

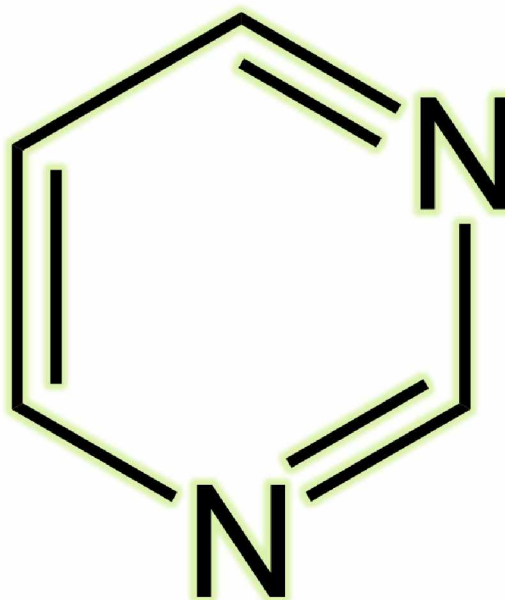


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Νέα παράγωγα 2, 4- διαμινοπυριμιδίνης ως πιθανοί
κυτταροτοξικοί παράγοντες. Σύνθεση και φασματοσκοπικός
προσδιορισμός.



Κωνσταντίνος Αναστασίου του Σταύρου

ΛΑΡΙΣΑ 2021

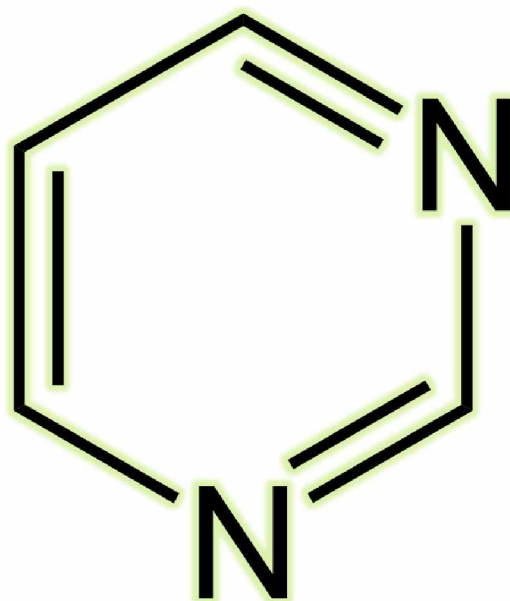


University of Thessaly
School of Health Sciences
Department of Biochemistry &
Biotechnology



DIPLOMA THESIS

New 2, 4-diaminopyrimidine derivatives as potential cytotoxic agents. Composition and spectroscopic determination.



Konstantinos Anastasiou

LARISSA 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Κοιώτης Δημήτριος: Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη Σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δρ. Μήτσος Χρήστος: Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού (Ε.ΔΙ.Π), Εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δρ. Κολλάτος Νικόλαος: Ακαδημαϊκός Υπότροφος Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον κ. Χρήστο Μήτσο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτρη που δέχτηκε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του, για την ανάθεση του θέματος και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον κ. Μήτσο Χρήστο για τις εποικοδομητικές υποδείξεις και την καθοριστική βοήθεια που μου παρείχε σε κάθε φάση της πορείας μου συμβάλλοντας ουσιαστικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία καθώς και τον κ. Κολλάτο Νικόλαο που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ο δακτύλιος της πυριμιδίνης.....	8
1.2 Παράγωγα πυριμιδίνης εγκεκριμένα ως φάρμακα.....	10
1.3 Αντικαρκινικά παράγωγα πυριμιδίνης.....	17
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	23
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	24
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....	24
3.2 Χρωματογραφία στήλης.....	25
3.3 Προσδιορισμός σημείου τήξεως (T_m).....	27
3.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	28
3.5 Συσκευή μικροκυμάτων.....	29
4. ΠΕΙΡΑΜΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
4.1 Επισκόπηση συνθετικής πορείας.....	30
4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης.....	31
4.3 Επιμέρους αντιδράσεις.....	32
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	39
5.1 NMR πρωτονίου.....	39
5.2 NMR άνθρακα-13.....	43
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	46
7. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	47
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πυριμιδίνη είναι ένας εξαμελής αρωματικός ετεροκυκλικός δακτύλιος, με δύο άτομα αζώτου σε 1,3-διάταξη. Η ετεροκυκλική δομή της πυριμιδίνης έχει χρησιμοποιηθεί ως βάση για την σύνθεση πολυάριθμων ουσιών με ποικίλες φαρμακευτικές ιδιότητες.

Οι κινάσες πρωτεϊνών έχουν ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ο μεταβολισμός και η απόπτωση. Μία από τις πιο σημαντικές κινάσες πρωτεϊνών είναι ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ο οποίος έχει καθοριστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων. Ορισμένα παράγωγα της πυριμιδίνης αποτελούν αναστολείς των EGFR, με το αντικαρκινικό φάρμακο Osimertinib ως πλέον αντιπροσωπευτικό παράδειγμα. Οι κινάσες πρωτεϊνών με ρυθμιστικό ρόλο στο κυτταρικό κύκλο, όπως είναι οι *auo* και οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs), αποτελούν στόχους στην αντικαρκινική θεραπεία. Αρκετά παράγωγα 5-φθοροπυριμιδίνης δρουν ως αναστολείς αυτών των κινασών.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας σειράς νέων ενώσεων, με βάση την 5-φθοροπυριμιδίνη, ως εν δυνάμει κυτταροτοξικοί παράγοντες. Η δομή των νέων ενώσεων ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους, και στο μέλλον θα αποτιμηθεί η πιθανή κυτταροτοξική δράση τους έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών.

ABSTRACT

Pyrimidine is a six-membered aromatic heterocyclic ring, with two nitrogen atoms in a 1,3-configuration. The pyrimidine scaffold has been used extensively in the design and synthesis of numerous substances with a variety of important medicinal properties.

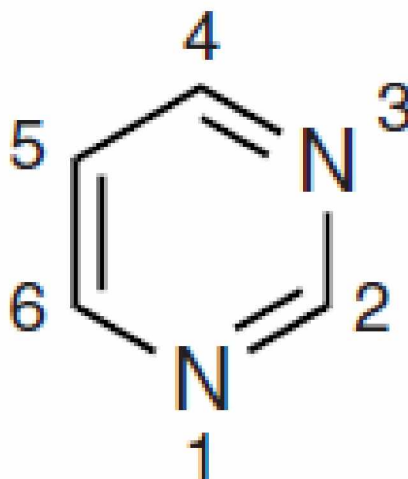
Protein kinases play a vital role in regulating cellular functions such as cell proliferation, metabolism and apoptosis. One of the most important protein kinases is the epidermal growth factor receptor (EGFR), a tyrosine kinase implicated in important cellular functions, as cell proliferation and migration. Some pyrimidine derivatives are potent EGFR inhibitors, with the anticancer agent Osimertinib being the most prominent example. Protein kinases involved in cell-cycle regulation, as the aurora and the cyclin-dependent kinases (DDKs), are promising targets in anticancer therapy. Several 5-fluoropyrimidine derivatives have been identified as inhibitors of these kinases.

In the present dissertation, a series of novel compounds based on the 5-fluoropyrimidine core were synthesized as potential cytotoxic agents. Structural identification of all new compounds was also carried out, and in the future their cytotoxic activity against cancer cell lines will be evaluated.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ο δακτύλιος της πυριμιδίνης

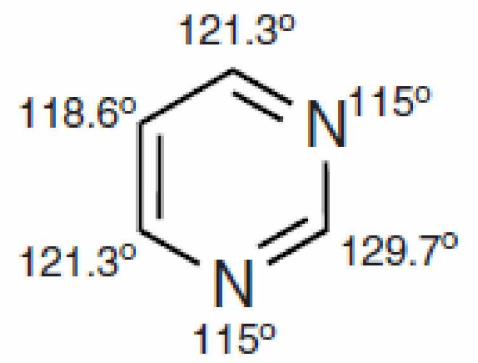
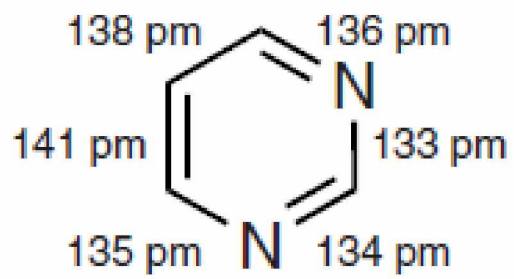
Πυριμιδίνη ονομάζεται ένας εξαμελής αρωματικός ετεροκυκλικός δακτύλιος, με δύο άτομα αζώτου σε 1,3-διάταξη. Και τα δύο άτομα αζώτου μοιάζουν με το άζωτο της πυριδίνης. Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του καθενός από αυτά, βρίσκεται στο τροχιακό με υβριδισμό sp^2 , στο επίπεδο του αρωματικού δακτυλίου. Τα μονήρη αυτά ζεύγη δεν είναι απαραίτητα για την αρωματική εξάδα και είναι βασικά, όπως και το μονήρες ζεύγος της πυριδίνης. {1}



Εικόνα 1: Δομή πυριμιδίνης

Το πρώτο συνθετικό παράγωγο με το ετεροκυκλικό σύστημα της πυριμιδίνης παρασκευάστηκε το 1818, ωστόσο η πρώτη σύνθεση της μητρικής ένωσης επιτεύχθηκε μόλις το 1899 από τον Gabriel και τον Colman. {2}

Ο δακτύλιος της πυριμιδίνης σχηματίζει ένα ακανόνιστο εξάγωνο με έξι διαφορετικά μήκη δεσμού και τέσσερις διαφορετικές γωνίες δεσμού όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



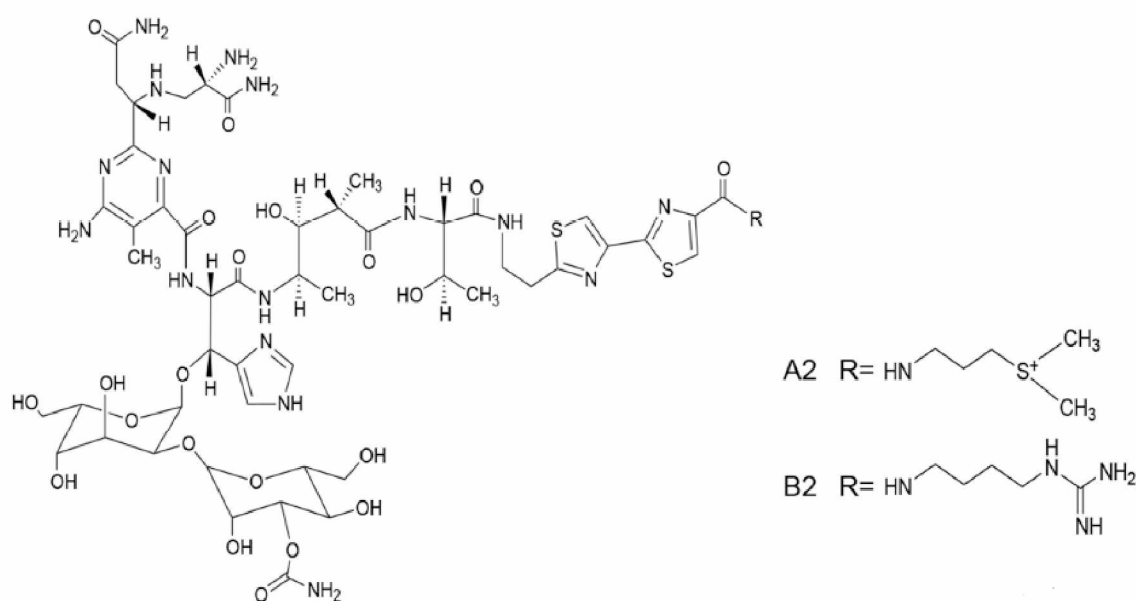
Εικόνα 2: Μήκη και γωνίες δεσμών της πυριμιδίνης

1.2 Παράγωγα πυριμιδίνης εγκεκριμένα ως φάρμακα

Η πυριμιδίνη είναι η πιο σημαντική διαζίνη και είναι απαραίτητη για κάθε μορφή ζωής, καθώς αποτελεί συστατικό πολλών βιολογικά δραστικών ουσιών, με πολλά παράγωγα πυριμιδίνης να έχουν φαρμακολογικό ενδιαφέρον. {3} Οι φαρμακολογικές δράσεις μπορεί να είναι για παράδειγμα αντιμικροβιακές, αντιδιαβητικές, αντιυπερτασικές και αντικαρκινικές. Επιπλέον, διάφορα παράγωγα της πυριμιδίνης χρησιμοποιήθηκαν ως αναστολείς κινασών, ιδιότητα που μπορεί να αξιοποιηθεί στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου. Στη συνέχεια παρουσιάζονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα παραγώγων πυριμιδίνης με φαρμακευτικές ιδιότητες.

Μπλεομυκίνη (Bleomycin, BLM)

Η μπλεομυκίνη (BLM) είναι ένα μείγμα κυρίως δύο ενώσεων, των A2 και B2 που περιλαμβάνονται στο κατάλογο βασικών φαρμάκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. {4} Πρόκειται για φυσικά προϊόντα με σύνθετη χημική δομή και κλινικά σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα. Οι A2 και B2 είναι πεπτίδια συνδεδεμένα με διάφορους ετερόκυκλους που περιλαμβάνουν έναν πλήρως υποκατεστημένο δακτύλιο πυριμιδίνης. {3}

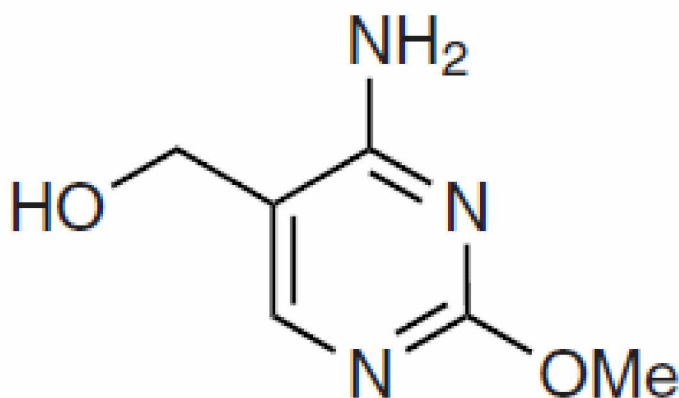


Εικόνα 3: Δομή Μπλεομυκίνης

Η μπλεομυκίνη (BLM) είναι υδρόφιλο μόριο που εξαρτάται από τους μεταφορείς ή τους υποδοχείς ενδοκυττάρωσης για να μπει μέσα στα κύτταρα. Μόλις μπει μέσα, οι αντικαρκινικές δραστηριότητες βασίζονται στις ικανότητές του να παράγουν ρήγματα DNA, οδηγώντας έτσι σε κυτταρικό θάνατο. {5}

Βασιμεθρίνη (Bacimethrin)

Η βασιμεθρίνη είναι ένα αντιβιοτικό που περιέχει δακτύλιο πυριμιδίνης ως βασικό στοιχείο.

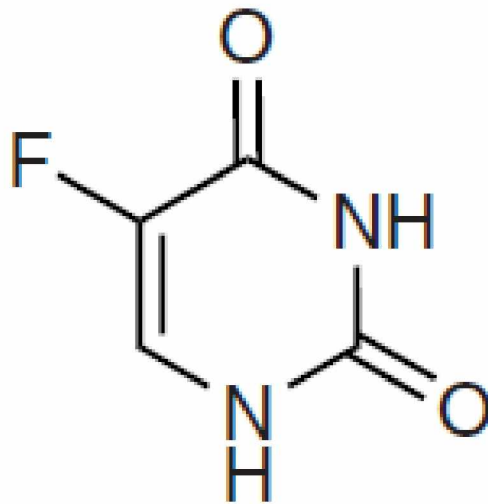


Εικόνα 4: Δομή Βασιμεθρίνης

Η βασιμεθρίνη απομονώθηκε το 1961 από το *Bacillus megaterium* και είναι δραστική έναντι πολλών ζυμομυκήτων και βακτηριδίων. Η βασιμεθρίνη αποτελεί υπόστρωμα ενζύμων βιοσύνθεσης της θειαμίνης, χωρίς να προκαλεί καταστολή των γονιδίων που τα κωδικοποιούν. {6}

5-φθοροουρακίλη (5-fluorouracil)

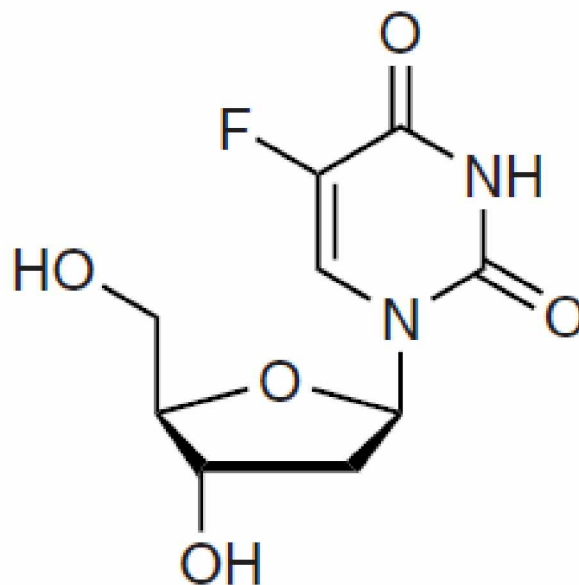
Η 5-φθοροουρακίλη είναι ένα κλινικά αποδεδειγμένο αντικαρκινικό φάρμακο και συστατικό διαφόρων πολυδύναμων φαρμάκων για τη θεραπεία όγκων του μαστού, του παχέος εντέρου, των ωοθηκών, του κεφαλιού και του αυχένα. {3}



Εικόνα 5: Δομή 5-φθορουρακίλης

Αν και κυκλοφόρησε πριν από 30 χρόνια, η 5-φθορουρακίλη εξακολουθεί να είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντικαρκινικά φάρμακα. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ορισμένων κακοηθειών, είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα. {7}

Ιn νίνο, η 5-φθορουρακίλη ενεργοποιείται σε 5-φθοροδεοξουριδίνη η οποία χρησιμοποιείται επίσης ως αντικαρκινικό φάρμακο. {3}

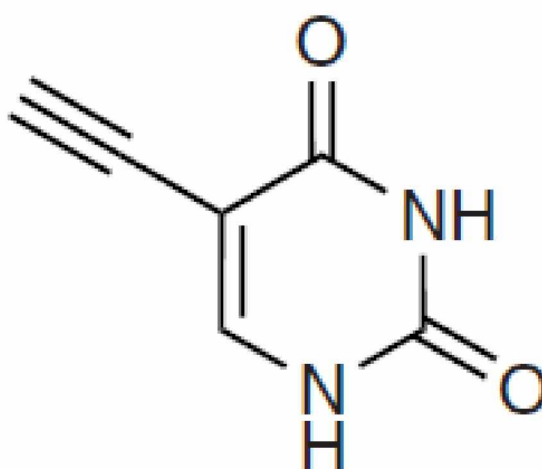


Εικόνα 6: Δομή της 5-φθοροδεοξουριδίνης

Ενιλουρακίλη (Eniluracil)

Το Eniluracil είναι ένα χορηγούμενο από το στόμα δραστικό ανάλογο φθοροπυριμιδίνης. Το Eniluracil αναστέλλει την αφυδρογονάση της διυδροπυριμιδίνης, το ένζυμο που καταβολίζει και απενεργοποιεί την 5 φθοροουρακίλη (5 FU) στο ήπαρ. {8}

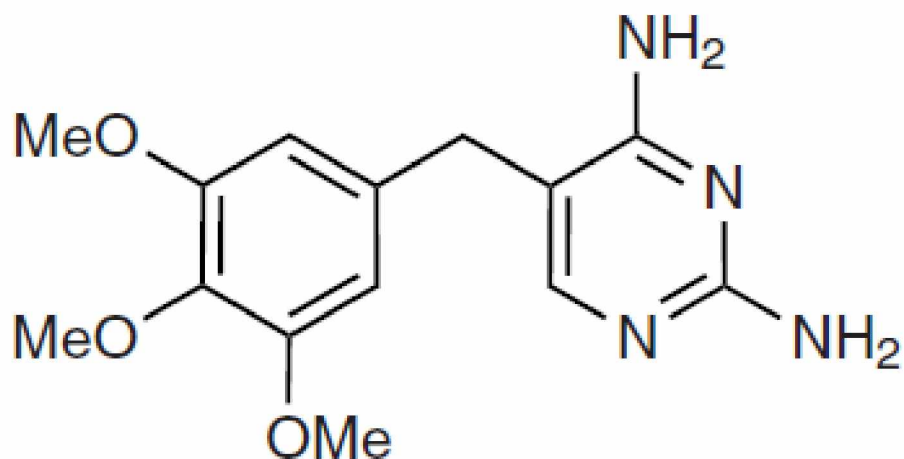
Αν και η eniluracil δεν είναι ούτε τοξική, ούτε δραστική από μόνη της, σε ζώα, βελτιώνει την αντικαρκινική αποτελεσματικότητα και τον θεραπευτικό δείκτη της 5-FU. {9}



Εικόνα 7: Δομή της Eniluracil

Τριμεθοπρίμη

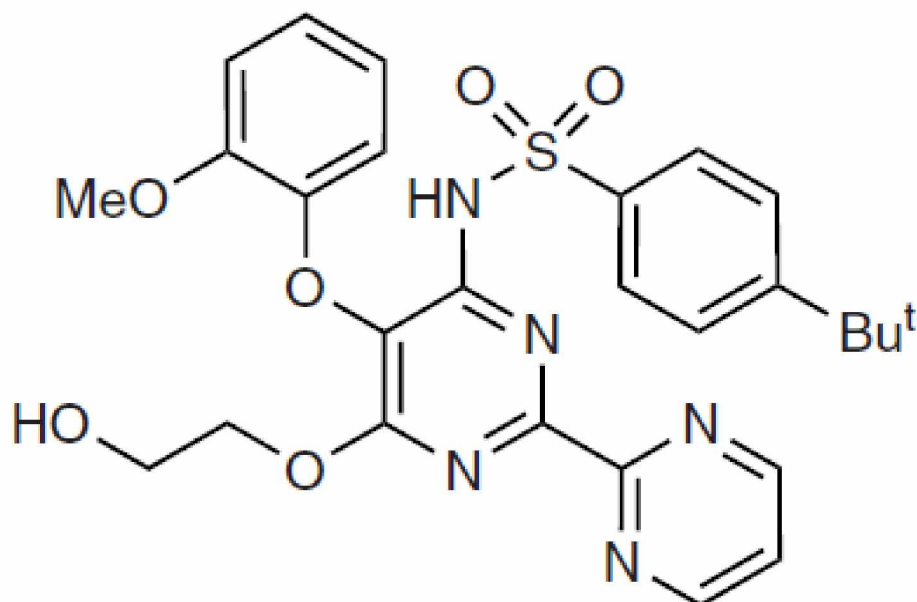
Πρόκειται για ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο με βάση τη πυριμιδίνη. Είναι δραστικό έναντι πολλών θετικών και αρνητικών κατά gram βακτηρίων, αναστέλλοντας τη διϋδροφιλική αναγωγή τους. Συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη σουλφαμεθοξαζόλη για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων. Ειδικότερα, είναι χρήσιμο για τη θεραπεία και την προφύλαξη διαφόρων λοιμώξεων του ουροποιητικού και ορισμένων λοιμώξεων του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού σωλήνα. {10}



Εικόνα 8: Δομή Τριμεθοπρίμης

Βοσεντάνη (Bosentan)

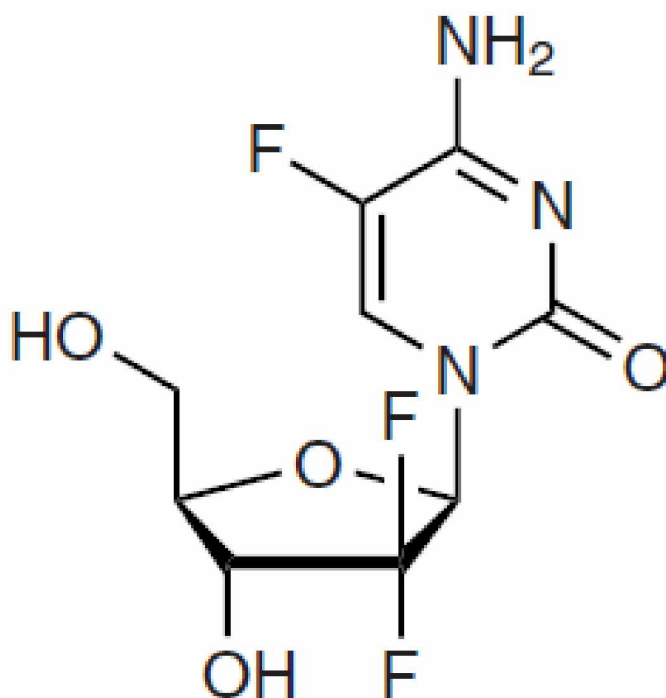
Το Bosentan, που πωλείται με την επωνυμία Tracleer, δρα ως αναστολέας των υποδοχέων ενδοθηλίνης και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της υπέρτασης της πνευμονικής αρτηρίας. Το Bosentan περιέχει δύο δακτύλιους πυριμιδίνης. {11}



Εικόνα 9: Δομή Βοσεντάνης

Γεμισταβίνη (Gemsitabine)

Η γεμισταβίνη είναι ένας ειδικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας που σκοτώνει κυρίως κύτταρα που βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, καθώς και αναστέλλοντας την εξέλιξη των κυττάρων μέσω του ορίου φάσης G1/S. Η γεμισταβίνη μεταβολίζεται ενδοκυτταρικά στα ενεργά νουκλεοτίδια διφωσφορικού και τριφωσφορικού. Η κυτταροτοξική επίδραση της γεμισταβίνης οφείλεται σε συνδυασμό των δύο δράσεων από τα διφωσφορικά και τα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια που οδηγούν στην αναστολή της σύνθεσης του DNA. Η γεμισταβίνη έχει δείξει βιολογικές δραστηριότητες σε ένα ευρύ φάσμα συμπαγών όγκων, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του παγκρέατος. {12}



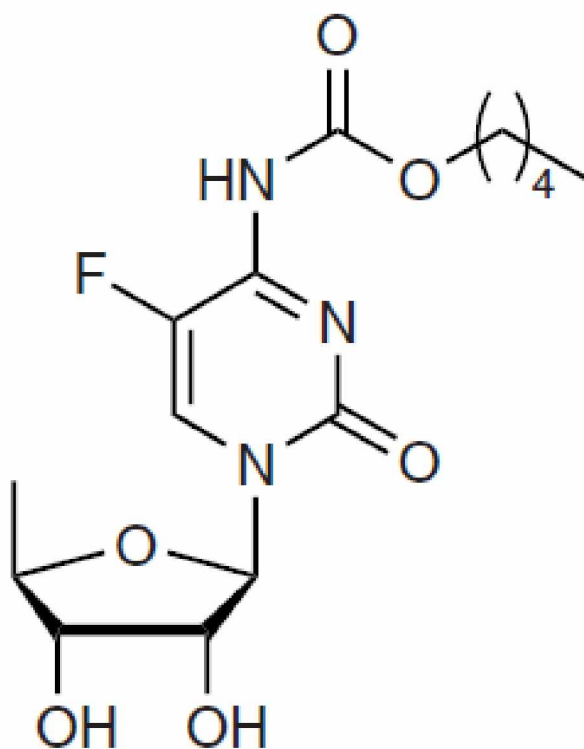
Εικόνα 10: Δομή Γεμισταβίνης

Καπεσιταβίνη (Capesitabine)

Η καπεσιταβίνη (N4-πεντυλοξυκαρβονυλ-5'-δεοξυ-5-φθοροκυτιδίνη) είναι μια καρβαμική φθοροπυριμιδίνη που ενεργοποιείται επιλεκτικά από το ένζυμο φωσφορυλάση θυμιδίνης (TP) για να σχηματίσει 5-FU. {13}

Η καπεσιταβίνη είναι ένα προφάρμακο του ευρέως χρησιμοποιούμενου κυτταροτοξικού παράγοντα 5-φθοροουρακίλη (5-FU). Σε αντίθεση με τη 5-FU, απορροφάται εκτενώς και αξιόπιστα μετά τη χορήγηση από το στόμα, και δεν απαιτεί ενίσχυση φολινικού οξέος (FA). Η ενεργοποίηση της καπεσιταβίνης είναι μια ενζυματική διαδικασία τριών σταδίων. Το τελικό ενεργοποιητικό ένζυμο - η φωσφορυλάση της θυμιδίνης - βρίσκεται σε ασυνήθιστα υψηλές συγκεντρώσεις σε πολλούς συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, με αποτέλεσμα την αυξημένη παροχή 5-FU σε καρκινικούς ιστούς, και την πιθανότητα μεγαλύτερης επιλεκτικής κυτταροτοξικότητας σε σχέση με τη 5-FU.

Η καπεσιταβίνη έχει δοκιμαστεί μόνη της αλλά και σε συνδυασμό με μια ποικιλία κυτταροτοξικών φαρμάκων στη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού. {14}



Εικόνα 11: Δομή Καπεσιταβίνης

1.3 Αντικαρκινικά παράγωγα πυριμιδίνης

Ο καρκίνος είναι μία από τις πιο σοβαρές ασθένειες και η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Σημειώθηκαν περίπου 18,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου και 9,6 εκατομμύρια θάνατοι το 2018. Το γεγονός αυτό προκαλεί μεγάλο κοινωνικοοικονομικό βάρος. Η θεραπεία και η πρόληψη του καρκίνου αποτελούν για πολλά χρόνια κρίσιμο πρόβλημα και πρόκληση για τους επαγγελματίες του ιατρικού τομέα. {15}

Ο καρκίνος προκύπτει όταν τα φυσιολογικά κύτταρα χάνουν τους ρυθμιστικούς τους μηχανισμούς που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό τους. Οι κινάσες πρωτεϊνών έχουν ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ο μεταβολισμός και η απόπτωση. Πολλές περιπτώσεις καρκίνου συνδέονται με την υπερέκφραση ή τη μετάλλαξη κινασών που εμπλέκονται σε αυτές τις λειτουργίες.

Μια από τις πιο σημαντικές κινάσες πρωτεϊνών είναι ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ο οποίος έχει καθοριστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων. Ο EGFR υπερεκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους συμπαγείς όγκους, όπως ο καρκίνος του μαστού και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC). {16}

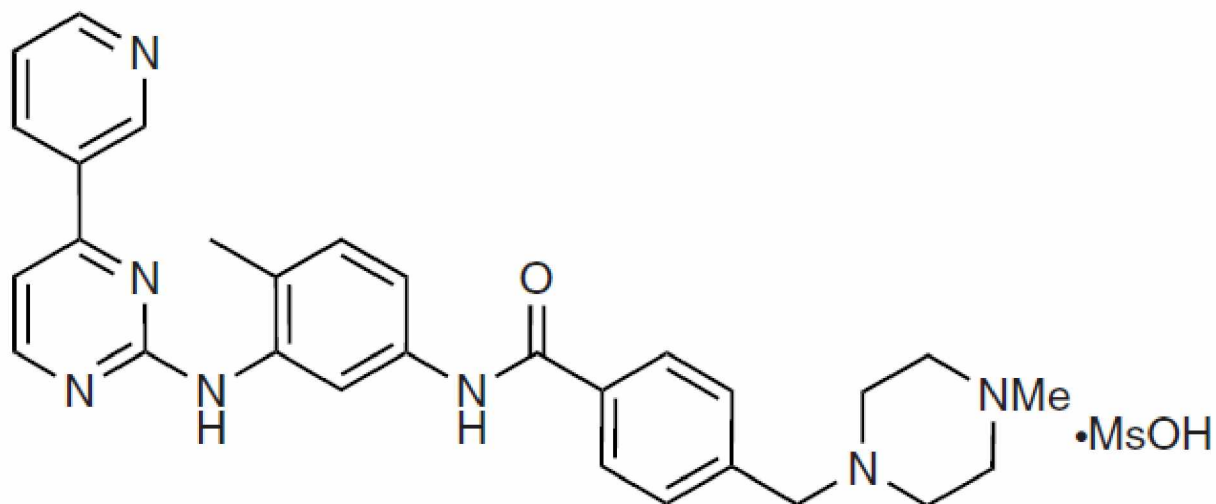
Ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει ο πιο κοινός καρκίνος παγκοσμίως, με περίπου 1,8 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ετησίως. Ο NSCLC είναι ο πιο κοινός καρκίνος του πνεύμονα. Οι υποδοχείς επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFRs) αποτελούν τους πιο πολύτιμους θεραπευτικούς στόχους για τον NSCLC καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την προσκόλληση, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. {17}

Imatinib

Πρόκειται για έναν σημαντικό παράγοντα για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML), ο οποίος αποτελεί αναστολέα κινασών τυροσίνης, και ιδιαίτερα της bcr-abl. {3}

Το imatinib αντιπροσωπεύει το παράδειγμα μιας νέας κατηγορίας αντικαρκινικών παραγόντων, τα λεγόμενα μικρά μόρια (small molecules). Έχουν υψηλή

επιλεκτικότητα έναντι ενός συγκεκριμένου μοριακού στόχου που είναι γνωστό ότι είναι η αιτία για την καθιέρωση και τη συντήρηση του κακοήθους φαινοτύπου. Το imatinib αποδείχθηκε ότι έχει αξιοσημείωτη κλινική δράση σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML), ή με κακοήθεις όγκους γαστρεντερικού στρώματος (GIST), και έχει λάβει έγκριση για τη θεραπεία αυτών των ασθενειών. Η θεραπεία με imatinib είναι γενικά καλά ανεκτή με χαμηλή συχνότητα σοβαρών παρενεργειών. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν ήπιο έως μέτριο οίδημα, μυϊκές κράμπες, διάρροια, ναυτία, δερματικά εξανθήματα και μυελοκαταστολή. {18}

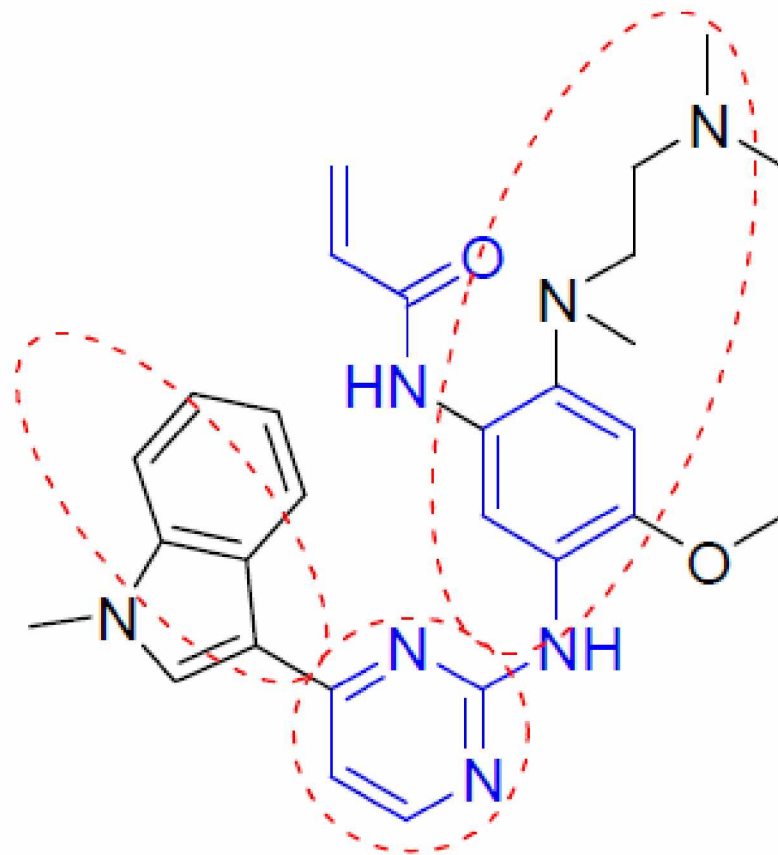


Εικόνα 12: Δομή του imatinib mesylate

Οσιμερτινίμπη (Osimertinib)

Η οσιμερτινίμπη (osimertinib) ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων κινασών τυροσίνης. Αποτελεί μη αναστρέψιμο αναστολέα των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) που φέρουν μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης (EGFRm) και τη μετάλλαξη T790M. In vitro μελέτες έχουν καταδείξει ότι η οσιμερτινίμπη έχει υψηλή δραστηριότητα και ανασταλτική δράση έναντι του EGFR σε ένα ευρύ φάσμα όλων των κλινικά σχετικών κυτταρικών σειρών μη μικροκυτταρικού καρκίνου του

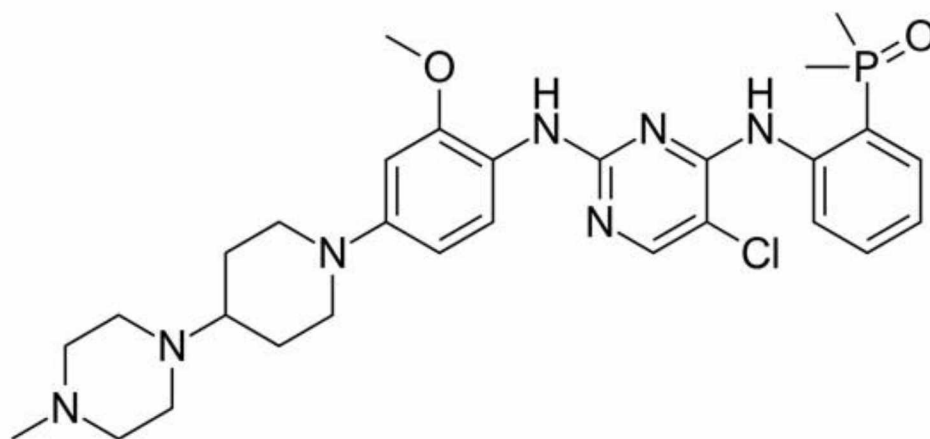
πνεύμονα (ΜΜΚΠ), με μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης του EGFR και μεταλλάξεις T790M. {19}



Εικόνα 13: Δομή Οσιμερτινίμπης

Brigatinib

Το brigatinib (εμπορική ονομασία Alunbrig) δρα ως αναστολέας της κινάσης ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) και έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. {20}

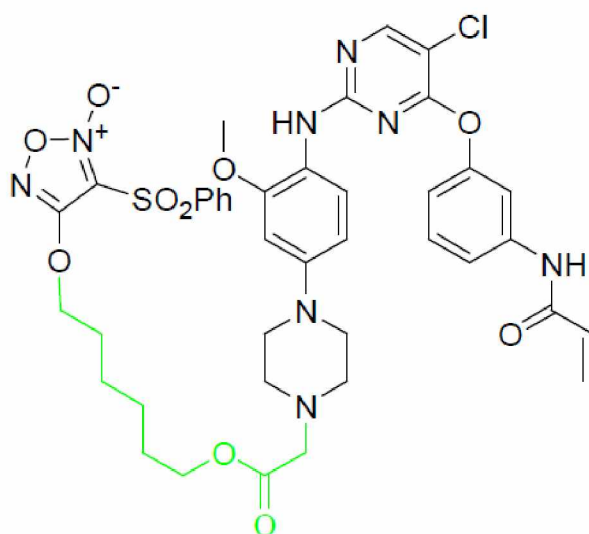


Εικόνα 14: Δομή του Brigatinib

5-Αλογονωμένα παράγωγα πυριμιδίνης

Εκτός από το brigatinib, που είναι παράγωγο της 5-χλωροπυριμιδίνης, πολλές ακόμη ενώσεις με αλογόνο στη θέση 5 της πυριμιδίνης έχουν αναφερθεί ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες.

Ενζυμικές δοκιμασίες έδειξαν ότι η παρακάτω ένωση είχε ισχυρή και εκλεκτική ανασταλτική δραστηριότητα κινάσης EGFR. Επίσης, *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι η συγκεκριμένη ένωση ανέστειλε ουσιαστικά την ανάπτυξη όγκου σε ένα μοντέλο ποντικού ξενομοσχεύματος H1975. {21}



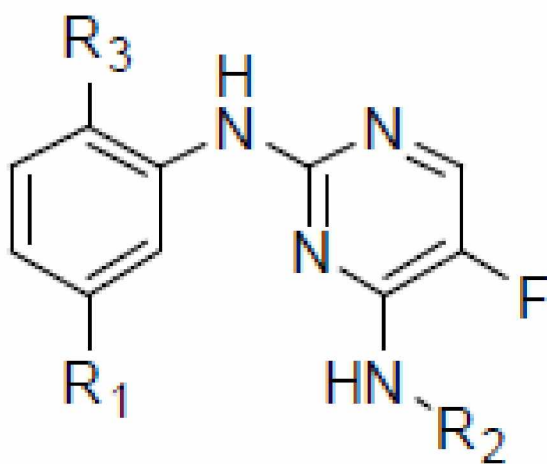
Εικόνα 15: 5-Αλογονωμένο παράγωγο πυριμιδίνης με ανασταλτική δραστηριότητα κινάσης EGFR

Οι κινάσες Aurora είναι μια οικογένεια κινασών σερίνης-θρεονίνης που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης. Υπερεκφράζονται σε μια ποικιλία τύπων καρκίνου και εμπλέκονται σε πολλές πτυχές της ανάπτυξης όγκων. Τα τρία μέλη της οικογένειας, Aurora A, B, και C μοιράζονται υψηλό βαθμό δομικής ομοιότητας στον τομέα με δράση κινάσης, αλλά καθεμία παίζει διαφορετικό ρόλο στον έλεγχο της μίτωσης. Οι Aurora A και B έχουν λάβει τη μεγαλύτερη προσοχή μέχρι σήμερα ως αντικαρκινικοί στόχοι, και αρκετά παράγωγα 5-φθοροπυριμιδίνης έχουν αναφερθεί ως αναστολείς τους. Συγκεκριμένα, μια σειρά 5-φθοροπυριμιδινών με ο-χλωρο-ανιλίνη στη θέση 4 αναπτύχθηκαν ως αναστολείς των Aurora A και B {22}, ενώ παρόμοιες ενώσεις με p-αμινοβενζαμιδουποκατάσταση επέδειξαν ιδιαίτερη εκλεκτικότητα για την Aurora A. {23}

Εικόνα 16: 5-Φθοροπυριμιδίνες με ανασταλτική δράση κατά Aurora κινασών

Οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (CDK) είναι μία οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών σερίνης /θρεονίνης που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και στη ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. Λόγω της συμμετοχής τους σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες και ασθένειες, οι CDK έχουν προσελκύσει εκτεταμένο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αρκετές από τις CDK παίζουν κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, και ένας αριθμός αναστολέων CDK βρίσκονται επί του παρόντος υπό κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων.

Μια σειρά 30 νέων παραγώγων N²,N⁴-διφαινυλο-5-φθοροπυριμιδιν-2,4-διαμίνης ανέστειλαν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, με τα πλέον δραστικά να επιδεικνύουν και ανασταλτική δράση κατά των κινασών CDK2 και CDK9. {24}



Εικόνα 17: 5-φθοροπυριμιδίνες με ανασταλτική δράση κατά των κινασών CDK2 και CDK9

2. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω αρκετά παράγωγα πυριμιδίνης έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αξιοποιηθούν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων παραγώγων 2,4-διαμινοπυριμιδίνης ως πιθανών κυτταροτοξικών παραγόντων. Μετά τη σύνθεση των νέων αυτών παραγώγων θα ακολουθήσει η ταυτοποίηση της δομής τους, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα. Απώτερο στόχο της εργασίας αποτελεί η μελλοντική αποτίμηση της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης των νέων ενώσεων.

Εικόνα 18: Δομή παραγώγων πυριμιδίνης

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στο πλαίσιο αυτής της ενότητας θα αναλυθούν οι αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία των πειραμάτων. Με τη χρήση αυτών των μεθόδων έγινε η ταυτοποίηση, ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός των ενώσεων που συντέθηκαν.

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

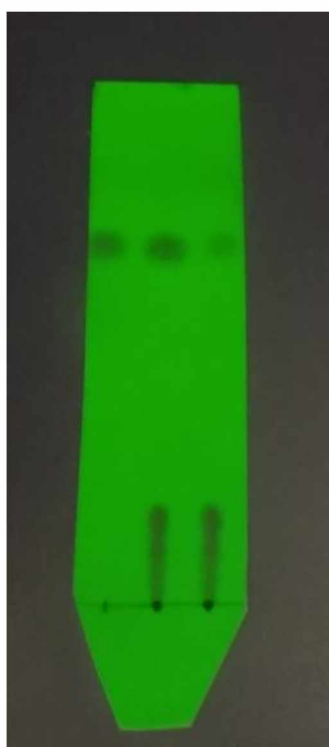
Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μια ευέλικτη μέθοδος με την οποία μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μη πτητικό μίγμα στα χημικά του συστατικά ώστε να γίνει απομόνωση μίας ένωσης, ή να γίνει εκτίμηση της καθαρότητας μιας μη πτητικής ουσίας. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, απλότητα, γρήγορο χρόνο ανάπτυξης, υψηλή ευαισθησία και καλή αναπαραγωγιμότητα. Ειδικότερα, το TLC είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας όπου η κινητή φάση είναι υγρή και η στατική φάση είναι ένα λεπτό στρώμα υλικού πάνω σε μια επίπεδη πλάκα. Η στατική φάση είναι συνήθως ένα μίγμα γύψου και διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) επιστρωμένο πάνω σε φύλλο αλουμινίου. Η κινητή φάση είναι γνωστή ως διαλύτης ανάπτυξης, ο οποίος μεταφέρει τις διαλυτές ουσίες μέσω της στατικής φάσης, κινούμενος κατακόρυφα από κάτω προς τα πάνω.

Το διαλυμένο δείγμα τοποθετείται πάνω στην πλάκα η οποία, μετά την εξάτμιση του διαλύτη, τοποθετείται σε ένα βάζο με βιδωτό πώμα (θάλαμος ανάπτυξης) που περιέχει μικρή ποσότητα του διαλύτη ανάπτυξης. Όταν ο διαλύτης ανέβει κοντά στην κορυφή της πλάκας, η πλάκα αφαιρείται, ξηραίνεται και οπτικοποιείται χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως ή κατάλληλο αντιδραστήριο που αντιδρά με τις ουσίες του δείγματος. Οι διαλύτες θα πρέπει να εξατμίζονται πλήρως πριν από την ανίχνευση και οπτικοποίηση. Οι πλάκες μπορούν να στεγνώσουν στον αέρα αλλά και με στεγνωτήρα μαλλιών ή σε φούρνο. Στην ξήρανση σε υψηλές θερμοκρασίες χρειάζεται προσοχή ώστε να μη γίνει αποσύνθεση του δείγματος.

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορετικές ταχύτητες ανόδου των ουσιών κατά μήκος της στατικής φάσης λόγω της διαφορετικής αλληλεπίδρασής τους με αυτή. Ενώσεις που περιέχουν πολικές ομάδες αλληλεπιδρούν ισχυρά με την πολική στατική

φάση και κινούνται πιο αργά, φτάνοντας σε μικρότερο ύψος στην πλάκα, σε σχέση με τις λιγότερο πολικές ουσίες.

Με την οπτικοποίηση («εμφάνιση του TLC») οι ουσίες εμφανίζονται σε διαφορετικές θέσεις πάνω στην πλάκα. Ο λόγος της διαδρομής που διάνυσε μια ουσία προς τη διαδρομή του διαλύτη ανάπτυξης ονομάζεται συντελεστής επιβράδυνσης (Retention Factor, R_f), και έχει σταθερή τιμή για μία ουσία, σε ορισμένο διαλύτη ανάπτυξης. Ο συντελεστής R_f αποτελεί μέτρο της πολικότητας μιας ένωσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή της. {25}



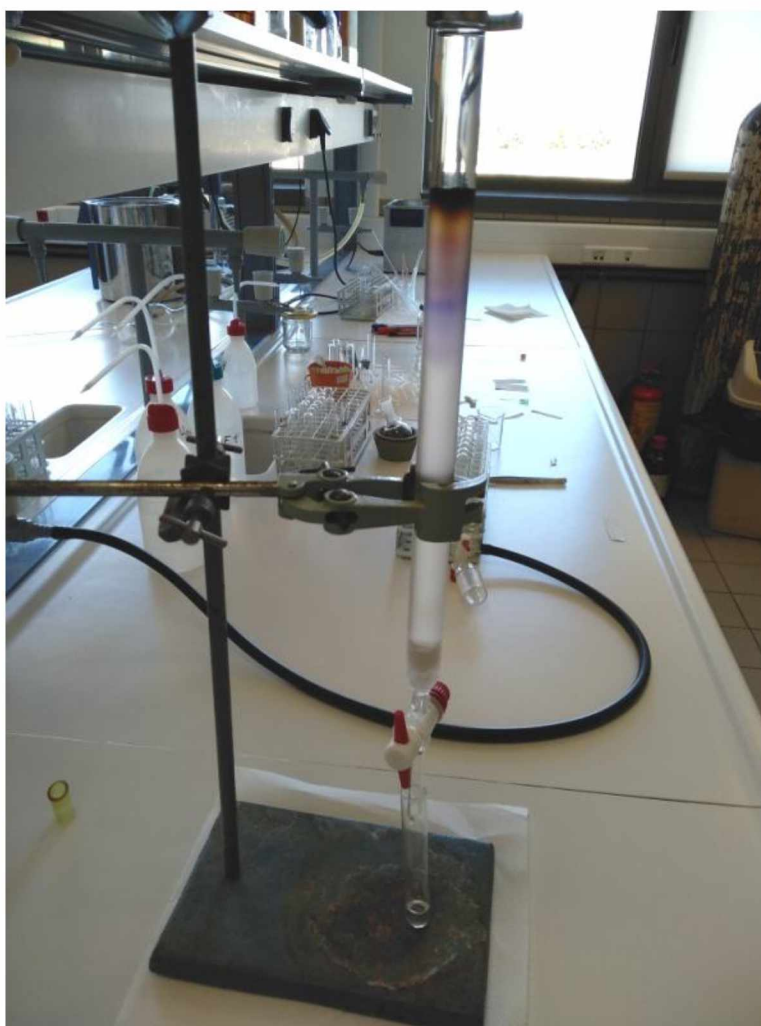
Εικόνα 19: Παράδειγμα TLC

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Κάθε φορά που εκτελείται μία αντίδραση, η ένωση-στόχος πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρωματογραφία στήλης. Ειδικότερα το προς διαχωρισμό μίγμα διαλύεται σε ένα διαλύτη, που αποτελεί την κινητή φάση, και αφήνεται να διέλθει διαμέσου ενός προσροφητικού υλικού που αποτελεί την στατική φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως silica gel, το οποίο έχει αναμειχθεί με ποσότητα της κινητής φάσης, ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες αέρα

μέσα στη μάζα του, και έχει τοποθετηθεί μέσα σε κατακόρυφο γυάλινο σωλήνα. Το διαλυμένο μείγμα τοποθετείται στο άνω μέρος της στατικής φάσης και έπειτα διοχετεύεται περισσότερος διαλύτης μέσω της στήλης, οπότε οι διάφορες ενώσεις εξέρχονται από το κάτω μέρος της στήλης (εκλύονται) σε διαφορετικό χρόνο.

Η πολικότητα μιας ένωσης επηρεάζει τον χρόνο έκλουσης της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται σε γενικές γραμμές εντονότερα και συνεπώς μετακινούνται διαμέσου της στατικής φάσης βραδύτερα από τα άπολα μόρια. {26}

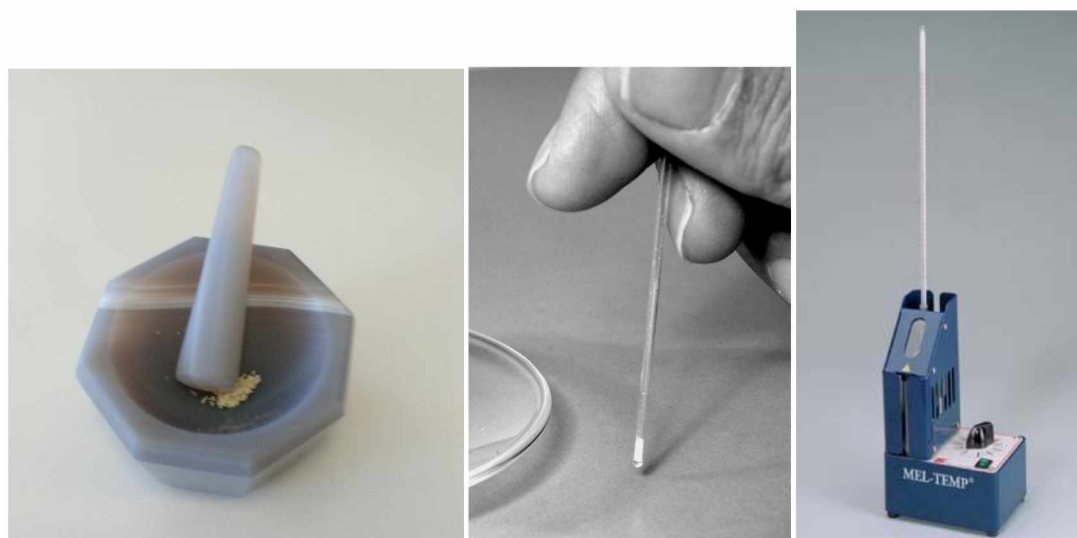


Εικόνα 20: Παράδειγμα χρωματογραφίας στήλης

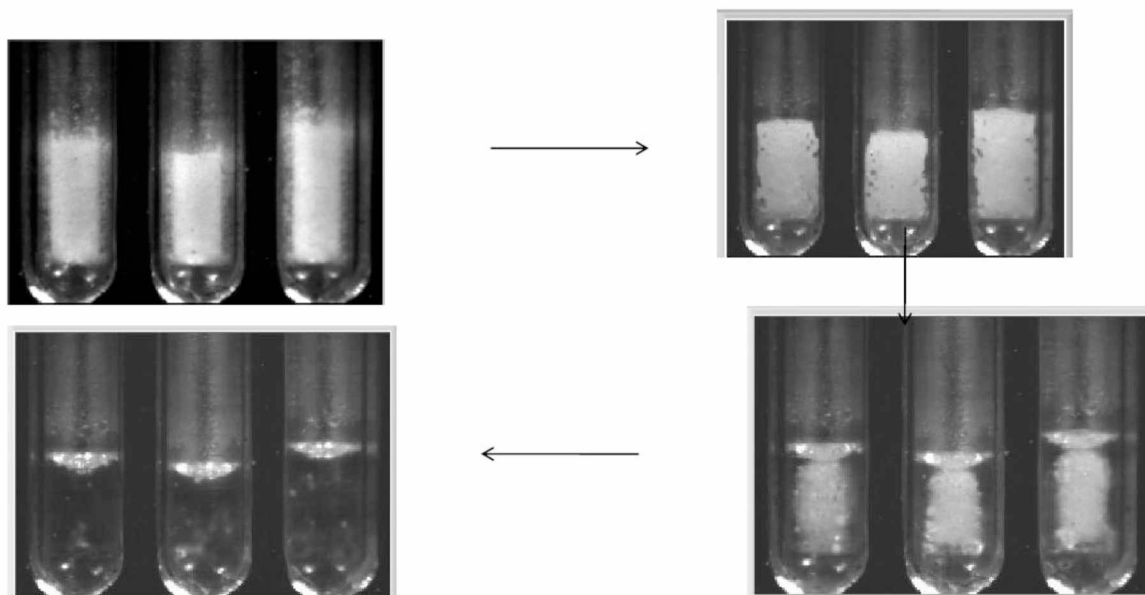
3.3 Προσδιορισμός σημείου τήξεως (T_m)

Σημείο τήξεως μιας στερεής οργανικής ένωσης είναι η θερμοκρασία στην οποία η στερεή φάση μετατρέπεται στην υγρή, χωρίς να συμβεί οποιαδήποτε χημική μεταβολή της. Το σημείο τήξεως χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση μιας ουσίας και στον έλεγχο της καθαρότητας των οργανικών ενώσεων. Μια καθαρή κρυσταλλική οργανική ένωση έχει σταθερό σημείο τήξεως, με μικρό εύρος, το πολύ 2-3 °C. Η παρουσία κάποιας πρόσμιξης, ακόμη και σε μικρές ποσότητες, προκαλεί ελάττωση του σημείου τήξεως και αύξηση του εύρους.

Για τον προσδιορισμό του σημείου τήξεως γίνεται χρήση κατάλληλης συσκευής. Πιο συγκεκριμένα, κονιοποιείται μια μικρή ποσότητα της στερεής ένωσης με τη χρήση ειδικού γουδιού και στη συνέχεια τοποθετείται σε τριχοειδές σωληνάριο. Έπειτα, το τριχοειδές σωληνάριο αφήνεται από κάποιο ύψος ώστε να πακεταριστεί καλά η ένωση. Το σωληνάριο θα τοποθετηθεί τελικά στην κατάλληλη συσκευή η οποία επιτρέπει την παρακολούθηση της θερμοκρασίας. Με την εμφάνιση του πρώτου σταγονιδίου στο εσωτερικό του σωληναρίου γίνεται η πρώτη καταμέτρηση της θερμοκρασίας ενώ η τελευταία μέτρηση πραγματοποιείται όταν η ένωση έχει ρευστοποιηθεί πλήρως.



Εικόνα 21: Εργαλεία προσδιορισμού σημείου τήξεως.



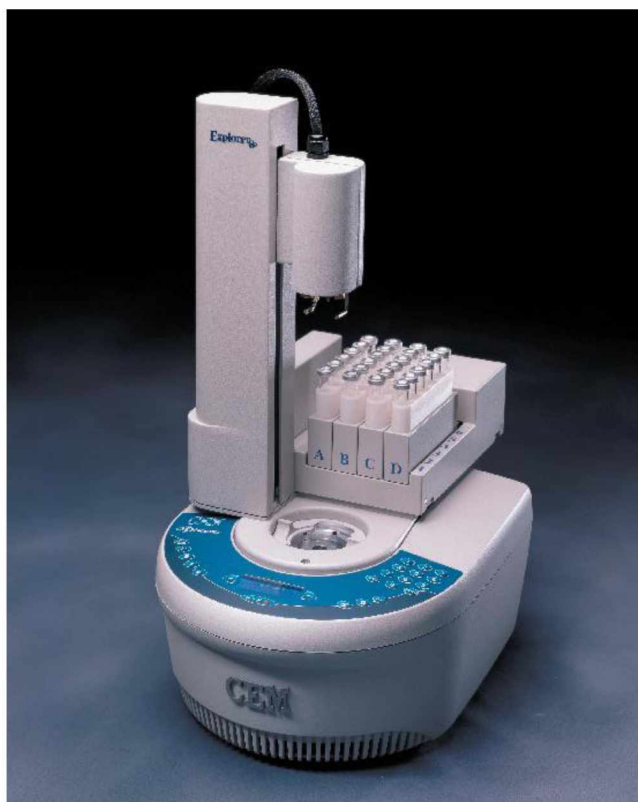
Εικόνα 22: Στάδια τήξης μιας στερεής οργανικής ένωσης

3.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την ισχυρότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδο που διαθέτουν οι οργανικοί χημικοί για την ταυτοποίηση οργανικών δομών, δίνοντας πληροφορίες για τον αριθμό και τους τύπους των ατόμων σε ένα μόριο. Ειδικότερα το NMR είναι ένα φυσικό φαινόμενο όπου οι πυρήνες απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όταν βρίσκονται μέσα σε μαγνητικό πεδίο. Αυτή η ενέργεια αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συχνότητα (συχνότητα συντονισμού), η οποία εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του ισότοπου των ατόμων. Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για τη μελέτη μιας μεγάλης ποικιλίας πυρήνων με τους πυρήνες πρωτονίου (^1H) και άνθρακα (^{13}C) να είναι οι χρησιμότεροι στην οργανική χημεία, καθώς τόσο το υδρογόνο όσο και ο άνθρακας αποτελούν τα κύρια συστατικά των οργανικών ενώσεων. {3} {26}

3.5 Συσκευή μικροκυμάτων

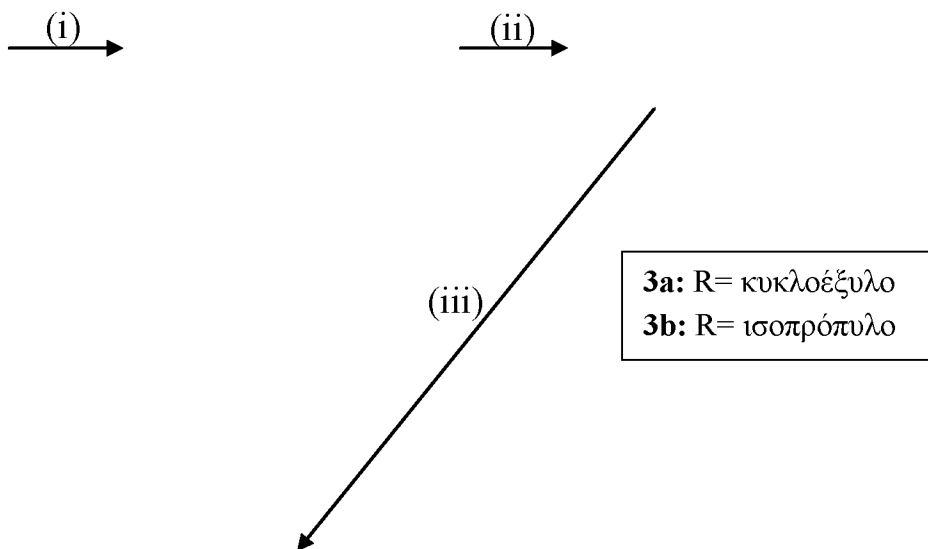
Κάποιες από τις αντιδράσεις απαιτούσαν τη χρήση θέρμανσης μέσω μικροκυμάτων (microwaves, MW), τα οποία αποτελούν μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας που αντιστοιχεί στα χαμηλότερα επίπεδα συχνότητας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη συσκευή MW, και συγκεκριμένα το μοντέλο CEM Discover, με προσάρτηση τροφοδότη Explorer, που λειτουργεί σε συχνότητα 2,45 GHz, με ισχύ ακτινοβολίας από 0 έως 300 Watt, και μέγιστη εσωτερική πίεση 250 PSI.



Εικόνα 23: Συσκευή μικροκυμάτων CEM Discover

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Επισκόπηση συνθετικής πορείας



4a:R= κυκλοέξυλο
Ar= 4-μορφόλινο-φαινυλο
4b:R= κυκλοέξυλο
Ar= 3-χλώρο-φαινυλο
4c:R= ισοπρόπυλο
Ar= 3-χλώρο-φαινυλο
4d:R= ισοπρόπυλο
Ar= 4-μορφόλινο-φαινυλο

i) POCl_3 (Φωσφορυλοχλωρίδιο), $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ (N, N-Δισοπροπυλαιθυλαμίνη), 105°C

ii) RNH_2 όπου R= κυκλοέξυλο ή R= ισοπρόπυλο, $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$ (N, N-Δισοπροπυλαιθυλαμίνη), CH_2Cl_2 (Διχλωρομεθάνιο)

iii) ArNH_2 όπου Ar= 4-μορφόλινο-φαινυλο ή Ar= 3-χλώρο-φαινυλο, p-TsOH (p-τολουολοσουλφονικό οξύ), $i\text{-PrOH}$ (ισοπροπανόλη)

4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

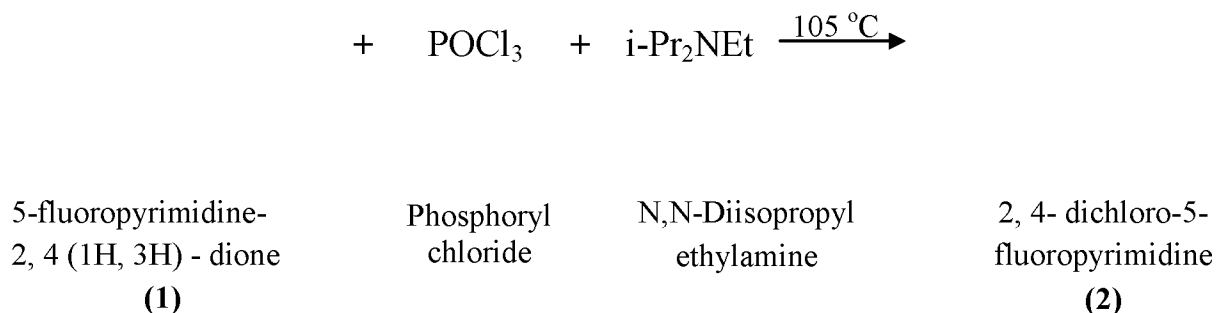
Στην αντίδραση (i) πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνης (**2**) η οποία αποτέλεσε την πρώτη ύλη για τις επόμενες αντιδράσεις. Στη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η εμπορικά διαθέσιμη πυριμιδινο-2,4-(1H,3H)-διόνη (**1**).

Στην αντίδραση (ii) από τη 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνη (**2**), προσθέτοντας την κυκλοεξυλαμίνη ή την ισοπροπυλαμίνη, προκύπτουν η 2-chloro-N-cyclohexyl-5-fluoropyrimidin-4-amine (**3a**) ή η 2-chloro-5-fluoro-N-isopropylpyrimidin-4-amine (**3b**) αντίστοιχα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνης, η οποία δεσμεύει το παραγόμενο υδροχλώριο, και παρατηρήθηκε εισαγωγή της άμινο ομάδας αποκλειστικά στη θέση 4 του δακτυλίου της πυριμιδίνης.

Στην αντίδραση (iii) με την προσθήκη 4-μορφολινοανιλίνης ή 3-χλωροανιλίνης στην 2-chloro-N-cyclohexyl-5-fluoropyrimidin-4-amine (**3a**) προκύπτει η N⁴-cyclohexyl-5-fluoro-N²-(4-morpholinophenyl) pyrimidine-2,4-diamine (**4a**) και η N²-(3-chlorophenyl)-N⁴-cyclohexyl-5-fluoropyrimidine-2,4-diamine (**4b**) αντίστοιχα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία p-τολουολοσουλφονικού οξέος ή πυκνού υδροχλωρίου ως όξινου καταλύτη. Κατά το ίδιο τρόπο, με την προσθήκη 4-μορφολινοανιλίνης ή 3-χλωροανιλίνης στην 2-chloro-5-fluoro-N-isopropylpyrimidin-4-amine (**3b**) προκύπτει η N²-(3-chlorophenyl)-5-fluoro-N⁴-isopropylpyrimidine-2,4-diamine (**4c**) και η 5-fluoro-N⁴-isopropyl-N²-(4-morpholinophenyl) pyrimidine-2,4-diamine (**4d**) αντίστοιχα.

4.3 Επιμέρους αντιδράσεις

Αντίδραση (i): σύνθεση της 2,4- χλώρο- 5- φθοροπυριμιδίνης (**2**)

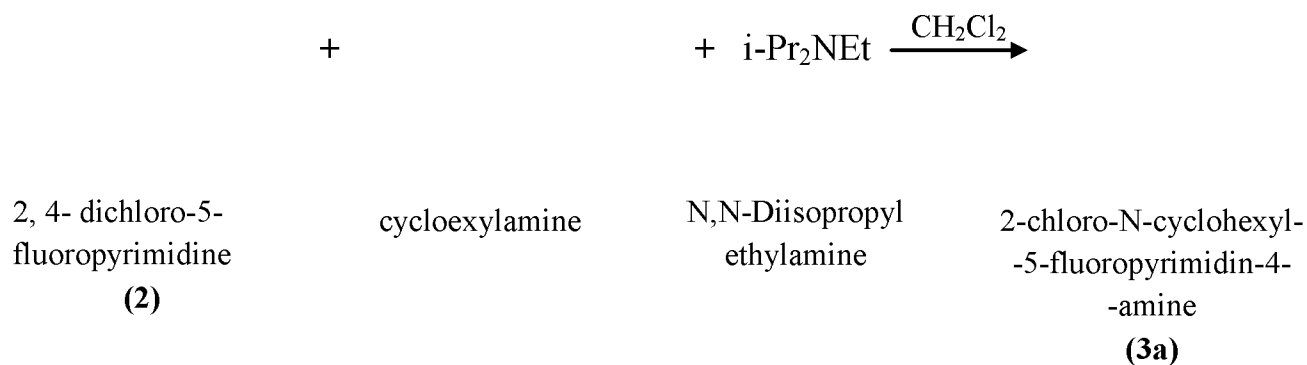


Πειραματική πορεία για την (i)

Αρχικά μίγμα 5-φθορο-ουρακίλης (**1**) (m=130 mg, n=1,0 mmol, M_r = 130,08 g/mol), φωσφορυλοχλωριδίου (POCl_3 , V= 1,0 mL, M_r = 153,33 g/mol, d= 1,645 g/ml) και N,N- διισοπροπυλαιθυλαμίνης (i-Pr₂NEt, n= 1,5 mmol, V= 0,26 ml, d= 0,747 g/ml, M_r = 129,25 g/mol) θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 105 °C. Μετά από 4 ώρες διαπιστώθηκε με TLC (5% MeOH σε CH₂Cl₂) η πλήρης κατανάλωση της ένωσης (**1**). Το μείγμα αφέθηκε να ψυχθεί για λίγη ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε στη συνέχεια να απομακρυνθεί η περίσσεια POCl_3 με εξάτμιση υπό κενό. Η παραλαβή του προϊόντος (**2**) έγινε μετά από αραιώση με 10 ml AcOEt, έκπλυση του διαλύματος δύο φορές με 10 ml H₂O κάθε φορά, έκπλυση δύο φορές με 10 ml NaHCO₃ κάθε φορά, μία έκπλυση με 10 ml NaCl, και τέλος ξήρανση με Na₂SO₄. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και τέλος καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (silica gel, έκλυση με σύστημα διαλυτών εξάνιο-διχλωρομεθάνιο αναλογίας 7 προς 3).

Χαρακτηριστικά του (2)

Μοριακό Βάρος (M_r)	166,96 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	39-40 °C
Συντελεστής Επιβράδυνσης (R_f) TLC: Hex - CH ₂ Cl ₂ 7:3	0,21
Απόδοση	71 %

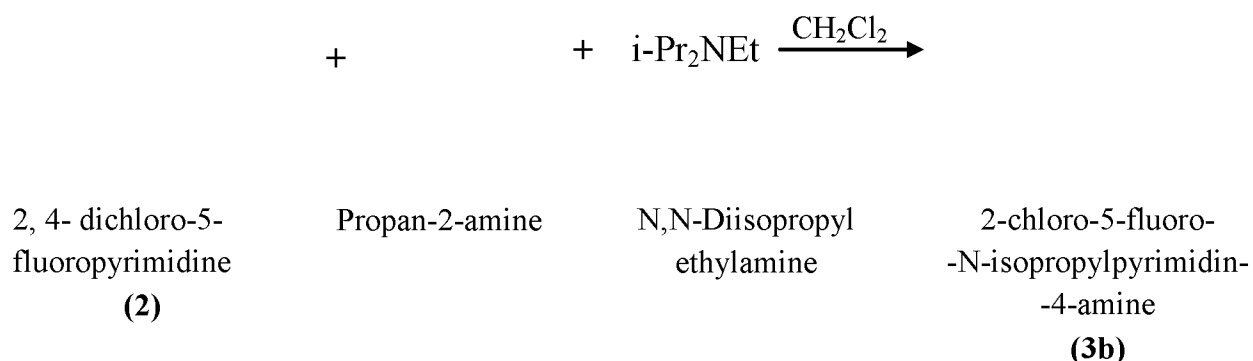
Αντίδραση (ii-a): σύνθεση της 2-chloro-N-cyclohexyl-5-fluoropyrimidin-4-amine (**3a**)**Πειραματική πορεία για την (ii-a)**

Αρχικά η 2,4-δichλωρο-5-φθοροπυριμιδίνη (**2**) ($m= 53 \text{ mg}$, $n= 0,32 \text{ mmol}$, $M_r= 166,96 \text{ g/mol}$) διαλύθηκε σε dichλωρομεθάνιο ($V= 1 \text{ ml}$) και το διάλυμα ψύχθηκε σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια προστέθηκε η N-N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη ($i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, $n= 0,35 \text{ mmol}$, $V= 61 \mu\text{l}$, $d= 0,747 \text{ g/ml}$, $M_r= 129,25 \text{ g/mol}$) και η κυκλοεξυλαμίνη ($n= 0,33 \text{ mmol}$, $V= 38 \mu\text{l}$, $d= 0,867 \text{ g/ml}$, $M_r= 99,17 \text{ g/mol}$). Μετά από 50 λεπτά διαπιστώθηκε με TLC (Hex-AcOEt 9:1) η πλήρης κατανάλωση της ένωσης (**2**). Η παραλαβή του προϊόντος (**3a**) έγινε μετά από αραίωση με 10ml AcOEt, έκπλυση 2 φορές με 10 ml NaCl κάθε φορά, και ξήρανση με Na_2SO_4 . Τέλος, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (silica gel, έκλουση με σύστημα διαλυτών εξάνιο- οξικός αιθυλεστέρας αναλογίας 9 προς 1).

Χαρακτηριστικά του (3a)

Μοριακό Βάρος (M_r)	229,68 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	78-81 °C
Συντελεστής Επιβράδυνσης (R_f) TLC: Hex-EtOAc 9:1	0,20
Απόδοση	86 %

Αντίδραση (ii-b): σύνθεση της 2-chloro-5-fluoro-N-isopropylpyrimidin-4-amine (**3b**)



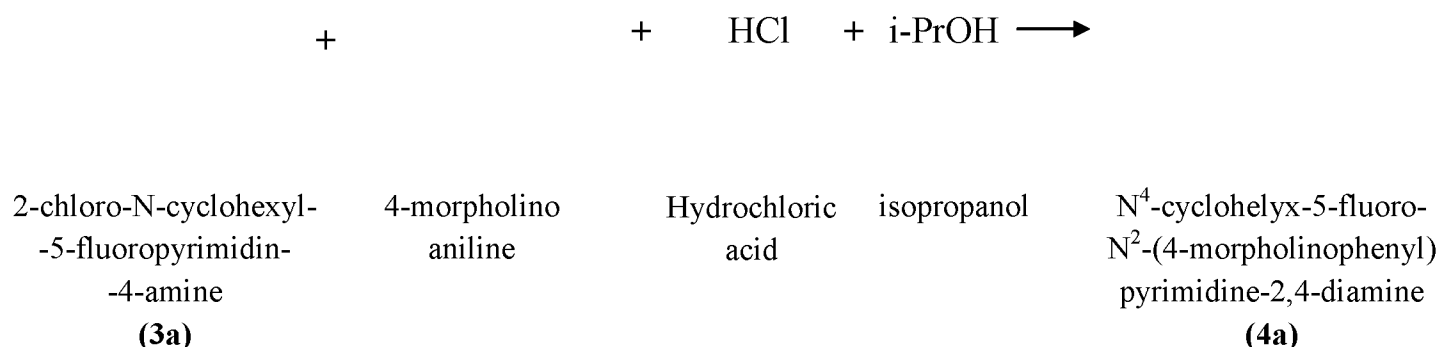
Πειραματική πορεία για την (ii-b)

Η 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνη (**2**) ($m = 42 \text{ mg}$, $n = 0,25 \text{ mmol}$, $M_r = 166,96 \text{ g/mol}$) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο ($V = 2,5 \text{ ml}$) και στη συνέχεια προστέθηκαν κατά σειρά η ισοπροπυλαμίνη ($V = 30 \text{ }\mu\text{l}$, $n = 0,35 \text{ mmol}$, $M_r = 59,11 \text{ g/mol}$, $d = 0,687 \text{ g/ml}$) και η N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη ($i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, $V = 44 \text{ }\mu\text{l}$, $n = 0,25 \text{ mmol}$, $M_r = 129,25 \text{ g/mol}$, $d = 0,747 \text{ g/ml}$). Το μίγμα αφέθηκε overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη ημέρα διαπιστώθηκε με TLC (9 Hexane : 1 AcOEt) η πλήρης κατανάλωση του (**2**). Η παραλαβή του προϊόντος (**3b**) έγινε μετά από αραιώση με 15 ml AcOEt, έκπλυση του διαλύματος δύο φορές με 15 ml NaCl κάθε φορά, ξήρανση του με Na_2SO_4 , απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό, και τέλος καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα διαλυτών εξάνιο- οξικός αιθυλεστέρας αναλογίας 95 προς 5 αντίστοιχα.

Χαρακτηριστικά του (3b)

Μοριακό Βάρος (M_r)	189,62
Σημείο Τήξεως (T_m)	52-54
Συντελεστής Επιβράδυνσης (R_f) TLC: Hexane-AcOEt 9:1	0,23
Απόδοση	70%

Αντίδραση (iii-a): σύνθεση της (4a)



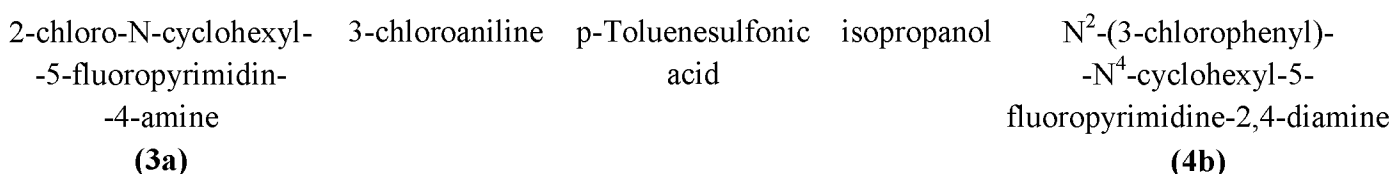
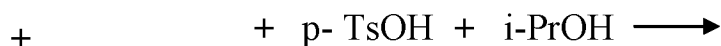
Πειραματική πορεία για την (4a)

Αρχικά, η 2-chloro-N-cyclohexyl-5-fluoropyrimidin-4-amine (**3a**) (m= 23 mg, n= 0,10 mmol, $M_r= 229,68$ g/mol) και η 4-morpholinoaniline (m= 18 mg, n= 0,10 mmol, $M_r= 178,24$ g/mol) αναμείχθηκαν με ισοπροπανόλη (V= 1 ml). Στη συνέχεια προστέθηκε πυκνό HCl (1-2 σταγόνες). Η αντίδραση έλαβε χώρα σε συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 110 °C. Η παραλαβή του προϊόντος (**4a**) έγινε μετά από αραίωση με 10ml AcOEt, έκπλυση 2 φορές με 10 ml NaHCO₃ κάθε φορά, έκπλυση 2 φορές με 10 ml NaCl κάθε φορά, και ξήρανση με Na₂SO₄. Τέλος, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα διαλυτών εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας αναλογίας 4 προς 6.

Χαρακτηριστικά του (4a)

Μοριακό Βάρος (M_r)	371,46 g/mol
Σημείο Τήξεως (T_m)	195-198 °C
Συντελεστής Επιβράδυνσης (R_f) TLC: Hexane- AcOEt 2:1	0,27
Απόδοση	65 %

Αντίδραση (iii-b): σύνθεση της N²-(3-chlorophenyl)-N⁴-cyclohexyl-5-fluoropyrimidine-2,4-diamine (**4b**)



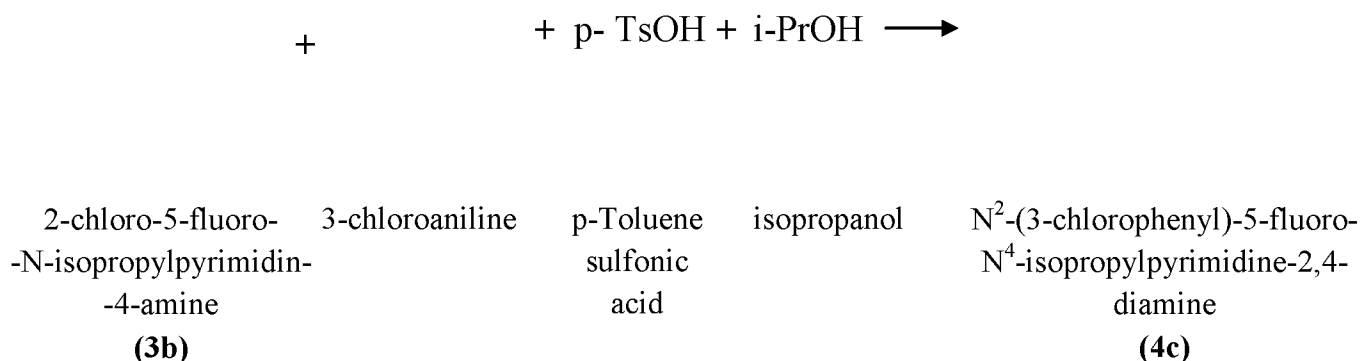
Πειραματική πορεία για την (**4b**)

Η 2-chloro-N-cyclohexyl-5-fluoropyrimidin-4-amine (**3a**) (m= 23 mg, n= 0,10 mmol, M_r= 229,68 g/mol) αναμειχθηκε με p-τολουολοσουλφονικό οξύ (p-TsOH, m= 19 mg, n=0,10 mmol, M_r= 190,22 g/mol). Στη συνέχεια προστέθηκε ισοπροπανόλη (i-PrOH, V= 1 ml) και η 3-χλωροανιλίνη (V= 11 μl, M_r= 127,57 g/mol, n= 0,104 mmol, d= 1,210 g/ml). Το μίγμα θερμάνθηκε overnight σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 85 °C. Την επόμενη ημέρα διαπιστώθηκε με TLC (4 Hexane : 1 AcOEt) η πλήρης κατανάλωση της (**3a**). Η παραλαβή του προϊόντος (**4b**) έγινε μετά από αραιώση με 10 ml AcOEt, έκπλυση του διαλύματος δύο φορές με 10 ml NaHCO₃ κάθε φορά, μία έκπλυση με 10 ml NaCl και τέλος ξήρανση με Na₂SO₄. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και τέλος καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα διαλυτών εξάνιο- οξικός αιθυλεστέρας αναλογίας 9 προς 1.

Χαρακτηριστικά του (**4b**)

Μοριακό Βάρος (M _r)	320,80 g/mol
Σημείο Τήξεως (T _m)	152-154 °C
Συντελεστής Επιβράδυνσης (R _f) TLC: Hexane-AcOEt 4:1	0,33
Απόδοση	97%

Αντίδραση (iii-c): σύνθεση της N²-(3-chlorophenyl)-5-fluoro-N⁴-isopropylpyrimidine-2,4-diamine (**4c**)



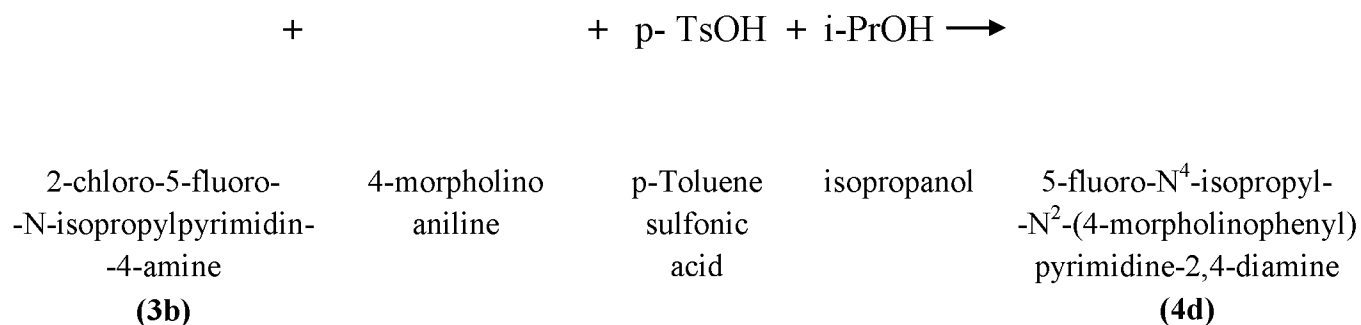
Πειραματική πορεία για την (iii-c)

Η 2-chloro-5-fluoro-N-isopropylpyrimidin-4-amine (**3b**) (m= 36 mg, n= 0,19 mmol, M_r= 189,62 g/mol) αναμείχθηκε με ισοπροπανόλη (V= 0,8 ml). Στη συνέχεια προστέθηκε p-τολουολοσουλφονικό οξύ (p-TsOH, m= 36 mg, n= 0,19 mmol, M_r= 190,22 g/mol) και η 3-χλωροανιλίνη (V= 24 μl, d= 1,210 g/ml, M_r= 127,57 g/mol). Το μίγμα θερμάνθηκε overnight σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 85 °C. Την επόμενη ημέρα διαπιστώθηκε με TLC (4 Hexane : 1 AcOEt) η πλήρης κατανάλωση της (**3b**). Η παραλαβή του προϊόντος (**4c**) έγινε μετά από αραίωση με 15ml AcOEt, έκπλυση του διαλύματος δύο φορές με 15 ml NaHCO₃ κάθε φορά, μία έκπλυση με 15 ml NaCl και τέλος ξήρανση με Na₂SO₄. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και τέλος καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα διαλυτών εξάνιο- οξικός αιθυλεστέρας αναλογίας 9 προς 1.

Χαρακτηριστικά του (4c)

Μοριακό Βάρος (M _r)	280,73 g/mol
Σημείο Τήξεως (T _m)	118-120 °C
Συντελεστής Επιβράδυνσης (R _f) TLC: Hexane - AcOEt 4:1	0,37
Απόδοση	85%

Αντίδραση (iii-d): σύνθεση της 5-fluoro-N⁴-isopropyl-N²-(4-morpholinophenyl) pyrimidine-2,4-diamine (**4d**)



Πειραματική πορεία για την (4d):

Η 2-chloro-5-fluoro-N-isopropylpyrimidin-4-amine (**3b**) (m= 19 mg, n= 0,10 mmol, M_r= 189,62 g/mol) αναμείχθηκε με 4-morphoaniline (m= 22 mg, n= 0,10 mmol, M_r= 178,24 g/mol), p-τολουολοσουλφονικό οξύ (p-TsOH, m= 19 mg, n= 0,10 mmol, M_r= 190,92 g/mol) και ισοπροπανόλη (V= 1 ml). Το μίγμα θερμάνθηκε overnight σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 80 °C. Την επόμενη ημέρα διαπιστώθηκε με TLC (2 Hexane : 1 AcOEt) η πλήρης κατανάλωση της (**3b**). Η παραλαβή του προϊόντος (**4d**) έγινε μετά από αραίωση με 15 ml AcOEt, έκπλυση του διαλύματος δύο φορές με 15 ml NaHCO₃ κάθε φορά, μία έκπλυση με 15ml NaCl και τέλος ξήρανση με Na₂SO₄. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό, και τέλος καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε silica gel, με σύστημα διαλυτών εξάνιο- οξικός αιθυλεστέρας αναλογίας 3 προς 1.

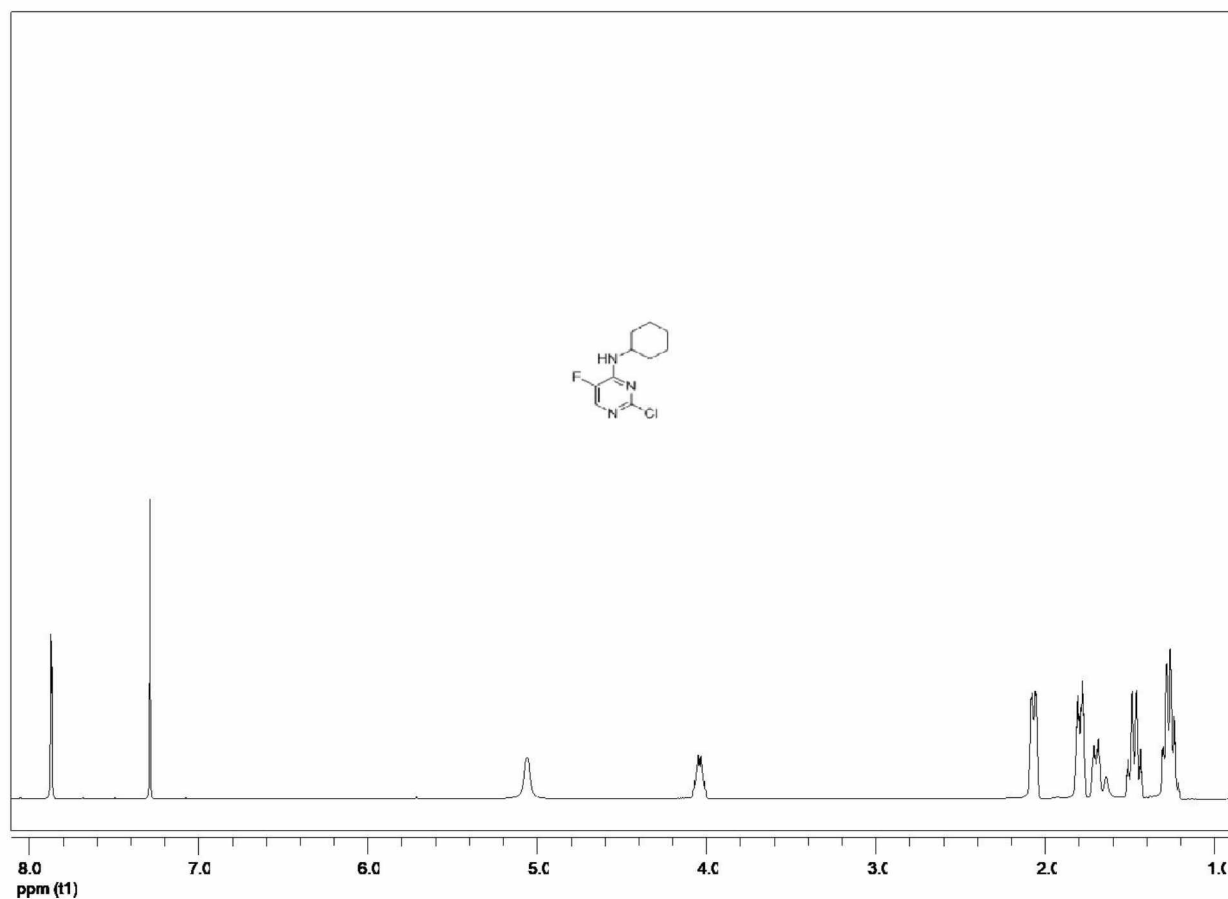
Χαρακτηριστικά του (4d)

Μοριακό Βάρος (M _r)	331,40 g/mol
Σημείο Τήξεως (T _m)	178-182 °C
Συντελεστής Επιβράδυνσης (R _f) TLC: Hexane – AcOEt 2:1	0,18
Απόδοση	81%

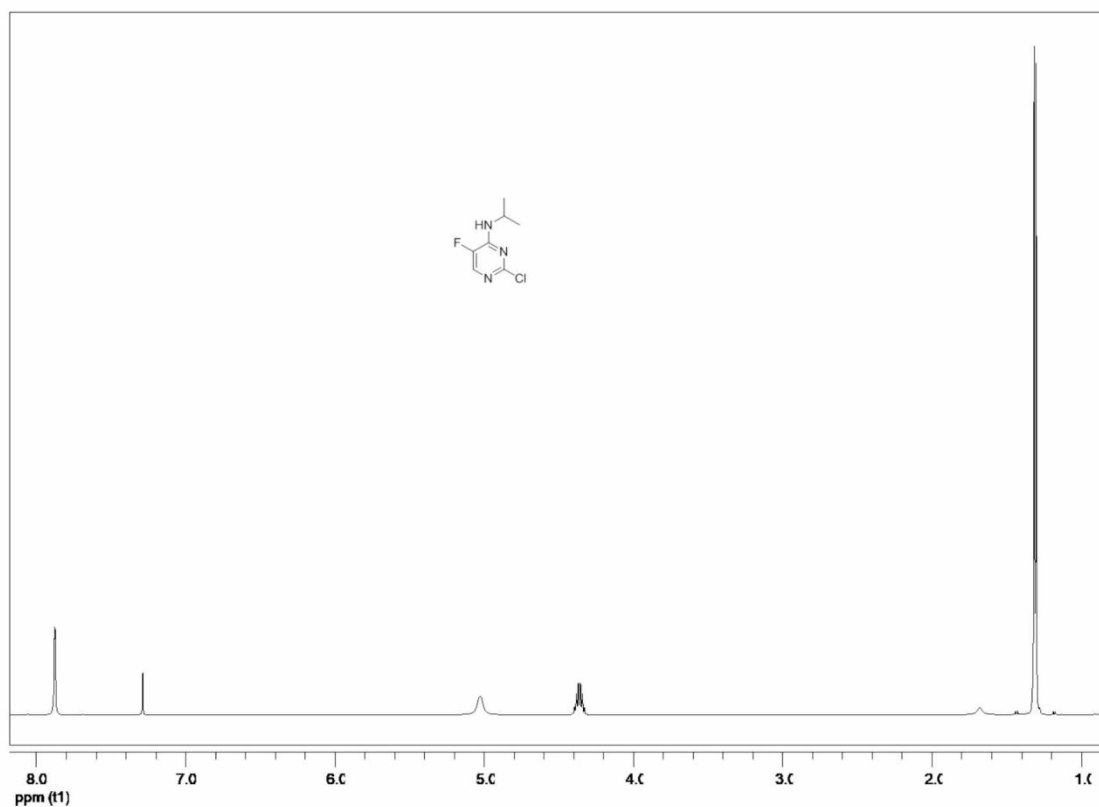
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η ταυτοποίηση της ένωσης (**2**) έγινε με βάση το σημείο τήξεως. Η ταυτοποίηση των υπόλοιπων τελικών προϊόντων των αντιδράσεων του πειραματικού μέρους πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου (^1H NMR) και άνθρακα-13 (^{13}C NMR). Έτσι επιβεβαιώθηκε η δομή και η καθαρότητα των προϊόντων και συνεπώς η επιτυχία των πειραμάτων. Παρακάτω απεικονίζονται τα φάσματα NMR όλων των ενώσεων.

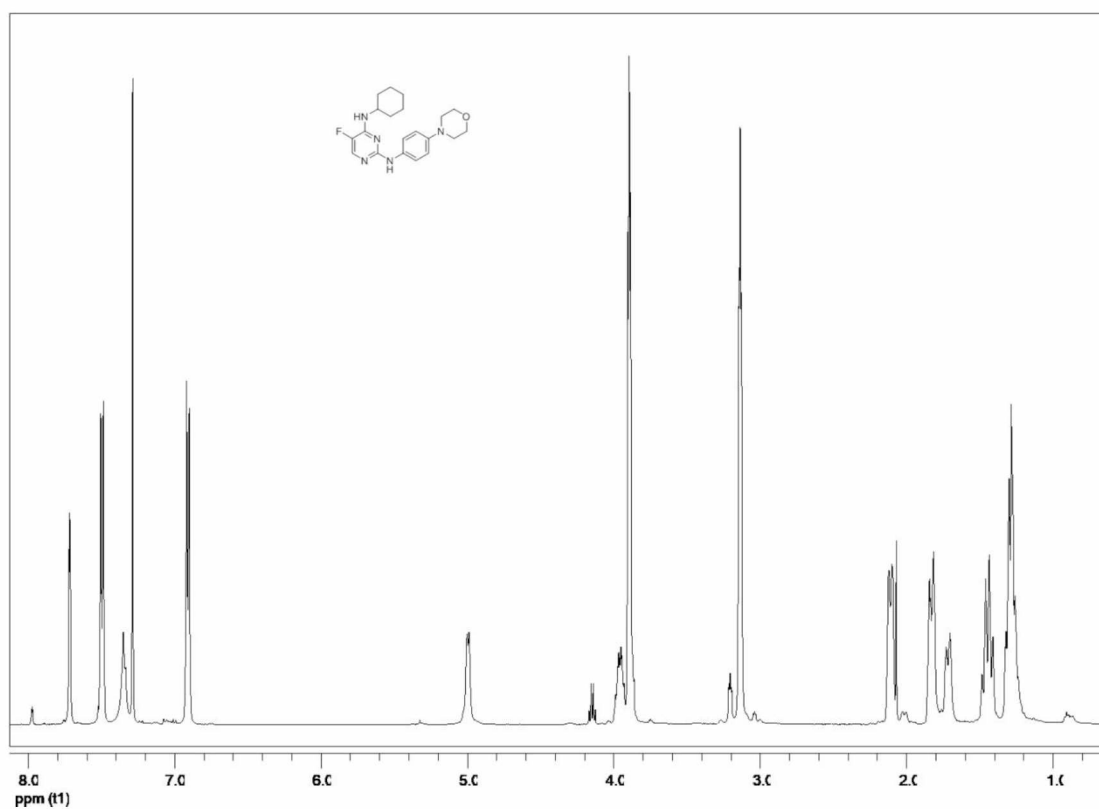
5.1 Φάσματα NMR πρωτονίου (^1H NMR)



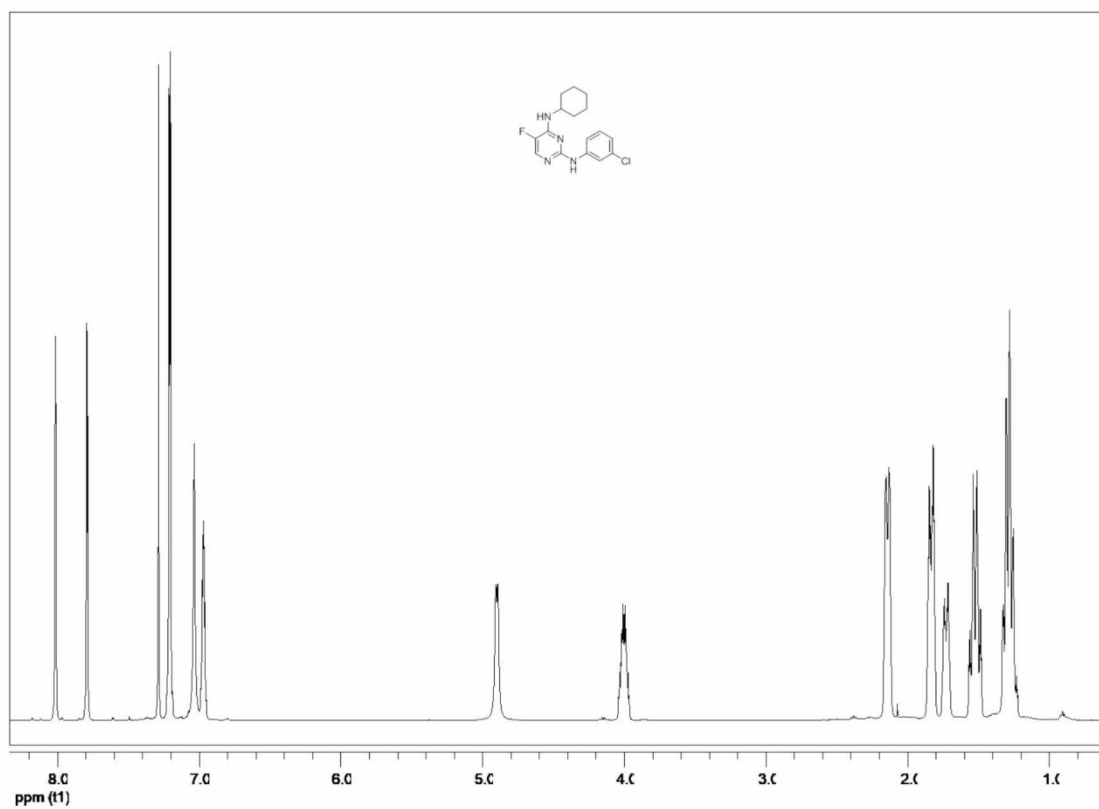
Εικόνα 24 : Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**3a**)



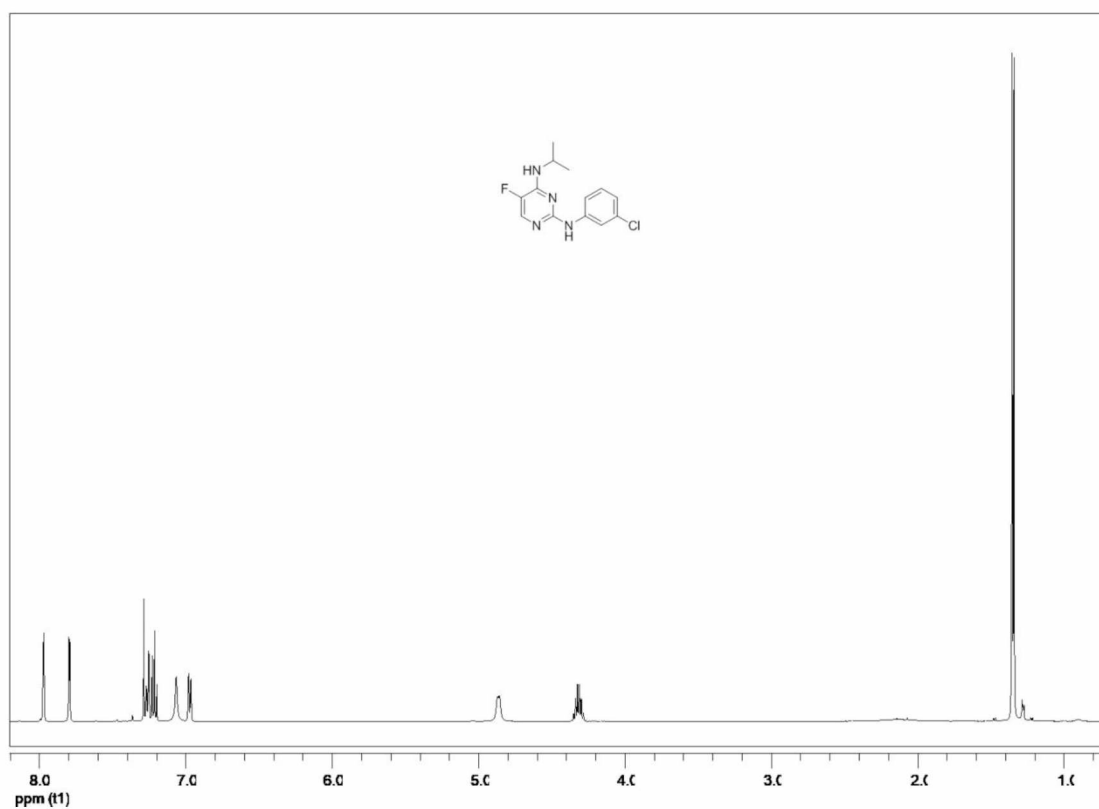
Εικόνα 25: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης **(3b)**



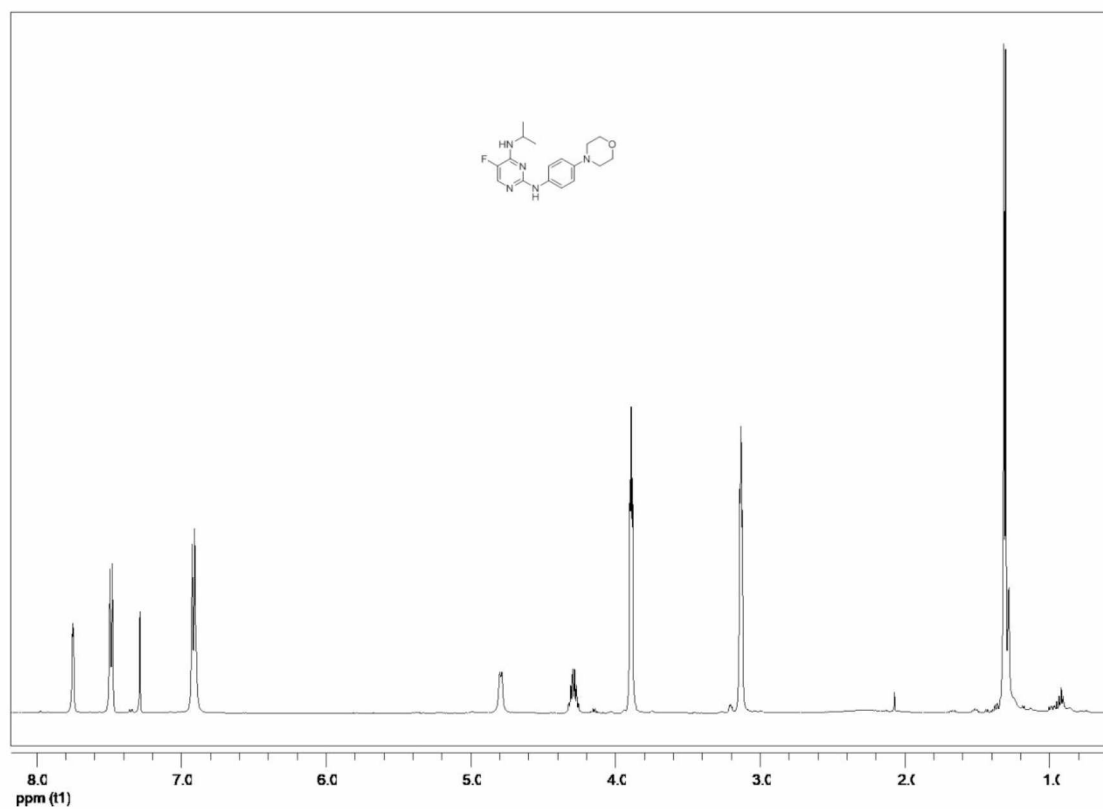
Εικόνα 26: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης **(4a)**



Εικόνα 27: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**4b**)

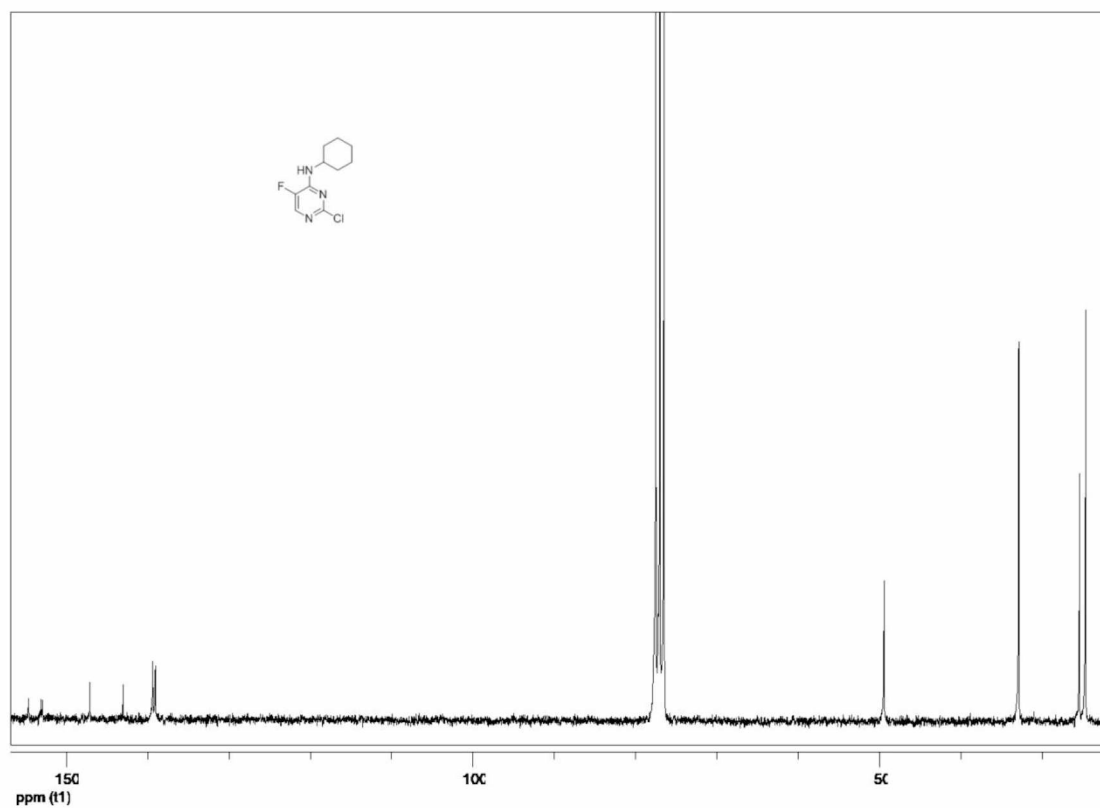


Εικόνα 28: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (**4c**)

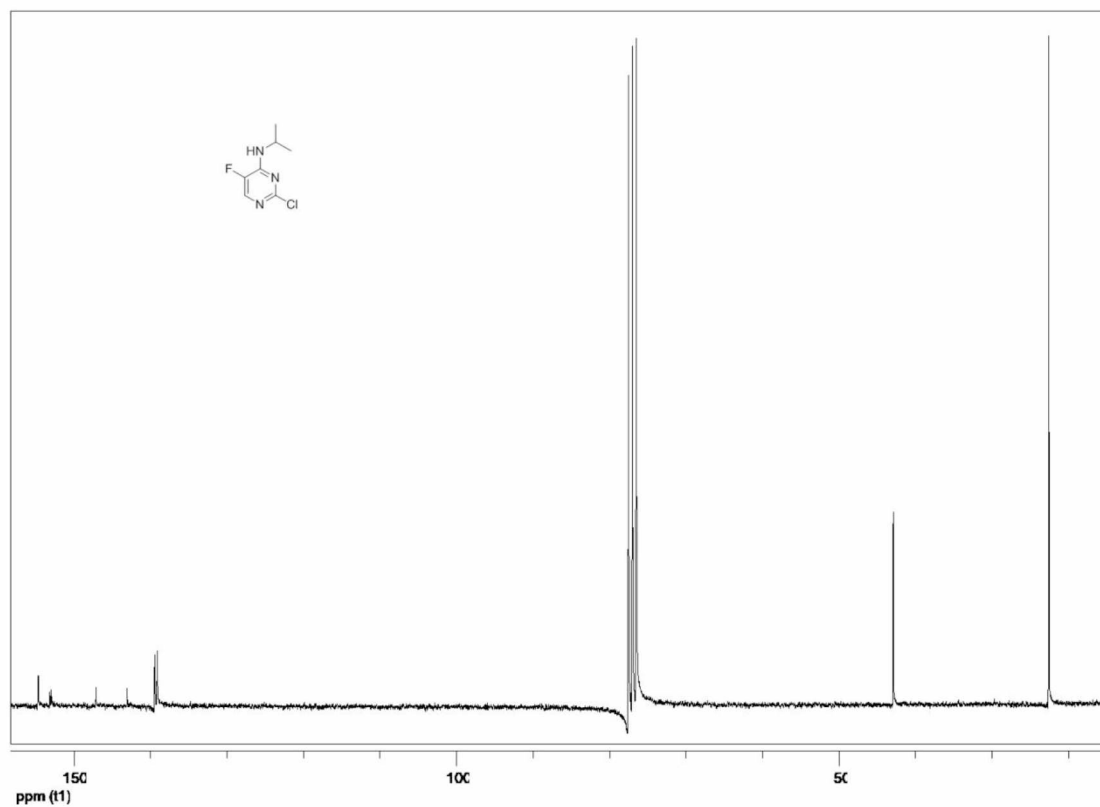


Εικόνα 29: Φάσμα ¹H NMR της ένωσης (4d)

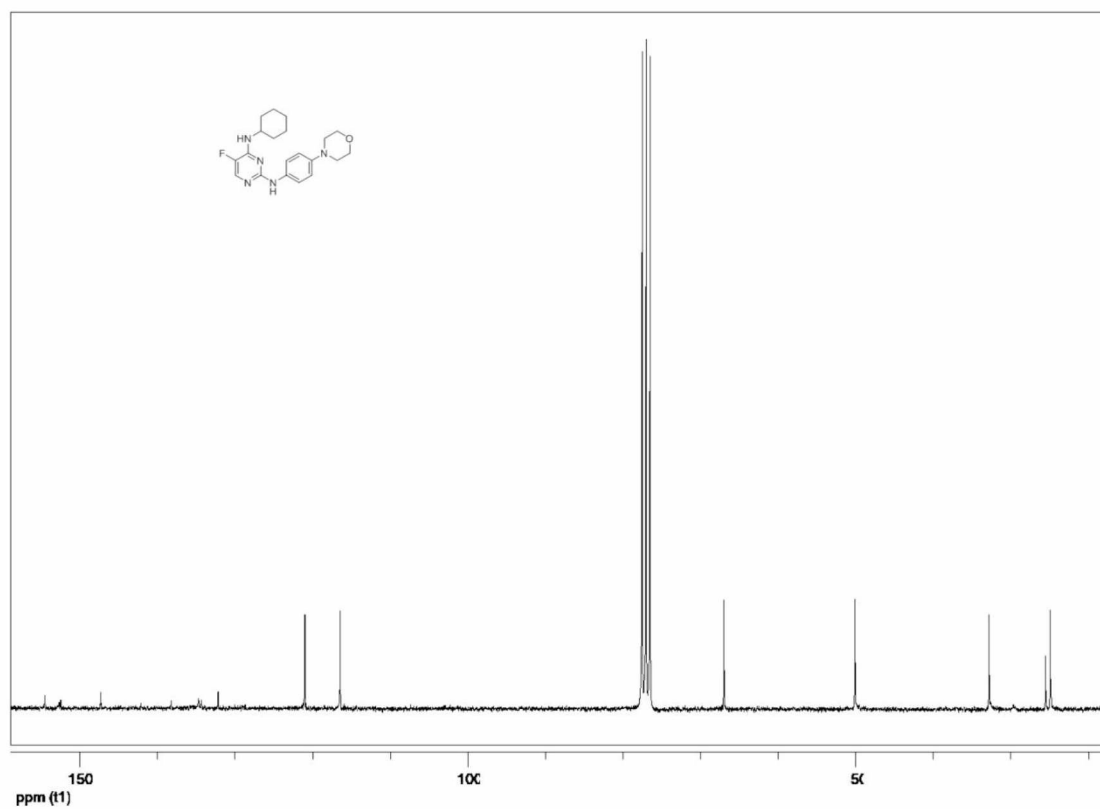
5.2 Φάσματα NMR άνθρακα-13 (^{13}C NMR)



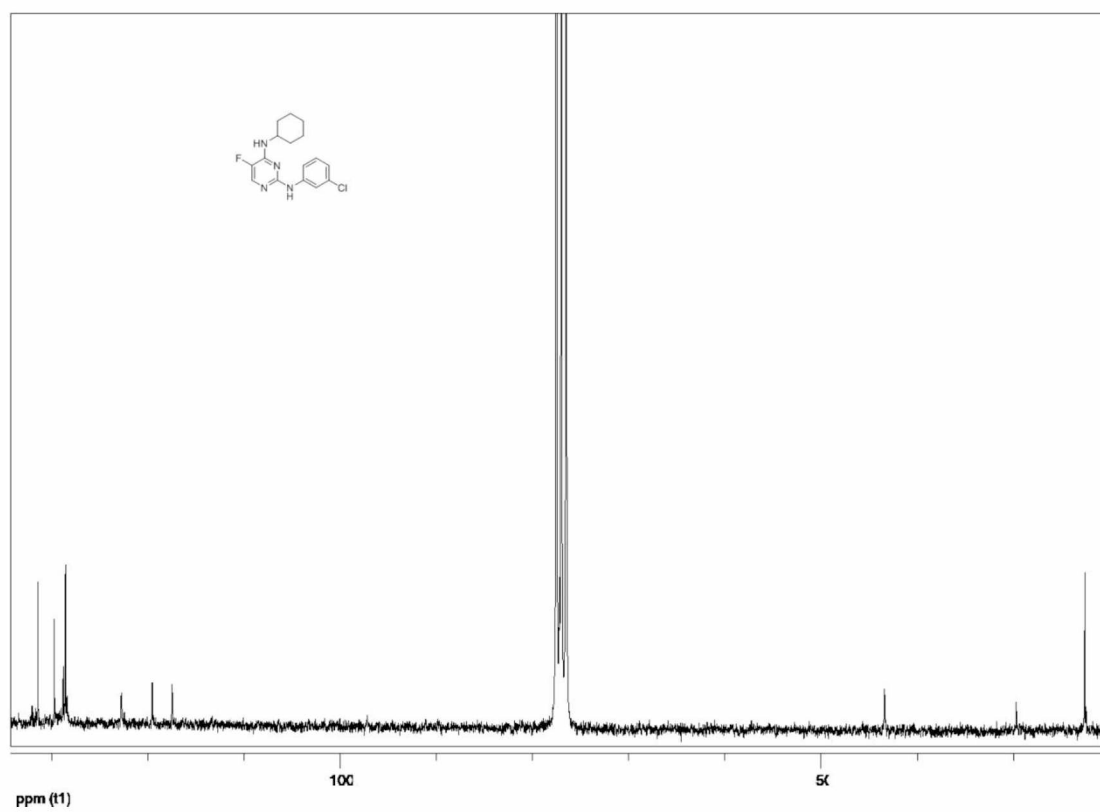
Εικόνα 30: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**3a**)



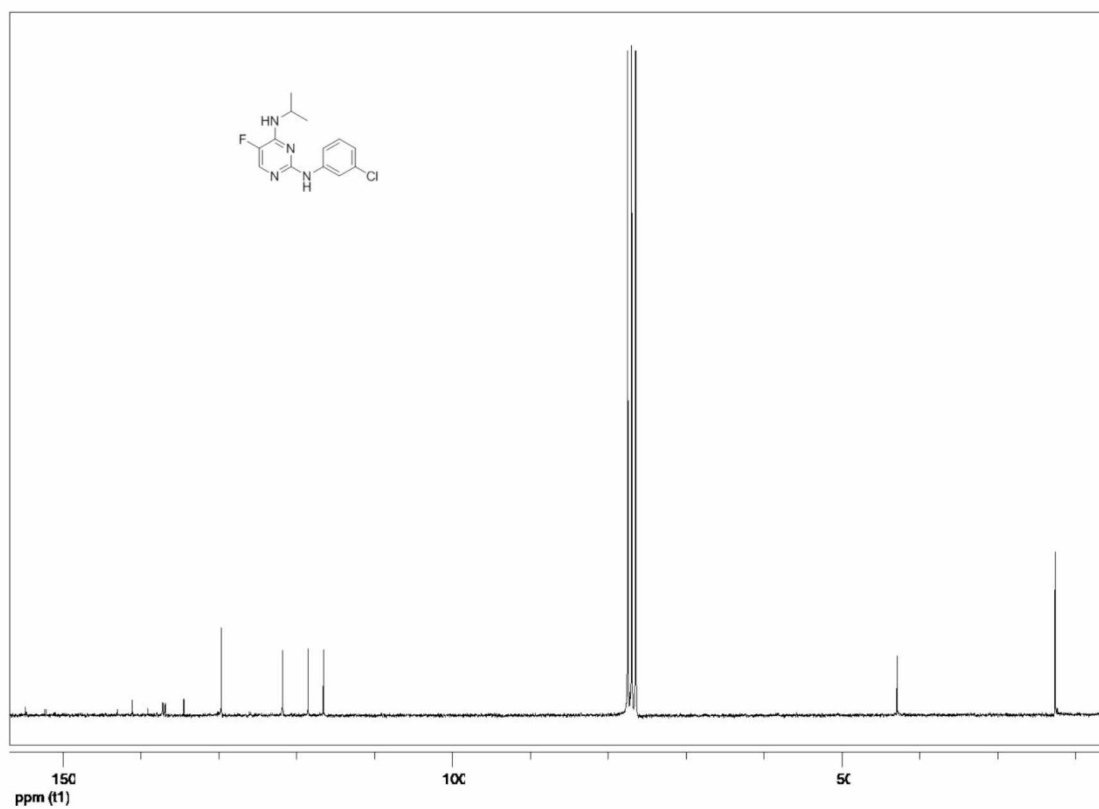
Εικόνα 31: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**3b**)



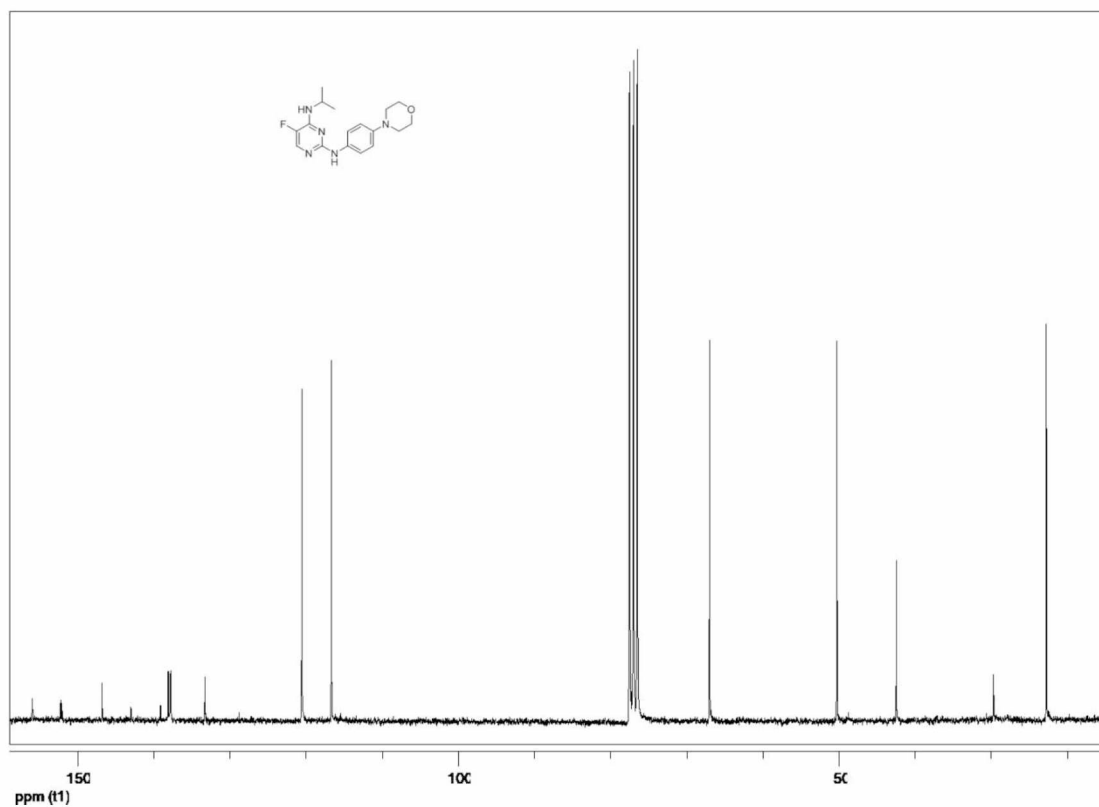
Εικόνα 32: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**4a**)



Εικόνα 33: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**4b**)



Εικόνα 34: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**4c**)



Εικόνα 35: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (**4d**)

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τεσσάρων νέων παραγώγων 5-φθοροπυριμιδίνης με αμινο-υποκαταστάτες στις θέσεις 2 και 4 του δακτυλίου.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των τεσσάρων νέων παραγώγων πυριμιδίνης παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Αρχικά είναι μια σχετικά σύντομη πορεία καθώς περιλαμβάνει μόλις τρία στάδια. Επίσης, σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι σχεδόν όλες οι αντιδράσεις είχαν υψηλές αποδόσεις, ενώ τα τελικά προϊόντα παραλήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης.

Συγκεκριμένα η αντίδραση εισαγωγής της αμινομάδας στη θέση 4 του δακτυλίου πραγματοποιήθηκε παρουσία βάσης ως καταλύτη, και χαρακτηρίστηκε από απόλυτη τοποεκλεκτικότητα. Η εισαγωγή της ανίλινο ομάδας στη θέση έγινε δυνατή με τη χρήση όξινου καταλύτη.

Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχίας της πειραματικής πορείας, επόμενο στόχο αποτελεί η βιολογική αποτίμηση των τελικών προϊόντων ως προς την πιθανή κυτταροτοξική δράση τους. Η ίδια συνθετική πορεία δίνει τη δυνατότητα εισαγωγής διαφορετικών υποκαταστατών στις θέσεις 2 και 4 της πυριμιδίνης, προκειμένου να συντεθούν παράγωγα αυξημένης βιολογικής δράσης, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών ενώσεων.

7. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή πυριμιδίνης.....	8
Εικόνα 2: Μήκη και γωνίες δεσμών της πυριμιδίνης.....	9
Εικόνα 3: Δομή Μπλεομυκίνης.....	10
Εικόνα 4: Δομή Βασιμεθρίνης.....	11
Εικόνα 5: Δομή 5-φθοροουρακίλης.....	12
Εικόνα 6: Δομή της 5-φθοροδεοξουριδίνης.....	12
Εικόνα 7: Δομή της Eniluracil.....	13
Εικόνα 8: Δομή Τριμεθοπρίμης.....	14
Εικόνα 9: Δομή Βοσεντάνης.....	14
Εικόνα 10: Δομή Γεμισταβίνης.....	15
Εικόνα 11: Δομή Καπεσιταβίνης.....	16
Εικόνα 12: Δομή του imatinib mesylate.....	18
Εικόνα 13: Δομή Οσιμερτινίμης.....	19
Εικόνα 14: Δομή του Brigatinib.....	20
Εικόνα 15: 5-Αλογονωμένο παράγωγο πυριμιδίνης με ανασταλτική δραστηριότητα κινάσης EGFR.....	20
Εικόνα 16: 5-Φθοροπυριμιδίνες με ανασταλτική δράση κατά Αυτοκινασών.....	21
Εικόνα 17: 5-φθοροπυριμιδίνες με ανασταλτική δράση κατά των κινασών CDK2 και CDK9.....	22
Εικόνα 18: Δομή παραγώγων πυριμιδίνης.....	23
Εικόνα 19: Παράδειγμα TLC.....	25
Εικόνα 20: Παράδειγμα χρωματογραφίας στήλης.....	26
Εικόνα 21: Εργαλεία προσδιορισμού σημείου τήξεως.....	27
Εικόνα 22: Στάδια τήξης μιας στερεής οργανικής ένωσης.....	28
Εικόνα 23: Συσκευή μικροκυμάτων CEMDiscover.....	29
Εικόνα 24 : Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (3a).....	39
Εικόνα 25: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (3b).....	40
Εικόνα 26: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (4a).....	40
Εικόνα 27: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (4b).....	41
Εικόνα 28: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (4c).....	41
Εικόνα 29: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης (4d).....	42
Εικόνα 30: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (3a).....	43

Εικόνα 31: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (3b).....	43
Εικόνα 32: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (4a).....	44
Εικόνα 33: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (4b).....	44
Εικόνα 34: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (4c).....	45
Εικόνα 30: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης (4d).....	45

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. L.G. Wade, Οργανική Χημεία, 7^η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, 2013, 626, 636
2. Brown, D. J., Mason, S. F. (1962). Chemistry of Heterocyclic Compounds, Volume 16: The Pyrimidines. John Wiley & Sons, Inc. DOI:10.1002/9780470186756
3. von Angerer, S. (2011). Product Class 12: Pyrimidines. Science of Synthesis: Knowledge Updates 2011/1. Thieme. DOI: 10.1055/sos-SD-116-00063
4. <https://list.essentialmeds.org/>
5. He, Y.; Lan, Y.; Liu, Y.; Yu, H.; Han, Z.; Li, X.; Zhang, L. Pingyangmycin and Bleomycin Share the Same Cytotoxicity Pathway. *Molecules* 2016, 21, 862. <https://doi.org/10.3390/molecules21070862>
6. J. J. Reddick, S. Saha, J. Lee, J. S. Melnick, J. Perkins, T. P. Begley. The mechanism of action of bacimethrin, a naturally occurring thiamin antimetabolite. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11(17), 2245-2248. doi: 10.1016/s0960-894x(01)00373-0
7. Diasio R. B., Harris B. E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet.* 1989, 16(4), 215-237. doi: 10.2165/00003088-198916040-00002. PMID: 2656050.
8. National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 43157, Eniluracil. Retrieved February 14, 2021 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eniluracil>.
9. Schilsky R. L., Kindler H. L. Eniluracil: an irreversible inhibitor of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2000, 9(7), 1635-1649. doi: 10.1517/13543784.9.7.1635. PMID: 11060767.
10. Cockerill F. R. 3rd, Edson R. S.. Trimethoprim-sulfamethoxazole. *Mayo Clin. Proc.* 1987, 62(10), 921-929. doi: 10.1016/s0025-6196(12)65049-6. PMID: 3498863.
11. Clozel M., Breu V., Gray G. A., Kalina B., Löffler B. M., Burri K., Cassal J. M., Hirth G., Müller M., Neidhart W., et al. Pharmacological characterization of bosentan, a new potent orally active nonpeptide endothelin receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 270(1), 228-35. PMID: 8035319.

12. Abdel-Rahman, O., Elsayed, Z., & Elhalawani, H. (2018). Gemcitabine-based chemotherapy for advanced biliary tract carcinomas. The Cochrane database of systematic reviews, 4(4), CD011746. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011746.pub2>
13. Cathy Eng, Hedy L. Kindler, Richard L. Schilsky. Oral Fluoropyrimidine Treatment of Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 2001, 1(2), 95-103. <https://doi.org/10.3816/CCC.2001.n.009>.
14. Summerhayes M. Capecitabine: a novel, orally administered, tumour-activated treatment for breast cancer. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2002;8(1):1-17. doi:10.1191/1078155202jp086oa
15. Gang H., Chu W., Xin X., Shuaikang L., Zefei L., Yanfang Z., Ping G., Design, synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminopyrimidine derivatives as potent antitumor agents. 2019. *New Journal of Chemistry*.
16. Nasser A. A., Eissa I. H., Oun M. R., El-Zahabi M. A., Taghour M.S., Belal A., Saleh A, Mehany A. B. M., Luesch H., Mostafa A. E., Afifi W. M., Rocca J.R., Mahdy H.A. Discovery of new pyrimidine-5-carbonitrile derivatives as anticancer agents targeting EGFR^{WT} and EGFR^{T790M}. *Org. Biomol. Chem.* 2020, 18(38), 7608-7634. doi: 10.1039/d0ob01557a. PMID: 32959865.
17. Song Z., Ge Y., Wang C., Huang S., Shu X., Liu K., Zhou Y., Ma X. Challenges and Perspectives on the Development of Small-Molecule EGFR Inhibitors against T790M-Mediated Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Med. Chem.* 2016, 59(14), 6580–6594. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00840>
18. Waller C. F. Imatinib Mesylate. *Recent Results Cancer Res.* 2018 ,212, 1-27. doi: 10.1007/978-3-319-91439-8_1. PMID: 30069623.
19. Soria J. C., Ohe Y., Vansteenkiste J., Reungwetwattana T., Chewaskulyong B., Lee K. H., Dechaphunkul A., Imamura F., Nogami N., Kurata T., Okamoto I., Zhou C., Cho B. C., Cheng Y., Cho E. K., Voon P. J., Planchard D., Su W. C., Gray J. E., Lee S. M., Hodge R., Marotti M., Rukazenzov Y., Ramalingam S. S.; FLAURA Investigators. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378(2), 113-125. doi: 10.1056/NEJMoa1713137. Epub 2017 Nov 18. PMID: 29151359.
20. Wei-ShengHuangetal. Discovery of Brigatinib (AP26113), a Phosphine Oxide-Containing, Potent, Orally Active Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 4948–4964.

21. Han,C.;Huang,Z.;Zheng,C.;Wan,L.;Zhang,L.;Peng,S.;Ding,K.; Ji, H.; Tian, J.; Zhang, Y. Novel hybrids of (phenylsulfonyl) furoxan and anilinopyrimidine as potent and selective epidermal growth factor receptor inhibitors for intervention of non-small-cell lung cancer. *J.Med.Chem.* 2013, 56, 4738–4748.
22. H. R. Lawrenceetal. Development of o-Chlorophenyl Substituted Pyrimidines as Exceptionally Potent Aurora Kinase Inhibitors *J. Med. Chem.* 2012, 55, 7392–7416
23. Ignacio Aliagas-Martin etal. A Class of 2,4-Bisanilinopyrimidine Aurora A Inhibitors with Unusually High Selectivity against Aurora B. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 3300–3307
24. GaoJ., FangC., XiaoZ., HuangL., ChenC. H., WangL. T., LeeK. H. Discovery of novel 5-fluoro-N2,N4-diphenylpyrimidine-2,4-diamines as potent inhibitors against CDK2 and CDK9. *MedChemComm.* 2015, 6(3), 444-454. doi: 10.1039/C4MD00412D. PMID: 25914804.
25. Marina Santiago, Scott Strobel. Thin Layer Chromatography. *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*, Chapter 24. *Methods in Enzymology*, Volume 533, Pages 2-347 (2013)
26. J. McMURRY, *Οργανική Χημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2015, 449-450, 559-560