



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

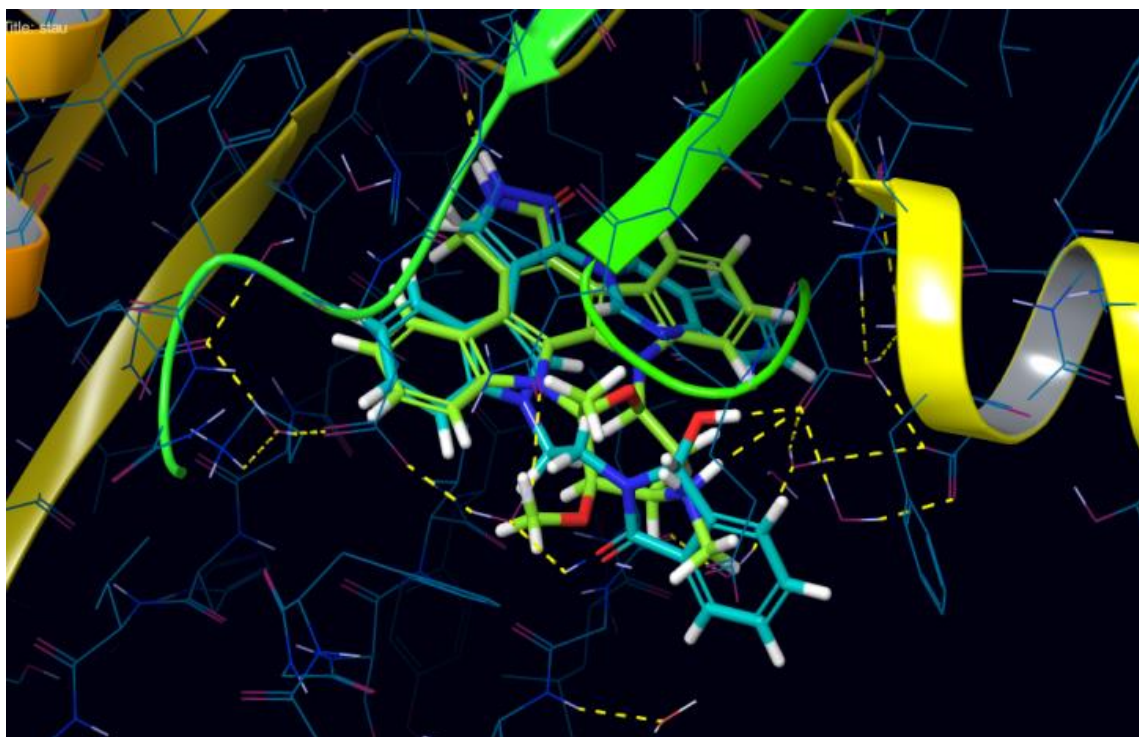
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΑΥΡΟΣΠΟΡΙΝΕ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ P115 ΚΙΝΑΣΗΣ



ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	6
1.2.1 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ	8
1.2.2 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	11
1.3 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ PIM	13
1.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ PIM-1	15
1.4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ PIM-1	15
1.4.2 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ Η PIM-1	16
1.4.2 ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ PIM-1 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	20
1.4.4 ΔΟΜΗ ΤΗΣ PIM-1 ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ	22
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	26
3. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ	41
4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ	41
4.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (PROTEIN PREPARATION WIZARD)	41
4.1.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (GLIDE AND/OR INDUCED FIT DOCKING).....	41
4.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (DOCKING)	42
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ιωάννης Κ. Κωστάκης, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Παναγιώτης Μαράκος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σαμιωτάκη Μαρίνα, Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Βαθμίδας Β', Ινστιτούτο
Βιοκαινοτομίας Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμιγκ»

Ιωάννης Κ. Κωστάκης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ..

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Για την παρούσα εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέως τον επιβλέποντα καθηγητή μου Επίκουρο Καθηγητή Ι. Κ. Κωστάκη, για την ευκαιρία που μου προσέφερε, την καθοδήγηση και τις γνώσεις, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την πολύ καλή συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την τριμελή επιτροπή, τον Καθηγητή κύριο Παναγιώτη Μαράκο, και την Ειδική Λειτουργική Επιστήμονα Βαθμίδας Β' Μαρτίνα Σαμιωτάκη, για τις πολύτιμες συμβουλές τους, το χρόνο και την προσοχή τους.

Ευχαριστώ επιπλέον, τους συνεργάτες μου στο εργαστήριο, Καρέλλου Μαίρη, Κομιανού Κατερίνα, Πάλλα Αλεξάνδρα και Χριστοπούλου Καλλιόπη για τη συννεύση, συνεργασία και βοήθεια τους και ιδιαίτερος την Καλαμπαλίκη Αμαλία για την υπομονή, τη στήριξη αλλά και τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Ξεχωριστά θα ήθελα να δηλώσω τις ευχαριστίες και την αγάπη μου στους γονείς μου και για την υποστήριξη, εμπύχωση, υπομονή και εμπιστοσύνη τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν στόχο για την θεραπεία πολλών ασθενειών όπως ο καρκίνος. Μεταξύ αυτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η κινάση Pim-1, η οποία εμπλέκεται στην εμφάνιση και εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου και ιδιαίτερα στην εμφάνιση μυελογενούς λευχαιμίας και καρκίνου του προστάτη αποτελώντας έναν πολύ ελκυστικό στόχο για τη δημιουργία αναστολέων της. Το αλκαλοειδές Staurosporine και το διΐνδολομαλεΐμίδιο Ruboxistaurin είναι ισχυροί αντικαρκινικοί παράγοντες που αναστέλλουν διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες, συμπεριλαμβανομένης και της Pim-1. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση αναλόγων Staurosporine ως πιθανών αναστολέων της κινάσης Pim-1. Τα νέα παράγωγα φέρουν έναν δακτύλιο πυραζολίου, στο οποίο συνδέεται ένας κινολινικός και ένας ινδολικός δακτύλιος, προσομοιάζοντας έτσι των σκελετό των διΐνδολίων. Για την σύνθεση των παραγώγων χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη το 3-ινδολοακετονιτρίλιο από το οποίο αρχικά συντίθενται οι κατάλληλα υποκατεστημένες 5-[ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-3-αμίνες και στη συνέχεια συντίθεται ο κινολινικός δακτύλιος. Τα νέα παράγωγα βρίσκονται υπό φαρμακολογική αξιολόγηση.

DESIGN AND SYNTHESIS OF STAUROSPORINE ANALOGUES AS POTENT INHIBITORS OF PIM-1 KINASE

ABSTRACT

Protein kinases are targets for numerous diseases, including cancer. Among them, Pim-1 is a serine-threonine kinase with intrinsic activity and implicated in many types of cancer and especially myelogenous leukemia and prostate cancer. The alkaloid Staurosporine and the bis-maleimide Ruboxistaurin own a broad spectrum of antitumor activity. The mechanisms that are involved in these compounds' anticancer properties, are based on their ability to inhibit protein kinases, including Pim-1 and other distinct pathways of antitumor activities. The main goal of this project is to design and synthesize novel hybrids of bisindole derivatives which will include in their main structure the important indole and quinazolinone moieties, linked in a pyrazole ring. The new compounds are under pharmacological evaluation.

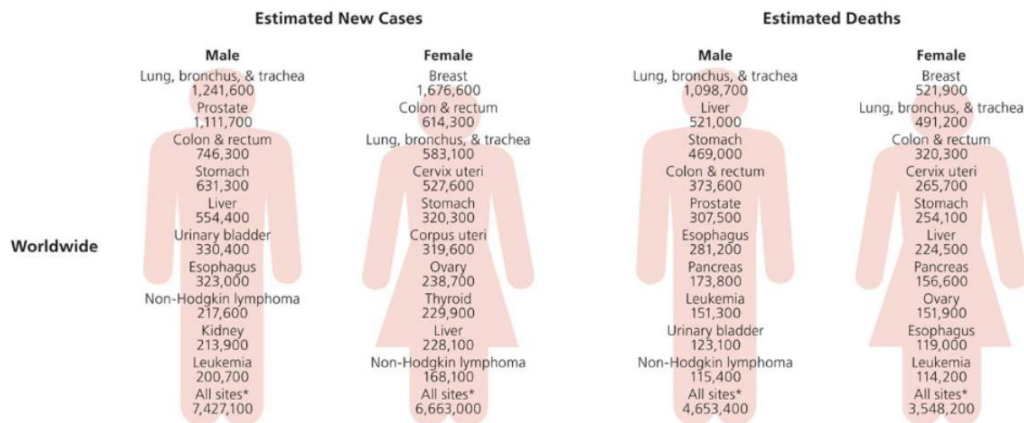
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο καρκίνος είναι μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την εξάπλωσή τους στους περιβάλλοντες ιστούς. Είναι μία από τις κύριες αιτίες θανάτου τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες. Τα περιστατικά αναμένεται να αυξηθούν παγκοσμίως λόγω της αύξησης του ορίου ηλικίας του πληθυσμού, ιδίως στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, στις οποίες κατοικεί το 82% περίπου του παγκόσμιου πληθυσμού. (1)

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια, προκαλείται δηλαδή από αλλαγές στα γονίδια που ελέγχουν τον τρόπο λειτουργίας των κυττάρων, και συγκεκριμένα του κυτταρικού κύκλου. Οι γενετικές αλλαγές που ευθύνονται για τον κίνδυνο εμφάνισης του μπορεί να είναι κληρονομικές ή να οφείλονται σε εξωτερικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα, η κακή διατροφή, η σωματική αδράνεια ή και η έκθεση σε ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA. (1)

Υπολογίζεται ότι 14.1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου και 8,2 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο συνέβησαν το 2012 σε όλο τον κόσμο (Εικόνα 1). Ο καρκίνος του πνεύμονα και του μαστού είναι οι πιο συχνά διαγνωσμένοι τύποι και οι κύριες αιτίες θανάτου από καρκίνο σε άνδρες και γυναίκες, αντιστοίχως. Στις πιο αναπτυγμένες χώρες, ωστόσο, ο καρκίνος του προστάτη είναι ο συχνότερα διαγνωσμένος τύπος στους άνδρες. (1)

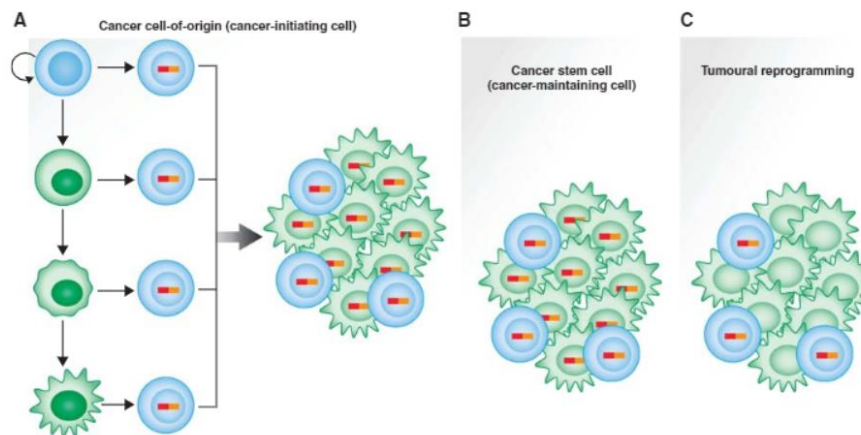


Εικόνα 1: Εκτιμώμενες νέες περιπτώσεις καρκίνου και θάνατοι παγκοσμίως κατά φύλο

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ανθρώπινα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται για να σχηματίσουν νέα κύτταρα, όταν αυτό είναι απαραίτητο για τον οργανισμό. Όταν τα κύτταρα αυτά “γεράσουν” ή καταστραφούν παίρνουν μέρος σε μία διαδικασία που ονομάζεται απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Αυτή η διαδικασία υπόκειται στον κυτταρικό κύκλο, η ροή του οποίου διαταράσσεται στην περίπτωση εμφάνισης καρκίνου. Έτσι νέα κύτταρα σχηματίζονται χωρίς να χρειάζονται, ενώ τα ήδη υπάρχοντα δεν παίρνουν μέρος στη διαδικασία της απόπτωσης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση κυττάρων που δημιουργούν όγκους. Οι όγκοι αυτοί μπορεί να είναι καλοήθεις, να μην εισβάλλουν δηλαδή στους γειτονικούς ιστούς και να μην εξαπλώνονται. Σε αντίθεση με αυτούς, οι κακοήθεις όγκοι μπορεί να είναι μεταστατικοί, που σημαίνει ότι καρκινικά

κύτταρα από αυτούς μπορούν να μεταφερθούν μέσω του αίματος και της λέμφου σε άλλους ιστούς, όπου δίνουν σήματα που ενεργοποιούν γονίδια για την παραγωγή πρωτεϊνών ώστε να δημιουργηθούν νέοι όγκοι. (2)

Οι γενετικές αλλαγές που συμβάλλουν στον καρκίνο τείνουν να επηρεάζουν τρεις κύριους τύπους γονιδίων, τα πρωτο-ογκογονίδια, τα γονίδια καταστολής όγκων και τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA. Τα πρωτο-ογκογονίδια εμπλέκονται στη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Ωστόσο, όταν αυτά μεταβάλλονται με ορισμένους τρόπους ή είναι πιο δραστικά από το φυσιολογικό, μπορεί να γίνουν ογκογονίδια (γονίδια που προκαλούν καρκίνο), επιτρέποντας στα κύτταρα να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν όταν δεν πρέπει. Η έκφραση των ογκογονιδίων δεν είναι υπεύθυνη μόνο για την εμφάνιση του καρκίνου αλλά και για τη διατήρηση της ασθένειας. Το αρχικά υγιές κύτταρο επαναπρογραμματίζεται από το ογκογονίδιο και οδηγεί στη δημιουργία ενός προκαρκινικού κυττάρου με ιδιότητες βλαστοκυττάρου. Το νεοπλασματικό βλαστοκύτταρο θα επαναπρογραμματιστεί για να δημιουργήσει το νέο παθολογικό ιστό αντί για τον κανονικό (Εικόνα 2). (3)



Εικόνα 2: (A) Το κύτταρο στο οποίο λαμβάνει χώρα η πρώτη γενετική βλάβη, συνδέεται με την ανάπτυξη του όγκου. Μπορεί να συναντάται σε οποιοδήποτε στάδιο της φυσιολογικής διαφοροποίησης. (B) Καρκινικά κύτταρα: αυτά τα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να αναγεννήσουν όλη την κυτταρική ποικιλομορφία του όγκου. Διατηρούν ευρύ δυναμικό αυτοανανέωσης και δυναμικό διαφοροποίησης. Εμφανίζονται από το αρχικά τροποποιημένο κύτταρο και στη συνέχεια μπορούν να αυτο-πολλαπλασιαστούν (Γ) Καρκινικός επαναπρογραμματισμός: η αρχική ογκογονική βλάβη χρησιμοποιεί και επαναπροσδιορίζει τον τρόπο μεταγραφής του υγιούς κυττάρου (όπου πλέον δε θα είναι απαραίτητη η παρουσία της αρχικής ογκογονικής βλάβης), για να δημιουργήσει τη νέα κυτταρική διαφοροποίηση, οδηγώντας στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Με βάση τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι σήμερα, τα αντικαρκινικά φάρμακα στοχεύουν στον περιορισμό της εξέλιξης του καρκίνου ή στη θεραπεία του. Τα περισσότερα από τα κυτταροτοξικά αντικαρκινικά φάρμακα στην τρέχουσα χρήση έχει αποδειχθεί ότι επάγουν την απόπτωση των κυττάρων. Προκαλούν αναστολή της διαίρεσης και ανάπτυξης των κυττάρων μέσω διαφόρων τρόπων, όπως ο διαχωρισμός της αλυσίδας του DNA και αλλαγές στη συμπύκνωση της χρωματίνης, επάγοντας τελικά την απόπτωση. Αντικαρκινικά φάρμακα ευρείας χρήσης αποτελούν τα γλυκοκορτικοειδή, οι αναστολείς τοποϊσομεράσης, οι παράγοντες αλκυλίωσης, οι αντιμεταβολίτες και οι αντι-ορμόνες. Ωστόσο, αυτά τα φάρμακα μπορεί να καταστρέφουν και φυσιολογικά κύτταρα που διαιρούνται και αναπτύσσονται γρήγορα, γεγονός το οποίο έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην εύρεση νέων φαρμάκων με εκλεκτική δράση. (4) Ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αντικαρκινικοί στόχοι εμφανίζουν κάποιες πρωτεΐνες, οι κινάσες. Τα τελευταία 10 χρόνια αναπτύσσονται φάρμακα έναντι συγκεκριμένων κινασών, που εμπλέκονται στην

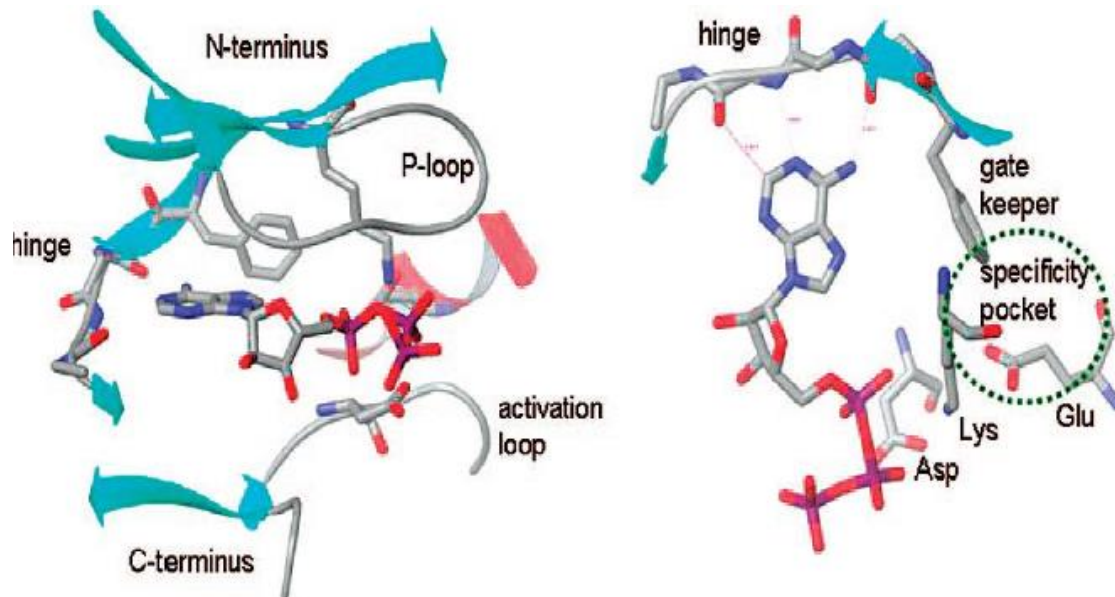
ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Αυτές οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε πολλές οδούς σηματοδότησης των φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων καλύπτοντας συνεπώς ευρύ φάσμα από τη βιολογία έως την υποξία του όγκου και από την αγγειογένεση προς τις οδούς κυτταρικού θανάτου. (5)

1.2 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

1.2.1 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων, τα οποία μεσολαβούν στην απόκριση των κυττάρων στα εξωτερικά ερεθίσματα, με τη διαδικασία της φωσφορυλίωσης. (5) Κατά τη διαδικασία αυτή μεταφέρεται μια φωσφορική ομάδα από ένα δότη φωσφορικής ομάδας σε ένα αμινοξύ-δέκτη μιας πρωτεΐνης με ρόλο υποστρώματος (Εικόνα 4). Γενικά, η φωσφορική ομάδα γ του ATP ή άλλου τριφωσφορικού νουκλεοζίτη είναι ο δότης, αλλά μεμονωμένα ένζυμα μπορεί να έχουν και άλλους δότες φωσφορικών ομάδων. (6)

Όλες οι κινάσες διαθέτουν μία καταλυτική περιοχή στην οποία περιέχεται ένας θύλακας, όπου συνδέεται το ATP. (7) Η καταλυτική περιοχή της πρωτεϊνικής κινάσης έχει 2 υποπεριοχές, N- και C-τελικό άκρο. Ο N-λοβός περιέχει ένα συνεχή βρόγχο, πλούσιο σε γλυκίνη, ο οποίος αναφέρεται ως G-loop και διαμορφώνεται ανάλογα με την κατάσταση της πρωτεϊνικής κινάσης. Ο G-loop καλύπτει και αγκιστρώνει τα μη μεταφερόμενα φωσφορικά ATP. Και οι δύο υποπεριοχές συνδέονται με μία σύνδεση πεπτιδικής φύσεως, η οποία σχηματίζει μία ενεργή θέση με ένα μπροστινό θύλακα (καταλυτικές θέσεις), όπου γίνεται η πρόσδεση του ATP και ένα πίσω θύλακα, που περιλαμβάνει στοιχεία σημαντικά για τη ρύθμιση της κατάλυσης της κινάσης. Η πρόσβαση στον πίσω θύλακα ελέγχεται από ένα διατηρημένο υπόλειμμα λυσίνης και ένα υπόλειμμα «gatekeeper». Η καταλυτική περιοχή δεν είναι διαθέσιμη όταν είναι ενεργή, επειδή οι έλικες των N- και C-τελικών άκρων περιστρέφονται προς τα μέσα. Η ενεργοποίηση της καταλυτικής περιοχής λαμβάνει χώρα μέσω της φωσφορυλίωσης του βρόγχου ενεργοποίησης ή μέσω ενός αλλοστερικού μηχανισμού. Επιπλέον, οι κινάσες έχουν μη καταλυτικές περιοχές που επιτρέπουν τη σύνδεση των υποστρωμάτων και την πρόσληψη άλλων πρωτεϊνών σηματοδότησης. (8,9)

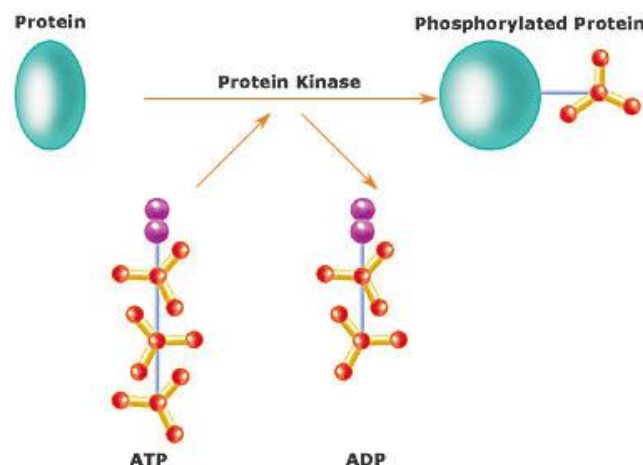


Εικόνα 3: Απεικόνιση ενεργού κέντρου πρωτεϊνικής κινάσης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούνται με τη φωσφορυλίωση, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί μία σειρά διαδικασιών που οδηγούν στη φωσφορυλίωση διαφορετικών αμινοξέων. Η ενεργοποίηση ή η απενεργοποίηση της κινάσης συμβαίνει με διάφορους τρόπους:

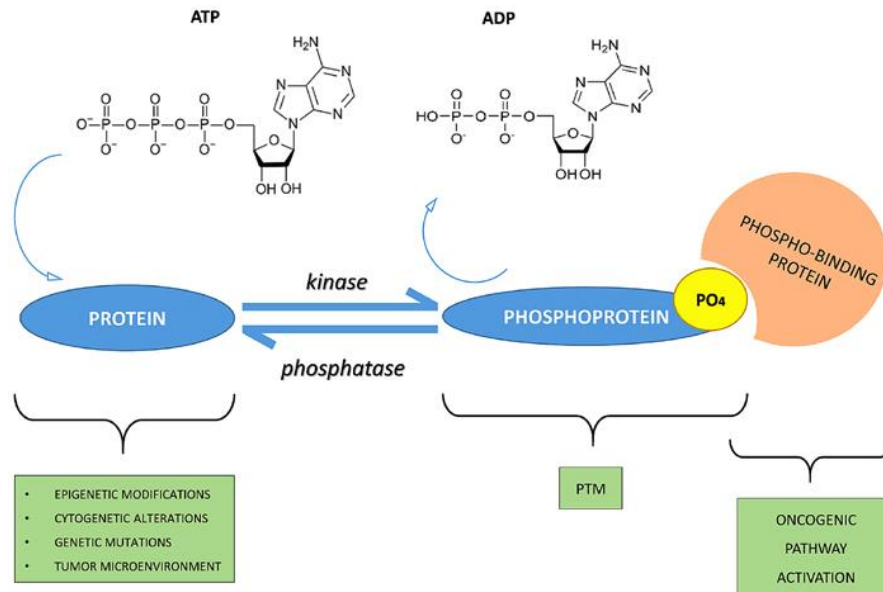
- α) μέσω της ίδιας της κινάσης με *cis*-φωσφορυλίωση / αυτοφωσφορυλίωση,
- β) συνδεδεμένες με μια πρωτεΐνη ενεργοποιητή ή αναστολέα ή
- γ) ελέγχοντας τον εντοπισμό τους στο κύτταρο σε σχέση με το υπόστρωμα τους.

Έτσι, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, τον μεταβολισμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. (7,9) Η φωσφορυλίωση κατέχει επίσης κρίσιμο ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία, στην ομοιόσταση και στη λειτουργία του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος. (8)



Εικόνα 4: Διαδικασία φωσφορυλίωσης

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια αποτελούνται κυρίως από πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες και τις πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν ως υποστρώματα. Ο μηχανισμός λειτουργίας των κινασών και των φωσφατασών είναι ανταγωνιστικός όσον αφορά τη ρύθμιση των καταστάσεων φωσφορυλίωσης κοινών υποστρωμάτων. (7) (Εικόνα 4)

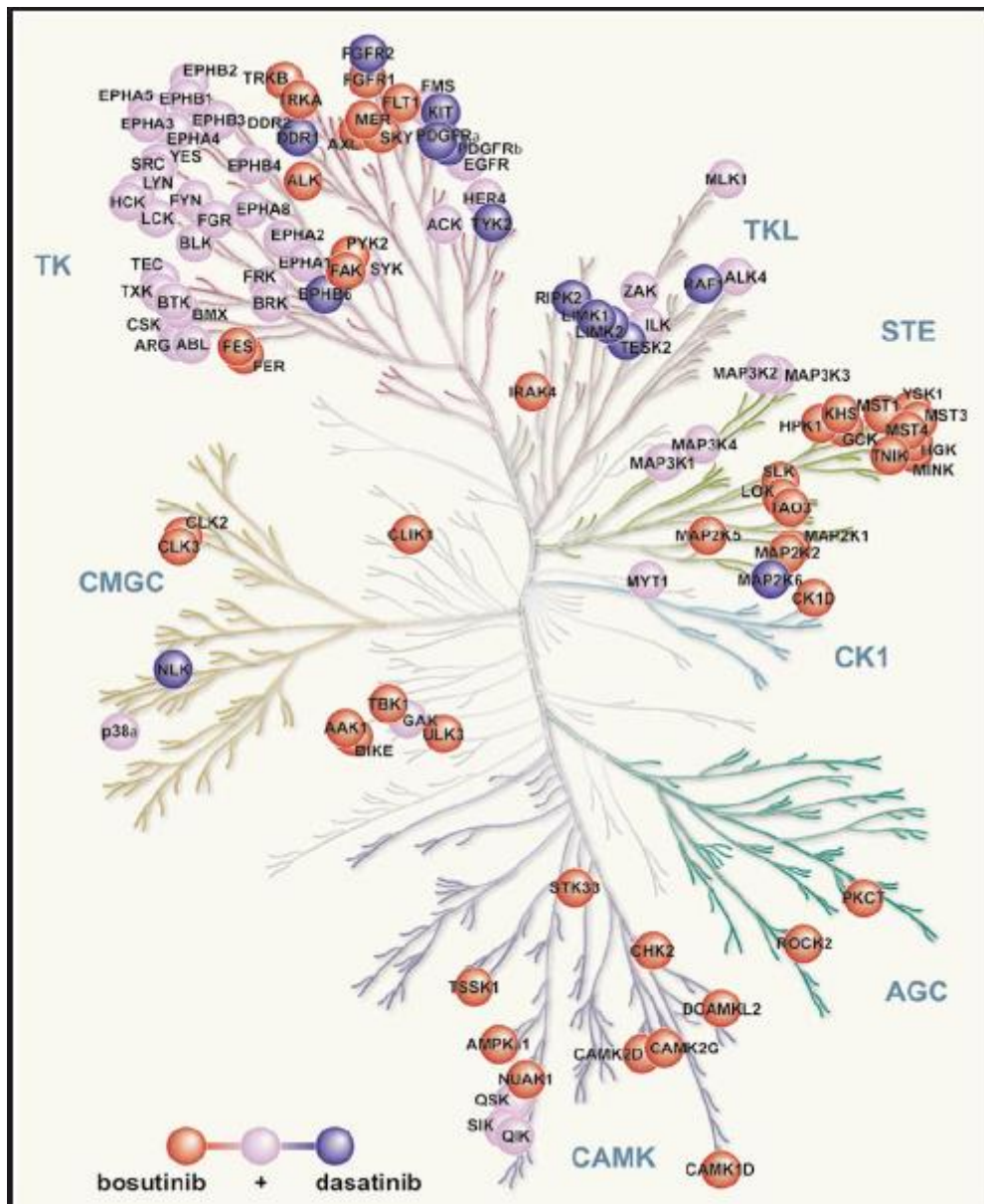


Εικόνα 5: Φωσφοσηματοδοτικά δίκτυα. Η φωσφορυλίωση είναι μία αναστρέψιμη διαδικασία λόγω της ανταγωνιστικής δράσης της κινάσης έναντι της φωσφατάσης.

Το ανθρώπινο κίνωμα αποτελείται από περισσότερες από 500 πρωτεϊνικές κινάσες, γι' αυτό και θεωρείται μία από τις μεγαλύτερες οικογένειες γονιδίων. (10) Οι ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες έχουν κατηγοριοποιηθεί σύμφωνα με την αλληλουχία των αμινοξέων στην καταλυτική τους περιοχή, καθώς και με βάση το υπόστρωμα που φωσφορυλιώνουν στις παρακάτω οικογένειες:

- AGC: Κινάσες σερίνης-θρεονίνης, που περιλαμβάνουν τις υποκατηγορίες PDK1, PKB/Akt, SGK, PKO, PKK / PKN, MSK, RSK, S6K, PKA, PKO, CRIK, MAST, GRK, Sgk494 και YANK.
- CAMK: Κινάσες σερίνης-θρεονίνης, των οποίων η λειτουργία εξαρτάται από το σύστημα Ca^{2+} /καλμοδουλίνης. Η μεταφορά της φωσφορικής ομάδας γίνεται με σκοπό την αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου. Μετά την ενεργοποίησή τους, φωσφορυλιώνουν πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες. Μέλη της οικογένειας αυτής είναι: CaMKI, CaMKII, CaMKIII, CaMKIV και CaMKV.
- CK1: Κινάσες σερίνης-θρεονίνης, που περιλαμβάνουν τις υποκατηγορίες: TTBK (κινάση τουμπουλίνης) και VRK.
- CMGC: Κινάσες σερίνης-θρεονίνης, που περιλαμβάνουν τις CDK, CDKL, CLK, DYRK, GSK, MAPK, RCK και SRPK.
- STE: Περιλαμβάνει 3 κινάσες σερίνης-θρεονίνης τις STE20, STE11, STE7, οι οποίες ενεργοποιούν η μία την άλλη και στη συνέχεια ενεργοποιούν τις MAPK.
- TKL: Κινάσες σερίνης-θρεονίνης, που προσομοιάζουν τις κινάσες τυροσίνης. Μέλη αυτής της ομάδας είναι: MLK, RAF, STKR, LRRK, LISK, IRAK και RIPK

- TK: Κινάσες τυροσίνης (7,11,12)



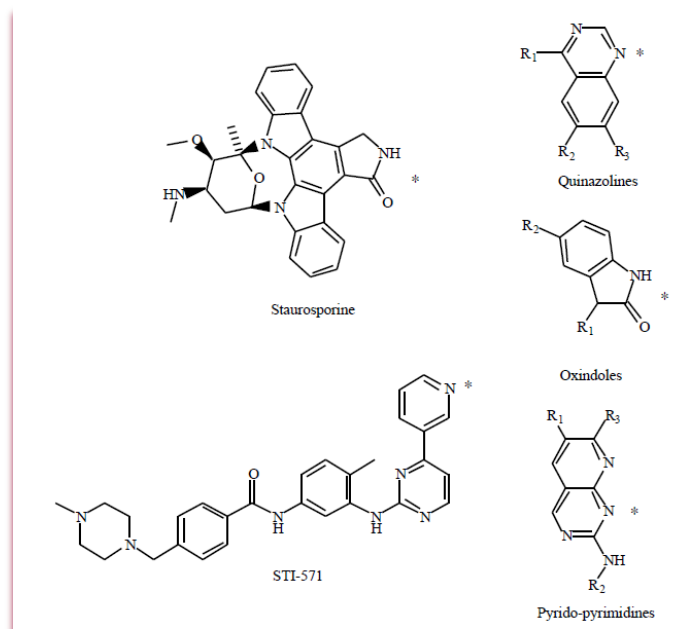
Εικόνα 6: Φυλογενετικό δέντρο των ανθρώπινων κινασών

1.2.2 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

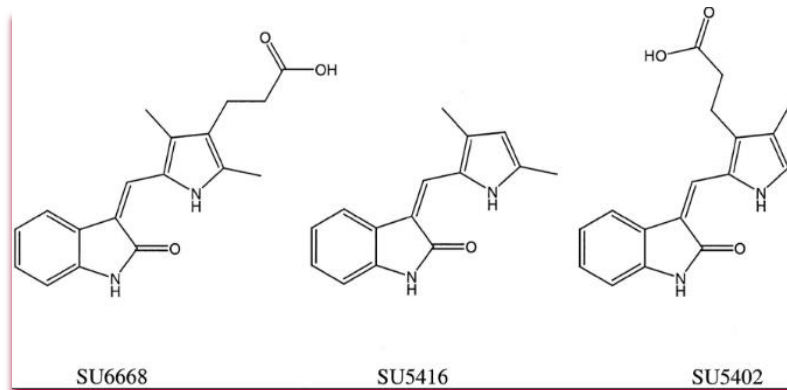
Η φωσφορυλίωση είναι μία από τις διαδικασίες που εμπλέκονται στη ρύθμιση των πολλαπλών βιολογικών διεργασιών. Μεταλλάξεις ή ελαττώματα στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς μπορούν να οδηγήσουν σε ανώμαλη ενεργοποίηση ή απορρύθμιση του μονοπατιού σηματοδότησης μίας κινάσης και αυτή είναι η βάση της ογκογένεσης. Πολλές βασικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων είναι στόχοι των κινασών. Η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας σε μια πρωτεΐνη μπορεί να αλλάξει τη δραστηριότητά της και η δράση λειτουργεί ως διακόπτης ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης της πρωτεΐνης. Στη χρόνια μυελογενή

λευχαιμία για παράδειγμα, μία συγκεκριμένη χρωμοσωμική μετατόπιση (χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας) αναγνωρίστηκε ότι δημιουργεί μία πρωτότυπη πρωτεΐνη που είναι πάντα ενεργή, το ρετινοβλάστωμα, PRB. Η διαδικασία που κανονικά ελέγχεται από αυτή την πρωτεΐνη βρίσκεται συνεχώς σε εξέλιξη, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση κυττάρων και τη δημιουργία όγκων. Τα μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζονται από πρωτεϊνικές κινάσες συμβάλλουν στην εμφάνιση και την εξέλιξη σχεδόν όλων των τύπων καρκίνου. Κατά συνέπεια, η μελέτη τους με σκοπό τη στοχευμένη θεραπεία θα μπορούσε να έχει σημαντική θεραπευτική χρησιμότητα. (8)

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν ελκυστικούς στόχους για τη δημιουργία αναστολέων, λόγω του ότι παρουσιάζουν υψηλό «drugability» (δηλαδή, μεγάλη ευαισθησία στη διαμόρφωση τους από μικρά μόρια αναστολείς). Όλες οι κινάσες κατέχουν μια θέση σύνδεσης για το ATP, και στη συντριπτική τους πλειονότητα οι αναστολείς κινάσων που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα είναι ανταγωνιστές του ATP, μιμούμενοι τις αλληλεπιδράσεις δέσμευσης της χαρακτηριστικής ομάδα αδενοσίνης στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης-στόχου. Γενικά ο καταλυτικός μηχανισμός σύνδεσης του ATP διατηρείται στις διάφορες οικογένειες κινάσων. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μεγάλη ποικιλομορφία και διαφοροποίηση γύρω από το ενεργό τους κέντρο, κάτι το οποίο μπορεί να φανεί πολύ χρήσιμο στην επίτευξη εξειδικευμένης αναστολής. Αρκετοί αναστολείς επίσης, έχουν δείξει να έχουν πρόσβαση σε περιοχές έξω από την θέση πρόσδεσης του ATP, και/ή προκαλούν σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στις κινάσες-στόχο τους. Ενδεικτικά, κάποιος από τους αναστολείς κινάσων που έχουν σχεδιαστεί είναι ο STI-571, ο οποίος έχει εγκριθεί από τον FDA με το όνομα imatinib, ως ισχυρός αναστολέας του συνεχώς ενεργού συμπλέγματος Bcr-Abl, υπεύθυνο για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία και ο SU6668, που αναστέλλει τους KDR, FGFR1 και PDGFRb υποδοχείς, προκαλώντας αντι-αγγειογενετική και προαποπτωτική δράση. (11)



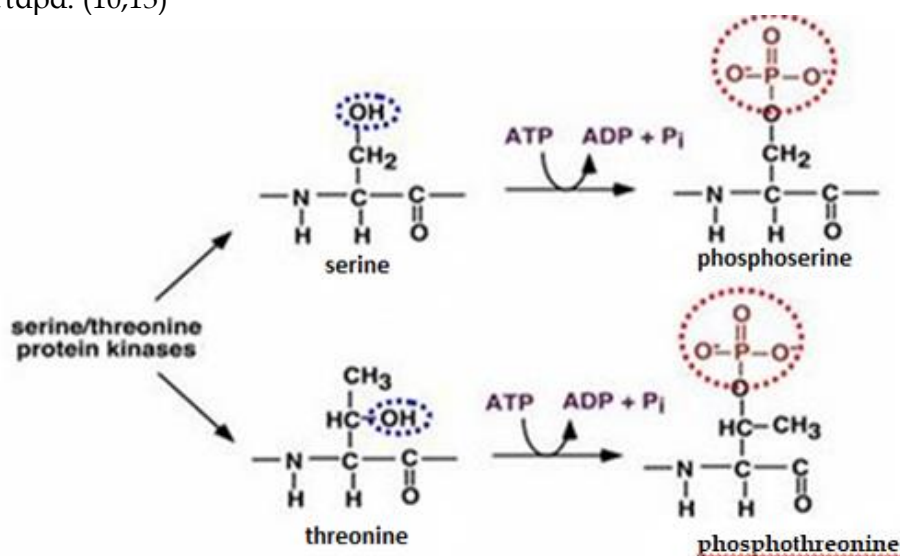
Εικόνα 7: Αναστολείς κινάσων: Η Staurosporine (πάνω αριστερά) είναι ένας ισχυρός αναστολέας κινάσων, ενώ ο STI-571 (Gleevec; κάτω αριστερά) είναι εκλεκτικός αναστολέας της c-Abl. Οι πυριμιδίνες, οι κιναζολίνες και τα οξοϊνδόλια, δείχνουν διάφορους βαθμούς εκλεκτικότητας, η οποία μπορεί να ρυθμίζεται μέσω επιλογής της ομάδας «L». Οι αλληλεπιδράσεις τους ως δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων επισημειώνονται με αστερίσκο. Η αρωματική φύση των σκελετών αυτών είναι επίσης σημαντική για τη δραστηριότητά τους ως αναστολέων.



Εικόνα 8: Αναστολείς κινασών: ο SU6668 που αναστέλλει τους KDR, FGFR1 και PDGFRb υποδοχείς προκαλώντας αντι-αγγειογενετική και προαποπτωτική δράση, το Semaxanib (SU5416) είναι ένας αναστολέας της κινάσης τυροσίνης που σχεδιάστηκε ως θεραπευτικό του καρκίνου. Είναι σε πειραματικό στάδιο και αποτελεί ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα του συμπλέγματος FLK-1 / KDR. Στοχεύει την οδό VEGF, και τόσο οι in vivo όσο και οι in vitro μελέτες έχουν δείξει αντι-αγγειογόνο δράση. Ο SU5402 είναι ένας αναστολέας υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR) με $IC_{50} \sim 0,03 \mu M$. Μελέτες στο πολλαπλό μύελωμα προτείνουν ότι ο SU5402 αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του FGFR3 in vitro. Έχει πολύ ισχυρή αναστολή VEGFR και PDGF.

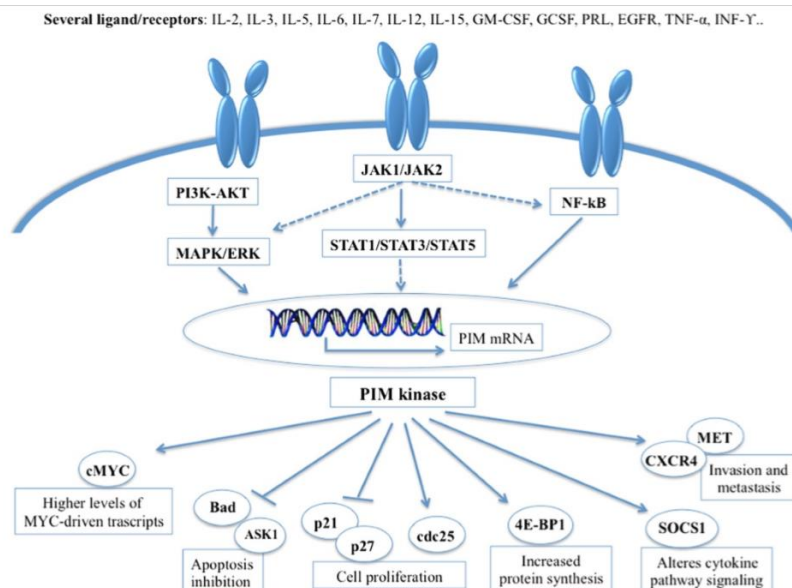
1.3 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ PIM

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με μία πολύ σημαντική οικογένεια κινασών, τις Pim κινάσες και πιο συγκεκριμένα την Pim-1. Η οικογένεια Pim αποτελείται από τρία μέλη, την Pim-1, Pim-2 και Pim-3 με έξι διαφορετικές ισομορφές που προκύπτουν από διαφορετικές θέσεις έναρξης μετάφρασης. Πρόκειται για κινάσες με δράση σερίνης-θρεονίνης, οι οποίες κωδικοποιούνται από ένα πρωτο-ογκογονίδιο που βρίσκεται στα αιμοποιητικά κύτταρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε αυτή την οικογένεια κινασών παρουσιάζει το γεγονός ότι παρόλο που η μεταγραφή και η μετάφρασή τους ρυθμίζεται στα κύτταρα, λόγω έλλειψης ενός ρυθμιστικού παράγοντα παραμένουν συνεχώς ενεργές. Αυτό έχει ως επακόλουθο η δράση τους να εξαρτάται από τη σταθερότητά τους και το ποσοστό έκφρασής τους στα κύτταρα. (10,13)



Εικόνα 9: Λειτουργία κινασών σερίνης-θρεονίνης

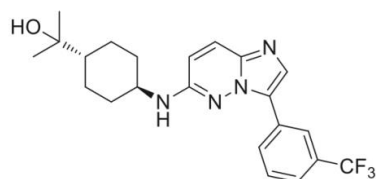
Η υπερέκφρασή τους φαίνεται να προωθεί την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την αντιαποπτωτική δράση φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην πρόοδο και διατήρηση διαφόρων τύπων καρκίνου, και ιδιαίτερα αιματολογικών κακοηθειών και συμπαγών όγκων. (14) Παρόλο που συχνότερα εμπλέκονται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, είναι υπεύθυνες και για πολλούς άλλους τύπους καρκίνων, όπως ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης, του προστάτη, της κεφαλής, του λαιμού, του παγκρέατος της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας αλλά και κακοήθειες άλλων Β-λεμφοκυττάρων. Αυτό συμβαίνει μέσω της συμμετοχής τους σε μία ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία αφορούν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και μετακίνηση των κυττάρων μέσω ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και ειδικά της απόπτωσης. Οι Pim κινάσες είναι σηματοδοτικοί στόχοι των γονιδίων STAT-3 και STAT-5, τα οποία ελέγχονται από την κινάσες JAK-1 και JAK-2. Με τη σειρά τους οι Pim κινάσες στοχεύουν τον προαποπτωτικό παράγοντα BAD και το ογκογονίδιο MYC αναστέλλοντας την απόπτωση, ενώ συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω μείωσης της μετάφρασης του παράγοντα 4EBP1, των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, αλλά και των αναστολέων τους p21 και p27. Επιπλέον, εμπλέκονται στη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων και την εισβολή τους στους ιστούς μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των υποδοχέων MET και CXCR4. (15,16) Γι' αυτό το λόγο αποτελούν πολύ ελκυστικούς στόχους αναστολέων στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και κυρίως διαφόρων τύπων καρκίνου.



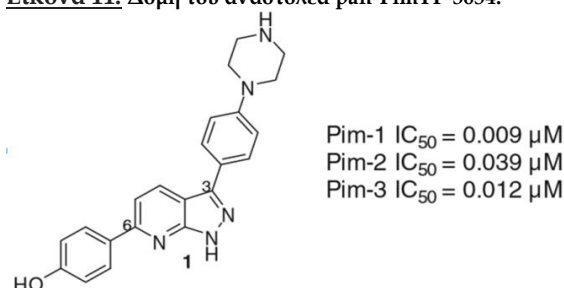
Εικόνα 10: Σηματοδοτικά μονοπάτια συμμετοχής της οικογένειας των Pim κινασών

Μέσα από κρυσταλλογραφικές μελέτες παρατηρήθηκε πως οι κινάσες της οικογένειας Pim έχουν μια ιδιαιτερότητα στη θέση πρόσδεσης του ATP. Στην αρθρωτή περιοχή περιέχεται ένα κατάλοιπο προλίνης και κάποια άλλα μοναδικά κατάλοιπα στη θέση πρόσδεσης του ATP, κάτι που δε συμβαίνει συνήθως στις κινάσες σερίνης-θρεονίνης, αλλά φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αναστολέων για το συγκεκριμένο είδος. Στην πλειοψηφία τους, οι αναστολείς που έχουν συντεθεί για την οικογένεια Pim και εμφανίζουν δράση έναντι και των τριών βασικών ισομορφών, βασίζονται στο σκελετό του αζαινδολίου, με τους

διαφορετικούς υποκαταστάτες που φέρει ο καθένας να διαφοροποιεί το ποσοστό αναστολής μεταξύ τους. (14,15)

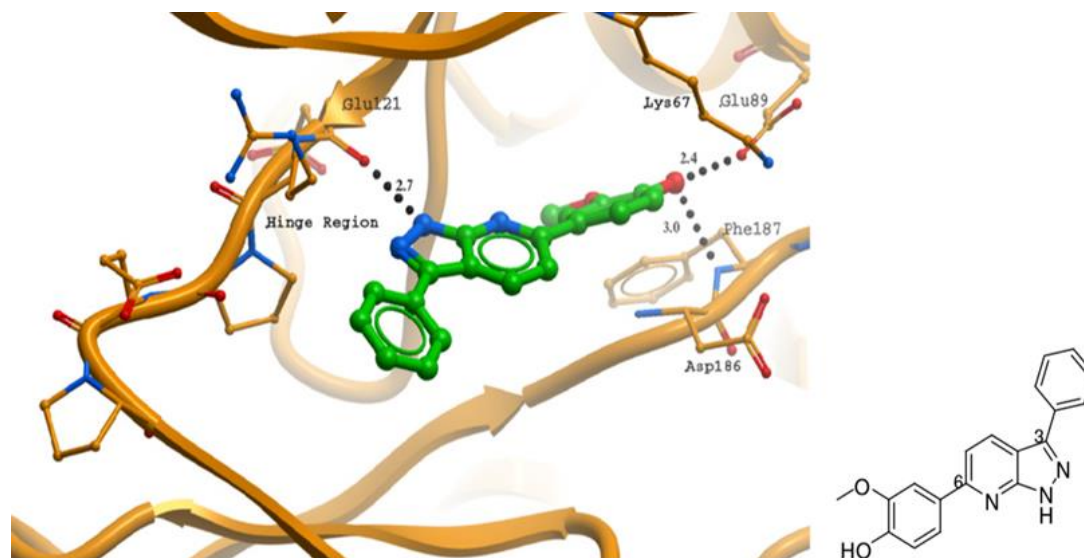


Εικόνα 11: Δομή του αναστολέα pan-PimTP-3654.



X, Y	Pim-1	Pim-2	Pim-3
N, N	0.009	0.039	0.012
N, CH	0.03	0.283	0.058
CH, CH	0.004	0.042	0.022

Εικόνα 12: Υποκατεστημένα ινδόλια με ανασταλτική δράση έναντι της οικογένειας Pim κινασών. Η διαφορά υποκατάστασης παρουσιάζει διαφορές στη δράση και κάποιο ποσοστό εκλεκτικότητας μεταξύ των τριών βασικών ισομορφών.



Εικόνα 13: Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της πρόσδεσης του πιθανού αναστολέα αζαϊνδολίου στο ενεργό κέντρο της Pim-1

1.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΚΙΝΑΣΗ PIM-1

1.4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ PIM-1

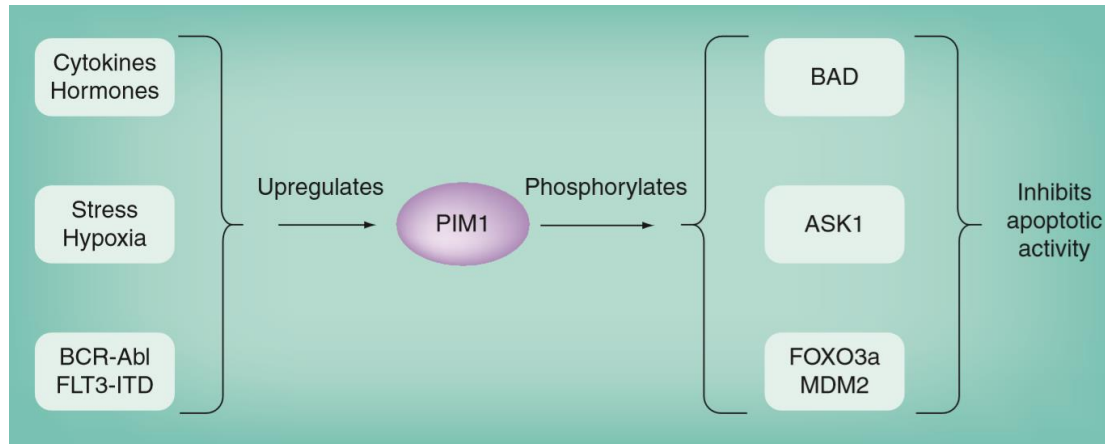
Η Pim-1 είναι η μία από τις τρεις κινάσες σερίνης-θρεονίνης της οικογένειας Pim. Αναγνωρίστηκε αρχικά σε δείγματα λεμφώματος ποντικού ως ένα ενεργοποιημένο γονίδιο που προέκυψε από την ενσωμάτωση του ιού της λευχαιμίας στο γονίδιο της Pim-1. Η ενσωμάτωση αυτή είχε ως συνέπεια την εμφάνιση ενός

αντιγράφου με μεγάλο χρόνο ημιζωής, το οποίο επέτρεπε τη σύνθεση μεγάλων ποσοτών της *Pim-1* στα κύτταρα. Το γονίδιο αυτό που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6p, αποδείχθηκε πως είναι πρωτοογκογονίδιο, καθώς η υπερέκφρασή του προκαλούσε την εμφάνιση λεμφώματος σε δείγματα ποντικών σε μικρό βαθμό. Ωστόσο συνεργιστικά με την υπερέκφραση άλλων γονιδίων κινασών που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση, όπως το *c-Myc*, το *pim-1* είναι ένα σημαντικό ογκογονίδιο που μπορεί να προκαλέσει 100% θνησιμότητα από λέμφωμα σε δείγματα ποντικών. (17)

Η *Pim-1* εκφράζεται σε υψηλό βαθμό, κυρίως στα αιμοποιητικά κύτταρα, τα κύτταρα του γαστρικού συστήματος, του λαιμού, της κεφαλής και του προστάτη. (18) Βρίσκεται σε δύο ισομορφές, την *Pim-1L* και την *Pim-1S*, με την πρώτη να είναι μεγαλύτερη (44 kDa) και να συναντάται στην πλασματική μεμβράνη και στα κύτταρα του προστάτη, ενώ η δεύτερη (33 kDa) βρίσκεται στον πυρήνα και το κυτοσόλιο. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της *Pim-1L*, είναι η πλούσια σε προλίνη περιοχή που φέρει στο N-τελικό άκρο της, το οποίο της επιτρέπει την αλληλεπίδραση με περισσότερες πρωτεΐνες και ως επακόλουθο την εμπλοκή της σε περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια. (10)

1.4.2 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΕΤΑΙ Η *PIM-1*

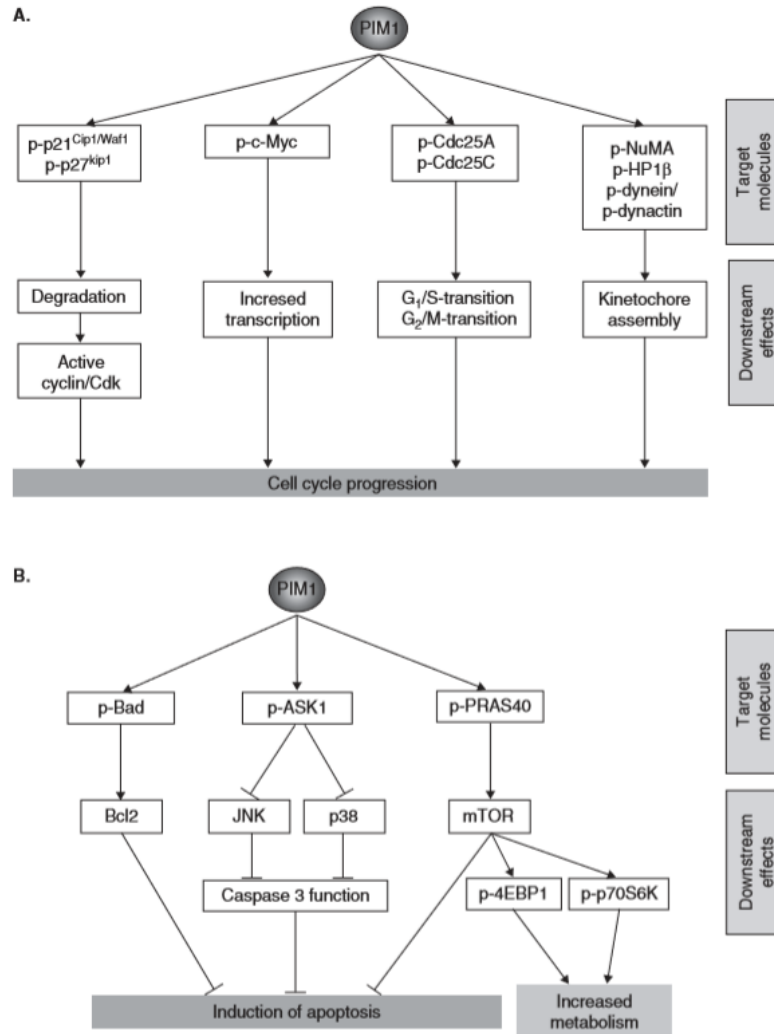
Από μελέτες που έγιναν σε ποντίκια, από τα οποία λείπει η *Pim-1*, φάνηκε πως κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αιμοποιητικού συστήματος και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Όπως προαναφέρθηκε, η *Pim-1* είναι μια ισχυρή ογκοπρωτεΐνη, της οποίας η υπερέκφραση μπορεί να προκαλέσει την επαγωγή του κυτταρικού κύκλου και την αναστολή της απόπτωσης. Αυτό συμβαίνει μέσω φωσφορυλίωσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου, όπως η *Cdc 25A*, αλλά και αναστολέων τους, όπως οι παράγοντες *p21* και *p27*. Έχει επίσης βρεθεί, πως μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, συμμετέχει και στην αντίσταση των κυττάρων στα αντικαρκινικά φάρμακα, στη ρύθμιση της γήρανσης των κυττάρων, στη μετάσταση καρκινικών όγκων και μπορεί να αποτελέσει παράγοντα επιβίωσης για τα κύτταρα σε αντίξοες συνθήκες, όπως η έλλειψη ιντερλευκίνης 3 (*IL-3*). (10,17) Υπερέκφραση της *Pim-1* μπορεί να προκληθεί από μία ποικιλία ερεθισμάτων, όπως οι κυτοκίνες, οι ορμόνες, η υποξία και το στρες, ενώ πολλές φορές τα ίδια τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να προκαλέσουν κυτταρικό στρες. Όλα αυτά, οδηγούν στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών όπου εμπλέκεται η *Pim-1*, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνοντας τη *BAD*, την *ASK1*, τη *FOXO3a* και την *MDM2*, οδηγεί στην αναστολή της απόπτωσης. Η *MDM2* είναι μία πρωτεΐνη που λειτουργεί ως E3-λιγάση και υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνων, όπως λευχαιμία, λέμφωμα, καρκίνωμα του στήθους και των μακροκυττάρων του πνεύμονα και καρκίνο του κόλον. Υψηλά επίπεδα της συνδέονται με επιθετικό καρκίνο, χαμηλή αντίδραση στα φάρμακα και χαμηλή πρόγνωση. Στόχοι της είναι οι πρωτεΐνες *pRB*, *HF-1*, *p75*, *p53*, *NFkB*, *E3F1* και *FOXO3a*, με τις οποίες αλληλεπιδρά και συμβάλλει στην αντιαποπτωτική δράση. (19)



Εικόνα 14: Παράγοντες που προκαλούν την απορρύθμιση της έκφρασης της Pim-1

Όσον αφορά την κυτταρική επιβίωση και την αναστολή της διαδικασίας της απόπτωσης, η Pim-1 εμπλέκεται σε μία ποικιλία μονοπατιών που οδηγούν σε αυτό το αποτέλεσμα. Ένα από αυτά, είναι το αντιαποπτωτικό μονοπάτι της Bcl-2. Αρχικά η Pim-1 φωσφορυλιώνει το προαποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2, BAD στη Ser112 και προκαλεί την προτεασωμική της διάσπαση και τη μεταφορά της στο κυτταρόπλασμα. Όταν η BAD δεν είναι φωσφορυλιωμένη μπορεί να ετεροδιμερίσει την Bcl-2 και την Bcl-xl, αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας που βρίσκονται στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι δύο αυτές πρωτεΐνες σχηματίζουν ετεροδιμερικά σύμπλοκα με την BAX (προαποπτωτική πρωτεΐνη), ακυρώνοντας έτσι την προαποπτωτική της λειτουργία. Η μη φωσφορυλιωμένη BAD όμως, συνδέεται στις Bcl-2 και Bcl-xl και εκτοπίζει την BAX από τα σύμπλοκα. Η απελευθερωμένη BAX δημιουργεί ομοδιμερή και προαποπτωτικούς πόρους στη μεμβράνη που επιτρέπουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια στο κυτταρόπλασμα, το οποίο με τη σειρά του προκαλεί την απόπτωση. Από μελέτες που έγιναν σε έναν αναστολέα της JAK-2 κινάσης, φάνηκε πως η Pim-1 επηρεάζεται από αυτήν μέσω του μονοπατιού JAK-STAT. Ο υποδοχέας JAK ενεργοποιείται από τις κυτοκίνες (ιντερλευκίνες, ιντερφερόνες κ.α), διμερίζεται και αλληλεπιδρά με τις κινάσες STAT. Εδώ διαδραματίζεται ένας κύκλος διαδικασιών που δείχνει πως οι ίδιες οι κινάσες STAT μπορούν να προκαλέσουν την αναστολή τους. Οι κινάσες αυτές έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται στην Pim-1, η οποία φωσφορυλιώνει και σταθεροποιεί τις SOCS-1 και το SOCS-3 και αυτές αλληλεπιδρούν με τις JAK μπλοκάροντας τη φωσφορυλίωση των STAT. (13) Οι STAT κινάσες αποτελούν τους μετατροπείς και ενεργοποιητές σήματος των μεταγραφικών πρωτεϊνών της οικογένειας STAT. Οι STAT-3 και STAT-5 με τη σειρά τους είναι υπεύθυνες για την επαγωγή της μετάφρασης της Pim-1, η οποία φωσφορυλιώνει την Ask-1 στη Ser83 και την απενεργοποιεί, οδηγώντας έτσι σε μείωση της φωσφορυλίωσης της JNK και του p38. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και μείωση της λειτουργίας της απόπτωσης. Η ASK επίσης φωσφορυλιώνει τον προαποπτωτικό παράγοντα FOXO3a, ο οποίος απορυθμίζει τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες BIM και FAS που συνδέονται σε αυτόν προάγοντας έτσι την απόπτωση. Η φωσφορυλιωμένη ASK ωστόσο επάγει τη μεταφορά του FOXO3a από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα προκαλώντας μείωση της αποπτωτικής του δράσης και προωθεί την επιβίωση των κυττάρων. Η Pim-1 μπορεί να δράσει με τον ίδιο τρόπο στον FOXO3a χωρίς τη μεσολάβηση της ASK. Τέλος, η Pim-1 επιδρά μέσω της οδού της m-TOR πρωτεΐνης στη λειτουργία του μεταβολισμού. Αρχικά φωσφορυλιώνει την PRAS40 στη Thr246,

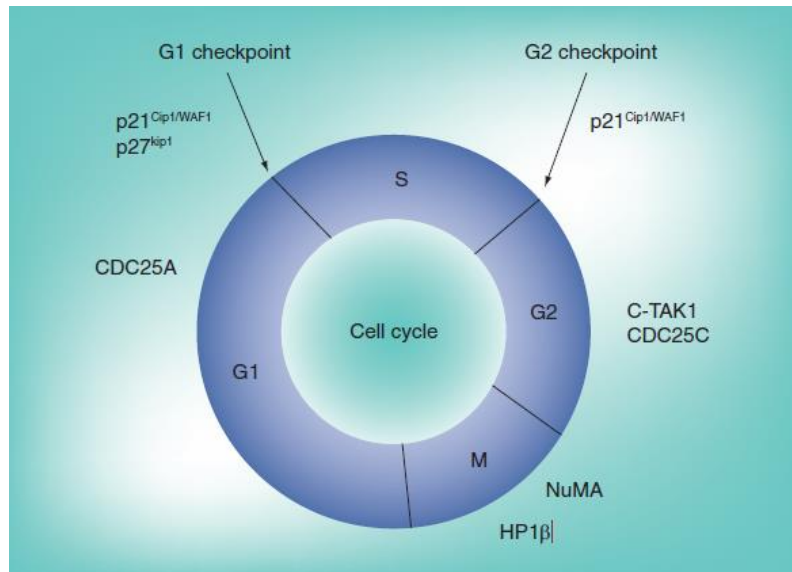
αποκόπτωντάς την από το σύμπλοκό της με την m-TOR. Αυτό έχει ως συνέπεια την αυξημένη δράση της που σημαίνει αυξημένη φωσφορυλίωση των παραγόντων p-4EBP1 και p-70S6K, τα οποία συμμετέχουν σε αυτοφαγικά μονοπάτια και οδηγούν στον αυξημένο μεταβολισμό. (17,19)



Εικόνα 15: Σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται η Pim-1: A. με αποτέλεσμα την προώθηση του κυτταρικού κύκλου και επομένως τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και B. με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης

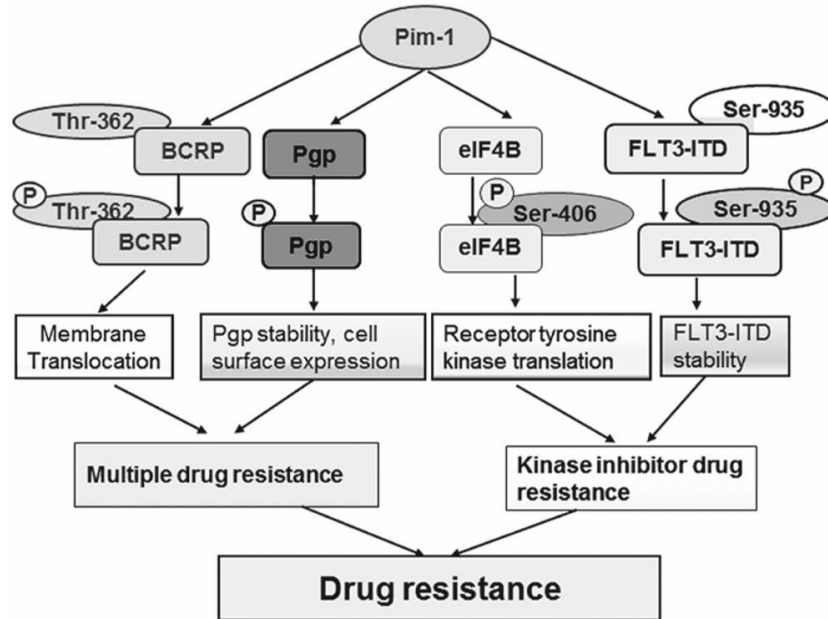
Η εμπλοκή της Pim-1 στον κυτταρικό κύκλο συμβαίνει εξίσου μέσω μιας ποικιλίας σηματοδοτικών μονοπατιών. Η φωσφορυλίωση του αναστολέα p-21 της CDK στη Thr145 οδηγεί στη μεταφορά του έξω από τον πυρήνα και στην απενεργοποίησή του. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση του στις Thr157 και Thr198 προκαλεί προτεασωμική διάσπαση και ενεργοποιεί τις κυκλίνες E/Cdk2 και D/Cdk4 που προωθούν τις φάσεις G₁ και G₂/M αντίστοιχα. Ακόμη φωσφορυλιώνει τη ρυθμιστική πρωτεΐνη c-MYC αυξάνοντας έτσι τη μεταγραφή. Η φωσφορυλίωση της Cdc-25A από την Pim-1 οδηγεί σε προώθηση της φάσης G₁ και S. Η πρωτεΐνη Cdc-25C, εκτός από την άμεση επιρροή της από την Pim-1, επηρεάζεται και μέσω της φωσφορυλίωσης της CTAK1, που προκαλεί τη έξοδο της από τον πυρήνα και κατά συνέπεια την ενεργοποίησή της. Οι ενέργειες αυτές επάγουν τη μετάβαση από τη φάση G₁ σε S και από G₂ σε M αντίστοιχα. Τέλος, η Pim-1 αλληλεπιδρά με τη NuMA, την HP1β, με τη δυνείνη και τη δυνακίνη, προωθώντας τη μίτωση μέσω γεφύρωσης

του κινετοχώρου με τον άξονα της μιτωτικής ατράκτου που δημιουργείται κατά την κυτταρική διαίρεση. (17,19)



Εικόνα 16: Συμμετοχή της Pim-1 στον κυτταρικό κύκλο

Μία ακόμη σημαντική λειτουργία της Pim-1 που την κάνει ελκυστικό στόχο σύνθεσης αναστολέων, είναι η εμπλοκή της στην αντίσταση έναντι των καρκινικών φαρμάκων. Συμβάλλει σε αυτή τη διαδικασία μέσω ενός μηχανισμού πολλαπλής αντίστασης στον οποίο μεσολαβούν οι ABC μεταφορείς φαρμάκων. Πρόκειται για μόρια που επάγουν την αντοχή στα φάρμακα μέσω φωσφορυλίωσής τους από την Pim-1 και της μεταφοράς τους στην πλασματική μεμβράνη με την ταυτόχρονη εκροή των φαρμάκων έξω από τα κύτταρα. Τέτοιοι μεταφορείς είναι η P-γλυκοπρωτεΐνη και η BCRP. Επίσης, επιδρά στην ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα μέσω του ανταγωνισμού της με την p-53 στην πρόσδεσή της με την Etk, εμποδίζοντας την προώθηση της απόπτωσης. Τέλος, αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο FLT3-ITD μέσω φωσφορυλίωσής του στη Ser935, σταθεροποιώντας το. Έχει αποδειχθεί πως ταυτόχρονη αναστολή της Pim-1 και του υποδοχέα FLT3, οδηγεί σε ευαισθησία στα φάρμακα. (19)



Εικόνα 17: Σηματοδοτικό μονοπάτι, μέσω του οποίου η Pim-1 προκαλεί αντίσταση στα αντικαρκινικά φάρμακα

1.4.2 ΕΜΠΛΟΚΗ ΤΗΣ PIM-1 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Εκτός από το συσχετισμό της Pim-1 με την εμφάνιση λευχαιμίας σε ποντίκια, έχει παρατηρηθεί πως η υπερέκφρασή της εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων αιματολογικών κακοηθειών, όπως μυελογενούς και λεμφοειδούς λευχαιμίας, λεμφώματος και άλλων ειδών καρκίνου. Αυτό κάνει την Pim-1 να αποτελεί ένα χρήσιμο σηματοδότη τέτοιου είδους ασθενειών. Στις αιματολογικές κακοήθειες συνδέεται η ύπαρξή της με χαμηλή πρόγνωση σε ποικίλες μορφές λευχαιμίας, MCL λέμφωμα (είδος non-Hodgkin's λέμφωμα) και λέμφωμα B-κυττάρων. (17,19) Σε περιπτώσεις εμφάνισης AML, μεταλλάξεις του υποδοχέα FLT3, προκαλούν τη φωσφορυλίωση της STAT-5, που με τη σειρά της προκαλεί τη μεταγραφή του γονιδίου της Pim-1. Η Pim-1 φωσφορυλιώνει και σταθεροποιεί το σύμπλοκο FLT3-ITD με τη βοήθεια των Hsp-96 πρωτεϊνών, το οποίο παραμένει πάντα ενεργό. (16) Το λέμφωμα MCL παθολογικά, αποτελείται από μικρά, ώριμα κύτταρα που εμφανίζονται με ελαφρές πυρηνικές ανωμαλίες. Οι όζοι που δημιουργούνται είναι συνήθως διάχυτοι και σπάνια μπορούν να γίνουν διακριτοί. Η σχετικά επιθετική φύση του χαρακτηρίζεται από τη συχνή παρουσία μιτωτικών στοιχείων, ένα χαρακτηριστικό ασυνήθιστο σε άλλα B-κυτταρικά λεμφώματα μικρών λεμφοκυττάρων. Η Pim-1 αποτελεί δείκτη της ύπαρξης λεμφώματος MCL ακόμη κι όταν εκλείπει η βλαστοειδής μορφολογία. Μεταλλάξεις στην Pim-1 έχουν συσχετιστεί με μεγάλα λεμφώματα και έχουν ως αποτέλεσμα διαφοροποιημένη λειτουργία. Γι' αυτό η μέτρηση της δραστηρότητάς της ή των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων της αποτελούν πιο αξιόπιστο δείκτη από το επίπεδο έκφρασης της. (20) Σε κλινική φάση II, όπου συμμετείχαν 102 ασθενείς, το 72% των περιπτώσεων με MCL λέμφωμα, παρουσίασε αυξημένη έκφραση της Pim-1 που συσχετίστηκαν με χαμηλή πρόγνωση. Ένα άλλο παράδειγμα χρήσης των επιπέδων της Pim-1 ως προγνωστικού δείκτη, ήταν η απόπειρα διάκρισης μεταξύ δύο τύπων πρωτογενών λεμφωμάτων, δερματικών μεγάλων B-κυττάρων, από τα οποία το ένα έχει 5 χρόνια επιβίωσης σε ποσοστό πάνω από 95% και το άλλο έχει 5 χρόνια επιβίωσης σε ποσοστό περίπου

52%. Διαπιστώθηκε ότι ο τύπος του λεμφώματος με τη φτωχότερη πρόγνωση, είχε σταθερά υψηλή έκφραση του *pim-1* mRNA. (21)

Όσον αφορά τους συμπαγείς όγκους, η υπερέκφραση της Pim-1 έχει ανιχνευθεί στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης (με υψηλότερα επίπεδα στον διηθητικό απ' ότι στο μη διηθητικό καρκίνο), στην παγκρεατική ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία και σε δείγματα καρκίνου του προστάτη, όπου επίσης συσχετίστηκε με χαμηλή πρόγνωση και χαμηλή αντίδραση στη θεραπεία. Παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν και για τον οισοφαγικό και γαστρικό καρκίνο, όπου το βακτήριο *Helicobacter pylori* απορρυθμίζει την Pim-1, προκαλώντας την υπερέκφρασή της. Εδώ μπορεί να αποτελέσει δείκτη τόσο για το μέγεθος της κακοήθειας, καθώς όσο αυτό αυξάνεται, τόσο αυξάνονται και τα επίπεδα της στα αντίστοιχα κύτταρα, όσο και για το αποτέλεσμα των χειρουργικών επεμβάσεων, καθώς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *pim-1*, του SLAM και του CD36 αποτελούν δείκτη χρόνου ζωής για τους ασθενείς που έχουν υποστεί αυτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η Pim-1 ως αντιγόνο σχετιζόμενο με τον καρκίνο του κόλον που έχει εγκριθεί ως ένας νέος, ευαίσθητος και ακριβής δείκτης. Στον καρκίνο του προστάτη μελέτες έχουν δείξει πως το γονίδιο *pim-1* δρα συνεργιστικά με το *c-Myc*, το οποίο συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προάγει την αγγειογένεση. Θεωρείται πως η Pim-1 αυξάνει την έκφραση της *c-Myc* ή προκαλεί τη δέσμευση της RNA πολυμεράσης II οδηγώντας σε αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων *c-Myc*. (21) Άλλη μία διαδικασία στην οποία εμπλέκεται είναι η αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η Pim-1L αλληλεπιδρά απευθείας με την κινάση τυροσίνης Etk στην πλασματική μεμβράνη και συμμετέχει σε αντιαποπτωτικά μονοπάτια, προκαλώντας την ενεργοποίηση της Etk. Η τοποθέτησή της επίσης στην πλασματική μεμβράνη επιτρέπει τη φωσφορυλίωση κάποιων πρωτεϊνών της μεμβράνης ή συσχετιζόμενων με αυτή, οι οποίες εμπλέκονται άμεσα στην αντίσταση στα φάρμακα. (22) Η πρώτη φορά που καθορίστηκε η Pim-1, ως πιθανός δείκτης για τον καρκίνο του προστάτη ήταν το 2001. Ο αυξημένος βαθμός έκφρασής της συσχετίστηκε με προχωρημένα στάδια καρκίνου, εκτός από την περίπτωση των προχωρημένων μεταστατικών όγκων, σε κάποιους απ' τους οποίους δεν ανιχνεύθηκε καμία ποσότητα της κινάσης. Παρατηρήθηκε ακόμη, πως αυξημένα επίπεδα του *pim-1* RNA μπορεί να σημαίνουν την επικείμενη έναρξη της ασθένειας, αφού στα υγιή κύτταρα δεν ανιχνεύθηκε καμία ποσότητα. Η Pim-1 έχει επίσης βρεθεί να εμπλέκεται και στις ορμονοεξαρτώμενες περιπτώσεις καρκίνου του προστάτη, όπου σημαντικό ρόλο παίζει ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR). Τόσο η Pim-1L, όσο και η Pim-1S, επάγουν την ανάπτυξη του καρκίνου φωσφορυλιώνοντας τον AR σε διαφορετικά αμινοξέα ακόμη και σε μικρά επίπεδα, με την Pim-1L να συμβάλλει στην σταθερότητά του υποδοχέα και την Pim-1S στην αποικοδόμησή του. (19,23)

Στον καρκίνο του λαιμού και της κεφαλής που γενικά είναι δύσκολο να θεραπευτεί, η Pim-1 υπερεκφράζεται σε πιο αναπτυγμένα στάδια και συσχετίζεται επίσης με χαμηλή πρόγνωση και μετάσταση των όζων μέσω της λέμφου. Επιπλέον σε αυτά τα είδη καρκίνων η υπερέκφρασή της μπορεί να προβλέψει την αντίδραση στη ραδιοθεραπεία. Σε μια μελέτη για να προσδιοριστεί εάν συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται διαφορετικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των όγκων αυτών, φάνηκε ότι το *pim-1* mRNA εκφράστηκε σε τέτοιους όγκους. Ανοσοϊστοχημικές αναλύσεις στην ίδια μελέτη αποκάλυψαν ότι η πρωτεΐνη Pim-1 εκφράζεται στο 98% (41 από 42) των όγκων διαφορετικών βαθμών και σταδίων, αλλά όχι σε κανονικό ιστό, ενώ δε φάνηκε να συσχετίζεται με το βαθμό εξέλιξης του όγκου. Ωστόσο, μία πιο πρόσφατη αξιολόγηση της έκφρασης της Pim-1 σε 77 περιπτώσεις καρκινώματος από πλακώδες

επιθήλιο κατέδειξε ότι η έκφρασή της αυξάνεται στα πιο προχωρημένα στάδια, τονίζοντας έτσι περαιτέρω τη χρήση της ως προγνωστικό δείκτη. (17,19)

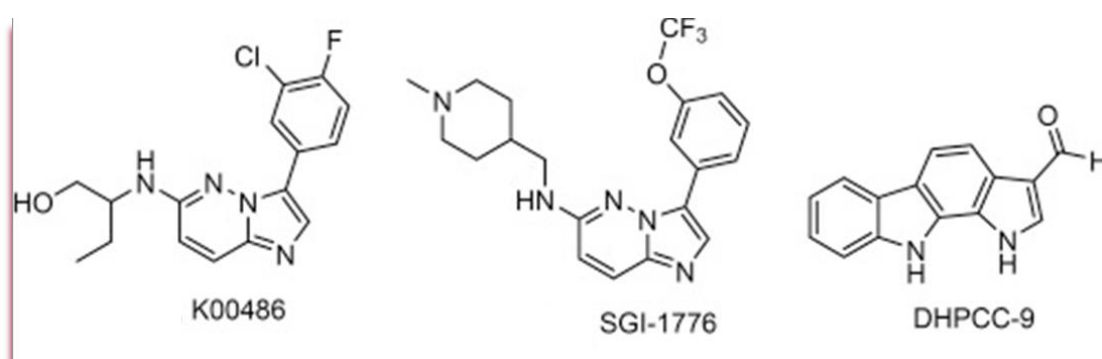
Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, μία σημαντική μείωση του *pim-1* mRNA βρέθηκε σε πρωτογενή μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ φαίνεται να μειώνεται ακόμη περισσότερο σε μεταστατικά καρκινώματα των λεμφαδένων. Αυξημένη έκφραση έχει επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος. Ωστόσο, τα υψηλά επίπεδα συσχετίστηκαν με παρατεταμένη μέση επιβίωση 23.4 μηνών σε σύγκριση με 13.8 μήνες, σε ασθενείς με χαμηλό *pim-1* mRNA. Αυτό προκαλεί έκπληξη, καθώς η Pim-1 έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται άμεσα με τις ογκογενείς μεταλλάξεις K-RAS και την υποξία στον καρκίνο του παγκρέατος. Επίσης αναφέρθηκε ότι συμβάλλει στην αντίσταση σε ακτινοθεραπείες και χημειοθεραπείες στο πάγκρεας, τον προστάτη, την κεφαλή, το λαιμό και τον πνεύμονα, το οποίο επιβεβαιώνει τις ανωτέρω περιγραφόμενες ογκογενείς ιδιότητες στη ρύθμιση της αντίδρασης στην υποξία ή τη σηματοδότηση της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα. (17,19)

1.4.4 ΔΟΜΗ ΤΗΣ PIM-1 ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ

Η δομή της Pim-1 έχει μια γενική διαμόρφωση χαρακτηριστική των κινάσων σερίνης-θρεονίνης, που αποτελείται από δύο περιοχές που συνδέονται μέσω μίας αρθρωτής περιοχής (hinge region). Το N-τελικό άκρο αποτελείται κυρίως από αντιπαράλληλες περιοχές με β-πτυχωτή διαμόρφωση, ενώ το C-τελικό άκρο είναι σε μεγάλο βαθμό ελικοειδές. Το ενεργό κέντρο σχηματίζεται από ένα «αυλάκι» στη διεπιφάνεια μεταξύ αυτών των δύο περιοχών και περικλείεται από την αρθρωτή περιοχή, τον πλούσιο σε γλυκίνη βρόγχο και τον βρόγχο ενεργοποίησης. Ο βρόγχος της Pim-1 που είναι πλούσιος σε γλυκίνη μετακινείται προς την C-τελική περιοχή και η Phe49 κατευθύνεται προς την αρθρωτή περιοχή, γεμίζοντας έτσι το χώρο που συνήθως καταλαμβάνεται από φωσφορικά ATP. Σε όλες τις πρωτεϊνικές κινάσες η αρθρωτή περιοχή σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με το ATP. Ωστόσο, η αλληλουχία της αρθρωτής περιοχής στην Pim-1 είναι ασυνήθιστη, εξαιτίας της εισαγωγής ενός καταλοίπου αμινοξέος Pro123 που δεν υπάρχει σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες. Λόγω της παρουσίας του αμινοξέος αυτού, η αρθρωτή περιοχή σχηματίζει μόνο έναν δεσμό υδρογόνου με το ATP, ενώ ταυτόχρονα σχηματίζεται ένας πρόσθετος χώρος, ο οποίος καταλαμβάνεται από την πλευρική αλυσίδα της Val126, η οποία είναι προσανατολισμένη προς την θέση πρόσδεσης του ATP και αλληλεπιδρά με την Pro123. Αυτή η μοναδική διαμόρφωση της αρθρωτής περιοχής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό ειδικών αναστολέων Pim-1. (17,19,24)

Έχει καταγραφεί μία μεγάλη ποικιλία αναστολέων της Pim-1, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε οργανομεταλλικά σύμπλοκα με ρουθίνιο, διϋνδόλια μαλεΐμιδιών, ινδολοκαρβαζόλια, ναφθριδίνες, ιμιδαζο[1,2-*b*]πυριδαζίνες, πυριδόνες, φλαβονοειδή, βενζοϊσοξαζόλια, ισοξαζολοκινολιν-3,4(1H,9H)-διόνες, κιναμικά οξέα και 3H-βενζο[4,5]θειενο[3,2-*d*]πυριμιδιν-4-όνες. Οι περισσότεροι από αυτούς λειτουργούν ως ανταγωνιστές του ATP για τη θέση πρόσδεσής του στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Οι περισσότεροι από τους ταυτοποιημένους αναστολείς παρουσιάζουν ισχυρή δράση με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται στην υπομικρομοριακή έως νανομοριακή περιοχή. Διάφοροι από τους αναστολείς, έχει επίσης αποδειχθεί, ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro*. Πρόσφατα, σχεδιάστηκαν παράγωγα ιμιδαζοπυριδαζίνης, όπως το ETP-45299, το K00135, το SGI-1776 ή το παράγωγο διϋδροπυρρολοκαρβαζολίου DHPCC-9. Επίσης

έχει περιγραφεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα Pim-1, το οποίο συνδέεται με κυτοσολικό, πυρηνικό και μεμβρανικό Pim-1 και επάγει την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπου και ποντικού σε προκλινικά μοντέλα. Όλες οι αναφερθείσες ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων και επηρεάζουν την απόπτωση επανευαισθητοποιώντας τα καρκινικά κύτταρα σε συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες ή αναστολείς κινασών σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μέχρι στιγμής μόνο ο αναστολέας SGI-1776 (μία ένωση ιμιδαζο[1,2-*b*] πυριδαζίνης), έχει προχωρήσει σε προκλινικές μελέτες και έδειξε ότι προκαλεί απόπτωση σε κύτταρα χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας και επανευαισθητοποιεί χημειοανθεκτικά καρκινικά κύτταρα σε ταξάνες. Επιπλέον, το SGI-1776 αποδείχθηκε ότι είναι ένας αρκετά επιλεκτικός αναστολέας των κινασών PIM με την πιο ισχυρή δραστηριότητα να παρουσιάζεται έναντι της Pim-1 ($IC_{50} = 7 \pm 1.8$ nmol/l) σε σύγκριση με την Pim-2 ($IC_{50} = 364 \pm 2.6$ nmol/l) και την Pim-3 ($IC_{50} = 69 \pm 9.2$ nmol/l). (17,19)



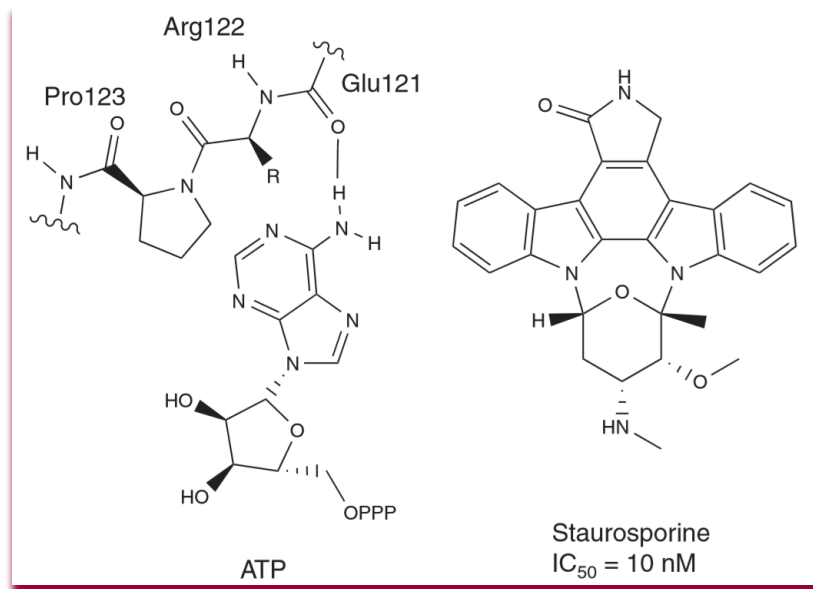
Εικόνα 18: Παράγωγα ιμιδαζοπυριδαζίνης που έχουν σχεδιαστεί ως πιθανοί αναστολείς της Pim-1 (25)

Ο μη εκλεκτικός, ευρέος φάσματος αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης, Staurosporine και τα ανοιχτά ανάλογα αυτού όπως τα διίνδολομαλεΐμίδια ή η τάξη των οργανομεταλλικών συμπλοκών πυριδοκαρβαζολίου αντιπροσωπεύουν την πρώτη κατηγορία και μιμούνται στενά τη δέσμευση του ATP στην αρθρωτή περιοχή. (17,19)

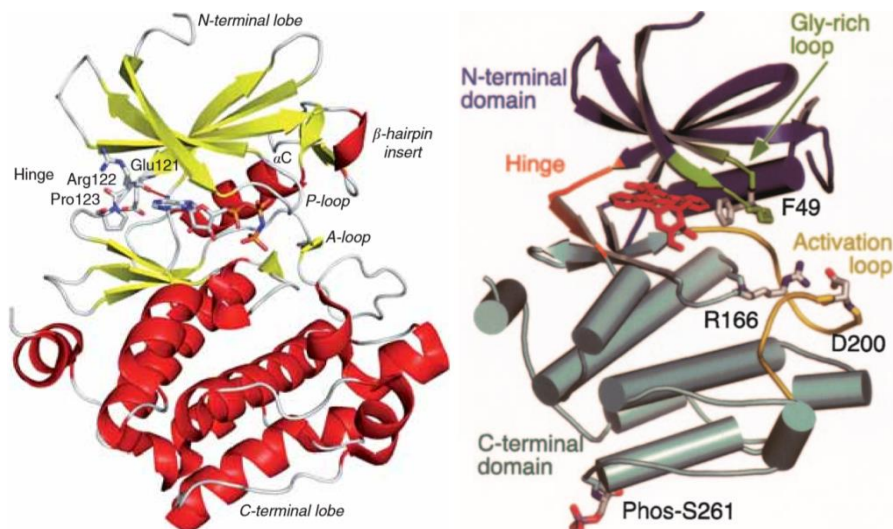
Η Staurosporine είναι μια ετεροκυκλική ένωση, που αποτελείται από δύο ινδόλια, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με έναν πυρρολικό δακτύλιο και ένα αμινοσάκχαρο σε μορφή λουτήρα. Δρα ανταγωνιστικά έναντι του ATP στη θέση πρόσδεσής του στο ενεργό κέντρο διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών. Σημαντικό ρόλο σε αυτό κατέχει το αμινοσάκχαρο, το οποίο καταλαμβάνει την κοιλότητα της ριβόζης, ενώ ο πυρρολικός δακτύλιος και πιο ειδικά το C-5 καρβονύλιο και το γειτονικό άζωτο αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου ανάλογους με αυτούς της αδενυλομάδας του ATP. Αρχικά ανακαλύφθηκε η ανασταλτική της δράση έναντι της κινάσης PKC αλλά αργότερα αποδείχθηκε πως είναι ένας δραστηκός αλλά μη εκλεκτικός ανταγωνιστικός αναστολέας του ATP σε ένα μεγάλο εύρος κινασών. Χαρακτηριστικά έχει δείξει δράση έναντι της PKC με $IC_{50} = 2.2$ nM με αντνεοπλασματική δράση, και έναντι της Pim-1 με $IC_{50} = 0.01$ nM έναντι της λευχαιμίας. (24)

Ο τρόπος δέσμευσης της σταυροσπορίνης και της αδενοσίνης στην Pim-1 είναι παρόμοιος με εκείνους που παρατηρούνται σε άλλες δομές συμπλόκου-πρωτεϊνικής κινάσης, ωστόσο η παρουσία της προλίνης στη θέση 123 εμποδίζει το σχηματισμό του δεύτερου δεσμού υδρογόνου και στις δύο ενώσεις. Και οι δύο ενώσεις βρίσκονται μεταξύ υδρόφοβων καταλοίπων από τον πλούσιο σε γλυκίνη

βρόγχο, το C-τελικό άκρο και την περιοχή hinge. Στο σύμπλοκο αδενοσίνης Pim-1 παρατηρείται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλίου της Glu121 της κύριας αλυσίδας και της N-6 αμινομάδας. Όσον αφορά τη Staurosporine, το άζωτο της πυρρολιδινόνης σχηματίζει παρόμοιο δεσμό υδρογόνου. (24)

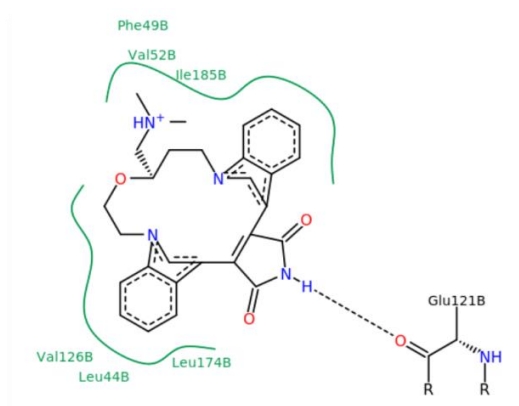


Εικόνα 19: Δομές του ATP και της Staurosporine



Εικόνα 20: Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της πρόσδεσης του ATP και της Staurosporine στο ενεργό κέντρο της Pim-1

Τέλος ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο LY-333351 (Ruboxistaurin), ο οποίος έχει καταδείξει ανασταλτική δράση έναντι της PKC- β , που βρίσκεται και σε κλινικές δοκιμές φάσης III για την αντιμετώπιση του διαβήτη και της Pim-1 στα 200 nM. Με βάση το γεγονός πως και οι δύο αυτές κινάσες συνδέονται με την εμφάνιση κακοηθειών, θεωρείται πως η ταυτόχρονη αναστολή τους μπορεί να δράσει συνεργιστικά έναντι της ανάπτυξης όγκων. Δοκιμάστηκε επίσης σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινης μυελώδους λευχαιμίας παρουσιάζοντας δράση της τάξης του 0.7-1.5 nM και μείωσε σε μεγάλο βαθμό τα λευχαιμικά βλαστώματα ασθενών. Το Ruboxistaurin συνδέεται στο ενεργό κέντρο της Pim-1 και δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με τη Glu121 στην αρθρωτή περιοχή και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα F49, L120, I104 και I185. (26)

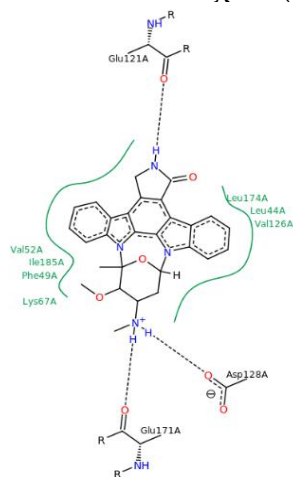
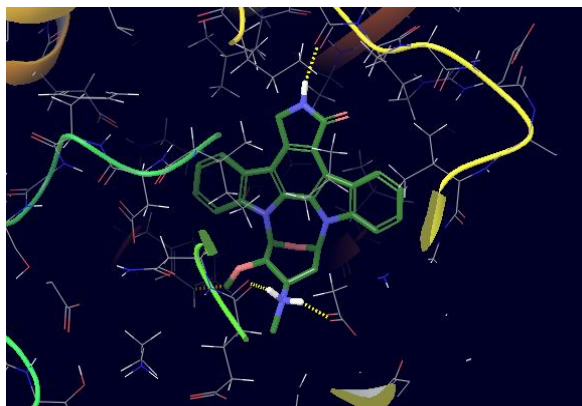


Εικόνα 21: Απεικόνιση Ruboxistaurin

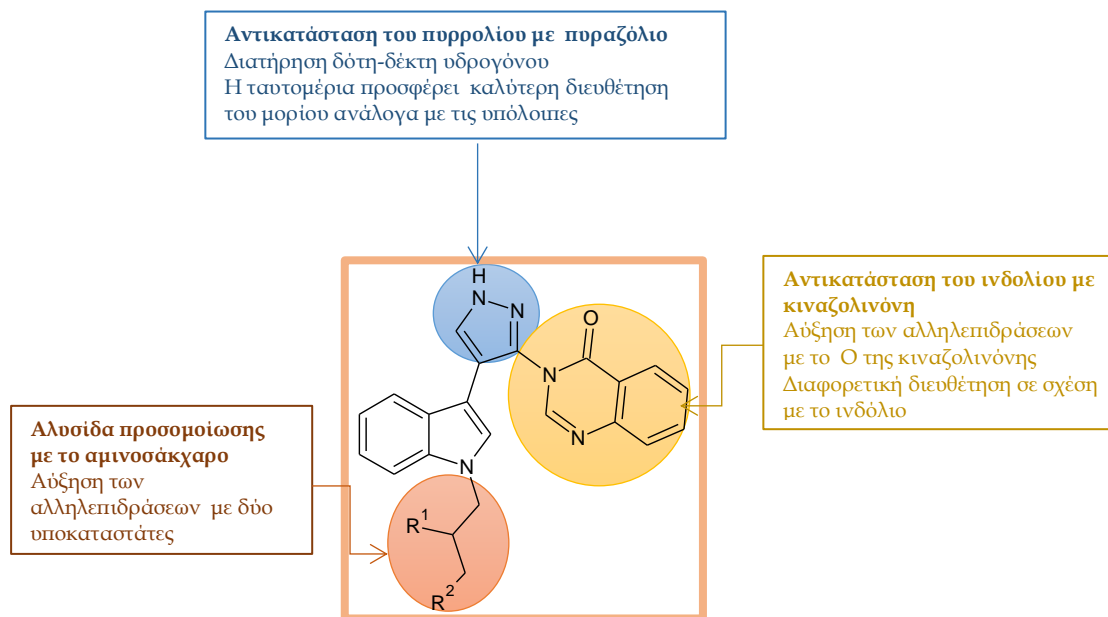
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να συντεθούν ανάλογα της εικόνας 24. Ένωση οδηγό αποτέλεσε το αλκαλοειδές Staurosporine, το οποίο όπως αναφέρθηκε παραπάνω έχει καταδείξει ισχυρή αντικαρκινική δράση ως ανταγωνιστής του ATP στο ενεργό κέντρο διαφόρων κινασών και συγκεκριμένα έναντι της Pim-1 με $IC_{50}=0.01$ nM, στην οποία επικεντρώνεται η συγκεκριμένη έρευνα. Σημαντικό μειονέκτημα της Staurosporine είναι η έλλειψη εκλεκτικότητας καθώς το φυσικό παράγωγο έχει δράση σε πολλές κινάσες επηρεάζοντας έτσι πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια ταυτόχρονα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο αναστολέας Ruboxistaurin, ένα δινδολομαλεΐμιδιο με $IC_{50} = 200$ nM έναντι της Pim-1, παρότι παρουσιάζει χαμηλότερη δράση χαρακτηρίζεται από υψηλότερη εκλεκτικότητα έναντι της Pim-1. Τα δύο παράγωγα αλληλεπιδρούν με τον ίδιο τρόπο με το ενεργό κέντρο της Pim-1, όμως η εκλεκτικότητα του Ruboxistaurin θεωρείται πως οφείλεται εκτός των άλλων, και στη μη επίπεδη διαμόρφωσή του. Γι' αυτό το λόγο, εκτός από την Staurosporine, στο σχεδιασμό των νέων ενώσεων σημαντικό ρόλο έπαιξε και το Ruboxistaurin. (27)

Στα 10 νέα παράγωγα, οι C_{1α} και C_{1β} δε συνδέονται πλέον μεταξύ τους, ενώ έχει αντικατασταθεί το ένα ινδόλιο από από κιναζολινόνη και το πυρρόλιο έχει από έναν πυραζολικό δακτύλιο. Όπως φαίνεται από το κρυσταλλογραφημένο μόριο της Staurosporine στο ενεργό κέντρο της Pim-1, το σάκχαρο κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο καλύπτοντας την κοιλότητα της ριβόζης και κάνοντας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu171A και Asp128A (Εικόνα 22). Ωστόσο τα φυσικά σάκχαρα είναι συνήθως ασταθή, γι' αυτό στα νέα παράγωγα γίνεται προσομοίωση του σακχάρου της Staurosporine με μία αλυσίδα αποτελούμενη από τρεις άνθρακες και μία ή δύο πολικές ομάδες στον C₃ ή στον C₂ και C₃ αντίστοιχα (Εικόνα 23).

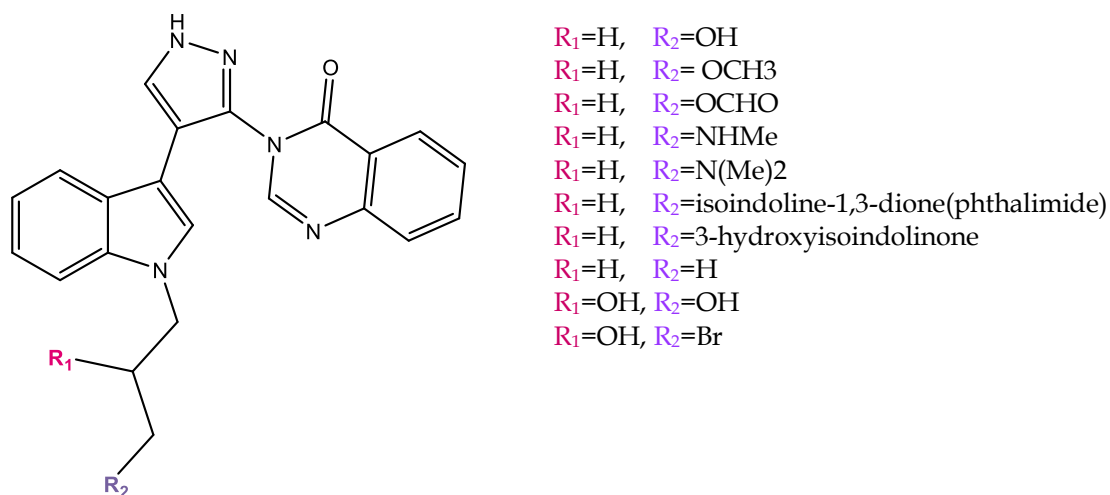


Εικόνα 22: 3D απεικόνιση της κρυσταλλογραφημένης Pim-1 με τη Staurosporine στο ενεργό της κέντρο (αριστερά) και 2D απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου της Staurosporine με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της Pim-1 (δεξιά)



Εικόνα 23: Βασικός σκελετός της σειράς συντιθέμενων μορίων

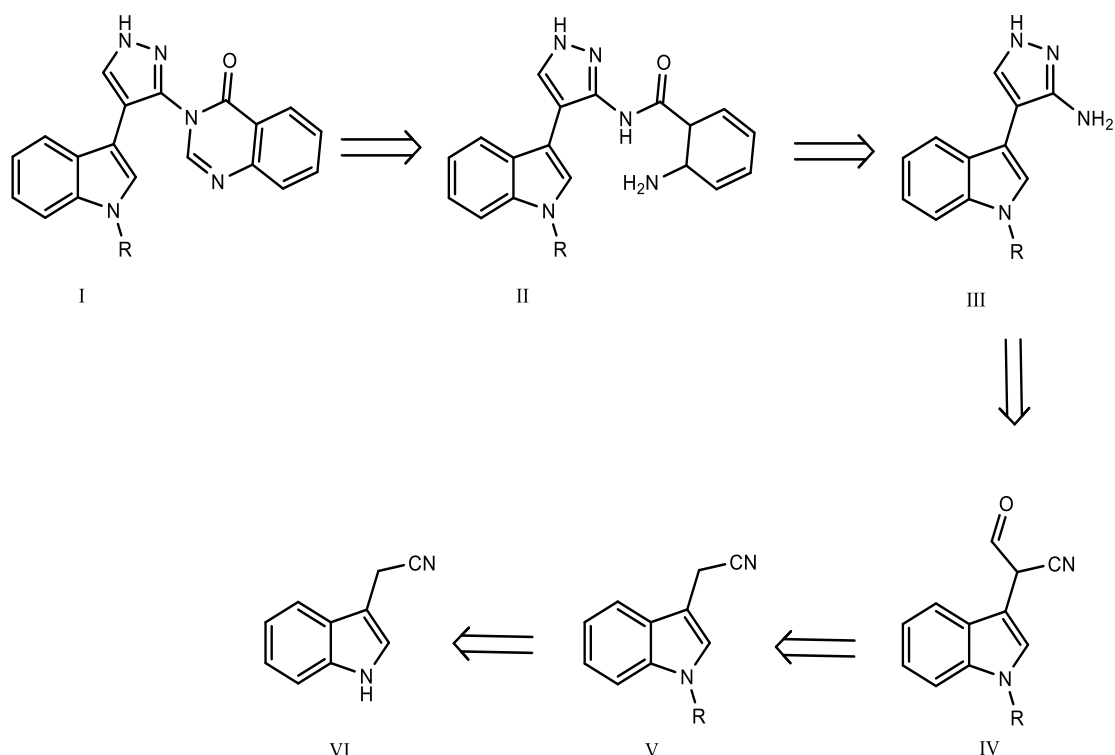
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελετών μοριακής πρόσδεσης καταλήξαμε στη σύνθεση 10 τελικών παραγώγων (Εικόνα 24), τα οποία έδειξαν να διευθετούνται με το βέλτιστο δυνατό τρόπο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, προσομοιάζοντας το μόριο του κρυστάλλου. Η σύνθεση των συγκεκριμένων παραγώγων θα επιτρέψει την ασφαλή εξαγωγή αποτελεσμάτων για την αποσαφήνιση σχέσεων δομής-δράσης τους έναντι της Staurosporine.



Εικόνα 24: Βασικός σκελετός της σειράς συντιθέμενων μορίων και οι υποκαταστάσεις του

3. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

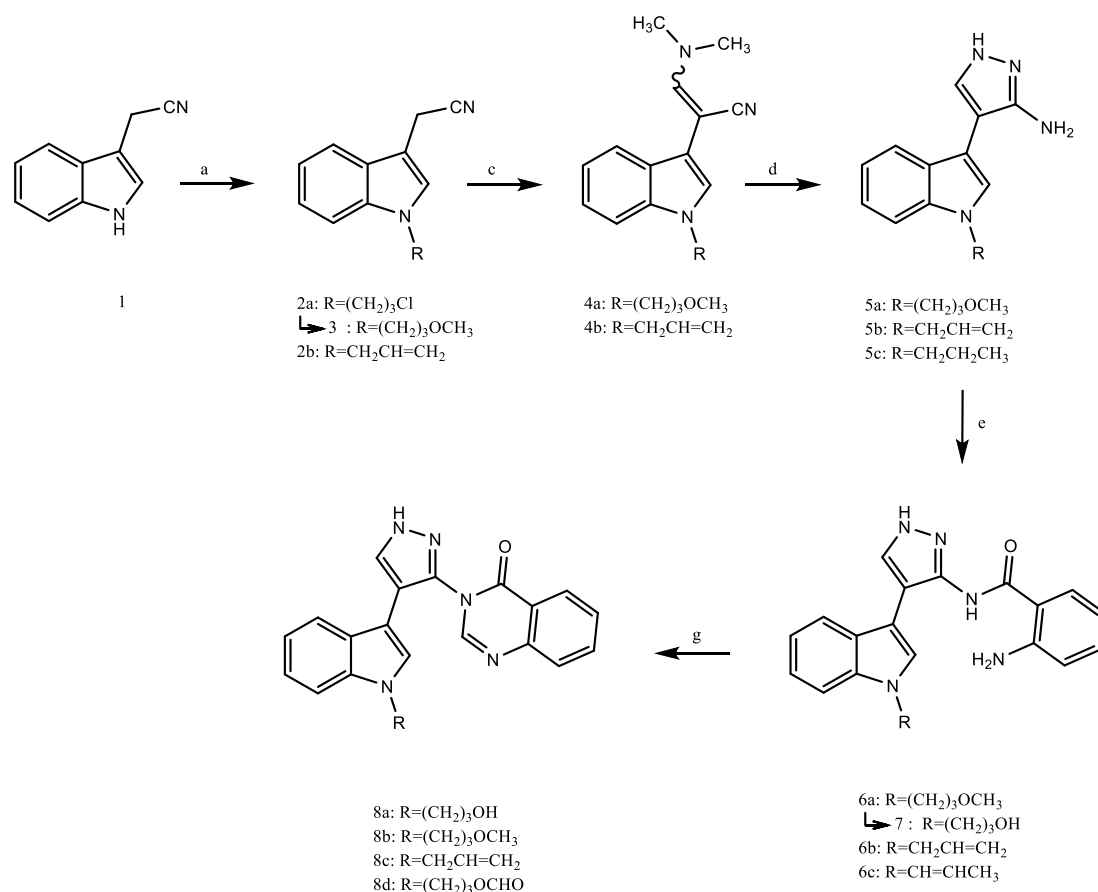
Σύμφωνα με το ρετροσυνθετικό σχήμα 1, η σύνθεση των μορίων στόχων της εργασίας θα μπορούσε να γίνει με ενδομοριακή κύκλωση του παραγώγου II, που προκύπτει από αμιδοποίηση του παραγώγου III, το οποίο θα μπορούσε να συντεθεί με επίδραση υδραζίνης επί του παραγώγου IV. Το παράγωγο IV μπορεί να προκύψει από αλκυλίωση του V, το οποίο μπορεί να παρασκευαστεί από το εμπορικά διαθέσιμο ινδολοακετονιτρίλιο VI ύστερα από την προσθήκη της κατάλληλης υποκατάστασης.



Σχήμα 1: Ρετροσύνθεση τελικών μορίων-στόχων

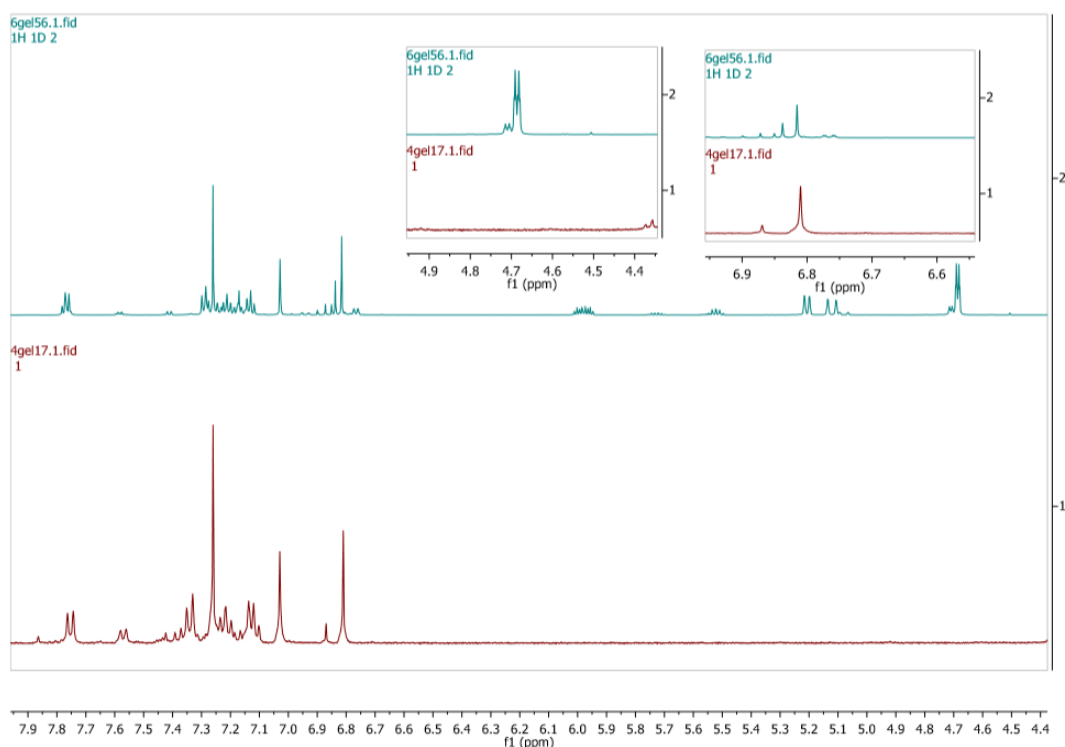
Η προσθήκη της αλειφατικής αλυσίδας επιλέχθηκε να γίνει στο πρώτο στάδιο της συνθετικής πορείας καθώς στα τελικά προϊόντα, λόγω της ύπαρξης των αζώτων του πυραζολικού δακτυλίου είναι πιθανή και η σύνθεση των αντίστοιχων N-αλκυλο υποκατεστημένων πυραζολικών αναλόγων.

Αρχικά λοιπόν, με επίδραση του κατάλληλου βρωμιδίου (1,3-βρωμοχλωροπροπανίου ή αλλυλοβρωμιδίου) επί του ινδολοακετονιτρίλιου **1**, λαμβάνονται τα N-αλκυλοϋποκατεστημένα ινδόλια **2a** και **2b** αντίστοιχα (Σχήμα 2). Η αντίδραση γίνεται σε συνθήκες μεταφοράς φάσεως σε μίγμα νερού-διχλωρομεθανίου, παρουσία όξινου θεικού τετραβουτυλαμμωνίου ως καταλύτη. Πρέπει να τονιστεί ότι επιλέγονται οι συγκεκριμένες συνθήκες αλκυλίωσης καθώς με επίδραση βάσεως (πχ NaH ή NaOH) σε άνυδρες συνθήκες, με ή χωρίς θέρμανση, λαμβάνεται πολύπλοκο μίγμα προϊόντων λόγω της οξύτητας των μεθυλενικών υδρογόνων του ινδολοακετονιτρίλιου.

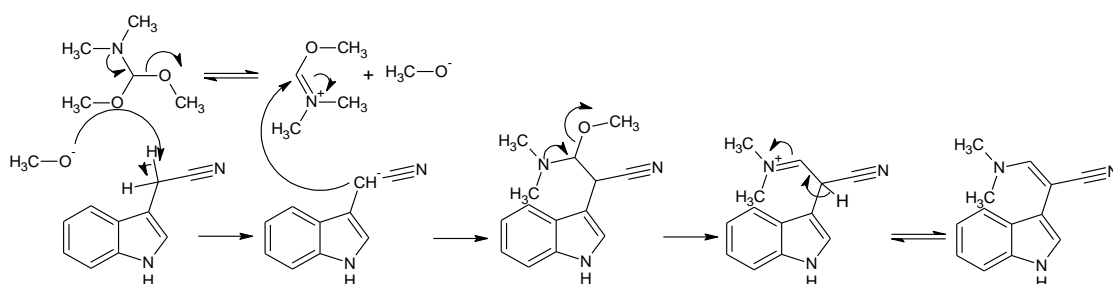


Σχήμα 2: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a) 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο, TBAHS, υδατικό διάλυμα NaOH 15%, CH₂Cl₂, βρασμός; ή αλλολοβρωμιδίο, TBAHS, υδατικό διάλυμα NaOH 15%, CH₂Cl₂, βρασμός; b) MeONa, MeOH, βρασμός; c) DMF-DMA, DMF, βρασμός; d) NH₂NH₂·H₂O 64%, CH₃COOH, EtOH, βρασμός; e) ισοπυκνικός ανυδρίτης, DMF, βρασμός; f) BBr₃, CHCl₃, 25 °C; g) (EtO)₃CH, p-TsOH, άνυδρο THF, 25 °C.

Στη συνέχεια, με επίδραση μεθοξυ νατρίου επί του χλωριδίου **2a** παραλαμβάνεται το μεθοξυ υποκατεστημένο παράγωγο **3**. Ακολούθως, με επίδραση N,N-διμεθυλακεταλης του N,N-διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF-DMA) επί των παραγώγων **3** και **2b** λαμβάνονται τα παράγωγα **4a** και **4b** αντίστοιχα (Σχήμα 2). Τα παράγωγα αυτά λαμβάνονται ως μίγμα των ισομερών Z και E, τα οποία δεν ήταν δυνατό να διαχωριστούν και χρησιμοποιήθηκαν ως έχει στο επόμενο στάδιο. Η ύπαρξη των δύο ισομερών είναι εμφανής στο φάσμα ¹H NMR, όπου χαρακτηριστικές είναι οι δύο απλές κορυφές στα 6.81 και 6.87 ppm, σε αναλογία 2/1 για το παράγωγο **4a** και στα 6.82 και 6.84 ppm, σε αναλογία 6/1, για το παράγωγο **4b**, που απαντούν στην απορρόφηση των μεθινίων του διπλού δεσμού και οι κορυφές 4.71 και 4.69 ppm του παραγώγου **4b**, που αντιστοιχούν στα υδρογόνα του C-1''' της αλυσίδας (Εικόνα 25).



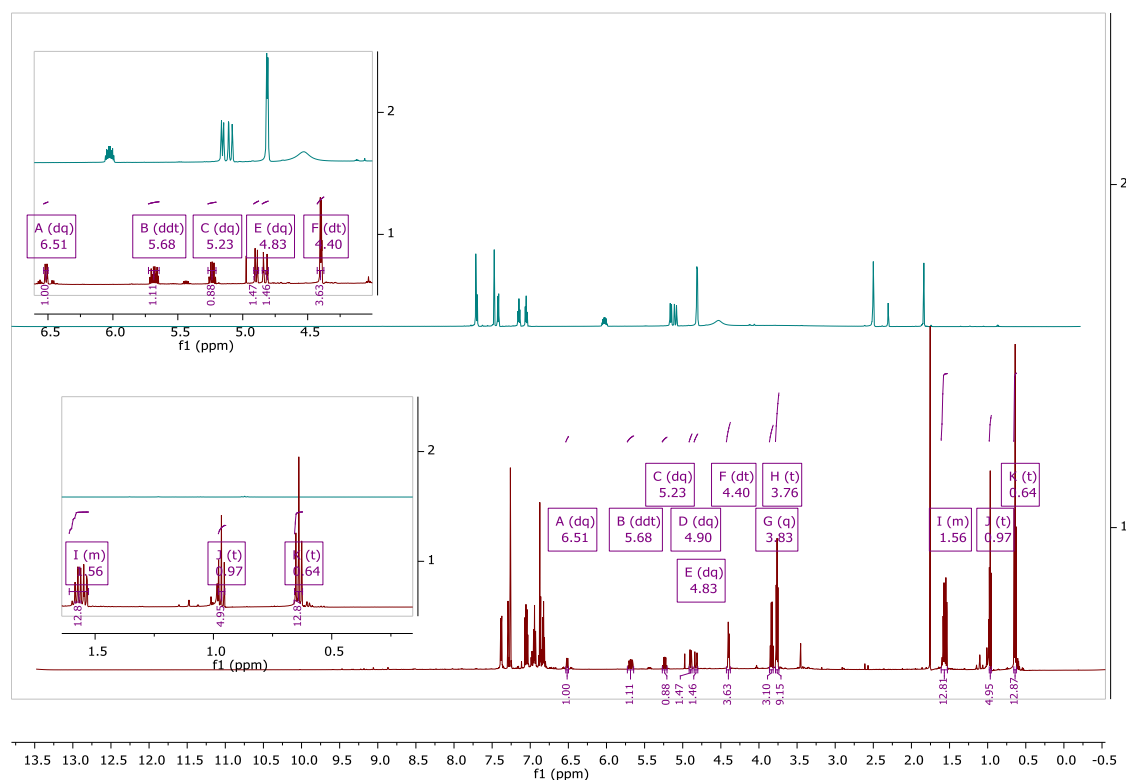
Εικόνα 25: Φάσματα 1H NMR σε CDCl₃ των παραγώγων **4a** (κάτω) και **4b** (πάνω) με εστίαση στις κορυφές διαφορετικών αναλογιών λόγω των δύο ισομερών που προκύπτουν στην κάθε περίπτωση. Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, το DMF-DMA βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη του μορφή, η οποία λειτουργεί ως πολύ καλό ηλεκτρονιόφιλο. Έτσι, με επίδραση του 3-ινδολοακετονιτριλίου (1) λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν ως μίγμα των δύο ισομερών (Σχήμα 3). (**28**)



Σχήμα 3: Μηχανισμός φορμυλίωσης μέσω του DMF-DMA.

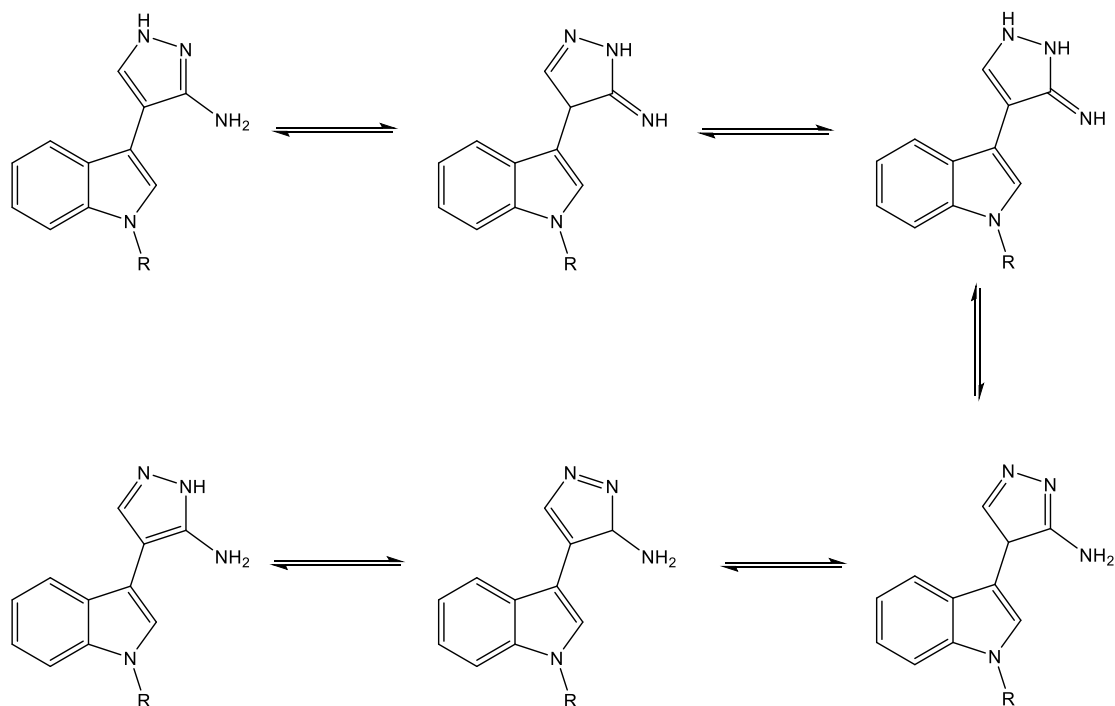
Στη συνέχεια με επίδραση υδραζίνης επί των παραγώγων **4a** και **4b** προκύπτουν τα αμινοπυραζόλια **5a** και **5b** αντίστοιχα. Η αντίδραση επιχειρήθηκε με διάφορους τρόπους, με χρήση κλασικών συνθηκών θέρμανσης αλλά και μικροκυμματικής ακτινοβολίας. Κατά την θέρμανση εντός αιθανόλης, σε

θερμοκρασία βρασμού ή στους 120 °C σε αυτόκλειστο, λαμβάνεται μικρό ποσοστό προϊόντος, ακόμα και μετά από παρατεταμένη θέρμανση, το οποίο είναι δύσκολο να καθαριστεί. Με την αντικατάσταση της αιθανόλης από διαιθυλενογλυκόλη και θέρμανση στους 140 °C για 24 ώρες, λαμβάνεται το παράγωγο **5a** σε καλύτερη απόδοση, ενώ με την χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας και θέρμανση στους 140 °C για 70 λεπτά, το επιθυμητό αμινοπυραζόλιο **5a** λαμβάνεται σε απόδοση 75%. Παρότι ο χρόνος και η απόδοση της αντίδρασης βελτιώθηκε σημαντικά με την χρήση της διαιθυλενογλυκόλης, η κατεργασία της αντίδρασης ήταν ιδιαίτερα επίπονη, κυρίως λόγω της δυσκολίας απομάκρυνσης της διαιθυλενογλυκόλης. Τελικά, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επίδραση υδραζίνης, παρουσία ισομοριακής ποσότητας οξικού οξέος, με βρασμό εντός αιθανόλης για 1.5 ώρα. Με τον τρόπο αυτό παραλαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο **5a** σε απόδοση 70%, ενώ η κατεργασία/καθαρισμός της αντίδρασης είναι ιδιαίτερα απλός. Δυστυχώς, κατά την αντίδραση σύνθεσης του αντίστοιχου αλλυλο παραγώγου **5b** λαμβάνεται μίγμα του επιθυμητού παραγώγου **5b** και του αντίστοιχου προϊόντος αναγωγής προπυλο παραγώγου **5c** (Εικόνα 26). Όπως φαίνεται στο φάσμα ¹H NMR, ενώ στο παράγωγο **5b** παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις της αλλυλικής ομάδας στα 6.03, 5.16 και 5.09 ppm, στο αντίστοιχο προϊόντος αναγωγής **5c** παρατηρούνται μία πενταπλή και δύο τριπλές κορυφές στα 0.97, 0.64 και 1.56 ppm στις οποίες συντονίζεται η προπυλική ομάδα. Για την παραλαβή του παραγώγου **5b** δοκιμάστηκαν διαφορετικές αναλογίες υδραζίνης με την βέλτιστη απόδοση ($\alpha = 96\%$) να επιτυγχάνεται με αναλογία υδραζίνης/παραγώγου **5b** 0.9/1.



Εικόνα 26: Σύγκριση φάσματος ¹H NMR σε διαλύτη DMSO-*d*₆ του παραγώγου **5b** (πάνω) και του παραγώγου **5c** (κάτω).

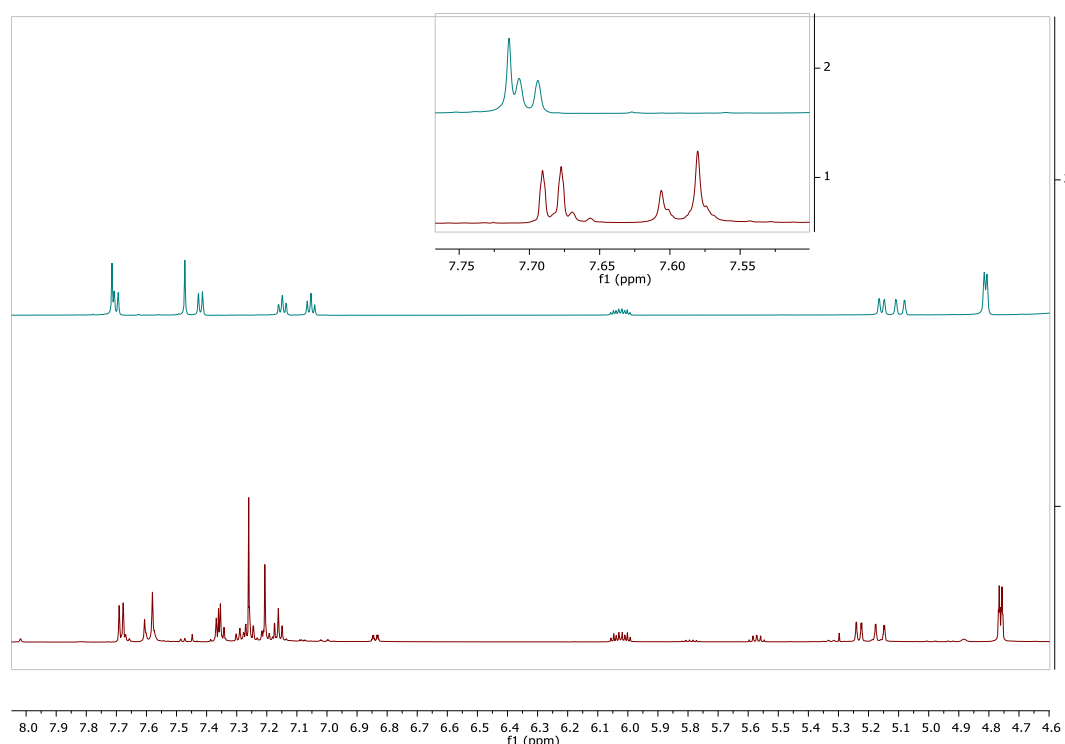
Τα παράγωγα **5a**, **5b** και **5c** μπορεί να βρίσκονται υπό την μορφή 6 ταυτομερών δομών (Σχήμα 4) (29), η ύπαρξη των οποίων μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, ο διαλύτης και οι άλλοι υποκαταστάτες του δακτυλίου. Ειδικότερα, στα αμινοπυραζόλια, η αμινομάδα βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ της αμίνης και της ιμίνης, με την ισορροπία να είναι σαφώς μετατοπισμένη προς την μορφή της αμίνης. (30)



Σχήμα 4: Πιθανές ταυτομερείς δομές παραγώγων **5a** και **5b**.

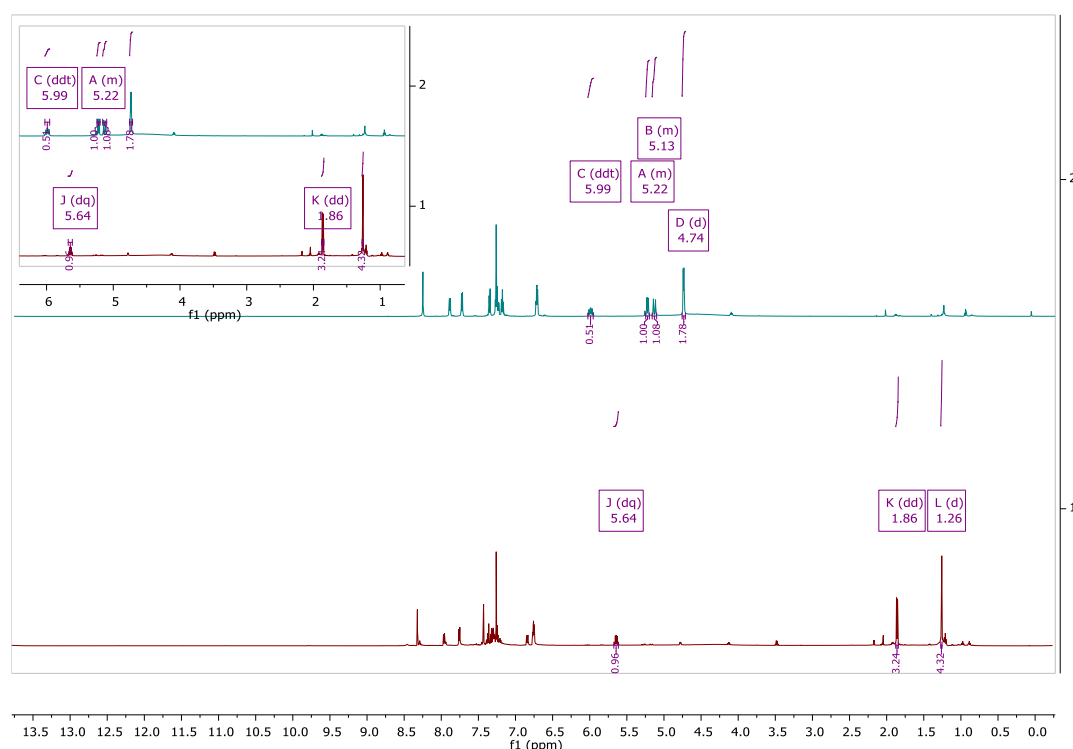
Η παρουσία των ταυτομερών επιβεβαιώθηκε με την βοήθεια φασματοσκοπίας ^1H NMR. Συγκεκριμένα, ελήφθησαν φάσματα ^1H NMR του παραγώγου **5b** σε CDCl_3 και $\text{DMSO}-d_6$ και σε διάφορες θερμοκρασίες. Από τα ανωτέρω πειράματα φαίνεται ότι η αναλογία των ταυτομερών δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την θερμοκρασία, όμως η επίδραση των διαλυτών είναι σημαντική.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 28, η ύπαρξη των ταυτομερών δομών δε γίνεται αντιληπτή στην περίπτωση του $\text{DMSO}-d_6$, ενώ στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το CDCl_3 είναι σαφής η ύπαρξη τους. Χαρακτηριστικά στο φάσμα του παραγώγου **5b** σε CDCl_3 παρουσιάζονται δύο απλές κορυφές στα 7.60 και 7.58 ppm, σε διαφορετική αναλογία, ενώ στο φάσμα του μορίου σε $\text{DMSO}-d_6$ εμφανίζεται μία απλή κορυφή στα 7.71 ppm, που αντιστοιχούν στα ίδια αρωματικά πρωτόνια του πυραζολικού δακτυλίου, (Εικόνα 27).

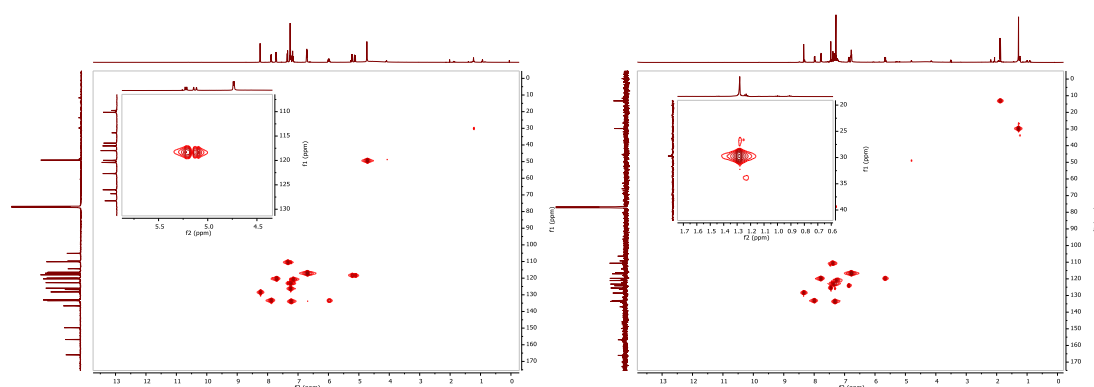


Εικόνα 27: Σύγκριση των φασμάτων ^1H NMR της ένωσης **5b** σε $\text{DMSO-}d_6$ και CDCl_3 πάνω και κάτω αντίστοιχα. Στην εστίαση φαίνονται οι κορυφές που οφείλονται στην ταυτομέρεια που παρουσιάζουν όταν γίνει η αλλαγή διαλύτη.

Τα παράγωγα **6a** και **6b** παρασκευάστηκαν με σύζευξη τους με ισοτοϊκό ανυδρίτη σε DMF σε θερμοκρασία βρασμού. Όσον αφορά το αλλυλοϋποκατεστημένο αμίδιο **6b** παρατηρήθηκε πως η θερμοκρασία της αντίδρασης παίζει καιρίο ρόλο στην παραλαβή του. Βέλτιστη θερμοκρασία ήταν οι $140\text{-}145^\circ\text{C}$ όπου παραλαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο **6b** σε απόδοση 70%, ενώ στους $145\text{-}150^\circ\text{C}$ παραλαμβάνεται μίγμα παραπροϊόντων που ήταν δύσκολο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν. Αντίθετα, με θέρμανση στους $130\text{-}140^\circ\text{C}$ παρατηρήθηκε μετάθεση του διπλού δεσμού προς παραλαβή του παραγώγου **6c**. Η μετάθεση αυτή είναι φανερή στο φάσμα ^1H NMR, όπου παρατηρείται εμφάνιση μίας απλής κορυφής στα 1.26 ppm στη θέση των δύο διπλών κορυφών στα 5.22 και 5.13 ppm του φάσματος ^1H NMR του **6b**. Οι κορυφές αυτές ανήκουν στα υδρογόνα της αλυσίδας του C-3''', τα οποία λόγω του διπλού δεσμού βρίσκονται σε διαφορετικό περιβάλλον μεταξύ τους στο παράγωγο **6b**, γι' αυτό και σχάζονται διαφορετικά. Επιπλέον υπάρχει μετατόπιση στην πολλαπλή κορυφή του C-2''' από τα 5.64 στα 5.99 ppm και στη διπλή κορυφή του C-1''' από τα 1.86 στα 4.74 ppm του **6c** και του **6b** αντίστοιχα, λόγω του ότι πλέον βρίσκεται δίπλα σε διπλό δεσμό και αποθωρακίζεται (Εικόνα 28). Η μετατόπιση του διπλού δεσμού γίνεται επίσης αντιληπτή με τη λήψη φάσματος HSQC, όπου φαίνεται πως στον C-3''' του **6c** στα 29.8 ppm αντιστοιχεί μία απλή κορυφή στα 1.26 ppm με ολοκλήρωση 3, ενώ στο **6b** παράγωγο στον C-3''' αντιστοιχούν δύο διπλές κορυφές πρωτονίων στα 5.22 και 5.13 ppm (Εικόνα 29).



Εικόνα 28: Σύγκριση φασμάτων ^1H NMR σε CDCl_3 των παραγώγων **6c** (κάτω) και **6b** (πάνω)

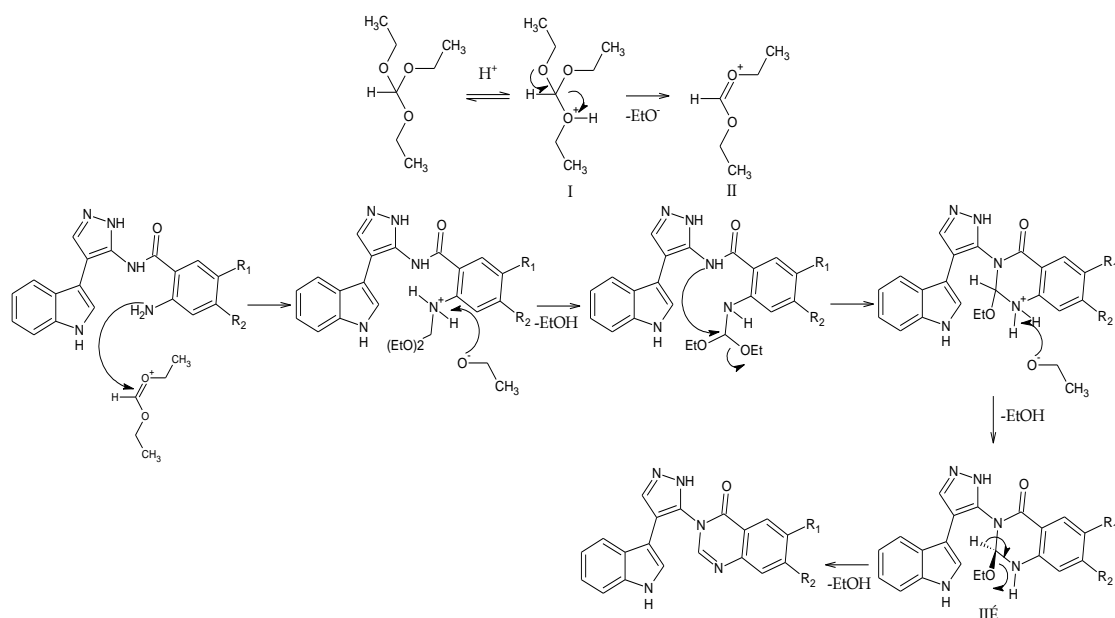


Εικόνα 29: Φάσματα HSQC των παραγώγων **6b** (αριστερά) και **6c** (δεξιά) με εστίαση στις συζεύξεις των μεταποτισμένων κορυφών της αλυσίδας

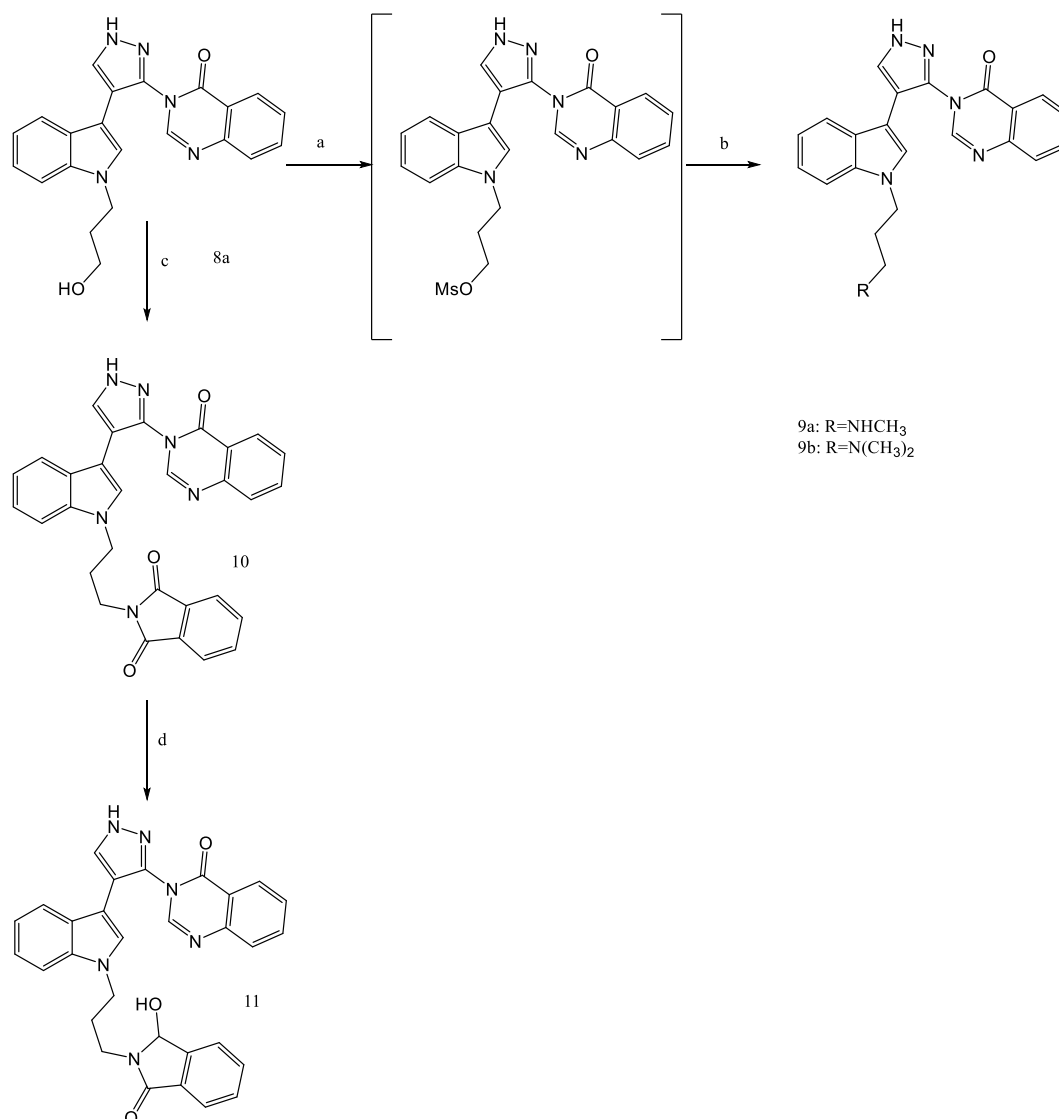
Η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων **8a** και **8c** πραγματοποιήθηκε με ανάδευση μίγματος του κατάλληλου αμιδίου, **6a** και **6b** αντίστοιχα, και μυρμηκικού τριαυθυλεστέρα παρουσία καταλυτικής ποσότητας π-τολουολοσουλφονικού οξέος, αυστηρά σε θερμοκρασία 25 °C. Πρέπει να τονιστεί ότι η θερμοκρασία της αντίδρασης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο καθώς μικρές αυξομειώσεις μειώνουν την απόδοση ενώ ταυτόχρονα λαμβάνονται πολύπλοκα μίγματα προϊόντων που είναι δύσκολο να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν. Όσον αφορά το υδροξυ υποκατεστημένο παράγωγο **8a**, αρχικά επιχειρήθηκε η απομεθυλίωση του μεθοξυ παραγώγου **8b** με τριβρωμιούχο βόριο σε χλωροφόρμιο, σε θερμοκρασία δωματίου, όμως η απόδοση της αντίδρασης ήταν ιδιαίτερα χαμηλή ενώ ταυτόχρονα λαμβάναμε πολύπλοκα μίγματα προϊόντων. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε η αποπροστασία να γίνει σε προηγούμενο στάδιο της συνθετικής πορείας. Έτσι λοιπόν, με επίδραση τριβρωμιούχου βορίου επί του μεθοξυ παραγώγου **6a** λαμβάνεται το υδροξυ

παράγωγο 7, από το οποίο, με επίδραση μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα παρουσία καταλυτικής ποσότητας π-τολουολοσουλφονικού οξέος, στους 25 °C, λαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο 8a. Παρατηρήθηκε πως η αντίδραση της κύκλωσης στα αποπροστατευμένα αμιδία χρειαζόταν αισθητά περισσότερο χρόνο (16 ώρες) από εκείνα που φέρουν μεθοξύλιο στην αλυσίδα τους (2ώρες), ενώ αξιοσημείωτη είναι η διαφορά στις αποδόσεις, αφού στην πρώτη περίπτωση ήταν 60% ενώ στη δεύτερη 80%, παρόλ' αυτά όμως η συνολική απόδοση της πορείας αυτής είναι αισθητά καλύτερη από την προηγούμενη.

Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, αρχικά πραγματοποιείται πρωτονίωση του μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα παρουσία του οξέος προς το δραστικό ενδιάμεσο II, από το οποίο με επίδραση της κατάλληλης αμίνης λαμβάνεται μετά από απόσπαση αιθοξυ ομάδων το ενδιάμεσο III από το οποίο στη συνέχεια με αρωματικοποίηση παρασκευάζεται το επιθυμητό παράγωγο (Σχήμα 5). (31)



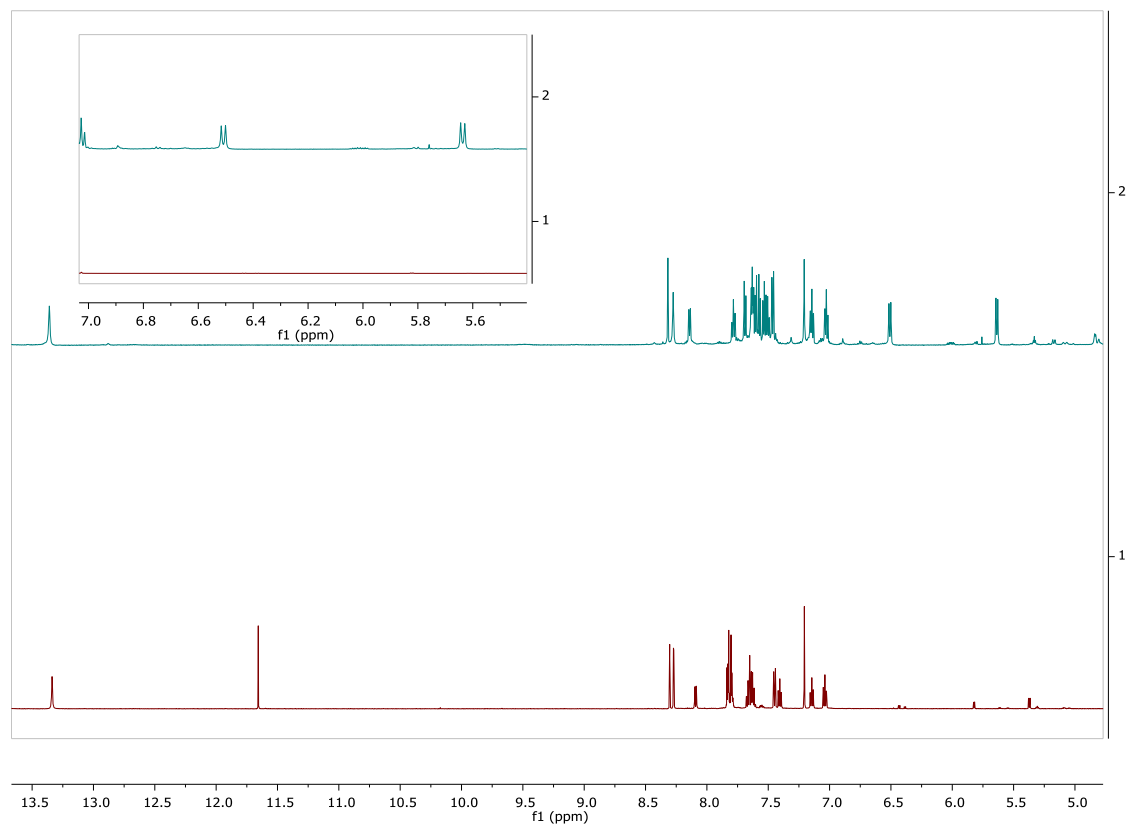
Σχήμα 5: Μηχανισμός σχηματισμού κιναζολινόνης μέσω του μυρμηκικού τριαιθυλεστέρα



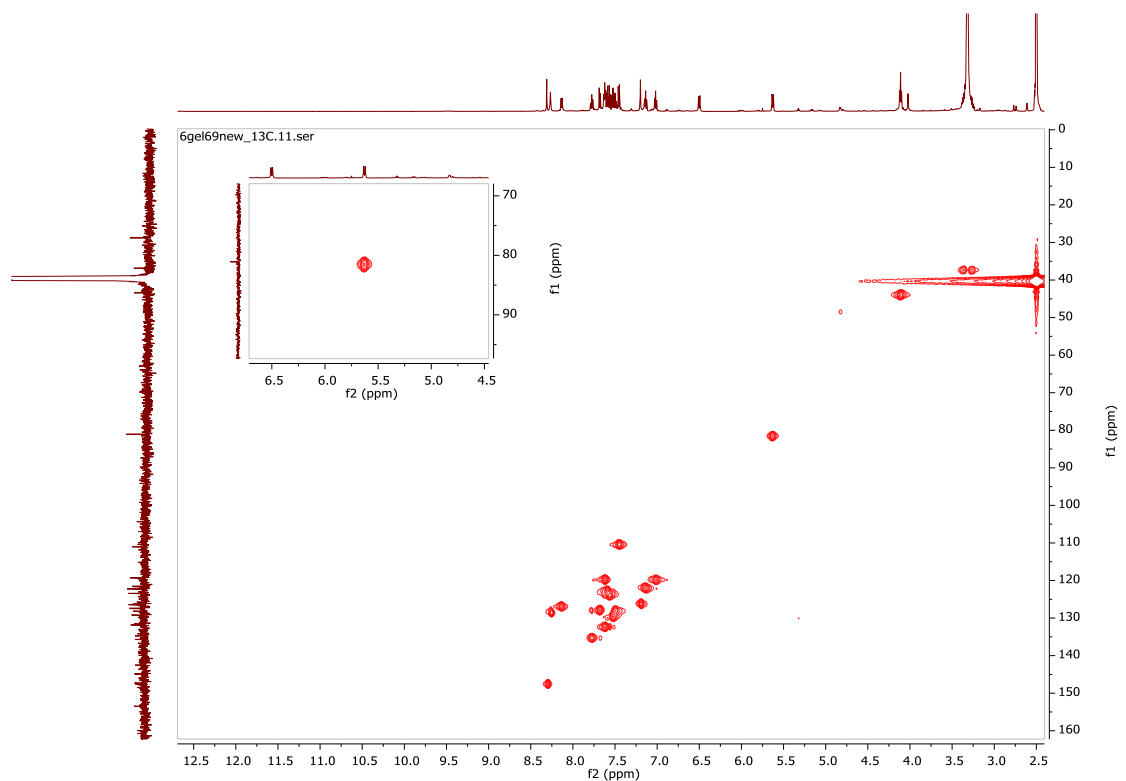
Σχήμα 6: Συνθετικό σχήμα των αναλόγων 9a, 9b, 10 και 11 από το παράγωγο 8a. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. MsCl, THF, 0°C; b. THF/EtOH, μεθυλαμίνη ή διμεθυλαμίνη αμίνη, 60°C και 70°C αντιστοίχα; c. φθαλιμίδιο, τριφαινυλοφωσφίνη, DEAD, THF, rt; d. B₂H₆, THF, MeOH, 0-5°C

Για την σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων **9a-b** ήταν απαραίτητη η «ενεργοποίηση» του υδρόξυ υποκατεστημένου παράγωγο **8a** προς το αντίστοιχο αλογονομένο παράγωγο ή σουλφονικό εστέρα. Αρχικά επιχειρήθηκε η σύνθεση του αντίστοιχου χλωρο παραγώγου με επίδραση θειονυλο χλωριδίου ή μίγματος τριφαινυλοφωσφίνης/τετραχλωράνθρακα όμως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν παρατηρούσαμε καμία αντίδραση ενώ σε αυξημένη θερμοκρασία παραλαμβάναμε πολύπλοκο μίγμα προϊόντων. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην ευαισθησία του παραγώγου **8a** σε όξινες συνθήκες ή στην αυξημένη ενεργότητα του πυραζολικού και του ινδολικού δακτυλίου στις αρωματικές ηλεκτρονιόφιλες υποκαταστάσεις. Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε να συνθέσουμε το αντίστοιχο μεθανοσουλφονικό εστέρα. Έτσι λοιπόν, τα επιθυμητά παράγωγα **9a-b** παρασκευάστηκαν με επίδραση περίσσειας μεθανοσουλφονυλο χλωριδίου, παρουσία τριαιθυλαμίνης, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθως προσθήκη της κατάλληλης αμίνης επί του ενδιάμεσου μεθανοσουλφονικού εστέρα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο ενδιάμεσος εστέρας δεν απομονώθηκε, αλλά η αντίδραση έγινε σε ένα στάδιο με προσθήκη της αντίστοιχης αμίνης και θέρμανση. Η επιλογή αυτή δεν έγινε λόγω της αστάθειας του

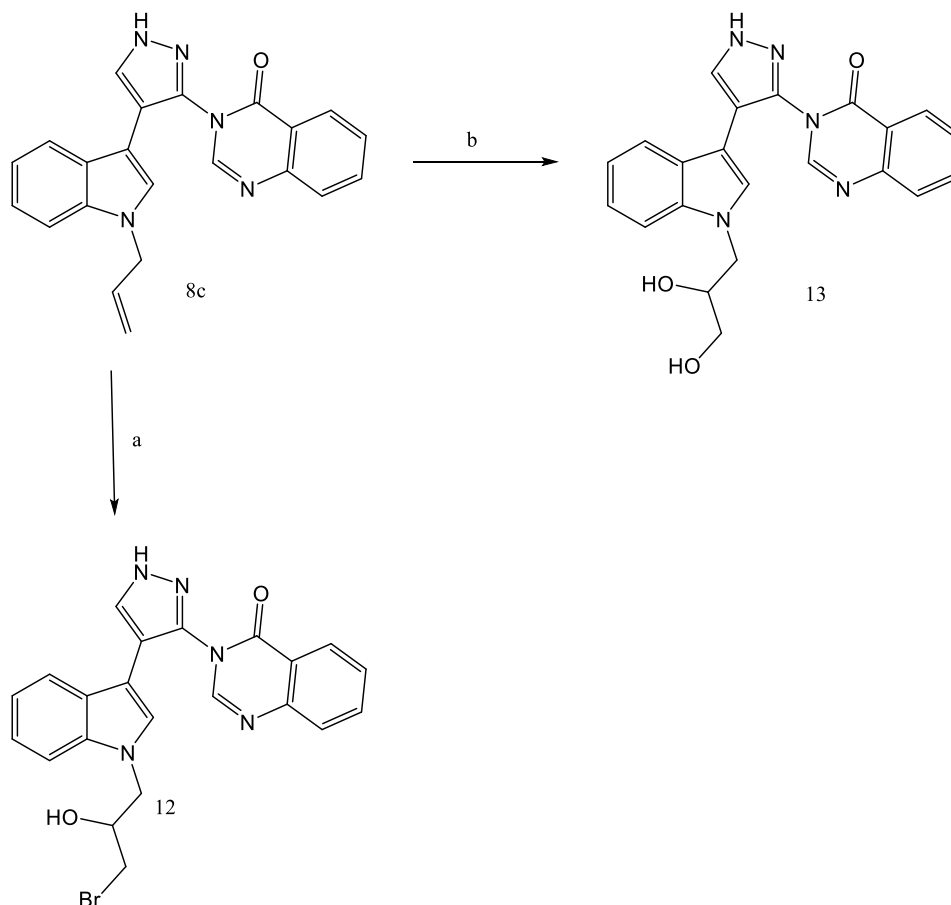
ppm, οι οποίες ανήκουν στο ευκίνητο υδρογόνο του OH και τον άνθρακα με τον οποίο συζεύγνυται αντίστοιχα. (Εικόνα 30)



Εικόνα 30: Φάσματα ^1H NMR σε DMSO της ένωσης 10 (κάτω) και 11 (πάνω) με εστίαση στις κορυφές της 11 που ανήκουν στο H του C7''' και του ευκίνητου του που δείχνουν την αναγωγή του ενός καρβονυλίου του φθαλιμιδίου.

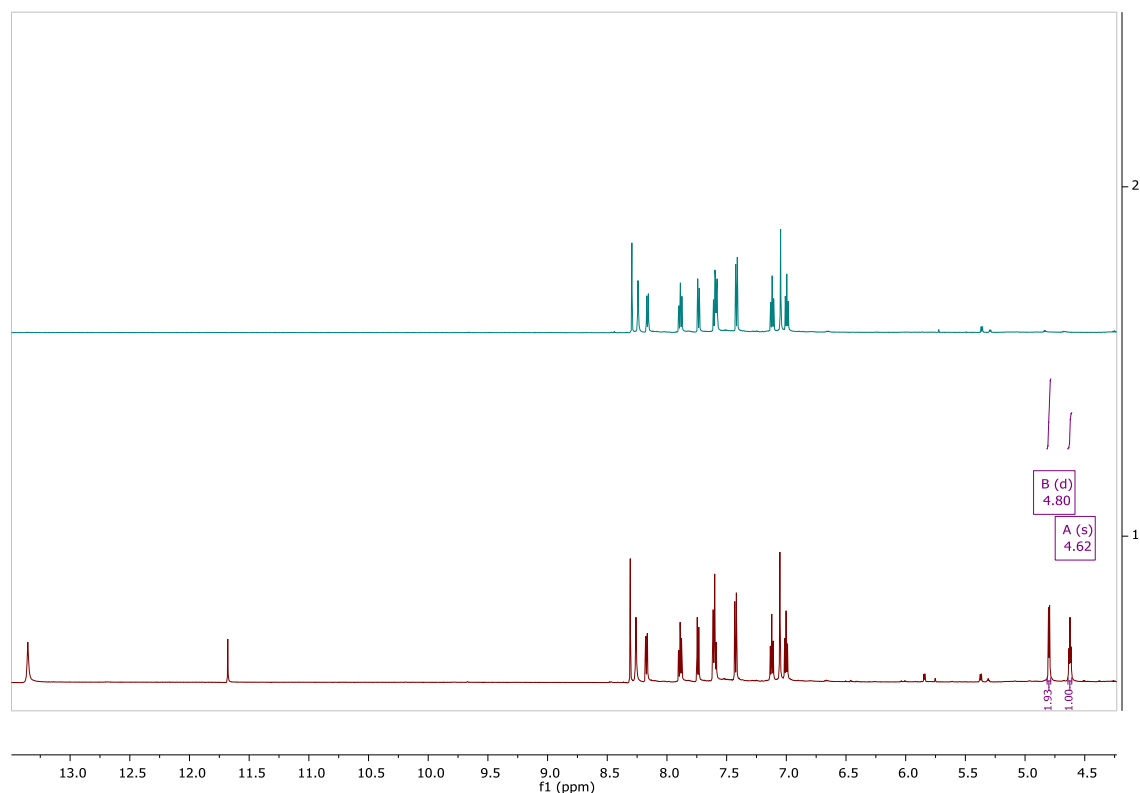


Εικόνα 31: Φάσμα HSQC της ένωσης **11** με έμφαση στη σύζευξη του C-7''' με το αντίστοιχο H.



Σχήμα 8: Συνθετικό σχήμα των αναλόγων **12** και **13** από το παράγωγο **8c**. Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. NBS, THF/H₂O, rt; b. KMnO₄, ακετόνη/ H₂O, rt

Η σύνθεση του παραγώγου **13** αρχικά επιχειρήθηκε με επίδραση τετροξειδίου του οσμίου παρουσία N-οξειδίου της N-μεθυλομορφολίνης, όμως δεν παρελήφθη προϊόν ακόμα και μετά από ανάδευση 8 ημερών. Η αντίδραση επιχειρήθηκε και με ελαφρά τροποποίηση των συνθηκών π.χ. αύξηση του τετροξειδίου του οσμίου, αύξηση του N-οξειδίου της N-μεθυλομορφολίνης, προσθήκη 4-διμεθλαμινοπυριμιδίνης ή και μικρή αύξηση της θερμοκρασίας, όμως σε κάθε περίπτωση παραλαβάναμε αποκλειστικά την πρώτη ύλη. Τελικά το προϊόν παρελήφθη με προσθήκη υπερμαγγανικού καλίου σε διάλυμα ακετόνης-νερού, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στο φάσμα ¹H NMR του παραγώγου **13** είναι χαρακτηριστικές οι κορυφές των ευκίνητων υδρογόνων των δύο υδροξυλίων της αλυσίδας, τα οποία συντονίζονται ως μία διπλή και μία τριπλή κορυφή στα 4.80 και 4.62 ppm αντίστοιχα και με την προσθήκη δευτεριωμένου νερού εξαφανίζονται.



Εικόνα 32: Φάσμα ¹H NMR του παραγώγου 13 σε DMSO-*d*₆ (κάτω) και με προσθήκη δευτεριωμένου νερού (πάνω), όπου φαίνονται τα εκκίνητα πρωτόνια του κύριου σκελετού στα 13.35 και 11.68 και της αλυσίδας στα 4.80 και 4.62 ppm.

Συνοπτικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 21 νέα μόρια, εκ των οποίων τα 10 αποτελούν τελικά παράγωγα. Τα νέα παράγωγα βρίσκονται υπό φαρμακολογική αξιολόγηση στο εργαστήριο του Καθηγητή Knapp Stefan (University of Frankfurt and Oxford). Ο έλεγχος γίνεται έναντι της κινάσης Pim-1 αλλά και άλλων κινασών έτσι ώστε να μελετηθεί η εκλεκτικότητα των νέων ενώσεων.

4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ

4.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ

4.1.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (PROTEIN PREPARATION WIZARD)

Αποτελεί λογισμικό της εταιρείας Schrödinger το οποίο προετοιμάζει την πρωτεΐνη για υπολογισμούς πρόσδεσης. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για *in silico* μελέτες μία πρωτεΐνη πρέπει να υποβληθεί σε επεξεργασία. Συγκεκριμένα, εισάγει άτομα υδρογόνου, διορθώνει και εισάγει δεσμούς ανάμεσα στα άτομα, όπου αυτό κρίνεται αναγκαίο, συμπληρώνει φορτία στα αμινοξέα που απαιτείται και ελαχιστοποιεί την ενέργεια του συστήματος, οδηγώντας σε μια σταθερή διαμόρφωση. Τέλος, όλα τα κρυσταλλογραφικά μόρια νερού σε ακτίνα 4Å από το ενεργό κέντρο διατηρήθηκαν, ενώ τα υπόλοιπα μόρια νερού διαγράφηκαν.

4.1.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (GLIDE AND/OR INDUCED FIT DOCKING)

Το Glide docking στηρίζεται στη βασική παραδοχή ενός άκαμπτου υποδοχέα. Σε πρότυπες μελέτες εικονικής σύνδεσης, οι προσδέτες συνδέονται στη θέση δέσμευσης ενός υποδοχέα, ο οποίος είναι άκαμπτος και ο προσδέτης είναι ελεύθερος να κινηθεί. Η υπόθεση ενός άκαμπτου υποδοχέα μπορεί να δώσει παραπλανητικά αποτελέσματα, αφού στην πραγματικότητα πολλές πρωτεΐνες κινούν την πλευρική αλυσίδα ή τον σκελετό, ή και τα δύο, προς επίτευξη σύνδεσης. Η κλιμάκωση των ακτινών van der Waals των μη πολικών ατόμων, η οποία μειώνει τις ποινές για κοντινές επαφές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαμορφώσει μια μικρή ευχέρεια του υποδοχέα ή του προσδέτη ή και των δύο, ενώ και σε συγκεκριμένες ομάδες υδροξυλίου μπορεί να επιτραπεί να αναπροσανατολιστούν για τη βελτιστοποίηση δεσμών υδρογόνου. Αυτό όμως, μπορεί να μην είναι αρκετό για συστήματα όπου η δέσμευση του συνδέτη επάγει ουσιαστικές αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα («επαγόμενη προσαρμογή»). Αυτές οι αλλαγές επιτρέπουν στο δέκτη να αλλάξει τις θέσεις σύνδεσης, έτσι ώστε να αλληλεπιδρά καλύτερα με τον συνδέτη. Αυτό συχνά αναφέρεται ως «επαγόμενο συνταίριασμα» (induced fit). Το λογισμικό της εταιρείας Schrödinger έχει αναπτύξει μια διαδικασία για τις περιπτώσεις αυτές που χρησιμοποιεί το Prime και το Glide για την εκτέλεση σύνδεσης επαγόμενης προσαρμογής, τα οποία εξετάζουν διεξοδικά τους δυνατούς τρόπους δέσμευσης και τις σχετικές αλλαγές διαμόρφωσης μέσα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Η δυνατότητα για επαγόμενο συνταίριασμα έχει δύο κύριες εφαρμογές:

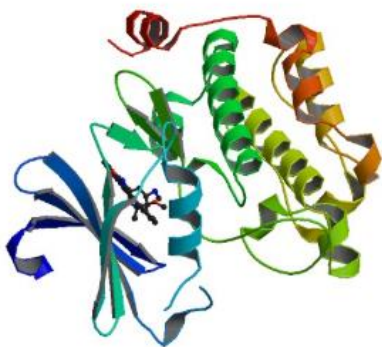
- Δημιουργία μιας ακριβούς, πολύπλοκης δομής για ένα πρόσδεμα που είναι γνωστό ότι είναι ενεργό, αλλά ότι δεν μπορεί να συνδεθεί στην υπάρχουσα (άκαμπτη) δομή του υποδοχέα.
- Ψευδώς χαμηλή βαθμολογία σε καλούς συνδέτες σε πειράματα εικονικής σάρωσης. Το πρωτόκολλο του IFD των συνδετών ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

- 1) προαιρετική ελαχιστοποίηση του υποδοχέα (protein preparation) με σημείο αποκοπής RMSD 0.18 Å. Κανονικά αυτό γίνεται κατά την προετοιμασία της πρωτεΐνης με το protein preparation wizard.
- 2) Σύνδεση με χρήση του αλγόριθμου Glide του κάθε προσδέτη με προαιρετική απομάκρυνση των πλευρικών αλυσίδων και εφαρμογή περιορισμών. Από προεπιλογή, διατηρούνται 20 πόζες ανά συνδέτη, και εξ' ορισμού οι πόζες που θα διατηρηθούν πρέπει να έχουν έναν Coulomb-VDW βαθμό λιγότερο από 100 και σκορ δεσμών υδρογόνου λιγότερο από -0.05.
- 3) Πρόβλεψη μέσω του Prime της διαμόρφωσης της πλευρικής αλυσίδας για κάθε σύμπλοκο πρωτεΐνης- συνδέτη, για τα υπολείμματα που βρίσκονται σε δεδομένη προεπιλεγμένη απόσταση 5 Å από τον συνδέτη, με προαιρετική ένταξη ή αποκλεισμό άλλων υπολειμμάτων.
- 4) Ελαχιστοποίηση μέσω του Prime του ίδιου συνόλου υπολειμμάτων και προσδέματος για κάθε σύμπλοκο πρωτεΐνης- συνδέτη. Η δομή του υποδοχέα σε κάθε στάση τώρα αντανακλά μια επαγόμενη σύνδεση που ταιριάζει με τη δομή του συνδέτη και τη διαμόρφωση του.
- 5) Glideredocking κάθε περιπλοκής δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης-συνδέτη εντός συγκεκριμένης ενέργειας της δομής χαμηλότερης ενέργειας (προεπιλογή 30 kcal/mol). Ο συνδέτης είναι πλέον αυστηρά συνδεδεμένος, χρησιμοποιώντας προεπιλεγμένες ρυθμίσεις Glide στη δομή του υποδοχέα που προέκυψε από το inducedfit.
- 6) Τέλος εκτιμάται η ενέργεια πρόσδεσης (IFDScore) για κάθε εξαγόμενο πρόσδεμα

4.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ (DOCKING)

Για τον σχεδιασμό των νέων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλογραφική δομή συγκεκριμένης κινάσης, η οποία αποτελεί το φαρμακολογικό στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Έπειτα από οπτική παρατήρηση του τρόπου σύνδεσης των ενώσεων και αξιολογώντας την θεωρητική εμπειρική ενέργεια σύνδεσης έγινε, ο σχεδιασμός των νέων ενώσεων και εκτιμήθηκαν τα αρχικά βιολογικά αποτελέσματα. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται στη συνέχεια ορισμένα αποτελέσματα και συγκρίνονται με τα πρώτα φαρμακολογικά αποτελέσματα.

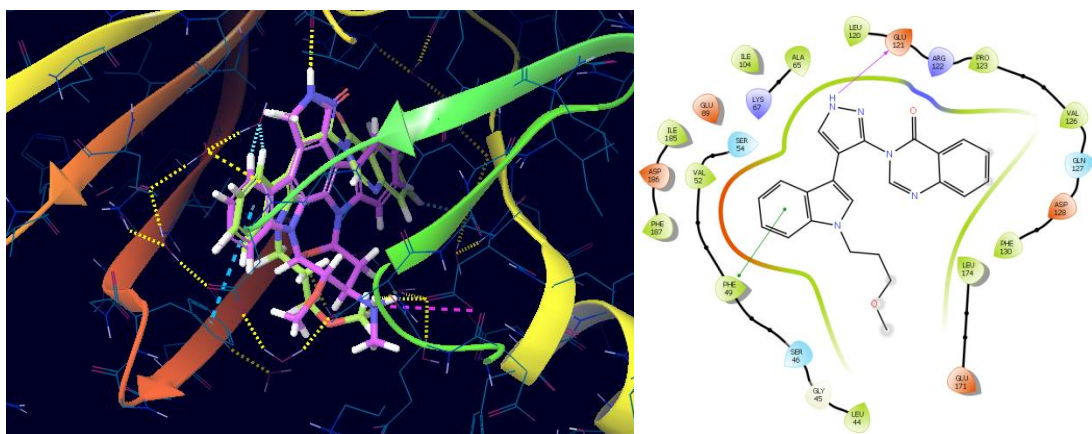
Για τους θεωρητικούς υπολογισμούς πρόσδεσης έναντι κινασών επιλέχθηκε η κρυσταλλογραφική δομή της «Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1» σε σύμπλοκο με την Staurosporine (κωδικός PDB: 1YHS) (24)



Εικόνα 33: Κρυσταλλογραφική δομή της Pim-1

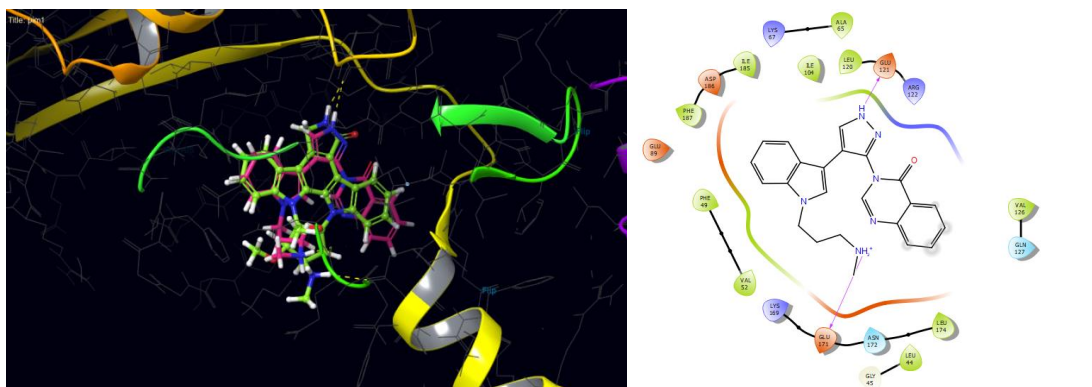
Γενικά παρατηρήθηκε πως τα νέα παράγωγα διευθετούνται στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης με τρόπο παρεμφερή της Staurosporine. Γενικά τα νεοσυντιθέμενα μόρια παρουσιάζουν μία κάμψη σε σχέση με το μόριο οδηγό, λόγω του ότι έχουν διαμόρφωση τύπου δινδολίου και όχι κλειστή όπως η Staurosporine, η οποία είναι άκαμπτη. Έτσι σε όλες τις νέες ενώσεις φαίνεται πως υπάρχει μία μικρή γωνία κάμψης μεταξύ του ινδολικού και κιναζολικού δακτυλίου. Ωστόσο το ινδόλιο των τελικών παραγώγων συμπίπτει με ένα εκ των δύο ινδολίων της, αλλά και το πυραζόλιο με τον πυρρολικό της δακτύλιο, το οποίο διατηρεί το δεσμό υδρογόνου με που σχηματίζεται με την Glu121. Επιπλέον η αλυσίδα, η οποία τείνει να προσομοιώνει το σάκχαρο της ένωσης-οδηγού διευθετείται με γωνία και προς την ίδια πλευρά με αυτό.

Εδώ παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες από τις ενώσεις που συντέθηκαν, στο ενεργό κέντρο της Pim-1 με τους δεσμούς που δημιουργούνται σε σύγκριση με το μόριο της Staurosporine (πράσινο χρώμα) σε 3D.



Εικόνα 34: 3D απεικόνιση της κρυσταλλογραφημένης Pim-1 με τη Staurosporine στο ενεργό της κέντρο (αριστερά) και το παράγωγο 8b και 2D απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του παραγώγου 8b στο ενεργό κέντρο της Pim-1 (δεξιά).

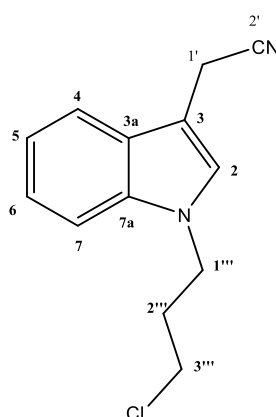
Τα παράγωγα **8b** και **9a** διευθετούνται με παρόμοιο τρόπο με τη Staurosporine στο ενεργό κέντρο της Pim-1 και διατηρούν το δεσμό υδρογόνου με τη Glu121. Επιπλέον του δεσμού αυτού, το παράγωγο **8b** σχηματίζει αλληλεπίδραση πi-πi stacking με τη Phe49, ενώ το **9a** λειτουργεί ως δότης σε δεσμό υδρογόνου με το το αμινοξύ Glu171, όπως και η ένωση-οδηγός.



Εικόνα 35: 3D απεικόνιση της κρυσταλλογραφημένης Pim-1 με τη Staurosporine στο ενεργό της κέντρο (αριστερά) και το παράγωγο και 2D απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του παραγώγου στο ενεργό κέντρο της Pim-1 (δεξιά).

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) Silica gel 60F254. Οι χρωματογραφικές στήλες πραγματοποιήθηκαν με Silicagel 60 AC (SDS35-70 mm). Τα φάσματα ^1H NMR και ^{13}C NMR λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο BrukerAvance 400 στα 400 MHz και BrukerAvance III στα 600 MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), ακετόνη (Acetone-*d*6) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*6). Το φάσμα μάζας λήφθηκε σε φασματοφωτόμετρο μαζών LTQ Orbitrap Discovery με πηγή ιονισμού Ionmax. Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα.

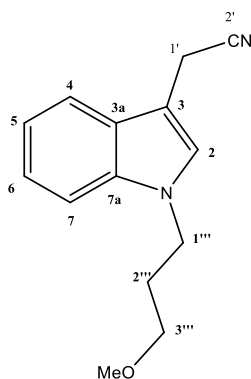


5.1 Σύνθεση του [1-(3-χλωροπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]ακετονιτρίλιου (2a)

Σε διάλυμα 3-ινδολοακετονιτρίλιου (500 mg, 3.20 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (7.38 mL) και διάλυμα καυστικού νατρίου 15% w/v (7.38 mL) προστίθεται 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο (514 μL , 5.20 mmol) και θειϊκό άλας τετραβουτυλαμμωνίου (62.6 mg, 0.18 mmol) και το μίγμα αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία βρασμού για 36 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οργανική στιβάδα πλένεται με νερό, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου, συμπυκνώνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 5/1. Λαμβάνονται 500 mg πορτοκαλί ελαιώδους προϊόντος ($\alpha=67\%$).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.59 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H, H-4), 7.40 (d, $J = 8.0$, Hz, 1H, H-7), 7.29 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 7.20 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 7.15 (s, 2H, H-2), 4.33 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-1''), 3.83 (s, 2H, H-2'), 3.46 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-3'), 2.27 (m, 2H, H-2'').

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 136.46 (C-7a), 126.72 (C-3a), 126.50 (C-2), 122.70 (C-6), 120.05 (C-5), 118.50 (C-4), 118.23 (C-3), 109.80 (C-7), 103.73 (C-2'), 43.01 (C-1''), 41.76 (C-3'), 32.67 (C-2'), 14.34 (C-1').



5.2 Σύνθεση του [1-(3-μεθοξυπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]ακετονιτριλίου (3)

Σε διάλυμα του παραγώγου **2a** (800 mg, 3.44 mmol) προστίθεται διάλυμα μεθοξυνατρίου (204 mg, 3.78 mmol) σε μεθανόλη (4 mL), υπό ψύξη, και στη συνέχεια αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία βρασμού, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 12 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο μίγμα προστίθεται διάλυμα υδροχλωρίου 9% (pH~5) και συμπύκνωσης υπό ελαττωμένη πίεση. Το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και νερό, και η οργανική φάση ξηραίνεται με προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου και συμπύκνωσης υπό κενό. Ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διχλωρομεθανίου/κυκλοεξανίου : 1/2–3/1. Λαμβάνονται 620 mg πορτοκαλί ελαιώδες προϊόντος ($\alpha=79\%$).

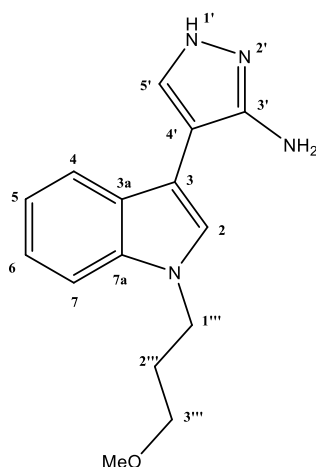
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.46 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 7.27 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7), 7.16 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5), 7.06 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 7.01 (s, $J = 1.1$ Hz, 1H, H-2), 4.10 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-1''), 3.69 (s, 2H, H-2), 3.22 (s, 3H, O-CH₃), 3.16 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-3''), 1.93 (m, 2H, H-2'').

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 136.61 (C-7a), 126.60 (C-3a), 122.41 (C-6), 119.76 (C-5), 118.34 (C-4), 118.29 (C-3), 109.91 (C-7), 103.24 (C-2'), 68.92 (C-3''), 58.69 (O-CH₃), 42.97 (C-1''), 30.32 (C-2''), 14.33 (C-1').

5.3 Σύνθεση του (2EZ)-3-(διμεθυλαμινο)-2-[1-(3-μεθοξυπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]προπ-2-ενονιτριλίου (4a)

Σε διάλυμα του παραγώγου **3** (364 mg, 1.6 mmol) σε άνυδρο διμεθυλφορμαμίδιο (1.5 mL), προστίθεται διμεθυλακετάλη του N-N-διμεθυλοφορμαμιδίου (1.48 mL, 11.16 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 24 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η περίσσεια του διαλύτη απομακρύνεται υπό κενό και στο ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται προστίθεται νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική στιβάδα ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπύκνωσης υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/διχλωρομεθανίου:

1/1. Λαμβάνονται 218 mg ελαιώδους προϊόντος ($\alpha=60\%$) ως μίγμα των E και Z ισομερών, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο.



5.4 Σύνθεση της 4-[1-(3-μεθοξυπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]-1-H-πυραζολ-3-αμίνης (5a)

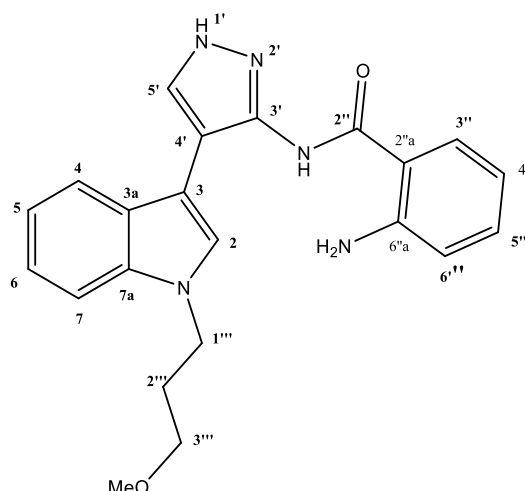
Σε διάλυμα του παραγώγου **4a** (200 mg, 0.71 mmol) σε διαιθυλενογλυκόλη (10 mL) προστίθεται υδραζίνη (75.69 μ L, 1.55 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 140°C, σε κλίβανο μικροκυμάτων (CEM Ethos, 100 Watt), για 70 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε νερό, πλένεται με διχλωρομεθάνιο, ξηραίνεται (άνυδρο θειικό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 100/1 έως 9/1. Λαμβάνονται 150 mg προϊόντος ($\alpha=75\%$).

Σ.τ.: 116.9- 119.3 °C (THF)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{15}H_{18}ON_4^+$ [MH^+]: 270.1481, ευρεθέν 270.1477.

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.71 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-4), 7.57 (s, 1H, H-5'), 7.41 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-7), 7.26 (t, $J = 8$ Hz, 1H, H-6), 7.19 (s, 1H, H-2), 7.14 (t, 1H, H-5), 4.22 (t, $J = 8$ Hz, 1H, H-3''), 3.34 (s, 3H, H-2''), 3.30 (s, 3H, O-CH₃), 2.06 (m, 2H, H-1'').

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 151.41 (C-3'), 136.55 (C-7a), 129.23 (C-5'), 127.19 (C-3a), 125.35 (C-2), 122.03 (C-6), 120.09 (C-4), 119.56 (C-5), 109.69 (C-7), 106.89 (C-4'), 101.47 (C-3), 69.28 (C-2''), 58.72 (O-CH₃), 42.97 (C-3''), 30.44 (C-1'').



5.5 Σύνθεση του 2-αμινο-N-[4-[1-(3-μεθοξυπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-3-υλ]βενζαμιδίου (6a)

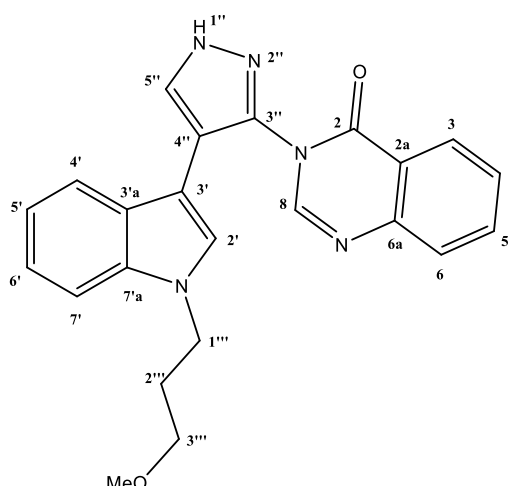
Μίγμα του αμινοπυραζολίου **5a** (210 mg, 0.78 mmol) και ισοτοϊκού ανυδρίτη (139 mg, 0.85 mmol) σε άνυδρο DMF (1 mL), υπό ατμόσφαιρα αργού, αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1.5 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η περίσσεια του διαλύτη απομακρύνεται υπό κενό, το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα, πλένεται με 10% διάλυμα ανθρακικού νατρίου (3 X 15 mL) και νερό (15 mL), ξηραίνεται (άνυδρο θειικό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 100/2 έως 10/1. Λαμβάνονται 286 mg λευκού στερεού ($\alpha=94\%$).

Σ.τ.: 176.3- 178.2°C (EtOAc-Et₂O)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₂₂H₂₀O₂N₅⁺ [MNa⁺]: 389.1852, ευρεθέν 389.185.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.30 (s, 1H, H-5'), 7.96 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-3), 7.76 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-4''), 7.43 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-7''), 7.31 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.30 (s, 1H, H-2''), 7.29 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-5), 7.29 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-6''), 7.20 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-5''), 6.75 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-4), 4.30 (t, J = 8.2 Hz, 2H, H-1'''), 3.35 (s, 3H, O-CH₃), 3.33 (t, J = 8.2 Hz, 2H, H-3'''), 2.11 (m, 2H, H-2''').

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.13 (C-2), 156.74 (C-3'), 150.07 (C-6a), 136.71 (C-7''a), 133.58 (C-5), 133.22 (C-3), 128.24 (C-5'), 126.80 (C-3''a), 126.31 (C-6), 122.65 (C-6''), 120.30 (C-5''), 120.02 (C-4''), 116.98 (C-4), 116.37 (C-2a), 114.29 (C-3''), 109.98 (C-2''), 109.80 (C-7''), 104.97 (C-4'), 69.12 (O-CH₃), 58.86 (C-3'''), 43.28 (C-1'''), 30.44 (C-2''').



5.6 Σύνθεση της 3-[4-[1-(3-μεθοξυπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-3-υλ]κιναζολιν-4(3H)-όνης (8b)

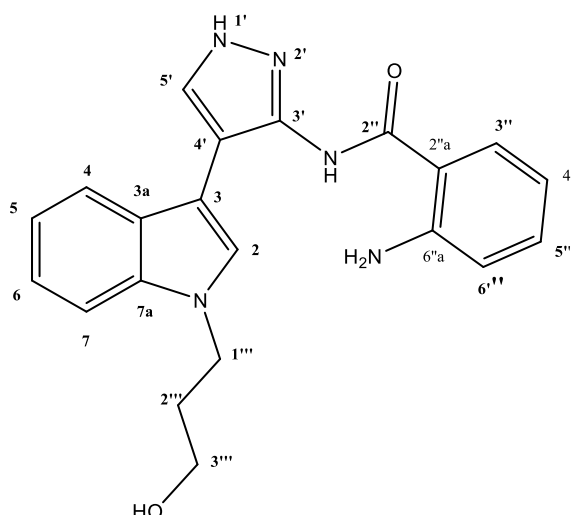
Σε διάλυμα του παραγώγου **6a** (60 mg, 0.15 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 mL), προστίθεται μυρμηκικός τριαιθυλεστέρας (77 μ L, 0.46 mmol) και π-τολουουλοσουλφονικό οξύ (0.93 mg, 0.008 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα: 3/1-1/2. Λαμβάνονται 47 mg υποκίτρινου στερεού (α =80%).

Σ.τ.: 225.2- 227.6°C (MeOH)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{23}H_{21}O_2N_5$ [MH⁺]: 399.1695, ευρεθέν 399.1684.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 13.37 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 8.33 (s, 1H, H-2), 8.30 (s, 1H, H-5'), 8.17 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5), 7.90 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.75 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-8), 7.66 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-4''), 7.61 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.42 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-7''), 7.15 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-6''), 7.04 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-5''), 6.96 (s, 1H, H-2''), 4.07 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-1'''), 2.99 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-3'''), 2.95 (s, 3H, O-CH₃), 1.76 (m, 1H, H-2''').

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160.53 (C-4), 148.14 (C-8a), 147.87 (C-2), 142.49 (C-3'), 136.19 (C-7'a), 135.47 (C-7), 128.74 (C-5'), 128.19 (C-6), 127.97 (C-8), 126.96 (C-3'a), 126.67 (C-5), 125.94 (C-2''), 122.08 (C-4a), 121.60 (C-6''), 120.38 (C-5''), 119.80 (C-4''), 111.49 (C-4'), 110.34 (C-7'), 104.88 (C-3'''), 68.85 (O-CH₃), 58.12 (C-3'''), 42.64 (C-1'''), 31.16 (C-2''').



5.7 Σύνθεση του 2-αμινο-N-[4-[1-(3-υδροξυπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-3-υλ]βενζαμιδίου (7)

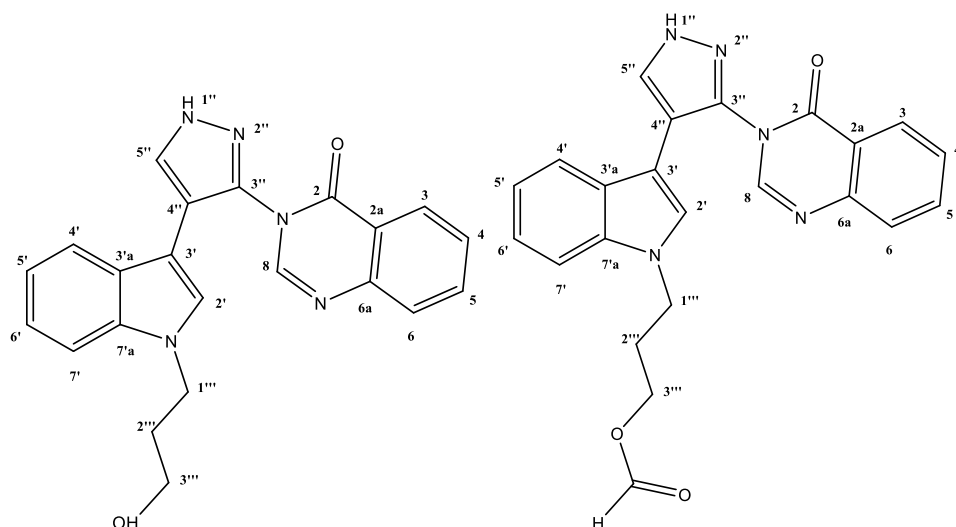
Σε διάλυμα του παραγώγου **6a** (310 mg, 0.80 mmol), σε άνυδρο χλωροφόρμιο, στους -30°C , προστίθεται σταγόδην τριβρωμιούχο βόριο, υπό ατμόσφαιρα αργού. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η ανάδευση συνεχίζεται για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα πλένεται με νερό, διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 5%, ξηραίνεται (άνυδροθειϊκό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν που παραλαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 100/1 έως 50/1. Λαμβάνονται 250 mg πράσινο-κίτρινου στερεού ($\alpha=65\%$).

Σ.τ.: $106.2-108.7^{\circ}\text{C}$ (CH_2Cl_2 -n-pentane)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_5^+$ [MNa^+]: 375.1695, ευρεθέν 375.169.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 8.38 (s, 1H, H-5'), 7.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-3), 7.75 (s, 1H, H-2'), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-4''), 7.54 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7''), 7.23 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6''), 7.23 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5), 7.15 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5''), 6.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-6), 6.58 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-4), 4.27 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-3'''), 3.42 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-1'''), 1.96 (m, 2H, H-2''').

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 165.15 (C-2), 156.97 (C-3'), 150.33 (C-6a), 136.04 (C-7'a), 132.67 (C-5), 132.62 (C-3), 127.20 (C-2''), 125.97 (C-3''a), 125.69 (C-5'), 121.81 (C-6''), 119.71 (C-5''), 119.43 (C-4'), 116.18 (C-6), 114.39 (C-4), 113.57 (C-2a), 110.14 (C-3''), 109.79 (C-7''), 103.73 (C-4'), 57.86 (C-1'''), 42.70 (C-3'''), 32.82 (C-2''').



5.8 Σύνθεση της 3-[4-[1-(3-προπυλεστερ)-1*H*-ινδολ-3-υλ]]-1*H*-πυραζολ-3-υλ]κιναζολιν-4(3*H*)-όνης (**8a**) και της 3-[4-[1-(3-υδροξυπροπυλ)-1*H*-ινδολ-3-υλ]]-1*H*-πυραζολ-3-υλ]κιναζολιν-4(3*H*)-όνης (**8d**)

Σε διάλυμα του παραγώγου **7** (60 mg, 0.15 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 mL), προστίθεται μυρμηκικός τριαιθυλεστέρας (77 μ L, 0.46 mmol) και π-τολουολοσουλφονικό οξύ (0.93 mg, 0.008 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 16 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και διαχωρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 100/0.1 έως 40/1. Λαμβάνονται 18 mg του προϊόντος **8a** (α =30%) και 36 mg του προϊόντος **8d** (α =60%).

Σ.τ.: 238.1- 240.0 °C (THF)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{22}H_{19}O_2N_5^+$ [MNa^+]: 385.1539, ευρεθέν 385.284.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.30 (s, 1H, H-2), 8.26 (s, 1H, H-5'), 8.14 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5), 8.00 (s, 1H, H-4'''), 7.88 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.73 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-8), 7.62 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-4''), 7.59 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.43 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-7''), 7.15 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-6''), 7.03 (s, 1H, H-2'') 7.02 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-5''), 4.12 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-1'''), 3.83 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-3'''), 1.89 (m, 2H, H-2''').

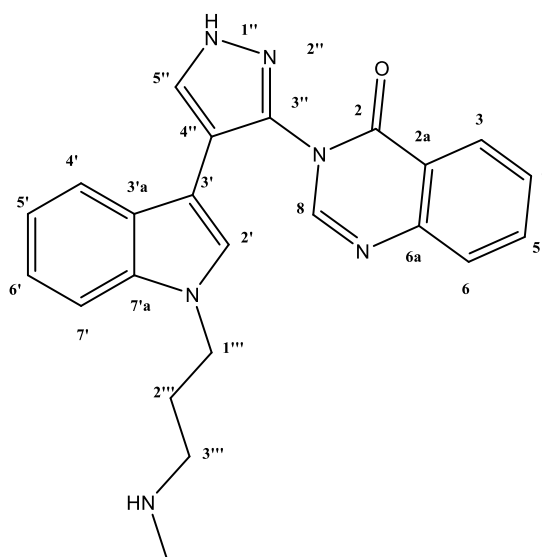
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 162.10 (C-4), 148.11 (C-8a), 147.80 (C-2), 143.04 (C-3'), 136.20 (C-7'a), 135.40 (C-7), 128.72 (C-5'), 128.13 (C-6), 127.94 (C-8), 126.93 (C-3'a), 126.75 (C-5), 125.88 (C-2''), 122.14 (C-4a), 121.83 (C-6''), 119.88 (C-5''), 119.79 (C-4''), 111.40 (C-4'), 110.33 (C-7''), 105.18 (C-3''), 98.88 (C-4'''), 60.84 (C-3'''), 42.47 (C-1'''), 29.1 (C-2''').

Σ.τ.: 161.8- 163.2°C (CH_2Cl_2)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{22}H_{19}O_2N_5^+$ [MNa^+]: 385.1539, ευρεθέν 385.1523.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 13.35 (s, D_2O exchang., 1H, NHN), 11.68 (s, D_2O exchang., 1H, NHN), 8.32 (s, 1H, H-2), 8.27 (s, 1H, H-5'), 8.16 (d, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H, H-5), 7.89 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 7.74 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-8), 7.62 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6), 7.43 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7''), 7.13 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6''), 7.03 (s, 1H, H-2''), 7.01 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5''), 4.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-1'''), 3.21 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-3'''), 1.70 (m, 2H, H-2''').

^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 160.00 (C-4), 147.60 (C-8a), 147.35 (C-2), 142.49 (C-3'), 135.78 (C-7'a), 134.95 (C-7), 128.22 (C-5'), 127.67 (C-6), 127.46 (C-8), 126.47 (C-3''a), 126.17 (C-5), 125.43 (C-2''), 121.60 (C-4a), 121.47 (C-6''), 119.22 (C-5''), 119.17 (C-4''), 111.02 (C-4'), 109.93 (C-7''), 104.32 (C-3''), 57.58 (C-3'''), 42.25 (C-1'''), 32.80 (C-2''').



5.9 Σύνθεση της 3-[4-[1-(3-μεθυλαμινοπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]]-1H-πυραζολ-3-υλ]κινναζολιν-4(3H)-όνης (9a)

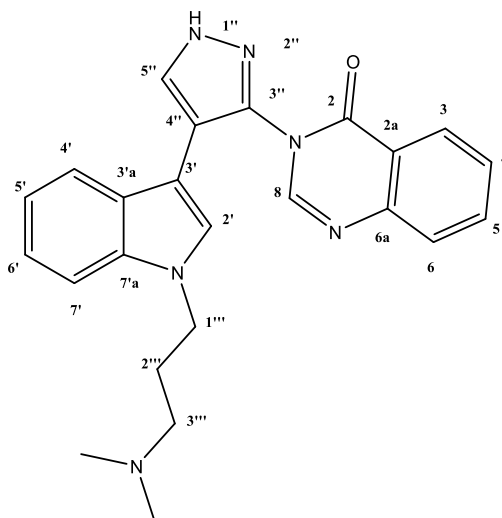
Σε διάλυμα του παραγώγου **8a** (38.5 mg, 0.1 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 mL), υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται μεθανοσουλφονυχλωρίδιο (23 μL , 0.3 mmol) και τριαιθυλαμίνη (56 μL , 0.4 mmol) και το μίγμα που λαμβάνεται αναδεύεται, στους 0°C , για 4 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό, ξηραίνεται (άνυδρο θειϊκό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε μίγμα αιθανόλης/τετραϋδροφουρανίου 10/1 (11 mL) προστίθεται υδροχλωρική μεθυλαμίνη (93 mg) και διϋσοπροπυλαιθυλαμίνη (287 μL) και το μίγμα που λαμβάνεται αναδεύεται στους 60°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης η περίσσεια διαλύτη απομακρύνεται υπό κενό και το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Al_2O_3 , Grade III κατά Brockmann) με σύστημα διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 95/5. Λαμβάνονται 18 mg του παραγώγου **9a** ($\alpha=45\%$) ως υποκίτρινο στερεό.

Σ.τ.: 167.3- 169.5°C (CH₂Cl₂)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₂₃H₂₂ON₆ [MH]: 398.1855, ευρεθέν 398.1940.

¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 8.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5), 8.01 (s, 1H, H-5'), 7.95 (s, 1H, H-2''), 7.80 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.74 (d, *J* = 8.0Hz, 1H, H-8), 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-4''), 7.54(t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.33 (d, *J* = 8.0Hz, 1H, H-7''), 7.22 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6''), 7.11 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5''), 6.99 (s, 1H, H-2''), 4.20 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-1'''), 3.23 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H-3'''), 2.10 1.85 (m, 2H, H-2'''), 2.04 (s, 6H, NHCH₃).

¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm): 161.32 (C-4), 149.26 (C-8a), 147.93 (C-2), 137.72 (C-3'), 137.09 (C-7''a), 135.46 (C-7), 128.83 (C-5'), 128.56 (C-6), 128.25 (C-8), 128.08 (C-3''a), 127.58 (C-5), 126.77 (C-2''), 123.30 (C-4a), 122.77 (C-6''), 120.52 (C-5''), 120.33 (C-4''), 112.74 (C-4'), 110.54 (C-7''), 106.11 (C-3''), 43.52 (C-3'''), 42.57 (C-1'''), 33.51 (C-2'''), 30.34 (NH-CH₃).



5.10 Σύνθεση της 3-{4-[1-(3-διμεθυλαμινοπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]}-1H-πυραζολ-3-υλ}κιναζολιν-4(3H)-όνης (9b)

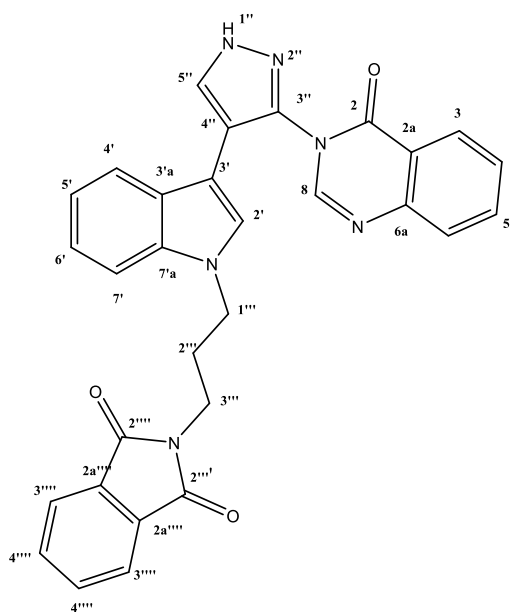
Σε διάλυμα του παραγώγου 8a (53 mg, 0.138 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 mL), προστίθεται μεθανοσουλφονυλοχλωρίδιο (32 μL) και τριαιθυλαμίνη (78 μL) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0°C, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 4 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης τα πηκτικά απομακρύνονται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό, ξηραίνεται (άνυδρο θειϊκό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Στη συνέχεια, το μίγμα που λαμβάνεται διαλύεται σε μίγμα αιθανόλης/τετραϋδροφουρανίου 10/1 (11 mL), προστίθεται διμεθυλαμίνη (180 μL, 40% σε αιθανόλη) και αφήνεται υπό ανάδευση στους 70 °C για 24 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης απομακρύνεται η περίσσεια διαλύτη υπό κενό και το προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 95/5 (Al₂O₃, Grade III κατά Brockmann). Λαμβάνεται λευκό στερεό 21 mg (α=40%).

Σ.τ.: 170.1- 172.5°C (CH₂Cl₂)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₂₄H₂₄ON₆ [MH]: 412.2012, ευρεθέν 412.2001.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5), 8.01 (s, 1H, H-2), 7.90 (s, 1H, H-5'), 7.78 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-7), 7.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-8), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4''), 7.53 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6), 7.31 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7''), 7.19 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-6''), 7.06 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5''), 6.96 (s, 1H, H-2''), 4.06 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-1'''), 2.15 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3'''), 2.11 (s, 6H, NH(CH₃)₂), 1.85 (m, 2H, H-2''').

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 161.56 (C-4), 148.11 (C-8a), 146.68 (C-2), 143.21 (C-3'), 136.32 (C-7''a), 134.89 (C-7), 128.85 (C-5'), 127.87 (C-6), 127.75 (C-8), 127.36 (C-3''a), 127.15 (C-5), 126.00 (C-2''), 122.38 (C-4a), 122.22 (C-6''), 120.01 (C-5''), 119.36 (C-4''), 112.21 (C-4'), 109.83 (C-7'''), 104.35 (C-3'''), 56.27 (C-3'''), 45.07 (NH-CH₃), 44.11 (C-1'''), 27.79 (C-2''').



5.11 Σύνθεση της 2-[3-[3-(3-(4-οξοκινναζολιν-3(4H)-ολ) -1H-πυραζολ-4-ολ)-1H-ινδολ-1-ολ]προπυλ]ισοϊνδολιν-1,3-διόνης (10)

Σε διάλυμα του παραγώγου **8a** (140 mg, 0.36 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο, υπό ατμόσφαιρα αργού, στους 0°C, προστίθεται φθαλιμίδιο (106 mg, 0.72 mmol), τριφαινυλοφωσφίνη (190 mg, 0.72 mmol) και διαιθυλαζοδικαρβοξυλικός εστέρας (315 μL, 0.72 mmol, 40% σε τολουόλιο) και το μίγμα που λαμβάνεται αφήνεται υπό ανάδευση για 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα διαχωρίζεται σε χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα: 5/1-1/2. Λαμβάνονται 110 mg πράσινο-κίτρινο στερεό (α=60%).

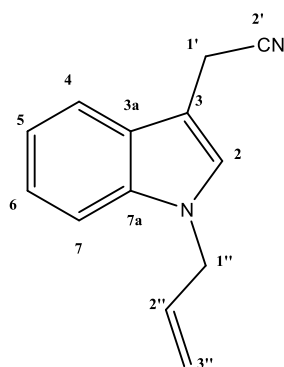
λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 50/1-10/1. Λαμβάνονται 10 mg λευκού στερεού ($\alpha=20\%$).

Σ.τ.: 168.8- 170.2°C (THF)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{30}H_{24}O_3N_6^+$ [MNa^+]: 516.1900, ευρεθέν 539.2012

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 13.35 (s, D_2O exchang., 1H, NHN), 8.31 (s, 1H, H-2), 8.27 (s, 1H, H-5'), 8.13 (d, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 1H, H-5), 7.78 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-7), 7.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-8), 7.62 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-5'''), 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4''), 7.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-6'''), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-3'''), 7.53 (t, $J = 7.9$, 1H, H-4'''), 7.49 (t, $J = 7.9$, 1H, H-6), 7.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7''), 7.20 (s, 1H, H-2''), 7.14 (t, $J=7.9, 1.8$ Hz, 1H, H-6''), 7.02 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5''), 6.50 (d, D_2O exchang., 1H, OH-7'''), 5.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7'''), 4.11 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-1'''), 3.25 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-3'''), 1.95 (m, 2H, H-2''').

^{13}C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 166.05 (C-2'''), 159.96 (C-4), 147.59 (C-8a), 147.26 (C-2), 144.88 (C-3'), 135.66 (C-6''''a), 136.66 (C-7''a), 135.66 (C-6''''a), 134.73 (C-7), 131.80 (C-2''''a), 131.56 (C-5''''), 129.17 (C-4''''), 128.13 (C-5'), 127.33 (C-8), 126.41 (C-5), 126.27 (C-3''a), 125.72 (C-2''), 124.43 (C-6), 123.41 (C-3''''), 122.21 (C-6''''), 121.66 (C-4a), 121.47 (C-6''), 119.27 (C-5''), 119.20 (C-4''), 111.00 (C-4'), 109.93 (C-7''), 104.33 (C-3''), 81.06 (C-7''''), 43.41 (C-1'''), 36.85 (C-3'''), 28.75 (C-2''').

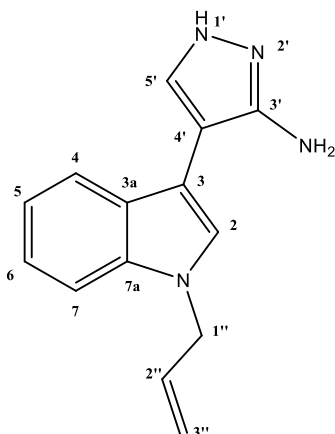


5.13 Σύνθεση του(1-(προπ-2-εν-1-υλ)-1H -ινδολ-3-υλ]ακετονιτριλίου (2b)

Σε διάλυμα του 3-ινδολοακετονιτριλίου (5 g, 30 mmol), αλλυλοβρωμιδίου (4.43 mL, 0.05 mol) και θεικού άλατος του τετραβοουταμμονίου (0.6 g, 1.8 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (70 mL) προστίθεται διάλυμα καυστικού νατρίου 15% w/v (70 mL) και το μίγμα αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία βρασμού για 3 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οργανική σιβάδα συλλέγεται, πλένεται με νερό, ξηραίνεται (άνυδρο θεικό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Λαμβάνονται 5.9 g ($\alpha=86\%$) προϊόντος, πρακτικά καθαρού, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο. (33)

5.14 Σύνθεση του (2EZ)-3-(προπ-2-εν-1-υλ)-2-[1-(3-μεθοξυπροπυλ)-1H-ινδολ-3-υλ]προπ-2-ενονιτριλίου (4b)

Σε διάλυμα του παραγώγου **2b** (5.88 g, 0.03 mol) σε άνυδρο διμεθυλφορμαμίδιο (19 mL), προστίθεται διμεθυλακετάλη του N-N-διμεθυλοφορμαμιδίου (28 mL, 0.21 mol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού, υπό ατμόσφαιρα αργού, για 23 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η περίσσεια του διαλύτη απομακρύνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα: 6/1. Λαμβάνονται 5.23 g μίγματος των E και Z ισομερών ($\alpha=70\%$), το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο.



5.15 Σύνθεση της 4-[1-(προπ-2-εν-1-υλ)-1H-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-3-αμίνης (**5b**)

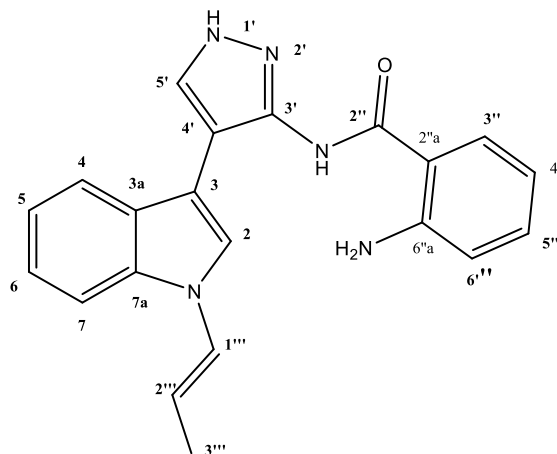
Σε διάλυμα του παραγώγου **4b** (2.5 g, 0.01 mol) σε άνυδρη αιθανόλη (10 mL) προστίθεται μονοϋδρική υδραζίνη (0.59 mL, 0.01 mol) και οξικό οξύ (0.69 mL, 0.01 mol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2.5 ώρες. Ακολουθεί εκδίωξη του διαλύτη και του οξικού οξέος υπό χαμηλή πίεση και το προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 50/1 έως 20/1. Λαμβάνονται 150 mg ροζ στερεό ($\alpha=96\%$).

Σ.τ.: 176.3- 178.1°C (THF)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{14}H_{14}N_4^+$ [MH^+]: 238.1218, ευρεθέν 238.1211.

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 7.71 (s, 1H, H-2), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4), 7.47 (s, 1H, H-5'), 7.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-7), 7.15 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-6), 7.05 (t, 1H, H-5), 6.03 (m, 1H, H-2''), 5.16 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H, H-3''), 5.09 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H, H-3''), 4.81 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-1'').

^{13}C NMR (151 MHz, $DMSO-d_6$) δ (ppm): 135.82 (C-7a), 134.41 (C-2''), 126.42 (C-3a), 124.83 (C-5'), 121.22 (C-6), 119.77 (C-4), 119.77 (C-2), 118.86 (C-5), 116.71 (C-3''), 115.61 (C-4'), 109.88 (C-7), 107.19 (C-3'), 99.76 (C-3), 48.03 (C-1'').



5.17 Σύνθεση του 2-αμινο-N-[4- [1-(προπ-1-εν-1-υλ)-1H-ινδολ-3-υλ]]-1H-πυραζολ-3-υλ]βενζαμιδίου (6c)

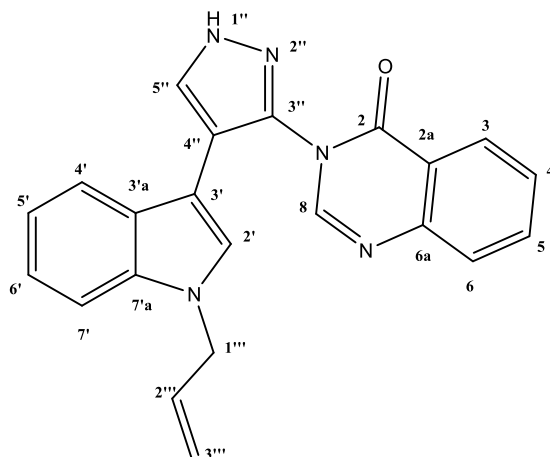
Μίγμα του αμινοπυραζολίου **5b** (605 mg, 2,5 mmol) και ισοτοϊκού ανυδρίτη (457 mg, 2.8 mmol) σε άνυδρο DMF (3 mL), υπό ατμόσφαιρα αργού, αναδεύεται στους 130-135°C για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η περίσσεια του διαλύτη απομακρύνεται υπό κενό, το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα, πλένεται με 10% διάλυμα ανθρακικού νατρίου (3 X 15 mL) και νερό (15 mL), ξηραίνεται (άνυδρο θειικό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα: 9/1-1/1 και λαμβάνονται 178 mg κίτρινου στερεού ($\alpha=20\%$).

Σ.τ.: 176.1- 178.8°C (CH₂Cl₂- *n*-pentane)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς C₂₁H₁₉ON₅⁺ [MNa⁺]: 357.1590, ευρεθέν 380.2900.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.25 (s, 1H, H-5'), 7.88 (d, *J* = 8.1, 1H, H-3), 7.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-4'), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-7''), 7.28 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-6) 7.26 (s, 1H, H-2''), 7.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5), 7.18 (t, *J* = 7.9, 1H, H-4''), 6.71 (t, *J* = 7.9, 1H, H-6''), 6.71 (t, *J* = 7.9, 1H, H-4), 5.99 (m, 1H, H-2'''), 5.22 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H, H-3'''), 5.13 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H, H-3'''), 4.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-1''').

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166.12 (C-2), 156.69 (C-3'), 149.98 (C-6a), 136.87 (C-7''a), 133.69 (C-5), 133.19 (C-3), 128.65 (C-5'), 126.46 (C-3''a), 125.63 (C-2'') 124.28 (C-1'''), 123.28 (C-6'), 121.16 (C-6), 119.90 (C-4''), 119.78 (C-2'''), 117.09 (C-5'), 116.50 (C-4), 114.21 (C-2a), 110.76 (C-7''), 109.35 (C-3'), 106.53 (C-4), 29.86 (C-3'''), 13.25 (C-1''').



5.18 Σύνθεση της 3-{4-[1-(προπ-2-εν-1-υλ) -1H-ινδολ-3-υλ]}-1H-πυραζολ-3-υλ}κινναζολιν-4(3H)-όνης (8c)

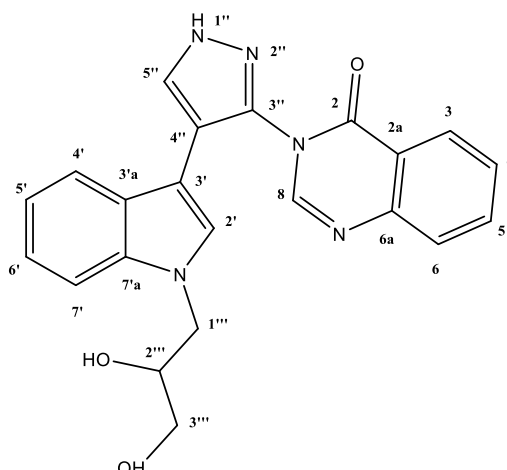
Σε διάλυμα του παραγώγου **6b** (350 mg 0.98 mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (3 mL), προστίθεται μυρμηκικός τριαιθυλεστέρας (489 μ L, 2.94 mmol) και *π*-τολουολοσουλφονικό οξύ (5.9 mg, 0.147 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό, διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέραπλένεται με νερό, ξηραίνεται (άνυδρο θειικό νάτριο) και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα: 5/1-1/1. Λαμβάνονται 159 mg λευκού στερεού (α =44%).

Σ.τ.: 241.3- 243.6°C (THF)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{22}H_{17}ON_5^-$ [MH⁻]: 367.1433, ευρεθέν 367.1444.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.32 (s, 1H, H-2), 8.29 (s, 1H, H-5'), 8.15 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-5), 7.89 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-7), 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-8), 7.64 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-4''), 7.60 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-6), 7.39 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-7''), 7.13 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-6''), 7.03 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-5''), 6.99 (s, 1H, H-2''), 5.79 (m, 1H, H-2'''), 4.91 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H-3'''), 4.79 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H, H-3'''), 4.67 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-1''').

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.98 (C-4), 147.59 (C-8a), 147.30 (C-2), 142.36 (C-3'), 135.84 (C-7''a), 134.92 (C-7), 133.99 (C-2'''), 128.31 (C-5'), 127.62 (C-6), 127.42 (C-8), 126.45 (C-3''a), 126.21 (C-5), 125.32 (C-5), 121.59 (C-4a), 121.57 (C-6''), 119.38 (C-5''), 119.20 (C-4''), 116.45 (C-3'''), 110.91 (C-4'), 110.11 (C-7''), 104.67 (C-3''), 47.64 (C-1''').



5.20 Σύνθεση της 3-[4-[1-(2,3-διυδροξυπροπυλ) -1H-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-3-υλ]κιναζολιν-4(3H)-όνης (13)

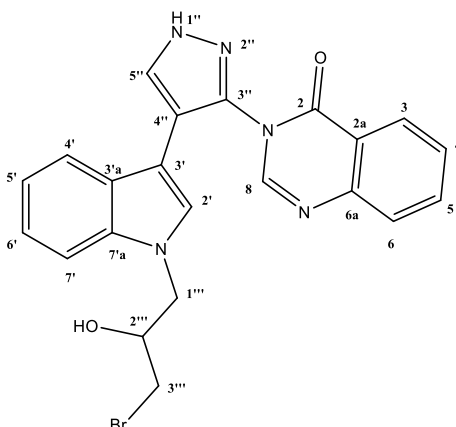
Σε διάλυμα του παραγώγου **8c** (50 mg 0.14 mmol) σε μίγμα ακετόνης/νερού: 3/1 (4 mL) προστίθεται υπό ψύξη υπερμαγγανικό κάλιο (23.53 mg 0.15 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα διηθείται υπό κελίτη και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα πλένεται με νερό, ξηραίνεται (άνυδρο θειϊκό νάτριο), συμπυκνώνεται υπό κενό και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 50/1-7/1. Λαμβάνονται 10 mg λευκού στερεού ($\alpha = 17\%$).

Σ.τ.: 187.2- 189.4°C (THF)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{22}H_{19}O_3N_5^+$ [MH]: 401.1488, ευρεθέν 401.1497.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 13.35 (s, D₂O exchang., 1H, NH), 11.68 (s, D₂O exchang., 1H, NHN), 8.29 (s, 1H, H-2), 8.24 (s, 1H, H-5'), 8.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5), 7.89 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 7.74 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-8), 7.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4''), 7.60 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7''), 7.12 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6''), 7.05 (s, 1H, H-2''), 7.00 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5''), 4.80 (d, $J = 8.0$ Hz, D₂O exchang., 1H, OH-3'''), 4.62 (t, $J = 7.9$ Hz, D₂O exchang., 1H, OH-2'''), 4.14 (dd, $J = 8.20, 1.9$ Hz, 1H, H-1'''), 3.87 (dd, $J = 8.20, 1.9$ Hz, 1H, H-1'''), 3.60 (m, 1H, H-2'''), 3.20 (dd, $J = 8.20, 1.9$ Hz, 1H, H-3'''), 3.14 (dd, $J = 8.20, 1.9$ Hz, 1H, H-3''').

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 160.58 (C-4), 148.04 (C-8a), 147.76 (C-2), 142.84 (C-3'), 136.75 (C-7'a), 135.48 (C-7), 128.49 (C-5'), 128.21 (C-6), 127.92 (C-8), 127.04 (C-3'a), 127.00 (C-5), 126.57 (C-2''), 122.04 (C-4a), 121.86 (C-6''), 119.69 (C-5''), 119.44 (C-4''), 111.61 (C-4'), 110.72 (C-7''), 104.50 (C-3''), 67.49 (C-2'''), 63.47 (C-3'''), 49.17 (C-1''').



5.21 Σύνθεση της 3-[4-[1-(προπ-1-βρωμο-2-υδροξυ-1-υλ) -1H-ινδολ-3-υλ]-1H-πυραζολ-3-υλ]κινναζολιν-4(3H)-όνης (14)

Σε διάλυμα του παραγώγου **8c** (50 mg, 0.14 mmol) σε μίγμα νερού (2 mL) και τετραϋδροφουράνιο (2 mL) προστίθεται N-βρωμοηλεκτριμίδιο (34 mg, 0.19 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, για 70 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση, το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα πλένεται με νερό, ξηραίνεται (άνυδρο θειϊκό νάτριο), συμπυκνώνεται υπό κενό και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη: 50/1-20/1. Λαμβάνονται 20 mg λευκού στερεού ($\alpha=30\%$).

Σ.τ.: > 250.0°C (THF)

ESI - HRMS υπολογισθέν ως προς $C_{22}H_{19}O_3N_5^+$ [MH]: 401.1488, ευρεθέν 401.1497.

1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 13.29 (s, D2O exchang., 1H, NHN), 11.68 (s, D2O exchang., 1H, NHN), 7.99 (s, 1H, H-5'), 7.93 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5), 7.88 (s, 1H, H-2), 7.80 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-7), 7.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-8), 7.50 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6), 7.12 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4''), 6.83 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6''), 6.71 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5''), 6.56 (s, 1H, H-2''), 6.50 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-7''), 5.77 (m, 1H, H-2'''), 5.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-1'''), 5.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-1'''), 4.15 (dd, $J = 8.20, 1.9$ Hz, 1H, H-3'''), 3.96 (dd, $J = 8.20, 1.9$ Hz, 1H, H-3''').

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 159.43 (C-4), 147.29 (C-8a), 146.64 (C-2), 142.36 (C-7''a), 141.48 (C-3'), 134.53 (C-7), 131.97 (C-2'''), 130.57 (C-5'), 129.92 (C-3''a), 128.92 (C-6''), 127.11 (C-6), 127.04 (C-8), 126.17 (C-5), 124.41 (C-4''), 121.95 (C-5''), 121.06 (C-4a), 117.13 (C-1'''), 116.88 (C-4'), 108.65 (C-7''), 108.65 (C-2''), 72.05 (C-3''), 41.72 (C-3''').

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2):87–108.
2. El-sayed MT, Hamdy NA, Osman DA, Ahmed KM. Indoles as anticancer agents. *Adv Mod Oncol Res.* 2015 Oct 6;1(1):20.
3. Vicente-Dueñas C, Romero-Camarero I, Cobaleda C, Sánchez-García I. Function of oncogenes in cancer development: a changing paradigm. *EMBO J.* 2013 May 29;32(11):1502–13.
4. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* 1992 Sep;11(2):121–39.
5. Curt null. *Cancer Drug Development: New Targets for Cancer Treatment.* The Oncologist. 1996;1(3):II–III.
6. Hunter T. Protein kinase classification. *Methods Enzymol.* 1991;200:3–37.
7. Manning G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1912–34.
8. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio LL. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med.* 2017 Aug;40(2):271–80.
9. Liao JJ-L. Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors. *J Med Chem.* 2007 Feb;50(3):409–24.
10. Tursynbay Y, Zhang J, Li Z, Tokay T, Zhumadilov Z, Wu D, et al. Pim-1 kinase as cancer drug target: An update. *Biomed Rep.* 2016 Feb;4(2):140–6.
11. Stout TJ, Foster PG, Matthews DJ. High-throughput structural biology in drug discovery: protein kinases. *Curr Pharm Des.* 2004;10(10):1069–82.
12. Swulius MT, Waxham MN. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2008 Sep;65(17):2637–57.
13. Leroux AE, Schulze JO, Biondi RM. AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development. *Semin Cancer Biol.* 2018;48:1–17.
14. Nishiguchi GA, Atallah G, Bellamacina C, Burger MT, Ding Y, Feucht PH, et al. Discovery of novel 3,5-disubstituted indole derivatives as potent inhibitors of Pim-1, Pim-2, and Pim-3 protein kinases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011 Nov;21(21):6366–9.
15. Foulks JM, Carpenter KJ, Luo B, Xu Y, Senina A, Nix R, et al. A Small-Molecule Inhibitor of PIM Kinases as a Potential Treatment for Urothelial Carcinomas. *Neoplasia.* 2014 May;16(5):403–12.

16. Mondello P, Cuzzocrea S, Mian M. Pim kinases in hematological malignancies: where are we now and where are we going? *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2014 Dec;7(1):95.
17. Magnuson NS, Wang Z, Ding G, Reeves R. Why target PIM1 for cancer diagnosis and treatment? *Future Oncol*. 2010 Sep;6(9):1461–78.
18. Warfel NA, Kraft AS. PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. *Pharmacol Ther*. 2015 Jul;151:41–9.
19. Merkel AL, Meggers E, Ocker M. PIM1 kinase as a target for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Apr;21(4):425–36.
20. Hsi ED, Jung S-H, Lai R, Johnson JL, Cook JR, Jones D, et al. Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study. *Leuk Lymphoma*. 2008 Jan;49(11):2081–90.
21. Kim J, Roh M, Abdulkadir SA. Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity. *BMC Cancer*. 2010 Dec;10(1):248.
22. Xie Y, Xu K, Dai B, Guo Z, Jiang T, Chen H, et al. The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene*. 2006 Jan;25(1):70–8.
23. Valdman A, Fang X, Pang S-T, Ekman P, Egevad L. Pim-1 expression in prostatic intraepithelial neoplasia and human prostate cancer. *The Prostate*. 2004 Sep 1;60(4):367–71.
24. Jacobs MD, Black J, Futer O, Swenson L, Hare B, Fleming M, et al. Pim-1 Ligand-bound Structures Reveal the Mechanism of Serine/Threonine Kinase Inhibition by LY294002. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13728–34.
25. Dadashpour S, Emami S. Indole in the target-based design of anticancer agents: A versatile scaffold with diverse mechanisms. *Eur J Med Chem*. 2018 Apr 25;150:9–29.
26. Fedorov O, Marsden B, Pogacic V, Rellos P, Muller S, Bullock AN, et al. A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Dec 18;104(51):20523–8.
27. Zhang H-C, Boñaga LVR, Ye H, Derian CK, Damiano BP, Maryanoff BE. Novel bis(indolyl)maleimide pyridinophanes that are potent, selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 May;17(10):2863–8.
28. Elguero J, Katritzky AR, Denisko OV. Prototropic Tautomerism of Heterocycles: Heteroaromatic Tautomerism—General Overview and Methodology. In: *Advances in Heterocyclic Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2000 [cited 2019 Apr 8]. p. 1–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006527250076003X>
29. Campanacci L, Huber W. [Recent advances and prospects in periodic hemodialytic treatment for patients with uremia]. *Minerva Med*. 1976 Jul 14;67(34):2151–60.

30. A new protocol for the synthesis of primary, secondary and tertiary anthranilamides utilizing N-(2-aminoarylacetyl)benzotriazoles. *Arkivoc.* 2012 Jul 22;2012(8):198.
31. Varala R, editor. Scope of Selective Heterocycles from Organic and Pharmaceutical Perspective [Internet]. InTech; 2016 [cited 2019 Apr 8]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/scope-of-selective-heterocycles-from-organic-and-pharmaceutical-perspective>
32. But TYS, Toy PH. The Mitsunobu Reaction: Origin, Mechanism, Improvements, and Applications. *Chem – Asian J.* 2007 Nov 5;2(11):1340–55.
33. Hock KJ, Knorrscheidt A, Hommelsheim R, Ho J, Weissenborn MJ, Koenigs RM. Tryptamine Synthesis by Iron Porphyrin Catalyzed C–H Functionalization of Indoles with Diazoacetonitrile. *Angew Chem Int Ed.* 2019 Mar 11;58(11):3630–4.