



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΜΣ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Σχεδιασμός και σύνθεση ετεροκυκλικών ιμιδικών αναλόγων με πιθανή αντικαρκινική δράση μέσω αναστολής του παράγοντα c-Myc

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της φοιτήτριας

Σωτηρίας Χαλιώτη

Επιβλέπων: Ζωίδης Γρηγόριος, Επίκουρος Καθηγητής



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΜΣ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Σχεδιασμός και σύνθεση ετεροκυκλικών ιμιδικών αναλόγων με πιθανή αντικαρκινική δράση μέσω αναστολής του παράγοντα c-Myc

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της φοιτήτριας
Σωτηρίας Χαλιώτη
Α.Μ.: 170721

Επιβλέπων: Ζωίδης Γρηγόριος, Επίκουρος Καθηγητής

Εγκρίθηκε από την τριμελή επιτροπή στις 09/01/2020:

Μικρός Εμμανουήλ, Καθηγητής

Ζωίδης Γρηγόριος, Επίκουρος Καθηγητής

Κωστάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες ως φαρμακολογικός στόχος	6
1.2 Η φυσιολογική λειτουργία και η απορρύθμιση του παράγοντα c-Myc	7
1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc και ο συμπαράγοντάς του Max	9
1.4 Η δομή της πρωτεΐνης c-Myc	11
1.5 Οι λειτουργίες του c-Myc ως ρυθμιστής της μεταγραφής	13
1.6 Intrinsically disordered proteins.....	15
1.7 Ο παράγοντας c-Myc ως φαρμακολογικός στόχος	16
1.8 Αναστολείς του παράγοντα c-Myc	18
1.8.1 Αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max	18
1.8.2 Εναλλακτικές προσεγγίσεις για την αναστολή του c-Myc	23
1.8.3 Μελέτες πρόσδεσης γνωστών αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max	25
1.8.4 Δημοσιευμένες υπολογιστικές μέθοδοι εύρεσης c-Myc αναστολέων	27
ΣΚΟΠΟΣ	33
ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
Θειο/-βαρβιτουρικά παράγωγα	35
Παράγωγα ουρακίλης	37
In vitro αξιολόγηση των ενώσεων 1-16	41
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	46
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	48
Σύνθεση της 5-[(1H-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]-2-θειοξοπυριμιδινό-4,6-(1H,3H, 5H)-διόνης (1)	48
Σύνθεση της 5-[(1H-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινό-2,4,6-(1H,3H, 5H)-τριόνης (2)	49
Σύνθεση της 5-[(1-μεθυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινό-2,4,6-(1H,3H,5H)-τριόνης (3)	50
Σύνθεση της 1-μεθυλο-πυρρολο-2-καρβαλδεΐδης	50
Σύνθεση της 5-[(1-μεθυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινό-2,4,6-(1H,3H,5H)-τριόνης (3)	50
Σύνθεση της 5-[(1-μεθυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]-2-θειοξοπυριμιδι-νό-4,6-(1H,3H, 5H)- διόνης (4)	51

Σύνθεση της 5-[(1-βενζυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινό-2,4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-τριόνης (5)	52
Σύνθεση της 1-βενζυλο-πυρρο-2-καρβαλδεΐδης	52
Σύνθεση της 5-[(1-βενζυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινό-2,4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-τριόνης (5).....	52
Σύνθεση της 5-[(1 <i>H</i> -7-αζαϊνδο-3-υλ)μεθυλενο]- πυριμιδινό-2,4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-τριόνης (6)	53
Σύνθεση της 5-[(1 <i>H</i> -ινδο-3-υλ)μεθυλενο]- πυριμιδινό-2,4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-τριόνης (7)...	54
Σύνθεση της 5-((1 <i>H</i> -ινδο-3-υλ)μεθυλενο)-2-θειοξοπυριμιδινό-4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-διόνης (8)	55
Σύνθεση της 5-(3,4-διυδροξυβενζυλιδενο)πυριμιδινό-2,4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-τριόνης (9).....	55
Σύνθεση της 5-(3,4-διυδροξυβενζυλιδενο)-2-θειοξοπυριμιδινό-4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-διόνης (10)	56
Σύνθεση της 5-(4-φθοροβενζυλιδενο)πυριμιδινό-2,4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-τριόνης (11)	57
Σύνθεση της 5-((1 <i>H</i> -ινδο-5-υλ)μεθυλενο)-2-θειοξοπυριμιδινό-4,6-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> , 5 <i>H</i>)-διόνης (12)	57
Σύνθεση της 5-(1-((βενζυλοξυ)ιμινο)αιθυλ)πυριμιδινό-2,4 (1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-διόνης (13).....	58
Σύνθεση της 5-(1-(υδροξυιμινο)αιθυλο)πυριμιδινό-2,4-3 <i>H</i> -διόνης (14)	59
Σύνθεση της 1-βενζυλο-5-ακετυλοπυριμιδινό-2,4-3 <i>H</i> -διόνης	60
Σύνθεση της 1-βενζυλο-5-(1-(υδροξυιμινο)αιθυλο)πυριμιδινό-2,4-3 <i>H</i> -διόνης (15).....	60
Σύνθεση της 1-βενζυλο-5-(1-((βενζυλοξυ)ιμινο)αιθυλ)πυριμιδινό-2,4-3 <i>H</i> -διόνης (16).....	61
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 1-16	63

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων» του τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την παρούσα παράγραφο οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της και ιδιαίτερα:

Τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας κ. Γρηγόρη Ζωΐδη, για την επιστημονική καθοδήγηση, την πολύτιμη υποστήριξη και το ενδιαφέρον του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Επιπλέον, τον Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας κ. Εμμανουήλ Μικρό για την καθοριστική συμβολή του και τις παραγωγικές υποδείξεις του, ο οποίος σε συνεργασία με τον κ. Γρηγόρη Ζωΐδη πραγματοποίησε την ανάθεση του θέματος με το οποίο είχα την ευκαιρία να ασχοληθώ στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και το τρίτο μέλος της επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακευτικής Χημείας κ. Ιωάννη Κωστάκη για το χρόνο που αφιέρωσε για τη λεπτομερή ανάγνωση της εργασίας και τις παρατηρήσεις του.

Ευχαριστώ θερμά το Δρ. Αργύρη Ευστρατιάδη, καθώς τα *in vitro* πειράματα διεξάχθηκαν στο εργαστήριο του στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδάκτορα ερευνήτρια Ανδριάνα Παπαδημητροπούλου που εργάστηκε για την πραγματοποίηση των *in vitro* πειραμάτων.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω το Δρ. Θωμά Ευαγγελίδη, ο οποίος στα πλαίσια της Διδακτορικής Διατριβής του ασχολήθηκε με την εύρεση αναστολέων του παράγοντα c-Myc και τα αποτελέσματα του χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για την ανάπτυξη της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ. Δήμητρα Μπενάκη για τη βοήθεια και την άποψη συνεργασία κατά τη λήψη των φασμάτων NMR, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου που μου επέτρεψαν να εργαστώ δημιουργικά σε ένα ευχάριστο περιβάλλον.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την προσφορά και τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεΐνη c-Myc αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας bHLHZip (basic-region/helix-loop-helix/leucine-zipper). Ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζει την έκφραση του 10-15% του γονιδιώματος. Στο 30% των ανθρώπινων καρκίνων, η έκφραση του γονιδίου MYC απορρυθμίζεται, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων c-Myc. Επομένως, η εύρεση νέων αναστολέων του παράγοντα c-Myc είναι εξαιρετικά ενδιαφέροντα με σκοπό τη χρήση τους ως chemical probes και στη συνέχεια για την ανάπτυξή τους ως πιθανά θεραπευτικά.

Η προσπάθεια για την ανακάλυψη μορίων ικανών να αναστείλουν τις ογκογόνες λειτουργίες του c-Myc έχει απασχολήσει την έρευνα τα τελευταία χρόνια και πολλές επιστημονικές ομάδες έχουν δημοσιεύσει σχετικούς αναστολείς. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί μόρια με ικανοποιητική δραστηριότητα και κατάλληλες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, γεγονός που οφείλεται εν μέρει στην αδυναμία χρήσης υπολογιστικών μεθόδων για την πρόβλεψη της συγγένειας σύνδεσης των υπό εξέταση ενώσεων με τον παράγοντα c-Myc.

Ο παράγοντας c-Myc ανήκει στην κατηγορία των εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών (intrinsically disordered proteins, IDPs), οι οποίες δεν αναδιπλώνονται προς σχηματισμό δευτεροταγών ή τριτοταγών δομών, αλλά υφίστανται ως ένα σύνολο ταχέως εναλλασσόμενων δομών. Ο c-Myc αποκτά συγκεκριμένη ελικοειδή μορφή μόνο εφόσον ετεροδιμερίζεται με το μεταγραφικό παράγοντα Max (Myc-associated protein X). Οποιαδήποτε βιολογική δράση της πρωτεΐνης c-Myc έχει περιγραφεί ως σήμερα, αφορά το ετεροδιμερές σύμπλοκο.

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου, βρέθηκε ότι η ένωση **NSC-645852** προσδένεται στον παράγοντα c-Myc με $KD = 2.7 \pm 0.7 \mu M$. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, περιγράφονται ο σχεδιασμός ενώσεων μέσω δομικών τροποποιήσεων της ένωσης οδηγού **NSC-645852** και η σύνθεση των επιλεγμένων μορίων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του Δρ. Αργύρη Ευστρατιάδη, στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, η *in vitro* αξιολόγηση των νέων αναλόγων ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων με c-Myc εξαρτώμενο μηχανισμό.

Η ένωση οδηγός **NSC-645852** είναι ένα θειοβαρβιτουρικό παράγωγο. Η εύρεση της προέκυψε από μελέτες ομοιότητας με το γνωστό αναστολέα **10058-F4**. Ο **10058-F4** και τα δημοσιευμένα δραστικά ανάλογά του περιλαμβάνουν είτε μια ιμιδική είτε μια θειοϊμιδική ομάδα. Επομένως, η παρουσία των ομάδων αυτών θεωρήθηκε σημαντική για τη δράση και βασισμένοι στη δομή της ένωσης οδηγού αποφασίστηκε η σύνθεση μορίων με κεντρικό σκελετό το δακτύλιο του βαρβιτουρικού οξέος, του θειοβαρβιτουρικού οξέος ή της

ουρακίλης. Οι επιπλέον τροποποιήσεις ως προς την ένωση οδηγό πραγματοποιήθηκαν στην υποκατάσταση της θέσης 5 των δακτυλίων.

Η σύνθεση της ένωσης οδηγού και **15** επιπλέον μορίων πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας. Για την υποκατάσταση των δακτυλίων χρησιμοποιήθηκαν κυρίως αρωματικές ομάδες με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, ποικιλία ως προς το μέγεθος, την παρουσία χαρακτηριστικών ομάδων και τη λιποφιλικότητα.

Το βασικό στάδιο στις συνθετικές πορείες για την σύνθεση των θειο/-βαρβιτουρικών παραγώγων αποτέλεσε η προσθήκη επιλεγμένων αλδεϋδων στην C5 θέση του θειο/-βαρβιτουρικού οξέος. Αντίστοιχα, για τη σύνθεση των παραγώγων ουρακίλης πραγματοποιήθηκε η προσθήκη υδροξυλαμινών στην καρβονυλομάδα της 5-ακέτυλουουρακίλης.

Για την *in vitro* αξιολόγηση των ενώσεων **1-16** για τον προσδιορισμό τυχόν αναστολής που μπορεί να προκαλούν οι υπό εξέταση ενώσεις έναντι της ογκογενετικής πρωτεΐνης c-myc, χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές TGR1 (ινοβλάστες από αρουραίο *Rattus norvegicus*, c-myc +/+) και HO1519 (ινοβλάστες από αρουραίο *Rattus norvegicus*, c-myc -/-).

Τέσσερα από τα ανάλογα, τρία θειοβαρβιτουρικά και ένα βαρβιτουρικό παράγωγο, παρουσίασαν βελτιωμένη δραστηριότητα (ενδεικτικές τιμές $IC_{50} = 3 - 12 \mu M$) σε σχέση με το γνωστό αναστολέα **10058-F4** ($IC_{50} = 75 \mu M$). Τα συμπεράσματα που εξάχθηκαν από τις παρατηρούμενες σχέσεις δομής-δράσης θέτουν τις βάσεις για την ορθολογική ανάπτυξη ενός φαρμακοφόρου μοντέλου για την πρόβλεψη χημικών ενώσεων με παρόμοια συμπεριφορά.

ABSTRACT

c-Myc protein is a transcription factor of the bHLHZip family (basic-region / helix-loop-helix / leucine-zipper). As a transcription factor, it regulates the expression of 10-15% of the genome. Deregulation of MYC expression occurs in 30% of human cancers, resulting in increased c-Myc levels. Therefore, the discovery of new c-Myc inhibitors is extremely interesting regarding their use as chemical probes and subsequently for their development to potential therapeutics.

Attempts to discover inhibitors of the oncogenic functions of c-Myc have been subject of research in recent years and a significant number of such inhibitors has been reported. However, molecules with satisfactory activity and appropriate pharmacokinetic properties have not yet been identified. This fact relies partly on the difficulty of developing rational design methods and computational methods to predict the nature of substances that might inhibit c-Myc/Max dimer formation.

c-Myc factor belongs to the category of intrinsically disordered proteins (IDPs), which do not fold to form stable secondary or tertiary structures but exist as a set of transient structures. C-Myc acquires a specific helix conformation only after heterodimerization with transcription factor Max (Myc-associated protein X). Any biological activity of c-Myc, which has been described so far, refers to the heterodimeric complex.

In previous work of our laboratory, compound **NSC-645852** was found to bind to c-Myc with a KD constant of $2.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$. Described within the present thesis are the design of molecules through structural modifications of lead compound **NSC-645852** and synthesis of the chosen compounds. In addition, *in vitro* evaluation of the synthesized compounds regarding their activity as inhibitors of cell growth through a c-Myc dependent mechanism, was conducted at the laboratory of Dr. Argiris Efstratiadis at Biomedical Research Foundation Academy of Athens.

Lead compound **NSC-645852** is a thiobarbituric analogue, which was found from similarity studies based on the known inhibitor **10058-F4**. **10058-F4** and its active analogs contain either an imide or a thiimide group. Therefore, the presence of these groups was considered important for the inhibitory activity of the compounds. Based on this fact and on the structure of the lead compound, it was decided to synthesize compounds which contain a thiobarbituric acid, a barbituric acid or an uracil ring. Further modifications of the lead compound were carried out on the substituent at C5 of the rings.

Lead compound and **15** other compounds were synthesized. For the substitution of the rings mainly aromatic groups were chosen, with different physicochemical properties, variety in size, presence of functional groups and lipophilicity.

The basic step of the synthetic approach for thio/-barbituric derivatives included addition of substituted aldehydes on the C5 position of thio/-barbituric acid. Accordingly, addition of selected hydroxylamines on the carbonyl group of 5-acetyluracil was performed for the synthesis of uracil derivatives.

Cell lines used for the *in vitro* evaluation of compounds **1-16** in order to determine any inhibitory activity of the new candidates against myc oncogene protein, were the following: TGR1 (fibroblasts from rat *Rattus norvegicus*, c-myc +/+) and HO1519 (fibroblasts from rat c-myc -/-).

Four of the new analogues, three thiobarbiturate and one barbiturate derivative, demonstrated improved potency (apparent IC₅₀ = 3 -12 µM) compared to the known inhibitor **10058-F4** (IC₅₀ = 75µM). The conclusions drawn from the observed structure-activity relationship lay the basis for the rational development of a pharmacophore model in order to predict compounds with similar behavior.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι μεταγραφικοί παράγοντες ως φαρμακολογικός στόχος

Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική ασθένεια η οποία συνιστά πλέον σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία με τα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας να αυξάνονται τα τελευταία χρόνια. Η ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής θεραπείας για τον καρκίνο συνιστά προτεραιότητα της επιστημονικής κοινότητας, με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.

Η ανάπτυξη του καρκίνου συχνά προκύπτει ως αποτέλεσμα συνεργιστικών ή διαδοχικών βλαβών του DNA που οδηγούν στην ενεργοποίηση διάφορων πρωτο-ογκογονιδίων και την αναστολή της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, προκαλώντας την τροποποίηση του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA και της ρύθμισης της απόπτωσης.¹

Η ρύθμιση της μεταγραφής αποτελεί μια σημαντική βιολογική λειτουργία για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται στο DNA και ρυθμίζουν (θετικά ή αρνητικά) τη σύνθεση του mRNA των γονιδίων στόχων τους. Ως εκ τούτου, μέσω της ακόλουθης μετάφρασης του mRNA σε πρωτεΐνες, οι μεταγραφικοί παράγοντες καθορίζουν τον κυτταρικό φαινότυπο. Η δράση τους τις περισσότερες φορές λαμβάνει χώρα σε συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες με ενεργοποιητική ή ανασταλτική δράση. Το ενεργοποιητικό σύμπλεγμα μεταγραφικών παραγόντων πυροδοτεί την προσέγγιση της RNA πολυμεράσης II στο επιθυμητό γονίδιο.

Πολλές ανθρώπινες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης και αυτοάνοσα νοσήματα έχουν συσχετιστεί με την απορρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων, επομένως η αναστολή τους έχει αποτελέσει ερευνητικό πεδίο υψηλού ενδιαφέροντος, με στόχο την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών διεξόδων. Εντούτοις, η αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων συχνά συνιστά πρόκληση, λόγω της έλλειψης σαφών θέσεων δέσμευσης μικρών μορίων δυσχεραίνοντας τις μεθόδους του ορθολογικού σχεδιασμού.²⁻⁴

Τα ευρήματα των τελευταίων δεκαετιών έχουν αναδείξει το μεταγραφικό παράγοντα c-Myc σε κύριο μεταγραφικό ρυθμιστή του μεταβολισμού, παρέχοντας δομικές μονάδες και ATP στις αναβολικές οδούς για την υποστήριξη της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.⁴ Ωστόσο, στο 30% των ανθρώπινων καρκίνων, μεταξύ των οποίων του μαστού, του παχέος εντέρου, του τραχήλου της μήτρας, του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του οστεοσαρκώματος, του γλοιοβλαστώματος, του μελανώματος και των μυελοειδών λευχαιμιών, η έκφραση του γονιδίου MYC απορρυθμίζεται, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του μεταγραφικού παράγοντα c-Myc σε σύγκριση με τα περισσότερα φυσιολογικά

κύτταρα (με εξαίρεση τα φυσιολογικά κύτταρα κατά τις περιόδους υψηλού πολλαπλασιαστικού ρυθμού και μεταβολικών αναγκών, π.χ. κατά την ενεργοποίηση των T-κυττάρων).^{5,6} Ο c-Myc συμμετέχει στη δημιουργία νεοπλασματικού φαινοτύπου με την παρεμπόδιση της διαφοροποίησης, τη μείωση των απαιτήσεων για αυξητικούς παράγοντες, την πρόκληση αστάθειας του γονιδιώματος και την προαγωγή της αγγειογένεσης, καθώς θεωρείται ο κύριος ρυθμιστής των αγγειογόνων παραγόντων, κυρίως του VEGF.^{6,7}

Η οικογένεια των γονιδίων MYC περιλαμβάνει τα γονίδια CMYC, NMYC και LMYC. Τα γονίδια MYC ανήκουν στα γονίδια με τη συχνότερη υπερέκφραση στους ανθρώπινους καρκίνους, προκαλώντας το ερευνητικό ενδιαφέρον. Και τα τρία μέλη της οικογένειας Myc έχειδειχθεί πως ενισχύονται στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, με συχνότητα 10% (n-Myc), 13% (l-Myc) και 20% (c-Myc). Ομοίως, στο γλοιοβλάστωμα ένα, δύο ή και τα τρία MYC γονίδια υφίστανται ενίσχυση με διαφορετική συχνότητα.⁸ Τα γονίδια n-Myc και l-Myc ενισχύονται στο νευροβλάστωμα και στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, αντίστοιχα.¹⁴

1.2 Η φυσιολογική λειτουργία και η απορρύθμιση του παράγοντα c-Myc

Ως μεταγραφικός παράγοντας, η πρωτεΐνη c-Myc ρυθμίζει την έκφραση του 10-15% του γονιδιώματος, το οποίο περιλαμβάνει γονίδια υπεύθυνα για μια ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων, όπως της απόπτωσης, της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων.^{6,10}

Ορισμένες από τις φυσιολογικές λειτουργίες της πρωτεΐνης c-Myc αποτελούν ο αποκλεισμός της μεταγραφής των ρυθμιστικών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου και των αναστολέων των κυκλινεξεαρτώμενων κινασών (CDK), καθώς και η προώθηση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου μέσω ενεργοποίησης κυκλινών. Επιπλέον, ο παράγοντας c-Myc διεγείρει τη διαφοροποίηση και την ανανέωση των βλαστοκυττάρων, αυξάνει τον μεταβολισμό των κυττάρων μέσω ρύθμισης του μεταφορέα γλυκόζης GLUT1 και των μεταφορέων γλουταμίνης (ASCT2 και SLC7A25), της εξοκινάσης 2, της φωσφοφρουκτοκινάσης, της ενολάσης και της γλουταμινάσης. Ακόμα, συμβάλλει στη χρωμοσωμική αστάθεια, την παραγωγή ROS και την απόπτωση των κυττάρων.⁶

Η σημασία του ρόλου της πρωτεΐνης c-Myc για την φυσιολογική κυτταρική ομοιοστασία υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι η εξάλειψη του c-Myc σε ποντίκια προκαλεί εβρικό θάνατο, λόγω παρεμπόδισης της αγγειογένεσης, του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων.¹¹

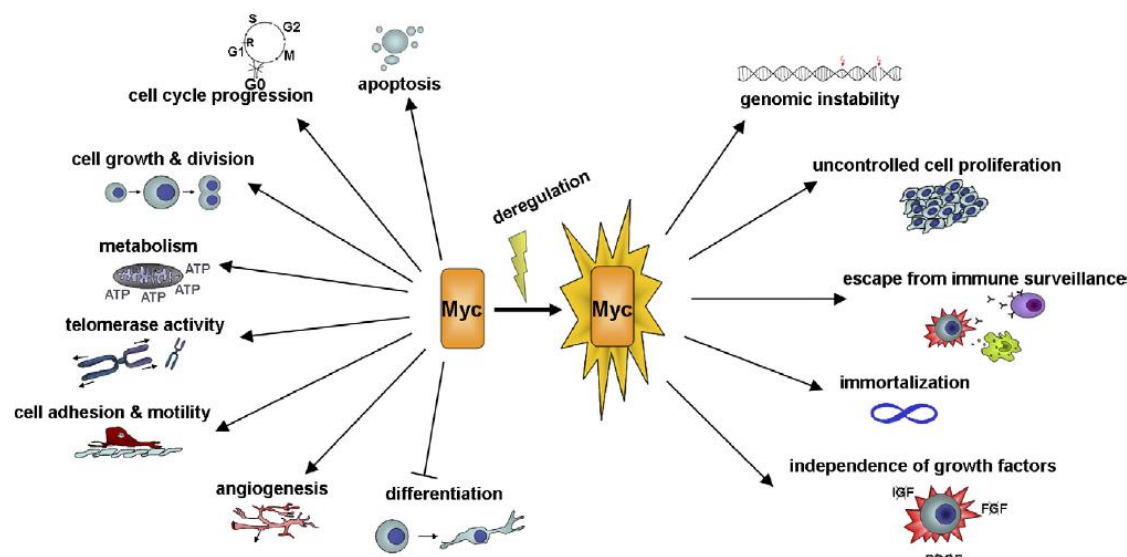
Η έκφραση και η μετα-μεταγραφική σταθεροποίηση του c-Myc στα κύτταρα που αναπαράγονται με φυσιολογικό ρυθμό ελέγχονται άμεσα και έμμεσα από πολλαπλές οδούς μεταγωγής σήματος, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούνται από εξωτερικά και εσωτερικά ερεθίσματα όπως αυξητικοί παράγοντες, μιτογόνα και κυτοκίνες, καθώς και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Πολλές από αυτές τις οδούς προκαλούν τη μεταγραφή του MYC γονιδίου, ενώ άλλοι παράγοντες ρυθμίζουν τη μεταφορά του MYC mRNA, το χρόνο ημιζωής και τη μετάφραση του. Με τους παραπάνω μηχανισμούς ρυθμίζεται η ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της ελεγχόμενης αποικοδόμησης της πρωτεΐνης για τη σταθεροποίηση των επιπέδων της στο κύτταρο.^{5,12}

Η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του παράγοντα c-Myc έχει συνδεθεί με την εισαγωγή ρετροϊκών υποκινητών στο κυτταρικό DNA, τη μετατόπιση χρωμοσωμάτων, την ενίσχυση γονιδίων, την ενεργοποίηση υποδοχέων από ορμόνες, δεύτερων αγγελιαφόρων και μεταγραφικών παραγόντων, καθώς και την ενεργοποίηση υπερ-ενισχυτών του γονιδίου MYC ή τη μετάλλαξη οδών που ενισχύουν τη σταθερότητα της πρωτεΐνης.^{4,6,13-15} Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν τα φυσιολογικά μονοπάτια που θα οδηγούσαν στη μείωση των επιπέδων c-Myc.⁴

Παρά την πληθώρα των γενετικών αναδιαρθρώσεων που σχετίζονται με το γονίδιο MYC, η μεγάλη πλειοψηφία αυτών δεν επηρεάζει άμεσα την περιοχή κωδικοποίησης της πρωτεΐνης, γεγονός που υποστηρίζει τη θεωρία ότι η αιτία των Myc-εξαρτώμενων καρκίνων αποτελεί η απορρύθμιση της έκφρασης του και όχι η παραγωγή κάποιας μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης.⁵ Για παράδειγμα, το λέμφωμα Burkitt χαρακτηρίζεται από χρωμοσωμικές μετατοπίσεις οι οποίες τοποθετούν το γονίδιο MYC στην εγγύτητα ενός ενισχυτή ανοσοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα να προάγεται η σύνθεση υψηλών επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης c-Myc. Παρόμοιες ανακατατάξεις λαμβάνουν, επίσης, χώρα στο διάχυτο από μεγάλα B-κύτταρα λέμφωμα, στην οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία, στο πολλαπλό μυέλωμα και στην πρωτογενή λευχαιμία κυττάρων του πλάσματος. Αντίστοιχα, η συνηθέστερη παρέκκλιση που αφορά την έκφραση του Myc στους συμπαγείς όγκους αποτελεί η ενίσχυση, δηλαδή η ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων του γονιδίου.

Η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη, εφόσον διμεριστεί με το συμπαράγοντα του Max, προσδένεται σε αλληλουχίες DNA για τις οποίες φυσιολογικά παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια, με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκινικού μεταγραφικού προφίλ.⁵ Ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του Myc, προκαλείται ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός και απορρύθμιση της έκφρασης του 10-15% του γονιδιώματος, γονιδίων που εξαρτώνται από την πολυμεράση-II, καθώς και των rRNA και tRNA γονιδίων, τα οποία ρυθμίζονται από τις RNA πολυμεράσες I και III, αντίστοιχα. Οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στην έκφραση του

γονιδιώματος σχετίζονται άμεσα με την έναρξη της καρκινογένεσης, την εξέλιξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.^{5,16}



Εικόνα 1. Κυτταρικές διεργασίες ελεγχόμενες από τον παράγοντα c-Myc υπό φυσιολογικές συνθήκες και κατά την ογκογένεση. Ο c-Myc αποτελεί βασικό ρυθμιστή πολλών βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης (ρύθμιση της τροποποίησης της χρωματίνης)· της προόδου του κυτταρικού κύκλου (ρύθμιση κυκλινών, κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και φωσφατασών)· της απόπτωσης και της κυτταρικής διαφοροποίησης· του κυτταρικού μεταβολισμού (γλυκόλυση, βιοσύνθεση και μεταφορά αμινοξέων, σύνθεση μακρομορίων και μεταβολισμός DNA)· της αγγειογένεσης (θετική ρύθμιση του VEGF)· της κυτταρικής προσκόλλησης και κινητικότητας (έλεγχος της έκφρασης των ιντεγκρινών). Η απορρύθμιση του c-Myc μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση, αστάθεια του γονιδιώματος, ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό κυττάρων, διαφυγή από το ανοσοποιητικό σύστημα και κατάργηση της ανάγκης παρουσίας αυξητικών παραγόντων.⁸

1.3 Ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc και ο συμπαράγοντάς του Max

Το γονίδιο MYC ανακαλύφθηκε πριν από περίπου 25 χρόνια ως ένα ογκογονίδιο v-myc (virus) παρόν στα γονιδιώματα των ρετροϊών MyeloCytomatosis, οι οποίοι προσβάλλουν τα πτηνά, προκαλούν μετασχηματισμό των ινοβλαστών σε ιστοκαλλιέργειες, καθώς και ανάπτυξη διαφόρων τύπων αιματοποιητικών νεοπλασμάτων σε ζώα. Αργότερα, αποδείχθηκε ότι το γονίδιο v-myc προέρχεται από το κυτταρικό γονίδιο MYC. Το ανθρώπινο γονίδιο CMYC (cellular) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στο λέμφωμα Burkitt και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 q24.1, αποτελούμενο από τρία εξόνια και δύο εσώνια.^{1,4,5,8,9}

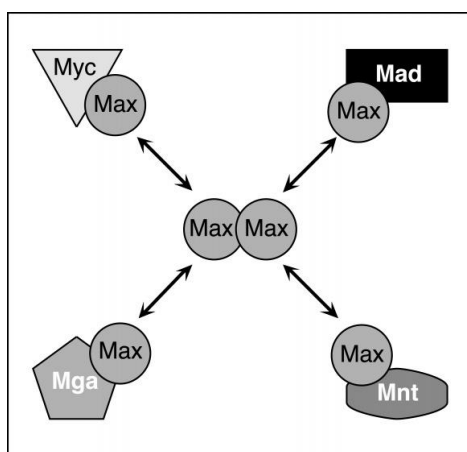
Οι πρωτεΐνες c-Myc, n-Myc και l-Myc αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας bHLHZip (basic-region/helix-loop-helix/leucine-zipper) και ανήκουν στην

κατηγορία των εγγενώς μη δομημένων πρωτεϊνών (intrinsically disordered proteins, IDPs). Οι IDPs είναι πρωτεΐνες οι οποίες δεν αναδιπλώνονται στο χώρο προς σχηματισμό δευτεροταγών ή τριτοταγών δομών, αλλά υφίστανται ως ένα σύνολο ταχέως εναλλασσόμενων δομών.

Ο παράγοντας c-Myc αποτελεί μια 65 kDa πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, η οποία περιέχει 439 αμινοξέα.¹ Αποκτά συγκεκριμένη ελικοειδή μορφή μόνο εφόσον ετεροδιμερίζεται με το μεταγραφικό παράγοντα Max (Myc-associated protein X). Οποιαδήποτε βιολογική δράση της πρωτεΐνης c-Myc έχει περιγραφεί ως σήμερα αφορά το ετεροδιμερές σύμπλοκο. Ο παράγοντας Max ανήκει επίσης στην οικογένεια πρωτεϊνών bHLHZip και ομοίως με το c-Myc, δεν παρουσιάζει σταθερή διαμόρφωση στην ελεύθερη μορφή του.^{2,17}

Σε αντίθεση με το c-Myc, ο παράγοντας Max μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή, τα οποία συνδέονται στις ίδιες αλληλουχίες DNA με το ετεροδιμερές c-Myc/Max.^{6,18} Επομένως, η μεταγραφή που επάγεται από το σύμπλοκο c-Myc/Max ελέγχεται από το σχηματισμό των ανταγωνιστικών συμπλόκων που σχηματίζει ο παράγοντας Max με το ομοδιμερισμό του καθώς και με άλλες bHLHZip πρωτεΐνες: τις Mad1, Mad2, Mad3, Mad4 (Max dimerization proteins), Mxi1, Mnt (MAX network transcriptional repressor) και Mga.^{6,18}

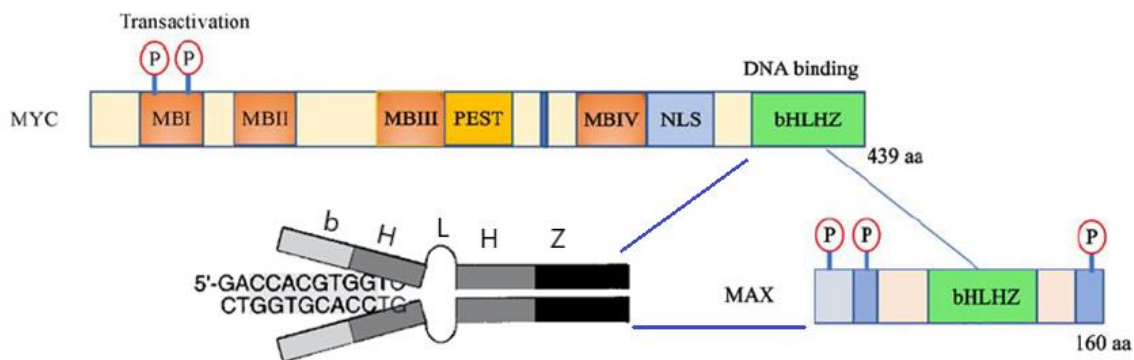
Οι πρωτεΐνες Mad και Myc ανταγωνίζονται για τη σύνδεση με τον παράγοντα Max με περίπου ίσες συγγένειες, ενώ ο σχηματισμός των ετεροδιμερών αυτών έναντι του ομοδιμερούς Max/Max είναι προτιμητέος. Τα ετεροδιμερή Mad/Max καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση που πυροδοτείται από το σύμπλοκο c-Myc/Max. Οι πρωτεΐνες Mad ετεροδιμερίζονται με το Max μέσω των bHLHZip υπομονάδων τους για να προσδεθούν στις αλληλουχίες E-box (enhancer box) του DNA και σε αντίθεση με το Myc/Max καταστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων που τις περιέχουν. Συνοπτικά, τα ετεροδιμερή c-Myc/Max κυριαρχούν στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, όπου επάγουν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, ενώ τα σύμπλοκα Mad/Max και Mnt/MAX κυριαρχούν σε κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας ή διαφοροποίησης.^{6,19,20}



Εικόνα 2. Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα Max. Καθεμία από αυτές διμερίζεται με το Max μέσω της bHLHZip υπομονάδας της.¹⁸

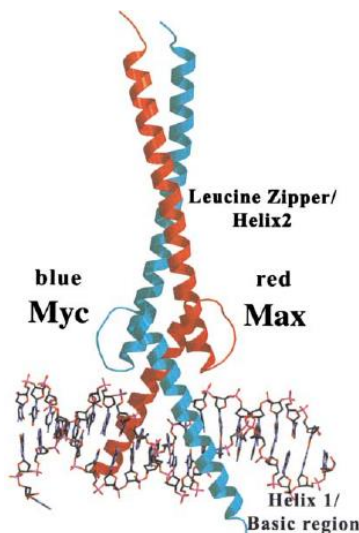
1.4 Η δομή της πρωτεΐνης c-Myc

Τα μέλη της οικογένειας Myc παρουσιάζουν υψηλή δομική ομολογία, καθώς όλες διαθέτουν το μοτίβο bHLHZip και τέσσερις διατηρημένες περιοχές, περίπου 20 αμινοξέων η καθεμία, γνωστές ως Myc boxes (MB), οι οποίες συμμετέχουν σε διαφορετικές λειτουργίες της πρωτεΐνης. Η αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain, NTD) της πρωτεΐνης c-Myc (αμινοξέα 1-167) περιέχει την υπομονάδα transcription activation domain (TAD), υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η υπομονάδα TAD περιέχει την MBI, η οποία περιέχει τη θέση αναγνώρισης από το πρωτεάσωμα για τη σύνδεση και την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Η MBI παρουσιάζει συχνά μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκινικού φαινοτύπου.³ Η περιοχή MBII εντοπίζεται επίσης στην υπομονάδα TAD και συμμετέχει στην πλειονότητα των λειτουργιών του Myc. Η κεντρική περιοχή της c-Myc φιλοξενεί MBIII, η οποία εμπλέκεται στην καταστολή της μεταγραφής, την απόπτωση και τη λεμφματογένεση. Η MBIV βρίσκεται, επίσης, στην κεντρική περιοχή και εκτός της συμμετοχής της στις διαδικασίες της απόπτωσης και του μετασχηματισμού, ρυθμίζει τη σύνδεση με το DNA. Η καρβοτελική περιοχή (C-terminal domain, CTD) περιλαμβάνει την υπομονάδα basic region (BR), απαραίτητη για την πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA και τη helix-loop-helix leucine zipper υπομονάδα (αμινοξέα 354-454), υπεύθυνη για το διμερισμό με την πρωτεΐνη Max.^{1,8,9,13,16,21}



Εικόνα 3. Δομή των πρωτεϊνών c-Myc και Max και σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος c-Myc/Max/DNA. Τα ετεροδιμερή σχηματίζονται με την αλληλεπίδραση των υπομονάδων bHLHZ των δύο πρωτεϊνών και η σύνδεση με την αλληλουχία E-box γίνεται μέσω των βασικών περιοχών. PEST: περιοχή πλούσια σε προλίνη, γλουταμινικό οξύ, σερίνη και θρεονίνη, NLS (nuclear localization sequence): αλληλουχία θετικά φορτισμένων αμινοξέων που διευκολύνουν την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα μέσω πόρων των πυρηνικών μεμβρανών.^{5,9}

Η υπομονάδα leucine zipper, παρούσα σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες, περιέχει ένα κατάλοιπο λευκίνης κάθε επτά αμινοξέα και σχηματίζει μια α -έλικα, όπου δύο διαδοχικά κατάλοιπα λευκίνης τοποθετούνται στην ίδια πλευρά της. Οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων λευκίνης της leucine zipper υπομονάδας αλληλεπιδρούν με την αντίστοιχη υπομονάδα άλλων πρωτεϊνών σχηματίζοντας διμερή σύμπλοκα.²²



Εικόνα 4. Κρυσταλλική δομή των υπομονάδων basic helix-loop-helix leucine zipper του διμερούς c-Myc/Max, προσδεμένο στην αλυσίδα του DNA.²⁰

Ο παράγοντας c-Myc για να μπορέσει να προσδεθεί στο DNA και να ρυθμίσει την έκφραση των γονιδίων στόχων, θα πρέπει πρώτα να σχηματίσει ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη Max, η οποία δε διαθέτει την υπομονάδα TAD για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Ο ετεροδιμερισμός γίνεται μέσω των υπομονάδων bHLHZ των δύο πρωτεϊνών και επιτρέπει στις διμερισμένες βασικές περιοχές να σχηματίσουν α -έλικες οι οποίες μέσω των βασικών

αμινοξικών καταλοίπων τους αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των βάσεων του DNA.^{2,5,16,20}

Ανακεφαλαιώνοντας, το ετεροδιμερές c-Myc/Max σχηματίζει τέσσερις έλικες· κάθε μονομερές αποτελείται από δύο έλικες που χωρίζονται από έναν εύκαμπτο βρόχο. Η πρώτη έλικα περιέχει τη βασική περιοχή, η οποία συνιστά τη θέση δέσμευσης του DNA, και την έλικα 1 της περιοχής HLH, ενώ η δεύτερη έλικα περιέχει την έλικα 2 της περιοχής HLH και την LZ υπομονάδα.^{11,12}

1.5 Οι λειτουργίες του c-Myc ως ρυθμιστής της μεταγραφής

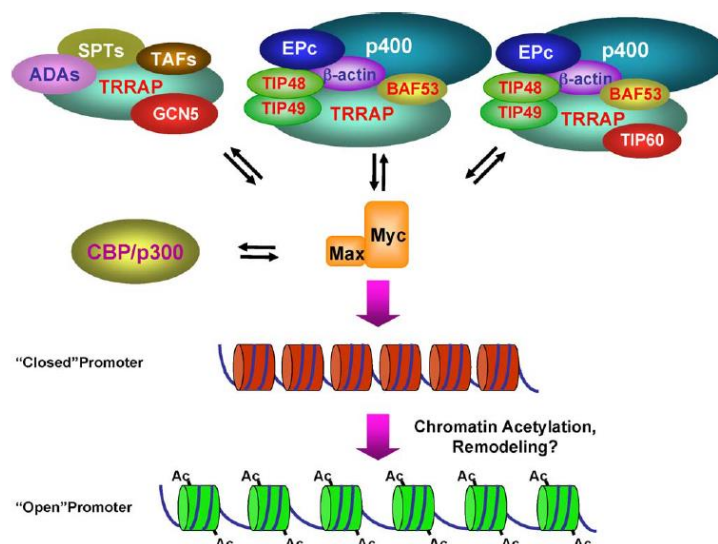
Τα ετεροδιμερή c-Myc/Max ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων μέσω δύο μηχανισμών: πρώτον, συνδεόμενα απευθείας σε ειδικές θέσεις αναγνώρισης του DNA εντός των υποκινητών των γονιδίων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της μεταγραφής και δεύτερον, αλληλεπιδρώντας με το μεταγραφικό παράγοντα Miz-1 (c-Myc-interacting zinc finger protein-1) που οδηγεί στην καταστολή των γονιδίων. Γονίδια που ρυθμίζονται θετικά από τον c-Myc αποτελούν τα HDAC2, CCND1, CCND2, CDK4, E2F2, LDHA και SHMT, ενώ γονίδια που ρυθμίζονται αρνητικά είναι τα p21, p15, οι N-καντχερίνες και οι ιντεγκρίνες.^{6,12}

Στα κύτταρα η σταθερότητα και η δραστικότητα του c-Myc ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από τη φωσφορυλίωση των καταλοίπων Thr58 και Ser62, ενώ η δέσμευση του DNA από το c-Myc/Max εξαρτάται από τη δομή της χρωματίνης.^{5,9} Η παρουσία της τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3 (μεθυλιωμένη στη θέση της λυσίνης 4 σε σχέση με το αμινοτελικό άκρο, H3-K4me3) έχει αποδειχθεί πως διευκολύνει τη πρόσδεση του ετεροδιμερούς.^{5,6}

Ως ενεργοποιητής της μεταγραφής, το ετεροδιμερές αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CACGTG-3' στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων και συνδεόμενη σε αυτή ενεργοποιεί τις διαδικασίες για το σχηματισμό του συμπλόκου της μεταγραφής. Η αλληλουχία CACGTG ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των E-box (enhancer box) αλληλουχιών CANNTG, οι παραλλαγές των οποίων αναγνωρίζονται επίσης από το σύμπλοκο c-Myc/Max με χαμηλότερη συγγένεια. Πρόκειται για σχετικά συνήθεις αλληλουχίες στο γονιδίωμα με την αλληλουχία CACGTG να εμφανίζεται περίπου κάθε 4000 βάσεις.^{5,9}

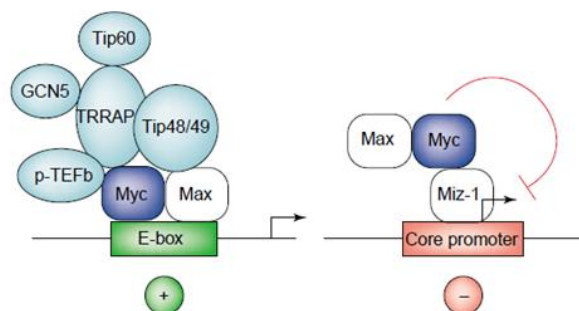
Το σύμπλοκο c-Myc/Max προσδένεται στο DNA, ενώ παράλληλα προσελκύει και άλλες πρωτεΐνες στις αλληλουχίες E-box. Μεταξύ των πρωτεϊνών αυτών είναι οι: positive transcription elongation factor b (P-TEFb), οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (CREB-binding protein, p300, TRRAP, GCN5, TIP60), οι ATPάσες TIP48 and TIP49 και η E3 λιγάση ουβικουιτίνης SKP2. Πολλές από αυτές συνδέονται με την υπομονάδα TAD στο αμινοτελικό

άκρο του c-Myc και άλλες προσδένονται στην επιφάνεια διεπαφής των c-Myc/Max επηρεάζοντας σημαντικά τη μεταγραφική δραστηριότητα του συμπλόκου. Η δημιουργία αυτού του συμπλέγματος πρωτεϊνών με το DNA επάγει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης προς μια πιο «ανοιχτή» δομή, η οποία καθιστά ευκολότερη την πρόσβαση της RNA πολυμεράσης II (RNA Pol II).^{5,6}



Εικόνα 5. Η πρωτεΐνη c-Myc προσελκύει σύμπλοκα πρωτεϊνών ικανά να προκαλέσουν τοπική τροποποίηση και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Οι ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών μέσω ακετυλίωσης την νουκλεοσωμάτων προκαλούν το «άνοιγμα» της χρωματίνης.²³

Ο παράγοντας c-Myc δρα ως αναστολέας της μεταγραφής εφόσον συνδεθεί με την πρωτεΐνη Miz-1. Ο μεταγραφικός παράγοντας Miz-1 της οικογένειας POZ domain/zinc finger αποτελεί ενεργοποιητή των αρνητικών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως των αναστολέων των κυκλινεξαρτώμενων κινασών p15^{INK4}, p21^{CIP1}, και p57^{KIP2}, επομένως οδηγεί τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας. Το διμερές c-Myc/Max μπορεί να προσδεθεί στην πρωτεΐνη Miz-1 και να καταστείλει την έκφραση των γονιδίων αυτών, πιθανώς εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ του Miz-1 και των συμπαραγόντων του, p300 και Nrm1. Επιπλέον, το σύμπλοκο c-Myc/Max/Miz-1 διεγείρει την προσέγγιση της DNA μεθυλοτρανσφεράσης Dnmt3a και των αποακετυλασών των ιστονών στους υποκινητές προκαλώντας σίγαση της γονιδιακής έκφρασης. Ο παράγοντας c-Myc, επομένως, παρεμποδίζει την προκαλούμενη από το Miz-1 αναστολή της ανάπτυξης και μετατρέπει το Miz-1 από μεταγραφικό ενεργοποιητή σε καταστολέα. Έχειδειχθεί ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης του c-Myc με το Miz-1 είναι η υπομονάδα HLH και πως ο Miz-1 δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το Max. Ο παράγοντας Miz-1 μπορεί να προσδεθεί και στις πρωτεΐνες n-Myc και l-Myc, ασθενέστερα όμως από ό,τι με τη c-Myc.²⁴⁻²⁸



Εικόνα 6. Αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του παράγοντα c-Myc προς σχηματισμό ενεργοποιητικού και κατασταλτικού μεταγραφικού συμπλόκου.²⁶

1.6 Intrinsically disordered proteins

Οι πρωτεΐνες οφείλουν τον πολύπλευρο κυτταρικό ρόλο τους στην υψηλή ετερογένεια και την ποικιλομορφία των δομών τους. Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης εξαρτάται άμεσα από την αναδιπλωμένη τρισδιάστατη δομή της πολυπεπτιδικής της αλυσίδας στο χώρο. Ωστόσο, η έρευνα τη δεκαετία του 1990 ανέδειξε την ύπαρξη αλληλουχιών αμινοξέων οι οποίες δεν αναδιπλώνονται προς σχηματισμό δευτεροταγών ή τριτοταγών δομών, αλλά υφίστανται ως ένα σύνολο ταχέως εναλλασσόμενων δομών. Οι περιοχές αυτές καλούνται εγγενώς μη δομημένες περιοχές (intrinsically disordered regions, IDRs) και αντίστοιχα, οι πρωτεΐνες που τις περιέχουν, εγγενώς μη δομημένες πρωτεΐνες (intrinsically disordered proteins, IDPs).

Στην ελεύθερη μορφή τους, οι IDPs δεν παρουσιάζουν καθορισμένες τρισδιάστατες δομές, γεγονός που τους προσδίδει ένα κινητικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις αυστηρώς δομημένες πρωτεΐνες με αποτέλεσμα συχνά να αναπτύσσουν αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα. Εφόσον δεσμευθούν σε μια έταιρη πρωτεΐνη ή με τον ομοδιμερισμό τους, ορισμένες από τις IDPs αποκτούν τριτοταγή δομή. Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα χαρακτηρίζονται από υψηλή εκλεκτικότητα και μέτρια συγγένεια, λόγω του εντροπικού κόστους που συνδέεται με την επαγωγή δομικής σταθερότητας. Μια ιδιαίτερα κοινή μετάβαση από τη μη δομημένη προς τη δομημένη κατάσταση σε τέτοια συστήματα αποτελεί ο σχηματισμός ελικοειδών διαμορφώσεων.^{3,16,29}

Η ετερογένεια των διαμορφώσεων των IDPs έχει μελετηθεί με διάφορες τεχνικές, όπως ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός, η ανισοτροπία φθορισμού, η απόσβεση φθορισμού τρυπτοφάνης και η φασματοσκοπία συσχέτισης φθορισμού. Οι IDPs διαφέρουν από τις δομημένες πρωτεΐνες ως προς τη σύνθεση της αλληλουχίας, τα φορτία, την υδροφοβικότητα, την ευκαμψία και την αρωματικότητα των αμινοξικών καταλοίπων τους. Οι IDPs/IDRs περιέχουν κυρίως φορτισμένα αμινοξέα που προάγουν τη δομική αστάθεια.³

Η συχνότητα των IDRs αυξάνει με την πολυπλοκότητα των οργανισμών και οι IDPs διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών.³⁰ Η ανάλυση του ευκαρυωτικού πρωτεώματος έχει αποκαλύψει πως το 33% των πρωτεϊνών αποτελείται από IDPs και ότι οι περισσότερες από αυτές εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου.^{3,29}

Η σχετική ευελιξία των IDRs τις καθιστά κατάλληλα υποστρώματα για μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και συχνά εμπλέκονται σε κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς, όπως η φωσφορυλίωση (70% των πρωτεϊνών που μεσολαβούν στην κυτταρική σηματοδότηση αποτελείται από IDPs).¹⁶ Μεγάλος αριθμός των IDPs ανήκει επίσης στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο c-Myc.

Η απορρύθμιση της δραστηριότητάς των IDPs έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη καρκίνου και άλλων ασθενειών, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, αμυλοείδωση, νευροεκφυλιστικές νόσοι και διαβήτη.¹⁶ Επομένως, η κατανόηση των σχέσεων μεταξύ της δομής και της λειτουργίας των IDPs αποτελεί πλέον επιτακτική ανάγκη. Για το σκοπό αυτό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων ορθολογικού σχεδιασμού συνθετικών παραγόντων ικανών να στοχεύουν IDPs και να τροποποιήσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης στόχου και των συμπαραγόντων της. Η δέσμευση ενός μικρού μορίου σε μια πρωτεΐνη IDP θεωρείται ικανή να αποτρέψει τη δέσμευση της πρωτεΐνης στόχου στους συμπράγοντες της και τη δημιουργία ενός αυστηρώς δομημένου συστήματος, λόγω του εντροπικού κέρδους ενός διαταραγμένου συστήματος.

Μέχρι σήμερα, η ανάπτυξη χημικών προσεγγίσεων για τον σχεδιασμό δραστικών προσδεμάτων των IDPs βρίσκεται σε πολύ πρώιμα στάδια και ο ορθολογικός σχεδιασμός τους εξακολουθεί να αποτελεί ένα δύσκολο στόχο. Οι βιοφυσικές μέθοδοι που είναι σε θέση να αναλύσουν τον τρόπο δέσμευσης των προσδεμάτων στο στόχο τους, αναμένεται να αποτελέσουν τα εργαλεία για την ανάπτυξη υπολογιστικών σχεδιαστικών μεθόδων.²⁹

1.7 Ο παράγοντας c-Myc ως φαρμακολογικός στόχος

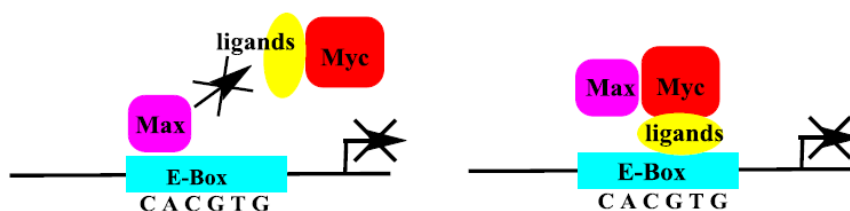
Μελέτες σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση του c-Myc επάγει την ανάπτυξη καρκίνου, ενώ ακόμη και η παροδική αδρανοποίηση του προκαλεί υποχώρηση του όγκου, υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως στόχος της αντικαρκινικής θεραπείας. Επειδή ο παράγοντας c-Myc διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, έχει υποστηριχθεί στο παρελθόν ότι η αναστολή της λειτουργίας του θα οδηγούσε σε ευρείες ανεπιθύμητες ενέργειες *in vivo*. Ωστόσο, μελέτες με βάση τον αναστολέα Otopmyc (βλ. 1.8.1 *Αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max*) έδειξαν ότι η αναστολή του c-Myc έχει μόνο ήπιες και ταχέως αναστρέψιμες επιδράσεις στους φυσιολογικούς ιστούς.³¹⁻³⁴

Εφόσον η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου η στόχευση με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα καθίσταται ανέφικτη. Επομένως, υπάρχουν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για την αναστολή του c-Myc με μικρά μόρια: η παρεμβολή κατά το διμερισμό c-Myc/Max και η παρεμπόδιση της πρόσδεσης του ενεργού διμερούς στο DNA.

Η προσπάθεια για την ανακάλυψη μικρών μορίων ικανών να αναστείλουν τις ογκογόνες λειτουργίες του c-Myc έχει απασχολήσει την έρευνα τα τελευταία χρόνια και πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν δημοσιεύσει σχετικούς αναστολείς. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί μόρια με ικανοποιητική δραστηριότητα και κατάλληλες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, γεγονός που οφείλεται εν μέρει στην αδυναμία χρήσης υπολογιστικών μεθόδων για την πρόβλεψη της συγγένειας σύνδεσης των υπό εξέταση ενώσεων με τον παράγοντα c-Myc.

Έχειδειχθεί ότι η αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος του c-Myc μπορεί να αναστείλει πλήρως το διμερισμό c-Myc/Max, αποδεικνύοντας πως ένα πρόσδεμα με υψηλή συγγένεια για κάποια περιοχή του c-Myc που συμμετέχει στο διμερισμό είναι επαρκές για να διαταράξει την αλληλεπίδραση. Παρόλο που η αναστολή του διμερισμού c-Myc/Max φαίνεται να είναι η πιο άμεση προσέγγιση για την αναστολή των λειτουργιών του c-Myc, η ελεύθερη πρωτεΐνη c-Myc, πριν τον ετεροδιμερισμό της με το Max, δεν εμφανίζει συγκεκριμένη δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή. Επιπλέον, σημαντικό εμπόδιο για την ανακάλυψη αναστολέων της κατηγορίας αυτής αποτελεί η μεγάλη επιφάνεια επαφής μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (3.206 Å²).^{12,13} Έπειτα από τη σύνδεση με έναν μικρό μοριακό αναστολέα η αλληλουχία του c-Myc παραμένει στη μη δομημένη κατάσταση, εμποδίζοντας το λεπτομερή πειραματικό χαρακτηρισμό των αναπτυσσόμενων μοριακών αλληλεπιδράσεων, ο οποίος θα παρείχε πληροφορίες για τη βελτίωση της στόχευσης.¹⁷

Όσον αφορά την αναστολή της σύνδεσης του διμερούς στις αλληλουχίες E-box, το ετεροδιμερές c-Myc/Max στερείται κατάλληλης κοιλότητας που θα μπορούσε να στοχευθεί εύκολα από μικρά μόρια.



Εικόνα 7. Αναστολή των λειτουργιών του c-Myc με μικρά μόρια. Αριστερά: αναστολή του διμερισμού c-Myc/Max· δεξιά: αναστολή της πρόσδεσης του c-Myc/Max στις αλληλουχίες E-box. Και στις δύο περιπτώσεις επιτυγχάνεται αναστολή της μεταγραφής των εξαρτώμενων από το c-Myc γονιδίων.¹

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι η εύρεση αναστολέων του μεταγραφικού παράγοντα c-Myc δεν είναι πιθανή με τη χρήση των κλασικών σχεδιαστικών στρατηγικών. Για το λόγο αυτό, η πλειονότητα των αναστολέων c-Myc που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα ανακαλύφθηκε μέσω σάρωσης μεγάλων χημικών βιβλιοθηκών *in vitro*.²

1.8 Αναστολείς του παράγοντα c-Myc

1.8.1 Αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max

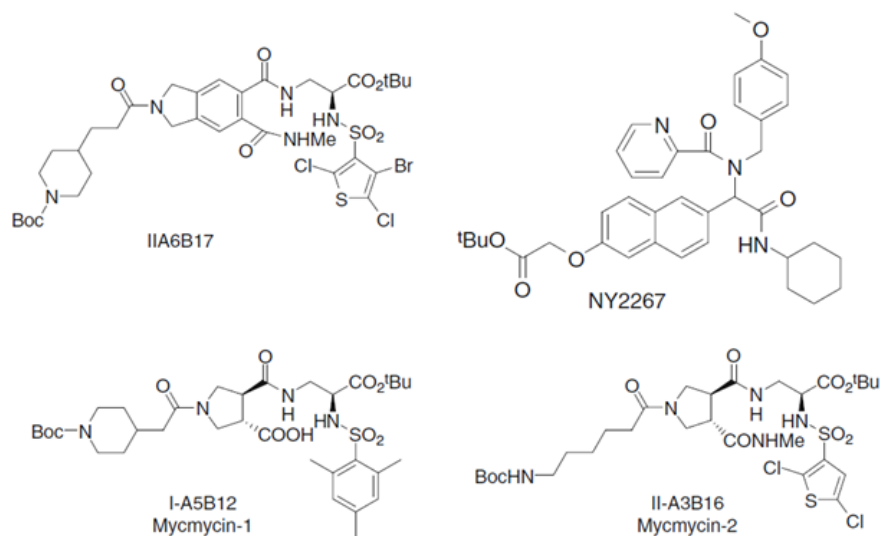
Παρά την απουσία κάποιας εμφανούς κοιλότητας στη διεπιφάνεια του ετεροδιμερούς c-Myc/Max, έχουν βρεθεί διάφορα μόρια ικανά να αναστείλουν το διμερισμό τους. Παρόλα αυτά, οι περισσότεροι δημοσιευμένοι αναστολείς παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή δραστηριότητα με σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων να επιτυγχάνεται μόνο σε συγκεντρώσεις της τάξεως 50 - 100 mol/L, γεγονός που περιορίζει την κλινική τους χρησιμότητα.³⁵ Επιπλέον, τα μόρια αυτά συχνά δε διαθέτουν τις βέλτιστες φαρμακολογικές ιδιότητες ούτε επαρκή εκλεκτικότητα για τον παράγοντα c-Myc.³⁶

Η πρώτη δημοσίευση μικρών μορίων που δρουν ως αναστολείς του MYC έγινε το 2002 από τους Boger και Vogt *et al.*³⁷ με την εύρεση του ΠΑ6Β17, μιας ένωσης με κύριο σκελετό έναν ισοϊνδολινικό πυρήνα. Ο αναστολέας ΠΑ6Β17 αναστέλλει το διμερισμό c-Myc/Max με τιμή IC₅₀=50 μM, όπως δείχθηκε με τη χρήση μεθόδων FRET (Förster resonance energy transfer) και ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Επιπλέον, αναστέλλει το Myc-εξαρτώμενο ογκογόνο μετασχηματισμό σε καλλιέργειες CEF (chicken embryo fibroblast) με IC₅₀=20 μM. Ωστόσο, το μόριο αυτό, όπως και τα ανάλογα του, βρέθηκε ότι δρα επίσης στο μεταγραφικό παράγοντα c-Jun, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συγκεκριμένοι αναστολείς προσδένονται στην υπομονάδα leucine zipper, παρούσα σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες.^{1,2,12}

Ακολούθως (2006), οι Vogt και Janda *et al.*³⁸ λαμβάνοντας υπόψη ότι οι επιφάνειες αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών είναι συχνά υδρόφοβες και σχετικά επίπεδες, ανέπτυξαν μια χημειοθήκη ενώσεων βασισμένη στον υδρόφοβο και επίπεδο ναφθαλινικό πυρήνα καταλήγοντας στο δραστικό μόριο Ny2267 που αναστέλλει τον ογκογόνο μετασχηματισμό σε καλλιέργειες CEF με IC₅₀=20 μM. Εντούτοις, ο αναστολέας Ny2267 παρουσιάζει το ίδιο πρόβλημα εκλεκτικότητας με τα προηγούμενα μόρια.^{2,12,38}

Σε συνέχεια της προηγούμενης εργασίας τους, οι Vogt και Boger *et al.*¹⁹ (2009) αντικατέστησαν το τμήμα του ισοϊνδολινό-5,6-δικαρβοξυλικού οξέος του ΠΑ6Β17 με την ομάδα του πυρρολιδινό-3,4-δικαρβοξυλικού οξέος. Από τη σάρωση της χημειοθήκης που προέκυψε, ανακαλύφθηκαν δύο νέοι αναστολείς, οι mycmycin-1 και mycmycin-2. Οι δύο αναστολείς παρουσίασαν παρεμπόδιση του ογκογόνου μετασχηματισμού σε καλλιέργειες

CEF με τιμές $IC_{95}=20\ \mu M$, τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα από τον αναστολέα IIA6B17 και τα ανάλογά του. Επιπροσθέτως, τα μόρια mycmycin-1 και mycmycin-2 εμφανίζουν το πλεονέκτημα της εκλεκτικότητας σε σχέση με τα δραστικά μόρια που είχαν περιγραφεί ως τότε.^{2,12,19}

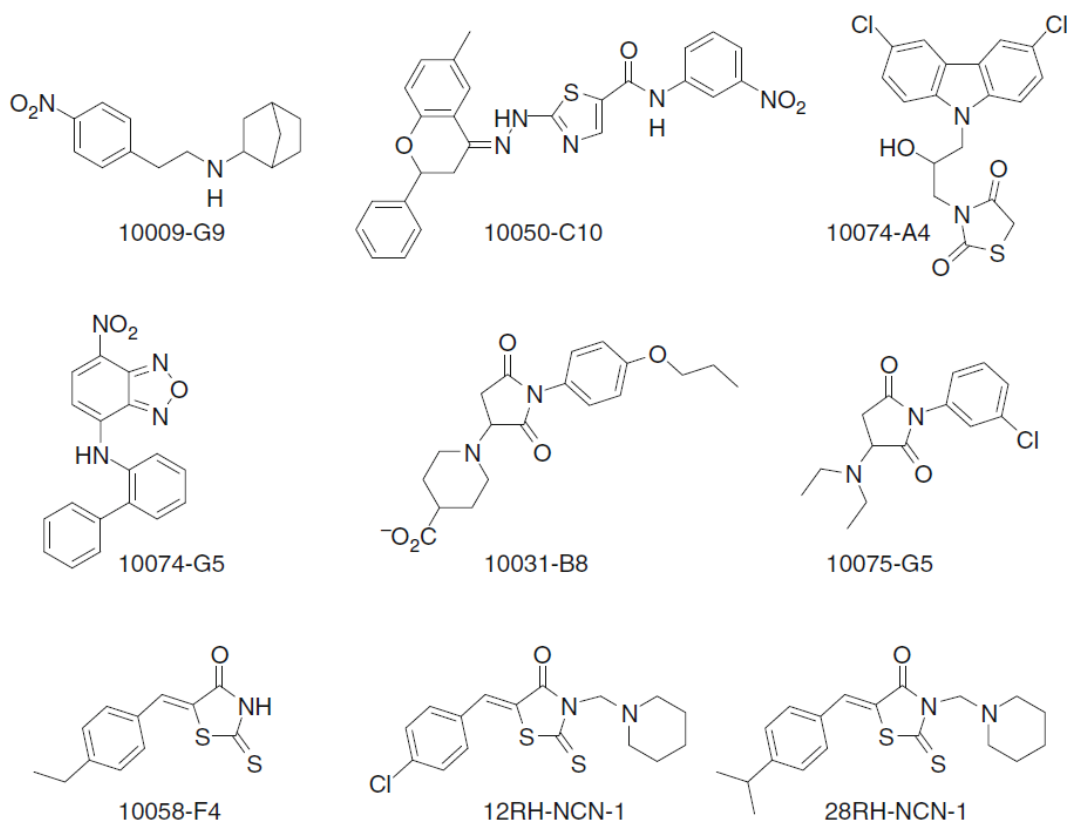


Εικόνα 8. Τα πρώτα δημοσιευμένα μόρια αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max και παράγωγά τους.¹²

Παράλληλα, το 2003, οι Prochownik *et al.*⁷ πραγματοποίησαν τη σάρωση μιας χημειοθήκης 10.000 ενώσεων, μέσω μιας yeast two-hybrid ανάλυσης, για την εύρεση αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max καταλήγοντας σε επτά νέα δραστικά μόρια (10058-F4, 10009-G9, 10050-C10, 10074-A4, 10074-G5, 10031-B8, και 10075-G5). Οι συνεργατικές προσπάθειες που έγιναν από την ομάδα του Metallo, χρησιμοποιώντας αναλύσεις βασισμένες σε μεταλλάξεις, κυκλικό διχρωισμό, δοκιμασίες πόλωσης φθορισμού και μελέτες NMR, αποκάλυψαν την ύπαρξη τριών διακριτών θέσεων πρόσδεσης στην περιοχή bHLHZir του c-Myc μονομερούς και πως καθεμία από τις επτά ενώσεις συνδέεται εκλεκτικά σε κάποια από αυτές (βλ. 1.8.3 Μελέτες πρόσδεσης γνωστών αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max).³⁹ Μία από τις πιο δραστικές ενώσεις αποτέλεσε το μόριο 10058-F4, το οποίο αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων HL60 (κυτταρική γραμμή ανθρώπινης προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας που υπερεκφράζει το γονίδιο c-Myc) με τιμή $IC_{50}=49\ \mu M$, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα για το c-Myc.

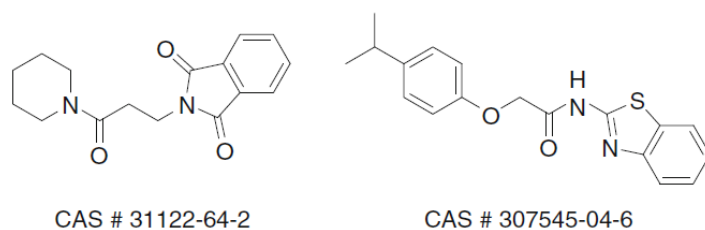
Στη συνέχεια (2007), πραγματοποιήθηκαν ποικίλες τροποποιήσεις των υποκαταστατών του αρωματικού δακτυλίου, του δακτυλίου της ροδανίνης και συνδυασμοί αυτών, με αποτέλεσμα την εύρεση των δύο νέων αναστολέων 12RH-NCN-1 και 28RH-NCN-1, τα οποία διαθέτουν παρόμοια συγγένεια σύνδεσης με τη μητρική ένωση 10058-F4 για το πεπτίδιο c-Myc₃₅₃₋₄₃₉,

αλλά παρουσιάζουν διπλάσια δραστικότητα στις κυτταρικές καλλιέργειες HL60 (12RH-NCN-1: 38 μ M, 28RH-NCN-1: 29 μ M).³⁵



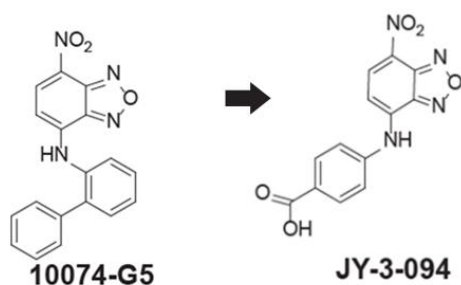
Εικόνα 9. Μικρά μόρια αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max ταυτοποιημένα από τους Prochownik *et al.*¹²

Το 2009, οι Mustata *et al.*⁴⁰ κατάφεραν να εξάγουν ένα τρισδιάτατο φαρμακοφόρο μοντέλο βασισμένο στο δραστικό μόριο 10058-F4 και τα ανάλογα του (βλ. 1.8.4 Δημοσιευμένες υπολογιστικές μέθοδοι εύρεσης c-Myc αναστολέων). Από το μοντέλο αυτό, βρέθηκαν ακόμα δύο αναστολείς, οι 31122-64-2 και 307545-04-6, οι οποίοι δρουν συνδεόμενοι στο c-Myc μονομερές.⁴⁰



Εικόνα 10. Μικρά μόρια αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max που αναγνωρίστηκαν από το τρισδιάτατο φαρμακοφόρο μοντέλο με βάσει τον αναστολέα 10058-F4.

Το 2014 πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η αξιολόγηση αναλόγων του δραστικού μορίου 10074-G5, από όπου προέκυψε ο αναστολέας JY-3-094, ικανός να παρεμβαίνει στο διμερισμό c-Myc/Max 5 φορές πιο αποτελεσματικά από την ένωση οδηγό, αλλά με το μειονέκτημα της χαμηλής κυτταρικής διαπερατότητας λόγω της παρουσίας της καρβοξυλικής ομάδας. Ωστόσο, η κυτταρική πρόσληψη βελτιώθηκε με την εστεροποίησή της, ενώ παράλληλα διατηρήθηκε η δραστικότητα του μορίου.¹

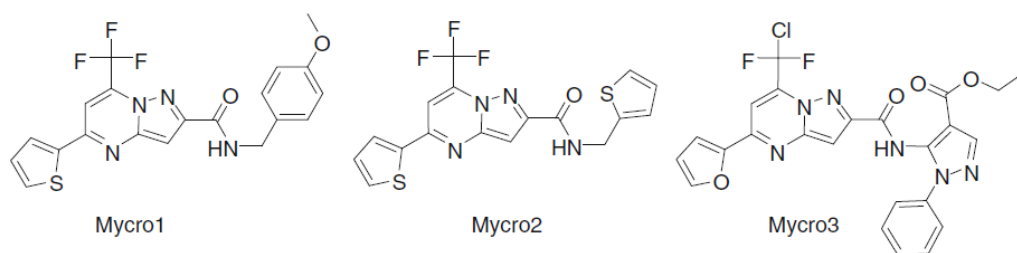


Εικόνα 11. Ανάλογο με βελτιωμένη δραστικότητα βασισμένο στην ένωση οδηγό 10074-G5.

Μια άλλη ομάδα ερευνητών⁴¹, χρησιμοποιώντας μια μέθοδο πόλωσης φθορισμού για τη σάρωση μιας ετερογενούς χημειοθήκης 17,000 ενώσεων, ανακάλυψαν την ένωση Mycro1. Η ένωση αυτή, με βασικό σκελετό το αρωματικό σύστημα της πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνης, ανέστειλε τη σύνδεση c-Myc–Max/DNA με IC₅₀=30 μM.

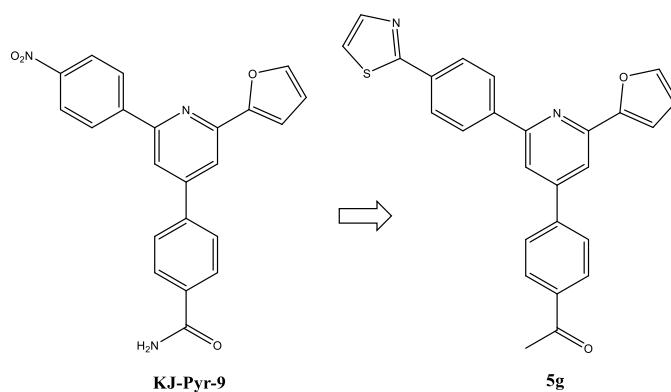
Το Mycro1 βρέθηκε ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό μιας ποικιλίας κυτταρικών σειρών με τρόπο εξαρτώμενο από το μεταγραφικό παραγόντα c-Myc, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σειράς καρκίνου του μαστού MCF-7. Με τη χρήση αναλύσεων EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) βρέθηκε ότι ο αναστολέας Mycro1 είναι εκλεκτικός έναντι του ετεροδιμερούς των μεταγραφικών παραγόντων c-Jun/c-Fos. Παρόλα αυτά η εκλεκτικότητα στα κύτταρα ήταν χαμηλή, καθώς η μεταγραφή των γονιδίων για την οποία είναι υπεύθυνοι οι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας AP-1, που επίσης διμερίζονται μέσω υπομονάδων leucine zipper, παρεμποδίστηκε στον ίδιο βαθμό με τη μεταγραφή των c-Myc/Max εξαρτώμενων γονιδίων.

Στη συνέχεια, από τη σάρωση μιας νέας προσανατολισμένης πλέον χημειοθήκης μορίων με βασικό σκελετό την πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνη ανακαλύφθηκε το Mycro3 (IC₅₀ =40 μM), το οποίο διατηρεί την εκλεκτικότητα του σε κυτταρικές μελέτες. Τα μόριο αυτό αποτελεί τον πρώτο αναστολέα του διμερισμού c-Myc/Max, που επίσης αναστέλλει τη σύνδεση c-Myc / Max / DNA και αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με το c-Myc/Max έναντι άλλων διμερών μεταγραφικών παραγόντων.^{41,42}



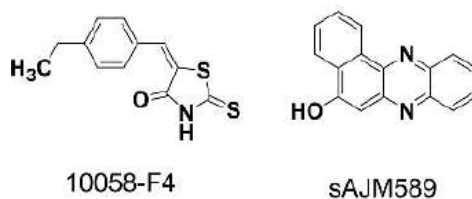
Εικόνα 12. Αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max βασισμένοι στο σκελετό της πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνης.

Το 2014, οι Vogt και Janda *et al.*³¹ σε μια νέα απόπειρα για την εύρεση c-Myc αναστολέων, ανακάλυψαν το δραστικό μόριο KJ-Pyr-9 από τη σάρωση μιας χημειοθήκης υποκατεστημένων πυριδινών με τη χρήση μιας μεθόδου πόλωσης φθορισμού. Ο αναστολέας σε καλλιέργεια κυττάρων λεμφώματος Burkitt παρουσίασε τιμή $IC_{50}=1-2.5 \mu M$. Επίσης, σε δοκιμασίες εκλεκτικότητας έναντι των μεταγραφικών παραγόντων v-Src, v-Jun και της μεταλλαγμένης κινάσης PI3K (PI3K H1047R) έδειξε ικανοποιητική εκλεκτικότητα.³¹ Ωστόσο, το KJ-Pyr-9 εμφανίζει μικρή διαλυτότητα ($\sim 8 \mu M$) δυσχεραίνοντας τις βιοφυσικές αναλύσεις. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος ακολούθησε η σύνθεση και η αξιολόγηση αναλόγων του η οποία οδήγησε στην εύρεση του μορίου 5g, το οποίο διαθέτει βελτιωμένα χαρακτηριστικά και παρόμοια αποτελεσματικότητα με τη μητρική ένωση.⁴³



Εικόνα 13. Δραστικό μόριο αναστολέας του διμερισμού c-Myc/Max ταυτοποιημένο από τους Vogt και Janda *et al.* (KJ-Pyr-9) και ανάλογό του με βελτιωμένα χαρακτηριστικά.

Τέλος, ένας νέος αναστολέας του διμερισμού c-Myc/Max (sAJM589) ανακαλύφθηκε το 2017 μέσω σάρωσης υψηλής απόδοσης με τη χρήση της μεθόδου PCA (Protein-fragment Complementation Assay) και παρουσίασε $IC_{50}=1.8 \mu M$, δηλαδή 25 φορές δραστικότερο από το 10058-F4. Ο αναστολέας sAJM589 διαθέτει επίσης εκλεκτικότητα και δεν επηρεάζει το διμερισμό των Max/Max και Jun/Fos.³⁶



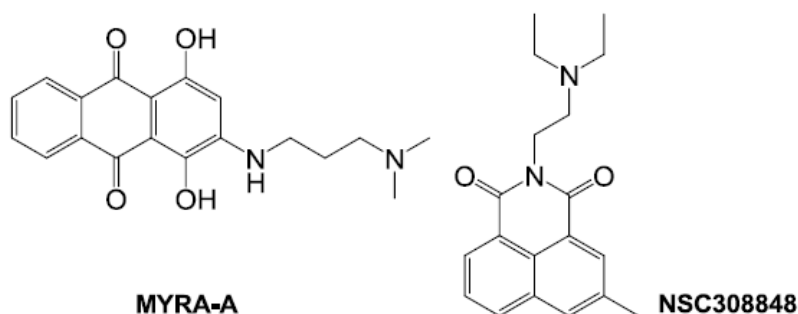
Εικόνα 14. Νέος αναστολέας του διμερισμού c-Myc/Max (sAJM589) ταυτοποιημένος από τους Choi *et al.*³⁶

Μια εναλλακτική στρατηγική για την αναστολή του διμερισμού c-Myc/Max αποτέλεσε το Otopomyc, ένα μεταλλαγμένο ομόλογο του c-Myc που διαθέτει την basic-helix-loop-helix υπομονάδα. Δρα είτε συνδεδεμένο στο c-Myc, είτε στο Max με αποτέλεσμα το σχηματισμό μη λειτουργικών διμερών αποτρέποντας το διμερισμό c-Myc/Max και την πρόσδεσή του συμπλόκου στο DNA. Ωστόσο, το Otopomyc δεν μπορεί να διεισδύσει σε όγκους και ως εκ τούτου είναι αναποτελεσματικός ως θεραπευτικός παράγοντας κατά του καρκίνου, επομένως η χρήση του περιορίζεται στη διερεύνηση των επιδράσεων της αναστολής του MYC *in vivo*.⁴⁴

1.8.2 Εναλλακτικές προσεγγίσεις για την αναστολή του c-Myc

Αναστολείς του σχηματισμού του συμπλέγματος c-Myc/Max/DNA

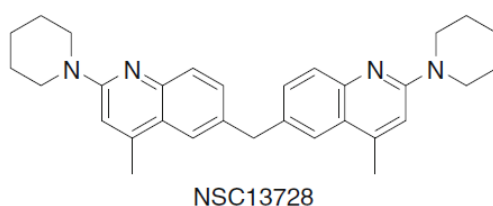
Οι Mo και Henriksson⁴⁵ χρησιμοποιώντας μια κυτταρική δοκιμασία για την εύρεση νέων αναστολέων του c-Myc ανακάλυψαν τα δραστικά μόρια MYRA-A και NSC308848. Ενώ οι αναστολείς αυτοί παρεμπόδισαν το σχηματισμό του συμπλέγματος c-Myc/Max/DNA (προσδιορισμός EMSA), δεν υπήρξαν στοιχεία που να αποδεικνύουν την αναστολή του διμερισμού c-Myc/Max ως μηχανισμό δράσης, αντίθετα με το σύνολο του αναστολέων που περιγράφηκαν ως τώρα. Επιπλέον, δεδομένου ότι δεν παρεμβαίνουν στην πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα USF στο DNA, ο οποίος αναγνωρίζει την ίδια αλληλουχία E-box, αποδεικνύεται ότι η δράση δεν οφείλεται στην παρεμβολή των εν λόγω μορίων στο DNA. Επομένως, οι αναστολείς αυτοί πιθανώς δρουν μέσω στόχευσης των περιοχών πρόσδεσης του διμερούς c-Myc/Max στο DNA.^{1,45,46}



Εικόνα 15. Γνωστά μόρια αναστολείς του σχηματισμού του συμπλέγματος c-Myc/Max/DNA.¹

Σταθεροποιητές του διμερούς Max/Max

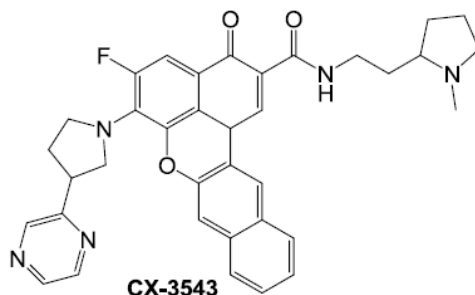
Σε μια άλλη προσέγγιση, ο Vogt και οι συνεργάτες του⁴⁷ υποστήριξαν ότι οι λειτουργίες του c-Myc μπορούν να ανασταλούν έμμεσα μειώνοντας τις ελεύθερες Max πρωτεΐνες που είναι διαθέσιμες για τη δέσμευση και την ενεργοποίηση του c-Myc. Για την επίτευξη αυτού, οι συγγραφείς διενήργησαν εικονική σάρωση μιας σειράς ετερογενών χημικών ενώσεων του National Cancer Institute, με σκοπό την εύρεση μικρών μορίων που σταθεροποιούν εκλεκτικά τα ομοδιμερή Max/Max. Η πειραματική επικύρωση των υπολογιστικών δεδομένων πρόσδεσης, με τη χρήση μιας μεθόδου βασισμένης στο FRET, επαλήθευσε ορισμένες προβλέψεις της εικονικής σάρωσης ως πραγματικούς σταθεροποιητές του διμερούς Max/Max. Από αυτές τις ενώσεις, επιλέχθηκε το μικρό μόριο NSC13728 για περαιτέρω διερεύνηση. Σε κυτταρικές δοκιμασίες, το NSC13728 εμφάνισε ανασταλτική δράση έναντι των λειτουργιών του c-Myc, ενώ ο ογκογονικός μετασχηματισμός σε καλλιέργειες CEF μειώθηκε σημαντικά σε συγκέντρωση 2,5 μM του NSC13728. Επιπλέον, η ένωση εμφάνισε εξαιρετική εκλεκτικότητα έναντι του μετασχηματισμού που προκαλείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Src, Jun ή PI3K σε συγκεντρώσεις έως 10 μM .^{12,47}



Εικόνα 15. Μικρό μόριο σταθεροποιητής του διμερούς Max/Max.

Αναστολείς της μεταγραφής του c-MYC γονιδίου

Οι αλληλουχίες G-quadruplex αποτελούν δομές πλούσιες σε γουανίνη οι οποίες εντοπίζονται σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος και στους υποκινητές ογκογονιδίων, όπως του c-MYC. Οι δομές αυτές παρουσιάζουν δύο διαμορφώσεις, μια ενεργοποιημένη, η οποία επιτρέπει τη μεταγραφή του γονιδίου και μια απενεργοποιημένη, που οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του. Επομένως, η σταθεροποίηση της ανενεργής διαμόρφωσης με μικρά μόρια είναι δυνατόν να μειώσει τα επίπεδα της πρωτεΐνης c-Myc και να αναστείλει τις λειτουργίες της. Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί διάφορα μικρά μόρια που δρουν με τον παραπάνω μηχανισμό, συμπεριλαμβανομένων παραγώγων πορφυρίνης, βερβερίνης, κινολιδίνης, καρβαζόλης, ναφθοπυρόνης και σύμπλοκα μετάλλων. Ο αναστολέας CX-3543 (Quarfloxin), ο οποίος στοχεύει εκλεκτικά την αλληλουχία G-quadruplex του υποκινητή του c-MYC γονιδίου έχει προχωρήσει σε κλινικές δοκιμασίες φάσης II για τη θεραπεία νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων.^{1,48}



Εικόνα 16. Μικρό μόριο που προσδένεται στον υποκινητή του c-MYC γονιδίου και σταθεροποιεί την ανενεργή του διαμόρφωση.¹

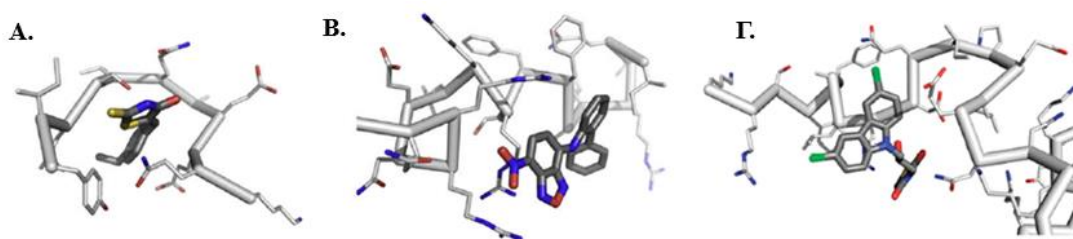
1.8.3 Μελέτες πρόσδεσης γνωστών αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max

Από την ερευνητική μελέτη των Metallo *et al.*³⁹ προτάθηκε η ύπαρξη συγκεκριμένων διακριτών θέσεων πρόσδεσης των αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max στην υπομονάδα bHLH-Zip του c-Myc μονομερούς. Οι ερευνητές μελέτησαν αρχικά τον τρόπο σύνδεσης δύο γνωστών αναστολέων, των 10058-F4 και 10074-G5. Οι μελέτες πρόσδεσης διεξήχθησαν σε πρώτο στάδιο μέσω αναλύσεων πόλωσης φθορισμού (Fluorescence Polarization, FP), εκμεταλλευόμενοι τον ενδογενή φθορισμό των δύο ενώσεων, χρησιμοποιώντας την υπομονάδα bHLH-Zip του c-Myc (c-Myc₃₅₃₋₄₃₇). Οι αναστολείς 10058-F4 και 10074-G5 παρουσίασαν συγγένεια σύνδεσης 5.3 και 2.8 μM για το πεπτίδιο c-Myc₃₅₃₋₄₃₇, αντίστοιχα. Η ταυτόχρονη και ανεξάρτητη δέσμευση των δυο ενώσεων αποκάλυψε την παρουσία τουλάχιστον δύο διαφορετικών θέσεων σύνδεσης στο πεπτίδιο. Στη συνέχεια, μέσω μελετών βασισμένων σε σημειακές μεταλλάξεις και αποκοπών αμινοξέων στην αλληλουχία c-Myc₃₅₃₋₄₃₇, οι συγγραφείς ταυτοποίησαν δύο συνθετικά πεπτιδία, τα c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ και c-Myc₃₆₃₋₃₈₁, καθένα από τα οποία δεσμεύεται ειδικά με τους αναστολείς 10074-G5 και 10058-F4, αντίστοιχα, με συγγένειες πλησίον των τιμών που ελήφθησαν για το πεπτίδιο c-Myc₃₅₃₋₄₃₇.

Οι μεταβολές στα φάσματα κυκλικού διχρωισμού (Circular dichroism, CD) των c-Myc₄₀₂₋₄₁₂ και c-Myc₃₆₃₋₃₈₁ έδειξαν ότι τα πεπτιδία υπέστησαν σημαντικές αλλαγές της διαμόρφωσής τους μετά τη δέσμευση των δραστικών μορίων. Αν και η σύνδεση των δύο αναστολέων με την υπομονάδα bHLH-Zip (c-Myc₃₅₃₋₄₃₇) μπορούσε να ανιχνευθεί από την FP ανάλυση, οι μεταβολές στα φάσματα CD του c-Myc₃₅₃₋₄₃₇ δεν ήταν παρατηρήσιμες, υποστηρίζοντας έτσι ότι αμφοτέρωτα τα 10074-G5 και 10058-F4 προκαλούν εξαιρετικά τοπικές διαμορφωτικές αλλαγές, οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν μόνο με τη χρήση μικρότερων πεπτιδίων. Επιπλέον, τα φάσματα ¹H και ¹³C NMR αποκάλυψαν το σχηματισμό μιας υδρόφοβης περιοχής αποτελούμενη από τα αμινοξικά κατάλοιπα Tyr402, Ile403, Leu404, Val406, Ala408 στο σύμπλοκο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂/10058-F4 και μίας υδρόφοβης κοιλότητας (Phe374,

Phe375, Ala376, Leu377 και Ile381) στο αμινοτελικό άκρο μιας επαγόμενης α-έλικας του συμπλόκου c-Myc₃₆₃₋₃₈₁/10074-G5. Δεδομένου ότι αυτές οι περιοχές πρόσδεσης αποτελούνται από διαδοχικά αμινοξέα, οι συγγραφείς πρότειναν ότι είναι πιθανό να επιτευχθεί ορθολογικός σχεδιασμός αναστολέων των IDPs απλώς μέσω παρατήρησης της πρωτοταγούς δομής των πρωτεϊνών.^{2,39}

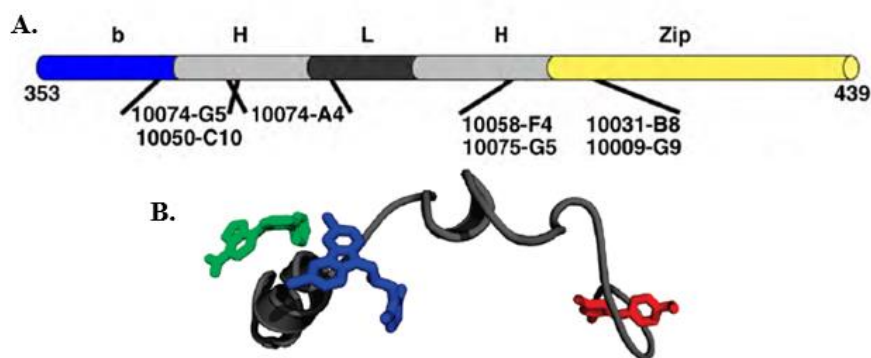
Μοντέλα των πεπτιδίων στις ελεύθερες και δεσμευμένες καταστάσεις τους δημιουργήθηκαν λαμβάνοντας υπόψιν τους περιορισμούς των διεδρών γωνιών με βάση τις χημικές μετατοπίσεις (chemical shift-based dihedral constraints). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί πρόσδεσης (docking) μεταξύ των δεσμευμένων δομών και των αντίστοιχων αναστολέων. Τα πεπτίδια σε κανένα από τα δύο σύμπλοκα δεν παρουσίασαν την ίδια διαμόρφωση με εκείνη που εμφανίζεται στην κρυσταλλική δομή του διμερούς c-Myc/Max, δείχνοντας ότι αυτή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη πιθανών θέσεων πρόσδεσης μικρών μορίων.³⁹



Εικόνα 17. Αποτελέσματα υπολογισμών πρόσδεσης των αναστολέων 10058-F4, 10074-G5 και 10074-A4 στα αντίστοιχα πεπτίδια, βασισμένα σε μοντέλα NMR. Πιθανές διαμορφώσεις των συμπλόκων: **A.** 10058-F4 με το πεπτίδιο c-Myc₄₀₂₋₄₁₂, **B.** 10074-G5 με το πεπτίδιο c-Myc₃₆₃₋₃₈₁, **Γ.** 10074-A4 με το πεπτίδιο c-Myc₃₇₀₋₄₀₉.^{16,39}

Όπως αναφέρθηκε, οι ενώσεις 10074-G5 και 10058-F4 αποτελούν ενδογενώς φθορίζοντα μόρια. Στις αναλύσεις πόλωσης φθορισμού, η πρόσδεση των αναστολέων στο πεπτίδιο c-Myc₃₅₃₋₄₃₇ ανιχνεύεται από την αύξηση της πόλωσης του εκπεμπόμενου φθορισμού σε σχέση με την ελεύθερη ένωση. Μετά την εύρεση των δυο προτεινόμενων θέσεων πρόσδεσης των δραστικών μορίων 10074-G5 και 10058-F4, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανταγωνισμού αυτών με μη φθορίζοντα μόρια, γνωστούς αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max. Κατά τις δοκιμασίες αυτές προστέθηκε ο υπό εξέταση αναστολέας σε διάλυμα που περιείχε το πεπτίδιο c-Myc₃₅₃₋₄₃₇ και ισομοριακή συγκέντρωση είτε του μορίου 10058-F4 είτε του 10074-G5. Όλα τα δραστικά μόρια που ταυτοποιήθηκαν από τους Yin *et al.*⁷ εξετάστηκαν με την παραπάνω ανάλυση. Μείωση της πόλωσης φθορισμού από το 10058-F4 προκλήθηκε από τις ενώσεις 10031-B8, 10075-G5 και 10009-G9, γεγονός που υποδεικνύει ότι εκτοπίζουν το 10058-F4 από τη θέση πρόσδεσης του. Ομοίως, το 10074-G5 εκτοπίζεται από το μόριο 10050-C10. Κανένα από τα 10031-B8, 10075-G5 και 10009-G9 δεν εκτοπίζει το 10074-G5 από το c-Myc,

όπως και το 10050-C10 δεν εκτοπίζει το 10058-F4. Καθώς η δραστική ένωση 10074-A4 δεν προκάλεσε μείωση της πόλωσης φθορισμού καμίας εκ των δύο ενώσεων, θεωρήθηκε ότι δεσμεύεται σε μια τρίτη θέση της bHLHZip υπομονάδας του c-Myc. Μέσω της μελέτης των αλλαγών στα φάσμα CD διαφόρων θραυσμάτων του c-Myc, μόνων και παρουσία του 10074-A4, και των μεταβολών στις χημικές μετατοπίσεις, προτάθηκε η αλληλουχία c-Myc₃₇₀₋₄₀₇ ως θέση πρόσδεσης του 10074-A4. Επιπλέον, οι αναλύσεις έδειξαν ότι οι αναστολείς μπορούν ταυτόχρονα να αλληλεπιδρούν με καθεμία από τις τρεις θέσεις πρόσδεσης χωρίς ανιχνεύσιμες αλλαγές στη συγγένειά τους.^{16,30}

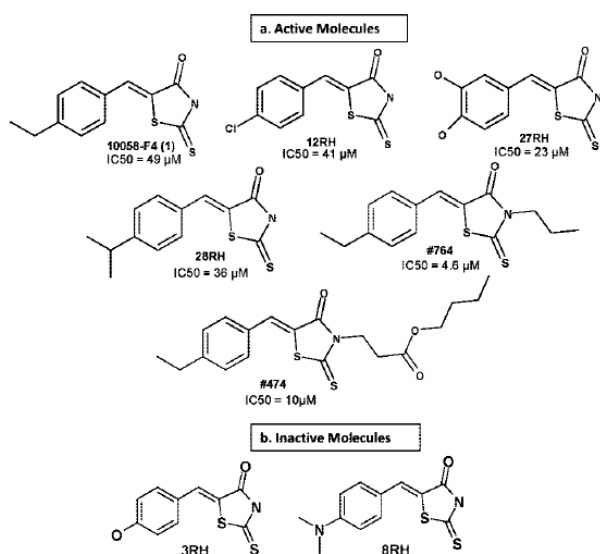


Εικόνα 18. A. Περιοχές πρόσδεσης γνωστών αναστολέων στην υπομονάδα bHLHZip του c-Myc μονομερούς.³⁰ B. Μοντέλο το οποίο αναπαριστά την ταυτόχρονη πρόσδεση των αναστολέων 10074-F4 (κόκκινο), 10074-G5 (πράσινο) και 10074-A4 (μπλε).¹⁶

1.8.4 Δημοσιευμένες υπολογιστικές μέθοδοι εύρεσης c-Myc αναστολέων

Αξιοποιώντας τα δεδομένα δομής/δράσης των γνωστών αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max, το 2009 οι Mustata *et al.*⁴⁰ ανέπτυξαν ένα φαρμακοφόρο μοντέλο το οποίο συνοψίζει τα βασικά κοινά χαρακτηριστικά των δραστικών μορίων με τη χρήση του αλγορίθμου GALAHAD (Genetic Algorithm with Linear Assignment for Hypermolecular Alignment of Datasets). Από την *in silico* εξέταση της βάσης δεδομένων ZINC (περίπου 5×10^6 ενώσεις) εντοπίστηκε αρχικά ένας μεγάλος αριθμός δομικά διαφορετικών μορίων. Η ομάδα αυτή περιορίστηκε σε ένα σύνολο 30 ενώσεων με τις πλέον ευνοϊκές ιδιότητες ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) και κατόπιν μειώθηκε περαιτέρω σε 9, διατηρώντας τη δομική ποικιλομορφία, οι οποίες θεωρήθηκαν ως φτωχά υποστρώματα για το ένζυμο CYP3A4, το κύριο ένζυμο υπεύθυνο για τον ξενοβιοτικό μεταβολισμό. Από τις 9 ενώσεις, 7 έδειξαν δραστικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις όταν ελέγχθηκαν παρουσία του συμπλόκου c-Myc/Max χρησιμοποιώντας CD. Οι 4 ενώσεις με τα καλύτερα αποτελέσματα έδειξαν 2 έως 10 φορές χαμηλότερη συγγένεια σύνδεσης για τον παράγοντα c-Myc σε σχέση με την ένωση 10058-F4. Όπως προσδιορίστηκε από πειράματα πόλωσης φθορισμού, οι ενώσεις αυτές ανταγωνίζονται με την 10058-F4 για την πρόσδεση στον παράγοντα c-Myc, και επίσης, σύμφωνα με δοκιμασίες βασισμένες στην μέθοδο EMSA, αναστέλλουν τη

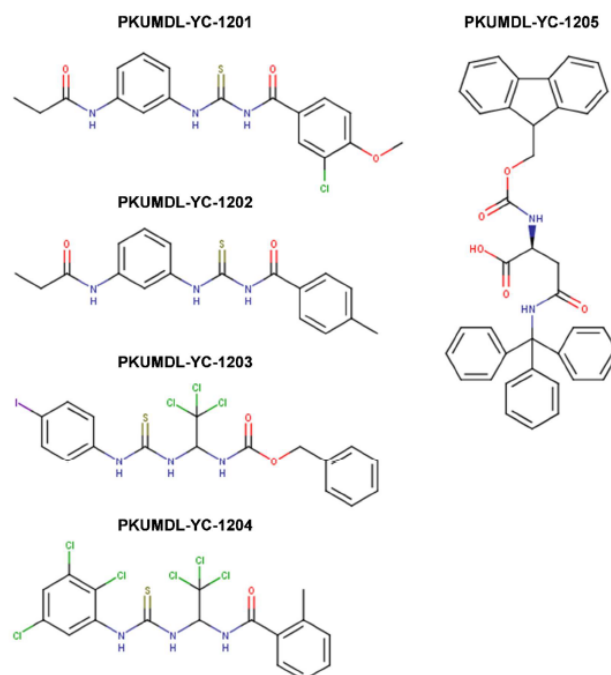
δέσμευση του DNA στο σύμπλοκο c-Myc/Max. Τέλος, όταν εξετάστηκαν σε δοκιμασίες πολλαπλασιασμού κυττάρων, καμία από τις εξεταζόμενες ενώσεις δεν ήταν περισσότερο από 2 φορές καλύτερη από την 10058-F4.^{40,49}



Εικόνα 19. Μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη του φαρμακοφόρου μοντέλου. (α) δομές δραστικών μορίων (β) δομές μη δραστικών μορίων.⁴⁰

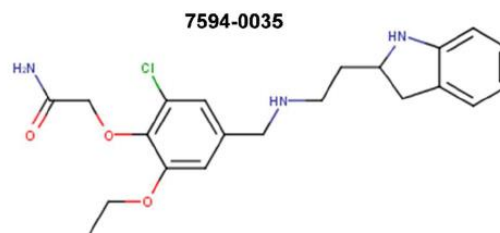
Το 2016, οι Yu *et al.*⁵⁰ διεξήγαγαν εκτεταμένες προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamic, MD) για να ερευνήσουν το σύνολο των διαμορφώσεων του πεπτιδίου c-Myc₃₇₀₋₄₀₉. Δύο πιθανές διαμορφώσεις του c-Myc₃₇₀₋₄₀₉ επιλέχθηκαν, εντός των οποίων αναγνωρίστηκαν τρεις συνολικά πιθανές περιοχές πρόσδεσης μικρών μορίων με τη χρήση του προγράμματος CAVITY. Οι θέσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την εικονική σάρωση χημικών βιβλιοθηκών μέσω του Glide standard precision mode (Maestro suite, Schrödinger LLC) με σκοπό την εύρεση πιθανών προσδεμάτων. Επιπλέον, τα S και R στερεοϊσομερή της ένωσης 10074-A4 χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή δοκιμασιών ομοιότητας με την εφαρμογή Phase. Συνολικά, 250 ενώσεις από την εικονική σάρωση και 23 ανάλογα του 10074-A4 από τη δοκιμασία ομοιότητας εξετάστηκαν πειραματικά για τη δράση τους. Οι επιλεγμένες 273 ενώσεις ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να προκαλέσουν αλλαγές στο CD φάσμα του c-Myc₃₇₀₋₄₀₉. Επτά από τις ενώσεις προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές σε διάφορα μήκη κύματος του CD φάσματος με τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση. Η συγγένεια σύνδεσης των ενώσεων αυτών με το πεπτίδιο εξετάστηκε με τη μέθοδο συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) και οι σταθερές διάστασης KD υπολογίστηκαν 0.28, 17.2, 32, 0.55, 18 μM για τις ενώσεις PKUMDL-YC-1101, PKUMDL-YC-1201, PKUMDL-YC-1203, PKUMDL-YC-1204, και PKUMDL-YC-1205, αντίστοιχα (KD = 36.3 μM για την ένωση 10074-A4). Τέσσερις από τις δραστικές ενώσεις ανέστειλαν τη λειτουργία του c-Myc και την ανάπτυξη των κυττάρων HL-60 (human promyelocytic leukaemia) με EC₅₀ 6.9, 8.8, και 40 μM για τις ενώσεις PKUMDL-YC-1203,

PKUMDL-YC-1204 και PKUMDL-YC-1205, αντίστοιχα ($EC_{50}=15.1 \mu M$ για την ένωση 10074-A4). Οι ενώσεις αυτές περιέχουν στη δομή τους μια ομάδα ουρίας ή θειουρίας.⁵⁰



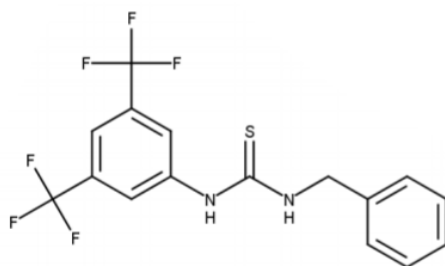
Εικόνα 20. Χημικές δομές των ενώσεων PKUMDL-YC-1201 έως -1205.⁵¹

Το 2018, οι Yao *et al.*⁵² ταυτοποίησαν την ένωση 7594-0035 ως άμεσο αναστολέα του παράγοντα c-Myc, με στόχο την πιθανή εφαρμογή του στη θεραπεία του υποτροπιάζοντος / ανθεκτικού πολλαπλού μυελώματος, στο οποίο η ανάπτυξη αντοχής έναντι των φαρμάκων πρώτης γραμμής έχει συσχετιστεί με το c-Myc. Η ένωση επιλέχθηκε έπειτα από τη διεξαγωγή εικονικής σάρωσης της βάσης δεδομένων ChemDiv, μιας εμπορικά διαθέσιμης χημειοθήκης μικρών μορίων με περισσότερο από ένα εκατομμύριο καταχωρήσεις, με τον αλγόριθμο Surflex της Sybyl-X2.1, χρησιμοποιώντας τη δημοσιευμένη κρυσταλλική δομή του συμπλέγματος c-Myc/Max/DNA (PDB ID: 1NKP). Σημειώνεται ότι οι ερευνητές χρησιμοποίησαν ως περιοχή πρόσδεσης για την εικονική σάρωση την περιοχή του c-Myc στην οποία δεσμεύεται, όπως περιγράφηκε από τους Metallo *et al.*, ο αναστολέας 10074-G5 στην ελεύθερη, μη δομημένη πρωτεΐνη c-Myc. Με βάση την κατάταξη των ενώσεων από την εικονική σάρωση, 200 ενώσεις αγοράστηκαν από την ChemDiv για την πειραματική αξιολόγηση της δράσης τους. Η ένωση 7594-0035 ανέστειλε την έκφραση της πρωτεΐνης παρεμβαίνοντας στη σταθερότητα της. Επιπλέον, μείωσε την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων σε κυτταρικές σειρές πολλαπλού μυελώματος με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση, καθώς επίσης σε συνδυασμό με το φάρμακο bortezomib (BTZ) βελτίωσε την κυτταροτοξική δράση του BTZ ξεπερνώντας την ανάπτυξη αντοχής έναντι του BTZ.⁵²



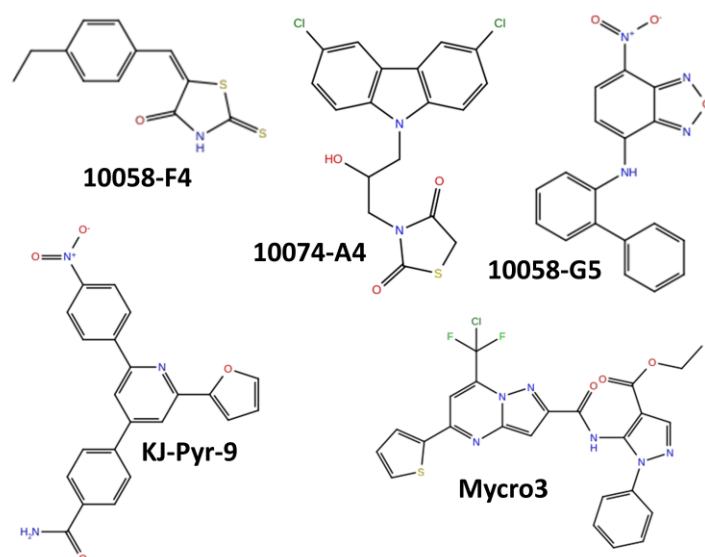
Εικόνα 21. Χημική δομή της ένωσης 7594-0035.

Το ίδιο έτος, οι Carabet *et al.*⁵¹ εφάρμοσαν μια ορθολογική υπολογιστική προσέγγιση για την εύρεση αναστολέων της λειτουργίας του συμπλόκου c-Myc/Max ως πιθανούς φαρμακευτικούς παράγοντες για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη (PCa). Μέσω του αλγόριθμου Site Finder της Molecular Operating environment (MOE), προσδιορίστηκε μια πιθανή θέση πρόσδεσης μικρών μορίων εντός της επιφάνειας διεπαφής των c-Myc/Max/DNA, χρησιμοποιώντας την κρυσταλλογραφία του τριμερούς συμπλόκου (PDB ID: 1NKP). Στη συνέχεια, 4.7 εκατομμύρια ενώσεις επιλέχθηκαν με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (π.χ. φορτία, αριθμός δακτυλίων κ.α.) από τη βάση δεδομένων ZINC12, οι οποίες υποβλήθηκαν σε εικονική σάρωση με τον αλγόριθμο Glide standard precision mode (Maestro 9.3 suite, Schrödinger LLC) εντός της προβλεπόμενης περιοχής πρόσδεσης. Ακολούθως, οι ενώσεις με την υψηλότερη προβλεπόμενη συγγένεια σύνδεσης (docking score έως -5.5 kcal/mol) αξιολογήθηκαν περαιτέρω με βάση ένα φαρμακοφόρο μοντέλο το οποίο περιλάμβανε δύο υδρόφοβες θέσεις, καθώς και ως προς την ικανότητα των ενώσεων να σχηματίζουν επιπλέον δεσμούς υδρογόνου με τα φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα που βρίσκονται στην προβλεπόμενη περιοχή πρόσδεσης. Τελικά, 69 ενώσεις εξετάστηκαν πειραματικά ως προς την επιθυμητή δράση. Από τις 10 ενώσεις που παρουσίασαν μεγαλύτερη από 50% αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του διμερούς c-Myc/Max σε κυτταρικές σειρές LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate), η ένωση VPC-70063 εμφάνισε τα καλύτερα αποτελέσματα με IC₅₀=8.9 μM και μελετήθηκε περαιτέρω. Ο μηχανισμός δράσης της ένωσης αποδείχτηκε πως σχετίζεται με τον παράγοντα c-Myc καθώς τα πειράματα έγιναν συγκριτικά σε δυο κυτταρικές σειρές, μια c-Myc θετική και μια c-Myc αρνητική. Επιπλέον, η χρήση της ανάλυσης biolayer interferometry (BLI) έδειξε ότι η ένωση VPC-70063 αναστέλλει τη σύνδεση του συμπλόκου c-Myc/Max στο DNA με τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση.^{51,53}



Εικόνα 22. Χημική δομή της ένωσης VPC-70063.⁵¹

Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου με στόχο την εύρεση νέων, με βελτιωμένα χαρακτηριστικά αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max, χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός υπολογιστικών μεθόδων σχεδιασμού φαρμάκων, οι οποίες βασίζονται στη γνώση της δομής αναστολέων που έχουν ανακαλυφθεί έως σήμερα.⁵⁴ Στο πλαίσιο αυτό, διεξάχθηκαν δοκιμασίες ομοιότητας στις οποίες έγινε εικονική σάρωση της χημειοθήκης του NCI (National Cancer Institute) για την κατάταξη των ενώσεων ως προς την ομοιότητα τους με τους γνωστούς αναστολείς KJ-Pyr-9, 10058-F4, 10074-A4, 10074-G5 και Micro-3.



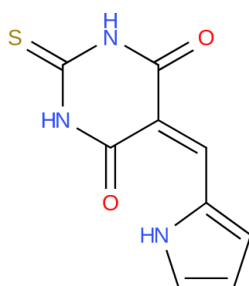
Εικόνα 23. Οι χημικές δομές των 5 αναστολέων του c-Myc/Max διμερισμού οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως μόρια αναφοράς στις δοκιμασίες ομοιότητας.

Η αποτελεσματική και ακριβής μετατροπή των μοριακών δομών από δύο σε τρεις διαστάσεις είναι ένα βασικό απαιτούμενο για τις υπολογιστικές αναλύσεις. Η προετοιμασία της χημειοθήκης NCI για την εικονική σάρωση έγινε μέσω του αλγόριθμου LigPrep (Schrödinger). Ο αλγόριθμος LigPrep αποτελεί μια ισχυρή συλλογή εργαλείων σχεδιασμένων για την προετοιμασία ενεργειακά ελαχιστοποιημένων τρισδιάστατων δομών υψηλής ποιότητας μεγάλου αριθμού μορίων. Από κάθε αρχική δομή που εισάγεται παράγεται ένας αριθμός δομών με διάφορες καταστάσεις ιονισμού, ταυτομέρειας, στερεοχημείας και διαμόρφωσης δακτυλίου.

Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν τα δακτυλικά αποτυπώματα (fingerprints) όλων των ενώσεων της χημειοθήκης NCI, καθώς και των 5 γνωστών αναστολέων ως προς τα 2D δομικά χαρακτηριστικά τους (linear, maccs, radial, dendritic, molprint2D) (Schrödinger), το μοριακό σχήμα και τη 3D φαραμακοφόρο δομή (Canvas, Schrödinger). Τα δακτυλικά αποτυπώματα αποτελούν αλληλουχίες από bits. Ακολούθως, υπολογίστηκαν οι βαθμοί ομοιότητας (Tanimoto similarity scores) ανάμεσα στα μόρια της NCI και τους 5 αναστολείς χρησιμοποιώντας τους 7 τύπους δακτυλικών αποτυπωμάτων που αναφέρθηκαν. Βάσει αυτών, υπολογίστηκε ο συνολικός βαθμός ομοιότητας (consensus similarity score) για κάθε ένωση της χημειοθήκης NCI, καθιστώντας τη διαδικασία πιο αποτελεσματική για την αξιολόγηση της ομοιότητας τους από το να λαμβάνεται υπόψιν ο βαθμός ομοιότητας για κάθε δακτυλικό αποτύπωμα ξεχωριστά.

Τέλος, όλες οι χημικές ενώσεις της χημειοθήκης NCI ταξινομήθηκαν σύμφωνα με το συνολικό βαθμό ομοιότητας σε κάποιον από τους 5 γνωστούς αναστολείς, οι 3D δομές τους απεικονίστηκαν στο σύστημα διεπαφής Maestro (Schrödinger) και 34 μόρια επιλέχθηκαν για πειραματική αξιολόγηση.

Από τα 34 υποψήφια μόρια που αξιολογήθηκαν για την ικανότητα πρόσδεσης τους στο c-Myc μέσω μικροσκοπικής θερμοφώρησης (Microscale Thermophoresis, MST) και συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR), η ένωση NSC-645852 παρουσίασε σταθερά διάσταση (KD) σε επίπεδο μM ($\text{KD} = 2.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ από την MST), προσεγγίζοντας την KD της πρωτεΐνης Max ($\text{KD} = 1.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ από MST και SPR).



Εικόνα 24. Χημική δομή της ένωσης NSC-645852.

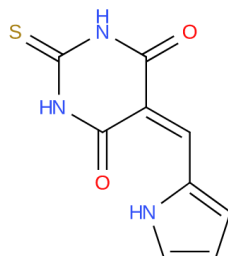
Η ένωση NSC-645852 παρουσιάζει ορισμένα κοινά δομικά χαρακτηριστικά με εκείνη του γνωστού αναστολέα 10058-F4 και είναι γνωστό ότι εμφανίζει ισχυρές θεραπευτικές ιδιότητες έναντι μεγάλου εύρους κατηγοριών καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με το ChEMBL έχει ανασταλτική δράση σε επίπεδο μM έναντι 60 διαφορετικών ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound/inspect/ChEMBL1970786>

ΣΚΟΠΟΣ

Η πρωτεΐνη c-Myc αποτελεί μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων. Τα γονίδια MYC ανήκουν στα συχνότερα υπερεκφρασμένα γονίδια στους ανθρώπινους καρκίνους. Ως εκ τούτου, ο παράγοντας c-Myc μπορεί να αποτελέσει στόχο για την ανάπτυξη νέων μορίων με πιθανό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, η εύρεση μορίων ικανών να τροποποιούν τη λειτουργία του θα προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την ορθολογική ανάπτυξη ενός φαρμακοφόρου μοντέλου βασισμένο σε σχέσεις δομής-δράσης. Η κατανόηση αυτών θα αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για τη διερεύνηση της περιοχής πρόσδεσης των μορίων. Οι ligand-based υπολογιστικές μέθοδοι που έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα για την εύρεση αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max βασίζονται σε περιορισμένα δεδομένα. Επομένως, η ανακάλυψη νέων αναστολέων θα ενισχύσει την ήδη υπάρχουσα γνώση δραστικών μορίων, με αποτέλεσμα τη βελτίωση των μοντέλων πρόβλεψης χημικών ενώσεων με παρόμοια συμπεριφορά. Σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου, βρέθηκε ότι η ένωση NSC-645852 προσδένεται στον παράγοντα c-Myc με $KD = 2.7 \pm 0.7 \mu M$. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας περιλαμβάνει το σχεδιασμό βελτιωμένων αναλόγων μέσω δομικών τροποποιήσεων της ένωσης οδηγού NSC-645852, τη σύνθεση των επιλεγμένων μορίων καθώς και την *in vitro* αξιολόγησή τους (πραγματοποιήθηκε από το Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών). Τελικό στόχο αποτελεί η εύρεση αναστολέων με βελτιωμένη δραστηριότητα, ικανών να παρεμποδίζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του πρωτεϊνικού συμπλόκου c-Myc/Max μέσω πρόσδεσης στο c-Myc μονομερές. Η εύρεση νέων αναστολέων του παράγοντα c-Myc είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσα για τη χρήση τους ως chemical probes και στη συνέχεια για την ανάπτυξή τους ως πιθανά θεραπευτικά.

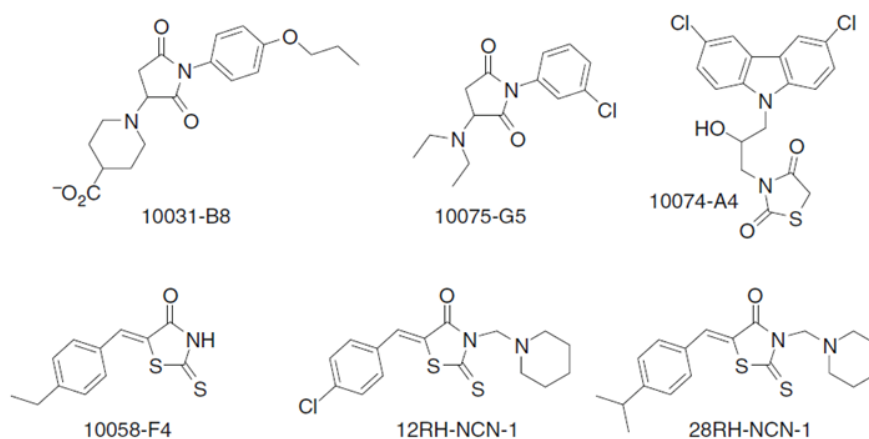
ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η ένωση οδηγός NSC-645852, 5-[(1*H*-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]-2-θειοξοπυριμιδινο-4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-διόνη (**1**), προέκυψε από μελέτες ομοιότητας με το γνωστό αναστολέα 10058-F4 στα πλαίσια προηγούμενης έρευνας του εργαστηρίου για την εύρεση προσδεμάτων του παράγοντα c-Myc.⁵⁴



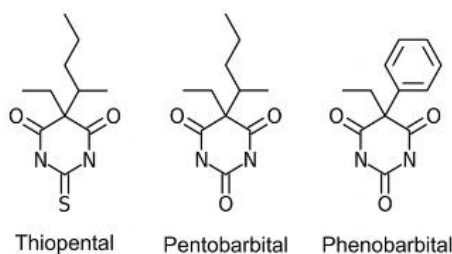
Εικόνα 25. Χημική δομή της ένωσης οδηγού NSC-645852 (**1**).

Ο γνωστός αναστολέας 10058-F4, τα δημοσιευμένα δραστικά ανάλογά του (βλ. **Εικόνα 26**), καθώς και η ένωση οδηγός, η οποία αποτελεί θειοβαρβιτουρικό παράγωγο, περιλαμβάνουν στις δομές τους είτε μια ιμιδική είτε μια θειοϊμιδική ομάδα. Επομένως, η παρουσία των ομάδων αυτών θεωρήθηκε σημαντική για την εμφάνιση δράσης και βασισμένοι στη δομή της ένωσης οδηγού αποφασίστηκε η σύνθεση μορίων με κεντρικό σκελετό το δακτύλιο του βαρβιτουρικού οξέος, του θειοβαρβιτουρικού οξέος ή της ουρακίλης. Η σύνθεση των παραγώγων ουρακίλης πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της απουσίας του τρίτου καρβονυλίου, διατηρώντας παράλληλα την ιμιδική ομάδα που περιέχεται στον αναστολέα 10058-F4.



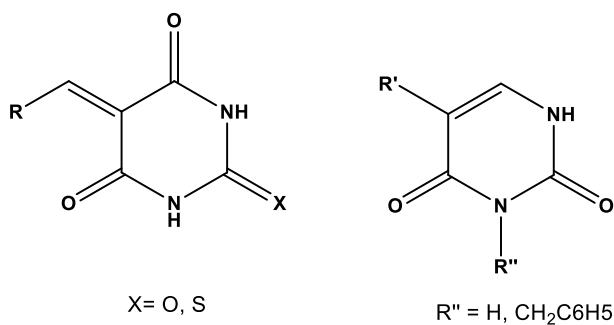
Εικόνα 26. Γνωστοί αναστολείς του διμερισμού c-Myc/Max που περιλαμβάνουν ομάδες ιμιδικού τύπου.

Οι επιλεγμένοι δακτύλιοι αποτελούν γνωστές φαρμακοφόρες δομές. Στην **Εικόνα 27** παρουσιάζονται γνωστά (θειο)βαρβιτουρικά παράγωγα με αγχολυτική, αναισθητική, υπνωτική και αντιεπιληπτική δράση.



Εικόνα 27. Φαρμακευτικές ενώσεις παράγωγα του βαρβιτουρικού και του θειοβαρβιτουρικού οξέος με υπνωτική/αναισθητική δράση.

Οι επιπλέον τροποποιήσεις ως προς την ένωση οδηγό πραγματοποιήθηκαν στον υποκαταστάτη της θέσης 5 των δακτυλίου. Παρακάτω παρουσιάζονται οι γενικές δομές των παραγώγων τα οποία συντέθηκαν στην παρούσα εργασία:



Θειο/-βαρβιτουρικά παράγωγα

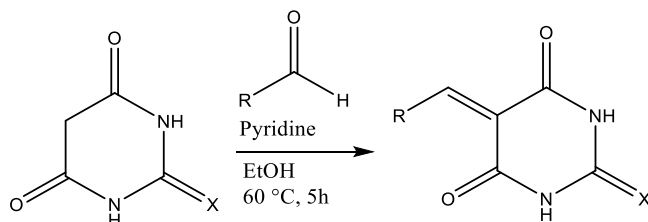
Καθώς οι μέχρι σήμερα γνωστοί αναστολείς του c-Myc περιλαμβάνουν εκτεταμένα αρωματικά συστήματα, για την υποκατάσταση στην 5-θέση του θειο/-βαρβιτουρικού δακτυλίου επιλέχθηκαν αρωματικές αλδεΐδες.

Πίνακας 1. Οι αρωματικές αλδεΐδες που χρησιμοποιήθηκαν για την υποκατάσταση του θειο/-βαρβιτουρικού δακτυλίου.

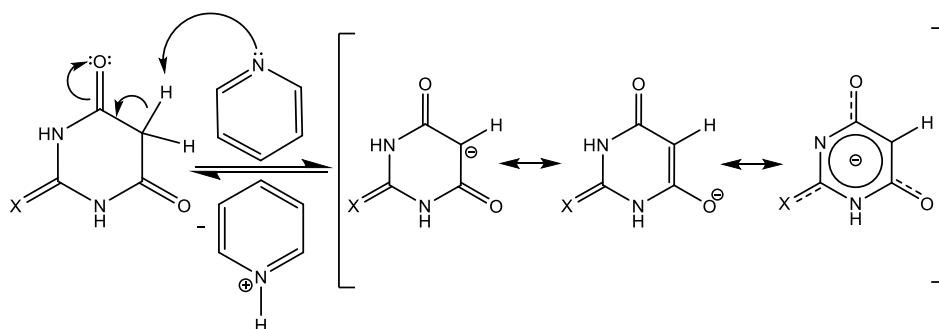
Οι αλδεΐδες που χρησιμοποιήθηκαν περιέχουν δακτυλίους διαφορετικού μεγέθους και λιποφιλότητας, καθώς επίσης περιλαμβάνουν χαρακτηριστικές ομάδες ικανές να αναπτύξουν δεσμούς υδρογόνου, είτε ως δότες είτε ως δέκτες πρωτονίων, σε διαφορετικές θέσεις του κεντρικού δακτυλίου. Στις επιλεγμένες αλδεΐδες συμπεριλήφθηκαν γνωστές φαρμακοφόρες δομές, όπως ο πυρρολικός και ο ινδολικός δακτύλιος.

Η συμπύκνωση μεταξύ της αλδεΐδας και του θειο/-βαρβιτουρικού οξέος δοκιμάστηκε μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων:

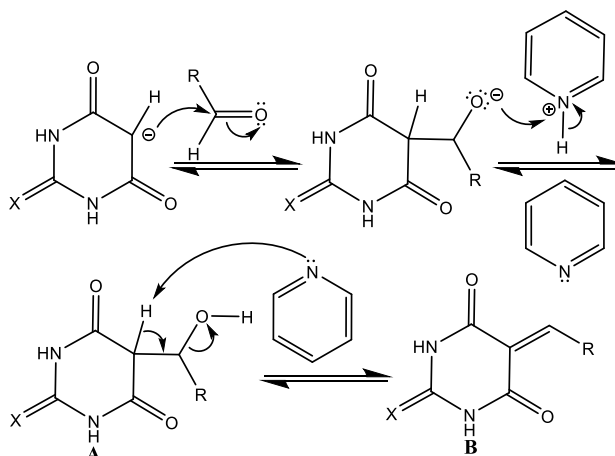
A) Μέσω της αντίδρασης *Knoevenagel* παρουσία καταλυτικής ποσότητας πυριδίνης ως βάση⁵⁵:



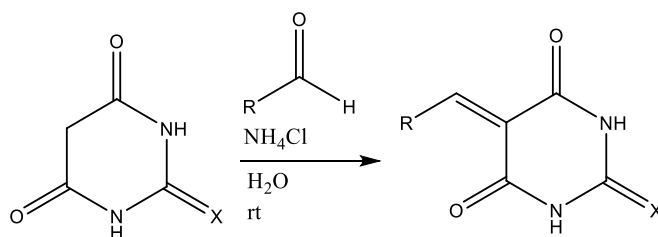
Η έναρξη της αντίδρασης λαμβάνει χώρα σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό:



Στη συνέχεια, το ενολικό ανιόν του θειο/-βαρβιτουρικού οξέος προσβάλλει το καρβονύλιο της αλδεΐδας. Ακολούθως το αλδολικό ανιόν αποσπά το πρωτόνιο που είχε λάβει προηγουμένως η πυριδίνη και τέλος, η ενδιάμεση αλκοόλη **A** αφυδατώνεται προς το αλκενυλο-παράγωγο **B**.



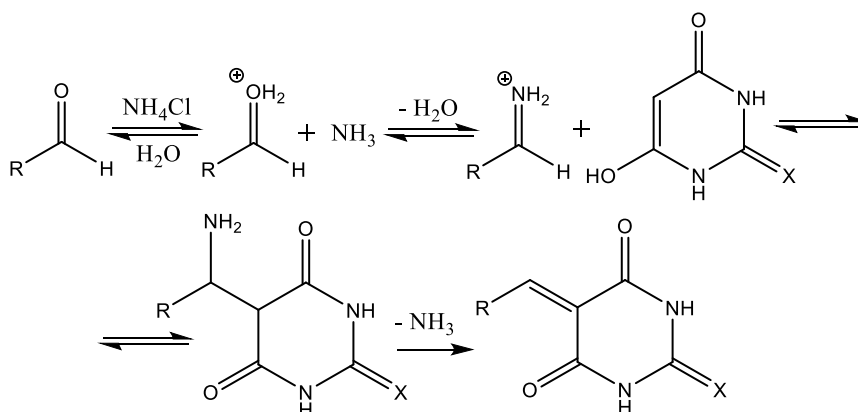
B) Παρουσία ισομοριακής ποσότητας χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl)⁵⁶:



Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης ποικίλλει ανάλογα με τη φύση της αλδεΐδης.

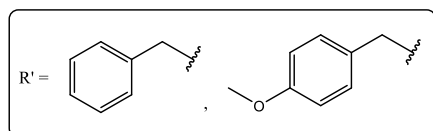
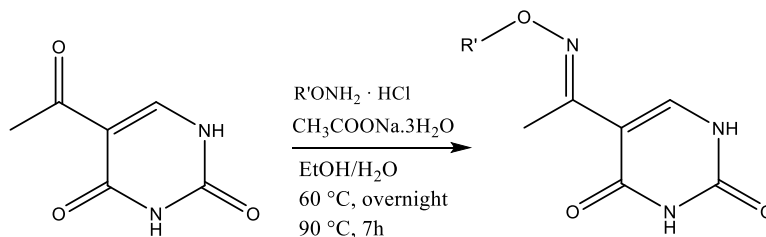
Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό:

Αρχικά, η αλδεΐδη πρωτονιώνεται στο όξινο περιβάλλον και με την επίδραση της αμμωνίας σχηματίζεται το ιμινικό κατιόν. Στη συνέχεια, το ιμινικό ιόν προσβάλλεται από την ενολική μορφή του θειο/-βαρβιτουρικού οξέος για να σχηματίσει ένα αμινικό ενδιάμεσο από το οποίο προκύπτει το αντίστοιχο αλκυλένο-παράγωγο με την αποβολή ενός μορίου αμμωνίας.

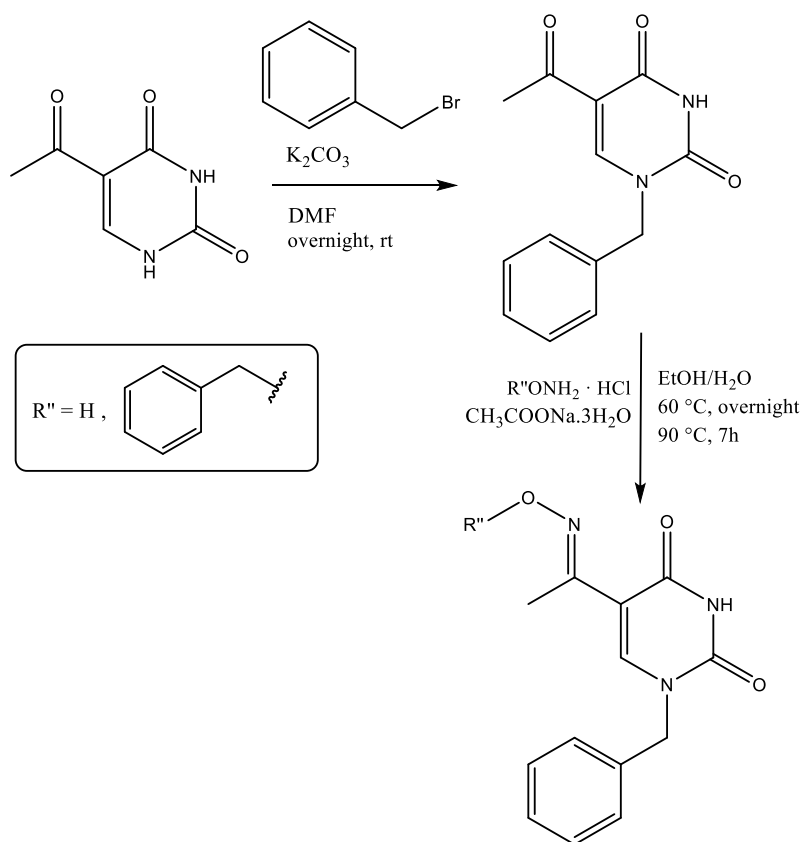


Παράγωγα ουρακίλης

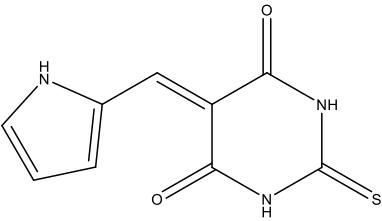
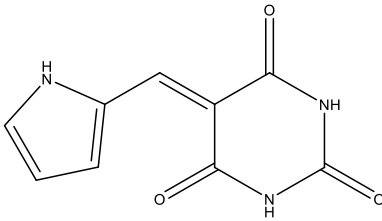
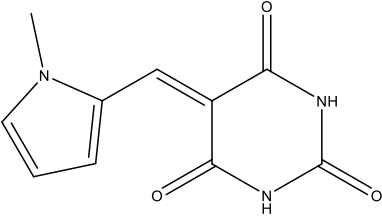
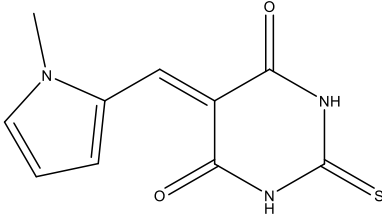
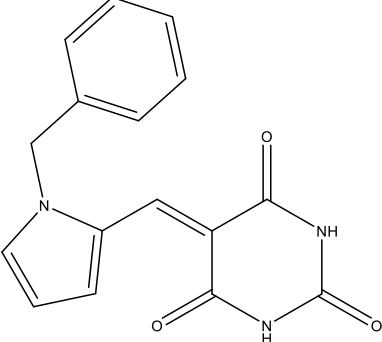
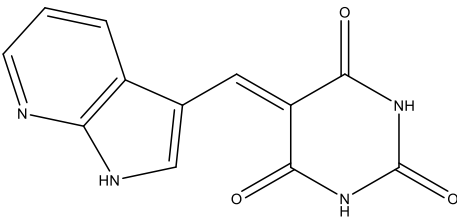
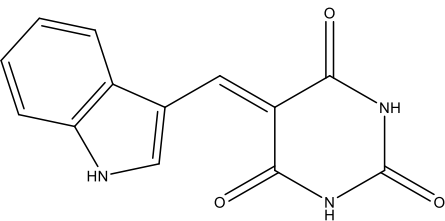
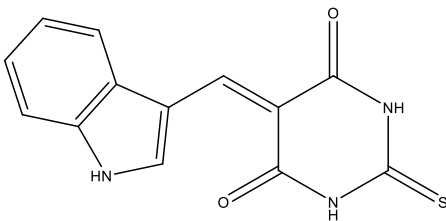
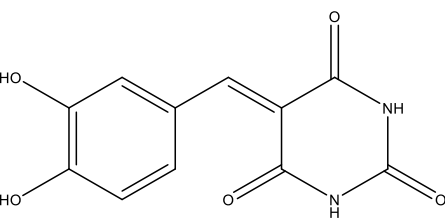
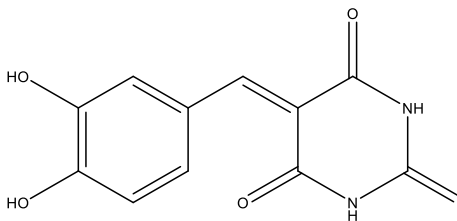
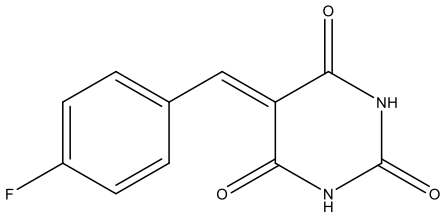
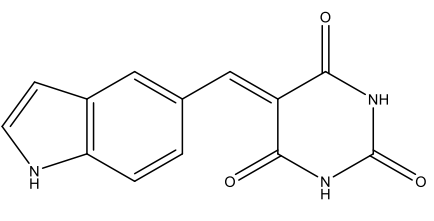
Χρησιμοποιώντας την 5-ακέτυλοουρακίλη ως πρώτη ύλη, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση μεταξύ του καρβονυλίου της ακετυλοομάδας της 5-ακέτυλοουρακίλης και των υδροξυλαμινών: *O*-βενζυλοϋδροξυλαμίνη και *O*-(4-μεθοξυβενζυλο)υδροξυλαμίνη.

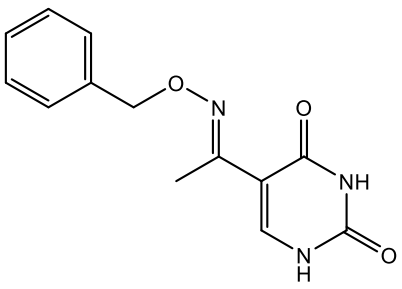
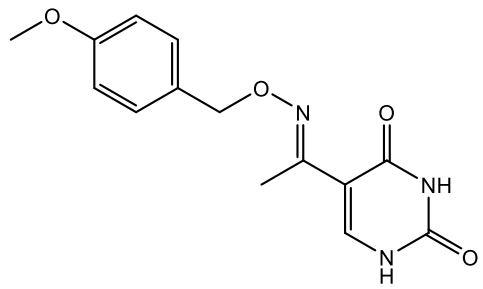
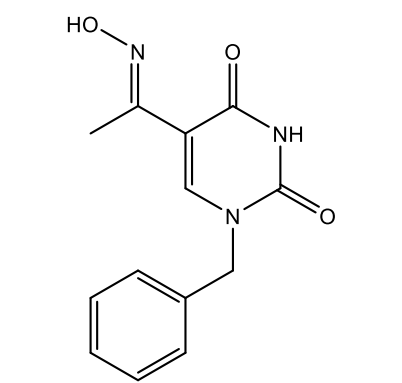
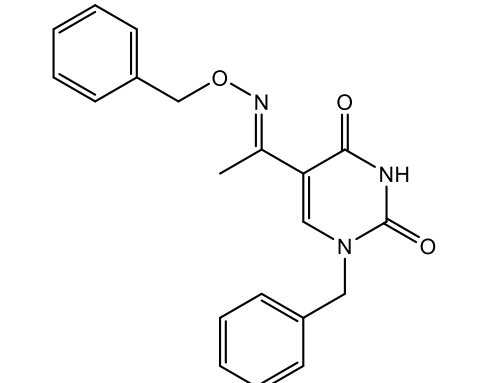


Επιπροσθέτως, θέλοντας να διερευνήσουμε αν η παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου σε μια διαφορετική θέση του δακτυλίου της ουρακίλης θα προσδώσει στο μόριο την ικανότητα ανάπτυξης περισσότερων υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ή/και αλληλεπιδράσεων π-π με λιπόφιλα και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα, το N-3 της 5-ακέτυλοουρακίλης υποκαταστάθηκε με μια βενζυλική ομάδα. Στη συνέχεια, ακολούθησε συμύκνωση του ακετυλικού καρβονυλίου με την υδροξυλαμίνη και την O-βενζυλοϋδροξυλαμίνη. Με τον τρόπο αυτό, θέλαμε να διαπιστωθεί αν είναι ευνοϊκή η παρουσία μιας πολικής (υδροξυλαμίνη) ή μιας περισσότερο υδρόφοβης αρωματικής ομάδας στην 5-θέση του δακτυλίου.



Τα παράγωγα που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

1.		2.	
3.		4.	
5.		6.	
7.		8.	
9.		10.	
11.		12.	

13.		14.	
15.		16.	

In vitro αξιολόγηση των ενώσεων 1-16

Η *in vitro* αξιολόγηση των ενώσεων **1-16** με στόχο την εύρεση νέων αναστολέων της ογκογενετικής πρωτεΐνης Myc, πραγματοποιήθηκε από τα μέλη του εργαστηρίου του Δρ. Αργύρη Ευστρατιάδη στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

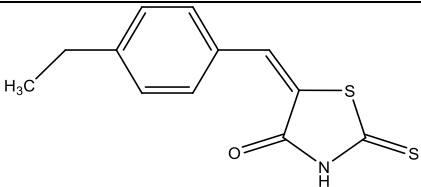
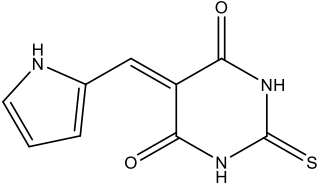
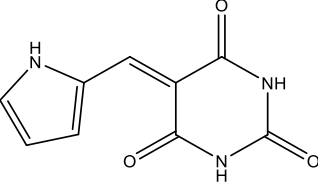
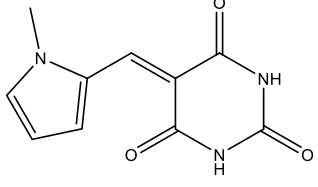
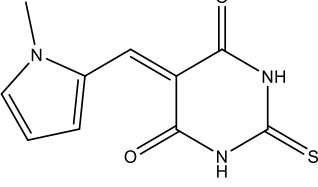
Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τυχόν αναστολής που μπορεί να προκαλούν οι υπό εξέταση ενώσεις έναντι της ογκογενετικής πρωτεΐνης myc, οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές: TGR1 (ινοβλάστες από αρουραίο *Rattus norvegicus*, c-myc +/+) και HO1519 (ινοβλάστες από αρουραίο *Rattus norvegicus*, c-myc -/-). Και οι δύο κυτταρικές σειρές διατηρήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (with Phenol Red), το οποίο περιείχε επιπλέον 10 % εμβρυϊκό όρο μοσχαριού (Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 µg/ml στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα συντηρήθηκαν σε τρυβλία διαμέτρου 60 mm, σε επωαστικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C και σε ατμόσφαιρα 5 % CO₂. Όταν η πυκνότητα ήταν περίπου 80-90%, τα κύτταρα μεταφέρονταν σε νέο τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό μέσο, σε αραιώση 1:10, περίπου κάθε 3 ημέρες.

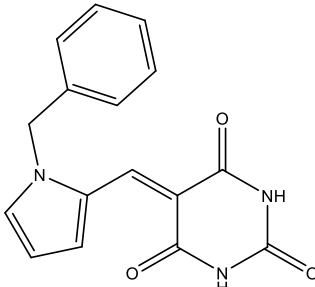
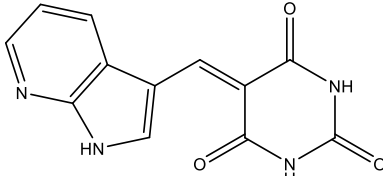
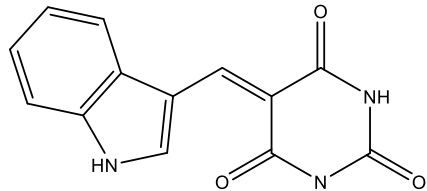
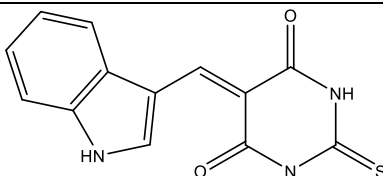
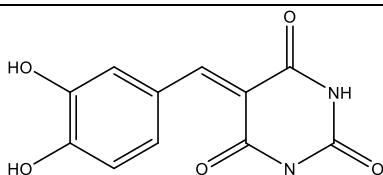
Την Ημέρα 0 έγινε επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων σε ειδικά διάφανα τρυβλία 96 θέσεων. Για την κυτταρική σειρά TGR1 επιστρώθηκαν 1000 κύτταρα σε κάθε θέση, ενώ για τη κυτταρική σειρά HO1519 υπολογίστηκαν 2000 κύτταρα σε κάθε θέση. Την Ημέρα 1 ξεκίνησε η επώαση των δύο ειδών κυττάρων με τις υπό εξέταση ενώσεις. Πιο αναλυτικά, όλες οι ενώσεις διαλύθηκαν σε DMSO και αραιώθηκαν στις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις (σε εύρος 0µM-100µM) σε θρεπτικό μέσο DMEM (χωρίς Phenol Red) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 72 ώρες με τις υπό αξιολόγηση ενώσεις. Την Ημέρα 4 ο έλεγχος της δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας των ζωντανών κυττάρων με τη χρήση του Cell Counting Kit-8 (CK04, Dojindo Laboratories). Η συγκεκριμένη δοκιμασία βασίζεται στην μεταβολισμό του άλατος τετραζολίου WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt], σε φορμαζάνη (formazan) χρώματος πορτοκαλί από τα ζωντανά κύτταρα. Αρχικά, γίνεται προσθήκη 10 µl του διαλύματος CCK-8 σε κάθε θέση, ακολουθεί επώαση των κυττάρων για 1 ώρα στον επωαστικό κλίβανο και μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 450 nm σε ειδική συσκευή (φωτόμετρο).

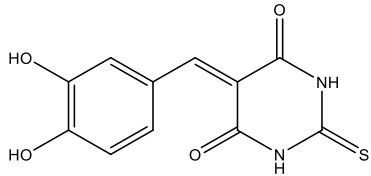
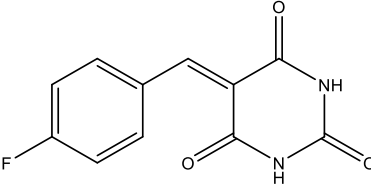
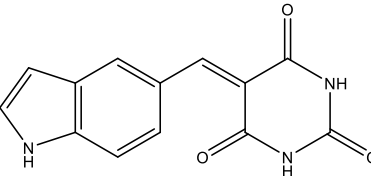
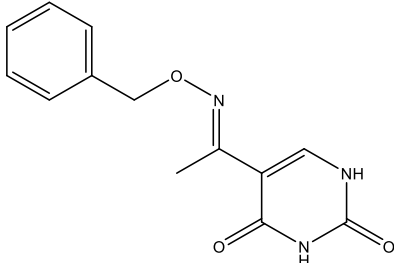
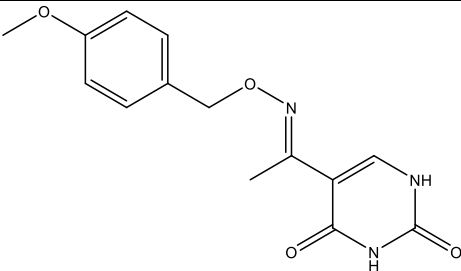
Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η % επιβίωση των κυττάρων για κάθε συγκέντρωση και προσδιορίστηκαν οι ενδεικτικές τιμές IC₅₀ (συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την αναστολή της ανάπτυξης του 50% των κυττάρων) για τις ενώσεις οι οποίες παρουσίασαν ανασταλτική δράση. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα.

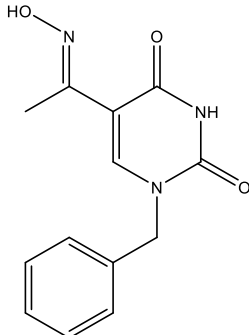
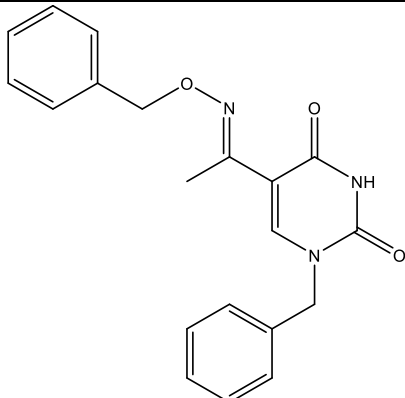
Πίνακας 2. *In vitro* αποτελέσματα για τις ενώσεις 1-16. Οι τιμές έχουν επισημανθεί για τις δύο κυτταρικές σειρές ως εξής: **TGR1** και **HO1519**.

(α. Οι ενδεικτικές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για την πρόκληση του θανάτου του 50% των κυττάρων. Τα δεδομένα IC50 προέκυψαν από το μέσο όρο δύο πειραμάτων).

	ΔΟΜΗ	C (μM)													Apparent IC50 ^a (μM)
		0,1	1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25	50	75	100	
Control		-	-	-	-	-	-	<u>94,11</u>	-	-	<u>92,59</u>	<u>72,25</u>	<u>70,53</u>	<u>48,99</u>	<u>75</u>
		-	-	-	-	-	-	92,02	-	-	97,81	103,28	90,04	83,68	>120
1.		-	<u>84,76</u>	-	<u>30,47</u>	-	<u>26,69</u>	-	-	-	<u>11,46</u>	<u>14,82</u>	-	-	<u>3</u>
		-	94,02	-	98,87	-	31,36	-	-	-	19,46	19,43	-	-	9
2.		-	<u>122,60</u>	-	<u>91,60</u>	-	<u>55,37</u>	-	-	-	<u>17,29</u>	<u>13,37</u>	-	-	<u>12</u>
		-	99,19	-	105,53	-	79,67	-	-	-	69,00	29,26	-	-	33
3.		-	-	-	<u>144,48</u>	-	<u>119,39</u>	-	<u>109,08</u>	<u>87,65</u>	<u>125,26</u>	-	-	-	-
		-	-	-	96,42	-	61,73	-	103,95	66,30	124,69	-	-	-	-
4.		-	<u>79,89</u>	<u>54,30</u>	<u>38,60</u>	<u>28,73</u>	<u>19,36</u>	-	-	-	-	-	-	-	<u>3</u>
		-	123,86	106,25	76,74	73,81	32,53	-	-	-	-	-	-	-	9

	Δ OMH	C (μ M)													Apparent IC ₅₀ ^a (μ M)
		0,1	1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25	50	75	100	
5.		<u>110,97</u>	<u>113,83</u>	-	-	-	<u>108,77</u>	-	-	-	<u>73,70</u>	<u>65,45</u>	-	-	-
		125,34	119,49	-	-	-	105,87	-	-	-	99,09	81,62	-	-	-
6.		<u>113,99</u>	<u>96,46</u>	-	-	-	<u>101,50</u>	-	-	-	<u>95,99</u>	<u>110,29</u>	-	-	-
		127,96	115,17	-	-	-	136,57	-	-	-	99,00	104,00	-	-	-
7.		<u>107,64</u>	<u>97,56</u>	-	-	-	<u>90,42</u>	-	-	-	<u>77,13</u>	<u>114,26</u>	-	-	-
		129,23	104,98	-	-	-	136,38	-	-	-	126,04	116,87	-	-	-
8.		<u>92,28</u>	<u>85,50</u>	-	-	-	<u>10,29</u>	-	-	-	<u>12,06</u>	<u>11,95</u>	-	-	<u>3</u>
		91,78	106,17	-	-	-	30,49	-	-	-	19,06	27,61	-	-	7
9.		<u>130,62</u>	<u>96,32</u>	-	-	-	<u>101,75</u>	-	-	-	<u>80,52</u>	<u>52,96</u>	-	-	-
		117,31	120,01	-	-	-	87,22	-	-	-	104,34	54,67	-	-	-

	Δ OMH	C (μ M)													Apparent IC ₅₀ ^a (μ M)
		0,1	1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25	50	75	100	
10.		<u>94,31</u>	<u>88,97</u>	-	-	-	<u>92,67</u>	-	-	-	<u>69,65</u>	<u>72,84</u>	-	-	-
		115,09	113,20	-	-	-	96,00	-	-	-	69,13	85,67	-	-	-
11.		<u>97,85</u>	<u>98,87</u>	-	-	-	<u>108,22</u>	-	-	-	<u>100,89</u>	<u>103,84</u>	-	-	-
		96,92	97,15	-	-	-	100,58	-	-	-	100,03	99,54	-	-	-
12.		<u>102,59</u>	<u>107,92</u>	-	-	-	<u>102,39</u>	-	-	-	<u>100,80</u>	<u>102,95</u>	-	-	-
		111,12	86,96	-	-	-	107,98	-	-	-	97,60	87,83	-	-	-
13.		-	<u>107,96</u>	-	-	-	<u>91,02</u>	-	-	-	-	<u>73,44</u>	-	-	-
		-	90,85	-	-	-	124,31	-	-	-	-	134,90	-	-	-
14.		-	<u>141,16</u>	-	-	-	<u>139,79</u>	-	-	-	-	<u>108,66</u>	-	-	-
		-	115,86	-	-	-	132,59	-	-	-	-	81,999	-	-	-

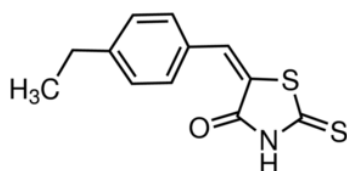
	Δ OMH	C (μ M)													Apparent IC50 ^a (μ M)
		0,1	1	2,5	5	7,5	10	12,5	15	20	25	50	75	100	
15.		<u>98,45</u>	<u>93,39</u>	-	-	-	<u>94,44</u>	-	-	-	<u>90,09</u>	<u>99,61</u>	-	-	-
		112,16	93,06	-	-	-	96,50	-	-	-	106,65	81,77	-	-	-
16.		-	<u>136,05</u>	-	<u>115,54</u>	-	<u>108,98</u>	-	-	-	-	<u>93,81</u>		<u>97,83</u>	-
		-	127,92	-	126,00	-	130,69	-	-	-	-	131,85		143,77	-

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση **16** ενώσεων, με σκοπό την εύρεση βελτιωμένων αναστολέων της μεταγραφικής δραστηριότητας του ετεροδιμερούς c-Myc/Max, μέσω πρόσδεσης στο c-Myc μονομερές. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν θειοβαρβιτουρικά, βαρβιτουρικά ή ουρακλικά παράγωγα. Η επιλογή των δακτυλίων αυτών βασίστηκε στη δομή της ένωσης οδηγού, η οποία αποτελεί παράγωγο θειοβαρβιτουρικού οξέος. Επιπλέον, μεγάλος αριθμός ήδη γνωστών αναστολέων του διμερισμού c-Myc/Max περιλαμβάνουν ιμιδικές και θειοϊμιδικές ομάδες αποδεικνύοντας τη σημασία της παρουσίας τους για την εμφάνιση δράσης. Τέλος, οι δακτύλιοι αυτοί αποτελούν γνωστές φαρμακοφόρες δομές με ευρεία χρήση στη φαρμακευτική χημεία.

Με βάση τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των ενώσεων **1-16** εξάγονται ορισμένα συμπεράσματα αναφορικά με τις σχέσεις δομής-δράσης:

Τέσσερα από τα θειο-/βαρβιτουρικά παράγωγα (τρία θειοβαρβιτουρικά: **1**, **4**, **8** και ένα βαρβιτουρικό: **2**) εμφάνισαν δραστικότητα σε low μM επίπεδα. Η διεύρυνση του πενταμελούς δακτυλίου του αναλόγου **10058-F4** σε εξαμελή με την προσθήκη ενός επιπλέον καρβονυλίου φαίνεται πως επηρεάζει θετικά τη δραστικότητα, πιθανώς μέσω του σχηματισμού επιπλέον δεσμών υδρογόνου. Μάλιστα, τα παράγωγα **1**, **2**, **4** και **8** (apparent $\text{IC}_{50} = 3-12 \mu\text{M}$) παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με το **10058-F4** ($\text{IC}_{50} = 75 \mu\text{M}$).

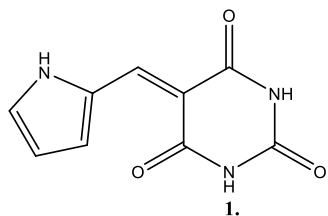


10058-F4

Εφόσον κανένα από τα παράγωγα ουρακίλης δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η παρουσία του τρίτου καρβονυλίου και όχι μόνο η διεύρυνση του δακτυλίου με την εισαγωγή ενός επιπλέον ατόμου άνθρακα ευνοεί τη δραστικότητα.

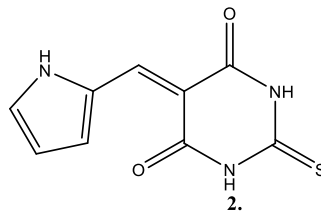
Παρότι τα περισσότερα ανάλογα που εμφάνισαν δραστικότητα ανήκουν στα θειοβαρβιτουρικά παράγωγα, φαίνεται ότι η ύπαρξη θειοκαρβονυλίου έναντι καρβονυλίου δεν είναι απαραίτητη, καθώς το ανάλογο **2** που έδειξε επίσης δραστικότητα είναι βαρβιτουρικό παράγωγο. Ωστόσο, η δράση φαίνεται να ενισχύεται με την ύπαρξη θειοκαρβονυλίου έναντι του καρβονυλίου.

Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τα βιολογικά αποτελέσματα των αναλόγων **1** και **2**, τα οποία διαφέρουν μόνο ως προς την παρουσία καρβονυλίου ή θειοκαρβονυλίου, παρατηρείται ότι η δραστηριότητα είναι αυξημένη για το θειοβαρβιτουρικό παράγωγο αλλά η εκλεκτικότητα ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές είναι παρόμοια για τις δύο ενώσεις.



Apparent IC₅₀ TGR1 (c-myc +/+): 12 μM

Apparent IC₅₀ HO1519 (c-myc -/-): 33 μM



Apparent IC₅₀ TGR1: 3 μM

Apparent IC₅₀ HO1519: 9 μM

Όσον αφορά την 5-υποκατάσταση του θειο/-βαρβιτουρικού οξέος, ως υποκαταστάτες επιλέχθηκαν αρωματικές ομάδες, καθώς οι ήδη υπάρχοντες αναστολείς, όπως έχει ήδη συζητηθεί, περιλαμβάνουν εκτεταμένα αρωματικά συστήματα. Ωστόσο, τα παράγωγα **9**, **10** και **11** που φέρουν στυρένιο στην 5-θέση δεν εμφανίζουν δράση, συνεπώς η ύπαρξη ετεροατόμου στον υποκαταστάτη κρίνεται απαραίτητη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

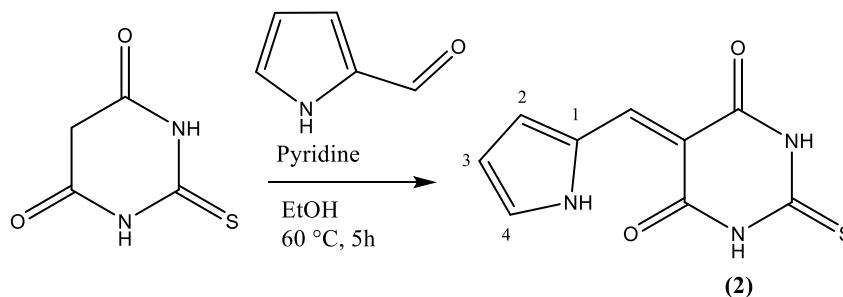
Τα σημεία τήξεως των ενώσεων που παρασκευάστηκαν, μετρήθηκαν σε τριχοειδείς σωληνίσκους σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα.

Ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR η ερμηνεία των οποίων έγινε με τη χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δύο διαστάσεων (2D NMR): COSY (Correlation spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) και HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Τα φάσματα ^1H NMR και 2D NMR, καταγράφηκαν σε φασματογράφους πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού AVANCE III 600 MHz. Τα πειράματα ^{13}C NMR, πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker Ultrashield™ Plus 600 στα 150 MHz. Οι σταθερές σύζευξης (J) εκφράζονται σε μονάδες Hertz (Hz). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Η πολλαπλότητα των κορυφών ορίζεται ως s=απλή, d=διπλή, t=τριπλή, q=τετραπλή, brs=ευρεία απλή, dd=διπλή διπλών, m=πολλαπλή.

Για τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 F₂₅₄ (Merck), με πάχος στιβάδας 0.2 mm.

Για τις χρωματογραφίες στήλης χρησιμοποιήθηκε silica (SiO_2) silice 60 AC.C 70-200 μm CHROMAGEL (SdS).

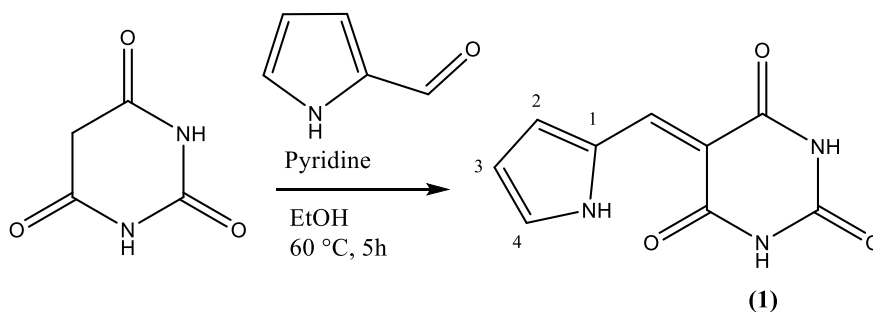
Σύνθεση της 5-[(1*H*-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]-2-θειοξοπυριμιδινο-4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-διόνης (1)



Σε εναιώρημα της 2-θειοξοπυριμιδινο-4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-διόνης (θειοβαρβιτουρικό οξύ) (1.895 g, 13.15 mmol) σε 53 mL αιθανόλης προστίθεται η ποσότητα της 1*H*-πυρρολο-2-καρβαλδεΐδης (1.000 g, 10.52 mmol) και καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Το σύστημα φέρεται σε θερμοκρασία 60 °C με κάθετο ψυκτήρα και αναδεύεται για 5 ώρες. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Στο ακατέργαστο υπόλειμμα προστίθενται 10 mL ύδατος και διηθείται υπό κενό. Το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Λαμβάνονται 2.950 g πορτοκαλί στερεού, το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: Σχεδόν ποσοτική. Mp: 258-260 °C (dec).

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 13.07 (s, 1H, NH-pyr), 12.32 (s, 1H, NH), 12.26 (s, 1H, NH), 8.14 (s, 1H, $\text{HC}=\text{C}$), 7.74 – 7.72 (m, 1H, $\text{H}_4\text{-pyr}$), 7.50 (brs, 1H, $\text{H}_2\text{-pyr}$), 6.58 (dt, J = 4.1, 2.1 Hz, 1H, $\text{H}_3\text{-pyr}$).

Σύνθεση της 5-((1*H*-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο)πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-τριόνης (2)



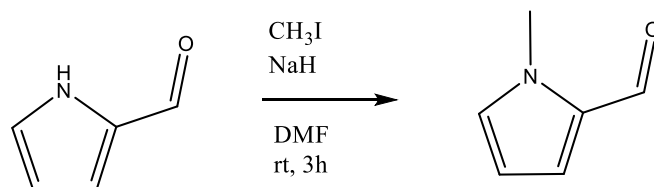
Σε εναιώρημα της πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-τριόνης (βαρβιτουρικό οξύ) (500mg, 3.90 mmol) σε 16 mL αιθανόλης προστίθεται η ποσότητα της 1*H*-πυρρολο-2-καρβαλδεΐδης (297mg, 3.12 mmol) και καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Το σύστημα φέρεται σε θερμοκρασία 60 °C με κάθετο ψυκτήρα και αναδεύεται για 5 ώρες. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Στο ακατέργαστο υπόλειμμα προστίθενται 10 mL ύδατος και διηθείται υπό κενό. Το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Λαμβάνονται 555 mg κίτρινου στερεού το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 86.7%. Mp: 282-284 °C.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 13.01 (s, 1H, NH-pyr), 11.21 (s, 1H, NH), 11.13 (s, 1H, NH), 8.13 (s, 1H, $\text{HC}=\text{C}$), 7.66 – 7.63 (m, 1H, $\text{H}_4\text{-pyr}$), 7.38 (brs, 1H, $\text{H}_2\text{-pyr}$), 6.53 (dt, J = 4.1, 2.2 Hz, 1H, $\text{H}_3\text{-pyr}$).

^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 164.72 (C=O), 164.16 (C=O), 150.21 (NHCONH), 140.43 ($\text{HC}=\text{C}$), 132.46 ($\text{C}_4\text{-pyr}$), 129.45 ($\text{C}_2\text{-pyr}$), 128.57 ($\text{C}_1\text{-pyr}$), 113.93 ($\text{C}_3\text{-pyr}$), 105.99 ($\text{HC}=\text{C}$).

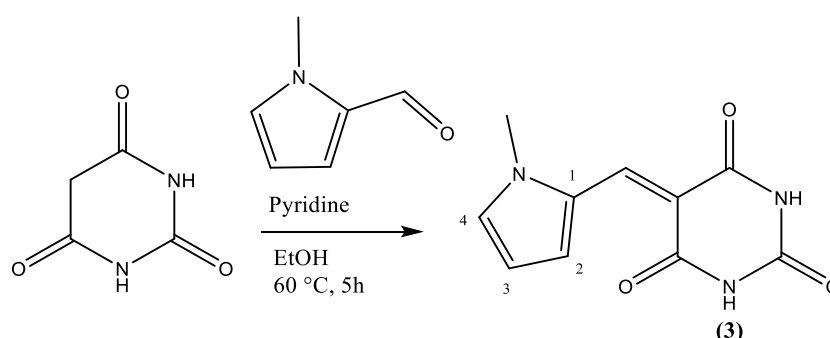
Σύνθεση της 5-[(1-μεθυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-τριόνης (3)

Σύνθεση της 1-μεθυλο-πυρρολο-2-καρβαλδεΐδης



Σε διάλυμα της 1*H*-πυρρολο-2-καρβαλδεΐδης (300 mg, 3.15 mmol) σε 10 mL *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου προστίθεται υπό ψύξη η ποσότητα του υδριδίου του νατρίου (NaH) (126 mg, 3.15 mmol). Το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολούθως, προστίθεται στάγδην ο όγκος του μεθυλοϊωδιδίου (896 mg, 6.31 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ατμόσφαιρα αργού overnight. Μετά το πέρας της αντίδρασης, στο μείγμα προστίθονται 90 mL ύδατος και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (AcOEt) (3x80 mL). Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις εκπλένονται με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (4x100 mL). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ξήρανση της οργανικής φάσης με άνδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και εξάτμιση αυτής υπό κενό μέχρι ξηρού.⁵⁷ Το ακατέργαστο ελαιώδες υπόλειμμα χρωματογραφείται σε στήλη οξειδίου του πυριτίου (gravity) με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο/οξικό αιθυλεστέρα ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 3:1). Λαμβάνονται 200 mg λεπτόρρευστου ελαιώδους υγρού μπορντό χρώματος. Απόδοση: 51.5%

Σύνθεση της 5-[(1-μεθυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-τριόνης (3)



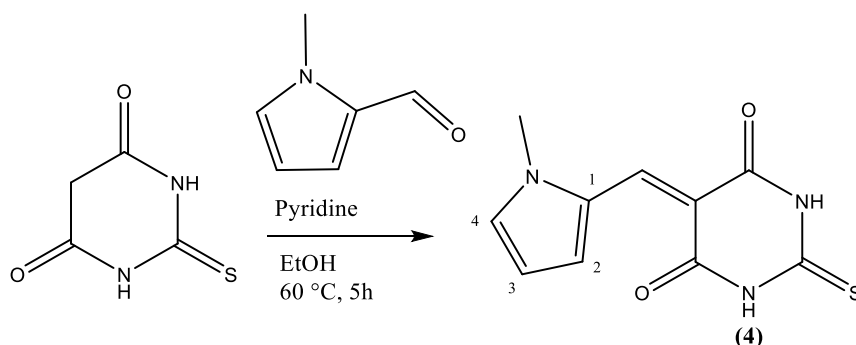
Σε εναιώρημα του βαρβιτουρικό οξέος (125mg, 0.97 mmol) σε 6 mL αιθανόλης προστίθεται η ποσότητα της 1-μεθυλοπυρρολο-2-καρβαλδεΐδης (85mg, 0.78 mmol) και καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Το σύστημα φέρεται σε θερμοκρασία 60°C με κάθετο ψυκτήρα και αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ώρες. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Στο ακατέργαστο υπόλειμμα προστίθονται 10 mL ύδατος και διηθείται υπό κενό. Το

στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Λαμβάνονται 127 mg κίτρινου στερεού το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 74.3%. Mp: 283-285 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 11.06 (s, 1H, NH), 10.91 (s, 1H, NH), 8.42 (d, J = 3.3 Hz, 1H, H_2 -pyr), 8.21 (s, 1H, HC=C), 7.61 (s, 1H, H_4 -pyr), 6.41 (dd, J = 4.0, 2.1 Hz, 1H, H_3 -pyr), 3.87 (s, 4H, CH_3).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 164.52 (C=O), 162.34 (C=O), 150.26 (NHCONH), 137.64 (HC=C), 136.45 (C_4 -pyr), 128.91 (C_1 -pyr), 126.93 (C_3 -pyr), 111.67 (C_2 -pyr), 106.68 (HC=C), 34.28 (CH_3).

Σύνθεση της 5-[(1-μεθυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]-2-θειοξοπυριμιδινο-4,6-(1H,3H, 5H)-διόνης (4)



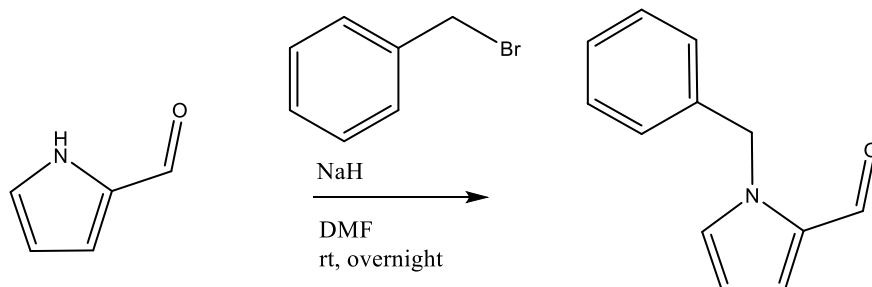
Σε εναιώρημα του θειοβαρβιτουρικό οξέος (248 mg, 1.72 mmol) σε 7 mL αιθανόλης προστίθεται η ποσότητα της 1-μεθυλοπυρρολο-2-καρβαλδεΐδης (150 mg, 1.37 mmol) και καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Το σύστημα φέρεται σε θερμοκρασία 60 °C με κάθετο ψυκτήρα και αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ώρες. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Στο ακατέργαστο υπόλειμμα προστίθενται 10 mL ύδατος και διηθείται υπό κενό. Το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Λαμβάνονται 206 mg πορτοκαλί στερεού το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 63.8%. Mp: 289-291 °C (dec).

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 12.17 (s, 1H, NH), 12.05 (s, 1H, NH), 8.50 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H_2 -pyr), 8.21 (s, 1H, HC=C), 7.72 (s, 1H, H_4 -pyr), 6.47 (s, 1H, H_3 -pyr), 3.89 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 177.59 (C=S), 162.78 (C=O), 160.11 (C=O), 138.20 (HC=C), 138.13 (C_4 -pyr), 129.67 (C_1 -pyr), 128.13 (C_3 -pyr), 112.48 (C_2 -pyr), 106.69 (HC=C), 34.35 (CH_3).

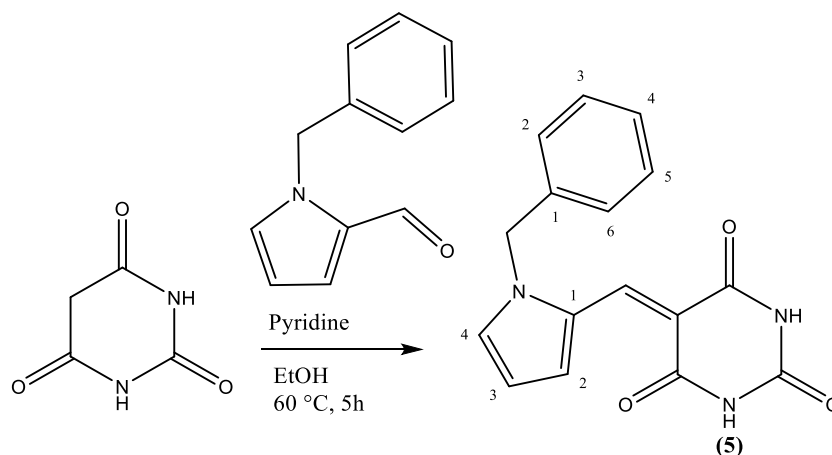
Σύνθεση της 5-[(1-βενζυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-τριώνης (5)

Σύνθεση της 1-βενζυλο-πυρρο-2-καρβαλδεΐδης



Σε διάλυμα της 1*H*-πυρρο-2-καρβαλδεΐδης (500 mg, 5.26 mmol) σε 10 mL DMF προστίθεται υπο ψύξη η ποσότητα του υδριδίου του νατρίου (420 mg, 10.52 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια, προστίθεται η ποσότητα του βενζυλοβρωμιδίου (1.798 g, 10.52 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αργού σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ακολούθως, στο μείγμα προστίθενται 90 mL ύδατος και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ (3x70 mL). Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις εκπλένονται διαδοχικά με νερό (2x120 mL) και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (2x120 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται άνυδρο θεικό νάτριο (Na₂SO₄) και εξατμίζεται υπό κενό μέχρι ξηρού.⁵⁷ Το ελαιώδες υπόλειμμα που παραλαμβάνεται χρωματογραφείται σε στήλη οξειδίου του πυριτίου (gravity) με διαλύτη έκλουσης μείγμα οξικού αιθυλεστέρα/εξάνιο (AcOEt/Hexane 10%). Λαμβάνονται 940 mg λεπτόρρευστου ελαιώδους υγρού υποκίτρινου χρώματος. Απόδοση: 96.5%

Σύνθεση της 5-[(1-βενζυλο-πυρρο-2-υλ)μεθυλενο]πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-τριώνης (5)



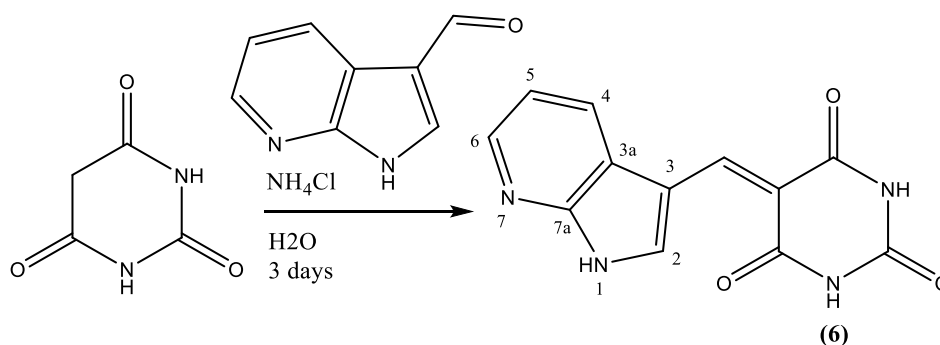
Σε εναιώρημα του βαρβιτουρικό οξέος (260 mg, 2.03 mmol) σε 12 mL αιθανόλης προστίθεται η ποσότητα της 1-βενζυλοπυρρο-2-καρβαλδεΐδης (300 mg, 1.62 mmol) και

καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Το σύστημα φέρεται σε θερμοκρασία 60 °C με κάθετο ψυκτήρα και αναδεύεται για 5 ώρες. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Στο ακατέργαστο υπόλειμμα προστίθενται 10 mL ύδατος και ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Λαμβάνονται 423 mg κίτρινου στερεού το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 88.5%, Mp: 289-291 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 11.00 (s, 1H, NH), 10.90 (s, 1H, NH), 8.46 (dd, J = 4.4, 1.5 Hz, 1H, H_2 -pyr), 8.26 (s, 1H, HC=C), 7.85 – 7.83 (m, 1H, H_4 -pyr), 7.36 – 7.31 (m, 2H, $H_{3,5}$ -benz), 7.29 – 7.25 (m, J = 7.4 Hz, 1H, H_4 -benz), 7.17 (m, 2H, $H_{2,6}$ -benz), 6.51 (dd, J = 4.3, 2.4 Hz, 1H, H_3 -pyr), 5.51 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 164.22 (C=O), 162.23 (C=O), 150.17 (NHCONH), 137.90 (HC=C), 137.50 (C_1 -benz), 135.89 (C_2 -pyr), 128.69 (2C, $\text{C}_{2,6}$ -benz), 127.85 (C_1 -pyr), 127.68 (C_4 -benz), 127.19 (C_4 -pyr), 126.50 (2C, $\text{C}_{3,5}$ -benz), 112.03 (C_3 -pyr), 107.22 (HC=C), 50.33 (CH_2).

Σύνθεση της 5-[(1*H*-7-αζαϊνδο-3-υλ)μεθυλενο]- πυριμιдино-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-τριόνης (6)

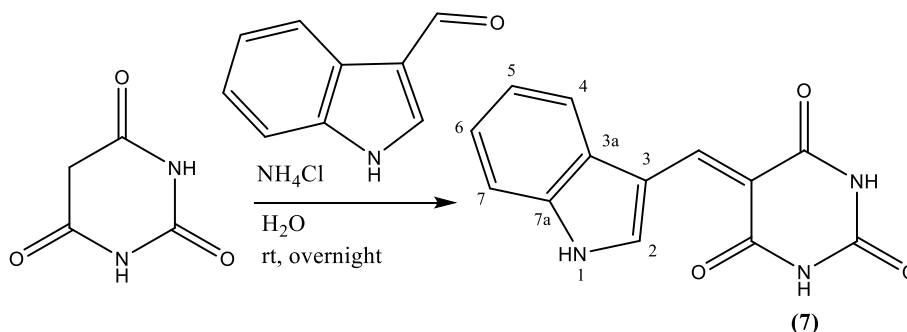


Σε διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) (84 mg, 1.56 mmol) σε 10 mL ύδατος προστίθενται διαδοχικά οι ποσότητες του βαρβιτουρικού οξέος (200 mg, 1.56 mmol) και της 1*H*-7αζαϊνδο-3-καρβοξαλδεϋδης (228 mg, 1.56 mmol). Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ημέρες. Ακολούθως, διηθείται υπό κενό και το στερεό εκπλένεται με AcOEt και διαιθυλαιθέρα. Το στερεό ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού και λαμβάνονται 245 mg κίτρινου στερεού, το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 59.8%. Mp: >325 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 13.17 (s, 1H, NH-ind), 11.16 (s, 1H, NH), 11.09 (s, 1H, NH), 9.55 (s, 1H, H_2 -ind), 8.64 (s, 1H, HC=C), 8.41 (dd, J = 4.7, 1.4 Hz, 1H, H_6 -ind), 8.35 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H_4 -ind), 7.35 (dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H, H_5 -ind).

^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 164.24 (C=O), 163.10 (C=O), 150.26 (NHCONH), 149.29 (C_{7a} -ind), 144.77 (C_6 -ind), 143.22 (HC=C), 139.86 (C_2 -ind), 126.78 (C_4 -ind), 121.47 (C_{3a} -ind), 118.42 (C_5 -ind), 110.14 (C_3 -ind), 109.73 (C=CH).

Σύνθεση της 5-[(1*H*-ινδολο-3-υλ)μεθυλενο]- πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)- τριόνης (7)

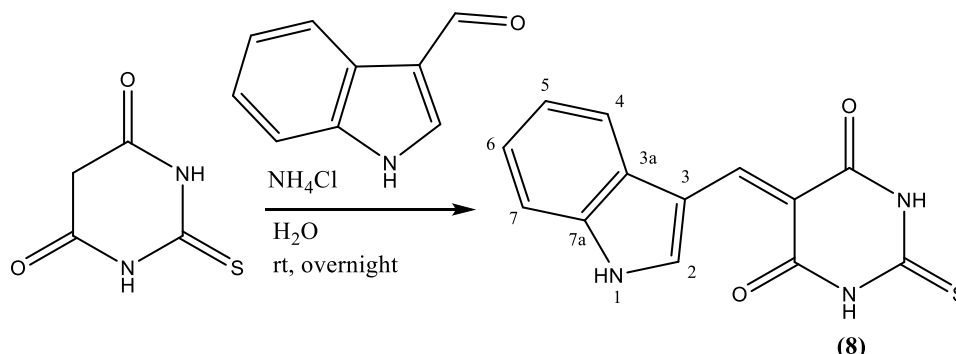


Σε διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) (84 mg, 1.56 mmol) σε 10 mL ύδατος προστίθενται διαδοχικά οι ποσότητες του βαρβιτουρικού οξέος (200 mg, 1.56 mmol) και της 1*H*-ινδολο-3-καρβοξαλδεΐδης (227 mg, 1.56 mmol). Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Ακολούθως, το μείγμα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Το στερεό παραλαμβάνεται από τον ηθμό και κατεργάζεται με AcOEt . Στη συνέχεια, διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με AcOEt και διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Λαμβάνονται 130 mg κίτρινου στερεού, το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 32.6%. Mp: 249-251 °C.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 12.70 (s, 1H, NH-ind), 11.08 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 9.51 (s, 1H, H_2 -ind), 8.72 (s, 1H, HC=C), 7.91 – 7.84 (m, 1H, H_7 -ind), 7.64 – 7.54 (m, 1H, H_4 -ind), 7.36 – 7.28 (m, 2H, $\text{H}_{5,6}$ -ind).

^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 164.49 (C=O), 163.18 (C=O), 150.33 (NHCONH), 143.69 (HC=C), 139.70 (C_2 -ind), 136.39 (C_{7a} -ind), 129.14 (C_{3a} -ind), 123.63 (C_6 -ind), 122.62 (C_5 -ind), 117.62 (C_7 -ind), 113.12 (C_4 -ind), 111.38 (C_3 -ind), 108.62 (HC=C).

Σύνθεση της 5-((1*H*-ινδολο-3-υλ)μεθυλενο)-2-θειοξοπυριμιδινο-4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-διόνης (8)

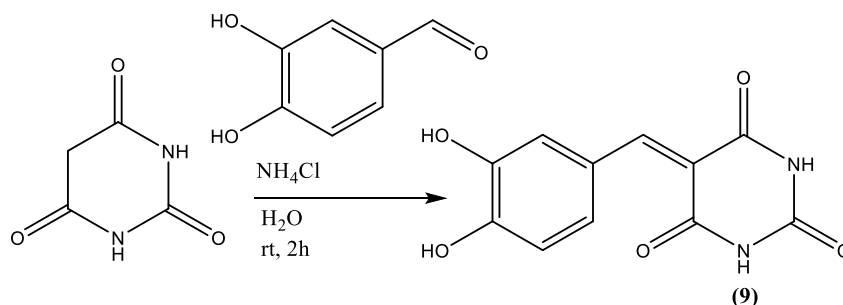


Σε διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) (74 mg, 1.39 mmol) σε 10 mL ύδατος προστίθονται διαδοχικά οι ποσότητες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (200 mg, 1.39 mmol) και της 1*H*-ινδολο-3-καρβοξαλδεϋδης (201 mg, 1.39 mmol). Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Ακολούθως, το μείγμα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Το στερεό παραλαμβάνεται από τον ηθμό και κατεργάζεται με AcOEt . Στη συνέχεια, διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με AcOEt και διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Λαμβάνονται 132 mg πορτοκαλί στερεού, το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 35.1%. Mp: 251-253 °C.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 12.91 (s, 1H, NH-ind), 12.20 (s, 1H, NH), 12.15 (s, 1H, NH), 9.58 (s, 1H, H_2 -ind), 8.74 (s, 1H, $\text{HC}=\text{C}$), 7.91 – 7.88 (m, 1H, H_7 -ind), 7.63 – 7.59 (m, 1H, H_4 -ind), 7.37 – 7.33 (m, 2H, $H_{5,6}$ -ind).

^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ (ppm): 177.68 ($\text{C}=\text{S}$), 162.72 ($\text{C}=\text{O}$), 160.92 ($\text{C}=\text{O}$), 144.53 ($\text{HC}=\text{C}$), 141.00 (C_2 -ind), 136.60 (C_{7a} -ind), 129.02 (C_{3a} -ind), 124.00 (C_6 -ind), 123.05 (C_5 -ind), 117.82 (C_7 -ind), 113.33 (C_8 -ind), 112.36 (C_3 -ind), 108.72 ($\text{HC}=\text{C}$).

Σύνθεση της 5-(3,4-διυδροξυβενζυλιδενο)πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-τριόνης (9)



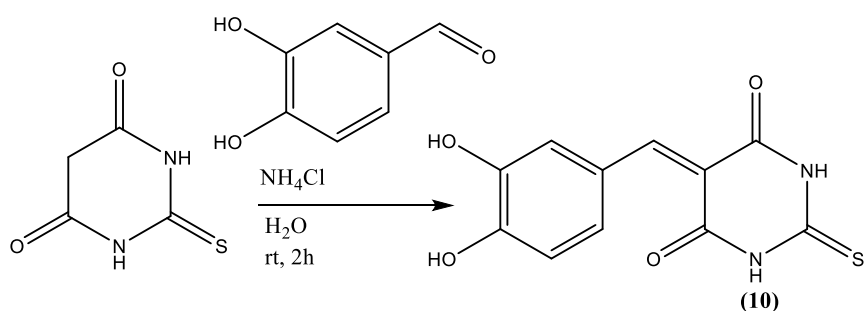
Σε διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) (84 mg, 1.56 mmol) σε 10 mL ύδατος προστίθονται διαδοχικά οι ποσότητες του βαρβιτουρικού οξέος (200 mg, 1.56 mmol) και της

3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδης (216 mg, 1.56 mmol).⁵⁶ Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Ακολούθως, το μείγμα διηθείται υπό κενό. Το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Λαμβάνονται 377 mg πορτοκαλί στερεού το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ¹H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 97,4%. Mp: 261-263 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 11.19 (s, 1H, NH), 11.06 (s, 1H, NH), 10.35 (s, 1H, OH), 9.43 (s, 1H, OH), 8.20 – 8.16 (m, 1H, H₂), 8.12 (s, 1H, HC=C), 7.65 – 7.61 (m, 1H, H₆), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 164.14 (C=O), 162.19 (s), 155.98 (HC=C), 152.31 (C₁), 150.18 (HC=C), 144.81 (C₃), 131.20 (C₆), 124.25 (C₄), 121.33 (C₂), 115.34 (C₅), 113.67 (HC=C).

Σύνθεση της 5-(3,4-διυδροξυβενζυλιδενο)-2-θειοξοπυριμιδινο-4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-δiónης (10)

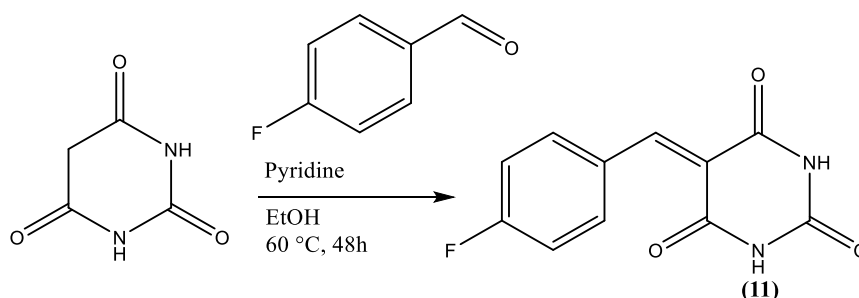


Σε διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl) (74 mg, 1.39 mmol) σε 10 mL ύδατος προστίθενται διαδοχικά οι ποσότητες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (200 mg, 1.39 mmol) και της 3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδης (192 mg, 1.39 mmol). Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Ακολούθως, το μείγμα διηθείται υπό κενό. Το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού. Λαμβάνονται 318 mg πορτοκαλί στερεού το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ¹H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 86,6%. Mp: 255-257 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.28 (s, 1H, NH), 12.19 (s, 1H, NH), 10.54 (s, 1H, OH), 9.53 (s, 1H, OH), 8.27 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H₂-benz), 8.14 (s, 1H, HC=C), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H₆-benz), 6.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅-benz)

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ 178.07 (C=S), 162.45 (C=O), 159.94 (C=O), 157.06 (HC=C), 153.22 (C₁-benz), 144.97 (C₃-benz), 132.13 (C₆-benz), 124.48 (C₄-benz), 121.45 (C₂-benz), 115.50 (C₅-benz), 113.65 (HC=C)

Σύνθεση της 5-(4-φθοροβενζυλιδενο)πυριμιδινο-2,4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-τριώνης (11)

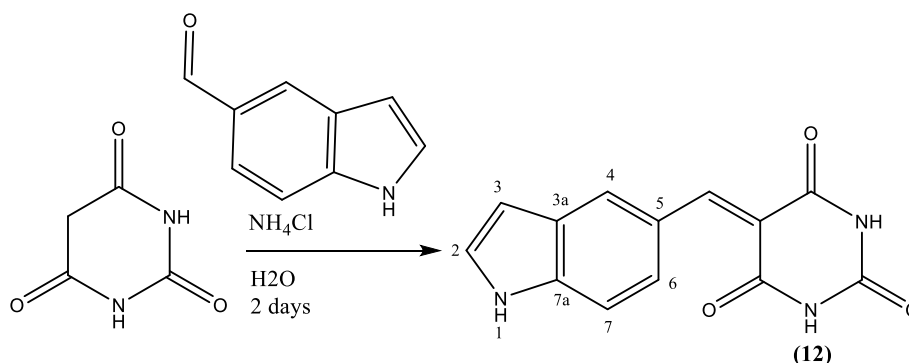


Σε εναιώρημα βαρβιτουρικό οξέος (150 mg, 1.17 mmol) σε 6 mL αιθανόλης προστίθεται η ποσότητα της 4-φθοροβενζαλδεΐδης (116 mg, 0.94 mmol) και καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Το σύστημα φέρεται σε θερμοκρασία 60 °C με κάθετο ψυκτήρα και αναδεύεται για 5 ώρες. Στη συνέχεια, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Στο ακατέργαστο υπόλειμμα προστίθενται 50 mL ύδατος και ακολουθεί αλκαλοποίηση του μείγματος με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου NaOH 10%. Στη συνέχεια, το υδατικό διάλυμα εκχυλίζεται με AcOEt (3x50mL). Η υδατική φάση οξινίζεται με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος HCl 10% σχηματίζεται στερεό. Ακολούθως το μείγμα διηθείται υπό κενό και το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα. Λαμβάνονται 90 mg κίτρινου στερεού το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 43,1%. Mp: 305-307 °C.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 11.36 (s, 1H, NH), 11.22 (s, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, HC=C), 8.23 (m, $J = 8.6, 5.7$ Hz, 2H, $H_{2,6}$), 7.32 (m, $J = 8.9$ Hz, 2H, $H_{3,5}$).

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 164.95 (CF), 163.29 (C=O), 161.64 (C=O), 153.34 (HC=C), 150.08 (NHCONH), 136.28 (1C, $C_{2/6}$), 136.22 (1C, $C_{2/6}$), 129.20 (C_1), 118.68 (HC=C), 115.21 (1C, $C_{3/5}$), 115.07 (1C, $C_{3/5}$).

Σύνθεση της 5-((1*H*-ινδολο-5-υλ)μεθυλενο)-2-θειοξοπυριμιδινο-4,6-(1*H*,3*H*, 5*H*)-διόνης (12)



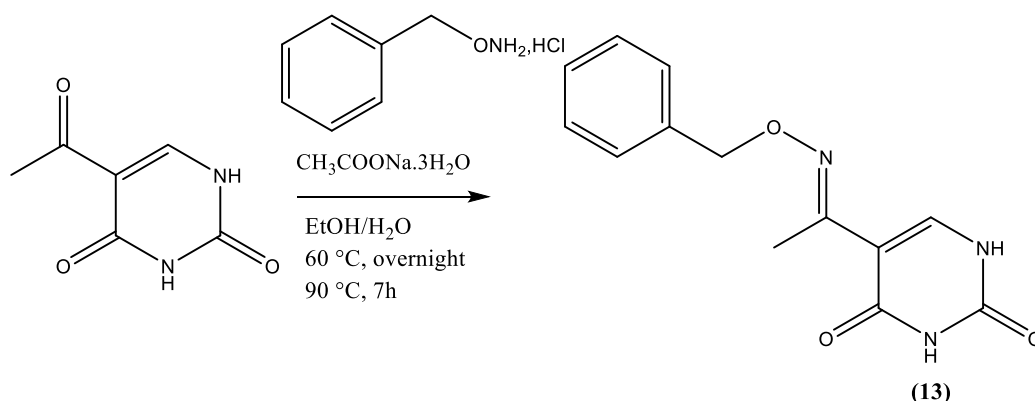
Σε διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) (84 mg, 1.56 mmol) σε 10 mL ύδατος προστίθενται διαδοχικά οι ποσότητες του βαρβιτουρικού οξέος (200 mg, 1.56 mmol) και της

1H-ίνδοιο-5-καρβοξαλδεϋδης (227 mg, 1.56 mmol). Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες. Ακολουθώς, διηθείται υπό κενό και το στερεό εκπλένεται με AcOEt και διαιθυλαιθέρα. Το στερεό ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού και λαμβάνονται 328 mg πορτοκαλί στερεού, το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ¹H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 82.4%. Mp: 286-288 °C (dec).

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.58 (s, 1H, *NH*-ind), 11.23 (s, 1H, *NH*), 11.09 (s, 1H, *NH*), 8.80 (s, 1H, *H*₆-ind), 8.45 (s, 1H, *HC*=C), 8.15 (dd, *J* = 8.7, 1.2 Hz, 1H, *H*₄-ind), 7.50 – 7.46 (m, 2H, *H*_{2,3}-ind), 6.62 – 6.60 (m, 1H, *H*₇-ind).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm): 164.19 (C=O), 162.22 (C=O), 157.98 (HC=C), 150.22 (NHCONH), 138.89 (C_{7a}-ind), 130.03 (C₆-ind), 128.57 (C₄-ind), 127.63 (C₂-ind), 127.47 (C_{3a}-ind), 123.76 (C₅-ind), 114.06 (HC=C), 111.30 (C₃-ind), 103.31 (C₇-ind).

Σύνθεση της 5-(1-((βενζυλοξυ)μινο)αιθυλ)πυριμιδιν-2,4 (1*H*,3*H*)-διόνης (13)

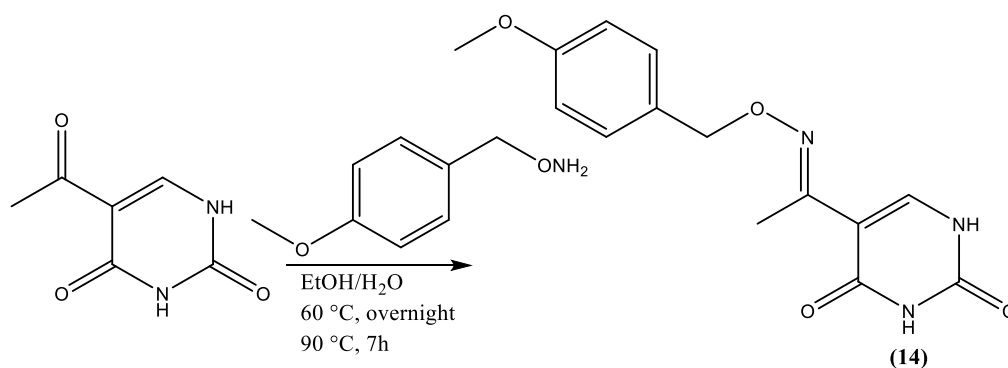


Σε διάλυμα της υδροχλωρικής *O*-βενζυλοϋδροξυλαμίνης (109 mg, 0.68 mmol) σε 3 mL μείγματος διαλυτών (EtOH/H₂O 2/1 v/v) προστίθεται αρχικά η ποσότητα του οξικού νατρίου (CH₃COONa·3H₂O) (93 mg, 0.68 mmol) και στη συνέχεια η ποσότητα της 5-ακετυλοουρακίλης (70 mg, 0.45 mmol). Το σύστημα αναδεύεται overnight σε θερμοκρασία 60 °C. Την επόμενη μέρα, το μείγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό με κάθετο ψυκτήρα στους 90-95 °C (reflux) και αναδεύεται υπό αυτές τις συνθήκες για 7 ώρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και οι διαλύτες απομακρύνονται πλήρως με εξάτμιση υπό κενό.⁵⁸ Στο υπόλειμμα προστίθενται 3 ml ύδατος και ακολουθεί διήθηση υπό κενό, οπότε λαμβάνονται 95 mg λευκού στερεού, το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ¹H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 81% . Mp: 240 - 242°C. (AcOEt, MeOH/*n*-pentane).

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.23 (s, 1H, *NH*), 11.07 (s, 1H, *NH*), 7.38 – 7.34 (m, 5H, C₆H₅), 5.10 (s, 3H, CH₃), 2.06 (s, 2H, CH₂).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm): 162.72 (NHCONH), 152.37 (C=N), 150.82 (C=O), 140.26 (CH=C), 137.97 (C₁-benz), 128.24 (C_{3,5}-benz), 127.74 (C_{2,6}-benz), 127.57 (C₄-benz), 109.44 (HC=C), 74.94 (CH₂), 14.56 (CH₃)

Σύνθεση της 5-(1-(υδροξυιμινο)αιθυλο)πυριμιδινο-2,4-3H-διόνης (14)

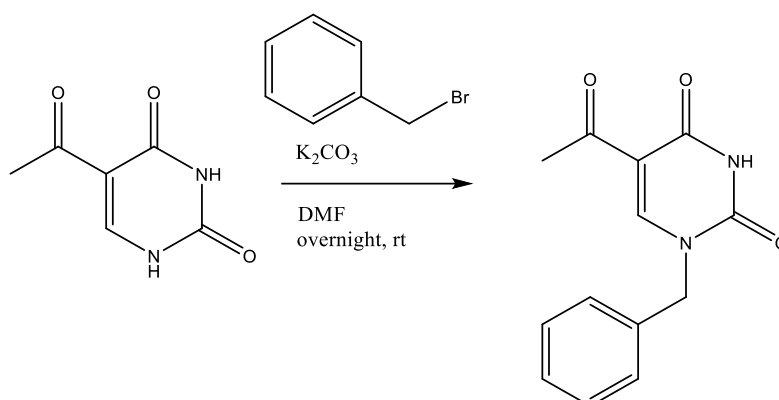


Η ποσότητα της 5-ακετυλοουρακίλης (70 mg, 0,45 mmol) απαιωρείται σε 3 mL μείγματος διαλυτών (EtOH/H₂O 2/1 v/v) και στη συνέχεια προστίθεται η ποσότητα της υδροχλωρικής O-(4-μεθοξυ-βενζυλ)-υδροξυλαμίνης (104 mg, 0,68 mmol). Το σύστημα αναδεύεται overnight σε θερμοκρασία 60 °C. Την επόμενη μέρα, το μείγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό με κάθετο ψυκτήρα στους 90-95 °C (reflux) και αναδεύεται υπό αυτές τις συνθήκες για 7 ώρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και οι διαλύτες απομακρύνονται πλήρως με εξάτμιση υπό κενό.⁵⁸ Στο λευκό στερεό υπόλειμμα προστίθενται 3 ml ύδατος και ακολουθεί διήθηση υπό κενό, οπότε λαμβάνονται 120 mg λευκού στερεού, το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ^1H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 91%. Mp: 239-241 °C. (MeOH/*n*-pentane).

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.22 (s, 1H, NH), 11.06 (s, 1H, NH), 7.38 (s, 1H), 7.31 – 7.28 (m, 2H, H_{2,6}-benz), 6.93 – 6.89 (m, J = 7.9 Hz, 2H, H_{3,5}-benz), 5.01 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃).

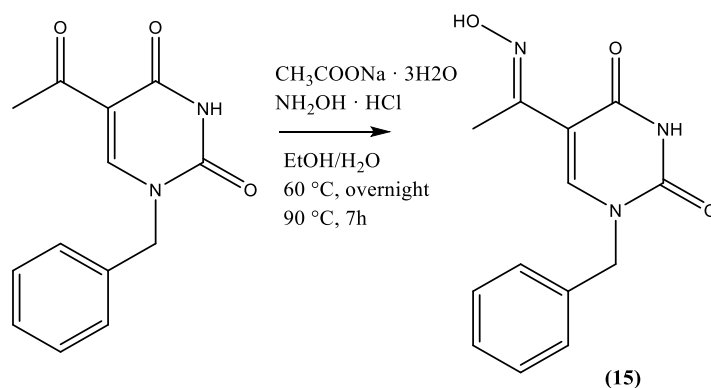
^{13}C NMR (150 MHz, DMSO) δ (ppm): 162.74 (NHCONH), 158.88 (COCH₃), 152.05 (C=N), 150.83 (C=O), 140.20 (CH=C), 129.76 (C₁-benz), 129.61 (C_{2,6}-benz), 113.66 (C_{3,5}-benz), 109.52 (HC=C), 74.73 (CH₂), 55.02 (OCH₃), 14.54 (CH₃)

Σύνθεση της 1-βενζυλο-5-ακετυλοπυριμιдино-2,4-3H-διόνης



Σε εναιώρημα της 5-ακετυλοπυριμιдино-2,4-3H-διόνης (5-ακέτυλουουρακίλης) (150mg, 0.97 mmol) σε 7 mL άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF) προστίθεται η ποσότητα του ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) (148 mg, 0.97 mmol) και το σύστημα αναδεύεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αργού.⁵⁹ Ακολούθως, προστίθεται η ποσότητα του βενζυλοβρωμιδίου (183 mg, 1.07 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό τις ίδιες συνθήκες overnight. Την επόμενη μέρα, προστίθενται στο μείγμα 60 mL ύδατος και εκχλίζεται με 3x50 mL οξικού αιθυλεστέρα (AcOEt). Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις εκπλένονται διαδοχικά με 2x60 mL νερού και 1x60 mL κορεσμένου υδατικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου (brine). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και εξάτμιση αυτής υπό κενό μέχρι ξηρού. Το ακατέργαστο στερεό υπόλειμμα που παραλαμβάνεται χρωματογραφείται σε στήλη οξειδίου του πυριτίου (gravity) με διαλύτη έκλουσης μείγμα διχλωρομεθανίου/οξικού αιθυλεστέρα (CH_2Cl_2 /AcOEt 8:1 και 6:1). Λαμβάνονται 170 mg λευκού στερεού προϊόντος, τα χαρακτηριστικά του οποίου συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Απόδοση: 71.5%

Σύνθεση της 1-βενζυλο-5-(1-(υδροξυμινο)αιθυλο)πυριμιдино-2,4-3H-διόνης (15)



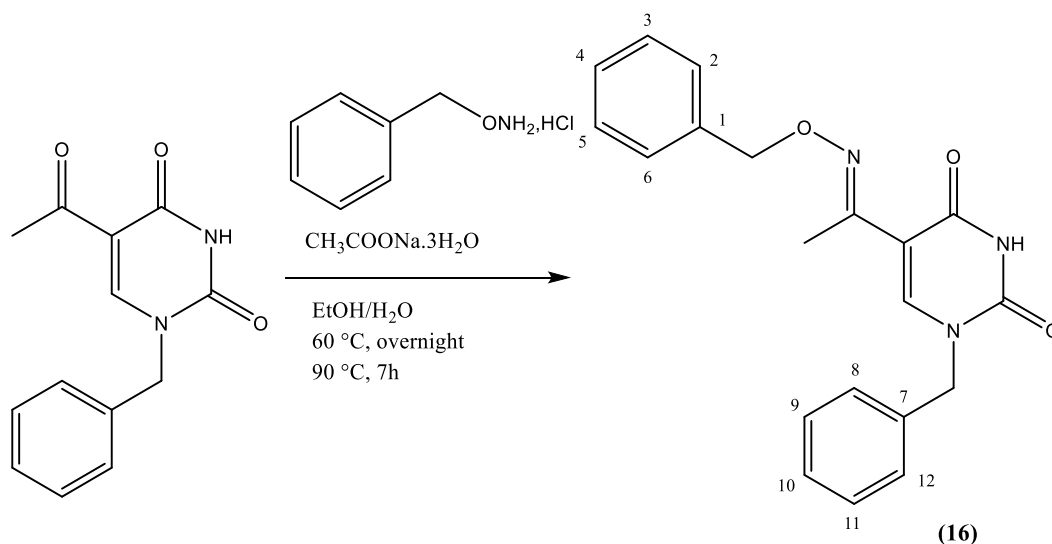
Σε διάλυμα της υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (20 mg, 0.29 mmol) σε 6 mL μείγματος διαλυτών ($EtOH/H_2O$ 2/1 v/v) προστίθεται αρχικά η ποσότητα του οξικού νατρίου

(CH₃COONa·3H₂O) (40 mg, 0.29 mmol) και στη συνέχεια η ποσότητα της 1-βενζυλο-5-ακετυλοουρακίλης (50 mg, 0.20 mmol). Το σύστημα αναδεύεται overnight σε θερμοκρασία 60 °C. Την επόμενη μέρα, το μείγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό με κάθετο ψυκτήρα στους 90-95 °C (reflux) και αναδεύεται υπό αυτές τις συνθήκες για 7 ώρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και η αιθανόλη απομακρύνεται με εξάτμιση υπό κενό.⁵⁸ Στο υπόλειμμα προστίθενται 4 mL ύδατος και διηθείται υπό κενό. Το λευκό στερεό υπόλειμμα, κατεργάζεται με *n*-pentane/Et₂O (5:1). Λαμβάνονται 30 mg λευκού στερεού προϊόντος το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ¹H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 39.7%. Mp: 219-221 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.50 (s, 1H, OH), 10.99 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, HC=C), 7.39 – 7.34 (m, 2H, H_{2,6}-benz), 7.34 – 7.29 (m, 3H, H_{3,5}-benz), 4.93 (s, 2H, CH₂), 1.98 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (150 MHz, DMSO) δ (ppm): 162.34 (C=O), 150.57 (HC=C), 150.21 (NHCONH), 142.98 (HC=C), 136.69 (C₁-benz), 128.65 (C_{3,5}-benz), 127.73 (C₄-benz), 127.63 (C_{2,6}-benz), 111.49 (C=CH), 50.22 (CH₂), 13.77 (CH₃).

Σύνθεση της 1-βενζυλο-5-(1-((βενζυλοξυ)ιμινο)αιθυλ)πυριμιδινο-2,4-3H-διόνης (16)



Σε διάλυμα της υδροχλωρικής O-βενζυλοϋδροξυλαμίνης (65 mg, 0.41 mmol) σε 6 mL μείγματος διαλυτών (EtOH/H₂O 2/1 v/v) προστίθεται αρχικά η ποσότητα του οξικού νατρίου (CH₃COONa·3H₂O) (55 mg, 0.41 mmol) και στη συνέχεια η ποσότητα της 1-βενζυλο-5-ακετυλοουρακίλης (70 mg, 0.29 mmol). Το σύστημα αναδεύεται overnight σε θερμοκρασία 60 °C. Την επόμενη μέρα, το μείγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό με κάθετο ψυκτήρα στους 90-95 °C (reflux) και αναδεύεται για 7 ώρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και οι διαλύτες απομακρύνονται πλήρως με εξάτμιση υπό κενό.⁵⁸ Το

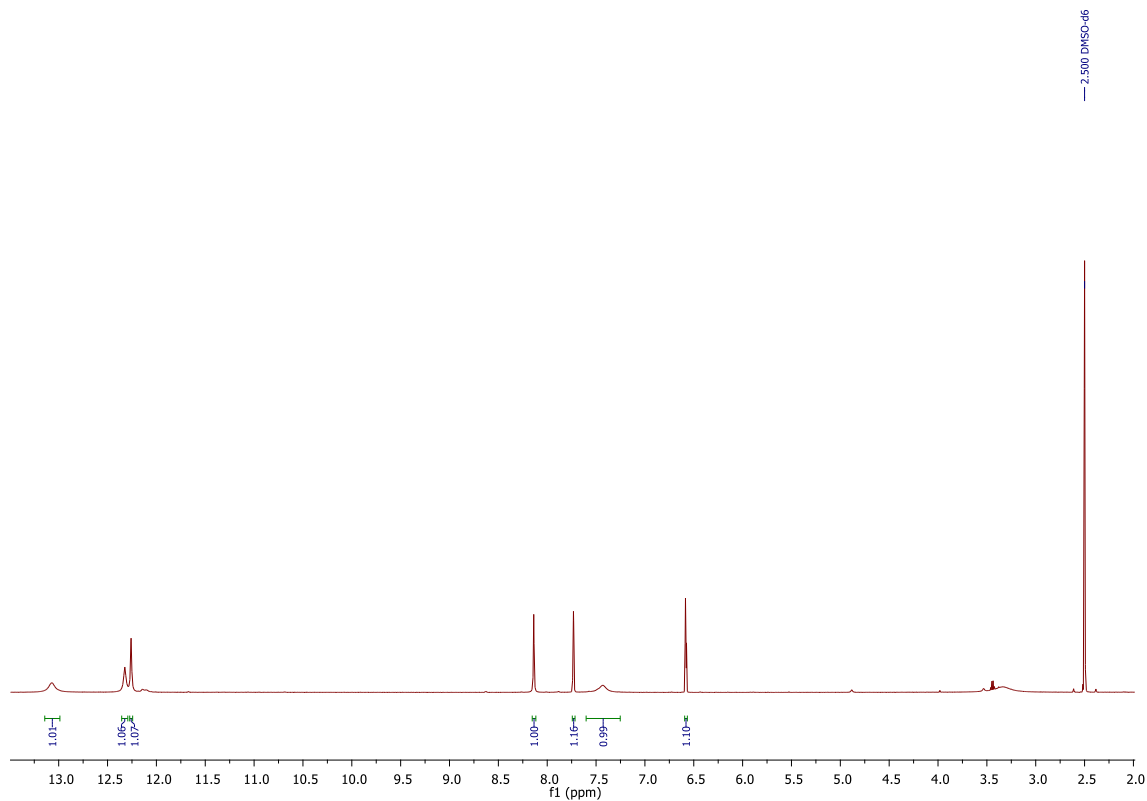
λευκό στερεό υπόλειμμα που προκύπτει, κατεργάζεται με *n*-pentane/Et₂O (5:1), οπότε παραλαμβάνονται 83 mg λευκού στερεού προϊόντος το οποίο έπειτα από τη λήψη φάσματος ¹H NMR ταυτοποιείται ως το επιθυμητό προϊόν. Απόδοση: 83%. Mp: 109-111 °C.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.58 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, HC=C), 7.39 – 7.34 (m, 5H, H₈₋₁₂), 7.33 – 7.25 (m, 5H, H₂₋₆), 5.10 (s, 2H, OCH₂), 4.93 (s, 2H, NCH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃).

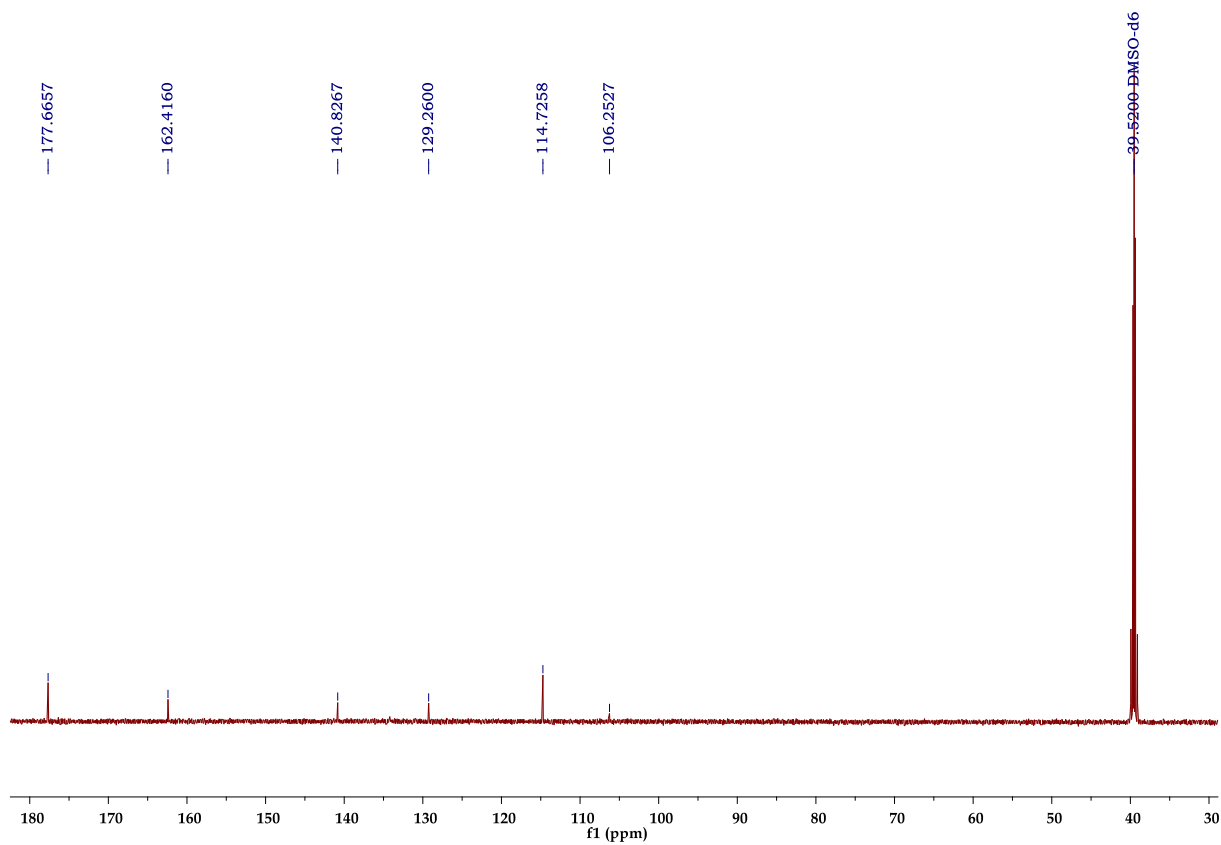
¹³C NMR (150 MHz, DMSO) δ (ppm): 162.54 (C=O), 152.33 (C=N), 150.80 (NHCONH), 143.48 (C=CH), 137.77 (C₁), 136.67 (C₇), 128.62 (C_{9,11}), 128.26 (C_{3,5}), 127.84 (C_{2,6}), 127.68 (C_{4/10}), 127.65 (C_{4/10}), 127.55 (C_{8,12}), 110.44 (C=CH), 75.05 (OCH₂), 50.38 (NCH₂), 14.70 (CH₃).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 1-16

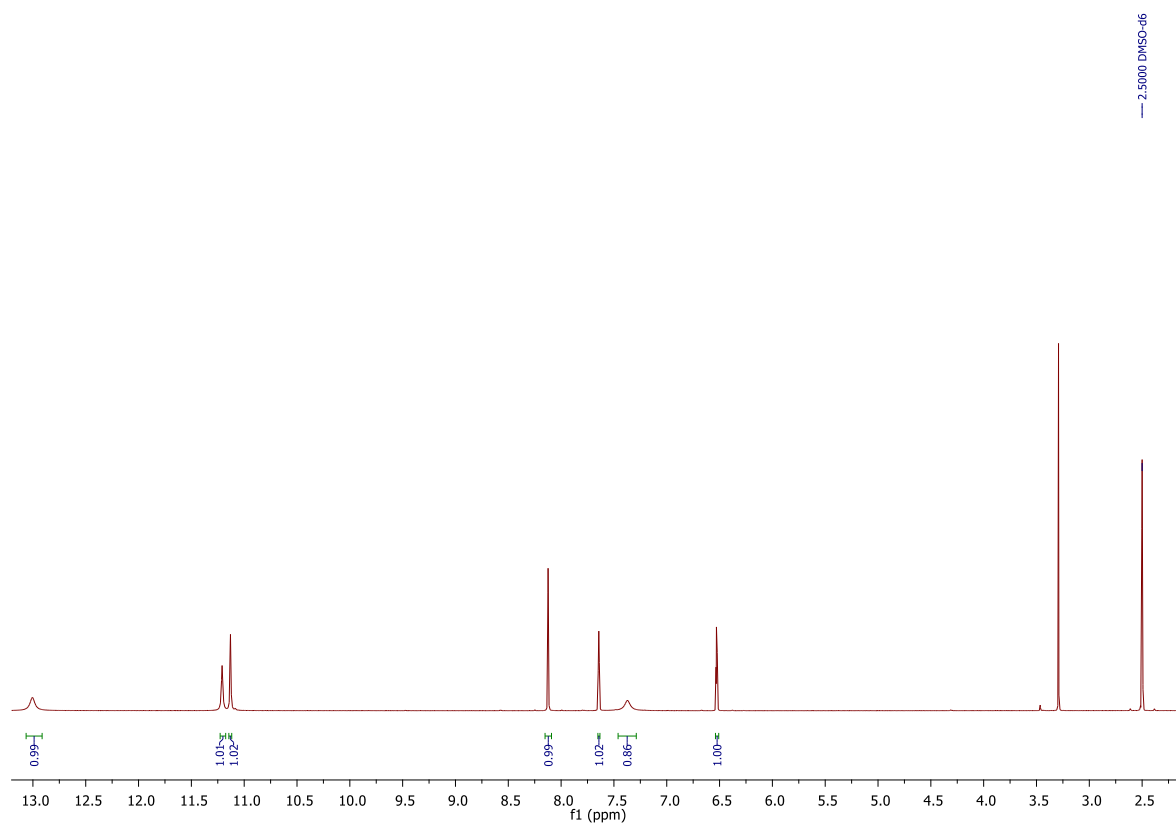
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) της ένωσης 1.



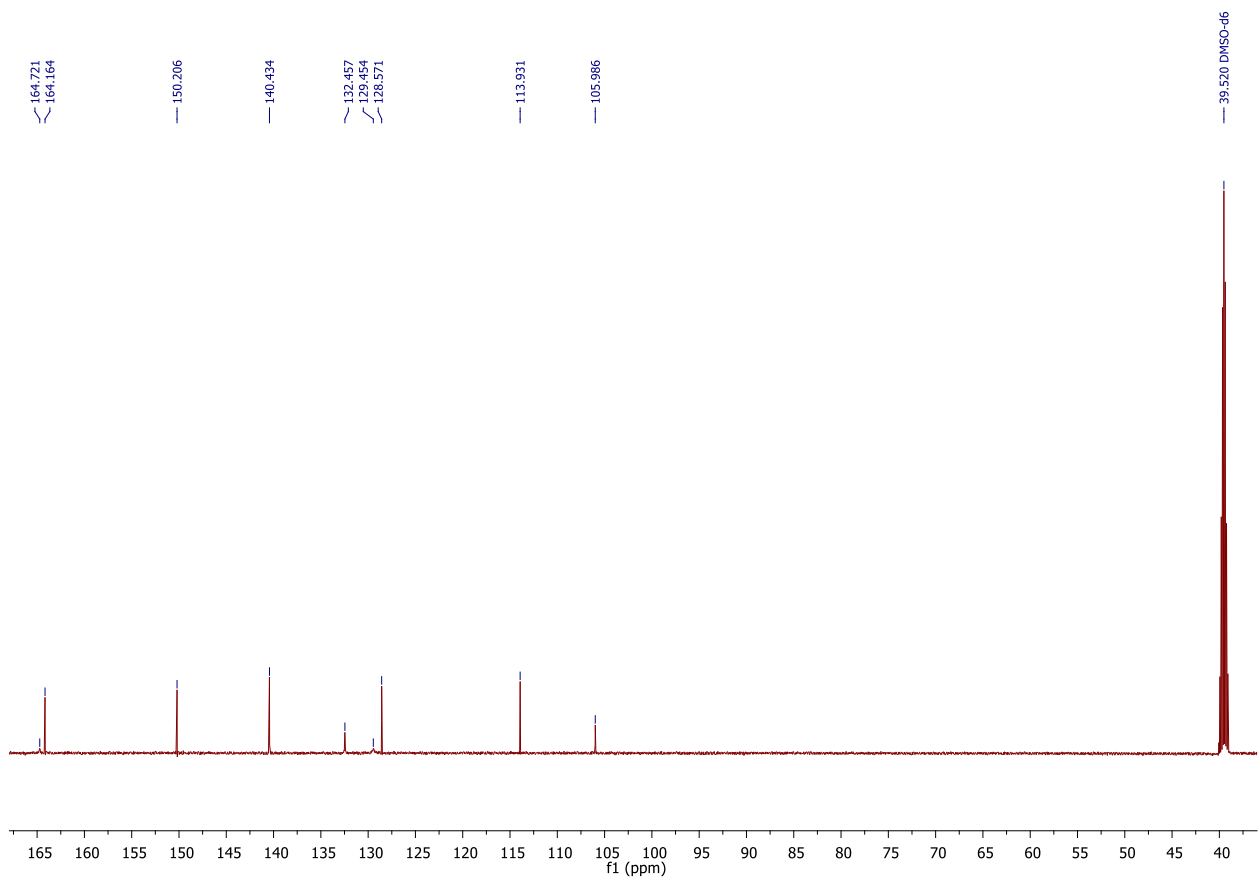
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) της ένωσης 1.



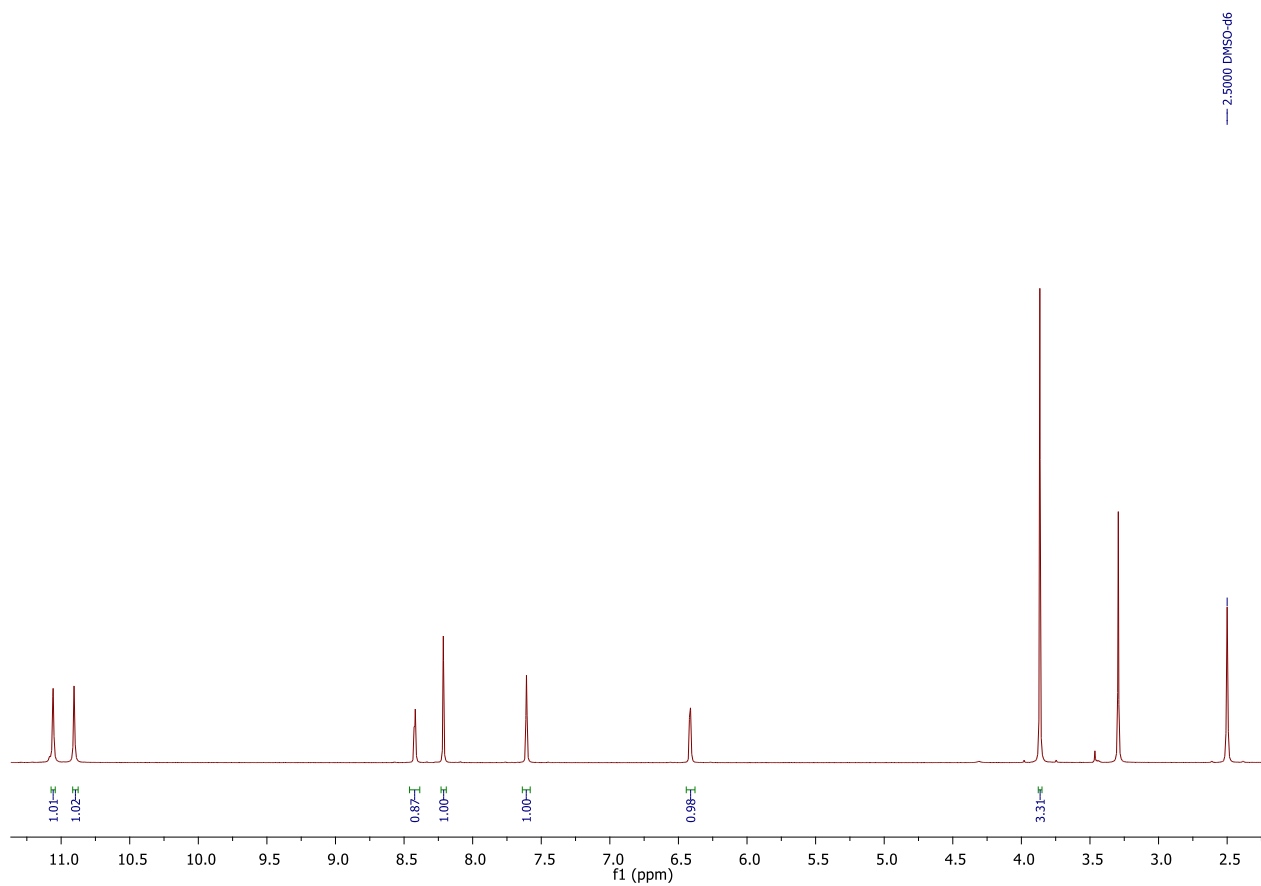
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) της ένωσης 2.



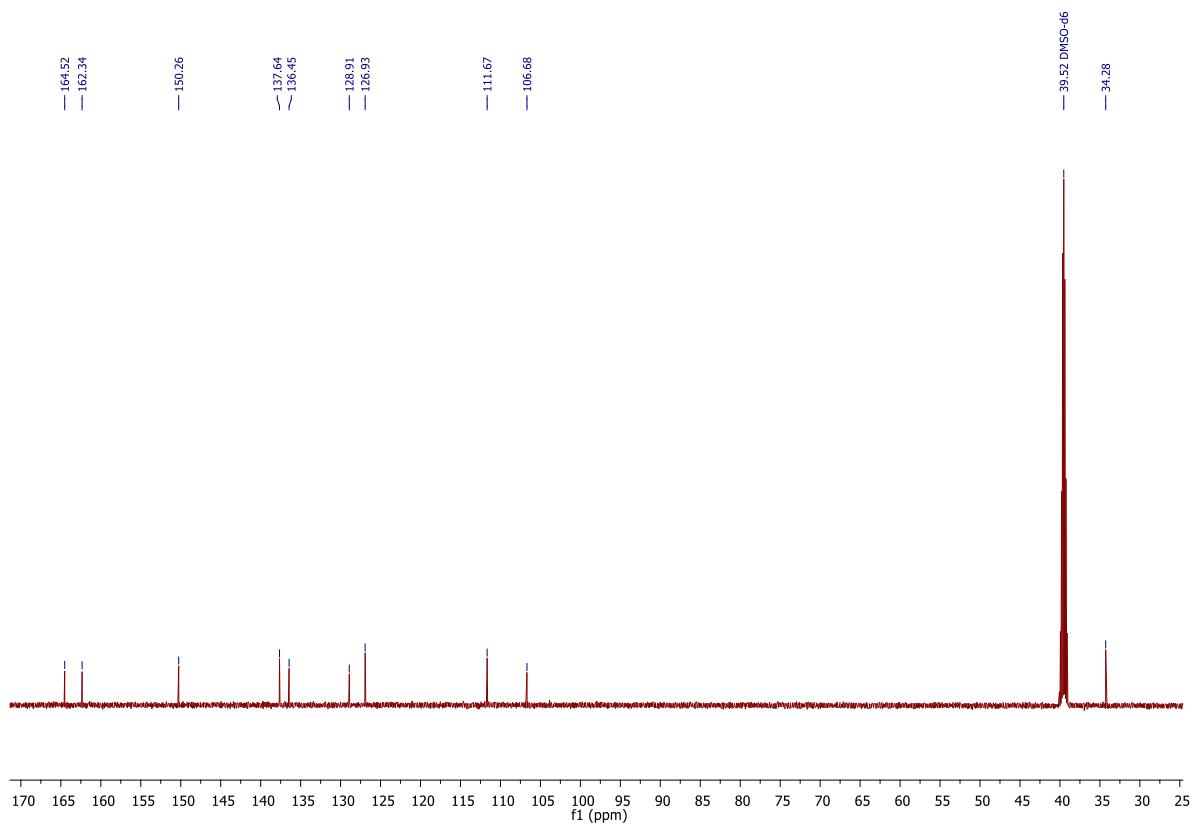
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) της ένωσης 2.



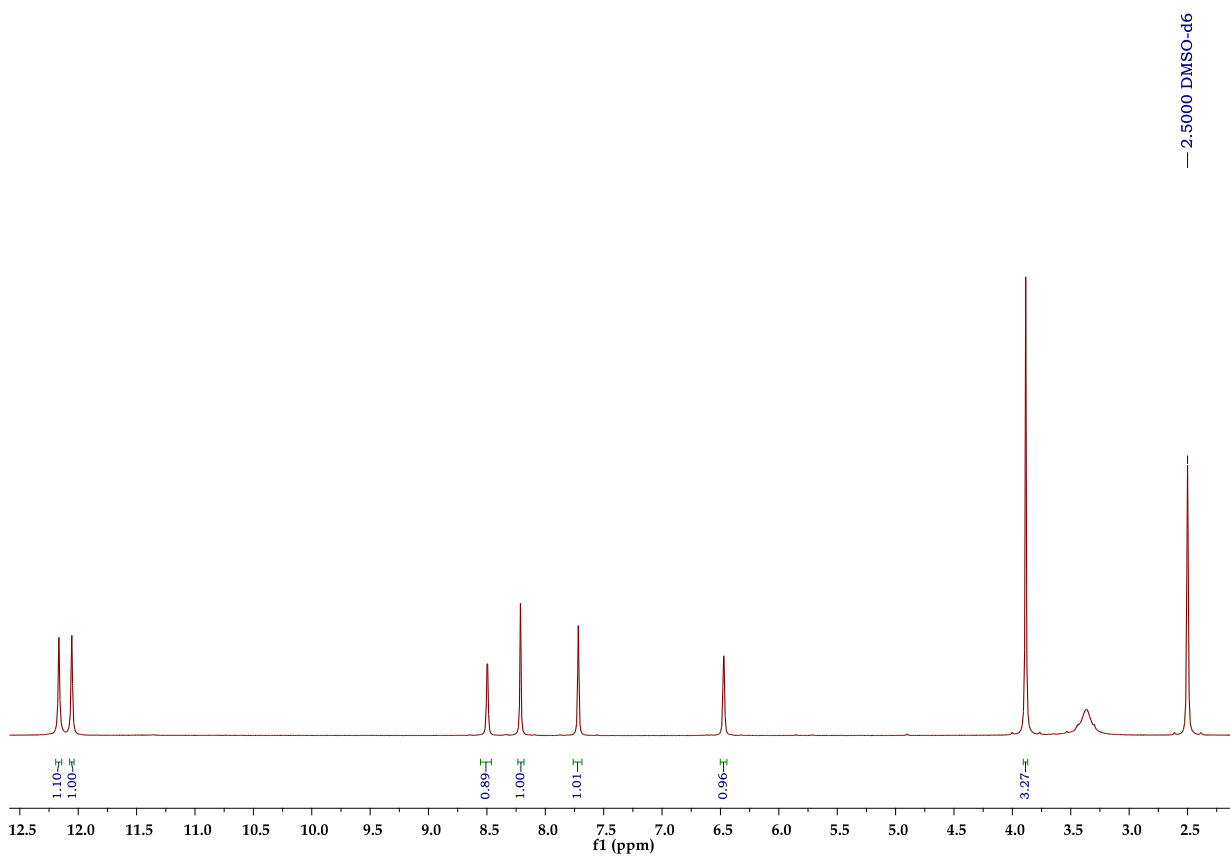
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 3.



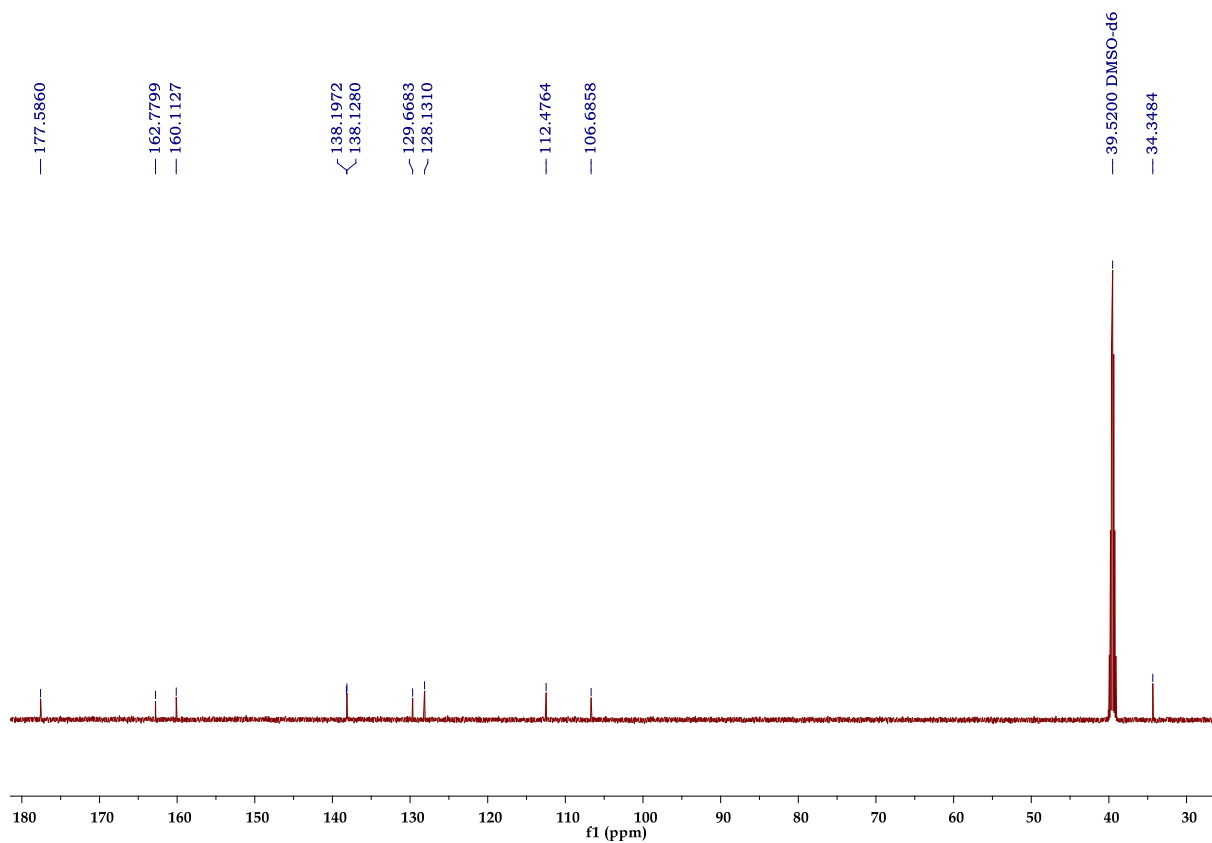
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 3.



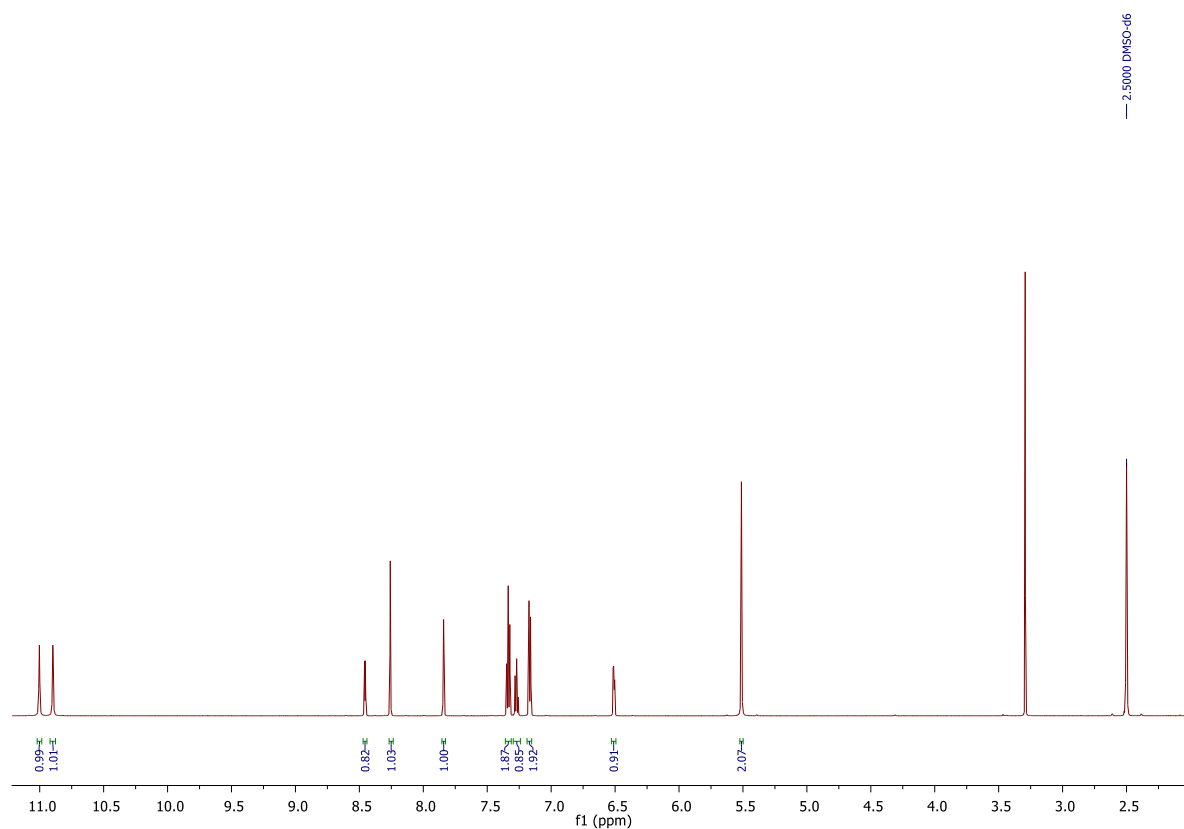
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 4.



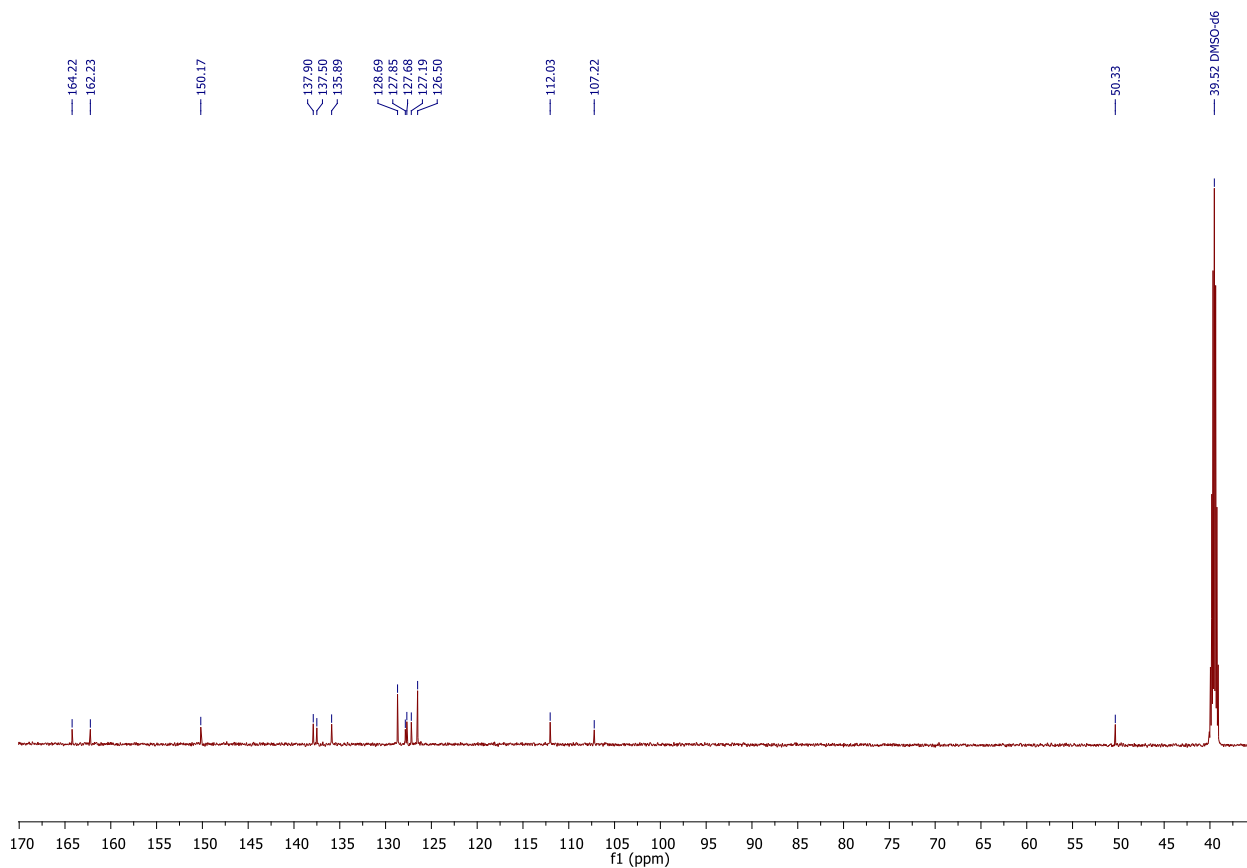
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 4.



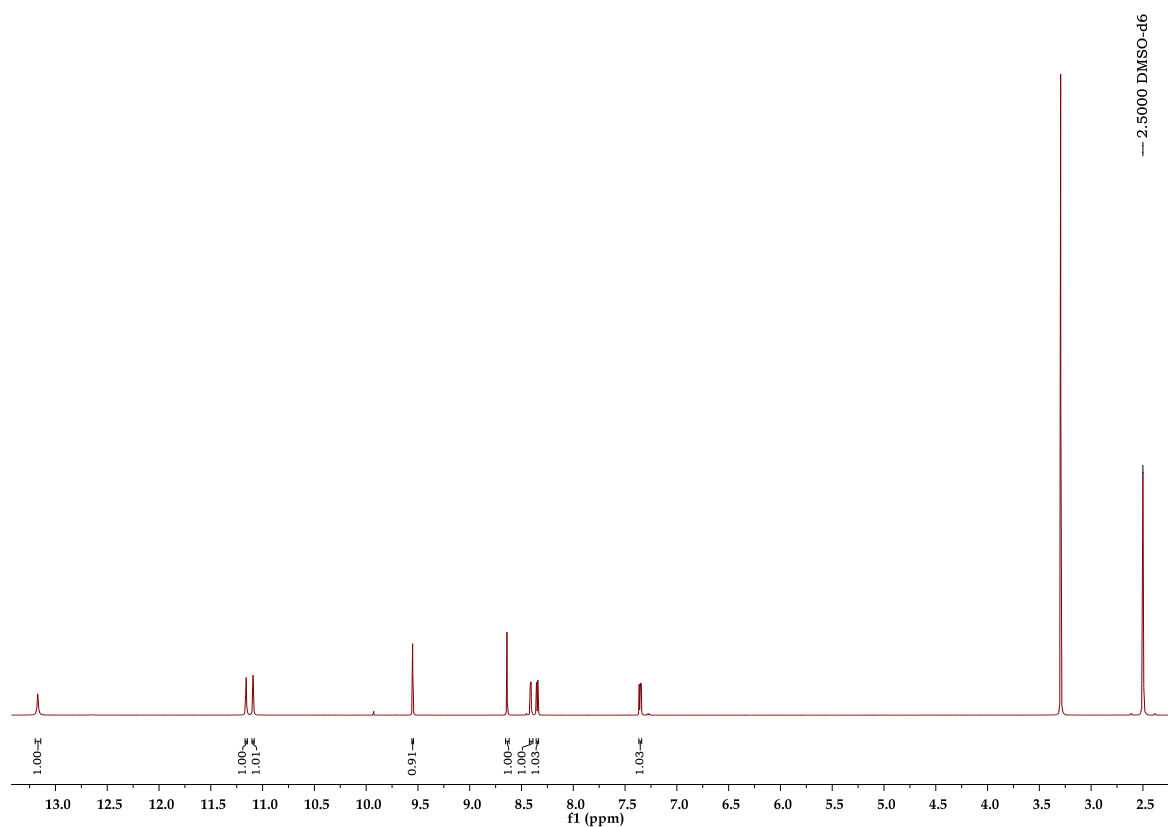
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 5.



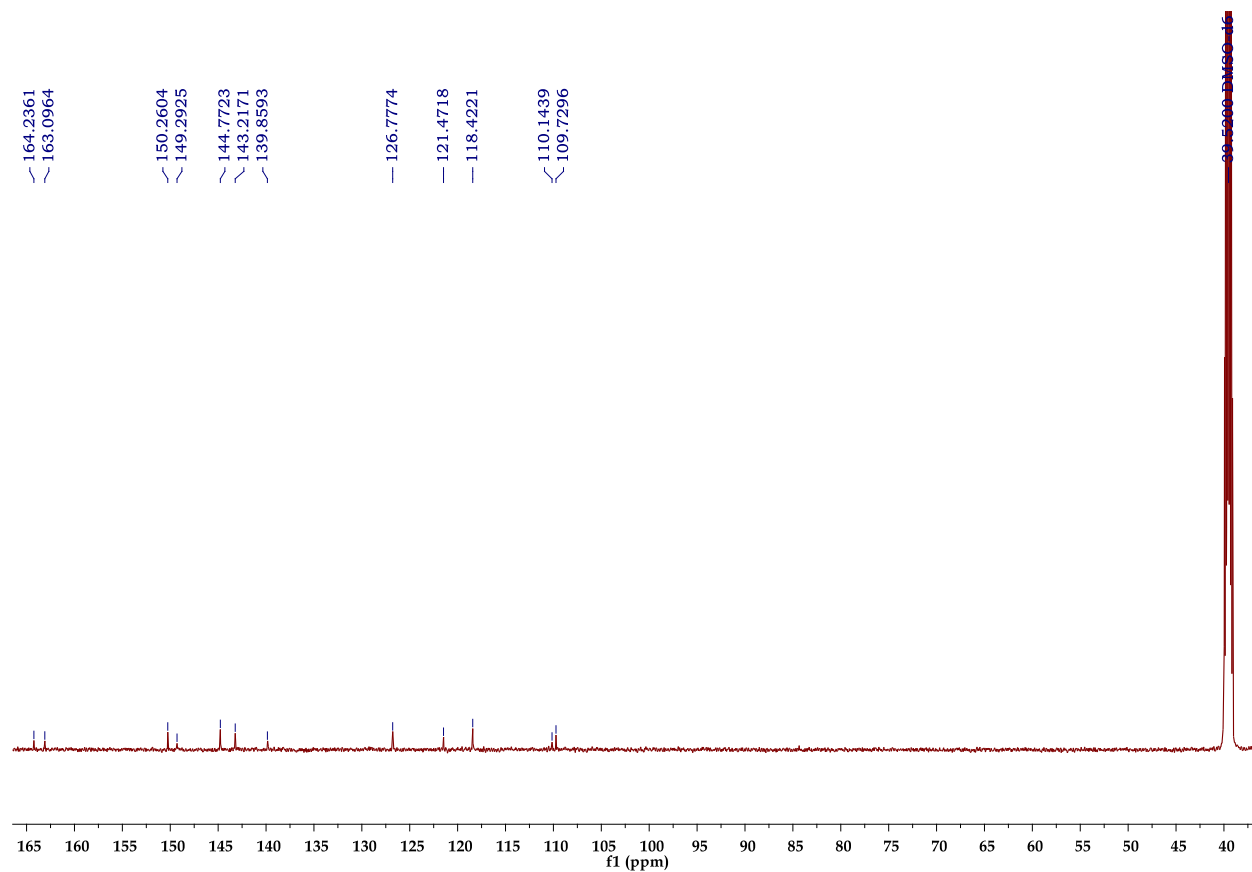
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 5.



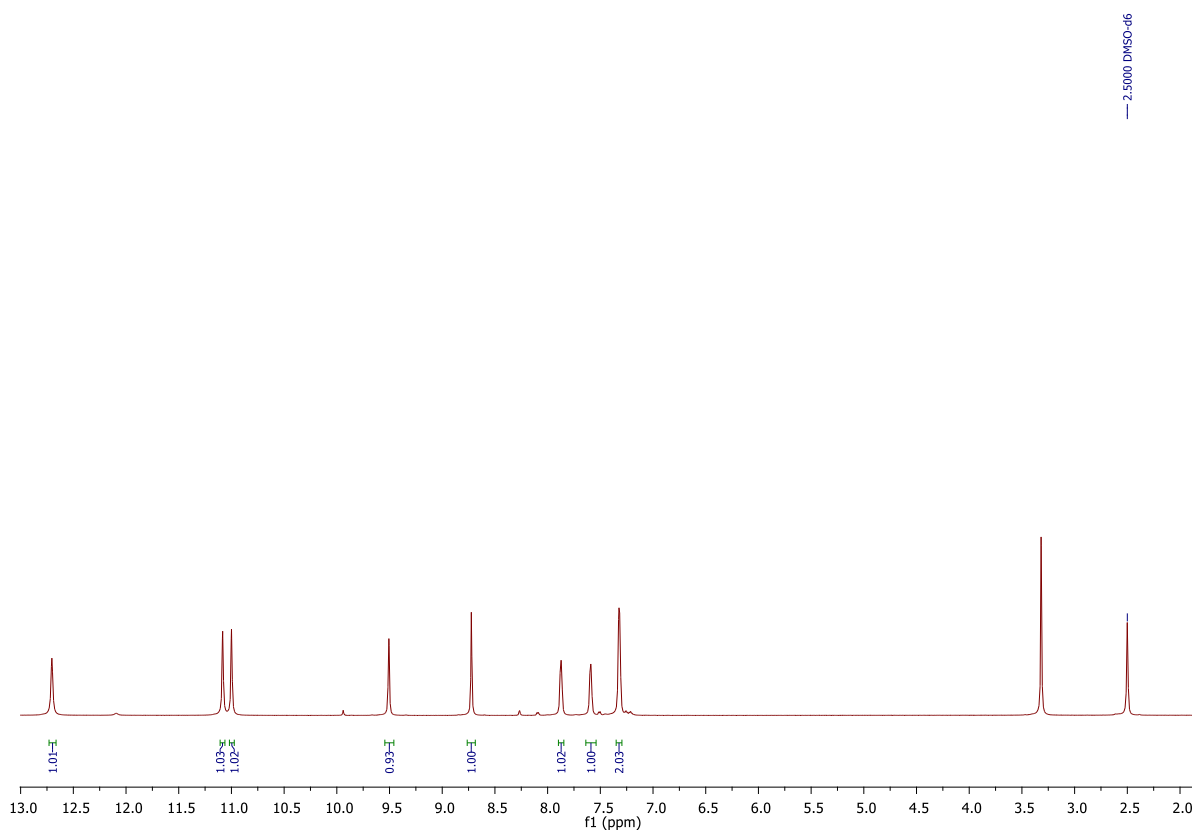
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 6.



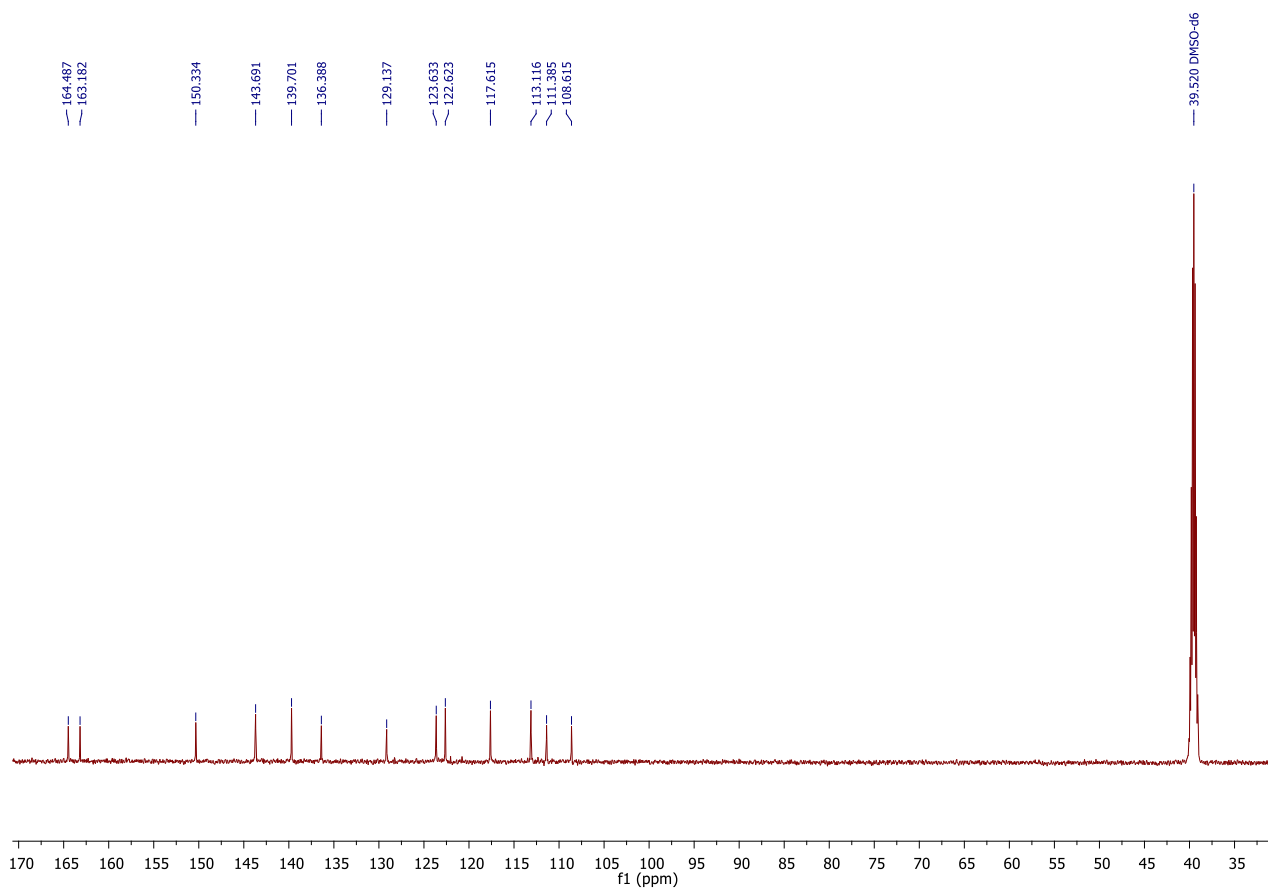
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 6.



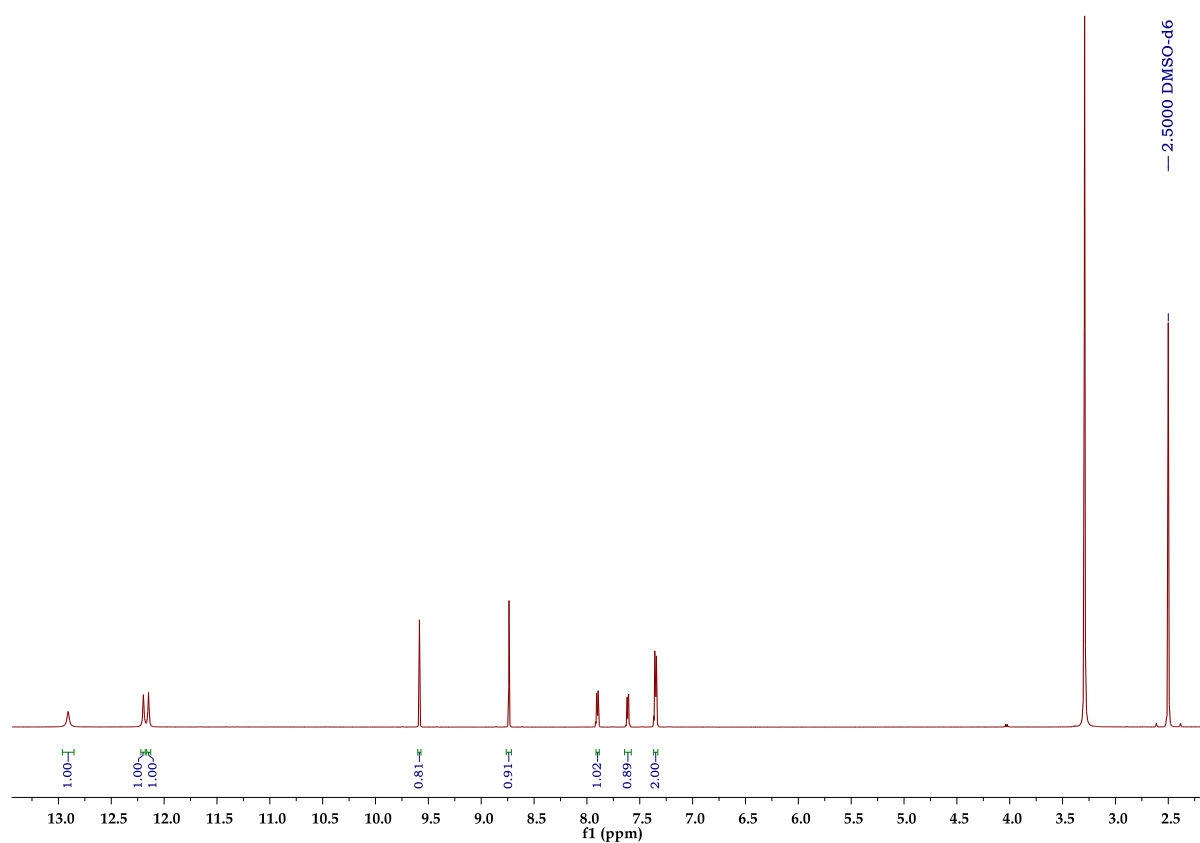
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 7.



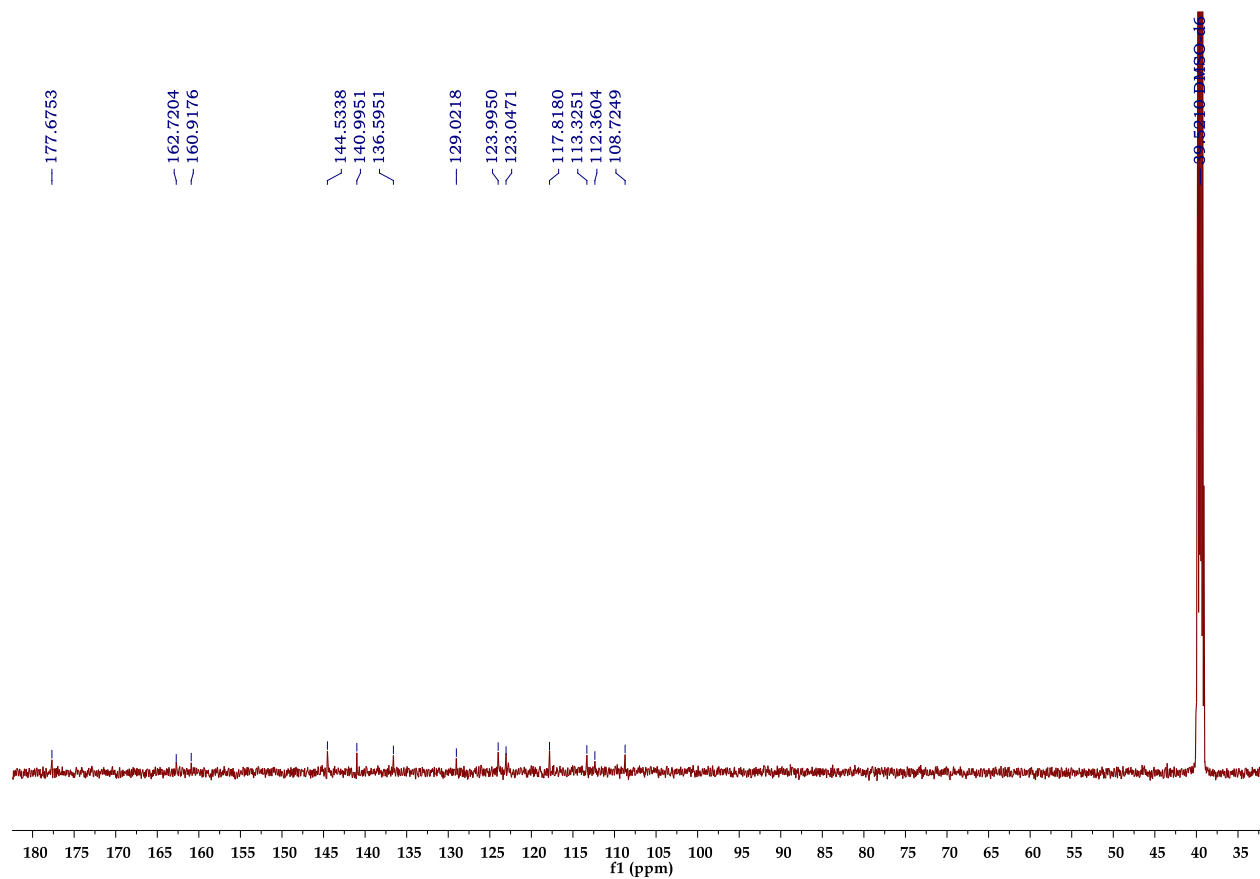
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 7.



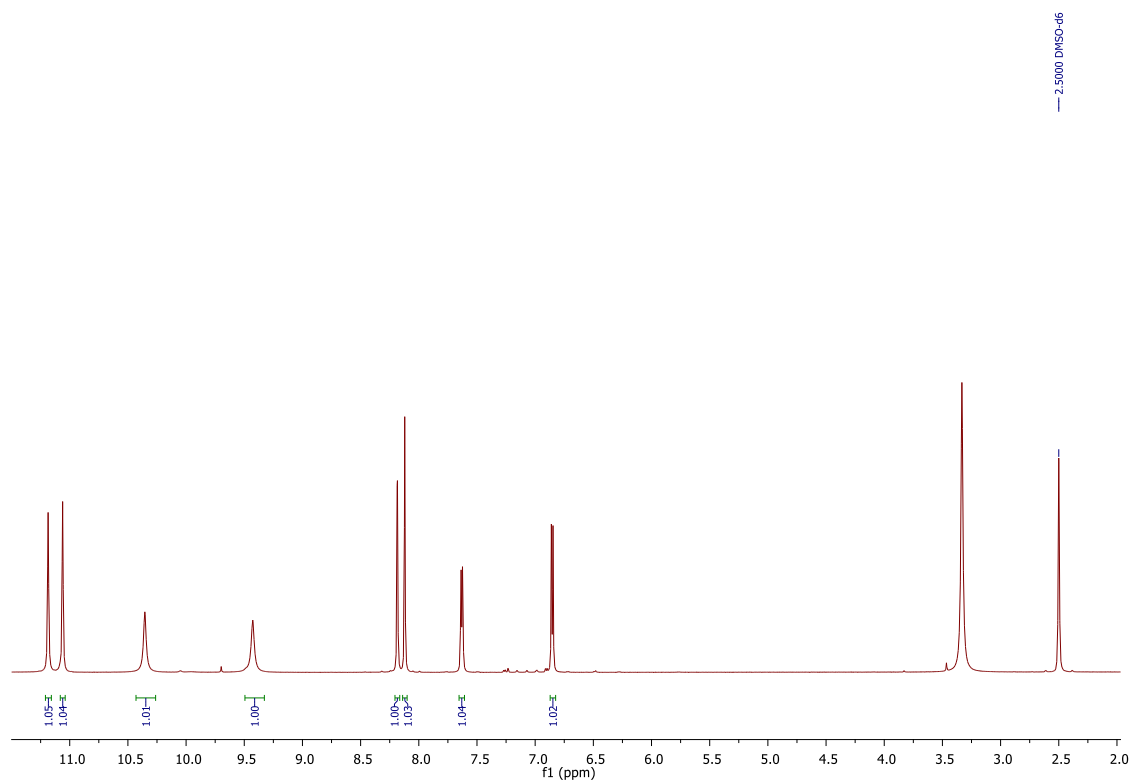
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 8.



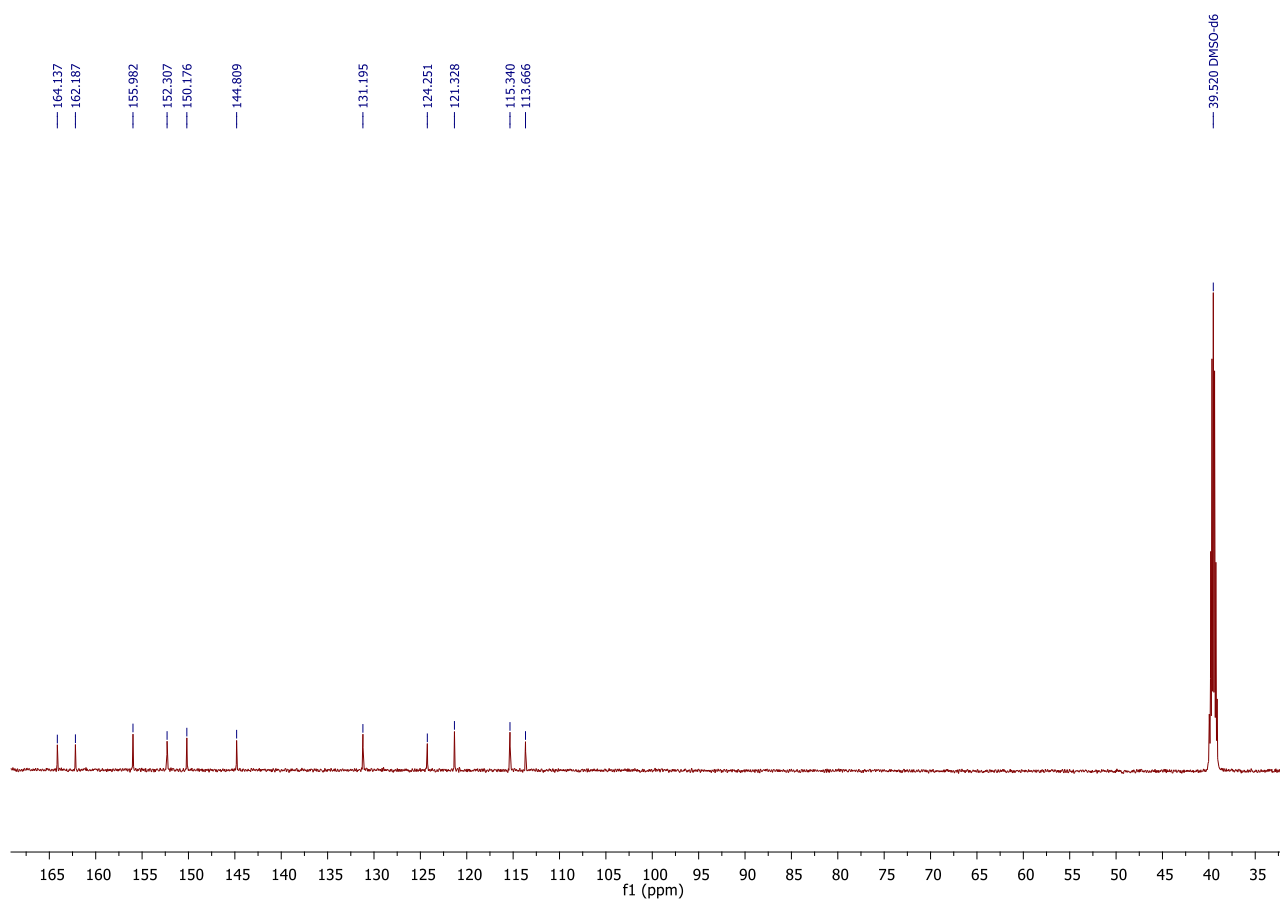
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 8.



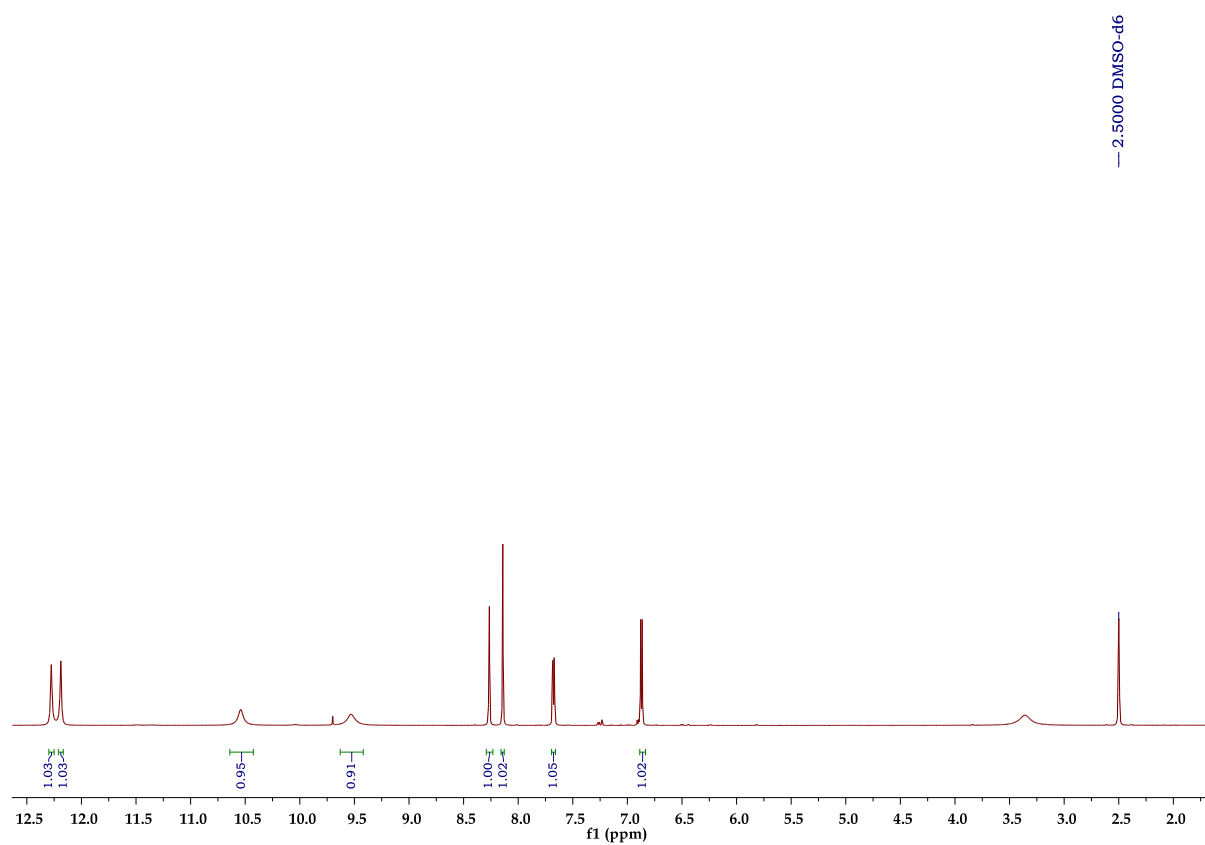
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 9.



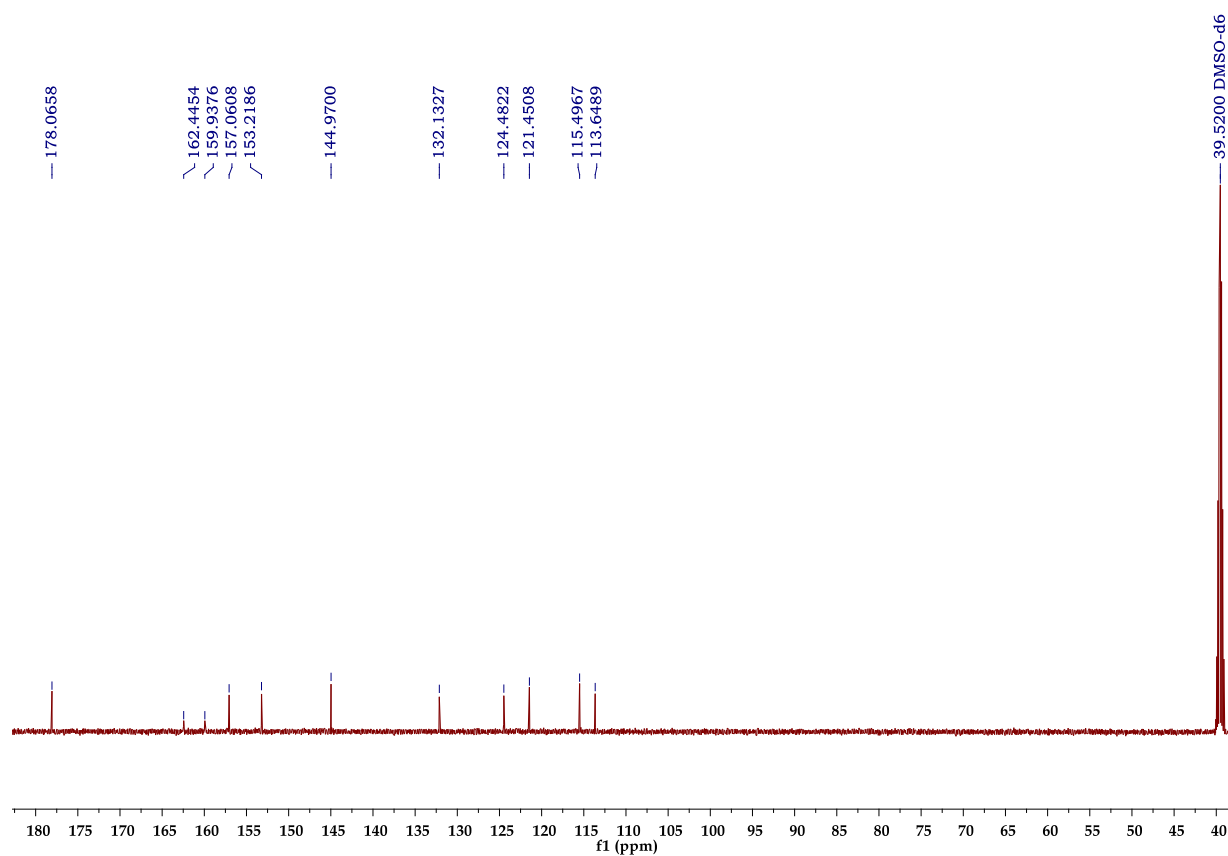
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 9.



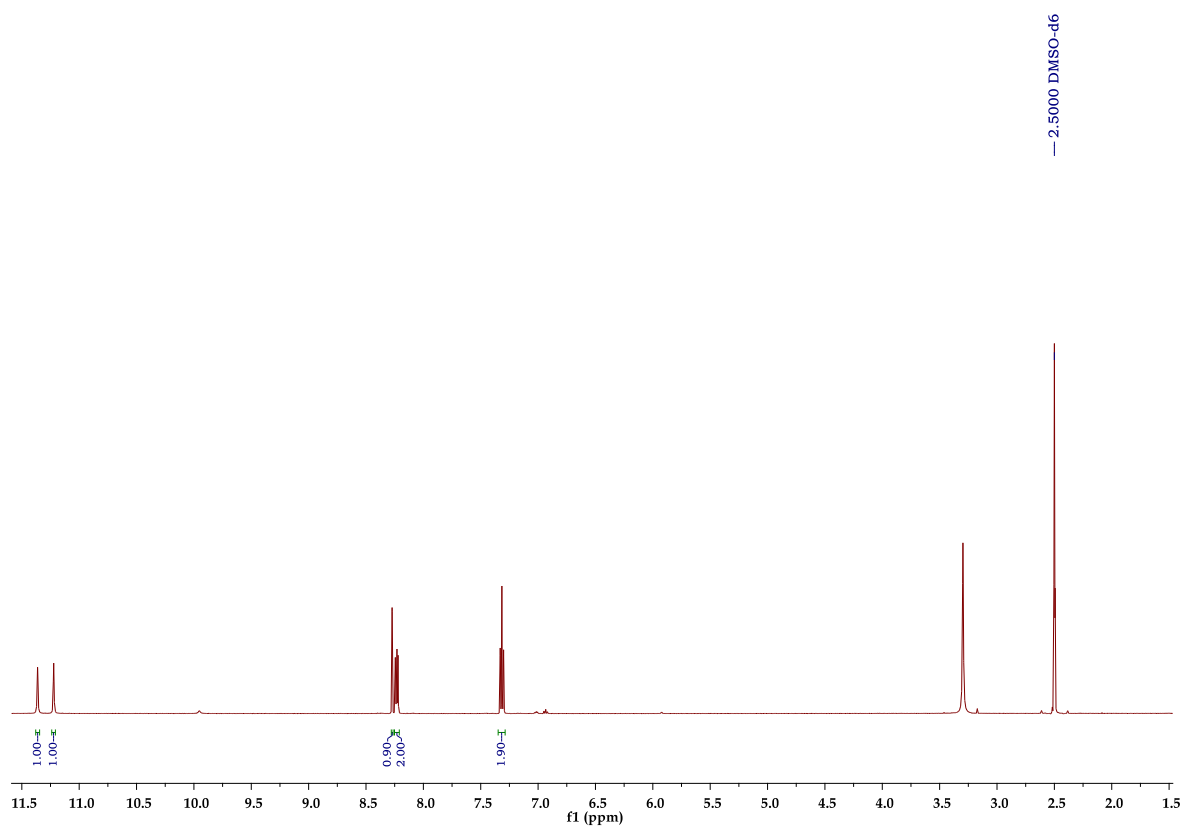
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 10.



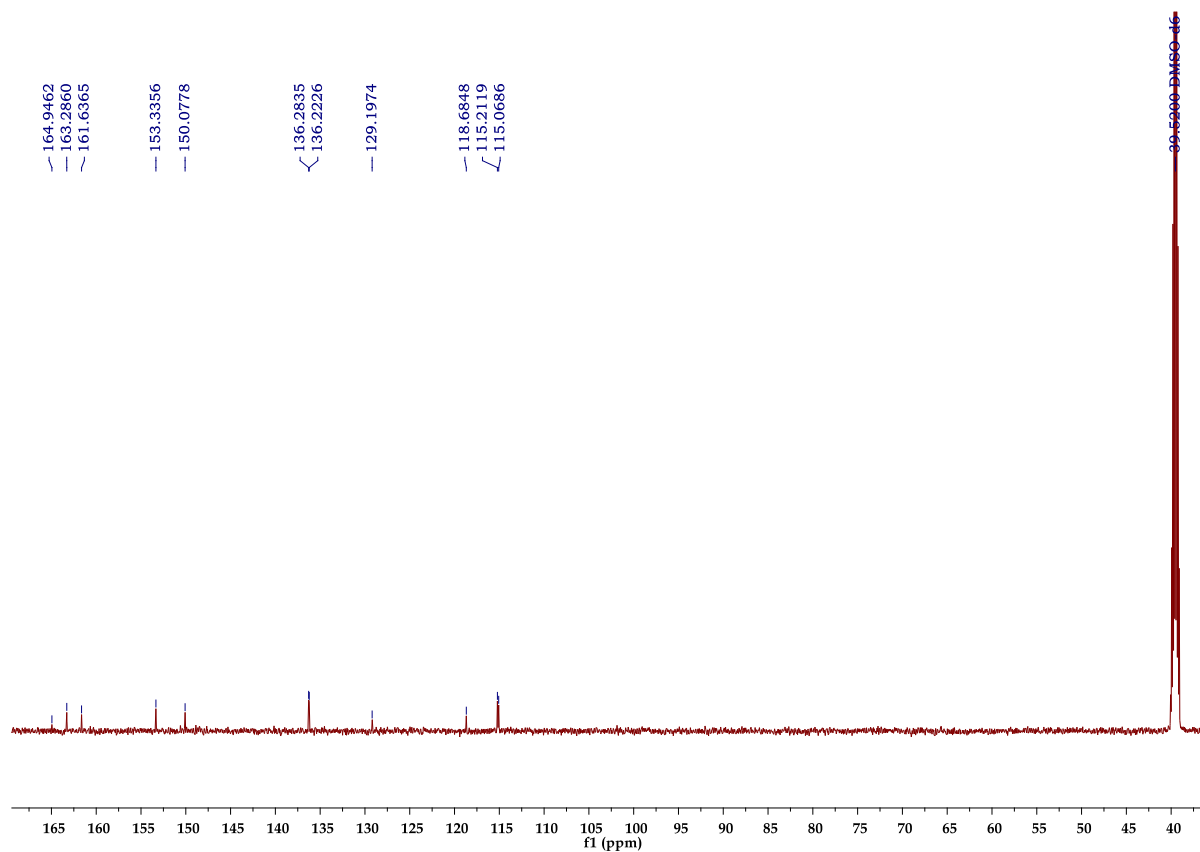
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 10.



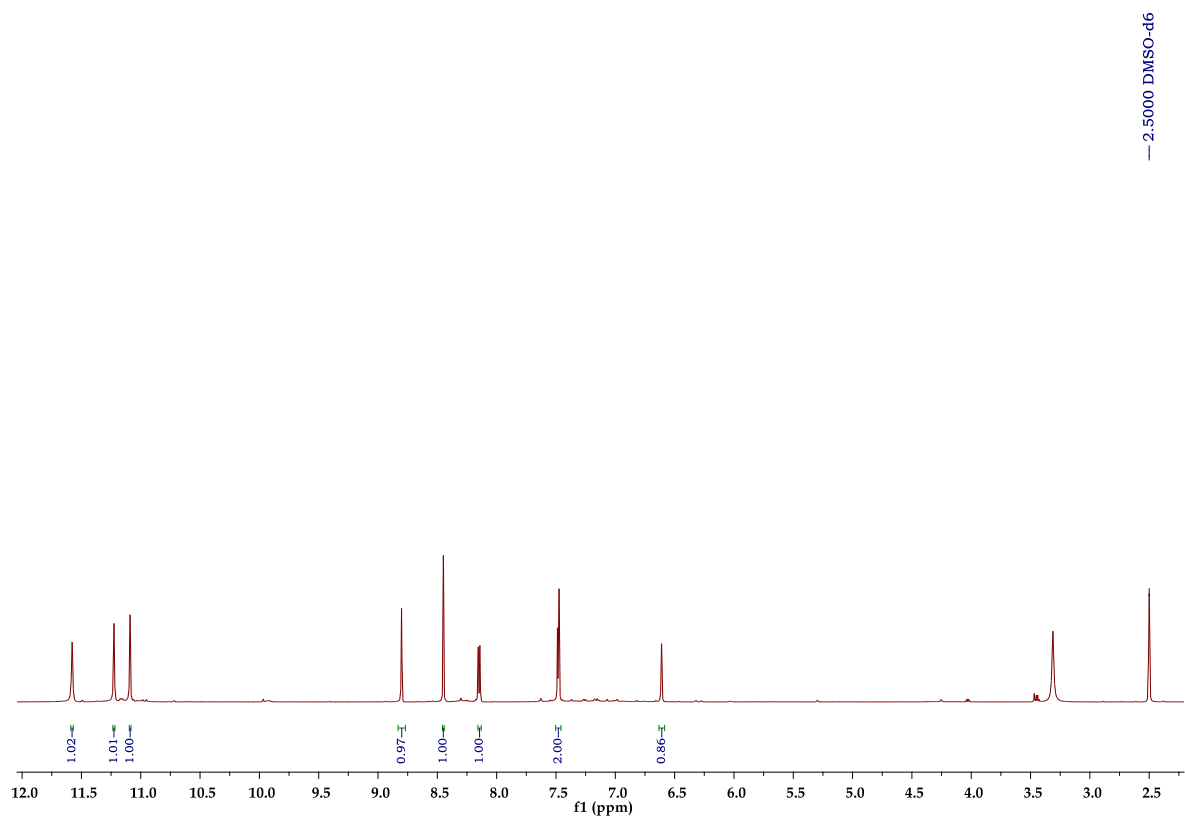
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 11.



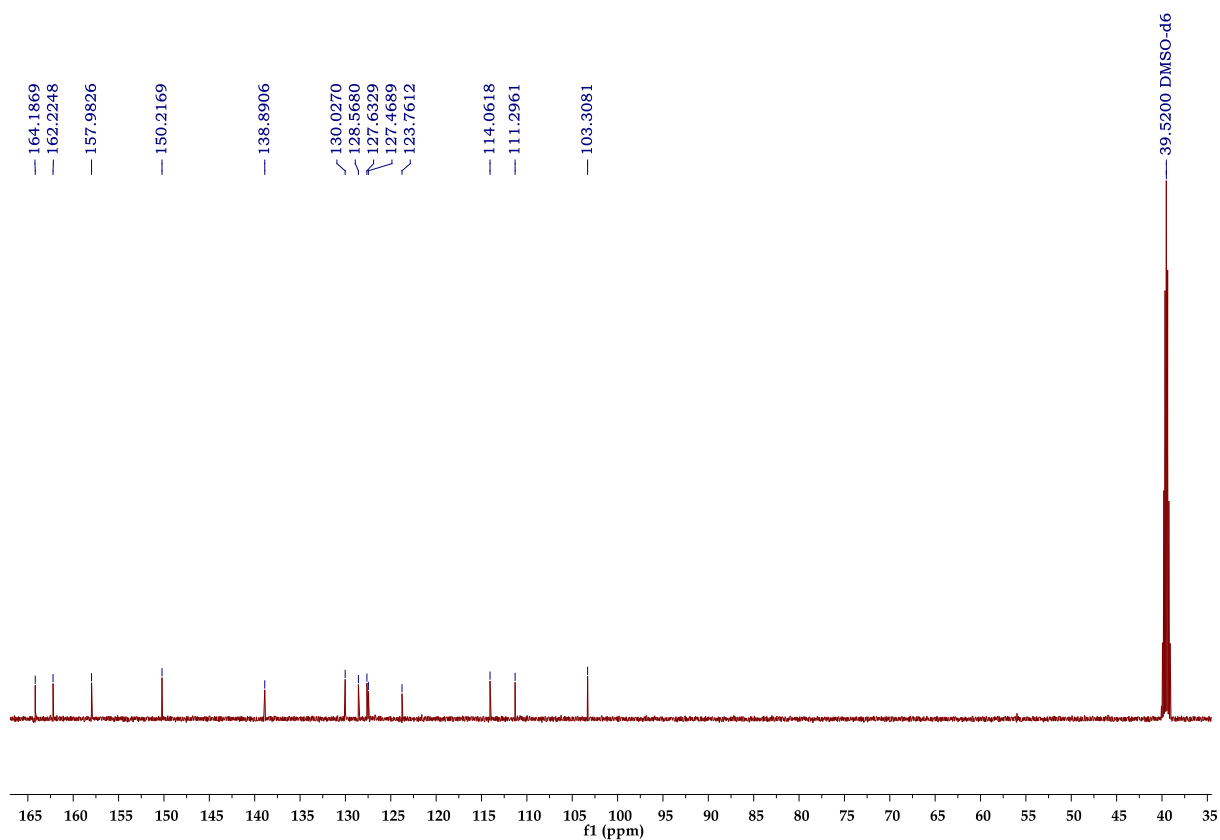
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 11.



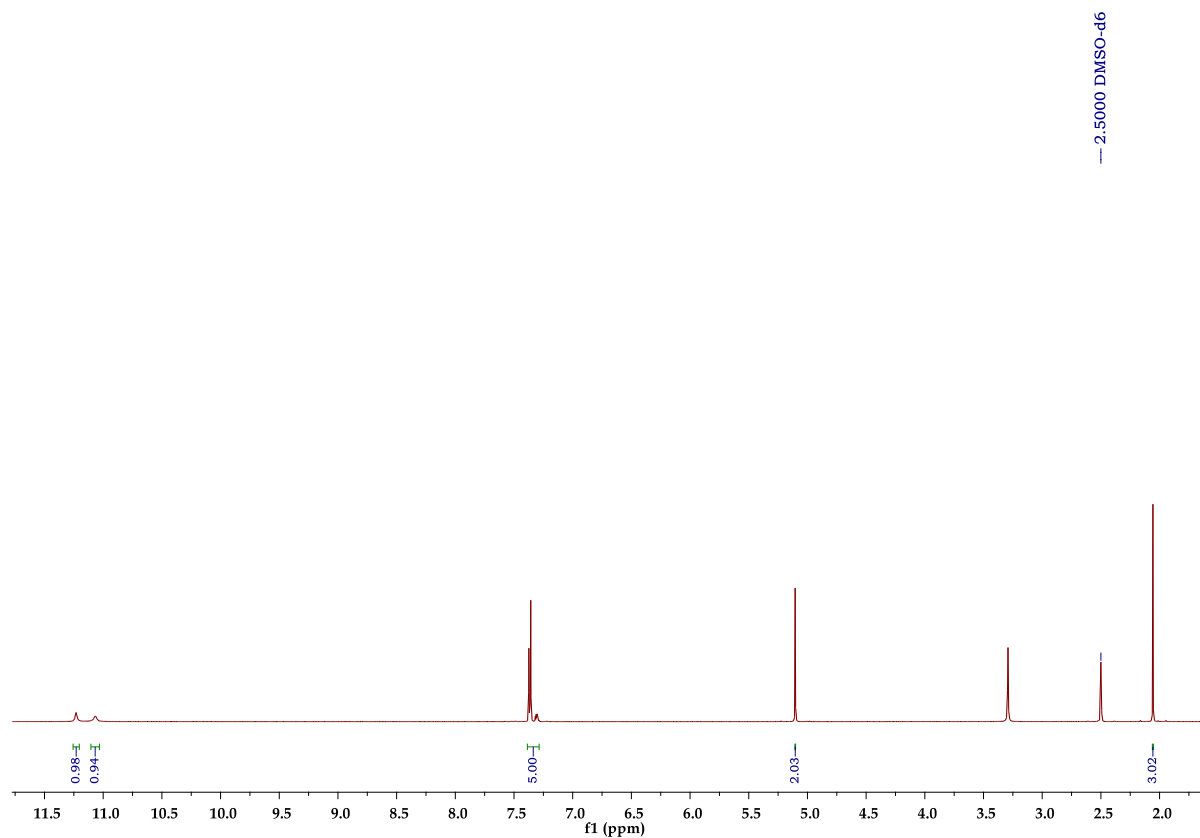
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 12.



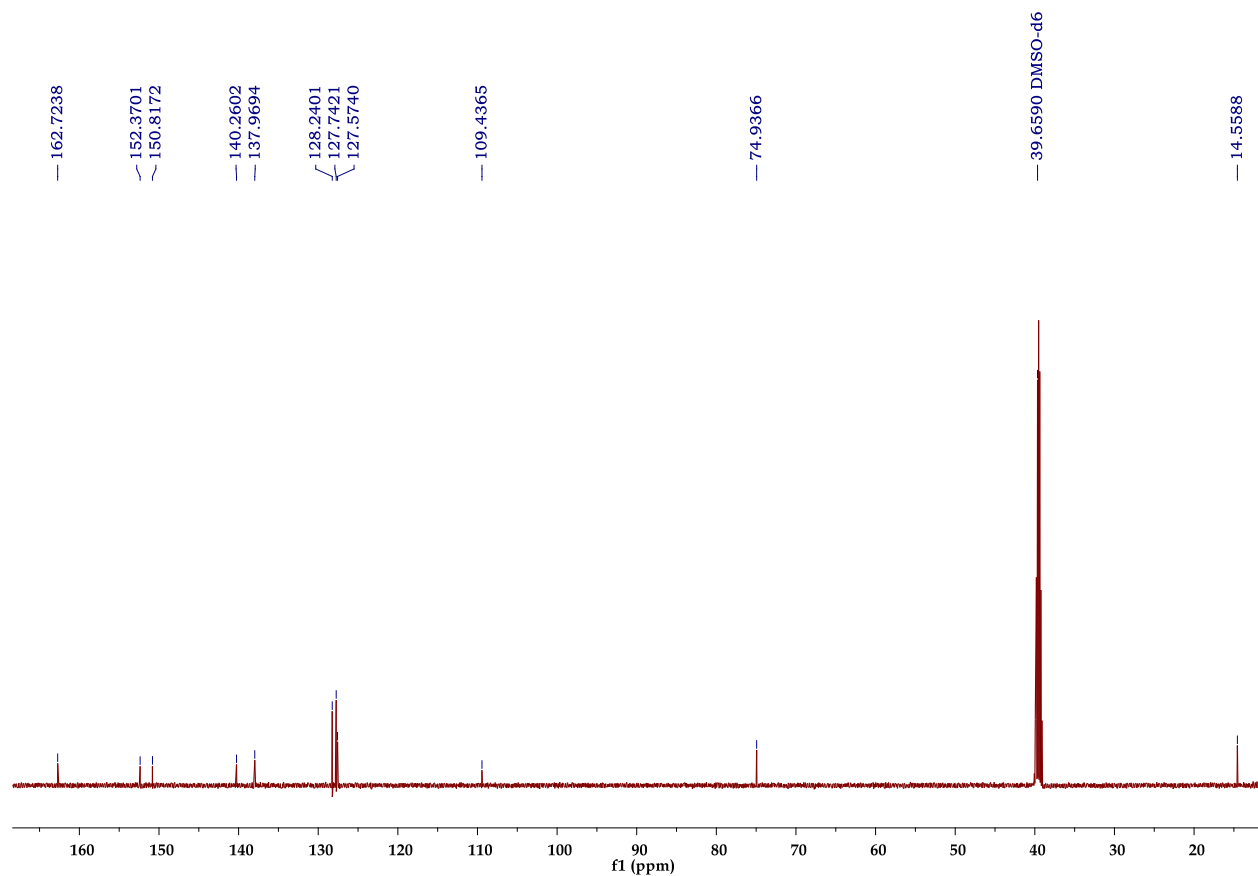
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 12.



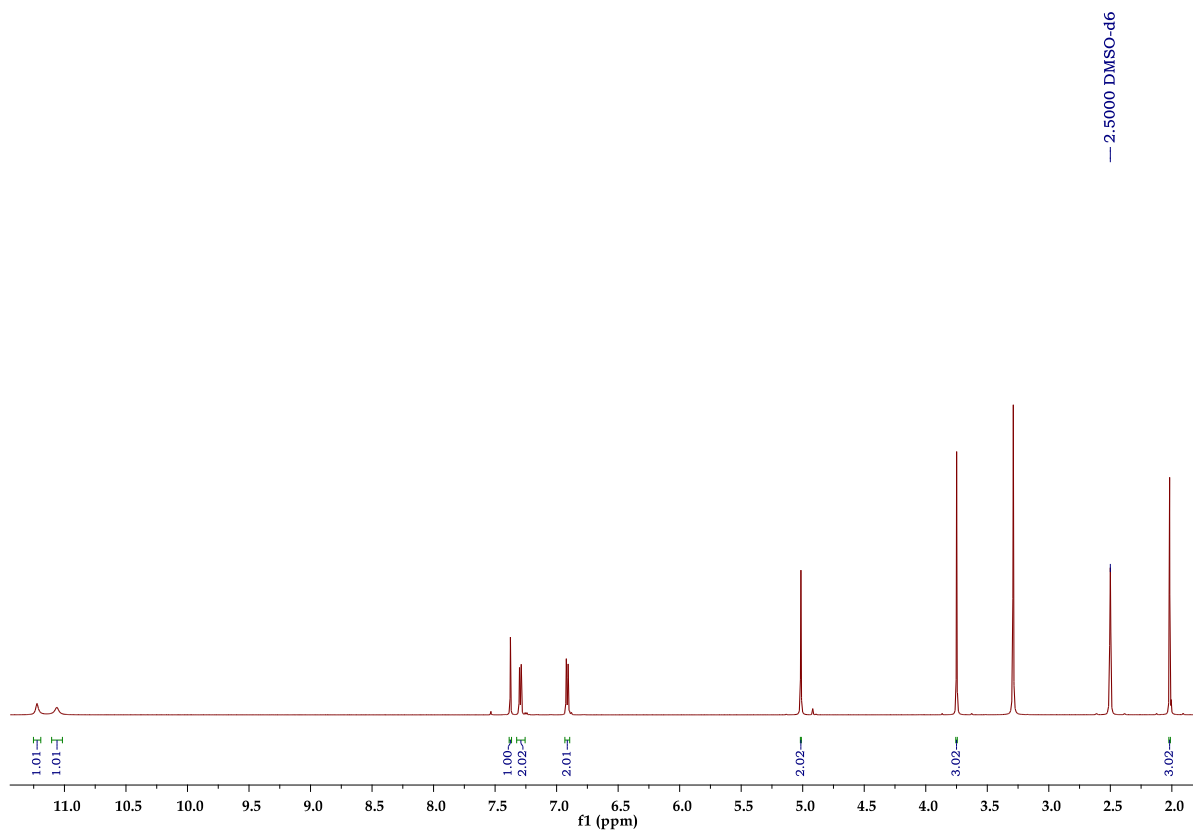
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 13.



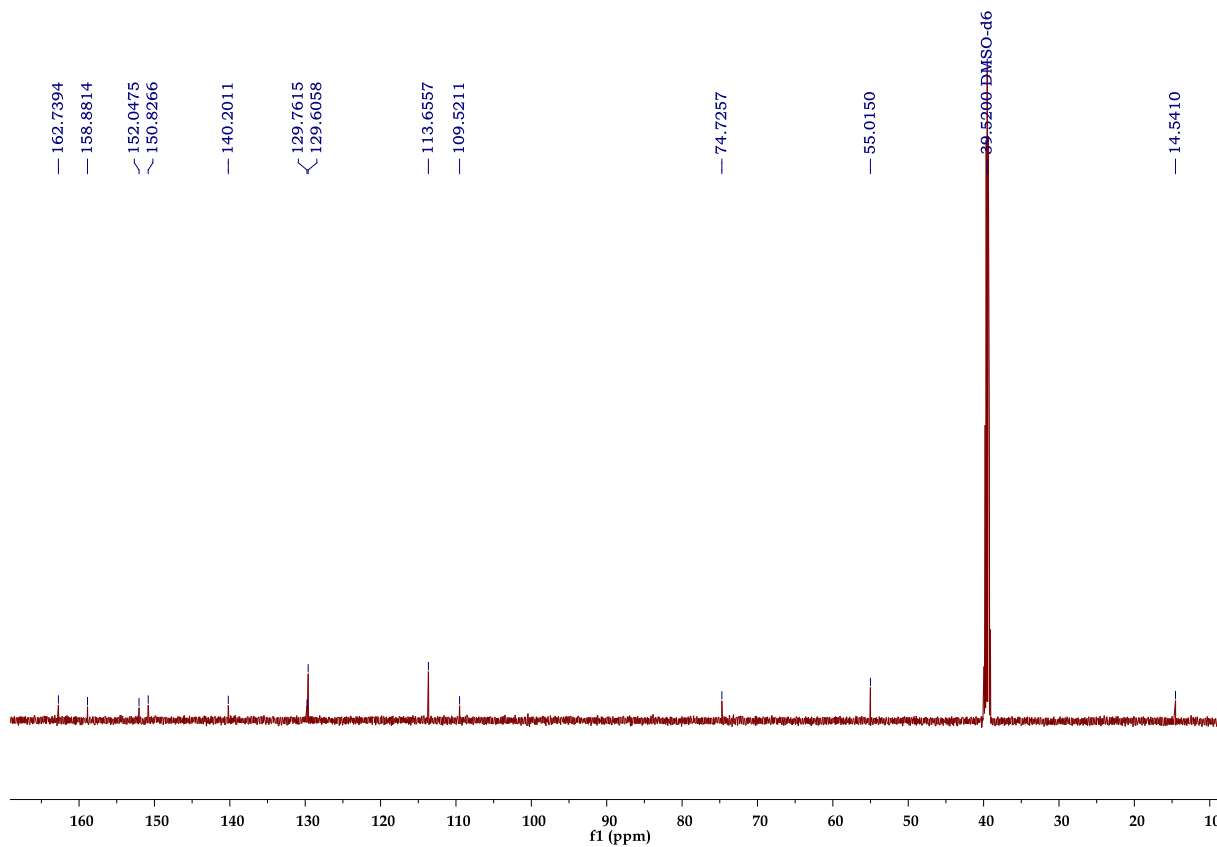
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 13.



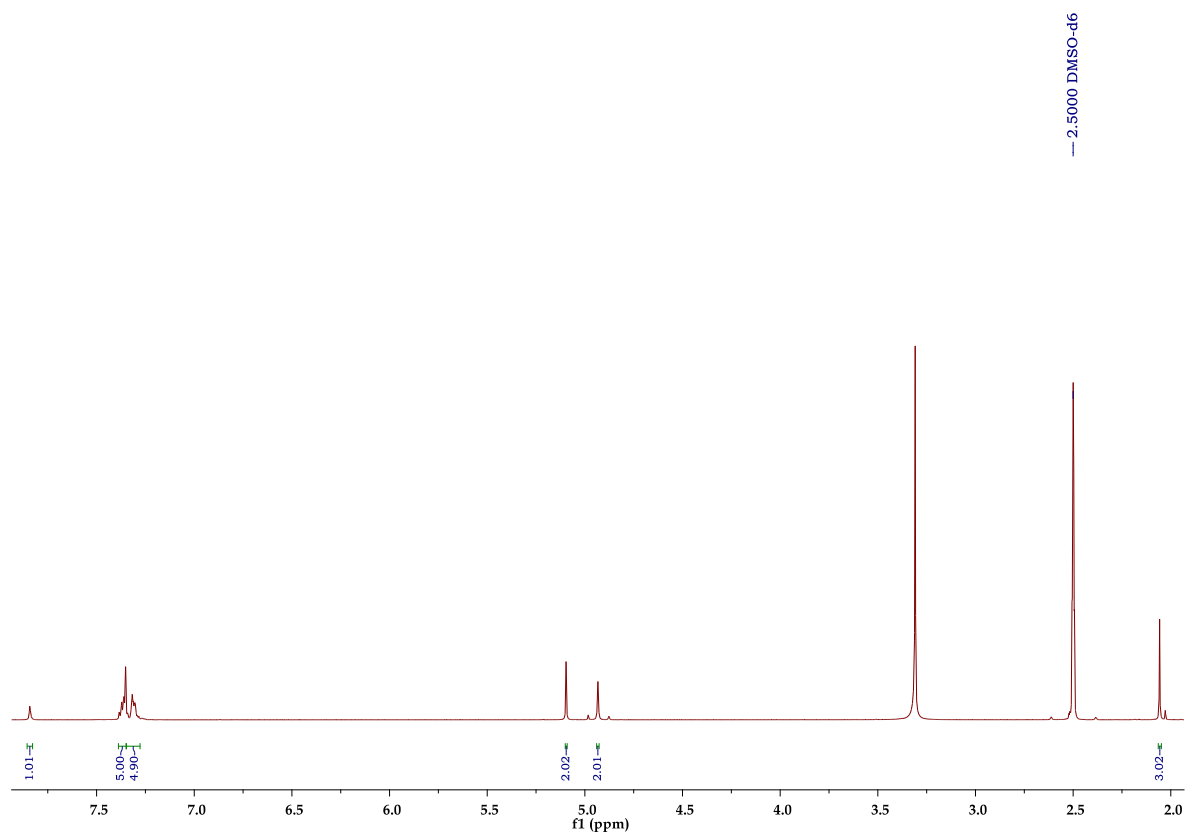
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 14.



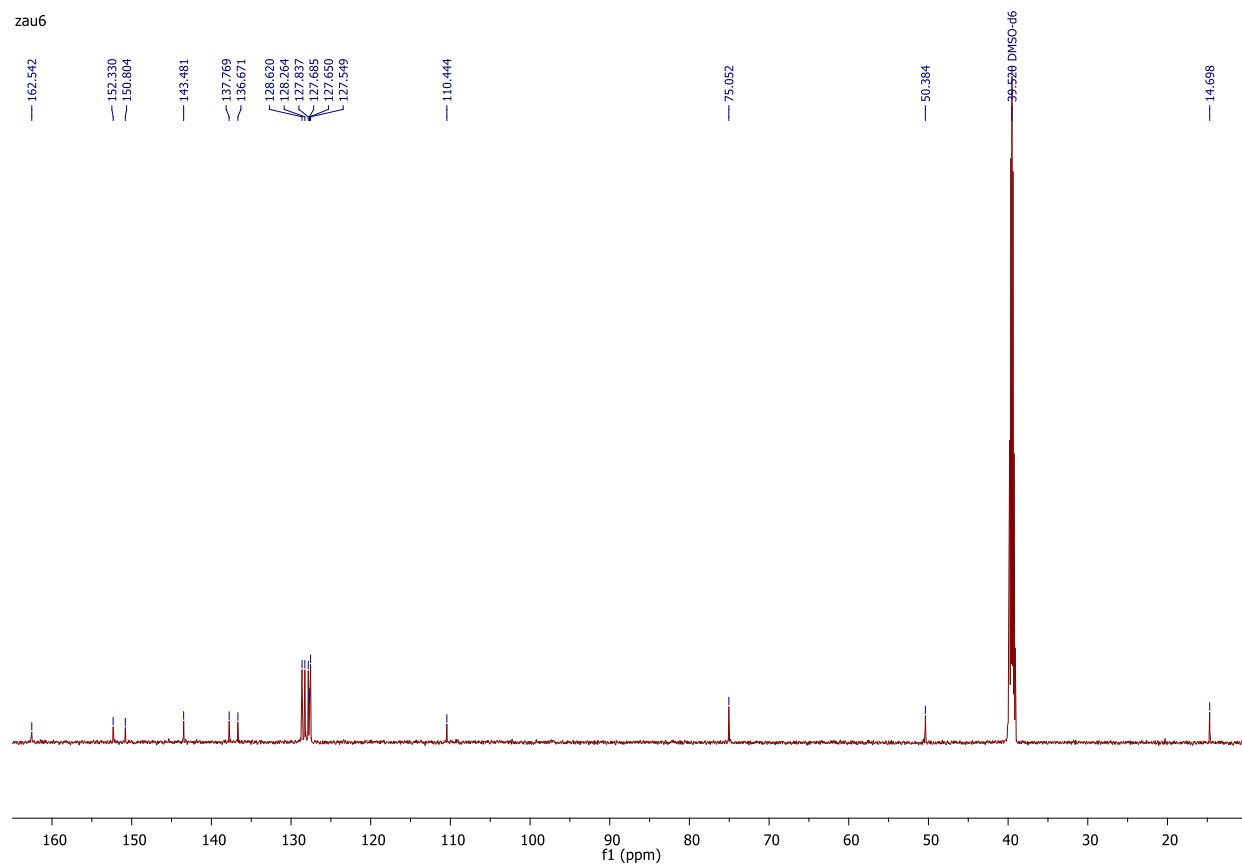
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 14.



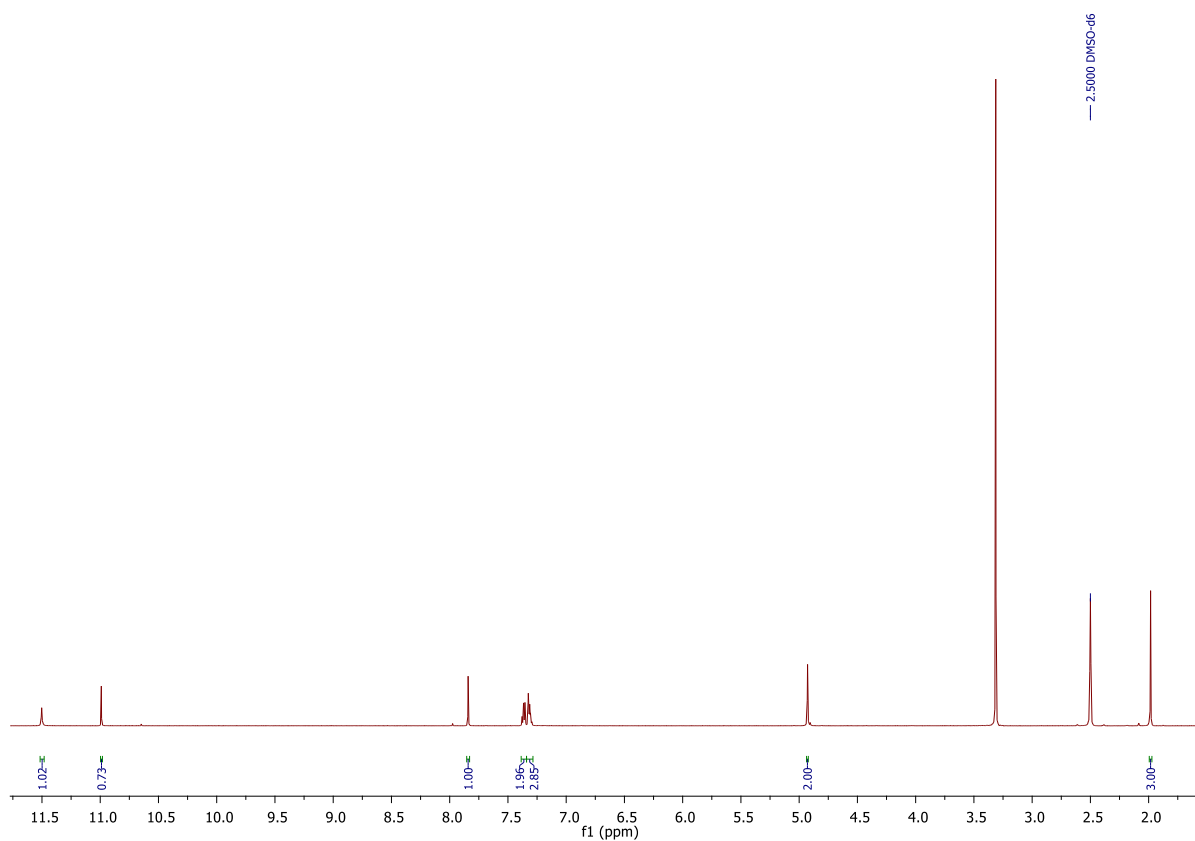
Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 15.



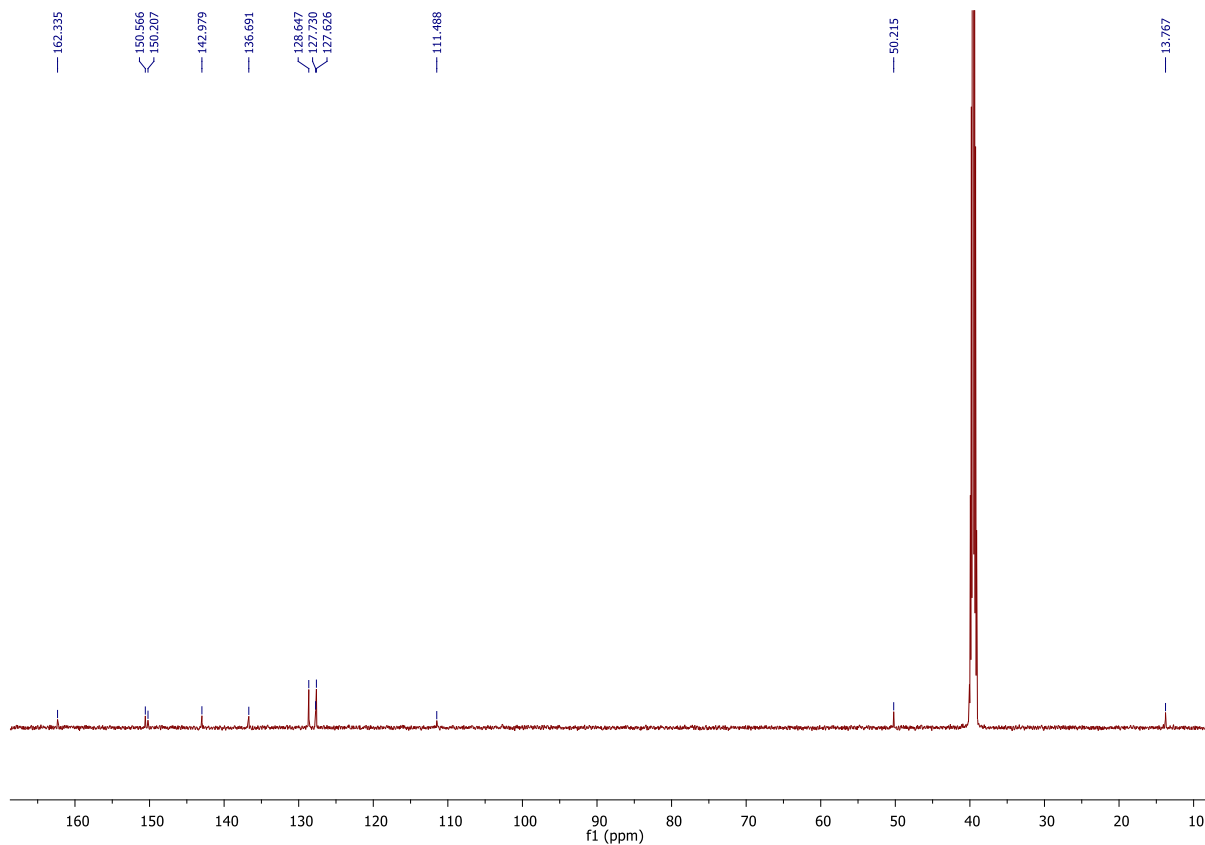
Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 15.



Φάσμα ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 16.



Φάσμα ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) της ένωσης 16.



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chen, B.-J., Wu, Y.-L., Tanaka, Y. & Zhang, W. Small Molecules Targeting c-Myc Oncogene: Promising Anti-Cancer Therapeutics. *Int. J. Biol. Sci.* **10**, 1084–1096 (2014).
2. Yap, J. L. *et al.* Small-molecule inhibitors of dimeric transcription factors: Antagonism of protein–protein and protein–DNA interactions. *MedChemComm* **3**, 541 (2012).
3. Kumar, D., Sharma, N. & Giri, R. Therapeutic Interventions of Cancers Using Intrinsically Disordered Proteins as Drug Targets: c-Myc as Model System. *Cancer Inform.* **16**, 117693511769940 (2017).
4. Wolpaw, A. J. & Dang, C. V. MYC-induced metabolic stress and tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **1870**, 43–50 (2018).
5. Carroll, P. A., Freie, B. W., Mathsyaraja, H. & Eisenman, R. N. The MYC transcription factor network: balancing metabolism, proliferation and oncogenesis. *Front. Med.* **12**, 412–425 (2018).
6. Podar, K. & Anderson, K. C. A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1- dependent signaling pathways. *Cell Cycle* **9**, 1722–1728 (2010).
7. Yin, X., Giap, C., Lazo, J. S. & Prochownik, E. V. Low molecular weight inhibitors of Myc–Max interaction and function. *Oncogene* **22**, 6151–6159 (2003).
8. Vita, M. & Henriksson, M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 318–330 (2006).
9. Lüscher, B. & Larsson, L.-G. The basic region/helix – loop – helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: Function and regulation. *Oncogene* **18**, 2955–2966 (1999).
10. Bretones, G., Delgado, M. D. & León, J. Myc and cell cycle control. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* **1849**, 506–516 (2015).
11. Prochownik, E. V. c-Myc as a therapeutic target in cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **4**, 289–302 (2004).

12. Berg, T. Small-Molecule Modulators of c-Myc/Max and Max/Max Interactions. in *Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions* (eds. Vassilev, L. & Fry, D.) vol. 348 139–149 (Springer Berlin Heidelberg, 2010).
13. Chen, H., Liu, H. & Qing, G. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment. *Signal Transduct. Target. Ther.* **3**, (2018).
14. Cascon, A. & Robledo, M. MAX and MYC: A Heritable Breakup. *Cancer Res.* **72**, 3119–3124 (2012).
15. Kalkat, M. *et al.* MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes* **8**, 151 (2017).
16. Hammoudeh, D. I., Follis, A. V., Prochownik, E. V. & Metallo, S. J. Multiple Independent Binding Sites for Small-Molecule Inhibitors on the Oncoprotein c-Myc. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7390–7401 (2009).
17. Jin, F., Yu, C., Lai, L. & Liu, Z. Ligand Clouds around Protein Clouds: A Scenario of Ligand Binding with Intrinsically Disordered Proteins. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003249 (2013).
18. Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P. & Eisenman, R. N. The Myc/Max/Mad Network and the Transcriptional Control of Cell Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 653–699 (2000).
19. Shi, J., Stover, J. S., Whitby, L. R., Vogt, P. K. & Boger, D. L. Small molecule inhibitors of Myc/Max dimerization and Myc-induced cell transformation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 6038–6041 (2009).
20. Nair, S. K. & Burley, S. K. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* **112**, 193–205 (2003).
21. Andresen, C. *et al.* Transient structure and dynamics in the disordered c-Myc transactivation domain affect Bin1 binding. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6353–6366 (2012).
22. Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J. & Johnson, G. T. Gene expression. in *Cell biology* 179–181 (Elsevier, 2017).

23. Cowling, V. H. & Cole, M. D. Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 242–252 (2006).
24. Varlakhanova, N., Cotterman, R., Bradnam, K., Korf, I. & Knoepfler, P. S. Myc and Miz-1 have coordinate genomic functions including targeting Hox genes in human embryonic stem cells. *Epigenetics Chromatin* **4**, 20 (2011).
25. Bédard, M., Maltais, L., Montagne, M. & Lavigne, P. Miz-1 and Max compete to engage c-Myc: implication for the mechanism of inhibition of c-Myc transcriptional activity by Miz-1: Miz-1 and Max Compete to Engage c-Myc. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **85**, 199–206 (2017).
26. Wanzel, M., Herold, S. & Eilers, M. Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol.* **13**, 146–150 (2003).
27. Bédard, M., Roy, V., Montagne, M. & Lavigne, P. Structural Insights into c-Myc-interacting Zinc Finger Protein-1 (Miz-1) Delineate Domains Required for DNA Scanning and Sequence-specific Binding. *J. Biol. Chem.* **292**, 3323–3340 (2017).
28. Wiese, K. E. *et al.* The Role of MIZ-1 in MYC-Dependent Tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**, a014290–a014290 (2013).
29. Harvey, S. R. *et al.* Small-Molecule Inhibition of c-MYC:MAX Leucine Zipper Formation Is Revealed by Ion Mobility Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 19384–19392 (2012).
30. Metallo, S. J. Intrinsically disordered proteins are potential drug targets. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 481–488 (2010).
31. Hart, J. R. *et al.* Inhibitor of MYC identified in a Krohnke pyridine library. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 12556–12561 (2014).
32. Shachaf, C. M. *et al.* MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* **431**, 1112–1117 (2004).

33. Stellas, D. *et al.* Therapeutic Effects of an Anti-Myc Drug on Mouse Pancreatic Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **106**, (2014).
34. Jain, M. Sustained Loss of a Neoplastic Phenotype by Brief Inactivation of MYC. *Science* **297**, 102–104 (2002).
35. Wang, H. *et al.* Improved low molecular weight Myc-Max inhibitors. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2399–2408 (2007).
36. Choi, S. H. *et al.* Targeted Disruption of Myc–Max Oncoprotein Complex by a Small Molecule. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2715–2719 (2017).
37. Berg, T. *et al.* Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 3830–3835 (2002).
38. Xu, Y. *et al.* A credit-card library approach for disrupting protein–protein interactions. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 2660–2673 (2006).
39. Follis, A. V., Hammoudeh, D. I., Wang, H., Prochownik, E. V. & Metallo, S. J. Structural Rationale for the Coupled Binding and Unfolding of the c-Myc Oncoprotein by Small Molecules. *Chem. Biol.* **15**, 1149–1155 (2008).
40. Mustata, G. *et al.* Discovery of Novel Myc–Max Heterodimer Disruptors with a Three-Dimensional Pharmacophore Model. *J. Med. Chem.* **52**, 1247–1250 (2009).
41. Kiessling, A., Sperl, B., Hollis, A., Eick, D. & Berg, T. Selective Inhibition of c-Myc/Max Dimerization and DNA Binding by Small Molecules. *Chem. Biol.* **13**, 745–751 (2006).
42. Kiessling, A., Wiesinger, R., Sperl, B. & Berg, T. Selective Inhibition of c-Myc/Max Dimerization by a Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine. *ChemMedChem* **2**, 627–630 (2007).
43. Jacob, N. T. *et al.* Synthetic molecules for disruption of the MYC protein-protein interface. *Bioorg. Med. Chem.* **26**, 4234–4239 (2018).
44. Posternak, V. & Cole, M. D. Strategically targeting MYC in cancer. *F1000Research* **5**, 408 (2016).

45. Mo, H. & Henriksson, M. Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 6344–6349 (2006).
46. Mo, H., Vita, M., Crespin, M. & Henriksson, M. A. Myc Overexpression Enhances Apoptosis Induced by Small Molecules. *Cell Cycle* **5**, 2191–2194 (2006).
47. Jiang, H. *et al.* Stabilizers of the Max Homodimer Identified in Virtual Ligand Screening Inhibit Myc Function. *Mol. Pharmacol.* **76**, 491–502 (2009).
48. Hu, M.-H. *et al.* Discovery of a New Four-Leaf Clover-Like Ligand as a Potent *c-MYC* Transcription Inhibitor Specifically Targeting the Promoter G-Quadruplex. *J. Med. Chem.* **61**, 2447–2459 (2018).
49. Prochownik, E. V. & Vogt, P. K. Therapeutic Targeting of Myc. *Genes Cancer* **1**, 650–659 (2010).
50. Yu, C. *et al.* Structure-based Inhibitor Design for the Intrinsically Disordered Protein *c-Myc*. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
51. Carabet, L., Rennie, P. & Cherkasov, A. Therapeutic Inhibition of Myc in Cancer. Structural Bases and Computer-Aided Drug Discovery Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 120 (2018).
52. Yao, R. *et al.* Identification of a novel *c-Myc* inhibitor with antitumor effects on multiple myeloma cells. *Biosci. Rep.* **38**, BSR20181027 (2018).
53. Carabet, L. A. *et al.* Computer-aided drug discovery of Myc-Max inhibitors as potential therapeutics for prostate cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **160**, 108–119 (2018).
54. Evangelidis, T. Structural studies of the oncoproteins *c-Myc* and *PI3K α* and development of new synthetic molecules inhibiting their function. (2017).
55. De Berlin, J. Y. *et al.* Barbituric acid analogs as therapeutic agents.
56. Mohammed Khan, K., Ali, M., Khan, M., Taha, M. & Perveen, S. NH_4Cl Mediated New Protocol for the Synthesis of 5-Arylidene Barbiturates. *Lett. Org. Chem.* **8**, 28–32 (2011).

57. Li, Z. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of matrine derivatives as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 677–683 (2018).
58. de Candia, M. *et al.* New azepino[4,3-b]indole derivatives as nanomolar selective inhibitors of human butyrylcholinesterase showing protective effects against NMDA-induced neurotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **125**, 288–298 (2017).
59. Vasu, N., Guochen, C. & Vinod R., U. Diketo acids with nucleobase scaffolds: anti-HIV replication inhibitors targeted at HIV integrase.