

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ-ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση, φασματοσκοπικός προσδιορισμός και βιολογική αποτίμηση
νέων παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης ως πιθανών
κυτταροστατικών παραγόντων

ΕΡΜΙΝΑ-ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΦΡΑΓΚΕΔΗ

Υπεύθυνος καθηγητής: Δημήτριος Κοριώτης

ΛΑΡΙΣΑ 2021

UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

**APPLICATIONS OF MOLECULAR BIOLOGY-GENETICS-
DIAGNOSTIC BIOMARKERS**

LABORATORY OF BIOORGANIC CHEMISTRY



MASTER THESIS

Synthesis, spectroscopic identification and biological evaluation of novel
pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives as potential cytostatic agents

ERMINA-AIKATERINI FRAGKEDI

Master Thesis Supervisor: Dimitrios Komiotis

LARISSA 2021

Στη Σύλβια, στον Λάμπρο, στη μαμά μου και στη γιαγιά Ερμίνα,

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Κομιώτης

*Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας*

Γρηγόριος Αμούτζιας

*Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στη Μικροβιολογία, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Δημήτριος Μόσιαλος

*Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Οργανικής Χημείας, κ. Δημήτριου Κομιώτη, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου την δυνατότητα να ενταχθώ στην ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου του.

Επίσης θα ήθελα να αποδώσω ιδιαίτερες ευχαριστίες τον κ. Χρήστο Μήτσο, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Βιοοργανικής Χημείας, για την αμέριστη καθοδήγηση, στήριξη και υπομονή που επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής διατριβής μου. Οι επιστημονικές συμβουλές και υποδείξεις του αποτέλεσαν πολύτιμο οδηγό για την ολοκλήρωσή της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αναπληρωτές καθηγητές, κ. Γρηγόριο Αμούτζια και κ. Δημήτριο Μόσιαλο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου, τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που με ενθαρρύνει, με στηρίζει και μου συμπαραστέκεται με πολλή αγάπη σε κάθε μου απόφαση και κάθε μου βήμα.

Και τέλος ευχαριστώ πολύ τους δικούς μου ανθρώπους, και ιδιαίτερα την Ειρήνη Χατζηπαναγιωτίδου, τη Ρούλα Καρέτσου και τον Σταύρο Λιάπη για τη συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν σε αυτή μου την προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πυρρολοπυριμιδίνες αποτελούν μία ομάδα συμπυκνωμένων ετεροκυκλικών ενώσεων που περιλαμβάνει ένα δακτύλιο πυρρολίου και έναν πυριμιδίνη, οι οποίοι, ανάλογα με τον τρόπο συμπύκνωσής τους, δίνουν διαφορετικά ισομερή ετεροκυκλικά συστήματα. Τα παράγωγα των πυρρολοπυριμιδινών εμφανίζουν μεγάλο εύρος βιολογικών δράσεων όπως είναι η αντικαρκινική, η αντιβακτηριακή, η αντική και η αντιφλεγμονώδης. Μεταξύ των δυνατών ισομερών πυρρολοπυριμιδίνης οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες (γνωστές και ως 7-δεαζαπυριδίνες) απαντούν στη φύση στη μορφή των νουκλεοζιτών τους, είτε ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων, είτε ως δευτερογενείς μεταβολίτες διαφόρων μικροοργανισμών. Νουκλεοζίτες πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινών που απομονώθηκαν από στρεπτομύκητες εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση που οφείλεται στη φωσφορυλίωσή τους προς τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια τα οποία ενσωματώνονται στη συνέχεια στο DNA και RNA επηρεάζοντας τη λειτουργία τους. Στα πλαίσια της διαρκούς έρευνας για την ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών αντικαρκινικών φαρμάκων με ελάχιστες δυνατές παρενέργειες, τα παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης έχουν μελετηθεί εκτενώς, και πολλές ενώσεις αυτής της ομάδας αποτελούν πλέον εγκεκριμένα φάρμακα για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου και άλλων ασθενειών, ή έχουν εισέλθει σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών.

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η σύνθεση και ο φασματοσκοπικός προσδιορισμός νέων παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης ως πιθανών κυτταροστατικών παραγόντων. Η σύνθεση των νέων παραγώγων επιχειρήθηκε ακολουθώντας δύο διαφορετικές συνθετικές πορείες, καθεμία αποτελούμενη από πέντε επιμέρους αντιδράσεις, εστιάζοντας στη δυνατότητα υποκατάστασης των θέσεων 2, 6 και 7 του πυρήνα της πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης με ποικίλες ομάδες. Οι αντιδράσεις-κλειδί και στις δύο πορείες ήταν μία αντίδραση σύζευξης Sonogashira και μία ενδομοριακή 5-*endo-dig* κυκλοποίηση. Η δομή των νέων 2,6,7-τριυποκατεστημένων παραγώγων επιβεβαιώθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Μελλοντικά θα πραγματοποιηθεί και η βιολογική αποτίμηση των νέων ενώσεων και συγκεκριμένα των πιθανών κυτταροστατικών ιδιοτήτων τους, σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Λέξεις κλειδιά

Πυρρολοπυριμιδίνη, πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνη, αντίδραση σύζευξης Sonogashira, 5-*endo-dig* κυκλοποίηση, φασματοσκοπία NMR, κυτταροστατικά φάρμακα

ABSTRACT

Pyrrrolopyrimidines constitute a class of fused heterocyclic compounds comprising a pyrrole and a pyrimidine ring which, depending on their fusion mode, give rise to different isomeric heterocyclic systems. Pyrrrolopyrimidine derivatives display an array of biological activities, including anticancer, antibacterial, antiviral and anti-inflammatory properties. Among the possible pyrrrolopyrimidine isomers, pyrrrolo[2,3-*d*]pyrimidines (also known as 7-deazapurines) have been found in nature in the form of their nucleosides, either as components of nucleic acids or as secondary metabolites in various microorganisms. Pyrrrolo[2,3-*d*]pyrimidine nucleosides isolated from streptomycetes exhibit cytotoxic activity through their phosphorylation towards the corresponding nucleotides which are subsequently incorporated in DNA and RNA and modulate their function. In the context of the continuous research for the development of novel and more efficient anticancer agents, with minimized side-effects, pyrrrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives have been studied extensively and many compounds of this class have been either approved for the treatment of various types of cancer and other diseases, or submitted to clinical trials.

The object of the current thesis is the synthesis and spectroscopic identification of novel pyrrrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives as potential cytostatic agents. The synthesis of the new compounds has been attempted via two distinct synthetic routes, both involving five steps, with principal objective the feasible introduction of various groups at positions 2,6 and 7 of the pyrrrolo[2,3-*d*]pyrimidine scaffold. Key steps in both routes were a Sonogashira coupling reaction and a 5-*endo-dig* cyclization. The structure of the new 2,6,7-trisubstituted derivatives has been confirmed through nuclear magnetic resonance spectroscopy. In the future the biological evaluation of these novel compounds will be performed, particularly examination of their potential cytostatic properties against various cancer cell lines.

Keywords

Pyrrrolopyrimidine, pyrrrolo[2,3-*d*]pyrimidine, Sonogashira coupling reaction, 5-*endo-dig* cyclization, NMR spectroscopy, cytostatic drugs

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Πυρρολοπυριμιδίνες.....	10
1.2 Πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδίνες.....	12
1.2.1 Φυσικά απαντώμενα παράγωγα πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδίνης.....	12
1.2.2 Στρατηγικές σύνθεσης παραγώγων πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδίνης.....	13
1.2.3 Εγκεκριμένα αντικαρκινικά φάρμακα με δραστική ουσία παράγωγα πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδίνης και παράγωγα πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδίνης σε κλινικές δοκιμές 14	
1.2.4 Η δράση παραγώγων πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδίνης έναντι διάφορων βιολογικών στόχων.....	21
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	30
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
3.1 Συνθετική πορεία.....	31
3.2 Αντίδραση Sonogashira.....	33
3.3 5- <i>endo-dig</i> κυκλοποίηση.....	34
3.4 Γενικές μέθοδοι.....	35
3.5 Σύνθεση του κοινού ενδιάμεσου <i>N</i> -ισοπροπυλο-5-ιωδο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνη (3).....	37
3.6 Σύνθεση της <i>N</i> ⁴ -ισοπροπυλο-5-ιωδο- <i>N</i> ² -(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (4).....	39
3.7 Γενική μέθοδος σύνθεσης των 5-αλκυλοπυριμιδιν-2,4-διαμινών 5a-c, 7a-b (αντίδραση Sonogashira).....	41
3.8 Γενική μέθοδος σύνθεσης των τελικών παραγώγων πυρρολο[2,3- <i>d</i>]πυριμιδίνης 6a-c' και του 8 (5- <i>endo-dig</i> κυκλοποίηση).....	49
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

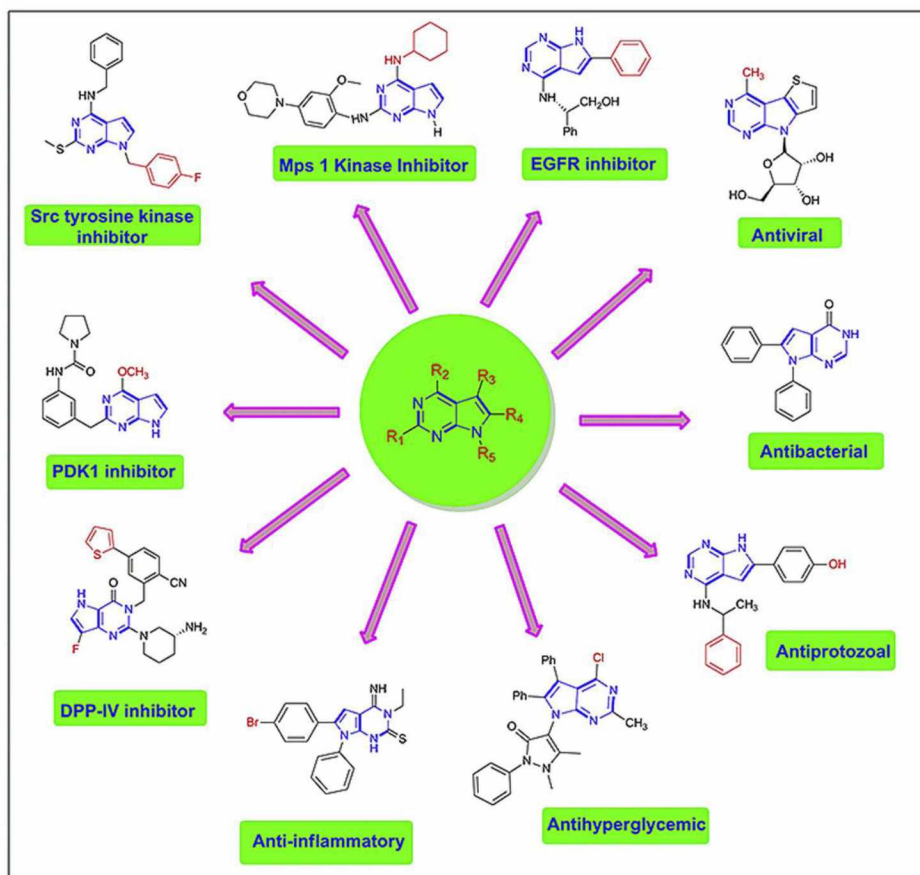
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

DCM	Διχλωρομεθάνιο
DMF	N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
i-Pr ₂ NEt	N,N-Δισοπροπυλαιθυλαμίνη
MeCN	Ακετονιτρίλιο
MeOH	Μεθανόλη
p-TsOH	π-Τολουολοσουλφονικό οξύ
R _f	Παράγοντας καθυστέρησης (Retardation factor)
RT	Θερμοκρασία δωματίου (Room temperature)
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin layer chromatography)
v/v	Όγκο κατ' όγκο (Volume per volume)
POCl ₃	Οξυχλωριούχος φώσφορος
i-PrNH ₂	Ισοπροπυλαμίνη
i-PrOH	Ισοπροπανόλη
Pd(PPh ₃) ₄	Τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)-παλλάδιο
CuI	Ιωδιούχος χαλκός
Cs ₂ CO ₃	Ανθρακικό καίσιο
NaHCO ₃	Όξινο ανθρακικό νάτριο
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
Na ₂ SO ₄	Θειικό νάτριο
Hexane	Εξάνιο
NH ₃	Αμμωνία
DBU	1,8-Διαζοδικυκλο[5.4.0]ενδεκα-7-ένιο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

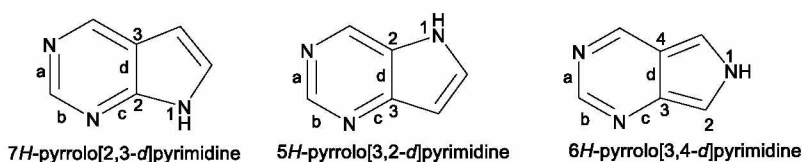
1.1 Πυρρολοπυριμιδίνες

Οι συμπυκνωμένες πυριμιδίνες είναι μια ομάδα ετεροκυκλικών ενώσεων η οποία έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω του εκτενούς φαρμακολογικού προφίλ που παρουσιάζουν. Μεταξύ των ενώσεων της ομάδας αυτής, οι πυρρολοπυριμιδίνες αποτελούν χρήσιμο ικρίωμα καθώς εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Η μελέτη των ενώσεων αυτών ξεκίνησε από την ανακάλυψη ορισμένων παραγώγων πουρίνης, π.χ. 6-μερκαπτοπουρίνη, τα οποία εμφάνιζαν αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι αρχικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν εστίασαν στις φαρμακολογικές δράσεις των πουρινών και των αναλόγων τους, και ειδικότερα των δεαζα- αναλόγων τους, ενώ αργότερα στα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν κάποια φυσικά απαντώμενα αντιβιοτικά που περιείχαν στη δομή τους πυρήνα πυρρολοπυριμιδίνης. Παρόλο που η σημασία των πυρρολοπυριμιδινών ήταν γνωστή από τότε, μελετήθηκαν εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες, και πλέον έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της χημικής και φαρμακευτικής βιομηχανίας. Από τη βιβλιογραφία διαπιστώνεται ότι οι ενώσεις αυτές δρουν ως αντικαρκινικοί, αντιβακτηριδιακοί, αντιφλεγμονώδεις και αντιικοί παράγοντες, ενώ σε αρκετές μελέτες αναφέρεται πως λόγω της σύντηξης των δύο δακτυλίων, οι πυρρολοπυριμιδίνες εμφανίζουν πολύ πιο ισχυρή φαρμακολογική δράση σε σχέση με τους μεμονωμένους δακτυλίους πυρρολίου και πυριμιδίνης. Εξαιτίας της διαφορετικής φύσης των βιολογικών στόχων που ευθύνονται για παθολογικές καταστάσεις, απαιτούνται φαρμακολογικά δραστικές ενώσεις με διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά και για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές σύνθεσης παραγώγων πυρρολοπυριμιδίνης τα οποία φέρουν ποικίλους υποκαταστάτες (**Εικόνα 1**) (Pathania *et al.*, 2018). Πολλά από αυτά τα παράγωγα έχουν εγκριθεί, από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) ή από τους αντίστοιχους φορείς άλλων χωρών, ως θεραπείες για διάφορες ασθένειες, καθώς και αρκετά άλλα έχουν εισέλθει σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών (Adel *et al.*, 2018b).



Εικόνα 1. Υποκαταστημένα παράγωγα πυρρολοπυριμιδινών και οι φαρμακολογικές τους δράσεις (Pathania *et al.*, 2018)

Οι πυρρολοπυριμιδίνες εμφανίζονται με τη μορφή διαφόρων ισομερών ανάλογα με τον τρόπο σύντηξης των δακτυλίων του πυρρολίου και της πυριμιδίνης. Κάποια παραδείγματα τέτοιων ισομερών που μελετώνται εκτενώς ως προς τις φαρμακολογικές τους δράσεις είναι οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες, οι πυρρολο[3,2-*d*]πυριμιδίνες και πυρρολο[3,4-*d*]πυριμιδίνες (**Εικόνα 2**).



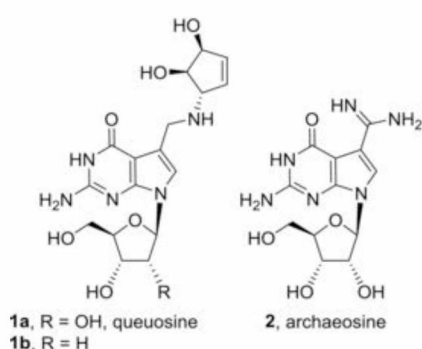
Εικόνα 2. Παραδείγματα ισομερών πυρρολοπυριμιδινών που μελετώνται εκτενώς ως προς τις φαρμακολογικές τους δράσεις. Η ονοματολογία των ενώσεων προκύπτει αριθμώντας τους δεσμούς του δακτυλίου της πυριμιδίνης με τα γράμματα a, b, c, d κτλ., και τα άτομα του πυρρολικού δακτυλίου με τους αριθμούς 1, 2, 3, 4 κτλ.

Η παρούσα εργασία θα επικεντρωθεί στις πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες οι οποίες αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας λόγω της αξιοσημείωτης αντικαρκινικής δράσης που εμφανίζουν πολλά από τα συνθετικά παράγωγά τους.

1.2 Πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες

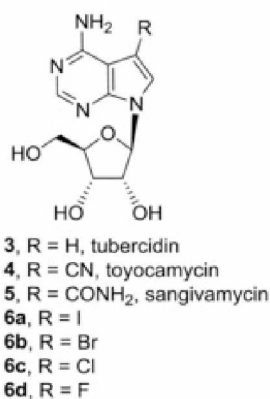
1.2.1 Φυσικά απαντώμενα παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης

Οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες (γνωστές και ως 7-δεαζαπουρίνες) απαντώνται στη φύση ως νουκλεοζίτες, ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων, αλλά και ως δευτερογενείς μεταβολίτες διαφόρων μικροοργανισμών. Οι νουκλεοζίτες των πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινών από χημικής απόψεως ομοιάζουν ως προς τη δομή με τους νουκλεοζίτες των πουρινών και έτσι μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα αυτών στο DNA και στο RNA. Παραδείγματα φυσικά απαντώμενων νουκλεοζιτών των πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινών είναι η queuosine (**1a**) και η archaeosine (**2**) που βρέθηκαν και απομονώθηκαν η μεν πρώτη από tRNA προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων, και η δεύτερη από κύτταρα αρχαίων. Επίσης πρόσφατα βρέθηκε η 2'-deoxy-queuosine (**1b**) σε DNA βακτηρίων (**Εικόνα 3**).



Εικόνα 3. Παραδείγματα φυσικά απαντώμενων νουκλεοζιτών των πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινών (Perlíková *et al.*, 2017)

Τη δεκαετία του 1960 ανακαλύφθηκαν οι πρώτες φυσικά απαντώμενες πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες που παρουσίαζαν κυτταροτοξικές ιδιότητες. Αυτές ήταν η tubercidin (**3**), η toyocamycin (**4**) και η sangivamycin (**5**) οι οποίες απομονώθηκαν από καλλιέργειες στρεπτομυκήτων και διαπιστώθηκε ότι διέθεταν ισχυρές κυτταροτοξικές ιδιότητες απέναντι σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 4**).



Εικόνα 4. Φυσικά απαντώμενοι νουκλεοζίτες των πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδινών με κυτταροτοξική δράση (**3-5**) και συνθετικά παράγωγα αυτών (**6a-d**) (Perlíková *et al.*, 2017)

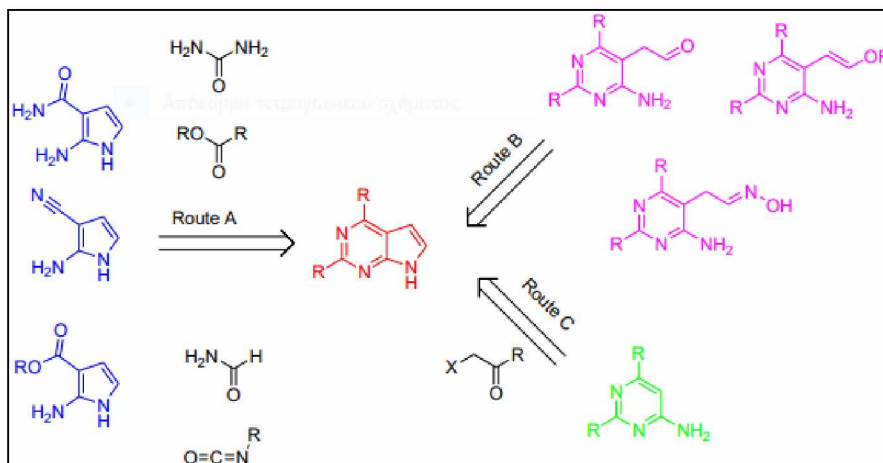
Η tubercidin, η toyocamycin και η sangivamycin φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές κινάσες και τα νουκλεοτίδια που προκύπτουν (μονοφωσφορικά, διφωσφορικά και τριφωσφορικά) ενσωματώνονται στη συνέχεια στο DNA και RNA προκαλώντας έτσι βλάβη στις λειτουργίες αυτών. Παρά το γεγονός ότι έχουν παρόμοια δομή, έχουν διαφορετικούς τρόπους δράσης. Η tubercidin επιδρά σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η ωρίμανση του πρόδρομου mRNA, η μιτοχονδριακή αναπνοή, η επεξεργασία του rRNA, η μεθυλίωση του tRNA καθώς και η σύνθεση πουρινών. Ακόμη, ασκεί ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της υδρολάσης της S-αδενοσυλ-ομοκυστεΐνης. Η toyocamycin δρα ανασταλτικά έναντι της κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της σύνθεσης και ωρίμανσης του rRNA. Επίσης πρόσφατα βρέθηκε ότι η toyocamycin είναι ισχυρός αναστολέας της αποικοδόμησης του mRNA η οποία προκαλείται από την πρωτεΐνη XBP1 (X box binding protein 1). Η πρωτεΐνη αυτή συμμετέχει στο μονοπάτι IRE1α-XBP1 (inositol-requiring enzyme 1 - X box binding protein 1 pathway) που παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου στο οξειδωτικό στρες. Η ανασταλτική επίδραση της toyocamycin στο μονοπάτι αυτό οδηγεί σε απόπτωση των κυττάρων σε όγκους με στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και στο πολλαπλό μύελωμα. Η sangivamycin εμφανίζει κυτταροτοξικότητα λόγω της ισχυρής και επιλεκτικής ανασταλτικής δράσης έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης C. Πρόσφατες μελέτες σε κύτταρα λεμφώματος έδειξαν ότι η sangivamycin δρα στα σηματοδοτικά μονοπάτια Erk και Akt, που εμφανίζονται απορρυθμισμένα σε πολλούς καρκινικούς όγκους. Ακόμα, προσδένεται στην HSP70 (heat-shock protein 70), που δρα ως μοριακός συνοδός και κατέχει σημαντικό ρόλο στην ογκολογία (Perlíková *et al.*, 2017).

1.2.2 Στρατηγικές σύνθεσης παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης

Οι στρατηγικές σύνθεσης των παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης που έχουν αναφερθεί στη σύγχρονη βιβλιογραφία παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ποικιλομορφία. Σε γενικές γραμμές η πορεία που προτάσσεται είναι πρώτα η σύνθεση του πυρρολικού δακτυλίου και στη συνέχεια ο σχηματισμός του δακτυλίου της πυριμιδίνης, αν και πολλές φορές χρησιμοποιείται και η αντίστροφη πορεία (Adel *et al.*, 2018b).

Αναλυτικότερα, στην πρώτη συνθετική πορεία (**Route A**) ο δακτύλιος της πυριμιδίνης σχηματίζεται πάνω σε υποκαταστημένο πυρρολικό δακτύλιο, μέσω δύο διαδοχικών αμιδικών δεσμών, με τη χρήση παραγώγων ουρίας, εστέρων, φορμαμίδων ή ρετρο-συνθετικών τους αναλόγων όπως π.χ. ορθοεστέρες ή οργανικές ισοκυανικές ενώσεις (**Σχήμα 1**).

Η δεύτερη, πολύ συνήθης, συνθετική πορεία περιλαμβάνει αρχικά τη σύνθεση 4-αμινοπυριμιδινών, οι οποίες φέρουν ως υποκαταστάτη 2-οξο-αίθυλο (ή 2-οξο-άλκυλο) ομάδα στη θέση 5, και στη συνέχεια τη συμπύκνωση των δύο υποκαταστατών ώστε να σχηματιστεί ο πυρρολικός δακτύλιος (**Route B**). Η εισαγωγή της 2-οξο-άλκυλο ομάδας στις 4-αμινοπυριμιδίνες επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης αυτών με α-αλογονωμένες κετόνες ή αλδεΐδες με επακόλουθη συμπύκνωση για το σχηματισμό του πυρρολίου, σε αντίδραση *one-pot* (**Route C**) (Adel *et al.*, 2018b).



Σχήμα 1. Παραδείγματα στρατηγικών σύνθεσης παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης (Adel *et al.*, 2018b)

Στην παρούσα εργασία ο πυρρολικός δακτύλιος δομήθηκε πάνω στον δακτύλιο της πυριμιδίνης. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει καταλυόμενες από παλλάδιο και χαλκό αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης (Sonogashira), μεταξύ τελικών αλκινίων και μιας 4-αμινοπυριμιδίνης, καθώς και μια καταλυόμενη από βάση 5-*endo-dig* κυκλοποίηση προς σχηματισμό του πυρρολικού δακτυλίου. Τα τελικά παράγωγα που προέκυψαν φέρουν υποκαταστάτες στις θέσεις 2, 6 και 7 του πυρήνα της πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης.

1.2.3 Εγκεκριμένα αντικαρκινικά φάρμακα με δραστική ουσία παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης και παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης σε κλινικές δοκιμές

Ο καρκίνος που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό είναι η δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Ο αριθμός των ετήσιων κρουσμάτων υπολογίζεται σε 18.000.000. Στις τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις υπάρχουν πολλοί περιορισμοί όπως οι έντονες παρενέργειες καθώς και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων, παράγοντες που καθιστούν επιτακτική την ανάγκη για ανακάλυψη νέων, ασφαλέστερων και πιο αποτελεσματικών αντικαρκινικών φαρμάκων. Σήμερα πάνω από το 75% των εγκεκριμένων από τον FDA αντικαρκινικών φαρμάκων είναι αζωτούχες ετεροκυκλικές ενώσεις καθώς αναπτύσσουν εύκολα δεσμούς υδρογόνου και άλλες αλληλεπιδράσεις (δεσμοί van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κ.α.) με μόρια-στόχους. Μεταξύ αυτών των ετεροκυκλικών ενώσεων, αρκετά αντικαρκινικά φάρμακα με δραστική ουσία παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης έχουν εγκριθεί από τον FDA και από τους αντίστοιχους οργανισμούς άλλων χωρών, ενώ άλλα βρίσκονται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών. Παρακάτω θα γίνει μια αναφορά σε κάποια εγκεκριμένα φαρμακευτικά σκευάσματα, καθώς και σε ορισμένα παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης που έχουν εισέλθει σε κλινικές δοκιμές.

1.2.3.1 Εγκεκριμένα αντικαρκινικά φάρμακα με δραστική ουσία παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης

- **Ribociclib**

Το Ribociclib (Ριμποσικλίμπη) είναι ένα αντικαρκινικό φάρμακο με πυρήνα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης που κυκλοφορεί στην αγορά από την εταιρία Novartis με την εμπορική ονομασία Kisqali (**Εικόνα 5**). Τον Μάρτιο του 2017 έλαβε έγκριση από τον FDA, σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, ως θεραπεία σε γυναίκες με θετικό σε ορμονικό υποδοχέα (HR+) και αρνητικό στον υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2-) προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού (Novartis, 2017).

Το Ribociclib πρόκειται για έναν εκλεκτικό αναστολέα των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών (CDKs) 4 και 6. Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται όταν δεσμεύονται από τις D κυκλίνες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε σηματοδοτικά μονοπάτια σχετιζόμενα με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται μέσω του συμπλέγματος D-CDK4/6 που φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb). In vitro μελέτες σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού έδειξαν ότι το Ribociclib μείωσε την φωσφορυλίωση της pRb, εμποδίζοντας έτσι τα κύτταρα να περάσουν από το σημείο ελέγχου G1 του κυτταρικού κύκλου, καθώς επίσης μείωσε τον πολλαπλασιασμό τους. Ακόμα, σε in vivo μελέτες παρατηρήθηκε υποχώρηση του όγκου μετά από θεραπεία με Ribociclib η οποία σχετίστηκε με αναστολή της φωσφορυλίωσης της pRb (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2020b).



Εικόνα 5. Χημική δομή Ribociclib

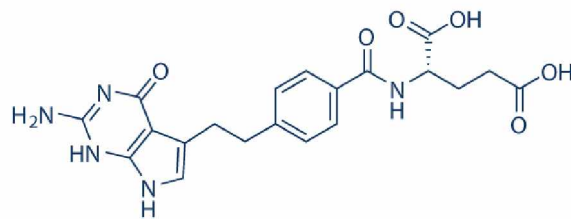
- **Pemetrexed**

Το Pemetrexed (Πεμετρεξίδη) είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που διατίθεται στην αγορά από την εταιρεία Elli Lilly με την εμπορική ονομασία ALIMTA (**Εικόνα 6**). Τον Φεβρουάριο του 2004 έλαβε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία καρκίνων όπως το κακοήθες μεσοθηλίωμα του υπεζωκότα και τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, συνδυαστικά με τη σισπλατίνη (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2020a).

Το Pemetrexed είναι ένας ανταγωνιστής του φολικού οξέος, με πυρήνα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης, που ασκεί την αντικαρκινική του δράση διαταράσσοντας μεταβολικές διεργασίες

των κυττάρων οι οποίες εξαρτώνται από το φολικό οξύ και είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό τους. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι το Pemetrexed αναστέλλει μια σειρά εξαρτώμενων από φολικό οξύ ενζύμων που συμμετέχουν στη de novo σύνθεση νουκλεοτιδίων θυμιδίνης και πουρίνης. Τα ένζυμα αυτά είναι: η θυμιδική συνθάση (TS), η διυδροφυλλική αναγωγίαση (DHFR), και η φορμυλοτρανσφεράση του γλυκιναμιδικού ριβονουκλεοτιδίου (GARFT) (Fuld *et al.*, 2010).

Το Pemetrexed μεταφέρεται εντός των κυττάρων μέσω του μεταφορέα του ανηγμένου φολικού, αλλά και μεμβρανικών πρωτεϊνικών μεταφορικών συστημάτων που δεσμεύουν φολικό οξύ. Μόλις το φάρμακο εισέλθει στα κύτταρα μετατρέπεται σε πολυγλουταμικές μορφές από το ένζυμο φολυλπολυγλουταμική συνθετάση, αυτές παραμένουν στα κύτταρα και αναστέλλουν κυρίως τη δράση των ενζύμων TS και GARFT. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται κυρίως εντός των καρκινικών κυττάρων και σε μικρότερο βαθμό στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι πολυγλουταμικές μορφές έχουν αυξημένο χρόνο ημίσειας ζωής εντός των κυττάρων με αποτέλεσμα αυξημένη διάρκεια δράσης του φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2020a).



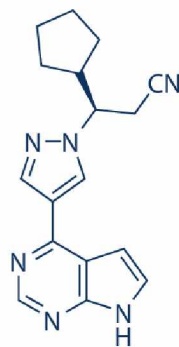
Εικόνα 6. Χημική δομή Pemetrexed

- **Ruxolitinib**

Το Ruxolitinib (Ρουξολιτινίμπη), το οποίο παλιότερα ήταν γνωστό ως INCB018424 ή INC424, κυκλοφορεί από την εταιρία Novartis με την εμπορική ονομασία Jakafi ή και Jakavi (**Εικόνα 7**). Εγκρίθηκε από τον FDA το 2011 και από τον EMA το 2012 για τη θεραπεία σχετικής με τη νόσο σπληνομεγαλίας ή συμπτωμάτων, σε ασθενείς με πρωτοπαθή μυελοϊνώση, ενώ το 2014 εγκρίθηκε για την μυελοϊνώση μετά από αληθή πολυκυτταραιμία (Ajayi *et al.*, 2018). Επίσης ερευνήθηκε για τη θεραπεία ασθενών με COVID-19 που εμφάνισαν σοβαρές επιπλοκές, ωστόσο οι μελέτες δεν έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Novartis, 2020).

Αξίζει να σημειωθεί πως το Ruxolitinib είναι ο πρώτος ανταγωνιστικός αναστολέας ATP των JAK1 και JAK2 που αναπτύχθηκε, καθώς και ο πρώτος χημειοθεραπευτικός παράγοντας που έλαβε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία της μυελοϊνώσης.

Οι JAK1 και JAK2 ανήκουν στην οικογένεια των κυτταροπλασματικών τυροσινικών κινασών Janus και εμπλέκονται στη σηματοδότηση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αιμοποίηση και την ανοσοποιητική λειτουργία. Είναι γνωστό πως στη μυελοϊνώση και στην αληθή πολυκυτταραιμία η μεταγωγή σημάτων των JAK1 και JAK2 απορρυθμίζεται. Οι αιτίες της απορρύθμισης πιστεύεται ότι είναι: η ενεργοποίηση της οδού JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription proteins) λόγω των υψηλών επιπέδων κυκλοφορούντων κυτοκινών, η υπερλειτουργία των JAK1 και JAK2 εξαιτίας μεταλλάξεων που φέρουν, και η αδρανοποίηση των αρνητικών ρυθμιστικών μηχανισμών. Το σηματοδοτικό μονοπάτι JAK/STAT παίζει βασικό ρυθμιστικό ρόλο στη παραγωγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων και εμπλέκεται σε πολύπλοκες και σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η αιμοποίηση και η ανοσοβιολογική απόκριση (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2021). Το Ruxolitinib αναστέλλοντας τις JAK1 και JAK2, μπλοκάρει τα απορρυθμισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια και αποτρέπει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών κυττάρων.



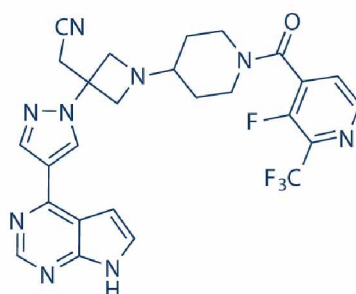
Εικόνα 7. Χημική δομή Ruxolitinib

Εκτός από το Ruxolitinib, υπάρχουν τρία επιπλέον εγκεκριμένα από τον FDA παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης που δρουν ως αναστολείς των JAKs. Το πρώτο παράγωγο είναι το Tofacitinib που διατίθεται στην αγορά από τη Pfizer με την εμπορική ονομασία XELJANZ. Έχει εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται ή έχουν δυσανεξία στη μεθοτρεξάτη, καθώς επίσης βρίσκεται σε στάδια κλινικών δοκιμών για αποφυγή της απόρριψης μοσχευμάτων σε μεταμοσχεύσεις, αλλά και για τη θεραπεία της ψωρίασης. Το δεύτερο παράγωγο ονομάζεται Baricitinib και διατίθεται στην αγορά από την εταιρία Eli Lilly με την εμπορική ονομασία Olumiant. Έχει εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με μέτρια έως σοβαρή ρευματοειδή αρθρίτιδα που είχαν ανεπαρκή ανταπόκριση σε μία ή περισσότερες θεραπείες με αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF). Τέλος το τρίτο παράγωγο είναι το Oclacitinib και πρόκειται για κτηνιατρικό φάρμακο που φέρει την εμπορική ονομασία APOQUEL, και διατίθεται από την εταιρία Zoetis. Εγκρίθηκε από τον FDA το Μάιο του 2013 και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ατοπικής δερματίτιδας και του κνησμού που προκαλείται από αλλεργική δερματίτιδα σε σκύλους ηλικίας τουλάχιστον 12 μηνών.

1.2.3.2 Παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης σε κλινικές δοκιμές

- **Itacitinib**

Το Itacitinib είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας της JAK1, που ανήκει στην οικογένεια των κινασών τυροσίνης Janus, και φαίνεται να έχει αντικαρκινική και ανοσορρυθμιστική δράση (**Εικόνα 8**). Οι μελέτες έδειξαν ότι μετά την στοματική χορήγηση, το Itacitinib αναστέλλει επιλεκτικά την JAK1 παρεμποδίζοντας έτσι την φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών STAT. Επίσης εμποδίζεται και η παραγωγή προφλεγμονωδών παραγόντων από κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη-23 (IL-23) και η ιντερλευκίνη-6 (IL-6). Το Itacitinib έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της μυελοϊνωσης, μεταστατικών ή προχωρημένων συμπαγών όγκων, της λευχαιμίας των Β-κυττάρων και άλλων ασθενειών, ενώ πλέον βρίσκεται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του διάχυτου λεμφώματος από μεγάλα Β-κύτταρα, διαφόρων τύπων μεταστατικών καρκίνων και άλλες ασθένειες (*Itacitinib*). Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί 49 κλινικές δοκιμές στον ιστότοπο clintrials.gov.

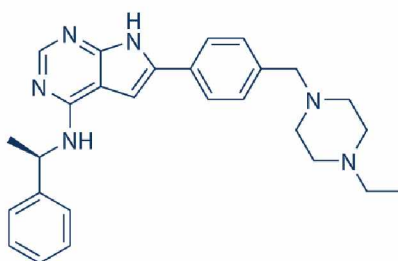


Εικόνα 8. Χημική δομή Itacitinib

- **AEE-788**

Το AEE-788 είναι ένα παράγωγο πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης που εμφανίζει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι τόσο του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), όσο και του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) (**Εικόνα 9**). Και οι δύο αυτοί υποδοχείς έχουν ενεργότητα τυροσινικής κινάσης. Ο EGFR μαζί με τους υποδοχείς ERBB2, ERBB3 και ERBB4 συγκροτούν την οικογένεια των υποδοχέων ERBB. Παρόλο που οι υποδοχείς ERBB είναι κρίσιμοι ρυθμιστές για τις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, έχει αποδειχτεί ότι η απορρύθμισή τους, ως συνέπεια της γονιδιακής ενίσχυσης, της υπερέκφρασης πρωτεϊνών και/ή της ενεργοποίησης μεταλλάξεων, οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνων. Από τα μέλη της οικογένειας ERBB, ο ERBB2 και ο EGFR συχνά υπερεκφράζονται σε διάφορους καρκίνους (Hsu *et al.*, 2016). Αντίστοιχα ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και ο υποδοχέας του (VEGFR), έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στη φυσιολογική αγγειογένεση, αλλά και στις περισσότερες καταστάσεις παθολογικής αγγειογένεσης, όπως ο καρκίνος.

Μελέτες ενζυμικής δραστηριότητας έδειξαν ότι το AEE-788 έδρασε ανασταλτικά, σε επίπεδο nM, έναντι του EGFR και του VEGFR, ενώ ανέστειλε τη φωσφορυλίωση των υποδοχέων EGFR και ERBB2 η οποία προκαλείται από τους αυξητικούς παράγοντες στα κύτταρα. Ακόμα το AEE-788 επέδειξε αντιπλλασιαστική δράση έναντι καρκινικών σειρών στις οποίες υπερεκφράζονταν ο EGFR και ο ERBB2, καθώς επίσης ανέστειλε τον πλλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων της ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας που διεγείρονται από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα και τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (Traxler *et al.*, 2004). Το AEE-788 έχει χρησιμοποιηθεί σε τρεις κλινικές δοκιμές ως μονοθεραπεία αλλά και σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως του πολύμορφου γλοιοβλαστώματος, όγκων του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος (AEE-788).



Εικόνα 9. Χημική δομή AEE788

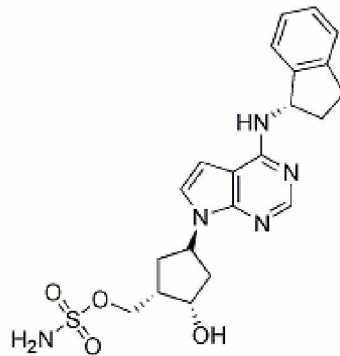
- **Pevonedistat**

Το Pevonedistat (MLN4924) είναι ένα μόριο με πυρήνα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης, και πρόκειται για το πρώτο μικρό μόριο-αναστολέα του ενζύμου ενεργοποίησης της πρωτεΐνης NEDD8, NAE (NEDD8-activating enzyme) (Εικόνα 10).

Η NEDD8 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8) είναι μια πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους, η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο σε μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που ονομάζεται νεδυλίωση. Η νεδυλίωση είναι μια αναστρέψιμη ομοιοπολική σύζευξη της NEDD8 με κατάλοιπα λυσίνης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων της, η οποία ενεργοποιείται από έναν ενζυμικό καταρράκτη στον οποίο συμμετέχει και το NAE. Η σύζευξη αυτή μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα, τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τη διαμόρφωση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών-στόχων. Τα πιο γνωστά υποστρώματα της νεδυλίωσης είναι οι υπομονάδες Cullin των Cullin-RING λιγασών (CRLs). Δεδομένου ότι η υπερενεργοποίηση των CRLs οδηγεί στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, η στόχευση της νεδυλίωσης των υπομονάδων Cullin φαίνεται να είναι μια προσέγγιση για τη θεραπεία του καρκίνου.

Η ανάλυση της δομής του Pevonedistat αποκάλυψε ότι προσδέεται ομοιοπολικά με τη πρωτεΐνη NEDD8, σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο Pevonedistat-NEDD8 το οποίο παραμένει ισχυρά προσδεμένο στο NAE. Με αυτόν τον τρόπο, το Pevonedistat μπλοκάρει αποτελεσματικά τη νεδυλίωση των υπομονάδων Cullin και απενεργοποιεί τις CRL, οδηγώντας

σε συσσώρευση διαφόρων υποστρωμάτων CRL, προκαλώντας έτσι πολλαπλές κυτταρικές αποκρίσεις, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της γήρανσης και της αυτοφαγίας. Οι προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι το Pevonedistat έγινε καλά ανεκτό ενώ παράλληλα εμφάνισε ισχυρή αντικαρκινική δράση και έτσι έχει προχωρήσει σε μια σειρά κλινικών δοκιμών διαφόρων φάσεων για ασθενείς που πάσχουν από συμπαγείς όγκους και αιματολογικές κακοήθειες (Zhou *et al.*, 2019). Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί 30 κλινικές δοκιμές στον ιστότοπο [clintrials.gov](https://clinicaltrials.gov).

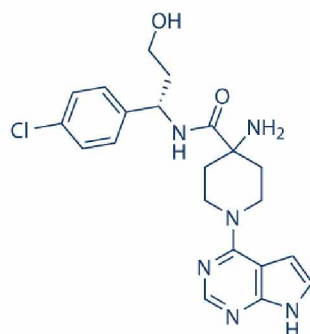


Εικόνα 10. Χημική δομή Pevonedistat

- **Capivasertib**

Το Capivasertib (AZD5363) είναι ένας από του στόματος ενεργός και ισχυρός αναστολέας των μελών της οικογένειας των κινασών σερίνης/θρεονίνης AKT (**Εικόνα 11**). Μελέτες έδειξαν ότι προσδένεται και αναστέλλει τη φωσφορυλίωση και των τριών ισομορφών της AKT: Akt1, Akt2 και Akt3. Η αναστολή της AKT εμποδίζει τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της που μεσολαβούν σε κυτταρικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαίρεση, η απόπτωση και ο μεταβολισμός της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων. Το σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει η AKT (PI3K/AKT/mTOR) προάγει το μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση των κυττάρων, την ανάπτυξη και την αγγειογένεση, ως απάντηση σε εξωκυτταρικά σήματα. Έχει παρατηρηθεί ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR απορρυθμίζεται σε ένα ευρύ φάσμα συμπαγών όγκων και αιματολογικών κακοηθειών και αυτό συνήθως συμβαίνει λόγω μεταλλάξεων σε πολλαπλά συστατικά της σηματοδότησης. Για το λόγο αυτό η AKT, που πρόκειται για ένα βασικό μόριο του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT, αποτελεί στόχο για τη θεραπεία πολλών τύπων καρκίνου.

Το Capivasertib βρίσκεται σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου όπως του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του προστάτη, διαφόρων συμπαγών όγκων και αιματολογικών καρκίνων. Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί 18 κλινικές δοκιμές στον ιστότοπο [clintrials.gov](https://clinicaltrials.gov).



Εικόνα 11. Χημική δομή Capivasertib

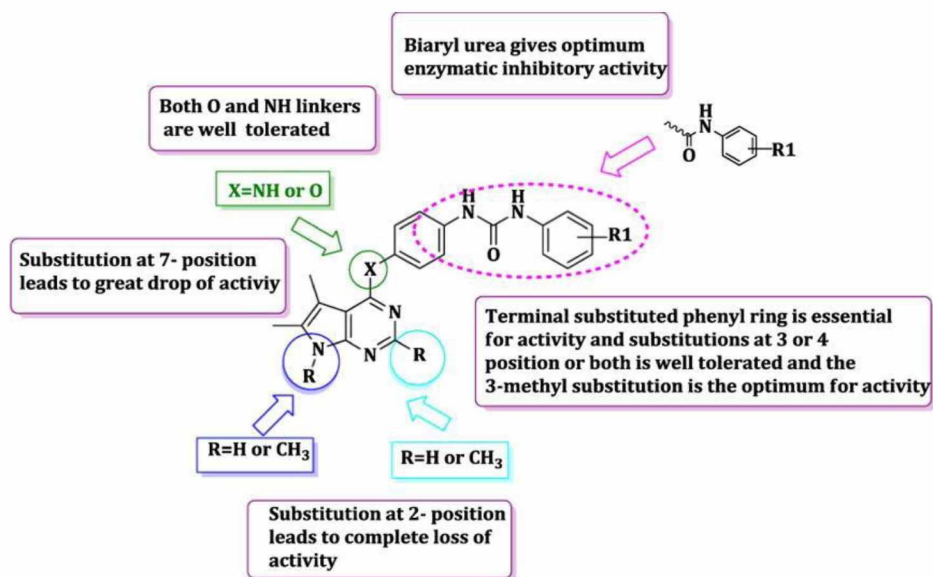
1.2.4 Η δράση παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης έναντι διάφορων βιολογικών στόχων

Κάθε χρόνο πραγματοποιούνται πολλές μελέτες για την ανεύρεση νέων παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης με πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες. Αρκετές από τις μελέτες αυτές αξιολογούν τη δράση των μορίων αυτών ως αναστολείς κινασών, αλλά και έναντι άλλων βιολογικών στόχων. Παρακάτω γίνεται μια αναφορά σε ορισμένες από αυτές τις μελέτες.

Οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες ως αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2)

Ο υποδοχέας VEGFR-2 είναι ένας βασικός παράγοντας για την καρκινική αγγειογένεση. Σε φυσιολογικά κύτταρα είναι ο βασικός υποδοχέας που ρυθμίζει την αγγειογένεση, τη κυτταρική διαφοροποίηση και επιβίωση καθώς και τη διαπερατότητα και τη διαστολή των αγγείων.

Οι Adel *et al.* (2018) συνέθεσαν μια σειρά παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης, χρησιμοποιώντας ως πρότυπα γνωστούς αναστολείς του VEGFR-2. Επίσης αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητά τους, *in vitro*, ως προς την αναστολή της δράσης της κινάσης του VEGFR-2, και οι τιμές IC₅₀ που προέκυψαν ήταν της τάξης των nM. Όλα τα νεοσυντιθέμενα παράγωγα εμφάνισαν πολύ ισχυρή δοσοεξαρτώμενη ανασταλτική δράση έναντι του VEGFR-2. Από τα παράγωγα αυτά, εκείνα που έφεραν ως υποκαταστάτες τμήματα διαρυλ-ουρίας παρουσίασαν την ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε τιμές IC₅₀ της τάξης των nM (**Σχήμα 2**). Οι τελικές ενώσεις δοκιμάστηκαν σε πάνω από 60 καρκινικές κυτταρικές σειρές, ενώ μελέτες της μοριακής πρόσδεσης έδειξαν ότι ο τρόπος με τον οποίο τα μόρια αυτά προσδένονταν με τον VEGFR-2, ήταν παραπλήσιος με αυτόν των εγκεκριμένων από τον FDA αναστολέων. Επομένως αυτοί οι νεοσυντιθέμενοι αναστολείς κινασών, δυνητικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη ενός νέου αντικαρκινικού φαρμάκου με στοχευμένη δράση (Adel *et al.*, 2018a).



Σχήμα 2. Η υποκατάσταση με τμήματα διαρυλ-ουρίας απέδωσε παράγωγα με τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση. (Adel *et al.*, 2018a)

Οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες ως αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epithermal growth factor receptor, EGFR)

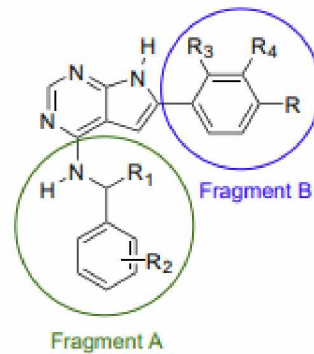
Ο EGFR/Her1, όπως και άλλοι υποδοχείς των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων έχει διαπιστωθεί ότι συχνά υφίστανται μεταλλάξεις ή εκφράζονται σε υπερβολικό βαθμό σε καρκίνους με συμπαγείς όγκους. Η αυθόρμητη φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης αυτών των υποδοχέων έχει ως αποτέλεσμα την διαμόρφωση θέσεων πρόσδεσης διαφόρων μεσολαβητών της κατάντη σηματοδότησης που τελικά οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και τη διαφυγή της απόπτωσης των κυττάρων. Οι υποδοχείς αυτοί εντοπίζονται κυρίως στη κυτταρική μεμβράνη αλλά επίσης έχουν βρεθεί στο πυρήνα, στα μιτοχόνδρια και σε άλλα κυτταρικά οργάνδια.

Στα μέλη της οικογένειας HER μπορούν να ασκήσουν ανασταλτική δράση μονοκλωνικά αντισώματα και διάφορα άλλα μόρια. Το είδος της θεραπευτικής προσέγγισης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος και τα χαρακτηριστικά του κάθε καρκίνου. Σήμερα εγκεκριμένοι αναστολείς των κινάσων των υποδοχέων HER είναι το Erlotinib και το Gefitinib που χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ο οποίος εμφανίζει κακή πρόγνωση και μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης. Οι αναστολείς αυτοί έχουν δράση έναντι των υποδοχέων EGFR άγριου τύπου αλλά και εναντίον μεταλλαγμένων τύπων όπως ο EGFR L858R. Επίσης ο εγκεκριμένος αναστολέας Lapatinib έχει βρεθεί ότι έχει ανασταλτική δράση του υποδοχέα Her2 στον καρκίνο του μαστού (Kaspersen *et al.*, 2014).

Οι Kaspersen *et al.* (2014) μελέτησαν την επίδραση παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης στον πολλαπλασιασμό διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (A431, C-33A, AU-565, K-562) και συνέκριναν τη δράση αυτών των παραγώγων με το εγκεκριμένο φάρμακο Erlotinib. Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκεκριμένοι ερευνητές είχαν διερευνήσει και στο παρελθόν την

ανασταλτική δράση των πυρρολοπυριμιδινών και των θειενοπυριμιδινών έναντι του EGFR, υποδεικνύοντας την υπεροχή των πυρρολοπυριμιδινών.

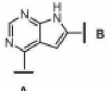
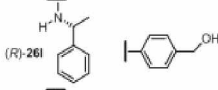
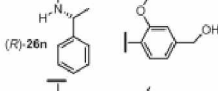
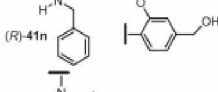
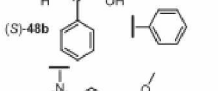
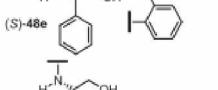
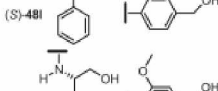
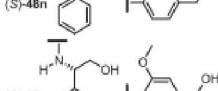
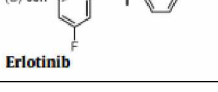
Έτσι στη νέα τους μελέτη χρησιμοποίησαν ως κρίωμα την 4-N-υποκατεστημένη 6-αρυλ-7H-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-4-αμίνη από τη οποία συνέθεσαν διάφορα παράγωγα, τοποθετώντας ποικίλους υποκαταστάτες στη 4-αμινο-ομάδα (Fragment A) και στην 6-αρυλο-ομάδα (Fragment B) προσπαθώντας να εντοπίσουν τους πιο ισχυρούς αναστολείς (**Σχήμα 3**).



Σχήμα 3. Η μελέτη βασίστηκε στη προσθήκη διάφορων υποκαταστατών στη 4-αμινο-ομάδα και στην 6 αρυλο-ομάδα. (Kaspersen *et al.*, 2014)

Τα αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης ορισμένων από τα συνθετικά παράγωγα απεικονίζονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Τιμές ανασταλτικής δραστηριότητας IC₅₀ των 8 επιλεγμένων παραγώγων για διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Kaspersen *et al.*, 2014)

	Ba/F3-EGFR ^{L858R} nM (n = 3)	A-431 μM (n = 3)	AU-565 μM (n = 2)	C-33A μM (n = 2)	K-562 μM (n = 3)
(R)-26l 	80 ± 9	1.2 ± 0.5	>31	0.8 ± 0.1	>100
(R)-26n 	99 ± 27	0.8 ± 0.4	2.9 ± 0.5	0.8 ± 0.2	9.5 ± 0.5
(R)-41n 	>200	0.8 ± 0.1	>31	1.1 ± 0.3	>100
(S)-48b 	127 ± 29	0.3 ± 0.1	2.5 ± 0.4	0.7 ± 0.0	15 ± 2
(S)-48e 	134 ± 22	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.8 ± 0.0	17 ± 1
(S)-48l 	172 ± 46	0.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1	0.5 ± 0.0	18 ± 2
(S)-48n 	70 ± 22	0.5 ± 0.3	1.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0	16 ± 2
(S)-60n 	83 ± 13	0.8 ± 0.1	3.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1	29 ± 1
Erlotinib	142 ± 65	0.4 ± 0.1	3.3 ± 0.6	0.9 ± 0.0	55 ± 9


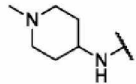
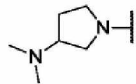


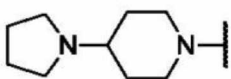

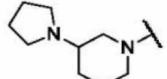
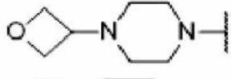


Οι ερευνητές εντόπισαν συνολικά 8 παράγωγα με πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική δράση. Η ισχυρότερη ενζυμική ανασταλτική δράση παρατηρήθηκε όταν στην 6 αρυλο-ομάδα είχαν τοποθετηθεί πολικοί υποκαταστάτες υδροξυμεθυλίου. Επίσης τα νέα παράγωγα εμφάνισαν ανασταλτική δράση και έναντι της οικογένειας των κινασών Src. Από τη σύγκριση της δράσης των παραγώγων με το Erlotinib σε μοντέλα καρκινικών κυττάρων διαφαίνεται η υψηλότερη ανασταλτική ισχύς τους (Kaspersen *et al.*, 2014).

Οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες ως αναστολείς της τυροσινικής κινάσης των υποδοχέων της οικογένειας TAM

Η TAM (Axl, Mer και Tyro3) είναι μια οικογένεια υποδοχέων με δράση τυροσινικών κινασών που ρυθμίζουν διαδικασίες συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης και της μετανάστευσης των κυττάρων, καθώς επίσης εμπλέκονται στη ρύθμιση παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν ανιχνευθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπου ενισχύουν την επιβίωση, τη χημειοαντίσταση και την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό τα μέλη της οικογένειας TAM θεωρούνται δυνητικός θεραπευτικός στόχος (Musumecia *et al.*, 2017).

Οι Chung *et al.* (2020) συνέθεσαν μια σειρά 7-αρυλ-2-ανιλινο-πυρρολοπυριμιδινών που αξιολογήθηκαν ως ισχυροί αναστολείς των κινασών Axl και Mer χωρίς όμως να εμφανίζουν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι της Tyro3 (40% αναστολή της Tyro3 για IC₅₀ 1μM). Μέρος των αποτελεσμάτων απεικονίζονται στον Πίνακα 2. Από αυτά φαίνεται ότι το παράγωγο 27 εμφάνισε τιμές IC₅₀ 16nM και 2nM για τις Axl και Mer αντίστοιχα, ενώ ανέστειλε σημαντικά και τη φωσφορυλίωση της Mer σε μια σειρά καρκινικών κυττάρων. Οι μελέτες της σχέσης δομής-δραστικότητας και προσομοίωσης της πρόσδεσης έδειξαν ότι ο σχηματισμός μιας γέφυρας άλατος και η προσθήκη μιας αρωματικής ομάδας στο N⁷ ήταν απαραίτητα βήματα για την ανάπτυξη ανασταλτικής δραστηριότητας των Axl και Mer (Chung *et al.*, 2020).

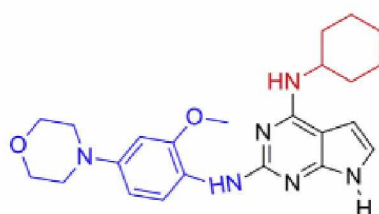
Πίνακας 2. Δραστικότητα διαφόρων παραγώγων (Chung *et al.*, 2020)

Compound	R2	R3	% Inhibition at 1 μM		
			MER	AXL	TYRO3
16		H	15	104	27
17		H	10	199	37
18		H	46	175	30
25	H		2	17	86
26	H		4	18	92
27	H		2	16	40
28	H		7	32	72
29	H		31	31	49
30	H		36	212	39
31	H		>3000	>3000	4
32	H		40	288	0

Οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες ως αναστολείς της κινάσης *Mps1*

Η *Mps1* είναι μια κινάση που ρυθμίζει το σημείο ελέγχου SAC (spindle assembly checkpoint), δηλαδή το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου. Φωσφορυλιώνει κατάλοιπα κυρίως θρεονίνης, τυροσίνης και σερίνης σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες-στόχους. Ο βασικός ρόλος της είναι να εξασφαλίζει το σωστό προσανατολισμό των αδελφών χρωματίδων και το σωστό διαχωρισμό τους κατά μήκος του κινητοχώρου της ατράκτου. Σε αντίθεση με τα περισσότερα φυσιολογικά όργανα, όπου τα επίπεδα της κινάσης *Mps1* είναι αρκετά χαμηλά, σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως του παγκρέατος, του μαστού, του θυροειδούς, σε περιπτώσεις γλοιοβλαστωμάτων κ.ά. αυτή υπερεκφράζεται. Στον καρκίνο του μαστού, η υπερέκφραση της κινάσης *Mps1* έχει βρεθεί ότι συνδέεται με υψηλό ιστολογικό βαθμό κακοήθειας, με επιθετικότητα και μεταστατικότητα του καρκινικού όγκου, ανευπλοειδία και αστάθεια των χρωμοσωμάτων (Serrano *et al.*, 2020). Αυτή η υπερέκφραση της σε καρκινικούς όγκους καθώς και ο σημαντικός ρόλος της στη κυτταρική διαίρεση οδήγησαν στη διεξαγωγή ερευνών για την σύνθεση αναστολέων της κινάσης *Mps1* και την αξιολόγησή τους ως πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων (Liu *et al.*, 2012).

Οι Sugimoto *et al.* (2017) σχεδίασαν με τη βοήθεια μοριακών προσομοιώσεων μικρά μόρια-αναστολείς της *Mps1*, τα οποία στη συνέχεια συνέθεσαν και αξιολόγησαν σε καρκινικές σειρές καρκίνου του μαστού μελετώντας την επίδρασή τους σε ποικιλία βιολογικών λειτουργιών. Τα συνθετικά αυτά μόρια είχαν ικρίωμα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης και έφεραν υποκαταστάσεις σε διάφορες θέσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πολλά από τα συντιθέμενα μόρια, παρουσίασαν ισχυρές αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 0.356 μM έως 0.809 μM, ενώ έδρασαν αναστέλλοντας λειτουργίες όπως ο διπλασιασμός των κεντροσωμάτων και η ανάπτυξη της ατράκτου. Επίσης βρέθηκε ένα παράγωγο που ανέστειλε και την ανάπτυξη όγκων σε ποντίκια που έφεραν ξενομοσχεύματα καρκίνου του μαστού (Εικόνα 12).



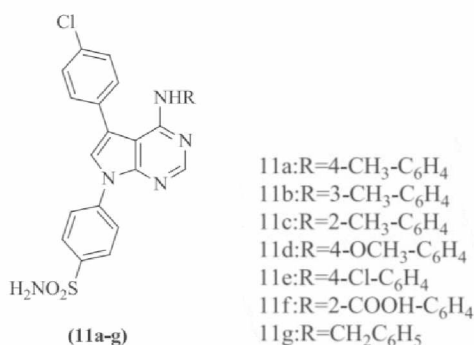
Εικόνα 12. Χημική δομή του συνθετικού παραγώγου που εμφάνισε τη μικρότερη τιμή IC₅₀ (0.356 μM) και ανέστειλε την ανάπτυξη όγκων σε ποντίκια που έφεραν ξενομοσχεύματα καρκίνου του μαστού (Sugimoto *et al.*, 2017)

Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτά τα μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικά μέσα για τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Sugimoto *et al.*, 2017).

Οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες ως αναστολείς καρβονικών ανυδρασών

Οι καρβονικές ανυδράσες (CA) καταλύουν την αναστρέψιμη ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα προς παραγωγή ενός όξινου ανθρακικού ιόντος και ενός πρωτονίου. Πολλαπλές ισομορφές CA εμπλέκονται σε μια σειρά ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Σε συμπαγείς όγκους, τα συνεχώς διαιρούμενα κύτταρα δημιουργούν υποξικές συνθήκες που τελικά οδηγούν στη δημιουργία όξινου μικροπεριβάλλοντος. Τα υποξικά καρκινικά κύτταρα διαθέτουν διαφορετικούς μηχανισμούς για τη ρύθμιση και την προσαρμογή του μικροπεριβάλλοντος προκειμένου να επιβιώσουν. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την έκφραση των CA ισομορφών IX (CA IX) και XII (CA XII). Τα ένζυμα αυτά βοηθούν στη διατήρηση ενός φυσιολογικού ενδοκυττάριου pH, ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν σε ένα όξινο εξωκυτταρικό pH, με αποτέλεσμα την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Η έκφραση των CA IX και CA XII έχει επίσης αποδειχθεί ότι προάγει την νεοπλασματική διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Singh *et al.*, 2018).

Οι Khalil *et al.* (2020) σε μια μελέτη τους συνέθεσαν μια σειρά παραγώγων πυρρολίου και πυρρολοπυριμιδίνης με υποκαταστάτη σουλφοναμίδιο και αξιολόγησαν τη δράση τους ως αναστολείς καρβονικών ανυδρασών σε καρκινικά κύτταρα HeLa του τραχήλου της μήτρας. Αρχικά εξετάστηκε η ανασταλτική τους δράση έναντι των κυτοσολικών ισομορφών της καρβονικής ανυδράσης, I και II, αλλά και των διαμεμβρανικών ισομορφών IX και XII. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα παράγωγα εμφάνιζαν δραστικότητα έναντι της IX ισομορφής, και συγκεκριμένα το παράγωγο 11a εμφάνιζε δύο φορές υψηλότερη δραστικότητα έναντι της ισομορφής IX σε σχέση με το φάρμακο ακεταζολαμίδη. Ωστόσο η δραστικότητα των παραγώγων έναντι της ισομορφής XII ήταν μειωμένη σε σχέση με το φάρμακο. Τα παράγωγα που εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστικότητα αξιολογήθηκαν περαιτέρω ως προς την εκλεκτικότητα και τη δραστικότητά τους σε φυσιολογικά κύτταρα αλλά και σε καρκινικά κύτταρα HeLa. Η δραστικότητα της ένωσης 11b ήταν τρεις φορές υψηλότερη σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου, ενώ της ένωσης 11f ήταν περίπου τέσσερις φορές υψηλότερη. Και οι δύο αυτές ενώσεις έφεραν πυρήνα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης. Τέλος πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακής πρόσδεσης από όπου και φάνηκε ότι οι επιλεγμένες ενώσεις προσδένονταν με την ισομορφή IX με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που συνδέεται η ακεταζολαμίδη (Khalil *et al.*, 2020).

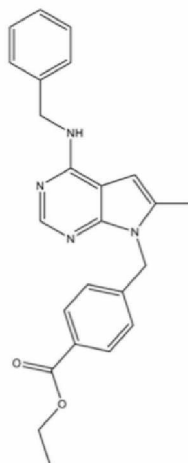


Εικόνα 13. Χημική δομή των μορίων που εμφάνισαν υψηλότερη δραστικότητα έναντι της καρβονικής ανυδράσης IX (Khalil *et al.*, 2020)

Οι πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνες ως δηλητήρια της μιτωτικής ατράκτου

Οι μικροσωληνίσκοι οργανώνονται από ετεροδιμερή α - και β - τουμπουλίνης, είναι εξαιρετικά δυναμικές δομές που μεταβάλλονται συνεχώς και συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η κυτταρική κίνηση και η κυκλοφορία οργανιδίων και συστατικών στο εσωτερικό του κυττάρου. Ακόμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων καθώς συμμετέχουν στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου κατά την κυτταρική διαίρεση οπότε και εξασφαλίζεται η κίνηση των χρωμοσωμάτων. Εντός του κυττάρου, οι μικροσωληνίσκοι παρουσιάζουν ποικιλομορφία καθώς μπορεί να αποτελούνται από διάφορους υποτύπους τουμπουλίνης οι οποίοι υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και αλληλεπιδρούν με διαφορετικές πρωτεΐνες (microtubule-associated proteins). Εκτός από αυτούς τους εγγενείς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τη δυναμική των μικροσωληνίσκων, υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες (παράγοντες στόχευσης των μικροσωληνίσκων) που μπορούν να την επηρεάσουν είτε σταθεροποιώντας τη δομή τους, είτε αποσταθεροποιώντας την. Έτσι οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν σημαντικό στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου (Borys *et al.*, 2020).

Συνήθως για την αποδιοργάνωση της μιτωτικής ατράκτου χρησιμοποιούνται ισχυρές ουσίες σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία που όμως εμφανίζουν σε μεγάλο βαθμό παρενέργειες καθώς επιδρούν και σε υγιή κύτταρα και επιπλέον προκαλούν χημειοανθεκτικότητα. Οι Gilson *et al.* (2017) πραγματοποίησαν διαλογή υψηλής απόδοσης για πάνω από 7.500 μόρια, προκειμένου να εντοπίσουν νέες χημικές ενώσεις ικανές να ξεπεράσουν την αντίσταση στην απόπτωση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Από τα μόρια αυτά ένα παράγωγο πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης που ονομάστηκε PP-13 (**Εικόνα 14**), ταυτοποιήθηκε ως ισχυρό δηλητήριο της μιτωτικής ατράκτου.



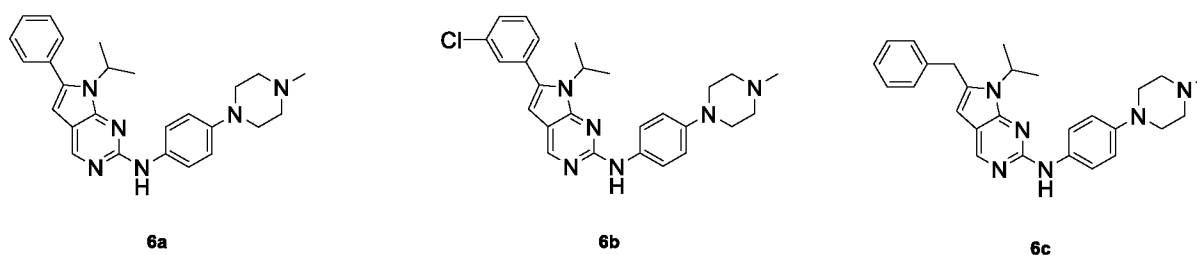
Εικόνα 14. Χημική δομή παραγώγου πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης (PP-13) που ταυτοποιήθηκε ως ισχυρό δηλητήριο της μιτωτικής ατράκτου (Gilson *et al.*, 2017)

Αξιολογώντας τις αντικαρκινικές ιδιότητες της συγκεκριμένης ένωσης παρατηρήθηκε ότι ασκεί ισχυρή κυτταροτοξική δράση σε πλήθος καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων εμφανίζοντας ανθεκτικότητα σε στοχευμένες θεραπείες και χημειοθεραπείες. Περαιτέρω

μελέτες που αφορούσαν στον τρόπο δράσης του παραγώγου αυτού αποκάλυψαν την παρεμβολή του στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, καθώς και στη δυναμική των μικροσωληνίσκων, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να οδηγούνται σε απόπτωση. In vitro μελέτες έδειξαν ότι το μόριο αυτό αναστέλλει άμεσα τη συγκρότηση των μικροσωληνίσκων στοχεύοντας τη θέση πρόσδεσης της κολχικίνης στην β -τουμπουλίνη, ενώ αντίστοιχα από in vivo μελέτες διαπιστώθηκε η αντικαρκινική δράση του μορίου αυτού καθώς και η ελάχιστη τοξικότητά του (Gilson *et al.*, 2017).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι αντικαρκινικές ιδιότητες των παραγώγων πυρρολο[2,3-*a*]πυριμιδίνης έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών με αποτέλεσμα να έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες στις οποίες επιχειρείται η σύνθεση νέων παραγώγων με πιθανές κυτταροστατικές ιδιότητες. Κάποια από αυτά τα παράγωγα έχουν εγκριθεί από τον FDA και από τους αντίστοιχους οργανισμούς άλλων χωρών, ενώ άλλα έχουν εισέλθει σε διάφορες φάσεις κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου. Βάσει όσων αναφέρθηκαν και λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τη σημασία των ενώσεων αυτών στη θεραπεία του καρκίνου, η παρούσα μελέτη διεξάχθηκε με σκοπό τη σύνθεση των νέων 2,6,7-τριυποκατεστημένων παραγώγων πυρρολο[2,3-*a*]πυριμιδίνης **6a**, **6b**, και **6c**, ως εν δυνάμει κυτταροστατικών παραγόντων (**Εικόνα 15**). Ως υποκαταστάτες των θέσεων 2, 6 και 7 επιλέχθηκαν η 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη, οι ομάδες: φαίνυλο, 3-χλωρο- φαίνυλο και βένζυλο, και η ισοπροπυλο-ομάδα, αντίστοιχα.

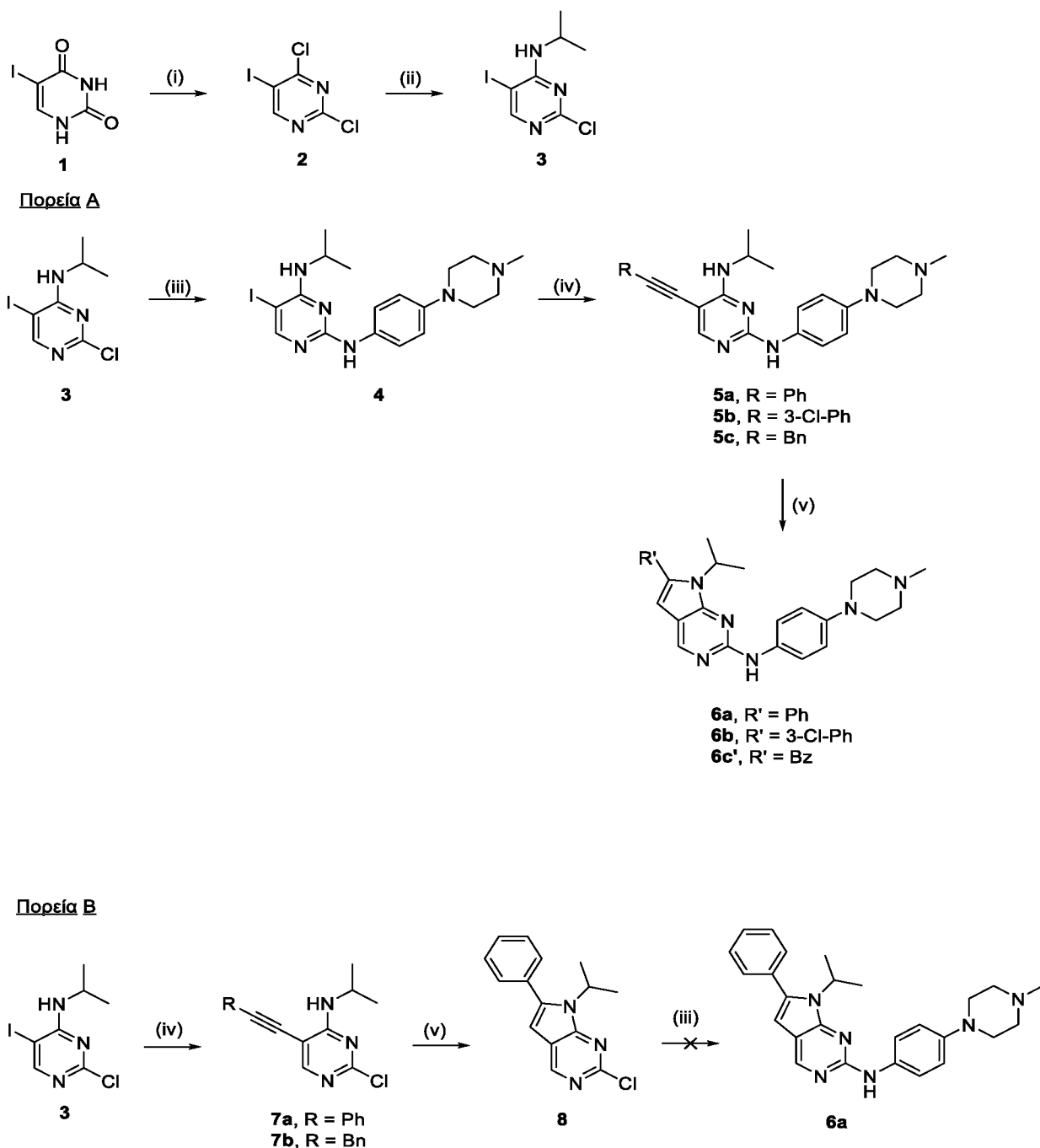


Εικόνα 15. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η σύνθεση των νέων 2,6,7-τριυποκατεστημένων παραγώγων πυρρολο[2,3-*a*]πυριμιδίνης **6a**, **6b**, **6c**, ως εν δυνάμει κυτταροστατικών παραγόντων.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Συνθετική πορεία

Η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης επιχειρήθηκε ακολουθώντας δύο διαφορετικές συνθετικές πορείες οι οποίες είχαν ως κοινό ενδιάμεσο την *N*-ισοπροπυλο-5-ιωδο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνη (**3**) (Σχήμα 4). Οι δύο πορείες διαφέρουν ως προς το στάδιο εισαγωγής της ανίλινο ομάδας στο δακτύλιο της πυριμιδίνης.

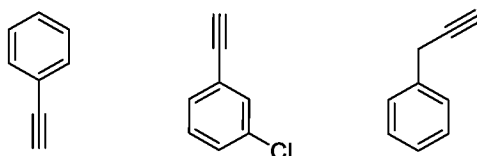


Σχήμα 4. Σύνθεση των ενώσεων **2**, **3**, **4**, **5a-c**, **6a-c'**, **7a-b**, **8**. Αντιδραστήρια και συνθήκες (i) POCl₃, *i*-PrNEt, (ii) *i*-PrNH₂, *i*-PrNEt, DCM, RT, (iii) 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη, *p*-TsOH, *i*-PrOH, 85 °C, (iv) αλκίνιο, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, RT ή 50 °C, (v) Cs₂CO₃, DMF, 100-120 °C.

Η σύνθεση του κοινού ενδιάμεσου **3** πραγματοποιήθηκε με δύο επιμέρους αντιδράσεις ξεκινώντας από την εμπορικά διαθέσιμη 5-ιωδο-ουρακίλη (**1**). Αρχικά η **1** με την επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου (POCl₃) παρουσία N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (i-Pr₂NEt) στους 105 °C (**i**), μετατράπηκε στην 2,4-διχλωροπυριμιδίνη (**2**). Στην αντίδραση αυτή το POCl₃ έδρασε ταυτόχρονα ως χλωριωτικό μέσο αλλά και ως διαλύτης, και το παραγόμενο υδροχλώριο δεσμεύθηκε από την i-Pr₂NEt. Στη συνέχεια επιτεύχθηκε η τοποεκλεκτική υποκατάσταση του χλωρίου-4 της **2** από την ισοπροπυλαμίνη (i-PrNH₂), παρουσία i-Pr₂NEt σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (DCM) και θερμοκρασία δωματίου (**ii**), για να παραληφθεί το κοινό ενδιάμεσο **3**. Στο σημείο αυτό η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων επιχειρήθηκε ακολουθώντας τις δυο διαφορετικές συνθετικές πορείες, **A** και **B**.

Στην πορεία **A** πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση του χλωρίου-2 της **3** με την ανίλινο ομάδα. Η αντίδραση της **3** με την 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη πραγματοποιήθηκε με θέρμανση στους 85 °C, παρουσία p-τολουολοσουλφονικού οξέος (p-TsOH) και με διαλύτη ισοπροπανόλη (i-PrOH) (**iii**), για να δώσει την 5-ιωδοπυριμιδιν-2,4-διαμίνη **4**.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης (Sonogashira) της **4** με τρία διαφορετικά αλκίνια: φαινυλακετυλένιο, 1-αιθυνυλο-3-χλωρο-βενζόλιο και 3-φαινυλο-1-προπίνιο, παρουσία τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)-παλλαδίου (Pd(PPh₃)₄) ως καταλύτη, ιωδιούχου χαλκού (CuI) ως συγκαταλύτη, και τριαιθυλαμίνης (Et₃N) ως βάσης, σε διαλύτη άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) (**iv**), για να παραληφθούν οι 5-αλκυνοπυριμιδιν-2,4-διαμίνες **5a-c** (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Στη συνθετική πορεία **A** πραγματοποιήθηκαν καταλυόμενες από παλλάδιο και χαλκό αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης Sonogashira με τα αλκίνια: φαινυλακετυλένιο, 1-αιθυνυλο-3-χλωρο-βενζόλιο και 3-φαινυλο-1-προπίνιο (από τα αριστερά προς τα δεξιά), ενώ στην πορεία **B** οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με φαινυλακετυλένιο και 3-φαινυλο-1-προπίνιο.

Ο σχηματισμός του πυρρολικού δακτυλίου επιτεύχθηκε μέσω μιας καταλυόμενης από βάση 5-endo-dig κυκλοποίησης, με θέρμανση στους 100-120 °C παρουσία ανθρακικού καισίου (Cs₂CO₃) σε άνυδρο DMF (**v**), για να παραληφθούν τα τελικά προϊόντα **6a-c**.

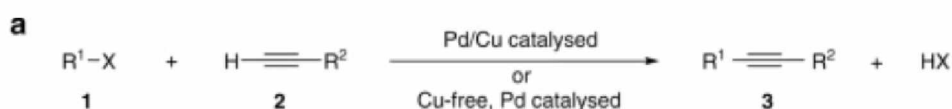
Στην πορεία **B** πραγματοποιήθηκαν καταλυόμενες από παλλάδιο και χαλκό αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης Sonogashira της **3** με δύο διαφορετικά αλκίνια: φαινυλακετυλένιο και 3-φαινυλο-1-προπίνιο, για να παραληφθούν οι 5-αλκυνοπυριμιδιν-4-αμίνες **7a-b** (**iv**).

Σε αυτό το στάδιο της συνθετικής πορείας **B** ο σχηματισμός του πυρρολικού δακτυλίου επιχειρήθηκε μέσω της ίδιας αντίδρασης κυκλοποίησης που πραγματοποιήθηκε και στην πορεία **A** (**v**), από την οποία και παραλήφθηκε μόνο το κυκλοποιημένο παράγωγο **8**.

Προκειμένου να παραληφθεί το προϊόν **6a**, επιχειρήθηκε η εισαγωγή της 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνης στη θέση 2 της πυρρολοπυριμιδίνης **8**, υπό τις ίδιες συνθήκες που περιεγράφηκαν και στην πορεία **A (iii)**, χωρίς ωστόσο αυτή να καταστεί επιτυχή.

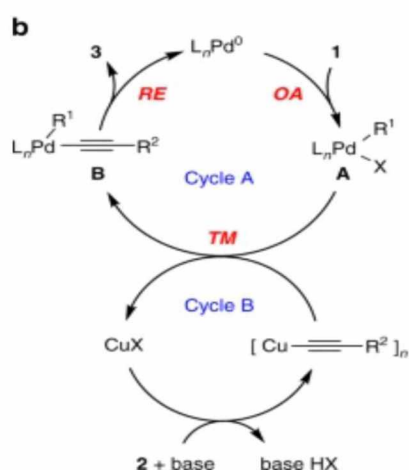
3.2 Αντίδραση Sonogashira

Η αντίδραση Sonogashira είναι μια καταλυόμενη από παλλάδιο, αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης η οποία πραγματοποιείται παρουσία ή απουσία συγκαταλύτη χαλκού (I), προς σχηματισμό sp^2 - sp δεσμού άνθρακα-άνθρακα, μεταξύ ενός οργανοαλογονιδίου (άρυλο ή αλκένυλο) (**1**) και ενός τελικού αλκινίου (**2**) (**Σχήμα 5**).



Σχήμα 5. Γενικό σχήμα αναπαράστασης της καταλυόμενης από παλλάδιο και χαλκό, ή άνευ χαλκού, αντίδρασης διασταυρούμενης σύζευξης Sonogashira (Gazvoda *et al.*, 2018)

Ο μηχανισμός της καταλυόμενης από παλλάδιο και χαλκό αντίδρασης διασταυρούμενης σύζευξης Sonogashira πιστεύεται ότι περιλαμβάνει τα στάδια της οξειδωτικής προσθήκης, της τρανσμετάλλωσης, της αναγωγικής απόσπασης και συνεχίζεται μέσω δύο καταλυτικών κύκλων, αυτόν του παλλαδίου (**Cycle A**) και αυτόν του χαλκού (**Cycle B**) οι οποίοι λειτουργούν συνεργιστικά (**Σχήμα 6**) (Sonogashira *et al.*, 1975). Αν και το στάδιο της τρανσμετάλλωσης και ο κύκλος του χαλκού δεν έχουν καθοριστεί πλήρως, ο μηχανισμός της αντίδρασης που έχει γίνει αποδεκτός από την επιστημονική κοινότητα είναι αυτός που παρουσιάζεται στο **Σχήμα 6** και αναλύεται στη συνέχεια (Gazvoda *et al.*, 2018).



Σχήμα 6. Προτεινόμενος μηχανισμός συνεργιστικά καταλυόμενης από παλλάδιο και χαλκό αντίδρασης διασταυρούμενης σύζευξης Sonogashira. OA (oxidative addition) οξειδωτική προσθήκη, TM (transmetalation) τρανσμετάλλωση, RE (reductive elimination) αναγωγική απόσπαση. (Gazvoda *et al.*, 2018)

Ο κύκλος του παλλαδίου ξεκινά με οξειδωτική προσθήκη του αλογονιδίου R^1-X (**1**) στο Pd^0 προς σχηματισμό του συμπλόκου του Pd^{II} , **A** (Σχήμα 5 και 6). Το στάδιο αυτό διευκολύνεται στις περιπτώσεις όπου το X του αλογονιδίου R^1-X είναι το ιώδιο ή το ψευδαλογόνο τριφθορομεθανοσουλφονικό ($X = I$ ή OTf αντίστοιχα), αλλά και στην περίπτωση ύπαρξης ομάδων που έλκουν ηλεκτρόνια καθώς η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του δεσμού άνθρακα- X ελαττώνεται.

Παράλληλα με όσα αναφέρθηκαν για τον κύκλο του παλλαδίου, στον κύκλο του χαλκού το τελικό αλκίνιο **2** αντιδρά με ένα αλογονίδιο του χαλκού (CuX , πχ CuI), παρουσία μιας βάσης (συνήθως αυτή είναι τριτοταγής αμίνη, πχ τριαιθυλαμίνη), η οποία και αποσπά το όξινο υδρογόνο του τελικού αλκινίου **2**, και σχηματίζεται το αντίστοιχο ακετυλενίδιο του χαλκού (Chinchilla *et al.*, 2007).

Στη συνέχεια, στο στάδιο της τρανσμετάλλωσης, ο υποκαταστάτης X του συμπλόκου **A** δεσμεύεται από τον Cu , και υποκαθίσταται από την ακετυλενική ομάδα του ακετυλενιδίου. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου **B** καθώς και στην αναγέννηση του συγκαταλύτη CuX .

Τέλος το σύμπλοκο **B** υφίσταται αναγωγική απόσπαση και σχηματίζεται το τελικό συζευγμένο αλκίνιο **3**, ενώ συγχρόνως ο καταλύτης παλλαδίου (Pd^0) αναγεννάται.

3.3 5-endo-dig κυκλοποίηση

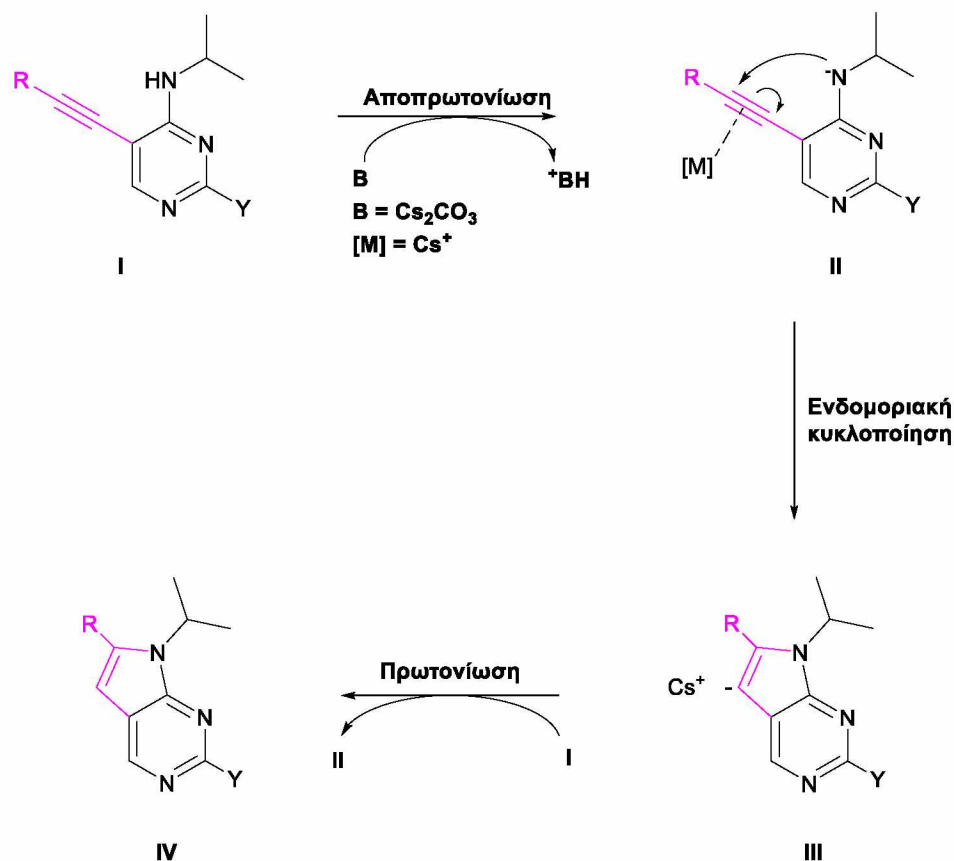
Το 1976 ο Jack Baldwin πρότεινε μια σειρά κανόνων οι οποίοι περιγράφουν τις σχετικά ευνοϊκές αντιδράσεις σχηματισμού δακτυλίων σε αλεικυκλικές ενώσεις (Baldwin, 1976). Οι κανόνες αυτοί ορίστηκαν βάσει των συνθηκών που απαιτούνται προκειμένου να επιτευχθεί αλληλοεπικάλυψη των κατάλληλων τροχιακών και ο σχηματισμός των επιθυμητών δεσμών.

Ο Baldwin προκειμένου να χαρακτηρίσει μια αντίδραση κυκλοποίησης χρησιμοποίησε τρεις προθέσεις. Η πρώτη πρόθεση ορίζει τον αριθμό των ατόμων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του δακτυλίου και μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή ≥ 3 . Η δεύτερη πρόθεση, *exo*- και *endo*-, υποδηλώνει το αν ο διασπώμενος δεσμός βρίσκεται αντίστοιχα εκτός ή εντός του δακτυλίου που σχηματίζεται (Σχήμα 7). Η τρίτη πρόθεση, *tet*-, *trig*-, και *dig*-, αναφέρεται στον υβριδισμό του ηλεκτρονιόφιλου άνθρακα που προσβάλλεται προς σχηματισμό του δακτυλίου. Αναλυτικότερα η πρόθεση *tet*- (tetrahedral) αντιστοιχεί σε sp^3 υβριδισμό, η πρόθεση *trig*- (trigonal) σε sp^2 υβριδισμό και η πρόθεση *dig*- (digonal) σε sp υβριδισμό. Σύμφωνα με τους κανόνες του Baldwin μόνο ορισμένοι συνδυασμοί των παραπάνω παραμέτρων ευνοούνται συμπεριλαμβανομένης και της 5-endo-dig κυκλοποίησης.



Σχήμα 7. Οι προθέσεις *exo*- και *endo*-, υποδηλώνουν αν ο διασπώμενος δεσμός βρίσκεται αντίστοιχα εκτός ή εντός του δακτυλίου που σχηματίζεται. (Sajid *et al.*, 2020)

Στο **Σχήμα 8** προτείνεται ένας μηχανισμός της 5-*endo-dig* κυκλοποίησης μέσω της οποίας δομείται ο δακτύλιος του πυρρολίου. Αρχικά, με αποπρωτονίωση του NH της 5-αλκυλοπυριμιδιν-4-αμίνης **I** από το Cs_2CO_3 , σχηματίζεται το ενδιάμεσο **II** όπου έχει ενισχυθεί ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας του ατόμου αζώτου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η 5-*endo-dig* κυκλοποίηση, πιθανόν υποβοηθούμενη από το σχηματισμό π-συμπλόκου του Cs^+ με τον τριπλό δεσμό, για να δώσει το ανιόν της πυρρολοπυριμιδίνης **III**. Τέλος, πρωτονίωση του ενδιαμέσου **III** από το NH δεύτερου μορίου της **I** δίνει την τελική πυρρολοπυριμιδίνη **IV**, με παράλληλο σχηματισμό επιπλέον ενδιαμέσου **II**.



Σχήμα 8. Προτεινόμενος μηχανισμός της 5-*endo-dig* κυκλοποίησης μέσω της οποίας δομείται ο δακτύλιος του πυρρολίου

3.4 Γενικές μέθοδοι

Αντιδραστήρια

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν χημικώς καθαρά και εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια, τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω καθαρισμό.

Άνυδρες συνθήκες και ξήρανση διαλυτών

Στις αντιδράσεις που απαιτούνταν άνυδρες συνθήκες, αυτές πραγματοποιήθηκαν υπό ατμόσφαιρα αζώτου, σε στεγανά πωματισμένους γυάλινους σωλήνες, οι οποίοι είχαν ξηρανθεί ολονύκτια σε κλίβανο, στους $200\text{ }^\circ\text{C}$, και χρησιμοποιήθηκαν άνυδροι διαλύτες. Το

διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα αποθηκεύτηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4 Å. Το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο αποστάχθηκε παρουσία υδριδίου του ασβεστίου και το απόσταγμα αποθηκεύτηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3 Å.

Θέρμανση

Στις αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκε θέρμανση αυτή πραγματοποιήθηκε σε ελαιόλουτρο ή σε συσκευή μικροκυμάτων και CEM Discover με αυτόματο τροφοδότη CEM-Explorer. Η συχνότητα λειτουργίας της συσκευής ήταν τα 2.45 GHz, με συνεχή ισχύ ακτινοβολίας, από 0 έως και 300 W, μέγιστη εκπεμπόμενη ισχύ 300 W και μέγιστη εκπεμπόμενη πίεση 250 PSI.

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography, TLC)

Ο έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Χρησιμοποιήθηκαν αλουμινένιες πλάκες προεπιστρωμένες με silica gel πάχους 0.2 mm που περιείχε φθορίζοντα δείκτη F_{254} . Οι κηλίδες των διαλυμένων ουσιών έγιναν ορατές κάτω από λάμπα υπεριώδους (ultraviolet, UV) ακτινοβολίας. Οι παράγοντες καθυστέρησης (retardation factor, R_f) των νεοσυντιθέμενων μορίων υπολογίστηκαν με τη χρήση της εξίσωσης $R_f = d_R/d_M$, όπου d_R και d_M η γραμμική απόσταση που διένυσε ο αναλύτης και η απόσταση που διένυσε ο διαλύτης από την αρχική γραμμή ανάπτυξης, αντίστοιχα.

Χρωματογραφία στήλης (column chromatography, CC)

Τα επιθυμητά προϊόντα παραλήφθηκαν έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (flash column chromatography), εφαρμόζοντας αέρα υπό πίεση στη στήλη. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε silica gel 60 (230-400 Mesh) της εταιρείας E. Merck.

Σημείο τήξεως (melting point, MP)

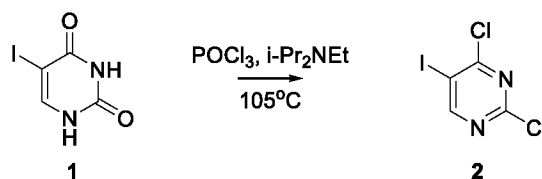
Τα σημεία τήξεως των στερεών προϊόντων προσδιορίστηκαν με όργανο MEL-TEMP® capillary melting point apparatus.

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR)

Η ταυτοποίηση της δομής των νεοσυντιθέμενων ενώσεων έγινε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Τα φάσματα ^1H NMR καταγράφηκαν στα 500 MHz, σε φασματόμετρο BRUKER Avance DRX 500, ενώ τα φάσματα ^{13}C NMR καταγράφηκαν στα 62.5 MHz φασματόμετρο BRUKER Avance III 250. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Οι χημικές μετατοπίσεις (chemical shifts, δ) είναι εκφρασμένες σε μέρη ανά εκατομμύριο (parts per million, ppm) και η κλίμακα δ βαθμονομήθηκε βάσει του σήματος της μη δευτεριωμένης ποσότητας του διαλύτη στα φάσματα ^1H NMR και του σήματος του άνθρακα-13 του διαλύτη στα φάσματα ^{13}C NMR.

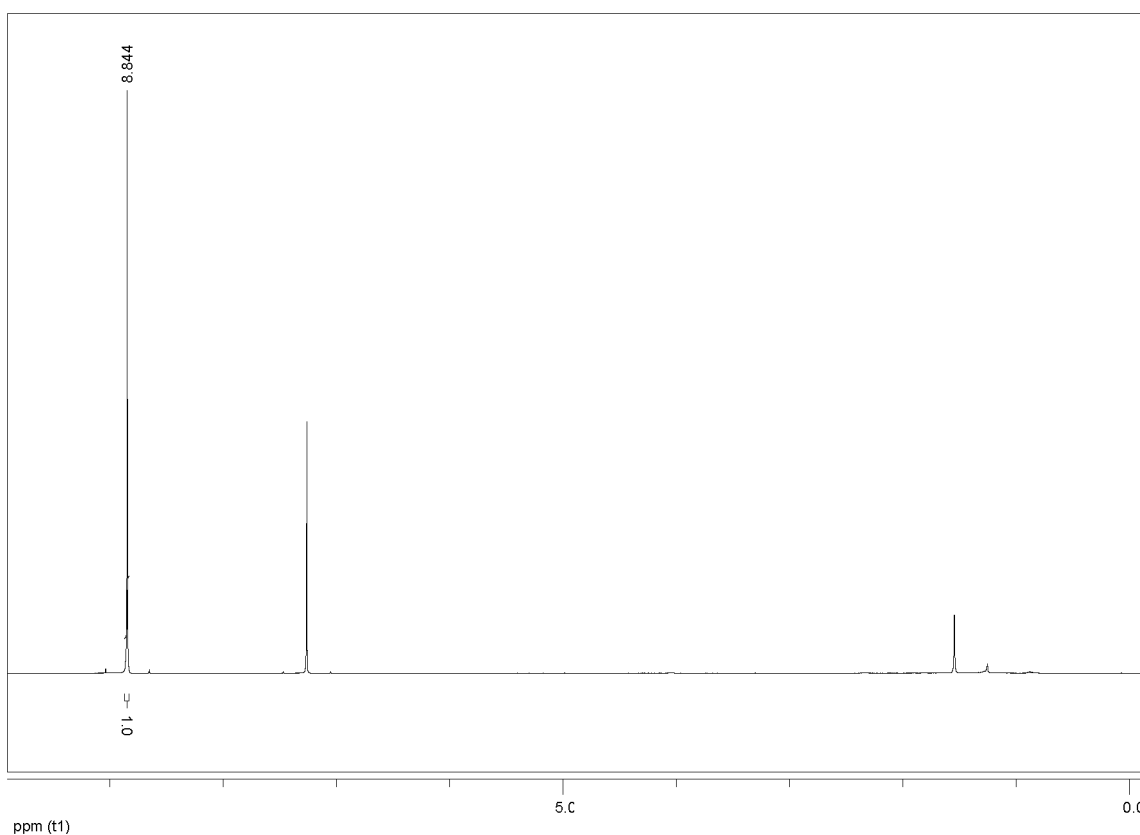
3.5 Σύνθεση του κοινού ενδιάμεσου *N*-ισοπροπυλο-5-ιωδο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνη (3)

2,4-διχλωρο-5-ιωδοπυριμιδίνη (2)



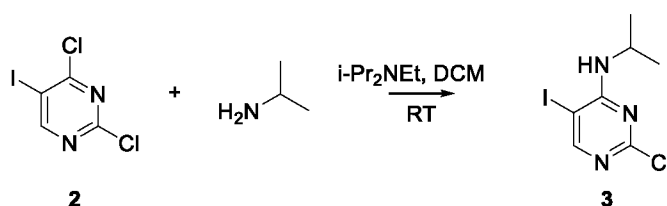
Σε διάλυμα εμπορικά διαθέσιμης 5-ιωδο-ουρακίλης (**1**) (1.190 g, 5.0 mmol) σε οξυχλωριούχο φώσφορο (3.7 mL), προστέθηκε σταγόδην *N,N*-δισοπροπυλ-αιθυλαμίνη (1.73 mL, 10.0 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύθηκε για 4 ώρες στους 105°C , σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Διαπιστώνοντας την ολοκλήρωση της αντίδρασης (TLC, EtOAc: Hexane = 1:9), ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε EtOAc (50 mL). Το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (2×50 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1×50 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, DCM: Hexane = 1:3 σε 1:2, v/v) και παραλήφθηκε η **2** (1.38 gr, 90.4%) ως μπεζ στερεό.

TLC R_f 0.34 (DCM: Hexane = 1:2). Σημείο τήξεως $71\text{--}74^\circ\text{C}$.



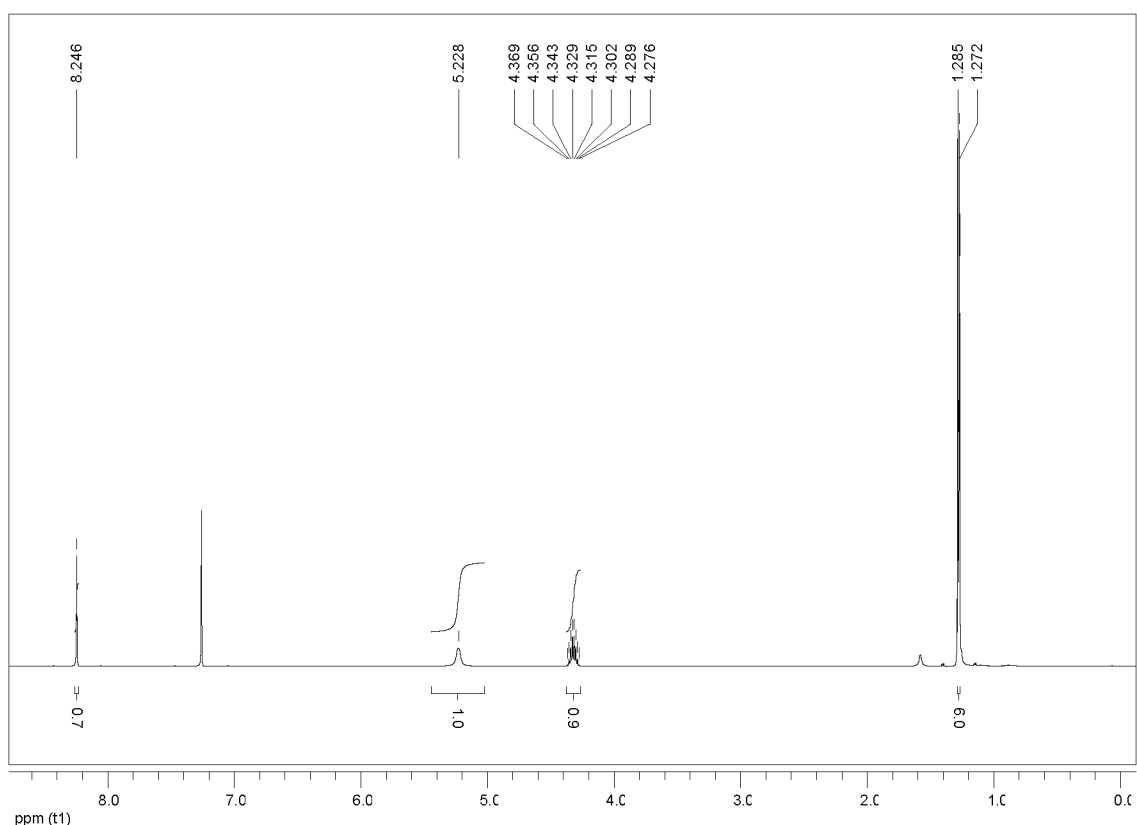
Εικόνα 17. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **2** (CDCl_3)

N-ισοπροπυλο-5-ιωδο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνη (3)

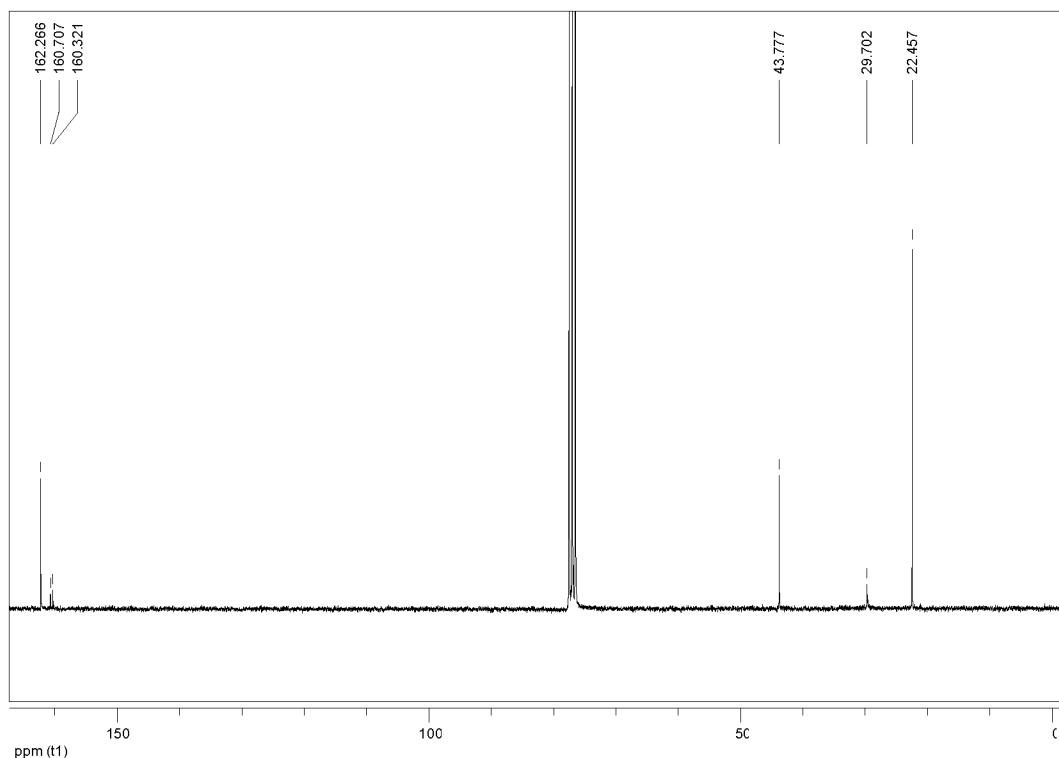


Σε διάλυμα της **2** (550 mg, 2 mmol), σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (15 mL), προστέθηκαν διαδοχικά και στάγδην N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (0.35 mL, 2 mmol), και ισοπροπυλαμίνη (0.2 mL, 2 mmol), στους 0 °C, σε παγόλουτρο, υπό συνεχή ανάδευση. Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και τέθηκε υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Αφού ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης (TLC, EtOAc: Hexane = 1:9), και διαπιστώθηκε η μη ολοκλήρωσή της, το μίγμα τέθηκε υπό ολονύκτια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης επανελέχθηκε (TLC, DCM: Hexane = 1:1) και διαπιστώνοντας την ολοκλήρωσή της, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε EtOAc (50 mL). Το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H₂O (2 × 20 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1 × 20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, DCM: Hexane = 2:3 σε 3:2, v/v) και παραλήφθηκε η **3** (522 mg, 88%) ως λευκό στερεό.

TLC R_f 0.19 (DCM: Hexane = 1:1). Σημείο τήξεως 51-54 °C.

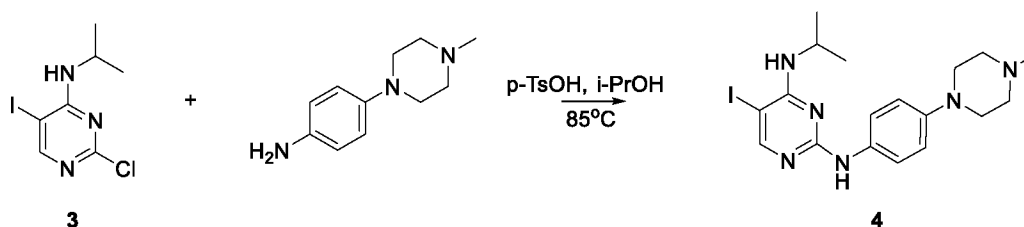


Εικόνα 18. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης **3** (CDCl₃)



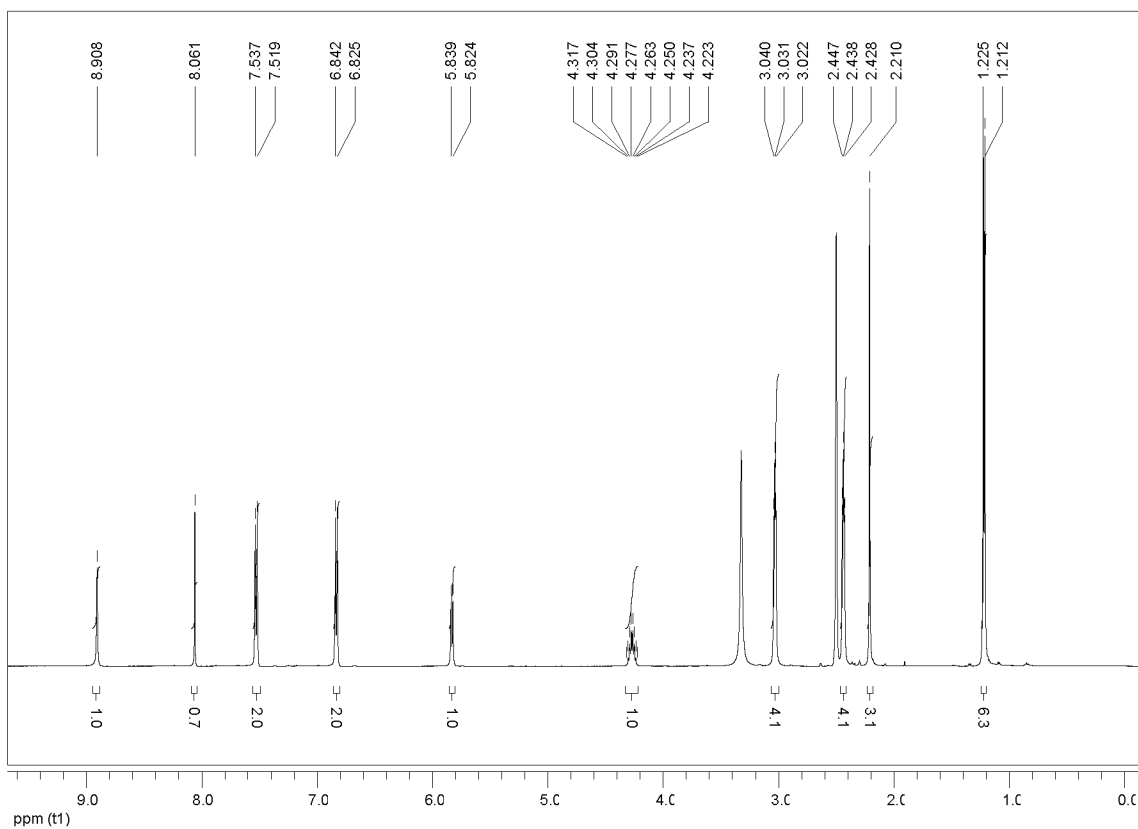
Εικόνα 19. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **3** (CDCl_3)

3.6 Σύνθεση της N^4 -ισοπροπυλο-5-ιωδο- N^2 -(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνης (**4**)

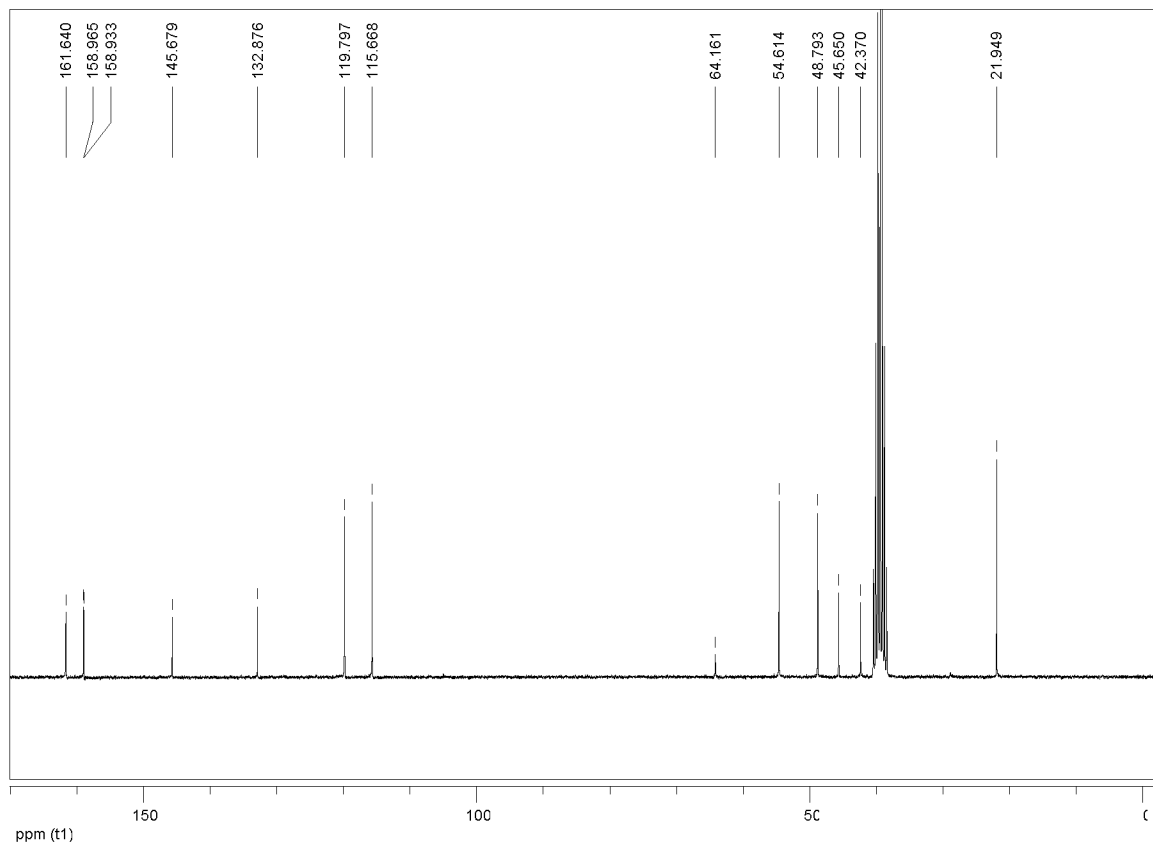


Διάλυμα της **3** (149 mg, 0.50 mmol), 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνης (96 mg, 0.50 mmol), *p*-τολουολοσουλφονικού οξέος (95 mg, 0.50 mmol), σε απαερωμένη ισοπροπανόλη (2.5 mL), ακτινοβολήθηκε με μικροκύματα για 1 ώρα στους 80-85 °C στα 100 Watts. Αφού ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης (TLC, EtOAc: Hexane = 3:1), και διαπιστώθηκε η μη ολοκλήρωσή της, το μίγμα της αντίδρασης τέθηκε υπό ολονύκτια ανάδευση στους 80-85 °C, σε ελαιόλουτρο. Η πορεία της αντίδρασης επανελέγχθηκε (TLC, EtOAc: Hexane = 4:1) και διαπιστώνοντας την ολοκλήρωσή της, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε EtOAc (40 mL). Το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 (3 × 15 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1 × 15 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, MeOH: DCM = 5:100, v/v) και παραλήφθηκε η **4** (147 mg, 64%) ως ανοικτό καφέ στερεό.

TLC R_f 0.23 (MeOH: DCM = 5:100). Σημείο τήξεως 160-161 °C.



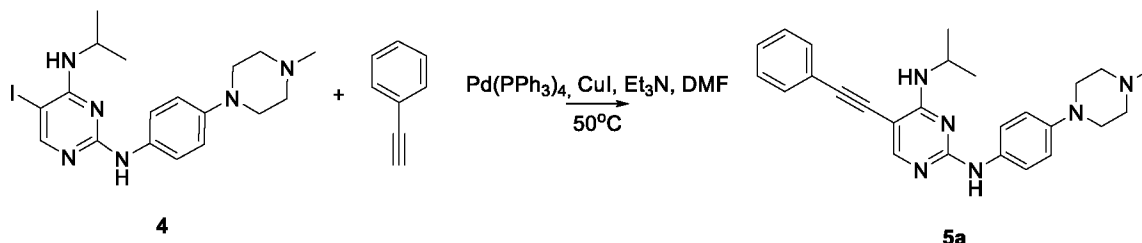
Εικόνα 20. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 4 (DMSO- d_6)



Εικόνα 21. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης 4 (DMSO- d_6)

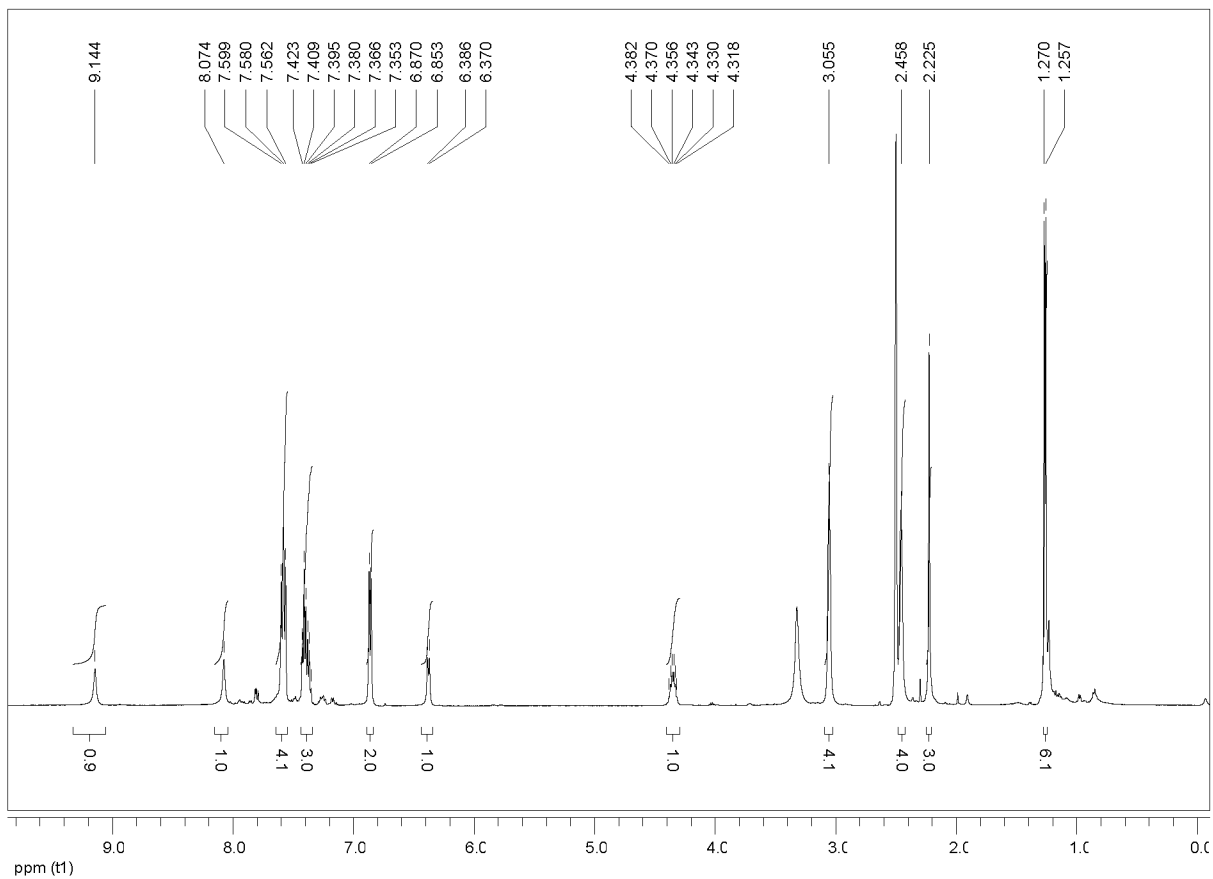
3.7 Γενική μέθοδος σύνθεσης των 5-αλκυνολοπυριμιδιν-2,4-διαμινών **5a-c**, **7a-b** (αντίδραση Sonogashira)

*N*⁴-ισοπροπυλο-*N*²-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5 (φαινυλαιθυνο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνη (**5a**)

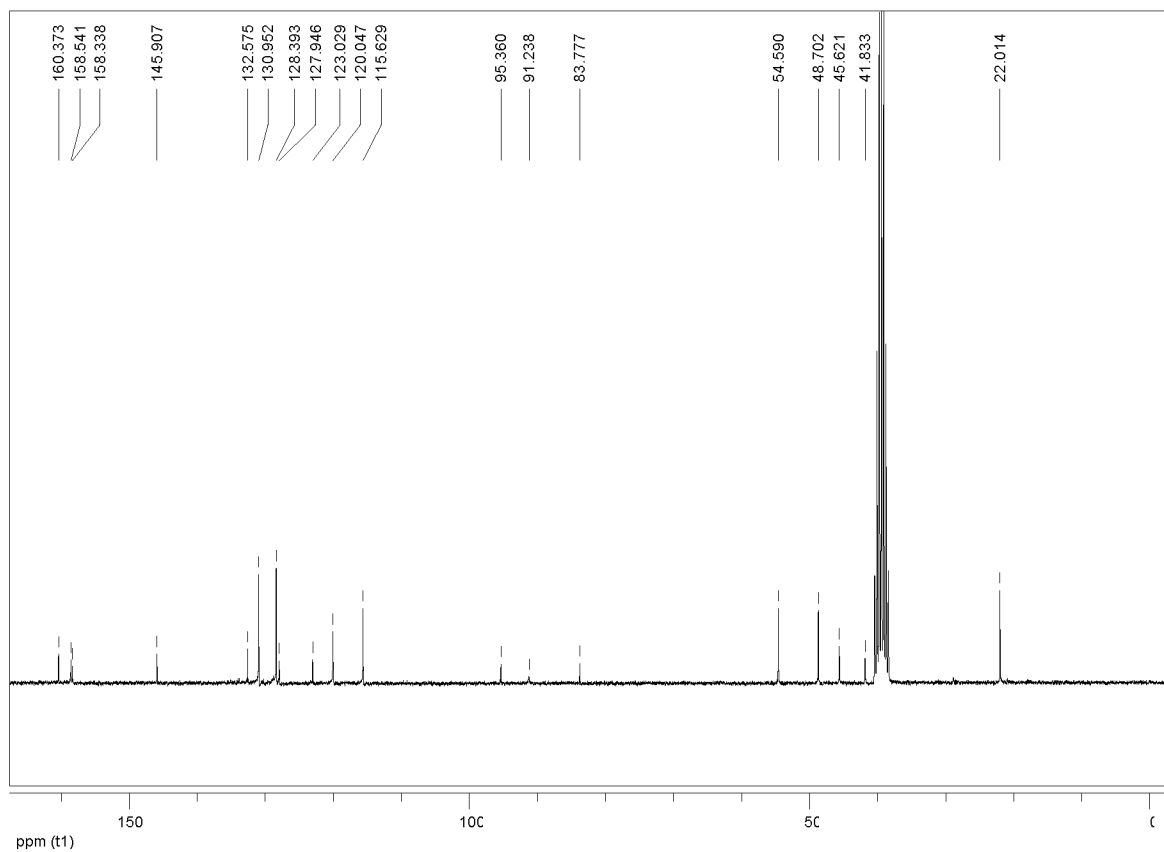


Διάλυμα της **4** (46 mg, 0.10 mmol), ιωδιούχου χαλκού (4 mg, 0.02 mmol), τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)-παλλαδίου (12 mg, 0.01 mmol), φαινυλακετυλενίου (33 μL , 0.30 mmol) και τριαιθυλαμίνης (42 μL , 0.30 mmol) σε άνυδρο DMF (1.0 mL), αναδεύθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα της αντίδρασης, ακτινοβολήθηκε με μικροκύματα για 1 ώρα στους 50°C στα 200 Watts. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, $\text{MeOH}:\text{DCM} = 5:100$), διαπιστώθηκε η μη ολοκλήρωσή της. Προστέθηκε ποσότητα φαινυλακετυλενίου (22 μL , 0.20 mmol), και το μίγμα αφέθηκε υπό ολονύκτια ανάδευση στους 50°C , σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η πορεία της αντίδρασης επανελέγχθηκε και διαπιστώνοντας την ολοκλήρωσή της, το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (20 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H_2O (4×5 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1×5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, $\text{MeOH}:\text{DCM} = 4:100$ σε $5:100$, v/v) και παραλήφθηκε η **5a** (32 mg, 80%) ως κίτρινο στερεό.

TLC R_f 0.18 ($\text{MeOH}:\text{DCM} = 5:100$). Σημείο τήξεως $140-142^\circ\text{C}$.

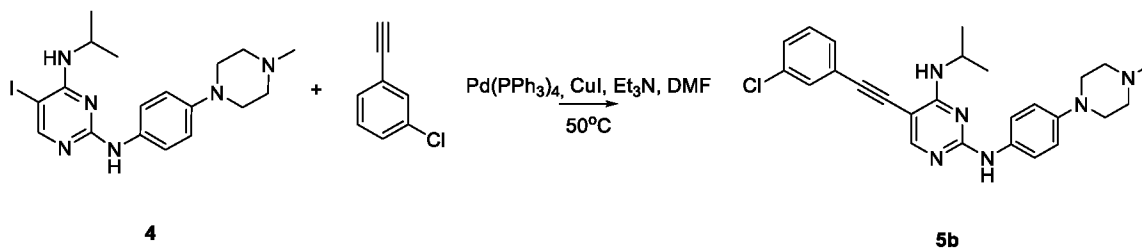


Εικόνα 22. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5a** (DMSO-d_6)



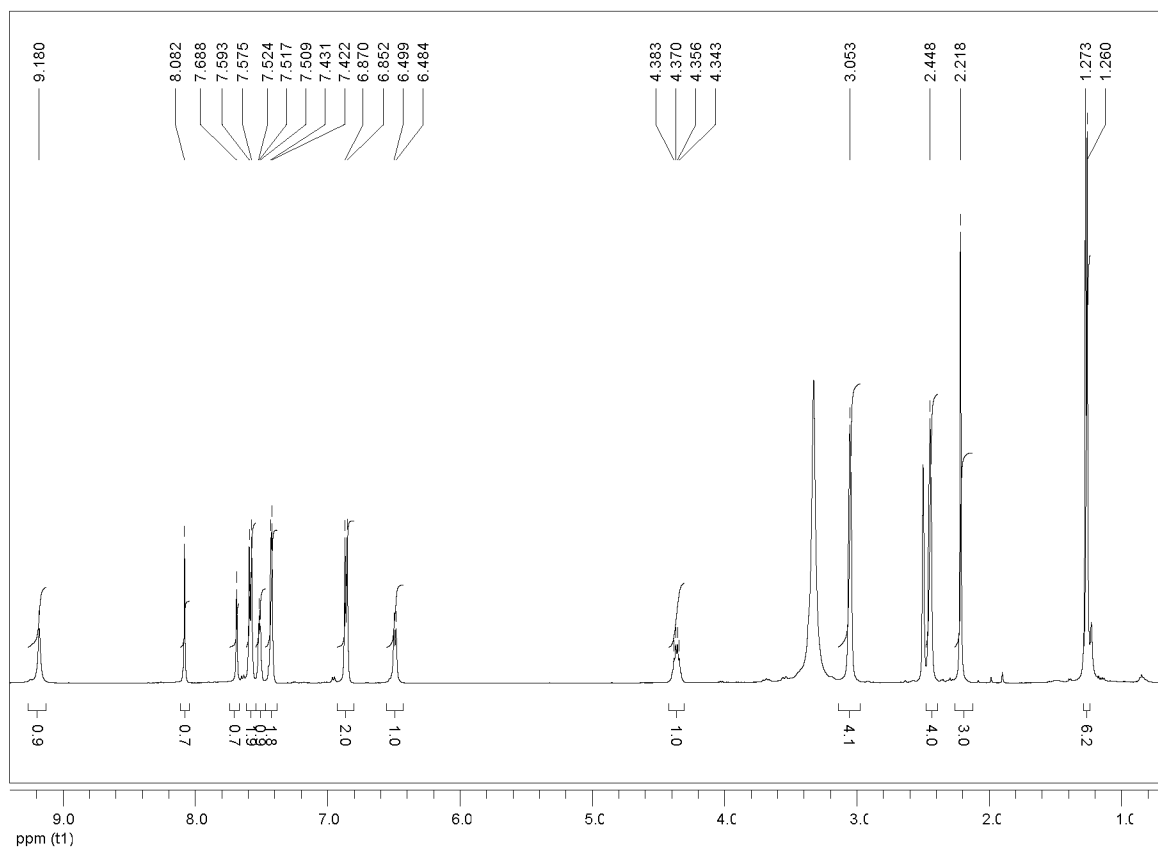
Εικόνα 23. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5a** (DMSO-d_6)

***N*⁴-ισοπροπυλο-*N*²-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-((3-χλωροφαινυλ)αιθυνυλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνη (5b)**

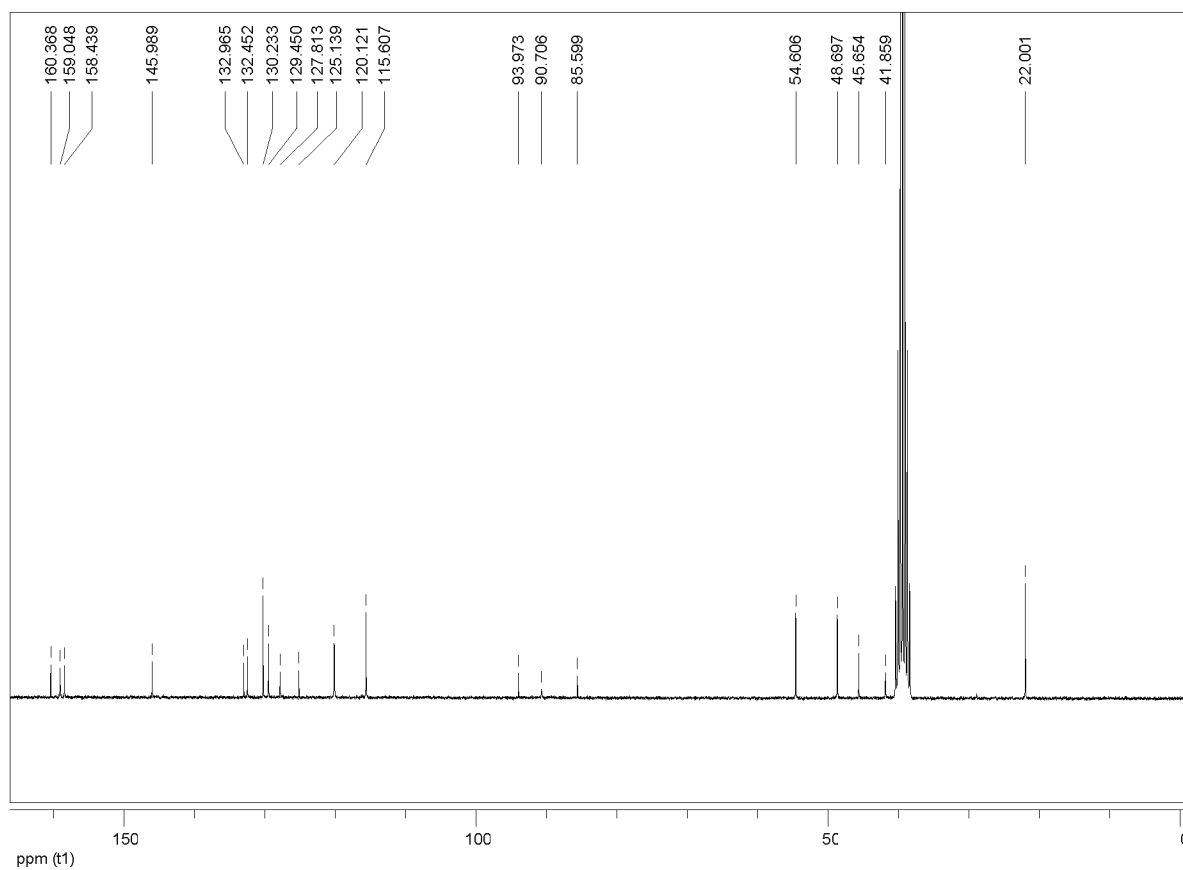


Διάλυμα της **4** (46 mg, 0.10 mmol), ιωδιούχου χαλκού (4 mg, 0.02 mmol), τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)-παλλαδίου (12 mg, 0.01 mmol), 1-αιθυνυλο-3-χλωρο-βενζολίου (37 μ L, 0.30 mmol) και τριαιθυλαμίνης (42 μ L, 0.30 mmol) σε άνυδρο DMF (1.0 mL), αναδεύθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα της αντίδρασης ακτινοβολήθηκε με μικροκύματα στους 50 °C στα 200 Watts για 30 λεπτά, και ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, MeOH: MeCN = 1:9), διαπιστώθηκε η ολοκλήρωσή της. Το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (20 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H₂O (4 \times 5 mL), και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1 \times 5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθарίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, MeOH: DCM = 4:100 σε 5:100, v/v) και παραλήφθηκε η **5b** (41 mg, 90%) ως κίτρινο στερεό.

TLC *R_f* 0.25 (MeOH: DCM = 5:100). Σημείο τήξεως 160-163 °C.

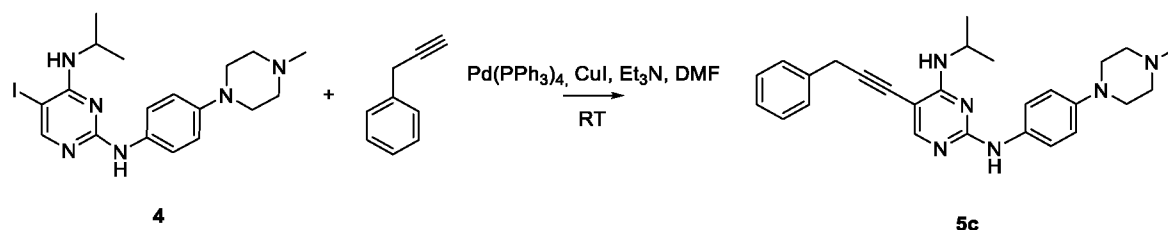


Εικόνα 24. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5b** (DMSO-d_6)



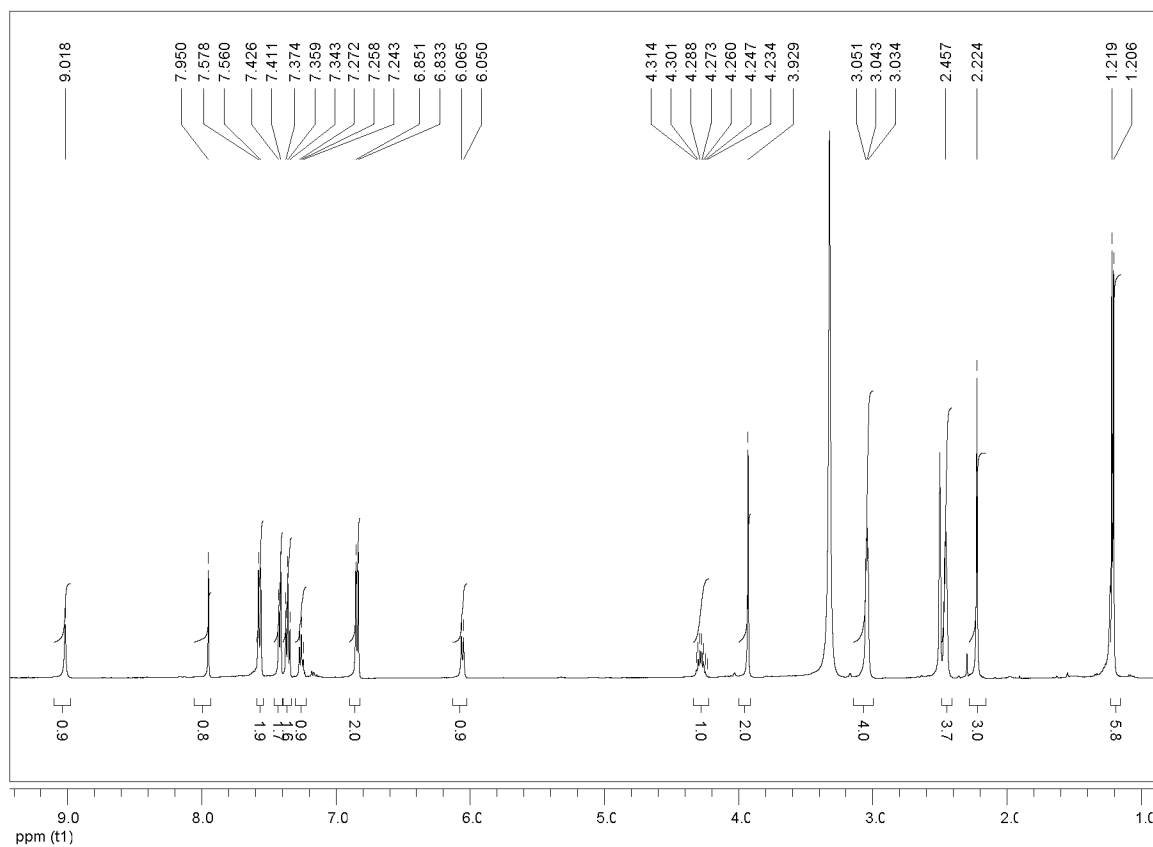
Εικόνα 25. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5b** (DMSO-d_6)

***N*⁴-ισοπροπυλο-*N*²-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-5-(3-φαινυλπροπ-1-ιν-1-υλο)πυριμιδιν-2,4-διαμίνη (5c)**

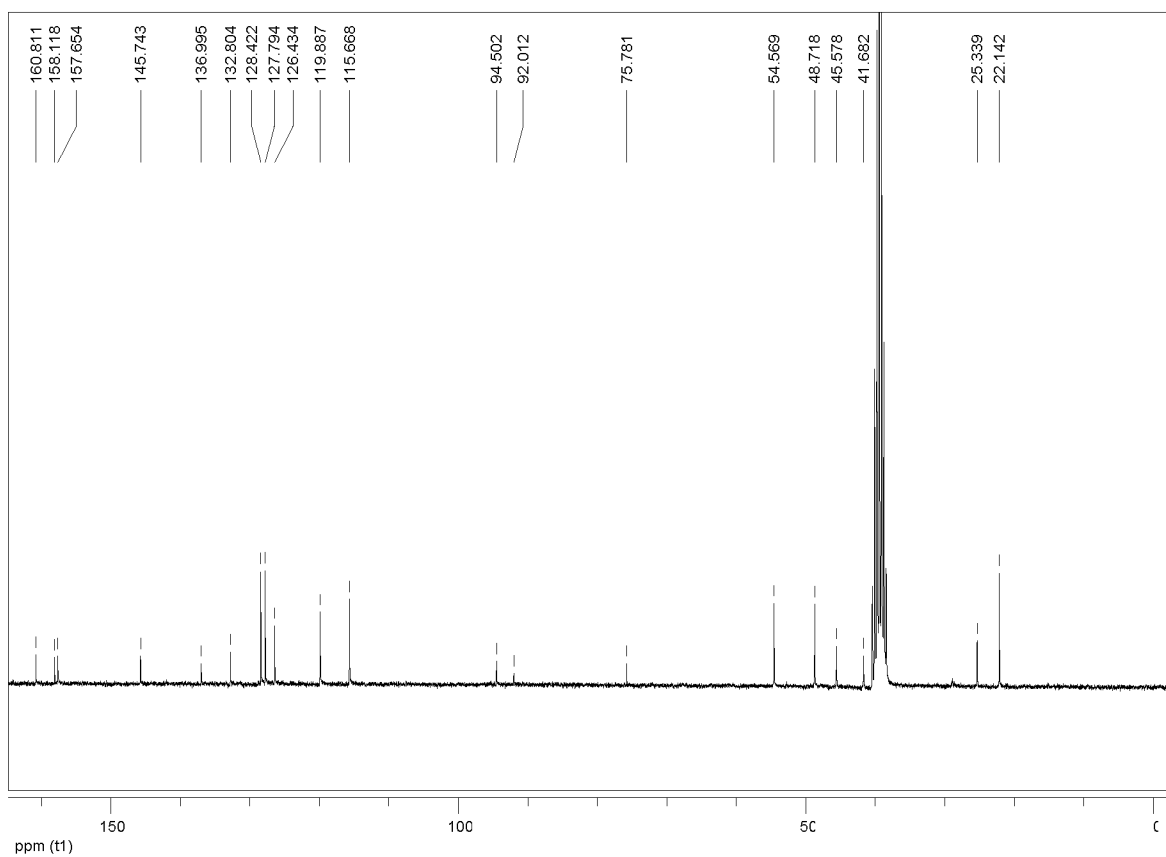


Διάλυμα της **4** (38 mg, 0.084 mmol), ιωδιούχου χαλκού (4 mg, 0.02 mmol), τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)-παλλαδίου (10 mg, 0.0087 mmol), 3-φαινυλο-1-προπινίου (21 μL, 0.17 mmol) και τριαιθυλαμίνης (35 μL, 0.25 mmol) σε άνυδρο DMF (0.8 mL), αναδεύθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, MeOH: DCM = 5:100 ή MeOH: MeCN 10:100), δεν κατέστη δυνατή η εξακρίβωση της ολοκλήρωσής της, καθώς οι κηλίδες του αντιδρώντος (**4**) και του προϊόντος (**5**) αλληλεπικαλύπτονταν. Το μίγμα τέθηκε υπό ανάδευση για επιπλέον 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (20 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με διάλυμα NH₃ 0.5 M (2 × 5 mL), με H₂O (4 × 5 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1 × 5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, MeOH: DCM = 5:100, v/v) και παραλήφθηκε η **5c** (32 mg, 86%) ως πορτοκαλί στερεό.

TLC *R_f* 0.19 (MeOH: DCM = 5:100). Σημείο τήξεως 140-142 °C.

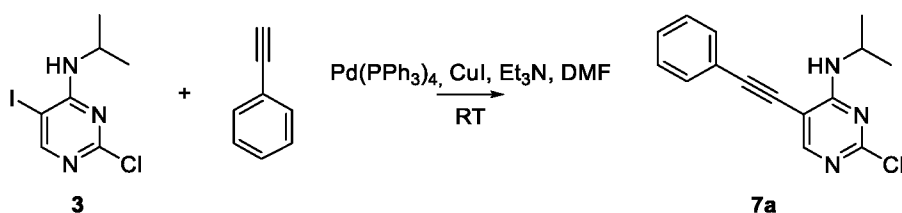


Εικόνα 26. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **5c** (DMSO-d_6)



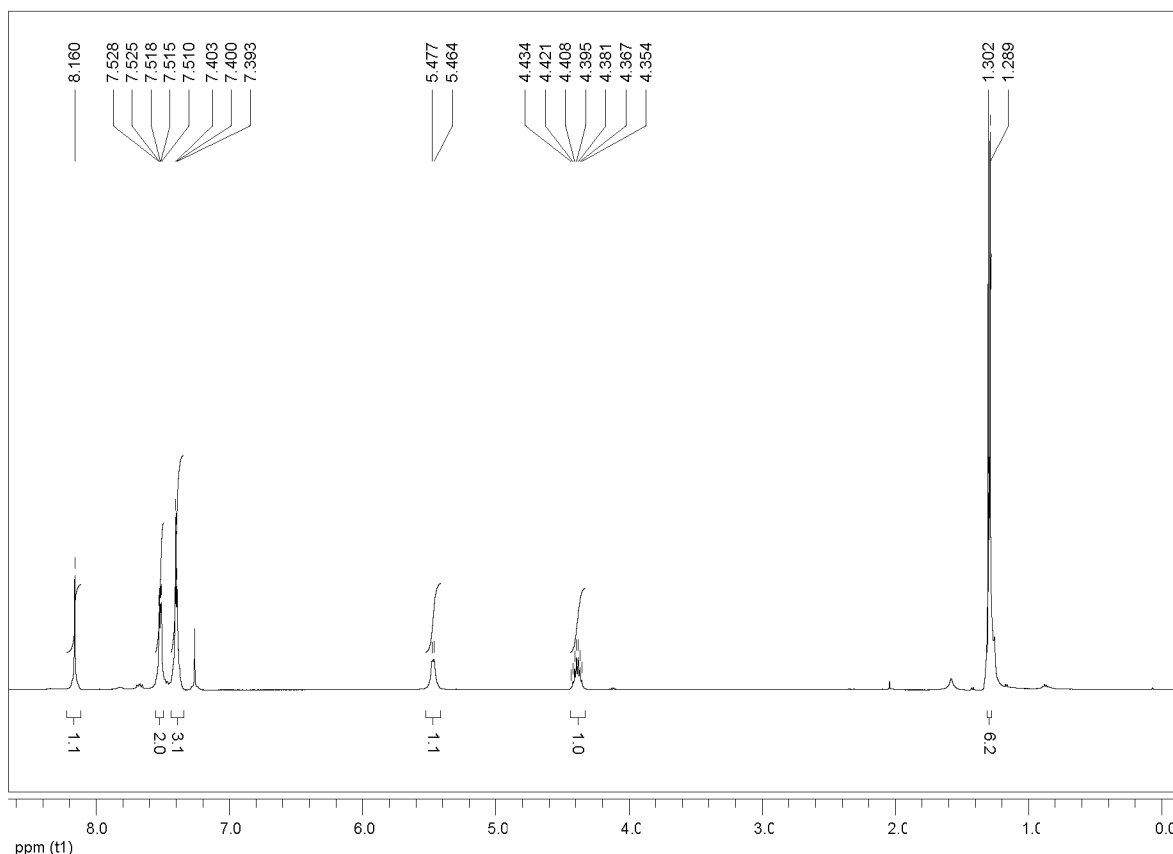
Εικόνα 27. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **5c** (DMSO-d_6)

***N*-ισοπροπυλο-5-(φαινυλαιθινυλο)-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνη (7a)**



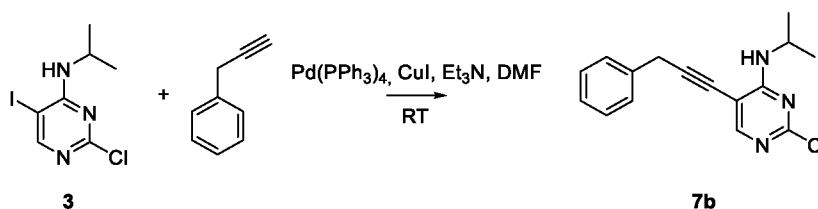
Διάλυμα της **3** (30 mg, 0.10 mmol), ιωδιούχου χαλκού (4 mg, 0.02 mmol), τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)-παλλαδίου (12 mg, 0.01 mmol), φαινυλ-ακετυλενίου (33 μL , 0.3 mmol) και τριαιθυλαμίνης (42 μL , 0.3 mmol) σε άνυδρο DMF (1.0 mL), αναδεύθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, EtOAc: Hexane = 1:9 ή DCM: Hexane = 2:1), διαπιστώθηκε η μη ολοκλήρωσή της και το μίγμα τέθηκε υπό ολονύκτια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης επανελέγχθηκε (TLC, DCM: Hexane = 2:1) και διαπιστώνοντας την ολοκλήρωσή της, το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (20 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H_2O (4 \times 5 mL), και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1 \times 5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθарίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, DCM: Hexane = 3:2 σε 2:1, v/v) και παραλήφθηκε η **7a** (24 mg, 87%) ως σκούρο κίτρινο στερεό.

TLC R_f 0.41 (DCM: Hexane = 2:1). Σημείο τήξεως 90-93 $^\circ\text{C}$.



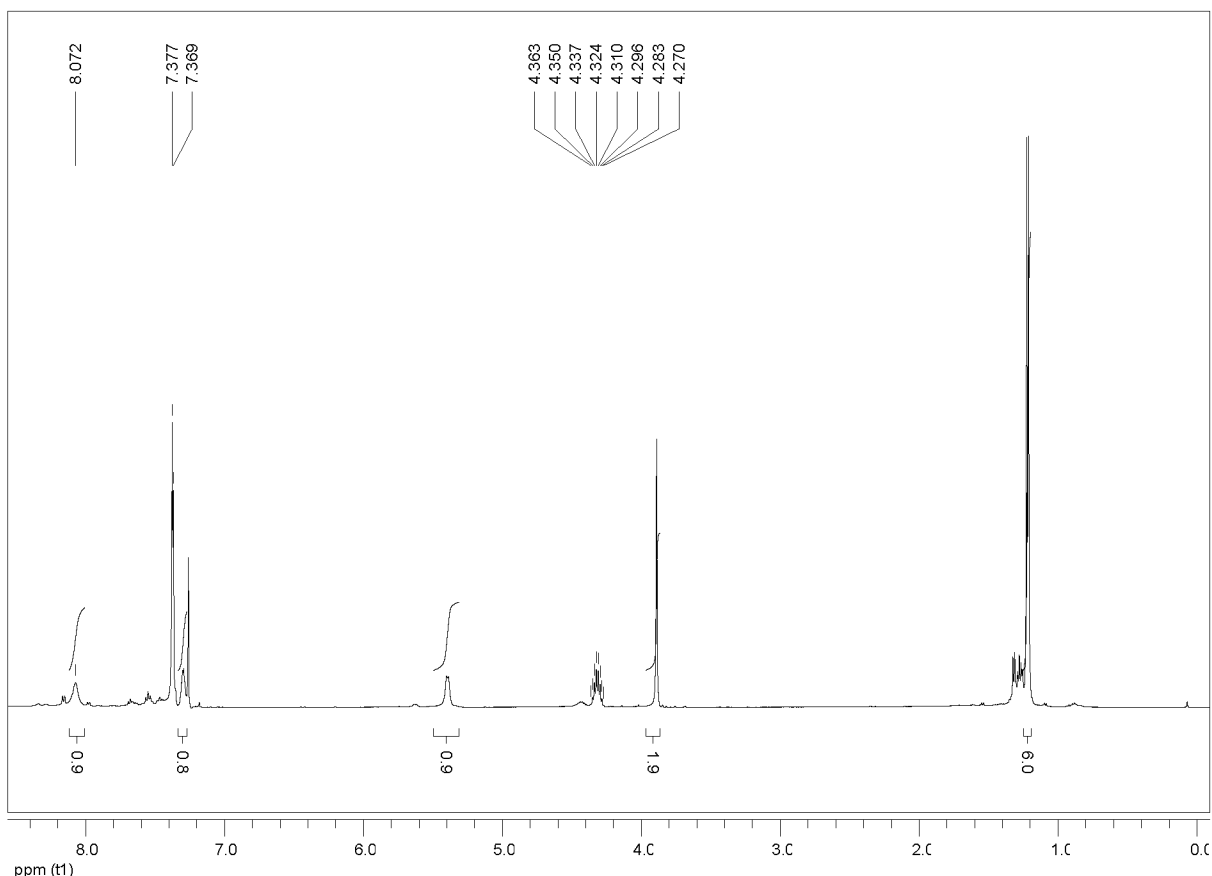
Εικόνα 28. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **7a** (CDCl_3)

N-ισοπροπυλο-5-(3-φαινυλοπροπ-1-ιν-1-υλο)-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνη (**7b**)



Διάλυμα της **3** (60 mg, 0.20 mmol), ιωδιούχου χαλκού (8 mg, 0.04 mmol), τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)-παλλαδίου (23 mg, 0.020 mmol), 3-φαινυλο-1-προπίνιου (75 μL , 0.60 mmol) και τριαιθυλαμίνης (83 μL , 0.60 mmol) σε άνυδρο DMF (1.0 mL), αναδεύθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 21 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, DCM: Hexane = 2:1 ή EtOAc: Hexane 1:9), διαπιστώθηκε η ολοκλήρωσή της. Το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (25 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H_2O (4×10 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1×10 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα τοποθετήθηκε σε αντλία κενού για 10 λεπτά. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, DCM: Hexane = 7:3 σε 3:1, v/v) και παραλήφθηκε η **7b** (42 mg, 73%), αφού είχε τοποθετηθεί σε αντλία κενού για 25 λεπτά, ως κίτρινο ελαιώδες υγρό.

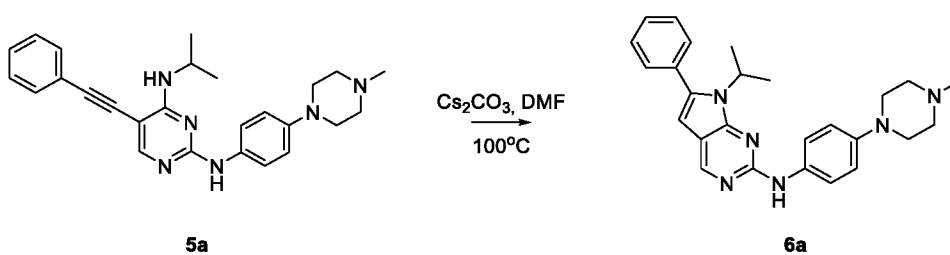
TLC R_f 0.17 (DCM: Hexane = 2:1).



Εικόνα 29. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **7b** (CDCl_3)

3.8 Γενική μέθοδος σύνθεσης των τελικών παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης **6a-c'** και του **8** (5-*endo-dig* κυκλοποίηση)

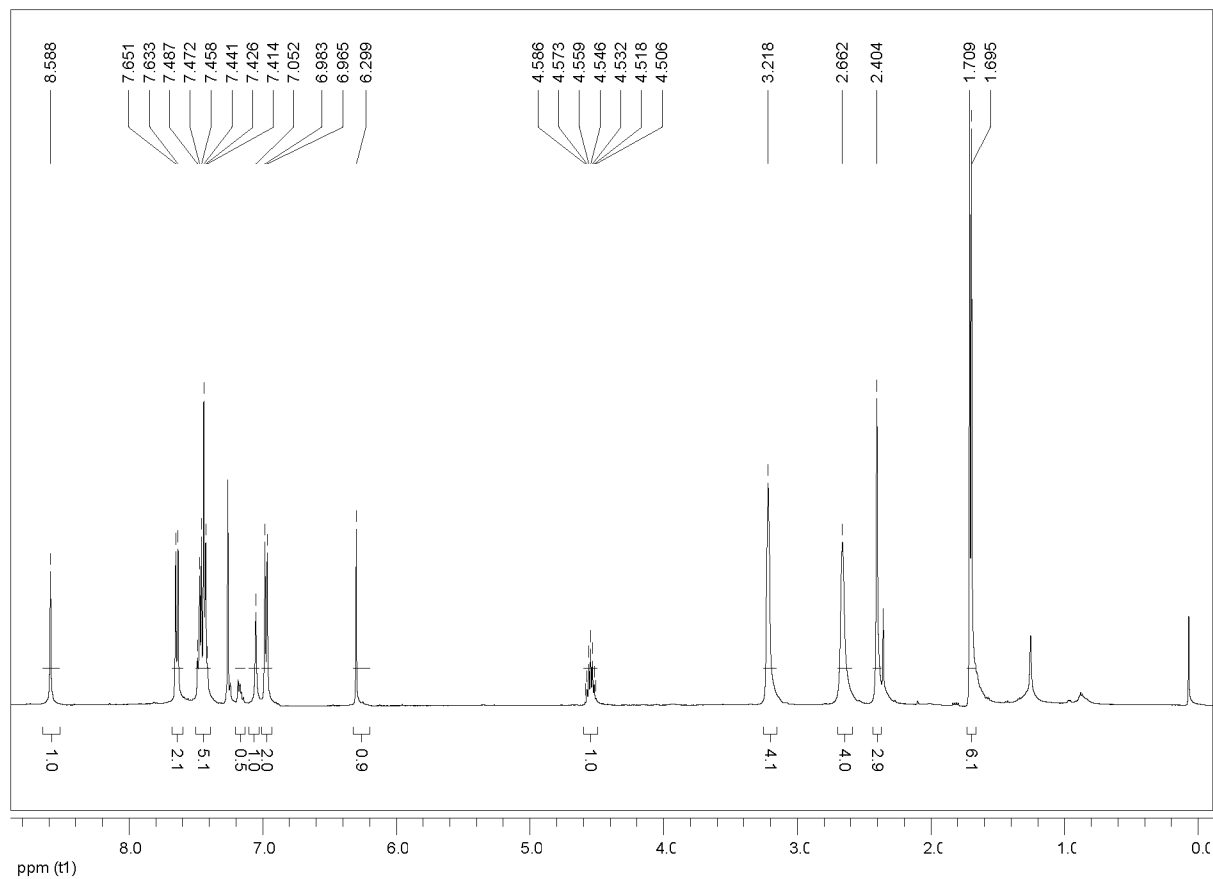
7-ισοπροπυλο-*N*-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-6-φαινυλο-7*H*-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-2-αμίνη (**6a**)



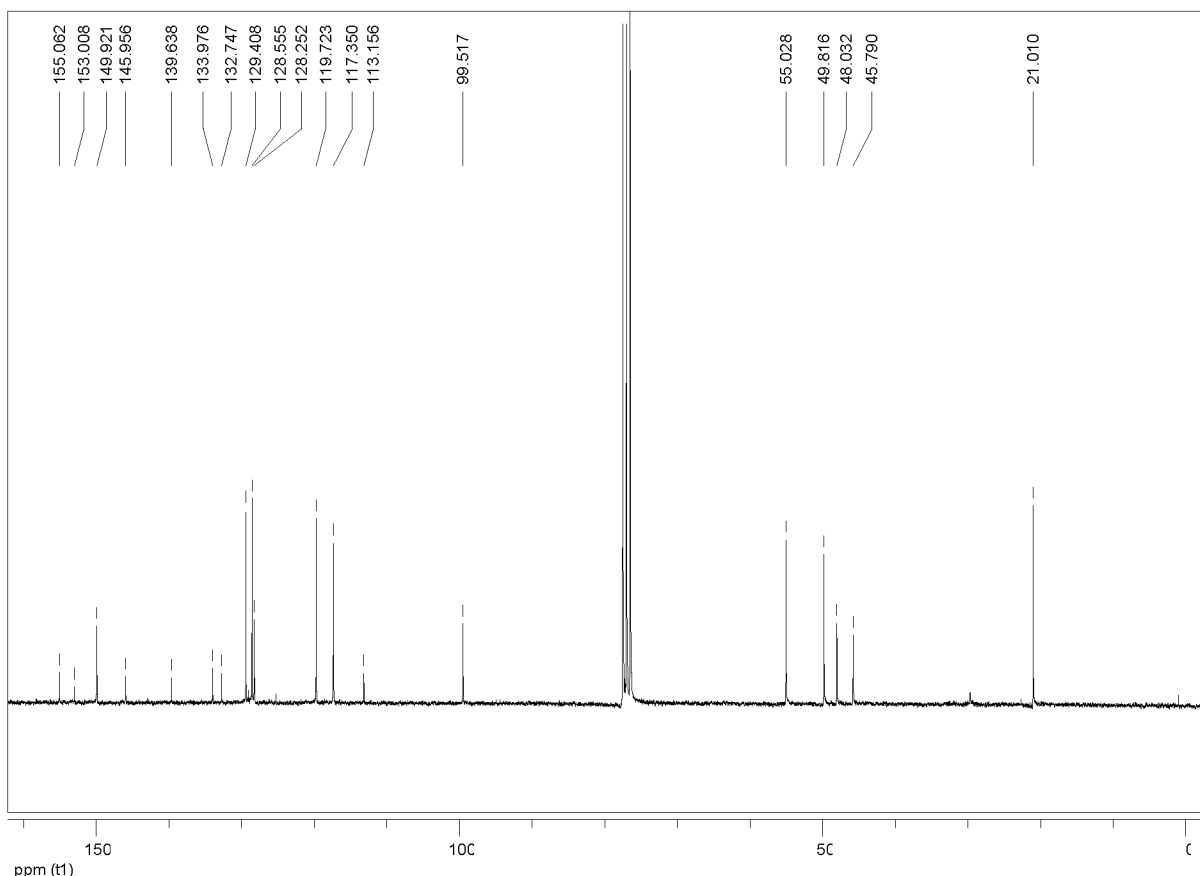
Διάλυμα της **5a** (20 mg, 0.047 mmol) και ανθρακικού καισίου (16 mg, 0.049 mmol) σε άνυδρο DMF (0.5 mL) αναδεύθηκε στους 100 °C, σε ελαιόλουτρο, για 16 ώρες υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, MeOH: DCM = 5:100 ή 8:100), δεν κατέστη δυνατή η εξακρίβωση της ολοκλήρωσής της, καθώς οι κηλίδες αντιδρώντος και προϊόντος (**5a**, **6a**) αλληλεπικαλύπτονταν. Το μίγμα αναδεύθηκε για επιπλέον 24 ώρες στους 100 °C, σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (15 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H_2O (4 × 5 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1 × 5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και

συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, MeOH: DCM = 4:100 σε 5:100, v/v) και παραλήφθηκε η **6a** (11 mg, 55%) ως κίτρινο στερεό.

TLC R_f 0.19 (MeOH: DCM = 8:100). Σημείο τήξεως 163-165 °C.

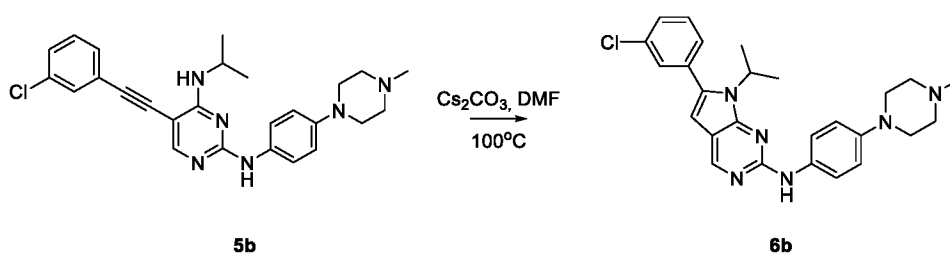


Εικόνα 30. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **6a** (CDCl_3)



Εικόνα 31. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **6a** (CDCl_3)

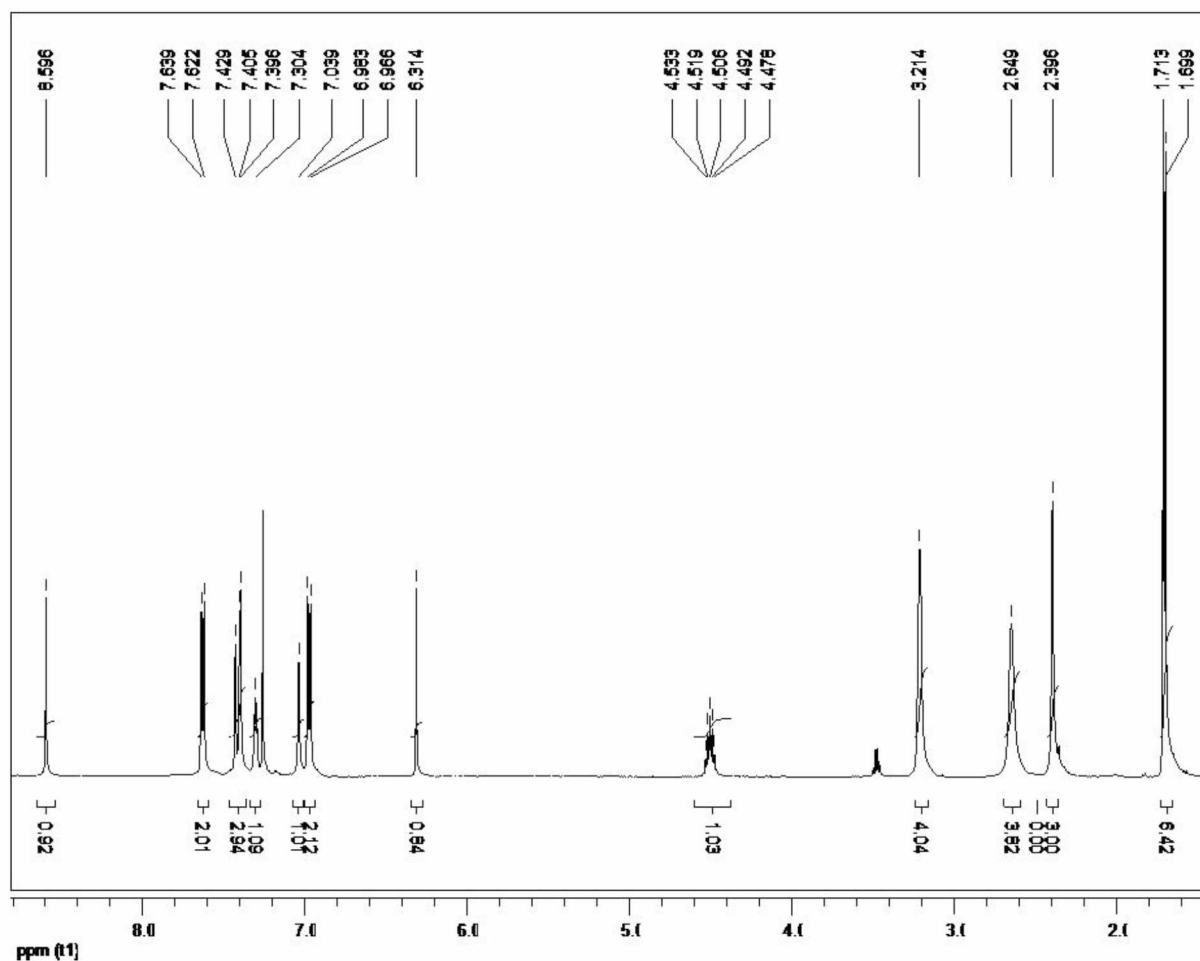
7-ισοπροπυλο-*N*-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-6-(3-χλωροφαινυλο)-7*H*-πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδιν-2-αμίνη (6b**)**



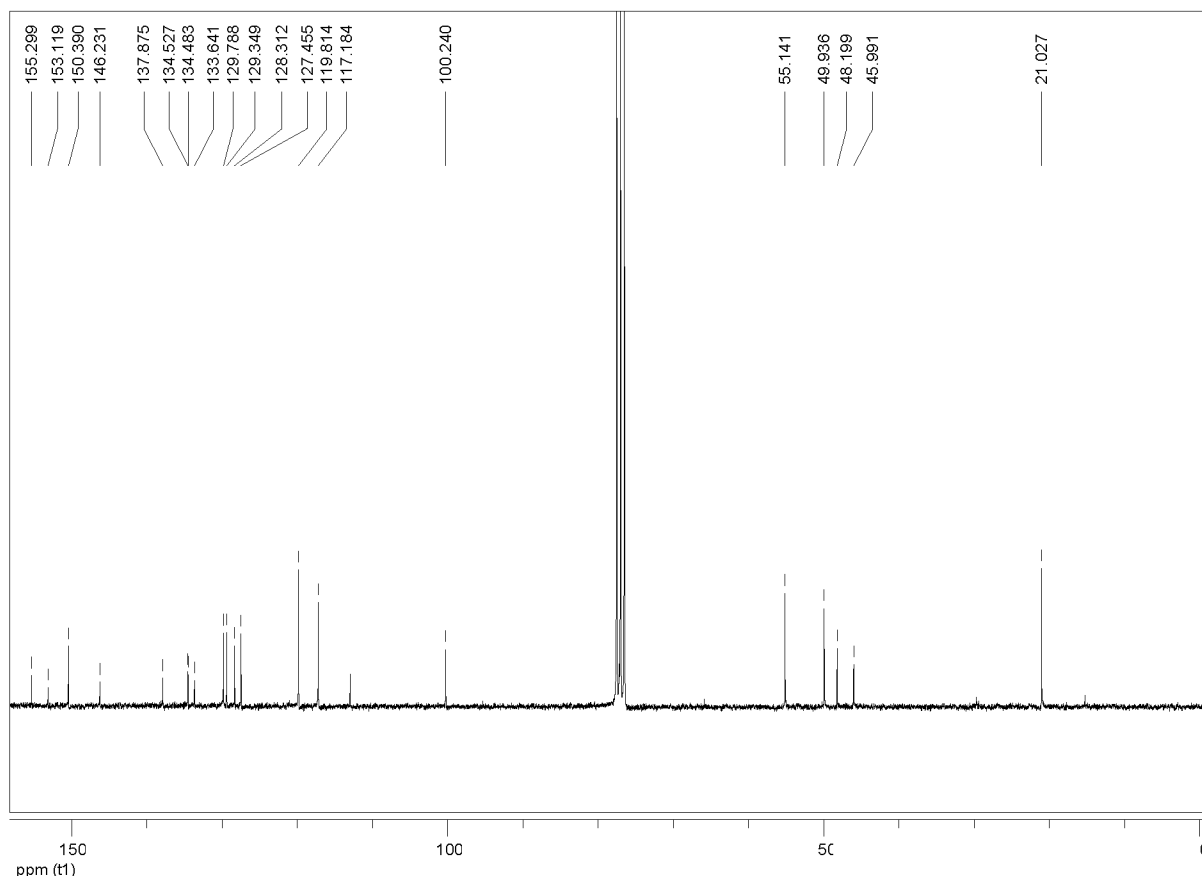
Διάλυμα της **5b** (23 mg, 0.050 mmol) και ανθρακικού καϊσίου (17 mg, 0.052 mmol) σε άνυδρο DMF (0.5 mL) αναδεύθηκε για 22 ώρες στους 100 °C, σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, MeOH: DCM = 5:100 ή 8:100), δεν κατέστη δυνατή η εξακρίβωση της ολοκλήρωσής της, καθώς οι κηλίδες αντιδρώντος και προϊόντος (**5b**, **6b**) αλληλεπικαλύπτονταν. Το μίγμα τέθηκε υπό ανάδευση για επιπλέον 24 ώρες στους 100 °C, σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (15 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H_2O (4×5 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1×5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης

υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, MeOH: DCM = 5:100, v/v) και παραλήφθηκε η **6b** (11 mg, 48%) ως κίτρινο στερεό.

TLC R_f 0.20 (MeOH: DCM = 8:100). Σημείο τήξεως 183-184 °C.

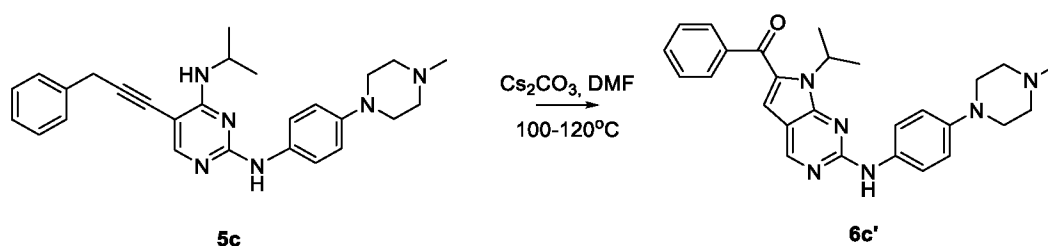


Εικόνα 32. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **6b** (CDCl_3)



Εικόνα 33. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **6b** (CDCl_3)

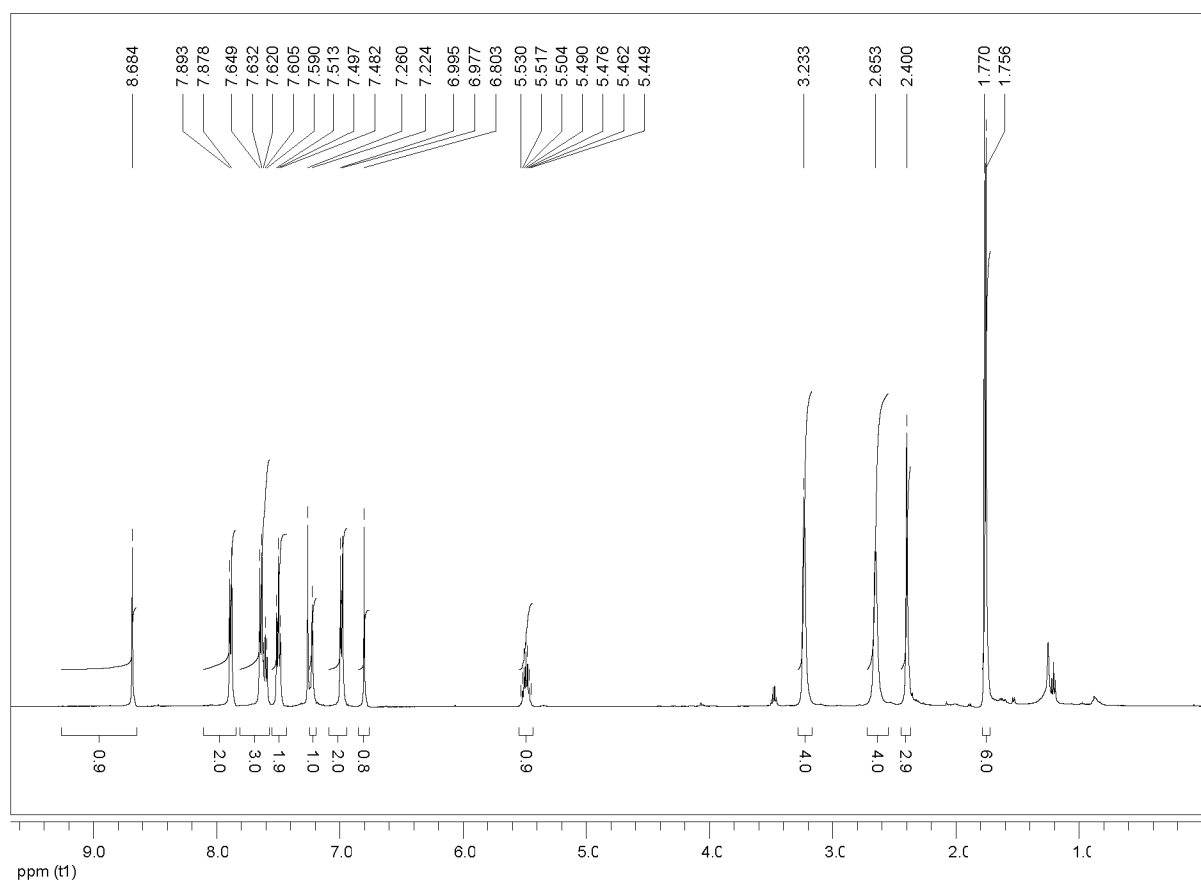
6-βενζούλο-7-ισοπροπυλο-N2-(4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο)-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδιν-2-αμίνη (6c')



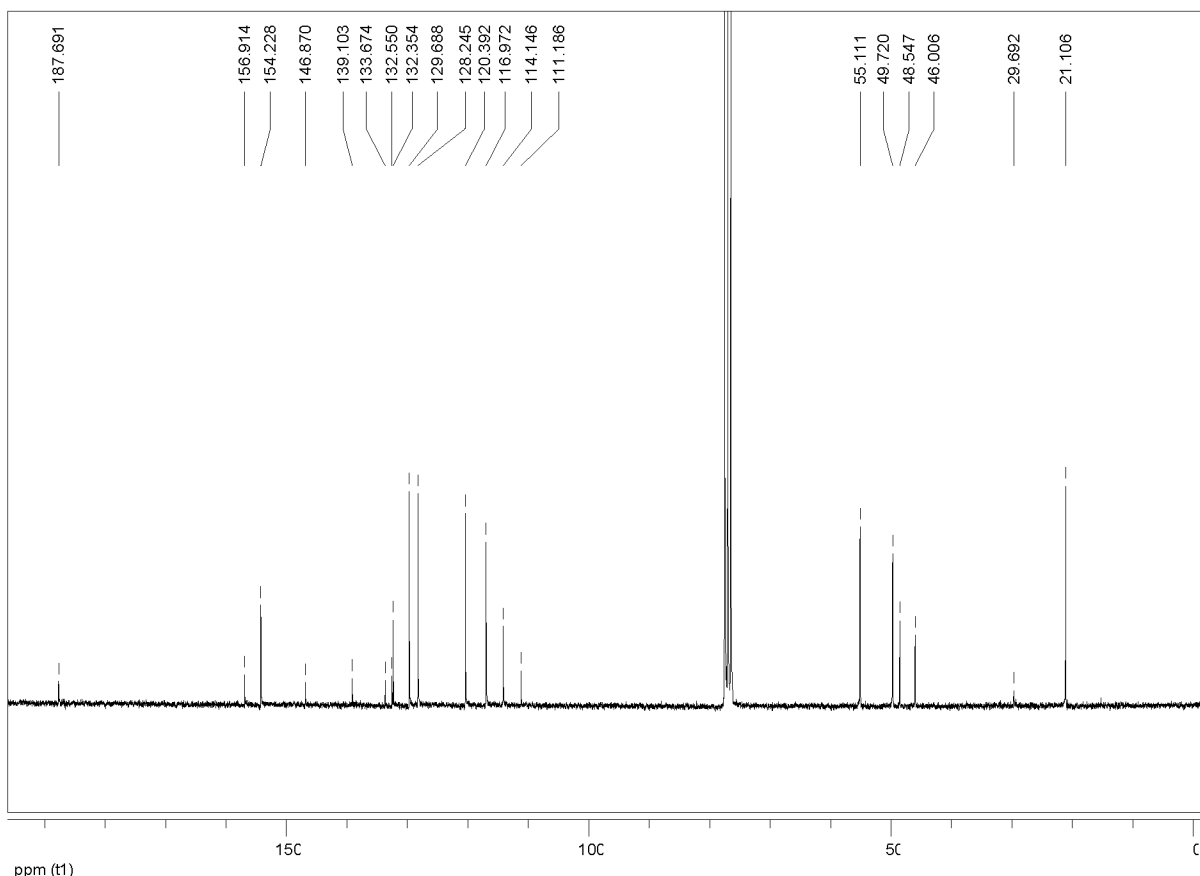
Διάλυμα **5c** (26 mg, 0.059 mmol) και ανθρακικού καϊσίου (20 mg, 0.061 mmol) σε άνυδρο DMF (0.6 mL) αναδεύθηκε για 24 ώρες στους 100°C , σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, MeOH: DCM = 5:100 ή 6:100), δεν κατέστη δυνατή η εξακρίβωση της ολοκλήρωσής, καθώς οι κηλίδες αντιδρώντος και προϊόντος (**5c**, **6c'**) αλληλοεπικαλύπτονταν. Το μίγμα τέθηκε υπό ανάδευση για επιπλέον 48 ώρες στους 120°C , σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου, πραγματοποιώντας ενδιάμεσους ελέγχους της πορείας της αντίδρασης (TLC). Το μίγμα αραιώθηκε με EtOAc (20 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H_2O (5×5 mL) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1×5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών

έκλουσης, MeOH: DCM = 5:100, v/v) και παραλήφθηκε η **6c'** (17 mg, 65%) ως πορτοκαλί στερεό.

TLC R_f 0.23 (MeOH: DCM = 8:100). Σημείο τήξεως 171-172 °C.

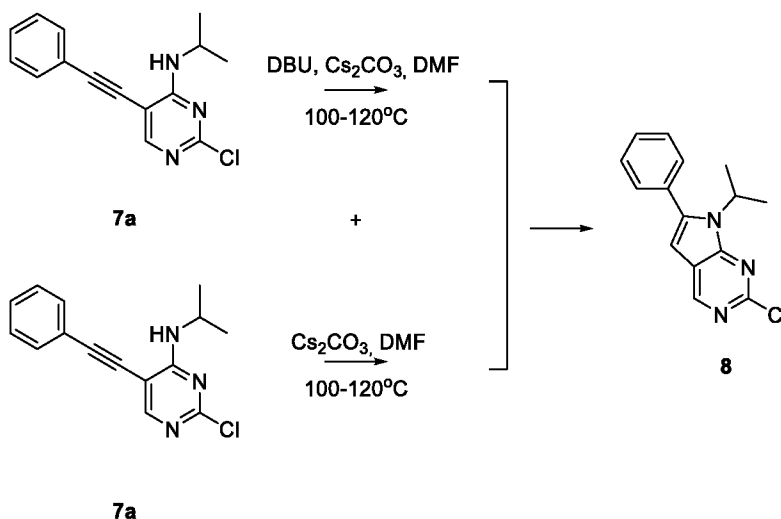


Εικόνα 34. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **6c'** (CDCl_3)



Εικόνα 35. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **6c'** (CDCl_3)

7-ισοπροπυλ-6-φαινυλ-2-χλωρο-7H-πυρρολο[2,3-d]πυριμιδίνη (**8**)



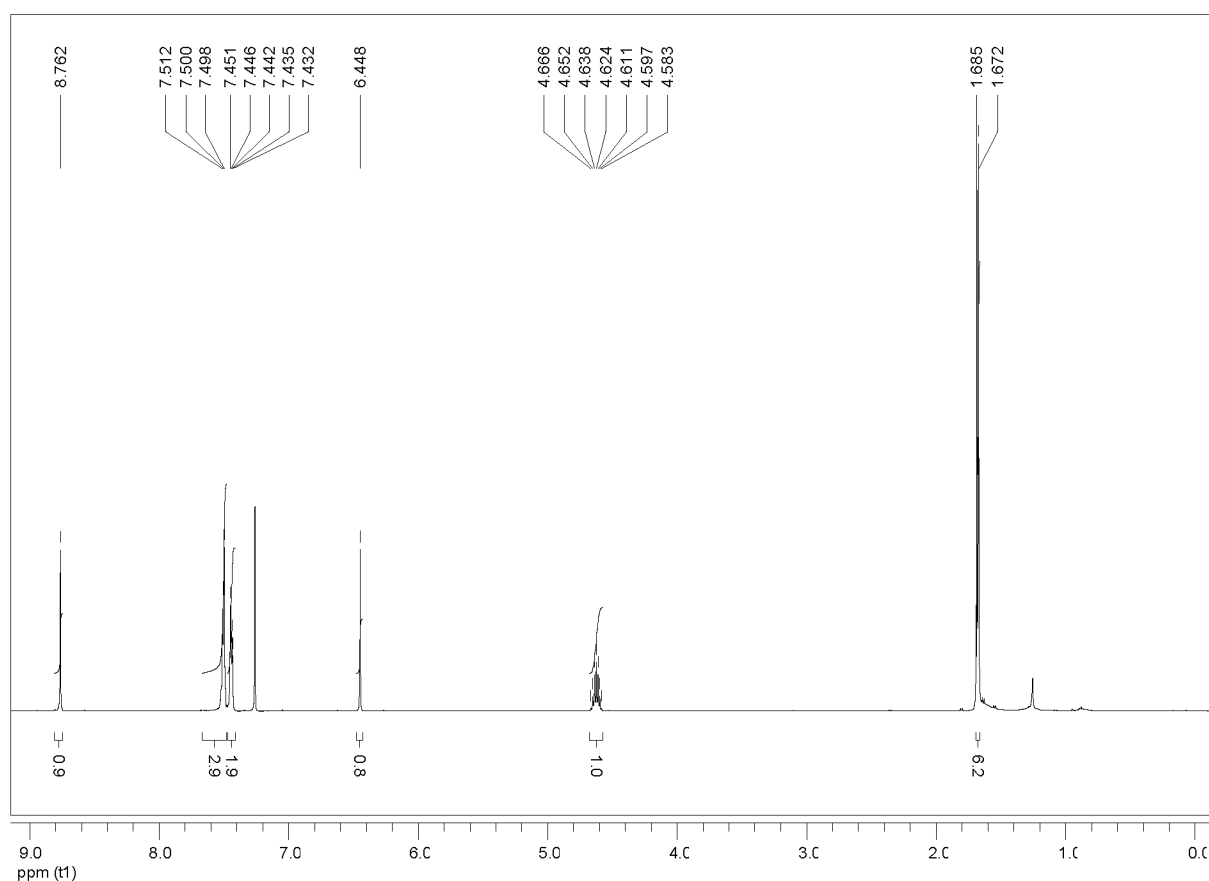
Διάλυμα **7a** (11 mg, 0.040 mmol) και 1,8-διαζοδικυκλο[5.4.0]ενδεκα-7-ενίου (DBU) (6 μL) σε άνυδρο DMF (0.4 mL) ακτινοβολήθηκε με μικροκύματα συνολικά για 3 ώρες στους 100 $^{\circ}\text{C}$ στα 200 Watts. Πραγματοποιώντας ενδιάμεσους ελέγχους της πορείας της αντίδρασης (TLC, $\text{DCM}:\text{Hexane} = 1:1$ ή $2:1$ ή $4:1$, ή $\text{EtOAc}:\text{Hexane} = 1:9$), διαπιστώθηκε η μη ολοκλήρωσή της και το μίγμα της αντίδρασης τέθηκε υπό ανάδευση για επιπλέον 19 ώρες στους 100 $^{\circ}\text{C}$ υπό

ατμόσφαιρα αζώτου. Ελέγχοντας την πορεία της αντίδρασης (TLC, EtOAc: Hexane = 1:9) διαπιστώθηκε η μη ολοκλήρωσή της και προστέθηκε στο μίγμα ποσότητα ανθρακικού καισίου (13 mg, 0.040 mmol) και άνυδρο DMF (0.4 mL). Το μίγμα ακτινοβολήθηκε με μικροκύματα συνολικά για 4 ώρες στους 100-120 °C στα 200 Watts, όμως από τον έλεγχο της πορείας της αντίδρασης (TLC) διαπιστώθηκε και πάλι η μη ολοκλήρωσή της και το μίγμα φυλάχθηκε στο ψυγείο.

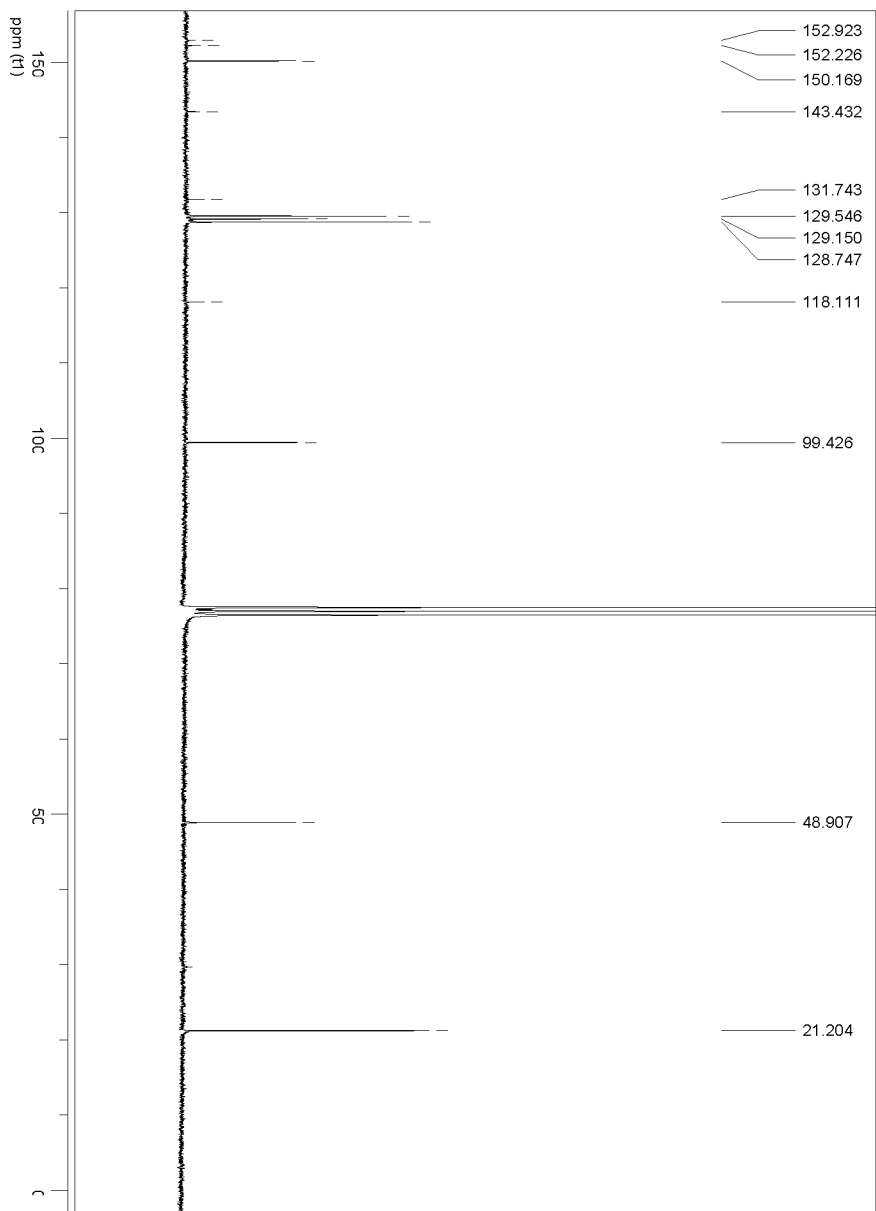
Διάλυμα **7a** (7 mg, 0.026 mmol) και ανθρακικού καισίου (9 mg, 0.026 mmol) σε άνυδρο DMF (0.3 mL) αναδεύθηκε, για 20 ώρες στους 100 °C, σε ελαιόλουτρο, υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Σε αυτό το στάδιο του πειράματος, δεν κατέστη δυνατός ο ασφαλής έλεγχος της πορείας της αντίδρασης.

Τα δύο μίγματα διαλύθηκαν σε EtOAc (20 mL) και το διάλυμα εκπλύθηκε με H₂O (3 × 5 mL), και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 × 5 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προκύπτον μίγμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (μίγμα διαλυτών έκλουσης, DCM: Hexane = 1:1 σε 2:1, v/v) και παραλήφθηκε η **8** (6 mg, 33%) ως καφέ στερεό.

TLC *R_f* 0.37 (EtOAc: Hexane = 1:9). Σημείο τήξεως 118-122 °C.



Εικόνα 36. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης **8** (CDCl₃)

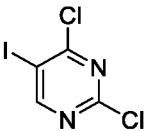
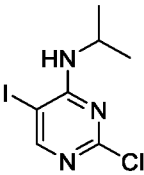
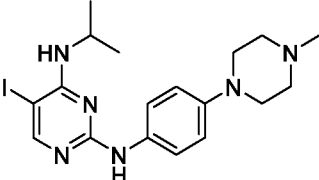
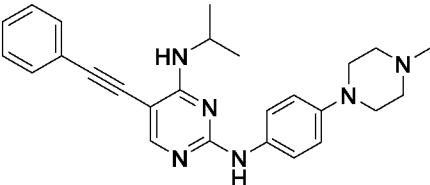
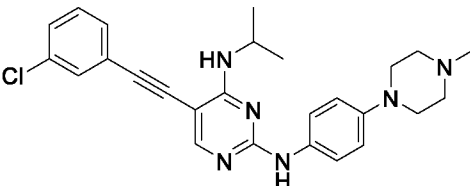
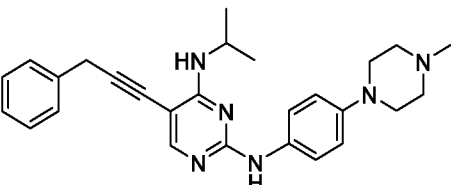


Εικόνα 37. Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **8** (CDCl_3)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και η ταυτοποίηση, με φασματοσκοπία NMR, των μορίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 συνοδευόμενα από τον παράγοντα καθυστέρησής τους στο αναγραφόμενο σύστημα διαλυτών, το σημείο τήξεώς τους και την απόδοση της αντίδρασης μέσω της οποίας συντέθηκε το καθένα.

Πίνακας 3. Συγκεντρωτικός πίνακας των ενώσεων **2**, **3**, **4**, **5a-c**, **6a-c'**, **7a-b**, **8**, των αντίστοιχων παραγόντων καθυστέρησής τους, σημείων τήξεώς τους και των αποδόσεων των αντιδράσεων μέσω των οποίων αυτά συντέθηκαν

Ένωση	Χημική δομή μορίου	Παράγοντας καθυστέρησης (R_f)	Απόδοση	Σημείο τήξεως
2		0.34 (DCM: Hexane = 1:2)	90.4 %	71- 74 °C
3		0.19 (DCM: Hexane = 1:1)	88 %	51- 54 °C
4		0.23 (MeOH: DCM = 5:100)	64 %	160- 161 °C
5a		0.18 (MeOH: DCM = 5:100)	80 %	140- 142 °C
5b		0.25 (MeOH: DCM = 5:100)	90 %	160- 163 °C
5c		0.19 (MeOH: DCM = 5:100)	86 %	140- 142 °C

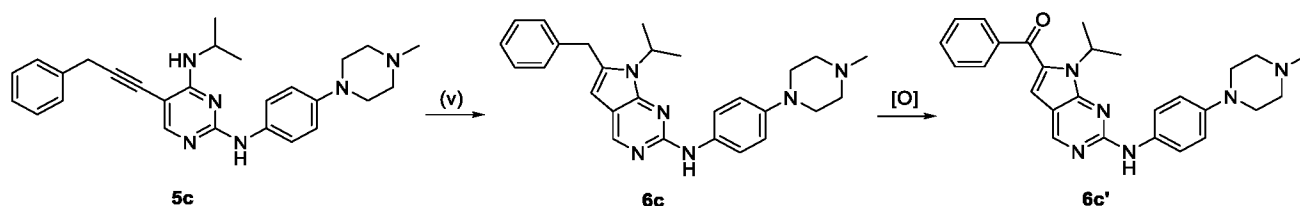
6a		0.19 (MeOH: DCM = 8:100)	55 %	163- 165 °C
6b		0.20 (MeOH: DCM = 8:100)	48 %	183- 184 °C
6c'		0.23 (MeOH: DCM = 8:100)	65 %	171- 172 °C
7a		0.41 (DCM: Hexane = 2:1)	87 %	90- 93 °C
7b		0.17 (DCM: Hexane = 2:1)	73 %	-
8		0.37 (EtOAc: Hexane = 1:9)	33%	118- 122 °C

Οι αντιδράσεις μέσω των οποίων παραλήφθηκαν η ένωση **2** και η ένωση **3** παρουσίασαν τις υψηλότερες αποδόσεις (90.4 και 88% αντίστοιχα).

Στην πορεία **A** η αντίδραση της **4** με την 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη είχε απόδοση 64%, ενώ η εισαγωγή αλκύνυλο ομάδων μέσω καταλυόμενων από παλλάδιο και χαλκό αντιδράσεων Sonogashira στη θέση 5 της ένωσης **4** απέφερε τα παράγωγα **5a-c**, με τις αντίστοιχες αντιδράσεις να έχουν πολύ ικανοποιητικές αποδόσεις (80-90%).

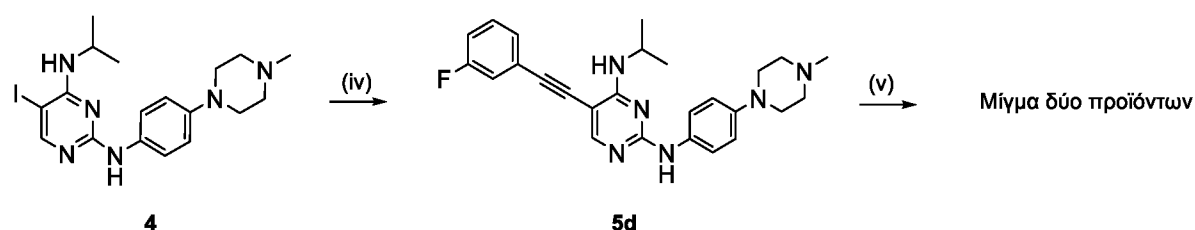
Ωστόσο το τελευταίο στάδιο της πορείας **A** (5-*endo-dig* κυκλοποίηση) απεδείχθη το δυσκολότερο λόγω της πρακτικά ίσης πολικότητας των αρχικών 5-αλκυνυλοπυριμιδινών (**5a-c**) με τις τελικές πυρρολοπυριμιδίνες (**6a-c'**), η οποία και δεν επέτρεπε τον ασφαλή έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων αυτών με TLC. Οι αντιδράσεις κυκλοποίησης πραγματοποιήθηκαν

με θέρμανση παρουσία ανθρακικού καϊσίου (Cs_2CO_3) σε διαλύτη DMF και οι αποδόσεις κυμάνθηκαν από 48 έως και 65%. Επιπλέον, στην περίπτωση της κυκλοποίησης της αλκυνυλοπυριμιδίνης **5c** διαπιστώθηκε με TLC η πλήρης μετατροπή του αντιδρώντος μετά από παρατεταμένη θέρμανση, όμως έλεγχος της δομής του προϊόντος με φασματοσκοπία NMR έδειξε ότι παρελήφθη η 6-βενζυλοπυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνη **6c'**, αντί για το αναμενόμενο 6-βενζυλο-παράγωγο **6c** (Σχήμα 9). Προφανώς η αρχικά σχηματισθείσα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνη **6c** μετατράπηκε στην **6c'** με οξείδωση της βενζυλικής θέσης από ίχνη ατμοσφαιρικού οξυγόνου κατά την παρατεταμένη υψηλή θέρμανση.



Σχήμα 9. Η αλκυνυλοπυριμιδίνη **5c** υποβλήθηκε σε συνθήκες κυκλοποίησης και διαπιστώθηκε με TLC η πλήρης μετατροπή της μετά από παρατεταμένη θέρμανση, όμως ο έλεγχος της δομής του προϊόντος με φασματοσκοπία NMR έδειξε ότι παρελήφθη η 6-βενζυλοπυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνη **6c'**. Αντιδραστήρια και συνθήκες (v) Cs_2CO_3 , DMF, 100-120 °C.

Σε αυτό το σημείο αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι στα πλαίσια της παρούσας μελέτης επιχειρήθηκε και η κυκλοποίηση (v) του παραγώγου **5d¹** το οποίο συντέθηκε μέσω καταλυόμενης από παλλάδιο και χαλκό αντίδρασης Sonogashira της **3** με το 1-αιθυνυλο-3-φθορο-βενζόλιο (iv) (Σχήμα 10). Ωστόσο δεν κατέστη δυνατός ο ασφαλής έλεγχος της πορείας της αντίδρασης κυκλοποίησης, με αποτέλεσμα να παραληφθεί μίγμα δύο προϊόντων τα οποία δεν διαχωρίστηκαν επαρκώς με χρωματογραφία στήλης, αλλά ούτε και χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά.



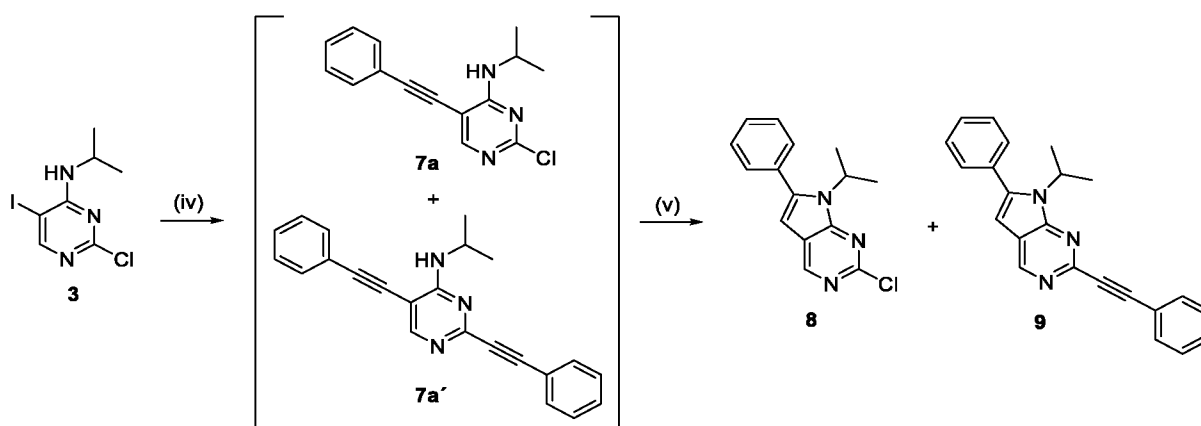
Σχήμα 10. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της 5-αλκυνυλοπυριμιδίν-2,4-διαμίνης **5d** προέκυψε μίγμα δύο προϊόντων τα οποία δεν κατέστη δυνατό να διαχωριστούν επαρκώς με χρωματογραφία στήλης, αλλά ούτε και χαρακτηριστούν φασματοσκοπικά. Αντιδραστήρια και συνθήκες (iv) 1-αιθυνυλο-3-φθοροβενζόλιο, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, Et_3N , DMF, RT, (v) Cs_2CO_3 , DMF, 100-120 °C.

Προκειμένου λοιπόν να ξεπεραστεί η δυσκολία που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη πειραματική διαδικασία, η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων επιχειρήθηκε ακολουθώντας

¹ Το πειραματικό μέρος των αντιδράσεων δεν περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία.

μια διαφορετική πορεία (**B**) όπου η εισαγωγή της πολικής πιπεραζινυλανίλινο ομάδας αφέθηκε για το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης.

Εισαγωγή αλκύνυλο ομάδων στη θέση 5 του ενδιαμέσου **3**, μέσω καταλυόμενων από παλλάδιο και χαλκό αντιδράσεων διασταυρούμενης σύζευξης Sonogashira, απέφερε τις 5-αλκυνυλο-2-χλωροπυριμιδίνες **7a** και **7b**. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων αυτών ήταν 87 και 63% αντίστοιχα. Ωστόσο σε μια αρχική προσπάθεια σύζευξης της **3** με το φαινυλακετυλένιο (**iv**), πέραν της επιθυμητής ένωσης **7a**, παρατηρήθηκε και σχηματισμός του 2,5-διαλκύνυλο παραγώγου **7a'** ως παραπροϊόντος (**Σχήμα 11**). Το μίγμα των **7a** και **7a'** δεν κατέστη δυνατό να διαχωρισθεί με χρωματογραφία στήλης και υποβλήθηκε στις συνθήκες κυκλοποίησης (**v**) αποφέροντας τις πυρρολοπυριμιδίνες **8** και **9**, οι οποίες διαχωρίστηκαν επιτυχώς και ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας NMR πρωτονίου².

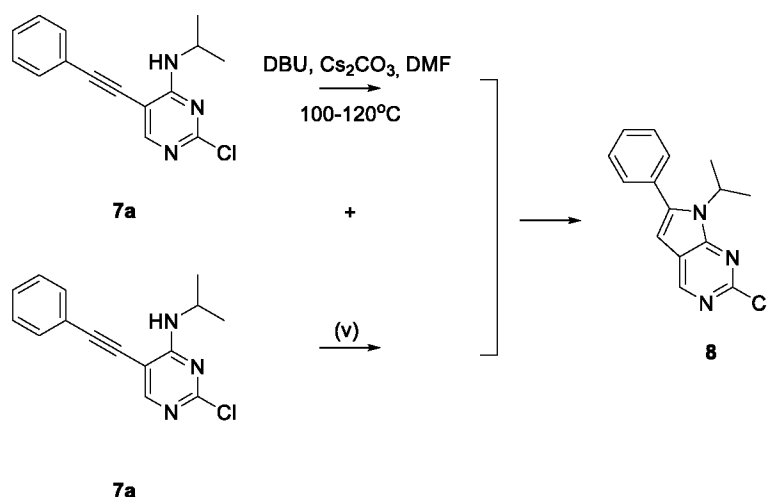


Σχήμα 11. Από την σύζευξη της 2-χλωροπυρρολοπυριμιδίνης **3** με το φαινυλακετυλένιο, μέσω καταλυόμενης από παλλάδιο και χαλκό αντίδρασης Sonogashira, προέκυψε μίγμα των μορίων **7a** και **7b** το οποίο υποβλήθηκε σε συνθήκες κυκλοποίησης αποφέροντας τις πυρρολοπυριμιδίνες **8** και **9**. Αντιδραστήρια και συνθήκες (iv) φαινυλακετυλένιο, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, MW 50 °C, (v) Cs₂CO₃, DMF, 100-120 °C.

Σε μια δεύτερη προσπάθεια σύνθεσης της **8**, η αντίδραση σύζευξης της **3** με το φαινυλακετυλένιο επαναλήφθηκε και η **7a** παραλήφθηκε ως μοναδικό προϊόν, με την απόδοση της αντίστοιχης αντίδρασης να είναι 87%.

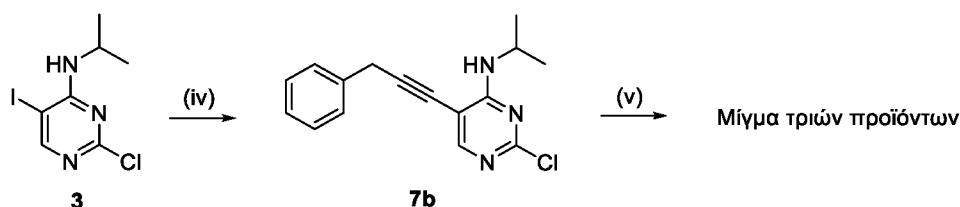
Στο επόμενο βήμα της συνθετικής πορείας **B** η **7a** υποβλήθηκε σε συνθήκες κυκλοποίησης, με θέρμανση στους 100-120 °C παρουσία 1,8-διαζοδικυκλο[5.4.0]ενδεκα-7-ενίου (DBU) ως βάση, σε άνυδρο DMF, όμως όπως διαπιστώθηκε με TLC δεν κατέστη δυνατή η πλήρης μετατροπή του αντιδρώντος στο επιθυμητό προϊόν **8**, ακόμα και μετά από προσθήκη Cs₂CO₃ και παρατεταμένη θέρμανση. Έτσι η κυκλοποίηση της **7a** επιχειρήθηκε εκ νέου εφαρμόζοντας τις συνθήκες που αναφέρθηκαν και στην πορεία **A** (**v**). Τα ακάθαρτα προϊόντα των δύο αντιδράσεων αναμείχθηκαν και το μίγμα υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, με αποτέλεσμα να παραληφθεί το επιθυμητό προϊόν **8**, το οποίο και ταυτοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας NMR (**Σχήμα 12**). Η απόδοση της αντίδρασης αυτής ήταν 33%.

² Το φάσμα ¹H NMR της ένωσης **9** δεν παρατίθεται στην παρούσα εργασία.



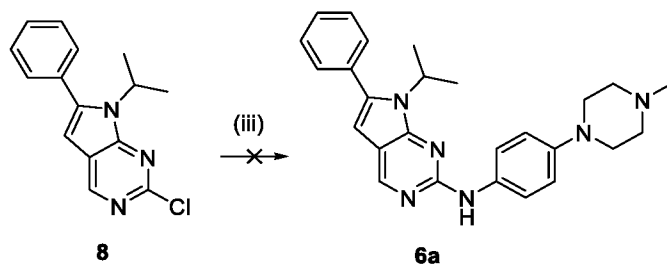
Σχήμα 12. Η 5-αλκυνο-2-χλωροπυριμιδίνη **7a** υποβλήθηκε σε συνθήκες κυκλοποίησης παρουσία DBU όμως δεν κατέστη δυνατή η πλήρης μετατροπή του αντιδρώντος στο επιθυμητό προϊόν **8**. Έτσι η κυκλοποίηση επιχειρήθηκε και με διαφορετικές συνθήκες (v), τα ακάθαρτα προϊόντα των δύο αντιδράσεων αναμείχθηκαν και το μίγμα υποβλήθηκε σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, με αποτέλεσμα να παραληφθεί το επιθυμητό προϊόν **8**. Αντιδραστήρια και συνθήκες (v) Cs₂CO₃, DMF, 100-120 °C.

Η αντίστοιχη αντίδραση κυκλοποίησης του παραγώγου **7b** έδωσε μίγμα τριών προϊόντων τα οποία δεν κατέστη δυνατό να διαχωριστούν επαρκώς με χρωματογραφία στήλης και να χαρακτηριστούν φασματοσκοπικά (**Σχήμα 13**).



Σχήμα 13. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της 2-χλωροπυρρολοπυριμιδίνης **7b** προέκυψε μίγμα τριών προϊόντων τα οποία δεν κατέστη δυνατό να διαχωριστούν επαρκώς με χρωματογραφία στήλης και να χαρακτηριστούν φασματοσκοπικά. Αντιδραστήρια και συνθήκες (iv) 3-φαινο-1-πυρρολίνη, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, RT, (v) Cs₂CO₃, DMF, 100-120 °C.

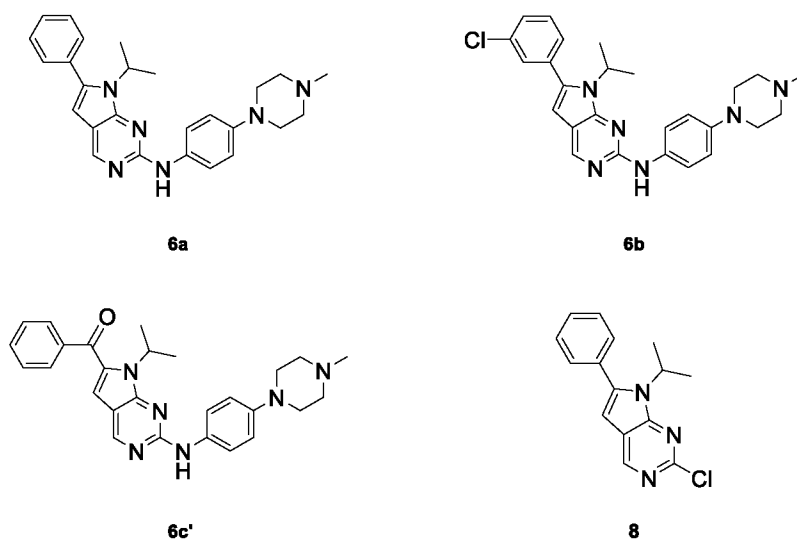
Τέλος, προκειμένου να παραχθεί το παράγωγο πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης **6a** μέσω και της πορείας **B**, η 2-χλωροπυρρολοπυριμιδίνη **8** υποβλήθηκε σε αντίδραση με την 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην πορεία **A** (iii), ωστόσο δεν κατέστη δυνατή η επιθυμητή μετατροπή, ακόμη και μετά από θέρμανση σε υψηλότερη θερμοκρασία (**Σχήμα 14**).



Σχήμα 14. Η 2-χλωροπυρρολοπυριμιδίνη **8** υποβλήθηκε σε αντίδραση με την 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη **(iii)** όμως δεν κατέστη δυνατή η μετατροπή της στο επιθυμητό παράγωγο πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης **6a** ακόμη και μετά από θέρμανση σε υψηλότερη θερμοκρασία. Αντιδραστήρια και συνθήκες **(iii)** 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη, *p*-TsOH, *i*-PrOH, 85-120 °C.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη συντέθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H και ^{13}C τέσσερα νέα παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης. Τα νεοσυντιθέμενα μόρια **6a**, **6b**, **6c'** και **8** φέρουν υποκαταστάτες στις θέσεις 2, 6 και 7 του πυρήνα της πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης (Εικόνα 38).



Εικόνα 38. Χημική δομή νεοσυντιθέμενων παραγώγων πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης **6a**, **6b**, **6c'** και **8**

Αναπτύχθηκαν δύο συνθετικές πορείες (**A** και **B**) οι οποίες βασίστηκαν στο σχηματισμό του πυρρολικού δακτυλίου πάνω στον δακτύλιο της πυριμιδίνης και είχαν ως κοινό ενδιάμεσο την Ν-ισοπροπυλο-5-ιωδο-2-χλωροπυριμιδιν-4-αμίνη (**3**). Η **3** παραλήφθηκε μέσω δύο αντιδράσεων υποκατάστασης, ξεκινώντας από την εμπορικά διαθέσιμη 5-ιωδο-ουρακίλη. Η πρώτη συνθετική πορεία περιλαμβάνει τις εξής στάδια: υποκατάσταση του χλωρίου-2 της **3** με την 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ανιλίνη, αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης με τρία διαφορετικά αλκίνια και καταλυόμενες από βάση αντιδράσεις κυκλοποίησης. Η διαφορά της πρώτης συνθετικής πορείας με τη δεύτερη είναι ότι στην δεύτερη το στάδιο εισαγωγής της πολικής ανίλινο ομάδας στον δακτύλιο της πυριμιδίνης αφέθηκε για το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης προκειμένου να ελέγχεται ασφαλέστερα η πορεία της αντίδρασης. Τα μόρια **6a**, **6b**, **6c'** προέκυψαν ακολουθώντας την συνθετική πορεία **A**, ενώ το μόριο **8** ακολουθώντας την συνθετική πορεία **B**. Τα τελευταία στάδια και των δύο συνθετικών πορειών αποδείχθηκαν και τα δυσκολότερα της συνολικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε. Συγκεκριμένα, στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας **A** δεν κατέστη ασφαλής ο έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων (TLC), λόγω της πρακτικά ίσης πολικότητας των μορίων. Ακόμη, κατά το τελικό στάδιο σύνθεσης της ένωσης **6c**, ενώ είχε διαπιστωθεί με TLC η πλήρης μετατροπή του αντιδρώντος μετά από παρατεταμένη θέρμανση, ο έλεγχος της δομής του προϊόντος με φασματοσκοπία NMR έδειξε ότι παρελήφθη η 6-βενζυλοπυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνη **6c'**, αντί για το αναμενόμενο 6-βενζυλο-παράγωγο **6c**. Αντίστοιχα, κατά το τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας **B** δεν κατέστη δυνατή η υποκατάσταση του χλωρίου-2 της **8** με την επιθυμητή ανίλινο ομάδα.

Ενόψει των ανωτέρω, οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στα τελευταία στάδια των δύο συνθετικών πορειών φέρουν περιθώρια βελτιστοποίησης καθώς επίσης απαιτείται περαιτέρω μελέτη προκειμένου να επιτευχθούν υψηλότερα ποσοστά αποδόσεων των αντίστοιχων αντιδράσεων.

Στο μέλλον θα πραγματοποιηθεί βιολογική αποτίμηση των νεοσυντιθέμενων ενώσεων ως προς τις κυτταροστατικές τους ιδιότητες.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Adel, M., Serya, R. A. T., Lasheen, D. S., & Abouzid, K. A. M. (2018a). Identification of new pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as potent VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors: Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling. *Bioorganic chemistry*, 81, 612-629. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.09.001>
- Adel, M., Serya, R. A. T., Lasheen, D. S., & Abouzid, K. A. M. (2018b). Pyrrolopyrimidine, A Multifaceted Scaffold in Cancer Targeted Therapy. *Drug Research*, 68(9), 485-498. <https://doi.org/10.1055/s-0044-101256>
- AEE-788. <https://go.drugbank.com/drugs/DB12558>
- Ajayi, S., Becker, H., Reinhardt, H., Engelhardt, M., Zeiser, R., Bubnoff, N. v., & Wäsch, R. (2018). Ruxolitinib. In (pp. 119-132). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8_6
- Baldwin, J. E. (1976). Rules for ring closure. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications*(18), 734-736. <https://doi.org/10.1039/C39760000734>
- Borys, F., Joachimiak, E., Krawczyk, H., & Fabczak, H. (2020). Intrinsic and Extrinsic Factors Affecting Microtubule Dynamics in Normal and Cancer Cells. *Molecules*, 25(16), Article 3705. <https://doi.org/10.3390/molecules25163705>
- Chinchilla, R., & Nájera, C. (2007). The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry†. *Chemical Reviews*, 107(3), 874-922. <https://doi.org/10.1021/cr050992x>
- Chung, S. H., Park, J., Lee, J. W., Song, J., Jung, D., & Min, K. H. (2020). Structure-activity relationship of 7-aryl-2-anilino-pyrrolopyrimidines as Mer and Axl tyrosine kinase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 35(1), 1822-1833. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1825407>
- Committee for Medicinal Products for Human Use. (2020a). *ALIMTA, INN-pemetrexed* [European public assessment report]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/alimta-epar-product-information_el.pdf
- Committee for Medicinal Products for Human Use. (2020b). *Kisqali, INN-ribociclib* [European public assessment report]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kisqali-epar-product-information_el.pdf
- Committee for Medicinal Products for Human Use. (2021). *Jakavi, INN-ruxolitinib* [European public assessment report]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/jakavi-epar-product-information_el.pdf
- Fuld, A. D., Dragnev, K. H., & Rigas, J. R. (2010). Pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 11(8), 1387-1402 <https://doi.org/10.1517/14656566.2010.482560>
- Gazvoda, M., Virant, M., Pinter, B., & Košmrlj, J. (2018). Mechanism of copper-free Sonogashira reaction operates through palladium-palladium transmetalation. *Nature Communications*, 9, Article 4814. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07081-5>
- Gilson, P., Josa-Prado, F., Beauvineau, C., Naud-Martin, D., Vanwonterghem, L., Mahuteau-Betzer, F., Moreno, A., Falson, P., Lafanechère, L., Frachet, V., Coll, J.-L., Díaz, J. F., Hurbin, A., & Busser, B. (2017). Identification of pyrrolopyrimidine derivative PP-13 as a novel microtubule-destabilizing agent with promising anticancer properties. *Scientific Reports*, 7, 1-14, Article 10209. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09491-9>

- Hsu, J. L., & Hung, M.-C. (2016). The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 35(4), 575–588. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9649-6>
- *Itacitinib*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB12154>
- Kaspersen, S. J., Hanab, J., G.Nørsettc, K., Rydså, L., Kjølbid, E., Bugge, S., Bjørkøy, G., Sundby, E., & Hoff, B. H. (2014). Identification of new 4-N-substituted 6-aryl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-4-amines as highly potent EGFR-TK inhibitors with Src-family activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59, 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.011>
- Khalil, O. M., Kamala, A. M., Bua, S., Teba, H. E. S., Nissan, Y. M., & Supuran, C. T. (2020). Pyrrolo and pyrrolopyrimidine sulfonamides act as cytotoxic agents in hypoxia via inhibition of transmembrane carbonic anhydrases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112021>
- Liu, X., & Winey, M. (2012). The MPS1 Family of Protein Kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 561-585 <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061611-090435>
- McCarty, R. M., & Bandarian, V. (2012). Biosynthesis of pyrrolopyrimidines. *Bioorganic chemistry*, 43, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2012.01.001>
- Musumecia, F., Sannaa, M., Grossia, G., Brulloa, C., Fallacarab, A. L., & Schenone, S. (2017). Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidines as Kinase Inhibitors *Current Medicinal Chemistry*, 24, 2059-2085. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170303162100>
- Novartis. (2017). Novartis Kisqali® (ribociclib, LEE011) receives FDA approval as first-line treatment for HR+/HER2- metastatic breast cancer in combination with any aromatase inhibitor. <https://novartis.gcs-web.com/LEE011-US-FDA-Approval>
- Novartis. (2020). Novartis provides update on RUXCOVID study of ruxolitinib for hospitalized patients with COVID-19. <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-provides-update-ruxcovid-study-ruxolitinib-hospitalized-patients-covid-19>
- Pathania, S., & Rawal, R. K. (2018). Pyrrolopyrimidines: An update on recent advancements in their medicinal attributes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 503-526. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.023>
- Perlíková, P., & Hocek, M. (2017). Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine (7-deazapurine) as a privileged scaffold in design of antitumor and antiviral nucleosides. *Medicinal Research Reviews*, 37(6), 1429-1460. <https://doi.org/10.1002/med.21465>
- Sajid, M. A., Khan, Z. A., Shahzad, S. A., Naqvi, S. A. R., & Usman, M. (2020). 5-Endo-dig cyclizations in organic syntheses. *Molecular Diversity* 24, 295–317. <https://doi.org/10.1007/s11030-019-09930-x>
- Serrano, S. S., Sime, W., Abassi, Y., Daams, R., Massoumi, R., & Jemaà, M. (2020). Inhibition of mitotic kinase Mps1 promotes cell death in neuroblastoma. *Scientific Reports*, 10, 1-14, Article 11997. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68829-y>
- Singh, S., Lomelino, C. L., Mboge, M. Y., Frost, S. C., & McKenna, R. (2018). Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. *Molecules* 23(5), Article 1045. <https://doi.org/10.3390/molecules23051045>
- Sonogashira, K., Tohda, Y., & Hagihara, N. (1975). A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and

- bromopyridines. *Tetrahedron Letters*, 16(50), 4467–4470. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)91094-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)91094-3)
- Sugimoto, Y., B.Sawant, D., A.Fisk, H., Mao, L., Li, C., Chettiara, S., Li, P.-K., V.Darby, M., & W.Brueggemeier, R. (2017). Novel pyrrolopyrimidines as Mps1/TTK kinase inhibitors for breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(7), 2156-2166. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.030>
 - Traxler, P., Allegrini, P. R., Brandt, R., Brueggen, J., Cozens, R., Fabbro, D., Grosios, K., Lane, H. A., McSheehy, P., Mestan, J., Meyer, T., Tang, C., Wartmann, M., Wood, J., & Caravatti, G. (2004). AEE788. *Cancer Research*, 64(14), 4931-4941. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3681>
 - Zhou, L., Jiang, Y., Luo, Q., Li, L., & Jia, L. (2019). Neddylation: a novel modulator of the tumor microenvironment. *Molecular Cancer*, 18(1), Article 77. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0979-1>