

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ 'ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ'

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σύνθεση, φασματοσκοπικός προσδιορισμός και βιολογική αποτίμηση
νέων 2,4-διυποκατεστημένων πυριμιδινών ως πιθανών κυτταροτοξικών
παραγόντων

ΚΑΡΕΤΣΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
MSc 'TOXICOLOGY'

THESIS

Synthesis, spectroscopic determination and biological evaluation of new
2,4-substituted pyrimidines as potential cytotoxic agents

KARETSOU BARBARA

LARISSA, 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος

Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Κολλάτος Νικόλαος

Ακαδημαϊκός Υπότροφος του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μόσιαλος Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας του Μεταπτυχιακού 'Τοξικολογίας', στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα. Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς αλληλεπιδράσεων με διάφορα άτομα, καθένα από τα οποία έπαιξε ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξή της. Αξίζει λοιπόν, να αφιερώσω την παρούσα σελίδα για να ευχαριστήσω ειλικρινά τα άτομα αυτά για τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας:

Και πρώτα απ' όλα, το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» αξίζει στον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, κύριο Χρήστο Μήτσο για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς επίσης και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Δημήτριο Κομιώτη, καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, ο οποίος μου εμπιστεύτηκε την παρούσα διπλωματική εργασία και μου προσέφερε βοήθεια όποτε τη χρειαζόμουν, καθώς επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Ακόμη θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω και τον κύριο Χρήστο Μήτσο και τον κύριο Νικόλαο Κολλάτο γιατί από την πρώτη στιγμή πίστεψαν σε μένα και στην προσπάθειά μου και με στήριξαν.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φίλη και συμπορεύτριά μου Κατερίνα Φραγκέδη για τη στήριξη της και την συντροφιά της.

Ακόμη, ένα μεγάλο «ευχαριστώ» θα ήθελα να το πω στη Ρούλα.

BK

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα περισσότερα από τα κλασικά αντικαρκινικά φάρμακα είναι κυτταροτοξικοί παράγοντες που έχουν χαμηλή εκλεκτικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας έτσι σε σημαντικές παρενέργειες (δηλαδή, καταστολή του μυελού των οστών, αλωπεκία, ναυτία και έμετος). Επιπλέον, τα περισσότερα από τα φάρμακα αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά δεν επηρεάζουν τα καρκινικά κύτταρα στη φάση ανάπαυσης. Ως εκ τούτου, νέα φάρμακα που δρουν σε διάφορους στόχους αναπτύσσονται συνεχώς για τη βελτίωση του ελέγχου και της πρόληψης της ασθένειας. Τα αντικαρκινικά φάρμακα των νεότερων γενεών αναπτύσσονται για να επιτύχουν υψηλότερη ισχύ και επιλεκτικότητα, καλύτερη φαρμακοκινητική καθώς και ελάχιστη τοξικότητα.

Η πυριδίνη και η πυριμιδίνη αποτελούν ελκυστικές βασικές δομές για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη φαρμάκων. Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα, δρώντας σε διάφορους φαρμακευτικούς στόχους, περιέχουν αυτές τις προνομιακές δομές. Τα νουκλεϊκά οξέα γενετικών υλικών (DNA και RNA) είναι παράγωγα πυριμιδίνης και πουρίνης. Από αυτήν την άποψη, πολλοί αντιμεταβολίτες έχουν αναπτυχθεί ως αντικαρκινικά φάρμακα βασιζόμενα στη μίμηση φυσικών υποστρωμάτων ώστε να δρουν ανταγωνιστικά στους στόχους, δηλαδή τους υποδοχείς ή τα ένζυμα.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων παραγώγων πυριμιδίνης ως πιθανών κυτταροτοξικών παραγόντων. Οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από τον σκελετό της διαμινοπυριμιδίνης υποκατεστημένης με αλκύνυλο ομάδες και η δομή τους επιβεβαιώθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Μελλοντικά η κυτταροστατική δράση αυτών των ενώσεων σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές θα αποτιμηθεί προκειμένου να διερευνηθεί η χρησιμότητά τους για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων.

ABSTRACT

Most of the classical anticancer drugs are cytotoxic agents which have low selectivity towards cancer cells thereby leading to considerable adverse effects (i.e., bone marrow suppression, alopecia, nausea, and vomiting). In addition, most of the drugs are mainly active against proliferating cells but do not affect cancer cells in the resting phase. Hence, novel drugs acting at various targets have been continuously developed for improving disease control and prevention. Anticancer drugs of later generations are developed to achieve higher potency and selectivity, better pharmacokinetics as well as minimum toxicity. These targeted therapy agents inhibit enzymes vital for oncogenesis or tumor growth, which carry specific mutations found only in cancer cells and not in normal ones.

Pyridine and pyrimidine are attractive scaffolds for drug design and development. Many currently used anticancer drugs, acting at various drug targets, contain these privileged structures. The nucleic acids of genetic materials (DNA and RNA) are pyrimidine and purine derivatives. In this regard, many antimetabolite anticancer drugs have been developed based on mimicking natural substrate to competitively bind with the targets i.e., receptors or enzymes. In the field of targeted cancer therapy many pyrimidine derivatives have been approved for pharmaceutical use or undergo clinical trials.

In the context of this thesis novel pyrimidine derivatives have been designed and synthesized as potential cytotoxic agents. The new compounds are characterized by a diaminopyrimidine scaffold substituted with an alkynyl moiety and their structure has been confirmed through nuclear magnetic resonance spectroscopy. In the future the cytostatic activity of these derivatives against various cancer cell lines will be evaluated to investigate their potential as a basis for the development of new anticancer agents.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

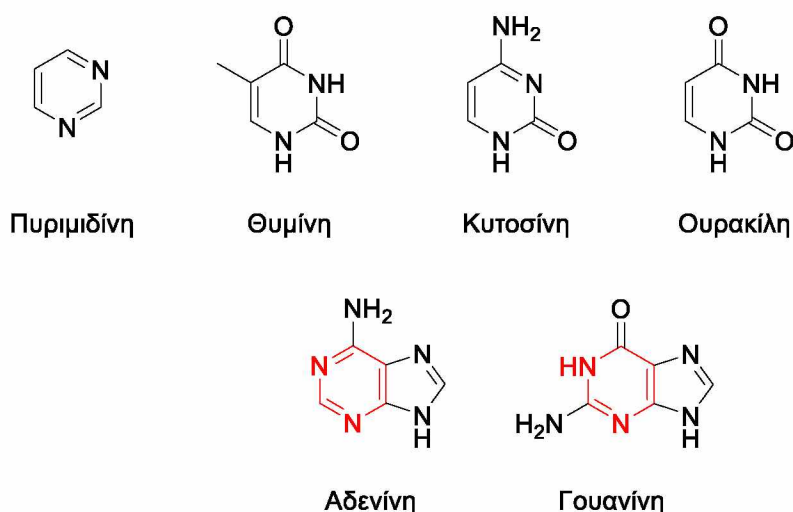
Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
Περιεχόμενα	7
1. Εισαγωγή.....	9
i. Πυριμιδίνες.....	9
ii. Δράσεις πυριμιδινών.....	10
iii. Αντινεοπλασματικά και αντικαρκινικά μέσα.....	10
iv. Αναστολείς κινασών πρωτεϊνών.....	12
v. Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης.....	13
vi. Υποδοχείς κινάσης τυροσίνης.....	13
vii. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς συνδεδεμένοι με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης.....	14
viii. Μονομερείς υποδοχείς.....	14
ix. Υποδοχέας EGFR.....	15
x. Μηχανισμός δράσης EGFR.....	16
xi. Πρώτη γενιά EGFR αναστολέων.....	16
xii. Δεύτερη γενιά EGFR αναστολέων.....	17
xiii. Τρίτη γενιά EGFR αναστολέων.....	18
xiv. Αναστολείς EGFR σε ανάπτυξη.....	20
xv. Υποδοχέας ALK.....	21
xvi. Αναστολείς ALK πρώτης γενιάς.....	21
xvii. Αναστολείς ALK δεύτερης γενιάς.....	22
xviii. Αναστολείς της ALK με δομή πυριμιδίνης	23
xix. Αναστολείς Aurora κινασών.....	24
xx. Αλκινυλο-πυριμιδίνες ως αναστολείς κινασών.....	26
2. Σκοπός της Εργασίας.....	28
3. Πειραματικές Τεχνικές.....	29
i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....	29
ii. Χρωματογραφία στήλης.....	30
iii. Ξήρανση διαλυτών.....	31
iv. Ταυτοποίηση ενώσεων.....	32

4. Πειραματικό μέρος.....	33
i. Προεπισκόπηση συνθετικής πορείας.....	33
ii. Μεθοδολογία σύνθεσης.....	33
iii. Σύνθεση της 5-ιωδο-ουρακίλης.....	35
iv. Σύνθεση της 2,4-διχλωρο-5-ιωδοπυριμιδίνης.....	36
v. Σύνθεση της 5-ιωδο-N-ισοπροπυλο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης.....	37
vi. Σύνθεση της 1-μεθυλο-4-(4-νιτροφαινυλο)πιπεραζίνης.....	38
vii. Σύνθεση της 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνης.....	39
viii. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-5-ιωδο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.....	40
ix. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-(φαινυλαιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.....	41
x. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-((3-φθοροφαινυλ)αιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.....	42
xi. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-((3-χλωροφαινυλ)αιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης.....	43
5. Φασματοσκοπικός προσδιορισμός.....	44
i. Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης (3)	44
ii. Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης (3)	45
iii. Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης (5)	45
iv. Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης (5)	46
v. Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης (6)	46
vi. Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης (6)	47
vii. Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης (7)	47
viii. Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης (7)	48
ix. Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης (8a)	49
x. Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης (8a)	49
xi. Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης (8b)	50
xii. Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης (8b)	50
xiii. Φάσμα ¹ H-NMR της ένωσης (8c)	51
xiv. Φάσμα ¹³ C-NMR της ένωσης (8c)	51
6. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	52
Βιβλιογραφία.....	53

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

i. Πυριμιδίνες

Η πυριμιδίνη είναι μια αρωματική ετεροκυκλική οργανική ένωση παρόμοια με την πυριδίνη. Όντας μία από τις τρεις διαζίνες (εξαμελή ετεροκυκλικά με δύο άτομα αζώτου στον δακτύλιο), έχει τα άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 3 στον δακτύλιο. Οι άλλες διαζίνες είναι η πυραζίνη (άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 4) και πυριδαζίνη (άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 2). Στα νουκλεϊκά οξέα, τρεις τύποι νουκλεοβάσεων είναι παράγωγα πυριμιδίνης: κυτοσίνη (C), θυμίνη (T) και ουρακίλη (U).



Εικόνα 1: Δομή πυριμιδίνης και νουκλεοβάσεων

Το σύστημα δακτυλίου πυριμιδίνης έχει ευρεία εμφάνιση στη φύση ως υποκατεστημένες και συντηγμένες με δακτύλιο ενώσεις και παράγωγα, όπως είναι οι νουκλεοβάσεις κυτοσίνη, θυμίνη και ουρακίλη, οι αντίστοιχες συντηγμένες με μιδαζολικό δακτύλιο βάσεις αδενίνη και γουανίνη, η θειαμίνη (βιταμίνη B1) και η αλλοξάνη. Βρίσκεται επίσης σε πολλές συνθετικές ενώσεις όπως τα βαρβιτουρικά και το φάρμακο AZT, ή ζιδοβουδίνη, που χρησιμοποιείται στη θεραπεία ασθενών προσβεβλημένων από τον ιό HIV. Αν και τα παράγωγα πυριμιδίνης όπως το ουρικό οξύ και η αλλοξάνη ήταν γνωστά στις αρχές του 19ου αιώνα, εργαστηριακή σύνθεση πυριμιδίνης δεν πραγματοποιήθηκε μέχρι το 1879, όταν ο Grimaux ανέφερε την παρασκευή βαρβιτουρικού οξέος από ουρία και μηλονικό οξύ παρουσία οξυχλωριούχου φωσφόρου. Η συστηματική μελέτη των πυριμιδινών ξεκίνησε το 1884 με τον Pinner, ο οποίος συνέθεσε παράγωγα με συμπύκνωση ακετοξικού αιθυλεστέρα με αμιδίνες. Ο Pinner πρότεινε για πρώτη φορά το όνομα «πυριμιδίνη» το 1885. Η μητρική ένωση παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τους Gabriel και Colman το 1900, με μετατροπή του βαρβιτουρικού οξέος σε 2,4,6-

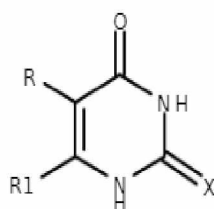
τριχλωροπυριμιδίνη ακολουθούμενη από αναγωγή χρησιμοποιώντας σκόνη ψευδαργύρου σε ζεστό νερό.

ii. Δράσεις πυριμιδινών

Με τα χρόνια, ο πυρήνας πυριμιδίνης έχει παρουσιασθεί ως μία σημαντική φαρμακοφόρος ένωση που αλληλεπιδρά με τη σύνθεση και τις λειτουργίες των νουκλεϊκών οξέων. Ο δακτύλιος πυριμιδίνης αποτελεί δομική μονάδα του DNA και του RNA, ως εκ τούτου τα παράγωγα πυριμιδίνης εμφανίζουν ποικίλες φαρμακολογικές δράσεις όπως αντικαρκινικές, αντι-ιικές, ειδικά αντι-HIV, αντιελονοσιακές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδης. Επίσης εμφανίζουν δραστικότητα έναντι των υποδοχέων ορμόνης που απελευθερώνουν γοναδοτροπίνη και εμφανίζουν ζιζανιοκτόνο δυναμικό αναστέλλοντας τη συνθετάση ακετοϋδροξυοξέος, ένα βασικό ένζυμο στη βιοσύνθεση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Ο δακτύλιος πυριμιδίνης είναι επίσης ένα βασικό τμήμα στο δομικό πλαίσιο βιταμινών όπως θειαμίνη, ριβοφλαβίνη και φολικό οξύ.

iii. Αντινεοπλασματικά και αντικαρκινικά μέσα

Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός αντιμεταβολιτών με βάση την πυριμιδίνη. Συνήθως σχετίζονται δομικά με τα ενδογενή υποστρώματα που ανταγωνίζονται. Η δομική τροποποίηση μπορεί να είναι στον δακτύλιο πυριμιδίνης ή στις ομάδες σακχάρου. Ένας από τους πρώτους μεταβολίτες που παρασκευάστηκαν ήταν η 5-φθοροουρακίλη (5-FU), ένα παράγωγο πυριμιδίνης. Η 5-θειοουρακίλη παρουσιάζει επίσης μερικές χρήσιμες αντινεοπλασματικές δράσεις.

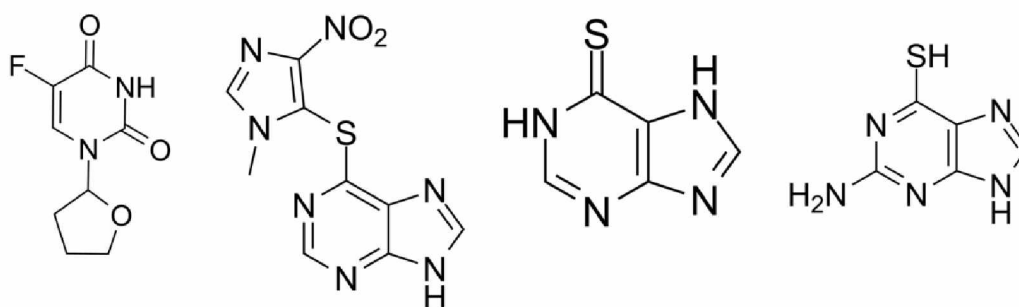


X = O, R = F, R₁ = H, 5-fluorouracil

X = O, R = SH, R₁ = H, 5-thiouracil

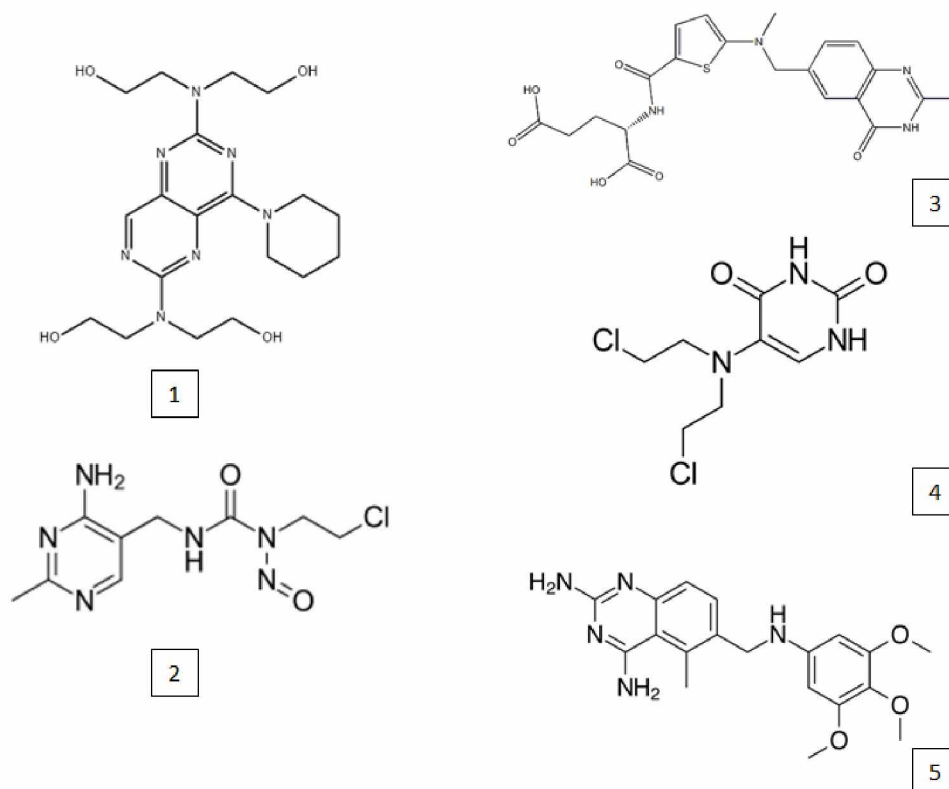
Εικόνα 2: Μοριακή δομή των φθοροουρακίλη και θειοουρακίλη

Οι αντινεοπλασματικές ενώσεις που φέρουν τον πυρήνα γουανίνης όπως η αζαθειοπρίνη, η μερκαπτοπουρίνη, η θειογουανίνη, η τεγαφουρίνη κ.λ.π. ανακαλύφθηκαν μετά τη διαμόρφωση της θεωρίας του αντιμεταβολίτη από τους Woods και Fildes το 1940. Αυτά τα φάρμακα αποτρέπουν τη χρήση φυσιολογικών κυτταρικών μεταβολιτών.



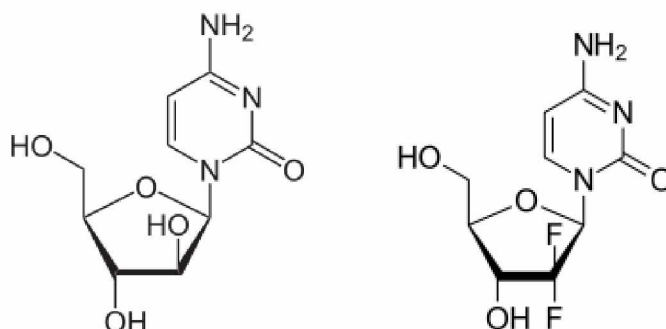
Εικόνα 3: Μοριακές δομές των τεγαφουρίνη, αζαθειοπρίνη, μερκαπτοπουρίνη και θειογουανίνη

Ακόμα περισσότερα παρόμοια φάρμακα έχουν ανακαλυφθεί τα τελευταία χρόνια, όπως η μοπιδαμόλη, η νιμουστίνη, η ραλιτρεξίδη, η ουραμουστίνη και η τριμεθοπρίμη.



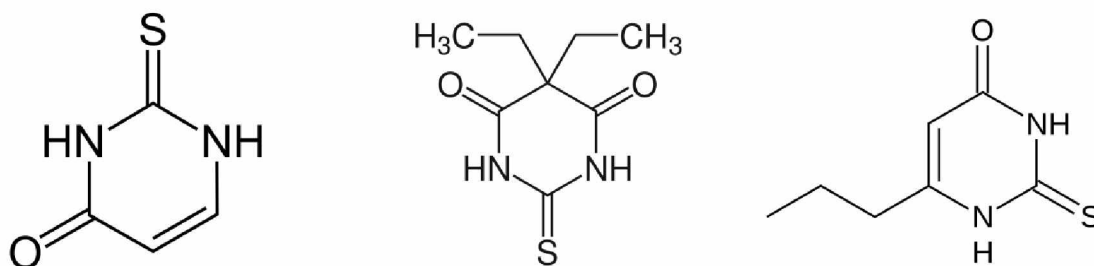
Εικόνα 4: Μοριακές δομές των μοπιδαμόλη (1), νιμουστίνη (2), ραλιτρεξίδη (3), ουραμουστίνη (4) και τριμεθοπρίμη (5)

Η 1-β-D-Arabinosylcytosine (κυταραβίνη ή Ara-C) είναι επίσης ένα παράδειγμα αντιμεταβολίτη πυριμιδίνης στον οποίο το σάκχαρο είναι αραβινόζη με διαμόρφωση βήτα. Χρησιμοποιείται κυρίως ως αντικαρκινικός παράγοντας και παρουσιάζει επίσης σημαντικά θεραπευτικά αποτελέσματα σε ασθενείς με λοιμώξεις από τον ιό του έρπητα και την εγκεφαλίτιδα από έρπητα. Η γεμισταβίνη, ένας αντιμεταβολίτης πυριμιδίνης, παρουσιάζει εξαιρετική αντικαρκινική δράση κατά των συμπαγών όγκων ποντικού.



Εικόνα 5: Μοριακές δομές της κυταραβίνης και γεμισταβίνης

Η 2-θειουρακίλη και το 5,5-διαίθυλο ανάλογό της, η θειοβαρβιτάλη είναι αποτελεσματικά φάρμακα κατά του υπερθυρεοειδισμού. Η προπυλοθειουρακίλη χρησιμοποιείται ως φάρμακο για υπερθυρεοειδισμό με ελάχιστες παρενέργειες.



Εικόνα 6: Μοριακές δομές των 2-θειουρακίλη, θειοβαρβιτάλη και προπυλοθειουρακίλη

iv. Αναστολείς κινασών πρωτεϊνών

Ο ετεροκυκλικός δακτύλιος της πυριμιδίνης απαντά σε πληθώρα παραγώγων με ανασταλτική δράση απέναντι σε κινάσες πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν στόχους για την ανάπτυξη αντικαρκινικών παραγόντων καθώς εμπλέκονται στη ρύθμιση διαδικασιών όπως είναι η μίτωση, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, και γενικά η διατήρηση στη ζωή ή ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Πολλές από αυτές τις

ενώσεις αποτελούν εγκεκριμένα φάρμακα ή βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου.

v. Κινάσες τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης, παρόμοια με τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ενδοκυτταρική μετάδοση μηνυμάτων και γι' αυτό είναι πολύ σημαντικές. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινάσων τυροσίνης “πυροδοτείται” κυρίως από σήματα που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Τα εξωκυτταρικά σήματα είναι συνήθως πρωτεϊνικές ορμόνες, οι οποίες αν ασκούν ρυθμιστική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ταξινομούνται ως αυξητικοί παράγοντες. Η σύζευξη ενός εξωκυτταρικού μηνύματος και η επακόλουθη φωσφορυλίωση της τυροσίνης στο εσωτερικό του κυττάρου μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν δύο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων, τους υποδοχείς με εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης και τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς συνδεδεμένους με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης.

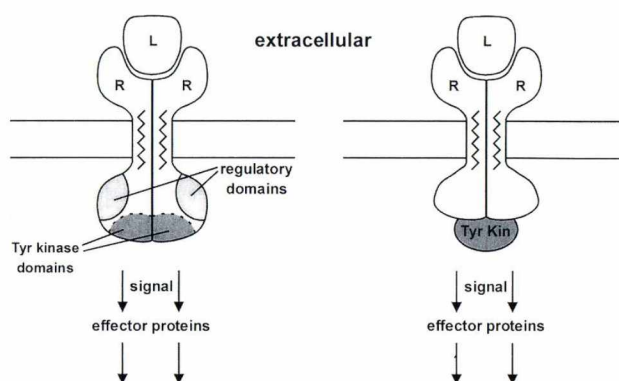
Διακρίνονται 5 κατηγορίες υποδοχέων: 1. EGF-R (επιδερμικού αυξητικού παράγοντα) 2. Υποδοχέα της ινσουλίνης (διμερής) 3. PDGF-R (αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα) 4. FGFR-R (αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών) 5. TRKA (υποδοχέας των νευροτροφινών).

vi. Υποδοχείς κινάσων τυροσίνης

Οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι εμφανίζουν στην εξωκυτταρική τους επιφάνεια θέσεις πρόσδεσης για εξωκυτταρικούς προσδέτες. Όταν αυτοί συνδέονται στον υποδοχέα ενεργοποιούν τη δράση μιας ειδικής κινάσης τυροσίνης που βρίσκεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στον ίδιο τον υποδοχέα αλλά και σε διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Αυτά με τη σειρά τους “πυροδοτούν” τη βιολογική απόκριση του κυττάρου ενεργοποιώντας μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων. Η απόκριση μπορεί να φθάσει μέχρι το επίπεδο του πυρήνα και να ενεργοποιήσει εκεί τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Επίσης μπορεί να επηρεάσει την αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, και τις αντιδράσεις του ενδιάμεσου μεταβολισμού τους, επίσης την κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και μορφογένεση.

vii. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς συνδεδεμένοι με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης

Ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας, είναι συνδεδεμένος στην ενδοκυτταρική του περιοχή με μια κινάση τυροσίνης, η οποία ενεργοποιείται όταν ένας προσδέτης συνδέεται στην εξωκυτταρική του περιοχή. Η διαφορά είναι ότι η κινάση τυροσίνης και ο υποδοχέας δεν αποτελούν τμήματα της ίδιας πρωτεΐνης.



Εικόνα 7: Α: Υποδοχέας κινάσης Tyr, Β: Υποδοχέας συνδεδεμένος με κινάση Tyr

Οι υποδοχείς αυτοί εμφανίζουν στην κυτταροπλασματική τους περιοχή μια κινάση τυροσίνης, η οποία ενεργοποιείται με τη σύνδεση του προσδέτη στην εξωκυτταρική πλευρά του υποδοχέα και παράγει ένα σήμα που ενεργοποιεί άλλες πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins). Οι υποδοχείς της κατηγορίας αυτής μεταφέρουν το σήμα σε μια κινάση τυροσίνης, η οποία δεν αποτελεί εσωτερικό τμήμα του υποδοχέα, αλλά είναι παροδικά ή μόνιμα συνδεδεμένη με την κυτταροπλασματική του περιοχή.

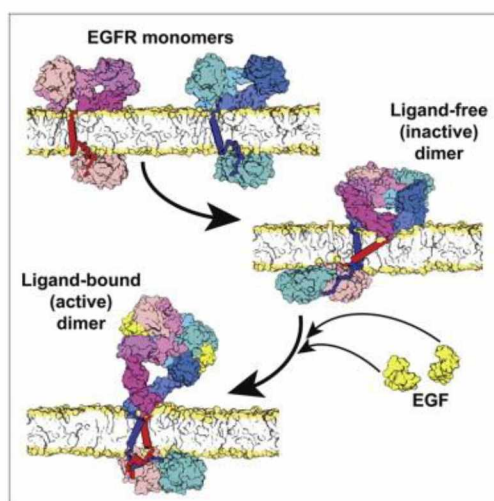
viii. Μονομερείς υποδοχείς

Οι υποδοχείς αυτοί είναι μονομερείς πρωτεΐνες με μια εξωκυτταρική, μια ενδομεμβρανική και μια ενδοκυτταρική περιοχή. Η εξωκυτταρική περιοχή (αμινοτελικό άκρο) περιέχει τη θέση σύνδεσης του αυξητικού παράγοντα, η ενδομεμβρανική περιοχή συγκρατεί τον υποδοχέα στη μεμβράνη και η κυτταροπλασματική περιοχή (καρβοξυτελικό άκρο) περιέχει την κινάση της τυροσίνης. Πέρα από την κοινή δομή που εμφανίζουν οι υποδοχείς αυτής της κατηγορίας, έχουν ορισμένες δομικές ιδιαιτερότητες, οι οποίες τους κατατάσσουν σε

διαφορετικές οικογένειες. Σε αυτή την κατηγορία υποδοχέων κινάσης τυροσίνης εντάσσεται και η οικογένεια του υποδοχέα EGFR.

ix. Υποδοχέας EGFR

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, ErbB-1, HER1 σε ανθρώπους) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που είναι υποδοχέας για εξωκυτταρικές συνδετικές πρωτεΐνες, μέλη της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (οικογένεια EGF).



Εικόνα 8: Δομή υποδοχέα EGFR ως μονομερές, ως αδρανές διμερές και ως δραστικό διμερές

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα είναι μέλος της υποοικογένειας υποδοχέων ErbB που περιλαμβάνει τέσσερις στενά συγγενικούς υποδοχείς κινασών τυροσίνης: EGFR (ErbB-1), HER2 / neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) και Her 4 (ErbB-4). Σε πολλούς τύπους καρκίνου, μεταλλάξεις που επηρεάζουν την έκφραση ή τη δραστικότητα του EGFR θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση.

Η ανεπαρκής σηματοδότηση του EGFR και άλλων υποδοχέων κινάσης τυροσίνης στον άνθρωπο σχετίζεται με ασθένειες όπως το Alzheimer, ενώ η υπερβολική έκφραση σχετίζεται με την ανάπτυξη μιας ευρείας ποικιλίας όγκων. Η διακοπή της σηματοδότησης EGFR, είτε με μπλοκάρισμα των θέσεων σύνδεσης EGFR στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα είτε με αναστολή της δραστικότητας της ενδοκυτταρικής κινάσης τυροσίνης, μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη όγκων που προκαλούνται από EGFR και να βελτιώσει την κατάσταση του ασθενούς.

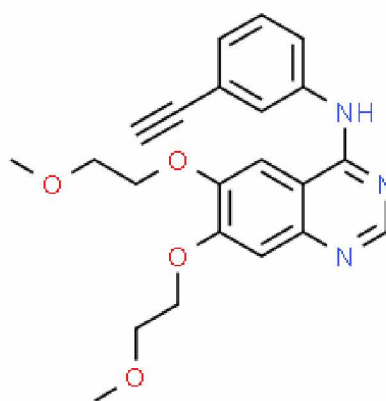
χ. Μηχανισμός δράσης EGFR

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) είναι ένας από τους συνδέτες υψηλής συγγένειας του EGFR. Το σύστημα EGF / EGFR προκαλεί ανάπτυξη, διαφοροποίηση, μετανάστευση, προσκόλληση και επιβίωση κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης διαφόρων οδών σηματοδότησης. Η σύνδεση του EGF στην εξωκυτταρική περιοχή του EGFR προκαλεί τον διμερισμό, την ενεργοποίηση της ενδογενούς δραστηριότητας κινάσης και την επακόλουθη αυτοφωσφορυλίωση του EGFR σε πολλαπλά υπολείμματα Tyr στην κυτταροπλασματική περιοχή. Ο ενεργοποιημένος EGFR προσλαμβάνει διάφορες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που μετατρέπουν και ρυθμίζουν τη λειτουργία του. Από εκεί και μέσω πολλαπλών καταρακτών αντιδράσεων και αλληλεπιδράσεων η επιθυμητή δράση του EGFR φτάνει στο αποτέλεσμα που θα έχει ανάλογα με το μόριο το οποίο έχει συνδεθεί σε αυτόν εξαρχής.

χι. Πρώτη γενιά EGFR αναστολέων

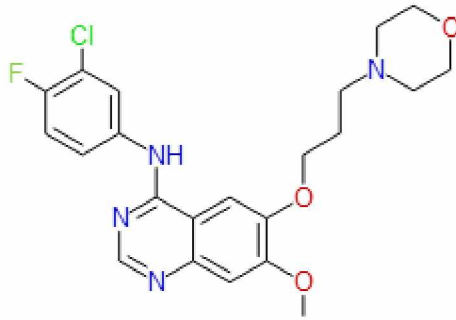
Ο μηχανισμός λειτουργίας των EGFR αναστολέων πρώτης γενιάς είναι να μπλοκάρουν την ενεργοποίηση της σηματοδοτικής διαδικασίας που προκαλείται από τον EGFR μέσω της δέσμευσης τους στις θέσεις σύνδεσης ATP. Μερικοί από αυτούς είναι οι:

- Tarceva® (ερλοτινίμπη)



Ερλοτινίμπη

- Iressa® (γεφινιτίμπη) - έχει εγκριθεί για ασθενείς των οποίων οι όγκοι εκφράζουν τους πιο συνηθισμένους τύπους μεταλλάξεων EGFR στον καρκίνο του πνεύμονα.

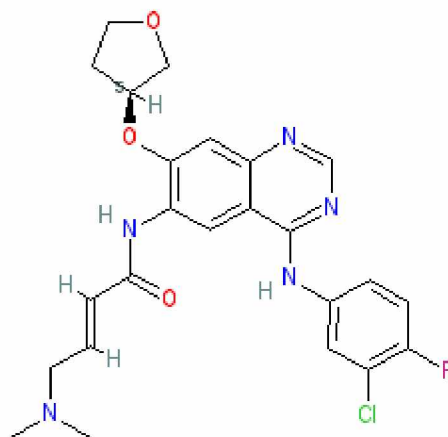


Γεφτινίμνη

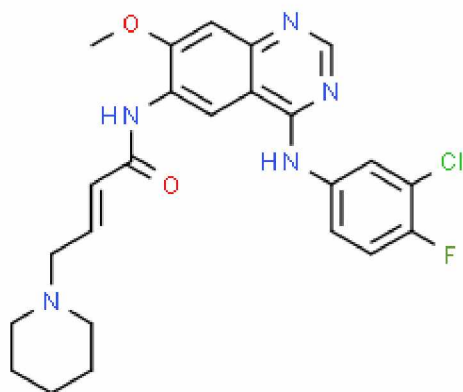
xii. Δεύτερη γενιά EGFR αναστολέων

Η ανάπτυξη EGFR αναστολέων δεύτερης γενιάς ήταν απαραίτητη για να ξεπεραστεί η επίκτητη αντίσταση που προέρχεται από την αποτυχία των EGFR αναστολέων πρώτης γενιάς. Έτσι, οι μηχανισμοί δράσης των EGFR αναστολέων δεύτερης γενιάς δεν είναι ακριβώς παρόμοιοι με αυτών της πρώτης γενιάς και αυτά τα φάρμακα μπορούν να προσφέρουν όφελος όταν τα φάρμακα πρώτης γενιάς δεν λειτουργούν πλέον. Μερικά από αυτά είναι τα:

- Gilotrif (αφατινίμνη)



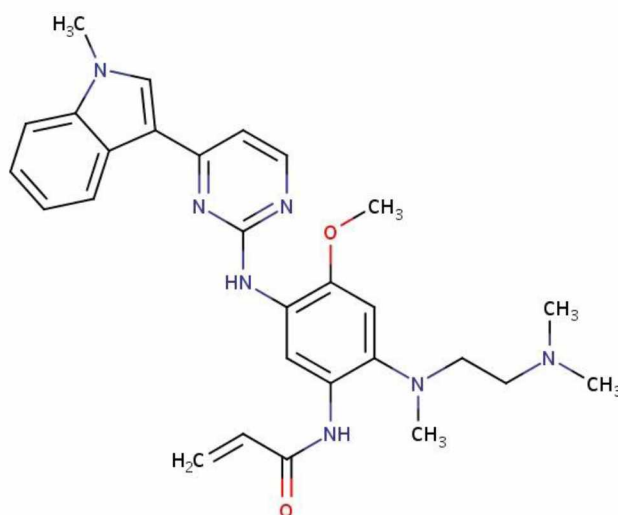
- Vizimpro (δακομτινίμπη)



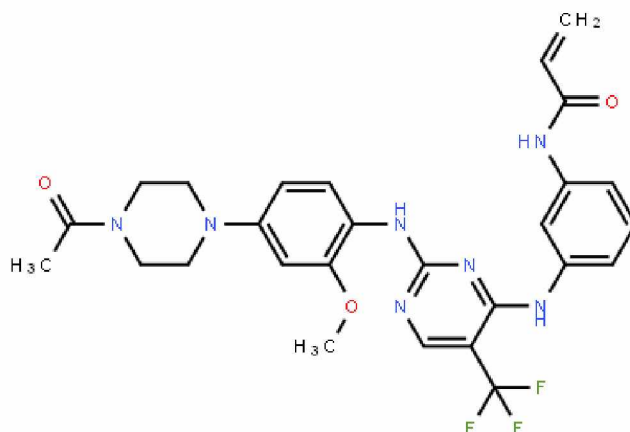
xiii. Τρίτη γενιά EGFR αναστολέων

Οι περισσότεροι ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με αναστολείς 1ης ή 2ης γενιάς τελικά θα παρουσιάσουν αντίσταση στη θεραπεία. Η τρίτη γενιά αναστολέων προσφέρει νέες ελπίδες για ασθενείς με προοδευτικό καρκίνο του πνεύμονα. Μερικοί από τους αναστολείς τρίτης γενιάς είναι οι:

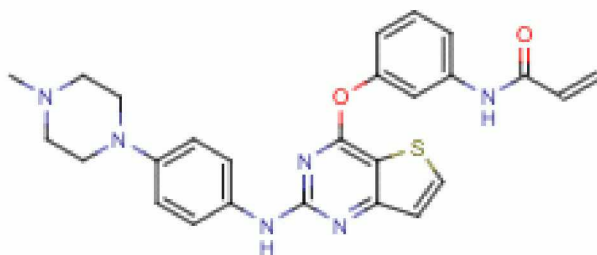
- Tagrisso (οσιμερτινίμπη)



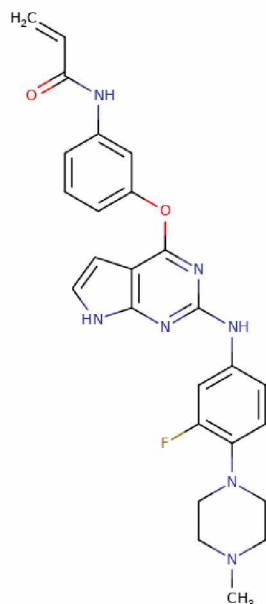
- CO1686 (ροσιτελινίμμη)



- HM61713 (ολμουτινίμμη)

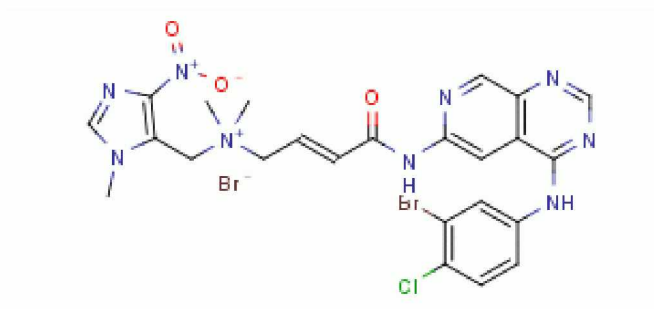


- AC0010 (αβτινίμμη)

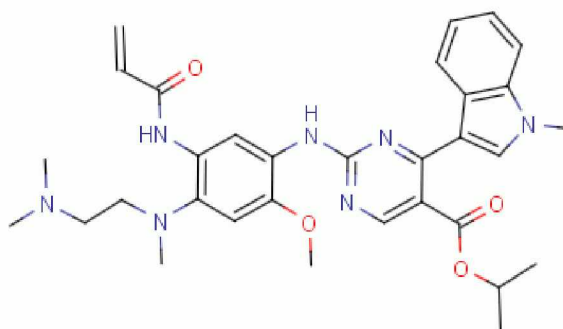


xiv. Αναστολείς EGFR σε ανάπτυξη

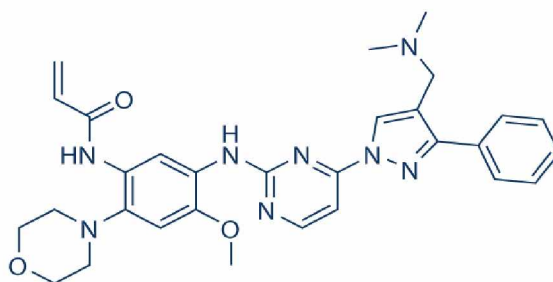
- Tarlox (ταρλοξοτινίμπη), για μεταλλάξεις εισαγωγής ή διπλασιασμού νουκλεοτιδίων του εξονίου 20 του EGFR, μίας από τις πιο συχνές μεταλλάξεις που οδηγούν σε καρκίνο. Οι μεταλλάξεις του εξονίου 20 σχετίζονται με την πρωτογενή αντίσταση σε αναστολείς.



- Το Mobocertinib (TAK-788) είναι ένας αναστολέας τρίτης γενιάς των μεταλλάξεων εισαγωγής νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 20 του EGFR που σχεδιάστηκε ειδικά για να στοχεύει τη μετάλλαξη αυτή.



- Το Lazertinib (YH25448) είναι μία ένωση μονοανιλίνο-πυριμιδίνης δομικά παρόμοια με το osimertinib. Συνδέεται μη αντιστρεπτά με την EGFR κινάση στοχεύοντας το υπόλειμμα κυστεΐνης-797 στη θέση σύνδεσης ATP, μέσω σχηματισμού ομοιοπολικού δεσμού. Ευρήματα δείχνουν ότι το YH25448 είναι ένας πολλά υποσχόμενος αναστολέας EGFR τρίτης γενιάς, ο οποίος μπορεί να είναι πιο αποτελεσματικός και πιο ανεκτός, από την άποψη παρενεργειών, από το τρέχον εγκεκριμένο osimertinib.



xv. Υποδοχέας ALK

Η κινάση αναπλαστικού λεμφώματος (ALK), ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης της οικογένειας υποδοχέων ινσουλίνης. Οι μετατοπίσεις συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδίου ALK μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση ογκογονικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Ο σχηματισμός πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων ALK έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και τη απορρύθμιση της έκφρασης και σηματοδότησης του γονιδίου, τα οποία μπορούν να συμβάλουν στην αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καταλήγοντας στη δημιουργία όγκων που εκφράζουν αυτές τις πρωτεΐνες.

Η ALK ταυτοποιήθηκε αρχικά ως μέρος της ένωσης των πρωτεϊνών NPM – ALK που προέκυψε από μια αμοιβαία μετατόπιση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 2 και 5, σε αναπλαστικά λεμφώματα των μεγαλοκυττάρων (ALCL). Η ένωση NPM – ALK έχει ανιχνευθεί σε περίπου 75% των ασθενών με ALK + ALCL και η συστηματική ενεργοποίησή του οδηγεί στην παθογένεση της νόσου.

Η σημασία του ALK ως έγκυρου στόχου στην αντικαρκινική θεραπεία δεν είχε αναγνωριστεί πλήρως έως το 2007, όταν η σύνδεση της πρωτεΐνης EML4 με τον ALK εντοπίστηκε στο 5% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα. Δεδομένου του μεγάλου πληθυσμού ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, οι νέες ALK+ περιπτώσεις εκτιμάται ότι υπερβαίνουν τα 8.000 ετησίως στις ΗΠΑ, αντιπροσωπεύοντας μια σημαντική ανεκπλήρωτη ιατρική ανάγκη. Ενδιαφέρον είναι ότι οι ασθενείς που φέρουν το γονίδιο EML4-ALK σπάνια αλληλεπικαλύπτονται με αυτούς που φέρουν μεταλλάξεις του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) ή στην GTPάση KRAS, καθιστώντας το EML4 – ALK ξεχωριστό μοριακό στόχο για ένα υποσύνολο ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Πιο πρόσφατα, έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις ενίσχυσης ή ενεργοποίησης του γονιδίου ALK στο νευροβλάστωμα, στον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδούς και στον καρκίνο των ωθηκών.

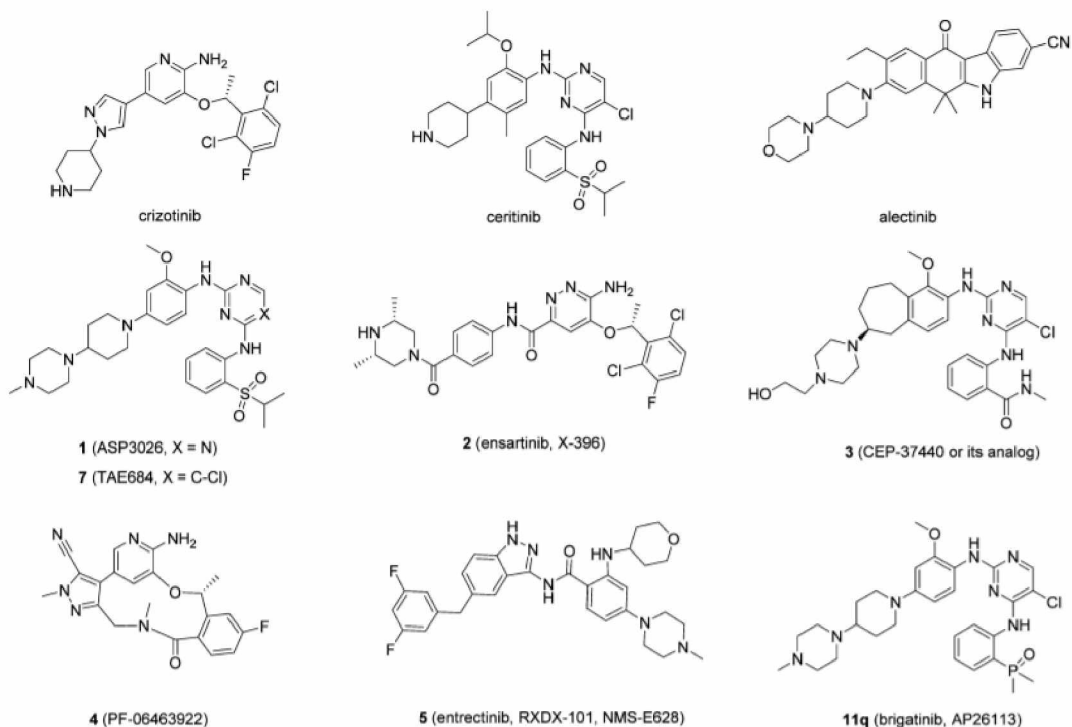
xvi. Αναστολείς ALK πρώτης γενιάς

Ο αναστολέας πρώτης γενιάς crizotinib εγκρίθηκε για κλινική χρήση το 2011 και έχει δείξει σαφές κλινικό όφελος, με αποκρίσεις που παρατηρήθηκαν στο 60–74% των ασθενών με ALK+ καρκίνου του πνεύμονα. Παρά την πρώιμη αποτελεσματικότητα της θεραπείας με crizotinib, η πλειονότητα των ασθενών εμφανίζει υποτροπιασμό της νόσου εντός ενός έτους μετά τη θεραπεία. Έχουν αναγνωριστεί διάφοροι μηχανισμοί ανθεκτικότητας στη θεραπεία, όπως ενίσχυση του γονιδίου σύντηξης ALK, ενεργοποίηση παράκαμψης των οδών σηματοδότησης, ανεπαρκής έκφραση στο κεντρικό νευρικό σύστημα και, όπως παρατηρήθηκε και με άλλες στοχευμένες

θεραπείες, εμφάνιση δευτερογενών μεταλλάξεων στο τμήμα της κινάσης ALK. Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών με ανθεκτικότητα στο crizotinib αναπτύσσουν δευτερογενείς μεταλλάξεις και το 40% των ασθενών με θετική ALK δεν έχουν αντικειμενική ανταπόκριση κατά τη θεραπεία με crizotinib.

xvii. Αναστολείς ALK δεύτερης γενιάς

Πρόσφατα, πολλοί και πιο ισχυροί αναστολείς ALK δεύτερης γενιάς, όπως το ceritinib και το alectinib, έχουν αναγνωρισθεί για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στους αναστολείς πρώτης γενιάς. Αν και αυτοί οι αναστολείς δεύτερης γενιάς έχουν δείξει αποτελεσματικότητα έναντι της πλειονότητας των ανθεκτικών σε crizotinib μεταλλαγμάτων, παραμένουν αδρανείς έναντι αρκετών μεταλλάξεων, συμπεριλαμβανομένων των I1171N/T/S για το alectinib, F1174C/V για το ceritinib και G1202R και για τους δύο παράγοντες. Επομένως, είναι ιδιαίτερα επιθυμητή η ανάπτυξη αναστολέων ALK επόμενης γενιάς, ικανών να αναστέλλουν ισχυρά όλα τα επίκτητα μεταλλάγματα ALK. Η συνεχιζόμενη αναζήτηση έχει καταλήξει σε αρκετές ενώσεις σε κλινικές δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων των 1) ASP3026, 2) CEP37440, 3) TSR-011, 4) λορλατινίμη (PF06463922), 5) entrectinib (RXDX-101) και 6) brigatinib. Επιπλέον, ένας αριθμός αναστολέων ALK που προέρχονται από μια ποικιλία διαφοροποιημένων χημικών τάξεων έχουν αξιολογηθεί σε προκλινικά στάδια.



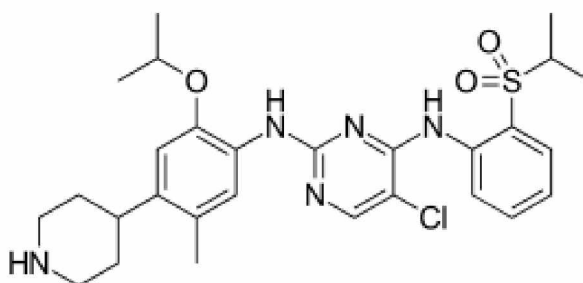
Εικόνα 9: Δομές αναστολέων ALK

xviii. Αναστολείς της ALK με δομή πυριμιδίνης

Από τους προαναφερθέντες αναστολείς της ALK εμπεριέχουν το δακτύλιο της πυριμιδίνης οι α) Ceritinib, β) Brigatinib, και γ) CEP-37440.

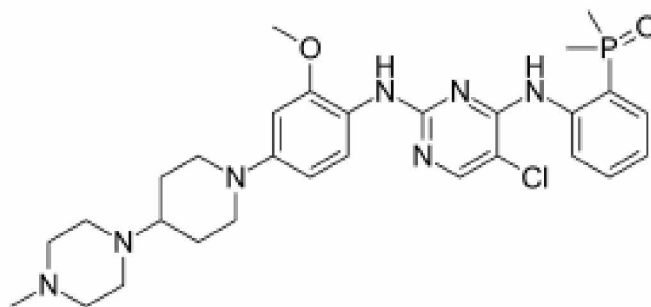
- Ceritinib (εμπορική ονομασία Zycadia).

Το Ceritinib είναι μέλος της τάξης των αμινοπυριμιδινών που ανήκει η 2,6-διαμινο-5-χλωροπυριμιδίνη στην οποία οι αμινομάδες στις θέσεις 2 και 6 φέρουν αντίστοιχα 2-μεθοξυ-4-(πιπεριδιν-4-υλ)-5-μεθυλφαινυλο και 2-(ισοπροπυλοσουλφονυλ)φαινυλο υποκαταστάτες. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του πνεύμονα ο οποίος οφείλεται σε μετάλλαξη στον υποδοχέα ALK. Έχει ρόλο ως αντινεοπλασματικός παράγοντας και αναστολέας.



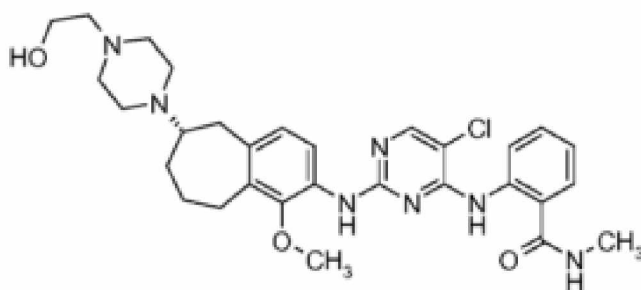
- Brigatinib (εμπορική ονομασία Alunbrig).

Το brigatinib, που αρχικά ονομάστηκε AP26113, είναι ένας αναστρέψιμος διπλός αναστολέας της αναπλαστικής κινάσης λεμφώματος (ALK) και του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Παρουσιάζει επιλεκτικότητα έναντι των μεταλλαγμένων μορφών του EGFR σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Εν συντομία, η δομή δείχνει ότι το brigatinib συνδέεται με το ALK στη θέση σύνδεσης ATP υιοθετώντας μια διαμόρφωση προσδέματος σχήματος U. Ενώ ο πυρήνας πυριμιδίνης της brigatinib συνδέεται στη θέση αδενοσίνης, η ομάδα μεθοξυλίου και η ανιλίνη DMPO συνδέονται κοντά στις θέσεις άρθρωσης και DFG, αντίστοιχα.



- CEP-37440.

Το CEP-37440 είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστής ATP, ιδιαίτερα επιλεκτικός και δραστικός αναστολέας της κινάσης FAK1 και της αναπλαστικής κινάσης λεμφώματος (ALK). Εκτός από μια ευνοϊκή μεταβολική σταθερότητα και φαρμακοκινητικό προφίλ προκλινικά, το CEP-37440 είναι επίσης ένα μόριο το οποίο μπορεί και διαπερνά τον εγκεφαλικό φραγμό. Μελέτες που χρησιμοποιούν μοντέλα ξενομοσχεύματος IBC έδειξαν ότι το CEP-37440 μειώνει επίσης αποτελεσματικά την ανάπτυξη των πρωτογενών ξενομοσχευμάτων όγκου και αναστέλλει την ανάπτυξη εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ποντίκια.

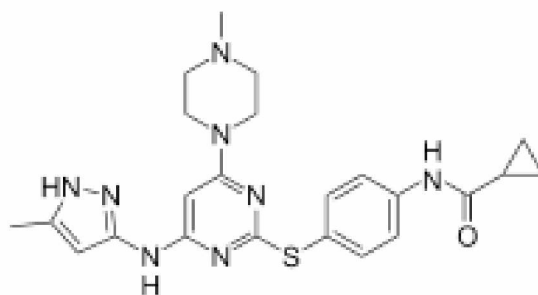


xix. Αναστολείς Aurora κινασών

Οι Aurora κινάσες ανήκουν στην ομάδα των κινασών σερίνης/θρεονίνης και διαδραματίζουν διάφορους ρόλους στη μίτωση και την κυτταρική διαίρεση. Τρεις τύποι Aurora κινασών έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα, οι A, B, και C. Η Aurora A είναι απαραίτητη για την ωρίμανση και τον διαχωρισμό των κεντροσωματίων κατά το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Η Aurora B συμμετέχει στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων κατά την πρόφαση αλλά και στον ορθό προσανατολισμό και τη σύνδεσή των αδελφών χρωματίδων στον κινητοχώρο κατά τη μετάφαση. Τέλος ο ρόλος της Aurora C δεν είναι πλήρως κατανοητός. Η σημασία των Aurora κινασών τους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων τις καθιστά ελκυστικούς στόχους για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων και μεγάλος αριθμός αναστολέων τους έχουν ανακαλυφθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες.

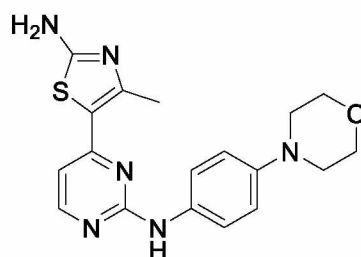
Μεταξύ των παραγώγων πυριμιδίνης που έχουν αναπτυχθεί ως αναστολείς Aurora κινασών το Tozasertib (VX-680) εισήλθε σε κλινικές δοκιμές για την αντιμετώπιση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) και της θετικής στο χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (ALL). Το Tozasertib εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι των τ Aurora κινασών A, B, και C, με τιμές K_i 0.6, 18, και 5 nM αντίστοιχα, δηλαδή παρουσιάζει μικρή εκλεκτικότητα απέναντι στην Aurora A. Αναστέλλει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διάφορες καρκινικές

σειρές και την *in vivo* ανάπτυξη καρκινικών όγκων λευχαιμίας, παχέος εντέρου και παγκρέατος.



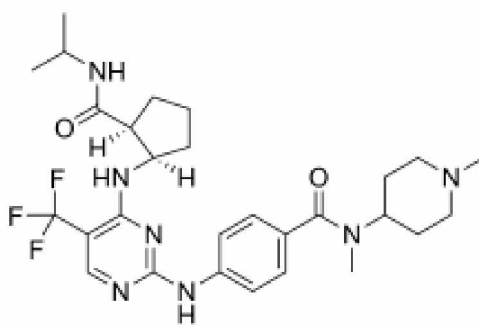
Tozasertib (VX-680)

Το CYC116 είναι παράγωγο 2-αμινοπυριμιδίνης, υποκατεστημένο με θειαζόλιο στη θέση 4, με ανασταλτική δράση απέναντι στις κινάσες Aurora A και B, με τιμές K_i 8 και 9.2 nM αντίστοιχα. Επιπλέον επέδειξε αντιπολλαπλασιαστική δράση απέναντι σε ευρύ φάσμα καρκινικών κυτταρικών σειρών και αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών όγκων σε ζωικά μοντέλα. Εισήλθε σε αρχικές κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία συμπαγών όγκων, χωρίς να έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα επιπλέον μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του.



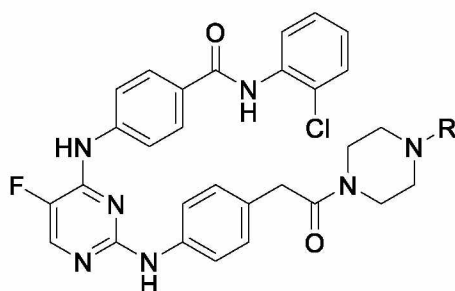
CYC116

Το BI811283 είναι ένα παράγωγο 2,4-διαμινοπυριμιδίνης υποκατεστημένο με τριφθορομέθυλο ομάδα στη θέση 5 που ανακαλύφθηκε από την Boehringer Ingelheim. Είναι ανταγωνιστικός του ATP αναστολέας της Aurora B με IC_{50} 9 nM, όμως ενδεχόμενη ανασταλτική δράση του έναντι της Aurora A δεν έχει αναφερθεί. Χρησιμοποιήθηκε σε κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους, αλλά και σε συνδυασμό με κυταραβίνη σε ασθενείς με οξεία μυελοειδή λευχαιμία, χωρίς να έχει λάβει μέχρι σήμερα έγκριση για φαρμακευτική χρήση.



BI 811283

Οι Aliagas-Martin et al ανακάλυψαν μια σειρά 2,4-διανίλινο παραγώγων της 5-φθοροπυριμιδίνης με ανασταλτική δράση έναντι της Aurora A και αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα σε σχέση με την Aurora B. Οι πλέον δραστικές ενώσεις 9 και 10 ανέστειλαν τη δράση κινάσης της Aurora A, με τιμές IC₅₀ 4.3 και 3.4 nM αντίστοιχα, ενώ ήταν 860 και 1000 φορές λιγότερο δραστικές απέναντι στην Aurora B. Αν και εμφάνισαν μέτρια αντιπολλαπλασιαστική δράση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, η μελέτη των συγκεκριμένων παραγώγων παρέχει πληροφορίες για την ανάπτυξη αναστολέων εκλεκτικών για την Aurora A.

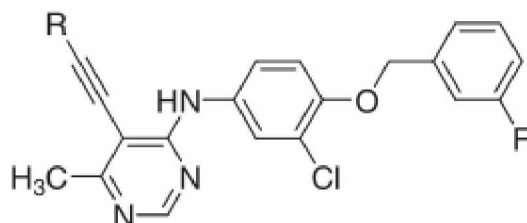


9 (R = COMe), 10 (R = Et)

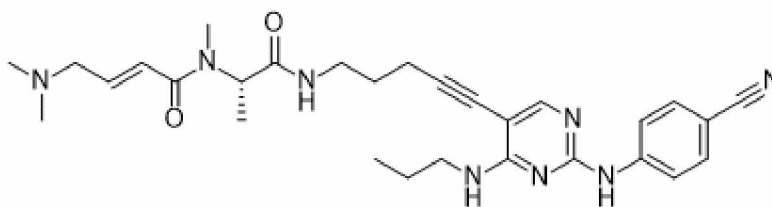
xx. Αλκινυλο-πυριμιδίνες ως αναστολείς κινασών

Οι Suzuki et al ανέφεραν μια σειρά παραγώγων 4-ανίλινο-πυριμιδίνης υποκατεστημένων με αλκινυλο-ομάδες στη θέση 5, τα οποία εμφάνισαν διπλή ανασταλτική δράση απέναντι στον EGFR και τον HER-2. Συνοπτικά, περιέγραψαν μια μελέτη SAR για ανάλογα 5-αλκινυλίου, 5-αλκινυλοπυριμιδίνης η οποία οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός ισχυρού διπλού αναστολέα EGFR / Her-2. Η βασική τροποποίηση ήταν η εισαγωγή ενός τμήματος πυρρολιδίνης ως το τελικό υδρόφιλο ομάδα και μετα-φθόρο υποκατάσταση στον τελικό φαίνυλο δακτύλιο. Η ενσωμάτωση ενός μετα-φθόρο υποκαταστάτη στον δακτύλιο φαίνυλίου στο τμήμα R της παρακάτω ένωσης διαπιστώθηκε ότι επιφέρει αύξηση της δραστικότητας μέσω της αξιολόγησης σε κυτταρικές σειρές BT474 και N87. Ήταν εξαιρετικά επιλεκτική για

την οικογένεια HER, και παρουσίασε σημαντική *in vivo* δραστικότητα κατά των όγκων. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα αυτής της ένωσης υπογραμμίζουν τις δυνατότητες αυτής της σειράς να παρέχουν νέους ισχυρούς αντικαρκινικούς παράγοντες.



Το FF-10101 είναι ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας της κινάσης FLT3. Το FF-10101 επιδεικνύει ομοιοπολική και επιλεκτική σύνδεση με την FLT3. Ο μοναδικός τρόπος σύνδεσης του FF-10101, που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού με το υπόλειμμα κυστεΐνης στη θέση 695 (C695) διατηρώντας παράλληλα την ικανότητα δέσμευσης στην ενεργή ή ανενεργή διαμόρφωση του FLT3, έχει ισχύ έναντι του FLT3-ITD όπως επίσης και της μετάλλαξης FLT3-TKD, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών σε κουιζαρτινίμη μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν σε κλινικές μελέτες. Επιπλέον, το FF-10101 δείχνει ισχυρά ανασταλτικά αποτελέσματα ανάπτυξης σε πρωτογενή κύτταρα AML με μεταλλάξεις FLT3 τόσο σε μοντέλα *in vitro* όσο και σε ποντίκια ξενομοσχευμένα με πρωτογενή κύτταρα AML.

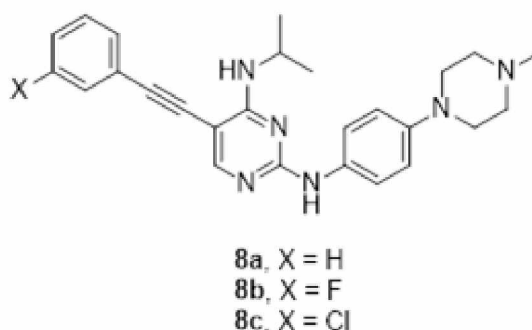


FF-10101

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, ποικιλία αναλόγων πυριμιδίνης που μπορούν να δράσουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ή χρησιμοποιούνται ήδη στη θεραπεία διαφόρων νεοπλαστικών ασθενειών. Λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που υποδεικνύουν ότι ανάλογα πυριμιδίνης, όπως οι 2,4-διαμινοπυριμιδίνες, εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι μίας πληθώρας καρκινικών στόχων, στόχος της παρούσης εργασίας αποτελεί η σύνθεση νέων ενώσεων αυτού του τύπου, ως εν δυνάμει αντικαρκινικά φάρμακα.

Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας προσπάθειες φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εκτός από το ευρέως χρησιμοποιούμενο μοτίβο της 2,4-διαμινοπυριμιδίνης τα νέα παράγωγα θα φέρουν αλκύνυλο υποκαταστάτη στη θέση 5 του πυριμιδινικού δακτυλίου. Ενώσεις αυτού του τύπου είναι σπανιότερες στη βιβλιογραφία, με πιο εξέχων παράδειγμα τον αναστολέα FF-10101 της κινάσης FLT3 που αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Η πιστοποίηση της δομής των νέων ενώσεων θα πραγματοποιηθεί με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR) και άνθρακα-13 (^{13}C NMR).

Μελλοντική επέκταση της παρούσας εργασίας θα αποτελέσει η διερεύνηση των πιθανών κυταροστατικών ιδιοτήτων των νέων ενώσεων έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

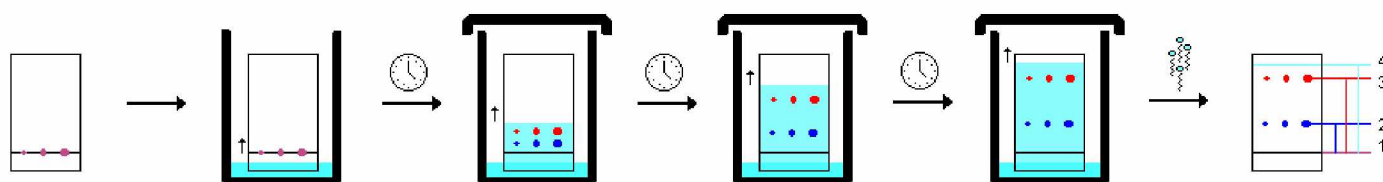
i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60 F254) πάχους 0,2 mm.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ανήκει στην γενικότερη κατηγορία υγρής χρωματογραφίας και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ενώσεων με παραπλήσια δομή. Για τον διαχωρισμό πολικών μορίων η ακίνητη φάση είναι η silica gel (διοξείδιο του πυριτίου) η οποία επιστρώνεται πάνω σε γυαλί ή φύλλο πλαστικού ή αλουμινίου (υλικό επίστρωσης). Η κινητή φάση (διαλύτης ανάπτυξης) συνήθως είναι κάποιος οργανικός διαλύτης ή μείγμα οργανικών διαλυτών.

Ο διαχωρισμός των ενώσεων οφείλεται στην διαφορετική ταχύτητα κίνησής τους διαμέσου της ακίνητης φάσης (πλακίδιο). Καθώς ο διαλύτης κινείται λόγω τριχοειδών φαινομένων πάνω στο πλακίδιο, οι ενώσεις συμπαρασύρονται με διαφορετική ταχύτητα. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις οι οποίες συγκρατούνται ισχυρότερα από την ακίνητη φάση, κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, οι ενώσεις οι οποίες συγκρατούνται ασθενέστερα από την ακίνητη φάση, κινούνται ταχύτερα.

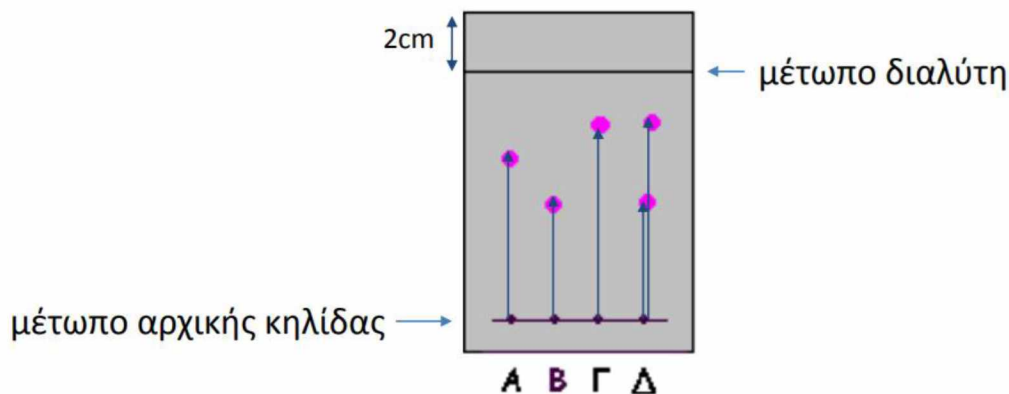
Με τριχοειδές σωληνάκι τοποθετούνται τα δείγματα, διαλυμένα σε κατάλληλο διαλύτη, πάνω στο πλακίδιο, υπό μορφή κηλίδας διαμέτρου μικρότερης των 5 mm. Μόλις ξηρανθούν οι κηλίδες, η πλάκα τοποθετείται με προσοχή στον θάλαμο ανάπτυξης, όπου υπάρχει το υγρό ανάπτυξης (κινητή φάση). Το υγρό ανάπτυξης δεν πρέπει να διαβρέχει την θέση που τοποθετήθηκε η κηλίδα του δείγματος. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H₂SO₄ (θειικού οξέος) 30%.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση ανάπτυξης ενός TLC σε σύστημα διαλυτών

Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f, που ορίζεται από τον λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από

τον διαλύτη (α). Η τιμή Rf ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μια άγνωστης ουσίας.



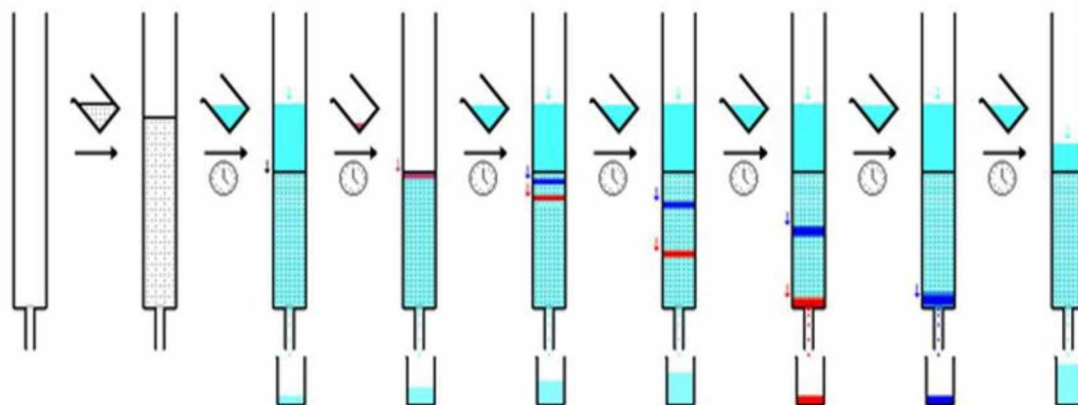
Εικόνα 11: Υπολογισμός Rf: Απόσταση που διανύθηκε από την ένωση προς την απόσταση που διανύθηκε από τον διαλύτη.

ii. Χρωματογραφία στήλης

Χρωματογραφία στήλης είναι η διαδικασία εκείνη βάσει της οποίας επιτυγχάνεται διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος με κατανομή τους μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής. Στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του μίγματος σε ένα σύστημα κινητής και ακίνητης φάσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι άλλα συστατικά να κατακρατούνται για περισσότερο και άλλα για λιγότερο χρόνο. Στην χρωματογραφία στήλης τα μόρια διαλυτής ουσίας συμμετέχουν σε συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση (κυρίως με το φαινόμενο της προσρόφησης – adsorption). Προσδένονται στη στατική φάση με ιοντικούς δεσμούς, δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography ή LC) βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή, με μοναδικό περιορισμό τη δυνατότητα διαλυτοποίησης των αναλυόμενων ουσιών στην κινητή φάση. Μη πτητικές και θερμοευαίσθητες ενώσεις διαχωρίζονται αποκλειστικά με υγρή χρωματογραφία.

Στη υγρή χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από γυαλί ή πλαστικό. Το δείγμα το τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση (διαλύτης ή buffer) ρέει μέσω της στατικής



Εικόνα 12: Αναπαράσταση καθαρισμού ενώσεων σε στήλη χρωματογραφίας σε συνάρτηση με το χρόνο.

φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από τη συγγένεια των συστατικών ως προς τη στατική φάση. Τα κλάσματα συλλέγονται και για κάθε κλάσμα πιστοποιείται η παρουσία ή μη κάποιας ουσίας με παρατήρηση κηλίδας του σε πλακίδιο TLC κάτω από λαμπτήρα UV.

iii. Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, τολουόλιο και μεθανόλη.

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου και του τολουολίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε. Η ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακό κόσκινα 3\AA (molecular sieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μια ημέρα.

Με τον όρο ξήρανση επίσης εννοούμε και την απομάκρυνση μικροποσοτήτων ύδατος από υγρές οργανικές ουσίες και από διαλύματα σε οργανικούς διαλύτες με τη χρήση ξηραντικών μέσων. Τα ξηραντικά είναι συνήθως ανόργανα άλατα που συγκρατούν το νερό σαν κρυσταλλικό ύδωρ. Η ξήρανση γίνεται με προσθήκη μικρής ποσότητας ξηραντικού στο διάλυμα ή στην ουσία που θέλουμε να ξηράνουμε, ανακίνηση της φιάλης και παραμονή για μερικά λεπτά. Μετά την ξήρανση το ξηραντικό

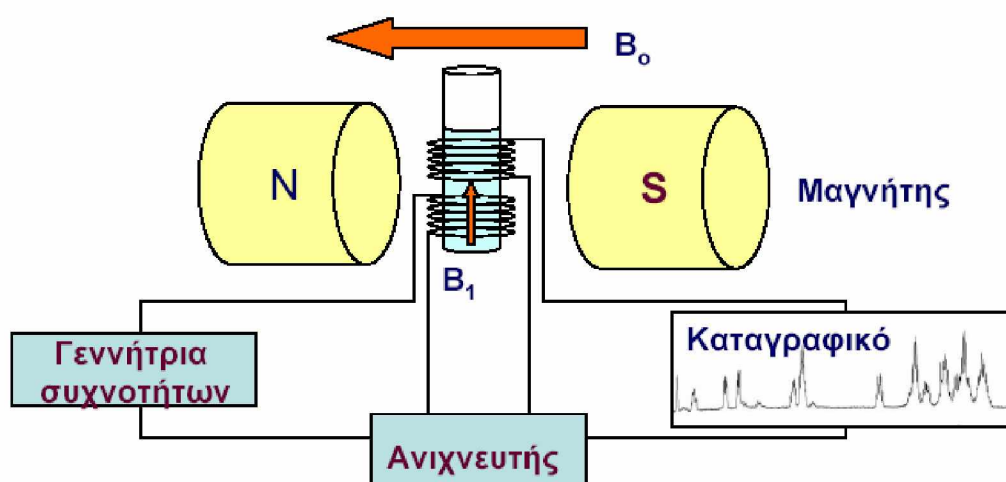
απομακρύνεται με διήθηση. Ένα καλό ξηραντικό πρέπει να μην αντιδρά με την ουσία που θα ξηράνει, να ξηραίνει γρήγορα και σχεδόν ποσοτικά, να μην διαλύεται πολύ στο νερό, και τέλος να μην είναι ακριβό. Τα ξηραντικά χαρακτηρίζονται από την χωρητικότητα τους σε νερό, από την ταχύτητα κατακρατήσεως του νερού, αλλά και από την ένταση ξήρανσης. Τα σπουδαιότερα ξηραντικά που χρησιμοποιούνται είναι το άνυδρο CaCl_2 , και το άνυδρο Na_2SO_4 .

iv. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι οργανικοί χημικοί. Αυτό συμβαίνει γιατί παρέχει τον χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα του σε ένα οργανικό μόριο.

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μία από τις πολλές εκδηλώσεις του φαινομένου που σχετίζεται με την επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό τα ενεργειακά επίπεδα σχετίζονται με τους διαφορετικούς προσανατολισμούς της πυρηνικής μαγνητικής ροπής του ατόμου σε ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.

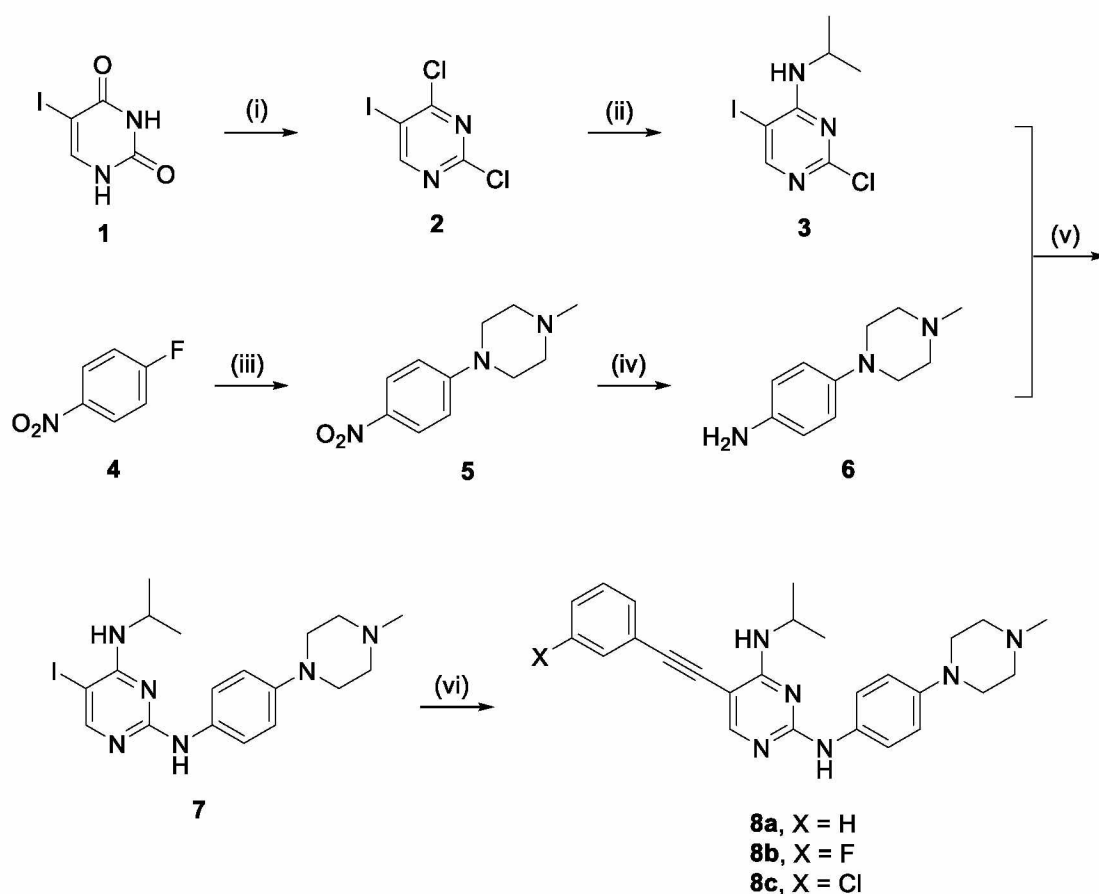
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που παρασκευάστηκαν έγινε με τη βοήθεια των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVANCE III 300, χρησιμοποιώντας ως διαλύτες δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) ή διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d_6).



Εικόνα 13: Σχηματική διάταξη ενός οργάνου NMR

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

i. Επισκόπηση συνθετικής πορείας



(i) POCl_3 , $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, 105°C , (ii) $i\text{-PrNH}_2$, $i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, CH_2Cl_2 , 0°C to rt, (iii) 1-methylpiperazine, K_2CO_3 , DMF, $75\text{-}80^\circ\text{C}$, (iv) In , NH_4Cl , MeOH, H_2O , reflux, (v) $p\text{-TsOH}$, $i\text{-PrOH}$, $80\text{-}85^\circ\text{C}$, (vi) alkyne, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI , Et_3N , DMF, 50°C .

ii. Μεθοδολογία Σύνθεσης

Στο πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας η εμπορικά διαθέσιμη 5-ιωδο-ουρακίλη (1) μετατράπηκε στη 2,4-διχλωρο-5-ιωδοπυριμιδίνη (2) με την επίδραση μεγάλης περίσσειας οξυχλωριδίου φωσφόρου (POCl_3) παρουσία N,N -δισοπροπυλαιθυλαμίνης ($i\text{-Pr}_2\text{NEt}$). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με θέρμανση στους 105°C , με το οξυχλωρίδιο φωσφόρου να επιτελεί το ρόλο του χλωριωτικού μέσου αλλά και του διαλύτη.

Στη συνέχεια, κατά την αντίδραση (ii) το παράγωγο της αντίδρασης (i) μετατράπηκε σε N4-ισοπροπυλ-5-ιωδοπυριμιδίν-4-αμίνη (3) με υποκατάσταση του χλωρίου της θέσης 4 του προϊόντος (2). Η αντίδραση έγινε με ισοπροπυλαμίνη (i-PrNH₂), παρουσία της τριτοταγούς αμίνης N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (i-Pr₂Net) και του διχλωρομεθανίου ως διαλύτη. Με σκοπό να αποτραπεί η υποκατάσταση του χλωρίου στη θέση 2, η αντίδραση αρχικά ψύχθηκε.

Στην αντίδραση (iii) πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της N4-ισοπροπυλ-5-ιωδο-N2-(3-χλωροφαινυλ)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (4), μέσω πυρηνόφιλης υποκατάστασης του χλωρίου της ένωσης (3) με την 3-χλωροανιλίνη, παρουσία ισοπροπανόλης ως διαλύτη και του τολουολοσουλφονικού οξέος ως καταλύτη. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις Sonogashira με πρώτη ύλη την ένωση (4) και τα εξής τρία αλκίνια: φαινυλακετυλένιο, 3-φθορο-φαινυλακετυλένιο, και 3-χλωροφαινυλακετυλένιο, οδηγώντας στην σύνθεση των παραγώγων :

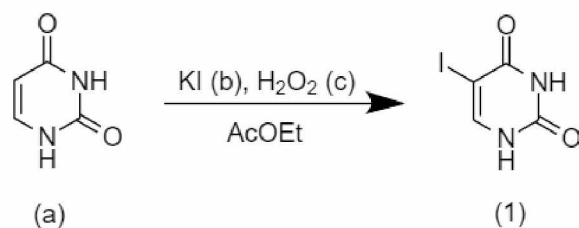
(a) N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-(φαινυλαιθυνυλο)-πυριμιδιν-2,4-διαμίνη (**8a**),

(b) N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-((3-φθοροφαινυλ)-αιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνη (**8b**),

(c) N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-((3-χλωροφαινυλ)-αιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνη (**8c**).

Τα μόρια 8a, 8b και 8c είναι αποτέλεσμα σύζευξης του μορίου 7 με τις ενώσεις a, b και c, αντίστοιχα. Αυτή η σύζευξη επιτυγχάθηκε με θέρμανση σε θερμομαντική πλάκα ή στα μικροκύματα μέχρι και μία μέρα και σε θερμοκρασίες από 50°C έως και 60°C. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν και άλλα αλκίνια, εκτός των a, b και c, χωρίς όμως να έχουμε την επιθυμητή απόδοση αλλά και καθαρότητα της τελικής ένωσης.

iii. Σύνθεση της 5-ιωδο-ουρακίλης (1)

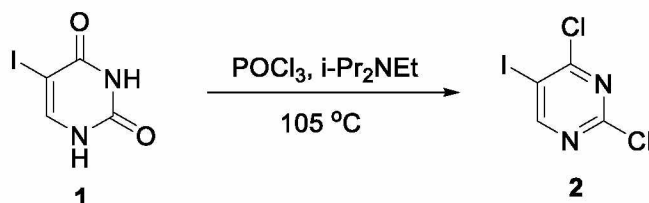


Σε σφαιρική φιάλη των 25ml ή 50ml προστίθενται τα α ($m=1,12g$, $n=10mmol$) και β ($m=1,83g$, $n=11mmol$, 1,1eq) μαζί με τον διαλύτη (οξικό οξύ, AcOH, 10ml) και το μείγμα αναδεύεται για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετείται σε λουτρό νερού-πάγου για να ψυχθεί σε θερμοκρασία $\sim 5-10^{\circ}C$. Κατόπιν, προστίθεται στάγδην το γ (30% w/w, $V= 2,25ml$), οπότε και το μείγμα παίρνει ένα καφέ-κόκκινο χρώμα. Επειδή η αντίδραση είναι εξώθερμη, το μείγμα ψύχεται συνεχώς σε παγόλουτρο. Με το πέρας της προσθήκης το παγόλουτρο αφαιρείται και το μείγμα συνεχίζει να αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Ο έλεγχος για την πορεία της αντίδρασης γίνεται με TLC σε σύστημα διαλυτών 93:7 CH₂Cl₂:MeOH. Η αντίδραση μετά από έλεγχο με TLC φάνηκε πως είναι αργή οπότε και αφέθηκε για μία μέρα ώστε να ολοκληρωθεί εντελώς. Με τη λήξη της αντίδρασης το μείγμα ψύχεται στους 0°C και προστίθεται διάλυμα θειοθειικού νατρίου (Na₂S₂O₃) σε νερό μέχρι να εξαφανιστεί το χρώμα του ιωδίου. Το μείγμα αφήνεται στους 0°C για 15-30 λεπτά και αν εμφανιστεί εκ νέου το χρώμα τότε προστίθεται επιπλέον διάλυμα Na₂S₂O₃. Το λευκό μείγμα ψύχεται για λίγη ώρα στους 0°C, διηθείται υπό κενό και το λευκό στερεό ξεπλένεται διαδοχικά με διάλυμα Na₂S₂O₃ 10% σε 0°C και νερό και αφήνεται να ξηραθεί σε ρεύμα αέρα.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά της ένωσης (1)

Μοριακό βάρος (M_r)	237.98
Σταθερά επιβράδυνσης (R_f)	0.31 (DCM-MeOH 94:6)
Σημείο τήξεως (T_m)	270-272 °C
Απόδοση	90%

iv. Σύνθεση της 2,4-διχλωρο-5-ιωδοπυριμιδίνης (2)

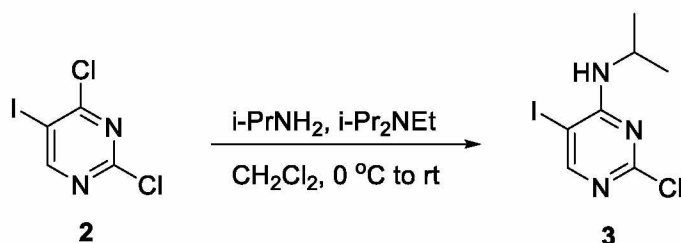


Σε στεγνή σφαιρική φιάλη προστίθεται η 5-ιωδο-ουρακίλη (1), ($m= 1,190\text{g}$, $n=5\text{mmol}$, 1eq) και το οξυχλωρίδιο φωσφόρου (POCl_3 , $V=3,7\text{ mL}$, $n=40\text{ mmol}$, 8 eq). Διαβιβάζεται άνυδρο αέριο άζωτο και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην N,N -δισοπροπυλαιθυλαμίνη ($i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, $V=1,73\text{ mL}$, $n=10\text{ mmol}$, 2 eq). Το μείγμα θερμαίνεται στους 105°C κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{MeOH } 95:5$) και αφού διαπιστωθεί η πλήρης μετατροπή της 1 το μείγμα αφήνεται να ψυχθεί και απομακρύνεται η περίσσεια του POCl_3 με εξάτμιση υπό κενό. Το υπόλειμμα διαλύεται σε AcOEt (50 mL), το διάλυμα ξεπλένεται διαδοχικά με νερό (2 x 25 mL), κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 (2 x 50 mL), και κορεσμένο διάλυμα NaCl (1 x 50 mL), και ξηραίνεται με άνυδρο Na_2SO_4 . Το ακάθαρτο προϊόν παραλαμβάνεται με εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό και υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (flash column chromatography), με σύστημα διαλυτών $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{hexane } 1:1$, για να αποφέρει την 2,4-διχλωρο-5-ιωδοπυριμιδίνη (2) σε μορφή λευκού στερεού ($m=1,38\text{g}$, 90,4%).

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της ένωσης (2)

Μοριακό βάρος (M_r)	274,87
Σταθερά επιβράδυνσης (R_f)	0,13 (hex-DCM 3:1), 0,34 (hex-DCM 2:1)
Σημείο τήξεως (T_m)	71-74 °C
Απόδοση	90,4%

ν. Σύνθεση της 5-ιωδο-N-ισοπροπυλο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνης (3)

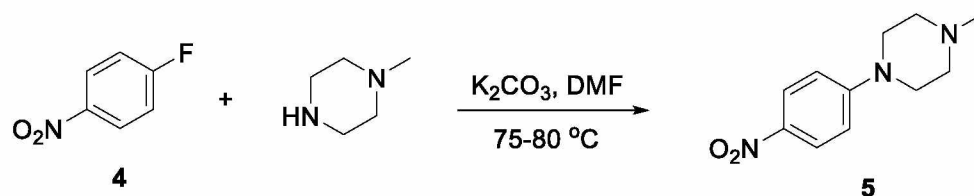


Αρχικά, σε σφαιρική φιάλη των 25ml προστίθεται η ένωση (2) ($m=550\text{mg}$, $n=2\text{mmol}$, 1eq), που παράχθηκε στην αντίδραση (i), και το CH_2Cl_2 (10 ml) ως διαλύτης. Ακολούθως, προστίθενται στάγδην τα άλλα δύο αντιδραστήρια της αντίδρασης, η διισοπροπυλαιθυλαμίνη ($i\text{-Pr}_2\text{NEt}$, $V=0,35\text{ml}$, $n=2\text{mmol}$, 1eq) και η ισοπροπυλαμίνη ($i\text{-PrNH}_2$, $V=0,20\text{ml}$, $n=2\text{mmol}$, 1eq), ενώ η φιάλη βρίσκεται σε παγόλουτρο, και κατόπιν αφήνεται να φτάσει μέχρι τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης ελεγχόταν ανά χρονικά διαστήματα με TLC σε σύστημα διαλυτών 9:1 Hexane - AcOEt. Επειδή η αντίδραση φάνηκε να είναι αργή αφέθηκε σε ανάδευση για μία μέρα. Ύστερα από έλεγχο με TLC την επόμενη μέρα διαπιστώθηκε πως η πρώτη ύλη είχε καταναλωθεί και τότε προχωρήσαμε σε επεξεργασία του μείγματος. Αφού προηγήθηκε εξάτμιση του με στόχο την απομάκρυνση του CH_2Cl_2 , ακολούθησε διάλυσή του υπολείμματος με AcOEt (40 ml), έκπλυση του διαλύματος με απιονισμένο H_2O (10 ml) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (40 ml), ξήρανση του με την προσθήκη Na_2SO_4 και τελικά συμπύκνωση του υπό κενό. Το προϊόν (3) απομονώθηκε μέσω χρωματογραφίας στήλης με σύστημα διαλυτών εξάνιο προς διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 3:2 μέχρι να απομακρυνθεί το παραπροϊόν της αντίδρασης. Στη συνέχεια, ανεβάζοντας πολικότητα (εξάνιο-διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 2:3), απομονώσαμε και το επιθυμητό προϊόν μας το οποίο είχε μάζα 492mg.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά της ένωσης (3)

Μοριακό βάρος (M_r)	297,52
Σταθερά επιβράδυνσης (R_f)	0.36 (Hex-AcOEt 4:1)
Σημείο τήξεως (T_m)	51-54 °C
Απόδοση	82,6%

vi. Σύνθεση της 1-μεθυλο-4-(4-νιτροφαινυλο)πιπεραζίνης (5)

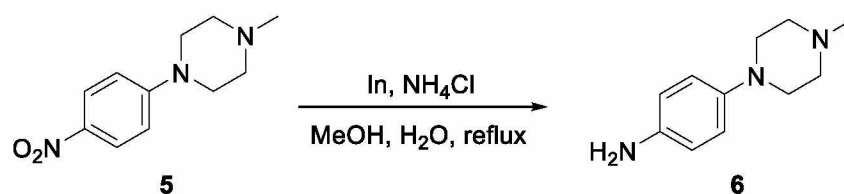


Σε στεγνό σωλήνα προστίθενται διαδοχικά ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3 , $m=414,63\text{mg}$, 3mmol , $1,5\text{eq}$), άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF, $V=2\text{ml}$), 4-νιτρο-1-φθοροβενζόλιο (4, $V=212\mu\text{l}$, 2mmol , 1eq) και 1-μεθυλοπιπεραζίνη ($V=233\mu\text{l}$, $2,1\text{mmol}$, $1,05\text{ eq}$). Διαβιβάζεται άνυδρο αέριο άζωτο, ο σωλήνας πωματίζεται ερμητικά και το μείγμα θερμαίνεται στους $75-80^\circ\text{C}$ σε ελαιόλουτρο. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε συστήματα διαλυτών Hex-AcOEt 9:1 και 9,5:0,5. Αφού διαπιστώσαμε ότι η αντίδραση έχει τελειώσει αφαιρέσαμε το σωλήνα από το ελαιόλουτρο και αφήσαμε να φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε εκχύλιση με AcOEt (30ml) και νερό (5x10ml), ξηράναμε με Na_2SO_4 και συμπυκνώσαμε το διάλυμα. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με τη χρήση χρωματογραφίας στήλης. Ξεκινώντας με ένα σύστημα 2% MeOH σε CH_2Cl_2 απομακρύναμε την ανεπιθύμητη κόκκινη χρώση και στη συνέχεια ανεβάσαμε την πολικότητα σε 5% MeOH σε CH_2Cl_2 για να πάρουμε το προϊόν 5. Η μάζα του προϊόντος ήταν 391mg.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά της ένωσης (5)

Μοριακό βάρος (M_r)	221,26
Σταθερά επιβράδυνσης (R_f)	0.65 (DCM-MeOH 94:6)
Σημείο τήξεως (T_m)	112-113 $^\circ\text{C}$
Απόδοση	89%

vii. Σύνθεση της 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνης (6)

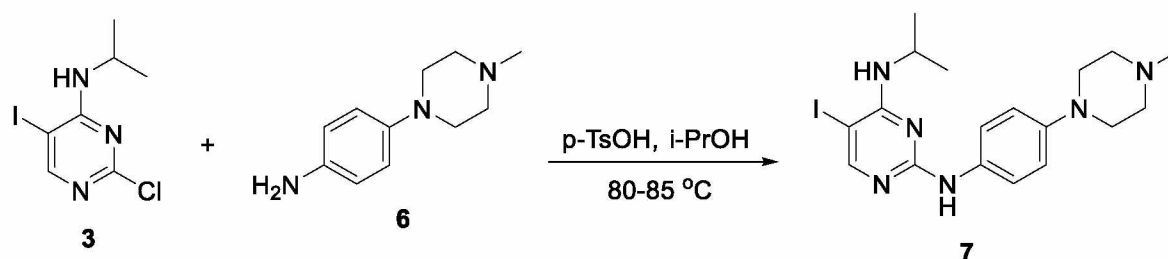


Σε στεγνή σφαιρική φιάλη 25ml ή 50ml τοποθετούμε το προϊόν της αντίδρασης (iii) 1-μεθυλο-4-(4-νιτροφαινυλο)πιπεραζίνη ($m=391\text{mg}$, $1,77\text{mmol}$, 1eq) και $10,5\text{ml}$ MeOH ($\sim 6\text{ml}/\text{mmol}$). Στη συνέχεια, προσθέτουμε το ίνδιο ($m=813\text{mg}$, $7,08\text{mmol}$, 4eq). Σε μία άλλη σφαιρική φιάλη των 10ml προσθέτουμε το χλωριούχο αμμώνιο ($m=947\text{mg}$, $17,7\text{mmol}$, 10eq) και το διαλύουμε σε $3,5\text{ml}$ H₂O ($0,2\text{ml}/\text{mmol}$). Το διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου το προσθέτουμε στη μεγάλη σφαιρική φιάλη και θερμαίνουμε το μείγμα με reflux. Για να ελέγξουμε την αντίδραση προσέχουμε αρχικά τις αλλαγές των χρωμάτων. Η αντίδραση ξεκινά με ένα ζωηρό πορτοκαλί χρώμα και καταλήγει σε κίτρινο. Το σύστημα διαλυτών που γίνεται έλεγχος της αντίδρασης με TLC είναι 10% MeOH σε CH₂Cl₂. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης κάναμε διήθηση του μείγματος από μικρή στήλη με celite (γη διατόμων) το οποίο ξεπλύναμε με MeOH. Ύστερα, συμπυκνώσαμε το διήθημα ώστε να μείνει μόνο το νερό στη σφαιρική φιάλη ($\sim 10\text{ml}$), ρυθμίσαμε το pH στο 11-12 με προσθήκη διαλύματος NaOH 1M και εκχύλισαμε με CH₂Cl₂ ($4 \times 20\text{mL}$). Αφού ξηράναμε το εκχύλισμα με Na₂SO₄ συμπυκνώσαμε για να παραμείνει στη σφαιρική μόνο το επιθυμητό προϊόν μας (6) με μάζα 301mg .

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά της ένωσης (6)

Μοριακό βάρος (M_r)	191,28
Σταθερά επιβράδυνσης (R_f)	0.22 (DCM-MeOH 9:1)
Σημείο τήξεως (T_m)	92-94 °C
Απόδοση	89,0%

viii. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-5-ιωδο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (7)

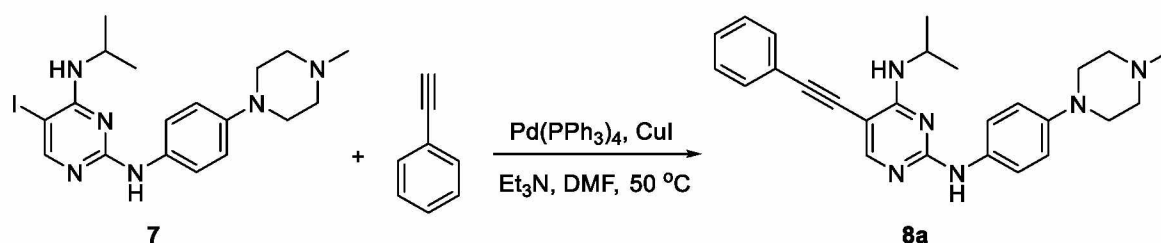


Αρχικά σε microwave (MW) tube προστέθηκαν η ένωση (3) (m=149mg, 0,50mmol, 1eq), η 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη (m=96mg, 0,50mmol, 1eq), το p-τολουολοσουλφονικό οξύ (m=95mg, 0,50mmol, 1eq) ως καταλύτης, και η ισοπροπανόλη (degassed) ως διαλύτης (V=2,5ml) και ακολούθησε θέρμανση του μείγματος στους 80-85°C. Ο έλεγχος για την πορεία της αντίδρασης έγινε με σύστημα διαλυτών AcOEt-Hex 3:1. Όπως φάνηκε με τους πρώτους ελέγχους η αντίδραση είναι αργή οπότε και αφήσαμε σε ανάδευση και θέρμανση για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα έγινε έλεγχος με σύστημα AcOEt-Hex 4:1 και διαπιστώθηκε πως η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί. Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε εξάτμιση της ισοπροπανόλης, διαλύσαμε το υπόλειμμα με AcOEt (40ml), ξεπλύναμε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ (3x15ml) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (15ml), ξηράναμε με Na₂SO₄ και συμπυκνώσαμε. Η απομόνωση του προϊόντος μας (7) έγινε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 5% MeOH σε CH₂Cl₂. Η μάζα του προϊόντος που απομονώσαμε ήταν 147mg.

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά της ένωσης (7)

Μοριακό βάρος (M _r)	452,34
Σταθερά επιβράδυνσης (R _f)	0.23 (5% MeOH in DCM)
Σημείο τήξεως (T _m)	160-161 °C
Απόδοση	64%

ix. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-(φαινυλαιθινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (8a)

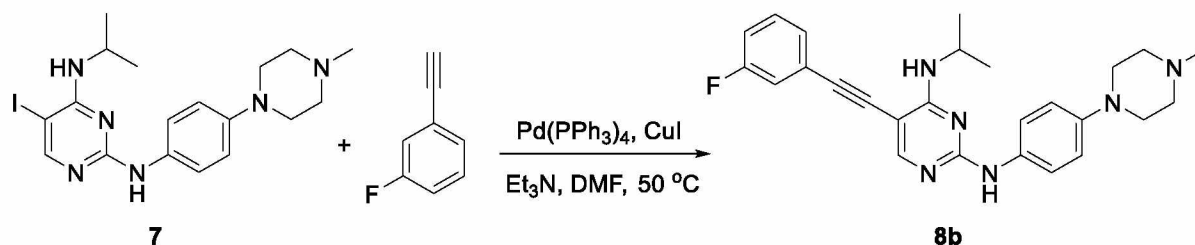


Σε στεγνό microwave tube προστίθεται διαδοχικά το προϊόν (7) (m=46mg, 0,10mmol, 1eq), ο ιωδιούχος χαλκός (m=4mg, 0,02mmol, 0,2eq), ο καταλύτης παλλαδίου (m=12mg, 0,01mmol, 0,1eq) και διοχετεύεται άνυδρο αέριο άζωτο. Στη συνέχεια προστίθεται ο άνυδρος διαλύτης DMF (1ml), το αλκίνιο φαινυλακετυλένιο (V=33μl, 0,3mmol, 3eq) και η τριαιθυλαμίνη (V=42μl, 0,3mmol, 3eq), διοχετεύθηκε εκ νέου άζωτο και ο σωλήνας πωματίστηκε στεγανά. Αφού αφήσαμε για 10 λεπτά να αναδευτεί, το μείγμα μεταφέρθηκε στο microwave όπου και ρυθμίστηκαν συνθήκες 50°C για μία ώρα. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC σε σύστημα διαλυτών 5% MeOH σε CH₂Cl₂ στη μία ώρα αλλά η αντίδραση δεν είχε ολοκληρωθεί. Αφού προστέθηκαν ακόμα 2eq αλκινίου (+ 22μl) η αντίδραση αφέθηκε overnight σε συνεχή θέρμανση στους 50°C, σε ελαιόλουτρο, και ανάδευση. Όταν η αντίδραση ολοκληρωθεί αραιώνουμε το μείγμα με AcOEt (20ml), ξεπλύνουμε το διάλυμα με H₂O (4x5ml) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5mL), ξηραίνουμε με Na₂SO₄ και συμπυκνώνουμε. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας σε σύστημα διαλυτών αρχικά 4% MeOH σε CH₂Cl₂ και στη συνέχεια 5%, με αποτέλεσμα να πάρουμε 32mg του προϊόντος 8a σε μορφή κίτρινου στερεού.

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά της ένωσης (8a)

Μοριακό βάρος (M _r)	426,57
Σταθερά επιβράδυνσης (R _f)	0,18 (5% MeOH in DCM)
Σημείο τήξεως (T _m)	140-142 °C
Απόδοση	80%

χ. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-((3-φθοροφαινυλ)αιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (8b)

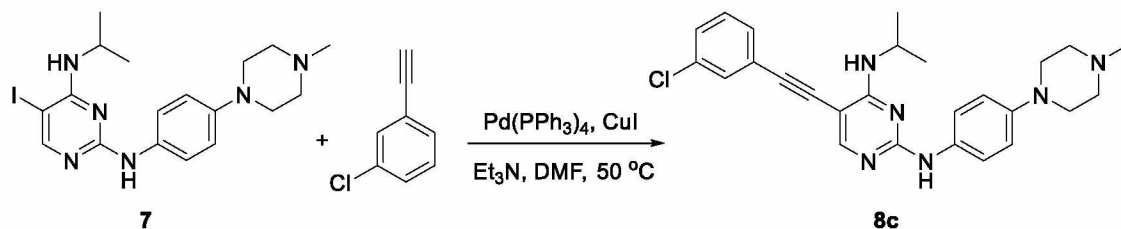


Σε στεγνό microwave tube προστίθεται διαδοχικά το προϊόν (7) (m=46mg, 0,10mmol, 1eq), ο ιωδιούχος χαλκός (m=4mg, 0,02mmol, 0,2eq), ο καταλύτης παλλαδίου (m=12mg, 0,01mmol, 0,1eq) και διοχετεύεται άνυδρο αέριο άζωτο. Στη συνέχεια προστίθεται ο άνυδρος διαλύτης DMF (1ml), το αλκίνιο 1-αιθυνυλ-3-φθορο-βενζόλιο (V=35μl, 0,3mmol, 3eq) και η τριαιθυλαμίνη (V=42μl, 0,3mmol, 3eq), διοχετεύθηκε εκ νέου άζωτο και ο σωλήνας πωματίστηκε στεγανά. Αφού αφήσαμε για 10 λεπτά να αναδευτεί, το μείγμα μεταφέρθηκε στο microwave όπου και ρυθμίστηκαν συνθήκες 50°C για 30 λεπτά αρχικά αλλά ύστερα από έλεγχο με TLC σε σύστημα 5% MeOH σε CH₂Cl₂ αποδείχθηκε ότι η αντίδραση δεν είχε ολοκληρωθεί οπότε και επαναλάβαμε για ακόμη 30 λεπτά το πρόγραμμα. Έγινε πάλι έλεγχος της αντίδρασης αλλά και πάλι δεν είχε ολοκληρωθεί οπότε και την αφήσαμε overnight σε συνεχή θέρμανση στους 50°C, σε ελαιόλουτρο, και ανάδευση. Όταν η αντίδραση ολοκληρωθεί αραιώνουμε το μείγμα με AcOEt (20ml), ξεπλένουμε το διάλυμα με H₂O (4x5ml) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5mL), ξηραίνουμε με Na₂SO₄ και συμπυκνώνουμε. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας σε σύστημα διαλυτών αρχικά 4% MeOH σε CH₂Cl₂ και στη συνέχεια 5%, με αποτέλεσμα να πάρουμε 27mg του προϊόντος 8b σε μορφή κίτρινου στερεού.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά της ένωσης (8b)

Μοριακό βάρος (M _r)	444,56
Σταθερά επιβράδυνσης (R _f)	0,46 (5% MeOH in DCM)
Σημείο τήξεως (T _m)	161-163°C
Απόδοση	60%

xi. Σύνθεση της N4-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-((3-χλωροφαινυλ)αιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (8c)



Σε στεγνό microwave tube προστίθεται διαδοχικά το προϊόν (7) ($m=46\text{mg}$, $0,10\text{mmol}$, 1eq), ο ιωδιούχος χαλκός ($m=4\text{mg}$, $0,02\text{mmol}$, $0,2\text{eq}$), ο καταλύτης παλλαδίου ($m=12\text{mg}$, $0,01\text{mmol}$, $0,1\text{eq}$) και διοχετεύεται άνυδρο αέριο άζωτο. Στη συνέχεια προστίθεται ο άνυδρος διαλύτης DMF (1ml), το αλκίνιο 1-χλωρο-3-αιθυνυλοβενζόλιο ($V=37\mu\text{l}$, $0,3\text{mmol}$, 3eq) και η τριαιθυλαμίνη ($V=42\mu\text{l}$, $0,3\text{mmol}$, 3eq), διοχετεύθηκε εκ νέου άζωτο και ο σωλήνας πωματίστηκε στεγανά. Αφού αφήσαμε για 10 λεπτά να αναδευτεί, το μείγμα μεταφέρθηκε στο microwave όπου και ρυθμίστηκαν συνθήκες 50°C για 30 λεπτά. Η αντίδραση φάνηκε ότι ολοκληρώθηκε μετά από έλεγχο με TLC, σε σύστημα διαλυτών ακετονιτρίλιο-MeOH 9:1. Αραιώνουμε το μείγμα με AcOEt (20ml), ξεπλένουμε το διάλυμα με H_2O ($4 \times 5\text{ml}$) και κορεσμένο διάλυμα NaCl (5mL), ξηραίνουμε με Na_2SO_4 και συμπυκνώνουμε. Το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε με τη χρήση στήλης χρωματογραφίας σε σύστημα διαλυτών αρχικά 4% MeOH σε CH_2Cl_2 και στη συνέχεια 5%, με αποτέλεσμα να πάρουμε 41mg του προϊόντος 8c σε μορφή κίτρινου στερεού.

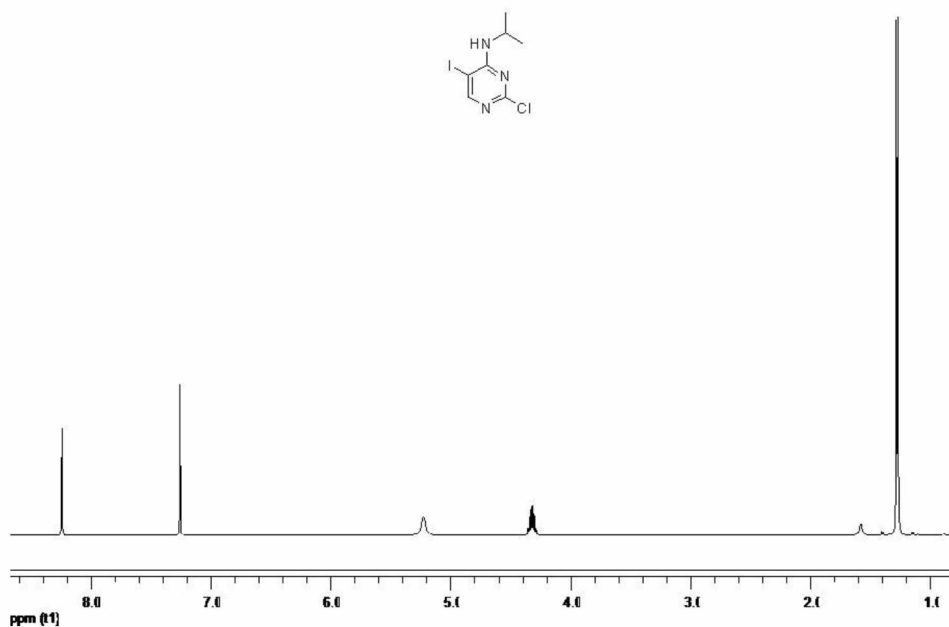
Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά της ένωσης (8c)

Μοριακό βάρος (M_r)	461,01
Σταθερά επιβράδυνσης (R_f)	0,25 (5% MeOH in DCM)
Σημείο τήξεως (T_m)	160-163 °C
Απόδοση	90%

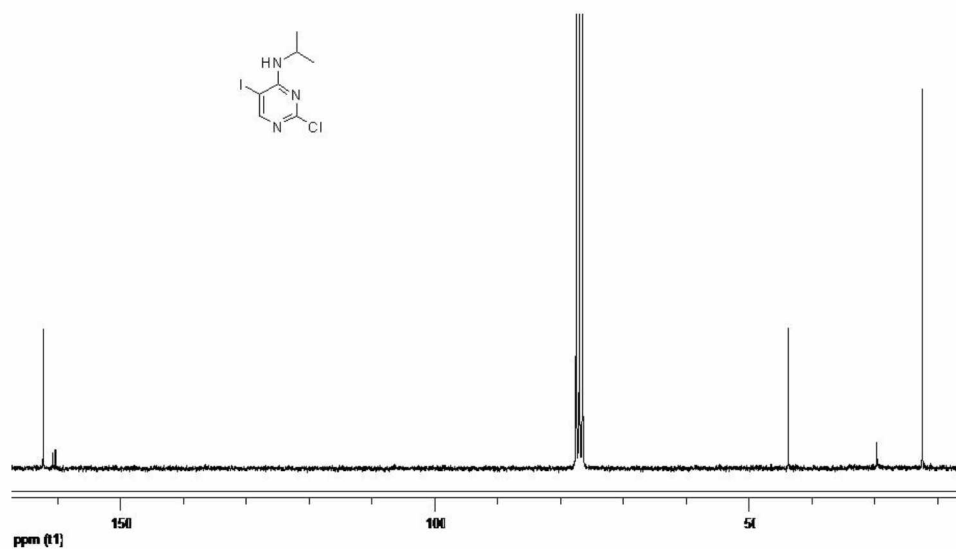
5. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Οι δομές όλων των ενώσεων ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) και άνθρακα-13 ($^{13}\text{C-NMR}$). Στη συνέχεια παρατίθενται τα φάσματα των ενδιάμεσων 3, 4, 5, 6 και 7, και των τελικών ενώσεων 8a-c.

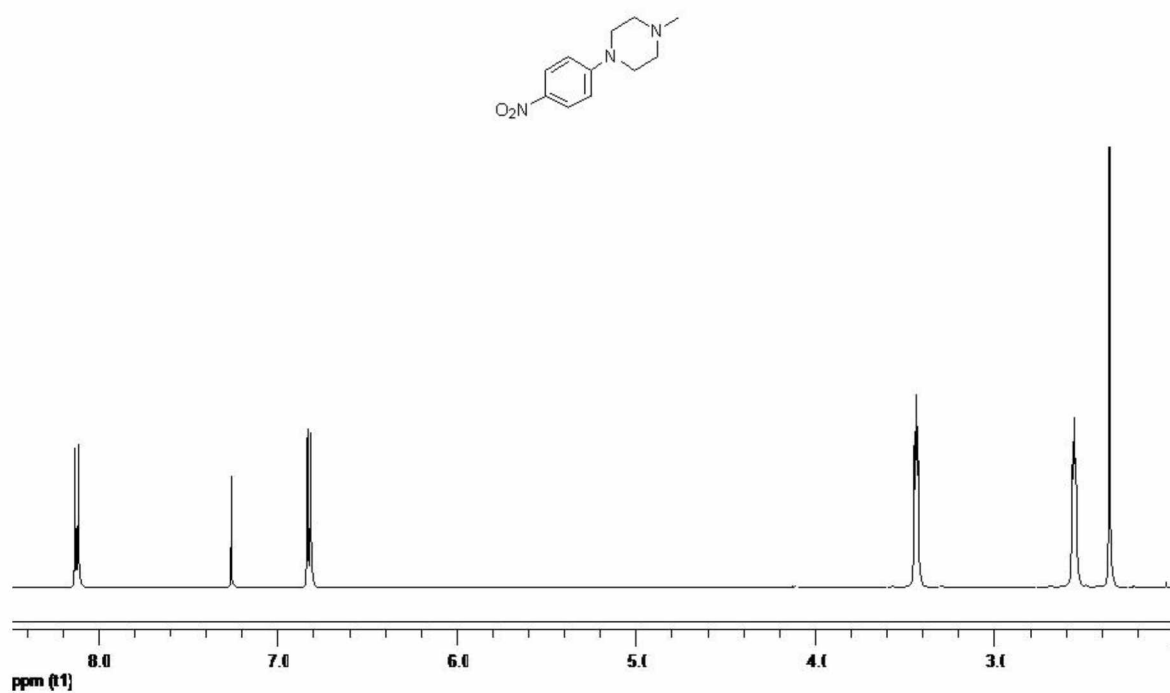
i. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (3)



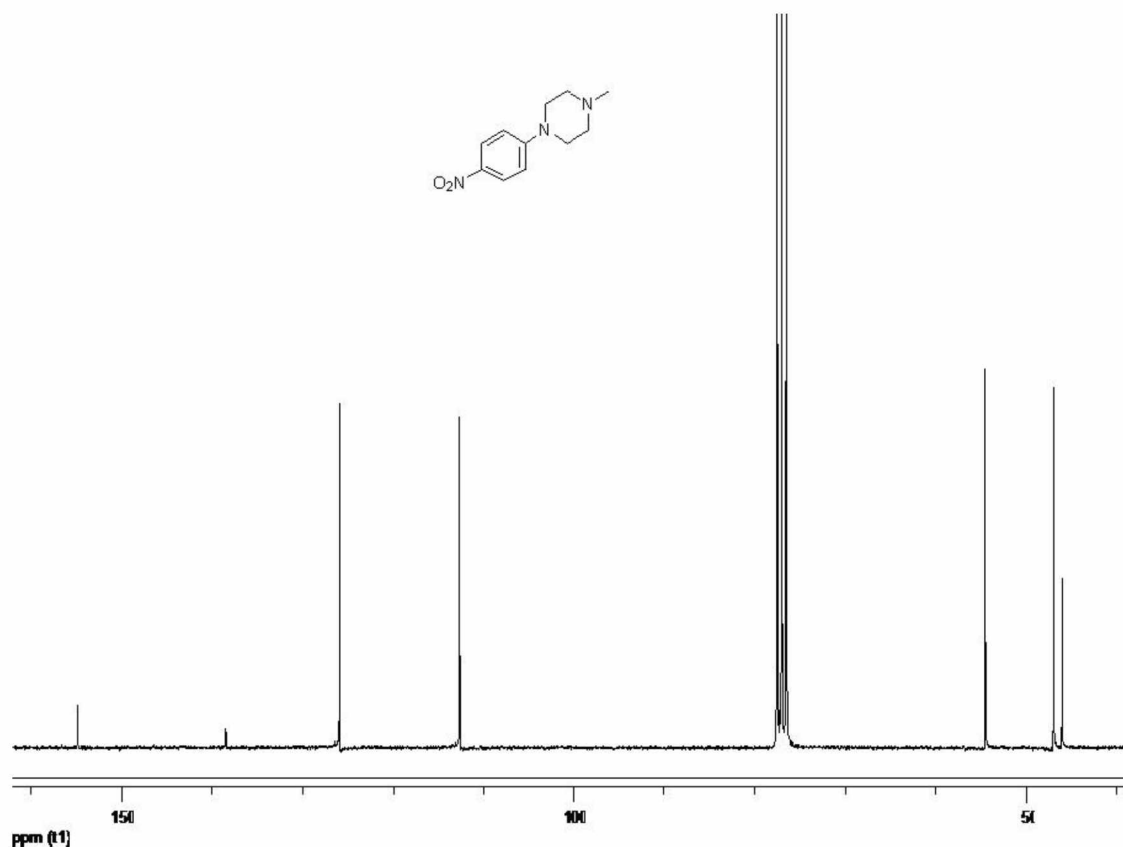
ii. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης (3)



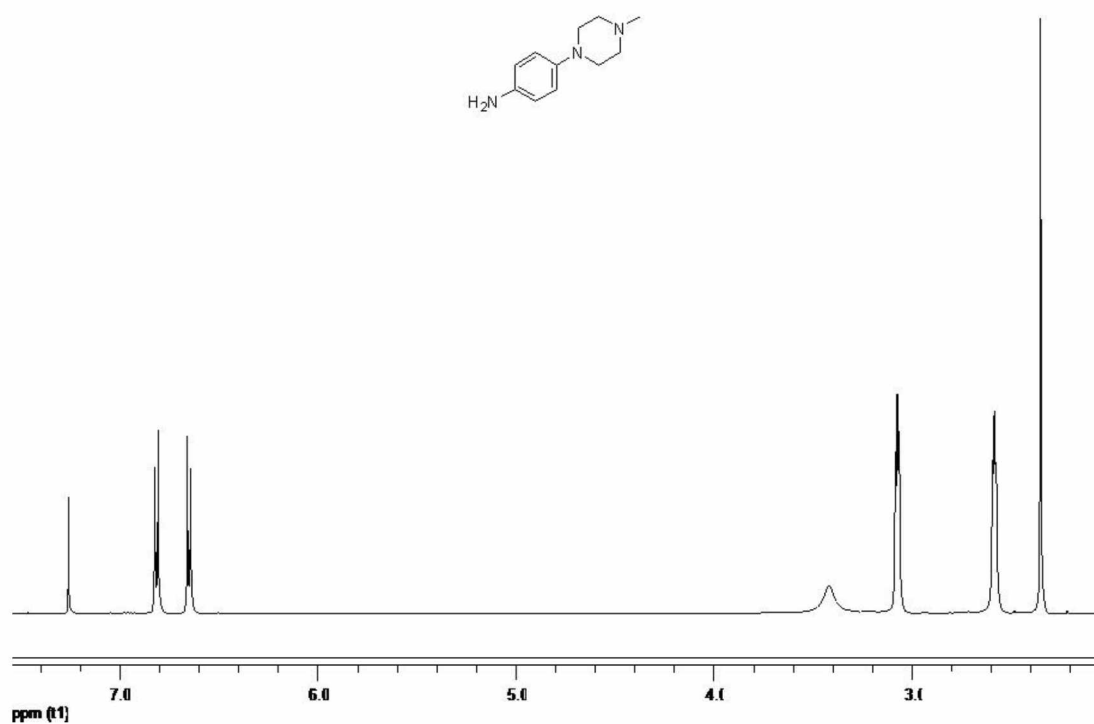
iii. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης (5)



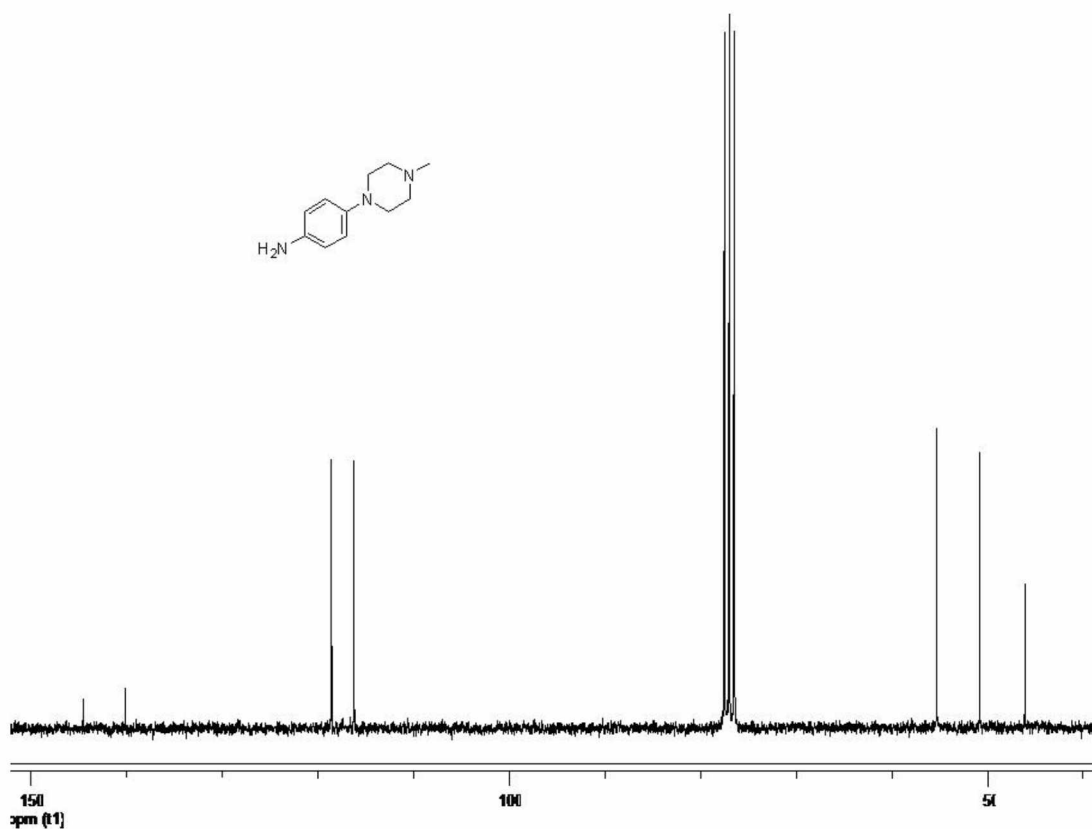
iv. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης (5)



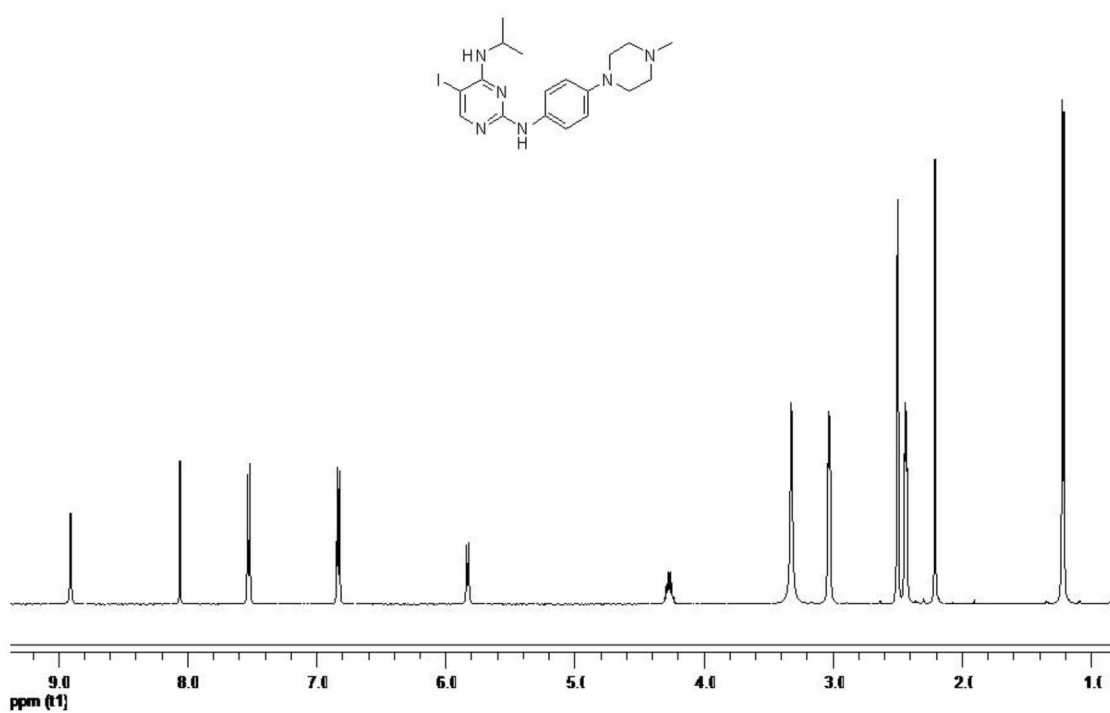
v. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 6



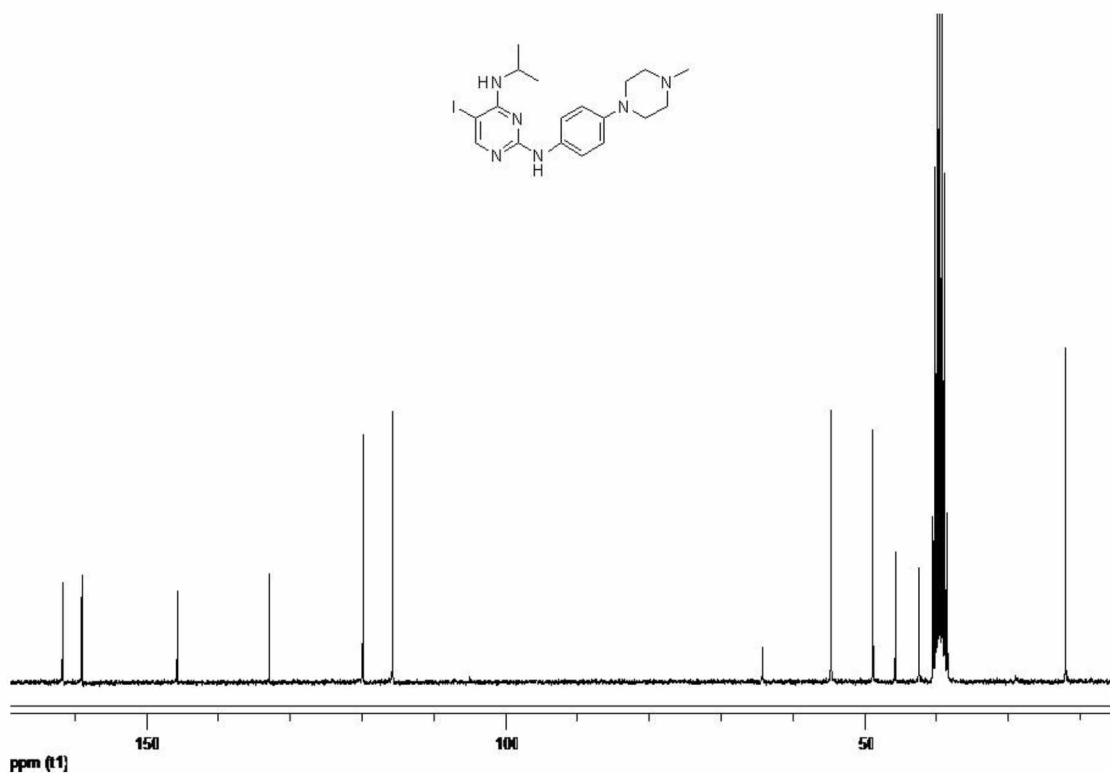
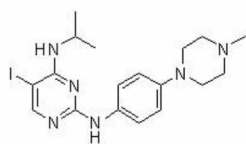
vi. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 6



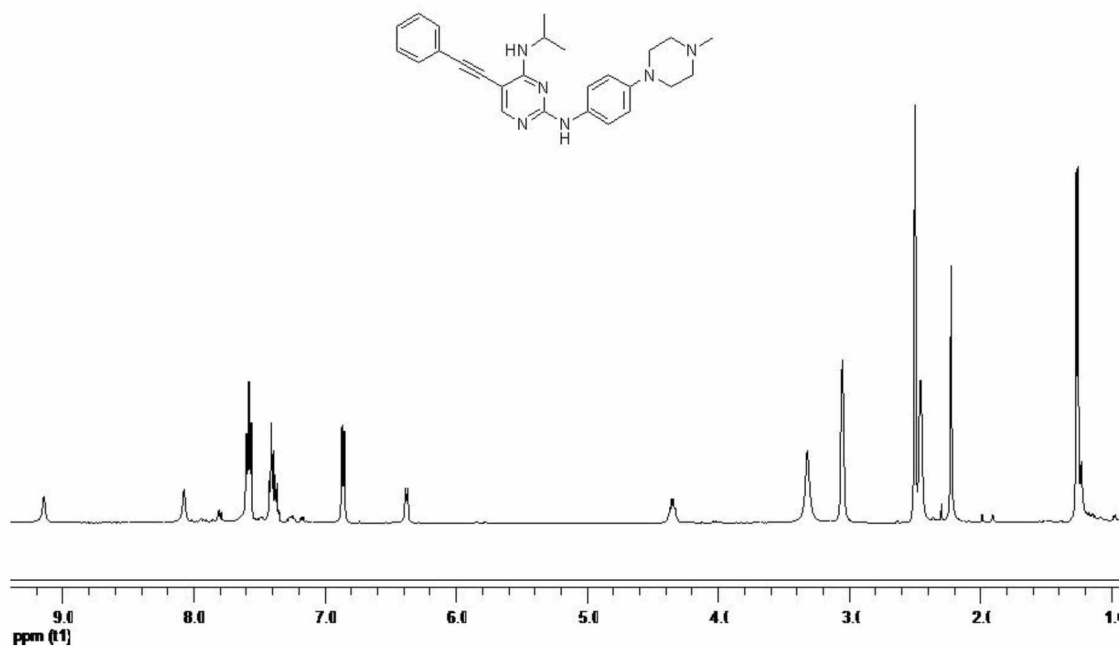
vii. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης 7



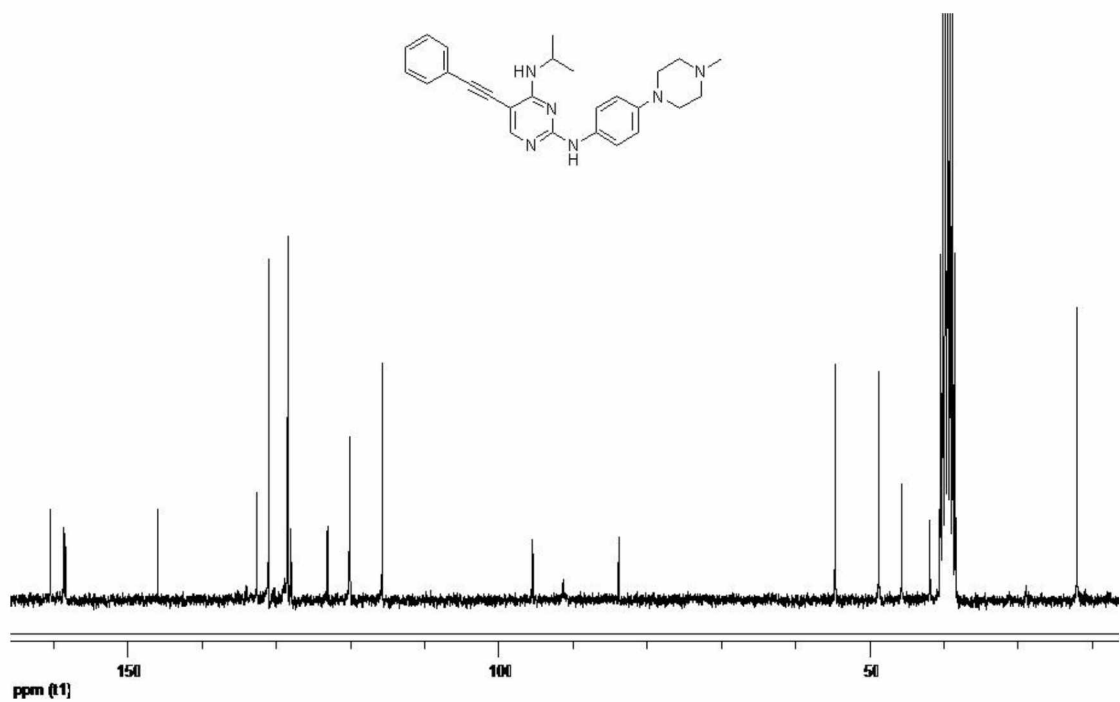
viii. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης 7



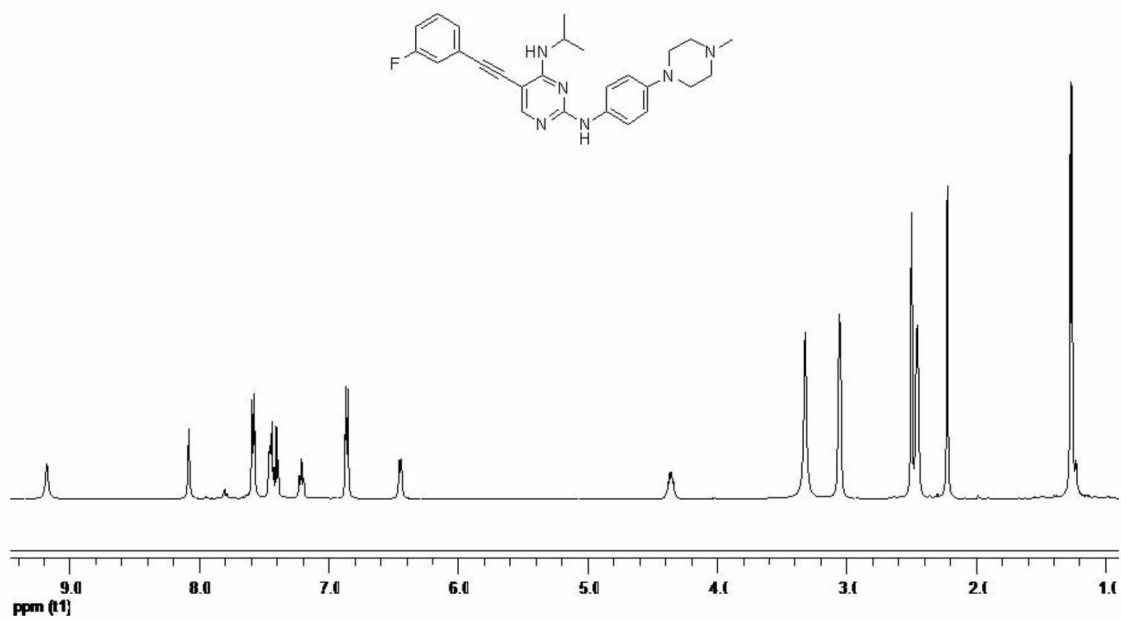
ix. Φάσμα 1H-NMR της ένωσης 8a



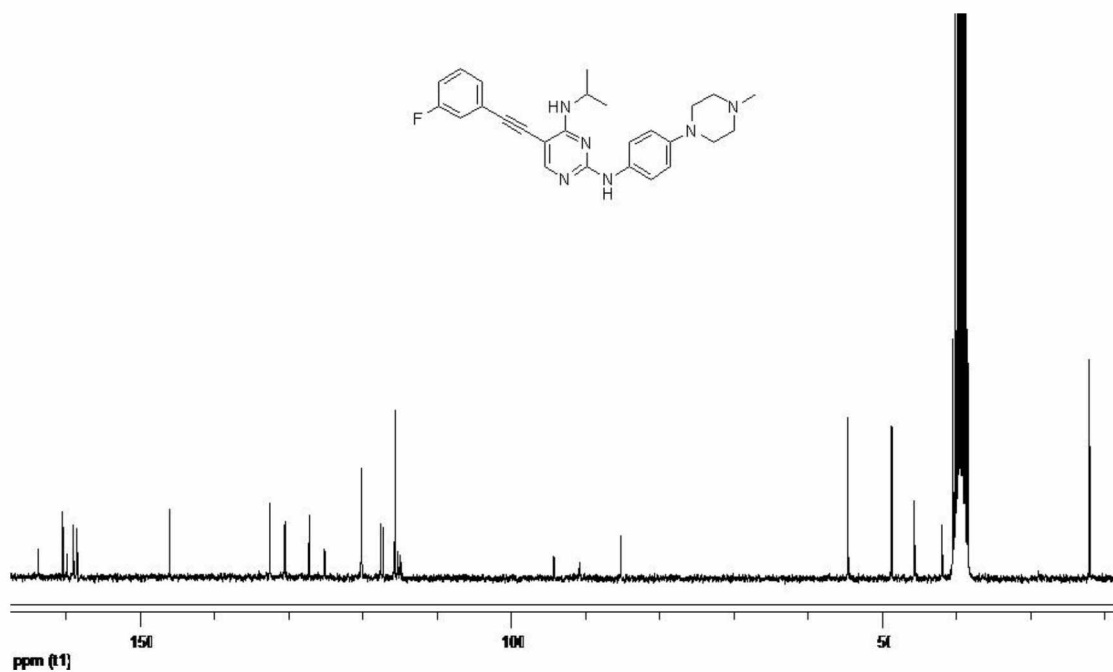
x. Φάσμα 13C-NMR της ένωσης 8a



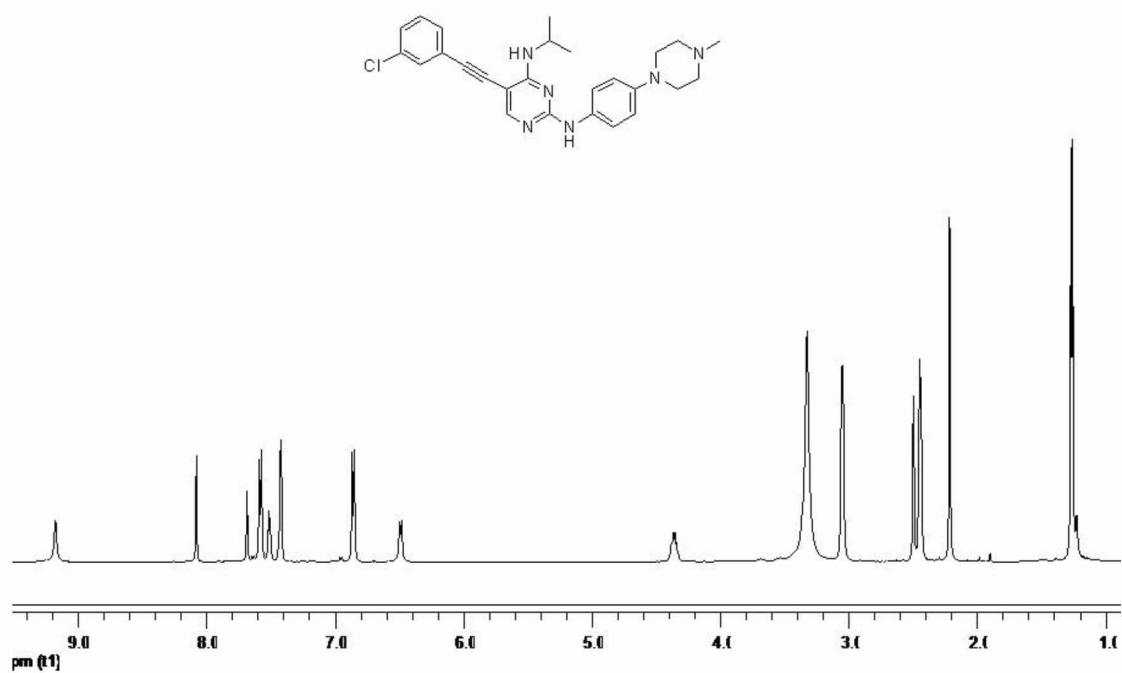
xi. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 8b



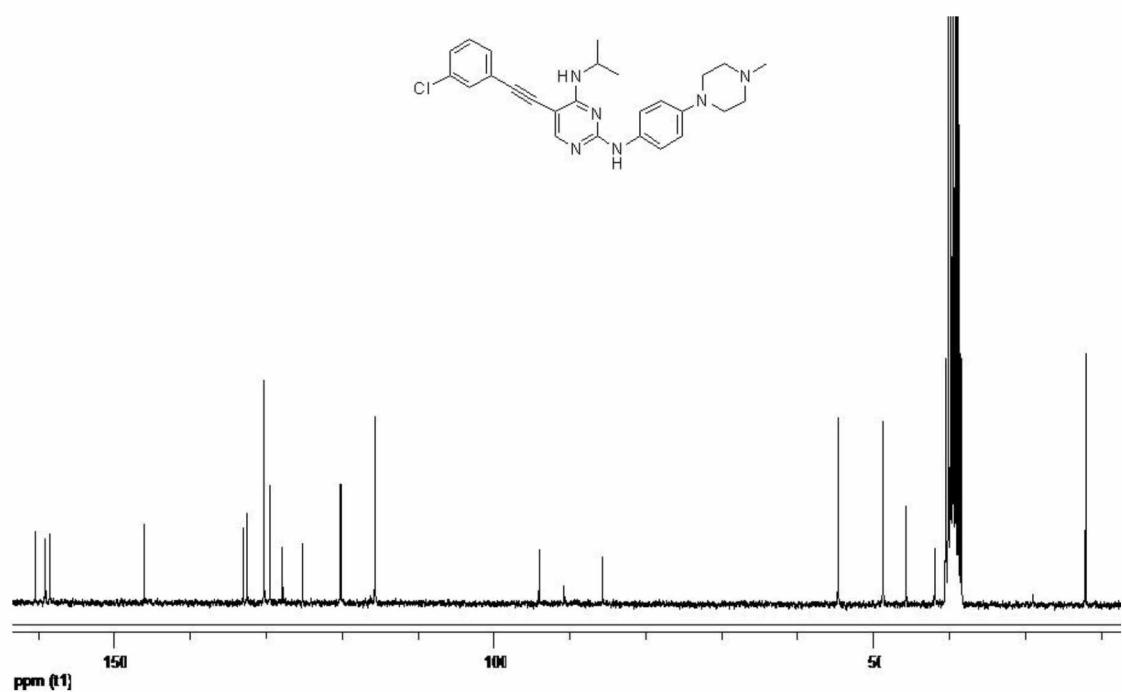
xii. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 8b



xiii. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 8c



xiv. Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης 8c



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πυριδίνη και η πυριμιδίνη είναι ελκυστικά ικρίώματα στην ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων λόγω του ρόλου τους στις βιολογικές διαδικασίες, των διαφορετικών βιολογικών δραστηριοτήτων τους και των συντονιστικών ικανοτήτων τους. Ως σημείο εκκίνησης, εφαρμόστηκε στρατηγική μίμησης φυσικής ουσίας για την ανάπτυξη αναλόγων πυριμιδίνης / πουρίνης που εμφάνισαν αντικαρκινικές δραστηριότητές τους μέσω ανταγωνισμού με τη φυσική ουσία για δέσμευση σε υποδοχείς στόχους ή ένζυμα. Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική υποκατάστασης με διάφορους τύπους τμημάτων και δακτυλίων στην δομή του πυρήνα για να ληφθεί μια ποικιλία παραγώγων πυριδίνης / πυριμιδίνης και συντηγμένων πυριδινών / πυριμιδινών.

Όσον αφορά την τάση της πολυφαρμακολογίας, πραγματοποιήθηκε η σύζευξη ανιλίνης και πυριμιδίνης με τις υπάρχουσες βιοδραστικές ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων με πολλαπλές φαρμακευτικές εφαρμογές. Η πυριμιδίνη περιέχει ηλεκτρόνια μόνου ζεύγους που συμβάλλουν στις συντονιστικές της ικανότητες. Από αυτή την άποψη, πολλά μεταλλικά σύμπλοκα με βάση την πυριμιδίνη αναπτύχθηκαν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτά τα μικρά μόρια, η πυριδίνη και η πυριμιδίνη, είναι πολλά υποσχόμενα ικρίώματα για την ανάπτυξη αντικαρκινικών παραγόντων έναντι πολλών στόχων και θεωρείται ότι είναι πιθανά φαρμακοφόρα για την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών ενώσεων για θεραπευτικές εφαρμογές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bebbington et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 3586-3592
2. Harrington et al, *Nat. Med.*, 2004, 10, 262-267
3. Wang et al, *J. Med. Chem.* 2010, 53, 4367-4378
4. Mross et al, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2016, 78, 405-417
5. Döhner et al, *British Journal of Haematology*, 2019, 185, 563-633
6. Aliagas-Martin et al, *J. Med. Chem.* 2009, 52, 3300-3307
7. N. Suzuki et al. / *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 456-460
8. Singh B, Guru SK, Kour S, Jain SK, Sharma R, Sharma PR, et al. Synthesis, antiproliferative and apoptosis-inducing activity of thiazolo[5,4-d]pyrimidines. *Eur J Med Chem* 2013; 70: 864-74.
9. Tan Q, Zhang Z, Hui J, Zhao Y, Zhu L. Synthesis and anticancer activities of thieno[3,2-d]pyrimidines as novel HDAC inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 358-65.
10. Ji X, Peng T, Zhang X, Li J, Yang W, Tong L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 6-alkenylamides substituted of 4-anilinothieno[2,3-d]pyrimidines as irreversible epidermal growth factor receptor inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 2366-78
11. Kassab E, Gedawy EM. Synthesis and anticancer activity of novel 2-pyridyl hexahydrocyclooctathieno[2,3-d]pyrimidine derivatives. *Eur J Med Chem* 2013; 63: 224-30.
12. Konakanchi, D.P., Pula, S.R., Ananthaneni, L., Pilli, R., Satya, B., Chowdary, N.V. Novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives as anticancer agents. WO2009098715 (2009)
13. Butterworth, S., Finlay, M., Ward, R.A., Kadambar, V.K., Chandrashekar, R.C., Murugan, A., Redfearn, H.M. 2-(2, 4, 5- Substituted-anilin) pyrimidine derivatives as EGFR modulators useful for treating cancer. AU2013204962 (2013).
14. Lucking, U., Kosemund, D., Scholz, A., Lienau, P., Siemeister, G., Bomer, U., Bohlmann, R. Disubstituted 5-fluoro pyrimidine derivatives containing a sulfoximine group. WO2013037894 (2013)
15. Burgdorf, L., Kuhn, D., Ross, T., Deutsch, C. Pyridopyrimidine derivatives as protein kinase inhibitors. WO2014023385 (2014).
16. Suzuki, N.; Shiota, T.; Watanabe, F.; Haga, N.; Murashi, T.; Ohara, T.; Matsuo, K.; Omori, N.; Yari, H.; Dohi, K.; Inoue, M.; Iguchi, M.; Sentou, J.; Wada, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 1601.
17. Wakeling, A. E.; Guy, S. P.; Woodburn, J. R.; Ashton, S. E.; Curry, B. J.; Barker, A. J.; Gibson, K. H. *Cancer Res.* 2002, 62, 5749.
18. Engel, R. H.; Kaklamani, V. G. *Drugs* 2007, 67, 1329

19. Jiyeon Yun, Min Hee Hong, Seok-Young Kim, et al. Clin Cancer Res 2019;25:2575-2587. Published OnlineFirst January 22, 2019.