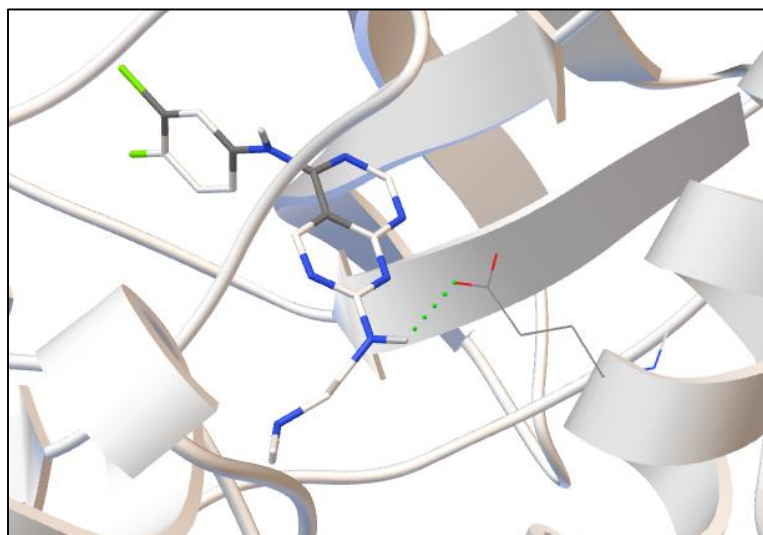




**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ  
ΔΙΣΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΥΡΙΜΙΔΟ[4,5-  
d]ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ EGFR ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**



**Φαρμακοποιός**

**Παρασκευάς Κωνσταντίνος**

*Μεταπτυχιακή Εργασία*

**ΑΘΗΝΑ 2014**

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

**N. ΠΟΥΛΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**E. ΜΙΚΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**I. Κ. ΚΩΣΤΑΚΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ)**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν στόχο για τη θεραπεία πολλών ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι και ο EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων ErbB, που διαθέτουν ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης. Ο EGFR εμπλέκεται στη φυσιολογική ανάπτυξη και μορφοποίηση κυττάρων και ιστών. Ωστόσο ανωμαλίες στη λειτουργία του συνδέονται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εκτεταμένη αγγειογένεση, για αυτό και οι μεταλλαγμένοι υπότυποι του συναντώνται σε πολλούς τύπους καρκίνου όπως στο γλοιβλάστωμα, στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα των πνευμόνων (NSCLC), στον καρκίνο του μαστού κ.α. Από τις πιο επιτυχημένες φαρμακολογικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής για την αναστολή του EGFR είναι η χορήγηση μικρών μορίων με ικανότητα αναστολής κινασών τυροσίνης (tyrosine kinase inhibitors-TKIs). Με αυτόν τον τρόπο λειτουργούν και οι 4-αμινοκιναζολίνες, όπως το gefitinib (Iressa®), το erlotinib (Tarceva®) και το vandetanib (Caprelsa®), που έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα σε κλινική φάση III. Βασισμένοι κυρίως σε αυτή την κατηγορία ενώσεων στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αναφερόμαστε στο σχεδιασμό και τη σύνθεση δισυποκαστετημένων πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδινών, ως πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων με ικανότητα αναστολής του EGFR.

## ABSTRACT

Protein kinases are targets for treatment of numerous diseases, including cancer. One such protein is EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), which belongs to the family of transmembrane receptors ErbB with intrinsic tyrosine kinase activity. EGFR is involved in normal growth and shaping of cells and tissues. However function abnormalities of EGFR associate with increased cell proliferation and excessive angiogenesis and that is why its mutant subtypes are found in many types of cancer as in glioblastoma, non-small cell lung carcinoma (NSCLC), breast cancer, etc. One of the most successful pharmacological approaches that has been developed so far for the inhibition of EGFR includes the use of small molecules capable of inhibiting tyrosine kinases (tyrosine kinase inhibitors-TKIs). 4-aminoquinazolines like gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®) and vandetanib (Caprelsa®) act in such way and have shown remarkable efficacy in clinical phase III. Based mainly on this class of compounds, in this thesis we report the design and synthesis of disubstituted pyrimido[4,5-d]pyrimidines as potential antitumor agents, with EGFR inhibitory activity.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....  | 5  |
| ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ .....                                     | 6  |
| ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ EGFR.....           | 12 |
| Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ EGFR .....   | 12 |
| ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ EGFR.....                            | 16 |
| ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ EGFR.....                                   | 19 |
| ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟΥ EGFR-ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ .....              | 21 |
| ΑΝΤΟΧΗ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ .....                              | 24 |
| ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGFR .. | 24 |
| ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ VEGFR.....                            | 26 |
| ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΟΥ EGFR ΜΕ ΤΟ VEGF.....                              | 28 |
| ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ EGFR.....                             | 29 |
| ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΩΝ 4-ΑΝΙΛΙΝΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝΩΝ.....                 | 31 |
| ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 4-ΑΝΙΛΙΝΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝΩΝ .....                 | 32 |
| ΑΛΛΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΟΚΙΝΑΣΗΣ ΤΟΥ EGFR.....            | 35 |
| ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ EGFR/VEGFR.....                          | 37 |
| ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΥΡΙΜΙΔΟ[4,5-d]ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ .....                   | 39 |
| ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....  | 41 |
| ΣΥΝΘΕΣΗ 2-(ΘΕΙΟΜΕΘΥΛΟ)ΠΥΡΙΜΙΔΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ .....               | 51 |
| ΣΥΝΘΕΣΗ 2,5 ΑΜΙΝΟΎΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΥΡΙΜΙΔΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ .....    | 57 |
| ΣΥΝΘΕΣΗ 2-ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΙΜΙΔΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ .....                     | 65 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....                                       | 67 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 79 |

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

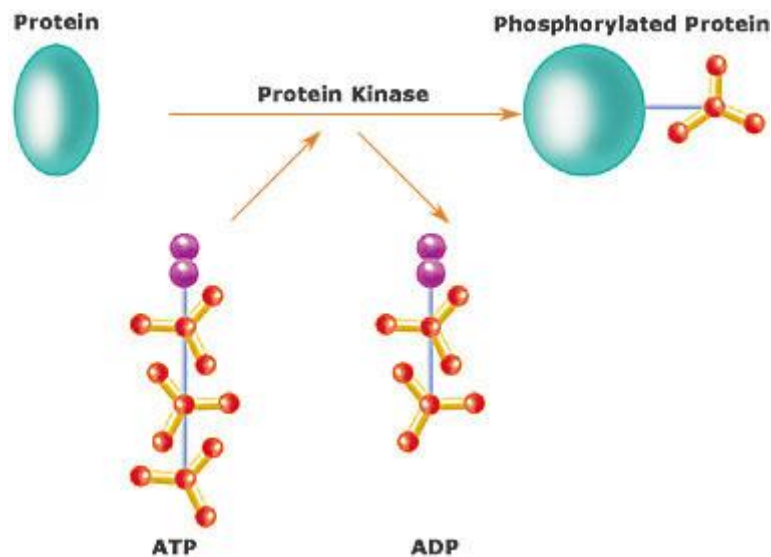
Τα κύτταρα όλων των πολυκύτταρων οργανισμών χαρακτηρίζονται από την ικανότητα της εξειδίκευσης και της κυτταρικής διαίρεσης, δύο βασικές ιδιότητες που επηρεάζουν άμεσα τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία των συστημάτων στα οποία ανήκουν. Τα κύτταρα κατά τον πολλαπλασιασμό τους περνούν από διάφορες φάσεις, οι οποίες συνθέτουν τον κυτταρικό κύκλο. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το κύτταρο αναπαράγει όλα του τα συστατικά κι έπειτα διχοτομείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα.<sup>1</sup> Όλα τα στάδια, από τα οποία αποτελείται ο κυτταρικός κύκλος, ελέγχονται αυστηρά από ένα πολύπλοκο σύνολο μηχανισμών. Απορρύθμιση αυτών των μηχανισμών λόγω επίκτητων γενετικών ανωμαλιών είναι ικανή να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, υπέρμετρη επιβίωση και περιορισμένη διαφοροποίηση των κυττάρων, φαινόμενα που οδηγούν στην καρκινογένεση. Τέτοιοι μηχανισμοί, που συμμετέχουν στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης, αποτελούν τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος (signal transduction pathways).

Με τον όρο μεταγωγή σήματος αναφερόμαστε γενικότερα στη διαδικασία κατά την οποία ένα εξωκυττάριο μόριο-σηματοδότης συνδέεται με έναν μεμβρανικό υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του και τη μετέπειτα πυροδότηση σειράς ενδοκυττάρων αντιδράσεων.<sup>2</sup> Σε αυτό το μηχανισμό συχνά συμμετέχουν και δευτερεύοντα μόρια-αγγελιοφόροι, τα οποία ενισχύουν το σήμα και το προωθούν προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις, προάγοντας έτσι τη γονιδιακή έκφραση και συνεπώς μια εξειδικευμένη βιολογική απόκριση. Σε αυτό το πολύπλοκο δίκτυο διακυτταρικής κι ενδοκυτταρικής επικοινωνίας όλα τα μόρια που επεμβαίνουν, είτε σηματοδότες είτε υποδοχείς, παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς τη χημική τους δομή. Έτσι λοιπόν συναντώνται μόρια που διαθέτουν υψηλή λιποφιλία, όπως η οικογένεια των στεροειδών ορμονών, τα οποία διαπερνούν εύκολα την κυτταροπλασματική μεμβράνη και συνδέονται με πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι μετά τη σύνδεση λαμβάνουν ειδική διαμόρφωση, ώστε να επιδρούν στη μεταγραφή του DNA.<sup>3</sup> Άλλα πάλι μόρια-σηματοδότες προσδένονται σε μεμβρανικούς υποδοχείς, που ελέγχουν διαύλους ιόντων (ιοντοτροπικοί υποδοχείς), οι οποίοι, μετά τη σύνδεση, επιτρέπουν την ελεύθερη διέλευση ιόντων από και προς το κύτταρο, μια διαδικασία που οδηγεί στην εκπόλωση της μεμβράνης και συνεπώς στην επαγωγή διαφόρων βιολογικών αντιδράσεων. Επίσης υπάρχουν οι GPCRs (G protein-coupled receptors), δηλαδή υποδοχείς οι οποίοι μετά τη σύνδεσή τους με εξειδικευμένο αγωνιστή, ενεργοποιούν μια διαμεσολαβητική πρωτεΐνη, με το όνομα G-πρωτεΐνη, η οποία επάγει μια σειρά μηνυμάτων που περιλαμβάνει ποικιλία ενζύμων. Τέλος, υπάρχει μία μεγάλη ομάδα διαμεμβρανικών υποδοχέων που αποκρίνονται σε ειδικούς διαμεσολαβητές, που προσδένονται στο εξωκυττάριο τμήμα τους, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, και ενεργοποιούν το ενδοκυττάριο τμήμα τους, που διαθέτει δραστηριότητα πρωτεϊνικής κίνησης.

## ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ

Είναι πολύ συχνό κατά τη μεταγωγή σήματος διάφορες πρωτεΐνες, που επεμβαίνουν, να υφίστανται διαφοροποιήσεις που οδηγούν σε μεταβολή των ιδιοτήτων τους, όπως η δράση τους. Υπάρχουν πολλά είδη τέτοιων τροποποιήσεων, ικανών να οδηγήσουν στο σχηματισμό νέων αμινοξικών περιοχών με αποτέλεσμα την επέκταση του «ρεπερτορίου» των χημικών αντιδράσεων στις οποίες μπορούν να συμμετέχουν οι πρωτεΐνες. Έναν τέτοιου είδους μετασχηματισμό καταλύουν και οι πρωτεϊνικές κινάσες. Οι κινάσες ή αλλιώς φωσφοτρανσφεράσες εκτελούν φωσφορυλιώσεις, δηλαδή τη μεταφορά μιας γ-φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο-δότη, όπως η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) προς υποστρώματα-δέκτες, με αποτέλεσμα την πρόκληση διαμορφωτικών αλλαγών στη δομή των τελευταίων και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση ή απενεργοποίησή τους (Σχήμα 1). Ως υποστρώματα μπορούν να εμφανιστούν διάφορες δομικές πρωτεΐνες, μεταβολικά ένζυμα και παράγοντες μεταγραφής, ο μετασχηματισμός των οποίων ρυθμίζει τη μεταγωγή σήματος κι ένα σύνολο πολύπλοκων κυτταρικών διαδικασιών, όπως η διαφοροποίηση, η μεταβολική συμπεριφορά, ο κυτταρικός κύκλος και η ικανότητα μετάστασης, αγγειογένεσης κι απόπτωσης.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει γύρω στα 500 γονίδια υπεύθυνα για την έκφραση πρωτεϊνικών κινασών, ποσοστό που αποτελεί περίπου το 2% όλων των ανθρώπινων γονιδίων.<sup>4</sup> Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι στον άνθρωπο γύρω στο 30% όλων του των πρωτεϊνών μπορεί να υποστεί τροποποίηση από κάποια κινάση.



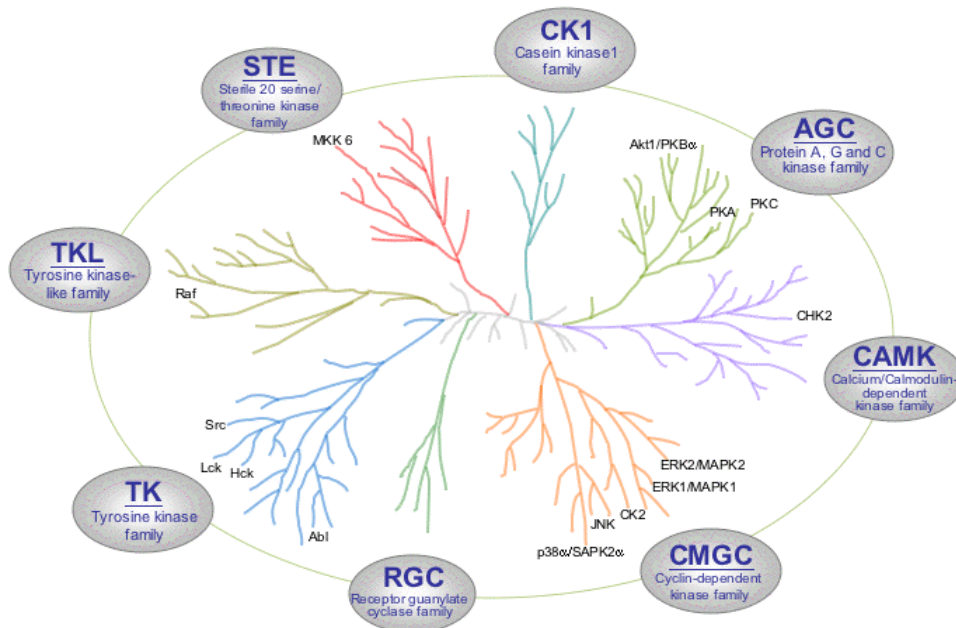
Σχήμα 1: Οι πρωτεϊνικές κινάσες μεταφέρουν μία φωσφορική ομάδα από ένα μόριο-δότη (ATP) προς μία πρωτεΐνη-υπόστρωμα μεταβάλλοντας έτσι τη λειτουργία της τελευταίας.

Όπως προαναφέρθηκε οι πρωτεϊνικές κινάσες λειτουργούν με έναν κοινό μηχανισμό, δηλαδή τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP και τη σύνδεσή της με συγκεκριμένα αμινοξέα που φέρουν ελεύθερη υδροξυλομάδα. Έτσι λοιπόν μια πρωτεϊνική κινάση θα πρέπει να φέρει τις εξής τρεις θεμελιώδεις περιοχές στην καταλυτική της περιοχή: Μια θέση πρόσδεσης του ATP, μια περιοχή πρόσδεσης του πρωτεϊνικού υποστρώματος και μια περιοχή που θα εκτελεί τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το ένα μόριο στο άλλο.<sup>5</sup> Η καταλυτική περιοχή παρουσιάζει εν γένει υψηλή ομολογία μεταξύ των διαφορετικών κινασών, διατηρώντας σε μεγάλο βαθμό σταθερή την τριτοταγή της δομή για τη θέση πρόσδεσης του ATP κι έτσι παρέχει μια διαφωτιστική εικόνα για τους μηχανισμούς ενεργοποίησης κι απενεργοποίησης των ενζύμων αυτών.<sup>6</sup> Για παράδειγμα σε όλες τις πρωτεϊνικές κινάσες συναντάται μία περιοχή πλούσια σε ομάδες γλυκίνης κοντά στην οποία βρίσκεται κι ένα αμινοξύ λυσίνης. Αυτή η ιδιαίτερη δομή, που ονομάζεται συνήθως P-βρόγχος ή G-βρόγχος, αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με τις φωσφορικές ομάδες του ATP, συμβάλλοντας έτσι στη φωσφορυλίωση.<sup>7</sup>

Οι ανθρώπινες πρωτεϊνικές κινάσες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το υπόστρωμα που φωσφορυλιώνεται καθώς και την αλληλουχία των αμινοξέων της καταλυτικής περιοχής τους, στις παρακάτω οικογένειες (Σχήμα 2):<sup>8,9</sup>

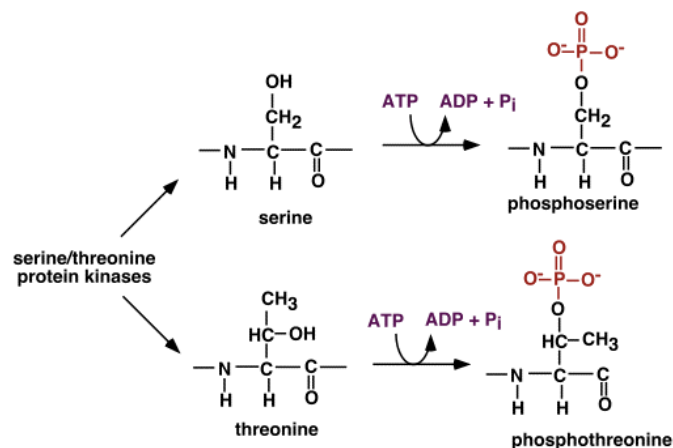
- AGC: Περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης που υποδιαιρούνται περαιτέρω στις πρωτεϊνικές κινάσες A (PKA-protein kinase A), C (PKC) και G (PKG).
- CAMK: Περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, των οποίων η λειτουργία εξαρτάται από το σύμπλεγμα  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνης.
- CK1: Αποτελεί μία μικρή οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης που ονομάζονται κασεϊνικές κινάσες 1.
- CMGC: Περιλαμβάνει τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης CDK, MAP, GSK3 και CLK.
- STE: Περιλαμβάνει κινάσες σερίνης/θρεονίνης ομόλογες των Sterile 7, Sterile 11, και Sterile 20 που συναντώνται σε κάποιους ζυμομύκητες.
- TK: Ονομάζονται οι κινάσες τυροσίνης.
- TKL: Οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών που προσομοιάζουν στις κινάσες τυροσίνης και παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ποικιλομορφία.
- RGC: Αποτελεί μία υπεριοικογένεια υποδοχέων συνδεδεμένων με γουανυλική κυκλάση.





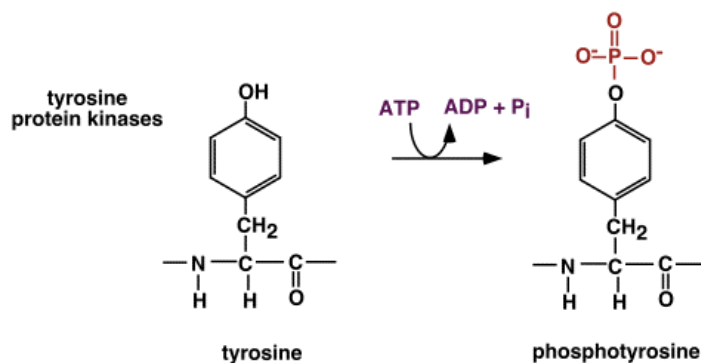
Σχήμα 2: Οι οικογένειες πρωτεϊνικών κινασών στον άνθρωπο.

Σε αυτό το σημείο συνιστάται η επεξήγηση των όρων πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης και πρωτεϊνική κινάση τυροσίνης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης φωσφορυλιώνουν τις πλευρικές υδροξυλομάδες των αντίστοιχων αμινοξέων (Σχήμα 3). Ενεργοποίηση αυτών των κινασών μπορεί να γίνει από διάφορα γεγονότα, όπως βλάβη στο DNA ή μέσω χημικής σηματοδότησης, όπως αυτή που γίνεται από τα μόρια cAMP/cGMP, διακυλογλυκερόλη και το σύμπλεγμα Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνης. Συνήθως παίζουν ρόλο στη ρύθμιση διαδικασιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, η διαφοροποίηση των κυττάρων και η εμβρυική ανάπτυξη. Οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης μπορεί να αποτελούν τμήματα διαμεμβρανικών υποδοχέων ή να είναι ολόκληρα ενδοκυτταρικά ένζυμα που συμμετέχουν στη μετάδοση του σήματος.



Σχήμα 3: Φωσφορυλίωση σερίνης και θρεονίνης.

Από την άλλη πλευρά οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης αποτελούν ένζυμα με την ικανότητα να αποσπούν τη γ-φωσφορική ομάδα από το ATP με σκοπό τη φωσφορυλίωση του φαινολικού υδροξυλίου μια τυροσίνης (Σχήμα 4). Έτσι λοιπόν μπορούν να ρυθμίζουν τις ιδιότητες ολόκληρων πρωτεϊνών, όπως την ενζυμική δραστηριότητα, τη θέση τους στο κύτταρο και την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στη μεταγωγή σήματος για διάφορες λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Είναι οι πρώτες κινάσες που ταυτοποιήθηκαν και μελετήθηκαν κι έχει βρεθεί πως το ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να κωδικοποιήσει έως και 90 κινάσες αυτής της οικογένειας.<sup>10</sup>



Σχήμα 4: Φωσφορυλίωση τυροσίνης.

Διακρίνονται σε 2 υποκατηγορίες:

- **Τους υποδοχείς με δράση τυροσινοκινάσης (RTKs-receptor tyrosine kinase):**

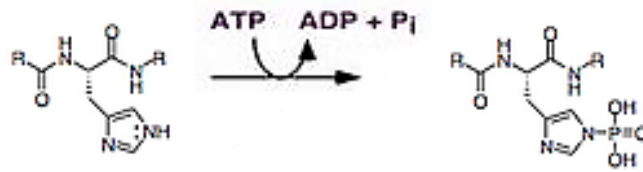
Αποτελούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς με υψηλή συγγένεια για διάφορα πολυπεπίδια, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες και οι ορμόνες. Από τα 90 γονίδια υπεύθυνα για τη σύνθεση όλων των κινασών τυροσίνης, τα 58 κωδικοποιούν RTKs.<sup>11</sup> Συνολικά υπάρχουν 20 υποοικογένειες σε αυτήν την κατηγορία, με τις πιο μελετημένες να είναι οι RTKs τύπου I (υποδοχείς EGF), τύπου II (υποδοχείς ινσουλίνης), τύπου III (υποδοχείς PDGF), τύπου IV (υποδοχείς FGF) και τύπου V (υποδοχείς VEGF).<sup>12</sup> Δομικά αποτελούν μονομερείς πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή περίπου 25-38 αμινοξέων, ένα εξωκυττάριο N-τελικό άκρο που παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση με τους προσδέτες κι ένα C-τελικό άκρο, που διατηρεί υψηλή ομολογία και φέρει την καταλυτική περιοχή με δράση τυροσινοκινάσης.

Ο μηχανισμός δράσης ενός ενεργοποιημένου RTK περιλαμβάνει το διμερισμό του με ένα γειτονικό υποδοχέα της ίδιας υποοικογένειας και την επακόλουθη αυτοφωσφορυλίωση καταλοίπων τυροσίνης που φέρει το διμερές στο ενδοκυττάριο τμήμα του. Οι φωσφορυλιωμένες πλέον περιοχές τυροσίνης είναι ιδανικές για πρόσδεση πρωτεϊνών που περιέχουν την αμινοξική ακολουθία SH2 (Src Homology 2 domain) καθώς και την περιοχή πρόσδεσης φωσφοτυροσίνης (PTB- phosphotyrosine binding domain) κι έτσι εκκινούνται οι διαδικασίες μετάδοσης σήματος που οδηγούν εν τέλει σε βιολογική απόκριση.<sup>13</sup>

- **Τους μη υποδοχείς με δράση τυροσινοκινάσης (nRTKs-non-receptor tyrosine kinase):**

Αντίθετα με τους RTKs, οι nRTKs αποτελούν κυτοπλασματικά ένζυμα τα οποία καταλύουν τη φωσφορυλίωση τυροσινικών καταλοίπων που ανήκουν σε διάφορες πρωτεΐνες, συμμετέχοντας τοιουτοτρόπως σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στην ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την προσκόλληση, τη μετανάστευση και την απόπτωση. Η δράση τους επηρεάζει μέχρι και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς εμπλέκονται στη σηματοδότηση εντός των ενεργών T- και B-λεμφοκυττάρων.<sup>14</sup> Εντοπίζονται συνήθως στο κυτταρόπλασμα αλλά μπορούν επίσης και να βρεθούν στον πυρήνα ή στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Από το σύνολο των 90 κινασών τυροσίνης οι 32 ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και μάλιστα διαχωρίζονται περαιτέρω σε 10 υποοικογένειες ανάλογα με τη δομική οργάνωση και την αμινοξική αλληλουχία της καταλυτικής περιοχής.<sup>15</sup> Κατασκευαστικά διαφέρουν πολύ από τους RTKs, καθώς δε παρουσιάζουν στοιχεία υποδοχέα, αλλά αποτελούνται από διάφορες δομικές μονάδες συγκολλημένες μεταξύ τους με συνδετικές αμινοξικές αλληλουχίες. Η σημαντικότερη από αυτές τις μονάδες είναι εκείνη με τη δράση τυροσινοκινάσης μήκους γύρω στα 275 αμινοξέα, η οποία αποτελείται από 2 λοβούς, έναν μικρό για τη σύνδεση με το ATP κι έναν μεγάλο για την πρόσδεση του υποστρώματος. Άλλες μονάδες επιτρέπουν την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων με διάφορα μόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και το DNA επεκτείνοντας έτσι τη συμμετοχή τους στην ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος.

Εκτός από τις πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης και τυροσίνης υπάρχουν και οι κινάσες ιστιδίνης (Σχήμα 5). Οι κινάσες αυτές αποτελούν πολυλειτουργικές, συνήθως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στη μεταγωγή του σήματος εντός της κυτταρικής μεμβράνης.<sup>16</sup> Κατά τη συντριπτική πλειοψηφία τους είναι ομοδιμερή και κατέχουν δράση αυτοκινάσης, φωσφοτρανσφεράσης και φωσφατάσης. Μπορούν να δράσουν ως μεμβρανικοί υποδοχείς για μόρια σηματοδότησης με έναν τρόπο ανάλογο όπως οι RTKs, με τη διαφορά ότι τόσο N- όσο και το C-τελικό άκρο βρίσκονται ενδοκυττάρια και συνδέονται μέσω μίας εξωκυττάριας θηλιάς. Η εξωκυττάρια αυτή θηλιά είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των αγωνιστών, ενώ στο N- και C-τελικό άκρο οφείλεται η καταλυτική δράση. Επίσης, σε αντίθεση με τις άλλες πρωτεϊνικές κινάσες που αναφέρθηκαν παραπάνω οι κινάσες ιστιδίνης δε φωσφορυλιώνουν ελεύθερα υδροξύλια αλλά το N1 ή το N3 ή ακόμα και τα δύο ιμιδαζολικά άζωτα μιας ιστιδίνης. Μια ακόμη διαφορά αποτελεί το γεγονός ότι ο μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο φωσφορυλιώνουν κι ενεργοποιούν το εκάστοτε υπόστρωμα περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά γίνεται η μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP σε ένα υπόλειμμα ιστιδίνης εντός της κινάσης και σε δεύτερο στάδιο μεταφέρεται σε ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος, το οποίο ανήκει σε ένα διαφορετικό πρωτεϊνικό μόριο-δέκτη (ενίοτε και στην ίδια την κινάση). Η πρωτεΐνη που φέρει το φωσφορυλιωμένο πλέον ασπαρτικό οξύ είναι εν τέλει ενεργοποιημένη και έτοιμη για την εκκίνηση της σηματοδότησης.



Σχήμα 5: Φωσφορυλίωση ιστοιδίνης.

Μία σημαντική πρωτεϊνική κινάση που ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων με δράση τυροσινοκινάσης είναι ο EGFR (Epidermal growth factor receptor). Ο EGFR αποτελεί σημαντικό μόριο-δείκτη σχετικά με τη γένεση και εξέλιξη διαφόρων μορφών καρκίνου και για αυτό το λόγο είναι στόχος για την ανάπτυξη πολλών θεραπειών. Σύμφωνα με πολλές μελέτες η εκτεταμένη έκφρασή του και η δυσλειτουργία του εντοπίζονται σε πολλά παρασκευάσματα που προέρχονται από ανθρώπινους όγκους (Σχήμα 6).<sup>17,18</sup>

| Είδος όγκου                          | HER1/EGFR έκφραση (%) |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Πλακώδες κεφαλής - τραχήλου          | 70-100                |
| Μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα | 50-90                 |
| Προστάτη                             | 40-70                 |
| Γλοίωμα                              | 10-50                 |
| Στομάχου                             | 30-60                 |
| Μαστού                               | 35-70                 |
| Παχέος                               | 25-80                 |
| Παγκρέατος                           | 30-50                 |
| Ωοθηκών                              | 35-60                 |

Σχήμα 6: Αυξημένη έκφραση του EGFR παρατηρείται σε διαφορετικά είδη καρκίνου.

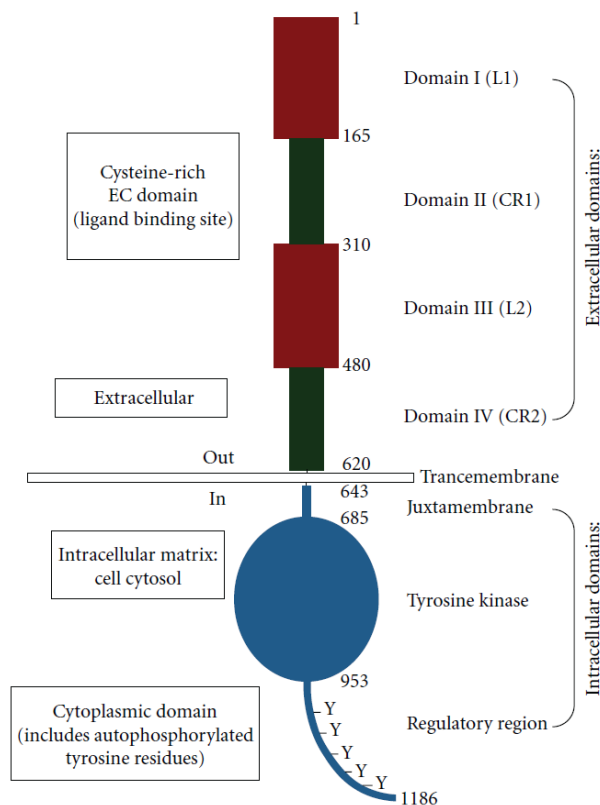
## ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ EGFR

Ο EGFR, ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων HER ή ErbB. Και τα 4 μέλη της οικογένειας αυτής (EGFR ή ErbB1 ή HER1, ErbB2 ή HER2 ή HER2/neu, ErbB3 ή HER3 και ErbB4 ή HER4) είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και ανήκουν στους RTKs τύπου I. Οι ErbB υποδοχείς παίζουν ένα ουσιαστικό ρόλο στην εξέλιξη και την ανάπτυξη οργάνων ρυθμίζοντας τόσο την διαφοροποίηση όσο και τη μορφολογία των κυττάρων και των ιστών. Το γονίδιο που εκφράζει τον EGFR/HER1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17p12.3-p12.1. Αναλυτικότερα, ο EGFR είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 1186 αμινοξέα και διαθέτει μοριακό βάρος 170 kDa. Η ενδομεμβρανική περιοχή διαθέτει δράση κινάσης της τυροσίνης ενώ η εξωκυττάρια περιοχή σύνδεσης του, ενεργοποιείται από τους αυτοκρινείς αγωνιστές EGF (επιδερμικός αυξητικός παράγοντας), TGF- $\alpha$  (μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-άλφα) και την αμφιρεγουλίνη. Τόσο ο EGF όσο κι ο TGF- $\alpha$  έχουν περιγραφεί πριν από 20 χρόνια και είναι γνωστό ότι επάγουν τη σύνθεση του DNA και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων σε ποικιλία ανθρωπίνων ιστών και σε όγκους του πεπτικού συστήματος.

Η εξωκυττάρια περιοχή συγκριτικά με την ενδοκυττάρια παρουσιάζει λιγότερη ομοιογένεια μεταξύ των διαφόρων υποτύπων γεγονός που σημαίνει και μεγαλύτερη ποικιλία στα μορία που προσδένονται και ενεργοποιούν τους υποδοχείς της συγκεκριμένης οικογένειας. Ο EGFR, μετά τη σύνδεση με κατάλληλο αγωνιστή, ενεργοποιεί την ενζυμική περιοχή του με δράση τυροσινοκινάσης και εκκινεί μια σειρά ενδοκυττάρια αλλαγών μεσολαβώντας έτσι στη μετάδοση σήματος. Με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζει διάφορες λειτουργίες που σχετίζονται με προαγωγή αγγειογενετικών διεργασιών, προστασία των κυττάρων από την απόπτωση και διευκόλυνση της διηθητικής τους ικανότητας.<sup>19</sup>

## Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ EGFR

Όπως προαναφέρθηκε ο EGFR ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων με δράση κινάσης της τυροσίνης, συνεπώς φέρει και τις χαρακτηριστικές δομές που διαθέτουν όλοι οι υποδοχείς αυτής της οικογένειας (Σχήμα 7): α) Μία εξωκυτταρική περιοχή, όπου και βρίσκεται το αμινοτελικό N-άκρο της αλυσίδας το οποίο περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης για τους ειδικούς προσδέτες και οδηγεί σε ενεργοποίηση, β) Μία υδρόφοβη περιοχή που διασχίζει την κυτταρική μεμβράνη ως μία  $\alpha$ -έλικα επτά στροφών και συμμετέχει στο διμερισμό των υποδοχέων, γ) Μία ενδοκυττάρια περιοχή, όπου βρίσκεται το καρβοξυτελικό C-άκρο της αλυσίδας και αποτελεί την καταλυτική περιοχή φωσφορυλίωσης τυροσινών και πρόσδεσης πρωτεϊνών.<sup>20</sup> Αναλυτικότερα, παρακάτω αναφερόμαστε εκτενέστερα στο ρόλο και τη λειτουργία κάθε μιας από αυτές τις δομές:



Σχήμα 7: Απλή απεικόνιση της μονομερούς δομής του EGFR.

- **Εξωκυττάρια περιοχή: Η περιοχή δέσμευσης με το συνδέτη.**

Οι περιοχές I-IV συνθέτουν το εξωκυττάριο τμήμα του EGFR, μία δομή βάρους 621 kDa, υπεύθυνη για τη δέσμευση του συνδέτη αλλά και το διμερισμό, χαρακτηριστικά απαραίτητα για τις επακόλουθες αλλαγές στη διαμόρφωση ώστε να ενεργοποιηθεί η εσωτερική κινάση τυροσίνης. Η περιοχή I ή L1 (όπου L: πλούσια σε λευκίνη) παρουσιάζει δομική ομολογία με την περιοχή III ή L2. Σύμφωνα με μελέτες επιλεκτικής μετάλλαξης και οι δύο περιοχές εμπλέκονται στη σύνδεση προσδέματος και ειδικότερα το τμήμα μεταξύ των αμινοξέων 294 και 543.<sup>21</sup> Οι περιοχές II και IV, που αναφέρονται επίσης ως CR1 και CR2, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε κυστεΐνη, παρουσιάζουν τη δυνατότητα για σχηματισμό εσωτερικών δισουλφιδικών δεσμών που διευκολύνουν τη συνολική διαμορφωτική αλλαγή που προκαλείται από τη σύνδεση του συνδέτη με τον EGFR. Ο CR1 περιέχει επίσης έναν "προεξέχοντα βρόγχο", ο οποίος βρίσκεται κοντά στη θέση σύνδεσης του EGFR και διαθέτει ικανότητα κάμψης προς μια σχετικά ευθύγραμμη δομή. Αυτή η ιδιαιτερότητα επιτρέπει τη σύνδεση του προσδέτη στο τμήμα μεταξύ των δύο περιοχών L ενώ παράλληλα προάγει και τις αναγκαίες επαφές που πρέπει να γίνουν με τον αντίστοιχο βρόγχο ενός άλλου EGFR προς σχηματισμό διμερούς συμπλόκου. Στην ανενεργή μορφή του υποδοχέα οι περιοχές CR1 και CR2 αλληλεπιδρούν σε αντίθεση με τις L1 και L2 που είναι απομακρυσμένες η μία από την άλλη.<sup>22</sup> Αυτή η διαμόρφωση ονομάζεται «κλειστή». Η σύνδεση με προσδέτη προκαλεί σημαντικές δομικές

αναδιατάξεις οδηγώντας στην «ανοιχτή» διαμόρφωση η οποία είναι έτοιμη για διμερισμό.<sup>23,24</sup>

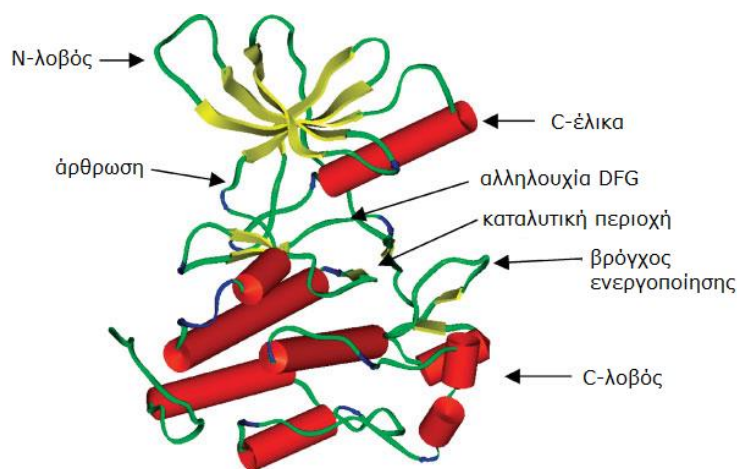
- ***Διαμεμβρανική και παραμεμβρανική περιοχή.***

Η διαμεμβρανική περιοχή αποτελείται από 23 αμινοξέα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην «αγκυροβόληση» του υποδοχέα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα του κυττάρου. Έπειτα από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η N-γλυκοζυλίωση, το μεγαλύτερο μέρος της διαμεμβρανικής περιοχής σχηματίζει εγκολλώσεις ή λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts), με σκοπό τον εμπλουτισμό ορισμένων περιοχών της μεμβράνης σε EGFR, έτσι ώστε να επιτευχθεί ταχύτερος διμερισμός του υποδοχέα μετά τη δέσμευση με τον προσδέτη<sup>21,25</sup>. Από την άλλη, η παραμεμβρανική περιοχή θεωρείται πως ρυθμίζει διάφορες λειτουργίες του EGFR, όπως ο έλεγχος της δράσης κινάσης τυροσίνης, η καταστολή του EGFR, η πρόσληψη του συνδέτη και η εξειδίκευση του υποδοχέα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιοχή αυτή διαθέτει σημεία πρόσδεσης με δεύτερο αγγελιοφόρο μόριο όπως η καλμοδουλίνη.<sup>21</sup>

- ***Περιοχή κινάσης τυροσίνης.***

Η περιοχή κινάσης τυροσίνης (TKD-Tyrosine Kinase Domain) είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του υποδοχέα και κατά συνέπεια την επαγωγή της σηματοδότησης από τον EGFR για τον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης και του πολλαπλασιασμού. Η TKD περιλαμβάνει σημαντικές ομάδες τυροσίνης (Y), τα οποία μπορούν να φωσφορυλιωθούν και να αποφωσφορυλιωθούν. Σε μη ενεργοποιημένη κατάσταση ο EGFR είναι οργανωμένος έτσι ώστε οι θηλιές που πλευρίζουν την TKD να αναστέλλουν στερικώς τη δέσμευση από διάφορα υποστρώματα. Σύνδεση του αγωνιστή στην εξωκυττάρια περιοχή απαλλάσσει από αυτά τα στερεοχημικά εμπόδια, τα οποία φυσιολογικά εμποδίζουν τη λειτουργία της κινάσης τυροσίνης, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή της. Η ενεργοποίησή αυτή περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση πολλών στόχων όπως του ίδιου (αυτοφωσφορυλίωση), ενός έτερου μορίου EGFR (ομοδιμερισμός), ενός άλλου υποδοχέα της οικογένειας ErbB όπως ο HER-2/neu (ετεροδιμερισμός), και άλλων υποστρωμάτων που δεν αποτελούν υποδοχείς, όπως οι Grb2/SOS, STATs, PLC, ή / και PI3K, οι οποίοι με τη σειρά τους εκκινούν τους καταρράκτες σηματοδότησης των MAPK / ERK, STATs, PIP2 και AKT αντιστοίχως. Δεν αποτελεί έκπληξη, επομένως, το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις στη συγκεκριμένη περιοχή μπορούν να προκαλέσουν μια σημαντική μείωση στη δραστηριότητα της κινάσης, ένα αποτέλεσμα που είναι επιθυμητό στη θεραπεία του καρκίνου και στο οποίο βασίζεται εν μέρει και η δράση των sTKIs (small tyrosine kinase inhibitors), που θα αναφερθούν παρακάτω. Αξίζει να αναφερθεί το γεγονός πως η κινάση τυροσίνης του EGFR είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη μέσω της δικής της εσωτερικής ρυθμιστικής περιοχής που βρίσκεται στην ουρά του C-τελικού άκρου, το οποίο περιλαμβάνει ένα σύμπλεγμα τυροσινών. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από την ολιγοπεπτιδική αλληλουχία LVI (περιοχές 955-957), που βρίσκεται εντός του C-τελικού άκρου και περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση αρκετών καταλοίπων τυροσίνης συμπεριλαμβανομένων των Tyr1069, Tyr1092, Tyr1110, Tyr1116, Tyr1172,

Tyr1197, δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης με άλλα αγγελιοφόρα μόρια.<sup>20,26</sup> Το πλούσιο σε τυροσίνες C-τελικό άκρο φωσφορυλιώνεται και είναι ιδιαίτερα ευκίνητο, παρόλο που είναι συνδεδεμένο με τη σχετικώς στατική TKD. Όπως και στις περισσότερες πρωτεΐνες με δράση κινάσης έτσι και στον EGFR η περιοχή κινάσης εμφανίζει «δילוβική» διαμόρφωση (Σχήμα 8). Χαρακτηρίζεται λοιπόν από την ύπαρξη ενός N-λοβού, που αποτελείται από πέντε β-πτυχωτές επιφάνειες και μία α-έλικα, και ενός C-λοβού που περιέχει κυρίως α-έλικες. Ανάμεσα στους δύο λοβούς σχηματίζεται μία σχισμή. Αυτή η μοριακή διαμόρφωση επιτρέπει τη δέσμευση του υποστρώματος και του ATP στη δραστική θέση, οδηγώντας σε φωσφορυλίωση του υποστρώματος έπειτα από υδρόλυση του ATP.<sup>26-29</sup>



Σχήμα 8: Η δילוβική διαμόρφωση της περιοχής τυροσινοκινάσης του EGFR<sup>30</sup>.

Η σχισμή αποτελείται από τέσσερα σημαντικά δομικά στοιχεία: την άρθρωση (hinge), την καταλυτική θέση (catalytic site), το βρόγχο ενεργοποίησης (activation loop) και το θύλακα εκλεκτικότητας κινάσης (kinase specificity pocket).

Η άρθρωση, που αποτελείται από την αλληλουχία TQLMP (αμινοξέα 766-770) και το NH της μεθειονίνης της πεπτιδικής «ραχοκοκαλιάς» συμμετέχει στη σύνδεση τόσο του ATP όσο και των ανταγωνιστών του με την περιοχή πρόσδεσης του ATP.

Η καταλυτική θέση φέρει την αλληλουχία HRDLAARN (αμινοξέα 811-818), όπου το ασπαρτικό οξύ είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από το ATP στις τυροσίνες του υποστρώματος. Η γειτονική αλληλουχία DFG (αμινοξέα 831-833) είναι απαραίτητη για τη διευθέτηση του ATP. Συγκεκριμένα, το ασπαρτικό οξύ της αλληλουχίας συνδέεται με  $Mg^{2+}$ , μέσω του οποίου προσανατολίζονται κατάλληλα οι β- και γ- φωσφορικές ομάδες του ATP. Επίσης αξίζει να αναφερθεί πως και η Lys721, που συναντάται εκτός του EGFR και σε άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, σχηματίζει ιοντικούς δεσμούς με τις φωσφορικές ομάδες του ATP, συμμετέχοντας έτσι στη διευθέτηση του τελευταίου.



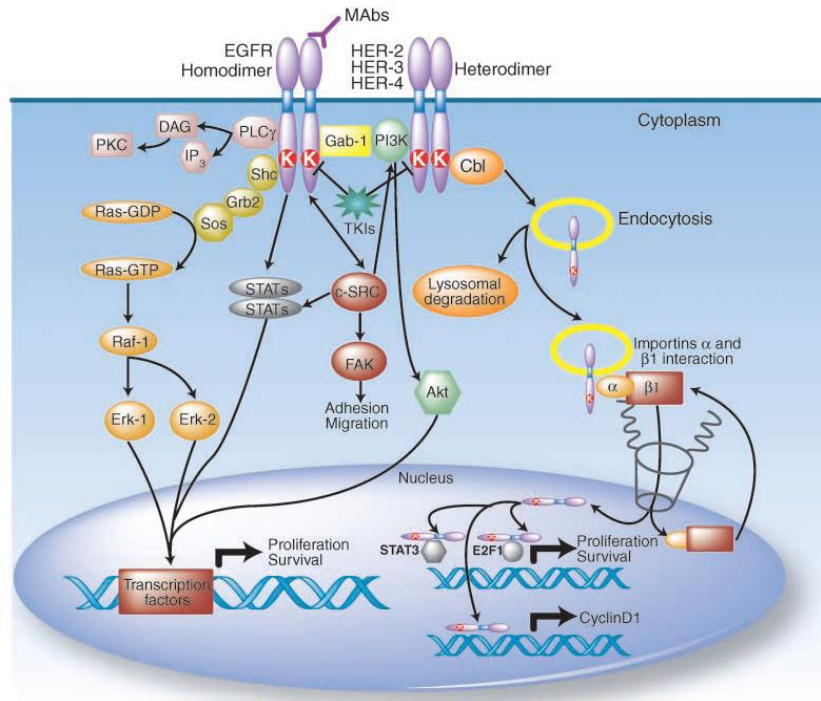
Ο βρόγχος ενεργοποίησης ξεκινά με την αλληλουχία DFG και συνεχίζει με τα αμινοξέα EEKEYHAE(αμινοξέα 841-848). Στις περισσότερες κινάσες ο βρόγχος ενεργοποίησης λαμβάνει μία καταλυτικώς ενεργή διαμόρφωση, μετά τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης ή της θρεονίνης που φέρει στη θέση 845.<sup>31-33</sup> Αντιθέτως, στον EGFR ο βρόγχος ενεργοποίησης μπορεί να λάβει μία διαμόρφωση παρόμοια με την ενεργή που προαναφέρθηκε χωρίς να απαιτείται προηγουμένως κάποια φωσφορυλίωση.<sup>34</sup> Το χαρακτηριστικό αυτό οφείλεται στο γεγονός πως ο βρόγχος ενεργοποίησης στον EGFR διαθέτει τέσσερα γλουταμικά οξέα τα οποία λόγω του αρνητικού τους φορτίου μιμούνται τις φωσφορικές ομάδες διατηρώντας έτσι το βρόγχο σε ενεργή διαμόρφωση. Η μετάβαση του βρόγχου από την ανενεργή διαμόρφωση στην ενεργή επηρεάζει άμεσα τη γειτονική C-έλικα και συνεπώς την κατάσταση όλου του υποδοχέα. Όταν ο βρόγχος ενεργοποίησης βρίσκεται σε ανενεργή διαμόρφωση, τότε σχηματίζει μία χαρακτηριστική βραχεία α-έλικα που εντοπίζεται κοντά στο N-άκρο της και η οποία αναγκάζει τη C-έλικα να προσανατολιστεί προς τα έξω από το κέντρο της περιοχής κινάσης τυροσίνης. Αυτή αποτελεί και την ανενεργή κατάσταση τόσο της C-έλικας όσο και όλης της πρωτεΐνης. Αντιθέτως, όταν ο βρόγχος ενεργοποιηθεί παύει να λαμβάνει τη διαμόρφωση εκείνη που κλειδώνει τη C-έλικα με κατεύθυνση προς τα έξω, δίνοντας έτσι στην τελευταία τη δυνατότητα να στραφεί προς το κέντρο της καταλυτικής περιοχής και στον υποδοχέα να ενεργοποιηθεί. Επιπροσθέτως, η θέση της C-έλικας ρυθμίζεται σε μικρότερο βαθμό κι από τον P-βρόγχο, ο οποίος σχηματίζει μία κοιλότητα που φέρει τα αμινοξέα Phe723, Leu747 και Leu862, τα οποία μέσω υδρόφοβων δεσμών αλληλοεπιδρούν με τη Leu858 της C-έλικας.

Ο θύλακας εκλεκτικότητας της κινάσης οριοθετείται από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Met742, Cys751, Leu764, Thr766, Thr830, Phe832, και μέρος της Lys721. Αν και το ATP δεν αλληλοεπιδρά με τις συγκεκριμένες περιοχές του θύλακα, αυτές επηρεάζουν την εκλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα των ανταγωνιστών του ATP στη θέση πρόσδεσής του. Η ύπαρξη της συγκεκριμένης περιοχής είναι ιδιαίτερος κρίσιμη καθώς επιτρέπει στοχευμένη θεραπεία που βασίζεται στην εκλεκτική αναστολή του EGFR κι όχι όλων των πρωτεϊνικών κινασών στον άνθρωπο. Αξίζει να προστεθεί πως μέσα από κρυσταλλογραφικές μελέτες φαίνεται πως η διαμόρφωση του θύλακα επηρεάζεται από ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου και γεφυρών μορίων νερού, στο οποίο συμμετέχουν τόσο η C-έλικα όσο και η τριάδα DFG.<sup>35</sup>

## ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ EGFR

Μετά τη σύνδεση του προσδέτη με τον EGFR, ο τελευταίος υπό φυσιολογικές συνθήκες ομοδιμερίζεται ή ετεροδιμερίζεται. Μετά το διμερισμό του EGFR έπεται η αυτοφωσφορυλίωση από τις ενδοκυττάρειες περιοχές κινάσης συνεπώς και η ενεργοποίηση του υποδοχέα. Το μεταγωγικό μονοπάτι που ακολουθεί εξαρτάται από το πλήθος των υποδοχέων, την πρωτεΐνη που έχει διμερισθεί ο EGFR αλλά κι από το

είδος της πρωτεΐνης-προσαρμογέα που συνδέεται με τις φωσφορυλιωμένες πλέον τυροσίνες (Σχήμα 9). Οι κύριοι εκπρόσωποι αυτών των πρωτεϊνών είναι οι Grb2, Shc και Dok-R.



Σχήμα 9: Τα μεταγωγικά μονοπάτια σηματοδότησης στα οποία συμμετέχει ο EGFR.

Κλειδί για την ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras/ERK και Ras/MAPK είναι η σύνδεση του EGFR με την πρωτεΐνη Shc που επάγει τη φωσφορυλίωση κι έπειτα την πρόσδεση της Grb2 σε αυτό το φωσφορυλιωμένο σύμπλοκο.<sup>36</sup> Η Grb2 είναι εξ αρχής συνδεδεμένη με τη Sos, έναν παράγοντα μεταφοράς γουανινών. Η πρόσδεση της Grb2 στη διαμεμβρανική περιοχή του EGFR έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά της Sos στην κυτταρική μεμβράνη όπου και βρίσκεται η πρωτεΐνη Ras. Αλληλεπίδραση της Ras με τη Sos επιφέρει και ενεργοποίηση της πρώτης μέσω κατάλληλων G πρωτεϊνών. Η Ras με τη σειρά της ενεργοποιεί την κινάση Raf, που φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MAPKs (mitogen activated protein kinases).<sup>37</sup> Οι MAPKs αποτελούν μία τεράστια οικογένεια κινάσων σερίνης/θρεονίνης που περιλαμβάνει τις ERKs (extra-cellular signal-regulated kinases), SAPKs (stress-activated protein kinases) και p38-MAPKs.<sup>38</sup>

Ο ενεργοποιημένος EGFR αλληλοεπιδρά επίσης και με τη φωσφολιπάση C, η οποία επάγει την υδρόλυση της 4,5-διφωφορικής φωσφατυδιλοϊνσιτόλης προς 1,4,5-τριφωφορική ινσιτόλη και διακυλογλυκερόλη (DAG). Η πρώτη προάγει την ενδοκυττάρια απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  από τις αποθήκες ασβεστίου του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η DAG συμμετέχει στην ενεργοποίηση της PKC (protein kinase C).<sup>39</sup> Ακολούθως, η PKC ενεργοποιεί τις MAPKs.<sup>40</sup> Με τον έναν ή με τον άλλον τρόπο οι MAPKs που ενεργοποιούνται μεταφέρονται μέσα στον κυτταρικό πυρήνα και

φωσφορυλιώνουν μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι επάγουν τη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών με αντιαποπτωτική δράση όπως οι IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) και μέλη της Bcl-2 οικογένειας.<sup>41</sup> Τελικώς, οι Erk-1 και Erk-2 επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενεργοποιώντας σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως η c-Myc και ισομορφές της οικογένειας RSK (ribosomal subunit kinase).<sup>42</sup>

Ένα άλλο μεταγωγικό μονοπάτι που σχετίζεται με την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ταυτόχρονη μείωση της κυτταρικής απόπτωσης είναι το PI3K/Akt. Σε αυτή την περίπτωση το C-τελικό άκρο του EGFR που βρίσκεται στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα παρέχει κατάλληλη περιοχή πρόσδεσης για την υπομονάδα p85 του PI3K. Η σύνδεση αυτή μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε έμμεσα με τη συμβολή της πρωτεΐνης-προσαρμογέα Grb2.<sup>43</sup> Μετά την ενεργοποίησή της, η PI3K αναγεννά την 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PIP3) η οποία με τη σειρά της επιστρατεύει κι ενεργοποιεί την πρωτεΐνη Akt, μία κινάση σερίνης/θρεονίνης γνωστή επίσης κι ως PKB (protein kinase B). Η παραπάνω διαδικασία ρυθμίζεται από την PTEN, μία πρωτεΐνη με δράση λιπιδικής φωσφατάσης, η οποία αποφωσφορυλιώνει την PIP3 στη θέση D3 στην κυτταρική μεμβράνη προς PIP2, περιορίζοντας κατά συνέπεια και τη μεταφορά, φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Akt.<sup>44</sup> Έτσι λοιπόν αυξημένη λειτουργικότητα του PIP3 ή ελαττωμένη λειτουργικότητα του PTEN σημαίνει κι αυτομάτως ενισχυμένη δραστηριότητα του Akt.<sup>45</sup>

Ο φωσφορυλιωμένος Akt σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση, καθώς φωσφορυλιώνει αποπτωτικές πρωτεΐνες, μεταγραφικούς παράγοντες και κινάσες. Αναλυτικότερα ο Akt μπορεί μέσω φωσφορυλίωσης να απενεργοποιήσει τον Bad, μία προαποπτωτική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια Bcl-2 και να ενεργοποιήσει την κασπάση 9, ένα ένζυμο που λαμβάνει μέρος στο Fas-εξαρτώμενο μονοπάτι, που έχει στόχο την αναστολή της απόπτωσης.<sup>46</sup> Επιπλέον ο Akt ενεργοποιεί κι άλλους παράγοντες, όπως τους HIF-1, NFκB και CREB, οι οποίοι προάγουν τη μεταγραφή αντιαποπτωτικών γονιδίων.<sup>47</sup> Ακόμη, ο Akt μπορεί να απενεργοποιήσει τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας Forkhead και το p53, είτε άμεσα μέσω φωσφορυλίωσής τους είτε έμμεσα μέσω φωσφορυλίωσης κι ενεργοποίησης του MDM2, που είναι υπεύθυνος για την αναστολή του p53.<sup>48</sup> Το τελικό αποτέλεσμα και σε αυτή την περίπτωση είναι η μειωμένη έκφραση προαποπτωτικών γονιδίων και η προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης. Επιπροσθέτως, όπως αναφέρθηκε, ο Akt φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί ορισμένες κινάσες όπως την Gsk-3, που σχετίζεται με τη μείωση του κυτταρικού μεταβολισμού, αλλά και τον mTOR, μία κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση.<sup>49</sup> Ακόμη, η κινάση Akt μπορεί να ενεργοποιήσει την ενδοθηλιακή συνθετάση του NO (eNOS – endothelial nitric oxide synthetase), η οποία παίζει κυρίαρχο ρόλο στην αγγειογένεση, ενώ επίσης επιτρέπει και την ενεργοποίηση, μέσω φωσφορυλίωσης, της ανάστροφης μεταγραφάσης της ανθρώπινης τελομεράσης και προάγει γεγονότα διήθησης και μετάστασης ενεργοποιώντας κατηγορίες μεταλλοπρωτεϊνών.<sup>50-52</sup>

Ένα επιπλέον μεταγωγικό μονοπάτι που ρυθμίζει ο EGFR είναι εκείνο που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες STAT και μπορεί να εξαρτάται από τις κινάσες JAK

(Janus kinase).<sup>53</sup> Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του EGFR επάγει τη φωσφορυλίωση του STAT1, εκκινώντας έτσι τη διαδικασία σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ των STAT1 και STAT3 και των JAK1 και JAK2. Η διαδικασία αυτή συνεπάγεται τη μετακίνηση των πρωτεϊνών STAT στον κυτταρικό πυρήνα, όπου και ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση και την κυτταρική επιβίωση.<sup>53,54</sup> Αξίζει να σημειωθεί πως αυξημένη λειτουργία των πρωτεϊνών STAT και ιδίως του STAT3 έχει συνδεθεί με πολλά περιστατικά πρωτογενούς καρκίνου.<sup>55</sup>

## ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ EGFR

Η πολυπλοκότητα των μεταγωγικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχει ο EGFR καθώς και η συσχέτιση του τελευταίου με λειτουργίες που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη κι επιβίωση τονίζουν το σημαντικό ρόλο που μπορεί να έχουν οι μεταλλάξεις του συγκεκριμένου υποδοχέα σε παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται με την καρκινογένεση. Πράγματι ανωμαλίες στη λειτουργία του EGFR συνδέονται με τον αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την εκτεταμένη αγγειογένεση καθώς και την υψηλή πιθανότητα μετάστασης.<sup>56</sup> Οι ανωμαλίες αυτές μπορεί να προέρχονται από διάφορους παράγοντες όπως μεταλλάξεις του υποδοχέα ή των συναρμοτών του, παρατεταμένη ενεργοποίηση του υποδοχέα ή/και αυξημένη έκφραση του EGFR. Ο EGFR εκφράζεται σε ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών κυττάρων και το πλήθος του αγγίζει φυσιολογικά τους 40.000 με 100.000 υποδοχείς ανά κύτταρο.<sup>57</sup> Σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου όμως ο αριθμός αυτός μπορεί να ξεπεράσει το 1.000.000, όπως σε καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων από όγκους κεφαλής και λαιμού (HNSCC), στο γλοιοβλάστωμα, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνευμόνων (NSCLC), στον καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη και των ωοθηκών.<sup>58</sup> Η υπερέκφραση του EGFR μπορεί να προκληθεί από διάφορους μηχανισμούς, όπως υπερπαραγωγή EGFR-προσδετών, αυξημένη γονιδιακή μεταγραφή και μεταλλάξεις που οδηγούν σε διαρκή ενεργοποίηση των κινασών τυροσίνης.<sup>58</sup> Έτσι λοιπόν δεν είναι τυχαίο που η υπερέκφραση του EGFR αλλά και των προσδετών του όπως ο EGF κι ο TGF $\alpha$  παρατηρείται σε κύτταρα προχωρημένων σταδίων καρκίνου και συσχετίζεται με δυσκολία πρόγνωσης της πορείας της ασθένειας και αντιμετώπισής της αλλά και με την αυξημένη πιθανότητα μετάστασης.<sup>59</sup>

Παρόλα αυτά είναι πιθανόν το ενδεχόμενο η ενεργοποίηση του EGFR να προκαλείται ανεξάρτητα από την ύπαρξη των κατάλληλων προσδετών. Συγκεκριμένα, ο EGFR παράγεται αρχικά ως πρόδρομο μόριο και λαμβάνει την τελική ενεργή του δομή έπειτα από δράση ορισμένων πρωτεασών που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτή η διαδικασία γνωστή ως «αποβολή εξωκυττάρου τμήματος» (ectodomain shedding) πραγματοποιείται μέσω των μεταλλοπρωτεϊνών MMPs και ADAM και φαίνεται πως σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου καθώς αποτελούν μία διαρκή πηγή ενεργοποίησης του υποδοχέα και των σηματοδοτικών μονοπατιών που ακολουθούν όπως αυτό του MAPK.<sup>60</sup> Οι μεταλλοπρωτεάσες αυτές

ενεργοποιούνται συνήθως από συγκεκριμένες G-πρωτεΐνες, και είναι ικανές να διεγείρουν όχι μόνο τον EGFR αλλά ολόκληρη την οικογένεια των ErbB υποδοχέων.<sup>61</sup>

Ο HER2, σε αντίθεση με τους άλλους υποδοχείς της οικογένειας ErbB, δεν παρουσιάζει συγκεκριμένο αγωνιστή, παρά βρίσκεται σε μία ενεργοποιημένη, αδέσμευτη κατάσταση που του επιτρέπει να συνδέεται εκλεκτικά με τον EGFR.<sup>62</sup> Όταν λοιπόν ο HER2 υπερεκφράζεται, αυξάνεται η συγκέντρωσή του στην κυτταρική μεμβράνη και συνεπώς οι πιθανότητες ετεροδιμερισμού με τον EGFR. Αυτό συνεπάγεται υπερενεργοποίηση του τελευταίου, επομένως και ανεξέλεγκτη σηματοδότηση στον πυρήνα για έκφραση γονιδίων και κυτταρικό πολλαπλασιασμό, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση. Δεν είναι τυχαία άλλωστε και η αυξημένη συγκέντρωση ετεροδιμερών EGFR/HER2 που παρατηρείται στον επιθετικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.<sup>63</sup>

Η αυξημένη έκφραση του EGFR μπορεί να συνοδεύεται σε πολλούς καρκίνους από δομικές αλλοιώσεις του υποδοχέα, όπως ελλείψεις δομικών χαρακτηριστικών από την εξωκυττάρια περιοχή του με κυριότερο παράδειγμα τη μεταλλαγμένη παραλλαγή τύπου III του ανθρώπινου EGFR, ή αλλιώς EGFRvIII.<sup>64</sup> Αυτός ο μεταλλαγμένος υποδοχέας προκύπτει έπειτα από διαγραφή των εξωνίων 1-7 του αντίστοιχου γονιδίου, τα οποία κωδικοποιούν ένα μέρος του βραχίονα διμερισμού ενώ επίσης χαρακτηρίζεται και από την απουσία κρίσιμων αμινοξέων στις περιοχές 6-273 της εξωκυττάριας περιοχής.<sup>65</sup> Η έλλειψη αυτών των κρίσιμων δομικών στοιχείων οδηγεί σε σημαντική αλλοίωση της περιοχής σύνδεσης με τους προσδέτες, με αποτέλεσμα ο EGF αλλά και οι υπόλοιποι προσδέτες να αδυνατούν να συνδεθούν με τον EGFR. Χαρακτηριστικό του EGFRvIII είναι το γεγονός πως παραμένει διαρκώς ενεργοποιημένος, εκκινώντας έτσι τα μεταγωγικά μονοπάτια συνεχώς. Αυτό οφείλεται στο ότι η απουσία του συγκεκριμένου τμήματος της εξωκυττάριας περιοχής προκαλεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα, ώστε ο τελευταίος να μιμείται το φυσικό EGFR συνδεδεμένο και ενεργοποιημένο από κατάλληλο προσδέτη.<sup>66</sup> Ο συγκεκριμένος μεταλλαγμένος τύπος έχει εμφανιστεί σε μεγάλο βαθμό σε πολλούς τύπους ανθρώπινου καρκίνου όπως στο στήθος, στους πνεύμονες, στις ωοθήκες και στα κακοήγη γλοιοβλαστώματα.<sup>67</sup>

Υπάρχουν κι άλλες μεταλλάξεις του υποδοχέα που προέρχονται είτε από διαγραφή διαφορετικών γονιδιακών τμημάτων, είτε από σημειακές μεταλλάξεις είτε από μεταλλάξεις ενδοπαρεμβολής και προκαλούν δομικές αλλοιώσεις στην περιοχή κίνησης του υποδοχέα, ικανές να αναστείλουν τη φυσιολογική αυτοανασταλτική ικανότητα που διαθέτει και να αυξήσουν την καταλυτική του δράση μέχρι και 50 φορές.<sup>64</sup> Οι πιο συνηθισμένες από αυτές τις μεταλλάξεις είναι η διαγραφή των αμινοξέων 746-750 στο εξώνιο 19, υποκατάσταση μιας λευκίνης από αργινίνη στο κωδώνιο 858 του εξωνίου 21 (L858R) και μιας λευκίνης από γλουταμικό οξύ στο κωδώνιο 861 του ίδιου εξωνίου (L861Q) καθώς και η υποκατάσταση μιας γλυκίνης από κυστεΐνη στο κωδώνιο 719 του εξωνίου 19 (G719C).<sup>68</sup> Η μετάλλαξη L858R, που είναι και η πιο κοινή από αυτές, παρατηρείται στο βρόγχο ενεργοποίησης, ενώ οι λιγότερο συχνές μεταλλάξεις που αφορούν τη Gly719 επηρεάζουν τον P-βρόγχο, υπεύθυνο για τη σύνδεση με φωσφορικά ανιόντα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως

και οι δύο μεταλλάξεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία απέναντι στους αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs) από αυτή που παρουσιάζει ο φυσιολογικός τύπος υποδοχέα.<sup>69</sup> Από την άλλη μεριά, μία μετάλλαξη η οποία προσδίδει αντοχή έναντι διαφόρων αναστολέων είναι η υποκατάσταση της θρεονίνης από μεθειονίνη σε διάφορα σημεία του εξωνίου 20 (T790M και T766M).<sup>70</sup>

Θεωρείται δεδομένο πως οι μεταλλάξεις του EGFR συνδέονται άρρηκτα με την καρκινογένεση, όπως υποδηλώνουν και μελέτες επιμόλυνσης μεταλλαγμένου EGFR σε κυτταρικές καλλιέργειες. Τα κύτταρα που έφεραν το μεταλλαγμένο υποδοχέα παρουσιάζουν αυξημένη αυτοφωσφορυλίωση και ενίσχυση των μονοπατιών PDK/Akt και STAT που προάγουν την κυτταρική επιβίωση.<sup>68</sup> Ωστόσο μελετάται ακόμη ο ακριβής ρόλος αυτών των μεταλλάξεων στην ανάπτυξη του όγκου.

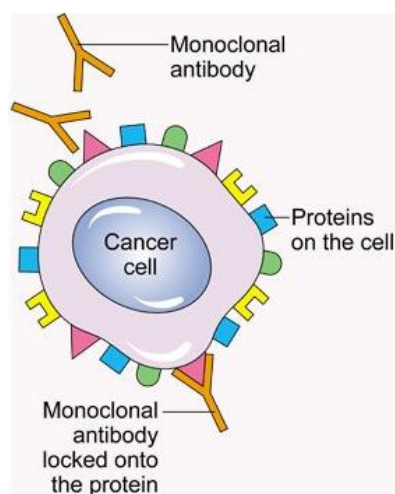
Πέρα από τις διαταραχές στην έκφραση της οικογένειας ErbB, στην παραγωγή των προσδετών και τις εξωκυττάρειες μεταλλάξεις, στον καρκίνο παρατηρούνται και ανωμαλίες εντός του κυττάρου στα μεταγωγικά μονοπάτια που ελέγχει ο υποδοχέας. Για παράδειγμα στον καρκίνο του παχέος εντέρου και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων εμφανίζονται μεταλλάξεις στη RAS που είναι υπεύθυνες για την έκπτωση του RAS/ERK μονοπατιού και την παράλληλη ενίσχυση της MAPK σηματοδότησης.<sup>71</sup> Επιπλέον, μεταλλάξεις στον ογκοκατασταλτικό PTEN, που έχουν ως αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του, μπορούν να οδηγήσουν σε ενίσχυση του μονοπατιού PI3K/Akt προσδίδοντας έτσι αντοχή έναντι συγκεκριμένων EGFR-αναστολέων.<sup>72</sup> Μάλιστα στο 25% των στερεών όγκων η αυξημένη κυτταρική επιβίωση οφείλεται σε ενισχυμένη δράση του EGFR και του Akt, που συσχετίζεται με τις μεταλλάξεις αυτές.<sup>73</sup> Η υπερενεργοποίηση του EGFR συσχετίζεται και με τη συνεχή δραστηριότητα των πρωτεϊνών STAT που διαθέτουν ογκογόνες ιδιότητες.<sup>74</sup> Συμπερασματικά, οι αιτίες πρόκλησης του EGFR-εξαρτώμενου καρκίνου είναι τόσο πολλές ούτως ώστε οι πιθανότητες των καρκινικών κυττάρων για επιβίωση, μετάσταση και αντοχή έναντι στοχευμένων θεραπειών να είναι αρκετά υψηλές.

## ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΤΑ ΤΟΥ EGFR-ΕΠΑΓΟΜΕΝΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Ο EGFR αποτελεί σημαντικό στόχο στη θεραπεία του καρκίνου τα τελευταία 20 χρόνια λόγω της στενής συσχέτισης μεταξύ των μεταγωγικών μονοπατιών που ρυθμίζει και της ανάπτυξης νεοπλασίας. Διάφορες φαρμακολογικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί μέχρι στιγμής, όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies-MAbs), μικρά μόρια με ικανότητα αναστολής κινάσων τυροσίνης (small tyrosine kinase inhibitors-sTKIs), ανοσοτοξίνες, antisense θεραπεία ή RNA-i για τη μείωση της έκφρασης του EGFR και μόρια που στοχεύουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιεί ο EGFR.<sup>75</sup> Προς το παρόν μόνο οι δύο πρώτες κατηγορίες κατέληξαν σε εγκεκριμένα φάρμακα, που είναι αποτελεσματικά κι έχουν μελετηθεί σε βάθος.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα προσδένονται στην εξωκυττάρια περιοχή του EGFR και ανταγωνιστικά αναστέλλουν τη σύνδεση με άλλο υποκαταστάτη, εμποδίζοντας έτσι το διμερισμό του υποδοχέα και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης που διαθέτει (Σχήμα 10). Το σύμπλοκο EGFR-μονοκλωνικού αντισώματος ενδοκυτταρώνεται, προκαλώντας μια παροδική μείωση στον αριθμό των EGFR. Αξίζει να σημειωθεί πως για να παρουσιασθεί η δράση των μονοκλωνικών αντισωμάτων χρειάζεται η παρουσία κυττάρων-τελεστών, όπως τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η σταθερή περιοχή Fc των αντισωμάτων συνδέεται με συγκεκριμένο υποδοχέα των κυττάρων-τελεστών, μία αλληλεπίδραση που επάγει την «κυτταροτοξικότητα εξαρτώμενη από αντισώματα» (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity - ADCC).<sup>76</sup>

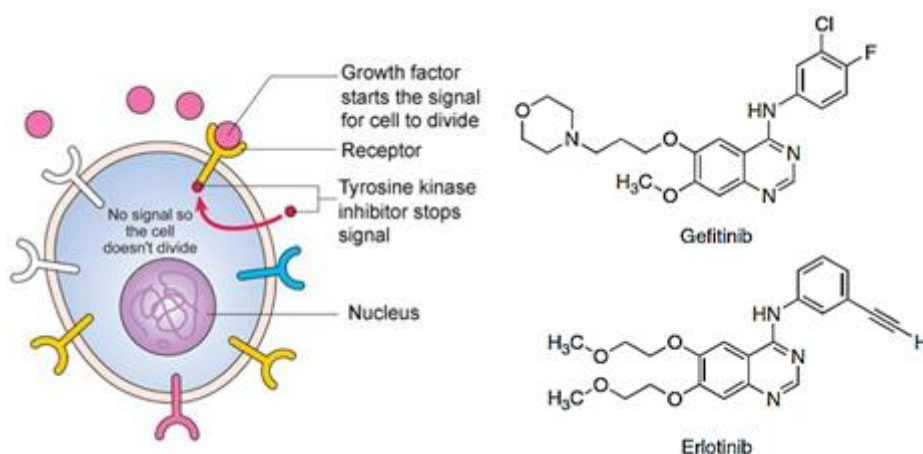
Το σπουδαιότερο παράδειγμα αντι-EGFR μονοκλωνικού αντισώματος αποτελεί το μόριο cetuximab. Το cetuximab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα IgG1 με ικανότητα σύνδεσης με τον EGFR υψηλότερη από αυτή που διαθέτουν οι φυσικοί αγωνιστές του, TGF- $\alpha$  και EGF.<sup>77</sup> Η σύνδεση αυτή οδηγεί αρχικά σε ενδοκυττάρωση του υποδοχέα κι έπειτα σε αποικοδόμησή του, με αποτέλεσμα την ελάττωση της ποσότητάς των EGFR που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και κατ' επέκταση των μεταγωγικών μονοπατιών που εκκινούν.<sup>78</sup> Η δράση του cetuximab δεν περιορίζεται μόνο στο φυσικό EGFR αλλά και σε μεταλλαγμένους τύπους του που παρουσιάζουν μεταλλάξεις στην περιοχή της κινάσης, όπου οι TKIs αδυνατούν να λειτουργήσουν.<sup>79</sup> Η αντικαρκινική δράση του cetuximab εντοπίζεται στη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (G1 arrest) κι εκδηλώνεται ως επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης, αναστολή της αγγειογένεσης, περιορισμό της πιθανότητας για μετάσταση και ευαισθητοποίηση σε ραδιοθεραπεία και χημειοθεραπεία με άλλα φάρμακα.<sup>80,81</sup> Επιπλέον, εμποδίζει τον EGFR από το να ενεργοποιήσει τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του DNA που μπορούν να προσδώσουν αντοχή στα καρκινικά κύτταρα<sup>82</sup>.



Σχήμα 10: Τα μονοκλωνικά αντισώματα εμποδίζουν τη σύνδεση του EGFR με τους φυσιολογικούς προσδέτες του.

Από την άλλη μεριά υπάρχουν τα sTKIs ή TKIs, δηλαδή ενώσεις μικρού μοριακού βάρους οι οποίες διέρχονται το κυτταρικό φραγμό και συνδέονται με την ενδοκυττάρια περιοχή του εκάστοτε υποδοχέα με δράση τυροσινοκινάσης με σκοπό την αδρανοποίησή τόσο του ίδιου του υποδοχέα όσο και των μονοπατιών που ενεργοποιεί (Σχήμα 11). Τα sTKIs λειτουργούν μέσω διαφόρων μηχανισμών, μπορεί να ανταγωνίζονται το ATP ή τα φυσικά υποστρώματα-μεσολαβητές είτε να συνδέονται σε μία αλλοστερική θέση του υποδοχέα προς αναδίαταξη της διαμόρφωσης του τελευταίου. Παρόλο που ο αποκλεισμός της ενδοκυττάριας περιοχής φωσφορυλίωσης δε μοιάζει με ελκυστικό στόχο, καθώς ο οργανισμός διαθέτει πληθώρα πρωτεϊνικών κινάσων και γενικότερα ενζύμων που χρησιμοποιούν το ATP, εν τούτοις η πλειονότητα των TKIs που έχουν αναπτυχθεί για την αναστολή του EGFR στηρίζονται σε αυτόν τον τρόπο δράσης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ύπαρξη του θύλακα εκλεκτικότητας, που εντοπίζεται κοντά στην καταλυτική περιοχή του υποδοχέα κι επιτρέπει το σχεδιασμό και την ανάπτυξη μορίων που δρουν μόνο στον EGFR.

Το gefitinib και το erlotinib (Σχήμα 11) αποτελούν δύο τέτοια μόρια, τα οποία εμποδίζουν το ATP να προσδεθεί στη θέση σύνδεσής του με τον EGFR, αναστέλλοντας έτσι τη δράση της κινάσης τυροσίνης που διαθέτει. Αποτέλεσμα είναι η αναστολή της αυτοφωσφορυλίωσης του υποδοχέα και της ενεργοποίησης του καταρράκτη μεταγωγής σήματος. Το gefitinib και το erlotinib έχουν αποδείξει in vivo αντικαρκινική δράση σε όγκους που περιέχουν το μεταλλαγμένο EGFRvIII. Συγκεκριμένα, τόσο το gefitinib όσο και το erlotinib έχουν εγκριθεί για χρήση κατά τη θεραπεία του μεταστατικού μη-μικροκυτταρικού καρκινώματος των πνευμόνων, όπου άλλες θεραπείες έχουν αποτύχει.<sup>83,84</sup>



Σχήμα 11: Οι μικροί αναστολείς τυροσινοκινάσης (π.χ. gefitinib, erlotinib) αναστέλλουν τον EGFR μέσω σύνδεσης με το ενεργό του κέντρο.



## ΑΝΤΟΧΗ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Στοιχεία από πρόσφατες πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποφύγουν δυσμενείς για την επιβίωσή τους συνθήκες μέσω πολλαπλών εναλλακτικών μονοπατιών ανάπτυξης. Στην πραγματικότητα, αυτά τα μονοπάτια, που σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη, μπορεί να εμφανίζουν ενδογενείς αλλοιώσεις ή μπορεί να ενεργοποιηθούν σε καρκινικά κύτταρα μετά από θεραπεία με εκλεκτικούς αναστολείς μεταγωγής σήματος, όπως οι αναστολείς του EGFR, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη επίκτητης αντίστασης στα φάρμακα αυτά. Λόγω της γενετικής αστάθειας που χαρακτηρίζει τα καρκινικά κύτταρα, τα τελευταία είναι ικανά να στραφούν σε μία πληθώρα εναλλακτικών δίοδων επιδιώκοντας την επιβίωσή τους όταν αυτή κινδυνεύει.

Η ανοσία στη θεραπεία κατά του EGFR-επαγόμενου καρκίνου μπορεί να οφείλεται σε: 1) Έλλειψη του PTEN. Ο φυσιολογικός ρόλος του PTEN είναι η αναστολή της πρωτεΐνης Akt, που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K, η προαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης και η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη του καρκίνου.<sup>85</sup> 2) Ενεργοποίηση του IGF-IR (insulin-like growth factor I receptor) και της περαιτέρω δραστηριότητας των μεταγωγικών μονοπατιών PI3K/Akt και Shc/Ras/Raf/MEK/ERK τα οποία ελέγχουν τη μίτωση, την κυτταρική επιβίωση και την αντοχή στην απόπτωση.<sup>86</sup> 3) Ο μεταλλαγμένος τύπος EGFRvIII, που χαρακτηρίζεται από την ιδιότητά του να παραμένει συνεχώς ενεργοποιημένος λόγω της απουσίας τμήματος της εξωκυττάριας περιοχής που συνδέεται με τους προσδέτες παρουσιάζει ανοσία στα μονοκλωνικά αντισώματα. Παρόλο αυτά τα TKIs εμφανίζουν δράση ενάντια σε αυτό το είδος υποδοχέα. 4) Οι μεταλλάξεις T766M και T790M του EGFR χαρακτηρίζονται από αλλαγές στο θύλακα εκλεκτικότητας της κινάσης, οι οποίες εμποδίζουν τη σύνδεση με τους ανταγωνιστές του ATP, όπως το gefitinib και το erlotinib, αλλά όχι με το ίδιο το ATP.<sup>87</sup> 5) Η υπερέκκριση του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) συνδέεται στενά με την ανεξέλεγκτη αγγειογένεση των καρκινικών κυττάρων και την επιβίωση τους.

## ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGFR

Η αγγειογένεση, ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων από τα προϋπάρχοντα, είναι μια φυσιολογική και ζωτικής σημασίας διαδικασία απαραίτητη για την ανάπτυξη.<sup>88</sup> Η δημιουργία νέων αγγειακών δικτύων σε φυσιολογικές συνθήκες παίζει σημαντικό ρόλο για τους ενήλικες στην επούλωση τραυμάτων, ανάπτυξη του πλακούντα, μυϊκή ανάπτυξη και στην εναπόθεση λιπώδους ιστού.<sup>89</sup> Ωστόσο, η ανώμαλη ρύθμιση της αγγειογένεσης έχει αναφερθεί στην παθογένεση πολλών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της στεφανιαίας νόσου, της φλεγμονής

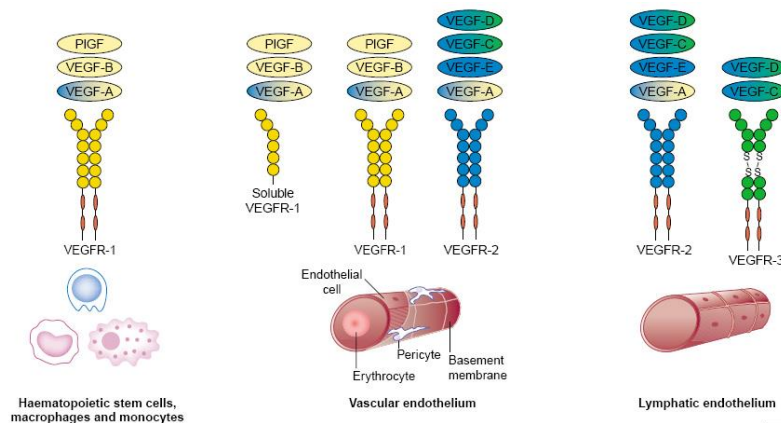
και της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας.<sup>90-92</sup> Αποτελεί επίσης ένα θεμελιώδες βήμα για τη μετάβαση των όγκων από μια λανθάνουσα κατάσταση προς μία κακοήθη.<sup>93</sup>

Η αγγειογένεση αποτελεί μία διαδικασία που είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη από προαγγειογενετικούς και αντιαγγειογενετικούς παράγοντες. Διαταραχή της ισορροπίας, που οφείλεται σε μεταβολή της συγκέντρωσης ή/και δραστηριότητας αυτών των παραγόντων μπορεί να επιφέρει την ανάπτυξη νεοπλασίας. Η δημιουργία νέων αγγείων αποτελεί μία περίπλοκη διεργασία, στην οποία συμμετέχουν πάνω από 50 ανεξάρτητοι αυξητικοί παράγοντες, υποδοχείς, κυτοκίνες και ένζυμα που περιλαμβάνουν τις οικογένειες VEGF, αγγειοποιητινών και εφρινών (eprins).<sup>94</sup>

Ο VEGF (vascular endothelial growth factor) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αγγειογενετικούς επαγωγείς. Η ενεργοποίηση των υποδοχέων στους οποίους συνδέεται ο VEGF, προάγει τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση, και την αγγειογένεση, διεργασίες δηλαδή οι οποίες συνδέονται άρρηκτα με την ανάπτυξη του καρκίνου. Εκτός από παρακρινής προ-αγγειογενετικός παράγοντας ο VEGF λειτουργεί επίσης κι ως αυτοκρινής παράγοντας επιβίωσης σε πολλά είδη καρκινικών κυττάρων, όπως τα ποδοκύτταρα, τα αιματοποιητικά προγονικά κύτταρα, τους οστεοβλάστες, τους οστεοκλάστες και τα μονοκύτταρα.<sup>95</sup>

Οι VEGFs αποτελούν ομοδιμερείς γλυκοπρωτεΐνες των 34-46 kDa με ισχυρή μιτογόνο δράση και εκκρίνονται από κύτταρα που ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων.<sup>96</sup> Η οικογένεια των VEGFs αποτελείται από 7 γλυκοπρωτεΐνες, τις VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα PlGF.<sup>97,98</sup> Όλα τα μέλη αυτής της οικογένειας δρουν στους υποδοχείς VEGFRs.

Οι VEGFRs ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια των υποδοχέων με δράση τυροσινικινάσης. Υπάρχουν τρεις υπότυποι, ο VEGFR-1 (ή Flt-1), ο VEGFR-2 (ή KDR/Flk-1) και ο VEGFR-3 (ή Flt-4) (Σχήμα 12). Ενώ και οι τρεις τους αποτελούν μονομερείς υποδοχείς, η σύνδεσή τους με τους VEGFs οδηγεί στο διμερισμό τους και την ενεργοποίησή τους, με τρόπο παρόμοιο όπως και στους EGFRs.<sup>99,100</sup> Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη διασταυρούμενη αυτοφωσφορυλίωση της ενδοκυττάριας περιοχής του διμερούς με δράση κινάσης τυροσίνης και την επακόλουθη κινητοποίηση ενός εκτεταμένου δικτύου σηματοδοτικών μονοπατιών που πυροδοτεί την έναρξη διαφόρων αγγειογενετικών προγραμμάτων. Στους ενήλικες ο VEGFR-2 εντοπίζεται στην επιφάνεια των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και αναφέρεται ως ο βασικός μεσολαβητής της VEGF-επαγόμενης αγγειογένεσης. Ο VEGFR-1 εκφράζεται στα αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα, καθώς και στο αγγειακό ενδοθήλιο. Ο VEGFR-3 περιορίζεται στο μεγαλύτερο βαθμό στο λεμφικό ενδοθήλιο και η έκφρασή του συσχετίζεται με τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων σε περιφερειακούς λεμφαδένες.<sup>99,101</sup>



Σχήμα 12: Οι υπότυποι των VEGFR και οι διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται μετά την ενεργοποίησή τους από τους αγωνιστές τους.

Το σύστημα σηματοδότησης VEGF/VEGFR συμμετέχει σε πολυάριθμες λειτουργίες ως προς τη ρύθμιση του αγγειακού συστήματος ενός όγκου, όπως τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, τη μετανάστευση, την αγγειακή διαπερατότητα και την αγγειοδιαστολή.

Αξιοσημείωτες αποδείξεις από κλινικές παρατηρήσεις και εργαστηριακές έρευνες δείχνουν ότι ανωμαλίες στην VEGF/VEGFR-επαγόμενη αγγειογένεση εμπλέκονται σε πολλές καρκινικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων αυτών του στομάχου, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, των νεφρών, των ωοθηκών, του προστάτη του γαστρεντερικού σωλήνα, καθώς επίσης στο μελάνωμα, τη λευχαιμία, το λέμφωμα και το πολλαπλό μυέλωμα.<sup>102-109</sup>

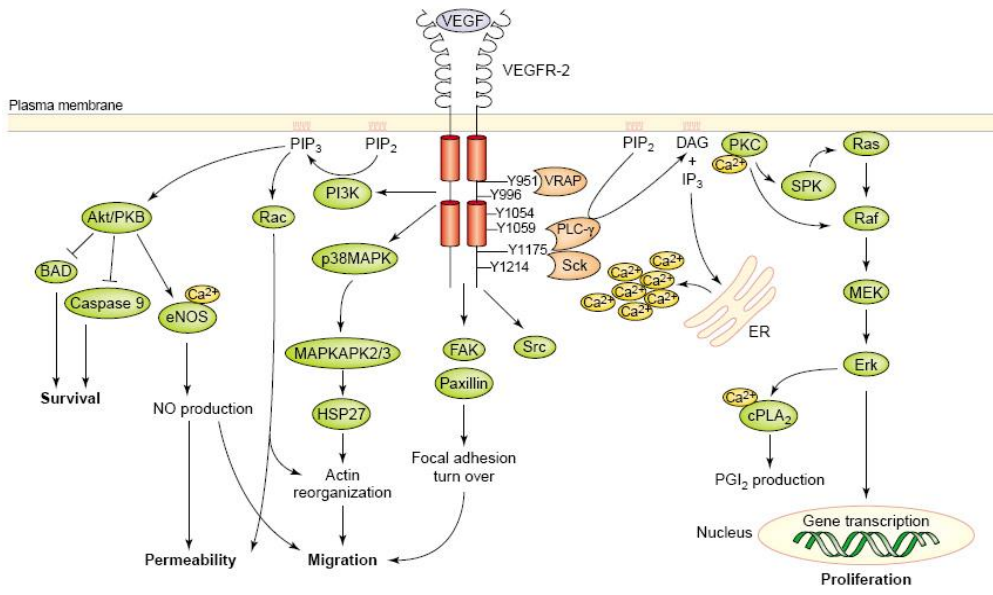
## ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ VEGFR

Μεταξύ των τριών υποτύπων VEGFR, παρόλο που ο VEGFR-1 παίζει ρόλο στην αγγειογένεση ορισμένων όγκων και ο VEGFR-3 σχετίζεται με την διαδικασία της λεμφαγγειογένεσης, ο VEGFR-2 επηρεάζει κυρίως την VEGF-επαγόμενη μιτογονική και χημειοτακτική σηματοδότηση στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, διαδραματίζοντας έτσι έναν κρίσιμο ρόλο στην αγγειογένεση και στην αιμάτωση ενός όγκου.

Ο VEGFR-2 αποτελείται από επτά εξωκυττάριας ομόλογες περιοχές ανοσοσφαιρίνης που περιλαμβάνουν την περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη, μία μικρή διαμεμβρανική περιοχή και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα με δράση κινάσης τυροσίνης, υπεύθυνο για την επαγωγή της σηματοδότησης.<sup>99,100</sup> Η περιοχή πρόσδεσης, που εντοπίζεται στην εξωκυτταρική περιοχή δεσμεύει όλες τις ισομορφές του VEGF-A, το VEGF-C, το VEGF-D και το VEGF-E.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ο αδέσμευτος VEGFR-2 αποτελεί ξεκάθαρα μία μονομερή διαμεμβρανική πρωτεΐνη, της οποίας το εξωκυτταρικό τμήμα παραλαμβάνει τυχαίες διαμορφώσεις. Η σύνδεση με το VEGF αυξάνει την πιθανότητα

προσκόλλησης ενός ετέρου μονομερούς VEGFR-2, προς σχηματισμό διμερούς (Σχήμα 13). Μάλιστα, οι ομόλογες περιοχές ανοσοσφαιρίνης 2 και 3 φαίνεται να συμβάλλουν στη σύνδεση με τον προσδέτη.<sup>110</sup> Μόλις οι δύο υποδοχείς αλληλοεπιδράσουν με το VEGF, οι επταμελείς εξωκυττάριας περιοχές τους παρουσιάζουν πολύ μικρότερο βαθμό ελευθερίας των διαμορφώσεων που μπορούν να λάβουν. Η γεφύρωση αυτή συνεπώς προκαλεί δομικές ανακατατάξεις σε όλη την έκταση του διμερούς, προκαλώντας την αυτοφωσφορυλίωση των ενδοκυττάριας τμημάτων με δράση κινασών τυροσίνης και τη μετέπειτα μετάδοση του σήματος<sup>111</sup>. Πέντε υπολείμματα τυροσίνης έχουν ταυτοποιηθεί ως οι κύριες θέσεις φωσφορυλίωσης, η Y951 στην περιοχή ανάμεσα των δύο καταλυτικών τμημάτων, οι Y1054 και Y1059 στο βρόγχο ενεργοποίησης της περιοχής τυροσινοκινάσης 2 και οι Y1175 και Y1214 στο καρβοξυτελικό άκρο.<sup>112</sup>

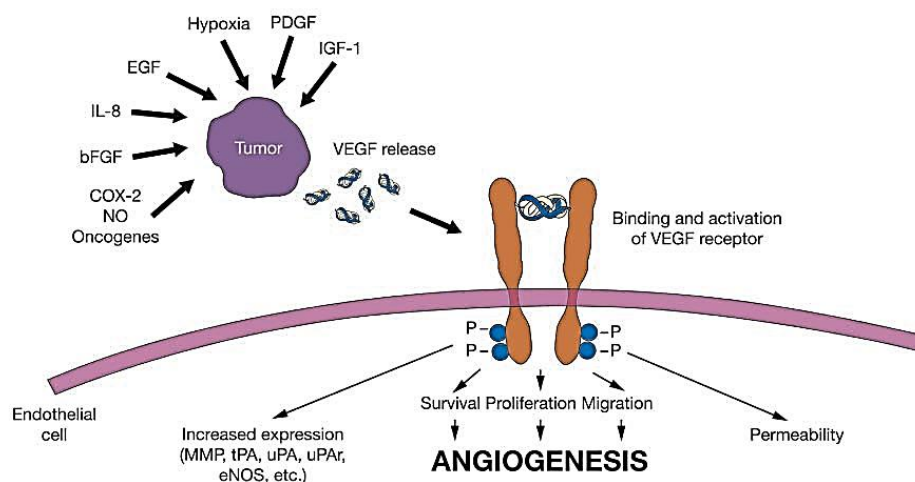


Σχήμα 13: Τα μεταγωγικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο VEGFR-2.

Η φωσφορυλίωση όλων αυτών των περιοχών οδηγεί σε επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση διαφόρων ενδοκυττάριας πρωτεϊνών σηματοδότησης, όπως η φωσφολιπάση C-γ1 (PLC-γ1), οι κινάσες τυροσίνης της οικογένειας Src, η 3-κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K), η ογκογόνος πρωτεΐνη-προσαρμογέας Nck και οι πρωτεΐνες-προσαρμογείς Shb και Sck. Όλα αυτά τα μόρια μεσολαβούν στον καταρράκτη σηματοδότησης για την επαγωγή της αγγειογένεσης και για αυτό έχουν πολύ στενές σχέσεις με το σύστημα αιμάτωσης και θρέψης των καρκινικών κυττάρων.

## ΣΧΕΣΕΙΣ ΤΟΥ EGFR ΜΕ ΤΟ VEGF

Η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες που είναι χαρακτηριστικοί σε πολλούς τύπους όγκων, όπως η υποξία και η υπερέκφραση ογκογονιδίων (Σχήμα 14). Έτσι λοιπόν, η επαγωγή της έκφρασης του mRNA υπεύθυνου για το VEGF και τη δημιουργία νεοαγγείωσης ελέγχεται έμμεσα από διάφορους ογκογόνους παράγοντες, όπως ο EGF, ο TGF- $\alpha$ , ο TNF- $\alpha$ , ο IGF-I, ο FGF, ο PDGF, διάφορες κυτοκίνες όπως οι IL-1 $\alpha$  και IL-6 και μεταλλάξεις ογκογονιδίων όπως του KRAS.<sup>113</sup>



Σχήμα 14: Η έκφραση του VEGF επάγεται από πολλούς ογκογόνους παράγοντες.

Όπως αποδεικνύεται από διάφορα μοντέλα κυτταρικών καλλιιεργειών ο EGF κι ο TGF- $\alpha$  επάγουν την έκφραση του VEGF μέσω ενεργοποίησης του EGFR, παρουσιάζοντας έτσι αγγειογενετικές ιδιότητες.<sup>114</sup> Από την άλλη πλευρά υπάρχουν στοιχεία που ομολογούν πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων που περιβάλλουν τον όγκο παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του EGFR, γεγονός που συνδέεται μάλιστα με την κακή πρόγνωση του καρκίνου.<sup>115,116</sup> Είναι προφανές πλέον ότι η οδός του EGFR ρυθμίζει εκτός των άλλων και την αγγειογένεση μέσω θετικής επίδρασης στα επίπεδα του VEGF, γεγονός που μαρτυρούν και μελέτες σε διάφορα προκλινικά μοντέλα.

Ο αποκλεισμός του EGFR με μονοκλωνικά αντισώματα, όπως το cetuximab έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή προαγγειογενετικών μεσολαβητών, όπως ο VEGF, η IL-8 και ο FGF, καθώς και τη μείωση της πυκνότητας των μικρών αγγείων (micro vessel density) και του μεταστατικού δυναμικού.<sup>116,117</sup> Έτσι η αντικαρκινική δράση που διαθέτει το συγκεκριμένο φάρμακο οφείλεται και στην ικανότητά του να επεμβαίνει και να διακόπτει τα μεταγωγικά μονοπάτια που συμβάλλουν στην αγγειογένεση. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ληφθεί και από μελέτες καταστολής του EGFR με αναστολείς τυροσινικινασών. Σε πειράματα με καρκινικές κυτταρικές

σειρές η αναστολή του EGFR από το gefitinib οδηγεί σε καταστολή του VEGF, της IL-8 και κατ' επέκταση, της αγγειογένεσης<sup>118,119</sup>.

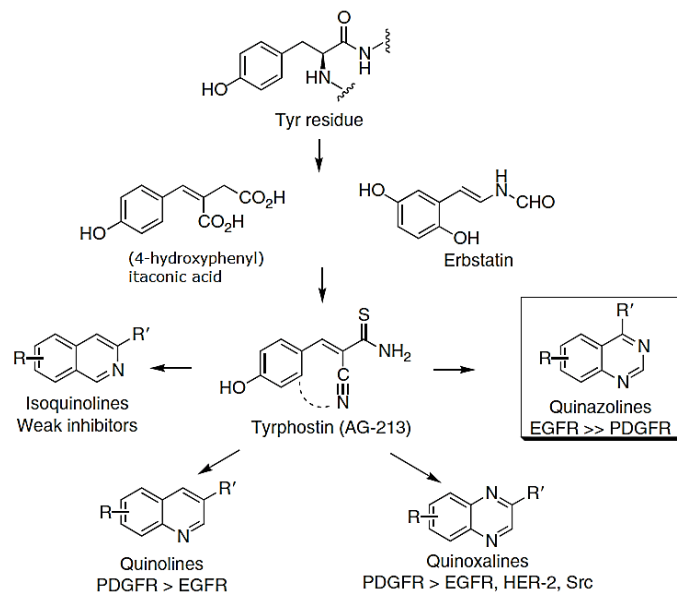
Επιπλέον, άλλες προκλινικές μελέτες έδειξαν πως χρόνια χορήγηση των φαρμάκων cetuximab και gefitinib για την αντιμετώπιση του καρκίνου του παχέος εντέρου οδήγησε σε ανάπτυξη αντοχής, η οποία συνδυαζόταν με αυξημένη έκφραση του VEGF κατά 5 με 10 φορές παραπάνω από το σύνηθες.<sup>120</sup> Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα στην προσπάθειά τους να επιβιώσουν σε δυσμενείς συνθήκες καταφεύγουν σε διάφορες λύσεις, μεταξύ των οποίων και στην επέκταση του αγγειακού δικτύου που τα αιματώνει, μέσω υπερέκφρασης του VEGF. Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται κι από το γεγονός πως τα κύτταρα αυτά δεν ανέπτυξαν αντοχή όταν τους χορηγήθηκε το vandetanib, ένα μόριο που επιδεικνύει ανασταλτική δράση έναντι του EGFR και του VEGFR-2.

Φαίνεται λοιπόν ότι στους συμπαγείς όγκους οι δύο οδοί EGFR και VEGF είναι αλληλένδετες και αλληλοεξαρτώμενες ειδικά όσον αφορά την αγγειογένεση. Η έκφραση του VEGF εξαρτάται από την ενεργοποίηση και έκφραση του EGFR αλλά όχι μόνον από αυτήν. Ως εκ τούτου, η αναστολή του EGFR δεν αναστέλλει πλήρως την έκφραση του VEGF. Η λύση αυτού του προβλήματος ίσως βρίσκεται στην ανάπτυξη νέων αναστολέων με πολλαπλούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων των EGFR και VEGF.<sup>121-123</sup>

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΟΥ EGFR

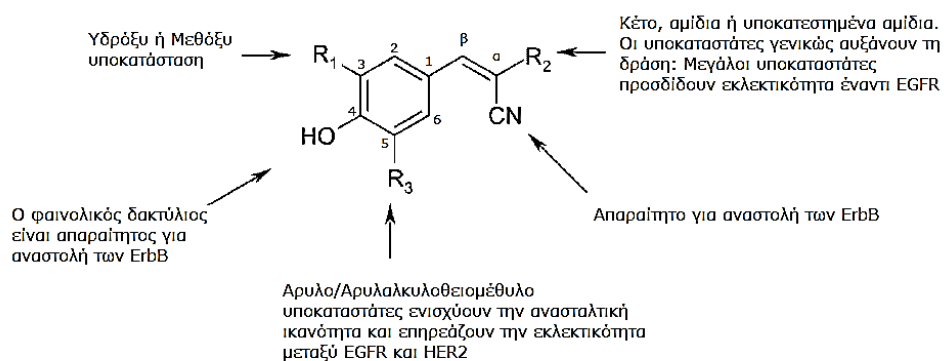
Λόγω της μεγάλης συσχέτισης που υπάρχει μεταξύ της υπερέκφρασης και της ανώμαλης λειτουργίας του EGFR με την ανάπτυξη διαφόρων κακοηθειών, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την εύρεση παραγόντων που αναστέλλουν τον EGFR. Καθώς ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει πάνω από 500 κινάσες που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, αποτελεί μεγάλη πρόκληση η ανάπτυξη εκλεκτικών και μη τοξικών μορίων. Επιπλέον λόγω της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να αναπτύσσουν αντοχή στη θεραπεία η ανάπτυξη νέων EGFR αναστολέων αποτελεί ένα ανεξάντλητο αντικείμενο έρευνας.

Αρχικά η έρευνα για την ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης επικεντρώθηκε στην εύρεση ανταγωνιστών του φυσικού τους υποστρώματος, δηλαδή της τυροσίνης. Ένα από τα πρώτα μόρια της κατηγορίας αυτής είναι το (4-υδροξυφαινυλο)ιτακονικό οξύ, μια ένωση που αναστέλλει την τυροσινικινάση του υποδοχέα ινσουλίνης (IR, insulin receptor) χωρίς καμία επίδραση σε κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Σχήμα 15). Ένα άλλο παράγωγο είναι το φυσικό προϊόν erbstatin, το οποίο μεταξύ άλλων κινασών αναστέλλει και τον EGFR. Ο πρώτος πραγματικά ισχυρός αναστολέας του EGFR που αναπτύχθηκε ήταν το tyrphostin (AG-213). Το tyrphostin αλλά κι άλλες ενώσεις της κατηγορίας των βενζυλιδενομηλονιτριλίων (tyrphostins), δεν ανταγωνίζονται μόνο το φυσικό πρωτεϊνικό υπόστρωμα αλλά και το ATP στη θέση πρόσδεσής του στον EGFR και τον HER2.<sup>124,125</sup>



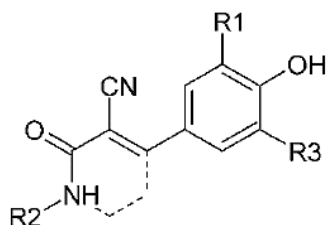
Σχήμα 15: Η εξέλιξη των αναστολέων κινασών τυροσίνης.

Το κυριότερο γνώρισμα αυτών των ενώσεων είναι η 4-υδροξυλομάδα καθώς και η χαρακτηριστική *cis*-κυανο-ομάδα, η οποία βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τον αρωματικό δακτύλιο και είναι σημαντικές για δράση κατά των ErbB (Σχήμα 16).<sup>124,125</sup> Σύμφωνα με φαρμακολογικές μελέτες στα μόρια αυτά ο  $\alpha$ -υποκαταστάτης θα πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένο μέγεθος και συγκεκριμένη διαμόρφωση.<sup>126</sup> Επίσης τα παράγωγα με 3-υδροξυ-υποκατάσταση και  $\alpha$ -αμιδο- ή κετο-υποκατάσταση αναστέλλουν εκλεκτικά τον EGFR.<sup>127</sup> Εάν ο 4-υποκαταστάτης είναι αρυλοθειομεθύλο- ή αρυλαλκυλοθειομεθύλο- τότε αυξάνεται η ανασταλτική δράση επιλεκτικά έναντι HER2 τουλάχιστον κατά 2 φορές.<sup>128</sup>



Σχήμα 16: Σχέσης δομής-δράσης των βενζυλιδενομηλονιτριλίων.

Σύμφωνα με μελέτες 3D-QSAR που διεξήχθησαν η κυανο-ομάδα αναπτύσσει σημαντικούς δεσμούς υδρογόνου με τη Met769 και την Cys751 στο ενεργό κέντρο του EGFR, ενώ η ενσωμάτωση της ίδιας όσο και της καρβονυλομάδας σε κυκλικό σύστημα μπορεί να βελτιώσει τη συνδετική ικανότητα των μορίων (Σχήμα 17).<sup>129</sup>



Σχήμα 17: Μία πιθανή στρατηγική για τη βελτίωση της συνδετικής ικανότητας των βενζυλιδενομηλονιτριλίων.

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΩΝ 4-ΑΝΙΛΙΝΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝΩΝ

Έπειτα από πολλές μελέτες για την εύρεση μίας πιο άκαμπτης δομής με τα κατάλληλα χαρακτηριστικά για σύνδεση με την ενζυμική περιοχή του EGFR, προέκυψε μία μεγάλη ποικιλία δικυκλικών παραγώγων (ισοκινολίνες, κινολίνες, κινόξαλίνες, κιναζολίνες κ.α.) τα οποία δρουν πλέον ως ανταγωνιστές του ATP και όχι ως ανάλογα τυροσινικών υποστρωμάτων, όπως ήταν η αρχική ιδέα πίσω από αυτό το σχεδιασμό (Σχήμα 15).

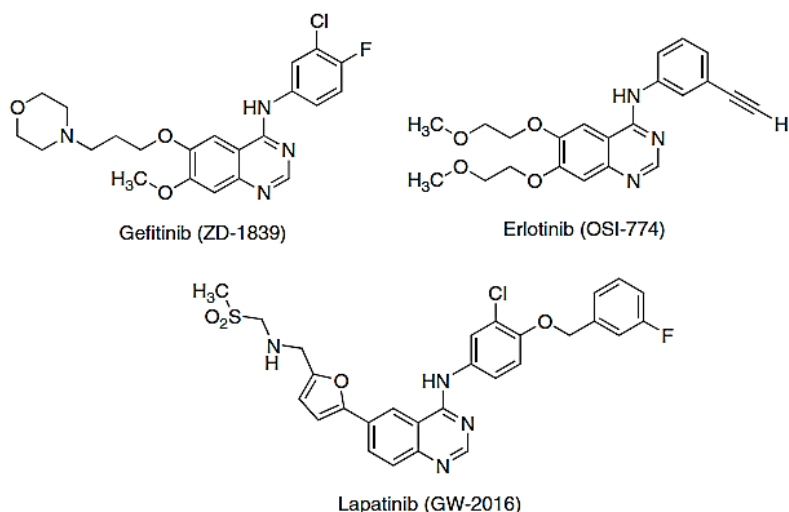
Κατά τη διάρκεια μελετών high-throughput screening ανακαλύφθηκε ότι οι 4-ανιλνοκιναζολίνες αποτελούσαν υποσχόμενους αναστολείς (Σχήμα 18).<sup>130</sup> Μεταξύ των 4-ανιλνοκιναζολινών, το gefitinib (ZO-1839) ήταν το πρώτο TKI με ανασταλτική δράση έναντι του EGFR που εγκρίθηκε για κλινική εφαρμογή ως μονοθεραπεία για την αντιμετώπιση προχωρημένου μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε ασθενείς όπου το docetaxel και οι ενώσεις λευκοχρύσου είχαν αποτύχει.<sup>131,132</sup> Στη συνέχεια μελέτες απέδειξαν πως η χορήγηση του gefitinib συνδέεται με την ανάπτυξη μεταλλάξεων του EGFR και συνεπώς αντοχή έναντι στη θεραπεία.<sup>133,134</sup> Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ύπαρξη αναφορών για συσχέτιση του gefitinib με πνευμονική τοξικότητα, οδήγησαν στην αντικατάστασή του από μία νέα κινάζολίνη, το erlotinib (OSI-774).

Το erlotinib παρουσίασε αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα καθώς και σε ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος.<sup>135</sup> Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση του gefitinib, η χορήγηση erlotinib για διάστημα 8-12 μηνών οδήγησε σε ανάπτυξη αντοχής που μπορεί να οφείλεται σε διάφορες μεταλλάξεις του EGFR.

Ένα άλλο παράγωγο που ανήκει στην κατηγορία των 4-ανιλνοκιναζολινών είναι το lapatinib, το οποίο σε αντίθεση με τα προηγούμενα παράγωγα φέρει μόνο



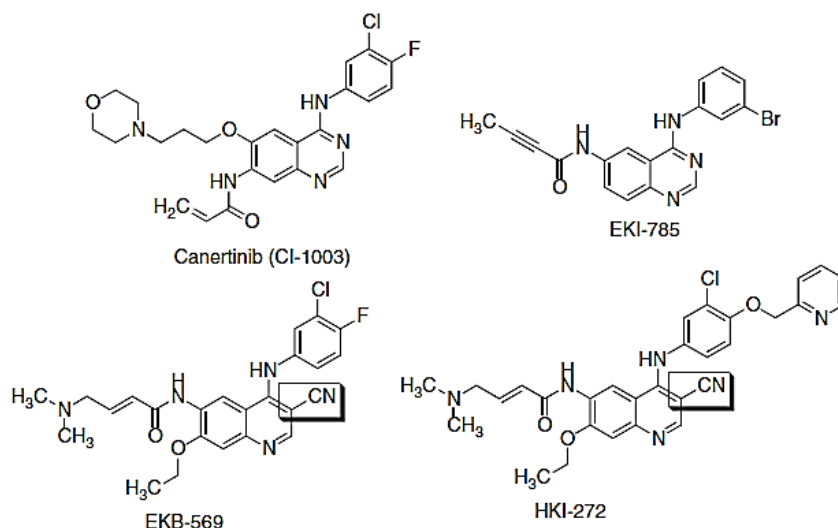
έναν υποκαταστάτη στην θέση 6 του κιναζολινικού δακτυλίου (Σχήμα 18). Το lapatinib παρουσίασε αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση τόσο επί του EGFR όσο και επί του HER2, η υπερέκφραση του οποίου σχετίζεται στενά με τον καρκίνο του μαστού και σήμερα χορηγείται σε ασθενείς για την καταπολέμηση στερεών όγκων, όπως ο καρκίνος του μαστού, ενώ ταυτόχρονα μελετάται η δράση του για τον καρκίνο του στομάχου.<sup>136</sup>



Σχήμα 18: Χημικές δομές των gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®) και lapatinib (Tykerb®).

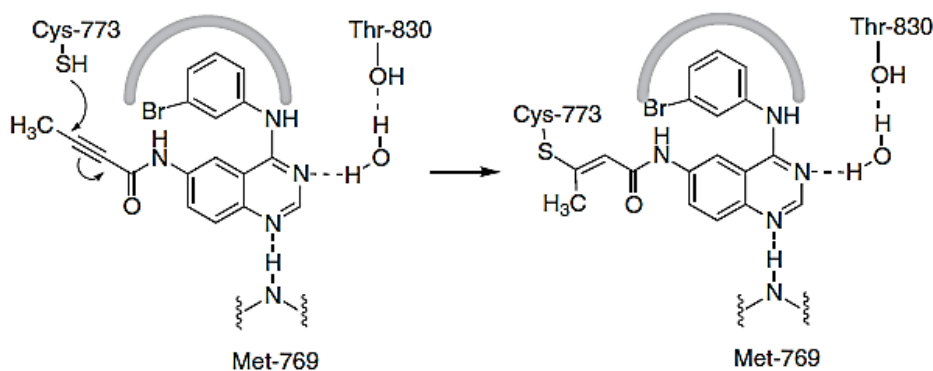
## ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ 4-ΑΝΙΛΙΝΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝΩΝ

Οι αναστολείς που ανταγωνίζονται το ATP πρέπει να υπερισχύουν των υψηλών συγκεντρώσεων σε ATP εντός των καρκινικών κυττάρων, καθώς εκτοπίζονται γρήγορα προτού προλάβουν να δράσουν. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα έγιναν εντατικές προσπάθειες με στόχο την ανάπτυξη μη αναστρέψιμων αναστολέων EGFR (Σχήμα 19). Μερικοί από αυτούς είναι το canertinib (CI-1003), με ανασταλτική δράση έναντι του EGFR και του HER2, το EKI-785, το EKB-569 και το HKI-272.<sup>138</sup>



Σχήμα 19: Χημικές δομές μη αντιστρεπτών αναστολέων της τυροσινικινάσης του EGFR.

Η μη αντιστρεπτή δράση των ενώσεων αυτών οφείλεται στην ικανότητά τους να αναπτύσσουν μη αντιστρεπτό ομοιοπολικό δεσμό με τον EGFR μέσω πυρηνόφιλης προσβολής της γειτονικής Cys773 της περιοχής πρόσδεσης του ATP (Σχήμα 20).<sup>139</sup>

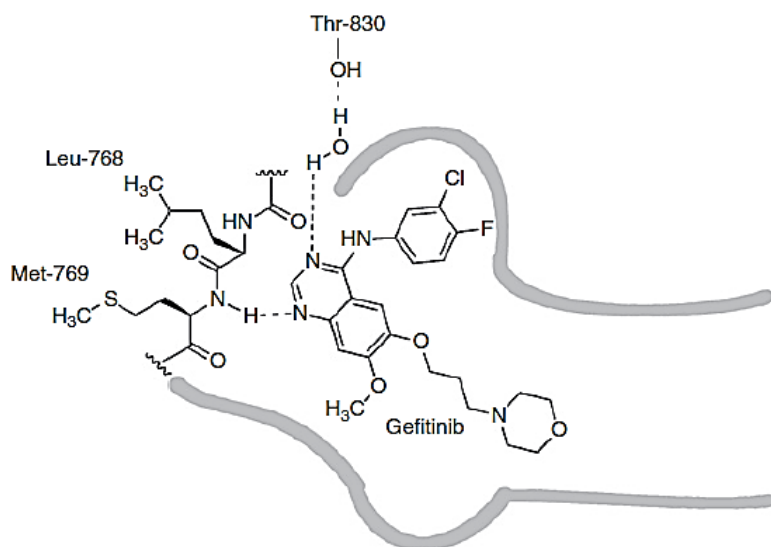


Σχήμα 20: Μηχανισμός δράσης των μη αντιστρεπτών αναστολέων της τυροσινικινάσης του EGFR.

Όπως είναι λογικό, ο μεγάλος αριθμός μορίων-αναστολέων του EGFR που έχουν συντεθεί, σε συνδυασμό με την κρυσταλλογραφική δομή του υποδοχέα σε σύμπλοκο με το ATP καθώς και με διάφορα TKIs, καθώς και οι διάφορες μελέτες μοριακής προσομοίωσης που έχουν γίνει, έχουν δώσει πολύτιμα δεδομένα όσον αφορά την αλληλεπίδραση των 4-ανιλνοκινολινών με τον EGFR (Σχήμα 21 και 22). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά:

- ✓ Κατά την αλληλεπίδραση των 4-ανιλνοκινολινών με τον EGFR παρατηρείται ότι ο 4-ανιλνικός υποκαταστάτης καταλαμβάνει τον υδρόφοβο θύλακα εκλεκτικότητας (Σχήμα 21). Κατά την αλληλεπίδραση αυτή αναπτύσσονται δύο

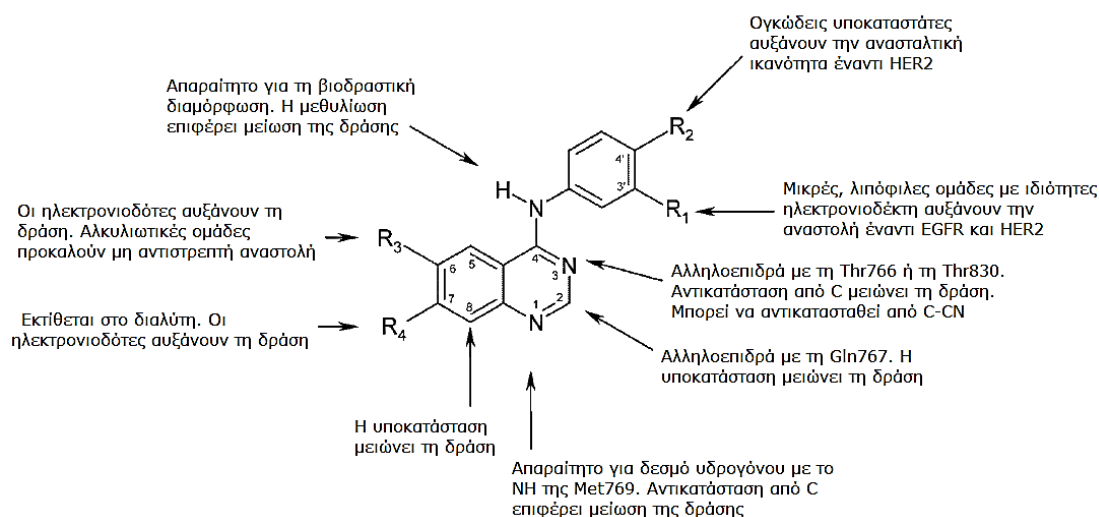
ιδιαίτερα σημαντικοί δεσμοί υδρογόνου, ένας μεταξύ του N1 και της Met769 καθώς και ένας μεταξύ του N3 και της Thr830, όπου εμπλέκεται κι ένα μόριο νερού.<sup>137</sup> Πρέπει να σημειωθεί πως λόγω της μεγάλης ευρυχωρίας που παρουσιάζει η συγκεκριμένη περιοχή είναι δυνατόν ακόμα και δομικά ανάλογοι αναστολείς να προσανατολίζονται διαφορετικά.



Σχήμα: 21: Αλληλοεπίδραση του gefitinib με την καταλυτική περιοχή του EGFR.

- ✓ Η αντικατάσταση του N1 και του N3 του σκελετού της κιναζολίνης με άνθρακα οδηγεί σε μείωση της ανασταλτικής δράσης κατά 3700 και 200 φορές αντίστοιχα, γεγονός που υποδεικνύει ταυτόχρονα τη σημασία του N1 συγκριτικά με το N3.<sup>140</sup>
- ✓ Εξαιρεση αποτελεί η περίπτωση στην οποία το N3 έχει αντικατασταθεί από άνθρακα που φέρει ομάδα νιτριλίου. Πιο συγκεκριμένα, στο EKB-569 και το HKI-272 στα οποία ο παραδοσιακός δακτύλιος της κιναζολίνης έχει αντικατασταθεί από 3-κυανοκινολίνη (Σχήμα 19), το άζωτο του νιτριλίου είναι ικανό να αλληλοεπιδράσει μέσω δεσμού υδρογόνου χωρίς να απαιτείται η συμμετοχή ενός μορίου νερού, όπως γίνεται στα κλασσικά κιναζολινικά παράγωγα.
- ✓ Η 4-ανιλινική ομάδα παίζει σημαντικό ρόλο στη σύνδεση αλλά και την εκλεκτικότητα των αναστολέων. Μικρές, ηλεκτρονιόφιλες και λιπόφιλες ομάδες, όπως τα αλογόνα, στη μετα-θέση ευνοούν τη δράση.<sup>141</sup> Άρυλο ή αρυλάλκυλο υποκατεστημένες ανιλίνες που περιέχουν ογκώδεις υποκαταστάτες, όπως φαίνυλο ή βένζυλο ομάδες αυξάνουν την ικανότητα αναστολής του HER2 αλλά ταυτόχρονα μειώνουν δραματικά την ικανότητα για αναστολή του EGFR.<sup>142,143</sup>
- ✓ Η μεθυλίωση του ανιλινικού αζώτου συνεπάγεται σε σημαντική μείωση της δράσης, πιθανόν λόγω αδυναμίας της ανιλίνης να περιστραφεί κατάλληλα ώστε να επιτύχει τη βιοδραστική διαμόρφωση. Αυτό οφείλεται σε στερικές παρεμποδίσεις μεταξύ του N-μεθυλίου και του H5 του κιναζολινικού δακτυλίου.<sup>144</sup>

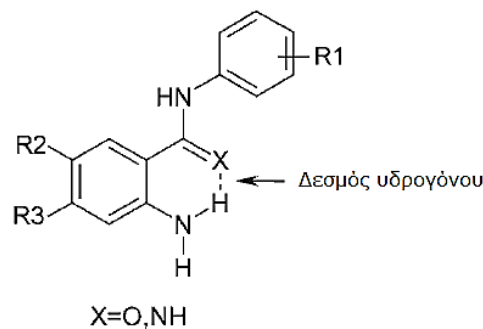
- ✓ Η γωνία μεταξύ των επιπέδων των δύο αρωματικών συστημάτων συνήθως κυμαίνεται κοντά στις 40°, έτσι ώστε το ανιλινικό τμήμα να εισχωρεί κατάλληλα στο θυλάκιο εκλεκτικότητας της κινάσης.<sup>145</sup>
- ✓ Αντικατάσταση του C5 με άζωτο μειώνει την αποτελεσματικότητα καθώς έτσι δεν αναπτύσσεται αλληλεπίδραση μεταξύ του H5 και του ανιλινικού αζώτου.
- ✓ Υποκατάσταση στον C2 και C8 προκαλεί μείωση της δράσης λόγω στερικών φαινομένων.<sup>140</sup>
- ✓ Υποκατάσταση στη θέση 6 και 7 με ομάδες, που διαθέτουν ιδιότητες ηλεκτρονιοδότη, προκαλεί αύξηση της δράσης. Αυτές οι πλευρικές ομάδες, όταν είναι ογκώδεις, συνήθως εμφανίζουν ελευθερία στο χώρο και προεξέχουν εκτός της ενζυμικής περιοχής.
- ✓ Σε περίπτωση ύπαρξης αλκυλιωτικού υποκαταστάτη σε τουλάχιστον μία από τις θέσεις 6 και 7, τότε η αναστολή που προκαλείται είναι μη αντιστρεπτή.



Σχήμα 22: Σχέσεις δομής-δράσης των 4-ανιλνοκινολινών.

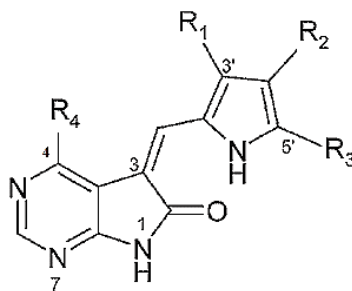
## ΑΛΛΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΟΚΙΝΑΣΗΣ ΤΟΥ EGFR

Χρησιμοποιώντας ως ένωση αναφοράς τις 4-ανιλνοκινολίνες έχουν συντεθεί πολλά μόρια με δράσεις χαμηλότερες ή συγκρίσιμες με αυτές των ενώσεων οδηγών. Μεταξύ αυτών είναι τα βενζαμίδια και οι βενζαμιδίνες, τα οποία φέρουν ένα ψευδοδικυκλικό σύστημα λόγω του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ της α-αμινομάδας και του γειτονικού «καρβονυλίου» (Σχήμα 23).<sup>146</sup> Η δράση των παραγώγων αυτών είναι χαμηλότερη συγκριτικά με εκείνη των κινολινών γεγονός που επιβεβαιώνει πως ένας άκαμπτος σταθερός σκελετός είναι αναγκαίος για την ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων με τον EGFR.



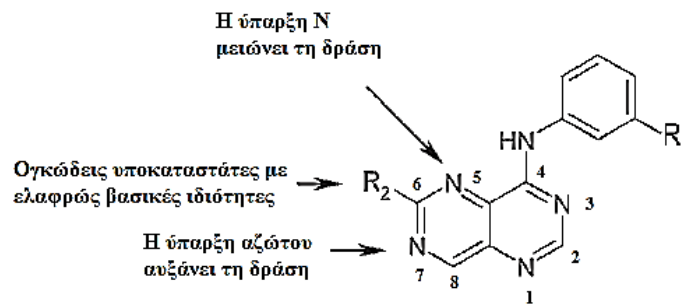
Σχήμα 23: Γενικός χημικός τύπος των βενζαμιδίων και βενζαμιδινών.

Οι 5,7-διαζαϊνδολινόνες σχεδιάστηκαν με βάση τη δομή κινάζολινικών και ινδολινονικών παραγώγων (Σχήμα 24). Έχει βρεθεί πως αυτές οι ενώσεις εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι όχι μόνο του EGFR αλλά και του HER2 και μπορούν να δράσουν ως διπλοί αναστολείς.<sup>147</sup> Μελέτες σχέσης δομής-δράσης έδειξαν πως η υποκατάσταση στον C3 καθώς και η μη υποκατάσταση στο N1 είναι απαραίτητες για ανασταλτική δράση κατά της κινάσης του EGFR. Επίσης ο υποκαταστάτης της θέσης 4 θα πρέπει να είναι υποχρεωτικά ανιλίνη, οι πλευρικές ομάδες της οποίας μπορούν να επηρεάσουν δραματικά τη δραστηριότητα τους.



Σχήμα 24: Γενικός χημικός τύπος 5,7-διαζαϊνδολινονών.

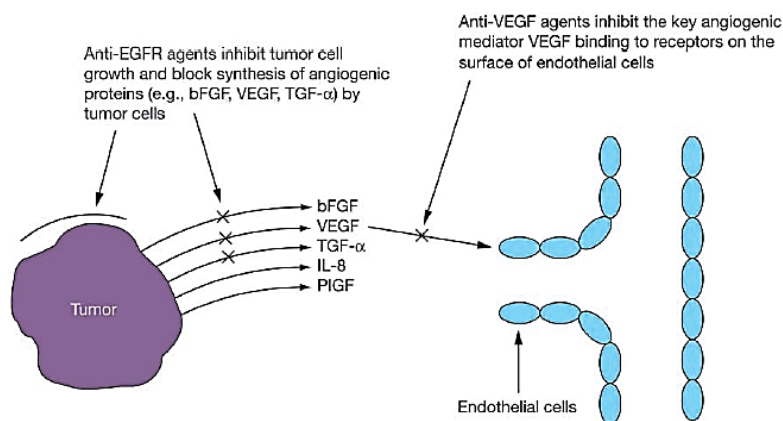
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν ορισμένα πυριδοπυριμιδινικά και πυριμιδοπυριμιδινικά παράγωγα που έχουν συντεθεί και έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη δράση. Σύμφωνα με μελέτες σχέσης δομής-δράσης που διεξήχθησαν στα μόρια αυτά, η ύπαρξη του N7 οδηγεί σε αύξηση της δράσης (Σχήμα 25). Αντιθέτως, η αντικατάσταση του C5 από άζωτο μειώνει τη δράση καθώς απαγορεύει στο μόριο να λάβει δραστικές διαμορφώσεις. Επίσης, υποκατάσταση στη θέση 6 με ογκώδεις ομάδες που διαθέτουν ελαφρώς βασικές ιδιότητες, όπως μία δευτεροταγής αμινομάδα, προσδίδει στο μόριο ανασταλτική δράση επί των κυττάρων A431.<sup>148,149</sup>



Σχήμα 25: Σχέσης δομής δράσης των πυριμιδο[5,4-d]πυριμιδινών.

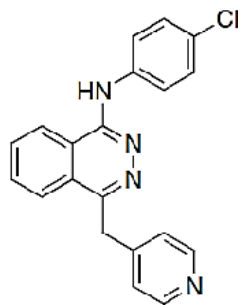
## ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ EGFR/VEGFR

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως τα μονοπάτια σηματοδότησης που συμμετέχουν ο EGFR και ο VEGFR παρουσιάζουν στενή σχέση μεταξύ τους. Η σηματοδότηση μέσω VEGFR ενισχύεται από την αυξημένη έκφραση του EGFR και αντίστροφα η αντίσταση του EGFR έναντι στην αναστολή ενισχύεται από αυξημένη δραστηριότητα του VEGFR. Υπάρχουν αποδείξεις που υποδηλώνουν ότι η συνδυασμένη αναστολή του EGFR και του VEGFR παρέχει βελτιωμένη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με την αναστολή κάθε οδού ξεχωριστά (Σχήμα 26).

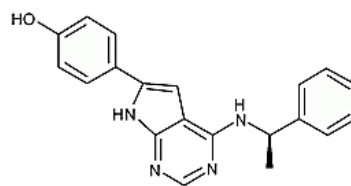


Σχήμα 26: Συνδυασμένη αναστολή των EGFR και VEGFR οδηγεί σε πιο ολοκληρωμένη αντικαρκινική θεραπεία.

Για αυτό ακριβώς το λόγο έχουν αναπτυχθεί πάρα πολλά θεραπευτικά σχήματα που στηρίζονται στην ταυτόχρονη χορήγηση EGFR και VEGFR αναστολέων. Για παράδειγμα πειράματα σε ξενομοσχεύματα ποντικών έχουν δείξει πως η συνχορήγηση vatalanib, ενός VEGFR-1/VEGFR-2 αναστολέα και PKI-166, ενός EGFR/HER2 αναστολέα, εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου του παγκρέατος (Σχήμα 27).<sup>150</sup>



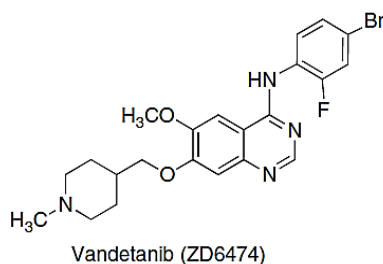
Vatalanib



PKI-166

Σχήμα 27: Χημικές δομές των vatalanib και PKI-166.

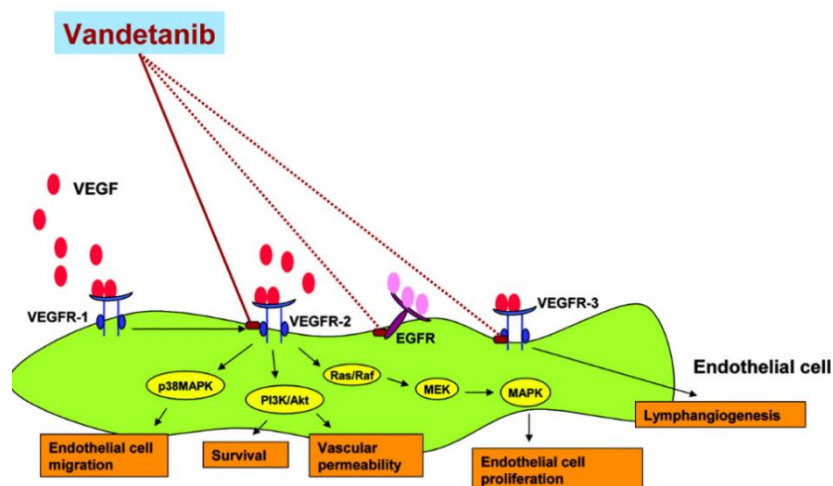
Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας έχει στραφεί στην ανάπτυξη νέων υβριδικών αναστολέων, όπως το vandetanib (ZD6474) (Σχήμα 28).



Vandetanib (ZD6474)

Σχήμα 28: Χημική δομή του vandetanib (Caprelsa®).

Το vandetanib, που ανήκει στην οικογένεια των 4-αμινοκιναζολινών, έχει επιδείξει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του VEGFR-2 καθώς και μέτρια ανασταλτική δράση έναντι των VEGFR-3 και EGFR (Σχήμα 29). Για αυτό το λόγο μπορεί να αναστείλει όγκους με αντοχή στους EGFR αναστολείς ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει και μεγαλύτερη δραστηριότητα συγκριτικά με εκλεκτικούς αναστολείς του VEGFR.<sup>151</sup> Μάλιστα κυκλοφορεί στην αγορά με το όνομα Caprelsa® για τη θεραπεία όγκων του θυρεοειδούς αδένου. Από την ομοιότητα του vandetanib με γνωστούς EGFR αναστολείς είναι φανερό ότι είναι δυνατή η ανάπτυξη νέων EGFR ή/και VEGFR αναστολέων με σκοπό τη χρήση τους ως θεραπευτικών παραγόντων στην αντιμετώπιση του καρκίνου.



Σχήμα 29: Το vandetanib αναστέλλει ισχυρώς το VEGFR-2 και μετρίως τον EGFR και VEGFR-3, για αυτό κι επιδεικνύει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με εκλεκτικούς αναστολείς του EGFR ή του VEGFR.

## ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΥΡΙΜΙΔΟ[4,5-d]ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ

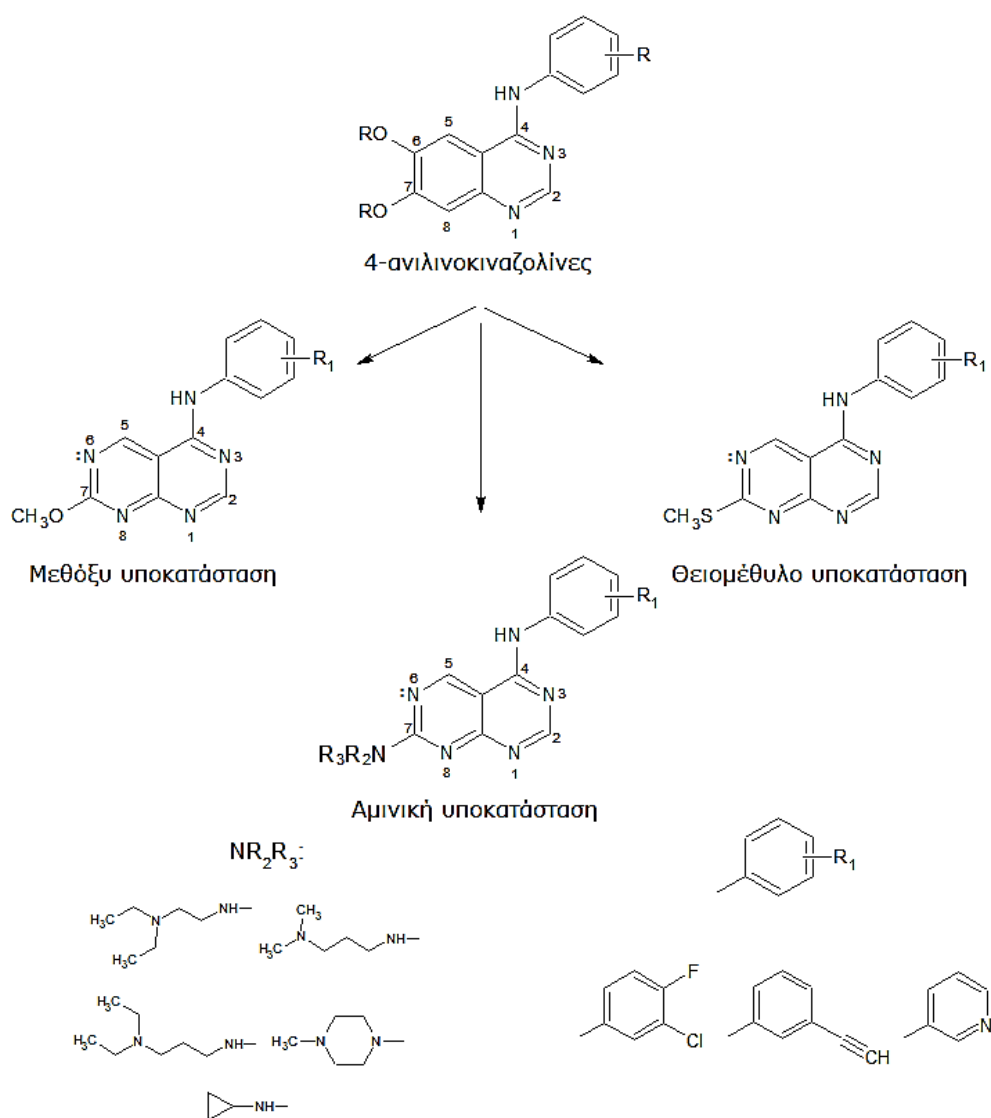
Όπως είναι εμφανές από τα ανωτέρω έχει συντεθεί μία τεράστια ποικιλία 4-ανιλινοκιναζολινών ή δομικών τους αναλόγων, τα οποία φέρουν ένα ή περισσότερα άζωτα στο βενζολικό δακτύλιο ή στη θέση του βενζολικού δακτυλίου φέρουν άλλο συμπυκνωμένο δακτύλιο. Όλα τα νέα παράγωγα εκδηλώνουν ενδιαφέρουσα δράση και η μελέτη τους έχει δώσει πολύτιμα συμπεράσματα όσον αφορά στο σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων EGFR αναστολέων.

Λαμβάνοντας υπόψη όσα έχουν αναφερθεί και σε συνέχεια των προηγούμενων μελετών, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση 4,7-δισυποκατεστημένων πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδινών (Σχήμα 30) ως πιθανών EGFR ή/και VEGFR αναστολέων. Η δομή των νέων μορίων φέρει χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά των 4-ανιλινοκιναζολινών, τα οποία θεωρούνται σημαντικά για την εκδήλωση της ανασταλτικής δράσης. Αναλυτικότερα, τα νέα παράγωγα φέρουν δύο άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 3 τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη δύο πολύ κρίσιμων δεσμών υδρογόνου. Επίσης, στη θέση 4 φέρουν μία κατάλληλα υποκατεστημένη ανιλίνη για εκλεκτική δράση στους συγκεκριμένους υποδοχείς. Από την άλλη πλευρά, σημαντική διαφορά από τις 4-ανιλινοκιναζολίνες είναι η ύπαρξη δύο επιπλέον αζώτων στις θέσεις 6 και 8.

Ειδικότερα στη θέση 6, όπου σε άλλους γνωστούς EGFR αναστολείς συνήθως βρίσκονται μικρές, πλούσιες σε ηλεκτρόνια ομάδες, επιλέχθηκε να τοποθετηθεί το άτομο του αζώτου το οποίο φέρει ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων. Επίσης, στη θέση 7 του ετεροκυκλικού σκελετού, τα νέα παράγωγα φέρουν μία μεθόξυ ομάδα την οποία συναντούμε σε γνωστούς EGFR αναστολείς ή μία θειομέθυλο ομάδα με σκοπό να μελετηθεί κατά πόσο το ογκώδες άτομο του θείου επηρεάζει την δράση των νέων παραγώγων αλλά και την λιποφιλία αυτών. Τέλος, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να



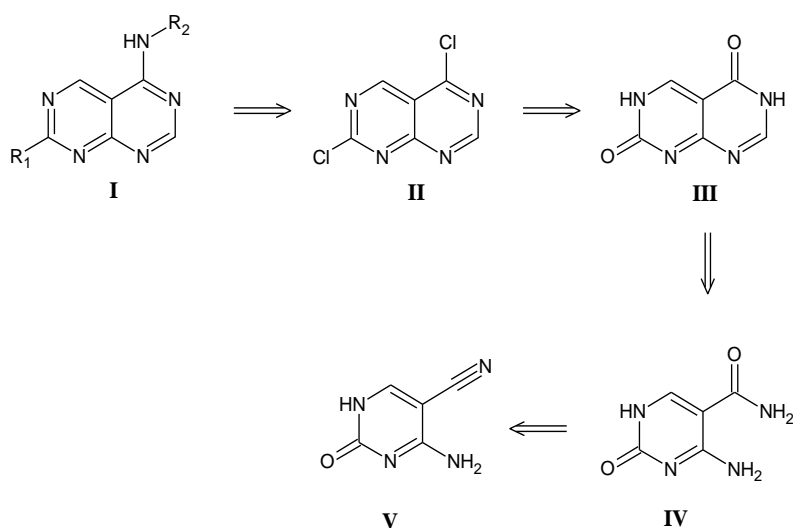
συντεθούν και παράγωγα που στη θέση της μεθόξυ ομάδας φέρουν αμινική αλυσίδα. Στα παράγωγα αυτά το άζωτο που συνδέεται με τον ετερόκυκλο είναι δευτεροταγές ή τριτοταγές με σκοπό να μελετηθεί κατά πόσο ο όγκος αλλά και η δυνατότητα ταυτομέρειας μπορεί να επηρεάσει τη δράση τους. Εξάλλου, γνωρίζοντας ότι η υποκατάσταση στη θέση αυτή επηρεάζει την εκλεκτικότητα των EGFR αναστολέων και την πιθανή τους δράση έναντι του VEGFR, έχουν προστεθεί διαφόρων μεγεθών αμινικοί υποκαταστάτες με σκοπό την ανάπτυξη σχέσεων δομής-δράσης για τη μελλοντική βελτιστοποίηση της νέας αυτής κατηγορίας ενώσεων.



Σχήμα 30: Χημική δομή των πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδινών.

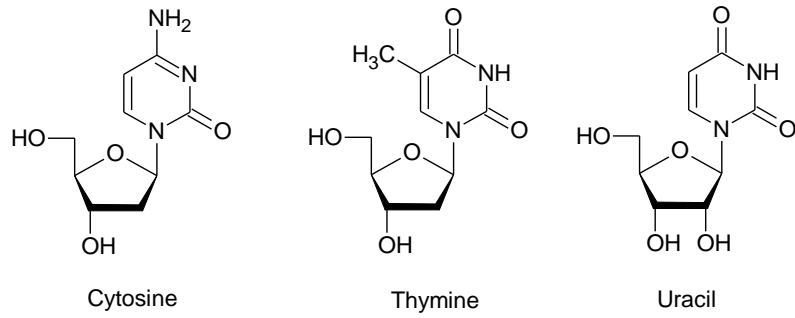
## ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για τη σύνθεση των επιθυμητών πυριμιδοπυριμιδινών απαραίτητο δομικό ενδιάμεσο είναι η διχλωροϋποκατεστημένη πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδίνη **II** (Σχήμα 31). Για τη σύνθεση αυτή είναι απαραίτητη η εκλεκτική αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης έναντι των δύο χλωρίων στις θέσεις 2 και 5, κάτι που είναι εφικτό καθώς είναι γνωστό ότι η αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης στις 2,4-διχλωροπυριμιδίνες γίνεται πρώτα στη θέση 4 και μετά στη θέση 2.<sup>152</sup> Ακολούθως, το χλωρίδιο **II** μπορεί να παραχθεί από την πυριμιδοπυριμιδινοδιόνη **III**, η σύνθεση της οποίας μπορεί να γίνει από το 4-αμινο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιδινο-5-καρβονιτρίλιο **V** μέσω του ενδιάμεσου καρβοξαμιδίου **IV**.



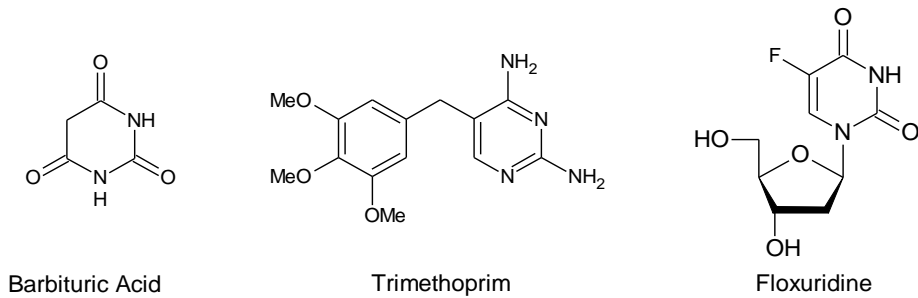
Σχήμα 31: Ρετροσυνθετική πορεία για τη σύνθεση των επιθυμητών πυριμιδοπυριμιδινών **I**.

Η πυριμιδίνη αποτελεί τη σημαντικότερη από τις διαζίνες και μία από τις πιο απαραίτητες χημικές δομές σε οποιαδήποτε μορφή ζωής.<sup>153</sup> Ο συγκεκριμένος ετερόκυκλος αποτελεί το κέντρο έρευνας πολλών μελετών, εφόσον συναντάται σε πολλά βιογενή μόρια, καθώς και σε πληθώρα θεραπευτικών παραγόντων. Ενδεικτικά, ο πυριμιδινικός δακτύλιος αποτελεί βασικό δομικό συστατικό των νουκλεοτιδίων που οικοδομούν το DNA και το RNA (Σχήμα 32)



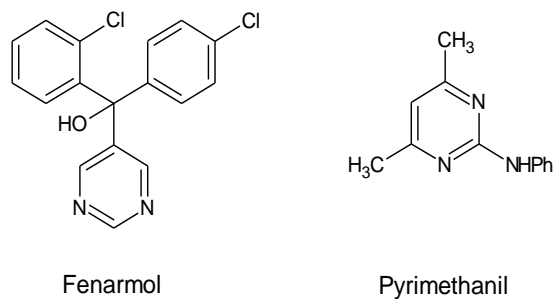
Σχήμα 32: Η κυτοσίνη, η θυμίνη και η ουρακίλη αποτελούν βασικούς δομικούς λίθους του DNA και του RNA.

Επιπλέον, πλήθος φαρμακευτικών μορίων ανεξαρτήτου κατηγορίας και δράσης φέρουν στο εσωτερικό τους τον πυριμιδικό σκελετό (Σχήμα 33).



Σχήμα 33: Η πυριμιδίνη εμπεριέχεται σε πολλά γνωστά φάρμακα, όπως στα βαρβιτουρικά οξέα, στην τριμεθοπρίμη και στην φλοξουριδίνη.

Ακόμη και πολλά από τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως παρουσιάζουν το συγκεκριμένο δακτύλιο στη δομή τους (Σχήμα 34).<sup>154</sup>

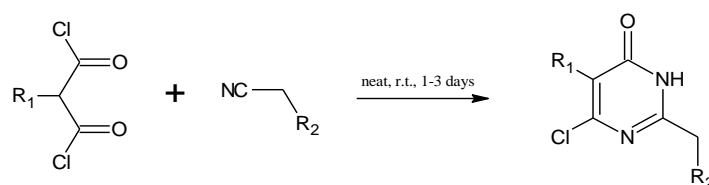


Σχήμα 34: Η φενερμόλη και η πυριμεθανίλη, δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα, φέρουν πυριμιδίνη εντός της δομής τους.

Έχουν αναπτυχθεί πολλές γενικές μέθοδοι παρασκευής πυριμιδικών αναλόγων. Παρακάτω αναφέρονται εν συντομία ορισμένες από αυτές, μέσω των οποίων είναι δυνατή η σύνθεση κατάλληλα υποκατεστημένων πυριμιδινών, για την διεξαγωγή της συνθετικής μας πορείας:

✓ **Αντίδραση χλωριδίων του μηλονικού οξέος με νιτρίλια:**<sup>155</sup>

Αντίδραση μηλονικών χλωριδίων με αλογονο-υποκατεστημένα ακετονιτρίλια οδηγεί στο σχηματισμό 6-χλωρο-2-(αλογονομεθυλο)πυριμιδιν-4(3H)-ονών σε διάφορες αποδόσεις. Σε αυτή τη μέθοδο οι C4, C5 και C6 του πυριμιδικού δακτυλίου προέρχονται από το μηλονικό παράγωγο ενώ το τμήμα N-C-N προέρχεται από το νιτρίλιο (Σχήμα 35).

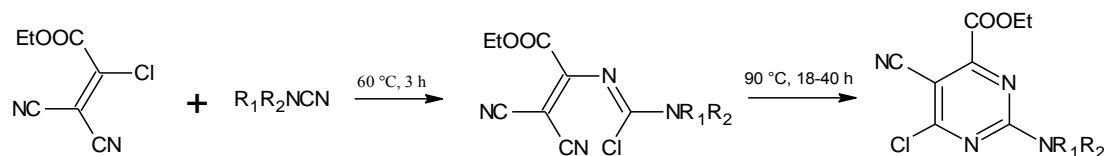


R<sub>1</sub>: H, Cl; R<sub>2</sub>: F, Cl, Br

Σχήμα 35: Σύνθεση 6-χλωρο-2-(αλογονομεθυλο)πυριμιδιν-4(3H)-ονών.

✓ **Αντίδραση 3-χλωροακρυλονιτρίλιων με νιτρίλια:**<sup>156</sup>

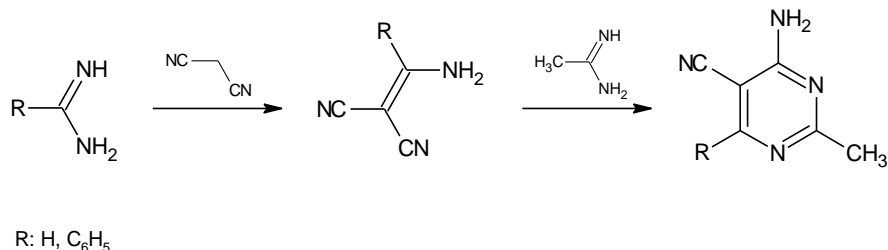
Τα νιτρίλια μπορούν να δράσουν και ως δέκτες αλλά και ως δότες ηλεκτρονίων. Σε αυτή τους την ιδιαιτερότητα στηρίζεται και η αντίδραση μεταξύ του 2-χλωρο-3,3-δικυανοακρυλικού αιθυλεστέρα με διακυκλοκυναμίδια προς παρασκευή τετραϋποκατεστημένων πυριμιδινών μέσω του ενδιάμεσου αζαδιενίου (Σχήμα 36).



Σχήμα 36: Σύνθεση αιθυλεστέρων του 6-χλωρο-5-κυανο-2-(διακυλαμινο)πυριμιδινό-4-καρβοξυλικού οξέος.

✓ **Αντίδραση αμιδινών με μηλονονιτρίλιο:**<sup>157</sup>

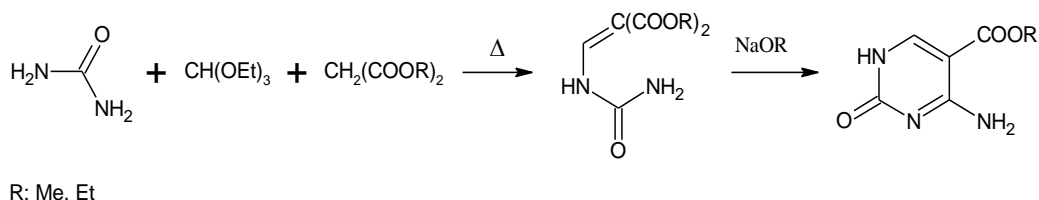
Η συμπύκνωση του μηλονονιτρίλιου με αμιδίνες, όπως η φορμαμιδίνη ή η βενζαμιδίνη και η μετέπειτα αντίδραση του ενδιάμεσου προϊόντος με ακεταμιδίνη μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό υποκατεστημένων πυριμιдино-5-καρβονιτριλίων (Σχήμα 37).



Σχήμα 37: Σύνθεση 2-μεθυλο-4-αμινοπυριμιдино-5-καρβονιτριλίων.

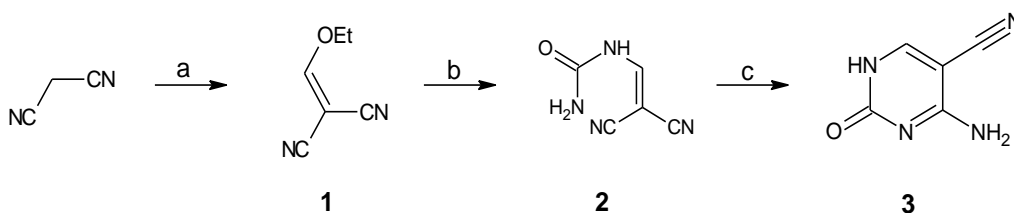
✓ **Αντίδραση ουρίας με εστέρες του μηλονικού οξέος:**<sup>158</sup>

Η ουρία αντιδρά με μηλονικούς εστέρες, παρουσία ορθοφορμικού τριαιθυλεστέρα, προς παρασκευή ενός ενδιάμεσου μορίου, το οποίο με επίδραση αλκοξυνατρίου οδηγεί στο σχηματισμό πυριμιдино-5-καρβοξυλικών εστέρων (Σχήμα 38).



Σχήμα 38: Σύνθεση εστέρων του 4-αμινο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιдино-5-καρβοξυλικού οξέος.

Από τους παραπάνω τρόπους μετά από διάφορες δοκιμές επιλέχθηκε μία παραλλαγή της τελευταίας μεθόδου. Στη θέση του μηλονικού εστέρα χρησιμοποιήθηκε το μηλονονιτρίλιο, καθώς έτσι λαμβάνεται ευκολότερα το επιθυμητό πυριμιδινικό ανάλογο **3** (Σχήμα 39). Αρχικά λοιπόν με επίδραση ορθοφορμικού τριαιθυλεστέρα επί του μηλονονιτρίλιου, παρουσία οξικού ανυδρίτη, παρασκευάζεται το παράγωγο **1** το οποίο καθαρίζεται με απόσταξη υπό κενό.<sup>159</sup> Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το δινιτρίλιο **1** είναι εμπορικά διαθέσιμο, όμως η παρασκευή και η απομόνωσή του είναι ιδιαίτερα απλή ακόμα και σε ποσότητες δεκάδων γραμμαρίων.

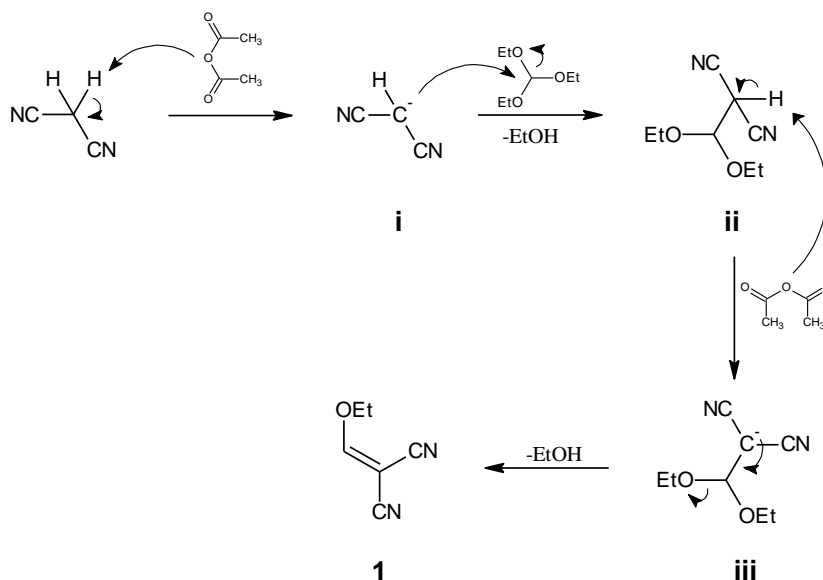


a)  $\text{CH}(\text{OEt})_3$ ,  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , βρασμός, 4 h. b)  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , βρασμός, 4 h. c)  $\text{MeONa}$ ,  $\Delta$ , 30 min.

Σχήμα 39: Συνθετική πορεία του 4-αμινο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου (**3**).

Ακολουθώς, με επίδραση ουρίας επί του παραγώγου **1** λαμβάνεται το ενδιάμεσο μηλονικό παράγωγο **2**, από το οποίο με επίδραση μεθοξυνατρίου και μετά από ενδομοριακή κύκλωση παρασκευάζεται η επιθυμητή πυριμιδίνη **3** (Σχήμα 39).

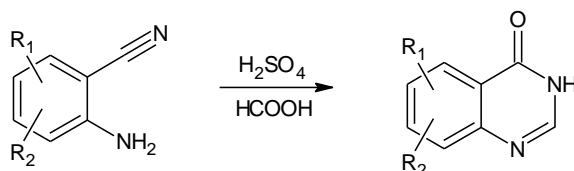
Κατά την αντίδραση αυτή, αρχικά με επίδραση οξικού ανυδρίτη επί του μηλονονιτριλίου σχηματίζεται το αντίστοιχο ανιόν **i**, το οποίο επιδρά επί του ορθοφορμικού τριαιθυλεστέρα προς σχηματισμό του ενδιάμεσου δινιτριλίου **ii** (Σχήμα 40). Ακολουθώς με επίδραση ενός δεύτερου μορίου οξικού ανυδρίτη σχηματίζεται το ενδιάμεσο ανιόν **iii**, από το οποίο με απόσπαση αιθανόλης λαμβάνεται το αιθοξυμεθυλενομηλονονιτρίλιο (**1**).



Σχήμα 40: Σύνθεση του αιθοξυμεθυλενομηλονονιτριλίου (**1**).

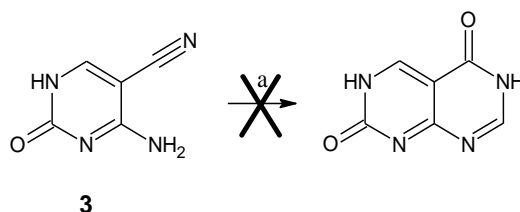
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την σύνθεση του σκελετού της πυριμιδοπυριμιδινοδίωνης **III** (Σχήμα 31), η οποία αρχικά επιχειρήθηκε να γίνει μετά από υδρόλυση του νιτριλίου **3** προς το αντίστοιχο πρωτοταγές αμίδιο και κύκλωση αυτού παρουσία μυρμηκικού οξέος. Δυστυχώς όμως η υδρόλυση του

παραγώγου **3** δεν κατέστη δυνατή ακόμα και σε ισχυρά όξινες συνθήκες καθώς παρελήφθη πολύπλοκο μίγμα προϊόντων. Εναλλακτικά στη βιβλιογραφία περιγράφεται η σύνθεση αρυλοϋποκατεστημένων κιναζολιν-4(1*H*)-ονών, σε ένα στάδιο, από το κατάλληλο ανθρανιλονιτρίλιο με επίδραση μυρμηκικού οξέος παρουσία θεικού οξέος (Σχήμα 41).<sup>160</sup> Κατά την αντίδραση αυτή, το θεικό οξύ λειτουργεί ως διαλύτης αλλά και ως καταλύτης πρωτονιώνοντας το άζωτο του νιτριλίου, ενισχύοντας έτσι την ηλεκτρονιοφιλία του γειτονικού άνθρακα.



Σχήμα 41: Σύνθεση αρυλοϋποκατεστημένων κιναζολιν-4(1*H*)-ονών από τα κατάλληλα ανθρανιλονιτρίλια.

Η αντίδραση επιχειρήθηκε σε διάφορες συνθήκες (θερμοκρασία, συγκέντρωση οξέων) καθώς και με τη χρήση μικροκυμάτων χωρίς όμως αποτέλεσμα, πιθανώς λόγω της πρωτονίωσης των πυριμιδινικών αζώτων στις ισχυρά όξινες συνθήκες της αντίδρασης και επομένως της μείωσης της πυρηνοφιλίας της αμινομάδας (Σχήμα 42).



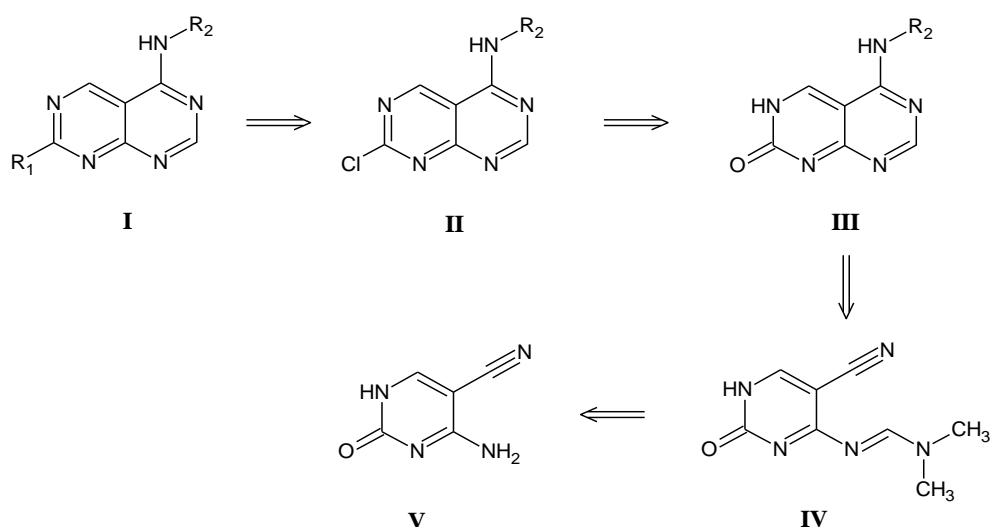
a) HCOOH (88%), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%), 110 °C, 1.5 h.

Σχήμα 42: Η κύκλωση απέτυχε σε όξινες συνθήκες.

Θεωρώντας ότι το βασικό πρόβλημα αυτής της συνθετικής πορείας είναι οι ιδιαίτερα όξινες συνθήκες που απαιτούνται είτε για την υδρόλυση του νιτριλίου προς το πρωτοταγές αμίδιο είτε για την απευθείας κύκλωση αυτού προς το δακτύλιο της πυριμιδοπυριμιδίνης, αποφασίστηκε η τροποποίηση της συνθετικής πορείας κι επιχειρήθηκε η κύκλωση με εφαρμογή ηπιότερων συνθηκών και χρήση ουδέτερων ή βασικών αντιδραστηρίων.

Είναι γνωστό ότι η σύνθεση 4-αμινοϋποκατεστημένων κινολινών μπορεί να γίνει με επίδραση διμεθυλακετάλης του *N,N*-διμεθυλφορμαμιδίου (DMF-DMA) επί των κατάλληλων ανθρανιλονιτριλίων μέσω ενός φορμαμιδικού ενδιάμεσου.<sup>161</sup> Οι

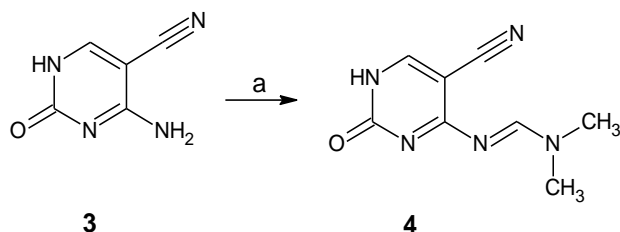
συνθήκες της αντίδρασης αυτής είναι ιδιαίτερα ήπιες, ενώ για την επιτυχία αυτής είναι απαραίτητο η αμινομάδα να χαρακτηρίζεται από ισχυρή πυρηνοφιλία. Με βάση τη συγκεκριμένη αντίδραση απαραίτητο δομικό ενδιάμεσο για τη σύνθεση των επιθυμητών αμινοϋποκατεστημένων πυριμιδοπυριμιδινών **I** είναι το παράγωγο **IV**, από το οποίο με επίδραση της κατάλληλα υποκατεστημένης ανιλίνης λαμβάνεται η πυριμιδοπυριμιδίνη **III** (Σχήμα 43). Ακολούθως, μετά από χλωρίωση και αρωματική πυρηνόφιλη υποκατάσταση επί του ενδιάμεσου χλωριδίου **II** λαμβάνονται οι επιθυμητές πυριμιδοπυριμίνες **I**.



Σχήμα 43: Δεύτερη ρετροσυνθετική πορεία για τη σύνθεση των πυριμιδοπυριμιδινών **I**.

Όπως είναι προφανές με τη νέα πορεία αποφεύγεται οποιοδήποτε ζήτημα εκλεκτικότητας για την υποκατάσταση στις θέσεις 2 και 5, καθώς δεν χρησιμοποιείται πλέον το διχλωρίδιο **II** της παλαιότερης συνθετικής οδού (Σχήμα 31).

Έτσι λοιπόν, με επίδραση DMF-DMA επί του πυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου **3** εντός τολουολίου σε θερμοκρασία βρασμού λαμβάνεται το φορμαμίδιο **4** (Σχήμα 44).

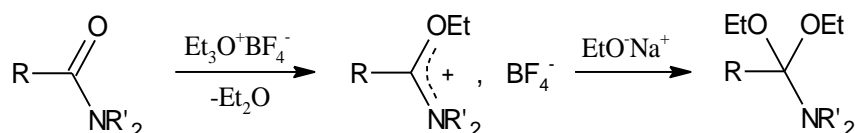


a) DMF-DMA, βρασμός, 1 h.

Σχήμα 44: Η φορμυλίωση του 4-αμινο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου (**3**) προς το αντίστοιχο διμεθυλιμιδοφορμαμίδιο **4**.

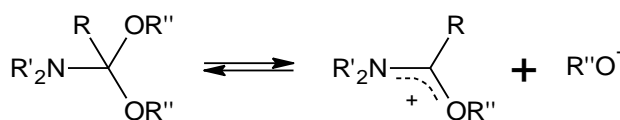


Το DMF-DMA ανήκει στην κατηγορία των αμιδινικών ακεταλών. Τα μόρια αυτά προέρχονται από τα αντίστοιχα αμίδια, ύστερα από επίδραση ακυλιωτικών ή ακυλιωτικών παραγόντων, όπως το τριαιθυλοξάνιο του τετραφθοροβορικού οξέος και μετέπειτα κατεργασία του συμπλόκου που δημιουργείται με αλκοξείδια αλκαλικών μετάλλων (Σχήμα 45).<sup>162</sup>



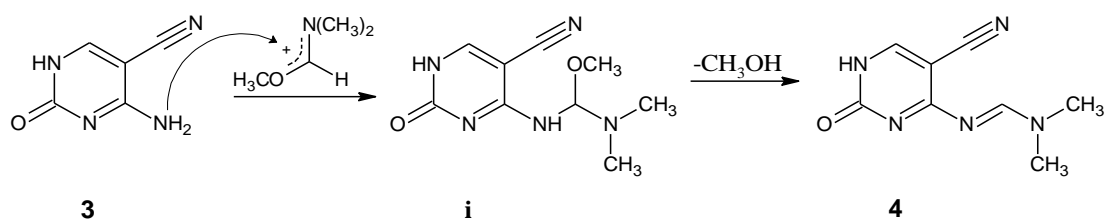
Σχήμα 45: Γενική μέθοδος παρασκευής των αμιδινικών ακεταλών.

Παρουσιάζουν εξαιρετική δραστηριότητα συγκριτικά με τα αμίδια από τα οποία σχηματίζονται, για αυτό και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην οργανική χημεία, όπως σε αντιδράσεις μετατροπής λειτουργικών ομάδων καθώς επίσης χρησιμοποιούνται κι ως σύνθονα (synthons) ατόμων άνθρακα στην κατασκευή ανθρακικών σκελετών.<sup>163,164</sup> Η αυξημένη δραστηριότητα που παρουσιάζουν αυτές οι ενώσεις οφείλεται στο γεγονός πως όταν διαλύονται, δίστανται σε ένα ανιόν αλκοξειδίου και ένα αμινικό κατιόν, επιδεκτικό σε πυρηνόφιλες προσβολές (Σχήμα 46).<sup>165</sup>



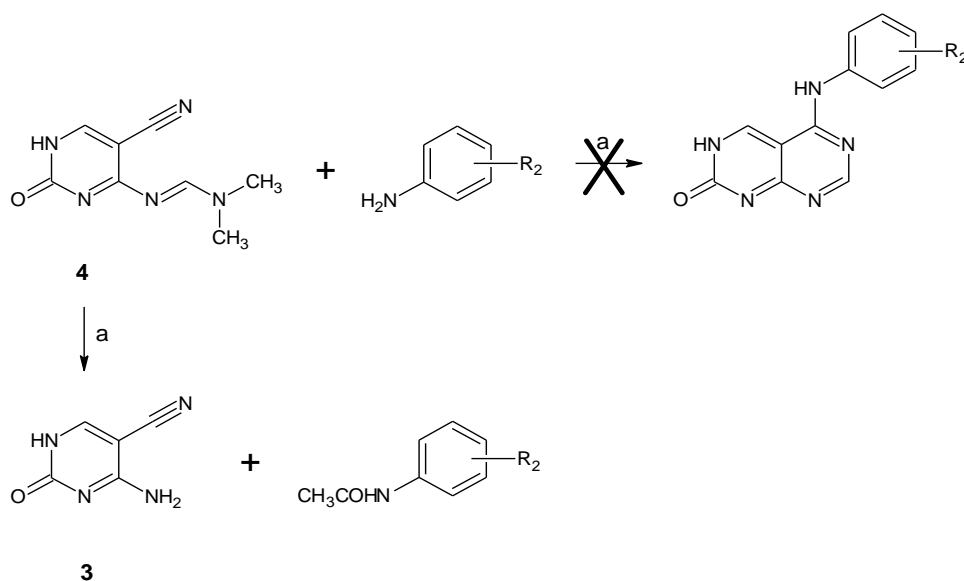
Σχήμα 46: Η διάσταση των αμιδινικών ακεταλών σε αμινικό κατιόν κι ανιόν αλκοξειδίου.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης του παραγώγου **3** με το DMF-DMA παρουσιάζεται στο Σχήμα 47. Αρχικά, με πυρηνόφιλη προσβολή της αμινομάδας στον τριτοταγή άνθρακα του κατιόντος, που σχηματίζεται κατά τη διάσταση του DMF-DMA, λαμβάνεται το ενδιάμεσο **i** από το οποίο με απόσπαση ενός μορίου μεθανόλης λαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο **4**.



Σχήμα 47: Μηχανισμός φορμυλίωσης του 4-αμινο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου (**3**).

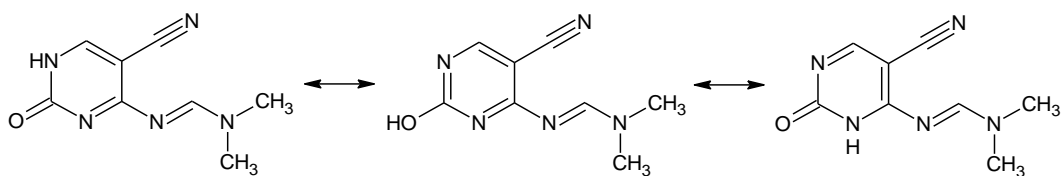
Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την κύκλωση του παραγώγου **4**, με επίδραση της κατάλληλης ανιλίνης προς την επιθυμητή αμινοϋποκατεστημένη πυριμιδοπυριμιδίνη (Σχήμα 43). Η συγκεκριμένη αντίδραση επιχειρήθηκε σύμφωνα με τις συνθήκες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (βρασμός ισομοριακού μίγματος της κατάλληλης ανιλίνης και του παραγώγου **4** σε οξικό οξύ, υπό κλασικές συνθήκες θέρμανσης ή και με τη χρήση μικροκυμάτων), χωρίς όμως αποτέλεσμα (Σχήμα 48). Πρέπει να αναφερθεί ότι ακόμα και μετά από παρατεταμένη θέρμανση, το παράγωγο **4** παρέμενε σταθερό ή υδρολυόταν προς την πρώτη ύλη αυτού, δηλαδή την αμίνη **3**, ενώ ταυτόχρονα σχηματιζόταν το ακετυλιωμένο παράγωγο της εκάστοτε ανιλίνης.



a)  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , βρασμός, 2 h.

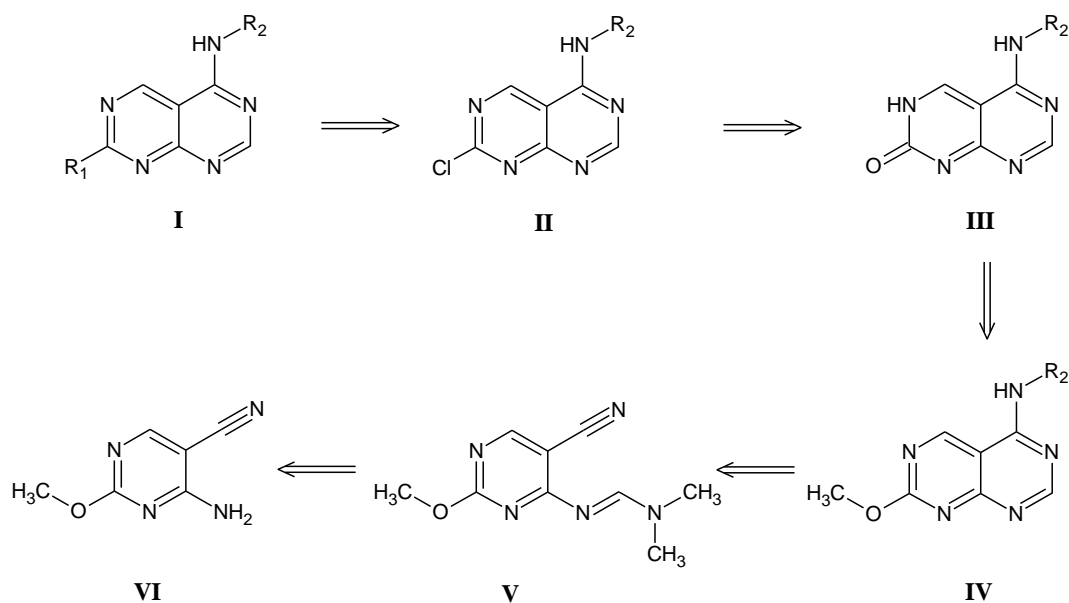
Σχήμα 48: Το φορμαμίδιο **4** δεν οδηγεί στην επιθυμητή πυριμιδοπυριμιδίνη με προσθήκη κατάλληλης ανιλίνης.

Δεδομένης της ευκολίας με την οποία γίνεται η ανωτέρω αντίδραση σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, θεωρήθηκε ότι η δυσκολία της οφείλεται στην ύπαρξη ταυτομέρειας του παραγώγου **4**, η οποία και επηρεάζει τη δραστηριότητα του ιμινικού δεσμού (Σχήμα 49). Εξάλλου, η ανωτέρω αντίδραση έχει ήδη περιγραφεί για μη υποκατεστημένες πυριμιδίνες.<sup>164</sup> Επειδή στο αντίστοιχο μεθοξυ-παραίγωγο η ταυτομέρεια αυτή δεν είναι εφικτή θεωρήθηκε ότι η κύκλωση του θα μπορούσε να γίνει εύκολα.



Σχήμα 49: Τα ταυτομερή του φορμαμιδίου 4.

Η επιλογή της μεθοξυ-ομάδας προφανώς αποκλείει την δυνατότητα ταυτομέρειας στο παράγωγο **V** όμως προϋποθέτει την αποπροστασία προς το παράγωγο **III** και τη μετατροπή αυτού στο αντίστοιχο χλωρίδιο **II** ώστε να παρασκευαστούν οι επιθυμητές δυσποκαταστημένες πυριμιδοπυριμιδίνες **I** (Σχήμα 50). Η πορεία αυτή εκτός του ότι αποτελείται από πολλά βήματα προϋποθέτει τη μη ύπαρξη ευαίσθητων ομάδων κατά την αντίδραση απομεθυλίωσης.

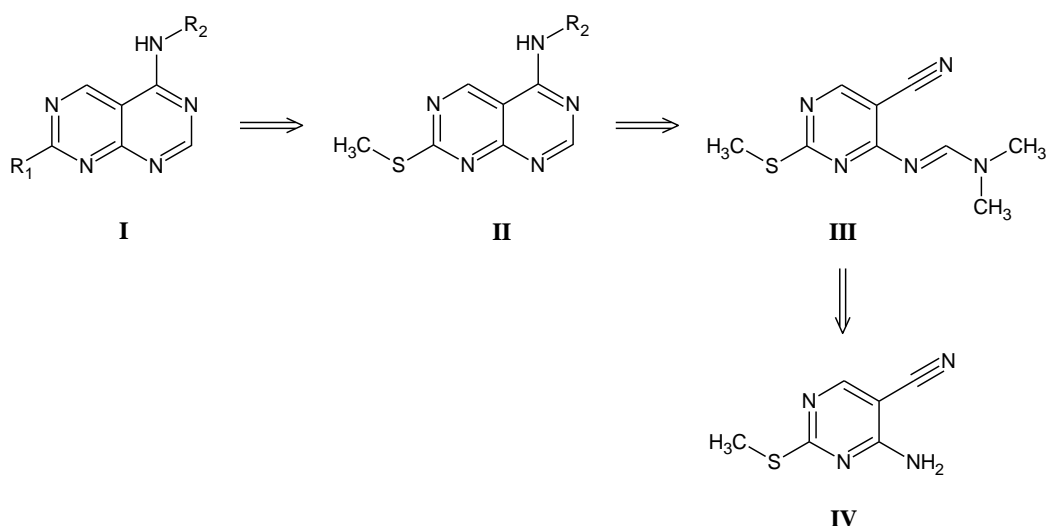


Σχήμα 50: Πετροσυνθετική πορεία για τη σύνθεση των επιθυμητών πυριμιδοπυριμιδινών **I** με χρήση του μεθόξυ παραγώγου **VI**.

Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι η θειομέθυλο ομάδα είναι πολύ πιο χρηστική καθώς αποκλείει την δυνατότητα ταυτομέρειας ενώ ταυτόχρονα μπορεί η ίδια ή η οξειδωμένη της μορφή (σουλφονυλομάδα) να χρησιμοποιηθεί σαν αποχωρούσα ομάδα για την αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης.

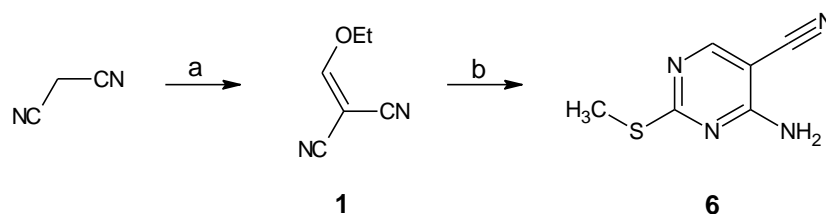
## ΣΥΝΘΕΣΗ 2-(ΘΕΙΟΜΕΘΥΛΟ)ΠΥΡΙΜΙΔΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ

Τα επιθυμητά μόρια **I** μπορούν να προέλθουν μετά από αρωματική πυρηνόφιλη υποκατάσταση στη 2-(θειομεθυλο)πυριμιδοπυριμιδίνη **II** η οποία μπορεί να παραχθεί μετά από ενδομοριακή κύκλωση του ενδιάμεσου **III** παρουσία της κατάλληλης ανιλίνης (Σχήμα 51).



Σχήμα 51: Ρετροσυνθετική πορεία για τη σύνθεση των παραγώγων **I** μέσω των 2-(θειομεθυλο)πυριμιδοπυριμιδινών **II**.

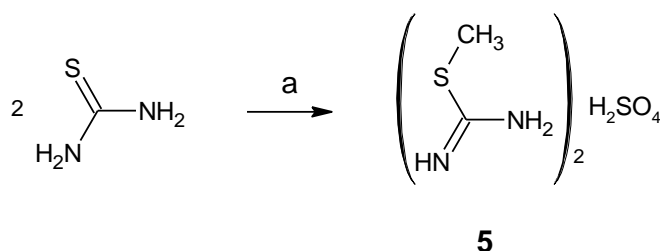
Κατά αναλογία με την πορεία σύνθεσης του παραγώγου **3** (Σχήμα 39), αντίδραση αιθοξυμεθυλενομηλονιτριλίου (**1**) και θεικής 2-μεθυλ-2-θειοψευδοουρίας ή αλλιώς θεικής S-μεθυλουρίας (**5**) παρουσία *N,N*-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνης (Hunig's base) οδηγεί στο επιθυμητό πυριμιδινικό ανάλογο **6** (Σχήμα 52).



a)  $\text{CH}(\text{OEt})_3$ ,  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , βρασμός, 4 h. b) θεική 2-μεθυλο-2-θειοψευδοουρία **5**, *N,N*-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη, 1 h.

Σχήμα 52: Συνθετική πορεία του 4-αμινο-2-(θειομεθυλο)πυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου (**6**).

Η σύνθεση της θεικής 2-μεθυλο-2-θειοψευδοουρίας (**5**) γίνεται μετά από επίδραση του θεικού διμεθυλίου επί της θειουρίας σε υδατικό διάλυμα και σε θερμοκρασία βρασμού (Σχήμα 53).<sup>166</sup>

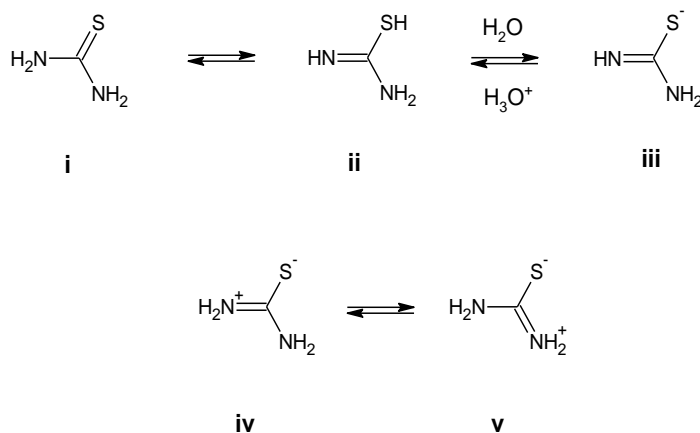


a)  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , βρασμός, 1 h.

Σχήμα 53: Σύνθεση της θεικής 2-μεθυλο-2-θειοψευδοουρίας (**5**).

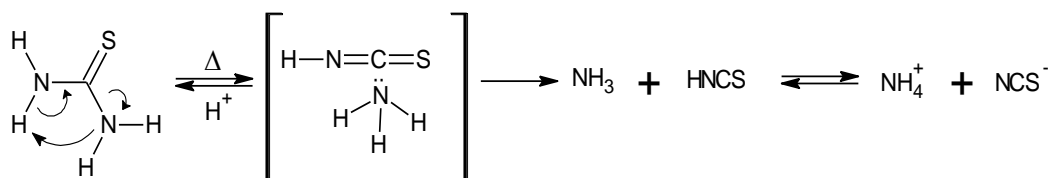
Στην παραπάνω αντίδραση η μεθυλίωση γίνεται αποκλειστικά στο άτομο του θείου κι όχι σε ένα τουλάχιστον από τα δύο ηλεκτραρνητικά άτομα αζώτου που διαθέτει το μόριο της θειουρίας. Υπάρχουν δύο προτεινόμενοι μηχανισμοί που εξηγούν αυτή την εκλεκτική αλκυλίωση (Σχήματα 54 και 55).

Σύμφωνα με τον πρώτο προτεινόμενο μηχανισμό η θειουρία βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ δύο ταυτομερών δομών **i** και **ii** (Σχήμα 54).<sup>167</sup> Στη δομή **ii** και σε υδατικό περιβάλλον σημειώνεται μία ελεύθερη μετακίνηση του πρωτονίου της όξινης σουλφυδρυλομάδας στο μόριο του νερού με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ισορροπίας στην οποία συμμετέχει το ιόν **iii**, το οποίο είναι σταθερό λόγω της ιδιαίτερης ηλεκτραρνητικότητας του θείου. Η ισορροπία, λόγω της ύπαρξης του οξωνίου παρουσία των δύο αζώτων, εναλλακτικά μπορεί να γραφεί σαν ισορροπία μεταξύ των δομών **iv** και **v**. Το αρνητικά φορτισμένο άτομο του θείου, και στις δύο δομές, έχει πλέον αυξημένες πυρηνόφιλες ιδιότητες με αποτέλεσμα κατά την αντίδραση με το θεικό διμεθύλιο να λαμβάνεται αποκλειστικά η μεθυλοθειουρία.



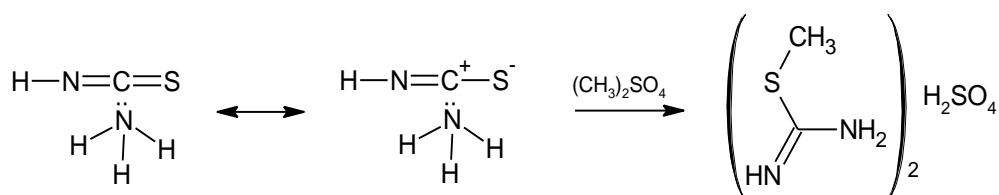
Σχήμα 54: Η εκλεκτική αλκυλίωση στο θείο της θειουρίας μπορεί να οφείλεται στην παραπάνω ισορροπία..

Σύμφωνα με τον δεύτερο προτεινόμενο μηχανισμό, η θειουρία σε όξινο ή ελαφρώς όξινο περιβάλλον και σε υψηλή θερμοκρασία μεταβαίνει σε μία κατάσταση διάστασης, λόγω των ευκίνητων ατόμων υδρογόνου των δύο αζώτων, αποτελούμενη από ένα «ισοθειοκυανικό» κι ένα «αμινικό κομμάτι» (Σχήμα 55).<sup>168</sup>



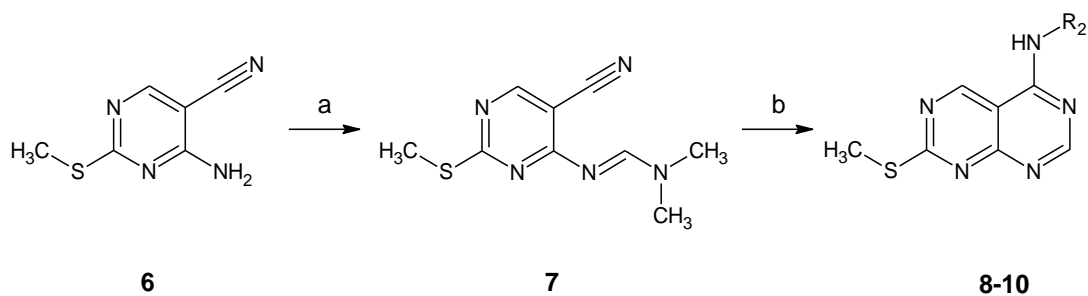
Σχήμα 55: Η θειουρία δίσταται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και (ελαφρώς) όξινο περιβάλλοντος. Διαρκής έκθεση σε αυτές τις συνθήκες οδηγεί σε μη αντιστρεπτή διάσταση.

Διαρκής έκθεση στις συνθήκες αυτές οδηγεί σε μη αντιστρεπτή διάσταση και ολική υδρόλυση της ουρίας, όμως παρουσία του θειϊκού διμεθυλίου το εξαιρετικά δραστικό ισοθειοκυανικό τμήμα της διίσταμένης μορφής αντιδρά με το θειϊκό διμεθύλιο προς σχηματισμό της μεθυλοθειουρίας (Σχήμα 56).



Σχήμα 56: Η μεθυλίωση της θειουρίας σύμφωνα με το δεύτερο μηχανισμό.

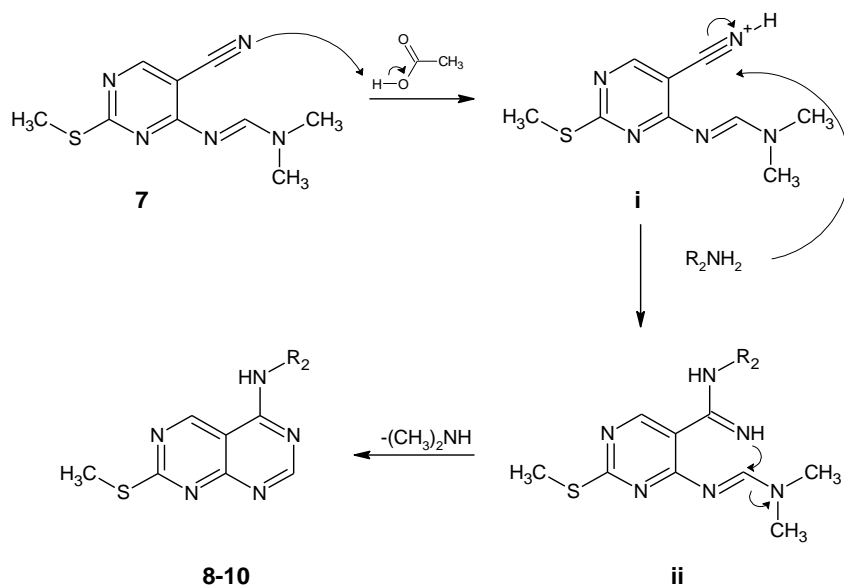
Ακολούθως, με επίδραση DMF-DMA επί του 4-αμινο-2-(θειομεθυλο)πυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου (**6**) λαμβάνεται το παράγωγο **7**, από το οποίο με βρασμό εντός οξικού οξέος παρουσία της κατάλληλης ανιλίνης λαμβάνονται οι επιθυμητές *N*-υποκατεστημένες-2-(θειομεθυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-5-αμίνες (**8-10**) (Σχήμα 57).



a) DMF-DMA, βρασμός, 2.5 h. b) κατάλληλη ανιλίνη, CH<sub>3</sub>COOH, μικροκύμματα, 118 °C, 5 min.

Σχήμα 57: Παρασκευή των *N*-υποκατεστημένων-2-(θειομεθυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-5-αμινών (**8-10**).

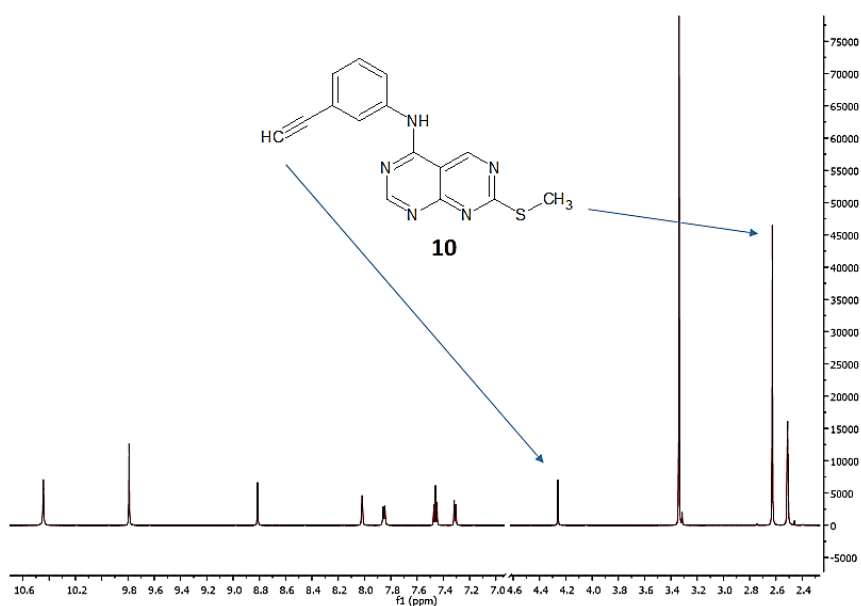
Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί για την κύκλωση του παραγώγου **7** προς τις πυριμιδινόπυριμιδίνες **8-10**.<sup>161,164</sup> Σε όλους τους προτεινόμενους μηχανισμούς, σημείο κλειδί για την ολοκλήρωση της αντίδρασης αποτελεί η πρωτονίωση του νιτριλίου από το οξικό οξύ (Σχήμα 58). Στη συνέχεια, μετά από πυρηνόφιλη προσβολή του κατιόντος **i** από την ανιλίνη σχηματίζεται η ενδιάμεση ιμιδίνη **ii**, από την οποία μέσω ενδομοριακής κύκλωσης λαμβάνονται οι επιθυμητές πυριμιδινόπυριμιδίνες **8-10**.



Σχήμα 58: Μηχανισμός της σύνθεσης των *N*-υποκατεστημένων-2-(θειομεθυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-5-αμινών (**8-10**).

Στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR της *N*-(3-αιθυλοφαινυλο)-7-(θειομεθυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-4-αμίνης (**10**) διακρίνονται δύο απλές κορυφές στα 4.25 ppm και στα

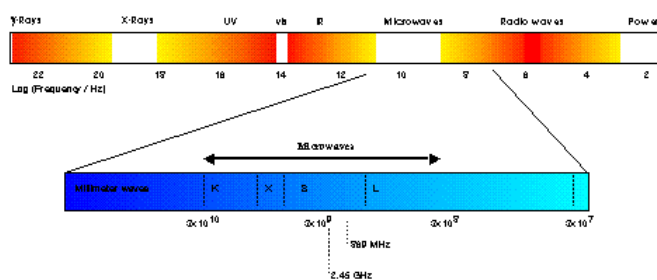
2.63 ppm που αντιστοιχούν στην αιθυνυλομάδα και στη θειομέθυλο ομάδα (Σχήμα 59).



Σχήμα 59: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του παραγώγου **10** ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Πρέπει να τονιστεί ότι η αντίδραση πραγματοποιείται με τη χρήση μικροκυμάτων μέσα σε 5 μόνο λεπτά. Από την ευκολία με την οποία γίνεται η αντίδραση στα θειομέθυλο παράγωγα συμπεραίνεται ότι η ύπαρξη ταυτομέρειας στο κέτο παράγωγο **4** ήταν πράγματι ο ανασταλτικός παράγοντας για την κύκλωση αυτού προς την επιθυμητή πυριμιδοπυριμιδίνη (Σχήμα 48).

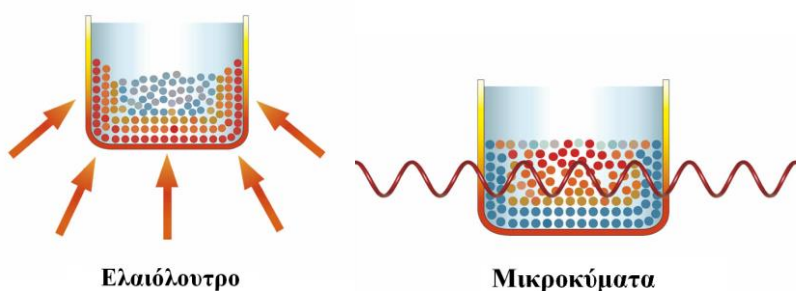
Η χρήση μικροκυμάτων στην οργανική χημεία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1986.<sup>169,170</sup> Τα μικροκύματα αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με συχνότητες μεταξύ 0.3-300 GHz (Σχήμα 60), ωστόσο στον τομέα της οργανικής σύνθεσης επιτρέπεται η χρήση μόνο της ακτινοβολίας με συχνότητα περί τα 2.450 (+/- 0.050) GHz καθώς στα επίπεδα αυτά αποφεύγεται η αλληλεπίδραση με τα μικροκύματα που χρησιμοποιούνται στις τηλεπικοινωνίες.



Σχήμα 60: Περιοχή συχνότητας των μικροκυμάτων.



Η θέρμανση που προκαλείται από τη μικροκυματική ακτινοβολία οφείλεται κυρίως σε δύο μηχανισμούς, τη διπολική πόλωση και την ιοντική μεταγωγή. Κατά την ακτινοβολία ενός μίγματος με συχνότητες μικροκυμάτων εφαρμόζεται ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο στο οποίο ευθυγραμμίζονται τα δίπολα ή τα ιόντα που περιέχει το μίγμα αυτό. Καθώς λοιπόν το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο ταλαντεύεται, ταλαντεύεται ταυτόχρονα και το εκάστοτε διπολικό ή ιοντικό πεδίο με αποτέλεσμα την απώλεια ενέργειας σε μορφή θερμότητας, η οποία οφείλεται στις μοριακές τριβές και τις διηλεκτρικές απώλειες. Για αυτόν ακριβώς το λόγο η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη επηρεάζει κατά πολύ την επίδραση των μικροκυμάτων στο μίγμα. Η επίδραση της μικροκυματικής ακτινοβολίας στις αντιδράσεις βασίζεται τόσο σε θερμικά όσο και σε μη θερμικά φαινόμενα. Τα μεν πρώτα περιλαμβάνουν το ρυθμό θέρμανσης, την υπερθέρμανση, τις θερμοπηγές και την εκλεκτική απορρόφηση της ακτινοβολίας από πολικές ενώσεις. Τα δε δεύτερα προέρχονται από το πεδίο δημιουργίας υψηλής πολικότητας και αφορούν την κινητικότητα και διάχυση, που μπορούν να αυξήσουν τις πιθανότητες αποτελεσματικών επαφών. Λόγω των παραπάνω στοιχείων η χρήση μικροκυματικού αντιδραστήρα παρουσιάζει πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις κλασσικές μεθόδους θέρμανσης, όπως το ελαιόλουτρο (Σχήμα 61). Ενδεικτικά, η θέρμανση που βασίζεται στην εκπομπή μικροκυμάτων χαρακτηρίζεται από ομοιομορφία σε όλο τον όγκο του μίγματος γεγονός που συνεπάγεται σε ταχύτερη αντίδραση. Επιπλέον, η εφαρμογή μικροκυμάτων συμπεριλαμβάνει και χρήση μικρότερων ποσών ενέργειας και διαλύτη («πράσινη χημεία»), απαίτηση ηπιότερων συνθηκών αντίδρασης και σε πολλές περιπτώσεις αυξημένη απόδοση και καθαρότητα των προϊόντων.



Σχήμα 61: Ο τρόπος θέρμανσης με χρήση μικροκυμάτων παρουσιάζει πολλές διαφορές από εκείνον που στηρίζεται στη χρήση ελαιόλουτρου.

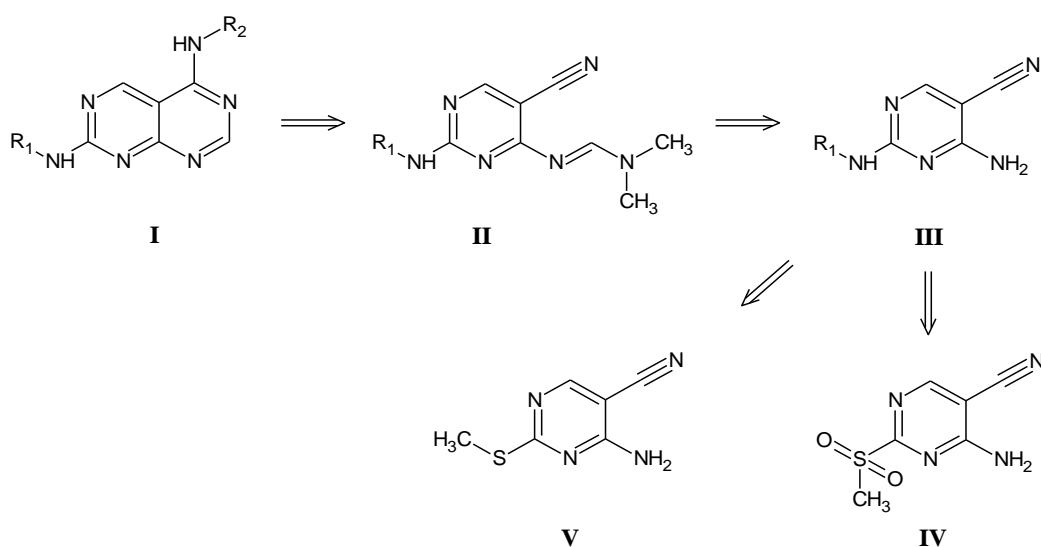
## ΣΥΝΘΕΣΗ 2,5 ΑΜΙΝΟΎΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΥΡΙΜΙΔΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την αντίδραση της αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης επί των (θειομεθυλο)πυριμιδοπυριμιδινών **8-10** με τις κατάλληλα υποκατεστημένες αμίνες για την παραλαβή των τελικών δισυποκατεστημένων πυριμιδοπυριμιδινών. Η συγκεκριμένη αντίδραση επιχειρήθηκε σε διάφορες συνθήκες (αναλογία αντιδραστηρίων, διαλύτες), υπό κλασσικές συνθήκες θέρμανσης καθώς και με τη χρήση μικροκυμάτων χωρίς όμως αποτέλεσμα.

Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι οι επιθυμητές πυριμιδοπυριμιδίνες θα μπορούσαν να παρασκευασθούν με αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης επί του μεθυλοσουλφονυλο-υποκατεστημένου παραγώγου καθώς είναι γνωστό ότι η μεθυλοσουλφονυλομάδα, δηλαδή η οξειδωμένη μορφή της θειομεθυλομάδας είναι πολύ καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από τη θειομεθυλο.

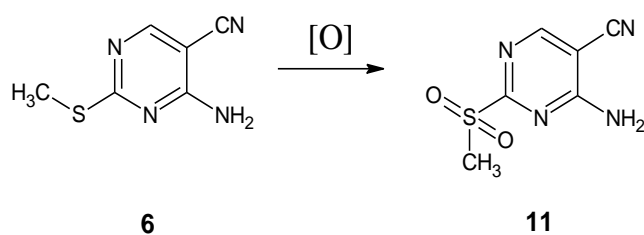
Η οξείδωση των σουλφιδίων προς σουλφοξείδια ή/και περαιτέρω σε σουλφόνες μπορεί να γίνει με χρήση διαφόρων αντιδραστηρίων, είτε οργανικών, όπως το μ-χλωρούπερβενζοϊκό οξύ, είτε ανόργανων, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υπερμαγγανικό κάλιο, το αντιδραστήριο Jones, ακόμα και το O<sub>2</sub>. Η παραπάνω οξείδωση επιχειρήθηκε με τρία διαφορετικά αντιδραστήρια, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το μ-χλωρούπερβενζοϊκό οξύ και το Oxone® αλλά καμία αντίδραση δεν έδωσε το επιθυμητό προϊόν.

Για αυτό το λόγο θεωρήθηκε ότι η προσθήκη του 2-αμινικού υποκαταστάτη θα πρέπει να προηγηθεί της κύκλωσης προς τον σκελετό της πυριμιδοπυριμιδίνης. Έτσι λοιπόν οι επιθυμητές πυριμιδοπυριμιδινοδιαμίνες **I** μπορούν να προέλθουν από την υποκατεστημένη πυριμιδίνη **III** η σύνθεση της οποίας μπορεί να γίνει με αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης επί της (θειομεθυλο)πυριμιδίνης **V** είτε επί της οξειδωμένης μορφής της **IV** (Σχήμα 62).



Σχήμα 62: Ρετροσυνθετική πορεία για την παρασκευή των πυριμιδοπυριμιδινών **I** μέσω της 2-υποκατεστημένης-πυριμιδίνης **III**.

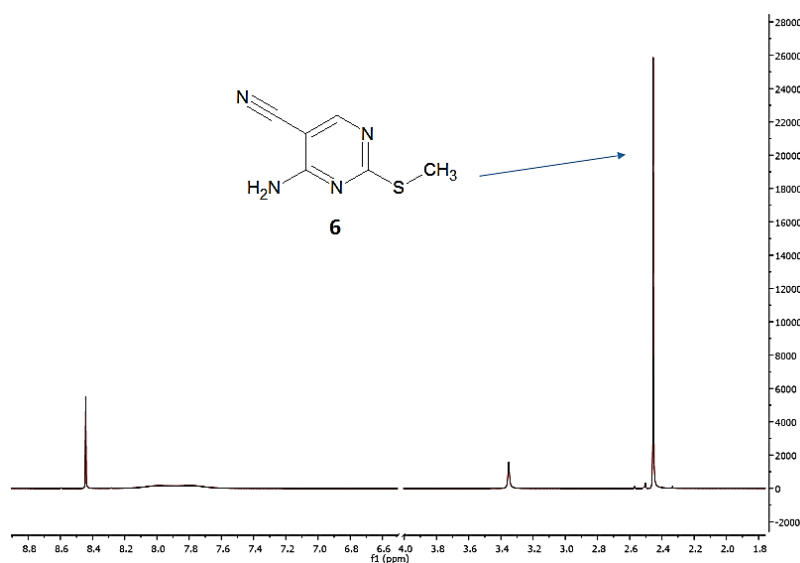
Αρχικά λοιπόν, η αντίδραση επιχειρήθηκε με επίδραση της κατάλληλα υποκατεστημένης αμίνης επί της θειομεθυλοπυριμιδίνης **6** χωρίς όμως αποτέλεσμα, προφανώς λόγω της απενεργοποίησης του πυρήνα λόγω της ύπαρξης της 4-αμινομάδας. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε ότι η αντίδραση θα μπορούσε να επιτευχθεί στην οξειδωμένη μορφή της θειομεθυλοπυριμιδίνης **6**. Η οξείδωση αυτή επιχειρήθηκε με χρήση μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος καθώς και με χρήση Oxone® και παρελήφθη σε καλές απόδοσεις (της τάξεως του 50%) το επιθυμητό οξειδωμένο παράγωγο **11** (Σχήμα 63).



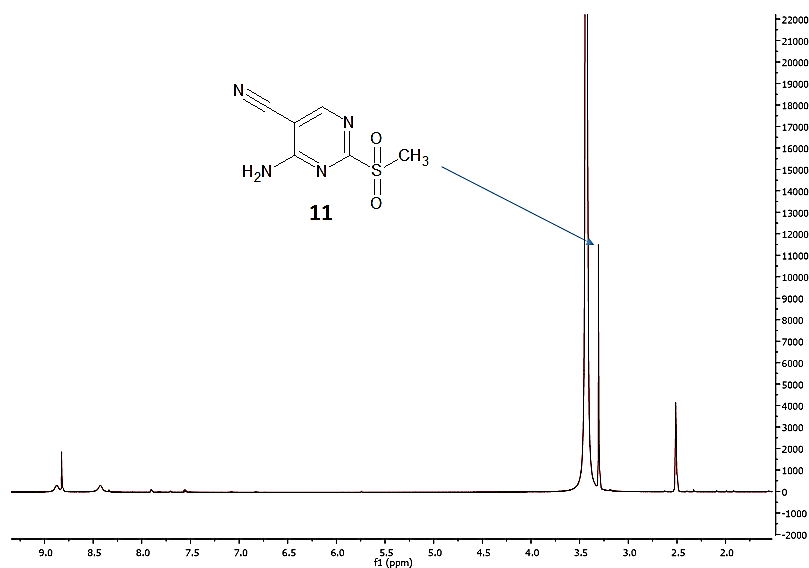
Σχήμα 63: Η οξείδωση της (θειομεθυλο)πυριδίνης **6** προς το αντίστοιχο (μεθυλοσουλφονυλο)παράγωγο **11** έγινε με χρήση μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος και με χρήση Oxone®.

Η ταυτοποίηση του προϊόντος της αντίδρασης έγινε με την βοήθεια φασματοσκοπίας NMR και φασματομετρίας μάζας.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρείται η χαρακτηριστική μετατόπιση της πλευρικής μεθυλομάδας από τα 2.45 ppm του παραγωγού **6** (Σχήμα 64) στα 3.30 ppm του παραγωγού **11** (Σχήμα 65). Αυτή η διαφορά οφείλεται σαφώς στην οξείδωση του γειτονικού ατόμου του θείου.

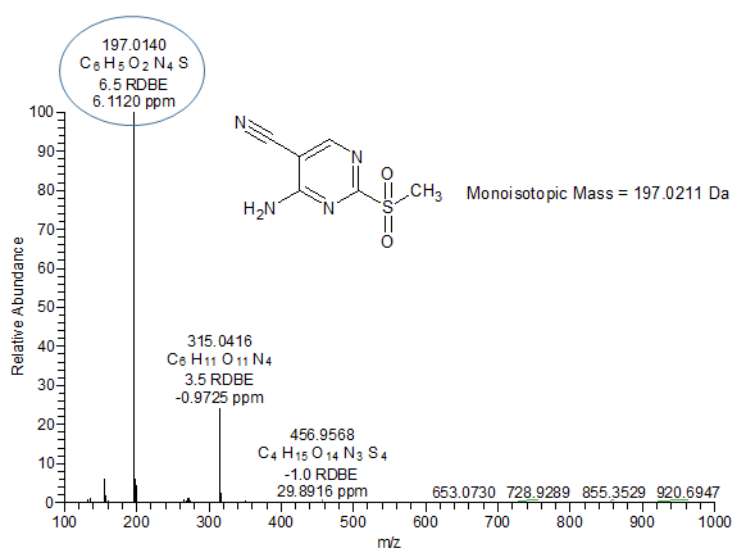


Σχήμα 64: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του 4-αμινο-2-(θειομεθυλο)πυριμιδινό-5-καρβονιτριλίου (**6**) ( $\text{DMSO-d}_6$ ).



Σχήμα 65: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του 4-αμινο-2-(μεθυλοσουλφονυλο)πυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου (**11**) ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

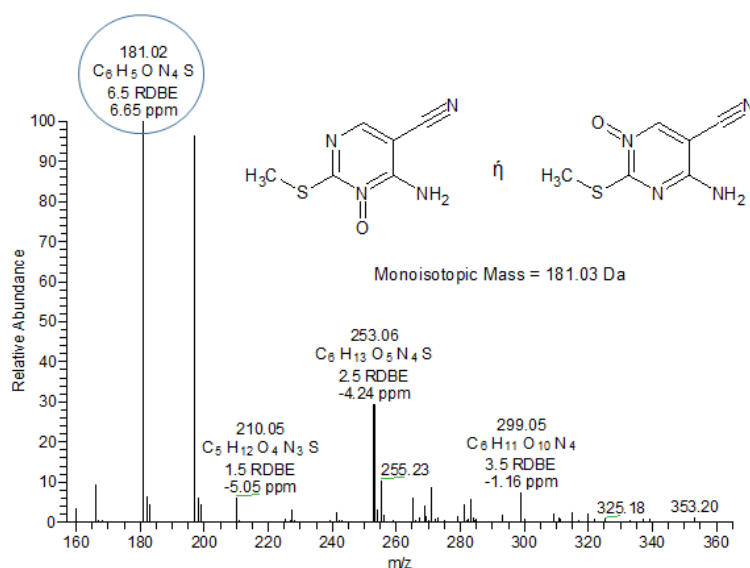
Η πλήρης απόδειξη της δομής έγινε με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας (Σχήμα 66). Στο φάσμα μάζας είναι εμφανής η ύπαρξη μοριακού ιόντος στα 197.0140 Da το οποίο αποδεικνύει ότι πρόκειται για την διοξειδωμένη μορφή της θειομεθυλομάδας και όχι για την μονοοξειδωμένη μορφή.



Σχήμα 66: Φάσμα μάζας για το προϊόν της οξείδωσης.

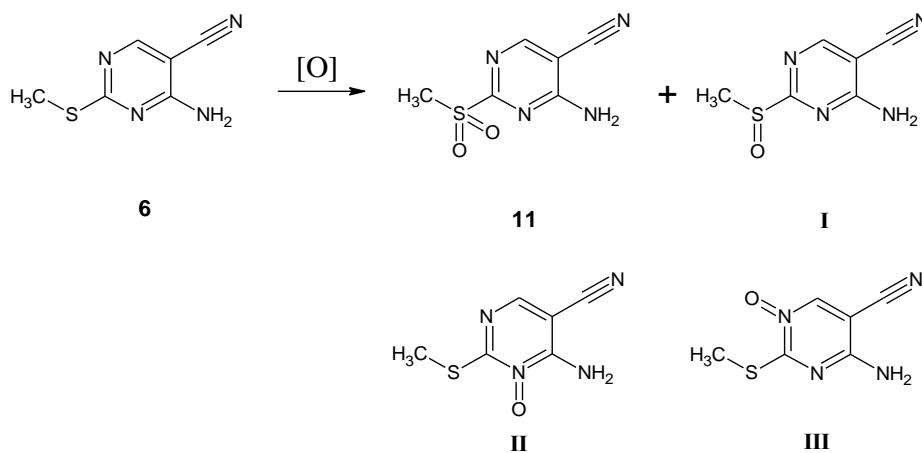
Από τους δύο τρόπους οξείδωσης, μετά από δοκιμές σε διάφορες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, θερμοκρασιών και διαλυτών, επιλέχθηκε η οξείδωση με τη χρήση μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος λόγω της μεγαλύτερης επαναληψιμότητας, των ελαφριά καλύτερων αποδόσεων και της ευκολότερης κατεργασίας.

Ακολουθως, με επίδραση των κατάλληλα υποκατεστημένων αμιμών επί της πυριμιδίνης **11** παρελήφθησαν οι αμινοϋποκατεστημένες πυριμιδίνες **12-16**. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την οξείδωση της πυριμιδίνης **6** προς την σουλφόνη **11** με την βοήθεια μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος, εκτός του επιθυμητού προϊόντος **11** παρελήφθη και ένα δεύτερο προϊόν. Στο φάσμα μάζας του προϊόντος αυτού το μοριακό ιόν είναι 181.02 Da, περίπου 16 μονάδες μικρότερο από αυτό του προϊόντος **11** (Σχήμα 67).



Σχήμα 67: Φάσμα μάζας για το παραπροϊόν της οξείδωσης.

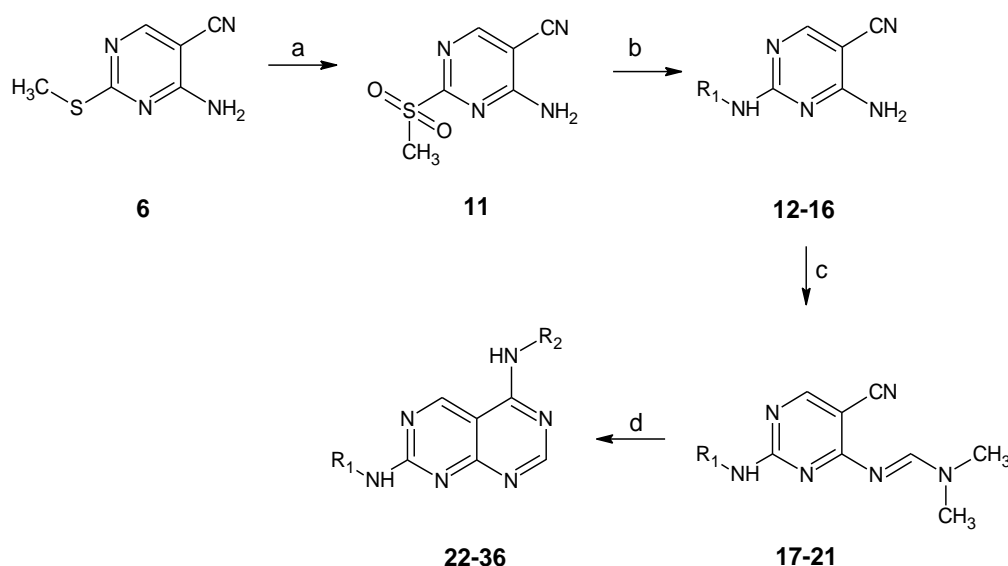
Γνωρίζοντας από τη βιβλιογραφία ότι η οξείδωση της θειομεθυλομάδας, με την βοήθεια του μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος, γίνεται σε δύο στάδια μέσω της μονοξειδωμένης μορφής θεωρήθηκε ότι πρόκειται για το μονοοξειδωμένο παράγωγο **I** (Σχήμα 68).<sup>171</sup>



Σχήμα 68: Πιθανά παραπροϊόντα της οξείδωσης με μ-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ.

Στο παράγωγο αυτό θεωρητικά θα μπορούσε να γίνει αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης και να παραληφθούν τα ίδια προϊόντα με αυτά κατά την αντίδραση με την πυριμιδίνη **11**. Πράγματι, μετά από επίδραση αμίνης επί του παραγώγου αυτού, παρελήφθη με ιδιαίτερη ευκολία προϊόν, το οποίο όμως ήταν διαφορετικό από αυτό κατά την αντίδραση της αμίνης με την πυριμιδίνη **11**. Δεδομένης της ευκολίας με την οποία έγινε η ανωτέρω αντίδραση και γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία ότι είναι εφικτή η οξείδωση στο άζωτο του σκελετού της πυριμιδίνης, θεωρήθηκε ότι το προϊόν αυτό είναι κάποιο από τα N οξειδία **II** και **III**.<sup>172,173</sup>

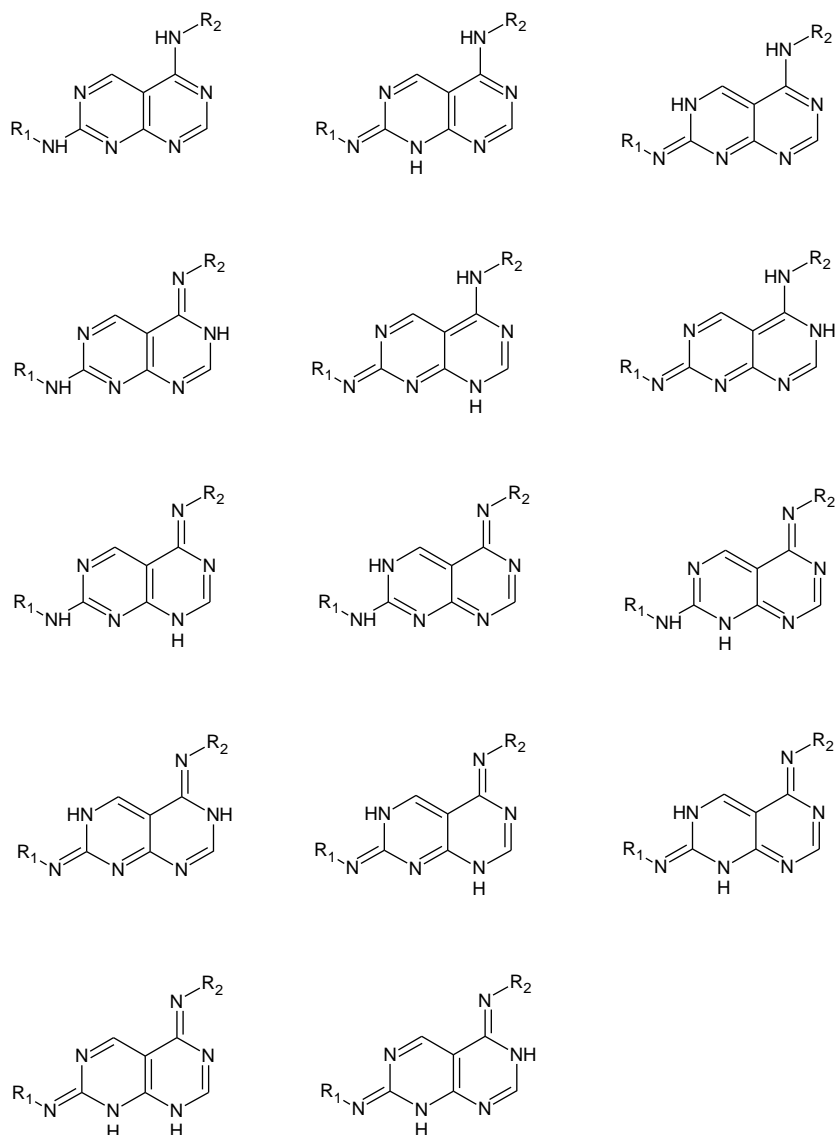
Στη συνέχεια, από τις πυριμιδίνες **12-16** με επίδραση DMF-DMA και βρασμό εντός τολουολίου παρελήφθησαν τα παράγωγα **17-21**, από τα οποία με βρασμό εντός οξικού οξέος και προσθήκη της κατάλληλης ανιλίνης παρελήφθησαν οι επιθυμητές αμινο δισυποκατεστημένες πυριμιδοπυριμιδίνες **22-36** (Σχήμα 69).



a) μ-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ, 3 h. b) κατάλληλη αμίνη, 1 h. c) DMF-DMA, βρασμός, 1.5 h. d) κατάλληλη ανιλίνη, CH<sub>3</sub>COOH, βρασμός, 1.5 h.

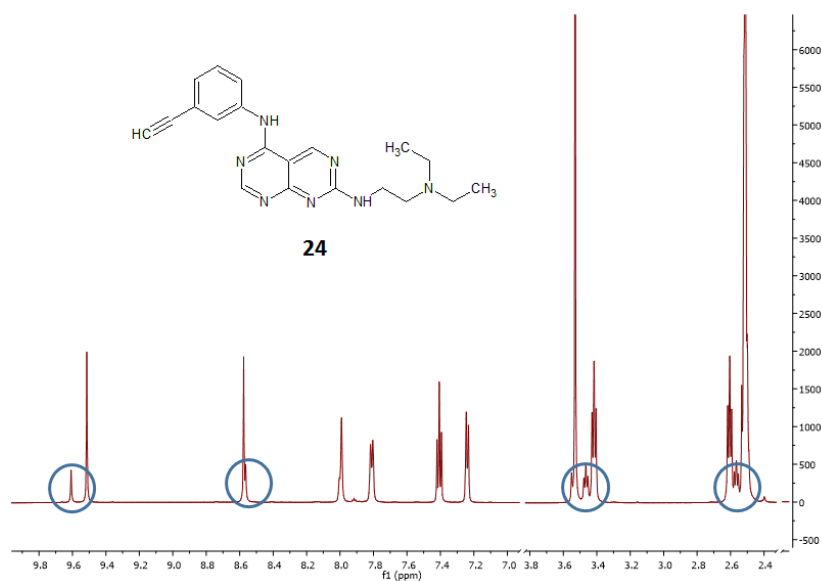
Σχήμα 69: Συνθετική πορεία των αμινο δισυποκατεστημένων πυριμιδοπυριμιδινών **22-36**.

Είναι γνωστό ότι οι αμινοϋποκατεστημένες πυριμιδίνες παρουσιάζουν το φαινόμενο της ταυτομέρειας το οποίο επηρεάζει ιδιαίτερα τη δράση αυτών, όπως χαρακτηριστικά παρατηρείται στις πουρίνες.<sup>174</sup> Ειδικότερα για τις πυριμιδοπυριμιδίνες της παρούσας εργασίας, οι οποίες φέρουν δύο δευτεροταγείς αμίνες ως υποκαταστάτες, θεωρητικά είναι πιθανή η ύπαρξη 14 ταυτομερών (Σχήμα 70), ενώ στα αντίστοιχα παράγωγα που φέρουν μόνο μία δευτεροταγή αμίνη ο αριθμός αυτών μειώνεται δραστικά στα 5 μόνο πιθανά ταυτομερή.



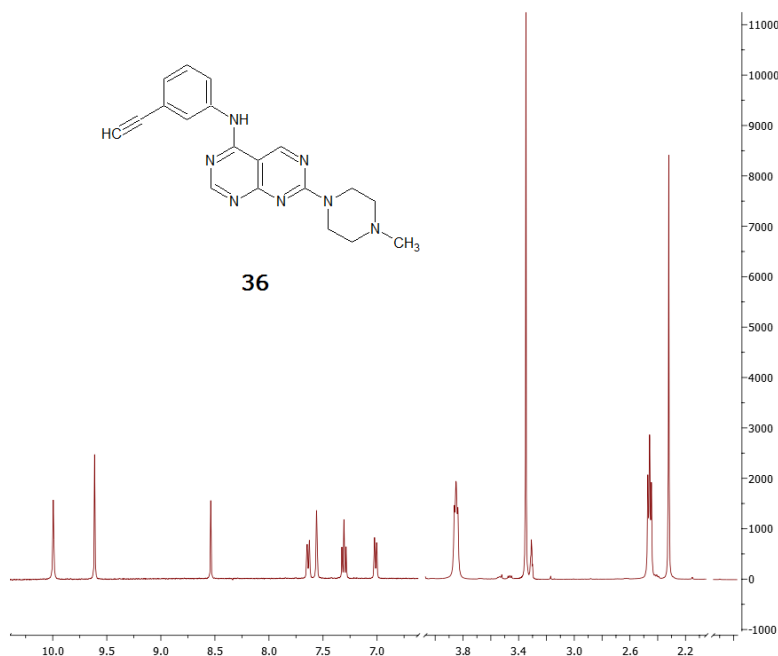
Σχήμα 70: Τα πιθανά ταυτομερή των πυριμιδοπυριμιδινών που φέρουν δευτεροταγή αμινομάδα στη θέση 2.

Παρόλα αυτά στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR των πυριμιδοπυριμιδινών που φέρουν δύο δευτεροταγείς αμίνες ως υποκαταστάτες, δεν παρατηρούνται 14 ταυτομερή ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες ( $7\text{ }^\circ\text{C}$ ). Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα της *N'*-[2-(διαιθυλαμινο)αιθυλο]-*N*-(3-αιθυνυλφαινυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιдино-2,5-διαμίνης (**24**) είναι εμφανής η παρουσία δύο μόνο ταυτομερών σε αναλογία 3:1 κάτι που φαίνεται χαρακτηριστικά από τις δύο απλές κορυφές στα 9.61 και 8.56 ppm καθώς επίσης και από τις δύο τριπλές κορυφές στα 3.47 και 2.57 ppm (Σχήμα 71).



Σχήμα 71: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του παραγώγου **24** ( $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O} - 9/1, 7^\circ\text{C}$ ).

Από την άλλη πλευρά, στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της N-(3-αιθυλφαινυλο)-7-(4-μεθυλππεραζιν-1-υλο)πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-4-αμίνης (**36**), όπου υπάρχει μόνο μία δευτεροταγής αμίνη, δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο (Σχήμα 72). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, συμπεραίνεται πως η ταυτομέρεια αυτή επηρεάζεται κυρίως από τη φύση του 2-υποκαταστάτη.



Σχήμα 72: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του παραγώγου **36** ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

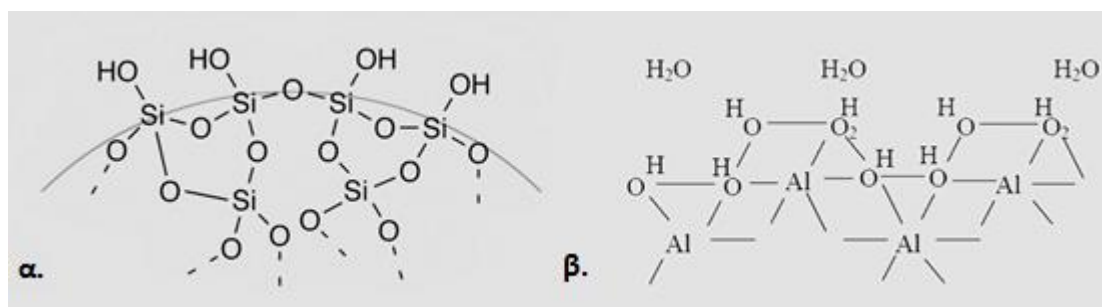


Λόγω της ανωτέρω ταυτομέρειας η λήψη φασμάτων  $^{13}\text{C}$  NMR ήταν ιδιαίτερα δύσκολη ακόμα και σε δείγματα υψηλής συγκεντρώσεως. Τελικά η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (7 °C), με χρήση φασματοφωτομέτρου Bruker Avance III στα 600 MHz και σε σύστημα διαλυτών DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O σε αναλογία 9/1.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η κύκλωση των φορμαμιδίων **17-21** προς τις επιθυμητές διαμίνες **22-36** δεν γίνεται με χρήση μικροκυμάτων, όπως συμβαίνει στα θειομεθυλοπαράγωγα **8-10**, αλλά με συμβατική θέρμανση και χρήση ελαιόλουτρου, αφού με τη χρήση μικροκυμάτων λαμβάνεται σχεδόν αποκλειστικά η ακετυλιωμένη ανιλίνη και η αντίστοιχη αμινοπυριμιδίνη **12-16**.

Όσον αφορά τον καθαρισμό των τελικών αμινοϋποκατεστημένων πυριμιδοπυριμιδινών, αυτός αποδείχθηκε ιδιαίτερα επίπονος λόγω της εξαιρετικής τους πολικότητας. Αρχικά, για την απομόνωσή τους χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση γέλη πυριτίου (silica gel). Ως γνωστόν η γέλη πυριτίου διαθέτει ελαφρώς όξινες ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται στις ελεύθερες υδροξυλομάδες που φέρει στην επιφάνειά της (Σχήμα 73-α.). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη βασικότητα και την αυξημένη πολικότητα των μορίων, καθιστούσε την παραλαβή τους αδύνατη, ακόμα και έπειτα από έκλυση με πολύ πολικά συστήματα διαλυτών ή με συστήματα που περιείχαν τριαιθυλαμίνη. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί γέλη πυριτίου αντιστρόφου φάσεως (reversed phase silica gel), όμως κάτι τέτοιο προϋποθέτει την ύπαρξη εξοπλισμού (π.χ. ημιπαρασκευαστικής HPLC ή MPLC), ενώ ταυτόχρονα απαιτεί και την απομάκρυνση του νερού. Για τους λόγους αυτούς χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση ενεργοποιημένο βασικό οξείδιο του αργιλίου (active, basic aluminum oxide).

Το οξείδιο του αργιλίου ή αλλιώς αλούμινα χρησιμοποιείται στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς ως στατική φάση. Αποτελεί επαμφοτερίζουσα ένωση και μπορεί να δράσει κι ως οξύ κι ως βάση. Επιπλέον η προσροφητικότητα της αλούμινας εξαρτάται από το βαθμό ενυδάτωσής της, όσο πιο ενυδατωμένη είναι τόσο λιγότερο συγκρατεί τις ενώσεις (Σχήμα 73-β.). Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει τη μεταβολή της συμπεριφοράς της κατά το διαχωρισμό, ανάλογα με τη φύση των μορίων που πρέπει να διαχωριστούν. Μια κατάλληλα ενυδατωμένη αλούμινα είναι ικανή να επιτύχει διαχωρισμούς, οι οποίοι με τη γέλη πυριτίου είναι αδύνατοι.

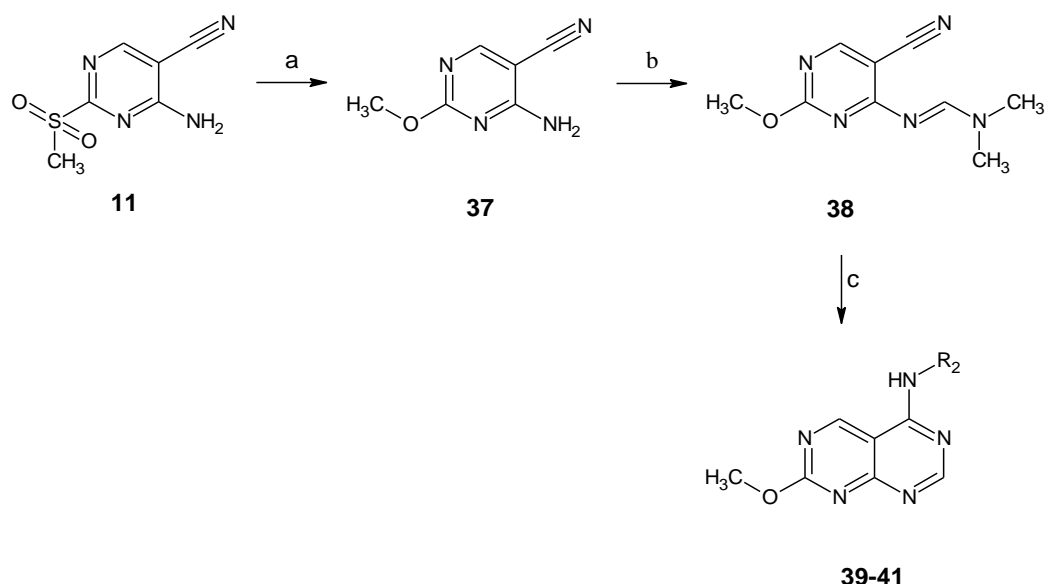


Σχήμα 73: α. Η επιφάνεια της γέλης πυριτίου (silica gel) με τις ελεύθερες υδροξυλομάδες. β. Η επιφάνεια μιας ενυδατωμένης αλούμινας (aluminum oxide).

## ΣΥΝΘΕΣΗ 2-ΜΕΘΟΞΥΠΥΡΙΜΙΔΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΩΝ

Η σύνθεση των επιθυμητών μεθοξυ-υποκατεστημένων πυριμιδοπυριμιδινών έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των αμινοδισυποκατεστημένων πυριμιδοπυριμιδινών **22-36**.

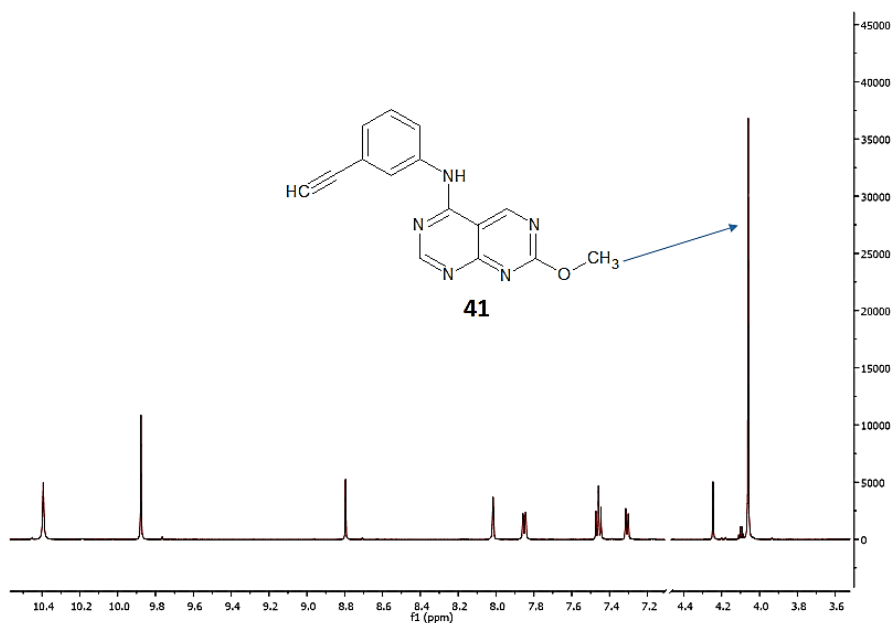
Αρχικά λοιπόν, με επίδραση μεθοξυνατρίου επί του 4-αμινο-2-(μεθυλοσουλφονυλο)πυριμιδινο-5-καρβονιτριλίου (**11**) λαμβάνεται η 2-μεθοξυπυριμιδίνη **37** από την οποία με αντίδραση με DMF-DMA λαμβάνεται το παράγωγο **38** (Σχήμα 74). Ακολούθως, με επίδραση της επιθυμητής ανιλίνης και βρασμό εντός οξικού οξέος λαμβάνονται οι επιθυμητές 2-μεθοξυπυριμιδο[4,5-d]πυριμιδίνες **39-41**.



a)  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , 5 min. b) DMF-DMA, βρασμός, 1 h. c) κατάλληλη ανιλίνη,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , βρασμός, 1.5 h.

Σχήμα 74: Σύνθεση των N-υποκατεστημενων-2-μεθοξυπυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-5-αμινών (**39-41**).

Είναι χαρακτηριστικό ότι στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της *N*-(3-αιθινυλφαινυλ)-7-μεθοξυπυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-4-αμίνης (**41**) (Σχήμα 75), όπως και στο αντίστοιχο θειομέθυλο παράγωγο **10** (Σχήμα 59), δεν παρατηρείται το φαινόμενο της ταυτομέρειας, γεγονός που επιβαιώνει ότι η ταυτομέρεια των πυριμιδοπυριμιδινοδιαμινών **22-33** επηρεάζεται κυρίως από την αμινομάδα της θέσης 2.



Σχήμα 75: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του παραγώγου **41** ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

Συμπερασματικά στην παρούσα εργασία συντέθηκαν 21 νέες δισυποκατεστημένες πυριμιδοπυριμιδίνες, η φαρμακολογική αξιολόγηση των οποίων ως πιθανών αναστολέων του EGFR ή και του VEGFR βρίσκεται σε εξέλιξη. Για τη σύνθεση αυτών αναπτύχθηκε μία νέα συνθετική πορεία αποτελούμενη από λίγα βήματα. Η πορεία αυτή επιτρέπει την εύκολη και απλή σύνθεση νέων παραγώγων, υποκατεστημένων στις θέσεις 2 και 5 του σκελετού της πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδίνης με διάφορους υποκαταστάτες (αμινικούς ή μη) έτσι ώστε να μελετηθεί η επίδραση τους στην δράση έναντι του EGFR ή και του VEGFR.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση silica gel 60A (SDS 40-60  $\mu\text{m}$ ), silica gel 60A (SDS 60-200  $\mu\text{m}$ ) και aluminum oxide 90A, basic (SDS 60-200  $\mu\text{m}$ ). Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) σε πλάκες silica gel 60<sub>F254</sub> και aluminum oxide 200<sub>F254</sub>. Τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance III στα 600 MHz και Bruker Avance 400 στα 400 MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*6), δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>) και δευτεριωμένη μεθανόλη (CD<sub>3</sub>OD).

### Σύνθεση του αιθοξυμεθυλενομηλονονιτριλίου (1).

Μίγμα μηλονονιτριλίου (3.40 g, 52.00 mmol), ορθοφορμικού τριαιθυλεστέρα (11.10 g, 70.00 mmol) και οξικού ανυδρίτη (12.50 g, 120.00 mmol) θερμαίνονται σε θερμοκρασία βρασμού για 4 ώρες. Έπειτα το μίγμα αποστάζεται υπό κενό και συλλέγεται το κλάσμα στους 140-160 °C. Τελικώς παραλαμβάνονται 6.60 g υποκίτρινου στερεού (98%).

Σ.Τ.: 66 °C (EtOH) (Βιβλ. 66-67 °C (EtOH)<sup>175</sup>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.69 (s, 1H), 4.43 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.49 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 174.66, 111.99, 109.88, 74.90, 66.00, 14.74.

### Σύνθεση της 1-(2,2-δικυανοβινυλ)ουρίας (2).

Μίγμα αιθοξυμεθυλενομηλονονιτριλίου (12.20 g, 100.00 mmol, **1**) και ουρίας (9.00 g, 150.00 mmol) σε αιθανόλη (65 mL) θερμαίνονται σε θερμοκρασία βρασμού για 4 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε πάγο και το λευκό στερεό που σχηματίζεται διηθείται, εκπλένεται με νερό και μεθανόλη και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Τελικώς παραλαμβάνονται 9.70 g προϊόντος (71%).

Σ.Τ.: 141 °C (EtOH) (Βιβλ. 141-144 °C (EtOH)<sup>176</sup>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 10.66 (d,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 8.30 (d,  $J = 11.4$  Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 6.63 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 155.60, 151.24, 114.49, 112.80, 56.52.

### Σύνθεση του 4-αμινο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιδino-5-καρβονιτριλίου (3).

Σε διάλυμα μεθοξυνατρίου (216 mg, 4.00 mmol) σε απόλυτη μεθανόλη (12 mL), προστίθεται 1-(2,2-δικυανοβινυλ)ουρία (500 mg, 3.68 mmol, **2**) και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 30 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε παγωμένο νερό (5 mL), οξινίζεται με HCl 9% (pH ~ 5-6) και το πορτοκαλόχρωμο στερεό που σχηματίζεται διηθείται και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Τελικώς συλλέγονται 420 mg προϊόντος (84%).

Σ.Τ.: 225 °C (H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 11.56 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 8.34 (s, 1H), 7.83 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 7.40 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 163.16, 154.34, 153.29, 115.08, 77.60.

**Σύνθεση του *N'*-(5-κυανο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιδιν-4-υλο)-*N,N*-διμεθυλιμιδοφορμαμίδιου (4).**

Σε εναιώρημα 4-αμινο-2-οξο-1,2-διϋδροπυριμιδινό-5-καρβονιτρίλιο (100 mg, 0.73 mmol, **3**) σε τολουόλιο (30 mL) προστίθεται DMF-DMA (97.00 μL, 0.73 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1 ώρα. Μετά το τέλος της αντίδρασης το πορτοκαλόχρωμο στερεό που σχηματίζεται διηθείται και εκπλένεται με οξικό αιθυλεστέρα. Τελικώς παραλαμβάνονται 110 mg προϊόντος (78%).

Σ.Τ.: 222-225 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.67 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 3.20 (s, 1H), 3.09 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 168.86, 158.17, 155.65, 154.15, 115.65, 86.31, 37.65, 34.96.

**Σύνθεση της θειικής 2-μεθυλο-2-θειοψευδοουρίας (5).**

Σε διάλυμα θειουρίας (15.20 g, 200.00 mmol) σε νερό (7 mL) προστίθεται υπό ανάδευση θειικό διμεθύλιο (13.80 g, 110.00 mmol). (Προσοχή, κατά την προσθήκη η αντίδραση είναι ιδιαίτερα εξώθερμη και η προσθήκη πρέπει να γίνεται σταδιακά υπό ψύξη). Μετά την ολοκλήρωση της αρχικής έντονης αντίδρασης, το μίγμα θερμαίνεται για μία ώρα σε θερμοκρασία βρασμού, αφήνεται να ψυχθεί και προστίθενται 95% αιθανόλη (20 mL). Το στερεό που λαμβάνεται διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με 95% αιθανόλη και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Τελικώς συλλέγονται 23.00 g λευκού κρυσταλλικού προϊόντος (82%).

Σ.Τ.: 233-235 °C (EtOH) (Βιβλ. 235°C (EtOH)<sup>177</sup>); ); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.82 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 4H), 2.58 (s, 3H)

**Σύνθεση του 4-αμινο-2-(θειομεθυλο)πυριμιδινό-5-καρβονιτρίλιου (6).**

Σε εναιώρημα θειικής 2-μεθυλο-2-θειοψευδοουρίας (2.30 g, 8.20 mmol, **5**) και αιθοξυμεθυλενομηλονονιτρίλιου (2.00 g, 16.39 mmol, **1**) σε απόλυτη αιθανόλη (40 mL), στους 0 °C, προστίθεται στάγδην *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (3.57 mL, 20.05 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το στερεό που λαμβάνεται διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με 95% αιθανόλη και ξηραίνεται σε ξηραντήρα κενού υπεράνω P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Τελικώς συλλέγονται 1.70 g υποκίτρινης σκόνης (62.5%).

Σ.Τ.: 235-237 °C (EtOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.44 (s, 1H), 7.90 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 2H), 2.45 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 175.04, 161.80, 160.95, 116.08, 85.69, 13.84.

**Σύνθεση του *N'*-[5-κυανο-2-(θειομεθυλο)πυριμιδιν-4-υλο]-*N,N*-διμεθυλιμιδοφορμαμίδιου (7).**

Σε εναιώρημα 4-αμινο-2-(θειομεθυλο)πυριμιδινό-5-καρβονιτρίλιου (100 mg, 0.60 mmol, **6**) σε τολουόλιο (30 mL) προστίθεται DMF-DMA (81 μL, 0.60 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2.5 ώρες. Μετά την

ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιου/οξικού αιθυλεστέρα 1/1. Τελικώς παραλαμβάνονται 120 mg λευκού στερεού (92%).

Σ.Τ.: 104-105 °C (CHCl<sub>3</sub>/petroleum ether); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.80 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 3.24 (s, 6H), 2.55 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 174.71, 166.49, 160.09, 157.32, 116.10, 96.55, 41.53, 35.42, 14.16.

#### **Γενική μέθοδος σύνθεσης των *N*-υποκατεστημενων-7-(θειομεθυλο)πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-4-αμινών (8-10).**

Σε υάλινο σωλήνα προστίθεται το παράγωγο **7** (1.90 g, 8.43 mmol) και η εκάστοτε ανιλίνη (8.60 mmol) σε παγόμορφο οξικό οξύ (10 mL), ο σωλήνας σφραγίζεται και τοποθετείται στην συσκευή μικροκυμάτων (Start E, Milestone). Χρησιμοποιείται ακτινοβολία 200 W, η θερμοκρασία αυξάνεται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος στους 118°C και το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στη θερμοκρασία αυτή για 5 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το οξικό οξύ απομακρύνεται με τη βοήθεια κενού και το μίγμα καθαρίζεται μέσω χρωματογραφίας στήλης (silica gel) με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιου-διχλωρομεθάνιου/οξικού αιθυλεστέρα 4/1.

#### ***N*-(3-γλωρο-4-φθοροφαινυλο)-7-(θειομεθυλο)πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-4-αμίνη (8).**

Απόδοση: 46%; Σ.Τ.: >300 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 10.50 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.81 (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.5H), 8.14 (dd, *J* = 19.6 Hz, 16.4 Hz, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.50 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 176.22, 162.76, 162.26, 161.85, 161.00, 159.11, 157.95, 156.86, 151.98, 135.83, 124.61, 123.45, 123.30, 119.72, 119.31, 117.48, 117.04, 104.96, 14.28.

#### **7-(θειομεθυλο)-*N*-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-4-αμίνη (9).**

Απόδοση: 44%; Σ.Τ.: 270 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 10.56 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 9.78 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 8.2 Hz, 4.7 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 176.27, 162.75, 162.28, 159.44, 158.04, 145.78, 144.32, 135.34, 130.20, 123.88, 106.00, 14.25.

#### ***N*-(3-αιθυλοφαινυλο)-7-(θειομεθυλο)πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-4-αμίνη (10).**

Απόδοση: 41%; Σ.Τ.: 279 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 10.45 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.63 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) 175.78, 162.42, 161.87, 158.83, 157.70, 138.45, 129.10, 127.68, 125.38, 123.08, 121.92, 104.55, 83.16, 81.00, 13.77.

#### **Σύνθεση του 4-αμινο-2-(μεθυλοσουλφονυλο)πυριμιδινό-5-καρβονιτριλίου (11).**

Μίγμα 4-αμινο-2-(θειομεθυλο)πυριμιδινό-5-καρβονιτριλίου (500 mg, 3.01 mmol, **6**) και m-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος (1.7 g, 9.91 mmol) σε διχλωρομεθάνιο (30 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Έπειτα το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και προστίθεται ποσότητα τετραϋδροφουρανίου (20 mL). Το λευκό ίζημα που καθιζάνει, διηθείται, εκπλένεται με τετραϋδροφουράνιο κι απορρίπτεται. Έπειτα το διήθημα συμπυκνώνεται εκ νέου και προστίθεται ποσότητα διαιθυλαιθέρα (20 mL). Το ίζημα που καθιζάνει, διηθείται, εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα κι αφήνεται να στεγνώσει. Τελικώς συλλέγονται 351 mg υποκίτρινου στερεού (59%).

Σ.Τ.: 211-214 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 8.88 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 8.82 (s, 1H), 8.43 (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 3.31 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (600 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 166.78, 162.94, 162.38, 114.15, 91.95, 38.55.

#### **Γενική μέθοδος σύνθεσης των 4-αμινο-2-αμινοϋποκατεστημενων πυριμιδινό-5-καρβονιτριλίων (12-16).**

Μίγμα 4-αμινο-2-(μεθυλοσουλφονυλο)πυριμιδινό-5-καρβονιτριλίου (100 mg, 0.50 mmol, **11**) και της εκάστοτε αλειφατικής αμίνης (0.55 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο (20 mL) αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό κι έπειτα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (aluminum oxide – Brockmann III) με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιου/διχλωρομεθάνιου 1/1–διχλωρομεθάνιου/μεθανόλης 15/1.

#### **4-αμινο-2-{[2-(διαιθυλαμινο)αιθυλ]αμινο}πυριμιδινό-5-καρβονιτρίλιο (12).**

Απόδοση: 80%; Σ.Τ.: 150-151 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.25 (minor) (s, 0.6H), 8.16 (major) (s, 1H), 6.04 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1.6H), 3.42 (minor + major) (m, 3.2H), 2.62 (minor + major) (t, *J* = 5.8 Hz, 3.2H), 2.55 (minor + major) (q, *J* = 7.1 Hz, 6.4H), 1.65 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 3.2H), 1.02 (minor + major) (t, *J* = 7.1 Hz, 9.6H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 163.44, 162.89, 162.66, 162.45, 162.33, 162.25, 117.77, 117.51, 80.10, 78.39, 50.36, 49.92, 49.78, 46.84, 46.81, 36.42, 36.31, 9.49.

#### **4-αμινο-2-{[3-(διμεθυλαμινο)προπυλ]αμινο}πυριμιδινό-5-καρβονιτρίλιο (13).**

Απόδοση: 50%; Σ.Τ.: 147 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 7 °C) δ (ppm) 8.25 (minor) (s, 0.7H), 8.16 (major) (s, 1H), 7.26 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 0.9H), 6.91 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1.7H), 5.54 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1.7H) 3.46 (minor + major) (m, 3.4H), 2.43 (minor + major) (m, 3.4H), 2.27 (major) (s, 6H), 2.25 (minor) (s, 4.2), 1.77 (minor + major) (m, 3.4H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 7 °C) δ (ppm) 163.51, 162.90, 162.15, 161.82, 161.29, 117.13, 80.33, 78.83, 57.90, 57.04, 45.38, 45.23, 40.58, 39.84, 29.68, 25.88.

**4-αμινο-2-{{3-(διαιθυλαμινο)προπυλ}αμινο}πυριμιδινο-5-καρβονιτρίλιο (14).**

Απόδοση: 66%; Σ.Τ.: 114 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 8.25 (minor) (s, 0.7H), 8.15 (major), (s, 1H), 3.27 (minor) (t, *J* = 6.8 Hz, 1.4H), 3.24 (major) (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.60 (minor + major) (brs, 6.8H), 2.56 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 3.4H), 1.65 (minor +major) (m, 3.4H), 0.99 (minor + major) (t, *J* = 7.1 Hz, 10.2H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 163.49, 162.78, 162.61, 162.43, 162.20, 118.01, 117.80, 79.35, 77.64, 50.04, 49.85, 46.49, 25.95, 25.59, 11.11.

**4-αμινο-2-(κυκλοπροπυλαμινο)πυριμιδινο-5-καρβονιτρίλιο (15).**

Απόδοση: 80%, Σ.Τ.: 206 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 8.29 (minor) (s, 0.5H), 8.15 (major) (s, 1H), 7.66 (major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 7.48 (minor) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 0.5H), 7.23 (major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 2H), 7.04 (minor) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 2.76 (minor + major) (m, 1.5H), 0.64 (minor + major) (m, 3H), 0.49 (minor + major) (brs, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 163.27, 162.27, 161.49, 154.33, 153.23, 117.44, 114.98, 79.57, 77.87, 23.80, 22.34, 6.22, 3.66.

**4-αμινο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)πυριμιδινο-5-καρβονιτρίλιο (16).**

Απόδοση: 61%; Σ.Τ.: 197 °C (EtOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 8.18 (s, 1H), 3.85 (m, 4H), 2.46 (m, 4H), 1.45 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 162.77, 161.86, 160.60, 117.24, 78.26, 54.27, 45.64, 43.02.

**Γενική μέθοδος σύνθεσης των *N'*-[5-κυανο-2-(αμινουποκατεστημενων)πυριμιδιν-4-υλο]-*N,N*-διμεθυλιμιδοφορμαμίδιων (17-21).**

Σε διάλυμα του κατάλληλου καρβονιτρίλιου **12-16** (1.00 mmol) σε τολουόλιο (30 mL) προστίθεται DMF-DMA (266 μL, 2.00 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1.5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το τολουόλιο απομακρύνεται με συμπύκνωση και το ελαιώδες μίγμα που παραμένει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με σύστημα έκλυσης διχλωρομεθάνιου/μεθανόλης 30/1-διχλωρομεθάνιου/μεθανόλης 7/1.

***N'*-(5-κυανο-2-{{2-(διαιθυλαμινο)αιθυλ}αμινο}πυριμιδιν-4-υλο)-*N,N*-διμεθυλιμιδοφορμαμίδιο (17).**

Απόδοση: 67%; Σ.Τ.: 79 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 8.75 (major) (s, 1H), 8.60 (minor) (s, 0.5H), 8.38 (minor) (s, 0.5H), 8.28 (major) (s, 1H), 3.37 (minor + major) (brs, 3H), 3.15 (major) (s, 3H), 3.13 (minor) (s, 1.5H), 3.07 (major) (s, 3H), 3.05 (minor) (s, 1.5H), 2.59 (minor +major) (brs, 6H), 2.55 (minor + major) (brs, 3H), 2.38 (minor + major) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.75H), 0.97 (minor + major) (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 168.59, 168.12, 162.92, 162.67, 162.28, 162.18, 157.68, 157.43, 118.59, 118.42, 89.43, 88.20, 51.39, 50.90, 47.04, 46.86, 41.22, 38.39, 38.15, 35.00, 34.93.



***N'*-(5-κυανο-2-[[2-(διμεθυλαμινο)προπυλ]αμινο]πυριμιδιν-4-υλο)-*N,N*-διμεθυλμιθοφορμαμίδιο (18).**

Απόδοση: 80%; Σ.Τ.: 145 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 7 °C) δ (ppm) 8.72 (major) (s, 1H), 8.59 (minor) (s, 0.6H), 8.34 (minor) (s, 0.6H), 8.28 (major) (s, 1H), 6.40 (major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1H), 5.95 (minor) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 0.6H), 3.52 (minor + major) (q, *J* = 6.2 Hz 3,2H), 3.21 (minor + major) (s, 4.8H), 3.20 (minor + major) (s, 4.8H), 2.42 (minor + major) (t, *J* = 6.5 Hz, 3.2H), 2.27 (minor+major) (s, 9.6H), 1.77 (minor + major) (m, 3.2H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 7 °C) δ (ppm) 168.83, 168.34, 162.60, 162.34, 162.04, 156.91, 156.74, 118.14, 117.98, 90.88, 89.53, 58.27, 57.55, 45.34, 41.34, 40.70, 40.37, 35.19, 26.54, 26.22.

***N'*-(5-κυανο-2-[[2-(διαιθυλαμινο)προπυλ]αμινο]πυριμιδιν-4-υλο)-*N,N*-διμεθυλμιθοφορμαμίδιο (19).**

Απόδοση: 38%, Σ.Τ.: 89 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 8.73 (major) (s, 1H), 8.59 (minor) (s, 0.7H), 8.39 (minor) (s, 0.7H), 8.29 (major) (s, 1H), 3.30 (minor + major) (m, 3.4H), 3.17 (major) (s, 3H), 3.13 (minor) (s, 2.1H), 3.07 (major) (s, 3H), 3.06 (minor) (s, 2.1H), 2.43 (minor + major) (m, 6.8H), 2.39 (minor + major) (m, 3.4H), 1.99 (minor + major) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.85H), 1.61 (minor + major) (m, 3.4H), 0.92 (minor + major) (m, 10.2H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 168.53, 168.10, 162.93, 162.59, 162.35, 162.25, 157.56, 157.32, 118.71, 118.51, 89.14, 87.88, 50.49, 50.29, 46.57, 41.25, 41.16, 34.98, 34.93, 26.80, 26.36, 11.86.

***N'*-[5-κυανο-2-(κυκλοπροπυλαμινο)πυριμιδιν-4-υλο]-*N,N*-διμεθυλμιθοφορμαμίδιο (20).**

Απόδοση: 36%, Σ.Τ.: 204 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.78 (major) (s, 1H), 8.58 (minor) (s, 0.7H), 8.44 (minor) (s, 0.7H), 8.30 (major) (s, 1H), 7.81 (major) (s, 1H), 7.72 (minor) (s, 0.7H), 3.18 (major) (s, 3H), 3.14 (minor) (s, 2.1H), 3.09 (minor + major) (s, 5.1H), 2.88 (major) (m, 1H), 2.78 (minor) (m, 0.7H), 0.68 (minor + major) (m, 3.4H), 0.49 (minor + major) (brs, 3.4H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 168.29, 163.18, 162.59, 161.95, 157.29, 118.06, 89.53, 88.20, 40.84, 34.61, 23.75, 6.02.

***N'*-[5-κυανο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)πυριμιδιν-4-υλο]-*N,N*-διμεθυλμιθοφορμαμίδιο (21).**

Απόδοση: 51%; Σ.Τ.: 125 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.76 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 3.81 (brs, 4H), 3.21 (s, 3H), 3.10 (s, 3H), 2.35 (m, 4H), 2.22 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 167.74, 162.19, 160.51, 157.40, 117.89, 88.34, 54.37, 45.68, 43.19, 40.79, 34.69.

**Γενική μέθοδος σύνθεσης των *N'*-αρυλοϋποκατεστημενων διαμινών 22-36.**

Σε διάλυμα της εκάστοτε αμίνης **17-21** (1.00 mmol) σε παγόμορφο οξικό οξύ (15 mL), προστίθεται η επιθυμητή ανιλίνη (1.05 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1.5 ώρα. Μετά το τέλος της αντίδρασης το οξικό οξύ απομακρύνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (aluminum oxide – Brockmann III) με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιου-διχλωρομεθάνιου/μεθανόλης 7/1.

***N'*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλο)-*N*-[2-(δισαιθυλαμινο)αιθυλο]πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινο-2,5-διαμίνη (22).**

Απόδοση: 36%; Σ.Τ.: 212 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 9.61 (minor) (s, 0.2H), 9.53 (major) (s, 1H), 8.61 (minor) (s, 0.2H), 8.57 (major) (s, 1H), 8.10 (minor + major) (m, 1.2H), 7.72 (minor + major) (m, 1.2H), 7.44 (minor + major) (t, *J* = 9.1Hz, 1.2H), 3.52 (minor + major) (m, 2.4H), 2.83 (minor) (brs, 0.8H), 2.75 (major) (brs, 4H), 2.69 (major) (brs, 2H), 2.63 (minor) (brs, 0.4H), 2.55 (minor + major) (s, 1.2H), 1.98 (minor) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.1H), 1.91 (major) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.5H), 1.04 (major) (m, 6H), 0.99 (minor) (m, 1.2H) <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 163.91, 163.66, 163.45, 163.24, 162.10, 160.66, 159.78, 159.42, 158.33, 157.35, 154.72, 153.16, 136.20, 124.01, 122.82, 119.36, 119.20, 117.14, 117.03, 100.60, 51.27, 50.73, 46.96, 40.09, 37.98, 14.20, 10.99.

***N'*-[2-(δισαιθυλαμινο)αιθυλο]-*N*-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινο-2,5-διαμίνη (23).**

Απόδοση: 38%; Σ.Τ.: 220-224 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 10.11 (minor + major) (s, 1.3H), 9.63 (minor) (s, 0.3H), 9.54 (major) (s, 1H), 8.93 (minor + major) (s, 1.3H), 8.56 (minor + major) (s, 1.3H), 8.34 (minor + major) (s, 1.3H), 8.22 (minor + major) (d, *J* = 7.4 Hz, 1.3H), 7.85 (major) (t, *J* = 5.5, 1H), 7.82 (minor) (brs, *J* = 0.3H), 7.43 (minor + major) (dt, *J* = 13.8 Hz, 6.9 Hz, 1.3H), 3.49 (minor) (m, 0.6H), 3.44 (major) (m, 2H), 2.65 (major) (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.61 (minor) (m, 0.6H), 2.55 (minor + major) (m, 5.2H), 0.99 (minor + major) (t, *J* = 7.1 Hz, 7.8H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 164.05, 163.51, 162.42, 162.07, 159.45, 158.74, 151.01, 150.24, 145.10, 143.82, 137.49, 135.89, 131.27, 130.25, 129.20, 128.33, 128.07, 124.18, 120.32, 118.74, 100.68, 92.56, 51.50, 50.85, 50.70, 38.38, 37.94, 19.96, 16.04, 11.63, 11.49, 11.29.

***N'*-[2-(δισαιθυλαμινο)αιθυλο]-*N*-(3-αιθυνοϋλοφαινυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινο-2,5-διαμίνη (24).**

Απόδοση: 57%; Σ.Τ.: 182 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 9.61 (minor) (s, 0.3H), 9.51 (major) (s, 1H), 8.58 (major) (s, 1H), 8.56 (minor) (s, 0.3H), 8.00 (minor) (s, 0.3H), 7.99 (major) (s, 1H), 7.81 (minor + major) (d, *J* = 7.9 Hz, 1.3H), 7.41 (minor + major) (t, *J* = 7.9 Hz, 1.3H), 7.24 (minor + major) (d, *J* = 7.6 Hz, 1.3H), 4.25 (minor + major) (s, 1.3H), 3.47 (minor) (t, *J* = 7.1 Hz, 0.6H), 3.42 (major) (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.61 (major) (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.57 (minor)

(t,  $J = 7.1$  Hz, 0.6H), 2.52 (minor + major) (m, 5.2H), 0.97 (minor + major) (t,  $J = 7.1$  Hz, 7.8H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C)  $\delta$  (ppm) 164.09, 163.76, 163.50, 162.08, 159.77, 159.23, 158.43, 139.32, 129.47, 127.35, 125.12, 122.94, 122.17, 100.89, 100.52, 83.77, 81.22, 51.87, 51.15, 47.09, 47.00, 39.01, 12.19.

***N'*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλο)-*N*-[2-(διμεθυλαμινο)προπυλο]πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινό-2,5-διαμίνη (25).**

Απόδοση: 30%;  $\Sigma$ .Τ.: >300 °C (MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 10.16 (minor) (s, 0.4H), 10.11 (major) (s, 1H), 9.63 (minor) (s, 0.4H), 9.54 (major) (s, 1H), 8.57 (minor + major) (s, 1.4H), 8.14 (minor + major) (s, 1.4H), 8.12 (minor + major) (m, 1.4H), 7.75 (minor + major) (m, 1.4H), 7.45 (minor + major) (t,  $J = 9.1$  Hz, 1.4H), 3.16 (minor + major) (m, 2.8H), 2.33 (minor + major) (m, 2.8H), 2.18 (minor + major) (s, 8.4H), 1.72 (minor + major) (m, 2.8H).

***N'*-[2-(διμεθυλαμινο)προπυλο]-*N*-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινό-2,5-διαμίνη (26).**

Απόδοση: 35%;  $\Sigma$ .Τ.: 239 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C)  $\delta$  (ppm) 9.64 (minor) (s, 0.3H), 9.56 (major) (s, 1H), 8.95 (minor + major) (s, 1.3H), 8.59 (major) (s, 1H), 8.57 (minor) (s, 0.3H), 8.38 (minor + major) (m, 1.3H), 8.26 (minor + major) (d,  $J = 8.0$  Hz, 1.3H), 7.50 (minor + major) (dd,  $J = 8.2$  Hz, 4.7 Hz, 1.3H), 3.48 (minor) (t,  $J = 7.2$  Hz, 0.6H), 3.42 (major) (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.21 (major) (s, 1H), 3.13 (minor) (s, 0.3H), 2.41 (major) (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.38 (minor) (m, 0.6H), 2.24 (major) (s, 6H), 2.22 (minor) (s, 1.8H), 1.78 (major + minor) (m, 2.6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C)  $\delta$  (ppm) 164.04, 163.73, 163.48, 162.03, 159.83, 159.31, 158.65, 145.25, 145.02, 143.89, 143.78, 135.85, 130.26, 130.03, 124.04, 100.49, 56.88, 48.90, 45.19, 27.23, 26.42.

***N'*-[2-(διμεθυλαμινο)προπυλο]-*N*-(3-αιθυνυλφαινυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινό-2,5-διαμίνη (27).**

Απόδοση: 26%;  $\Sigma$ .Τ.: 218 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C)  $\delta$  (ppm) 9.59 (minor) (s, 0.3H), 9.52 (major) (s, 1H), 8.57 (major) (s, 1H), 8.56 (minor) (s, 0.3H), 7.99 (minor + major) (s, 1.3H), 7.81 (minor + major) (d,  $J = 8.0$  Hz, 1.3H), 7.40 (minor + major) (t,  $J = 10.6$  Hz, 1.3H), 7.24 (minor + major) (d,  $J = 7.6$  Hz, 1.3H), 4.25 (minor + major) (s, 1.3H), 3.43 (minor) (t,  $J = 7.0$  Hz, 0.6H), 3.37 (major) (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.29 (minor + major) (m, 2.6H), 2.15 (major) (s, 6H), 2.14 (minor) (s, 1.8H), 1.71 (minor + major) (m, 2.6H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C)  $\delta$  (ppm) 164.09, 163.72, 163.48, 162.04, 159.20, 158.43, 139.33, 129.47, 127.35, 125.27, 125.12, 123.09, 122.94, 122.16, 100.46, 83.77, 81.21, 57.10, 56.99, 45.50, 40.21, 27.46, 26.68.

***N'*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλο)-*N*-[2-(διαιθυλαμινο)προπυλο]πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινό-2,5-διαμίνη (28).**

Απόδοση: 12%;  $\Sigma$ .Τ.: 206 °C (EtOAc);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 9.55 (minor) (s, 0.3H), 9.47 (major) (s, 1H), 8.55 (major) (s, 1H), 8.53 (minor) (s, 0.3H), 8.08 (major + minor) (d,  $J = 5.0$  Hz, 1.3H), 7.71 (minor + major) (m, 1.3H), 7.43

(minor + major) (t,  $J = 9.0$  Hz, 1.3H), 5.74 (minor + major) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.7H), 3.42 (minor) (t,  $J = 6.7$  Hz, 0.6H), 3.36 (major) (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.16 (major) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.5H), 3.09 (minor) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.15H), 2.47 (minor + major) (m, 5.2H), 2.46 (minor + major) (brs, 2.6H), 1.69 (minor + major) (m, 2.6H), 0.95 (minor + major) (t,  $J = 6.9$  Hz, 7.8H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 164.02, 163.48, 161.90, 159.64, 159.08, 158.33, 154.70, 153.08, 136.30, 124.12, 123.97, 122.80, 119.35, 119.23, 117.12, 116.97, 100.34, 55.20, 50.37, 50.20, 48.85, 49.59, 26.70, 25.96, 11.72.

***N'*-[2-(διαιθυλαμινο)προπυλο]-*N*-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινο-2,5-διαμίνη (29).**

Απόδοση: 9%; Σ.Τ.: 216 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C)  $\delta$  (ppm) 9.57 (minor) (s, 0.3H), 9.49 (major) (s, 1H), 8.88 (minor + major) (s, 1.3H), 8.53 (major) (s, 1H), 8.51 (minor) (s, 0.3H), 8.31, (minor + major) (d,  $J = 3.8$  Hz, 1.3H), 8.20 (minor + major) (d,  $J = 8.2$  Hz, 1.3H), 7.44 (minor + major) (dd,  $J = 8.2$  Hz, 3.8 Hz, 1.3H), 3.41 (minor) (t,  $J = 6.8$  Hz, 0.6H), 3.35 (major) (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.45 (minor + major) (m, 7.8H), 1.69 (minor + major) (m, 2.6H), 0.93 (minor + major) (m, 7.8H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C)  $\delta$  (ppm) 164.03, 163.68, 163.45, 161.95, 159.75, 159.19, 158.60, 144.95, 143.87, 143.73, 135.84, 130.09, 129.91, 123.95, 100.85, 100.42, 50.25, 50.07, 46.52, 40.00, 26.55, 25.82, 11.64.

***N'*-[2-(διαιθυλαμινο)προπυλο]-*N*-(3-αιθυνυλφαινυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινο-2,5-διαμίνη (30).**

Απόδοση: 8%; Σ.Τ.: 118 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 10.07 (minor) (s, 0.3H), 10.01 (major) (s, 1H), 9.64 (minor) (s, 0.3H), 9.56 (major) (s, 1H), 8.58 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 0.7H), 8.11 (minor + major) (brs, D<sub>2</sub>O exchang., 1.3H), 8.05 (minor) (s, 0.3H), 8.00 (major) (s, 1H), 7.84 (minor + major) (d,  $J = 8.0$  Hz, 1.3H), 7.41 (minor + major) (t,  $J = 10.6$  Hz, 1.3H), 7.25 (minor + major) (d,  $J = 7.6$  Hz, 1.3H), 4.22 (minor + major) (s, 1.3H), 3.40 (minor + major) (m, 2.6H), 2.49 (minor + major) (brs, 7.8H), 1.73 (minor + major) (m, 2.6H), 0.98 (minor + major) (s, 7.8H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 163.85, 163.24, 161.60, 158.80, 158.20, 139.09, 128.96, 126.89, 124.85, 122.61, 121.80, 100.12, 83.37, 80.68, 50.09, 46.28, 40.06, 25.81, 11.45.

***N'*-(3-χλώρο-4-φθοροφαινυλο)-*N*-κυκλοπροπυλοπυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδινο-2,5-διαμίνη (31).**

Απόδοση: 21%; Σ.Τ.: 298 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 10.12 (minor) (s, 0.3H), 10.05 (major) (s, 1H), 8.61 (minor + major) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.7H), 8.25 (minor + major) (d,  $J = 3.5$  Hz, 1.3H), 8.13 (minor + major) (dd,  $J = 6.8$  Hz, 2.5 Hz, 1.3H), 7.74 (minor + major) (m, 1.3H), 7.46 (minor + major) (t, 9.1Hz, 1.3H), 2.90 (minor + major) (m, 1.3H), 0.75 (minor + major) (m, 2.6H), 0.57 (minor + major) (brs, 2.6H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 164.39,

163.72, 161.53, 158.40, 158.07, 154.29, 152.68, 136.06, 123.56, 122.37, 118.93, 118.81, 116.71, 116.56, 100.41, 24.01, 6.15.

***N'*-κυκλοπροπυλο-*N*-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιдино-2,5-διαμίνη (32).**

Απόδοση: 42%; Σ.Τ.: 243 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 10.13 (minor) (s, 0.2H), 10.11 (major) (s, 1H), 9.65 (minor) (s, 0.2H), 9.54 (major) (s, 1H), 8.93 (minor + major) (s, 1.2H), 8.59 (minor + major) (s, 1.2H), 8.34 (minor + major) (d, *J* = 4.7 Hz, 1.2H), 8.25 (minor + major) (d, *J* = 3.8 Hz, 1.2H), 8.23 (minor + major) (s, 1.2H), 7.43 (minor + major) (dd, *J* = 4.7 Hz, 3.8 Hz, 1.2H), 2.75 (minor + major) (m, 1.2H), 0.75 (minor + major) (m, 2.4H), 0.57 (minor + major) (brs, 2.4H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 164.43, 163.83, 163.30, 162.22, 161.58, 159.40, 158.53, 144.59, 143.51, 135.55, 129.22, 123.35, 117.44, 100.52, 77.89, 24.02, 23.78, 6.16.

***N'*-κυκλοπροπυλο-*N*-(3-αιθονυλφαινυλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιдино-2,5-διαμίνη (33).**

Απόδοση: 11%; Σ.Τ.: 296 °C (EtOAc); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 9.97 (minor) (s, 0.2H), 9.91 (major) (s, 1H), 9.63 (minor) (s, 0.2H), 9.53 (major) (s, 1H), 8.54 (minor + major) (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.6H), 8.17 (minor + major) (d, *J* = 3.4 Hz, 1.2H), 7.65 (minor + major) (d, *J* = 8.0 Hz, 1.2H), 7.57 (minor + major) (s, 1.2H), 7.30 (minor + major) (t, *J* = 7.8 Hz, 1.2H), 7.00 (minor + major) (d, *J* = 7.5 Hz, 1.2H), 4.25 (minor + major) (s, 1.2H), 2.90 (minor + major) (m, 1.2H), 0.75 (minor + major) (m, 2.4H), 0.57 (minor + major) (brs, 2.4H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6/D<sub>2</sub>O - 9/1, 7 °C) δ (ppm) 164.42, 163.82, 161.75, 158.44, 144.09, 138.69, 128.40, 123.49, 121.97, 121.60, 119.86, 100.48, 83.23, 80.17, 24.00, 6.17.

***N*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλο)-7-(4-μεθυλππεραζιν-1-υλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-4-αμίνη (34).**

Απόδοση: 45%; Σ.Τ.: >300 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 10.13 (s, 1H), 9.59 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.47 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.86 (brs, 4H), 2.41 (m, 4H), 2.24 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 163.45, 161.93, 158.98, 158.24, 154.44, 152.84, 135.93, 123.80, 122.61, 116.77, 116.62, 100.08, 54.31, 45.58, 43.36.

**7-(4-μεθυλππεραζιν-1-υλο)-*N*-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-4-αμίνη (35).**

Απόδοση: 20%; Σ.Τ.: >300 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 10.17 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.35 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 6.8 Hz, 2.7 Hz, 1H), 3.92 (brs, 4H), 2.41 (m, 4H), 2.24 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 163.48, 161.90, 161.80, 159.02, 158.50, 144.72, 143.66, 135.44, 129.41, 123.36, 100.17, 54.36, 45.69, 43.45.

***N*-(3-αιθυλφαινυλο)-7-(4-μεθυλπυριμιδιν-1-υλο)πυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-4-αμίνη (36).**

Απόδοση: 9%, Σ.Τ.: 290 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 10.00 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 8.54 (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.5H), 7.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.31 (t, 7.8 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.26 (s, 1H), 3.91 (brs, 4H), 2.41 (m, 4H), 2.24 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 163.51, 162.09, 161.79, 158.91, 158.48, 144.33, 138.51, 128.42, 123.66, 121.78, 120.06, 100.14, 83.14, 80.58, 54.36, 45.70, 43.42.

**Σύνθεση του 4-αμινο-2-μεθοξυπυριμιδιν-5-καρβονιτριλίου (37).**

Σε διάλυμα 4-αμινο-2-(μεθυλοσουλφονυλο)πυριμιδιν-5-καρβονιτριλίου (100 mg, 0.50 mmol, **11**) σε άνυδρη μεθανόλη (20 mL), υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται μεθοξυνάτριο (28 mg, 1.50 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης η μεθανόλη απομακρύνεται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3 x 20 mL). Μετά τη συμπύκνωση της οργανικής στοιβάδας παραλαμβάνουμε 45 mg υποκίτρινου στερεού (60%).

Σ.Τ.: 221 °C (EtOH) (Βιβλ. 221 °C (EtOH)<sup>178</sup>); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 8.48 (s, 1H), 7.85 (s, 2H), 3.83 (s, 3H).

**Σύνθεση του *N'*-(5-κυανο-2-μεθοξυπυριμιδιν-4-υλο)-*N,N*-διμεθυλμιδοφορμαμίδιου (38).**

Σε εναιώρημα 4-αμινο-2-μεθοξυπυριμιδιν-5-καρβονιτριλίου (600 mg, 4.00 mmol, **37**) σε τολουόλιο (30 mL) προστίθεται DMF-DMA (1.00 mL, 8.00 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το τολουόλιο απομακρύνεται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με διαλύτη έκλυσης κυκλοεξάνιου/οξικού αιθυλεστέρα 1/1. Λαμβάνονται 340 mg λευκού στερεού (41%). Σ.Τ.: 135-137 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 8.84 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.14 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 169.44, 165.55, 163.72, 158.04, 116.48, 93.91, 54.75, 41.07, 34.92.

**Γενική μέθοδος σύνθεσης των *N*-υποκατεστημενων-7-μεθοξυπυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-4-αμινών (39-41).**

Σε διάλυμα *N'*-(5-κυανο-2-μεθοξυπυριμιδιν-4-υλο)-*N,N*-διμεθυλμιδοφορμαμίδιου (100 mg, 0.50 mmol, **38**) σε παγόμορφο οξικό οξύ προστίθεται η εκάστοτε ανιλίνη και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το οξικό οξύ απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) με σύστημα έκλυσης διγλωρομεθάνιου-διγλωρομεθάνιου/μεθανόλης 25/1.

***N*-(3-γλωρο-4-φθοροφαινυλο)-7-μεθοξυπυριμιδο[4,5-*d*]πυριμιδιν-4-αμίνη (39).**

Απόδοση: 20%; Σ.Τ.: >300 °C (MeOH); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) 10.45 (s, 1H), 9.85 (s, 1H), 8.80 (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.5H), 8.14 (dd, *J* = 6.8 Hz, 2.4

Hz, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.50 (t,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 4.06 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 166.82, 163.96, 162.33, 161.26, 158.54, 154.76, 153.11, 135.43, 124.19, 122.95, 119.09, 118.97, 116.89, 116.75, 103.66, 55.20.

**7-μεθοξυ-N-(πυριδιν-3-υλο)πυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-4-αμίνη (40).**

Απόδοση: 22%; Σ.Τ.: 276 °C (MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) 9.79 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.41 (d,  $J = 4.7$  Hz, 1H), 8.37 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.44 (dd,  $J = 8.0$  Hz, 4.7 Hz, 1H), 4.19 (s, 3H).

**N-(3-αιθυλφαινυλ)-7-μεθοξυπυριμιδο[4,5-d]πυριμιδιν-4-αμίνη (41).**

Απόδοση: 11%; Σ.Τ.: 236 °C (MeOH);  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 10.39 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.80 (s, D<sub>2</sub>O exchang., 0.5H), 8.02 (s, 1H), 7.85 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.46 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.06 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  (ppm) 166.79, 164.01, 162.39, 161.33, 158.62, 138.50, 129.13, 127.66, 125.33, 123.07, 121.95, 103.76, 83.19, 80.02, 55.18.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore; *Φαρμακολογία (5<sup>η</sup> Έκδοση)*; Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.; **2007**.
2. Gomperts B.D., Kramer I.M., Tatham P.E.R.; *Signa; transduction*; Academic Press; **2002**.
3. McKenna N.J., Lanz R.B., O'Malley B.W.; *Nuclear receptor coregulators: Cellural and molecular biology*; Endocr. Rev. **1999**: 321-344.
4. Manning G, Whyte D.B.; *The protein kinase complement of the human genome*; Science; **2002**: 1912–1934.
5. Liao J.; *Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors*; J. Med. Chem.; **2007**: 409-420.
6. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T.; *The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*; Science; **1988**: 42-52.
7. Knighton D.R., Zheng J.H., Ten Eyck L.F., Ashford V.A., Xuong N.H., Taylor S.S., Sowadski J.M; *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase*; Science; **1991**: 407–414.
8. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S.; *The protein kinase complement of the human genome*; Science; **2002**: 1912-1934.
9. Miranda-Saavedra D., Barton G.J.; *Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases*; Proteins; **2007**: 893-914.
10. Robinson D.R., Wu, Y.M., Lin S.F.; *The protein tyrosine kinase family of the human genome*; Oncogene; **2000**: 5548-5557.
11. Robinson D.R., Wu Y.M., Lin S.F.; *The protein tyrosine kinase family of the human genome*; Oncogene; **2000**: 5548–5557.
12. Stout T.J., Foster P.G., Matthews D.J.; *High-throughput structural biology in drug discovery: protein kinases*; Curr. Pharm. Des.: **2004**; 1069–1082.
13. Hunter T.; *Protein kinase classification*; Meth Enzymol. Methods in Enzymology; **1991**: 3–37.
14. Weiss A., Littman D.R.; *Signal transduction by lymphocyte antigen receptors*; Cell; **1994**: 263–274.
15. Neet K., Hunter T.; *Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families*; Genes Cells; **1996**: 147–169.
16. Wolanin P.W., Thomason P.A., Stock J.B.; *Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom*; Genome Biology; **2002**: 3013.1–3013.8.
17. Goldstein N.S., Armin M.; *Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system*; Cancer; **2001**: 1331-1346.



18. Giaccone G.; *HER1/EGFR-targeted agents: predicting the future for patients with unpredictable outcomes to therapy*; Ann. Oncol.; **2005**:538-548.
19. Spano J.P., Fagard R., Soria J.C., Rixe O., Khayat D., Milano G.; *Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives*; Ann. Oncol.;**2005**:189-194.
20. John F.F., Christina W. Joseph M.Wu.; *Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer*; Journal of Oncology; **2009**: 1-16.
21. Aifa S., Aydin J., Nordvall G., Lundstrom I., Svensson S. P. S., Hermanson O.; *A basic peptide within the juxtamembrane region is required for EGF receptor dimerization*; Experimental Cell Research; **2005**: 108–114.
22. Ogiso H., Ishitani R., Nureki O.; *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*; Cell; **2002**: 775–787.
23. Ferguson K.M., Berger M.B., Mendrola J.M., Cho H.S., Leahy D.J., Lemmon M.A.; *EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization*; Mol. Cell.; **2003**:507–517.
24. Ferguson K.M.; *Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor*; Biochem. Soc. Trans.; **2004**:742–745.
25. Mineo C., Gill G. N., and Anderson R. G. W.; *Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae*; The Journal of Biological Chemistry; **1999**: 30636–30643.
26. Stamos J., Sliwkowski M.X., Eigenbrot C.; *Structure of the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Domain Alone and in Complex with a 4-Anilinoquinazoline Inhibitor*; The Journal of Biological Chemistry; **2002**: 46265-46272.
27. Boyd M. C.; *Epidermal growth factor receptor: structural basis for functional properties*; A Literature Review Submitted to the Program for Biochemistry and Molecular Biology at New York Medical College in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science, Laboratory of Dr. Joseph Wu, New York Medical College, Valhalla, NY, USA, **2005**.
28. Gotoh N., Tojo A., Hino M., Yazaki Y., Shibuya M.; *A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor*; Biochemical and Biophysical Research Communications; **1992**: 768–774.
29. Wood E.R., Truesdale A.T., McDonald O.B., Yuan D., Hassell A., Dickerson S.H., Ellis B., Pennisi C., Horne E., Lackey K., Alligood K.J., Rusnak D.W., Gilmer T.M., Shewchuk L.; *A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): Relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells*; Cancer; **2004**:6652–6659.
30. Kamath S, Buolamwini J. K.; *Targeting EGFR and HER-2 Receptor Tyrosine Kinases for Cancer Drug Discovery and Development*; Medicinal Research Reviews; **2006**: 569-594.

31. Hubbard SR.; *Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog.*; EMBO J.; **1997**: 5572–5581.
32. Mohammadi M., Schlessinger J., Hubbard S.R.; *Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism*; Cell; **1996**:577–587.
33. Yamaguchi H., Hendrickson W.A.; *Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation*; Nature; **1996**:484–489.
34. Gotoh N., Tojo A., Hino M., Yazaki Y., Shibuya M.; *A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor*; Biochem. Biophys. Res. Commun.; **1992**:768–774.
35. Park J. H., Liu Y., Lemmon M.A., Radhakrishnan R.; *Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain*; Biochem. J.; **2012**: 417–423.
36. Waters S. B., Chen D., Kao A.W., Okada S., Holt K. H., Pessin, J. E.; *Insulin and epidermal growth factor receptors regulate distinct pools of Grb2-SOS in the control of Ras activation*; J. Biol. Chem.; **1996**; 18224–18230.
37. Marais R., Marshall C. J.; *Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf*; Cancer Surv.; **1996**: 101–125.
38. Johnson G. L., Dohlman H. G., Graves L. M.; *MAPKkinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression*; Curr. Opin. Chem. Biol.; **2005**: 325–331.
39. Chattopadhyay A., Vecchi M., Ji Q., Mernaugh R., Carpenter G.; *The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-g1 with the activated EGF receptor*; J. Biol. Chem.; **1999**: 26091–26097.
40. McClellan M., Kievit P., Auersperg N., Rodland K.; *Regulation of proliferation and apoptosis by epidermal growth factor and protein kinase C in human ovarian surface epithelial cells*; Exp. Cell Res.; **1999**: 471–479.
41. Lin H., Chen C., Li X., Chen B. D.; *Activation of the MEK/MAPK pathway is involved in bryostatin1-induced monocytic differentiation and up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein*; Exp. Cell Res.; **2002**: 192–198.
42. Gavin A. C., Nebreda A. R.; *A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90 (rsk)/MAPKAP kinase-1*; Curr. Biol.; **1999**: 281–284.
43. Stover D. R., Becker M., Liebetanz J., Lydon N. B.; *Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha.*; J. Biol. Chem.; **1995**; 15591–15597.
44. Cantley L. C., Neel B. G.; *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; **1999**: 4240–4245.
45. Samuels Y., Ericson, K.; *Oncogenic PI3K and its role in cancer*; Curr. Opin. Oncol.; **2006**: 77–82.

46. Song G., Ouyang G., Bao S.; *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*; J. Cell. Mol. Med.; **2005**: 59–71.
47. Jun T., Gjoerup O., Roberts T. M.; *Tangled webs: Evidence of cross-talk between c-Raf-1 and Akt*; Sci. STKE; **1999**: PE1.
48. Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S.; *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*; Cell; **1999**: 857–868.
49. Chan S.; *Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): A new approach to treating cancer*; Br. J. Cancer; **2004**: 1420–1424.
50. Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K.; *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*; Nature; **1999**:597-601.
51. Kang S.S., Kwon T., Kwon D.Y., Do S.I.; *Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit*; J Biol Chem.; **1999**:13085-13090.
52. Thant A.A., Nawa A., Kikkawa F., Ichigotani Y., Zhang Y., Sein T.T.; *Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells*; Clin Exp Metastasis; **2000**:423-428.
53. Andl C. D., Mizushima T., Oyama K., Bowser M., Nakagawa H., Rustgi A. K.; *EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes*; Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.; **2004**: 1227–1237.
54. Leaman D.W., Pisharody S., Flickinger T.W., Commane M. A., Schlessinger J., Kerr I. M.; *Roles of JAKs in activation of STATs and stimulation of c-fos gene expression by epidermal growth factor*; Mol. Cell. Biol.; **1996**:369–375.
55. Bromberg J.; *Stat proteins and oncogenesis*; J. Clin. Invest.; **2002**: 1139–1142.
56. Herbst R. S., Shin D. M.; *Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: A new paradigm for cancer therapy*; Cancer; **2002**: 1593–1611.
57. Carpenter G., Cohen S.; *Epidermal growth factor*; Annu. Rev. Biochem.; **1979**: 193–216.
58. Ennis B. W., Lippman M. E., Dickson R. B.; *The EGF receptor system as a target for antitumor therapy*; Cancer Invest.; **1991**: 553–562.
59. ERBITUX; New York, NY. ImClone Systems Incorporated, and Princeton, NJ: Bristol-Myers Squibb Company; **2004**.
60. Luttrell L. M., Daaka Y., Lefkowitz R. J.; *Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors*; Curr. Opin. Cell Biol.; **1999**: 177–183.
61. Prenzel N.; *EGF receptor transactivation by G-protein coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHBEGF*; Nature; **1999**: 884–888.
62. Haslekas C., Breen K., Pedersen K. W., Johannessen L., Stang E., Madhus, I. H.; *The inhibitory effect of ErbB2 on EGF-induced formation of clathrin-*

- coated pits correlates with retention of EGFR-ErbB2 oligomeric complexes at the plasma membrane*; Mol. Biol. Cell.; **2005**: 5832–5842.
63. Graus-Porta D., Beerli R. R., Daly J. M., Hynes N. E.; *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*; EMBO J.; **1997**: 1647–1655.
  64. Ekstrand A. J., Sugawa N., James C. D., Collins V. P.; *Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails*; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; **1992**: 4309–4313.
  65. Kuan C. T., Wikstrand C. J., Bigner D. D.; *EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy*; End. Relat. Cancer; **2001**: 83–96.
  66. Moscatello D.K., Montgomery R.B., Sundareshan P., McDanel H., Wong M.Y., Wong A.J.; *Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor*; Oncogene; **1996**: 85–96.
  67. Moscatello D. K., Holgado-Madruga M., Godwin A. K., Ramirez G., Gunn G., Zoltick P. W.; *Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors*; Cancer Res.; **1995**: 5536–5539.
  68. Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R. A., Brannigan B. W.; *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*; N. Engl. J. Med.; **2004**: 2129–2139.
  69. Pao W., Miller V., Zakowski M., Doherty J., Politi K., Sarkaria I., Singh B., Heelan R., Rusch V., Fulton L.; *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from ‘never smokers’ and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; **2004**: 13306–13311.
  70. Blencke S., Ullrich A., Daub H.; *Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors*; J. Biol. Chem.; **2003**: 15435–15440.
  71. Friday B. B., Adjei A. A.; *K-ras as a target for cancer therapy*; Biochim. Biophys Acta; **2005**: 127–144.
  72. Bianco R., Shin I., Ritter C. A., Yakes F. M., Basso A., Rosen N.; *Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors*; Oncogene; **2003**: 2812–2822.
  73. Sansal I., Sellers W. R.; *The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway*; J. Clin. Oncol.; **2004**: 2954–2963.
  74. Amit-Vazina M., Shishodia S., Harris D., Van Q., Wang M., Weber D.; *Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells*; Br. J. Cancer; **2005**: 70–80.
  75. Azemar, M., Schmidt M., Arlt F., Kennel P., Brandt B., Papadimitriou A.; *Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo*; Int. J. Cancer; **2000**: 269–275.

76. Bleeker W. K., Lammerts van Bueren J. J., van Ojik H. H., Gerritsen A. F., Pluyter M., Houtkamp M.; *Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy*; J. Immunol.; **2004**: 4699–4707.
77. Kim E. S., Khuri F. R., Herbst, R. S.; *Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225)*; Curr. Opin. Oncol.; **2001**: 506–513.
78. Hadari Y. R., Doody J. F., Wang Y., Patel S. N., Apblett R. L., Loizos N.; *The IgG1 monoclonal antibody cetuximab induces degradation of the epidermal growth factor receptor*; Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.; **2004**: 234.
79. Perez-Torres M., Guix M., Gonzalez A., Arteaga C. L.; *EGF receptor antibody downregulates mutant receptors and inhibits tumors expressing EGFR mutations*; J. Biol. Chem.; **2006**: 40183–40192.
80. Peng D., Fan Z., Lu Y.; *Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145*; Cancer Res; **1996**: 3666–3669.
81. Wu X., Rubin M., Fan Z.; *Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody*; Oncogene; **1996**: 1397–1403.
82. Foon K. A., Yang X. D., Weiner L. M., Belldegrun A. S., Figlin R. A., Crawford J.; *Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody*; Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.; **2004**: 984–990.
83. Barker A. J.; *Studies leading to the identification of ZD1839 (Iressa™): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer*; Bioorg. Med. Chem. Lett.; **2001**: 1911-1914.
84. Hidalgo M.; *Phase I and Pharmacologic Study of OSI-774, an Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Malignancies*; J. Clin. Oncol.; **2001**: 3267-3279.
85. Wymann M.P., Pirola L.; *Structure and function of phosphoinositide 3-kinases*; Biochim Biophys Acta; **1998**: 127–150.
86. Peruzzi F., Prisco M., Dews M., Salomoni P.; *Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis*; Mol Cell Biol; 1999: 7203–7215.
87. Wikstrand C.J., Reist C.J., Archer G.E., Zalutsky M.R., Bigner D.D.; *The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): Characterization and utilization as an immunotherapeutic target*; J Neurovirol; **1998**: 148–158.
88. Folkman J., D'Amore P.; *A. Blood vessel formation: what is its molecular basis*; Cell; **1996**: 1153-1155.
89. Klagsbrun M. Moses M. A.; *Molecular angiogenesis*; Chem. Biol.; **1999**: 217-224.
90. Walsh D.; *A. Angiogenesis and arthritis*; Rheumatology (Oxford); **1999**: 103-112.

91. Pousa I. D., Mate J., Gisbert, J. P.; *Angiogenesis in inflammatory bowel disease*; Eur. J. Clin. Invest.; **2008**: 73-81.
92. Ferrara N., Alitalo K.; *Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors*; Nat. Med.; **1999**: 1359-1364.
93. Folkman J.; *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*; Semin. Oncol.; **2002**: 15-18.
94. Carmeliet P.; *VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angiogenesis*; Nat Med.; **2000**: 1102-1103.
95. Bachelder R.E., Crago A., Chung J., Wendt M.A., Shaw L.M., Robinson G.; *Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin1/2 expressing breast carcinoma cells*; Cancer Res.; **2001**: 5736-5740.
96. Thomas K.; *A. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent*; J Biol Chem.; **1996**: 603-606.
97. Ogawa S., Oku A., Sawano, A., Yamaguchi S., Yazaki Y., Shibuya M. A ; *novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain*; J Biol Chem; **1998**: 31273-31282.
98. De Falco S., Gigante B.; Persico M. G.; *Structure and function of placental growth factor*; Trends Cardiovasc Med.; **2002**: 241-246.
99. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.; *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*; FASEB J.; **1999**: 9-22.
100. Terman, B. I., Carrion M. E., Kovacs E., Rasmussen B. A., Eddy R. L., Shows T. B.; *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase*; Oncogene; **1991**: 1677-1683.
101. Kowanetz M., Ferrara N.; *Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective*; Clin. Cancer Res.; **2006**: 5018-5022.
102. Tanigawa N., Amaya H., Matsumura M., Shimomatsuya T., Horiuchi T., Muraoka R., Iki M.; *Extent of Tumor Vascularization Correlates with Prognosis and Hematogenous Metastasis in Gastric Carcinomas*; Cancer Res.; **1996**: 2671-2676.
103. Litz J.; Krystal G. W.; *Imatinib inhibits c-Kit-induced hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activity and vascular endothelial growth factor expression in small cell lung cancer cells*; Mol. Cancer Ther.; **2006**: 1415-1422.
104. Brown L. F., Berse B., Jackman R. W., Tognazzi K., Manseau E. J., Dvorak H. F., Senger D. R. ; *Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas*; Am. J. Pathol.; **1993**: 1255-1262.
105. Olson T. A., Mohanraj D., Carson L. F., Ramakrishnan S.; *Vascular Permeability Factor Gene Expression in Normal and Neoplastic Human Ovaries*; Cancer Res.; **1994**: 276-280.
106. Soultz N., Karyotis I., Delakas D.; Spandidos D.; *A. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGF $\beta$ 1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*; Int J Oncol.; **2006** 305-314.

107. Brown L. F., Berse B., Jackman R. W., Tognazzi K., Manseau E. J., Senger D. R., Dvorak H. F.; *Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract*; *Cancer Res.*; **1993**: 4727-4735.
108. Gille J.; *Antiangiogenic cancer therapies get their act together: current developments and future prospects of growth factor- and growth factor receptor-targeted approaches*; *Exp. Dermatol.*; **2006**: 175-186.
109. Bellamy W. T., Richter L., Frutiger Y., Grogan T. M.; *Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Hematopoietic Malignancies*; *Cancer Res.*; **1999**: 728-733.
110. Fuh G., Li B., Crowley C., Cunningham B., Wells J.; *A. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor*; *J. Biol. Chem*; **1998**: 11197-11204.
111. Ruch C., Skiniotis G., Steinmetz M. O., Walz T., Ballmer-Hofer K.; *Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy*; *Nat. Struct. Mol. Biol.*; **2007**: 249-250.
112. Holmes K., Roberts O. L., Thomas A. M., Cross M. J.; *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*; *Cell Signal*; **2007**: 2003-2012.
113. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.; *The biology of VEGF and its receptors*; *Nat Med.*; **2003**: 669-676.
114. Perrotte P., Matsumoto T., Inoue K., Kuniyasu H., Eve B.Y., Hicklin D.J.; *Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice*; *Clin Cancer Res.*; **1999**: 257-265.
115. Kim S.J., Uehara H., Karashima T., Shepherd D.L., Killion J.J., Fidler I.J.; *Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgen-independent human prostate cancer growing in the bone of nude mice*; *Clin Cancer Res.* **2003**: 1200-1210.
116. Ellis L.M.; *Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis*; *Hematol Oncol Clin North Am.*; **2004**: 1007-1021.
117. Petit A.M., Rak J., Hung M.C., Rockwell P., Goldstein N., Fendly B.; *Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors*; *Am J Pathol.*; **1997**: 1523-1530.
118. Hirata A., Ogawa S., Kometani T., Kuwano T., Naito S., Kuwano M.; *ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase*; *Cancer Res.*; **2002**: 2554-60.
119. Ciardiello F., Bianco R., Damiano V., Fontanini G., Caputo R., Pomatico G.; *Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial*

- growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells;* Clin Cancer Res.; **2000**: 3739-3747.
120. Ciardiello F., Bianco R., Caputo R.; *Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cell lines with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy;* Clin. Can. Res.: **2004**: 784–793.
  121. Shibuya M.; *Vascular endothelial growth factor-dependent and –independent regulation of angiogenesis;* BMB Rep.; **2008**: 278-286.
  122. Ciardiello F., Troiani T., Bianco R., Orditura M., Morgillo F., Martinelli E.; *Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy;* Ann Oncol.; **2006**: 109-114.
  123. Cohen D.J., Hochster H.S.; *Rationale for combining biotherapy in the treatment of advanced colon cancer;* Gastrointest Cancer Res.; **2008**: 145-151.
  124. Yaish P., Gazit A., Gilon C., Levitzki A.; *Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors;* Science; **1988**: 933–935.
  125. Gazit A., Yaish P., Gilon C., Levitzki A.; *Tyrphostins I: Synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors;* J. Med. Chem.; **1989**: 2344–2352.
  126. Osherov N., Gazit A., Gilon C., Levitzki A.; *Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER-2/ neu receptors by tyrphostins;* J. Biol. Chem.; **1993**: 11134–11142.
  127. Gazit A., Osherov N., Posner I., Yaish P., Poradosu E., Gilon C., Levitzki A.; *Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and erbB2/ neu tyrosine kinases;* J. Med. Chem.; **1991**: 1896–1907.
  128. Gazit A., Osherov N., Posner I., Bar-Sinai A., Gilon C., Levitzki A.; *Tyrphostins. 3. Structure-activity relationship studies of alpha-substituted benzylidenemalononitrile 5-S-aryltyrphostins;* J. Med. Chem.; **1993**: 3556–3564.
  129. Kamath S., Buolamwini J.K.; *Receptor-guided alignment-based comparative 3D-QSAR studies of benzylidene malonitrile tyrphostins as EGFR and HER-2 kinase inhibitors;* J. Med. Chem. **2003**: 4657–4668.
  130. Suh N., Glasebrook A. L., Palkowitz A. D., Bryant H. U., Burris L. L., Starling J. J., Pearce H. L., Williams C., Peer C., Wang Y., Sporn M. B.; *Arzoxifene, a New Selective Estrogen Receptor Modulator for Chemoprevention of Experimental Breast Cancer;* Cancer Res.; 2001: 8412-8415.
  131. Lee J. J., Hong W. K., Hittelman W. N., Mao L., Lotan R., Shin D. M., Benner S. E., Xu X.-C., Lee J. S., Papadimitrakopoulou V. M., Geyer C., Pe´rez C.; *alPredicting Cancer Development in Oral Leukoplakia: Ten Years of Translational Research;* Clin. Cancer Res.; **2000**: 1702-1710.
  132. Decensi A., Costa A.; *Recent advances in cancer chemoprevention, with emphasis on breast and colorectal cancer;* Eur. J. Cancer; **2000**: 694-709.



133. Paez J.G., Jänne P. A., Lee J.C., Tracy S., Greulich; *EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy*; Science; **2004**: 1947-1500.
134. Muto Y., Moriwaki H., Saito A.; *Prevention of Second Primary Tumors by an Acyclic Retinoid in Patients with Hepatocellular Carcinoma*; N. Engl. J. Med.; **1999**: 1046-1047.
135. Kobayashi K., Hagiwara, K.; *Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and personalized therapy in advanced nonsmall cell lung cancer (NSCLC)*; Targeted Oncology; **2013**: 27–33.
136. Wood E.R., Truesdale A.T., McDonald O.B., Yuan D., Hassell A., Dickerson S.H., Ellis B., Pennisi C. et al.; *A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells*; Cancer Research; **2004**: 6652–6659.
137. Hussain S. P., Hofseth L. J., Harris C. C.; *Radical causes of cancer*; Nat. Rev. Cancer; **2003**: 276-285.
138. Bridges A.J., Zhou H., Cody D.R., Rewcastle G.W., McMichael A., Showalter H.D., Fry D.W., Kraker A.J., Denny W.A.; *Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor*; J. Med. Chem.; **1996**: 267–276.
139. Suh N., Wang Y., Williams C. R., Risingsong R., Gilmer T., Willson T. M., Sporn M. B.; *A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis*; Cancer Res.; **1999**: 5671-5673.
140. Ward W.H.J., Cook P.N., Slater A.M., Davies D.H., Holdgate G.A., Green L.R.; *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure based searching and discovery of a potent inhibitor*; Biochem. Pharmacol.; **1994**: 659–666.
141. Bhattacharya S.K., Cox E.D., Kath J.C., Mathiowetz A.M., Morris J., Moyer J.D., Pustilnik L.R., Rafidi K., Richter D.T., Su C., Wessel M.D.; *Achieving selectivity between highly homologous tyrosine kinases: A novel selective erbB2 inhibitor*; Biochem. Biophys. Res. Commun.; **2003**: 267–273.
142. Gaul M.D., Guo Y., Affleck K., Cockerill G.S., Gilmer T.M., Griffin R.J., Guntrip S., Keith B.R., Knight W.B., Mullin R.J., Murray D.M., Rusnak D.W., Smith K., Tadepalli S., Wood E.R., Lackey K.; *Discovery and biological evaluation of potent dual erbB-2/EGFR tyrosine kinase inhibitors: 6-thiazolylquinazolines*; Bioorg. Med. Chem. Lett.; **2003**: 637–640.
143. Myers M.R., Setzer N.N., Spada A.P., Persons P.E., Ly C.Q., Maguire M.P., Zulli A.L., Cheney D.L., Zilberstein A., Johnson S.E., Franks C.F., Mitchell K.J.; *The synthesis and SAR of new 4-(N-alkyl-N-phenyl)amino-6,7-dimethoxyquinazolines and 4-(N-alkyl-N-phenyl)aminopyrazolo [3,4-d]pyrimidines, inhibitors of CSFIR tyrosine kinase activity*; Bioorg. Med. Chem. Lett.; **1997**: 421–424.

144. Martin E., Noble M.; Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure; Science; **2004**: 1800-1807.
145. Norman M.H., Kelly J.L., Hollingsworth E.B.. *Conformationally restricted analogues of remoxipride as potential antipsychotic agents*; J. Med. Chem. **1993**: 3417–3423.
146. Hodge C.N., Pierce J.; *A diazine heterocycle replaces a six-membered hydrogen-bonded array in the active site of scytalone dehydratase*; Bioorg. Med. Chem. Lett.; **1993**: 1605–1608. + Sun L., Cui J., Liang C., Zhou Y., Nematalla A., Wang X., Chen H., Tang C., Wei J.; *Rational design of 4,5-disubstituted-5,7-dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6-ones as a novel class of inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and HER-2 (p185(erbB)) tyrosine kinases*; Bioorg. Med. Chem. Lett.; **2002**: 2153–2157.
147. Hunt J.T., Mitt T., Borzilleri R., Gullo-Brown J., Fargnoli J., Fink B., Han W.C., Mortillo S., Vite G., Wautlet B., Wong T., Yu C., Zheng X., Bhide R.; *Discovery of the pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazine nucleus as a new kinase inhibitor template*; J. Med. Chem. **2004**: 4054–4059.
148. Rewcastle G.W., Palmer B.D., Thompson A.M., Bridges A.J., Cody D.R., Zhou H., Fry D.W., McMichael A., Denny W.A.; *Tyrosine kinase inhibitors. 10. Isomeric 4-[(3-bromophenyl)amino]pyrido[d]-pyrimidines are potent ATP binding site inhibitors of the tyrosine kinase function of the epidermal growth factor receptor*; J. Med. Chem.; **1996**: 1823–1835.
149. Rewcastle G.W., Bridges A.J., Fry D.W., Rubin J.R., Denny W.A.; *Tyrosine kinase inhibitors. 12. Synthesis and structure-activity relationships for 6-substituted 4-(phenylamino)pyrimido[5,4-d]pyrimidines designed as inhibitors of the epidermal growth factor receptor*; J. Med. Chem.; **1997**: 1820–1826.
150. Baker C.H., Solorzano C.C., Fidler I.J.; *Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer*; Cancer Res; **2002**: 1996–2003.
151. Ciardiello F., Bianco R., Caputo R., et al.; *Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy*; Clin. Cancer Res.; **2004**: 784–793.
152. Guanglin L., Ling C., Graham S.P.; *Microwave-assisted synthesis of aminopyrimidines*; Tetrahedron Letters; **2002**: 5739–5742.
153. Brugnatelli G.; Ann. Chim. Phys.; **1818**: 201-206.
154. Tomlin C.D.S.; The pesticide manual; British crop protection council: 1997.
155. Elvidge J. A., Zaidi N. A.; *Heterocyclic syntheses with malonyl chloride. Part IX. 2-Substituted 4-chloro-6-pyrimidones from certain nitriles*; J. Chem. Soc. C; **1968**: 2188-2198.
156. Ried W., Beller G.; *Reaktionen von Chlorpyrimidinen, I Synthese von Thieno[2,3-d]pyrimidinen und Pyrrolo[2,3,-d]pyrimidinen*; Liebigs Ann. Chem.; **1988**: 633–642.
157. Chemical Abstract, **1942**; 4041.

158. Miyashita O., Matsumura K., Shimadju H., Hashimoto N.; *Studies on fluorinated pyrimidines. I. A New Method of Synthesizing 5-Fluorouracil and Its Derivatives*; Chem. Pharm. Bull.; **1981**: 3181-3190.
159. Reuben G.J.; *Reactions of Orthoesters with Active Methylene Compounds*; J. Am. Chem. Soc.; **1952**: 4889-4891.
160. Roth G.A., Tai J.J.; *A new Synthesis of Aryl Substituted Quinazolin-4(1H)-ones*; J. Heterocyclic Chem.; **1996**: 2051-2053.
161. Tsou H.R., Mamuya N., Johnson B.D., Reich M.F., Gruber B.C., Ye, F., Nilakantan R., Shen, R., Discifani C., DeBlanc R., Davis R., Koehn F.E. Greenberger L.M., Wang Y.F., Wissner A.J.; *6-Substituted-4-(3-bromophenylamino)quinazolines as putative irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor (HER-2) tyrosine kinases with enhanced antitumor activity.*; Med. Chem.; **2001**: 2719-2734.
162. Gloede J.; *Zur Reaktion von Dimethylformamidacetalen mit Alkylierungs- und Acylierungsmitteln*; Journal für Praktische Chemie; **1970**: 712-719.
163. Anelli P.L., Brocchetta M., Palano D., Visigalli M.; *Mild Conversion of primary Carboxamides into Carboxylic Esters*; Tetrahedron Letters; **1997**: 2367-2368.
164. Stanovnik B., Tisler M.; *Convenient Cyclization of oDifunctional Heterocycles with N,N-Dimethylformamide Dimethyl Acetal*; Synthesis; **1974**: 120-122.
165. Meerwein H., Florian W., Schon N., Stopp G.; *Über Säureamidacetale, Harnstoffacetale und Lactamacetale*; Justus Liebigs Annalen der Chemie; **1961**: 1-39.
166. Shildneck P. R., Windus W.; *S-methyl isothiurea sulfate*; Organic Syntheses; **1943**: 411.
167. Tkac A.; *Osmometrická studia tiomočoviny*; Chemicke Zvesti; **1949**: 332-339.
168. William H., Shaw R., Walker D.G.; *Kinetic Studies of Thiourea Derivatives. IV. The Methylated Thioureas. Conclusions*; J. Am. Chem. Soc.; **1958**: 5337-5342.
169. Gedye R.; Smith F.; Westaway K.; Ali H.; Baldisera L.; Laberge L.; Roussel J.; *The use of microwave ovens for rapid organic synthesis.*; Tetrahedron Lett.; **1986**: 279-282.
170. Giguere R. G.; Bray T. L.; Duncan S. M.; Majetich G.; *Application of commercial microwave ovens to organic Synthesis.*; Tetrahedron Lett.; **1986**: 4945-4948.
171. Trost B.M., Curran D.P.; *Chemoselective Oxidation of Sulfides to Sulfones with Potassium Hydrogen Persulfate*; Tetrahedron Letters; **1981**: 1287-1290.
172. Yamanaka H., Ogawa S., Sakamoto T.; *Oxidation of 2,4-Disubstituted Pyrimidines with Organic Peracids*; Heterocycles; **1981**: 573-576.
173. Kress T.J.; *Chemistry of Pyrimidine. 2. Synthesis of Pyrimidine N-Oxides and 4-Pyrimidinones by Reaction of 5-Substituted Pyrimidines with Peracids.*

- Evidence for Covalent Hydrates as Reaction Intermediates*; J. Org. Chem.; **1985**: 3073-3076.
174. Dreyfus M., Dodin G., Bensaude O., Dubois J. E.; *Tautomerism of purines. I. N(7)H .dha. N(9)H equilibrium in adenine*; J. Am. Chem. Soc.; **1975**: 2369–2376.
175. Kabuzs S., Tritschler W.; *Dialkoxymethyl-ammoniumsalze und ihre Verwendung als Formylierungsmittel*; Synthesis; **1971**: 312-314.
176. Prystaš M., Šorm F.; *Nucleic acids components and their analogues. LXXXV. Synthesis of 5-cyanouracil, 5-nitrouracil, and 5-aminouracil 1-glycosyl derivatives*; Collect. Czech. Chem. Commun.; **1966**: 3990-4001.
177. Taylor J.; *II.—The chloroacetates of S-alkylthiocarbamides*; J. Chem. Soc., Trans.; **1920**: 4-11.
178. Taylor E.C., Knopf R. J., Meyer R.F., Holmes A. Hoefle M.L.; *Pyrimido [4,5-d] pyrimidines. Part I*; J. Am. Chem. Soc.; **1960**: 5711–5718.