στα **Σχήματα 3, 4, 5, 6 και 7** παρουσιάζονται οι τρισδιάστατες δομές των συμπλόκων της πρωτεΐνης **4Y72** τόσο με τον αναστολέα αναφοράς **LZ9** όσο και με τις υπό μελέτη συντεθειμένες ενώσεις (T1–T4), καθώς και τα αντίστοιχα δισδιάστατα διαγράμματα των αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Στα διαγράμματα αυτά, οι **πράσινες διακεκομμένες γραμμές**

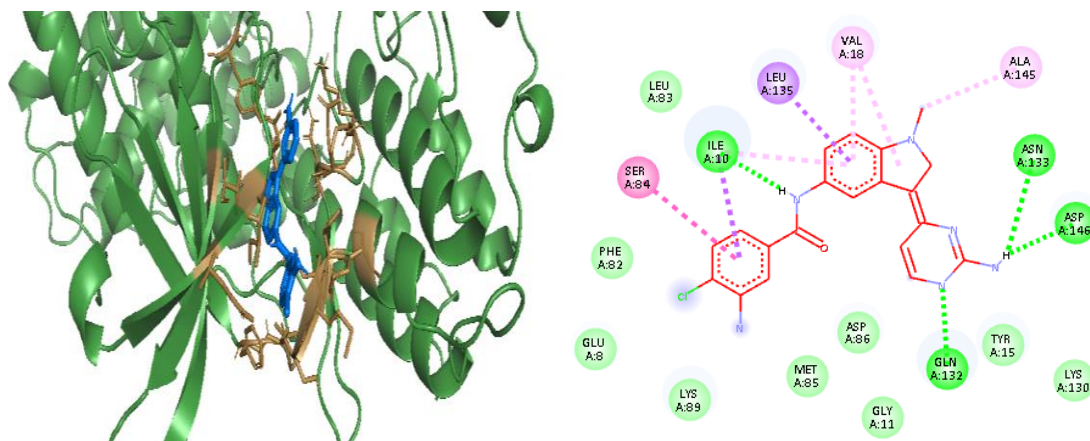
αντιστοιχούν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ οι ροζ/μωβ διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν υδρόφοβες και αρωματικές αλληλεπιδράσεις.



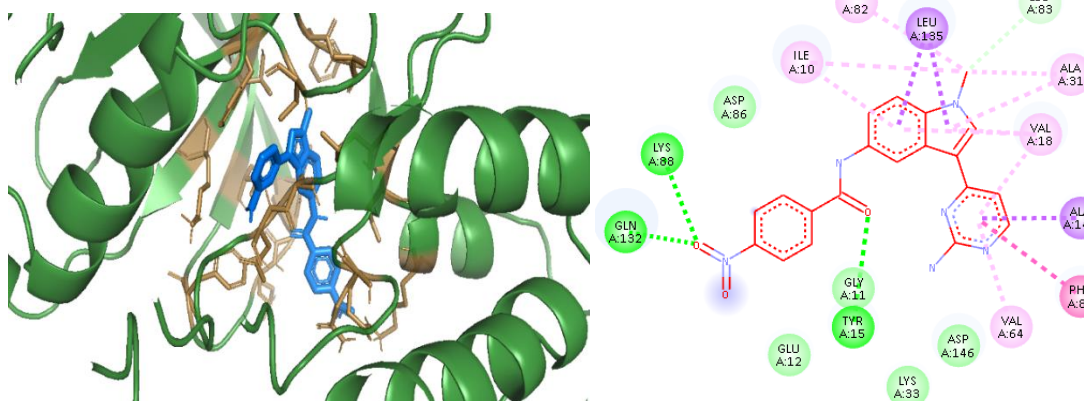
Σχήμα 3. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη αναφοράς **LZ9** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοιχτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και εντοπίζεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή πρόσδεσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



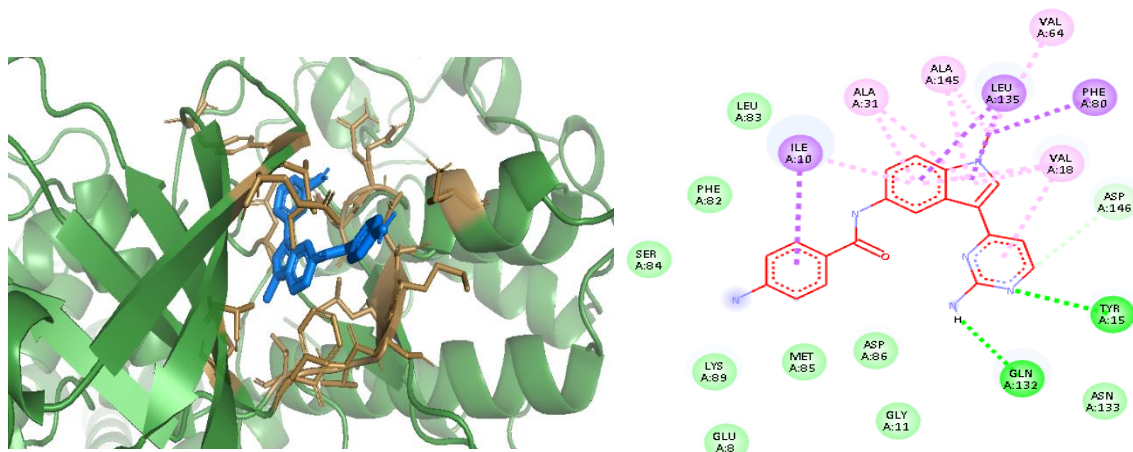
Σχήμα 4. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T1** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοιχτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



Σχήμα 5. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T2** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



Σχήμα 6. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T3** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

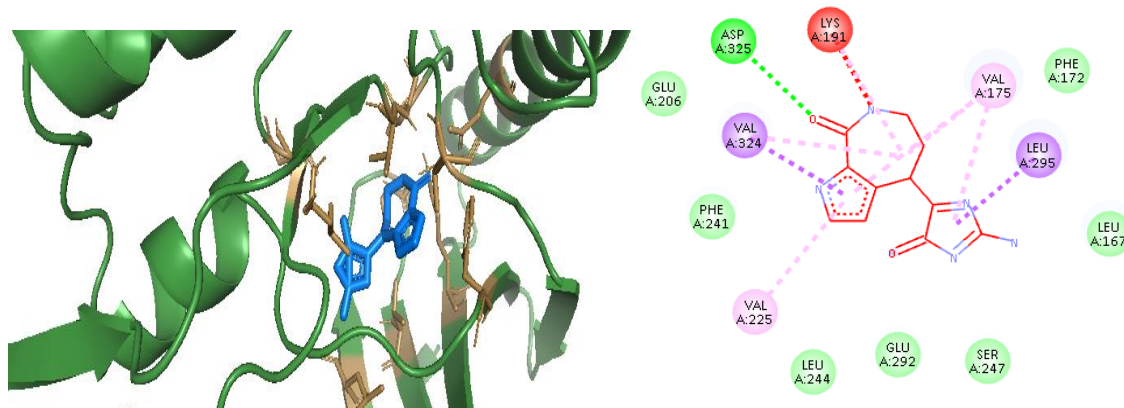


Σχήμα 7. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T4** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Οι υπολογισμοί μοριακού docking έδειξαν ότι όλοι οι υπό μελέτη υποκαταστάτες παρουσιάζουν ευνοϊκές τιμές υπολογισμένης ενέργειας πρόσδεσης προς την πρωτεΐνη-στόχο, με τιμές συγκρίσιμες με τον αναστολέα αναφοράς LZ9. Συγκεκριμένα, ο υποκαταστάτης T3 εμφάνισε την πιο αρνητική τιμή ενέργειας πρόσδεσης (−11,40 kcal/mol), ενώ οι T1, T2 και T4 παρουσίασαν παρόμοιες τιμές (−11,11 έως −11,15 kcal/mol), υποδηλώνοντας συγκρίσιμη συγγένεια πρόσδεσης. Τα δισδιάστατα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων επιβεβαιώνουν ότι οι δομικές τροποποιήσεις των υποκαταστατών δεν διαταράσσουν τις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο, αλλά διατηρούν παρόμοιο μοτίβο επαφών με εκείνο του αναστολέα αναφοράς. Οι παρατηρούμενες διαφορές στις τιμές ενέργειας πρόσδεσης αποδίδονται κυρίως σε διαφοροποιήσεις στη γεωμετρία των ενώσεων εντός του binding pocket. Συνολικά, τα αποτελέσματα του μοριακού docking υποδεικνύουν ότι οι υποκαταστάτες T1–T4 αποτελούν υποσχόμενες ενώσεις, με τον T3 να εμφανίζει την ευνοϊκότερη υπολογισμένη συγγένεια πρόσδεσης, ενώ όλοι διατηρούν σταθερή και συνεπή δέσμευση στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης-στόχου.

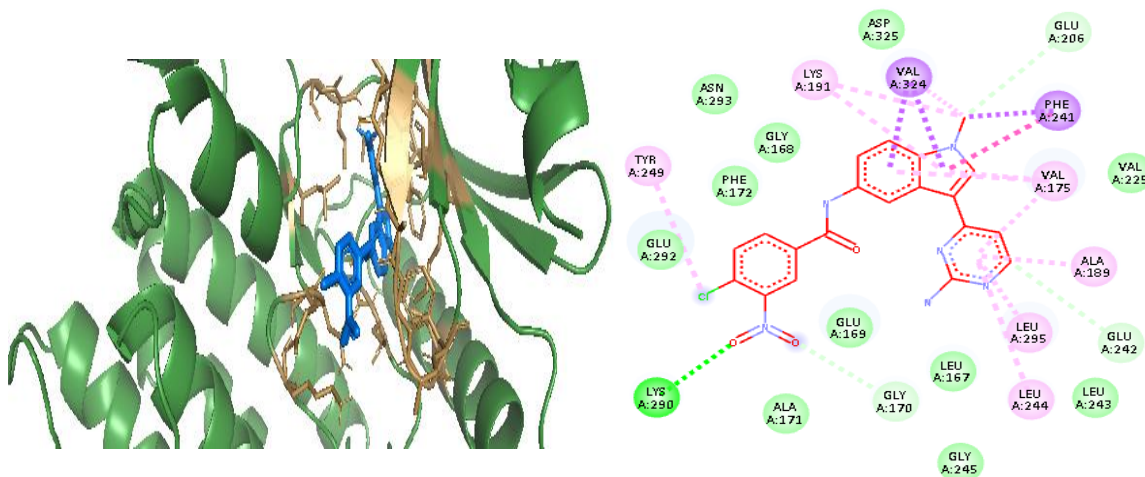
Στα **Σχήματα 8, 9, 10, 11 και 12** απεικονίζονται οι τρισδιάστατες δομές των συμπλόκων της πρωτεΐνης **1Z57** με τον αναστολέα αναφοράς **DBQ**, καθώς και με τις συνθετισμένες ενώσεις T1–T4. Παράλληλα, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα δισδιάστατα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου,

όπου οι πράσινες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ οι ροζ/μωβ διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν υδρόφοβες και αρωματικές αλληλεπιδράσεις.



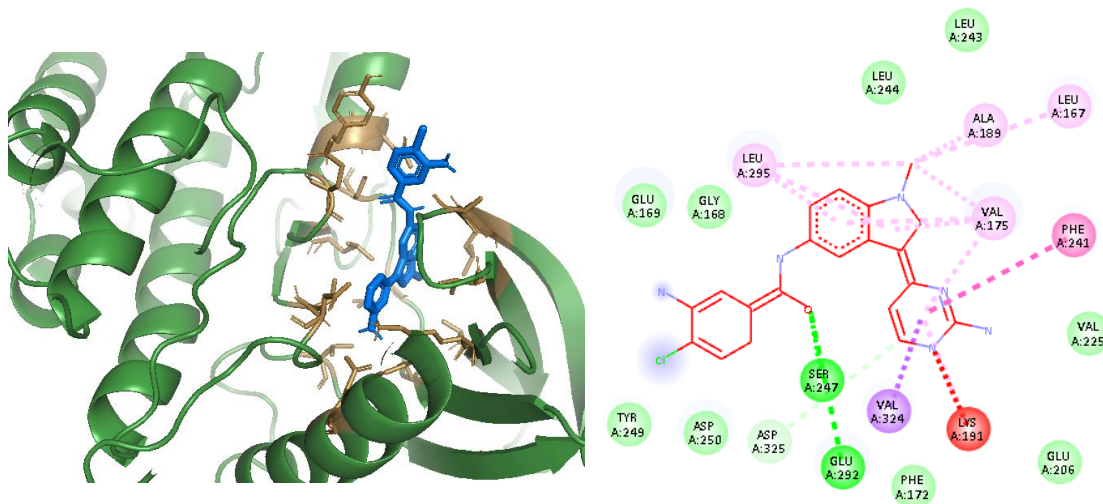
Σχήμα 8. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη αναφοράς **DBQ** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Ο υποκαταστάτης **DBQ** σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το **ASP325** και παρουσιάζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα του ενεργού κέντρου (π.χ. **VAL175**, **VAL324**, **LEU295**, **PHE172**), οι οποίες συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της δέσμευσης. Παρατηρείται επίσης μία μη ευνοϊκή αλληλεπίδραση τύπου *donor–donor* με το κατάλοιπο **LYS191**.

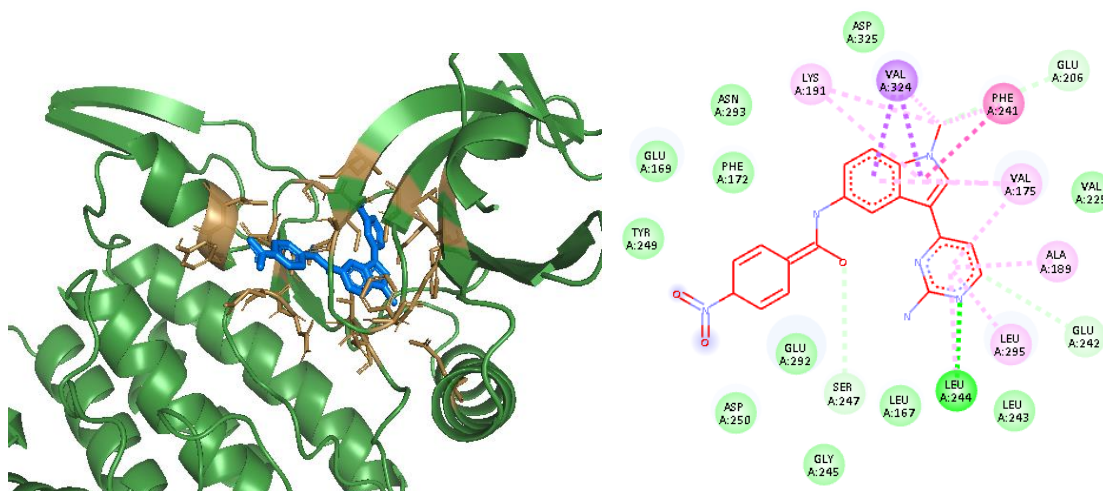


Σχήμα 9. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T1** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon*

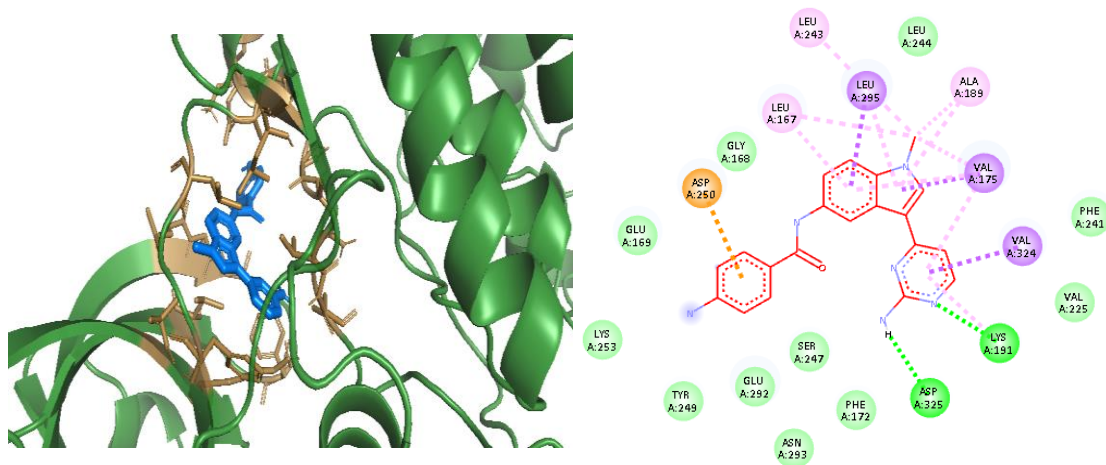
(πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



Σχήμα 10. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T2** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



Σχήμα 11. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T3** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

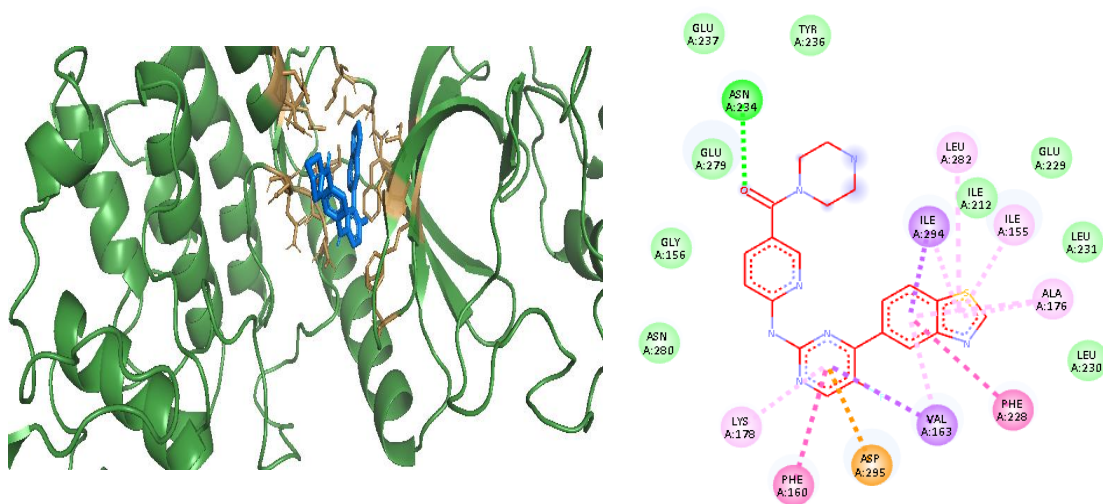


Σχήμα 12. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T4** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

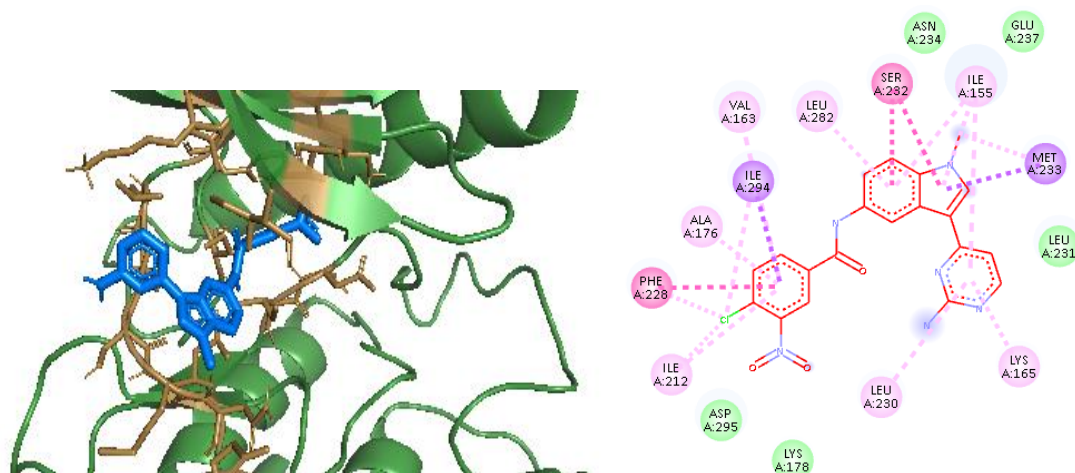
Συνολικά, τα αποτελέσματα του μοριακού docking δείχνουν ότι όλοι οι υποκαταστάτες (T1–T4) παρουσιάζουν βελτιωμένη συγγένεια πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης σε σύγκριση με το μόριο αναφοράς DBQ, όπως προκύπτει από τις πιο αρνητικές τιμές ενέργειας πρόσδεσης. Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων αποκαλύπτει την παρουσία δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και αρωματικών αλληλεπιδράσεων με κρίσιμα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, τα οποία συμβάλλουν καθοριστικά στη σταθεροποίηση των συμπλόκων. Παρότι παρατηρούνται μεμονωμένες μη ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις, αυτές δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά τη συνολική δέσμευση. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι υποκαταστάτες T1–T4 αποτελούν υποσχόμενες ενώσεις και δικαιολογούν την περαιτέρω διερεύνησή τους με πιο εκτεταμένες υπολογιστικές ή πειραματικές μελέτες.

Στο Σχήμα 13 παρουσιάζεται η τρισδιάστατη δομή του συμπλόκου της πρωτεΐνης 8HLT με τον υποκαταστάτη αναφοράς XSE, καθώς και το αντίστοιχο δισδιάστατο διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Επιπλέον, στα **Σχήματα 14, 15, 16 και 17** απεικονίζονται οι τρισδιάστατες δομές των συμπλόκων της πρωτεΐνης 8HLT με τους υποκαταστάτες T1, T2, T3 και T4, αντίστοιχα, συνοδευόμενες από τα αντίστοιχα δισδιάστατα διαγράμματα αλληλεπιδράσεων. Στα διαγράμματα αυτά, **οι πράσινες διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ οι ροζ/μωβ διακεκομμένες γραμμές**

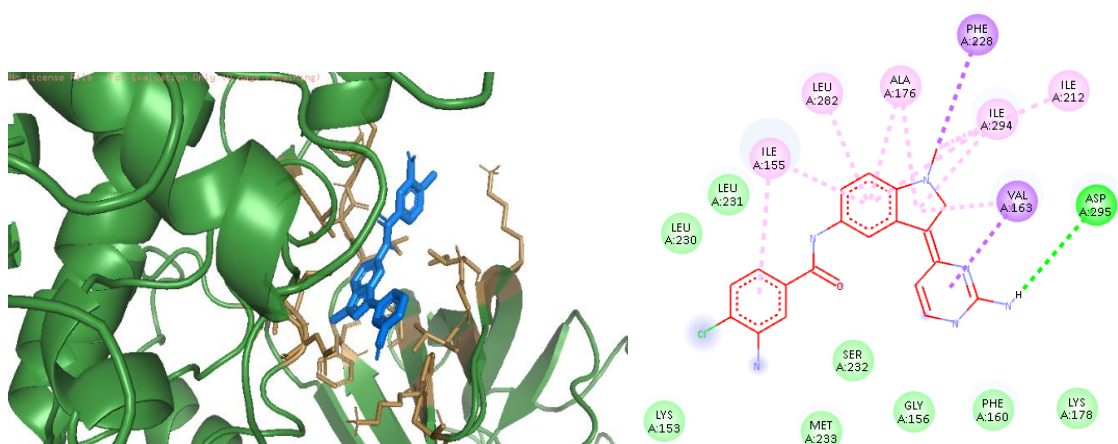
υποδηλώνουν υδρόφοβες και αρωματικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες συμβάλλουν καθοριστικά στη σταθεροποίηση των συμπλόκων πρωτεΐνης–υποκαταστάτη.



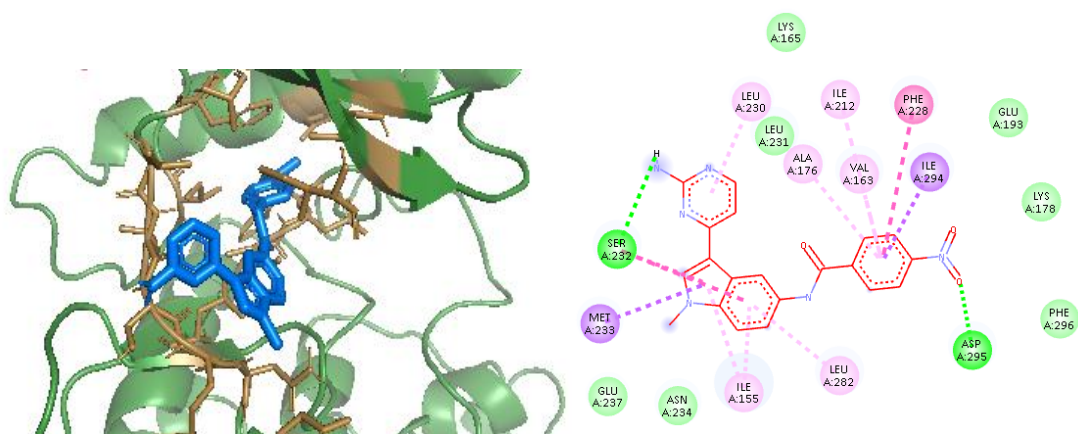
Σχήμα 13. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη αναφοράς XSE που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



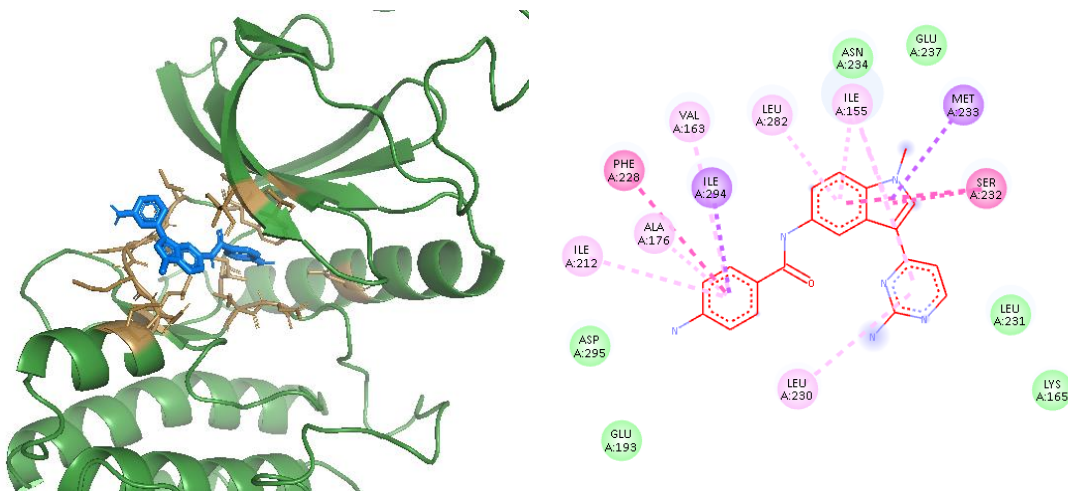
Σχήμα 14. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη T1 που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



Σχήμα 15. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T2** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



Σχήμα 16. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T3** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.



Σχήμα 17. Αριστερά: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεΐνης–υποκαταστάτη **T4** που προέκυψε από μοριακό docking. Η πρωτεΐνη απεικονίζεται σε αναπαράσταση *cartoon* (πράσινο), ενώ τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (*binding pocket*) παρουσιάζονται σε μορφή *sticks* (ανοικτό καφέ). Ο υποκαταστάτης απεικονίζεται σε μορφή *sticks* (μπλε) και βρίσκεται εντός του ενεργού κέντρου, υποδεικνύοντας τη σταθερή δέσμευσή του. **Δεξιά:** Δισδιάστατη σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

Με βάση τα αποτελέσματα του μοριακού docking έναντι της πρωτεΐνης 8HLT παρατηρείται ότι όλοι οι μελετώμενοι υποκαταστάτες (XSF, T1, T2, T3 και T4) προσδένονται σταθερά στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, με τιμές ενέργειας πρόσδεσης που κυμαίνονται από $-9,666$ έως $-10,12$ kcal/mol. Ο υποκαταστάτης αναφοράς XSF παρουσίασε ενέργεια πρόσδεσης $-9,851$ kcal/mol, ενώ ο T1 εμφάνισε ελαφρώς βελτιωμένη τιμή ($-9,931$ kcal/mol), υποδηλώνοντας αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης. Αντίθετα, ο T2 ($-9,785$ kcal/mol) και ο T4 ($-9,666$ kcal/mol) παρουσίασαν λιγότερο ευνοϊκές τιμές σε σύγκριση με τον XSF. Ο υποκαταστάτης T3 κατέγραψε τη χαμηλότερη ενέργεια πρόσδεσης ($-10,12$ kcal/mol) άρα και αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης, γεγονός που συνάδει με το εκτενέστερο δίκτυο αλληλεπιδράσεων που παρατηρείται στο δισδιάστατο διάγραμμα. Συνολικά, ο T3 αναδεικνύεται ως ο πλέον υποσχόμενος υποκαταστάτης, συνδυάζοντας ενεργειακή σταθερότητα και ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου.

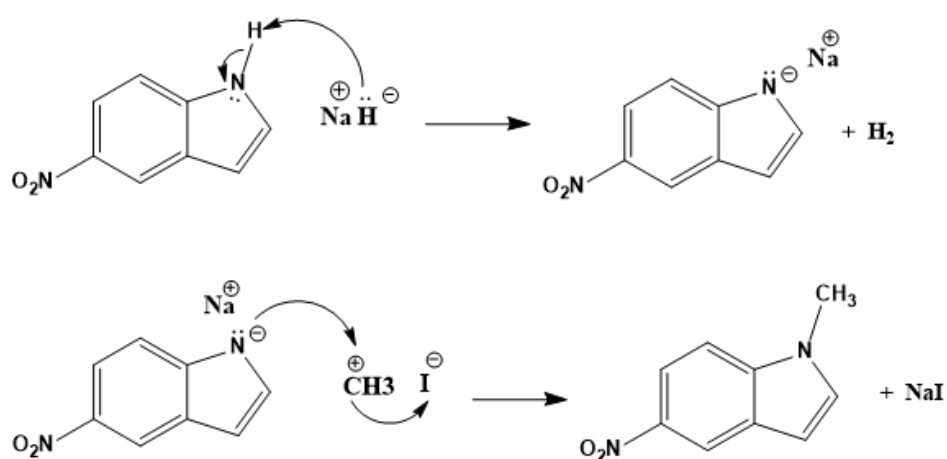
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : Μελέτη των Μηχανισμών Αντίδρασης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός των παραγώγων μεριδιανίνης, με παράλληλη θεωρητική διερεύνηση μέσω της υπολογιστικής μεθόδου DFT.

Στο τέλος του προηγούμενου κεφαλαίου έγινε αναφορά σε δύο χαρακτηριστικές ομάδες-τμήματα οργανικών μορίων, οι οποίες παρατηρούνται σε πληθώρα εγκεκριμένων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, συγκεκριμένα στο ινδολικό τμήμα και στο τμήμα της μονοϋποκατεστημένης 2-αμινοπυριμιδίνης. Οι προσπάθειες σύνθεσης περιλαμβάνουν μόρια που φέρουν τα δύο αυτά μοριακά τμήματα, ενώ αντί του απλού ινδολίου χρησιμοποιείται το 5-νιτροινδόλιο.

4.1 Αντίδραση 1: Μεθυλίωση του 5-νιτρο-1*H*-ινδολίου

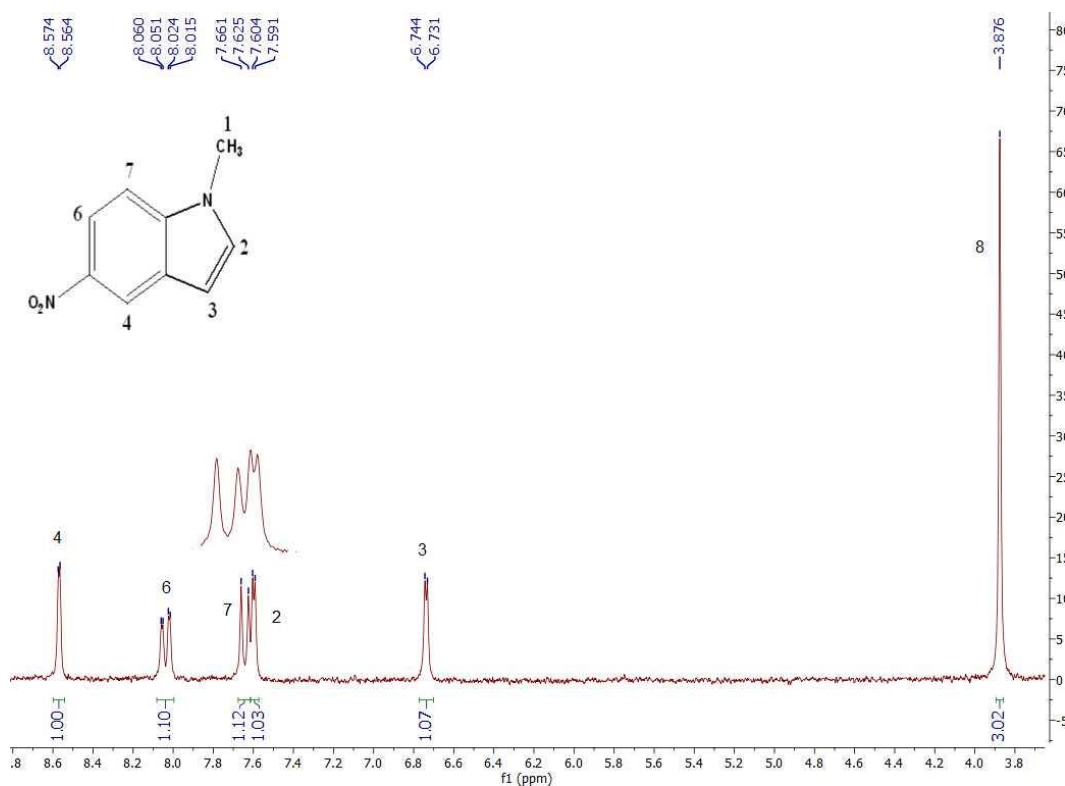
4.1.1 Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης

Η αντίδραση αφορά τη μεθυλίωση του ινδολίου μέσω σχηματισμού του αντίστοιχου *N*-μεθυλοινδολίου. Αρχικά, το όξινο πρωτόνιο του αζώτου του ινδολίου απομακρύνεται με τη χρήση υδριδίου του νατρίου (NaH) σε απόλυτο τετραϋδροφουράνιο (THF), οδηγώντας στον σχηματισμό του αντίστοιχου ανιονικού ενδιάμεσου. Στη συνέχεια, το αποπρωτονιωμένο άζωτο δρα ως πυρηνόφιλο κέντρο και προσβάλλει την μεθυλομάδα του ιωδομεθανίου (CH₃I), σχηματίζοντας το επιθυμητό προϊόν *N*-μεθυλοινδόλιο. Ο μηχανισμός της αντίδρασης υποκατάστασης απεικονίζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Μηχανισμός της αντίδρασης μεθυλίωσης του 5-νιτρο-1*H*-ινδολίου μέσω μιας αντίδρασης S_N2 υποκατάστασης.

4.1.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολίου



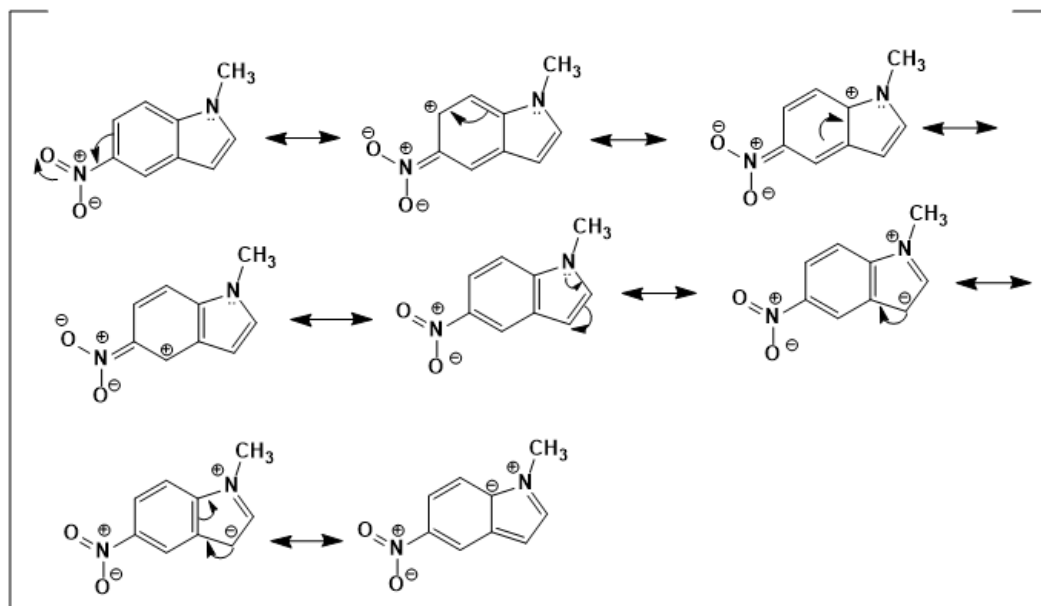
Σχήμα 2. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) 1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολίου σε διαλύτη DMSO-d_6 .

^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 8.569 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 1H), 8.038 (dd, $^3J = 9$, $^4J = 2.5$ Hz, 1H), 7.643 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H), 7.598 (d, $^3J = 3.25$ Hz, 1H), 6.738 (d, $^3J = 3.25$ Hz, 1H), 3.876 (s, 3H).

Η νιτρομάδα είναι ένας από τους ισχυρότερους δέκτες ηλεκτρονίων ούσα υποκαταστάτης σε αρωματικά και εν γένει συζυγιακά συστήματα. Άρα, αναμένεται όλα τα πρωτόνια και δη τα γειτονικά ως προς την συγκεκριμένη ομάδα να αποπροστατεύονται, δημιουργώντας έλλειμμα ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε όρθο- και πάρα- θέση, με αποτέλεσμα ο συντονισμός που υφίσταται να μετατοπίζει σε μεγαλύτερες τιμές ppm τα πρωτόνια, δηλαδή, αυτά να αποπροστατεύονται.

Στο φάσμα ^1H NMR, το πρωτόνιο της **4-θέσης** του ινδολίου εμφανίζεται ως το πλέον **αποπροστατευμένο**, με χημική μετατόπιση στα **8,569 ppm**. Το σήμα αυτό παρουσιάζει κοινή σταθερά σύζευξης $^4J = 2,5$ Hz με την **διπλή διπλής** κορυφή στα **8,038 ppm**, η οποία, επομένως, αποδίδεται στο **πρωτόνιο της 6-θέσης** του ινδολίου. Τα πρωτόνια της **2-** και **3-θέσης** του πυρολικού δακτυλίου, με μετατοπίσεις στα **7,598** και **6,738 ppm** αντίστοιχα, παρουσιάζουν μεταξύ τους κοινή σταθερά σύζευξης $^3J = 3,25$ Hz,

χαρακτηριστική της αλληλεπίδρασης γειτονικών πρωτονίων σε ετεροαρωματικό σύστημα. Το πρωτόνιο της **7-θέσης** του ινδολίου δίνει σήμα στα **7,643 ppm** και συζεύγνυται με το πρωτόνιο της **6-θέσης** με $^3J = 9 \text{ Hz}$, ένδειξη ορθο-σύζευξης στον βενζολικό δακτύλιο. Τέλος, η κορυφή στα **3,876 ppm** επιβεβαιώνει την ολοκλήρωση της αντίδρασης, καθώς αντιστοιχεί στη **μεθυλομάδα του αζώτου** του ινδολικού δακτυλίου καθώς αυτή είναι **μη πολική** και διαθέτει **υψηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα**, η οποία αντισταθμίζει μερικώς την έλξη του αζώτου. Οι **δομές συντονισμού που απεικονίζονται παρακάτω** εξηγούν την αποπροστασία των πρωτονίων. Οι **δομές συντονισμού που απεικονίζονται στο Σχήμα 3** εξηγούν την αποπροστασία των πρωτονίων.



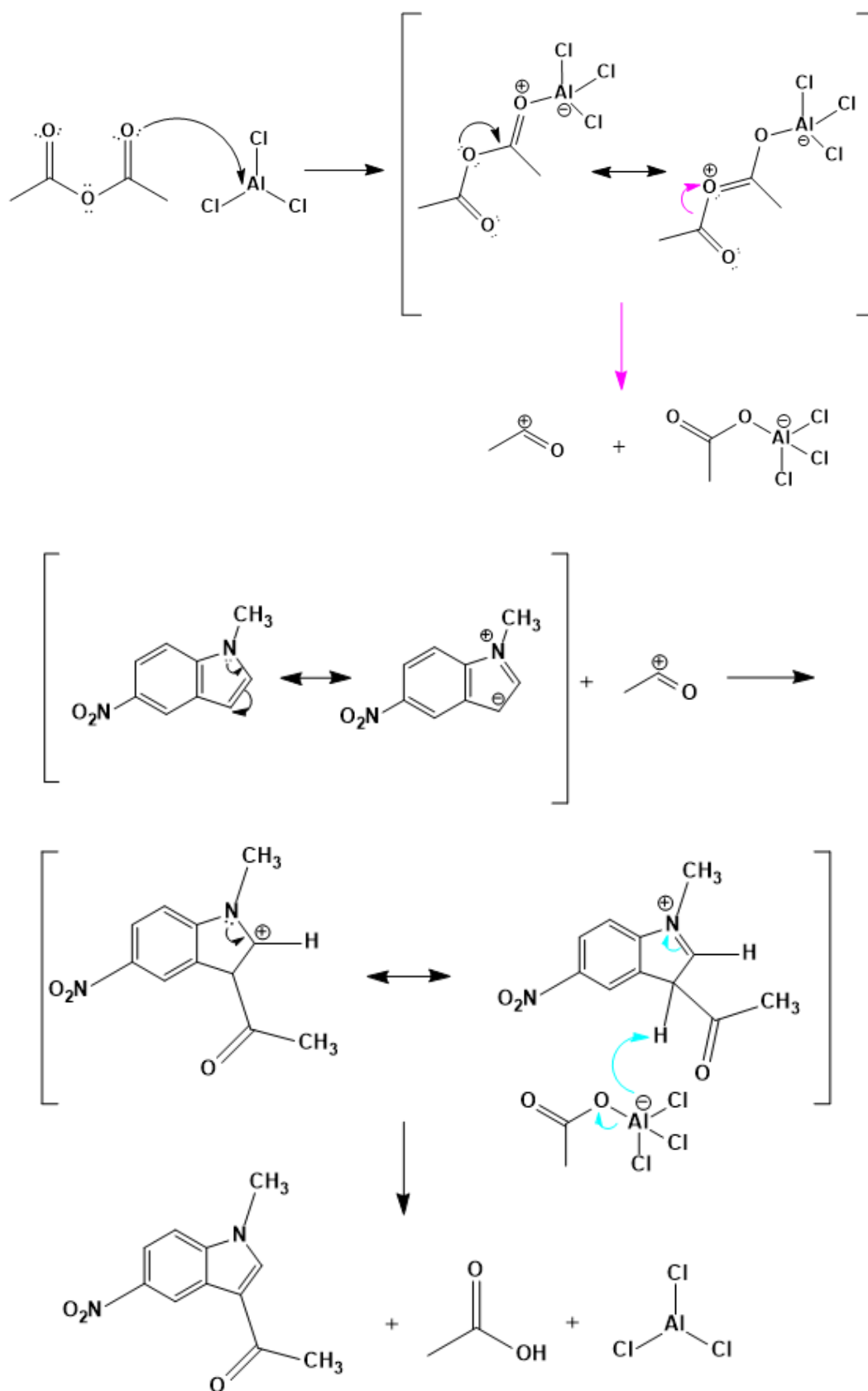
Σχήμα 3. Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία των πρωτονίων.

4.2 Αντίδραση 2: Ακυλίωση του 1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολίου

4.2.1 Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης

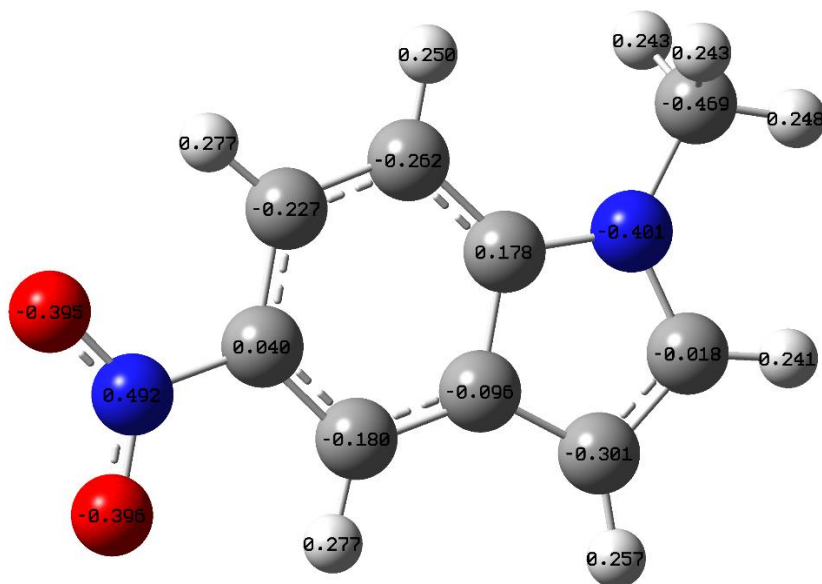
Η εισαγωγή της ακυλομάδας στον ινδολικό δακτύλιο επιτεύχθηκε μέσω ακυλίωσης Friedel–Crafts, χρησιμοποιώντας οξικό ανυδρίτη ως ακυλιωτικό παράγοντα και AlCl_3 ως καταλύτη Lewis, σε άνυδρο CH_2Cl_2 . Το AlCl_3 δρα ως **οξύ κατά Lewis**, ενώ το καρβονυλικό οξυγόνο του ανυδρίτη ως **βάση Lewis**. Το οξυγόνο προσφέρει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων και σχηματίζεται ο **δεσμός $\text{O} \rightarrow \text{Al}$** . Ο δεσμός αυτός **πολώνει** τον δεσμό $\text{C}=\text{O}$, καθιστώντας τον καρβονυλικό άνθρακα ισχυρότερο **ηλεκτρονιόφιλο**, και ταυτόχρονα **αποδυναμώνει** τον γειτονικό δεσμό **άνθρακα-οξυγόνο** ($\text{C}-\text{O}$) του ανυδρίτη. Ως αποτέλεσμα, επέρχεται **ετερολυτική διάσπαση** του ανυδρίτη και δημιουργία του **ιόντος ακυλίου**, που είναι το πραγματικό ηλεκτρονιόφιλο, το οποίο **σταθεροποιείται με συντονισμό** και, συνεπώς, **δεν υφίσταται αναδιατάξεις** τύπου καρβοκατιόντος.

Στη συνέχεια, ο αρωματικός δακτύλιος λειτουργεί ως πυρηνόφιλο: το π-σύστημα προσβάλλει το ιόν ακυλίου και σχηματίζεται το **σίγμα-σύμπλοκο (Wheland)**, βήμα το οποίο είναι **καθοριστικό του ρυθμού** (της *ταχύτητας*) της συνολικής **ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης (EAS)**. Η **αποπρωτονίωση** του σιγμά-συμπλόκου από τη βάση του μέσου ($\text{AcO}^- \cdot \text{AlCl}_3$) αποκαθιστά την αρωματικότητα και δίνει την **αρωματική κετόνη**, η οποία **παραμένει συμπλοκοποιημένη** με το AlCl_3 μέσω του καρβονυλικού οξυγόνου (σύμπλοκο κετόνης– AlCl_3). Η **τελική υδρόλυση** διασπά το σύμπλοκο και απελευθερώνει την κετόνη. Στο **Σχήμα 4** αποτυπώνεται ο **μηχανισμός** της αντίδρασης.



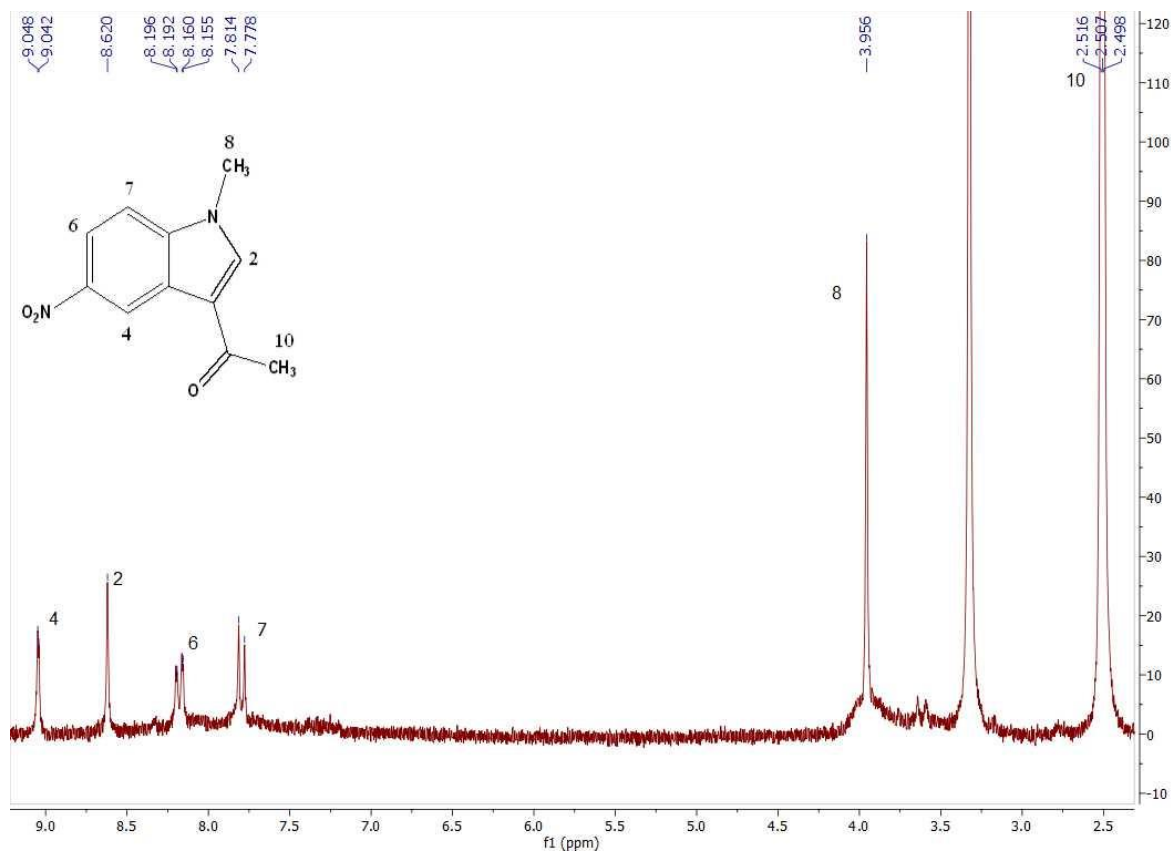
Σχήμα 4. Μηχανισμός της αντίδρασης ακυλίωσης κατά Friedel-Crafts.

Το γεγονός ότι η ακυλίωση θα πραγματοποιηθεί στη θέση 3 του ινδολικού δακτυλίου μπορεί να επιβεβαιωθεί και από την θεωρητική μελέτη της ένωσης με τη μέθοδο DFT (B3LYP functional). Η NBO ανάλυση των natural charges (φορτία που δείχνουν την κατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας μεταξύ των ατόμων και χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των πυρηνόφιλων και ηλεκτρονιόφιλων κέντρων) που πραγματοποιήθηκε δείχνει ότι το άτομο C-3 του πυρρολικού δακτυλίου είναι πολύ πιο ηλεκτροαρνητικό από το C-2. Έτσι, η ακυλίωση λαμβάνει χώρα αποκλειστικά στη θέση 3. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η δραστηρότητα της ένωσης καθορίζεται κυρίως από την κατανομή της π – ηλεκτρονιακής πυκνότητας του HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) τροχιακού. Δηλαδή, ανάλογα με το πως μοιράζεται η π – ηλεκτρονιακή πυκνότητα του HOMO στα διάφορα άτομα του μορίου, καθορίζεται σε ποιες θέσεις συγκεντρώνεται το μεγαλύτερο μέρος των π – ηλεκτρονίων που είναι διαθέσιμα για να δοθούν σ' ένα ηλεκτρονιόφιλο. Συνεπώς, οι θέσεις με τη μεγαλύτερη συμμετοχή στο HOMO αναμένεται να είναι και οι πιο πυρηνόφιλες και να ευνοούν τον σχηματισμό του αντίστοιχου σ – συμπλόκου κατά την ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Το **Σχήμα 5** που ακολουθεί αναπαριστά τα φορτία των ατόμων όπως υπολογίστηκαν με την NBO ανάλυση.



Σχήμα 5. Απεικόνιση των φορτίων των ατόμων με τη μέθοδο NBO (B3LYP functional).

4.2.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)αιθανόνης

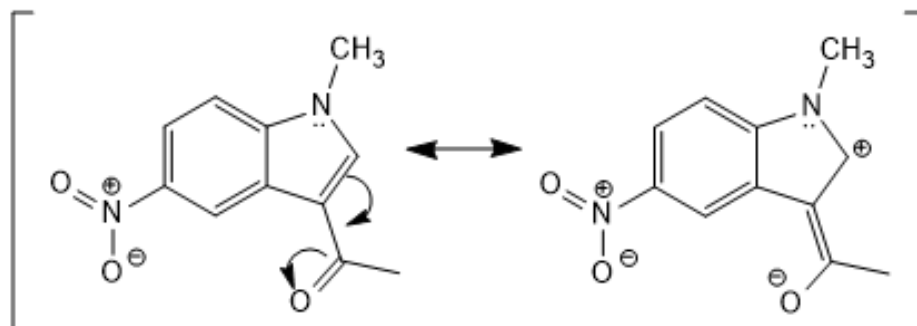


Σχήμα Φάσμα ¹H NMR (250 MHz) της 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)αιθανόνης σε διαλύτη DMSO-*d*₆.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 9.045 (d, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H), 8.620 (s, 1H), 8.176 (dd, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 1 Hz, 1H), 7.796 (d, ³*J* = 9.1 Hz, 1H), 3.956 (s, 3H), 2.498 (s, 3H).

Το **H-4** εμφανίζεται ως **διπλή κορυφή (d)** με ⁴*J* = 1,5 Hz στα **9,045**, μετατοπισμένο πέρα από το σύνηθες εύρος των αρωματικών πρωτονίων (6,5–8,5 ppm). Η ισχυρή αυτή αποθωράκιση αποδίδεται αφενός στην παρουσία του υποκαταστάτη **δέκτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας (-NO₂)** και αφετέρου σε **ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις** με το οξυγόνο της καρβονυλικής ομάδας και της νιτρομάδας. Τα πρωτόνια του **μεθυλίου της ακυλομάδας** που βρίσκεται στη 3-θέση του πυρρολικού δακτυλίου (αριθμός 10) δίνουν **απλή κορυφή (s)** στα **2,498 ppm** με ολοκλήρωση 3. Παρατηρείται ωστόσο, **μερική αλληλεπικάλυψη** με υπόλειμμα μη δευτεριωμένου διαλύτη, με αποτέλεσμα το σήμα να μην είναι πλήρως ευκρινές. Το **H-2** ανιχνεύεται στα **8,620 ppm** ως **μονή κορυφή (s)**, χωρίς σχάση, λόγω απουσίας γειτονικών πρωτονίων. Το **H-6** συντονίζεται στα **8,176 ppm** ως **διπλή διπλής (dd)** με ³*J* = 9 Hz και ⁴*J* = 1 Hz, ενώ το

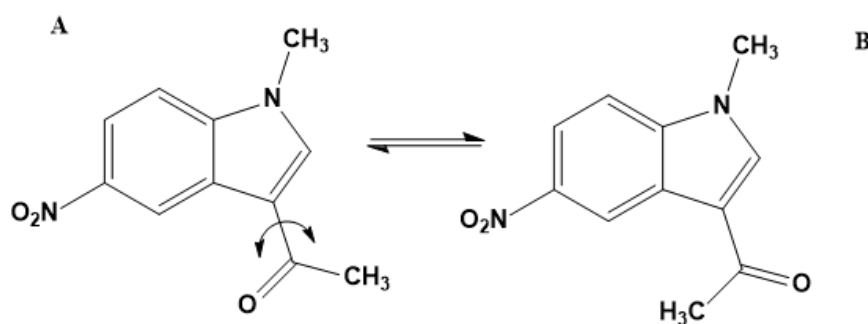
H-7 εμφανίζεται ως **διπλή (d)** με $^3J = 9,1 \text{ Hz}$. Οι δομές συντονισμού που παρατίθενται παρακάτω **Σχήμα 6** ερμηνεύουν την παρατηρούμενη **αποπροστασία του πρωτονίου στη 2-θέση**.



Σχήμα 6. Δομές συντονισμού που εξηγούν την αποπροστασία του πρωτονίου 2.

4.2.3 Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλ)αιθανόνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD /6-31+G(d)

Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη θεωρία λειτουργικού πυκνότητας DFT, χρησιμοποιώντας το υβριδικό συναρτησιακό B3LYP και ω B97XD και το σύνολο βάσης 6-31G+G(d). Για να προσδιοριστούν τα διαμορφωμερή της ένωσης στο διάλυμα, πραγματοποιήθηκαν περιστροφές γύρω από τους απλούς δεσμούς του μορίου, δημιουργώντας καινούργιες γεωμετρίες. Κάθε γεωμετρία βελτιστοποιήθηκε ώστε, να διατηρηθούν μόνο τα πραγματικά ελάχιστα. Οι συγκεκριμένες διαμορφώσεις συγκρίνονται με τα πειραματικά δεδομένα και, όπου απαιτείται, σταθμίζονται με βάση την κατανομή Boltzmann. Τα διαμορφωμερή της ένωσης είναι τα A και B που απεικονίζονται στο **Σχήμα 7** που ακολουθεί.



Σχήμα 7. Διαμορφωμερή της ένωσης της 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)αιθανόνης.

Στον **Πίνακα 1** συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τα δύο διαμορφωμερή του υπό μελέτη μορίου, όπως προέκυψαν από τις δύο υπολογιστικές μεθόδους **DFT/B3LYP/6-**

31G+d και **DFT/ ω B97XD/6-31G+d**. Για κάθε συνδυασμό διαμορφωμερούς – μεθόδου παρατίθενται η ελεύθερη ενέργεια G , η σχετική ΔG ως προς το σταθερότερο διαμορφωμερές της ίδιας μεθόδου, η διπολική ροπή μ και το ποσοστό τους στο διάλυμα. Οι πληθυσμοί υπολογίστηκαν από τις τιμές ΔG με κατανομή Boltzmann στη θερμοκρασία της μελέτης (298 K), επιτρέποντας την αξιολόγηση της σχετικής σταθερότητας των διαμορφωμερών και τον έλεγχο της συνέπειας μεταξύ των μεθόδων (ταύτιση ή απόκλιση στη σειρά σταθερότητας).

Πίνακας 1. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-760,159950	0	10,847	84,7
B	B3LYP	-760,158337	1,012	6,673	15,3
A	ωB97XD	-759,903867	0	10,698	56
B	ωB97XD	-759,903639	0,143	6,456	44

* ΔG : ως προς το πιο σταθερό διαμορφωμερές της ίδιας μεθόδου.

Οι γεωμετρίες όλων των δομών βελτιστοποιήθηκαν και επαληθεύτηκαν με τον υπολογισμό των συχνοτήτων (καμία φανταστική συχνότητα), ώστε να διασφαλιστεί ότι αντιστοιχούν σε **πραγματικά ελάχιστα**. Η δομή **A** εμφανίζει χαμηλότερη (πιο αρνητική) τιμή G από τη **B**, οπότε αντιστοιχεί στο **σταθερότερο διαμορφωμερές**. Με τη μέθοδο **DFT/B3LYP/6-31G+d** η σχετική διαφορά είναι $\Delta G = 1.01 \frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$ (298 K). Η διαφορά αυτή μεταφράζεται, μέσω της κατανομής Boltzmann,

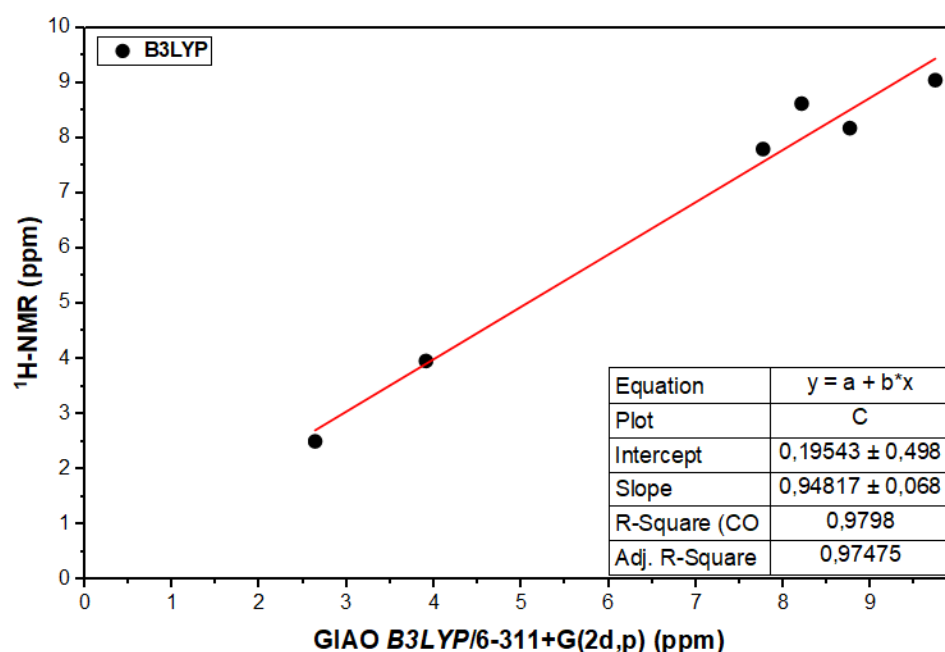
$$p_i = \frac{e^{-\Delta G_i/RT}}{\sum_j e^{-\Delta G_j/RT}}$$

με $R = 0,001987 \frac{\text{kcal}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$ ($T = 298 \text{ K}$) σε πληθυσμούς **A: 84,7%** και **B: 15,3%**.

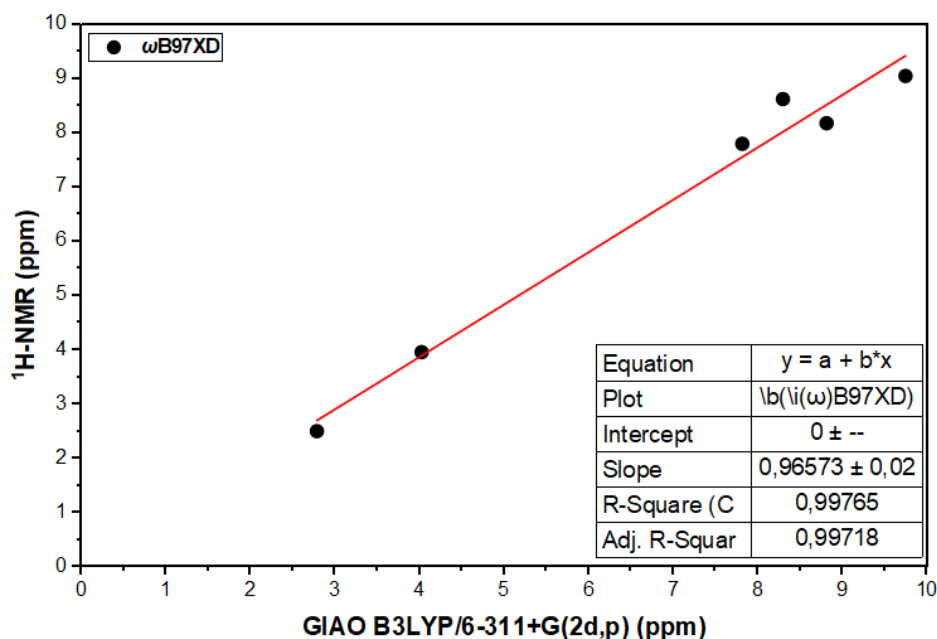
Συνεπώς, στο διάλυμα αναμένεται να επικρατεί η **A** και να καθορίζει τα πειραματικά δεδομένα.

Για την άμεση σύγκριση με NMR, οι θεωρητικές χημικές μετατοπίσεις σταθμίστηκαν με τους παραπάνω πληθυσμούς Boltzmann (σταθμισμένος μέσος όρος). Εφαρμόστηκε μια μικρή ολική διόρθωση (π.χ. 0,09 ppm για το B3LYP και 0,05 ppm για το ω B97XD), ώστε να αντισταθμιστεί η συστηματική απόκλιση ως προς την ένωση αναφοράς, χωρίς να επηρεάζεται η σειρά σταθερότητας των δομών. Οι τιμές αυτές προκύπτουν από το σήμα απορρόφησης του SiMe₄ (TMS) υπολογισμένου με την ίδια μέθοδο. Από τα διαγράμματα των θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων έναντι των πειραματικών όπως απεικονίζονται στο **Σχήμα 8** και **Σχήμα 9** φαίνεται να υπάρχει πολύ καλή συμφωνία θεωρητικών–πειραματικών τιμών.

Η συνολική εικόνα συγκλίνει ότι η Α είναι η κυρίαρχη δομή στο διάλυμα στους 298 K.



Σχήμα 8. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ¹H (δ, ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO₃, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).

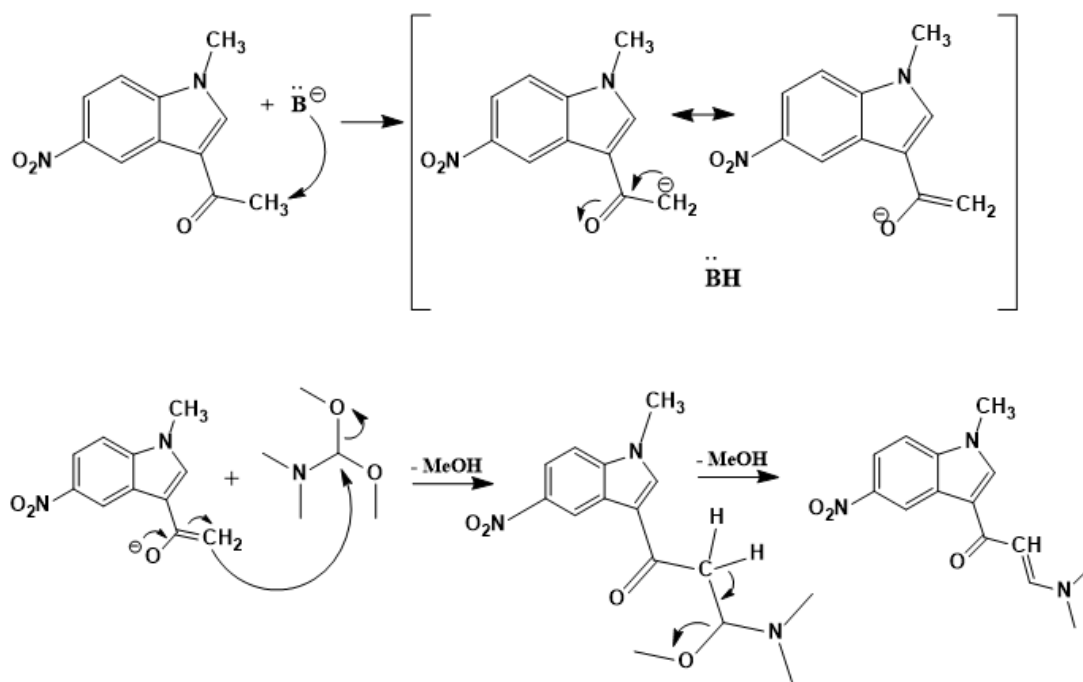


Σχήμα 9. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).

4.3 Αντίδραση 3: Σχηματισμός της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης

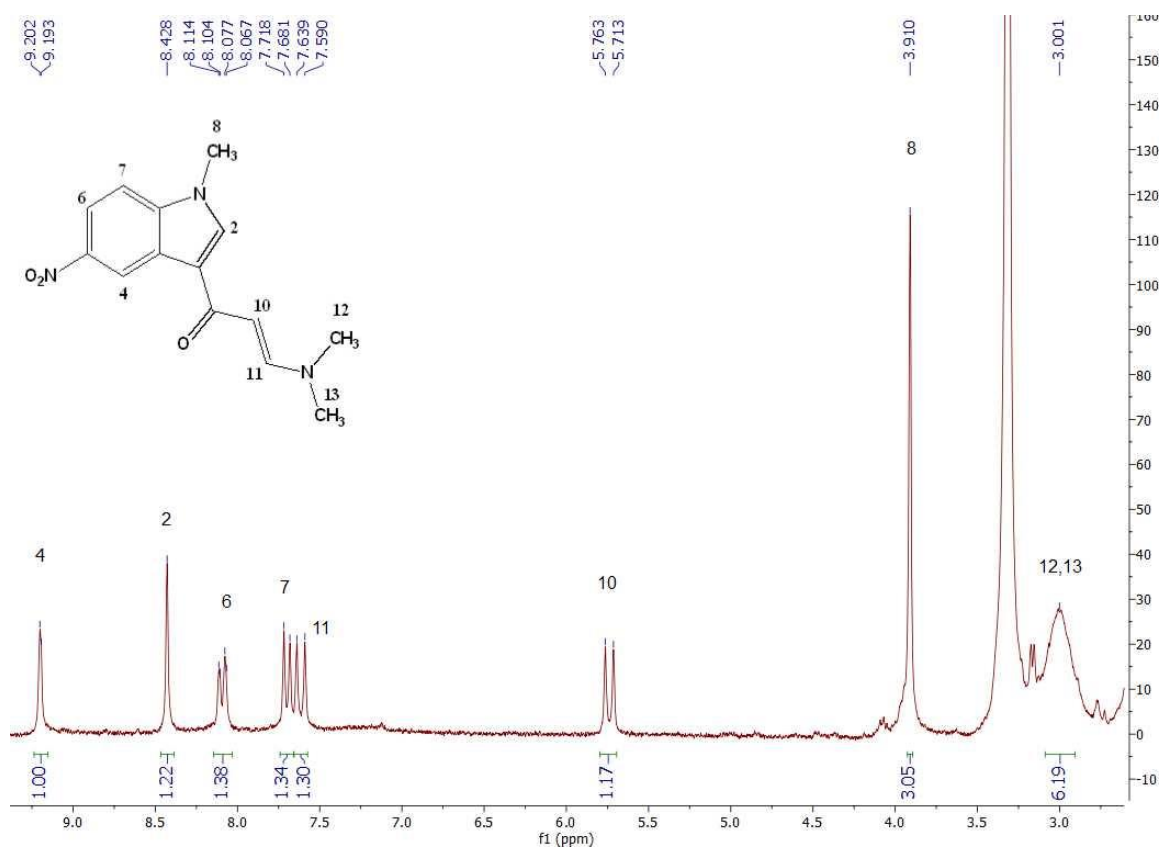
4.3.1 Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης

Παρότι η φαινομενικά αντιδρώσα μορφή της 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)αιθανόνης είναι η καρβονυλική, στην πράξη αντιδρά από το **ενολικό ταυτομερές** έστω και σε χαμηλή αναλογία. Στην ενολική μορφή, ο άνθρακας του διπλού δεσμού εμφανίζει **πυρηνόφιλο χαρακτήρα** και **προσβάλλει** τον **ηλεκτρονιόφιλο** κεντρικό άνθρακα της διμεθυλοακετάλης του DMF (DMF–DMA), που φέρει δύο μεθοξυομάδες. Κατά τη σύζευξη, μία μεθοξυομάδα **αποχωρεί** σχηματίζοντας **μεθανόλη** και το αντίστοιχο ενδιάμεσο. Εν συνεχεία, με **αποβολή δεύτερου μορίου μεθανόλης**, το ενδιάμεσο **αναδιευθετείται** και καταλήγει στο τελικό προϊόν, την **εναμινόνη**.



Σχήμα 10. Μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού της εναμινόνης.

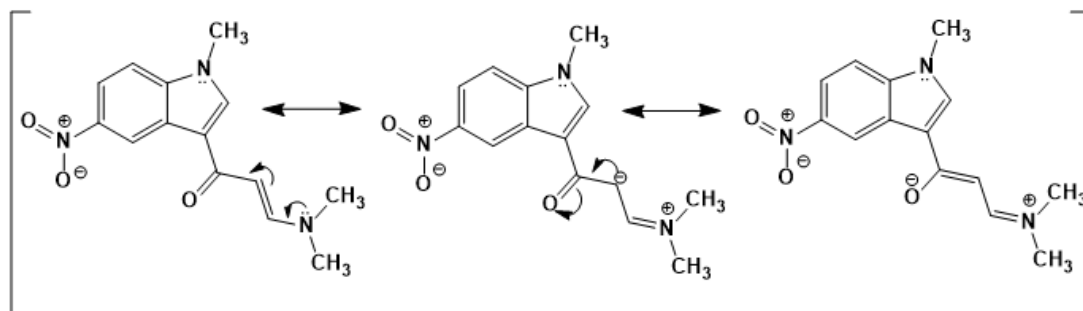
4.3.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1H-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης



Σχήμα 11. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO- d_6 .

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.198 (d, $^4J = 2.38$ Hz, 1H), 8.428 (s, 1H), 8.091 (dd, $^3J = 9.25$, $^4J = 2.38$ Hz, 1H), 7.700 (d, $^3J = 9.25$ Hz, 1H), 7.615 (d, $^3J = 12.38$ Hz, 1H), 5.738 (d, $^3J = 12.38$ Hz, 1H), 3.910 (s, 3H), 3.001 (s, 6H).

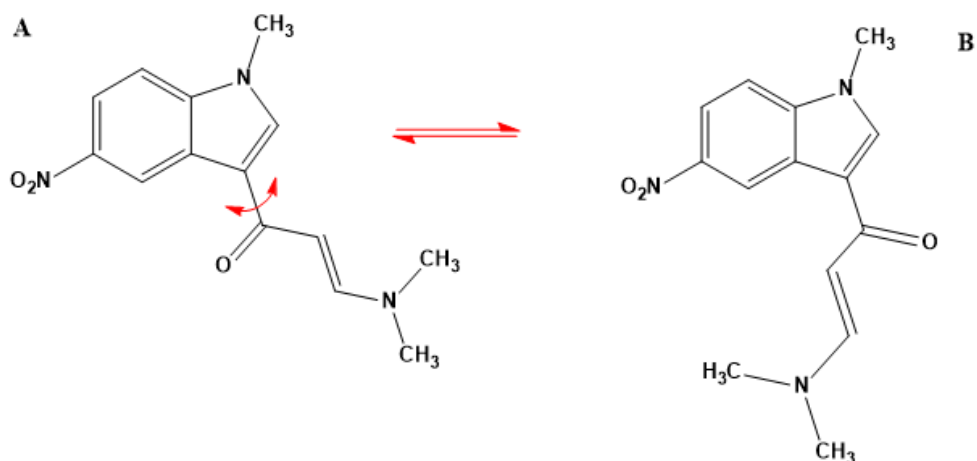
Από το ^1H NMR φάσμα φαίνεται ότι το πιο αποθωρακισμένο πρωτόνιο είναι το H-4, το οποίο εμφανίζεται ως διπλή (d) με $^4J = 2,38$ Hz, λόγω σύζευξης με το H-6. Το H-6 δίνει διπλή διπλής (dd) στα 8,091 ppm, με $^4J(\text{H-6,H-4}) = 2,38$ Hz και $^3J(\text{H-6,H-7}) = 9,25$ Hz. Το H-2 εμφανίζεται ως μονή κορυφή (s) στα 8,428 ppm, χωρίς σχάση, ενώ το H-7 δίνει σήμα στα 7,700 ppm. Τα ολεφινικά πρωτόνια H-10 και H-11 εμφανίζονται ως διπλές (d) στα 5,738 και 7,615 ppm αντίστοιχα, με $^3J = 12,38$ Hz. Το μεθύλιο του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου (N-CH₃) δίνει απλή κορυφή (s) στα 3,910 ppm, ενώ οι δύο μεθυλομάδες του αζώτου της εναμίνης (N,N-(CH₃)₂) εμφανίζονται ως ευρεία απλή (br s) στα 3,001 ppm με ολοκλήρωση 6. Οι ακόλουθες δομές συντονισμού ερμηνεύουν την αποπροστασία των ολεφινικών πρωτονίων και δικαιολογούν γιατί το H-11 εμφανίζεται πιο αποθωρακισμένο από το H-10.



Σχήμα 12. Δομές που εξηγούν την αποπροστασία των ολεφινικών πρωτονίων.

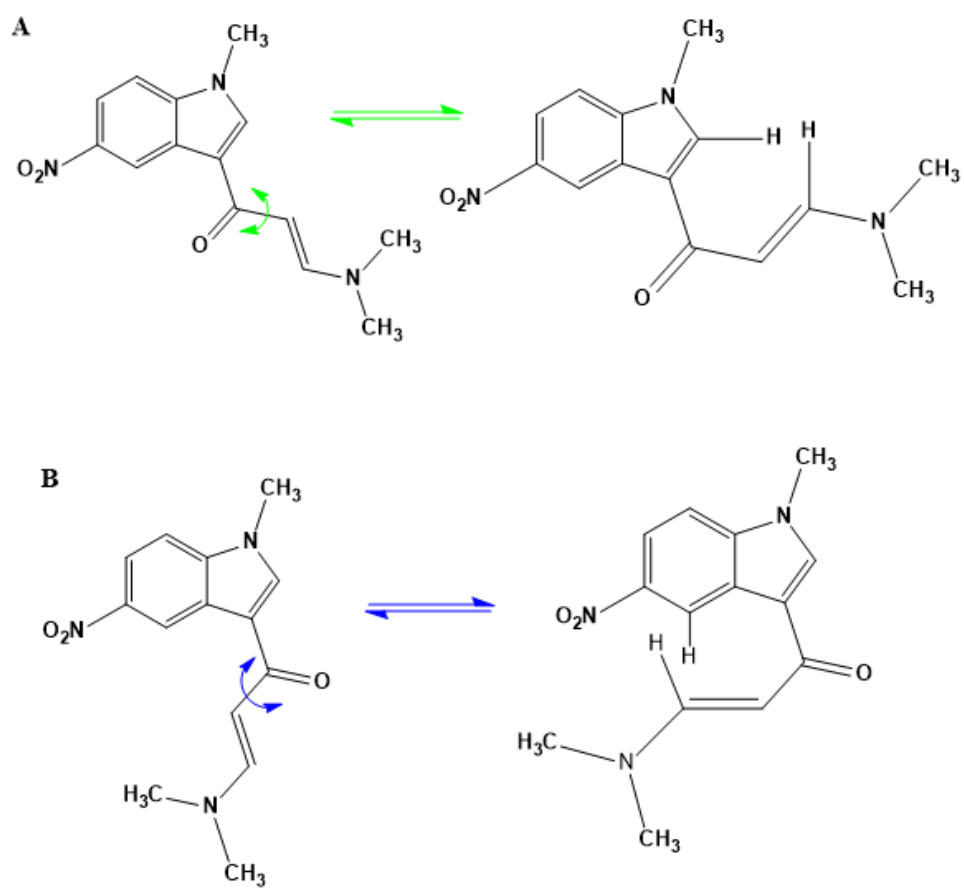
4.3.3 Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD /6-31+G(d)

Τα διαμορφωμερή της ένωσης φαίνονται στο **Σχήμα 12** και είναι τα A και B.

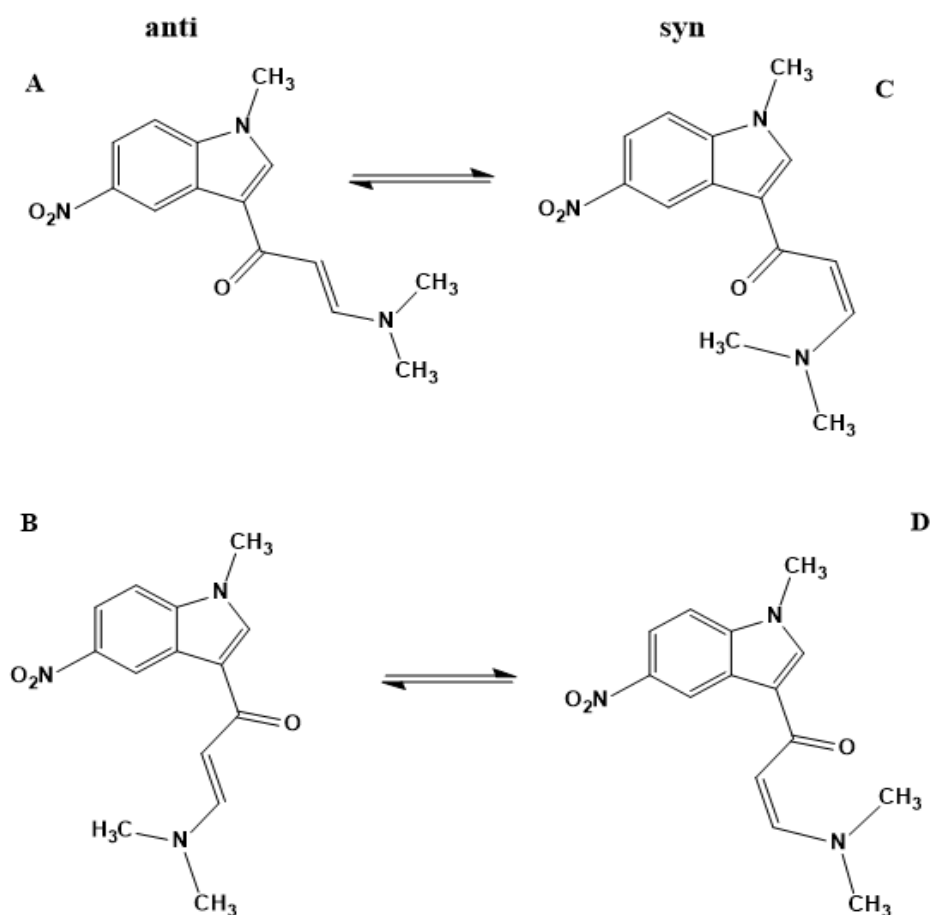


Σχήμα 12. Διαμορφωμερή της ένωσης 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

Αν και η γεωμετρία του μορίου επιτρέπει περιστροφή γύρω από τον δεσμό C–C που απεικονίζεται στο **Σχήμα 13**, οι διαμορφώσεις που προκύπτουν είναι ενεργειακά ασταθείς και εκτιμάται ότι παρουσιάζουν αμελητέο πληθυσμό στο διάλυμα. Για τον λόγο αυτό, γίνεται μόνο συνοπτική αναφορά σε αυτές. Αντίστοιχα, εξετάστηκαν και οι *syn* διαμορφώσεις του **Σχήματος 14**, οι οποίες συμπεριλήφθηκαν στους υπολογισμούς αποκλειστικά και μόνο για την επιβεβαίωση του παραπάνω συμπεράσματος και δεν μεταβάλλουν ουσιαστικά το τελικό θεωρητικό προφίλ στο διάλυμα.



Σχήμα 13. Ασταθείς διαμορφώσεις της ένωσης 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης με περιστροφή του δεσμού C–C.



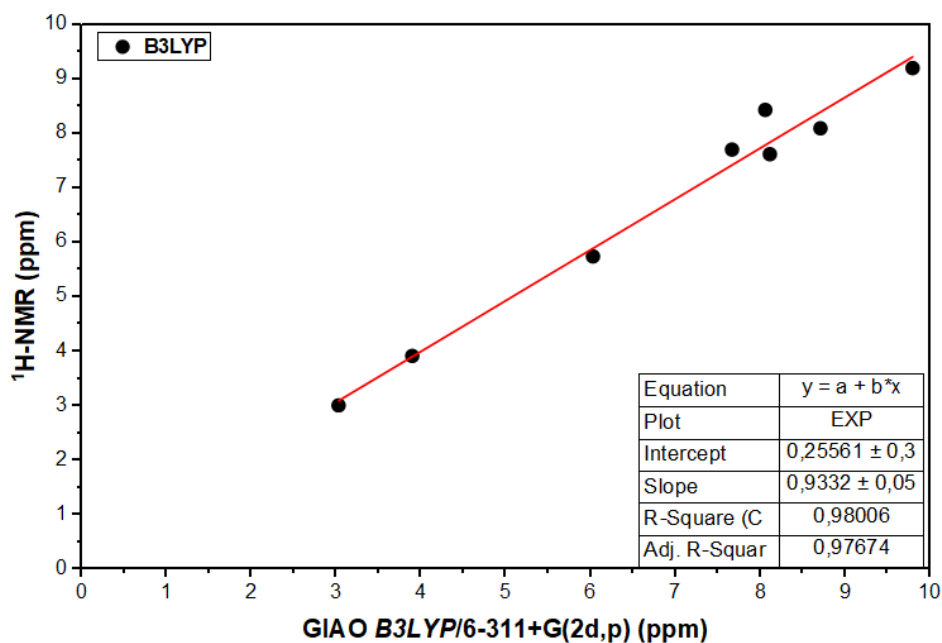
Σχήμα 14. Διαμορφώσεις anti (A και B) και syn (C και D) της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

Με βάση τα αποτελέσματα των θεωρητικών υπολογισμών που απεικονίζονται παρακάτω, οι διαμορφώσεις C και D φαίνεται ότι έχουν πρακτικά μηδενικό πληθυσμό στο διάλυμα. Συνεπώς, η εναμινόνη αναμένεται να απαντάται στο διάλυμα σχεδόν αποκλειστικά στην **anti** διαμόρφωση, η οποία είναι ενεργειακά ευνοϊκότερη. Στον **Πίνακα 2** συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τα διαμορφωμερή του υπό μελέτη μορίου, όπως προέκυψαν από τις μεθόδους **DFT/B3LYP/6-31+G(d)** και **DFT/ωB97XD/6-31+G(d)**. Για κάθε συνδυασμό διαμορφωμερούς–μεθόδου δίνονται η ελεύθερη ενέργεια G, η σχετική ΔG, η διπολική ροπή μ και ο πληθυσμός Boltzmann στο διάλυμα (298 K), επιτρέποντας τη σύγκριση της σχετικής σταθερότητας των διαμορφωμερών και της συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων.

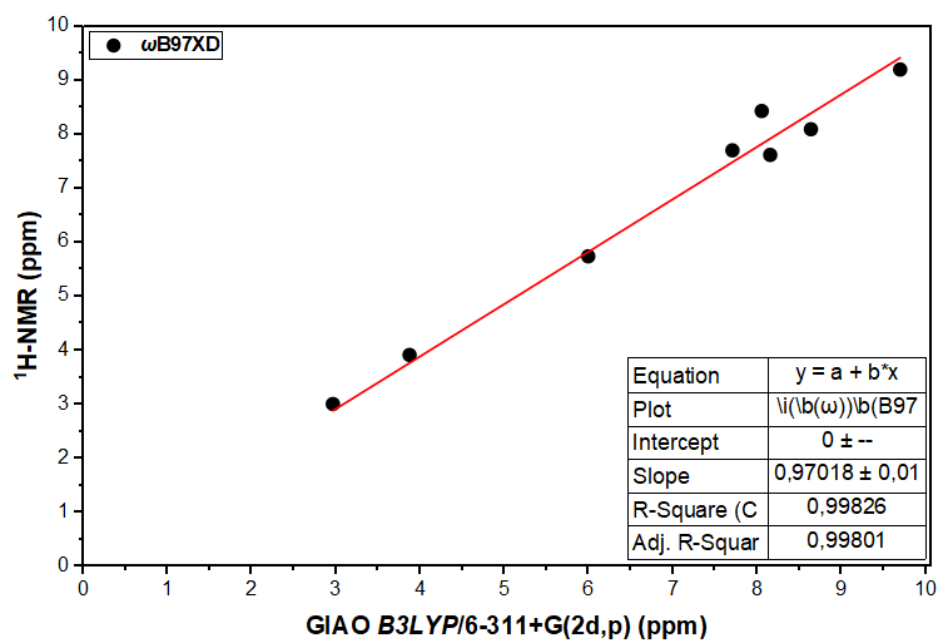
Πίνακας 2. Χρησιμοποιούμενες μεθόδους και οι αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-932,158100	0	12,444	55,51
B	B3LYP	-932,157891	0,131	3,839	44,49
C	B3LYP	-932,148774	5,852	10,588	0,00285
D	B3LYP	-932,1486555	5,938	5,052	0,00246
A	ωB97XD	-931,844538	0,430	12,126	32,62
B	ωB97XD	-931,845223	0	3,622	67,38
C	ωB97XD	-931,834604	6,664	10,380	0,0009
D	ωB97XD	-931,836110	5,718	5,012	0,0043

Για την αποτίμηση και ερμηνεία των φασμάτων της υπό μελέτη ένωσης, πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί φασμάτων NMR με τη μέθοδο GIAO (DFT, B3LYP/6-311+G(2d,p)) σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, χρησιμοποιώντας γεωμετρίες βελτιστοποιημένες με λειτουργικά B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD/6-31+G(d). Ελήφθησαν υπόψη όλα τα διαμορφωμερή και τα syn και anti και οι θεωρητικές χημικές μετατοπίσεις σταθμίστηκαν βάσει της κατανομής Boltzmann. Τα διαγράμματα συσχέτισης μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων παρουσιάζονται στα **Σχήματα 15** και **16**.

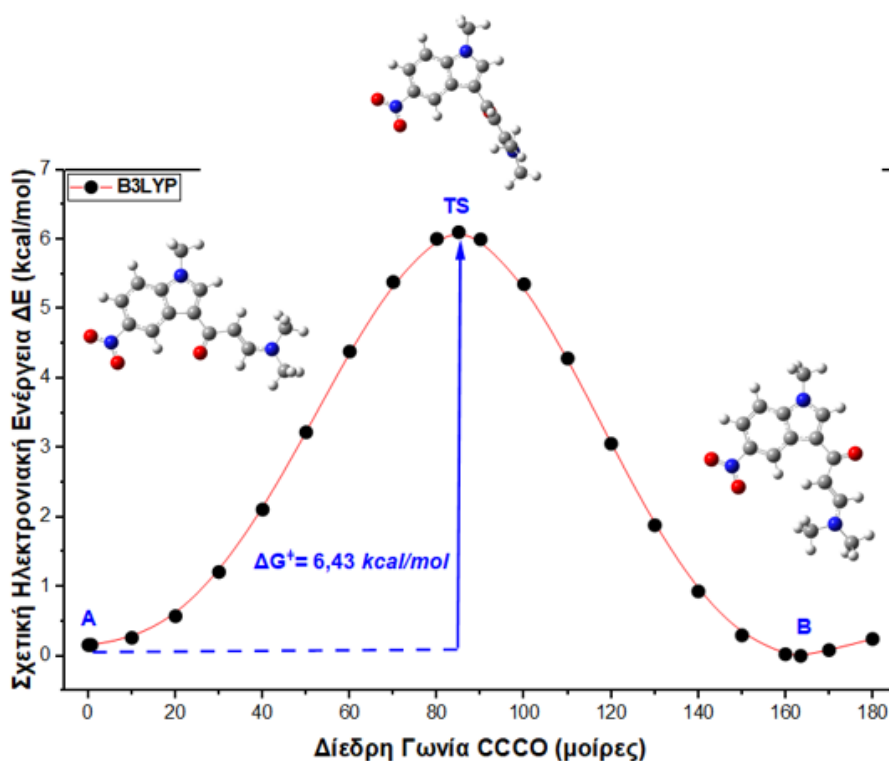


Σχήμα 15. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).

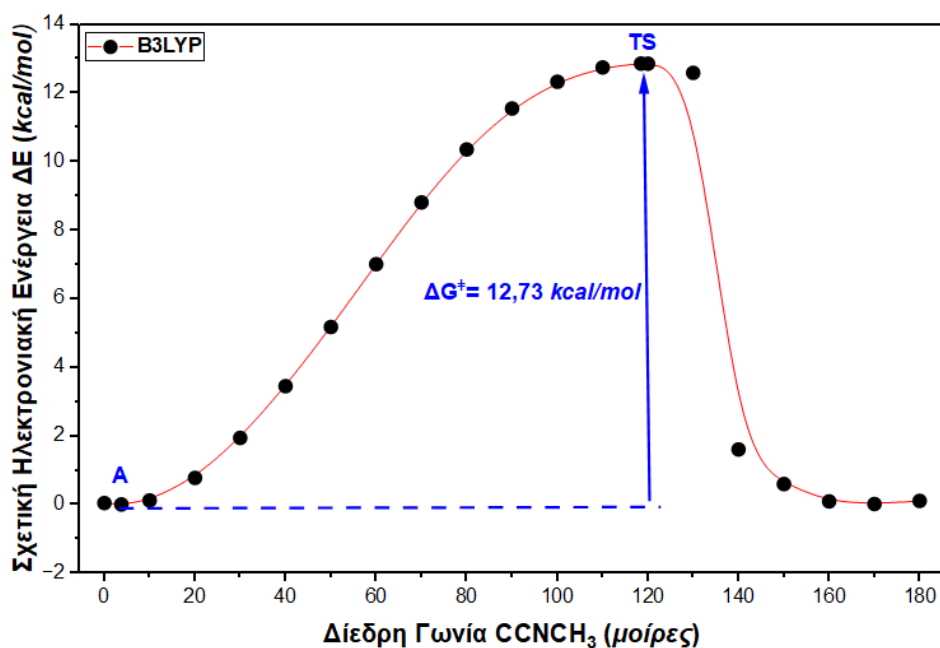


Σχήμα 16. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).

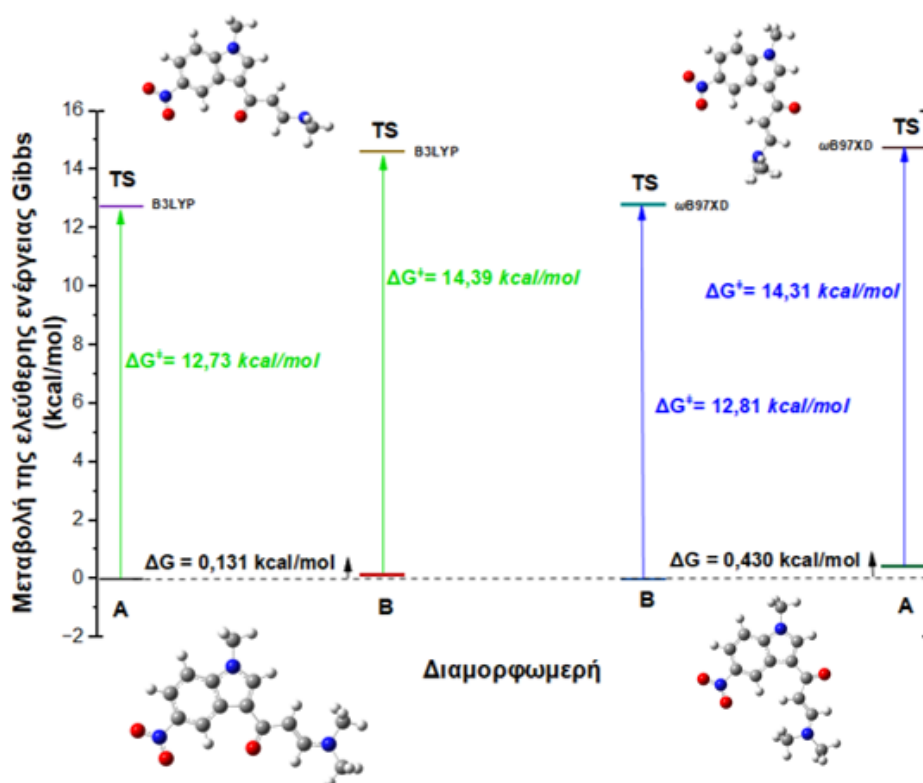
Πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ενεργειακού φράγματος περιστροφής του δεσμού C-C-O της εναμινόνης, εξετάζοντας τη μετάβαση από το διαμορφωμερές A στο διαμορφωμερές B, καθώς και του ενεργειακού φράγματος περιστροφής του δεσμού C-C-N-CH₃. Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ότι και οι **δύο δεσμοί περιστρέφονται γρήγορα** στη θερμοκρασία καταγραφής του φάσματος, με αποτέλεσμα οι χημικά μη ισοδύναμες θέσεις των πρωτονίων να εξισώνονται στην κλίμακα χρόνου του ¹H NMR. Τα ενεργειακά φράγματα περιστροφής είναι 6,43 kcal/mol και 12,73 kcal/mol για τους δύο δεσμούς αντίστοιχα. Έτσι, δικαιολογείται η παρατήρηση ενός και μόνο σήματος πρωτονίων στο φάσμα NMR, καθώς τα πρωτόνια αντιλαμβάνονται ένα μόνο χημικό περιβάλλον. Τα **Σχήματα 17** και **18** απεικονίζουν την περιστροφή και το ενεργειακό φράγμα των δεσμών C-C-C-O και C-C-N-CH₃ της εναμινόνης αντίστοιχα.



Σχήμα 17. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη διεδρη γωνία CCCO (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο B3LYP).



Σχήμα 18. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη δίοδρη γωνία CCNCH_3 για το διαμορφωμερές A (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο B3LYP).



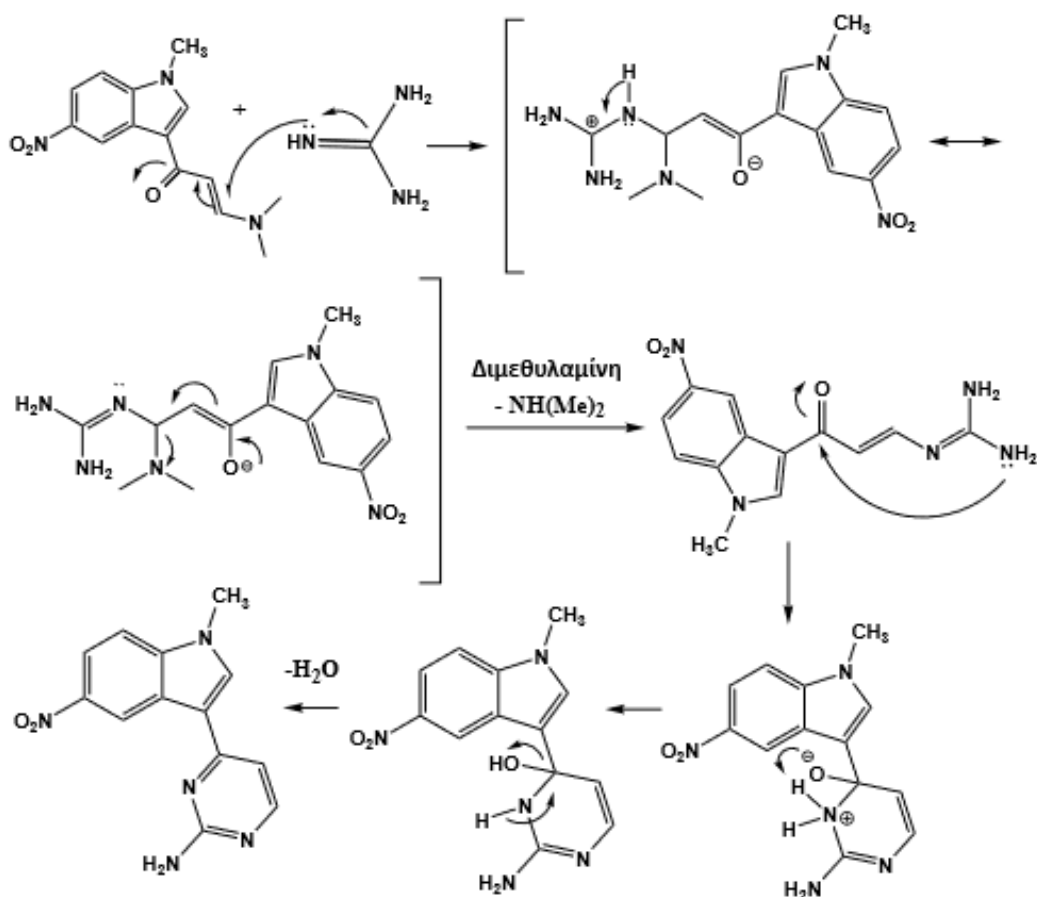
Σχήμα 19. Διάγραμμα που απεικονίζει τα διαμορφωμερή σε συνάρτηση με την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, με τις μεθόδους B3LYP/6-31G+d (πράσινα βέλη) και $\omega\text{B97XD}/6-31\text{G}+\text{d}$ (μπλε βέλη).

4.4 Αντίδραση 4: Σχηματισμός της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης

4.4.1 Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης

Η μετατροπή εκκινεί με **αζα-Michael προσθήκη**: το **νουκλεόφιλο άζωτο** της γουανιδίνης **προσβάλλει** τον **β-άνθρακα** της εναμινόνης (β ως προς το καρβονύλιο). Το ενδιάμεσο που προκύπτει **αποκαθιστά** τη συζυγία του C=C-C=O μέσω **αποβολής διμεθυλαμίνης**, δίνοντας προϊόν **προσθήκης-αποβολής** (aza-Michael/E1cb).

Στο επόμενο στάδιο, μία από τις **πρωτοταγείς αμινομάδες** της προσδεδεμένης πλέον γουανιδίνης, **προσβάλλει ενδομοριακά** τον **καρβονυλικό άνθρακα**, σχηματίζοντας ενδιάμεσο **ημισιμενικό/ιμιδικό** τύπου. Με διαδοχικές **μεταφορές πρωτονίων** και **κυκλοποίηση**, προκύπτει ο **πυριμιδινικός σκελετός**, ο οποίος **ολοκληρώνεται** με **αφυδάτωση** (αυθόρμητη αποβολή H₂O) ώστε να δημιουργηθεί η **τελική αμινοπυριμιδίνη**.

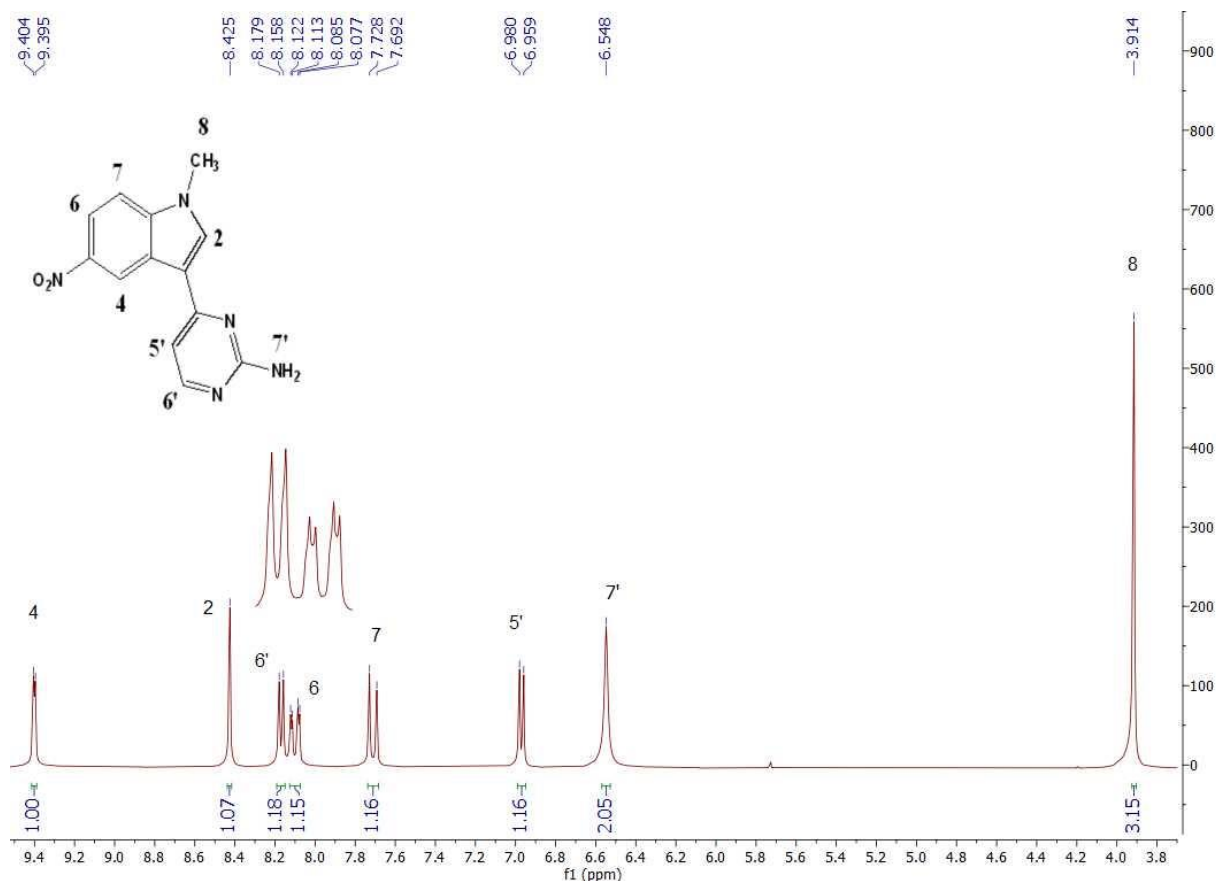


Σχήμα 20. Μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού πυριμιδινικού δακτυλίου.

4.4.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης

Το κυκλοποιημένο προϊόν αποτελεί συνθετικό ανάλογο των **μεριδιανινών**, με εκτεταμένο αρωματικό/συζυγιακό σύστημα, στο οποίο σχηματίζεται δακτύλιος **2-αμινοπυριμιδίνης**. Στη θέση 4 του δακτυλίου αυτού υπάρχει δεσμός προς τη θέση 3 του ινδολικού υποστρώματος. Λόγω του **επαγωγικού φαινομένου**, τα άζωτα της πυριμιδίνης **έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα** από τον πυριμιδινικό δακτύλιο, καθιστώντας τον ηλεκτρονικά «φτωχότερο». Ως συνέπεια, τα δύο πυριμιδινικά πρωτόνια—ιδίως εκείνο που βρίσκεται **γειτονικά** στο άζωτο—εμφανίζονται **αποπροστατευμένα** (σήματα σε υψηλές τιμές ppm), όπως και τα πρωτόνια της **αμινοομάδας**.

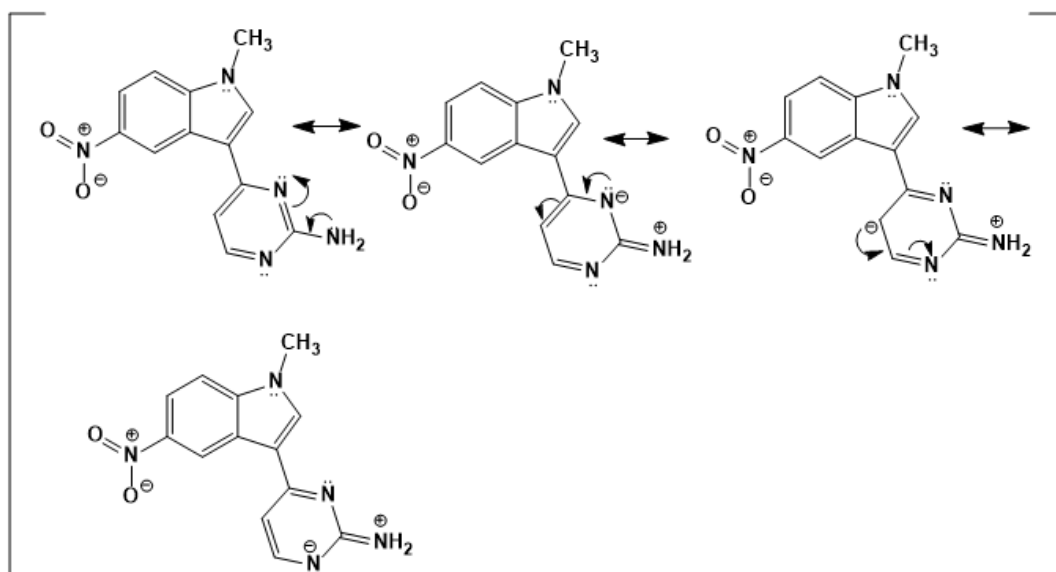
Παρά ταύτα, αν και θα αναμενόταν τα πυριμιδινικά πρωτόνια να είναι τα πλέον αποθωρακισμένα, τα δεδομένα δείχνουν ότι, συχνά, **μεγαλύτερη αποπροστασία** εμφανίζουν τα **ινδολικά H-2 και H-4**. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει **ενδομοριακές χωρικές αλληλεπιδράσεις/ανισοτροπικές επιδράσεις** μεταξύ αυτών των πρωτονίων και του πυριμιδινικού δακτυλίου, οι οποίες ευνοούνται από την **ελεύθερη περιστροφή** γύρω από τον δεσμό που ενώνει το ινδόλιο με την πυριμιδίνη και τη διαμόρφωση που φέρνει τα κέντρα αυτά σε κοντινή απόσταση. Έτσι, εξηγείται η παρατηρούμενη μετατόπιση τους σε **ακόμη υψηλότερες** τιμές ppm.



Σχήμα 21. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλ)πυριμιδιν-2-αμίνης σε διαλύτη $\text{DMSO}-d_6$.

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 9.400 (d, $^4J = 2.25$ Hz, 1H), 8.425 (s, 1H), 8.169 (d, $^3J = 5.25$ Hz, 1H), 8.099 (dd, $^3J = 9.13$, $^4J = 2.25$ Hz, 1H), 7.710 (d, $^3J = 9.13$ Hz, 1H), 6.970 (d, $^3J = 5.25$ Hz, 1H), 3.914 (s, 3H), 6.548 (s, 2H).

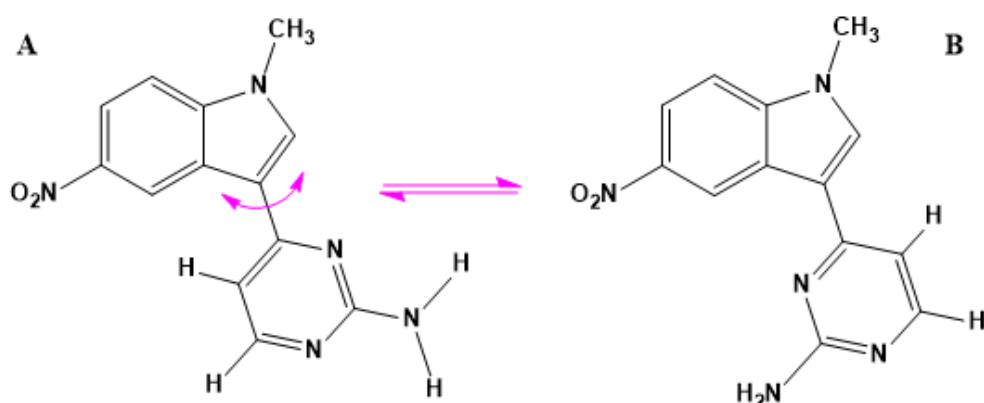
Από το φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 21) προκύπτει ότι το πλέον αποθωρακισμένο πρωτόνιο είναι το **H-4**, το οποίο εμφανίζεται στα **9,400 ppm** ως **διπλή** (d, $^4J = 2,25$ Hz) λόγω σύζευξης με το **H-6**. Το **H-6** καταγράφεται στα **8,099 ppm** ως **διπλή διπλής** (dd, $^3J = 9,13$ Hz, $^4J = 2,25$ Hz) εξαιτίας σύζευξης με τα **H-7** και **H-4** αντίστοιχα. Το **H-7** εμφανίζεται στα **7,710 ppm** ως **διπλή** (d, $^3J = 9,13$ Hz). Το **H-2** δίνει **απλή** (s) στα **8,425 ppm**. Τα πυριμιδινικά πρωτόνια **H-5'** και **H-6'** εμφανίζονται ως **διπλές** (d) στα **6,970** και **8,169 ppm** αντίστοιχα ($^3J = 5,25$ Hz). Σημειώνεται **μερική επικάλυψη** του **H-6'** με το **H-6** στην περιοχή **~8,20 ppm**. Η **αμινοομάδα** της πυριμιδίνης καταγράφεται ως **ευρεία μονήρης** (br s) στα **6,548 ppm** με ολοκλήρωση **2H** (NH_2-2'), ενώ το μεθύλιο του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου δίνει **απλή κορυφή** (s) στα **3,914 ppm** με ολοκλήρωση **3H**. Όπως φαίνεται παρακάτω, οι δομές συντονισμού δείχνουν την αποπροστασία που υφίστανται τα πρωτόνια του πυριμιδινικού δακτυλίου.



Σχήμα 22. Δομές συντονισμού που δείχνουν την αποπροστασία των πυριμιδινικών πρωτονίων.

4.4.3 Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 4-(1-μεθυλο-5 νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλ)πυριμιδιν-2-αμίνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD /6-31+G(d)

Τα πιθανά διαμορφωμερή που μπορεί να λάβει η ένωση στο διάλυμα είναι αυτά που απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα (**Σχήμα 23**) με περιστροφή του απλού δεσμού που συνδέει τον άνθρακα 3 του πυρρολικού δακτυλίου με τον άνθρακα 4' του πυριμιδινικού δακτυλίου.



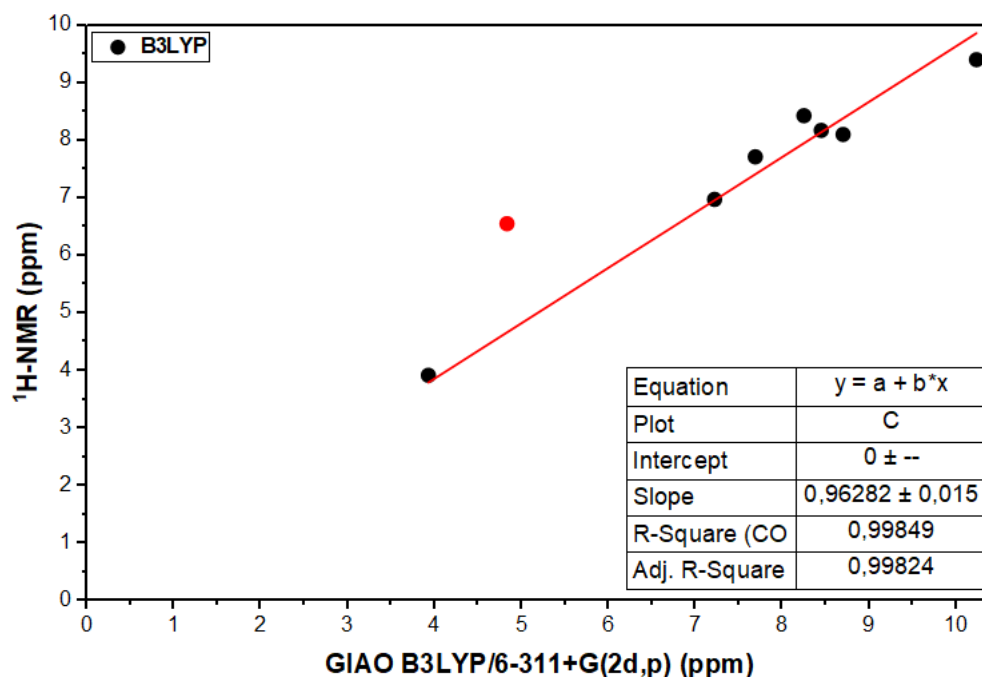
Σχήμα 23. Διαμορφωμερή της ένωσης 4-(1-μεθυλο-5 νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης.

Στον **Πίνακα 3** συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τα δύο διαμορφωμερή του υπό μελέτη μορίου, όπως προέκυψαν από τις μεθόδους **DFT/B3LYP/6-31+G(d)** και **DFT/ ω B97XD/6-31+G(d)**. Για κάθε συνδυασμό διαμορφωμερούς–μεθόδου δίνονται η ελεύθερη ενέργεια G , η σχετική ΔG , η διπολική ροπή μ και ο πληθυσμός Boltzmann στο διάλυμα (298 K), επιτρέποντας τη σύγκριση της σχετικής σταθερότητας των διαμορφωμερών και της συμφωνίας μεταξύ των δύο μεθόδων.

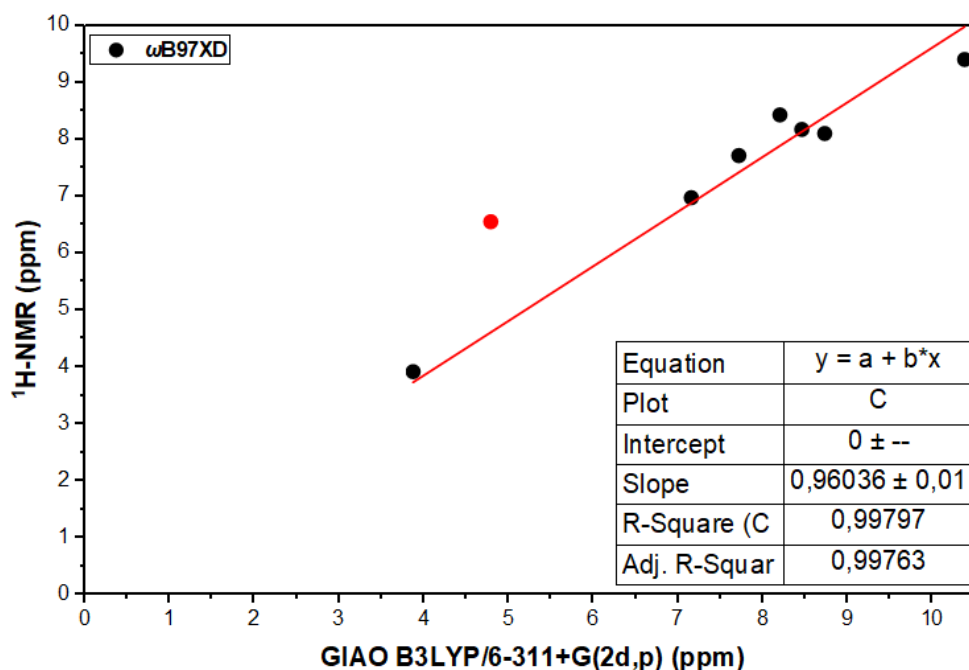
Πίνακας 3. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και οι αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-925,991888	0	8,034	17,36
B	B3LYP	-925,993361	0,924	8,300	82,64
A	ωB97XD	-925,678791	0	7,707	10,5
B	ωB97XD	-925,680819	1,273	8,129	89,5

Από τα δεδομένα του **Πίνακα 3** προκύπτει ότι και με τις δύο μεθόδους το διαμορφωμερές **B** είναι ενεργειακά σταθερότερο από το **A**. Η συμφωνία των υπολογισμένων ποσοστών πληθυσμού μεταξύ των μεθόδων B3LYP και ω B97XD είναι ικανοποιητική, ενώ το σταθερότερο διαμορφωμερές εμφανίζει και ελαφρώς μεγαλύτερη διπολική ροπή άρα είναι πιο πολικό. Για την αποτίμηση και ερμηνεία των φασμάτων της υπό μελέτη ένωσης, πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί φασμάτων NMR με τη μέθοδο GIAO (DFT, B3LYP/6-311+G(2d,p)) σε μέσο επιδιάλυσης IefPCM = DMSO, χρησιμοποιώντας γεωμετρίες βελτιστοποιημένες με λειτουργικά B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD/6-31+G(d), όπως απεικονίζεται στα **Σχήματα 24** και **25**.



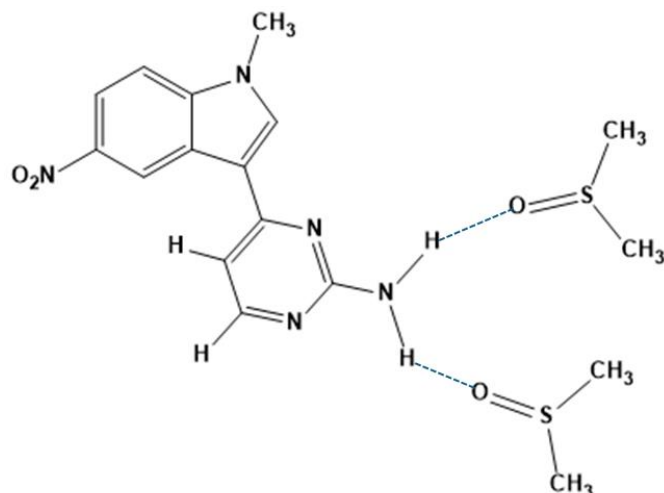
Σχήμα 24. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



Σχήμα 25. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).

Η κουκίδα που έχει επισημανθεί με κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στα πρωτόνια της αμινομάδας του πυριμιδινικού δακτυλίου, τα οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου

με τον διαλύτη DMSO, οδηγώντας στον σχηματισμό συμπλόκου (Σχήμα 26) και, συνεπώς, στην αποπροστασία τους.



Σχήμα 26. Σύμπλοκο των πρωτονίων της αμινομάδας του πυριμιδινικού δακτυλίου με τον (δευτεριωμένο) διαλύτη DMSO-d₆.

4.4.4 Αντίδραση 5: Καταλυτική υδρογόνωση για αναγωγή της νιτροομάδος με H₂/PtO₂ (καταλύτης Adams) προς τον σχηματισμό της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-ύλο)-1-μεθυλο-1H-ινδολ-5-αμίνης

4.4.5 Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης

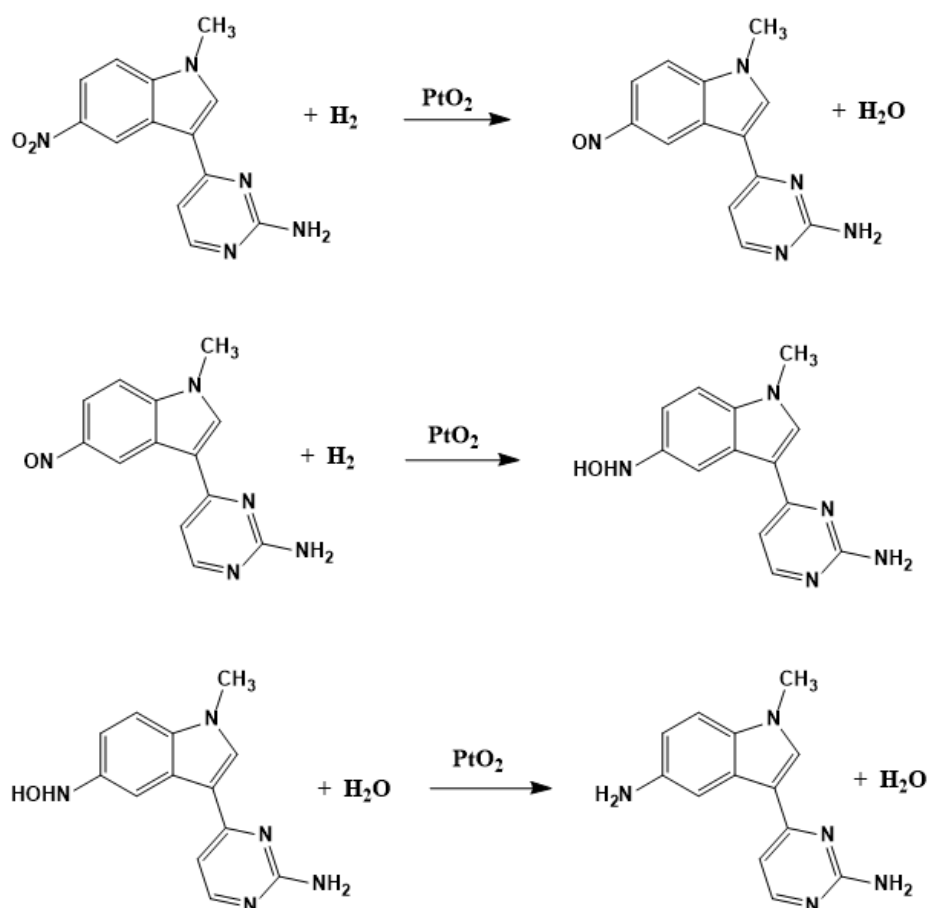
Η αναγωγή νιτροομάδων (–NO₂) σε αμινοομάδες (–NH₂) πραγματοποιείται με μοριακό υδρογόνο παρουσία διοξειδίου του λευκοχρύσου (PtO₂, καταλύτης Adams). Στη στερεά ένωση PtO₂ ο λευκόχρυσος βρίσκεται στον αριθμό οξείδωσης +4 και στις συνθήκες της αντίδρασης το PtO₂ ανάγεται in situ στην ενεργή μεταλλική μορφή Pt(0). Τα λεπτόκοκκα σωματίδια Pt(0) είναι αυτά όπου προσροφώνται τα αντιδρώντα και εξελίσσονται τα στάδια της κατάλυσης. Ο μηχανισμός ακολουθεί το μοντέλο **Langmuir–Hinshelwood** (συνπροσρόφηση υποστρώματος και υδρογόνου στην επιφάνεια του καταλύτη):

- (i) **Ενεργοποίηση καταλύτη** : Το PtO₂ ανάγεται Pt(0) καθώς η αντίδραση αυτή είναι ισχυρά εξώθερμη και παράγεται η «μαύρη πλατίνα», που αποτελεί την ενεργή φάση του καταλύτη. Μόλις σχηματιστούν τα πρώτα σωματίδια Pt(0), **επιταχύνουν** κι άλλο την αναγωγή του εναπομείναντος PtO₂ (αυτοκαταλυτικός χαρακτήρας).
- (ii) **Διασπαστική προσρόφηση H₂** : Μόρια υδρογόνου προσροφώνται στην επιφάνεια και διασπώνται ομοιολυτικά σε υδρίδια (Pt–H).
- (iii) **Προσρόφηση της νιτροομάδας** : Το Ar–NO₂ προσδένεται στην επιφάνεια του καταλύτη με τα δύο **οξυγόνα** της –NO₂ είτε μονοδοντικά, είτε διδοντικά

επάνω σε γειτονικές θέσεις της επιφάνειας Pt. Ο καταλύτης δρα ως **οξύ Lewis**: έλκει ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τα **μονήρη ζεύγη** των O. Η σύζευξη των **μονήρων ζευγών των O** με τις κενά d τροχιακά της Pt (σ-δωρεά), σε συνδυασμό με πιθανή «οπισθοδωρεά» από d-τροχιακά της Pt προς τα **αντιδεσμικά π^*** τροχιακά του NO₂, οδηγεί σε **επιπλέον πόλωση και εξασθένηση των δεσμών N–O**, καθιστώντας τους πιο επιρρεπείς σε **υδρογονόλυση**.

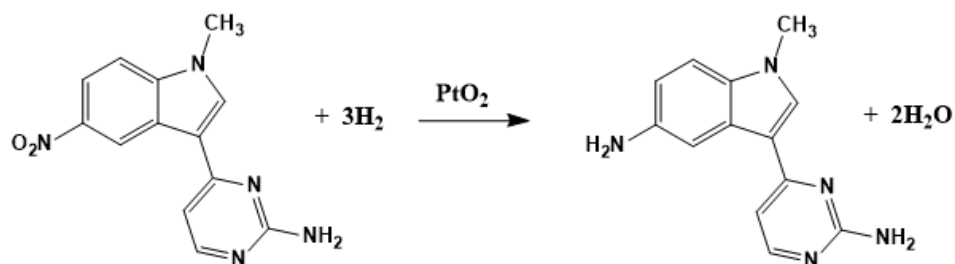
- (iv) **Διαδοχικές μεταφορές H/υδρογονόλυση N–O** : Κατά την καταλυτική αναγωγή της νιτροομάδας στην επιφάνεια Pt(0), τόσο το υδρογόνο όσο και η νιτροένωση προσροφώνται ταυτόχρονα στην επιφάνεια του καταλύτη (μηχανισμός Langmuir–Hinshelwood). Το H₂ διασπάται στην επιφάνεια του καταλύτη σε υδρίδια (Pt–H), τα οποία μεταφέρονται διαδοχικά στο υπόστρωμα. Αρχικά, η –NO₂ ανάγεται σε νιτρόσο ένωση (Ar–NO) με ταυτόχρονο σχηματισμό ενός μορίου νερού. Στη συνέχεια η νιτρόσο ένωση μετατρέπεται σε υδροξυλαμίνη (Ar–NHOH) και, τέλος, η υδροξυλαμίνη υφίσταται υδρογονόλυση του δεσμού N–O, δίνοντας την αμίνη (Ar–NH₂) και ένα ακόμη μόριο νερού.
- (v) **Αποδέσμευση προϊόντος/ανακύκλωση επιφάνειας** : Η Ar–NH₂ έχει μειωμένη συγγένεια προς την Pt(0) και εκροφάται, απελευθερώνοντας ενεργές θέσεις για τον επόμενο κύκλο.

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής:



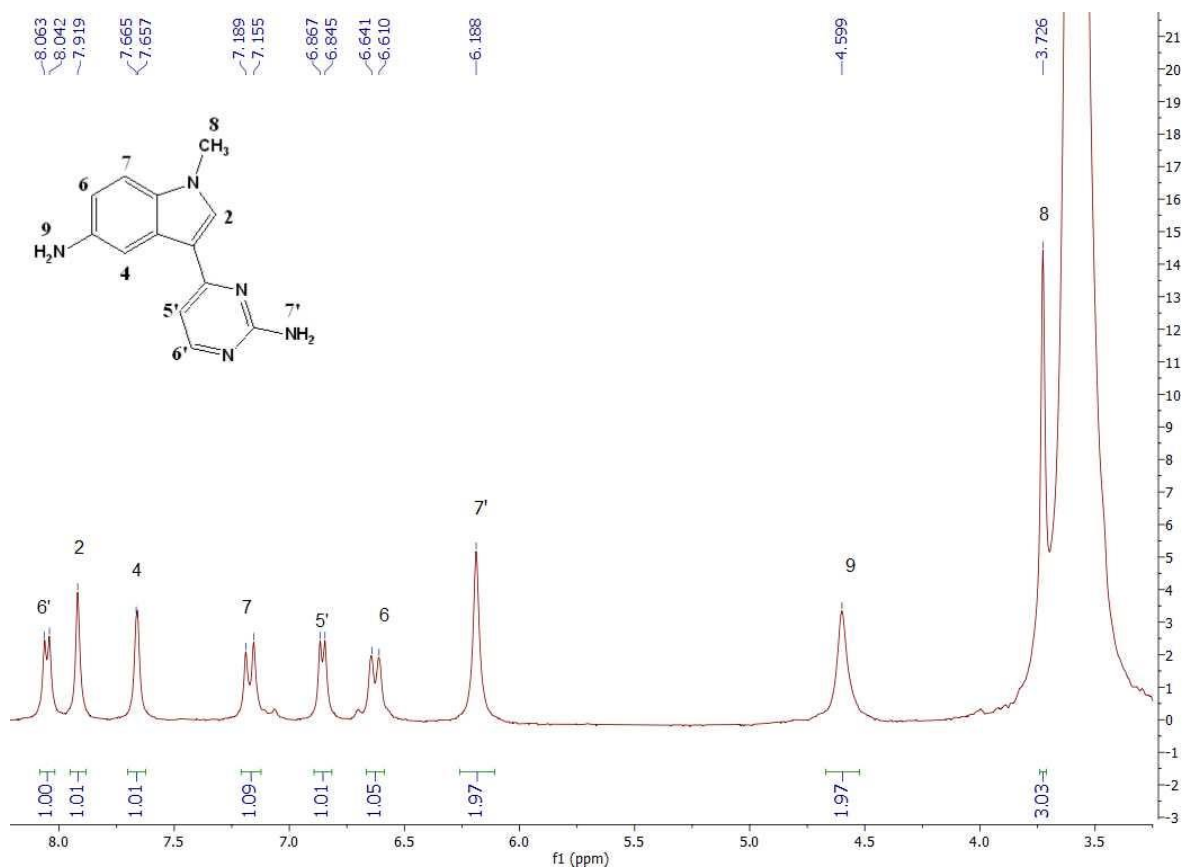
Σχήμα 27. Στάδια της αντίδρασης αναγωγής της ένωσης 4-(1-μεθυλο-5 νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλ)πυριμιδιν-2-αμίνης με τη χρήση του καταλύτη PtO₂.

Η τελική αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Σχήμα 28. Συνολική αντίδραση αναγωγής.

4.4.6 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης της 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-αμίνης



Σχήμα 29. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d_6 .

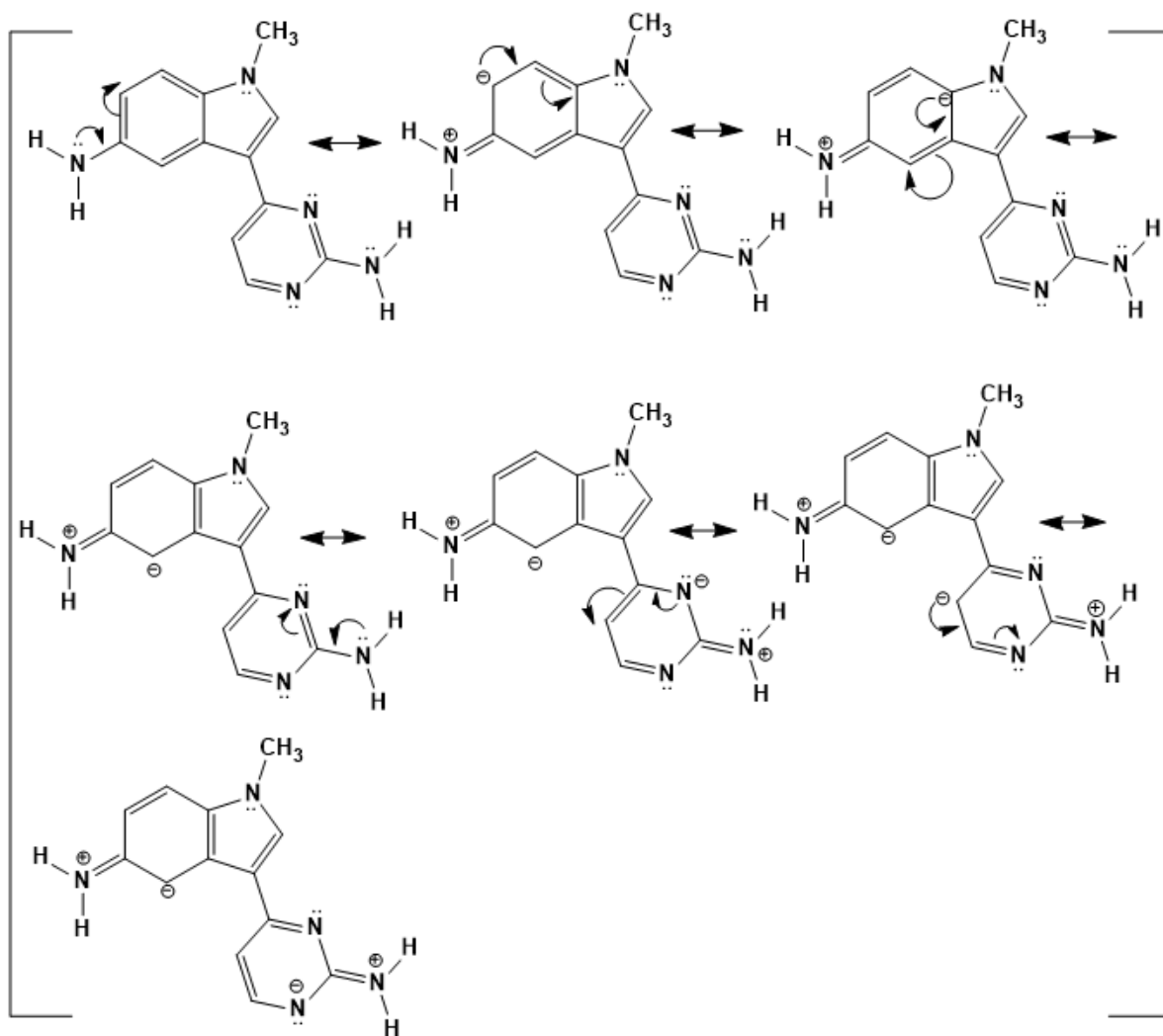
^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 8.053 (d, $^3J = 5.38$ Hz, 1H), 7.919 (s, 1H), 7.661 (d, $^4J = 2$ Hz, 1H), 7.172 (d, $^3J = 8.13$ Hz, 1H), 6.856 (d, $^3J = 5.38$ Hz, 1H), 6.626 (d, $^3J = 8.13$ Hz, 1H), 6.188 (s, 2H), 4.599 (s, 2H), 3.726 (s, 3H).

Από το φάσμα ^1H NMR (Σχήμα 27) προκύπτει ότι το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το **H-6'**, το οποίο εμφανίζεται στα **8,053 ppm** ως **διπλή κορυφή** (d, $^3J = 5,38$ Hz) λόγω σύζευξης με το **H-5'**. Το πρωτόνιο αυτό αποπροστατεύεται τόσο καθώς ο άνθρακας στη θέση 6' του πυριμιδινικού δακτυλίου συνδέεται απευθείας με το άζωτο που είναι ηλεκτροαρνητικό άτομο και έλκει από τον C ηλεκτρονιακή πυκνότητα απογυμνώνοντας έτσι το πρωτόνιο. Το **H-4** καταγράφεται στα **7,661 ppm** ως **διπλή κορυφή** (d, $^4J = 2$ Hz) εξαιτίας σύζευξης με το **H-6**. Το **H-7** εμφανίζεται στα **7,172 ppm** ως **διπλή** (d, $^3J = 8,13$ Hz) και σχάζεται από το **H-6** το οποίο επίσης εμφανίζεται ως διπλή κορυφή, με $^3J = 8,13$ Hz. Το πυριμιδινικό πρωτόνιο **H-5'** εμφανίζεται ως **διπλή** (d) στα **6,856 ppm** και σχάζεται από το πρωτόνιο **H-6'** με $^3J = 5,38$ Hz.

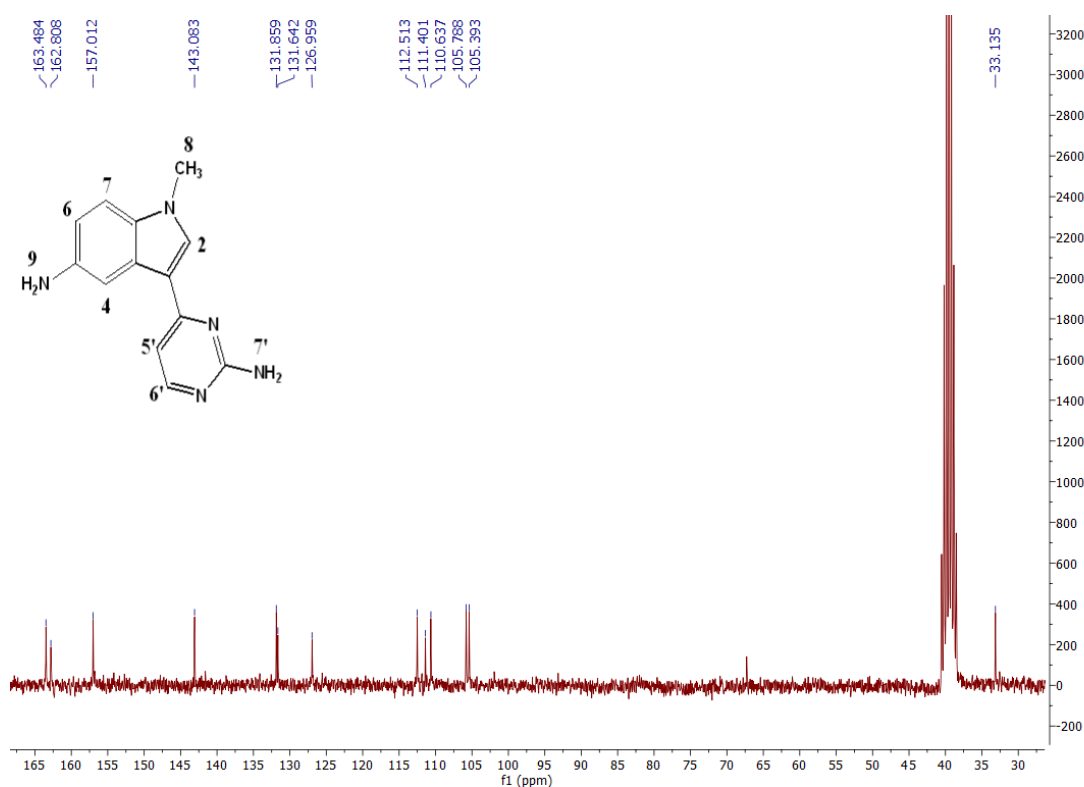
Τα πρωτόνια της **αμινομάδας** της πυριμιδίνης καταγράφονται ως **ευρεία μονήρης κορυφή** (br s) στα **6,188 ppm** με ολοκλήρωση **2H** (NH_2 -7'), ενώ τα πρωτόνια της αμινομάδας του ινδολικού δακτυλίου **H-9** εμφανίζονται στα **4,599 ppm** ως απλή

κορυφή. Το μεθύλιο του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου δίνει **απλή κορυφή (s)** στα **3,726 ppm** με ολοκλήρωση **3H**.

Όπως φαίνεται παρακάτω (**Σχήμα 28**), οι δομές συντονισμού δείχνουν την προστασία που υφίστανται τα πρωτόνια του πυριμιδινικού δακτυλίου σε σχέση με το φάσμα της ένωσης 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολ-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης. Λόγω της παρουσίας της αμινομάδος, τα πρωτόνια εμφανίζονται σε χαμηλότερες τιμές ppm σε σχέση με το προηγούμενο φάσμα καθώς η αμινομάδα προστατεύει να πρωτόνια όντας δότης ηλεκτρονιακής πυκνότητας.



Σχήμα 30. Δομές συντονισμού που δείχνουν την προστασία των πρωτονίων του ινδολικού δακτυλίου.



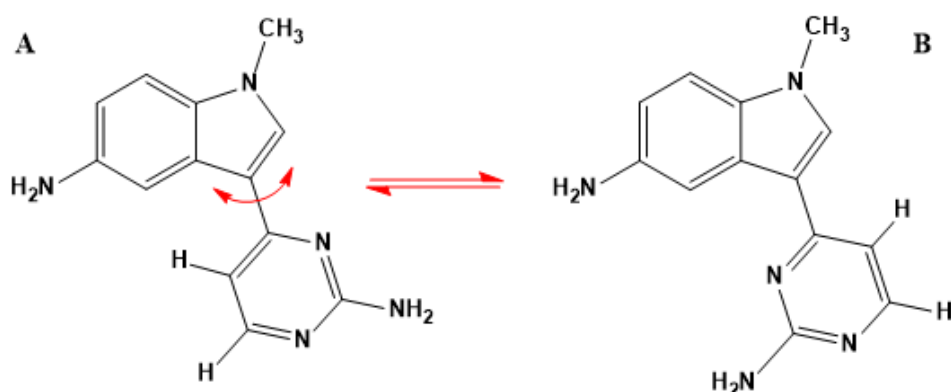
Σχήμα 31. Φάσμα ^{13}C NMR (63 MHz) της 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-αμίνης σε διαλύτη DMSO-d_6 .

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 163.48, 162.81, 157.01, 143.08, 131.86, 131.64, 126.96, 112.51, 111.40, 110.64, 105.79, 105.39, 33.14.

Στο φάσμα ^{13}C NMR διακρίνονται όλα τα άτομα ^{13}C που υπάρχουν στην ένωση όπως επίσης και η χαρακτηριστική κορυφή του μεθυλικού άνθρακα στα 33,135 ppm.

4.4.7 Υπολογιστική μελέτη της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-αμίνης με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD /6-31+G(d)

Τα διαμορφωμερή της ένωσης είναι τα A και B και φαίνονται στο **Σχήμα 30**.



Σχήμα 32. Διαμορφωμερή της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-αμίνης.

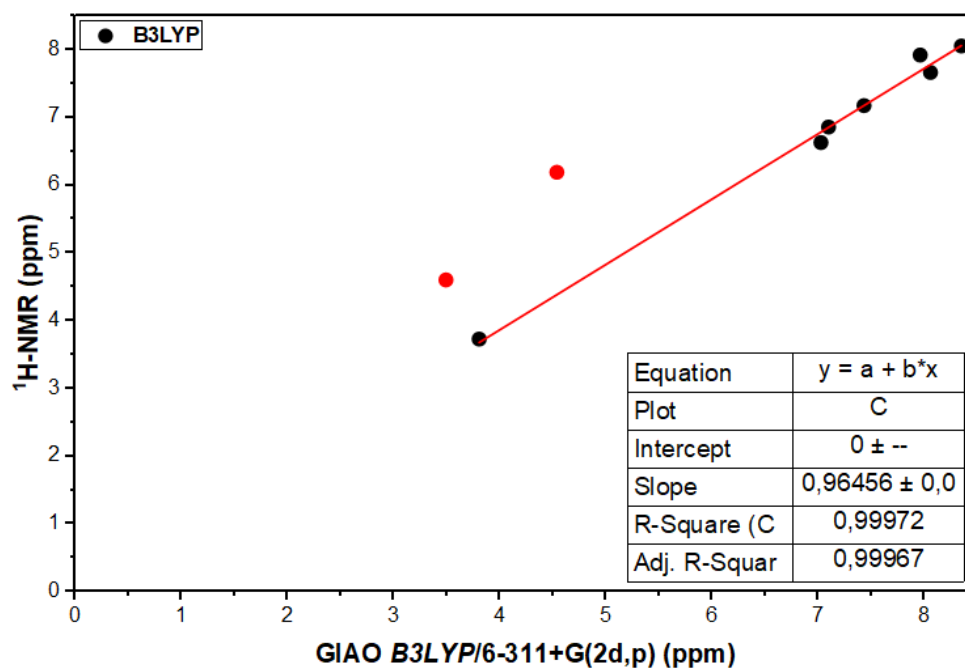
Στον **Πίνακα 4** συνοψίζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών για τα δύο πιθανά διαμορφωμερή της ένωσης με τις μεθόδους B3LYP και ω B97XD. Και στις δύο μεθόδους το διαμορφωμερές B εμφανίζει χαμηλότερη τιμή G, με αποτέλεσμα να είναι ενεργειακά ευνοϊκότερο και να επικρατεί στο διάλυμα, ενώ το διαμορφωμερές A συμμετέχει σε μικρότερο βαθμό. Οι τιμές της διπολικής ροπής είναι παρόμοιες για τα δύο διαμορφωμερή και στις δύο μεθόδους.

Πίνακας 4. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και οι αντίστοιχες τιμές του G, της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

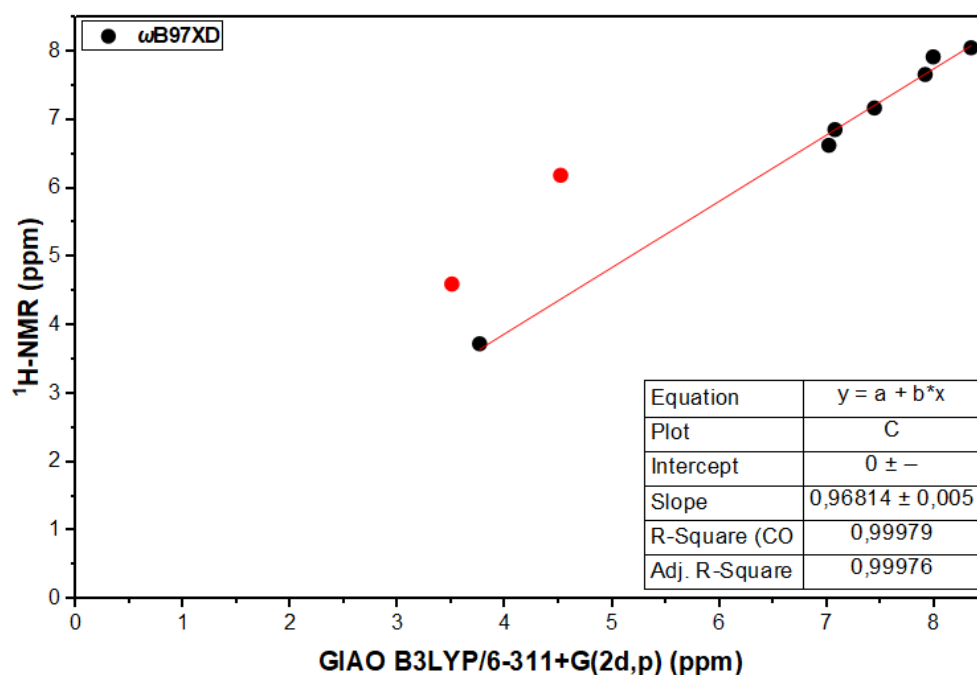
Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-776,816173	0	3,976	39,1
B	B3LYP	-776,816592	0,263	3,700	60,9
A	ω B97XD	-776,553356	0	3,791	55,54
B	ω B97XD	-776,553184	0,108	3,587	45,46

Στα παρακάτω διαγράμματα (**Σχήματα 33** και **34**) απεικονίζεται η συσχέτιση των πειραματικών χημικών μετατοπίσεων ^1H NMR με τις υπολογισμένες τιμές GIAO με τις μεθόδους B3LYP/6-311+G(2d,p) και ω B97XD αντίστοιχα. Τα περισσότερα πρωτόνια του μορίου ακολουθούν ικανοποιητικά τη γραμμική παλινδρόμηση, γεγονός που υποδεικνύει πολύ καλή συμφωνία θεωρίας–πειράματος (υψηλές τιμές R^2 και κλίσεων κοντά στη μονάδα).

Οι κόκκινες κουκίδες αντιστοιχούν στα πρωτόνια των αμινομάδων, τα οποία αποκλίνουν από τη γραμμική τάση. Η απόκλιση αυτή οφείλεται στο ότι τα πρωτόνια N–H σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με τον διαλύτη DMSO, με αποτέλεσμα να αποπροστατεύονται.



Σχήμα 33. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



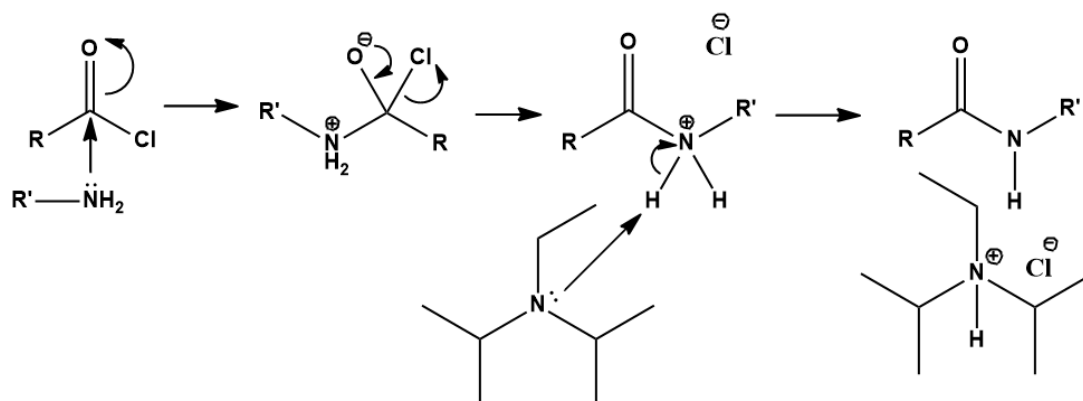
Σχήμα 34. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).

4.5 Σύνθεση τελικών προϊόντων

4.5.1 Περιγραφή του μηχανισμού της αντίδρασης

Πραγματοποιήθηκε επέκταση του παραγώγου της μεριδιανίνης από την πλευρά της νιτροομάδας του ινδολικού δακτυλίου. Η τροποποίηση αυτή υλοποιήθηκε μέσω δημιουργίας αμιδικού δεσμού στην αμινομάδα του ινδολικού δακτυλίου, με αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μορίου και πρωτεΐνης (σχηματισμός περισσότερων δεσμών υδρογόνου), καθώς και την αύξηση της εκλεκτικότητας και της ισχύος της αναστολής, οδηγώντας στα τελικά παράγωγα που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο. Κοινός παρονομαστής των παρακάτω μετατροπών είναι η **πυρηνόφιλη προσβολή στον καρβονυλικό άνθρακα**, όπου ως πυρηνόφιλο δρα το ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου της αμινομάδας. Στην περίπτωση μας, η αμίνη είναι ινδολική (αρωματική) και, λόγω συζυγίας εμφανίζει μειωμένο πυρηνόφιλο χαρακτήρα σε σύγκριση με τις αλειφατικές αμίνες. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιούμε ενεργοποιημένο παράγωγο οξέος (ακυλοχλωρίδιο) και βάση (π.χ. DIPEA) ώστε να παγιδεύεται το παραγόμενο HCl και να μετατοπίζεται η ισορροπία προς το αμιδικό προϊόν. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει: (i) προσθήκη του N

στην καρβονυλική ομάδα με σχηματισμό τετραεδρικού ενδιάμεσου, (ii) αποβολή χλωριδίου και (iii) αποπρωτονίωση του N για τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού. Σε αντίθεση με τις αλειφατικές αμίνες, όπου συχνά οι αποδόσεις είναι υψηλές ακόμη και χωρίς βάση λόγω ισχυρότερης πυρηνοφιλίας της αμινομάδος, η αρωματική αμίνη απαιτεί την παρουσία βάσης καθώς και άνυδρες συνθήκες για την αποφυγή υδρόλυσης του ακυλοχλωριδίου.

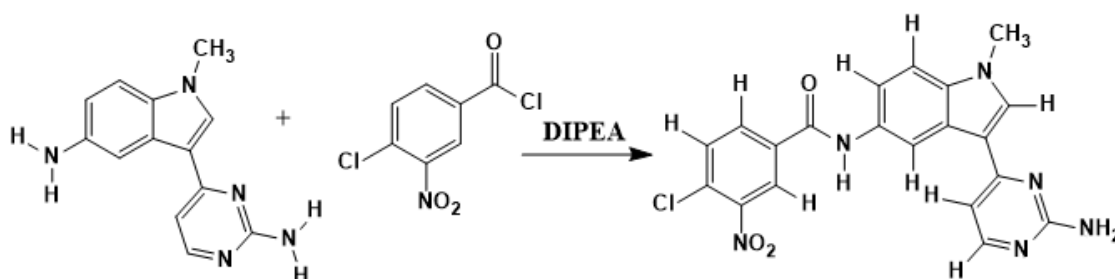


Σχήμα 35. Απεικόνιση του γενικού μηχανισμού δημιουργίας αμιδικού δεσμού με χρήση DIPEA μέσω άκυλο υποκατάστασης.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας συντέθηκαν αμιδικά παράγωγα μέσω σύζευξης της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-αμίνης με δύο υποστρώματα: το **4-χλωρο-3-νιτροβενζοΐλο χλωρίδιο** και το **p-νιτροβενζοΐλο χλωρίδιο**. Στη συνέχεια, στα παραγόμενα προϊόντα πραγματοποιήθηκε εκλεκτική αναγωγή της νιτροομάδας του βενζολικού δακτυλίου του χλωριδίου προς αμινομάδα με καταλύτη διοξείδιο της πλατίνας (PtO_2) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου, σύμφωνα με τον μηχανισμό που αναλύθηκε στην προηγούμενη αντίδραση (**Αντίδραση 5**). Τέλος, διερευνήθηκε η περαιτέρω αμιδίωση της νέας αμινομάδας με κυκλοπροπενυλοχλωρίδιο, χωρίς όμως να επιτευχθεί το επιθυμητό προϊόν.

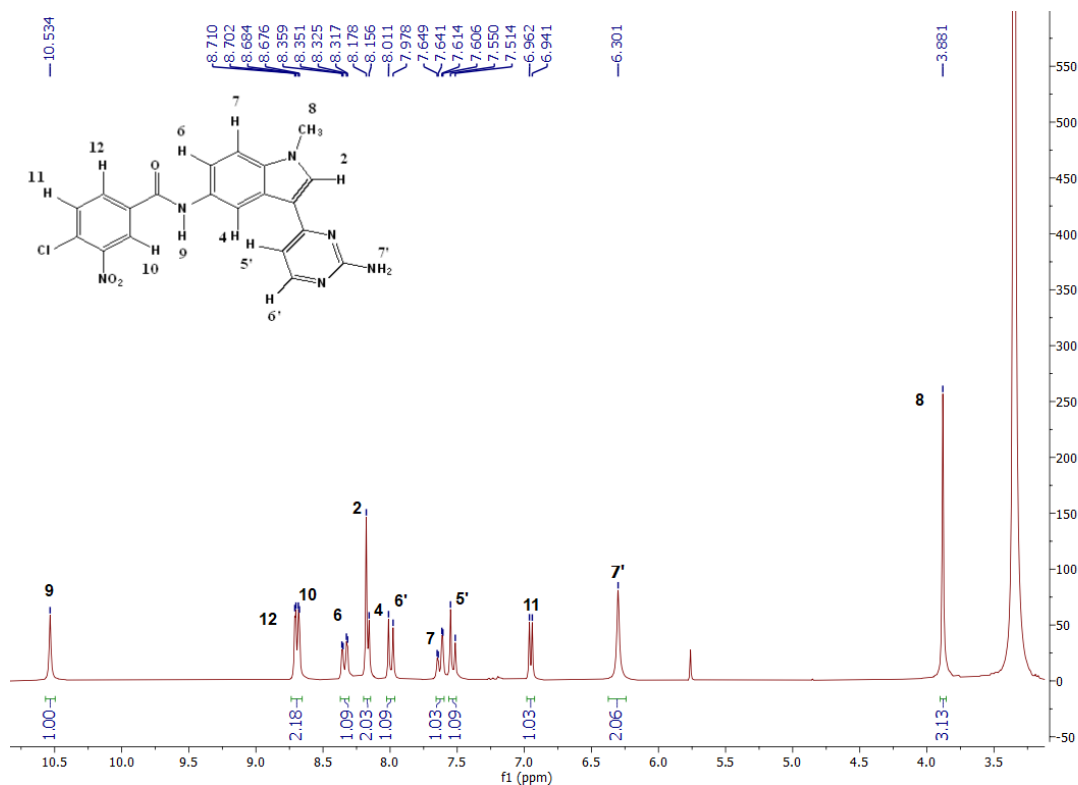
4.6 Για το προϊόν που προκύπτει από την προσθήκη 4-χλωρο-3-νιτροβενζοΐλο χλωριδίου, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αντιδράσεις:

4.6.1 Αντίδραση 6: Δημιουργία αμιδικού δεσμού και σχηματισμός της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο



Σχήμα 36. Δημιουργία αμιδικού δεσμού με το 4-χλωρο-3-νιτροβενζοϊλο χλωρίδιο.

4.6.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο

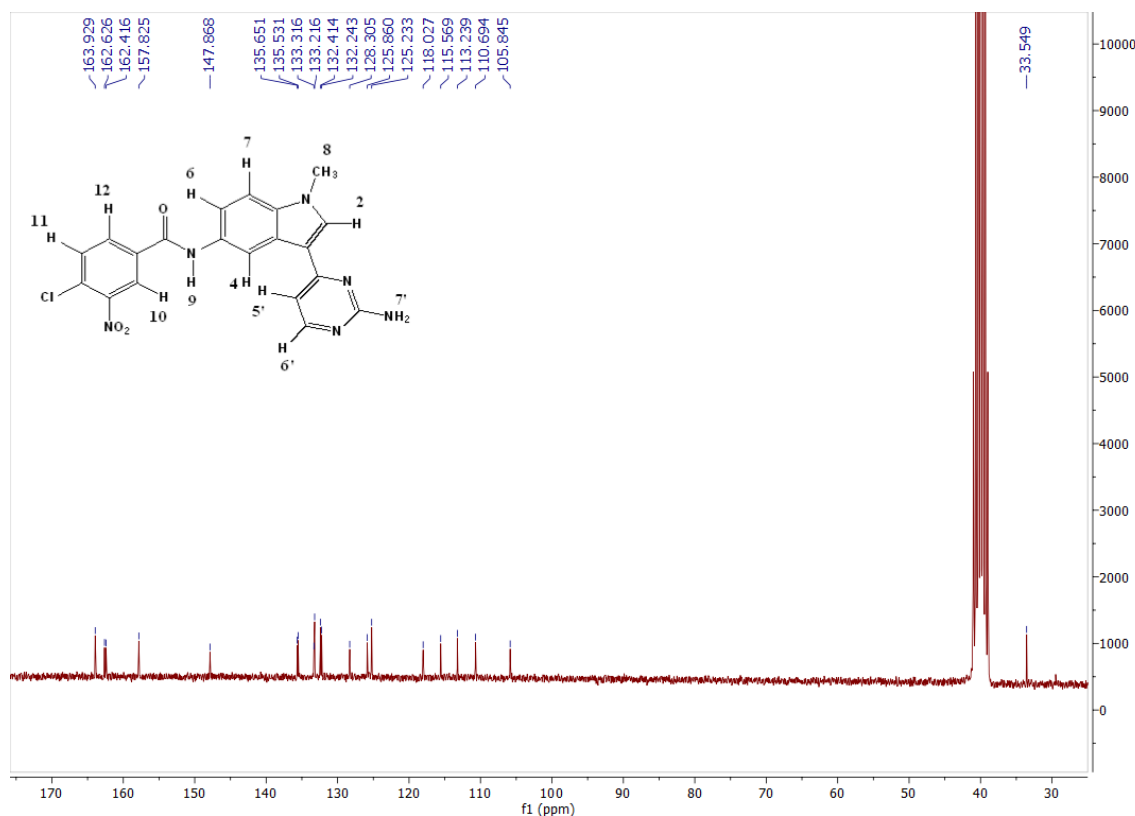


Σχήμα 37. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$.

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 10.534 (s, 1H), 8.693 (dd, 2H), 8.338 (dd, $^3J = 8.63$, $^4J = 2$ Hz, 1H), 8.178 (s, 1H), 8.156 (s, 1H), 7.995 (d, $^3J = 8.25$ Hz, 1H), 7.628 (dd, $^3J = 8.63$, $^4J = 2$ Hz, 1H), 7.532 (d, $^3J = 8.25$ Hz, 1H), 6.952 (d, 1H), 6.301 (s, 2H), 3.881 (s, 3H).

Στο φάσμα ^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο καταγράφεται η κορυφή του πρωτονίου του αμιδικού δεσμού (-NH-) ως απλή κορυφή στα 10,534 ppm (1H). Τα πρωτόνια H-10 και H-12 συντονίζονται μαζί στα 8,693 ppm και είναι αποπροστατευμένα καθώς βρίσκονται σε θέσεις όρθο και πάρα ως προς τη νιτροομάδα που είναι ισχυρός απενεργοποιητής. Το πρωτόνιο H-6 του ινδολικού δακτυλίου σχάζεται από το πρωτόνιο H-7 με $^3J = 8,63$ Hz ενώ, το H-6 σχάζει το H-4 με $^4J = 2$ Hz. Τα πρωτόνια H-5' και H-6' του πυριμιδινικού δακτυλίου σχάζονται με $^3J = 8,25$ Hz και συντονίζονται στα 7,532 ppm 7,995 ppm. Η κορυφή στα 6,301 ppm (2H) αντιστοιχεί στα πρωτόνια της ομάδας $-\text{NH}_2$ του δακτυλίου της πυριμιδίνης, τα οποία

αποπροστατεύονται τόσο λόγω της γειτνίασης με άζωτο όσο και λόγω της δημιουργίας συμπλόκου με τον διαλύτη DMSO. Τέλος, η κορυφή στα 3,881 ppm (3H) αποδίδεται στο μεθυλομάδα N-CH₃ στην θέση 1 του ινδολίου. Η ολοκλήρωση όλων των σημάτων συμφωνεί με τα 15 πρωτόνια της δομής της ένωσης.



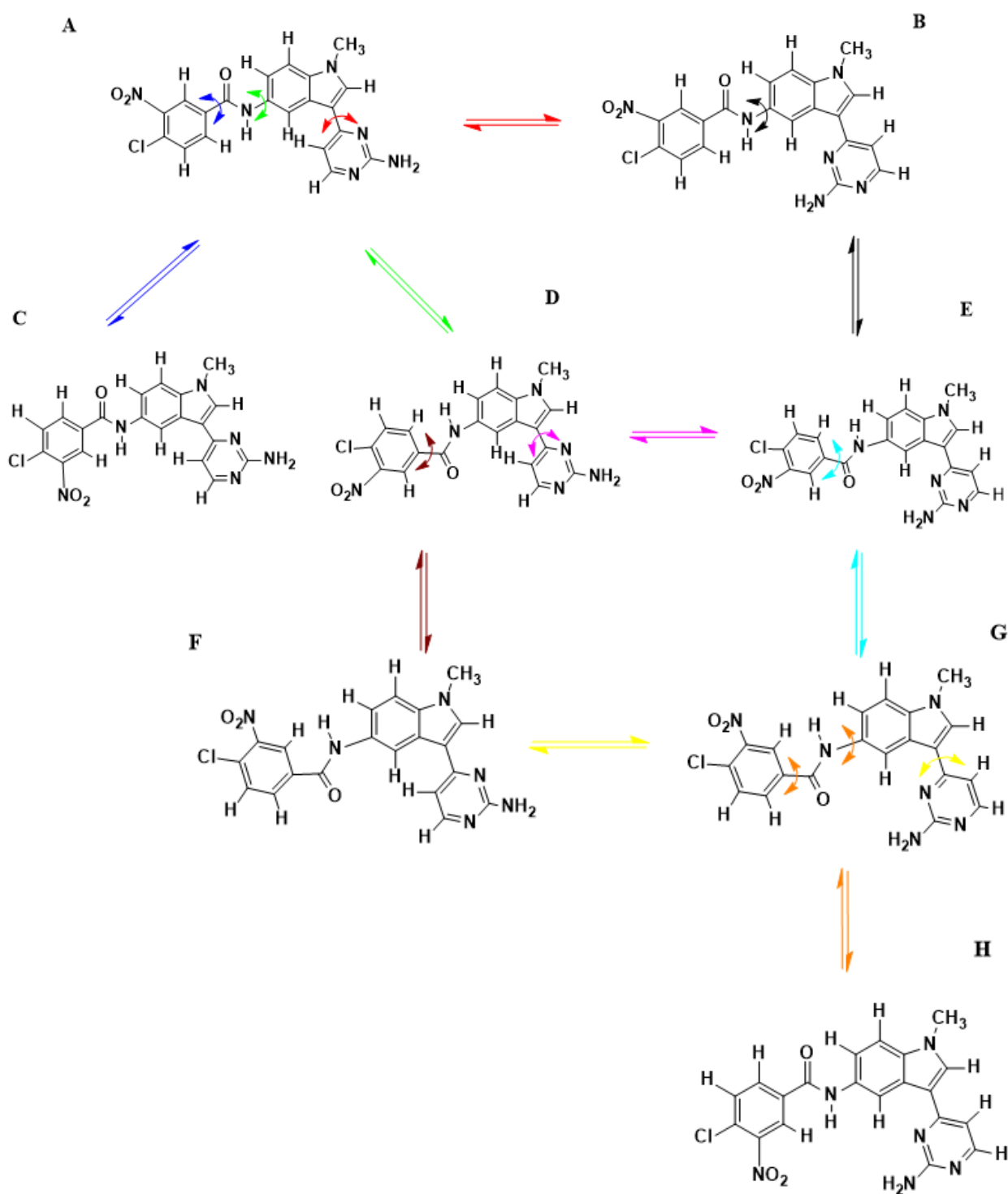
Σχήμα 31. Φάσμα ¹³C NMR (63 MHz) της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο σε διαλύτη DMSO-d₆.

¹³C NMR (63 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.93, 162.63, 162.42, 157.83, 147.87, 135.65, 135.53, 133.32, 133.22, 132.41, 132.24, 128.30, 125.86, 125.23, 118.03, 115.57, 113.24, 110.69, 105.84, 33.55.

Το φάσμα ¹³C NMR (DMSO-d₆) της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο εμφανίζει αριθμό σημάτων που βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα 20 άτομα άνθρακα του μορίου, γεγονός που επιβεβαιώνει τη σύνθεσή του. Το πιο αποπροστατευμένο σήμα στην περιοχή ~165–170 ppm αποδίδεται στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα της ομάδας αμίδιου.

4.6.3 Υπολογιστική μελέτη της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο

Τα διαμορφωμερή της ένωσης A-H φαίνονται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 38) :



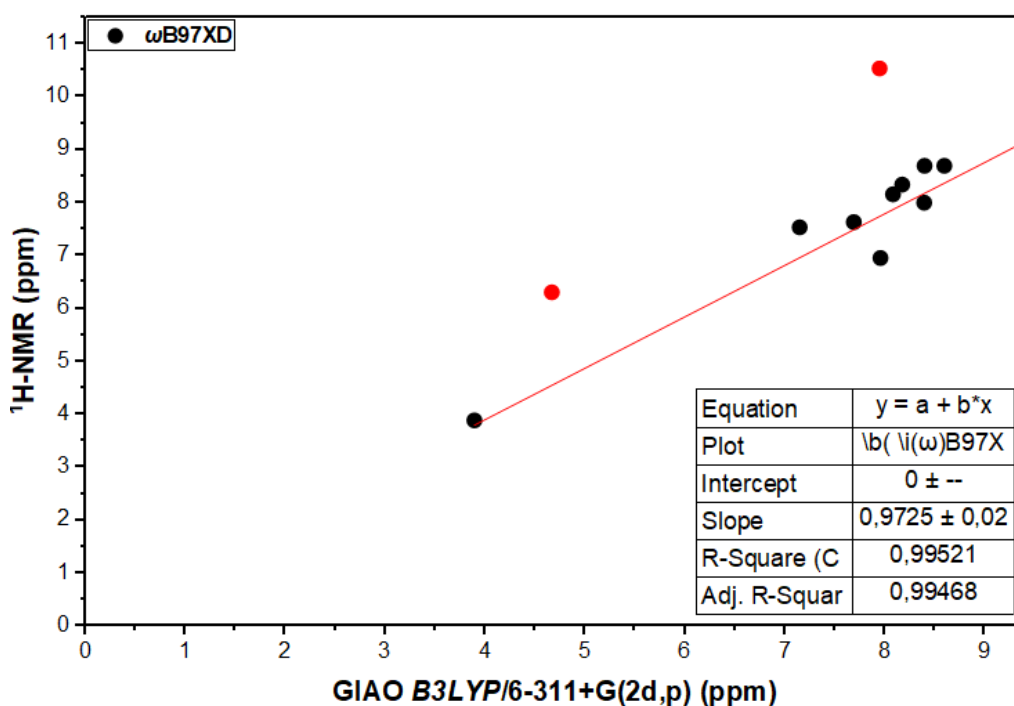
Σχήμα 38. Διαμορφωμερή της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο.

Για την εκτίμηση της σχετικής σταθερότητας των διαμορφωμερών της ένωσης πραγματοποιήθηκε διαμορφωμετρική ανάλυση με θεωρία DFT, χρησιμοποιώντας τα λειτουργικά B3LYP και ω B97XD σε διαλύτη DMSO. Για κάθε διαμορφωμερές (A–H) υπολογίσθηκαν η ελεύθερη ενέργεια G , η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ΔG ως προς το σταθερότερο διαμορφωμερές, η διπολική ροπή μ καθώς και το ποσοστό συμμετοχής τους στο διάλυμα, όπως αυτό προκύπτει από την κατανομή Boltzmann σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον **Πίνακα 5**, ενώ το διάγραμμα κατανομής των διαμορφωμερών για την υπολογιστική μέθοδο ω B97XD απεικονίζεται στο **Σχήμα 39**. Από το διάγραμμα παρατηρείται πολύ καλή γραμμική συσχέτιση μεταξύ θεωρητικών και πειραματικών χημικών μετατοπίσεων. Τα πρωτόνια όμως της αμινομάδας και του αμιδικού δεσμού παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις λόγω σχηματισμού συμπλόκου και δεσμού υδρογόνου με τον διαλύτη, καθώς είναι εύκολα ανταλλάξιμα και γι' αυτό τον λόγο «αποπροστατεύονται». Έτσι, σημειώνονται με κόκκινο χρώμα στα αντίστοιχα διαγράμματα.

Πίνακας 5. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και οι αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

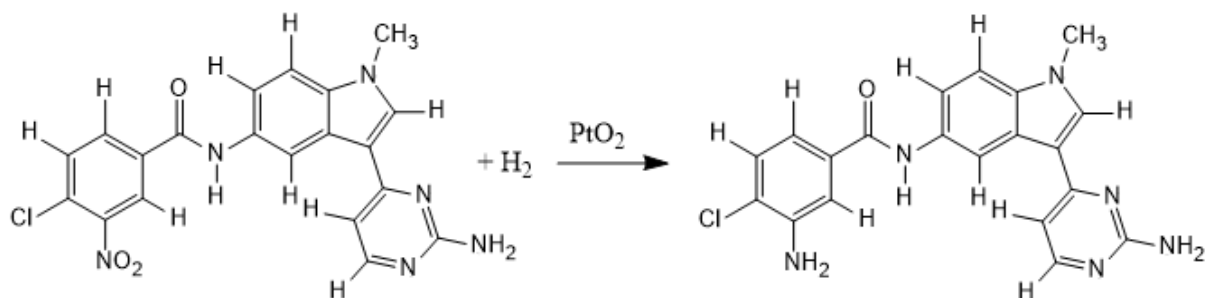
Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-1785,252176	1,451	7,487	3,19
B	B3LYP	-1785,253402	0,682	8,323	11,68
C	B3LYP	-1785,253050	0,903	6,516	8,05
D	B3LYP	-1785,252412	1,303	10,654	4,09
E	B3LYP	-1785,252829	1,042	10,549	6,37
F	B3LYP	-1785,253522	0,607	4,835	13,27
G	B3LYP	-1785,253723	0,481	5,762	16,41

H	B3LYP	-1785,254489	0	6,414	36,94
A	ωB97XD	-1784,791047	1,109	7,500	3,76
B	ωB97XD	-1784,792167	0,406	8,399	12,32
C	ωB97XD	-1784,791607	0,757	6,243	6,81
D	ωB97XD	-1784,791597	0,764	10,254	6,73
E	ωB97XD	-1784,792195	0,388	10,265	12,69
F	ωB97XD	-1784,792353	0,289	5,003	15,00
G	ωB97XD	-1784,792538	0,173	5,919	18,25
H	ωB97XD	-1784,792814	0	6,265	24,44



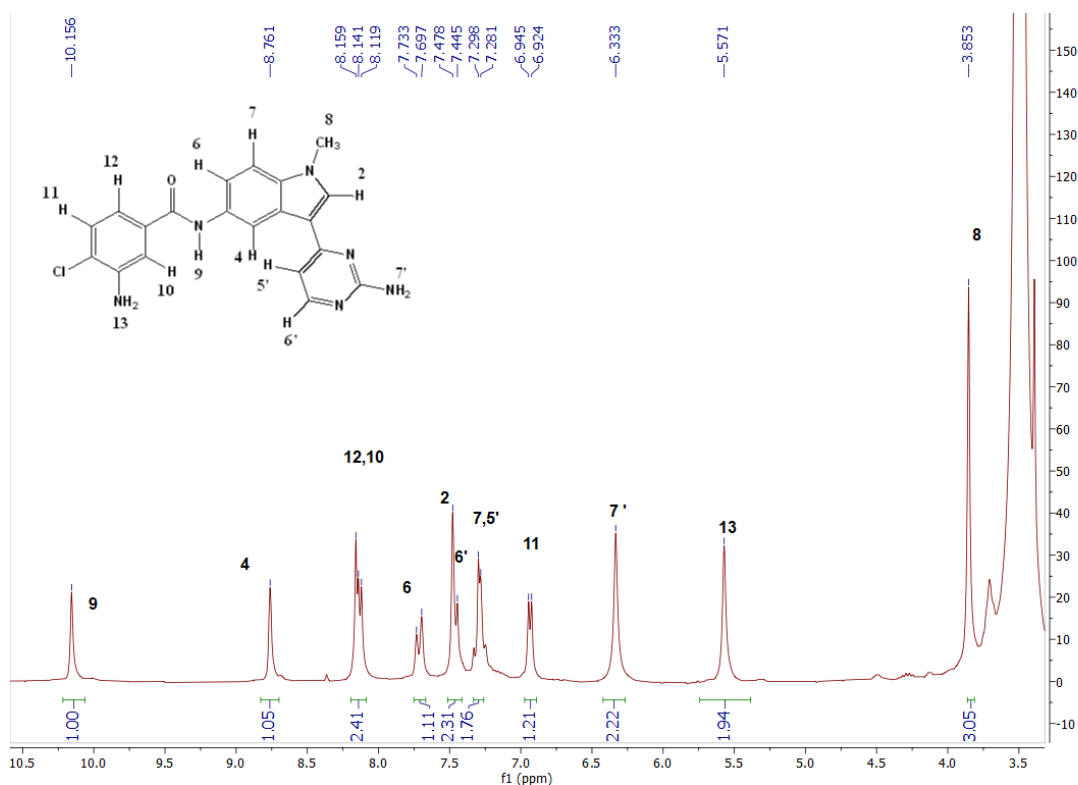
Σχήμα 39. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο ω B97XD/6-31+G(d)).

4.6.4 Αντίδραση 7: Αναγωγή της νιτροομάδος του ινδολικού δακτυλίου με καταλύτη διοξείδιο της πλατίνας (PtO₂) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου για να σχηματιστεί η ένωση 3-αμινο-*N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4 χλωροβενζαμίδιο



Σχήμα 40. Αντίδραση αναγωγής της νιτροομάδος της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο.

4.6.5 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 3-αμινο-*N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4 χλωροβενζαμίδιο



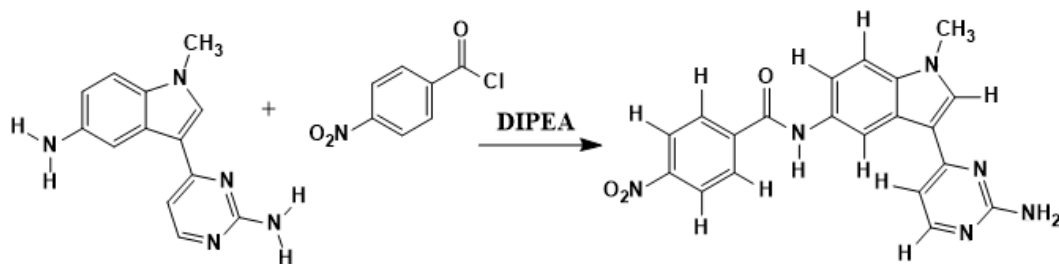
Σχήμα 41. Φάσμα ¹H NMR (250 MHz) της ένωσης 3-αμινο-*N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4 χλωροβενζαμίδιο σε διαλύτη DMSO-d₆.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.156 (s, 1H), 8.761 (s, 1H), 8.139 (2H), 7.715 (d, 1H), 7.462 (d, 2H), 7.290 (d, 2H), 6.935 (d, 1H), 6.333 (s, 2H), 5.571 (s, 2H), 3.853 (s, 3H).

Το φάσμα ¹H NMR (DMSO-d₆) του αναγμένου 4-χλωρο-3-αμινοβενζαμιδικού παραγώγου της μεριδιανίνης είναι πλήρως συμβατό με την δομή. Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι το H-9 στα 10,156 ppm και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του N του αμιδικού δεσμού, το οποίο επηρεάζεται έντονα τόσο από τον γειτονικό καρβονυλικό άνθρακα όσο και από την δημιουργία δεσμών με τον διαλύτη DMSO. Τα αρωματικά πρωτόνια H-10 και H-12 εμφανίζονται πλέον πιο προστατευμένα στα 8,139 ppm καθώς, είναι σε θέσεις όρθο και πάρα ως προς την αμινομάδα που αποτελεί δότη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Στη περιοχή 6,935-7,715 ppm υπάρχουν τα υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια τα οποία διαφοροποιούνται ελαφρώς σε σχέση με της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο, πιθανώς εξαιτίας διαφορετικής διαμόρφωσης την οποία λαμβάνει η ένωση λόγω περιστροφής των δεσμών. Χαρακτηριστικά της δομής είναι οι δύο πλατειές κορυφές στην περιοχή 5-6,5 ppm, οι οποίες αποδίδονται, αντίστοιχα, στην αμινομάδα του βενζολικού δακτυλίου του χλωριδίου και της πυριμιδίνης. Το εύρος αλλά και η μεταβλητότητα της θέσης τους οφείλονται στην ευκολία ανταλλαγής των πρωτονίων αυτών και στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τον διαλύτη DMSO. Η κορυφή στα ~4 ppm αντιστοιχεί στη μεθυλομάδα N-CH₃ του ινδολικού δακτυλίου. Συνολικά, ο αριθμός, ο τύπος και οι χημικές μετατοπίσεις των σημάτων επιβεβαιώνουν την επιτυχή αναγωγή της νιτροομάδας σε αμινομάδα και την καθαρότητα του αναγμένου προϊόντος.

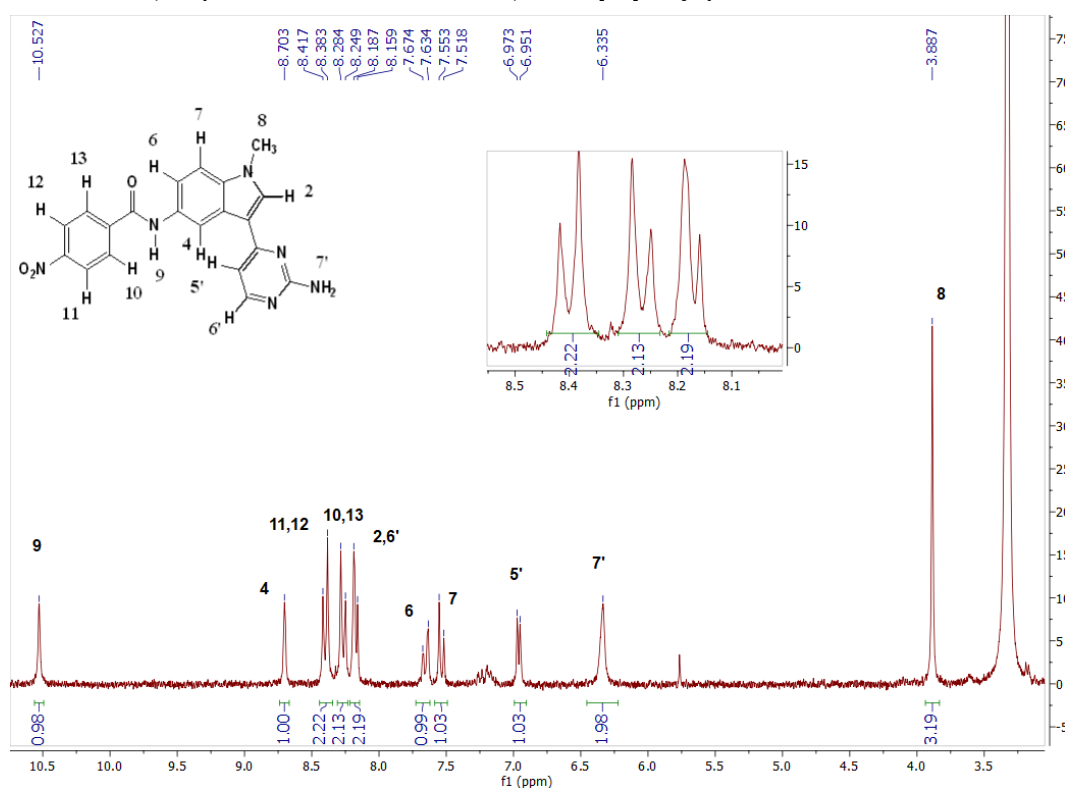
4.7 Για το προϊόν που προκύπτει από την προσθήκη 4-νιτροβενζοϋλο χλωριδίου, πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες αντιδράσεις:

4.7.1 Αντίδραση 6: Δημιουργία αμιδικού δεσμού και σχηματισμός της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο



Σχήμα 42. Δημιουργία αμιδικού δεσμού με το 4-νιτρο-βενζοϋλο χλωρίδιο.

4.7.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης *N*-(3-(2-αμινο-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο



Σχήμα 43. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της ένωσης *N*-(3-(2-αμινο-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο σε διαλύτη DMSO-d_6 .

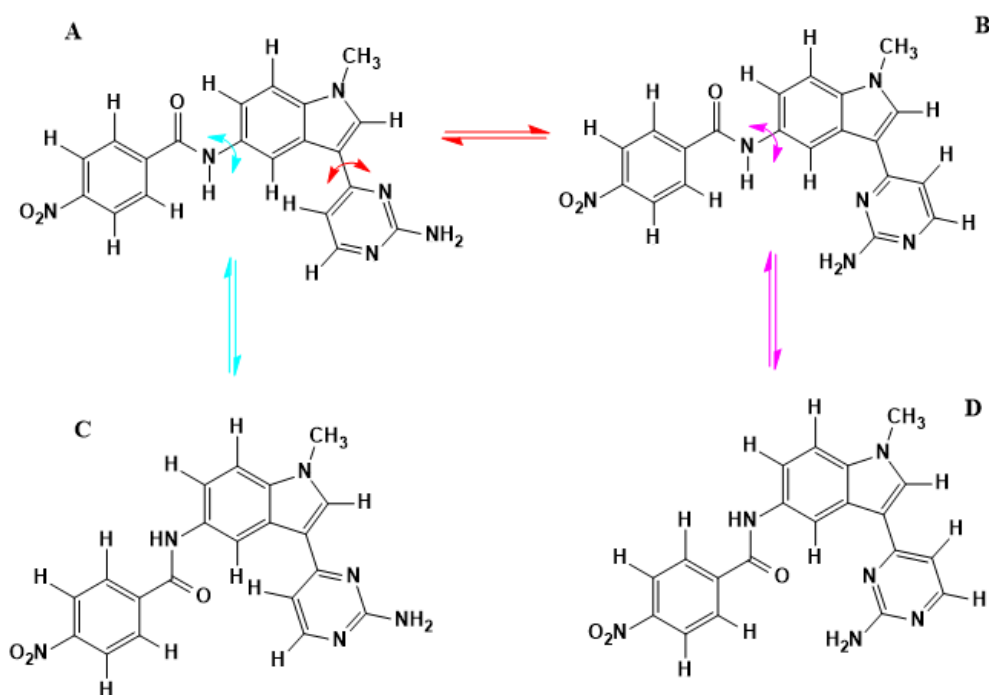
^1H NMR (250 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 10.527 (s, 1H), 8.703 (s, 1H), 8.40 (d, $^3J = 8.63$ Hz, 2H), 8.267 (d, $^3J = 8.63$ Hz, 2H), 8.173 (d, 2H), 7.654 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.536 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.962 (d, 1H), 6.335 (s, 2H), 3.887 (s, 3H).

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης, στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων εμφανίζονται δύο ζεύγη κορυφών, τα οποία αντιστοιχούν στα H-11, H-12 και H-10, H-13, με ολοκλήρωση δύο ανά ζεύγος. Το πρότυπο αυτό είναι χαρακτηριστικό των διυποκατεστημένων βενζολικών δακτυλίων, λόγω της συμμετρίας τους που καθιστά τα αντίστοιχα πρωτόνια ισοδύναμα. Τα υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια εντοπίζονται στην

περιοχή 6,962-8,173 ppm ενώ, πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού (H-9) εμφανίζεται έντονα αποπροστατευμένο στα 10,527 ppm. Τέλος, διακρίνεται και η παρουσία του πρωτονίου H-7' της αμινομάδας ως διευρυμένη κορυφή γύρω στα 6 ppm.

4.7.3 Υπολογιστική μελέτη της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο

Τα διαμορφωμερή της ένωσης (A-D) απεικονίζονται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 44).

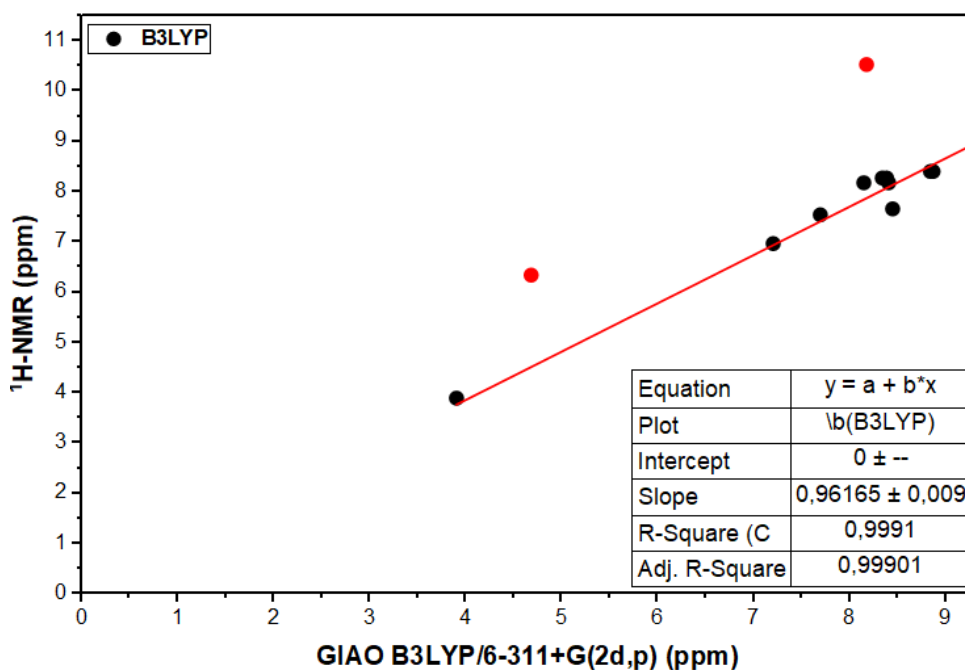


Σχήμα 44. Διαμορφωμερή της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο.

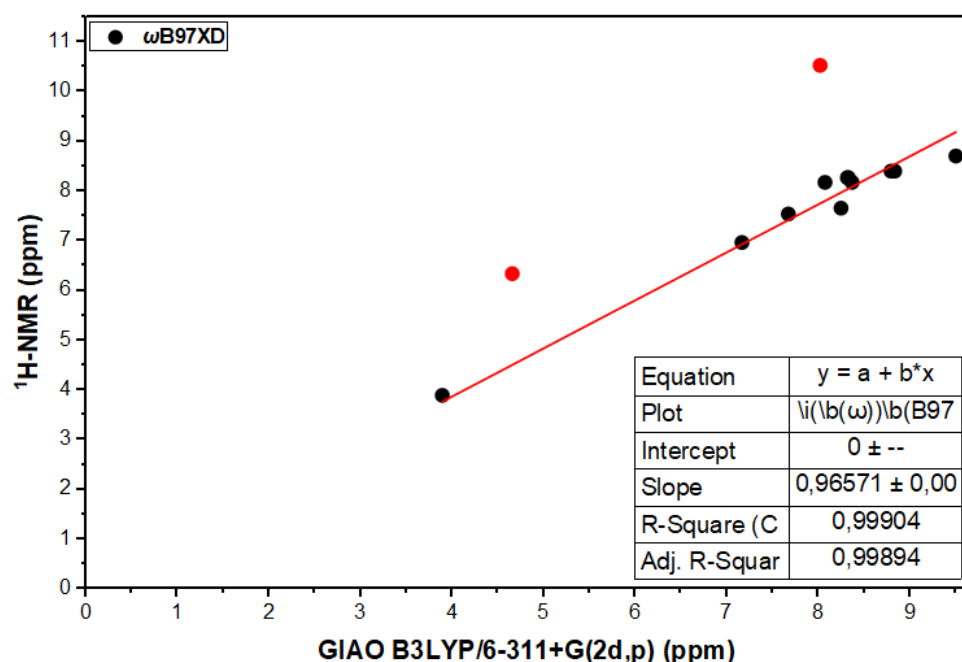
Στον **Πίνακα 6** που ακολουθεί συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τη διαμορφωτική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε με τη θεωρία DFT, χρησιμοποιώντας τα λειτουργικά B3LYP και ω B97XD σε διαλύτη DMSO. Για κάθε διαμορφωμερές (A–D) υπολογίστηκαν η ελεύθερη ενέργεια G, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ΔG ως προς το σταθερότερο διαμορφωμερές, η διπολική ροπή μ καθώς και το ποσοστό συμμετοχής του στο διάλυμα, όπως αυτό προκύπτει από την κατανομή Boltzmann σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαγράμματα κατανομής των θεωρητικών και πειραματικών χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων των διαμορφωμερών απεικονίζονται στα **Σχήματα 45 και 46**.

Πίνακας 6. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και οι αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-1325,658654	0,786	7,516	12,22
B	B3LYP	-1325,659907	0	7,977	46,06
C	B3LYP	-1325,659002	0,568	8,350	17,66
D	B3LYP	-1325,659294	0,385	8,698	24,06
A	ωB97XD	-1325,211689	0,706	7,188	11,90
B	ωB97XD	-1325,212814	0	7,725	39,17
C	ωB97XD	-1325,212204	0,383	7,958	20,53
D	ωB97XD	-1325,212511	0,190	8,397	28,41



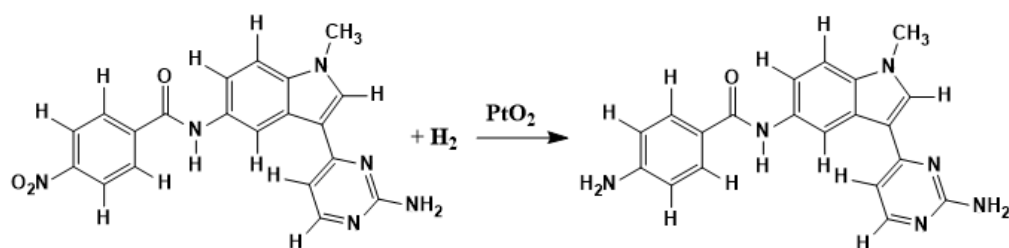
Σχήμα 45. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων 1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιάλυσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



Σχήμα 46. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο ω B97XD/6-31+G(d)).

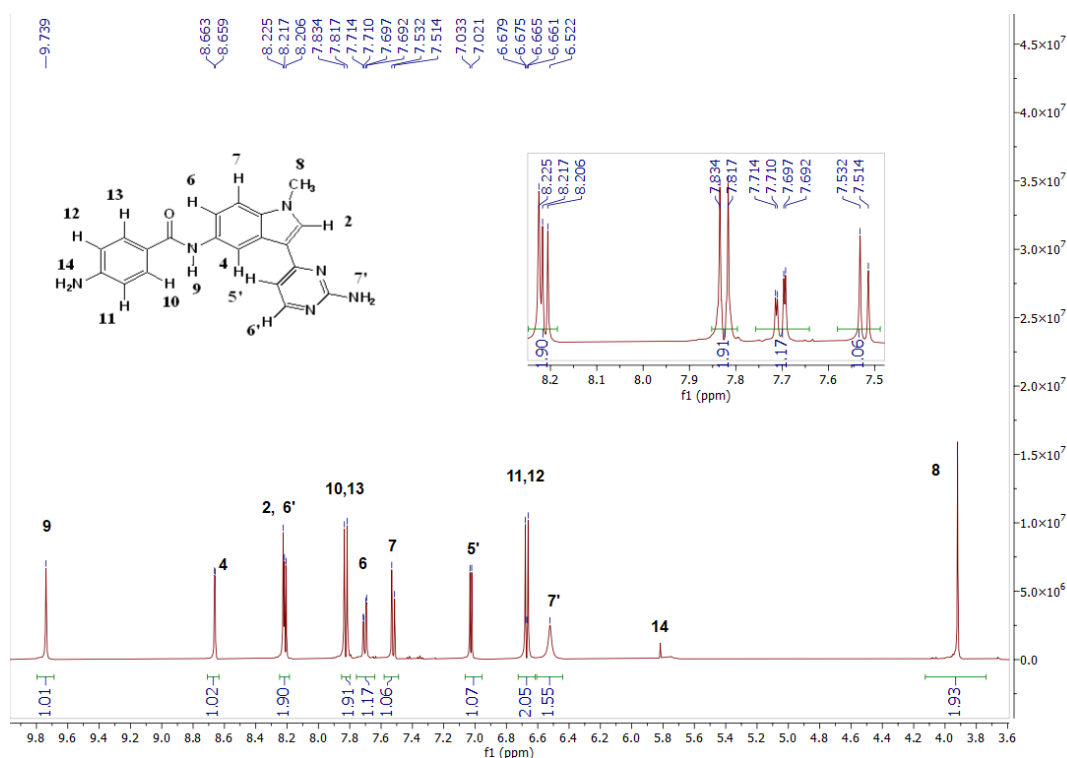
Παρατηρείται πολύ καλή γραμμική συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και θεωρητικών τιμών. Οι κόκκινες κουκκίδες αντιστοιχούν στα πρωτόνια του αμιδικού δεσμού και της αμινομάδας, τα οποία σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου με τον διαλύτη, με αποτέλεσμα να αποπροστατεύονται και να παρεκκλίνουν από τη γραμμική συσχέτιση.

4.7.4 Αντίδραση 7: Αναγωγή της νιτροομάδας του ινδολικού δακτυλίου με καταλύτη διοξείδιο της πλατίνας (PtO_2) υπό ατμόσφαιρα υδρογόνου για να σχηματιστεί η ένωση 4-αμινο-*N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο



Σχήμα 47. Αντίδραση αναγωγής της νιτροομάδος της ένωσης 4-αμινο-*N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλ-1*H*-ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο.

4.7.5 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της ένωσης 4-αμινο-*N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλ-1*H*-ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο



Σχήμα 48. Φάσμα ^1H NMR (500 MHz) της ένωσης 4-αμινο-*N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλ-1*H*-ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο σε διαλύτη DMSO-d_6 .

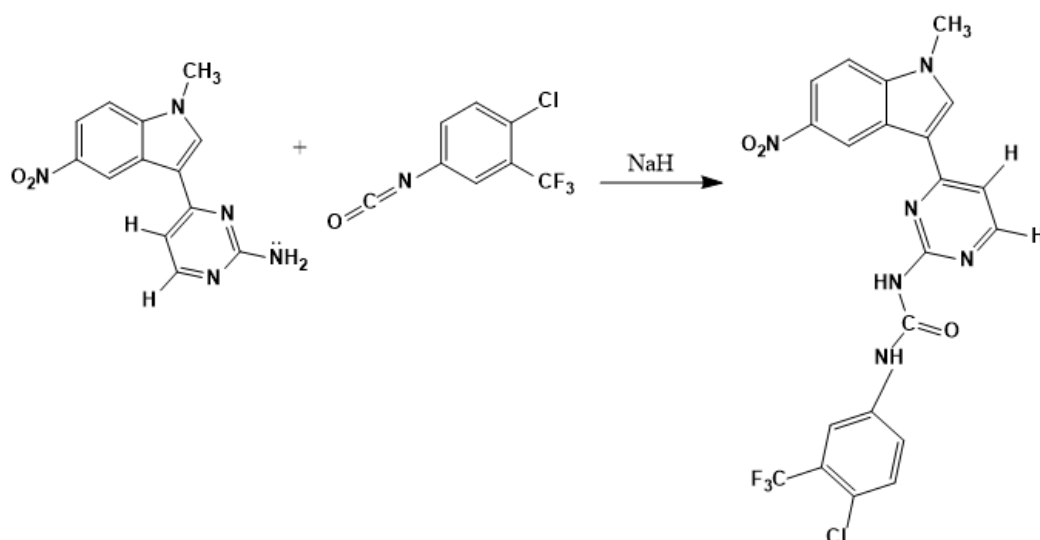
^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 9.739 (s, 1H), 8.661 (d, $^4J = 2.0$ Hz, 1H), 8.225 – 8.206 (m, 2H), 7.823 (d, $^3J = 8.75$ Hz, 2H), 7.703 (dd, $^3J = 8.9$, $^4J = 2.0$ Hz, 1H), 7.523 (d, $^3J = 8.75$ Hz, 1H), 7.027 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 1H), 6.670 (d, $^3J = 8.75$ Hz, 2H), 6.522 (s, 2H), 6.471 (s, 2H), 3.934 (s, 3H).

Στο συγκεκριμένο φάσμα ^1H NMR το πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού εμφανίζεται ως το πιο αποπροστατευμένο στα 9,739 ppm, ενώ, τα αρωματικά πρωτόνια H-11 και H-12 που βρίσκονται σε όρθο θέση ως προς την αμινομάδα προστατεύονται και μετατοπίζονται σε χαμηλότερες τιμές ppm. Στην περιοχή 7,5-8,4 ppm εντοπίζονται τα

υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης τα οποία, δεν μεταβάλλονται δραματικά ενώ, τα πρωτόνια των αμινομάδων του πυριμιδινικού δακτυλίου και του βενζολικού δακτυλίου εντοπίζονται στα 6,522 και 6,471 αντίστοιχα. Οι ολοκληρώσεις των σημάτων αντιστοιχούν στο αναμενόμενο πλήθος πρωτονίων για τη δομή της ένωσης.

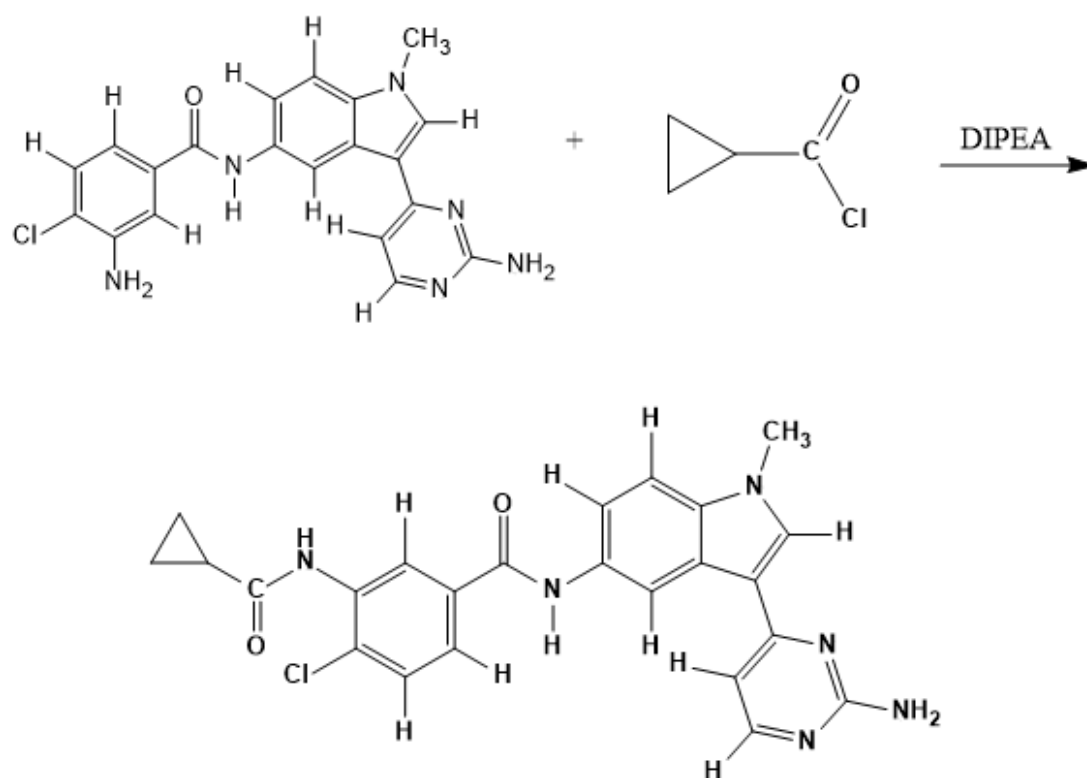
4.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΔΥΟ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕ ΜΗ ΕΠΙΘΥΜΗΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο συνθετικό μέρος της παρούσας εργασίας επιχειρήθηκε αρχικά η δημιουργία δεσμού τύπου ουρίας μέσω αντίδρασης ισοκυανικού με την αμινομάδα της πυριμιδίνης. Η αντίδραση δεν οδήγησε στον επιθυμητό στόχο, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο ότι το **άζωτο της πυριμιδίνης συμμετέχει ηλεκτρονιακά στο πυριμιδινικό δακτύλιο**, προσφέροντας τα μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων του στο αρωματικό σύστημα. Ως αποτέλεσμα, λειτουργεί ως **ασθενές πυρηνόφιλο** και δεν προσφέρει εύκολα το ζεύγος ηλεκτρονίων του στον C του ισοκυανικού, μειώνοντας σημαντικά την δραστηριότητά του. Στο **Σχήμα 1** που ακολουθεί απεικονίζεται η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε.



Σχήμα 1. Δημιουργία δεσμού ουρίας με το ισοκυανικό.

Σε δεύτερη φάση, επιχειρήθηκε η δημιουργία ενός επιπλέον αμιδικού δεσμού με τη χρήση κυκλοπροπανυλοκαρβονυλογλωριδίου στην αναγμένη νιτροομάδα (αμινομάδα) της ένωσης *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο. Και αυτή η συνθετική προσέγγιση που απεικονίζεται στο **Σχήμα 2** δεν στέφθηκε με επιτυχία, πιθανότατα λόγω έντονων ηλεκτρονιακών και στερικών παρεμποδίσεων, οι οποίες καθιστούν δυσμενή τη συγκεκριμένη αντίδραση σύζευξης και περιορίζουν τον σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Ωστόσο, με κατάλληλη περιστροφή του δεσμού η αντίδραση θα μπορούσε ενδεχομένως να πραγματοποιηθεί· το ενδεχόμενο αυτό, όμως, απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.



Σχήμα 2. Δημιουργία αμιδικού δεσμού με το κυκλοπροπανυλοκαρβονυλο χλωρίδιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : Πειραματική Πορεία και Βιολογική Αξιολόγηση των Συντιθέμενων Ενώσεων σε Καρκινικές Κυτταρικές Σειρές

Η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στον προσδιορισμό της βιωσιμότητας του κυτταρικού πληθυσμού καρκινικών κυττάρων οστεοσαρκώματος μετά από τη χορήγηση συνθετικών αναλόγων μεριδιανινών T1, T3 και T4 (**Σχήμα 1**) τα οποία αποτελούν μικρά μόρια με ανασταλτική δράση έναντι πρωτεϊνικών κινασών. Η βιολογική τους αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε μέσω προσδιορισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων οστεοσαρκώματος μετά από έκθεση στις υπό μελέτη ενώσεις, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης. Η εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατέστη δυνατή με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT, η οποία βασίζεται στη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων που επιβιώνουν και επιτρέπει την **έμμεση αξιολόγηση** της κυτταροτοξικής επίδρασης των υπό μελέτη ενώσεων.

5.1 Καλλιέργεια και επίστροφή κυττάρων

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό **DMEM** υψηλής **συγκέντρωσης γλυκόζης**, εμπλουτισμένο με **10% (v/v) εμβρυικό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum, FBS)** και **1% (v/v) αντιβιοτικό διάλυμα πενικιλίνης–στρεπτομυκίνης**. Τα κύτταρα επωάζονταν σε επωαστήρα (incubator) υπό συνθήκες **37°C και 5% CO₂**. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές ανακαλλιέργειες των κυττάρων έως την επίτευξη της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Μετά τη διασφάλιση ικανοποιητικού ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κατέστη δυνατή η πειραματική παρέμβαση με τις υπό μελέτη ενώσεις. Πριν από την προσθήκη των υπό μελέτη ενώσεων, τα κύτταρα σπάρθηκαν και επώαστηκαν αποκλειστικά με καλλιεργητικό μέσο, ώστε να επιτευχθεί η ομοιόμορφη προσκόλληση και προσαρμογή τους. Ειδικότερα, κατά την πρώτη ημέρα σπάρθηκε ίσος αριθμός κυττάρων (**3000 κύτταρα ανά πηγαδάκι**) σε πλάκες **96 θέσεων τύπου ELISA**, οι οποίες επώαστηκαν για **24 ώρες**, προκειμένου να επιτευχθεί η προσκόλληση και η προσαρμογή των κυττάρων στο καλλιεργητικό υπόστρωμα.

5.2 Προσθήκη των παραγόντων

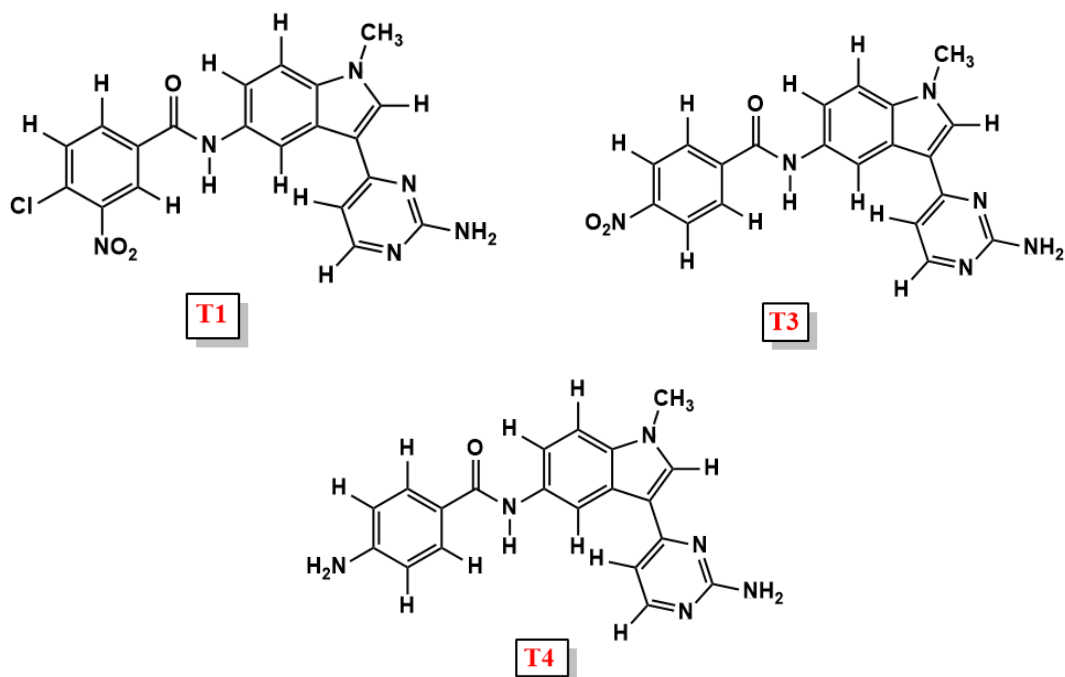
Τη δεύτερη ημέρα του πειράματος πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των προς μελέτη ενώσεων. Αρχικά, οι ενώσεις διαλυτοποιήθηκαν σε **διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)**, προκειμένου να παρασκευαστούν διαλύματα αποθέματος (**stock solutions**)

συγκέντρωσης **20 mM**. Στη συνέχεια, μέσω διαδοχικών αραιώσεων στο καλλιεργητικό μέσο, προέκυψαν οι τελικές συγκεντρώσεις **1,25 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM και 80 μM**.

Κάθε συγκέντρωση της υπό μελέτη ένωσης εφαρμόστηκε σε **τρία ανεξάρτητα πηγαδάκια**, με σκοπό τη διασφάλιση της επαναληψιμότητας των πειραματικών αποτελεσμάτων. Ως **θετικός μάρτυρας (positive control)** ορίστηκαν πηγαδάκια που περιείχαν μόνο κύτταρα, ενώ ως **αρνητικός μάρτυρας (negative control)** χρησιμοποιήθηκαν πηγαδάκια που περιείχαν κύτταρα με την αντίστοιχη συγκέντρωση DMSO. Η επίδραση των ενώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων μελετήθηκε μετά από **24, 48 και 72 ώρες επώασης** παρουσία του παράγοντα.

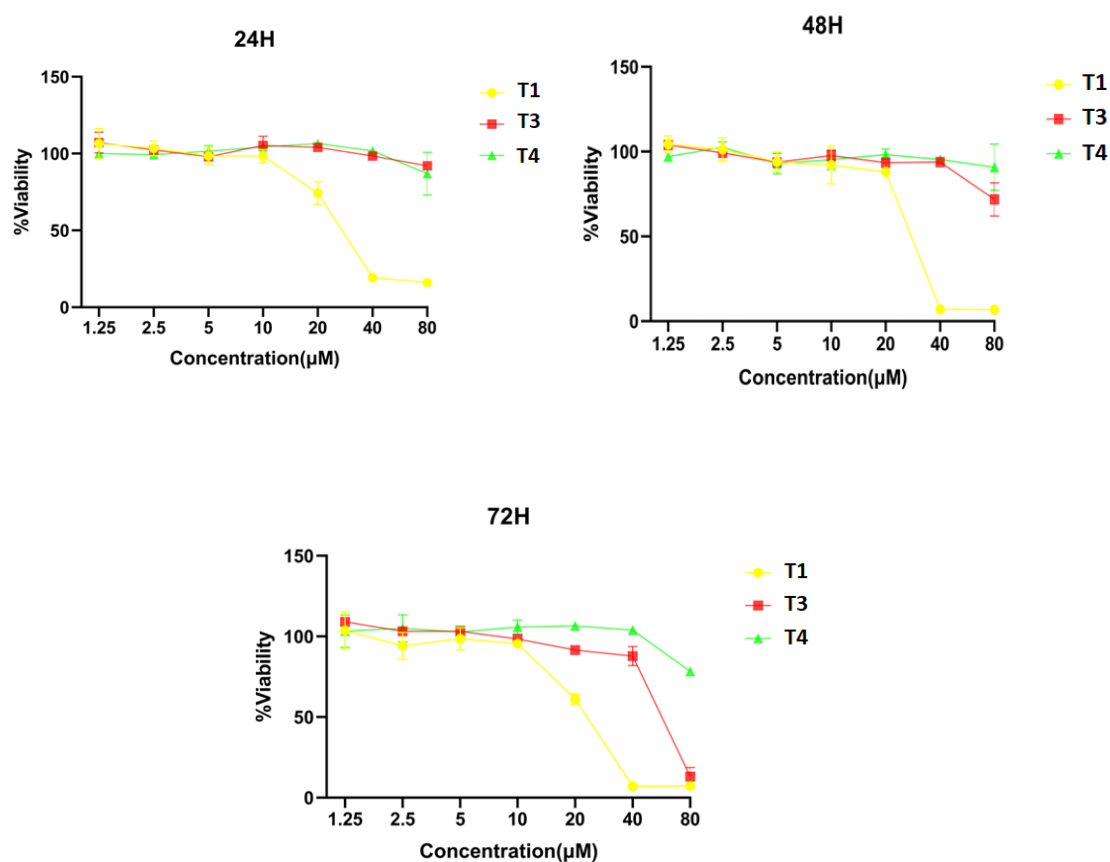
5.3 Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας – Μέθοδος MTT

Ο προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο **MTT** (βρωμίδιο 3-[4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο]-2,5-διφαινυλοτετραζολίου). Το αντιδραστήριο MTT (**κίτρινο**, υδατοδιαλυτό τετραζολικό άλας) έχει τη δυνατότητα να διαπερνά την κυτταρική και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη των **κυττάρων που επιβιώνουν** και να ανάγεται σε αδιάλυτη **φορμαζάνη ιώδους χρώματος** από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα. Η αναγωγική αυτή διεργασία οδηγεί στον σχηματισμό ιώδους χρώματος, επιτρέποντας την ανάπτυξη μιας χρωματομετρικής μεθόδου που συσχετίζει την ποσότητα της παραγόμενης φορμαζάνης με τη μεταβολική δραστηριότητα και, κατ' επέκταση, τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Για την εκτέλεση της μεθόδου, παρασκευάστηκε διάλυμα MTT συγκέντρωσης **0,5 mg/mL**, το οποίο προστέθηκε σε κάθε πηγαδάκι και αφέθηκε για επώαση στους **37°C για 4–6 ώρες**. Στη συνέχεια, οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίστηκαν διαλυτοποιήθηκαν με την προσθήκη **DMSO**. Η οπτική πυκνότητα του ομογενοποιημένου διαλύματος μετρήθηκε με **αναγνώστη μικροπλακών (microplate reader)** σε μήκος κύματος **570 nm**. Οι μετρούμενες τιμές απορρόφησης αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση της φορμαζάνης και συνεπώς την ενδοκυττάρια αναγωγή του MTT, παρέχοντας **έμμεση εκτίμηση του κυτταρικού πληθυσμού που επιβίωσε μετά την έκθεση στις υπό μελέτη ενώσεις**.



Σχήμα 1. Χημικές δομές των ενώσεων T1, T3, T4 που μελετήθηκαν στα καρκινικά κύτταρα.

5.4 Αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας (24–72 h)



Σχήμα 2. Επίδραση των ενώσεων T1, T3 και T4 στη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από 24, 48 και 72 ώρες επώασης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται ως ποσοστό (%) σε σχέση με τον μάρτυρα (control).

Και στα τρία χρονικά σημεία (24, 48 και 72 ώρες) παρατηρείται δόσοεξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των τριών ενώσεων. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει διαφορετική κυτταροτοξική ισχύ και πιθανώς διαφορετικό μηχανισμό δράσης.

Η ένωση **T1** εμφανίζει την εντονότερη κυτταροτοξική δράση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ενώσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1,25–20 μM) η βιωσιμότητα παραμένει κοντά στο 90–100%. Ωστόσο, σε συγκεντρώσεις ≥ 40 μM παρατηρείται απότομη και δραματική μείωση της βιωσιμότητας, η οποία γίνεται εντονότερη με την αύξηση του χρόνου επώασης. Στις 48 και 72 ώρες, η βιωσιμότητα μειώνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (<10–20%), γεγονός που υποδηλώνει ισχυρή κυτταροτοξική δράση.

Η ένωση **T3** παρουσιάζει **μέτρια και σαφώς δόσοεξαρτώμενη μείωση της βιωσιμότητας**. Μέχρι τα 20 μM , η επίδραση είναι περιορισμένη. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (40–80 μM) παρατηρείται **σημαντική μείωση της βιωσιμότητας**, ιδιαίτερα μετά από 72 ώρες επώασης. Η δράση της **T3** φαίνεται **λιγότερο έντονη από της T1**, αλλά σαφώς πιο έντονη σε σχέση με την T4.

Η ένωση **T4** εμφανίζει τη **χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα** από τις τρεις ενώσεις. Η κυτταρική βιωσιμότητα παραμένει σε υψηλά επίπεδα (>80–90%) για το μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων. Ακόμη και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις, η μείωση της βιωσιμότητας είναι **ήπια**, γεγονός που υποδηλώνει **χαμηλή τοξικότητα ή διαφορετική φαρμακοδυναμική συμπεριφορά**.

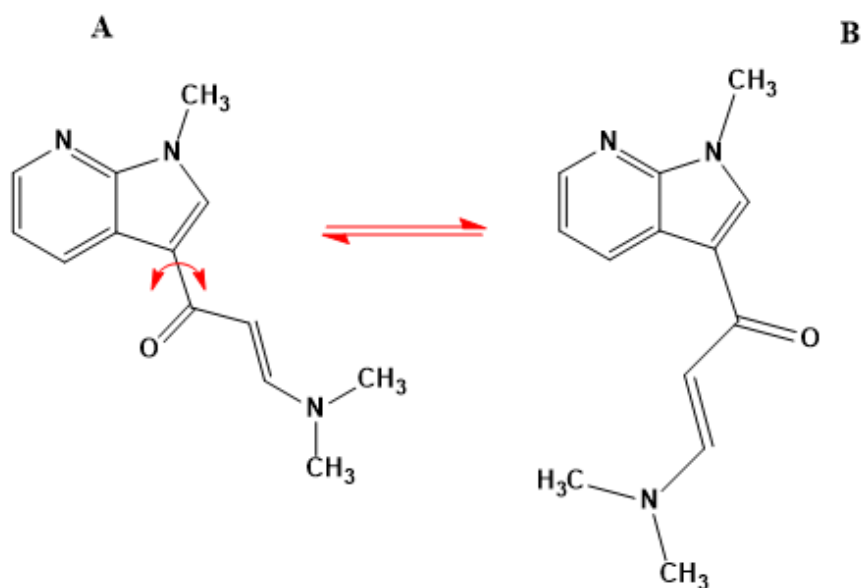
Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι μικρές δομικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ενώσεων επηρεάζουν σημαντικά τη βιολογική τους δράση και καθιστούν την ένωση **T1** υποψήφια για περαιτέρω διερεύνηση ως αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών με αντικαρκινική δράση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΣΕΙΡΑΣ ΕΝΑΜΙΝΟΝΩΝ

Στο παρόν κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη μιας σειράς εναμινονών με βάση τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$. Το ενδιαφέρον εστιάστηκε στα πρωτόνια των μεθυλομάδων που είναι συνδεδεμένες με το άζωτο, όπου παρατηρήθηκε ότι σε κάποιες περιπτώσεις εμφανίζονται ως μια απλή κορύφη, ενώ σε άλλες ως δύο απλές κορυφές. Η διαφοροποίηση αυτή θα πρέπει να συνδέεται με το ενεργειακό φράγμα περιστροφής του δεσμού $=\text{C-N}(\text{Me})_3$, το οποίο καθορίζει την ταχύτητα περιστροφής γύρω από τον δεσμό C–N σε σχέση με την κλίμακα χρόνου που καταγράφει το NMR (αποδιέγερση των spin). Όταν, δηλαδή, η εναλλαγή των διαμορφώσεων είναι γρήγορη, η χημική μετατόπιση των δύο πρωτονίων καταγράφεται ως ένας μέσος όρος (ένα σήμα), ενώ όταν η εναλλαγή είναι αργή, τα δύο πρωτόνια παραμένουν διακριτά κατά τη μέτρηση και παρατηρούνται δύο σήματα. Για την υποστήριξη αυτής της ερμηνείας, πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί σε επίπεδο **DFT/B3LYP/6-31G+d** και **DFT/ ω B97XD/6-31G+d** και μελέτη της περιστροφής του δεσμού C–N, τα οποία συσχετίστηκαν με τα πειραματικά δεδομένα. Ακολουθεί συνοπτική παρουσίαση των εναμινονών και των πιθανών διαμορφωμερών τους, των πειραματικών δεδομένων και των αντίστοιχων υπολογιστικών αποτελεσμάτων, ώστε να αναδειχθεί ξεκάθαρα πότε προκύπτει ένα σήμα και πότε δύο, καθώς και πώς οι υπολογισμοί και η περιστροφή γύρω από τον δεσμό C–N πλαισιώνουν την ερμηνεία των ευρημάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, χρησιμοποιούνται φασματοσκοπικά δεδομένα NMR τα οποία έχουν ληφθεί σε προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου από άλλους ερευνητές. Τα δεδομένα αυτά δεν μετρήθηκαν εκ νέου στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, αλλά αξιοποιούνται για την ερμηνεία και την επιβεβαίωση της δομής των ενώσεων [67], [70], [71].

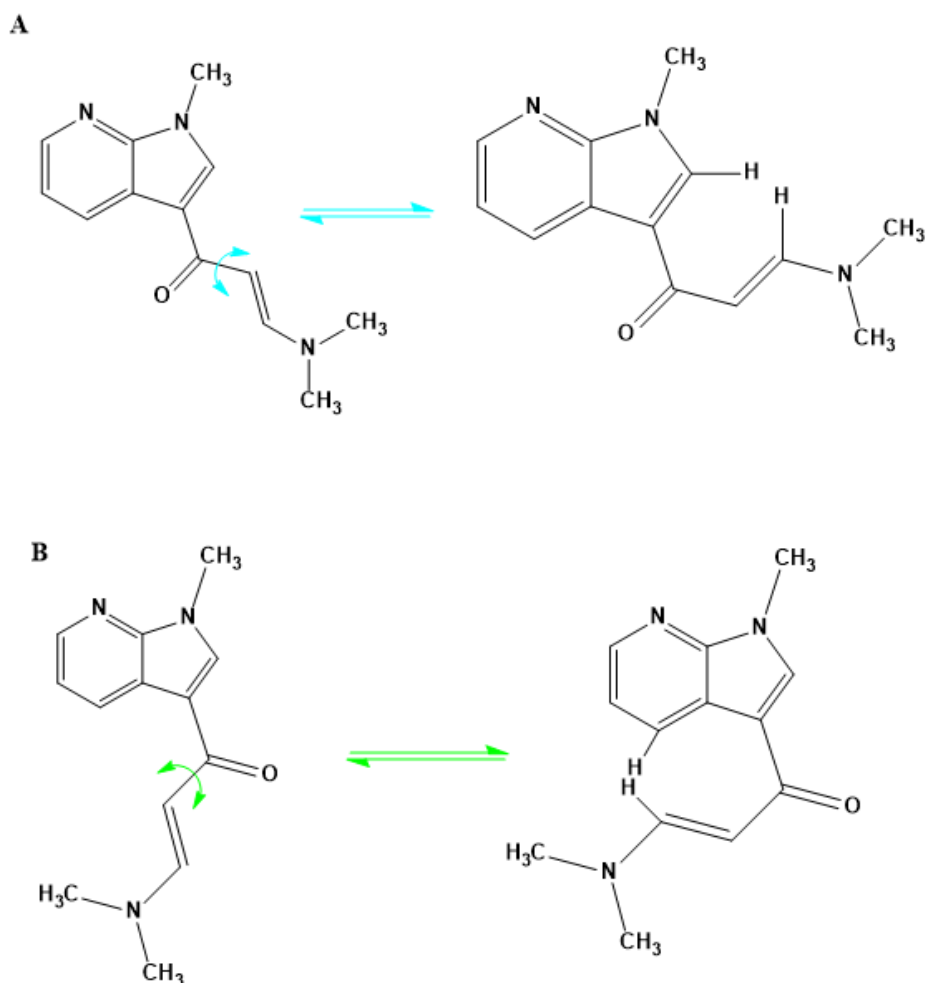
6.1 Εναμινόνη 1: (E)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη [67]

Τα διαμορφωμερή της ένωσης αυτής είναι τα Α και Β που φαίνονται στο **Σχήμα 1**.



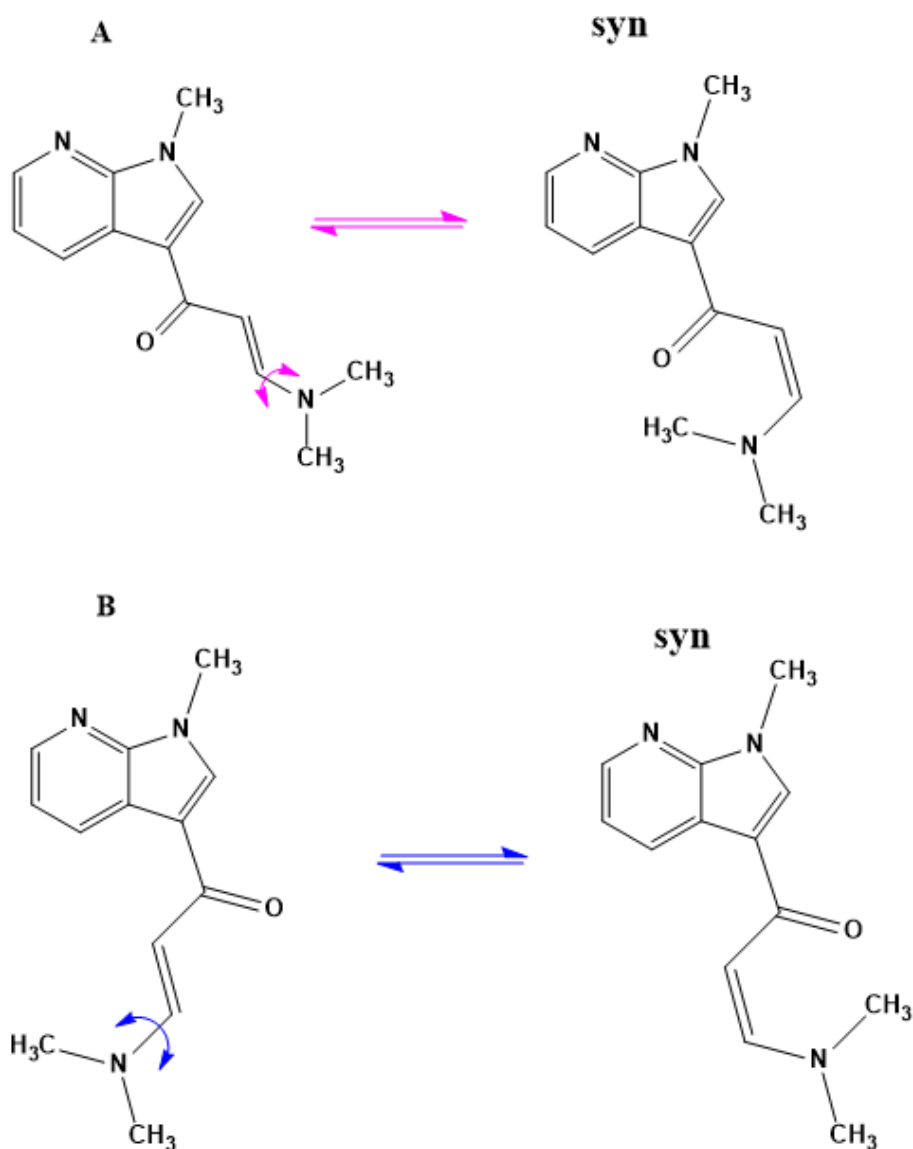
Σχήμα 1. Διαμορφωμερή της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-πυρρολο[2,3-*b*]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

Παρότι, η γεωμετρία του μορίου επιτρέπει επιπλέον και την περιστροφή γύρω από τον δεσμό C–C που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2** που ακολουθεί και για τα δύο διαμορφωμερή, οι διαμορφώσεις αυτές είναι ενεργειακά ασταθείς άρα εμφανίζουν πολύ μικρή σταθερότητα. Γι' αυτόν τον λόγο, γίνεται απλή αναφορά τους, χωρίς όμως να ληφθούν υπόψιν στους υπολογισμούς που ακολουθούν.



Σχήμα 2. Ασταθείς διαμορφώσεις της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-πυρρολο[2,3-*b*]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης με περιστροφή του δεσμού C-C.

Παρατηρούμε ότι σ' αυτές τις δομές, **οι ακτίνες Wan der Waals** των πρωτονίων έρχονται πολύ κοντά μεταξύ τους, πράγμα το οποίο δεν ευνοεί τον σχηματισμό των μορίων αυτών. Θα μπορούσε, θεωρητικά, να ληφθεί υπόψη και η περιστροφή γύρω από τον διπλό δεσμό C=C, ώστε να προκύψουν οι *syn* διαμορφώσεις της εναμινόνης και για τα δύο διαμορφωμερή, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3**. Ωστόσο, οι *syn* διαμορφώσεις είναι ενεργειακά δυσμενείς και παρουσιάζουν μικρότερη σταθερότητα σε σχέση με τις αντίστοιχες *anti* και συνεπώς, βρίσκονται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις με βάση την κατανομή Boltzmann. Επομένως, για τους ενεργειακούς υπολογισμούς και τη σύγκριση των διαμορφώσεων θα θεωρήσουμε ότι στο σύστημα συμμετέχουν μόνο οι *anti* διαμορφώσεις.



Σχήμα 3. Διαμορφώσεις anti και syn της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-πυρρολο[2,3-*b*]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

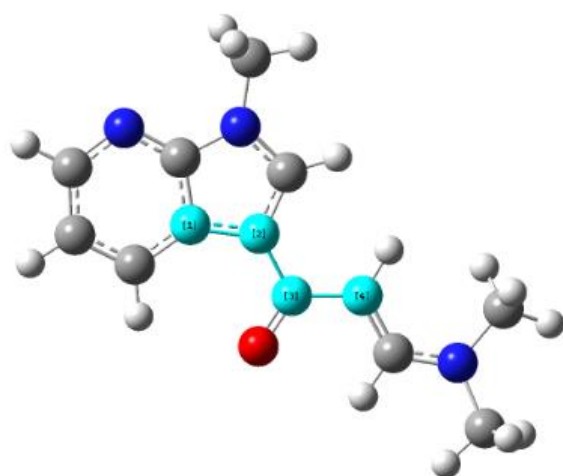
Στον **Πίνακα 1** που ακολουθεί, συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τα δύο διαμορφωμερή του υπό μελέτη μορίου, όπως προέκυψαν από τις δύο υπολογιστικές μεθόδους **DFT/B3LYP/6-31G+d** και **DFT/ ω B97XD/6-31G+d**. Για κάθε συνδυασμό διαμορφωμερούς–μεθόδου παρατίθενται η ελεύθερη ενέργεια G , η σχετική ΔG ως προς το σταθερότερο διαμορφωμερές της ίδιας μεθόδου, η διπολική ροπή μ και το ποσοστό τους στο διάλυμα. Οι πληθυσμοί υπολογίστηκαν από τις τιμές ΔG με κατανομή Boltzmann στη θερμοκρασία της μελέτης (298 K), επιτρέποντας την αξιολόγηση της σχετικής σταθερότητας των διαμορφωμερών και τον έλεγχο της συνέπειας μεταξύ των μεθόδων (ταύτιση ή απόκλιση στη σειρά σταθερότητας).

Πίνακας 1. Χρησιμοποιούμενες μεθόδους και αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

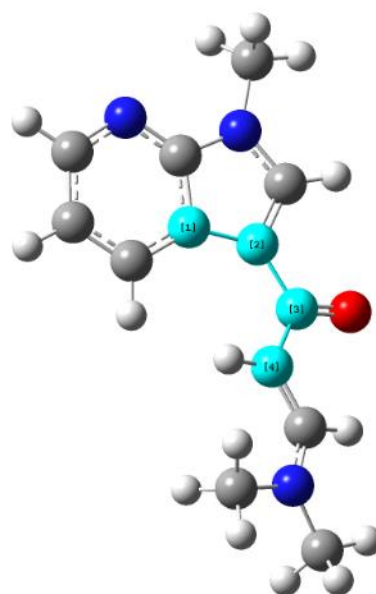
Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-743,701397	0	6,056	92,60
B	B3LYP	-743,699011	1,497	3,812	7,40
A	ωB97XD	-743,448678	0	5,989	95,74
B	ωB97XD	-743,445739	1,844	3,812	4,26

* ΔG : ως προς το πιο σταθερό διαμορφωμερές της ίδιας μεθόδου.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1** συγκλίνουν με τη δομική εικόνα των διαμορφωμερών, καθώς στο διαμορφωμερές A που είναι το πιο σταθερό, η διεδρική γωνία είναι περίπου $179,6^\circ$ πράγμα που υποδεικνύει ουσιαστικά πλήρως **συνεπίπεδη διάταξη**, ενώ η αντίστοιχη τιμή στο λιγότερο σταθερό διαμορφωμερές B, περίπου $14,9^\circ$, μαρτυρά **μικρή απόκλιση από την επιπεδότητα λόγω στερικών αλληλεπιδράσεων των πρωτονίων**. Οι αντίστοιχες δομές των διαμορφωμερών και οι χαρακτηριστικές διεδρες γωνίες τους (άτομα με ανοιχτό μπλε χρώμα) παρουσιάζονται στο **Σχήμα 4**.



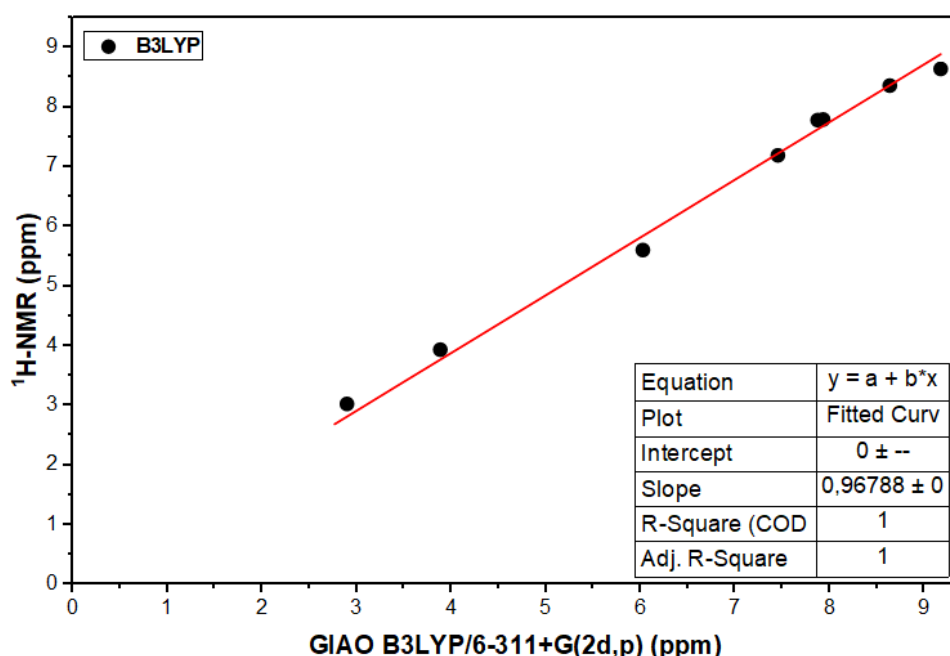
ΔΙΑΜΟΡΦΩΜΕΡΕΣ A



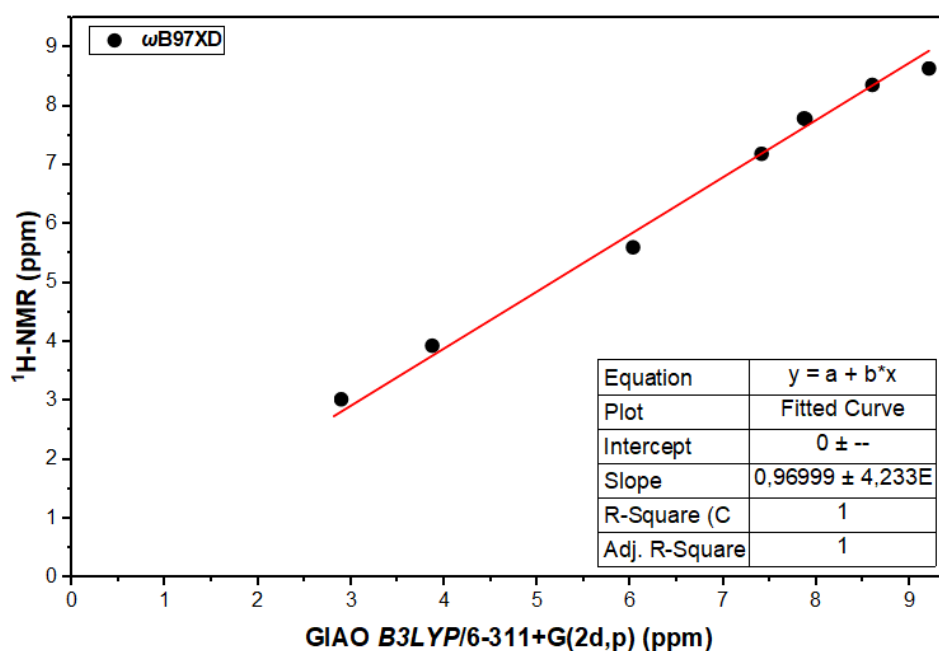
ΔΙΑΜΟΡΦΩΜΕΡΕΣ B

Σχήμα 4. Απεικόνιση των διεδρων γωνιών (άτομα με ανοιχτό μπλε χρώμα) των διαμορφωμένων Α και Β της ένωσης (E)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

Για την καλύτερη αποτίμηση και ερμηνεία των φασμάτων που λήφθηκαν, πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί φασμάτων NMR με τη μέθοδο **GIAO** σε επίπεδο **DFT B3LYP/6-311+G(2d,p)** για όλα τα διαμορφωμερή που προέκυψαν από τις μελέτες, τόσο με το λειτουργικό **B3LYP** όσο και με το **ωB97XD**. Στους υπολογισμούς αυτούς, χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης αυτός που χρησιμοποιήθηκε και για την καταγραφή των φασμάτων. Για κάθε διακριτό πρωτόνιο, οι θεωρητικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων προέκυψαν ως μέσοι όροι των τιμών των διαμορφωμένων, όπου η συμβολή κάθε διαμορφωμερούς σταθμίστηκε σύμφωνα με την κατανομή Boltzmann (δηλαδή, ανάλογα με τον πληθυσμό του). Τα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζουν τη γραφική συσχέτιση των πειραματικών και θεωρητικών τιμών των χημικών μετατοπίσεων, όπου οι θεωρητικές τιμές υπολογίστηκαν με τη μέθοδο GIAO σε επίπεδο DFT B3LYP/6-311+G(2d,p) σε CHCl₃ (IefPCM, CHCl₃), χρησιμοποιώντας γεωμετρίες βελτιστοποιημένες με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ωB97XD/6-31+G(d).



Σχήμα 5. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ¹H (δ, ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιάλυσης IefPCM = CHCl₃, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).

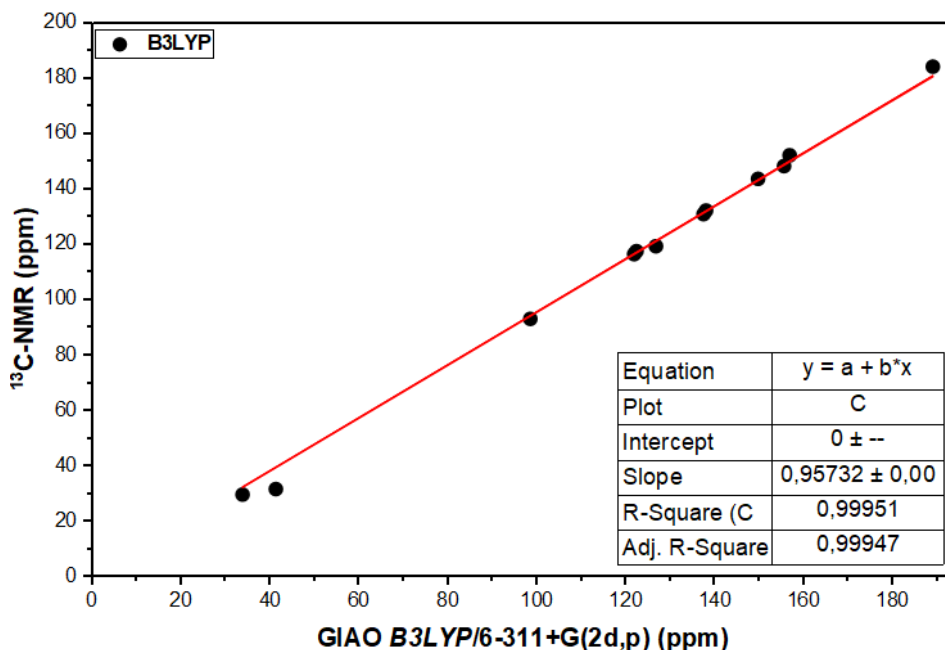


Σχήμα 6. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl_3 , σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-311+G(d)$).

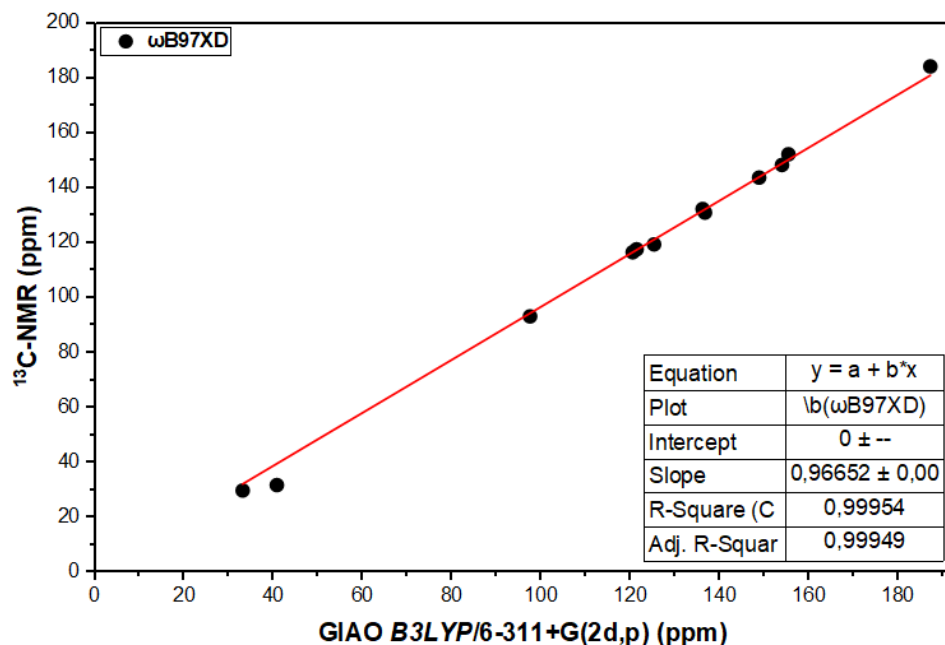
Από τα δύο διαγράμματα παρατηρούμε τα εξής:

- Και στα δύο σχήματα η συσχέτιση μεταξύ των θεωρητικών τιμών GIAO (άξονας x) και των πειραματικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (άξονα y) αξιολογήθηκε μέσω απλής γραμμικής παλινδρόμησης (**linear regression**) με ελαχιστοποίηση τετραγώνων, με σταθερό όρο το μηδέν (τεμνόμενη, $y = b \cdot x$).
- Το ιδανικό θα ήταν $b = 1$ και $a = 0$, όπου τότε θα είχαμε τέλεια συμφωνία θεωρίας – πειράματος. Οι κλίσεις που βρέθηκαν από τις δύο μεθόδους είναι:
 - B3LYP/6-311G+(2d, p): $b = 0,9679 \pm 0,00$, $R^2 = 0,9991$
 - $\omega\text{B97XD}/6-311G+(2d, p)$: $b = 0,9700 \pm 0,010$, $R^2 = 0,9992$
- Κλίση < 1 σημαίνει ότι οι θεωρητικές τιμές είναι συστηματικά ελαφρώς μεγαλύτερες από τις πειραματικές (υπερεκτίμηση $\sim 3\%$). Άλλωστε είναι γνωστό ότι τα αρωματικά πρωτόνια συνήθως υπερεκτιμούνται σ' ένα μικρό βαθμό.
- Τα $R^2 \approx 0,999$ υποδεικνύουν **εξαιρετική γραμμικότητα** και πολύ μικρή διασπορά: οι αποκλίσεις είναι κυρίως συστηματικές, όχι τυχαίες.
- Μεταξύ των δύο μεθόδων, η ωB97XD δίνει κλίση ελαφρώς πιο κοντά στη μονάδα άρα μια οριακά καλύτερη αναπαραγωγή της κλίμακας των πειραματικών τιμών.

Στα παρακάτω σχήματα απεικονίζονται τα διαγράμματα συσχέτισης των χημικών μετατοπίσεων ^{13}C μεταξύ των θεωρητικών και των πειραματικών τιμών.



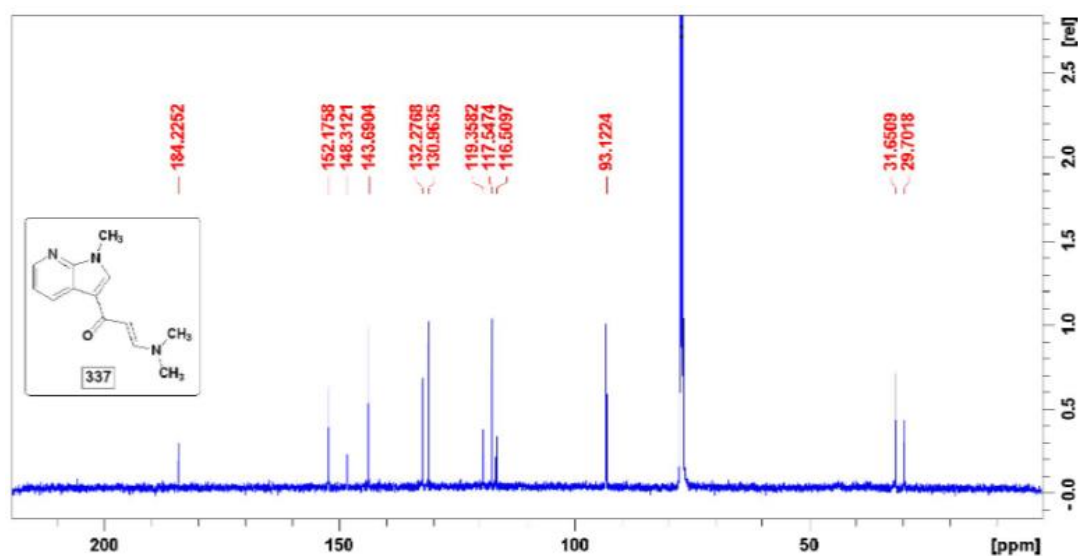
Σχήμα 7. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^{13}C (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl_3 , σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



Σχήμα 8. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^{13}C (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl_3 , σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).

Συνολικά, τα διαγράμματα συσχέτισης πειραματικών και θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^{13}C -NMR για τις μεθόδους GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p) και

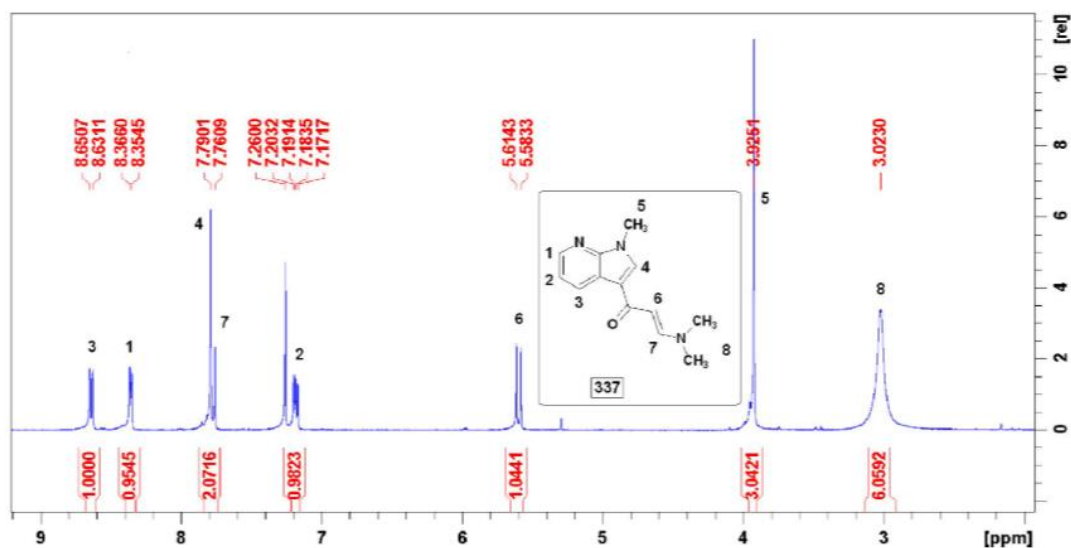
GIAO/DFT ω B97XD/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM/CHCl₃, εμφανίζουν υψηλή γραμμική συσχέτιση ($R^2 \approx 0,9995$) και πρακτικά μηδενική τετμημένη, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία σταθερού συστηματικού σφάλματος. Οι κλίσεις των ευθειών παλινδρόμησης ($b = 0,957$ για το B3LYP και $b = 0,967$ για το ω B97XD) βρίσκονται πολύ κοντά στη μονάδα, με το λειτουργικό ω B97XD να αποδίδει ελαφρώς καλύτερη προσαρμογή στις πειραματικές τιμές. Επομένως, και οι δύο υπολογιστικές προσεγγίσεις κρίνονται ιδιαίτερα αξιόπιστες για την πρόβλεψη και ερμηνεία φασμάτων ¹³C-NMR, με το ω B97XD να παρουσιάζει λίγο καλύτερα αποτελέσματα.



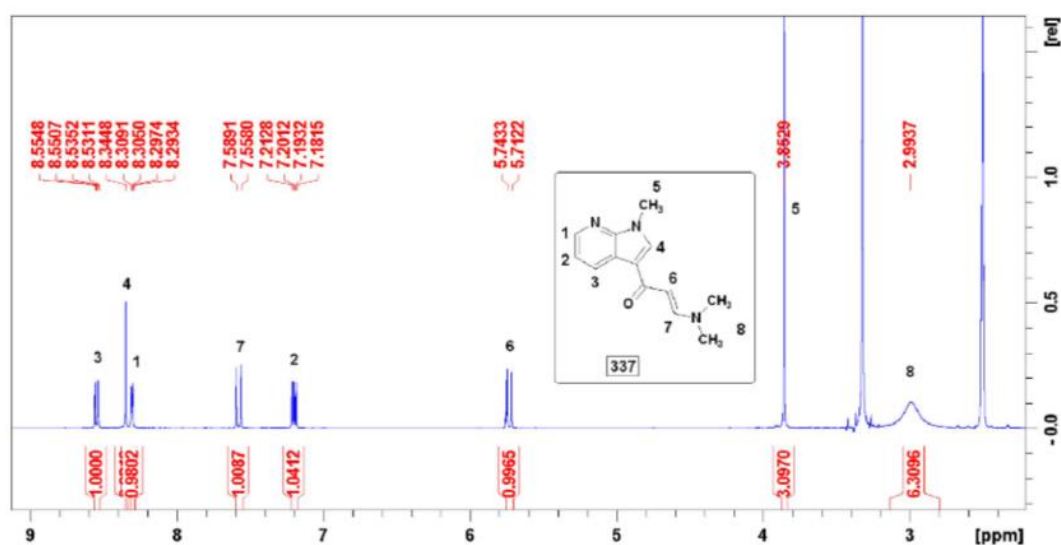
Σχήμα 9. Φάσμα ¹³C NMR (100 MHz) της ένωσης 1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολίου (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-πυρρολο[2,3-*b*]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη CDCl₃ [67].

Στην υπό μελέτη εναμινόνη, για τα μεθυλικά πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στο άζωτο (N), παρατηρείται στο φάσμα NMR **μία μόνο απλή κορυφή** στους 298 K, όπως φαίνεται στα **Σχήματα 10,11**. Το γεγονός αυτό αποδίδεται τόσο στην ευκολία περιστροφής του δεσμού C–N, όσο και στο αντίστοιχο ενεργειακό φράγμα περιστροφής ($\Delta G^\ddagger$) του δεσμού. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε μελέτη του δεσμού C–N και της περιστροφής του, με στόχο τον υπολογισμό του ενεργειακού φράγματος περιστροφής ($\Delta G^\ddagger$) μέσω του προσδιορισμού της ενέργειας της μεταβατικής κατάστασης (**Transition State, TS**) για όλα τα πιθανά διαμορφωμερή. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 12** όπου, απεικονίζεται η μεταβολή που υφίσταται η ηλεκτρονιακή ενέργεια σε συνάρτηση με την αλλαγή της διέδρης γωνίας CCNCH₃, αλλά και στο **Σχήμα 13** όπου φαίνεται η μεταβολή της

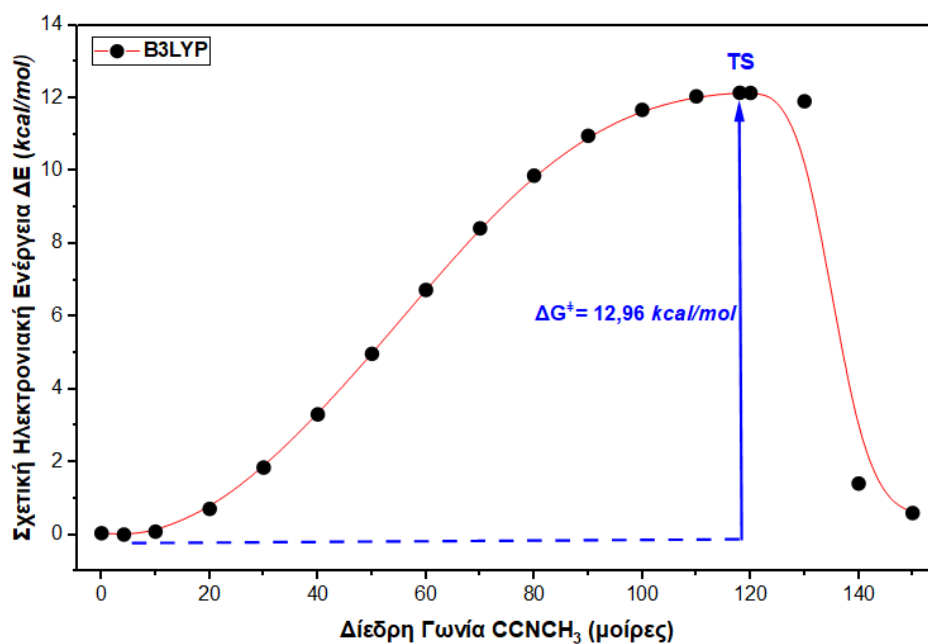
ελεύθερης ενέργειας Gibbs για τα πιθανά διαμορφωμερή, όπως υπολογίστηκε και με τις δύο μεθόδους.



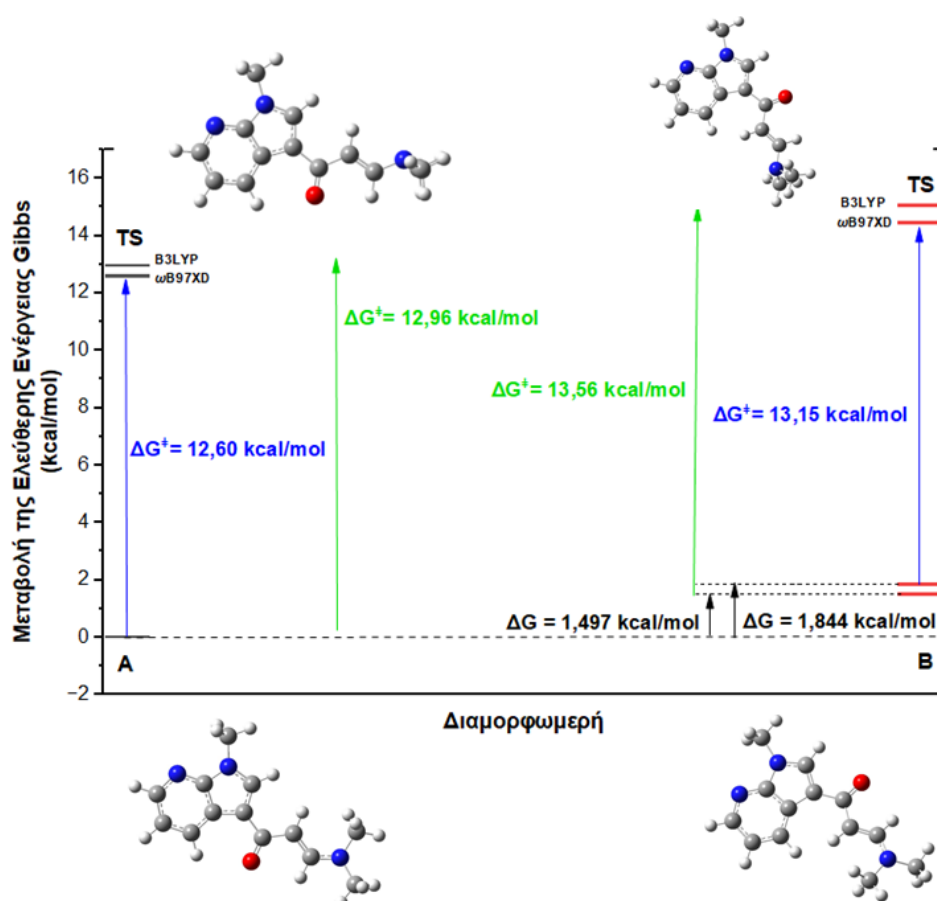
Σχήμα 10. Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της ένωσης 1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολίου (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-πυρρολο[2,3-*b*]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη CDCl_3 [67].



Σχήμα 11. Φάσμα ^1H NMR (400 MHz) της ένωσης 1-μεθυλο-5-νιτρο-1*H*-ινδολίου (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-πυρρολο[2,3-*b*]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO-d_6 [67].



Σχήμα 12. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη διεδρη γωνία $CCNCH_3$ για το διαμορφωμερές A (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο B3LYP) .



Σχήμα 13. Διάγραμμα που απεικονίζει τα διαμορφωμερή σε συνάρτηση με την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, με τις μεθόδους B3LYP/6-31G+d (πράσινα βέλη) και $\omega B97XD/6-31G+d$ (μπλε βέλη).

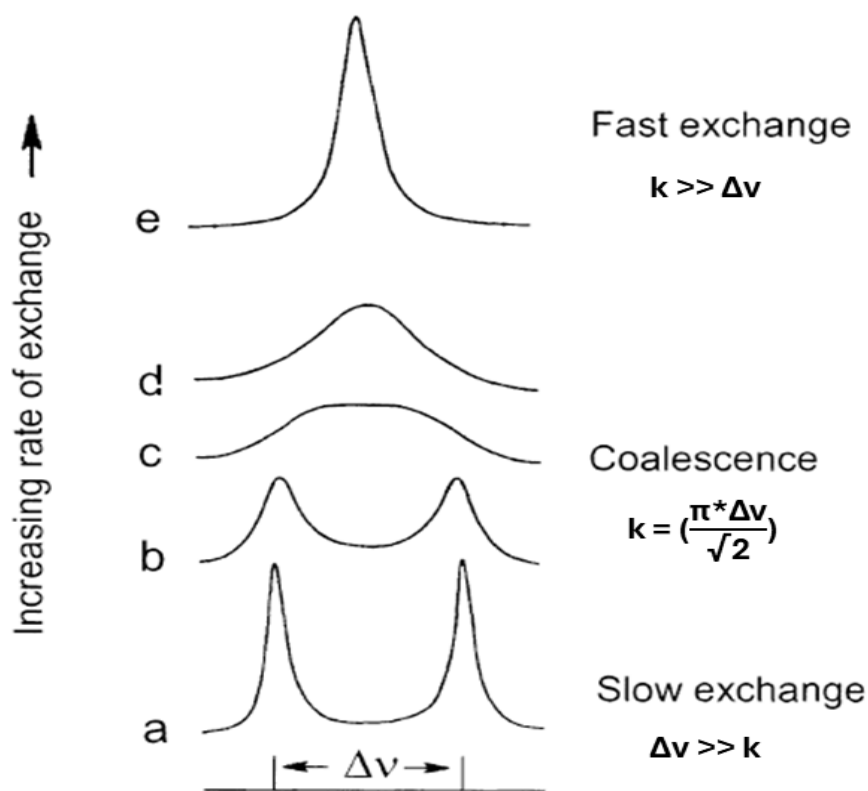
Όταν δύο μαγνητικοί πυρήνες βρίσκονται σε διαφορετικά μοριακά περιβάλλοντα, εμφανίζονται στο φάσμα NMR ως **δύο διακριτά σήματα**, χωρισμένα μεταξύ τους κατά $\Delta\nu$ Hz (Σχήμα 13a). Εάν όμως λαμβάνει χώρα μια δυναμική διεργασία που εναλλάσσει τα δύο περιβάλλοντα με ρυθμό k πολύ μεγαλύτερο από τη διαφορά συχνότητας $\Delta\nu$ ($k \gg \Delta\nu$), τότε οι πυρήνες δεν διακρίνονται πλέον ξεχωριστά και παρατηρείται ένα μόνο, «μέσο» σήμα σε ενδιάμεση συχνότητα (Σχήματα 13d, 13e).

Όταν ο ρυθμός ανταλλαγής k είναι συγκρίσιμος με τη διαφορά συχνοτήτων $\Delta\nu$, καταγράφονται χαρακτηριστικά διευρυμένα σήματα (exchange broadened spectra, Σχήμα 13b). Από τα φάσματα αυτά μπορούν να υπολογιστούν οι σταθερές ρυθμού της διεργασίας ανταλλαγής και, στη συνέχεια, οι θερμοδυναμικές παράμετροι ενεργοποίησης $\Delta G^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$ και $\Delta S^\ddagger$.

Στο σημείο συναίρεσης (coalescence), όπου τα δύο αρχικά διακριτά σήματα συγχωνεύονται σε ένα ενιαίο, μέσο σήμα (Σχήμα 13c), ο ρυθμός ανταλλαγής μπορεί να προσεγγιστεί από τη σχέση:

$$k_c \approx \frac{\pi \Delta\nu}{\sqrt{2}}$$

όπου $\Delta\nu$ είναι η διαφορά συχνοτήτων (σε Hz) των δύο σημάτων στην περιοχή αργής ανταλλαγής.



Σχήμα 13. Σχηματική απεικόνιση της εξέλιξης των σημάτων NMR για δύο πυρήνες που ανταλλάσσουν θέσεις.

Σε πρακτικό επίπεδο, μία ένωση στην οποία λαμβάνει χώρα διεργασία ανταλλαγής μπορεί, όταν τα φάσματα NMR καταγράφονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες, να δώσει μια ακολουθία φασμάτων αντίστοιχη με αυτή του Σχήματος 13. Η μεταβολή της θερμοκρασίας του δείγματος μεταβάλλει τη σταθερά ρυθμού της ανταλλαγής (η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού), και η μορφή του φάσματος εξαρτάται από το αν η σταθερά ρυθμού k (σε s^{-1}) είναι μεγάλη ή μικρή σε σχέση με τη διαφορά χημικής μετατόπισης των πυρήνων που ανταλλάσσονται, $\Delta\nu$ (σε Hz). Επιπλέον, μόρια στα οποία λαμβάνουν χώρα διεργασίες ανταλλαγής μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική φασματική εικόνα σε φασματογράφους NMR διαφορετικής συχνότητας, καθώς το $\Delta\nu$ εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου. Έτσι, ένα φάσμα που σε ένα όργανο εμφανίζει διεύρυνση λόγω ανταλλαγής μπορεί, όταν καταγραφεί σε φασματογράφο ισχυρότερου πεδίου, να αντιστοιχεί πλέον σε φάσμα αργής ανταλλαγής με σαφέστερα διαχωρισμένα σήματα. Τα φαινόμενα μέσης τιμής που οφείλονται σε διεργασίες ανταλλαγής μπορούν, κατ' αρχήν, να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε δυναμική διεργασία λαμβάνει χώρα μέσα σε ένα μόριο ή μεταξύ μορίων. Ωστόσο, πολλές από αυτές εξελίσσονται με ρυθμούς είτε τόσο γρήγορους είτε τόσο

αργούς, ώστε να μην προκαλούν ορατή διεύρυνση στα φάσματα NMR. Η χρονική κλίμακα του NMR συμπίπτει τυχαία με τους ρυθμούς ορισμένων συνηθισμένων χημικών διεργασιών, οι οποίες, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία, οδηγούν σε χαρακτηριστική αλλαγή της μορφής των φασμάτων NMR. Σε αυτές περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, ανταλλαγή μεταξύ διαφορετικών διαμορφώσεων (π.χ. chair–boat–chair στο κυκλοεξάνιο), ανταλλαγή εύκολα ανταλλάξιμων πρωτονίων (π.χ. -OH, -COOH, -NH₂) και περιορισμένη περιστροφή γύρω από δεσμούς με μερικό διπλό χαρακτήρα [68].

Η **εξίσωση Eyring-Evans-Polanyi** που προκύπτει από τη Θεωρία Μεταβατικής Κατάστασης (Transition State Theory, TST) συνδέει τον ρυθμό μιας διεργασίας (την σταθερά ρυθμού k) με το **φράγμα ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης $\Delta G^\ddagger$** :

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} \exp \left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \right)$$

όπου k η σταθερά ρυθμού (rate constant), k_B η σταθερά του Boltzmann, h η σταθερά Planck, R η παγκόσμια σταθερά αερίων, T η θερμοκρασία και κ ο **συντελεστής μετάδοσης** (συνήθως λαμβάνεται $\kappa = 1$, εκτός αν υπάρχουν σημαντικές διορθώσεις ανα-διέλευσης/διάχυσης) [69].

Η $\Delta G^\ddagger$ σχετίζεται με την ενθαλπία και την εντροπία ενεργοποίησης μέσω:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Έτσι, ο ρυθμός εξαρτάται από ενθαλπικούς παράγοντες και από την εντροπική συνεισφορά που απαιτείται προκειμένου να επιτευχθεί η μεταβατική κατάσταση. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο δεν χρησιμοποιούμε τη ΔE , η οποία προκύπτει από τον κβαντομηχανικό υπολογισμό ως καθαρά ηλεκτρονιακή ενέργεια και αντιστοιχεί θεωρητικά σε 0 K, χωρίς να περιλαμβάνει την ενέργεια μηδενικού σημείου (ZPE), τις θερμικές και εντροπικές συνεισφορές και την επίδραση του διαλύτη. Για να υπολογιστεί πόσο απέχουν δύο σήματα σε συχνότητα (Hz) στο φάσμα ¹H NMR, με βάση τη διαφορά τους σε ppm χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$\Delta \nu \text{ (Hz)} = \Delta \delta \text{ (ppm)} \times \nu_o \text{ (MHz)} ,$$

όπου $\Delta \delta \text{ (ppm)}$ = η **διαφορά της χημικής μετατόπισης** δύο κορυφών στο φάσμα.

ν_0 (MHz) = η **συχνότητα λειτουργίας του οργάνου** (π.χ. 250, 400, 500 MHz).

$\Delta\nu$ (Hz) = η **πραγματική διαφορά συχνότητας** αυτών των δύο σημάτων στο συγκεκριμένο όργανο, δηλαδή στο NMR.

Για την ίδια εναμινόνη, **(E)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1H-πυρρολο[2,3-b]πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη**, ισχύει το εξής:

Για την περιγραφή της δυναμικής ανταλλαγής των μεθυλικών πρωτονίων υπολογίστηκαν δύο φράγματα ενεργοποίησης $\Delta G^\ddagger$, που αντιστοιχούν στις επιμέρους διαμορφώσεις του μορίου με τιμές 12,96 και 13,56 kcal·mol⁻¹ (με τη μέθοδο B3LYP). Οι τιμές των φραγμάτων ενεργοποίησης είναι πολύ κοντινές μεταξύ τους, συνεπώς, ως αντιπροσωπευτικό φράγμα ενεργοποίησης επιλέχθηκε το χαμηλότερο, $\Delta G^\ddagger = 12,96$ kcal·mol⁻¹, το οποίο αντιστοιχεί **στο ενεργειακά σταθερότερο διαμορφωμερές** και χρησιμοποιήθηκε στην εξίσωση Eyring για τον υπολογισμό του αντίστοιχου ρυθμού ανταλλαγής. Για $\Delta G^\ddagger = 12,96$ kcal·mol⁻¹, $T = 298$ K, $\kappa = 1$

$$k = 1 \frac{1,380649 * 10^{-23} (\text{J} * \text{K}^{-1}) * 298 \text{ K}}{6,62607015 * 10^{-34} (\text{J} * \text{s})} \exp \left(- \frac{12,96 \text{ kcal/mol}}{1,987 * 10^{-3} \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol} * \text{K}} \right) * 298 \text{ K}} \right)$$

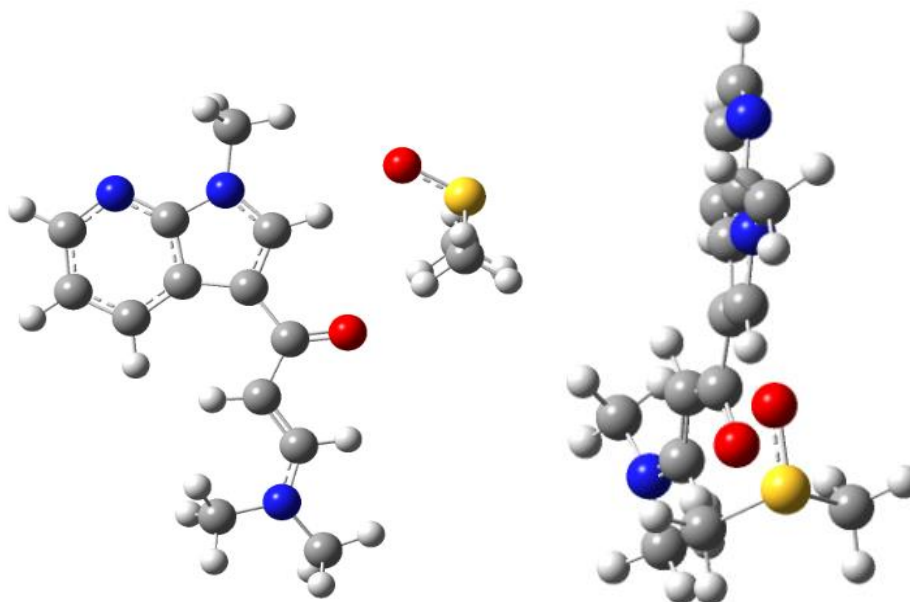
Επομένως, $k \approx 1,9 * 10^3 \text{ s}^{-1}$ και τ είναι ο **χαρακτηριστικός χρόνος ή μέσος χρόνος παραμονής** για να γίνει η αλλαγή από τη μία κατάσταση στην άλλη.

$$\tau = \frac{1}{k} = 0,00052 \text{ s ή } 0,52 \text{ ms}$$

Τα δύο μεθύλια επί του αζώτου εμφανίζονται ως μία μόνο απλή κορυφή στο φάσμα ¹H NMR, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύστημα βρίσκεται στην **περιοχή γρήγορης ανταλλαγής** ως προς τη χρονική κλίμακα του NMR. Δηλαδή, τα άτομα προλαβαίνουν να βρεθούν και στα δύο περιβάλλοντα πολλές φορές, μέσα στον χρόνο παρατήρησης του NMR και έτσι το όργανο καταγράφει έναν χρονικά σταθμισμένο μέσο όρο. Επειδή τα δύο σήματα δεν διαχωρίζονται, η διαφορά χημικής μετατόπισης $\Delta\delta$ και, κατά συνέπεια, η $\Delta\nu$ δεν μπορούν να προσδιοριστούν άμεσα από το πείραμα. Παρ' όλα αυτά, η τιμή του ρυθμού ανταλλαγής k που προκύπτει από την εξίσωση Eyring είναι επαρκώς υψηλή ώστε, να δικαιολογεί την παρατήρηση ενός μέσου σήματος, σε συμφωνία με την κατάταξη του συστήματος στην **περιοχή γρήγορης ανταλλαγής (fast exchange)**.

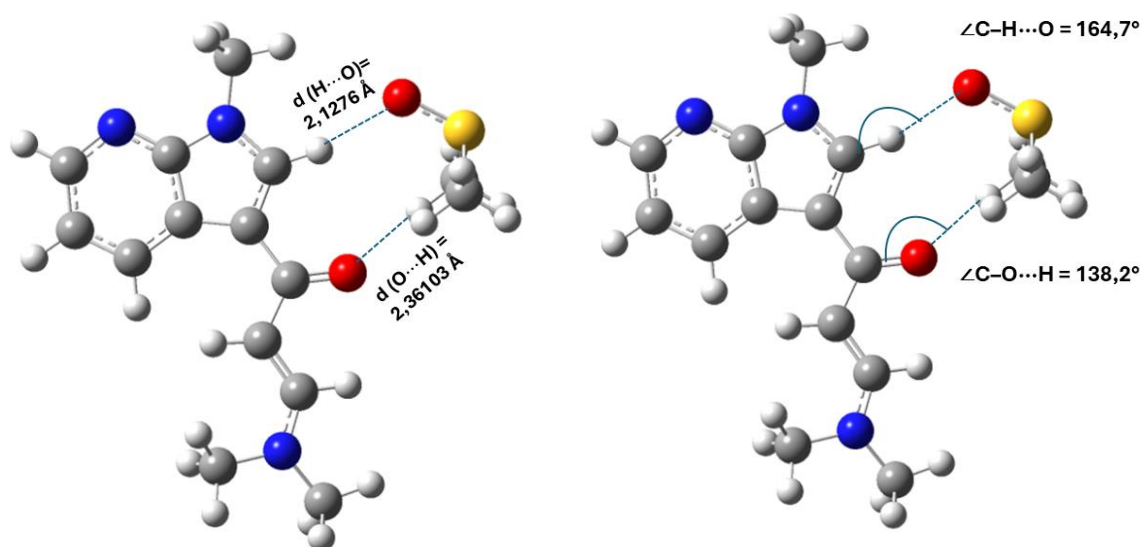
Με τη μέθοδο ω B97XD, και συγκεκριμένα για το πιο σταθερό διαμορφωμερές που είναι το **A**, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί της ενέργειας της μεταβατικής κατάστασης τόσο απουσία όσο και παρουσία διαλύτη, με στόχο να διερευνηθεί η επίδραση του διαλύτη στο ενεργειακό φράγμα της διεργασίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, χωρίς διαλύτη, το φράγμα ενεργοποίησης ανέρχεται σε **12,60 kcal/mol**, ενώ με την εισαγωγή του διαλύτη αυξάνεται σε **13,90 kcal/mol**. Η αύξηση αυτή υποδηλώνει ότι ο διαλύτης **σταθεροποιεί περισσότερο την αρχική κατάσταση** σε σχέση με τη μεταβατική, με αποτέλεσμα την αύξηση του φράγματος ενεργοποίησης. Συνεπώς, η **επιδιαλύτωση φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη δυναμική της αντίδρασης, οδηγώντας σε λιγότερο ευνοϊκές κινητικές συνθήκες**.

Παρατηρήθηκε επίσης, ότι το **πρωτόνιο 4** σε διαλύτη DMSO (**Σχήμα 11**) εμφανίζεται αρκετά αποπροστατευμένο σε σχέση με τον διαλύτη CDCl_3 (**Σχήμα 10**), παρουσιάζοντας χημικές μετατοπίσεις 8,34 και 7,79 ppm αντίστοιχα. Το φαινόμενο αυτό, φαίνεται να οφείλεται στο γεγονός ότι στο διαμορφωμερές B το πρωτόνιο 4 σε συνδυασμό με το οξυγόνο του καρβονυλίου, σχηματίζει σύμπλοκο με το DMSO μέσω δεσμών υδρογόνου με το άτομο οξυγόνου του διαλύτη, με αποτέλεσμα την περαιτέρω αποπροστασία του και τη μετατόπισή του σε μεγαλύτερες τιμές ppm, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω **Σχήμα 14**.



Σχήμα 14. Βελτιστοποιημένη γεωμετρία του συμπλόκου της εναμινόνης με DMSO, όπου φαίνεται η προσέγγιση του διαλύτη στην περιοχή του πρωτονίου H_4 . Στα δεξιά απεικονίζεται το ίδιο σύμπλοκο από διαφορετική οπτική γωνία.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η παρατηρούμενη αποπροστασία του πρωτονίου H₄ στο φάσμα ¹H NMR, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί βελτιστοποίησης της γεωμετρίας του **συμπλόκου της εναμίνονης με ένα μόριο DMSO**. Στο παρακάτω σχήμα (**Σχήμα 15**) παρουσιάζεται η βελτιστοποιημένη δομή του συμπλόκου, καθώς και οι χαρακτηριστικές αποστάσεις και γωνίες στην περιοχή της αλληλεπίδρασης.

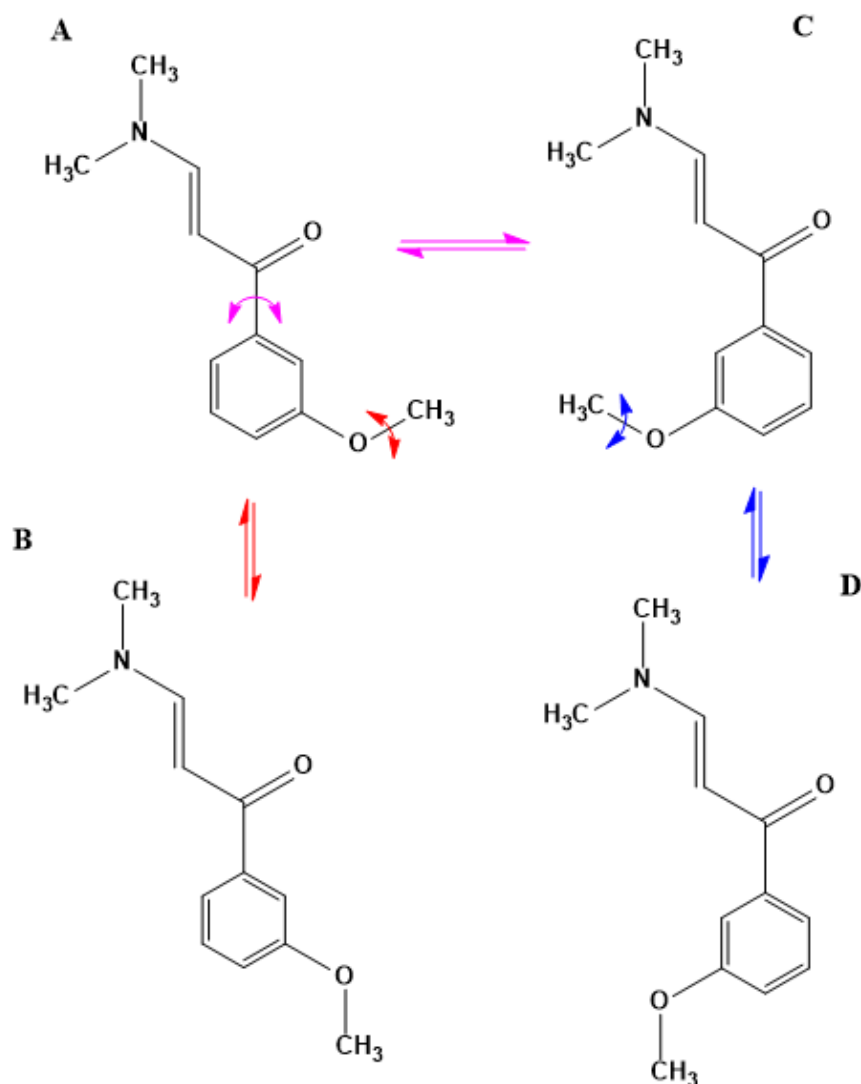


Σχήμα 15. Απεικόνιση των χαρακτηριστικών αποστάσεων H $\cdots$ O και O $\cdots$ H αλλά και των γωνιών $\angle$ C-H $\cdots$ O και $\angle$ C-O $\cdots$ H στην περιοχή της αλληλεπίδρασης για το σύμπλοκο της εναμίνονης με DMSO.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 15**, οι αποστάσεις H $\cdots$ O (2,13 και 2,36 Å) και οι γωνίες $\angle$ C-H $\cdots$ O και $\angle$ C-O $\cdots$ H (164,7° και 138,2° αντίστοιχα) υποδεικνύουν τον σχηματισμό ασθενούς δεσμού υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου H₄ και του οξυγόνου του DMSO. Η **σχεδόν γραμμική διάταξη** για τη **μεγαλύτερη από τις δύο γωνίες** ευνοεί τόσο την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του πρωτονίου H₄ και του οξυγόνου του DMSO όσο και την τροχιακή αλληλεπίδραση (lone pair O $\rightarrow$ σ^* C-H). Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου αλληλεπιδρά με το αντιδεσμικό τροχιακό σ^* του δεσμού C-H, μεταφέροντας ηλεκτρονική πυκνότητα σε αυτό και οδηγώντας σε αποδυνάμωση και ελαφρά επιμήκυνση του δεσμού C-H. Το γεγονός αυτό εξηγεί την αυξημένη αποπροστασία του στο φάσμα ¹H NMR σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρωτόνια.

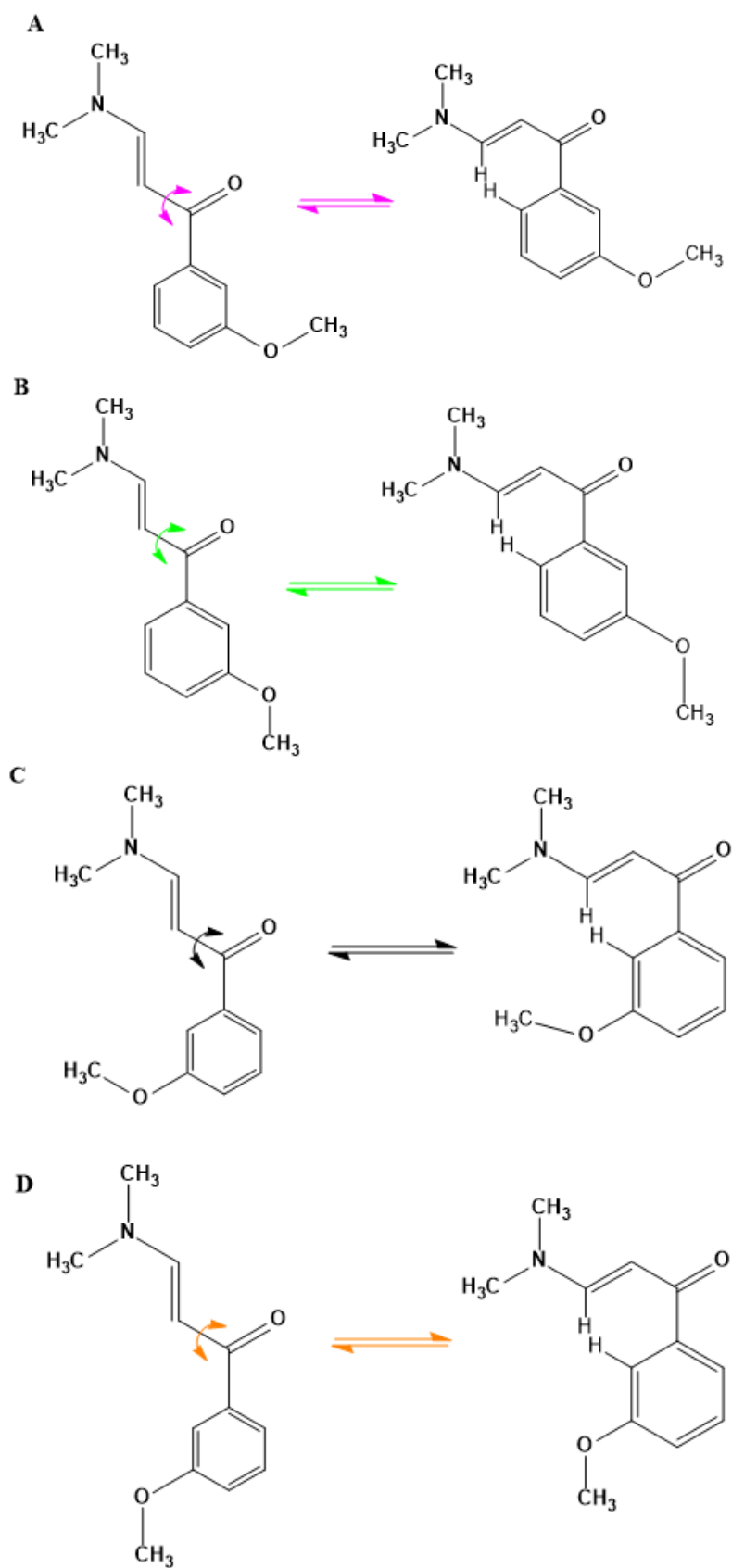
6.2 Εναμίνονη 2: (E)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη [70]

Τα διαμορφωμερή της ένωσης αυτής είναι τα A, B, C, D που φαίνονται στο **Σχήμα 16**.



Σχήμα 16. Διαμορφωμερή της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης.

Παρότι, η γεωμετρία του μορίου επιτρέπει επιπλέον και την περιστροφή γύρω από τον δεσμό C–C που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 17**, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι διαμορφώσεις που προκύπτουν απ’ αυτή την περιστροφή είναι ενεργειακά ασταθείς άρα εμφανίζουν πολύ μικρή σταθερότητα. Το ίδιο ισχύει και για τις *syn* διαμορφώσεις που απεικονίζονται στο **Σχήμα 18** και γι’ αυτόν τον λόγο, γίνεται απλή αναφορά τους, χωρίς όμως να ληφθούν υπόψιν στους υπολογισμούς που ακολουθούν.



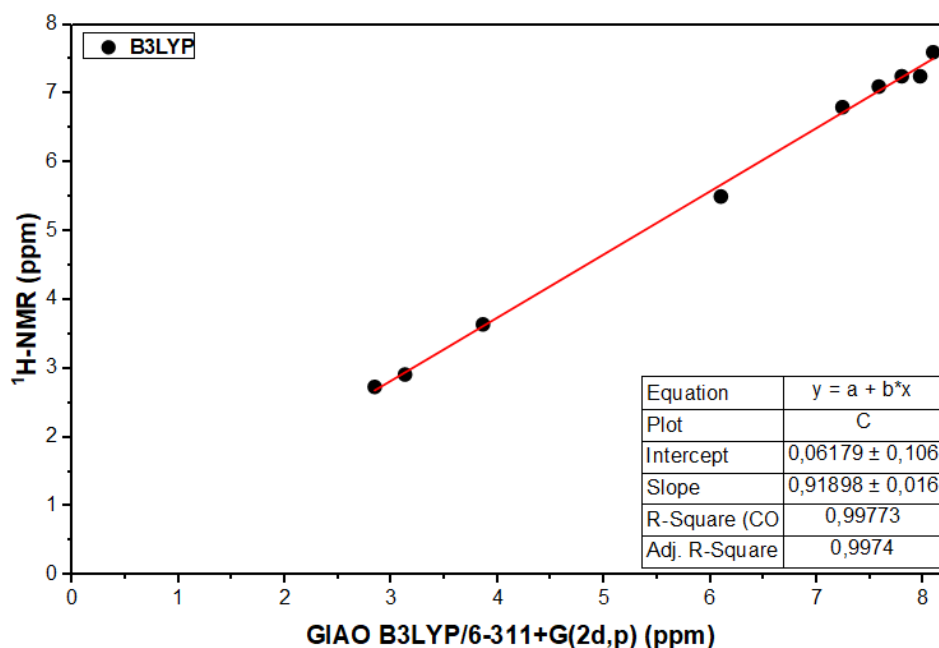
Σχήμα 17. Ασταθείς διαμορφώσεις της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης με περιστροφή του δεσμού C–C.

Σχήμα 18. Διαμορφώσεις anti και syn της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης.

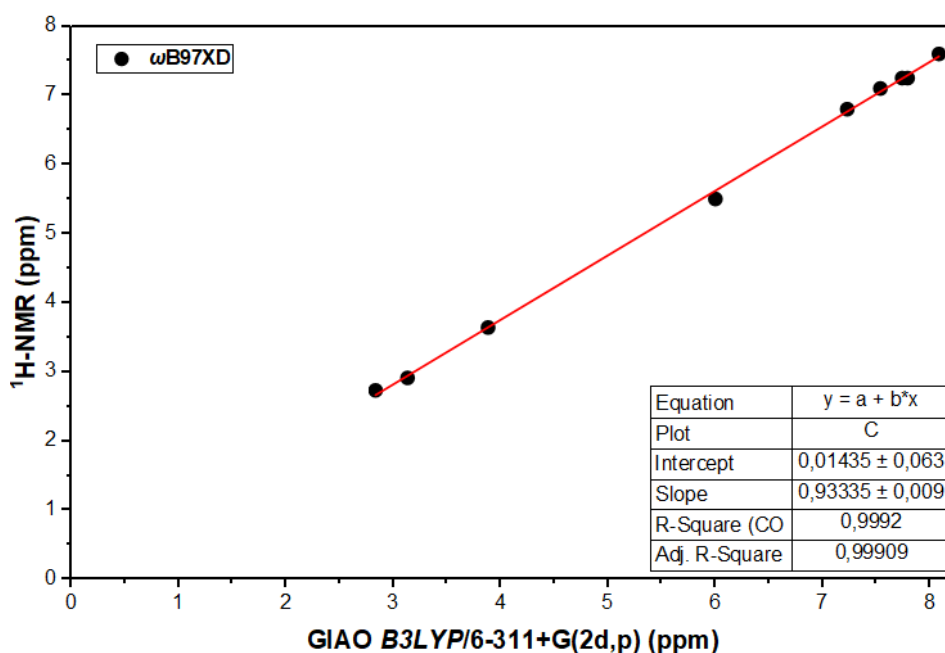
Πίνακας 2. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και οι αντίστοιχες τιμές του G, της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG, της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG * (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-671,303762	0	4,757	64,19
B	B3LYP	-671,302200	0,980	4,847	12,27
C	B3LYP	-671,301804	1,229	6,331	8,07
D	B3LYP	-671,302419	0,843	4,532	15,48
A	ωB97XD	-671,074339	0	4,775	60,47
B	ωB97XD	-671,072559	1,117	4,845	9,18
C	ωB97XD	-671,072916	0,893	6,268	13,40
D	ωB97XD	-671,073138	0,754	4,468	16,95

Για την αποτίμηση και ερμηνεία των φασμάτων της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης, εφαρμόστηκε η ίδια υπολογιστική προσέγγιση όπως περιγράφηκε ανωτέρω, με θεωρητικούς υπολογισμούς φασμάτων NMR (μέθοδος GIAO, DFT B3LYP/6-311+G(2d,p) σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl₃), χρησιμοποιώντας γεωμετρίες βελτιστοποιημένες με τις μεθόδους **B3LYP/6-31+G(d)** και **ωB97XD/6-31+G(d)**, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα διαμορφωμερή και σταθμίζοντας τις χημικές μετατοπίσεις ως προς την κατανομή Boltzmann. Τα διαγράμματα συσχέτισης πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων παρουσιάζονται στα **Σχήματα 19** και **20**.



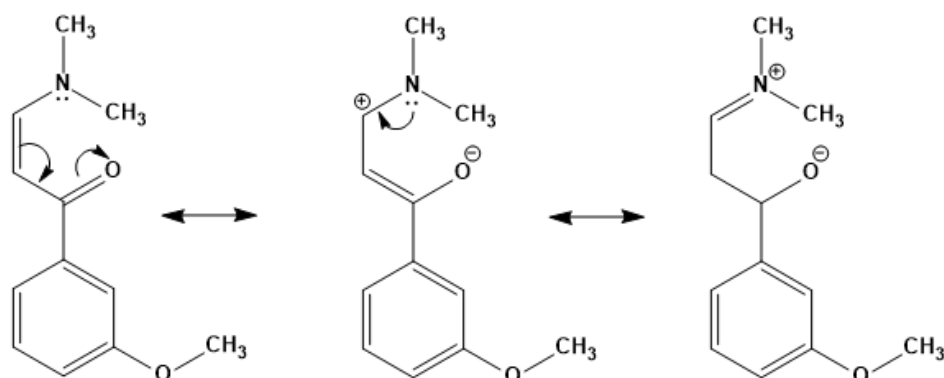
Σχήμα 19. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl_3 , σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



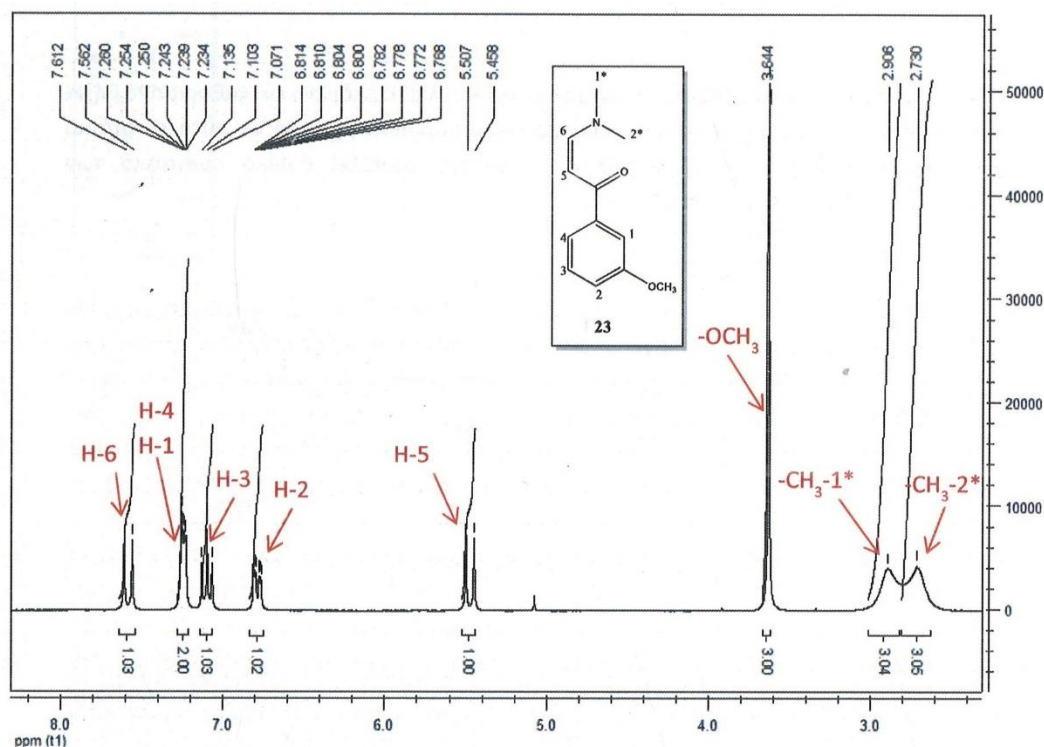
Σχήμα 20. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl_3 , σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).

Και τα δύο διαγράμματα δείχνουν εξαιρετική γραμμική συσχέτιση μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών μετατοπίσεων ^1H NMR ($R^2 \approx 1$), επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία των υπολογισμών **GIAO/DFT**. Η μέθοδος ωB97XD εμφανίζει οριακά καλύτερη προσαρμογή από τη B3LYP (κλίση πιο κοντά στη μονάδα).

Στην υπό μελέτη εναμινόνη, η παρουσία δύο απλών κορυφών για τα *N*-μεθυλικά πρωτόνια στους 298 K (Σχήμα 22) υποδεικνύει ότι η περιστροφή γύρω από τον δεσμό C–N είναι σχετικά αργή (περιοχή αργής ανταλλαγής, *slow exchange*) στη χρονική κλίμακα του NMR και, συνεπώς, το ενεργειακό φράγμα περιστροφής ($\Delta G^\ddagger$) είναι σημαντικά αυξημένο, με τον δεσμό C–N να εμφανίζει έντονο **χαρακτήρα διπλού δεσμού λόγω συζυγίας** (Σχήμα 21) .

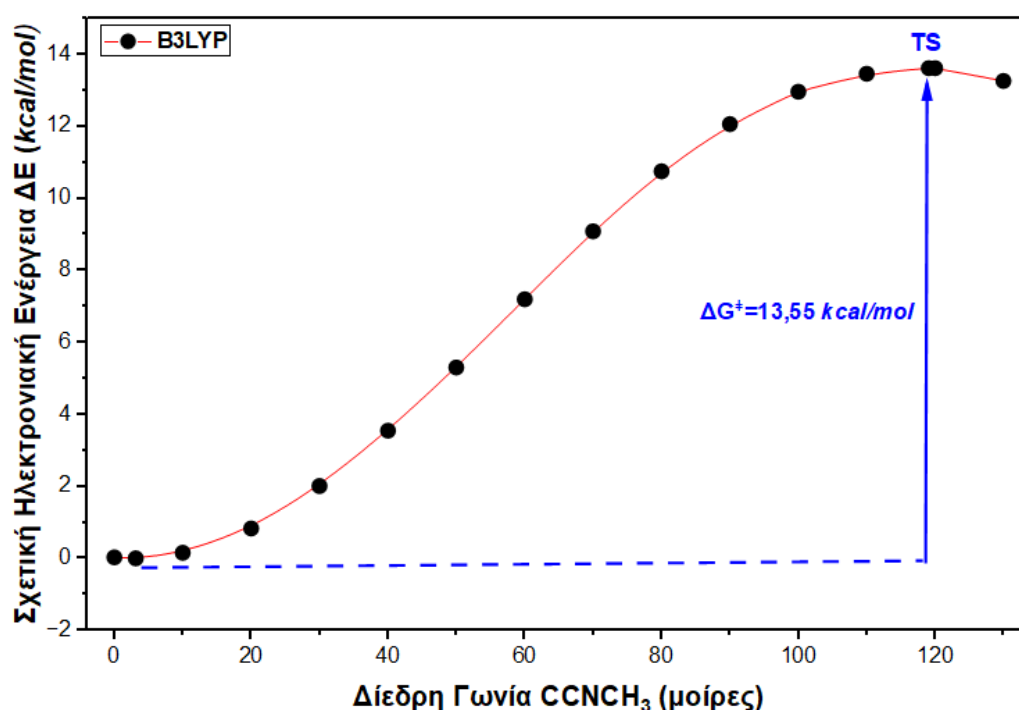


Σχήμα 21. Δομές συντονισμού που καταδεικνύουν τον έντονο χαρακτήρα διπλού δεσμού C – N και την δυσκολία στην περιστροφή του δεσμού.



Σχήμα 22. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη CDCl_3 [70].

Για να επιβεβαιωθεί αυτό το συμπέρασμα, μελετήθηκε η περιστροφή γύρω από τον δεσμό C-N και σχεδιάστηκαν τα διαγράμματα όπου απεικονίζεται η μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας κατά την περιστροφή της διεδρης γωνίας CCNCH₃ (Σχήμα 23), αλλά και οι μεταβατικές καταστάσεις (TS) για όλα τα πιθανά διαμορφωμερή (Σχήματα 24,25). Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τις μεθόδους **DFT/B3LYP/6-31G+d** και **DFT/ ω B97XD/6-31G+d**, με το επίπεδο μηδενικής ενέργειας να ορίζεται στη διαμόρφωση αναφοράς. Η ενέργεια αυξάνει προοδευτικά καθώς μεταβαίνουμε από την περιοχή του ελαχίστου γύρω στις 0-10°, φτάνοντας σε μέγιστο περίπου στις 110° όπου υφίσταται η μεταβατική κατάσταση (TS). Το αντίστοιχο ενεργειακό φράγμα είναι **13,55 kcal/mol**, τιμή που υποδηλώνει μέτρια προς υψηλή δυσκολία στην περιστροφή, υπό συνθήκες δωματίου (298 K).



Σχήμα 23. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη διεδρη γωνία CCNCH₃ για το διαμορφωμερές Α (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο B3LYP).

Για την ίδια εναμινόνη, (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνη, για την περιγραφή της δυναμικής ανταλλαγής των μεθυλικών πρωτονίων υπολογίστηκαν τέσσερα φράγματα ενεργοποίησης $\Delta G^\ddagger$, που αντιστοιχούν στις επιμέρους διαμορφώσεις του μορίου με τιμές 13,55, 13,41, 13,21 και 13,38 kcal·mol⁻¹ (με τη μέθοδο B3LYP). Οι τιμές αυτές είναι πολύ κοντά μεταξύ τους (διαφορά < 0,4 kcal·mol⁻¹), δηλαδή εντός της τυπικής υπολογιστικής αβεβαιότητας της μεθόδου, και οδηγούν σε ρυθμούς ανταλλαγής της ίδιας τάξης μεγέθους. Για τον λόγο αυτό, ως

αντιπροσωπευτικό φράγμα ενεργοποίησης επιλέχθηκε αυτό του σταθερότερου διαμορφωμερούς $\Delta G^\ddagger = 13,55 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, το οποίο εισήχθη στην εξίσωση Eyring για τον υπολογισμό του συνολικού ρυθμού ανταλλαγής k .

Για $\Delta G^\ddagger = 13,55 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$, $\kappa = 1$:

$$k = 1 \frac{1,380649 * 10^{-23} (\text{J} * \text{K}^{-1}) * 298 \text{ K}}{6,62607015 * 10^{-34} (\text{J} * \text{s})} \exp \left(- \frac{13,55 \text{ kcal/mol}}{1,987 * 10^{-3} \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol} * \text{K}} \right) * 298 \text{ K}} \right)$$

Επομένως, $k \approx 7,2 * 10^2 \text{ s}^{-1}$ και τ είναι ο χαρακτηριστικός χρόνος ή μέσος χρόνος παραμονής για να γίνει η αλλαγή από τη μία κατάσταση στην άλλη.

$$\tau = \frac{1}{k} = 0,0014 \text{ s ή } 1,4 \text{ ms}$$

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση Eyring και θεωρώντας το φράγμα ενεργοποίησης $\Delta G^\ddagger = 13,55 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ στους 298 K , υπολογίστηκε ο ρυθμός ανταλλαγής $k \approx 7,2 * 10^2$, που αντιστοιχεί σε μέσο χρόνο παραμονής $\tau \approx 1,4 * 10^{-3} \text{ s}$. Για τα δύο μεθύλια επί του αζώτου, οι πειραματικές χημικές μετατοπίσεις είναι $2,906$ και $2,730 \text{ ppm}$ στο φάσμα $^1\text{H NMR}$ στα 250 MHz και αντιστοιχούν σε $\Delta\delta = 0,176 \text{ ppm}$ ή $\Delta\nu = 44 \text{ Hz}$. Η παρατήρηση δύο διακριτών σημάτων στο φάσμα υποδεικνύει ότι, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, το σύστημα βρίσκεται στην **περιοχή αργής ανταλλαγής (slow exchange)** ως προς τη χρονική κλίμακα που καταγράφει το NMR, δηλαδή $k \ll \Delta\nu$. Η παρατηρούμενη συμπεριφορά δείχνει ότι στην πράξη η αντίδραση έχει λίγο ψηλότερο φράγμα ενεργοποίησης από αυτό που δίνουν οι υπολογισμοί ($> 15 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), πιθανότατα επειδή οι θεωρητικές μέθοδοι κάνουν κάποιες απλοποιήσεις (κυρίως στο πώς περιγράφουν τον διαλύτη και τις εντροπικές συνεισφορές). Παρόλα αυτά, η θεωρία εξακολουθεί να μην αναιρεί τη γενική εικόνα για το ύψος του φράγματος. Πρέπει, επιπλέον, να σημειωθεί ότι η ακριβής θερμοκρασία απόκτησης του φάσματος δεν είναι γνωστή, ενώ για μια ακριβέστερη σύγκριση θεωρίας-πειράματος θα ήταν ιδανικό να ληφθεί φάσμα σε θερμοκρασία όπου, η απόσταση μεταξύ των δύο σημάτων των μεθυλικών πρωτονίων είναι μέγιστη, κάτι που επιτυγχάνεται συνήθως με περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας.

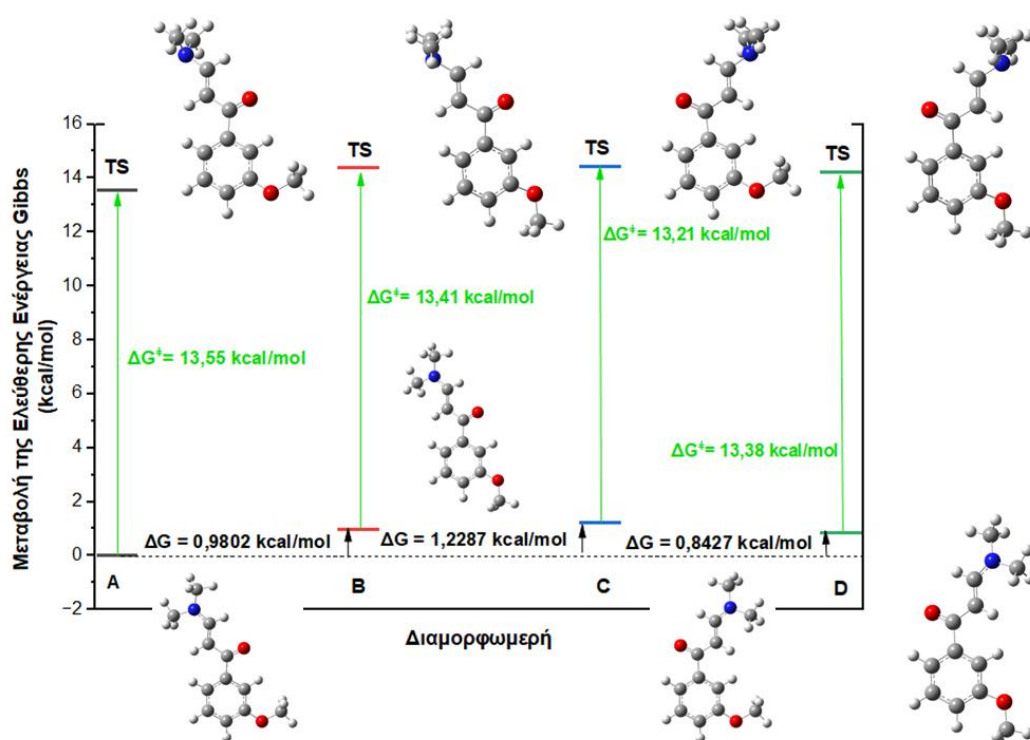
Προκειμένου να διερευνηθεί **πώς ο διαλύτης** επηρεάζει το φράγμα ενεργοποίησης, οι θεωρητικοί υπολογισμοί επαναλήφθηκαν με συμπερίληψη του χλωροφορμίου (CHCl_3)

ως διαλύτη, σε συμφωνία με τις πειραματικές συνθήκες λήψης του φάσματος $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3). Στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3**) παρουσιάζονται, η υπολογιστική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε, οι αντίστοιχες τιμές της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (G) για το αρχικό διαμορφομερές D και για τη μεταβατική κατάσταση, καθώς και η διπολική ροπή μ . Τα μεγέθη αυτά δίνονται σε άμεση σύγκριση με τα αποτελέσματα που προκύπτουν απουσία διαλύτη, ώστε να **αναδειχθεί η επίδραση του διαλυτικού μέσου** στη σχετική σταθερότητα των δομών και στο υπολογιζόμενο φράγμα ενεργοποίησης.

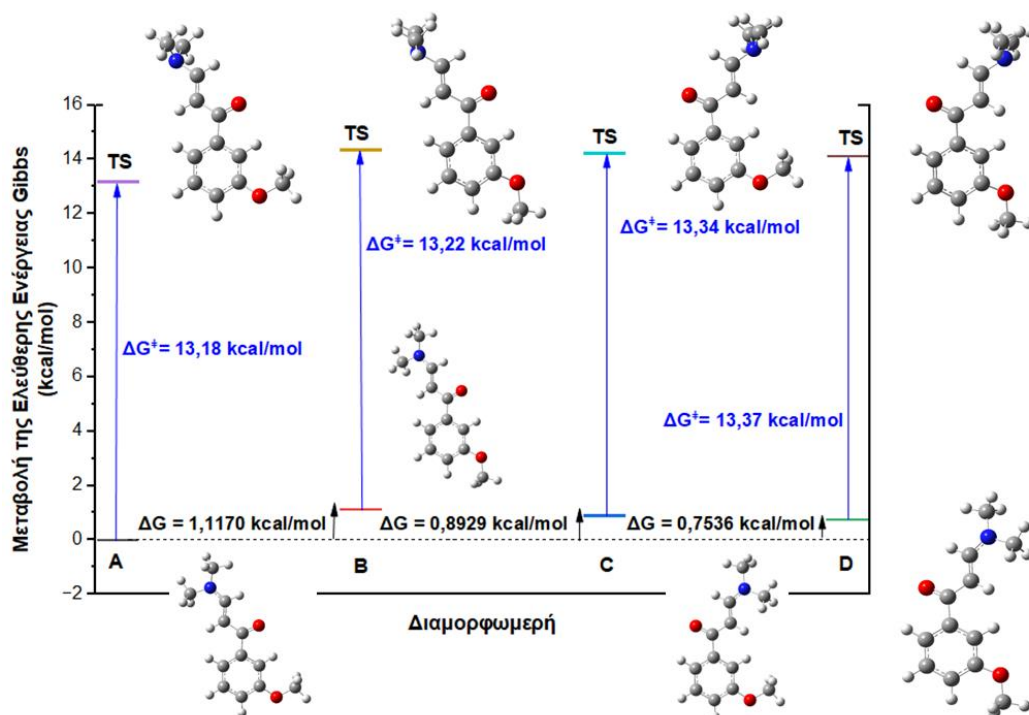
Πίνακας 3. Ελεύθερη ενέργεια Gibbs G (σε Hartree) και διπολική ροπή μ (σε Debye) για το αρχικό μόριο (διαμορφομερές D) και τη μεταβατική κατάσταση, όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ωB97XD σε αέρια φάση και με την παρουσία διαλύτη μέσω του μοντέλου IefPCM (CHCl_3).

Διαμορφομερές	Μέθοδος	G (Hartree)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)
D	ωB97XD	-671,073138	4,468
D	TS ωB97XD	-671,051828	2,820
D	ωB97XD με μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl_3	-671,084723	6,133
D	TS ωB97XD με μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = CHCl_3	-671,059466	3,468

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι στην αρχική του διαμόρφωση (για το διαμορφομερές D), το μόριο εμφανίζει σε όλους τους υπολογισμούς **μεγαλύτερη διπολική ροπή** από τη μεταβατική κατάσταση, γεγονός που υποδεικνύει ότι είναι **πιο πολικό**. Η παρουσία του διαλύτη CHCl_3 , ο οποίος σταθεροποιεί εντονότερα τις πιο πολικές δομές, ευνοεί ενεργειακά περισσότερο το αρχικό μόριο σε σχέση με τη μεταβατική κατάσταση (ρίχνει την ενέργεια, άρα θα έχει πιο αρνητική τιμή). Ως αποτέλεσμα, η ενέργεια του αρχικού μορίου μειώνεται σχετικά περισσότερο από εκείνη της μεταβατικής κατάστασης και η διαφορά $G_{\text{TS}} - G_{\text{D}}$, δηλαδή το φράγμα ενεργοποίησης, αυξάνεται. Υπό τις συνθήκες αυτές, το φράγμα ενεργοποίησης προκύπτει ίσο με **15,85 kcal·mol⁻¹**, τιμή ελαφρώς υψηλότερη από εκείνη που υπολογίζεται για το σύστημα χωρίς τον διαλύτη.



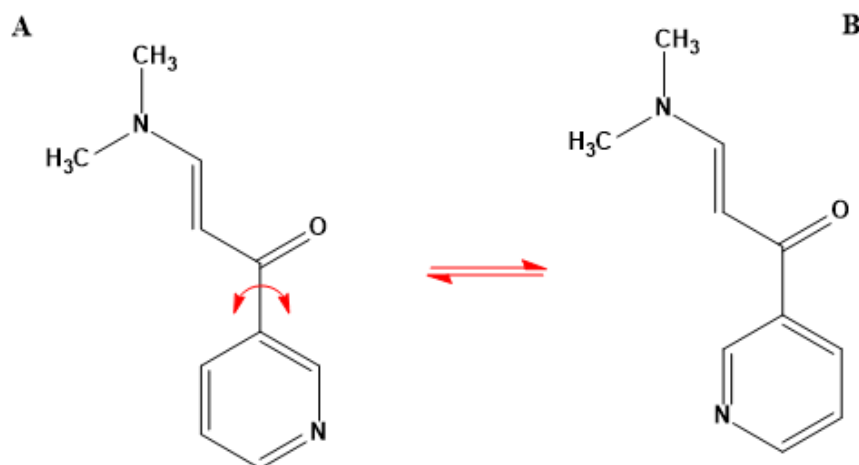
Σχήμα 24. Διάγραμμα που απεικονίζει τα διαμορφωμερή σε συνάρτηση με την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, με τη μέθοδο **B3LYP/6-31G+d** (πράσινα βέλη).



Σχήμα 25. Διάγραμμα που απεικονίζει τα διαμορφωμερή σε συνάρτηση με την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, με τη μέθοδο **ωB97XD/6-31G+d** (μπλε βέλη).

6.3 Εναμινόνη 3: (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη [71]

Τα πιο σταθερά διαμορφωμερή της ένωσης απεικονίζονται στο **Σχήμα 26** που ακολουθεί και είναι τα Α και Β.



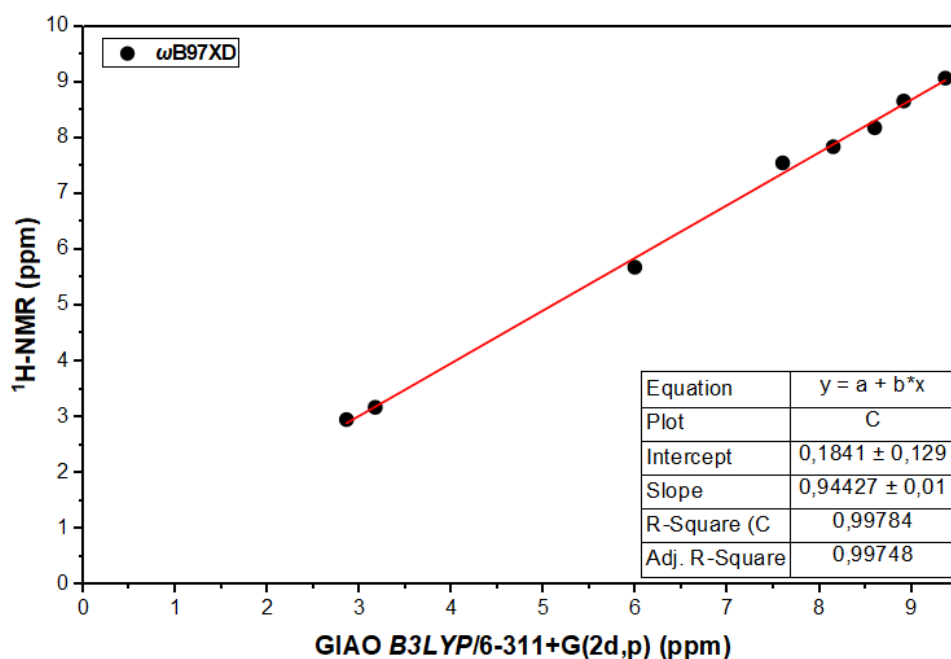
Σχήμα 26. Διαμορφωμερή της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται τα θερμοδυναμικά δεδομένα των διαμορφωμερών Α και Β της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης που υπολογίστηκαν στη μέθοδο ω B97XD. Το διαμορφωμερές Β έχει χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια G (-572,655399 Hartree) σε σχέση με το Α (-572,653813 Hartree), με αποτέλεσμα να λαμβάνεται ως σημείο αναφοράς ($\Delta G^* = 0$ kcal/mol). Η σχετική ελεύθερη ενέργεια του Α είναι 0,995 kcal/mol, γεγονός που οδηγεί σε αναλογία 84,29 % για το Β και 15.71 % για το Α στο διάλυμα. Επιπλέον, το Β εμφανίζει μικρότερη διπολική ροπή (4,762 D) από το Α (7,689 D), υποδηλώνοντας ότι είναι **λιγότερο πολικό**, κάτι που ενδέχεται να επηρεάζει τη σταθερότητά του στο συγκεκριμένο περιβάλλον. Οι υπολογισμοί με τη μέθοδο B3LYP έχουν ήδη πραγματοποιηθεί και παρουσιαστεί σε προηγούμενες μελέτες, επομένως στο παρόν κεφάλαιο δεν κρίθηκε απαραίτητο να επαναληφθούν και το ενδιαφέρον εστιάστηκε στα αποτελέσματα της μεθόδου ω B97XD.

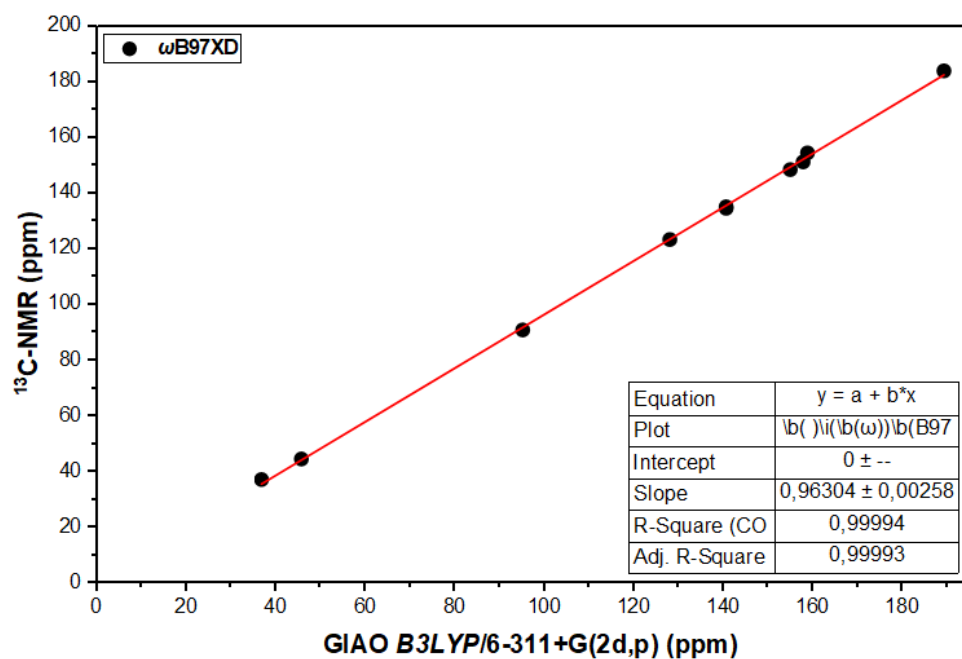
Πίνακας 4. Χρησιμοποιούμενη μέθοδος και οι αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	ωB97XD	-572,653813	0,995	7,689	15,71
B	ωB97XD	-572,655399	0	4,762	84,29

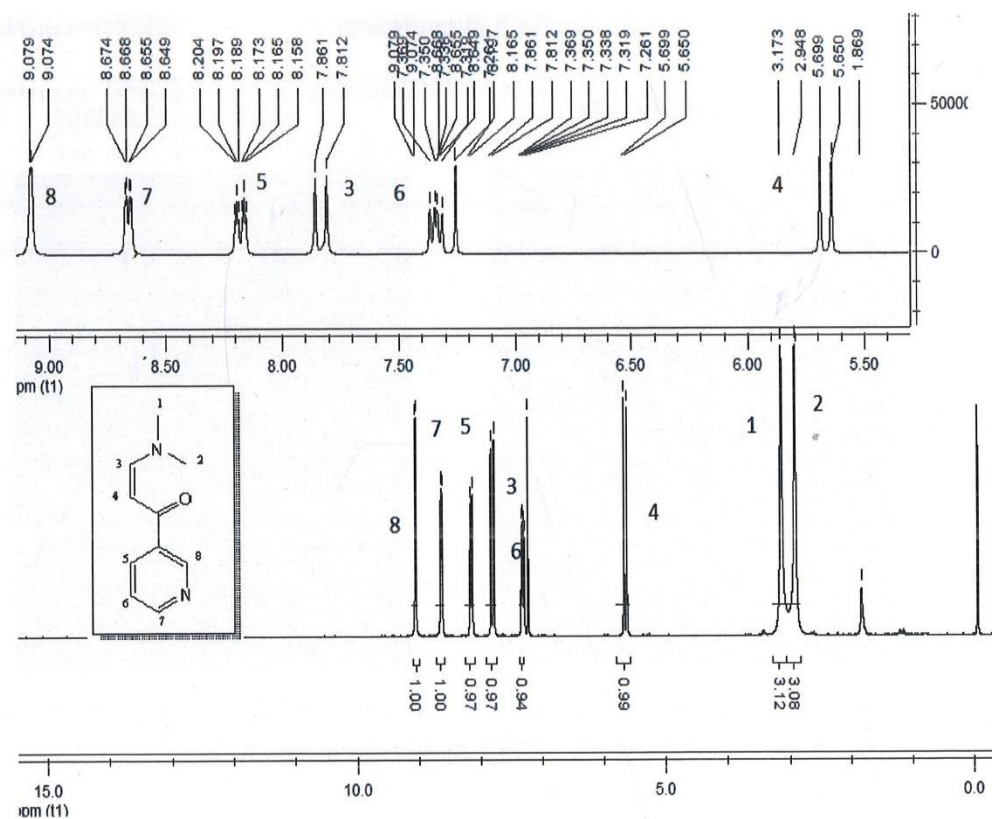
Για να αξιολογηθεί η αξιοπιστία της θεωρητικής προσέγγισης ως προς την πειραματική, ελέγχθηκε κατά πόσο η υπολογιστική μέθοδος μπορεί να αναπαράγει τα πειραματικά φάσματα ^1H -NMR και ^{13}C -NMR. Για τον σκοπό αυτό, υπολογίστηκαν οι θεωρητικές χημικές μετατοπίσεις ^1H (GIAO/B3LYP/6-311+G(2d,p), IefPCM = CHCl_3 και IefPCM = DMSO) πάνω στις γεωμετρίες που βελτιστοποιήθηκαν με τη μέθοδο ω B97XD/6-31+G(d) και συγκρίθηκαν με τις πειραματικές τιμές σε CDCl_3 και DMSO. Η γραμμική συσχέτιση των δύο συνόλων δεδομένων παρουσιάζεται στα **Σχήματα 27, 28**.



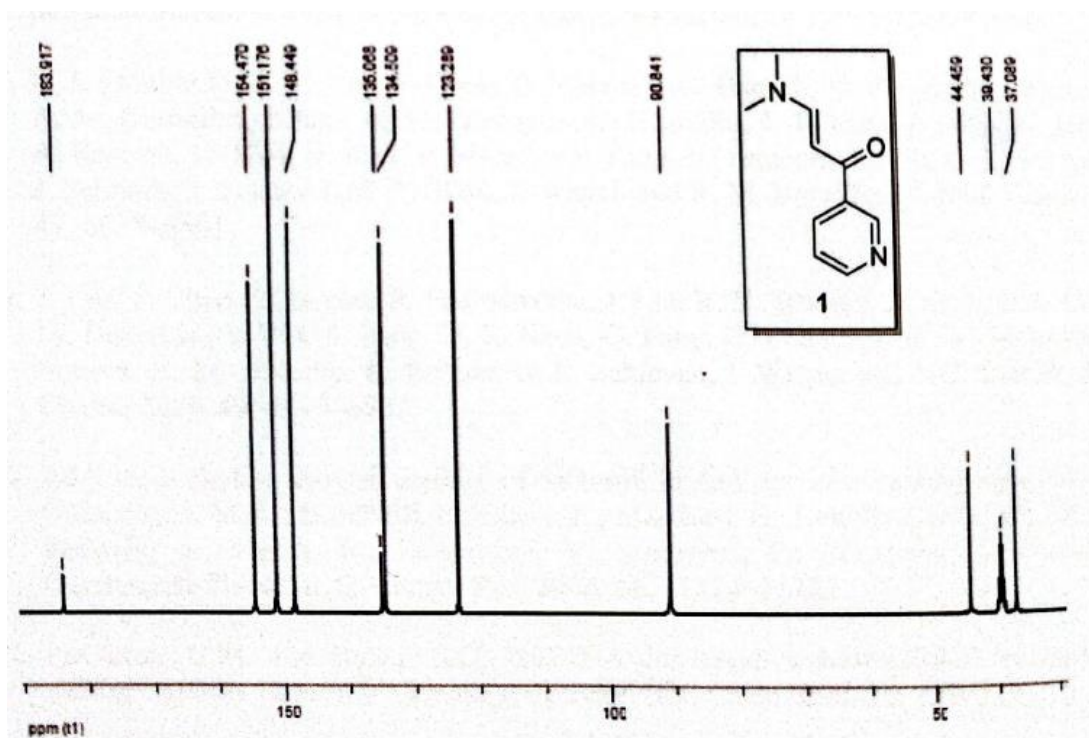
Σχήμα 27. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιάλυσης IefPCM = CHCl_3 , σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο ω B97XD/6-31+G(d)).



Σχήμα 28. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^{13}C (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6\text{-}31\text{+G(d)}$).

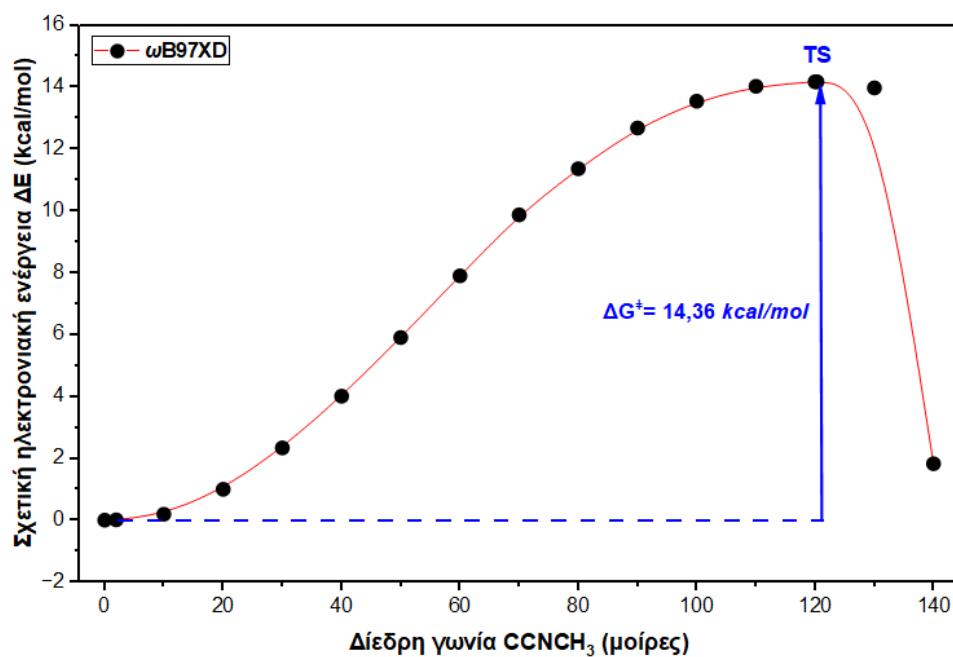


Σχήμα 29. Φάσμα ^1H NMR (250 MHz) της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη CDCl_3 [71].



Σχήμα 30. Φάσμα ^{13}C NMR (400 MHz) της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO [71].

Υπολογίστηκε το ενεργειακό φράγμα περιστροφής γύρω από τον δεσμό C–C–N–CH₃, το οποίο βρέθηκε ίσο με **14,36 kcal·mol⁻¹**, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 31). Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στο σταθερότερο διαμορφωμερές B και προέκυψε από υπολογισμούς με τη μέθοδο ωB97XD .



Σχήμα 31. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη δίεδρη γωνία CCNCH₃ για το διαμορφωμερές A (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο ωB97XD).

Από την εξίσωση Eyring όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για τον υπολογισμό του αντίστοιχου ρυθμού ανταλλαγής προκύπτει ότι για $\Delta G^\ddagger = 14,36 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$, $\kappa = 1$

$$k = 1 \frac{1,380649 * 10^{-23} (\text{J} * \text{K}^{-1}) * 298 \text{ K}}{6,62607015 * 10^{-34} (\text{J} * \text{s})} \exp \left(- \frac{14,36 \text{ kcal/mol}}{1,987 * 10^{-3} \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol} * \text{K}} \right) * 298 \text{ K}} \right)$$

Επομένως, $k \approx 1,8 * 10^2 \text{ s}^{-1}$ και τ είναι ο **χαρακτηριστικός χρόνος ή μέσος χρόνος παραμονής** για να γίνει η αλλαγή από τη μία κατάσταση στην άλλη.

$$\tau = \frac{1}{k} = 0,0055 \text{ s ή } 5,5 \text{ ms}$$

Για τα δύο μεθύλια επί του αζώτου, οι πειραματικές χημικές μετατοπίσεις είναι 3,17 και 2,95 ppm στο φάσμα ^1H NMR στα 250 MHz και αντιστοιχούν σε $\Delta\delta = 0,22 \text{ ppm}$ ή $\Delta\nu = 55 \text{ Hz}$. Η παρατήρηση δύο απλών κορυφών στο φάσμα (**Σχήμα 29**) υποδεικνύει ότι, στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, το σύστημα βρίσκεται στην **περιοχή αργής ανταλλαγής (slow exchange)** ως προς τη χρονική κλίμακα που καταγράφει το NMR, δηλαδή $k \ll \Delta\nu$. Η συμπεριφορά αυτή αντιστοιχεί πρακτικά σε υψηλότερο φράγμα ενεργοποίησης ($> 15 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) από την τιμή των $14,36 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ που προκύπτει από τους θεωρητικούς υπολογισμούς, διαφορά η οποία μπορεί να σχετίζεται με προσεγγίσεις της θεωρητικής μεθοδολογίας (περιγραφή διαλύτη, εντροπικές συνεισφορές κ.ά.) χωρίς, ωστόσο, να αναιρεί τη γενική εικόνα για το ύψος του φράγματος. Πρέπει, επιπλέον, να σημειωθεί ότι η ακριβής θερμοκρασία απόκτησης του φάσματος όπως και για την **Εναμιμόνη 2** δεν είναι γνωστή, ενώ για μια ακριβέστερη σύγκριση θεωρίας-πειράματος θα ήταν ιδανικό να ληφθεί φάσμα σε θερμοκρασία όπου, η απόσταση μεταξύ των δύο σημάτων των μεθυλικών πρωτονίων είναι μέγιστη, κάτι που επιτυγχάνεται συνήθως με περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν εκ νέου θεωρητικοί υπολογισμοί παρουσία του διαλύτη DMSO, προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδρασή του στις ενεργειακές παραμέτρους του συστήματος. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5. Ελεύθερη ενέργεια Gibbs G (σε Hartree) και διπολική ροπή μ (σε Debye) για το για το αρχικό μόριο (διαμορφωμερές B) και τη μεταβατική κατάσταση, όπως υπολογίστηκαν με τη

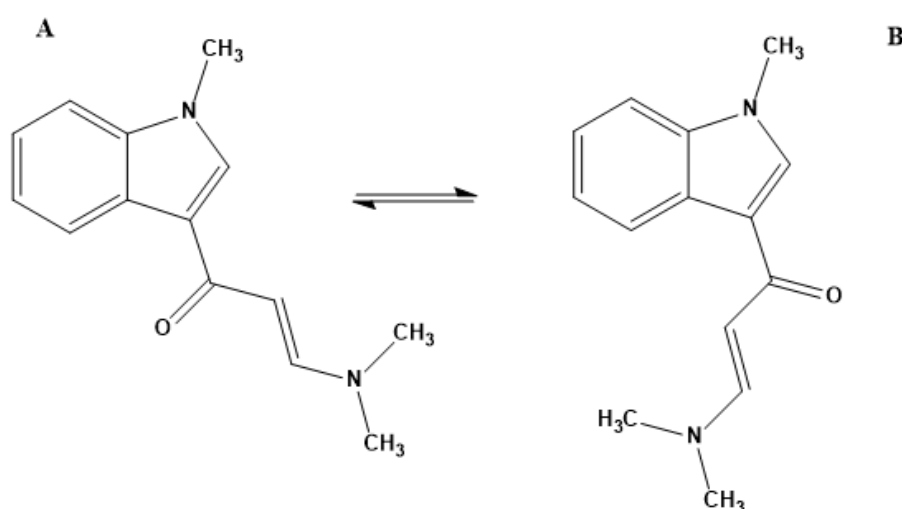
μέθοδο ω B97XD σε αέρια φάση και με την παρουσία διαλύτη μέσω του μοντέλου IefPCM (DMSO).

Διαμορφωμερές	Μέθοδος	G (Hartree)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)
B	ω B97XD	-572,655399	4,762
B	TS ω B97XD	-572,632511	1,074
B	ω B97XD με μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO	-572,670278	7,021
B	TS ω B97XD με μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO	-572,642959	1,268

Από τον **Πίνακα 5** προκύπτει ότι στην αρχική του διαμόρφωση (διαμορφωμερές B) το μόριο είναι **πιο πολικό από τη μεταβατική κατάσταση**, ιδίως παρουσία DMSO ($\mu = 7,021$ και $1,268$ D, αντίστοιχα). Η παρουσία του πολικού διαλύτη οδηγεί σε επιπλέον σταθεροποίηση της αρχικής κατάστασης σε σχέση με τη μεταβατική, με αποτέλεσμα το φράγμα ενεργοποίησης να αυξάνεται από $14,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (φάση αερίου) σε $17,14 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (IefPCM = DMSO).

6.4 Εναμινόνη 4: (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη [67]

Τα διαμορφωμερή της ένωσης αυτής είναι τα A και B που φαίνονται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 32. Διαμορφωμερή της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

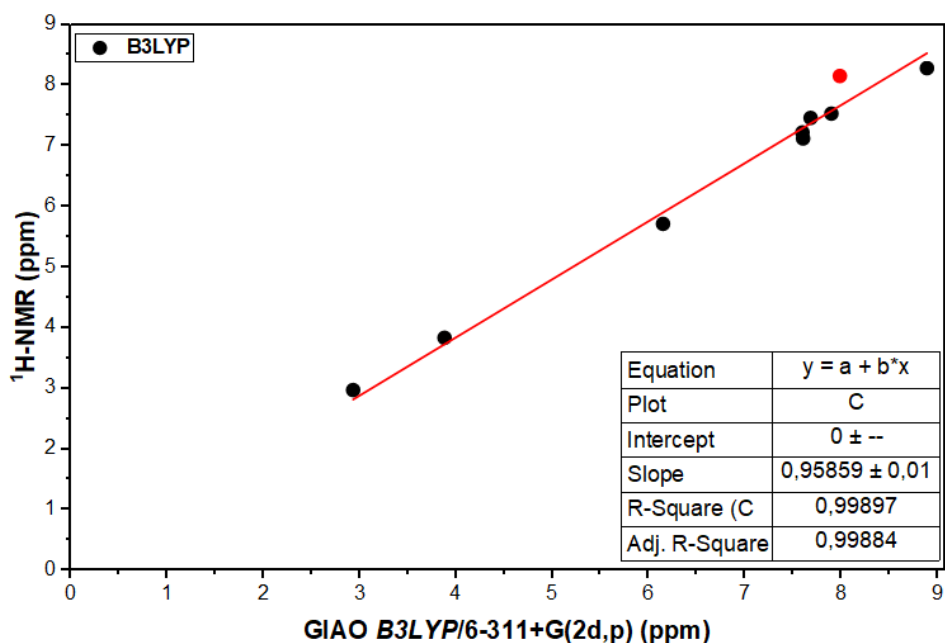
Στον **Πίνακα 6** που ακολουθεί, συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τα δύο διαμορφωμερή του υπό μελέτη μορίου, όπως προέκυψαν από τις δύο υπολογιστικές μεθόδους **DFT/B3LYP/6-31G+d** και **DFT/ ω B97XD/6-31G+d**.

Πίνακας 4. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

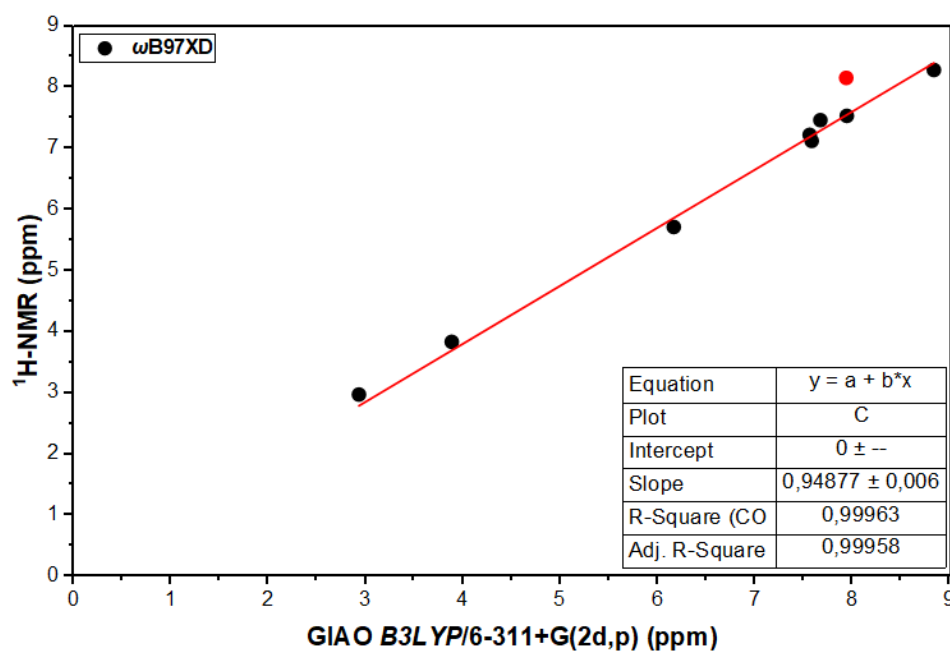
Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-727,642071	1,101	6,344	86,50
B	B3LYP	-727,640317	0	2,323	13,50
A	ωB97XD	-727,394474	0,932	6,307	82,82
B	ωB97XD	-727,392989	0	2,364	17,18

* ΔG : ως προς το πιο σταθερό διαμορφωμερές της ίδιας μεθόδου.

Για τη διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ των θεωρητικών και πειραματικών τιμών των χημικών μετατοπίσεων παρουσιάζονται τα παρακάτω διαγράμματα, στα οποία οι θεωρητικές τιμές υπολογίστηκαν με τη μέθοδο GIAO σε επίπεδο DFT B3LYP/6-311+G(2d,p) σε DMSO (IefPCM, DMSO), χρησιμοποιώντας γεωμετρίες βελτιστοποιημένες με τις μεθόδους B3LYP/6-31+G(d) και ω B97XD/6-31+G(d). Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν πολύ καλή συμφωνία μεταξύ υπολογιστικών και πειραματικών δεδομένων, γεγονός που υποστηρίζει την αξιοπιστία της επιλεγμένης θεωρητικής προσέγγισης για την περιγραφή των φασματικών χαρακτηριστικών της ένωσης.



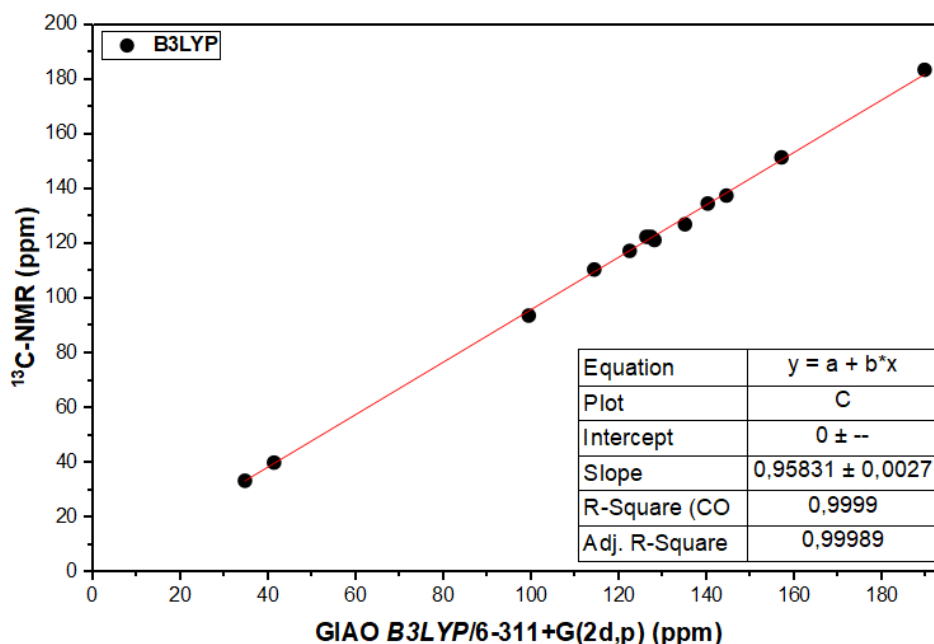
Σχήμα 33. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



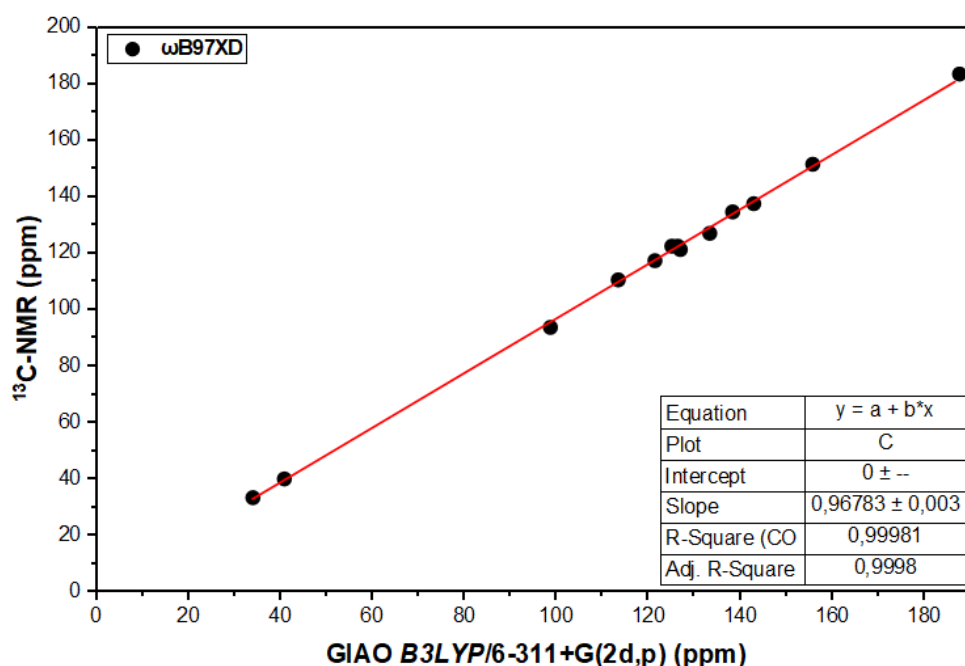
Σχήμα 34. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).

Η κόκκινη κουκίδα που εμφανίζει ελαφρά απόκλιση από τη γραμμική συσχέτιση αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του πυρρολικού δακτυλίου στη θέση 2, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με το DMSO μέσω δεσμών υδρογόνου και αποπροστατεύεται σημαντικά, με αποτέλεσμα η πειραματική του χημική μετατόπιση να εμφανίζεται πιο μετατοπισμένη σε σχέση με την υπολογισμένη τιμή. Για τον λόγο αυτό, το συγκεκριμένο σημείο

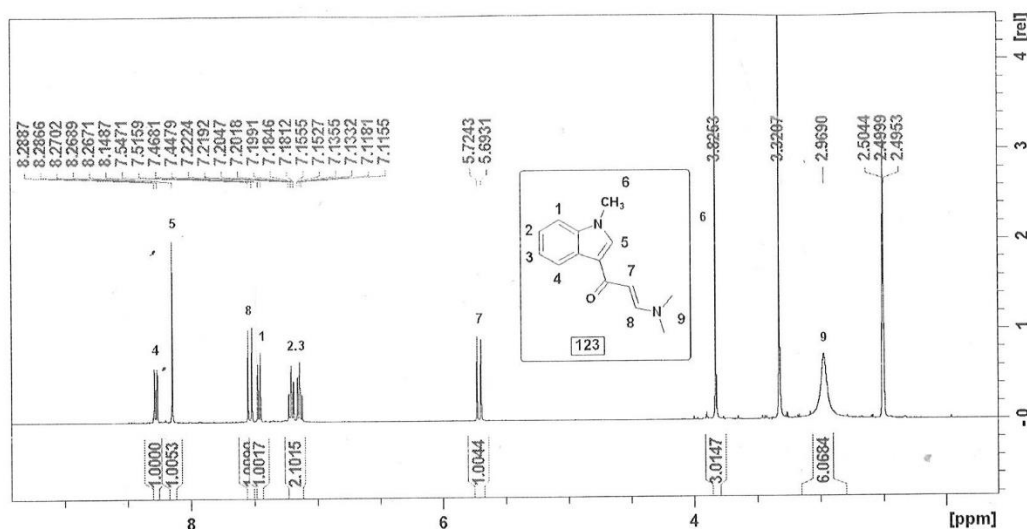
θεωρείται εκτός τάσης και δεν λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό της κλίσης της ευθείας (καθώς και των υπόλοιπων παραμέτρων της γραμμικής παλινδρόμησης).



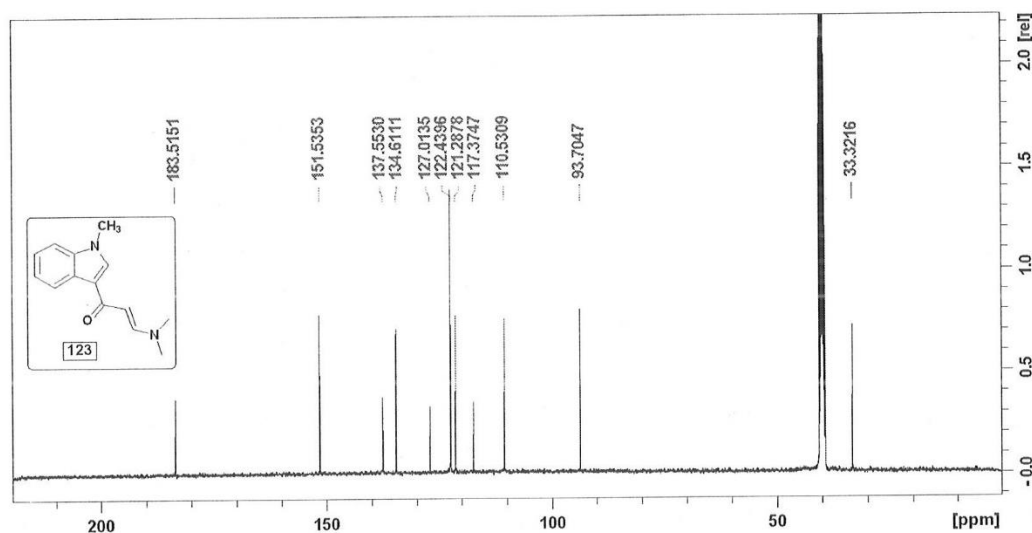
Σχήμα 35. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^{13}C (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



Σχήμα 36. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^{13}C (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο $\omega\text{B97XD}/6-31+G(d)$).



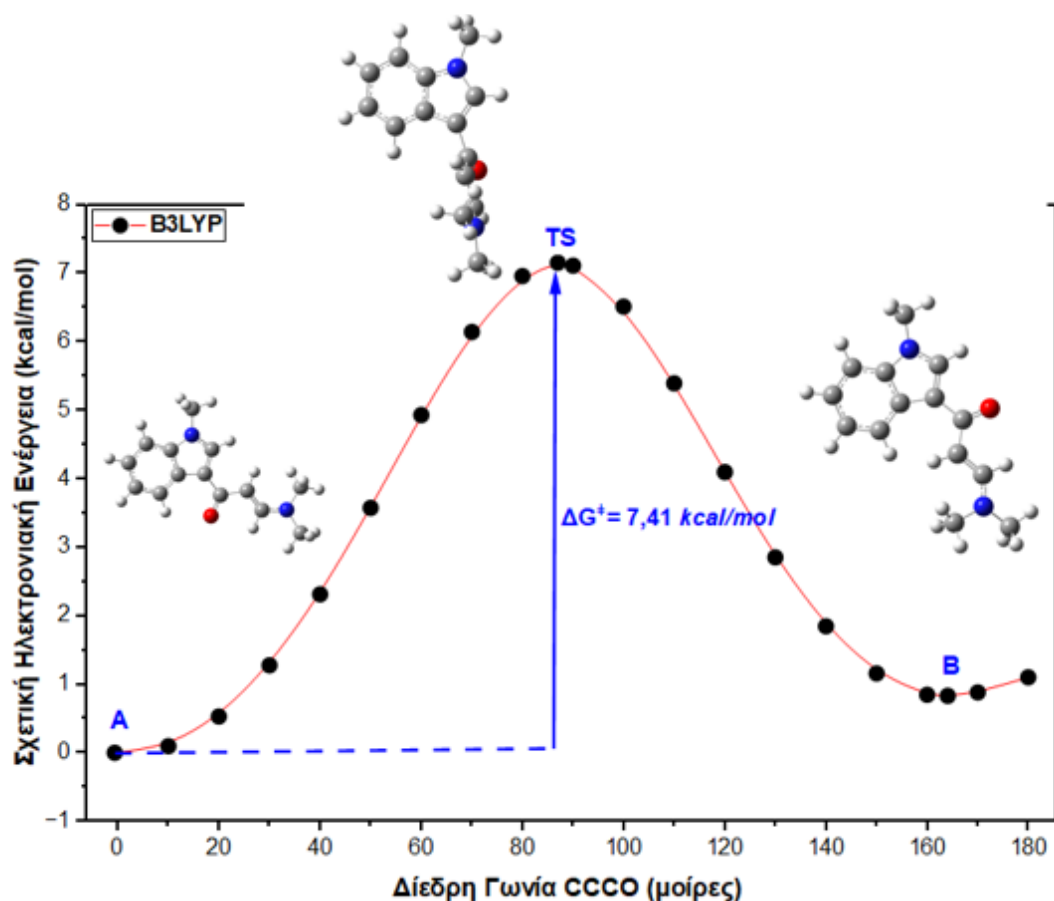
Σχήμα 37. Φάσμα ¹H NMR (400 MHz) της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO [67].



Σχήμα 38. Φάσμα ¹³C NMR (100 MHz) της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(3-μεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-1-όνης σε διαλύτη DMSO [67].

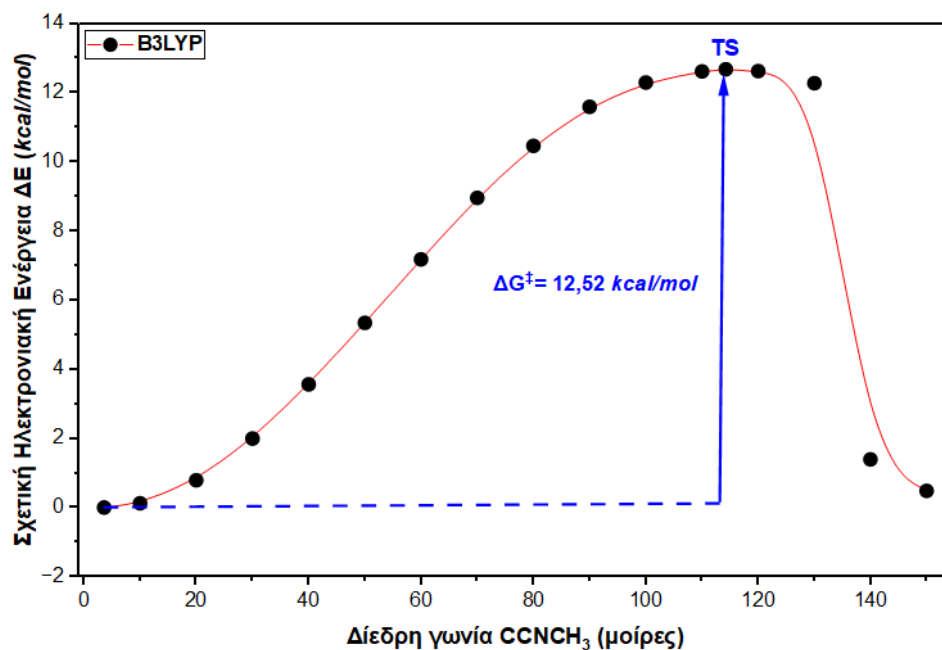
Στη συνέχεια μελετήθηκε το ενεργειακό φράγμα περιστροφής γύρω από τον δεσμό C–C–O για τη μετατροπή από το διαμορφωμερές A στο διαμορφωμερές B. Από το αντίστοιχο ενεργειακό διάγραμμα (**Σχήμα 39**) προκύπτει ότι το φράγμα περιστροφής είναι σχετικά χαμηλό, οπότε η μεταξύ τους μετατροπή είναι γρήγορη στη θερμοκρασία μελέτης και, κατά συνέπεια, τα δύο διαμορφωμερή συνυπάρχουν σε δυναμική ισορροπία. Με τη μέθοδο ω B97XD, και συγκεκριμένα για το πιο σταθερό διαμορφωμερές που είναι το **A**, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί της ενέργειας της μεταβατικής κατάστασης τόσο απουσία όσο και παρουσία διαλύτη, με στόχο να διερευνηθεί η επίδραση του διαλύτη στο ενεργειακό φράγμα της διεργασίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, χωρίς διαλύτη, το φράγμα ενεργοποίησης ανέρχεται σε

11,72 kcal/mol, ενώ με την εισαγωγή του διαλύτη DMSO αυξάνεται σε **15,16 kcal/mol**. Η αύξηση αυτή υποδηλώνει ότι ο διαλύτης σταθεροποιεί περισσότερο την αρχική κατάσταση σε σχέση με τη μεταβατική, με αποτέλεσμα την αύξηση του φράγματος ενεργοποίησης. Συνεπώς, η επιδιалύτωση φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη δυναμική της αντίδρασης, οδηγώντας σε δυσμενέστερες κινητικές συνθήκες.

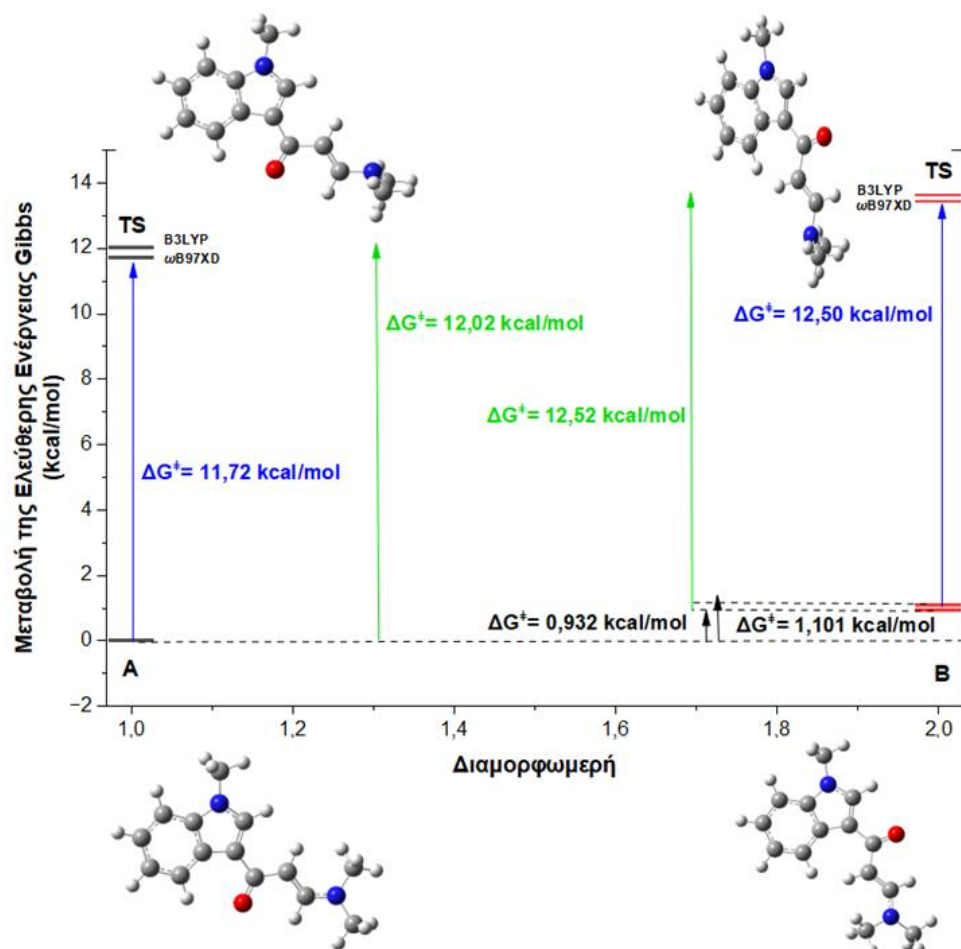


Σχήμα 39. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη διέδρη γωνία CCCO (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο B3LYP).

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 37**, από το φάσμα ^1H NMR τα μεθυλικά πρωτόνια εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σάρωση (scan) του δεσμού C–C–N–CH₃ για το διαμορφωμερές B με τη μέθοδο B3LYP, από την οποία προέκυψε τιμή 12,52 (**Σχήμα 40**). Τέλος, υπολογίστηκαν οι ενέργειες μεταβατικής κατάστασης για όλα τα διαμορφωμερή και με τις δύο μεθόδους, όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 41**.



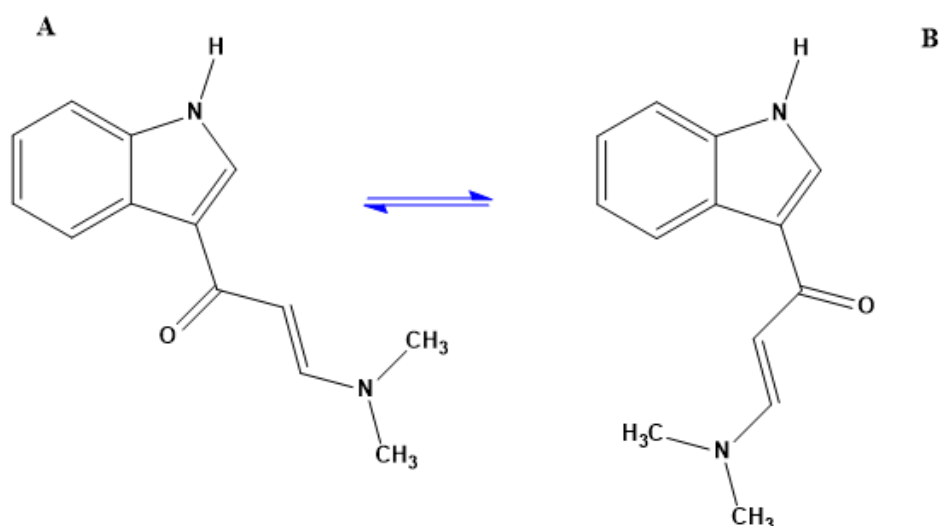
Σχήμα 40. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη διεδρη γωνία $CCNCH_3$ για τι διαμορφωμερές B (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο $\omega B97XD$).



Σχήμα 41. Διάγραμμα που απεικονίζει τα διαμορφωμερή σε συνάρτηση με την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, με τις μεθόδους **B3LYP/6-31G+d** (πράσινα βέλη) και **ωB97XD/6-31G+d** (μπλε βέλη).

6.5 Εναμινόνη 5: (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη

Τα διαμορφωμερή της ένωσης αυτής είναι τα Α και Β που φαίνονται στο **Σχήμα 42**.



Σχήμα 42. Διαμορφωμερή της ένωσης (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1*H*-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης.

Στον **Πίνακα 7** που ακολουθεί, συνοψίζονται τα αποτελέσματα για τα δύο διαμορφωμερή του υπό μελέτη μορίου, όπως προέκυψαν από τις δύο υπολογιστικές μεθόδους **DFT/B3LYP/6-31G+d** και **DFT/ωB97XD/6-31G+d**.

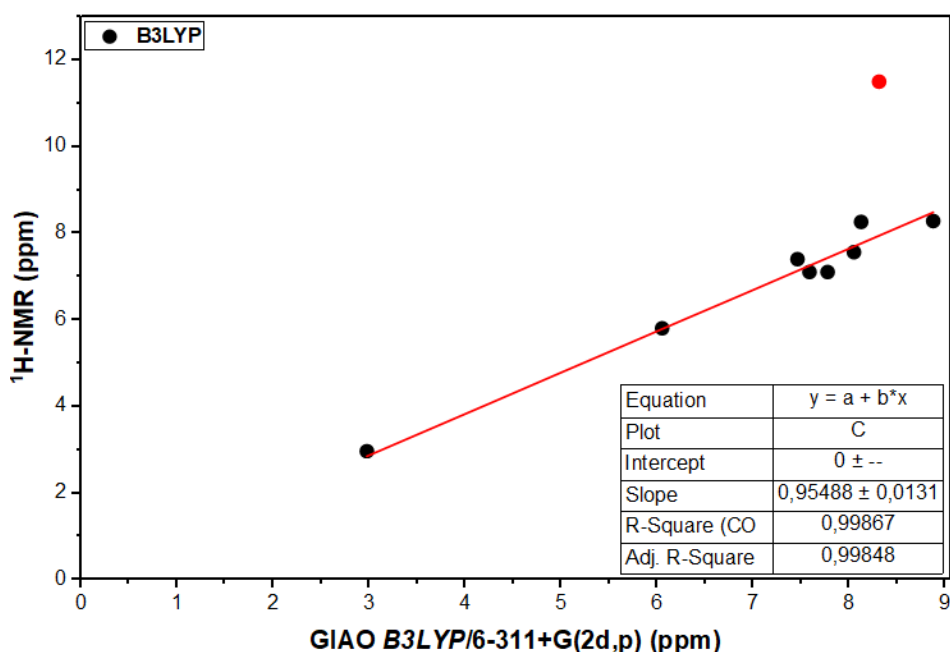
Πίνακας 7. Χρησιμοποιούμενες μέθοδοι και αντίστοιχες τιμές του G , της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG , της διπολικής ροπής μ και του ποσοστού στο διάλυμα (%) για τα πιθανά διαμορφωμερή.

Διαμορφωμερή	Μέθοδος	G (Hartree)	ΔG^* (kcal/mol)	Διπολική ροπή (μ σε Debye)	% Ποσοστό στο διάλυμα
A	B3LYP	-688,355310	1,129	6,155	87,05
B	B3LYP	-688,353511	0	2,710	12,95
A	ωB97XD	-688,119686	0,996	6,124	84,30
B	ωB97XD	-688,118099	0	2,720	15,70

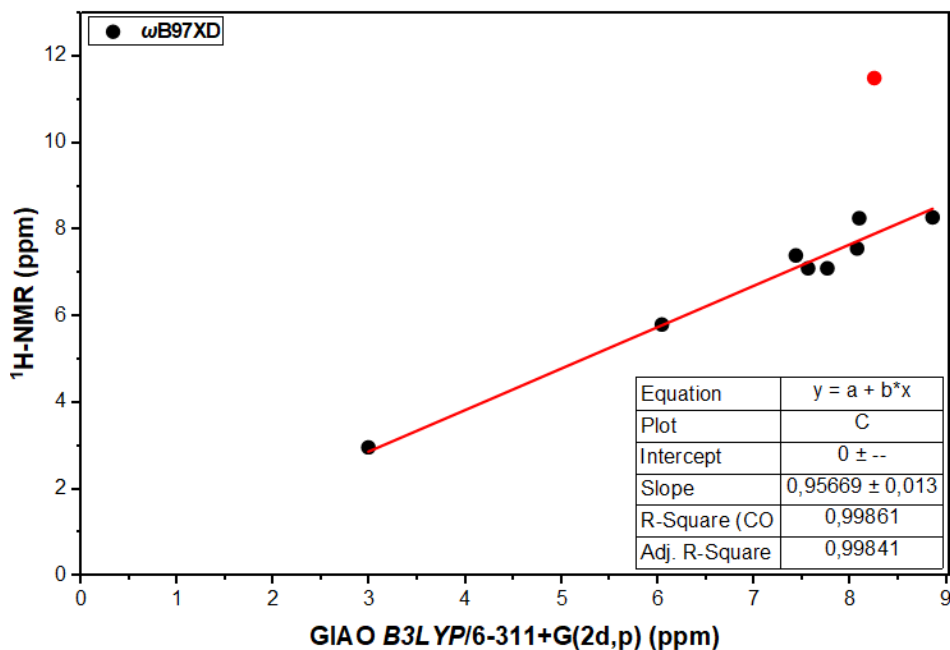
* ΔG : ως προς το πιο σταθερό διαμορφωμερές της ίδιας μεθόδου.

Στα **Σχήματα 43** και **44** παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση των πειραματικών χημικών μετατοπίσεων ^1H NMR με τις θεωρητικές τιμές που υπολογίστηκαν με τις

μεθόδους B3LYP και ω B97XD/6-311+G(2d,p). Η πολύ καλή γραμμική προσαρμογή (κλίση $\approx 0,95$ και $R^2 > 0,998$) δείχνει ότι και οι δύο θεωρητικές προσεγγίσεις αναπαράγουν με μεγάλη αξιοπιστία τα πειραματικά δεδομένα. Και στα δύο διαγράμματα, το πρωτόνιο H-2 του πυρρολικού δακτυλίου (κόκκινη κουκίδα) είναι αυτό που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόκλιση από τη γραμμική συσχέτιση.

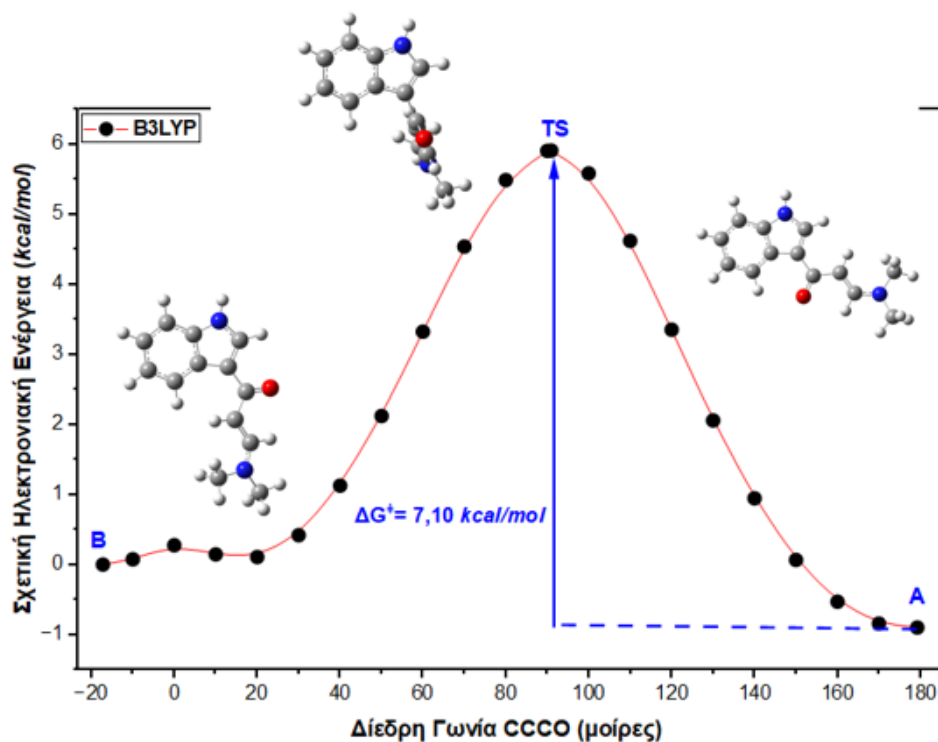


Σχήμα 43. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^{13}C (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο B3LYP/6-31+G(d)).



Σχήμα 44. Συσχέτιση πειραματικών–θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων ^1H (δ , ppm) (GIAO/DFT B3LYP/6-311+G(2d,p), σε μέσο επιδιαλύτωσης IefPCM = DMSO, σε βελτιστοποιημένες γεωμετρίες με τη μέθοδο ω B97XD/6-31+G(d)).

Στη συνέχεια, υπολογίσαμε το ενεργειακό φράγμα μετάπτωσης από το διαμορφωμερές A στο B, προκειμένου να εκτιμηθεί η σχετική ευκολία μετατροπής μεταξύ των δύο διαμορφώσεων.



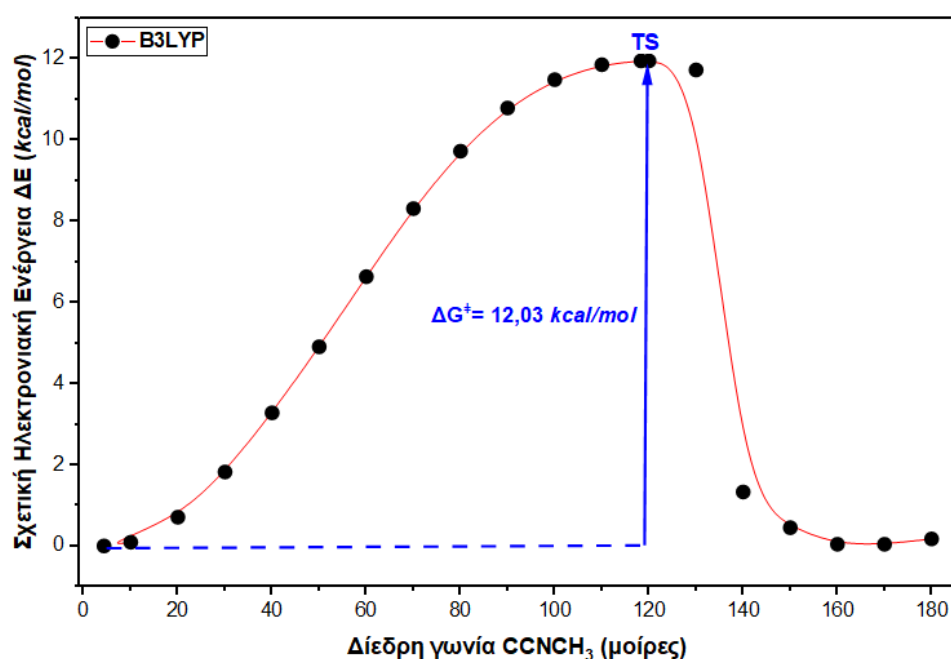
Σχήμα 45. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη διεδρη γωνία CCCO (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο B3LYP).

Από το διάγραμμα (**Σχήμα 45**) προκύπτει ότι η μετάβαση από το διαμορφωμερές A στο B συνοδεύεται από ενεργειακό φράγμα $\Delta G^\ddagger = 7,10 \text{ kcal/mol}$. Το σχετικά χαμηλό αυτό φράγμα υποδηλώνει ότι η περιστροφή γύρω από τον δεσμό είναι **αρκετά εύκολη**, ώστε σε θερμοκρασία δωματίου οι δύο διαμορφώσεις να **αλληλομετατρέπονται** ταχύτατα στην κλίμακα του NMR.

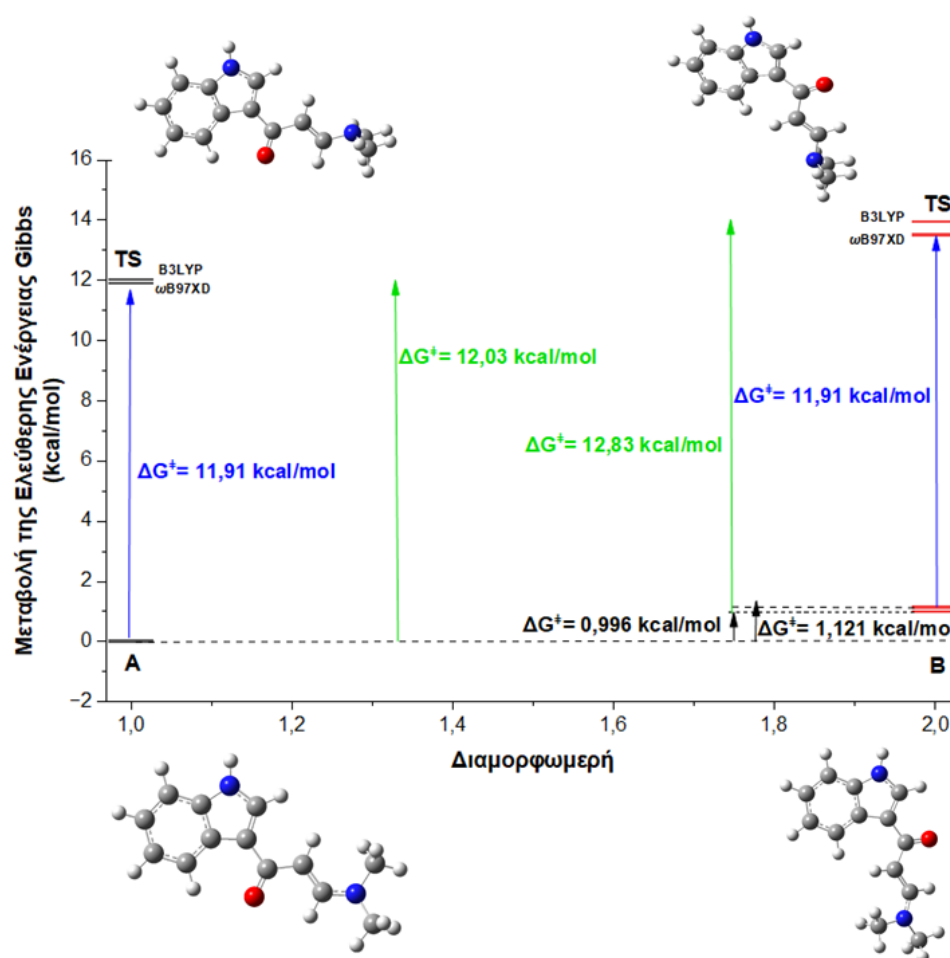
Για την ένωση (*E*)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1H-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνη δεν είναι διαθέσιμο το πρωτότυπο φάσμα ^1H NMR ωστόσο, διατίθεται η περιγραφική ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων, η οποία προέρχεται από προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου:

^1H NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 11.50 (s, 1H, H-7), 8.28 (d, 1H, H-3), 8.26 (d, 1H, H-8), 7.60 (d, 1H, H-6), 7.56 (d, 1H, H-1), 7.10 (d, 2H, H-4, H-5), 5.80 (d, 1H, H-2), 2.96 (br s, 6H, 2CH₃) [70].

Παρατηρούμε ότι τα πρωτόνια των μεθυλομάδων εμφανίζουν μία απλή κορυφή στο φάσμα ^1H NMR, γεγονός που υποδεικνύει ότι βρισκόμαστε στην **περιοχή γρήγορης ανταλλαγής** στη χημική κλίμακα του NMR και, κατά συνέπεια, ότι η περιστροφή γύρω από τον δεσμό C-C-N-CH₃ είναι ταχεία. Για να υπολογιστεί το ενεργειακό φράγμα αυτής της περιστροφής, πραγματοποιήθηκε σάρωση (scan) του δεσμού C-C-N-CH₃. Στο **Σχήμα 46** παρουσιάζεται το ενεργειακό προφίλ της σάρωσης για το διαμορφωμέρες A, από το οποίο προκύπτει ενεργειακό φράγμα 12,03 kcal/mol με τη μέθοδο B3LYP. Στο **Σχήμα 47** απεικονίζονται συγκεντρωτικά τα ενεργειακά φράγματα για όλα τα διαμορφωμέρα, όπως υπολογίστηκαν με τις δύο μεθόδους.



Σχήμα 46. Μεταβολή της σχετικής ηλεκτρονιακής ενέργειας ως προς τη δίεδρη γωνία CCNCH₃ για τι διαμορφωμέρες A (οι υπολογισμοί έγιναν με τη μέθοδο ω B97XD) .



Σχήμα 47. Διάγραμμα που απεικονίζει τα διαμορφωμερή σε συνάρτηση με την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs, με τις μεθόδους **B3LYP/6-31G+d** (πράσινα βέλη) και **ω B97XD/6-31G+d** (μπλε βέλη).

Με τη μέθοδο ω B97XD, και συγκεκριμένα για το πιο σταθερό διαμορφωμερές που είναι το A, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί της ενέργειας της μεταβατικής κατάστασης τόσο απουσία όσο και παρουσία διαλύτη, με στόχο να διερευνηθεί η επίδραση του διαλύτη στο ενεργειακό φράγμα της διεργασίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, χωρίς διαλύτη, το φράγμα ενεργοποίησης ανέρχεται σε 11,91 kcal/mol, ενώ με την εισαγωγή του διαλύτη DMSO αυξάνεται σε 14,6 kcal/mol. Η αύξηση αυτή υποδηλώνει ότι ο διαλύτης σταθεροποιεί περισσότερο την αρχική κατάσταση σε σχέση με τη μεταβατική, με αποτέλεσμα την αύξηση του φράγματος ενεργοποίησης. Συνεπώς, η επιδιαλύτωση φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη δυναμική της αντίδρασης, οδηγώντας σε λιγότερο ευνοϊκές κινητικές συνθήκες.

6.6 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για όλα τα διαμορφωμερή των εναμινονών πραγματοποιήθηκε, με χρήση της μεθόδου ω B97XD, συστηματική μελέτη συσχέτισης:

- της τάξης του δεσμού C–N κατά Wiberg με την ελεύθερη ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης,
- του μήκους του δεσμού C–N με ίδια ελεύθερη ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης,
- καθώς και του μήκους του δεσμού C–N με την τάξη του δεσμού κατά Wiberg.

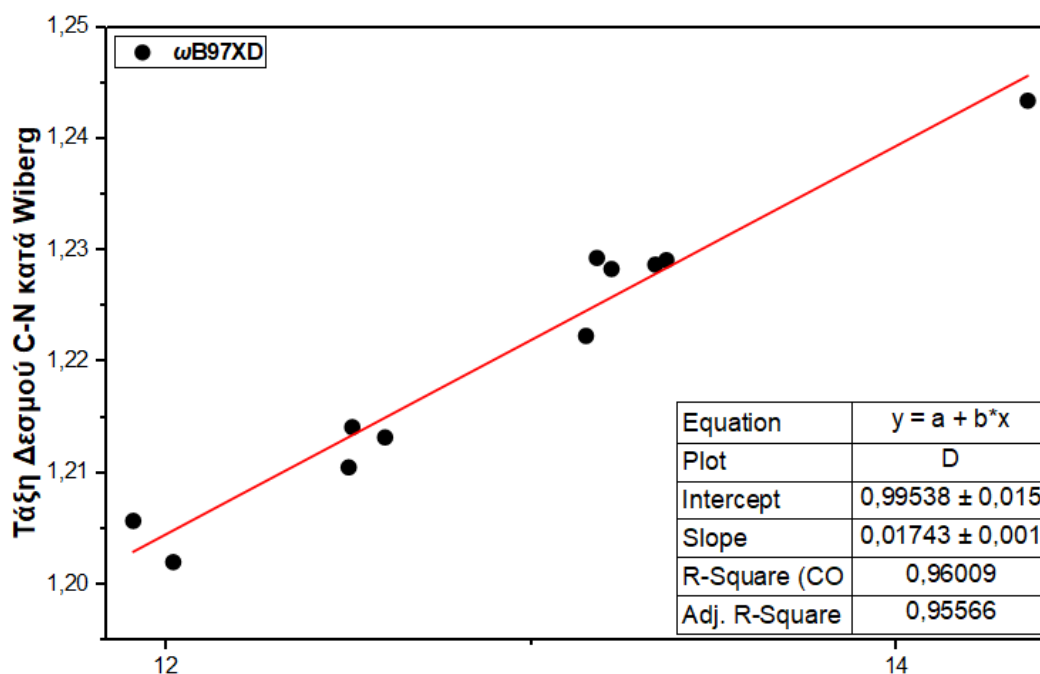
Από τα σχετικά διαγράμματα τα οποία απεικονίζονται παρακάτω προκύπτουν συσχετίσεις, οι οποίες καταδεικνύουν ότι τόσο **η ισχύς όσο και το μήκος του δεσμού C–N** επιδρούν καθοριστικά στο **ύψος του ενεργειακού φράγματος**. Ειδικότερα, **υψηλότερη τάξη δεσμού και μικρότερο μήκος C–N** συνδέονται με **σταθερότερες δομές και υψηλότερη ενέργεια μεταβατικής κατάστασης $\Delta G^\ddagger$** .

Συνολικά, τα αποτελέσματα των θεωρητικών υπολογισμών, σε συνδυασμό με τα πειραματικά δεδομένα, προσφέρουν μία συνεκτική και δομικά τεκμηριωμένη εικόνα της σχέσης μεταξύ μοριακής δομής και της ισχύος του δεσμού. Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται οι υπολογισμένες τιμές της ενέργειας μεταβατικής κατάστασης ($\Delta G^\ddagger$, kcal/mol) και της τάξης δεσμού C–N κατά Wiberg για τα διαμορφωμερή A–D των εναμινονών 1–5, ενώ στο **Σχήμα 48** το αντίστοιχο διάγραμμα.

Πίνακας 8. Υπολογισμένες τιμές της ενέργειας μεταβατικής κατάστασης ($\Delta G^\ddagger$, kcal/mol) και της τάξης δεσμού C–N κατά Wiberg για τα διαμορφωμερή A–D των εναμινονών 1–5.

Εναμινόνη	Διαμορφωμερές	Ενέργεια Μεταβατικής Κατάστασης $\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	Τάξη Δεσμού C-N κατά Wiberg
1	A	12,60	1,2132
1	B	13,15	1,2223
2	A	13,18	1,2293
2	B	13,22	1,2283
2	C	13,34	1,2287
2	D	13,37	1,2291
3	B	14,36	1,2434

4	A	12,02	1,2020
4	B	12,50	1,2105
5	A	11,91	1,2057
5	B	12,51	1,2141



Ενέργεια Μεταβατικής Κατάστασης $\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)

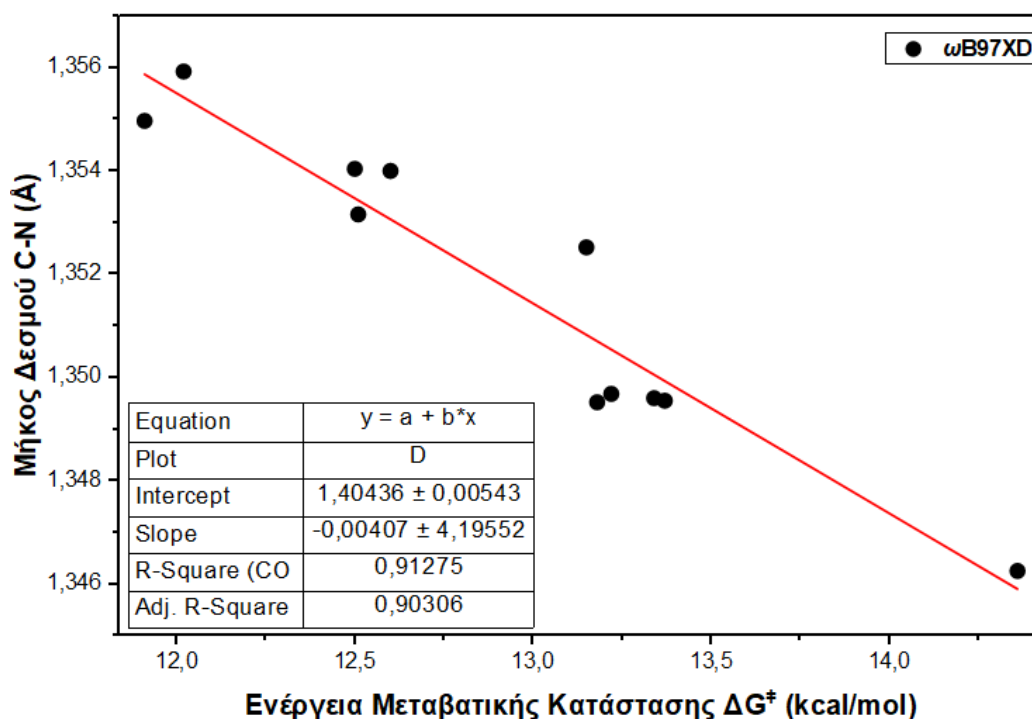
Σχήμα 48. Γραμμική συσχέτιση της ενέργειας μεταβατικής κατάστασης $\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol) με την τάξη δεσμού C–N κατά Wiberg για τα διαμορφωμερή A–D των εναμιनों 1–5 (με τη μέθοδο $\omega B97XD$).

Στον **Πίνακα 9** παρουσιάζονται οι υπολογισμένες τιμές της ενέργειας μεταβατικής κατάστασης ($\Delta G^\ddagger$, kcal/mol) και του μήκους του δεσμού C–N (Å) για τα διαμορφωμερή A–D των εναμιनों 1–5, ενώ στο **Σχήμα 49** το αντίστοιχο διάγραμμα.

Πίνακας 9. Υπολογισμένες τιμές της ενέργειας μεταβατικής κατάστασης ($\Delta G^\ddagger$, kcal/mol) και της τάξης δεσμού C–N κατά Wiberg για τα διαμορφωμερή A–D των εναμιनों 1–5.

Εναμινόνη	Διαμορφωμερές	Ενέργεια Μεταβατικής Κατάστασης $\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol)	Μήκος Δεσμού C–N (Å)
1	A	12,60	1,35400
1	B	13,15	1,35252
2	A	13,18	1,34952
2	B	13,22	1,34968
2	C	13,34	1,34960

2	D	13,37	1,34955
3	B	14,36	1,34625
4	A	12,02	1,35593
4	B	12,50	1,35404
5	A	11,91	1,35497
5	B	12,51	1,35316



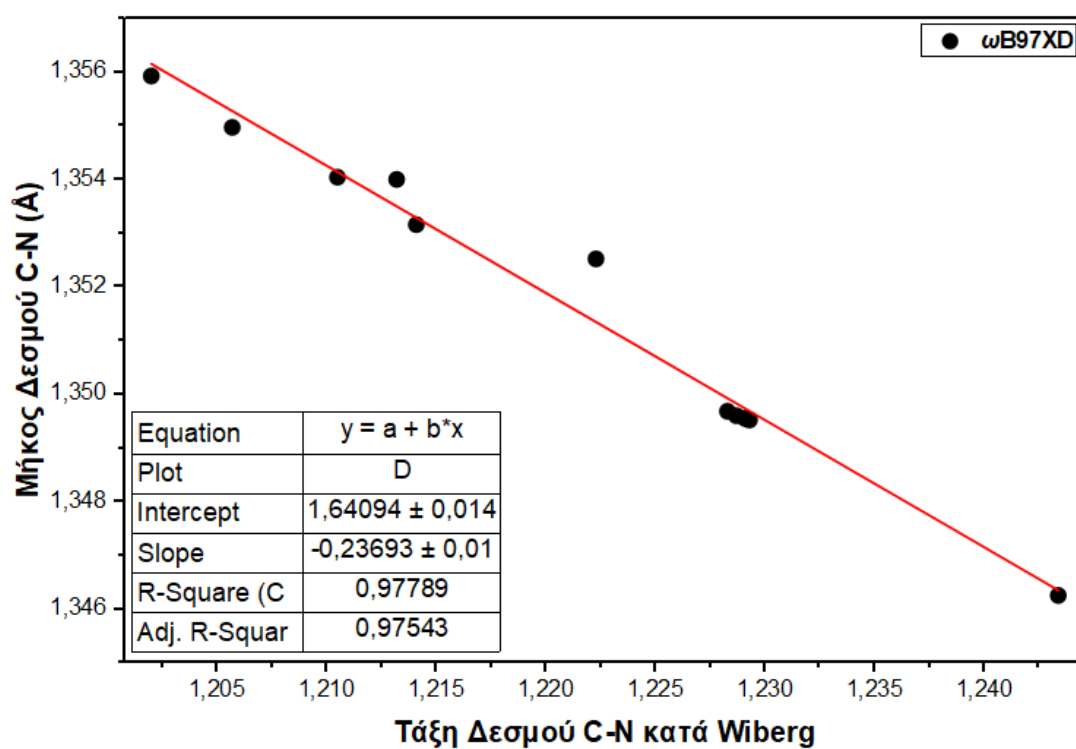
Σχήμα 49. Γραμμική συσχέτιση της ενέργειας μεταβατικής κατάστασης $\Delta G^\ddagger$ (kcal/mol) με την το μήκος του δεσμού C-N (Å) για τα διαμορφωμερή A-D των εναμιनोंων 1–5 (με τη μέθοδο ω B97XD).

Στον **Πίνακα 10** παρουσιάζονται οι υπολογισμένες τιμές της τάξης δεσμού C–N κατά Wiberg και του μήκους του δεσμού C–N (Å) για τα διαμορφωμερή A–D των εναμιनोंων 1–5, ενώ στο **Σχήμα 50** το αντίστοιχο διάγραμμα.

Πίνακας 10. Υπολογισμένες τιμές της τάξης δεσμού C–N κατά Wiberg και του μήκους του δεσμού C–N (Å) για τα διαμορφωμερή A–D των εναμιनोंων 1–5.

Εναμινόνη	Διαμορφωμερές	Τάξη Δεσμού C–N κατά Wiberg	Μήκος Δεσμού C–N (Å)
1	A	1,2132	1,35400
1	B	1,2223	1,35252

2	A	1,2293	1,34952
2	B	1,2283	1,34968
2	C	1,2287	1,34960
2	D	1,2291	1,34955
3	B	1,2434	1,34625
4	A	1,2020	1,35593
4	B	1,2105	1,35404
5	A	1,2057	1,35497
5	B	1,2141	1,35316



Σχήμα 50. Γραμμική συσχέτιση της τάξης του δεσμού C-N κατά Wiberg με το μήκος του δεσμού C-N (Å) για τα διαμορφωμερή A-D των εναμιनों 1–5 (με τη μέθοδο ωB97XD).

6.7 ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο συνθετικό μέρος της παρούσας εργασίας επιτεύχθηκε η επέκταση του σκελετού των μεριδιανινών από την πλευρά του ινδολικού δακτυλίου, μέσω σχηματισμού αμιδικού δεσμού με κατάλληλα υποκατεστημένα βενζοϋλο-χλωρίδια. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν νέα ανάλογα των μεριδιανινών, τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως δυνητικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών. Πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων οστεοσαρκώματος, επιτρέποντας τη μελέτη της κυτταρικής απόκρισης σε μόρια ανάλογα των μεριδιανινών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις παρουσίαζαν δοσοεξαρτώμενη συμπεριφορά, διαφοροποιούμενες ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση των χρησιμοποιούμενων αναλόγων. Παράλληλα, η υπολογιστική προσέγγιση μέσω molecular docking σε διαφορετικές πρωτεΐνες ανέδειξε πιθανές μοριακές αλληλεπιδράσεις. Παρότι οι πειραματικές και υπολογιστικές προσεγγίσεις αφορούσαν διαφορετικά βιολογικά συστήματα, συνεισφέρουν συμπληρωματικά στη συνολική κατανόηση του τρόπου δράσης των αναλόγων.

Τα συνθετικά ενδιάμεσα μελετήθηκαν θεωρητικά και, μέσω ανάλυσης NBO και υπολογισμού των ατομικών φορτίων, τεκμηριώθηκε ο λόγος για τον οποίο η ακυλίωση λαμβάνει χώρα εκλεκτικά στη θέση 3 του πυρρολικού δακτυλίου. Η υψηλότερη πυκνότητα φορτίου και η μεγαλύτερη πυρονοφιλία στον συγκεκριμένο C, σε συνδυασμό με τη σταθεροποίηση του αντίστοιχου ακυλιωμένου ενδιάμεσου, εξηγούν την παρατηρούμενη χημειοεκλεκτικότητα.

Τόσο για το συνθετικό μέρος όσο και για το κεφάλαιο των εναμινονών, οι θεωρητικοί υπολογισμοί με τη μέθοδο DFT, χρησιμοποιώντας τα λειτουργικά B3LYP και ω B97XD, έδειξαν πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών τιμών (κυρίως NMR), με υψηλούς συντελεστές γραμμικής συσχέτισης και ικανοποιητική γραμμικότητα στα αντίστοιχα διαγράμματα. Η σύγκλιση θεωρίας και πειράματος ενισχύει την αξιοπιστία των μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή της δομής και της ηλεκτρονικής κατανομής των ενώσεων.

Για τις εναμιμόνες αποδείχθηκε ότι το πρωτόνιο στη θέση 2 του πυρρολικού δακτυλίου, σε διαλύτη DMSO, σχηματίζει ισχυρό σύμπλοκο μέσω δεσμών υδρογόνου, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται σημαντικά αποπροστατευμένο στο φάσμα ^1H NMR σε

σχέση με άλλους διαλύτες. Η συμπεριφορά αυτή ερμηνεύεται πλήρως από τους DFT υπολογισμούς και την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων με το DMSO.

Επιπλέον, υπολογίσθηκε το ενεργειακό φράγμα περιστροφής γύρω από τον δεσμό $C=C-N-CH_3$ των εναμινονών. Διαπιστώθηκε ότι, όταν το φράγμα είναι υψηλό, η περιστροφή είναι αργή στη χρονική κλίμακα του NMR και τα αντίστοιχα πρωτόνια δίνουν δύο διακριτές, απλές κορυφές. Η παρουσία διαλύτη αυξάνει περαιτέρω το φράγμα περιστροφής, καθώς σταθεροποιεί ενεργειακά το αρχικό μόριο και επηρεάζει τον τρόπο επιδιалύτωσης των διαμορφωμένων.

Τέλος, βρέθηκε σαφής συσχέτιση ανάμεσα στην τάξη δεσμού κατά **Wiberg**, στο μήκος δεσμού και στο ενεργειακό φράγμα περιστροφής γύρω από τον δεσμό $C-N$. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνεται η τάξη δεσμού $C-N$, τόσο μειώνεται το μήκος του δεσμού και αυξάνεται το ενεργειακό φράγμα ενεργοποίησης για την περιστροφή, επιβεβαιώνοντας τον μερικώς διπλό χαρακτήρα του δεσμού $C-N$ στις εναμινόνες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

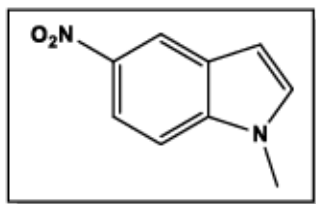
Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας X3-210. Κατά την διεξαγωγή των αντιδράσεων, η παρακολούθηση της πορείας τους πραγματοποιούνταν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και συγκεκριμένα με πλάκες silica gel F254 ms των εταιρειών Merck και Fluorochem. Ο διαχωρισμός και η απομόνωση των ενώσεων με χρωματογραφία στήλης έγινε επίσης με Silica gel F254 ms της εταιρείας Fluorochem.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως πρόδρομες ενώσεις για την διεξαγωγή των πειραμάτων προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma Aldrich, Alfa Aesar Fluorochem και Carbosynth και ήταν υψηλής καθαρότητας και δεν επεξεργάστηκαν πριν χρησιμοποιηθούν. Οι διαλύτες των αντιδράσεων, οι οποίοι προμηθεύτηκαν από τις ίδιες εταιρείες, είτε χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία είτε καθαρίστηκαν και κατέστησαν απόλυτοι (άνυδροι), όπου αυτό ήταν απαραίτητο. Οι προκύπτουσες ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) σε φασματογράφο Bruker AV 250, 500 MHz.

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της Θεωρίας Λειτουργικού Πυκνότητας (DFT) με χρήση του προγράμματος **Gaussian 09**. Οι γεωμετρίες των ενώσεων και των ενδιάμεσων βελτιστοποιήθηκαν με τα λειτουργικά **B3LYP** και **ωB97XD** και βάση 6-31+G(d), ενώ ακολούθησαν υπολογισμοί συχνοτήτων που επιβεβαίωσαν ότι οι δομές αντιστοιχούν σε ελάχιστα ενέργειας και για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών μεγεθών (G) σε 298 K. Η επίδραση του διαλύτη DMSO ή CHCl₃ προσομοιώθηκε με μοντέλο συνεχούς μέσου (PCM/IefPCM). Τα θεωρητικά φάσματα ¹H και ¹³C NMR υπολογίστηκαν με τη μέθοδο GIAO στο ίδιο επίπεδο θεωρίας. Οι υπολογισμένες χημικές μετατοπίσεις συγκρίθηκαν άμεσα με τις πειραματικές τιμές μέσω διαγραμμάτων συσχέτισης (θεωρητικές έναντι πειραματικών τιμών) και γραμμικής παλινδρόμησης, από τα οποία προέκυψε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης (R²) και αξιολογήθηκε η ποιότητα της συμφωνίας θεωρίας–πειράματος. Για τις εναμινόνες πραγματοποιήθηκε υπολογισμός ενεργειακών φραγμάτων περιστροφής γύρω από τον δεσμό C–N, καθώς και σταθμισμένος κατά Boltzmann υπολογισμός των ποσοστών των επιμέρους διαμορφωμάτων στο διάλυμα.

7.1 ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

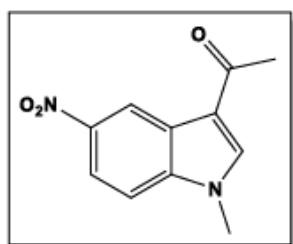
7.1.1 Σύνθεση του 1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολίου:



Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθεται διάλυμα 5-νιτρο-ινδολίου (5g, 30,83 mmol) σε άνυδρο THF (35 mL). Στους 0°C και υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται NaH 50% w/w σε λάδι (3,7, g 77,08 mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 45 λεπτά και στην συνέχεια προστίθεται στάγδην CH₃I (10,94 g, 77,08 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική φάση απομονώνεται, ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και διηθείται. Ο διαλύτης απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το προϊόν απομονώνεται ως κίτρινο ίζημα (Απόδοση 98%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.569 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 1H), 8.038 (dd, ³J = 9, ⁴J = 2.5 Hz, 1H), 7.643 (d, ³J = 9 Hz, 1H), 7.598 (d, ³J = 3.25 Hz, 1H), 6.738 (d, ³J = 3.25 Hz, 1H), 3.876 (s, 3H).

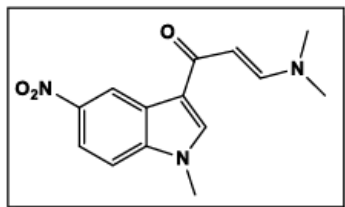
7.1.2 Σύνθεση της 1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1H-ινδολ-3-υλο)αιθανο-1-όνης:



Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL φέρεται διάλυμα 1-μεθυλο-5-νίτρο-1H-ινδολίου (4g, 18,33 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (40 mL). Στην συνέχεια, στους 0 °C και σε ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται AlCl₃ (7,33g, 55mmol) σε δόσεις. Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 60 λεπτά στους 0 °C. Έπειτα, πραγματοποιείται προσθήκη Ac₂O (2,43 g, 23,83 mmol) στάγδην και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος TLC) ο διαλύτης απομακρύνεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία προστίθεται κρύο νερό στην σφαιρική φιάλη για την μετατροπή του AlCl₃ σε Al(OH)₃ και αφήνεται υπό ανάδευση για 4 ώρες ακολουθούμενη από εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ξηραίνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂ και το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως κίτρινο στερεό (Απόδοση: 71%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.045 (d, ⁴J = 1.5 Hz, 1H), 8.620 (s, 1H), 8.176 (dd, ³J = 9 Hz, ⁴J = 1 Hz, 1H), 7.796 (d, ³J = 9.1 Hz, 1H), 3.956 (s, 3H), 2.498 (s, 3H).

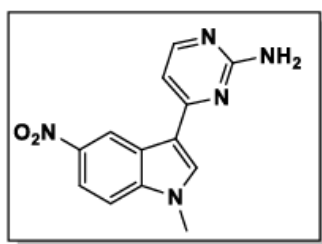
7.1.3 Σύνθεση της (E)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1H-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης:



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται διάλυμα της 1-(1-μεθυλο-ινδολ-3-υλο) αιθαν-1-όνης (500 mg, 2,29 mmol) σε ο-ξυλόλιο (10 mL) και το μείγμα θερμαίνεται στους 100 °C. Στην συνέχεια, προστίθεται DMF-DMA (819 mg, 6,87 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 140 °C για 60 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μείγμα μεταφέρεται αρχικά σε περιστροφικό εξατμιστήρα και εν συνεχεία σε αντλία υψηλού κενού για απομάκρυνση του διαλύτη και του DMF-DMA. Το επιθυμητό προϊόν διαχωρίζεται από το διάλυμα με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών έκλουσης 5% MeOH σε CH₂Cl₂ (Απόδοση: 75%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.198 (d, ⁴J = 2.38 Hz, 1H), 8.428 (s, 1H), 8.091 (dd, ³J = 9.25, ⁴J = 2.38 Hz, 1H), 7.700 (d, ³J = 9.25 Hz, 1H), 7.615 (d, ³J = 12.38 Hz, 1H), 5.738 (d, ³J = 12.38 Hz, 1H), 3.910 (s, 3H), 3.001 (s, 6H).

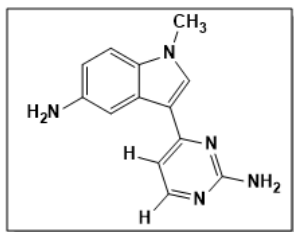
7.1.4 Σύνθεση της 4-(1-μεθυλο-5-νιτρο-ινδολ-3-υλο)πυριμιδino-2-αμίνης:



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού άλατος γουανιδίνης (372 mg, 3,9 mmol) και K₂CO₃ (718 mg, 5,2 mmol) σε 1-προπανόλη (10 mL). Το μείγμα θερμαίνεται στους 97°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται (E)-3-(διμεθυλαμινο)-1-(1-μεθυλο-5-νιτρο-1H-ινδολ-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (350 mg, 1,28 mmol) και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 36 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης απομακρύνεται ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ διηθείται και ο EtOAc απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα έκλουσης 33% EtOAc σε CH₂Cl₂ ως κίτρινο ίζημα (Απόδοση: 59%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 9.400 (d, ⁴J = 2.25 Hz, 1H), 8.425 (s, 1H), 8.169 (d, ³J = 5.25 Hz, 1H), 8.099 (dd, ³J = 9.13, ⁴J = 2.25 Hz, 1H), 7.710 (d, ³J = 9.13 Hz, 1H), 6.970 (d, ³J = 5.25 Hz, 1H), 3.914 (s, 3H), 6.548 (s, 2H).

7.1.5 Σύνθεση της ένωσης 3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-αμίνης:

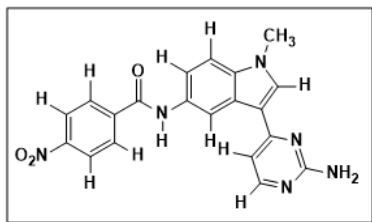
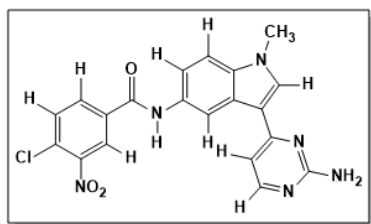


Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, η οποία έχει προηγουμένως ξηραθεί, φέρεται καταλυτική ποσότητα PtO₂ (περίπου 5–10% κ.β. ως προς το υπόστρωμα). Ο καταλύτης ενεργοποιείται υπό έντονη ανάδευση για περίπου 10 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ροή υδρογόνου. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα της προς αναγωγή ένωσης σε άνυδρο THF και το μίγμα αφήνεται να αναδεύεται έντονα σε μαγνητικό αναδευτήρα. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) έως την πλήρη κατανάλωση του εκκινητή (μετατροπή ~100%). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται υπό κενό μέσω χωνιού Büchner, χρησιμοποιώντας διχλωρομεθάνιο για την έκπλυση και πλήρη απομάκρυνση του καταλύτη PtO₂. Το διήθημα συλλέγεται και οι πτητικοί διαλύτες απομακρύνονται σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό μειωμένη πίεση, δίνοντας το προϊόν, το οποίο καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης (Απόδοση: 100%).

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8.053 (d, ³J = 5.38 Hz, 1H), 7.919 (s, 1H), 7.661 (d, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7.172 (d, ³J = 8.13 Hz, 1H), 6.856 (d, ³J = 5.38 Hz, 1H), 6.626 (d, ³J = 8.13 Hz, 1H), 6.188 (s, 2H), 4.599 (s, 2H), 3.726 (s, 3H).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.48, 162.81, 157.01, 143.08, 131.86, 131.64, 126.96, 112.51, 111.40, 110.64, 105.79, 105.39, 33.14.

7.1.6 Σύνθεση των ενώσεων *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-χλωρο-3-νιτροβενζαμίδιο και *N*-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4-νιτροβενζαμίδιο:



Σε ξηρή δύλαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL, μεταφέρεται η προς ακυλίωση αμινοένωση και προστίθενται 1–2 σταγόνες DIPEA ως οργανική βάση υπό ατμόσφαιρα αζώτου και ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθεται το εκάστοτε οξαλοχλωρίδιο (2,0 ισοδύναμα) διαλυμένο σε άνυδρο THF. Το μίγμα αναδεύεται σε παγόλουτρο για περίπου 10 min και κατόπιν απομακρύνεται και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 30 min, έως ότου

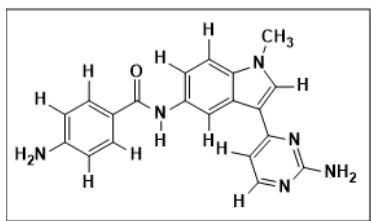
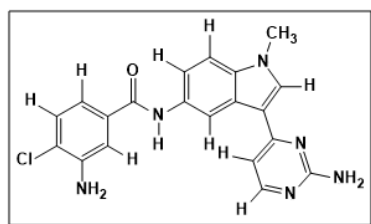
η αντίδραση ολοκληρωθεί (έλεγχος με TLC). Ο διαλύτης (δηλ. THF) απομακρύνεται στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ακολουθεί εκχύλιση με νερό και διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση εκπλένεται διαδοχικά με διάλυμα NaHCO₃ 10% (w/v), ώστε να απομακρυνθεί το σχηματιζόμενο βενζοϊκό οξύ. Ύστερα ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄, διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται εκ νέου στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, χρησιμοποιώντας μίγμα διαλυτών DCM/MeOH 20:1 (v/v), με απόδοση 60%.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.534 (s, 1H), 8.693 (dd, 2H), 8.338 (dd, ³J = 8.63, ⁴J = 2 Hz, 1H), 8.178 (s, 1H), 8.156 (s, 1H), 7.995 (d, ³J = 8.25 Hz, 1H), 7.628 (dd, ³J = 8.63, ⁴J = 2 Hz, 1H), 7.532 (d, ³J = 8.25 Hz, 1H), 6.952 (d, 1H), 6.301 (s, 2H), 3.881 (s, 3H).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 163.93, 162.63, 162.42, 157.83, 147.87, 135.65, 135.53, 133.32, 133.22, 132.41, 132.24, 128.30, 125.86, 125.23, 118.03, 115.57, 113.24, 110.69, 105.84, 33.55.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.527 (s, 1H), 8.703 (s, 1H), 8.40 (d, ³J = 8.63 Hz, 2H), 8.267 (d, ³J = 8.63 Hz, 2H), 8.173 (d, 2H), 7.654 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.536 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.962 (d, 1H), 6.335 (s, 2H), 3.887 (s, 3H).

7.1.7 Σύνθεση των ενώσεων 3-αμινο-N-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)-4 χλωροβενζαμίδιο και 4-αμινο-N-(3-(2-αμινοπυριμιδιν-4-υλο)-1-μεθυλο-1*H*-ινδολ-5-υλο)βενζαμίδιο:



Οι ενώσεις αυτές παρασκευάζονται με αναγωγή των αντίστοιχων νιτρο-ενώσεων ακολουθώντας την ίδια πειραματική πορεία αναγωγής με PtO_2/H_2 που περιγράφεται στην προηγούμενη σύνθεση. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο καταλύτης απομακρύνεται με διήθηση υπό κενό και, μετά από απομάκρυνση των διαλυτών στον περιστροφικό εξατμιστήρα, τα προϊόντα καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, χρησιμοποιώντας

ως μίγμα διαλυτών DCM/MeOH 20:1 (v/v) με απόδοση 65%.

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 10.156 (s, 1H), 8.761 (s, 1H), 8.139 (2H), 7.715 (d, 1H), 7.462 (d, 2H), 7.290 (d, 2H), 6.935 (d, 1H), 6.333 (s, 2H), 5.571 (s, 2H), 3.853 (s, 3H).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 9.739 (s, 1H), 8.661 (d, $^4J = 2.0$ Hz, 1H), 8.225 – 8.206 (m, 2H), 7.823 (d, $^3J = 8.75$ Hz, 2H), 7.703 (dd, $^3J = 8.9$, $^4J = 2.0$ Hz, 1H), 7.523 (d, $^3J = 8.75$ Hz, 1H), 7.027 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 1H), 6.670 (d, $^3J = 8.75$ Hz, 2H), 6.522 (s, 2H), 6.471 (s, 2H), 3.934 (s, 3H).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Klaunig, J.E. Mutagenesis, Carcinogenesis Reference Module in Biomedical Sciences, 2014.
- [2] Miao, H. et al. Transforming the landscape of cancer treatment with seven promising novel therapies: evolution and future perspectives. *Med Plus* 2025, 2, 100087.
- [3] Hait, W.N. Targeted Cancer Therapeutics. *Cancer Res* 2009, 69, 1263–1267.
- [4] Adjei, I.M., Blanka, S. Modulation of the Tumor Microenvironment for Cancer Treatment: A Biomaterials Approach. *J. Funct. Biomater.* 2015, 6, 81-103.
- [5] Valter, K. et al. Contrasting effects of glutamine deprivation on apoptosis induced by conventionally used anticancer drugs. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Res* 2017, 1864, 498-506.
- [6] Bailey, K.M. et al. Chapter Four - Targeting the Metabolic Microenvironment of Tumors. *Adv Pharm* 2012, 65, 63-107.
- [7] Suryadev, Y.Y. et al. Targeted cancer therapy. *Res Refl* 2017, 1, 11-17.
- [8] Weber, W.A. Positron Emission Tomography As an Imaging Biomarker. *J Clin Oncol* 2006, 24, 3282-3292.
- [9] Citri, A., Yarden, Y. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7, 505–516.
- [10] Luo, J., Manning, B.D., Cantley, L.C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer. Rationale and promise. *Cancer Cell* 2003, 4, 257-262.
- [11] Hurwitz, H. et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New Engl J Med* 2004, 350, 2335-2342.
- [12] Debela, D.T. et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine* 2021, 9.
- [13] Balik, K. et al. Limitations of molecularly targeted therapy. *Med Res J* 2019, 4(2), 99-105.
- [14] Huang, M. et al. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharm Sci* 2014, 35, 41-50.
- [15] Adams, J. Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chem Rev* 2001, 101, 2271–2290.
- [16] Roskoski, R., Jr. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 2015, 100, 1-23.
- [17] Nestler, E.J., Greengard P. Protein Phosphorylation is of Fundamental Importance in Biological Regulation. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. Basic

Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.

[18] McClendon, C.L. et al. Dynamic architecture of a protein kinase. *PNAS* 2014, 111 (43), E4623-E4631

[19] de Oliveira P.S.L., et al. Revisiting protein kinase-substrate interactions: Toward therapeutic development. *Sci Signal* 2016, 9(420), re3.

[20] Modi, V., Dunbrack, R.L. Jr. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *PNAS* 2019, 116 (14), 6818-6827.

[21] Brooijmans, N. et al. An enriched structural kinase database to enable kinome-wide structure-based analyses and drug discovery. *Protein Sci* 2010, 19(4), 763–774.

[22] Wilson, L.J. New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome. *Cancer Res* 2018, 78 (1), 15–29.

[23] Capra, M. et al. Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Res* 2006, 66(16), 8147-8154.

[24] Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. Protein serine/threonine kinases. *Annu Rev Biochem* 1987, 56, 567-613.

[25] Sun, E. et al. Serine/threonine kinase 32C is overexpressed in bladder cancer and contributes to tumor progression. *Cancer Biol Ther* 2019, 20(3), 307-320.

[26] Manash K.P., Anup K.M. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int J Med Sci* 2004, 1(2), 101–115.

[27] Hubbard, S.R., Till, J.H. Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu Rev Biochem* 2000, 69, 373-398.

[28] Zámečníkova, A. Novel approaches to the development of tyrosine kinase inhibitors and their role in the fight against cancer. *Expert Opin Drug Discov* 2014, 9(1), 77-92.

[29] Wieduwilt, M.J., Moasser, M.M. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(10), 1566-1584.

[30] Zhang, H. et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 2007, 117(8), 2051-2058.

[31] Baluk, P., Hashizume, H., McDonald, D.M. Cellular Abnormalities of Blood Vessels as Targets in Cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005, 15, 102-111.

[32] Voldborg, B.R. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997, 8(12), 1197-206.

- [33] Bethune G. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *J Thorac Dis* 2010, 2(1), 48–51.
- [34] Eshaq, A.M. Non-receptor tyrosine kinases: Their structure and mechanistic role in tumor progression and resistance. *Cancers* 2024, 16(15), 2754.
- [35] Kanev, G.K. et al. The landscape of atypical and eukaryotic protein kinases. *Trends Pharm Sci* 2019, 40(11), 818-832.
- [36] Hardie, D.G. Roles of protein kinases and phosphatases in signal transduction. *Symp Soc Exp Biol* 1990, 44, 241-255.
- [37] Schenk, P.W., Snaar-Jagalska, B.E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1449(1), 1-24.
- [38] Ferguson, F.M., Gray, N.S. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nature Rev Drug Discov* 2018, 17, 353–377.
- [39] Schram, A.M. et al. Fusions in solid tumours: diagnostic strategies, targeted therapy, and acquired resistance. *Nat Rev Clin Oncol* 2017, 14(12), 735-748.
- [40] Gagic, Z. et al. *In silico* Methods for design of kinase inhibitors as anticancer drugs. *Front Chem* 2020, 7, Article 873.
- [41] Bhullar, K.S. et al. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer* 2018, 17(1), 48.
- [42] Roskoski, R., Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update *Pharmacol Res* 2024, 200, 107059.
- [43] Łukasik, P. et al. Inhibitors of cyclin-dependent kinases: types and their mechanism of action. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(6), 2806.
- [44] Fabbro, D. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther* 2002, 93(2-3), 79-98.
- [45] Mingyu Li et al. Chapter Four - Dual roles of ATP-binding site in protein kinases: Orthosteric inhibition and allosteric regulation. *Adv Protein Chem Struct Biol* 124, 2021, 87-119
- [46] Remon, J. et al. Osimertinib and other third-generation EGFR TKI in EGFR-mutant NSCLC patients. *Ann Oncol* 2018, 29(suppl_1), i20-i27.
- [47] Cerbone, L. et al. An overview of osimertinib as a treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): an update. *Expert Opin Pharmacother* 2021, 22(7), 809-819.
- [48] Hughes, D.L. Patent review of manufacturing routes to oncology drugs: carfilzomib, osimertinib, and venetoclax. *Org Process Res Dev* 2016, 20, 2028–2042
- [49] Liu, H. et al. A novel and efficient synthesis of anti-cancer agent, mereletinib. *J Chem Res* 2015, 39, 318-320.

- [50] Abdelgalil, A.A., Alkahtani, H.M., Al-Jenoobi, F.I. Sorafenib. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 2019, 44, 239-266.
- [51] Tang, W. et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects. *Signal Transduct Target Ther* 2020, 5(1), 87.
- [52] Robinson, B. The Fischer indole synthesis. *Chem Rev* 1963, 63(4), 373–401.
- [53] Mori, M., Ban, Y. The reactions and syntheses with organometallic compounds. V. a new synthesis of indoles and isoquinolines by intramolecular palladium-catalyzed reactions of aryl halides with olefinic bonds. *Tetrahedron* 1977, 12, 1037-1040.
- [54] Gribble, G. Indole ring synthesis: From natural products to drug discovery, 2016 John Wiley & Sons.
- [55] Hayakawa, K., Yasukouchi, T., Kanematsu, K. A new approach to the efficient indole synthesis by allene intramolecular cycloaddition. *Tetrahedron* 1986, 27, 1837-1840.
- [56] Kaushik, N.K. et al. Biomedical importance of indoles. *Molecules* 2013, 18(6), 6620-6662.
- [57] Lau, H.Y. et al. An improved isoprenylcysteine carboxymethyltransferase inhibitor induces cancer cell death and attenuates tumor growth in vivo. *Cancer Biol Ther* 2014, 15(9), 1280-1291.
- [58] Gangjee, A. et al. Single agents with designed combination chemotherapy potential: synthesis and evaluation of substituted pyrimido[4,5-b]indoles as receptor tyrosine kinase and thymidylate synthase inhibitors and as antitumor agents. *J Med Chem* 2010, 53(4), 1563-1578.
- [59] Foote, K.M. et al. Discovery of 4-4-[(3R)-3-Methylmorpholin-4-yl]-6-[1-(methylsulfonyl)cyclopropyl] pyrimidin-2-yl-1H-indole (AZ20): a potent and selective inhibitor of ATR protein kinase with monotherapy in vivo antitumor activity. *J Med Chem* 2013, 56(5), 2125-2138.
- [60] Song, F. et al. Indole alkaloids, synthetic dimers and hybrids with potential in vivo anticancer activity. *Curr Top Med Chem* 2021, 21(5), 377-403.
- [61] Xiao, L. A Review: Meridianins and Meridianins Derivatives. *Molecules*, 2022, 27(24).
- [62] Perez, D.I., C. Gil, A. Martinez, Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases. *Med Res Rev*, 2011, 31(6), 924-54.
- [63] Karpov, A.S. et al., Concise syntheses of meridianins by carbonylative alkynylation and a four-component pyrimidine synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(42), 6951-6.

- [64] Yu, H., Z. Yu. Direct alkenylation of indoles with alpha-oxo ketene dithioacetals: efficient synthesis of indole alkaloids meridianin derivatives. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(16), 2929-33.
- [65] Pellarin, I. et al. Cyclin-dependent protein kinases and cell cycle regulation in biology and disease. *Signal Transd Targ Therapy*, 2025, 10, 11.
- [66] Bai J. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. *Cancer Biol Med*, 2017, 14(4), 348-362.
- [67] Βούλγαρη, Π. Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογικός έλεγχος νέων οργανικών-βιοδραστικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους ως ανταγωνιστών της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 2021
- [68] Field, L.D., Sternhell, S., Kalman, J.R. Organic Structures from Spectra. 5th ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2013.
- [69] Yang, T.T., Saidi, W.A. The Bell-Evans-Polanyi relation for hydrogen evolution reaction from first-principles. *npj Comput Mater* 2024, 10, 98.
- [70] Γώγου, Μ. Εκλεκτικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών: Σχεδιασμός, σύνθεση και μοριακή μοντελοποίηση νέων, ευρέως τροποποιημένων αναλόγων της Ιματινίβης-Εισαγωγή των δομών της Χρωμόνης και της Κουμαρίνης. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 2022.
- [71] Πολυχρονίδου, Β. Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός αναλόγων του Nilotinib, ως εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών με αντικαρκινική δράση-Επιλεκτική δομική τροποποίηση με την εισαγωγή αμινοξέων και ανάπτυξη νέας βελτιωμένης συνθετικής πορείας. Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 2017

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

