



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων αναλόγων του  
φαρμακευτικού σκευάσματος Lenvatinib ως εν δυνάμει αναστολέων  
του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2  
(VEGFR2)**

---

**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης**

**Καραγιάννη Λεμονιά**

**Χημικός**

**Επιβλέπων καθηγητής**

**Σκομπρίδης Κωνσταντίνος**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026



## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Καραγιάννη Λεμονιά Α.Μ.: 1402

Επιβλέπων καθηγητής: Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας - Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χατζηαράπογλου Λάζαρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας- Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

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

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ  
ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ  
κα Λεμονιά Καραγιάννη (ΑΜ 1402), πτυχιούχο Χημικό του Τμ. Χημείας του  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η 3μελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε από τη Γενική Συνέλευση του Τμήματος Χημείας στη συνεδρίασή της 1153/19-12-2025 για την κρίση της μεταπτυχιακής εργασίας της κα. Λεμονιάς Καραγιάννη συνήλθε στις 16/02/2026 και ώρα 09:00 με τηλεδιάσκεψη με χρήση Google Meet (σύνδεσμος σύσκεψης: meet.google.com/mrs-aiwn-gqx) και αφού παρακολούθησε τη δημόσια παρουσίαση της μεταπτυχιακής διατριβής με τίτλο: *Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Lenvatinib ως εν δυνάμει αναστολέων του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 (VEGFR2)*

[Τίτλος στην Αγγλική γλώσσα]: *Design, synthesis and characterization of new analogs of Lenvatinib as potential inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2).*

προέβη σε εξέτασή της.

Στη συνέχεια, η 3μελής Εξεταστική Επιτροπή βαθμολόγησε τη μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία ως εξής:

	Όνοματεπώνυμο μέλους της 3μελούς	Βαθμός (αριθμητικά)	Βαθμός (ολογράφως)
1.	Λάζαρος Χατζηαράπογλου (επιβλέπων), Καθηγητής, Τμ. Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων	10	δέκα
2.	Μιχάλης Σίσκος (μέλος), Καθηγητής, Τμ. Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων	10	δέκα
3.	Δημήτρης Αλιβέρτης (μέλος), Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Παν/μιο Ιωαννίνων	10	δέκα

**Μέσος όρος Βαθμολογίας: 10 (δέκα)**

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:



Λάζαρος Χατζηαράπογλου  
Καθηγητής



Μιχάλης Σίσκος  
Καθηγητής



Δημήτρης Αλιβέρτης  
Επίκουρος Καθηγητής

Η βαθμολόγηση βασίζεται στην ποιότητα της εργασίας, την ικανότητα παρουσίασής της και στην ορθότητα/πληρότητα των απαντήσεων του εξεταζόμενου στις ερωτήσεις των μελών της 3μελούς.

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία για το Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης εκπονήθηκε στο διάστημα μεταξύ Νοεμβρίου 2021 και Νοεμβρίου 2023, στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στην κατεύθυνση «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία – Βιοδραστικές Ενώσεις». Αφορά στο μοριακό σχεδιασμό, τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό των νέων αναλόγων του Lenvatinib, ως εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 (VEGFR2). Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο X3-210 του Τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου.

Για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, αρχικά, στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, ο οποίος δεν βρίσκεται, πλέον, στη ζωή. Είμαι ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε προκειμένου να γίνω μέλος της ερευνητικής του ομάδας και την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Μέσα από αυτή τη συνεργασία με γνώμονα την εμπειρία του, την καθοδήγηση, καθώς και την στήριξή του, αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις. Σε οποιοδήποτε εμπόδιο βρισκόταν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας βοηθώντας με να εξελιχθώ. Η μνήμη και το έργο του θα παραμείνουν ζωντανά.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω τον καθηγητή Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Χατζηαράπογλου, καθώς και τον επίκουρο καθηγητή κ. Αλίβερτη Δημήτριο που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς μου επιτροπής και βοήθησαν στην επίτευξη των στόχων που έθεσα για τη μεταπτυχιακή μου διατριβή προσφέροντας βοήθεια σε επιστημονικό επίπεδο όποτε αυτή χρειάστηκε καθώς και για την στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω θερμά τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Βαρβούνη Γεώργιο για την βοήθεια αυτά τα δύο χρόνια με την καθοδήγησή του.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου τους φίλους και συναδέλφους μου μέσα σε αυτή την ξεχωριστή ερευνητική ομάδα του κ. Σκομπρίδη. Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αλαγιάννη Μιχάλη, Μπαζάνου Γεωργία, Πεπονίδου Φωτεινή, Αλασώνα Παντελή, Χρονοπούλου Ιωάννα, Ζώτου Μαρία, Χατζηαγγελίδου Κυριακή και Κωνσταντίνι Έλενα για τη άριστη συνεργασία και την βοήθεια που μου προσέφεραν, αλλά και για το πιο σπουδαίο, το άριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο που μου έδωσαν μεγαλύτερο έναυσμα για την επίτευξη των ερευνητικών μου στόχων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον διδακτορικό φοιτητή του κ. Βαρβούνη, Γερωντίτη Ιωάννη για όλη την βοήθεια κάθε φορά που την χρειάστηκα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου, Βασίλη και Όλγα, για τις θυσίες τους όλα αυτά τα χρόνια και την στήριξή τους σε κάθε μου βήμα και τα αδέρφια μου, Μαρία και Μερκούρη που βρίσκονται πάντα δίπλα μου.



## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	11
Abstract.....	13

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1\*

1.1 Εισαγωγή.....	15
1.2 Δομική ανάλυση του ενεργού κέντρου των πρωτεϊνικών κινασών .....	17
1.3 Ενδοκυτταρικός ρόλος πρωτεϊνικών κινασών.....	18
1.4 Φωσφορυλίωση – Αποφωσφορυλίωση.....	22
1.5 Οδός EGFR/Ras/MEK/ERK .....	23
1.6 Οδός PI3K/Akt.....	24
1.7 Οδός VEGF.....	25
1.8 Κυτταρικός κύκλος.....	26
1.9 Υποδοχείς συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G.....	28
1.10 Πρωτεϊνικές κινάσες και καρκίνος.....	29
1.10.1 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών.....	30
1.10.2 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης.....	31
1.10.3 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης.....	31
1.10.4 Υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (RTK's).....	32
1.10.5 Μη υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (nRTK's).....	33
1.11 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.....	34
1.12 Κατηγοριοποίηση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.....	34

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2\*

2.1 Σκοπός.....	37
2.2 Η κινολίνη ως δομικό συστατικό.....	38
2.3 Καρκίνος του θυροειδούς .....	39
2.4 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.....	40
2.5 Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα .....	41

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3\*

3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων του VEGFR2.....	42
3.2 Σύνθεση Lenvatinib.....	49
3.3 Ολική πορεία σύνθεσης νέων αναλόγων του Lenvatinib.....	53
3.4 Σύνθεση νέων αναλόγων.....	56
3.4.1 Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο) μεθυλο)αμινο)2 μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 29.....	56
3.4.2 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4 διωδροκινολινο-6- καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30.....	57
3.4.3 Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του εστέρα 30 προς το καρβοξυλικό οξύ 18 σε μη υδατικό περιβάλλον.....	59
3.4.4 Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 20.....	59
3.4.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλεστέρα, ένωση 35 .....	62
3.4.6 Σύνθεση του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2- χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 36.....	64
3.4.7 Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμι- δίου, ένωση 37.....	65
3.4.8 Σύνθεση τελικών ενώσεων.....	66
3.5 Ολική συνθετική πορεία αναλόγου 3.....	67
3.5.1 Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3- κυκλοπροπυλουρίας με CDI, ένωση 89.....	68

3.5.2 Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας με τριφωσγένιο, ένωση 89.....	71
3.6 Βελτιστοποιήσεις στη συνθετική πορεία των αναλόγων του Lenvatinib.....	73

## Κεφάλαιο 4\*

Φασματοσκοπικά δεδομένα .....	77
4.1.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο 1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 29.....	77
4.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4 διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30.....	79
4.1.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-χλωρο-7 μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 18.....	81
4.1.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6 καρβοξαμιδίου, ένωση 20.....	82
4.1.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο) καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 35.....	84
4.1.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ) 7-μεθοξυκινολινο-6- καρβοξαμιδίου, ένωση 37.....	86
4.2.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 5-(((4-μεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξάνιο-4,6-διόνης, ένωση 40.....	87
4.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 6-μεθοξυκινολιν-4(1H)-όνης, ένωση 41.....	87
4.2.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 4-χλωρο-6-μεθοξυκινολίνης, ένωση 42.....	89
4.2.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο) καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 35.....	92
4.2.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας, ένωση 88 .....	94

## Κεφάλαιο 5\*

5.1. Γενικές Πειραματικές Συνθήκες και Οργανολογία .....	95
5.2 Πειραματικό μέρος .....	95

5.2.1	Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο) μεθυλο)-αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 29.....	96
5.2.2	Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30.....	96
5.2.3	Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30 (μέθοδος Esai).....	97
5.2.4	Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 18.....	98
5.2.5	Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 20.....	97
5.2.6	Προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, σύνθεση ένωσης 35.....	98
5.2.7	Σύνθεση του (4-(((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ) 2-χλωροφαινυλο)-καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 36.....	99
5.2.8	Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6- καρβοξαμιδίου, ένωση 37.....	99
5.2.9	Σύνθεση αναλόγου 1 .....	100
5.2.10	Σύνθεση αναλόγου 2.....	101
5.3.	Σύνθεση αναλόγου 3 .....	102
5.3.1	Σύνθεση 5-(((4-μεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξάνιο-4,6-διόνη, ένωση 40.....	102
5.3.2	Σύνθεση 6-μεθοξυκινολιν-4(1H)-όνη, ένωση 41.....	102
5.3.3	Σύνθεση της 4-χλωρο-6-μεθοξυκινολίνη, ένωση 42 .....	103
5.3.4	Σύνθεση (3-χλωρο-4-(((6-μεθοξυκινολιν-4-υλ)οξυ)φαινυλο)καρβαμιδικό τριτοταγές βουτύλιο, ένωση 43.....	103
5.3.5	Σύνθεση 3-χλωρο-4-(((6-μεθοξυκινολιν-4-υλ)οξυ)ανιλίνη, ένωση 89.....	104
5.3.6	Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-(((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας με CDI, ένωση 89 .....	104
5.3.7	Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-(((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας με τριφωσγένιο, ένωση 89 .....	105

## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup>

6.1. Συμπεράσματα- Συζήτηση	106
.....	.....
Βιβλιογραφία	109

\

## Περίληψη

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, ο καρκίνος συνιστά ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται στις αναπτυγμένες χώρες. Συγκεκριμένα, αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τις καρδιαγγειακές νόσους. Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα του ανεξέλεγκτου και μη προγραμματισμένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα φυσιολογικά κύτταρα των οργανισμών αναπτύσσονται και διαιρούνται, ώστε να προκύψουν θυγατρικά κύτταρα και να διατηρηθεί η υγεία του οργανισμού. Μερικές φορές, η διαδικασία αυτή εκτρέπεται από το φυσιολογικό, οπότε προκύπτουν νέα κύτταρα, ενώ παράλληλα δεν υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Τα πλεονάζοντα κύτταρα σχηματίζουν μάζες, που καλούνται όγκοι.

Η πλειονότητα των καρκίνων είναι αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων που προκαλούνται σε γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της ανάπτυξης και της διαίρεσης των κυττάρων. Οι παράγοντες που προκαλούν αυτή τη γενετική μετάλλαξη δεν είναι λίγοι. Ορισμένα παραδείγματα αυτών είναι χημικές ουσίες, ο τρόπος ζωής, γενετικοί παράγοντες, μολυσματικοί μικροοργανισμοί, κ.α. Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που αντιμετωπίζει η επιστημονική κοινότητα είναι η εύρεση αντικαρκινικής θεραπείας.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν ένζυμα τα οποία καταλύουν την αντίδραση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών. Αποτελούν κύριοι μεσολαβητές μεταγωγής σημάτων, που εμπλέκονται σε όλες τις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου και επηρεάζουν τις κυτταρικές διεργασίες με την ενζυματική μεταφορά της τελικής (γ-) φωσφορικής ομάδας του ATP στο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της σερίνης, της θρεονίνης ή της τυροσίνης μιας πρωτεΐνης.

Η εκλεκτική αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών, μέσω της σύνθεσης αναστολέων αυτών, έχει καθιερωθεί ως μία από τις πλέον υποσχόμενες θεραπευτικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση ασθενειών, όπως οι νεοπλασίες. Η ανασταλτική δράση των πρωτεϊνικών κινασών.

Το Lenvatinib έχει εγκριθεί ως φαρμακευτικό σκεύασμα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), καθώς και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA), το 2016 και συνιστά αναστολέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα 2 (VEGFR2). Ειδικότερα, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του θυροειδούς και δεν ανταποκρίνονται σε θεραπείες με ραδιενεργό ιώδιο. Επιπρόσθετα, έχει εγκριθεί για την καταπολέμηση του νεφροκυτταρικού καρκινώματος, σε συνδυασμό με το φαρμακευτικό σκεύασμα Everolimus, ενώ φαίνεται να παρουσιάζει ανασταλτική δράση και σε περιπτώσεις ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, παρουσιάζεται ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων ενώσεων, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Lenvatinib, με στόχο την εκλεκτική αναστολή του VEGFR2. Η σύνθεση των αναλόγων βασίστηκε στην συνθετική πορεία της ιαπωνικής εταιρίας Eisai. Οι, εν λόγω, στοχευμένες τροποποιήσεις είναι αποτέλεσμα της μοριακής μοντελοποίησης, έτσι ώστε οι εν δυνάμει αναστολείς να δρουν αποτελεσματικότερα έναντι του VEGFR2, αναστέλλοντας τη δράση του. Ταυτόχρονα, έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της πειραματικής πορείας, με στόχο την αύξηση της απόδοσης και την ελάττωση του χρόνου πραγματοποίησης των χημικών αντιδράσεων. Τέλος, για τον έλεγχο σύνθεσης των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπικές τεχνικές  $^1\text{H-NMR}$  και  $^{13}\text{C-NMR}$ .

## Abstract

According to recent research, cancer is one of the most serious health problems observed in developed countries. Specifically, it is the second cause of death after cardiovascular diseases. Cancer is the result of uncontrolled, unplanned growth of cells in the body. Normal cells in organisms grow and divide to produce daughter cells and maintain the health of the body. Sometimes, this process deviates from normal, so new cells arise, while old cells do not die. The excess cells form masses, called tumors.

The majority of cancers are the result of genetic mutations that occur in genes that are responsible for controlling cell growth and division. The factors that cause this genetic mutation are not few. Some examples of these are chemicals, lifestyle, genetic factors, infectious microorganisms, etc. One of the greatest challenges facing the scientific community is finding an anti-cancer treatment.

Protein kinases are enzymes that catalyze the reaction of protein phosphorylation. They are major signal transducers involved in all signaling pathways of the cell and influence cellular processes by enzymatically transferring the terminal phosphate group of ATP to the hydroxyl of the side chain of serine, threonine or tyrosine of a protein.

The selective inhibition of protein kinases, through the synthesis of their inhibitors, has been established as one of the most promising therapeutic strategies for the treatment of diseases, such as neoplasia. The inhibitory action of protein kinases.

Lenvatinib was approved as a pharmaceutical by the FDA (and EMA) in 2016 and is an inhibitor of vascular endothelial growth factor 2 (VEGFR2). In particular, it has been approved for the treatment of patients suffering from thyroid cancer who do not respond to radioactive iodine treatments. In addition, it has been approved for the treatment of renal cell carcinoma in combination with the pharmaceutical everolimus, while it also appears to have inhibitory activity in cases of hepatocellular carcinoma.

In this thesis, the design and synthesis of new compounds, analogues of the pharmaceutical preparation Lenvatinib, aiming at the selective inhibition of VEGFR2, will be presented. The synthesis of the analogues was based on the synthetic route of the Japanese company Eisai. These targeted modifications are the result of molecular modeling, so that the potential inhibitors act more effectively against VEGFR2 by inhibiting its action. At the same time, an attempt was made to optimize the experimental route with the aim of increasing the yield and reducing the reaction time. The spectroscopic techniques  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  were used to control the synthesis of the compounds.



## Κεφάλαιο 1

### 1.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κύριες προτεραιότητες που έρχονται αντιμέτωποι οι επιστήμονες από όλο τον κόσμο. Μάλιστα, αποτελεί δεύτερη αιτία θανάτου σε παγκόσμιο επίπεδο μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Βέβαια, η συχνότητα εμφάνισης της συγκεκριμένης νόσου αναμένεται πως θα αυξηθεί ακόμα περισσότερο τα επόμενα χρόνια. Σύμφωνα με την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρία εκτιμάται ότι ο αριθμός νέων περιπτώσεων καρκίνου που πρόκειται να εμφανισθούν στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής θα ανέλθει όπως 2.001.140, ενώ προβλέπεται να αυξηθεί και ο αριθμός των θανάτων που προκύπτουν από καρκίνο όπως 611.720 για το έτος 2024. [38]

Ο όρος «καρκίνος» με την ευρύτερη έννοια αναφέρεται σε περισσότερους από 277 διαφορετικούς τύπους καρκινικών ασθενειών. Πρόκειται για μία ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό κυττάρων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό όγκων. Οι μεταλλάξεις αυτές που είναι υπεύθυνες για την αλλαγή των κυτταρικών λειτουργιών εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως το κάπνισμα, οι χημικές ουσίες, οι ιοί, η ακτινοβολία, η ηλικία και η διατροφή. Πράγματι, έρευνα έχει δείξει ότι οι θάνατοι από την συγκεκριμένη νόσο μειώθηκαν αισθητά μέχρι το 2021, λόγω μείωσης του καπνίσματος και σε συνδυασμό με την έγκαιρη διάγνωση αποτράπηκαν τουλάχιστον 4.000.000 θάνατοι από το 1991. [17]

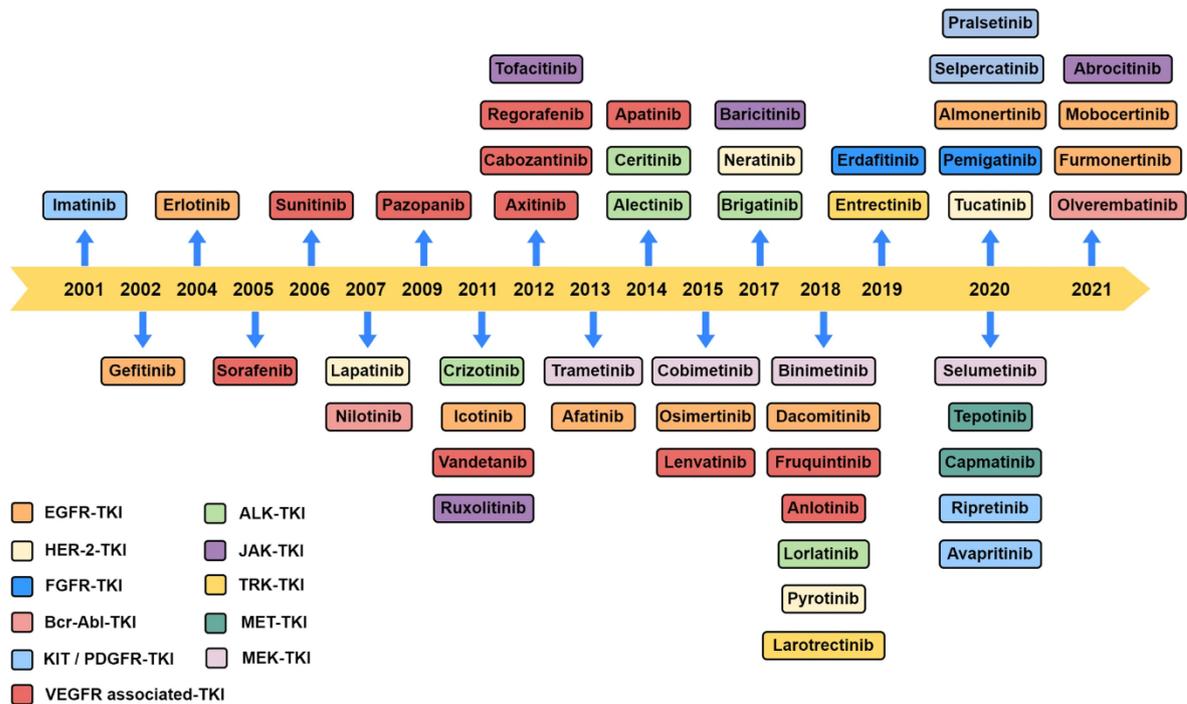
Όσον αφορά τις μεθόδους θεραπείας του καρκίνου, αυτές εξαρτώνται τόσο από το είδος όσο κι από το στάδιο στο οποίο βρίσκεται σε εξέλιξη η νόσος. Για την θεραπευτική αντιμετώπιση προτείνονται η χειρουργική παρέμβαση, η ακτινοβολία, η χημειοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία καθώς και η ορμονοθεραπεία. Αναλόγως με την κατάσταση του ασθενούς, το είδος και την εξέλιξη του καρκίνου κάθε ασθενής λαμβάνει διαφορετική θεραπεία που μπορεί να περιλαμβάνει συνδυασμό των παραπάνω μεθόδων. [39] Στόχος όπως θεραπείας είναι η εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, οι προαναφερθέντες τρόποι θεραπείας παρουσιάζουν ένα σημαντικό μειονέκτημα: Μαζί με τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφονται και υγιή κύτταρα του οργανισμού. Έτσι, μία νέα μέθοδος θεραπείας έχει έρθει στο προσκήνιο, οι στοχευμένες θεραπείες. [4]

Όπως και οι υπόλοιπες μέθοδοι θεραπείας κατά του καρκίνου, έτσι και οι στοχευμένες θεραπείες στόχο έχουν να αναστείλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να αυξήσουν την κυτταρική απόπτωση και να περιορίσουν την εξάπλωση του καρκινικού όγκου. Η ειδοποιός διαφορά, που καθιστά ξεχωριστή τη συγκεκριμένη θεραπεία από όπως

υπόλοιπες, είναι ότι οι στοχευμένες θεραπείες επιδρούν μονάχα σε πρωτεΐνες-στόχους που εμπλέκονται με την καρκινογένεση. Ο συγκεκριμένος τύπος θεραπείας περιλαμβάνει τα μονοκλωνικά αντισώματα, όπως ανοσοτοξίνες και τέλος όπως αναστολείς μικρού μοριακού βάρους. Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται όπως αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών μικρού μοριακού βάρους. [4]

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα κύτταρα όπως οργανισμού διαταράσσοντας βασικές λειτουργίες όπως, που ευθύνονται για την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου συμπεριλαμβανομένου της διαίρεσης, της ανάπτυξης και της απόπτωσης των κυττάρων όπως οργανισμού. Οι φωσφοτρανσφεράσες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες ενζυμικές κατηγορίες στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι πιο πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 538 πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία φωσφοτρανσφερασών. Πρόκειται για ένζυμα τα οποία καταλύουν τη φωσφορυλίωση των αμινοξέων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης των πρωτεϊνών στόχων, μεταφέροντας τη φωσφορική ομάδα από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) στην πρωτεΐνη-στόχο, ρυθμίζοντας κάθε βιοχημική πορεία. Η φωσφορυλίωση αποτελεί μία από όπως σπουδαιότερες διεργασίες που πραγματοποιούνται στα κύτταρα όπως οργανισμού επιδρώντας σε όπως όπως λειτουργίες όπως. Συνεπώς, η οποιαδήποτε απορρύθμιση ή υπερέκφραση τους φαίνεται να ευθύνεται για την ανεξέλεγκτη κυτταρική διαίρεση και τελικά τον σχηματισμό καρκινικών μαζών. Αυτό ώθησε την επιστημονική κοινότητα να στραφεί στον σχηματισμό μορίων που στόχο έχουν την αναστολή των απορρυθμισμένων πρωτεϊνικών κινασών για την καταπολέμηση των νεοπλασιών. [6]

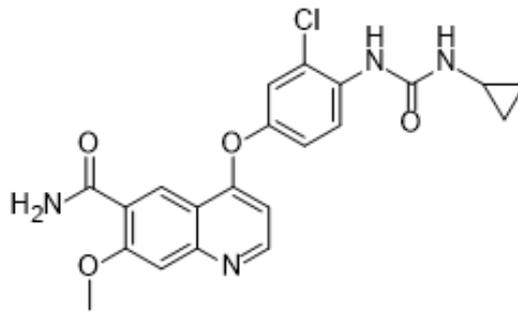
Για τον σχεδιασμό μορίων που δρουν ως αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η συσχέτιση δομής-δράσης των μορίων αυτών. Στόχος όπως είναι να αναστείλουν εκλεκτικά την δράση των πρωτεϊνικών κινασών που επιδρούν δυσμενώς όπως κυτταρικές διεργασίες. Από το 2001 που κυκλοφόρησε ως φαρμακευτικό σκεύασμα ο πρώτος αναστολέας όπως πρωτεϊνικής κινάσης Bcr-Abl, Imatinib, για τη θεραπεία όπως Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον από όπως φαρμακευτικές εταιρίες για την ανάπτυξη τέτοιων μορίων ως φαρμακευτικά σκευάσματα. Ωστόσο, Μάλιστα, αρκετοί είναι οι αναστολείς που έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) τα τελευταία χρόνια. [6]



**Εικόνα 1:** Εγκεκριμένοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών από τον FDA από το 2001 έως το 2021 [10]

Σκοπός των επιστημόνων είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση μορίων, τα οποία θα παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα έναντι των απορυθμισμένων πρωτεϊνικών κινασών που ευθύνονται για την ογκογένεση, καθώς στην περίπτωση του Imatinib, πρώτης γενιάς αναστολέα, δεν ήταν λίγες οι περιπτώσεις εμφάνισης ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο σκεύασμα που καταγράφηκαν. [10]

Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του θυροειδούς συνεχίζει να αυξάνεται παγκοσμίως και συνιστά τον πέμπτο πιο συχνό καρκίνο όπως γυναίκες όπως Ηνωμένες Πολιτείες όπως Αμερικής. Το 2015 εμφανίσθηκαν περισσότερες από 62.000 περιπτώσεις ενδοκρινικής κακοήθειας όπως ΗΠΑ. Η συνηθέστερη μέθοδος αντιμετώπισης του καρκινώματος του θυροειδούς περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση, όπως μερική ή ολική θυροειδεκτομή. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων χορηγείται μετεγχειρητικά ραδιενεργό ιώδιο για την εξάλειψη τυχόν μεταστάσεων και για την αφαίρεση τυχόν τμημάτων του ιστού του θυροειδούς. Παρόλα αυτά υπάρχει ένα μικρό ποσοστό ασθενών που φαίνεται να έχουν αναπτύξει αντίσταση στο ραδιενεργό ιώδιο. Το Lenvatinib, το οποίο έχει αναπτυχθεί από την εταιρία Esai Inc., αναστέλλει αντιστρεπτά όπως κινάσες VEGFR1/2/3, PDGFR, FGFR1/2/3/4 RET, και c-Kit. [8]



**Εικόνα 2:** Δομή του Lenvatinib

Ο συγκεκριμένος αναστολέας εγκρίθηκε το 2015 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (FDA) και χορηγείται σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του θυροειδούς, αλλά δεν ανταποκρίνονται στην θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο. Λίγο αργότερα εγκρίθηκε για τη θεραπεία του νεφροκυτταρικού καρκινώματος σε ασθενείς που βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο σε συνδυασμό με το Everolimus, ενώ το 2018 εγκρίθηκε για την καταπολέμηση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Το Lenvatinib, λοιπόν, είναι μία ένωση μικρού μοριακού βάρους που δεσμεύεται αντιστρεπτά στην πρωτεΐνη-στόχο VEGFR2 ισχυρότερα από το ATP και μάλιστα φαίνεται να έχει καλύτερη ανασταλτική δράση από αναστολείς παλαιότερης γενιάς, όπως το Sunitinib και το Sorafenib. [44]

## 1.2 Δομική ανάλυση του ενεργού κέντρου των πρωτεϊνικών κινασών

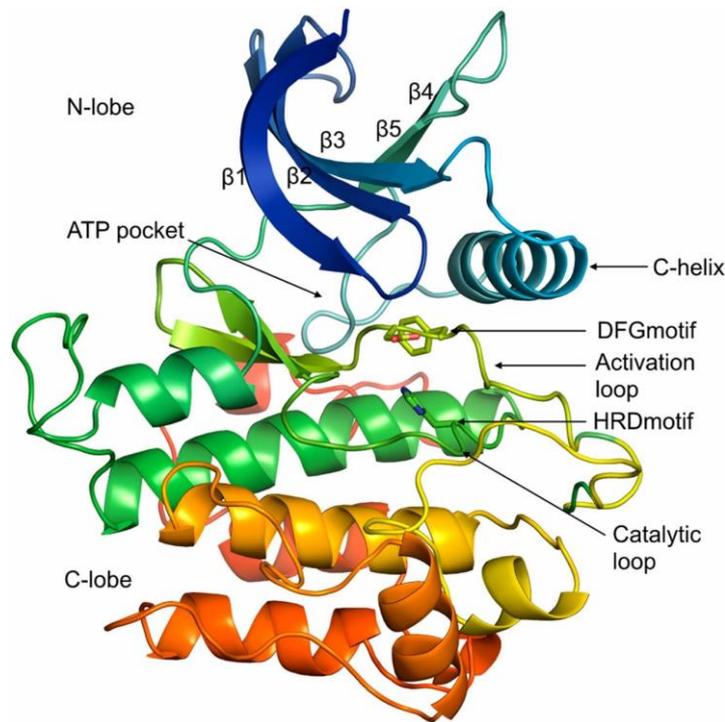
Οι οδοί κυτταρικής σηματοδότησης που ρυθμίζονται από πρωτεϊνικές κινάσες συμβάλλουν στην εμφάνιση και την εξέλιξη σχεδόν όλων των τύπων καρκίνου. Συνεπώς, η έρευνα επικεντρώθηκε στην διερεύνηση των μοριακών οδών και πιο συγκεκριμένα των πρωτεϊνικών κινασών που εμπλέκονται σε αυτές. Λόγω της κομβικής τους σημασίας μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικό θεραπευτικό στόχο για διάφορους τύπους καρκίνων. Επομένως, λόγω της σημαντικής κλινικοθεραπευτικής χρησιμότητας, οι μελέτες εστιαστήκαν στον δομικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνικών κινασών με σκοπό την ανεύρεση θυλάκων δέσμευσης μικρών μορίων που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως θέσεις στόχευσης για την αποτελεσματική αναστολή της δράσης τους.

Σαν πρότυπο στη προσπάθεια αυτή -για όλες τις πρωτεϊνικές κινάσες- χρησιμοποιήθηκε η διαμόρφωση του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης EGFR. Η περιοχή του ενεργού κέντρου της EGFR διαθέτει ένα μικρό N-τελικό λοβό και έναν μεγάλο C-τελικό λοβό που περιέχουν αρκετά διατηρημένα δευτεροταγή στοιχεία. Στο μικρό λοβό κυριαρχεί ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο που διαθέτει 5 κλώνους (β1-β 5) και μια α-C- τελική έλικα που περιέχει ένα κατάλοιπο γλουταμικού που δημιουργεί μια γέφυρα άλατος με μια λυσίνη του β3-φύλλου στην ενεργή διαμόρφωση. Ο μικρός

λοβός περιέχει επίσης έναν διατηρημένο βρόχο δέσμευσης ATP πλούσιο σε γλυκίνη που εμφανίζεται μεταξύ των β1- και β2-κλώνων. Ο βρόχος πλούσιος σε G βοηθά στην τοποθέτηση των β- και γ-φωσφορικών του ATP για την κατάλυση. Οι β1- και β2-κλώνοι φιλοξενούν την αδενίνη του ATP. [16]

Ο πλούσιος σε γλυκίνη βρόχος ακολουθείται από μια διατηρημένη βαλίνη εντός του β2-φύλλου που αλληλεπιδρά υδρόφοβα με την αδενίνη του ATP. Το β3-φύλλο περιέχει μια αλληλουχία Ala-Xxx-Lys, η λυσίνη της οποίας συνδέει τα α- και β-φωσφορικά του ATP με την α-C-τελική-έλικα. Ένα διατηρημένο γλουταμικό εμφανίζεται κοντά στο κέντρο της α-C-τελικής-έλικας στο εσωτερικό του μικρού λοβού των πρωτεϊνικών κινασών. Η παρουσία της γέφυρας άλατος μεταξύ της β3-λυσίνης και του α-C-γλουταμινικού είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το σχηματισμό της ενεργούς κατάστασης και συνήθως αντιστοιχεί στη διαμόρφωση «αC-in». Αντίθετα, η β3-λυσίνη και το αC-γλουταμινικό της αδρανούς μορφής του EGFR αποτυγχάνουν να έρθουν σε επαφή στη διαμόρφωση "αC-out" . Η διαμόρφωση αC-in είναι απαραίτητη, αλλά όχι επαρκής, για την έκφραση της πλήρους δραστηριότητας της κινάσης. [16]

Ο μεγάλος λοβός του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης EGFR διαθέτει κυρίως α-έλικες με έξι διατηρημένα τμήματα (αD-αI). Ο μεγάλος λοβός περιέχει επίσης τέσσερα μικρά διατηρημένα β-φύλλα (β6-β9) που περιέχουν τα περισσότερα από τα καταλυτικά υπολείμματα που σχετίζονται με τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το ATP στους εκάστοτε πρωτεϊνικούς στόχους. Την αE-έλικα ακολουθούν το β6-φύλλο, ο καταλυτικός βρόχος, τα β7- και β8-φύλλα και το τμήμα ενεργοποίησης, που περιέχει το β9-φύλλο. Το τμήμα ενεργοποίησης στην ενεργό κατάσταση σχηματίζει μια ανοιχτή δομή που εκτείνεται μακριά από τον καταλυτικό βρόχο που επιτρέπει τη δέσμευση υποστρώματος πρωτεΐνης/πεπτιδίου. Η αδρανής και η ενεργή πρωτεϊνική κινάση περιέχουν μια πρόσθετη έλικα αEF κοντά στο άκρο του τμήματος ενεργοποίησης. Το μοριακό μοτίβο K/E/D/D (Lys/Glu/Asp/Asp) μπορεί να επεξηγήσει τις καταλυτικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών κινασών. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μια συντηρημένη λυσίνη του β3-φύλλου σχηματίζει γέφυρα άλατος με το αC-γλουταμινικό. Το μοριακό μοτίβο των καταλυτικών βρόχων που περιβάλλουν την πραγματική θέση μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας διαφέρει στις κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τις κινάσες τυροσίνης. [34]

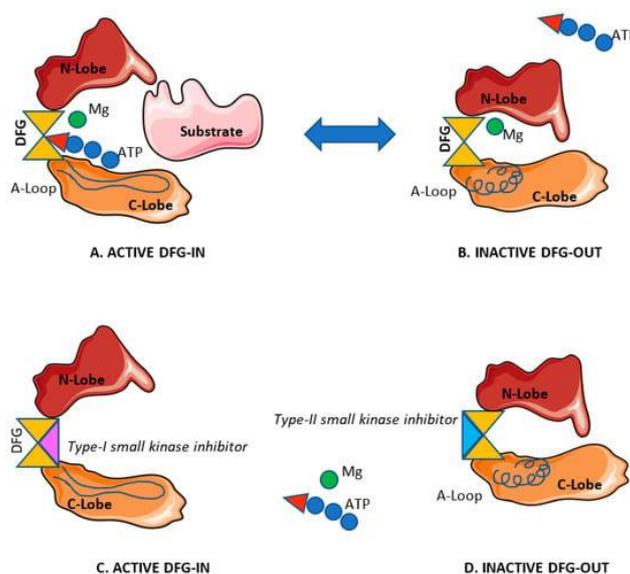


**Εικόνα 3:** Τρισδιάστατη διαμόρφωση πρωτεϊνικής κινάσης [28]

Το κατάλοιπο ασπαρτικού στο καταλυτικό βρόχο, χρησιμεύει ως βάση στην αποπρωτονίωση της -OH του αμινοξικού καταλοίπου της πρωτεΐνης στόχου διευκολύνοντας έτσι την πυρηνόφιλη προσβολή της υδροξυλομάδας από τον γ-άτομο φωσφόρου του ATP. Το δεύτερο ασπαρτικό του μοτίβου K/E/D/D αποτελεί το πρώτο αμινοξύ του τμήματος ενεργοποίησης. Στην πλειονότητα των πρωτεϊνικών κινασών, αυτό το τμήμα αρχίζει με DFG (Asp-Phe-Gly) και τελειώνει με APE (Ala-Pro-Glu). Αν και το τμήμα ενεργοποίησης του EGFR ξεκινά με DFG, τελειώνει με ALE (Ala-Leu-Glu). Η διαφορά μεταξύ ενεργών και αδρανών διαμορφώσεων έχει λάβει σημαντική έμφαση στον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνικών κινασών και το DFG-Asp στη διαμόρφωση αντιπροσωπεύει την ενεργή διαμόρφωση. Ωστόσο, ο αδρανής EGFR εμφανίζεται επίσης με τη διαμόρφωση του DFG-Asp. Το DFG-Asp δεσμεύει το  $Mg^{2+}$ , το οποίο με τη σειρά του συντονίζει τα α-β- και γ-φωσφορικά του ATP. Η δομή του καταλυτικού βρόχου HRD εμφανίζεται πριν από τους β7- και β8-κλώνους, οι οποίοι ακολουθούνται από το τμήμα ενεργοποίησης. Ο μεγάλος λοβός δεσμεύει εκλεκτικά τα υποστρώματα πεπτιδίου/πρωτεΐνης μέσω ενός βρόχου δέσμωσης εντός του τμήματος ενεργοποίησης. Η διαμόρφωση του τμήματος ενεργοποίησης ελέγχει τόσο τη σύνδεση του υποστρώματος όσο και την κατάλυση. Επιπλέον, τα πέντε αρχικά αμινοξέα του τμήματος ενεργοποίησης συνθέτουν τον βρόχο τοποθέτησης του μαγνησίου. Το τμήμα ενεργοποίησης στο EGFR περιέχει μια φωσφορυλιωμένη τυροσίνη. Ο βρόχος τοποθέτησης του μαγνησίου, στο N-άκρο της αC-έλικας και η συντηρημένη περιοχή HRD του καταλυτικού βρόχου βρίσκονται κοντά στην τριτοταγή διαμόρφωση.

Αν και η τριτοταγής δομή των καταλυτικά ενεργών περιοχών των πρωτεϊνικών κινασών είναι παρόμοια, παρατηρήθηκε πως οι κρυσταλλικές δομές των αδρανών ενζύμων αποκαλύπτουν διακριτές ανενεργές διαμορφώσεις. Από τις πιο κοινές μορφές ανενεργών ενζύμων είναι η διαμόρφωση DFG-Asp out. Όταν αυτό το ασπαρτικό κατευθύνεται προς το εξωτερικό του ενεργού κέντρου, το DFG-F κατευθύνεται στην

ενεργή θέση ( Εικ. 3) και η κατεύθυνση της αC-έλικας εξωτερικά του ενεργού κέντρου (αC-out). Περαιτέρω κρυσταλλογραφικές αναλύσεις κατέδειξαν πως υφίστανται τρία κύρια ρυθμιστικά στοιχεία εντός του τομέα της κινάσης που ελέγχουν την ενεργότητα του ενζύμου. Σε αυτά περιλαμβάνεται, η διαμόρφωση της αC-έλικας (αC-in, ενεργή διαμόρφωση· αC-out, ανενεργή διαμόρφωση) του N-τελικού λοβού, η διαμόρφωση της αλληλουχίας DFG-Asp (DFG-Asp in, ενεργή διαμόρφωση, DFG-Asp out, ανενεργή διαμόρφωση) του C-τελικού λοβού και το τμήμα ενεργοποίησης του C-τελικού λοβού (AS in, ενεργή διαμόρφωση, AS out, ανενεργή διαμόρφωση). Επίσης σημαντικό ρόλο στην ενεργότητα ή την αδρανοποίηση του ενζύμου έχει η δομή της “regulatory spine”, η οποία είναι σχεδόν γραμμική στην ενεργή διαμόρφωση ενώ κατά την υιοθέτηση της ανενεργής διαμόρφωσης παραμορφώνεται. [34]



**Εικόνα 4:** Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται οι διαμορφώσεις DFG-Asp in (ενεργή διαμόρφωση) και DFG-Asp out (ανενεργή διαμόρφωση) του καταλυτικού κέντρου των πρωτεϊνικών κινασών [13]

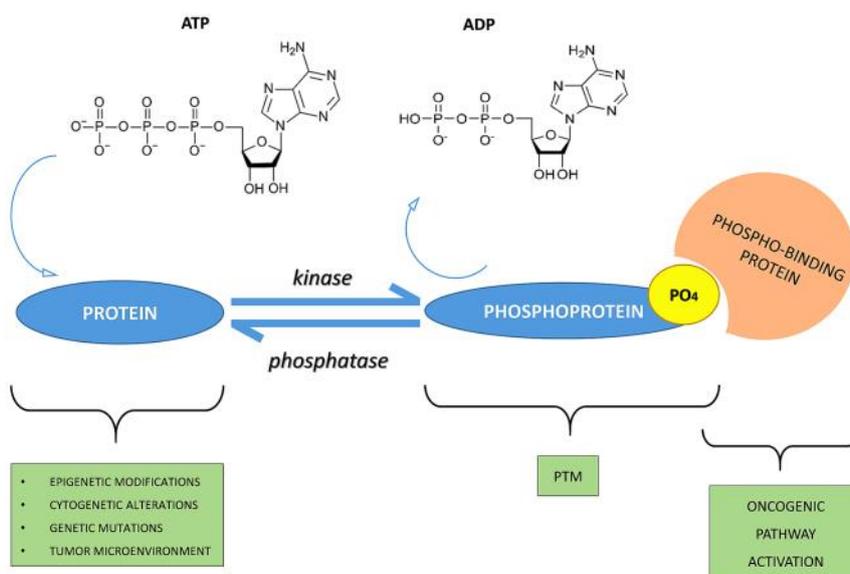
### 1.3 Ενδοκυτταρικός ρόλος πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ανήκουν σε μια οικογένεια ενζύμων και κύριος ρόλος τους είναι να καταλύουν την αντίδραση φωσφορυλίωσης υδροξυλομάδων πρωτεϊνών-στόχων μεταφέροντας την τελική φωσφορυλική ομάδα ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) από ένα δότη υψηλής ενέργειας, όπως ATP, σε αμινοξέα των πρωτεϊνών στόχων, συνήθως σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Έως και 30% του συνόλου των πρωτεϊνών στο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να τροποποιηθεί από τη δραστηριότητα των κινασών, καθώς ρυθμίζουν την πλειονότητα των κυτταρικών οδών, κυρίως εκείνων που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος. Βέβαια, πιο πρόσφατες έρευνες αποκαλύπτουν ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες δεν απαραίτητες μόνο για τη κυτταρική σηματοδότηση, αλλά και για τη μετάδοση του σήματος ελέγχοντας το εύρος του. [2]

## 1.4 Φωσφορυλίωση – Αποφωσφορυλίωση

Μια από τις πιο σημαντικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις αποτελεί η φωσφορυλίωση πρωτεϊών. Η φωσφορυλίωση αμινοξικών καταλοίπων είναι κομβική για ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες και εμπλέκεται στη πλειονότητα των σηματοδοτικών κυτταρικών οδών. Η πρωτεϊνοσύνθεση, η κυτταρική διαίρεση, η ανάπτυξη και η κυτταρική γήρανση, αποτελούν μόνο μερικά παραδείγματα κυτταρικών διεργασιών που υποκινούνται από την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση ενδοκυτταρικών στόχων των αντίστοιχων σηματοδοτικών οδών μέσω φωσφορυλίωσης. Η εν λόγω μετα-μεταφραστική τροποποίηση τελείται, όπως ήδη προαναφέρθηκε, από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται πρωτεϊνικές κινάσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν την δυνατότητα να φωσφορυλιώνουν εκλεκτικά πρωτεΐνες-στόχους. Η φωσφορυλίωση περιλαμβάνει την απόσπαση μιας φωσφορικής ομάδας από την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και την ομοιοπολική της προθήκη σε ελεύθερη υδροξυλομάδα των αμινοξικών καταλοίπων ενώ παράλληλα το ATP γίνεται ADP. Τα κύρια αμινοξικά κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται είναι η σερίνη (Ser), η θρεονίνη (Thr) και η τυροσίνη (Tyr). Οι πλειοψηφία των πρωτεϊνικών κινάσων είναι κινάσες Thr και Ser, μια επίσης μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνικών κινάσων είναι οι κινάσες Tyr, ενώ τέλος υφίστανται και κινάσες διπλής εξειδίκευσης (dual-specificity kinases) που δρουν και στα τρεις αμινοξικές θέσεις. Πέραν, αυτών των κύριων θέσεων φωσφορυλίωσης, υπάρχουν και κινάσες που φωσφορυλιώνουν άλλα αμινοξέα, όπως για παράδειγμα οι κινάσες ιστιδίνης (His).

Η φωσφορυλίωση είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία και τα ένζυμα που συμβάλλουν στην αποφωσφορυλίωση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνικών στόχων ονομάζονται πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούν μόρια  $H_2O$  για να διασπάσουν τον φωσφορικό μονοεστέρα του αμινοξικού καταλοίπου που φωσφορυλιώθηκε σε φωσφορικό ιόν και  $-OH$ . Έτσι τα αμινοξικά κατάλοιπα ανακτούν την αρχική τους υδροξυλομάδα και γίνονται ενεργά σε έναν νέο κύκλο φωσφορυλίωσης – αποφωσφορυλίωσης. [11]

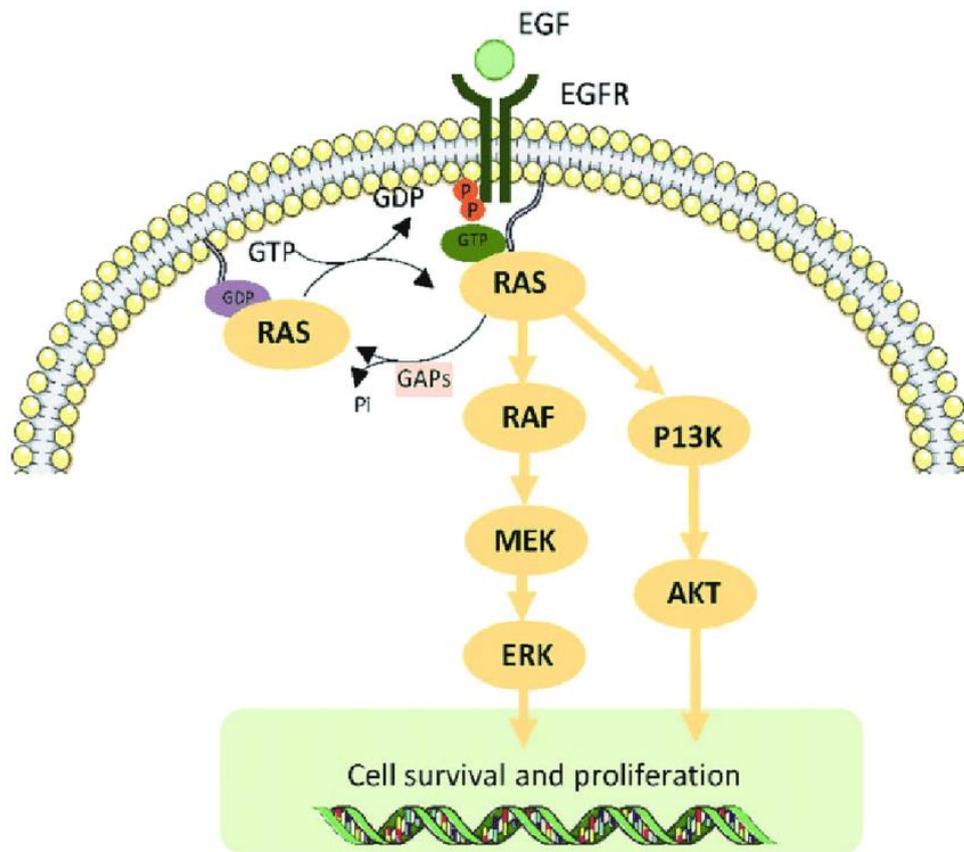


**Εικόνα 5:** Στην παραπάνω εικόνα δείχνεται η αντιστρεπτότητα της διαδικασίας φωσφορυλίωσης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες φωσφορυλιώνουν έναν πρωτεϊνικό στόχο

ενώ η φωσφατάσες επάγουν την αντίστροφη διεργασία αποφωσφορυλιώνοντας την φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη. [2]

## 1.5 Οδός EGFR/Ras/MEK/ERK

Κομβικής σημασίας για την κυτταρική επιβίωση αποτελεί το σηματοδοτικό μονοπάτι EGFR/Ras/MEK/ERK που ως απόκριση στη διαθεσιμότητα του αυξητικού παράγοντα EGF (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας) επάγει την επιβίωση ανάπτυξη και διαφοροποίηση του κυττάρου. Η σηματοδοτική οδός ξεκινά με τη πρόσδεση του EGF στον υποδοχέα του EGFR. Ο EGFR αποτελεί έναν διμερή υποδοχέα κινάσης τυροσίνης που διαθέτει μια εξωκυτταρική δομική περιοχή πρόσδεσης του αυξητικού παράγοντα μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυτταρική επικράτεια με δράση κινάσης τυροσίνης. Η πρόσδεση του EGF στον EGFR έχει σαν αποτέλεσμα τον διμερισμό του υποδοχέα και την αυτοφωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής επικράτειας. Η αυτοφωσφορυλίωση αφενός αυξάνει την ενεργότητα πρωτεϊνικής κινάσης αφετέρου δημιουργεί μοτίβα φωσφοτυροσίνης όπου προσδένονται κατάντη σηματοδοτικές πρωτεΐνες που διαθέτουν επικράτειες SH2. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν και ενεργοποιούν μια πρωτεΐνη παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEF) που με τη σειρά της επάγει την αντικατάσταση του GDP με GTP και κατ'επέκταση την ενεργοποίηση της Ras. Η Ras ενεργοποιεί κατόπιν τη κινάση σερίνης θρεονίνης τη Raf h που ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης μια δεύτερη κινάση τη MEK η οποία ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης τη κινάση ERK. Η ERK φωσφορυλιώνει πολλαπλούς πρωτεϊνικούς στόχους τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο πυρήνα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παράγοντα που φωσφορυλιώνεται από την ERK εντός του πυρήνα είναι ο ELK-1 που αποτελεί μέρος ενός συμπλόκου απόκρισης στον ορό. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο προσδένεται σε γονίδια που διαθέτουν το ρυθμιστικό στοιχείο SRE (στοιχείο απόκρισης στον ορό) με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται μια σειρά από γονίδια ως πρωταρχική απόκριση στον αυξητικό παράγοντα. Αυτά τα γονίδια ονομάζονται γονίδια πρώιμης απόκρισης και πολλά από αυτά κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούν τη μεταγραφή δευτερευόντων γονιδίων. Η ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων έχει σαν αποτέλεσμα τον επαναπρογραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης όπως στη περίπτωση προώθησης του κυτταρικού κύκλου. [21]



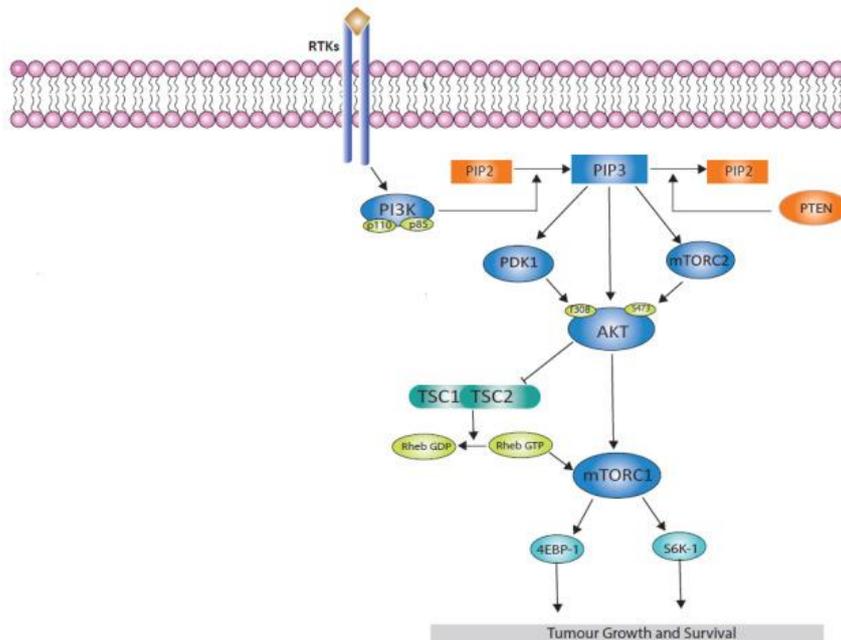
Εικόνα 6: Μονοπάτι RAS/RAF/MEK/ERK [21]

## 1.6 Οδός PI3K/Akt

Τα κύτταρα μπορούν να προσαρμόζουν τη πρωτεϊνοσυνθετική τους ικανότητα ανάλογα με τη διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων, θρεπτικών στοιχείων και ενέργειας.

Παρουσία αυξητικών παραγόντων ενεργοποιούνται υποδοχείς κινάσων τυροσίνης όπως ο EGFR. Η ενεργοποίηση τέτοιων υποδοχέων έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μοτίβων φωσφοτυροσίνης στη κυτταροπλασματική τους επικράτεια. Σε τέτοια μοτίβα προσδένεται η πρωτεΐνη PI3K που ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από την επικράτεια τυροσίνης του υποδοχέα. Στη συνέχεια φωσφορυλιώνει έναν δεύτερο αγγελιοφόρο που ονομάζεται PIP2. Ο φωσφορυλιωμένος PIP2, πλέον PIP3 αποτελεί περιοχή πρόσδεσης πρωτεϊνών με επικράτεια πλεξτρίνης (PH) όπως η Akt, η PDK1 και η mTORC2. Η PDK1 και η mTORC2 φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την Akt. Στη συνέχεια η Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την TSC που είναι μια πρωτεΐνη GAP. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η Rheb να δεσμεύει GTP και να επάγει την ενεργοποίηση της mTORC1. Η mTORC1 ενεργοποιείται επίσης από τη διαθεσιμότητα αμινοξέων. Αφού ενεργοποιηθεί αυξάνει πρωτεϊνοσυνθετική ικανότητα του κυττάρου αφενός φωσφορυλιώνοντας τη κινάση S6K που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει διάφορους παράγοντες προώθησης της μεταγραφής συμπεριλαμβανομένου και της πρωτεΐνης S6, αφετέρου φωσφορυλιώνοντας την πρωτεΐνη 4EBP1 που προσδένεται στον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4E και τον παρεμποδίζει να

αλληλεπιδράσει με τον eIF4G. Η φωσφορυλίωση απομακρύνει την 4EBP1 από τον eIF4E με αποτέλεσμα την προώθηση της μετάφρασης από το 5' άκρο του mRNA. [42]



Εικόνα 7: Μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR [42]

## 1.7 Οδός VEGF

Ο VEGF είναι ένας ομοδιμερής γλυκοπρωτεϊνικός αυξητικός παράγοντας. Η κύρια λειτουργία του είναι η διέγερση της αγγειογένεσης (δημιουργία νέων αγγείων από υπάρχοντα) και της αγγειογένεσης de novo (αγγειογένεση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη). Σε έναν υγιή οργανισμό, ο VEGF είναι απαραίτητος για:

- Την επούλωση πληγών.
- Την εμβρυϊκή ανάπτυξη.
- Τον εμμηνορροϊκό κύκλο.

Δεν πρόκειται για μία μόνο πρωτεΐνη, αλλά για μια οικογένεια ισομορφών, δηλαδή τον VEGF-A που αποτελεί τον πιο σημαντικό και καλά μελετημένο. Είναι ο κύριος ρυθμιστής της αγγειογένεσης (αυτόν συνήθως εννοούμε όταν λέμε σκέτο "VEGF"), τον VEGF-B που σχετίζεται με τη συντήρηση των αγγείων, τους VEGF-C & VEGF-D που ρυθμίζουν κυρίως τη λεμφαγγειογένεση (δημιουργία λεμφικών αγγείων) και τέλος τον PlGF (Placental Growth Factor) που είναι σημαντικός κατά την εγκυμοσύνη και σε παθολογικές καταστάσεις.[48]

Ο VEGF δρα προσδεσμένος σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τους VEGFRs (Vascular Endothelial Growth Factor Receptors) με κυρίαρχο τον VEGFR-2, ο οποίος αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή της μιτογόνου και αγγειογενετικής δράσης του VEGF.[48]

Ο υποδοχέας VEGFR2 (γνωστός και ως KDR στον άνθρωπο) αποτελεί τον κύριο μεταγωγέα των αγγειογενετικών σημάτων. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης και μεταγωγής σήματος ακολουθεί μια αυστηρά ρυθμιζόμενη αλληλουχία γεγονότων:

### 1. Σύνδεση και Διμερισμός (Ligand Binding & Dimerization)

Η διαδικασία ξεκινά με την πρόσδεση του ομοδιμερούς συνδέτη VEGF-A στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, και συγκεκριμένα στις περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες. Η πρόσδεση αυτή επάγει τη δομική αλλαγή και τον ομοδιμερισμό δύο μονομερών VEGFR2. Αυτό το βήμα είναι κρίσιμο, καθώς φέρνει τις ενδοκυττάρια καταλυτικές περιοχές των δύο υποδοχέων σε εγγύτητα.[49]

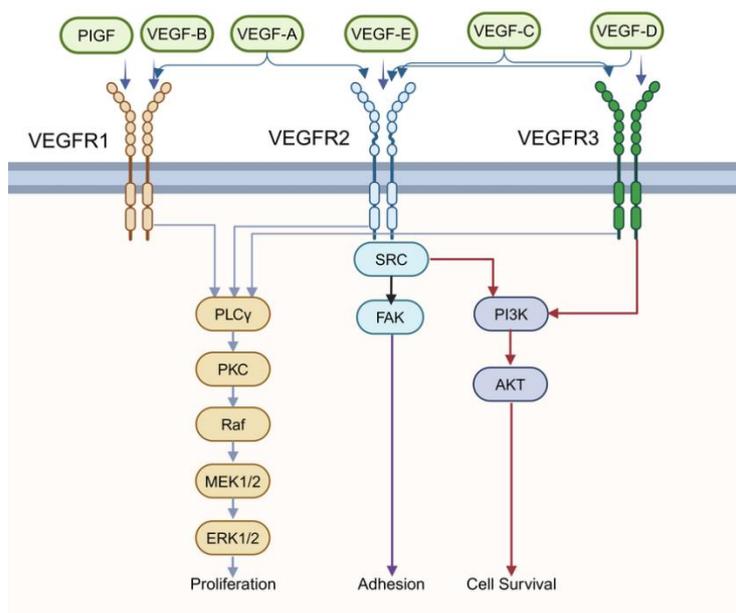
### 2. Αυτοφωσφορυλίωση (Autophosphorylation)

Ο διμερισμός οδηγεί στην ενεργοποίηση της ενδοκυττάριας τυροσινικής κινάσης. Κάθε μονομερές φωσφορυλιώνει το άλλο (trans-autophosphorylation) σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης. Το άρθρο των Olsson et al. τονίζει τη σημασία συγκεκριμένων θέσεων φωσφορυλίωσης που λειτουργούν ως "θέσεις πρόσδεσης" (docking sites) για πρωτεΐνες-σηματοδότες:

Tyr1175 (Y1175): Θεωρείται η σημαντικότερη θέση φωσφορυλίωσης για την αγγειογένεση.

Tyr951 (Y951): Σχετίζεται με τη ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας. [49]

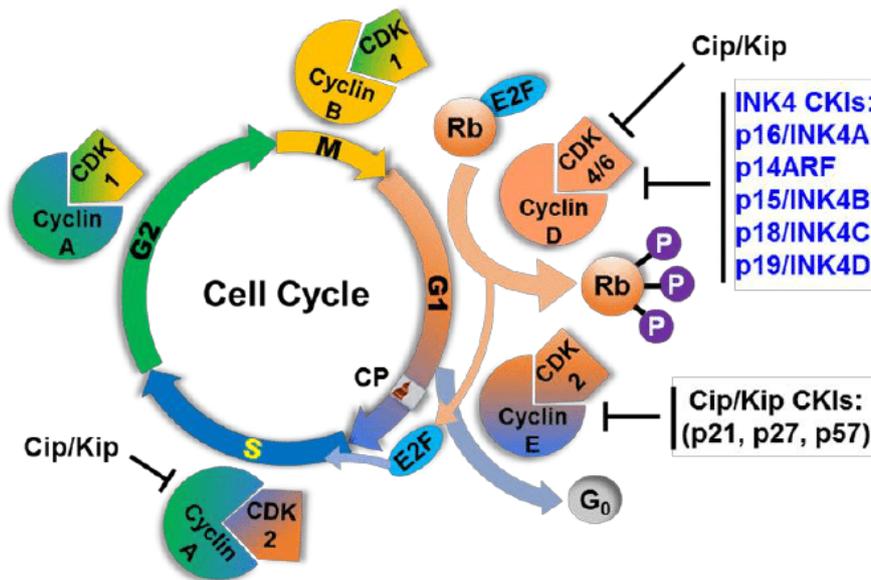
Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η ενεργοποίηση του μονοπατιού VEGF/VEGFR αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της νεοαγγειογένεσης. Η πρόσδεση του συνδέτη VEGF στον υποδοχέα VEGFR-2 επάγει τον διμερισμό και την επακόλουθη αυτοφωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης στην ενδοκυττάρια περιοχή της κινάσης. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί έναν καταρράκτη σηματοδότησης μέσω των μονοπατιών RAS/RAF/MEK/ERK και PI3K/AKT, οδηγώντας τελικά στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, διαδικασίες απαραίτητες για την αγγείωση και ανάπτυξη του όγκου. [48]



**Εικόνα 8:** Οδός VEGF

## 1.8 Κυτταρικός κύκλος

Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται σύμφωνα με μια καθορισμένη διαδοχή γεγονότων που αποτελούν τον κυτταρικό κύκλο. Οι Howard και Pelc ήταν εκείνοι που πρότειναν την ύπαρξη συνολικά τεσσάρων σταδίων στον κυτταρικό κύκλο. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από τη φάση G1 όπου το κύτταρο είναι μεταβολικά ενεργό και εμφανίζει έντονη πρωτεϊνοσυνθετική ικανότητα αυξάνοντας παράλληλα τον όγκο του. Τη φάση G2 όπου γίνεται η αντιγραφή του DNA, τη φάση G2 όπου το κύτταρο συνεχίζει να αυξάνει σε μέγεθος και να συνθέτει πρωτεΐνες πριν μπει στη μίτωση. Τέλος στη φάση M συμβαίνει ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων και η κατανομή τους στους θυγατρικούς πυρήνες και στο τέλος αυτής της φάσης τα κύτταρα διαχωρίζονται με την κυτταροκίνηση. Όλες οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζονται άμεσα από κινάσες που ονομάζονται κυκλινοεξαρτώμενες αφού η ενεργότητα τους εξαρτάται από τη σύνδεση τους με κυκλίνες. Η φάση G1 μέχρι και το σημείο περιορισμού ρυθμίζεται από σύμπλοκα Cdk4,6/CycD, η μετάβαση από τη φάση G1 στη φάση S αλλά και η έναρξη της σύνθεσης του DNA ρυθμίζεται από σύμπλοκα Cdk2/CycE. Η όψιμη φάση S, η μετάβαση στη G2, ρυθμίζονται από σύμπλοκα Cdk2/CycA. Η διεξαγωγή της G2 καθώς και η μετάβαση στην M ρυθμίζονται από σύμπλοκα Cdk1/CycA. Τέλος η φάση M ρυθμίζεται από σύμπλοκα Cdk2/CycB.[45]

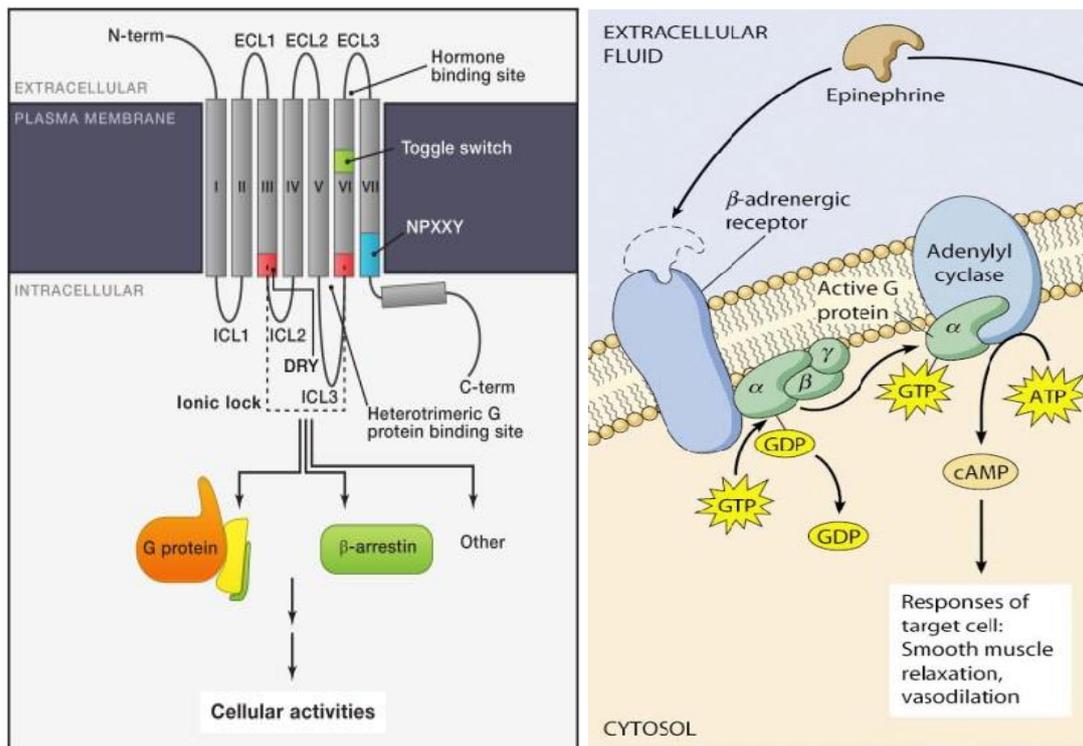


Εικόνα 9: Κυτταρικός κύκλος. [25]

## 1.9 Υποδοχείς συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G

Οι υποδοχείς συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες G διαθέτουν 7 διαμεμβρανικές επικράτειες μια εξωκυτταρική επικράτεια προσδεσης σηματοδοτικού μορίου και μια κυτταροπλασματική επικράτεια αλληλεπίδρασης με ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο αβγ. Στην ανενεργή διαμόρφωση η υπομονάδα α του συμπλόκου δεσμεύει GDP και διατηρείται συνδεδεμένη με τις υπομονάδες βγ. Με την πρόσδεση του σηματοδοτικού μορίου, επάγεται μια αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα με αποτέλεσμα την ανταλλαγή του GDP με GTP της υπομονάδας α και την διάσπαση του συμπλόκου αβγ. Έπειτα η υπομονάδα α-GTP και οι υπομονάδες βγ (ως ενιαίο σύμπλοκο) λειτουργούν ανεξάρτητα ενεργοποιώντας καθοδικούς τελεστές (κυρίως πρωτεϊνικές κινάσες). [3]

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα σηματοδοτικού μονοπατιού που εμπλέκονται πρωτεΐνες G είναι το μονοπάτι ρύθμισης του μεταβολισμού του γλυκογόνου από την επινεφρίνη. Στο μονοπάτι αυτό που ενεργοποιείται όταν απαιτείται επιπλέον ενέργεια για επιπρόσθετο μυϊκό έργο η επινεφρίνη προσδένεται σε έναν υποδοχέα συνδεδεμένο με πρωτεΐνη G. Η πρόσδεση αυτή αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα και ενεργοποιεί τη διάσπαση του συμπλόκου αβγ. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη α-GTP ενεργοποιεί ένα μεμβρανοσύνδετο ένζυμο την αδενυλική κυκλάση που μετατρέπει το ATP σε cAMP. Η αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PKA (πρωτεϊνικής κινάσης A). Στη συνέχεια οι καταλυτικές υπομονάδες της PKA ενεργοποιούν την κινάση της φωσφορυλάσης μέσω φωσφορυλίωσης και η ενεργοποιημένη κινάση ενεργοποιεί τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου με τον ίδιο τρόπο. Τέλος, η φωσφορυλάση του γλυκογόνου επάγει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου προς 6-φωσφορική γλυκόζη, που αξιοποιείται από τα μυϊκά κύτταρα για την παραγωγή ενέργειας. [27]

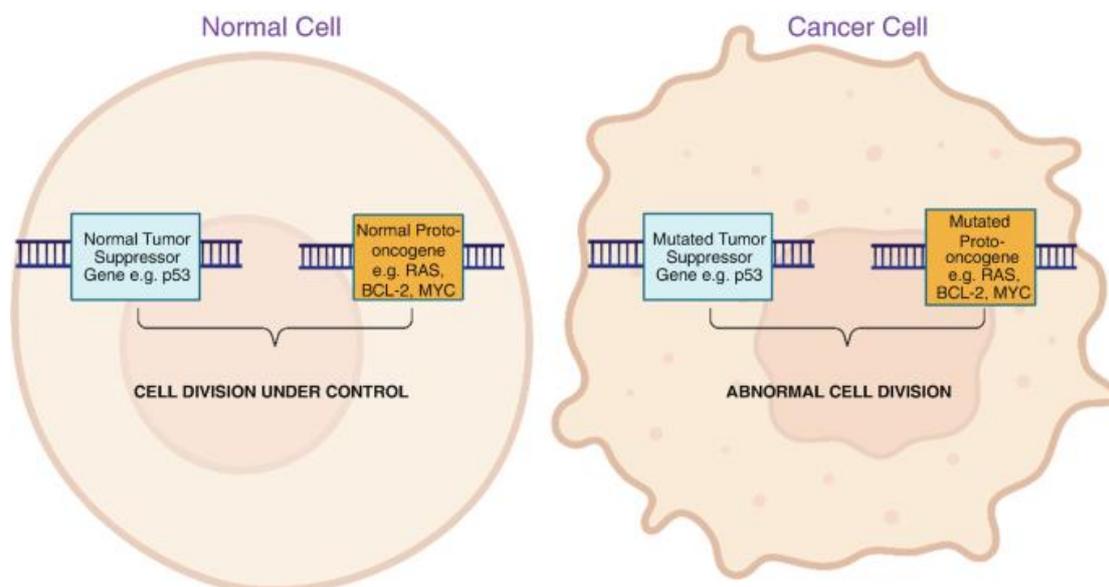


**Εικόνα 10:** Αριστερά αναπαρίσταται σχηματικά η δομή ενός υποδοχέα συνδεδεμένου με πρωτεΐνη G. Δεξιά αναπαρίσταται ο υποδοχέα της επινεφρίνης και το αρχικό τμήμα της κατάντη σηματοδοτικής οδού. [3]

### 1.10 Πρωτεϊνικές κινάσες και καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί μια γενετική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γενωμική αστάθεια και αποφυγή της απόπτωσης. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στο DNA των κυττάρων έχουν σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή των πρώτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια καθώς και την μείωση ή τη καταστολή της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα πρώτο-ογκογονίδια μετατρέπονται σε ογκογονίδια μέσω γονιδιακής ενίσχυσης όπως το N-Myc σε καρκίνους νευροβλαστώματος, σημειακών μεταλλάξεων που οδηγούν σε αντικαταστάσεις αμινοξέων σε θέσεις κομβικές για την ενεργότητα της πρωτεΐνης όπως το K-Ras στον καρκίνο του παχέος εντέρου και χρωμοσωμικών μετατοπίσεων όπως η δημιουργία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφεια στη χρόνια μυελολογική λευχαιμία που προκύπτει από την μετατόπιση ενός τμήματος του χρωμοσώματος 22 (που εδράζεται η Abl) στο χρωμόσωμα 9 (όπου εδράζεται η Bcr). Πολλά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες είναι πρώτο ογκογονίδια που μετατρέπονται σε ογκογονίδια και κατ' επέκταση επάγουν την ανάπτυξη ογκογόνων χαρακτηριστικών, καθώς υπερκεφράζονται ή καθίστανται ιδιοστατικά ενεργές. Από την άλλη πλευρά η καταστολή διαφόρων ογκοκατασταλτικών γονιδίων μπορεί επίσης να προάγει την καρκινογένεση. Πολλά ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεϊνικές φωσφατάσες που ανταγωνίζονται την δράση των πρωτεϊνικών κινάσων ως προς τη δραστηριότητα των υποστρωμάτων τους, χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η PTEN που υδρολύει τη φωσφορική ομάδα της PIP3 μετατρέποντας την και πάλι σε PIP2,

δηλαδή ανταγωνίζεται τη δράση της PI3K. Συνεπώς, είτε η μετατροπή του πρώτο-ογκογονιδίου της PI3K σε ογκογονίδιο είτε η καταστολή του γονιδίου της PTEN έχει σαν αποτέλεσμα της προώθηση της ογκογένεσης. [37]



**Εικόνα 11:** Τα ογκογόνα χαρακτηριστικά αποκτώνται σταδιακά κυρίως με τη μετατροπή των πρώτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια και την καταστολή της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων [37]

### 1.10.1 Ταξινόμηση πρωτεϊνικών κινασών

Με δεδομένο ότι οι περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες έχουν πολλαπλά υποστρώματα, η ταξινόμηση των πρωτεϊνικών κινασών φαινόταν λογικό να γίνει με βάση το αμινοξύ-αποδέκτη της φωσφορικής ομάδας. Έτσι, λοιπόν, παρατίθενται οι ακόλουθες κατηγορίες:

- 1) Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, που φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα των αμινοξέων σερίνης και θρεονίνης.
- 2) Κινάσες τυροσίνης, που φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα που βρίσκεται στο αρωματικό σύστημα του αμινοξέος τυροσίνη.
- 3) Κινάσες ιστιδίνης, οι οποίες φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα των αμινοξέων ιστιδίνης, αργινίνης και λυσίνης, όπου η υποκατάσταση πραγματοποιείται στα άτομα 1 ή 3 του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, στην ομάδα γουανιδίνης της λυσίνης και στην αμινομάδα της λυσίνης.
- 4) Κινάσες κυστεΐνης, όπου δρουν σε κατάλοιπα αμινοξέων κυστεΐνης και δημιουργούνται, μετά την υποκατάσταση, φωσφορικοί θειοεστέρες.
- 5) Ασπάρτυλο ή γλουτάμιλο κινάσες των οποίων το υπόστρωμα είναι μια άκυλο ομάδα.

Από τις κατηγορίες αυτές οι δύο πρώτες είναι ευρέως διαδεδομένες, καθώς φαίνεται να αποτελούν την πλειοψηφία των ενζύμων αυτών και χαρακτηρίζονται ως «υπεροικογένειες». [19]

### 1.10.2 Πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης

Μία εκ των δύο «υπεροικογένεια» πρωτεϊνικών κινασών, όπως χαρακτηρίστηκε προηγουμένως, αποτελούν οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης (STKs). Ο χαρακτηρισμός αυτός αποδίδεται στο γεγονός ότι τουλάχιστον 125 από τις μέχρι τώρα 538 γνωστές ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Τα ένζυμα αυτά φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα (OH<sup>-</sup>), που βρίσκεται στην πλευρική αλυσίδα ενός κατάλοιπου σερίνης ή θρεονίνης. Τα δύο αυτά είδη πρωτεϊνικών κινασών ανήκουν στην ίδια κατηγορία, επειδή τα δύο αυτά αμινοξέα έχουν πανομοιότυπες πλευρικές αλυσίδες. Εξαιτίας του εξαιρετικά συντηρημένου καταλυτικού κέντρου, οι κινάσες δεν εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα σε ένα μόνο υπόστρωμα, αλλά αντίθετα φωσφορυλιώνουν μία οικογένεια υποστρωμάτων. [12]

Η συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνικών κινασών συμμετέχει ενεργά στις πιο σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η κυτταρική απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαίρεση, κ.α., μέσω της ικανότητάς τους να φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και μια τεράστια σειρά κυτταροπλασματικών και πυρηνικών τελεστών. [9]

### 1.10.3 Πρωτεϊνικές Κινάσες τυροσίνης

Οι τυροσινικές πρωτεϊνικές κινάσες (TKs) είναι η δεύτερη «υπεροικογένεια» πρωτεϊνικών κινασών. Από τις 58 τυροσινικές πρωτεϊνικές κινάσες, μόνο οι 52 φαίνεται να έχουν επιβεβαιωμένη δραστηριότητα σύμφωνα με UniProtKB/SwissProt. Πρόκειται για ένζυμα πρωτεϊνικής φύσεως που σχετίζονται, όπως και η παραπάνω κατηγορία, άμεσα με τις κυτταρικές διεργασίες διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο σε πολυάριθμα βιοχημικά μονοπάτια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Εξ ορισμού ρόλος τους είναι να καταλύουν τη φωσφορυλίωση τυροσινικών καταλοίπων πρωτεϊνών-στόχων χρησιμοποιώντας μόρια ATP. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και διατήρηση της ομοιόστασης. Οι κινάσες τυροσίνης συμμετέχουν, κυρίως, σε σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο καθώς επίσης και στην αποτροπή οποιουδήποτε απορυθμισμένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Με τις πιο πρόσφατες έρευνες έχουν ταυτοποιηθεί 90 τυροσινικές κινάσες όπου ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

- Υποδοχικές κινάσες τυροσίνης και
- Μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης.

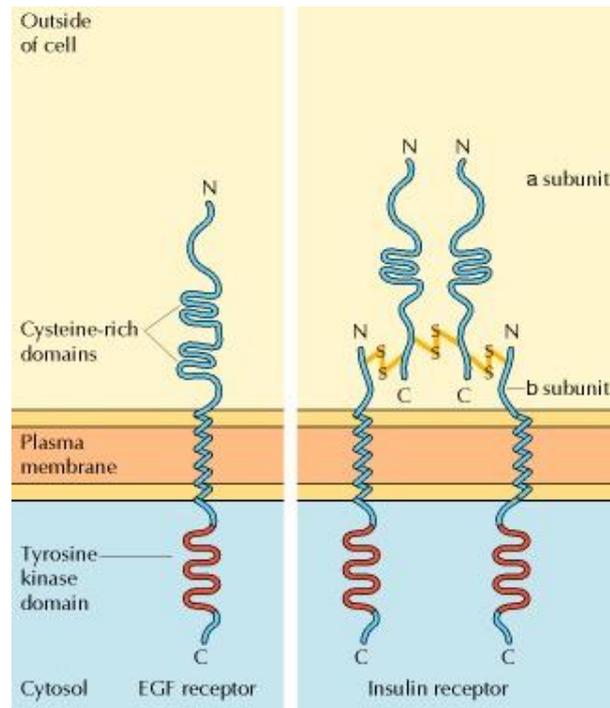
Από τις 90 κινάσες τυροσίνης που έχουν ταυτοποιηθεί, οι 59 αποτελούν υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs) και οι υπόλοιπες 31 ανήκουν στις μη-υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (nRTKs). Οι υποδοχικές τυροσινικές κινάσες συμμετέχουν στη

διαμεμβρανική σηματοδότηση, ενώ οι μη-υποδοχικές τυροσινικές κινάσες συμμετέχουν στη σηματοδότηση προς τον πυρήνα. [33]

#### **1.10.4 Υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (RTKs)**

Η συγκεκριμένη κατηγορία είναι ευρέως διαδεδομένη, διότι η πλειονότητα των τυροσινικών κινασών ανήκουν στις υποδοχικές κινάσες. Πράγματι, η πρώτη πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια μελετών που αφορούσαν την ογκογόνο πρωτεΐνη του ιού του σαρκώματος Rous. Αυτές με τη σειρά τους, ανάλογα με την ομόλογη αλληλουχία και τη δομή της εξωκυττάριας περιοχής τους διακρίνονται σε 20 υποκατηγορίες με τις πιο σημαντικές να αποτελούν τους υποδοχείς με ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης και τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς συνδεδεμένους με κινάσες τυροσίνης. Στην πρώτη κατηγορία η κινάση συνιστά τμήμα του ενζύμου, ενώ στην δεύτερη κατηγορία κινάση και υποδοχέας αποτελούν διαφορετικά τμήματα. Η μοριακή δομή όλων των υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών φαίνεται να είναι παρόμοια και περιλαμβάνει συνολικά τρία τμήματα: μία θέση πρόσδεσης ου υποκαταστάτη στην εξωκυττάρια περιοχή, μια κυτταροπλασματική περιοχή που περικλείει το ένζυμο καθώς επίσης και μια υδρόφοβη διαμεμβρανική α-έλικα.

Ανάλογα με τη δομή τους κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν τους μονομερείς, όπως οι υποδοχείς EGF και τους πολυμερείς υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας της ινσουλίνης. Αν και οι περισσότερες υποδοχικές πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούνται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, ο υποδοχέας ορισμένων αυξητικών παραγόντων, όπως ο υποδοχέας της ινσουλίνης είναι διμερή. Κατά την δέσμευση των προσδετών στις εξωκυτταρικές περιοχές των υποδοχέων ενεργοποιούνται παράλληλα και οι κυτταροπλασματικές περιοχές των κινασών αυτών με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση τόσο των ίδιων όσο και των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-στόχων οι οποίες μεταδίδουν περαιτέρω το σήμα που ξεκινά από την πρόσδεση του αντίστοιχου αυξητικού παράγοντα. [33]

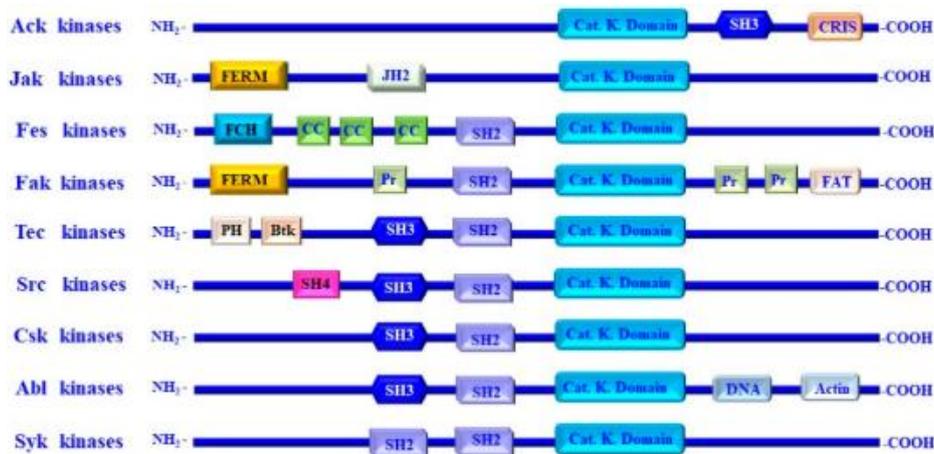


**Εικόνα 12:** Οργάνωση των υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών. Οι υποδοχείς τόσο του EGF όσο και της ινσουλίνης διαθέτουν εξωκυτταρικές επικράτειες που είναι πλούσιες σε κυστείνες.

### 1.10.5 Μη υποδοχικές κινάσες τυροσίνης (nRTKs)

Σε αντίθεση με τις υποδοχικές τυροσινικές κινάσες, οι μη υποδοχικές τυροσινικές κινάσες δεν διαθέτουν διαμεμβρανική περιοχή και εντοπίζονται κυρίως στο εσωτερικό του πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς δεν διαθέτουν οι ίδιοι ενζυμική ενεργότητα, αλλά δρουν διεγείροντας ενδοκυτταρικές πρωτεϊνικές τυροσινικές κινάσες. Συγκεκριμένα, η δέσμευση του προσδέτη επάγει τον διμερισμό του υποδοχέα προκαλώντας την ενεργοποίηση μιας συνδεδεμένης με αυτόν μη υποδοχικής πρωτεϊνικής κινάσης τυροσίνης. Η ενεργοποίηση αυτή είναι συνέπεια της αλληλοφωσφορυλίωσή τους. Με αυτόν τον τρόπο οι ενεργοποιημένες πλέον κινάσες φωσφορυλιώνουν τυροσίνες του υποδοχέα.

Οι μη υποδοχικές κινάσες τυροσίνης δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με τα εξωκυττάρια σήματα, αλλά δρουν σε συνδυασμό με σηματοδοτικά μονοπάτια πολλών υποδοχικών κινασών μεταξύ των οποίων οι υποδοχείς των κυτταροκινών.



Εικόνα 13: Κύριες οικογένειες των nRTKs [12]

### 1.11 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

Λόγω του κομβικού ρόλου που διαδραματίζουν οι πρωτεϊνικές κινάσες για την κυτταρική λειτουργία όταν απορρυθμίζονται σε πολλές περιπτώσεις οδηγούν σε καρκινογένεση. Συνακόλουθα, αποτελούν έναν από τους πιο σημαντικούς θεραπευτικούς στόχους την καταπολέμηση διαφόρων καρκίνων. Έχουν αναφερθεί πολλοί αξιολογοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών στη διεθνή βιβλιογραφία όπως για παράδειγμα το Imatinib που χρησιμοποιείται ευρέως στη καταπολέμηση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας όταν εκφράζεται η χειμερική πρωτεΐνη Bcr/Abl ή όταν (λόγω χρωμοσωμικής μετατόπισης) αντικαθίσταται η εξωκυτταρική επικράτεια του PDGFR από αλληλουχίες του μεταγραφικού παράγοντα Tel με αποτέλεσμα ο υποδοχέας να είναι ιδιοστατικά ενεργός. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί το Vemurafenib που αποτελεί έναν αναστολέα της κινάσης σερίνης/θρεονίνης B-RAF που μεταλλάσσεται σε μελανώματα. Τέλος, ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αναστολέα πολλαπλών κινασών στόχων είναι το Sorafenib που χρησιμοποιείται σε πολλούς τύπους καρκίνων όπως ο ηπατοκυτταρικός, ο νεφροκυτταρικός ή ο καρκίνος του θυροειδούς. [14]

### 1.12 Κατηγοριοποίηση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Οι δομικές μελέτες οδήγησαν όχι μόνο στην διαλεύκανση των ενεργών και ανενεργών διαμορφώσεων των πρωτεϊνικών κινασών αλλά και στην διάκριση των αναστολέων σε πέντε κατηγορίες αναλόγως τον τρόπο δέσμευσης στο πρωτεϊνικό μόριο.

Οι αναστολείς τύπου I ανταγωνίζονται το ATP για την δέσμευση στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Η δέσμευση αυτών των τύπων αναστολέα ωθεί την κινάση να υιοθετήσει την διαμόρφωση DFG-in .

Οι αναστολείς τύπου I<sub>1/2</sub> συνδέονται στη περιοχή δέσμευσης του δακτυλίου αδενίνης του ATP μέσω συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων στη περιοχή της άρθρωσης και στο

εσωτερικό της κοιλότητας δέσμευσης του ATP. Κατά την δέσμευση των αναστολέων τύπου I<sub>1/2</sub> η κινάση ωθείται σε διαμόρφωση DFG-in και αC-out.

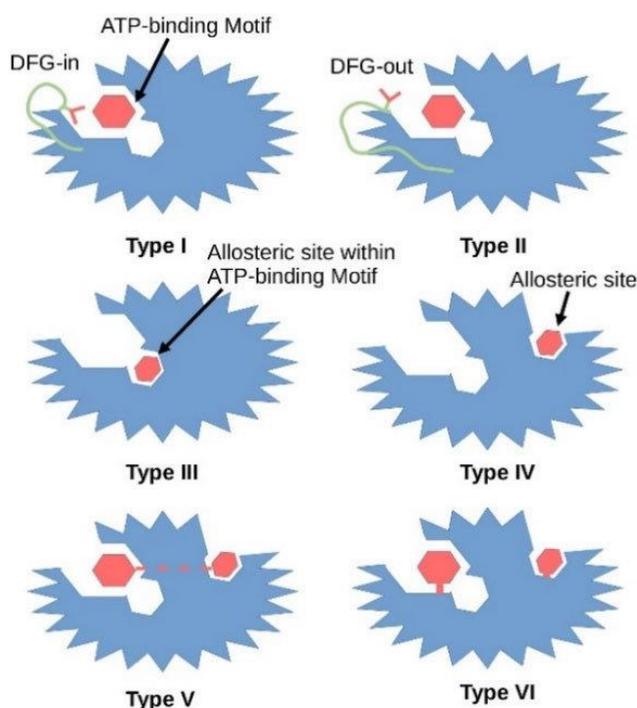
Οι αναστολείς τύπου II συνδέονται με στον θύλακα δέσμευσης ATP όταν η κινάση βρίσκεται στην DFG-out διαμόρφωση.

Οι αναστολείς τύπου III συνδέονται αποκλειστικά σε μια αλλοστερική θέση που είναι γειτονική στη θέση πρόσδεσης του ATP, χωρίς να αλληλεπιδρούν με αυτήν, προκαλώντας αλλαγή στη πρωτεϊνική διαμόρφωση της κινάσης. Η αλλαγή στη πρωτεϊνική διαμόρφωση που επάγεται από την δέσμευση αναστολέα τύπου III καθιστά αδύνατη την είσοδο του ATP στο ενεργό κέντρο.

Οι αναστολείς τύπου IV συνδέονται στο εξωτερικό της σχισμής του φωσφορουποδοχέα της πρωτεϊνικής κινάσης. Η πρόσδεση των αναστολέων τύπου IV επάγει αλλαγή στη πρωτεϊνική διαμόρφωση που καθιστά τη καταλυτική περιοχή ανενεργή.

Οι αναστολείς τύπου V συνδέονται σε δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεϊνικής κινάσης, διαφορετικά στην βιβλιογραφία αναφέρονται ως δισθενείς αναστολείς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αναστολέα αυτού του τύπου αποτελεί το Lenvatinib που αλληλεπιδρά τόσο με την θέση δέσμευσης του ATP όσο και με μια γειτονική αλλοστερική περιοχή σε κινάσες με διαμόρφωση DFG-in.

Αναστολείς τύπου VI συνδέονται με την πρωτεϊνική κινάση, στη θέση πρόσδεσης ATP ή σε αλλοστερική περιοχή, σχηματίζοντας ομοιοπολικά προϊόντα προσθήκης με το ένζυμο στόχο. [34]



**Εικόνα 14:** Κατηγορίες αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. [14]

Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών είναι κομβικός σε πολλές πτυχές της κυτταρικής λειτουργίας αφού αποτελούν κύριους τελεστές πολλαπλών ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης. Υφίστανται διάφοροι τύποι κινασών που είτε λειτουργούν ως υποδοχείς (υποδοχείς κινασών τυροσίνης) είτε ως κατάντη σηματοδοτικά μόρια (κινάσες τυροσίνης που δεν είναι υποδοχείς και κινάσες σερίνης θρεονίνης).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα σηματοδοτικής οδού που εμπλέκονται διαφόρων τύπων κινάσες είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK. Οι οδοί αυτές ρυθμίζουν ποικίλες κυτταρικές συμπεριφορές ως απόκρισης στη διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων ή κυτταροκινών. Τα μονοπάτια αυτού του τύπου αποτελούνται από μια πρωτεΐνη δέσμευσης GTP (όπως η Ras) δύο ανοδικές κινάσες και μια καθοδική εκτελεστική κινάση.

## Κεφάλαιο 2

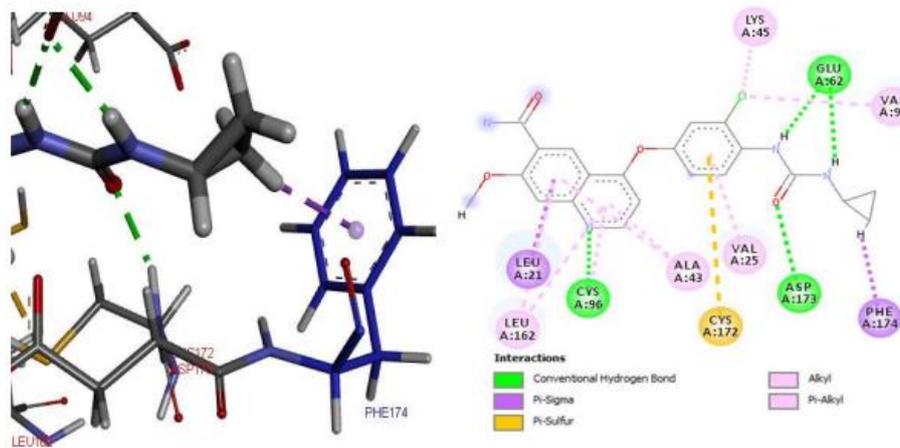
### 2.1 Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση ενώσεων αναλόγων του Lenvatinib, ως δυνητικών αναστολέων των προαναφερθεισών πρωτεϊνικών κινασών, ώστε να αυξηθεί η εκλεκτικότητα και η ανασταλτική δράση έναντι αυτών. Για τον λόγο αυτό διενεργήθηκε *in silico* μοριακός σχεδιασμός μέσω μελετών μοριακής πρόσδεσης (molecular docking) με βάση το ενεργό κέντρο της VEGFR2. Για τη μοριακή μοντελοποίηση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Autodock Vina και το UCSF Chimera.

Όσον αφορά την πειραματική πορεία σύνθεσης των νέων μορίων, αυτή βασίστηκε στην συνθετική πορεία που έχει προταθεί από την εταιρία Esai. Ωστόσο, στο ερευνητικό εργαστήριο έγιναν προσπάθειες βελτιστοποίησης της πειραματικής πορείας με σκοπό την μείωση των επιμέρους σταδίων σύνθεσης και την αύξηση της ολικής απόδοσης.

Όπως έγινε αντιληπτό στα πλαίσια της ερευνητικής δραστηριότητας, ακόμη και μικρές τροποποιήσεις στο εν λόγω μόριο μπορεί να επιφέρουν ακόμη και ουσιαστική αλλαγή της διαμόρφωσης του εν δυνάμει αναστολέα και κατ' επέκταση σε αύξηση της ανασταλτικής και εκλεκτικής του δράσης έναντι μιας σειράς πρωτεϊνικών κινασών εμπλεκόμενων σε διάφορες μορφές καρκίνου.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι αναστολείς τύπου V αλληλεπιδρούν σε δύο σημεία της πρωτεϊνικής κινάσης, το ενεργό κέντρο και με μια γειτονική αλλοστερική περιοχή. Αποτελούν μάλιστα μία από τις πιο πρόσφατες κατηγορίες αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών που χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα. Αρχικά, διακρίνουμε ένα εκτεταμένο δίκτυο των δεσμών υδρογόνου, γεγονός που, συνήθως, υποδηλώνει μεγαλύτερη σταθερότητα. Πιο συγκεκριμένα, το Lenvatinib καταλαμβάνει πλήρως τη θέση πρόσδεσης του δακτυλίου αδενίνης σχηματίζοντας συνολικά τέσσερις δεσμούς υδρογόνου στο σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2 εκ των οποίων οι τρεις λαμβάνουν χώρα μεταξύ της ουρίας του Lenvatinib και των καταλοίπων Glu885 και Asp1046 του πρωτεϊνικού μορίου της κινάσης και ο τέταρτος μεταξύ του αζώτου του κινολινικού δακτυλίου του αναστολέα και του καταλοίπου Cys919. Η ανασταλτική και εκλεκτική δράση του Lenvatinib είναι αποτέλεσμα επιπρόσθετων αλληλεπιδράσεων, καθώς φαίνονται να σχηματίζονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Μεταξύ αυτών πιο σπουδαία υδρόφοβη αλληλεπίδραση αποτελεί η π-αλληλεπίδραση μεταξύ του κυκλοπροπανίου και του φαινυλίου του καταλοίπου Phe1047 του μοτίβου DFG. Βέβαια, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι ασθενέστερες μεταξύ των διαμοριακών δυνάμεων, αλλά η συγκεκριμένη π-αλληλεπίδραση είναι υπεύθυνη τόσο για την αυξημένη ανασταλτική δράση του Lenvatinib όσο και για τον χρόνο παραμονής του στο σύμπλοκο Lenvatinib-VEGFR2.



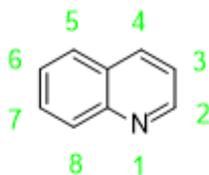
**Εικόνα 15:** Απεικόνιση π αλληλεπίδρασης μεταξύ του κυκλοπροπανίου του Lenvatinib και του φαινυλίου του καταλοίπου Phe1047 (αριστερά). Δισδιάστατη δομή του Lenvatinib και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2 (δεξιά).

Το Lenvatinib το οποίο χορηγείται με την εμπορική ονομασία Lenvima από την φαρμακευτική εταιρία Eisai Co., είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων μικρού μοριακού βάρους πολλαπλών υποδοχικών κινασών τυροσίνης (multi-targeted kinase inhibitor). Η συγκεκριμένη δραστική ουσία χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες για την αντιμετώπιση ορισμένων κακοηθειών. Συγκεκριμένα, έχει εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του διαφοροποιημένου θυροειδικού καρκίνου (DTC) ανθεκτικού στο ραδιενεργό ιώδιο. Έναν χρόνο αργότερα εγκρίθηκε η χορηγία της για την θεραπεία του καρκινώματος νεφρικών κυττάρων (RCC), σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, όπως το everolimus ή το pembrolizumab. Μάλιστα, ο συνδυασμός λενβατινίμης και πεμπρολιζουμάμης φαίνεται να έχει καλύτερη δράση σε σύγκριση με το sunitinib. Τέλος, έχει εγκριθεί ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC).

## 2.2 Η κινολίνη ως δομικό συστατικό

Μεταξύ των ετεροκυκλικών ενώσεων, η κινολίνη φαίνεται να αποτελεί μία από τις πιο ενδιαφέρουσες ενώσεις που απασχολεί την επιστημονική κοινότητα. Η κινολίνη και τα παράγωγα αυτής έχουν δοκιμαστεί μεγάλη ποικιλία δραστηριοτήτων βιολογικής προελεύσεως και φαίνεται να συνιστούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες ενώσεων για τον σχεδιασμό και την σύνθεση νέων φαρμακευτικών προϊόντων. Πρόκειται για ετεροκυκλική αζωτούχος ένωση που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1834 από τον Γερμανό χημικό Runge ονομάζοντάς την «λευκό λάδι», ενώ το 1842 απομονώθηκε από τον Γάλλο χημικό Gerhardt με αλκαλική πυρόλυση άλλων φυσικών προϊόντων, όπως της κίνινης, της στρυχνίνης, καθώς επίσης και της κινchonίνης. Οι κινολίνες φαίνεται να έχουν πολλές εφαρμογές στην καθημερινότητα με σπουδαιότερη την χρήση τους στην ιατρική. Μάλιστα, παράγωγο αυτής αποτέλεσε το πρώτο φάρμακο για την αντιμετώπιση της ελονοσίας. Φάρμακα που περιέχουν στη δομή τους την κινολίνη παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, γι' αυτό και

χαρακτηρίζεται ως «προνομιούχα δομή», διότι μπορεί να δεσμευτεί αποτελεσματικά σε πολλαπλούς βιολογικούς στόχους (υποδοχείς, ένζυμα) με υψηλή συγγένεια, οδηγώντας σε ευρύ φάσμα θεραπευτικών ιδιοτήτων, μεταξύ αυτών η αντική, η αντιφλεγμονώδης και η αντικαρκινική δράση. Η κινολίνη σχηματίζεται από την συμπύκνωση ενός βενζολικού κι ενός πυριδινικού δακτυλίου. Διαθέτει συνολικά 10 π ηλεκτρόνια, ενώ φαίνεται να παρουσιάζεται μεγαλύτερο ενδιαφέρον στις θέσεις 2 και 4. Αυτό συμβαίνει καθώς ο πυριδινικός δακτύλιος εμφανίζει έλλειψη ηλεκτρονίων και έτσι οι θέσεις αυτές είναι οι πλέον κατάλληλες για αντιδράσεις πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. [20]



**Σχήμα 1:** Χημική δομή και αρίθμηση του κινολινικού δακτυλίου

### 2.3 Καρκίνος του θυροειδούς

Η παγκόσμια επίπτωση του καρκίνου του θυροειδούς έχει αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες. Η ετήσια συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του θυροειδούς έχει παρουσιάσει σημαντική αύξηση κατά τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες: από 4,9 ανά 100.000 το 1975 ανήλθε σε 14,3 ανά 100.000 το 2009. Ωστόσο, είναι κρίσιμο να σημειωθεί ότι το ετήσιο ποσοστό θνησιμότητας (προσαρμοσμένο ως προς την ηλικία και το φύλο) έχει παραμείνει σταθερό στο 0,5 ανά 100.000.

Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών του καρκίνου του θυροειδούς τα τελευταία 20 χρόνια. Η πλειονότητα των ανωμαλιών-οδηγών (driver abnormalities) εντοπίζεται σε βασικές οδούς σηματοδότησης, με διαφορές ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο:

#### 1. Θηλώδης Καρκίνος Θυροειδούς (PTC)

Οι συνηθεις ανωμαλίες-οδηγοί στο PTC επικεντρώνονται στην ιδιοσυστατική ενεργοποίηση της κυτταρικής οδού σηματοδότησης MAPK.

#### 2. Θυλακιώδης Καρκίνος Θυροειδούς (FTC)

Το FTC συνδέεται συχνά με την ενεργοποίηση τόσο της οδού PI3K όσο και της MAPK.

### 3. Αναπλαστικός Καρκίνος Θυρεοειδούς (ATC)

Τα ATC είναι πιο γονιδιωματικά πολύπλοκα και φιλοξενούν συχνά πολλαπλές ανωμαλίες, οι οποίες περιλαμβάνουν:

- Γονίδια που κωδικοποιούν υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs), όπως VEGFR, EGFR, PDGFR, MET και KIT.
- Κινάσες της οδού PI3K/AKT, συμπεριλαμβανομένων των PIK3CA, PIK3CB, και της PDPK1 (φωσφοϊνοσιτιδική πρωτεϊνική κινάση 1).
- Αυξημένη έκφραση δεικτών βλαστοκυττάρων.

### 4. Μυελοειδής Καρκίνος Θυρεοειδούς (MTC)

Το MTC, το οποίο προέρχεται από τα κύτταρα C, προκαλείται συχνότερα είτε από βλαστική γραμμή (οικογενής MTC ή πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 2A) είτε από σωματικές ενεργοποιητικές μεταλλάξεις σε RET ή RAS. [32]

## 2.4 Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα

Ο καρκίνος του ήπατος κατατάσσεται ως ο έκτος πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως και αποτελεί την τρίτη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο. Ο Ηπατοκυτταρικός Καρκίνος (HCC) ευθύνεται για το 80% του παγκόσμιου φορτίου καρκίνου του ήπατος. Το 2020 καταγράφηκαν περισσότερες από 900.000 νέες περιπτώσεις, με ηλικιακά τυποποιημένο ποσοστό 7,3 ανά 100.000. [43]

Η θεραπευτική στρατηγική για την υποτροπή του HCC εξαρτάται από την εντόπιση και την έκταση της νόσου και περιλαμβάνει τις εξής επιλογές:

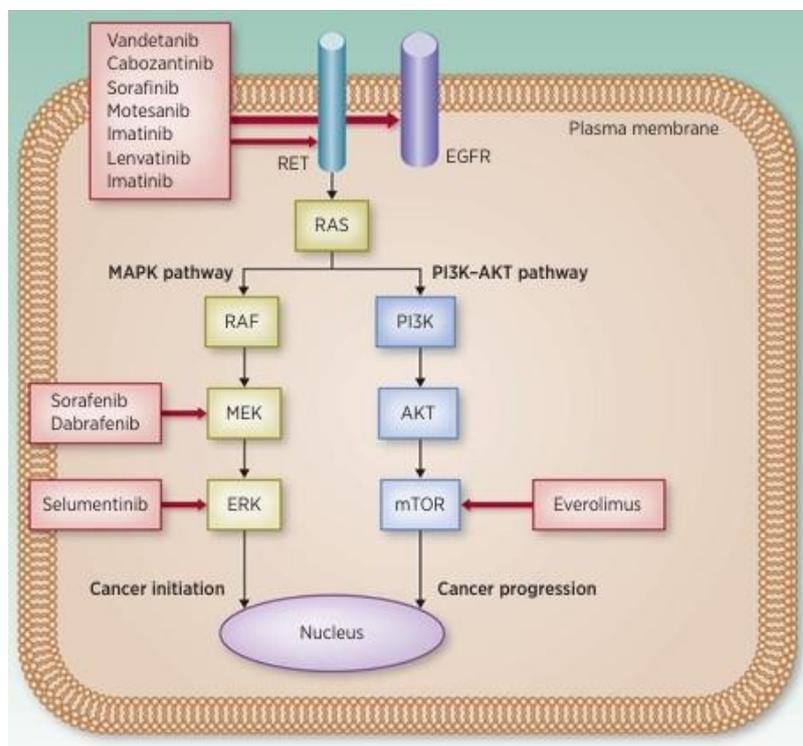
1. *Τοπικές και Τοπικοπεριοχικές Θεραπείες:* Για την αντιμετώπιση μονήρους υποτροπής ή μεταστάσεων, χρησιμοποιούνται τοπικές θεραπευτικές προσεγγίσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν:
  - Χειρουργική εκτομή.
  - Στερεοτακτική ακτινογραφία σώματος (SBRT).
  - Πρωτονιακή θεραπεία.
  - Βραχυθεραπεία υψηλής δόσης (HDR) με καθοδήγηση εικόνας.
  - Θερμική αφαίρεση ή άλλες τοπικοπεριοχικές θεραπείες.
2. *Συστηματική Θεραπεία:* Για την αντιμετώπιση της πολυεστιακής υποτροπής ή των μεταστάσεων, επιλέγονται στοχευμένες θεραπείες, όπως οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKIs). Η επιλογή αυτή δικαιολογείται από το γεγονός ότι, σε τέτοιες περιπτώσεις, έρευνες έχουν δείξει εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις αυξητικών παραγόντων, όπως ο VEGF (Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός

Παράγοντας), οι οποίοι προάγουν την αγγειογένεση και την εξέλιξη του όγκου. [43]

## 2.5 Νεφροκυτταρικό καρκίνωμα

Ο καρκίνος του νεφρού αποτελεί την όγδοη πιο συχνή αιτία θανάτου που σχετίζεται με τον καρκίνο σε παγκόσμιο επίπεδο. Μόνο στις ΗΠΑ, υπολογίστηκαν 63.340 νέες διαγνώσεις και 14.970 θάνατοι το 2018. Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αναμένεται να αυξάνεται κατά ετήσια βάση. Το Νεφροκυτταρικό Καρκίνωμα (RCC), το οποίο προέρχεται από τον νεφρικό φλοιό, ευθύνεται για περίπου το 90% όλων των πρωτοπαθών νεφρικών νεοπλασμάτων. Το RCC παρουσιάζει διπλάσια συχνότητα εμφάνισης στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες. Παρά την ύπαρξη διαφορετικών θεραπευτικών φαρμάκων που είναι σήμερα διαθέσιμα για το RCC, η πρόγνωση του μεταστατικού σταδίου της νόσου παραμένει δυσμενής (κακή). [35]

Ενώ η συμβατική χημειοθεραπεία για το RCC απέδωσε σχετικά κακά αποτελέσματα, την τελευταία δεκαετία σημειώθηκε πρόοδος με την εφαρμογή καινοτόμων βιολογικών φαρμάκων στη θεραπεία των ασθενών. Σε ασθενείς με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (RCC), η συνιστώμενη θεραπεία εστιάζει στη στοχευμένη αναστολή τυροσινικών κινασών (TKIs). Αυτή η προσέγγιση επιλέγεται καθώς οι εν λόγω κινάσες έχουν αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την μετάσταση των νεοπλασμάτων. [35]

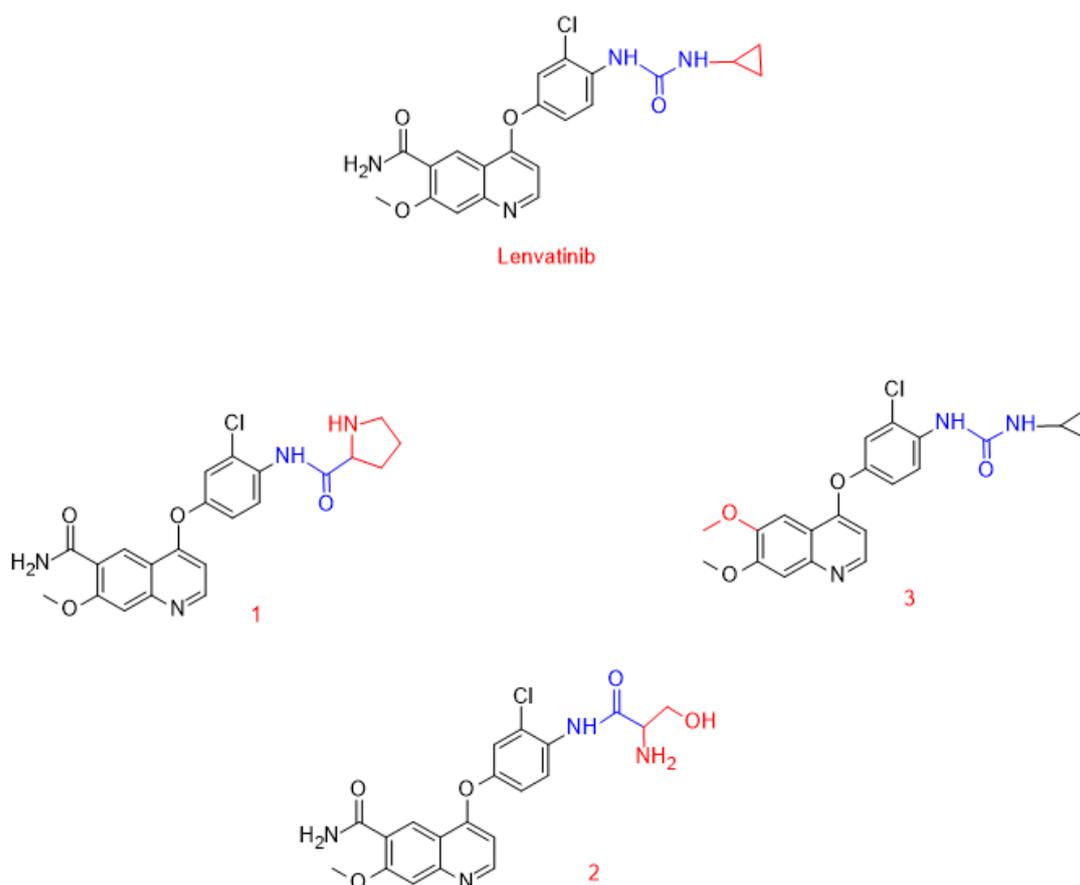


**Εικόνα 16:** Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία όπου μπορούν να δράσουν οι θεραπευτικοί παράγοντες (αναστολείς), μπλοκάροντας έτσι τη μετάδοση του σήματος και αναστέλλοντας την ανάπτυξη του καρκίνου. [32]

## Κεφάλαιο 3

### 3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων του VEGFR2

Αρχικά, διενεργήθηκε μοριακός σχεδιασμός μέσω των θεωρητικών προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης. Οι νέες ενώσεις που σχεδιάστηκαν, ως ανάλογα φαρμακευτικών σκευασμάτων, ήταν αποτέλεσμα εισαγωγής διάφορων υποκαταστατών, καθώς, όπως προαναφέρθηκε, τυχόν μικρές αλλαγές στον ήδη υπάρχον αναστολέα μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου και συνεπώς αύξηση στην ανασταλτική του δράση. Αλλαγές πραγματοποιήθηκαν τόσο στον κινολινικό δακτύλιο όσο και στον δεσμό ουρίας αντικαθιστώντας τον με αμιδικό δεσμό και εισάγοντας το φυσικό αμινοξύ L- προλίνη και L-σερίνη αντίστοιχα.



**Σχήμα 2 :** Σχηματική απεικόνιση νέων αναλόγων του Lenvatinib που σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο

## Ανάλογο 1

Όσον αφορά το ανάλογο 1, η χρήση του ετεροκυκλικού δακτυλίου της προλίνης εισάγει μια νέα γεωμετρική παράμετρο: τον περιορισμό των βαθμών ελευθερίας (conformational constraint), ο οποίος επηρεάζει άμεσα τη σταθερότητα του συμπλόκου.

Η προλίνη, ως δευτεροταγές αμινοξύ, προσδίδει μια «κάμψη» στη δομή του μορίου, η οποία φαίνεται να ταιριάζει ιδανικά στη γεωμετρία της ενεργού θέσης. Στο φαρμακοφόρο της τμήμα εντάσσονται:

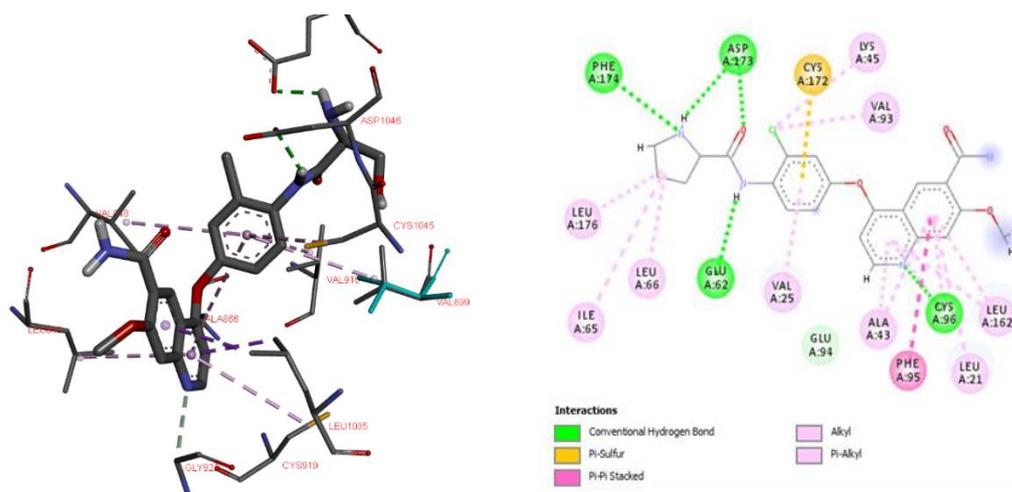
- Δεσμοί Υδρογόνου με Asp173: Όπως και στο ανάλογο της σερίνης, το Asp173 παραμένει ο κεντρικός πυλώνας σταθεροποίησης. Παρατηρούμε διπλό δεσμό υδρογόνου (Conventional H-bond) με το καρβονύλιο και το NH του αμιδικού δεσμού που συνδέει την προλίνη.
- Αλληλεπίδραση με Phe174: Το δευτεροταγές άζωτο του δακτυλίου της προλίνης σχηματίζει έναν κρίσιμο δεσμό υδρογόνου με το Phe174. Ο δεσμός αυτός είναι πιο κατευθυντικός σε σχέση με τη σερίνη, λόγω της ακαμψίας του πενταμελούς δακτυλίου.
- Δεσμός με Glu62: Εμφανίζεται ένας επιπλέον δεσμός υδρογόνου με το Glu62, ο οποίος ενισχύει την αγκίστρωση του μορίου στο άνω τμήμα της κοιλότητας.

Αναλύοντας ακροθιγώς τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του δακτυλίου, διακρίνεται η υπεροχή της προλίνης έναντι της σερίνης ως προς τη σταθερότητα Van der Waals. Σε αυτό συνεισφέρουν οι:

- Alkyl Επαφές: Ο δακτύλιος της προλίνης, όντας υδρόφοβος, σχηματίζει Alkyl αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Leu176, Leu66 και Ile65. Αυτό επιτρέπει στο ανάλογο να "γεμίζει" την υδρόφοβη υπο-κοιλότητα, προσομοιάζοντας τη δράση του κυκλοπροπυλίου του Lenvatinib.

Στον κεντρικό σκελετό και περιοχή πρόσδεσης συγκαταλέγονται οι:

- Σταθεροποίηση Hinge (Cys96): Ο δακτύλιος της κινολίνης διατηρεί τον θεμελιώδη δεσμό υδρογόνου με το Cys96, διασφαλίζοντας ότι η βασική τοποθέτηση του αναστολέα παραμένει αμετάβλητη.
- Pi-Pi Stacked αλληλεπίδραση: Μια πολύ σημαντική προσθήκη στο Ανάλογο Προλίνης είναι η Pi-Pi Stacked αλληλεπίδραση (ροζ έντονη γραμμή) με το Phe95. Αυτού του είδους η αλληλεπίδραση προσφέρει εξαιρετική σταθερότητα προσανατολισμού, «σφραγίζοντας» τον αρωματικό σκελετό ανάμεσα στα αμινοξέα.
- Pi-Sulfur (Cys172): Διατηρείται η αλληλεπίδραση με το θείο της κυστεΐνης, η οποία φαίνεται να είναι κοινό χαρακτηριστικό στα επιτυχημένα ανάλογα αυτής της σειράς.



**Εικόνα 17:** Τρισδιάστατη δομή του Αναλόγου 1 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2- Δισδιάστατη δομή του Αναλόγου 1 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

Αδιαμφισβήτητα, λοιπόν, το ανάλογο 1 φαίνεται να είναι πολύ αποτελεσματικό. Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα και των δύο κόσμων:

1. Την πολική σταθερότητα (δεσμοί υδρογόνου) που προσφέρει ένα αμινοξύ.
2. Την υδρόφοβη πλήρωση και τη στερεοχημική ακαμψία που απαιτείται για ισχυρή σύνδεση.

Η παρουσία του Pi-Pi stacking με το Phe95 και οι πολλαπλοί δεσμοί με το Asp173 υποδηλώνουν ότι η προλίνη παρέχει έναν εξαιρετικά σταθερό προσανατολισμό, μειώνοντας την εντροπία του συστήματος κατά την πρόσδεση.

Ο δακτύλιος της προλίνης είναι ένας ετερόκυκλος με στερεοχημικό περιορισμό. Αυτό σημαίνει ότι, σε αντίθεση με τη σερίνη που είναι εύκαμπτη, η προλίνη "επιβάλλει" μια συγκεκριμένη γωνία στο μόριο, η οποία στο διάγραμμα φαίνεται να ευνοεί τον σχηματισμό πολλαπλών δεσμών στην αλλοστερική κοιλότητα.

Στο Ανάλογο 1 εμφανίζεται η αλληλεπίδραση Pi-Pi Stacked με το Phe95 (ροζ έντονη γραμμή). Αυτό υποδηλώνει ότι ο αρωματικός δακτύλιος του φαρμάκου "κουμπώνει" παράλληλα με τον δακτύλιο της φαινυλαλανίνης, κάτι που προσφέρει τεράστια σταθερότητα και δεν απεικονίζεται στο διάγραμμα του Lenvatinib. Διατηρείται η αλληλεπίδραση Pi-Sulfur με το Cys172, η οποία σταθεροποιεί τον κεντρικό δακτύλιο. Παρά τον πολικό χαρακτήρα των δεσμών υδρογόνου, ο δακτύλιος της προλίνης καταφέρνει να διατηρήσει υδρόφοβες επαφές με τα Leu176, Leu66 και Ile65, παρόμοια με τις επαφές που κάνει το κυκλοπροπύλιο του Lenvatinib με τα Leu889/Leu1049.

## Ανάλογο 2

Συνεχίζοντας με το 2<sup>ο</sup> ανάλογο, ο βασικός σκελετός της κινολίνης διατηρείται στην περιοχή «hinge», αλλά η τροποποίηση στο άκρο του μορίου επηρεάζει τη σταθερότητα, επιδρώντας στους εξής παράγοντες:

- Γραμμικότητα: Η εισαγωγή της σερίνης προσδίδει μεγαλύτερη ευκαμψία (flexibility) στην αλυσίδα σε σχέση με τον άκαμπτο δακτύλιο του κυκλοπροπυλίου.
- Προσανατολισμός: Το μόριο εξακολουθεί να εκτείνεται προς την αλλοστερική κοιλότητα, όμως η πολικότητα της σερίνης μετατοπίζει το κέντρο βάρους των αλληλεπιδράσεων προς πιο υδρόφιλες περιοχές.

Σε αντίθεση με το Lenvatinib που διαθέτει δις-υποκατεστημένη ουρία, εδώ υφίσταται μια δομή που προσομοιάζει σε αμιδικό δεσμό:

- Δεσμός με Cys1045: Παρατηρείται ένας κρίσιμος δεσμός υδρογόνου μεταξύ του NH του αμιδίου και του Cys1045. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι κομβική, καθώς το Cys1045 βρίσκεται συχνά στην περιοχή ελέγχου της πύλης (gatekeeper) ή κοντά στο hinge loop.
- Απώλεια αλληλεπίδρασης Asp1046: Στο Ανάλογο 2, η γεωμετρία φαίνεται να απομακρύνεται ελαφρώς από το Asp1046 (σε σχέση με το Lenvatinib), κάτι που μπορεί να εξηγεί μια πιθανή διαφοροποίηση στην εκλεκτικότητα. μειώνοντας την υδρόφοβη σταθερότητα.

Η μεγαλύτερη διαφορά με το φάρμακο περιστρέφεται γύρω από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις:

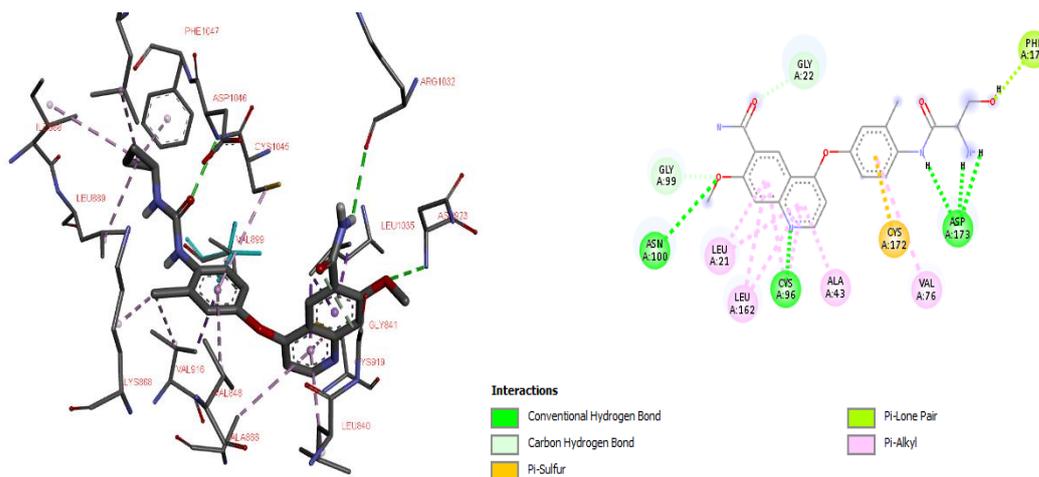
- Μείωση Alkyl επαφών: Ενώ το Lenvatinib είχε 4-5 ισχυρές Alkyl αλληλεπιδράσεις στην περιοχή του κυκλοπροπυλίου, το Ανάλογο 1 εμφανίζει λιγότερες επαφές με τα Leu1049 και Leu889.
- Pi-Alkyl Σταθερότητα: Οι αρωματικοί δακτύλιοι (φαινύλιο και κινολίνη) διατηρούν τις επαφές με Val848, Ala866 και Val916, διασφαλίζοντας ότι η «καρδιά» του φαρμάκου παραμένει σωστά προσδεμένη.

Στο άκρο του μορίου, το τμήμα της L-σερίνης (με την ελεύθερη υδροξυλομάδα και την αμινομάδα) συνιστά το φαρμακοφόρο τμήμα και αναλαμβάνει τον ηγετικό ρόλο στη σταθεροποίηση:

- Δεσμοί Υδρογόνου με Asp173: Παρατηρούμε ένα ισχυρό δίκτυο τριών δεσμών υδρογόνου (Conventional Hydrogen Bonds) μεταξύ του αζώτου και του οξυγόνου του αναλόγου με το κατάλοιπο Asp173. Αυτό αντικαθιστά τη λειτουργία της ουρίας του Lenvatinib, προσφέροντας εξαιρετική πολική σταθερότητα σε αυτή την περιοχή.
- Αλληλεπίδραση με Phe174: Η υδροξυλομάδα της σερίνης σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το Phe174, μια αλληλεπίδραση που δεν υπήρχε στο Lenvatinib. Η περιοχή πρόσδεσης «hinge» και ο κεντρικός σκελετός συγκροτούνται από:

- Cys96 (Hinge): Ο δακτύλιος της κινολίνης διατηρεί τον θεμελιώδη δεσμό υδρογόνου με το Cys96. Αυτός ο δεσμός είναι ο "συνδετικός κρίκος" που κρατά το φάρμακο στην τσέπη σύνδεσης του ATP.
- Asn100: Η μεθοξυ-ομάδα σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το Asn100, ενισχύοντας την πρόσδεση στην πλευρική περιοχή της κοιλότητας. Ακόμα, οι υδρόφοβες Αλληλεπιδράσεις & Pi-Sulfur
- Pi-Sulfur (Cys172): Εδώ παρατηρούμε μια εξειδικευμένη αλληλεπίδραση (πορτοκαλί διακεκομμένη γραμμή) μεταξύ του κεντρικού αρωματικού δακτυλίου και του θείου της Cys172. Αυτό προσδίδει επιπλέον σταθερότητα που είναι χαρακτηριστική για ανάλογα που φέρουν τον συγκεκριμένο linker.
- Pi-Alkyl: Ο δακτύλιος της κινολίνης περιβάλλεται από υδρόφοβα κατάλοιπα όπως Leu21, Leu162 και Ala43, διασφαλίζοντας τη σωστή γεωμετρική τοποθέτηση.

Ως εκ τούτου, το Ανάλογο 2 φαίνεται να «ανταλλάσσει» μέρος της υδρόφοβης σταθερότητας του Lenvatinib με ένα νέο προφίλ δεσμών υδρογόνου (μέσω της σερίνης), γεγονός που το καθιστά πιο υδατοδιαλυτό, αλλά πιθανώς λιγότερο ισχυρό στην αναστολή της DFG-out διαμόρφωσης σε σχέση με το Lenvatinib.



**Εικόνα 18:** Τρισδιάστατη δομή του Αναλόγου 2 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2- Δισδιάστατη δομή του Αναλόγου 2 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

### Ανάλογο 3

Τελευταίο ανάλογο, προς ανάλυση και ερμηνεία, είναι αυτό του 2-μεθοξυ-4-αμινοβενζοϊκού μεθυλεστέρα (ανάλογο 3). Το μόριο αυτό επιστρέφει στη χρήση του κυκλοπροπυλίου (όπως το Lenvatinib), αλλά τροποποιεί τη σύνδεση στην περιοχή της ουρίας/αμιδίου.

Το συγκεκριμένο ανάλογο διατηρεί τον βασικό σκελετό, αλλά η αντικατάσταση της ουρίας από μια αμιδική γέφυρα συνδεδεμένη με τον μεθυλεστέρα αλλάζει τη γεωμετρία της πρόσδεσης:

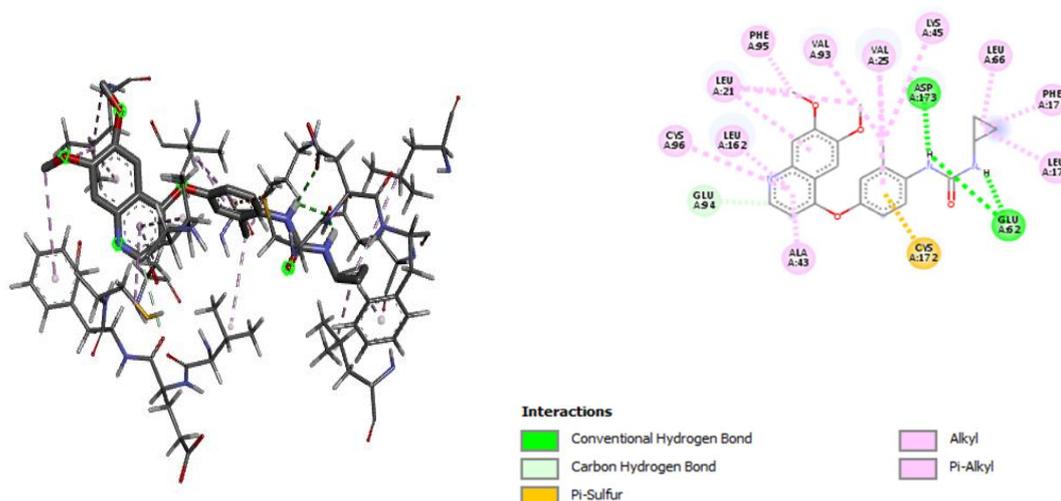
Το μόριο διατηρεί την "επίπεδη" διάταξη που ευνοεί την είσοδο στην ενεργό θέση της κινάσης, ενώ επιστρέφει η υδρόφοβη ομάδα στο άκρο, η οποία προσανατολίζεται προς την τσέπη που οριοθετείται από το Phe174 και το Leu176.

Εδώ παρατηρούμε ένα πολύ συγκεκριμένο μοτίβο δεσμών υδρογόνου που διαφοροποιείται από το Lenvatinib:

- Σύμπλεγμα με Asp173 & Glu62: Το άζωτο του αμιδίου σχηματίζει έναν ισχυρό συμβατικό δεσμό υδρογόνου με το Asp173. Ταυτόχρονα, το καρβονύλιο του εστέρα αλληλεπιδρά μέσω δεσμού υδρογόνου με το Glu62. Αυτό το διπλό "άγκιστρο" προσφέρει σταθερότητα παρόμοια με αυτήν της προλίνης, αλλά με λιγότερη στερεοχημική παρεμπόδιση.

Το ανάλογο αυτό εκμεταλλεύεται στο έπακρο το υδρόφοβο περιβάλλον:

- Pi-Sulfur (Cys172): Όπως και στα προηγούμενα ανάλογα, η αλληλεπίδραση του κεντρικού δακτυλίου με το θείο της Cys172 παραμένει σταθερή.
- Alkyl & Pi-Alkyl: Ο δακτύλιος της κινολίνης και οι μεθοξυ-ομάδες περιβάλλονται από ένα δίκτυο υδρόφοβων επαφών με τα Leu21, Leu162, Ala43 και Val93. Αυτό εξασφαλίζει ότι το μόριο "γεμίζει" την κοιλότητα χωρίς να αφήνει κενά που θα μείωναν τη συγγένεια σύνδεσης.
- Phe95: Παρατηρείται Pi-Alkyl αλληλεπίδραση με το Phe95, η οποία σταθεροποιεί περαιτέρω τον αρωματικό σκελετό.



**Εικόνα 19:** Τρισδιάστατη δομή του Αναλόγου 3 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2- Δισδιάστατη δομή του Αναλόγου 3 και οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της κινάσης VEGFR2.

Η συγγένεια πρόσδεσης ενός μορίου στον βιολογικό στόχο αξιολογείται μέσω της ελεύθερης ενέργειας Gibbs. Θερμοδυναμικά, η ύπαρξη μιας έντονα αρνητικής τιμής

υποδηλώνει τον σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου και, κατά συνέπεια, ισχυρή πρόσδεση.

Η συνολική αυτή ενέργεια δεν είναι μονοσήμαντη, αλλά προκύπτει ως συνισταμένη πολλαπλών φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδέματος και της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, υπολογίζεται ως το άθροισμα των ηλεκτροστατικών δυνάμεων, των αλληλεπιδράσεων Van der Waals, των δεσμών υδρογόνου, καθώς και των εντροπικών μεταβολών που σχετίζονται με τους στρωφικούς βαθμούς ελευθερίας και την επιδιάλυτωση (desolvation effects), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$DG_{\text{binding}} = DG_{\text{vdW}} + DG_{\text{es}} + DG_{\text{hb}} + DG_{\text{tor}} + DG_{\text{desolv}}$$

Βάσει της μοριακής μοντελοποίησης πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των τιμών των ελεύθερων ενεργειών Gibbs (Kcal/mol) κατά την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της VEGFR2

**Lenvatinib (-10,2 kcal/mol):** Παραμένει ένα εξαιρετικά σταθερό μόριο, όπου η ενέργεια πρόσδεσης προέρχεται κυρίως από τη συμπληρωματικότητα σχήματος και τις υδρόφοβες δυνάμεις Van der Waals.

**Ανάλογο 1 (-11,1 kcal/mol):** Η χαμηλότερη τιμή ενέργειας εξηγείται από τη συνέργεια των τριών δεσμών υδρογόνου με την "Pi-Pi Stacked" αλληλεπίδραση (Phe95). Η προλίνη περιορίζει την εντροπία του συστήματος, προσφέροντας ένα πιο "σταθερό" σύμπλοκο.

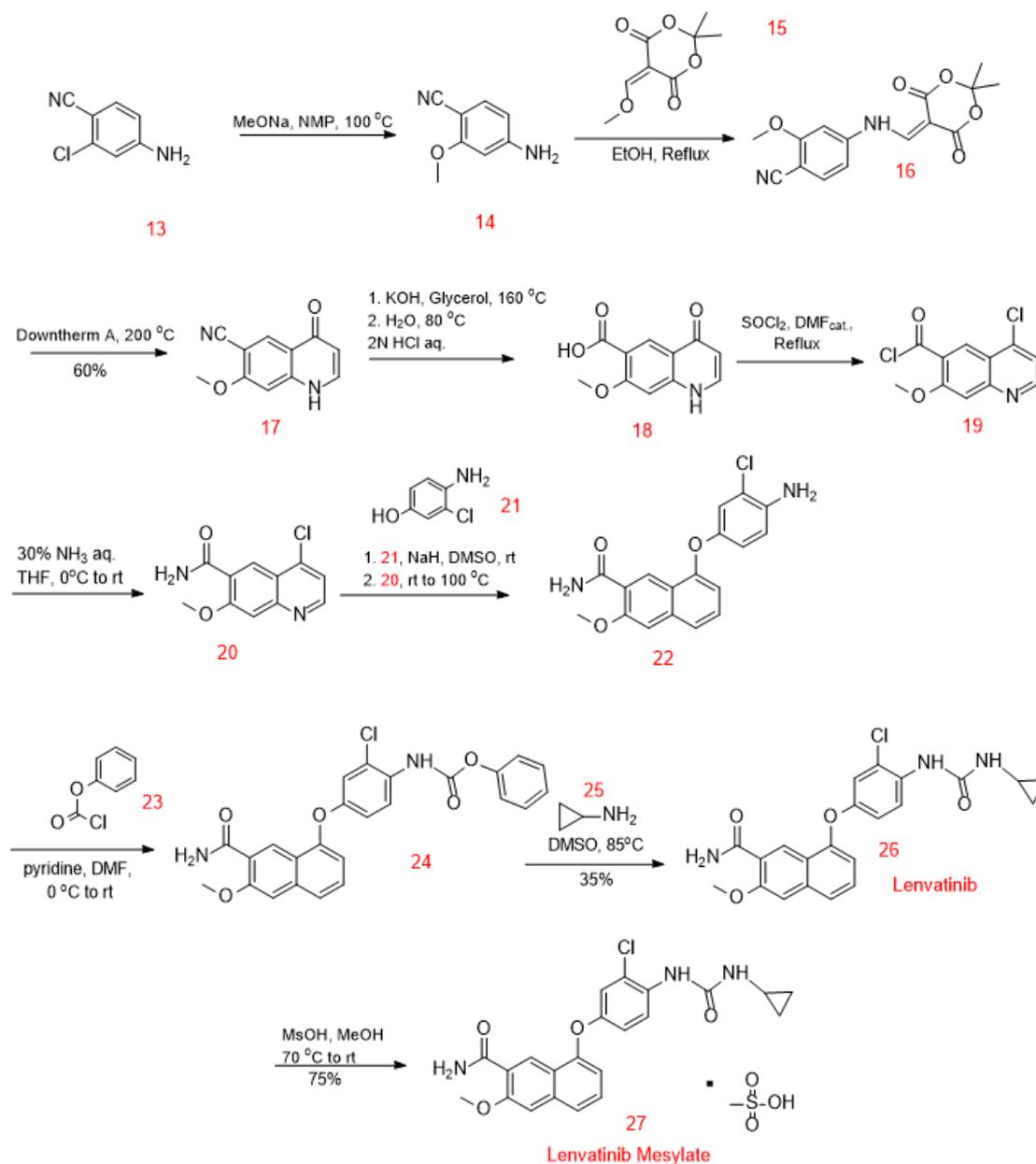
**Ανάλογο 2 (-10,7 kcal/mol):** Παρά την έλλειψη υδρόφοβου δακτυλίου, οι πολλαπλοί δεσμοί υδρογόνου της σερίνης επαρκούν για να ξεπεράσουν σε σταθερότητα το μητρικό Lenvatinib.

**Ανάλογο 3 (-9,8 kcal/mol):** Η μικρή υστέρηση στην ενέργεια υποδηλώνει ότι η αμιδική σύνδεση του μεθυλεστέρα, αν και αποτελεσματική, δεν επιτυγχάνει το ίδιο βάθος αλληλεπίδρασης στην αλλοστερική τσέπη όσο ο δακτύλιος της προλίνης.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν αλλαγές στην πειραματική πορεία σύνθεσης του φαρμακευτικού σκευάσματος, μειώνοντας τα στάδια σύνθεσης και αυξάνοντας την συνολική απόδοση σύνθεσης του φαρμακευτικού αυτού σκευάσματος.

### 3.2 Σύνθεση Lenvatinib

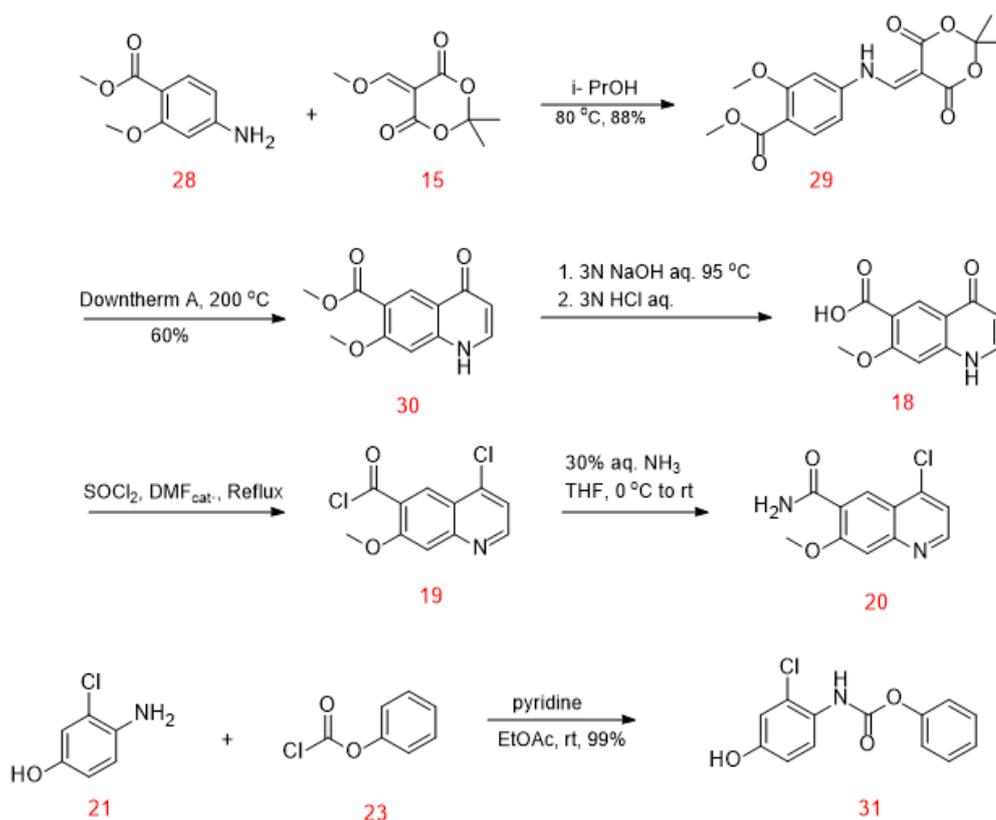
Η σύνθεση του Lenvatinib αποτελείται από πολλά στάδια και περιλαμβάνει την σύζευξη δύο βασικών δομικών μονάδων για τη δημιουργία της τελικής επιθυμητής μοριακής δομής. Οι συνθετικές πορείες μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη βιομηχανική διαδικασία ή την ερευνητική προσέγγιση, αλλά οι κύριες αρχές παραμένουν παρόμοιες. Η πρώτη ολική συνθετική πορεία δημοσιεύθηκε από την εταιρία Eisai R&D Management Company, Ltd. Η εν λόγω συνθετική πορεία αποτελείται συνολικά από 10 στάδια με το πρώτο στάδια να περιλαμβάνει την μετατροπή του εμπορικά διαθέσιμου 4-αμινο-2-χλωρο βενζονιτριλίου σε 4-αμινο-2-μεθοξυβενζονιτριλίο μέσω μιας πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με τη χρήση μεθοξειδίου του νατρίου σε διαλύτη N-μεθυλο-2-πυρρολιδόνη, στους 100 °C. Το προϊόν αυτής της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να συντεθεί η επιθυμητή εναμίνη 16 με τη βοήθεια του εμπορικά διαθέσιμου βινυλο-μεθόξυ παράγωγου του οξέος Meldrum 15 μέσω συζυγούς προσθήκης τύπου Michael. Στη συνέχεια με αύξηση θερμοκρασίας στους 200 °C και τη χρήση του αντιδραστηρίου Downtherm A πραγματοποιήθηκε ενδομοριακή κυκλοποίηση της εναμίνης και μετατροπή αυτής στην αντίστοιχη υποκατεστημένη κινολόνη 17. Έπειτα, ακολούθησε υδρόλυση της νιτριλο ομάδας του ενδιάμεσου στο αντίστοιχο παράγωγο καρβοξυλικού οξέος 18. Η παραγωγή του συγκεκριμένου υποκατεστημένου καρβοξυλικού οξέος πραγματοποιήθηκε μέσω κατεργασίας τριών σταδίων συνολικής απόδοσης 73%. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την προσθήκη της υποκατεστημένης κινολόνης σε διάλυμα καυστικού καλίου σε γλυκερόλη και θέρμανση στους 160 °C προσθέτοντας νερό και εφαρμόζοντας θέρμανση στους 80°C. Το επιθυμητό παράγωγο καρβοξυλικού οξέος απομονώθηκε μετά από κατεργασία με υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου 2N. Έπειτα, με τη χρήση θειονυλοχλωριδίου ως αντιδραστηρίου και παράλληλα ως διαλύτη καθώς επίσης και καταλυτικής ποσότητας διμεθυλοφορμαμιδίου, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη μετατροπή της υποκατεστημένης κινολόνης στην αντίστοιχη 4-χλωροκινολίνη και του καρβοξυλικού οξέος στο αντίστοιχο χλωρίδιο του 19. Με κατεργασία με διάλυμα υδατικής αμμωνίας 30% σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο και αυξάνοντας σταδιακά της θερμοκρασίας από τους 0 °C σε θερμοκρασία δωματίου απομονώθηκε το επιθυμητό υποκατεστημένο αμίδιο με συνολική απόδοση για τα δύο τελευταία στάδια είναι 63%. Στη συνέχεια, με τη χρήση της εμπορικά διαθέσιμης 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης και του αμιδίου που παράχθηκε στο προηγούμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του διάρυλο αιθέρα μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης χρησιμοποιώντας υδρίδιο του νατρίου σε διαλύτη διμέθυλοσουλφοξείδιο σε θερμοκρασία 100°C με την απόδοση να ανέρχεται σε 84%. Η ενδιάμεση ένωση απομονώθηκε μετά από επεξεργασία του διάρυλο αιθέρα 22 παρουσία χλωρομεθανικού φαινυλεστέρα, πυριδίνης και διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο με σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας από 0°C σε θερμοκρασία δωματίου. Η τελική δραστική ένωση (Lenvatinib) παραλήφθηκε μετά από σύζευξη της ενδιάμεσης ένωσης και της εμπορικά διαθέσιμης κυκλοπροπυλαμίνης σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο και θερμοκρασία 85°C, όπου τελικά απομονώθηκε με τη μορφή άλατος 27 έπειτα από επεξεργασία με μεθανοσουλφονικό οξύ και μεθανόλη. [52]

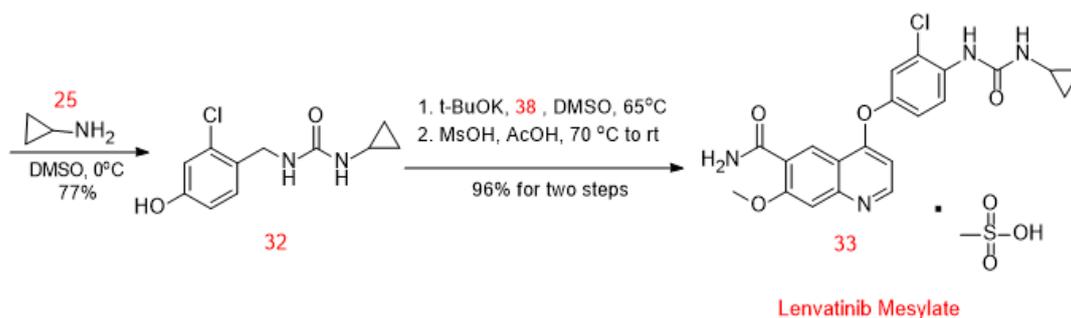


**Σχήμα 3:** Πρώτη συνθετική πορεία του Lenvatinib από την Esai

Τρία χρόνια αργότερα δόθηκε μια δεύτερη εναλλακτική συνθετική πορεία με σκοπό τη βελτιστοποίηση αυτής μειώνοντας τα στάδια από 10 σε 8 και κατά συνέπεια την αύξηση της συνολικής απόδοσης. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός του ενδιάμεσου της εναμίνης μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου 2-μεθοξυ-4-αμινο βενζοϊκού μεθυλεστέρα και του επίσης εμπορικά διαθέσιμου βινυλο-μεθοξυ παραγώγου του οξέος Meldrum σε διαλύτη 2-προπανόλη και εφαρμόζοντας θέρμανση έως ότου η θερμοκρασία ανέλθει στους 80 °C. Έπειτα, το ενδιάμεσο της εναμίνης υπέστη ενδομοριακή κυκλοποίηση προκειμένου να παραχθεί η επιθυμητή υποκατεστημένη κινολόνη με τη βοήθεια του διαλύτη Downtherm A σε θερμοκρασία 200°C. Ακολούθως, η κινολόνη υδrolύθηκε σε βασικές συνθήκες και μετετράπη στο

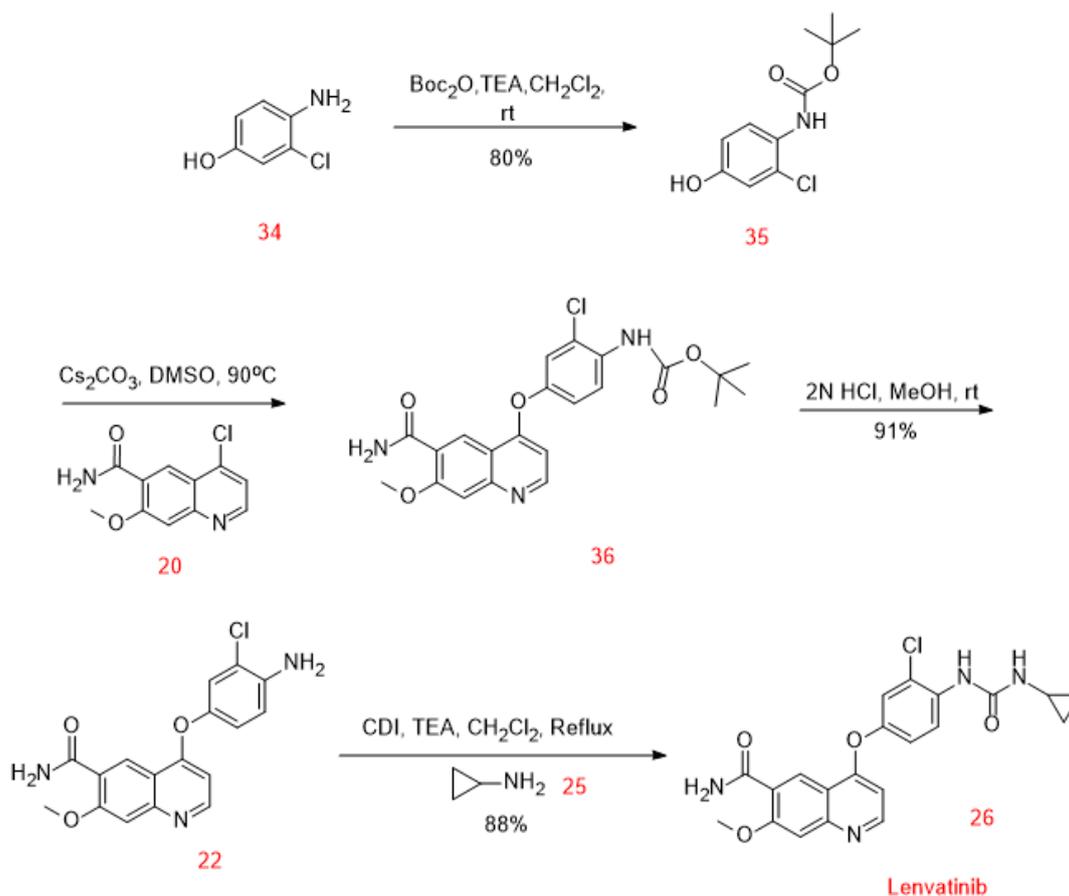
αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ. Το παράγωγο αυτό της κινολόνης μετετράπη, επίσης, στην αντίστοιχη 4-χλωροκινολίνη και παράλληλα το καρβοξυλικό οξύ μετετράπη στο αντίστοιχο χλωρίδιο αυτού. Για τη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο και παράλληλα ως διαλύτης το θειονυλοχλωρίδιο σε συνδυασμό με καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμίδιου. Ύστερα από κατεργασία με διάλυμα υδατικής αμμωνίας 30% σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο και με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 0°C σε θερμοκρασία δωματίου απομονώθηκε το αντίστοιχο αμίδιο αυτής. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η μετατροπή της εμπορικά διαθέσιμης 4-αμινο-3-χλωρο-φαινόλη μετατρέπεται ποσοτικά στον αντίστοιχο καρβαμιδικό φαινυλεστέρα, μέσω της χρήσης χλωρομυρμηκικού φαινυλεστέρα. Το παράγωγο του εστέρα μετατράπηκε στην αντίστοιχη φαινυλο ουρία παρουσία της εμπορικά διαθέσιμης κυκλοπροπυλαμίνης σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο σε θερμοκρασία 0°C. Το τελικό προϊόν απομονώθηκε ύστερα από τη συνένωση της υποκατεστημένης 4-χλωροκινολίνης και της φαινυλο ουρίας ακολουθούμενη από κατεργασία με μεθανοσουλφονικό οξύ και οξικό οξύ, επιτυγχάνοντας έτσι την παραγωγή του επιθυμητού άλατος του Lenvatinib σε απόδοση 96%. [50]





**Σχήμα 4:** Βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία του Lenvatinib από την εταιρία Esai

Λίγο αργότερα προτάθηκε από την κινεζική επιστημονική κοινότητα μια εναλλακτική προσέγγιση όσον αφορά την σύνθεση του Lenvatinib αρχίζοντας με τη N-Boc προστασία της εμπορικά διαθέσιμης 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης με χρήση Boc ανυδρίτη σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο σε βασικές συνθήκες. Στη συνέχεια, μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ της 4-χλωροκινολίνης και της N-Boc προστατευμένης 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού διαρυλο αιθέρα παρουσία ανθρακικού καυσίου σε βασικές συνθήκες. Τέλος, έγινε απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας σε όξινες συνθήκες, όπου προέκυψε η υποκατεστημένη ανιλίνη, η οποία στη συνέχεια συζεύχθηκε με την εμπορικά διαθέσιμη κυκλοπροπυλαμίνη 25 σχηματίζοντας την επιθυμητή τελική ένωση του Lenvatinib με απόδοση 88%. [51]



**Σχήμα 5:** Συνθετική πορεία του Lenvatinib η οποία έχει προταθεί στην κατοχυρωμένη πατέντα του 2017.

### 3.3 Ολική συνθετική πορεία νέων αναλόγων του Lenvatinib

Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας, η σύνθεση των νέων αναλόγων του Lenvatinib επιτεύχθηκε μέσω της συγχώνευσης δύο συνθετικών στρατηγικών. Η αρχική σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξικινολίνο-6-καρβοξαμιδίου βασίστηκε στην προσέγγιση που περιγράφηκε από την εταιρία Esai το 2007. Στη συνέχεια, τα επόμενα βήματα για την παρασκευή των επιθυμητών αναλόγων ακολούθησαν το συνθετικό μονοπάτι που κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 2017. Κατά τη διάρκεια και των δύο συνθετικών διαδρομών, πραγματοποιήθηκαν παρεμβάσεις σε επιμέρους στάδια της συνολικής διαδικασίας σύνθεσης, με διττό σκοπό: αφενός τη βελτίωση της συνολικής απόδοσης της σύνθεσης του φαρμάκου, και αφετέρου τη μείωση του κόστους παραγωγής.

Η συνολική σύνθεση των νέων αναλόγων του Lenvatinib περιλαμβάνει εννέα βήματα, όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα. Στο πρώτο βήμα, συντέθηκε η ένωση (εναμίνη), η οποία προέκυψε από την αντίδραση του βινυλο-αιθοξυ παράγωγου του οξέος Meldrum με τον μεθυλεστέρα του 2-μεθοξυ-4-αμινοβενζοϊκού οξέος μέσω αντίδρασης συζυγούς προσθήκης τύπου Michael σε θερμαινόμενη 1-προπανόλη.

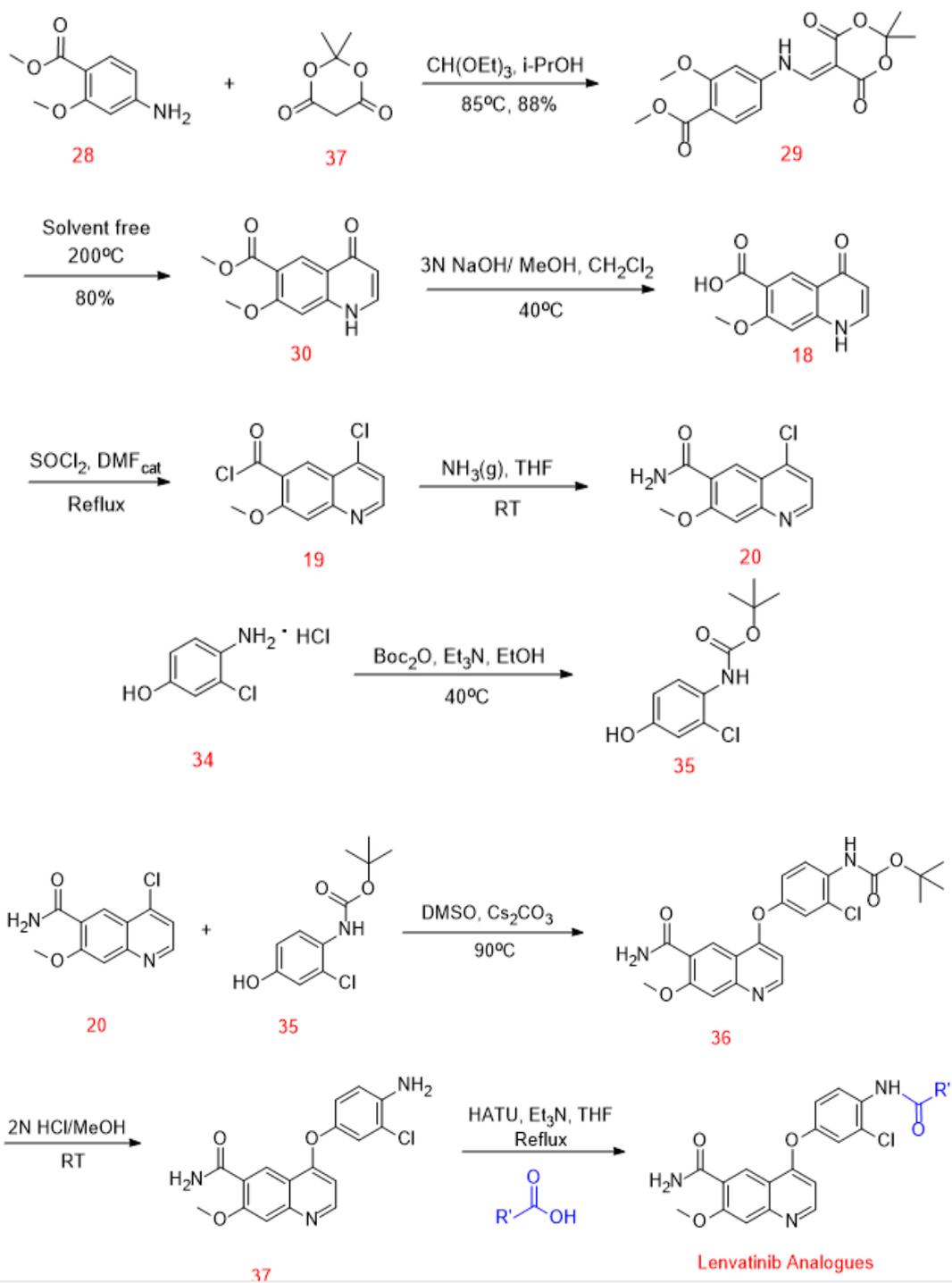
Έπειτα, η ενδιάμεση ένωση υπέστη θερμική αποικοδόμηση στους 200°C χωρίς τη χρήση διαλύτη, οδηγώντας στον σχηματισμό της επιθυμητής υποκατεστημένης κινολόνης μέσω ενδομοριακής ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.

Σε αυτό το σημείο πραγματοποιήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση από αυτή της εταιρίας επιλέγοντας να πραγματοποιηθεί η αντίδραση χωρίς διαλύτη, γεγονός που οδήγησε σε καλύτερες αποδόσεις και μικρότερο χρόνο αντίδρασης, όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα σε επόμενο κεφάλαιο. Στη συνέχεια, ο μεθυλεστέρας της ένωσης υδρολύθηκε βάσει μη υδατικής βασικής μεθόδου, προκειμένου να προκύψει το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ — μια διαδικασία που έχει βελτιστοποιηθεί από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου τα τελευταία χρόνια.

Το οξύ αυτό αντέδρασε με φρέσκο αποσταγμένο θειονυλοχλωρίδιο και καταλυτική ποσότητα άνυδρου διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), οδηγώντας αφενός στη μετατροπή του καρβοξυλικού οξέος σε χλωρίδιο οξέος, και αφετέρου στη χλωρίωση της κινολόνης. Ακολούθησε αντίδραση υποκατάστασης με χρήση αέριας αμμωνίας σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF) και θερμοκρασία περιβάλλοντος, σχηματίζοντας το ζητούμενο αμίδιο.

Παράλληλα, έγινε προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, μέσω αντίδρασης με Boc-ανυδρίτη σε θερμαινόμενη αιθανόλη (40 °C), με στόχο την αύξηση της απόδοσης. Ο επιθυμητός διάλυτο αιθέρας παράχθηκε στη συνέχεια μέσω πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης μεταξύ της Boc-προστατευμένης 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης και του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολίνιο-6-καρβοξαμίδιου, σε βασικές συνθήκες με ανθρακικό καΐσιο και άνυδρο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ως διαλύτη.

Τέλος, η απομάκρυνση της Boc προστατευτικής ομάδας πραγματοποιήθηκε σε όξινο περιβάλλον, οδηγώντας στον σχηματισμό της ανιλίνης. Η ένωση αυτή εν συνεχεία αντέδρασε με τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα, αξιοποιώντας επιλεγμένα αντιδραστήρια σύζευξης, με σκοπό την παρασκευή των στοχευμένων τελικών παραγώγων.



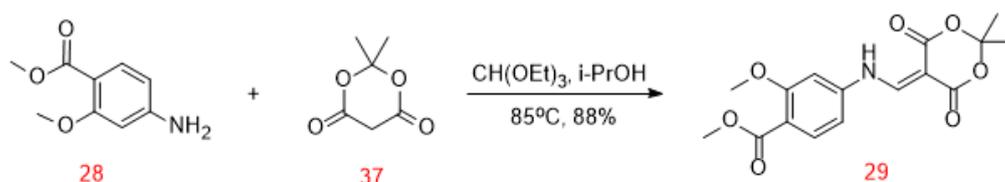
Σχήμα 6: Ολική συνθετική πορεία αναλόγων 1 και 2 του Lenvatinib.

### 3.4 Σύνθεση νέων αναλόγων του Lenvatinib

#### 3.4.1 Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)-2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 29

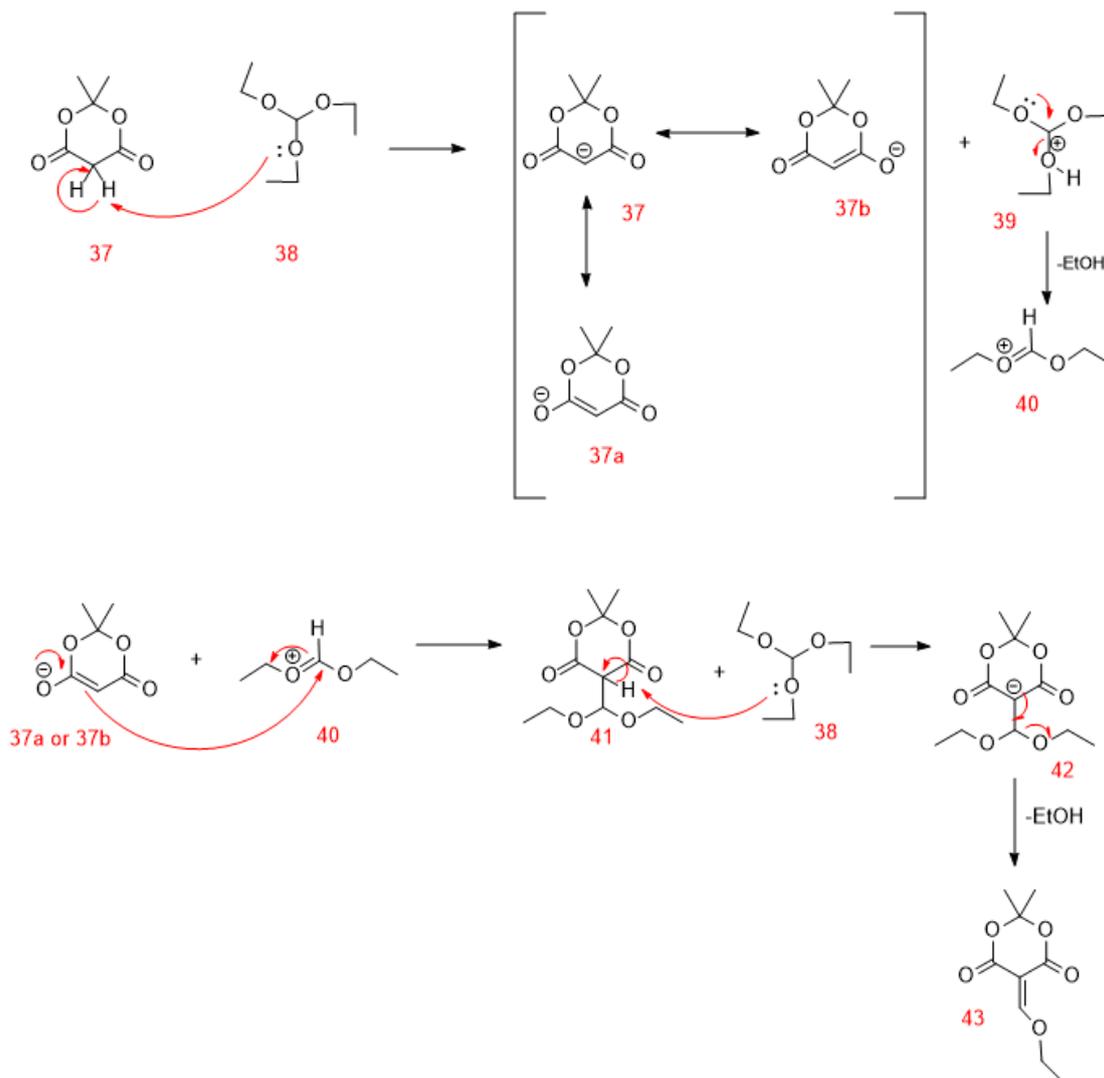
Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 4-(((2,2-διμεθυλο 4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 29

Για τον σχηματισμό της επιθυμητής εναμίνης 29 πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μεταξύ του εμπορικά διαθέσιμου 4-αμινο-2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα 28, του οξέος Meldrum 37 και του ορθοφορμικού τριαιθυλίου. Αρχικά, σχηματίστηκε το βινυλο-αιθοξύ παράγωγο του οξέος Meldrum, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε προσβολή του ενδιάμεσου αυτού από τον 4-αμινο-2-μεθοξυβενζοϊκό μεθυλεστέρα 28 ακολουθώντας τον μηχανισμό συζυγούς προσθήκης τύπου Michael σε διαλύτη 2-προπανόλη και θερμοκρασία 85°C. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος με υψηλή απόδοση, αγγίζοντας το 88%.



Σχήμα 7 : Αντίδραση σχηματισμού της εναμίνης 29

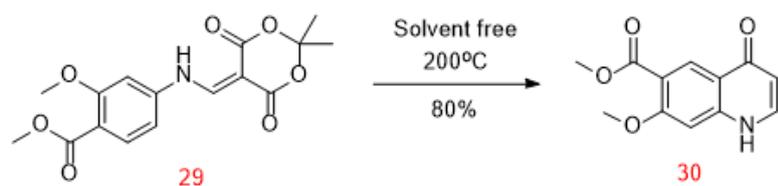
Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση είναι απαραίτητη η χρήση του μεθανικού τριαιθυλεστέρα. Όπως φαίνεται και στο σχήμα, με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται απόσπαση ενός α υδρογόνου από το οξύ Meldrum 37 με σκοπό τον σχηματισμό του ενολικού ιόντος (37a ή 37b), καθώς επίσης και του ενδιάμεσου ιόντος οξοκαρβενίου 40, το οποίο προκύπτει με απομάκρυνση ενός μορίου αιθανόλης. Το ενολικό ιόν με την ιδιότητα του πυρηνόφιλου πλέον προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του ιόντος του οξοκαρβενίου 40 οδηγώντας στον σχηματισμό του διαιθοξυ παραγώγου του οξέος Meldrum 42. Εν συνεχεία, επαναλαμβάνεται η απόσπαση ενός α υδρογόνου από το ενδιάμεσο προς σχηματισμό του βινυλο αιθοξυ του οξέος Meldrum 43. Ο μηχανισμός του σταδίου αυτού ολοκληρώνεται κατά την σύνθεση της επιθυμητής υποκατεστημένης εναμίνης 29 μέσω μιας αντίδρασης συζυγούς προσθήκης τύπου Michael μεταξύ του 4-αμινο-2-μεθοξυ-βενζοϊκού μεθυλεστέρα 28 και του βινυλο-αιθοξυ παραγώγου του οξέος Meldrum 43 αποβάλλοντας ένα μόριο αιθανόλης.



Σχήμα 8: Μηχανισμός σχηματισμού εναμίνης 29

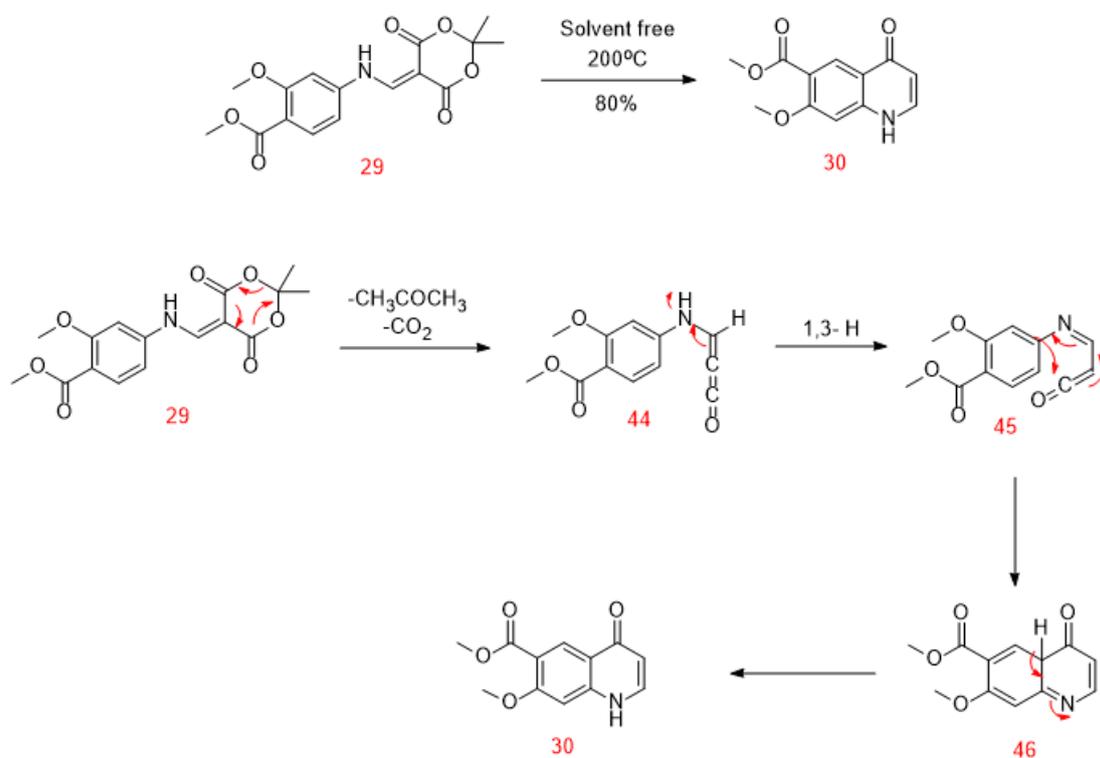
### 3.4.2 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4 διυδροκινολινο-6 καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30

Ο υποκατεστημένος κυκλικός εστέρας της εναμίνης 29 υπόκειται σε θερμική διάσπαση στους 200 °C. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, αποβάλλονται ακετόνη και διοξείδιο του άνθρακα, οδηγώντας στον σχηματισμό της επιθυμητής ενδιάμεσης υποκατεστημένης κινολόνης 30, μέσω μηχανισμού ενδομοριακής ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Ενώ η πειραματική πορεία που προτείνεται από την εταιρία περιλαμβάνει τη διεξαγωγή της αντίδρασης στους 200 °C με τη χρήση DOWTHERM A ως διαλύτη, στο ερευνητικό μας εργαστήριο εφαρμόσαμε μια διαφορετική προσέγγιση. Πραγματοποιήσαμε την αντίδραση στην ίδια θερμοκρασία, αλλά χωρίς την προσθήκη διαλύτη, γεγονός που οδήγησε στην παραλαβή του προϊόντος σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με απόδοση 80%.



**Σχήμα 9:** Στάδιο σύνθεσης κινολόνης

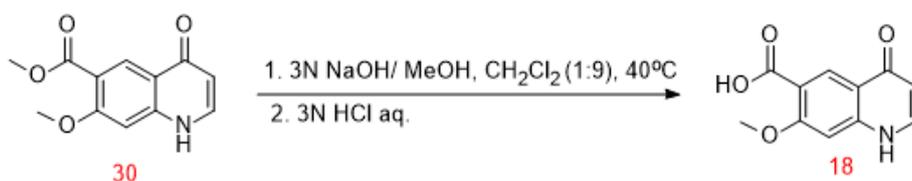
Η αντίδραση ακολουθεί έναν μηχανισμό που αρχίζει με τη θερμική διάσπαση του κυκλικού εστέρα της υποκατεστημένης εναμίνης 29, από όπου αποβάλλονται ένα μόριο ακετόνης και ένα διοξειδίου του άνθρακα. Στη συνέχεια, η προκύπτουσα μεθυλενοκετένη 44 υφίσταται 1,3 σιγματροπική μετάθεση και μετατρέπεται στην υποκατεστημένη ιμινοκετένη 45. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τον σχηματισμό της επιθυμητής υποκατεστημένης κινολόνης 30, μέσω ενδομοριακής ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.



**Σχήμα 10 :** Μηχανισμός σχηματισμού κινολόνης 30

### 3.4.3 Αντίδραση βασικής υδρόλυσης του εστέρα 30 προς το καρβοξυλικό οξύ 18 σε μη υδατικό περιβάλλον

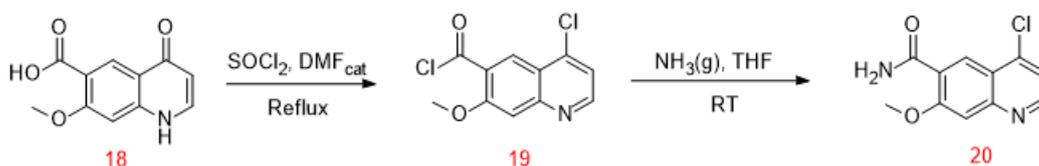
Μετά τον σχηματισμό του υποκατεστημένου εστέρα 30, ακολουθεί υδρόλυση προς το αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ 18, με σκοπό τη μετέπειτα δημιουργία του υποκατεστημένου αμιδίου 20. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε σε βασικό, μη υδατικό περιβάλλον, χρησιμοποιώντας μεθανολικό διάλυμα 3N υδροξειδίου του νατρίου σε αναλογία  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  9:1, με τελική συγκέντρωση 0.3 N NaOH. Η αντίδραση διεξήχθη με ήπια θέρμανση στους  $40^\circ\text{C}$ , αποδίδοντας το προϊόν σχεδόν ποσοτικά και σε σύντομο χρόνο. Η μέθοδος αυτή, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριό μας, υπερτερεί της κλασικής εταιρικής μεθόδου λόγω των ιδιαίτερα ήπιων συνθηκών (ήπια θέρμανση, μικρή περίσσεια βάσης) και της εύκολης, ποσοτικής παραλαβής του προϊόντος. Μετά την αντίδραση, το προϊόν (που βρίσκεται ως άλας νατρίου) οξινίζεται σε  $\text{pH} \sim 4$  με 3 N υδατικό διάλυμα HCl για να μετατραπεί στο αντίστοιχο οξύ.



Σχήμα 11: Υδρόλυση του εστέρα 30 σε βασικές συνθήκες προς καρβοξυλικό οξύ 18

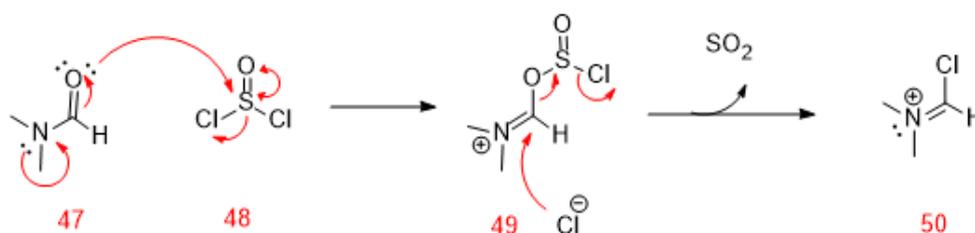
### 3.4.4 Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 20

Η σύνθεση του επιθυμητού αμιδίου 20 πραγματοποιείται σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά τον σχηματισμό του χλωριδίου του αντίστοιχου καρβοξυλικού οξέος 18 και, ταυτόχρονα, τη μετατροπή της κινολόνης 30 στην αντίστοιχη 4-χλωροκινολίνη. Η αντίδραση αυτή διεξάγεται υπό βρασμό, χρησιμοποιώντας θειονυλοχλωρίδιο και καταλυτική ποσότητα διμεθυλοφορμαμίδιου ως διαλύτη για δύο ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, η περίσσεια ποσότητα θειονυλοχλωριδίου απομακρύνεται. Στη συνέχεια, το επιθυμητό υποκατεστημένο αμίδιο 19 παράγεται μέσω πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης, όπου το χλωρίδιο του καρβοξυλικού οξέος αντιδρά με αέρια αμμωνία. Η συνδυασμένη απόδοση και των δύο σταδίων «αγγίζει» το 88%.



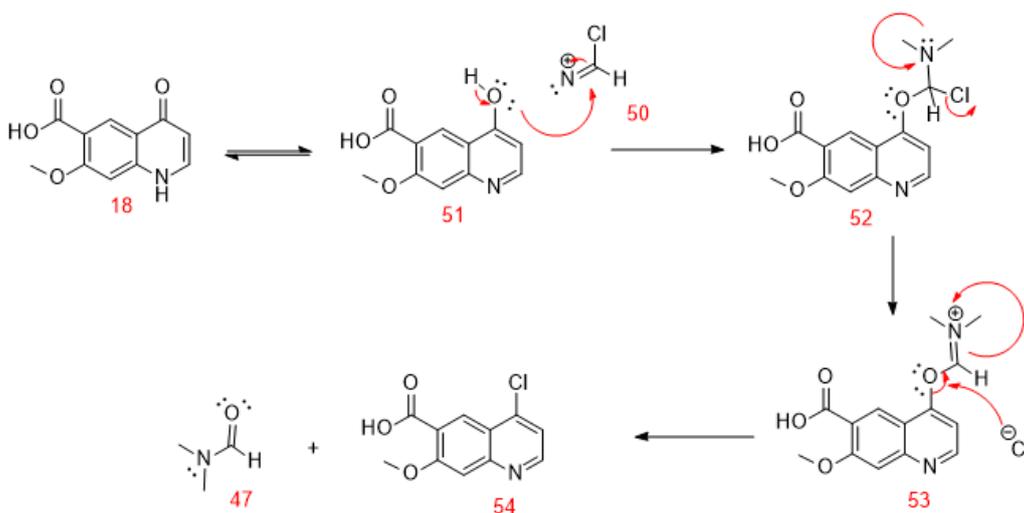
Σχήμα 12: Σχηματισμός ακυλοχλωριδίου και του αντίστοιχου αμιδίου του

Η μικρή ποσότητα διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF) καταλύει τις αντιδράσεις σχηματισμού ακυλο-χλωριδίων. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την αντίδραση του DMF με το θειονυλοχλωρίδιο, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του αντιδραστήριου Vilsmeier-Haack, με παράλληλη απομάκρυνση διοξειδίου του θείου και υδροχλωρίου. Το αντιδραστήριο Vilsmeier-Haack, ένα άλας αποτελούμενο από ανιόν χλωρίου και κατιόν N,N-διμεθυλιμίνιου, χρησιμεύει ως ο παράγοντας χλωρίωσης στην αντίδραση.



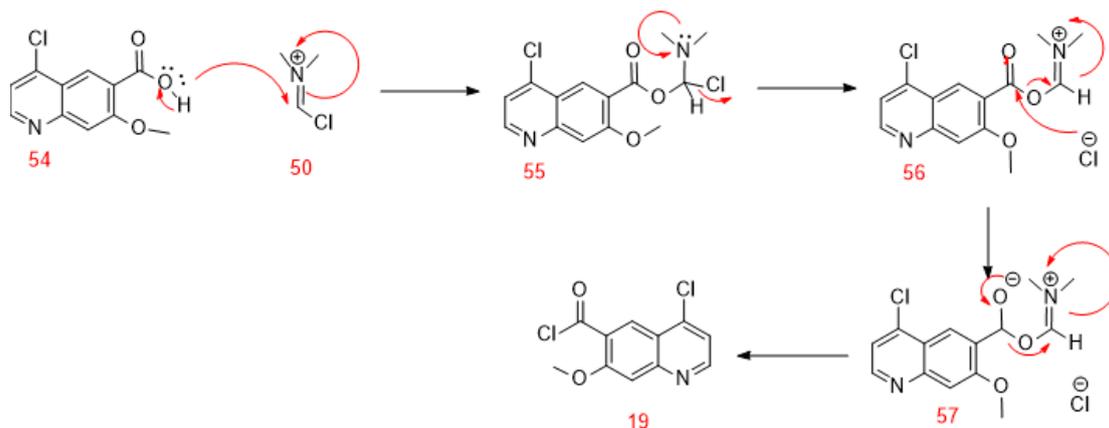
**Σχήμα 13:** Σχηματισμός αντιδραστήριου Vilsmeier-Haack

Η αντίδραση μετατροπής της υποκατεστημένης 4-κινολόνης στην αντίστοιχη 4-χλωροκινολίνη και η αντίδραση σχηματισμού του ακυλο-χλωριδίου λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα. Ωστόσο, για καλύτερη κατανόηση, θα αναλυθούν ως δύο ξεχωριστές διαδικασίες. Ο μηχανισμός της αντίδρασης ξεκινά με το οξυγόνο της 4-υδροξυκινολίνης, η οποία αποτελεί την ταυτομερή μορφή της 4-κινολόνης, να προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του κατιόντος ιμινίου. Αυτή η προσβολή έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ενδιάμεσης ένωσης 53 και την απομάκρυνση ενός μορίου υδροχλωρίου. Στο τελικό στάδιο, η επιθυμητή υποκατεστημένη 4-χλωροκινολίνη σχηματίζεται μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης, η οποία λαμβάνει χώρα μεταξύ της ενδιάμεσης ένωσης 53 και ενός ανιόντος χλωρίου, με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου διμεθυλοφορμαμίδιου.



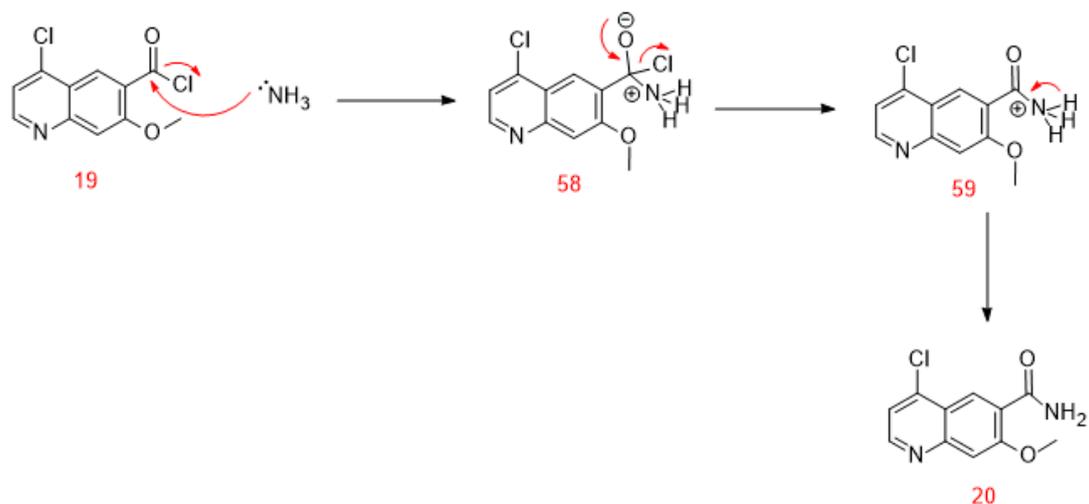
**Σχήμα 14:** Μηχανισμός σχηματισμού της 4-χλωροκινολίνης.

Αρχικά, για τον σχηματισμού του ακυλοχλωριδίου προηγείται η προσβολή του ηλεκτρονιόφιλου άνθρακα του κατιόντος μινίου από το οξυγόνο του καρβοξυλικού οξέος 18, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ενδιάμεσης ένωσης 53 και την αποβολή υδροχλωρίου. Στη συνέχεια, το επιθυμητό ακυλοχλωρίδιο παράγεται μέσω μηχανισμού ακυλο-υποκατάστασης, κατά τον οποίο ένα ιόν χλωρίου (ως πυρηνόφιλο) προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο καρβονυλικό άνθρακα της ενδιάμεσης ένωσης 53. Η διαδικασία αυτή οδηγεί αρχικά στο τετραεδρικό ενδιάμεσο 56 και τελικά στο ακυλοχλωρίδιο, μετά την απομάκρυνση ενός μορίου διμεθυλοφορμαμίδιου.



**Σχήμα 15:** Μηχανισμός σχηματισμού του ακυλοχλωριδίου

Ο σχηματισμός του αμιδίου 20 πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης ακυλο-υποκατάστασης, κατά την οποία η αμμωνία αντιδρά με το ακυλο-χλωρίδιο. Αναλυτικότερα, η αμμωνία, λειτουργώντας ως πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου του ακυλο-χλωριδίου, σχηματίζοντας αρχικά το τετραεδρικό ενδιάμεσο 58. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την αποβολή ενός μορίου υδροχλωρίου, οδηγώντας στην παραγωγή του τελικού προϊόντος, του αμιδίου 20.



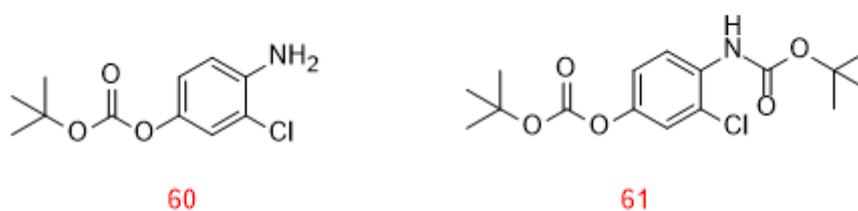
Σχήμα 16: Μηχανισμός σχηματισμός του αμιδίου 20

### 3.4.5 Σύνθεση του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλεστέρα, ένωση 35

Η παραγωγή του υποκατεστημένου διαρυλοαιθέρα 36 γίνεται με μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης ανάμεσα στην υποκατεστημένη 4-χλωροκινολίνη και την 4-υδροξυ-2-χλωραμίνη (εμπορικά διαθέσιμη ως υδροχλωρικό άλας). Για να αποτρέψουμε τη δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, η αμινομάδα της υποκατεστημένης αμίνης προηγείται μια αντίδραση προστασίας, η οποία πραγματοποιείται με τη χρήση Boc ανυδρίτη.

Για την προστασία της αμινομάδας με Boc ανυδρίτη, εφαρμόστηκε αρχικά η μέθοδος που κατοχυρώθηκε το 2017. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση είχε δύο προβλήματα:

- Η αντίδραση ήταν αργή, με σημαντική ποσότητα της αρχικής ένωσης να παραμένει αμετάβλητη ακόμα και μετά από τέσσερις ώρες.
- Δεν ήταν εκλεκτική, καθώς η υδροξυλομάδα προστατευόταν, επίσης, σε μεγάλο βαθμό, δημιουργώντας ανεπιθύμητα παραπροϊόντα.



Σχήμα 17: Δομή παραπροϊόντων Boc προστασίας

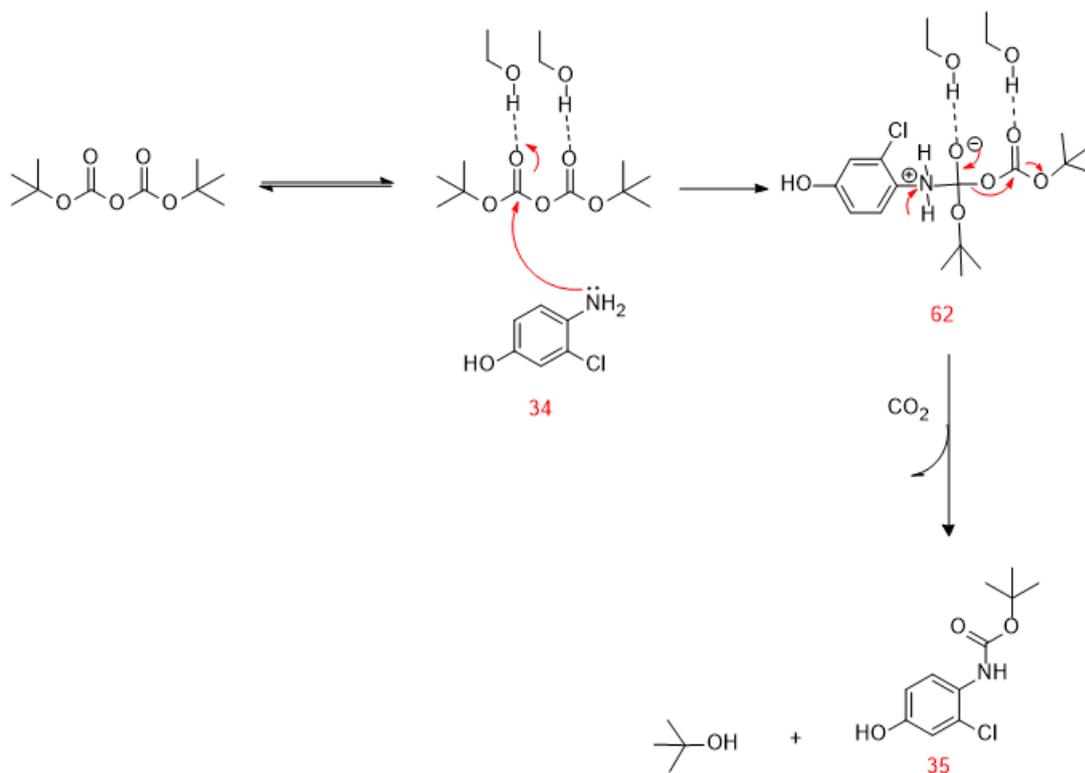
Λόγω αυτών των ζητημάτων, αποφασίσαμε να τροποποιήσουμε τις συνθήκες της αντίδρασης, πειραματιζόμενοι με τον διαλύτη, τη βάση, τη θερμοκρασία και την ποσότητα των αντιδραστηρίων, με σκοπό να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες για την εκλεκτική προστασία της αμινομάδας.

Η ποσότητα της βάσης που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα ήταν τουλάχιστον ίση με την ποσότητα του υδροχλωρικού άλατος της 4-υδροξυ-2-γλωραμίνη, ώστε να μετατραπεί πρώτα το άλας στην ελεύθερη αμίνη. Η αντικατάσταση του μη πρωτικού διαλύτη με έναν πρωτικό, σε συνδυασμό με ήπια θέρμανση (αυστηρά στους 40°C), οδήγησε σε εκλεκτική προστασία της αμινομάδας σε μικρότερο χρονικό διάστημα από την αρχική κατοχύρωση. Πειράματα με καταλυτική ποσότητα γουανιδίνης, καθώς επίσης και με ουρία και θειουρία, δεν έδειξαν καμία ουσιαστική βελτίωση στην παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος.

Διαλύτης	Βάση	Boc ανυδρίτης	Καταλύτης	Απόδοση
Αιθανόλη	1.1 eq Et <sub>3</sub> N	1.2 eq	-	95%
Αιθανόλη	1.1 eq Et <sub>3</sub> N	1.2 eq	Γουανιδίνη	95%
Αιθανόλη	1.1 eq Et <sub>3</sub> N	1.2 eq	Ουρία	95%
Αιθανόλη	1.1 eq Et <sub>3</sub> N	1.2 eq	Θειουρία	95%

**Πίνακας 1:** Πειραματικές συνθήκες για την N-Boc προστασία της 4-αμινο-3-γλωροφαινόλης

Έπειτα, λοιπόν, από πολλές προσπάθειες οδηγηθήκαμε στην εξής επιλογή συνθηκών προκειμένου να επιτευχθεί η εκλεκτική Boc προστασία της ένωσης 34 1 ώρα σε διαλύτη αιθανόλη ή 1-προπανόλη ή 2-προπανόλη με θερμοκρασία αυστηρά 40°C και την αναλογία των ενώσεων που αντιδρούν να είναι 1 αμίνη : 1.2 Boc ανυδρίτης : 1.1 τριαιθυλαμίνη. Με την διατήρηση αυτών των συνθηκών η απόδοση της αντίδρασης ανέρχεται στο 95% αποφεύγοντας την παραγωγή των προϊόντων 60 και 61.



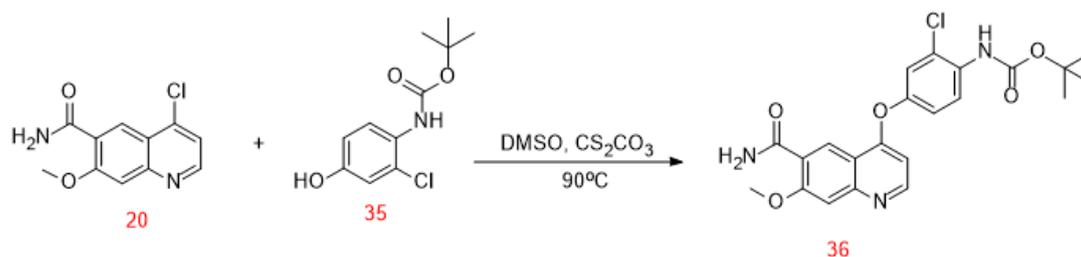
**Σχήμα 18:** Μηχανισμός N-Boc προστασίας

Ο μηχανισμός της προστασίας, όπως απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα, βασίζεται στην ενίσχυση του ηλεκτρονιόφιλου χαρακτήρα του Boc ανυδρίτη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των καρβονυλικών οξυγόνων του ανυδρίτη και της αιθανόλης. Ως αποτέλεσμα, η αμινομάδα προσβάλλει ευκολότερα τον άνθρακα του καρβονυλίου. Στη συνέχεια, η απομάκρυνση διοξειδίου του άνθρακα και tert-βουτυλο-αλκοόλης οδηγεί στην παραγωγή του N-Boc προστατευμένου προϊόντος. [47]

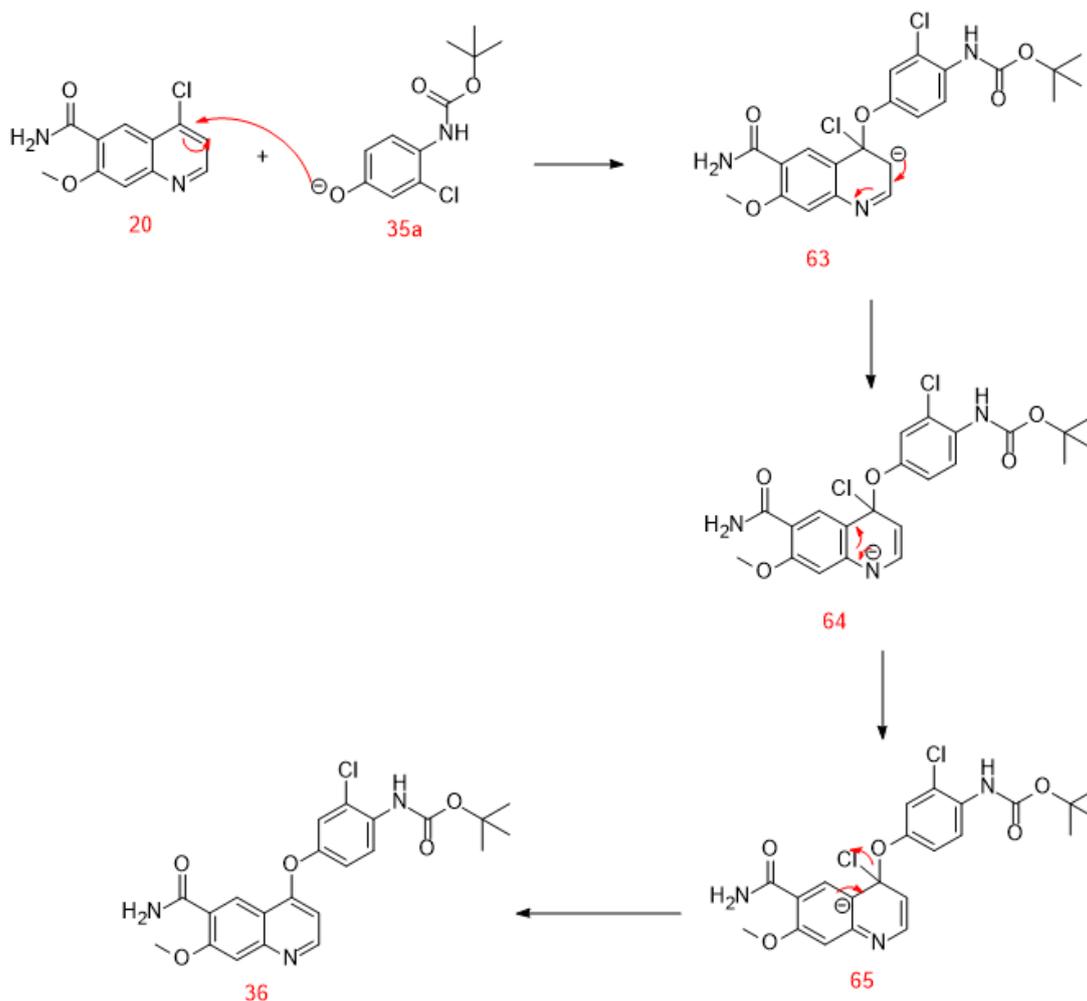
### 3.4.6 Σύνθεση του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξύ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 36

Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξύ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικού tert βουτυλ εστέρα, ένωση 36

Για τον σχηματισμό του διαρυλοαιθέρα 36 πραγματοποιείται μια αντίδραση σύζευξης μεταξύ της N-Boc προστατευμένης 4-αμινο-3χλωρο-φαινόλης 35 και του υποκατεστημένου αμιδίου 20. Πρόκειται για μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, η οποία πραγματοποιείται σε βασικές συνθήκες με τη χρήση ανθρακικού καισίου (C<sub>s</sub>CO<sub>3</sub>) και διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε άνυδρες συνθήκες και θερμοκρασία 90°C.



**Σχήμα 19:** Σχηματισμός του διαρυλοαιθέρα 36 μέσω πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης

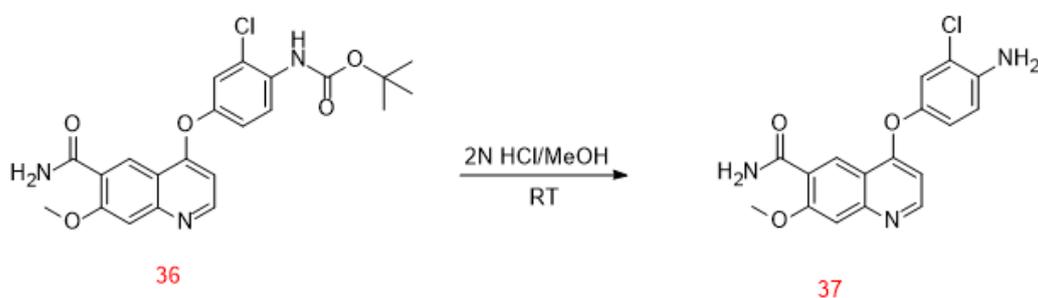


**Σχήμα 20:** Μηχανισμός σχηματισμού της N-Boc προστατευμένης ένωσης 36

### 3.4.7 Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκυκλολινο-6-καρβοξαμι-δίου, ένωση 37

Αντίδραση και μηχανισμός σύνθεσης του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκυκλολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 37

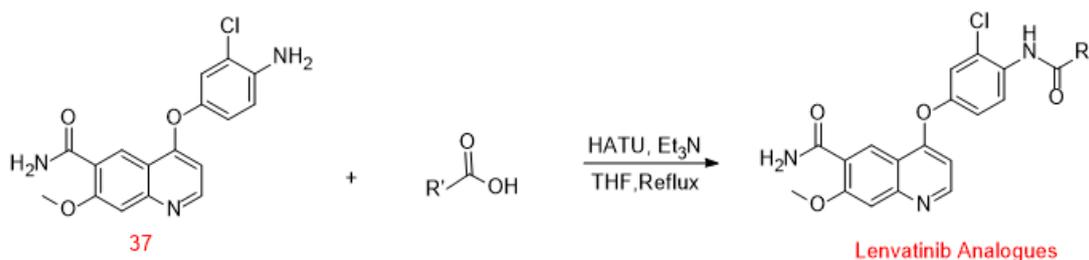
Ολοκληρώνοντας τη συνθετική πορεία, το τελικό στάδιο για τον σχηματισμό της επιθυμητής υποκατεστημένης ανιλίνης 37 είναι η αποπροστασία της αμινομάδας. Αυτή η διαδικασία αποσκοπεί στην αφαίρεση της ομάδας Boc από το N-τελικό άκρο της προστατευμένης ένωσης 36 με την αντίδραση να είναι σχεδόν ποσοτική. Η απομάκρυνση της Boc ομάδας πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα 2N μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρίου, σε θερμοκρασία δωματίου. Το προϊόν της αντίδρασης, το οποίο λαμβάνεται αρχικά ως υδροχλωρικό άλας, στη συνέχεια κατεργάζεται με ανθρακικό νάτριο (ή όξινο ανθρακικό νάτριο), μια ασθενή βάση, με σκοπό τη μετατροπή του στην επιθυμητή ελεύθερη βάση. Η ανιλίνη 37 θα αποτελέσει τον βασικό συνθετικό κρίκο για την παραγωγή των τελικών αναλόγων, μέσω της σύζευξης της με κατάλληλα παράγωγα καρβοξυλικών οξέων.



**Σχήμα 21:** Boc αποπροστασία αμινομάδας

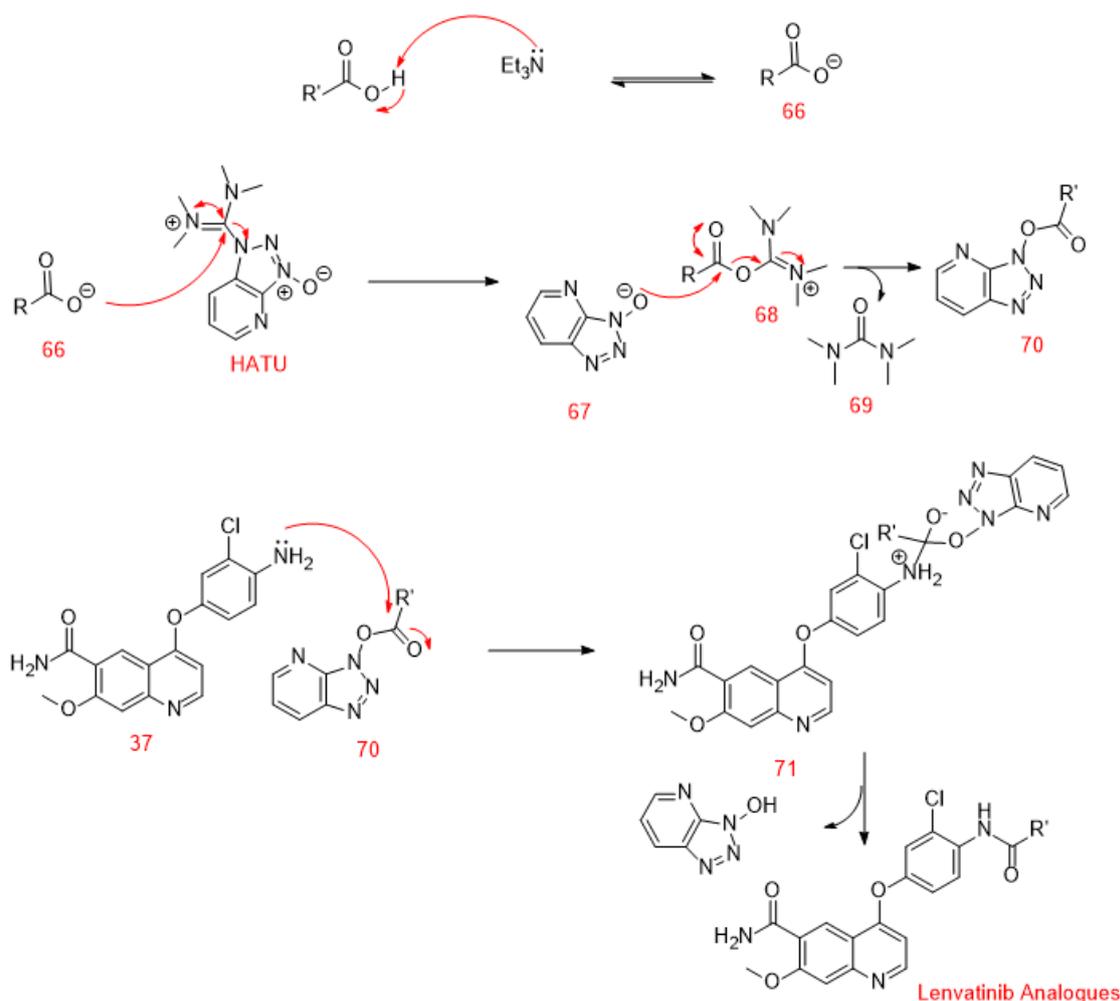
### 3.4.8 Σύνθεση τελικών ενώσεων

Η σύνθεση των τελικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε έπειτα από τη σύζευξη της ένωσης 37 και ενός καρβοξυλικού οξέος. Η αντίδραση σύζευξης έλαβε χώρα μέσω δημιουργίας ενός αμιδικού δεσμού μεταξύ των ενώσεων αυτών. Έπειτα από δοκιμές βρέθηκαν οι κατάλληλες αναλογίες του αντιδραστήριου σύζευξης HATU και της βάσης τριαιθυλαμίνης ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) σε διαλύτη άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF), διατηρώντας τη θερμοκρασία αυστηρά στους  $0^\circ\text{C}$ . Ακολουθεί η προσθήκη της 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7 μεθοξυκινολινο-6-καρβο-ξαμιδίου (ένωση 37) και αυξάνοντας τη θέρμανση σταδιακά - μέχρι τη θερμοκρασία βρασμού του διαλύτη - πραγματοποιείται η σύνθεση των επιθυμητών ενώσεων σε υψηλές αποδόσεις.



## Σχήμα 22: Σύνθεση αναλόγων Lenvatinib

Στο ακόλουθο σχήμα, φαίνεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύζευξης. Με τη χρήση της τριαιθυλαμίνης (βασικές συνθήκες) το καρβοξυλικό οξύ γίνεται σημαντικά πιο πυρηνόφιλο. Στη συνέχεια, αυτό το ενεργοποιημένο μόριο προσβάλλει το αντιδραστήριο σύζευξης, σχηματίζοντας έναν ενδιάμεσο, δραστικό εστέρα. Κατόπιν, ακολουθεί η πυρηνόφιλη προσβολή του ατόμου του αζώτου της ανιλίνης στην καρβονυλομάδα του ενεργοποιημένου εστέρα, ολοκληρώνοντας τον μηχανισμό με τη δημιουργία του αμιδικού δεσμού.

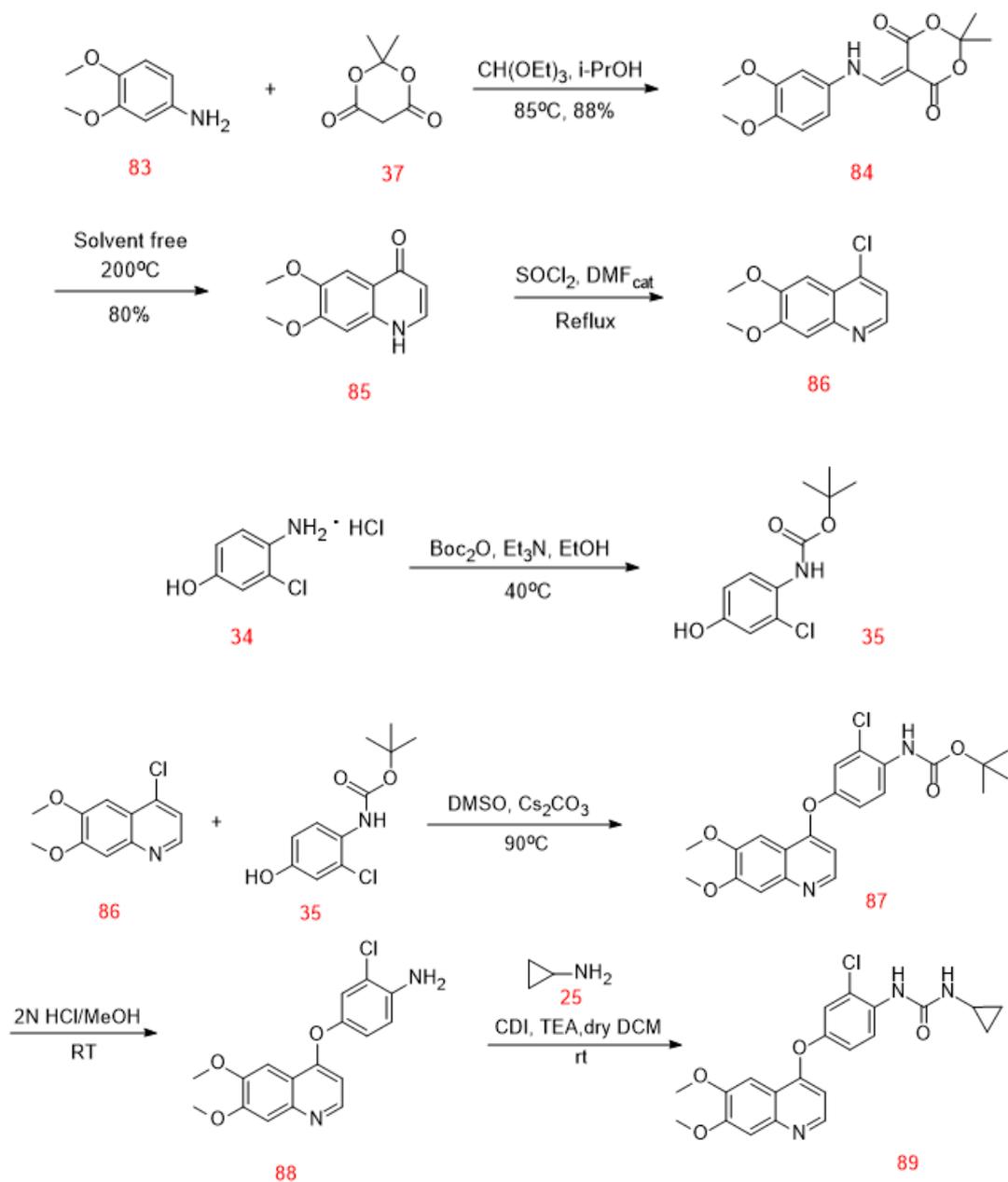


Σχήμα 23: Μηχανισμός αντίδρασης σύζευξης με τη χρήση HATU σε βασικές συνθήκες για τον σχηματισμό των τελικών ενώσεων (ανάλογα 1 και 2).

### 3.5 Ολική συνθετική πορεία αναλόγου 3

Η ανάλογη συνθετική προσέγγιση της πατέντας χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του αναλόγου 3, με τις αντιδράσεις των ενδιάμεσων να διεξάγονται υπό τις ίδιες

βελτιστοποιημένες συνθήκες, με ίδιες αποδόσεις, όπως και στα προηγούμενα δύο ανάλογα.



Σχήμα 24: Συνθετική πορεία σύνθεσης αναλόγου 3

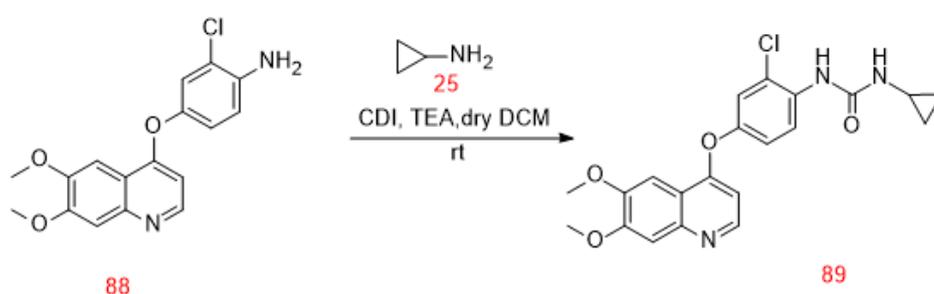
### 3.5.1 Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας με CDI, ένωση 89

Οι λειτουργικές ομάδες της ουρίας και του καρβαμδικού οξέος (ή των παραγώγων του, όπως οι καρβαμδικές εστέρες) αποτελούν σημαντικά δομικά στοιχεία με εκτεταμένη

εφαρμογή. Βρίσκονται σε πληθώρα υποψήφιων φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και σε ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στα αγροχημικά και την επιστήμη υλικών.

Παρά το γεγονός ότι έχουν αναπτυχθεί νέοι μέθοδοι για τον σχηματισμό αυτών των ομάδων, μια τυποποιημένη μέθοδος για την γρήγορη παραγωγή τους περιλαμβάνει τη χρήση αντιδραστηρίων μεταφοράς, μεταξύ αυτών το φωσγένιο, το τριφωσγένιο, το 1,1-καρβονυλιμιδαζόλιο, καθώς επίσης και ισοκυανικών. [30]

Αρχικά, έγινε προσπάθεια σχηματισμού του δεσμού ουρίας με χρήση του αντιδραστηρίου CDI, όπως προτείνει η εταιρία Esai. Πρόκειται για έναν κλασικό μηχανισμό Πυρηνόφιλης Ακυλο-Υποκατάστασης (Nucleophilic Acyl Substitution) που λαμβάνει χώρα σε δύο φάσεις.



**Σχήμα 25:** Τελική αντίδραση σύνθεσης αναλόγου 3 με τη χρήση αντιδραστηρίου CDI

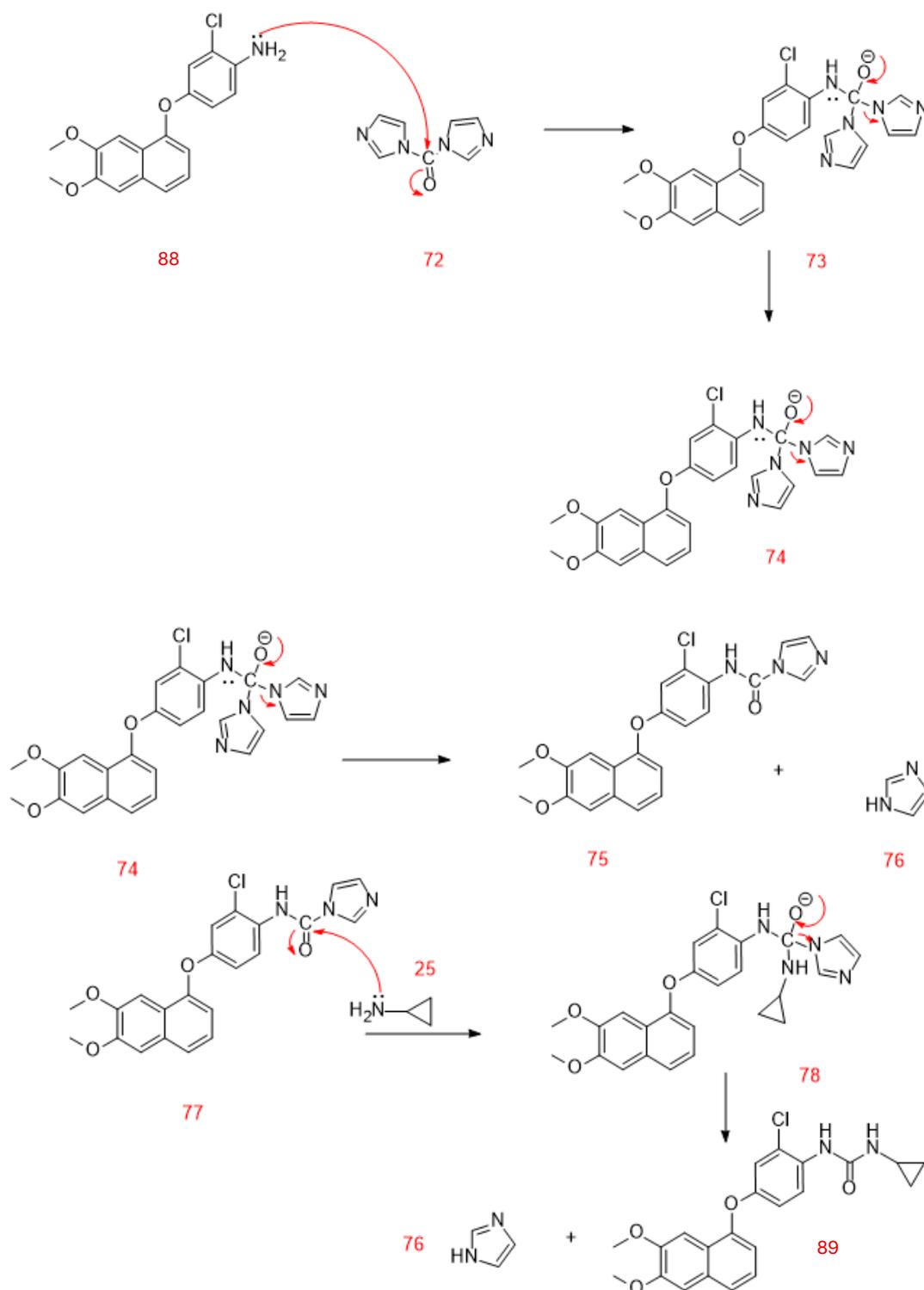
Η αντίδραση ξεκινά με την πυρηνόφιλη προσβολή του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου της αρωματικής αμίνης (Ένωση 88) στον καρβονυλικό άνθρακα του αντιδραστηρίου CDI (Ένωση 72). Η προσβολή αυτή οδηγεί στη διάσπαση του π-δεσμού του καρβονυλίου και τη μετατόπιση του αρνητικού φορτίου στο οξυγόνο, σχηματίζοντας το ασταθές τετραεδρικό ενδιάμεσο (Ένωση 73). Το ενδιάμεσο αυτό υφίσταται ενδομοριακές διευθετήσεις (μεταφορά πρωτονίου) οδηγώντας στη δομή 74, η οποία είναι έτοιμη για την αποβολή της αποχωρούσας ομάδας.

Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αρνητικά φορτισμένου οξυγόνου στο ενδιάμεσο 74 "κατεβαίνει" για να επανασχηματίσει τον διπλό δεσμό C=O. Αυτή η κίνηση προκαλεί τη διάσπαση του δεσμού C-N και την αποβολή ενός μορίου ιμιδαζολίου (Ένωση 76) ως καλή αποχωρούσα ομάδα.

Το προϊόν αυτής της διαδικασίας είναι το N-ακυλο-ιμιδαζόλιο (ή καρβαμοϋλο-ιμιδαζόλιο, Ένωση 75). Αυτή η ένωση είναι ελεγχόμενα δραστική (activated species) και φέρει μια καλή αποχωρούσα ομάδα (το δεύτερο ιμιδαζόλιο) για το επόμενο βήμα.

Η κυκλοπροπιλαμίνη (Ένωση 25) δρα ως πυρηνόφιλο. Το άζωτο προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του ενεργοποιημένου ενδιάμεσου (Ένωση 77, η οποία ταυτίζεται με την 75), οδηγώντας εκ νέου στον σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου (Ένωση 78). Το τετραεδρικό ενδιάμεσο 78 καταρρέει μέσω της επαναφοράς του διπλού δεσμού C=O. Αυτό οδηγεί στην αποβολή του δεύτερου μορίου

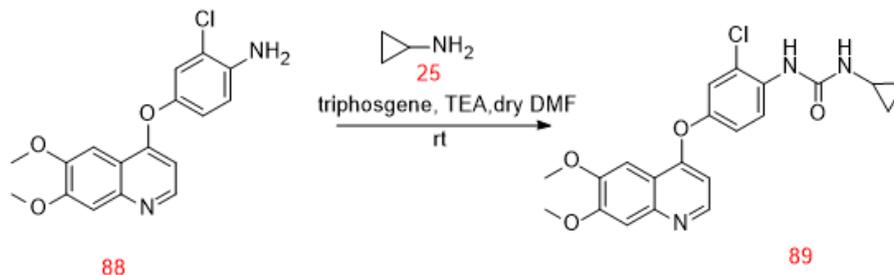
ιμιδαζολίου (Ένωση 76) και στον σχηματισμό της θερμοδυναμικά σταθερής, ασύμμετρης ουρίας (Ένωση 89). [46]



**Σχήμα 26:** Μηχανισμός σύνθεσης του αναλόγου 3 με CDI ως αντιδραστήριο σύζευξης

### 3.5.2 Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας με τριφωσγένιο, ένωση 89

Η αρχική προσπάθεια σύνθεσης της ουρίας, που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση CDI, δεν επέφερε το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή τη σύνθεση της ένωσης 45, ακόμα και με ελαφρώς διαφοροποιημένες συνθήκες (χρήση NaH αντί της Et<sub>3</sub>N και χρήση dry DCM αντί του DMF ως διαλύτη). Για τον λόγο αυτό, η στρατηγική τροποποιήθηκε με τη χρήση τριφωσγενίου (triphosgene).



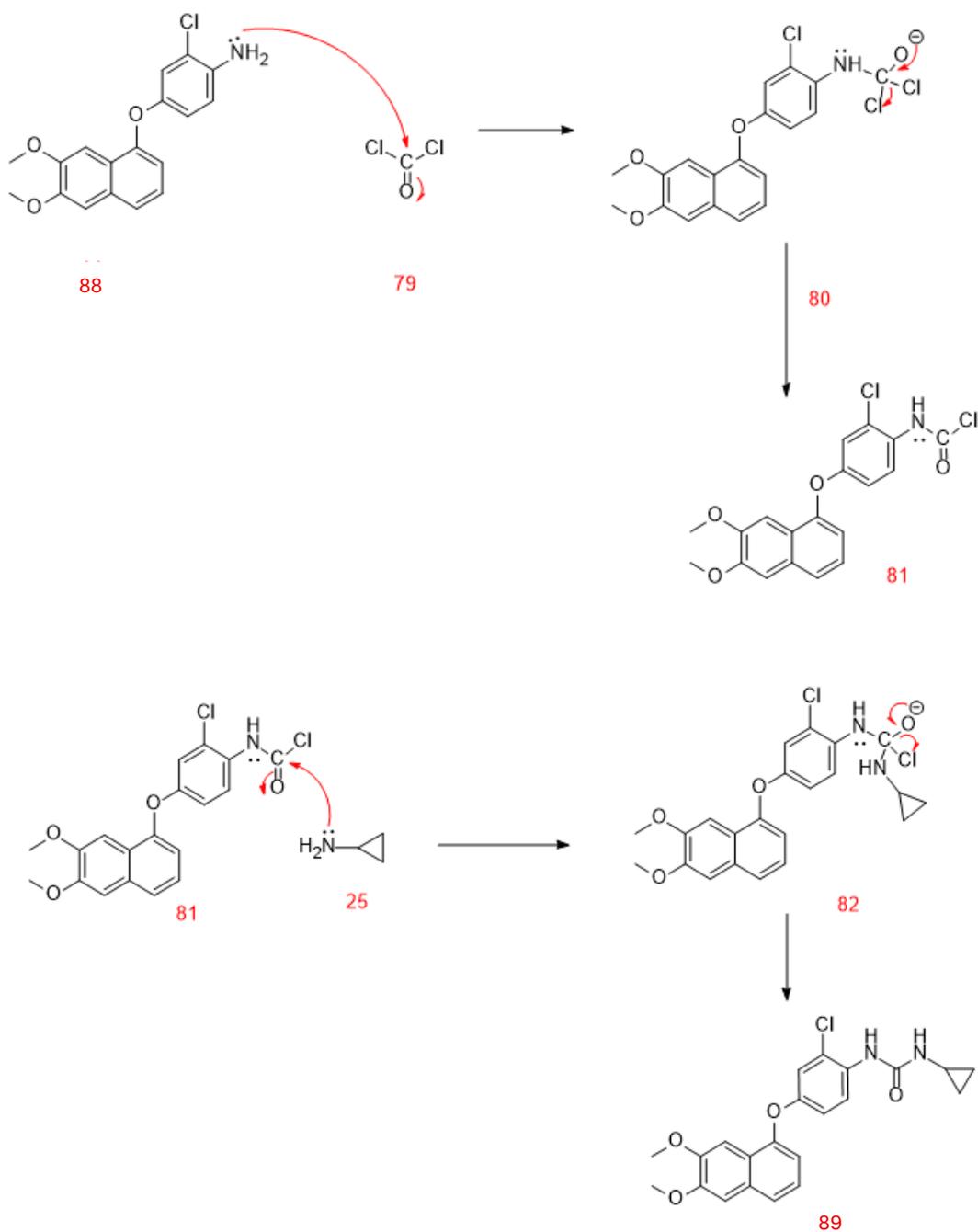
**Σχήμα 27:** Τελική αντίδραση σύνθεσης αναλόγου 3 με τη χρήση τριφωσγενίου

Το τριφωσγένιο επελέγη ως ένα πιο ισχυρό ηλεκτρόφιλο αντιδραστήριο σύζευξης. Λόγω της ικανότητάς του να εισάγει την καρβονυλομάδα υπό πιο δραστικές συνθήκες (μέσω σχηματισμού ενδιάμεσου ισοκυανικού εστέρα), κρίθηκε κατάλληλο για την υπερπήδηση τυχόν στερεοχημικών εμποδίων και τη βελτίωση της συνολικής απόδοσης της αντίδρασης.

Το τριφωσγένιο λειτουργεί ως στερεό ισοδύναμο του φωσγενίου. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει δύο στάδια πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης, με ενδιάμεσο σχηματισμό σταθερού καρβαμοϋλο-χλωριδίου. Το τριφωσγένιο διασπάται στο διάλυμα παράγοντας φωσγένιο (Ένωση 79), το οποίο φέρει δύο εξαιρετικά καλές αποχωρούσες ομάδες (άτομα χλωρίου). Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου της αρωματικής αμίνης (Ένωση 88) προσβάλλει τον έντονα ηλεκτροφιλικό άνθρακα του φωσγενίου. Η προσβολή οδηγεί στον σχηματισμό του τετραεδρικού ενδιάμεσου (Ένωση 80), όπου το αρνητικό φορτίο εντοπίζεται στο άτομο του οξυγόνου. Το ενδιάμεσο σταθεροποιείται μέσω της επαναφοράς του διπλού δεσμού C=O και της ταυτόχρονης αποβολής ενός ανιόντος χλωρίου (Cl<sup>-</sup>). Το προϊόν που προκύπτει είναι το καρβαμοϋλο-χλωρίδιο (Ένωση 81), μια δραστική ένωση που είναι πλέον ενεργοποιημένη για το επόμενο στάδιο.

Στο δεύτερο στάδιο, η κυκλοπροπυλαμίνη (Ένωση 25) δρα ως πυρηνόφιλο αντιδραστήριο. Το άζωτο προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του καρβαμοϋλο-χλωριδίου (81), οδηγώντας εκ νέου σε τετραεδρικό ενδιάμεσο (Ένωση 82). Το αρνητικό φορτίο του οξυγόνου κατέρχεται για να σχηματίσει τον καρβονυλικό δεσμό, αποβάλλοντας το δεύτερο άτομο χλωρίου (ως HCl ή άλας χλωρίου). Η διαδικασία

ολοκληρώνεται με τον σχηματισμό της τελικής, θερμοδυναμικά σταθερής ουρίας (Ένωση 89).



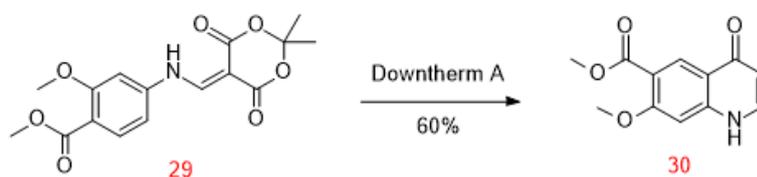
**Σχήμα 28:** Μηχανισμός σύνθεσης του αναλόγου 3 με τριφωσγένιο αντιδραστήριο σύζευξης

### 3.6 Βελτιστοποιήσεις στη συνθετική πορεία των αναλόγων του Lenvatinib

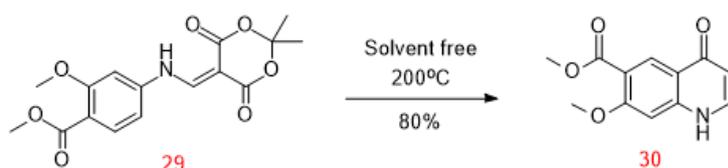
Όπως προαναφέρθηκε για τον σχηματισμό των νέων εν δυνάμει αναλόγων πραγματοποιήθηκε συνένωση δύο ενδιάμεσων ενώσεων, οι οποίες λαμβάνονται με τον συνδυασμό δύο συνθετικών πορειών. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση του ενδιάμεσου 4-χλωρο-7-μεθοξικιολινο-6- καρβοξαμιδίου βασίστηκε στη συνθετική πορεία που δόθηκε από την εταιρία Esai, ενώ το δεύτερο συνθετικό μέρος είναι αποτέλεσμα της συνθετικής πορείας που δημοσιεύτηκε στην κατοχυρωμένη πατέντα του 2017. Βέβαια, η ερευνητική μας ομάδα κατόρθωσε τη βελτιστοποίηση της ολικής σύνθεσης εφαρμόζοντας στοχευμένες τροποποιήσεις στη μέθοδο. Ως αποτέλεσμα αυτών των αλλαγών, καταφέραμε, σε αρκετές περιπτώσεις, να υιοθετήσουμε συνθήκες φιλικότερες προς το περιβάλλον. Οι τροποποιήσεις αυτές επικεντρώθηκαν ειδικότερα στα ακόλουθα στάδια:

#### 1) Σχηματισμός υποκατεστημένης κινολόνης

Σύμφωνα με τη συνθετική πορεία, στο στάδιο σύνθεσης της υποκατεστημένης κινολόνης πραγματοποιείται με τη βοήθεια θέρμανσης η διάσπαση του δακτυλίου του οξέος κατά Meldrum, λαμβάνοντας με 1,3 σιγματροπική αναδιάταξη την επιθυμητή κετένη. Τότε, πραγματοποιείται αντίδραση ενδομοριακής κυκλοποίησης, αφού ο π δεσμός του βενζολικού δακτυλίου προσβάλλει τον άνθρακα της κετένης με ταυτόχρονη απόσπαση του πρωτονίου από το άζωτο, προκειμένου να αποκατασταθεί η αρωματικότητα και πάλι στον δακτύλιο. Έτσι, επιτυγχάνεται η παραγωγή μιας κινολόνης. Για τη διάσπαση του κυκλικού εστέρα η εταιρεία Esai χρησιμοποιεί τον διαλύτη Downtherm A. Πρόκειται για ένα ευτηκτικό μείγμα αποτελούμενο από διφαινυλοαιθέρα (70%) και διφαινύλιο (30%). Στο ερευνητικό εργαστήριο έγινε προσπάθεια πραγματοποίησης του διαλύτη χωρίς χρήση κάποιου διαλύτη με το αποτέλεσμα να δείχνει τόσο μείωση του χρόνου πραγματοποίησης της αντίδρασης από 1 h μόλις σε 10 min, καθώς επίσης και αύξηση της απόδοσης του συγκεκριμένου σταδίου από 60% σε περίπου 80%.



**Σχήμα 29:** Σχηματισμός υποκατεστημένης κινολόνης από την πορεία σύνθεσης του Lenvatinib σύμφωνα με την Esai.



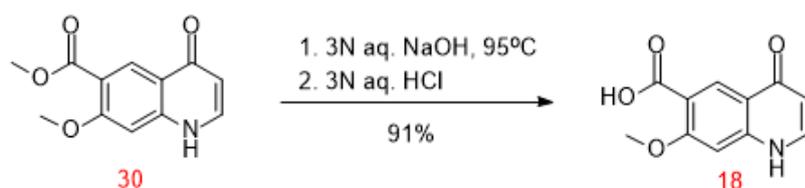
**Σχήμα 30:** Σχηματισμός υποκατεστημένης κινολόνης από την πορεία σύνθεσης του Lenvatinib και των νέων αναλόγων.

## 2) Υδρόλυση μεθυλεστέρα της υποκατεστημένης κινολόνης

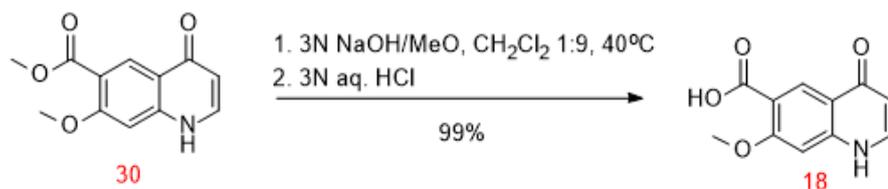
Το στάδιο της υδρόλυσης του μεθυλεστέρα της υποκατεστημένης κινολόνης 30, ακολουθήσαμε την καινοτόμο μέθοδο που ανέπτυξε και δημοσίευσε η ερευνητική μας ομάδα σε δύο εργασίες. [9, 33]

Η αντίδραση διεξήχθη σε βασικές, μη υδατικές συνθήκες, επιτυγχάνοντας σημαντική βελτίωση σε σχέση με την κλασική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή αυτής της μεθόδου επέτρεψε:

- Μείωση του χρόνου αντίδρασης από 1 ώρα σε μόλις 15 λεπτά.
- Χρήση ηπιότερων συνθηκών θέρμανσης.
- Αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης από 90% στο εντυπωσιακό 99%.



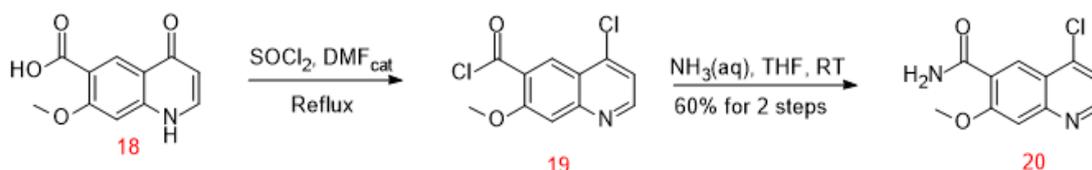
**Σχήμα 31** Υδρόλυση εστέρα από την πορεία σύνθεσης του Lenvatinib σύμφωνα με την Esai.



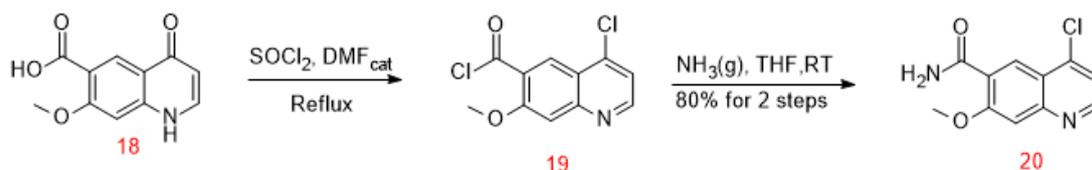
**Σχήμα 32:** Υδρόλυση εστέρα από την πορεία σύνθεσης του Lenvatinib και των νέων αναλόγων

### 3) Σχηματισμός αμιδίου της υποκατεστημένης γλωροκινολίνης

Κατά το στάδιο του σχηματισμού του αμιδίου της υποκατεστημένης γλωροκινολίνης 56 από το αντίστοιχο χλωρίδιο 55, πραγματοποιήσαμε μια κρίσιμη αλλαγή: χρησιμοποιήσαμε αέρια αμμωνία ως αντιδραστήριο, σε αντίθεση με το διάλυμα υδατικής αμμωνίας που εφαρμόζει η εταιρεία. Αυτή η τροποποίηση οδήγησε σε σημαντική αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης, η οποία ανήλθε από το 60% στο εντυπωσιακό 88%.



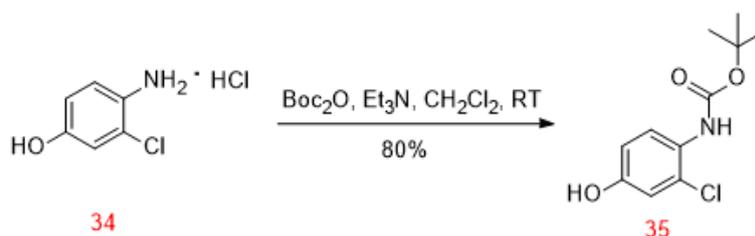
Σχήμα 33: Σχηματισμός αμιδίου από την πορεία σύνθεσης του Lenvatinib σύμφωνα με την Esai.



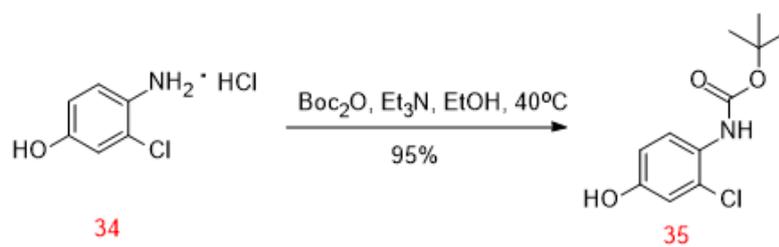
Σχήμα 34: Σχηματισμός αμιδίου από την πορεία σύνθεσης του Lenvatinib και των νέων αναλόγων.

### 4) Βοc-προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης

Η Βοc-προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης βασίζεται, σύμφωνα με τη δημοσιευμένη συνθετική οδό του 2017, στη χρήση Βοc ανυδρίτη, τριαιθυλαμίνης και διχλωρομεθανίου, αποδίδοντας 80%. Στο εργαστήριο, ωστόσο, πραγματοποιήσαμε την ίδια αντίδραση αντικαθιστώντας το διχλωρομεθάνιο με αιθανόλη. Η βελτιωμένη αυτή προσέγγιση είχε ως αποτέλεσμα την επίτευξη εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (95%) και, ταυτόχρονα, την αποφυγή εμφάνισης παραπροϊόντων.



**Σχήμα 35:** N-Boc προστασία της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, σύμφωνα με την πατέντα του 2017

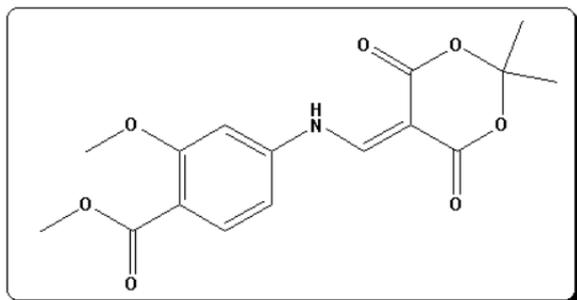


**Σχήμα 36:** N-Boc προστασία της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, σύμφωνα με τη τη πορεία σύνθεσης του Lenvatinib και των νέων αναλόγων

## Κεφάλαιο 4

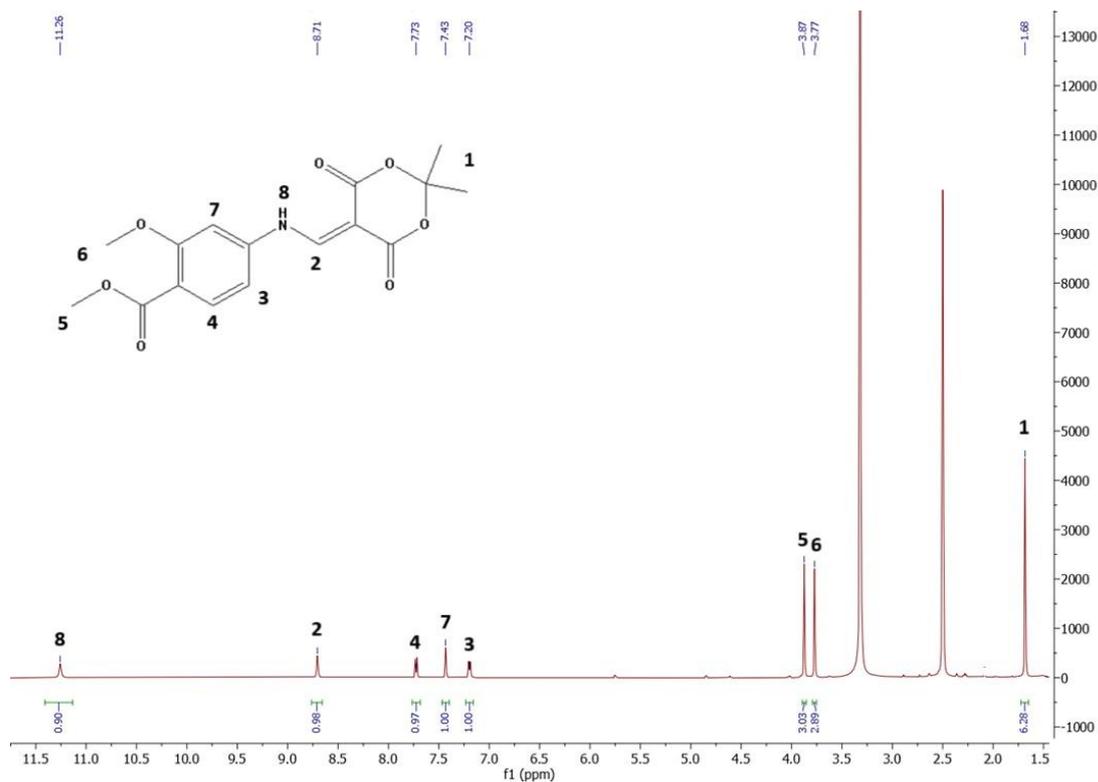
### Φασματοσκοπικά δεδομένα

#### 4.1.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 29



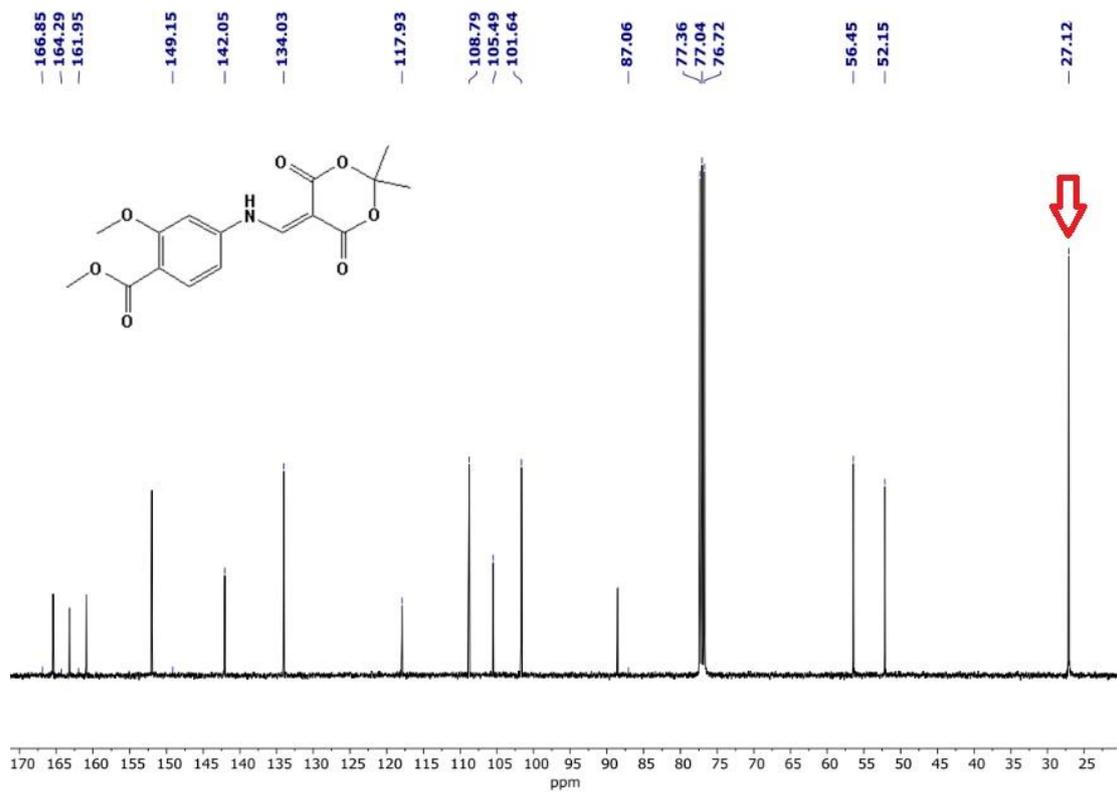
Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, παρατηρείται ότι το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 8 είναι το πλέον πιο αποπροστατευμένο με μετατόπιση στα 11.26 ppm και εμφανίζεται ως απλή

κορυφή. Το πρωτόνιο αυτό είναι εξαιρετικά αποπροστατευμένο λόγω της εκδηλούμενης εκτεταμένης συζυγίας ενώ το σήμα που καταγράφεται είναι ελαφρώς εξασθενημένο λόγω της ανταλλαγής του με άτομα του δευτεριομένου διαλύτη. Το βινυλικό πρωτόνιο της εναμίνης, συντονίζεται στα 8.71 ppm καταγράφοντας απλή κορυφή. Το εν λόγω πρωτόνιο έχει μειωμένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθώς βρίσκεται σε β θέση ως προς το καρβονύλιο, επομένως μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού, συνδέεται σε άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο. Επίσης, η αλληλεπίδρασή του με το γειτονικό οξυγόνο του καρβονυλίου μέσω ψευδοδεσμού υδρογόνου μετατοπίζει ακόμα περισσότερο το σήμα του. Τα αρωματικά πρωτόνια 3 και 4 συντονίζονται στα 7.20 και 7.73 ppm, αντίστοιχα. Αμφότερα καταγράφουν σήμα διπλής κορυφής με κοινή σταθερά σύζευξης  $^3J = 8,4$  Hz. Το πρωτόνιο 3 εμφανίζεται πιο αποπροστατευμένο καθώς βρίσκεται σε θέση ortho ως προς το άζωτο της εναμίνης το οποίο εκδυλώνει θετικό συζυγιακό φαινόμενο στον δακτύλιο και ταυτόχρονα το πρωτόνιο 4 βρίσκεται σε ortho θέση ως προς την εστερομάδα η οποία εκδυλώνει αρνητικό συζυγιακό φαινόμενο προς τον δακτύλιο όντας δέκτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Στο αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 7 οφείλεται η απλή κορυφή στα 7.43 ppm. Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται μεταξύ δυο υποκαταστατών που προσφέρουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον δακτύλιο και ως εκ τούτου το πλέον πιο προστατευμένο πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 5 της μεθοξυ-ομάδας συντονίζονται στα 3.77 ppm ως μία απλή κορυφή (s), με ολοκλήρωση 3, ενώ τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 6 του μεθυλεστέρα εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 3 στα 3.87 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια των δύο μεθυλομάδων, 5 και 6, εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 6 στα 1.68 ppm, όντας ισοδύναμα ηλεκτρονιακά.



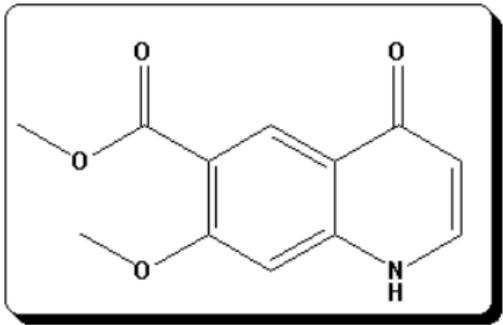
**Εικόνα 20:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 29 σε  $\text{DMSO-d}_6$ , στους 298 K.

Το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης αποτυπώνεται η προσάρτηση του αντιδραστηρίου Meldrum με χαρακτηριστική κορυφή στα 27,12ppm της οποίας το σήμα είναι και εντονότερο συγκριτικά με τα υπόλοιπα καθώς αντιστοιχεί στις 2 μεθυλομάδες του Meldrum οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται όντας μαγνητικά ισοδύναμες.



Εικόνα 21: Φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ένωσης 29 σε CDCl<sub>3</sub>, στους 298 K.

**4.1.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-δihυδροκινολινο-6- καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30**

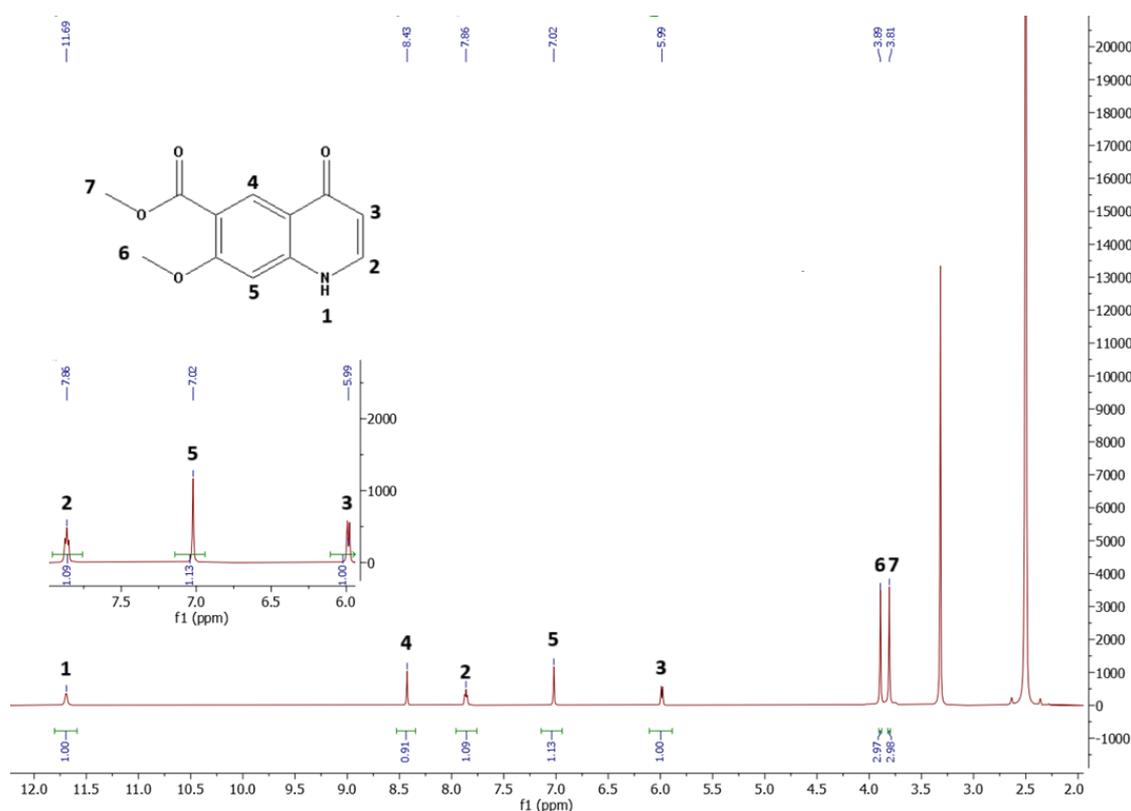


Στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 30, το πρωτόνιο του αζώτου στους κινολόνης, H<sub>1</sub>, το οποίο συντονίζεται στα 11.69 ppm και καταγράφει σήμα διπλής κορυφής. Είναι εξαιρετικά αποπροστατευμένο λόγω στους εκδηλούμενης εκτεταμένης συζυγίας και το σήμα του σχάζεται λόγω του πρωτονίου 2 με σταθερά σύζευξης <sup>3</sup>J = 5,5 Hz. Το H<sub>2</sub> συντονίζεται στα 7.86 ppm. Εμφανίζεται ως

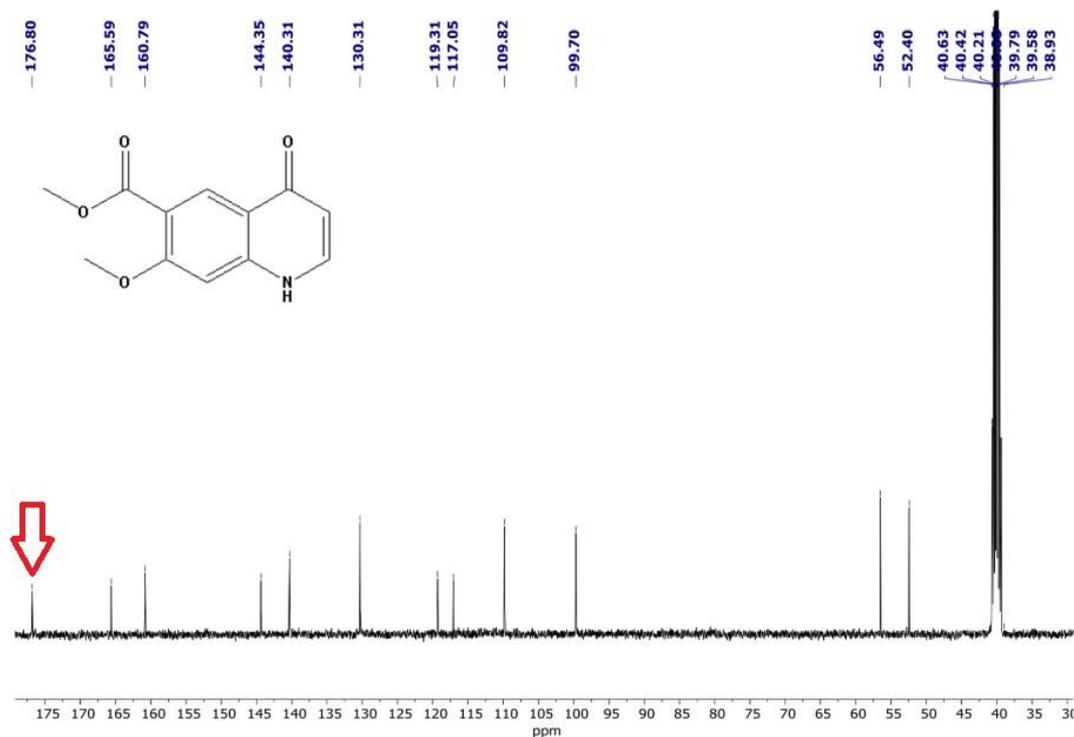
μία τριπλή κορυφή (t) λόγω των υδρογόνων H<sub>1</sub> και H<sub>3</sub>. Το H<sub>3</sub> συντονίζεται στα 5.99 ppm με <sup>3</sup>J = 7.5 Hz και εμφανίζεται ως μια διπλή κορυφή (d) λόγω του γειτονικού H<sub>2</sub>. Η μεγάλη αυτή διαφορά στους χημικές μετατοπίσεις οφείλεται στο γεγονός ότι το υδρογόνο H<sub>2</sub>, που βρίσκεται σε β θέση ως στους το καρβονύλιο, μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού, συνδέεται σε άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο ενώ αποπροστατεύεται ταυτόχρονα και λόγω του επαγωγικού φαινομένου που ασκεί το άτομο του αζώτου. Τα πρωτόνια H<sub>4</sub> και H<sub>5</sub> συντονίζονται στα 8.43 ppm και 7.02 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται με την μορφή δύο απλών (s) κορυφών. Το H<sub>4</sub> είναι εξαιρετικά αποπροστατευμένο καθώς σε όρθο θέση ως στους αυτό βρίσκεται η

καρβοξυλομάδα του μεθυλεστέρα, καθώς και σε γειτονική θέση η κετο ομάδα στους κινολόνες, ομάδες δηλαδή που αποτελούν δέκτες ηλεκτρονίων. Το αρωματικό πρωτόνιο υπ' αριθμόν 5 (H<sub>5</sub>) βρίσκεται μεταξύ δύο υποκαταστατών που προσφέρουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον δακτύλιο και ως εκ τούτου είναι το πλέον πιο προστατευμένο πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου. Τέλος, τα πρωτόνια H<sub>7</sub> στους μεθοξυ-ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 3 στα 3.89 ppm, καθώς βρίσκονται σε γειτονική θέση με οξυγόνο που προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα στο αρωματικό δακτύλιο μέσω του θετικού συζυγιακού φαινομένου. Τα πρωτόνια H<sub>7</sub> του μεθυλεστέρα συντονίζονται στα 3.81 ppm ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 3.

Στο φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ένωσης πιστοποιείται η πραγματοποίηση της αντίδρασης και η σύνθεση του δακτυλίου κινολόνης από το σήμα με μετατόπιση στα 176,80 ppm που αντιστοιχεί στον καρβονυλικό άνθρακα του εν λόγω δακτυλίου.

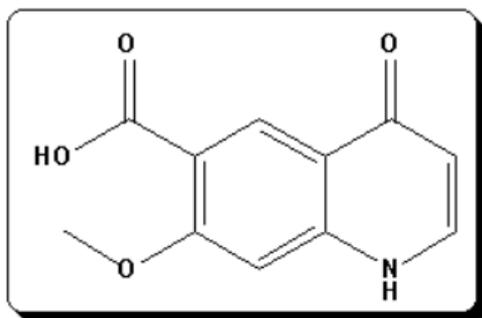


**Εικόνα 22:** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 30 σε DMSO-d<sub>6</sub>, στους 298 K



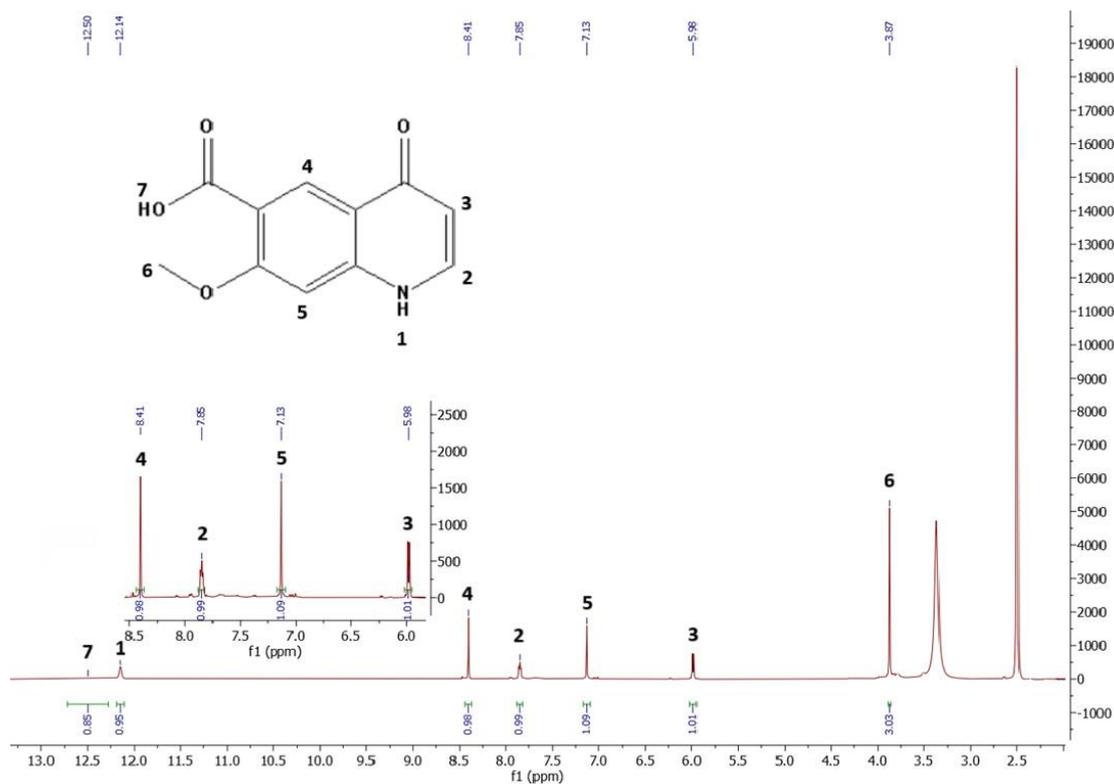
Εικόνα 23: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 30 DMSO- $\text{d}_6$ , στους 298 K

#### 4.1.3 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 18



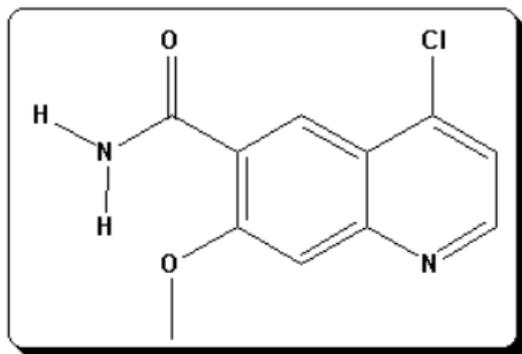
Οι κορυφές που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια καταγράφονται, όπως είναι επόμενο, σε παραπλήσιες τιμές ppm, διατηρώντας στους σχάσεις στους σε ισοδυναμία με τα πρωτόνια του αντίστοιχου μεθυλεστέρα,. Η νέα ευρεία κορυφή που εμφανίζεται στα 12.49 ppm είναι χαρακτηριστική και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του καρβοξυλικού οξέος. Άλλη μια ένδειξη,

ότι η υδρόλυση του εστέρα έγινε ποσοτικά, αποτελεί η απουσία στους κορυφής στους μεθυλομάδας αυτού στα 3.81 ppm.



Εικόνα 24: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 18 σε  $\text{DMSO-d}_6$ , στους 298 K.

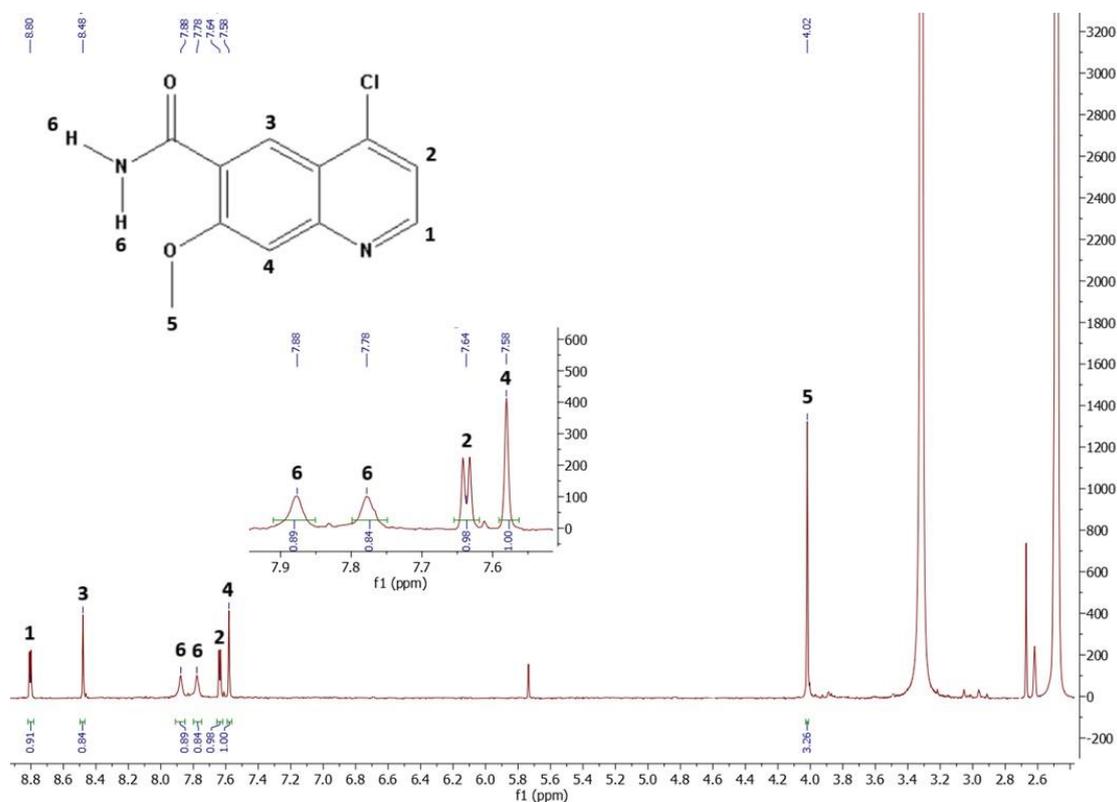
#### 4.1.4 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 20



Στο φάσμα τα πρωτόνια του πυριδινικού δακτυλίου, δηλαδή τα πρωτόνια  $\text{H}_1$  και  $\text{H}_2$ , συντονίζονται στα 8,80 ppm και 7,64 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται ως διπλές (d) κορυφές με σταθερά σύζευξης  $^3J = 5.2 \text{ Hz}$ . Το πρωτόνιο  $\text{H}_1$  είναι το πλέον αποπροστατευμένο, καθώς βρίσκεται στην 2-θέση του πυριδινικού δακτυλίου, και μέσω του αφενός

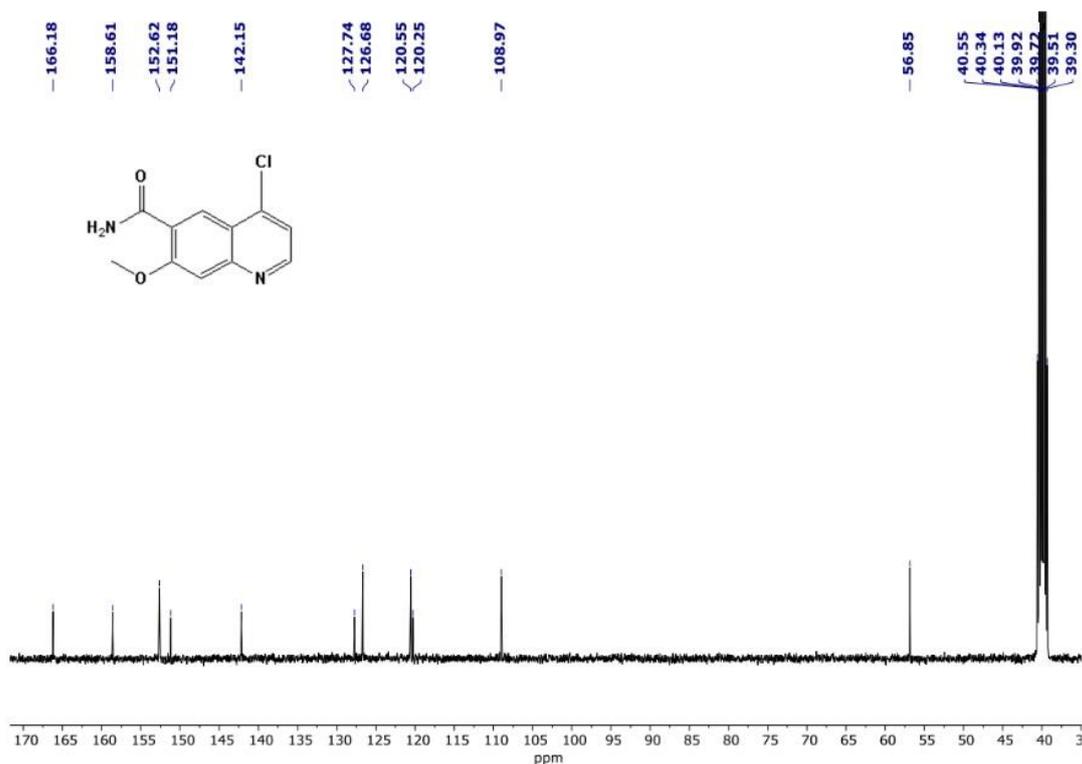
εκδηλουμένου επαγωγικού φαινομένου και αφετέρου λόγω στους εκτεταμένης συζυγίας συνδέεται στον άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο. Τα αρωματικά πρωτόνια 3 και 4 συντονίζονται στα 8,65 ppm και 7,48 ppm αντίστοιχα και εμφανίζονται ως απλές (s) κορυφές. Το πρωτόνιο 3 είναι πιο αποπροστατευμένο, συγκριτικά με το 4, καθώς βρίσκεται σε ορθο θέση ως στους το αμίδιο που αποτελεί δέκτη ηλεκτρονίων. Επιπροσθέτως, το πρωτόνιο 3 απογυμνώνεται περαιτέρω από ηλεκτρονιακή πυκνότητα καθώς βρίσκεται στην θέση 5 στους κινολίνης, επομένως μέσω των εκδηλουμένων δομών συντονισμού, συνδέεται σε άνθρακα που αποκτά θετικό φορτίο. Το πρωτόνιο 4 είναι το πλέον προστατευμένο καθώς σε ορθο θέση ως στους αυτό βρίσκεται η μεθοξυ-ομάδα που προσφέρει ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τα πρωτόνια του αμιδίου (6) καταγράφονται ως δυο απλές κορυφές (s) στα 7,88 και 7,78

ppm, αντίστοιχα. Θα περιμέναμε τα πρωτόνια αυτά να είναι ισοδύναμα, ωστόσο ο χαρακτήρας διπλού δεσμού που αποκτά το άζωτο με τον άνθρακα του καρβονυλίου επιβραδύνει την περιστροφή του με αποτέλεσμα τα 2 πρωτόνια να ανιχνεύονται με διαφορετικό σήμα. Τέλος, τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 9 στους μεθοξυ ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή (s) με ολοκλήρωση 3 στα 4.02 ppm.



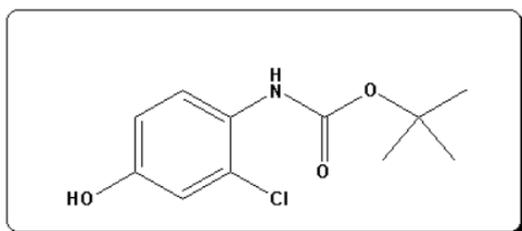
**Εικόνα 25:** : Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της ένωσης 20 σε DMSO-d<sub>6</sub>, στους 298 Κ.

Στο φάσμα <sup>13</sup>C NMR της ένωσης παρατηρείται η απουσία του καρβονυλικού άνθρακα του δακτυλίου της κινολόνης πιστοποιώντας την λήψη της υποκατεστημένης 4-χλώρο κινολίνης.

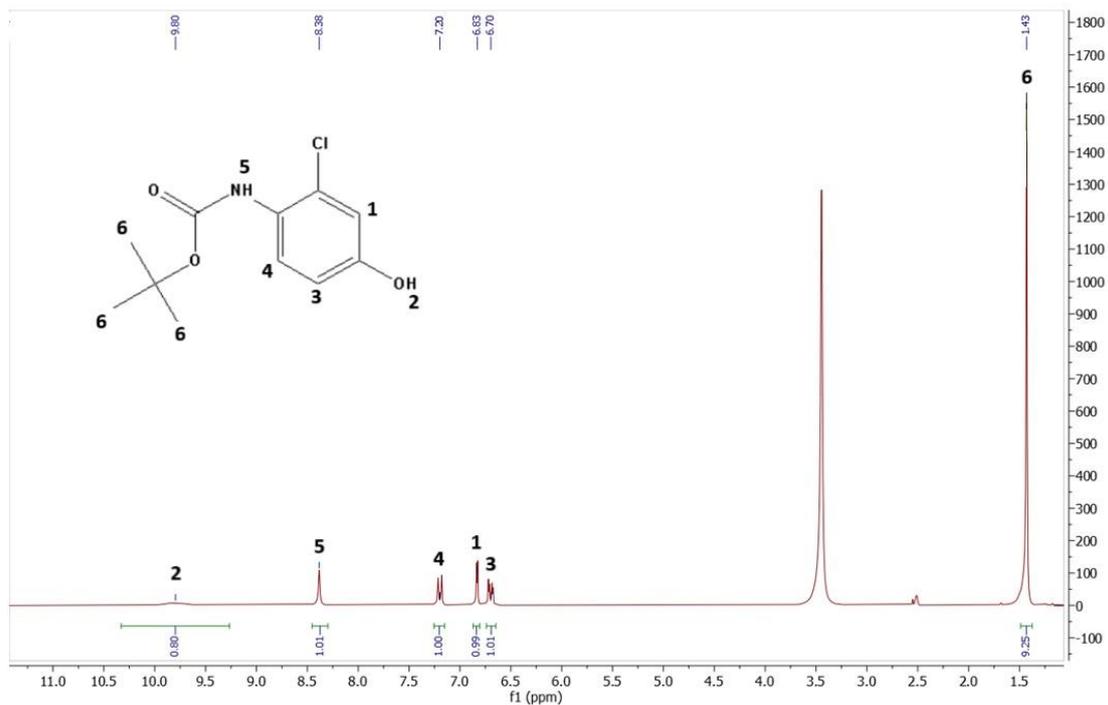


Εικόνα 26: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR στους ένωσης 20 DMSO- $d_6$ , στους 298 K

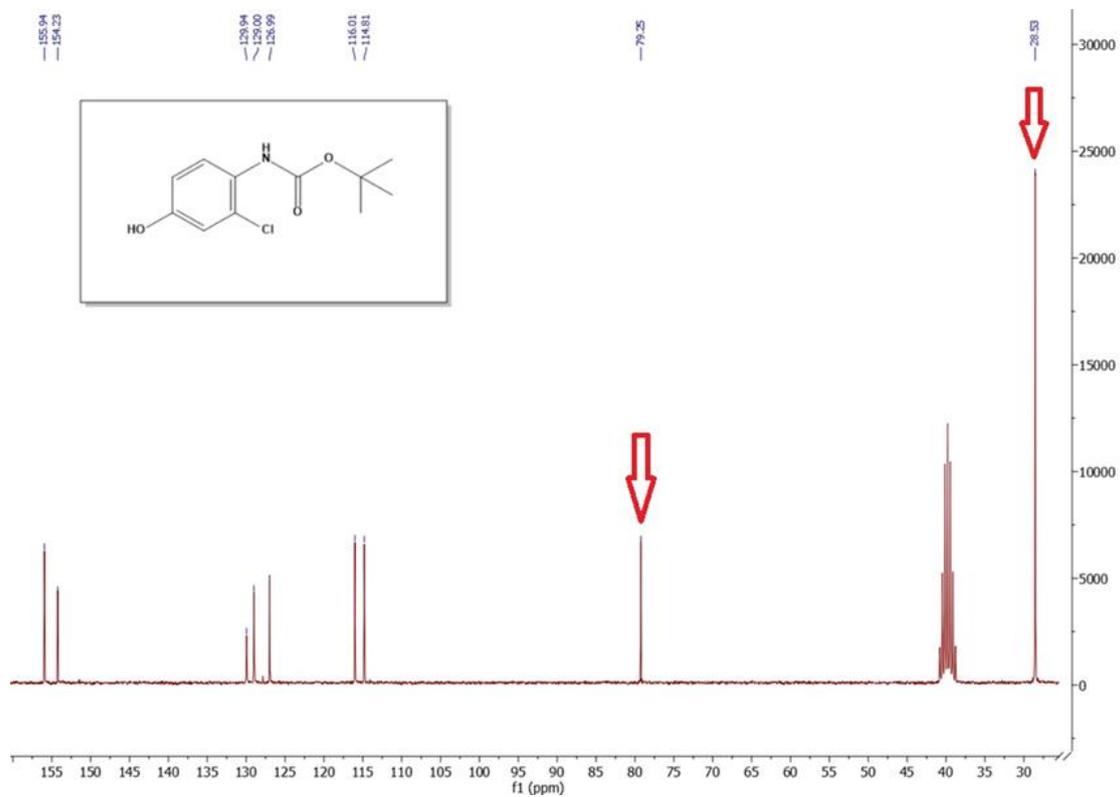
#### 4.1.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα του (2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο) καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 35



Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR στους ένωσης 35 το πλέον αποπροστατευμένο πρωτόνιο που απεικονίζεται στα 9.80 ppm αντιστοιχεί στην υδροξυλομάδα του βενζολικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια των μεθυλομάδων στους Boc προστατευτικής ομάδας καταγράφουν σήμα απλής κορυφής με ολοκλήρωση 9 στα 1,43 ppm. Αναφορικά με τα αρωματικά πρωτόνια το πρωτόνιο 1 εμφανίζεται με μετατόπιση 6,83 ppm με σταθερά σύζευξης  $^4\text{J} = 2,7$  Hz, ενώ το πρωτόνιο 2 καταγράφει σήμα στα 6,70 ppm με σταθερές σύζευξης  $^3\text{J} = 8,7$  Hz και  $^4\text{J} = 2,7$  Hz. Τέλος, το πρωτόνιο 3 όντας το πιο αποπροστατευμένο από τα αρωματικά καταγράφει σήμα διπλής κορυφής με σταθερά σύζευξης  $^3\text{J} = 8,7$  Hz στα 7,20 ppm

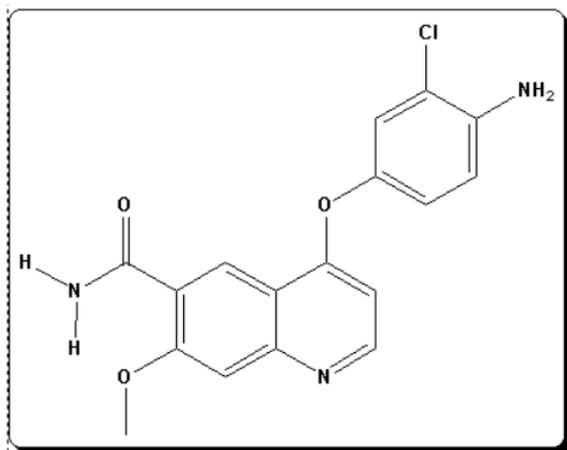


Εικόνα 27: : Φάσμα <sup>1</sup>H NMR στους ένωσης 35 σε DMSO-d<sub>6</sub>, στους 298 Κ.



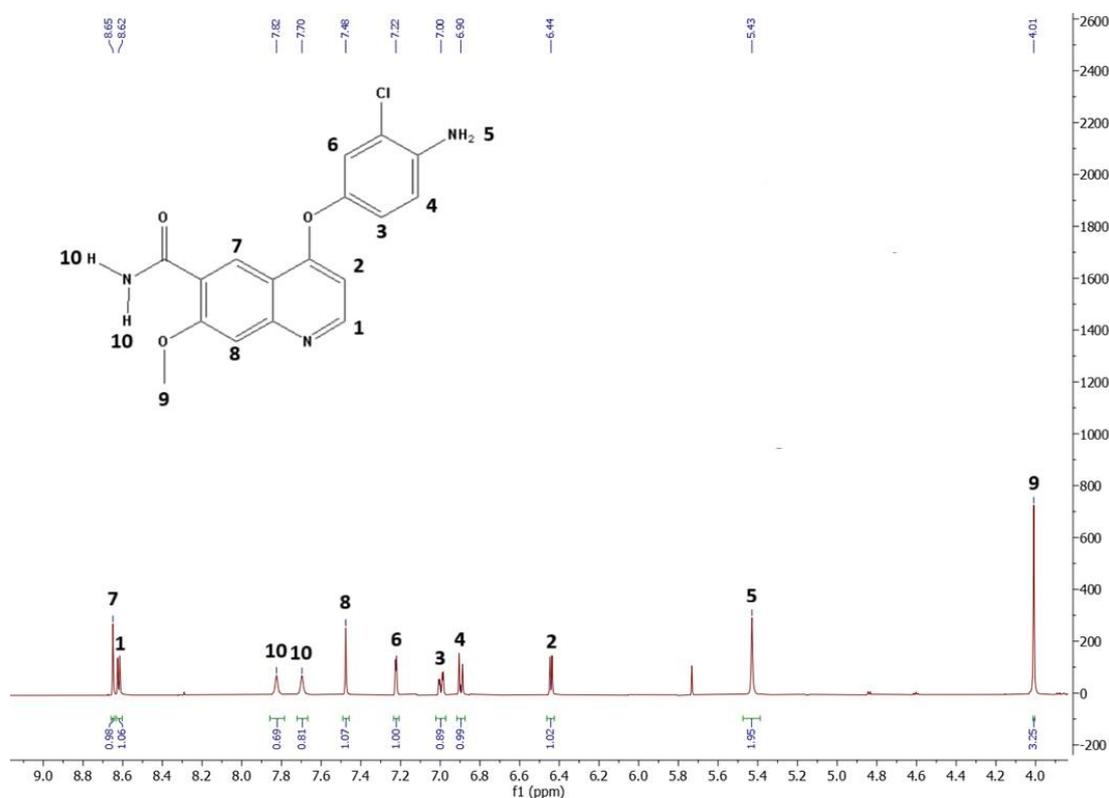
Εικόνα 28: Φάσμα <sup>13</sup>C NMR στους ένωσης 35 DMSO-d<sub>6</sub>, στους 298 Κ

#### 4.1.6 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ) 7-μεθοξυκινολινο-6- καρβοξαμιδίου, ένωση 37



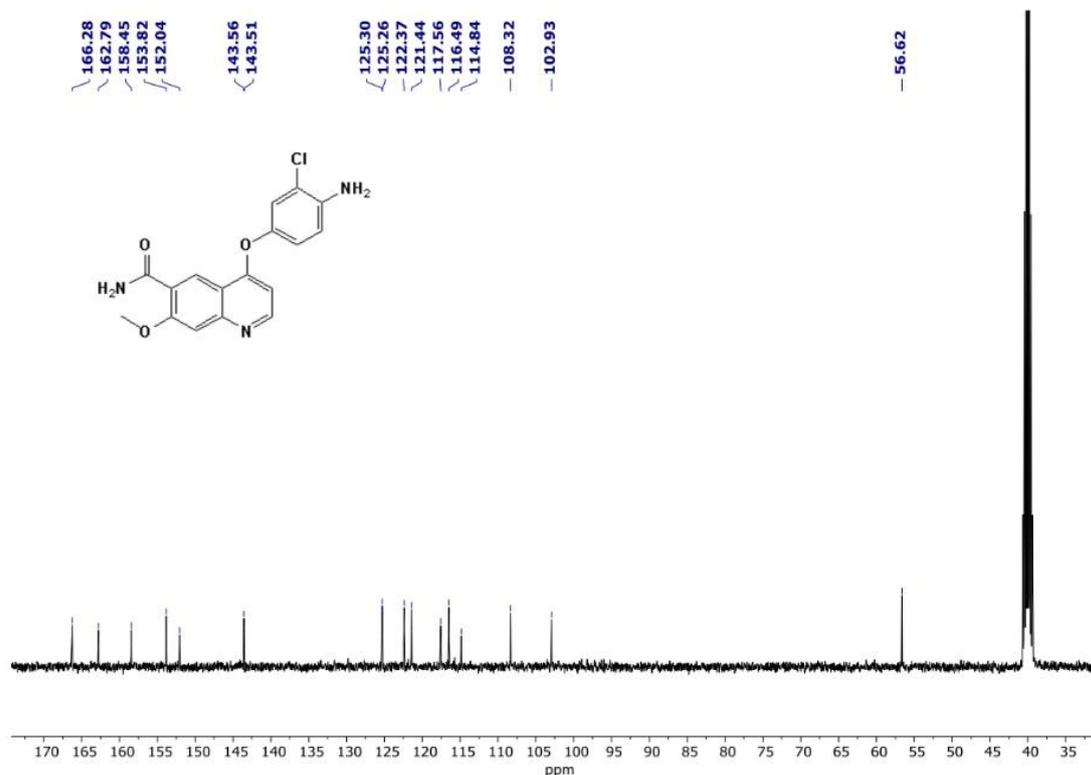
Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR το πρωτόνιο 7 εμφανίζεται ως το πλέον αποπροστατευμένο με μορφή απλής κορυφής στα 8,65 ppm. Η έλλειψη ηλεκτρονιακής πυκνότητας για το συγκεκριμένο πρωτόνιο οφείλεται στο ότι βρίσκεται σε θέση *ortho* σε σχέση με την ομάδα του αμιδίου που λόγω αρνητικού συζυγιακού φαινομένου αφαιρεί ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τον δακτύλιο, έν αντιθέσει με το

πρωτόνιο 8 το οποίο βρίσκεται σε θέση *ortho* ως στους την μεθοξθ ομάδα για αυτό και μετατοπίζεται λιγότερο (7,43 ppm). Τα πρωτόνια 1 και 2 παρουσιάζουν και για παρόμοιο λόγω εξ ίσου μεγάλη διαφορά μετατόπισης όπου το 1 καταγράφεται στα 8,62 ppm ενώ το 2 στα 6,44 ppm ωστόσο ταυτοποιούνται από την κοινή σταθερά σύζευξης  $^3J = 5,2$  Hz και συμπερασματικά το σήμα στους σχάζεται σε διπλή κορυφή.



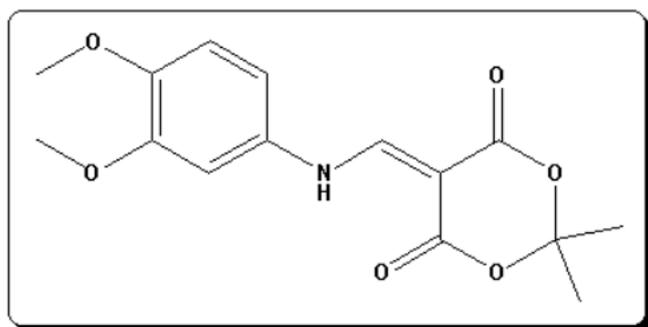
Εικόνα 29: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR στους ένωσης 37 σε DMSO- $d_6$ , στους 298 K.

Το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης αποδεικνύει επίσης την λήψη του διάρυλο αιθέρα αφού καταγράφονται 17 σήματα, όσα και τα άτομα άνθρακα της ένωσης και οι ύπαρξη 6 νέων σημάτων στην «αρωματική περιοχή» αντιστοιχούν στον προσαρτηθέντα βενζολικό δακτύλιο.



Εικόνα 30: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR στους ένωσης 37 DMSO- $d_6$ , στους 298 K

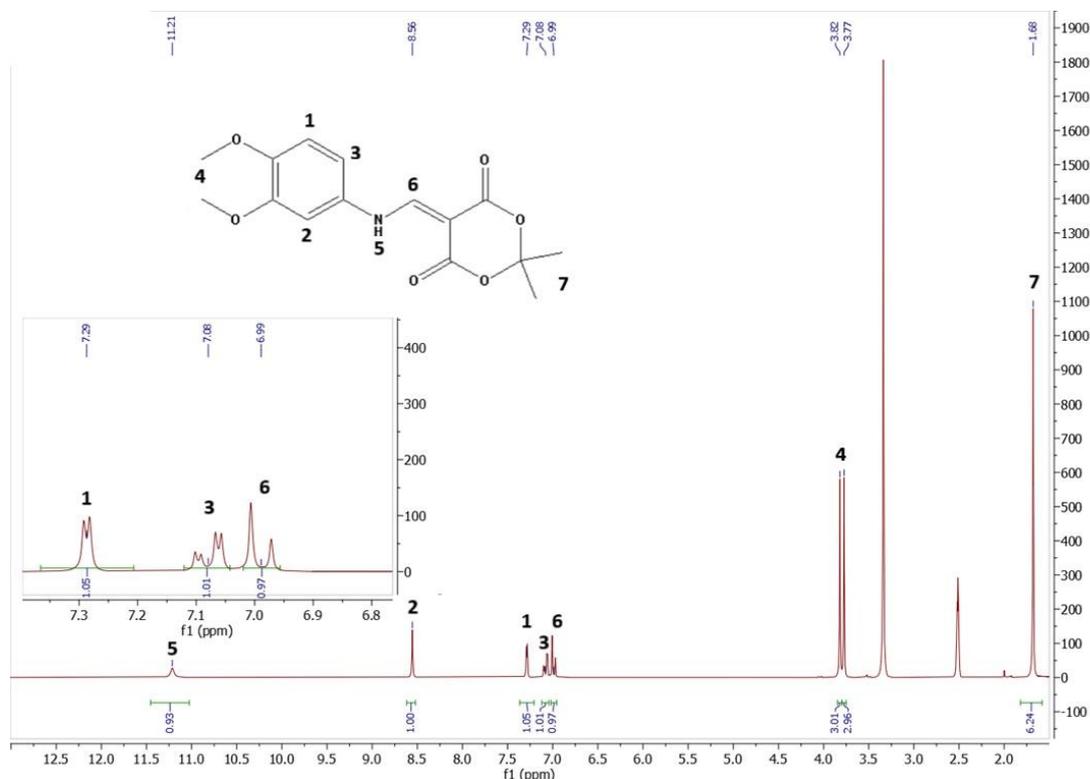
#### 4.2.1 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 5-(((4-μεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξάνιο-4,6-διόνης, ένωση 40



Στο φάσμα πρωτονίου το πρωτόνιο του αζώτου στους εναμίνας (5) καταγράφεται ως το πλέον αποπροστατευμένο με μετατόπιση στα 11,21 ppm χωρίς ωστόσο να σχάζεται το σήμα του. Το πρωτόνιο 6 καταγράφεται στα 8,55 ppm στους χωρίς να σχάζεται το σήμα του. Όσον

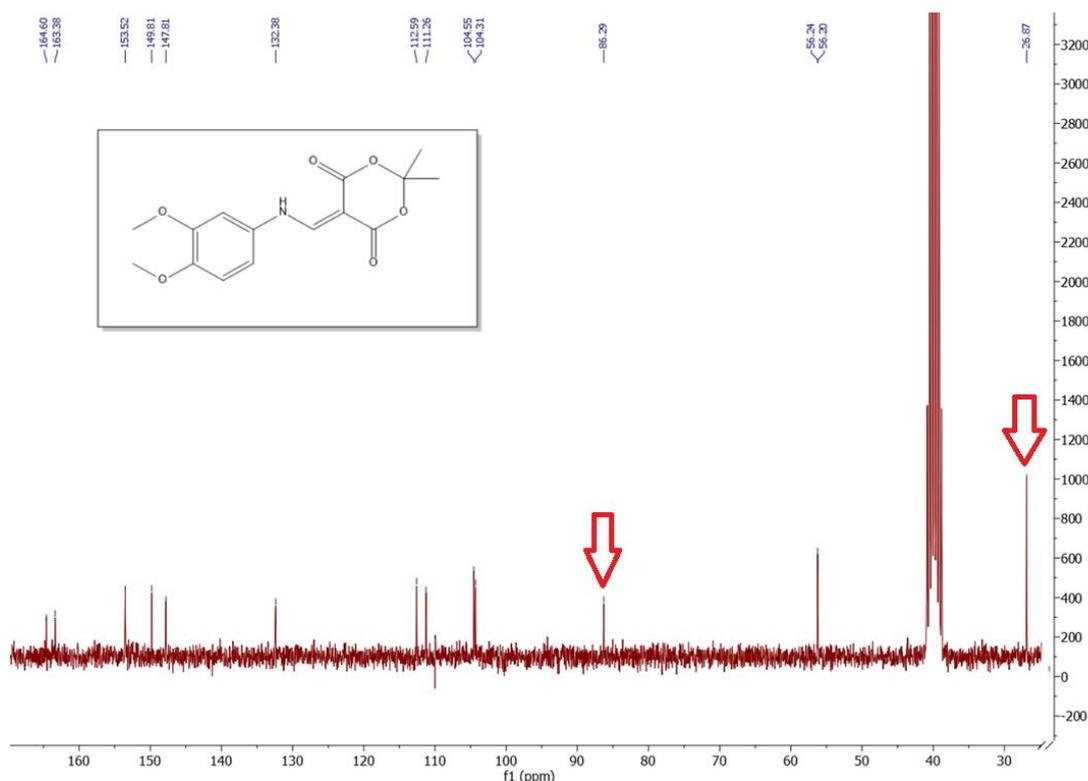
αφορά τα αρωματικά πρωτόνια το πρωτόνιο 1 απεικονίζεται στα 6,99 ppm με το σήμα του να σχάζεται σε διπλή κορυφή λόγω του πρωτονίου 3 με το οποίο παρουσιάζουν κοινή σταθερά σύζευξης  $^3J = 8.7$  Hz, ωστόσο το σήμα του πρωτονίου 3 σχάζεται περαιτέρω λόγω του πρωτονίου 2 σε διπλή διπλής κορυφή (dd) με

σταθερά σύζευξης  $^4J = 2.5$  Hz. Το πρωτόνιο υπ' αριθμόν 2 καταγράφει το σήμα του με μετατόπιση 7,29 ppm. Τέλος τα πρωτόνια 4 που αφορούν αυτά των 2 μεθόξυ ομάδων καταγράφουν σήμα απλής κορυφής με ολοκλήρωση 3 έκαστο στα 3,77 και 3,82 ppm αντίστοιχα ενώ τα πρωτόνια 7 λόγω του κοινού μαγνητικά περιβάλλοντός στους αλληλεπικαλύπτονται εξ ολοκλήρου στα 1,68 ppm με ολοκλήρωση 6.



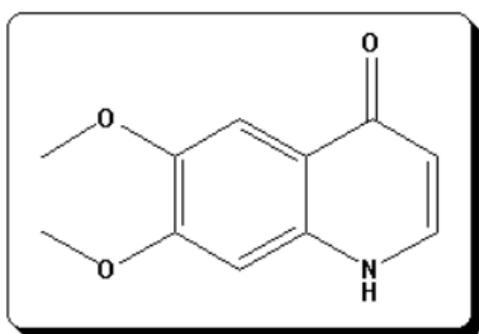
**Εικόνα 31:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR στους ένωσης 40 σε  $\text{DMSO-d}_6$ , στους 298 K

Το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 40 επιβεβαιώνει την πραγματοποίηση της αντίδρασης και την αντίδραση του αντιδραστηρίου Meldrum's καθώς απεικονίζονται με τους άνθρακες των 2 μεθυλομάδων να καταγράφουν σήμα στα 26,87 ppm, ενώ ο άνθρακας με τον οποίο συνδέεται να καταγράφει σήμα στα 86,29 ppm.

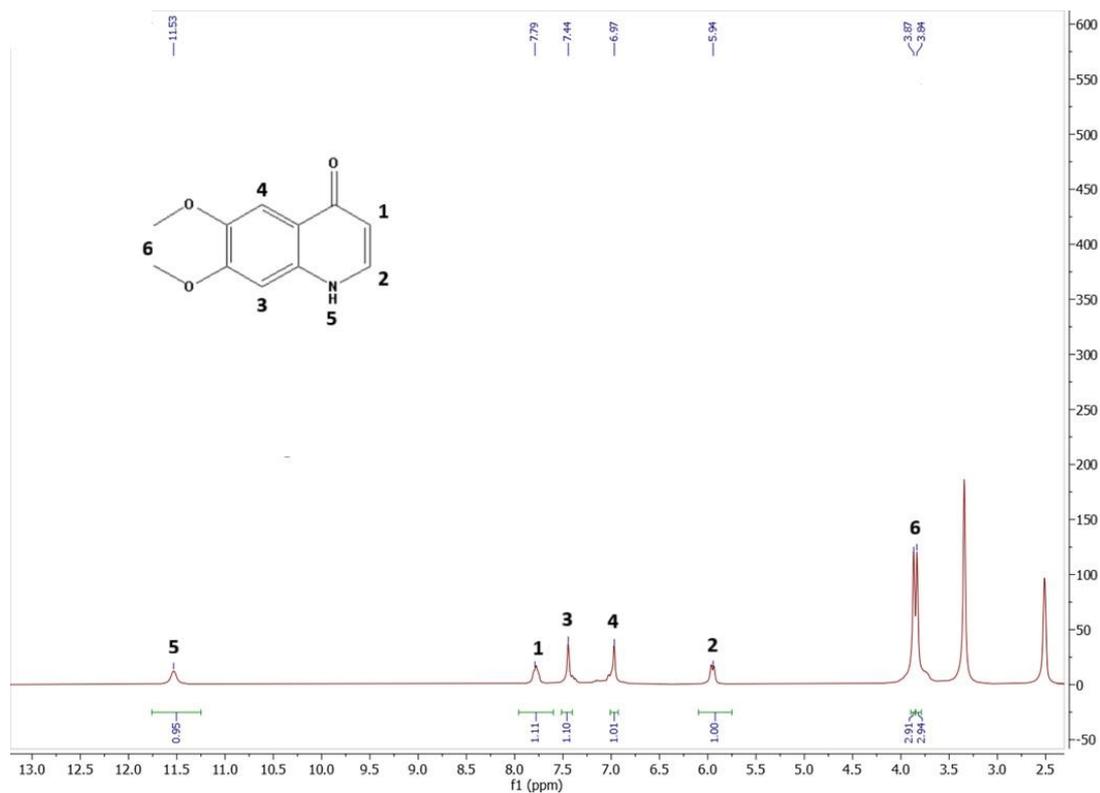


Εικόνα 32: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 40 DMSO- $\text{d}_6$ , στους 298 K

#### 4.2.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα της 6-μεθοξυκινολιν-4(1H)-όνης, ένωση 41

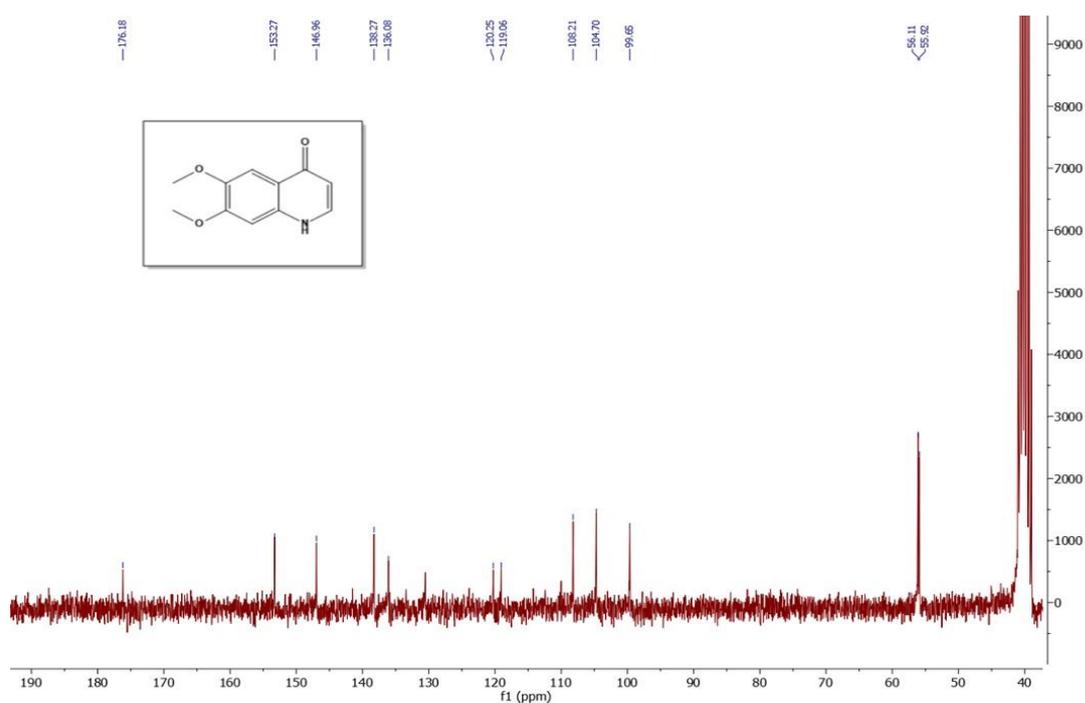


Στο φάσμα πρωτονίου της ένωσης το πρωτόνιο του αζώτου του πυρηδινικού δακτυλίου ( $\text{H}_5$ ) το οποίο είναι και το πλέον αποπροστατευμένο απεικονίζεται ως απλή κορυφή στα 11,53 ppm ως απλή κορυφή. Τα πρωτόνια υπ' αριθμόν 1 και 2 καταγράφουν σήμα στα 5,95 και 7,78 ppm αντίστοιχα. Το σήμα του πρωτονίου 1 σχάζεται από τα πρωτόνια 1 και 5 και ως εκ τούτου καταγράφει σήμα τριπλής κορυφής με σταθερά σύζευξης  $^3\text{J} = 6,6$  Hz, ενώ το 2 σε διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $^3\text{J} = 6,5$  Hz. Όπως αναφέρεται και παραπάνω η σχετικά μεγάλη διαφορά στις μετατοπίσεις και επομένως στο ηλεκτρονιακό περιβάλλον των 2 πρωτονίων οφείλεται στο ισχυρό επαγωγικό φαινόμενο που ασκείται από το άτομο αζώτου προς τον άνθρακα του πρωτονίου 2. Τα αρωματικά πρωτόνια 3 και 4 απεικονίζονται ως απλές κορυφές στα 7,45 και 6,97 ppm αντιστοίχως και καταλυκτικά, τα πρωτόνια των μεθόξυ ομάδων στα 3,84 και 3,87 ppm ως απλές κορυφές αμφότερες με ολοκλήρωση 3.



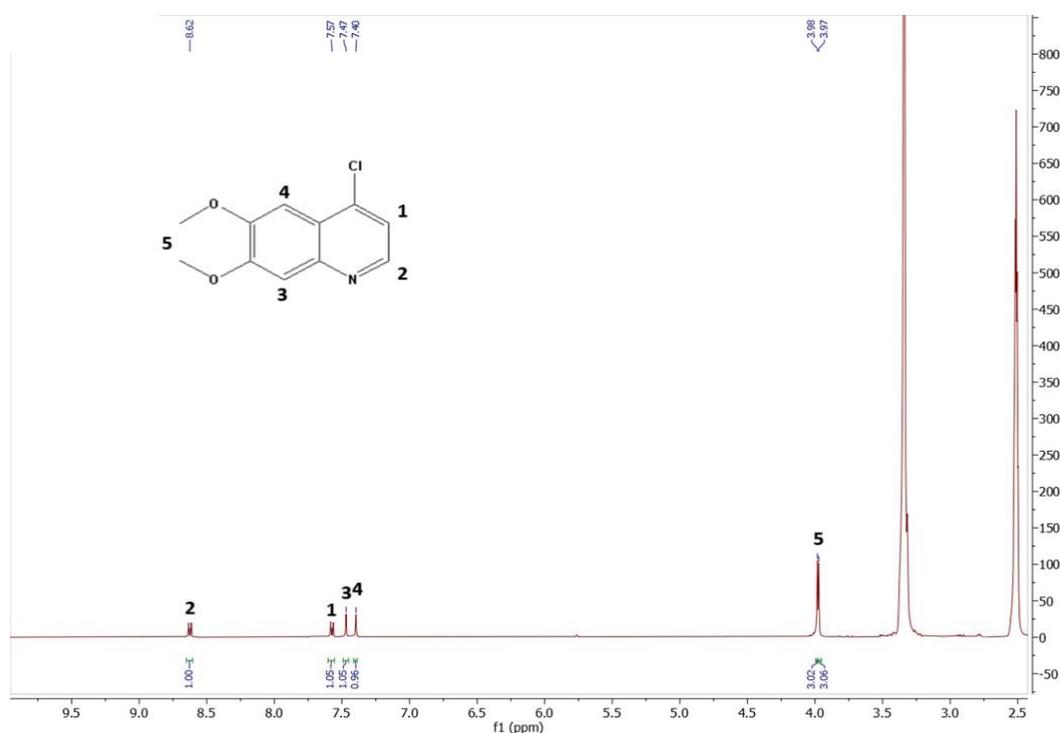
**Εικόνα 33:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 41 σε  $\text{DMSO-d}_6$ , στους 298 K

Το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της κινολόνης πιστώνει την λήψη του επιθυμητού προϊόντος από το σήμα στα 176,18 ppm που αντιστοιχεί στον καρβονυλικό άνθρακα του δακτυλίου.



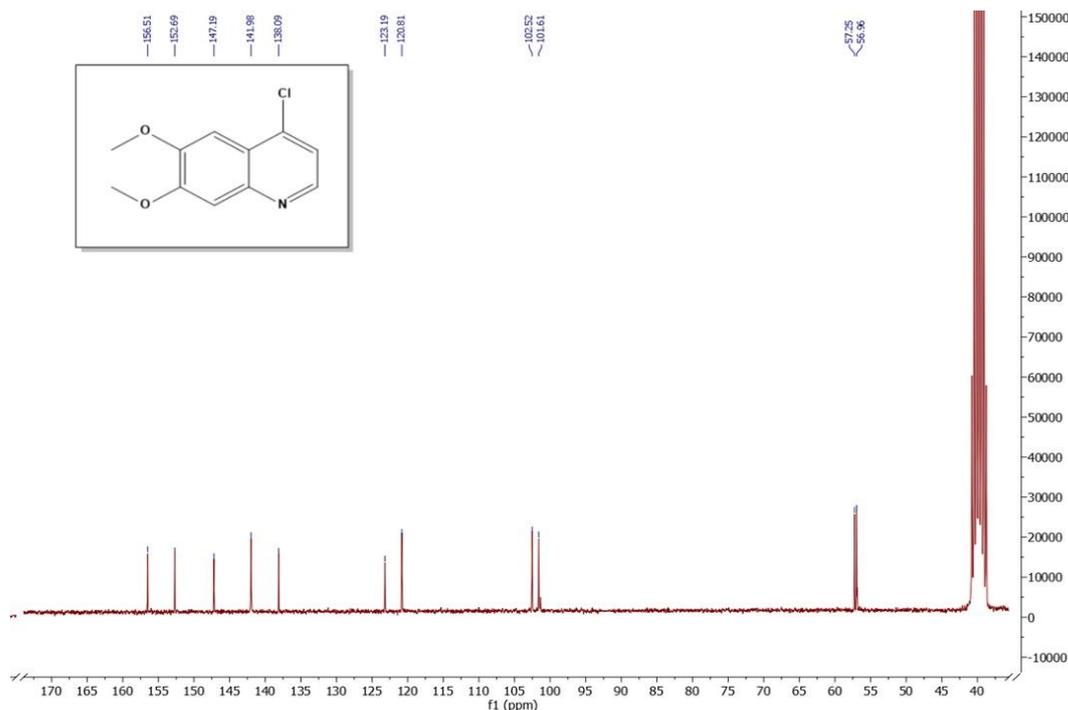
**Εικόνα 34:** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 41  $\text{DMSO-d}_6$ , στους 298 K

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης το πιο αποπροστατεμένο πρωτόνιο είναι το υπ' αριθμόν 2. Η αυξημένη μετατόπισή του (8,62 ppm) οφείλεται αρνητικό επαγωγικό και συζυγιακό φαινόμενο του αζώτου του δακτυλίου. Το σήμα του σχάζεται σε διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $^3J = 4,7$  Hz. Η σχάση του σήματός του οφείλεται στο πρωτόνιο 1 το οποίο καταγράφεται στα 7,57 ppm του οποίου το σήμα επίσης σχάζεται σε διπλή κορυφή. Τα πρωτόνια 3 και 4 είναι τα αντίστοιχα του βενζολικού δακτυλίου της κινολίνης με το 3 να εκτιμάται πως είναι ασθενώς πιο αποπροστατεμένο λόγω ισχνής επιρροής από το ετεροάτομο του δακτυλίου ακόμα και σε 3 μήκη δεσμών. Το σήμα και των 2 πρωτονίων παρουσιάζει σχάση και οι μετατοπίσεις τους είναι 7,47 και 7,40 αντίστοιχα. Τέλος το καταγράφον σήμα των πρωτονίων των μεθόξυ ομάδων (5) παρουσιάζει μερική αλληλεπικάλυψη λόγω του παρόμοιου μαγνητικά περιβάλλοντός τους.



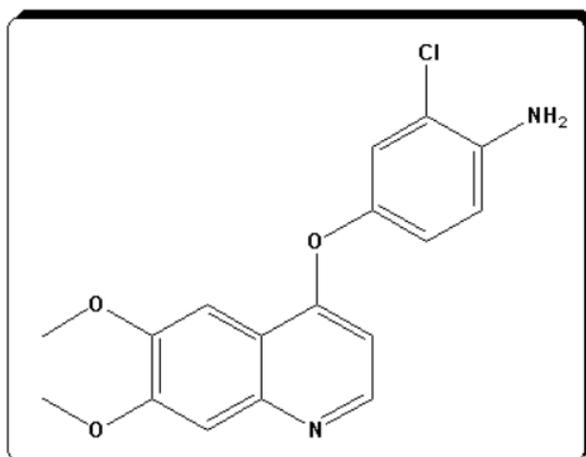
**Εικόνα 35:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 42 σε  $\text{DMSO-d}_6$ , στους 298 K

Στο φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της κινολίνης διαπιστώνεται η απουσία του μεγάλης μετατόπισης σήματος του καρβονυλικού άνθρακα της κινολόνης ( $\delta > 170$  ppm) αποδεικνύοντας την πραγματοποίηση της αντίδρασης.



Εικόνα 36: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 42 DMSO- $d_6$ , στους 298 K

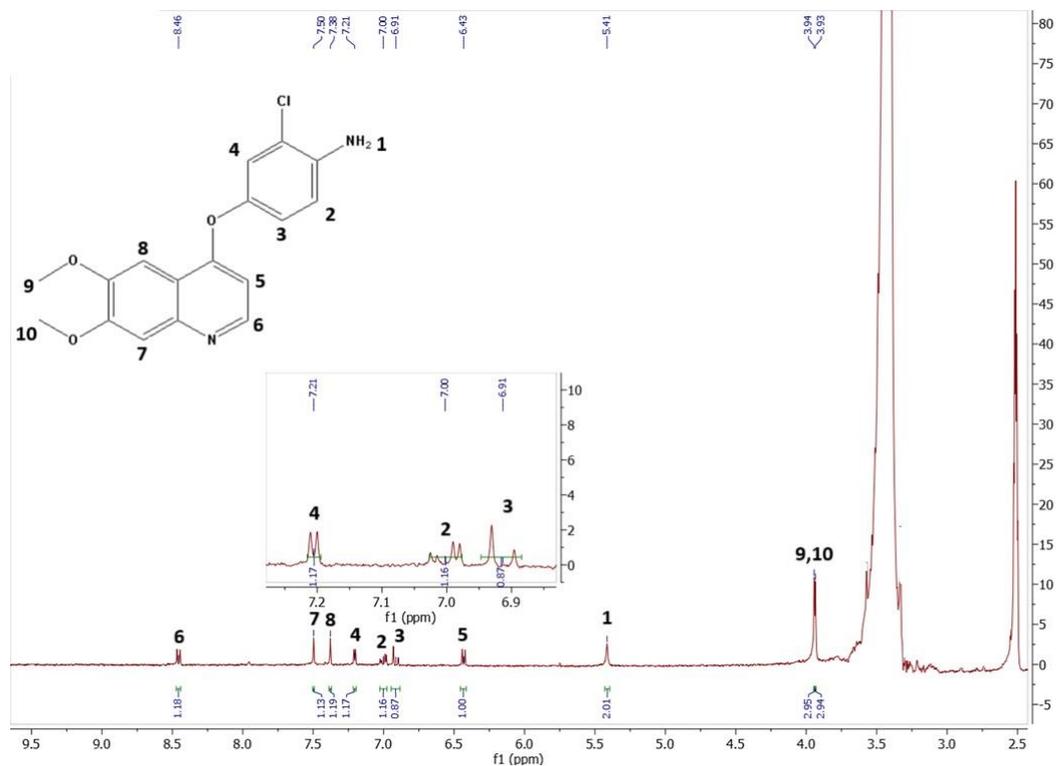
#### 4.2.5 Φασματοσκοπικά δεδομένα του 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας, ένωση 88



Στο φάσμα τα πρωτόνια της αμινομάδας (1) καταγράφουν σήμα απλής κορυφής στα 5,41 ppm. Η μετατόπιση σε αυτήν την, τηρουμένων των αναλογιών, μικρότερη μετατόπιση συγκριτικά με άλλες αμινομάδες συνδεδεμένες με δακτύλιο, οφείλεται στο εκδηλούμενο επαγωγικό φαινόμενο του χλωρίου και στο θετικό συζυγιακό φαινόμενο του διάρυλο-αιθέρα. Το πρωτόνιο 3 καταγράφεται στα 7,00 ppm ως διπλή διπλής κορυφή

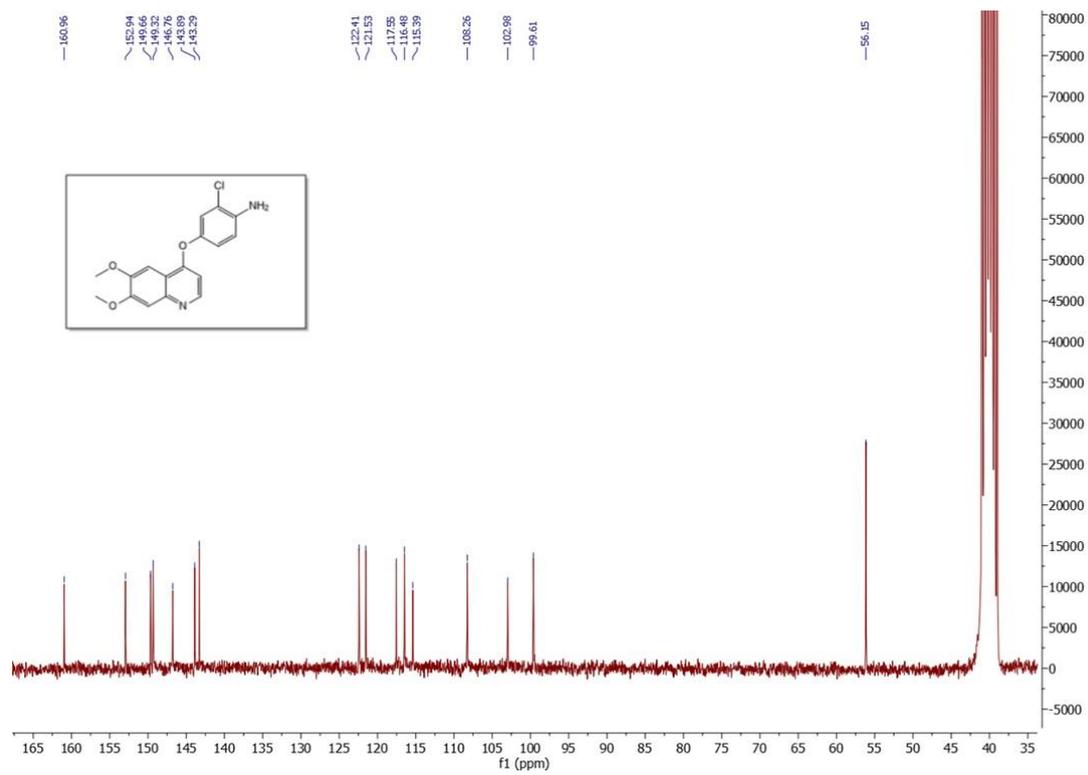
(dd) με σχάσεις  $^3J = 8,7$  Hz και  $^4J = 2,6$  Hz. Τα πρωτόνια 2 και 4 καταγράφονται ως διπλές κορυφές στα 6,91 και 7,21 ppm αντίστοιχα, με σταθερές σύζευξης  $^3J = 8,7$  Hz και  $^4J = 2,6$  Hz. Τα πρωτόνια 5 και 6 απεικονίζονται ως διπλές κορυφές στα 6,43 και 8,46 ppm αντίστοιχα με σταθερά σύζευξης  $^3J = 5,3$  Hz ενώ τα πρωτόνια 7 και 8 ως απλές κορυφές στα 7,38 και 7,50 ppm. Τέλος, τα πρωτόνια των 2 μεθόξυ ομάδων, λόγω της ελάχιστης διαφοράς στην ηλεκτρονιακή τους πυκνότητα, απεικονίζονται ως

2 απλές κορυφές, με ολοκλήρωση 3 έκαστη, οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται στα 3,93 και 3,94 ppm.



**Εικόνα 37:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 88 σε  $\text{DMSO-d}_6$ , στους 298 K

Η επιτυχής διεξαγωγή της αντίδρασης επαληθεύεται και από το φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR του διάλυτο αιθέρα όπου παρατηρείται η προσθήκη 6 επιπλέον σημάτων στην αρωματική περιοχή που αντιστοιχούν στον προσαρτηθέντα βενζολικό δακτύλιο.



Εικόνα 38: Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR της ένωσης 88 DMSO- $\text{d}_6$ , στους 298 Κ

## Κεφάλαιο 5

### 5.1 Γενικές Πειραματικές Συνθήκες και Οργανολογία

Η πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας διεξήχθη στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας (αίθουσα X3-210).

#### Αντιδραστήρια και Διαλύτες

Οι χημικές ενώσεις και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικές ύλες ήταν εμπορικά διαθέσιμα και προήλθαν από τους προμηθευτικούς οίκους Sigma-Aldrich, Merck και Carbosynth. Τα αντιδραστήρια ήταν υψηλής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι διαλύτες των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν είτε στην εμπορική τους μορφή, είτε κατόπιν κατάλληλης κατεργασίας για την παραλαβή τους ως απόλυτοι/άνυδροι, όταν οι συνθήκες της αντίδρασης απαιτούσαν απουσία υγρασίας.

#### Χρωματογραφία

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέσω Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας (TLC) σε προ-επιστρωμένες πλάκες πυριτίας φθορισμού (Silica gel F<sub>254</sub>) των εταιρειών Merck και Fluorochem. Η ανίχνευση των κηλίδων γινόταν με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV lamp).

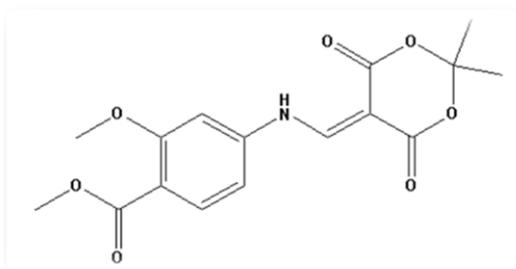
Για τον διαχωρισμό και την καθαρότητα των τελικών προϊόντων εφαρμόστηκε η τεχνική της Χρωματογραφίας Στήλης (Flash Column Chromatography), χρησιμοποιώντας ως στατική φάση Silica gel F<sub>254</sub> της εταιρείας Fluorochem.

#### Φασματοσκοπία

Η ταυτοποίηση και ο δομικός χαρακτηρισμός των συντιθέμενων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε φασματογράφους Bruker Avance συχνότητας 250 και 400 MHz.

### 5.2 Πειραματικό μέρος

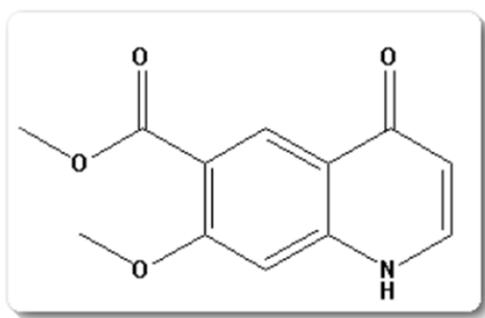
#### 5.2.1 Σύνθεση του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)-αμινο)2-μεθοξυβενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 29



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο 4-αμινο-2-μεθοξυ-βενζοϊκός μεθυλεστέρας (3.3g, 18.23 mmol) και προστίθεται η 2-προπανόλη (25 mL). Μόλις πραγματοποιηθεί η διαλυτοποίηση της αρχικής ένωσης ακολουθεί η προσθήκη του οξέος Meldrum (2.97 g, 20.62 mmol) και του μυρμηκικού τριαθυλεστέρα (6.66

g, 45.0 mmol,  $d=0.891$  g/mL) υπό ανάδευση. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος της αντίδρασης στους  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  με την χρήση κάθετου ψυκτήρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 1 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αυτής αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και παρατηρείται σχηματισμός λευκού ιζήματος. Προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα (100 ml) οδηγεί σε ποσοτική καταβύθιση του ιζήματος, οπότε και ακολουθεί διήθηση και έκπλυση του ιζήματος δύο φορές με ψυχρό διαιθυλαιθέρα (2 x 50 ml) . Μετά από ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν λευκού χρώματος

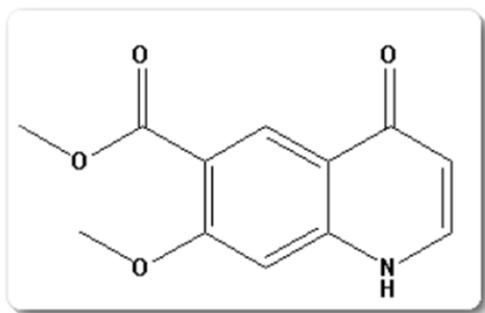
### 5.2.2 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-δωδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυ-βενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση (5.09 g, 15.2 mmol). Στη συνέχεια η ένωση θερμαίνεται υπό ανάδευση στους  $200^{\circ}\text{C}$  έως ότου τηχθεί. Η αντίδραση ολοκληρώνεται εντός 15min με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος μέσω χρωματογραφίας λεπτής

στοιβάδας (TLC)). Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με ψυχρό διαιθυλαιθέρα (2 x 50 ml). Μετά από ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν καφέ χρώματος.

### 5.2.3 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-δωδροκινολινο-6-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα, ένωση 30 (μέθοδος Esai)

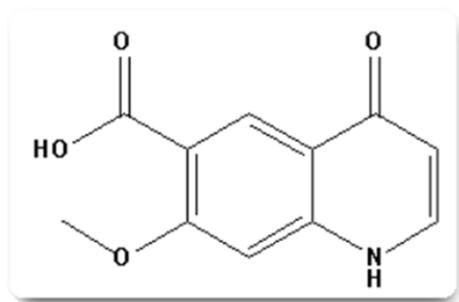


Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται το διάλυμα του 4-(((2,2-διμεθυλο-4,6-διοξο-1,3-διοξανο-5-υλιδενο)μεθυλο)αμινο)2-μεθοξυ-βενζοϊκού μεθυλεστέρα, ένωση 63 (7.35 g, 21.9 mmol) σε DOWTHERMTM A (8 mL διφαινολαιθέρα-3gr διφαινύλιο). Το διάλυμα θερμαίνεται υπό ανάδευση στους  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  με την χρήση κάθετου ψυκτήρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 1 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος

μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)). Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται μέχρι να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη διαιθυλαιθέρα (100 ml), διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με ψυχρό διαιθυλαιθέρα (2 x 50 ml). Μετά την ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού

κενού, το προϊόν απομονώνεται ως στερεό καφέ χρώματος (3.06 g, 13.14mmol, 60%).

#### 5.2.4 Σύνθεση του 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικού οξέος, ένωση 18



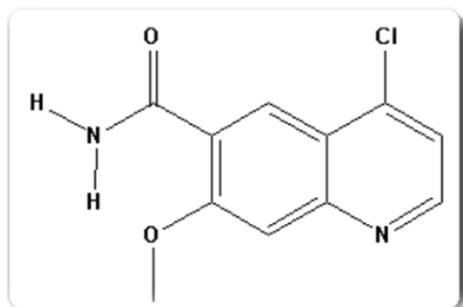
Σε σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50 mL εισήχθη η ένωση 7-μεθοξυ-4-οξο-1,4-διυδροκινολινο-6-καρβοξυλικός μεθυλεστέρας, (1.76g 7.55mmol) διαλυμένη σε 30mL διχλωρομεθανίου (DCM). Στο διάλυμα προστέθηκαν υπό ανάδευση 8.8mL μεθανολικού διαλύματος NaOH 3N. Το μίγμα της αντίδρασης υπεβλήθη σε θέρμανση στους 35°C υπό συνθήκες κάθετου ψυκτήρα. Η

πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), η οποία κατέδειξε την πλήρη κατανάλωση του αρχικού εστέρα εντός 15 λεπτών.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση. Το προκύπτον στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε 50mL ύδατος και το υδατικό διάλυμα εκπλύθηκε δύο φορές με διχλωρομεθάνιο για την απομάκρυνση των οργανικών προσμίξεων. Τέλος, η υδατική φάση συλλέχθηκε και οξινίστηκε προσεκτικά με υδατικό διάλυμα HCl 3N μέχρις ότου το pH του διαλύματος να φτάσει την τιμή 4.

Στην οξινισμένη υδατική φάση προστέθηκε χλωριούχο νάτριο (NaCl) έως ότου επιτευχθεί ο κορεσμός του διαλύματος και η ποσοτική καταβύθιση του προϊόντος. Ακολούθησε η παραλαβή του προϊόντος μέσω εκχύλισης της υδατικής φάσης με οξικό αιθυλεστέρα. Οι οργανικές στιβάδες συνενώθηκαν και αφυδατώθηκαν παρουσία ανύδρου θειικού νατρίου (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Στη συνέχεια, το ξηραντικό μέσο απομακρύνθηκε μέσω διήθησης και το διήθημα συμπυκνώθηκε υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού. Η διαδικασία απέδωσε το επιθυμητό προϊόν ως στερεό υποκίτρινου χρώματος.

#### 5.2.5 Σύνθεση του 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμιδίου, ένωση 20



Σε δίλιμη φιάλη 50mL, εισήχθη η ένωση (100mg, 0.46 mol) και διαλύθηκε σε περίσσεια φρεσκο-απεσταγμένου θειονυλοχλωριδίου (5mL), παρουσία καταλυτικής ποσότητας DMF (2 σταγόνες). Το μίγμα υπεβλήθη σε θέρμανση υπό κάθετη ψύξη (reflux) για 2 ώρες σε ατμόσφαιρα

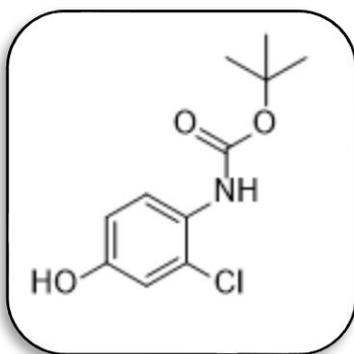
αζώτου. Ακολούθως, το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η περίσσεια του θειονυλοχλωριδίου απομακρύνθηκε υπό κενό, οδηγώντας στην απομόνωση του ενδιάμεσου 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβονυλοχλωριδίου ως στερεού καφέ χρώματος.

Το προκύπτον ακυλοχλωρίδιο επαναδιαλύθηκε άμεσα σε άνυδρο THF (5mL) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το διάλυμα ψύχθηκε στους 0°C και σε αυτό διοχετεύθηκε ρεύμα ξηρής αέριας αμμωνίας, η οποία παρήχθη *ex situ* μέσω αντίδρασης NaOH 12N 20g, 0.5mol) με NH<sub>4</sub>Cl (25g, 0.5mol). Η προσθήκη της αμμωνίας προκάλεσε την εμφάνιση φυσαλίδων και τον σχηματισμό καφέ ιζήματος.

Η αντίδραση αφέθηκε να εξελιχθεί σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την πλήρη κατανάλωση των αρχικών (έλεγχος TLC). Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα, το στερεό υπόλειμμα υπεβλήθη σε εκχύλιση με σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/ύδατος (25 mL/25 mL). Η οργανική φάση εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ξηράθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώθηκε.

Η διαδικασία απέδωσε το τελικό προϊόν ως υποκίτρινο στερεό.

### 5.2.6 Προστασία της αμινομάδας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης, σύνθεση ένωσης 35



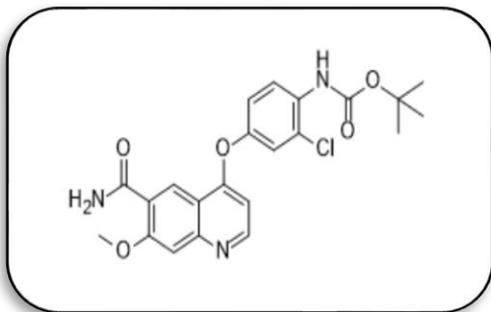
Σε σφαιρική φιάλη χωρητικότητας (50mL), εισήχθη το υδροχλωρικό άλας της 4-αμινο-3-χλωροφαινόλης (0.5g, 2,8mmol) και διαλύθηκε σε αιθανόλη (10mL). Υπό συνθήκες ανάδευσης, προστέθηκε αρχικά τριαιθυλαμίνη (0.29 g, 2.9mmol) για την εξουδετέρωση του υδροχλωρικού οξέος, και εν συνεχεία Boc-ανυδρίτης (Di-tert-butyl dicarbonate, 0.732g, 33.4mmol).

Το μίγμα της αντίδρασης υπεβλήθη σε θέρμανση στους 40°C με χρήση κάθετου ψυκτήρα. Η παρακολούθηση της πορείας μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) κατέδειξε την πλήρη κατανάλωση του αρχικού αντιδρώντος μετά από 1 ώρα.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης (αιθανόλη) απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προκύπτον υπόλειμμα υπεβλήθη σε εκχύλιση με σύστημα διχλωρομεθανίου/ύδατος (50mL/50mL). Η οργανική φάση συλλέχθηκε και εκπλύθηκε δύο φορές με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου για την απομάκρυνση των βασικών προσμίξεων.

Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης επί ανύδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διήθηση και συμπύκνωση υπό ελαττωμένη πίεση. Η διαδικασία οδήγησε στην απομόνωση του προϊόντος ως στερεού σκούρου κόκκινου χρώματος.

### 5.2.7 Σύνθεση του (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)-καρβαμικού tert-βουτυλεστέρα, ένωση 36



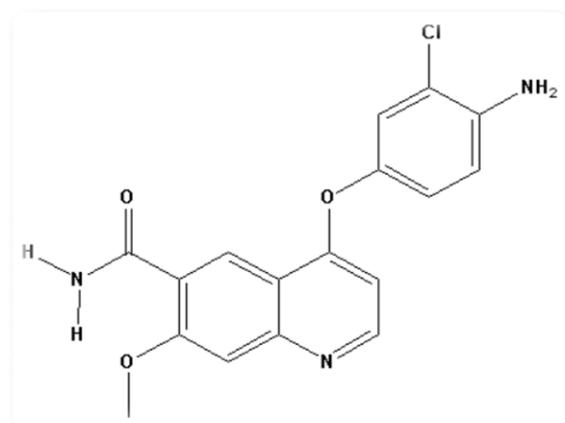
Σε σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50mL, εισήχθη ο 2-χλωρο-4-υδροξυφαινυλο)καρβαμικός tert-βουτυλεστέρας (60mg, 250 mmol) και διαλύθηκε σε απόλυτο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (1mL). Υπό ανάδευση, προστέθηκαν διαδοχικά το 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιο, (50mg, 0.211mmol) και η βάση ανθρακικό καίσιο ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , 190 mg, 0,58 mmol).

Το μίγμα της αντίδρασης υπεβλήθη σε θέρμανση στους 90°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου με χρήση κάθετου ψυκτήρα. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC), η οποία υπέδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης μετά από 12 ώρες.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το DMSO απομακρύνθηκε μέσω απόσταξης υπό υψηλό κενό (λόγω του υψηλού σημείου ζέσεώς του). Το προκύπτον υπόλειμμα διαμοιράστηκε σε σύστημα οξικού αιθυλεστέρα και ύδατος. Η οργανική στιβάδα διαχωρίστηκε και εκπλύθηκε εκ νέου με νερό 2x50mL) για την πλήρη απομάκρυνση των ανόργανων αλάτων και ιχνών του διαλύτη.

Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης επί ανύδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διήθηση και συμπύκνωση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν παρελήφθη ως στερεό σκούρου κόκκινου χρώματος. Η ένωση χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο συνθετικό στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

### 5.2.8 Σύνθεση του 4-(4-αμινο-3-χλωροφαινοξυ)-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιου, ένωση 37



Σε σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50mL, εισήχθη ο (4-((6-καρβαμοϋλο-7-μεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)-2-χλωροφαινυλο)καρβαμικός tert-βουτυλεστέρας (5g, 11.2mmol). Στη συνέχεια, προστέθηκε μεθανολικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος συγκέντρωσης 2N (20mL).

Το μίγμα παρέμεινε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλήρης μετατροπή της αρχικής ένωσης

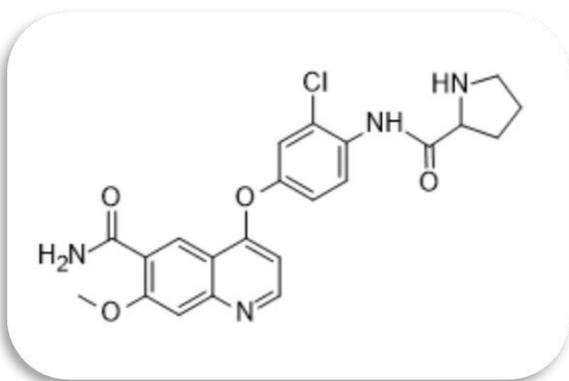
επιβεβαιώθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) μετά την πάροδο 2 ωρών.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττωμένη πίεση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το στερεό υπόλειμμα παρελήφθη με οξικό αιθυλεστέρα (100mL) και το μίγμα εξουδετερώθηκε/εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 100mL) για την απελευθέρωση της ελεύθερης αμίνης.

Η οργανική φάση διαχωρίστηκε, ξηράθηκε επί ανύδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού, αποδίδοντας ένα σκούρο κόκκινο στερεό.

Για την παραλαβή της καθαρής ένωσης, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (flash chromatography) με σύστημα διαλυτών DCM/ $\text{CH}_3\text{OH}$  σε αναλογία 10/0.3. Μετά την τελική ξήρανση του ιζήματος σε αντλία υψηλού κενού, απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν ως στερεό κόκκινου χρώματος.

### 5.2.9 Σύνθεση αναλόγου 1



Σε δίλιμη φιάλη 15mL, υπό ατμόσφαιρα αργού, εισήχθη διάλυμα της N-Boc-L-προλίνης (39mg, 0.18mmol) σε άνυδρο THF (3mL). Στο διάλυμα προστέθηκαν υπό ανάδευση και στους  $0^\circ\text{C}$  το αντιδραστήριο σύζευξης HATU (92mg, 0.24mmol) και η τριαιθυλαμίνη ( $\text{Et}_3\text{N}$ , 84mg, 0.84mmol).

Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά προκειμένου να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα. Ακολούθως, προστέθηκε η αμίνη (20mg, 0.06 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης υπεβλήθη σε θέρμανση υπό κάθετη ψύξη (reflux) και ατμόσφαιρα αζώτου. Ο έλεγχος με TLC έδειξε την ολοκλήρωση της αντίδρασης μετά από 8 ώρες.

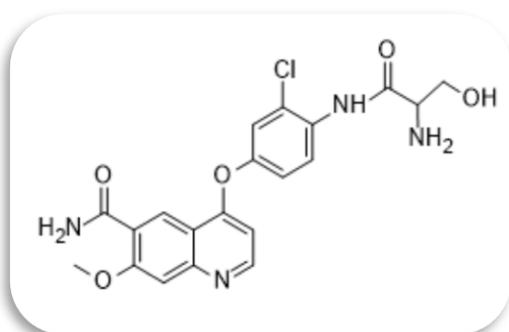
Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση, το υπόλειμμα διαμοιράστηκε σε οξικό αιθυλεστέρα (100mL) και νερό (100 mL). Η οργανική φάση εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $2 \times 100\text{mL}$ ), ξηράθηκε ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και συμπυκνώθηκε, αποδίδοντας το ενδιάμεσο N-Boc προστατευμένο προϊόν ως λευκό στερεό.

Το ενδιάμεσο προϊόν διαλύθηκε σε μεθανολικό διάλυμα HCl 2 N (15mL) σε φιάλη 25 mL και αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε εντός 1 ώρας (έλεγχος TLC).

Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος και επεξεργασία μέσω εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα (100mL) και κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (100mL) για την παραλαβή της ελεύθερης αμίνης. Η οργανική στιβάδα ξηράθηκε και συμπυκνώθηκε.

Ο τελικός καθαρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας στήλης με σύστημα διαλυτών DCM/EtOAc /MeOH (1/1/0.1).

### 5.2.10 Σύνθεση αναλόγου 2



Σε δίλαιο φιάλη 15mL, υπό ατμόσφαιρα αργού, εισήχθη διάλυμα της N-Boc-L-σερίνης 30mg, 0.146mmol) σε άνυδρο THF (3mL). Στο διάλυμα προστέθηκαν υπό ανάδευση και στους 0°C το αντιδραστήριο σύζευξης HATU 58mg, 0.152mmol) και η τριαιθυλαμίνη (Et<sub>3</sub>N, 41μL, 0.29mmol).

Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά

προκειμένου να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα.

Ακολούθως, προστέθηκε η αμίνη (20mg, 0.06 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης υπεβλήθη σε θέρμανση υπό κάθετη ψύξη (reflux) και ατμόσφαιρα αζώτου. Ο έλεγχος με TLC έδειξε την ολοκλήρωση της αντίδρασης μετά από 8 ώρες.

Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση, το υπόλειμμα διαμοιράστηκε σε οξικό αιθυλεστέρα (100mL) και νερό (100 mL). Η οργανική φάση εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2 × 100mL), ξηράθηκε ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και συμπυκνώθηκε, αποδίδοντας το ενδιάμεσο N-Boc προστατευμένο προϊόν ως λευκό στερεό.

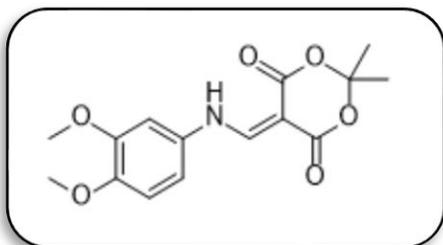
Το ενδιάμεσο προϊόν διαλύθηκε σε μεθανολικό διάλυμα HCl 2 N (15mL) σε φιάλη 25 mL και αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε εντός 1 ώρας (έλεγχος TLC).

Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος και επεξεργασία μέσω εκχύλισης με οξικό αιθυλεστέρα (100mL) και κορεσμένο διάλυμα  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (100mL) για την παραλαβή της ελεύθερης αμίνης. Η οργανική στιβάδα ξηράθηκε και συμπυκνώθηκε.

Ο τελικός καθαρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας στήλης με σύστημα διαλυτών DCM/EtOAc /MeOH (1/1/0.1). Το τελικό προϊόν απομονώθηκε ως λευκό στερεό.

### 5.3 Σύνθεση αναλόγου 3

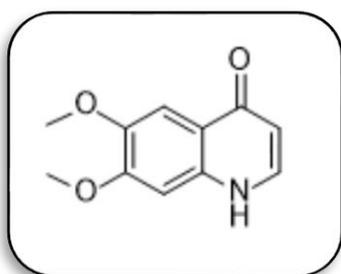
#### 5.3.1 Σύνθεση 5-(((4-μεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξάνιο-4,6-διόνη, ένωση 40



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται η 4-μεθοξυανιλίνη (p-Anisidine) (800mg, 6,50 mmol) και προστίθεται η 2-προπανόλη (5 mL). Μόλις πραγματοποιηθεί η διαλυτοποίηση της αρχικής ένωσης ακολουθεί η προσθήκη του οξέος Meldrum (1,13 g, 7,85 mmol) και του μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα (3mL) υπό

ανάδευση. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος της αντίδρασης στους 80 °C με την χρήση κάθετου ψυκτήρα. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 1 h με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αυτής αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και παρατηρείται σχηματισμός λευκού ιζήματος. Προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα (100 ml) οδηγεί σε ποσοτική καταβύθιση του ιζήματος, οπότε και ακολουθεί διήθηση και έκπλυση του ιζήματος δύο φορές με ψυχρό διαιθυλαιθέρα (2 x 50 ml) . Μετά από ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν λευκού χρώματος.

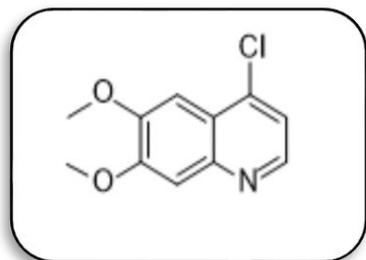
#### 5.3.2 Σύνθεση 6-μεθοξυκινολιν-4(1H)-όνη, ένωση 41



Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL φέρεται ο 5-(((4-μεθοξυφαινυλ)αμινο)μεθυλενο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξάνιο-4,6-διόνη, ένωση (200 mg, 0,722 mmol). Στη συνέχεια η ένωση θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 200°C έως ότου τηχθεί. Η αντίδραση ολοκληρώνεται εντός 15min με πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης (έλεγχος μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC)). Στη συνέχεια, το μίγμα της

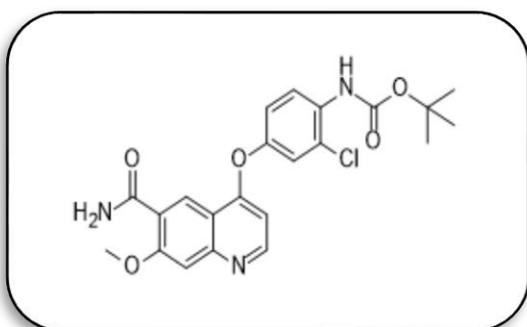
αντίδρασης αφήνεται να φτάσει τη θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με ψυχρό διαιθυλαιθέρα (2 x 50 ml). Μετά από ξήρανση του ιζήματος στην αντλία υψηλού κενού, λαμβάνεται το προϊόν καφέ χρώματος.

### 5.3.3 Σύνθεση της 4-χλωρο-6-μεθοξυκινολίνη, ένωση 42



Σε τρίλαιμη φιάλη 50mL, εισήχθη η ένωση (500mg, 2,60 mol) και διαλύθηκε σε περίσσεια φρεσκο-απεσταγμένου θειονυλοχλωριδίου (10mL), παρουσία καταλυτικής ποσότητας DMF (2 σταγόνες). Το μίγμα υπεβλήθη σε θέρμανση υπό κάθετη ψύξη (reflux) για 2 ώρες σε ατμόσφαιρα αζώτου. Ακολούθως, το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η περίσσεια του θειονυλοχλωριδίου απομακρύνθηκε υπό κενό, οδηγώντας στην απομόνωση της 4-χλωρο-6-μεθοξυκινολίνης ως στερεού λευκού χρώματος.

### 5.3.4 Σύνθεση (3-χλωρο-4-((6-μεθοξυκινολιν-4-υλ)οξυ)φαινυλο)καρβαμιδικό τριτοταγές βουτύλιο, ένωση 43

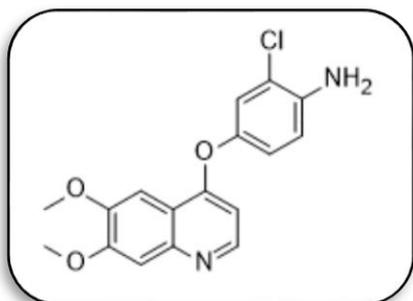


Σε σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 50mL, εισήχθη το 3-χλωρο-4-((6-μεθοξυκινολιν-4-υλ)οξυ)φαινυλο)καρβαμιδικό τριτοταγές βουτύλιο (150mg, 375 mmol) και διαλύθηκε σε απόλυτο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (1mL). Υπό ανάδευση, προστέθηκαν διαδοχικά το 4-χλωρο-7-μεθοξυκινολινο-6-καρβοξαμίδιο, (50mg, 0.211mmol) και η βάση ανθρακικό καίσιο ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , 190 mg, 0,58 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης υπεβλήθη σε θέρμανση στους 90°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου με χρήση κάθετου ψυκτήρα. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), η οποία υπέδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης μετά από 12 ώρες.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το DMSO απομακρύνθηκε μέσω απόσταξης υπό υψηλό κενό (λόγω του υψηλού σημείου ζέσεώς του). Το προκύπτον υπόλειμμα διαμοιράστηκε σε σύστημα οξικού αιθυλεστέρα και ύδατος. Η οργανική στιβάδα διαχωρίστηκε και εκπλύθηκε εκ νέου με νερό 2×50mL) για την πλήρη απομάκρυνση των ανόργανων αλάτων και ιχνών του διαλύτη.

Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης επί ανύδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διήθηση και συμπύκνωση στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν παρελήφθη ως στερεό σκούρου κόκκινου χρώματος. Η ένωση χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο συνθετικό στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

### 5.3.5 Σύνθεση 3-χλωρο-4-((6-μεθοξυκινολιν-4-υλ)οξυ)ανιλίνη, ένωση 89

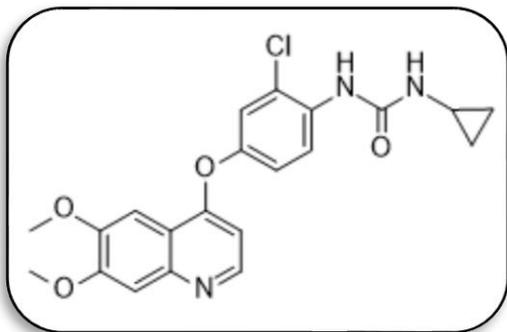


Το καθοριστικό στάδιο για την παραλαβή της υποκατεστημένης ανιλίνης 87 αφορά την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας Boc από το N-τελικό άκρο της ένωσης 88.

Η διαδικασία αποπροστασίας πραγματοποιήθηκε υπό όξινες συνθήκες, με τη χρήση μεθανολικού διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl/MeOH) συγκέντρωσης 2N, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Δεδομένου ότι η αντίδραση οδηγεί αρχικά στον σχηματισμό του προϊόντος υπό τη μορφή υδροχλωρικού άλατος, ακολούθησε στάδιο εξουδετέρωσης. Το μείγμα κατεργάστηκε με διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), μιας ασθενούς βάσης, επιτρέποντας την απελευθέρωση και την τελική απομόνωση της ελεύθερης αμίνης.

### 5.3.6 Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας με CDI, ένωση 89



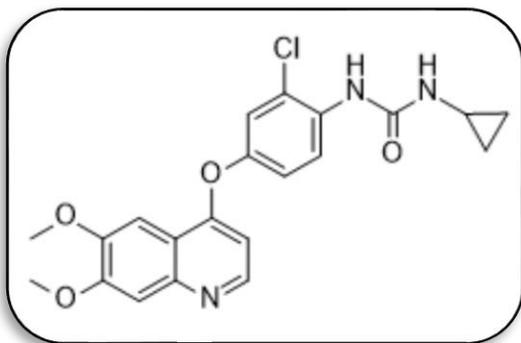
Σε σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 10mL, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, εισήχθη η ένωση 88 (300mg, 1mmol) διαλυμένη σε άνυδρο DMF 2mL).

Στο διάλυμα προστέθηκε το 1,1'-καρβονυλοδιιμιδαζόλιο (CDI) (194,58mg, 1,2 mmol, [1.2 ισοδύναμο]) σε μία δόση. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα,

προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης ενεργοποίηση της αρωματικής αμίνης και ο σχηματισμός του ενδιάμεσου N-ακυλο-ιμιδαζολίου.

Στη συνέχεια, προστέθηκε η κυκλοπροπυλαμίνη (102,762 mg ή 124,7μL, 1,8mmol, [1.5-ισοδύναμο]) και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε ήπια θέρμανση (40 °C) για επιπλέον 24 ώρες (overnight) μέχρι την ολοκλήρωσή της (έλεγχος με TLC), όπου δεν διαπιστώθηκε ο σχηματισμός νέας κηλίδας για περαιτέρω επεξεργασία.

### 5.3.7 Σύνθεση της 1-(2-χλωρο-4-((6,7-διμεθοξυκινολινο-4-υλο)οξυ)φαινυλο)-3-κυκλοπροπυλουρίας με τριφωσγενίο, ένωση 89



Σε σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αζώτου, εισήχθη η ένωση 88 (15mg, 0,045mmol) σε άνυδρο DMF. Το διάλυμα ψύχθηκε στους 0°C και προστέθηκε σταγόδην διάλυμα τριφωσγενίου (13,32mg, 0,045μL) διαλυμένο σε DMF, παρουσία τριαθυλαμίνης (11,6mg, 0,115 μL, 0,115mmol).

Το μίγμα αναδεύτηκε στους 0°C για 30 λεπτά ώστε να σχηματιστεί *in situ* το

ενδιάμεσο ισοκυανικό/καρβαμοϋλο-χλωρίδιο. Ακολούθως, προστέθηκε η κυκλοπροπυλαμίνη (7,44mg, 0,1305mmol) και η αντίδραση αφέθηκε να εξελιχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Ο έλεγχος με TLC έδειξε την ολοκλήρωση της αντίδρασης μετά από 24 ώρες. Ακολούθησε συμπύκνωση του μίγματος και επεξεργασία μέσω εκχύλισης με διχλωρομεθάνιο (DCM). Η οργανική στιβάδα ξηράθηκε και συμπυκνώθηκε.

Ο τελικός καθαρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας στήλης με σύστημα διαλυτών DCM/EtOAc (1/0.1). Το τελικό προϊόν απομονώθηκε ως λευκό στερεό.

## Κεφάλαιο 6

### 6.1 Συμπεράσματα - Συζήτηση

Επιχειρώντας μια συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ των σχεδιαζόμενων αναλόγων, βάσει της μοριακής μοντελοποίησης, οδηγούμαστε στα εξής:

#### Ανάλογο 1

Το ανάλογο αυτό αναδεικνύεται ως το πλέον υποσχόμενο λόγω του στερεοχημικού περιορισμού που επιβάλλει ο δακτύλιος της προλίνης:

- **Συνδυαστική Ισχύς:** Επιτυγχάνει πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου με τα Asp173, Phe174 και Glu62, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί υδρόφοβες επαφές (Leu176, Ile65) παρόμοιες με αυτές του Lenvatinib.
- **Pi-Pi Stacking:** Η εμφάνιση αλληλεπίδρασης Pi-Pi Stacked με το Phe95 προσφέρει μια επιπλέον στιβάδα σταθερότητας που δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα ανάλογα, «σφραγίζοντας» τον αρωματικό σκελετό στην ενεργό θέση.

#### Ανάλογο 2

Η αντικατάσταση της κυκλοπροπυλουρίας από το αμινοξύ σερίνη μετατοπίζει τον χαρακτήρα της πρόσδεσης από υδρόφοβο σε έντονα υδροφιλικό:

- **Πολική Σταθεροποίηση:** Παρατηρείται ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου με το Asp173 και το Phe174.
- **Μειονέκτημα:** Η αυξημένη πολικότητα και η ευκαμψία της αλυσίδας οδηγούν σε μείωση των υδρόφοβων Alkyl επαφών, γεγονός που ενδέχεται να επηρεάζει τη θερμοδυναμική σταθερότητα σε σύγκριση με το Lenvatinib.

#### Ανάλογο 3

Το μόριο αυτό αποτελεί μια υβριδική προσέγγιση:

- **Γέφυρα Αμιδίου-Εστέρα:** Χρησιμοποιεί τον μεθυλεστέρα για να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τα Asp173 και Glu62.
- **Επαναφορά Κυκλοπροπυλίου:** Η χρήση του κυκλοπροπυλίου επιτρέπει την αποτελεσματική πλήρωση της υδρόφοβης υπο-τσέπης, ενώ η αλληλεπίδραση Pi-Sulfur με τη Cys172 ενισχύει την εξειδίκευση της σύνδεσης.

Συνοψίζοντας, από τη συγκριτική ανάλυση των 2D διαγραμμάτων προκύπτει ότι:

1. Το Ανάλογο 1 υπερέχει σε τοπική σταθερότητα λόγω του Pi-Pi stacking και των πολλαπλών δεσμών υδρογόνου, καθιστώντας το έναν εξαιρετικό υποψήφιο για περαιτέρω *in vitro* μελέτες.
2. Το Ανάλογο 3 προσφέρει μια ισορροπημένη λύση μεταξύ πολικότητας και υδροφοβικότητας.

3. Το Ανάλογο 2, αν και παρουσιάζει καλή πολική πρόσδεση, υστερεί σε συμπληρωματικότητα σχήματος (shape complementarity) στην αλλοστερική κοιλότητα.

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία έθεσε τις βάσεις για τον σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων αναλόγων του Lenvatinib ως σημαντικούς υποψήφιους φαρμακευτικούς παράγοντες στο φαρμακολογικό «οπλοστάσιο» κατά του καρκίνου. Με βάση τα συμπεράσματα που προέκυψαν, οι μελλοντικοί ερευνητικοί στόχοι μπορούν να συνοψιστούν στους εξής άξονες:

1. Διεύρυνση Βιολογικών Στόχων: Ένας πρωταρχικός στόχος είναι η διερεύνηση της συγγένειας των νέων αναλόγων και με άλλους πιθανούς βιολογικούς στόχους (πέραν του VEGFR), στο πλαίσιο της πολυφαρμακολογίας (polypharmacology). Η μελέτη αυτή προτείνεται να πραγματοποιηθεί αρχικά σε *in silico* επίπεδο μέσω πειραμάτων Μοριακής Μοντελοποίησης (Molecular Docking) και, σε δεύτερο χρόνο, να επιβεβαιωθεί μέσω *in vitro* βιολογικής αξιολόγησης σε πάνελ κινασών.
2. Επέκταση της Μελέτης Σχέσης Δομής-Δράσης (SAR): Η βελτιστοποιημένη συνθετική μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία επιτρέπει την ευέλικτη και αποδοτική σύνθεση νέων παραγώγων. Προτείνεται ο σχεδιασμός νέων μορίων με ανάλογες δομικές τροποποιήσεις σε δύο κομβικά σημεία:
  - Τροποποίηση του δεσμού Ουρίας: Αντικατάσταση του κυκλοπροπυλικού δακτυλίου με άλλα φυσικά αμινοξέα. Η εισαγωγή τέτοιων πολικών ομάδων αναμένεται να επηρεάσει την υδατοδιαλυτότητα και τις αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με την ενεργό περιοχή του υποδοχέα.
  - Τροποποίηση του Κινολινικού Δακτυλίου: Διερεύνηση νέων υποκαταστατών στις θέσεις 6 και 7 του κινολινικού πυρήνα, με στόχο τη βελτιστοποίηση της στερεοχημικής και ηλεκτρονικής ταιριαστότητας με τον βιολογικό στόχο.

Όσον αφορά τις εφαρμοζόμενες βελτιστοποιήσεις της πειραματικής πορείας, αρχικά, κατά τον σχηματισμό της υποκατεστημένης κινολόνης, η εφαρμογή μεθόδου χωρίς τη χρήση διαλύτη αποδείχθηκε καθοριστική, καθώς περιόρισε δραστικά τον χρόνο αντίδρασης από τη μία ώρα στα δέκα λεπτά, αυξάνοντας παράλληλα την απόδοση από το 60% στο 80%. Η τάση αυτή συνεχίστηκε και στο στάδιο της υδρόλυσης του μεθυλεστέρα της κινολόνης, όπου η υιοθέτηση μη υδατικών βασικών συνθηκών (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 9:1) εξασφάλισε σχεδόν ποσοτική απόδοση (99%) σε ελάχιστο χρόνο, προσφέροντας μια περιβαλλοντικά φιλικότερη και ενεργειακά λιγότερο απαιτητική εναλλακτική.

Επιπλέον, η χρήση αέριας αμμωνίας για τον σχηματισμό του αμιδίου ενίσχυσε την απόδοση στο 88%, ενώ η βελτιστοποίηση της Boc-προστασίας της αμινομάδας με τη χρήση αιθανόλης στους 40°C εξασφάλισε υψηλή εκλεκτικότητα και απόδοση της τάξεως του 95%, αποφεύγοντας τον σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Τέλος, για την σύνθεση της τελικής ένωσης (Ανάλογο 3) έγινε χρήση του τριφωσγενίου, το οποίο λειτούργησε ως αποτελεσματικότερο αντιδραστήριο σύζευξης σε σύγκριση με το CDI, που πρότεινε η εταιρία Esai. Συμπερασματικά, οι συγκεκριμένες μεθοδολογικές τροποποιήσεις δεν αναβάθμισαν μόνο τις τελικές

αποδόσεις, αλλά κατέστησαν τη συνθετική πορεία ταχύτερη, οικονομικότερη και συμβατή με τις αρχές της Πράσινης Χημείας, προσφέροντας ένα ισχυρό υπόβαθρο για την περαιτέρω μελέτη των αναλόγων αυτών.

## Βιβλιογραφία

1. Abdelgalil, A. A., Alkahtani, H. M., & Al-Jenoobi, F. I. (2019). Sorafenib. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 44, 239–266. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.11.003>
2. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., & Lo Muzio, L. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 271–280. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>
3. Audet, M., & Bouvier, M. (2012). Restructuring G-protein-coupled receptor activation. *Cell*, 151(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.003>
4. Baudino, T. (2015). Targeted cancer therapy: The next generation of cancer treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(1), 3–20.
5. Besant, P. G., Tan, E., & Attwood, P. V. (2003). Mammalian protein histidine kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(3), 297–309.
6. Bhullar, K. S., Lagarón, N. O., McGowan, E. M., Parmar, I., Jha, A., Hubbard, B. P., ... & et al. (2018). Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer*, 17(1), 48.
7. Browne, I. M., & Okines, A. F. C. (2024). Resistance to targeted inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway in advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer. *Cancers*, 16(12), 2259.
8. Cabanillas, M. E., McFadden, D. G., & Durante, C. (2016). Thyroid cancer. *The Lancet*, 388(10061), 2783–2795.
9. Capra, M., Nuciforo, P. G., Confalonieri, S., Quarto, M., Bianchi, M., Nebuloni, M., ... & Di Fiore, P. P. (2006). Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Research*, 66(16), 8147–8154.
10. Chen, C., Shi, Q., Xu, J., Ren, T., Huang, Y., & Guo, W. (2022). Current progress and open challenges for applying tyrosine kinase inhibitors in osteosarcoma. *Cell Death Discovery*, 8(1), 488.
11. Dhanasekaran, N., & Premkumar Reddy, E. (1998). Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, 17(11), 1447–1455.
12. Edelman, A. M., & Krebs, E. G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 567–613.
13. García-Aranda, M., & Redondo, M. (2019). Targeting receptor kinases in colorectal cancer. *Cancers*, 11(4), 433.
14. Haber, D. A., Gray, N. S., & Baselga, J. (2011). The evolving war on cancer. *Cell*, 145(1), 19–24.
15. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
16. Hanks, S. K., Quinn, A. M., & Hunter, T. (1988). The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, 241(4861), 42–52.
17. Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129.
18. Hortaa, P., Secrierua, A., Coninckxa, A., & Cristianoa, M. L. S. (2019). Quinolones for applications in medicinal chemistry: Synthesis and structure. *Targets in Heterocyclic Systems*, 22, 260–291.

19. Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. *Methods in Enzymology*, 200, 3–37.
20. Ilakiyalakshmi, M., & Napoleon, A. A. (2022). Review on recent development of quinoline for anticancer activities. *Journal of Molecular Structure*, 1262, 133036.
21. Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134.
22. Li, Z. N., Zhao, L., Yu, L. F., & Wei, M. J. (2020). BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: Future perspectives for personalized therapy. *Gastroenterology Report*, 8(3), 192–205.
23. Little, J. (2013). *The use of genomic “knock-in” strategy to examine the role of the protein acyl transferase (DHHC) family of enzymes using Dictyostelium discoideum* (Doctoral dissertation).
24. Łukasik, P., Baranowska-Bosiacka, I., Kulczycka, K., & Gutowska, I. (2021). Inhibitors of cyclin-dependent kinases: Types and their mechanism of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2806.
25. Lutful Kabir, F. M., Alvarez, C. E., & Bird, R. C. (2015). Canine mammary carcinomas: A comparative analysis of altered gene expression. *Veterinary Sciences*, 3(1), 1.
26. Matada, B. S., Pattanashettar, R., & Yernale, N. G. (2021). A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 32, 115973.
27. Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 599–609.
28. Modi, V., & Dunbrack, R. L., Jr. (2019). Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(14), 6818–6827.
29. Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. *Cell*, 116(2), 221–234.
30. Padiya, K. J., Gavade, S., Kardile, B., Tiwari, M., Bajare, S., Mane, M., ... & Kurhade, S. (2012). Unprecedented “in water” imidazole carbonylation: Paradigm shift for preparation of urea and carbamate. *Green Chemistry*, 14(12), 3264–3267.
31. Pratibha, Y., & Kamal, S. (2021). Quinolones, a perpetual, multipurpose scaffold in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 210, 112994.
32. Raue, F., & Frank-Raue, K. (2016). Thyroid cancer: Risk-stratified management and individualized therapy. *Clinical Cancer Research*, 22(20), 5012–5021.
33. Robinson, D. R., Wu, Y. M., & Lin, S. F. (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19(49), 5548–5557.
34. Roskoski, R., Jr. (2016). Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacological Research*, 103, 26–48.
35. Roviello, G., Corona, S. P., Bozza, G., Aieta, M., Generali, D., Rodriquenz, M. G., ... & Sobhani, N. (2018). Lenvatinib for the treatment of renal cell carcinoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(6), 507–512.

36. Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L., & Cesareni, G. (2012). The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Letters*, 586(17), 2732–2739.
37. Seemayer, T. A., & Cavenee, W. K. (1989). Molecular mechanisms of oncogenesis. *Laboratory Investigation*, 60(5), 585–599.
38. Siegel, R. L., Giaquinto, A. N., & Jemal, A. (2024). Cancer statistics, 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(1), 12–49.
39. Tabatabaee, A., Tafreshi, M., Rassouli, M., Aledavood, S., Majd, H., & Farahmand, A. (2016). Effect of therapeutic touch in patients with cancer: A literature review. *Medical Archives*, 70(2), 142.
40. Theodorou, V., et al. (2007). A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, 48, 8230–8233.
41. Theodorou, V., et al. (2018). Mild alkaline hydrolysis of hindered esters in non-aqueous solution. *ARKIVOC*, 2018(7), 308–319.
42. Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., & Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: The path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3), 195–203.
43. Vogel, A., Chan, S. L., Dawson, L. A., Kelley, R. K., Llovet, J. M., Meyer, T., ... & Ducreux, M. (2018). Hepatocellular carcinoma: ESMO clinical practice guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 29(Suppl 4), iv238–iv255.
44. Wang, S., Wang, Y., Yu, J., Wu, H., & Zhou, Y. (2022). Lenvatinib as first-line treatment for unresectable hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancers*, 14(22), 5525.
45. Wang, Z. (2022). Cell cycle progression and synchronization: An overview. *Methods in Molecular Biology*, 2579, 3–23.
46. HOPKINS, Brian, T., 18 JUNE 2015, BIARYL INHIBITORS OF BRUTON'S TYROSINE KINASE -CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS
47. Jahani, F., et al., Guanidine hydrochloride as an organocatalyst for N-Boc protection of amino groups. *Tetrahedron Letters*, 2011. 52(12): p. 1260-1264.
48. Ferrara N., "VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors", *Nature Reviews Cancer*, 2002.
49. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling—in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(5), 359-371.
50. Sakaguchi T., Tsuruoka A. Amorphous Salt of 4-(3-Chloro-4-(cyclopropylaminocarbonyl)aminophenoxy)-7-methoxy-6-quinoline-carboxamide and Process for Preparing the Same. Eisai R&D Management Co Ltd. US20070004773A1, 2007.
51. Preparation method of lenvatinib. CN104876864A, 2017.
52. Funahashi Y., Tsuruoka A., et al. Nitrogen-containing aromatic derivatives. Eisai R&D Management Co Ltd. US20040053908A1, 2004.

