



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική δράση  
φαινυλαμινοπυριμιδινών  
- αναλόγων του φαρμάκου Glivec –  
ως δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων  
πρωτεϊνικών κινασών**

**ΚΥΝΗΓΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**  
M.Sc ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική δράση  
φαινυλαμινοπυριμιδινών  
- αναλόγων του φαρμάκου Glivec –  
ως δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων  
πρωτεϊνικών κινασών**

**ΚΥΝΗΓΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**  
M.Sc ΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»



Ημερομηνία **αίτησης** της κ. Μαρίας Κυνηγοπούλου : 26-4-2007

Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 666<sup>Α</sup>/ 27-4-2007

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Κωνσταντίνος Σκομπρίδης, Αν. Καθηγητής

Μέλη:

Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής

Βασιλική Θεοδώρου, Αν. Καθηγήτρια

Ημερομηνία **ορισμού θέματος**: 735<sup>Α</sup>/ 06-3-2009

**Θέμα:** «Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική δράση φαινυλαμινοπυριμιδινών – αναλόγων του φαρμάκου Glivec – ως δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 854<sup>Α</sup>/11-7-2012**

1. Βαρβούνης Γεώργιος Αν. Καθηγητής
2. Γεροθανάσης Ιωάννης, Καθηγητής
3. Θεοδώρου Βασιλική, Αν. Καθηγήτρια
4. Σίσκος Μιχαήλ, Αν. Καθηγητής
5. Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Αν. Καθηγητής
6. Τζάκος Αντρέας, Λέκτορας
7. Τσελέπης Αλέξανδρος, Καθηγητής

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**ΑΡΙΣΤΑ**» στις **12-7-2012**

**Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας**

**Η Γραμματέας του Τμήματος**

**Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής**

**Ελένη Αδαμαντίου**





Τμήμα Χημείας  
Τομέας Οργανικής Χημείας &  
Βιοχημείας  
45 110, Ιωάννινα  
Τηλ.: 26510 08398  
Fax: 26510 08799

Ιωάννινα, 12-07-2011

Προς  
το Τμήμα Χημείας  
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Θέμα:** «Πρακτικό εξέτασης και απόφασης της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την απονομή του Διδακτορικού Διπλώματος στην εξειδίκευση «Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες», με κατεύθυνση τη «Χημεία Νέων Υλικών – Πολυμερή» στη Μαρία Κυνηγοπούλου από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων»

Σήμερα, τη 12<sup>η</sup> Ιουλίου 2012 και ώρα 6:00 μ.μ., έγινε δημόσια παρουσίαση της Διδακτορικής Διατριβής στην εξειδίκευση «Χημικές και Βιοχημικές Τεχνολογίες», με κατεύθυνση τη «Χημεία Νέων Υλικών – Πολυμερή» και με θέμα: «Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική δράση φαινυλαμινοπυριμιδινών-αναλόγων του φαρμάκου Glivec- ως δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών» από την υποψήφια κα Μαρία Κυνηγοπούλου. Η παρουσίαση έλαβε χώρα στην αίθουσα σεμιναρίων Χ2-097 του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ενώπιον της κατά το νόμο ορισθείσης Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Ο κα Μαρία Κυνηγοπούλου ανέπτυξε επί περίπου 45 λεπτά τα κυριότερα αποτελέσματα της διδακτορικής της διατριβής και ακολούθως απάντησε σε σειρά ερωτήσεων. Κατόπιν, μετά την αποχώρηση της υποψήφιας και του ακροατηρίου, τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής έκριναν ομόφωνα ότι ο κα Μαρία Κυνηγοπούλου κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής της εργάστηκε συστηματικά στην ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης και απλούστερης μεθόδου σύνθεσης αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec, το οποίο χορηγείται σε ασθενείς για την αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, με μεγάλη επιτυχία. Συνέθεσε μια ευρεία κλίμακα τελικών ενώσεων, με πολλούς συνδυασμούς συντακτικών χαρακτηριστικών, επίσης βελτιστοποίησε τόσο τις συνθήκες, όσο και τις αποδόσεις διαφόρων σταδίων. Ο βιολογικός έλεγχος της ανασταλτικής δράσης των αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec, κατέδειξε σε ορισμένες περιπτώσεις ισχυρή ανασταλτική δράση, ισχυρότερη των φαρμακευτικών σκευασμάτων Glivec και Sorafenib, καθώς και εκλεκτική δράση σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις. Το έργο της παρουσιάζει επάρκεια και πρωτοτυπία, αξιοποιεί τη διαθέσιμη διεθνή βιβλιογραφία και αναδεικνύει νέες δυνατότητες στον τομέα έρευνας των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Για τους λόγους αυτούς, η επιτροπή προτείνει ομόφωνα την απονομή της Διδακτορικής Διατριβής στην κα Μαρία Κυνηγοπούλου με βαθμό «άριστα».

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

1. Κωνσταντίνος Σκομπρίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής, (Επιβλέπων Καθηγητής)
2. Βασιλική Θεοδώρου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, (μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής)
3. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής, (μέλος τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής)
4. Ιωάννης Γεροθανάσης, Καθηγητής, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής)
5. Γεώργιος Βαρβούνης, Αναπληρωτής Καθηγητής, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής)
6. Μιχαήλ Σίσκος, Αναπληρωτής Καθηγητής, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής)
7. Ανδρέας Τζάκος, Λέκτορας, (μέλος επταμελούς εξεταστικής επιτροπής)



# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αφορά στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τον έλεγχο της βιολογικής δράσης φαινυλαμινοπυτιμιδινών – αναλόγων του φαρμάκου Glivec (Imatinib) – ως δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

Η συνθετική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο πλαίσιο του Αναμορφωμένου Προγράμματος Σπουδών (ΕΠΕΑΕΚ II) και χρηματοδοτήθηκε εν μέρει στο πλαίσιο του προγράμματος «Επιστημονικές και τεχνολογικές συνεργασίες μεταξύ Ελληνικών Οργανισμών Ε/Τ και Οργανισμών εκτός Ευρώπης», με τίτλο: «Φωσφοροπρωτεομική ως εργαλείο για το σχεδιασμό δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών», καθώς και από την Επιτροπή Διαχείρισης Ειδικού Λογαριασμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με τίτλο: «Σχεδιασμός, σύνθεση και μελέτη της βιοδραστικότητας παραγώγων της φαινυλαμινοπυτιμιδίνης ως αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών».

Η ολοκλήρωση μίας διδακτορικής διατριβής απαιτεί πολύ κόπο αλλά και γνώσεις, μελέτη, αφοσίωση και ιδιαίτερα στην Οργανική Χημεία, μεράκι. Κάποιες στιγμές απογοητεύεσαι και, άλλες νιώθεις υπερήφανος, που από τους κόπους σου δημιουργήθηκαν νέα επιστημονικά δεδομένα. Ο καθένας μας σε κάθε του προσπάθεια έχει δίπλα του ανθρώπους που τον στηρίζουν και του προσφέρουν βοήθεια.

Για όλους τους παραπάνω λόγους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή και Δάσκαλό μου Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, ο οποίος στάθηκε δίπλα μου όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας. Με καθοδηγούσε καθόλη τη διάρκεια της διατριβής μου με τις επιστημονικές του γνώσεις και εμπειρίες με το ήθος του και την ανθρωπιά του. Ήταν η αφορμή να αγαπήσω την Οργανική Χημεία και να ολοκληρώσω με επιτυχία την ερευνητική μου προσπάθεια.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βασιλική Θεοδώρου για την συνεχή βοήθεια που μου πρόσφερε απλόχερα καθώς και να εκφράσω την εκτίμηση που τρέφω

στο πρόσωπό της. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αλέξανδρο Τσελέπη μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, καθώς και τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή Ιωάννη Γεροθανάση, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Βαρβούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μιχάλη Σίσκο και τον Λέκτορα Αντρέα Τζάκο.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ το συνάδελφο και σύζυγό μου Παναγιώτη Γκριτζάπη που με στήριξε και με βοηθούσε με τις πολύτιμες επιστημονικές και μη συμβουλές του, που στάθηκε όλα αυτά τα χρόνια δίπλα μου. Την οικογένειά μου που εκτίμησε την προσπάθειά μου και βρίσκονταν κοντά μου τόσο της καλές όσο και τις δύσκολες στιγμές. Τέλος, ευχαριστώ τους συναδέλφους, συνεργάτες και φίλους Δ. Αλίβερτη, Γ. Παρασκευόπουλο, Α. Ξιούνα, Α. Καρκατσούλη, Α.Γιαννούση και Μ. Καραμήτρου, στους οποίους στηρίχθηκα ποικιλοτρόπως για να φέρω εις πέρας την παρούσα διατριβή.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου της Λειψίας (Γερμανία), κ. Αθανάσιο Γιάννη, για τη φιλοξενία και τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της απασχόλησής μου στο ερευνητικό του εργαστήριο, καθώς και τη λήψη φασμάτων ESI-HRMS. Ευχαριστίες στο κέντρο NMR του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR και τη συνεργασία μας. Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Institute for Reproductive and Developmental Biology του Imperial College of London κ. Nick Dibb και την ομάδα του, για την ολοκλήρωση βιοχημικών και βιολογικών πειραμάτων.

---

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

|           |                                                          |           |
|-----------|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b> | <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>                        | <b>15</b> |
| <b>2.</b> | <b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>                                   | <b>23</b> |
| 2.1       | Πρωτεϊνικές κινάσες                                      | 23        |
| 2.2       | Οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών                          | 25        |
| 2.3       | Πρωτεϊνικές τυροσυλο-κινάσες                             | 26        |
| 2.3.1     | Υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (RTKs)    | 27        |
| 2.3.2     | Μη-υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (TKs)  | 32        |
| 2.4       | Πρωτεϊνικές Σερίνο-Θρεονινο-κινάσες                      | 35        |
| 2.5       | Άλλες πρωτεϊνικές κινάσες                                | 37        |
| 2.5.1     | Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)                                | 37        |
| 2.5.2     | Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDK)       | 39        |
| 2.6       | Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs)                        | 40        |
| 2.7       | Οι πρωτεϊνικές κινάσες στη σηματοδοτική οδό των κυττάρων | 41        |
| 2.8       | Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών - Συνθέσεις               | 43        |
| 2.9       | Glivec - Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία                     | 55        |
| 2.9.1     | Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία - Χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας | 55        |
| 2.9.2     | Δομή του φαρμάκου Glivec                                 | 56        |

---

|           |                                                                              |            |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.10      | Σχηματισμός του πυριδινικού δακτυλίου                                        | 59         |
| 2.11      | Αναγωγή της νιτροομάδας σε αμινομάδα                                         | 63         |
| <b>3.</b> | <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>                                               | <b>65</b>  |
| 3.1       | Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων                                        | 65         |
| 3.2       | Ολική πορεία σύνθεσης των νέων εν δυνάμει αναστολέων                         | 72         |
| 3.3       | Διαφοροποιήσεις στη συνθετική πορεία των νέων αναστολέων                     | 74         |
| 3.4       | Σύνθεση β-εναμινονών                                                         | 76         |
| 3.5       | Σύνθεση των μεθυλο-νιτρο-φαινυλογουανιδινών                                  | 80         |
| 3.6       | Σύνθεση των φαινυλαμινο-πυριμιδινών                                          | 81         |
| 3.7       | Αναγωγή της νιτροομάδας με υδρογόνωση παρουσία καταλύτη                      | 85         |
| 3.8       | Νίτρωση αλκυλο-βενζοϊκών οξέων                                               | 88         |
| 3.9       | Σχηματισμός αμιδικού δεσμού                                                  | 90         |
| 3.10      | Βιοχημικά και βιολογικά αποτελέσματα                                         | 104        |
| 3.10.1    | Αναστολή πρωτεϊνικών κινάσων - Βασικές έννοιες - Μοντέλα                     | 104        |
| 3.10.2    | Ανασταλτική δράση αναστολέων έναντι των A431 κυττάρων                        | 111        |
| 3.10.3    | Ανασταλτική δράση αναστολέων έναντι διάφορων μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών | 116        |
| <b>4.</b> | <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>                                                     | <b>127</b> |
| 4.1       | Συσκευές και όργανα                                                          | 127        |
| 4.2       | Αντιδράσεις σύνθεσης των β-εναμινονών                                        | 128        |

|           |                                                                                  |     |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3       | Αντιδράσεις σχηματισμού υδροχλωρικών αλάτων των μεθυλο-νιτροανιλινών             | 129 |
| 4.4       | Αντιδράσεις σύνθεσης των υδροχλωρικών αλάτων των μεθυλο-νιτρο-φαινυλογουανιδινών | 130 |
| 4.5       | Αντιδράσεις σύνθεσης των φαινυλαμινο-πυριμιδινών                                 | 131 |
| 4.6       | Αντιδράσεις αναγωγής των φαινυλαμινο-πυριμιδινών                                 | 133 |
| 4.7       | Αντιδράσεις νίτρωσης αλκυλο-βενζοϊκών οξέων                                      | 135 |
| 4.8       | Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων                                           | 137 |
| <b>5.</b> | <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>                                                              | 191 |



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων, νέων χημικών ενώσεων, αποτελεί μία από τις κύριες προτεραιότητες του κλάδου της χημείας. Από τα αρχικά στάδια του σχεδιασμού ενός θεωρητικού μοντέλου, την πραγματοποίηση της σύνθεσης και ταυτοποίησης της νέας οργανικής ένωσης έως το βιολογικό της έλεγχο, σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα, συμβάλλουν σχεδόν όλοι οι κλάδοι της χημείας. Φαρμακοβιομηχανίες αλλά και πολλές ερευνητικές ομάδες τις τελευταίες δεκαετίες ασχολούνται με την ανάπτυξη φαρμάκων εναντίον της πιο πολυδιάστατης και συχνά εμφανιζόμενης ασθένειας, τον καρκίνο.

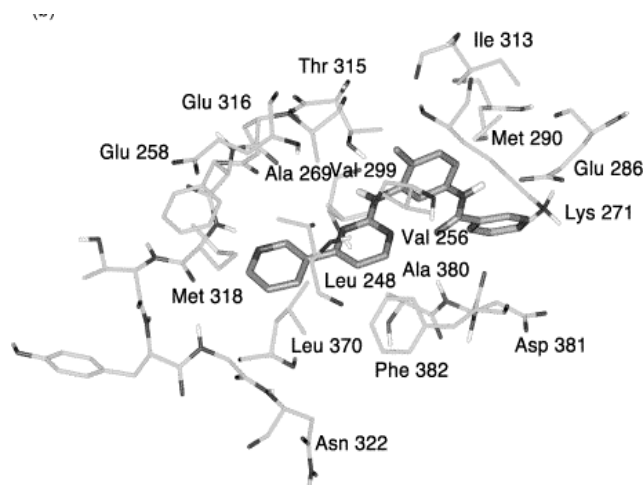
Οι έρευνες κατέδειξαν ότι οι μοριακές βλάβες, που ευθύνονται για τον καρκίνο, διαταράσσουν τους μηχανισμούς ελέγχου των κυττάρων, οι οποίοι ρυθμίζουν τη διαίρεση, την επιβίωση και το φυσιολογικό θάνατο απόπτωσής τους. Μεταλλάξεις μορίων που εμπλέκονται στις σηματοδοτικές οδούς του κυττάρου, όπως είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες, διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στην «εγωιστική»/αυτόνομη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων, συμπεριφορά που εκφράζεται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και την αποφυγή της απόπτωσής τους.

Οι κινάσες είναι οι πρωτεϊνικοί καταλύτες του κυττάρου, που με εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια εντολές φωσφορυλιώνουν μία υδροξυλομάδα μιας πρωτεΐνης ενεργοποιώντας την. Η φωσφορική ομάδα προσφέρεται από ένα μόριο ATP, το οποίο προσδένεται στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές κινάσες φωσφορυλιώνουν ανεξέλεγκτα πρωτεΐνες θέτοντας σε λειτουργία μη επιθυμητούς μηχανισμούς του κυττάρου, με αποτέλεσμα το συνεχή

πολλαπλασιασμό κυττάρων και τη δημιουργία όγκων.

Ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση μορφών καρκίνου απέδωσε η ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Αναστολέων, οι οποίοι κατευθύνονται στο ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης, δεσμεύονται σε αυτό, αναστέλλοντας έτσι την ανεξέλεγκτη λειτουργία της. Ως μιμητές του ATP καταλαμβάνουν το χώρο του ενεργού κέντρου της πρωτεϊνικής κινάσης δημιουργώντας αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κ.ά. Δρουν ανταγωνιστικά με τα μόρια του ATP, τα οποία ως συνέπεια αυτού αδυνατούν να προσδεθούν σε ένα ήδη κατειλημμένο χώρο, μη προσφέροντας την πολύτιμη φωσφορική τους ομάδα σε μία πρωτεΐνη, προκειμένου να ενεργοποιηθεί.

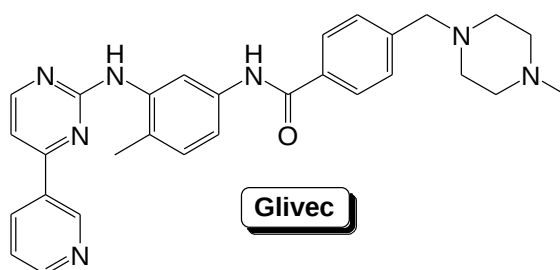
Ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας πρωτεϊνικής κινάσης, που χορηγείται εδώ και μερικά χρόνια επιτυχώς για τη θεραπευτική αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας (CML), είναι το φαρμακευτικό σκεύασμα Glivec (Imatinib) της φαρμακευτικής εταιρίας “Novartis”, ένα παράγωγο της φαινυλαμινοπυριμιδίνης.<sup>1-4</sup> Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Abl πρωτεϊνικής κινάσης και του φαρμάκου Glivec, σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική δομή, αποτελούν ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1:** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Glivec και της κινάσης Abl.

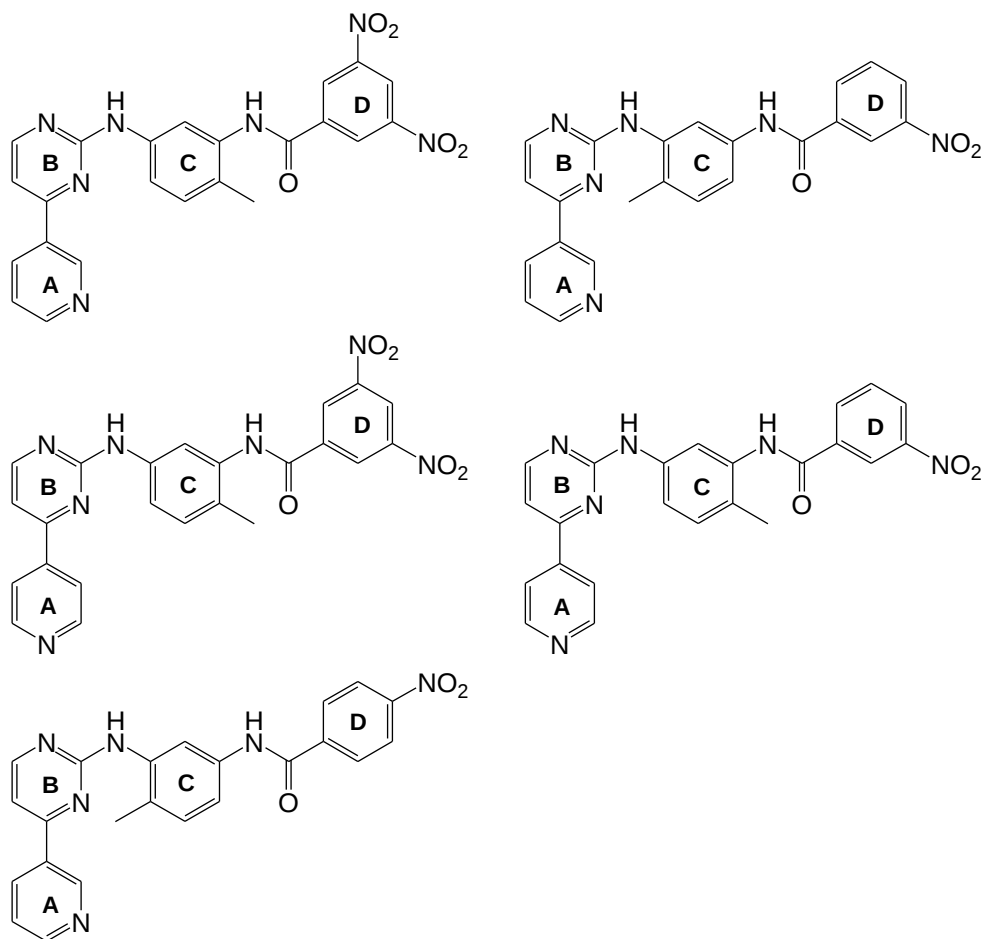
Η αρχική ένωση-αναστολέας (lead compound) που δοκιμάστηκε κατά την πορεία ανάπτυξης του εν λόγω φαρμακευτικού σκευάσματος και η οποία κατέδειξε μια ασθενή ανασταλτική δράση κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), ήταν μια φαινυλαμινοπυριμιδίνη. Στην πορεία της ερευνητικής προσπάθειας, για τη βελτιστοποίηση της μοριακής δομής, διαπιστώθηκε ότι η σύνδεση / προσάρτηση μιας 3-πυριδίνης στην 4-θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου, οδήγησε σε εντυπωσιακή αύξηση της ανασταλτικής δράσης κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C. Στην περαιτέρω προσπάθεια αύξησης της ανασταλτικής δράσης, η εισαγωγή μίας μεθυλομάδας στην 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου (Glivec), κατήργησε παντελώς την ανασταλτική δράση της εν λόγω ένωσης, έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης C. Αντιθέτως, η ένωση κατέστη εξαιρετικά εκλεκτική και ταυτόχρονα δραστική κατά της Bcr-Abl πρωτεϊνικής κινάσης.

Αυτό το παράδοξο εκ πρώτης όψεως πειραματικό δεδομένο, δηλ. η ουσιαστική απώλεια της ανασταλτικής δράσης έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), οφείλεται πιθανότατα στην ουσιαστική αλλαγή της διαμόρφωσης που επιφέρει η προσθήκη μίας μεθυλομάδας στην 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2:** Αλλαγή διαμόρφωσης με την εισαγωγή μεθυλομάδας

Με δεδομένη την παραπάνω παρατήρηση σχεδιάσθηκαν και συντέθηκαν αρχικά περίπου 30 νέοι αναστολείς, οι οποίοι ελέγχθηκαν έναντι αρκετών πρωτεϊνικών κινάσων σε συνεργασία με τη φαρμακευτική εταιρία “Novartis”. Τα βιολογικά αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά σε πέντε τύπους ενώσεων (Σχήμα 3).



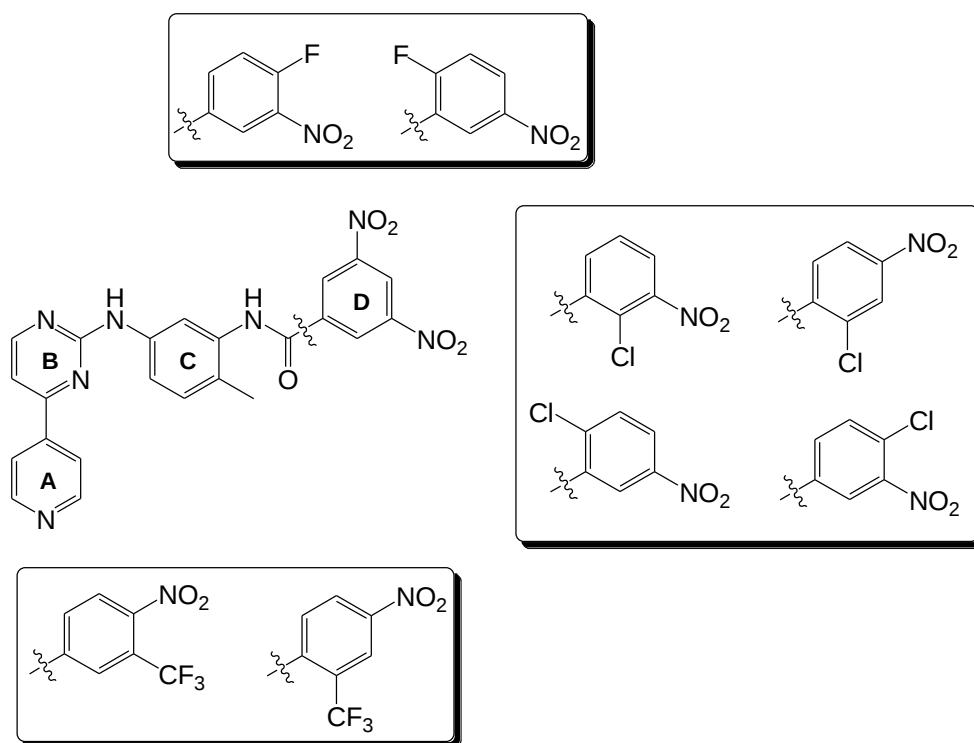
**Σχήμα 3:** Δομές ενώσεων με ενδιαφέρουσα ανασταλτική δράση

Οι ενώσεις αυτές περιείχαν παρόμοια δομικά στοιχεία, όπως το άζωτο στον **A** ετεροαρωματικό δακτύλιο, η μεθυλομάδα στο **C** αρωματικό δακτύλιο και την παρουσία της νιτροομάδας στο **D** τελικό αρωματικό δακτύλιο. Διατηρώντας σταθερούς τους τρεις δακτυλίους **A**, **B** και **C** και διαφοροποιώντας τους υποκαταστάτες του τελικού αρωματικού δακτυλίου σχεδιάσθηκαν και παρασκευάστηκαν τρεις νέες ομάδες ενώσεων.

Στην πρώτη ομάδα ενώσεων το άζωτο της πυριδίνης βρίσκεται στην 4-θέση, η μεθυλομάδα του αρωματικού δακτυλίου **C** είναι προσαρτημένη στην 4-

θέση και από το δακτύλιο **D** απομακρύνθηκε η μία νιτροομάδα και αντικαταστάθηκε από ένα αλογόνο, όπως το φθόριο, το χλώριο ή μία τριφθορο-μεθυλομάδα (Σχήμα 4).

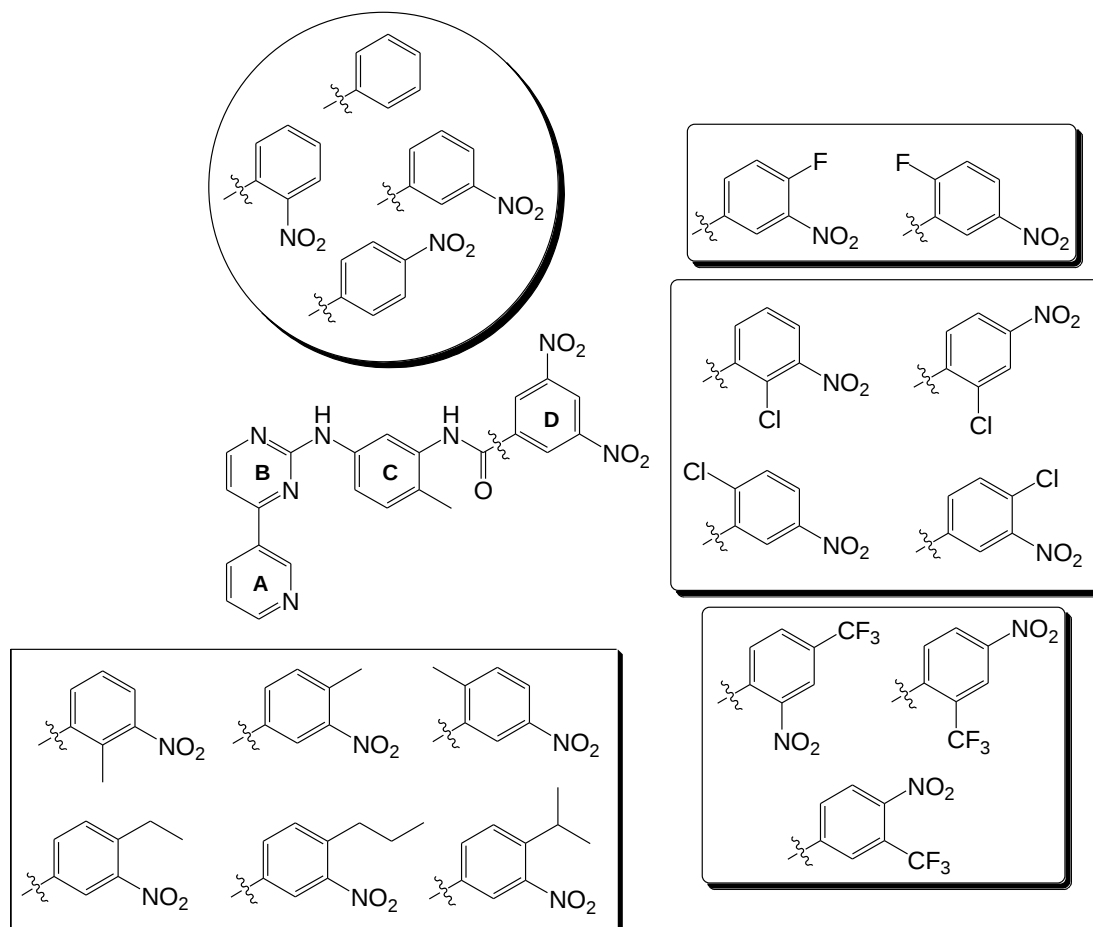
#### ΠΡΩΤΗ ΟΜΑΔΑ



**Σχήμα 4:** Πρώτη ομάδα νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Στη δεύτερη ομάδα ενώσεων το άζωτο της πυριδίνης βρίσκεται στην 3-θέση, η μεθυλομάδα του αρωματικού δακτυλίου **C** είναι προσαρτημένη στην 4-θέση. Στο δακτύλιο **D** παρασκευάστηκαν αρχικά τέσσερα παράγωγα, είτε χωρίς νιτροομάδα, είτε με μία νιτροομάδα σε όλες τις δυνατές θέσεις. Επιπλέον απομακρύνθηκε η μία νιτροομάδα και την αντικατέστησαν αλογόνα, όπως το φθόριο, το χλώριο ή μία τριφθορο-μεθυλομάδα. Τέλος έγινε εισαγωγή λιπόφιλων ομάδων, όπως μεθυλο-, αιθυλο-, προπυλο- και *i*-προπυλο-ομάδων (Σχήμα 5).

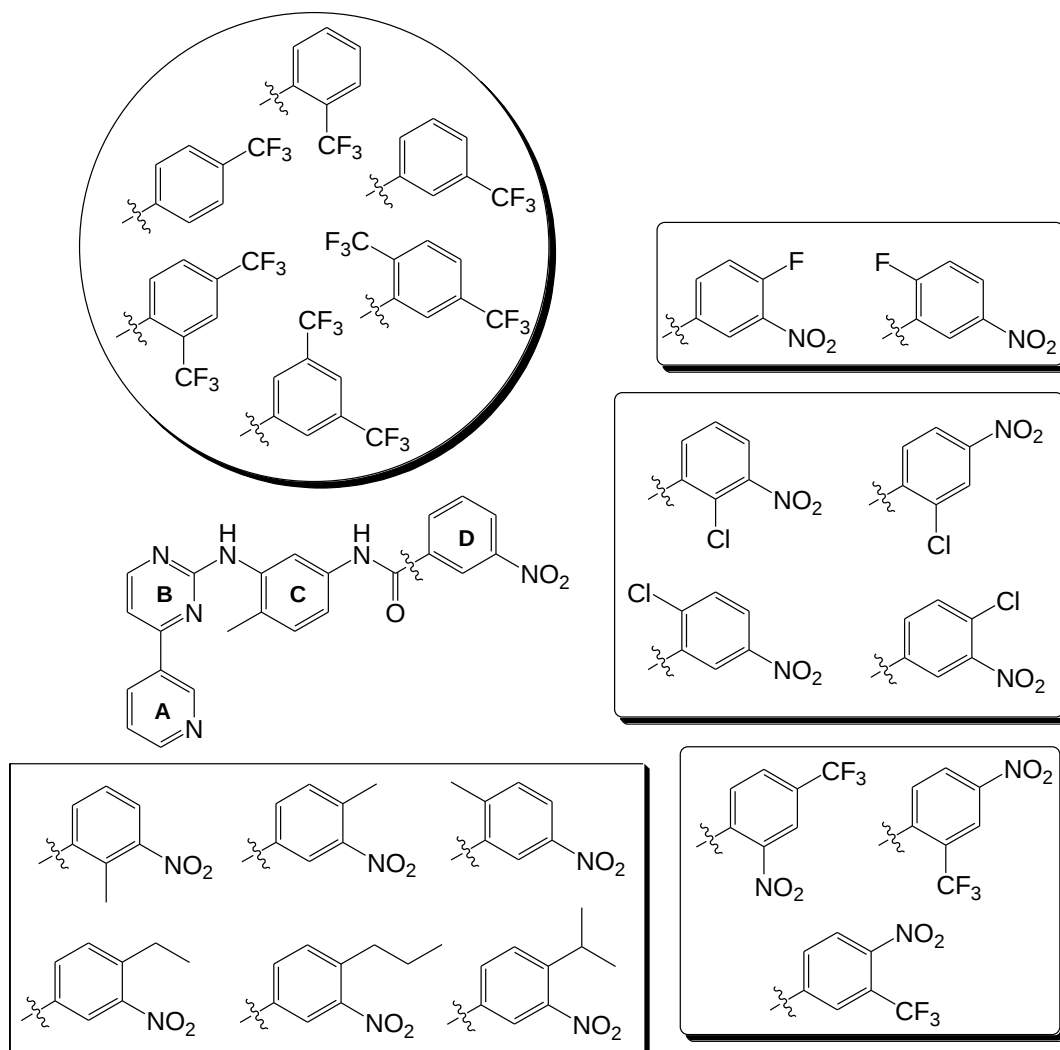
## ΔΕΥΤΕΡΗ ΟΜΑΔΑ



**Σχήμα 5:** Δεύτερη ομάδα νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Στην τρίτη ομάδα ενώσεων το άζωτο της πυριδίνης βρίσκεται στην 3-θέση, η μεθυλομάδα του αρωματικού δακτυλίου **C** είναι προσαρτημένη στην 6-θέση. Στο δακτύλιο **D** διατηρήθηκε η μία νιτροομάδα και προστέθηκαν είτε αλογόνα, όπως το φθόριο και το χλώριο, είτε τριφθορομεθυλο-υποκαταστάτης. Επίσης, εισήχθησαν υδρόφοβες ομάδες, όπως μεθυλο-, αιθυλο-, προπυλο- και *i*-προπυλο-ομάδες. Τέλος αντικαταστάθηκε η νιτροομάδα με μία ή δύο τριφθορομεθυλο-υποκαταστάτες (Σχήμα 6).

### ΤΡΙΤΗ ΟΜΑΔΑ



**Σχήμα 6:** Τρίτη ομάδα νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών

Οι προαναφερθείσες αλλαγές στη μοριακή δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec, οδήγησαν στη σύνθεση 48 νέων φαινυλοαμινοπυριμιδινικών παραγώγων, τα οποία σε επόμενο στάδιο ελέγχθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι των πρωτεϊνικών κινασών HER-1, KDR, Fit-3, IGR-1R, Tek, c-Src, c-Met, Ret, JAK-2, EphB4, Axl, FAK, PKA, CDK-2, B-Raf, c-Kit, FMS, PDGFRβ κ.α.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας, ήταν σχεδιασμός νέων εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών, με υψηλή εξειδίκευση

πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς, επίσης, μία απλούστερη και αποδοτικότερη μέθοδος σύνθεσης των παραπάνω μορίων. Οι νεοσυντεθείσες ενώσεις απομονώθηκαν καθαρές και ταυτοποιήθηκαν πλήρως, με σύγχρονες φασματοσκοπικές μεθόδους, (στα Πανεπιστήμια Ιωαννίνων και Λειψίας). Ο βιολογικός έλεγχος των ενώσεων πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο της Μεγάλης Βρετανίας Imperial College of London, με τη βοήθεια του Dr. N. J. Dibb και της ομάδας του, καθώς επίσης στη φαρμακοβιομηχανία Novartis.

## 2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Πρωτεϊνικές κινάσες

Η ανάπτυξη ενός εκλεκτικού αναστολέα μιας πρωτεϊνικής κινάσης είναι μία ερευνητική διαδικασία, η οποία επικεντρώνεται τις περισσότερες φορές στην επίτευξη αναστολής ενός συγκεκριμένου βιομακρομορίου από μία πληθώρα παρόμοιων του. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο σε αρκετές διεργασίες του κυττάρου, όπως στη ρύθμιση και την κατάλυση του μεταβολισμού της γλυκόζης, στη μεταγραφή των γονιδίων, στον κύκλο ανάπτυξης του κυττάρου, στη διαφοροποίηση, στην απόπτωση, κ.ά.

Τα ένζυμα, ως βιολογικοί καταλύτες που έχουν την ιδιότητα να συμμετέχουν στη χημική τροποποίηση μορίων, χωρίς τα ίδια να υφίστανται αλλαγές στη χημική τους σύσταση, είναι μία υποκατηγορία των λειτουργικών πρωτεϊνών. Οι λειτουργικές και δομικές πρωτεΐνες αποτελούν το σύνολο των πρωτεϊνών, μία ξεχωριστή κατηγορία βιομακρομορίων, με ιδιαίτερο ρόλο σε πλήθος διεργασιών του κυττάρου, όπως η ενζυμική κατάλυση, η μεταφορά και αποθήκευση χημικών ουσιών, κυρίως μικρών μορίων και ιόντων, η ανοσολογική προφύλαξη, κ.ά.

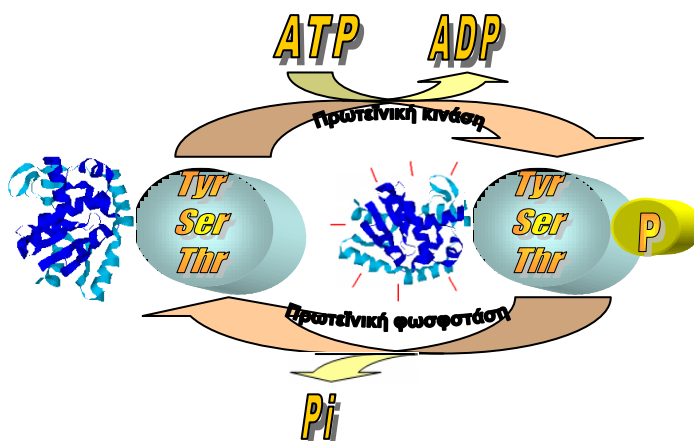
Η πλειοψηφία των πρωτεϊνικών μορίων έχουν την ιδιότητα να μεταβάλλουν την τριτοταγή ή τεταρτοταγή δομή τους, με σκοπό τη μεταβολή της ενεργότητάς τους. Η αλλοστερική τους ιδιότητα τους επιτρέπει να εναλλάσσονται μεταξύ ενεργής και ανενεργής μορφής, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του κυττάρου. Η

εναλλαγή απαιτείται να είναι απλή και ταχύτατη, ώστε να γίνονται αντιληπτά τα σήματα που λαμβάνει το κύτταρο.<sup>5</sup>

Η ομοιοπολική πρόσδεση μιας τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP στο υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της σερίνης, της θρεονίνης ή της τυροσίνης μίας πρωτεΐνης (Σχήμα 7) είναι ικανή να επιφέρει τροποποίηση στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια στη λειτουργία της (Σχήμα 8).



**Σχήμα 7:** Πρόσδεση μίας φωσφορικής ομάδας του ATP σε υδροξύλιο σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης μίας πρωτεΐνης



**Σχήμα 8:** Φωσφορυλίωση και αποσφωσφορυλίωση πρωτεϊνών με ένζυμα

Η πρόσδεση της εν λόγω ομάδας, η οποία φέρει δύο αρνητικά φορτία, έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση θετικά φορτισμένων ομάδων της πρωτεΐνης και τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με συνεισφορά των οξυγόνων της. Η εισαγωγή της φωσφορικής ομάδας καθιστά την πρωτεΐνη δραστική ή δίνει μία τέτοια διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο της που δρα παρεμποδιστικά.<sup>6</sup> Το μόριο του ATP, που συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις μέσα στο κύτταρο, προσφέρει μαζί με τη φορτισμένη ομάδα και την απαιτούμενη ενέργεια για την ολοκλήρωση της μεταφοράς.

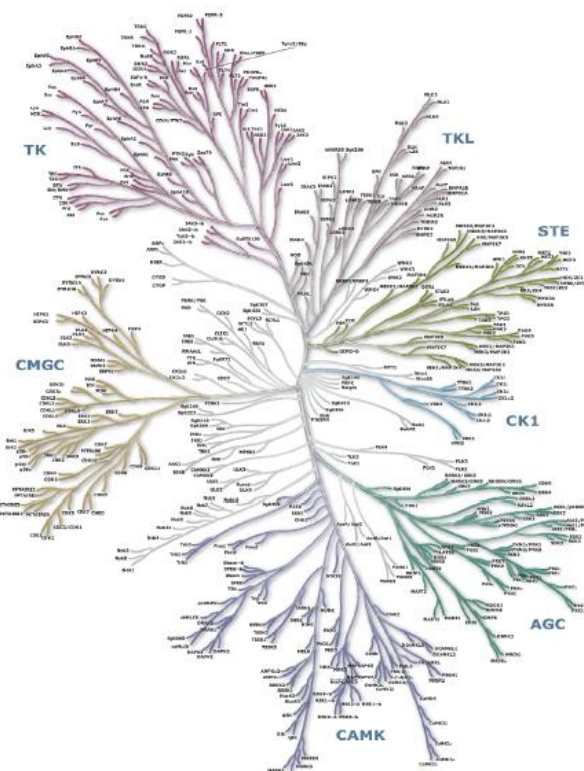
Σχεδόν 2% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεϊνικές κινάσες και 30-50% των πρωτεϊνών του κυττάρου φωσφορυλιώνονται.<sup>7</sup> Πιστεύεται ότι, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, πάνω από το 1/3 των 10.000 πρωτεϊνών ενός κοινού κυττάρου θηλαστικού είναι φωσφορυλιωμένες. Λόγω του μεγάλου αριθμού των πρωτεϊνών κινασών και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών θα επικεντρωθούμε στην αναφορά ορισμένων εξ' αυτών, ειδικότερα αυτών των οποίων έγινε προσπάθεια αναστολής.

## 2.2 Οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών

Έχει διαπιστωθεί ότι σε ένα μόνο κύτταρο θηλαστικού μπορεί να υπάρχουν αρκετές εκατοντάδες διαφορετικά είδη πρωτεϊνικών κινασών. Η ανάλυση του χάρτη του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση περισσότερων των 500 πρωτεϊνικών κινασών. Οι πρωτεϊνικές κινάσες κατατάσσονται σε οικογένειες ανάλογα με τις διεργασίες τις οποίες διεκπεραιώνουν μέσα στο κύτταρο. Άλλη οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών εμπλέκεται στη μεταγωγή σημάτων από την κυτταρική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, διαφορετική στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, ή στη μεταγραφή γονιδίων, κ.ο.κ.

Οι χαρακτηρισμένες πρωτεϊνικές κινάσες διαχωρίζονται σε δύο κύριες υπερ-οικογένειες, τις πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης και τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης-θρεονίνης. Οι δύο αυτές οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών εμπεριέχουν μικρότερες υπο-οικογένειες ανάλογα με τη δράση τους, την τρισδιάστατη δομή του ενεργού τους κέντρου καθώς και την εξάρτηση των μελών τους από άλλα μόρια, τόσο στον ενδοκυττάριο, όσο και στον εξωκυττάριο χώρο.<sup>8-9</sup>

Το δένδrogramμα του *Σχήματος 9*, μπορεί να δώσει μία εικόνα για τον αριθμό των χαρακτηρισμένων πρωτεϊνικών κινασών. Κάθε κλάδος αποτελεί μία ξεχωριστή οικογένεια, ενώ ο κάθε υπό-κλάδος αποτελεί μια διαφορετική υπο-οικογένεια. Σε αρκετές περιπτώσεις ο ρόλος των μορίων αυτών δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη, ενώ σε αντίθεση, υπάρχουν οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών που μελετώνται πάνω από τρεις δεκαετίες.



**Σχήμα 9:** Διαχωρισμός πρωτεϊνικών κινασών σε οικογένειες<sup>10</sup>

Λόγω του ιδιαίτερα μεγάλου αριθμού των πρωτεϊνικών κινασών στις παρακάτω παραγράφους θα γίνει μόνο μία σύντομη αναφορά στις πιο συχνά απαντώμενες υποοικογένειες.

## 2.3 Πρωτεϊνικές τυροσυλο-κινάσες

Αν και όλες οι οικογένειες των πρωτεϊνικών κινασών διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του κυττάρου, οι πλέον πολυσυζητημένες πρωτεϊνικές κινάσες είναι οι τυροσυλο-κινάσες (PKTs). Είναι η οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούν πολυάριθμες σηματοδοτικές οδούς μέσα στα κύτταρα και τα οδηγούν στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στη μετανάστευση ακόμα και στην απόπτωσή τους. Ο αναντικατάστατος ρόλος τους, καθώς επίσης και οι μεταλλάξεις που υφίστανται, τις τοποθετούν στην πρώτη θέση των θεραπευτικών στόχων για την καταπολέμηση πολλών ασθενειών και κυρίως των διαφόρων μορφών καρκίνου. Αν και είναι μία μειοψηφία των

πρωτεϊνικών κινασών, έχουν καταφέρει να στρέψουν το επιστημονικό ενδιαφέρον πάνω τους.

Οι πρωτεϊνικές τυροσυλο-κινάσες χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες:

- α) τις υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (RKTs) και
- β) τις μη-υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (NRTKs).<sup>11</sup>

### **2.3.1 Υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (RTKs)**

Οι υποδοχικές τυροσύλο-κινάσες αποτελούν περίπου το 10% του συνολικού αριθμού των πρωτεϊνικών κινασών στον άνθρωπο. Διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, ειδικά στα μονοπάτια σηματοδοτικών μεταγωγών, ενδοκυτταρικών επικοινωνιών και ανταποκρίνονται στο περιβαλλοντικό στρες. Τις τελευταίες δεκαετίες αποτελούν τον κύριο στόχο στην ανάπτυξη αντικαρκινικών σκευασμάτων, επειδή εμπλέκονται ενεργά στις μεταγωγικές οδούς που συνδέονται με τις βλάβες των κυττάρων και τον μηχανισμό απόπτωσης αυτών<sup>12</sup>. Οι πιο συχνά εμπλεκόμενοι αντιπρόσωποι της οικογένειας θα αναφερθούν εν συντομία παρακάτω.

Οι RKTs αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές, μία εξωκυττάρια δεσμευτική περιοχή, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία κυτταροπλασματική περιοχή, η οποία περικλείει τη δράση κινάσης.<sup>8,13</sup> Η λήψη του εξωκυττάριου σήματος και η μεταβίβασή του, με τη βοήθεια των υποδοχικών πρωτεϊνικών κινασών, στο εσωτερικό του κυττάρου παρατίθεται σε επόμενη παράγραφο.

#### **Υποδοχέας αυξητικών παραγόντων της ινσουλίνης IGF-1R**

Το πρώτο μέλος της οικογένειας που θα αναφερθούμε είναι ο υποδοχέας αυξητικών παραγόντων της ινσουλίνης IGF-1R. Οι αυξητικοί παράγοντες της ινσουλίνης IGF-I και IGF-II ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των αιματοποιητικών κυττάρων δια μέσου του υποδοχέα τους IGF-1R πάνω στα ερυθροκύτταρα, στα μονοκύτταρα καθώς επίσης και στα B και T λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση των IGF-I και IGF-II με τους υποδοχείς τους διαδραματίζουν έναν κεντρικό ρόλο στην ογκογένεση, στον πολλαπλασιασμό και στην ανάπτυξη πολλών ειδών καρκίνου, προωθώντας την ανάπτυξη του κυτταρικού κύκλου, που

αποτρέπει την απόπτωση των κυττάρων, και ρυθμίζει τη διατήρηση του ογκογενετικού φαινοτύπου.<sup>14</sup>

Η αυξημένη έκφραση των IGFs και IGF-1R καθώς και η μείωση έκφρασης των IGFs προσδετικών πρωτεϊνών είναι μηχανισμοί που οδηγούν στην πρόοδο του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ενός από τους πιο κοινούς καρκίνους. Πρόσφατα έκαναν την εμφάνισή τους, ως εναλλακτική θεραπεία, μικρού μοριακού βάρους αναστολείς της IGF-1R τυροσυλο-κινάσης, με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα.<sup>11,15</sup>

#### **Πρωτεϊνικές κινάσες c-KIT, FLT3, PDGF-Rα, PDGF-Rβ και c-FMS**

Οι πρωτεϊνικές κινάσες c-KIT, FLT3, PDGF-Rα, PDGF-Rβ και c-FMS αποτελούν την επόμενη υπο-οικογένεια RKTs, η οποία εμπλέκεται σε διάφορα είδη καρκίνου και κυρίως στη μυελογενή λευχαιμία. Συγκεκριμένα, η c-KIT κινάση εκφράζεται στα κύτταρα ιστών, τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα του εντέρου καθώς επίσης και στα αιμοτοποιητικά προγόνια κύτταρα. Έχει ήδη αποδειχθεί η εμπλοκή της στον καρκίνο του στομάχου, καθώς επίσης και στη λευχαιμία.<sup>11</sup>

#### **Υποδοχέας επιδερμικών αυξητικών παραγόντων HER1 ή EGF-R**

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα ο υποδοχέας EGF-R/HER1/ErbB-1 είναι μία τυροσύλο κινάση που ανήκει στην οικογένεια ErbB, μαζί με άλλους τρεις επίσης σημαντικούς υποδοχείς ErbB-2/HER2, ErbB-3/HER3 και ErbB-4/Her4. Ο HER1 έχει βρεθεί ότι εκφράζεται και τροποποιείται σε ποικιλία κακοήθων καρκίνων, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη μετανάστευση, στη ρύθμιση της απόπτωσης και την αγγειογένεση των κυττάρων.<sup>16</sup>

Οι πιο κοινές μεταλλάξεις, που γίνονται στους συγκεκριμένους υποδοχείς, αφορούν τη μη-ολοκληρωμένη εξωκυττάρια περιοχή και έχουν ως αποτέλεσμα να μη δεσμεύεται προσδέτης. Ωστόσο, έχουν μία άθικτη περιοχή τυροσύλο-κινάσης, που απαντά σε ανύπαρκτα εξωκυττάρια σήματα, με ταυτόχρονη ενεργοποίηση σηματοδοτικών καταρρακτών και κατάργηση των αποπτωτικών μηχανισμών ελέγχου του κυττάρου. Επιπλέον, έχουν διαπιστωθεί και μεταλλάξεις στην ενδοκυττάρια περιοχή, οι οποίες όμως δεν εμφανίζουν τόσο μεγάλη συχνότητα.<sup>17-</sup>

#### Υποδοχέας τυροσυλο-κινάσης AXL

Η υποοικογένεια AXL διαμεμβρανικών πρωτεϊνών αποτελείται από τρεις μικρότερες οικογένειες (Axl, Sky, Mer) και εμφανίζει μεγάλη ποικιλία στις εξωκυττάριας περιοχές. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται από αυξητικούς παράγοντες και εμπλέκονται σε διάφορες διεργασίες του κυττάρου, όπως:

Axl: στην επιβίωση, στον πολλαπλασιασμό, στη μετανάστευση (αποκόλληση) και στην προσκόλληση των κυττάρων,

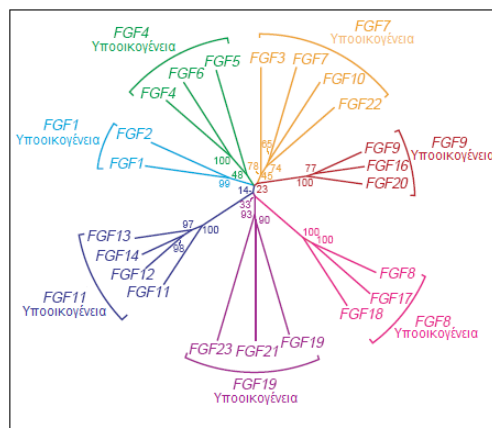
Sky: στην επιβίωση (νευροπροστασία) του κυττάρου,

Mer: στη φαγοκυττάρωση, στην επιβίωση και στο λεμφοπολλαπλασιασμό του κυττάρου.<sup>21</sup>

Αρχικά ο υποδοχέας τυροσυλο-κινάσης AXL περιγράφηκε ως μεταλλαγμένο γονίδιο που απομονώθηκε από ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Αργότερα όμως, η υπερэкφρασή του αναφέρθηκε και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως παχέος εντέρου, προστάτη, θυρεοειδούς, στήθους, στομάχου, νεφρών και πνευμόνων.<sup>12</sup>

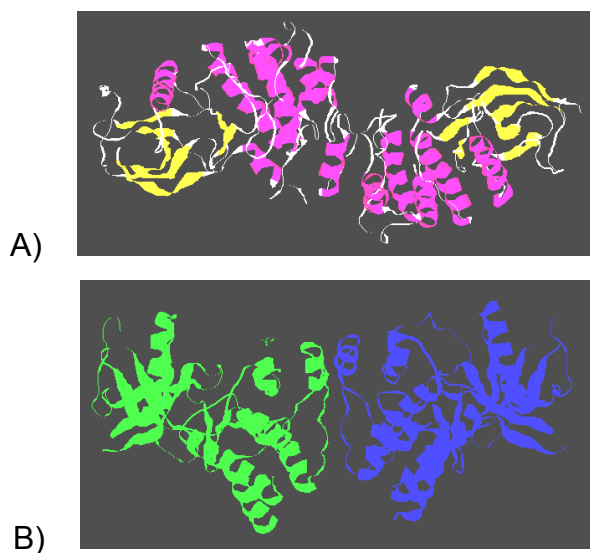
#### Υποδοχείς των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων FGF-R

Μία ακόμη μεγάλη οικογένεια υποδοχικών πρωτεϊνών, με δράση τυροσυλο-κινάσης, είναι οι υποδοχείς των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων FGF-R. Η ενεργοποίησή τους επιτυγχάνεται με την πρόσδεση των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων (FGF) στην ενεργό περιοχή τους. Οι FGFs είναι πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες που εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές δραστηριότητες, όπως αγγειογένεση, μιτογένεση, κυτταρική διαφοροποίηση, κυτταρική μετανάστευση και θεραπεία ιστο-τραυματισμών. Στον άνθρωπο έχουν διαπιστωθεί 22 γονίδια FGFs (Σχήμα 10) και 4 γονίδια FGF-R.



**Σχήμα 10:** Υποοικογένειες των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων<sup>22</sup>

Τα τέσσερα λειτουργικά γονίδια FGF-1R – FGF-4R περιέχουν τις τρεις διακριτές περιοχές: εξωκυττάρια, διαμεμβρανική και ενδοκυττάρια περιοχή, όπως και όλοι οι υποδοχείς που προαναφέρθηκαν. Οι αυξητικοί παράγοντες προσδένονται στην εξωκυττάρια περιοχή προκαλώντας διμερισμό και φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης. Στο Σχήμα 11A παρατηρούνται οι διάφορες περιοχές του FGF-1R, περιοχές πτυχωτού φύλλου και α-έλικας, καθώς επίσης και ο διμερισμός του (Σχήμα 11B).<sup>22-23</sup>



**Σχήμα 11:** Υποδοχέας των ινοβλαστικών αυξητικών παραγόντων FGF-1R.

#### Υποδοχέας τυροσυλο-κινάσης c-Met

Ένα ξεχωριστό μέλος της οικογένειας των RTKs, ο c-Met, ο μόνος γνωστός υψηλής συγγένειας υποδοχέας του υπατοκυτταρικού αυξητικού παράγοντα (HGF), αντιπροσωπεύει έναν ενδιαφέροντα στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου. Ο c-Met και ο αυξητικός παράγοντας HGF απαιτούνται για την ομαλή ανάπτυξη των θηλαστικών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μορφοποίηση, στη μετανάστευση στη διαφοροποίηση, αγγειογένεση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Η απορύθμιση του έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό όγκων, την ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη μετανάστευσή τους. Υπερεκφράσεις του υποδοχέα c-Met έχουν παρατηρηθεί σε πληθώρα μορφών καρκίνου, όπως των πνευμόνων, του στήθους, του παχέος εντέρου, του προστάτη, του παγκρέατος, του στομάχου και σε μελανώματα.<sup>24-25</sup>

#### Υποδοχέας τυροσυλο-κινάσης Erh

Οι υποδοχείς Erh είναι μία μοναδική οικογένεια των τυροσυλο-κινασών, εξαιτίας του ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη των αγγείων και στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση). Τα αιμοφόρα αγγεία είναι η πηγή τροφής και ανάπτυξης όλων των κυττάρων φυσιολογικών και μη. Για τον παραπάνω λόγο, η υπερέκφραση των Erh πρωτεϊνικών κινασών συνδέεται με αγγειογένεση σε καρκινικά κύτταρα και αύξηση όγκων σε διάφορους τύπους καρκίνων (στομάχου, οισοφάγου κ.α.).<sup>26-27</sup>

Η μεγάλη οικογένεια Erh των τυροσυλο-κινασών αριθμεί ήδη 16 χαρακτηρισμένους υποδοχείς. Χωρίζεται σε δύο υποοικογένειες A και B με 10 (ErhA1-ErhA10) και 6 (ErhB1-ErhB6) μέλη αντίστοιχα.<sup>72</sup> Οι Erh ελέγχουν και συντονίζουν την ανάπτυξη αγγείων, ποικίλων ιστών και τύπων κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο αρχικά αναφέρθηκαν σε εμβρυακούς οργανισμούς. Σήμερα είναι ξεκάθαρο ότι εμπλέκονται στη σηματοδοτική οδό που ρυθμίζει των πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση κυττάρων του νευρικού συστήματος σε ενήλικες οργανισμούς.<sup>28-29</sup>

#### Υποδοχέας τυροσυλο-κινάσης RET

Ο υποδοχέας RET εκφράζεται σε κύτταρα του νευρικού συστήματος και έχει ρόλο κλειδί στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στη μετανάστευση,

διαφοροποίηση και επιβίωση των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη των νεφρών και των περιφερειακών νευρώνων.

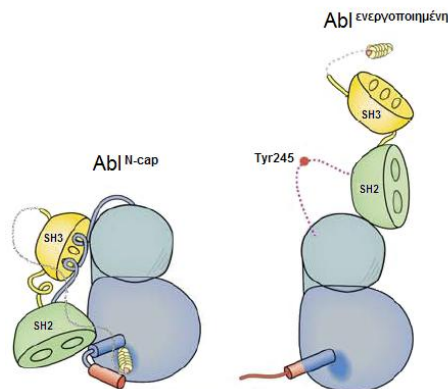
Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν τρία ισομερή της κινάσης RET, τα RET 51 και RET 9, τα πιο συχνά απαντώμενα και χαρακτηρισμένα, και το RET 43, μη χαρακτηρισμένο. Υπερεκφράσεις του υποδοχέα RET έχουν παρατηρηθεί σε θυρεοειδή καρκινώματα και στη νόσο Hirschsprung (διαταραχές του παχέος εντέρου σε νεογνά).<sup>30-32</sup>

### **2.3.2 Μη-υποδοχικές πρωτεΐνες με δράση τυροσυλο-κινάσης (TKs)**

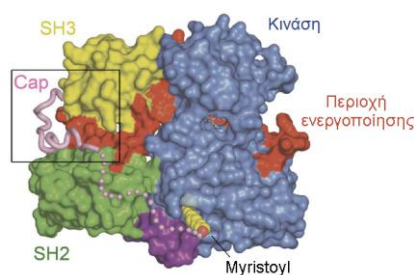
Οι οικογένεια των NRTKs είναι καθαρά κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και συμμετέχουν αμέσως στους σηματοδοτικούς καταρράκτες, προκαλούμενες από τις RKTs και άλλους επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς. Οι μη-υποδοχικές πρωτεΐνες περιέχουν 9 ευδιάκριτες υπο-οικογένειες: Src, Jak, Abl, Fak, Fps, Csk, Syk, Pyk2 και Btk.<sup>8,13</sup>

#### **Μη-Υποδοχική τυροσυλο-κινάση c-Abl**

Η οικογένεια Abl, της οποίας οι μεταλλάξεις θα μας απασχολήσουν ιδιαίτερα στην παρούσα εργασία, μετρά δύο σημαντικά μέλη την ABL1 ή c-Abl και την ABL2 ή Arg. Η ενεργός c-Abl απαντά σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως σε λάθη από την αντιγραφή του DNA και σε αλληλεπιδράσεις των κυτταρικών προσφύσεων. Μερικές από τις λειτουργίες συνδέονται με δραστηριότητες στον πυρήνα, ενώ άλλες είναι αμιγώς κυτταροπλασματικές. Η c-Abl περιλαμβάνει μία περιοχή N-cap στο N-τελικό άκρο, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της αυτο-ανασταλτικής της διαμόρφωσης (Σχήματα 12, 13). Η περιοχή αυτή έχει έναν αυτορυθμιστικό μηχανισμό που περιλαμβάνει την αναδίπλωση της με σκοπό τον έλεγχο της δραστηριότητας της κινάσης.<sup>33-34</sup>



**Σχήμα 12:** Διαμορφώσεις της ανενεργής και ενεργής δομής της Abl<sup>35</sup>



**Σχήμα 13:** Δομή της ανενεργής Abl στο χώρο<sup>35</sup>

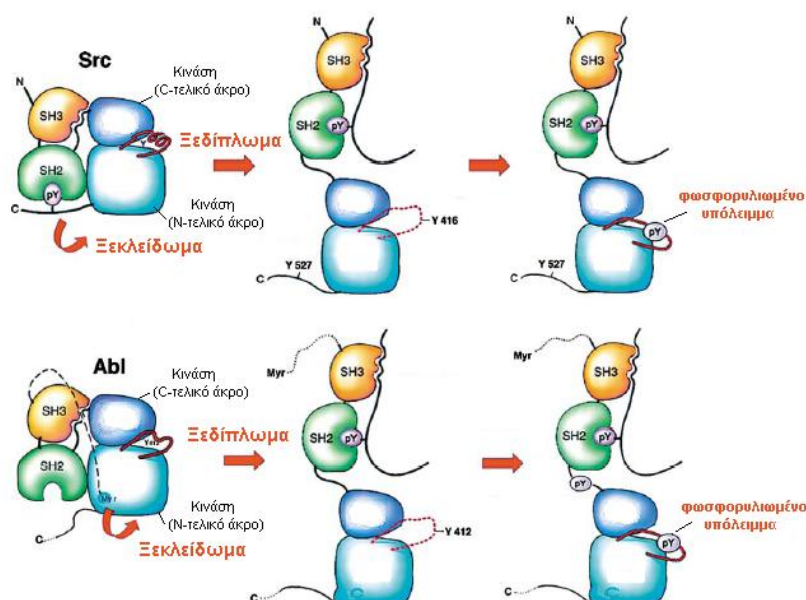
Η ογκογενετική ενεργοποίηση της Abl συχνά συσχετίζεται με μία χρωμοσωμική δυνατότητα διακίνησης ενός μέρους της Bcr πρωτεΐνης στο N-τελικό άκρο της Abl, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl. Οι ακολουθίες της Bcr οδηγούν στη κατάργηση της αυτο-ανασταλτικής δυνατότητας της Abl και σε αυξημένη δράση τυροσυλο-κινάσης. Η χιμαιρική πρωτεΐνη Bcr-Abl με τη σειρά της ενεργοποιεί την καθοδική σηματοδότηση σε μιτογενετικές και αντι-αποπτωτικές διαβιβάσεις. Εκτός από την αύξηση και την επιβίωση των κυττάρων, η Bcr-Abl φωσφορυλιώνει διάφορες εστιακές πρωτεΐνες πρόσφυσης και προωθεί την ανατάραξη των μεμβρανών, την κινητικότητα των κυτταρικών προσφύσεων και τη μετανάστευση κυττάρων. Οι επιδράσεις της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης στην κινητικότητα και την προσκόλληση των κυττάρων, συμβάλλουν στην απελευθέρωση των CML κυττάρων στο μυελό των οστών.<sup>36</sup>

#### Μη-Υποδοχική τυροσυλο-κινάση c-Src

Μια δεύτερη σημαντική οικογένεια των NRTKs είναι η οικογένεια Src. Τα μέλη της χρησιμεύουν ως μοριακοί διακόπτες που μεσολαβούν στην επικοινωνία

μεταξύ εξωκυττάριων σημάτων και ενδοκυττάριων διεργασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου, η διαφοροποίηση, η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, η επιβίωση και η απόπτωσή του.

Οι ομοιότητες μεταξύ των δύο πρωτεϊνικών οικογενειών δεν περιορίζονται μόνο σε δομικές, αλλά και στον τρόπο αλληλομετατροπής μεταξύ ενεργής και μη-ενεργής κατάστασης (Σχήμα 14). Μετά από μελέτες, έχει διαπιστωθεί ιδιαίτερα αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα των Src σε καρκινικά κύτταρα. Αν και οι μη-υποδοχικές τυροσυλο-κινάσες Src είναι αδύναμες από μόνες τους για ογκογένεση, σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες ανιχνεύονται σε πολλά είδη καρκίνου, όπως καρκίνος του στήθους, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του δέρματος, κ.ά.<sup>37-38</sup>



**Σχήμα 14:** Φωσφορυλίωση υποστρωμάτων από τις Src και Abl πρωτεϊνικές κινάσες<sup>39</sup>

Η μη-υποδοχική πρωτεΐνη c-Src, είναι το πλήρως διευκρινισμένο μέλος της οικογένειας Src. Στα φυσιολογικά κύτταρα συναντάται σε πολύ χαμηλά επίπεδα και, απουσία εξωκυττάριων σημάτων, διατηρείται σε μία ανενεργή διαμόρφωση. Σε αντίθεση με τον ιδιαίτερα καθορισμένο ρόλο της στα φυσιολογικά κύτταρα υπάρχουν ενδείξεις για απορρύθμιση και αύξηση της δραστηριότητάς της ως κινάσης σε καρκινικά κύτταρα. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η c-Src δεν έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει ογκογένεση, γι' αυτό το λόγο αμφισβητήθηκε η εμπλοκή της σε ανάπτυξη καρκίνων για πολλές δεκαετίες. Πρόσφατα

τεκμηριώθηκε το γεγονός και αποδείχθηκε ο σημαντικός ρόλος που διαδραματίζει εμμέσως η πρωτεΐνη, αλληλεπιδρώντας με κυτταρικούς παράγοντες, όπως οι EGF-R, CSF1, PDGF, FGF-R, FAK και Src, που εμπλέκονται σε πληθώρα καρκίνων. Η οικογένεια των Src, όπως και οι παραπάνω οικογένειες μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, αποτελεί ένα αντικαρκινικό στόχο για το σχεδιασμό αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.<sup>40-41</sup>

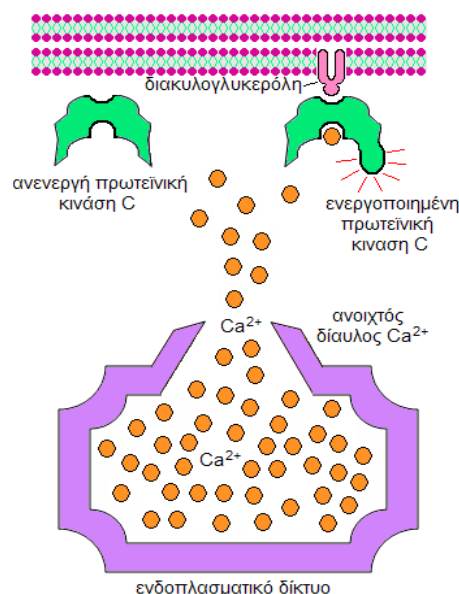
## 2.4 Πρωτεϊνικές Σερίνο-Θρεονινο-κινάσες

Η δεύτερη μεγάλη οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών είναι οι σερίνο-θρεονινο-κινάσες. Αν και αυτή η οικογένεια μετράει μεγάλο αριθμό μελών, θα αναφερθούν μόνο ορισμένα μέλη της. Ο κύριος λόγος είναι ότι οι κινάσες αυτής της οικογένειας δεν αποτελούν τόσο συχνά στόχους για τη θεραπεία τύπων καρκίνου.

### Σερίνο-θρεονινο-πρωτεϊνική κινάση C (PKC)

Από την οικογένεια PKC έχουν ταυτοποιηθεί, μέχρι σήμερα τουλάχιστον, 11 διαφορετικές ισομορφές PKC. Η πρώτη PKC ταυτοποιήθηκε πριν από 30 περίπου έτη από το Nishizuka και την ομάδα του. Οι πρωτεϊνικές κινάσες C συναντώνται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, υπό ορισμένες συνθήκες όμως τελευταίες έρευνες κατέδειξαν την ύπαρξη ισομορφών της PKC και στον κυτταρικό πυρήνα.<sup>42-43</sup>

Οι 11 ισομορφές υποδιαιρούνται σε τρεις υπο-οικογένειες λόγω διαφοροποίησης της δομής τους ή της εξάρτησής τους από άλλους ενεργοποιητές. Οι διευκρινισμένοι ρόλοι τους στο κύτταρο είναι πολλαπλασιασμός και πρόοδος του κυτταρικού κύκλου, διαφοροποίηση, κυτταροσκελετική αναδιαμόρφωση, διαμόρφωση των διαύλων ιόντων και απόπτωση.<sup>43</sup> Η πρωτεϊνική κινάση C εμπλέκεται στη νόσο του Alzheimer, στο διαβήτη, σε καρδιακά νοσήματα, καθώς επίσης και στην ογκογένεση. Η ενεργοποίηση των PKC απαιτεί την πρόσδεση της διακυλογλυκερόλης και ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  (Σχήμα 15).

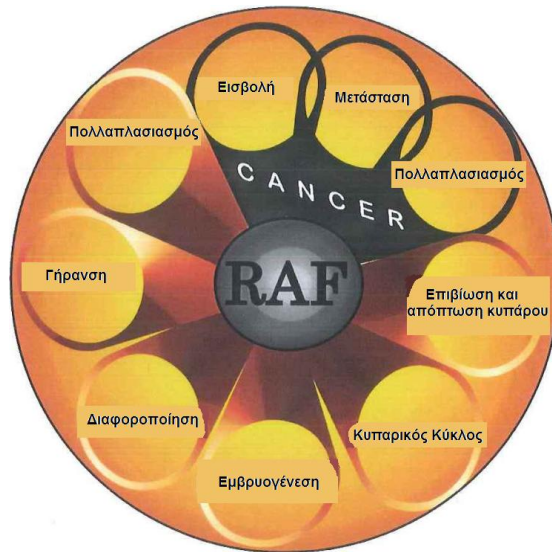


**Σχήμα 15:** Πρόσδεση ιόντων  $Ca^{2+}$  σε πρωτεϊνική κινάση C

#### Σερίνο-θρεονινο-πρωτεϊνική κινάση B-Raf

Η σηματοδοτική οδός που εμπλέκονται οι Raf κινάσες ρυθμίζει πολλές φυσιολογικές διεργασίες στη μεταβίβαση σημάτων από τους υποδοχείς της μεμβράνης στο ενδοκυττάριο και πυρηνικό χώρο. Η οικογένεια των Raf κινασών εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του κυττάρου, καθώς επίσης στην επιβίωση και απόπτωση αυτού (Σχήμα 16). Υπερεκφράσεις ή ενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών της αναφέρθηκαν σε διάφορες μορφές καρκίνου και στη μετανάστευση όγκων.<sup>44-45</sup>

Η οικογένεια των κινασών αυτών μετράει τρία μέλη τις A-Raf, B-Raf και C-Raf. Αν και αρχικώς η έρευνα είχε επικεντρωθεί στο C-Raf ισομερές, ο στόχος των ερευνητών άλλαξε με την απομόνωση της μεταλλαγμένης μορφής της B-Raf το 2002 από διάφορους τύπους καρκίνου. Μέχρι σήμερα έχει απομονωθεί στο 7% των τύπων καρκίνου στον άνθρωπο. Ανιχνεύθηκε στο 70% των μελανωμάτων, στο 30% των καρκίνων του θυρωειδούς, στο 15% των καρκίνων του παχέος εντέρου και σε μικρότερα ποσοστά σε άλλους τύπους.<sup>44-46</sup>



**Σχήμα 16:** Πρωτεϊνική κινάση Raf και οι λειτουργίες του κυττάρου που εμπλέκεται.<sup>44</sup>

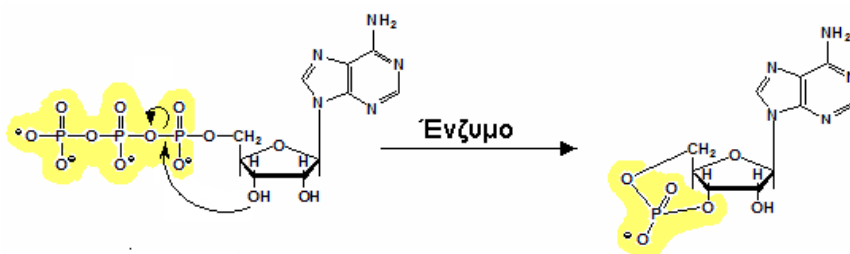
## 2.5 Άλλες πρωτεϊνικές κινάσες

Υπάρχουν πρωτεϊνικές κινάσες που δεν ενεργοποιούνται με την ομοιοπολική πρόσδεση μιας τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP στο μόριό τους. Μία τέτοια κατηγορία πρωτεϊνικών κινασών είναι η A ή PKA, που ενεργοποιείται με την πρόσδεση ενός μορίου κυκλικού ATP στο μόριό της. Επιπλέον, υπάρχουν οικογένειες που για να ενεργοποιηθεί η δράση τους ως κινάσες, απαιτούν την πρόσδεση στο μόριό τους πολύ συγκεκριμένων μορίων, όπως πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες ή CDK.

### 2.5.1 Πρωτεϊνική κινάση A (PKA)

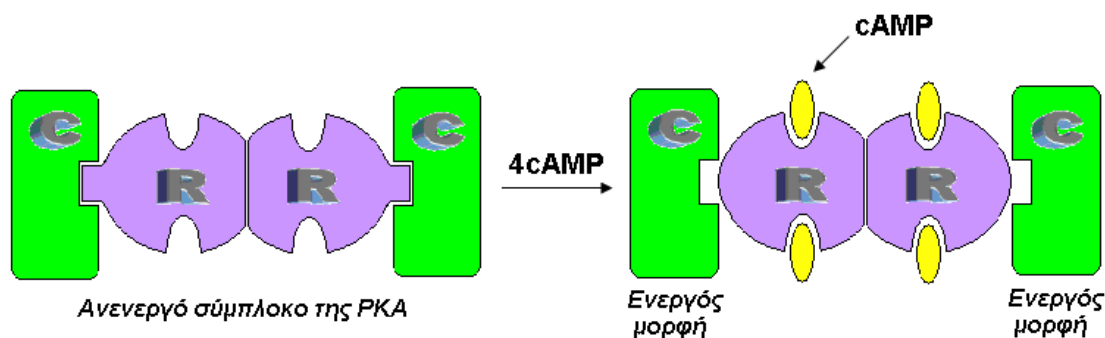
Οι πρωτεϊνικές κινάσες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι οι κύριοι ενδοκυτταρικοί μεταγωγοί σημάτων. Η διαδικασία της μεταγωγής από την κυτταρική μεμβράνη έως τον πυρήνα ξεκινάει με την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών. Για να ενεργοποιηθεί μία πρωτεϊνική κινάση, απαιτείται ένας εκκινητής και σε αρκετές περιπτώσεις το ρόλο αυτό αναλαμβάνει ένα μικρό οργανικό μόριο. Έτσι, λοιπόν, για να ενεργοποιηθεί η πρωτεϊνική κινάση A ή PKA

πραγματοποιείται στο μόριό της πρόσδεση του κυκλικού AMP (Σχήμα 17), το οποίο συντίθεται με τη βοήθεια ενζύμου, της αδενυλικής κυκλάσης, από ένα μόριο ATP.



**Σχήμα 17:** Σχηματισμός του κυκλικού AMP

Η εξαρτώμενη από το κυκλικό AMP πρωτεϊνική κινάση παρατηρήθηκε το 1979, αλλά χρειάστηκαν τουλάχιστον 14 χρόνια ώστε να κατανοηθεί ο ρόλος της ως πρωτεϊνικής κινάσης. Η ενεργοποίηση της PKA πραγματοποιείται με την πρόσδεση δύο μορίων cAMP σε καθεμία από τις δύο ρυθμιστικές υπομονάδες (R). Η πρόσδεση επιφέρει μεταβολή στην τριτοταγή δομή τους, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των δύο καταλυτικών υπομονάδων (C) από το ανενεργό σύμπλοκο (Σχήμα 18).<sup>6</sup> Οι κυτταρικές διεργασίες που επιφέρει η αυξημένη συγκέντρωση της cAMP είναι: αύξηση της αποδόμησης των αποθηκευμένων καυσίμων, αύξηση της έκκρισης οξέων από το γαστρικό βλεννογόνο, διασπορά των κοκκίων της χρωστικής μελανίνης, μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, άνοιγμα των διαύλων χλωρίου, κ.ά.<sup>5</sup>

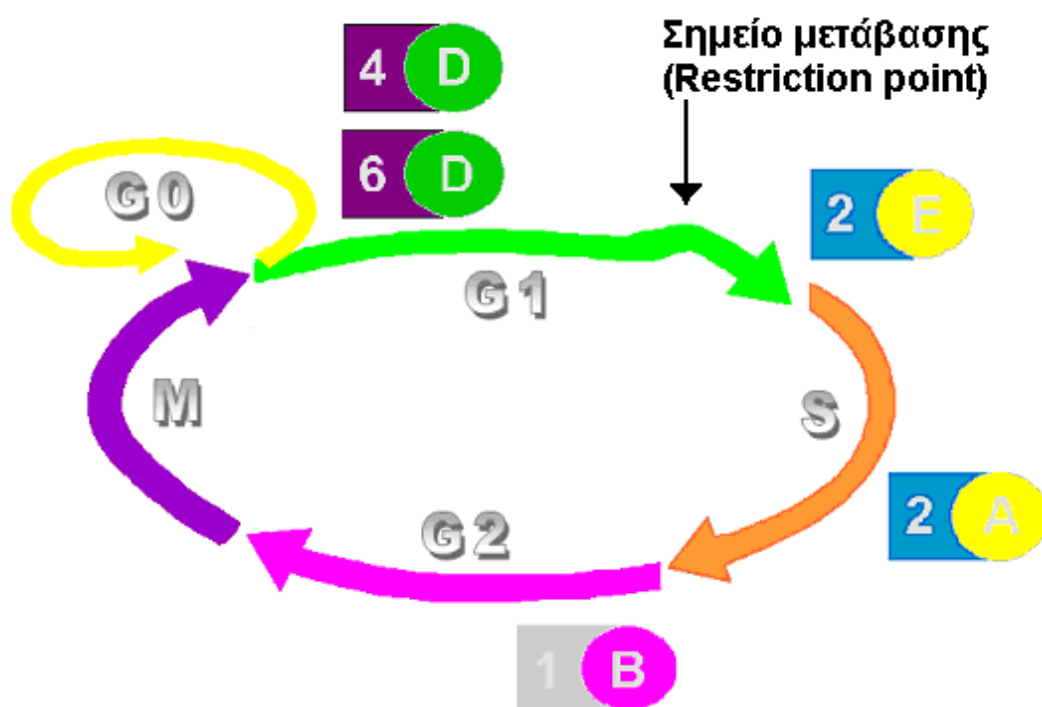


**Σχήμα 18:** Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A με πρόσδεση cAMP

### 2.5.2 Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνες (CDK)

Πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες ή CDK, είναι οι κινάσες που εμπλέκονται στο σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Οι CDK είναι απολύτως αναγκαίες για τη διάβαση του κυττάρου από τα σημεία ελέγχου της μίτωσης, δηλαδή της διαδικασίας πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η ρύθμιση της δραστηρότητάς τους ελέγχεται με τη σύνδεσή τους με κυκλίνες και με συγκεκριμένους πρωτεϊνογενετικούς CDK αναστολείς. Ο ρόλος κλειδί των CDK και των συνδετών τους είναι πολύ σημαντικός για πολλές κακοήθεις ασθένειες και ως εκ τούτου υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη CDK αναστολέων.

Δέκα πρωτεϊνικές κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες (CDK1-CDK10) είναι γνωστές ως σήμερα, εκ των οποίων μόνο οι πέντε συμμετέχουν άμεσα στα σημεία ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, καθώς και δεκαπέντε κυκλίνες, που έχουν ταυτοποιηθεί. Η κάθε μία από τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου χαρακτηρίζεται από την έκφραση διαφορετικών κυκλινών. Στην έναρξη της πρώτης φάσης G1 εμπλέκονται οι κυκλίνες D1, D2 και D3 καθώς επίσης και οι πρωτεϊνικές κινάσες CDK 4 και 6. Στη δεύτερη φάση S, όπου συντίθεται το νέο DNA, συμμετέχει η CDK 2 με τις κυκλίνες E και A. Τέλος, το σύμπλοκο της κινάσης CDK1/B οδηγεί στη φάση G2 και έπειτα στη μίτωση (Σχήμα 19).



**Σχήμα 19:** Φάσεις κυτταρικής διαίρεσης και εμπλοκή των CDK, όπου **φάση S** η περίοδος σύνθεσης του DNA, **G2** η περίοδος ελέγχου του νεοσυντεθειμένου DNA, **φάση M** η μίτωση, δηλ. η διαίρεση του μητρικού κυττάρου στα δύο θυγατρικά, **φάση G0** η περίοδος εφησυχασμού των κυττάρων και **φάση G1** η περίοδος προετοιμασίας της κυτταρικής διαίρεσης<sup>47</sup>

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, ο πολλαπλασιασμός του κυττάρου ελέγχεται απόλυτα από τις κινάσες CDK, καθώς είναι υπεύθυνες για την προώθηση της κυτταρικής διαίρεσης από την προηγούμενη φάση στην επόμενη. Μεταλλάξεις των προαναφερθέντων πρωτεϊνικών κινασών, μπορούν να οδηγήσουν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου, που μεταφράζεται ως καρκίνος.<sup>47</sup>

## 2.6 Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες (aPKs)

Πρόσφατη ανάλυση του συνόλου των πρωτεϊνικών κινασών του ανθρώπινου γονιδιώματος έχει καταδείξει ορισμένες πρωτεΐνες με επιβεβαιωμένη δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης, οι οποίες διαφέρουν αρκετά στην ομόλογη σειρά από κάθε γνωστή ευκαριωτική πρωτεϊνική κινάση. Σε μεγάλη πλειοψηφία των ευκαριωτικών πρωτεϊνικών κινασών, έχει διαπιστωθεί ότι η περιοχή δραστικότητας κινάσης περιλαμβάνει ένα N-τελικό άκρο, το οποίο αποτελείται από ένα β-φύλλο και μία R-έλικα, που καλείται C-έλικα, και ένα C-τελικό άκρο που αποτελείται από μία R-ελικοειδή περιοχή με ένα μικρό ποσοστό πτυχωτού φύλλου. Σε αντίθεση με τις παραπάνω πρωτεΐνες, οι πρωτεϊνικές κινάσες aPKs, ακριβώς για αυτή τους τη διαφοροποίηση, ονομάστηκαν άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες.<sup>6</sup>

Από τις 518 προσδιορισμένες πρωτεϊνικές κινάσες οι 43 είναι ταξινομημένες ως άτυπες. Οι aPKs κατατάσσονται σε 13 υπο-οικογένειες και η κάθε μία περιλαμβάνει ένα μικρό αριθμό μελών από 2 έως 6 κινάσες. Αν και ο ρόλος των περισσότερων έχει χαρακτηριστεί πλήρως, υπάρχουν οικογένειες των οποίων η λειτουργία είναι ακόμη άγνωστη (Πίνακας 1).<sup>48</sup>

### Οικογένειες Άτυπων πρωτεϊνικών κινασών

| Κινάση | Τύπος     | Λειτουργικές Πληροφορίες                                                                   |
|--------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| A6 K   | Tyr.      | Άγνωστη                                                                                    |
| ABC1   | ND        | Άγνωστη                                                                                    |
| Alpha  | Ser./Thr. | Έλεγχος μετάφρασης (EF2 κινάση), Κινάση καναλιών ιόντων (TRP/PLIK-ChaK)                    |
| BCR    | Ser./Thr. | Συμμετοχή στη σύντηξη της Bcr-Abl, Υποένταξη στις Ras σηματοδοτικές                        |
| BRD    | ND        | Περιοχή πρόσδεσης Br, Μετάφραση ρυθμιστικών BET-πρωτεϊνών,                                 |
| FAST   | Ser./Thr. | Εμπλοκή στους μηχανισμούς απόπτωσης, Ενεργοποίηση της σηματοδοτικής οδού του Fas-αντιγόνου |
| PIKK   | Ser./Thr. | Στρεσογόνες αποκρίσεις, Έλεγχος μετάφρασης (m-TOR)                                         |
| RIO    | Ser.      | Ριβοσωμικές βιογενέσεις, Εμπλοκή στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου                         |
| TIF    | Ser./Thr. | Έλεγχος αντιγραφής                                                                         |

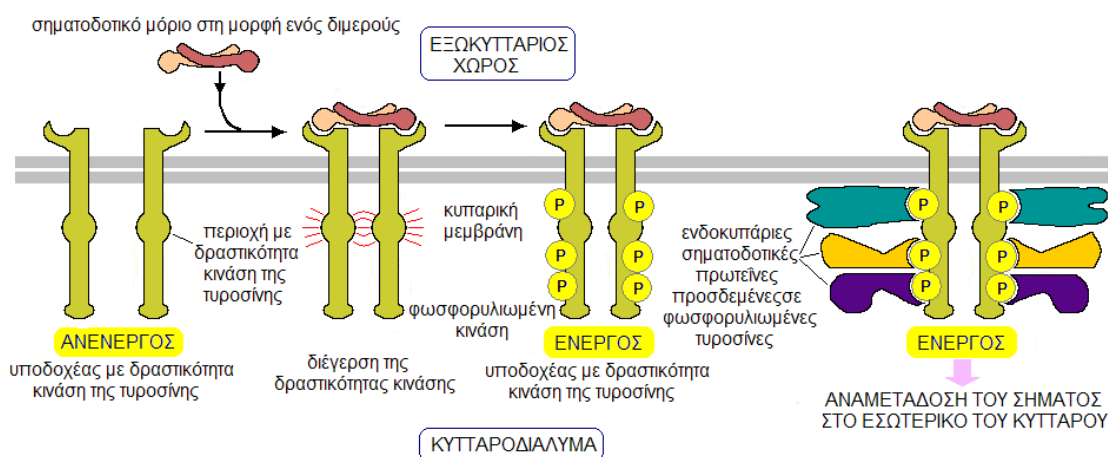
### Πίνακας 1: Άτυπες πρωτεϊνικές κινάσες

## 2.7 Οι πρωτεϊνικές κινάσες στη σηματοδοτική οδό των κυττάρων

Όλες οι οικογένειες των πρωτεϊνικών κινασών εμπλέκονται με το δικό τους χαρακτηριστικό ρόλο σε αρκετές διεργασίες του κυττάρου, όπως στη ρύθμιση και την κατάλυση του μεταβολισμού της γλυκόζης, στη μεταγραφή των γονιδίων, στην αγγειογένεση, στον κύκλο ανάπτυξης του κυττάρου, στην κυτταρική μετανάστευση, στη διαφοροποίηση, στην απόπτωση, κ.ά. Οι πρωτεϊνικές κινάσες μπορούν να χαρακτηριστούν ως οι αγγελιοφόροι του κυττάρου, καθώς συναντώνται σε όλες τις σηματοδοτικές οδούς του. Η πρόσληψη ενός σήματος στην εξωκυττάρια περιοχή, η διαβίβασή του από την κυτταρική μεμβράνη, καθώς και η προώθηση του από το κυτταρόπλασμα ως και τον πυρήνα πραγματοποιείται με φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση μίας σειράς πρωτεϊνικών κινασών.

Οι πρώτες πρωτεϊνικές κινάσες, που εμπλέκονται στην προώθηση του εξωκυττάρια σήματος, είναι οι διαμεμβρανικές. Το σήμα προσδένεται στην εξωκυττάρια περιοχή τους, προκαλώντας το σχηματισμό ενός διμερούς. Η προσέγγιση των δύο μονομερών έχει ως αποτέλεσμα την επαφή των δύο

ενδοκυττάρων μελών και την έναρξη μίας διασταυρωτής φωσφορυλίωσης (διαβίβαση σήματος μέσω της κυτταρικής μεμβράνης). Στη συνέχεια αναλαμβάνουν οι κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες προσδένονται στα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης των ενδοκυττάρων μελών και ενεργοποιούνται. Με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν νέες πρωτεϊνικές κινάσες και το σήμα διαχέεται σε όλο το κύτταρο (διαβίβαση σήματος στον ενδοκυττάριο χώρο). Οι τελευταίες πρωτεϊνικές κινάσες της ακολουθίας ενεργοποιούν αντίστοιχες πρωτεΐνες, για απόκριση στο εξωκυττάριο σήμα (Σχήμα 20).<sup>49</sup>



**Σχήμα 20:** Αρχή σηματοδοτικής οδού των κυττάρων (Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας: Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου, Alberts, Johnson, et al.)<sup>49</sup>

Ο σηματοδοτικός καταρράχτης σταματάει με την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών φωσφατασών, οι οποίες με τη σειρά τους αποφωσφορυλιώνουν τη διαμεμβρανική πρωτεϊνική κινάση. Οι πρωτεϊνικές κινάσες εμπλέκονται σε κάθε κύρια σηματοδοτική οδό και φαίνεται τελικά ότι μπορούν πρακτικά να ρυθμίζουν κάθε κυτταρική διεργασία. Είναι αυτές, οι οποίες, μέσω του μηχανισμού φωσφορυλίωσης, μπορούν να δώσουν εντολή στο κύτταρο να αλλάξει το σχήμα του, να διαιρεθεί, να ταξιδέψει, να εκκρίνει ένα χημικό προϊόν, να επιβιώσει ή να πεθάνει.

Είναι φανερό ότι μεταλλάξεις πρωτεϊνικών κινασών έχουν ως αποτέλεσμα μία ανεξέλεγκτη πορεία του κυτταρικού κύκλου. Το κύτταρο δε δέχεται εξωκυττάρια

σήματα και συμπεριφέρεται με «εγωιστικό» και αντικοινωνικό τρόπο, αυτόνομα, μη υπακούοντας στους μηχανισμούς ελέγχου και τελικά καταστρέφοντας την αρμονία του πολυκύτταρου οργανισμού, με ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και με εισβολή στους ιστούς. Η ανάπτυξη εκλεκτικών ανασταλτικών παραγόντων επιδιώκει την αποκατάσταση της απαραίτητης για επιβίωση αρμονίας.

## **2.8 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών - Συνθέσεις**

Οι πορείες μεταγωγής σημάτων, σε ένα ευκαριωτικό κύτταρο, είναι πολύπλοκες διαδικασίες πολλών σταδίων. Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός, ότι περιστασιακά αποτυγχάνουν οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες. Ο καρκίνος, είναι μία ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από μη ελεγχόμενη ή ακατάλληλη κυτταρική αύξηση. Η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς μεταλλάξεων στις σηματοδοτικές διαβιβάσεις τους. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν α) στην ανεξέλεγκτη διαίρεση των κυττάρων, β) στην ανάπτυξη αντι-αποπτωτικών σημάτων, ώστε να αποφευχθεί ο θάνατός τους και γ) στην ανάπτυξη μοριακών μηχανισμών, για την παραπλάνηση του ανοσοποιητικού συστήματος.

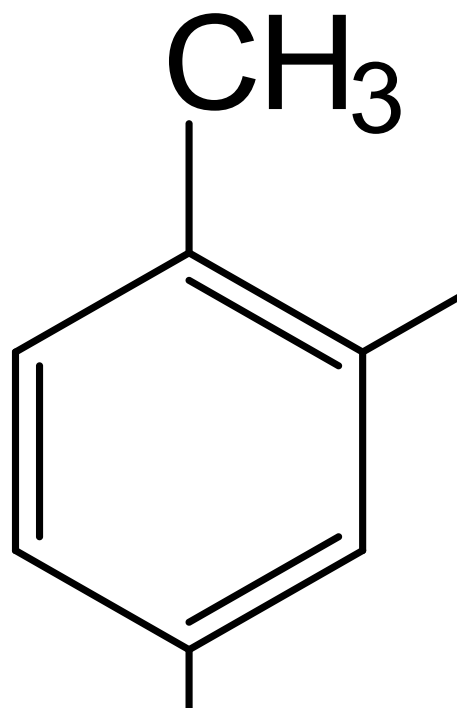
Οι παραπάνω μη-φυσιολογικές διεργασίες των καρκινικών κυττάρων συνδέονται στενά με βλάβες στις πρωτεϊνες μεταγωγής σημάτων. Κατ' αυτό τον τρόπο μεταλλάξεις στην έκφραση ή τη λειτουργία ή ακόμα και στα δύο, που υφίστανται οι πρωτεϊνικές κινάσες, είναι συχνά υπαίτιες για την ανάπτυξη καρκίνων. Από την άλλη πλευρά, οι εξειδικευμένες αυτές σηματοδοτικές διαδικασίες, μπορούν να αποτελέσουν την «Αχίλλειο Πτέρνα» των καρκινικών κυττάρων. Ο προσδιορισμός και η πλήρης κατανόηση των παραπάνω διαβιβάσεων έχει γίνει η βάση για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων. Μόρια, τα οποία μπορούν να αναστέλλουν αυτά τα ένζυμα, ονομάζονται αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες.<sup>8,50</sup> Φυσιολογικά, τουλάχιστον τρεις μηχανισμοί παρεμπόδισης έχουν προσδιοριστεί: (α) ένας μηχανισμός ψευδο-υποστρωμάτων, (β) ένας μιμητικός μηχανισμός αδενίνης και (γ) ένας μηχανισμός που περιλαμβάνει παγίδευση του ενζύμου σε μία ανενεργό διαμόρφωση, με τη χρήση επιφανειακών αμινοξέων εκτός του ενεργού κέντρου.

Χημικά, ένα μεγάλο μέρος της συνθετικής προσπάθειας έχει αφιερωθεί στην ATP-δεσμευτική περιοχή και η μεγάλη πλειονότητα των αναφερόμενων στη διεθνή βιβλιογραφία αναστολέων είναι αδενινοικοί μιμητές. Αν και οι ανταγωνιστές υποστρώματος φαινομενικά υπερέχουν από τους αδενινοικούς μιμητές, λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης του ATP που θα μπορούσε να δράσει ανταγωνιστικά με τους τελευταίους, η χρησιμότητά τους περιορίζεται εξαιτίας της μεγάλης ιδιαιτερότητας και εκλεκτικότητάς τους.<sup>8</sup>

Στο παρόν υποκεφάλαιο θα παρατεθούν οι σημαντικότεροι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, κυρίως μιμητών ATP, καθώς επίσης και η σύνθεση συγκεκριμένων μορίων, τα οποία βρίσκονται στα τελευταία κλινικά στάδια ή κυκλοφορούν στο εμπόριο ως αντικαρκινικά φάρμακα. Η επιτακτική ανάγκη για εύρεση εκλεκτικών αναστολέων και οι μη επαρκείς πληροφορίες στη δομή πρωτεϊνικών μορίων σε κυτταρικό περιβάλλον έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον συνθετικών οργανικών χημικών και βιοχημικών για το σχεδιασμό και τη σύνθεση οργανικών ετεροκυκλικών ενώσεων με επιθυμητή ανασταλτική δράση.

#### Glivec ή Imatinib (STI 571)

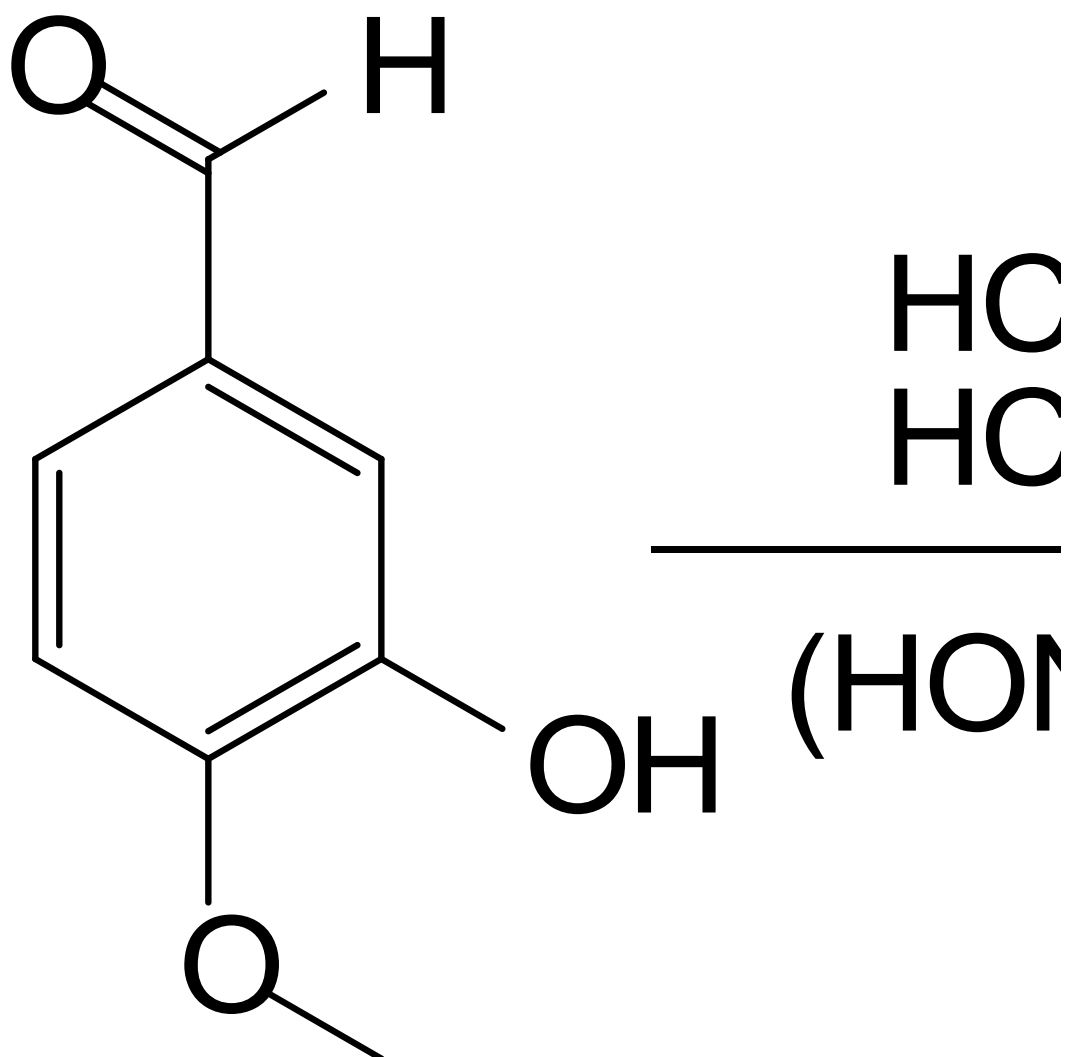
Το Glivec (Σχήμα 21) είναι ο πρώτος εκλεκτικός αναστολέας της χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl, ο οποίος κυκλοφορεί στο εμπόριο, ήδη από το 2001, με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Είναι ένας αδενινοικός μιμητής που αναστέλλει εκλεκτικά την υπέρμετρη δράση της χιμαιρικής πρωτεϊνικής κινάσης Bcr-Abl. Η σύνθεση του φαρμακευτικού σκευάσματος ολοκληρώθηκε στα μέσα της προηγούμενης δεκαετίας (1990-2000), ενώ η δράση του κατά της πρωτεϊνικής κινάσης διαπιστώθηκε περίπου 5 χρόνια αργότερα. Στο Σχήμα 21 περιγράφεται η συνθετική πορεία του Glivec, ενώ εκτενής αναφορά της δράσης και διάθεσης του θα πραγματοποιηθεί σε επόμενη παράγραφο.



**Σχήμα 21:** Σύνθεση του φαρμακευτικού σκευάσματος *Imatinib*<sup>1-2, 51</sup>

#### **Gefitinib ή Iressa (ZD-1830)**

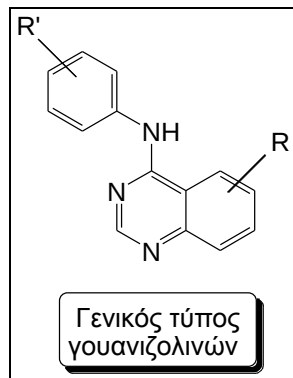
Ένας επίσης γνωστός αναστολέας, ο οποίος κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία Iressa (Σχήμα 22), έχει καταδείξει δράση κατά του υποδοχέα επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (EGF-R). Ο υποδοχέας EGF-R ενεργοποιεί διαβιβαστικές πορείες σημάτων, οι οποίες εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στο μεταβολισμό και την επιβίωση κυττάρων. Ο αναστολέας του υποδοχέα αν και εγκρίθηκε πρόσφατα για τη θεραπεία του καρκίνου των πνευμόνων, έχει καταδείξει σημαντικές τοξικές παρενέργειες σε μεγάλο αριθμό ασθενών. Εν τούτοις δεν παύει να αποτελεί ένα σπουδαίο όπλο στην αντιμετώπιση του καρκίνου.<sup>52-54</sup>



**Σχήμα 22:** Συνθετική πορεία του φαρμακευτικού σκευάσματος Gefitinib<sup>52</sup>

#### **Erlotinib ή Tarceva (OSI-774)**

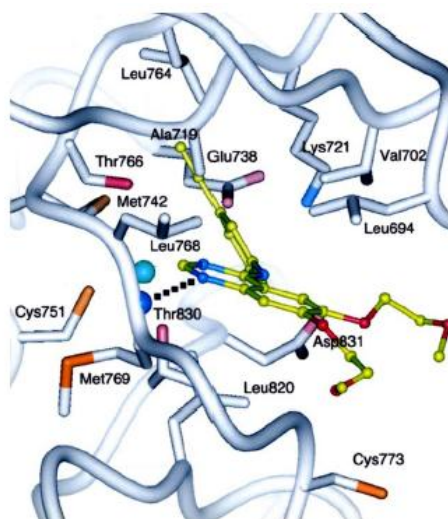
Εκτός από το Iressa έχει συντεθεί άλλος ένας αναστολέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR ο αναστολέας Tarceva (Erlotinib, OSI-774) (Σχήμα 23) που εγκρίθηκε το 2004 ως αντικαρκινικός παράγοντας σε ασθενείς με καρκίνο των πνευμόνων και λαμβάνεται από το στόμα στη δεύτερη ή τρίτη γραμμή θεραπείας της ασθένειας (με σύγχρονη χημειοθεραπεία). Οι δύο αυτοί αναστολείς κατατάσσονται στο γενικό τύπο γουανιζολινών.<sup>55-57</sup>



**Σχήμα 23:** Συνθετική πορεία του ανασταλτικού παράγοντα Erlotinib<sup>58</sup>

Ο Erlotinib χορηγείται σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο των πνευμόνων. Ως αναστολέας του EGFR εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και προκαλεί απόπτωση του κυττάρου. Από μελέτες που διεξήχθησαν, φαίνεται ότι

αναστέλλει εκλεκτικά την αυτοφωσφορυλίωση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 1000 φορές περισσότερο από κάθε άλλο αναστολέα του.<sup>55-57</sup> Είναι και αυτός ένας αδενινικός μιμητής και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις του με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα, κυρίως δεσμοί υδρογόνου, αναπαρίστανται στο *Σχήμα 24*.<sup>59</sup>



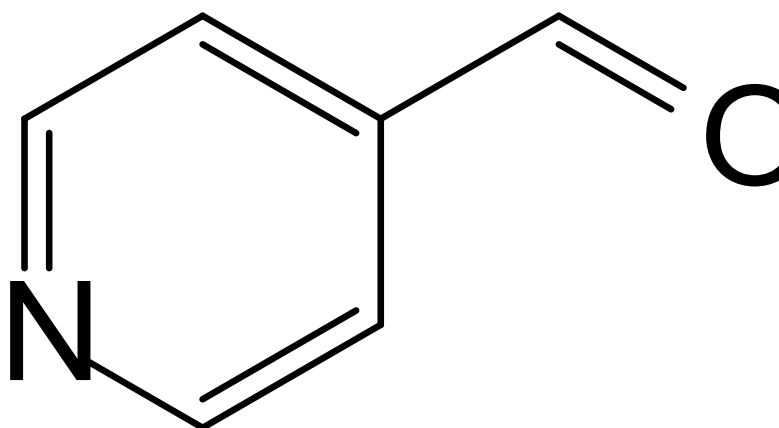
***Σχήμα 24:*** Αλληλεπίδραση του αναστολέα *Tarceva* με τον πρωτεϊνικό παράγοντα *EGF-R*<sup>60</sup>

#### **Vatalanib (CGP 79787D)**

Ένας άλλος αδενινικός μιμητής, ο οποίος βρίσκεται σε δοκιμαστικό στάδιο ακόμη, αναστολέας των υποδοχέων των αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (VEGF-R), είναι το Vatalanib. Εκτός από την ανασταλτική δράση που κατέδειξε εναντίων όλων των μελών της οικογένειας VEGFRs, φαίνεται ότι έχει ήπια ανασταλτική δράση εναντίων των PDGFR, c-KIT και c-FMS.

Ο αναστολέας αυτός, σε προ-κλινικές μελέτες, έχει προκαλέσει μείωση στην αγγειογένεση και την πυκνότητα των αγγείων ενός όγκου, αλλά και αποτελεσματική καταστολή στην αύξηση όγκων, εναντίον των αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων. Σε κλινικές μελέτες πρώτης και δεύτερης φάσης, ο Vatalanib έδειξε αξιόλογη βιολογική δράση σε αρκετούς προχωρημένους στερεούς όγκους (μεταστατικούς γαστρεντερικούς όγκους, νεφρικούς και προστατικούς καρκίνους), που οφείλονταν σε υπερέκφραση των VEGFR και των

υποδοχέων τους.<sup>61</sup> Η δομή και η συνθετική πορεία του αναστολέα περιγράφεται στο Σχήμα 25.

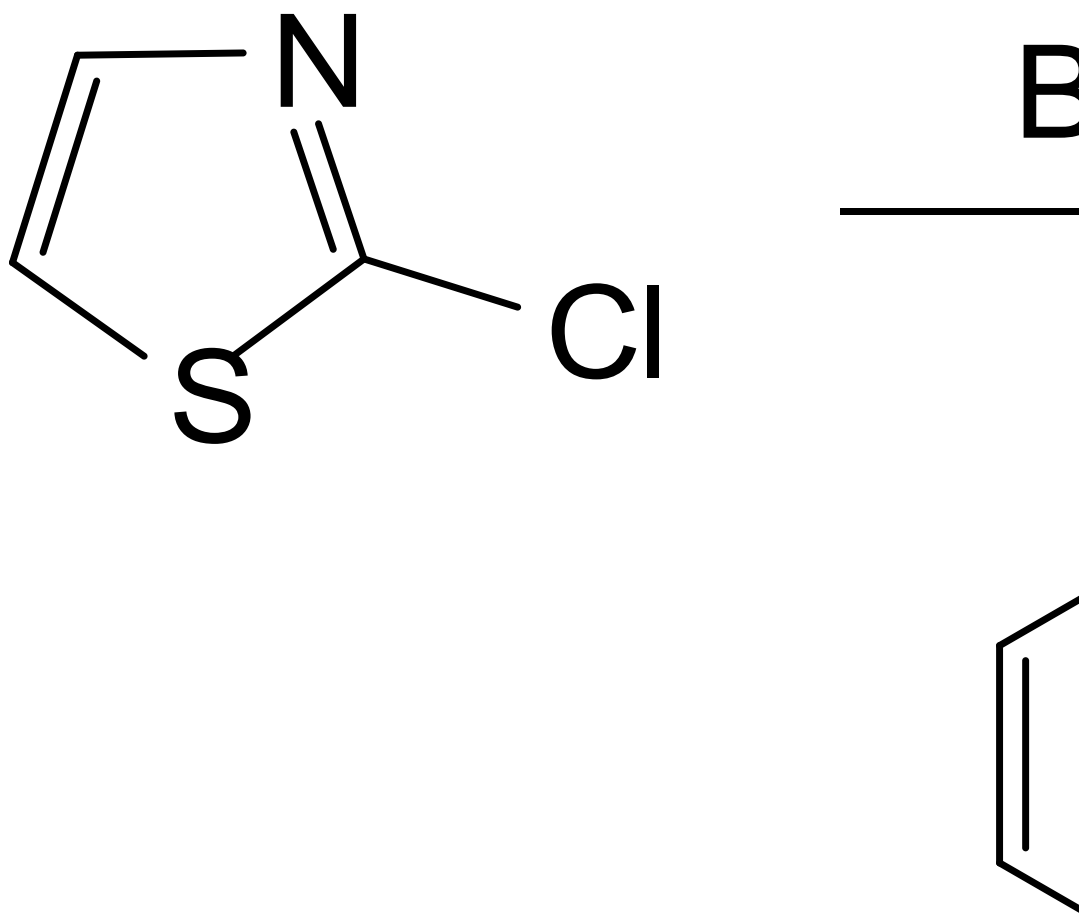


**Σχήμα 25:** Συνθετική πορεία του ανασταλτικού παράγοντα Vatalanib<sup>62</sup>

#### **Dasatinib ή Sprycel (BMS-354825)**

Ένας πρόσφατα εγκεκριμένος από αρκετές χώρες αναστολέας πολλαπλών στοχεύσεων πρωτεϊνικών κινασών είναι ο Dasatinib (Σχήμα 26). Ο αναστολέας χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, καθώς επίσης και της οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Σε αντίθεση με τον Imatinib ο εν λόγω αναστολέας στοχεύει την ενεργή μορφή της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης Bcr-Abl και ενδείκνυται για ασθενείς που δεν ανέχονται ή δεν ανταποκρίθηκαν σε άλλες θεραπευτικές μεθόδους.<sup>63-64</sup>

Ο Dasatinib έχει καταδείξει ανασταλτική δράση εναντίον της οικογένειας SRC πρωτεϊνικών κινασών. Οι SRC είναι υπεύθυνες για την ογκογένεση και τους οστεο-μεταστατικούς καρκίνους. Ο πρωτεϊνικός αναστολέας δρα ως κυτταροστατικός παράγοντας και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των κυττάρων. Εκτός της λευχαιμίας, έχει μελετηθεί η δράση του Dasatinib, σε προ-κλινικό στάδιο, εναντίον στερεών όγκων, όπως του προστάτη, του στήθους και άλλων τύπου καρκίνων.<sup>65</sup>

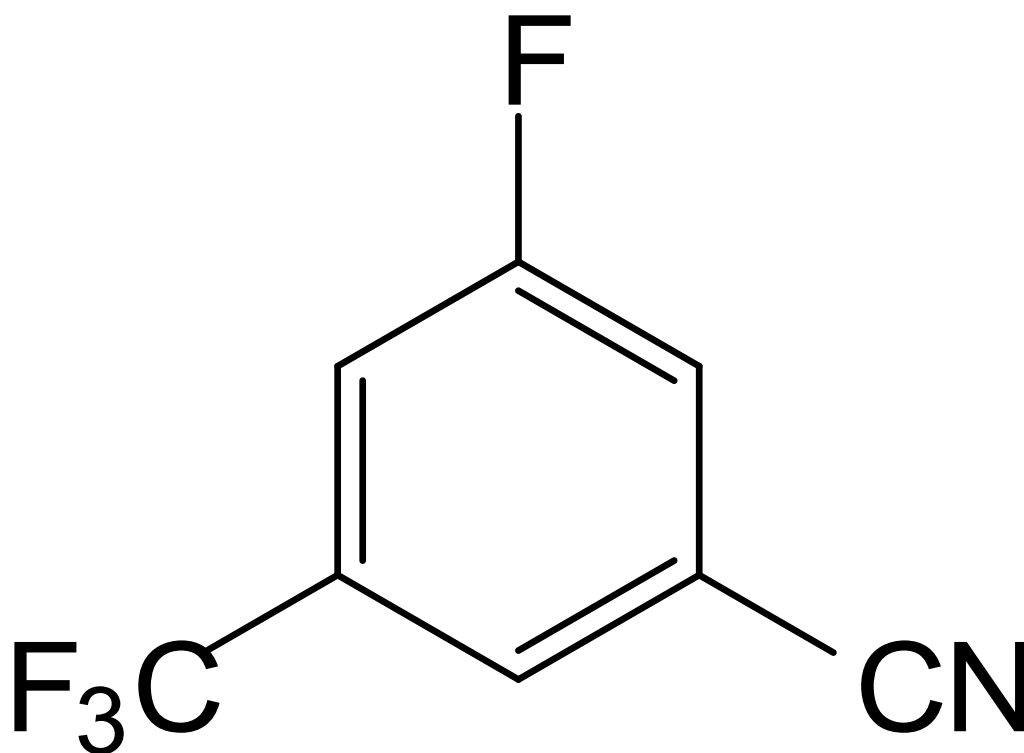


**Σχήμα 26:** Συνθετική πορεία του ανασταλτικού παράγοντα Dasatinib<sup>66</sup>

#### **Nilotinib ή Tasigna (AMN 107)**

Ο Nilotinib είναι αναστολέας δεύτερης γενιάς ως προς το Imatinib, ο οποίος ήδη κυκλοφορεί ως αντικαρκινικό φάρμακο. Αν και ο δεύτερος αναστολέας είναι στην πρώτη γραμμή θεραπείας ενάντια στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, ωστόσο έχουν παρατηρηθεί υποτροπές σε πολλούς ασθενείς κυρίως στη προχωρημένη μορφή της ασθένειας, λόγω μεταλλάξεων της Bcr-Abl. Το Nilotinib είναι 20 φορές πιο ισχυρό από το Glivec με αποτέλεσμα να αναστέλλει σχεδόν όλες τις μεταλλάξεις του γονιδίου, σε προκλινικές μελέτες βρέθηκε ότι έχει ανασταλτική δράση στις 32 από τις 33 ανθεκτικές στο Imatinib μεταλλάξεις της Bcr-Abl.

Το Nilotinib (Σχήμα 27) σχεδιάστηκε ώστε να αλληλεπιδρά με το σημείο πρόσδεσης του APT στη Bcr-Abl με υψηλότερη συγγένεια από το Glivec. Εγκρίθηκε από τον Οργανισμό Φαρμάκων της Αμερικής (FDA) το 2007 για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία σε ασθενείς με ανθεκτικότητα ή δυσανεξία στο Imatinib. Οι ασθενείς που τους χορηγήθηκε έχουν ποσοστά επιβίωσης 91%, ενώ σε αυτούς που βρίσκονταν σε προχωρημένο στάδιο τα ποσοστά επιβίωσης φτάνουν το 82%.<sup>67-71</sup>



**Σχήμα 27:** Συνθετική πορεία του ανασταλτικού παράγοντα Nilotinib<sup>67</sup>

**Αναστολείς στο εμπόριο ή σε προχωρημένα στάδια κλινικών δοκιμών**

Στο επόμενο σχήμα παρατίθενται αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που κυκλοφορούν ήδη στο εμπόριο σε διάφορες χώρες. Η έρευνα στη σύνθεση μικρών ή και λίγο μεγαλύτερων οργανικών μορίων που στοχεύουν στην αναστολή κινασών, εμπλεκόμενων σε διάφορες μορφές καρκίνου, έχει προχωρήσει ραγδαία

τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Πολλές πολυεθνικές φαρμακοβιομηχανίες, όπως Pfizer, Novartis, GlaxoSmithKline, Bayer, AstraZeneca, κ.α., προσανατολίζουν την έρευνά τους στο σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως τα παρακάτω.

**Σχήμα 28:** Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που κυκλοφορούν στο εμπόριο<sup>58,61</sup>

Οι παραπάνω αναστολείς στοχεύουν κυρίως τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF-R), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (EGFR) καθώς επίσης και τις πρωτεϊνικές κινάσες Raf, Ret και c-Kit. Η χρησιμότητά τους είναι έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως του συκωτιού, του στήθους, των ωοθηκών και του θεοειδή.<sup>61,72-74</sup>

Εκτός από τους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που κυκλοφορούν τα τελευταία χρόνια στην αγορά, υπάρχει μία σειρά αναστολέων που ακολουθούν και

βρίσκονται ήδη σε στάδια κλινικών δοκιμών. Μερικοί από τους εν λόγω αναστολείς περιλαμβάνονται στο επόμενο σχήμα.

**Σχήμα 29:** Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών σε στάδια κλινικών δοκιμών<sup>75</sup>

Οι υπό διερεύνηση αναστολείς βρίσκονται στο δεύτερο ή τρίτο στάδιο δοκιμών έναντι των πρωτεϊνικών κινασών Flt-3 και VEGRF. Στόχος των αναστολέων είναι η χρόνια μυελογενής λευχαιμία. Είναι αναμενόμενο τα επόμενα χρόνια ορισμένα από τα παραπάνω μόρια να τα συναντήσουμε στο εμπόριο, άλλα πάλι αποτύχουν στις τελικές κλινικές δοκιμές, όπως ο αναστολέας του σχήματος 30.<sup>76</sup>

**Σχήμα 30:** Αναστολέας που δεν προχώρησε στο τρίτο στάδιο δοκιμών

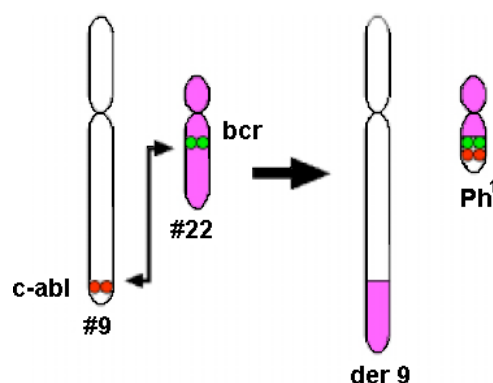
## 2.9 Glivec – Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία

Το Glivec, του οποίου η συνθετική πορεία έχει προηγηθεί (Σχήμα 21), είναι αναστολέας της ομάδας Abl πρωτεϊνικών τυροσυλο-κινασών και δρα ως ATP ανταγωνιστής. Είναι ένας πολύ δραστικός, αλλά ταυτόχρονα και εξαιρετικά εκλεκτικός αναστολέας, με ιδανική φαρμακοκινητική, που επιτρέπει στη θεραπευτική αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας με λήψη από τους ασθενείς ημερήσιας δόσης 300 mg. Σε αντίθεση με τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα, τα οποία χορηγούνται ενδοφλεβίως, το Glivec χορηγείται από το στόμα. Η επιτυχία του Glivec, ως εκλεκτικού αναστολέα πρωτεϊνικών κινασών, έχει ανοίξει στις επιστημονικές ομάδες ένα ελπιδοφόρο και πολλά υποσχόμενο δρόμο. Πριν αναλυθεί διεξοδικά ο τρόπος δράσης του αναστολέα, θα πραγματοποιηθεί μία σύντομη αναφορά στη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία.

### 2.9.1 Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία - Χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας

Το χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, το οποίο εμφανίζεται στο 95% των ασθενών που πάσχουν από Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία (CML), είναι αποτέλεσμα της σύντηξης των BCR και ABL γονιδίων και προκύπτει από την αμοιβαία χρωμοσωματική μετάλλαξή τους. Η Bcr-Abl ογκοπρωτεΐνη παρουσιάζει μία αυξημένη δραστηριότητα πρωτεϊνικής τυροσυλο-κινάσης, η οποία εμπλέκεται έντονα κυρίως στο μηχανισμό ανάπτυξης της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, αλλά και στο 5-10% των ενηλίκων με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Το μεταλλαγμένο Bcr-Abl γονίδιο προέρχεται από τη μεταφορά του Abl γονιδίου του χρωμοσώματος 9, στην περιοχή Bcr του χρωμοσώματος 22 (Σχήμα 31). Εξ αιτίας της μεταβλητότητας της περιοχής διάσπασης του Bcr γονιδίου έχουν περιγραφεί τρία χιμαιρικά γονίδια. Τα γονίδια p210<sup>Bcr-Abl</sup>, p190<sup>Bcr-Abl</sup> και p230<sup>Bcr-Abl</sup> περιέχουν το ίδιο τμήμα της Abl αλλά διαφορετικό τμήμα της Bcr πρωτεΐνης. Το γονίδιο p210<sup>Bcr-Abl</sup> είναι αυτό που συνδέεται με τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία, ενώ τα άλλα δύο γονίδια έχουν αναφερθεί σε άλλες μορφές λευχαιμίας.



**Σχήμα 31:** Το γονίδιο της *Abl* και το μεταλλαγμένο γονίδιο *Bcr-Abl*

Η Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία είναι μία κακοήθης αιματολογική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από την αύξηση των λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα. Κλινικά η ασθένεια εξελίσσεται μέσω ευδιάκριτων φάσεων: μία σταθερή ή χρόνια φάση, μία επιταχυνόμενη φάση και μία μοιραία οξεία λευχαιμία, γνωστή και ως κρίση φυσήματος.<sup>77-80</sup>

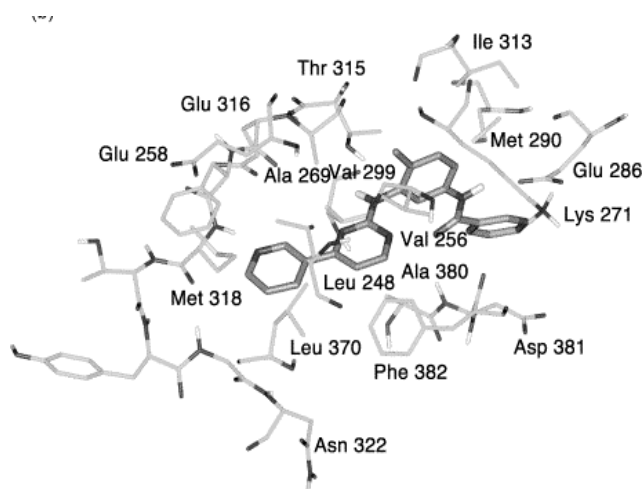
### 2.9.2 Δομή του φαρμάκου Glivec

Τα παράγωγα των φαινυλαμινοπυριμιδινών αρχικά σχεδιάστηκαν ως αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης C. Η αρχική ένωση που δοκιμάστηκε και η οποία κατέδειξε μια ασθενή ανασταλτική δράση κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), ήταν μια φαινυλαμινοπυριμιδίνη. Στην πορεία της ερευνητικής προσπάθειας, για τη βελτιστοποίηση της μοριακής δομής, διαπιστώθηκε ότι η προσάρτηση μιας 3-πυριδίνης στην 4-θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου, οδήγησε σε εντυπωσιακή αύξηση της ανασταλτικής δράσης κατά της πρωτεϊνικής κινάσης C. Στην περαιτέρω προσπάθεια αύξησης της ανασταλτικής δράσης, η εισαγωγή της μεθυλομάδας στην 6-θέση του βενζολικού δακτυλίου (Glivec), κατήργησε εντελώς την ανασταλτική δράση της εν λόγω ένωσης, έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης C.

**Σχήμα 32:** Δομή του εκλεκτικού αναστολέα Glivec

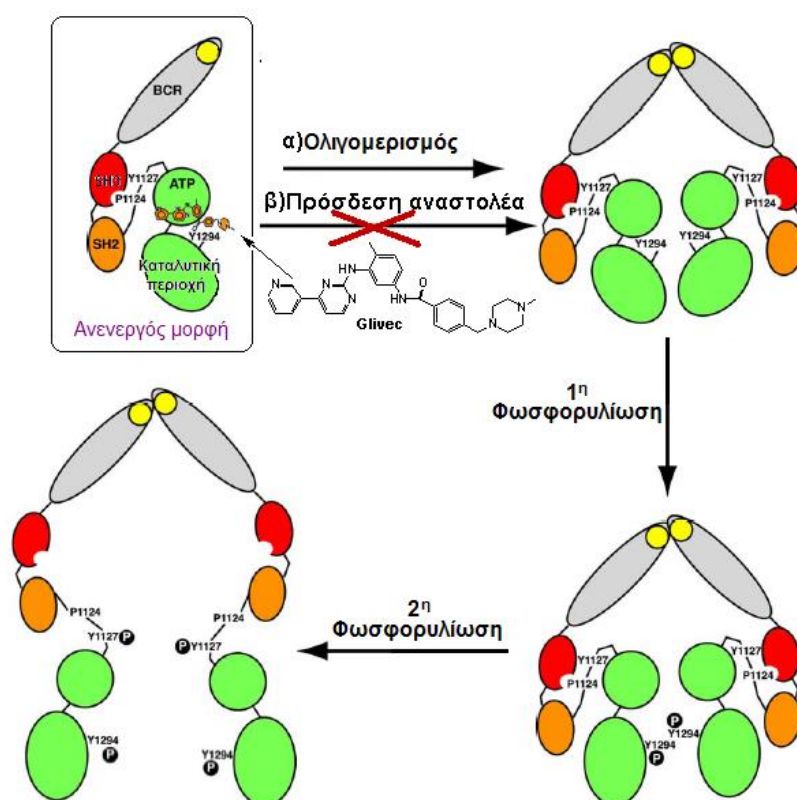
Αν και τα αρχικά αποτελέσματα ήταν αποθαρρυντικά για το νέο παράγωγο, οι προσπάθειες δε σταμάτησαν εκεί. Ελέγχοντάς το και σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες παρατηρήθηκε ότι είχε μία έντονη δραστικότητα κατά της ογκοπρωτεϊνικής κινάσης Bcr-Abl. Η επιτυχία του Glivec έγκειται στο γεγονός ότι προσδένεται εκλεκτικά μόνο στο ενεργό κέντρο της μεταλλαγμένης πρωτεϊνικής κινάσης, χωρίς να αλληλεπιδρά με φυσιολογικά κύτταρα, σε αντίθεση με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες κατέδειξαν επίσης τον τρόπο με τον οποίο το Glivec προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Σχήμα 33) και δρα ως αδερινικός μιμητής. Μόνο η αριστερή πλευρά του αναστολέα, η οποία αποτελείται από τον πυριδινικό και τον πυριμιδινικό δακτύλιο, εντοπίζεται στην περιοχή πρόσδεσης του ATP, ενώ το υπόλοιπο μόριο εισχωρεί μέσα στον υδροφοβικό πυρήνα του ενζύμου, όπου και σταθεροποιείται λόγω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.



**Σχήμα 33:** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Glivec και της κινάσης Abl.

Η πρόσδεση αυτή σταθεροποιεί την ανενεργό μορφή της χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl αποτρέποντας τον ολιγομερισμό της και κατ' επέκταση τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων (Σχήμα 34). Η διαδικασία οδηγεί στην κατάργηση της σηματοδοτικής οδού που προάγει τη λευχαιμιогένεση.<sup>81</sup> Το Glivec εξαιτίας της μεγάλης δραστικότητάς του προκαλεί μείωση κατά 92-98% στον αριθμό των αποικιών των Bcr-Abl κυττάρων.



**Σχήμα 34:** Ο ρόλος του Glivec στην αναστολή της χιμαιρικής πρωτεΐνης Bcr-Abl α) ολιγομερισμός της ογκοπρωτεΐνης Bcr-Abl που οδηγεί στη φωσφορυλίωση κατάλοιπων τυροσίνης, β) πρόσδεση του εκλεκτικού αναστολέα Glivec στο κέντρο πρόσδεσης του ATP με αποτέλεσμα να καθιστά την ογκοπρωτεΐνη ανενεργή<sup>82</sup>

Η επιτυχία του Glivec κατά της Χρόνιας Μυελογενής Λευχαιμίας (CML) είναι αδιαμφισβήτητα μεγάλη, εν τούτοις τα τελευταία χρόνια όλο και μεγαλύτερος αριθμός ασθενών που λαμβάνουν το φάρμακο υποτροπιάζει. Στη σταθερή ή χρόνια φάση περίπου στο 2-4% των περιπτώσεων δεν επιτυγχάνεται αιματολογική αλλαγή. Επιπλέον στο 60% των περιπτώσεων στην επιταχυνόμενη φάση και στο 90% των περιπτώσεων στη ραγδαία επιταχυνόμενη φάση ή κρίση φυσήματος, είτε

αποτυγχάνει η απόκριση, είτε υπάρχει σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα υποτροπή. Οι μεταλλάξεις της Bcr-Abl πρωτεϊνικής κινάσης είναι οι πιθανότεροι λόγοι της υποτροπής. Αξίζει λοιπόν να γίνει μία προσπάθεια σύνθεσης νέων αναστολέων, ώστε να μειωθούν τα ποσοστά υποτροπών σε ανθρώπους που πάσχουν από τη Χρόνια Μυελογενή Λευχαιμία.<sup>77-78, 80</sup>

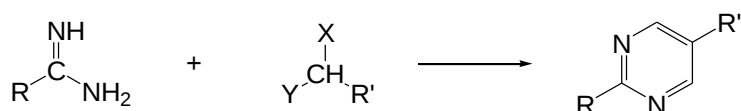
## 2.10 Σχηματισμός του πυριμιδινικού δακτυλίου

Η πυριμιδίνη είναι μία διαζίνη, δηλαδή ένας ετεροκυκλικός εξαμελής αρωματικός δακτύλιος, ο οποίος αποτελείται από τέσσερις άνθρακες και δύο άτομα αζώτου. Από τις τρεις πιθανές διαζίνες (1,2-, 1,3- και 1,4-διαζίνη) η πυριμιδίνη είναι μακράν η σπουδαιότερη ένωση. Παράγωγα της πυριμιδίνης είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και διαδραματίζουν σπουδαίο βιοχημικό και βιολογικό ρόλο. Η ουρακίλη, η θυμίνη και η κυτοσίνη, ως υδροξυπυριμιδίνες και παράγωγα αυτών στην κετο-μορφή, είναι συστατικά των νουκλεονικών οξέων.

Τα δύο άζωτα του δακτυλίου της πυριμιδίνης έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν καταλλήλως με πρωτόνια σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Με αυτού του τύπου τους δεσμούς συγκρατείται η διπλή έλικα του DNA και με τους ίδιους δεσμούς αλληλεπιδρά το Glivec και οι άλλοι αδενινικοί μιμητές με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου είναι οι σημαντικότεροι διαμοριακοί δεσμοί σε οργανικά συστήματα, για το λόγο αυτό και στα φάρμακα τα άτομα που συμμετέχουν στους δεσμούς αυτούς παίζουν κυρίαρχο ρόλο, είναι ίσως ένας απλός τρόπος παραπλάνησης του οργανισμού, με την ευρύτερη έννοια, ώστε να επιτευχθούν οι στόχοι.

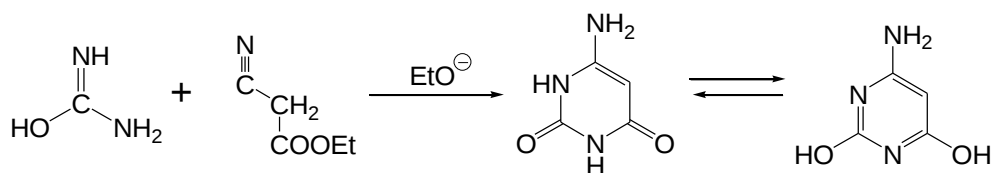
Η ύπαρξη ενός δεύτερου αζώτου στον αρωματικό δακτύλιο, σε σχέση με την πυριδίνη, μειώνει περαιτέρω την πυκνότητα των ηλεκτρονίων στον αρωματικό δακτύλιο, καθιστώντας το δακτύλιο μη δραστικό ως προς την ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Ως εκ τούτου, οι απαιτούμενες σχετικά δραστικές συνθήκες οδηγούν συχνά στη διάσπαση του ετεροκυκλικού δακτυλίου, παρά στην υποκατάσταση ενός ηλεκτρονιόφιλου. Αντιστοίχως, λόγω του δεύτερου αζώτου στο δακτύλιο, η πυριμιδίνη είναι μία ασθενέστερη βάση σε σχέση με την πυριδίνη.<sup>51-52, 83-87</sup>

Για την ανάπτυξη πυριμιδινικών δακτυλίων κατά κανόνα προσφέρονται ενώσεις που περιέχουν τρεις άνθρακες, όπως μηλονική διαλδεύδη, μηλονικός εστέρας, μηλονικό δινιτρίλιο καθώς και β-διαλδεύδες, β-κετοεστέρες και β-κετονιτρίλια του γενικού τύπου  $RCHXY$ , οι οποίες συμπυκνώνονται είτε με μία αμιδίνη, είτε με ουρία, ή παράγωγα αυτής, όπως γουανιδίνη και θειουρία (Σχήμα 35).



**Σχήμα 35:** Σχηματισμός πυριμιδινικού δακτυλίου από αμιδίνη και ενώσεις του τύπου  $RCHXY$

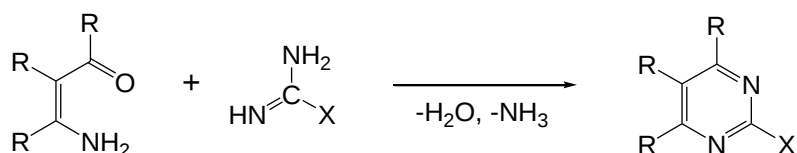
Εκτός του μηλονικού εστέρα ή άλλων παραγώγων του μηλονικού οξέος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συμπύκνωση σε πυριμιδινικούς δακτυλίου β-δικαρβονυλικές ενώσεις, β-κετοεστέρες, α-νιτρυλοεστέρες ή α-νιτρυλοκετόνες. Κατά αυτόν τον τρόπο, η αντίδραση της ουρίας στην ενολική μορφή και του νιτρυλοοξικού αιθυλεστέρα, παρουσία αιθοξειδίου του νατρίου, οδηγεί στο σχηματισμό της 2,4-διυδροξυ-6-αμινοπυριμιδίνης (Σχήμα 36):



**Σχήμα 36:** Σχηματισμός πυριμιδινικού δακτυλίου από ουρία στην ενολική μορφή και νιτρυλοοξικό αιθυλεστέρα

Πυριμιδίνες οι οποίες δε φέρουν υποκαταστάτες στη 2-θέση, μπορούν να παρασκευαστούν με τη συμπύκνωση φορμαμιδίων και β-δικαρβονυλικών ενώσεων ή των πρόδρομων ενώσεων σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (Σχήμα 37).

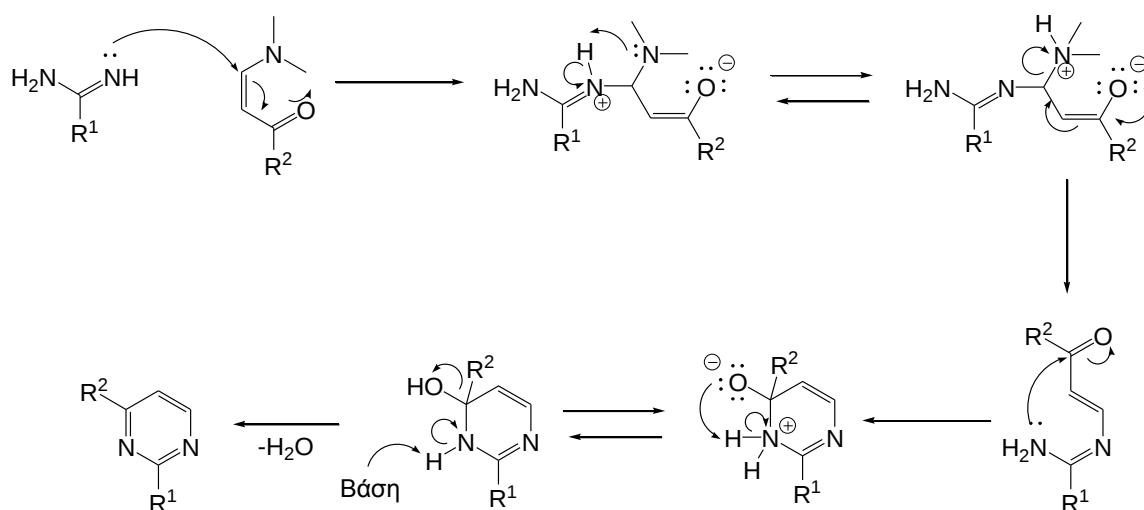




$X = \text{αλκύλιο} : \text{αμιδίνη}$   
 $X = \text{SH} : \text{ισοθειουρία}$   
 $X = \text{NH}_2 : \text{γουανιδίνη}$

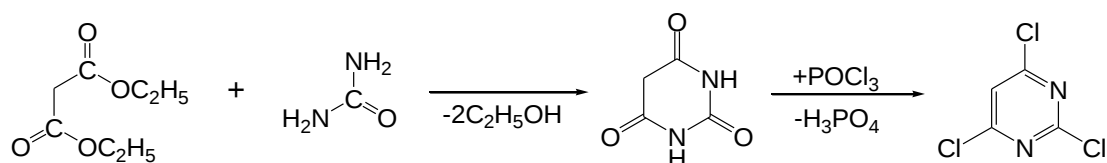
**Σχήμα 39:** Σχηματισμός πυριμιδινικού δακτυλίου και εισαγωγή υποκαταστάτη στη 2-θέση

Στο Σχήμα 40 παρατίθεται ο πιθανός μηχανισμός των εν λόγω αντιδράσεων, οι οποίες ακολουθήθηκαν και κατά την εργαστηριακή σύνθεση των ενώσεων μας, στο αρχικό στάδιο σχηματισμού του επιθυμητού πυριμιδινικού δακτυλίου:



**Σχήμα 40:** Μηχανισμός σύνθεσης πυριμιδινικού δακτυλίου

Τέλος, η αντίδραση του βαρβιτουρικού οξέος με τον οξυχλωριούχο φωσφόρο οδηγεί στην 2,4,6-τριχλωροπυριμιδίνη, η οποία μέσω πυρηνόφιλων αρωματικών υποκαταστάσεων μπορεί να αναπτυχθεί περαιτέρω σε διάφορα προϊόντα (Σχήμα 41).

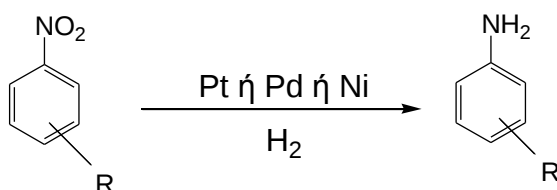


**Σχήμα 41:** Σχηματισμός πυριμιδινικού δακτυλίου από βαρβιτουρικό οξύ και οξυχλωριούχο φωσφόρο

## 2.11 Αναγωγή της νιτροομάδας σε αμινομάδα

Η μετατροπή μίας νιτροομάδας σε αμινομάδα είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη αναγωγική αντίδραση στην οργανική σύνθεση. Συνηθέστερος τρόπος αναγωγής νιτροομάδων είναι η καταλυτική υδρογόνωση παρουσία μεταλλικών καταλυτών (Σχήμα 42).

Η αναγωγή της νιτροομάδας πραγματοποιείται συχνότερα σε αρωματικά συστήματα παρά σε αλειφατικά. Ως μεταλλικοί καταλύτες κατά την υδρογόνωση χρησιμοποιούνται συνήθως λευκόχρυσος, παλλάδιο και νικέλιο. Ένας εναλλακτικός τρόπος είναι η χρήση ψευδαργύρου, σιδήρου ή κασσίτερου παρουσία υδροχλωρικού οξέος.<sup>1, 84-86</sup>



**Σχήμα 42:** Αναγωγή της νιτροομάδας με μεταλλικό καταλύτη



## 3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

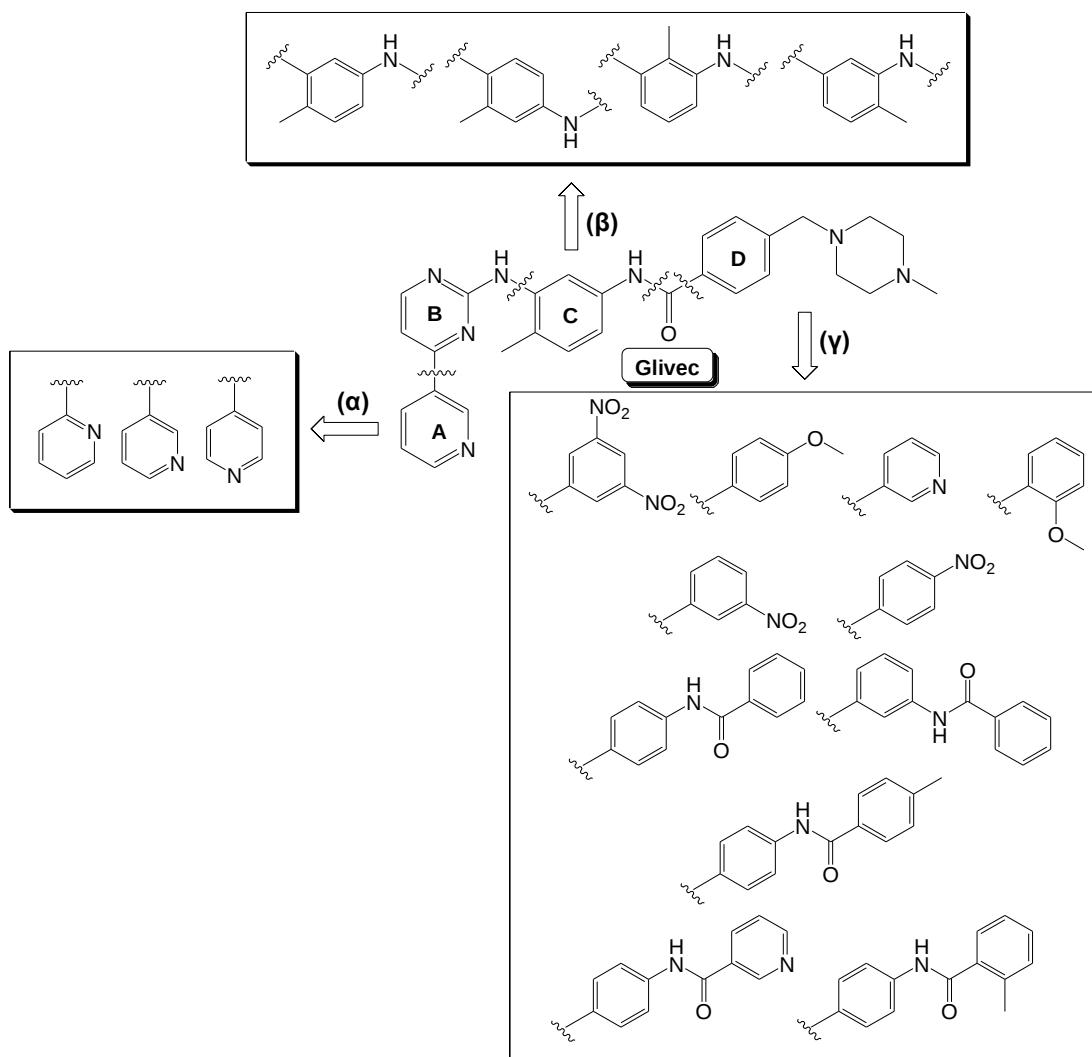
Στο θεωρητικό μέρος πραγματοποιήθηκε μία εκτενής αναφορά στις διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες απασχολούν τις τελευταίες δεκαετίες ερευνητικές ομάδες που ασχολούνται με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά του καρκίνου. Με επίκεντρο τη μεταλλαγμένη πρωτεϊνική κινάση BCR-Abl, η οποία εμπλέκεται στο μηχανισμό ανάπτυξης της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας, καθώς επίσης και τον εκλεκτικό αναστολέα της, το φαρμακευτικό σκεύασμα Glivec (Gleevec, STI-571, imatinib), της φαρμακευτικής εταιρίας 'Novartis', πραγματοποιήθηκαν οι συνθέσεις εν δυνάμει εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών.

### 3.1 Σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων

Το πρώτο σημαντικό βήμα για μία ερευνητική οργανική σύνθεση είναι ο σχεδιασμός της ένωσης, στα χαρακτηριστικά της οποίας θα βασιστεί η αναμενόμενη δραστηριότητά της. Με βάση το Glivec, κατά τη διάρκεια του Μ.Δ.Ε. ολοκληρώθηκε η σύνθεση 28 ενώσεων, εν δυνάμει αναστολέων. Θεωρώντας ότι η αλλαγή της μοριακής δομής του Glivec, έστω και στοιχειωδώς, θα μπορούσε να οδηγήσει ακόμη και σε ουσιαστική αλλαγή της διαμόρφωσης του εν δυνάμει αναστολέα και, κατά συνέπεια, πιθανόν στην ουσιαστική αύξηση της ανασταλτικής δράσης έναντι μιας σειράς πρωτεϊνικών κινασών, σχεδιάσαμε και ολοκληρώσαμε τη σύνθεση των αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec. Οι

τροποποιήσεις αφορούν όλους τους αρωματικούς ή ετεροαρωματικούς δακτυλίους (A, C, D), εκτός του πυριμιδινικού (B), του δευτέρου κατά σειρά, σύμφωνα με τη συνθετική πορεία ανάπτυξης των ενώσεων (Σχήμα 43).

Συγκεκριμένα σχεδιάσαμε και συνθέσαμε 28 νέες ενώσεις, σύμφωνα με τις ακόλουθες τροποποιήσεις:



**Σχήμα 43:** Αλλαγές στη μοριακή δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec

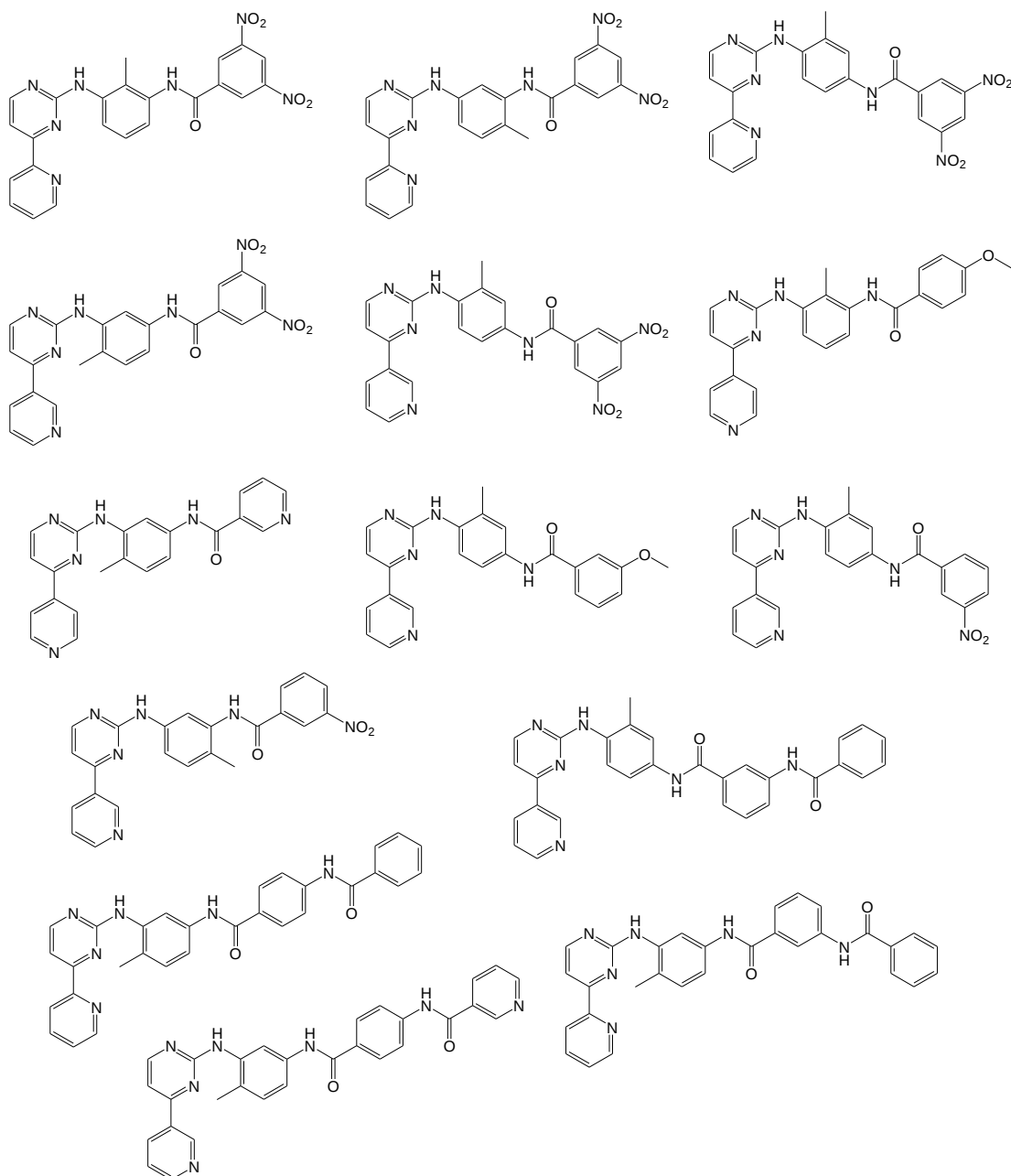
α) Σύνδεση της πυριδίνης στον πυριμιδινικό δακτύλιο, εκτός της 3-θέσης, στη 2- και στην 4-θέση.

β) Σύνδεση της μεθυλομάδας, εκτός της 6-θέσης, στη 2- και στην 4-θέση ως προς τη δευτεροταγή αμινομάδα. Επιπλέον, ο αμιδικός δεσμός εισήχθη, σε σχέση με τη δευτεροταγή αμινομάδα, εκτός της 3-θέσης, στην 4-θέση.

γ) Εισαγωγή υποκαταστατών, όπως  $-\text{NO}_2$  (3-,4- και 5-θέση) και  $-\text{OCH}_3$  (2- και 4-θέση), καθώς και αντικατάσταση του αρωματικού δακτυλίου **D** από ετεροαρωματικούς. Επιπλέον, εισαγωγή ενός δεύτερου αμιδικού δεσμού στον αρωματικό δακτύλιο **D**, σε 3- και 4-θέση, ως προς τον πρώτο αμιδικό δεσμό. Την προσθήκη του δεύτερου αμιδικού δεσμού ακολουθεί ταυτόχρονη εισαγωγή ενός πέμπτου, υποκατεστημένου ή μη, βενζολικού δακτυλίου ή ενός ετεροαρωματικού δακτυλίου.

Τα προϊόντα μετά την ολοκλήρωση, απομόνωση και ταυτοποίηση στο εργαστήριο, ελέγχθηκαν σε συνεργασία με τη φαρμακοβιομηχανία Novartis σε 20 πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες εμπλέκονται σε διάφορες σηματοδοτικές οδούς ενός κυττάρου και είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη καρκινικών όγκων.

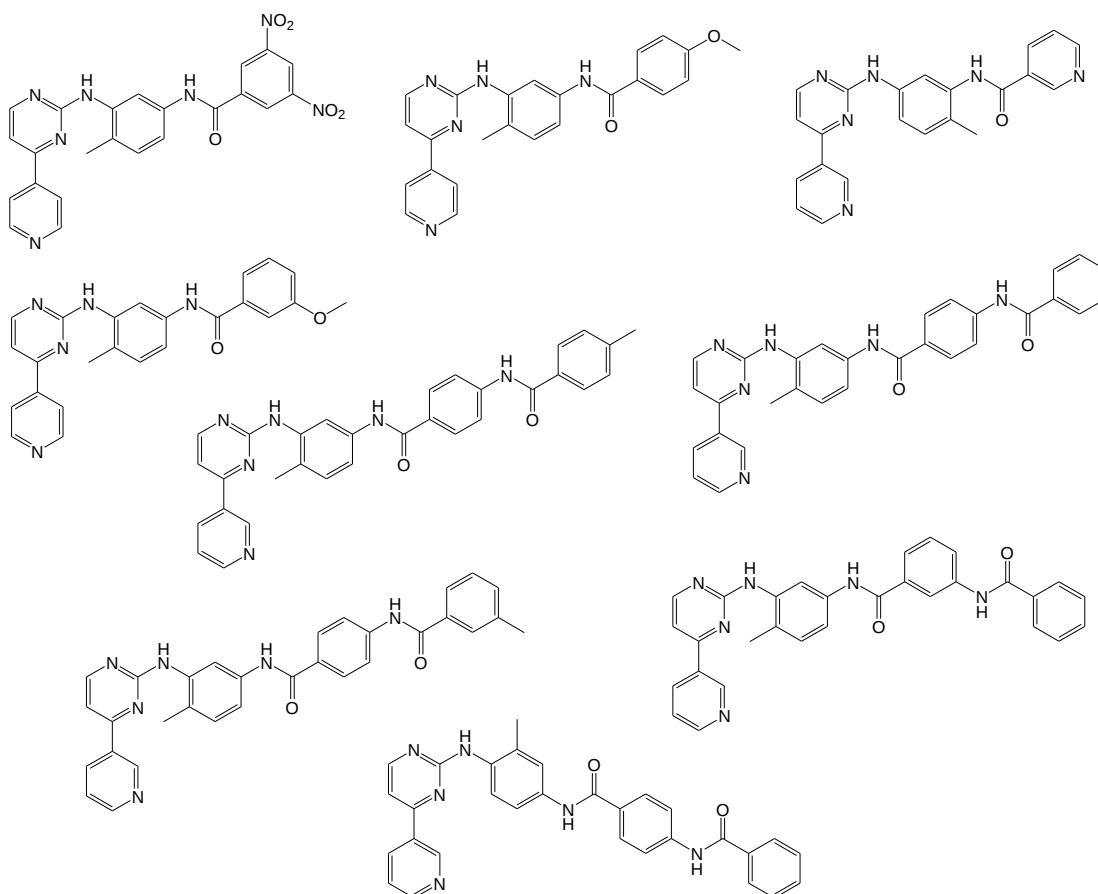
Από τις 28 νέες ενώσεις, οι οποίες ελέγχθηκαν στις HER-1, KDR, Flt-3, IGR-1R, Tek, c-Src, c-Met, Ret, JAK-2, Eph-B4, FGFR-3-K650E, Axl, FAK, c-Abl, c-Abl-T315I, PKA, CDK2/A, PKB, PDK1 και B-Raf-V599E πρωτεϊνικές κινάσες, οι 14 δομές δεν έδειξαν αξιολογήσιμη ανασταλτική δράση σε καμία από τις παραπάνω κινάσες. Ο συντακτικός τύπος των ενώσεων καταγράφεται στο *Σχήμα 44*.



**Σχήμα 44:** Εν δυνάμει αναστολείς χωρίς ανασταλτική δράση

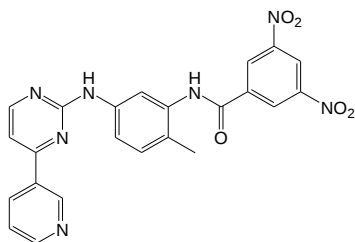
Ως γνωστό, για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα από βιολογική-φαρμακολογική πλευρά αξιολογήσιμο, θα πρέπει οι συγκεντρώσεις του αναστολέα να είναι  $<10 \mu\text{M}$ . Επίσης, σημαντικό είναι η ανασταλτική τους δράση να είναι εκλεκτική να περιορίζεται σε μία το πολύ δύο κινάσες.

Η επόμενη ομάδα συντακτικών τύπων (Σχήμα 45) δεν πληρεί τη μία ή και τις δύο παραπάνω προϋποθέσεις, αν και οι ενώσεις έδειξαν ανασταλτική δράση.

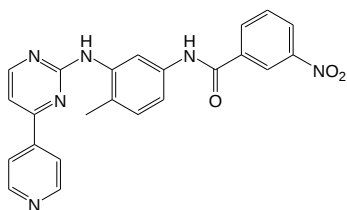


**Σχήμα 45:** Εν δυνάμει αναστολείς με μη αξιολογήσιμα βιολογικά αποτελέσματα

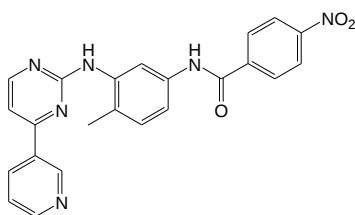
Ενδιαφέρουσα ανασταλτική δράση έδειξαν οι επόμενοι τρεις (3) συντακτικοί τύποι. Σε συγκεντρώσεις  $<5 \mu\text{M}$  αναστέλλουν εκλεκτικά τη δράση μία και μόνο πρωτεϊνική κινάση κατά 50% ( $\text{IC}_{50}$ ). Δομικά έχουν αρκετές ομοιότητες με το φαρμακευτικό σκεύασμα Glivec. Ο πυριδινικός δακτύλιος έχει το άζωτο σε 3- και 4- θέση, η μεθυλομάδα είναι είτε σε 4-θέση είτε σε 6-θέση στον αρωματικό δακτύλιο, ενώ όλες έχουν προσαρτημένη μία νιτροομάδα στον τελικό δακτύλιό τους. Στους πίνακες που ακολουθούν αναγράφονται οι δομές καθώς και οι συγκεντρώσεις (Σχήμα 46).



|               |     |               |     |                     |     |                    |             |
|---------------|-----|---------------|-----|---------------------|-----|--------------------|-------------|
| <b>HER-1</b>  | >10 | <b>c-Src</b>  | >10 | <b>FGFR-3-K650E</b> | >10 | <b>RKA</b>         | >10         |
| <b>KDR</b>    | >10 | <b>c-Met</b>  | >10 | <b>Axl</b>          | >10 | <b>CDK2/A</b>      | <b>0,50</b> |
| <b>Flt-3</b>  | >10 | <b>Ret</b>    | >10 | <b>FAK</b>          | >10 | <b>PKB</b>         | >10         |
| <b>IGR-1R</b> | >10 | <b>JAK-2</b>  | >10 | <b>c-Abl</b>        | >10 | <b>PDK1</b>        | >10         |
| <b>Tek</b>    | >10 | <b>Eph-B4</b> | >10 | <b>c-Abl-T315I</b>  | >10 | <b>B-Raf-V599E</b> | >10         |



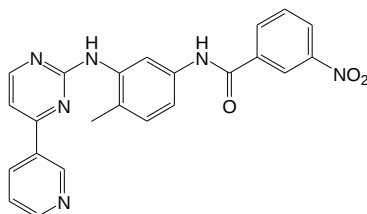
|               |     |               |     |                     |     |                    |             |
|---------------|-----|---------------|-----|---------------------|-----|--------------------|-------------|
| <b>HER-1</b>  | >10 | <b>c-Src</b>  | >10 | <b>FGFR-3-K650E</b> | >10 | <b>RKA</b>         | >10         |
| <b>KDR</b>    | >10 | <b>c-Met</b>  | >10 | <b>Axl</b>          | >10 | <b>CDK2/A</b>      | >10         |
| <b>Flt-3</b>  | >10 | <b>Ret</b>    | >10 | <b>FAK</b>          | >10 | <b>PKB</b>         | >10         |
| <b>IGR-1R</b> | >10 | <b>JAK-2</b>  | >10 | <b>c-Abl</b>        | >10 | <b>PDK1</b>        | >10         |
| <b>Tek</b>    | >10 | <b>Eph-B4</b> | >10 | <b>c-Abl-T315I</b>  | >10 | <b>B-Raf-V599E</b> | <b>0,55</b> |



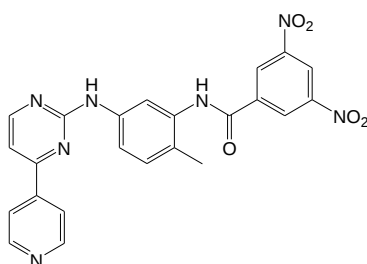
|               |     |               |     |                     |     |                    |             |
|---------------|-----|---------------|-----|---------------------|-----|--------------------|-------------|
| <b>HER-1</b>  | >10 | <b>c-Src</b>  | >10 | <b>FGFR-3-K650E</b> | >10 | <b>RKA</b>         | >10         |
| <b>KDR</b>    | >10 | <b>c-Met</b>  | >10 | <b>Axl</b>          | >10 | <b>CDK2/A</b>      | >10         |
| <b>Flt-3</b>  | >10 | <b>Ret</b>    | >10 | <b>FAK</b>          | >10 | <b>PKB</b>         | >10         |
| <b>IGR-1R</b> | >10 | <b>JAK-2</b>  | >10 | <b>c-Abl</b>        | >10 | <b>PDK1</b>        | >10         |
| <b>Tek</b>    | >10 | <b>Eph-B4</b> | >10 | <b>c-Abl-T315I</b>  | >10 | <b>B-Raf-V599E</b> | <b>0,48</b> |

**Σχήμα 46:** Δομές και βιολογικά αποτελέσματα των αναστολέων

Το ενδιαφέρον κίνησαν οι δύο εν δυνάμει αναστολείς, οι οποίοι, με συγκεντρώσεις της τάξης των nM, ανέστειλαν τη δραστικότητα κινασών στο ήμισυ. Ο πρώτος έδειξε ανασταλτική δράση έναντι της B-Raf πρωτεϊνικής κινάσης, ενώ παρατηρήθηκε και μία αρκετά καλή ανασταλτική δράση έναντι της c-Abl. Ο δεύτερος είναι πολύ εκλεκτικός έναντι της CDK2/A πρωτεϊνικής κινάσης, ενώ δεν έχει αξιολογήσιμα αποτελέσματα στις υπόλοιπες (Σχήμα 47).



|               |     |               |     |                     |             |                    |              |
|---------------|-----|---------------|-----|---------------------|-------------|--------------------|--------------|
| <b>HER-1</b>  | >10 | <b>c-Src</b>  | >10 | <b>FGFR-3-K650E</b> | >10         | <b>RKA</b>         | >10          |
| <b>KDR</b>    | >10 | <b>c-Met</b>  | >10 | <b>Axl</b>          | >10         | <b>CDK2/A</b>      | >10          |
| <b>Flt-3</b>  | >10 | <b>Ret</b>    | >10 | <b>FAK</b>          | >10         | <b>PKB</b>         | >10          |
| <b>IGR-1R</b> | >10 | <b>JAK-2</b>  | >10 | <b>c-Abl</b>        | <b>0,37</b> | <b>PDK1</b>        | >10          |
| <b>Tek</b>    | >10 | <b>Eph-B4</b> | >10 | <b>c-Abl-T315I</b>  | >10         | <b>B-Raf-V599E</b> | <b>0,038</b> |



|               |     |               |             |                     |     |                    |              |
|---------------|-----|---------------|-------------|---------------------|-----|--------------------|--------------|
| <b>HER-1</b>  | >10 | <b>c-Src</b>  | >10         | <b>FGFR-3-K650E</b> | >10 | <b>RKA</b>         | >10          |
| <b>KDR</b>    | >10 | <b>c-Met</b>  | >10         | <b>Axl</b>          | >10 | <b>CDK2/A</b>      | <b>0,014</b> |
| <b>Flt-3</b>  | >10 | <b>Ret</b>    | >10         | <b>FAK</b>          | >10 | <b>PKB</b>         | >10          |
| <b>IGR-1R</b> | >10 | <b>JAK-2</b>  | <b>3,48</b> | <b>c-Abl</b>        | >10 | <b>PDK1</b>        | >10          |
| <b>Tek</b>    | >10 | <b>Eph-B4</b> | >10         | <b>c-Abl-T315I</b>  | >10 | <b>B-Raf-V599E</b> | >10          |

**Σχήμα 47:** Δομές και βιολογικά αποτελέσματα των αναστολέων

Οι παραπάνω δομές ελέγχθηκαν από το ερευνητικό κέντρο της Novartis έναντι των παραπάνω πρωτεϊνικών κινασών και σε in-vivo βιολογικά πειράματα. Παρόλη τη δράση τους στα in-vitro πειράματα, η δραστηριότητά τους μειώθηκε αρκετά όταν ελέγχθηκε η ανασταλτική τους δράση έναντι πρωτεϊνικών κινασών σε κυτταροκαλλιέργειες. Η μείωση της δραστηριότητας οφείλεται ενδεχομένως στη δυσκολία εισαγωγής τους στο κύτταρο.

Στηριζόμενοι σε όλα τα παραπάνω πολύτιμα αποτελέσματα σχεδιάσαμε εκ νέου αναστολείς. Οι νέες δομές συνίστανται από τέσσερις συνολικά δακτυλίους, εφόσον η εισαγωγή του πέμπτου δακτυλίου και του δεύτερου αμιδικού δεσμού δεν πρόσφερε κάποια ενδιαφέροντα βιολογικά αποτελέσματα.

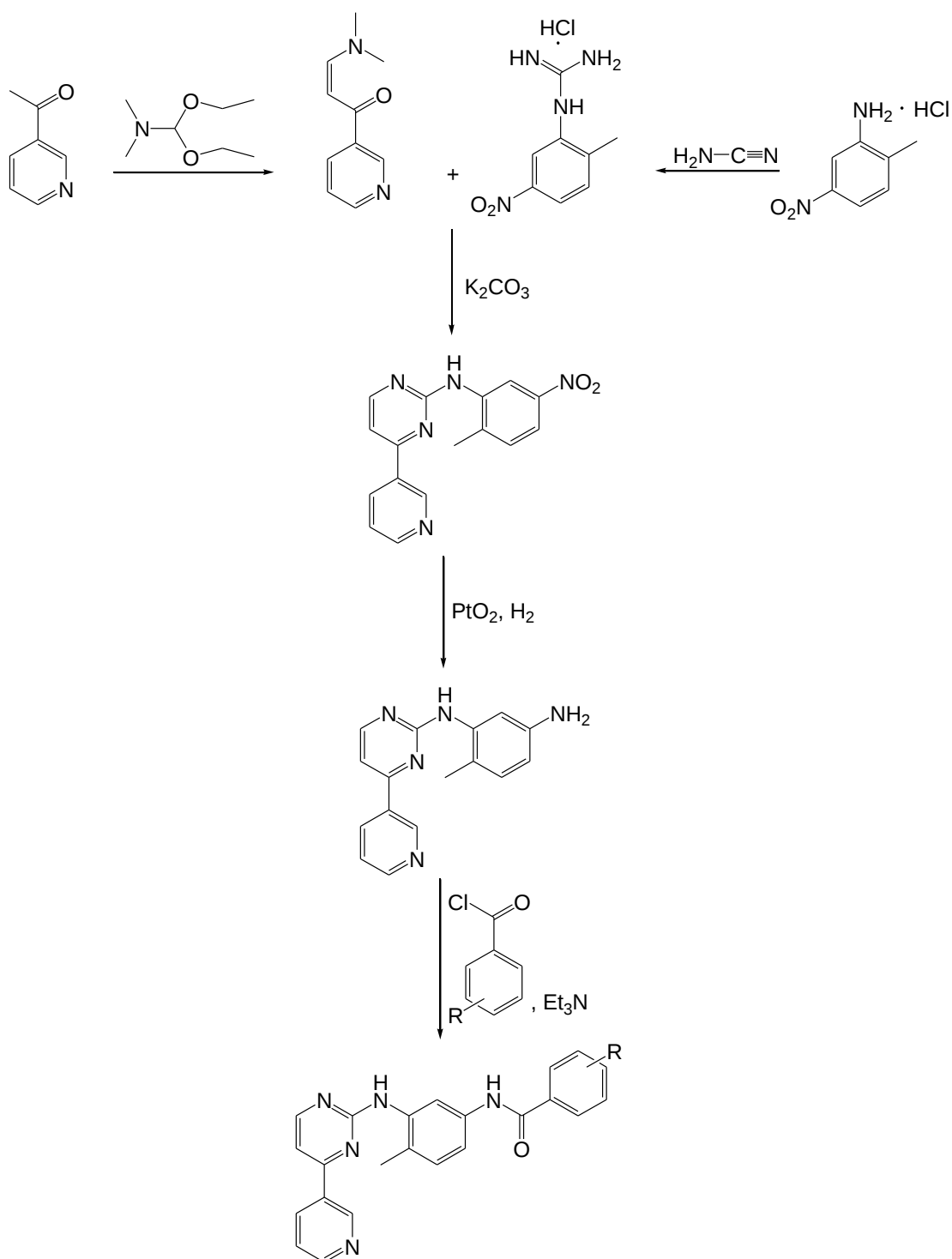
Αφαιρέθηκε από τους νέους αναστολείς ο πυριδινικός δακτύλιος με τη θέση του αζώτου στη 2-θέση ως προς τη σύνδεσή του με τον πυριμιδινικό. Ο αρωματικός δακτύλιος περιλάμβανε μία μεθυλομάδα σε 4- ή 6-θέση ως προς τη δευτεροταγή αμίνη και ο αμιδικός δεσμός παρέμεινε σταθερός στην 3-θέση. Στον τελικό δακτύλιο διατηρήθηκε η νιτροομάδα, η οποία φαίνεται ότι προσφέρει στην ανασταλτική δράση των αναστολέων. Δεν είναι τυχαίο ότι όλες οι ενώσεις με αξιολογήσιμα βιολογικά αποτελέσματα περιείχαν μία ή δύο νιτροομάδες.

Τέλος, έγινε προσπάθεια εισαγωγής πιο λιπόφιλων ομάδων, ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα των αναστολέων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και κάποιων αλογόνων, τα οποία συναντά κανείς συχνά σε αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.

### **3.2 Ολική πορεία σύνθεσης των νέων εν δυνάμει αναστολέων**

Στα πρώτα στάδια της συνθετικής πορείας, σύμφωνα με την κλασική μέθοδο σύνθεσης πυριμιδινικών δακτυλίων, ακετυλοπυριδίνες με την επίδραση της *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δαιθυλακετάλης μετατρέπονται σε εναμιόνες. Παράλληλα με τήξη κυαναμιδίου και προσθήκη μεθυλο-νιτροανιλινών πραγματοποιείται η σύνθεση των μεθυλο-νιτρο-φαινυλογουανιδινών. Ακολουθεί η κυκλοποίηση των εναμιονών, με την επίδραση των μεθυλο-νιτρο-φαινυλογουανιδινών, σε φαινυλαμινοπυριμιδίνες. Το επόμενο στάδιο είναι η καταλυτική υδρογόνωση με PtO<sub>2</sub> (καταλύτης Adams) των νιτρο-υποκατεστημένων

προϊόντων, που οδηγεί στα προϊόντα αναγωγής. Τέλος, η σύνθεση των τελικών προϊόντων επιτυγχάνεται με την αντίδραση προσάρτησης διάφορων βενζοϋλοχλωριδίων στα προϊόντα αναγωγής με σχηματισμό ενός αμιδικού δεσμού (Σχήμα 48).



**Σχήμα 48:** Σχηματική ολική συνθετική πορεία<sup>1-2, 84</sup>

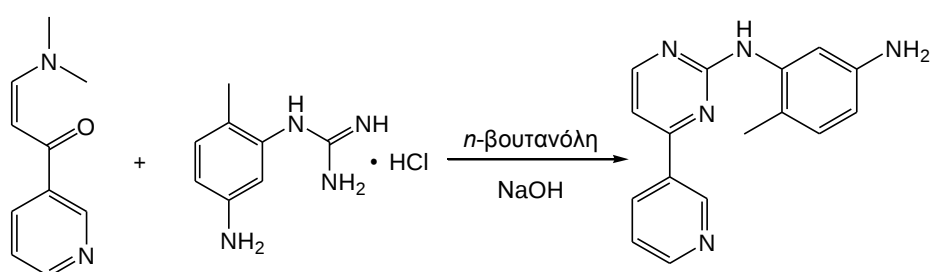
### 3.3 Διαφοροποιήσεις - βελτιστοποιήσεις στη συνθετική πορεία των νέων αναστολέων

Διαπιστώνεται εύκολα ότι η συνθετική πορεία, η οποία ακολουθήθηκε στο εργαστήριο, έχει διαφορές από αυτή του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec. Κατά τη σύνθεση των νέων αναστολέων έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης των συνθηκών και των αποδόσεων των διαφόρων σταδίων.

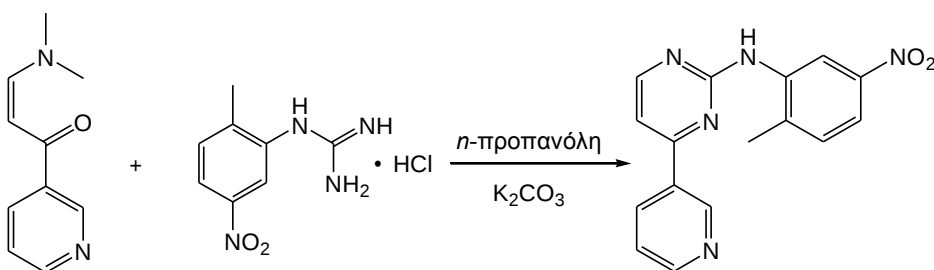
Στα αρχικά ακόμη στάδια της πορείας κατά τη σύνθεση υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών δε χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση κάποιος οργανικός διαλύτης, όπως η *n*-βουτανόλη. Το κυαναμίδιο, το ένα από τα δύο αντιδραστήρια, τήκεται μόλις στους 65°C και είχε τη δυνατότητα να λειτουργεί τηγμένο σε θερμοκρασία >65°C ως το μέσο διαλυτοποίησης των υποκατεστημένων υδροχλωρικών ανιλινών. Με τη τήξη του αντιδραστηρίου οδηγηθήκαμε, σε μία μόλις ώρα ως χρόνο αντίδρασης, σε αύξηση των αποδόσεων (~95%) και σε μία πιο πράσινη οργανική χημεία, δηλαδή σε αντιδράσεις χωρίς την άσκοπη χρήση διαλυτών (Σχήμα 49).

**Σχήμα 49:** Διαφοροποιήσεις κατά τη σύνθεση των υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών

Μία άλλη απόκλιση από την κλασική σύνθεση του εκλεκτικού αναστολέα είναι στο στάδιο της κυκλοποίησης. Ως βασικό αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε ανθρακικό κάλιο έναντι του καυστικού νατρίου. Διαπιστώθηκε ότι με τη χρήση πιο ήπιας βάσης δεν παρατηρούνταν η εμφάνιση ενός παραπροϊόντος, το οποίο παρεμπόδιζε την απομόνωση του κυκλοποιημένου προϊόντος (αποφυγή χρωματογραφίας στήλης). Η διαφοροποίηση του διαλύτη ήταν μικρή, αντί της *n*-βουτανόλης χρησιμοποιήθηκε *n*-προπανόλη. Αν και η δεύτερη έχει μικρότερο σημείο ζέσεως δεν παρατηρήθηκε μείωση στις αποδόσεις, με όφελος την ευκολότερη απομάκρυνση του διαλύτη (Σχήμα 50).



**Το στάδιο κυκλοποίησης του Glivec**

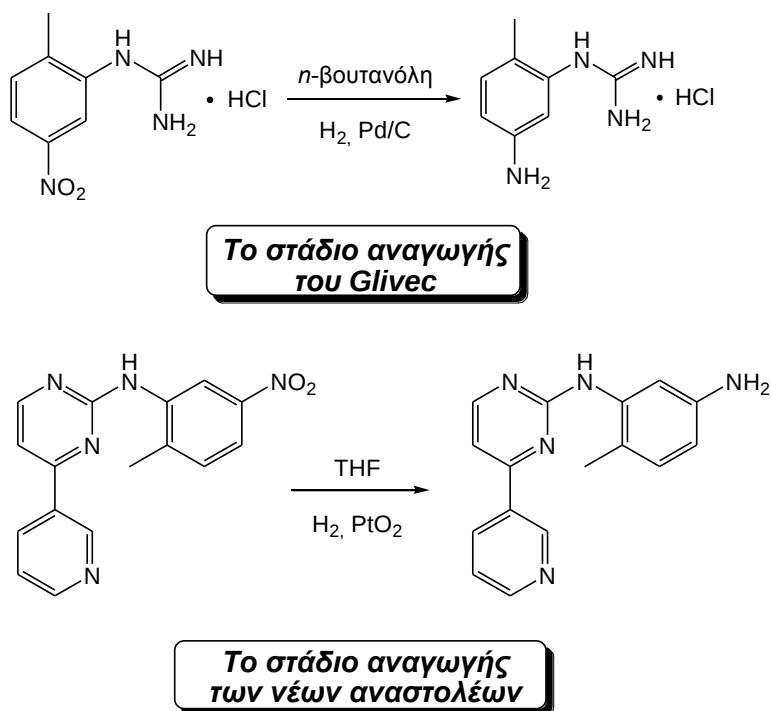


**Το στάδιο κυκλοποίησης των νέων αναστολέων**

**Σχήμα 50:** Διαφοροποιήσεις στο στάδιο κυκλοποίησης

Το πιο εντυπωσιακό όλων ήταν η αλλαγή του καταλύτη κατά την αναγωγή της νιτροομάδας σε αμινομάδα. Διαπιστώθηκε ότι η χρήση του οξειδίου του λευκόχρυσου (PtO<sub>2</sub>) έναντι του παλλαδίου προσροφημένο σε άνθρακα (Pd/C 10%) οδήγησε σε εκπληκτική αύξηση της απόδοσης. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν ~100%, με αποτέλεσμα να παραλαμβάνουμε ένα προϊόν ευοξειδωτο καθαρό έτοιμο να χρησιμοποιηθεί στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας. Αν και ο

νέος καταλύτης κόστιζε περισσότερο, υπήρχε, όμως, εξοικονόμηση χρόνου, υψηλή απόδοση προϊόντος και εξοικονόμηση διαλυτών κατά τη χρωματογραφία στήλης, η οποία απαιτούνταν για τον καθαρισμό των πρωτοταγών αμινών (Σχήμα 51).



**Σχήμα 51:** Διαφοροποιήσεις στο στάδιο αναγωγής της νιτροομάδας σε αμινομάδα

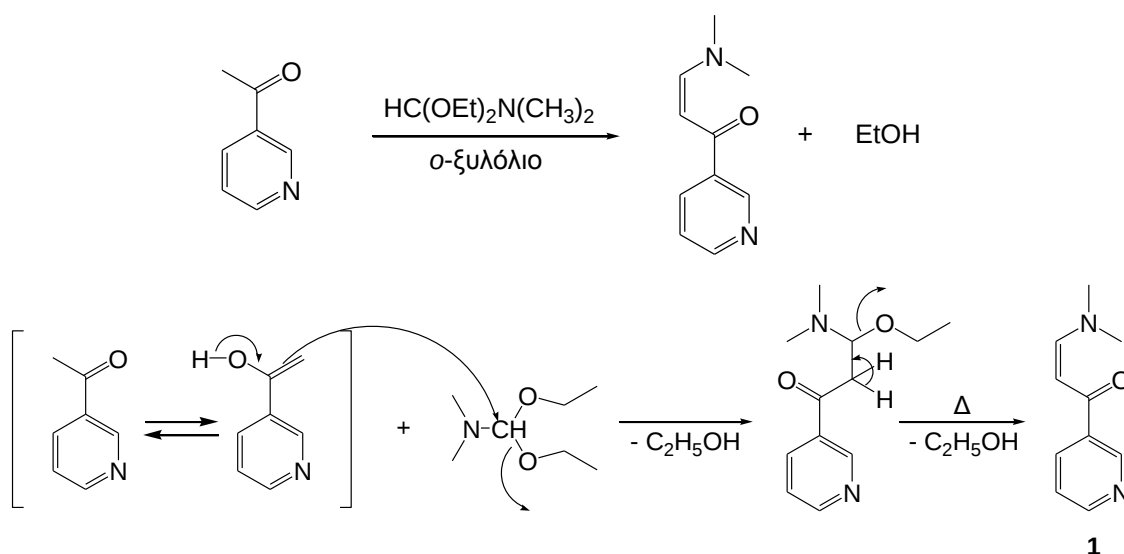
Για τη σύνθεση των νέων αναστολέων δεν ακολουθήθηκε η πορεία σύνθεσης του σκευάσματος Glivec, αλλά σε αρκετά στάδια δοκιμάστηκαν νέες συνθήκες και διαφορετικές αντιδράσεις. Εάν οι συνθήκες αυτές επέφεραν καλύτερες αποδόσεις, αλλά και μείωση χρήσης διαλυτών, τόσο στην αντίδραση όσο και για τον καθαρισμό των προϊόντων, ακολουθήθηκαν για τη σύνθεση όλης της σειράς των νέων αναστολέων.

### 3.4 Σύνθεση β-εναμινονών

Για τη σύνθεση των νέων εν δυνάμει αναστολέων, αρχικός στόχος είναι ο σχηματισμός των φαινυλαμινοπυριμιδινών, οι οποίες συνίστανται από τρεις

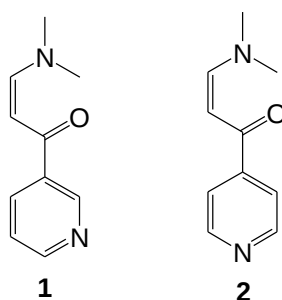
αρωματικούς δακτυλίους. Ο πρώτος δακτύλιος είναι μία πυριδίνη, ο δεύτερος μία πυριμιδίνη και ο τρίτος ένα υποκατεστημένο βενζόλιο. Ανάμεσα στο βεζολικό και στον πυριμιδινικό δακτύλιο παρεμβάλλεται μία δευτεροταγής αμίνη. Οι δύο δακτύλιοι (πυριδινικός και βενζολικός) υπάρχουν στα αρχικά αντιδραστήρια, ενώ ο πυριμιδινικός δακτύλιος συντίθεται στην πορεία. Οι τρεις άνθρακες του δακτυλίου προσφέρονται από μία εναμινόνη, ενώ τα δύο άζωτα και ο τέταρτος άνθρακας που εσωκλείουν από μία υποκατεστημένη φαινυλογουανιδίνη.

Ξεκινώντας από τον πυριδινικό δακτύλιο, με αρχικά αντιδραστήρια 3- και 4-ακετυλοπυριδίνη και τη *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφακετάλη, συντέθηκαν και απομονώθηκαν οι δύο εναμινόνες. Η ενολική μορφή της κάθε ακετυλοπυριδίνης αντιδρά με τη *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφακετάλη (η τελευταία είναι μία προστατευμένη αλδεΐδη με δύο καλές αποχωρούσες αιθοξυ-ομάδες). Η πρόδρομη ένωση της **1** μετατρέπεται εύκολα, με απόσπαση αιθανόλης, στο σταθερότερο προϊόν **1**. Ο μηχανισμός και η αντίδραση παρατίθενται στο Σχήμα 52.



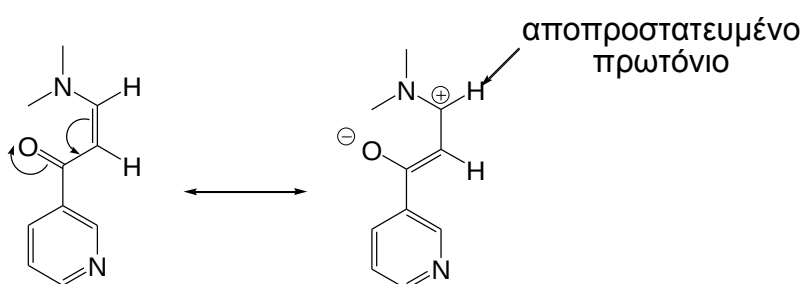
**Σχήμα 52:** Αντίδραση και μηχανισμός σχηματισμού των εναμινονών

Ως διαλύτης της αντίδρασης επιλέχθηκε το ο-ξυλόλιο με σημείο ζέσεως στους 140°C. Ο συγκεκριμένος διαλύτης έδωσε ικανοποιητικότερες αποδόσεις (~70%) σε αντίθεση με την αιθανόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε αρχικά με χαμηλότερες αποδόσεις της τάξης του 40%. Με τον παραπάνω τρόπο σύνθεσης παραλάβαμε τις β-εναμινόνες του Σχήματος 53.

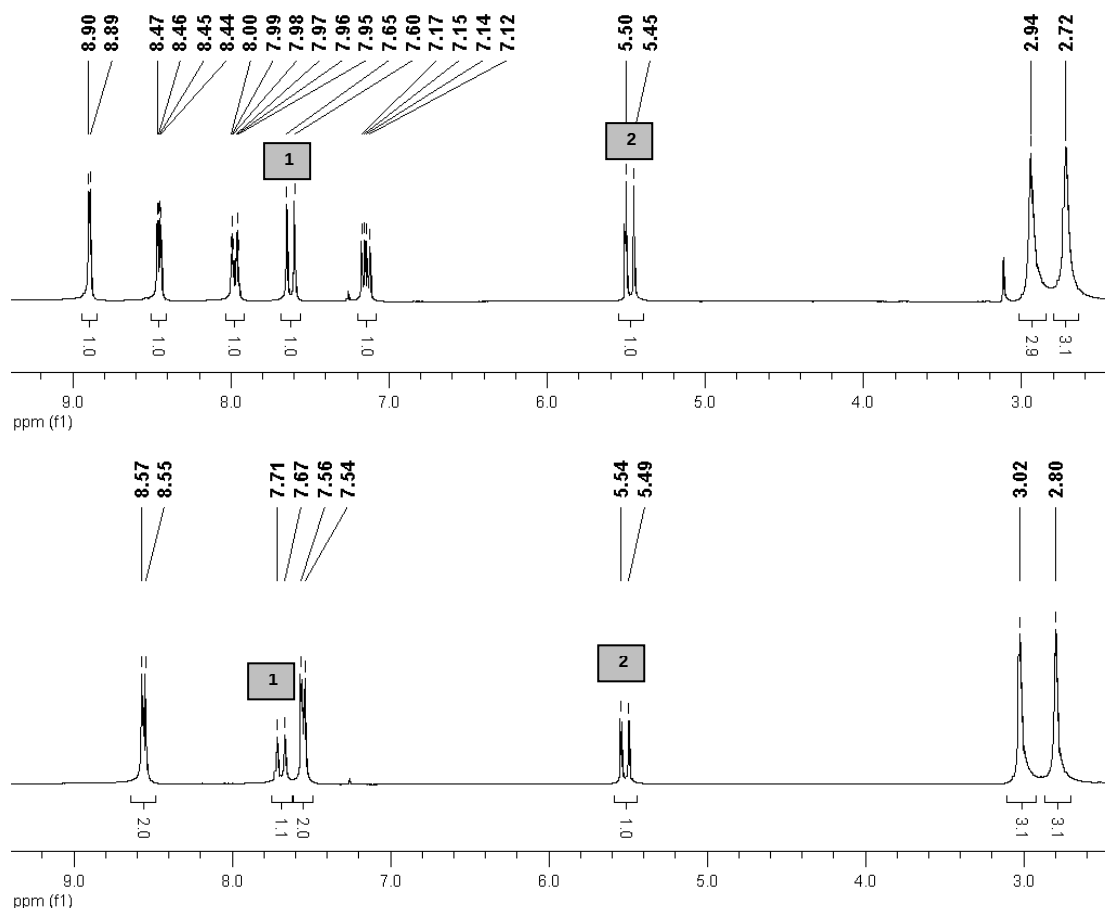


**Σχήμα 53:** Δομές των β-εναμινονών

Στα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των β-εναμινονών διακρίνουμε μία μετατόπιση σε ασθενέστερα πεδία των ολεφινικών πρωτονίων σε β-θέση ως προς το καρβονύλιο. Τα αποπροστατευμένα πρωτόνια για τις εναμινόνες **1** και **2** δίνουν σήματα συντονισμού στα 7.60 και 7.67 ppm, αντίστοιχα. Η ισχυρή αποπροστασία οφείλεται στην παρουσία δομής συντονισμού, όπου διακρίνεται καθαρά το θετικό φορτίο που φέρει ο β-άνθρακάς τους (Σχήμα 54).

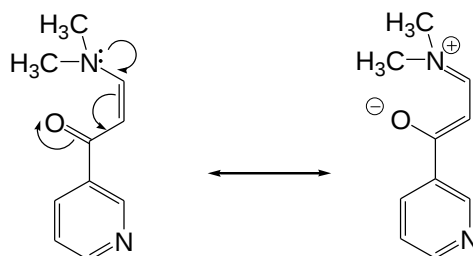


**Σχήμα 54:** Αποπροστατευμένο πρωτόνιο σε β-θέση



**Σχήμα 55:**  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ) φάσματα των εναμινονών **1** και **2**

Επιπλέον, στις εν λόγω ενώσεις, όπως είναι αναμενόμενο, υπάρχει περιορισμένη δυνατότητα περιστροφής γύρω από το δεσμό μεταξύ αζώτου και ολεφινικού άνθρακα, λόγω παρουσίας της παρακάτω δομής συντονισμού (Σχήμα 56).



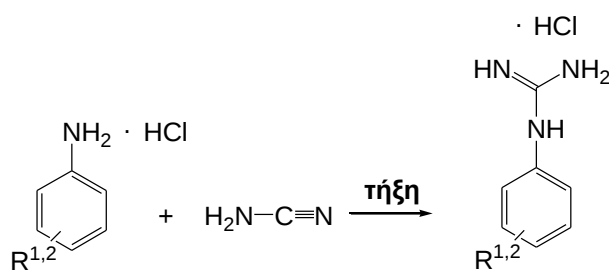
**Σχήμα 56:** Περιορισμός περιστροφής γύρω από το δεσμό μεταξύ αζώτου και ολεφινικού άνθρακα

Συνέπεια της περιορισμένης περιστροφής είναι ότι οι ενώσεις δίνουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος δύο σήματα συντονισμού για τα *N*-μεθυλικά πρωτόνια, γιατί κάθε μεθυλική ομάδα έχει διαφορετικό χημικό περιβάλλον (2.72 ppm και 2.94 ppm για την ένωση **1**, 2.80 ppm και 3.02 ppm για την ένωση **2**).

Επιπλέον, η γεωμετρία της εναμιनोंης είναι *cis* (*Z*-), δεδομένου ότι τα δύο ολεφινικά πρωτόνια στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  σχάζονται σε δύο διπλές κορυφές με χαρακτηριστική σταθερά σύζευξης  $^3J=11.50\text{ Hz}$ .

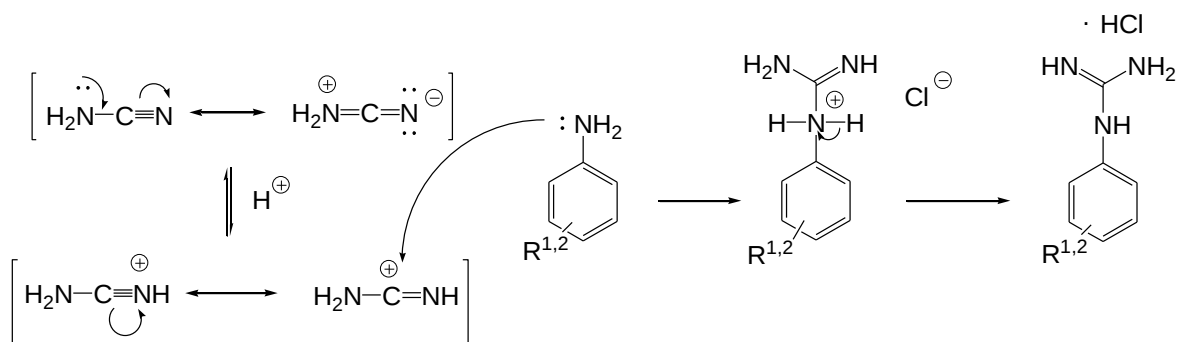
### 3.5 Σύνθεση των μεθυλο-νιτρο-φαινυλογουανιδινών

Μετά τη σύνθεση και απομόνωση των β-εναμιनोंων, ακολουθεί η σύνθεση των υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών. Όπως προαναφέρθηκε, η πράσινη αυτή αντίδραση δεν περιέχει κάποιο διαλύτη. Με το πέρασμα του κυαναμίδιου από τη στερεή στην υγρή φάση προσδίδουμε στο κυαναμίδιο διττή ιδιότητα αυτή του διαλύτη και του αντιδρώντος ταυτόχρονα (Σχήμα 57). Τα υδροχλωρικά άλατα συντέθηκαν με απευθείας διοχέτευση αέριου  $\text{HCl}$  σε μεθανολικό διάλυμα της αντίστοιχης ανιλίνης.



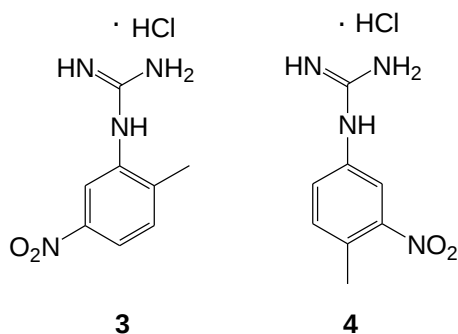
**Σχήμα 57:** Αντίδραση σχηματισμού των υδροχλωρικών αλάτων γουανιδίνης

Οι νέες συνθήκες της αντίδρασης έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, με πολύ καλές αποδόσεις (>95%) για τις υδροχλωρικές ανιλίνες. Τα προϊόντα απομονώθηκαν σε στερεά μορφή ως λευκά ιζήματα, μετά από έκπλυση με διαιθυλαιθέρα. Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο Σχήμα 58.



**Σχήμα 58:** Μηχανισμός σχηματισμού των γουανιδινών από κυαναμίδιο και ανιλίνες

Τα δύο παράγωγα των υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών, ως υδροχλωρικά άλατα, που συντέθηκαν στο εργαστήριο φαίνονται στο Σχήμα 59.

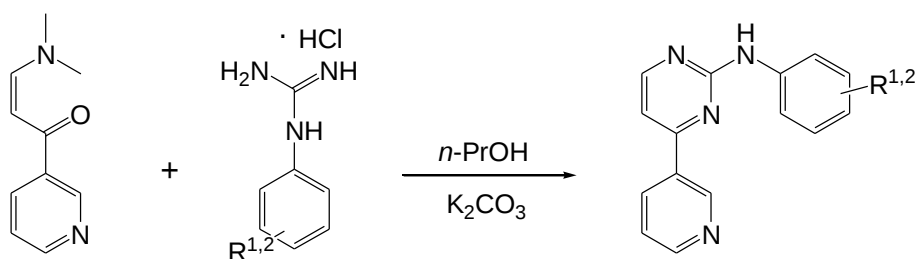


**Σχήμα 59:** Δομές γουανιδινών

### 3.6 Σύνθεση των φαινυλαμινο-πυριμιδινών

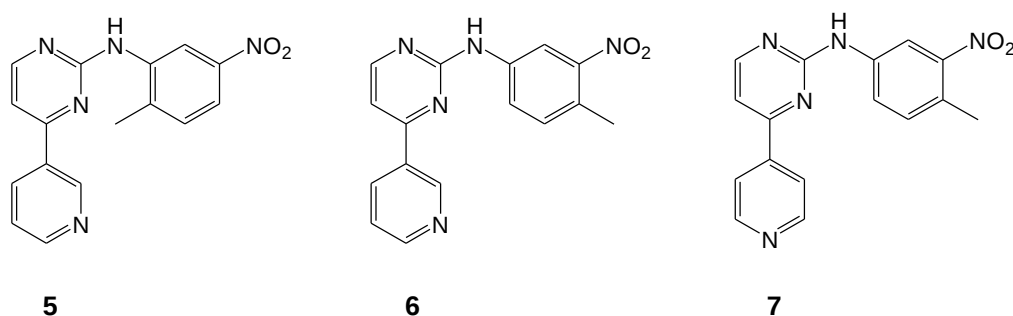
Το στάδιο της κυκλοποίησης, κατά τη σύνθεση των αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Σε αυτό το στάδιο σχηματίζεται ο πυριμιδινικός δακτύλιος, ένα πολύ χαρακτηριστικό δομικό συστατικό σε αυτού του τύπου τους αναστολείς. Είναι ο δακτύλιος, ο οποίος με τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργεί στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης του ATP, διεκδικεί τη θέση του μορίου ATP μέσα στο ένζυμο, λειτουργώντας ανταγωνιστικά και αναστέλλοντας τη δράση της πρωτεϊνικής κινάσης.

Η αντίδραση αρχικά πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα ισοπροπανόλης και ως βάση χρησιμοποιήθηκε NaOH. Παρατηρήθηκε, όμως, εμφάνιση παραπροϊόντων πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, πιθανόν λόγω του σχετικά ισχυρού πυρηνόφιλου χαρακτήρα των ιόντων υδροξυλίου. Η χρήση του K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, ως βάσης, έδωσε καλύτερες αποδόσεις. Για την περαιτέρω βελτίωση της απόδοσης δοκιμάστηκαν ως διαλύτες η *n*-προπανόλη και η *n*-βουτανόλη. Και στις δύο περιπτώσεις η απόδοση της αντίδρασης αυξήθηκε. Κατά τη χρήση της *n*-βουτανόλης, ενώ η απόδοση ήταν καλύτερη, υπήρξαν προβλήματα στην απομόνωση του προϊόντος, οπότε τελικά επιλέχθηκε η *n*-προπανόλη. Η αντίδραση σχηματισμού του πυριμιδινικού δακτυλίου περιγράφεται στο Σχήμα 60 και ο μηχανισμός έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο (Σχήμα 40).



**Σχήμα 60:** Αντίδραση σχηματισμού των φαινυλοαμινοπυριμιδινών από εναμινόνες και γουανιδίνες

Κατά την παραπάνω αντίδραση κυκλοποίησης συντέθηκαν τρία προϊόντα (Σχήμα 61).



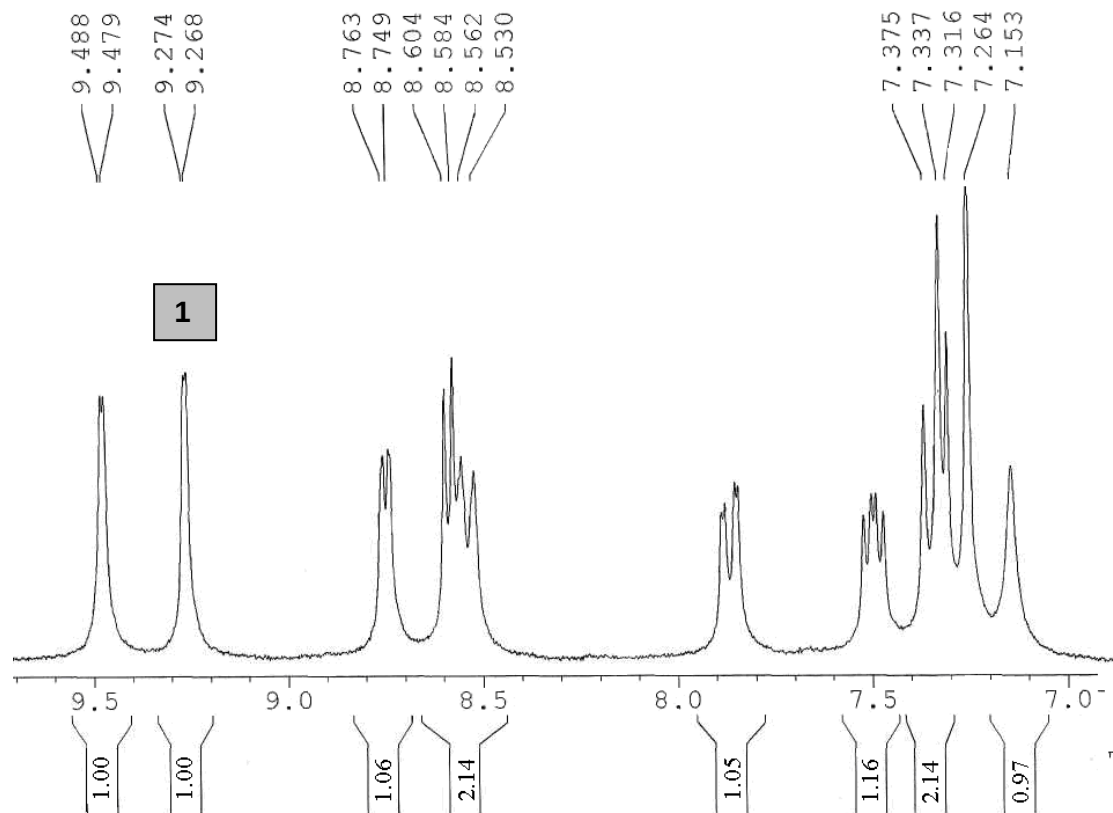
**Σχήμα 61:** Προϊόντα κυκλοποίησης - Σχηματισμός πυριμιδινικού δακτυλίου

Η σύνθεση των φαινυλοαμινοπυριμιδινών ακολουθείται από μία συζήτηση των φασματοσκοπικών δεδομένων <sup>1</sup>H-NMR, ώστε να αναφερθούν οι

χαρακτηριστικές κορυφές και να σχολιαστούν, επίσης, κάποιες κορυφές που προσελκύουν το ενδιαφέρον.

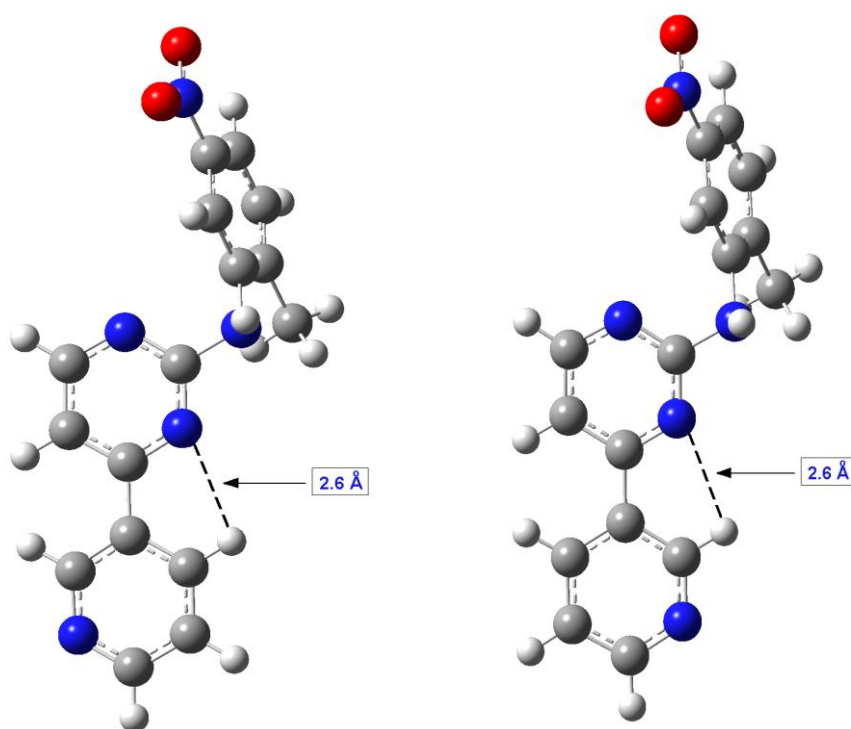
Η χαρακτηριστική κορυφή των ενώσεων κυκλοποίησης, που οφείλεται στο πρωτόνιο της δευτεροταγούς αμίνης και η οποία διασφαλίζει και την ολοκλήρωση του πυριμιδινικού δακτυλίου, στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  εμφανίζεται στα 7.15 ppm και 7.39 ppm για τα προϊόντα **5**, **6**, αντίστοιχα. Σε αντίθεση με το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **7** με κορυφή στα 10.22 ppm. Η διαφοροποίηση στις τιμές οφείλεται στην αλλαγή διαλύτη κατά τη λήψη του φάσματος. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις επιλέχθηκε το  $\text{CDCl}_3$ , ενώ στην τελευταία το DMSO, το οποίο λόγω της μεγαλύτερης πολικότητας του και της ικανότητάς του να εμπλέκεται σε δεσμούς υδρογόνου μετατοπίζει την κορυφή σε μεγαλύτερες τιμές ppm.

Το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο είναι αυτό του βενζολικού δακτυλίου, που βρίσκεται μεταξύ της νιτρομάδας και της αμινομάδας και εμφανίζει κορυφή στα 8.50 ppm περίπου. Τα πρωτόνια που προκάλεσαν τη προσοχή, ήταν εκείνα που συναντώνται ανάμεσα στο άζωτο του πυριδινικού δακτυλίου και σε 2-θέση ως προς τον πυριμιδινικό δακτύλιο, στις ενώσεις **5** και **6**. Η εμφάνισή του αναμένονταν στα 8.60 ppm, ενώ παρατηρήθηκαν στα 9.25 ppm. Η αποπροστασία των δύο πρωτονίων ενδεχομένως οφείλεται σε ψευδο-δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν τα δύο πρωτόνια και το άζωτο του πυριμιδινικού δακτυλίου. Η απόσταση των δύο πρωτονίων με το άζωτο της πυριμιδίνης είναι περίπου 2.6 Å. Η παραπάνω απόσταση βρίσκεται εντός των ορίων σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Στην ένωση **7** τα πρωτόνια δίπλα στο άζωτο εμφανίζονται στα 8.75 ppm, όπου και αναμένονταν. Στο Σχήμα 62 φαίνεται ενδεικτικά η αρωματική περιοχή της ένωσης **5**.



**Σχήμα 62:** Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της ένωσης 5

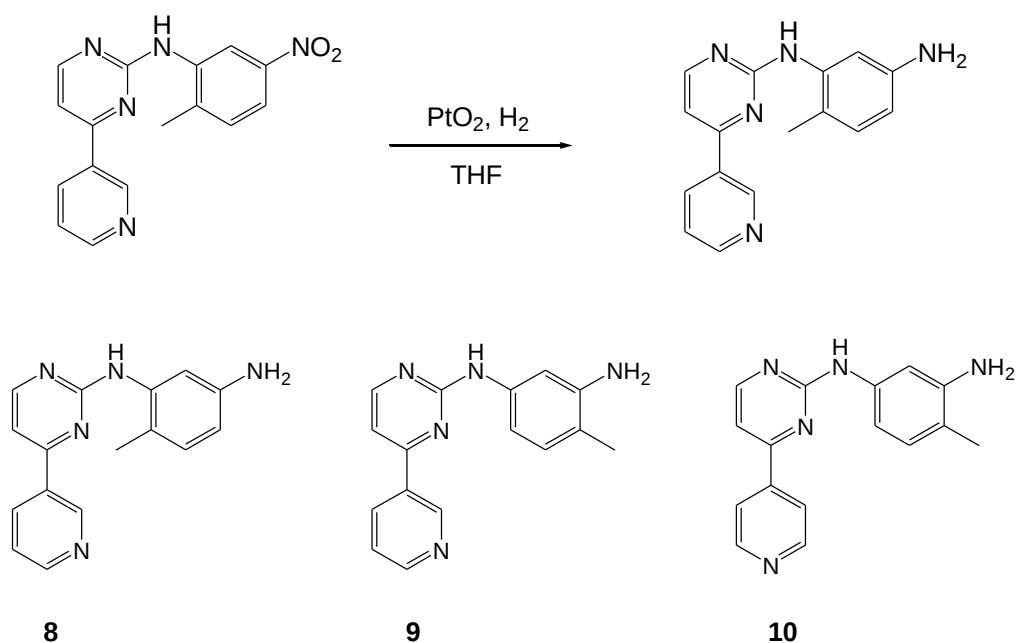
Σε ένα δεσμό υδρογόνου το άτομο του υδρογόνου μοιράζεται μεταξύ δύο ηλεκτραρνητικών ατόμων. Στα βιολογικά συστήματα τα ηλεκτραρνητικά άτομα είναι το οξυγόνο και το άζωτο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα κατέδειξαν μία ενδομοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ ενός ατόμου υδρογόνου, που συνδέεται με άνθρακα, με ένα άτομο αζώτου (Σχήμα 63). Οι δεσμοί αυτού του τύπου αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ως ψευδο-δεσμό υδρογόνου (Blue-Shifting Hydrogen Bonding). Δεσμοί αυτού του τύπου αν και πρωτοπαρατηρήθηκαν πριν από 40 χρόνια περίπου (1960-1970), μόλις στα μέσα της δεκαετίας 1990 έγιναν αποδεκτοί και με θεωρητικά αποτελέσματα.<sup>87</sup>



**Σχήμα 63:** Ψευδο-δεσμοί υδρογόνου των πρωτονίων της ένωσης 5

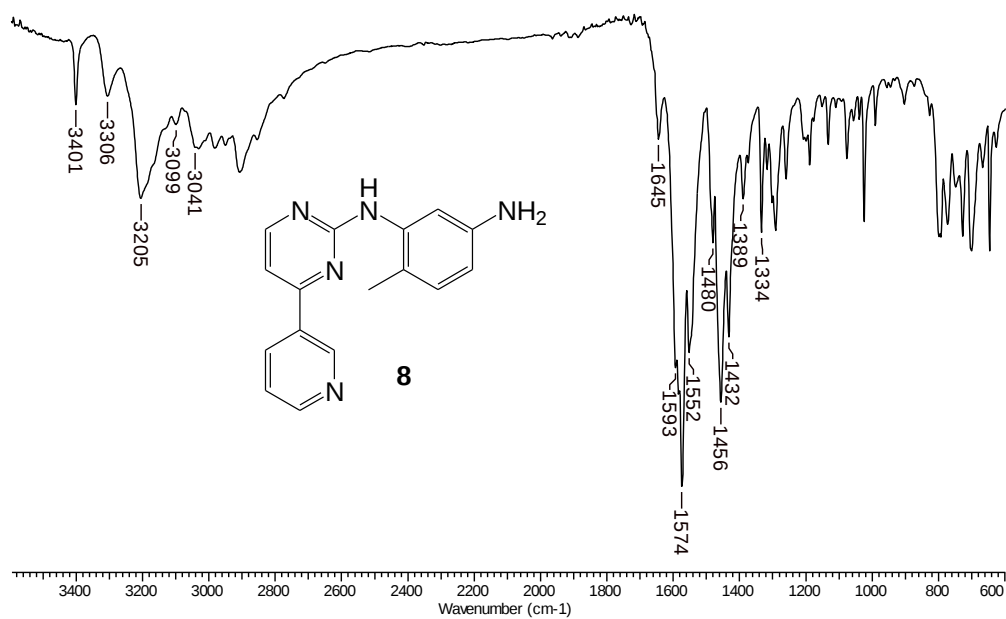
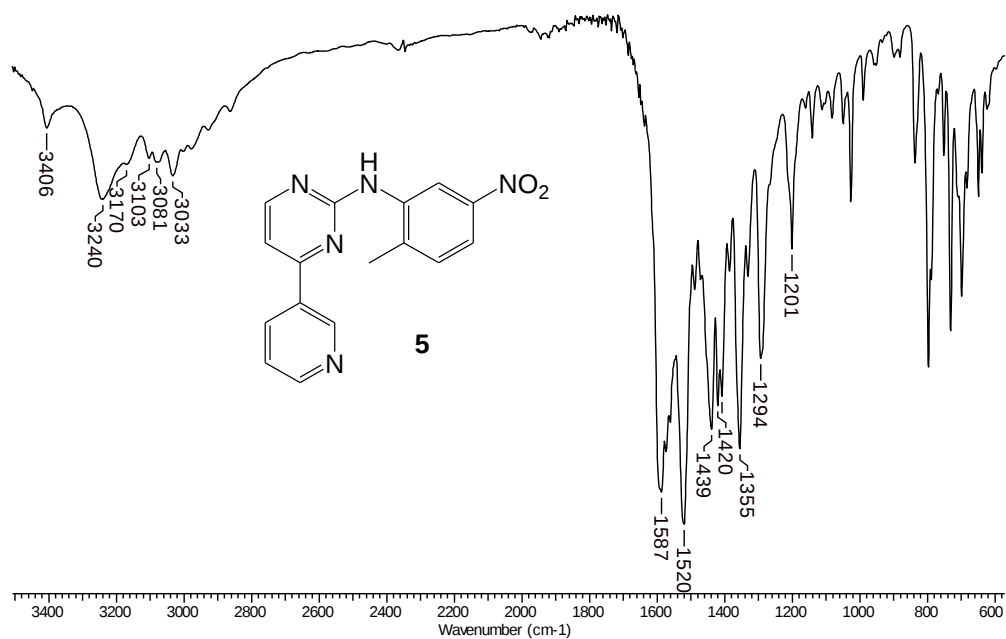
### 3.7 Αναγωγή της νιτροομάδας με υδρογόνωση παρουσία καταλύτη

Μετά την αντίδραση της κυκλοποίησης και την απομόνωση καθαρών προϊόντων υποκατεστημένων φαινυλοαμινοπυριμιδινών, ακολούθησε η αναγωγή της νιτροομάδας σε αμινομάδα, έτσι ώστε στο επόμενο βήμα να σχηματιστεί ο πρώτος αμιδικός δεσμός. Η αντίδραση αναγωγής με καταλύτη  $\text{PtO}_2$  και αέριο υδρογόνο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ήταν η αποδοτικότερη αντίδραση, με προϊόντα τα οποία παραλαμβάνουμε καθαρά μετά από απλή διήθηση του καταλύτη και εξάτμιση του διαλύτη της αντίδρασης (Σχήμα 64). Δεδομένου ότι τα προϊόντα ήταν αρκετά ευοξείδωτα, η αντίδραση εισαγωγής, μέσω του σχηματισμού ενός αμιδικού δεσμού, του τελικού βενζολικού δακτυλίου γίνονταν πρακτικά αμέσως μετά την αναγωγή της νιτροομάδας σε αμινομάδα.



**Σχήμα 64:** Αντίδραση και προϊόντα αναγωγής

Η μετατροπή μίας νιτροομάδας σε αμινομάδα γίνεται εμφανής κατά τη σύγκριση δύο φασμάτων IR. Αναμένεται η εμφάνιση νέων κορυφών στα 3500-3300  $\text{cm}^{-1}$  εξαιτίας των δονήσεων τάσεως της αμινομάδας και κατ' επέκταση η εξαφάνιση των δύο κορυφών στα  $\sim 1560$  και  $\sim 1350$   $\text{cm}^{-1}$ , που οφείλονται στη νιτροομάδα. Στα φάσματα των ενώσεων φαινυλαμινοπυριμιδίνης **5** (πάνω) και αμίνης **8** (κάτω) παρατηρείται η εμφάνιση μίας νέας κορυφής στα 3306  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ εξαφανίζονται οι κορυφές στα 1520 και στα 1355  $\text{cm}^{-1}$  που οφείλονται στη δόνηση τάσης της νιτροομάδας (Σχήμα 65).

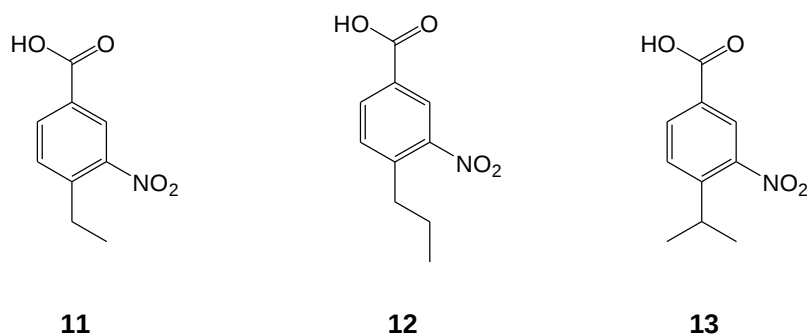


**Σχήμα 65:** Φάσματα IR της φαινυλαμινοπυριμιδίνης **5** (πάνω) και της αμίνης **8** (κάτω).

### 3.8 Νίτρωση αλκυλο-βενζοϊκών οξέων

Πριν ολοκληρωθεί η σύνθεση των τελικών προϊόντων με το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού μεταξύ της πρωτοταγούς αμίνης και του βενζοϋλοχλωριδίου, παρασκευάστηκαν συγκεκριμένα τριυποκατεστημένα βενζοϊκά οξέα. Επειδή κάποιοι αναστολείς, ενώ έδειξαν άκρως ικανοποιητική ανασταλτική δράση σε *in vitro* βιολογικά πειράματα, είχαν πιθανόν περιορισμένη κυτταρική διαπερατότητα, έγινε προσθήκη κάποιων λιπόφιλων ομάδων, με την αντικατάσταση μιας νιτροομάδας με μία λιπόφιλη ομάδα. Θεωρήθηκε ότι έτσι θα μπορούσε να αυξηθεί η κυτταρική διαπερατότητα.

Κατά τον αρχικό σχεδιασμό των νέων εν δυνάμει αναστολέων η ιδέα που επικράτησε ήταν η εισαγωγή αλογόνων, καθώς και μεθυλο-ομάδων διατηρώντας τη μια νιτροομάδα. Στην προσπάθεια να μειώσουμε την πολικότητα του συνολικού μορίου, σχεδιάσαμε στον τελευταίο δακτύλιο την εισαγωγή λιπόφιλων ομάδων, όπως αιθυλο-, προπυλο- και *i*-προπυλο-ομάδων. Τα νέα υποκατεστημένα βενζοϋλοχλωρίδια απεικονίζονται στο Σχήμα 66.



**Σχήμα 66:** Υποκαταστάτες για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού

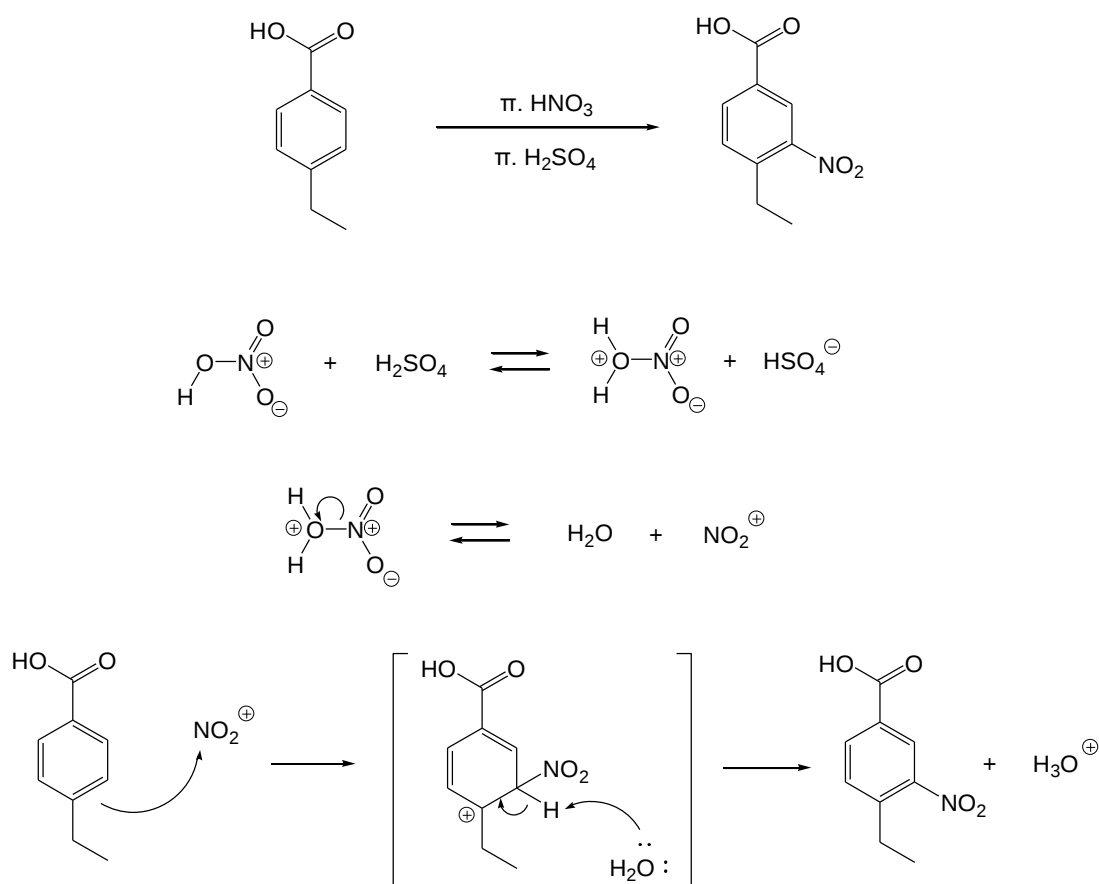
Για το σχηματισμό των υποκαταστατών οι δύο πιο απλές συνθετικές πορείες είναι :

(α) Αλκυλίωση Friedel-Crafts σε αρωματικούς δακτυλίους

(β) Νίτρωση αρωματικών δακτυλίων με πυκνό νιτρικό και θειικό οξύ

Η αντίδραση Friedel-Crafts πραγματοποιείται εύκολα σε υποκατεστημένα βενζόλια, με υποκαταστάτες που ενεργοποιούν τη ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Στην περίπτωση μας θα έπρεπε να γίνει η Friedel-Crafts σε υποκατεστημένα βενζόλια με δύο ομάδες απενεργοποιητές, όπως η νιτροομάδα και καρβοξυλομάδα.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε νίτρωση στα αντίστοιχα αλκυλο-βενζοϊκά οξέα. Με βάση τους δύο υποκαταστάτες που προϋπήρχαν στην ένωση η νιτροομάδα κατευθυνόταν σε *ο*-θέση ως προς την αλκυλο-ομάδα και *μ*-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε χωρίς τη χρήση διαλύτη, με απευθείας προσθήκη του στερεού υποκατεστημένου βενζοϊκού οξέος σε μίγμα πυκνών οξέων στους  $-10^{\circ}\text{C}$  (αντίδραση δύο φάσεων). Η αντίδραση και ο μηχανισμός της φαίνονται στο Σχήμα 67.



**Σχήμα 67:** Αντίδραση και μηχανισμός νίτρωσης αλκυλο-βενζοϊκών οξέων

Η προσθήκη του υποκατεστημένου βενζοϊκού οξέος πραγματοποιείται αρχικά στους  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  για την αποφυγή τετραϋποκατεστημένων προϊόντων. Μετά την προσθήκη, η αντίδραση συνεχίστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 78 ώρες περίπου. Με τις ως άνω συνθήκες είχαμε τις καλύτερες δυνατές αποδόσεις.

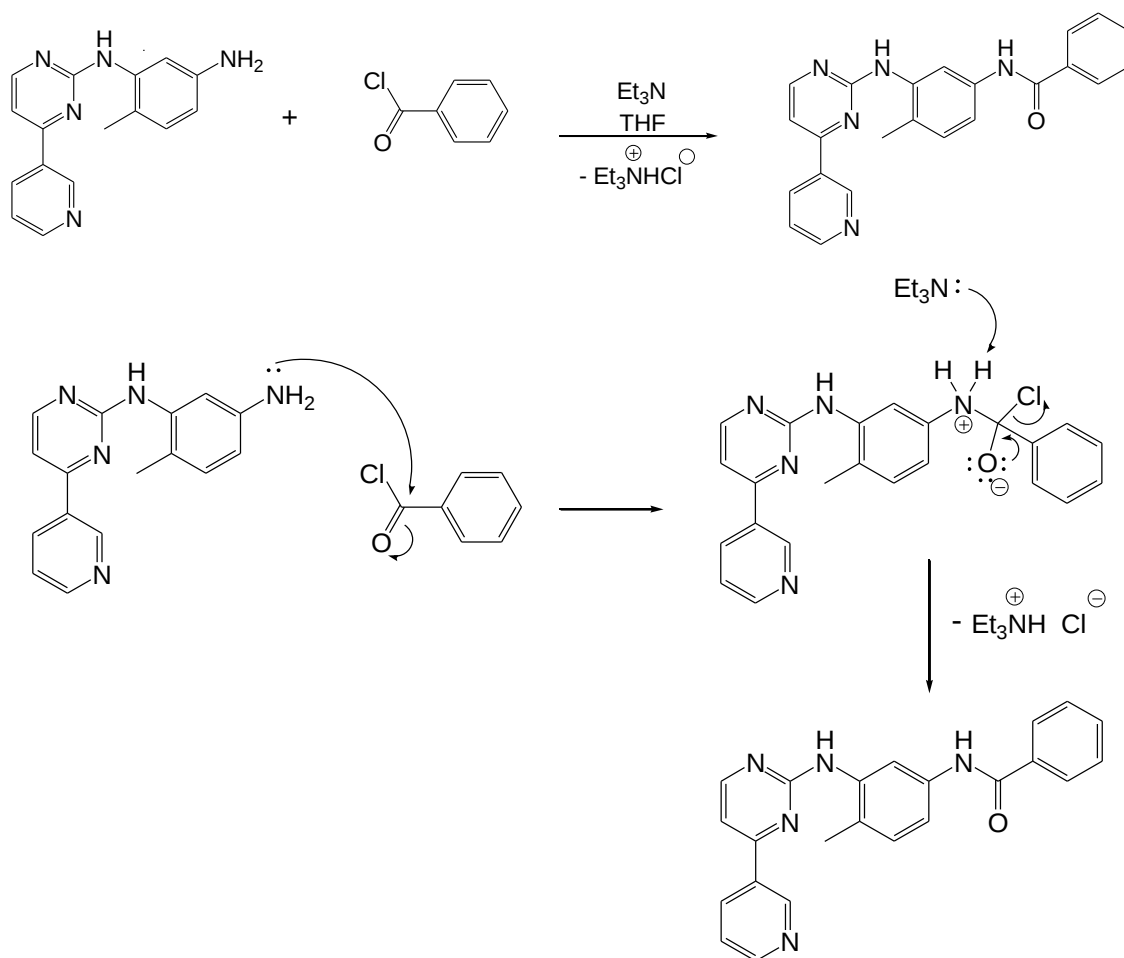
### 3.9 Σχηματισμός αμιδικού δεσμού

Ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού μεταξύ των πρωτοταγών αμινών και των υποκατεστημένων βενζοϋλοχλωριδίων πραγματοποιείται παρουσία βάσης. Η παρουσία μιας βάσης διευκολύνει την απομάκρυνση του ενός πρωτονίου της πρωτοταγούς αμίνης, έτσι ώστε να σχηματιστεί ο αμιδικός δεσμός. Στην παρούσα αντίδραση είναι άμεσα αντιληπτό ότι απαιτείται η χρήση μιας μη πυρηνόφιλης βάσης, η οποία δε θα αντιδρά με το βενζοϋλοχλωρίδιο παρεμποδίζοντας την πραγματοποίηση του αμιδικού δεσμού. Αυτό το ρόλο έχει η χρήση  $\text{Et}_3\text{N}$ .

Το δεύτερο κρίσιμο σημείο για την ολοκλήρωση του σχηματισμού αμιδικού δεσμού, μετά την επιλογή της βάσης, είναι η αποφυγή υδρόλυσης του βενζοϋλοχλωριδίου. Τα βενζοϋλοχλωρίδια, τα οποία παράγονται με την επίδραση θειονυλοχλωριδίου στα αντίστοιχα οξέα τους, υδρολύονται άμεσα ακόμη και όταν έρθουν σε επαφή με την υγρασία της ατμόσφαιρας. Για το λόγο αυτό η παρασκευή και χρήση των βενζοϋλοχλωριδίων ολοκληρώνεται με χρήση άνυδρων διαλυτών και άνυδρων συνθηκών αντίδρασης, λίγο πριν τη χρήση τους.

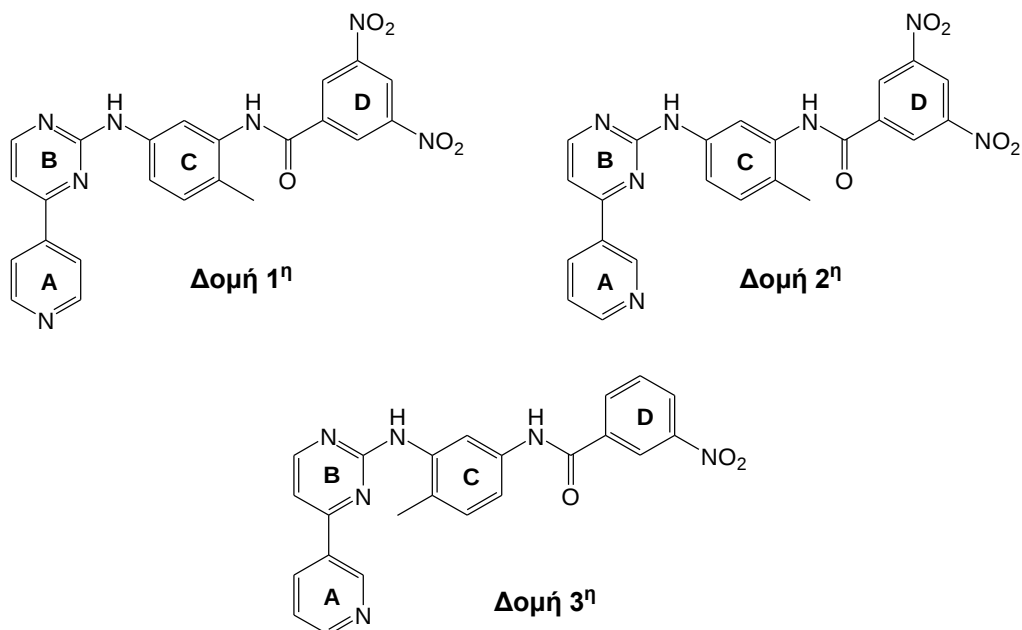
Κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης διαπιστώθηκε ότι περίσσεια βενζοϋλοχλωριδίου οδηγούσε σε διυποκατεστημένα προϊόντα, καθώς αντιδρούσε και η δευτεροταγής αμίνη. Για να αποφευχθούν τα παραπροϊόντα διυποκατάστασης, (λόγω της δευτεροταγούς αμινομάδας) το βενζοϋλοχλωρίδιο προστίθεται στάγδην διαλυμένο στο διαλύτη της αντίδρασης και σε αναλογία 1:1.1.

Οι αποδόσεις  $>60\%$  ήταν ικανοποιητικές σε όλες τις αντιδράσεις. Πέρα από τις καλές αποδόσεις, η αντίδραση ολοκληρώνεται τις περισσότερες φορές μέσα σε λίγα λεπτά, ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες ( $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Οι συνθήκες της αντίδρασης και ο μηχανισμός της παρατίθενται στο *Σχήμα 68*.



**Σχήμα 68:** Αντίδραση και μηχανισμός σχηματισμού αμιδικού δεσμού

Με την ως άνω διαδικασία συντέθηκαν, απομονώθηκαν, καθαρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν πλήρως 48 προϊόντα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, ο σχεδιασμός των τελικών προϊόντων στηρίχθηκε σε τρεις συγκεκριμένες μοριακές δομές (lead compounds) (Σχήμα 69). Η ολοκλήρωση των 48 προϊόντων βασίστηκε στη διατήρηση των τριών δακτυλίων **A**, **B** και **C** και στην τροποποίηση του τελευταίου δακτυλίου **D** με απομάκρυνση ή και εισαγωγή υποκαταστατών.

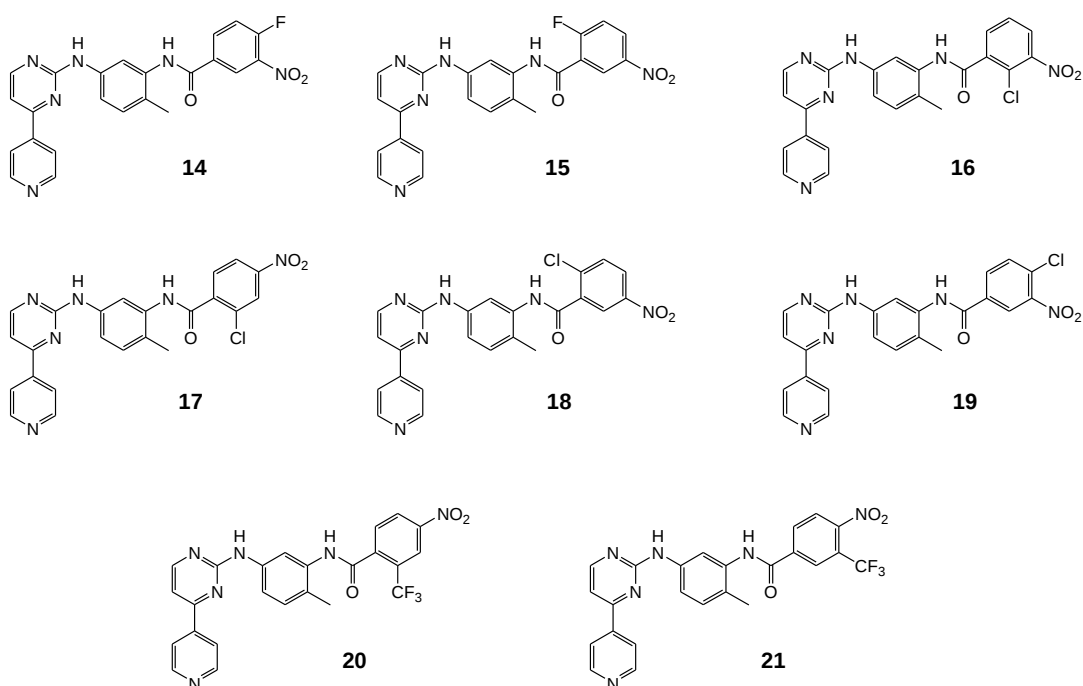
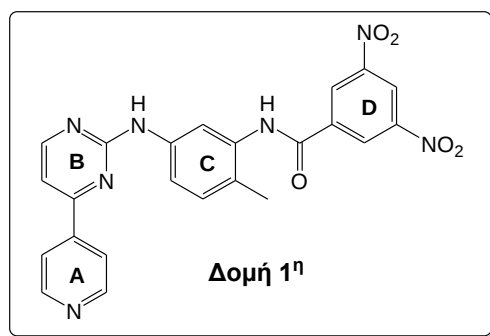


**Σχήμα 69:** Οι τρεις δομές στις οποίες πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στο δακτύλιο **D** για την τελική διαμόρφωση των προϊόντων

Για την ευκολότερη παρακολούθηση τόσο των δομικών αλλαγών, καθώς απαιτείται αρκετή προσοχή για τις μικρές δομικές διαφοροποιήσεις, όσο και των βιολογικών αποτελεσμάτων, τα τελικά προϊόντα έχουν ταξινομηθεί σε τρεις ομάδες, βάσει των ως άνω τριών δομών (Σχήμα 69).

Στην πρώτη ομάδα με βάση τη **Δομή 1**, αντικαταστάθηκε μια εκ των δύο νιτροομάδων του δακτυλίου **D** από τους υποκαταστάτες φθορο-, χλωρο- και τριφθορομεθυλο (Σχήμα 70).

## ΠΡΩΤΗ ΟΜΑΔΑ

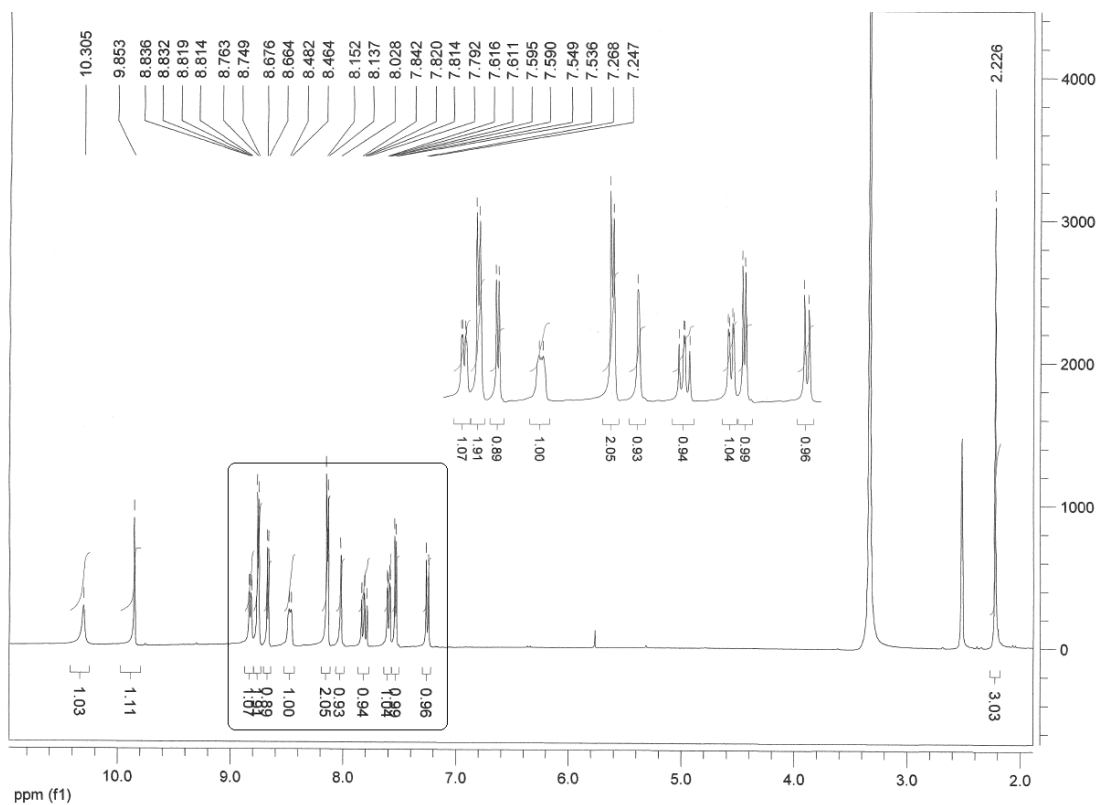


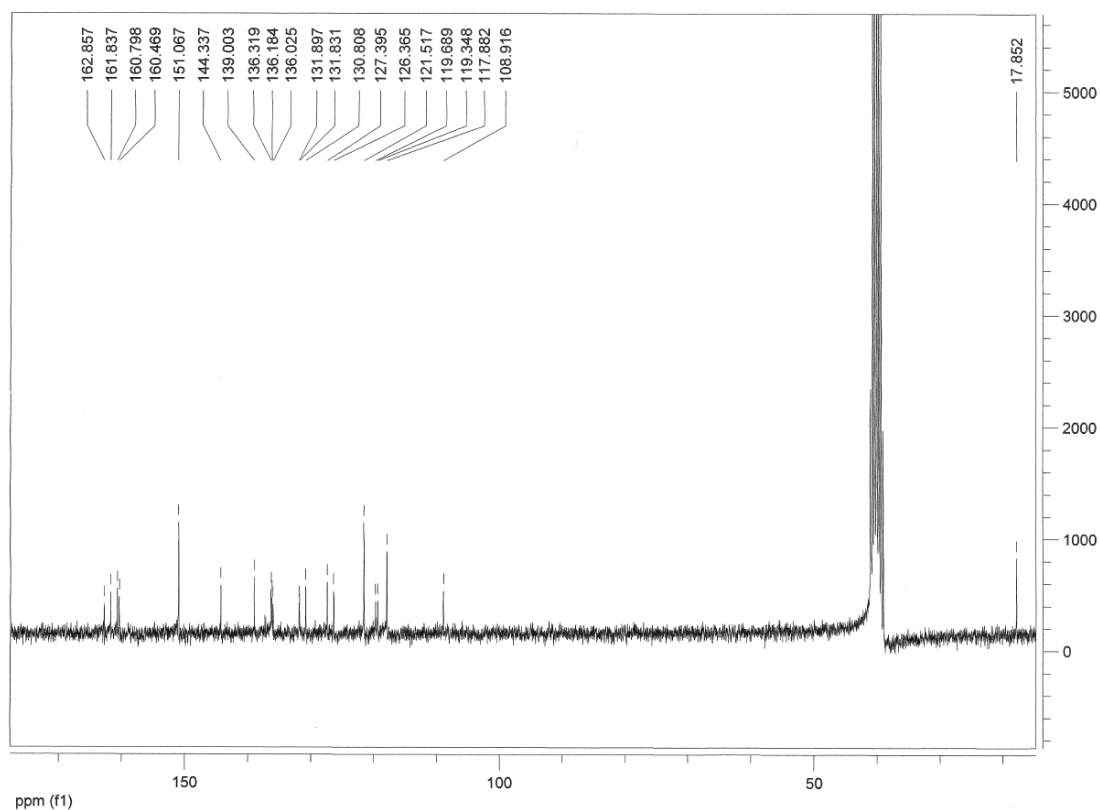
**Σχήμα 70:** Τελικά προϊόντα με βάση διαφοροποιήσεις στη **Δομή 1**

Όλα τα φασματοσκοπικά δεδομένα των τελικών προϊόντων της πρώτης ομάδας καθώς και των δύο επόμενων παρατίθενται στο παράρτημα της διατριβής. Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των τελικών προϊόντων είναι αδύνατο να σχολιαστούν τα φασματοσκοπικά δεδομένα τους. Για αυτό το λόγο έγινε δειγματοληπτική επιλογή κάποιων εξ αυτών.

Στο φάσμα πρωτονίου (Σχήμα 71) της ένωσης **14** που ακολουθεί, οι πρώτες δύο κορυφές ασθενούς πεδίου αναφέρονται στα πρωτόνια του αμιδικού δεσμού 10.30 ppm (bs, 1H) ppm και της δευτεροταγούς αμίνης 9.85 ppm (bs, 1H).

Διακρίνονται καθαρά οι δύο διπλές κορυφές που περιέχουν τα χημικώς ισοδύναμα πρωτόνια του πυριδινικού δακτυλίου στα 8.14 ppm (d,  $J = 6.00$  Hz, 2H) και στα 8.75 ppm (d,  $J = 6.00$  Hz, 2H). Τέλος, η μεθυλομάδα εμφανίζει μία απλή κορυφή στα 2.23 ppm (s, 3H). Στο Σχήμα 71 που ακολουθεί φαίνεται το φάσμα άνθρακα της ένωσης **14**.

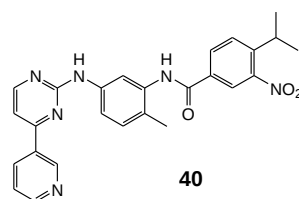
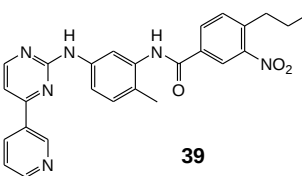
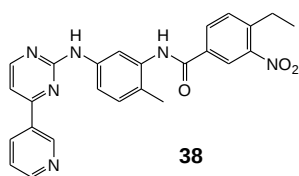
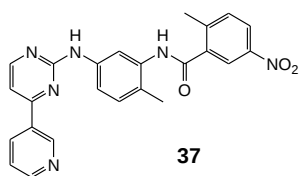
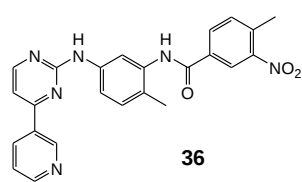
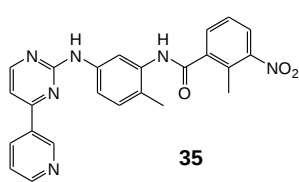
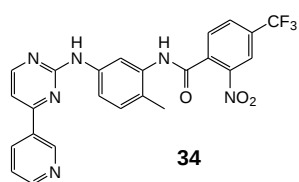
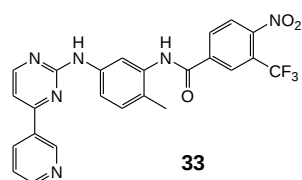
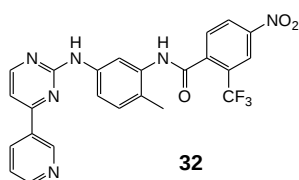
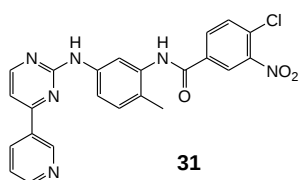
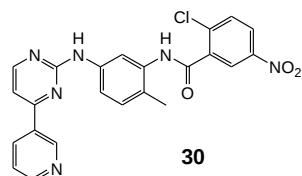
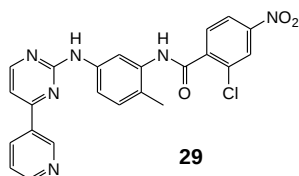
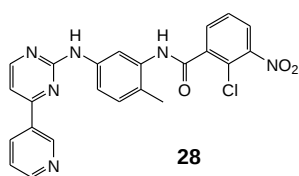
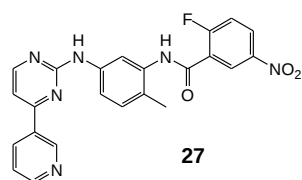
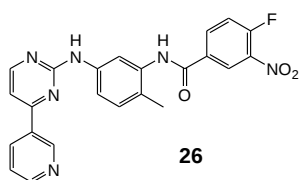
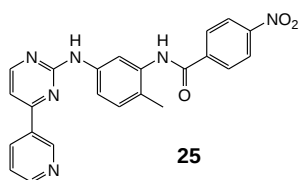
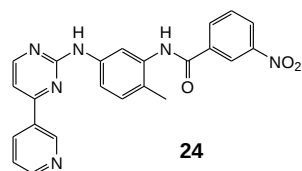
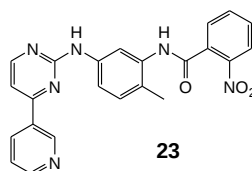
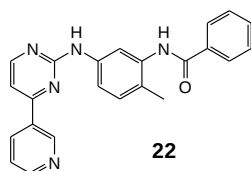
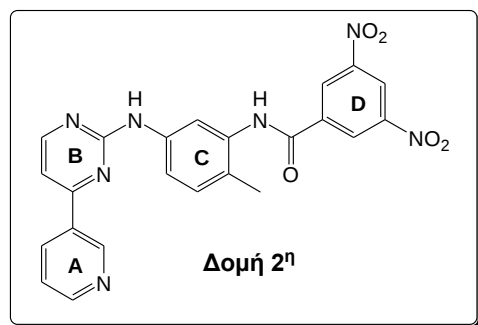




**Σχήμα 71:** Φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR και  $^{13}\text{C}$ -NMR της ένωσης **14**

Στην δεύτερη ομάδα με βάση τη **Δομή 2**, απομακρύνθηκε η μια ή και οι δύο νιτροομάδες σε μία περίπτωση από τον δακτύλιο **D** και αντικαταστάθηκαν είτε από τους υποκαταστάτες φθορο-, χλωρο- και τριφθορομεθυλο- είτε από τους υποκαταστάτες μεθυλο-, αιθυλο-, προπυλο- και *i*-προπυλο (Σχήμα 72).

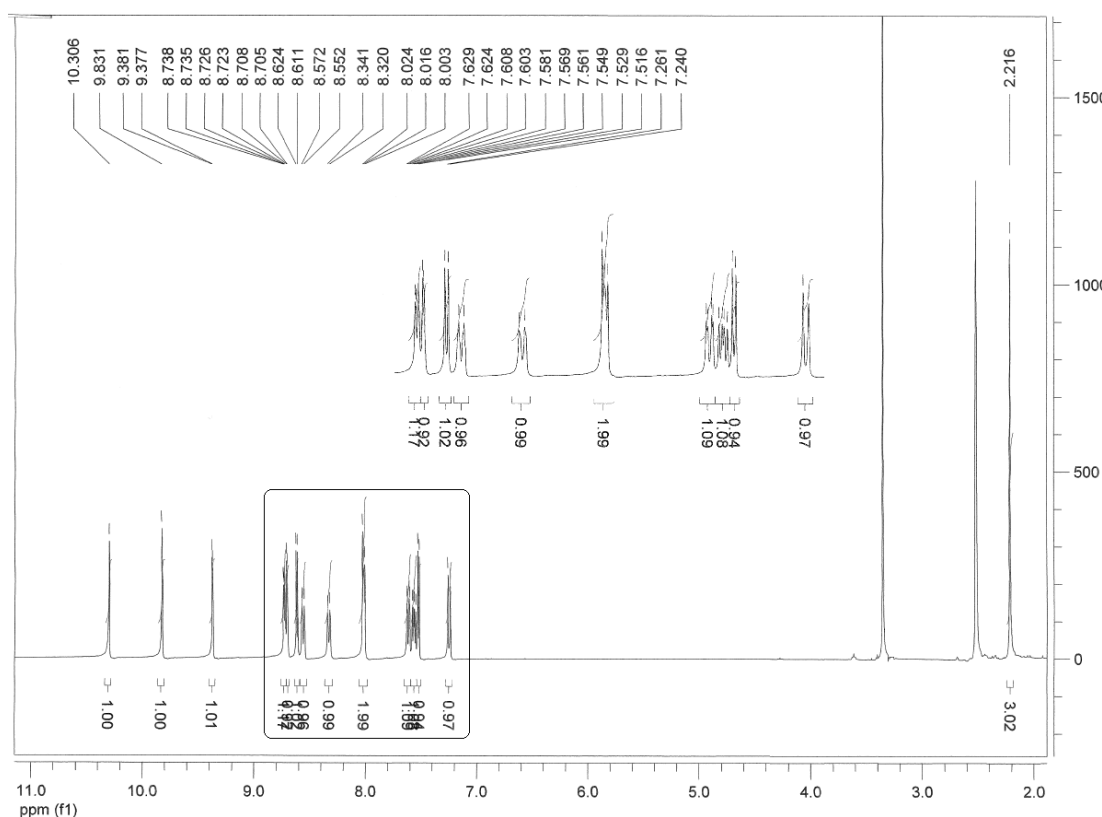
#### **ΔΕΥΤΕΡΗ ΟΜΑΔΑ**



**Σχήμα 72:** Τελικά προϊόντα με βάση διαφοροποιήσεις στη **Δομή 2**

Ενδεικτικά από τη δεύτερη ομάδα παρατίθενται τα φάσματα πρωτονίου καθώς και το φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας της ένωσης **31**.

Σε προηγούμενη παράγραφο έχει αναφερθεί ο δεσμός υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ του πρωτονίου, που βρίσκεται σε γειτονική θέση (2-θέση) σχετικά με τον πυριδινικό δακτύλιο, και του ενός αζώτου του διπλανού πυριμιδινικού δακτυλίου. Εκτός της εκδήλωσης του επαγωγικού και του φαινομένου συντονισμού από το άζωτο του πυριδινικού δακτυλίου, ο εν λόγω δεσμός αποπροστατεύει επιπρόσθετα το πρωτόνιο, το οποίο συντονίζεται σε μεγαλύτερες τιμές ppm. Το παραπάνω φαινόμενο παρατηρείται και στα τελικά προϊόντα. Στην ένωση **31** το πρωτόνιο εμφανίζεται στα 9.38 ppm (d,  $J = 2.00$  Hz, 1H), αλλά και το πρωτόνιο που βρίσκεται σε 6-θέση στον ίδιο δακτύλιο εμφανίζεται στα 8.72 ppm (dd,  $J = 1.25, 4.75$  Hz, 1H) εξαιτίας του ίδιου φαινομένου (Σχήμα 73).



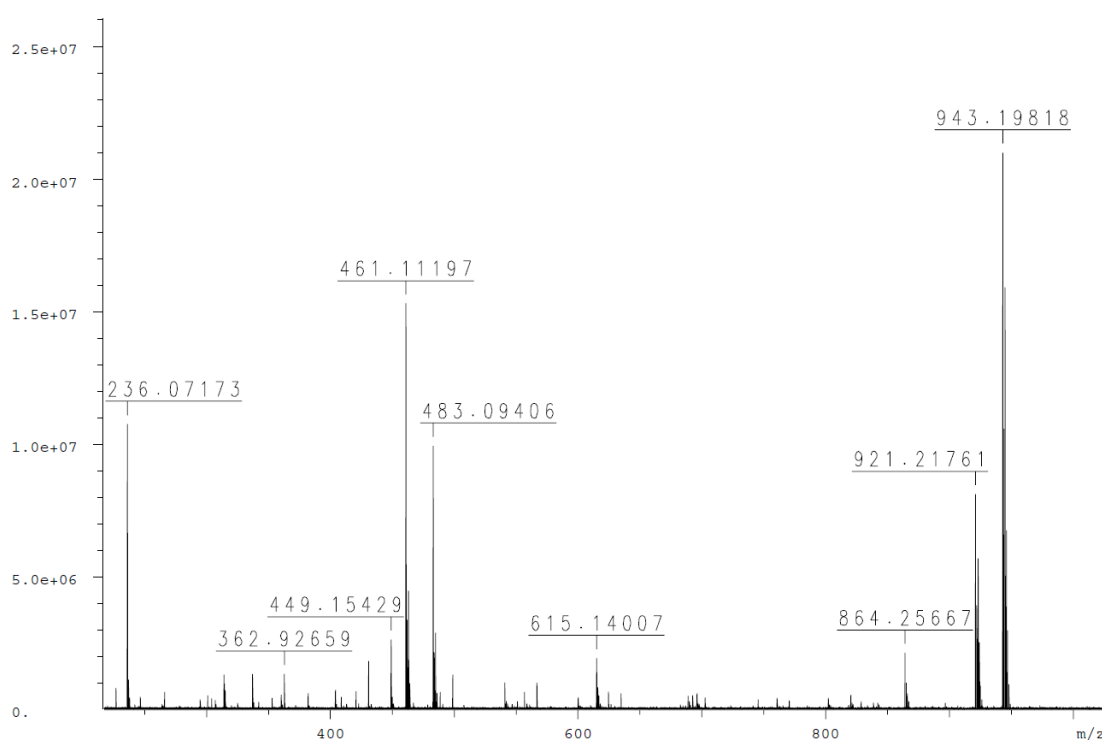
**Σχήμα 73:** Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  της ένωσης **31**

Στο φάσμα μάζας της ένωσης **31** που ακολουθεί εμφανίζεται το μοριακό ιόν  $[M+H]^+$ : 461.11197, με θεωρητική τιμή  $[M+H]^+$ : 461.11289 (Σχήμα 74). Διαπιστώνεται εύκολα ότι η διαφορά μεταξύ της θεωρητικής και της πραγματικής τιμής είναι στο τρίτο δεκαδικό ψηφίο. Επίσης, χαρακτηριστικές κορυφές είναι:

$[M+Na]^+$ : 483.09406

$[2M+H]^+$ : 921.21761

$[2M+Na]^+$ : 943.19818



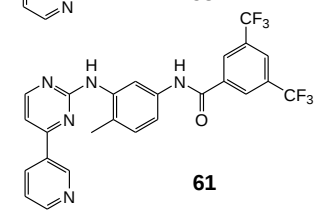
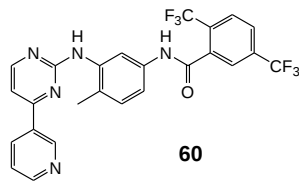
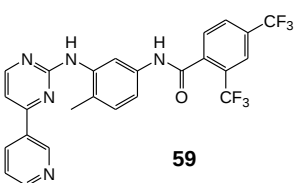
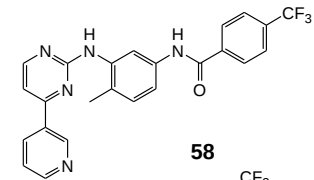
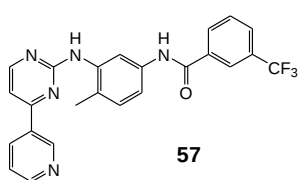
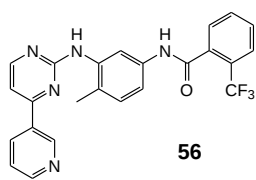
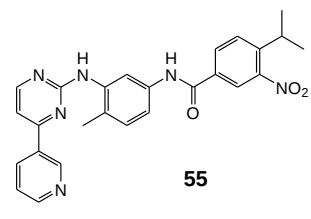
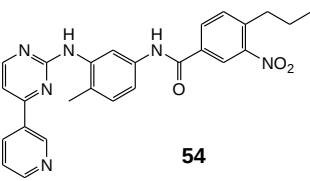
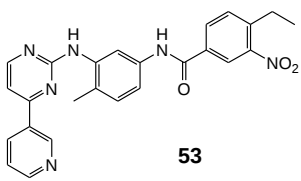
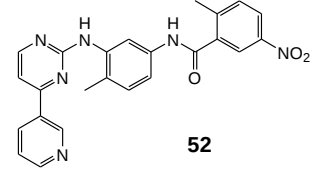
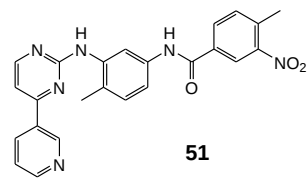
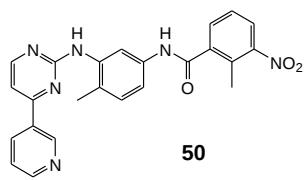
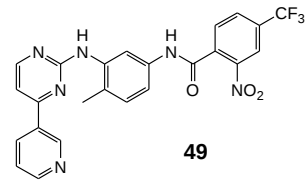
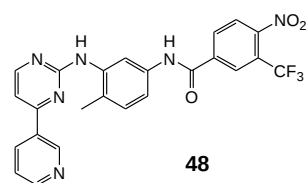
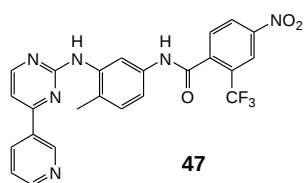
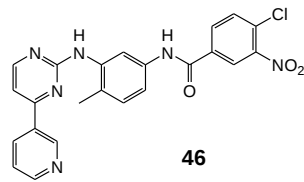
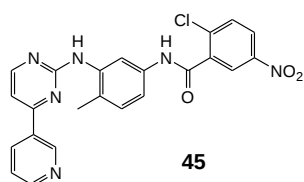
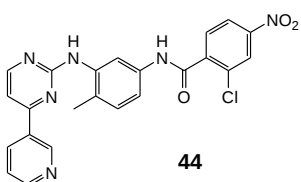
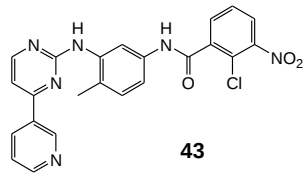
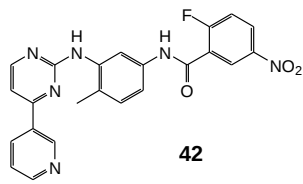
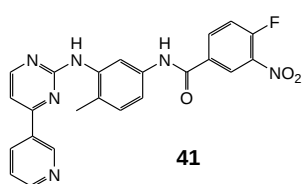
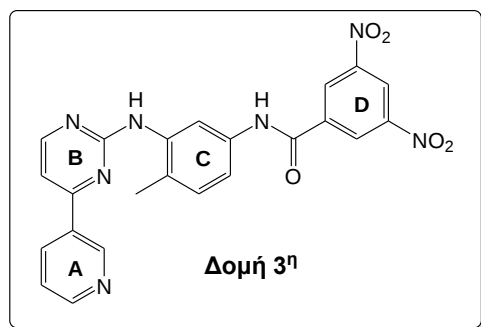
**Σχήμα 74:** Φάσμα μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) με τη μέθοδο ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) της ένωσης **31**

Στην τρίτη ομάδα με βάση τη **Δομή 3**, αντικαταστάθηκε η μια ή και οι δύο νιτροομάδες του δακτύλιου **D** με τους υποκαταστάτες φθορο-, χλωρο- και τριφθορομεθυλο, καθώς, επίσης, και με τους μεθυλο-, αιθυλο-, προπυλο- και *i*-προπυλο υποκαταστάτες (Σχήμα 75).

Τα τελικά προϊόντα της τρίτης ομάδας είναι αυτά που πλησιάζουν δομικά περισσότερο τη δομή του εκλεκτικού αναστολέα Glivec. Για το λόγο αυτό, έγινε μια προσπάθεια σύνθεσης εν δυνάμει αναστολέων, δίχως την ύπαρξη της

νιτροομάδας. Η νιτροομάδα, η οποία δεν εμφανίζεται στη δομή του αναστολέα, απομακρύνθηκε και στη θέση της έγινε προσθήκη μιας ή και δύο τριφθορομεθυλοομάδων.

### **ΤΡΙΤΗ ΟΜΑΔΑ**

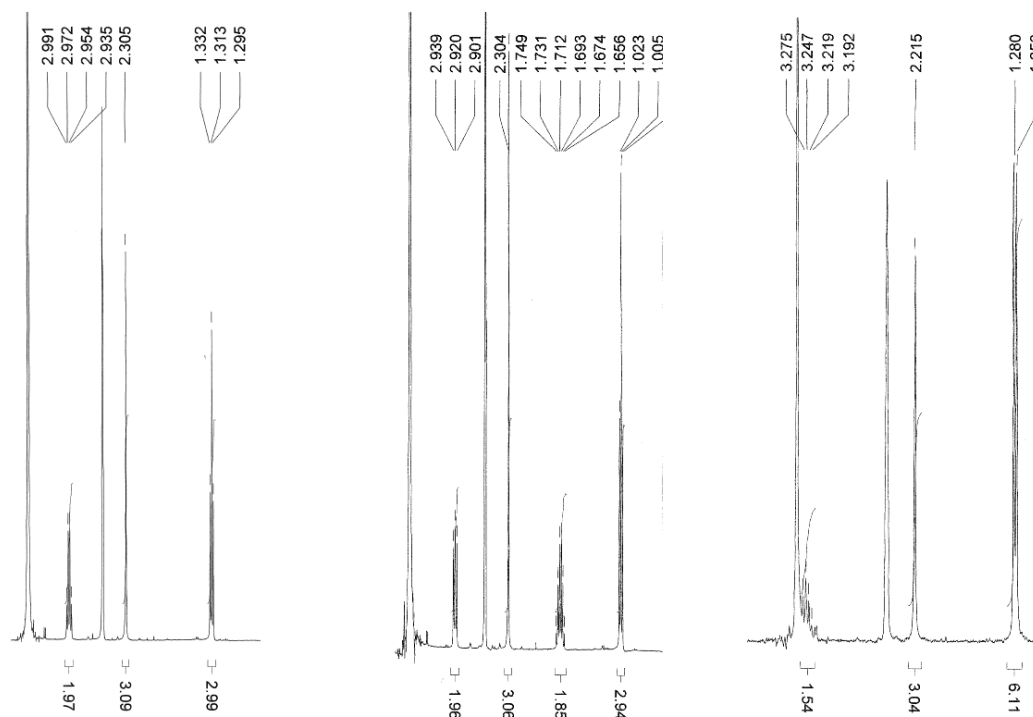


**Σχήμα 75: Τελικά προϊόντα με βάση διαφοροποιήσεις στη Δομή 3**

Σχετικά με την τρίτη ομάδα προϊόντων ακολουθούν τα φάσματα πρωτονίου των ενώσεων **53**, **54** και **55** χαρακτηριστικό των οποίων είναι οι υποκαταστάτες αιθυλο-, προπυλο- και *i*-προπυλο. Στο φάσμα της ένωσης **53** (Σχήμα 76α) σε ισχυρά πεδία εκτός από την κορυφή των πρωτονίων της μεθυλομάδας του δακτυλίου **C** στα 2.31 ppm, η οποία είναι μία απλή κορυφή, εμφανίζεται μία κορυφή στα 1.30 ppm (τριπλή κορυφή, λόγω σχάσης από τα 2 διπλανά πρωτόνια) των πρωτονίων του άνθρακα  $C^2$  της αιθυλομάδας και μία κορυφή στα 2.94 ppm (τετραπλή κορυφή, λόγω σχάσης από τα 3 διπλανά πρωτόνια) των πρωτονίων του άνθρακα  $C^1$ .

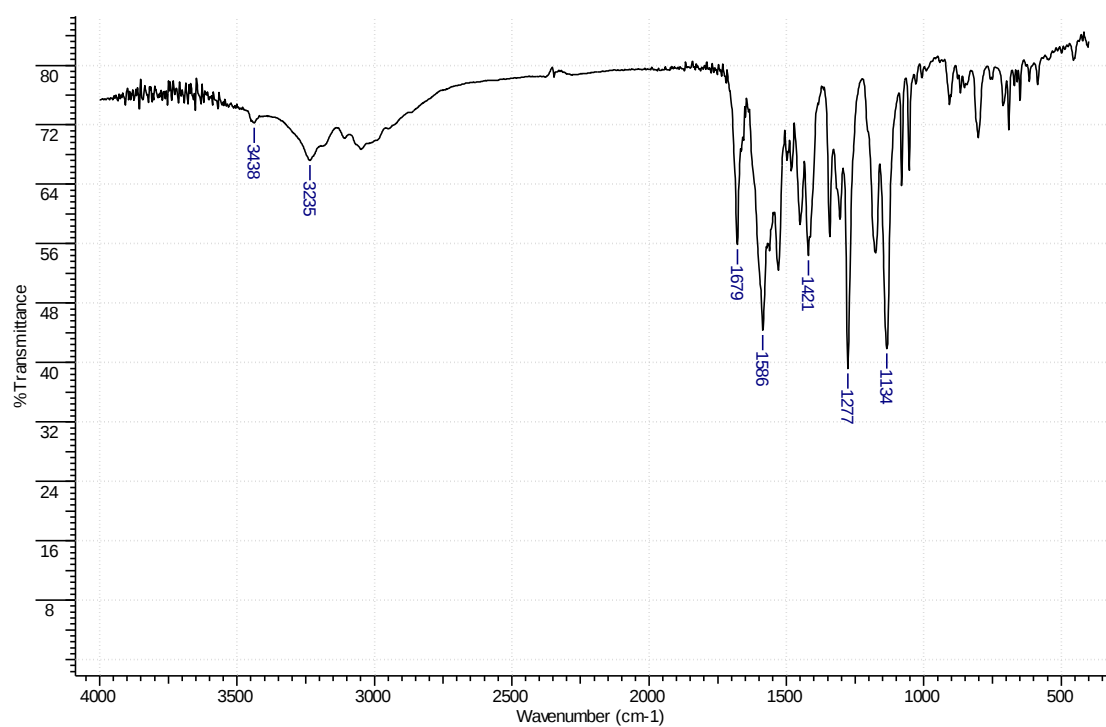
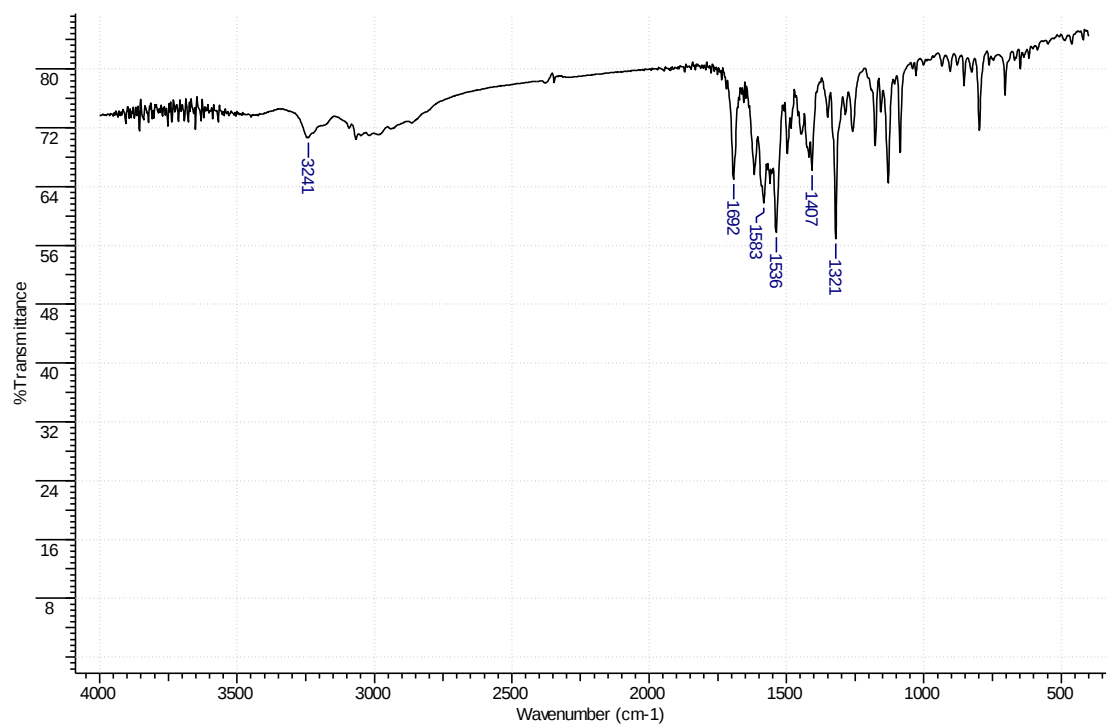
Για την ένωση **54** (Σχήμα 76β) αναμένουμε σε χαμηλές τιμές ppm την εμφάνιση μίας τριπλής κορυφής των πρωτονίων του άνθρακα  $C^3$  της προπυλομάδας, μίας εξαπλής κορυφής των δύο πρωτονίων του άνθρακα  $C^2$  και μίας ακόμη τριπλής κορυφής των δύο πρωτονίων του άνθρακα  $C^1$ . Πράγματι οι κορυφές αυτές εμφανίζονται με σειρά από ισχυρότερα σε ασθενέστερα πεδία στα 1.00 ppm (t, 3H), 1.66 ppm (m, 2H) και 2.90 ppm (t, 2H) αντίστοιχα.

Τέλος, το φάσμα πρωτονίου της ένωσης **55** (Σχήμα 76γ) εμφανίζει μία διπλή κορυφή στα 1.25 ppm (d, 6H) των έξι χημικώς ισοδύναμων πρωτονίων των ανθράκων  $C^2$  και  $C^3$ . Η κορυφή του πρωτονίου του άνθρακα  $C^1$  εμφανίζεται ως πολλαπλή στα 3.20 ppm (s, 1H). Η τελευταία κορυφή δεν διακρίνεται ευκρινέστατα λόγω του γεγονότος ότι βρίσκεται πολύ κοντά στα πρωτόνια του δευτεριωμένου διαλύτη DMSO. Στο σχήμα που ακολουθεί περιγράφονται οι τρεις ενώσεις, καθώς και μέρος των φασμάτων πρωτονίων τους, με τις αντίστοιχες κορυφές σε χαμηλές τιμές ppm.



**Σχήμα 76:** Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  α) της ένωσης **53**, β) της ένωσης **54** και γ) της ένωσης **55**

Από την τρίτη ομάδα τελικών προϊόντων, επιλέχθηκαν τα φάσματα IR των ενώσεων **49** και **59**. Στην ένωση **59** (Σχήμα 77 κάτω) εμφανίζεται ευρεία κορυφή στα  $3235\text{ cm}^{-1}$  εξαιτίας της δόνησης τάσης του δεσμού αζώτου-υδρογόνου του αμιδικού δεσμού, καθώς και η χαρακτηριστική κορυφή στα  $1679\text{ cm}^{-1}$  που οφείλεται στη καρβονυλική ομάδα. Στην ένωση **49** οι δύο παραπάνω κορυφές εμφανίζονται στα  $3241\text{ cm}^{-1}$  και  $1692\text{ cm}^{-1}$  αντίστοιχα. Η αντικατάσταση της τριμεθυλο-ομάδας, που βρίσκεται στην ο-θέση του δακτυλίου D, από μία νιτρο-ομάδα έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο νέων κορυφών στα  $1536\text{ cm}^{-1}$  και  $1321\text{ cm}^{-1}$  που οφείλεται στη δόνηση τάσης της νιτροομάδας (Σχήμα 77 πάνω).



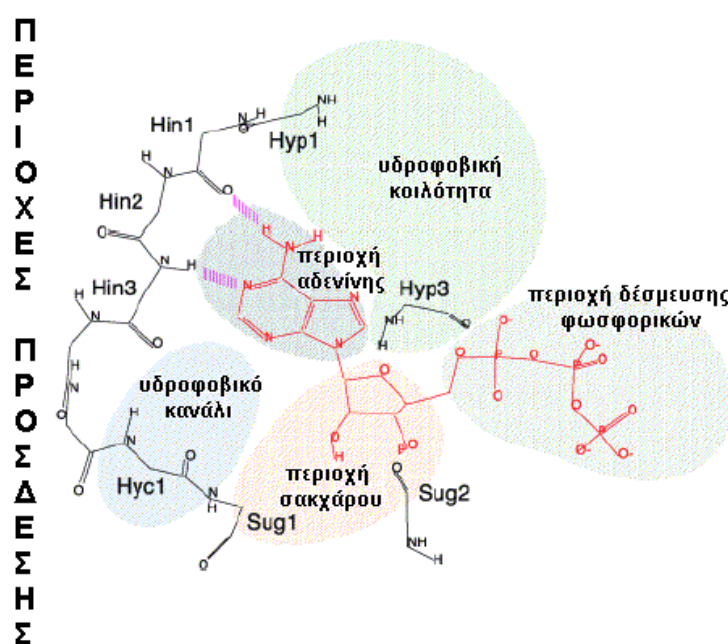
**Σχήμα 77:** Φάσματα IR των ενώσεων 49 και 59

### 3.10 Βιοχημικά και βιολογικά αποτελέσματα

#### 3.10.1 Αναστολή πρωτεϊνικών κινασών – Βασικές έννοιες – Μοντέλα

Η προσοχή όλων των ερευνητών σχετικά με την αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών επικεντρώνεται, κυρίως, στο ενεργό κέντρο πρόσδεσης του ATP. Μικρά μόρια, ως αδενινικοί μιμητές, έχουν εντοπισθεί να δεσμεύονται στο συγκεκριμένο μεσοδιάστημα της κίνησης μεταξύ των δύο λοβών και να αντικαθιστούν το μόριο ATP.

Η περιοχή συνδέσεων του ATP στις πρωτεϊνικές κινάσες δύναται να αναλυθεί στα ακόλουθα κύρια χαρακτηριστικά (Σχήμα 78):



**Σχήμα 78:** Θέση δέσμευσης του ATP στις πρωτεϊνικές κινάσες που εντοπισμός μεταξύ των N- και C-λοβών <sup>88</sup>

(1) Περιοχή αδενίνης: Τα N-1 και N-6 άτομα αζώτου του δακτυλίου της αδενίνης σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με αμιδικά -NH- και καρβονύλια της πρωτεΐνης. Για ένα δραστικό αναστολέα αυτές οι αλληλεπιδράσεις θα πρέπει να ληφθούν υπόψη.

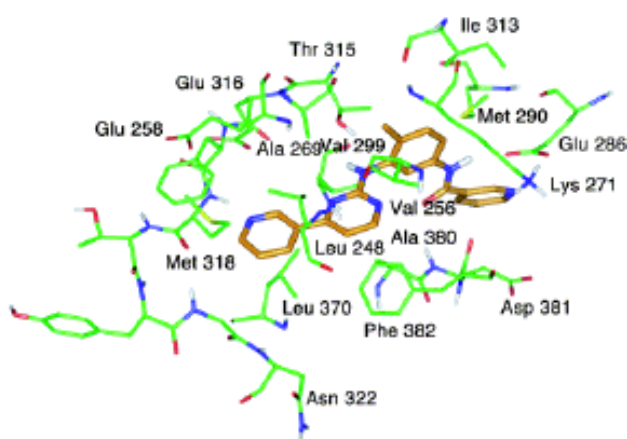
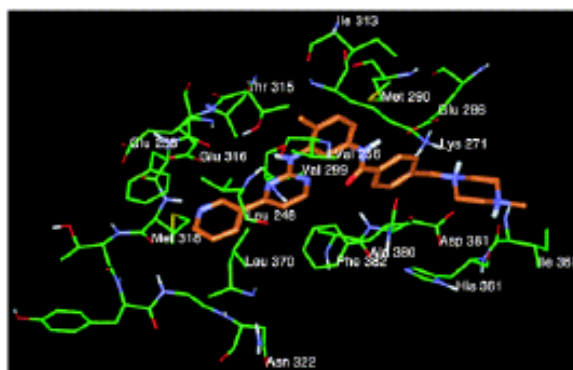
(2) Περιοχή σακχάρου: Σε αρκετές πρωτεϊνικές κινάσες αυτή η περιοχή είναι υδρόφιλη.

(3) Υδρόφοβη κοιλότητα (ή επιλεκτική θέση δέσμευσης): Η συγκεκριμένη θέση δεν χρησιμοποιείται από το ATP, αλλά αξιοποιείται από πληθώρα αναστολέων.

(4) Υδρόφοβο κανάλι: Το συγκεκριμένο κανάλι αποτελεί μια οπή που μεταφέρεται ο διαλύτης και μπορεί να αξιοποιηθεί για τη δέσμευση αναστολέα καθώς δεν χρησιμοποιείται από το ATP.

(5) Περιοχή δέσμευσης φωσφορικών: Αυτή η περιοχή είναι η λιγότερο σημαντική σε όρους συγγένειας δέσμευσης, καθώς είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη. Η τριφωσφορική ομάδα του ATP περιβάλλεται από μια θηλιά πλούσια σε γλυκίνες και δεσμεύεται από μια συστάδα βασικών αμινοξέων.

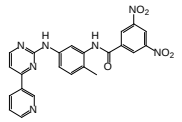
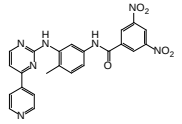
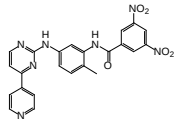
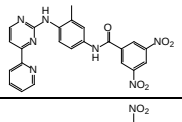
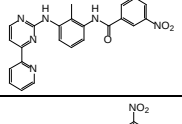
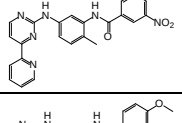
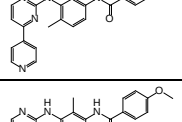
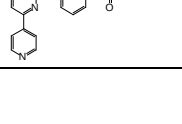
Ο εκλεκτικός αναστολέας Glivec, της πρωτεϊνικής κινάσης Bcr-Abl, ως ένας αδενινικός μιμητής, αλληλεπιδρά πολύπλευρα με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ Bcr-Abl και STI-571 αποτελούν ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου, όπως: το άζωτο της πυριδίνης με το αμιδικό πρωτόνιο της Met 318, το ανιλινικό πρωτόνιο με την παράπλευρη αλυσίδα της Thr 315, το αμιδικό πρωτόνιο με την παράπλευρη αλυσίδα του Glu 286, το αμιδικό καρβονύλιο με το αμιδικό πρωτόνιο της Ala 380, και η πρωτονιωμένη *N*-μεθυλοπιπεραζίνη με το αμιδικό καρβονύλιο της Ile 360 (Σχήμα 79). Επιπρόσθετα, ο πυριμιδινικός δακτύλιος του STI-571 εγκλωβίζεται μεταξύ των 19 υδρόφοβων αλυσίδων των Val 299 και Phe 382, ενώ η πυριδίνη περιβάλλεται από τις μη πολικές ομάδες των παράπλευρων αλυσίδων των Leu 248, Leu 370, Met 318, και Phe 317.<sup>35</sup>

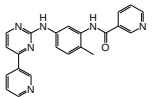
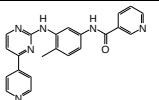
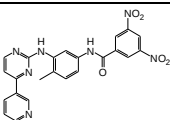
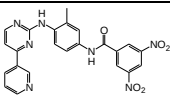
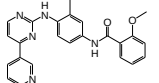
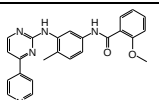
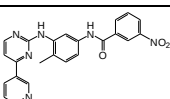
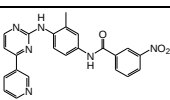
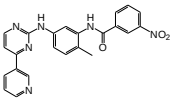


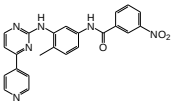
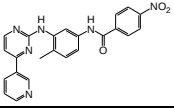
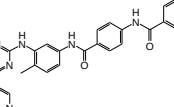
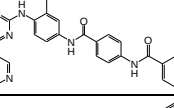
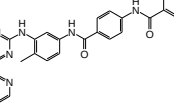
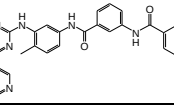
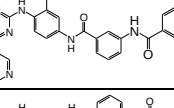
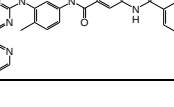
**Σχήμα 79:** Αλληλεπιδράσεις μεταξύ του STI-571 και της κινάσης Bcr-Abl.<sup>88</sup>

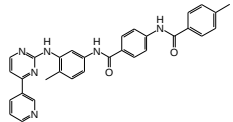
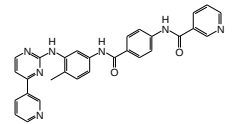
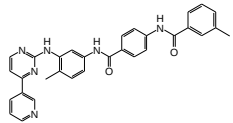
Κατά το σχεδιασμό των ενώσεών μας, ως εν δυνάμει αναστολέων των πρωτεϊνικών κινασών, έγινε προσπάθεια διατήρησης εφ' ενός των ομάδων που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, με βάση τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec, και αφ' ετέρου νέων προσθήκης ομάδων που να έχουν τη δυνατότητα, είτε να αλληλεπιδράσουν με υδροφοβικές περιοχές, είτε να σχηματίσουν νέους δεσμούς υδρογόνου καθώς και υποκαταστατών σε συγκεκριμένες θέσεις στους αρωματικούς δακτυλίους, που οδηγούν, σε αλλαγή της διαμόρφωσης των τελικών μορίων.

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας ολοκληρώθηκε η σύνθεση 28 νέων ενώσεων εν δυνάμει αναστολέων και διενεργήθηκαν βιολογικά πειράματα από τη φαρμακοβιομηχανία Novartis. Τα νέα οργανικά μόρια μελετήθηκαν ως προς τη ανασταλτική τους δράση έναντι 20 πρωτεϊνικών κινασών στόχων που εμπλέκονται σε διάφορες μορφές καρκίνου (Πίνακας 2).

|   |                                                                                     | HER-1 | KDR | Flt-3 | IGF-1R | Tek | c-src | c-Met | Ret  | JAK-2 | EphB4 | EGFR-3-K650E | Axl | FAK | c-Abl | c-Abl-T315I | PKA | CDK2/A | PKB | PDK1 | B-Raf-V599E |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----|-------|--------|-----|-------|-------|------|-------|-------|--------------|-----|-----|-------|-------------|-----|--------|-----|------|-------------|
| 1 |    | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | >10   | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | 0,50   | >10 | >10  | >10         |
| 2 |    | 3,49  | >10 | >10   | >10    | >10 | 7,92  | >10   | 4,04 | >10   | >10   | 5,03         | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | 4,90        |
| 3 |    | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | 3,48  | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | 0,014  | >10 | >10  | >10         |
| 4 |    | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | >10   | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | >10         |
| 5 |    | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | >10   | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | >10         |
| 6 |   | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | >10   | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | >10         |
| 7 |  | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | >10   | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | 2,36        |
| 8 |  | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | >10   | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | >10         |

|    |                                                                                     | HER-1 | KDR  | Flt-3 | IGF-1R | Tek | c-src | c-Met | Ret | JAK-2 | EphB4 | FGFR-3-<br>K650E | Axl | FAK  | c-Abl | c-Abl-<br>T315I | PKA | CDK2/A | PKB | PDK1 | B-Raf-<br>V599E |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|-------|--------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|------------------|-----|------|-------|-----------------|-----|--------|-----|------|-----------------|
| 9  |    | >10   | 2,24 | >10   | >10    | >10 | 2,51  | >10   | >10 | 1,66  | 4,69  | 9,54             | >10 | 2,21 | 5,40  | >10             | >10 | 2,84   | >10 | >10  | 9,97            |
| 10 |    | >10   | >10  | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 11 |    | >10   | >10  | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 12 |    | >10   | >10  | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 13 |    | >10   | >10  | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 14 |    | >10   | 4,93 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 15 |   | >10   | >10  | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | 0,37  | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | 0,038           |
| 16 |  | >10   | >10  | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 17 |  | >10   | >10  | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10  | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |

|    |                                                                                     | HER-1 | KDR | Flt-3 | IGF-1R | Tek | c-src | c-Met | Ret | JAK-2 | EphB4 | FGFR-3-<br>K650E | Axl | FAK | c-Abl | c-Abl-<br>T315I | PKA | CDK2/A | PKB | PDK1 | B-Raf-<br>V599E |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----|-------|--------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|------------------|-----|-----|-------|-----------------|-----|--------|-----|------|-----------------|
| 18 |    | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | 0,55            |
| 19 |    | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | 0,48            |
| 20 |    | 5,25  | >10 | >10   | >10    | >10 | 5,26  | 8,86  | >10 | >10   | >10   | 9,73             | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 21 |    | 5,94  | >10 | >10   | 5,18   | >10 | 7,05  | 9,88  | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 22 |    | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 23 |   | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | 0,73            |
| 24 |  | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |
| 25 |  | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10 | >10   | >10   | >10              | >10 | >10 | >10   | >10             | >10 | >10    | >10 | >10  | >10             |

|    |                                                                                   | HER-1 | KDR | Flt-3 | IGF-1R | Tek | c-src | c-Met | Ret  | JAK-2 | ErbB4 | EGFR-3-K650E | Axl | FAK | c-Abl | c-Abl-T315I | PKA | CDK2/A | PKB | PDK1 | B-Raf-V599E |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|-----|-------|--------|-----|-------|-------|------|-------|-------|--------------|-----|-----|-------|-------------|-----|--------|-----|------|-------------|
| 26 |  | 3,93  | >10 | >10   | >10    | >10 | 2,12  | 7,42  | >10  | >10   | >10   | 6,32         | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | 3,40   | >10 | >10  | >10         |
| 27 |  | >10   | >10 | >10   | >10    | >10 | >10   | >10   | >10  | >10   | >10   | >10          | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | 8,06        |
| 28 |  | 4,08  | >10 | >10   | >10    | >10 | 3,15  | 8,19  | 6,55 | >10   | >10   | 3,81         | >10 | >10 | >10   | >10         | >10 | >10    | >10 | >10  | 8,41        |

**Πίνακας 2:** Αποτελέσματα βιολογικών πειραμάτων από τη φαρμακοβιομηχανία Novartis

Αξιοποιώντας τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στους παραπάνω πίνακες, όπως προαναφέρθηκε, σχεδιάσαμε τη σύνθεση και την εκ νέου διερεύνηση της βιολογικής δράσης έναντι πρωτεϊνικών κινασών, 48 επιπλέον νέων οργανικών ενώσεων. Για τη μελέτη και την πιθανή ανασταλτική δράση αυτών των εν δυνάμει αναστολέων, το Εργαστήριό μας συνεργάστηκε με τα ερευνητικά κέντρα της Novartis (δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη ο έλεγχος), με το Βιοχημικό Εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τσιώτη στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, καθώς και με την ερευνητική ομάδα του κ. Dibb του Imperial College of London.

### **3.10.2 Ανασταλτική δράση αναστολέων έναντι των A431 κυττάρων**

Τα A431 κύτταρα είναι μία κυτταρική σειρά μοντέλο που χρησιμοποιείται στη βιοιατρική. Καθώς τα κύτταρα αυτά εκφράζουν ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα του υποδοχέα του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα (EGFR), χρησιμοποιούνται σε μελέτες καρκίνων, που σχετίζονται με την κυτταρική σηματοδοτική οδό. Είναι ένας τρόπος ελέγχου της ανασταλτικής δράσης εν δυνάμει αναστολέων, έναντι του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, που διεξάγεται σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και όχι *in vitro*.

Σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο της Κρήτης ελέγχθηκαν 22 ενώσεις ως προς την ανασταλτική τους δράση στην καρκινική κυτταρική σειρά A431. Τα αποτελέσματα των ενώσεων αυτών, εν δυνάμει αναστολέων παρατίθενται στους επόμενους πίνακες, όπου Μ.Ο. είναι ο μέσος όρος των τιμών.

| Δομή | EC50 (μM)                       | Αποτελεσματικότητα                           | Μ.Ο. EC50+/-Τ.Α(μM) |
|------|---------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|
|      | <0,5<br>0,208<br>0,597<br>0,345 | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη | 0,383+/-0,20        |
|      | 1,55<br>0,250<br>1,06<br>0,71   | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη | 0,89+/-0,55         |
|      | >24<br>>24                      | Μειωμένη<br>Μειωμένη                         | >24                 |
|      | <0,87<br>0,497<br>0,563         | Μέγιστη<br>Μέγιστη<br>Μέγιστη                | 0,53+/-0,047        |
|      | >24<br>>24                      | Μειωμένη<br>Μειωμένη                         | >24                 |

| Δομή | EC50 (μM)                                          | Αποτελεσματικότητα                                                               | Μ.Ο. EC50+/-Τ.Α(μM)        |
|------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
|      | >24<br>1,99<br>0,496<br>>24<br>>24<br>4,81<br>1,97 | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη | 2,32+/-1,80                |
|      | 2,409<br>3,98<br>1,15<br>1,25                      | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη                                     | 2,2+/-1,32                 |
|      | 2,42<br>1,77<br>2,12                               | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη                                                 | 2,10+/-0,32                |
|      | 8,58<br>0,829<br>2,78<br>1,43                      | Μειωμένη<br>Αυξημένη<br>Μειωμένη<br>Αυξημένη                                     | 1,58+/-1,05<br>3,33+/-3,60 |
|      | 0,70<br>1,43<br>0,71                               | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη                                                 | 0,95+/-0,42                |

| Δομή | EC50 (μM)                    | Αποτελεσματικότητα                           | Μ.Ο. EC50+/-Τ.Α(μM) |
|------|------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|
|      | 2,48<br>2,70<br>3,17<br>2,99 | Μέγιστη<br>Μέγιστη<br>Μέγιστη<br>Μέγιστη     | 2,84+/-0,31         |
|      | 4,99<br>4,80                 | Αυξημένη<br>Αυξημένη                         | 4,90+/-0,13         |
|      | 6,38<br>1,94<br>2,65<br>2,28 | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη | 2,29+/-0,36         |
|      | 0,35<br>0,365                | Μέγιστη<br>Μέγιστη                           | 0,36+/-0,01         |
|      | 1,11<br>1,18                 | Μέγιστη<br>Μέγιστη                           | 1,14+/-0,05         |
|      | 2,1<br>2,02<br>2,04          | Μέγιστη<br>Μέγιστη<br>Μέγιστη                | 2,05+/-0,04         |

| Δομή | EC50 (μM)            | Αποτελεσματικότητα               | Μ.Ο. EC50+/-Τ.Α(μM) |
|------|----------------------|----------------------------------|---------------------|
|      | 3,71<br>3,34         | Μειωμένη<br>Μειωμένη             | 3,52+/-0,26         |
|      | 2,18<br>1,77         | Μειωμένη<br>Μειωμένη             | 1,98+/-0,29         |
|      | 2,86<br>2,59         | Αυξημένη<br>Αυξημένη             | 2,72+/-0,19         |
|      | 3,26<br>2,10         | Μειωμένη<br>Μειωμένη             | 2,68+/-0,82         |
|      | 1,19<br>1,07         | Αυξημένη<br>Αυξημένη             | 1,13+/-0,085        |
|      | 2,03<br>2,68<br>1,23 | Μειωμένη<br>Μειωμένη<br>Μειωμένη | 1,98+/-0,73         |

**Πίνακας 3:** Αποτελέσματα βιολογικών πειραμάτων έναντι των A431 κυττάρων

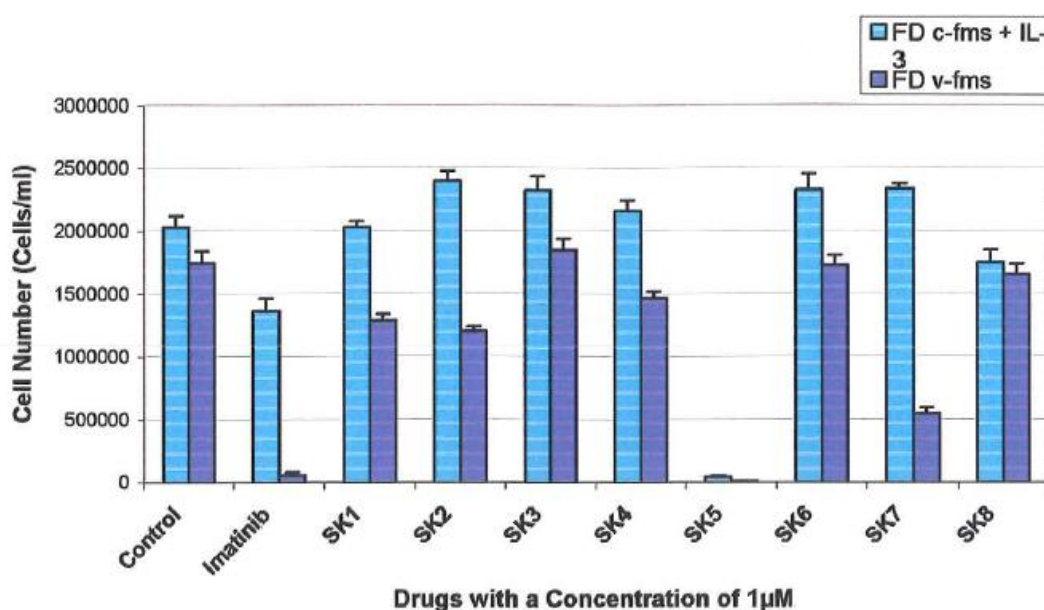
**3.10.3 Ανασταλτική δράση αναστολέων έναντι διάφορων μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών**

Μετά την ολοκλήρωσή της σύνθεσης των πρώτων εν δυνάμει αναστολέων διενεργήθηκε βιολογικός έλεγχος στο Imperial College of London από την ερευνητική ομάδα του N. Dibb. Οι ενώσεις SK1-SK8 στον παρακάτω πίνακα αρχικά ελέγχθηκαν ως προς την τοξικότητά τους.

|      |      |      |      |      |
|------|------|------|------|------|
| SK1  | SK2  | SK3  | SK4  | SK5  |
|      |      |      |      |      |
| SK6  | SK7  | SK8  | SK9  | SK10 |
|      |      |      |      |      |
| SK11 | SK12 | SK13 | SK14 | SK15 |
|      |      |      |      |      |
| SK16 | SK17 | SK18 | SK19 | SK20 |
|      |      |      |      |      |
| SK21 | SK22 | SK23 | SK24 | SK25 |
|      |      |      |      |      |
| SK26 | SK27 | SK28 | SK29 |      |
|      |      |      |      |      |

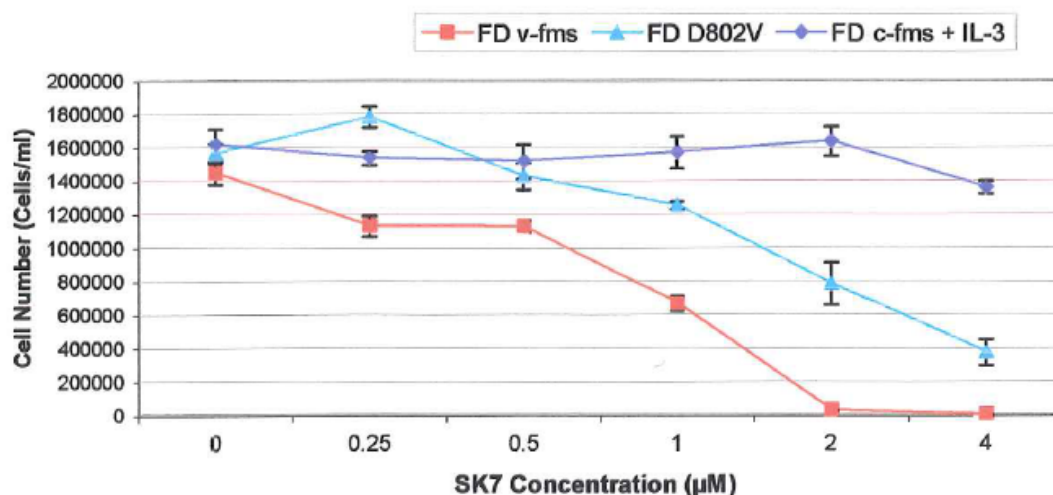
**Πίνακας 4:** Εν δυνάμει αναστολείς που ελέγχθηκαν έναντι μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του κ.Dibb

Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 80) φαίνεται η δραστικότητα των 8 οργανικών μορίων σε σύγκριση με το Imatinib, έναντι της κυτταρικής σειράς FDC-fms και της μεταλλαγμένης κυτταρικής σειράς FDv-fms. Παρατηρούμε ότι το Imatinib έχει έντονη ανασταλτική δράση ως προς τη μεταλλαγμένη κυτταρικής σειράς χωρίς να αναστέλλει τα φυσιολογικά κύτταρα. Το ίδιο συμβαίνει και με τον αναστολέα SK7, ενώ, αντίθετα λόγω της επιθετικότητας που έδειξε ο SK5 και στις δύο σειρές κυττάρων, δεν πήρε μέρος σε επόμενα πειράματα λόγω μεγάλης τοξικότητας.



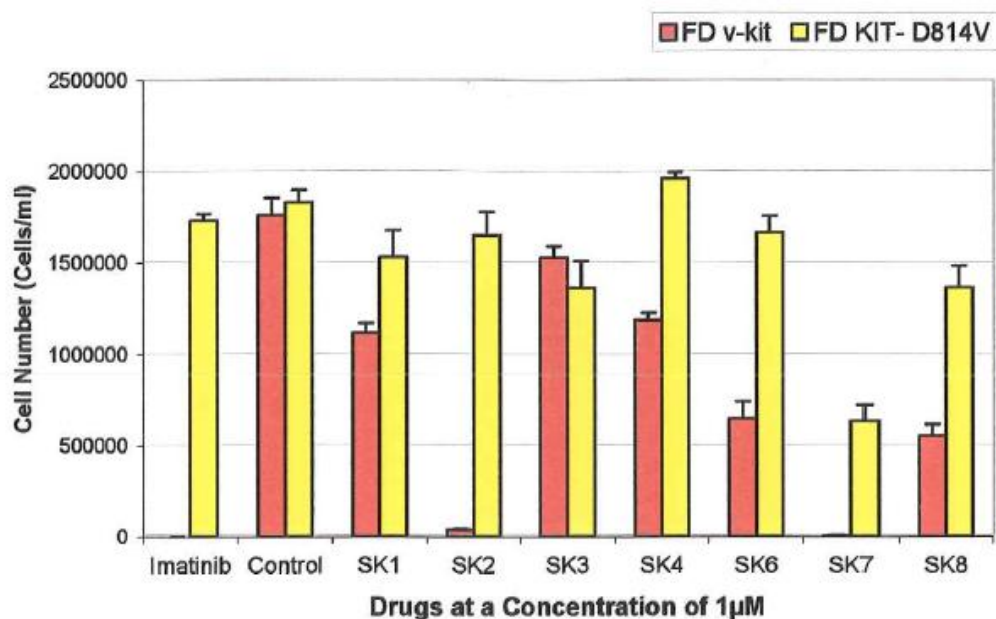
**Σχήμα 80:** Έλεγχος εν δυνάμει αναστολέων έναντι των κυτταρικών σειρών FDC-fms και FDv-fms

Μετά τα πρώτα αποτελέσματα ο αναστολέας SK7 ελέγχθηκε ως προς τη ανασταλτική του δράση έναντι και μίας δεύτερης μεταλλαγμένης σειράς των FDC-fms κυττάρων της FD D802V. Τα εν λόγω μεταλλαγμένα κύτταρα έχει διαπιστωθεί ότι είναι ανθεκτικά στο Imatinib, σε αντίθεση με τη κυτταρική σειρά FDv-fms. Από το παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 81) επαληθεύεται η ανασταλτική δράση του SK7 έναντι των FDv-fms (γραμμή με τετράγωνα) και παρατηρείται μερική ανασταλτική δράση έναντι και της δεύτερης σειρά μεταλλαγμένων κυττάρων (γραμμή με τρίγωνα), χωρίς να είναι τοξικός στα φυσιολογικά κύτταρα (γραμμή με ρόμβους).



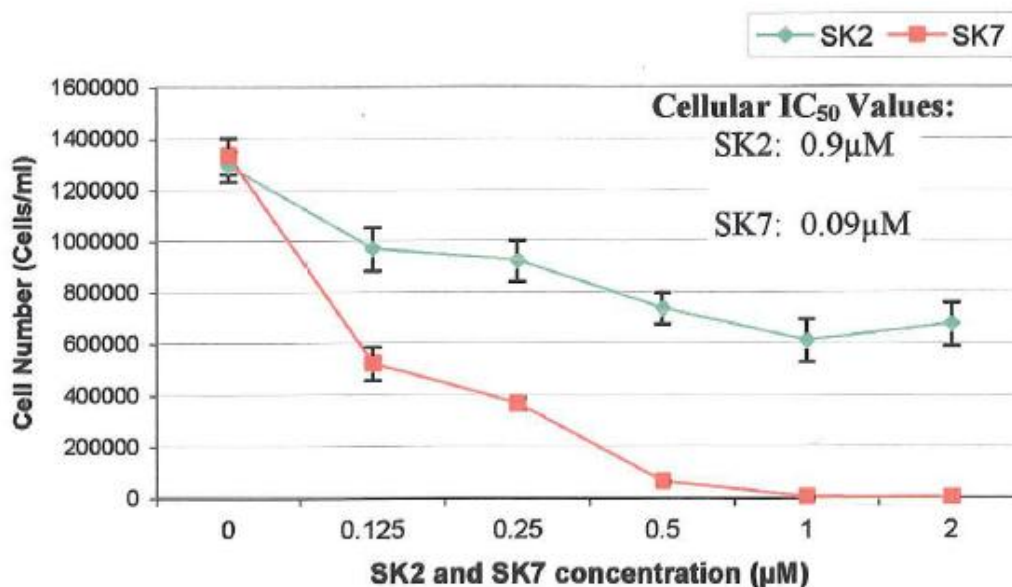
**Σχήμα 81:** Ανασταλτική δράση του SK7 σε διάφορες συγκεντρώσεις έναντι των κυτταρικών σειρών FDc-fms, FDv-fms και FD D802V

Στα επόμενα διαγράμματα (Σχήμα 82) φαίνεται η ανασταλτική δράση των αναστολέων SK1-SK8 έναντι των μεταλλαγμένων κυτταρικών σειρών FDv-kit και FD KIT-D814V, χωρίς να συμπεριλαμβάνεται ο SK5, λόγω της τοξικότητας του. Τα δύο γονίδια v-kit και KIT-D814V είναι μεταλλάξεις του γονιδίου c-kit και ειδικότερα τα κύτταρα FD KIT-D814V είναι ανθεκτικά στο Imatinib. Στις εν λόγω κυτταρικές σειρές έδειξαν ανασταλτική δράση ο SK7, αλλά και ο SK2. Ο SK7 έδειξε ικανοποιητική δράση έναντι της σειράς FDv-kit, αλλά και μία ήπια ανασταλτική δράση έναντι της FD KIT-D814V, σε αντίθεση με το Imatinib.



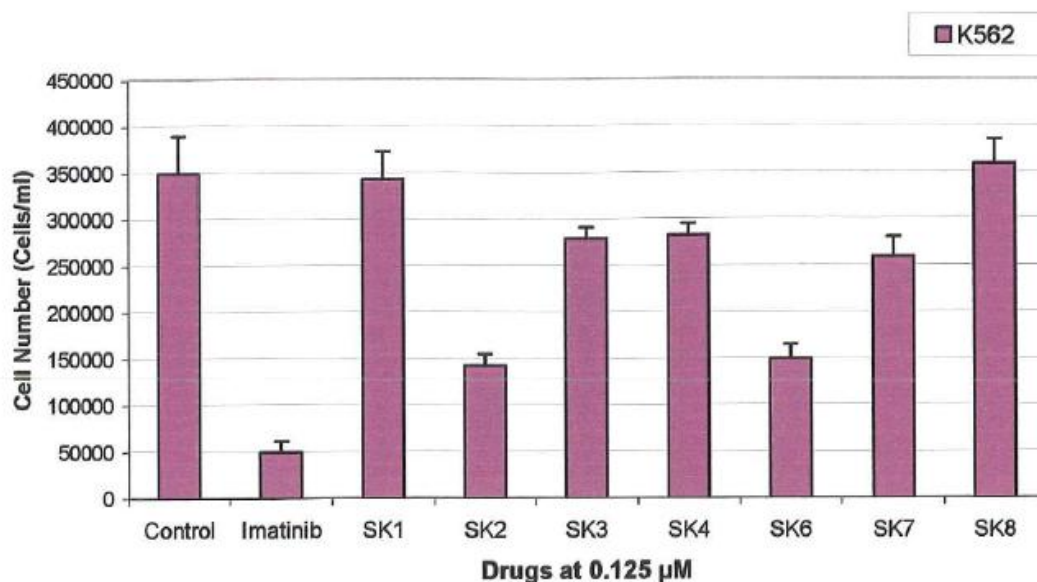
**Σχήμα 82:** Έλεγχος εν δυνάμει αναστολέων έναντι των κυτταρικών σειρών FDv-kit και FD KIT-D814V

Σε επιμέρους έλεγχο με διαφορετικές συγκεντρώσεις των αναστολέων διαπιστώθηκε ότι η ανασταλτική δράση του SK2 δεν είναι επαναλαμβανόμενη, άρα είναι μη αξιολογήσιμη (Σχήμα 83).



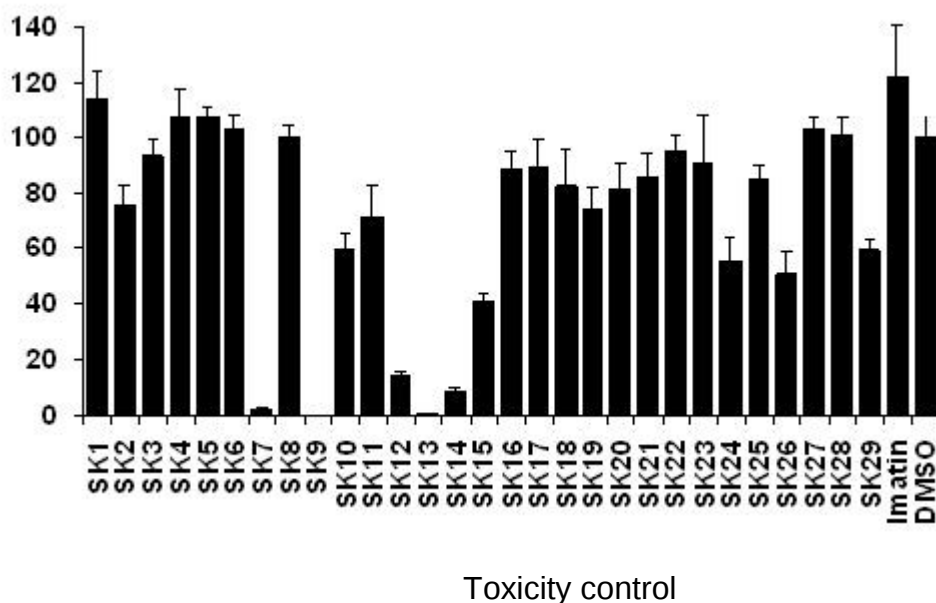
**Σχήμα 83:** Ανασταλτική δράση των SK7 και SK2 σε διάφορες συγκεντρώσεις έναντι των κυτταρικών σειρών FDv-kit

Στο τελευταίο διάγραμμα (Σχήμα 84) διαπιστώθηκε ότι κανένας από τους αναστολείς δεν έχει αξιολογήσιμη ανασταλτική δράση έναντι της κυτταρικής σειράς K562.



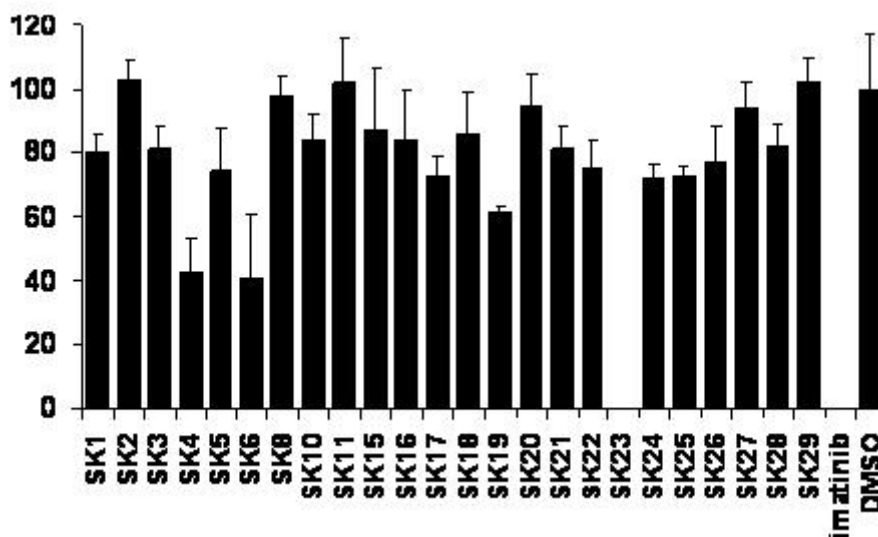
**Σχήμα 84:** Έλεγχος εν δυνάμει αναστολέων έναντι της κυτταρικής σειράς K562

Μετά τα πρώτα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ερευνητική ομάδα του N. Dibb, έγινε αποστολή άλλων 21 νέων ενώσεων. Αρχικά όπως και στην πρώτη αποστολή τα νέα οργανικά μόρια ελέγχθηκαν ως προς την τοξικότητά τους έναντι φυσιολογικών κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις SK7, SK9, SK12, SK13 και SK14 ήταν ιδιαίτερα τοξικές και δε συμπεριλήφθησαν στα μεταγενέστερα βιοχημικά και βιολογικά πειράματα (Σχήμα 85).



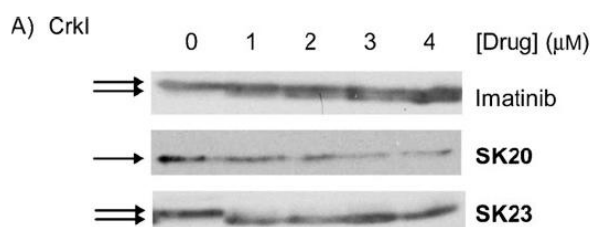
**Σχήμα 85:** Έλεγχος εν δυνάμει αναστολέων ως προς την τοξικότητά τους

Οι 24 εναπομείνουσες ενώσεις μελετήθηκαν ως προς τη ανασταλτική τους δράση στο πολλαπλασιασμό των K562 κυττάρων (Σχήμα 86). Ο πολλαπλασιασμός της κυτταρικής αυτής σειράς είναι γνωστό ότι ελέγχεται από τη ενεργοποίηση της Abl κινάσης. Στο παρακάτω διάγραμμα διαπιστώνεται εύκολα, ότι εκτός από την ένωση SK23, καμία άλλη ένωση-αναστολέας δεν είναι αποτελεσματικότερος από το Imatinib.



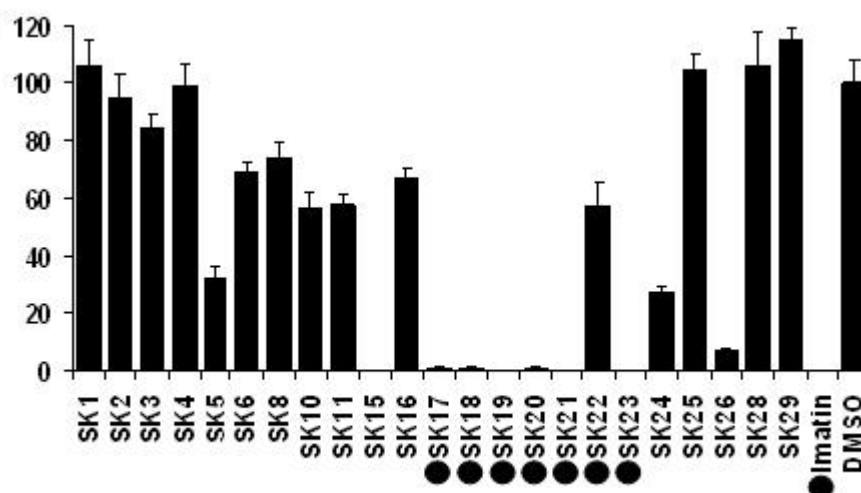
**Σχήμα 86:** Έλεγχος εν δυνάμει αναστολέων έναντι της κυτταρικής σειράς K562

Για την επιβεβαίωση της ανασταλτικής δράσης του SK23 έναντι της πρωτεϊνικής κινάσης Abl, ελέγχθηκε η επίδρασή του στη φωσφορυλίωση της Crkl πρωτεΐνης (Σχήμα 87), η οποία είναι η συνηθέστερη πρωτεΐνη για έλεγχο της Abl κινάσης *in vivo*. Η πρωτεΐνη Crkl φωσφορυλιώνεται από την Abl-Bcr κινάση, επομένως αναστολή της δεύτερης έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο γραμμών στο παρακάτω σχήμα (η μία γραμμή αναφέρεται στη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη, ενώ η δεύτερη στη μη φωσφορυλιωμένη). Μαζί με τον SK23 και τον Imatinib έγινε επανέλεγχος και στον SK20, ο οποίος έδειξε τη δράση μόνο των δύο πρώτων αναστολέων SK23 και Imatinib έναντι της πρωτεΐνης.



**Σχήμα 87:** Έλεγχος των εν δυνάμει αναστολέων SK20, SK23 και του Imatinib έναντι της πρωτεΐνης Crkl

Στη συνέχεια οι ενώσεις δοκιμάστηκαν έναντι της κυτταρικής σειράς FDv-fms (Σχήμα 88). Το διάγραμμα που ακολουθεί κατέδειξε την ανασταλτική δράση έναντι του υποδοχέα FMS των έξης εν δυνάμει αναστολέων SK15, SK17-SK24 και SK26. Την καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι του υποδοχέα FMS κατέδειξαν οι ενώσεις SK17 και SK23. Σε αντίθεση οι αναστολείς SK15, SK24 και SK26 δεν αναστέλλουν σημαντικά τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα FMS, αλλά πιθανώς αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων FDv-fms για άλλους λόγους.



FDv-fms

**Σχήμα 88:** Έλεγχος εν δυνάμει αναστολέων έναντι της κυτταρικής σειράς FDv-fms

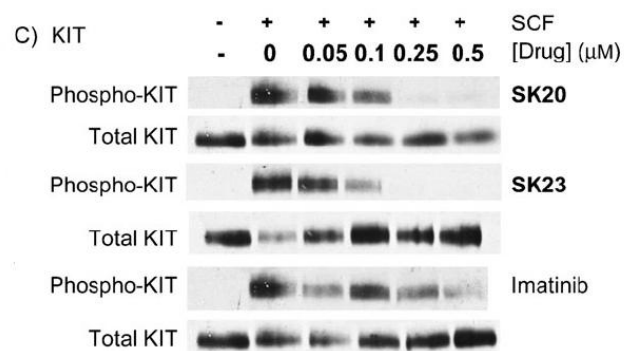
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα σε ένα συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζεται η ανασταλτική δράση των 7 επιλεγμένων εν δυνάμει αναστολέων έναντι των FMS, PDGFR και KIT πρωτεϊνικών υποδοχέων της Crkl πρωτεΐνης και των κυτταρικών σειρών K562 και FDv-fms.

| <b>Table 2.</b> Inhibition of phosphorylation of the FMS, PDGFβ, and KIT receptors and Crkl, as well as the growth of the K562 (Bcr-Abl) and FDv-fms cell lines. |      |       |      |                                              |       |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|------|----------------------------------------------|-------|---------|
| 1                                                                                                                                                                | 2    | 3     | 4    | 5                                            | 6     | 7       |
| Drug                                                                                                                                                             | FMS  | PDGFR | KIT  | IC <sub>50</sub> [μM] <sup>[a]</sup><br>Crkl | K562  | FDv-fms |
| SK17                                                                                                                                                             | 0.75 | 0.75  | ND   | ND                                           | > 1.0 | 0.75    |
| SK18                                                                                                                                                             | 0.5  | 0.3   | ND   | ND                                           | > 1.0 | 0.75    |
| SK19                                                                                                                                                             | 0.1  | 0.01  | ND   | ND                                           | 0.5   | 0.75    |
| SK20                                                                                                                                                             | 0.25 | 0.025 | 0.1  | > 4.0                                        | > 1.0 | 0.5     |
| SK21                                                                                                                                                             | 0.5  | 0.35  | ND   | ND                                           | 0.5   | 0.75    |
| SK22                                                                                                                                                             | 0.35 | 0.25  | ND   | ND                                           | > 1.0 | > 1.0   |
| SK23                                                                                                                                                             | 0.1  | 0.1   | 0.05 | 1                                            | 0.1   | 0.15    |
| Imatinib                                                                                                                                                         | 0.5  | 0.3   | 0.25 | 1                                            | 0.1   | 0.5     |
| [a] ND: not determined.                                                                                                                                          |      |       |      |                                              |       |         |

**Πίνακας 5:** Συνοπτικός πίνακας των αποτελεσμάτων των 7 επιλεγμένων αναστολέων.

Με μία πρώτη ματιά διαπιστώνεται ότι οι ενώσεις SK19, SK20 και SK23 σημειώνουν καλύτερη ανασταλτική δράση ως προς τη φωσφορυλίωση της PDGFR οικογένειας από το Imatinib. Επίσης οι ενώσεις SK18 και SK21 ανταγωνίζονται επάξια το Imatinib. Όλες οι ενώσεις εκτός από την SK23 είναι πολύ ασθενέστεροι αναστολείς έναντι της Abl από το Imatinib, όπως φαίνεται στις στήλες 5 και 6 του πίνακα. Το πρώτο συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι οι τροποποιήσεις των δακτυλίων οδήγησαν σε αύξηση της εκλεκτικότητας για την PDGFR οικογένεια έναντι της Abl οικογένειας.

Οι ενώσεις SK20 και SK23 κατέδειξαν καλύτερη ανασταλτική δράση από το Imatinib έναντι της κυτταρικής σειράς FDv-fms, αλλά και στον υποδοχέα KIT, όπως φαίνεται από το σχήμα 89 που ακολουθεί.



**Σχήμα 89:** Έλεγχος των εν δυνάμει αναστολέων SK20, SK23 και του Imatinib έναντι του υποδοχέα KIT

Από τις 29 ενώσεις που ελέγχθηκαν σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του N. Dibb, του Imperial College of London, οι ενώσεις SK20 και SK23 έδειξαν καλύτερη ανασταλτική δράση από το Imatinib, τόσο έναντι υποδοχέων όσο και κυτταρικών σειρών. Αυτό τους καθιστά ιδιαίτερα σημαντικούς ως προς τη ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Τα παραπάνω αποτελέσματα από τη συνεργασία της ομάδας μας με την ομάδα από το Imperial College of London δημοσιεύτηκαν ήδη στο περιοδικό ChemMedChem.<sup>89</sup>



## 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 Συσκευές και όργανα

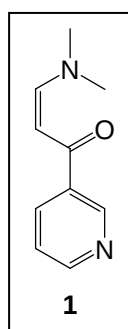
Τα σημεία τήξης των ενώσεων προσδιορίστηκαν σε συσκευή Buchi 510. Τα φάσματα υπερύθρου καταγράφηκαν στο φασματογράφο Perkin- Elmer GX FTIR. Η λήψη φασμάτων πυρηνικού συντονισμού έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AMX 400 και 250. Η λήψη φασμάτων μάζας έγινε στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ενώ στη Γερμανία, στο Πανεπιστήμιο της Λειψίας, έγινε λήψη φασμάτων μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS, high resolution mas spectrometry) με τη μέθοδο του ηλεκτροψεκασμού (ESI, electro spray ionization).

Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Fluka, Aldrich και Merck και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία. Οι διαλύτες προέρχονται από τις παραπάνω εταιρείες και, όπου ήταν απαραίτητο, κατέστησαν απόλυτοι και ακολούθως διατηρήθηκαν, έτσι, σύμφωνα με τις μεθόδους που αναφέρουν οι Perrin και Armarego.<sup>90</sup> Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F<sub>254</sub> ms Fluka, ενώ στους διαχωρισμούς μιγμάτων ενώσεων εφαρμόστηκε χρωματογραφία στήλης μέσης πίεσης (“flash chromatography”), με υλικό 9385 silica gel F<sub>254</sub> της Merck.

## 4.2 Αντιδράσεις σύνθεσης των β-εναμινονών

### Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-3-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (1).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα 3-ακετυλοπυριδίνης (15mL,  $d=1.1020$ , 0.14mol) σε ο-ξυλόλιο (30mL), και θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφακετάλης (28.2mL, 0.16mol) σε ο-ξυλόλιο (20mL) και αμέσως μετά το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (~140 °C) επί 4 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη στο μισό της αρχικής του ποσότητας. Στη συνέχεια προστίθεται διαιθυλαιθέρας (30mL) και το μίγμα ψύχεται μέχρι να καταβυθιστεί ίζημα. Ακολουθεί διήθηση και έκπλυση του ιζήματος με διαιθυλαιθέρα, δίνοντας την εναμινόνη **1** ως κίτρινο στερεό (18.7g, 77%).



**Σ.Τ.:** 83.5 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 1643 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

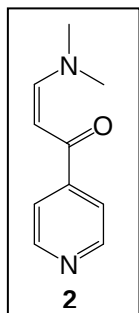
**$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  :** 2.72 (s, 3H), 2.94 (s, 3H), 5.45 (d,  $J = 12.25$  Hz, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.60 (d,  $J = 12.25$  Hz, 1H), 7.96 (dt,  $J = 7.75, 2.00$  Hz, 1H), 8.44 (dd,  $J = 4.75, 1.5$  Hz, 1H), 8.89 (d,  $J = 2.00$  Hz, 1H) ppm.

**$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  :** 38.95, 44.76, 91.32, 122.83, 134.53, 135.21, 148.47, 150.96, 154.26, 165.72 ppm.

### Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-4-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (2).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα 4-ακετυλοπυριδίνης (15mL,  $d=1.0950$ , 0.14mol) σε ο-ξυλόλιο (30mL), και θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδο-δισουλφακετάλης (28.2mL, 0.16mol) σε ο-ξυλόλιο (20mL) και αμέσως μετά το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού (~140 °C) επί 3 1/2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη στο μισό της αρχικής του ποσότητας. Στη συνέχεια προστίθεται διαιθυλαιθέρας (25mL) και το μίγμα ψύχεται μέχρι να καταβυθιστεί ίζημα. Ακολουθεί διήθηση και

έκπλυση του ιζήματος με διαιθυλαιθέρα, δίνοντας την εναμινόνη **2** ως πορτοκαλί στερεό (16.7g, 70%).



**Σ.Τ.:** 104 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 1642 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  :** 2.80 (s, 3H), 3.02 (s, 3H), 5.49 (d,  $J$  = 12.25 Hz, 1H), 7.54 (d,  $J$  = 6 Hz, 2H), 7.67 (d,  $J$  = 12.25 Hz, 1H), 8.55 (d,  $J$  = 6 Hz, 2H) ppm.

**$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  :** 37.05, 44.90, 91.30, 120.81, 148.85, 149.82, 154.82, 186.04 ppm.

#### 4.3 Αντιδράσεις σχηματισμού υδροχλωρικών αλάτων των μεθυλο-νιτροανιλινών

##### Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της 2-μεθυλο-5-νιτροανιλίνης.

Σε υπό ανάδευση διάλυμα 2-μεθυλο-5-νιτροανιλίνης (5.0g, 32.9mmol) σε μεθανόλη (100mL) ψυχόμενο στους 5 °C διοχετεύεται επί 2 ώρες αέριο υδροχλώριο, προερχόμενο από προσθήκη π.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  σε NaCl. Μετά το τέλος της αντίδρασης γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη στο 1/3 περίπου του όγκου του και προστίθεται διαιθυλαιθέρας (40mL). Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (10mL). Το προϊόν είναι στερεό λευκού χρώματος (6g, 95%).

##### Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της 4-μεθυλο-3-νιτροανιλίνης.

Σε υπό ανάδευση διάλυμα 2-μεθυλο-5-νιτροανιλίνης (5.0g, 32.9mmol) σε μεθανόλη (100mL) ψυχόμενο στους 5 °C διοχετεύεται επί 2 ώρες αέριο υδροχλώριο, προερχόμενο από προσθήκη π.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  σε NaCl. Μετά το τέλος της αντίδρασης γίνεται συμπύκνωση του διαλύτη στο 1/3 περίπου του όγκου του και προστίθεται διαιθυλαιθέρας (40mL). Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (10mL). Το προϊόν είναι στερεό λευκού χρώματος (6.2g, 98%).

#### **4.4 Αντιδράσεις σύνθεσης των υδροχλωρικών αλάτων των μεθυλο-νιτρο-φαινυλογουανιδινών**

##### **Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της 2-μεθυλο-5-νιτρο-φαινυλογουανιδίνης (3).**

Κυαναμίδιο (0.7g, 16.7mmol) τήκεται σε σφαιρική φιάλη υπό ανάδευση στους 65 °C και ακολούθως προστίθεται υδροχλωρικό άλας της 2-μεθυλο-5-νιτροανιλίνης (2.0g, 10.6mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται επί 2 ώρες στη θερμοκρασία αυτή. Το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστίθεται διαιθυλαιθέρας (30mL) και αφήνεται υπό ανάδευση επί 3 ώρες. Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (3×10mL), οπότε παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας της φαινυλογουανιδίνης **3** ως λευκό στερεό (2.3g, 96%).

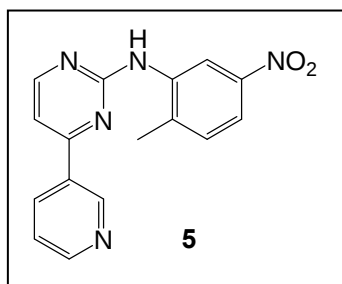
##### **Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος της 4-μεθυλο-3-νιτρο-φαινυλογουανιδίνης (4).**

Κυαναμίδιο (1.1g, 26.2mmol) τήκεται σε σφαιρική φιάλη υπό ανάδευση στους 65 °C και ακολούθως προστίθεται υδροχλωρικό άλας της 4-μεθυλο-3-νιτροανιλίνης (2.6g, 13.8mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται επί 3 ώρες. Το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστίθεται διαιθυλαιθέρας (30mL) και αφήνεται υπό ανάδευση επί 20 ώρες. Ακολουθεί διήθηση του ιζήματος και έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (3×10mL), οπότε παραλαμβάνεται το υδροχλωρικό άλας της φαινυλογουανιδίνης **4** ως γκρίζο στερεό (2.7g, 86%).

## 4.5 Αντιδράσεις σύνθεσης των φαινυλαμινο-πυριμιδινών

### Σύνθεση της N-(2-μεθυλο-5-νιτροφαινυλο)-4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης (5).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του υδροχλωρικού άλατος της 2-μεθυλο-5-νιτροφαινυλογουανιδίνης (1.19g, 5.2mmol) σε ισοπροπανόλη (40mL) προστίθεται σε περίσσεια ανθρακικό κάλιο και έπειτα η εναμινόνη **1** (0.82g, 4.7mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 110 °C επί 48 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το ίζημα διηθείται, συλλέγεται και αναδεύεται ως αιώρημα με νερό (60mL) επί 1 ώρα. Ακολούθως διηθείται, εκπλύνεται με ψυχρή ισοπροπανόλη (5mL) και διαιθυλαιθέρα (10mL) και ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Στο πρώτο διήθημα, το οποίο σύμφωνα με το χρωματογραφικό έλεγχο περιέχεται ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος, προστίθεται νερό (40mL) και το νέο ίζημα που προκύπτει διηθείται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 12:1). Η φαινυλαμινο-πυριμιδίνη **5** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (9.2g, 58 %).



**Σ.Τ.:** 192 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3250 (NH), 1535, 1347 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 2.48 (s, 3H), 7.15 (bs, 1H, NH), 7.32 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.85 (dd, *J* = 10, 2.25 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 5 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 3.5 Hz,

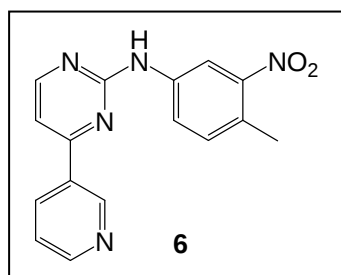
1H), 9.27 (s, 1H), 9.48 (d, *J* = 2.25 Hz, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ :** 18.56, 109.04, 117.47, 117.99, 124.01, 131.34, 132.02, 134.44, 138.68, 139.04, 145.97, 148.34, 151.77, 159.80, 160.42, 161.73 ppm.

### Σύνθεση της N-(4-μεθυλο-3-νιτροφαινυλο)-4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης (6).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του υδροχλωρικού άλατος της 4-μεθυλο-3-νιτροφαινυλογουανιδίνης (2.50g, 10.8mmol) σε ισοπροπανόλη (50mL) προστίθεται

καυστικό νάτριο (0.37g, 9.3mmol). Όταν διαλυθεί όλη η ποσότητα της βάσης προστίθεται η εναμινόνη **1** (1.16g, 6.6mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 110 °C επί 96 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το ίζημα διηθείται, συλλέγεται και αναδεύεται ως αιώρημα με νερό (60mL) επί 1 ώρα. Ακολουθώς διηθείται, εκπλύνεται με ψυχρή ισοπροπανόλη (5mL) και διαιθυλαιθέρα (10mL) και ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Στο πρώτο διήθημα, το οποίο σύμφωνα με το χρωματογραφικό έλεγχο περιέχεται ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος, προστίθεται νερό (40mL) και το νέο ίζημα που προκύπτει διηθείται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 12:1). Η φαινυλαμινο-πυριμιδίνη **6** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (1.34g, 66 %).



**Σ.Τ.:** 198 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3290 (NH), 1531, 1412 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

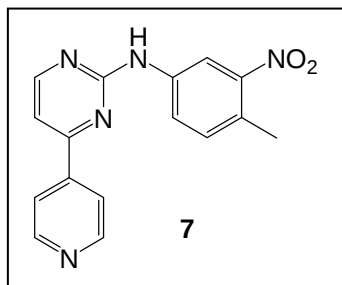
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  :** 2.58 (s, 3H), 7.27 (d, *J* = 3.25 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 7.39 (bs, 1H, NH), 7.47 (m, 1H), 7.62 (dd, *J* = 3.5, 1.5 Hz, 1H), 8.45 (dt, *J* = 5, 1 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 3.25, 1H), 8.73 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 8.74 (dd, *J* = 3, 1 Hz, 1H), 9.26 (d, *J* = 1.25 Hz, 1H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (63 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  :** 19.75, 108.80, 114.73, 123.13, 123.61, 126.92, 132.07, 132.72, 134.34, 138.08, 148.21, 151.52, 158.90, 159.57, 162.40 ppm.

### Σύνθεση της N-(4-μεθυλο-3-νιτροφαινυλο)-4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-αμίνης (**7**).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα του υδροχλωρικού άλατος της 4-μεθυλο-3-νιτροφαινυλογουανιδίνης (1.41g, 6.1mmol) σε ισοπροπανόλη (50mL) προστίθεται καυστικό κάλιο (0.20g, 5.0mmol) και έπειτα η εναμινόνη **2** (0.97g, 5.5mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 110 °C επί 72 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το ίζημα διηθείται, συλλέγεται και αναδεύεται ως αιώρημα με νερό (60mL) επί 1 ώρα. Έπειτα διηθείται, εκπλύνεται με ψυχρή ισοπροπανόλη (5mL) και διαιθυλαιθέρα (10mL) και ξηραίνεται σε ξηραντήρα υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου. Στο πρώτο διήθημα, το οποίο σύμφωνα με το χρωματογραφικό έλεγχο περιέχεται

ικανοποιητική ποσότητα προϊόντος, προστίθεται νερό (40mL) και το νέο ίζημα που προκύπτει διηθείται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 12:1). Η φαινυλαμινο-πυριμιδίνη **7** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (1.23g, 73 %).



**Σ.Τ.:** 259 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3267 (NH), 1524, 1336 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.47 (s, 3H), 7.40 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.60 (d,  $J$  = 5 Hz, 1H), 7.86 (dd,  $J$  = 8.5, 2 Hz, 1H), 8.09 (d,  $J$  = 5.75 Hz, 2H), 8.69 (d,  $J$  = 5 Hz, 1H), 8.76 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 2H) 8.79 (d,  $J$  = 2 Hz, 1H), 10.22 (bs,

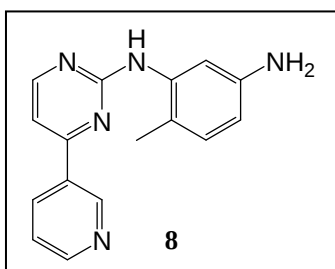
1H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (63 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 19.43, 109.51, 113.99, 121.08, 123.79, 125.51, 133.07, 139.56, 143.76, 148.78, 150.77, 160.05, 160.29, 161.60 ppm.

#### 4.6 Αντιδράσεις αναγωγής των φαινυλαμινο-πυριμιδινών

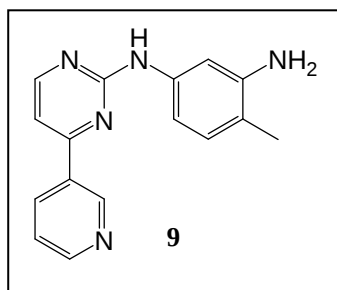
**Σύνθεση της 6-μεθυλο-N<sup>1</sup>-(4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)βενζο-1,3-διαμίνης (**8**).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα φαινυλαμινο-πυριμιδίνης **5** (1.00g, 3.36mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (50mL) και θερμοκρασία δωματίου προστίθεται καταλύτης PtO<sub>2</sub> (200.7mg) και αέριο υδρογόνο σε μπαλόνι χωρητικότητας 1L και παραμένει υπό ανάδευση επί 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC) γίνεται διήθηση του καταλύτη και εξάτμιση του διαλύτη. Το υπόλειμμα ήταν το καθαρό προϊόν αναγωγής **8**, που παραλείφθηκε ως κίτρινο στερεό (0.90g, ~100%).



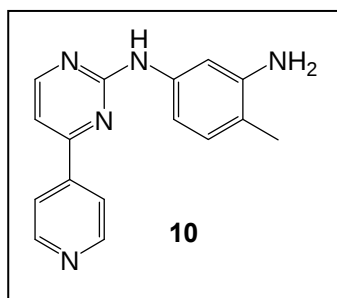
**Σύνθεση της 4-μεθυλο-N<sup>1</sup>-(4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)βενζο-1,3-διαμίνης (9).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα φαινυλαμινο-πυριμιδίνης **6** (1.00g, 3.26mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (50mL) και θερμοκρασία δωματίου προστίθεται καταλύτης PtO<sub>2</sub> (198.3mg) και αέριο υδρογόνο σε μπαλόνι χωρητικότητας 1L και παραμένει υπό ανάδευση επί 4 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC) γίνεται διήθηση του καταλύτη και εξάτμιση του διαλύτη. Το υπόλειμμα ήταν το καθαρό προϊόν αναγωγής **9**, που παραλείφθηκε ως κίτρινο σκούρο στερεό (0.90g, ~100%).



**Σύνθεση της 4-μεθυλο-N<sup>1</sup>-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλο)βενζο-1,3-διαμίνης (10).**

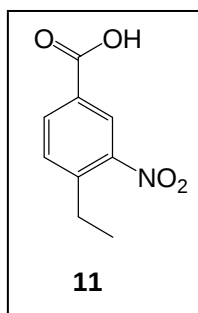
Σε υπό ανάδευση διάλυμα φαινυλαμινο-πυριμιδίνης **7** (0.96g, 3.1mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (50mL) και θερμοκρασία δωματίου προστίθεται καταλύτης PtO<sub>2</sub> (198.0mg) και αέριο υδρογόνο σε μπαλόνι χωρητικότητας 1L και παραμένει υπό ανάδευση επί 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος TLC) γίνεται διήθηση του καταλύτη και εξάτμιση του διαλύτη. Το υπόλειμμα ήταν το καθαρό προϊόν αναγωγής **10**, που παραλείφθηκε ως κίτρινο στερεό (0.86g, ~100%).



## 4.7 Αντιδράσεις νίτρωσης αλκυλο-βενζοϊκών οξέων

### Σύνθεση του 4-αιθυλο-3-νιτροβενζοϊκού οξέος (11).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα πυκνού νιτρικού οξέος (65%) (6mL) και πυκνούθειϊκού οξέος (1mL) στους -10 °C (υπό ψύξη) γίνεται προσθήκη σε στερεά φάση 4-αιθυλοβενζοϊκό οξύ (366.9mg, 2.44mmol) επί 30 λεπτά. Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 78 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόχυση του διαλύματος σε παγόλουτρο. Μόλις λιώσει ο πάγος, το ίζημα διηθείται και εκπλύνεται με νερό (3×10mL). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 1:1). Το προϊόν **11** παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό (168.5mg, 35%).

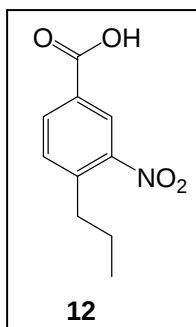


**Σ.Τ.:** 150-152 °C

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ :** 1.40 (t, 3H), 3.06 (q, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.30 (dd, *J* = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H) ppm

### Σύνθεση του 3-νιτρο-4-προπυλοβενζοϊκού οξέος (12).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα πυκνού νιτρικού οξέος (65%) (6mL) και πυκνούθειϊκού οξέος (1mL) στους -10 °C (υπό ψύξη) γίνεται προσθήκη σε στερεά φάση 4-προπυλοβενζοϊκό οξύ (246.1mg, 1.50mmol) επί 30 λεπτά. Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 78 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόχυση του διαλύματος σε παγόλουτρο. Μόλις λιώσει ο πάγος το ίζημα διηθείται και εκπλύνεται με νερό (3×10mL). Το προϊόν απομονώνεται με ανακρυστάλλωση από εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα. Το τελικό προϊόν **12** παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (177.7mg, 57%).

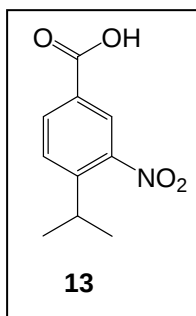


**Σ.Τ.:** 160-162 °C

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ :** 1.05 (t, 3H), 1.72 (m, 2H), 2.97 (t, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.26 (dd, *J* = 1.50, 8.00 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H) ppm

### Σύνθεση του 3-νιτρο-4-*i*-προπυλοβενζοϊκού οξέος (13).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα πυκνού νιτρικού οξέος (65%) (6mL) και πυκνού θειϊκού οξέος (1mL) στους -10 °C (υπό ψύξη) γίνεται προσθήκη σε στερεά φάση 4-*i*-προπυλοβενζοϊκό οξύ (354.0mg, 1.69mmol) για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 78 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόχυση του διαλύματος σε παγόλουτρο. Μόλις λιώσει ο πάγος το ίζημα διηθείται και εκπλύνεται με νερό (3×10mL). Το προϊόν απομονώνεται με ανακρυστάλλωση από εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα. Το τελικό προϊόν **13** παραλαμβάνεται ως λευκό στερεό (162.7mg, 46%).



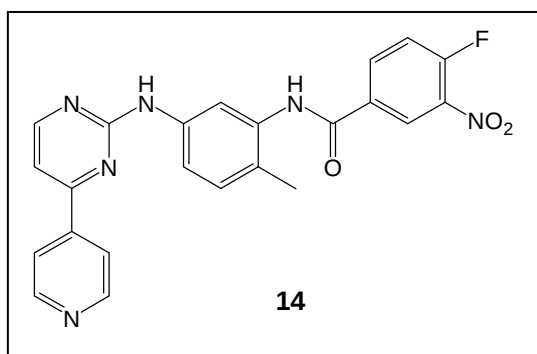
**Σ.Τ.:** 155-157 °C

**<sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ :** 1.30 (d, 6H), 3.38 (m, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.20 (dd, *J* = 1.25, 8.25 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H) ppm

## 4.8 Αντιδράσεις σύνθεσης τελικών προϊόντων

**Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]- 4-φθοροβενζαμιδίου (14).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (100.9mg, 0.36mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.5mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-4-φθοροβενζοϋλοχλωριδίου (88.9mg, 0.44mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 10:10:1). Το τελικό προϊόν **14** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (92.4mg, 58%).



**Σ.Τ.:** 226-228 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3310 (NH), 1649 (C=O), 1535, 1338 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

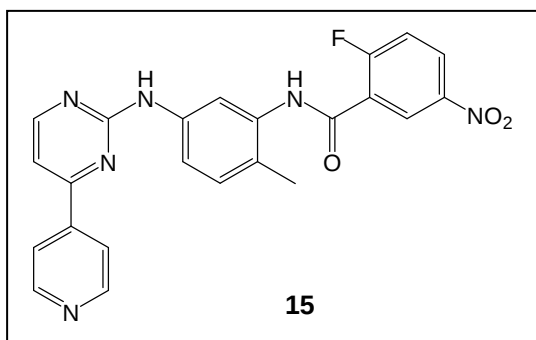
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.23 (s, 3H), 7.25 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.14

(d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.66 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 8.81 (d, *J* = 7.25 Hz, 1H), 9.85 (bs, 1H), 10.30 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.85, 108.92, 117.88, 119.35, 119.69, 121.52, 126.37, 127.39, 130.81, 131.83, 131.90, 136.03, 136.18, 136.32, 139.00, 144.34, 151.07, 160.47, 160.80, 161.84, 162.86 ppm

**Σύνθεση του 5-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]- 2-φθοροβενζαμιδίου (15).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (91.0mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 5-νιτρο-2-φθοροβενζοϋλοχλωριδίου (80.2mg, 0.39mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη 5:1). Το τελικό προϊόν **15** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (56.5mg, 39%).



**Σ.Τ.:** 210-213 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3462, 3275 (NH), 1686 (C=O), 1534, 1348 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.27 (s, 3H), 7.24 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.71 (d, *J* = 9.00 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 4.25 Hz, 2H), 8.26 (s, 1H), 8.48 (d, *J* = 8.00

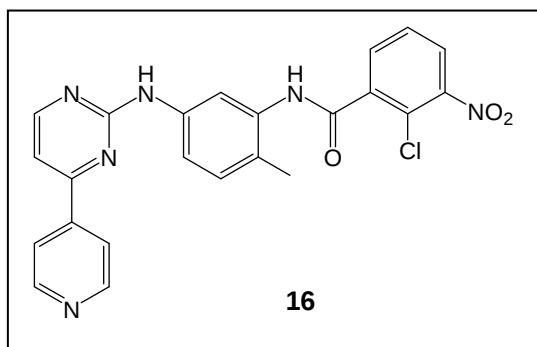
Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.77 (d, *J* = 4.75 Hz, 2H), 9.86 (bs, 1H), 10.16 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.78, 108.93, 116.88, 117.76, 118.50, 118.90, 121.52, 126.30, 126.40, 128.51, 128.68, 130.85, 135.90, 139.03, 144.36, 144.46, 151.06, 160.51, 160.80, 161.18, 161.80 ppm

**Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]- 2-χλωροβενζαμιδίου (16).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (99.5mg, 0.36mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.8mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό

ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωρίδιο (94.7mg, 0.43mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **16** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (72.0mg, 43%).



**Σ.Τ.:** 265-266 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3262 (NH), 1649 (C=O), 1527, 1361 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.28 (s, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.75 (t, *J* = 8.00 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.50 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 5.00 Hz, 2H),

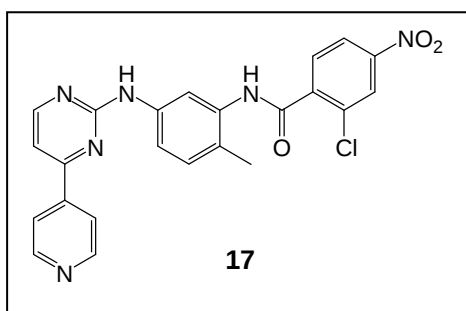
8.19 (m, 2H), 8.67 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 4.75 Hz, 2H), 9.84 (bs, 1H), 10.21 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.96, 108.93, 116.88, 117.79, 121.51, 122.15, 126.21, 126.33, 129.45, 130.88, 132.60, 135.78, 138.98, 140.10, 144.36, 149.15, 151.07, 160.52, 160.82, 161.79, 164.04 ppm

**Σύνθεση του 4-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-χλωροβενζαμιδίου (17).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (94.4mg, 0.34mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.5mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωρίδιο (34.7mg, 0.15mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή

ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διαιθυλαιθέρας (30mL). Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **17** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (102.9mg, 66%).



**Σ.Τ.:** 260-262 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3256 (NH), 1655 (C=O), 1528, 1350 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.29 (s, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 8.21

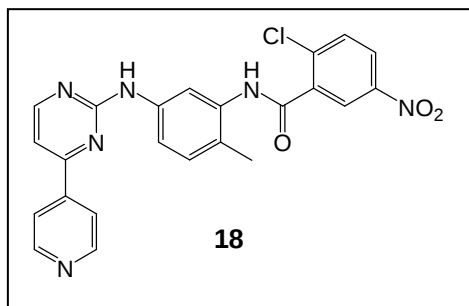
(s, 1H), 8.34 (dd, *J* = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.76 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 9.85 (bs, 1H), 10.24 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.95, 108.94, 117.01, 117.87, 121.51, 123.15, 125.21, 126.48, 130.54, 130.89, 131.61, 135.67, 139.00, 143.32, 144.35, 148.85, 151.09, 160.53, 160.81, 161.79, 164.22 ppm

**Σύνθεση του 5-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]- 2-χλωροβενζαμιδίου (18).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (101.3mg, 0.37mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (96.4mg, 0.44mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη 5:1), από

όπου δεν απομονώθηκε καθαρό το προϊόν. Ακολούθησε δεύτερη χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:2:1). Το τελικό προϊόν **18** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (29.0mg, 16%).



**Σ.Τ.:** 241-143 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3257 (NH), 1655 (C=O), 1534, 1345 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

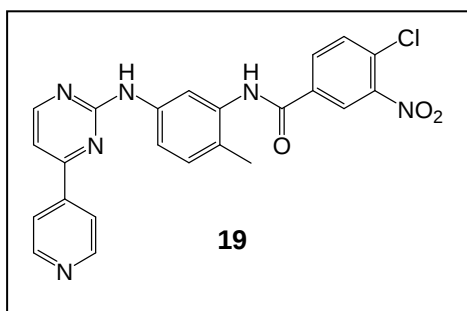
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.29 (s, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.75 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.75

Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 8.23 (s, 1H), 8.36 (dd, *J* = 2.75, 8.75 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 2.75 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.76 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 9.85 (bs, 1H), 10.23 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.99, 108.94, 116.18, 117.03, 117.87, 121.51, 124.25, 126.51, 130.87, 131.95, 135.76, 137.62, 138.55, 138.98, 144.36, 146.74, 151.08, 160.55, 160.82, 161.80, 163.65 ppm

### Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]- 4-χλωροβενζαμιδίου (**19**).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (60.0mg, 0.22mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-4-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (57.1mg, 0.26mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη 10:1). Το τελικό προϊόν **19** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (66.0mg, 65%).



**Σ.Τ.:** 179-181 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3284 (NH), 1649 (C=O), 1530, 1337 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

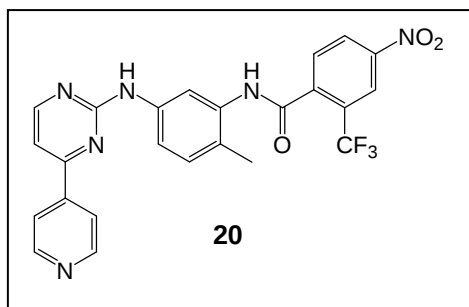
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.22 (s, 3H), 7.25 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 4.75 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.75 Hz, 1H), 8.00 (m, 2H),

8.14 (d, *J* = 4.00 Hz, 2H), 8.33 (d, *J* = 7.75 Hz, 1H), 8.66 (d, *J* = 4.75 Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.75 (d, *J* = 4.00 Hz, 2H), 9.86 (bs, 1H), 10.28 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.84, 108.92, 117.77, 117.94, 121.51, 125.48, 127.32, 128.72, 130.83, 132.65, 133.29, 135.07, 136.16, 139.01, 144.33, 147.97, 151.06, 160.45, 160.79, 161.84, 162.93 ppm

#### Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (**20**).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (94.6mg, 0.34mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-δινιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (103.8mg, 0.41mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:2:1). Το τελικό προϊόν **20** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (18.4mg, 11%).



**Σ.Τ.:** 270-273 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3255 (NH), 1655 (C=O), 1528, 1364 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

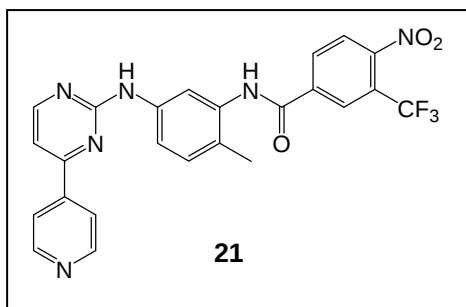
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.27 (s, 3H), 7.24 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 8.06 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 6.00

Hz, 2H), 8.60 (s, 1H), 8.66 (m, 2H), 8.74 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 9.85 (bs, 1H), 10.30 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.71, 108.95, 117.07, 118.02, 121.48 122.37, 126.50, 127.49, 128.02, 128.26, 130.91, 131.26, 135.66, 139.02, 142.30, 144.33, 148.38, 151.04, 160.54, 160.82, 161.79, 164.71 ppm

#### Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-4-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (21).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **10** (85.0mg, 0.31mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (93.3mg, 0.37mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, όπου παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **21** παραλαμβάνεται ως πορτοκαλί στερεό (61.0mg, 40%).



**Σ.Τ.:** 245-247 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3305 (NH), 1650 (C=O), 1536, 1360 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

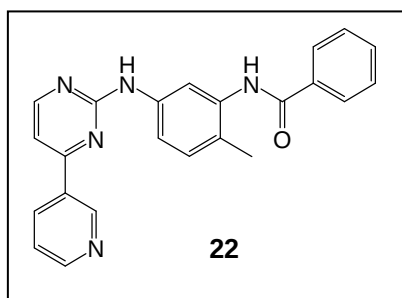
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.24 (s, 3H), 7.26 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H),

8.14 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 8.37 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.67 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.75 (d, *J* = 6.00 Hz, 2H), 9.87 (bs, 1H), 10.44 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.85, 108.95, 117.70, 118.05, 121.53, 122.32, 126.50, 127.34, 127.76, 127.84, 130.89, 134.34, 136.03, 139.04, 139.09, 144.33, 149.30, 151.05, 160.47, 160.79, 161.85, 162.86 ppm

**Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]βενζαμιδίου (22).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (91.5mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα βενζοϋλοχλωριδίου (55.7mg, 0.40mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 12:2:1). Το τελικό προϊόν **22** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (65.0mg, 52%).



**Σ.Τ.:** 195-196 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3512, 3278 (NH), 1639 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$ .

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 2.22 (s, 3H), 7.22 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 5.00 Hz, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.61 (d,  $J$  = 6.75 Hz, 2H), 7.99 (s, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 6.75 Hz, 2H), 8.56 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H),

8.61 (d,  $J$  = 5.00 Hz, 1H), 8.73 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.37 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 9.80 (bs, 1H), 9.94 (bs, 1H) ppm

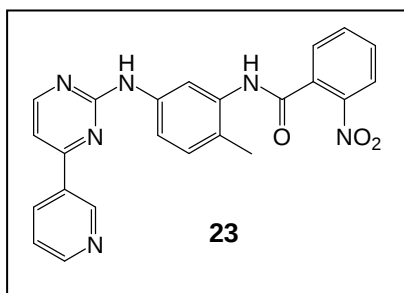
**$^{13}\text{C}$  NMR (63 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 17.86, 108.54, 117.51, 117.98, 124.42, 127.32, 128.18, 129.00, 130.62, 132.07, 132.74, 135.05, 135.16, 136.85, 139.00, 148.79, 152.08, 159.96, 160.74, 162.07, 165.81 ppm

**Υπολογίστηκε για  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}$   $[M+H]^+$  :** 382.16679

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$  :** 382.16624

**Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-νιτροβενζαμιδίου (23).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (82.4mg, 0.30mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (65.6mg, 0.35mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (30mL). Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **23** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (46.6mg, 36%).



**Σ.Τ.:** 237-239 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3285 (NH), 1638 (C=O) 1535, 1355 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

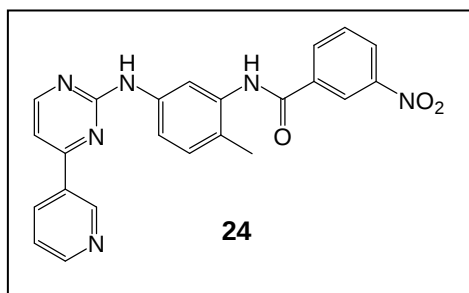
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.25 (s, 3H), 7.21 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.53 (m, 3H), 7.77 (t,  $J$  = 7.75 Hz, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 7.50 Hz, 1H), 7.90 (t,  $J$  = 7.25

Hz, 1H), 8.17 (m, 2H), 8.61 (m, 2H), 8.73 (d,  $J$  = 4.75 Hz, 1H), 9.38 (s, 1H), 9.81 (bs, 1H), 10.18 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (63 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.76, 108.50, 117.13, 117.70, 124.46, 124.80, 126.48, 129.89, 130.73, 131.37, 132.74, 133.53, 134.62, 135.10, 136.04, 139.02, 147.17, 148.78, 152.05, 160.02, 160.76, 162.00, 164.90 ppm

### Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-3-νιτροβενζαμιδίου (24).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (82.4mg, 0.30mmol) και τριαιθυλαμίνης (4mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (55.8mg, 0.30mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **24** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (64.6mg, 50%).



**Σ.Τ.:** 130 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3275 (NH), 1650 (C=O), 1527, 1355 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.22 (s, 3H), 7.22 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 4.75 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.58 (dd,

$J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 7.84 (t,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.00 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.44 (dd,  $J$  = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.48 (d,  $J$  = 7.75 Hz, 1H), 8.56 (td,  $J$  = 1.75, 7.50 Hz, 1H), 8.61 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.72 (dd,  $J$  = 1.50, 4.50 Hz, 1H), 8.87 (s, 1H), 9.37 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 9.79 (bs, 1H), 10.37 (bs, 1H) ppm

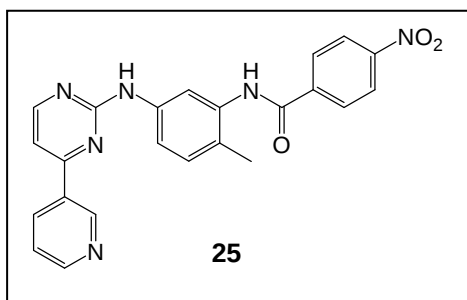
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.27, 108.02, 117.30, 117.72, 122.45, 123.83, 126.13, 126.78, 130.20, 130.26, 132.16, 134.02, 134.44, 135.76, 135.97, 138.53, 147.85, 148.23, 151.50, 159.37, 160.16, 161.53, 163.24 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 427.15186

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 427.15133

#### Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-4-νιτροβενζαμιδίου (25).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (82.4mg, 0.30mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (86.0mg, 0.46mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη 8:1). Το τελικό προϊόν **25** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (94.9mg, 74%).



**Σ.Τ.:** 255-256 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3293, (NH), 1648 (C=O), 1528, 1351 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.23 (s, 3H), 7.24 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.60 (dd,

*J* = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.50 Hz, 2H), 8.40 (d, *J* = 8.75 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 8.73 (dd, *J* = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.38 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H), 9.82 (bs, 1H), 10.29 (bs, 1H) ppm

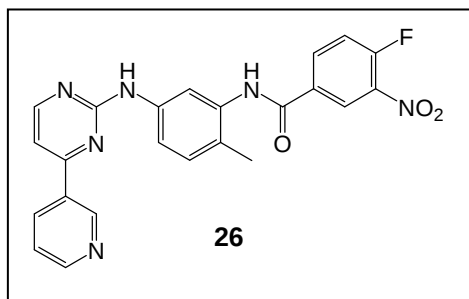
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.77, 108.53, 117.68, 117.79, 124.21, 124.39, 127.20, 129.71, 130.71, 132.66, 135.02, 136.24, 139.09, 140.79, 148.74, 149.68, 152.05, 159.93, 160.67, 162.03, 164.26 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>:** 427.15186

**Βρέθηκε *m/z* (HRMS, ESI) [M+H]<sup>+</sup>:** 427.15131

**Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-4-φθοροβενζαμιδίου (26).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-4-φθοροβενζοϋλοχλωριδίου (97.6mg, 0.48mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (15mL). Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **26** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (90.1mg, 51%).



**Σ.Τ.:** 227-229 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3277 (NH), 1648 (C=O), 1528, 1351 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.22 (s, 3H), 7.24 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.51 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 4.75, 7.75 Hz, 1H), 7.61 (dd,

$J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.79 (d,  $J$  = 8.75 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.55 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.61 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.73 (d,  $J$  = 4.50 Hz, 1H), 8.82 (dd,  $J$  = 1.75, 7.25 Hz, 1H), 9.38 (d,  $J$  = 1.25 Hz, 1H), 9.79 (bs, 1H), 10.30 (bs, 1H) ppm

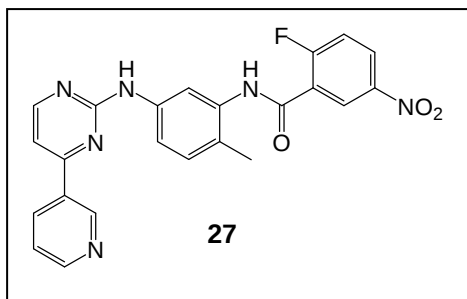
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.84, 108.61, 117.81, 117.86, 119.32, 119.66, 124.43, 126.41, 127.32, 130.79, 131.92, 132.71, 135.03, 136.01, 136.24, 137.37, 139.11, 148.80, 152.08, 159.96, 160.70, 162.10, 162.90 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 445.14244

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 445.14189

**Σύνθεση του 5-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-φθοροβενζαμιδίου (27).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 5-νιτρο-2-φθοροβενζοϋλοχλωριδίου (97.6mg, 0.48mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **27** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (114.5mg, 64%).



**Σ.Τ.:** 252-254 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3463, 3293 (NH), 1655 (C=O), 1531, 1349 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.27 (s, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.56 (dd,

*J* = 4.75, 8.50 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.00 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.48 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.74 (d, *J* = 4.25 Hz, 1H), 9.40 (s, 1H), 9.78 (bs, 1H), 10.14 (bs, 1H) ppm

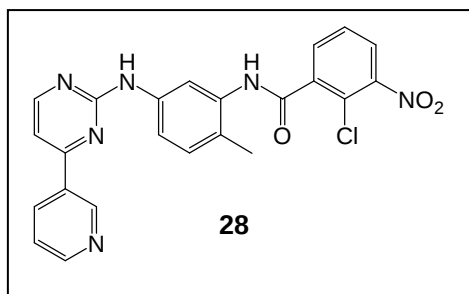
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.70, 108.57, 116.91, 117.70, 118.43, 124.41, 126.19, 126.49, 126.57, 128.65, 130.80, 132.73, 135.03, 135.86, 139.11, 144.46, 144.51, 148.85, 152.06, 160.01, 160.69, 161.21, 162.03 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$  :** 445.14244

**Βρέθηκε *m/z* (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$  :** 445.14189

**Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-χλωροβενζαμιδίου (28).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (96.7mg, 0.44mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 12:1). Το τελικό προϊόν **28** παραλαμβάνεται ως μπεζ-κίτρινο στερεό (105.4mg, 57%).



**Σ.Τ.:** 236-237 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3289 (NH), 1655 (C=O), 1534, 1356 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.27 (s, 3H), 7.21 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 7.51 (m, 3H), 7.74 (t,  $J$  = 7.50 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 7.25 Hz, 1H), 8.15

(m, 2H), 8.57 (d,  $J$  = 7.75 Hz, 1H), 8.61 (d,  $J$  = 5.00 Hz, 1H), 8.74 (d,  $J$  = 4.00 Hz, 1H), 9.39 (s, 1H), 9.78 (bs, 1H), 10.23 (bs, 1H) ppm

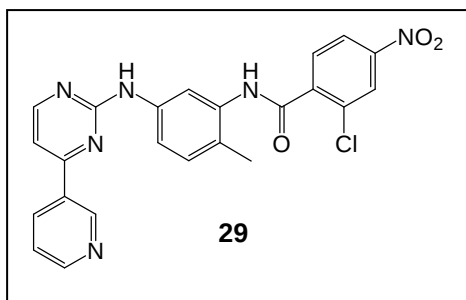
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.95, 108.59, 116.94, 117.74, 122.18, 124.45, 126.15, 126.30, 129.39, 130.83, 132.66, 132.73, 135.06, 135.86, 139.05, 140.15, 148.75, 149.15, 152.08, 160.05, 160.71, 162.02, 164.06 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 461.11289

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 461.11234

**Σύνθεση του 4-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-χλωροβενζαμιδίου (29).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (96.7mg, 0.44mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:2:1). Το τελικό προϊόν **29** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (15.4mg, 8%).



**Σ.Τ.:** 249-251 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3237 (NH), 1654 (C=O), 1542, 1351 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.28 (s, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.94 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H),

8.20 (s, 1H), 8.33 (dd, *J* = 2.25, 8.50 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 2.25 Hz, 1H), 8.58 (dt, *J* = 1.50, 8.00 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.75 (dd, *J* = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.39 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H), 9.82 (bs, 1H), 10.27 (bs, 1H) ppm

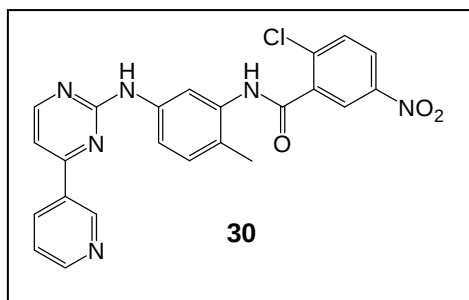
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.94, 108.61, 117.06, 117.85, 123.10, 124.48, 125.17, 126.46, 130.60, 130.86, 131.64, 132.73, 135.06, 135.64, 139.08, 143.34, 148.76, 148.84, 152.11, 160.07, 160.71, 162.02, 164.23 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$  :** 461.11289

**Βρέθηκε *m/z* (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$  :** 461.11234

**Σύνθεση του 5-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-χλωροβενζαμιδίου (30).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 5-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (105.5mg, 0.48mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 72 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, όπου παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **30** παραλαμβάνεται ως μπεζ στερεό (68.1mg, 37%).



**Σ.Τ.:** 230-233 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3277 (NH), 1655 (C=O), 1529, 1345 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.28 (s, 3H), 7.21 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.50 (m, 2H), 7.56 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 8.75 Hz,

1H), 8.21 (s, 1H), 8.33 (dd,  $J$  = 2.00, 8.75 Hz, 1H), 8.47 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.59 (m, 2H), 8.74 (d,  $J$  = 4.50 Hz, 1H), 9.40 (s, 1H), 9.80 (bs, 1H), 10.29 (bs, 1H) ppm

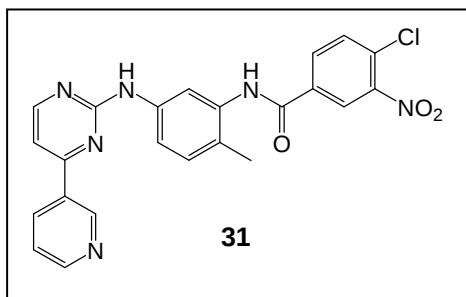
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 18.04, 108.51, 117.01, 117.42, 124.36, 124.44, 125.78, 125.88, 126.38, 130.70, 131.84, 132.75, 135.04, 137.64, 138.98, 139.07, 146.72, 148.80, 152.05, 160.00, 160.04, 160.72, 161.99 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 461.11289

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 461.11234

**Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-4-χλωροβενζαμιδίου (31).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-4-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (105.5mg, 0.48mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (15mL). Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **31** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (73.9mg, 43%).



**Σ.Τ.:** 226-228 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3277 (NH), 1648 (C=O), 1533, 1345 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.22 (s, 3H), 7.24 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.60 (dd,

*J* = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 8.00 (m, 2H), 8.32 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.55 (dt, *J* = 1.50, 8.00 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H), 8.72 (dd, *J* = 1.25, 4.75 Hz, 1H), 9.38 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 9.83 (bs, 1H), 10.31 (bs, 1H) ppm

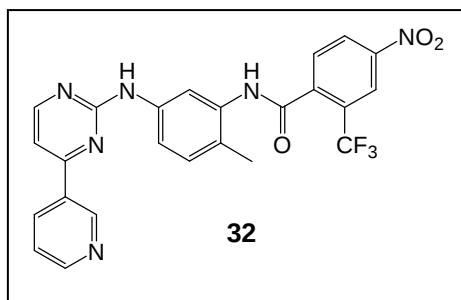
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.84, 108.62, 117.68, 117.87, 124.44, 125.53, 127.23, 128.64, 130.81, 132.61, 132.71, 133.27, 135.04, 135.14, 136.15, 139.11, 147.99, 148.80, 152.08, 159.96, 160.69, 162.09, 162.98 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 461.11289

**Βρέθηκε *m/z* (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 461.11197

**Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (32).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (121.6mg, 0.48mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **32** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (80.1mg, 41%).



**Σ.Τ.:** 269-271 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3293 (NH), 1655 (C=O), 1535, 1351 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.26 (s, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 7.55 (m, 2H), 8.07 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H),

8.12 (s, 1H), 8.57 (m, 2H), 8.61 (d, *J* = 5.00 Hz, 1H), 8.66 (dd, *J* = 1.75, 8.25 Hz, 1H), 8.74 (dd, *J* = 1.25, 4.75 Hz, 1H), 9.38 (d, *J* = 1.25 Hz, 1H), 9.83 (bs, 1H), 10.32 (bs, 1H) ppm

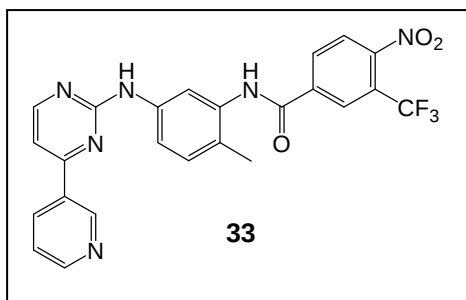
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.68, 108.61, 117.14, 117.99, 122.28, 124.46, 124.42, 124.52, 126.47, 128.24, 130.87, 131.31, 132.74, 132.78, 135.02, 135.63, 139.12, 148.37, 148.77, 152.09, 160.04, 160.74, 162.03, 164.71 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> :** 495.13925

**Βρέθηκε m/z (HRMS, ESI) [M+H]<sup>+</sup> :** 495.13870

**Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (33).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (110.8mg, 0.40mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (116.6mg, 0.46mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:2:1). Το τελικό προϊόν **33** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (118.3mg, 60%).



**Σ.Τ.:** 228-230 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3277 (NH), 1655 (C=O), 1542, 1346 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.23 (s, 3H), 7.25 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 4.75, 7.50 Hz, 1H), 7.60 (dd,

$J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.37 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 8.54 (m, 2H), 8.61 (m, 2H), 8.72 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.39 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 9.85 (bs, 1H), 10.46 (bs, 1H) ppm

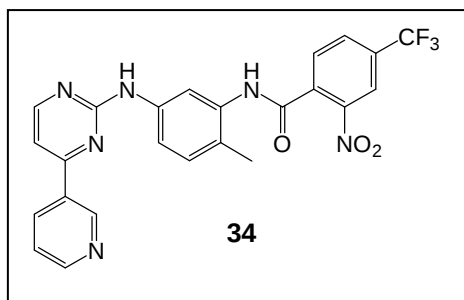
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.83, 108.64, 117.60, 117.97, 124.41, 126.43, 127.19, 127.89, 127.97, 130.86, 132.70, 134.30, 135.05, 136.01, 139.15, 139.18, 148.84, 149.29, 149.37, 152.07, 159.98, 160.69, 162.10, 162.96 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 495.13925

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 495.13870

**Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (34).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (102.3mg, 0.37mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (104.4mg, 0.44mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1). Το τελικό προϊόν **34** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (24.0mg, 13%).



**Σ.Τ.:** 267-270 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3259 (NH), 1645 (C=O), 1535, 1331 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

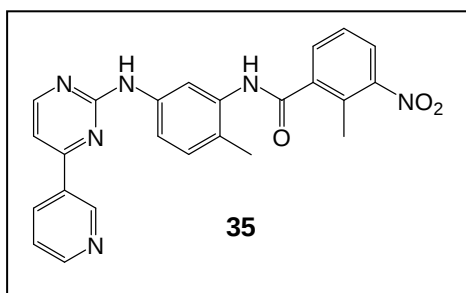
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.30 (s, 3H), 7.27 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.56 (m, 3H), 8.11 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.00

Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.65 (m, 2H), 8.77 (dd, *J* = 1.25, 4.75 Hz, 1H), 9.41 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H), 9.83 (bs, 1H), 10.35 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.62, 108.55, 116.88, 117.89, 122.15, 122.19, 124.52, 126.27, 130.86, 131.27, 131.35, 131.50, 132.71, 135.15, 135.62, 136.79, 139.03, 147.26, 148.67, 152.01, 160.05, 160.71, 162.00, 163.85 ppm

### Σύνθεση του 2-μεθυλο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτροβενζαμιδίου (35).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (91.5mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-μεθυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (79.0mg, 0.39mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1), από όπου δεν απομονώθηκε καθαρό το προϊόν. Ακολούθησε δεύτερη χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1), χωρίς αποτέλεσμα. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (15mL) και παραμένει για αρκετές μέρες αποθηκευμένο. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **35** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (41.9mg, 29%).



**Σ.Τ.:** 249-251 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3300 (NH), 1648 (C=O), 1527, 1350 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.27 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 7.22 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.60 (t,  $J$  = 7.75

Hz, 1H), 7.84 (d,  $J$  = 7.50 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 7.75 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.57 (dt,  $J$  = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.62 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.74 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.39 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 9.81 (bs, 1H), 10.11 (bs, 1H) ppm

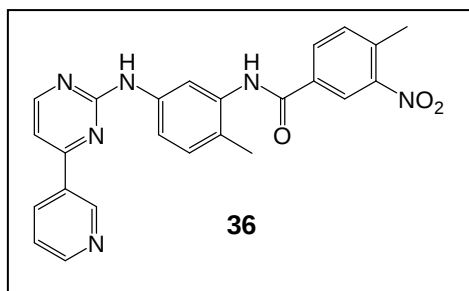
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 16.09, 17.97, 108.60, 117.26, 117.69, 124.44, 125.22, 126.53, 127.87, 129.35, 130.79, 131.89, 132.76, 135.01, 136.12, 139.06, 141.06, 148.77, 151.00, 152.11, 160.06, 160.72, 162.03, 166.80 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$  :** 441.16751

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$  :** 441.16696

**Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτροβενζαμιδίου (36).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (91.5mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-μεθυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (81.0mg, 0.41mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (30mL). Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **36** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (27.7mg, 19%).



**Σ.Τ.:** 210-212 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3255 (NH), 1639 (C=O), 1529, 1342 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.18 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 7.20 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.50 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz,

1H), 7.57 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.67 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 7.96 (d,  $J$  = 1.50 Hz, 1H), 8.22 (dd,  $J$  = 1.25, 8.00 Hz, 1H), 8.51 (dt,  $J$  = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.57 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.60 (d,  $J$  = 1.25 Hz, 1H), 8.68 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.33 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 9.77 (bs, 1H), 10.18 (bs, 1H) ppm

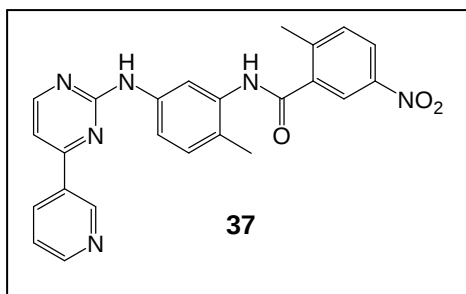
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 17.84, 20.18, 108.59, 117.77, 117.86, 124.19, 124.42, 127.33, 130.75, 132.58, 132.72, 133.72, 134.06, 135.03, 136.37, 136.83, 139.07, 148.79, 149.38, 152.07, 159.95, 160.71, 162.08, 163.67 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 441.16751

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 441.16696

**Σύνθεση του 2-μεθυλο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-5-νιτροβενζαμιδίου (37).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (91.5mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (4mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-μεθυλο-5-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (81.3mg, 0.41mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **37** παραλαμβάνεται ως μπεζ στερεό (57.2mg, 39%).



**Σ.Τ.:** 255-256 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3267 (NH), 1655 (C=O), 1523, 1348 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.24 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 7.19 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.48 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.51 (m, 2H), 7.61 (d,  $J$  = 8.50

Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.24 (dd,  $J$  = 2.00, 8.50 Hz, 1H), 8.31 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.53 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.69 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.35 (d,  $J$  = 1.50 Hz, 1H), 9.76 (bs, 1H), 10.08 (bs, 1H) ppm

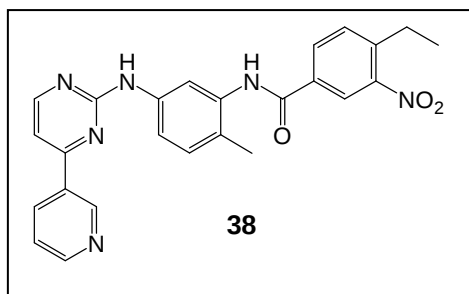
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 18.01, 20.22, 108.59, 117.43, 117.76, 122.63, 124.42, 124.70, 126.72, 130.80, 132.63, 132.76, 134.98, 136.10, 138.66, 139.06, 144.43, 145.94, 148.77, 152.07, 160.04, 160.71, 162.03, 166.31 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$  :** 441.16751

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$  :** 441.16696

**Σύνθεση του 4-αιθυλο-N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτροβενζαμιδίου (38).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (102.3mg, 0.37mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-αιθυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (75.3mg, 0.35mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **38** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (59.6mg, 46%).



**Σ.Τ.:** 215-216 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3266 (NH), 1637 (C=O), 1528, 1353 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

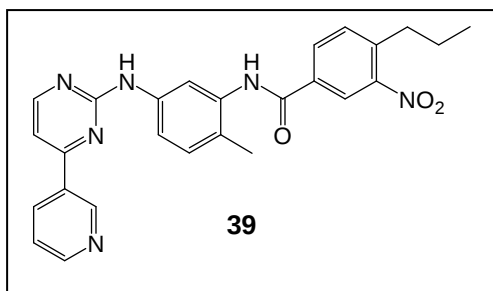
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 1.31 (t, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.95 (q, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 7.55 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J$  =

4.55, 8.00 Hz, 1H), 7.65 (dd,  $J$  = 2.25, 8.25 Hz, 1H), 7.78 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.33 (dd,  $J$  = 1.50, 8.00 Hz, 1H), 8.61 (m, 2H), 8.65 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.77 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.42 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 9.84 (bs, 1H), 10.25 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 15.32, 17.81, 25.78, 108.60, 117.82, 117.87, 124.05, 124.43, 127.35, 130.75, 132.28, 132.58, 132.73, 134.11, 135.05, 136.36, 139.05, 141.80, 148.76, 149.43, 152.05, 159.96, 160.71, 162.09, 163.73 ppm

**Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτρο-4-προπυλοβενζαμιδίου (39).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της της διαμίνης **9** (102.3mg, 0.37mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-προπυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (105.7mg, 0.46mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **39** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (89.8mg, 52%).



**Σ.Τ.:** 189-190 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3277 (NH), 1645 (C=O), 1530, 1337 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

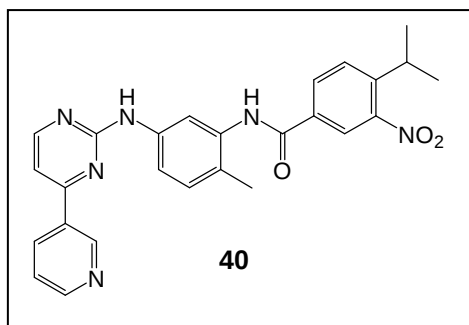
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 1.00 (t, 3H), 1.67 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.92 (t, 2H), 7.30 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 7.56 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H),

7.59 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 2.25, 8.25 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.32 (dd,  $J$  = 1.50, 8.00 Hz, 1H), 8.61 (m, 2H), 8.66 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.77 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.42 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 9.84 (bs, 1H), 10.25 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 14.31, 17.83, 23.90, 34.24, 108.59, 117.81, 117.86, 124.07, 124.41, 127.33, 130.74, 132.33, 132.73, 132.88, 134.17, 135.03, 136.37, 139.06, 140.11, 148.780, 149.66, 152.04, 159.94, 160.72, 162.09, 163.71 ppm

### Σύνθεση του N-[2-μεθυλο-5-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτρο-4- *i*-προπυλοβενζαμιδίου (40).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **9** (102.3mg, 0.37mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-*i*-προπυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (122.3mg, 0.53mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:2:1), από όπου δεν απομονώθηκε καθαρό το προϊόν. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (15mL) και παραμένει για αρκετές μέρες αποθηκευμένο. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **40** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (40.7mg, 32%).



**Σ.Τ.:** 233-235 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3268 (NH), 1639 (C=O), 1527, 1359 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

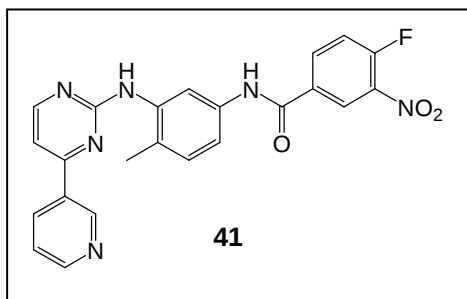
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 1.36 (d, 6H), 2.26 (s, 3H), 3.32 (m, 1H), 7.29 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 7.56 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.60 (dd,  $J$  =

4.75, 7.50 Hz, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 2.25, 8.25 Hz, 1H), 7.90 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.33 (dd,  $J$  = 1.75, 8.25 Hz, 1H), 8.48 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.60 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.66 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.77 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.42 (d,  $J$  = 2.25 Hz, 1H), 9.84 (bs, 1H), 10.22 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 17.81, 23.70, 29.01, 108.60, 117.84, 123.31, 124.42, 127.32, 128.90, 130.75, 132.20, 132.70, 132.73, 133.95, 135.04, 136.36, 139.06, 145.19, 148.78, 149.75, 152.05, 159.95, 160.72, 162.10, 163.69 ppm

#### **Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-4-φθοροβενζαμιδίου (41).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (99.4mg, 0.36mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-4-φθοροβενζοϋλοχλωριδίου (87.6mg, 0.43mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:2:1). Το τελικό προϊόν **41** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (79.3mg, 50%).



**Σ.Τ.:** 208-210 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3428, 3285 (NH), 1649 (C=O), 1530, 1346 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.26 (s, 3H), 7.25 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.46 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.49 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.53 (dd,

$J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.77 (d,  $J$  = 8.75 Hz, 1H), 8.10 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.49 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.53 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.70 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 8.76 (dd,  $J$  = 2.25, 7.25 Hz, 1H), 9.03 (bs, 1H), 9.30 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.54 (bs, 1H) ppm

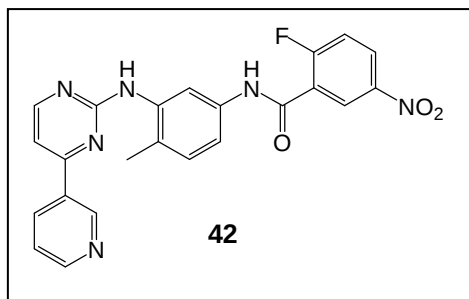
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 18.25, 108.18, 117.36, 117.80, 119.21, 119.55, 124.36, 126.31, 128.67, 130.74, 132.33, 132.72, 134.98, 136.14, 136.31, 137.13, 138.47, 148.75, 151.97, 160.05, 161.67, 162.17, 162.77 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 445.14244

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 445.14189

**Σύνθεση του 5-νιτρο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-φθοροβενζαμιδίου (42).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (232.0mg, 0.84mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (40mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 5-νιτρο-2-φθοροβενζοϋλοχλωριδίου (204.4mg, 1.00mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (15mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (30mL) και παραμένει έτσι αρκετές μέρες. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **42** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (164.5mg, 44%).



**Σ.Τ.:** 190-192 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3449, 3329 (NH), 1659 (C=O), 1528, 1349 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.26 (s, 3H), 7.25 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J$  = 2.00, 9.00 Hz, 1H), 7.46 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.53

(dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.67 (d,  $J$  = 9.00 Hz, 1H), 8.07 (d,  $J$  = 1.50 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.48 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.53 (m, 2H), 8.71 (dd,  $J$  = 1.25, 4.75 Hz, 1H), 9.04 (bs, 1H), 9.30 (d,  $J$  = 1.25 Hz, 1H), 10.66 (bs, 1H) ppm

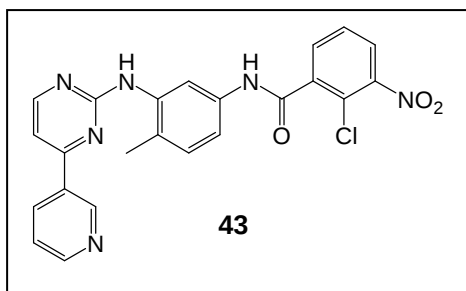
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 18.26, 108.23, 116.62, 117.01, 118.40, 118.79, 124.35, 126.28, 126.36, 126.73, 128.67, 130.87, 132.72, 134.97, 136.95, 138.56, 144.37, 148.76, 151.97, 160.06, 160.91, 161.60, 162.14 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 445.14244

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 445.14189

**Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-χλωροβενζαμιδίου (43).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (99.4mg, 0.36mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (94.6mg, 0.43mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1). Το τελικό προϊόν **43** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό πορτοκαλί στερεό (36.9mg, 22%).



**Σ.Τ.:** 223-225 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3422 (NH), 1676 (C=O), 1537, 1365 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.25 (s, 3H), 7.24 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.39 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.45 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.52

(dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.71 (t,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 7.92 (dd,  $J$  = 1.50, 7.75 Hz, 1H), 8.08 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.15 (dd,  $J$  = 1.50, 8.00 Hz, 1H), 8.47 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.54 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.70 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.04 (bs, 1H), 9.29 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.70 (bs, 1H) ppm

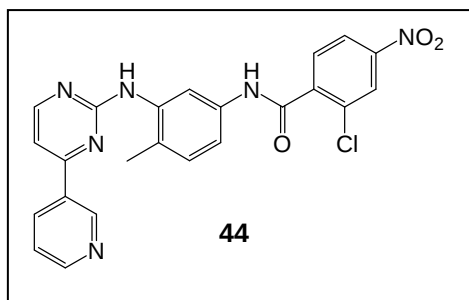
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 18.26, 108.22, 116.38, 116.77, 122.20, 124.34, 126.24, 128.57, 129.40, 130.87, 132.64, 132.71, 134.96, 137.02, 138.57, 139.93, 148.74, 149.10, 151.96, 160.08, 161.57, 162.10, 163.53 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$  :** 461.11289

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$  :** 461.11234

**Σύνθεση του 4-νιτρο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-χλωροβενζαμιδίου (44).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (92.3mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (89.3mg, 0.40mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:2:1). Το τελικό προϊόν **44** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (88.5mg, 58%).



**Σ.Τ.:** 190-193 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3429, 3247 (NH), 1671 (C=O), 1530, 1351 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.28 (s, 3H), 7.26 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.42 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.47 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.54

(dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.92 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 8.09 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.32 (dd,  $J$  = 2.25, 8.50 Hz, 1H), 8.46 (d,  $J$  = 2.25 Hz, 1H), 8.49 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.55 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.72 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.04 (bs, 1H), 9.31 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.73 (bs, 1H) ppm

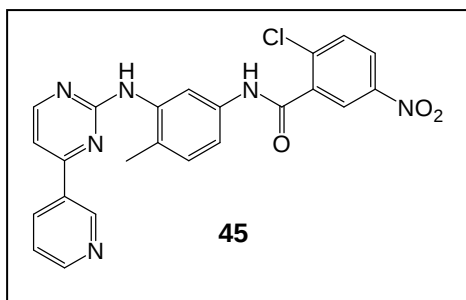
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 18.26, 108.23, 116.45, 116.84, 123.07, 124.36, 125.16, 128.63, 130.58, 130.88, 131.68, 132.72, 134.97, 136.96, 138.57, 143.08, 148.75, 148.84, 151.97, 160.09, 161.57, 162.11, 163.71 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 461.11289

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 461.11234

**Σύνθεση του 5-νιτρο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-2-χλωροβενζαμιδίου (45).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (95.4mg, 0.34mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 5-νιτρο-2-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (98.7mg, 0.45mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1). Το τελικό προϊόν **45** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (127.4mg, 81%).



**Σ.Τ.:** 222-224 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3435, 3259 (NH), 1656 (C=O), 1533, 1344 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

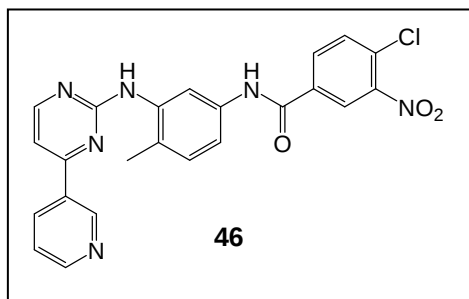
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.30 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.49 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.57

(dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 8.75 Hz, 1H), 8.12 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.38 (dd,  $J$  = 2.75, 8.75 Hz, 1H), 8.50 (d,  $J$  = 2.75 Hz, 1H), 8.52 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.74 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.05 (bs, 1H), 9.33 (d,  $J$  = 2.25 Hz, 1H), 10.75 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 18.24, 108.21, 116.58, 116.94, 124.23, 124.35, 126.15, 128.60, 130.86, 131.86, 132.71, 134.99, 137.04, 137.65, 138.43, 138.52, 146.68, 148.70, 151.94, 160.09, 161.57, 162.09, 163.18 ppm

**Σύνθεση του 3-νιτρο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-4-χλωροβενζαμιδίου (46).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (99.4mg, 0.36mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-νιτρο-4-χλωροβενζοϋλοχλωριδίου (86.0mg, 0.39mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (30mL) και παραμένει 24 ώρες αποθηκευμένο. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **46** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (97.3mg, 59%).



**Σ.Τ.:** 198-200 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3431, 3268 (NH), 1647 (C=O), 1528, 1335 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.26 (s, 3H), 7.25 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.46 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.48 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.53 (dd,

$J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.98 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 8.10 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.27 (dd,  $J$  = 2.00, 8.50 Hz, 1H), 8.48 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.53 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.65 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.70 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.03 (bs, 1H), 9.30 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.53 (bs, 1H) ppm

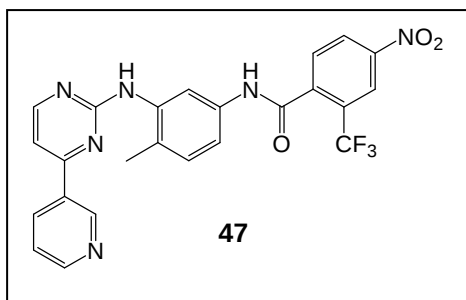
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 18.26, 108.18, 117.28, 117.73, 124.36, 125.38, 128.51, 128.71, 130.76, 132.48, 132.71, 133.37, 134.97, 135.53, 137.07, 138.48, 147.89, 148.74, 151.95, 160.04, 161.66, 162.17, 162.80 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>23</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 461.11289

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 461.11234

**Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (47).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (92.3mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-2-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (105.8mg, 0.42mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 12:2:1). Το τελικό προϊόν **47** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (45.2mg, 28%).



**Σ.Τ.:** 250-252 °C (αποσυντίθεται)

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3242 (NH), 1686 (C=O), 1533, 1356 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.28 (s, 3H), 7.26 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 7.52

(dd, *J* = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 8.49 (dt, *J* = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 8.64 (dd, *J* = 2.25, 8.25 Hz, 1H), 8.72 (dd, *J* = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.03 (bs, 1H), 9.30 (d, *J* = 1.75 Hz, 1H), 10.78 (bs, 1H) ppm

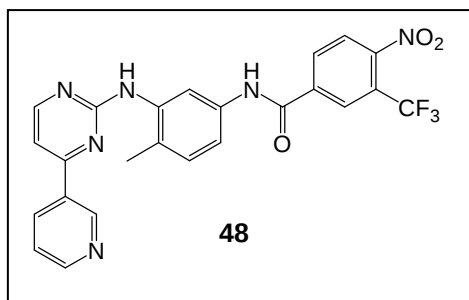
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 18.27, 108.23, 116.57, 116.96, 122.24, 122.32, 124.31, 127.47, 128.25, 128.80, 130.90, 131.22, 132.74, 134.96, 136.93, 138.59, 141.97, 148.36, 148.73, 151.97, 160.08, 161.58, 162.12, 164.11 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$  :** 495.13925

**Βρέθηκε *m/z* (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$  :** 495.13870

**Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (48).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (99.4mg, 0.36mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-νιτρο-3-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (96.6mg, 0.38mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1). Το τελικό προϊόν **48** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (70.9mg, 40%).



**Σ.Τ.:** 218-219 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3449, 3268 (NH), 1649 (C=O), 1527, 1363 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.29 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.48 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.51 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.55 (dd,

$J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 8.14 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.36 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 8.50 (dt,  $J$  = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.56 (m, 2H), 8.72 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.02 (bs, 1H), 9.32 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 10.67 (bs, 1H) ppm

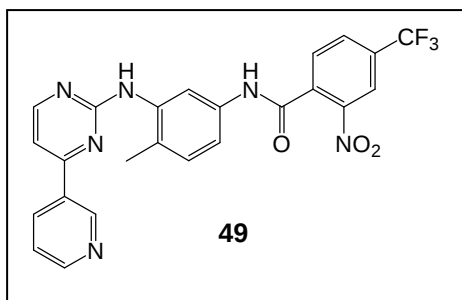
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 18.27, 108.21, 117.31, 117.73, 122.15, 124.36, 126.31, 127.81, 127.89, 128.85, 130.80, 132.69, 134.37, 134.98, 136.97, 138.52, 139.62, 148.76, 149.14, 151.97, 160.05, 161.65, 162.17, 162.82 ppm

**Υπολογίστηκε για C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  $[M+H]^+$ :** 495.13925

**Βρέθηκε  $m/z$  (HRMS, ESI)  $[M+H]^+$ :** 495.13870

**Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (49).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (96.6mg, 0.35mmol) και τριαιθυλαμίνης (1,5mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-νιτρο-4-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (114.3mg, 0.45mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 40:4:1). Το τελικό προϊόν **49** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (51.0mg, 30%).



**Σ.Τ.:** 217-219 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3241 (NH), 1692 (C=O), 1536, 1321 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

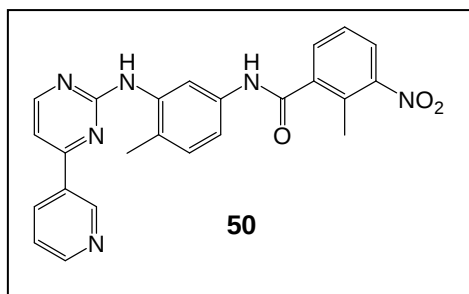
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.26 (s, 3H), 7.24 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 7.52

(dd, *J* = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.00 Hz, 1H), 8.48 (dt, *J* = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.53 (m, 2H), 8.70 (dd, *J* = 1.75, 4.75 Hz, 1H), 9.04 (bs, 1H), 9.28 (d, *J* = 1.75 Hz, 1H), 10.77 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 18.27, 108.22, 116.46, 116.82, 122.17, 122.23, 124.38, 128.63, 130.90, 131.31, 131.38, 131.49, 132.74, 135.02, 136.55, 137.01, 138.60, 147.32, 148.72, 151.95, 160.06, 161.57, 162.12, 163.15 ppm

**Σύνθεση του 2-μεθυλο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτροβενζαμιδίου (50).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (92.8mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-μεθυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (94.5mg, 0.47mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **50** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (43.4mg, 30%).



**Σ.Τ.:** 177-179 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3436, 3262 (NH), 1646 (C=O), 1531, 1341 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

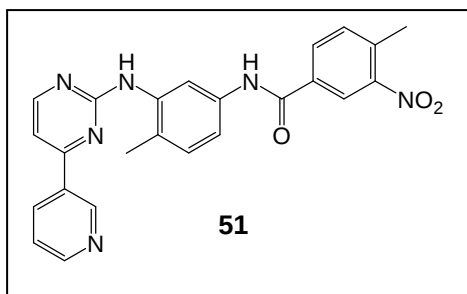
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.30 (s, 3H), 2.53 (s, 3H), 7.28 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.46 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz,

1H), 7.57 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.62 (t,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 7.84 (d,  $J$  = 7.50 Hz, 1H), 8.05 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.15 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.52 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.05 (bs, 1H), 9.34 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.58 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 16.01, 18.25, 108.19, 116.50, 116.86, 124.33, 125.26, 127.85, 128.37, 129.29, 130.77, 131.86, 132.73, 134.94, 137.26, 138.49, 140.97, 148.76, 150.96, 151.96, 160.08, 161.58, 162.09, 166.37 ppm

**Σύνθεση του 4-μεθυλο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτροβενζαμιδίου (51).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (91.5mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-μεθυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (94.9mg, 0.47mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (20mL) και παραμένει 24 ώρες αποθηκευμένο. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **51** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (111.4mg, 77%).



**Σ.Τ.:** 208-209 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3432, 3272 (NH), 1643 (C=O), 1530, 1338 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

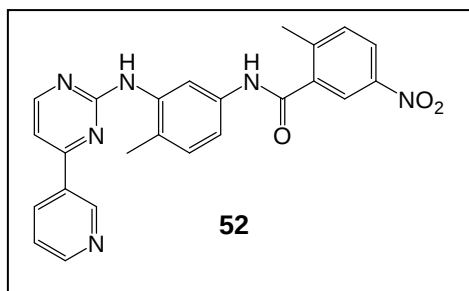
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 2.31 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 2.25, 8.25 Hz,

1H), 7.58 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 8.16 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.27 (dd,  $J$  = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.53 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.64 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.74 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.05 (bs, 1H), 9.34 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.49 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 18.24, 20.15, 108.14, 117.34, 117.80, 124.08, 124.35, 128.54, 130.70, 132.67, 132.72, 133.62, 134.42, 134.97, 136.76, 137.25, 138.43, 148.74, 149.29, 151.95, 160.04, 161.68, 162.15, 163.54 ppm

**Σύνθεση του 2-μεθυλο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-5-νιτροβενζαμιδίου (52).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (91.5mg, 0.33mmol) και τριαιθυλαμίνης (3mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-μεθυλο-5-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (90.9mg, 0.46mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1). Το τελικό προϊόν **52** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (62.3mg, 43%).



**Σ.Τ.:** 230-233 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3435, 3275 (NH), 1649 (C=O), 1533, 1345 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

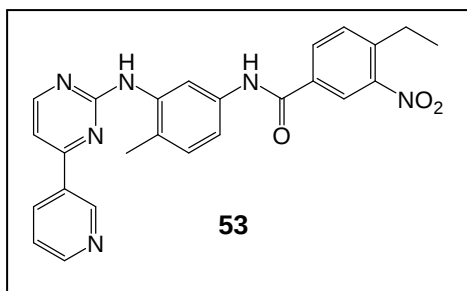
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 2.31 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.47 (dd,  $J$  = 2.00, 8.50 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz,

1H), 7.57 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.68 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 8.15 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.30 (dd,  $J$  = 2.50, 8.50 Hz, 1H), 8.36 (d,  $J$  = 2.50 Hz, 1H), 8.52 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.06 (bs, 1H), 9.34 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 10.58 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 18.25, 20.10, 108.17, 116.67, 117.04, 122.66, 124.32, 124.71, 128.41, 130.75, 132.61, 132.74, 134.94, 137.29, 138.47, 138.63, 144.48, 145.89, 148.76, 151.95, 160.08, 161.60, 162.10, 165.89 ppm

**Σύνθεση του 4-αιθυλο-N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτροβενζαμιδίου (53).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (95.4mg, 0.34mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-αιθυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (89.4mg, 0.41mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1). Το τελικό προϊόν **53** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (49.3mg, 32%).



**Σ.Τ.:** 148-150 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3247 (NH), 1663 (C=O), 1530, 1324 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

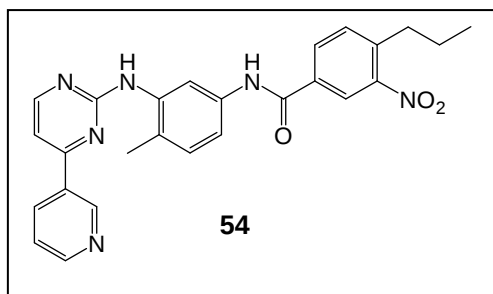
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 1.30 (t, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.94 (q, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  =

2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 8.15 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.28 (dd,  $J$  = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.53 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.56 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.74 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.05 (bs, 1H), 9.34 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.48 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 15.28, 18.21, 25.74, 108.13, 117.30, 117.75, 123.94, 124.34, 128.54, 130.69, 132.15, 132.67, 132.71, 134.49, 134.96, 137.21, 138.42, 141.68, 148.73, 149.28, 151.94, 160.04, 161.67, 162.15, 163.57 ppm

### Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτρο-4-προπυλοβενζαμιδίου (54).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (88.0mg, 0.32mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-προπυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (70.0mg, 0.31mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (30mL) και παραμένει αρκετές μέρες αποθηκευμένο. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **54** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (86.6mg, 60%).



**Σ.Τ.:** 171-173 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3431, 3287 (NH), 1647 (C=O), 1527, 1336 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

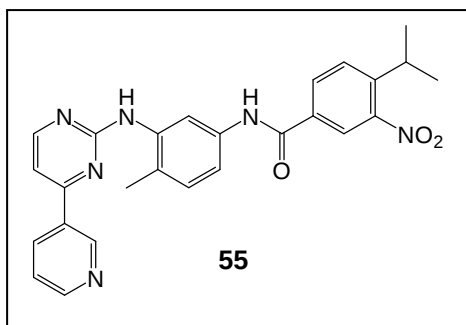
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 1.00 (t, 3H), 1.66 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.90 (t, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H),

7.53 (dd,  $J$  = 2.25, 8.25 Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.15 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.26 (dd,  $J$  = 1.75, 8.00 Hz, 1H), 8.53 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.55 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.74 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.04 (bs, 1H), 9.34 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.48 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 14.33, 18.25, 23.91, 34.22, 108.14, 117.31, 117.76, 123.96, 124.36, 128.55, 130.70, 132.42, 132.72, 132.78, 134.56, 134.97, 137.26, 138.43, 140.02, 148.74, 149.56, 151.95, 160.04, 161.68, 162.15, 163.59 ppm

### Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο)φαινυλο]-3-νιτρο-4- *i*-προπυλοβενζαμιδίου (55).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα διαμίνης **8** (88.0mg, 0.32mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-*i*-προπυλο-3-νιτροβενζοϋλοχλωριδίου (70.0mg, 0.31mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **55** παραλαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (88.7mg, 59%).



**Σ.Τ.:** 216-217 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3267 (NH), 1652 (C=O), 1535, 1367 (NO<sub>2</sub>) cm<sup>-1</sup>.

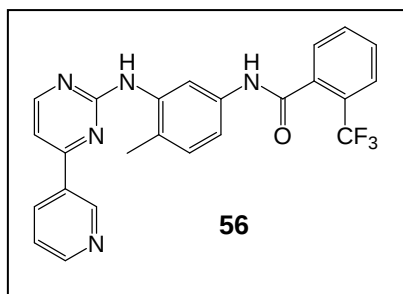
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 1.35 (d, 6H), 2.30 (s, 3H), 3.32 (m, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* =

2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 2.00 Hz, 1H), 8.27 (dd, *J* = 1.75, 8.25 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 1.75 Hz, 1H), 8.53 (dt, *J* = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 8.74 (dd, *J* = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.05 (bs, 1H), 9.34 (d, *J* = 1.50 Hz, 1H), 10.46 (bs, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  :** 18.24, 23.69, 29.00, 108.14, 117.26, 117.72, 123.17, 124.35, 128.54, 128.79, 130.70, 132.31, 132.72, 134.35, 134.97, 137.27, 138.43, 145.07, 148.74, 149.63, 151.94, 160.04, 161.67, 162.15, 163.61 ppm

#### **Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-2-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (56).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (96.6mg, 0.35mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.5mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (115.0mg, 0.55mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλύνονται με νερό, μετά ξηραίνονται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 40:4:1). Το τελικό προϊόν **56** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (66.6mg, 42%).



**Σ.Τ.:** 175-176 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3231 (NH), 1678 (C=O).

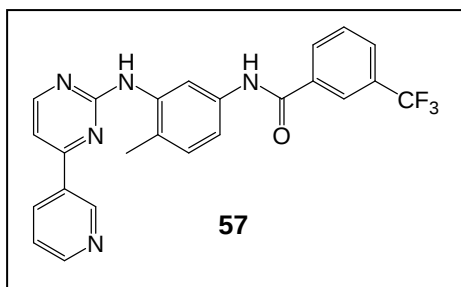
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 2.29 (s, 3H), 7.27 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.49 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.55 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.84 (m, 2H), 8.08 (d,  $J$

= 2.00 Hz, 1H), 8.52 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.57 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.06 (bs, 1H), 9.32 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 10.57 (bs, 1H) ppm

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 18.19, 108.12, 116.57, 116.98, 124.28, 126.07, 126.57, 126.79, 126.87, 128.41, 129.04, 130.47, 130.73, 132.77, 133.16, 134.96, 137.42, 138.45, 148.71, 151.92, 160.05, 161.63, 162.10, 165.95 ppm

### Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-3-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (57).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (96.6mg, 0.35mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.5mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (133.0mg, 0.64mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (30mL) και παραμένει 24 ώρες αποθηκευμένο. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **57** παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (103.6mg, 66%).



**Σ.Τ.:** 169-171 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3320 (NH), 1656 (C=O).

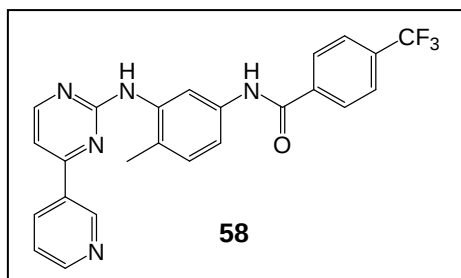
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 2.31 (s, 3H), 7.30 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.49 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 2.25, 8.50 Hz, 1H), 7.57 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.83 (t,  $J$  = 8.00 Hz, 1H),

8.02 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.16 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.32 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.53 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.74 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.04 (bs, 1H), 9.34 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 10.50 (bs, 1H) ppm

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 18.24, 108.13, 117.39, 117.84, 124.33, 124.72, 124.78, 128.55, 129.43, 129.94, 130.27, 130.68, 132.35, 132.72, 134.96, 136.43, 137.31, 138.43, 148.75, 151.94, 160.04, 161.69, 162.15, 164.39 ppm

#### **Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-4-(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (58).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (95.4mg, 0.34mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 4-(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (90.3mg, 0.43mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 40:4:1). Το τελικό προϊόν **58** παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (35.8mg, 23%).



**Σ.Τ.:** 229-230 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3449, 3305 (NH), 1648 (C=O).

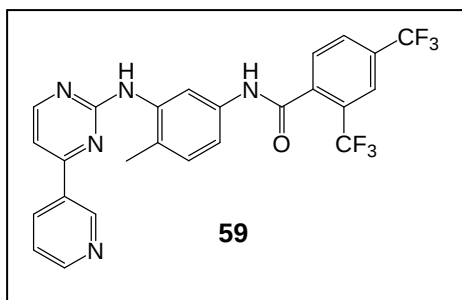
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 2.31 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.58 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 7.97 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 2H),

8.17 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.21 (d,  $J$  = 8.00 Hz, 2H), 8.53 (dt,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.05 (bs, 1H), 9.34 (d,  $J$  = 1.50 Hz, 1H), 10.50 (bs, 1H) ppm

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 18.25, 108.13, 117.30, 117.74, 124.35, 125.84, 125.91, 125.97, 128.54, 129.11, 130.69, 132.73, 134.97, 137.35, 138.43, 139.42, 148.74, 151.95, 160.04, 161.68, 162.15, 164.76 ppm

#### **Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-2,4-δισ(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (59).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (96.6mg, 0.35mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.5mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2,4-δισ(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (128.6mg, 0.46mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο στερεό υπόλειμμα προστίθεται διχλωρομεθάνιο (30mL) και παραμένει 24 ώρες αποθηκευμένο. Το νέο ίζημα διηθείται και παραλαμβάνεται ως καθαρό προϊόν. Το τελικό προϊόν **59** παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (44.2mg, 24%).



**Σ.Τ.:** 180-181 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3438, 3235 (NH), 1679 (C=O).

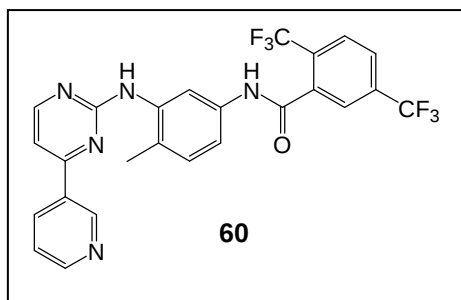
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :** 2.30 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.41 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.56 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 8.03 (d,  $J$  = 8.00 Hz,

1H), 8.06 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.28 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 8.52 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.06 (bs, 1H), 9.32 (d,  $J$  = 1.50 Hz, 1H), 10.71 (bs, 1H) ppm

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :** 18.23, 108.21, 116.54, 116.91, 123.95, 124.31, 125.68, 125.85, 127.20, 127.72, 128.68, 130.34, 130.59, 130.87, 131.13, 132.75, 134.97, 137.03, 138.55, 148.70, 151.94, 160.07, 161.58, 162.11, 164.60 ppm

#### **Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-2,5-δισ(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (60).**

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (95.4mg, 0.34mmol) και τριαιθυλαμίνης (1.5mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 2,5-δισ(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (156.2mg, 0.56mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 20:4:1). Το τελικό προϊόν **60** παραλαμβάνεται ως ανοιχτό κίτρινο στερεό (101.1mg, 57%).



**Σ.Τ.:** 219-220 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3451, 3240 (NH), 1656 (C=O).

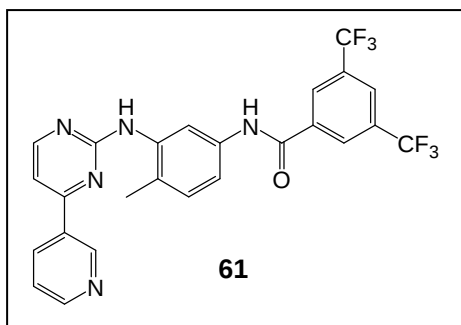
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 2.30 (s, 3H), 7.29 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J$  = 2.00, 8.25 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.55 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 8.06 (d,  $J$  = 2.00 Hz,

1H), 8.17 (m, 2H), 8.22 (s, 1H), 8.52 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.58 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.75 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.06 (bs, 1H), 9.33 (d,  $J$  = 1.75 Hz, 1H), 10.71 (bs, 1H) ppm

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 18.23, 108.19, 116.66, 117.06, 124.29, 126.19, 126.25, 127.48, 127.52, 128.39, 128.46, 128.67, 130.82, 132.75, 134.97, 137.09, 137.88, 137.91, 138.53, 148.72, 151.93, 160.07, 161.61, 162.10, 164.32 ppm

### Σύνθεση του N-[4-μεθυλο-3-(4-(πυριδιν-3υλο)πυριμιδιν-2-υλαμινο) φαινυλο]-3,5-δισ(τριφθορομεθυλο)βενζαμιδίου (61).

Σε υπό ανάδευση διάλυμα της διαμίνης **8** (88.0mg, 0.32mmol) και τριαιθυλαμίνης (2mL) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (30mL) στους 5 °C (υπό ψύξη) προστίθεται με σταγονομετρικό χωνί διάλυμα 3,5-δισ(τριφθορομεθυλο)βενζοϋλοχλωριδίου (95.6mg, 0.5mmol) σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10mL). Μετά το τέλος της προσθήκης η αντίδραση αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση επί 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ο διαλύτης συμπυκνώνεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα ανθρακικού καλίου και διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν ήταν δυσδιάλυτο στην οργανική φάση και πριν το διαχωρισμό πραγματοποιείται διήθηση, οπότε παραλαμβάνεται καθαρό. Στη συνέχεια η οργανική φάση συλλέγεται και εκπλύνεται με νερό, μετά ξηραίνεται με θειικό νάτριο και απομακρύνεται ο διαλύτης. Στο υπόλειμμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (διχλωρομεθάνιο / ακετόνη / μεθανόλη 24:4:1). Το τελικό προϊόν **61** παραλαμβάνεται ως υποκίτρινο στερεό (132.5mg, 80%).



**Σ.T.:** 241-242 °C

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$ :** 3446, 3277 (NH), 1651 (C=O).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 2.32 (s, 3H), 7.32 (d,  $J$  = 8.25 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 7.55 (dd,  $J$  = 2.25, 8.50 Hz, 1H), 7.57 (dd,  $J$  = 4.75, 8.00 Hz, 1H), 8.17 (d,  $J$  = 2.00 Hz, 1H),

8.43 (s, 1H), 8.53 (dt,  $J$  = 2.00, 8.00 Hz, 1H), 8.59 (d,  $J$  = 5.25 Hz, 1H), 8.68 (s, 2H), 8.74 (dd,  $J$  = 1.50, 4.75 Hz, 1H), 9.06 (bs, 1H), 9.35 (d,  $J$  = 2.25 Hz, 1H), 10.69 (bs, 1H) ppm

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  :** 18.23, 108.21, 117.44, 117.87, 124.33, 128.81, 129.05, 129.09, 130.74, 130.77, 131.27, 132.70, 134.97, 136.97, 137.75, 138.52, 148.76, 151.94, 160.04, 161.67, 162.18, 162.89 ppm

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα-συμπεράσματα, που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή, συνοψίζονται επιγραμματικά ως εξής:

✓ Πραγματοποιήθηκαν ο σχεδιασμός, η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και σε μεγάλο βαθμό ο βιολογικός έλεγχος **48** νέων παραγώγων της φαινυλοαμινοπυριμιδίνης, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec(Imatinib).

✓ Οι τροποποιήσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν, στοχευμένες-επιλεκτικές ή ευρείες, στη μοριακή δομή του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec, αφορούν τους δακτυλίους A, C και D, εκτός του πυριδινικού δακτυλίου, που διατηρήθηκε ως έχει και του N-μεθυλοπιπεραζινικού δακτυλίου, ο οποίος εξαλείφθηκε. Συγκεκριμένα:

α) Έγινε σύνδεση της πυριδινικού δακτυλίου A στην 4-θέση του πυριμιδινικού δακτύλιου B από όλες τις δυνατές θέσεις, 2-, 3- και 4-θέση.

β) Στον δακτύλιο C έγινε σύνδεση της μεθυλομάδας, εκτός της 6-θέσης, στη 2- και στην 4-θέση ως προς τη δευτεροταγή αμινομάδα. Επιπλέον, ο αμιδικός δεσμός εισήχθη, σε σχέση με τη δευτεροταγή αμινομάδα, εκτός της 3-θέσης, στην 4-θέση.

γ) Στο δακτύλιο D έγινε εισαγωγή υποκαταστατών, όπως  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{F}$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $\text{CF}_3$  και  $-\text{OCH}_3$  σε διαφορετικές θέσεις, καθώς και αντικατάσταση όλου του αρωματικού δακτυλίου D από ετεροαρωματικούς. Επιπλέον, έγινε εισαγωγή ενός δεύτερου αμιδικού δεσμού σε 3- και 4-θέση, ως προς τον πρώτο αμιδικό δεσμό. Την προσθήκη του δεύτερου αμιδικού δεσμού ακολουθεί ταυτόχρονη εισαγωγή ενός πέμπτου, υποκατεστημένου ή μη, βενζολικού δακτυλίου ή ενός ετεροαρωματικού δακτυλίου.

✓ Όλες οι νέες ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , φάσματα μαζών υψηλής ευκρίνειας/ESI-HRMS).

✓ Με τη σύνθεση και τον βιολογικό έλεγχο αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec συγκρίσιμου μεγέθους (συνολικά 5 βενζολικοί και ετεροαρωματικοί δακτύλιοι), διαπιστώθηκε εμμέσως ότι ο πιπεραζινικός δακτύλιος πιθανόν δεν συνεισφέρει ενεργειακά, λόγω της μη στερικής συμπληρωματικότητας, στην αναστολή της Bcr-Abl πρωτεϊνικής κινάσης. Η υπόθεση μας αυτή επιβεβαιώθηκε και από κρυσταλλογραφικές και προτεολυτικές μελέτες άλλων ερευνητών.

✓ Κατέστη δυνατή η ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης και απλούστερης μεθόδου σύνθεσης αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec, με τη βελτιστοποίηση τόσο των συνθηκών, όσο και των αποδόσεων διαφόρων σταδίων. Συγκεκριμένα:

α) Για τη σύνθεση υποκατεστημένων φαινυλογουανιδινών δεν χρησιμοποιήθηκε κατά την αντίδραση κάποιος οργανικός διαλύτης (n-βουτανόλη), όπως περιγράφεται στην κατοχύρωση της Φαρμακοβιομηχανίας Novartis, με χημικές αποδόσεις περίπου 20 %. Το κυαναμίδιο, το ένα από τα δύο αντιδραστήρια, τήκεται μόλις στους  $65^\circ\text{C}$  και είχε τη δυνατότητα να λειτουργεί ως το μέσο διαλυτοποίησης των υποκατεστημένων υδροχλωρικών ανιλινών. Με την τήξη του αντιδραστήριου αυτού οδηγηθήκαμε σε

εντυπωσιακή αύξηση των αποδόσεων (~95%), σε περίπου 2 h, αντί των 21 h της μεθόδου της Novartis.

β) Στο στάδιο της κυκλοποίησης για το σχηματισμό του πυριμιδινικού δακτυλίου, χρησιμοποιήθηκε ως βάση ανθρακικό κάλιο, αντί του καυστικού νατρίου. Διαπιστώθηκε ότι με τη χρήση πιο ήπιας βάσης δεν παρατηρούνταν η εμφάνιση ενός παραπροϊόντος σε μεγάλο ποσοστό, το οποίο, εκτός της μειωμένης απόδοσης του επιθυμητού προϊόντος, παρεμπόδιζε την απομόνωση του κυκλοποιημένου προϊόντος (αποφυγή χρωματογραφίας στήλης).

γ) Διαπιστώθηκε ότι η χρήση του οξειδίου του λευκόχρυσου ( $\text{PtO}_2$ ) αντί του παλλαδίου σε άνθρακα (Pd/C 10%) οδήγησε σε εκπληκτική αύξηση της απόδοσης. Οι αποδόσεις όλων των αντιδράσεων αναγωγής της νιτρομάδας στην αντίστοιχη αμινομάδα ήταν ποσοτικές.

✓ Ο βιολογικός έλεγχος της ανασταλτικής δράσης των αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec (Imatinib), έναντι μιας σειράς πρωτεϊνικών κινασών (Abl-Bcr, KIT, FMS, CDK2/A, B-Raf, PDGFR κ.ά.), κατέδειξε σε ορισμένες περιπτώσεις ισχυρή ανασταλτική δράση, ισχυρότερη των φαρμακευτικών σκευασμάτων Glivec (Imatinib) και Sorafenib, καθώς και εκλεκτική δράση σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας του ATP σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες, διαδραματίζοντας ως εκ τούτου σπουδαίο ρόλο σε όλες σχεδόν τις κυτταρικές διεργασίες. Στην έρευνα για την ανάπτυξη μορίων μικρού μοριακού βάρους έναντι του καρκίνου και άλλων ασθενειών, οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν ελκυστικούς στόχους και η αναστολή τους έχει αναγνωριστεί ως μία καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση, καθώς ορισμένες εξ αυτών συμβάλλουν, μεταξύ άλλων, στην εμφάνιση ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου.

Το φαρμακευτικό σκεύασμα Glivec (Imatinib), ένας κλινικά σπουδαίος ανταγωνιστής του ATP που στοχεύει και αναστέλλει τη δράση της ενδοκυτταρικής Abl-Bcr πρωτεϊνικής κινάσης, υπεύθυνης για την εμφάνιση της λευχαιμίας, αποτελεί πλέον μία σημαντική-επαναστατική πρόοδο στην αντιμετώπιση της Χρόνιας Μυελογενούς Λευχαιμίας. Ως πρότυπο αναστολέα πρωτεϊνικής κινάσης, το φαρμακευτικό σκεύασμα Glivec (Imatinib) προσφέρεται ως ένα εξαιρετο μοντέλο για τη διερεύνηση των μετατροπών και την επίδρασή τους στη βιολογική δραστικότητα διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφεται ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο βιολογικός έλεγχος νέων παραγώγων της φαινυλοαμινοπυριμιδίνης, αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec (Imatinib), τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη δράση και εκλεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών (Abl-Bcr, KIT, FMS, CDK2/A, B-Raf, PDGFR κ.ά), ως απόρροια όλων των μετατροπών: α) απομάκρυνση του N-μεθυλοπιπεραζινικού δακτυλίου, β) σύνδεση της πυριδίνης (A) στην 4-θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου (B), εκτός της 3-θέσης, στη 2- και στην 4-θέση, γ) σύνδεση της μεθυλομάδας, εκτός της 6-θέσης, στη 2- και στην 4-θέση ως προς τη δευτεροταγή αμινομάδα, δ) εισαγωγή του αμιδικού δεσμού σε διαφορετική θέση και εισαγωγή διαφόρων υποκαταστατών στον τελικό αρωματικό δακτύλιο (βενζολικό).

Οι νέες ενώσεις προσφέρουν ένα δομικό μοτίβο για περαιτέρω ανάπτυξη αναστολέων έναντι της σπουδαίας οικογένειας υποδοχέων των πρωτεϊνικών κινασών PDGF, καθώς και εναλλακτική οδό και για το σχεδιασμό φαρμάκων με εκλεκτική βιολογική δράση έναντι άλλων πρωτεϊνικών κινασών.

Επιπλέον, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής κατέστη εφικτή η ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης και απλούστερης μεθόδου σύνθεσης αναλόγων του φαρμακευτικού σκευάσματος Glivec, σε σχέση με τη μέθοδο σύνθεσης όπως αυτή περιγράφεται στην κατοχύρωση της Φαρμακοβιομηχανίας Novartis, με τη βελτιστοποίηση των συνθηκών και των αποδόσεων διαφόρων σταδίων. Όλες οι νέες ενώσεις έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , φάσματα μαζών υψηλής ευκρίνειας/ESI-HRMS).



## SUMMARY

Protein kinases are enzymes that modify other proteins by chemically adding phosphate groups to them and therefore playing a special role in nearly every aspect of cell biology. In the search for low-molecular weight therapeutic agents to treat cancers and other diseases, protein kinases have become attractive targets.

Glivec (Imatinib), a clinically important ATP analogue inhibitor that targets the tyrosine kinase domain of the intracellular Abl-Bcr, has revolutionized the treatment of chronic myeloid leukaemia, which is caused by the oncogene Bcr-Abl. As a leading kinase inhibitor, glivec (imatinib) also provides an excellent model system to investigate how changes in drug design impact biological activity.

In the present PhD thesis we describe the design, synthesis, and biological evaluation of a new series of phenylaminopyrimidines, structurally related to imatinib, which have in some cases greater activity and selectivity against several protein kinases (Abl-Bcr, KIT, FMS, CDK2/A, B-Raf, PDGFR etc) due to alterations of the phenyl, pyridine and N-methylpiperazine rings: a) lack of the N-methylpiperazine group, b) repositioning of nitrogen in its pyridyl moiety, 2- or 4-position, at the 4-position of the pyrimidine, c) repositioning of the methyl group, d) repositioning of the amide function at the phenyl ring and the incorporation of different groups at the final phenyl ring.

The new compounds provide a platform for further drug development against the therapeutically important receptor family PDGF, and they also provide insight into alternative ways of engineering drugs with altered biological activity.

Another objective of the present PhD thesis was to provide an improved process for the preparation of the imatinib analogues, overcoming the difficulties of the synthetic process described in patents of the Novartis Company. By our synthetic method the inhibitors were isolated much easier and also obtained in higher yields compared to the Novartis synthetic method. All the 48 new inhibitors described herein were fully characterized by IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, as well as by high resolution mass spectrometry.



## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N.; Traxler, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **1996**, 6, 1221.
2. Zimmermann, J.; Buchdunger, E.; Mett, H.; Meyer, T.; Lydon, N.; Traxler, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **1997**, 7, 187.
3. Zimmermann, J.; Caravatti, G.; Mett, M. et al. *Arch. Pharm.*, **1996**, 7, 371.
4. Zimmermann, J.; Furet, P.; Buchdunger, E. *Anticancer agents: Frontiers in Cancer Chemotherapy. ACS Symposium Series.*, 796, 245.
5. Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L.; *Βιοχημεία.*, 5<sup>η</sup> Έκδοση, **2001**, (Εκδόσεις Κρήτης).
6. Johnson, L.; Lewis, R. *Chemical Reviews.*, **2001**, 101, 2209.
7. Kobe, B.; Kampmann, T.; Forwood, J.; Listwan, P.; Brinkworth, R. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **2005**, 1754, 200.
8. Scapin, G.; *DDT.*, **2002**, 7, 601.
9. Berta, D.; Villa, M.; Vulpetti, A.; Felder, E. *Tetrahedron.*, **2005**, 61, 10801.
10. Lacal, J. *European Journal of Cancer SUPPLEMENTS.*, **2006**, 4, 14.
11. Reilly, J. *Blood Reviews.*, **2003**, 17, 241.
12. Hong, C.; Lay, J.; Huang, J.; Cheng, A.; Tang, J.; Lin, M.; Lai, G.; Chuang, S. *Cancer Letters.*, **2008**, 268, 314.
13. Gavi, S.; Shumay, E.; Wang, H.; Malbon, C. *TRENDS in*

- Endocrinology and Metabolism.*, **2006**, 17, 46.
14. Elghazi, L.; Balcazar, N.; Bernal-Mizrachi, E. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **2006**, 38, 157.
  15. Hopfner, M.; Huether, A.; Sutter, A.; Baradari, V.; Schuppan, D.; Scherubl, H. *Biochemical Pharmacology.*, **2006**, 71, 1435.
  16. Bianco, R.; Gelardi, T.; Damiano, V.; Ciardiello, F.; Tortora, G. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, **2007**, 39, 1416.
  17. Brazil, D.; Yang, Z.; Hemmings, B. *TRENDS in Biochemical Sciences.*, **2004**, 29, 233.
  18. Drennan, D.; Ryazanov, A. *Progress in Biophysics & Molecular Biology.*, **2004**, 85, 1.
  19. Contessa, J.; Abell, A.; Valerie, K.; Lin, P. ; Schmidt-Ullrich, R. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **2006**, 65, 851.
  20. Mass, R. *Int. J. Radiation Oncology Biology Physics.*, **2004**, 58, 932.
  21. Hafizi, S.; Dahlbäck, B. *Cytokine & Growth Factor Reviews.*, **2006**, 17, 295.
  22. Itoh, N.; Ornitz, D. *TRENDS in Genetics.*, **2004**, 20, 563.
  23. Wolanska, M.; Bankowski, E. *Biochimie*, **2006**, 88, 141.
  24. Christensen, J.; Burrows, J.; Salgia, R. *Cancer Letters.*, **2005**, 225, 1.
  25. Stellrecht, C.; Gandhi, V. *Cancer Letters.*, **2009**, 280, 1.
  26. Goldshmit, Y.; McLenachan, S.; Turnley, A. *Brain Research Reviews.*, **2006**, 52, 327.
  27. Cheng, N.; Brantly, D.; Chen, J. *Cytokine & Growth Factor Reviews.*, **2002**, 13, 75.
  28. Adams, R. *Cell & Developmental Biology.*, **2002**, 13, 55.
  29. Himanen, J.; Nikolov, D. *Trends in Neurosciences.*, **2003**, 26, 46.
  30. Plaza-Menacho, I.; Burzynski, G.; Willem de Groot, J.; Eggen, B.; Hofstra, R. *Trends in Genetics.*, **2006**, 22, 627.
  31. Arighi, E.; Borrello, M.; Sariola, H. *Cytokine & Growth Factor Reviews.*, **2005**, 16, 441.
  32. Ichihara, M.; Murakumo, Y.; Takahashi, M. *Cancer Letters.*, **2004**, 204, 197.

33. Hu, H.; Bliss, J.; Wang, Y.; Colicelli, J. *Current Biology.*, **2005**, 15, 815.
34. Levav-Cohen, Y.; Goldberg, Z.; Zuckerman, V.; Grossman, T.; Haupt, S.; Haupt, Y. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **2005**, 331, 737.
35. Nagar, B.; Hantschel, O.; Seeliger, M.; Davies, J.; Weis, W.; Superti-Furga, G.; Kuriyan, J. *Molecular Cell.*, **2006**, 21, 787.
36. Hernandez, S.; Krishnaswami, M.; Miller, A.; Koleske, A. *TRENDS in Cell Biology.*, **2004**, 14, 36.
37. Jeansonne, D. ; Bordes, T.; Bennett, C.; Kothandaraman, G.; Bush, J.; Vaccaro, J. *Protein Expression and Purification.*, **2006**, 46, 240.
38. Belsches-Jablonski, A.; Demory, M.; Parsons, T.; Parsons, S. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies.*, **2005**, 2, 313.
39. Harrison, S. *Cell.*, **2003**, 112, 737.
40. Barlaam, B.; Fennell, M.; Germain, H.; Green, T.; Hennequin, L.; Morgentin, R.; Olivier, A.; Ple, P.; Vautiera, M.; Costello, G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **2005**, 15, 5446.
41. Ishizawar, R.; Parsons, S. *CANCER CELL.*, **2004**, 6, 209.
42. Guo, B. ; Su, T. ; Rawlings, D. *Current Opinion in Immunology.*, **2004**, 16, 367.
43. Martelli, A. ; Evangelisti, C. ; Nyakern, M. ; Manzoli, F. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **2006**, 1761, 542.
44. Leicht, D.; Balan, V.; Kaplun, A.; Singh-Gupta, V.; Kaplun, L.; Dobson, M.; Tzivion, G. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **2007**, 1773, 1196.
45. Weinstein-Oppenheimer, C.; Blalock, W.; Steelman, L.; Chang, F.; McCubrey, *Pharmacology & Therapeutics.*, **2000**, 88, 229.
46. Hansen, J. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter.*, **2008**, 18, 4692.
47. Huwe, A.; Mazitshek, R.; Giannis, A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 2122.
48. LaRonde-LeBlanc, N. ; Wlodawer, A. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **2005**, 1754, 14.
49. Alberts, ; Johnson, et al. *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας:*

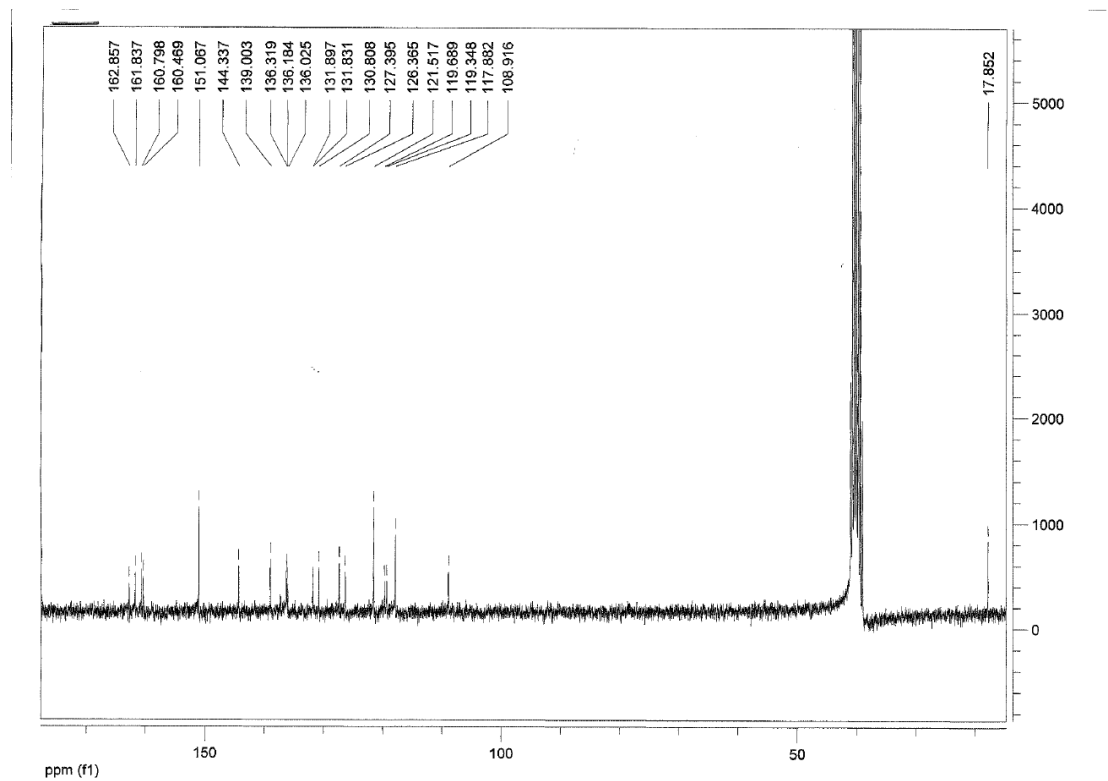
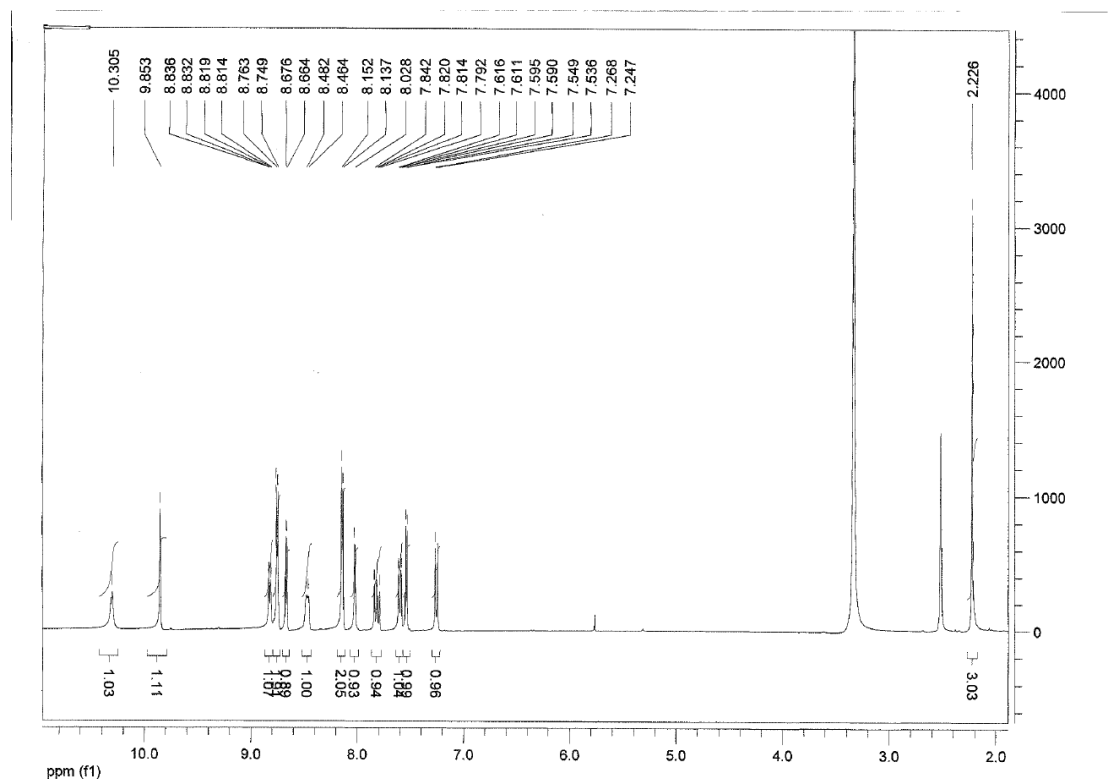
*Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου.*

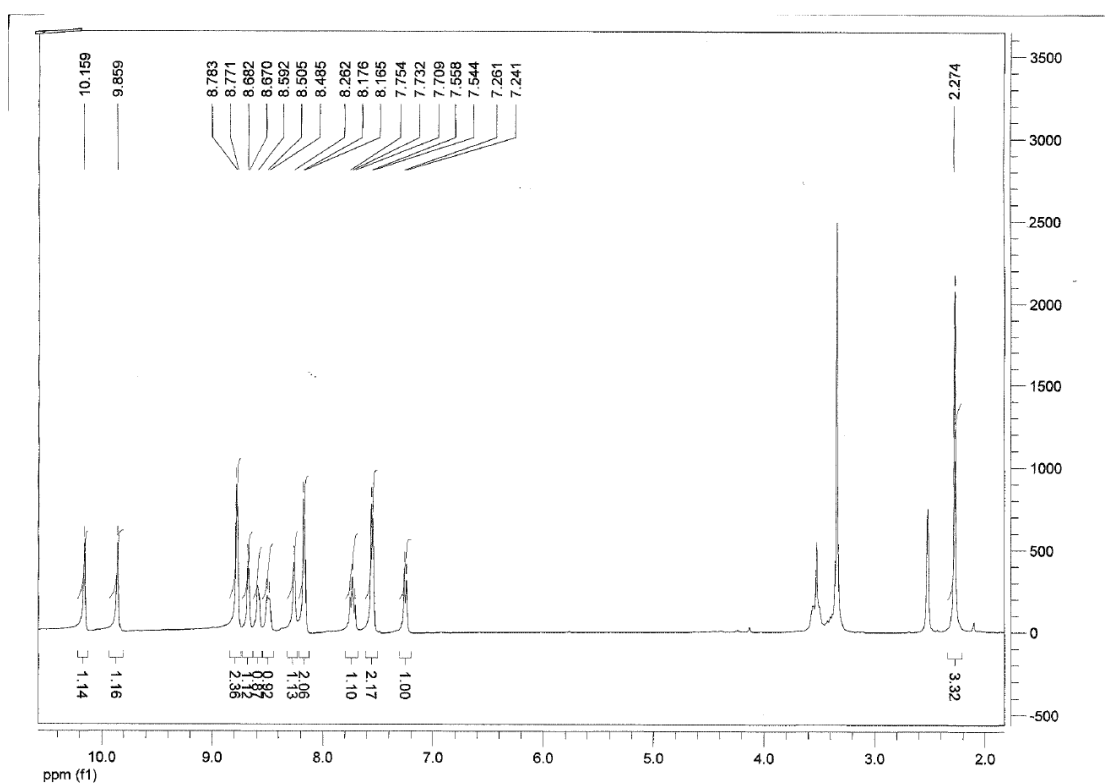
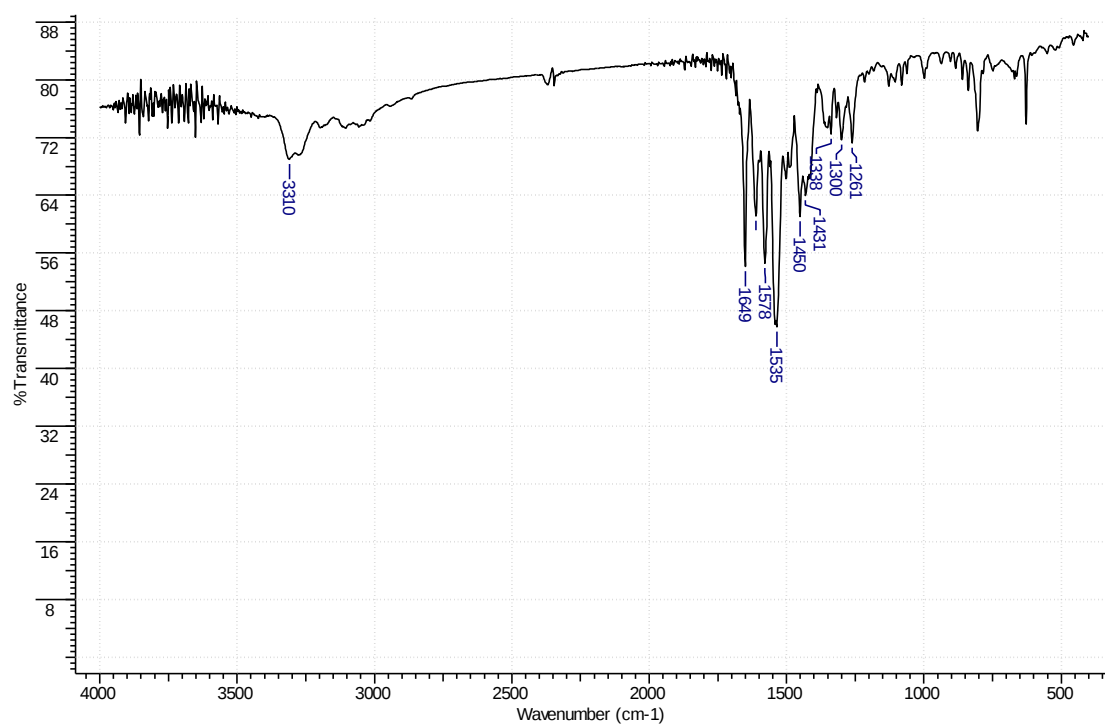
50. Levitzki, A. *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH.*, **2003**, 36, 462.
51. Asaki, T.; Sugiyama, Y.; Hamamoto, T.; Higashioka, M.; Umehara, M.; Naito, H.; Niwa, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **2006**, 16, 1421.
52. Wang, J.; Gao, M.; Miller, K.; Sledge, G.; Zheng, Q. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **2006**, 16, 4102.
53. Smith, L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **2006**, 16, 1643.
54. Adcock, I.; Chung, K.; Caramori, G.; Ito, K. *European Journal of Pharmacology.*, **2006**, 533, 118.
55. Masters, A.; Sweeney, C.; Jones, D. *Journal of Chromatography B.*, **2007**, 848, 379.
56. Roskoski, R. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **2004**, 319, 1.
57. Sridhar, S.; Seymour, L.; Shepherd, F. *THE LANCET Oncology.*, **2003**, 4, 397.
58. Knesl, P.; Röseling, D.; Jordis, U. *Molecules.*, **2006**, 11, 286.
59. Azim, H.; Ganti, A. *Cancer Treatment Reviews.*, **2006**, 32, 630.
60. Roskoski, R. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **2004**, 319, 1.
61. Rodriguez-Ariza, A.; Lopez-Pedreria, C.; Aranda, E.; Barbarroja, N. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.*, **2010**, in press.
62. Bold, G. et al. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2000**, 43, 2311.
63. Chen, B. et al. *Arkivoc.*, **2010**, vi, 32.
64. Steinberg, M. *Clinical Therapeutics.*, **2007**, 29, 2289.
65. Araujo, J.; Logothetis, C. *Cancer Treatment Reviews.*, **2010**, 36, 492.
66. McIntyre, J.; Castaner, J.; Bayes, M. *Drugs of the Future.*, **2006**, 31, 291.
67. Huang, W.; Shakespeare, W. *Synthesis.*, **2007**, 14, 2121.
68. Manley, P. et al. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **2010**, 1804, 445.
69. Weisberg, E.; Manley, P.; Mestan, J.; Cowan-Jacob, S.; Ray, A.; Griffin, JD. *British Journal of Cancer.*, **2006**, 94, 1765.

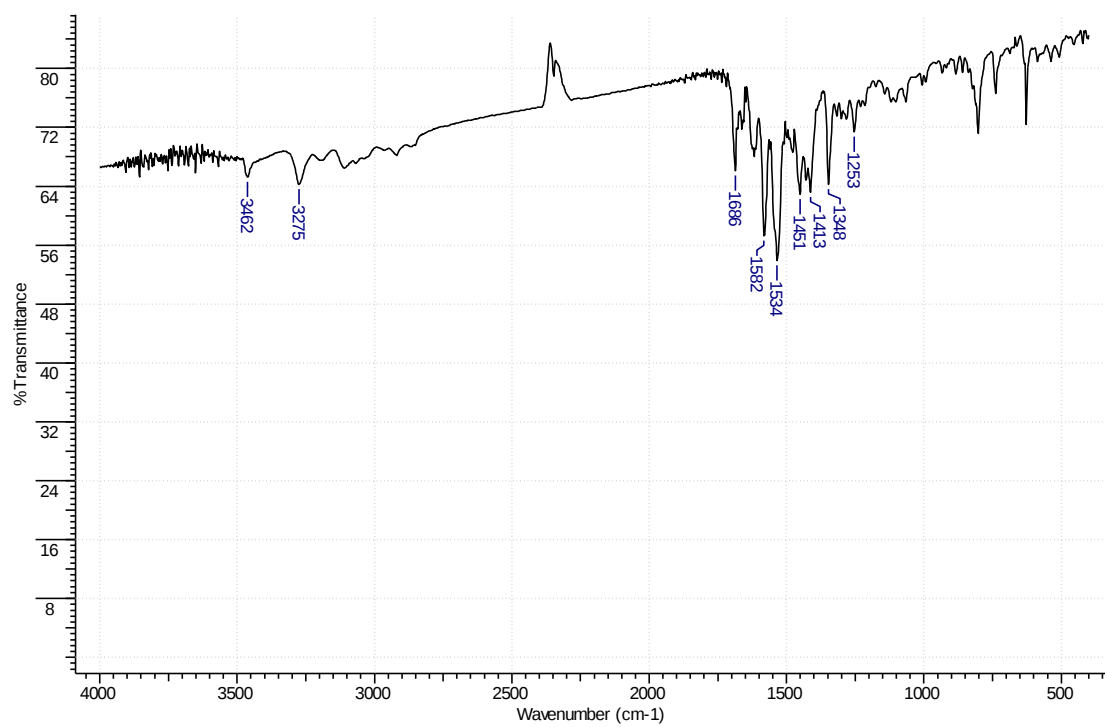
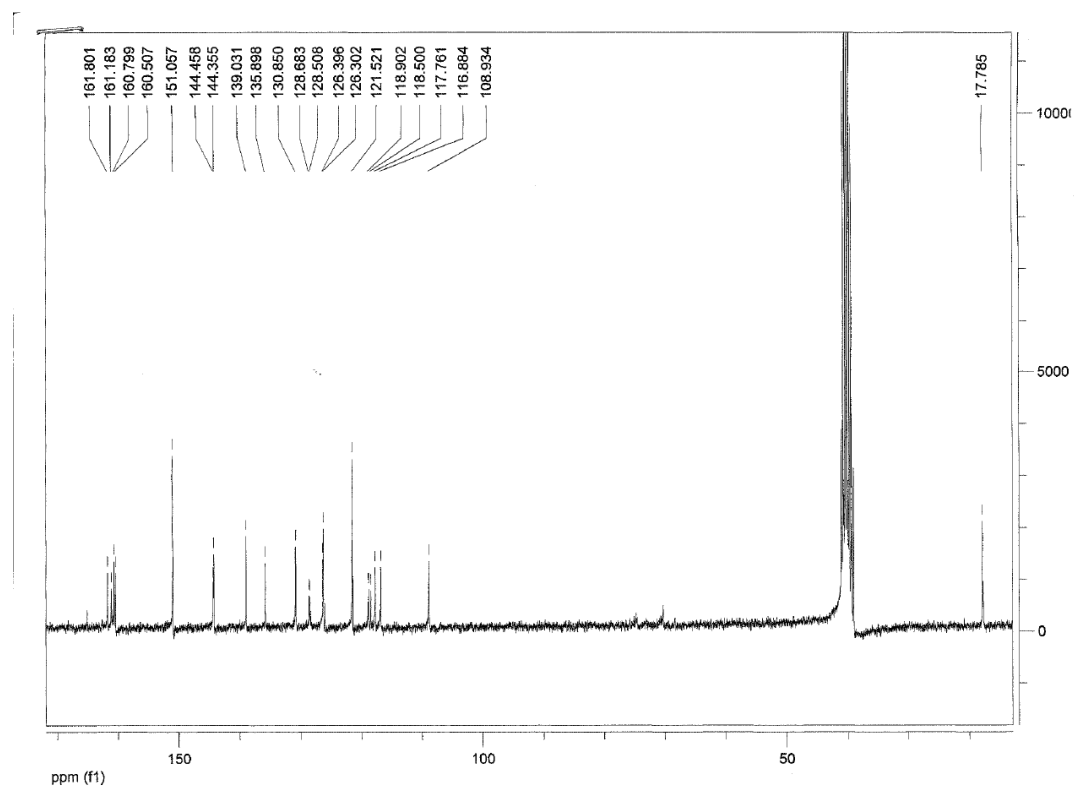
70. DeRemer, D.; Ustun, C.; Natarajan, K. *Clinical Therapeutics.*, **2008**, 30, 1956.
71. Manley, P. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, **2010**, 18, 6977.
72. Abou El Ella, D.; Ghorab, M.; Noaman, E.; Heiba, H.; Khalil, A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, **2006**, 16, 2391.
73. Larkin, J.; Eisen, T. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.*, **2006**, 60, 216.
74. Board, R.; Thistlethwaite, F.; Hawkins, R. *Cancer Treatment Reviews.*, **2007**, 33, 157.
75. Sistla, A.; Yang, W.; Shenoy, N. *Journal of Chromatography A.*, **2006**, 1110, 73.
76. Schittenhelm, M. *Cell Cycle.*, **2009**, 8, 2621.
77. Roskoski, R. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **2003**, 309, 709.
78. Druker, B. *CANCER CELL.*, **2002**, 1, 31.
79. Druker, B. *Trends in Molecular Medicine.*, **2002**, 8, 14.
80. Tauchi, T.; Ohyashiki, K. *Leukemia Research.*, **2004**, 28S1, 39.
81. Bridges, A. *Chemical Reviews.*, **2001**, 101, 2541.
82. Van Etten, R. *Leukemia Research.*, **2004**, 28S1, 21.
83. Bennett, G.; Mason, R.; Alden, L.; Roach, J. *Journal of Medicinal Chemistry.*, **1978**, 21, 623.
84. Paul, R. et al. *Journal of Medicinal Chemistry.*, **1993**, 36, 2716.
85. Manley, P.; Breitenstein, W.; Brugger, J.; Cowan-Jacob, S.; Furet, P.; Mestan, J.; Meyer, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, **2004**, 14, 5793.
86. Carey, F. *Organic Chemistry.*, 4th Edition, **2001**.
87. Matsuura, H.; Yoshida, H.; Hieda, M.; Yamanaka, S.; Harada, T.; Shin-ya, K.; Ohno, K. *J.A.C.S.*, **2003**, 125, 13910.
88. Fabbro, D. et al. *Pharmacology & Therapeutics.*, **2002**, 93, 79.
89. Skobridis, K. et al. *CHEMMEDCHEM.*, **2010**, 5, 130.
90. Armarego, W.; Perrin, D. *Purification of Laboratory Chemicals.*, 4<sup>th</sup> Edition.

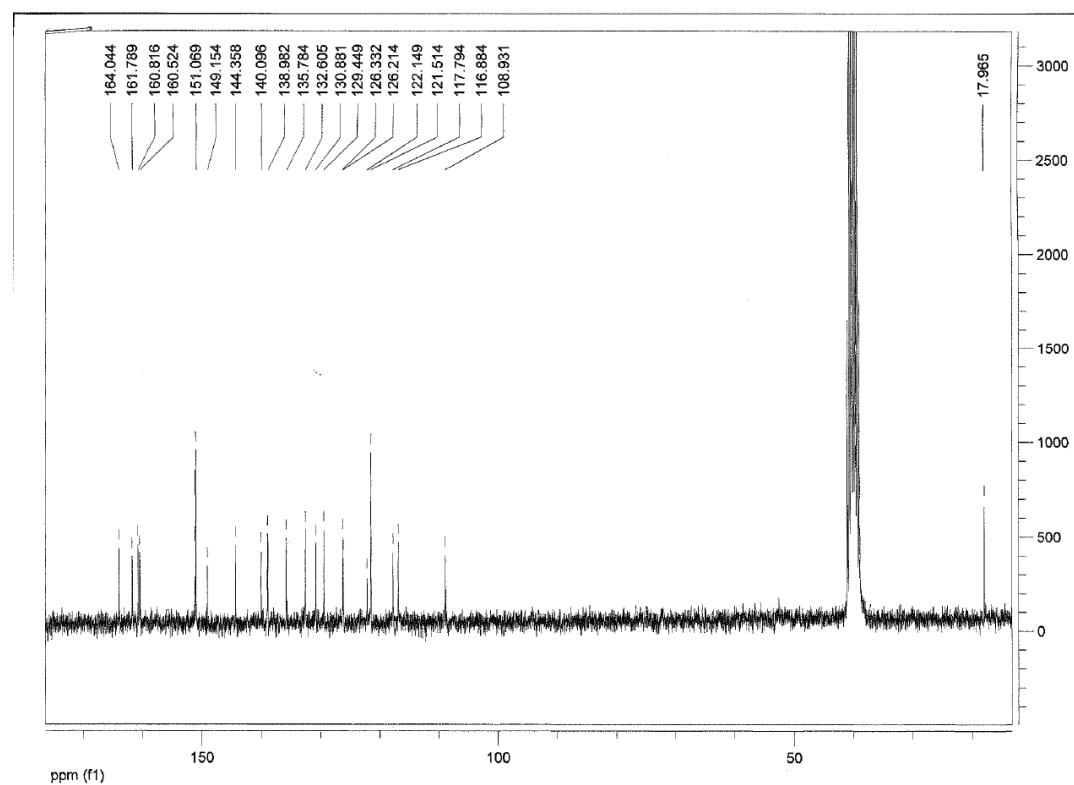
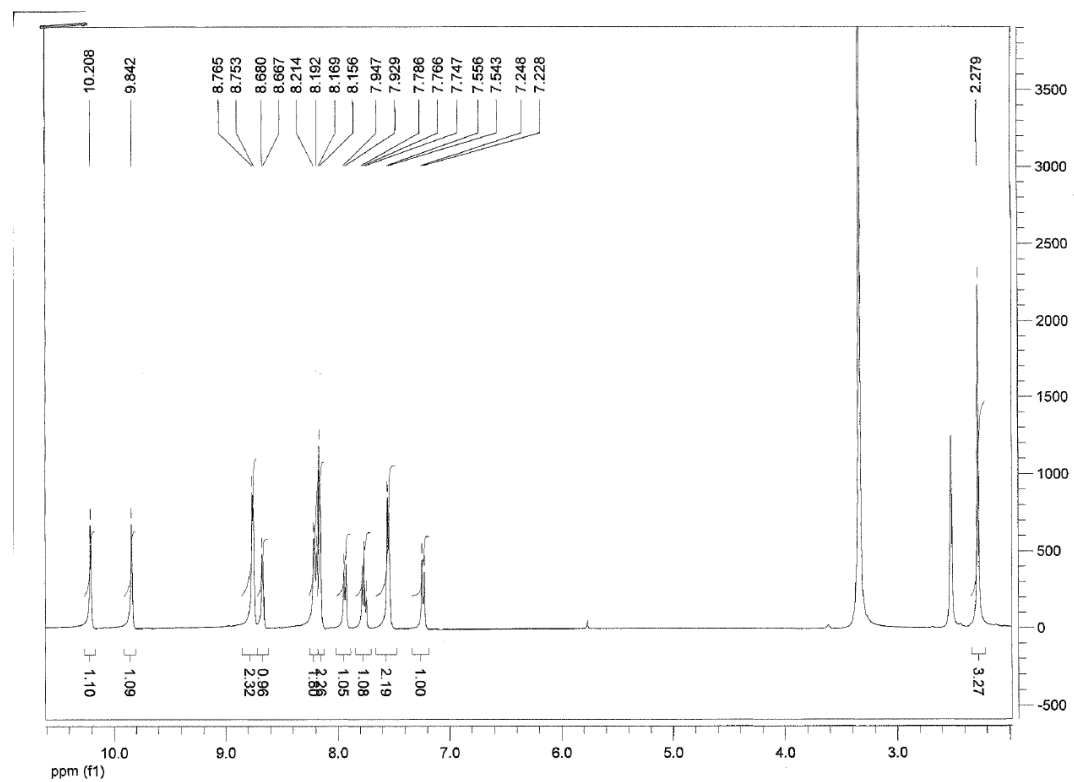
# Παράρτημα

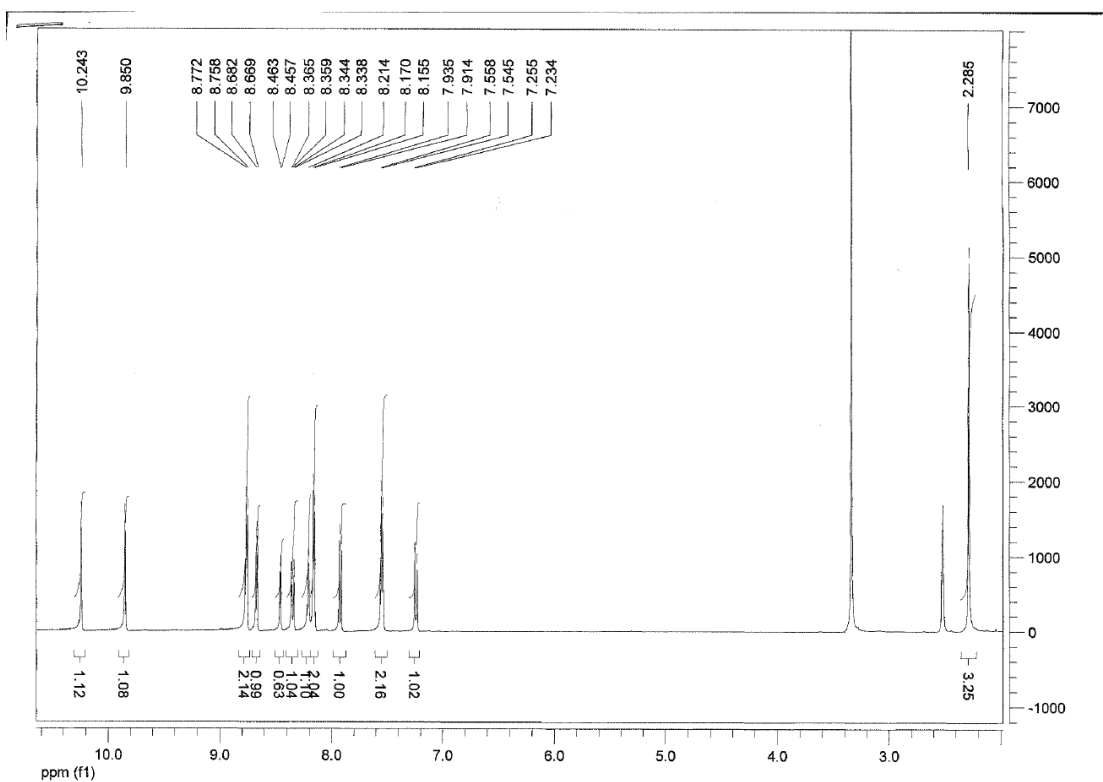
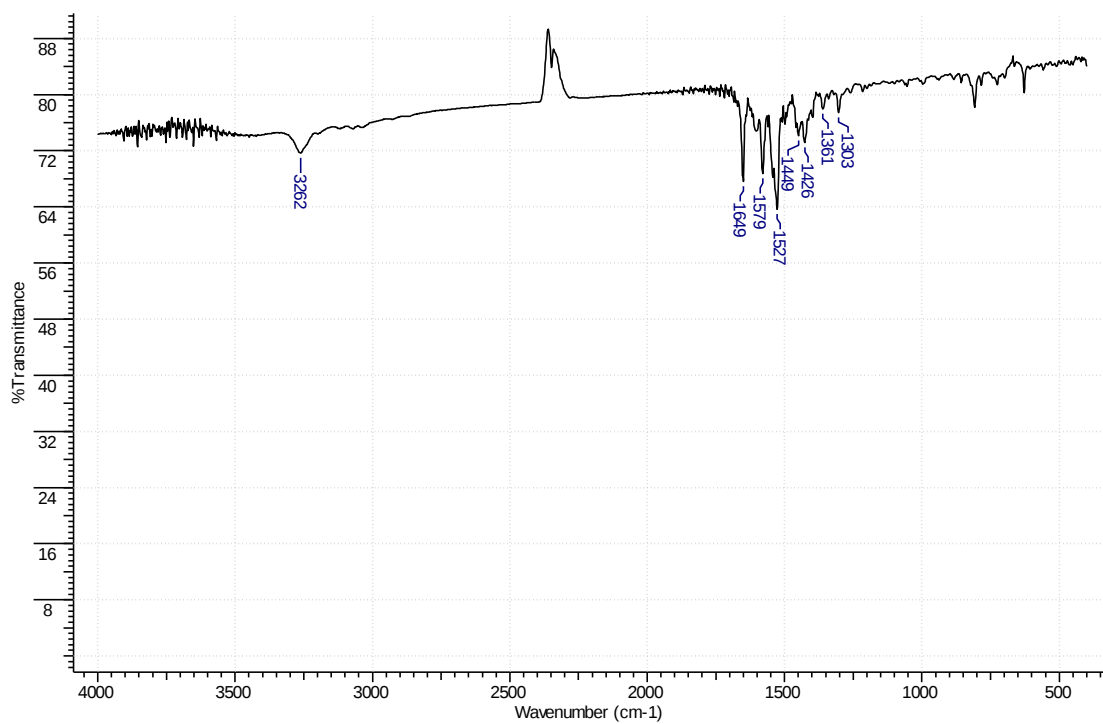
## ΠΡΩΤΗ ΟΜΑΔΑ

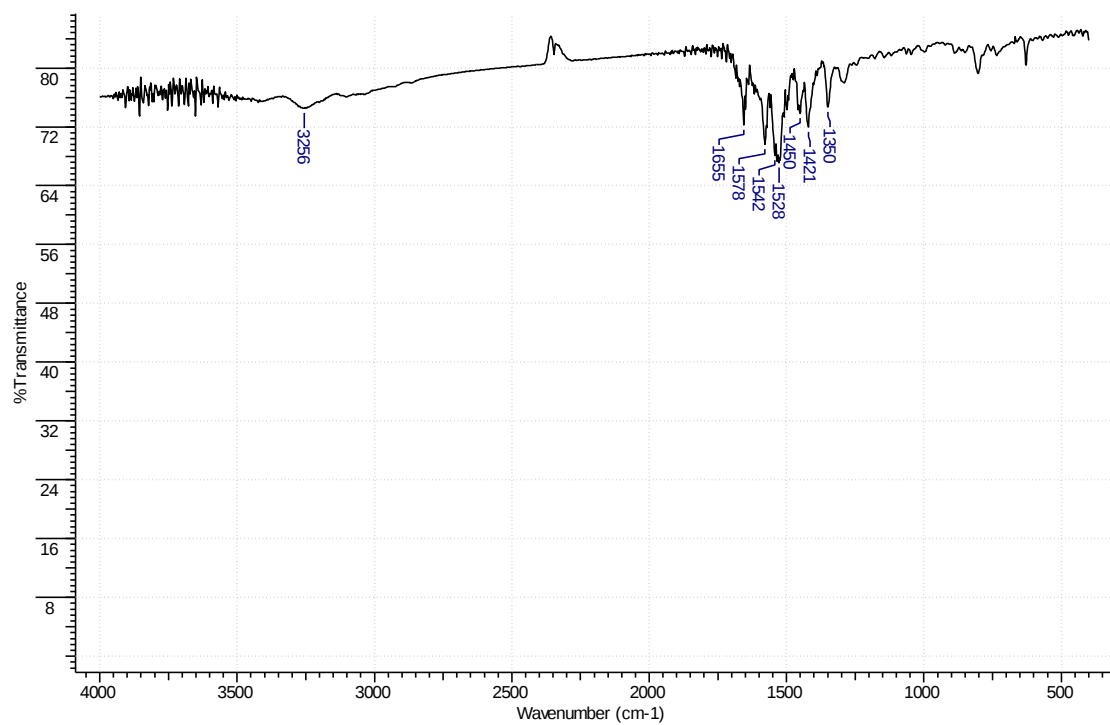
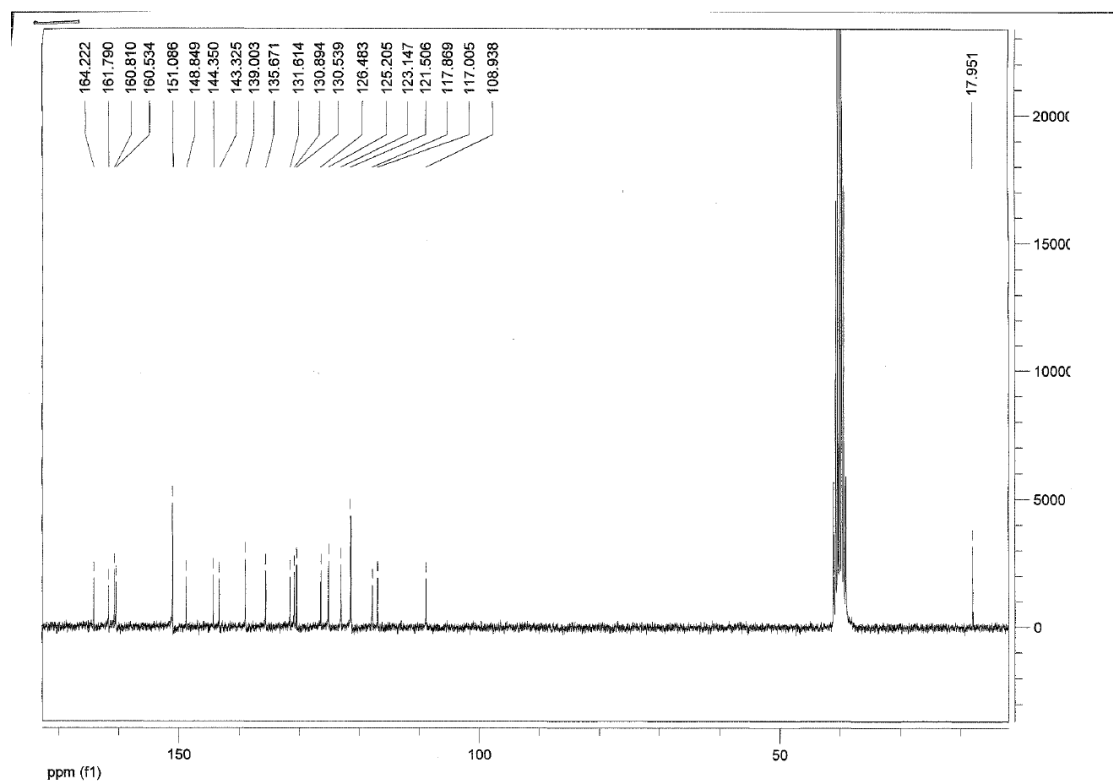


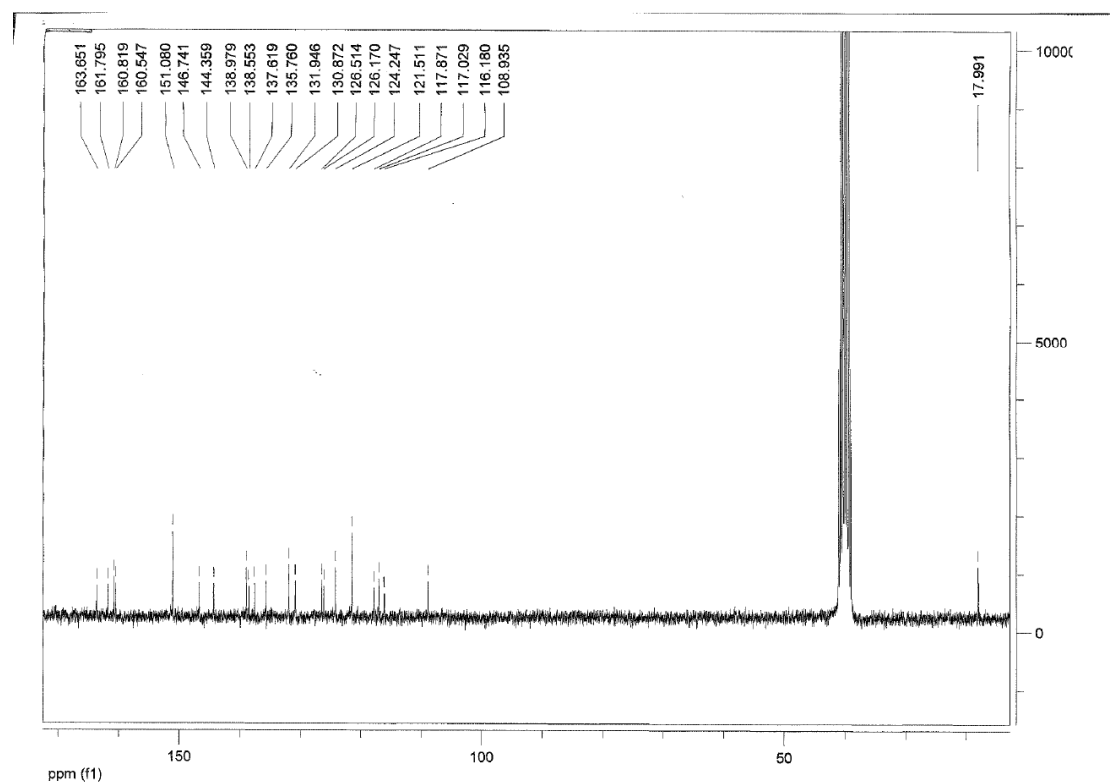
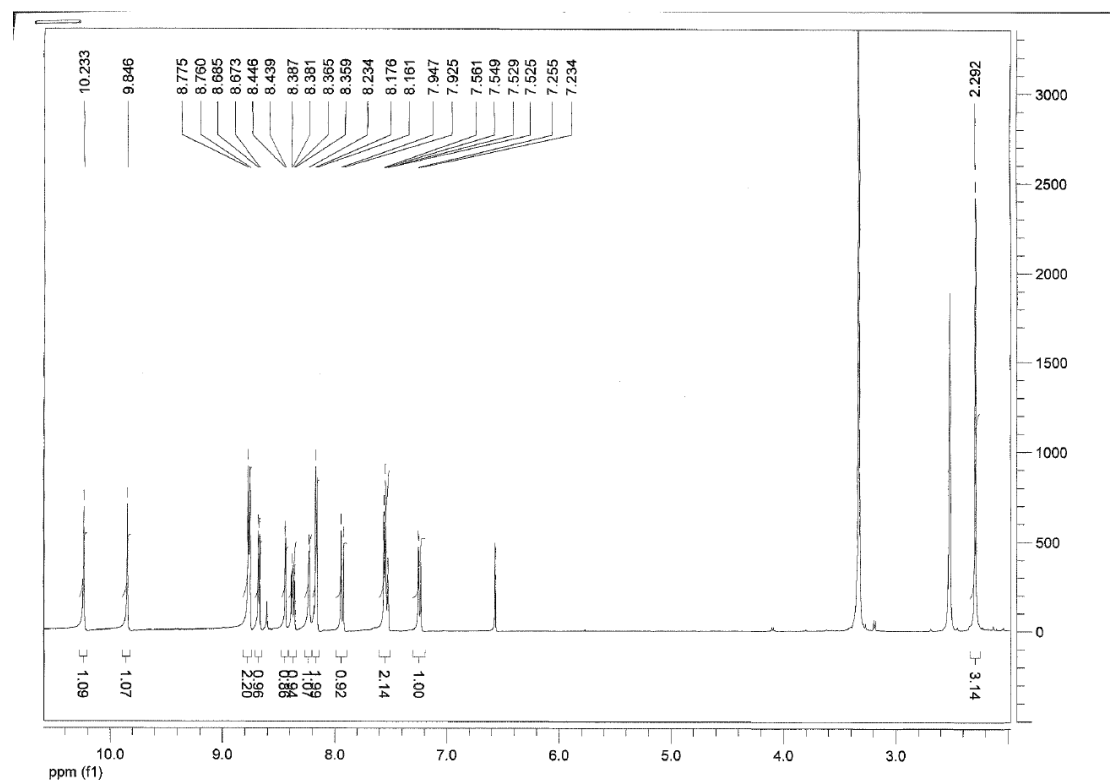


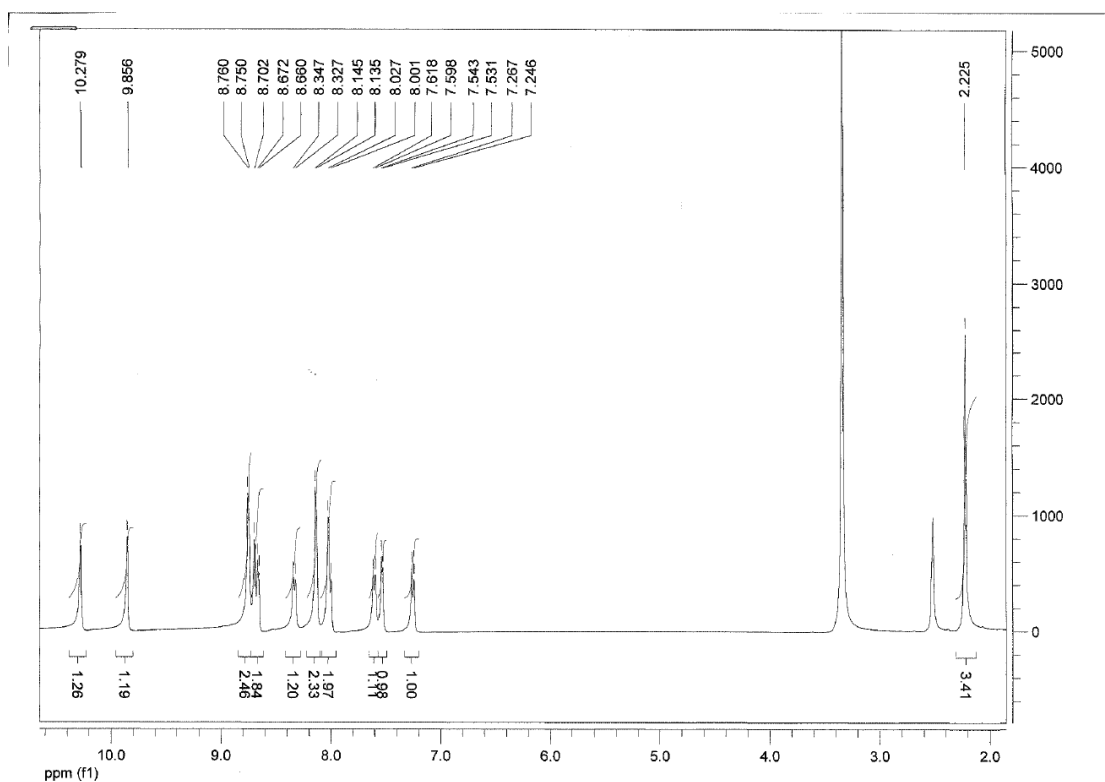
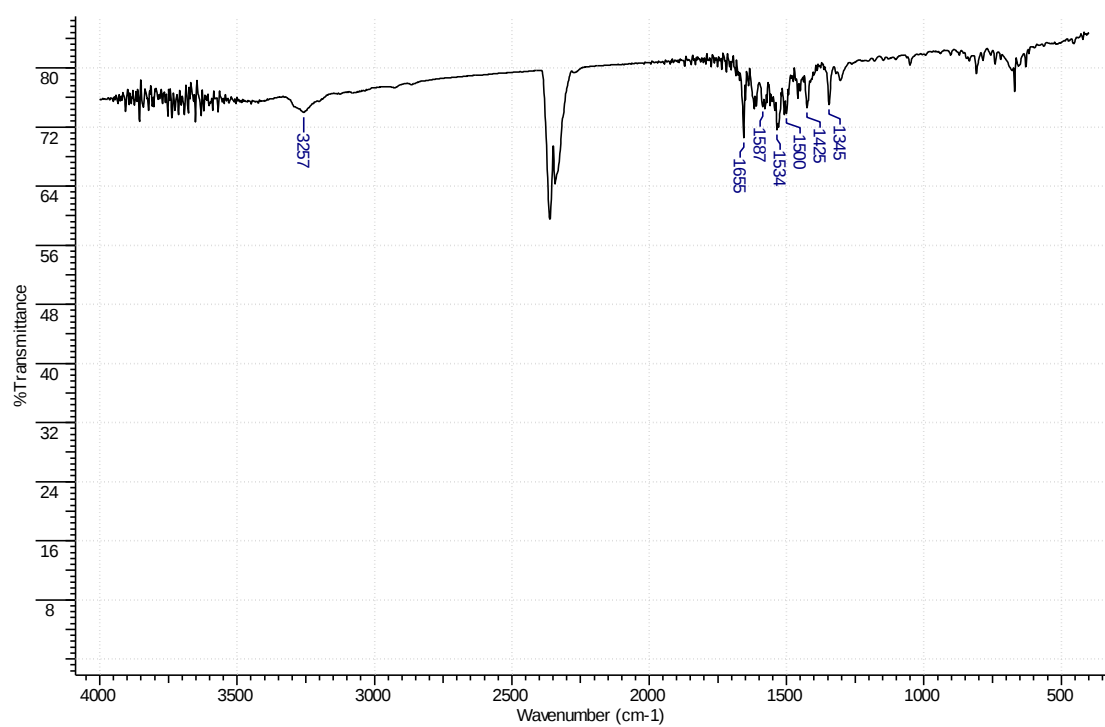


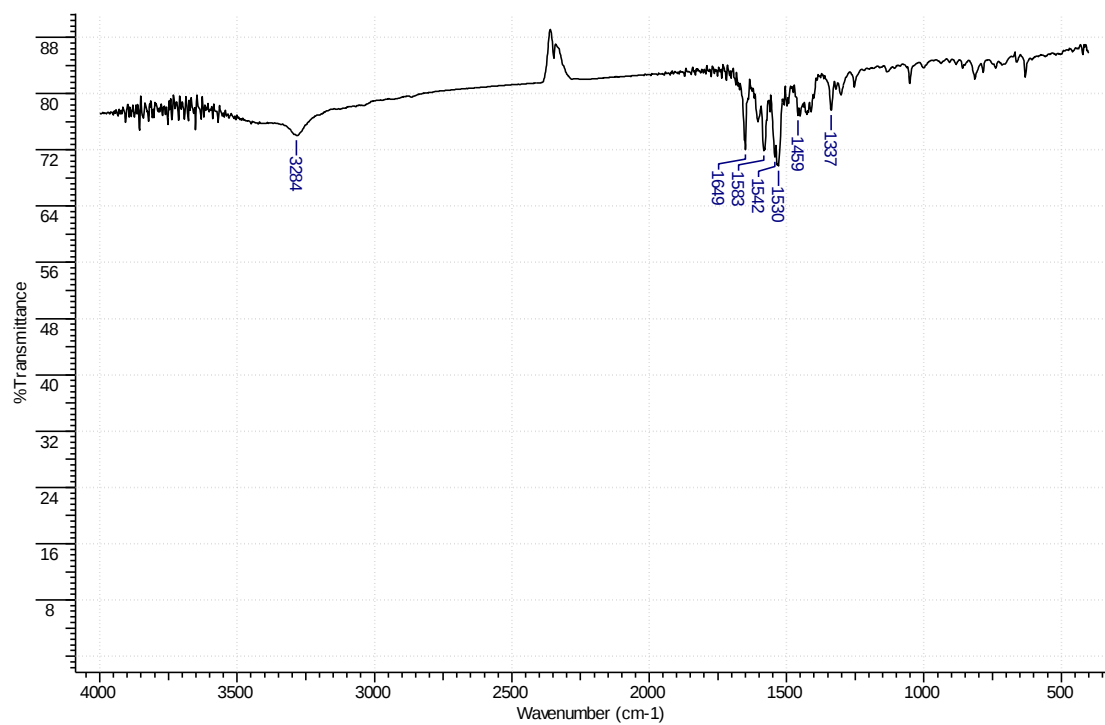
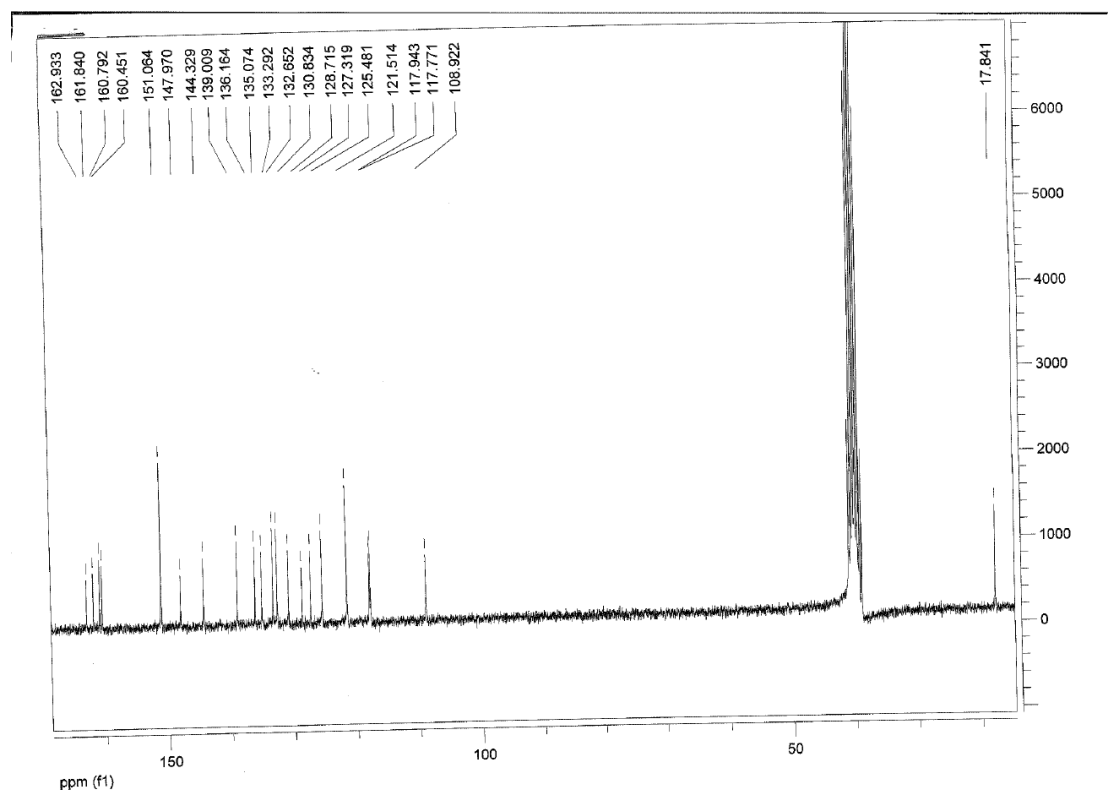


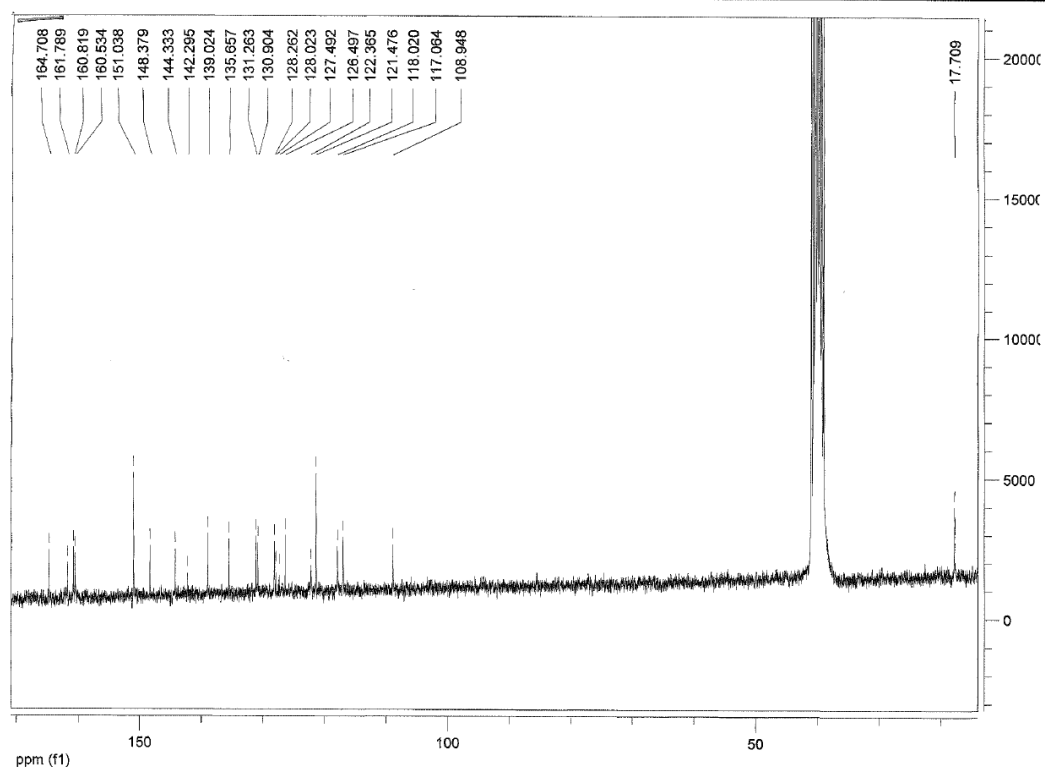
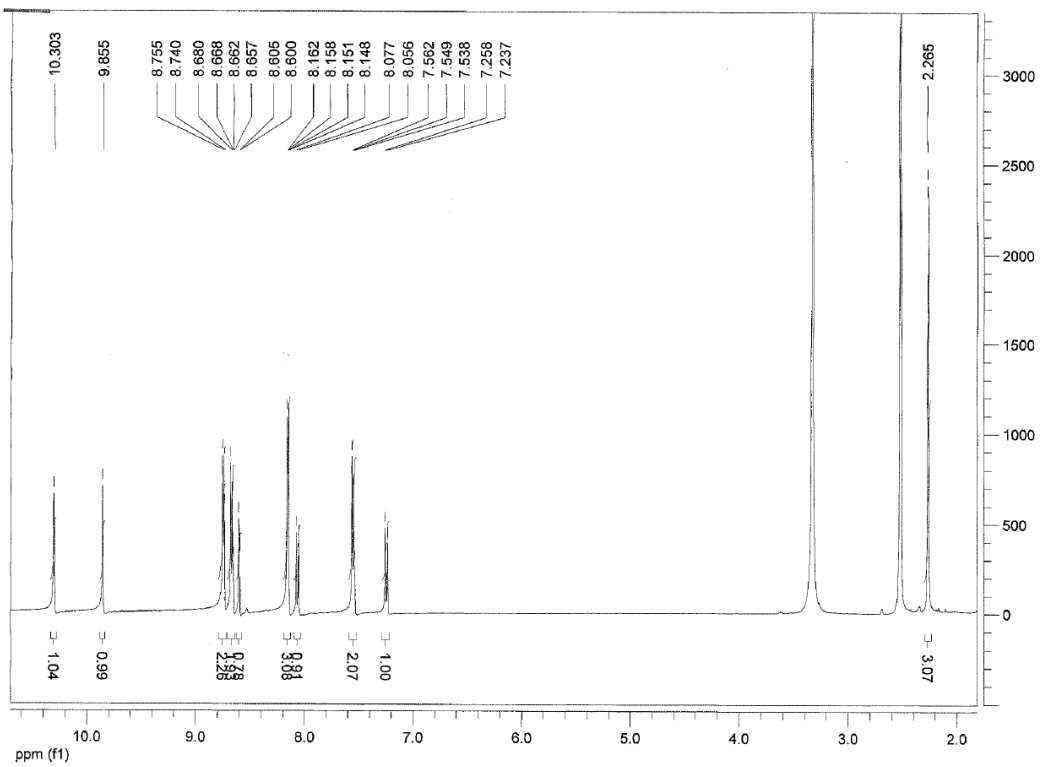


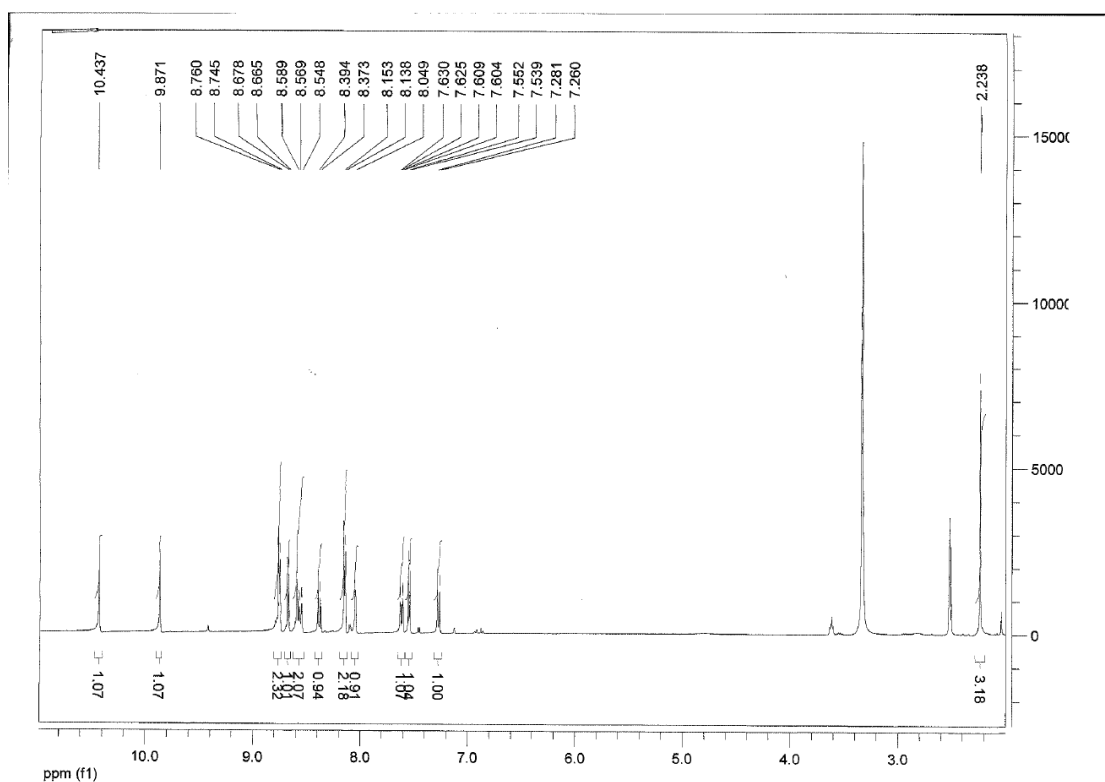
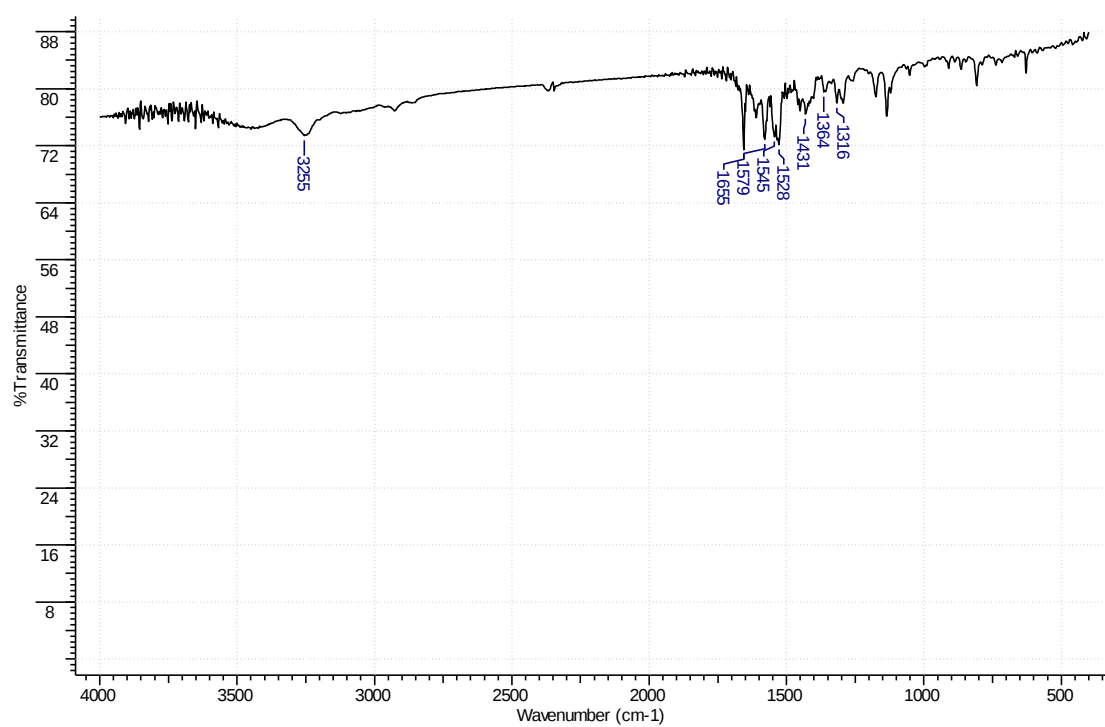


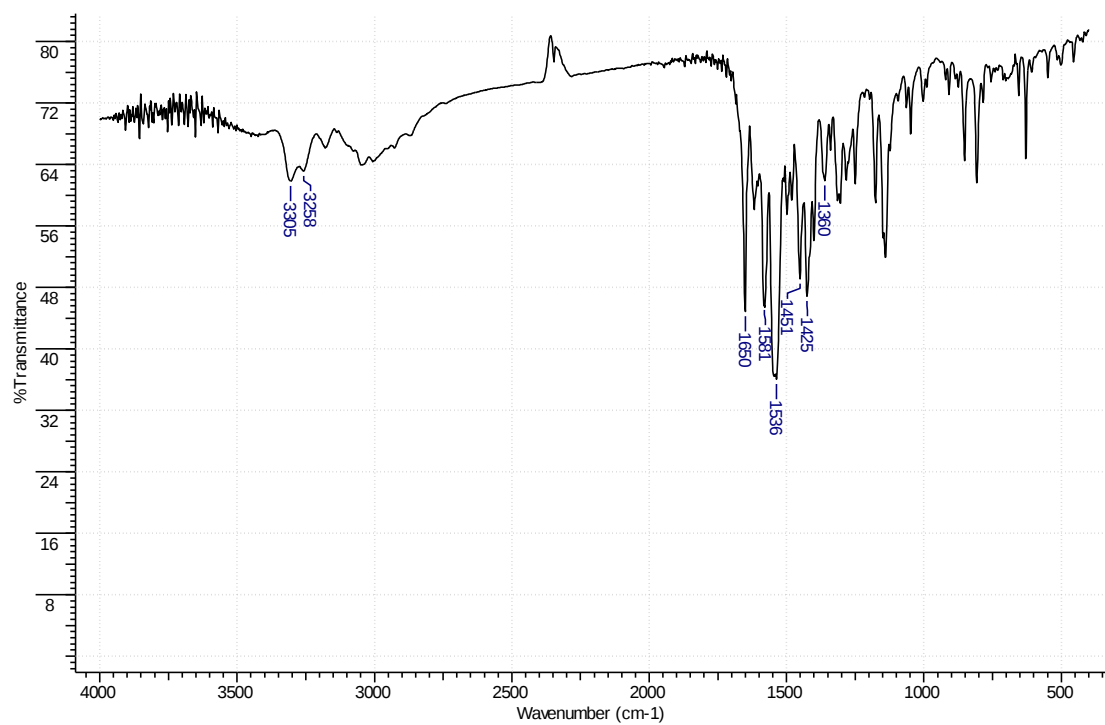
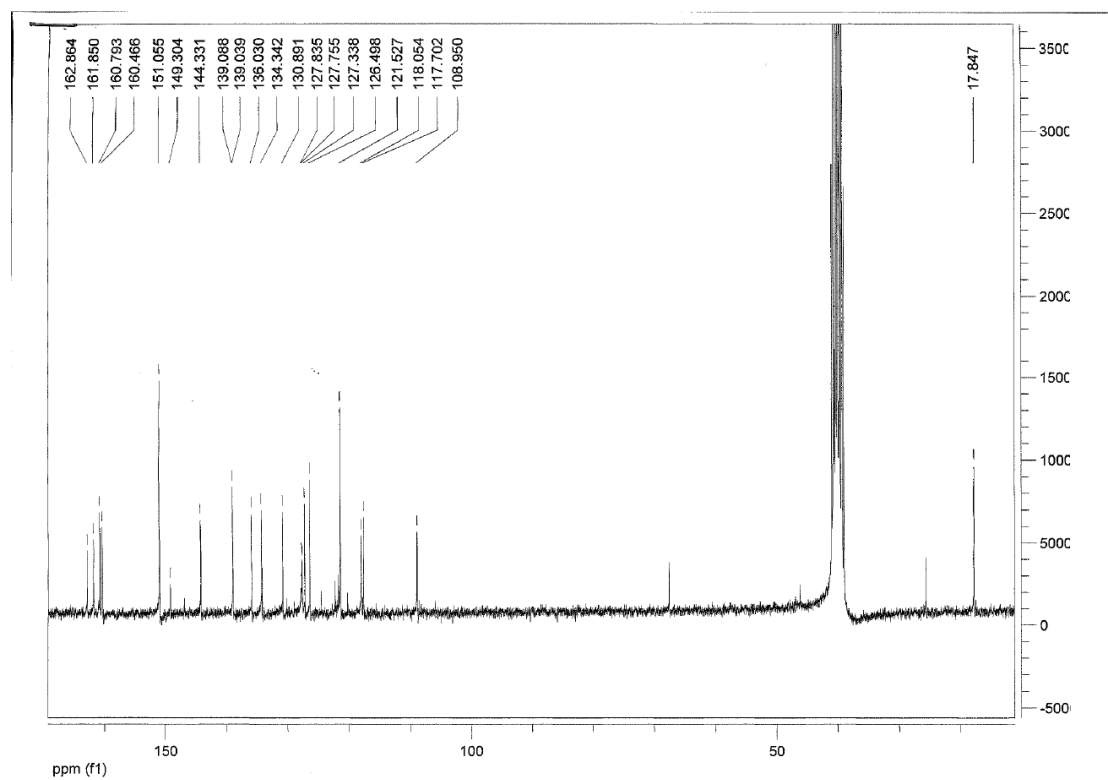




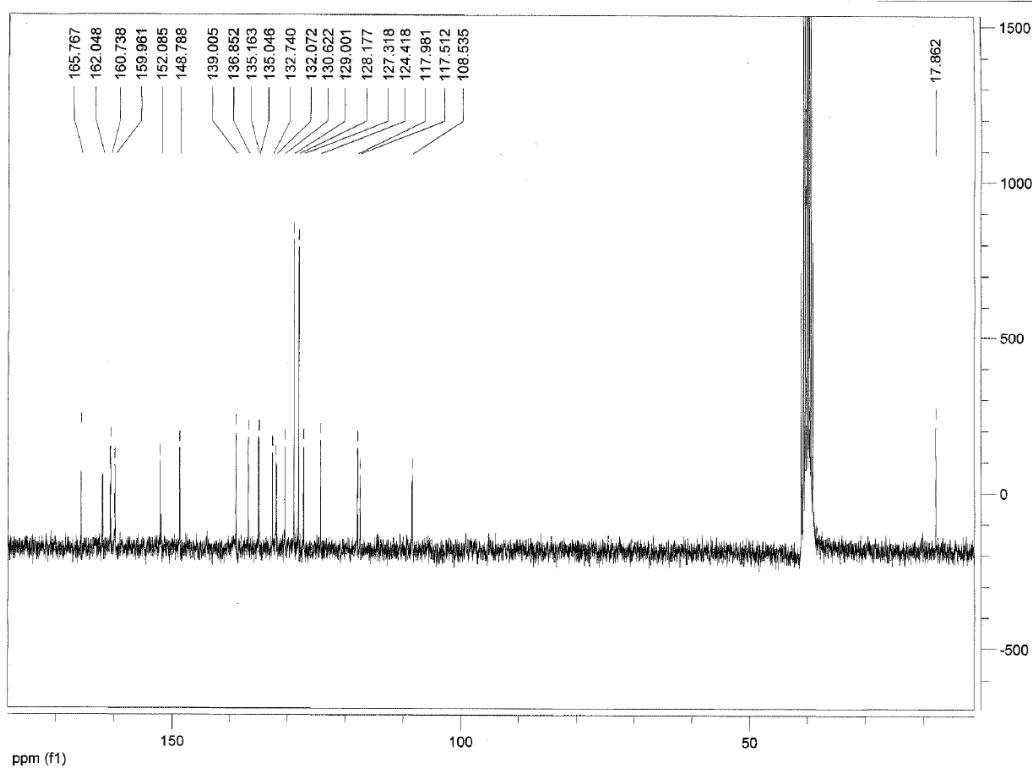
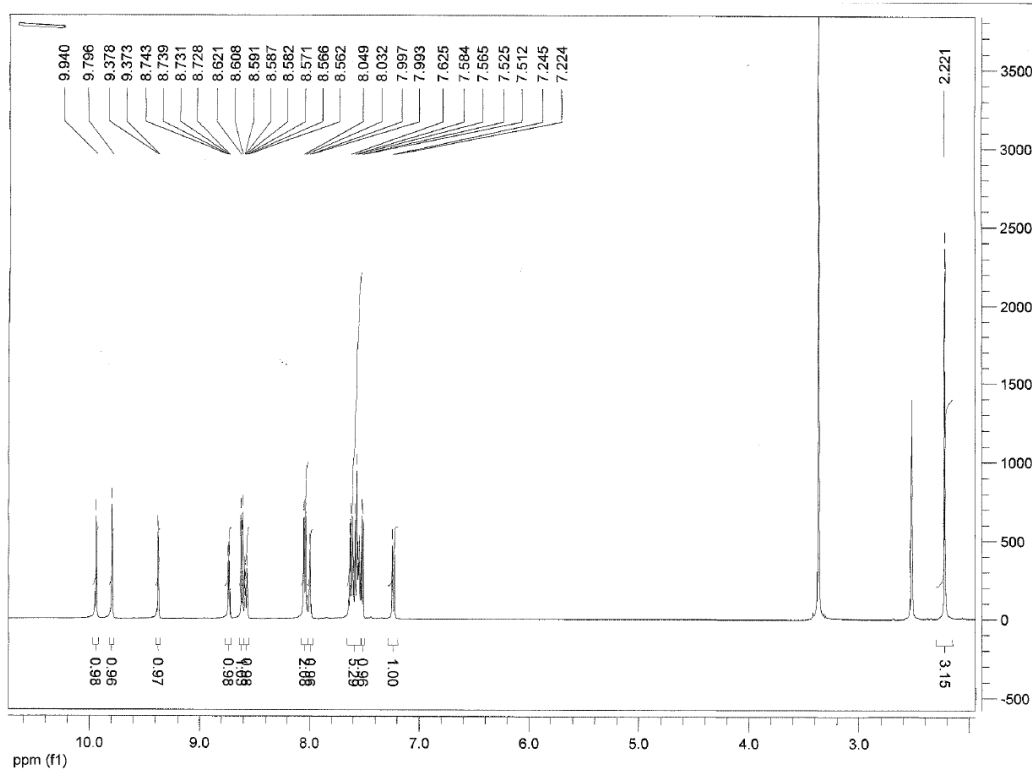




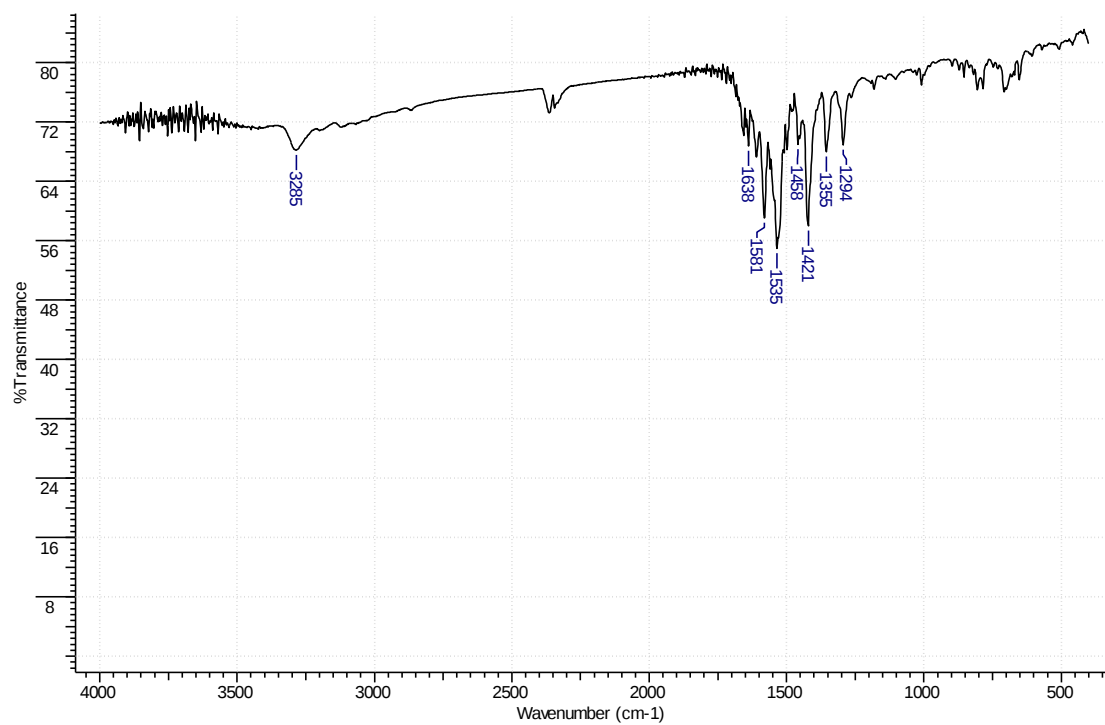
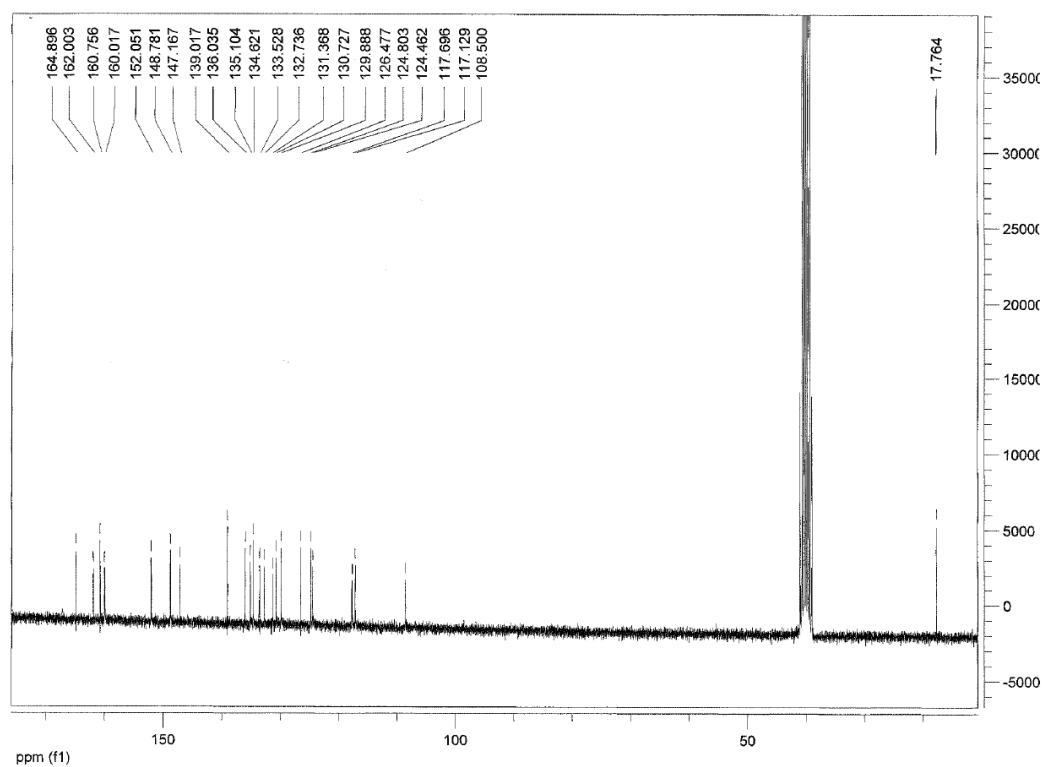




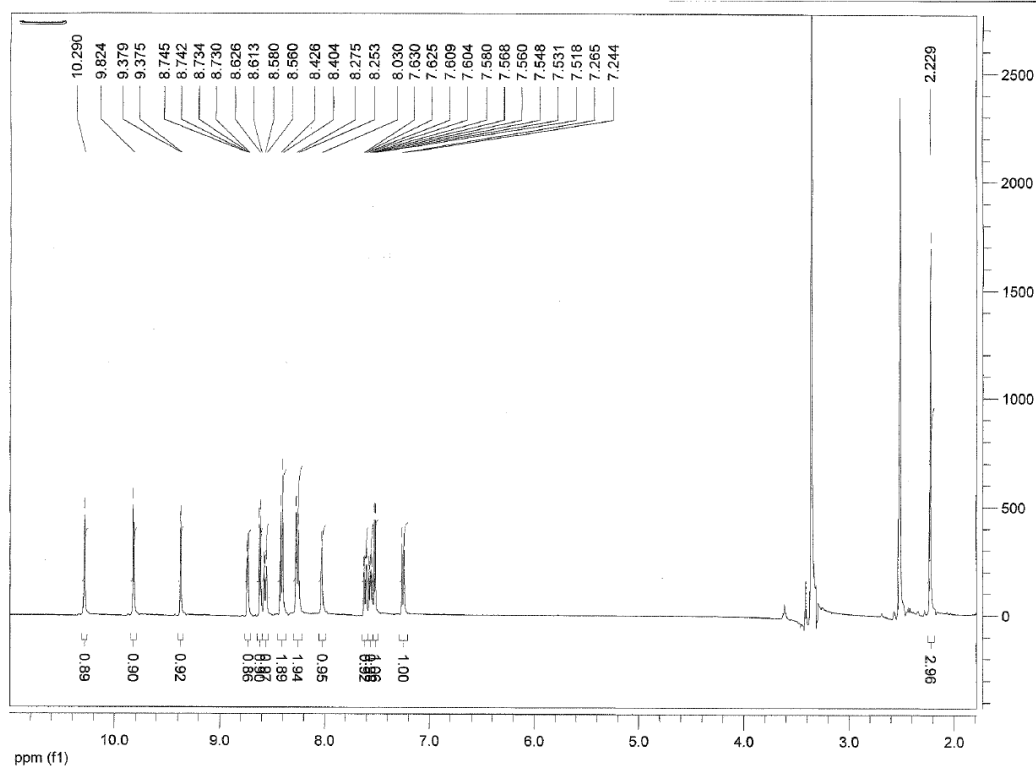
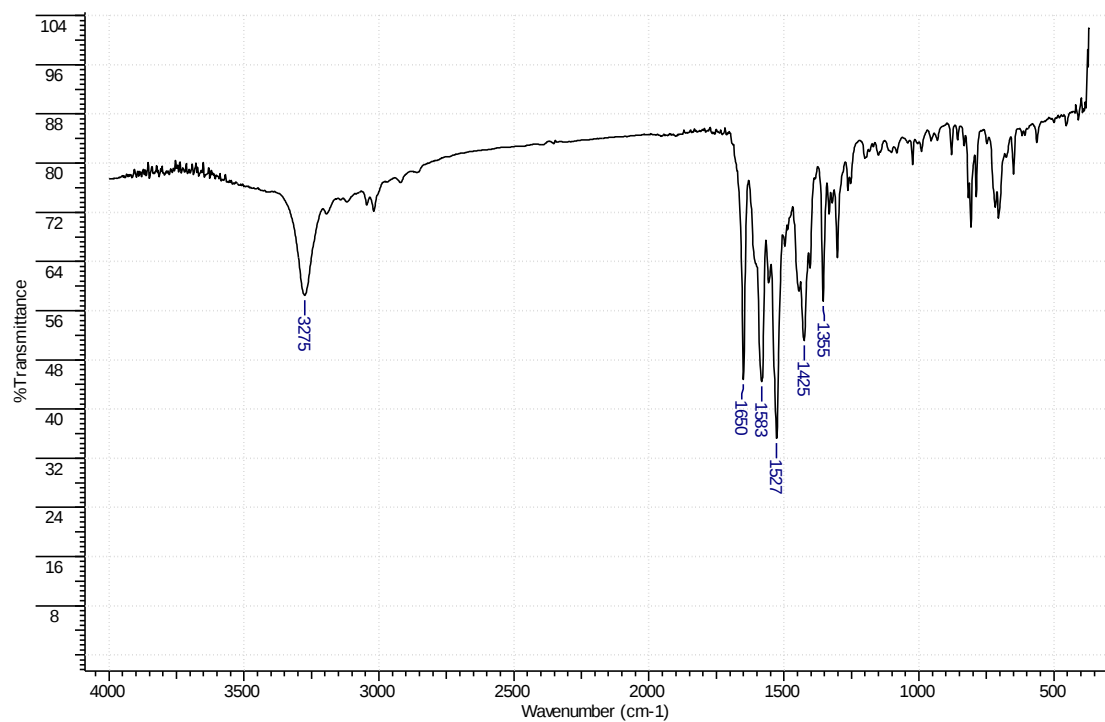
# ΔΕΥΤΕΡΗ ΟΜΑΔΑ

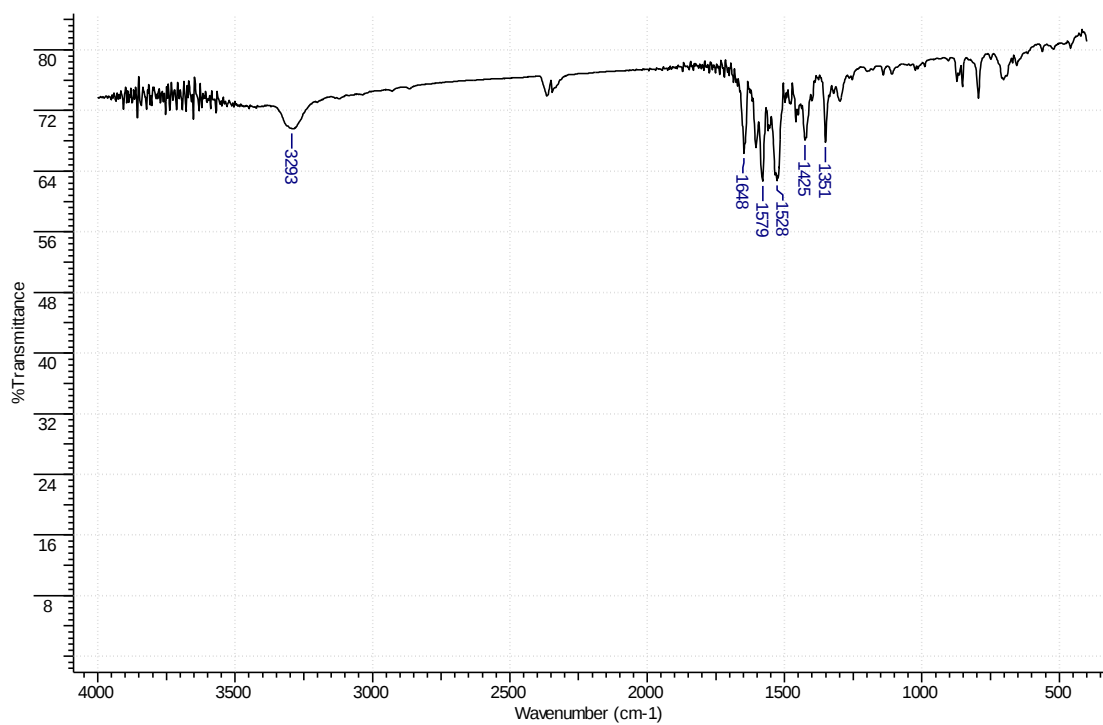
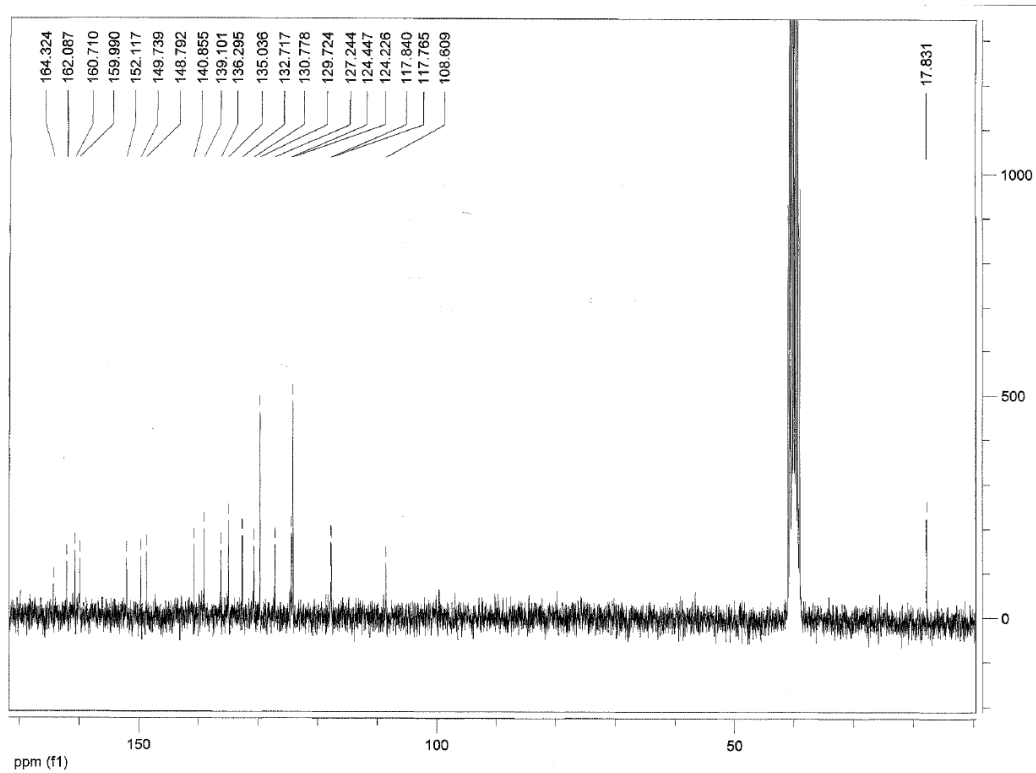


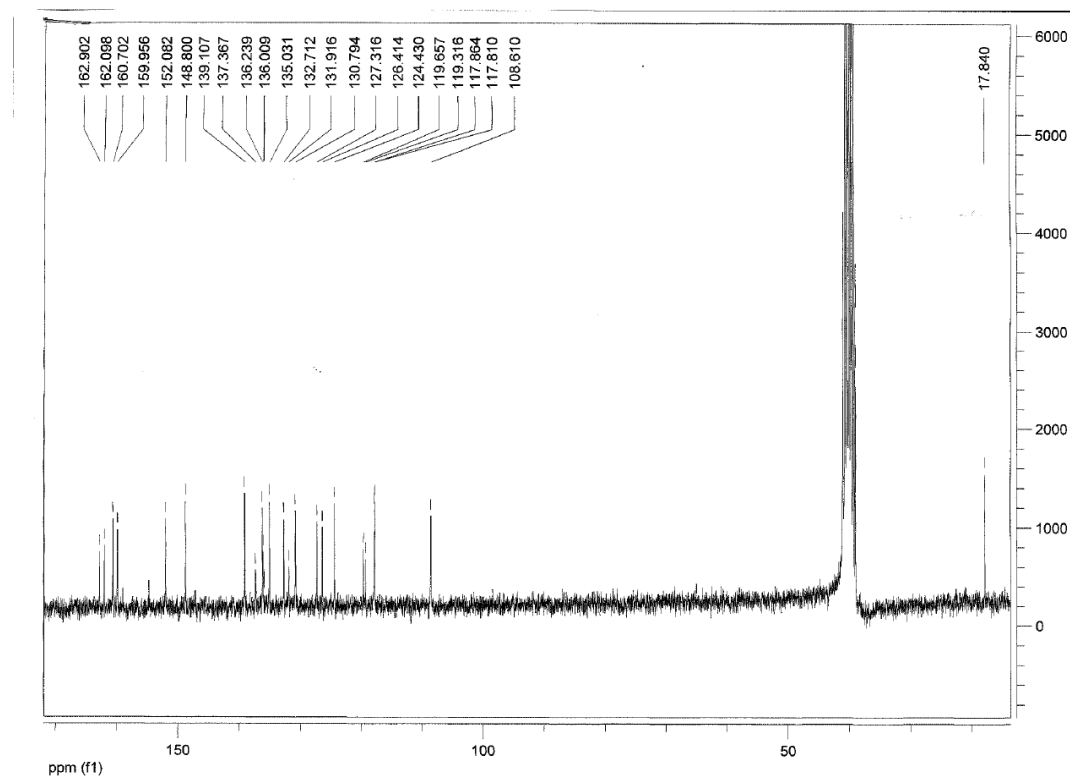
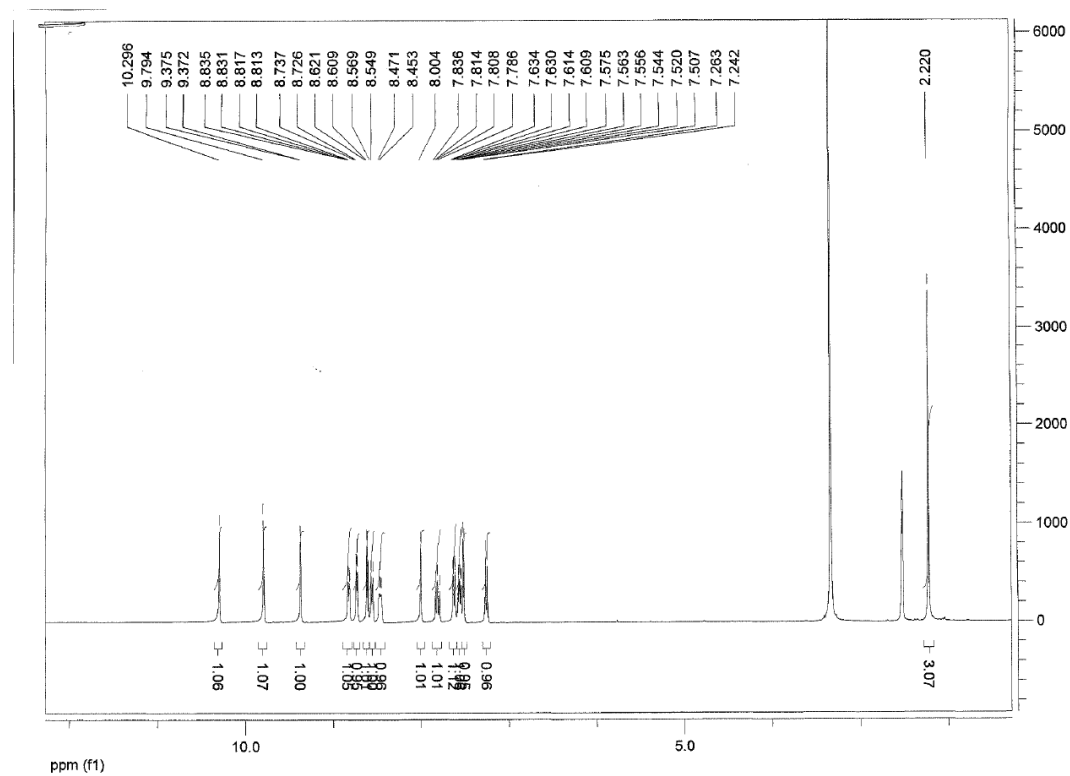


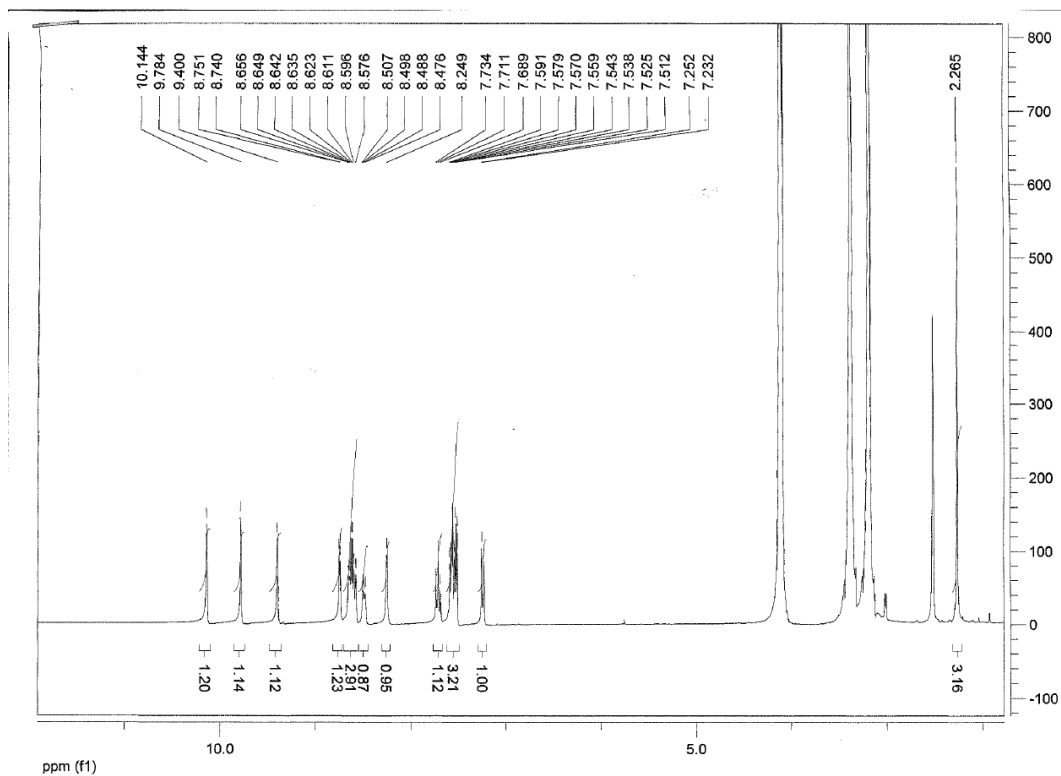
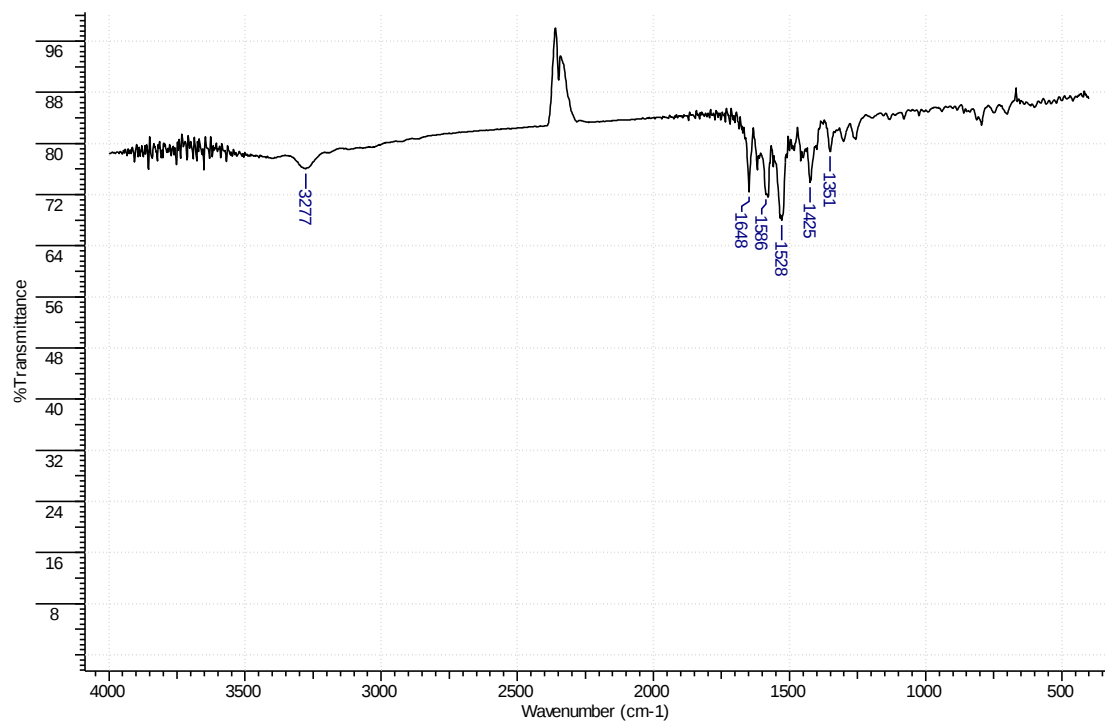


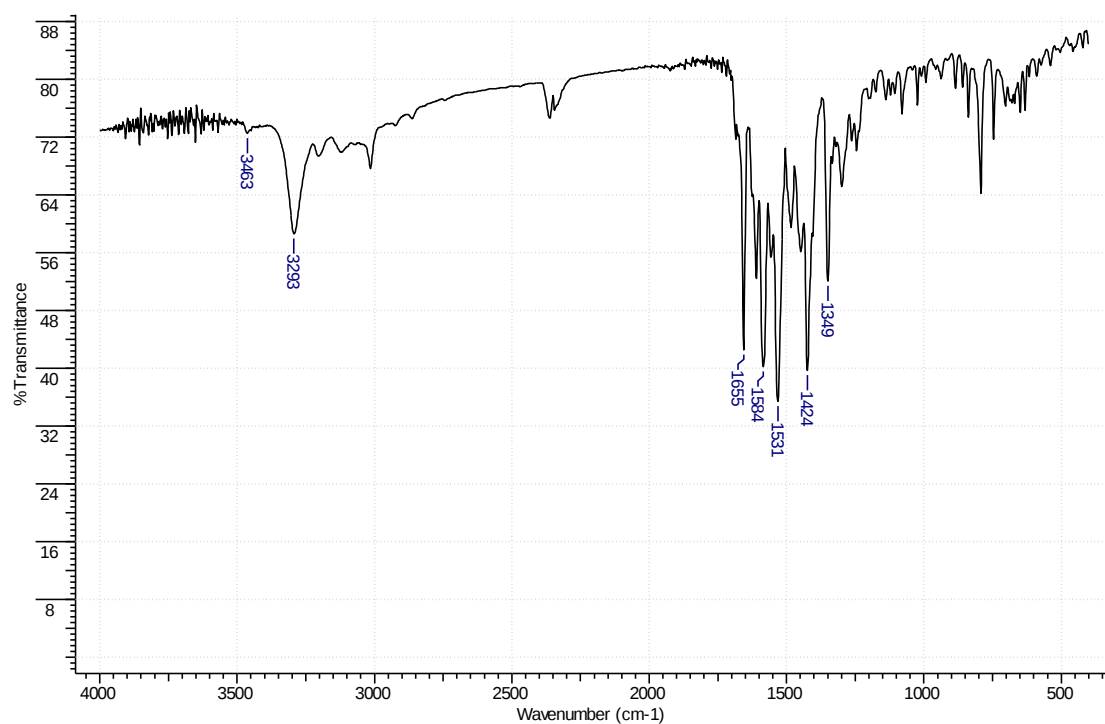
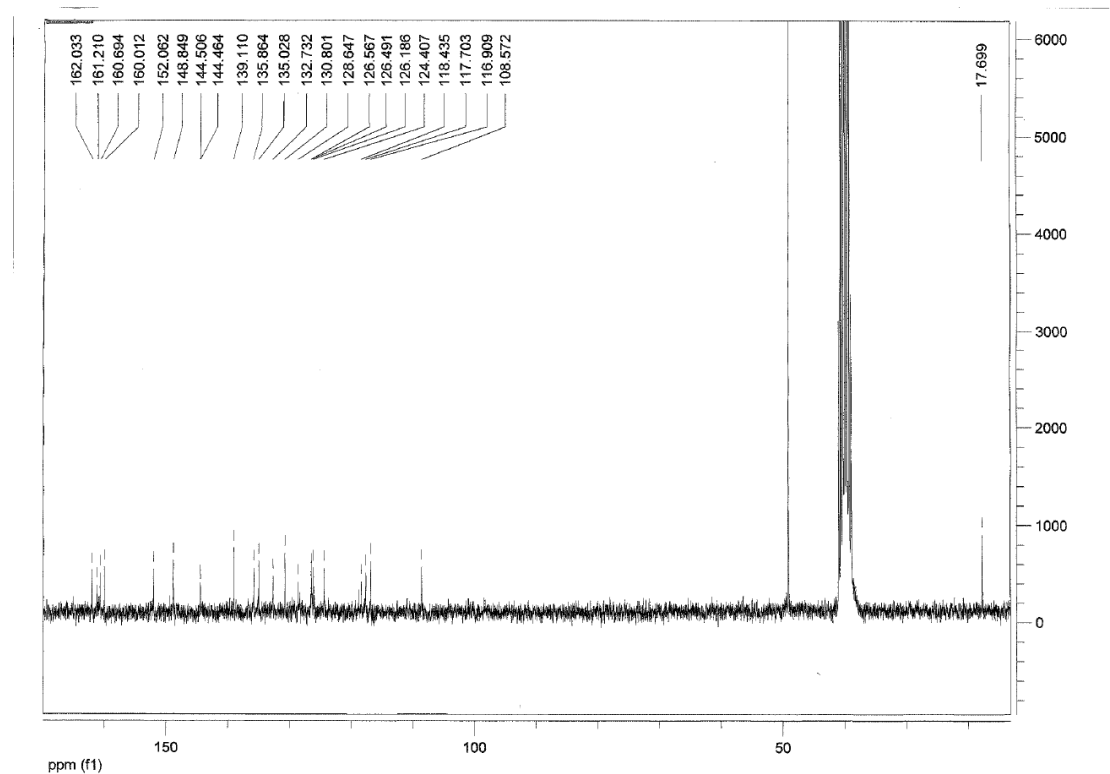


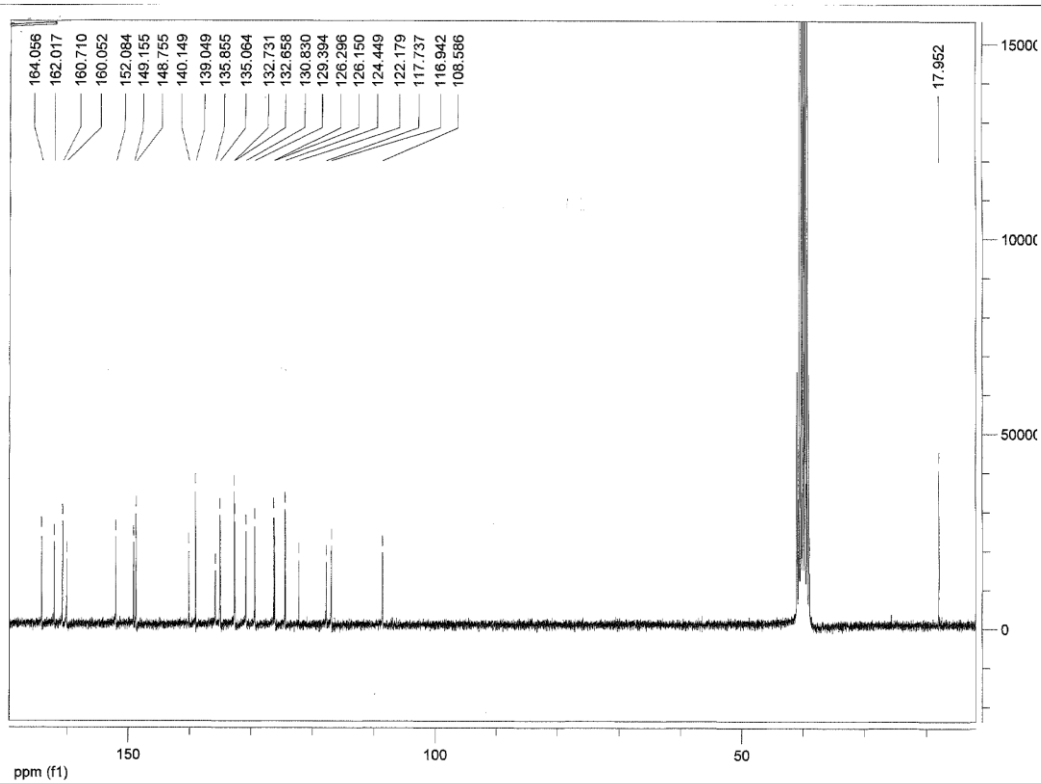
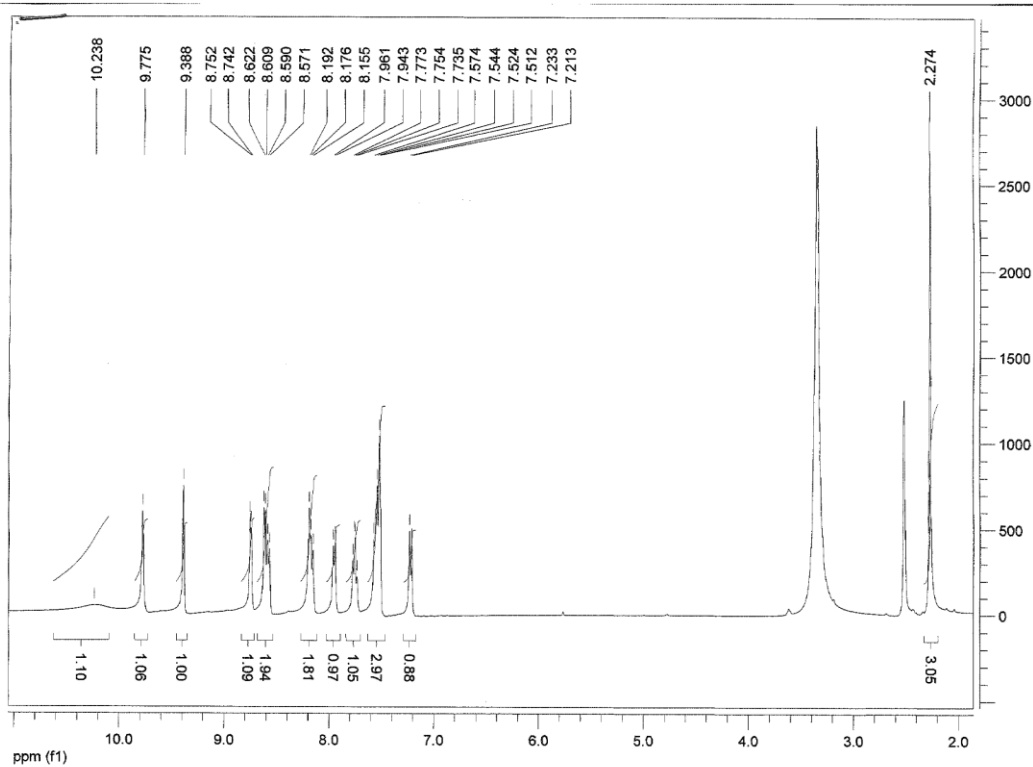


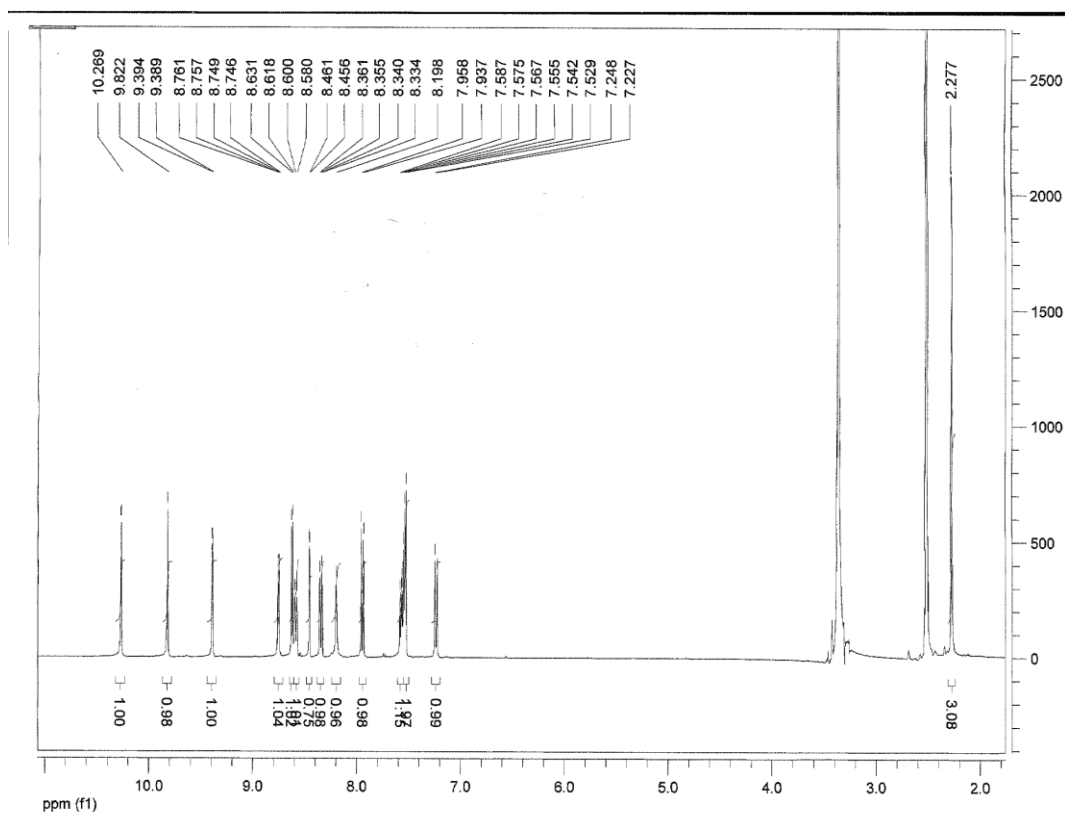
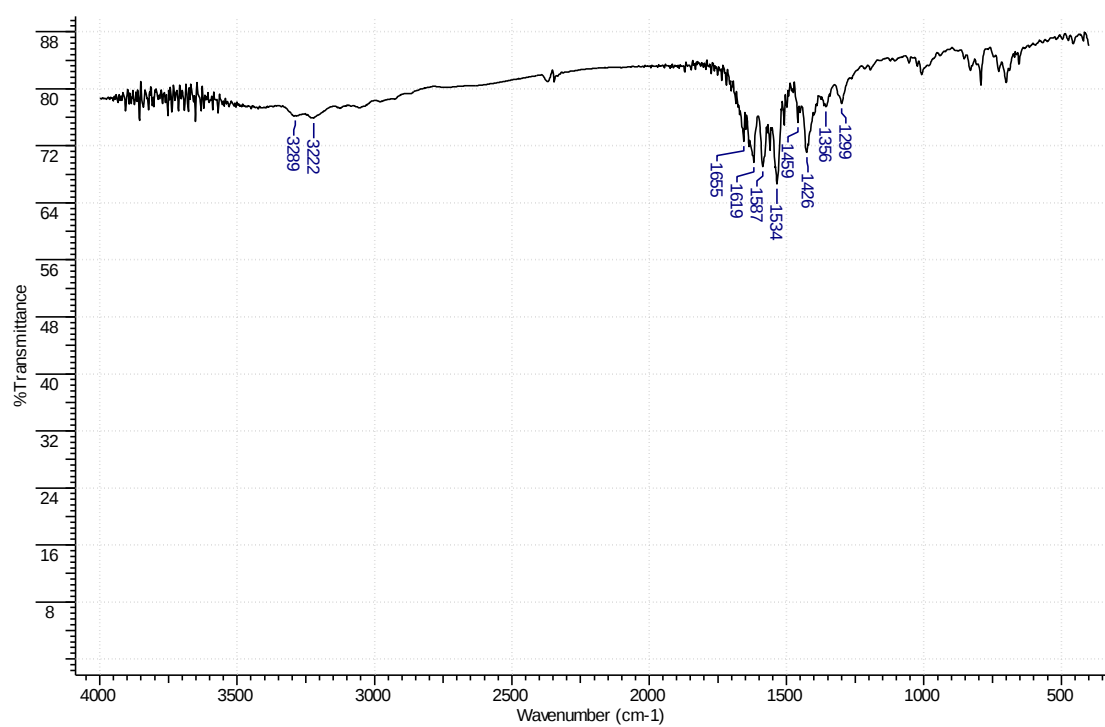


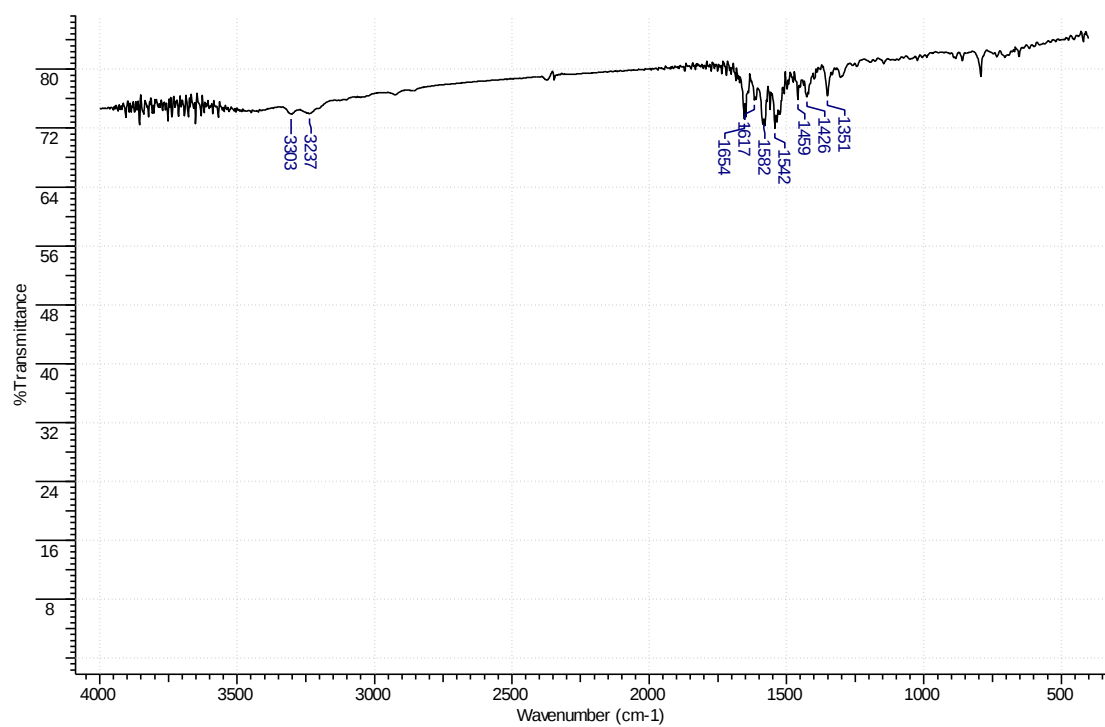
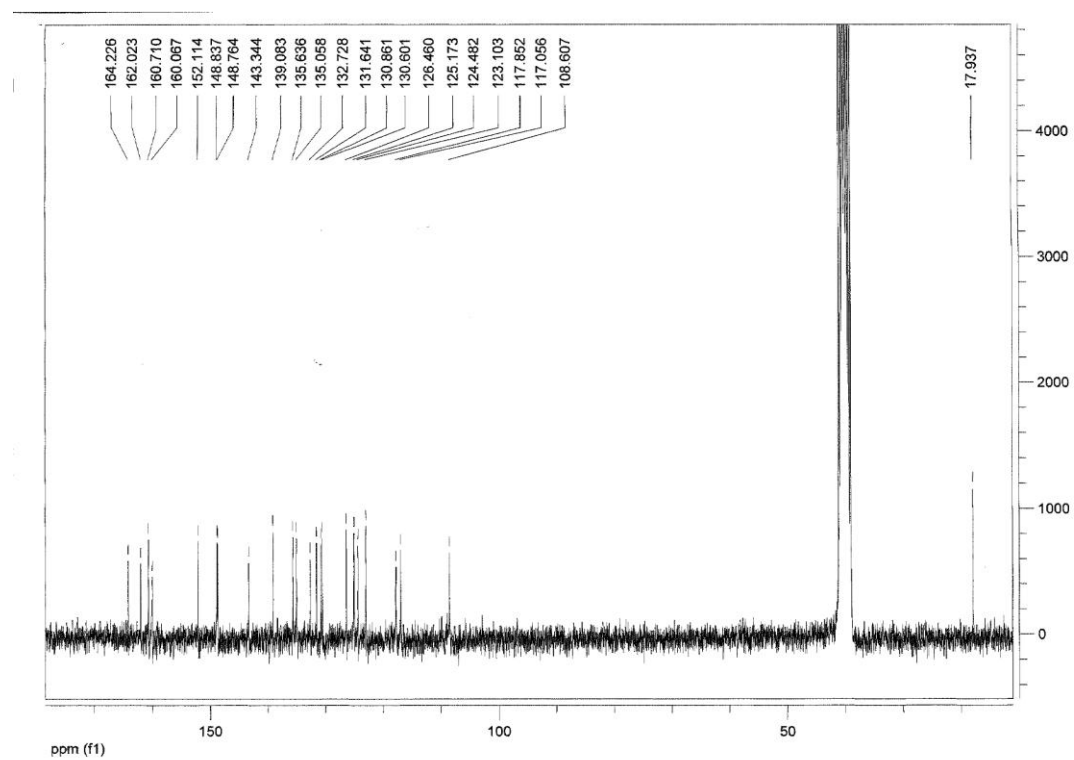


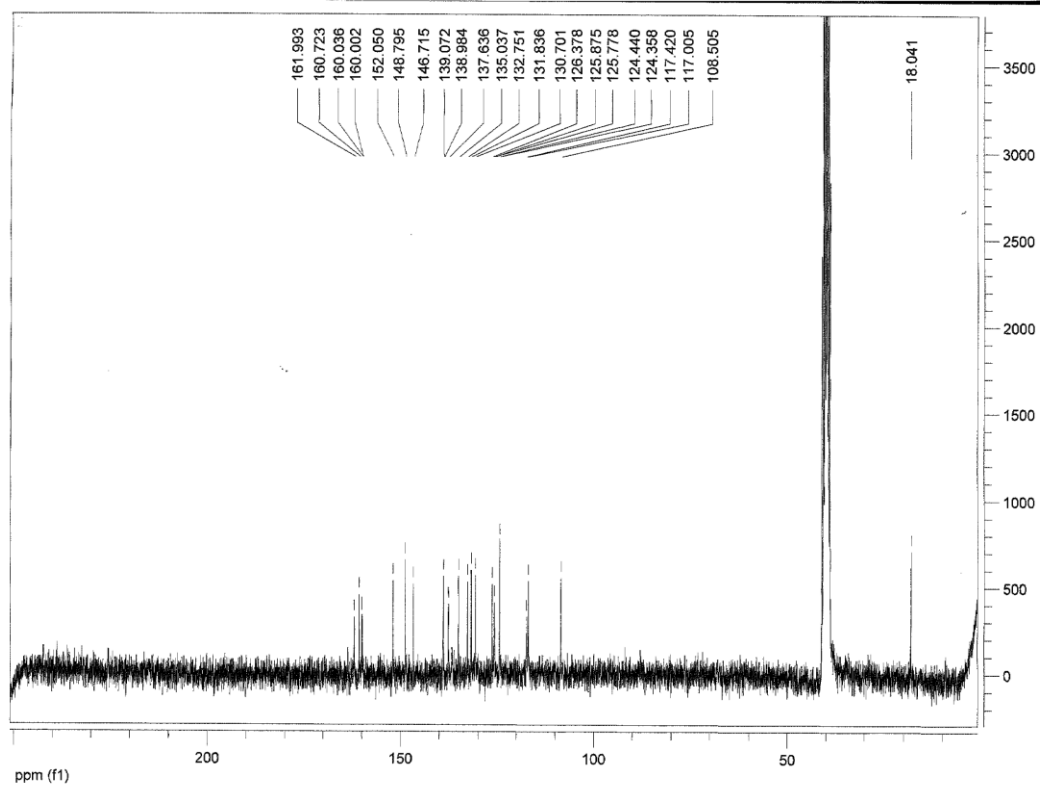
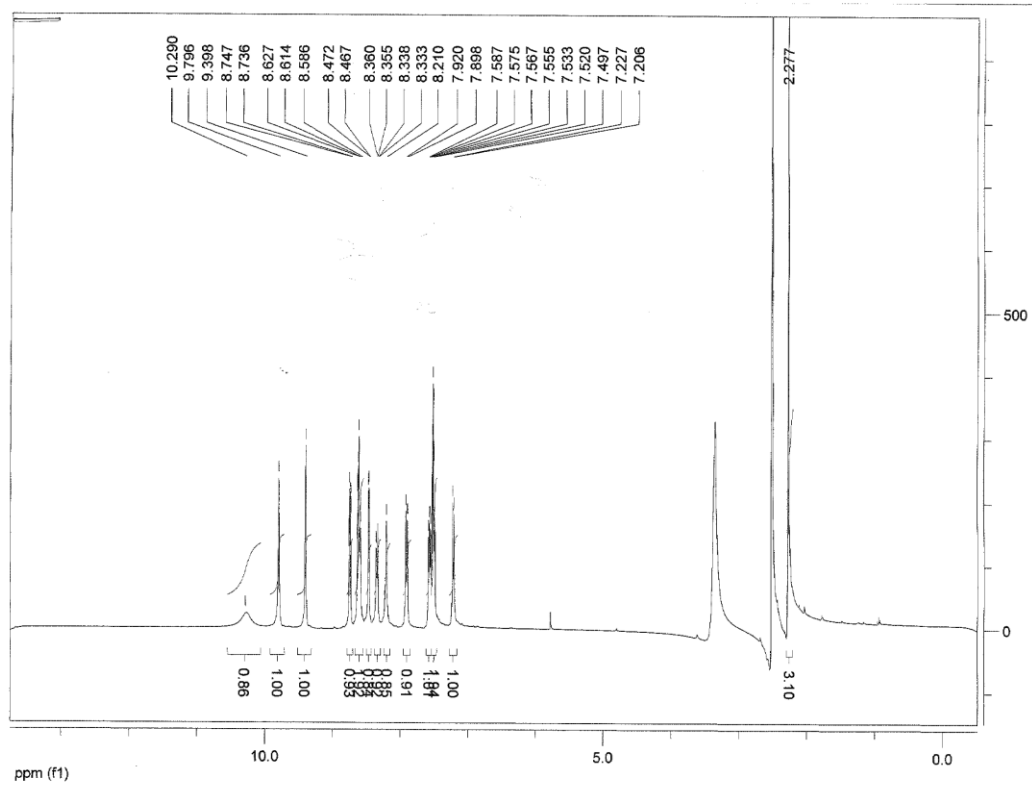


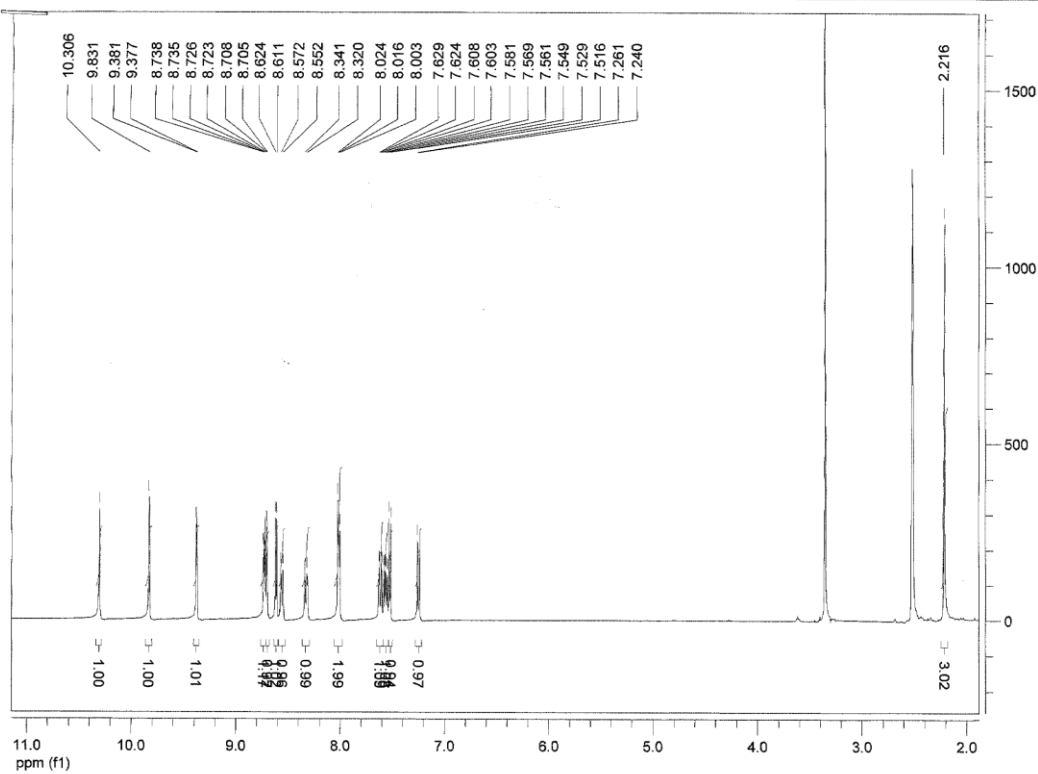
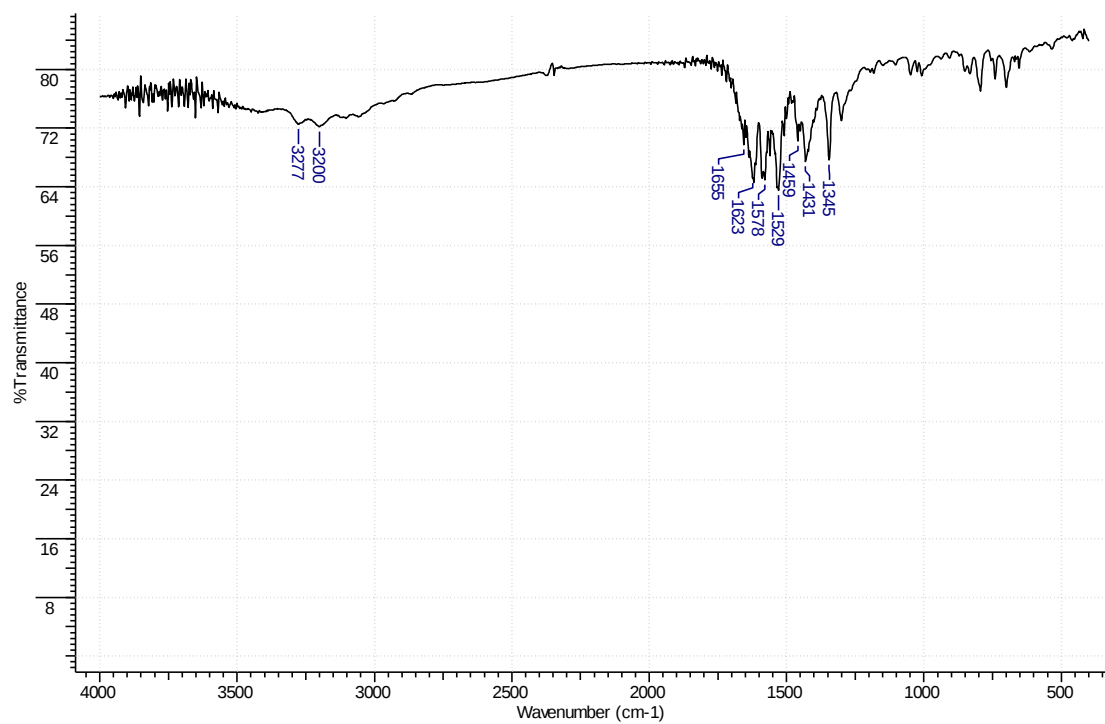


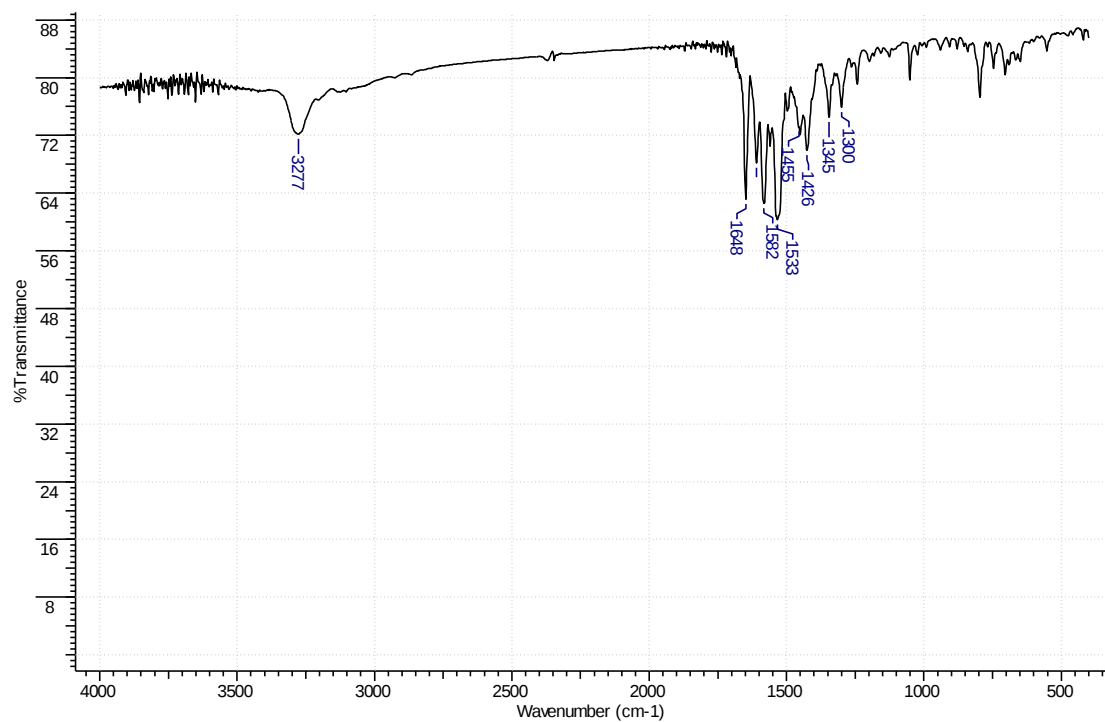
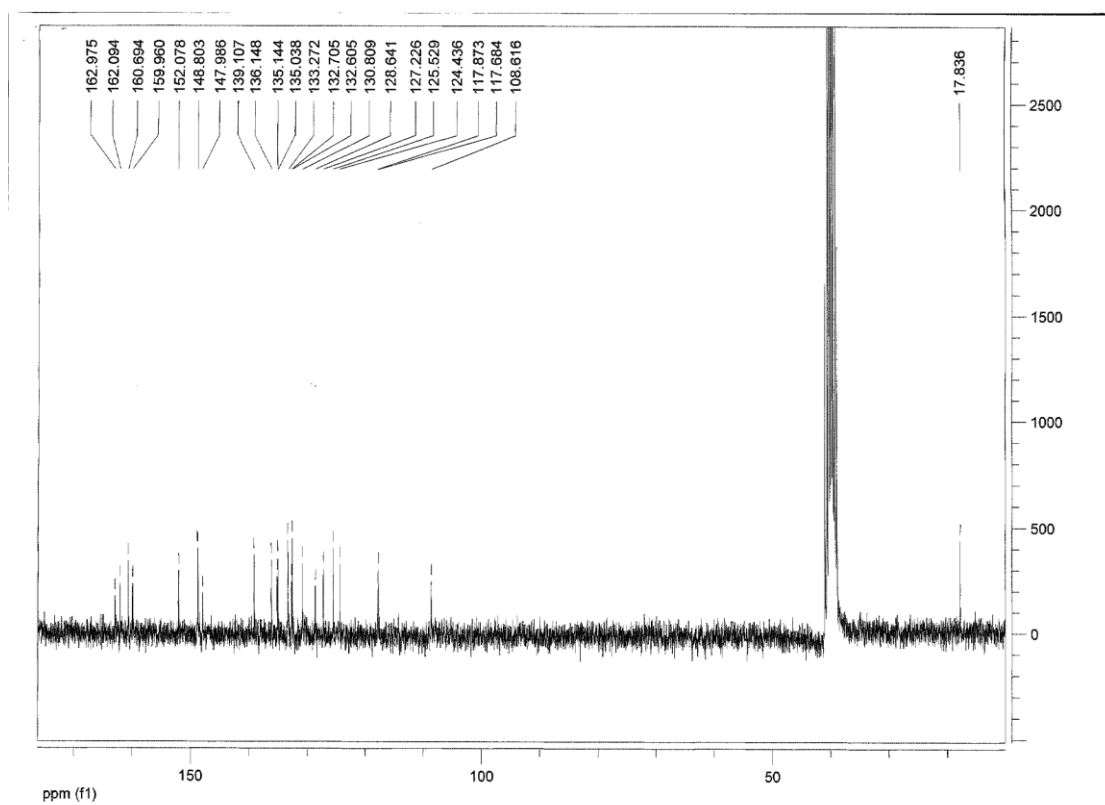


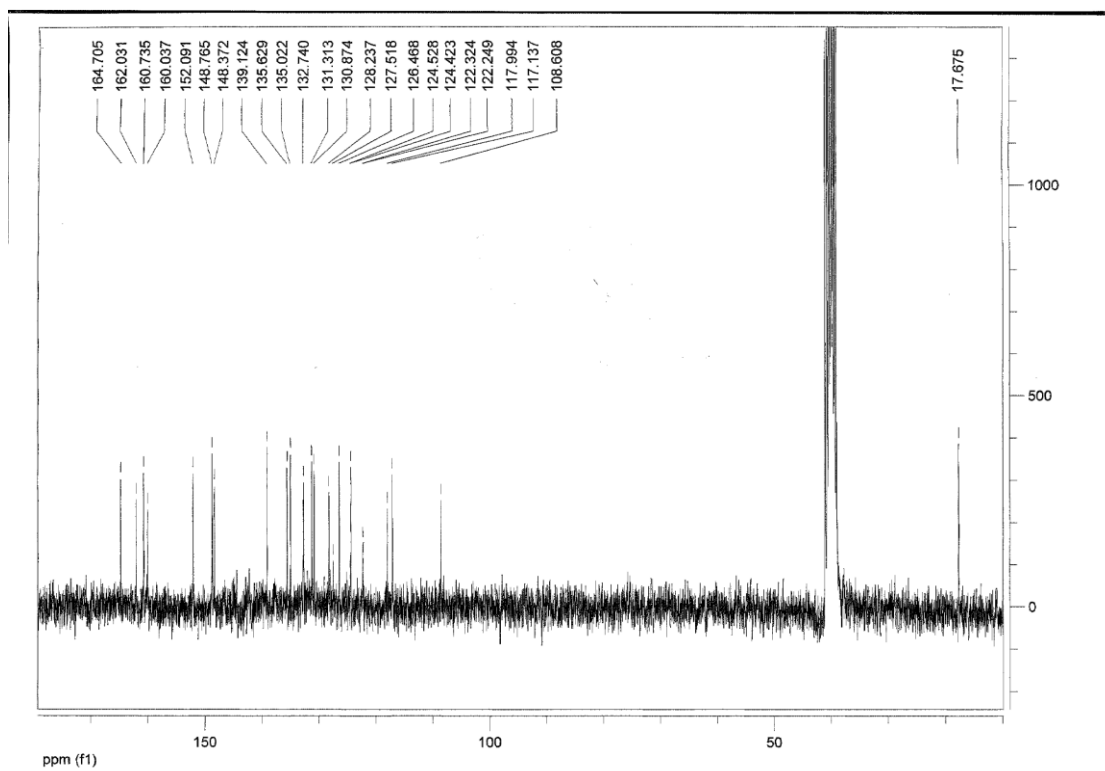
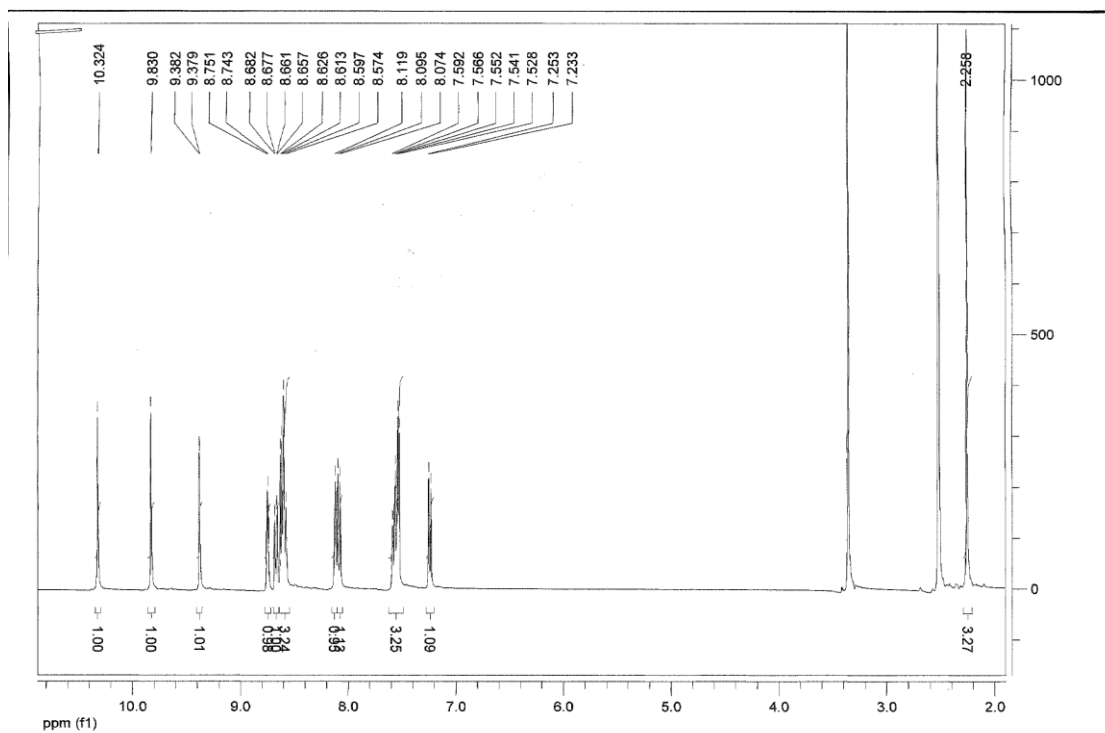


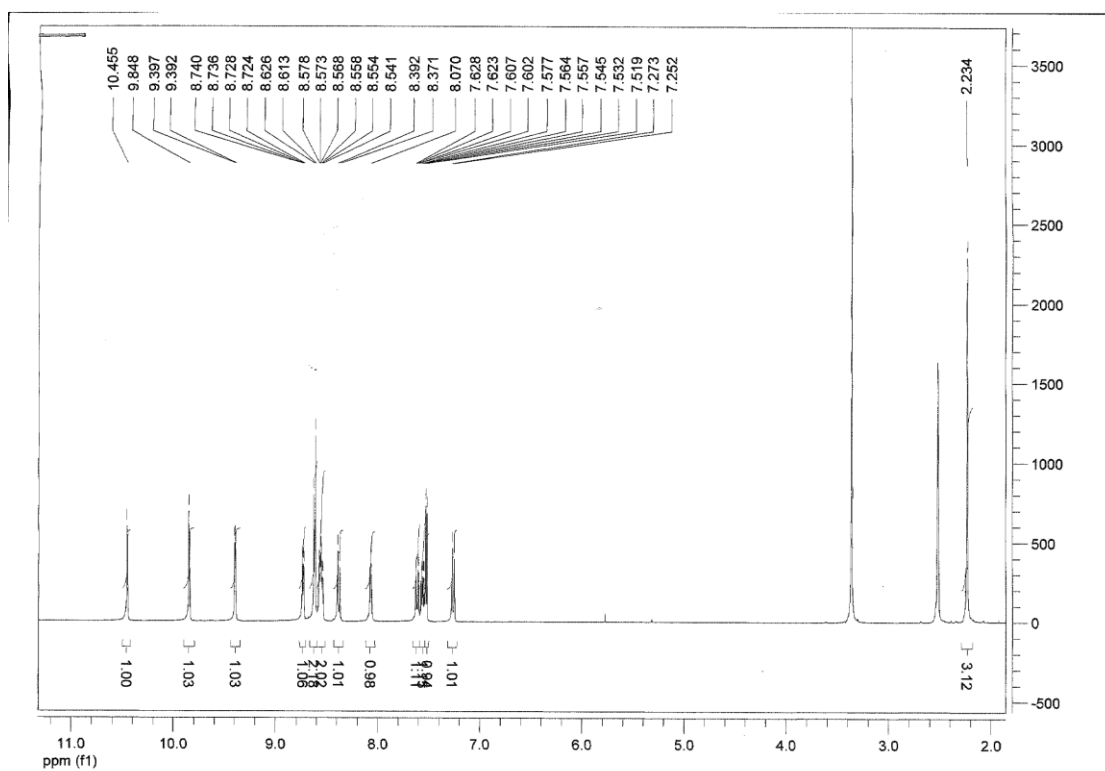
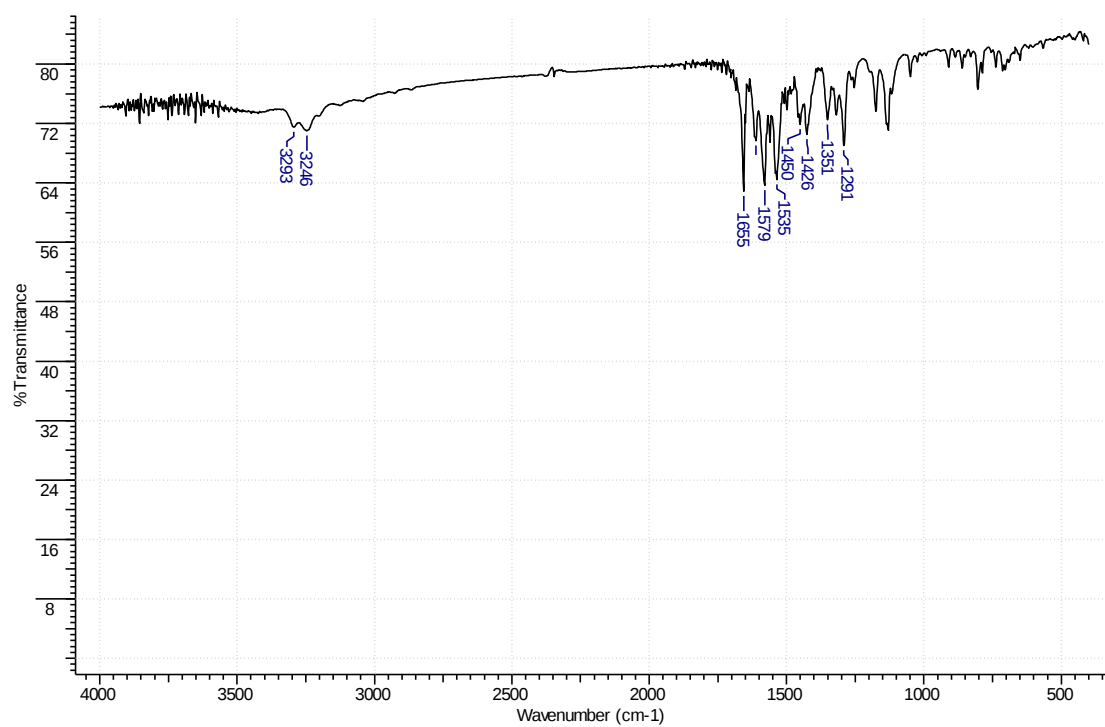


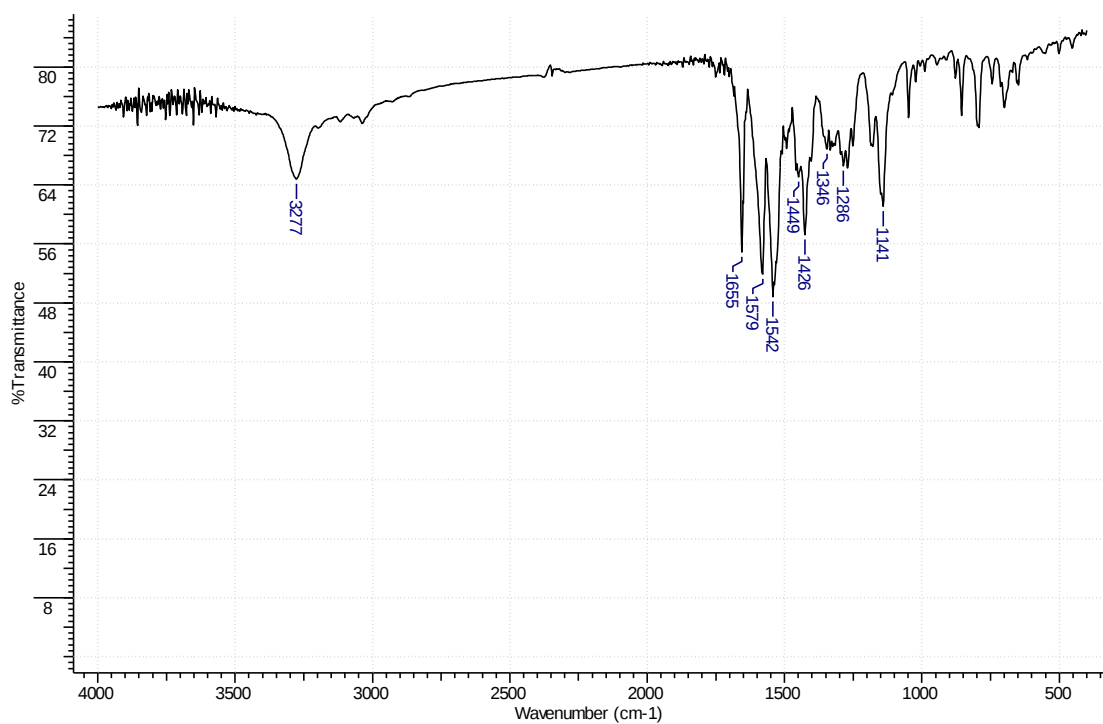
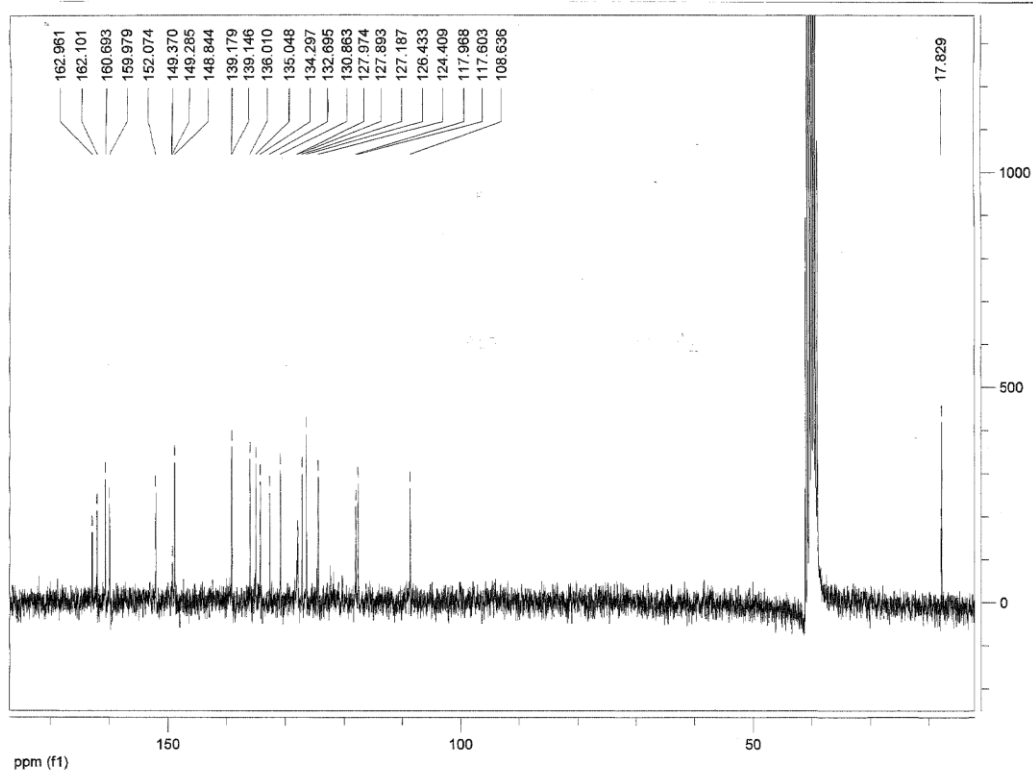


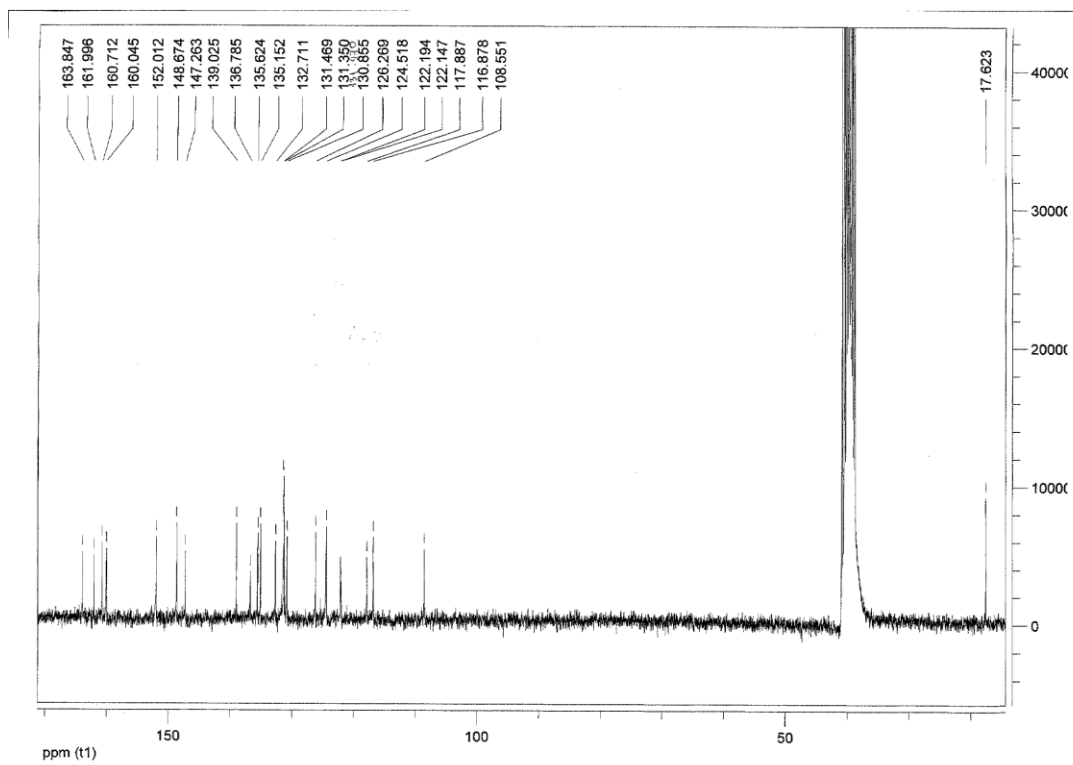
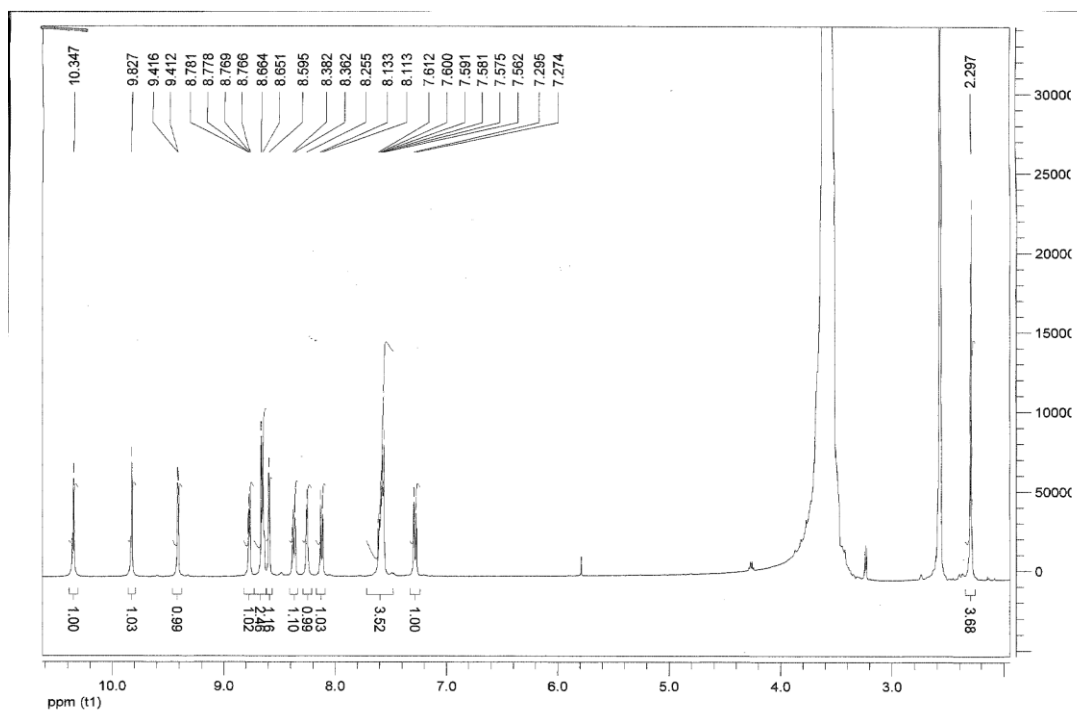


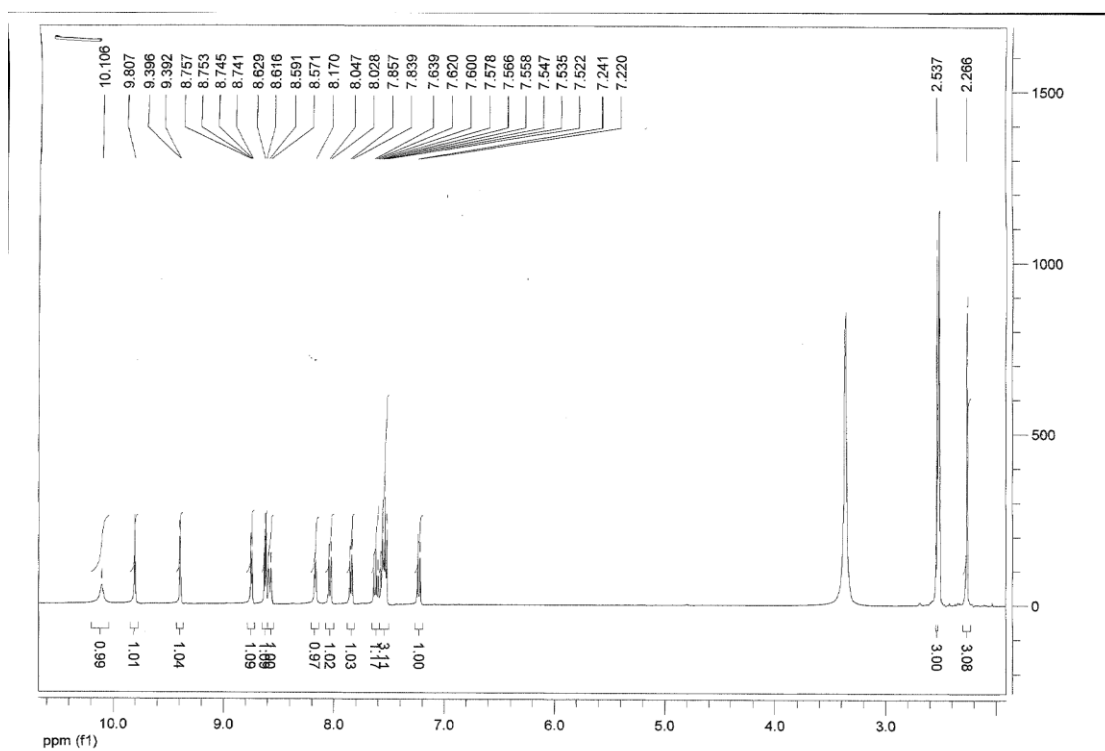
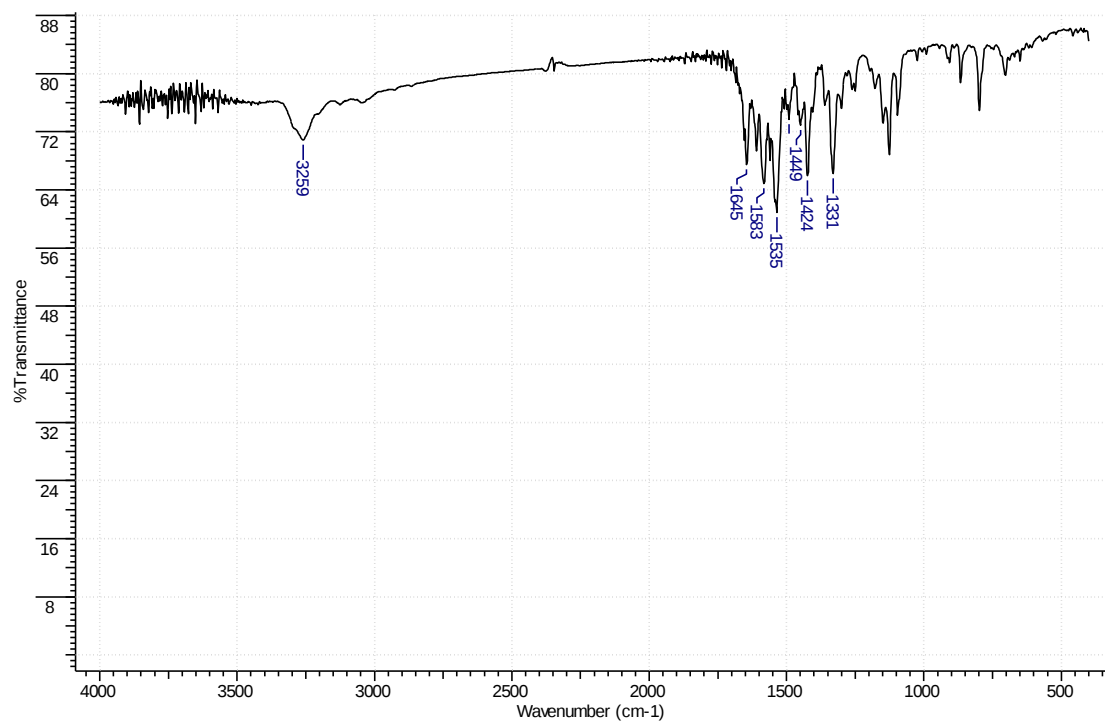


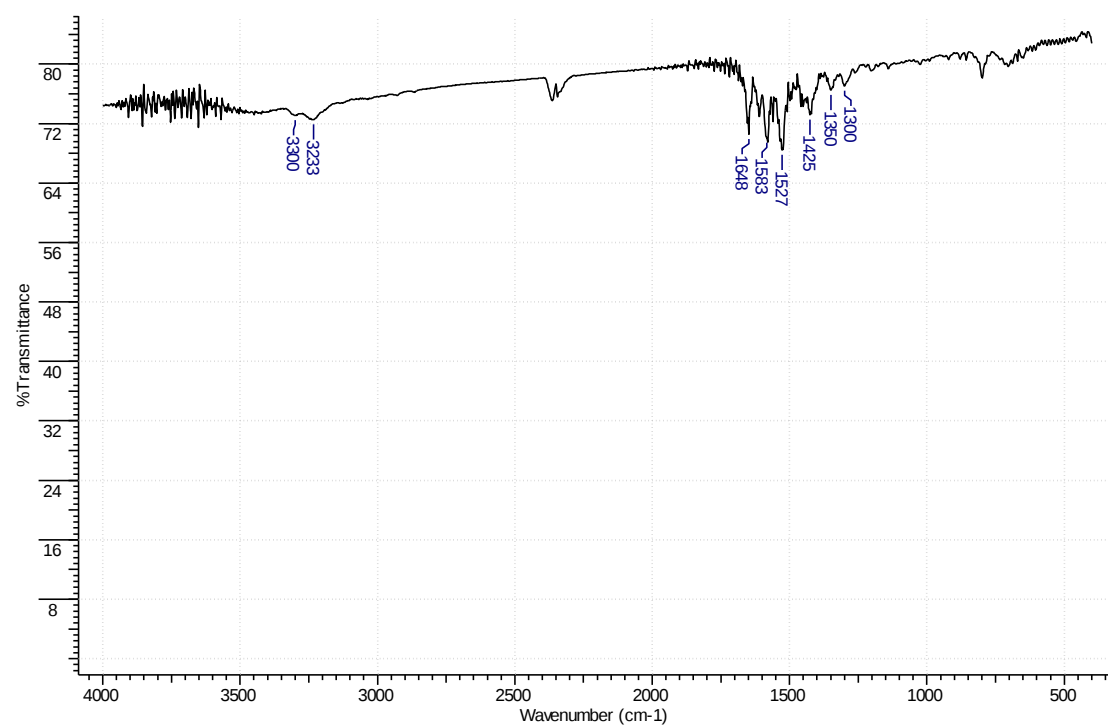
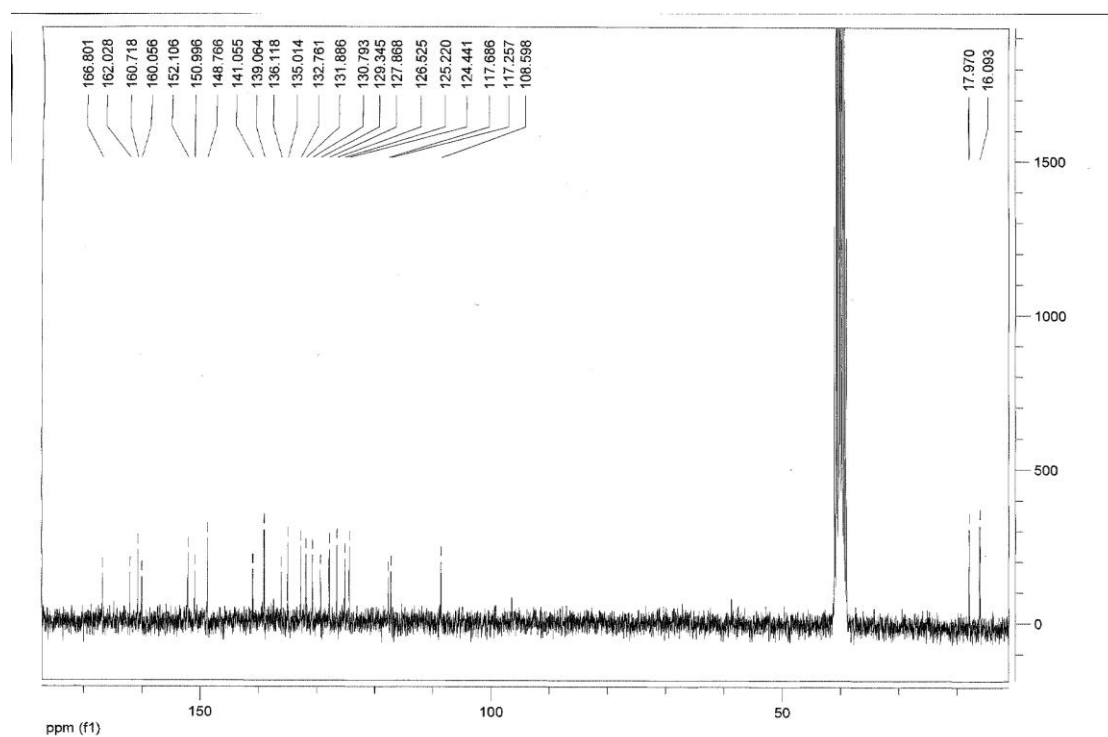


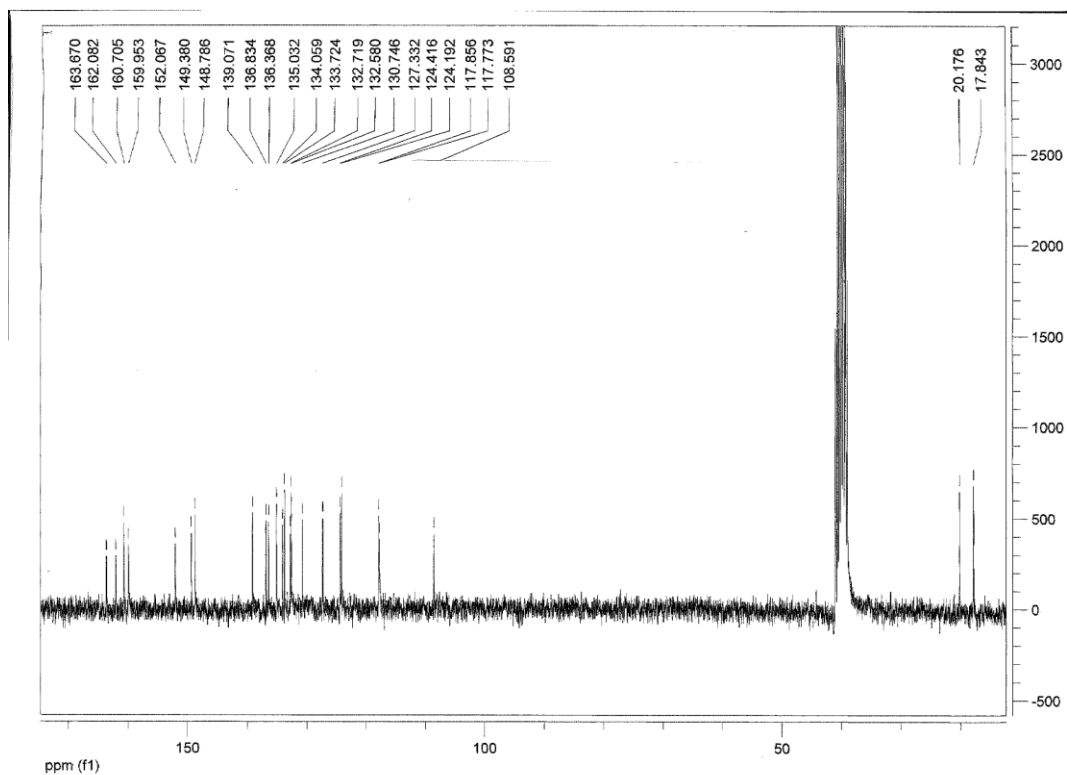
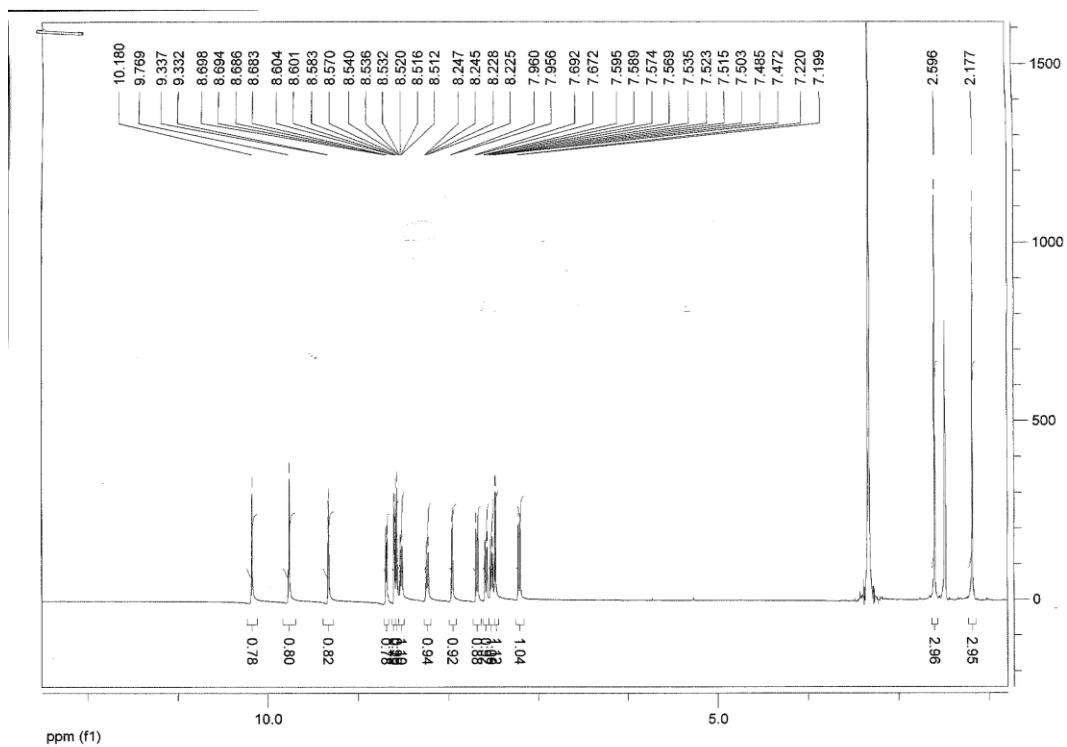


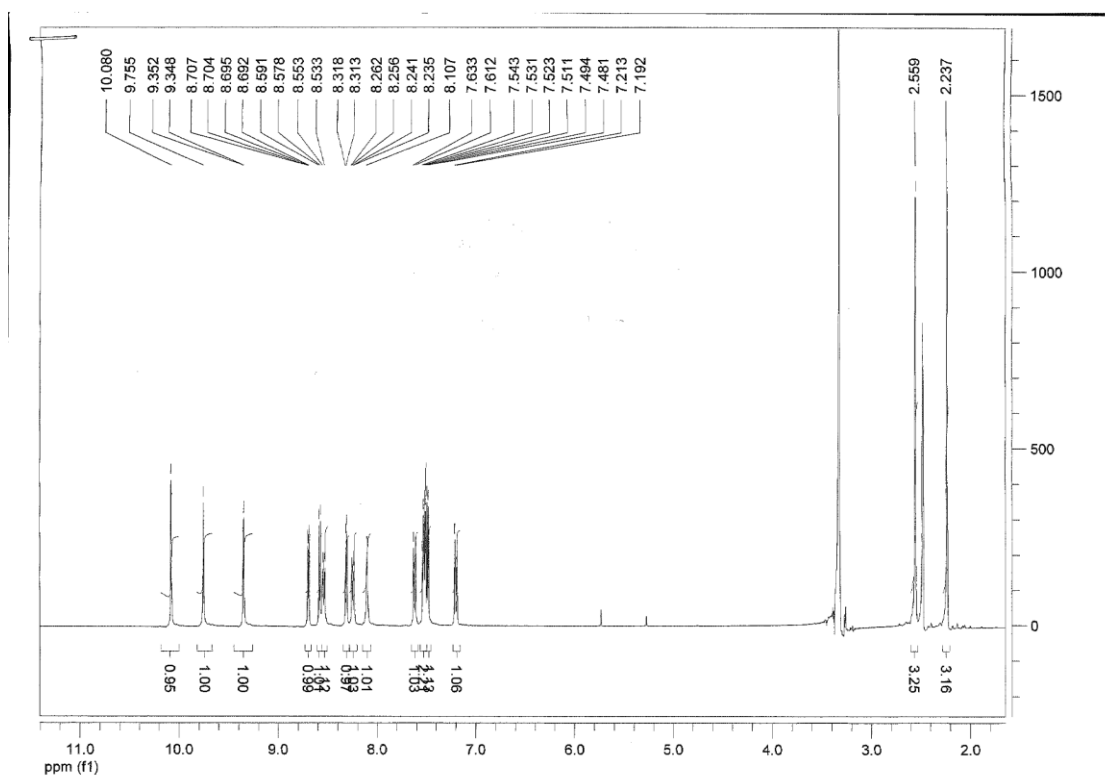
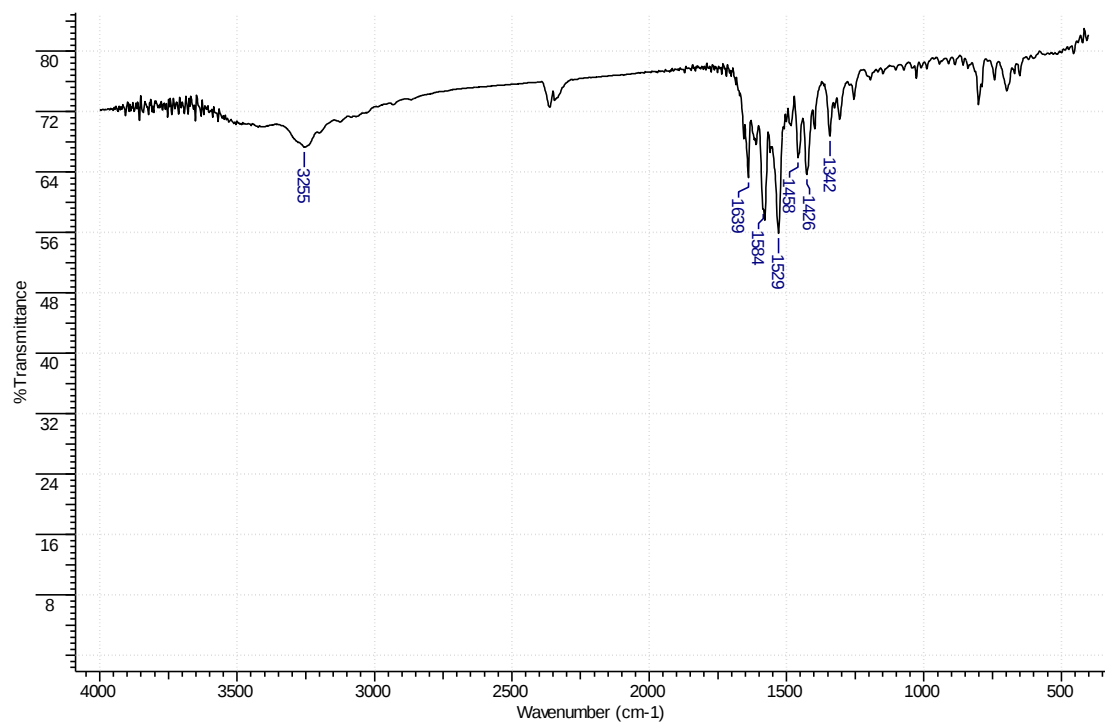


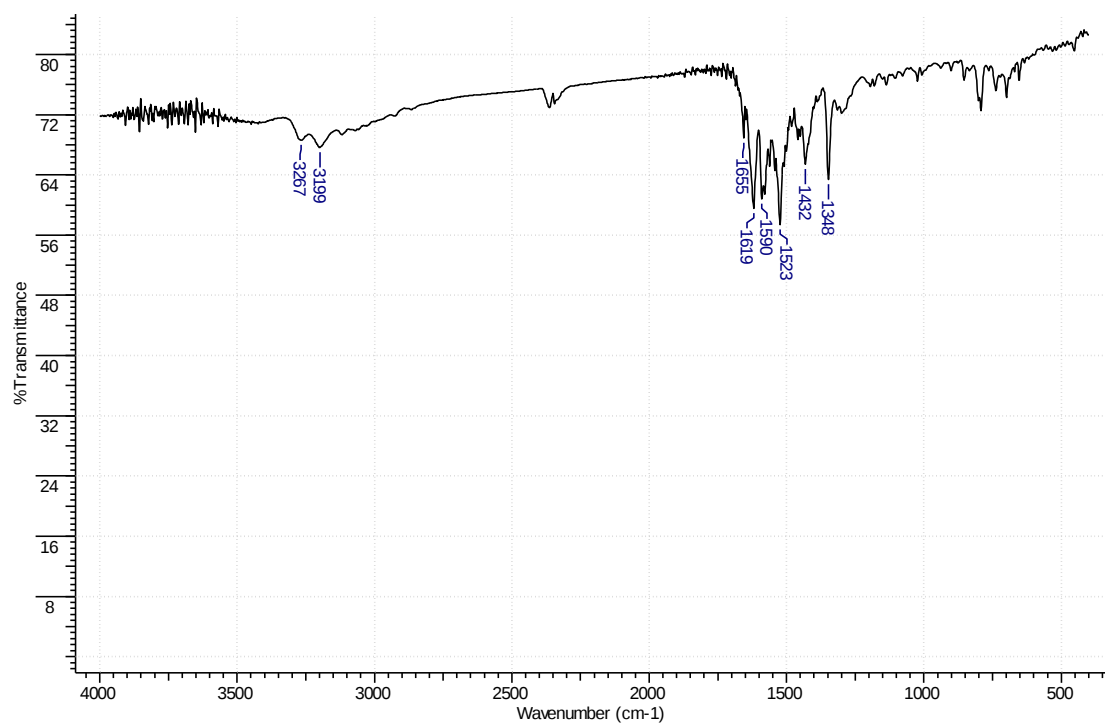
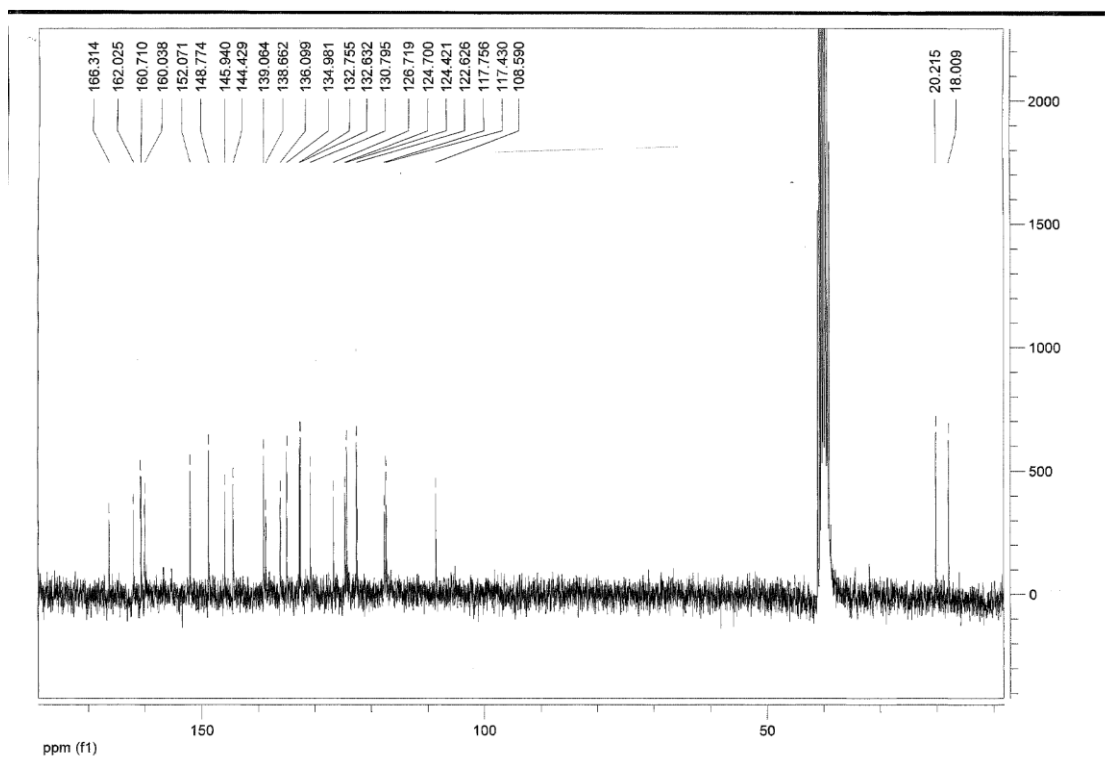


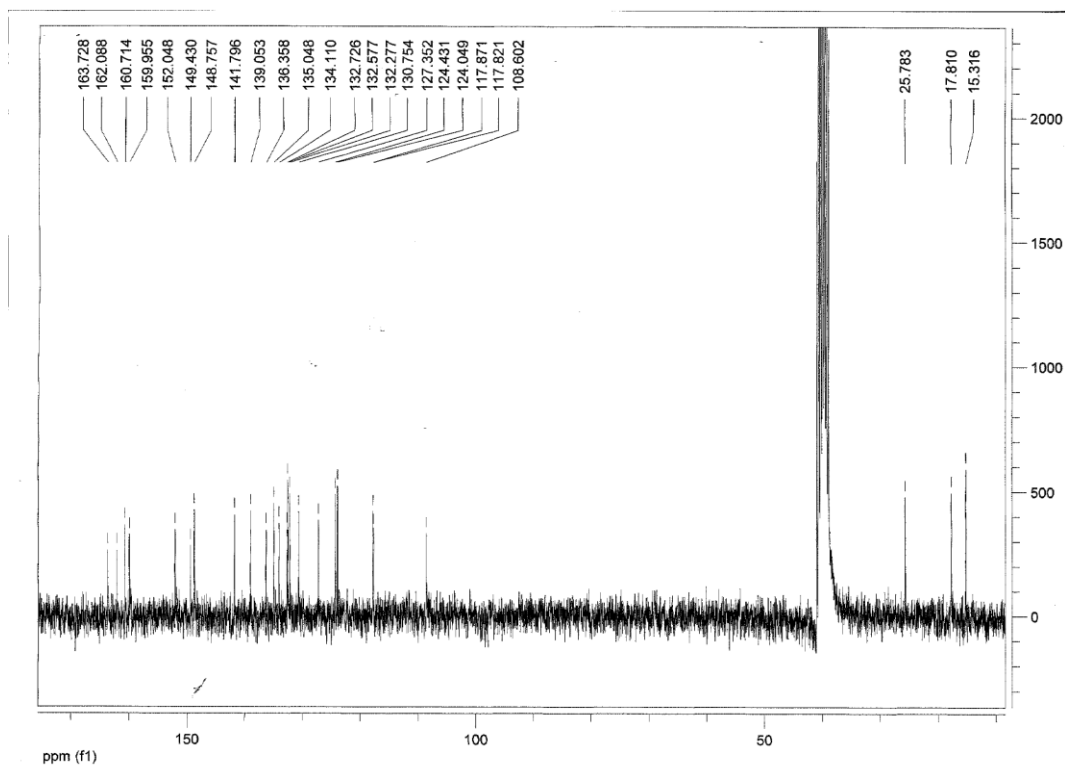
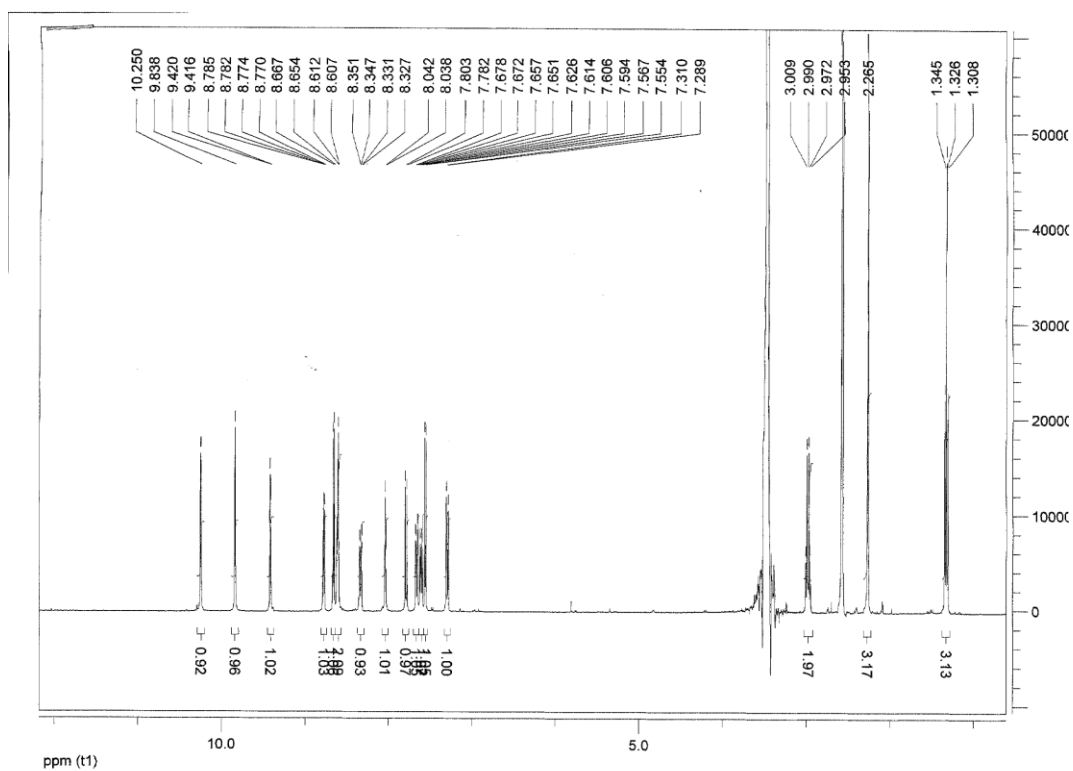


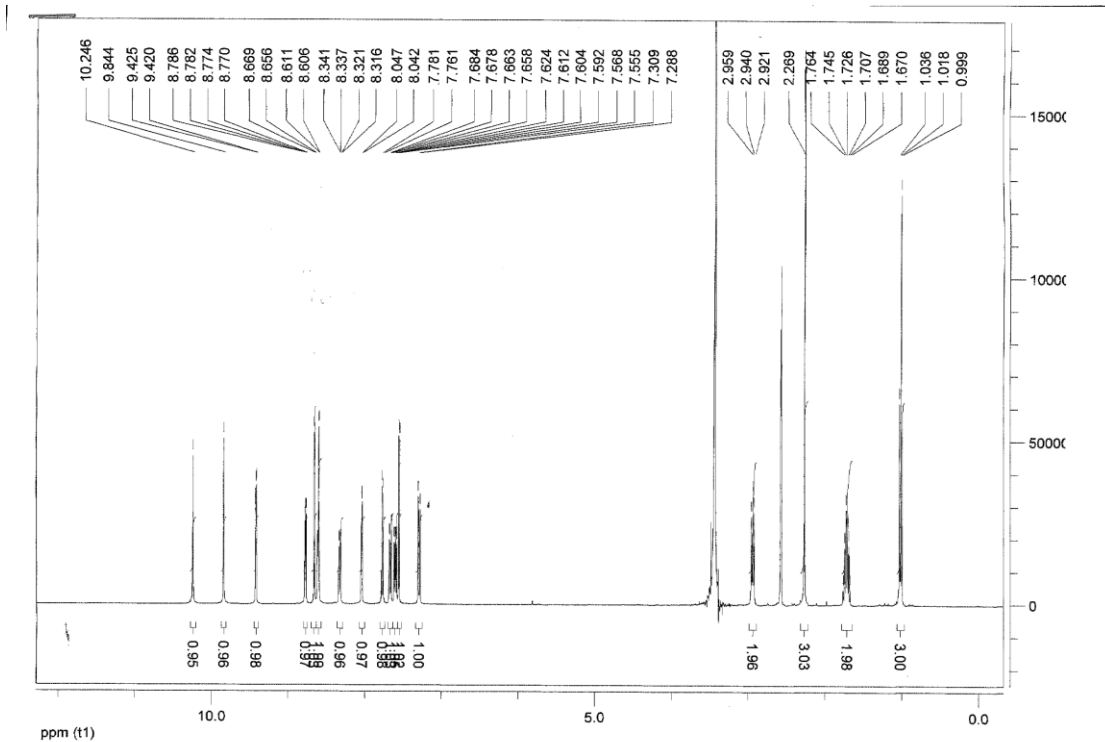


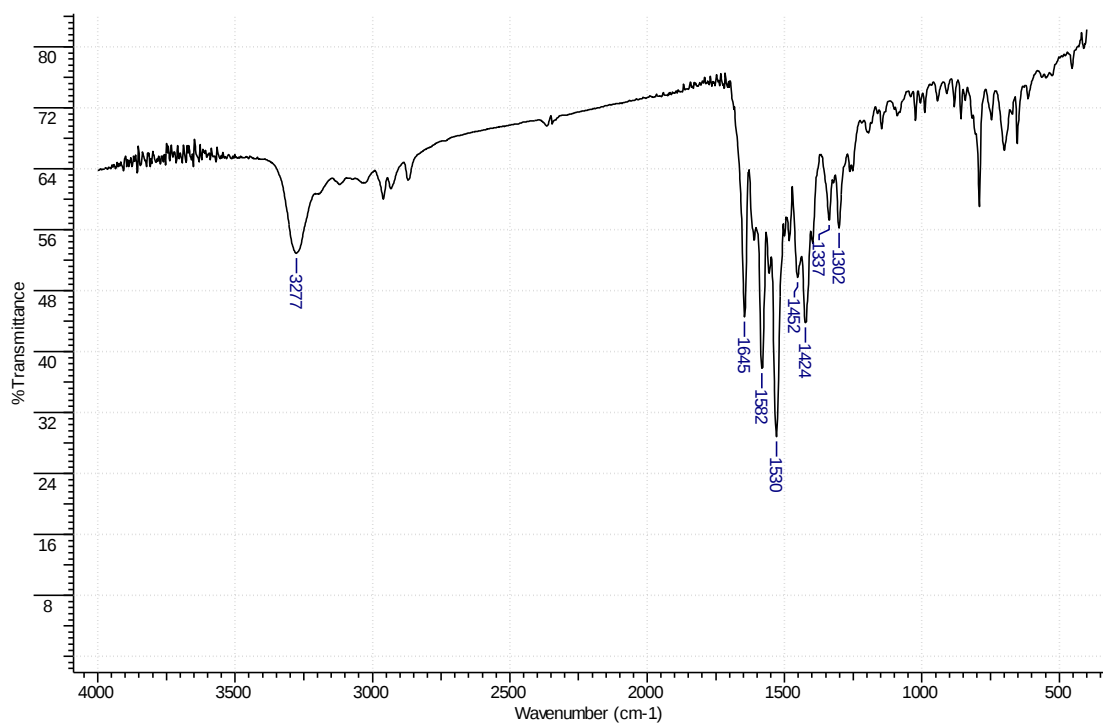
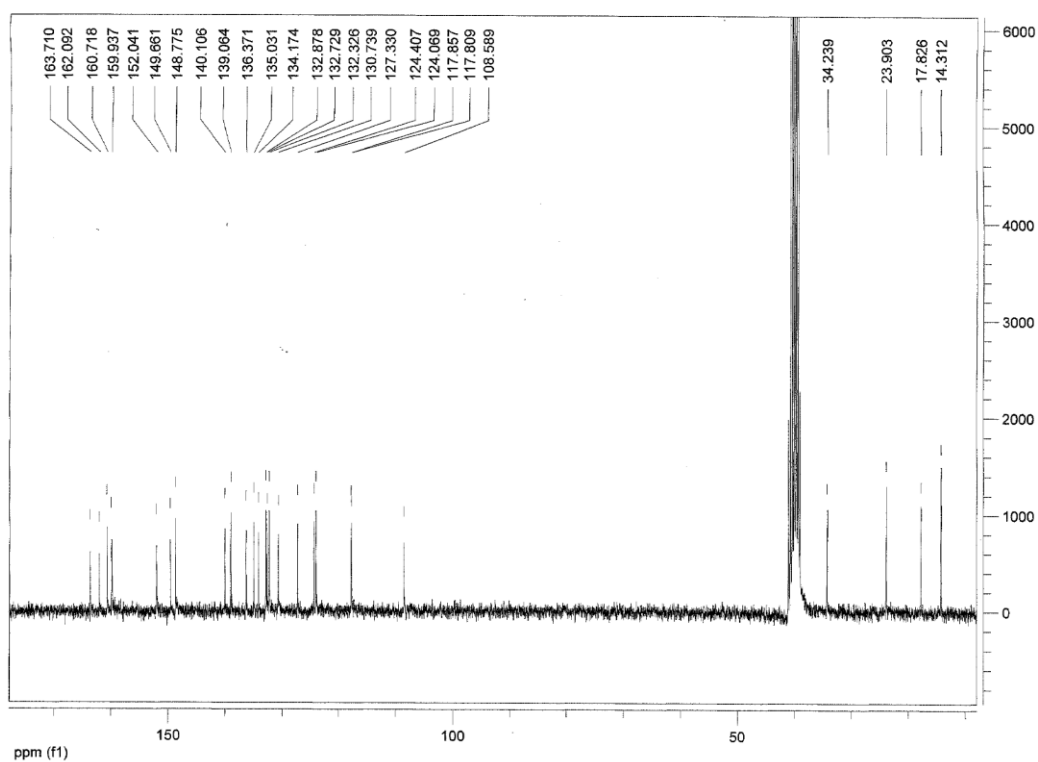


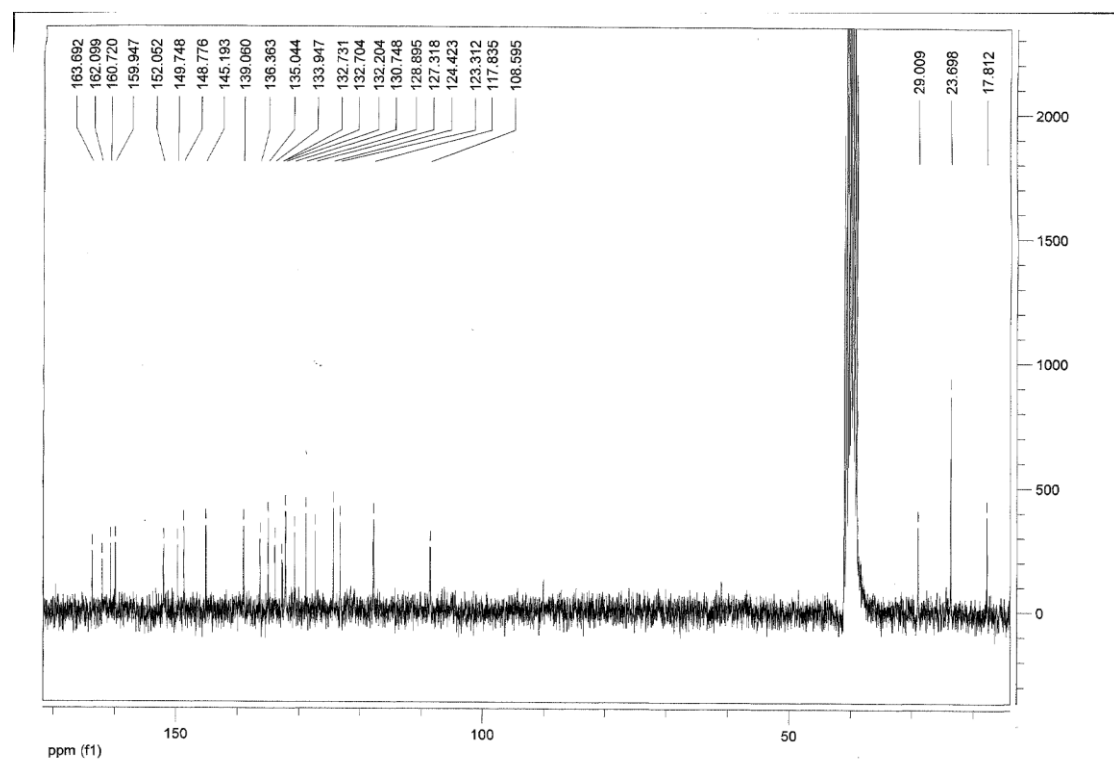
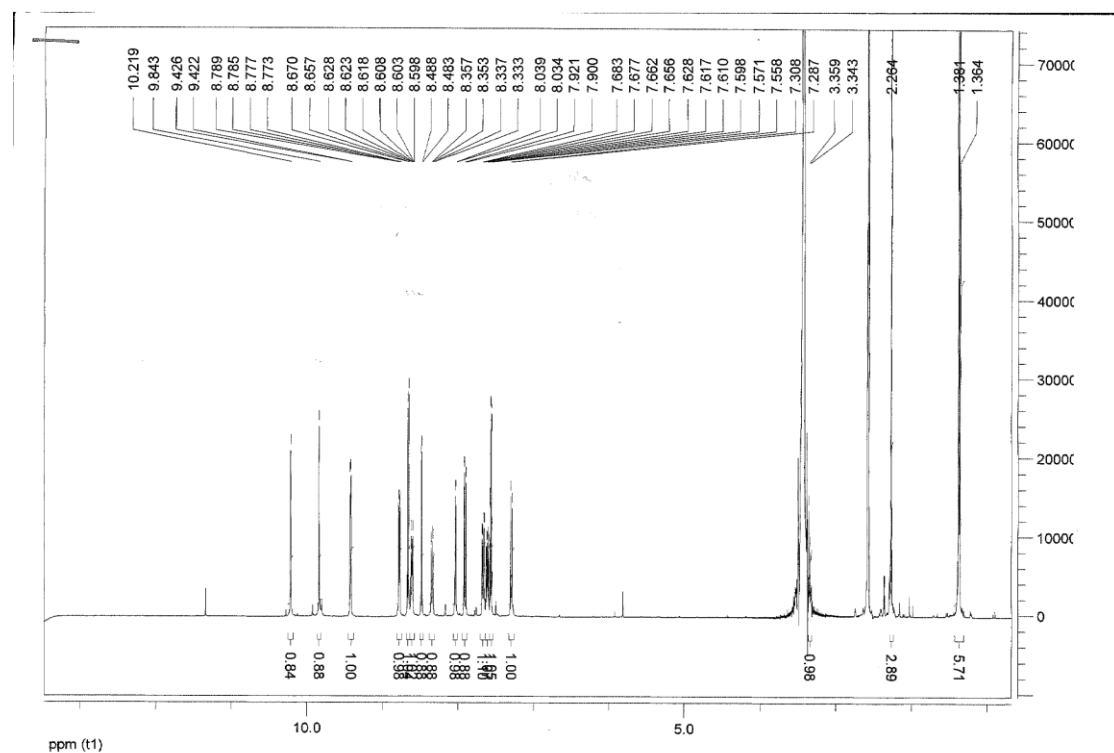


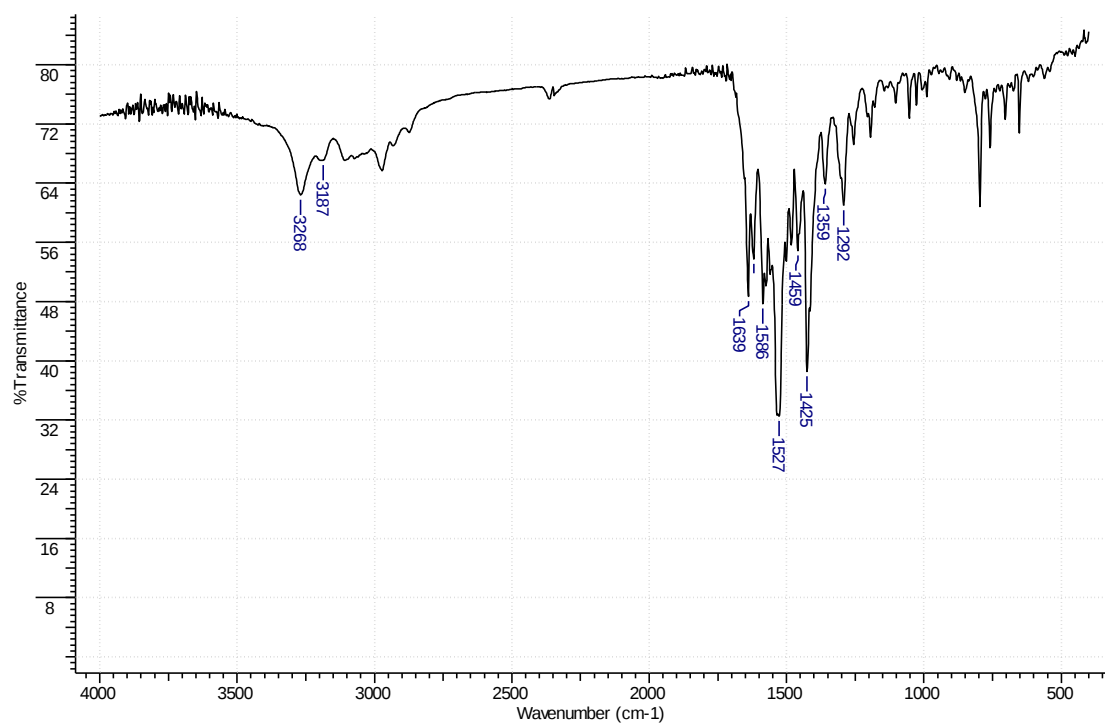












**ΤΡΙΤΗ ΟΜΑΔΑ**

