



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

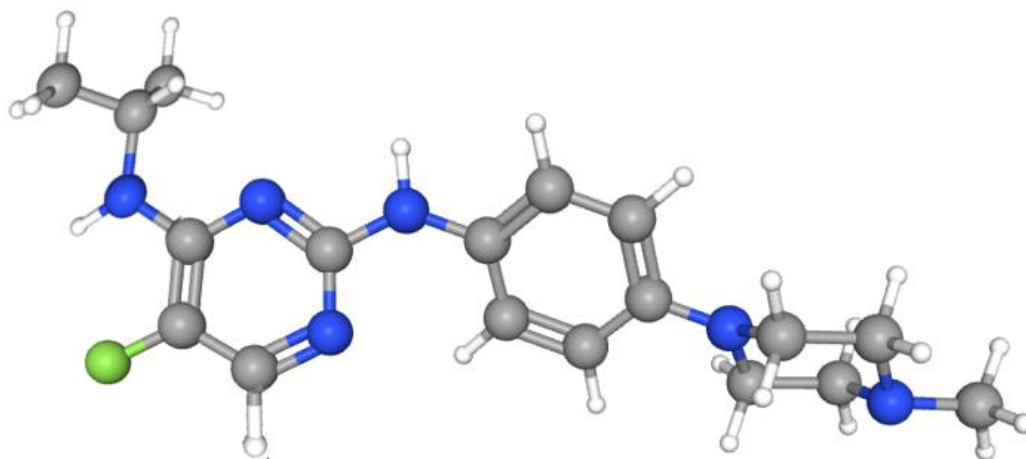
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σύνθεση και φασματοσκοπική ταυτοποίηση νέων
παραγώγων πυριμιδίνης ως πιθανών κυτταροστατικών
παραγόντων



ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΠΕΡΙΒΟΛΑΡΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2021

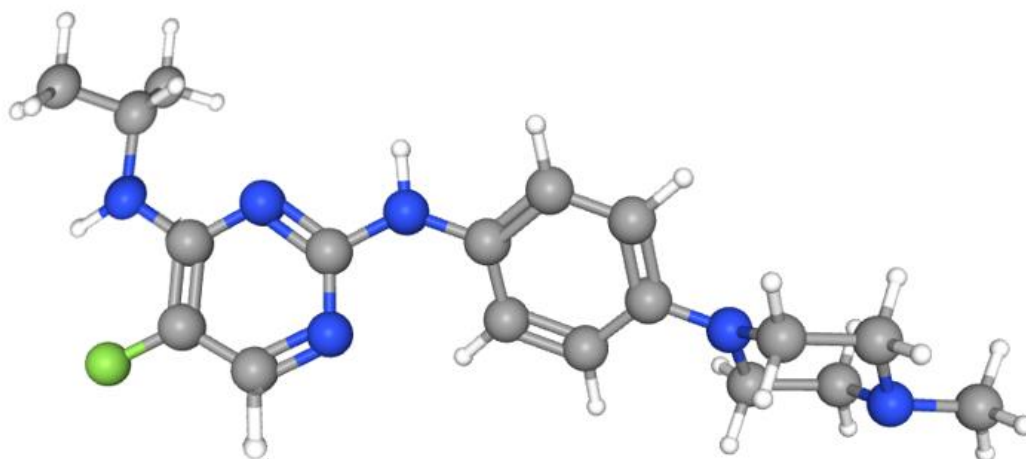


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY &
BIOTECHNOLOGY



DIPLOMA THESIS

**Synthesis and spectroscopic identification of novel
pyrimidine derivatives as potential cytostatic agents**



DIMITRIS PERIVOLARIS

LARISSA 2021

Τριμελής Επιτροπή:

Δρ. Κομιώτης Δημήτριος

Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Μήτσος Χρήστος

Μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Κολλάτος Νικόλαος

Πανεπιστημιακός υπότροφος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Κομιώτη Δημήτριου, Καθηγητή Οργανικής Χημείας. Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, με την παρούσα παράγραφο οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να εκπονήσω την διπλωματική μου στο εργαστήριο του, καθώς και την δυνατότητα που μου πρόσφερε να ενασχοληθώ με ένα θέμα του ενδιαφέροντος μου.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις θερμές μου ευχαριστίες στον κ. Μήτσο Χρήστο για την καθοδήγηση του, τις καίριες επιστημονικές επισημάνσεις του, τις χρήσιμες συμβουλές και βοήθεια του κατά τη διάρκεια υλοποίησης της προσπάθειας μου.

Ακόμα, ευχαριστώ τον κ. Κολλάτο που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις του.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένεια μου και το φιλικό μου περιβάλλον που στάθηκαν αρωγοί καθ' όλη την διάρκεια περάτωσης των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Πυριμιδίνες.....	7
1.2 Σύγχρονες συνθέσεις πυριμιδίνης.....	8
1.3 Φυσικά παράγωγα πυριμιδίνης.....	9
1.4 Βιοσύνθεση πυριμιδινών.....	12
1.5 Καρκίνος.....	14
1.5.1 Παράγωγα πυριμιδινών στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.....	15
1.5.2 Η 5-Φθορο-ουρακίλη.....	15
1.5.3 Η 2,4-διανιλινο-5-αλογονο-πυριμιδίνη ως βασική δομή στην αναστολή κινασών.....	17
1.5.3.1 Aurora κινάσες.....	17
1.5.3.2 CDKs κινάσες.....	18
1.5.3.3 EGFR υποδοχέας.....	19
1.5.4 Παράγωγα 2,4-διανιλινο-πυριμιδίνης ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1.....	20
2. Σκοπός Μελέτης.....	22
3. Τεχνικές-Μέθοδοι.....	23
3.1 Γενικά.....	23
3.2 Ξήρανση διαλυτών.....	23
3.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	23
3.4 Χρωματογραφία στήλης.....	24
3.4 Προσδιορισμός σημείων τήξεως.....	25
3.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	26
4. Πειραματικό μέρος.....	27
4.1 Επισκόπηση πορείας σύνθεσης.....	27
4.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.....	28
4.2.1 Σύνθεση της 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνης.....	29
4.2.2 Σύνθεση της N-ισοπροπυλο-5-φθορο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης.....	30
4.2.3 Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-5-φθορο-N2-(4-φθοροφαίνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.....	31
4.2.4 Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαίνυλο)-5-φθορο-πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.....	32
5. Ταυτοποίηση ενώσεων.....	33
6. Συζήτηση-Αποτελέσματα.....	39
7. Βιβλιογραφία.....	41

Περίληψη

Οι πυριμιδίνες είναι οργανικές αρωματικές ενώσεις της τάξης των διαζινών με άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 3 του δακτυλίου. Η χημική δομή τους εμφανίζεται σε μια πληθώρα βιομορίων στους ζωντανούς οργανισμούς, όπως σε βιταμίνες, σε συνένζυμα και κυρίως στις βάσεις των νουκλεοτιδίων της κυτιδίνης, της θυμιδίνης και της ουριδίνης. Η φυσική παρουσία των πυριμιδινών στα κύτταρα και οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες που τις χαρακτηρίζουν οδήγησε στην επιλογή της χημικής τους δομής για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη ενώσεων με κυτταροστατική, κυτταροτοξική και αντι-ιϊκή δράση. Οι φαρμακευτικές ενώσεις δρουν είτε ως αντιμεταβολίτες, παρεμβαίνοντας σε μια βιολογική διαδικασία των κυττάρων είτε ως αναστολείς ενός ενζύμου-στόχου αλληλεπιδρώντας ισχυρά και εκλεκτικά με μια λειτουργική ή μια ρυθμιστική περιοχή του. Στα παράγωγα της πυριμιδίνης, η αλληλεπίδραση στόχου-φαρμάκου συμβαίνει χάριν στις φυσικοχημικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα ετεροάτομα της πυριμιδίνης και τις υποκατεστημένες χημικές ομάδες στον δακτύλιο της.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται η πορεία σύνθεσης δύο νέων τροποποιημένων παραγώγων πυριμιδίνης, αμινο-υποκατεστημένων στις θέσεις 2 και 4, ως πιθανών κυτταροστατικών παραγόντων. Ως πρώτη ύλη των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η 5-φθορο-ουρακίλη, η οποία μέσα από μια σειρά τριών απλών και γρήγορων αντιδράσεων απέφερε τα επιθυμητά παράγωγα σε ικανοποιητικές αποδόσεις. Η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H -NMR και ^{13}C -NMR. Η ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση των νεοσυντιθέμενων ενώσεων θα διερευνηθεί, μελλοντικά, σε *in vitro* μελέτες σε κατάλληλες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Abstract

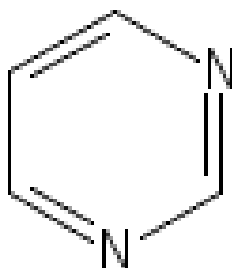
Pyrimidines are organic aromatic compounds, belonging to the order of diazines, with nitrogen atoms at position 1 and 3 of the ring. Their chemical structure occurs in a variety of biomolecules in living organisms, such as vitamins, coenzymes and especially in nucleotides of cytidine, thymidine and uridine. The physical presence of pyrimidines in cells and their characteristic pharmacokinetic properties designates this heterocyclic scaffold as the chemical structure of choice for the design and development of compounds with cytostatic, cytotoxic and antiviral activities. Organic compounds act as drugs, either as antimetabolites, interfering in a biological process, or as inhibitors of a target-enzyme, by strongly and selectively interacting with a functional or allosteric site thereof. In pyrimidine derivatives, the target-drug interactions are based on the chemical properties of the pyrimidine ring itself or their substituents.

In the present diploma thesis two novel modified pyrimidine derivatives, with amino substituents at positions 2 and 4, have been synthesized as possible cytostatic agents. 5-Fluoro-uracil was used as the starting material of the synthetic route, which, through a series of three simple reactions, afforded the desired derivatives in satisfactory yields. The structure of the new derivatives was identified by $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy. The potential anticancer activity of the newly synthesized compounds will be investigated in the future, through *in vitro* studies against suitable cancer cell lines.

1. Εισαγωγή.

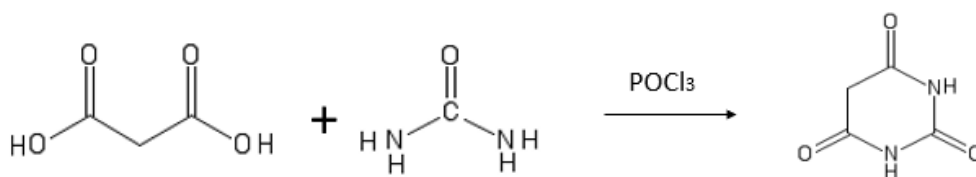
1.1. Πυριμιδίνες.

Οι πυριμιδίνες είναι οργανικές αρωματικές ενώσεις που αποτελούνται από έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο με δύο άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 3. Ο χημικός τους τύπος ($C_4H_4N_2$) τις κατατάσσει στην χημική ομάδα των διαζινών ενώ διαφέρουν από τις υπόλοιπες διαζίνες ως προς τη θέση των αζώτων στον αρωματικό δακτύλιο (πυριδαζίνες με θέσεις αζώτων 1,2 και πυραζίνες με θέσεις αζώτων 1,4). Οι πυριμιδίνες εμφανίζουν ιδιαίτερο βιολογικό και ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς αποτελούν δομικά συστατικά βιομορίων, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, και έχουν βιολογικούς ρόλους συμμετέχοντας σε αντιδράσεις είτε ως συνένζυμα είτε ως αγωνιστές και ανταγωνιστές.

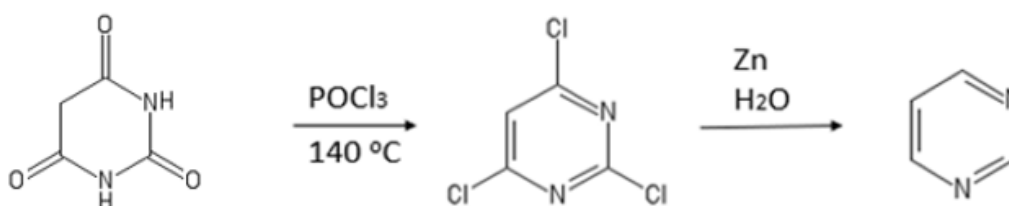


Εικόνα 1. Δομή Πυριμιδίνης

Η πρώτη χημική σύνθεση παραγώγου του πυριμιδινικού δακτυλίου αναφέρεται το 1879 από τον Γάλλο χημικό και φαρμακοποιό Louis Edouard Grimaux, ο οποίος συνέθεσε το βαρβιτουρικό οξύ από ουρία και μηλονικό οξύ με τη παρουσία φωσφορυλοχλωριδίου (1). Ο όρος πυριμιδίνη αποδόθηκε το 1885 από τον Pinner (συνδυάζοντας τις λέξεις πυριδίνη και αμιδίνη), ο οποίος συνέθεσε διάφορα παράγωγα πυριμιδίνης συμπυκνώνοντας τον αιθυλεστέρα του ακετοξικού οξέος με μια σειρά από αμιδίνες (1). Ωστόσο η σύνθεση της μητρικής ένωσης πραγματοποιήθηκε το 1900 όταν οι Gabriel και Colman κατάφεραν να αντικαταστήσουν τις όξο-ομάδες του βαρβιτουρικού οξέος με άτομα χλωρίου και στην συνέχεια να ανάγουν το προϊόν της 2,4,6 χλωροπυριμιδίνης σε πυριμιδίνη με την χρήση ψευδαργύρου (2).



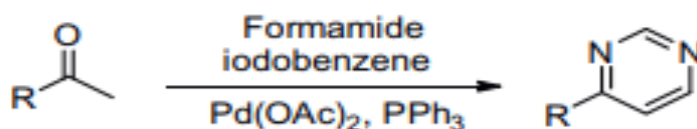
Εικόνα 2. Σύνθεση βαρβιτουρικού οξέος κατά Grimaux



Εικόνα 3. Σύνθεση πυριμιδίνης κατά Gabriel&Colman

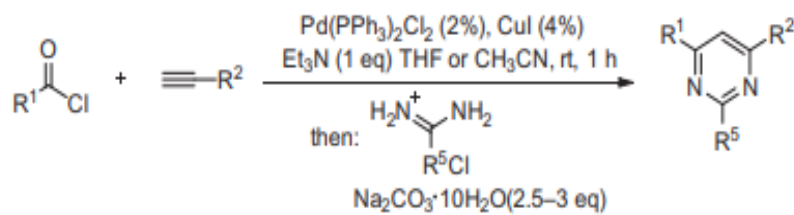
1.2. Σύγχρονες συνθέσεις πυριμιδίνης

Το 2005 αναπτύχθηκε μία μέθοδος σύνθεσης μονο-υποκατεστημένων πυριμιδινών καταλυόμενη από παλλάδιο. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται α-μέθυλοκετόνες και το φορμαμίδιο παρουσία οξικού παλλαδίου, ιωδοβενζολίου και τριφαινυλοφωσφίνης. Από την αντίδραση παράγονται 3-υποκατεστημένες πυριμιδίνες σε υψηλή απόδοση (3).



Το 2003 αναπτύχθηκε μία μέθοδος παρασκευής πυριμιδινών από ακυλοχλωρίδια και τελικά αλκίνια σε ένα μόνο βήμα. Η αντίδραση μπορεί να αποφέρει πυριμιδίνες δι-υποκατεστημένες και τρι-υποκατεστημένες, στις θέσεις 2,4 και 2,4,6 αντίστοιχα, με

αρωματικούς, ετεροαρωματικούς και αλειφατικούς υποκαταστάτες, σε καλές αποδόσεις (3).



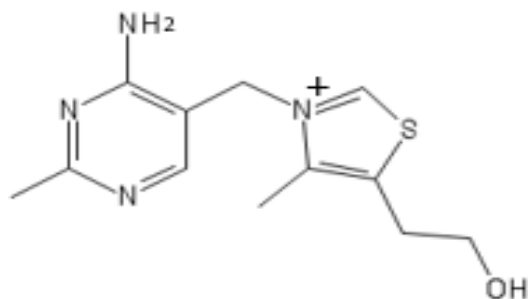
1.3. Φυσικά παράγωγα πυριμιδίνης.

Από πολύ νωρίς η επιστημονική κοινότητα αναγνώρισε την σημασία και τη βιολογική δυνατότητα των παραγώγων πυριμιδίνης, γεγονός που οδήγησε στην σύνθεση πληθώρας ενώσεων βάση αυτής. Ωστόσο τα φυσικά παράγωγα απαριθμούν σε μια μικρή ομάδα ενώσεων.

Μερικές από αυτές:

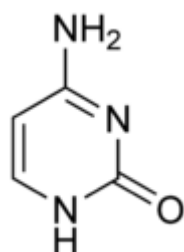
- Κυτοσίνη
- Θυμίνη
- Ουρακίλη
- Θειαμίνη

Η θειαμίνη, γνωστή και ως βιταμίνη B1, είναι ένα υδατοδιαλυτό παράγωγο πυριμιδίνης η οποία δρα ως συνένζυμο σε μονοπάτια απελευθέρωσης ενέργειας. Συμμετέχει στον καταβολισμό των υδατανθράκων και των αμινοξέων στα κύτταρα, και σε αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης των α-κετοξέων όπως το α-κετογλουταρικό οξύ και το πυροσταφυλικό οξύ (4)(5). Επίσης, φαίνεται να διευκολύνει την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών ακετυλχολίνη, νορεπινεφρίνη και ντοπαμίνη στις νευρικές απολήξεις (5). Η θειαμίνη δεν παράγεται στον ανθρώπινο σώμα και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η πρόσληψη της μέσω της τροφής. Βρίσκεται στα όσπρια, τα δημητριακά, το μη επεξεργασμένο ρύζι και το κρέας ενώ ένα μέρος της παράγεται από βακτήρια της χλωρίδας του εντέρου (4)(1).

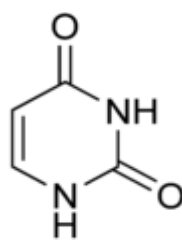


Εικόνα 4. Θειαμίνη

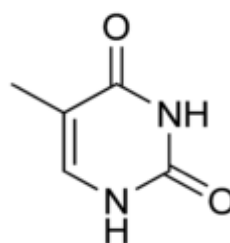
Η κυτοσίνη και η θυμίνη αποτελούν αζωτούχες βάσεις πυριμιδίνης και μαζί με τις αζωτούχες βάσεις των πουρινών, γουανίνη και αδενίνη, συντελούν στη δημιουργία των νουκλεϊκών οξέων. Οι δύο τύποι βάσεων, πουρίνες και πυριμιδίνες, έχουν την δυνατότητα να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους καθορίζοντας τη συμπληρωματικότητα του DNA. Συγκεκριμένα, η αδενίνη σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με τη θυμίνη ενώ η γουανίνη με την κυτοσίνη τρεις. Η ουρακίλη, ως βάση, συμμετέχει στη δόμηση των ριβονουκλεοτιδίων, αντικαθιστώντας, στο κανόνα της συμπληρωματικότητας, την θυμίνη (6).



Κυτοσίνη.



Ουρακίλη.



Θυμίνη.

Εικόνα 5. Νουκλεοτιδικές βάσεις πυριμιδίνης

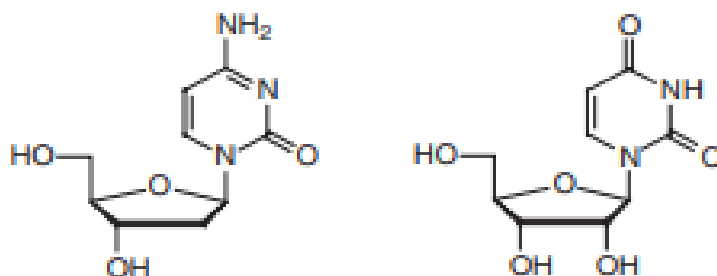
Οι αζωτούχες βάσεις είναι απαραίτητες για την διεκπεραίωση πολύ σημαντικών λειτουργιών του κυττάρου, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή. Για το λόγο αυτό πρέπει να βρίσκονται σε αφθονία στο κύτταρο και εκτός αυτού, να διατηρείται το ισοζύγιο βάσεων πυριμιδίνης και πουρίνης (6). Το κύτταρο διαθέτει μηχανισμούς βιοσύνθεσης των, εν λόγω μορίων, τα οποία υπόκεινται σε θετική και αρνητική

ανατροφοδότηση (7). Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των πυριμιδινών αναστέλλονται αλλοστερικά από τις πυριμιδίνες, όταν οι τελευταίες βρίσκονται σε αφθονία, και αντίστοιχα ενεργοποιούνται όταν η συγκέντρωση των προϊόντων τους δεν επαρκεί ώστε να ανασταλούν (8). Επιπλέον, αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων πυριμιδινών θα οδηγήσει στην αλλοστερική ενεργοποίηση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την σύνθεση πουρινών, έτσι ώστε να διατηρηθεί η ισορροπία μεταξύ των δύο τύπων βάσεων (7). Αντίστοιχα, οι πουρίνες αναστέλλουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι τους και ενεργοποιούν το μονοπάτι βιοσύνθεσης πυριμιδινών (6). Συμπερασματικά, η ρύθμιση παραγωγής των αζωτούχων βάσεων ακολουθεί, πέραν της αρνητικής ανατροφοδότησης ενζύμου-προϊόντος και την διασταυρούμενη θετική ρύθμιση των δύο βιοσυνθετικών οδών αποδεικνύοντας την βιολογική σημασία της διατήρησης του ισοζυγίου πουρινών πυριμιδινών.

Οι πυριμιδινικές βάσεις εμφανίζουν βιολογικούς ρόλους στα κύτταρα με την μορφή των νουκλεοτιδίων. Ανάλογα με το τύπο ριβόζης που συνδέονται σχηματίζουν ριβονουκλεϊκά (RNA) και δεοξυριβονουκλεϊκά οξέα (DNA). Ο αριθμός των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται δεσμευμένες στη ριβόζη καθορίζει την βιολογική δράση του μορίου.

Ρόλοι νουκλεοτιδίων πυριμιδίνης:

1. Το CTP, TTP και το UTP βρίσκονται στην δομή του RNA ενώ τα dCTP και dTTP στις αλυσίδες του DNA.
2. Το UDP είναι απαραίτητο για την βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών, ενώ λαμβάνει μέρος, ως μεταφορέας, στην γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών (9).
3. Το CDP συνδέεται με ενδιάμεσα μόρια της βιοσύνθεσης των φωσφολιπιδίων, σχηματίζοντας CDP-χολίνη και CDP-αιθανολαμίνη, και είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση της πορείας βιοσύνθεσής τους (9).

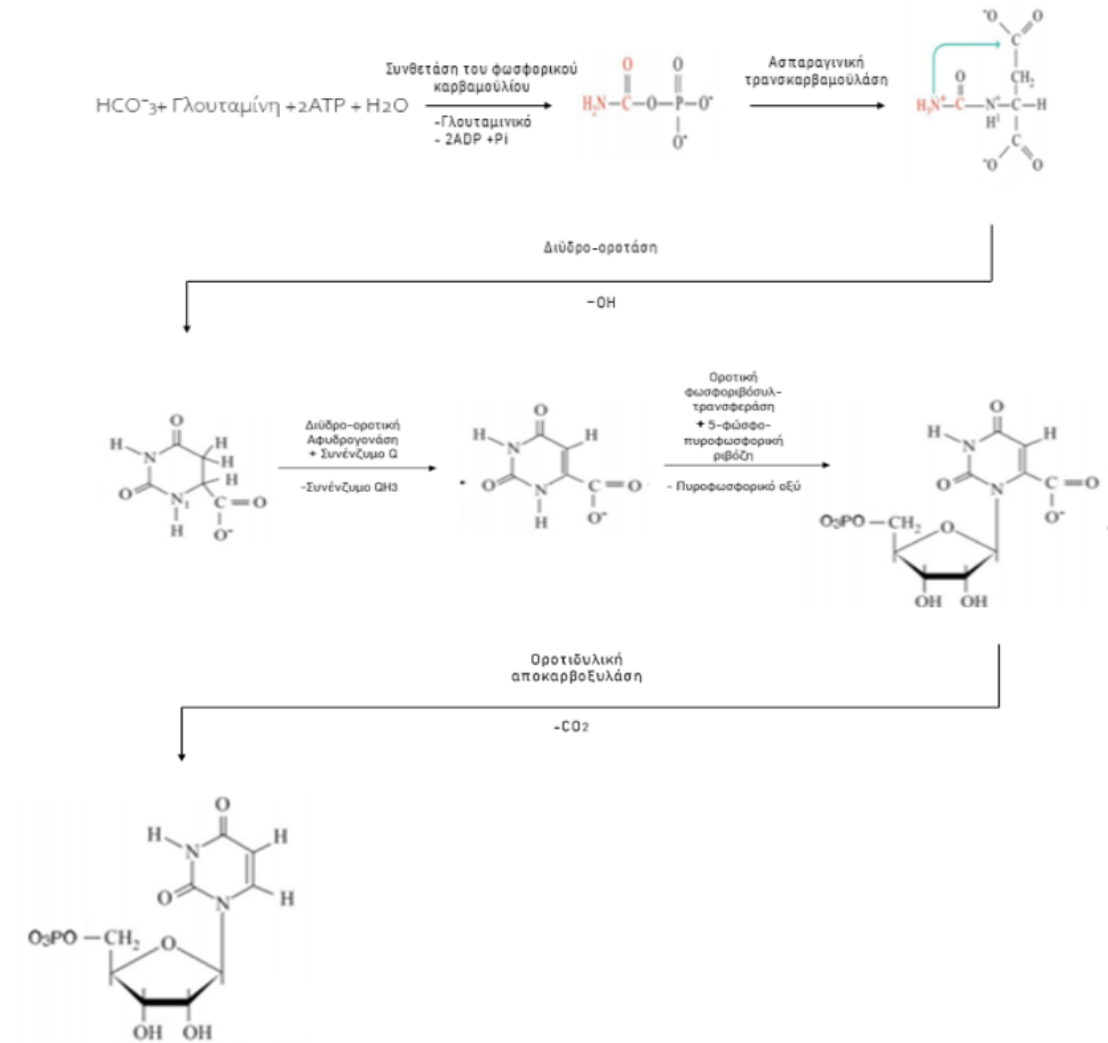


Εικόνα 6. Το δεοξυριβονουκλεοτίδιο της κυτοσίνης και το ριβονουκλεοτίδιο της ουρακίλης

1.4. Βιοσύνθεση πυριμιδινών.

Τα κύτταρα ,ανάλογα με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου όπου βρίσκονται, χρησιμοποιούν και διαφορετικό μοτίβο ως προς την παραγωγή νουκλεοτιδίων. Τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της μεσόφασης χρησιμοποιούν ως επί το πλείστον νουκλεοτιδικές βάσεις από μονοπάτια ανακύκλωσης βάσεων. Η ανάγκη σύνθεσης νέων βάσεων προκύπτει όταν το κύτταρο εισέρχεται σε φάση μίτωσης οπότε και επισπεύδονται οι διαδικασίες της μεταγραφής και της αντιγραφής. Τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε φάση μίτωσης οπότε η επιβίωση τους εξαρτάται από την εκ νέου βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων. Για το λόγο αυτό η αναστολή των ενζύμων που συμμετέχουν στην βιοσυνθετική πορεία των πυριμιδινών έχει προταθεί ως προσέγγιση για την καταπολέμηση της ασθένειας (10).

Η *de novo* βιοσύνθεση των πυριμιδινών πραγματοποιείται σε έξι ενζυμικά καταλυόμενα βήματα. Τα πρώτα τρία βήματα που απαιτούνται για την σύνθεση των πυριμιδινών πραγματοποιούνται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο με δραστηριότητα τριών ενζύμων (10). Η βιοσύνθεση ξεκινάει από το καρβονικό οξύ και το αμινοξύ γλουταμίνη, στο κυτταρόπλασμα, και στο τέλος δράσης του συμπλόκου παράγεται η κυκλοποιημένη ένωση του δι-υδρο-οροτικού οξέος (11). Η ένωση αυτή θα υποστεί αφυδρογόνωση των ανθράκων 5 και 6 του δακτυλίου και επακόλουθη δημιουργία διπλού δεσμού από την διϋδροοροτική αφυδρογονάση, με τη βοήθεια του συνενζύμου Q. Το παραπάνω βήμα λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων και το οροτικό οξύ που παράγεται αποτελεί μια πυριμιδίνη (10)(9). Στη συνέχεια, σε 2 βήματα, με την προσθήκη μιας φωσφορικής ριβόζης και μία αποκαρβοξυλίωση προκύπτει το ριβονουκλεοτίδιο της μονοφωσφορικής ουριδίνης (12). Η μονοφωσφορική ουριδίνη αποτελεί πρόδρομο μόριο για την σύνθεση της ουρακίλης και των άλλων δύο πυριμιδινικών βάσεων, της κυτοσίνης και της θυμίνης.



Εικόνα 7. *De novo* βιοσύνθεση βάσεων πυριμιδίνης. Το πρώτο βήμα είναι η αντίδραση του καρβονικού οξέος με το αμινοξύ γλουταμίνη, για την παραγωγή του φωσφορικού καρβαμυλίου, με την μεταφορά της αμμωνίας από τη γλουταμίνη στο καρβονικό οξύ. Πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα από την δράση συνθετάσης του φωσφορικού καρβαμυλίου, του συμπλόκου, με την χρήση 2 μορίων ATP. Ένα ATP προσφέρει την ενέργεια για την υδρόλυση της αμμωνίας από την γλουταμίνη και ένα χρησιμοποιείται για την ενεργοποίηση του προϊόντος. Το δεύτερο βήμα αφορά την παραγωγή του καρβαμυλο-ασπαραγινικού από το φωσφορικό καρβαμυλίο και την προσθήκη του ασπαραγινικού οξέος με δράση του συμπλόκου ως ασπαραγινική καρβαμυλτρανσφεράση. Ακολουθεί η κυκλοποίηση του καρβαμυλο-ασπαραγινικού σε διϋδρο-οροτικό οξύ από την διϋδρο-οροτάση. Η επόμενη αντίδραση αφορά στην αφυδρογόνωση των ανθράκων 5 και 6 του δακτυλίου και την επακόλουθη δημιουργία διπλού δεσμού σε αυτές τις θέσεις από διϋδροοροτική αφυδρογόνωση, με τη βοήθεια του συνενζύμου Q. Για τα επόμενα δύο βήματα στρατολογείται η συνθάση του ουριδυλικού. Η συνθάση του ουριδυλικού είναι ένα σύμπλοκο με δύο ενζυμικές δραστηριότητες, αυτή της φωσφοριβόζυλο τρανσφεράσης του οροτικού οξέος και αυτήν την αποκαρβοξυλάσης του οροτιδυλικού οξέος. Επομένως, η συνθάση του ουριδυλικού θα ενώσει το οροτικό με μια φωσφορική ριβόζη, στην θέση 1, χρησιμοποιώντας την 5-φώσφο πυροφωσφορική ριβόζη και στην συνέχεια θα αποκαρβοξυλώσει το οροτιδυλικό οξύ σχηματίζοντας το ριβονουκλεοτίδιο της μονοφωσφορικής ουριδίνης.

1.5. Καρκίνος

Καρκίνος, ή κακοήθης όγκος, ονομάζεται ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός ενός κυττάρου ή μιας ομάδας κυττάρων τα οποία έχουν απωλέσει την ιστοειδικότητα τους καθώς και βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση. Τα καρκινικά κύτταρα διηθούνται μέσω της λέμφου ή μεταφέρονται μέσω του αίματος σε άλλους ιστούς, στους οποίους και εγκαθιδρύονται οδηγώντας, με σταδιακές μεταστάσεις, τον οργανισμό σε θάνατο. Ο καρκίνος οφείλεται στη συσσώρευση μεταλλαγών στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου και συγκεκριμένα σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την εκτέλεση ή ρύθμιση διαδικασιών όπως η μίτωση, η επιδιόρθωση του DNA και η ογκοκαταστολή. Οι μεταλλαγές μπορεί να οδηγούν είτε σε απώλεια είτε σε ενίσχυση λειτουργίας μιας πρωτεΐνης έχοντας σε κάθε περίπτωση αρνητικές συνέπειες για την φυσιολογική έκβαση του κυττάρου. Αποδίδονται στην έκθεση των κυττάρων σε μεταλλαξιγόνους παράγοντες που σχετίζονται με το τρόπο ζωής του ατόμου (6).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας οι κακοήθης όγκοι αποτελούν τη δεύτερη αιτία θανάτου ανά τον κόσμο, καταλαμβάνοντας το ένα έκτο αυτών, ή περίπου 9,6 εκατομμύρια θανάτων για το 2018. Έχουν καταγραφεί περισσότερα από 100 είδη καρκίνου, με πιο συχνά εμφανιζόμενους τους καρκίνους του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη.

Η ανάπτυξη της κατάλληλης θεραπείας για το καρκίνο αποτελεί το κυριότερο στόχο της ιατρικής χημείας εδώ και αρκετές δεκαετίες. Ωστόσο, κάθε τύπος καρκίνου απαιτεί διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση, η οποία βασίζεται στα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του. Μέχρι σήμερα η κύρια μέθοδος αντιμετώπισης της νόσου στηρίζεται στη χορήγηση κυτταροτοξικών ενώσεων, οι οποίες στοχεύουν στη αναστολή ή παρεμπόδιση κυτταρικών μηχανισμών που χαρακτηρίζουν τα καρκινικά κύτταρα, με απώτερο σκοπό την εξάλειψή τους. Επίσης χορηγούνται ενώσεις που στοχεύουν στο περιορισμό ανάπτυξης του όγκου ανακόπτοντας την παροχή θρεπτικών συστατικών ή ενισχύοντας τη ανοσοποιητική απόκριση του οργανισμού (13).

Ανάλογα με το τρόπο δράσης τους τα αντικαρκινικά φάρμακα χωρίζονται σε κατηγορίες:

1. Αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες:
 - Αναστολείς της ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων (θαλιδομίδη, ενδοστατίνη)
 - Αναστολείς της αγγειογενετικής σηματοδότησης (αντισώματα κατά VEGF, EGFR, ραπαμυκίνη)

2. Αναστολείς της μιμητικής αγγειογένεσης των καρκινικών κυττάρων: (galunisertib, fasudil)
3. Τοξίνες της μιτωτικής ατράκτου: αναστέλλουν τη μίτωση μέσω της σύνδεσής τους στην τουμπουλίνη (vinblastine, paclitaxel)
4. Αλκυλιωτικοί παράγοντες: δημιουργούν δεσμούς με το DNA των καρκινικών κυττάρων (τετραζίνες, αζιριδίνες, ακτινομυκίνη D, μιτομυκίνη C)
5. Αναστολείς τοποϊσομερασών I και II (camptothecin, topotecan)
6. Αναστολείς σηματοδοτικών μονοπατιών κινασών:
 - Μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR (afuresertib, uprosertib, ipatasertib)
 - Κινάσες τυροσίνης (pazopanib, gefitinib, erlotinib, imatinib)
 - Μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK (selumetinib, trametinib)
7. Αναστολείς πρωτεασωμάτων (bortezomib, carfilzomib)
8. Αναστολείς των HSP90 (geldanamycin, ganetespib)
9. Αναστολή επιγενετικών τροποποιητών
 - Αναστολείς της ιστονικής αποακετυλάσης (vorinostat, entinostat)
 - Αναστολείς της DNA μεθυλοτρανφεράσης (azacytidine, hydralazine)
10. Αντιμεταβολίτες (φθοροουρακίλη, μεθοτρεξάτη)

1.5.1 Παράγωγα πυριμιδινών στην χημειοθεραπεία του καρκίνου.

Οι πολυ-υποκατεστημένες πυριμιδίνες συμμετέχουν σε αρκετές από αυτές τις κατηγορίες αντικαρκινικών ενώσεων που έχουν εγκριθεί από τον FDA και χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της νόσου. Μελέτες υποδεικνύουν ότι η ομάδα υποκατάστασης και η θέση της προσδίδουν την εκλεκτικότητα των μορίων ως προς τον στόχο τους. Συχνά αναφέρονται οι: θειάζολο-πυριμιδίνες ως επαγωγείς της απόπτωσης, οι θειενο-πυριμιδίνες ως αναστολείς της ιστονικής αποακετυλάσης, οι 4-ανιλνοθειενο πυριμιδίνες ως αναστολείς του EGFR, οι αλογονωμένες θειενο-πυριμιδίνες με κυτταροστατική δράση, οι πυραζολο-πυριμιδίνες ως αναστολείς κινασών σερίνης/θρεονίνης, καθώς επίσης και μία πληθώρα υποκατεστημένων πυριμιδινών συζευγμένων με βιομόρια, ως ενώσεις με κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση (14).

1.5.2 Η 5-Φθορο-ουρακίλη (FU)

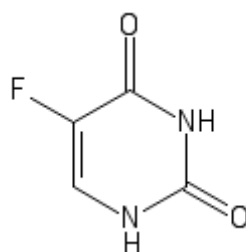
Η 5-φθορο-ουρακίλη αποτελεί μια αξιοσημείωτη ένωση όσον αφορά την θεραπεία του καρκίνου, αφού παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα ως αντιμεταβολίτης, ενώ χρησιμοποιείται ευρέως ως η αφετηρία για τις αντιδράσεις υποκατάστασης του πυριμιδινικού δακτυλίου που αποσκοπούν σε παράγωγα με αντι-πολλαπλασιαστική

δράση (15). Η 5-φθορο-ουρακίλη χορηγείται για την καταπολέμηση μιας σειράς συμπαγών όγκων, όπως όγκοι που εμφανίζονται στο στομάχι, τον οισοφάγο, το πάγκρεας, το παχύ έντερο και ο μαστός. Συνήθως χορηγείται σε συνδυασμό με άλλους αντιμεταβολίτες όπως η μεθοτρεξάτη.

Ο τρόπος δράσης αυτής της κατηγορίας φαρμάκων βασίζεται στο δομή τους η οποία είναι όμοια με φυσικούς μεταβολίτες του κυττάρου. Τα δομικά ανάλογα λαμβάνουν, λανθασμένα, μέρος σε ενζυμικές διαδικασίες, ως υποστρώματα, με τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων να καθιστούν την επιβίωση του κυττάρου αβέβαιη. Η 5-φθορο-ουρακίλη εισέρχεται στα κύτταρα μέσω μεταφορέων της μεμβράνης που εκφράζονται σε συνθήκες μίτωσης και στη συνέχεια ενσωματώνεται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης πυριμιδινών.

Η πιο κατανοητή και πιθανή κυτταροτοξική δράση της εν λόγω ένωσης αποδίδεται στην αναστολή βιοσύνθεσης νουκλεοτιδίων θυμίνης . Το ένζυμο συνθάση της θυμιδίνης καταλύει τη μετατροπή του dUMP σε dTMP, με τη μεταφορά μιας μεθυλοομάδας στην θέση 5 του dUMP, το οποίο εφόσον φωσφορυλιωθεί θα συμμετάσχει στην σύνθεση του DNA. Όσον αφορά την φθορο-ουρακίλη, αφενός, αυτή η χημική μετατροπή είναι αδύνατον να ολοκληρωθεί λόγω της παρουσίας του ατόμου του φθορίου το οποίο οδηγεί στη δημιουργία ενός σταθερού συμπλόκου ενζύμου-FdUMP-δότη της μεθυλοομάδας, αφετέρου το ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για τον αντιμεταβολίτη του FdUMP σε σχέση με το dUMP (16).

Άλλος μηχανισμός αναφέρει την ενσωμάτωση της FdUTP στο DNA στη θέση του dTTP και την αδυναμία των μηχανισμών επιδιόρθωσης να το απομακρύνουν εξ ολοκλήρου, όταν το ποσοστό ενσωμάτωσης είναι υψηλό. Το γεγονός αυτό, είναι πιθανό να καταλήγει στην ρήξη της διπλής έλικας του DNA ή σε παρεμβολές στην δευτεροταγή δομή του μορίου (16).



Εικόνα 8. Η δομή της 5-φθορο-ουρακίλης (5FU)

1.5.3 Η 2,4-διανιλινο-5-αλογονο-πυριμιδίνη ως βασική δομή στην αναστολή κινασών.

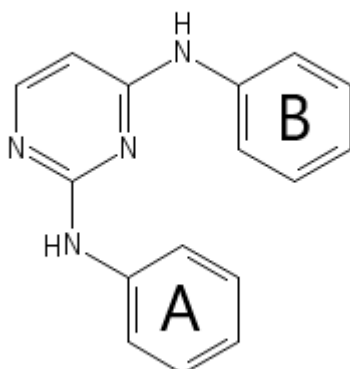
1.5.3.1. Κινάσες Aurora.

Η κατηγορία των Aurora κινασών διατηρεί ένα κρίσιμο ρόλο για την ολοκλήρωση των διαδικασιών της μίτωσης και η στόχευση τους έχει προταθεί ως θεραπευτικό μοντέλο για την θεραπεία του καρκίνου, ενώ έχουν συσχετιστεί με την έγκαιρη πρόγνωση του. Η κατηγορία αυτή συγκαταλέγεται στις κινάσες σερίνης/θρεονίνης και περιλαμβάνει τρεις κινάσες, τις Aurora A, B και C. Οι Aurora A και B μοιράζονται μια πανομοιότυπη αμινοξική αλληλουχία της τάξης του 70 %, η οποία διατηρείται και στην περιοχή πρόσδεσης του ATP (17). Το γεγονός αυτό οδήγησε στη σύνθεση μίας τρι-υποκατεστημένης πυριμιδίνης με κωδική ονομασία VX-680/MK-0457 ως αναστολέα της οικογένειας Aurora (18). Ωστόσο οι δύο κινάσες Aurora A και Aurora B φαίνεται να έχουν διαφορετικούς ρόλους στην μίτωση οδηγώντας την έρευνα στη ανάπτυξη αναστολέων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ανασταλτική δράση για κάθε μία από αυτές (18).

Η δράση της Aurora A σχετίζεται με την είσοδο του κυττάρου από τη φάση S στη φάση M ενώ συμμετέχει στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και των κεντροσωμάτων όπως και στη στοίχιση των χρωμοσωμάτων (19). Η Aurora B είναι υπεύθυνη για διάφορες διαδικασίες κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Στην αρχή της μίτωσης συνδράμει στην στοίχιση των χρωμοσωμάτων μέσω της φωσφορυλίωσης των ιστονών H3 (17). Συμμετέχει επίσης, ως μέρος ενός συμπλόκου πρωτεϊνών που δρομολογούν τον σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, στον προσανατολισμό των χρωμοσωμάτων μετά την αντιγραφή. Τέλος, είναι απαραίτητη για την επιτυχή έκβαση της κυτταρικής διαίρεσης (17).

Ο πυριμιδινικός δακτύλιος της 2,4-διανιλινο-πυριμιδίνης φαίνεται να είναι κατάλληλος να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου στο ενεργό κέντρο των δύο κινασών, ωστόσο εμφανίζει 43 φορές μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για την κινάση A έναντι της B. Με βάση κρυσταλλικές δομές αλληλεπίδρασης της φαρμακοφόρου δομής με το ένζυμο, η διαφορά φαίνεται οφείλεται στο κατάλοιπο της Thr217 της Aurora A, η οποία βρίσκεται εκτός του ενεργού κέντρου, στην περιοχή πρόσδεσης του ADP. Το αμινοξύ είναι ικανό να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με την αμινική ομάδα του δακτυλίου B της ανιλίνης.(17) Όσον αφορά τους πιθανούς υποκαταστάτες και τις θέσεις τους στους δακτυλίους ανιλίνης, παρατηρείται ότι η υποκατάσταση της ortho θέσης του δακτυλίου A, με αρνητικά φορτισμένες ομάδες όπως αλογόνα είναι καίριας σημασίας για την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με λειτουργικά κατάλοιπα της κινάσης, αυξάνοντας την ανασταλτική δράση του μορίου. Εξίσου σημαντική είναι η παρουσία της αμιδικής ομάδας στη *para* θέση του δακτυλίου B καθώς και η

υποκατάσταση της θέσης 5 της πυριμιδίνης με φθόριο η οποία αυξάνει την ενζυμική αναστολή κατά 2 με 3 φορές. (19)



Εικόνα 9. Διανίλινο-πυριμιδίνη

1.5.3.2. CDKs κινάσες.

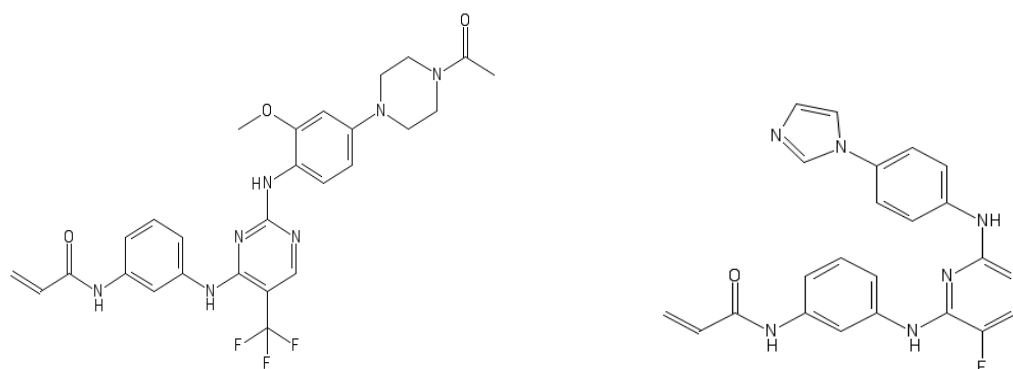
Οι CDKs (Cyclin-dependent kinases) είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το κυτταρικό κύκλο. Η CDK9 ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων φωσφορυλιώνοντας την RNA πολυμεράση II. Η δράση της έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο, την αντιγραφή του γονιδιώματος του HIV και την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, ενώ η CDK2 φαίνεται να σχετίζεται με τη ρύθμιση της μεταγραφής του HIV-1 γονιδιώματος. Η στόχευση τους αποτελεί θεραπευτική προσέγγιση για τις παραπάνω νόσους και οι 2,4-διανίλινο πυριμιδίνες έχουν προταθεί για την αναστολή τους. (20)

Ο μηχανισμός αναστολής στοχεύει στη κατάληψη της περιοχής πρόσδεσης του ATP. Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα που παρουσιάζει η ένωση ως προς την αναστολή των CDK9/2 με βάση τους υποκαταστάτες των ανιλινικών δακτυλίων παρατηρείται η επικράτηση της *para* υποκατάστασης του δακτυλίου B με φθόριο και της *para* υποκατάστασης του δακτυλίου A με *N*-αλειφατικά αμίδια. Τέτοιες υποκαταστάσεις των ανιλινικών δακτυλίων εμφανίζουν ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις κυτταροτοξικότητας στις κυτταρικές σειρές A549 (καρκίνος του πνεύμονα), DU-145 (καρκίνος του προστάτη), KB (ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα). (20)

1.5.3.3. EGFR υποδοχέας.

Οι EGFRs (epidermal growth factor receptors) αποτελούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης οι οποίοι υπερεκφράζονται σε μια πληθώρα τύπων καρκίνων με πιο εμφανή υπερέκφραση στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Στον συγκεκριμένο τύπο χορηγούνται συνθετικά παράγωγα κιναζολίνης με ανασταλτική δράση έναντι του EGFR, όπως το gefitinib και το erlotinib. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζονται δευτερογενείς μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη, με επακόλουθη ανάπτυξη αντίστασης στην θεραπεία. Η πιο συχνή μετάλλαξη αφορά τη μεταλλαγή της θρεονίνης 790 σε μεθειονίνη (T790M). Έχει ήδη καταστεί δυνατή η ανάπτυξη φαρμάκων, όπως το rociletinib, που φαίνεται να αναστέλλουν τον μεταλλαγμένο EGFR, όμως η έρευνα με στόχο την ανάπτυξη ισχυρότερων αναστολέων είναι σε εξέλιξη. (21)

Ο πυρήνας της πυριμιδίνης, με υποκαταστάτες φθόριο ή χλώριο στη θέση 5, φαίνεται να αλληλοεπιδρά ηλεκτροστατικά με τη Met790 του μεταλλαγμένου EGFR ενώ η *meta* *N*-ακρυλόυλο ομάδα εμφανίζεται καίριας σημασίας για την αποτελεσματικότητα του αναστολέα, καθώς συντελεί στη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού με τη Cys797 του EGFR. Η υποκατάσταση του δακτυλίου A της ανιλίνης με ιμιδαζόλιο στη θέση *para* φαίνεται να εμφανίζει ιδιαίτερα χαμηλότερα IC_{50} σε σχέση με άλλους υποκαταστάτες. Ταυτόχρονα παρουσιάζει 100 με 300 φορές μεγαλύτερη αναστολή του μεταλλαγμένου EGFR έναντι του EGFR αγρίου τύπου, γεγονός που συνεπάγεται αυξημένη εκλεκτικότητα. (21)



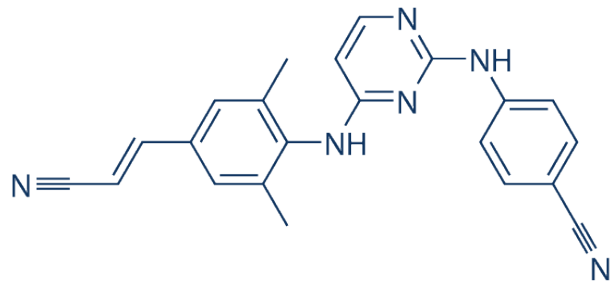
Εικόνα 10. Η χημικές ενώσεις του rociletinib και του ιδιαίτερα αποτελεσματικού αναστολέα του EGFR.

1.5.4 Παράγωγα 2,4-διανιλίνο-πυριμιδίνης ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1.

Η αντίστροφη μεταγραφάση (RT) του HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type 1) διατηρεί έναν πολύ σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό του ιού και ως εκ τούτου η αναστολή της αποτελεί μέρος της αντιμετώπισης της ασθένειας του AIDS. Η αναστολή της RT πραγματοποιείται με χημικές ενώσεις που στοχεύουν είτε στον ενεργό κέντρο του ενζύμου NRTIs (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors) είτε προσδένονται σε ένα αλλοστερικό σημείο του (Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors). Το ένζυμο διατηρεί ένα πολύ υψηλό ποσοστό λαθών κατά την μεταγραφή, γεγονός που οδηγεί σε αντικαταστάσεις ακόμα και συντηρημένων αμινοξέων. Τα συντηρημένα κατάλοιπα αποτελούν τους στόχους αλληλεπίδρασης αναστολέα-ενζύμου και συνεπώς, σε αυτή τη περίπτωση, χάνεται η συγγένεια μεταξύ τους, ενώ ταυτόχρονα επιλέγονται τα μεταλλαγμένα στελέχη του ιού που εμφανίζουν αντίσταση. Για το λόγο αυτό, καθίσταται απαραίτητη, αφενός η συγχορήγηση αναστολέων διαφόρων τύπων και διαφόρων ενζυμικών στόχων για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση αφετέρου η σύνθεση νέων ενώσεων με ισχυρότερη συγγένεια για την RT αγρίου τύπου αλλά και των τύπων που εμφανίζουν αντίσταση.(22)(23)

Μετά την ανάπτυξη της κρυσταλλογραφημένης δομής του ενζύμου RT και *in silico* μελέτες μοριακής μοντελοποίησης προτάθηκε ότι οι 2,4-διανίλινο-πυριμιδίνες θα μπορούσαν να δράσουν ως NNRTI. Αρχικά παράχθηκε η χημική ένωση TCM125 με την ονομασία daravirine όμως γρήγορα παρατηρήθηκε ότι υποκατάσταση της *para* θέσης του ανιλινικού δακτυλίου B με νιτρίλια αυξάνει τη συγγένεια με την συντηρημένη Trp229 της RT. Εξετάστηκε μια πληθώρα παραγώγων της ένωσης με διαφορετικού μήκους, ανθρακικών αλυσίδων, νιτρίλια ως υποκαταστάτες της θέσης *para*. Η μελέτη αφορούσε την 50% αναστολή της κυτταροπαθογένειας του ιού LAI και στελέχη με μονά (103N, 181C, 188L, 100I, and 227C) και διπλά μεταλλάγματα του (103 + 181, 100I + 103N, 227L + 106A) σε κυτταρικές σειρές MT-4 (EC_{50}). Η υποκατάσταση της *para* θέσης με ακρυλονιτρίλιο (R278474) εμφάνισε ιδιαίτερα χαμηλή $EC_{50} \leq 2$ nM για τον ιό αγρίου τύπου και στελέχη με μονά μεταλλάγματα.(22) Σε περαιτέρω μελέτες για την επίδραση των χημικών ενώσεων των nevirapine, efavirenz, TMC120 και R278474 σε 1200 μεταλλάγματα του HIV-1 που απομονώθηκαν από ασθενείς, το R278474 παρουσίασε $EC_{50} \leq 1$ nM στο 81% και $EC_{50} \leq 10$ nM στο 94% αυτών, ενώ τα ποσοστά αναστολής με $EC_{50} \leq 10$ nM είναι 18% για το nevirapine, 69% για το efavirenz και 79% για το TMC120, αντίστοιχα.(23) Η ισχυρή ανασταλτική δράση του R278474 σε συνδυασμό με την πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα, την υψηλή βιοδιαθεσιμότητα και τις ελάχιστες παρενέργειες

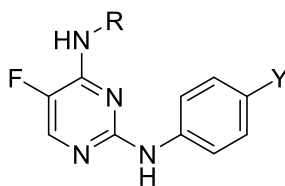
που επιβεβαιώθηκαν σε κλινικές μελέτες οδήγησαν στην έγκριση της κυκλοφορίας του, από τον FDA και την Ευρωπαϊκή Ένωση το 2011, με την ονομασία rilpivirine.



Εικόνα 11. Η δομή του rilpivirine.

2. Σκοπός Μελέτης

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στη σύνθεση και ταυτοποίηση νέων ενώσεων με πιθανή κυτταροτοξική ή/και αντι-ιϊκή δράση. Ο ετεροκυκλικός δακτύλιος της πυριμιδίνης εμφανίζεται σε πολλές ενώσεις με βιολογικούς ρόλους ενώ χημικά τροποποιημένα παράγωγα του χορηγούνται ως πιστοποιημένα φάρμακα με τις παραπάνω δράσεις. Για τον λόγο αυτό, θεωρήθηκε ιδανικός να αποτελέσει την υπόβαθρο δομή των ζητούμενων παραγώγων. Στόχος της πορείας σύνθεσης είναι η υποκατάσταση ορισμένων θέσεων του δακτυλίου με ενδεδειγμένες χημικές ομάδες ή άτομα, τα οποία βάσει προηγούμενων ερευνών προσδίδουν ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα όσον αφορά τις βιολογικές δράσεις του ενδιαφέροντος μας. Ταυτόχρονα τίθεται ως στόχος η υποκατάσταση θέσεων του δακτυλίου με χημικές ομάδες διαφορετικών χημικών χαρακτηριστικών, όπως το μέγεθος, η πολικότητα, η στερεοδομή κτλ. Τα πολυ-υποκατεστημένα παράγωγα που αποτελούν στόχο της μελέτης έχουν τη γενική δομή που απεικονίζεται παρακάτω.



R: άλκυλο ομάδα

Y: αλογόνο ή αζωτούχα ομάδα

3. Τεχνικές- Μέθοδοι

3.1 Γενικά

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορικά διαθέσιμα, σε υψηλή καθαρότητα, και τηρήθηκαν όλες οι προβλεπόμενες συνθήκες προς αποφυγή αλλοίωσης και επιμόλυνσης τους. Αντιδράσεις ευαίσθητες στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο διεξήχθησαν σε ατμόσφαιρα αδρανούς αζώτου. Σε αντιδράσεις που η ατμοσφαιρική υγρασία μπορούσε να επηρεάσει αρνητικά την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος χρησιμοποιήθηκαν άνυδροι διαλύτες και όλα τα σκεύη ξηράθηκαν στους 200 °C για τουλάχιστον 2 ώρες σε ειδικό κλίβανο αποξήρανσης. Τέλος, ως μέσο θέρμανσης χρησιμοποιείται το ελαιόλουτρο.

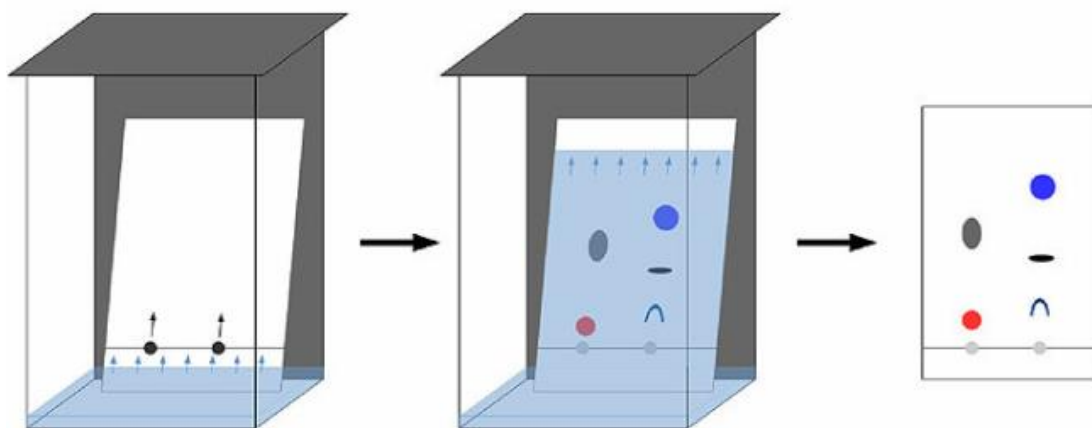
3.2 Ξήρανση διαλυτών

Αντιδράσεις που απαιτούσαν άνυδρες συνθήκες έλαβαν χώρα κάτω από ατμόσφαιρα αδρανούς αζώτου και με τη χρήση άνυδρων διαλυτών. Όλοι οι άνυδροι διαλύτες φυλάσσονται σε ατμόσφαιρα αζώτου ενώ η υγρασία, που τυχόν παρεισφρήσει στους διαλύτες, απορροφάται από μοριακά κόσκινα (molecular sieves).

3.3 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η μέθοδος TLC (Thin-Layer Chromatography) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της πορείας και της ολοκλήρωσης μιας αντίδρασης καθώς επίσης και για το ποιοτικό έλεγχό της. Ο ποιοτικός έλεγχος αφορά στον προσδιορισμό του αριθμού των ενώσεων που εμπεριέχονται στο μείγμα. Η τεχνική βασίζεται στο διαχωρισμό ενός μείγματος ενώσεων βάσει της διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ μιας στατικής φάσης (προσροφητικό υλικό) και ενός διαλύτη ή συστήματος διαλυτών (διαλύτης ανάπτυξης). Χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (στατική φάση) ή με άλλα προσροφητικά μέσα (όπως alumina) στις οποίες εναποτίθεται δείγμα από τα διαλύματα των αντιδράσεων. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη της αντίδρασης το κάτω μέρος της πλάκας βυθίζεται, κάθετα, σε μικρή ποσότητα διαλύτη ανάπτυξης και τριχοειδής δύναμεις ωθούν το διαλύτη να ανέλθει κατακόρυφα διαβρέχοντας την πλάκα και παρασύροντας το δείγμα. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω της διαφορετικής ταχύτητας ανόδου στην πλάκα που παρουσιάζουν οι ενώσεις του δείγματος, λόγω της διαφορετικής ισχύος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεών τους με τα μόρια της στατικής φάσης. Καθώς η

στατική φάση είναι πάντα πιο πολική από το διαλύτη ανάπτυξης οι ενώσεις που περιέχουν πολικές ομάδες συγκρατούνται ισχυρότερα σε αυτή και ανέρχονται σε χαμηλότερο ύψος, σε σχέση με τις λιγότερο πολικές ενώσεις του δείγματος, που παρασύρονται ταχύτερα από το διαλύτη ανάπτυξης. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε αεροστεγή θάλαμο για την επίτευξη κορεσμού στους ατμούς του διαλύτη και ταχύτερη ροή, ενώ σταματά λίγα χιλιοστά πριν φτάσει ο διαλύτης την κορυφή της πλάκας. Όταν οι ενώσεις περιέχουν ομάδες που απορροφούν στην υπεριώδη ακτινοβολία οι θέσεις των ενώσεων πάνω στην πλάκα γίνονται ορατές, ως κηλίδες, μέσω παρατήρησης κάτω από λάμπα UV. Σε διαφορετική περίπτωση η πλάκα ψεκάζεται ή εμβαπτίζεται σε διάλυμα κατάλληλου αντιδραστηρίου το οποίο αντιδρά με τις ενώσεις του δείγματος δίνοντας ορατές κηλίδες στα σημεία της πλάκας όπου έχουν ανέλθει αυτές. Το διάστημα που διένυσε η ουσία διαιρούμενο με το διάστημα που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη, πάνω στη πλάκα, προσδιορίζει το συντελεστή συγκράτησης R_f . Βάσει του συντελεστή συγκράτησης R_f προσδιορίζεται το σύστημα διαλυτών που θα επιλεγεί για την διεξαγωγή χρωματογραφίας στήλης, ενδεικτικά η τιμή R_f μιας ένωσης, σε ένα κατάλληλο σύστημα διαλυτών, θα πρέπει να κυμαίνεται στο 0,2. Η τεχνική του TLC δίνει, ακόμα, τη δυνατότητα ταυτοποίησης των ενώσεων ενός δείγματος μέσω της σύγκρισης των τιμών R_f του δείγματος με τις τιμές R_f γνωστών ενώσεων.



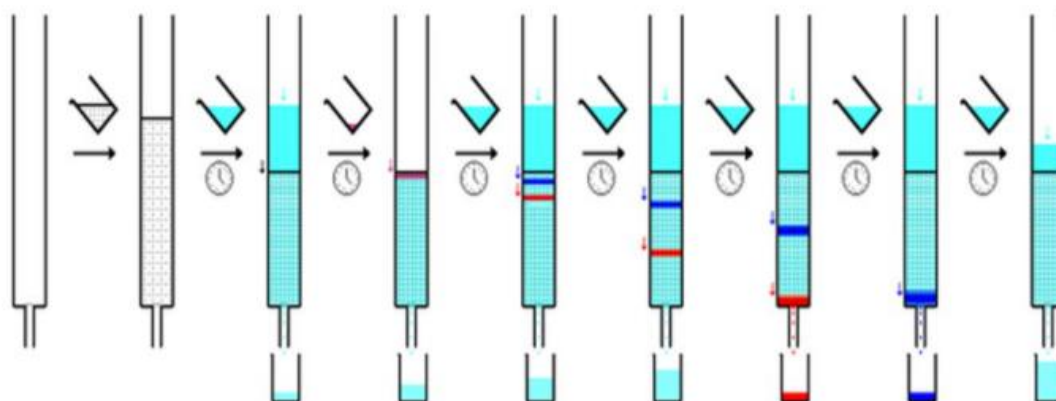
Εικόνα 12. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

3.4 Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό του επιθυμητού προϊόντος της αντίδρασης από παραπροϊόντα και προσμίξεις και αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον καθαρισμό οργανικών ενώσεων. Η

διαδικασία διενεργείται εντός γυάλινου κυλινδρικού σωλήνα στον οποίο έχει προστεθεί το προσροφητικό υλικό (συνήθως silica gel) αναμειγμένο με ποσότητα κατάλληλου συστήματος διαλυτών (διαλύτης έκλουσης) ώστε να συγκρατείται στο σωλήνα και να αποτελεί την στατική φάση. Το ακάθαρτο προϊόν της αντίδρασης, διαλύεται σε μικρή ποσότητα διαλύτη έκλουσης, ή σε άλλο κατάλληλο διαλύτη, και εναποτίθεται στην κορυφή της στήλης. Στην συνέχεια η στήλη εκλούεται με το σύστημα διαλυτών και τα εκλούσματα συλλέγονται σε κλάσματα. Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται, όπως και στην TLC, στις αλληλεπιδράσεις των χημικών ομάδων της κάθε ένωσης με το προσροφητικό υλικό. Όταν η στατική φάση είναι πολική, ενώσεις της κινητής φάσης με πολικές ομάδες αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με την στατική και καθυστερούν να εξέλθουν από τον σωλήνα. Με αυτό τον τρόπο οι ενώσεις που διαφέρουν σε πολικότητα συλλέγονται σε διαφορετικά κλάσματα.

Όλες η χρωματογραφίες διενεργήθηκαν με παροχή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) και ως προσροφητικό υλικό χρησιμοποιήθηκε silica gel.



Εικόνα 13. Χρωματογραφία στήλης

3.5 Προσδιορισμός σημείων τήξεως

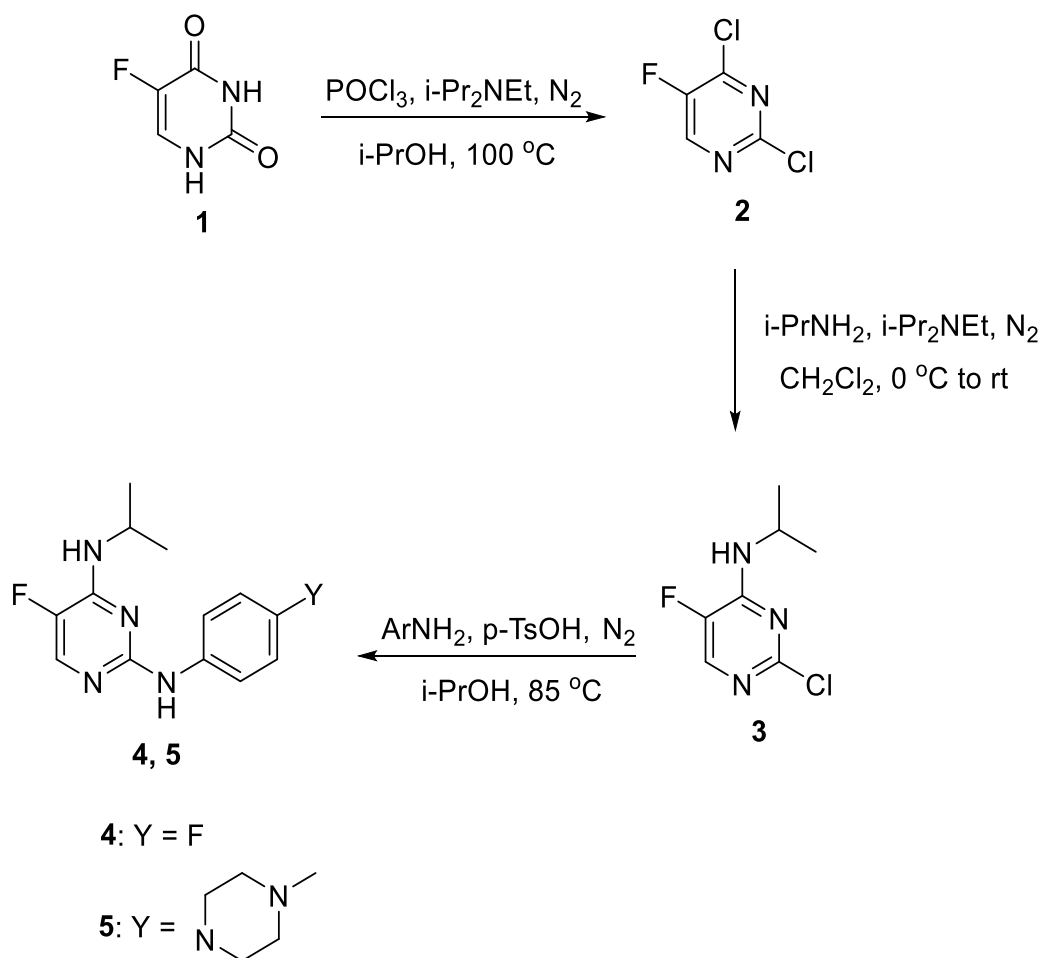
Στα προϊόντα που κρυσταλλώθηκαν μετά το καθαρισμό μετρήθηκε το σημείο τήξεως τους με την συσκευή Med-Temp Apparatus. Η μέτρηση διεξάγεται με την τοποθέτηση μικρής ποσότητας της στερεοποιημένης ένωσης σε κλειστό θάλαμο όπου επάγεται συνεχής αύξηση της θερμοκρασίας από μια θερμαινόμενη πλάκα και η αύξηση αυτή καταγράφεται ταυτόχρονα από ένα θερμόμετρο. Τη στιγμή της τήξης ο αναλυτής καταγράφει την θερμοκρασία του θερμομέτρου που αντιστοιχεί και στο σημείο τήξης της υπό μελέτη ένωσης.

3.6 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η ταυτοποίηση της δομής των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φάσματογράφου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Στα άτομα που περιέχουν περιττό αριθμό πρωτονίων και εμφανίζουν πυρηνικό σπιν εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο επάγωντας την ευθυγράμμιση των σπιν παράλληλα (α -σπιν) ή αντιπαράλληλα (β -σπιν) με την κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου. Στην συνέχεια εφαρμόζεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, κάθετη στην κατεύθυνση των σπιν, η οποία, μετά την απορρόφηση ενέργειας από τα πρωτόνια, προκαλεί την αλλαγή της κατεύθυνσης των σπιν, ένα φαινόμενο που ονομάζεται συντονισμός. Η απορρόφηση του ποσού της ενέργειας καταγράφεται από έναν φασματογράφο. Το ποσό της ενέργειας που απαιτείται για το συντονισμό κάθε ατόμου διαφέρει ανάλογα με το είδος του ατόμου και τα άτομα που το περιβάλλουν. Ως σημείο αναφοράς για την καταγραφή της απορροφούμενης ενέργειας χρησιμοποιείται το τετραμέθυλοσινάλιο (TMS). Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ μετρήθηκαν σε φωτόμετρο Bruker στα 300 MHz και 75.5 MHz, αντίστοιχα. Τα δείγματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) ή δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$).

4. Πειραματικό μέρος

4.1. Επισκόπηση πορείας σύνθεσης



4.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη χημική ένωση που χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο είναι η 5-φθοροουρακίλη (**1**) η οποία είναι διαθέσιμη εμπορικά. Η (**1**) χλωριώνεται στις θέσεις 2 και 4 από οξυχλωριούχο φώσφορο (POCl_3), με τη βοήθεια της N,N-δισοπροπυλοαιθυλαμίνης ($i\text{-Pr}_2\text{NEt}$) η οποία δεσμεύει το παραγόμενο υδροχλώριο, και παράγεται η ένωση 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνη (**2**).

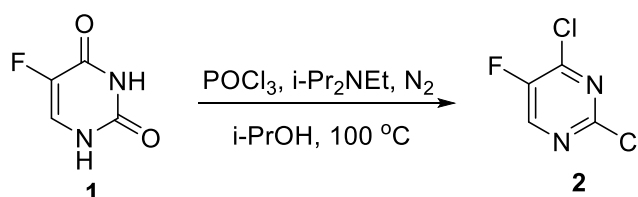
Το προϊόν (**2**) χρησιμοποιείται για την αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης του χλωρίου στη θέση 4 από την ισοπροπυλαμίνη ($i\text{-PrNH}_2$), παρουσία N,N-δισοπροπυλοαιθυλαμίνης ($i\text{-Pr}_2\text{NEt}$) η οποία δεσμεύει το παραγόμενο υδροχλώριο. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε άνυδρο διαλύτη διχλωρομεθάνιο και παράγεται ως κύριο προϊόν η ένωση N-ισοπροπυλο-5-φθορο-2-χλωροπυριμιδίν-4-αμίνη (**3**).

Η ολοκλήρωση της πορείας σύνθεσης των νεοσυντιθέμενων πυριμιδινικών αναλόγων αφορά την εισαγωγή p-υποκατεστημένων ανιλινών στην θέση 2 του δακτυλίου.

Η ένωση (**3**) αντιδρά με την p-φθοροανιλίνη ($p\text{-F-PhNH}_2$) ώστε να υποκατασταθεί το χλώριο στη θέση 2 της πυριμιδίνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη συμμετοχή του όξινου καταλύτη p-τολουολοσουλφονικού οξέος ($p\text{-TsOH}$) σε διαλύτη ισοπροπανόλη. Παράγεται η N4-ισοπροπυλο-5-φθορο-N2-(4-φθοροφαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνη (**4**).

Η ένωση (**3**) αντιδρά με την 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-ανιλίνη κάτω από τις ίδιες συνθήκες που έλαβε μέρος η αντίδραση για την παραγωγή της ένωσης (**4**). Παράγεται η N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-φθοροπυριμιδιν-2,4-διαμίνη (**5**).

4.2.1 Σύνθεση της 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνης (2)

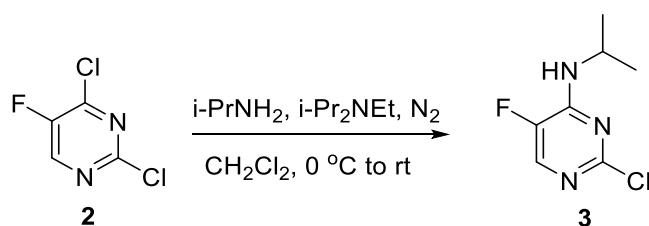


Σε στεγνή φιάλη των 10 ml προστίθενται η εμπορικά διαθέσιμη 5-φθοροουρακίλη (650 mg, 5 mmol) και αέριο N₂. Εν συνέχεια προστίθεται ο οξυχλωριούχος φώσφορος (POCl₃) (3.7 ml, 40 mmol, 8 eq), και τέλος η διισοπροπυλο-αιθυλαμίνη (i-Pr₂NEt) (1.3 ml, 7.5 mmol, 1.5 eq). Το διάλυμα αναδεύεται υπό θέρμανση στους 100 °C σε ελαιόλουτρο για 1 ώρα. Ο έλεγχος με TLC (CH₂Cl₂-MeOH 95:5) υποδεικνύει το πέρας της αντίδρασης ενώ το διάλυμα της αντίδρασης έχει αποκτήσει σκούρο καφέ χρώμα και παρατηρείται το ίζημα του άλατος i-Pr₂NH⁺Cl⁻. Πραγματοποιείται κατεργασία με υδατικό διάλυμα NaOH και κατόπιν εκχύλιση με AcOEt (20 ml) σε διαχωριστική χοάνη των 50 ml. Η οργανική φάση που προκύπτει πλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (brine), κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (2x10 ml) και ξανά με brine (2x10 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με προσθήκη άνυδρου Na₂SO₄ και στην συνέχεια συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού υπό κενό, στον περιστροφικό συμπυκνωτή (rotary evaporator), ενώ ίχνη διαλύτη σε αντλία κενού. Το υπόλειμμα έχει κιτρινωπό χρώμα και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (flash chromatography) χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών 70% Hex - 30% CH₂Cl₂. Το προϊόν (2) ανακτάται με εξάτμιση των διαλυτών υπό κενό στον περιστροφικό συμπυκνωτή και κρυσταλλώνεται στο ψυγείο αποκτώντας λευκό χρώμα. Μάζα προϊόντος m₍₂₎ = 514 mg, απόδοση 61.6%.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 2,4-διχλωρο-5-φθοροπυριμιδίνης.

R _f (70% Hex / 30% CH ₂ Cl ₂)	0.48
Σημείο τήξης	39-40 °C
Απόδοση	61.6 %

4.2.2 Σύνθεση της N-ισοπροπυλο-5-φθορο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης (**3**)

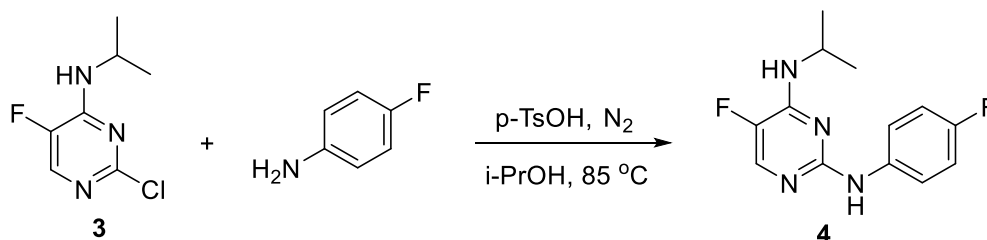


Σε φιάλη των 25 ml προστίθεται η (**2**) (167 mg, 1.00 mmol) και 10 ml άνυδρο διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) ως διαλύτης. Η φιάλη βυθίζεται σε παγόλουτρο ώστε να ρυθμιστεί η θερμοκρασία της αντίδρασης στους 0 °C. Στη συνέχεια προστίθεται η ισοπροπυλαμίνη (*i*-PrN₂) (130 μl, 1.51 mmol, 1.5 eq), και τέλος η διισοπροπυλοαιθυλαμίνη (*i*-Pr₂NEt) (174 μl, 1.00 mmol, 1 eq). Το μείγμα αναδεύεται στους 0 °C για περίπου 1 ώρα και κατόπιν αφήνεται να φτάσει σταδιακά σε θερμοκρασία δωματίου. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης ελέγχεται με TLC μετά από 46 ώρες, σε σύστημα διαλυτών 90% Hex / 10% AcOEt. Ακολουθεί αραίωση του διαλυματος με AcOEt (50 ml) και έκπλυσή του με απιονισμένο ύδωρ (2x10 ml) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (10 ml). Η οργανική φάση αποξηραίνεται με άνυδροθειϊκό νάτριο (Na₂SO₄) και συμπυκνώνεται με εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, και αφαίρεση υπολειμμάτων διαλύτη σε αντλία κενού. Το προϊόν (**3**) αφήνεται στο ψυγείο όπου και κρυσταλλώνεται δίνοντας λευκό στερεό μάζας m₍₃₎ = 155 mg (απόδοση 81.7%).

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της N-ισοπροπυλο-5-φθορο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης.

R _f (90% Hex / 10% AcOEt)	0.26
Σημείο τήξης	52-54 °C
Απόδοση	81.7 %

4.2.3 Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-5-φθορο-N2-(4-φθοροφαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (4).

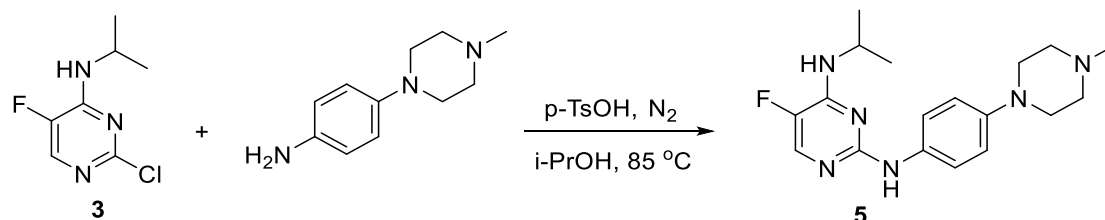


Σε δοκιμαστικό σωλήνα από πυρίμαχο γυαλί των 10 ml προστίθεται το αντιδρών (**3**) (38 mg, 0.20 mmol) και εν συνεχεία η *p*-φθοροανιλίνη (19.2 ml, 0.20 mmol, 1 eq), το *p*-τολουολοσουλφονικό οξύ (*p*-TsOH) (38 mg, 0.20 mmol, 1 eq), 2.0 ml ισοπροπανόλης (*i*-PrOH), και τέλος διαβιβάζεται αέριο N_2 και ο σωλήνας σφραγίζεται. Η ισοπροπανόλη είχε προηγουμένως υποστεί απαέρωση σε υδατόλουτρο υπερήχων. Το διάλυμα εμβαπτίζεται σε ελαιόλουτρο που έχει θερμανθεί στους $85\text{ }^\circ\text{C}$ και αφήνεται, υπό ανάδευση, για 22 ώρες. Το πέρας της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με TLC, σε σύστημα διαλυτών 80%Hex/20%AcOEt, και ακολουθεί αραίωση του διαλύματος με AcOEt (20 ml), έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (2x10 ml) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (10 ml). Ακολουθεί ξήρανση με Na_2SO_4 και συμπύκνωση της οργανικής φάσης υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, με διαλύτη έκλουσης 90%Hex/10%AcOEt. Τα επιθυμητά κλάσματα συλλέγονται και συμπυκνώνονται στον περιστροφικό συμπυκνωτή. Υπολείμματα διαλύτη αφαιρούνται στην αντλία κενού. Το προϊόν αποθηκεύεται στο ψυγείο όπου στερεοποιείται δίνοντας γκρι στερεό μάζας $m_{(4)} = 43\text{ mg}$ (απόδοση 81%).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της N4-ισοπροπυλο-5-φθορο-N2-(4-φθοροφαινυλο)-πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.

R_f (90% Hex / 10% AcOEt)	0.33
Σημείο τήξης	115-118 $^\circ\text{C}$
Απόδοση	81%

4.2.4 Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-φθορο-πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (5).



Σε δοκιμαστικό σωλήνα από πυρίμαχο γυαλί των 10 ml προστίθεται το αντιδρών (3) (38 mg, 0.20 mmol), η 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-ανιλίνη (38 μg, 0.2 mmol, 1 eq), το p-τολουοσουλφονικό οξύ (p-TsOH) (38 mg, 0.20 mmol, 1 eq) και 1.5 ml ισοπροπανόλης (i-PrOH) και τέλος διαβιβάζεται αέριο N₂ και ο σωλήνας σφραγίζεται. Η ισοπροπανόλη είχε προηγουμένως υποστεί απαέρωση σε υδατόλουτρο υπερήχων. Η θερμοκρασία της αντίδρασης ρυθμίζεται στους 85 °C σε ελαιόλουτρο. Με την εκκίνηση της αντίδρασης παρατηρείται ένα λευκό θόλωμα που σταδιακά μετατρέπεται σε σκούρο κυανό ενώ η αντίδραση αφήνεται για 30 ώρες. Η κατανάλωση του αντιδρώντος επιβεβαιώνεται με TLC, σε σύστημα διαλυτών 90%CH₂Cl₂/10%MeOH, και κατόπιν διεξάγεται κατεργασία με υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH). Ακολουθεί εκχύλιση του διαλύματος με AcOEt (20 ml), εκπλύσεις με υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (2x10 ml) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (10 ml), και κατόπιν ξήρανση της οργανικής φάσης με Na₂SO₄ και συμπύκνωσή της υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, με σύστημα διαλυτών 95% CH₂Cl₂ / 5% MeOH, για να αποφέρει ροζ στερεό μάζας m₍₅₎ = 27 mg (απόδοση 39%).

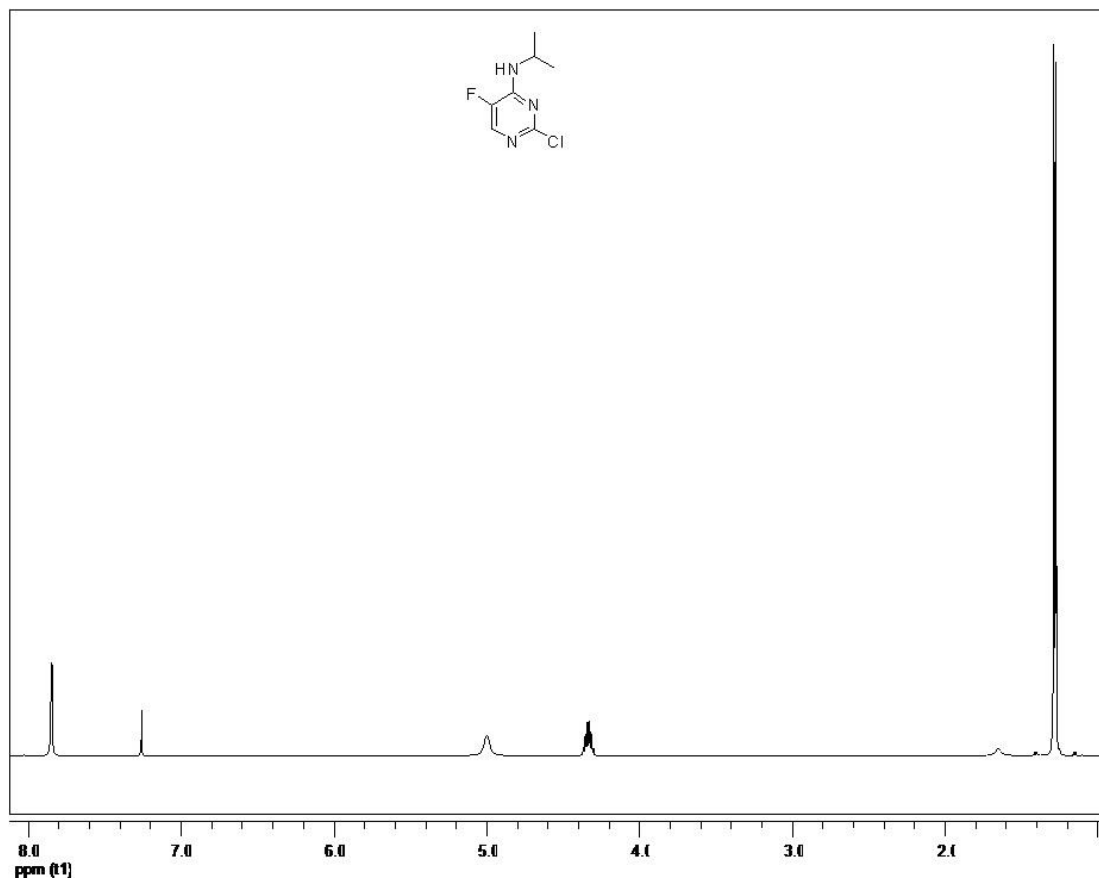
Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-φθορο-πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.

R _f (90% CH ₂ Cl ₂ / 10% MeOH)	0.22
Σημείο τήξης	101 °C
Απόδοση	39 %

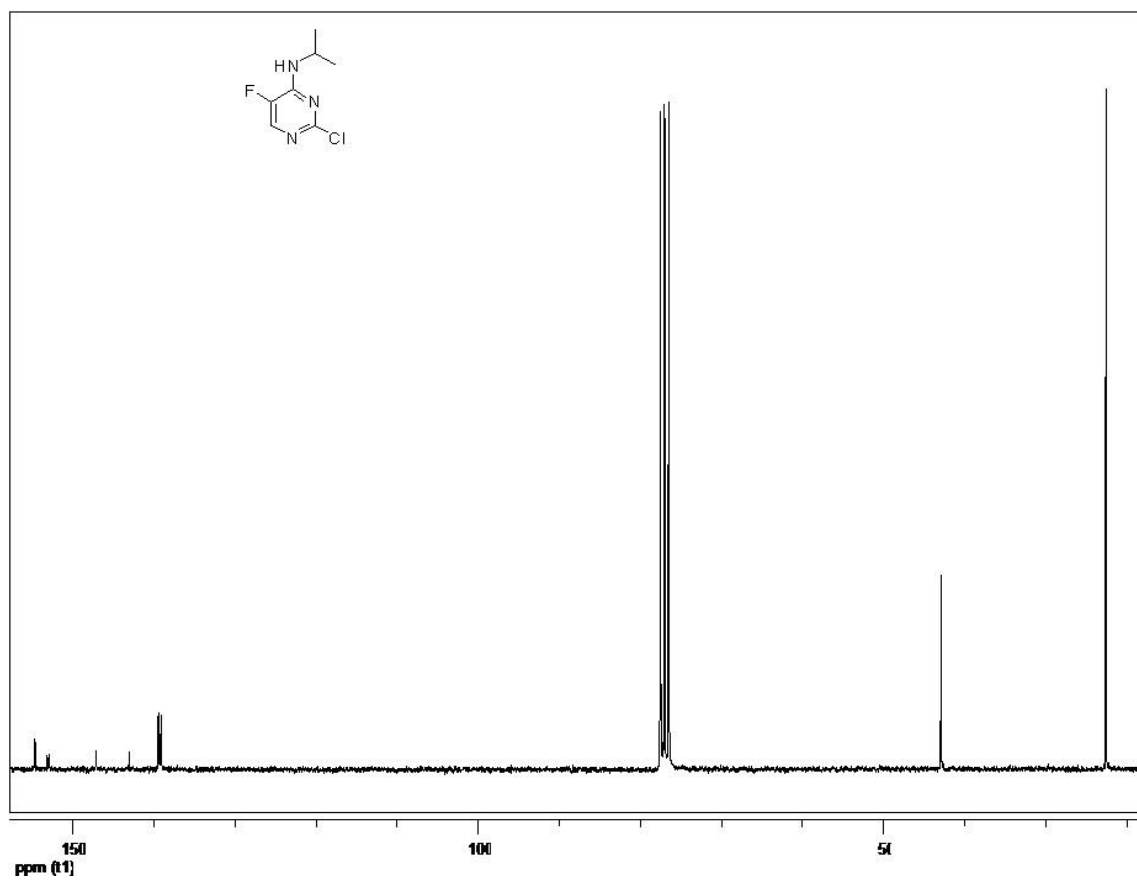
5. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση της δομής των τελικών παραγώγων **4** και **5** και του ενδιάμεσου **3** επιβεβαιώθηκε από τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) και άνθρακα-13 ($^{13}\text{C-NMR}$), τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.

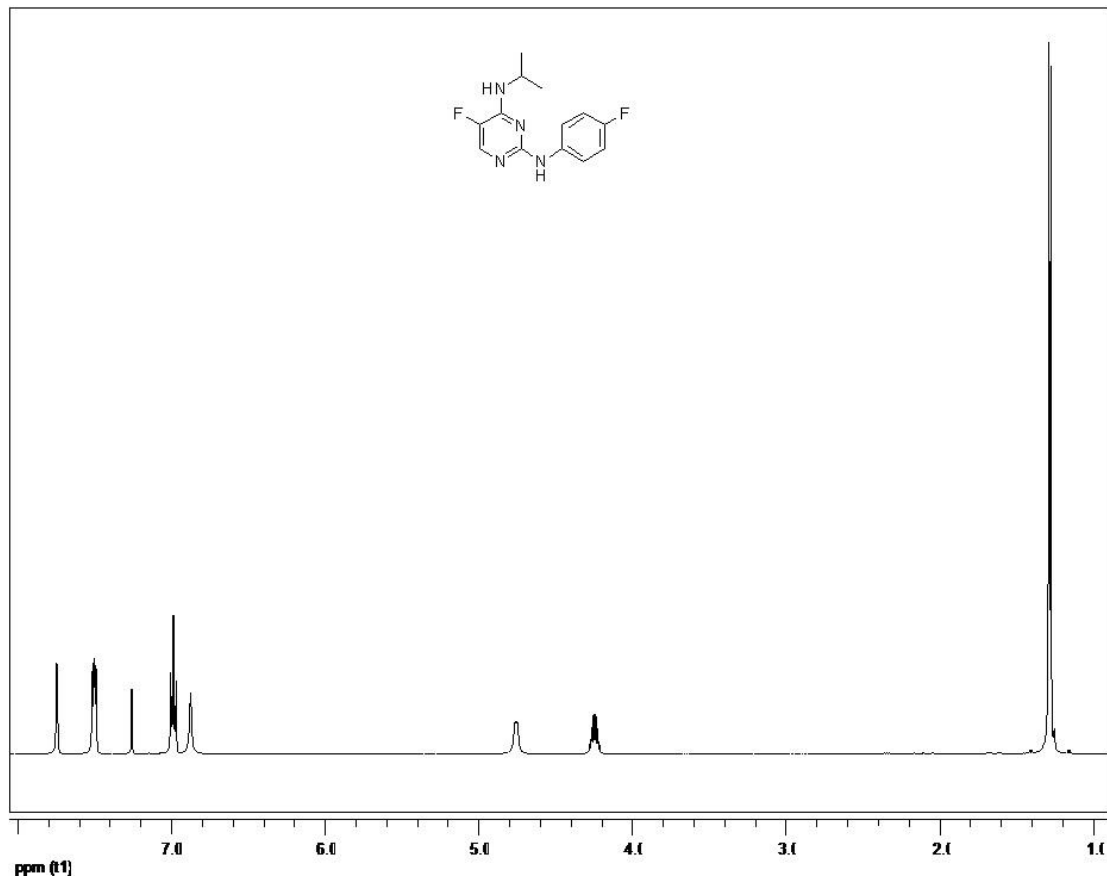
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της *N*-ισοπροπυλο-5-φθορο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης (**3**)



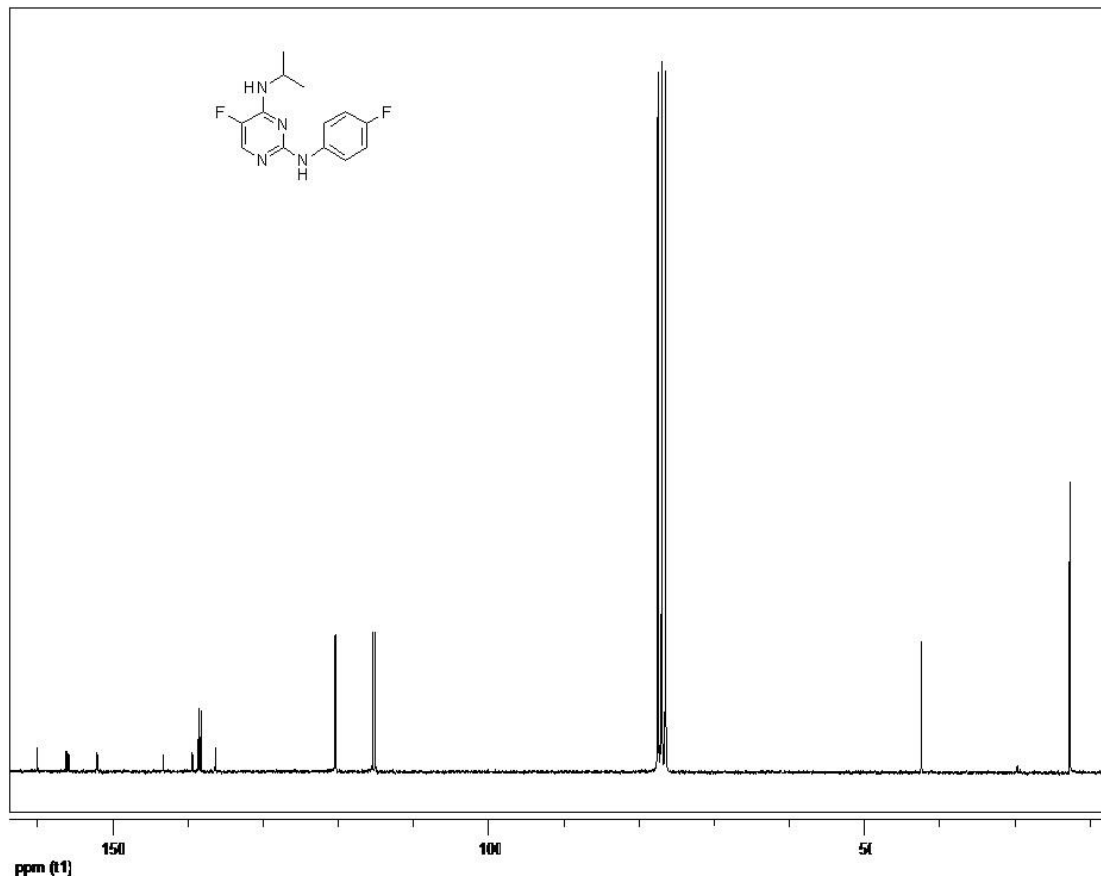
Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της *N*-ισοπροπυλο-5-φθορο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης (3)



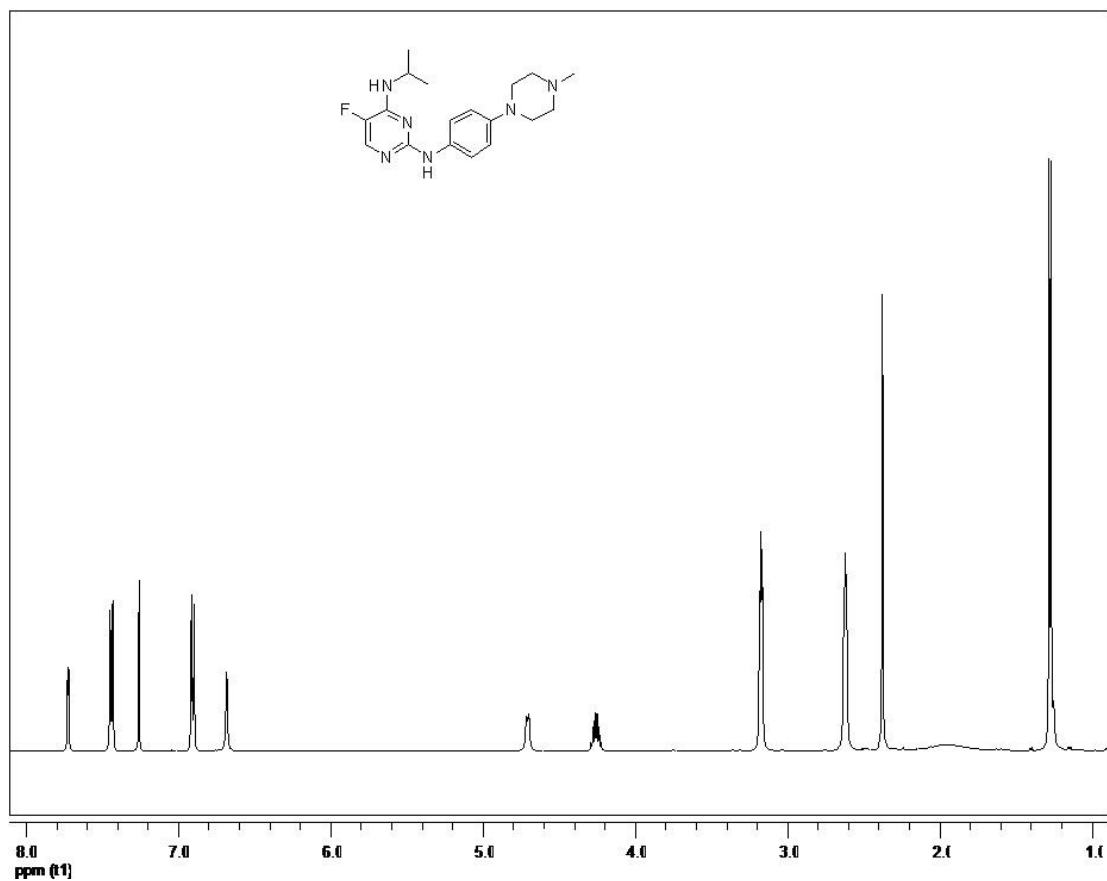
Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της N4-ισοπροπυλο-5-φθορο-N2-(4-φθοροφαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (4)



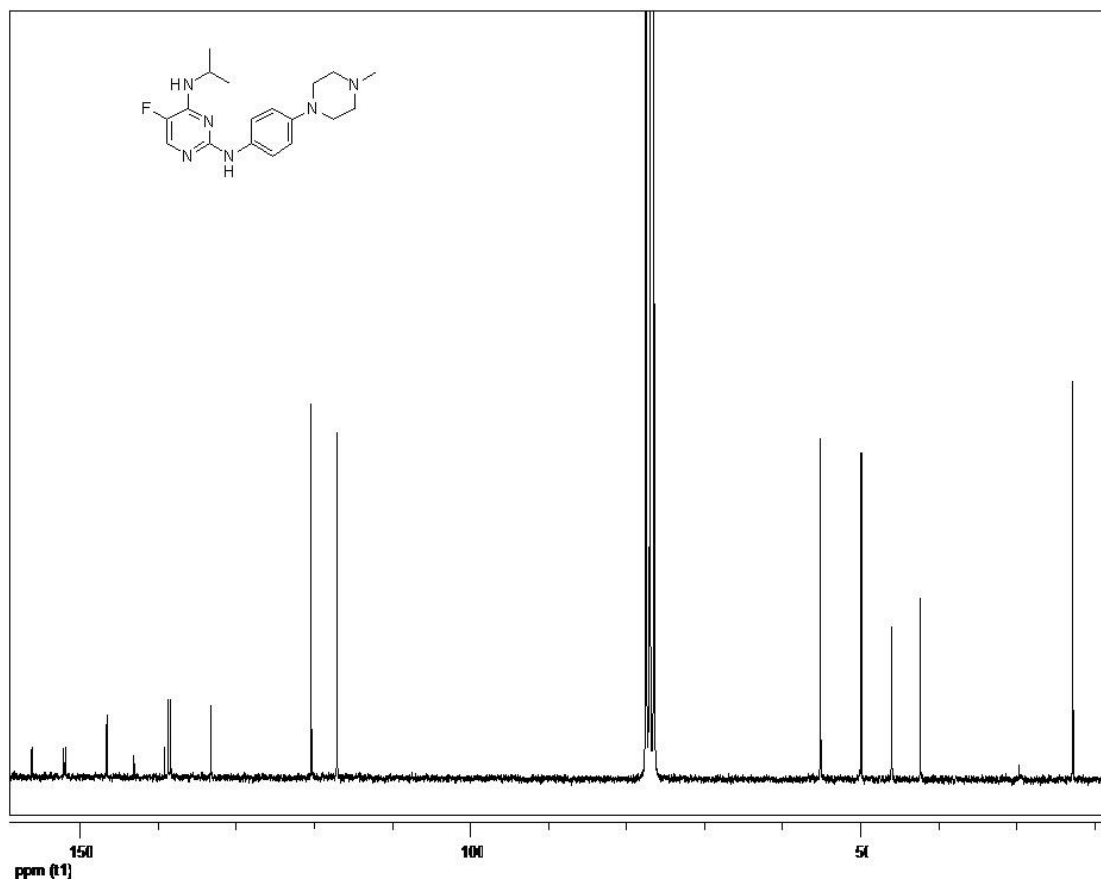
Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της N4-ισοπροπυλο-5-φθορο-N2-(4-φθοροφαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (4)



Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-φθοροπυριμιδιν-2,4-διαμίνης (5)



Φάσμα ^{13}C -NMR της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-φθοροπυριμιδιν-2,4-διαμίνης (5)



6.Συζήτηση- Αποτελέσματα

Η ανάπτυξη νέων αποτελεσματικότερων φαρμάκων για την καταπολέμηση κακοήθων νεοπλασιών και ιϊκών μολύνσεων αποτελεί ίσως το πιο σημαντικό μέλημα της φαρμακευτικής χημείας τα τελευταία χρόνια. Ο προσδιορισμός των βιοχημικών διαδικασιών που εμπλέκονται σε κάθε τύπου καρκίνου ή σε μολύνσεις από διαφορετικά στελέχη ιών επιτρέπει τον σχεδιασμό και την σύνθεση ενώσεων με στοχευμένη ανασταλτική δράση, αποφεύγοντας παρενέργειες που οφείλονται σε χαμηλή εκλεκτικότητα. Ο σχεδιασμός των ενώσεων γίνεται βάσει λογισμικών που αντλούν πληροφορίες από βάσεις δεδομένων για να προσομοιώσουν την τρισδιάστατη δομή του βιολογικού στόχου (για παράδειγμα κάποιου ενζύμου) και εν τέλει να προτείνουν μια κατάλληλη φαρμοκοφόρο ομάδα η οποία να αλληλοεπιδρά ικανά με το βιολογικό στόχο. Στην συνέχεια η φαρμακοφόρος ομάδα ενσωματώνεται σε μια κατάλληλη βασική δομή, όπως είναι για παράδειγμα ο δακτύλιος της πυριμιδίνης, και η ένωση-οδηγός που προκύπτει υποβάλλεται σε χημικές τροποποιήσεις με στόχο την βελτιστοποίηση της. Τα διάφορα παράγωγα ελέγχονται για την αποτελεσματικότητά τους *in vitro* σε κυτταροκαλλιέργειες. Ωστόσο, παρά τα δεδομένα που λαμβάνονται από *in silico* και *in vitro* μελέτες, τα *in vivo* αποτελέσματα ενδέχεται να διαφέρουν σημαντικά, καθώς η βιολογική δράση της ένωσης επηρεάζεται από τη διαλυτότητα, τη λιποφιλικότητα, την πολικότητα, δηλαδή ιδιότητες που καθορίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα, το μεταβολισμό και την απέκκρισή της.

Η υποκαταστάτες του πυριμιδινικού δακτυλίου επιλέγονται με βάση τα χημικές ιδιότητες που προσφέρουν στην ένωση, οι οποίες αφορούν κυρίως την βελτιστοποίηση της πρόσδεσης της στο μόριο στόχο αλλά και σε καλύτερη φαρμακοκινητική δράση.

Η υποκατάσταση της θέσης 5 της πυριμιδίνης με φθόριο.

Το άτομο του φθορίου είναι παραπλήσιου μεγέθους με το υδρογόνο χωρίς να αλλάζει σημαντικά τις αλληλεπιδράσεις με τον στόχο ενώ το μήκος δεσμού του με το άτομο του άνθρακα είναι αμελητέα μικρότερο από αυτό του υδρογόνου. Η ισχύς του δεσμού C-F (108 kcal/mol) δεν επιτρέπει πιθανές βιομετατροπές στο μόριο και συνήθως υποκατάσταση του H με F αυξάνει την λιποφιλία και την υδροφοβικότητα της ένωσης διευκολύνοντας την διέλευση της μέσω των πλασματικών μεμβρανών καθώς και την προσέγγιση σε υδρόφοβα ενεργά κέντρα ενζύμων (24).

Η υποκατάσταση της θέσης 2 της πυριμιδίνης με αμίνες.

Ο δακτύλιος της πυριμιδίνης διατηρεί έναν υδρόφοβο χαρακτήρα ο οποίος επεκτείνεται με την προσθήκη αμινών στην θέση 2. Σε προσομοιώσεις φαίνεται η σταθερότερη πρόσδεση της ένωσης με το ενεργό κέντρο κινασών που οφείλεται στη συμμετοχή του υδρογόνου της αμίνης στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με καταλυτικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου των κινασών. Αυτοί οι δεσμοί επιδρούν συνδυαστικά με αυτούς που δημιουργεί το άζωτο 1 της πυριμιδίνης.

Η 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-ανιλίνη στην θέση 2 της πυριμιδίνης.

Η N-μεθυλοπιπεραζίνη στην *para* θέση της ανιλίνης αυξάνει την υδροφιλικότητα της ένωσης συνεισφέροντας στην αύξηση της διαλυτότητας καθώς και στο σωστό προσανατολισμό της ένωσης κατά την αλληλεπίδραση της με το ενεργό κέντρο (25). Η συγκεκριμένη χημική ομάδα έχει χρησιμοποιηθεί ως *para* υποκαταστάτης της ανιλίνης στο φάρμακο cenisertib που χρησιμοποιείται ως αντικαρκινικό με ανασταλτική δράση των κινασών Aurora (26). Επίσης φαίνεται να προτιμάται ως χημική ομάδα στην αναστολή των κινασών PAK και ACT, αφού οι ενώσεις που τη διαθέτουν ως ομάδα υποκατάστασης παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλές ενζυμικές IC_{50} (27).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν δύο νέα παράγωγα πυριμιδίνης με τα προαναφερθέντα δομικά χαρακτηριστικά. Η σύνθεση των νέων ενώσεων (4) και (5) επιτεύχθηκε μέσω μιας απλής πορείας τριών βημάτων, ξεκινώντας από την εμπορικά διαθέσιμη 5-φθορο-ουρακίλη. Η ταυτοποίηση της δομής και η επιβεβαίωση της καθαρότητας των τελικών προϊόντων έγινε μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Μελλοντικά θα πραγματοποιηθεί και βιολογική αποτίμηση των νέων παραγώγων η οποία θα περιλαμβάνει διερεύνηση της πιθανής κυτταροστατικής δράσης τους σε κατάλληλες καρκινικές κυτταρικές σειρές και των πιθανών αντικών ιδιοτήτων τους.

7.Βιβλιογραφία

1. Lagoja IM. Pyrimidine as constituent of natural biologically active compounds. *Chem. Biodivers.* 2005, 2(1), 1–50.
2. Lythgoe B, Rayner LS. 515. Substitution reactions of pyrimidine and its 2- and 4-phenyl derivatives. *J. Chem. Soc.* 1951, 2323–9.
3. Wu X-F, Wang Z. Synthesis of Pyrimidine. Chapter 2 in *Transition Metal-Catalyzed Pyrimidine Synthesis: Transition Metal-Catalyzed Heterocycle Synthesis Series*. Elsevier, 2017, 5–54 p.
4. Jennifer C Kerns, Jean L Gutierrez. Thiamin, *Advances in Nutrition*, 2017, 8(2), 395–397, <https://doi.org/10.3945/an.116.013979>
5. Bettendorff L, Wins P. Biological functions of thiamine derivatives: Focus on non-coenzyme roles. *OA Biochem.* 2013, 1(1), 10.
6. A. C. Guyton. *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier. 2006
7. Lane AN, Fan TWM. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43(4), 2466–85.
8. Jacobson GR, Stark GR, Introduction I. Aspartate Transcarbamylases.
9. Miyachiro MM, Contreras-Martel C, Dessen A. Penicillin-Binding Proteins (PBPs) and Bacterial Cell Wall Elongation Complexes. Vol. 93, *Subcellular Biochemistry*. 2019. 273–289 p.
10. Madak JT, Bankhead A, Cuthbertson CR, Showalter HD, Neamati N. Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer. *Pharmacol. Ther.* 2019, 195, 111–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.10.012>
11. Evans DR, Guy HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: Fresh insights into an ancient pathway. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(32), 33035–8.
12. Yablonski MJ, Pasek DA, Han BD, Jones ME, Traut TW. Intrinsic activity and stability of bifunctional human UMP synthase and its two separate catalytic domains, orotate phosphoribosyltransferase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 1996, 271(18), 10704–8.
13. Prachayasittikul S, Pingaew R, Worachartcheewan A, Sinthupoom N, Prachayasittikul V, Ruchirawat S, et al. Roles of Pyridine and Pyrimidine Derivatives as Privileged Scaffolds in Anticancer Agents. *Mini-Reviews Med. Chem.* 2016, 17(10), 869–901.
14. Kaur R, Kaur P, Sharma S, Singh G, Mehndiratta S, Bedi P, et al. Anti-Cancer Pyrimidines in Diverse Scaffolds: A Review of Patent Literature. *Recent Patents*

- on Anti-Cancer Drug Discovery, 2014, 10, 23–71.
15. Wada H, Cheng L, Jiang J, Jiang Z, Xie J, Hu T, et al. Facile and regioselective synthesis of novel 2,4-disubstituted-5- fluoropyrimidines as potential kinase inhibitors. *Tetrahedron Lett.* 2012, 53(14), 1720–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.01.088>
 16. Diasio RB, Harris BE. Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* 1989, 16(4), 215–37.
 17. Aliagas-Martin I, Burdick D, Corson L, Dotson J, Drummond J, Fields C, et al. A class of 2,4-bisanilinopyrimidine Aurora A inhibitors with unusually high selectivity against Aurora B. *J. Med. Chem.* 2009, 52(10), 3300–7.
 18. Qin WW, Sang CY, Zhang LL, Wei W, Tian HZ, Liu HX, et al. Synthesis and biological evaluation of 2,4-diaminopyrimidines as selective Aurora A kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2015;95:174–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.044>
 19. Lawrence HR, Martin MP, Luo Y, Pireddu R, Yang H, Gevariya H, et al. Development of o-chlorophenyl substituted pyrimidines as exceptionally potent aurora kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012;, 55(17), 7392–416.
 20. Gao J, Fang C, Xiao Z, Huang L, Chen CH, Wang LT, et al. Discovery of novel 5-fluoro-N2,N4-diphenylpyrimidine-2,4-diamines as potent inhibitors against CDK2 and CDK9. *MedChemComm*, 2015, 6(3), 444–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4MD00412D>
 21. Song Z, Jin Y, Ge Y, Wang C, Zhang J, Tang Z, et al. Synthesis and biological evaluation ofazole-diphenylpyrimidine derivatives (AzDPPYs) as potent T790M mutant form of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Bioorg.Med. Chem.* 2016, 24(21), 5505–12.
 22. Guillemont J, Pasquier E, Palandjian P, Vernier D, Gaurrand S, Lewi PJ, et al. Synthesis of novel diarylpyrimidine analogues and their antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Chem.* 2005, 48(6), 2072–9.
 23. Janssen PAJ, Lewi PJ, Arnold E, Daeyaert F, De Jonge M, Heeres J, et al. In search of a novel anti-HIV drug: Multidisciplinary coordination in the discovery of 4-[[4-[[4-[(1E)-2-cyanoethenyl]-2,6-dimethylphenyl]amino]-2-pyrimidinyl]amino]benzotrile (R278474, rilpivirine). *J. Med. Chem.* 2005, 48(6), 1901–9.
 24. Δημόπουλος Β, Τσαντίλη-Κακουλίδου Α. Βασικές Αρχές Σχεδιασμού Και Ανάπτυξης Φαρμάκων. 2015. 29.
 25. Lawrence HR, Mahajan K, Luo Y, Zhang D, Tindall N, Huseyin M, et al. Development of novel ACK1/TNK2 inhibitors using a fragment-based approach. *J. Med. Chem.* 2015, 58(6), 2746–63.

26. Curtin ML, Robin Heyman H, Frey RR, Marcotte PA, Glaser KB, Jankowski JR, et al. Pyrazole diaminopyrimidines as dual inhibitors of KDR and Aurora B kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012, 22(14), 4750–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.05.067>
27. McCoull W, Hennessy EJ, Blades K, Chuaqui C, Dowling JE, Ferguson AD, et al. Optimization of Highly Kinase Selective Bis-anilino Pyrimidine PAK1 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2016, 7(12), 1118–23.