

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

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ**  
**ΠΥΡΑΖΟΛΟΠΥΡΙΔΙΝΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ**  
**ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ**

**ΓΙΑΝΝΟΥΛΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**  
**ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΑΘΗΝΑ 2013**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

|                   |                                          |
|-------------------|------------------------------------------|
| <b>Ν. ΠΟΥΛΗ</b>   | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> |
| <b>Π. ΜΑΡΑΚΟΣ</b> | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>                         |
| <b>Ε. ΜΙΚΡΟΣ</b>  | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>                         |

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

|                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| <b>Γ. Β. ΦΩΣΚΟΛΟΣ</b>    | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>           |
| <b>Α. Λ. ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ</b> | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>           |
| <b>Α. ΤΣΟΤΙΝΗΣ</b>       | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>           |
| <b>Π. ΜΑΡΑΚΟΣ</b>        | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>           |
| <b>Ε. ΜΙΚΡΟΣ</b>         | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b>           |
| <b>Ν. ΠΟΥΛΗ</b>          | <b>ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ</b>          |
| <b>Ι.Κ. ΚΩΣΤΑΚΗΣ</b>     | <b>ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ</b> |

**«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα» (Ν.5343/32, αρθ.202 παρ.2 και Ν.1268/82, αρθ. 50 παρ.8)**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΥΡΑΖΟΛΟΠΥΡΙΔΙΝΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή περιγράφεται ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων υποκατεστημένων πυραζολοπυριδινών, καθώς και η φαρμακολογική τους αξιολόγηση ως προς την κυτταροτοξική τους δράση και την αναστολή πρωτεϊνικών κινασών.

Τα μόρια που συντέθηκαν διακρίνονται σε τρεις ενότητες: στα παράγωγα της πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης, υποκατεστημένα με διάφορες αρυλαμινομάδες στη θέση 7, που φέρουν επιπλέον 5-χλωρο-, 5-κυανο-, 5-αρυλαμινομεθυλο- ή 5-αλκυλαμινομεθυλομάδα, και στα αντίστοιχα 3-φαινυλο- και 3-ισοπροπυλοανάλογα.

Η σύνθεση των παραγώγων της πρώτης ενότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ως πρώτων υλών του *N*-(2-χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-υλ)ακεταμιδίου και του *N*-(2-χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-5-υλ)ακεταμιδίου, τα οποία παρασκευάστηκαν από εμπορικά διαθέσιμες πικολίνες με σειρά χημικών μετατροπών. Για τα παράγωγα που φέρουν 5-χλωρο-υποκατάσταση ακολούθησε ενδομοριακή κύκλωση του 3-ακεταμιδίου προς τη 5-χλωροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη, οξείδωση προς το αντίστοιχο *N*-οξείδιο και μετάθεση αυτού προς το 5,7-διχλωροπαράγωγο. Στη συνέχεια έγινε υποκατάσταση με αρυλαμινομάδα στην 7-θέση και αφαλογόνωση. Για τη λήψη των 5-κυανοπαραγώγων πραγματοποιήθηκε μετάθεση του *N*-οξειδίου του 5-ακεταμιδίου και ενδομοριακή κύκλωση προς την 5-κυανο-7-χλωροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη. Κατόπιν έγινε υποκατάσταση στην 7-θέση και αναγωγική αμίνωση για την παρασκευή των 5-αρυλο- ή αλκυλαμινομεθυλο πυραζολοπυριδινών.

Στα μόρια της δεύτερης ενότητας ακολουθήθηκε ανάλογη διαδικασία για την παρασκευή των 5-χλωροπυραζολοπυριδινών, στις οποίες μετά από ιωδίωση στην 3-θέση και προστασία του πυραζολικού αζώτου εισήχθη η 3-φαινυλομάδα με σύζευξη τύπου Suzuki. Από το προϊόν αυτό προέκυψαν τα 5-χλωροανάλογα, αλλά και τα 5-κυανοανάλογα, με εισαγωγή της κυανομάδας στην 5-θέση, μέσω αντίδρασης σύζευξης με τη χρήση καταλυτών παλλαδίου.

Τα μόρια της τρίτης ενότητας παρασκευάστηκαν από κατάλληλα υποκατεστημένα πυριδινακεταμίδια, τα οποία προέκυψαν με εισαγωγή της ισοπροπυλομάδας με αντίδραση οργανολιθιακού επί της προστατευμένης 2-αμινο-4-πικολίνης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε ανάλογη συνθετική προσέγγιση για τη λήψη των υποκατεστημένων 3-ισοπροπυλο πυραζολοπυριδινών.

Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι δέκα ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Σημαντικός αριθμός παραγώγων έδειξε αξιόλογη δραστηριότητα, παρουσιάζοντας τιμές IC<sub>50</sub> 0.38 - 12 μM, με τα δραστικότερα να ανήκουν στην κατηγορία των 3-φαινυλοπυραζολοπυριδινών. Προκαταρκτικά πειράματα αναστολής της κινάσης PI3K έδειξαν ότι τα μόρια με κυτταροτοξική δράση ήταν επίσης καλοί αναστολείς του ενζύμου.

## ABSTRACT

### THE DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW SUBSTITUTED PYRAZOLOPYRIDINES AS POTENTIAL INHIBITORS OF PROTEIN KINASES

The present Thesis deals with the design and synthesis of new substituted pyrazolo[3,4-*c*]pyridines, and their pharmacological evaluation as cytotoxic agents, as well as potential inhibitors of protein kinases.

The compounds can be divided into three groups: the first includes derivatives of pyrazolo[3,4-*c*]pyridine which bear 7-arylamino substitution, as well as 5-chloro, 5-cyano-, 5-arylaminomethyl, or 5-alkylaminomethyl substituents. The other two groups include the corresponding 3-phenyl- and 3-isopropyl derivatives.

The synthesis of the first group derivatives was accomplished using either *N*-(2-chloro-4-methylpyridin-3-yl)acetamide or *N*-(2-chloro-4-methylpyridin-5-yl)acetamide, which have been prepared using commercially available picolines. The 5-chloro-analogues were obtained through intramolecular cyclization of the above mentioned 3-acetamide, *N*-oxidation of the intermediate pyrazol[3,4-*c*]pyridine and metathesis to the corresponding 5,7-dichloro compound. The 7-chloro-group was substituted by suitable arylamides and the 5-chloro group was then reduced. The 5-cyanopyrazolopyridines were prepared through *N*-oxide metathesis of the suitable picoline-5-acetamide, followed by intramolecular cyclization to result in the 5-cyano-7-chloropyrazolopyridine. Upon introduction of 7-arylamino substituents and reductive amination the 5-aryl- or alkylaminomethyl-derivatives were obtained.

The target substituted 3-phenylpyrazolopyridines were synthesized through Suzuki coupling of 5-chloro-3-iodopyrazolopyridine. The 5-cyano-group was then inserted to the resulting 5-chloro-3-phenyl derivative through palladium coupling.

Finally, the 3-isopropylpyrazolopyridines were prepared using suitably substituted pyridinacetamides, which were obtained through Lithium mediated introduction of the isopropyl group to protected 2-amino-4-picoline. The target compounds have resulted using an analogous synthetic procedure.

The new compounds have been evaluated for their cytotoxic activity against ten human cancer cell lines. A number of the derivatives proved to be active, showing  $IC_{50}$  values within the range of 0.38-12  $\mu$ M, whereas the most potent analogues proved to belong to the 3-phenylpyrazolopyridine series. Preliminary experiments concerning the evaluation of the inhibitory activity of the synthesized derivatives against PI3 Kinase, showed that a number of the most cytotoxic compounds were potent inhibitors of the enzyme as well.

Στους γονείς μου Κωνσταντίνο και Κορνηλία  
και στον αδερφό μου Χρήστο,  
για τη βαθιά κατανόηση,  
την ακλόνητη πίστη τους σε μένα και  
την αδιάκοπη συμπαράστασή τους  
καθ'όλη τη διάρκεια των χρόνων σπουδών μου.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμότες ευχαριστίες μου προς την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κα. Ν. Πουλή και τον Καθηγητή κ. Π. Μαράκο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν από τα πρώτα βήματα της συνεργασίας μας, καθώς και για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγησή τους και την ουσιαστική βοήθεια σε όλες τις φάσεις εκπόνησης και συγγραφής της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Καθηγητές κ. Γ.Β. Φώσκολο, κ. Α.Λ. Σκαλτσούνη, κ. Α. Τσοτίνη και κ. Ε. Μικρό, για τις εποικοδομητικές υποδείξεις τους κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι.Κ. Κωστάκη, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη μου για την πραγματικά ανεκτίμητη βοήθεια σε επιστημονικό επίπεδο, αλλά και για την αμέριστη συμπαράσταση και τη διαρκή του στήριξη με αστείρευτη επιμονή, υπομονή και αισιοδοξία όλα αυτά τα χρόνια που είχα την τιμή να συνεργάζομαι μαζί του.

Ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα κ. Ευάγγελο Γκίκα για τη λήψη των φασμάτων μάζας και τις πολύτιμες επεξηγήσεις του.

Ευχαριστώ τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο της ερευνητικής μας ομάδας, τα μέλη ΔΕΠ και όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, ευχαριστώ την επιστημονική ομάδα του ερευνητικού κέντρου City of Hope (City of Hope Comprehensive Cancer Center, Molecular Medicine, Beckman Research Institute, Duarte, CA, USA) καθώς και την ερευνητική ομάδα της Ακαδημίας Αθηνών και τους συνεργάτες τους στο Πανεπιστήμιο των Ιωαννίνων (Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Genetics Division, Biomedical Research Institute of Ioannina, Foundation of Research and Technology), για τη διενέργεια της φαρμακολογικής αξιολόγησης των ενώσεων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|                                                                                                                       |                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>                                                                                              | <b>10</b>                                      |
| <b>1.1. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ _____</b>                                                                                    | <b>ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.</b> |
| <b>1.2. ΚΙΝΑΣΕΣ _____</b>                                                                                             | <b>14</b>                                      |
| 1.2.1. Κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών _____                                                                  | 20                                             |
| <b>1.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ _____</b>                                 | <b>26</b>                                      |
| 1.3.1. Κινάσες που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο _____                                                                 | 26                                             |
| 1.3.2. Άλλες κινάσες που σχετίζονται με νεοπλασία _____                                                               | 42                                             |
| <b>1.4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ _____</b>                                   | <b>46</b>                                      |
| 1.4.1. Ο ρόλος των κινασών στην καρκινογένεση – θεραπευτικές προσεγγίσεις _____                                       | 46                                             |
| 1.4.2. Δέσμευση των αναστολέων στο ενεργό κέντρο των κινασών _____                                                    | 49                                             |
| 1.4.3. Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ως<br>αντικαρκινικών παραγόντων _____              | 56                                             |
| 1.4.4. Στόχοι της εργασίας _____                                                                                      | 59                                             |
| <b>2. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>                                                                                          | <b>61</b>                                      |
| <b>2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I _____</b>                                                                      | <b>61</b>                                      |
| 2.1.1. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο και 7-αρυλαμινο-5-χλωρο-υποκατεστημένων<br>αναλόγων του τύπου _____                  | 61                                             |
| 2.1.2. Παρασκευή των αναλόγων του τύπου I, $R = -CN, -CH_2NHA_r, -CH_2NHR$ _____                                      | 78                                             |
| 2.1.2.1. Παρασκευή του 7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτρίλιου _____                                      | 78                                             |
| 2.1.2.2. Παρασκευή των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών<br>(34 – 39) _____                   | 83                                             |
| <b>2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II _____</b>                                                           | <b>88</b>                                      |
| 2.2.1. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο και 7-αρυλαμινο-5-χλωρο-υποκατεστημένων<br>3-φαινυλο-αναλόγων του τύπου II _____     | 88                                             |
| 2.2.2. Παρασκευή των 3-φαινυλο-αναλόγων του τύπου II, $R = -CN, -CH_2NHA_r, -CH_2NHR$ _____                           | 94                                             |
| <b>2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III _____</b>                                                       | <b>101</b>                                     |
| 2.3.1. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο και 7-αρυλαμινο-5-χλωρο-υποκατεστημένων<br>3-ισοπροπυλο-αναλόγων του τύπου III _____ | 101                                            |
| 2.3.2. Παρασκευή των 3-ισοπροπυλο-αναλόγων του τύπου III, $R = -CN, -CH_2NHA_r,$<br>$-CH_2NHR$ _____                  | 112                                            |
| <b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>                                                         | <b>119</b>                                     |
| <b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>                                                                                     | <b>135</b>                                     |

|                                                                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ</b>                                                                                                  | <b>135</b> |
| <b>4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I</b>                                                                                               | <b>135</b> |
| 4.2.1. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο και 7-αρυλαμινο-5-χλωρο-υποκατεστημένων αναλόγων του τύπου I                                            | 135        |
| 4.2.1.1. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (20)                                              | 135        |
| 4.2.1.2. Γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 21 – 22 | 141        |
| 4.2.1.3. Γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 23 – 24                           | 143        |
| 4.2.1.4. Γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 25 – 26                                   | 144        |
| 4.2.2. Παρασκευή των αναλόγων του τύπου I, $R = -CN$ , $-CH_2NHA_r$ , $-CH_2NHR$                                                         | 145        |
| 4.2.2.1. Σύνθεση του 7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτριλίου (29)                                                            | 145        |
| 4.2.2.2. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτριλίων 30 – 31                                   | 146        |
| 4.2.2.3. Γενική μέθοδος παρασκευής των 1-{7-αρυλαμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино}μεθαναμινών 32 – 33                                   | 147        |
| 4.2.2.4. Γενική μέθοδος παρασκευής των N-υποκατεστημένων 1-{7-αρυλαμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино}μεθαναμινών 34 – 39                 | 148        |
| <b>4.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II</b>                                                                                    | <b>152</b> |
| 4.3.1. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο και 7-αρυλαμινο-5-χλωρο-υποκατεστημένων 3-φαινυλο-αναλόγων του τύπου II                                 | 152        |
| 4.3.1.1. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (44)                                    | 152        |
| 4.3.1.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 45 – 46         | 155        |
| 4.3.1.3. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 47 – 48                                   | 156        |
| 4.3.1.4. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 49 – 50                                           | 157        |
| 4.3.2. Παρασκευή των 3-φαινυλο-αναλόγων του τύπου II, $R = -CN$ , $-CH_2NHA_r$ , $-CH_2NHR$                                              | 158        |
| 4.3.2.1. Σύνθεση του 7-χλωρο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτριλίου (52)                                                 | 158        |
| 4.3.2.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-παραγώγων του 3-φαινυλο-1H-πυραζολο-[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτριλίου (54, 57)                           | 159        |
| 4.3.2.3. Σύνθεση των 1-{7-αρυλαμινο-3-φαινυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино}μεθαναμινών 58 - 59                                           | 162        |
| 4.3.2.4. Σύνθεση των N-υποκατεστημένων 1-{7-αρυλαμινο-3-φαινυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино}μεθαναμινών 60 - 65                         | 163        |
| <b>4.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III</b>                                                                                | <b>167</b> |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.1. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο και 7-αρυλαμινο-5-χλωρο-υποκατεστημένων 3-ισοπροπυλο-αναλόγων του τύπου III                             | 167 |
| 4.4.1.1.α. Σύνθεση της 1-ακετυλο-5,7-διχλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (75)                                          | 167 |
| β. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (89)                                  | 171 |
| 4.4.1.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 90 – 91 | 177 |
| 4.4.1.3. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 92 – 93                           | 178 |
| 4.4.1.4. Σύνθεση των αφαλογονομένων 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 94 – 95            | 179 |
| 4.4.2. Παρασκευή των 3-ισοπροπυλο-αναλόγων του τύπου I, R = -CN, -CH <sub>2</sub> NHAr, -CH <sub>2</sub> NHR                             | 180 |
| 4.4.2.1. Σύνθεση του 7-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτριλίου (102)                                          | 180 |
| 4.4.2.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτριλίων 103 – 104                  | 183 |
| 4.4.2.3. Σύνθεση των 1-{7-αρυλαμινο-3-ισοπροπυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-μεθαναμινών 105- 106                                      | 184 |
| 4.4.2.4. Σύνθεση των N-υποκατεστημένων 1-{7-αρυλαμινο-3-ισοπροπυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-μεθαναμινών 107 - 112                   | 185 |

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....189

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

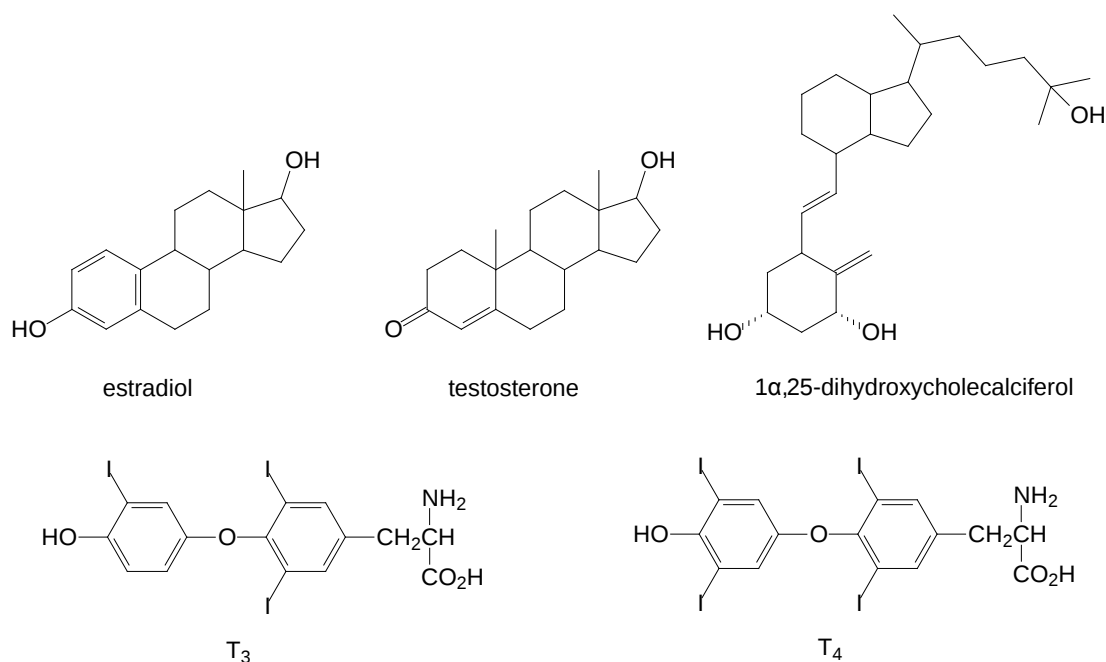
Πολλά από τα καθοριστικά χαρακτηριστικά του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων της ανεξέλεγκτης ανάπτυξης, επιβίωσης, διαφοροποίησης, αγγειογένεσης και μετάστασης, απορρέουν από την απόκλιση της ρυθμιστικής λειτουργίας των οδών μεταγωγής του σήματος (*signal transduction pathways*), οι οποίες φυσιολογικά βρίσκονται υπό στενό έλεγχο. Μέσα από τη συνεχή πρόοδο στην κατανόηση των μηχανισμών που υπογραμμίζουν την ανάπτυξη του καρκίνου, κατέστη εμφανές ότι συγκεκριμένα μονοπάτια απορρυθμίζονται συχνότερα. Η απορρύθμιση αυτή, ως αποτέλεσμα εξάλειψης, μετάλλαξης ή υπερέκφρασης των γονιδιακών προϊόντων, συνιστά μια παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση θεμελιωδών ρυθμιστών αυτών των μονοπατιών, με πρότυπο παράδειγμα αυτό των **κινασών**, των ενζύμων-κλειδιών που καταλύοντας τη φωσφορυλίωση διαφορετικών υποστρωμάτων, οδηγούν μέσα από πολύπλοκα δίκτυα πυροδότησης των «καταρρακτών» βιοχημικών αντιδράσεων (*reaction cascades*) και μεταγωγής σήματος, σε ένα βιοχημικό «ντόμινο» ενεργειών, με μεγάλη βιολογική σημασία.<sup>1</sup>

### 1.1. ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Με τον όρο μεταγωγή σήματος αναφέρεται η διαδικασία κατά την οποία ένα εξωκυττάριο μόριο-σηματοδότης ενεργοποιεί ένα μεμβρανικό υποδοχέα με αποτέλεσμα την πυροδότηση σειράς αντιδράσεων που συμβαίνουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Με τη συχνή συμμετοχή και δευτερευόντων αγγελιοφόρων, το σήμα ενισχύεται και προωθείται σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις προάγοντας μια βιολογική απόκριση και επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση. Οι εξωκυττάριοι σηματοδότες, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική και ενδοκυτταρική επικοινωνία ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό, περιλαμβάνοντας μόρια διαφορετικών χημικών δομών.<sup>2</sup>

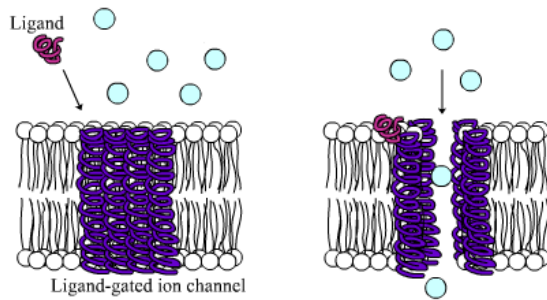
Στα πλαίσια του ελέγχου της λειτουργίας των πολυκύτταρων οργανισμών έχουν αναπτυχθεί πολύπλοκοι μηχανισμοί επικοινωνίας, οι οποίοι συνοψίζονται στους εξής:

● Στο μηχανισμό που ακολουθούν μόρια, των οποίων η λιποφιλία επιτρέπει τη διάβαση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όπως είναι η οικογένεια των στεροειδών ορμονών, των ορμονών του θυρεοειδούς, της βιταμίνης D (**Εικόνα 1.1.1.**) και του ρετινοϊκού οξέος. Με την είσοδό τους στο κύτταρο προσδένονται σε ειδικούς κυτταροπλασματικούς ή πυρηνικούς υποδοχείς. Κατόπιν αυτοί υφίστανται αλλαγή διαμόρφωσης και προσδένονται με τη σειρά τους σε χαρακτηριστικές αλληλουχίες των ρυθμιστικών περιοχών του DNA, επιδρώντας στη μεταγραφή, ή επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία με άμεση αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.<sup>3</sup>



**Εικόνα 1.1.1.**

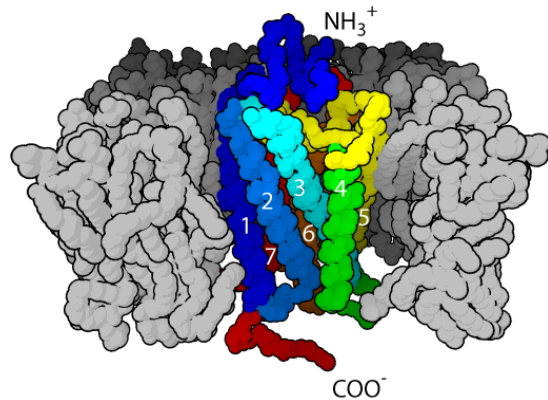
● Μόρια-σηματοδότες που προσδένονται σε μεμβρανικό υποδοχέα ο οποίος αποτελεί διάυλο ιόντων (ιοντοτρόποι υποδοχείς), προκαλώντας, ορθοστερικά ή αλλοστερικά ταχεία αλλαγή στη διαμόρφωσή του και εκπόλωση της μεμβράνης, που επιτρέπει την ελεύθερη διέλευση των ιόντων διαμέσου του διαύλου, η οποία και επιφέρει το βιολογικό αποτέλεσμα (**εικόνα 1.1.2.**). Ορισμένοι



νευροδιαβιβαστές,<sup>5</sup> όπως η ακετυλοχολίνη,<sup>6</sup> η γλυκίνη<sup>7</sup> και το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA),<sup>8</sup> ακολουθούν αυτό το μηχανισμό μεταγωγής σήματος.

**Εικόνα 1.1.2.**

● Στο μηχανισμό που περιλαμβάνει την πρόσδεση σε έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα, του οποίου η ενδοκυτταρική περιοχή είναι συζευγμένη με μια G-πρωτεΐνη, και η οποία με τη σειρά της ενεργοποιείται και πυροδοτεί την παραγωγή δευτερογενών σημάτων, που συνιστούν τελικά την κυτταρική απόκριση. Οι G-πρωτεΐνες (*Guanine nucleotide binding proteins*),<sup>9</sup> μπορεί να είναι δυο κατηγοριών: ετεροτριμερή, δηλαδή αποτελούμενες από τρεις διαφορετικές υπομονάδες  $\alpha$ ,  $\beta$  και  $\gamma$ , που είναι και η συχνότερη μορφή, ή μονομερή που σχετίζονται με



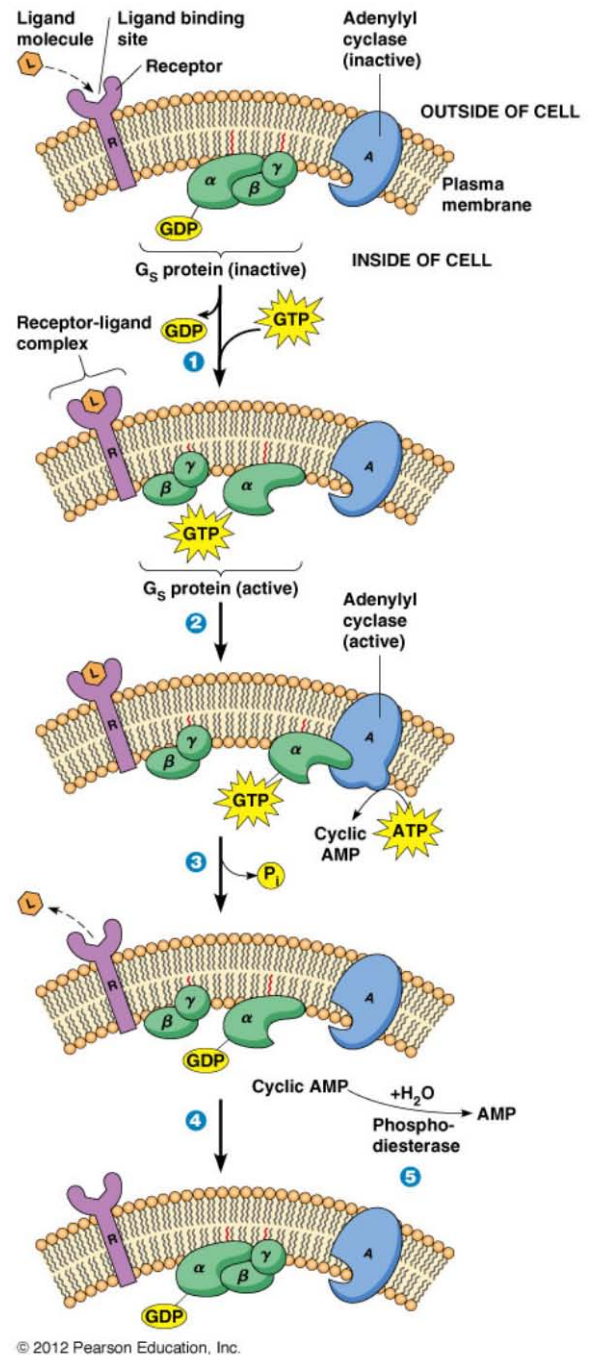
**Εικόνα 1.1.3.** Δομή των υποδοχέων GPCR.

την οικογένεια πρωτεϊνών Ras (*Rat sarcoma* - το όνομα του ογκογονιδίου που προκαλεί σάρκωμα σε αρουραίους)<sup>10</sup> ή αλλιώς την οικογένεια των μικρών GTP-ασών (*small GTPase family of G-proteins*), των οποίων η δομή και η λειτουργία είναι όμοια με αυτή της  $\alpha$ -υπομονάδας των τριμερών G-πρωτεϊνών. Κατά τη μεταγωγή του σήματος μέσω αυτού του μηχανισμού, ένα μόριο-σηματοδότης, όπως ορισμένες ορμόνες, νευροδιαβιβαστές, αγγειοδραστικά πεπτίδια και αυξητικοί παράγοντες (π.χ. η θρομβίνη, η βομβεσίνη, η βραδυκίνη, η βασοπρεσίνη και η σεροτονίνη), αλληλεπιδρά αρχικά με έναν υποδοχέα συζευγμένο με G-πρωτεΐνη (*G-protein coupled receptor, GPCR*) και επάγει την αλλαγή στη διαμόρφωσή του. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, και παρά τη χημική ποικιλομορφία των προσδετών τους, εμφανίζουν δομική ομοιότητα, που χαρακτηρίζεται από ένα εξωκυτταρικό αμινοτελικό άκρο

ακολουθούμενο από επτά διαμεμβρανικές  $\alpha$ -έλικες, που καταλήγουν σε ένα ενδοκυτταρικό καρβοξυτελικό άκρο (Εικόνα 1.1.3.).<sup>11</sup>

Οι G-πρωτεΐνες βρίσκονται στην ανενεργή τους μορφή όταν είναι συνδεδεμένες με διφωσφορική γουανοσίνη (GDP, *guanosine diphosphate*) και με την πρόσδεση του σηματοδότη στον υποδοχέα, επέρχεται φωσφορυλίωση του GDP που μετατρέπεται σε τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP, *guanosine triphosphate*) και αυτομάτως ενεργοποίηση της πρωτεΐνης και απόσπαση της υπομονάδας  $\alpha$  από το ετεροτριμερές (Εικόνα 1.1.4.).<sup>12</sup> Το σύμπλοκο  $\alpha$ -υπομονάδας-GTP, όπως και το διμερές  $\beta\gamma$ , μπορούν στη συνέχεια να ενεργοποιήσουν διαφορετικές εκτελεστικές πρωτεΐνες (*effector proteins*), όπως είναι η αδενυλική κυκλάση, η οποία με τη σειρά της καταλύει το σχηματισμό του δευτερεύοντος αγγελιοφόρου cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) από το ATP (*adenosine triphosphate*, τριφωσφορική αδενοσίνη). Τέλος η  $\alpha$ -υπομονάδα, μέσω της ενδογενούς ενζυμικής της δραστηριότητας ως GTP-άσης, υδρολύει το προσδεδεμένο GTP προς GDP, οδηγώντας στην επανασύνδεση με το διμερές  $\beta\gamma$  και την αναγέννηση του ετεροτριμερούς.

Με δεδομένο ότι οι  $\alpha$ -υπομονάδες ποικίλουν στα διάφορα μέλη της οικογένειας και διακρίνονται σε υποτύπους, ενώ οι  $\beta$  και  $\gamma$  υπομονάδες είναι κοινές, πυροδοτούνται διαφορετικά μονοπάτια δευτερογενών αγγελιοφόρων, ανάλογα με τον υποτύπο



Εικόνα 1.1.4. Μηχανισμός δράσης G πρωτεϊνών.<sup>12</sup>

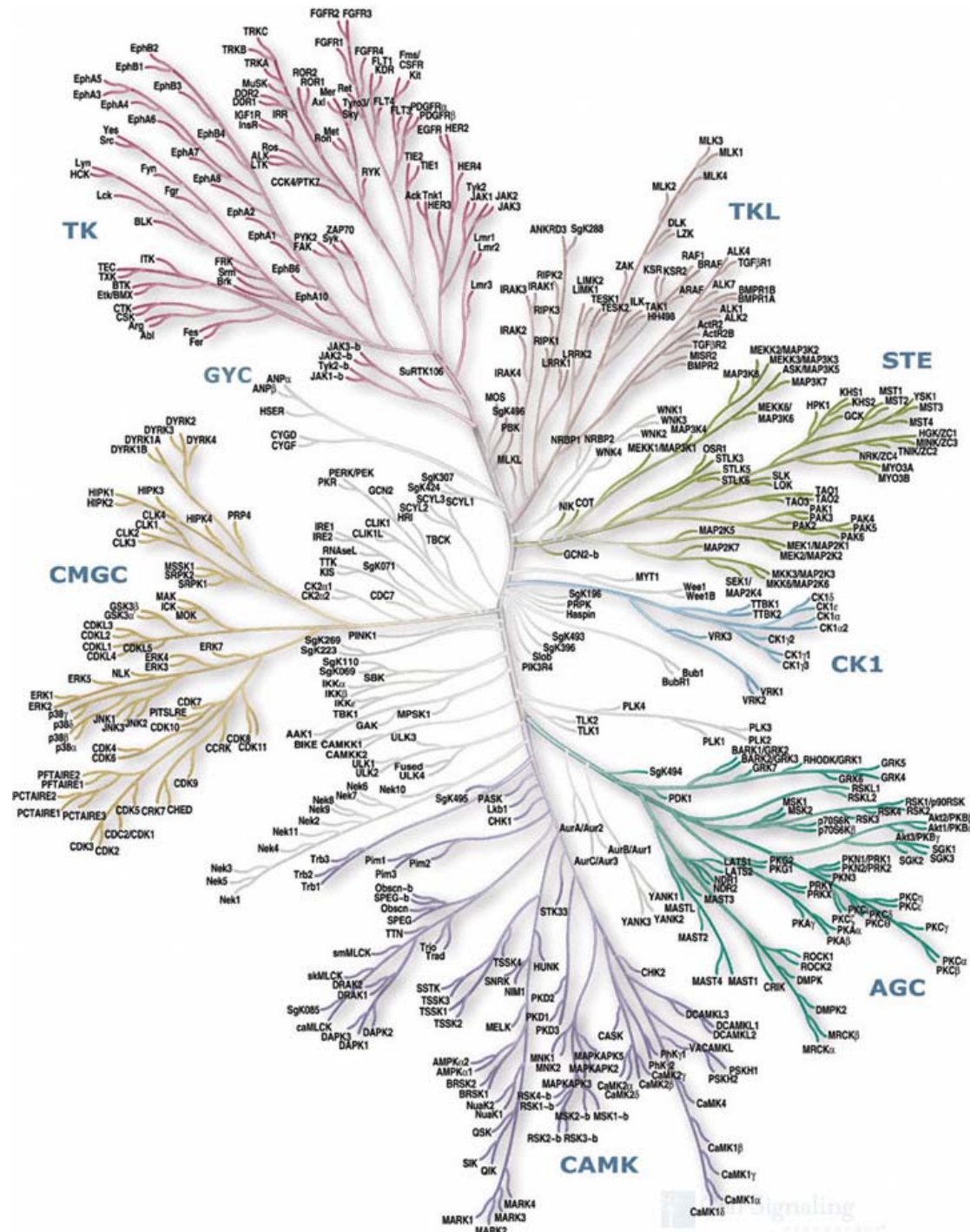
τους, όπως είναι η επαγωγή της τριφωσφορικής ινσιτόλης (*inositol-1,4,5-triphosphate*, IP3) και της διακυλογλυκερόλης (*diacylglycerol*, DAG), πέρα από το προαναφερθέν cAMP.<sup>13</sup> Οι G-πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη λειτουργία μεταβολικών ενζύμων, ιοντικών διαύλων, πρωτεϊνικών μεταφορέων, καθώς και τη μεταγραφή του DNA σε RNA.<sup>14</sup> Είναι καθοριστικής σημασίας για τη μετάδοση του σήματος, ενώ δυσλειτουργία των υποδοχέων τους (GPCRs) έχει συνδεθεί με ασθένειες όπως καρδιαγγειακά προβλήματα, διαβήτης, κατάθλιψη, διαταραχές όρασης, αλλεργίες και κάποιες μορφές καρκίνου, εξ ου και καταλαμβάνουν μεγάλο ποσοστό των κυτταρικών στόχων των σύγχρονων φαρμάκων.

● Ο μηχανισμός που ακολουθούν οι περισσότεροι πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (*Epidermal Growth Factor*, EGF), η ινσουλίνη, ο επαγόμενος από τα αιμοπετάλια αυξητικός παράγοντας (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) κα, οι οποίοι προσδένονται σε διαμεμβρανικό υποδοχέα που διαθέτει εγγενή δραστικότητα πρωτεϊνικής κινάσης. Αυτή ενεργοποιείται από την πρόσδεση του αυξητικού παράγοντα και προκαλεί τόσο την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα (φωσφορυλίωση τυροσίνης, σερίνης ή θρεονίνης που εντοπίζονται στην ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα), όσο και τη φωσφορυλίωση άλλων πρωτεϊνών εντός του κυττάρου, με συνέπεια την περαιτέρω μετάδοση του σήματος.<sup>15</sup>

## 1.2. ΚΙΝΑΣΕΣ

Οι κινάσες ή «φωσφοτρανσφεράσες» καταλύουν τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων από μόρια-δότες όπως η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), σε υποστρώματα-δέκτες. Ως υποστρώματα των κινασών εμφανίζονται λιπίδια, υδατάνθρακες, αμινοξέα και νουκλεοτίδια, με σκοπό τη μεταγωγή σήματος ή τη συμμετοχή σε μεταβολικά μονοπάτια. Μία από τις μεγαλύτερες και σημαντικότερες ομάδες των κυτταρικών κινασών είναι οι **πρωτεϊνικές κινάσες**, που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες πρωτεΐνες και τροποποιούν τη δράση τους φωσφορυλιώνοντας κατάλληλες ομάδες ορισμένων αμινοξέων τους. Διαθέτουν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, που περιλαμβάνει δομικές πρωτεΐνες, μεταβολικά ένζυμα και παράγοντες μεταγραφής και χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στη μεταγωγή σήματος,

ελέγχοντας πολύπλοκες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η διαφοροποίηση, η μεταβολική συμπεριφορά, ο κυτταρικός κύκλος, η κινητικότητα και η ικανότητα μετάστασης, αγγειογένεσης και απόπτωσης. Μέχρι σήμερα έχουν αποκωδικοποιηθεί από το ανθρώπινο γονιδίωμα 518 διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες (**Εικόνα 1.2.1.**),<sup>16</sup> των οποίων ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος και η λειτουργική κατάσταση αποτελεί ακόμα αντικείμενο μελέτης. Με δεδομένη αυτή την τεράστια ποικιλία, καθώς και τον κομβικό ρόλο που διαδραματίζουν στο εξαιρετικά σημαντικό για τη φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών, συντονισμένο σύνολο αντιδράσεων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσής πρωτεϊνών τους (μέσω των συνυπαρχουσών πρωτεϊνικών φωσφατασών, που απομακρύνουν τις φωσφορικές ομάδες, συμβάλλοντας στον έλεγχο της έντασης και της διάρκειας του αποτελέσματος), οι πρωτεϊνικές κινάσες δε μπορούν παρά να αποτελούν έναν ιδιαίτερα ελκυστικό αντικείμενο έρευνας για την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα.



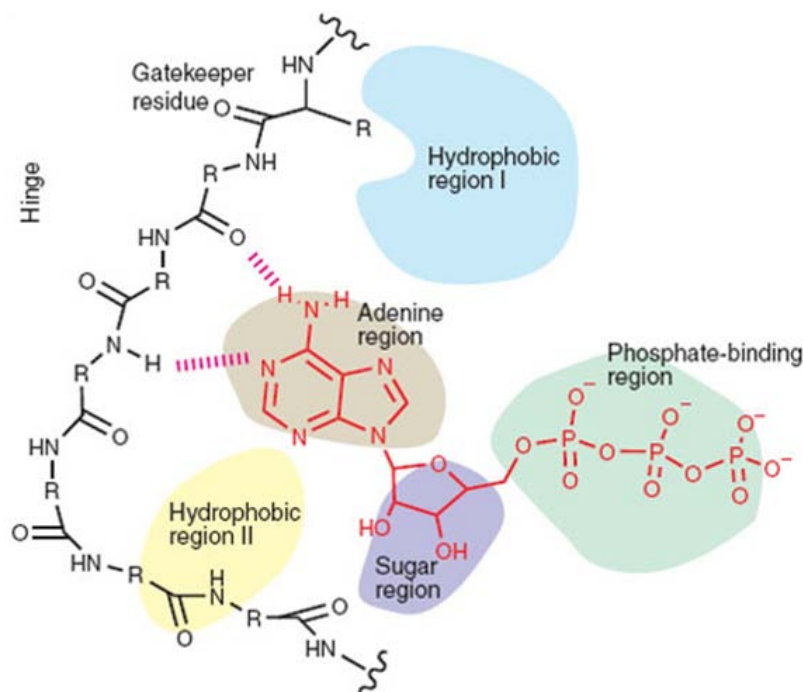
**Εικόνα 1.2.1.** **AGC** περιλαμβάνει τις οικογένειες PKA, PKG, PKC; **CAMK** Calcium/calmodulin-dependent protein kinase; **CK1** Casein kinase 1; **CMGC** περιλαμβάνει τις οικογένειες CDK, MAPK, GSK3, CLK; **STE** περιλαμβάνει τις Sterile 7, Sterile 11, Sterile 20 κινάσες; **TK** Tyrosine kinase; **TKL** Tyrosine kinase-like.<sup>17</sup>

Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες δρουν με ένα γενικό μηχανισμό που περιλαμβάνει τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σε ένα υπόλοιπο σερίνης, θρεονίνης ή τυροσίνης του υποστρώματός τους.<sup>18</sup> Για την αντίδραση μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας είναι απαραίτητες τρεις ειδικές περιοχές<sup>19</sup> στο μόριο της πρωτεϊνικής κινάσης:

- μία θέση πρόσδεσης του ATP
- μία περιοχή που καταλύει τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από το ATP, προς το υπόστρωμα και
- μία περιοχή πρόσδεσης του πρωτεϊνικού υποστρώματος

Η καταλυτική περιοχή των διαφορετικών κινασών παρουσιάζει εν γένει υψηλή ομολογία, με συγγενή τριτοταγή δομή για τη θέση πρόσδεσης του ATP, παρέχοντας μία διαφωτιστική εικόνα για τους μηχανισμούς ενεργοποίησης και απενεργοποίησης αυτών των ενζύμων.<sup>20</sup> Ωστόσο έχουν εντοπισθεί ορισμένες διαφορές, που παρέχουν τη δυνατότητα διάκρισης στην εκλεκτική αναστολή κάποιας υποκατηγορίας έναντι άλλων, χωρίς αυτές να επηρεάζονται.

Στη θέση πρόσδεσης του ATP διακρίνονται πέντε περιοχές (**Εικόνα 1.2.2.**):



**Εικόνα 1.2.2.** Θέση πρόσδεσης του ATP στις κινάσες.<sup>21</sup>

❖ Η περιοχή της αδεΐνης (*adenine region*). Πρόκειται για μια υδρόφοβη κοιλότητα, όπου σχηματίζονται δύο δεσμοί υδρογόνου, μεταξύ των αζώτων *N-1* και *N-6* του δακτυλίου της αδεΐνης, και των αμιδικών αζώτων και καρβονυλίων των απέναντι αμινοξέων της πρωτεϊνικής κινάσης. Οι δεσμοί αυτοί είναι καθοριστικοί για την πρόσδεση, γι' αυτό και μικρά μόρια–αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών, που καταλαμβάνουν ανταγωνιστικά τη θέση σύνδεσης του ATP, συχνά μιμούνται τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζει το αδεϊνικό τμήμα του ATP.<sup>22</sup>

❖ Η περιοχή του σακχάρου (*sugar region*). Για τις περισσότερες κινάσες πρόκειται για μια υδρόφιλη περιοχή, εξαιρούνται όμως ορισμένες, όπως για παράδειγμα ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), με ενζυμική ενεργότητα τυροσινικής κινάσης.<sup>23</sup>

❖ Ένας υδρόφοβος θύλακας (*hydrophobic pocket*) και

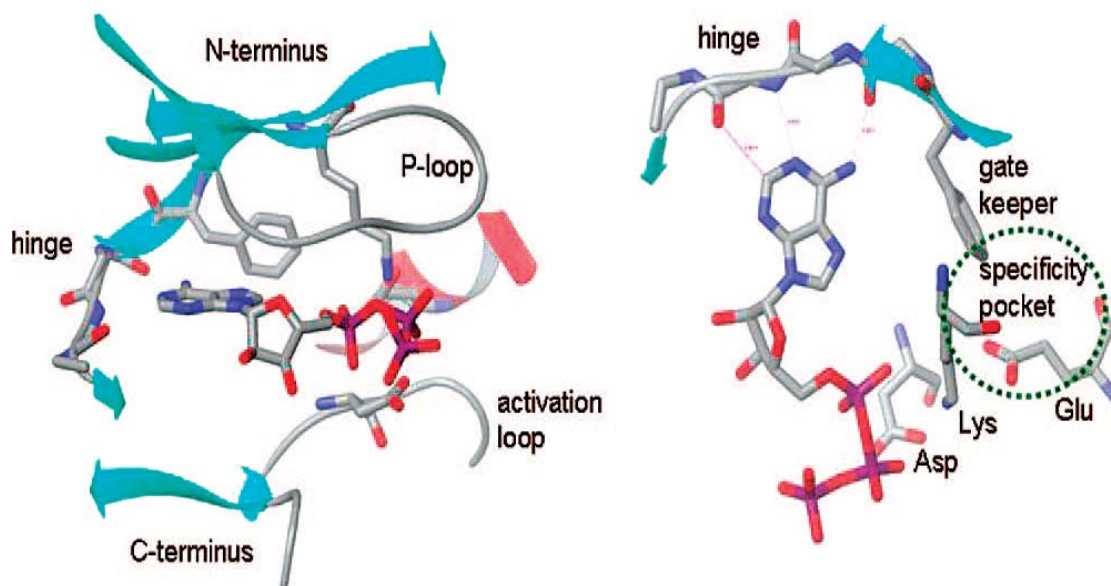
❖ ένας υδρόφοβος διάυλος (*hydrophobic channel*). Και οι δύο αυτές περιοχές δεν αλληλεπιδρούν με το ATP, αλλά μπορούν εν δυνάμει να χρησιμοποιηθούν από τους περισσότερους αναστολείς των κινασών, διαδραματίζοντας κατ' επέκταση σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα του αναστολέα.

❖ Μία περιοχή πρόσδεσης της φωσφορικής ομάδας (*phosphate-binding region*), ένα εγκόλπωμα πλούσιο σε ομάδες γλυκίνης στο αμινοτελικό άκρο του ενεργού κέντρου. Σταθεροποιείται από μια αλληλουχία βασικών αμινοξέων, τα οποία εμπλέκονται επίσης και στην καταλυτική διαδικασία.<sup>24,25</sup>

Τόσο η αμινοτελική, όσο και η καρβοξυτελική περιοχή των κινασών παρουσιάζουν μεγάλη δομική πολυπλοκότητα. Η αμινοτελική περιοχή αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και μια α-έλικα, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή αποτελείται κυρίως από α-έλικες. Όμως, μεταξύ των δύο αυτών περιοχών παρεμβάλλεται ένα ευκίνητο πολυπεπτιδικό τμήμα, που λειτουργεί ως άρθρωση, έτσι ώστε τόσο η αμινοτελική, όσο και η καρβοξυτελική περιοχή να μπορούν να κινούνται και να περιστρέφονται ανεξάρτητα, χωρίς αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Αυτό ακριβώς συμβαίνει κατά την πρόσδεση του υποστρώματος της κινάσης και του ATP, όταν το ετεροκυκλικό τμήμα της αδεΐνης συνδέεται στην κατάλληλη θέση, ενώ η ριβόζη διευθετείται προς την

αρχή της καρβοξυτελικής περιοχής, όπου εντοπίζεται η καταλυτική περιοχή της κινάσης (catalytic loop). (Εικόνα 1.2.3).<sup>26</sup> Για την περαιτέρω σταθεροποίηση του ATP στη θέση πρόσδεσης και κυρίως για τη σταθεροποίηση του μεταβατικού συμπλόκου (*transition state*) της φωσφορυλίωσης αναπτύσσονται πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφορικών ομάδων του σακχάρου και της πλούσιας σε γλυκίνη περιοχής του ενζύμου, που βρίσκεται στην οροφή του ενεργού κέντρου (αναφέρεται ως GXGXXG μοτίβο, G-loop, ή P-loop).

Στο κέντρο της καταλυτικής περιοχής εντοπίζεται μια καλά συντηρημένη τριπλέτα αμινοξέων, που απαρτίζεται από ασπαρτικό οξύ, φαινυλαλανίνη και γλυκίνη (*DFG* μοτίβο). Το ασπαρτικό οξύ συμμετέχει, μαζί με δύο μεταλλοϊόντα και τη γλυκίνη στο σχηματισμό συμπλόκου με την τριφωσφορική ομάδα του ATP και φαίνεται ότι παίζει ενεργό ρόλο στην μεταφορά της φωσφορικής ομάδας. Μια σημαντική διαμόρφωση των κινασών είναι εκείνη που χαρακτηρίζεται ως *DFG-out*, κατά την οποία το ασπαρτικό οξύ περιστρέφεται εκτός του ενεργού κέντρου, ακολουθούμενο βέβαια και από τα δύο διπλανά αμινοξέα, τη γλυκίνη και την φαινυλαλανίνη. Η μετακίνηση της ογκώδους φαινυλαλανίνης αφήνει κενή μια φαρδιά λιπόφιλη κοιλότητα, που μπορεί να χρησιμεύσει για αλληλεπίδραση με έναν κατάλληλα σχεδιασμένο αναστολέα. Πολύ σημαντικά φάρμακα, όπως η ιματινίμη δεσμεύονται και σταθεροποιούν αυτή την ανενεργή διαμόρφωση του ενεργού κέντρου.<sup>27</sup> Σημαντικός είναι και ο ρόλος του αμινοξέος που χαρακτηριστικά αναφέρεται ως αμινοξύ-θυρωρός (*gate keeper*), το οποίο βρίσκεται στην στενή είσοδο του ενεργού κέντρου και λαμβάνεται ως σημείο αναφοράς, για τον καθορισμό της θέσης των αμινοξέων που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με το ATP (Εικόνα 1.2.3.). Το μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας του θυρωρού ποικίλει στις διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες του κυττάρου και καθορίζει την προσβασιμότητα στο λιπόφιλο ενεργό τους κέντρο, προσφέροντας μια ακόμα δυνατότητα εκλεκτικής δράσης σε κατάλληλα σχεδιασμένους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.



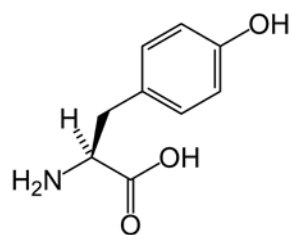
**Εικόνα 1.2.3** Τυπική εικόνα της θέσης πρόσδεσης του ATP, μεταξύ της αμινοτελικής και καρβοξυτελικής περιοχής της κινάσης. Δεξιά φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με το ευκίνητο, αρθρωτό τμήμα του ενζύμου, η DFG τριπλέτα και οι ομάδες που ελέγχουν την είσοδο στη ειδική θέση.

### 1.2.1. ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ

Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί διάφορα σχήματα κατηγοριοποίησης των πρωτεϊνικών κινασών, με τα δύο επικρατέστερα να λαμβάνουν ως κριτήρια αφενός το υποστρώμα που φωσφορυλιώνεται, και αφετέρου την αλληλουχία των αμινοξέων της καταλυτικής περιοχής των κινασών.<sup>16,28</sup>

Στην πρώτη περίπτωση τα ένζυμα διακρίνονται σε τρεις ευρείες κατηγορίες, ανάλογα με το αμινοξύ που φωσφορυλιώνουν :

α) **Κινάσες Τυροσίνης (Tyrosine Kinases, TKs)**, που φωσφορυλιώνουν το φαινολικό υδροξύλιο της τυροσίνης.



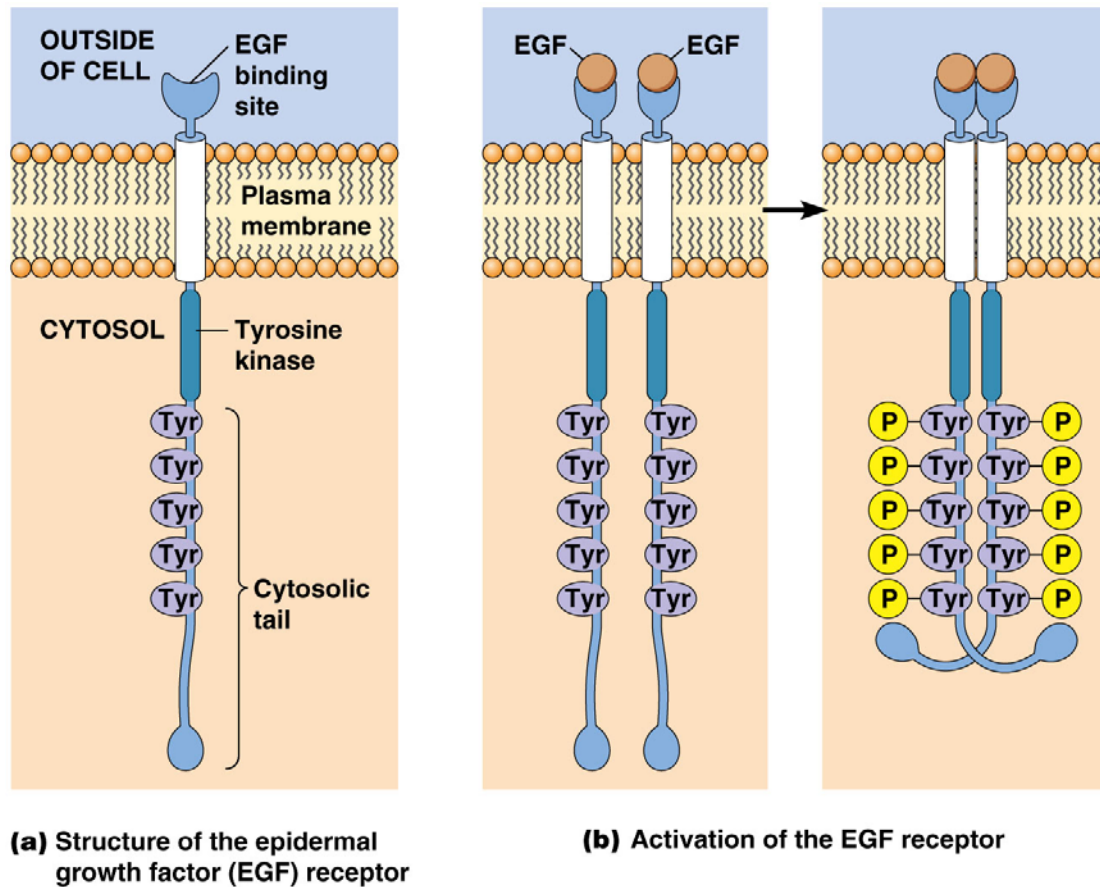
L-tyrosine

Είναι οι πρώτες κινάσες που ταυτοποιήθηκαν και μελετήθηκαν. Έχει βρεθεί ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 90 κινάσες τυροσίνης και 43 που προσομοιάζουν σε κινάσες τυροσίνης (*Tyrosine kinases-like, TKL*).<sup>29</sup> Διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες:

- στους μη υποδοχείς (*Non-Receptor Tyrosine Kinases*), που δρουν ως κυτταροπλασματικές κινάσες και λαμβάνουν μέρος στη μεταγωγή του σήματος ρυθμίζοντας τη δραστικότητα άλλων πρωτεϊνών. Εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, ή στην εσωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και από το σύνολο των 90 κινασών τυροσίνης, οι 32 ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και διακρίνονται περαιτέρω σε 10 υποοικογένειες, ανάλογα με τη δομική οργάνωση και την αμινοξική αλληλουχία της καταλυτικής περιοχής.<sup>30</sup> Η πρώτη κινάση αυτής της κατηγορίας που ταυτοποιήθηκε, ήταν η κινάση του ιογενούς ογκογονιδίου *v-src* (*viral sarcoma*),<sup>31</sup> η μετάλλαξη του οποίου οδήγησε στην ανακάλυψη της κινάσης του πρωτο-ογκογονιδίου *Src* (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*). Η μελέτη αυτής, όπως και άλλων μελών της οικογένειας των πρωτεϊνών *Src*, υπήρξε θεμελιώδης για την κατανόηση και κατ' επέκταση τη σύγχρονη αντίληψη κάποιων μορφών καρκίνου, ως ασθενειών οφειλόμενων στην απορρύθμιση της μεταγωγής του σήματος.<sup>32</sup>

- στους υποδοχείς (*Receptor Tyrosine Kinases, RTKs*). Αυτοί δρουν ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, αποτελούμενες από την εξωκυττάρια περιοχή που φέρει το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου και όπου συνδέεται το μόριο-σηματοδότης, την υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή περίπου 30 αμινοξέων διατεταγμένων σε α-έλικα και την ενδοκυττάρια καταλυτική περιοχή, που φέρει το καρβοξυτελικό άκρο, στο οποίο εντοπίζεται το ενεργό κέντρο της κινάσης. Στην κατηγορία των *RTKs* ανήκουν 58 κινάσες τυροσίνης, οι οποίες και διακρίνονται εν συνεχεία σε 20 υποοικογένειες. Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει το διμερισμό του υποδοχέα, όταν προσδεθεί σε αυτόν το μόριο-σηματοδότης. Η ενεργοποίηση αυτή του υποδοχέα προκαλεί κατόπιν την αυτοφωσφορυλίωση σε υπόλοιπα τυροσίνης που βρίσκονται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του (**Εικόνα 1.2.1.1.**). Με αυτόν τον τρόπο πυροδοτείται ένας καταρράκτης αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, κατά τον οποίο ανενεργείς πρωτεΐνες που περιέχουν μια περιοχή συγκεκριμένης αμινοξικής ακολουθίας, τη λεγόμενη *SH2* (*Src Homology 2*

domain), δεσμεύονται στους ενεργοποιημένους υποδοχείς και οδηγούν εν τέλει σε μια βιολογική απόκριση.<sup>33</sup>

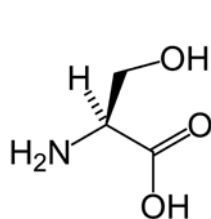


**Εικόνα 1.2.1.1.** Δομή (α) και ενεργοποίηση (β) του υποδοχέα-κινάση τυροσίνης EGFR (υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα).<sup>34</sup>

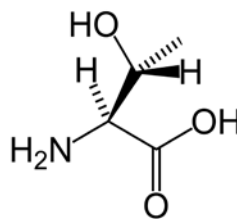
Οι υποδοχείς-κινάσες τυροσίνης που έχουν κυρίως μελετηθεί περιλαμβάνουν τις υποοικογένειες των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (*epidermal growth factor receptor, EGFR*),<sup>35</sup> του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (*Fibroblast growth factor receptor, FGFR*),<sup>36</sup> του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (*Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)*),<sup>37</sup> του επαγόμενου από τα αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα (*Platelet-derived growth factor Receptor, PDGFR*)<sup>38</sup> και των βλαστοκυττάρων (*c-kit* που ενεργοποιείται από το SCF, *Stem Cell Factor*).<sup>39</sup> Η λειτουργία τους υπόκειται εν γένει σε αυστηρό έλεγχο, αποσυντονισμός του οποίου μέσω ανεξέλεγκτης παραγωγής αυξητικών παραγόντων ή γονιδιακών μεταλλάξεων, οδηγεί σε υπερέκφραση των υποδοχέων

κινασών τυροσίνης και κατ'επέκταση υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εκδήλωση καρκίνου.<sup>40,30</sup>

β) **Κινάσες Σερίνης / Θρεονίνης** (*Serine / Threonine Kinases, STKs*), που φωσφορυλιώνουν το αλειφατικά υδροξύλια των αντίστοιχων αμινοξέων.



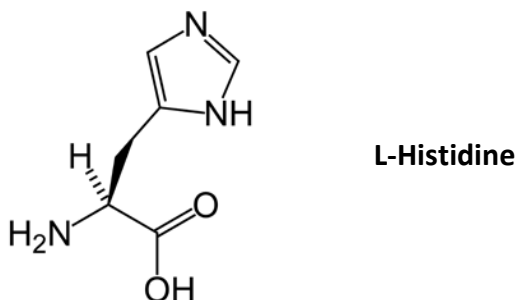
**L-Serine**



**L-Threonine**

Τα ένζυμα αυτά επιλέγουν να φωσφορυλιώσουν τις σερίνες και θρεονίνες του υποστρώματος σε συγκεκριμένες θέσεις, ανάλογα με την αμινοξική ακολουθία στο σημείο πρόσδεσης της φωσφορικής ομάδας, και η οποία ονομάζεται ακολουθία συναίνεσης (*consensus sequence*). Αυτή εξασφαλίζει μεν την προσαρμογή του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της κινάσης, αλλά η ύπαρξή της δεν εξειδικεύεται σε ένα μόνο υπόστρωμα με αποτέλεσμα οι STKs να φωσφορυλιώνουν ολόκληρες «οικογένειες υποστρωμάτων», όπου και αναγνωρίζουν τη συγκεκριμένη ακολουθία.<sup>41</sup> Η δραστηριότητα τους ρυθμίζεται από διάφορα γεγονότα (πχ. βλάβη του DNA), καθώς και από μια πληθώρα χημικών σηματοδοτών όπως τα cAMP/cGMP, η διακυλογλυκερόλη και το σύμπλεγμα  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοδουλίνης. Οι κινάσες σερίνης/θρεονίνης διακρίνονται σε αυτές που λειτουργούν ως υποδοχείς και σε αυτές που δρουν ως ενδοκυττάρια πεπτίδια ή πρωτεΐνες μετάδοσης σήματος. Στην τελευταία κατηγορία ανήκει μεταξύ άλλων και η κινάση της φωσφορυλάσης (*Phosphorylase kinase, PhK*) που ήταν και η πρώτη πρωτεϊνική κινάση που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε από τους E. Krebs και E. Fischer, κατά τη δεκαετία του 1950,<sup>42</sup> δίνοντας το έναυσμα για την ανακάλυψη μιας πληθώρας δεδομένων, σχετικών με την σημασία της αντίδρασης της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης και κατ'επέκταση το ρόλο των κινασών σε όλες τις βασικές κυτταρικές λειτουργίες, με τεράστιο αντίκτυπο στην επιστημονική κατανόηση των ρυθμιστικών αυτών μηχανισμών.

γ) **Κινάσες Ιστιδίνης (Histidine Kinases, HKs)**, που φωσφορυλιώνουν το ιμιδαζολικό άζωτο της ιστιδίνης.<sup>43</sup>



Σε αντίθεση με τις δύο προηγούμενες κατηγορίες κινασών που φωσφορυλιώνουν υδροξύλια, η φωσφορυλιωμένη ιστιδίνη σχηματίζεται με τη δημιουργία *N-P* φωσφοροαμιδικού δεσμού στο *N-1* ή στο *N-3* άζωτο, ενώ θεωρητικά είναι πιθανός και ο σχηματισμός της 1,3-διφωσφορικής ιστιδίνης.<sup>44</sup> Οι κινάσες ιστιδίνης έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στα κύτταρα των προκαρυωτικών και ορισμένων κατώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών, όπου είχαν αρχικά ανιχνευθεί. Πρόσφατα όμως εντοπίσθηκαν και σε κύτταρα θηλαστικών και άρχισε να διερευνάται ο ρόλος τους, στα πλαίσια της περαιτέρω κατανόησης των σηματοδοτικών μηχανισμών και της εμπλοκής τους στην καρκινογένεση. Έχουν μάλιστα αναπτυχθεί και αναστολείς κινασών ιστιδίνης, έναντι βακτηριακών λοιμώξεων ανθεκτικών στα συνήθη αντιβιοτικά, γεγονός που καθιστά αυτούς τους παράγοντες και την αντίστοιχη τεχνολογία πιθανά εφαρμόσιμη και για την αντιμετώπιση του καρκίνου.<sup>45</sup>

Η κατάταξη των πρωτεϊνικών κινασών με βάση την αμινοξική αλληλουχία της καταλυτικής τους περιοχής, υποδιαιρεί το ανθρώπινο κίνωμα ως εξής :

i) **Η οικογένεια των κινασών AGC** περιλαμβάνει κινάσες σερίνης/θρεονίνης,<sup>46</sup> που υποδιαιρούνται περαιτέρω στις πρωτεϊνικές κινάσες A, οι οποίες εξαρτώνται από το cAMP (*Protein Kinase A*, PKA), στις πρωτεϊνικές κινάσες C (*Protein Kinase C*, PKC), που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και της διακυλογλυκερόλης, και στις πρωτεϊνικές κινάσες G (*Protein Kinase G*, PKG), που εξαρτώνται από το cGMP. Η υποοικογένεια PKA εμπλέκεται μεταξύ άλλων στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στη ρύθμιση των επιπέδων του σακχάρου και του γλυκογόνου στο αίμα.<sup>47</sup> Η υποοικογένεια PKC έχει ρυθμιστικό ρόλο στη μεταγραφή

γονιδίων που σχετίζονται με τη κυτταρική ανάπτυξη, στην απευαισθητοποίηση ορισμένων υποδοχέων, και σε ανώτερες λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως είναι οι διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης.<sup>48</sup> Τέλος, η τρίτη υποοικογένεια, η PKG λαμβάνει μέρος στην κυτταρική διαίρεση, τη σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων, τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών και τη ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων.<sup>49</sup>

ii) **Η οικογένεια κινασών CAMK** (*Calmoduline Regulated Kinases*) περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, των οποίων η λειτουργία ρυθμίζεται από το σύμπλεγμα  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοδουλίνης. Εμπλέκονται στη φυσιολογία του νευρικού και καρδιαγγειακού συστήματος, ως διαμεσολαβητές στις διαδικασίες μνήμης και μάθησης<sup>50</sup> και ως ρυθμιστές της πρόσληψης των ιόντων ασβεστίου από τα κύτταρα του μυοκαρδίου, εξ ου και η απορρύθμισή τους συνδέεται με τη νόσο Alzheimer και καρδιακές αρρυθμίες.<sup>51</sup>

iii) **Η οικογένεια κινασών CK-1** (*Casein Kinases 1*) αποτελεί μια μικρή οικογένεια κινασών σερίνης/θρεονίνης με εμπλοκή στην επιδιόρθωση και μεταγραφή του DNA, στο κερκαδιανό ρυθμό και στη μετάδοση του σήματος μέσω της οδού *Wnt*, που συσχετίζεται με την κυτταρική απόπτωση.<sup>52</sup>

iv) **Η οικογένεια CMGC** περιλαμβάνει επίσης κινάσες σερίνης/θρεονίνης όπως:

- τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (*cyclin dependent kinases, CDKs*), με ουσιαδώς συντονιστικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων. Οι κινάσες αυτές ονομάζονται έτσι διότι αποκτούν ενεργότητα για τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών στόχων τους μόνο μετά από τη συμπλοκοποίησή τους με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, τις κυκλίνες. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 14 κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και 34 κυκλίνες.<sup>53</sup> Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες είναι πρωτεϊνικές κινάσες μεγέθους 33-40 KDa, που ενεργοποιούνται συνήθως με φωσφορυλίωση από άλλες κινάσες και ταυτόχρονα με τη σύνδεσή τους με την κατάλληλη κυκλίνη.<sup>54</sup>
- τις MAP κινάσες (*Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPKs*), που ενεργοποιούνται από διάφορα μιτογόνα, αλλά και από εξωκυττάρια ερεθίσματα όπως το θερμικό shock, το οσμωτικό stress κα. Ρυθμίζουν

μεταξύ άλλων τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την κυτταρική επιβίωση, τη μίτωση, τη γονιδιακή έκφραση και την απόπτωση.<sup>55</sup>

- την κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου (*Glycogen Synthase Kinase-3*, *GSK-3*). Πρόκειται για μία από τις πρώτες κινάσες που προσέλκυσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον, με δράση που περιλαμβάνει την αδρανοποίηση μέσω φωσφορυλίωσης συγκεκριμένων υποστρωμάτων-στόχων, όπως η συνθετάση του γλυκογόνου, απ' όπου πήρε και το όνομά της. Η οικογένεια αυτών των κινασών κατέχει επίσης κεντρικό ρόλο σε κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση και την απόπτωση, όπως είναι π.χ. ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου και η μεταγραφή γονιδίων.<sup>56</sup>

- τις κινάσες CLK-1 (*CDC-Like Kinase 1*), οικογένεια που προσομοιάζει στις πρωτεΐνες CDC (*Cell-Division Control Proteins*), και παρουσιάζει δράση διπλής εξειδίκευσης, καθώς φωσφορυλιώνει τόσο υπόλοιπα σερίνης/θρεονίνης όσο και υπόλοιπα τυροσίνης.<sup>57</sup>

v) **Η οικογένεια των κινασών STE** (*Sterility Kinases*) εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των κινασών MAPKs.<sup>58,59</sup>

vi) **Η οικογένεια κινασών τυροσίνης** (*Tyrosine kinases*, *TKs*) και

vii) **Η οικογένεια των κινασών που προσομοιάζουν στις κινάσες τυροσίνης** (*Tyrosine kinase-Like*, *TKL*) και παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ποικιλομορφία.

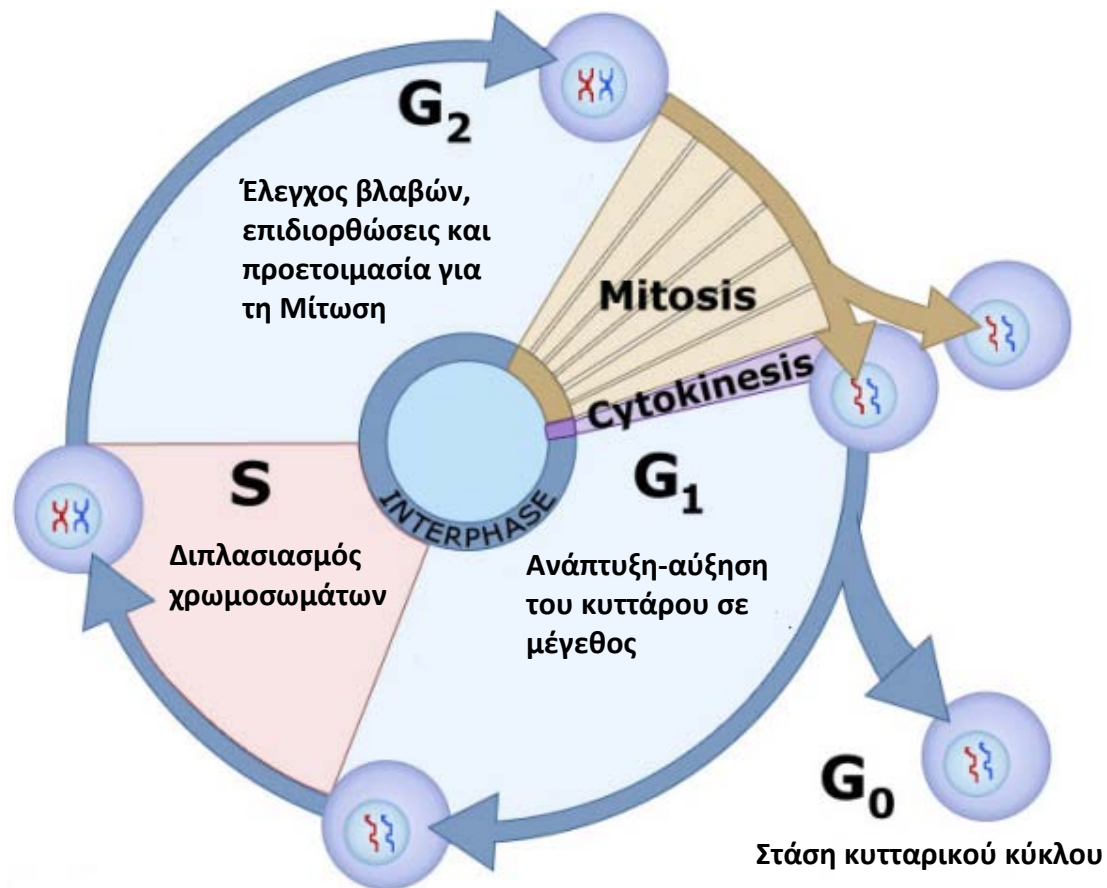
### **1.3. ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΩΣ ΣΤΟΧΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

#### **1.3.1. ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΥΚΛΟ**

Ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου είναι μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες των πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες διαδραματίζουν σ' αυτόν θεμελιώδη ρόλο. Ως κυτταρικός κύκλος ορίζεται το διάστημα από τη στιγμή της δημιουργίας ενός κυττάρου, μέχρι τη στιγμή του θανάτου του. Στον κύκλο ζωής του κυττάρου διακρίνονται ουσιαστικά δύο περίοδοι: μια περίοδος κατά την οποία το

κύτταρο δεν διαιρείται (Μεσόφαση, *Interphase*) και μία περίοδος διαίρεσης (μίτωση για τα σωματικά κύτταρα και μείωση για τα γαμετοκύτταρα). Αυτός ο κύκλος ζωής του κυττάρου, μεσόφαση-διαίρεση, επαναλαμβάνεται σε κάθε κυτταρική γενιά, αλλά η διάρκειά του ποικίλλει, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και τις επικρατούσες συνθήκες. Υπάρχουν κύτταρα που διαιρούνται πολύ συχνά, όπως τα επιθηλιακά, και άλλα που διαιρούνται σπάνια ή καθόλου, όπως τα πολύ διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα.<sup>60</sup> Η μεσόφαση καταλαμβάνει το συντριπτικά μεγαλύτερο διάστημα της ζωής του κυττάρου και διακρίνεται στις επιμέρους φάσεις (Εικόνα 1.3.1.1.):

1. Φάση  $G_1$  (*gap 1*, πρώτο χάσμα) : στη διάρκεια της φάσης αυτής το «νεογέννητο» κύτταρο που προήλθε από την προηγούμενη κυτταρική διαίρεση  $M$ , και διαθέτει το κανονικό, διπλοειδές DNA ( $2N$ ) αρχίζει να αυξάνεται σε μέγεθος και να υπόκειται σε πολύπλοκες βιοχημικές διαδικασίες με υψηλούς ρυθμούς, ώστε να προετοιμάσει την είσοδό του στην επόμενη φάση, αυτή της αντιγραφής του γενετικού υλικού.
2. Φάση  $S$  (*DNA Synthesis*) : στη διάρκεια της φάσης αυτής το DNA αντιγράφει με εξαιρετική ακρίβεια τον εαυτό του.
3. Φάση  $G_2$  (*gap 2*, δεύτερο χάσμα) : στη διάρκεια της φάσης αυτής το κύτταρο που περιέχει πλέον διπλάσιο γενετικό υλικό ( $4N$ ), προετοιμάζεται για την είσοδό του στο στάδιο της Μίτωσης, αυξάνοντας τόσο τους βιοσυνθετικούς ρυθμούς του για την παραγωγή των απαραίτητων μικροσωληνίσκων, όσο και το μέγεθός του.



Εικόνα 1.3.1.1.

Ακολουθεί η κυτταρική διαίρεση που περιλαμβάνει τη φάση της Μίτωσης (*Mitosis*, M), κατά την οποία ο πυρήνας και το περιεχόμενό του, κυρίως τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα διαιρούνται και μοιράζονται ομοιόμορφα στους δύο θυγατρικούς πυρήνες, και τη φάση της Κυτοκίνησης, στην οποία διαιρείται το κυτταρόπλασμα, τα οργανίδια και η μεμβράνη, οδηγώντας εν τέλει σε δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Η μίτωση καταλαμβάνει μόλις το 10% της ζωής του κυττάρου και ολοκληρώνεται σε τέσσερα διακριτά στάδια : πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση (Εικόνα 1.3.1.2.).<sup>60</sup>

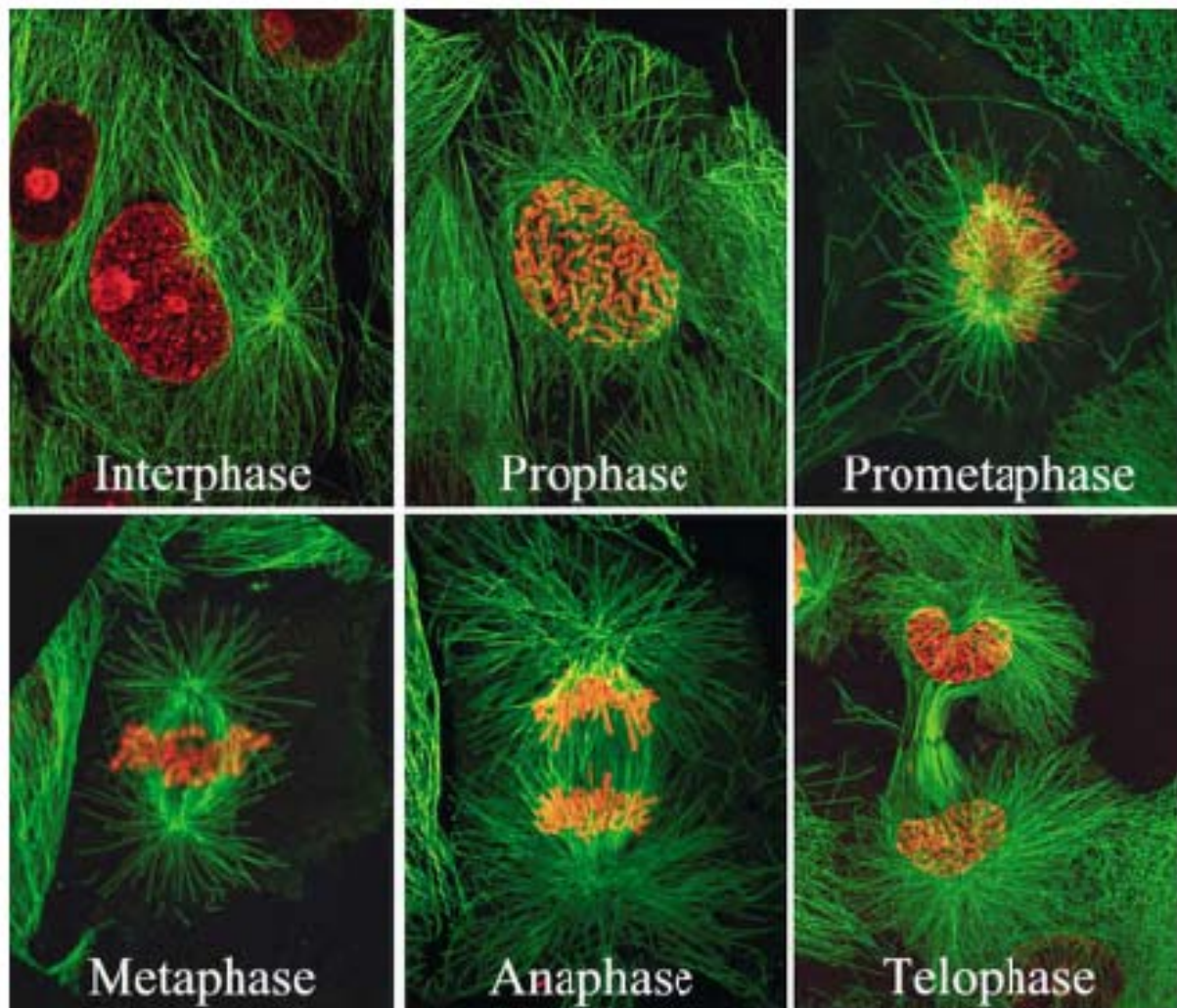
❖ *Πρόφαση* : στο στάδιο αυτό οι ίνες χρωματίνης συμπυκνώνονται στον πυρήνα σχηματίζοντας διακριτά χρωμοσώματα, κάθε ένα από τα οποία αποτελείται από δυο πανομοιότυπα μακρομόρια DNA, τις αδελφές χρωματίδες οι οποίες συνδέονται στο κεντρομερίδιο. Η μιτωτική άτρακτος, που αποτελείται από μικροσωληνίσκους και συνδεδεμένες πρωτεΐνες σχηματίζεται στο κυτταρόπλασμα ανάμεσα στα δύο ζεύγη κεντροσωμάτων που κινούνται αντιδιαμετρικά το ένα από το άλλο. Η πυρηνική μεμβράνη και οι πυρηνίσκοι εξαφανίζονται, ενώ ίνες ατράκτου

ως δέσμες μικροσωληνίσκων, εκτείνονται από κάθε πόλο προς τον ισημερινό του κυττάρου. Πάνω στο κεντρομερίδιο σχηματίζεται ο κινητοχώρος, μια πρωτεϊνική δομή που συνδέει τη χρωματίδη με τα νημάτια των μικροσωληνίσκων της ατράκτου, βοηθώντας την κίνηση των χρωμοσωμάτων προς το κέντρο του κυττάρου.

❖ *Μετάφαση* : η μιτωτική άτρακτος είναι πλήρως σχηματισμένη, με μιτωτικούς πόλους στα άκρα του κυττάρου. Τα χρωμοσώματα είναι πλήρως διατεταγμένα εγκάρσια στο ισημερινό επίπεδο της μιτωτικής ατράκτου ή αλλιώς μεταφασικής πλάκας.

❖ *Ανάφαση* : Τα χρωμοσώματα χωρίζονται στο κεντρομερίδιο που τα συνέδεε, απελευθερώνοντας τις αδελφές χρωματίδες, προς δύο πλήρη πλέον θυγατρικά χρωμοσώματα, τα οποία με τη βοήθεια των μικροσωληνίσκων κινούνται προς τους απέναντι πόλους της ατράκτου, ενώ αυτοί ταυτόχρονα απομακρύνονται, επιμηκύνοντας το κύτταρο.

❖ *Τελόφαση* : Στους πόλους του κυττάρου σχηματίζεται πυρηνική μεμβράνη γύρω από τα χρωμοσώματα, οι ίνες χρωματίνης κάθε χρωμοσώματος αποπολυμερίζονται, επανεμφανίζονται πυρηνίσκοι και προκύπτουν δύο θυγατρικοί πυρήνες.<sup>61</sup>



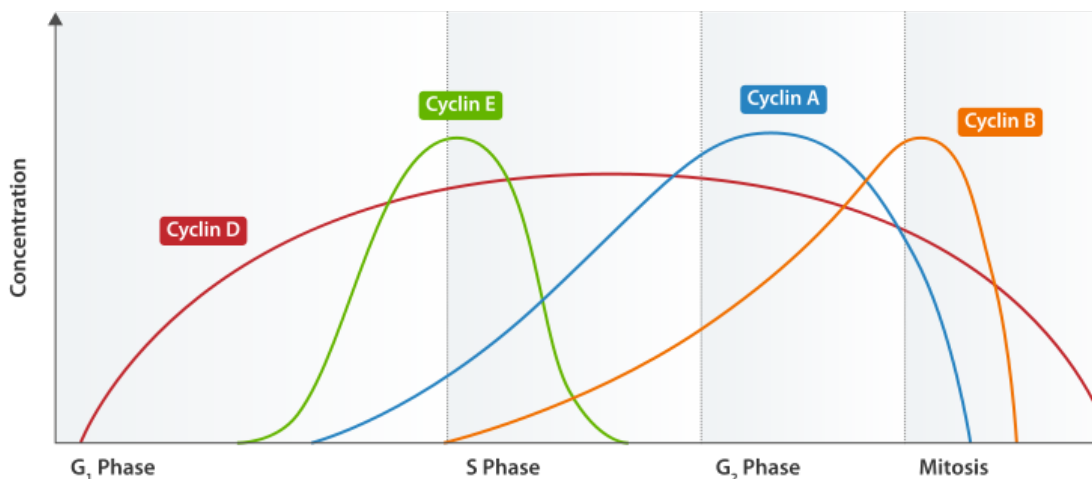
**Εικόνα 1.3.1.2.** Στάδια της Μίτωσης.

Το διαιρεμένο κύτταρο που έχει προκύψει από τη μίτωση μπορεί είτε να ακολουθήσει τις επόμενες φάσεις του κύκλου και να διαιρεθεί, είτε να βγει εκτός κύκλου στην φάση  $G_0$  (φάση ηρεμίας), είτε να σταματήσει προσωρινά στις φάσεις  $G_1$  ή  $G_2$  ( $G_1$ - ή  $G_2$ -arrest), είτε τέλος να πεθάνει πριν την ολοκλήρωση του κύκλου (απόπτωση).<sup>62</sup> Η επιλογή της πορείας που θα ακολουθηθεί εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος του κυττάρου και το γενετικό πρόγραμμα που θα εκφράσει, αλλά επηρεάζεται σημαντικά και από το κυτταρικό μικροπεριβάλλον, δηλαδή από ποικίλα εξωτερικά ερεθίσματα, όπως η ύπαρξη ή όχι εξωγενών μιτογόνων, αυξητικών ή άλλων παραγόντων. Έτσι, ένα επιθηλιακό κύτταρο, που φυσιολογικά θα έπρεπε να ακολουθήσει μια πορεία προς την διαίρεση, είναι δυνατόν να οδηγηθεί σε απόπτωση ή σταμάτημα του κύκλου, εφόσον υποστεί βλάβη το DNA του, ή δεν αποκτήσει το κατάλληλο μέγεθος πριν τη διαίρεση. Σε συγκεκριμένους

ιστούς η φάση  $G_0$  είναι μεγάλης σημασίας και το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων τους βρίσκονται σε φάση αδράνειας (όπως για παράδειγμα, για το λεμφικό ιστό, όπου η φάση  $G_0$  είναι αντιστρεπτή υπό την επίδραση διεγερτικών παραγόντων, ενώ για τους σκελετικούς μύες και το νευρικό ιστό, είναι μη αντιστρεπτή).<sup>63</sup>

Κατά τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου, προκειμένου να διατηρηθεί η απαραίτητη ακρίβεια και λειτουργική ακεραιότητα των γεγονότων, πρέπει να εξασφαλίζεται το αλάνθαστο του αποτελέσματος, μέσω της ύπαρξης πολλαπλών ελεγκτικών μηχανισμών, των **σημείων ελέγχου (ckeckpoints)**, όπου ελέγχεται η κανονικότητα της έως τότε διεργασίας και μετά την εκτίμηση των πιθανών βλαβών, επιδιορθώσιμων ή μη, επιτρέπεται βάσει συγκεκριμένων ερεθισμάτων, η συνέχιση/ολοκλήρωση του κύκλου ή η αναστολή του.<sup>64</sup> Απαραίτητα εργαλεία του κυττάρου στη ρυθμιστική αυτή διεργασία αποτελούν :

➤ οι κυκλίνες, μια οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις κυκλίνες D ( $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_3$ ), E, A και B,<sup>65</sup> οι οποίες ενεργοποιούν τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK, σχηματίζοντας ενεργά ετεροδιμερή σύμπλοκα. Τα επίπεδα των κυκλινών δεν είναι σταθερά κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά αυξάνονται ή μειώνονται με την επίδραση πλήθους εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων σημάτων. Η περιοδική συσσώρευση των επιπέδων των κυκλινών ρυθμίζει τη δραστηριότητα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, αφού μόνον όταν αυξάνονται τα επίπεδα των κυκλινών αυτές συνδέονται με τις CDKs (**Εικόνα 1.3.1.3.**). Κάθε οικογένεια κυκλινών έχει την ευθύνη ελέγχου διαφορετικής φάσης του κυτταρικού κύκλου και συνδέεται με μία συγκεκριμένη ομάδα κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.



**Εικόνα 1.3.1.3.** Διακύμανση των επιπέδων των κυκλινών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.

➤ Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDKs. Η συγκέντρωσή τους παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου, καθώς υφίστανται διαδοχική ενεργοποίηση και απενεργοποίηση ανάλογα με την απαιτούμενη ενεργότητα τους στις διάφορες φάσεις του κύκλου.<sup>66,54</sup> Οι CDKs που είναι απαραίτητες για ένα συγκεκριμένο στάδιο του κυτταρικού κύκλου υφίστανται έγκαιρη απενεργοποίηση μόλις έχουν επιτελέσει τη λειτουργία τους. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε με αντίδραση στην ίδια τη κινάση (π.χ. η φωσφορύλιωση θρεονίνης ή τυροσίνης στο *N*-τελικό άκρο, προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης που εμποδίζει τη σύνδεση τους με τις κυκλίνες), είτε μέσω αποδόμησης της συμπλοκοποιημένης κυκλίνης από πρωτεασώματα, πρωτεϊνικά συμπλοκα μεγάλου μεγέθους, με ρόλο αποικοδομητικό των πρωτεϊνών, όταν αυτές σηματοδοτηθούν από μια μικρή πρωτεΐνη, την ουβικιτίνη (*ubiquitin, Ub*).<sup>67</sup>

➤ Οι αναστολείς των συμπλεγμάτων CDK/κυκλινών (*CDK Inhibitors, CDIs*). Διακρίνονται σε δύο οικογένειες : α) την οικογένεια INK4, που περιλαμβάνει τους αναστολείς p15/ink4b, p16/ink4a, p18/ink4c και p19/ink4d και β) την οικογένεια CIP/KIP που περιλαμβάνει τους αναστολείς p21/waf1, p27/kip1 και p57/kip2.<sup>68</sup>

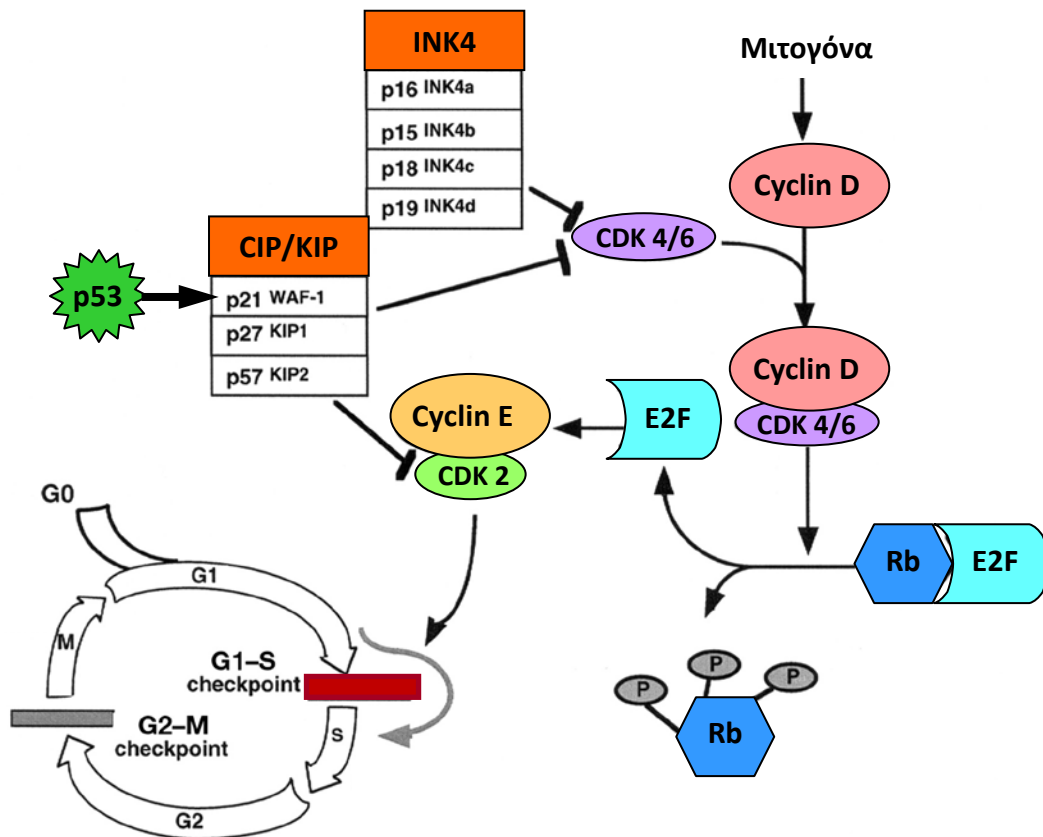
Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν αρκετά σημεία ελέγχου, τα σημαντικότερα και πλέον μελετημένα είναι :

α) Σημείο ελέγχου μεταξύ των φάσεων  $G_1$  και  $S$ .

Βρίσκεται στο τέλος της φάσης  $G_1$  και αποτελεί το καθοριστικό ή περιοριστικό σημείο (*Restriction point*)<sup>69,70</sup> για το αν το κύτταρο θα συνεχίσει στην επόμενη φάση  $S$ , ή θα βγει από τον κύκλο της διαίρεσης και θα παρεμείνει σε φάση ηρεμίας. Έχει αποδειχτεί ότι το σημείο  $G_1/S$  είναι ελαττωματικό στα καρκινικά κύτταρα, καθώς απουσία του σημείου-φραγμού της αναστολής ή καθυστέρησης του πολλαπλασιασμού των μεταλλαγμένων κυττάρων, οδηγεί αναπόφευκτα στην ανεξέλεγκτα επαναλαμβανόμενη διαίρεσή του. Στη φάση  $G_1$  έχουμε αρχικά την αύξηση της παραγωγής των κυκλινών της ομάδας  $D$  ( $D_{1,2,3}$ ), η οποία ενεργοποιεί και τελικά συνδέεται με τις CDK 4 και 6. Το σύμπλοκο κυκλίνης/CDK που προκύπτει, φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (*Retinoblastoma protein*, Rb), η οποία φυσιολογικά βρίσκεται συνδεδεμένη με τον παράγοντα μεταγραφής E2F. Η σύνδεση αυτή δεν επιτρέπει την εκδήλωση της δράσης του E2F που συνίσταται στην ενεργοποίηση άλλων γονιδίων και την προαγωγή της διαδικασίας του κυτταρικού κύκλου, έτσι ώστε να διακόπτεται η κινητικότητα του κυττάρου και η είσοδός του στη φάση  $S$  (ογκοκατασταλτική δράση της Rb). Η φωσφορυλίωση της Rb στο σύμπλοκο E2F-Rb, οδηγεί στην αδρανοποίηση της πρωτεΐνης και την απόσπασή της από αυτό. Η ενεργή πλέον υπομονάδα E2F, προκαλεί την έκφραση της κυκλίνης E, η οποία αλληλεπιδρά με την CDK 2, οδηγώντας τελικά στη μετάβαση από τη φάση  $G_1$  στη φάση  $S$ .<sup>71</sup>

Η διαδικασία αυτή υπόκειται σε πολύπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν τη δράση των αναστολέων των CDK. Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η πρωτεΐνη p53, η οποία από τη στιγμή που θα ενεργοποιηθεί, λόγω κάποιας βλάβης που υπάρχει στο DNA, εκφράζει την ογκοκατασταλτική της δράση, ενεργοποιώντας άλλες πρωτεΐνες που θα επιτελέσουν τις διαδικασίες επιδιόρθωσης και διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο  $G_1/S$ . Συγκεκριμένα η ενεργοποιημένη p53 προσδένεται στο DNA και επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης-αναστολέα p21/waf1, η οποία παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση των CDK 2, 4 και 6 με τις κυκλίνες τους. Με ανάλογο τρόπο δρουν και οι πρωτεΐνες p15/ink4b και

p16/ink4a, εμποδίζοντας τη συμπλοκοποίηση των CDK 4 και 6 με την κυκλίνη D, ενώ η p27/kip1 αναστέλλει και την αλληλεπίδραση της CDK 2 με την κυκλίνη E.<sup>68</sup>



**Εικόνα 1.3.1.4.** Το σημείο ελέγχου  $G_1/S$ .

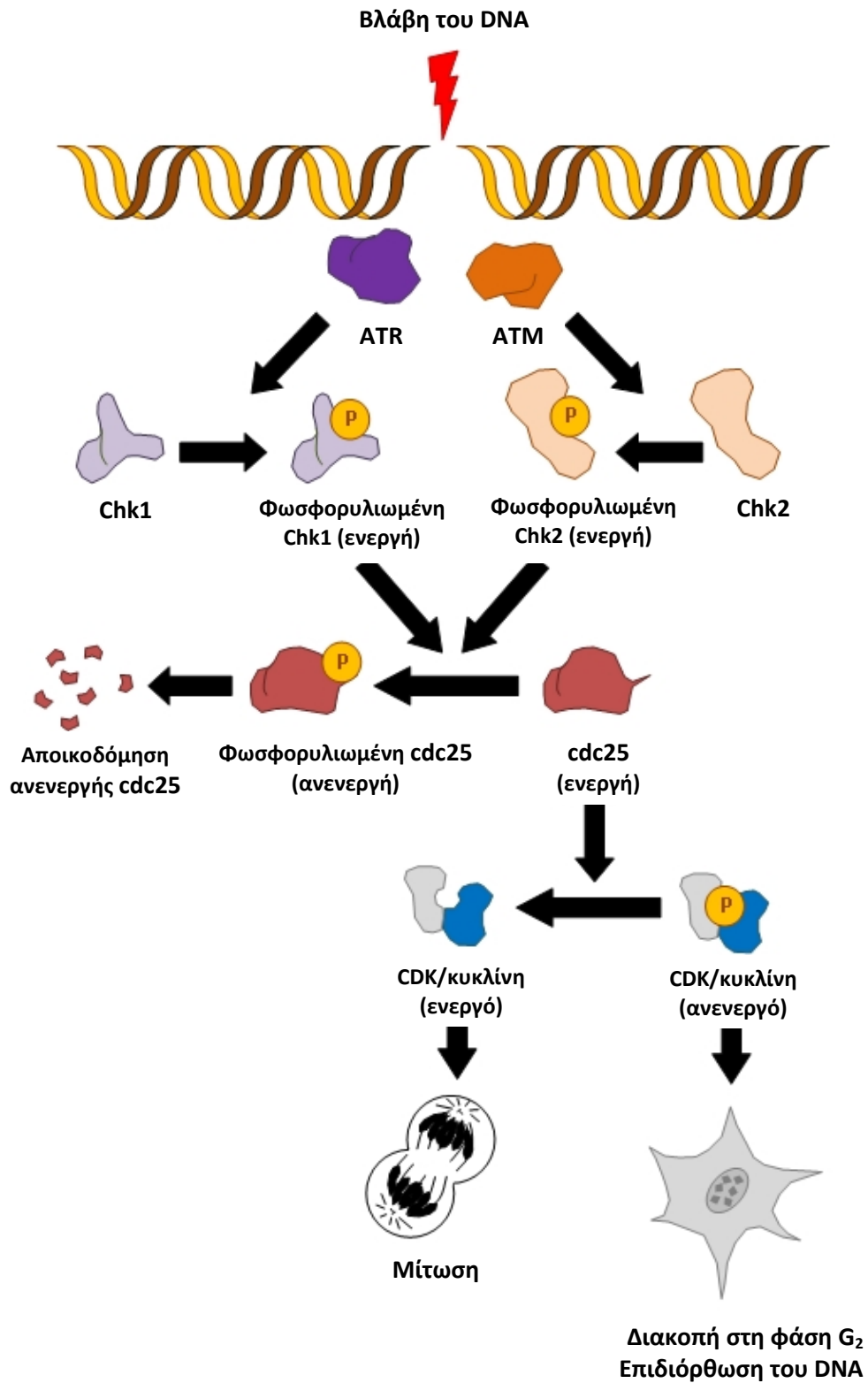
Κάθε παρεκτροπή από την ομαλή λειτουργία αυτού του πολύπλοκου συστήματος, όπως οι μεταλλάξεις παραγόντων που σχετίζονται με τη διακοπή του κύκλου στο περιοριστικό σημείο, έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζονται σημαντικές δυσλειτουργίες στο κύτταρο, όπως είναι η καρκινογένεση. Η υπερέκφραση της CDK 2 έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στον καρκίνο του παχέος εντέρου και του πνεύμονα, ενώ αντίστοιχα η υπερέκφραση CDK 4 σχετίζεται με πολλούς τύπους σαρκωμάτων και καρκίνους του πνεύμονα. Μεταλλάξη του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p16/ink4a, αυξάνει τις πιθανότητες ανάπτυξης διαφόρων τύπων καρκίνων όπως το παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα, το μελάνωμα, τον καρκίνο του στομάχου και του οισοφάγου. Επίσης μεταλλάξεις στο γονίδιο για την πρωτεΐνη p53, οδηγούν στη μη λειτουργική πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA και κατ' επέκταση τη μη επαγωγή της ανασταλτικής πρωτεΐνης p21 για το σταμάτημα του

κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία όγκων μέσω της ανεξέλεγκτης διαίρεσης. Η υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη σύνθεση της κυκλίνης D<sub>1</sub>, έχει παρατηρηθεί σε καρκίνους του οισοφάγου, του πνεύμονα, του μαστού και της κύστης,<sup>72</sup> ενώ υπερέκφραση της κυκλίνης E εμφανίζεται σε οξείες λεμφοβλαστικές και μυελογενείς λευχαιμίες,<sup>73</sup> καθώς και σε ορισμένους τύπους καρκίνου του μαστού<sup>74</sup> και του εντέρου.<sup>75</sup>

### β) Σημείο ελέγχου μεταξύ των φάσεων G<sub>2</sub> και M.

Σημαντικό ρόλο στην αναχαίτηση του κυτταρικού κύκλου κατά τη μετάβαση από τη φάση G<sub>2</sub> στη φάση της μίτωσης M μετά από βλάβη του DNA, παίζει η ενεργοποίηση του συμπλέγματος κυκλίνης B/CDK1, το οποίο ονομάζεται και παράγοντας που προάγει τη μίτωση (*Mitosis-Promoting Factor*, MPF) ή cdc2. Η βιοχημική έκφραση του MPF ελέγχεται αυστηρά, μεταξύ άλλων από την κινάση ενεργοποίησης των CDK (*CDK-Activating Kinase*, CAK), η οποία σε πρώτη φάση φωσφορυλιώνει την κυκλίνη του συμπλέγματος. Στη συνέχεια απαιτείται η διαμεσολάβηση μιας φωσφατάσης διπλής εξειδίκευσης (*dual-specificity phosphatase*), της cdc25 (*cell division cycle protein 25*),<sup>76</sup> η οποία απομακρύνει φωσφορικές ομάδες από μόρια θρεονίνης και τυροσίνης της υπομονάδας CDK1, καθιστώντας τελικά το σύμπλοκο ενεργό. Ο παράγοντας MPF ρυθμίζει την ίδια του τη βιοσύνθεση μέσω θετικού μηχανισμού ανατροφοδότησης (*feedback*), αυξάνοντας μεταξύ άλλων τα επίπεδα της cdc25. Η όλη διαδικασία υπόκειται και σε πιο εξειδικευμένους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, καθώς η CDK1 διατηρείται ανενεργή όταν φωσφορυλιωθεί από τις κινάσες Wee1 και Myt1, ενώ επιπρόσθετα το σημείο ελέγχου G<sub>2</sub>/M ελέγχει τις βλάβες του αναδιπλασιασμένου DNA μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών κινασών Chk1 και Chk2. Αυτές είναι κινάσες σερίνης / θρεονίνης που δε μοιάζουν δομικά, αλλά έχουν αλληλεπικαλυπτόμενες σε μεγάλο βαθμό λειτουργίες όπως φαίνεται και από το φάσμα των κοινών τους υποστρωμάτων. Ενεργοποιούνται κατά την ύπαρξη τοξικών προσβολών του γενετικού υλικού και ρόλος τους είναι να αναμεταδίδουν τα σήματα των κινασών ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated kinase*) και ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad-3 related kinase*), που αποτελούν σημεία ελέγχου της οικογένειας των κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 (*Phosphatidylinositol 3-kinases*, PI 3-kinases ή PI3Ks).<sup>77</sup>

Πιο συγκεκριμένα η κινάση ATM ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης την κινάση Chk2, η οποία είναι μία σταθερή πρωτεΐνη που εκφράζεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου<sup>78</sup> και φαίνεται να είναι ανενεργή όταν δεν υπάρχουν βλάβες στο DNA. Η ενεργοποίησή της έρχεται ως απάντηση σε διακοπή της διπλής έλικας του DNA λόγω επίδρασης ιονίζουσας ακτινοβολίας ή φαρμάκων που επεμβαίνουν στο DNA και περιλαμβάνει διμερισμό και αυτοφωσφορυλίωση. Η κινάση Chk1 εκφράζεται κυρίως στις φάσεις S και G<sub>2</sub><sup>78</sup> και ενεργοποιείται κυρίως από την κινάση ATR, μετά από επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας ή χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις και από την κινάση ATM όπως για παράδειγμα κατά την έκθεση του κυττάρου σε ιονίζουσα ακτινοβολία.<sup>79</sup> Μετά την ενεργοποίησή τους, οι Chk1 και Chk2 φωσφορυλιώνουν εκτελεστικές πρωτεΐνες οι οποίες με τη σειρά τους μεταδίδουν το σήμα των σημείων ελέγχου αναλόγα με τον τύπο του ερεθίσματος και την κατάσταση του κυττάρου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή της προόδου του κυτταρικού κύκλου, καθώς επάγωντας τη φωσφορυλίωση της φωσφατάσης cdc25, επέρχεται η απενεργοποίησή της, με συνέπεια το σύμπλοκο CDK1/κυκλίνης B (παράγοντας MPF), να παραμένει ανενεργό και το κύτταρο να μη μεταβαίνει στο στάδιο της μίτωσης μέχρι να επιδιορθωθεί το DNA (**Εικόνα 1.3.1.5.**)<sup>80</sup>

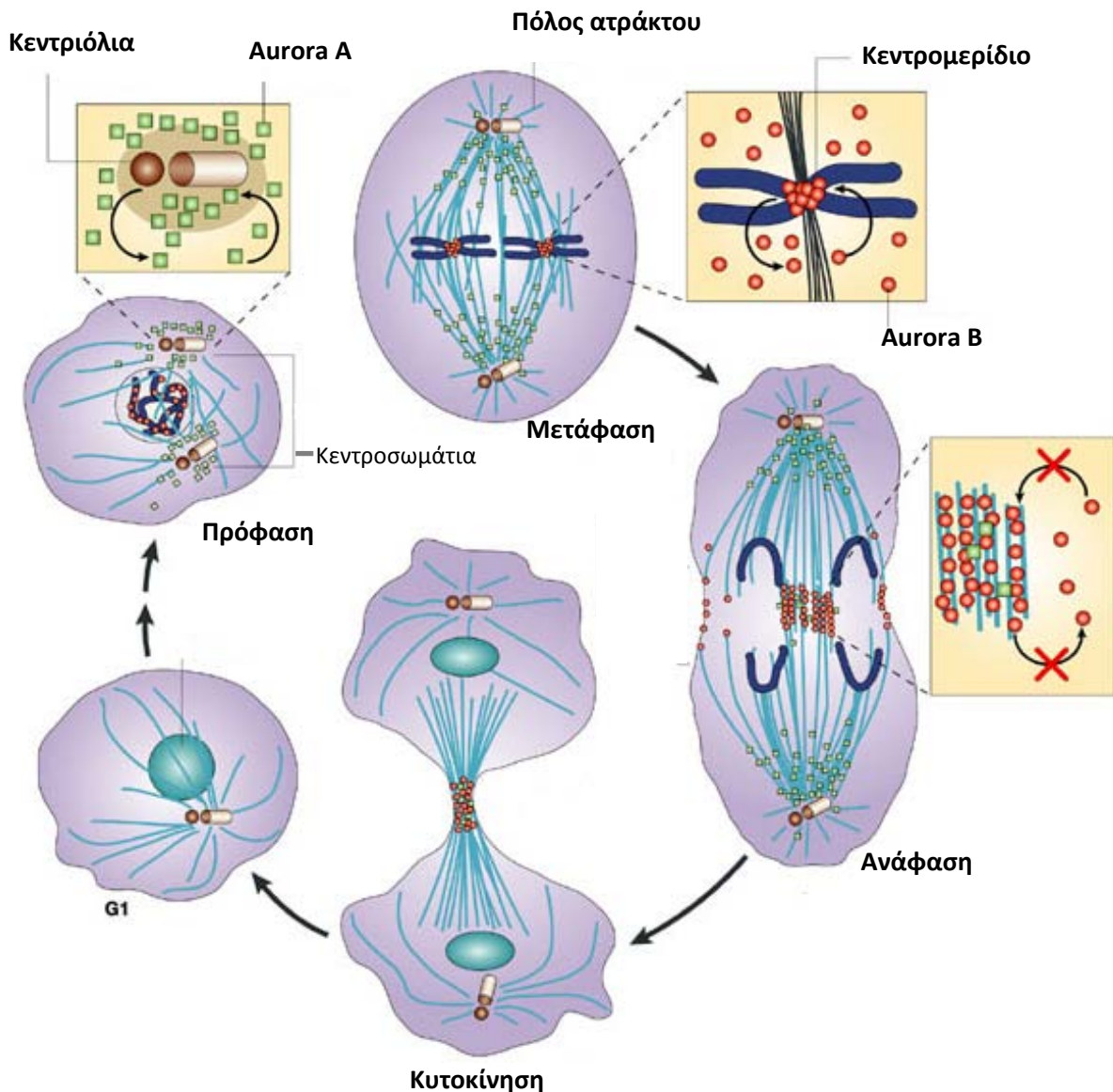


**Εικόνα 1.3.1.5.** Ρολος των κινασών Chk1 και Chk2 στη ρύθμιση του σημείου ελέγχου G<sub>2</sub>/M.

Μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της κινάσης Chk1 έχουν παρατηρηθεί σε καρκίνους του εντέρου, του ενδομητρίου<sup>81</sup> και σε διάφορες μορφές καρκίνου του στομάχου.<sup>82</sup> Αντίστοιχα, μετάλλαξη που επιφέρει απώλεια της λειτουργίας της κινάσης Chk2 συνδέεται με την εμφάνιση μιας κληρονομικής μορφή καρκίνου, του συνδρόμου Li-Fraumeni,<sup>83</sup> που παρουσιάζει πολλαπλές νεοπλασίες σε νεαρή ηλικία, κυρίως όγκους μαστού και σαρκώματα, και σχετίζεται συχνά με την εμφάνιση ταυτόχρονων μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53.

#### γ) Σημείο ελέγχου φάσης Μ (Μίτωσης).

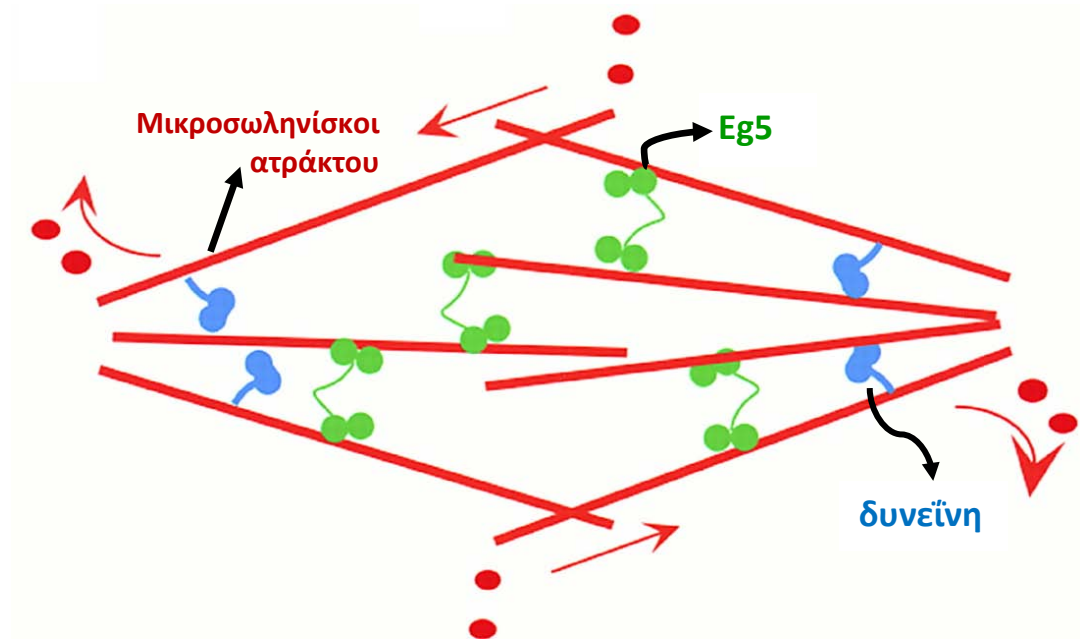
Κατά την πρόοδο της μιτωτικής φάσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι πρωτεϊνικές κινάσες της οικογένειας Aurora, οι οποίες αντιπροσωπεύουν μία νέα οικογένεια κινασών σερίνης / θρεονίνης. Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν τρεις κινάσες αυτής της οικογένειας οι Aur A, Aur B και Aur C και αποτελούνται από μία ρυθμιστική περιοχή στο αμινοτελικό άκρο, η οποία διαφέρει αρκετά μεταξύ τους, και μία καταλυτική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο, που παρουσιάζει όμως σημαντική ομολογία (σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%).<sup>84</sup> Εντοπίζονται σε διαφορετικά σημεία του κυττάρου (**Εικόνα 1.3.1.6.**)<sup>85</sup> και συγκεκριμένα η Aur A εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια (πόλοι της ατράκτου), όπου εμπλέκεται στη συσσώρευση και συναρμογή των διμερών α- και β- τουμπουλίνης που πολυμερίζονται προς μικροσωληνίσκους.<sup>86</sup> Η Aur B ελέγχει την πρόσδεση της ατράκτου στα κεντρομερίδια στην αρχή της μίτωσης, όπου συνδέεται με τα χρωμοσώματα διαμέσου των κινητοχώρων και επανεντοπίζεται στη μεσοφασική πλάκα της ατράκτου κατά την ανάφαση. Η Aur C εντοπίζεται στα κεντροσωμάτια από την ανάφαση μέχρι και την κυτοκίνηση,<sup>87</sup> συνεργάζεται με την Aur B στη ρύθμιση του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων<sup>88</sup> αλλά λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της λειτουργίας της.



**Εικόνα 1.3.1.6.** Εντοπισμός των κινασών της οικογένειας Aurora κατά την πορεία του κυτταρικού κύκλου.

Η Aur A λαμβάνει μέρος στη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου, ρυθμίζοντας την ωρίμανση των κεντροσωματίων, δηλαδή τη διαδικασία κατά την οποία, τα δύο διπλασιασμένα κεντροσωμάτια, στην αρχή της μίτωσης και πριν αρχίσει να δημιουργείται η άτρακτος, συγκεντρώνουν αρκετές πρωτεΐνες προκαλώντας τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Στη συνέχεια τα κεντροσωμάτια διαχωρίζονται μεταξύ τους, τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα προσδένονται στους μικροσωληνίσκους μέσω των κινητοχώρων τους και συγκλίνουν στο μέσο της ατράκτου. Η δημιουργία της διπολικής μιτωτικής ατράκτου, συντονίζεται μέσω της δράσης των κινητήριων πρωτεϊνών των μικροσωληνίσκων (*motor proteins*),<sup>89</sup> τη δυνεΐνη και την Eg5, τις οποίες

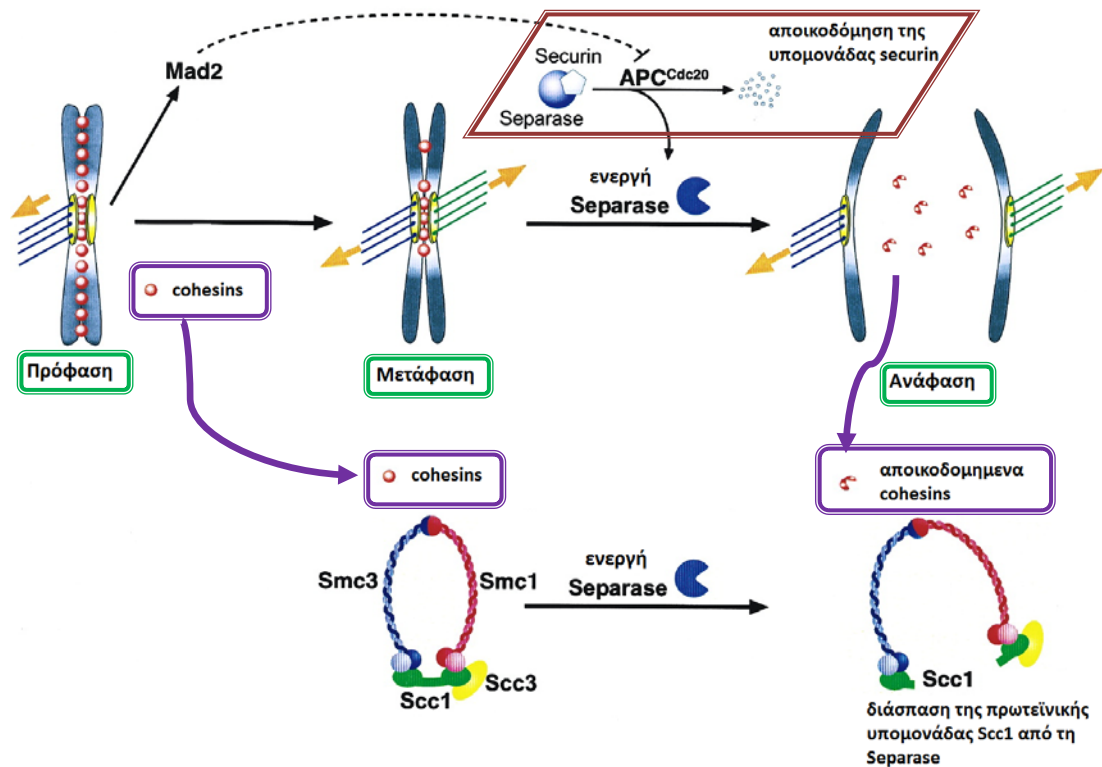
φωσφορυλιώνει η Aur A.<sup>90,91</sup> Αυτές οδηγούν σε αντιπαράλληλες δράσεις των μικροσωληνίσκων, απαραίτητες για τη δημιουργία του σταθερού άκαμπτου δικτύου της ατράκτου, που επιτρέπει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την ανάφαση<sup>89</sup> (Εικόνα 1.3.1.7.).<sup>92</sup>



**Εικόνα 1.3.1.7.** Επίδραση των πρωτεϊνών Eg5 και δυνεΐνης στη δημιουργία του σταθερού δικτύου της διπολικής ατράκτου.

Συνεπώς, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Aur A οδηγεί στην παρουσία περισσότερων κεντροσωματίων στο κύτταρο με αποτέλεσμα το μη σωστό σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και έτσι τον προβληματικό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Το γεγονός αυτό σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση καρκινογένεσης<sup>93</sup> και συγκεκριμένα σε μεγάλο ποσοστό με την εκδήλωση επιθετικών καρκίνων μαστού<sup>94</sup> και παχέος εντέρου,<sup>95</sup> καθώς και σε καρκίνους του παγκρέατος<sup>96</sup> και της ουροδόχου κύστης<sup>97</sup>. Η κινάση Aur B συμμετέχει στο λεγόμενο σημείο ελέγχου της ατράκτου (*Spindle Assembly Checkpoint*, SAC),<sup>98</sup> το οποίο εξασφαλίζει το σωστό διαχωρισμό των χρωματίδων και εντοπίζεται στο στάδιο κατά το οποίο το κύτταρο μεταβαίνει από τη μετάφαση στην ανάφαση της μίτωσης. Κατά τη μετάφαση τα χρωμοσώματα είναι διατεταγμένα, ως ζεύγη αδερφών χρωματίδων, στο επίπεδο της μιτωτικής ατράκτου και συνδέονται μεταξύ τους με

εξειδικευμένους μηχανισμούς (*cohesins*), πρωτεϊνικά τετραμερή (με υπομονάδες τις Smc1, Smc3, Scc1, Scc3, **Εικόνα 1.3.1.8.**) σε μορφή δακτυλίου.<sup>99</sup> Η συνεκτικότητα των αδερφών χρωματίδων ρυθμίζεται από τη σεπαράση (*separase*), μια πρωτεάση η οποία φυσιολογικά βρίσκεται συνδεδεμένη με την ανασταλτική πρωτεΐνη σεκιουρίνη (*securin*). Με την έναρξη της ανάφασης το σύμπλοκο APC/C (προωθητικό σύμπλοκο της Ανάφασης, *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*),<sup>100</sup> διασπά τη σεκιουρίνη και η ενεργή πλέον σεπαράση καταστρέφει τις πρωτεϊνικές δομές που συνδέουν τις χρωματίδες (*cohesins*), ώστε αυτές να διαχωριστούν μετακινούμενες προς τους πόλους της ατράκτου. Στο σημείο SAC, δρα ένας πολύπλοκος ελεγκτικός μηχανισμός που περιλαμβάνει πολλές ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως οι Bub1-3, BubR1, Mad1, Mad2, CENP-E, οι οποίες εντοπίζονται στους μη προσδεμένους κινητοχώρους και εμποδίζουν το σύμπλοκο APC/C να επιτρέψει στα κύτταρα την είσοδο στην ανάφαση. Η Aur B εξασφαλίζει ότι ο κυτταρικός κύκλος σταματά στη μετάφαση, εάν δεν είναι όλοι οι κινητοχώροι προσδεμένοι στους μικροσωληνίσκους,<sup>101,102</sup> συγκεντρώνοντας όλες τις πρωτεΐνες του σημείου ελέγχου στην περιοχή του κεντρομεριδίου / κινητοχώρου, από τις οποίες τελικά η Mad2 αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο APC/C, εμποδίζοντας την ενεργοποίησή του (**Εικόνα 1.3.1.8.**).<sup>103</sup>



**Εικόνα 1.3.1.8.** Το σημείο ελέγχου της ατράκτου (Spindle Assembly Checkpoint, SAC).<sup>104</sup>

Η υπερέκφραση της Aur B έχει ως αποτέλεσμα τον άνισο χρωμοσωμικό διαχωρισμό, οδηγώντας σε ανευπλοειδία (μη σταθερός αριθμός χρωμοσωμάτων μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση), και βρέθηκε να σχετίζεται με διαφόρους τύπους λεμφωμάτων<sup>105</sup> και καρκίνου, όπως του μαστού και του παχέος εντέρου.<sup>106</sup>

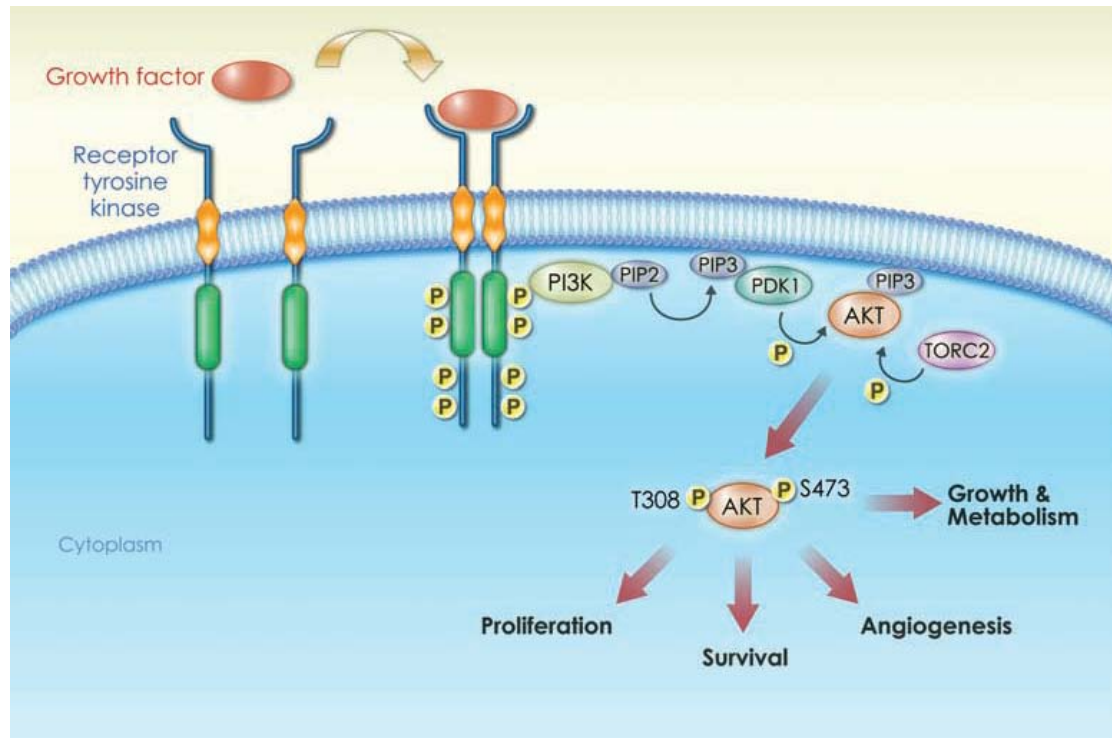
### 1.3.2. ΑΛΛΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ

Εκτός του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, εξετάζονται διεξοδικά και οι υπόλοιπες χαρακτηριστικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, η ικανότητα μετάστασης και αγγειογένεσης, η απώλεια διαφοροποίησης, η αποφυγή της απόπτωσης κλπ, όσον αφορά την πιθανή χρησιμοποίησή τους για την ορθολογική ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων.<sup>107</sup> Επειδή πρόκειται για πολυπαραμετρικές διαδικασίες, στις οποίες εμπλέκονται διάφοροι μηχανισμοί είναι δύσκολο να μελετηθούν *in vitro*, όμως έχουν βρεθεί και αξιολογηθεί φαρμακολογικά πολλές εμπλεκόμενες κινάσες, που η έκφραση και η

λειτουργικότητα τους σχετίζονται με την έκβαση των ανωτέρω διαδικασιών. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, όπως η οικογένεια EGFR, που όλα τα μέλη της υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα και συνδέονται με την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη μετάσταση,<sup>108</sup> σε σημείο που η κλινική ανίχνευση μεταλλαγμένου, υπερδραστήριου EGFR να αποτελεί παράγοντα κακής πρόγνωσης της έκβασης της ασθένειας.<sup>109</sup> Επίσης, ο VEGFR, που διευκολύνει τον σχηματισμό νέων τριχοειδών αγγείων, για την τροφοδοσία των στερεών όγκων και παίζει καθοριστικό ρόλο στην αγγειογένεση, πιθανότατα στη μετάσταση, καθώς και στην αντίσταση των όγκων έναντι της επίθεσης του ανοσοποιητικού συστήματος<sup>110</sup> και ο PDGFR, που συμμετέχει σε πλήθος σηματοδοτικών διαδικασιών και υπερεκφράζεται ή υπερενεργοποιείται σε μεγάλο αριθμό νεοπλασιών.<sup>111</sup> Τεκμηριωμένη φαρμακολογικά είναι η αναστολή συγκεκριμένων υποδοχέων και ενζύμων που λειτουργούν ως κινάσες τυροσίνης. Στη πρώτη κατηγορία ανήκουν οι υποδοχείς c-kit, που συνδέονται με την εμφάνιση όγκων του γαστρεντερικού συστήματος,<sup>112</sup> ο FLT-3, που σχετίζεται με την αιματοποίηση, την έκφραση του αντιαποπτωτικού γονιδίου bcl-2 και την αναστολή του προαποπτωτικού γονιδίου bax<sup>113</sup> και η κινάση Alk (*Anaplastic lymphoma kinase*), που σχετίζεται με ογκογενετικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα, τόσο στο αιμοποιητικό σύστημα, όσο και σε στερεούς όγκους.<sup>114</sup> Στη δεύτερη κατηγορία, των κινασών τυροσίνης που δεν είναι υποδοχείς, αλλά απλά ένζυμα, ανήκει η c-Abl κινάση, που λαμβάνει μέρος σε οδούς που σχετίζονται με τη μορφολογία, την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου.<sup>115</sup> Επίσης, μέλη αυτής της κατηγορίας είναι και οι κινάσες της οικογένειας Janus (JAK), που ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), οι οποίες δεσμεύονται στο DNA και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες.<sup>116</sup> Η αναστολή των κινασών JAK αποτελεί θεραπευτικό στόχο για την αντιμετώπιση των περιπτώσεων λευχαιμίας (πχ. οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία), όπου αυτές υπερεκφράζονται.<sup>117</sup> Τέλος, υπάρχουν και αρκετές κινάσες σερίνης/θρεονίνης, που η αναστολή τους συνδέεται με αντικαρκινική δράση, μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται οι κινάσες MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*), MEK (*Mitogen Activated or External signal-regulated Kinases*), η οικογένεια Raf (*Rapidly transforming fibroblastoma*), η πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η ILK

(*Integrin-linked kinase*), η mTOR (*mammalian Target of rapamycin*) και η κινάση PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinases*).<sup>118</sup>

Η ανώμαλη ενεργοποίηση της οδού που ελέγχεται από τις κινάσες της φωσφατιδυλοϊνositόλης PI3K (**Εικόνα 1.3.2.1.**) έχει στατιστικά συσχετισθεί με την εμφάνιση και την ανάπτυξη πολλών μορφών καρκίνου στον άνθρωπο. Γνωρίζουμε ότι ελέγχει την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των κυττάρων, όπως και την ανάπτυξη αντοχής στα εφαρμοζόμενα χημειοθεραπευτικά σχήματα.

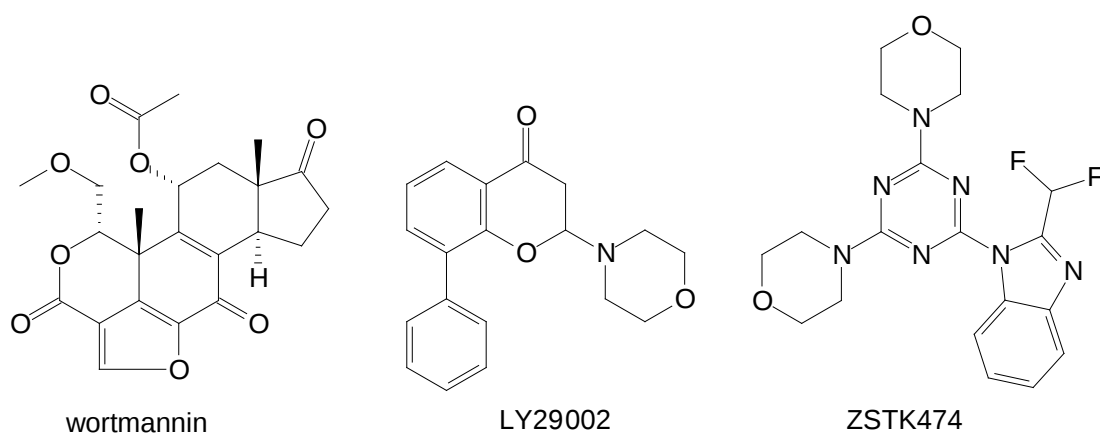


**Εικόνα 1.3.2.1.** Σχηματική παρουσίαση της οδού που ελέγχεται από τις κινάσες PI3K.<sup>119</sup>

Οι κινάσες PI3K είναι οκτώ και κατηγοριοποιούνται σε τρεις οικογένειες κινασών λιπιδίων. Φωσφορυλιώνουν την 3'-OH ομάδα φωσφοϊνσιτιδίων, δίνοντας έτσι το έναυσμα για την έναρξη καταρράκτη μεταγωγής σήματος, από την κυτταρική μεμβράνη προς το εσωτερικό του κυττάρου. Το καλύτερα χαρακτηρισμένο προϊόν αυτής της φωσφορυλίωσης είναι η 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνσιτιόλη (PIP<sub>3</sub>, *Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate*, **Εικόνα 1.3.2.1.**), της οποίας ο σχηματισμός ελέγχεται από την ογκοκατασταλτική φωσφατάση PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) και χρησιμεύει ως δεύτερος διαβιβαστής. Δεν ενεργοποιεί απευθείας τις Akt/PKB, αλλά τις μετακινεί προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου η Akt ενεργοποιείται με διπλή φωσφορυλίωση, σε υπόλοιπο σερίνης, με

συμμετοχή της κινάσης mTOR και σε υπόλοιπο θρεονίνης. Η οδός Akt/PKB εμπλέκεται σε καρκινογενετικούς μηχανισμούς, ενώ υπερέκφραση της Akt2 παρατηρείται στο 30-40% των καρκίνων του παγκρέατος και των ωοθηκών. Αντίστοιχα, αυξημένη ενεργοποίηση της Akt1 παρατηρείται συχνά στον καρκίνο του προστάτη (το ποσοστό υπερβαίνει το 50%) και σε καρκίνο μαστού και ωοθηκών (~40%), ενώ αυξημένη ενεργοποίηση της Akt2 έχει εντοπισθεί σε καρκίνο του παγκρέατος και του παχέος εντέρου.<sup>120</sup>

Οι κινάσες PI3K κατατάσσονται στις οικογένειες I (A και B) και II και εξ αυτών μόνο οι κινάσες IA έχουν συσχετισθεί ευθέως με την εμφάνιση καρκίνου. Πρόκειται για ετεροδιμερή, που αποτελούνται από μια ρυθμιστική υπομονάδα (p85α, p55α, p85β, p55γ) και μια καταλυτική υπομονάδα (p110α, p110β, p110δ), που ενεργοποιούνται καθοδικά από κυτταρικούς υποδοχείς που είναι κινάσες τυροσίνης (RTKs). Η εύρεση αναστολέων, είτε γενικών αναστολέων των PI3K κινάσων (*pan-specific*), είτε ειδικών PI3K IA αναστολέων, είναι επιθυμητή, καθώς γενετικές μεταλλάξεις αυτών των ενζύμων και γενικά η δυσλειτουργία των μονοπατιών και τελεστών τους αποτελούν ένα από τα συχνότερα απαντωμένα ευρήματα των νεοπλασιών.<sup>121</sup> Θεωρητικά, ένας γενικός PI3K αναστολέας, θα μπορούσε να ασκήσει τοξική δράση, παρεμβαίνοντας στον μεταβολισμό της γλυκόζης και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, ωστόσο αυτού του είδους οι παρενέργειες μπορούν να γίνουν ανεκτές από τον οργανισμό για ένα μικρό χρονικό διάστημα. Οι ειδικοί αναστολείς ισομορφών είναι βεβαίως δυσκολότερο να ευρεθούν, αλλά πιθανότατα μπορούν να εφαρμοσθούν σε χρόνια βάση.



**Σχήμα 1.3.2.1.** Αναστολείς της PI3K

Ως γενικός και μη αντιστρεπτός αναστολέας των PI3K δρα το φυσικό προϊόν wortmannin (**Σχήμα 1.3.2.1.**) δευτερογενής μεταβολίτης μυκήτων (*Penicillium funiculosum* και *Penicillium wortmannii*), που δεσμεύεται στη θέση του ATP και χρησιμεύει ως εργαλείο για την διαλεύκανση του βιολογικού ρόλου των κινασών και της εμπλοκής τους στις καρκινογενετικές διαδικασίες.<sup>122</sup> Καθώς ο χρόνος ημιζωής της wortmannin στον ορό πλάσματος δεν υπερβαίνει τα λίγα λεπτά, υπήρξε ανάγκη για την ανάπτυξη σταθερότερων δομικών της αναλόγων, που έδειξαν ενδιαφέρουσα αντικαρκινική δράση.<sup>123</sup> Τα τελευταία χρόνια μελετώνται και αντιστεπτοί αναστολείς του ενζύμου, που καταλαμβάνουν επίσης τη θέση πρόσδεσης του ATP, όπως ο γενικός αναστολέας LY29002,<sup>124</sup> ή ο ειδικός αναστολέας της οικογένειας PI3K I ZSTK474 (**Σχήμα 1.3.2.1.**)<sup>125</sup>, καθώς και αναστολείς που φέρουν ογκώδεις υποκαταστάτες, οι οποίοι εκτείνονται και δεσμεύονται σε μια διπλανή του ενεργού κέντρου υδρόφοβη κοιλότητα, σε μια προσπάθεια αύξησης της συνάφειας με συγκεκριμένα ένζυμα.<sup>126</sup> Αρκετοί εξ αυτών των αναστολέων βρίσκονται σε στάδια κλινικών μελετών.

#### **1.4. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**

##### **1.4.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗ – ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ**

Η απώλεια του αυστηρού φυσιολογικού ελέγχου της ενεργότητας των πρωτεϊνικών κινασών οδηγεί σε σοβαρή διαταραχή όλων των θεμελιωδών κυτταρικών λειτουργιών και συνδέεται με την εμφάνιση σοβαρών νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η φλεγμονή, ενώ συχνά καταλήγει ακόμα και στην εμφάνιση καρκινικού φαινότυπου. Όλες οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του νεοπλασματικού κυττάρου, η ανεξέλεγκτη διαίρεση, η ικανότητα διήθησης, μετάστασης και αγγειογένεσης, σχετίζονται με διαταραχή της λειτουργικότητας πρωτεϊνικών κινασών, σε σημείο που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι διάφορες

μορφές καρκίνου θα μπορούσαν να περιγραφούν και να καταταγούν ως ασθένειες, με βάση την παρατηρούμενη κάθε φορά διαταραχή λειτουργικότητας αυτών των ενζύμων.<sup>118</sup> Πάνω από το 50% των πρωτεϊνικών κινασών χαρακτηρίζονται ως ογκογενείς, επειδή είναι δυνατόν να λειτουργήσουν ανεξέλεγκτα και να εμπλακούν κατ'αυτόν τον τρόπο στην εμφάνιση κακοήθειας στον άνθρωπο. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί βεβαίως να αποδοθεί σε διάφορες αιτίες. Για παράδειγμα, μια χρωμοσωμική μετατόπιση μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό υβριδικής κινάσης, η οποία διατηρεί την καταλυτική ιδιότητα του ενζύμου, αλλά όχι και τον ελεγκτικό μηχανισμό που ασκείται από το υπόλοιπο της πρωτεΐνης. Είναι γνωστή η περίπτωση της υβριδικής Bcr-Abl κινάσης, που είναι συνεχώς ενεργή και ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας.<sup>127</sup> Άλλος μηχανισμός καρκινογένεσης αφορά την εμφάνιση γονιδιακής μετάλλαξης, που καθιστά την αντίστοιχη κινάση ανεξέλεγκτα ενεργή, όπως είναι για παράδειγμα η μεταλλαγμένη c-Kit κινάση των όγκων του γαστρεντερικού συστήματος. Ένας τρίτος μηχανισμός έχει σχέση με την αυξημένη έκφραση, ή την πλήρη απώλεια ελέγχου της έκφρασης της κινάσης, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στον ενδοθηλιακό αγγειακό αυξητικό παράγοντα και τον υποδοχέα του (VEGF και VEGFR, αντίστοιχα), που προκαλούν αγγειογένεση, απαραίτητη για την αύξηση του μεγέθους των στερεών όγκων. Τέλος, η λειτουργικότητα μιας κινάσης μπορεί να βρεθεί εκτός ελέγχου με την ενεργοποίηση κάποιου ογκογονιδίου, ή αντίστοιχα την απενεργοποίηση κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της απώλειας του ελέγχου που ασκεί η φωσφατάση PTEN στην PI3K/Akt κινάση. Φυσικό επακόλουθο όλων αυτών των παρατηρήσεων υπήρξε η προσπάθεια ανάπτυξης αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, που θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμοι στην αντικαρκινική θεραπεία.<sup>128, 129,130</sup> Μετά την επιτυχία του imatinib mesylate (Gleevec, ή Clivec), που είναι το πρώτο συνθετικό παράγωγο που πήρε έγκριση κυκλοφορίας το 2001 και δρα ως αναστολέας της υβριδικής Bcr-Abl κινάσης, η εύρεση νέων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών αποτελεί ένα από τα πλέον ελκυστικά πεδία φαρμακευτικής έρευνας.

Η εμπλοκή των 518 κινασών που συμπεριλαμβάνονται στο ανθρώπινο «κίνωμα» στα διάφορα μονοπάτια της μεταγωγής σήματος και η σχετιζόμενη με τον καρκίνο διαταραχή μελετάται λεπτομερώς και αξιολογείται κάθε φορά ο στόχος της

θεραπευτικής παρέμβασης. Είναι αναγκαία λοιπόν κάθε φορά η αναστολή μιας συγκεκριμένης κινάσης, ή μιας μικρής ομάδας κινασών και αυτό έχει επιτευχθεί κυρίως από μικρά μόρια που μιμούνται το ATP.<sup>131</sup> Περιέργως, η αναστολή αυτή δεν φαίνεται να προκαλεί ιδιαίτερα προβλήματα στη λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στο μεγάλο θεραπευτικό εύρος των αναστολέων, ακόμα και όταν αυτοί δεν είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί.<sup>132</sup> Η κλινική επιτυχία των φαρμάκων που έχουν ήδη εγκριθεί είναι αποδεδειγμένη και επισφραγίζεται από τα υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης των ασθενών, που για το imatinib π.χ. φθάνουν το 80%.<sup>133</sup> Ωστόσο, έχουν εμφανισθεί και ορισμένα προβλήματα στην κλινική εφαρμογή τους, που έχουν σχέση με την ανάγκη αύξησης της αποτελεσματικότητας τους, κυρίως σε συνάρτηση με την παρατηρούμενη ανάπτυξη επαγόμενης αντοχής, μετά από την παρατεταμένη χορήγησή τους.

Όπως και οι υπόλοιπες πρωτεϊνικές κινάσες, οι ογκογενείς κινάσες ενεργοποιούνται με κάποια διαδικασία που σχετίζεται με τη μεταγωγή σήματος. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων υφίστανται και οι ίδιες αντίδραση φωσφορυλίωσης σε τυροσίνη, σερίνη ή θρεονίνη που ανήκουν στον υδρόφιλο βρόγχο ενεργοποίησης (*activation loop*) της θέσης πρόσδεσης του ATP. Αποτέλεσμα αυτής της φωσφορυλίωσης είναι η τροποποίηση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, με μετακίνηση του υδρόφοβου τμήματος του βρόγχου προς την περιοχή του υδατικού διαλύματος, που συνεπάγεται αύξηση της προσβασιμότητας του ενεργού της κέντρου. Φαίνεται όμως, ότι εκτός της συγκεκριμένης διαμορφωτικής αλλαγής, με τη φωσφορυλίωση επηρεάζεται ευρύτερα η λειτουργικότητα της κινάσης, ενώ συχνά αλλάζει ακόμα και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της.<sup>134</sup> Εκτός της φωσφορυλίωσης, λειτουργούν και οι ειδικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης των κινασών, που αφορούν την αλληλεπίδραση συγκεκριμένης κατηγορίας κινασών με μόρια δεύτερων αγγελιοφόρων (όπως το c-AMP για την πρωτεϊνική κινάση A, ή το σύμπλοκο  $\text{Ca}^{2+}$ /καλμοδουλίνης για τις Cam κινάσες), ή με ενδοκυτταρικά συστατικά, που εκφράζονται σε συγκεκριμένες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (όπως είναι π.χ. οι κυκλίνες για τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες), ή εντοπίζονται σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα, ή αναγνωρίζουν κάποια ειδικά δομικά στοιχεία του ενζύμου, όπως είναι για παράδειγμα η περιοχή SH2 (*Src Homology 2 Domain*) στις Src κινάσες.<sup>135</sup> Ο αριθμός των ογκογενών κινασών που φέρουν μεταλλάξεις στον

βρόγχο ενεργοποίησης είναι μεγάλος, ενώ αυτές οι κινάσες έχουν αποδεδειγμένα συνδεθεί με την εμφάνιση συγκεκριμένου τύπου κακοήθειας, με συνέπεια η αναστολή τους να αποτελεί έναν ορθολογικό και προφανή θεραπευτικό στόχο.<sup>136,137</sup> Εξ ίσου επιθυμητή είναι όμως και η αναστολή ορισμένων κινασών, οι οποίες σπάνια βρίσκονται μεταλλαγμένες, αλλά συμβάλλουν σε δύο χαρακτηριστικές ικανότητες των καρκινικών κυττάρων: την ταχεία αναπαραγωγή και την αποφυγή απόπτωσης. Εδώ ανήκουν οι κινάσες MEK1 και MEK2 του μονοπατιού MAPK,<sup>138</sup> η κινάση mTOR του μονοπατιού PI3K-Akt<sup>139</sup> και όλες οι κινάσες ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Μια τρίτη κατηγορία κινασών-στόχων της αντικαρκινικής θεραπείας είναι αυτές που βοηθούν στην αύξηση του μεγέθους του καρκινικού όγκου και τη μετάσταση, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις κινάσες VEGFR, FGFR και NTRK2.<sup>140</sup> Η εκλεκτική αναστολή της πρώτης κατηγορίας των μεταλλαγμένων κινασών, που εντοπίζονται εύκολα με DNA sequencing, είναι εφικτή και έχει δώσει τα πλέον θεαματικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Η αναστολή των κινασών της δεύτερης και τρίτης κατηγορίας αποδείχθηκε πολύ δυσκολότερη, καθώς η μελέτη και αξιολόγηση των πιθανών αναστολέων αυτής της κατηγορίας δεν ελέγχεται και κυρίως δεν αξιολογείται εύκολα στις κυτταρικές καλλιέργειες, επειδή σχετίζεται με λειτουργικές διαφοροποιήσεις των καρκινικών κυττάρων σε επίπεδο οργανισμού.

#### **1.4.2. ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ**

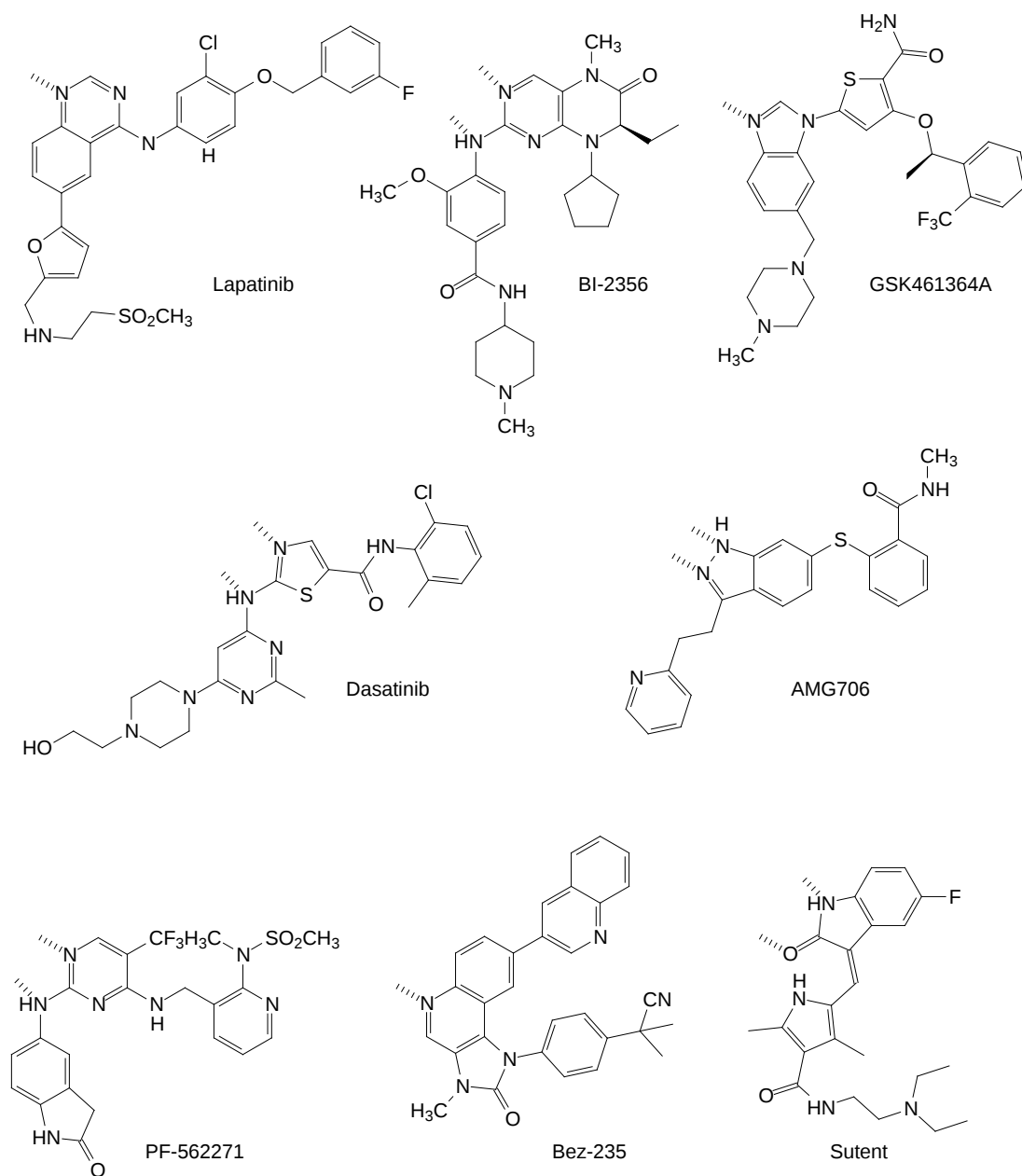
Θεωρητικά, ένας αναστολέας κινάσης θα μπορούσε να είναι δομικό ανάλογο του φυσικού υποστρώματός της, ώστε να παίζει το ρόλο ψευδούς υποστρώματος. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να προσομοιάσει τη δομή του ATP και να καταλάβει αντ' αυτού τη θέση πρόσδεσής του, ή να «κλειδώσει» με οποιονδήποτε άλλο τρόπο το ένζυμο στην ανενεργή του διαμόρφωση. Οι έως σήμερα γνωστοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και μάλιστα όσοι εξ αυτών έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας ως φάρμακα, ανήκουν στην πλειοψηφία τους στα μόρια που μοιάζουν δομικά και δρουν ανταγωνιστικά ως προς το ATP, ενώ δεν δρουν ανταγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα της κινάσης.<sup>141</sup> Αυτό συμβαίνει παρά την ύπαρξη μιας σειράς από λόγους, που δίνουν σαφές πλεονέκτημα στους αναστολείς που μιμούνται το

υπόστρωμα, όπως είναι η μεγάλη πιθανότητα εξειδίκευσης και εκλεκτικής αναστολής συγκεκριμένης κινάσης και η έλλειψη σοβαρού ανταγωνισμού στο κυτταρικό περιβάλλον. Αντιθέτως, όλοι οι αναστολείς που μιμούνται το ATP είναι απαραίτητο να διαθέτουν πολύ υψηλή συνάφεια με την κινάση που αναστέλλουν, αφού υφίστανται ανταγωνισμό από το ίδιο το ATP και αναπόφευκτα μειώνεται η δραστικότητά τους. Πράγματι, ενώσεις που αναστέλλουν ισχυρά διάφορες κινάσες σε νανομοριακή συγκέντρωση, πρέπει να χορηγηθούν σε πολλαπλάσια συγκέντρωση (της τάξεως του millimolar) στην κυτταρική καλλιέργεια, επειδή συνυπάρχει η συνήθως υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ATP.<sup>142</sup> Σε αντίθεση όμως με την ξεκάθαρη εικόνα του τρόπου πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο των κινασών, οι θέσεις και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων υποστρωμάτων τους δεν έχουν αποσαφηνισθεί πλήρως, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατόν να συλλεχθούν όλες οι πληροφορίες, που θεωρούνται απαραίτητες για τον σχεδιασμό φαρμάκων. Έτσι, μπορεί να δοθεί κάποια εξήγηση του παραδόξου που αναφέρθηκε προηγουμένως, χωρίς αυτό βεβαίως να αποκλείει τις προσπάθειες για μίμηση του υποστρώματος, οι οποίες είναι προς το παρόν περιορισμένες, αλλά μάλλον επιβεβαιώνουν τις προσδοκίες για εξειδικευμένη δράση και χαμηλή τοξικότητα.<sup>143,144</sup>

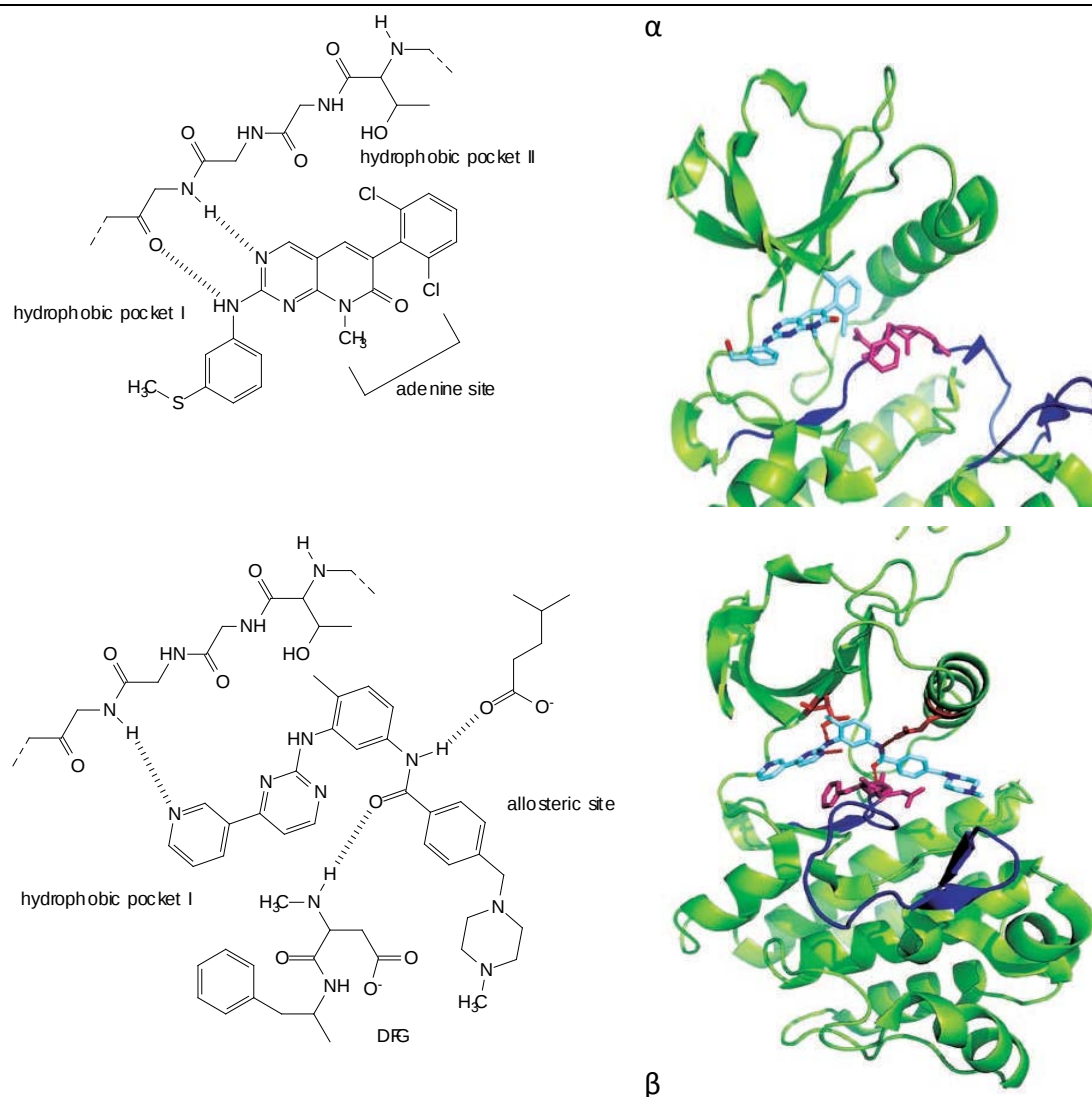
Ένα επιπλέον σημαντικό ερώτημα, που αφορά τους αναστολείς κινασών που είναι δομικά ανάλογα του ATP, έχει σχέση με την εκλεκτικότητα της αναστολής και την ασφάλεια της κλινικής εφαρμογής τους. Εκτός της πληθώρας των πρωτεϊνικών κινασών που απαντώνται σε κάθε κύτταρο, υπάρχουν και άλλα ένζυμα που αναγνωρίζουν ως υποστρώματα ή ως συμπαράγοντες τις πουρίνες, επομένως δεν είναι απίθανο να αλληλεπιδράσουν με κάποιο πουρινικό ανάλογο. Η εμπειρία όμως απέδειξε ότι είναι εφικτή η εύρεση αναστολέων που επιδεικνύουν αρκετά μεγάλη εκλεκτικότητα για ορισμένες κινάσες, ενώ προς την κατεύθυνση της αύξησης της εκλεκτικότητας καταβάλλονται αξιόλογες προσπάθειες, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν η εκμετάλλευση του όγκου των ομάδων του αμινοξέος-θυρωρού, η σύνδεση σε περιοχές που γειτνιάζουν με το ενεργό κέντρο και η ανάπτυξη μη αντιστρεπτών αναστολέων.<sup>145,146</sup>

Κατ' αναλογία με την αδενίνη του ATP οι αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών σχηματίζουν από έναν έως τρεις δεσμούς υδρογόνου με τα απέναντι

αμινοξέα του ευκίνητου τμήματος, όμως σπάνια αλληλεπιδρούν με τη θέση δέσμευσης της ριβόζης και της φωσφορικής ομάδας. Οι αναστολείς τύπου I (**Σχήμα 1.4.2.1.**) αναστέλλουν την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης, δηλαδή εκείνη που λαμβάνεται κατά την μεταφορά της φωσφορικής ομάδας. Στην ομάδα αυτή ανήκει η πλειοψηφία των γνωστών αναστολέων, που περιέχουν ετεροκυκλικό σύστημα το οποίο μιμείται την πουρίνη, ενώ παράλληλα χρησιμεύει ως κεντρική δομή πρόσδεσης πλευρικών αλυσίδων, που αλληλεπιδρούν με τα γειτονικά ευκίνητα υδρόφοβα τμήματα του ενεργού κέντρου (**Σχήμα 1.4.2.2α.**). Αντιθέτως, οι αναστολείς τύπου II αναγνωρίζουν την ανενεργό μορφή της κινάσης, την *DFG-out*, που προκύπτει από τη μετακίνηση της τριπλέτας αμινοξέων προς την πλευρά του διαλύτη (**Σχήμα 1.4.2.2β.**) και τη διαφορετική διεύθυνση του βρόγχου ενεργοποίησης, η οποία δίνει περιθώρια αλληλεπίδρασης του αναστολέα με μια υδρόφοβη κοιλότητα, που βρίσκεται δίπλα από τη θέση δέσμευσης του ATP.

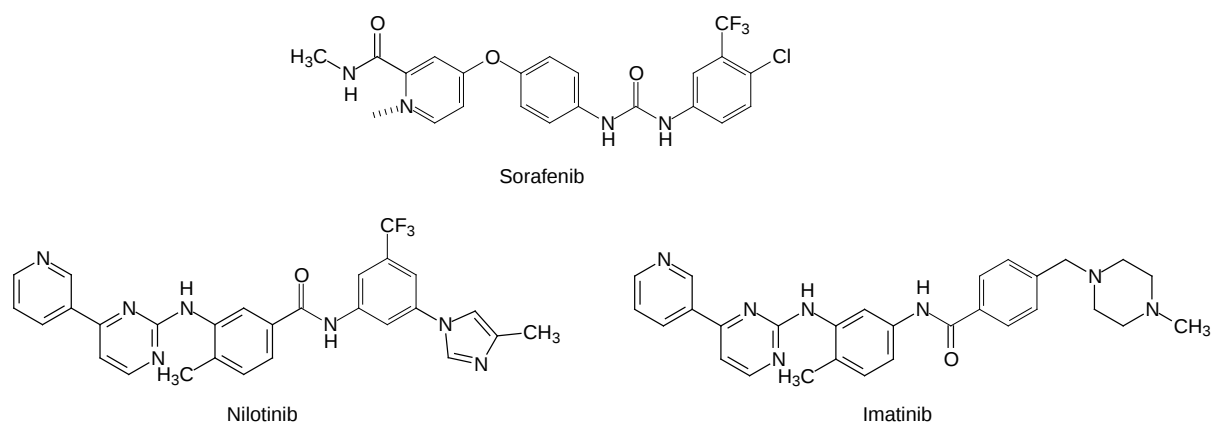


Σχήμα 1.4.2.1. Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών τύπου I.



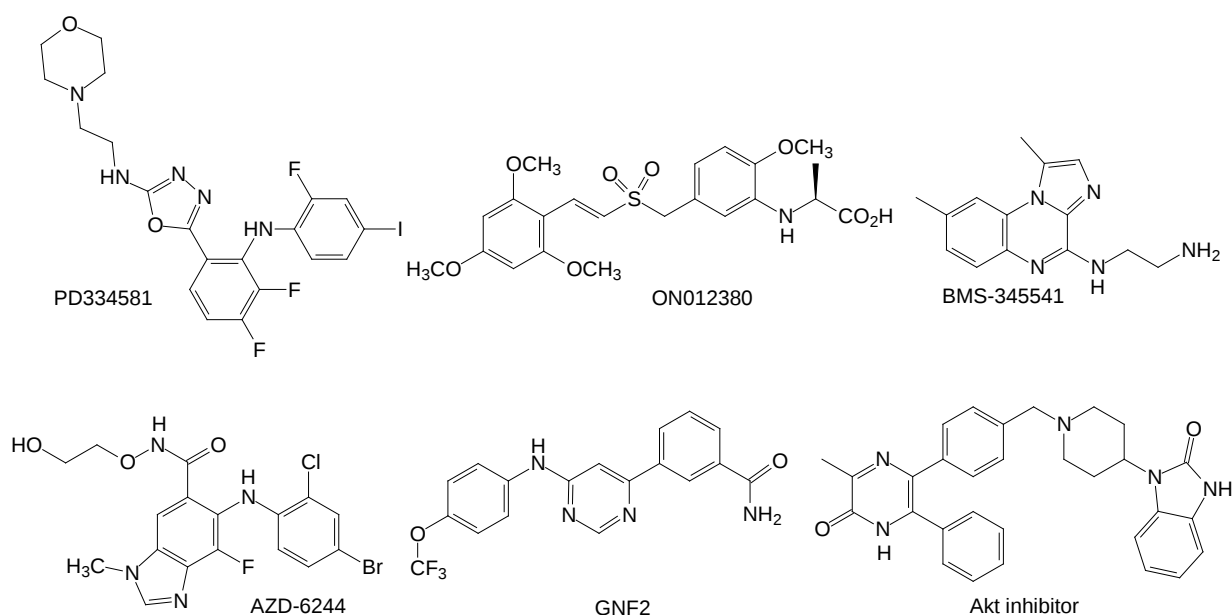
**Σχήμα 1.4.2.2.** Τρόποι δέσμευσης αναστολέων στο ενεργό κέντρο της κινάσης, **(α)**: αναστολείς τύπου I, **(β)** αναστολείς τύπου II.

Γνωστά φάρμακα, όπως τα imatinib, nilotinib και sorafenib (**Σχήμα 1.4.2.3.**) δρουν ως αναστολείς τύπου II έναντι των κινασών KIT και PDGFR, ή της Raf κινάσης, αντίστοιχα.<sup>147,148</sup> Οι αναστολείς τύπου II χαρακτηρίζονται από ποικιλία δομών ακόμη και όταν αναστέλλουν την ίδια κινάση, γεγονός που υποδεικνύει την ευκινησία του ενεργού κέντρου των κινασών, που είναι ικανό να υποστεί σημαντική διαμορφωτική αλλαγή, ώστε να μπορέσει να τις υποδεχθεί.<sup>21</sup> Παρ' όλα αυτά, όλα τα μόρια των αναστολέων τύπου II περιέχουν ένα κοινό «φαρμακοφόρο τμήμα», το οποίο αναπτύσσει τους δεσμούς υδρογόνου που είναι απαραίτητοι για τη σύνδεση με την κινάση.



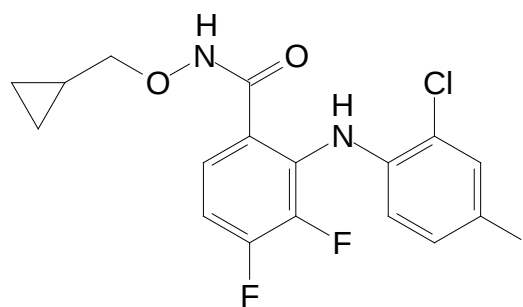
### Σχήμα 1.4.2.3. Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών τύπου II

Μια τρίτη κατηγορία αναστολέων είναι οι αλλοστερικοί (Σχήμα 1.4.2.4.), που παρουσιάζουν την ισχυρότερη δραστικότητα και την υψηλότερη εξειδίκευση.



### Σχήμα 1.4.2.4. Αλλοστερικοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.

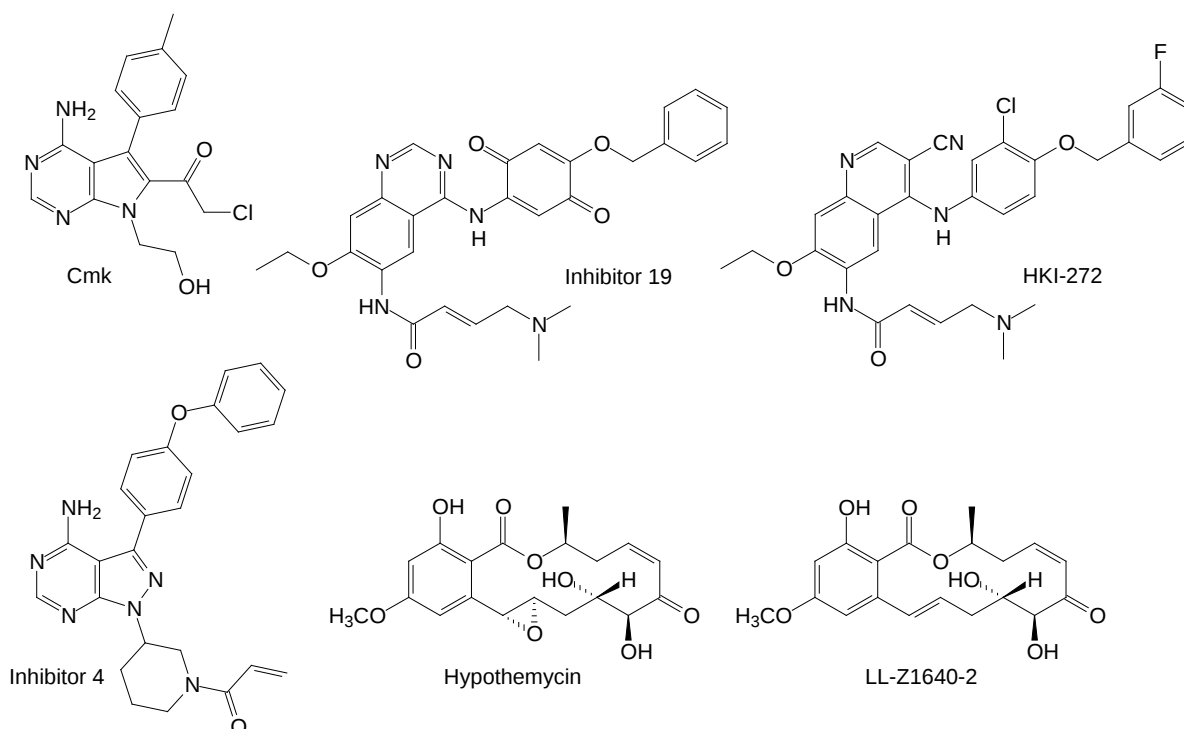
Ένας από τους πλέον μελετημένους είναι ο CI 1040 (Σχήμα 1.4.2.5.), αλλοστερικός αναστολέας των κινασών MEK1 και MEK2,<sup>149</sup> ενώ η κατηγορία αυτή αναμένεται να εμπλουτισθεί στο άμεσο μέλλον, καθώς αποκτούν βαρύτητα τα αποτελέσματα των screening tests σε επίπεδο κυτταρικής καλλιέργειας, όπου οι κινάσες βρίσκονται στο φυσιολογικό τους περιβάλλον, έναντι των δοκιμασιών της αναστολής ομάδας κινασών in vitro.



CI 1040

Σχήμα 1.4.2.5.

Η τέταρτη κατηγορία αναστολέων είναι οι μη αντιστρεπτοί (Σχήμα 1.4.2.6.), που φέρουν συνήθως μια ηλεκτρονιόφιλη ομάδα, ικανή να συμμετάσχει σε αντίδραση Michael με υπόλοιπο κυστεΐνης, που εντοπίζεται στην πλούσια σε γλυκίνη περιοχή του ενεργού κέντρου, συνήθως μάλιστα κοντά στην τριπλέτα DFG του βρόγχου ενεργοποίησης.<sup>150</sup>



Σχήμα 1.4.2.6. Μη αντιστρεπτοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.

Αρκετά κυτταροτοξικά φυσικά προϊόντα δρούν ως μη αντιστρεπτοί αναστολείς, ενώ σταδιακά εμπλουτίζεται και η ομάδα των συνθετικών παραγώγων, παρόλο που στην επιστημονική κοινότητα υπάρχει κάποια επιφύλαξη, σχετικά με την πιθανότητα ανεπιθύμητης τοξικότητας εκ μέρους μη αντιστρεπτών αναστολέων ενζύμων. Πέραν αυτού, αυτή η κατηγορία εμφανίζει μεγάλη δραστικότητα και μικρή πιθανότητα για την ανάπτυξη αντοχής.<sup>146</sup>

#### **1.4.3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

Μετά την πάροδο της πρώτης δεκαπενταετίας έντονης ερευνητικής δραστηριότητας και την εύρεση μεγάλου αριθμού «εκλεκτικών» αναστολέων, η κυρίαρχη αντίληψη κινείται προς την κατεύθυνση εύρεσης αναστολέα που παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο ανασταλτικό προφίλ και όχι απόλυτη εξειδίκευση. Λαμβανομένου υπόψη του γεγονότος ότι μόνο ένα υποσύνολο πρωτεϊνικών κινασών είναι διαθέσιμο για *in vitro* πειράματα, όχι μόνο είναι πρακτικά δύσκολο να επιτευχθεί και να αποδειχθεί η απόλυτη εξειδίκευση, αλλά δεν φαίνεται να είναι στην πραγματικότητα και αναγκαία. Αντίθετα, για την επίτευξη ενός συγκεκριμένου φαρμακολογικού αποτελέσματος απαιτείται (και ελέγχεται κάθε φορά) η αναστολή ενός συνόλου πρωτεϊνικών κινασών, που μπορεί να ανήκουν στην ίδια ή σε κάποια κοντινή φυλογενετικά οικογένεια και εμπλέκονται σε συγκεκριμένο παθογενετικό μηχανισμό καρκινογένεσης.<sup>151</sup>

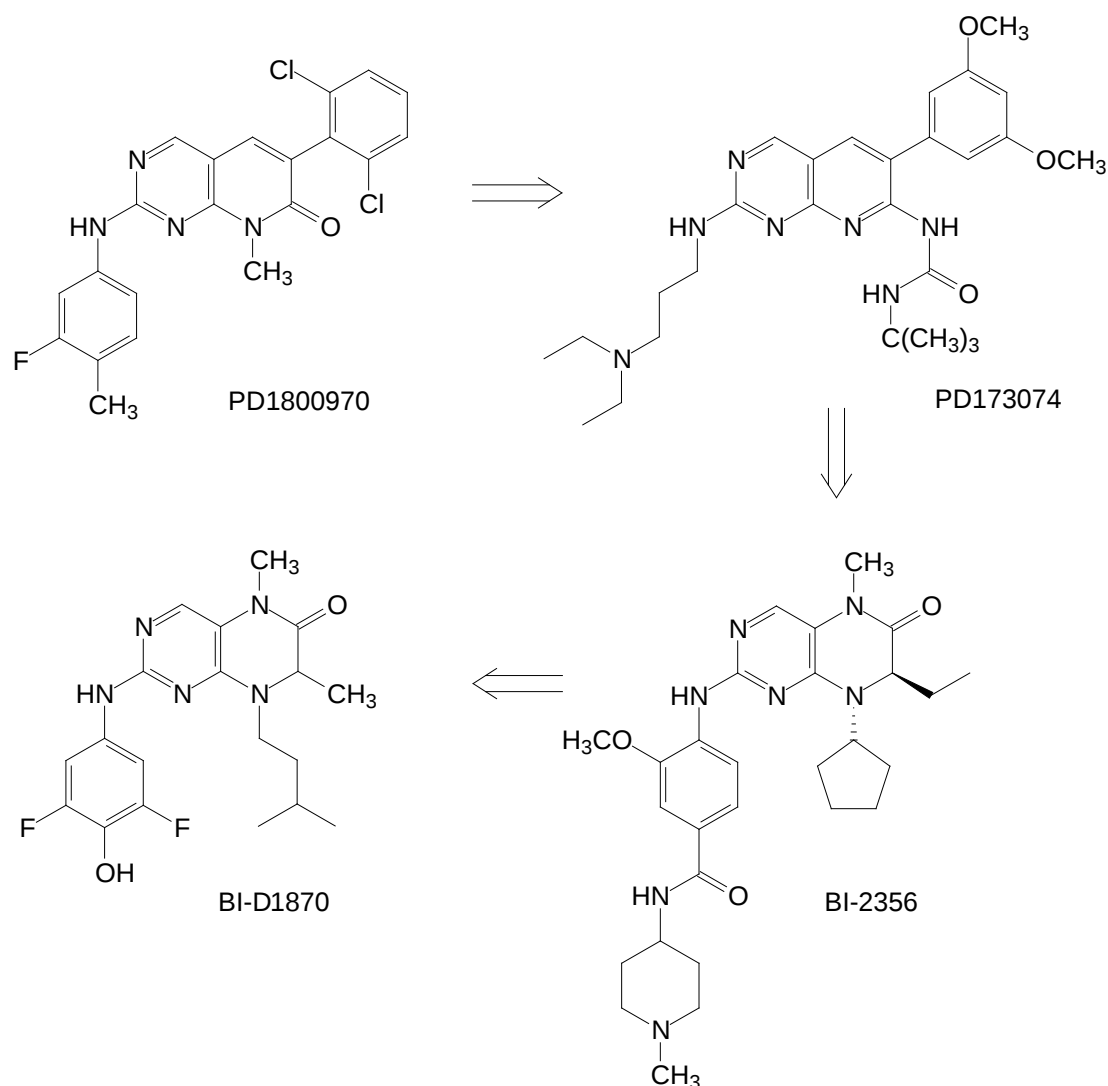
Αν και πολλοί ATP ανταγωνιστικοί αναστολείς τύπου I ανακαλύφθηκαν μέσω εκτεταμένων ελέγχων μεγάλων χημειοθηκών, αυτή η προσέγγιση τείνει να περιορισθεί, γιατί θεωρείται ότι απέδωσε ήδη, όσα μπορούσε να αποδώσει.<sup>152</sup> Εξαιρείται βεβαίως η μελέτη κινασών με κάπως ασυνήθιστο ενεργό κέντρο, ή η περίπτωση της διερεύνησης για την ανακάλυψη αλλοστερικών αναστολέων. Χρησιμοποιείται περισσότερο η σύνθεση αναλόγων των ήδη γνωστών αναστολέων, σε συνδυασμό με πληροφορίες από τη κρυσταλλογραφική εικόνα του ενεργού κέντρου και στρατηγικές συνδυασμού μοριακών τμημάτων (*fragment-based assembly strategies*), που αφορούν το σχεδιασμό αναστολέων που προκύπτουν από

την ένωση μέσω ομοιοπολικού δεσμού τμημάτων διαφορετικών αναστολέων, τα οποία δεσμεύονται σε διαφορετικές περιοχές της ίδιας κινάσης.<sup>153</sup>

Συχνά πραγματοποιούνται ισοστερείς αλλαγές ενώσεων που αρχικά ταυτοποιήθηκαν ως αναστολείς μιας ορισμένης κινάσης, ενώ αργότερα βρέθηκε ότι αναστέλλουν, έστω και ασθενέστερα και άλλες κινάσες. Χρησιμοποιούνται ως βάση ετεροκυκλικά συστήματα με δυνατότητα δέσμευσης στη θέση του ATP, πουρίνες, πυριμιδίνες, κιναζολίνες, κινολίνες, πυραζόλια, ιμιδαζόλια και οξινδόλια.<sup>154</sup> Καθώς συχνά η ανακάλυψη των αναστολέων προηγείται της κρυσταλλογραφίας του ενεργού κέντρου της κινάσης, χρησιμοποιούνται επίσης τεχνικές μοντελοποίησης (*homology modeling*) για τη πρόβλεψη του τρόπου δέσμευσης του αναστολέα, την περαιτέρω ενίσχυση της αναστολής και της εκλεκτικότητας. Τεχνικές που χρησιμοποιούνται όταν είναι γνωστή η τριτοταγής δομή του ενεργού κέντρου, είναι ο σχηματισμός υβριδικών μορίων, που προκύπτουν από τον συνδυασμό δομικών χαρακτηριστικών γνωστών αναστολέων και ο εικονικός έλεγχος πιθανών προσδεμάτων (*virtual ligand screening*).<sup>155</sup>

Οι ισοστερείς αλλαγές χρησιμεύουν για την βελτιστοποίηση των φαρμακοδυναμικών και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, με αλλαγές στους υποκαταστάτες, ενώ διατηρούνται κατά το δυνατόν τα δομικά, ηλεκτρονικά και στερεοχημικά χαρακτηριστικά, που είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ως παράδειγμα αναφέρεται η τροποποίηση του αναστολέα των Src κινασών PD180970 (**Σχήμα 1.4.3.1.**),<sup>156</sup> από την οποία προέκυψαν παράγωγα πυριδο[2,3-*d*]πυριμιδινών, ως αναστολείς κινασών τυροσίνης «δεύτερης γενιάς». Η κρυσταλλογραφική μελέτη του PD180970 δεσμευμένου στο ενεργό κέντρο μιας Src κινάσης αποκάλυψε την αλληλεπίδραση της φαινυλαμινοπυριμιδίνης με το ευκίνητο τμήμα του ενεργού κέντρου, ενώ ο διχλωροφαινυλοϋποκαταστάτης φάνηκε ότι καταλαμβάνει μία από τις πλαϊνές υδρόφοβες κοιλάδες. Με μια επιτυχημένη σειρά ισοστερών αλλαγών ανακαλύφθηκε το παράγωγο PD173074, που είναι εκλεκτικός αναστολέας των κινασών EGFR1 και 4.<sup>157</sup> Επίσης, από τροποποίηση του PD173074 βρέθηκε το παράγωγο BI 2356, που αναστέλλει τις PLK κινάσες.<sup>158</sup> Τέλος, η αντικατάσταση της πυριμιδινόνης από έναν κορεσμένο εξαμελή δακτύλιο, που προήλθε από την

κύκλωση αμινοξέος, οδήγησε στο BI-2356 και το BI-D1870, που αναστέλλει εκλεκτικά την κινάση RSK.<sup>159</sup>

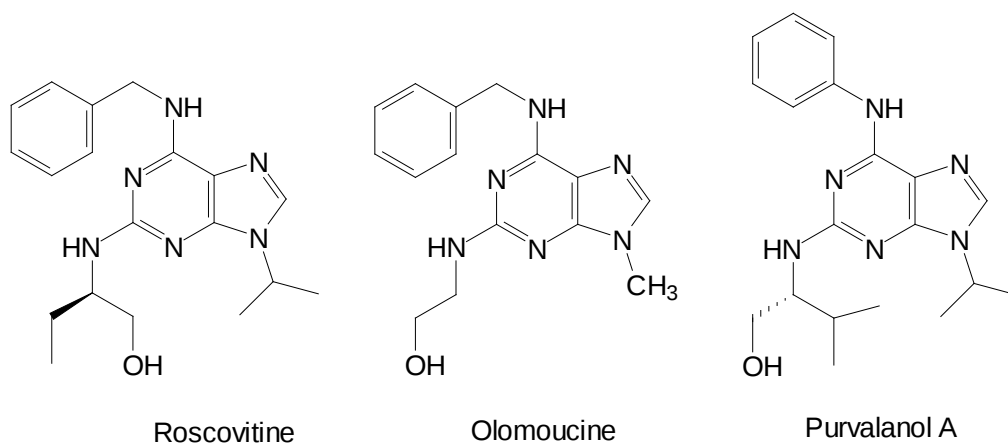


Σχήμα 1.4.3.1.

Κατά την επίπονη κυκλική διαδικασία της βελτιστοποίησης των μορίων με εκτεταμένες μελέτες δομής-δράσεως είναι επιθυμητή η παράλληλη μελέτη των νέων ενώσεων τόσο σε βιοχημικό (αναστολή ενζύμων), όσο και σε κυτταρικό επίπεδο, καθώς συχνά τα βιοχημικά αποτελέσματα δεν είναι ενδεικτικά της δράσης στο κυτταρικό επίπεδο. Το γεγονός αυτό σχετίζεται με τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και την εφικτή κάθε φορά ενδοκυτταρική συγκέντρωση του αναστολέα, αλλά και με τη μορφή της κινάσης που χρησιμοποιείται στον βιοχημικό έλεγχο, ειδικά όταν πρόκειται για υποδοχέα και χρησιμοποιείται μόνο το ενδοκυτταρικό τμήμα του.

#### 1.4.4. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

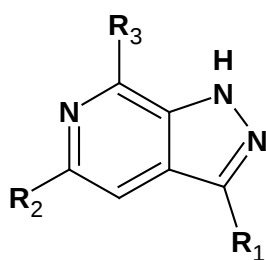
Προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας που αφορούν σε παράγωγα της πυραζολο[4,3-*b*]πυριδίνης και της πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης, με υποκαταστάτες στις θέσεις 3, 5 και 7 του δικυκλικού συστήματος, έδειξαν ότι τα μόρια διαθέτουν αξιόλογη δράση έναντι των κινασών που σχετίζονται με τη κυτταρική μίτωση, όπως οι CDK1, CDK4, PLK1, PLK2, PLK3, PLK4, AUR-B, καθώς και η GSK3, παρουσιάζοντας μια σχετική εξειδίκευση έναντι των κινασών Aurora και Polo-like (PLK). Λαμβάνοντας υπόψη αυτήν την παρατήρηση αποφασίστηκε η σύνθεση νέων πουρινικών αναλόγων, τα οποία στη συνέχεια θα ελεγχθούν για την κυτταροτοξική τους δράση, καθώς και για πιθανή ανασταλτική δράση έναντι μιας ποικιλίας πρωτεϊνικών κινασών. Ως μόρια-οδηγοί, εκτός από τα προαναφερθέντα χρησιμοποιήθηκαν και ανάλογα πουρινών, όπως τα olomoucine, roscovitine και purvalanol A (Σχήμα 1.4.4.1.),<sup>160</sup> τα οποία αναστέλλουν ισχυρά τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, καθώς και ισομερείς πυραζολοπυριδίνες και πυραζολοπυριμιδίνες, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, ως αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.<sup>161,162,163</sup>



**Σχήμα 1.4.4.1.** Αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών με δομή ανάλογη πουρίνης.

Με βάση τα παραπάνω συντέθηκαν παράγωγα της πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (Σχήμα 1.4.4.2.), τα οποία φέρουν ποικιλία αμινικών υποκαταστατών στις θέσεις 5- και 7- του ετεροκυκλικού συστήματος, ενώ στη θέση 3- φέρουν αρωματικό ή αλειφατικό υποκαταστάτη. Για την πληρέστερη μελέτη των σχέσεων δομής-δράσης

παρασκευάστηκαν και τα αντίστοιχα μη υποκατεστημένα επί του πυραζολικού δακτυλίου παράγωγα.



$R_1$  : H, Ph, iso-Pr

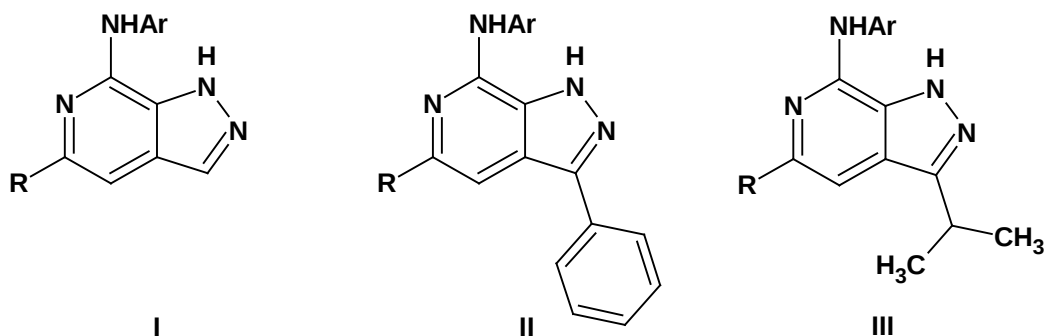
$R_2$  : H, Cl, CN,  $\text{CH}_2\text{NHAryl}$ ,  $\text{CH}_2\text{NHAalkyl}$

$R_3$  :  $\text{NHAr}$

Σχήμα 1.4.4.2.

## 2. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή συντέθηκαν παράγωγα πυραζολοπυριδινών των γενικών τύπων I, II, III (Σχήμα 2.1).



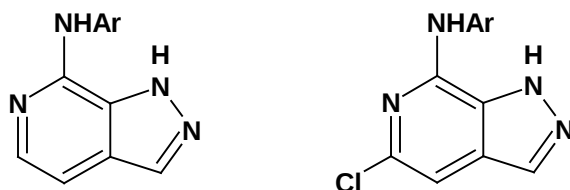
Ar : Phenyl,  
3,4,5-Trimethoxyphenyl

R : H,  
Cl,  
CN,  
CH<sub>2</sub>NHAlkyl,  
CH<sub>2</sub>NHAryl

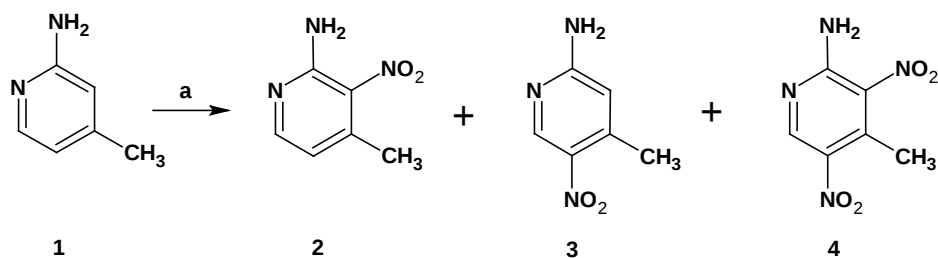
Σχήμα 2.1.

### 2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I

#### 2.1.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ ΚΑΙ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ-5-ΧΛΩΡΟ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I



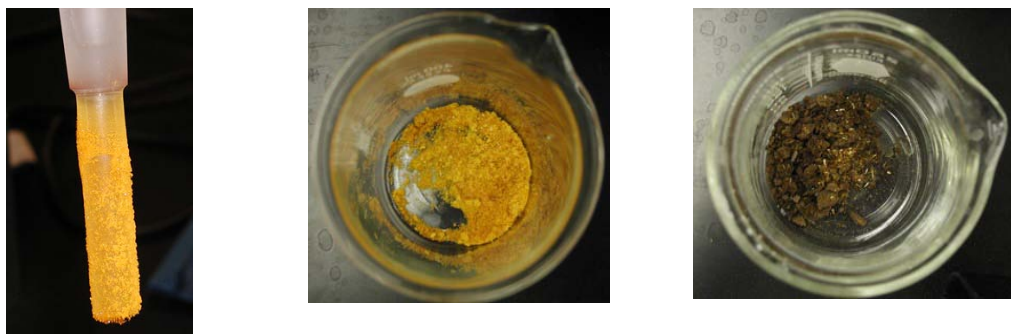
Ως πρώτη ύλη για την παρασκευή των παραγώγων της παρούσας ενότητας χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη 2-αμινο-4-πικολίνη, στην οποία επέδρασε οξύ νίτρωσης (HNO<sub>3</sub> και H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και προέκυψε μίγμα των νιτροπαραγώγων 2 - 4 (Σχήμα 2.1.1.1.).



a)  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 65 °C.

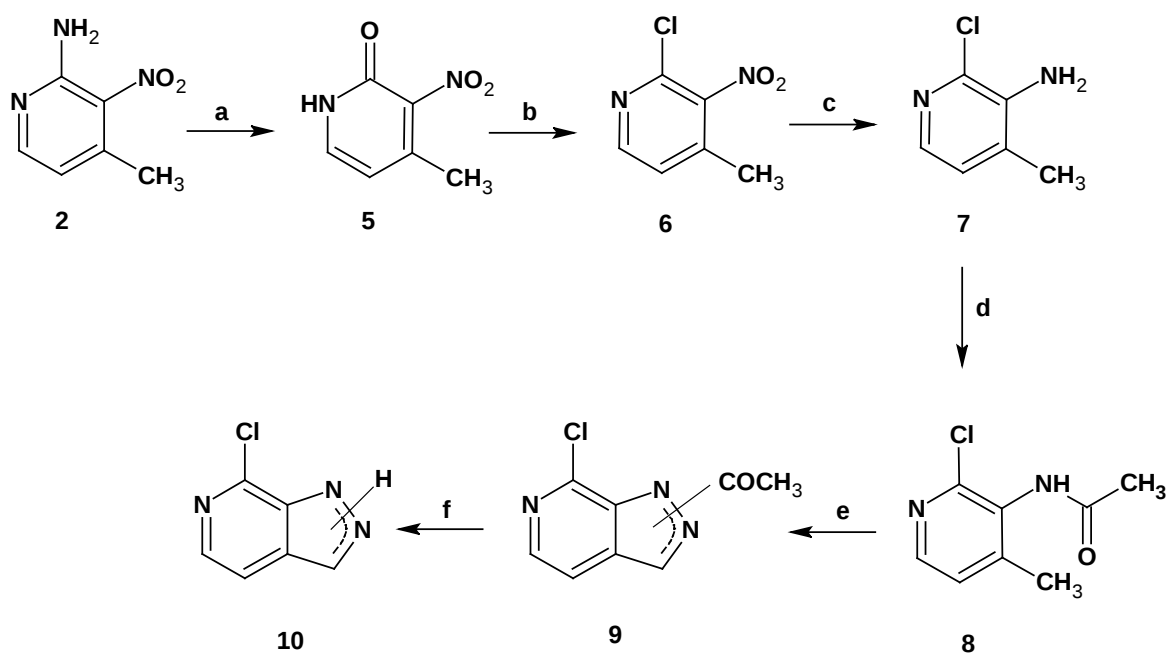
**Σχήμα 2.1.1.1.**

Το επιθυμητό νιτροπαραγόγω **2** απομονώθηκε με εξάχνωση υπό κενό (**Εικόνα 2.1.1.1.**), ενώ ο διαχωρισμός των παραγώγων **3** και **4**, επετεύχθη στη συνέχεια με χρωματογραφία στήλης και η δομή τους ταυτοποιήθηκε εύκολα με τη βοήθεια των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$ .<sup>164</sup>



**Εικόνα 2.1.1.1.** Διαχωρισμός ισομερών θέσεως μετά από αντίδραση νίτρωσης, μέσω εξάχνωσης.

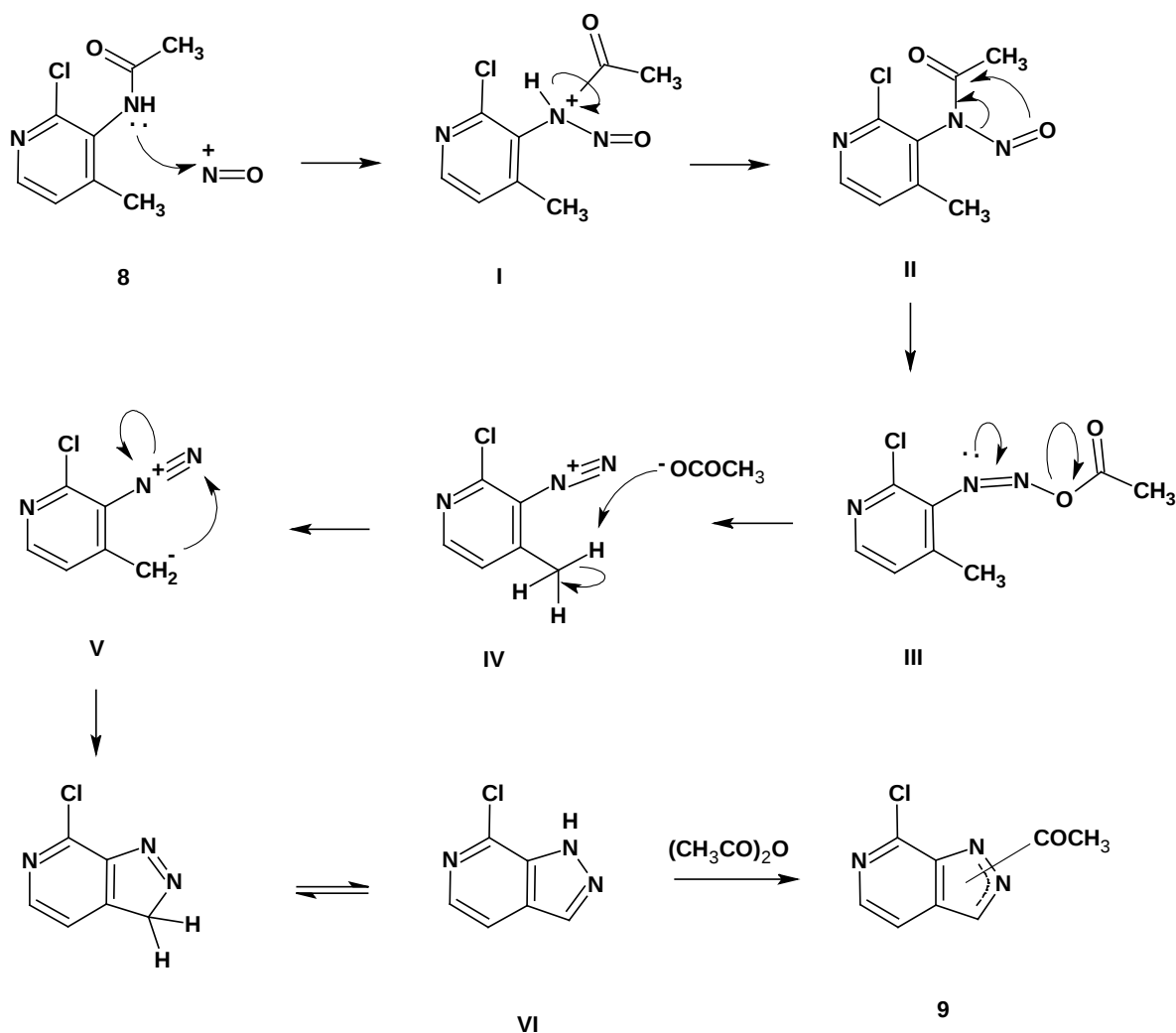
Ακολούθως η νιτροπυριδίνη **2** μετατράπηκε προς το αντίστοιχο διαζωνιακό άλας (**Σχήμα 2.1.1.2.**) με επίδραση νιτρώδους οξέος ( $\text{NaNO}_2$  και  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) υπό ψύξη,<sup>165</sup> από το οποίο μετά από υδρόλυση παρελήφθη η 4-μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2-όλη, η οποία βρίσκεται υπό τη σταθερή ταυτομερή δομή της πυριδινόνης **5**. Εν συνεχεία με επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου ελήφθη το χλωρίδιο **6**, από το οποίο με αναγωγή με διχλωριούχο κασσίτερο σε πυκνό υδροχλωρικό οξύ και ακετυλίωση της ενδιάμεσης αμίνης **7**, με τη χρήση οξικού ανυδρίτη παρελήφθη το ακεταμίδιο **8**.



a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , θερμοκρασία περιβάλλοντος ; b)  $\text{POCl}_3$ , βρασμός ; c)  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{HCl}$  36% ; d)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ; e) νιτρώδες ισοαμύλιο,  $\text{AcOK}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , βενζόλιο, βρασμός ; f) αέρια  $\text{NH}_3$ ,  $\text{MeOH}$ .

**Σχήμα 2.1.1.2.**

Ακολούθησε αντίδραση ενδομοριακής κύκλωσης του ακεταμιδίου **8** προς την 7-χλωροπυραζολοπυριδίνη **9**, με βρασμό σε βενζόλιο παρουσία νιτρώδους ισοαμυλίου ως μέσου νιτρώδωσης, οξικού ανυδρίτη και οξικού καλίου. Ο προτεινόμενος μηχανισμός της κυκλοποίησης φαίνεται στο **Σχήμα 2.1.1.3.**<sup>166</sup>

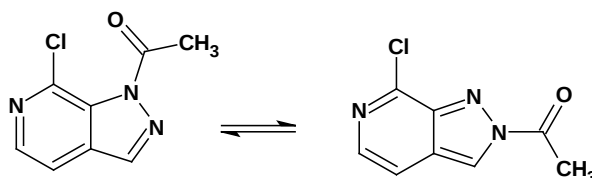


**Σχήμα 2.1.1.3.** Μηχανισμός ενδομοριακής κύκλωσης.

Το νιτρώδες ισοαμύλιο μετά τη θερμική του διάσπαση στη θερμοκρασία βρασμού του βενζολίου, απελευθερώνει *in situ* νιτρωδοκατιόν, το οποίο προσβάλλει το άζωτο του ακεταμιδίου. Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό του αντίστοιχου *N*-νιτρωδοακεταμιδίου I, από το οποίο μέσω ενδομοριακής μετάθεσης προς τον ενδιάμεσο διαζω-εστερα III, προκύπτει το οξικό άλας του διαζωνίου IV. Τελικά το μεθυλενικό ανιόν V, που προκύπτει μετά από απόσπαση ενός εκ των όξινων υδρογόνων του 4-μεθυλίου από το οξικό ανιόν του άλατος, προσβάλλει την ομάδα του διαζωνίου, πραγματοποιώντας κύκλωση προς την πυραζολοπυριδίνη VI, η οποία μετά από επίδραση του οξικού ανυδρίτη οδηγεί στο ακετυλιωμένο παράγωγο 9.

Κατά την αντίδραση αυτή, παρότι θεωρητικά υπάρχει η δυνατότητα παραλαβής δύο ισομερών θέσεως (Σχήμα 2.1.1.4.), λαμβάνεται αποκλειστικά η 1-

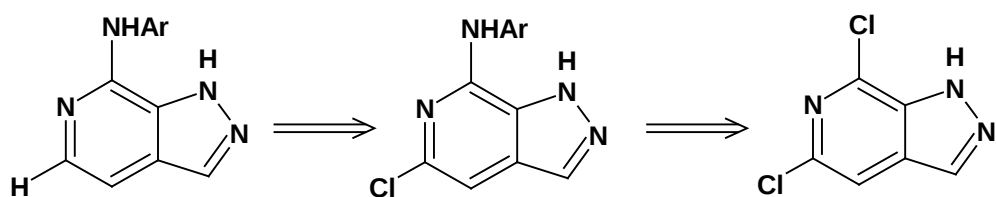
ακετυλο-7-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**9**),<sup>167</sup> ως θερμοδυναμικά σταθερότερη, η οποία μετά την απακετυλίωση με διαβίβαση αέριας αμμωνίας υπό ψύξη στο μεθανολικό διάλυμα του μορίου, οδήγησε στο επιθυμητό παράγωγο **10** (Σχήμα 2.1.1.2.).



Σχήμα 2.1.1.4.

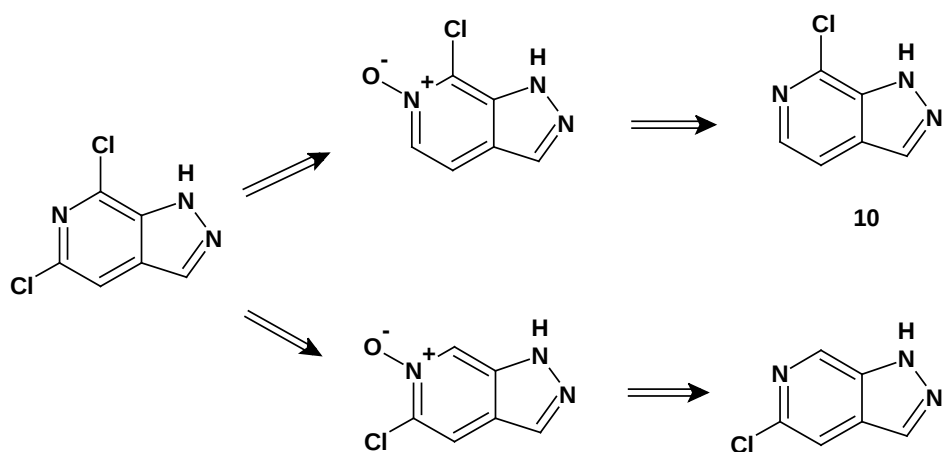
Στη συνέχεια επιχειρήθηκε πυρηνόφιλη υποκατάσταση του χλωρίου στο παράγωγο **10** με αρωματικές αμίνες, υπό διάφορες συνθήκες, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Δοκιμάσθηκε εύρος θερμοκρασιών, διαφορετική αναλογία αντιδραστηρίων, χρήση αυτοκλείστου και χρήση μικροκυμάτων, τόσο σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, όσο και σε συνθήκες υψηλής πίεσης. Επίσης η αντίδραση επαναλήφθηκε με τη χρήση καταλυτών παλλαδίου (*Pd coupling*) παρουσία βάσης, χωρίς επιτυχία.

Για τους παραπάνω λόγους, αποφασίστηκε η εισαγωγή στον πυριδινικό δακτύλιο υποκαταστάτη με χαρακτήρα ηλεκτρονιοδέκτη, καθώς αυτό θα διευκόλυνε την υποκατάσταση του 7-Cl. Έχοντας λοιπόν υπόψη ότι στόχος της εργασίας αυτής είναι η σύνθεση 5,7-δισυποκατεστημένων παραγώγων και εφόσον το χλώριο έχει χαρακτήρα ηλεκτρονιοδέκτη, ενώ ταυτόχρονα είναι δυνατόν να απομακρυνθεί με αναγωγική αφαλογόνωση, θεωρήθηκε ότι η σύνθεση των επιθυμητών παραγώγων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μέσω των 5-χλωρο-7-αρυλαμινοπυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών, για την παρασκευή των οποίων ως ενδιάμεσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η 5,7-διχλωροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη του Σχήματος 2.1.1.5.



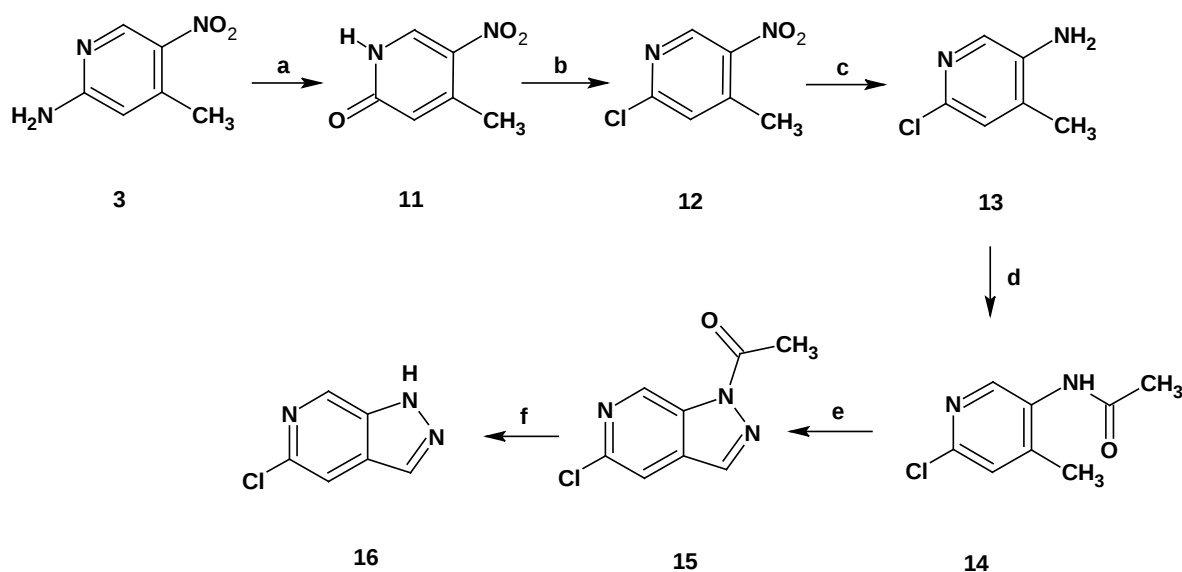
Σχήμα 2.1.1.5.

Η εισαγωγή χλωρίου στον  $\alpha$ -ανθρακα της πυριδίνης δεν επιτυγχάνεται με ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση,<sup>168</sup> αλλά με μετάθεση του αντίστοιχου *N*-οξειδίου σε οξυχλωριούχο φωσφόρο. Συνεπώς, για τη λήψη της 5,7-διχλωροπυραζολοπυριδίνης απαιτείται η σύνθεση των *N*-οξειδίων της 7-χλωροπυραζολοπυριδίνης ή της 5-χλωροπυραζολοπυριδίνης, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.1.1.6**.



Σχήμα 2.1.1.6.

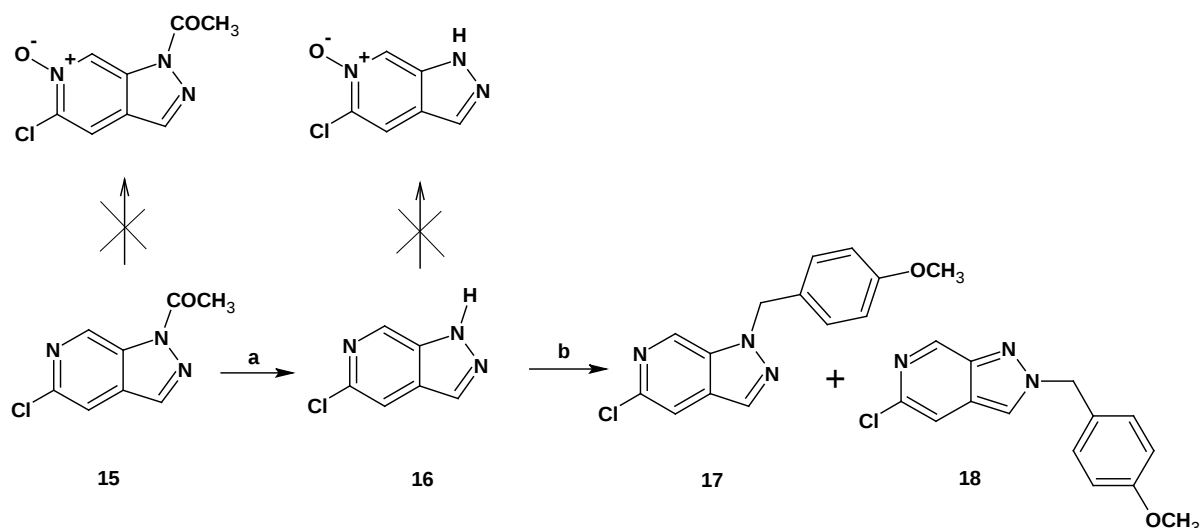
Η σύνθεση του παράγωγου **10** έχει ήδη περιγραφεί (**Σχήμα 2.1.1.2**), ενώ ανάλογη πορεία ακολουθήθηκε και για τη σύνθεση της 5-χλωροπυραζολοπυριδίνης από το ισομερές νιτροπαράγωγο **3**. Δεδομένου ότι το ισομερές αυτό λαμβάνεται κατά την αντίδραση νίτρωσης σε μεγαλύτερη αναλογία (2/1), έγινε η σύνθεση του 5-χλωροπαραγώγου μέσω της συνθετικής πορείας του **Σχήματος 2.1.1.7**. Με απακετυλίωση του παραγώγου **15** με μεθανολική αμμωνία, παρελήφθη η επιθυμητή 5-χλωροπυραζολοπυριδίνη **16**.



a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , θερμοκρασία περιβάλλοντος ; b)  $\text{POCl}_3$ , βρασμός ; c)  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{HCl}$  36% ; d)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ; e) νιτρώδες ισοαμύλιο,  $\text{AcOK}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , βενζόλιο, βρασμός ; f) αέρια  $\text{NH}_3$ ,  $\text{MeOH}$ .

**Σχήμα 2.1.1.7**

Για τη σύνθεση του *N*-οξειδίου του ακετυλοπαραγώγου **15** καθώς και του απακετυλιωμένου αναλόγου του **16**, δοκιμάστηκε αρχικά η επίδραση μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος καθώς και υπεροξειδίου του υδρογόνου σε οξικό οξύ. Και στις δύο περιπτώσεις, σχηματίστηκαν τα επιθυμητά *N*-οξείδια, όπως φάνηκε από τη σύγκριση προϊόντων και αντιδρώντων σωμάτων σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδος, αλλά και από τα αντίστοιχα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$ . Παρόλα αυτά, το προϊόν παρελήφθη σε πολύ χαμηλή απόδοση, πιθανώς λόγω της υψηλής υδατοδιαλυτότητας του *N*-οξειδίου. Έτσι, αποφασίστηκε η προστασία του πυραζολικού αζώτου, με σκοπό την αύξηση της λιποφιλίας του μορίου. Επιλέχθηκε η π-μεθοξυβενζυλομάδα, λόγω της σχετικά εύκολης απομάκρυνσης της σε οξειδωτικές ή αναγωγικές, όσο και σε όξινες συνθήκες (**Σχήμα 2.1.1.8**).

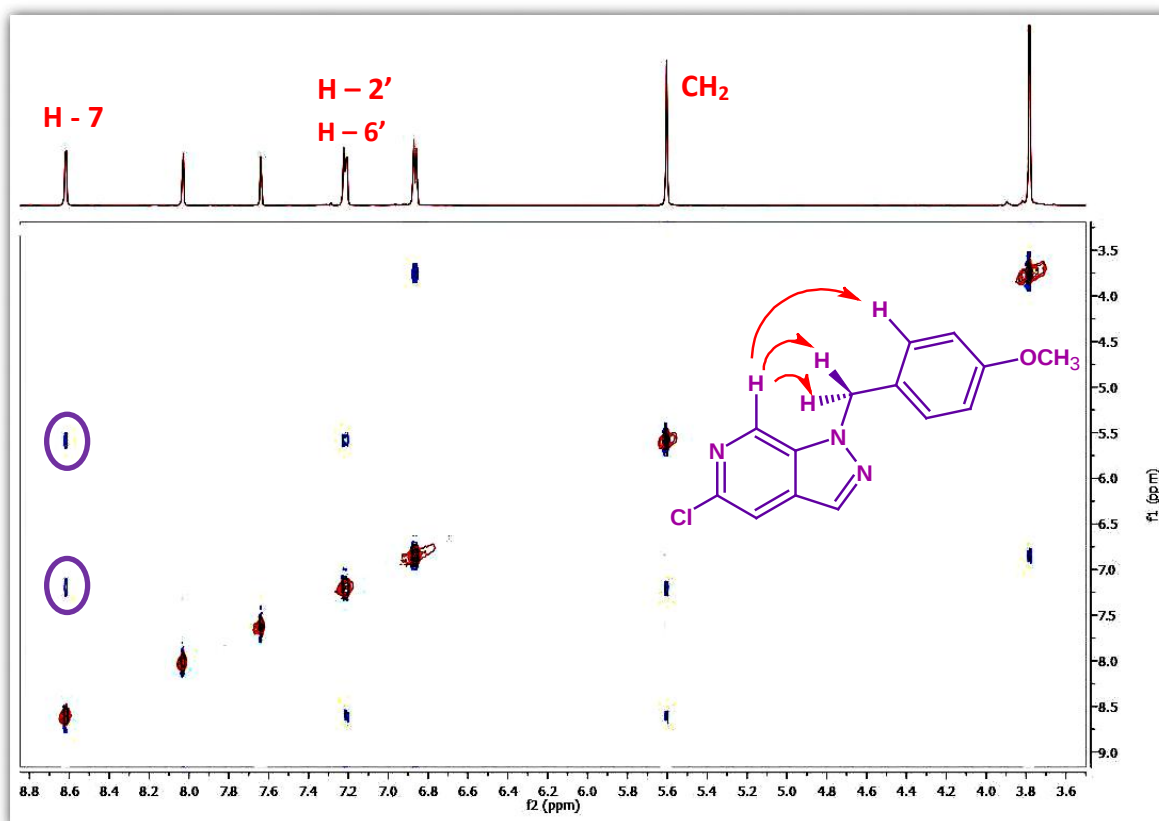


α) αέρια  $\text{NH}_3$ ,  $\text{MeOH}$ , θερμοκρασία περιβάλλοντος ; β)  $\text{NaH}$ , π-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο,  $\text{DMF}$  άνυδρο.

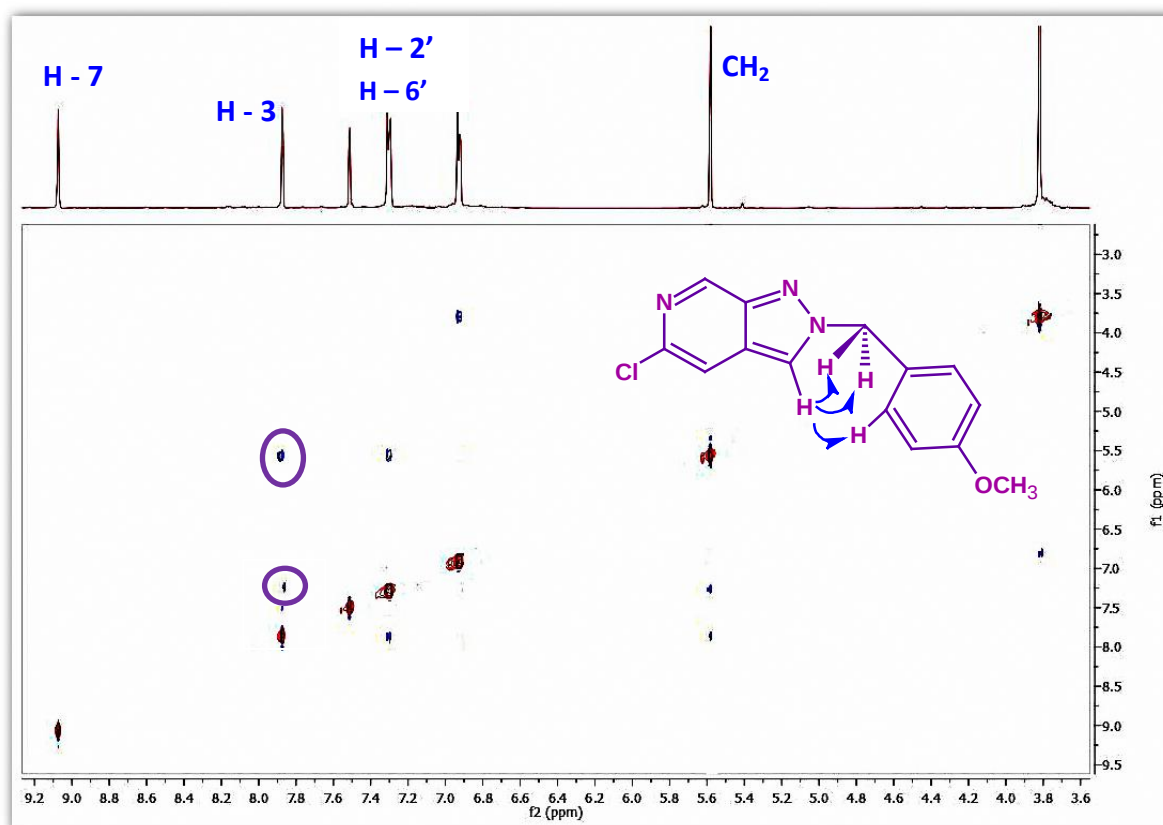
Σχήμα 2.1.1.8

Η εισαγωγή της προστατευτικής ομάδας πραγματοποιήθηκε σε αλκαλικό περιβάλλον με επίδραση π-μεθοξυβενζυλοχλωριδίου και οδήγησε στην λήψη των δύο ισομερών θέσεως **17** και **18** αντίστοιχα. Κατά την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης έγινε φανερό ότι η αναλογία των δύο ισομερών και η συνολική απόδοση της αντίδρασης επηρεάζεται από τον διαλύτη, τη θερμοκρασία και τη χρησιμοποιούμενη βάση. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η χρήση πολικότερου διαλύτη (άνυδρο διμεθυλοφωρμαμίδιο) και ισχυρότερης βάσης (υδρίδιο του νατρίου) ευνοούν την ταχύτητα και την απόδοση της αντίδρασης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διακύμανση της αναλογίας των δύο ισομερών σε σχέση με τη θερμοκρασία: όταν η αντίδραση πραγματοποιείται στους  $0^\circ\text{C}$ , τα ισομερή σχηματίζονται περίπου σε ισομοριακή αναλογία, ενώ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ευνοείται αισθητά (σε αναλογία 2 / 1) ο σχηματισμός του ισομερούς **17**. Τα δύο παράγωγα διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης silica gel και για τη διαπίστωση της δομής τους πραγματοποιήθηκε η λήψη φασμάτων NMR μίας ( $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ) και δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC και NOESY). Στο φάσμα NOE της *N*-1 προστατευμένης πυραζολοπυριδίνης **17** το 7-πυριδινικό πρωτόνιο που συντονίζεται στα 8.62 ppm παρουσιάζει συσχέτιση με τα πρωτόνια του μεθυλενίου της π-μεθοξυβενζυλομάδας που συντονίζονται στα 5.61 ppm (Εικόνα 2.1.1.2.), αλλά και με τα ο-αρωματικά πρωτόνια (H-2', H-6') στα 7.22 ppm. Αντιθέτως στο αντίστοιχο

φάσμα του ισομερούς **18** (Εικόνα 2.1.1.3.), το 7-πυριδινικό πρωτόνιο (9.07 ppm) δεν παρουσίασε καμία συσχέτιση, όχι όμως και το πυραζολικό πρωτόνιο στην 3-θέση του δακτυλίου (7.88 ppm), που συσχετίζεται εμφανώς με τα μεθυλενικά πρωτόνια της π-μεθοξυβενζυλομάδας (5.58 ppm).



Εικόνα 2.1.1.2.. Φάσμα NOE του ισομερούς 17.



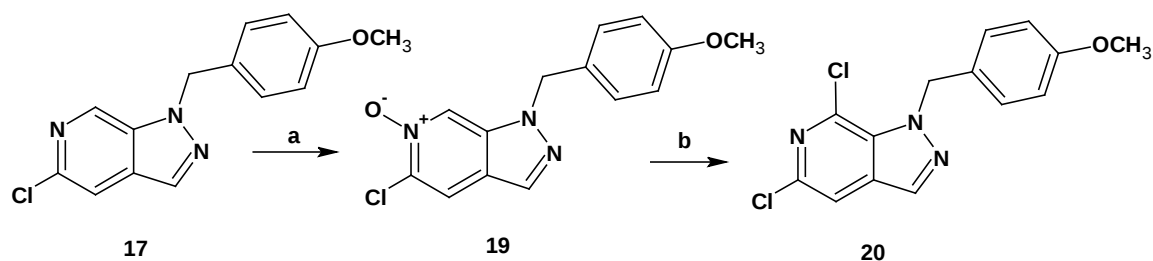
**Εικόνα 2.1.1.3.** Φάσμα NOE του ισομερούς **18**.

Ακολούθησε η παρασκευή του *N*-οξειδίου της πυραζολοπυριδίνης **17**. Ο σχηματισμός *N*-οξειδίων έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της χρησιμότητάς τους ως συνθετικών ενδιάμεσων, καθώς η ομάδα *N*-O μπορεί να δράσει αποτελεσματικά τόσο ως δότης ηλεκτρονίων, όσο και ως δέκτης. Αυτή η δυνατότητα δότη-δέκτη ηλεκτρονίων, καθιστά τα ετεροκυκλικά *N*-οξείδια ιδιαίτερως χρήσιμα ως προστατευτικές ομάδες, οξειδωτικά,<sup>169,170</sup> συνδέτες (ligands) σε σύμπλοκα μετάλλων,<sup>171</sup> και ως καταλύτες.<sup>169,170</sup> Στη βιβλιογραφία έχει περιγραφεί μια ποικιλία μεθόδων σχηματισμού πυριδινικών *N*-οξειδίων όπως:

- Από τη μετάθεση μέσω διάνοιξης παρουσία βάσης (όπως το DBU) ισοξαζολικών παραγώγων<sup>172</sup>
- Μέσω οξείδωσης πυριδινικών αναλόγων με χρήση :
  - α) υπεροξειδίου του υδρογόνου και οξικού οξέος,<sup>173</sup>
  - β) υπεροξειδίου του υδρογόνου και καταλυτικής ποσότητας μαγγανικής τετράκισ(2,6-διχλωροφαινυλο)πορφυρίνης [Mn(TDCPP)Cl],<sup>174</sup>

- γ) υπεροξειδίου του υδρογόνου και καταλυτικής ποσότητας μεθυλοτριοξορηνίου (*Methylrhenium trioxide*, MTO,  $\text{CH}_3\text{ReO}_3$ ),<sup>175,176</sup>
- δ) συμπλόκου ουρίας και υπεροξειδίου του υδρογόνου (*Urea-hydrogen peroxide*, UHP),<sup>177</sup>
- ε) διμεθυλοδιοξιρανίου (*Dimethyldioxirane*, DMD),<sup>178</sup>
- στ) οξέος του Caro (*Caro's acid*,  $\text{H}_2\text{SO}_5$ )<sup>179</sup> και
- ζ) μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος (*m-Chloroperoxybenzoic acid*, m-CPBA).<sup>180</sup>

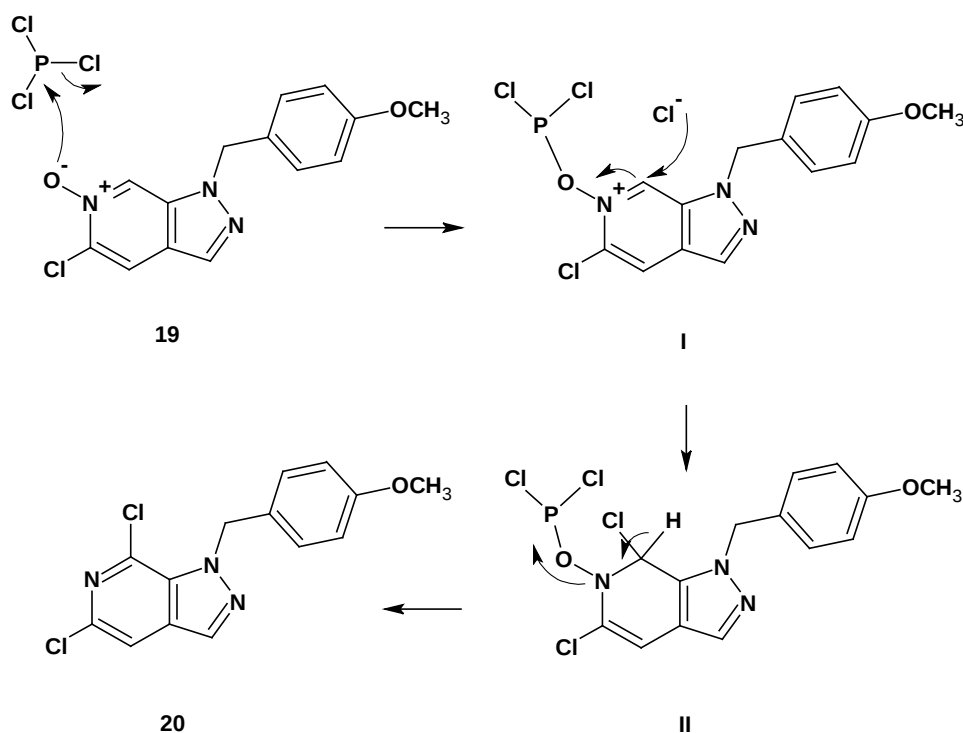
Για τη συγκεκριμένη αντίδραση επιλέχθηκε η χρήση μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος εντός χλωροφορμίου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η οποία και οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού *N*-οξειδίου **19** (Σχήμα 2.1.1.9.). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σύγκριση με το ακετυλοπαράγωγο **14** καθώς και με το μη προστατευμένο παράγωγο **15**, η αντίδραση σύνθεσης του *N*-οξειδίου στο μόριο **17** ήταν ταχύτερη και είχε πολύ καλύτερη απόδοση (90%). Επιπρόσθετα, όπως αναμενόταν, το *N*-οξείδιο **19** δεν ήταν ιδιαίτερα υδατοδιαλυτό και ο καθαρισμός του πραγματοποιήθηκε με κατεργασία του μίγματος της αντίδρασης με διάλυμα ανθρακικού νατρίου 5%.



a) *m*-CPBA, THF, θερμοκρασία περιβάλλοντος; b)  $\text{POCl}_3$ , THF, θερμοκρασία περιβάλλοντος.

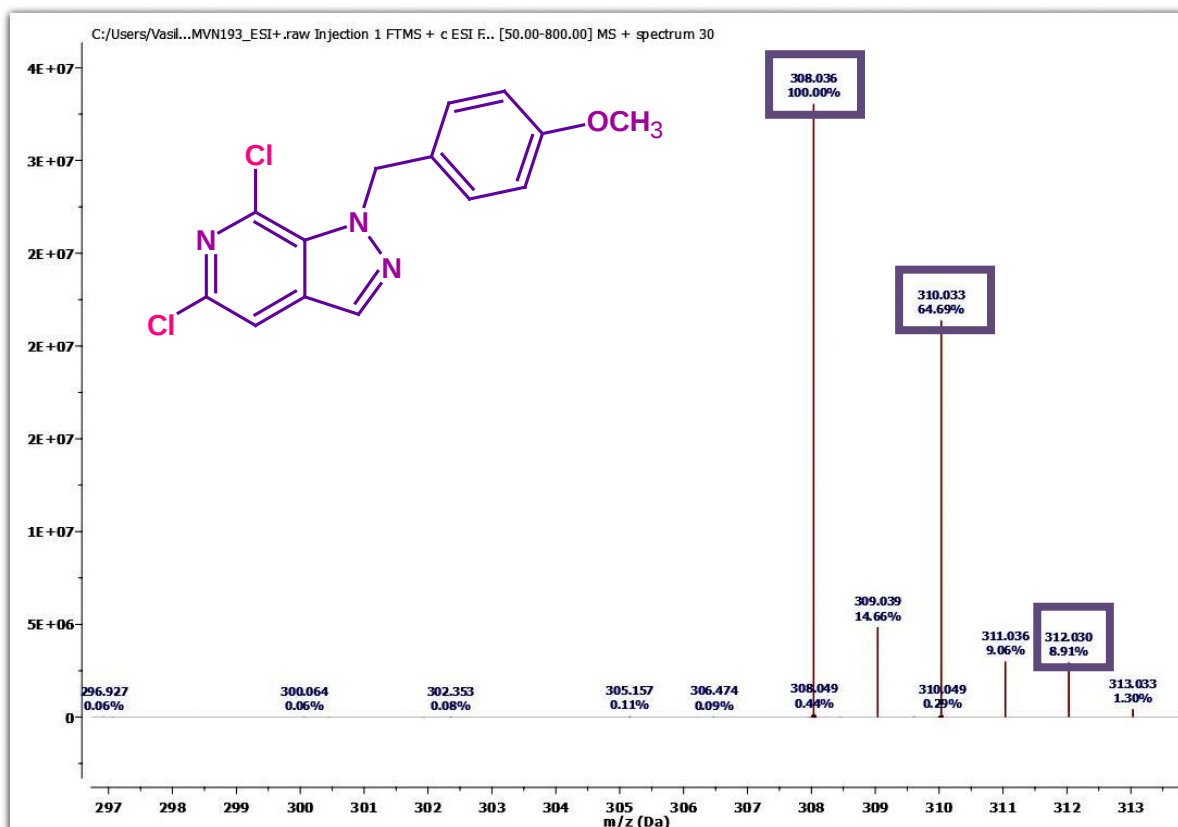
Σχήμα 2.1.1.9.

Η σύνθεση του επιθυμητού διχλωροπαράγωγου **20** έγινε με επίδραση περίσσειας οξυχλωριούχου φωσφόρου επί του **19** σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο μηχανισμός της μετάθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.1.1.10. Αρχικά με επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου σχηματίζεται το ενδιάμεσο άλας I, από το οποίο με επίδραση ανιόντος χλωρίου και απόσπασης υδρογόνου από το ενδιάμεσο II, σχηματίζεται το επιθυμητό μόριο **20**.<sup>168</sup>

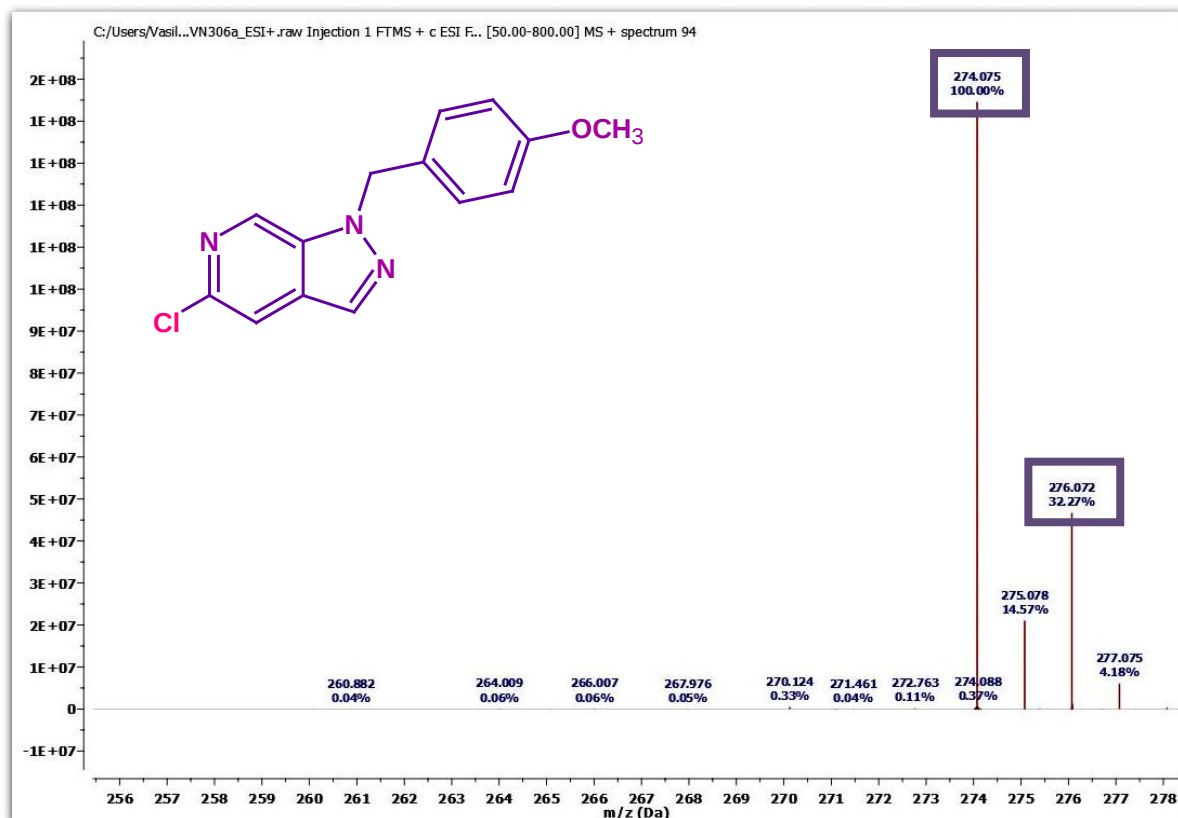


**Σχήμα 2.1.1.10.** Μηχανισμός μετάθεσης N-οξειδίου.

Στο φάσμα πρωτονίου του λαμβανόμενου μορίου παρατηρείται χαρακτηριστικά η εξαφάνιση της κορυφής του 7-πυριδινικού πρωτονίου, καθώς και η αποθωράκιση του αντίστοιχου άνθρακα, ο οποίος πλέον συντονίζεται στα 138.61 ppm, ενώ στο αντίστοιχο μονοχλωροπαράγωγο ο 7-άνθρακας συντονίζεται στα 123.88 ppm. Επιπρόσθετα για την απόδειξη της δομής του παραγώγου **20** πραγματοποιήθηκε η λήψη φάσματος μάζας υψηλής απόδοσης (**Εικόνα 2.1.1.4.**), κατά το οποίο διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο ατόμων χλωρίου στο μόριο, τόσο από την τιμή του μοριακού ιόντος ( $m/z$  308.036) όσο και από την εμφάνιση τριών ισοτοπικών φασματικών γραμμών (M, M+2, M+4) σχετικής έντασης 9 : 6 : 1. Αντίστοιχα στο φάσμα ESI-HRMS για το μονοχλωροπαράγωγο **17** (**Εικόνα 2.1.1.5.**) εμφανίζονται δύο ισοτοπικές κορυφές σε αναλογία έντασης 3 : 1.

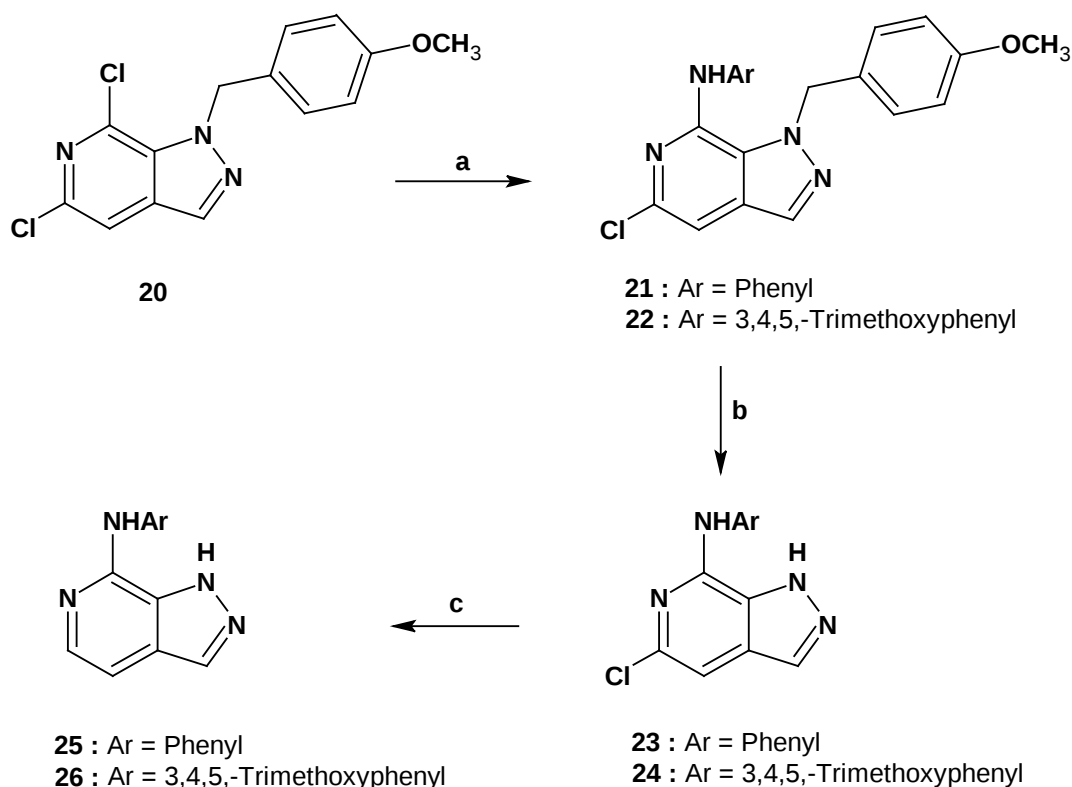


Εικόνα 2.1.1.4. Φάσμα ESI-HRMS της 5,7-δichλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (20).



Εικόνα 2.1.1.5. Φάσμα ESI-HRMS της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο [3,4-c]πυριδίνης (17).

Για τη σύνθεση των αμινοϋποκατεστημένων παραγωγών έγινε αρχικά αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης επί του διχλωροπαραγωγού **20** με βρασμό παρουσία της κατάλληλης αμίνης, χωρίς όμως αποτέλεσμα, ούτε μετά από θέρμανση, ούτε με τη χρήση μικροκυμάτων σε ατμοσφαιρική και σε υψηλή πίεση. Η αντίδραση τελικά πραγματοποιήθηκε μέσω του ανιόντος της αμίνης, που σχηματίστηκε με επίδραση υδριδίου του νατρίου, εντός άνυδρου διμεθυλοφορμαμίδιου στους 100 °C (Σχήμα 2.1.1.11.).

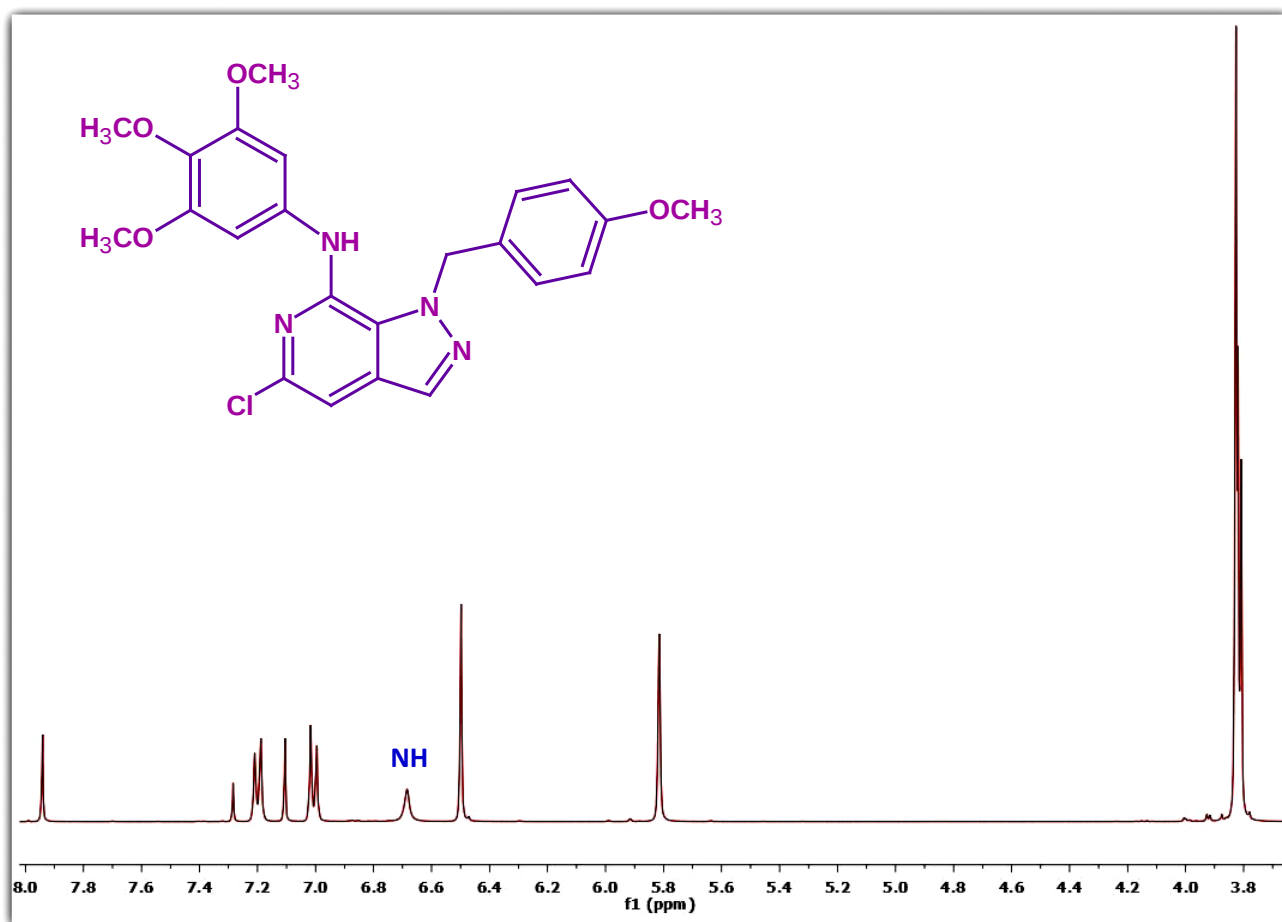


a)  $ArNH_2$ , NaH, DMF άνυδρο, 100 °C; b) τριφθοροξικό οξύ, θερμοκρασία περιβάλλοντος; c)  $H_2$ , Pd-C, AcOK, EtOH.

Σχήμα 2.1.1.11.

Στο φάσμα πρωτονίου της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνης (**22**) είναι χαρακτηριστική η κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αμινομάδας και συντονίζεται στα 6.68 ppm (Εικόνα 2.1.1.6.). Επιπλέον, από τη μελέτη του φάσματος HMBC παρουσιάζεται σαφής συσχέτιση του αμινικού πρωτονίου με τον 7-πυριδινικό άνθρακα, ο οποίος συντονίζεται στα 140.55 ppm κι έτσι αποδεικνύεται ότι η

πυρηνόφιλη υποκατάσταση πραγματοποιήθηκε στο χλώριο της 7-θέσης του πυριδινικού δακτυλίου.



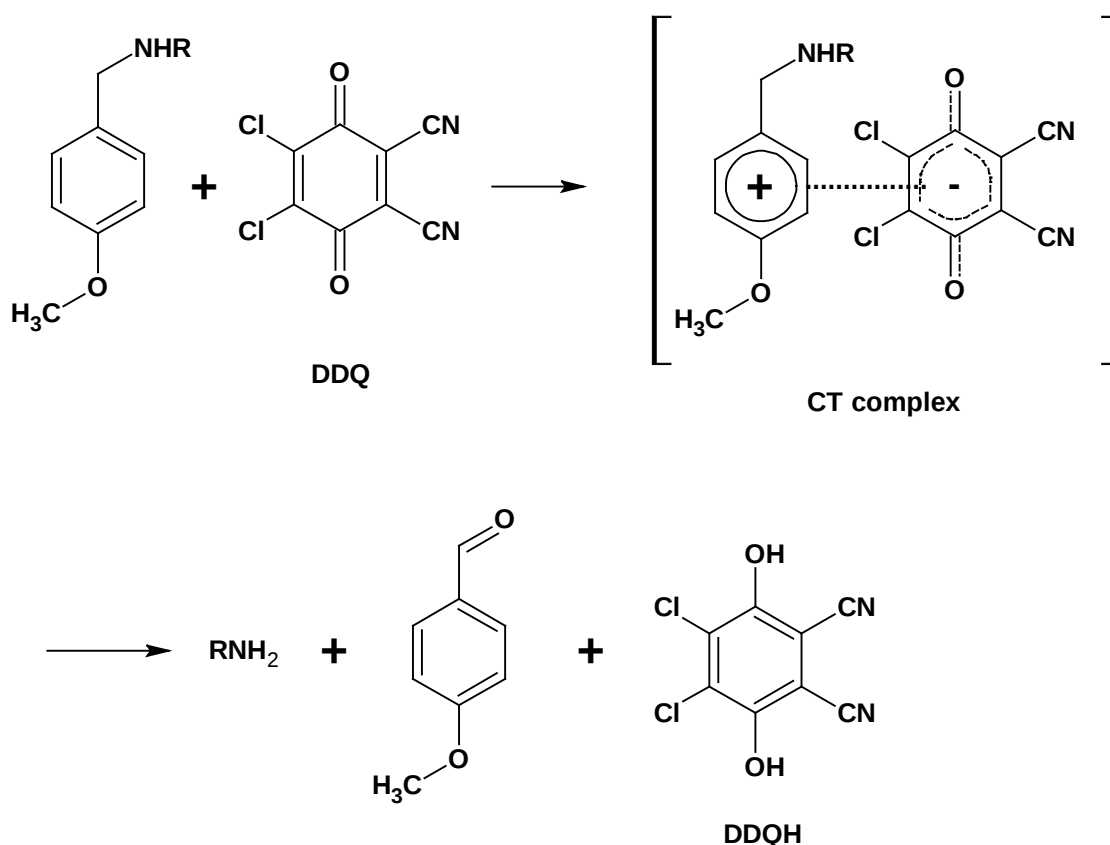
**Εικόνα 2.1.1.6.** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνης (**22**).

Στη συνέχεια έγινε η απομάκρυνση της π-μεθοξυβενζυλομάδας, η οποία σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους, όπως:

- Οξειδωτικά, με την χρήση ήπιων οξειδωτικών παραγόντων πχ. DDQ (2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη),<sup>181</sup> CAN (Εναμμώνιο Νιτρικό Δημήτριο),<sup>182</sup> DCA (9,10-Δικυανοανθρακένιο).<sup>183</sup>
- Αναγωγικά, με χρήση νατρίου εντός υγρής αμμωνίας ή  $\text{Na}[\text{BH}_3(\text{CN})]$  και  $(\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2)$ .<sup>184</sup>
- Σε όξινο περιβάλλον, με συνηθέστερη τη χρήση διαλύματος αραιού τριφθοροξικού οξέος.<sup>185</sup>

- Με τη χρήση συμπλόκων οξέων κατά Lewis, όπως  $\text{AlCl}_3\text{-EtSH}$ ,<sup>186</sup>  $\text{SnCl}_2\text{-TMSCl}$ ,<sup>187</sup>  $\text{MgBr}_2\text{-Et}_2\text{O}$ .<sup>188</sup>

Η αντίδραση της αποπροστασίας πραγματοποιήθηκε με επίδραση ελαφράς περίσσειας 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-βενζοκινόνης (DDQ) εντός διχλωρομεθανίου. Η αντίδραση (Σχήμα 2.1.1.12.) περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταφοράς φορτίου [*charge transfer (CT) complex*] μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της 4-μεθοξυβενζυλομάδας που φέρει χαρακτήρα ηλεκτρονιοδότη και του DDQ που λειτουργεί ως ηλεκτρονιοδέκτης. Τέλος, η αντίδραση καταλήγει στο σχηματισμό της π-ανισαλδεΰδης, της αντίστοιχης 1,4-υδροκινόνης (DDQH), καθώς και του αποπροστατευμένου μορίου.<sup>181</sup>

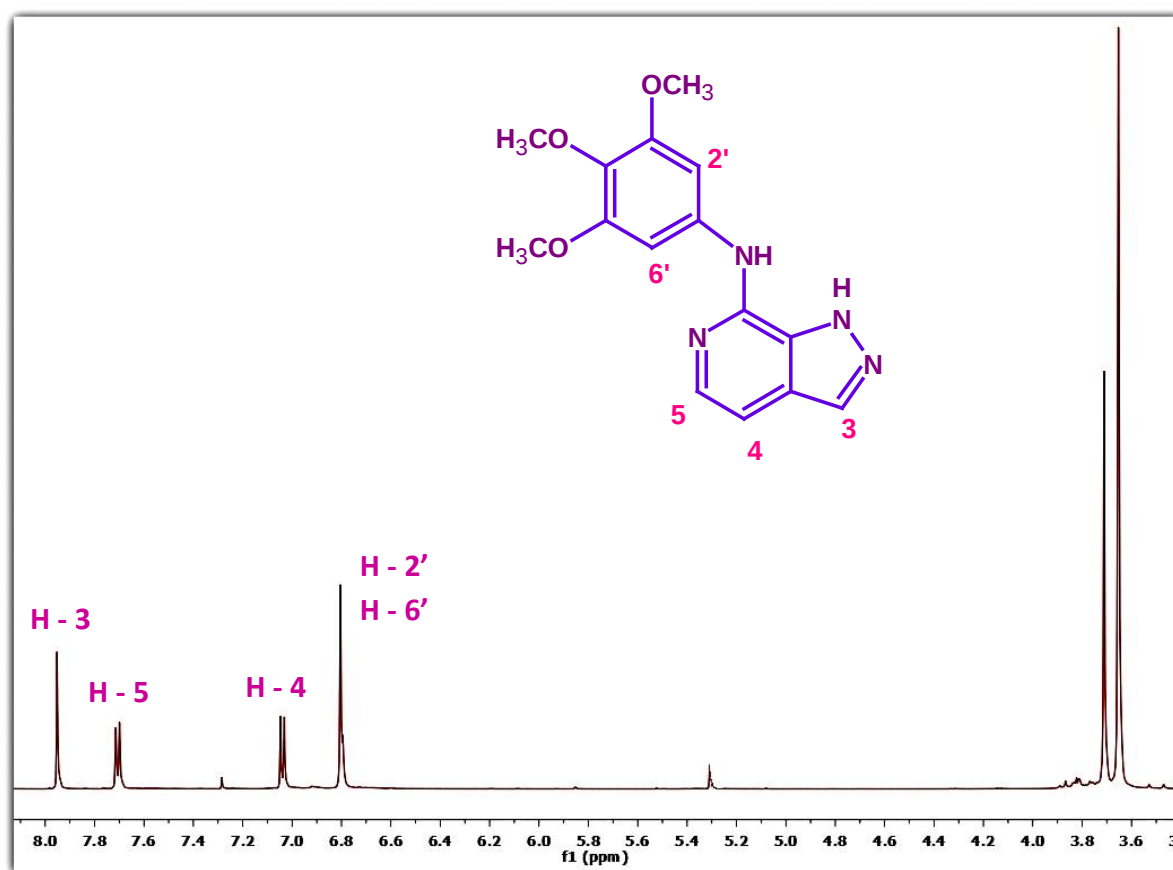


**Σχήμα 2.1.1.12.** Οξειδωτική αποπροστασία με επίδραση DDQ.

Όμως, κατά την παραπάνω αντίδραση παρελήφθη το επιθυμητό προϊόν, σε πολύ μικρή απόδοση, ενώ η απομόνωση και ο πλήρης καθαρισμός του ήταν ιδιαίτερα δύσκολος. Έτσι, η αποπροστασία έγινε με επίδραση τριφθοροξικού οξέος επί διαλύματος των αμινών **21** και **22** εντός διχλωρομεθανίου, οπότε

παρασκευάστηκαν τα επιθυμητά παράγωγα **23** και **24** σε ικανοποιητική απόδοση. Η απόδοση και ο χρόνος της αντίδρασης βελτιώθηκε με τη χρήση τριφθοροξικού οξέος και ως διαλύτη της αντίδρασης. Η κατεργασία ήταν ιδιαίτερα απλή, καθώς μετά από εξουδετέρωση και διήθηση, παρελήφθη το προϊόν σε υψηλή καθαρότητα.

Για τη σύνθεση των τελικών αμινών **25** και **26** ακολούθησε αφαλογόνωση των παραγώγων **23** και **24** αντίστοιχα. Η αναγωγή αρωματικών αλογονοπαραγώγων γίνεται με υδρογόνωση, με τη χρήση κατάλληλων καταλυτών, συνηθέστερα παλλαδίου επί άνθρακα ή νικελίου. Απαιτείται υψηλό καταλυτικό φορτίο, παρατεταμένος χρόνος αντίδρασης και η παρουσία ήπιας βάσης για τη δέσμευση του παραγόμενου υδροχλωρίου.<sup>189</sup> Στην προκειμένη περίπτωση η αναγωγική αφαλογόνωση των αμινών **23** και **24** πραγματοποιήθηκε με χρήση παλλαδίου επί άνθρακα ως καταλύτη και άνυδρου οξικού καλίου ως βάσης, σε πίεση 50 psi και ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 4 ημέρες.

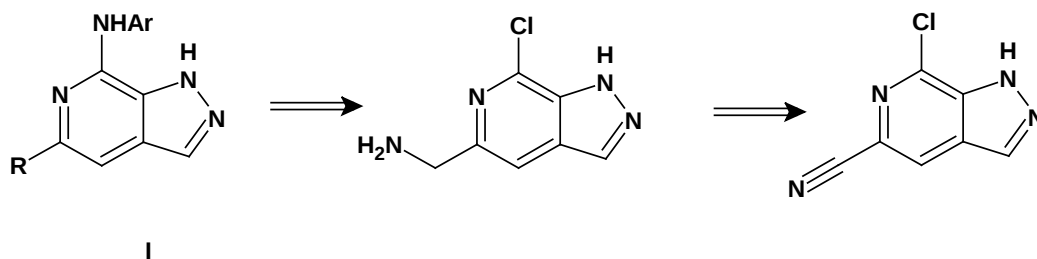


**Εικόνα 2.1.1.7.** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνης (**26**).

Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου της (*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνης (**26**) στο οποίο είναι χαρακτηριστικές οι διπλές κορυφές απορρόφησης που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 4 και 5 του πυριδινικού δακτυλίου και συντονίζονται στα 7.02 ppm και 7.69 ppm αντίστοιχα (**Εικόνα 2.1.1.7.**).

### 2.1.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I, *R* = -CN, -CH<sub>2</sub>NHAr, -CH<sub>2</sub>NHR

Τα 5-αμινομεθυλο-υποκατεστημένα παράγωγα του τύπου I (**Σχήμα 2.1**), μπορεί να προκύψουν από την αναγωγή του νιτριλίου της 7-χλωρο-5-κυανοπυραζολοπυριδίνης και κατόπιν την αναγωγική αμίνωση της ενδιάμεσης αμίνης (**Σχήμα 2.1.2.1.**).



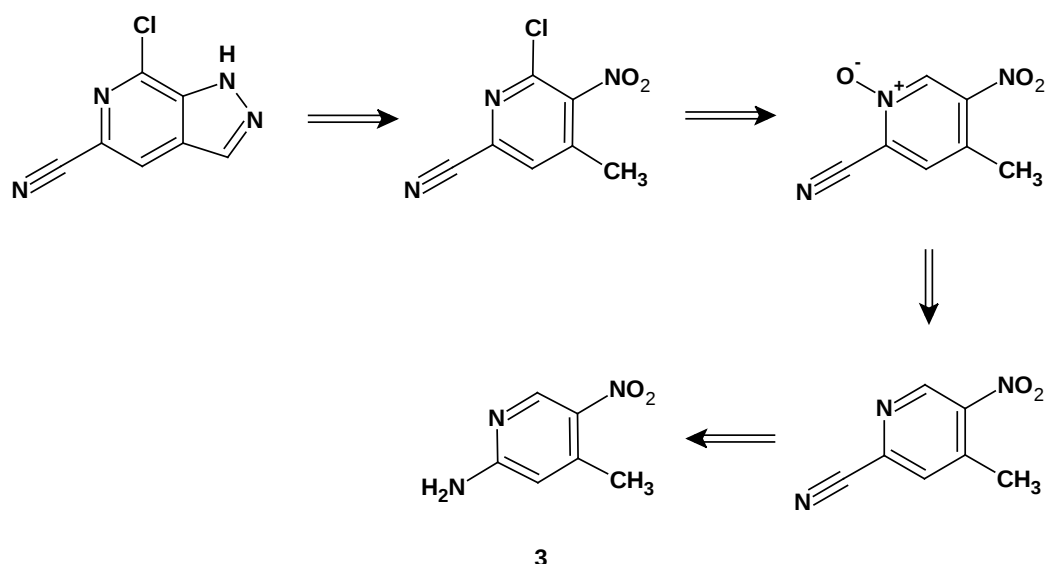
Ar : Phenyl, 3,4,5-Trimethoxyphenyl

R : CN, -CH<sub>2</sub>NHAr, -CH<sub>2</sub>NHAlkyl

**Σχήμα 2.1.2.1.**

#### 2.1.2.1. Παρασκευή του 7-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριдино-5-καρβονιτριλίου

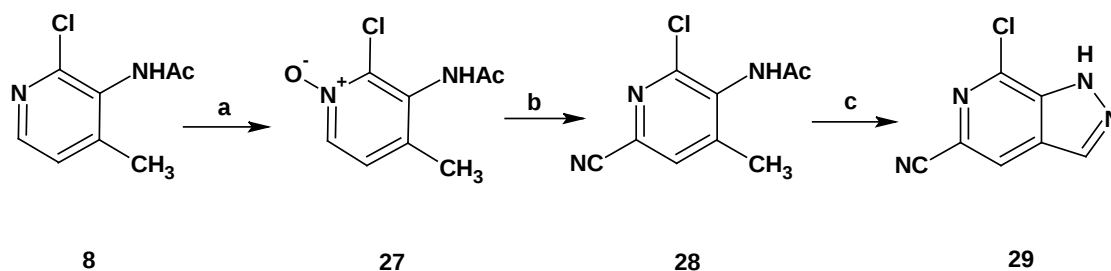
Η σύνθεση του επιθυμητού νιτριλίου θα μπορούσε να γίνει σύμφωνα με το ρετροσυνθετικό σχήμα που ακολουθεί. Αρχικά από την νιτροπυριδίνη **3**, θα συντεθεί το 2-κυανοπαράγωγο του **Σχήματος 2.1.2.2**. Από αυτό μέσω μετάθεσης του ενδιάμεσου *N*-οξειδίου θα παρασκευαστεί το αντίστοιχο χλωρίδιο, το οποίο θα οδηγήσει εν τέλει στο 7-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριдино-5-καρβονιτρίλιο.



**Σχήμα 2.1.2.2.**

Για το σκοπό αυτό επιχειρήθηκε αρχικά η σύνθεση του 4-μεθυλο-5-νιτροπυριдино-2-καρβονιτριλίου με διαζώτωση της αμινοπυριδίνης **3**. Κατά την αντίδραση εφαρμόστηκε εύρος θερμοκρασιών, καθώς και η χρήση διαφορετικών οξέων (υδροχλωρικό και θειικό οξύ) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Σε κάθε περίπτωση το μοναδικό προϊόν που απομονώθηκε ήταν η 4-μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2(1*H*)-όνη. Εναλλακτικά, επιχειρήθηκε αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης στην 2-χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη **12**. Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν NaCN, KCN και Zn(CN)<sub>2</sub>, σε απόλυτη αιθανόλη, άνυδρο διμεθυλοσουλφοξείδιο και άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο, σε θερμοκρασίες -10 °C, -5 °C, 0 °C, 10 °C και 20 °C, σε καμία όμως περίπτωση δεν απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν.

Συνεπώς, η συνθετική πορεία τροποποιήθηκε, χρησιμοποιώντας πλέον ως πρώτη ύλη το ακεταμίδιο **8** (Σχήμα 2.1.2.3.), το οποίο αντέδρασε με μ-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προέκυψε το *N*-οξείδιο **27**. Το παράγωγο αυτό οδήγησε στο νιτρίλιο **28** με μετάθεση του *N*-οξειδίου. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής δοκιμάστηκαν ως δότες κυανομάδας τα NaCN, KCN, CuCN και TMSCN, ενώ ως βάσεις τριαιθυλαμίνη, διμεθυλοκαρβαμοϋλοχλωρίδιο ή διαιθυλοκαρβαμοϋλοχλωρίδιο. Το επιθυμητό παράγωγο παρελήφθη μόνο με την χρήση του τριμεθυλοσιλυλοκυανιδίου (TMSCN) και του διαιθυλοκαρβαμοϋλοχλωριδίου.

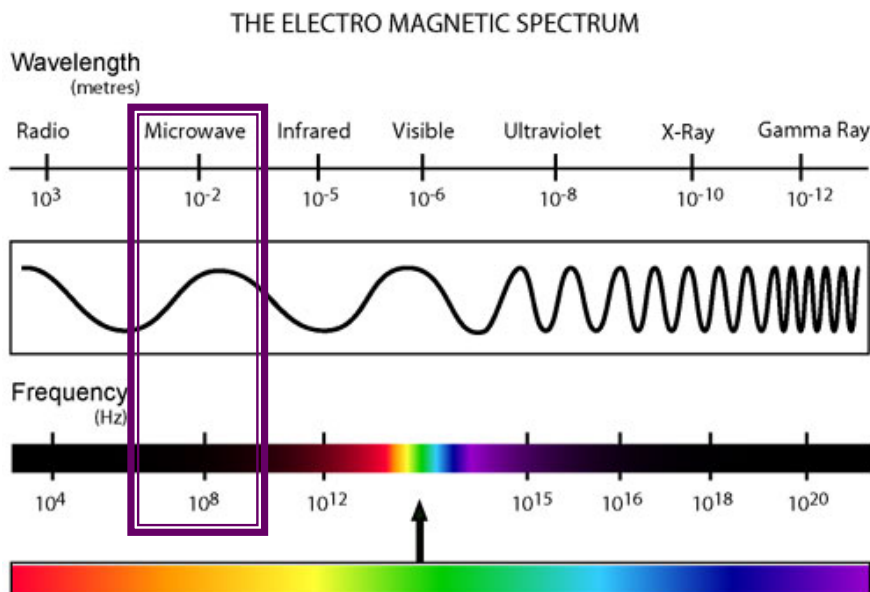


a) *m*-CPBA,  $\text{CHCl}_3$ , θερμοκρασία περιβάλλοντος; b)  $\text{TMSCN}$ , διαιθυλοκαρβαμοϋλο χλωρίδιο, άνυδρο ακετονιτρίλιο, 100 °C, 200 W ; c) νιτρώδες ισοαμύλιο,  $\text{AcOK}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , βενζόλιο, θρασμός.

### Σχήμα 2.1.2.3.

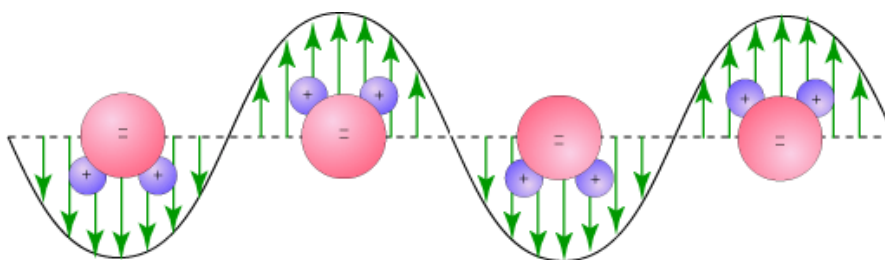
Η συγκεκριμένη αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με θέρμανση τόσο σε ελαιόλουτρο, όσο και σε συσκευή μικροκυμάτων. Σε ελαιόλουτρο χρειάστηκαν 14 ώρες για να ολοκληρωθεί, ενώ η απόδοση ήταν της τάξης του 50%. Αντίθετα, με θέρμανση σε συσκευή μικροκυμάτων σε αντίστοιχη θερμοκρασία και με τις ίδιες ποσότητες αντιδρώντων, η ταχύτητα της αντίδρασης, καθώς και η καθαρότητα και η απόδοση του προϊόντος αυξήθηκαν σημαντικά. Η θέρμανση με επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας πραγματοποιήθηκε υπό ατμοσφαιρική πίεση, καθώς και σε συνθήκες αυξημένης πίεσης (closed-vessel). Υπό πίεση χρειάστηκαν 20 λεπτά και 200 Watts για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση, ενώ χωρίς πίεση 35 λεπτά και 140 Watts. Οι αποδόσεις των παραπάνω αντιδράσεων ήταν υψηλότερες του 90%.

Τα μικροκύματα είναι εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε συχνότητες 300 MHz - 300 GHz (Εικόνα 2.1.2.1.), η ύπαρξη της οποίας είναι γνωστή από τη δεκαετία του 1940. Ωστόσο, η θέρμανση με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην οργανική σύνθεση το 1986 από τις ομάδες των Gedge και Giguere-Majetich<sup>190,191</sup> και έκτοτε έχει βρει εφαρμογές σε πολλές περιπτώσεις λόγω της πληθώρας των πλεονεκτημάτων που προσφέρει.<sup>192</sup> Επιτρέπεται η χρήση μόνο της ακτινοβολίας εκείνης με συχνότητα στα 2.450 (+/- 0.050) GHz, προς αποφυγή της αλληλεπίδρασης με τα μικροκύματα που χρησιμοποιούνται στις τηλεπικοινωνίες.<sup>193</sup>



**Εικόνα 2.1.2.1.** Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

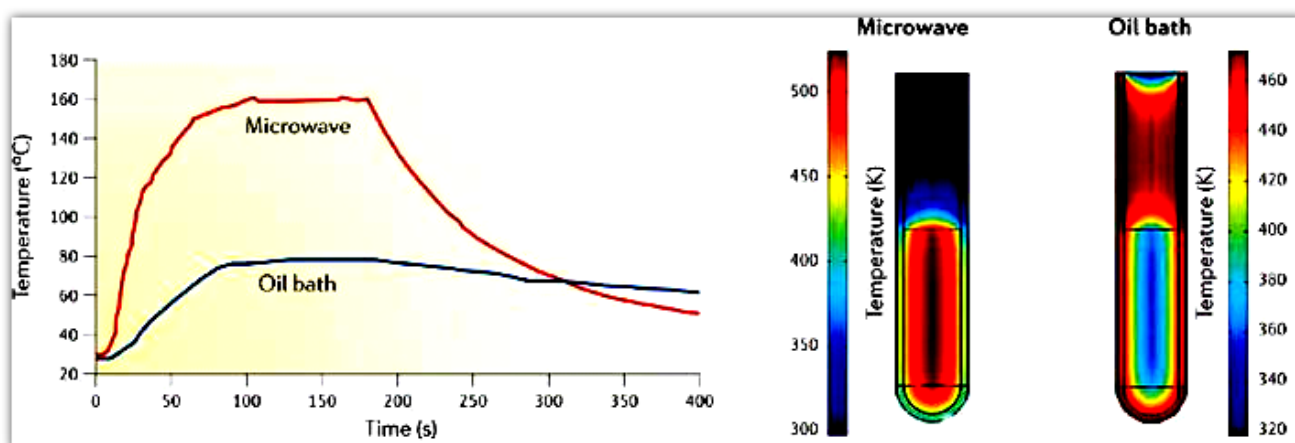
Η θέρμανση που προκαλείται μέσω μικροκυματικής ακτινοβολίας οφείλεται κυρίως σε δύο μηχανισμούς, τη διπολική πόλωση (*dipolar polarization*) και την ιοντική μεταγωγή (*ionic conduction*). Όταν τα δίπολα ή τα ιόντα του μίγματος ακτινοβολούνται σε συχνότητες μικροκυμάτων, ευθυγραμμίζονται στο ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται. Πιο συγκεκριμένα, καθώς το εφαρμοζόμενο πεδίο ταλαντεύεται, το διπολικό ή ιοντικό πεδίο προσπαθώντας να ευθυγραμμισθεί με το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (**Εικόνα 2.1.2.2.**) χάνει ενέργεια με την μορφή θερμότητας, λόγω μοριακών τριβών και διηλεκτρικών απωλειών.<sup>194</sup>



**Εικόνα 2.1.2.2.** Ευθυγράμμιση μορίων νερού (δίπολα) υπό την επίδραση εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου.

Όπως είναι επόμενο, η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη επηρεάζει κατά πολύ την επίδραση των μικροκυμάτων στο μίγμα. Έτσι, όταν πρόκειται για διαλύτες χαμηλής απορροφητικότητας, όπως είναι οι υδρογονάνθρακες, είναι δυνατό να

χρησιμοποιηθούν και πολικά πρόσθετα, όπως ιοντικά υγρά ή θερμαντικά στοιχεία κατασκευασμένα από υλικά που απορροφούν ισχυρά τα μικροκύματα (πχ. γραφίτης), με σκοπό να αυξηθεί το επίπεδο απορροφητικότητας του μέσου. Στην οργανική σύνθεση το συνολικό αποτέλεσμα της μικροκυματικής ακτινοβολήσης προέρχεται από ένα συνδυασμό θερμικών και μη θερμικών φαινομένων. Τα πρώτα αφορούν στο ρυθμό θέρμανσης, την υπερθέρμανση και την εκλεκτική απορρόφηση ακτινοβολίας από πολικές ουσίες, ενώ τα μη θερμικά προέρχονται από το πεδίο δημιουργίας υψηλής πολικότητας και εμπλέκονται στους μηχανισμούς κινητικότητας και διάχυσης που μπορούν να αυξήσουν τις πιθανότητες αποτελεσματικών επαφών.<sup>194</sup> Οι συμβατικές μέθοδοι θέρμανσης που περιλαμβάνουν τη χρήση λουτρών ελαίου, άμμου ή ζακέτας θέρμανσης, δεν μπορούν να επιφέρουν τέτοια αποτελέσματα, καθώς θερμαίνουν τα συστατικά της αντίδρασης εξ επαφής μέσω θέρμανσης της φιάλης. Αντιθέτως, η θέρμανση με μικροκύματα παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιομορφία στο εσωτερικό του μίγματος (**Εικόνα 2.1.2.3.**), δεδομένου ότι θερμαίνεται μόνο το μίγμα της αντίδρασης και όχι ο περιέκτης. Συνεπώς ο χρόνος αντίδρασης είναι σαφώς μειωμένος σε σχέση με τις κλασσικές συνθήκες θέρμανσης, ενώ στα πλεονεκτήματα της μεθόδου θα πρέπει να προστεθούν τόσο η αυξημένη απόδοση και καθαρότητα των προϊόντων, όσο και οι φιλικότερες προς το περιβάλλον συνθήκες, με τη χρήση μικρότερων ποσών ενέργειας και διαλύτη («πράσινη χημεία»).195

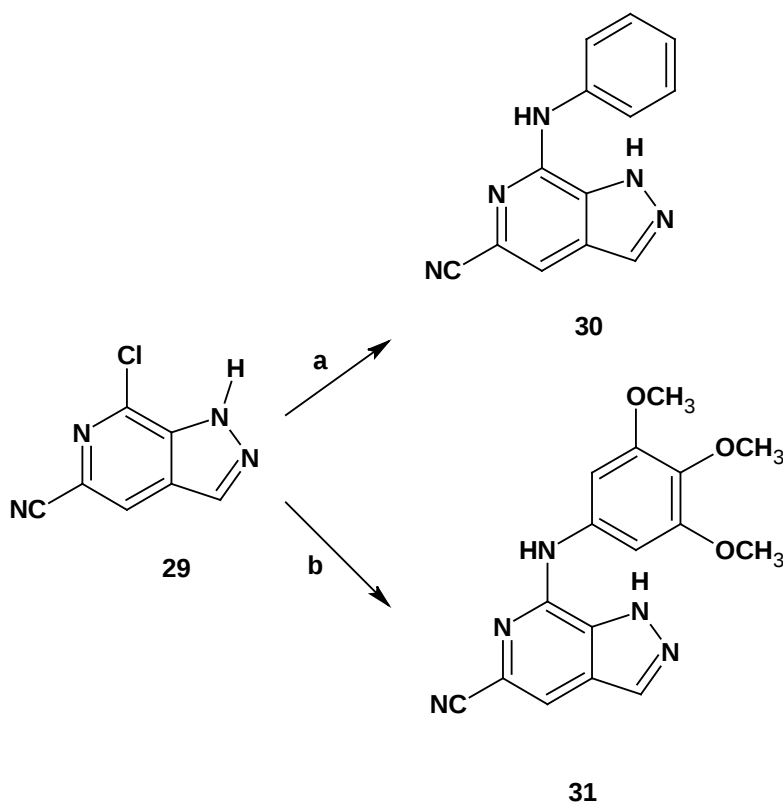


**Εικόνα 2.1.2.3.** Συγκριτική παρουσίαση της διακύμανσης της θερμοκρασίας σε σχέση με το χρόνο, κατά τη χρήση συσκευής μικροκυμάτων και ελαιόλουτρου.

Στη συνέχεια, μετά από αντίδραση ενδομοριακής κύκλωσης παρελήφθη απευθείας το επιθυμητό παράγωγο **29**, χωρίς να απομονωθεί το ακετυλιωμένο ανάλογο, προφανώς λόγω της ταχύτατης απακετυλίωσης του. Είναι ενδεικτικό ότι στο φάσμα πρωτονίου του λαμβανόμενου μορίου απουσιάζει η κορυφή της μεθυλομάδας, ενώ παρουσιάζεται στην αρωματική περιοχή μια δεύτερη μονή κορυφή, που συντονίζεται στα 8.22 ppm και η οποία αντιστοιχεί στο μεθινικό πρωτόνιο του πυραζολικού δακτυλίου.

#### **2.1.2.2. Παρασκευή των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών (34 – 39)**

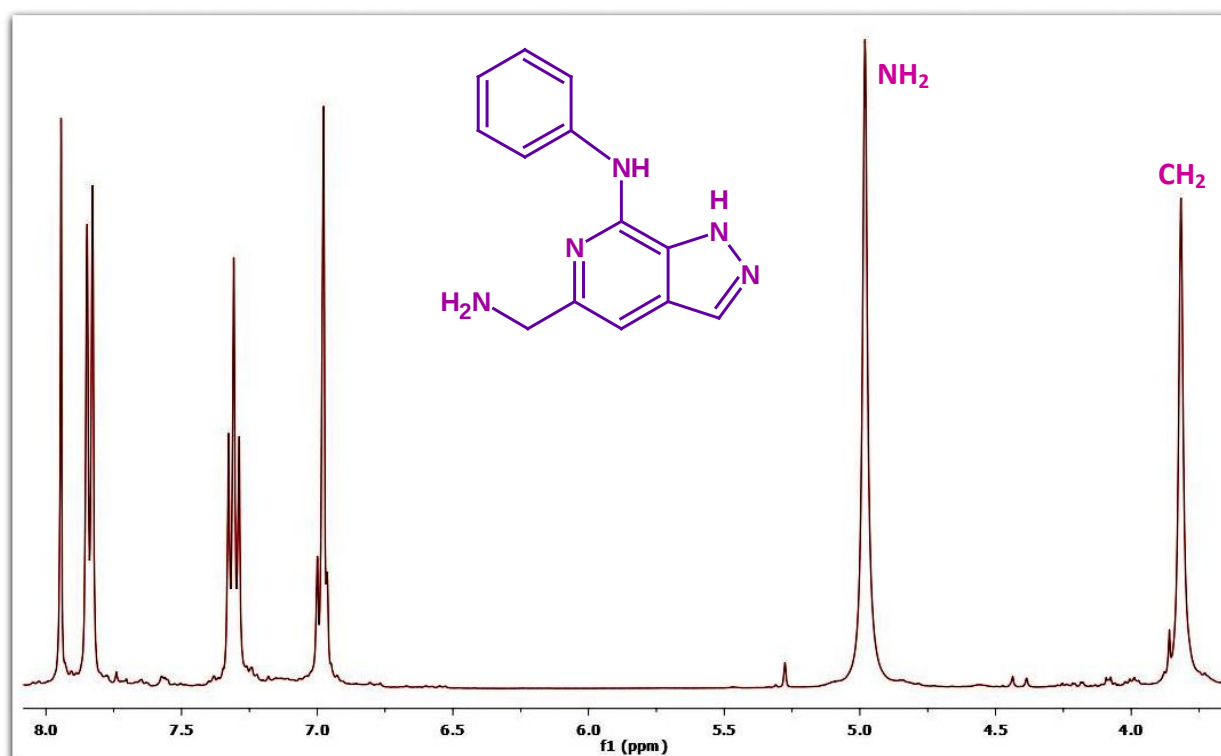
Για τη σύνθεση των 7-αρυλαμινο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτριλίων **30** και **31** (Σχήμα 2.1.2.4.) χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το νιτρίλιο **29** στο οποίο επέδρασαν οι κατάλληλες αρωματικές αμίνες. Στην περίπτωση του παραγώγου **30**, η πυρηνόφιλη υποκατάσταση πραγματοποιήθηκε με βρασμό εντός ανιλίνης, ενώ για τη λήψη του παραγώγου **31**, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επίδραση περίσσειας 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνης εντός άνυδρου διμεθυλοσουλφοξειδίου. Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκε αρχικά διμεθυλοφορμαμίδιο ως διαλύτης, προέκυψε όμως ως κύριο προϊόν το N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)φορμαμίδιο.



a) ανιλίνη, βρασμός; b) 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνη, άνυδρο DMSO.

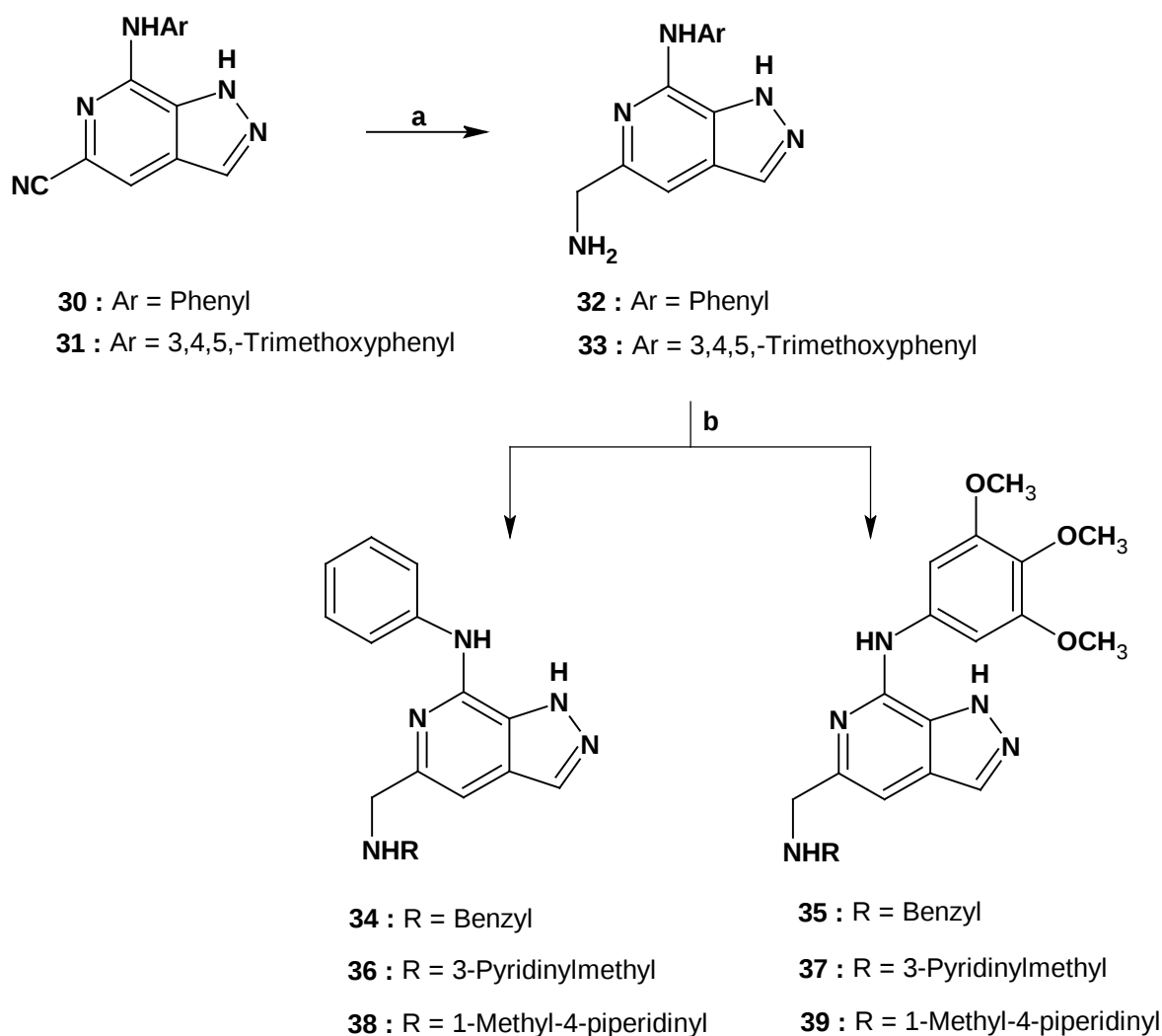
#### Σχήμα 2.1.2.4.

Ακολουθώντας με αναγωγή της κυανομάδας με επίδραση λιθιοαργιλιοϋδριδίου σε ζέον τετραϋδροφουράνιο παρελήφθησαν τα αμινομεθυλοπαράγωγα **32** και **33** (Σχήμα 2.1.2.5.). Στο φάσμα πρωτονίου της {7-φαινυλαμινο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**32**), παρατηρείται χαρακτηριστικά η απλή κορυφή απορρόφησης των πρωτονίων του μεθυλενίου που συντονίζονται στα 3.82 ppm, καθώς και η κορυφή των πρωτονίων της αμινομάδας στα 4.98 ppm (Εικόνα 2.1.2.4.).



**Εικόνα 2.1.2.4.** Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της {7-φαινυλαμινο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**32**).

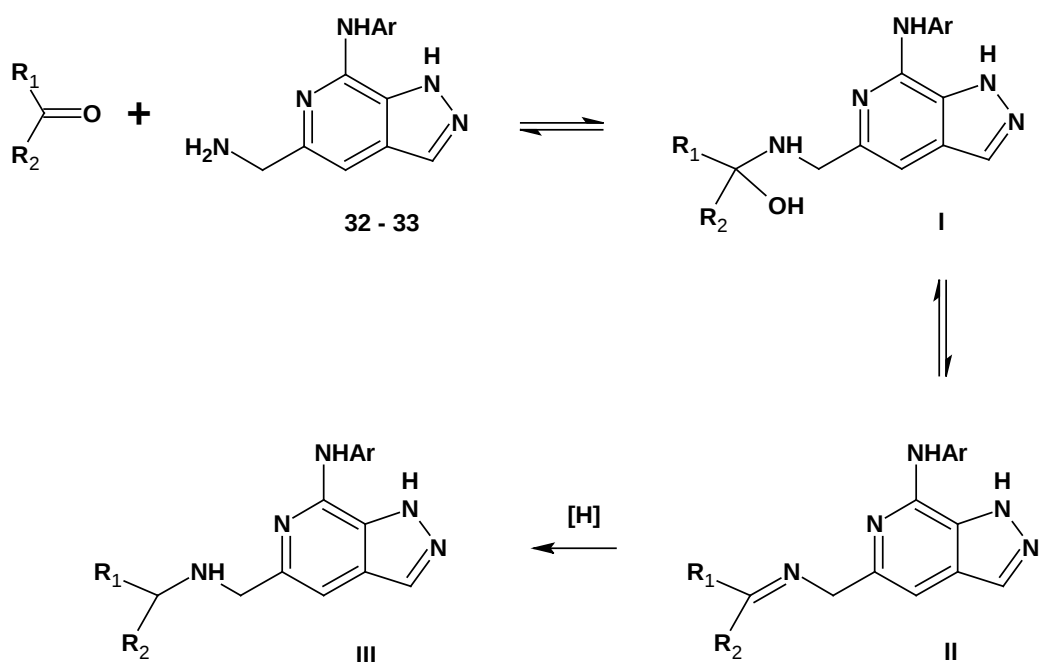
Στη συνέχεια με επίδραση της κατάλληλης αλδεΐδης ή κετόνης και αναγωγή της ενδιάμεσης βάσης του Schiff, παρασκευάστηκαν τα τελικά διυποκατεστημένα παράγωγα **34 – 39** (Σχήμα 2.1.2.5.).



a)  $\text{LiAlH}_4$ , THF; 80 °C b) Αλδεϋδη ή κετόνη,  $\text{NaBH}_4$ , αιθανόλη απόλυτη.

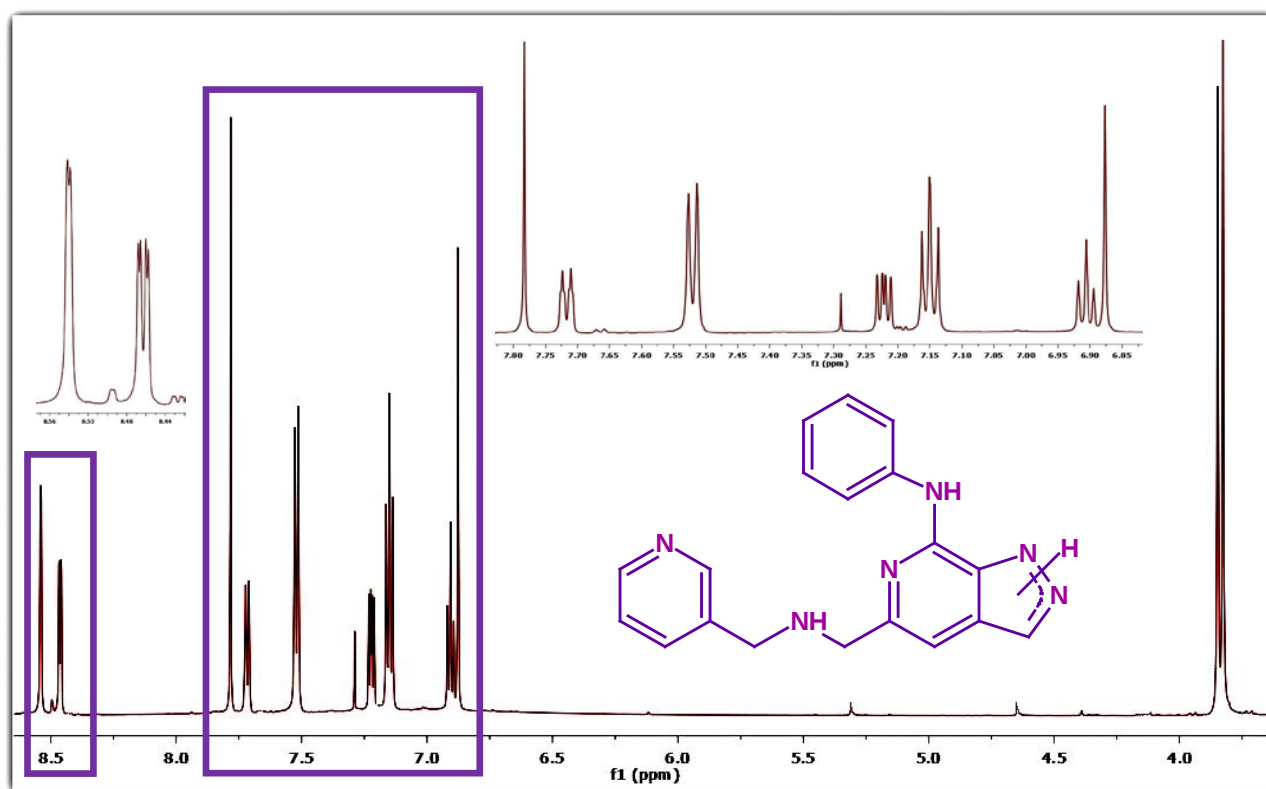
#### Σχήμα 2.1.2.5.

Πρόκειται για μια αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης, ο μηχανισμός της οποίας περιλαμβάνει αρχικά το σχηματισμό της αμίνης **I**, η οποία μέσω αφυδάτωσης μετατρέπεται στην ενδιάμεση μίνη **II**. Στη συνέχεια αυτή ανάγεται για τη λήψη των αλκυλιωμένων αμινών (Σχήμα 2.1.2.6.). Για τη σύνθεση των επιθυμητών αμινών **34** – **39** ως αναγωγικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το νατριοβοροϋδρίδιο, ενώ το στάδιο της αναγωγής πραγματοποιήθηκε απευθείας χωρίς την απομόνωση της ενδιάμεσης ασταθούς μίνης.



**Σχήμα 2.1.2.6.** Μηχανισμός αναγωγικής αμίνωσης.

Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου της *N*-(3-πυριδινυλομεθυλο)-{7-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**36**, **Εικόνα 2.1.2.5.**), στο οποίο διακρίνονται οι απλές κορυφές απορρόφησης στα 3.85 και 3.83 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των δύο μεθυλενίων του μορίου, ενώ στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται και οι χαρακτηριστικές κορυφές της 3-πυριδινυλομάδας του παραγώγου.



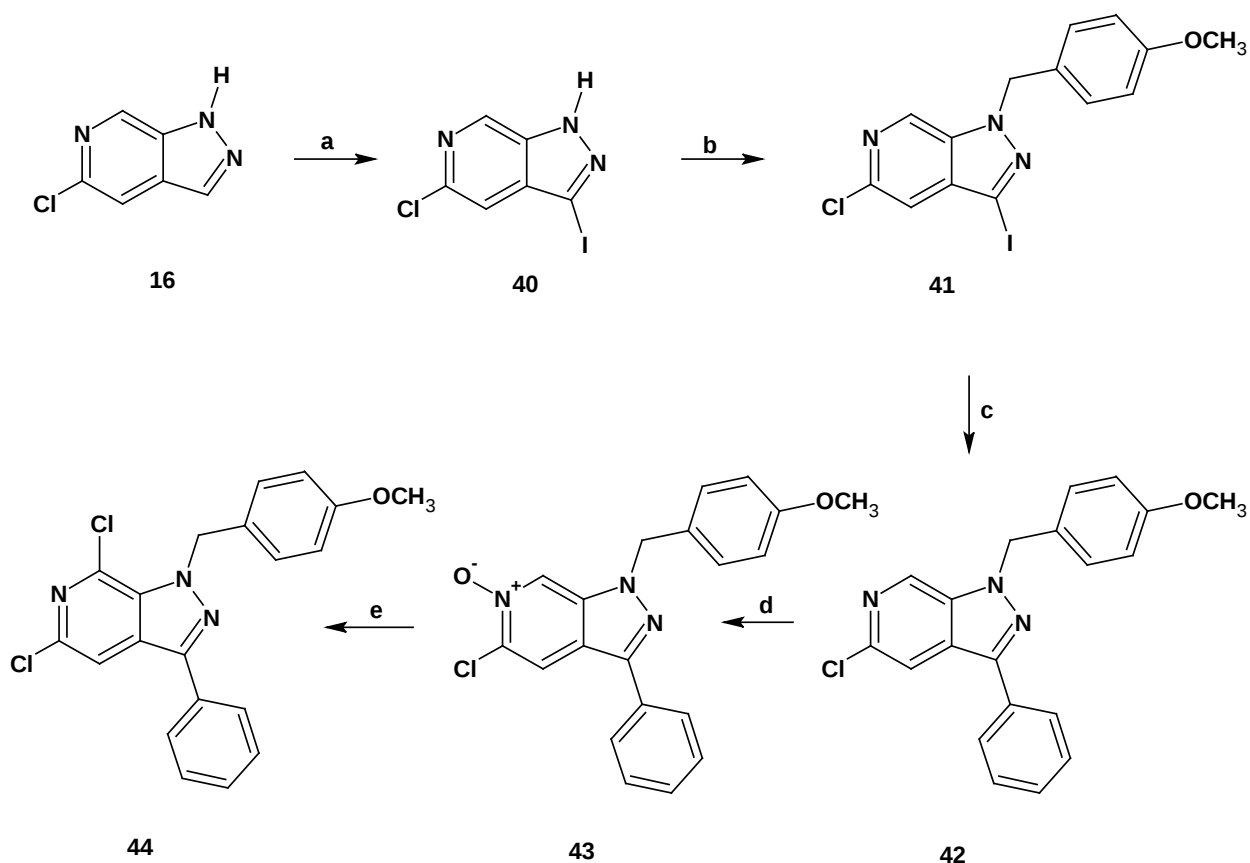
Εικόνα 2.1.2.5. Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR της *N*-(3-πυριδινυλομεθυλο)-{7-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**36**).

## 2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II

### 2.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ ΚΑΙ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ-5-ΧΛΩΡΟ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ 3-ΦΑΙΝΥΛΟΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II

Για την παρασκευή των 7-αρυλαμινο και 7-αρυλαμινο-5-χλωρο-υποκατεστημένων 3-φαινυλοπαραγώγων του τύπου II (Σχήμα 2.1.), θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ενδιάμεσο η 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**44**, Σχήμα 2.2.1.1.). Με ιωδίωση του παραγώγου **16** με τη χρήση *N*-ιωδοηλεκτριμίδιου παρελήφθη το ιωδίδιο **40**, στο οποίο επέδρασε π-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο οδηγώντας στη λήψη του προστατευμένου παραγώγου **41**. Κατά την αντίδραση αυτή δεν παρελήφθη το ισομερές θέσεως στο *N*-2 του πυραζολικού δακτυλίου, πιθανώς λόγω της στεreoχημικής παρεμπόδισης από την παρουσία του ογκώδους ατόμου του ιωδίου στην 3-θέση. Η ταυτοποίηση του ισομερούς έγινε με την βοήθεια φασματοσκοπίας

NMR μίας ( $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ) και δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC και NOESY). Ειδικότερα, από το φάσμα NOE διαπιστώθηκε ότι τα πρωτόνια του μεθυλενίου της π-μεθοξυβενζυλομάδας παρουσιάζουν συσχέτιση με το πυριδινικό πρωτόνιο στην 7-θέση του δακτυλίου.

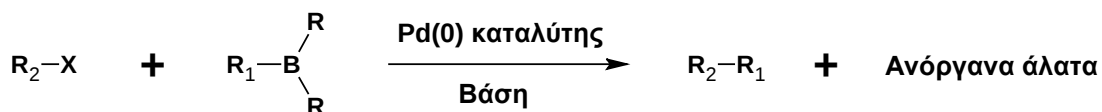


a) NIS, MeOH, θερμοκρασία περιβάλλοντος; b) NaH, π-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο, THF; c) βενζολοβορονικό οξύ, NaHCO<sub>3</sub>, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, τολουόλιο, βρασμός; d) m-CPBA, THF, θερμοκρασία περιβάλλοντος; e) POCl<sub>3</sub>, THF, θερμοκρασία περιβάλλοντος.

#### Σχήμα 2.2.1.1.

Στην συνέχεια με την επίδραση βενζολοβορονικού οξέος, παρουσία τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)παλλαδίου παρελήφθη το φαινυλο παράγωγο **42**, με εφαρμογή αντίδρασης σύζευξης τύπου Suzuki. Η αντίδραση αυτή αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1979 από τους A. Suzuki και N. Miyaura, και αρχικά αφορούσε στη σύζευξη αλκενοβορονικών παραγώγων με αλκενυλοβρωμίδια, η οποία οδηγούσε στο σχηματισμό δεσμού άνθρακα-άνθρακα υπό την καταλυτική επίδραση του παλλαδίου.<sup>196</sup> Σήμερα η αντίδραση αυτή εφαρμόζεται σε ευρύτερο φάσμα

περιπτώσεων, με τη χρήση μεγαλύτερης ποικιλίας αλογονιδίων, βορονικών παραγώγων αλλά και καταλυτών παλλαδίου (Σχήμα 2.2.1.2.)<sup>197</sup>



**R** : αλκυλο, OH, O-αλκυλο

**R<sub>1</sub>** : αλκυλο, αλλυλο, αλκενυλο, αλκυνυλο, αρυλο

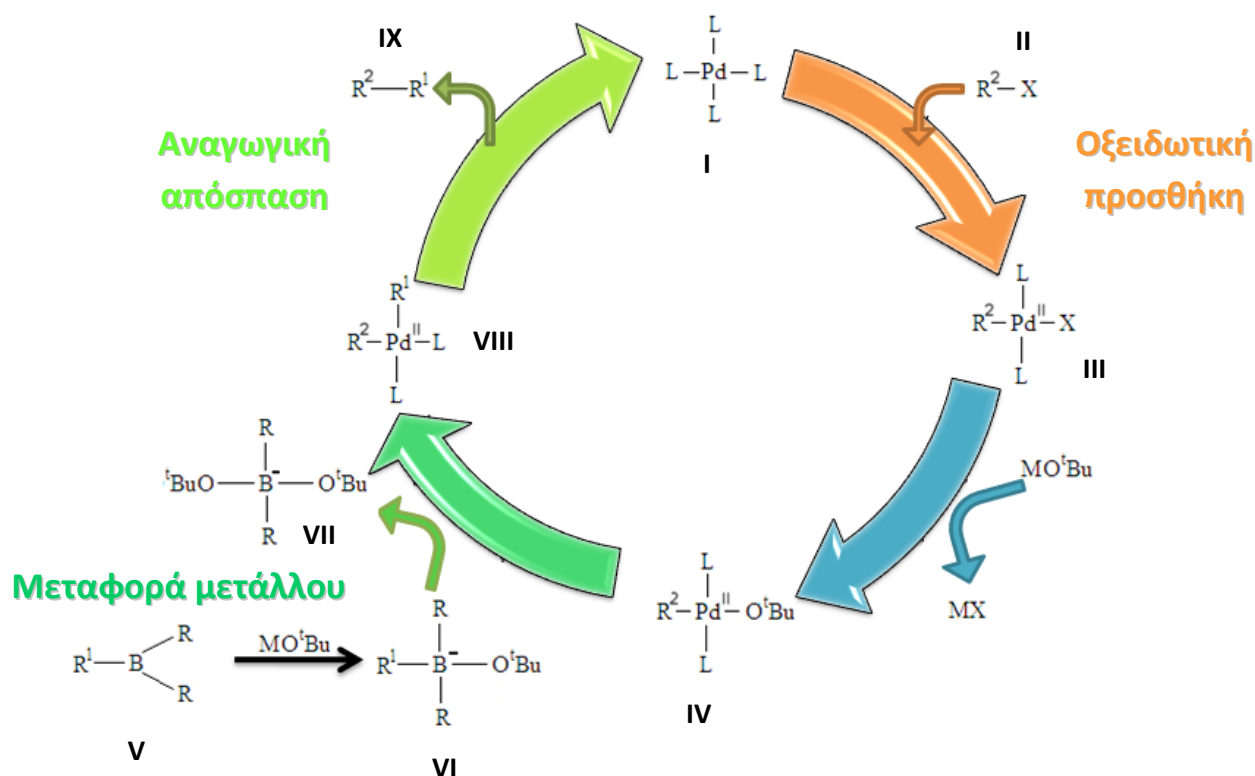
**R<sub>2</sub>** : αλκυλο, αλκενυλο, αρυλο

**X** : Cl, Br, I, OTf

**Βάση** : Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, M(O-αλκυλο)

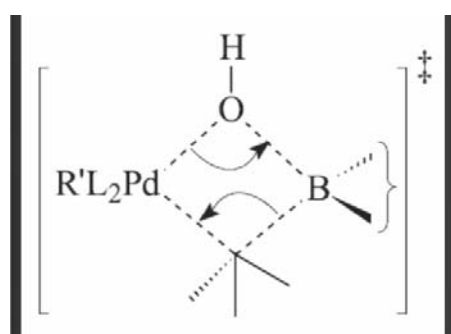
**Σχήμα 2.2.1.2.**

Ο γενικός μηχανισμός του καταλυτικού κύκλου της αντίδρασης Suzuki φαίνεται στο **Σχήμα 2.2.1.3.**<sup>197</sup> Το πρώτο στάδιο αφορά στην *οξειδωτική προσθήκη* (*oxidative addition*) του συμπλόκου παλλαδίου **I** στο αλογονίδιο **II** που οδηγεί στο σχηματισμό του οργανοπαλλαδικού ενδιάμεσου **III**. Αρχικά παράγεται η *cis*-δομή του ενδιάμεσου, η οποία όμως αμέσως ισομερίζεται προς την *trans*-δομή. Το στάδιο της οξειδωτικής προσθήκης αποτελεί συνήθως το καθοριστικό βήμα στον καταλυτικό κύκλο, ενώ η σχετική δραστητικότητα των αλογονιδίων ακολουθεί τη σειρά I>Br>>Cl. Στις αντιδράσεις σύζευξης Suzuki χρησιμοποιείται μια μεγάλη ποικιλία καταλυτών παλλαδίου(0) με πλέον χρησιμοποιούμενο το τετρακίς (τριφαινυλοφωσφίνο) παλλάδιο.



**Σχήμα 2.2.1.3.** Ο καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης σύζευξης Suzuki.

Από την αντίδραση του οργανοπαλλαδικού αλογονιδίου **III** με βάση προκύπτει το ενδιάμεσο **IV**. Κατόπιν, ακολουθεί το δεύτερο στάδιο του καταλυτικού κύκλου, η αντίδραση μεταφοράς μετάλλου (*transmetalation*). Ο μηχανισμός του σταδίου αυτού δεν έχει αποσαφηνιστεί επακριβώς. Ωστόσο αναφέρεται<sup>198</sup> ότι η χρησιμοποιούμενη βάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο ως προς τη διαμόρφωση του ενδιάμεσου **IV** όσο και ως προς την ενεργοποίηση του οργανοβορονικού παραγώγου **V**. Τα οργανοβορονικά παράγωγα θα αντιδρούσαν πολύ δύσκολα με το οργανοπαλλαδικό αλογονίδιο, λόγω της ελαττωμένης



πυρηνόφιλης ισχύος της οργανικής ομάδας που συνδέεται με το άτομο του βορίου. Με τη χρήση μιας αρνητικά φορτισμένης βάσης, το βορονικό παράγωγο **V** μετατρέπεται σε ένα τεταρτοταγές αρνητικά φορτισμένο σύμπλοκο (**VI**). Έτσι αυξάνει η πυρηνόφιλη ισχύς της οργανικής ομάδας που συνδέεται με το άτομο του βορίου και συνεπώς η αλληλεπίδραση με το ενδιάμεσο **IV** προς το σχηματισμό

του οργανοπαλλαδικού ενδιαμέσου **VIII** είναι εφικτή. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την αντίδραση της αναγωγικής απόσπασης (*reductive elimination*), κατά την οποία παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **IX**, ενώ ταυτόχρονα αναγεννάται και ο καταλύτης. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται αφού το σύμπλοκο **VIII** ισομεριστεί πρώτα προς την *cis*-μορφή του.

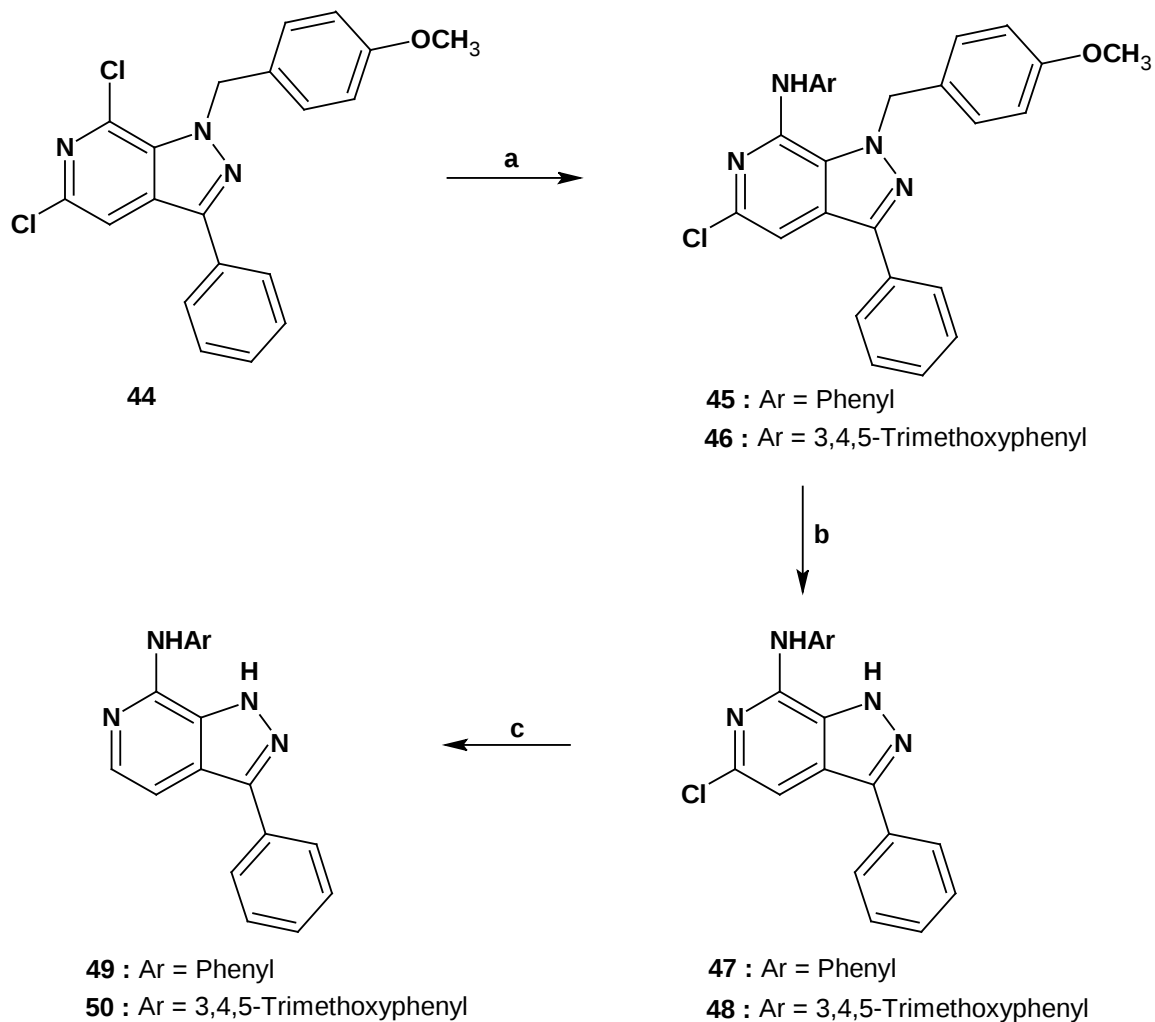
Η αντίδραση σύζευξης Suzuki εφαρμόζεται ευρέως στην οργανική σύνθεση, ως μια ιδιαίτερα σημαντική μέθοδος σχηματισμού δεσμού άνθρακα-άνθρακα, με έμφαση στη σύζευξη αρωματικών παραγώγων, και κατ' επέκταση στη δυνατότητα σύνθεσης μορίων πολύπλοκης δομής και φαρμακολογικού ενδιαφέροντος. Το Nobel Χημείας που απονεμήθηκε το 2010 στον Akira Suzuki ήρθε να επιβεβαιώσει τον καθοριστικό ρόλο που διαδραμάτισε η αντίδραση, ως ένα «ακριβές και αποτελεσματικό εργαλείο» στην εξέλιξη της επιστήμης της Χημείας.<sup>199</sup> Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η αντίδραση παρουσιάζει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων όπως είναι η εμπορική διαθεσιμότητα των βορονικών οξέων, η φιλική προς το περιβάλλον χρήση τους, καθώς και η σταθερότητά τους στη θέρμανση, τον ατμοσφαιρικό αέρα και την υγρασία, οι ήπιες συνθήκες της αντίδρασης και η εύκολη απομάκρυνση των ανόργανων παραπροϊόντων.<sup>200</sup>

Η προστασία του πυραζολικού αζώτου κρίνεται αναγκαία γιατί σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η αντίδραση σύζευξης με βενζολοβορονικό οξύ ευνοείται απουσία ευκίνητου υδρογόνου, αλλά και γιατί όπως έχει προαναφερθεί, η προστατευτική αυτή ομάδα αυξάνει σημαντικά τόσο την απόδοση όσο και την ταχύτητα του σχηματισμού του *N*-οξειδίου, που είναι το επόμενο μόριο στη συνθετική πορεία.

Το 3-φαινυλοπαράγωγο **42** αντέδρασε με μ-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προέκυψε το *N*-οξείδιο **43**, από το οποίο μετά από μετάθεση παρουσία περίσσειας οξυχλωριούχου φωσφόρου σε τετραϋδροφουράνιο παρελήφθη το διχλωροπαράγωγο **44** (Σχήμα 2.2.1.1.).

Με πορεία ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε στα παράγωγα **25** και **26**, παρασκευάστηκαν τα 7-υποκατεστημένα αμινοπαράγωγα **45** και **46** με αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης των κατάλληλων αμινών επί του χλωροπαράγωγου **44**, παρουσία υδριδίου του νατρίου. Τα τελευταία μετά από επίδραση τριφθοροξικού οξέος μετατράπηκαν στα αποπροστατευμένα μόρια **47** και

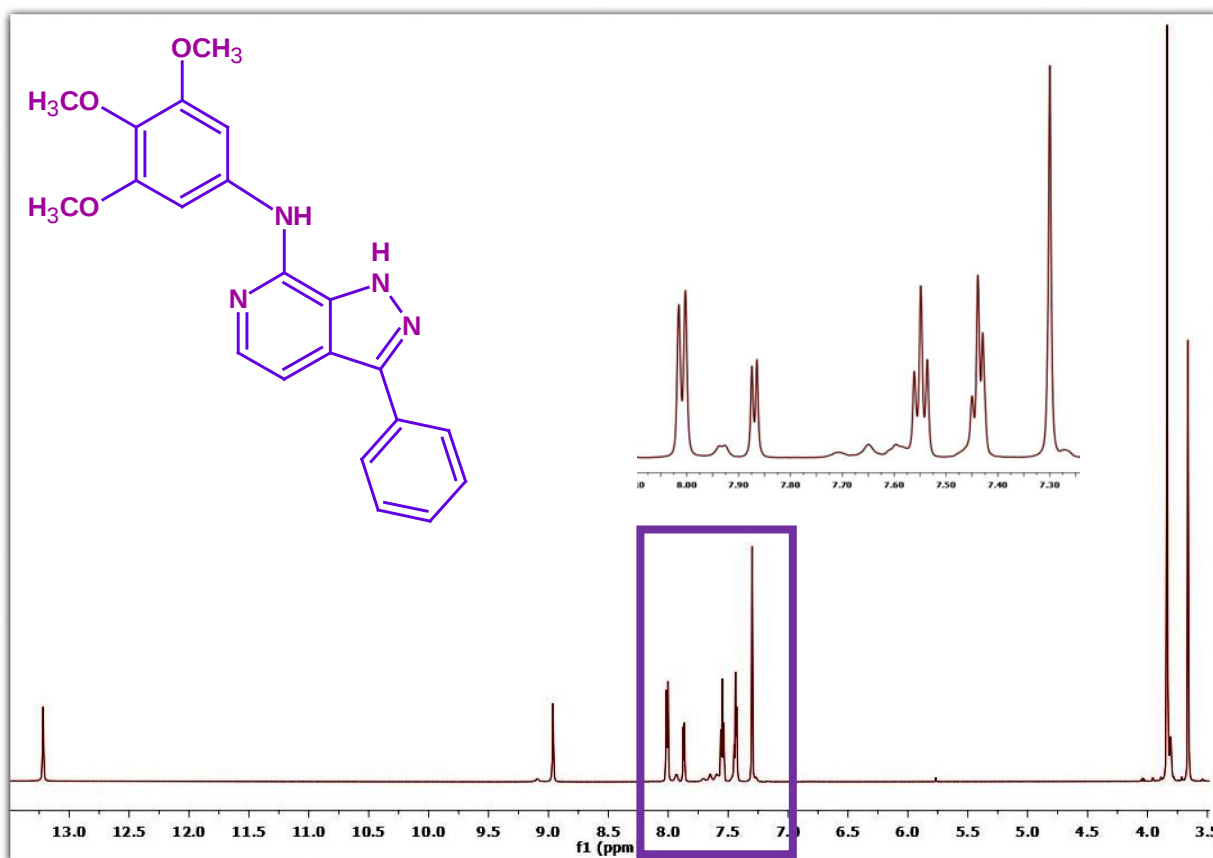
**48 (Σχήμα 2.2.1.2.)**, από τα οποία με αναγωγική αφαλογόνωση με χρήση παλλαδίου επί άνθρακα και άνυδρου οξικού καλίου, παρασκευάστηκαν οι αμίνες **49** και **50** αντίστοιχα.



a)  $ArNH_2$ , NaH, DMF, 100 °C; b) τριφθοροξικό οξύ, θερμοκρασία περιβάλλοντος; c)  $H_2$ , Pd-C, AcOK, EtOH.

**Σχήμα 2.2.1.2.**

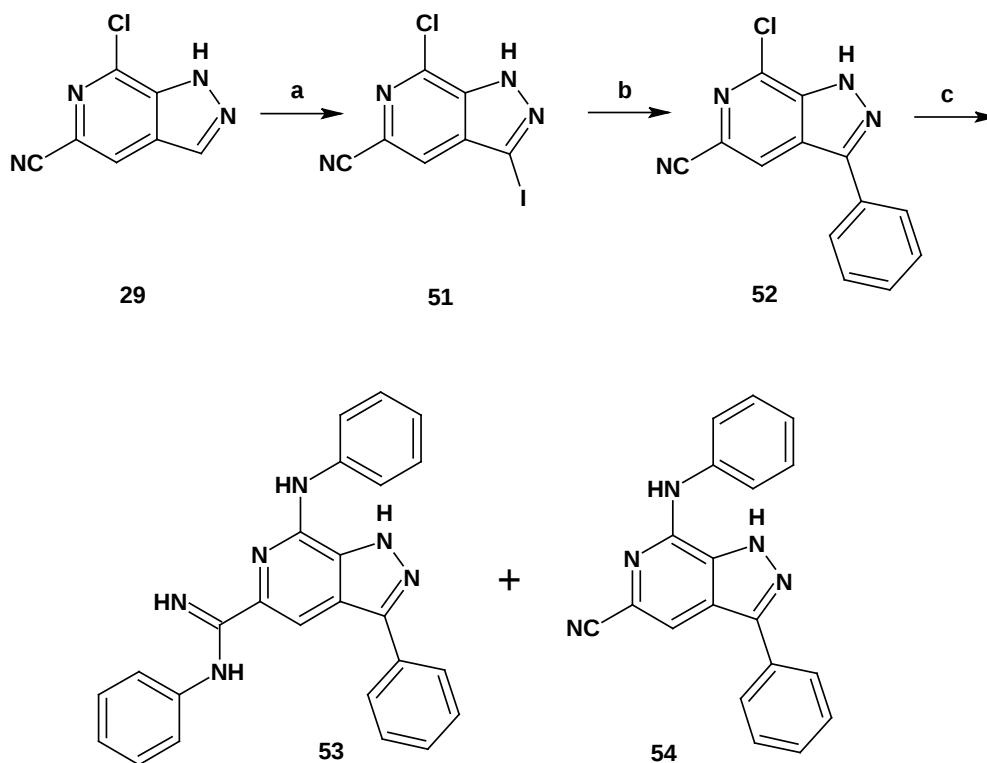
Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου του παραγώγου **50**, στο οποίο διακρίνονται χαρακτηριστικά οι δυο διπλές κορυφές απορρόφησης στα 7.44 και 7.87 ppm που αντιστοιχούν στα 4 και 5-πυριδινικά πρωτόνια αντίστοιχα (**Εικόνα 2.2.1.1.**).



**Εικόνα 2.2.1.1.** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της 3-φαινυλο-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4- c]πυριδιν-7-αμίνης (**50**).

## 2.2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 3-ΦΑΙΝΥΛΟ-ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II, $R = -\text{CN}$ , $-\text{CH}_2\text{NHAr}$ , $-\text{CH}_2\text{NHR}$

Για την παρασκευή των 5-κυανο-3-φαινυλοαναλόγων του τύπου II (Σχήμα 2.1.) ακολουθήθηκε η πορεία του σχήματος 2.2.2.1. Με ιωδίωση του παραγώγου **29** προέκυψε το μόριο **51**, που ήταν όμως εξαιρετικά δυσδιάλυτο ακόμα και σε DMSO, με αποτέλεσμα η προσπάθεια αντίδρασης με το 4-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο για την προστασία του πυραζολικού αζώτου να είναι ανεπιτυχής. Παρόλα αυτά, το ιωδοανάλογο **51** υποβλήθηκε σε αντίδραση σύζευξης με βενζολοβορονικό οξύ παρουσία καταλύτη παλλαδίου και οδήγησε στο επιθυμητό παράγωγο **52**, αλλά σε ιδιαίτερα χαμηλή απόδοση (Σχήμα 2.2.2.1.).



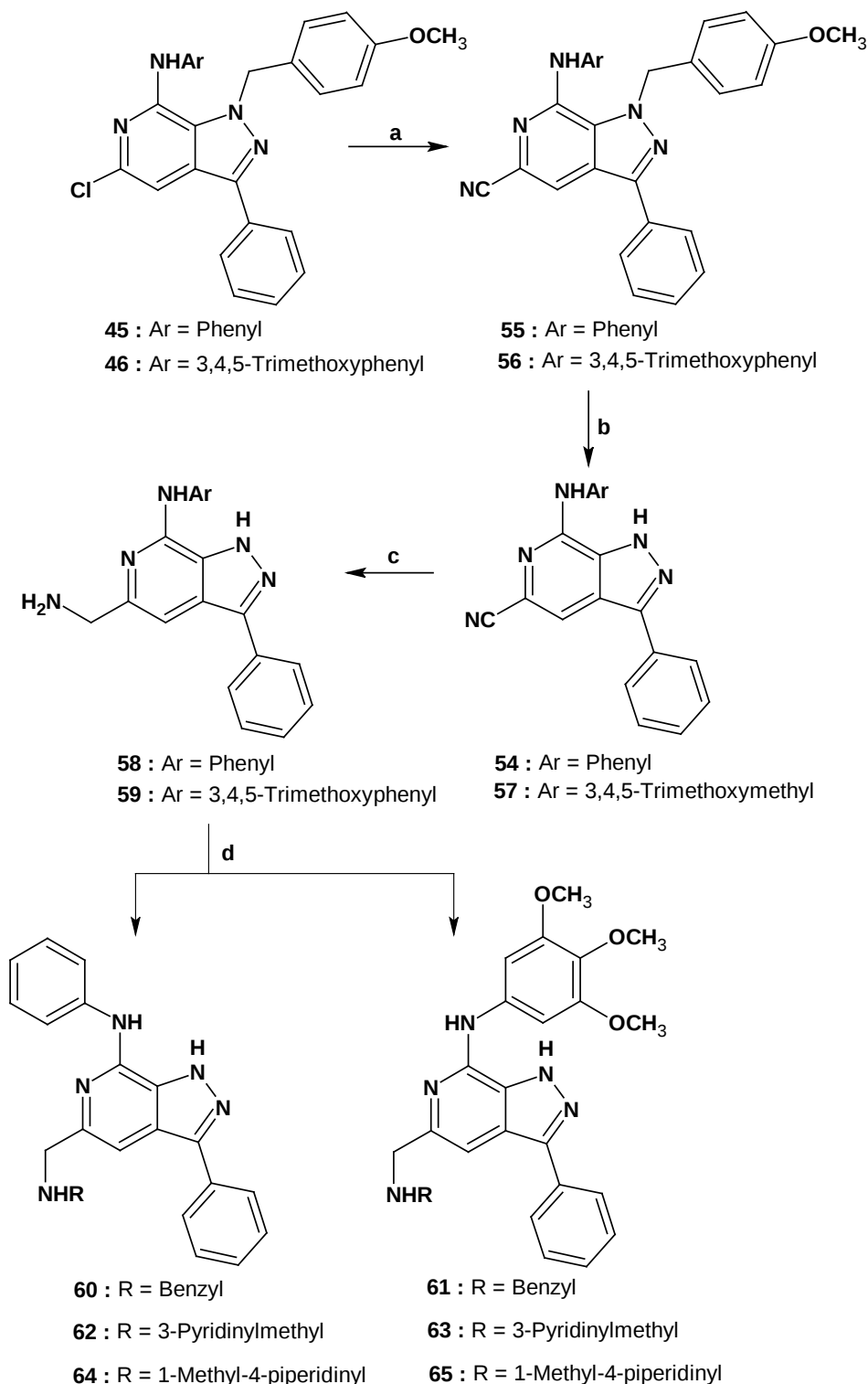
a) *NIS*, *MeOH*, θερμοκρασία περιβάλλοντος; b) βενζολβορονικό οξύ, *NaHCO<sub>3</sub>*, *Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>*, τολουόλιο, βρασμός; c) ανιλίνη, βρασμός.

**Σχήμα 2.2.2.1.**

Ακολούθως επιχειρήθηκε αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης με ανιλίνη, η οποία οδήγησε σε ένα πολύπλοκο μίγμα προϊόντων από το οποίο απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, το αμιδινικό παράγωγο **53** και σε πολύ χαμηλό ποσοστό το επιθυμητό παράγωγο **54**. Η ταυτοποίηση του παραγώγου **53** έγινε με τη βοήθεια φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων, καθώς και φασματομετρίας μάζας υψηλής ευκρίνειας.

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε σε διάφορες συνθήκες, όπως βρασμός σε ανιλίνη, χρήση διαφόρων βάσεων (*NaH*, ανθρακικό νάτριο), χρήση μικροκυμάτων, καθώς και με την προσθήκη καταλυτών παλλαδίου (*Buchwald-Hartwig amination*). Σε κάθε περίπτωση η απόδοση για το επιθυμητό παράγωγο ήταν της τάξεως του 2-5%. Έτσι, προς αποφυγή της πυρηνόφιλης προσβολής της κυανομάδας από την αρωματική αμίνη, που οδήγησε στη λήψη του παραπροϊόντος **53**, ακολουθήθηκε η συνθετική πορεία του **Σχήματος 2.2.2.2**. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα 5-

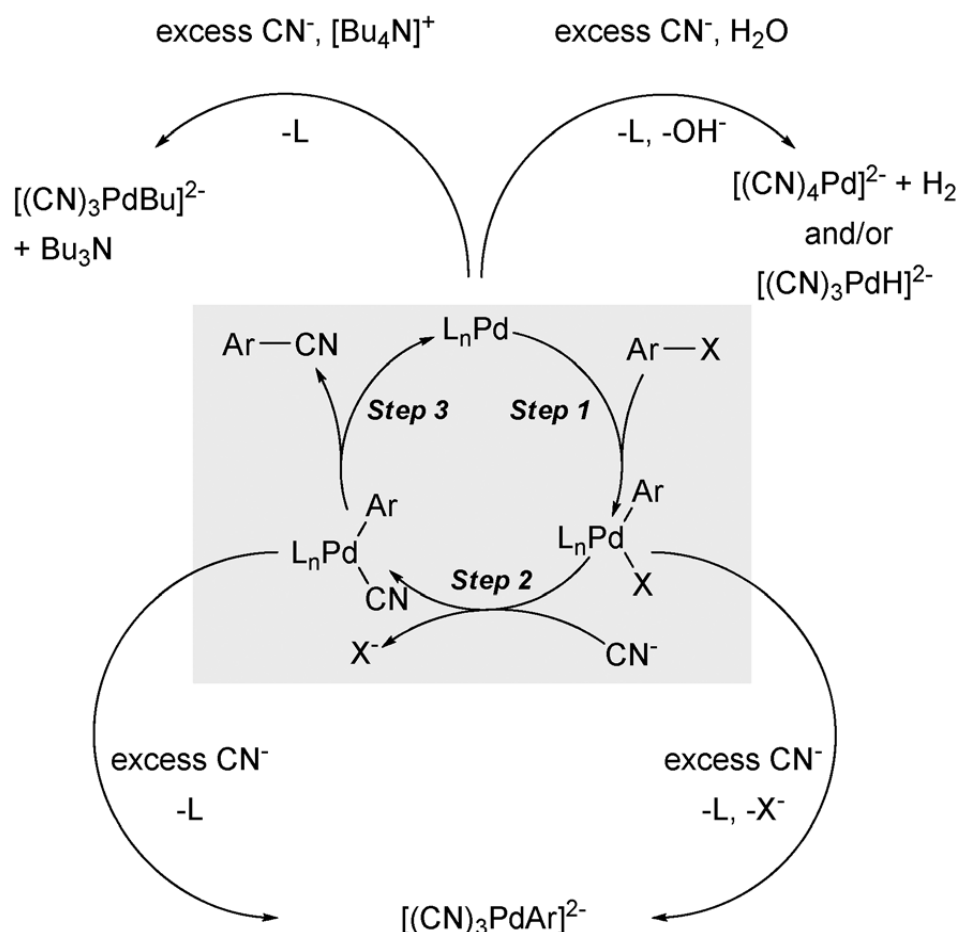
κυανοπαράγωγα **55** και **56**, λαμβάνοντας ως πρώτη ύλη τα χλωρίδια **45** και **46** αντίστοιχα, η σύνθεση των οποίων έχει ήδη περιγραφεί (Σχήμα 2.2.1.2.).



a)  $Pd_2(dba)_3$ , σκόνη Zn,  $Zn(CN)_2$ , dppf, DMA άνυδρο, βρασμός; b) τριφθοροξικό οξύ, θερμοκρασία περιβάλλοντος; c)  $LiAlH_4$ , THF, 80 °C; d) Αλδεΐδη ή κετόνη,  $NaBH_4$ , αιθανόλη απόλυτη.

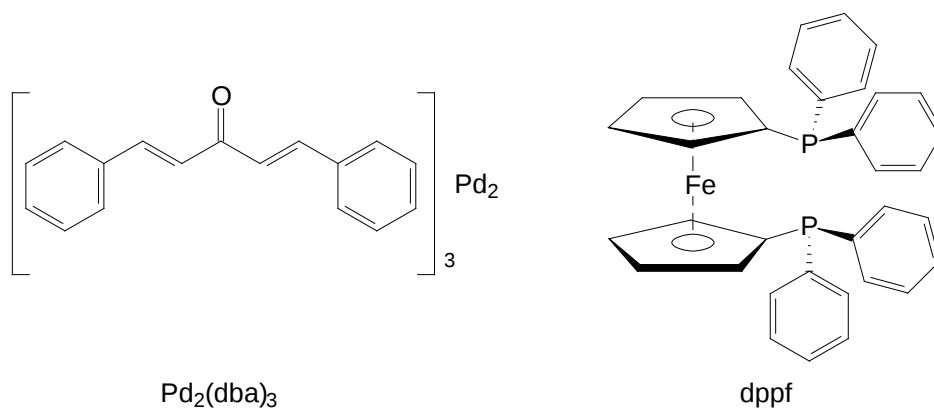
Σχήμα 2.2.2.2.

Η σύνθεση νιτριλίων από τα αντίστοιχα αλογονοπαράγωγα συνήθως γίνεται μέσω της αντίδρασης *Rosenmund-Von Braun* ή με την χρήση καταλυτών μετάλλων μεταπτώσεως, ιδιαίτερα παλλαδίου ή νικελίου.<sup>201-204</sup> Η αντίδραση *Rosenmund-Von Braun* παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα όπως είναι η απαιτούμενη εφαρμογή ιδιαίτερα υψηλών θερμοκρασιών (150°C - 250°C), η χρήση τουλάχιστον ισομοριακής ποσότητας κυανιούχου χαλκού, με αποτέλεσμα την παραγωγή ισοδύναμης ποσότητας αποβλήτων βαρέων μετάλλων και η μικρή δραστικότητα των χλωρο- και βρωμοπαραγώγων, που οδηγεί συχνά στη χρήση δαπανηρών ιωδο-αναλόγων.<sup>205-209</sup> Αντίθετα, η παρασκευή βενζονιτριλίων με την χρήση καταλυτών παλλαδίου αποτελεί μια ιδιαίτερα ελκυστική μέθοδο καθώς χρησιμοποιούνται φθηνά αντιδραστήρια όπως KCN, NaCN ή Zn(CN)<sub>2</sub>, ενώ οι καταλύτες αν και υψηλού κόστους χρησιμοποιούνται σε αναλογίες της τάξεως του 1-3%. Ο μηχανισμός της αντίδρασης, θεωρείται ότι ακολουθεί τον κλασικό οξειδοαναγωγικό κύκλο των αντιδράσεων σύζευξης με την χρήση ανάλογων καταλυτών (**Σχήμα 2.2.2.3.**).<sup>210</sup> Η δραστικότητα των αρυλοαλογονιδίων ακολουθεί την σειρά I > Br > Cl, ενώ οι πλούσιοι σε ηλεκτρόνια δακτύλιοι αντιδρούν πιο αργά συγκριτικά με τους φτωχότερους σε ηλεκτρόνια δακτυλίους.<sup>211,212</sup> Σημαντικό μειονέκτημα των αντιδράσεων αυτών είναι η δηλητηρίαση του καταλύτη λόγω της ισχυρής σύνδεσής του με τα ανιόντα κυανίου. Στις περισσότερες των περιπτώσεων αύξηση της συγκέντρωσης του κυανιούχου άλατος οδηγεί σε σημαντική μείωση της ταχύτητας και της απόδοσης, πιθανώς λόγω σχηματισμού συμπλόκων του γενικού τύπου Pd(II)(CN)<sub>x</sub><sup>(x-2)</sup> όπου x = 3 ή 4 (**Σχήμα 2.2.2.3.**).<sup>210</sup>



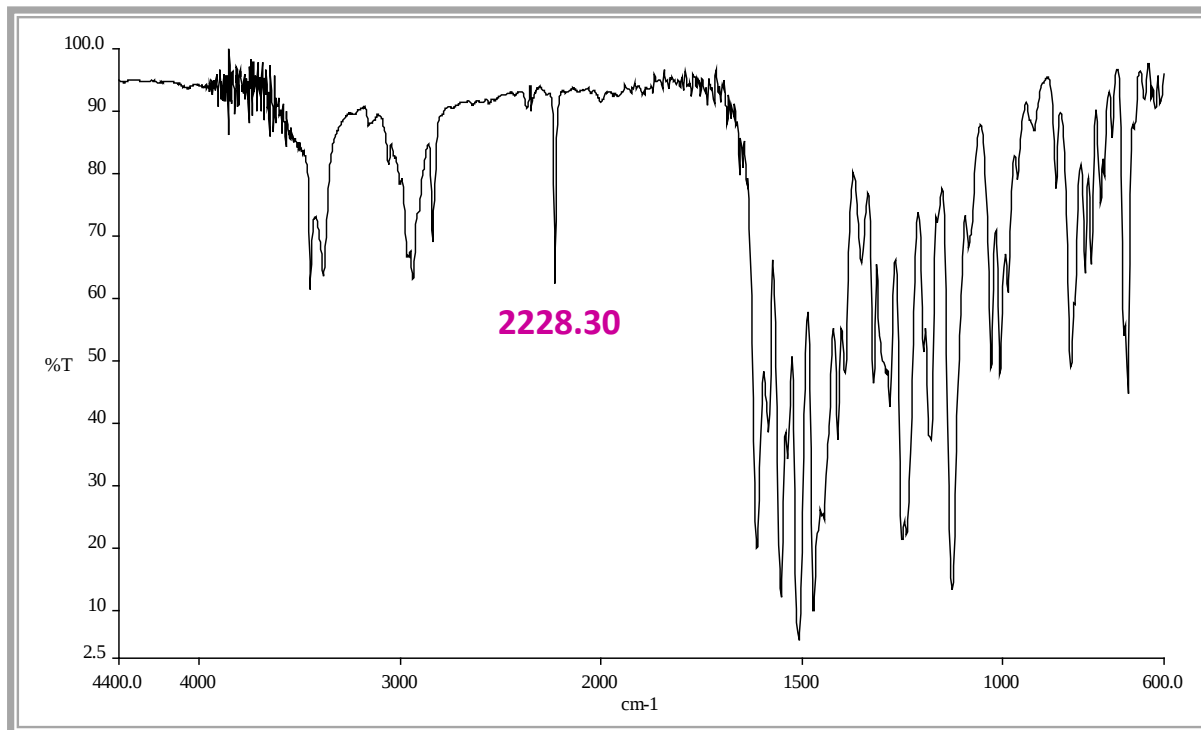
Σχήμα 2.2.2.3.

Αρχικά η αντίδραση έγινε με τη χρήση  $Pd(PPh_3)_4$  ως καταλύτη και  $KCN$  ως δότη κυανομάδας, όμως η απόδοση ήταν μικρή. Θεωρώντας ότι αυτό οφείλεται στην χρήση του  $KCN$ , επιλέχθηκε η χρήση κυανιούχου ψευδάργυρου ( $Zn(CN)_2$ ), καθώς λόγω της μικρότερης διαλυτότητάς του στο διμεθυλοακεταμίδιο (DMA), η συγκέντρωση των κυανιούχων ιόντων στο διάλυμα διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα με αποτέλεσμα ο καταλύτης να μη δηλητηριάζεται. Επιπλέον, προστέθηκε σκόνη ψευδαργύρου ( $Zn$ ), που βοηθά στην αναγέννηση του καταλύτη, ο οποίος ήταν το τρις(διβενζυλιδενοακετονο)παλλάδιο (0)  $\{Pd_2(dba)_3\}$  και ως συνδέτης (ligand) χρησιμοποιήθηκε το 1,1'-δις(διφαινυλοφωσφίνο)φερροκένιο ( $dppf$ ) (Σχήμα 2.2.2.4.). Με αυτές τις συνθήκες η αντίδραση οδήγησε στη λήψη του επιθυμητών παραγώγων **55** και **56** σε απόδοση της τάξεως του 90%.<sup>213</sup>



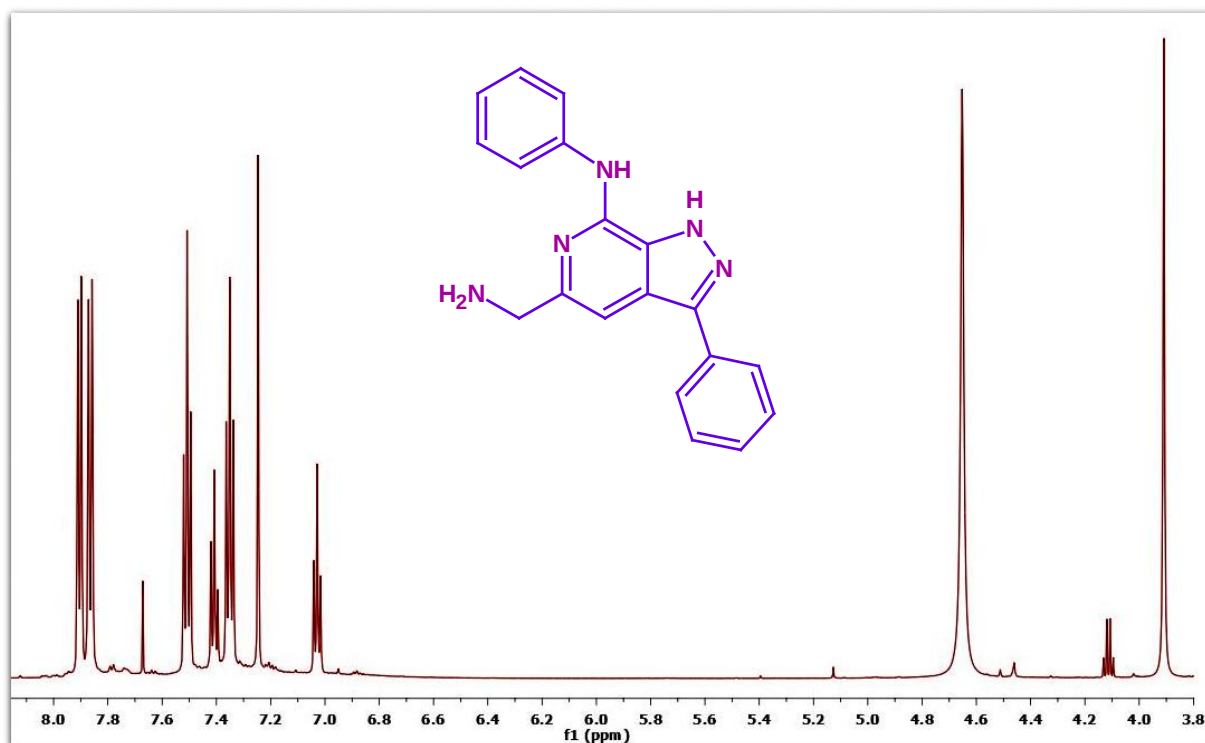
**Σχήμα 2.2.2.4.**

Η ταυτοποίηση του μορίου πραγματοποιήθηκε με λήψη φασμάτων NMR μιας και δύο διαστάσεων. Στο φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR του 1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό-5-καρβονιτριλίου (**56**) είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη της κορυφής του άνθρακα της κυανομάδας, που συντονίζεται στα 118.59 ppm. Επιπλέον, στο φάσμα υπερύθρου (IR) του μορίου διακρίνεται εμφανώς η κορυφή στα 2228.30  $\text{cm}^{-1}$ , που είναι ενδεικτική του νιτριλίου (**Εικόνα 2.2.2.1.**).



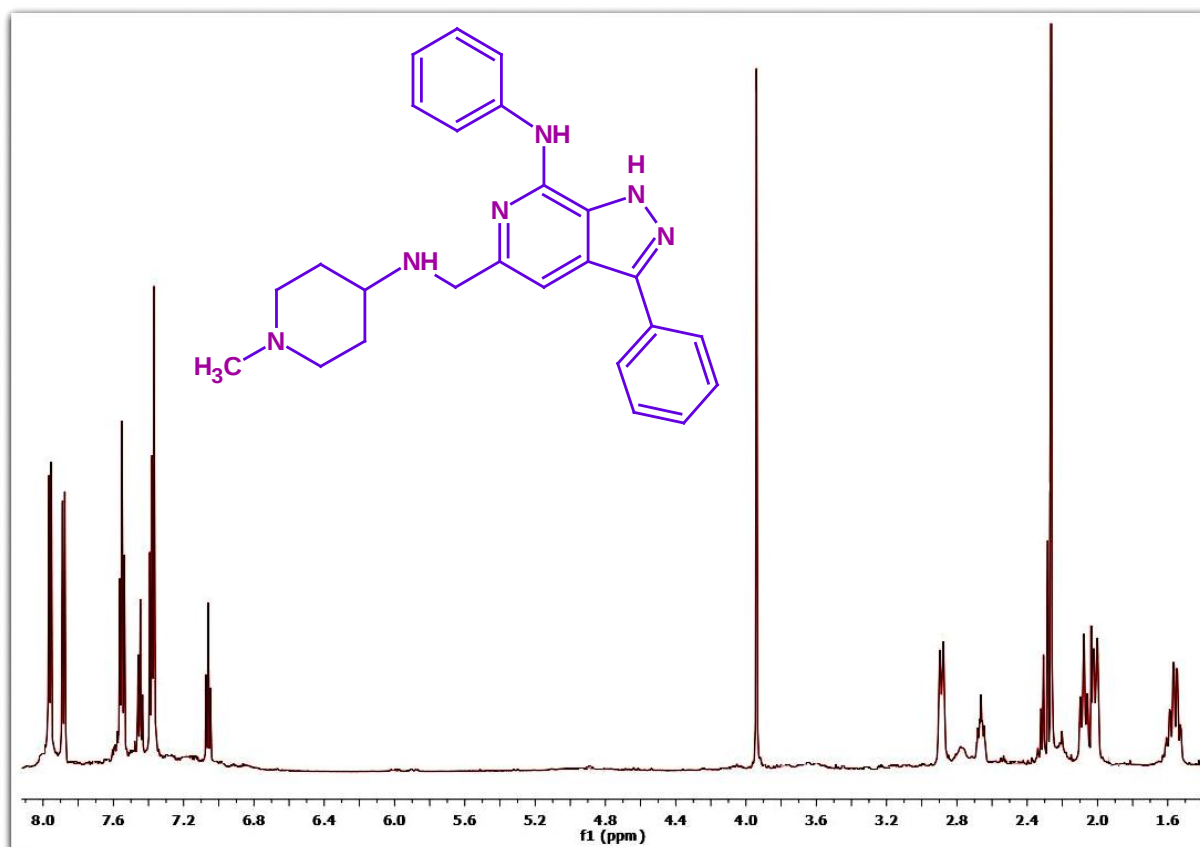
**Εικόνα 2.2.2.1.** Φάσμα υπερύθρου (δισκίο βρωμιούχου καλίου) του 1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό-5-καρβονιτριλίου (**56**).

Ακολουθώντας στα παράγωγα **55** και **56** επέδρασε τριφθοροξικό οξύ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη λήψη του παραγώγων **54** και **57**, ενώ στη συνέχεια με αναγωγή της κυανομάδας με επίδραση λιθιοαργιλιοϋδριδίου παρελήφθησαν τα επιθυμητά μόρια **58** και **59**. Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της αμίνης **58** διακρίνεται χαρακτηριστικά η απλή κορυφή των πρωτονίων του μεθυλενίου που συντονίζονται στα 3.91 ppm, καθώς και η ευρεία κορυφή που αντιστοιχεί στην απορρόφηση της αμινομάδας στα 4.65 ppm.



**Εικόνα 2.2.2.2.** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της {7-φαινυλαμινο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**58**).

Για την παρασκευή των τελικών αμινών **60** – **65**, πραγματοποιήθηκε αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης, όπως περιγράφηκε για τα ανάλογα του τύπου **I** (Κεφ. 2.1.2.2.). Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου της *N*-(1-μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-{7-φαινυλαμινο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**64**), στο οποίο διακρίνονται χαρακτηριστικά οι κορυφές απορρόφησης της 1-μεθυλο-4-πιπεριδινυλομάδας στην περιοχή των 3.00 - 1.50 ppm (Εικόνα 2.2.2.3.).

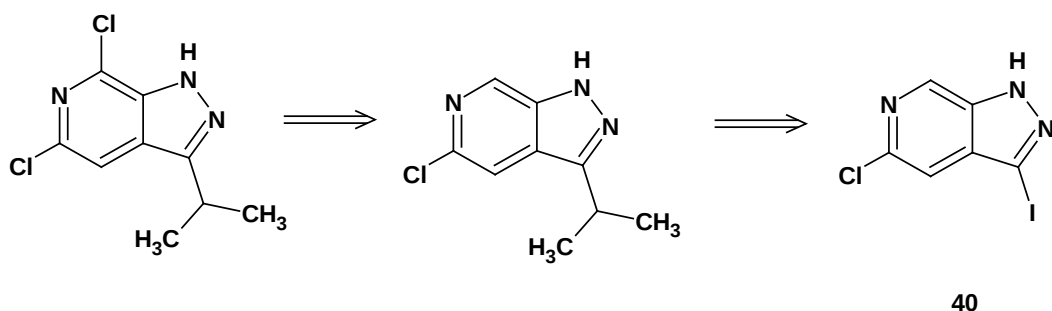


**Εικόνα 2.2.2.3.** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της *N*-(1-μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-{7-φαινυλαμινο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**64**).

## 2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III

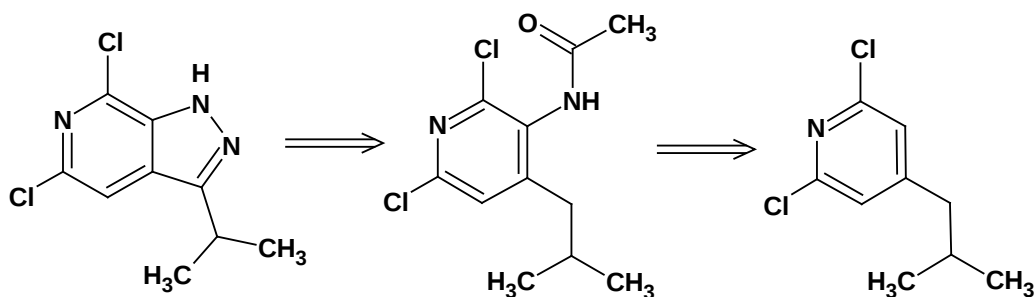
### 2.3.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ ΚΑΙ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ-5-ΧΛΩΡΟ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III

Για την παρασκευή των 3-ισοπροπυλοαναλόγων του τύπου III (Σχήμα 2.1.) μπορεί να χρησιμοποιηθεί η 5,7-διχλωρο-3-ισοπροπυλοπυραζολοπυριδίνη, η σύνθεση της οποίας θα μπορούσε να ακολουθήσει πορεία ανάλογη αυτής των 3-φαινυλοπαραγώγων, όπως φαίνεται στο ρετροσυνθετικό Σχήμα 2.3.1.1.



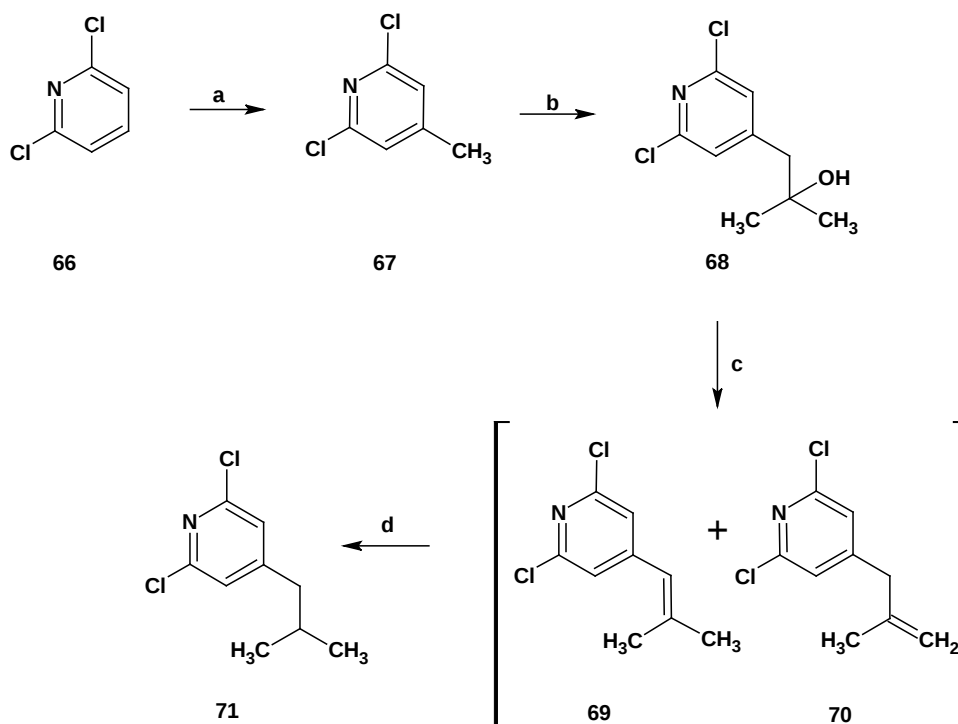
Σχήμα 2.3.1.1.

Έγιναν διάφορες προσπάθειες σύζευξης του ιωδοπαραγώγου **40** με 1-μεθυλαιθανοβορονικό οξύ με τη χρήση διαφόρων καταλυτών παλλαδίου παρουσία βάσης, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Κατόπιν αυτού θεωρήθηκε ότι η επιθυμητή διχλωροπυραζολοπυριδίνη μπορεί να προκύψει μέσω της ρετροσυνθετικής πορείας του **Σχήματος 2.3.1.2** από το αντίστοιχο πυριδινακεταμίδιο, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να παρασκευαστεί από τη 2,6-διχλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)πυριδίνη.



Σχήμα 2.3.1.2.

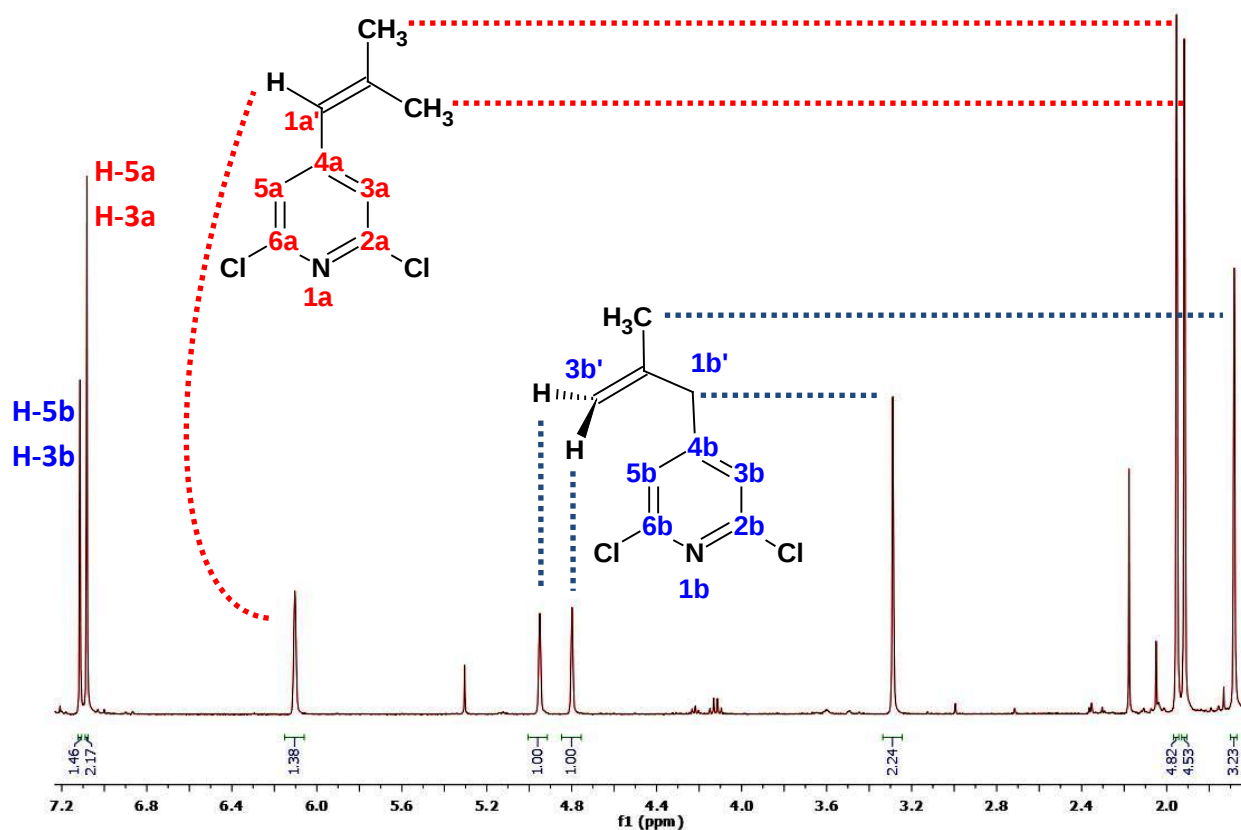
Έτσι, η σύνθεση της 2,6-διχλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)πυριδίνης επιχειρήθηκε με επίδραση ισοβουτυλοχλωριδίου επί του ανιόντος της 2,6-διχλωροπυριδίνης παρουσία n-βουτυλολιθίου στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , χωρίς όμως αποτέλεσμα, πιθανώς λόγω αφυδραλογονώσεως του ισοβουτυλοχλωριδίου. Συνεπώς, με επίδραση μεθυλοϊωδιδίου επί του ανιόντος της 2,6-διχλωροπυριδίνης παρασκευάστηκε η 2,6-διχλωρο-4-μεθυλοπυριδίνη (**67**, **Σχήμα 2.3.1.3.**), με σκοπό την εισαγωγή της ισοπροπυλομάδας στο 4-μεθύλιο της πυριδίνης, τα υδρογόνα του οποίου είναι αρκετά όξινα. Η επίδραση ισοπροπυλοβρωμιδίου στο ανιόν της πυριδίνης **67** παρουσία n-βουτυλολιθίου, ήταν ανεπιτυχής, αλλά με επίδραση ακετόνης ελήφθη η τριτοταγής αλκοόλη **68**.



a) *n*-BuLi, THF, -80 °C, CH<sub>3</sub>I; b) *n*-BuLi, THF, -80 °C, ακετόνη; c) Et<sub>3</sub>N, MsCl, THF, θερμοκρασία περιβάλλοντος; d) H<sub>2</sub>, EtOH, Ni-Raney.

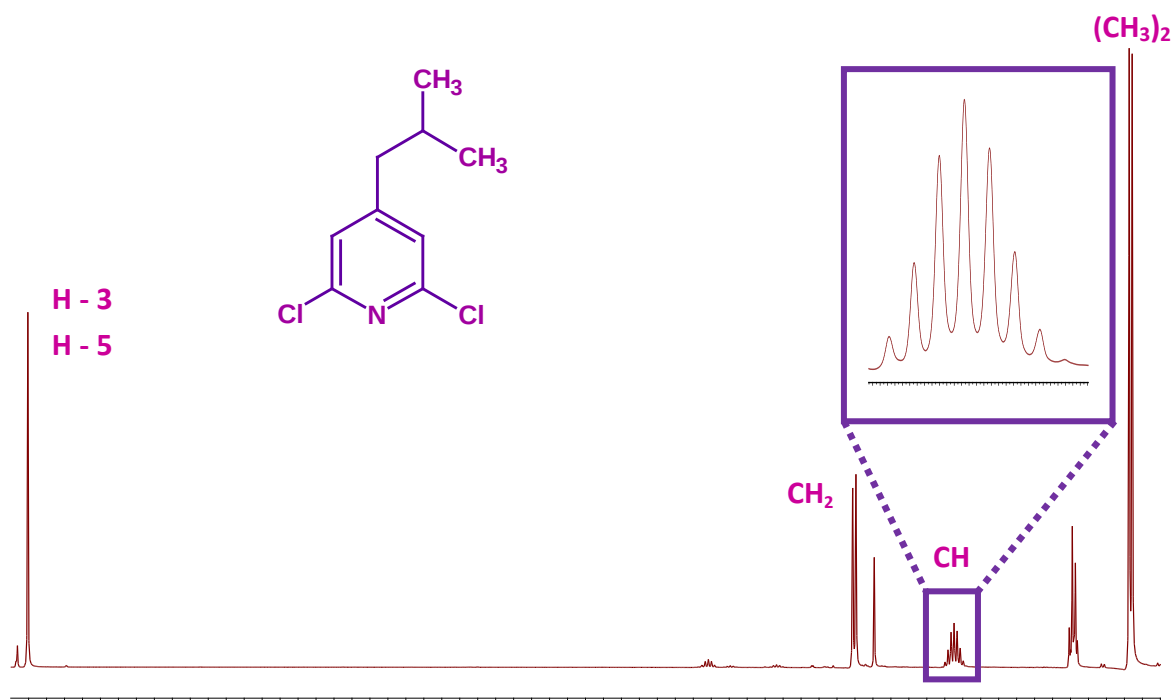
**Σχήμα 2.3.1.3.**

Η αλκοόλη **68** αφυδατώθηκε με επίδραση μεθανοσουλφονυλοχλωριδίου παρουσία τριαιθυλαμίνης, δίνοντας δύο ισομερή όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.3.1.3.**, ο διαχωρισμός των οποίων δεν κατέστη δυνατός με εφαρμογή των συνηθισμένων χρωματογραφικών τεχνικών. Από το φάσμα πρωτονίου του μίγματός τους (**Εικόνα 2.3.1.1.**) διακρίνονται οι δύο σχεδόν απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα gem-ολεφινικά πρωτόνια του ισομερούς **70** και συντονίζονται στα 4.94 ppm και 4.79 ppm αντίστοιχα, ενώ για το ισομερές **69** διακρίνεται εμφανώς η απλή κορυφή του ολεφινικού πρωτονίου της πλευρικής αλυσίδας (H-1a'), που συντονίζεται στα 6.10 ppm. Από την ολοκλήρωση των κορυφών αυτών προκύπτει ότι η αναλογία των ισομερών **69** / **70** είναι 1.4 / 1. Επιπρόσθετα, στο παράγωγο **70** είναι χαρακτηριστική η εμφάνιση της κορυφής του μεθυλενίου (3.29 ppm), και του μεθυλίου (1.68 ppm), ενώ στο ισομερές **69** τα υδρογόνα των μεθυλίων του ολεφινικού άνθρακα 2a' συντονίζονται στα 1.95 ppm και 1.91 ppm αντίστοιχα.



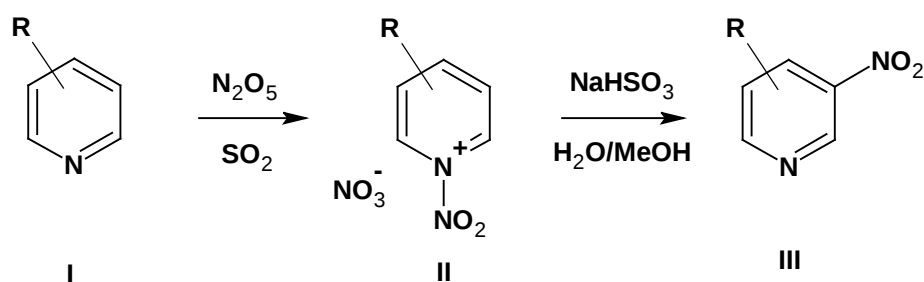
**Εικόνα 2.3.1.1.** Φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR του μίγματος των ισομερών **69** και **70**.

Στη συνέχεια το μίγμα υποβλήθηκε σε αντίδραση υδρογόνωσης παρουσία Νικελίου του Raney ως καταλύτη, οπότε παρελήφθη το διχλωροπαράγωγο **71**. Το προϊόν παρουσιάζει ακριβώς την ίδια πολικότητα με την πρώτη ύλη, αλλά στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR (**Εικόνα 2.3.1.2.**) είναι χαρακτηριστική η εξαφάνιση της κορυφής των ολεφινικών πρωτονίων και η παρουσία πια της πολλαπλής κορυφής του μεθινικού πρωτονίου της αλυσίδας στα 1.85 ppm.



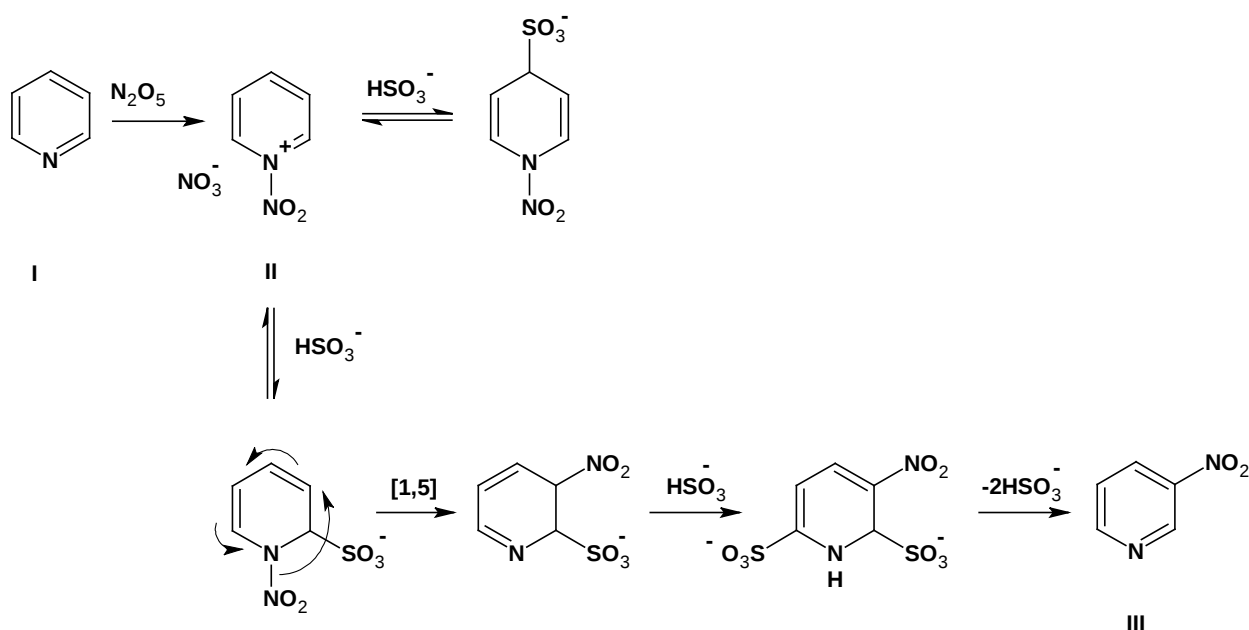
Εικόνα 2.3.1.2. Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του παραγώγου **71**.

Η νίτρωση της ισοβουτυλοπυριδίνης **71** με ατμίζον νιτρικό οξύ σε πυκνό θειικό οξύ, ήταν ανεπιτυχής. Είναι γνωστό ότι η νίτρωση της πυριδίνης και ιδιαίτερα των παραγώγων της που δε φέρουν ομάδα με χαρακτήρα ηλεκτρονιοδότη, είναι δύσκολη, επειδή αφενός η πυριδίνη είναι απενεργοποιημένη για ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση, και αφετέρου στις ιδιαίτερα όξινες συνθήκες της αντίδρασης το πυριδινικό άζωτο πρωτονιώνεται.<sup>214</sup> Έχει δε υπολογιστεί ότι ο δακτύλιος της πυριδίνης υφίσταται νίτρωση με ρυθμό αργότερο από το βενζόλιο κατά 10<sup>22</sup> φορές.<sup>215</sup> Στη δεκαετία του 1990 ο Bakke και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν ένα νέο τρόπο σύνθεσης 3-νιτροπυριδινών με επίδραση N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> σε υγρό SO<sub>2</sub>.<sup>216-218</sup> Κατά την αντίδραση αυτή σχηματίζεται το ενδιάμεσο ιόν του *N*-νιτροπυριδινίου **II**, από το οποίο με επίδραση όξινου θειώδους νατρίου λαμβάνεται η επιθυμητή 3-νιτροπυριδίνη (Σχήμα 2.3.1.4.).



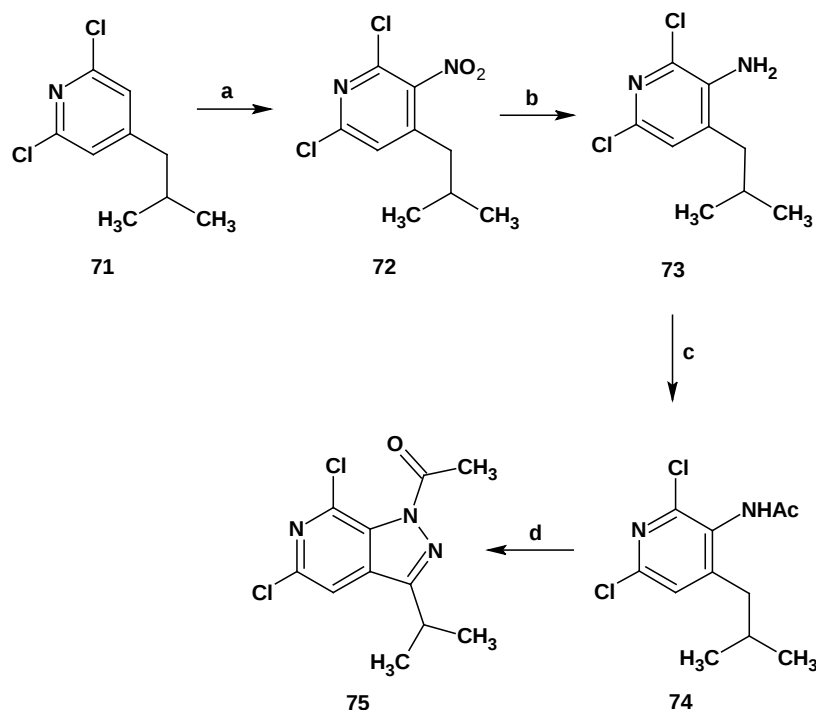
Σχήμα 2.3.1.4.

Ως προς τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της εν λόγω αντίδρασης,<sup>216,218,219</sup> έχουν αναφερθεί αρκετές μέθοδοι αντικατάστασης του δύσχρηστου υγρού διοξειδίου του θείου με απλούστερους διαλύτες όπως το νιτρομεθάνιο και με τη χρήση  $\text{NaHSO}_3$ . Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παραλλαγή της αντίδρασης από τον Katritzky και τους συνεργάτες του,<sup>220</sup> κατά την οποία με τη χρήση μίγματος νιτρικού οξέος/τριφθοροξικού ανυδρίτη παράγεται  $\text{N}_2\text{O}_5$  *in situ*. Οι αποδόσεις για τα 3-νιτροπαράγωγα της αντίδρασης αυτής είναι συγκρίσιμες ή και υψηλότερες σε σχέση με την μέθοδο του Bakke. Μελέτες του μηχανισμού<sup>220</sup> έχουν αποδείξει ότι δεν πρόκειται για ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση. Τα πρώτο στάδιο της αντίδρασης περιλαμβάνει το σχηματισμό του ιόντος της N-νιτροπυριδινίου II, στο οποίο πραγματοποιείται μια [1,5]σιγματροπική μετάθεση της νιτροομάδας από την 1 στην 3-θέση. (Σχήμα 2.3.1.5.)<sup>221-223</sup>



Σχήμα 2.3.1.5.

Το νιτροπαράγωγο **72** συντέθηκε με εφαρμογή της μεθόδου Katritzky σε απόδοση 50% (Σχήμα 2.3.1.6.). Είναι χαρακτηριστικό ότι στο φάσμα πρωτονίου το αρωματικό πρωτόνιο της πυριδίνης είναι εμφανώς αποθωρακισμένο και συντονίζεται στα 7.22 ppm, ενώ το αντίστοιχο πρωτόνιο του μη νιτρωμένου παραγώγου συντονίζεται στα 6.99 ppm. Αντίστοιχα στο φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR παρατηρείται αποθωράκιση για τον C-3, ο οποίος συντονίζεται στα 145.56 ppm. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αναγωγή της νιτροομάδας με διχλωριούχο κασσίτερο και ακετυλίωση της ενδιάμεσης αμινοπυριδίνης **73**. Το ακεταμίδιο **74** που παρελήφθη μετατράπηκε στη διχλωροπυραζολοπυριδίνη **75** μέσω ενδομοριακής κύκλωσης.

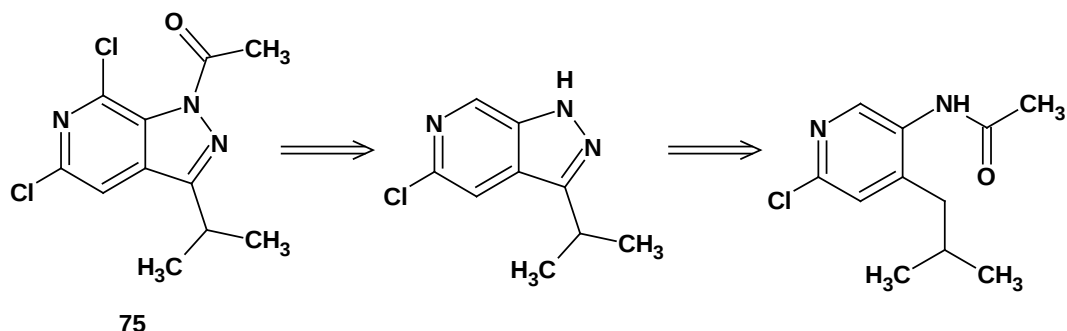


a) i)  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{HNO}_3$  ii)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ; b)  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{HCl}$  36%; c)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; d) νιτρώδες ισοαμύλιο,  $\text{AcOK}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , τολουόλιο, βρασμός.

Σχήμα 2.3.1.6.

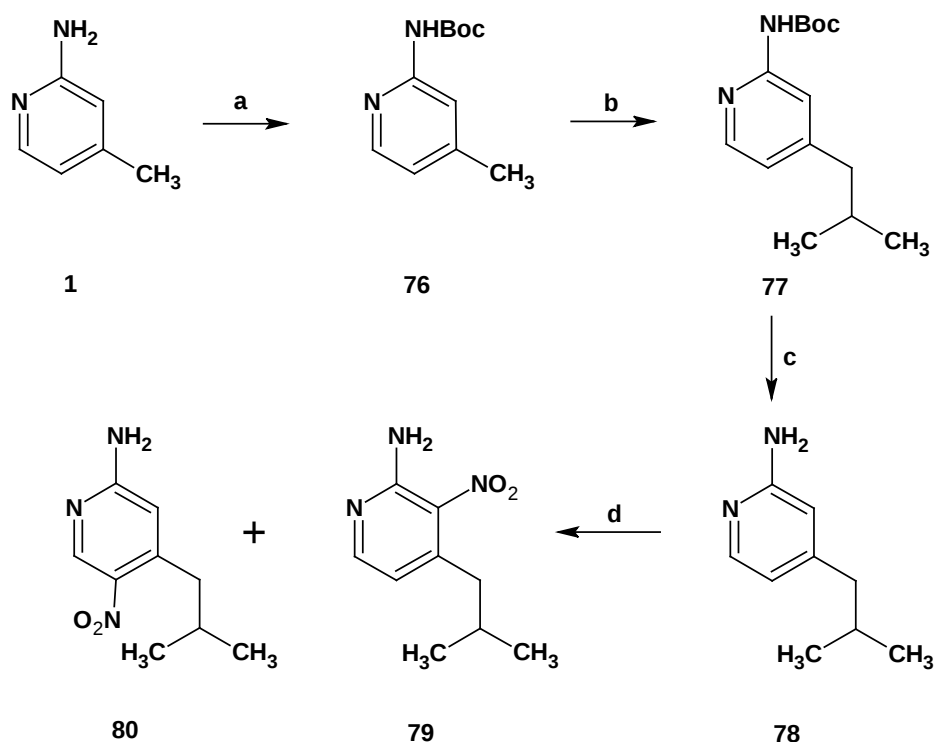
Η πορεία αυτή οδήγησε επιτυχώς στη λήψη της 1-ακετυλο-5,7-διχλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**75**), αλλά σε πολύ μικρή απόδοση της τάξεως 3-6% ενώ παράλληλα παρουσίασε πολλές πειραματικές δυσκολίες. Για το λόγο αυτό η πορεία σύνθεσης τροποποιήθηκε, καθώς το διχλωροπαραγώγο **75** μπορεί να παρασκευαστεί μέσω της 5-χλωρο-3-ισοπροπυλοπυραζολοπυριδίνης

(Σχήμα 2.3.1.7.) και αυτή από το *N*-[6-χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)πυριδιν-3-υλ]ακεταμίδιο.



Σχήμα 2.3.1.7.

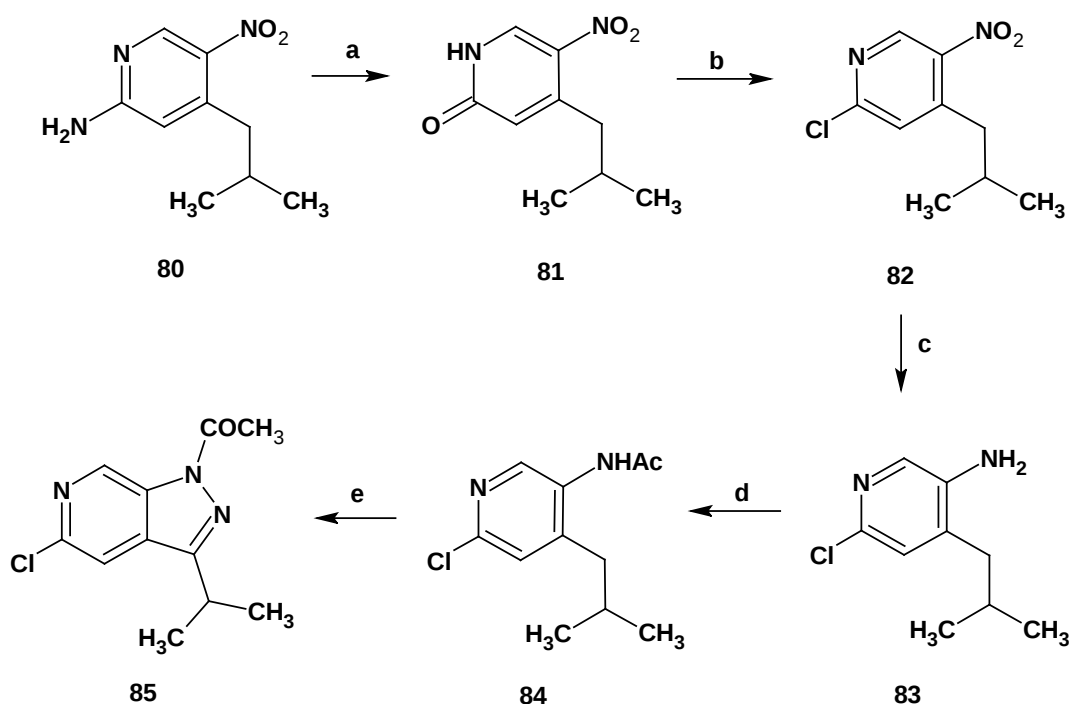
Έτσι, με επίδραση  $\text{Boc}_2\text{O}$  επί της πικολίνης **1** παρασκευάστηκε το καρβαμυδικό παράγωγο **76**, επί του ανιόντος του οποίου επέδρασε κατόπιν ισοπροπυλοβρωμίδιο στους  $-80^\circ\text{C}$ , για τη λήψη του παραγώγου **77**. Ακολούθησε ήπια όξινη υδρόλυση και νίτρωση της ενδιάμεσης αμίνης **78**, που οδήγησε στη λήψη μίγματος των ισομερών νιτροπαραγώγων **79** και **80** (Σχήμα 2.3.1.8.), τα οποία διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης silica gel.



a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ , *t*-BuOH, θερμοκρασία περιβάλλοντος; b) *n*-BuLi, THF,  $-80^\circ\text{C}$ , ισοπροπυλοβρωμίδιο; c) HCl 9%, θερμοκρασία περιβάλλοντος; d)  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $65^\circ\text{C}$ .

Σχήμα 2.3.1.8.

Ακολούθως η νιτροπυριδίνη **80** μετατράπηκε προς το αντίστοιχο διαζωνιακό άλας (Σχήμα 2.3.1.9.),<sup>165</sup> από το οποίο μετά από υδρόλυση παρελήφθη η 4-μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2-όλη, που βρίσκεται υπό τη σταθερή ταυτομερή δομή της πυριδινόνης **81**. Εν συνεχεία με επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου ελήφθη το χλωρίδιο **82**, αναγωγή του οποίου με διχλωριούχο κασσίτερο και ακετυλίωση της ενδιάμεσης αμίνης **83**, οδήγησε στο ακεταμίδιο **84**. Η σύνθεση της 1-ακετυλο-5-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλ)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**85**) έγινε με θερμική κύκλωση μετά από επίδραση νιτρώδους ισοαμυλίου παρουσία οξικού καλίου και οξικού ανυδρίτη σε βενζόλιο.

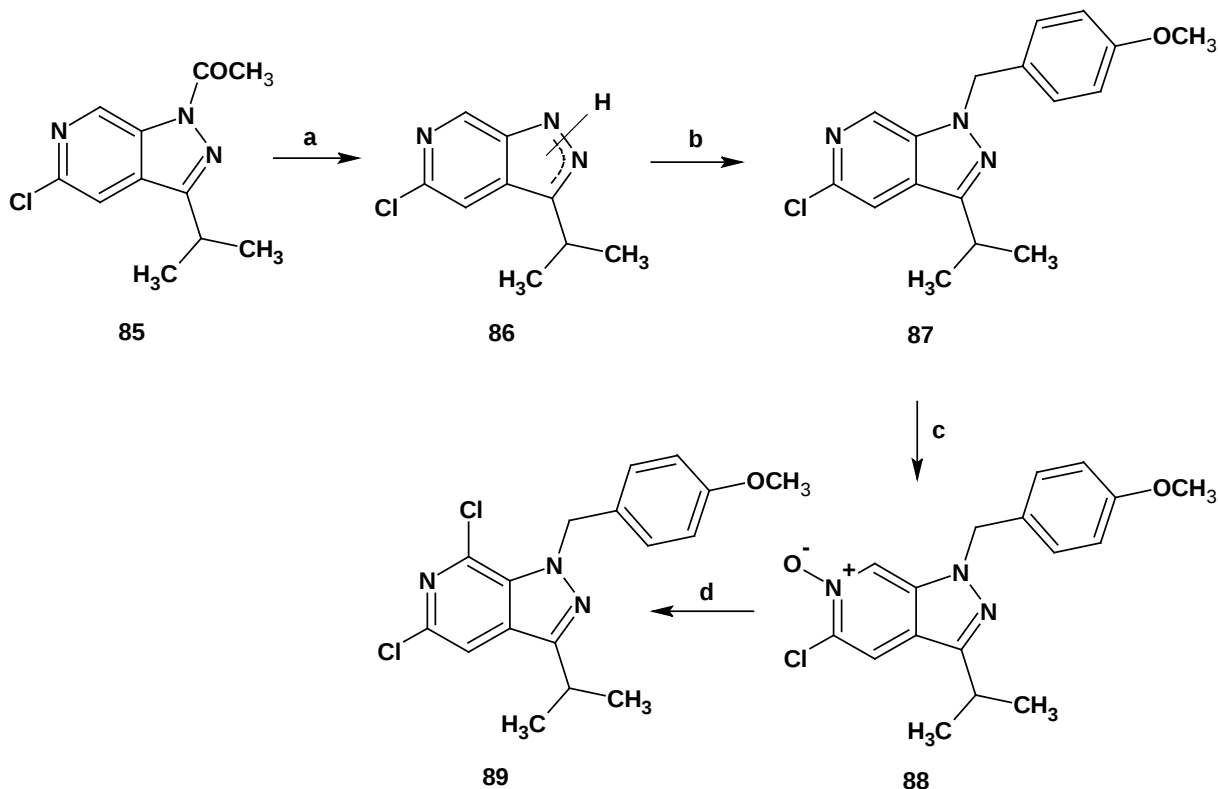


a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , θερμοκρασία περιβάλλοντος; b)  $\text{POCl}_3$ ; c)  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{HCl}$  36%; d)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; e) νιτρώδες ισοαμύλιο,  $\text{AcOK}$ ,  $\text{Ac}_2\text{O}$ , βενζόλιο, βρασμός.

Σχήμα 2.3.1.9.

Στη συνέχεια με διαβίβαση αέριας αμμωνίας στο μεθανολικό διάλυμα της πυραζολοπυριδίνης **85**, προέκυψε το απακετυλιωμένο μόριο **86** (Σχήμα 2.3.1.10.). Στο παράγωγο αυτό επέδρασε π-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο και παρελήφθη το προστατευμένο μόριο **87**. Η αντίδραση αυτή έδωσε μόνο το *N*-1 ισομερές, το οποίο ταυτοποιήθηκε με τη λήψη φασμάτων NMR μίας ( $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$ ) και δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC και NOESY). Το παράγωγο **87** αντέδρασε με μ-χλωροϋπερβενζοϊκό

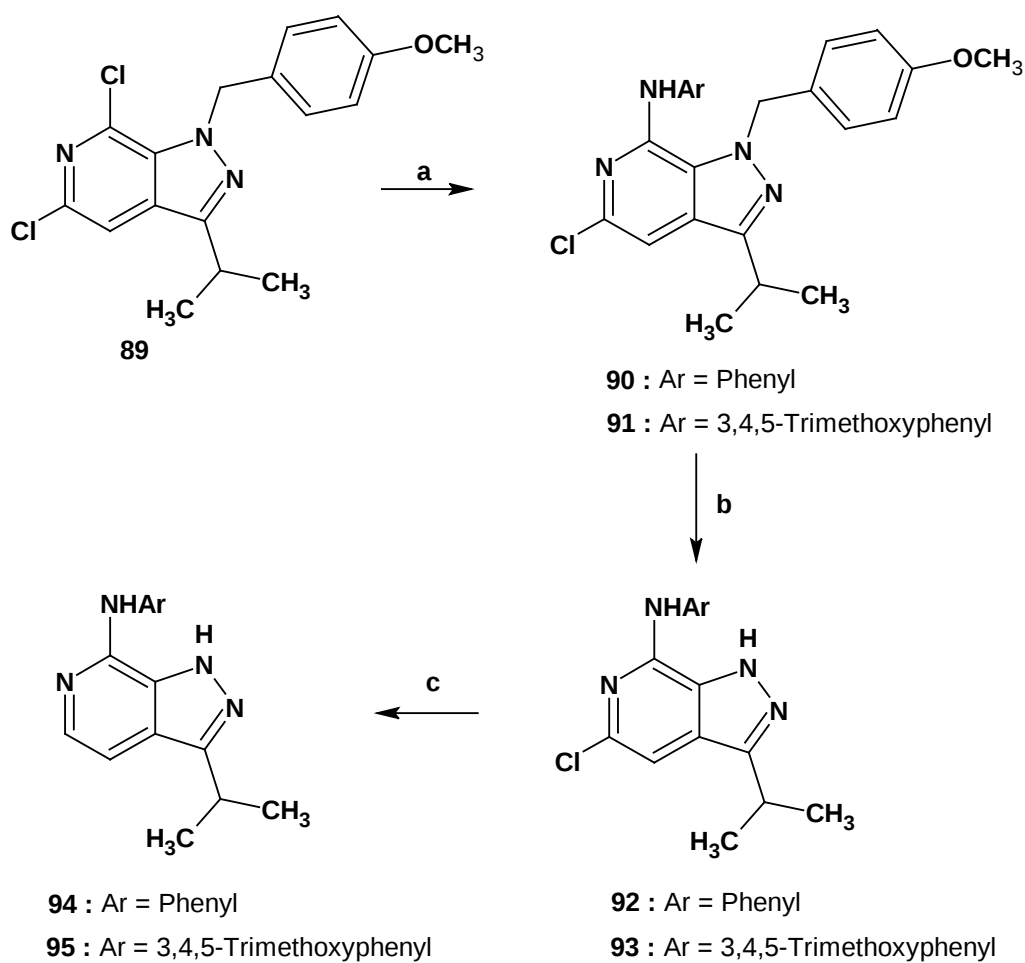
οξύ σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και οδήγησε στο *N*-οξείδιο **88**, από το οποίο μετά από μετάθεση παρουσία περίσσειας οξυχλωριούχου φωσφόρου εντός τετραϋδροφουρανίου παρελήφθη το διχλωροπαράγωγο **89**.



a) *gas NH<sub>3</sub>*, *MeOH*, θερμοκρασία περιβάλλοντος; b) *NaH*, *π-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο*, *THF*; c) *m-CPBA*, *CHCl<sub>3</sub>*, θερμοκρασία περιβάλλοντος; d) *POCl<sub>3</sub>*, *THF*, θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Σχήμα 2.3.1.10.**

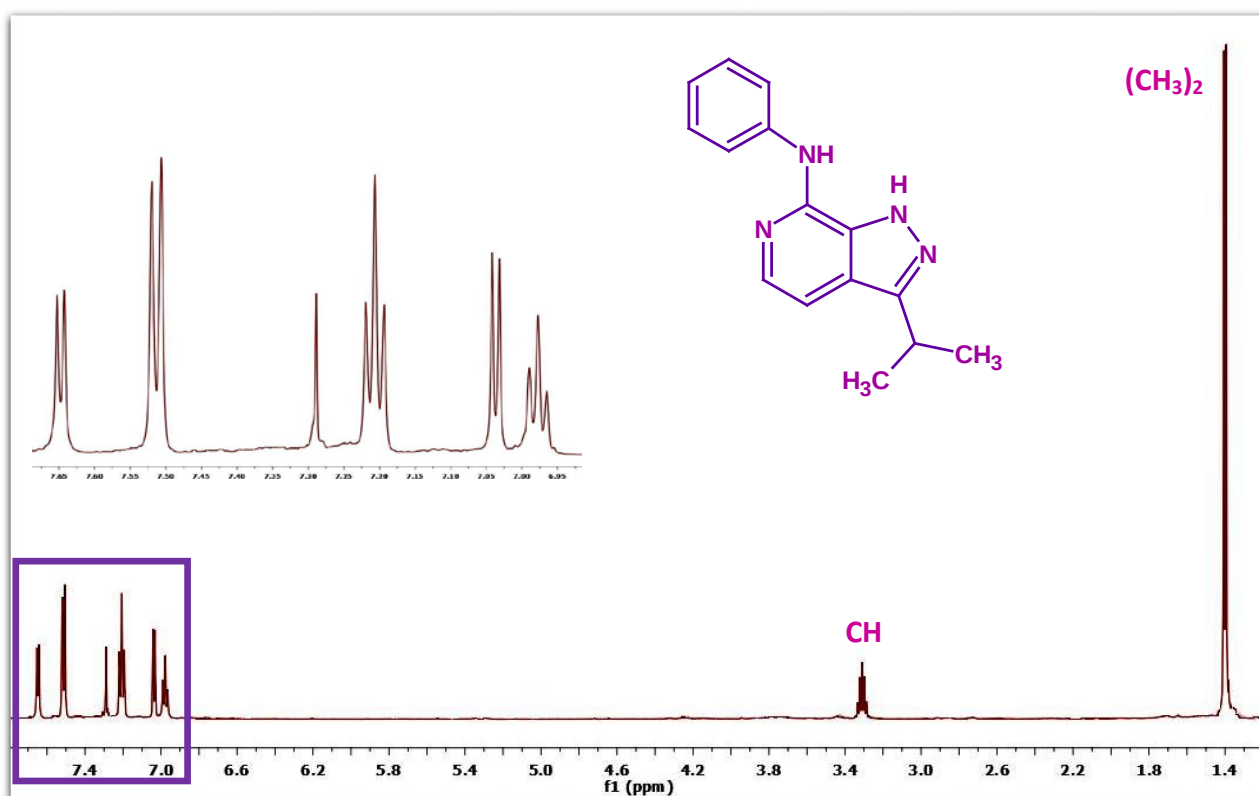
Ακολούθως παρασκευάστηκαν τα 7-υποκατεστημένα αμινοπαράγωγα **90** και **91** με αντίδραση αρωματικής πυρηνόφιλης υποκατάστασης των κατάλληλων αμινών επί του χλωροπαράγωγου **89** (Σχήμα 2.3.1.11.). Τα τελευταία με την επίδραση τριφθοροξικού οξέος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μετατράπηκαν στις αμινοϋποκατεστημένες πυραζολοπυριδίνες **92** και **93** αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αναγωγική αφαλογόνωση των αμινών αυτών με χρήση παλλαδίου επί άνθρακα ως καταλύτη παρουσία άνυδρου οξικού καλίου, και ανάδευση στα 50 psi σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, που οδήγησε στη λήψη των τελικών 7-αρυλαμινοπυραζολοπυριδινών **94** και **95**.



a)  $ArNH_2$ ,  $NaH$ ,  $DMF$ ,  $100\text{ }^\circ C$ ; b) τριφθοροξικό οξύ, θερμοκρασία περιβάλλοντος; c)  $H_2$ ,  $Pd-C$ ,  $AcOK$ ,  $EtOH$ .

**Σχήμα 2.3.1.11.**

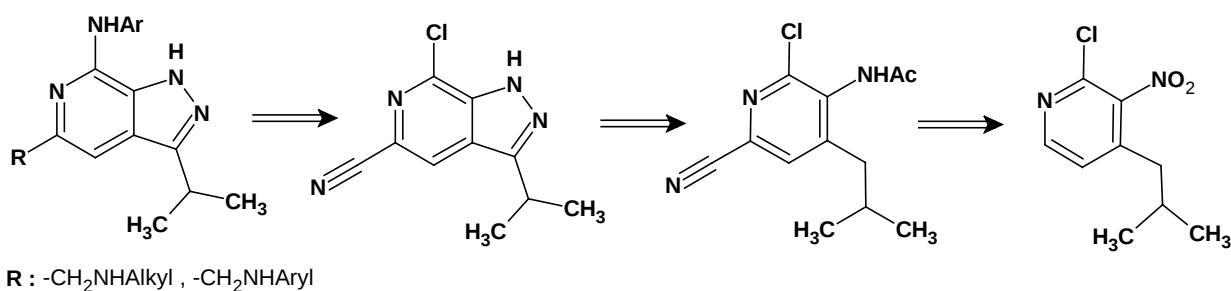
Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου της 3-(1-μεθυλαιθυλο)-N-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνης (**94**, **Εικόνα 2.3.1.3.**).



**Εικόνα 2.3.1.3.** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της 3-(1-μεθυλαιθυλο)-N-φαινυλο-1H-πυραζολο [3,4-c]πυριδιν-7-αμίνης (**94**).

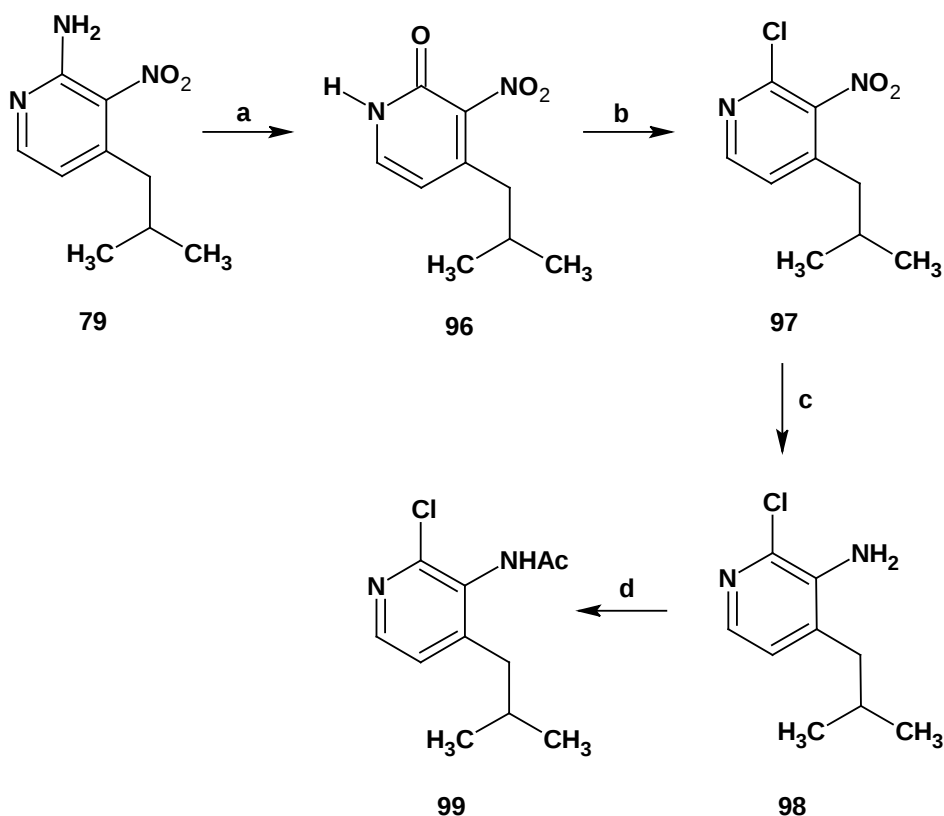
### 2.3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III, $R = -\text{CN}$ , $-\text{CH}_2\text{NHAr}$ , $-\text{CH}_2\text{NHR}$

Για την παρασκευή των 5-αμινομεθυλο-υποκατεστημένων 3-ισοπροπυλο-πυραζολοπυριδινών, ένα πιθανό συνθετικό σχήμα αφορά στην αναγωγή της κυανομάδας της 7-χλωρο-5-κυανο-3-ισοπροπυλοπυραζολοπυριδίνης και κατόπιν την αναγωγική αμίνωση της ενδιάμεσης αμίνης (**Σχήμα 2.3.2.1**). Το νιτρίλιο, μπορεί να προέλθει από το αντίστοιχο ακεταμίδιο, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να προκύψει από τη 2-χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-νιτροπυριδίνη, ακολουθώντας πορεία ανάλογη με αυτήν των 5-υποκατεστημένων αναλόγων του τύπου I (**Σχήμα 2.1**).



Σχήμα 2.3.2.1.

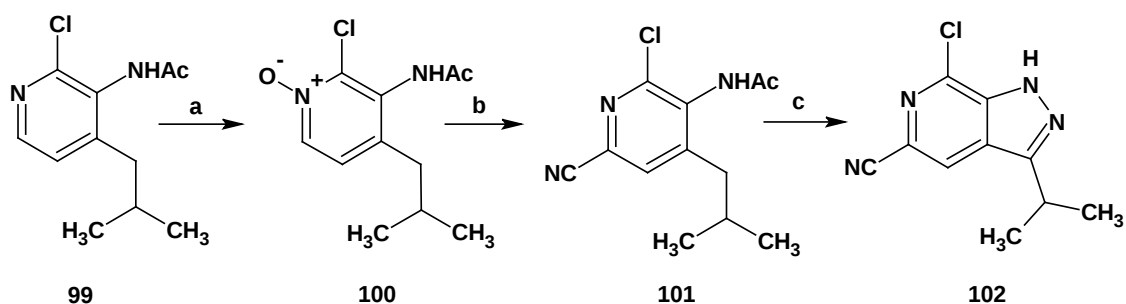
Για την παρασκευή του 3-νιτροπαραγώγου του Σχήματος 2.3.2.1., ακολουθήθηκε αλληλουχία αντιδράσεων σύνθεσης ανάλογη αυτής του μορίου **85** (Σχήμα 2.3.1.9.), λαμβάνοντας ως πρώτη ύλη το ισομερές νίτρωσης **79**. Αρχικά, μετά από διαζώτωση και υδρόλυση του ενδιάμεσου διαζωνιακού άλατος, παρελήφθη η πυριδινόνη **96** (Σχήμα 2.3.2.2.), από την οποία με επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αναγωγή του ενδιάμεσου χλωριδίου **97**, με διχλωριούχο κασσίτερο σε πυκνό υδροχλωρικό οξύ, παρασκευάστηκε η αμίνη **98**. Το μόριο αυτό ακετυλιώθηκε και παρελήφθη το ακεταμίδιο **99**.



a) NaNO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, θερμοκρασία περιβάλλοντος; b) POCl<sub>3</sub>; c) SnCl<sub>2</sub>, HCl 36%; d) (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Σχήμα 2.3.2.2.

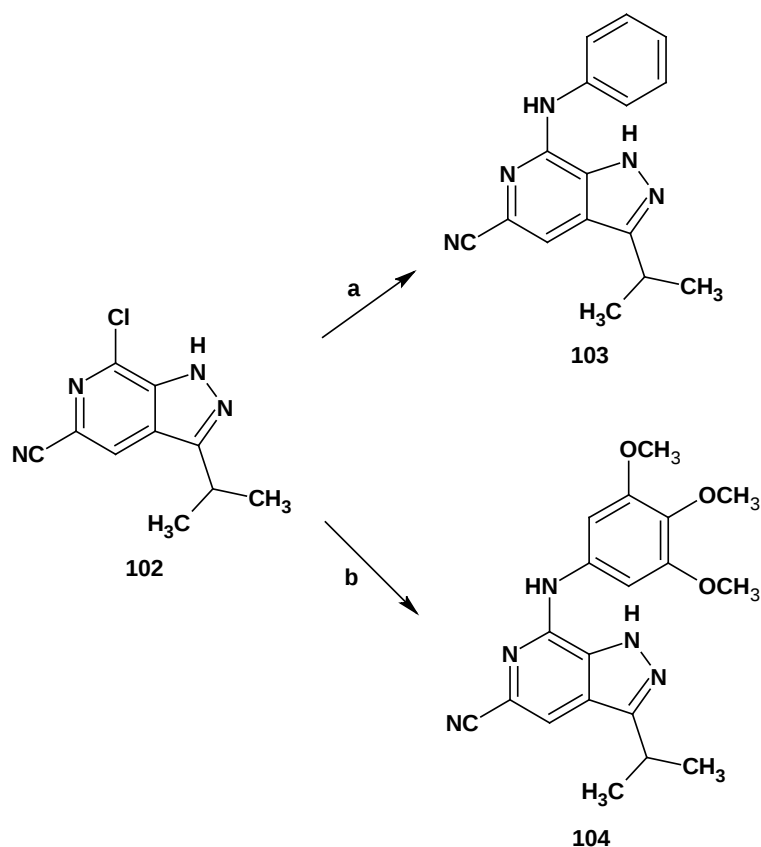
Το ακεταμίδιο **99** αντέδρασε με μ-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ για τη λήψη του *N*-οξειδίου **100** (Σχήμα 2.3.2.3.). Μετάθεση του *N*-οξειδίου, με επίδραση τριμεθυλοσιλυλοκυανιδίου (TMSCN) ως δότη κυανομάδας, παρουσία διαιθυλοκαρβαμυλοχλωριδίου ως βάσης, και χρήση μικροκυματικής ακτινοβολίας, οδήγησε στο νιτρίλιο **101**, το οποίο στη συνέχεια κύκλωσε προς το επιθυμητό παράγωγο **102**, χωρίς να παραληφθεί η ενδιάμεση ακετυλιωμένη πυραζολοπυριδίνη.



a) *m*-CPBA, CHCl<sub>3</sub>, θερμοκρασία περιβάλλοντος; b) TMSCN, ακετονιτρίλιο, βρασμός; c) νιτρώδες ισοαμύλιο, AcOK, Ac<sub>2</sub>O, βενζόλιο, βρασμός.

Σχήμα 2.3.2.3.

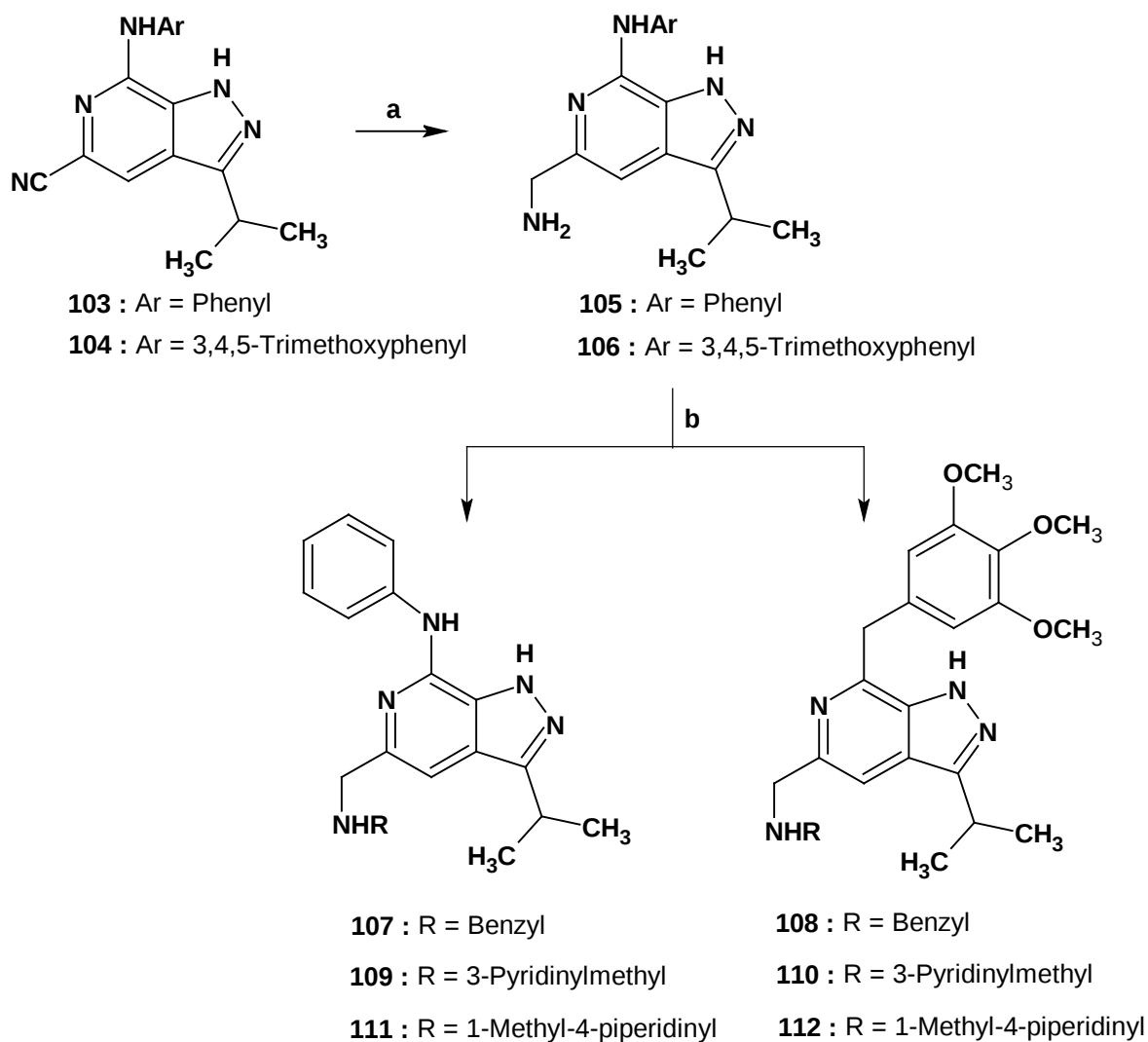
Με επίδραση της κατάλληλης αρωματικής αμίνης στο παράγωγο **102** παρασκευάστηκαν οι τελικές αμίνες **103** και **104** (Σχήμα 2.3.2.4.). Η πυρηνόφιλη υποκατάσταση πραγματοποιήθηκε απουσία βάσης, με βρασμό εντός ανιλίνης για το παράγωγο **103**, ενώ για το παράγωγο **104**, με επίδραση περίσσειας της 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνης εντός άνυδρου DMSO.



*a) ανιλίνη, θρασμός; b) 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνη, άνυδρο DMSO.*

#### Σχήμα 2.3.2.4.

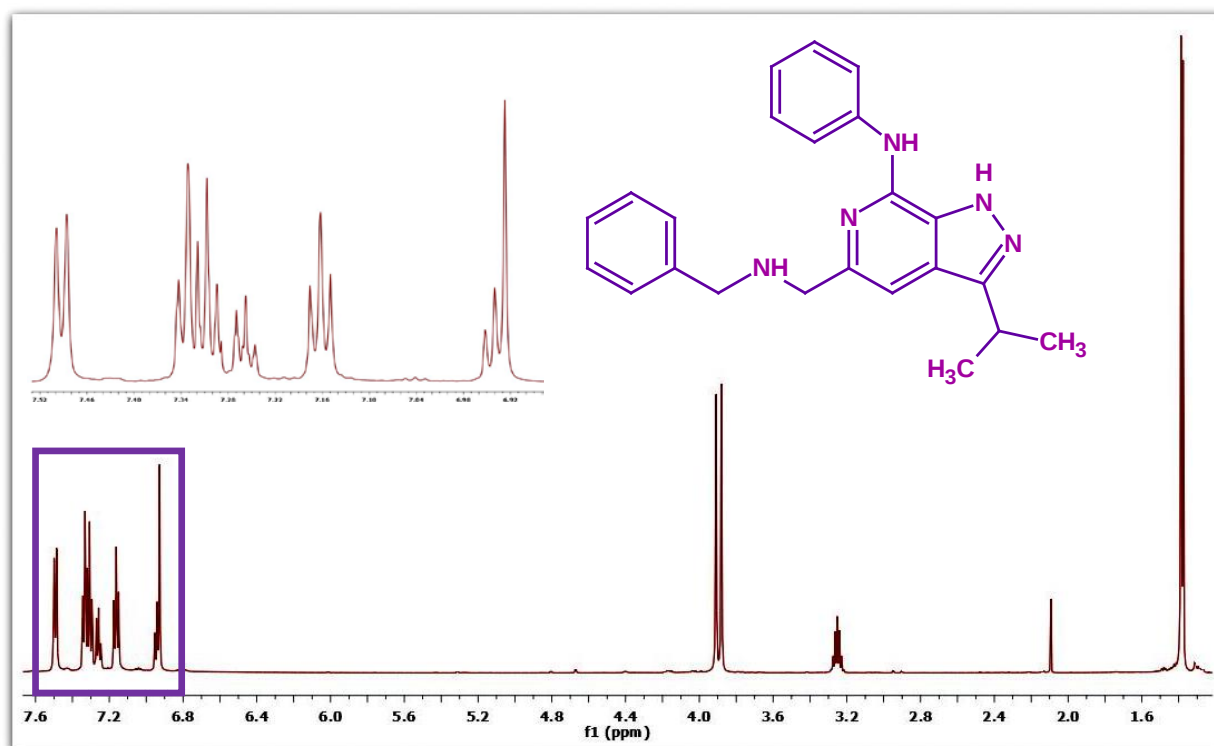
Ακολούθησε αναγωγή των παραγώγων **103** και **104** με επίδραση λιθιοαργιλιοϋδριδίου σε ζέον τετραϋδροφουράνιο που οδήγησε στη λήψη των αμινοπαραγώγων **105** και **106** αντίστοιχα (Σχήμα 2.3.2.5.). Στα μόρια αυτά πραγματοποιήθηκε αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης με επίδραση της κατάλληλης αλδεΐδης ή κετόνης και αναγωγή της ενδιάμεσης βάσης του Schiff, και παρασκευάστηκαν τα τελικά δισυποκατεστημένα παράγωγα **107 – 112**.



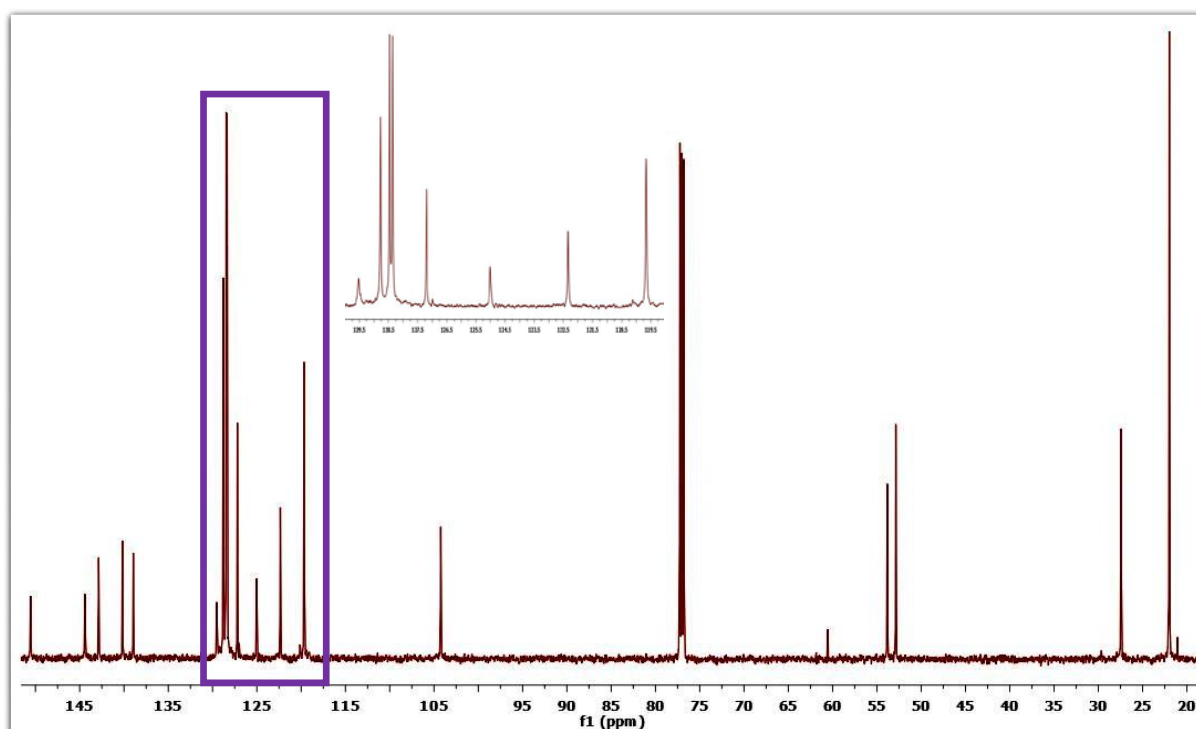
a)  $\text{LiAlH}_4$ , THF, 80 °C; b) Αλδεΐδη ή κετόνη,  $\text{NaBH}_4$ , αιθανόλη απόλυτη.

#### Σχήμα 2.3.2.5.

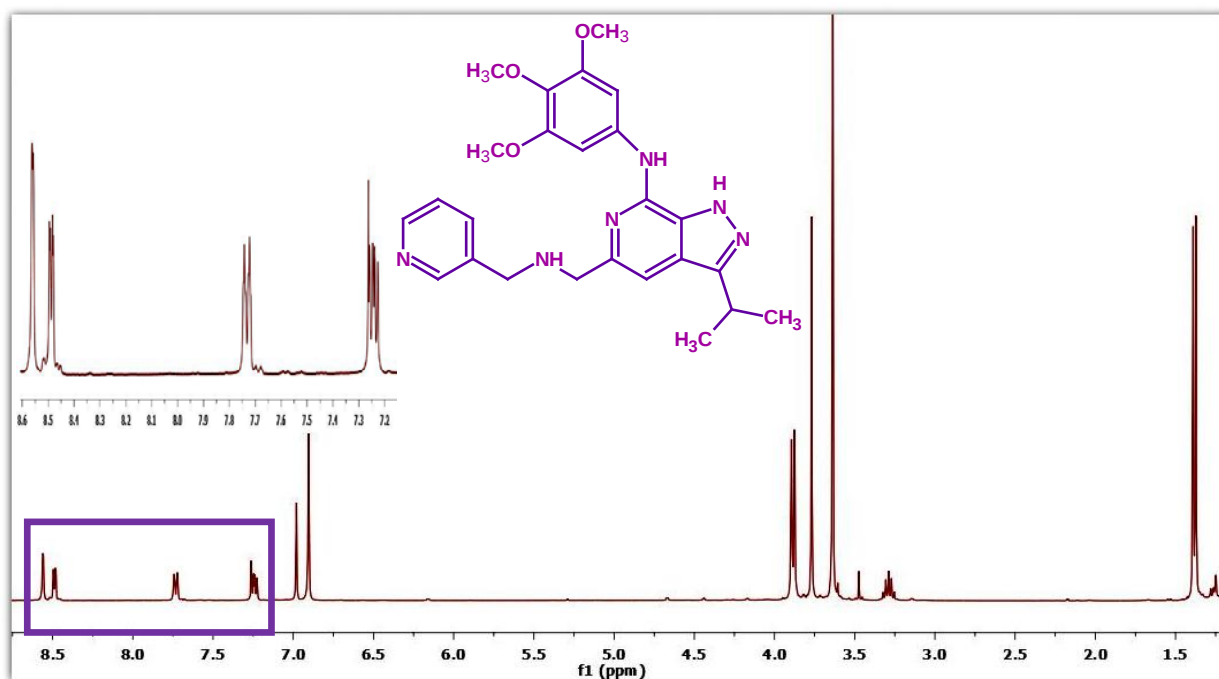
Παρατίθενται ενδεικτικά τα φάσματα πρωτονίου και άνθρακα για τα τελικά προϊόντα **107** (Εικόνες 2.3.2.1. και 2.3.2.2. αντίστοιχα) και **110** (Εικόνες 2.3.2.3. και 2.3.2.4. αντίστοιχα).



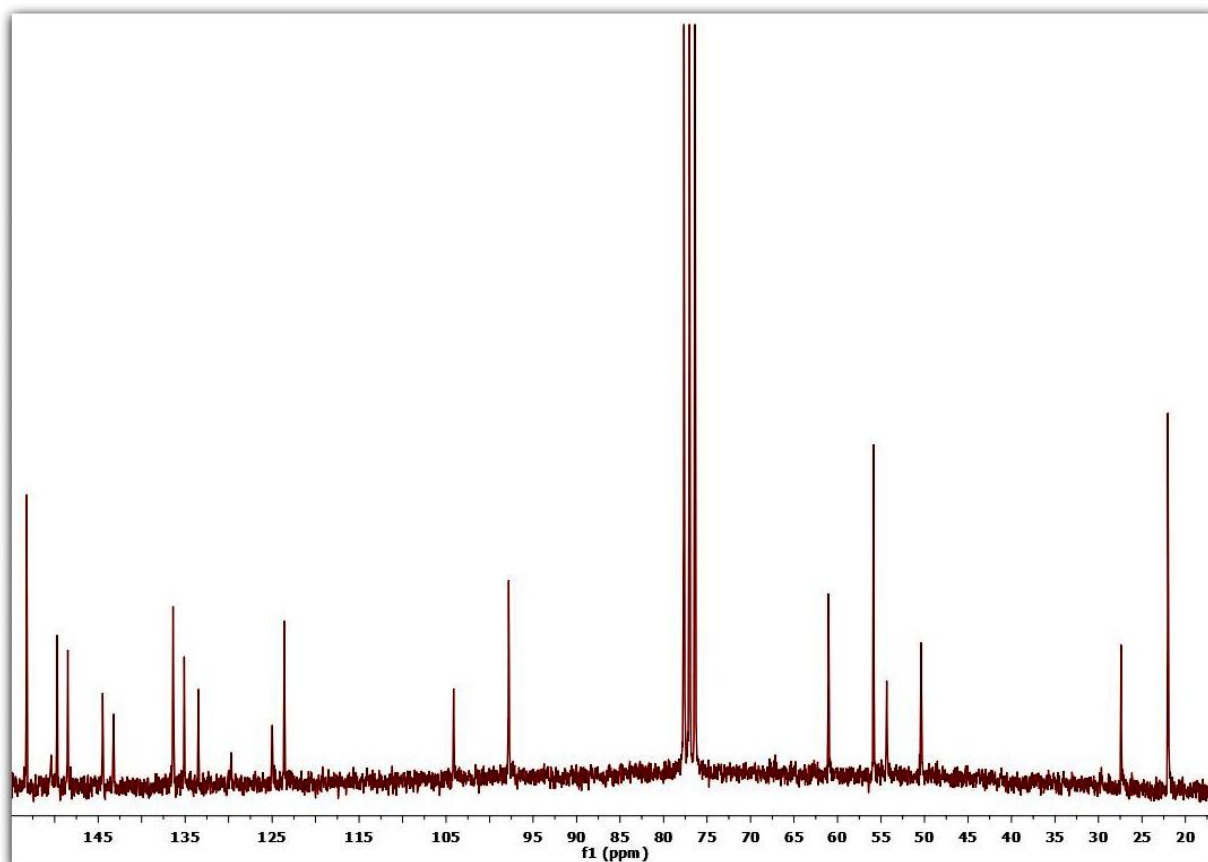
**Εικόνα 2.3.2.1.** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της *N*-φαινυλομεθυλο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-7-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**107**).



**Εικόνα 2.3.2.2.** Φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  της *N*-φαινυλομεθυλο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-7-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**107**).



**Εικόνα 2.3.2.3.** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της *N*-(πυριδιν-3-υλομεθυλο)-{3-(1-μεθυλαιθυλο)-7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**110**).



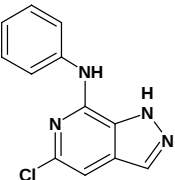
**Εικόνα 2.3.2.4.** Φάσμα  $^{13}\text{C-NMR}$  της *N*-(πυριδιν-3-υλομεθυλο)-{3-(1-μεθυλαιθυλο)-7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-υλο}μεθαναμίνης (**110**).

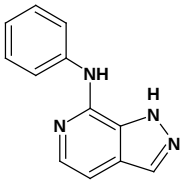
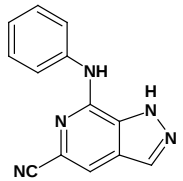
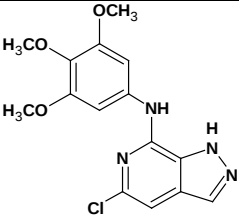
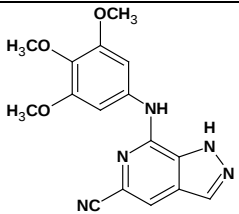
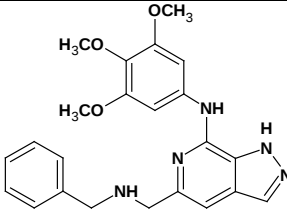
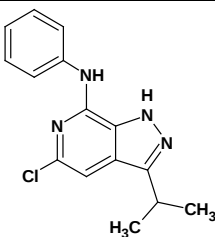
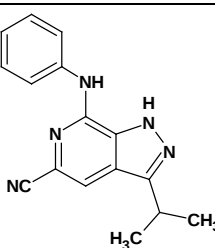
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

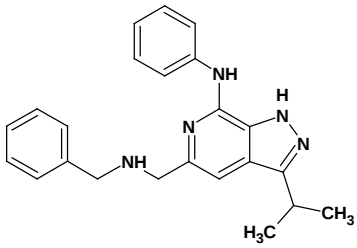
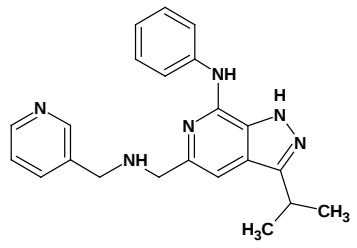
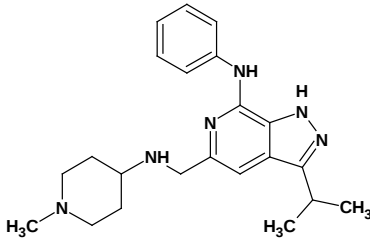
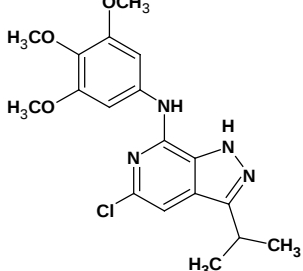
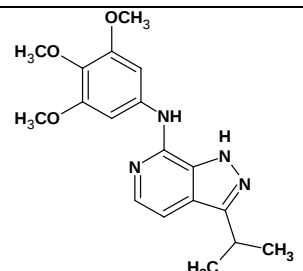
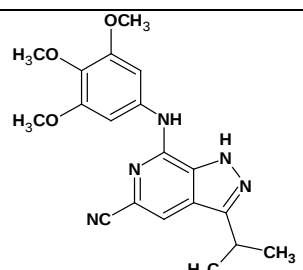
Η φαρμακολογική αξιολόγηση των νέων ενώσεων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται στο Ερευνητικό κέντρο City of Hope (City of Hope Comprehensive Cancer Center, Molecular Medicine, Beckman Research Institute, Duarte, CA, USA) και στην Ακαδημία Αθηνών, σε συνεργασία με το Πανεπιστήμιο των Ιωαννίνων (Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Genetics Division, Biomedical Research Institute of Ioannina, Foundation of Research and Technology).

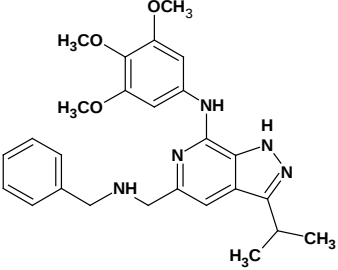
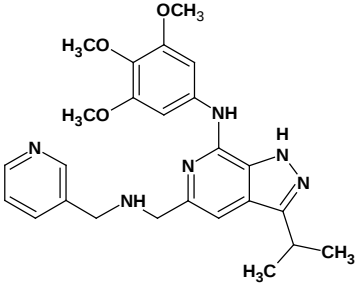
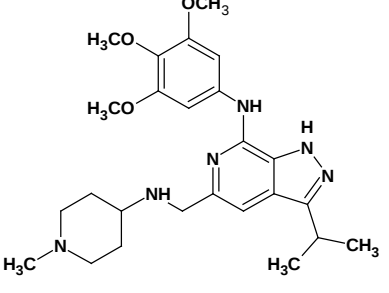
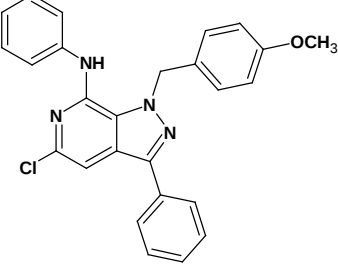
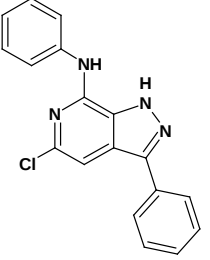
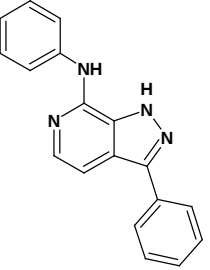
Η in vitro μελέτη της κυτταροστατικής δράσης έχει ολοκληρωθεί για τις ακόλουθες καρκινικές κυτταρικές σειρές: μελάνωμα A2058, παγκρεατική σειρά MIA-PaCa2, προστατική σειρά DU145, καρκίνος ωοθηκών SCOV 3, λευχαιμική σειρά KCL-22 CML, καθώς και η αντίστοιχη μεταλλαγμένη χημειοανθεκτική σειρά T315I (mutant KCL-22 CML). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 1**, όπου παρουσιάζεται η % επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μετά την επίδραση συγκέντρωσης διαλύματος 10  $\mu$ M των παραγώγων. Εμφανίζονται μόνον όσα μόρια έδειξαν ενδιαφέρουσα δραστηριότητα σε κάποιες από τις παραπάνω καρκινικές σειρές και δεν συμπεριελήφθησαν όσα παράγωγα παρουσίασαν επιβίωση των κυττάρων >65% σε όλες τις σειρές που μελετήθηκαν.

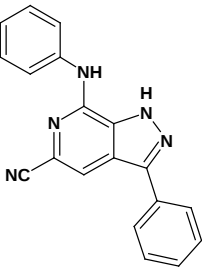
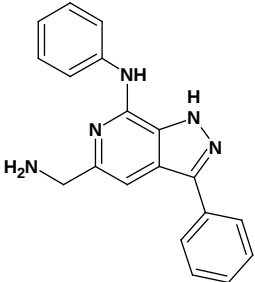
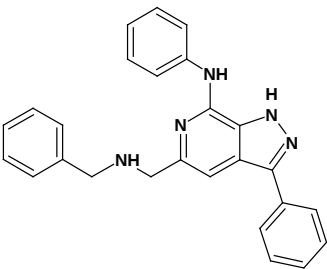
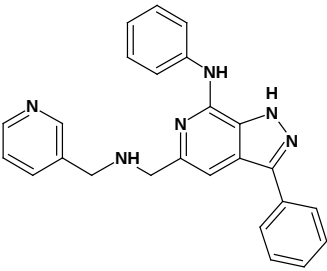
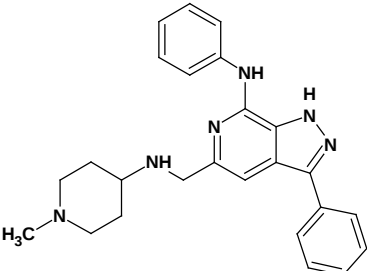
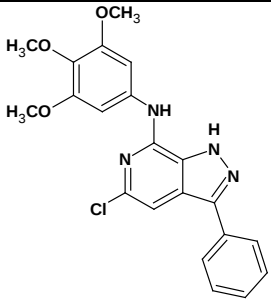
**Πίνακας 1.** % Επιβίωση σε συγκέντρωση προϊόντος 10  $\mu$ M.

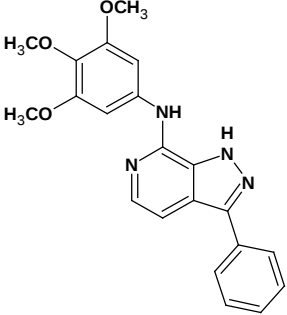
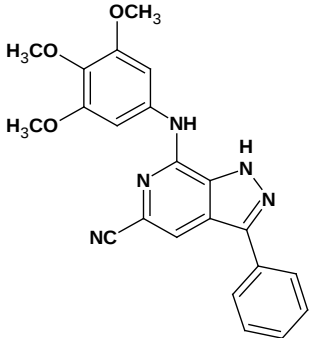
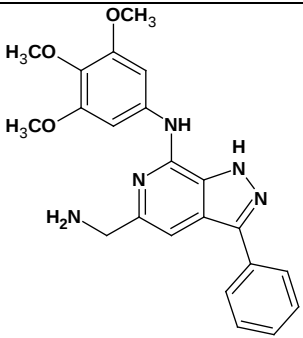
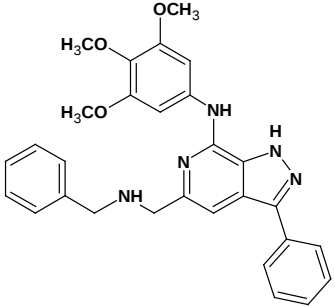
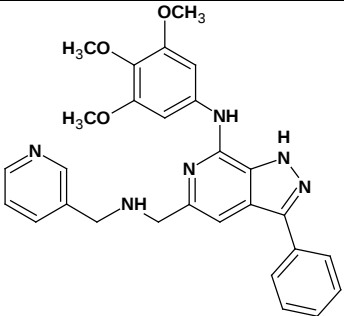
| ΠΑΡΑΓΩΓΑ                                                                            |           | ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ |       |       |       |            |                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------|-------|-------|-------|------------|------------------|
|                                                                                     |           | PaCa2                        | SCOV3 | DU145 | A2058 | KCL-22 CML | T315I KCL-22 CML |
|  | <b>23</b> | >65                          | >65   | >65   | 58    | >65        | 63               |

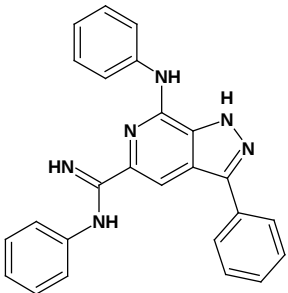
|                                                                                     |            |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | <b>25</b>  | 63  | >65 | >65 | >65 | >65 | >65 |
|    | <b>30</b>  | >65 | >65 | 60  | 50  | 58  | 55  |
|    | <b>24</b>  | >65 | >65 | >65 | 61  | 54  | 42  |
|   | <b>31</b>  | 61  | 55  | >65 | 63  | >65 | 48  |
|  | <b>35</b>  | 48  | >65 | >65 | >65 | 43  | 56  |
|  | <b>92</b>  | 63  | 42  | 62  | >65 | 50  | 53  |
|  | <b>103</b> | 43  | >65 | 37  | 32  | >65 | 54  |

|                                                                                     |            |    |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | <b>107</b> | 3  | 7   | 18  | 4   | 10  | 24  |
|    | <b>109</b> | 56 | >65 | >65 | 65  | >65 | >65 |
|    | <b>111</b> | 56 | >65 | >65 | >65 | >65 | >65 |
|  | <b>93</b>  | 37 | 13  | 26  | 28  | 21  | 56  |
|  | <b>95</b>  | 36 | 49  | 52  | 15  | 33  | 48  |
|  | <b>104</b> | 54 | >65 | >65 | 36  | 62  | >65 |

|                                                                                     |            |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | <b>108</b> | 33  | >65 | >65 | 15  | >65 | 63  |
|    | <b>110</b> | 61  | >65 | >65 | >65 | >65 | >65 |
|   | <b>112</b> | >65 | 61  | >65 | >65 | >65 | >65 |
|  | <b>45</b>  | 55  | >65 | >65 | >65 | >65 | >65 |
|  | <b>47</b>  | 42  | 28  | 27  | 31  | 24  | 34  |
|  | <b>49</b>  | 42  | 40  | 39  | 23  | 34  | 56  |

|                                                                                     |           |    |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | <b>54</b> | 18 | 17  | 23  | 10  | 16  | 27  |
|    | <b>58</b> | 22 | 30  | 20  | 10  | 23  | 31  |
|   | <b>60</b> | 14 | 12  | 33  | 7   | 15  | 31  |
|  | <b>62</b> | 53 | >65 | >65 | >65 | >65 | >65 |
|  | <b>64</b> | 51 | >65 | >65 | >65 | >65 | >65 |
|  | <b>48</b> | 43 | 5   | 27  | 27  | 35  | 39  |

|                                                                                     |           |    |     |    |    |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|-----|----|----|-----|-----|
|    | <b>50</b> | 32 | 39  | 26 | 14 | 12  | 21  |
|    | <b>57</b> | 12 | 9   | 22 | 4  | 17  | 25  |
|   | <b>59</b> | 26 | 45  | 63 | 4  | 34  | 32  |
|  | <b>61</b> | 20 | 5   | 24 | 1  | 3   | 16  |
|  | <b>63</b> | 34 | >65 | 55 | 44 | >65 | >65 |

|                                                                                   |           |   |     |   |     |   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|---|-----|---|-----|---|----|
|  | <b>53</b> | 8 | 0.5 | 1 | 0.7 | 6 | 15 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|---|-----|---|-----|---|----|

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων μπορεί να εξαχθούν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

❖ **Οι πυραζολοπυριδίνες που δεν φέρουν 3-υποκαταστάτη (γενικός τύπος I)** εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερη δράση, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα 3-υποκατεστημένα ανάλογα. Από αυτά τα μόρια, σχετικά αξιόλογη δράση έδειξαν τα **30** και **31**, τα οποία φέρουν 5-κυανομάδα, ενώ αυτό που έχει την 7-τριμεθοξυφαινυλαμινομάδα (**31**) εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερο εύρος δράσης, που όμως και πάλι μόνον οριακά μπορεί να χαρακτηριστεί ικανοποιητική. Αξιοσημείωτο είναι ότι αυτά που δεν φέρουν 5-υποκαταστάτη ή φέρουν μόνο 5-Cl, δεν έχουν αξιόλογη δράση, ενώ από τα παράγωγα που είναι δυσυποκατεστημένα με ογκωδέστερες ομάδες, μόνο το **35** έδειξε να έχει μια μικρή δράση έναντι της παγκρεατικής και της λευχαιμικής σειράς.

❖ **Σε ότι αφορά στα 3-ισοπροπυλοϋποκατεστημένα παράγωγα (γενικός τύπος III)**, σε αντίθεση με την προηγούμενη κατηγορία, τα 5-χλωροπαράγωγα **92** και **93** έχουν αξιόλογη δράση και εύρος δραστηριότητας. Ιδιαίτερα το δεύτερο με τον ογκωδέστερο και πλέον πλούσιο σε ηλεκτρόνια 7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-υποκαταστάτη, αναστέλλει κατά 50-90% την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων στις σειρές που μελετήθηκαν. Αντίστοιχα καλή δράση εμφανίζει και το 3,7-δυσυποκατεστημένο παράγωγο **95**, όχι όμως και το 7-φαινυλαμινο-ανάλογό του **94**. Τα 5-κυανο-παράγωγα **103** και **104** εμφανίζουν αξιόλογη δράση μόνον έναντι της σειράς μελανώματος A2058, όπου επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων κατά 70%. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε αυτή την κατηγορία παραγώγων παρουσιάζει το **107**, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη τριών καρκινικών σειρών, συγκεκριμένα των ωοθηκών SCOV 3, του μελανώματος A2058

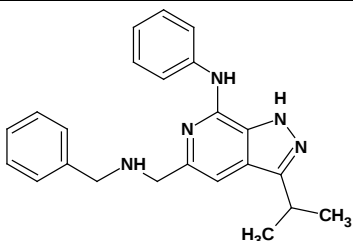
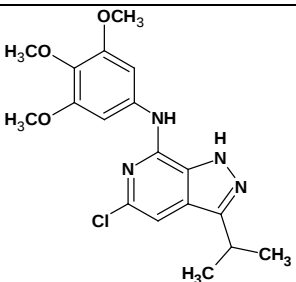
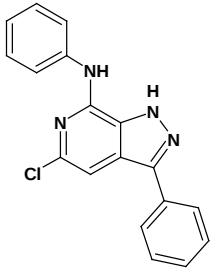
και του παγκρέατος MIA-PaCa2, σε ποσοστό 95% περίπου, ενώ έχει ελαφρά ασθενέστερη δράση έναντι των υπολοίπων τριών σειρών. Παρόλα αυτά τα **109**, **111** και **108**, **110**, **112**, που έχουν ανάλογη δομή, φέροντας υποκατεστημένη την 5-μεθυλαμινομάδα, δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα, με την εξαίρεση του **108**, που διαθέτει αξιόλογη δράση έναντι της A2058 σειράς.

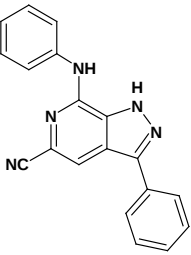
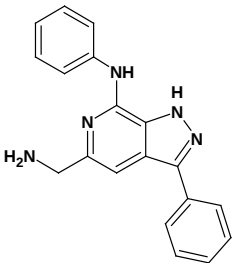
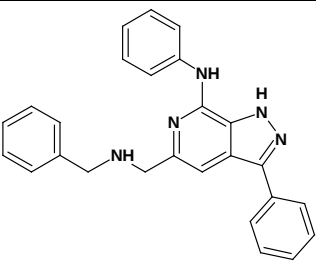
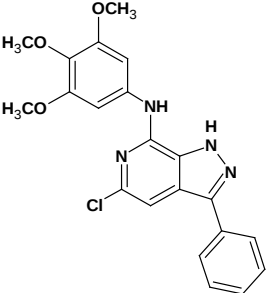
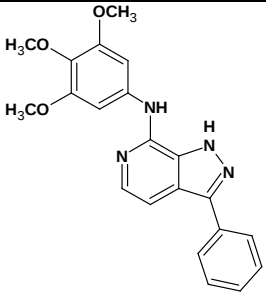
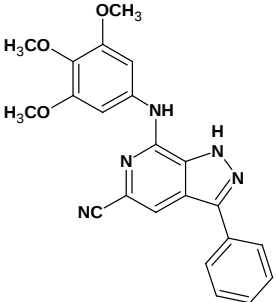
❖ Μακράν δραστικότερα των υπολοίπων εμφανίζονται τα **3-φαινυλο παράγωγα (γενικός τύπος II)**. Από αυτά, τα 5-χλωροπαράγωγα **47** και **48** παρουσιάζουν αξιόλογη δράση έναντι όλων των κυτταρικών σειρών, όπου ξεχωρίζει η σημαντική αναστολή της ανάπτυξης (95%) που επιφέρει το **48** στην ωοθηκική σειρά SCOV3. Αξιοσημείωτη είναι η απώλεια της δραστικότητας των αντίστοιχων χλωροπαραγώγων **45** και **46** που φέρουν την προστατευτική ομάδα (π-μεθοξυβενζυλομάδα) στην θέση 1. Τα 3,7-δισυποκατεστημένα μόρια **49**, **50** παρουσιάζονται σχετικά δραστικά, ενώ το **50** που φέρει την πλέον ογκώδη 7-υποκατάσταση έχει σημαντικότερη δράση, γεγονός που παρατηρήθηκε επίσης και στην περίπτωση των 3-ισοπροπυλοπαραγώγων. Σε ότι αφορά στα 5-κυανοπαράγωγα και πάλι τα 1-προστατευμένα μόρια **55** και **56** δεν είναι δραστικά, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα μη προστατευμένα **54** και **57**, τα οποία παρουσιάζουν σημαντική δράση, ιδίως το **57**, που αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό την ανάπτυξη όλων των καρκινικών σειρών, σε ποσοστό 80-96%. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των παραγώγων του γενικού τύπου II, είναι η δραστικότητα που εμφανίζουν τα 5-αμινομεθυλοπαράγωγα **58** και **59**, τα οποία είναι πολύ αποτελεσματικά στη σειρά μελανώματος A2058, όπου προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του 95% των κυττάρων. Από τα δύο προηγούμενα παράγωγα έχουν προέλθει τα αμινοϋποκατεστημένα μόρια **60**, **62**, **64** και **61**, **63**, **65** αντίστοιχα. Η παρατήρηση που είχε γίνει στην περίπτωση των 3-ισοπροπυλο παραγώγων ισχύει επίσης και για την παρούσα σειρά μορίων, δηλαδή από όλα τα προηγούμενα μόρια, μόνο τα 5-βενζυλαμινομεθυλο-ανάλογα **60** και **61** είναι δραστικά, κυρίως δε το **61**, το οποίο εμφανίζεται ιδιαίτερα αποτελεσματικό έναντι τριών από τις σειρές που μελετήθηκαν (SCOV3, A2058, KCL-22 CML). Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στη δραστικότητα της αμιδίνης **53**, η οποία είναι ένα μόριο που προέκυψε ως δευτερεύον προϊόν, κατά τη σύνθεση του 3-φαινυλοκαρβονιτριλίου **54**. Η αμιδίνη

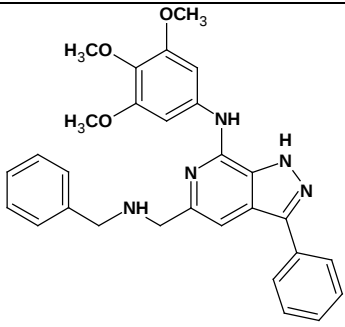
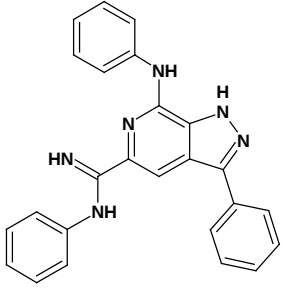
αυτή, παρουσιάζει ίσως την υψηλότερη δράση έναντι όλων των υπολοίπων παραγώγων, σε όλες τις καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν, παρεμποδίζοντας την ανάπτυξή τους σε ποσοστό 90-99%.

Σε επιλεγμένα δραστικά παράγωγα έγινε μελέτη της τιμής  $IC_{50}$  σε δύο καρκινικές σειρές, την παγκρεατική MIA-PaCa2 και την ωθηκική SCOV 3 και τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 2**. Σε γενικές γραμμές επιβεβαιώνονται τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από τη μελέτη των αποτελεσμάτων του **Πίνακα 1**, καθώς όλα τα μόρια παρουσιάζουν αρκετά χαμηλές τιμές  $IC_{50}$  κυμαινόμενες από 0.38-6.7  $\mu$ M. Αναδεικνύεται η ενδιαφέρουσα δράση του αμιδινικού παραγώγου **53**, αλλά και του 7-τριμεθοξυφαινυλαμινο-παραγώγου **50**. Ειδικότερα για το **50** υπολογίστηκε η τιμή  $IC_{50}$  σε δύο ακόμη σειρές, του μελανώματος A2058 όπου βρέθηκε 0.36  $\mu$ M και της προστατικής DU145, όπου ήταν 0.81  $\mu$ M.

**Πίνακας 2.** Τιμές  $IC_{50}$  σε  $\mu$ M για τις κυτταρικές σειρές MIA-PaCa2 και SCOV 3.

|                                                                                     |            | PaCa2 | SKOV3 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------|-------|
|  | <b>107</b> | 4.6   | 5     |
|  | <b>93</b>  | 6.1   | 5.6   |
|  | <b>47</b>  | 4.3   | 2.5   |

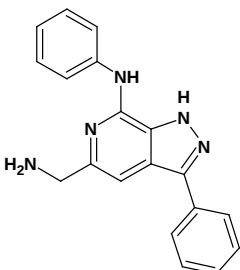
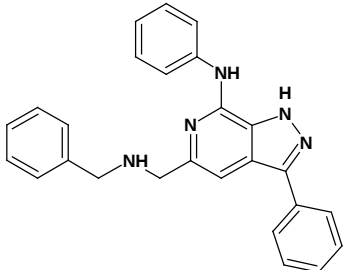
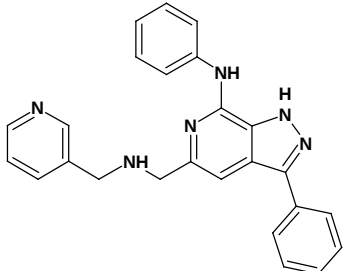
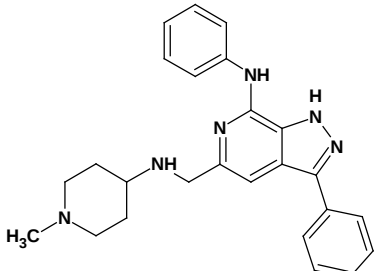
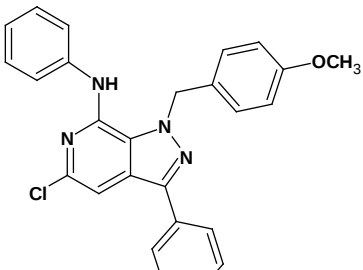
|                                                                                     |           |     |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----|------|
|    | <b>54</b> | 1.8 | 2    |
|    | <b>58</b> | 2.5 | 4.6  |
|   | <b>60</b> | 3.2 | 5.3  |
|  | <b>48</b> | 6.7 | 5.7  |
|  | <b>50</b> | 0.5 | 0.38 |
|  | <b>57</b> | 4   | 6.4  |

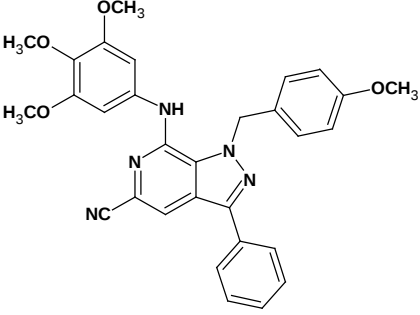
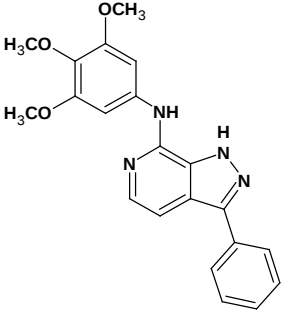
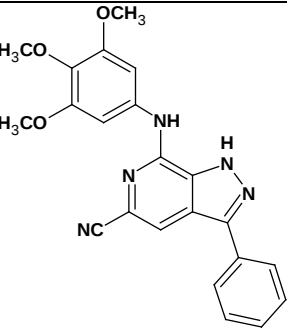
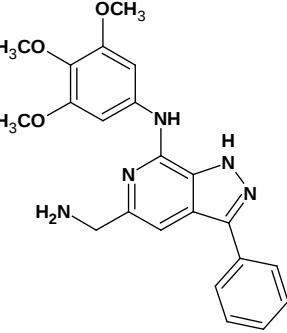
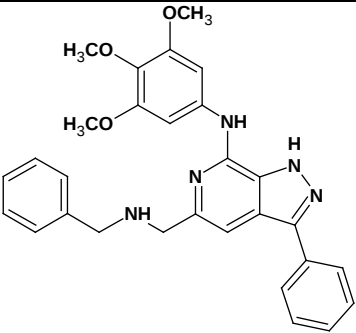
|                                                                                   |           |     |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----|------|
|  | <b>61</b> | 3.8 | 5    |
|  | <b>53</b> | 1.5 | 0.97 |

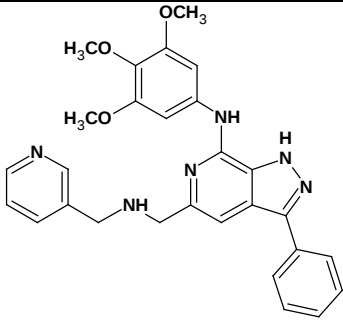
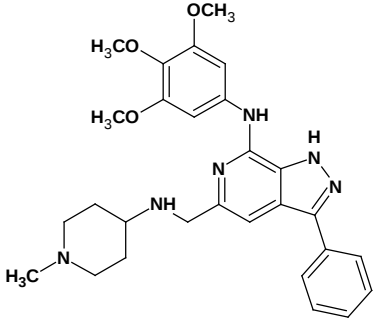
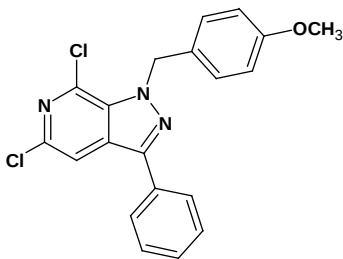
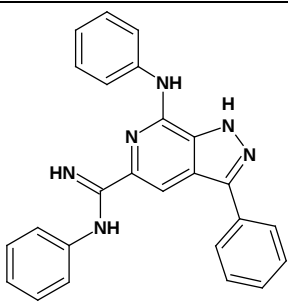
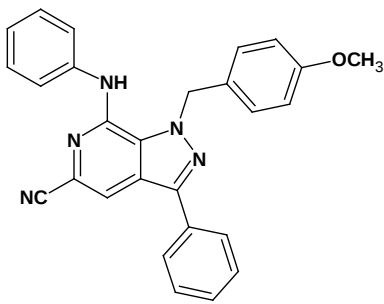
Το συμπέρασμα από τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα του φαρμακολογικού ελέγχου των νέων παραγώγων, είναι ότι η εκδήλωση αντιπρολαπλασιαστικής δράσης ευνοείται όταν ο πυρήνας της πυραζολοπυριδίνης φέρει αρωματικό 3-υποκαταστάτη, την τριμεθοξυφαινυλαμινομάδα στην 7-θέση, ενώ στην 5-θέση τα καλύτερα αποτελέσματα ως υποκαταστάτη έδωσε η βενζυλαμινομεθυλομάδα, χωρίς αυτή να είναι απαραίτητη.

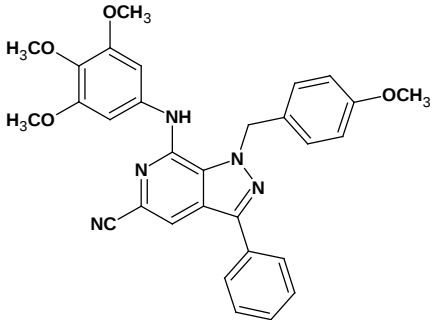
Σε μια άλλη σειρά πειραμάτων, επιλεγμένα παράγωγα του τύπου II, ελέγχθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών που προέρχονται από ανθρώπινο αδenoκαρκίνωμα μαστού (MCF-7, T47D, MDA 231 και HCC1954). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 3**, όπου παρουσιάζεται η % επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μετά την επίδραση των παραγώγων σε συγκεντρώσεις 30  $\mu$ M και 10  $\mu$ M.

**Πίνακας 3.** % Επιβίωση σε συγκέντρωση προϊόντος 10  $\mu$ M και 30  $\mu$ M.

| ΠΑΡΑΓΩΓΑ                                                                            |           | ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ |            |            |            |            |            |            |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                                                                     |           | MCF-7             |            | T47D       |            | MDA 231    |            | HCC1954    |            |
|                                                                                     |           | 30 $\mu$ M        | 10 $\mu$ M | 30 $\mu$ M | 10 $\mu$ M | 30 $\mu$ M | 10 $\mu$ M | 30 $\mu$ M | 10 $\mu$ M |
|    | <b>58</b> | 6                 | 53         | 2          | 55         | 8          | >80        | 0.5        | 17         |
|   | <b>60</b> | 1                 | 68         | 1.3        | 17         | 1.1        | 56         | 0.7        | 2          |
|  | <b>62</b> | 36                | >80        | 12         | 62         | 4          | >80        | 0.5        | 58         |
|  | <b>64</b> | 0.4               | >80        | 0.7        | 81         | 0.5        | >80        | 0.3        | >90        |
|  | <b>46</b> | >80               | >80        | 41         | 72         | >80        | >80        | 58         | >80        |

|                                                                                     |           |    |     |    |    |    |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|-----|----|----|----|-----|-----|-----|
|    | <b>48</b> | 5  | >80 | 20 | 47 | 3  | >80 | 2   | >80 |
|    | <b>50</b> | 24 | 33  | 52 | 53 | 63 | 77  | 25  | 25  |
|   | <b>57</b> | 1  | 48  | 2  | 40 | 1  | 76  | 2   | 55  |
|  | <b>59</b> | 1  | 51  | 2  | 46 | 1  | >80 | 1   | 75  |
|  | <b>61</b> | 1  | 26  | 2  | 11 | 1  | 48  | 0.5 | 33  |

|                                                                                     |           |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | <b>63</b> | 1.5 | 65  | 2   | 50  | 1   | 64  | 0.7 | 61  |
|    | <b>65</b> | 1   | 73  | 3   | 56  | 1   | >80 | 0.6 | 52  |
|   | <b>44</b> | 71  | 77  | 75  | >80 | >80 | >80 | 64  | 76  |
|  | <b>53</b> | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 0.8 | 0.3 | 0.1 | 0.1 | 0.6 |
|  | <b>55</b> | >80 | >80 | >80 | >80 | >80 | >80 | >80 | >80 |

|                                                                                   |           |    |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | <b>56</b> | 75 | >80 | >80 | >80 | >80 | >80 | >80 | >80 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

Από τα αποτελέσματα του **Πίνακα 3** φαίνεται ότι η πλειοψηφία των παραγώγων εμφανίζει αξιόλογη δράση στην υψηλότερη συγκέντρωση των 30  $\mu\text{M}$ . Σε αυτή τη συγκέντρωση τα 5-αμινοπαράγωγα **58-65** αναστέλλουν την ανάπτυξη του 95-99% των κυττάρων, σε όλες τις καρκινικές σειρές. Τα προστατευμένα νιτρίλια **55** και **56** δεν είναι δραστικά σε αντίθεση με το αποπροστατευμένο ανάλογο **57**. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το παράγωγο αμιδίνης **53**, το οποίο έχει εξαιρετική δραστικότητα ακόμη και στη χαμηλότερη συγκέντρωση των 10  $\mu\text{M}$  που χρησιμοποιήθηκε, στην οποία τα υπόλοιπα μόρια, με την εξαίρεση του **60** στην κυτταρική σειρά HCC1954, δεν παρουσίασαν αξιόλογη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Για τα παράγωγα **60** και **53** προσδιορίστηκαν οι τιμές  $\text{IC}_{50}$  για τις παραπάνω κυτταρικές σειρές και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

**Πίνακας 4.** Τιμές  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) των παραγώγων **60** και **53**.

|           | <b>MCF-7</b> | <b>T47D</b> | <b>MDA 231</b> | <b>HCC1954</b> |
|-----------|--------------|-------------|----------------|----------------|
| <b>60</b> | 12           | 4           | 9              | 3              |
| <b>53</b> | 1            | 2           | 3              | 2              |

Οι σειρές που προαναφέρθηκαν είναι ενδεικτικές για τη συσχέτιση της κυτταροτοξικότητας με την ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης PI3K. Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναστολής του ενζύμου για όσα παράγωγα έχουν προς το παρόν μελετηθεί. Φαίνεται ότι αρκετά μόρια, που είχαν επιδείξει αξιόλογη κυτταροστατική δράση, όπως τα **53**, **57**, **60**, **61**, **63** και **65**, διαθέτουν επίσης και σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης PI3K.

**Πίνακας 5. % Ενεργότητα της κινάσης PI3K.**

| ΠΑΡΑΓΩΓΟ     | 58 | 60 | 62 | 50 | 57 | 61 | 63 | 65 | 53  |
|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| % Ενεργότητα | 25 | 8  | 28 | 26 | 10 | 13 | 15 | 2  | 0.4 |

Ουσιαστικότερα συμπεράσματα, για την πληρέστερη εξαγωγή σχέσεων δομής – δράσης για τα υποκατεστημένα παράγωγα της πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης, που αποτέλεσαν αντικείμενο της παρούσας εργασίας, θα εξαχθούν μετά την ολοκλήρωση του φαρμακολογικού ελέγχου όλων των μορίων.

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel 60 AC.C (SDS 35-70  $\mu\text{m}$ ). Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) σε πλάκες Silica gel 60<sub>F254</sub>. Για τη λήψη φασμάτων  $^1\text{H}$ -NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκε Φασματοφωτόμετρο Bruker Avance 400 στα 400 MHz και Brucker AVANCE III στα 600 MHz, ενώ για τη λήψη φασμάτων  $^{13}\text{C}$ -NMR χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Bruker AC200 στα 50 MHz και Brucker AVANCE III στα 150 MHz. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ), μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Τα φάσματα μάζας λήφθηκαν σε φασματόμετρο μαζών LTQ Orbitrap Discovery με πηγή ιονισμού Ionmax.

### 4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I

#### 4.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ ΚΑΙ 7-ΑΡΥΛΑΜΙΝΟ-5-ΧΛΩΡΟ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I

##### 4.2.1.1. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (20)

##### 2-Αμινο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (2)

Σε διάλυμα της 2-αμινο-4-πικολίνης (**1**, 12 g, 0.11 mol) εντός πυκνούθειϊκού οξέος (57.6 ml), προστίθεται στάγδην στους 0 °C μίγμα πυκνούθειϊκού (8.4 ml) και νιτρικού οξέος 65% (8.4 ml). Το μίγμα θερμαίνεται στους 65 °C για 12 ώρες, στη συνέχεια αποχύνεται σε πάγο και εξουδετερώνεται με διάλυμα καυστικού νατρίου 40 %, υπό ανάδευση και ψύξη. Μετά από διήθηση υπό κενό λαμβάνεται μίγμα τριών ισομερών θέσεως, από το οποίο με εξάχνωση (110 °C, 10mbar) παραλαμβάνεται καθαρή η 2-αμινο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (**2**), ενώ το μίγμα των

άλλων δύο ισομερών διαχωρίστηκε με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 4 / 6.

#### 2-Αμινο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (**2**)<sup>164</sup>

Απόδοση: 25%. Σ.Τ. 134-136 °C (EtOAc), (Βιβλ. <sup>164</sup> 136 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.07 (d, 1H, H-6, J = 4.9 Hz), 6.58 (d, 1H, H-5, J = 4.9 Hz), 6.27 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 2.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### 2-Αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**3**)

Απόδοση: 47%. Σ.Τ. 220 °C (EtOAc), (Βιβλ. <sup>164</sup> 220 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.90 (s, 1H, H-6), 6.29 (s, 1H, H-3), 5.1 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 2.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### 2-Αμινο-3,5-δινιτρο-4-μεθυλοπυριδίνη (**4**)

Απόδοση: 7%. Σ.Τ. 170-171 °C (EtOAc) (Βιβλ. <sup>224</sup>). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.90 (s, 1H, H-6), 6.21 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### 4-Μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (**5**)<sup>225</sup>

Σε διάλυμα του **2** (10 g, 65.36 mmol) εντός μίγματος πυκνού θειϊκού οξέος (17.5 ml) και νερού (125 ml), προστίθεται στους 0 °C υπό έντονη ανάδευση, διάλυμα νιτρώδους νατρίου (10 g, 144.5 mmol) σε νερό (18.8 ml). Το διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες και στη συνέχεια φέρεται σε θερμοκρασία βρασμού για λίγα λεπτά για να εκδιωχθούν οι νιτρώδεις ατμοί. Το σχηματιζόμενο εναιώρημα αποχύνεται σε πάγο, διηθείται υπό κενό και λαμβάνεται μετά από ξήρανση καθαρό το προϊόν **5** (8.6 g, 86%). Σ.Τ. 235 °C (EtOH). (Βιβλ. <sup>225</sup> 234-235 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 13.14 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.45 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-6), 6.27 (d, J = 6.7 Hz, 1H, H-5), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### 2-Χλωρο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (**6**)<sup>165</sup>

Η 4-μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (**5**, 8 g, 51.95 mmol) προστίθεται εντός τριμοριακής ποσότητας οξυχλωριούχου φωσφόρου (14.24 ml), στους 0 °C, και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και το ελαιώδες υπόλειμμα αποχύνεται σε πάγο και ακολουθώς εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό οπότε

λαμβάνεται το προϊόν **6** (8.7 g, 97 %). Σ.Τ. 40 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-pentane) (Βιβλ. <sup>165</sup> 40-41 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.32 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-6), 7.22 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-5), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### **2-χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-αμίνη (7)** <sup>166</sup>

Σε διάλυμα του νιτροπαραγώγου **6** (8 g, 46.38 mmol) εντός πυκνού υδροχλωρικού οξέος (33 ml) προστίθεται στους 0 °C διχλωριούχος κασσίτερος (32 g). Το μίγμα αφήνεται σε ανάδευση υπό ψύξη για 10 λεπτά και κατόπιν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 40 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην πυκνό διάλυμα καυστικού νατρίου στους 0 °C μέχρι αλκαλοποίησης. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο οπότε λαμβάνεται καθαρή η αμίνη **7** (6.1 g, 92 %). Σ.Τ. 67 - 69 °C (EtOAc), (Βιβλ. <sup>226</sup> 69 °C). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ (ppm) 8.27 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-6), 7.83 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 7.33 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-5), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ (ppm) 167.0, 149.0, 147.4, 146.5, 134.3, 125.0, 19.0.

#### **N-(2-χλωρο-4-μεθυλο-3-πυριδιν)ακεταμίδιο (8)**

Σε διάλυμα της αμίνης **7** (6 g, 42.11 mmol) εντός άνυδρου διχλωρομεθανίου προστίθεται ισομοριακή ποσότητα οξικού ανυδρίτη (4.3 ml). Το μίγμα αφήνεται προς ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες υπό άνυδρες συνθήκες. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, ενώ το προϊόν λαμβάνεται σε καθαρή μορφή από το υπόλειμμα μετά από χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1, ως λευκό στερεό (7.2 g, 93%). Σ.Τ. 118-120 °C (EtOAc), (Βιβλ. <sup>167</sup> 120 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.95 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-6), 7.7 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.00 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.18 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>).

#### **1-Ακετυλο-7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (9)**

Σε διάλυμα του ακεταμιδίου **8** (7 g, 37.94 mmol) εντός άνυδρου βενζολίου (50ml), προστίθενται υπό ατμόσφαιρα αργού, οξικό κάλιο (5 g, 51.56 mmol) και οξικός ανυδρίτης (14.2 ml, 150 mmol), το μίγμα φέρεται σε βρασμό και στη θερμοκρασία αυτή προστίθεται νιτρώδες ισοαμύλιο (11.5 ml, 85.6 mmol). Μετά από 12 ώρες βρασμού, ακολουθεί διήθηση υπό κενό και τα στερεά ανόργανα υπολείμματα

εκπλένονται με τολουόλιο. Το διήθημα συμπυκνώνεται και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Λαμβάνονται 5.2 g στερεού προϊόντος (απόδοση 70%). (Βιβλ.<sup>167</sup>)

#### **7-Χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (10)**

Σε διάλυμα 5 g της 1-ακετυλο-7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (**9**) εντός άνυδρης μεθανόλης (20 ml) στους 0 °C διαβιβάζεται αέρια αμμωνία για 5 λεπτά. Ακολούθως το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1, οπότε απομονώνεται υποκίτρινο στερεό (3.7 g, 95%). Σ.τ. 161-163 °C (EtOAc), (Βιβλ.<sup>167</sup> 163 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.18 (s, 1H, H-3), 8.04 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 7.75 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 6.8 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH).

#### **4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (11)<sup>227</sup>**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **5** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 2-αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**3**, 10 g, 65.36 mmol) σε απόδοση 88%. Σ.τ. 189 - 190 °C (EtOH). (Βιβλ.<sup>227</sup> 188-190 °C). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.50 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 8.56 (s, 1H, H-6), 6.31 (s, 1H, H-3), 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### **2-Χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (12)<sup>228</sup>**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **6** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυριδινόνη **11** (8 g, 51.94 mmol) σε απόδοση 91 %. Σ.τ. 40 - 42 °C (Et<sub>2</sub>O). (Βιβλ.<sup>228</sup> 40-44 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.98 (s, 1H, H-6), 7.35 (s, 1H, H-3), 2.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### **2-Χλωρο-4-μεθυλο-5-πυριδιναμίνη (13)<sup>165</sup>**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **6** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το νιτροπαραγώγο **12** (7.2 g, 41.73

mmol) σε απόδοση 90 %. Σ.Τ. 69 - 71 °C (Et<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.71 (s, 1H, H-6), 6.93 (s, 1H, H-3), 3.84 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

#### **N-(2-Χλωρο-4-μεθυλο-5-πυριδιν)ακεταμίδιο (14)** <sup>165</sup>

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του ακεταμιδίου **8**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **13** (5.9 g, 41.4 mmol) σε απόδοση 92%. Σ.Τ. 155 - 156 °C (EtOAc). (Βιβλ. <sup>165</sup> 155-6 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.54 (s, 1H, H-6), 7.37 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.17 (s, 1H, H-3), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO).

#### **1-Ακετυλο-5-χλωροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (15)**

Λαμβάνεται από το ακεταμίδιο **14** (5 g, 27.1 mmol) με αντίδραση ενδομοριακής κύκλωσης ανάλογης με αυτήν που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **9**, οπότε προκύπτουν 4.9 g (93%) της πυραζολοπυριδίνης **15**. Σ.Τ. 132 – 133 °C (EtOAc). (Βιβλ. <sup>165</sup> 133 °C). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.52 (s, 1H, H-7), 8.15 (s, 1H, H-3), 7.67 (s, 1H, H-4), 2.79 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 170.4, 144.7, 138.0, 137.9, 134.7, 133.8, 114.9, 22.6.

#### **5-Χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (16)**

Λαμβάνεται κατόπιν απακετυλίωσης του παραγώγου **15** (3 g, 20.47 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **10**. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το υπόλειμα που λαμβάνεται προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1 παρέχοντας το προϊόν **16** σε απόδοση 96 %. Σ.Τ. 185 °C (EtOAc). (Βιβλ. <sup>165</sup> 184-5 °C). <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 13.83 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 8.88 (s, 1H, H-7), 8.20 (s, 1H, H-3), 7.86 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 139.15, 136.4, 134.7, 132.8, 129.3, 114.2.

#### **5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (17)**

Σε διάλυμα της πυραζολοπυριδίνης **16** (500 mg, 3.26 mmol) εντός 20 ml άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου και υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται 260 mg (6.52 mmol) νατριοϋδριδίου (60 % εναιώρημα σε παραφινέλαιο) στους 0 °C. Το μίγμα της

αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά, ακολούθως ψύχεται εκ νέου στους 0 °C όπου προστίθενται 0.66 ml (4.89 mmol) του 4-μεθοξυβενζυλοχλωριδίου. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες οπότε η αντίδραση ολοκληρώνεται. Στη φιάλη προστίθεται 0.5 ml νερού, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Τα δύο ισομερή θέσεως **17** και **18** διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα 5 / 1.

#### 5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**17**)

Απόδοση 57%. Σ.Τ. 117 - 119 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.62 (s, 1H, H-7), 8.03 (s, 1H, H-3), 7.64 (s, 1H, H-4), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 5.61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.7 (C-4'), 140.8 (C-5), 135.4 (C-7a), 133.2 (C-7), 132.0 (C-3), 131.1 (C-1'), 129.0 (C-2', C-6'), 127.4 (C-3a), 114.4 (C-3', C-5'), 114.4 (C-4), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 53.7 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>OCl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 274.0742, ευρεθέν 274.0746.

#### 5-Χλωρο-2-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**18**)

Απόδοση 28%. Σ.Τ. 92 – 94 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.07 (s, 1H, H-7), 7.88 (s, 1H, H-3), 7.51 (s, 1H, H-4), 7.30 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.91 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 5.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.12 (C-4'), 144.58 (C-5), 143.94 (C-7), 140.41 (C-7a), 129.96 (C-2', C-6'), 126.51 (C-1'), 126.42 (C-3a), 121.96 (C-3), 114.56 (C-3', C-5'), 112.79 (C-4), 57.99 (OCH<sub>3</sub>), 55.35 (CH<sub>2</sub>).

#### 6-Οξείδιο της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**19**)

Σε διάλυμα της πυραζολοπυριδίνης **17** (2 g, 7.31 mmol) εντός χλωροφορμίου προστίθεται μ-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ (1.77 g, 10.24 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 ημέρες. Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό, και στο υπόλειμμα προστίθεται διάλυμα ανθρακικού

νατρίου 5%. Σχηματίζεται λευκό ίζημα, το οποίο λαμβάνεται με διήθηση, ενώ το διήθημα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα, οδηγώντας στη λήψη καθαρού προϊόντος σε απόδοση 90% (1.9 g). Σ.τ. 156 – 158 °C (EtOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 8.58 (s, 1H, H-7), 7.99 (s, 1H, H-3), 7.83 (s, 1H, H-4), 7.20 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.87 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 5.47 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 159.3 (C-4'), 135.7 (C-5), 134.8 (C-7a), 133.7 (C-3), 129.8 (C-2', C-6'), 128.8 (C-1'), 123.9 (C-7), 120.3 (C-3a), 118.1 (C-4), 114.4 (C-3', C-5'), 55.5 (OCH<sub>3</sub>), 52.3 (CH<sub>2</sub>).

#### 5,7-Διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (20)

Σε διάλυμα του *N*-οξειδίου **19** (1.5 g, 4.87 mmol) εντός 20 ml τετραϋδροφουρανίου προστίθεται υπό ψύξη πενταμοριακή ποσότητα οξυχλωριούχου φωσφόρου (2.2 ml, 24.35 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε νερό και πάγο και αλκαλοποιείται με διάλυμα ανθρακικού νατρίου 5%. Το προϊόν λαμβάνεται κατόπιν εκχύλισης με διχλωρομεθάνιο, ο οργανικός διαλύτης συμπυκνώνεται και ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και το υπόλειμμα φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Απόδοση 93% (1.4 g). Σ.τ. 101 – 103 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.09 (s, 1H, H-3), 7.59 (s, 1H, H-4), 7.20 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-2', H-6'), 6.85 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H-2', H-6'), 5.92 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.3 (C-4'), 138.6 (C-7), 133.1 (C-5), 132.7 (C-3), 132.4 (C-3a), 132.35 (C-7a), 128.6 (C-1'), 128.6 (C-2', C-6'), 114.1 (C-3', C-5'), 114.0 (C-4), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 53.9 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>OCl<sub>2</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 308.0352, ευρεθέν 308.0358.

#### 4.2.1.2. Γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών 21 – 22

Σε διάλυμα της κατάλληλης αρωματικής αμίνης (1.42 mmol) εντός άνυδρου διμεθυλοφορμαμίδιου (15 ml) προστίθεται υπό ατμόσφαιρα αργού νατριοϋδρίδιο (69 mg, 1.71 mmol, 60 % εναιώρημα σε παραφινέλαιο) στους 0 °C. Το μίγμα

αφήνεται υπό ανάδευση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και κατόπιν προστίθεται η 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**20**, 400 mg, 1.3 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 30 λεπτά, στη συνέχεια ψύχεται, προστίθενται 3 σταγόνες αιθυλικής αλκοόλης, το διμεθυλοφορμαμίδιο απομακρύνεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και νερό. Ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται, εκπλένεται δυο φορές με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 4%, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1.

#### **5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-*N*-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**21**)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, με επίδραση ανιλίνης επί του παραγώγου **20**. Απόδοση 93%. Σ.Τ. 200 - 202 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.95 (s, 1H, H-3), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.23 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.18 – 7.12 (m, 3H, H-2'', H-6'', H-4), 7.04 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4'), 7.00 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 6.70 (s, br, exch, 1H, NH), 5.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.2 (C-4''), 140.6 (C-7), 139.4 (C-1'), 138.8 (C-5), 132.8 (C-3a), 132.2 (C-3), 129.0 (C-3', C-5'), 128.4 (C-1''), 127.7 (C-2'', C-6''), 126.5 (C-7a), 122.9 (C-4'), 119.2 (C-2', C-6'), 115.2 (C-3'', C-6''), 105.9 (C-4), 55.5 (CH<sub>2</sub>), 55.4 (OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>OCl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 365.1164, ευρεθέν 365.1168.

#### **5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**22**)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, με επίδραση 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνης επί του παραγώγου **20**. Απόδοση 90%. Σ.Τ. 172 – 174 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.94 (s, 1H, H-3), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.11 (s, 1H, H-4), 7.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 6.68 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 6.50 (s, 2H, H-2', H-6'), 5.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, 4''-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.2 (C-4''), 153.1 (C-3', C-

5'), 140.6 (C-7), 138.7 (C-5), 135.3 (C-1'), 133.5 (C-4'), 132.7 (C-3a), 132.2 (C-3), 128.2 (C-1''), 127.8 (C-2'', C-6''), 126.2 (C-7a), 115.2 (C-3'', C-5''), 105.3 (C-4), 96.9 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 56.0 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (4''-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Cl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 455.1481, ευρεθέν 455.1487.

#### 4.2.1.3. Γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 23 – 24

Σε διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (3 ml) προστίθεται 1.40 mmol κάθε μιάς από τις προστατευμένες αμίνες **21** και **22**. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το τριφθοροξικό οξύ απομακρύνεται υπό κενό, στο υπόλειμμα προστίθεται πάγος και νερό, ακολουθεί αλκαλοποίηση με προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου 5% και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Παρασκευάστηκαν τα παρακάτω παράγωγα :

##### 5-Χλωρο-N-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (23)

Απόδοση 90%. Σ.Τ. 96 – 98 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.01 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.85 (s, 1H, H-3), 7.50 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4'), 7.02 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 142.9 (C-7), 138.8 (C-5, C-1'), 130.4 (C-3), 129.3 (C-3', C-5'), 128.9 (C-3a), 128.7 (C-7a), 124.0 (C-4'), 120.7 (C-2', C-6'), 104.3 (C-4). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>Cl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 245.0589, ευρεθέν 245.0592.

##### 5-Χλωρο-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (24)

Απόδοση 90%. Σ.Τ. 227 – 229 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.93 (s, 1H, H-3), 7.28 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.00 (s, 1H, H-4), 4.71 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 3.89 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, MeOD) δ (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 142.0 (C-7), 138.2 (C-5), 136.4 (C-1'), 132.8 (C-4', C-3), 131.0 (C-3a), 128.2 (C-7a), 103.6 (C-4), 96.4 (C-2', C-6'), 60.5 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.5 (3'-OCH<sub>3</sub>,

5'-OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 335.0905, ευρεθέν 335.0914.

#### **4.2.1.4. Γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 25 – 26**

Διάλυμα των αμινών **23** – **24** (1 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (40 ml), υδρογονώνεται παρουσία 10% παλλαδίου επί άνθρακα και οξικού καλίου (0.3 mmol), σε πίεση 50 psi και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας της αντίδρασης (4 ημέρες), το μίγμα διηθείται υπό κελίτη, συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και νερό. Ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 2 / 1.

#### **N-Φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (25)**

Απόδοση 81%. Σ.Τ. 180 – 182 °C (EtOAc – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.92 (s, 1H, H-3), 7.77 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 7.43 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.23 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.03 (d, 1H, H-4), 6.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4'). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 143.5 (C-7), 139.0 (C-1'), 134.8 (C-5), 131.9 (C-3), 129.2 (C-3', C-5'), 126.6 (C-7a), 125.5 (C-4'), 123.8 (C-3a), 121.2 (C-2', C-6'), 106.20 (C-4). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 211.0978, ευρεθέν 211.0982.

#### **N-(3,4,5-Τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7αμίνη (26)**

Απόδοση 83%. Σ.Τ. 180 – 182 °C (EtOAc – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.75 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch., NH), 7.93 (s, 1H, H-3), 7.69 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 7.02 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-4), 6.78 (s, 12, H-2', H-6'), 3.69 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.64 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.2 (C-3', C-5'), 143.7 (C-7), 135.5 (C-1'), 135.0 (C-5), 133.8 (C-4'), 132.3 (C-3), 128.8 (C-3a), 126.7 (C-7a), 105.1 (C-4), 99.0 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 301.1295, ευρεθέν 301.1303.

#### 4.2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ I, R = -CN, -CH<sub>2</sub>NHAr, -CH<sub>2</sub>NHR

##### 4.2.2.1. Σύνθεση του 7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτριλίου (29)

##### N-Οξείδιο του 2-χλωρο-4-μεθυλο-3-πυριδινακεταμιδίου (27)

Σε διάλυμα του N-(2-χλωρο-4-μεθυλο-3-πυριδιν)ακεταμιδίου (**8**) (2 g, 10.84 mmol) εντός χλωροφορμίου (20 ml) προστίθεται μ-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ (3.7 g, 21.68 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 12 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης απομακρύνεται ο διαλύτης, το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και το μίγμα φέρεται προς καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Απομονώνεται καθαρό το προϊόν, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 4 / 1. Απόδοση 88% (1.91 g). Σ.τ. 170 – 172 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 10.01 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 8.34 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-6), 7.32 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-5), 2.19 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>), 2.10 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO- *d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 168.2 (C=O), 140.0 (C-4), 137.6 (C-6), 135.7 (C-2), 134.0 (C-3), 124.5 (C-5), 22.4 (COCH<sub>3</sub>), 17.2 (4-CH<sub>3</sub>).

##### N-(2-Χλωρο-6-κυανο-4-μεθυλο-3-πυριδιν)ακεταμίδιο (28)

Σε σωληνάκι αυτοκλείστου (sealed tube) που φέρει διάλυμα του N-οξειδίου **27** (2g, 9.97 mol) εντός άνυδρου ακετονιτριλίου (3 ml), προστίθενται 2.5 ml (19.95 mol) TMSCN και 2.75 ml (29.92 mol) διαιθυλοκαρβαμουϋλοχλωριδίου. Στη συνέχεια το σωληνάκι τοποθετήθηκε σε συσκευή μικροκυμάτων όπου το μίγμα θερμάνθηκε στους 100 °C με ισχύ 80 Watt για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αποχύθηκε σε πάγο, ακολούθησε εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, ξήρανση του οργανικού διαλύτη με άνυδροθειϊκό νάτριο, συμπύκνωσή του υπό κενό, και καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 87% (1.8 g). Σ.τ. 174 – 176 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.21 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.91 (s, 1H, H-5), 2.39 (s, 3H, 4-CH<sub>3</sub>), 2.23 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 169.4 (C=O), 153.0 (C-2), 141.0 (C-4), 134.0 (C-3), 130.0 (C-6), 129.9 (C-5), 115.8 (CN), 23.1 (COCH<sub>3</sub>), 17.2 (4-CH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>OCl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 210.0429, ευρεθέν 210.0431.

### 7-Χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτρίλιο (29)

Λαμβάνεται από το ακεταμίδιο **28** (600 mg, 2.86 mmol) με αντίδραση ενδομοριακής κύκλωσης ανάλογης αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **9**, οπότε μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 3/1, προκύπτουν 465 mg (91%) λευκού στερεού της απακετυλιωμένης πυραζολοπυριδίνης **29**. Σ.τ. 198 – 200 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 8.22 (s, 1H, H-3), 8.05 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 138.1 (C-7), 137.8 (C-7a), 136.3 (C-3), 128.8 (C-3a), 123.7 (C-4), 122.6 (C-5), 118.5 (CN).

#### 4.2.2.2. Παρασκευή των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτριλίων 30 – 31

### 7-(Φαινυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτρίλιο (30)

Διάλυμα του 7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτρίλιου (**29**) (200 mg, 1.11 mmol) εντός ανιλίνης (10 ml) αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία βρασμού (180 °C) για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φέρεται απ'ευθείας προς καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Απομονώνεται το προϊόν σε απόδοση 91% (230 mg). Σ.τ. 211 – 213 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 8.04 (s, 1H, H-3), 7.81 (d, 2H, *J* = 8Hz, H-2', H-6'), 7.54 (s, 1H, H-4), 7.33 (t, 2H, *J* = 8Hz, H-3', H-5'), 7.04 (t, 1H, *J* = 8Hz, H-4'). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 144.5 (C-7), 139.6 (C-1'), 131.3 (C-3), 128.5 (C-3', C-5', C-7a), 124.3 (C-3a), 122.6 (C-4'), 119.8 (C-5), 119.2 (C-2', C-6'), 118.6 (CN), 114.4 (C-4). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 236.0931, ευρεθέν 236.0935.

### 7-[(3,4,5-Τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτρίλιο (31)

Σε διάλυμα του 7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριдино-5-καρβονιτρίλιου (**29**) (500 mg, 2.78 mmol) εντός άνυδρου διμέθυλοσουλφοξειδίου (10 ml) προστίθεται 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνη (2.55 g, 13.9 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε

θερμοκρασία 180 °C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό, ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω ανύδρου θειϊκού νατρίου, συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 2. Απόδοση 86% (690 mg). Σ.Τ. 231 – 233 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 8.14 (s, 1H, H-3), 7.58 (s, 1H, H-4), 7.29 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.87 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 152.4 (C-3', C-5'), 143.7 (C-7), 135.5 (C-1', C-3), 132.4 (C-4'), 130.6 (C-7a), 123.6 (C-3a), 119.2 (C-5), 118.1 (CN), 113.7 (C-4), 96.1 (C-2', C-6'), 59.6 (4'-OCH<sub>3</sub>), 54.7 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 326.1248, ευρεθέν 326.1252.

#### **4.2.2.3. Γενική μέθοδος παρασκευής των 1-{7-αρυλαμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινο}μεθαναμινών 32 - 33**

Σε εναιώρημα λιθιοαργιλιοϋδριδίου (3 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (20 ml) προστίθεται στάγδην στους 0 °C, υπό ατμόσφαιρα αργού, διάλυμα του κατάλληλου καρβονιτρίλιου **30** – **31** (1 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 30 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται υπό ψύξη 3 σγ. παγωμένου νερού και 3 σγ. διαλύματος καυστικού νατρίου 5%. Μόλις ολοκληρωθεί η αντίδραση, το μίγμα να αφρίζει, προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης προς απομόνωση των επιθυμητών αμινών.

#### **1-{7-Φαινυλαμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινο}μεθαναμίνη (32)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 7-(φαινυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινο-5-καρβονιτρίλιο (**30**). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 7 / 1. Απόδοση 87 %. Σ.Τ. 143 – 145 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.94 (s, 2H, H-3), 7.84 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.32 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.03 – 6.92 (m, 2H, H-

4', H-4), 4.98 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 3.82 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 146.2 (C-5), 142.0 (C-7), 141.2 (C-1'), 132.0 (C-3), 128.5 (C-3', C-5', C-7a), 126.8 (C-3a), 121.0 (C-4'), 118.7 (C-2', C-6'), 102.4 (C-4), 46.0 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 240.1244, ευρεθέν 240.1249.

**1-{7-(3,4,5-Τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο}μεθαναμίνη (33)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (31). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 90%. Σ.Τ. 231 – 233 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.88 (s, 1H, H-3), 7.23 (s, 2H, H-2', H-6'), 6.88 (s, 1H, H-4), 4.97 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 148.1 (C-5), 142.7 (C-7), 137.3 (C-1'), 132.3 (C-4'), 131.3 (C-3), 128.7 (C-7a), 126.9 (C-3a), 101.8 (C-4), 96.1 (C-2', C-6'), 60.1 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.2 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 46.5 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 330.1561, ευρεθέν 330.1566.

**4.2.2.4. Γενική μέθοδος παρασκευής των N-υποκατεστημένων 1-{7-αρυλαμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο}μεθαναμινών 34 – 39**

Σε διάλυμα των μεθαναμινών 32 – 33 (1 mmol), εντός απόλυτης αιθανόλης (20 ml), προστίθεται υπό ατμόσφαιρα αργού η κατάλληλη αλδεΐδη ή κετόνη (1.4 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού (80 °C) για 2 ώρες. Στο στάδιο αυτό σχηματίζεται η ενδιάμεση ιμίνη, η οποία είναι ασταθής ακόμα και κατά τη διαδικασία ελέγχου της προόδου της αντίδρασης με TLC, οπότε δεν απομονώνεται αλλά φέρεται στο επόμενο στάδιο όπου το μίγμα ψύχεται στους 0 °C και κατόπιν προστίθεται νατριοβοροϋδρίδιο (4 mmol). Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 0 °C για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθενται 3 σπ. διαλύματος καυστικού νατρίου 5%, το μίγμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης προς απομόνωση των επιθυμητών αμινών.

***N*-Φαινυλομεθυλο-1-{7-φαινυλαμινο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριдино}μεθαναμίνη (34)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την μεθαναμίνη **32** (150 mg) και επιδρώντας με βενζαλδεΰδη (89 μl). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 9 / 1. Απόδοση 83 % (170 mg). Σ.τ. 124 – 126 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.90 (s, 1H, H-3), 7.68 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.31 – 7.27 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 7.25 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.00 (s, 1H, H-4), 6.99 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 3.97 (s, 2H, CH<sub>2</sub> – pyrazolopyridine), 3.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub> – phenyl). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 143.0 (C-5), 142.3 (C-3), 141.4 (C-7), 140.8 (C-1'), 135.8 (C-1''), 130.4 (C-3', C-5'), 130.4 (C-7a), 130.3 (C-2'', C-6'', C-3'', C-5''), 129.9 (C-4''), 124.0 (C-4'), 121.2 (C-3a), 121.0 (C-2', C-6'), 106.9 (C-4), 53.3 (CH<sub>2</sub> – phenyl), 52.5 (CH<sub>2</sub> – pyrazolopyridine). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 330.1713, ευρεθέν 330.1717.

***N*-Φαινυλομεθυλο-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριдино}μεθαναμίνη (35)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την μεθαναμίνη **33** (110 mg) και επιδρώντας με βενζαλδεΰδη (48 μl). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 8 / 1. Απόδοση 85 % (120 mg). Σ.τ. 107 – 109 °C (EtOH - Et<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.79 (s, 1H, H-3), 7.30 – 7.22 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5''), 6.94 (s, 2H, H-2', H-6'), 6.90 (s, 1H, H-4), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub> – pyrazolopyridine), 3.84 (s, 2H, CH<sub>2</sub> – phenyl), 3.77 (4'-OCH<sub>3</sub>), 3.60 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.1 (C-3', C-5'), 145.1 (C-5), 143.2 (C-7), 138.8 (C-1''), 136.6 (C-1'), 133.1 (C-4'), 131.3 (C-3), 129.3 (C-7a), 128.6 (C-2'', C-6''), 128.4 (C-3'', C-5''), 127.4 (C-4''), 127.0 (C-3a), 104.0 (C-4), 97.6 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 54.2 (CH<sub>2</sub> – phenyl), 53.2 (CH<sub>2</sub> – pyrazolopyridine). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 420.2030, ευρεθέν 420.2035.

***N*-(3-Πυριδινυλομεθυλο)-1-{7-φαινυλαμινο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό} μεθαναμίνη (36)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την μεθαναμίνη **32** (130 mg) και επιδρώντας με 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΰδη (72  $\mu$ l). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 8 / 1. Απόδοση 87 % (155 mg). Κολλώδες στερεό.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.54 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, pyridine – 2H), 8.46 (dd,  $J = 5$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H, pyridine – 6H), 7.78 (s, 1H, H-3), 7.72 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, pyridine – 4H), 7.52 (d,  $J = 8$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.22 (dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 5$  Hz, 1H, pyridine – 5H), 7.15 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.91 (t,  $J = 8$  Hz, 1H, H-4'), 6.88 (s, 1H, H-4), 3.85 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  – pyrazolopyridine), 3.83 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  – pyridine).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 149.4 (pyridine – 2C), 148.1 (pyridine – 6C), 145.4 (C-5), 143.0 (C-7), 140.1 (C-1'), 136.5 (pyridine – 1C), 135.4 (pyridine – 3C), 131.2 (C-3), 129.3 (C-7a), 128.8 (C-3', C-5'), 126.9 (C-3a), 123.7 (pyridine – 5C), 122.4 (C-4'), 119.4 (C-2', C-6'), 104.1 (C-4), 53.9 ( $\text{CH}_2$  – pyrazolopyridine), 50.03 ( $\text{CH}_2$  – pyridine). ESI- $\text{HRMS}$  υπολογισθέν ως προς  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_6^+$  [ $\text{MH}^+$ ]: 331.1666, ευρεθέν 331.1670.

***N*-(3-Πυριδινυλομεθυλο)-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (37)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την μεθαναμίνη **33** (80 mg) και επιδρώντας με 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΰδη (25  $\mu$ l). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 9 / 1. Απόδοση 89 % (90 mg). Σ.Τ. 116 – 118 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O).  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.56 (d,  $J = 1$  Hz, 1H, pyridine – 2H), 8.50 (dd,  $J = \text{Hz}$ ,  $J = 1$  Hz, pyridine – 6H), 7.82 (s, 1H, H-3), 7.73 (d,  $J = 7$  Hz, 1H, pyridine – 4H), 7.25 (dd,  $J = 7$  Hz,  $J = 5$  Hz, 1H, pyridine – 5H), 6.96 (s, 2H, H-2', H-6'), 6.93 (s, 1H, H-4), 3.90 (s, 2H, ,  $\text{CH}_2$  – pyrazolopyridine), 3.89 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  – pyridine), 3.78 (4'-OCH<sub>3</sub>), 3.68 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 153.3 (C-3', C-5'), 149.7 (pyridine – 2C), 148.5 (pyridine – 6C), 145.0 (C-5), 143.2 (C-7), 136.4 (pyridine – 4C), 136.2 (C-1'), 134.8 (pyridine – 3C), 133.4 (C-4'), 131.5 (C-3), 20.0 (C-7a), 127.1 (C-3a), 123.6 (pyridine – 5C), 104.1 (C-4), 97.7 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 54.0 ( $\text{CH}_2$  – pyrazolopyridine), 50.2 ( $\text{CH}_2$  –

pyridine). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $C_{22}H_{25}N_6O_3^+$   $[MH^+]$ : 421.1983, ευρεθέν 421.1988.

***N*-(1-Μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-1-{7-φαινυλαμινο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-ο} μεθαναμίνη (38)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την μεθαναμίνη **32** (150 mg) και επιδρώντας με 1-μεθυλο-4-πιπεριδινόνη (90 μl). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 86 % (180 mg). Σ.Τ. 192 – 194 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.68 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.58 (s, 1H, H-3), 7.18 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.92 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 6.77 (s, 1H, H-4), 3.83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.82 – 2.92 (m, 3H, piperidine - 2H, piperidine - 6H, piperidine - 4H), 2.77 – 2.64 (m, 2H, piperidine - 2H, piperidine - 6H), 2.26 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.08 – 1.94 (m, 2H, piperidine - 3H, piperidine - 5H), 1.73 – 1.57 (m, 1H, piperidine - 3H, piperidine - 5H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm) 144.2 (C-5), 142.9 (C-7), 140.8 (C-1'), 132.2 (C-3), 129.0 (C-3', C-5'), 128.8 (C-7a), 127.0 (C-3a), 122.2 (C-4'), 119.4 (C-2', C-6'), 104.2 (C-4), 54.5 (piperidine – 2C, piperidine – 6C), 51.8 (piperidine – 4C), 50.5 (CH<sub>2</sub>), 46.2 (NCH<sub>3</sub>), 31.8 (piperidine – 3C, piperidine – 5C). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $C_{19}H_{25}N_6^+$   $[MH^+]$ : 337.2135, ευρεθέν 337.2139.

***N*-(1-Μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-5-1*H*-πυραζολο [3,4-*c*]πυριδιν-ο}μεθαναμίνη (39)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την μεθαναμίνη **33** (230 mg) και επιδρώντας με 1-μεθυλο-4-πιπεριδινόνη (113 μl). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 84 % (250 mg). Σ.Τ. 126 – 128 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.74 (s, 1H, H-3), 7.10 (s, 2H, H-2', H-6'), 6.09 (s, 1H, H-4), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.78 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.75 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 2.90 – 2.82 (m, 2H, piperidine - 2H, piperidine - 6H), 2.64– 2.60 (m, 1H, piperidine - 4H), 2.26 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.09 – 2.00 (m, 2H, piperidine - 2H, piperidine - 6H), 1.98 – 1.90 (m, 2H, piperidine - 3H, piperidine - 5H), 1.73 – 1.57 (m, 1H, piperidine - 3H, piperidine - 5H). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, MeOD) δ (ppm)

152.1 (C-3', C-5'), 144.0 (C-5), 142.3 (C-7), 136.0 (C-1'), 131.9 (C-4'), 130.2 (C-3), 128.4 (C-7a), 125.7 (C-3a), 102.9 (C-4), 96.2 (C-2', C-6'), 60.1 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.0 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 53.2 (piperidine – 2C, piperidine – 6C), 53.9 (piperidine – 4C), 51.1 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (NCH<sub>3</sub>), 30.8 (piperidine – 3C, piperidine – 5C). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 427.2452, ευρεθέν 427.2457.

### 4.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II

#### 4.3.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 7-AMINO-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΚΑΙ 7-AMINO-5-ΧΛΩΡΟ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ 3-ΦΑΙΝΥΛΟ-ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II

##### 4.3.1.1. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (44)

##### 5-Χλωρο-3-ιωδο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (40) <sup>229</sup>

Σε διάλυμα της χλωροπυριδίνης **16** (11 g, 71.80 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (100 ml) προστίθεται υπό ατμόσφαιρα αργού *N*-ιωδοσουκινιμίδιο (21 g, 93.33 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Ακολούθως ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με υδατικό διάλυμα θειοθειϊκού νατρίου 5%. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 6 / 4, οπότε λαμβάνονται 17.2 g (86 %) του ιωδοπαραγώγου **40**, ως λευκό στερεό. Σ.τ. 223 - 225 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 14.23 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 8.87 (s, 1H, H-7), 7.52 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 139.9 (C-5), 136.9 (C-7a), 135.2 (C-7), 133.6 (C-3a), 113.8 (C-4), 92.1 (C-3).

##### 5-Χλωρο-3-ιωδο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (41)

Σε διάλυμα της ιωδοπυραζολοπυριδίνης **40** (17 g, 60.82 mmol) εντός άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου (30 ml) προστίθενται υπό ατμόσφαιρα αργού 5.84 g (24.33 mmol) νατριοϋδριδίου (60 % εναιώρημα σε παραφινέλαιο) στους 0 °C. Το μίγμα της

αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 λεπτά, ακολούθως ψύχεται εκ νέου στους 0 °C όπου προστίθενται 13.86 ml (10.23 mmol) του 4-μεθοξυβενζυλοχλωριδίου. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες οπότε η αντίδραση ολοκληρώνεται. Στη φιάλη προστίθεται 0.5 ml νερού, οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το παράγωγο **41** λαμβάνεται μετά από χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1 ως λευκό στερεό. Απόδοση 65 % (16 g). Σ.τ. 126 - 127 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.51 (s, 1H, H-7), 7.38 (s, 1H, H-4), 7.22 (d, *J* = 8.53 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.85 (d, *J* = 8.53 Hz, 2H, H-2', H-6'), 5.59 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.8 (C-4'), 141.4 (C-5), 136.2 (C-7), 135.6 (C-1'), 133.6 (C-7a), 129.2 (C-2', C-6'), 126.9 (C-3a), 114.4 (C-3', C-5', C-4), 88.9 (C-3), 55.3 (OCH<sub>3</sub>), 54.4 (CH<sub>2</sub>).

**5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (42)**

Σε διάλυμα της 5-χλωρο-3-ιωδο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (**41**) (6.6 g, 16.52 mmol) εντός 200 ml τολουολίου και 30 ml αιθανόλης προστίθεται φαινυλοβορικό οξύ (2.22 g, 18.19 mmol) και τετρακίς (τριφαινυλοφωσφίνο)παλλάδιο (0) (955 mg, 0.827 mmol). Ακολούθως προστίθεται όξινο ανθρακικό νάτριο (4.2 g) εντός νερού (50 ml) και το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό (100 °C) για 15 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης οι διαλύτες εξατμίζονται υπό κενό, το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο / νερό, η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα φέρεται σε χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1 οπότε λαμβάνονται 5.5 g (95%) του προϊόντος **42**. Σ.τ. 73 - 75 °C (MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.58 (s, 1H, H-7), 7.91 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.83 (s, 1H, H-4), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-4'), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 5.56 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3H,

OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.4 (C-4''), 142.8 (C-3), 141.1 (C-5), 136.6 (C-1'), 133.34 (C-7), 131.8 (C-1''), 129.0 (C-2', C-6'), 128.8 (C-2'', C-6''), 128.4 (C-7a), 128.3 (C-3a), 127.3 (C-4'), 126.8 (C-3', C-5'), 114.5 (C-3'', C-5''), 114.1 (C-4), 55.0 (OCH<sub>3</sub>), 53.5 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>OCl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 350.1055, ευρεθέν 350.1062.

#### **6-Οξείδιο της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (43)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για τη λήψη του Ν-οξειδίου **19**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**42**) (3 g, 8.58 mol). Λευκό στερεό (2.8 g, 89%). Σ.Τ. 142 – 144 °C (EtOH). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.60 (s, 1H, H-7), 8.01 (s, 1H, H-4), 7.85 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.51 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.44 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 5.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.7 (C-4''), 143.9 (C-3), 136.4 (C-5), 136.0 (C-7a), 132.1 (C-1'), 131.1 (C-7), 129.1 (C-3', C-5'), 129.0 (C-4'), 129.0 (C-2'', C-6''), 128.4 (C-1''), 127.0 (C-2', C-6'), 126.6 (C-3a, C-4), 114.4 (C-3'', C-5''), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 53.8 (CH<sub>2</sub>).

#### **5,7-Διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (44)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για τη λήψη του διχλωροπαραγώγου **20**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 6-οξείδιο της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (**43**) (2.5 g, 6.84 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Απόδοση 92% (2.4 g). Σ.Τ. 126 – 127 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.89 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.85 (s, 1H, H-4), 7.55 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.48 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 7.26 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.85 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 5.96 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.3 (C-4''), 144.0 (C-3), 139.0 (C-7), 133.7 (C-5), 132.5 (C-7a), 131.4 (C-3a), 130.9 (C-1'), 129.1 (C-3', C-5'), 128.9 (C-4'), 128.7 (C-1''), 128.6 (C-2'', C-6''), 127.3 (C-

2', C-6'), 114.3 (C-4), 114.0 (C-3'', C-5''), 55.2 (OCH<sub>3</sub>), 54.0 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>OCl<sub>2</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 384.0665, ευρεθέν 384.0671.

#### **4.3.1.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 45 – 46**

Για τη σύνθεση των πυραζολοπυριδινών **45 – 46**, ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών **21 - 22**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**44**).

#### **5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-N,3-διφαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (45)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο επιδρώντας με ανιλίνη (157 μl, 1.71 mmol) επί του παραγώγου **44** (600 mg, 1.56 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Απόδοση (84%, 580 mg). Σ.τ. 190 - 192 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.95 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.56 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.47 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.42 (s, 1H, H-4), 7.31 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.27 – 7.20 (m, 4H, H-2''', H-6''', H-2', H-6'), 7.07 - 6.98 (m, 3H, H-3''', H-5''', H-4'), 6.71 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 5.85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.1 (C-4'''), 143.4 (C-3), 140.80 (C-7), 139.3 (C-1'), 139.1 (C-5), 132.2 (C-1''), 130.2 (C-3a), 129.0 (C-3'', C-5'', C-3', C-5'), 128.4 (C-4''), 128.2 (C-7a), 127.7 (C-2'', C-6''), 127.7 (C-1'''), 127.2 (C-2''', C-6'''), 122.9 (C-4'), 119.2 (C-2', C-6'), 115.2 (C-3''', C-5'''), 106.2 (C-4), 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 55.4 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>OCl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 441.1477, ευρεθέν 441.1480.

#### **5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (46)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο επιδρώντας με 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνη (260 μl, 1.42 mmol) επί του παραγώγου **44** (500 mg, 1.30 mmol). Το προϊόν

καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Απόδοση 82% (530 mg). Σ.Τ. 183 - 185 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.54 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.97 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.55 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.52 (s, 1H, H-4), 7.46 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.12 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-2''', H-6'''), 6.94 (s, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.86 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-3''', H-5'''), 6.01 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.78 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3H, 4'''-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 159.2 (C-4'''), 153.0 (C-3', C-5'), 142.9 (C-3), 141.7 (C-5), 141.6 (C-7), 138.6 (C-7a), 136.4 (C-1'), 133.5 (C-4'), 132.2 (C-1''), 129.5 (C-1'''), 129.5 (C-3'', C-5''), 128.8 (C-4''), 128.7 (C-2''', C-6'''), 128.0 (C-3a), 127.2 (C-2'', C-6''), 114.6 (C-3''', C-5'''), 105.7 (C-4), 98.5 (C-2', C-6), 60.5 (4'-OCH<sub>3</sub>), 56.1 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 55.4 (4'''-OCH<sub>3</sub>), 54.8 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Cl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 531.1794, ευρεθέν 531.1800.

#### 4.3.1.3. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών 47 – 48

##### 5-Χλωρο-*N*,3-διφαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (47)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **23** - **24**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-*N*,3-διφαινυλ-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**45**) (500 mg, 1.13 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 94% (340 mg). Σ.Τ. 125 – 127 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.83 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.53 (t, *J* = 8 Hz, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 1H, H-), 7.27 (s, 1H, H-4), 7.14 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 143.6 (C-3), 139.8 (C-7), 139.2 (C-5, C-1'), 129.4 (C-1''), 128.9 (C-3', C-5'), 128.8 (C-3'', C-5'', C-4''), 128.3 (C-7a), 127.0 (C-3a), 126.8 (C-2'', C-6''), 122.5 (C-4'), 118.8 (C-2', C-6'), 104.0 (C-4). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>Cl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 321.0902, ευρεθέν 321.0908.

#### 5-Χλωρο-3-φαινυλο-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (48)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των αποπροστατευμένων 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **23** - **24**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-1-(4μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλ-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**46**) (500 mg, 1.01 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 95% (360 mg).  $\Sigma. \tau.$  > 250 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 7.87 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.76 (s, 1H, H-4), 7.55 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', 5''), 7.45 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.30 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.93 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 153.1 (C-3', C-5'), 142.3 (C-7), 137.4 (C-3), 135.6 (C-5), 133.4 (C-1'), 132.1 (C-1''), 131.2 (C-4''), 128.8 (C-3'', C-5''), 128.7 (C-7a), 128.4 (C-4''), 126.7 (C-2'', C-6''), 126.6 (C-3a), 103.8 (C-4), 97.1 (C-2', C-6'), 60.2 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.3 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 411.1218, ευρεθέν 411.1226.

#### 4.3.1.4. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών 49 – 50

##### *N*,3-Διφαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (49)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **25** - **26**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-*N*,3-διφαινυλ-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**47**) (300 mg, 0.94 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 79% (210 mg).  $\Sigma. \tau.$  212 – 214 °C (EtOAc – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 7.90 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-2'', H-6''), 7.71 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H-5), 7.54 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.47 – 7.37 (m, 4H, H-4'', H-3', H-5', H-4), 7.35 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.13 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 144.6 (C-3), 140.6 (C-7), 139.3 (C-1'), 136.0 (C-5), 130.4 (C-1''), 129.7 (C-3'', C-5''), 129.1 (C-3', C-5'), 128.9 (C-4''), 128.9 (C-7a), 128.8 (C-3a), 126.9 (C-2'',

C-6''), 122.5 (C-4'), 118.8 (C-2', C-6'), 106.5 (C-4). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $C_{18}H_{15}N_4^+$  [MH<sup>+</sup>]: 287.1211, ευρεθέν 287.1218.

### **3-Φαινυλο-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (50)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών **25** - **26**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-3-φαινυλο-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (**50**) (200 mg, 0.53 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία σε αναλογία 1 / 2. Απόδοση 94% (145 mg). Σ.τ. > 250 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 13.22 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 9.03 (brs, D<sub>2</sub>O exch, 1H, NH), 8.01 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.87 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 7.55 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.44 (m, 2H, H-4'', H-4), 7.30 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.82 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.60 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 152.8 (C-3', C-5'), 143.70 (C-7), 142.2 (C-3), 137.4 (C-5), 136.9 (C-1'), 133.0 (C-4'), 132.3 (C-1''), 129.0 (C-3'', C-5''), 128.4 (C-4''), 128.0 (C-7a), 126.5 (C-2'', C-6''), 123.7 (C-3a), 106.0 (C-4), 96.5 (C-2', C-6'), 60.2 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.8 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $C_{21}H_{21}N_4O_3^+$  [MH<sup>+</sup>]: 377.1608, ευρεθέν 377.1606.

## **4.3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 5-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ 3-ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ II**

### **4.3.2.1. Σύνθεση του 7-χλωρο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιου (52)**

#### **7-Χλωρο-3-ιωδο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (51)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του ιωδοπαραγώγου **17**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (**29**) (1.6 g, 8.96 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Απόδοση 80% (2.2 g). Σ.τ. 233 – 235 °C (MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.21 (s, 1H, H-4). <sup>13</sup>C-

**NMR** (151 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 137.6 (C-7), 136.2 (C-7a), 133.9 (C-3a), 123.2 (C-4), 122.8 (C-5), 117.8 (CN), 95.1 (C-3).

#### **7-Χλωρο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (52)**

Σε διάλυμα της ιωδοπυραζολοπυριδίνης **51** (5 g, 16.42 mmol) εντός μίγματος τολουολίου (150 ml) / αιθανόλης (20 ml) προστίθεται υπό ατμόσφαιρα αργού φαινυλοβορικό οξύ (2.2 g, 18.10 mmol) και τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο) παλλάδιο(0) (930 mg, 0.80 mmol). Ακολούθως προστίθεται όξινο ανθρακικό νάτριο (4.13 g, 49.26 mmol) και φθοριούχο κάλιο (2.86 g, 49.26 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (100 °C) για 20 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και αραιό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου 5%, η οργανική φάση συλλέγεται και ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα φέρεται σε χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 4 / 1 οπότε λαμβάνονται 3.47 g (83%) του προϊόντος **52**.  $\text{S.T.} > 250^\circ\text{C}$  (Acetone).  **$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.99 (s, 1H, H-4), 8.11 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.58 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.52 (t,  $J = 8$  Hz, 1H, H-4').  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 146.2 (C-3), 136.8 (C-7), 135.2 (C-7a), 131.1 (C-1'), 129.3 (C-4'), 129.2 (C-3', C-5'), 127.1 (C-2', C-6'), 124.9 (C-5), 123.6 (C-4), 120.7 (C-3a), 117.6 (CN).

#### **4.3.2.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-παραγώγων του 3-φαινυλο-1H-πυραζολο-[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιου (54, 57)**

##### **7-(Φαινυλαμινο)-N,3-διφαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-καρβοξυμιδαμίδιο (53)**

Διάλυμα του 7-χλωρο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιου (**52**) (400 mg, 1.57 mmol) εντός ανιλίνης (10 ml) αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία βρασμού (180 °C) για 40 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθεται νερό και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται και μετά από έκπλυση με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 4%, ξηραίνεται υπεράνω

άνυδρου θειϊκού νατρίου, συμπυκνώνεται υπό κενό και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης silica gel, όπου απομονώνεται το παράγωγο **53**, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 4 / 1. Απόδοση 49% (310 mg). Σ.τ. >250 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.25 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 8.34 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 8.01 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.81 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.60 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-4), 7.47 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.40 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.34 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3''', H-5'''), 7.06 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 7.01 (m, 3H, H-2''', H-4''', H-6'''). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 168.6 (C=NH), 152.7 (C-5), 150.6 (C-1'''), 140.4 (C-7), 140.1 (C-3), 134.0 (C-1'), 132.2 (C-1''), 129.1 (C-3'', C-5''), 129.1 (C-3''', C-5'''), 128.9 (C-3', C-5'), 128.3 (C-4''), 126.7 (C-2'', C-6''), 124.1 (C-7a), 122.2 (C-3a), 121.9 (C-4'''), 121.7 (C-4'), 119.4 (C-2', C-6'), 119.2 (C-2''', C-6'''), 104.3 (C-4). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 405.1822, ευρεθέν 405.1827.

**7-(Φαινυλαμινο)-3-φαινυλο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (55)**

Σε διάλυμα του χλωριδίου **45** (560 mg, 1.43 mmol) εντός άνυδρου διμεθυλακεταμιδίου (30 ml) προστίθενται υπό ατμόσφαιρα αργού Zn(CN)<sub>2</sub> (100.4 mg, 0.855 mmol) και σκόνη ψευδαργύρου (10.1 mg, 1.55 mmol). Κατόπιν προστίθενται Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (26.21 mg, 0.010 mmol) και δις(διφαινυλοφωσφίνο) φερροκένιο (dppf, 31.55 mg, 0.057 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία βρασμού (180 °C) για 90 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα ψύχεται, προστίθεται νερό και πάγος και ακολουθεί διήθηση, από την οποία απομονώνεται καθαρό το προϊόν (απόδοση 90 %, 490 mg). Σ.τ. 186 – 188 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.95 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.90 (s, 1H, H-4), 7.59 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.52 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.33 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.30 – 7.23 (m, 4H, H-2', H-6', H-2''', H-6'''), 7.09 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 7.04 (d, *J* = 9 Hz, H, H-3''', H-5'''), 6.84 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 5.94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.4 (C-4'''), 145.1 (C-3), 142.7 (C-7), 138.7 (C-1'), 131.6 (C-1''), 129.3 (C-3a), 129.2 (C-3'', C-5''), 129.1 (C-4''), 129.0 (C-3', C-5'), 127.8 (C-1'''), 127.7 (C-2''', C-6'''), 127.4 (C-2'', C-6''), 126.8 (C-7a), 123.4 (C-4'), 121.4 (C-5), 119.8 (C-2', C-6'), 118.7 (CN), 115.6 (C-4), 115.4 (C-3''', C-5'''), 55.7 (CH<sub>2</sub>),

55.5 (OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 432.1819, ευρεθέν 432.1821.

**1-(4-Μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (56)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του παραγώγου **55**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωρίδιο **46** (600 mg, 1.11 mmol). Απόδοση 91% (530 mg). Σ.τ. 188 – 190 °C (EtOAc - Cyclohexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.83 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.76 (s, 1H, H-4), 7.47 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.39 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.17 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2''', H-6'''), 6.90 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-3''', H-5'''), 6.45 (s, 2H, H-2', H-6'), 5.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.70 (s, 3H, 4'''-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.2 (C-4'''), 153.0 (C-3', C-5'), 144.9 (C-3), 142.6 (C-7), 134.7 (C-1'), 133.8 (C-4'), 131.4 (C-1''), 129.1 (C-3'', C-5''), 129.0 (C-4''), 128.9 (C-7a), 127.8 (C-2''', C-6'''), 127.7 (C-1'''), 127.3 (C-2'', C-6''), 126.6 (C-3a), 121.2 (C-5), 118.6 (CN), 115.18 (C-3''', C-5'''), 114.9 (C-4), 97.4 (C-2', C-6'), 60.8 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 55.61 (CH<sub>2</sub>), 52.3 (4'''-OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 522.2136, ευρεθέν 522.2141.

**3-Φαινυλο-7-(φαινυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (54)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας των πυραζολοπυριδινών **23 - 24**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 7-(φαινυλαμινο)-3-φαινυλο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (**55**) (400 mg, 1.05 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 94% (260 mg). Σ.τ. 248 - 250 °C (EtOAc - Cyclohexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.03 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.91 – 7.86 (m, 4H, H-2', H-6'), 7.81 (s, 1H, H-4), 7.54 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.47 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.37 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.09 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 139.4 (C-1', C-7), 136.2 (C-3), 131.6 (C-1''), 129.1 (C-3'', C-5''), 128.9 (C-3', C-5'), 128.8 (C-4'', C-7a), 127.2 (C-2'', C-6''), 123.1 (C-4'), 122.8 (C-3a), 120.4 (C-

5), 119.8 (C-2', C-6'), 119.1 (CN), 114.7 (C-4). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $C_{19}H_{14}N_5^+$   $[MH^+]$ : 312.1244, ευρεθέν 312.1251.

### **3-Φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (57)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας των πυραζολοπυριδινών **23** - **24**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (**56**) (500 mg, 0.94 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 90% (360 mg). Σ.τ. > 250 °C (EtOAc).  $^1H$ -NMR (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.39 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 8.14 (s, 1H, H-4), 8.01 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.54 (t,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.46 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.34 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 3.81 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.65 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>).  $^{13}C$ -NMR (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 152.7 (C-3', C-5'), 135.8 (C-1', C-7), 133.2 (C-3), 133.0 (C-4', C-1''), 129.1 (C-3'', C-5''), 128.9 (C-7a), 128.72 (C-4''), 126.8 (C-2'', C-6'', C-3a), 119.9 (C-5), 119.2 (CN), 114.6 (C-4), 97.4 (C-2', C-6'), 59.7 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.6 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $C_{22}H_{20}N_5O_3^+$   $[MH^+]$ : 402.1561, ευρεθέν 402.1568.

#### **4.3.2.3. Σύνθεση των 1-{7-αρυλαμινο-3-φαινυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-υλο}μεθαναμινών 58 - 59**

##### **1-{7-Φαινυλαμινο-3-φαινυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό}μεθαναμίνη (58)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-αμινομεθυλο-υποκατεστημένων πυραζολοπυριδινών **32** - **33**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 3-φαινυλο-7-(φαινυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (**53**) (830 mg, 2.67 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται μέσω χρωματογραφίας στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης / τριαιθυλαμίνης σε αναλογία 50 / 1 / 0.5. Απόδοση 69% (580 mg). Σ.τ. 188 - 190 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).  $^1H$ -NMR (600 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 7.90 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.86 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.51 (t,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.40 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H, H-

4''), 7.35 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.25 (s, 1H, H-4), 7.03 (t,  $J = 8$  Hz, 1H, H-4'), 4.65 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 148.3 (C-5), 144.4 (C-3), 142.3 (C-7), 140.0 (C-1'), 131.8 (C-1''), 128.1 (C-3'', C-5''), 128.0 (C-3', C-5'), 127.5 (C-4''), 126.3 (C-2'', C-6''), 126.1 (C-7a), 123.4 (C-3a), 121.3 (C-4'), 118.3 (C-2', C-6'), 101.9 (C-4), 46.3 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 316.1557, ευρεθέν 316.1563.

#### 1-{7-(3,4,5-Τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-3-φαινυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδino} μεθαναμίνη (59)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-αμινομεθυλο-υποκατεστημένων πυραζολοπυριδινών **32 – 33**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδino-5-καρβονιτρίλιο (**57**) (900 mg, 2.24 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται μεσω χρωματογραφίας στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 4 / 1. Απόδοση 72% (650 mg). Σ.Τ. 197 - 199 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 7.86 (d,  $J = 8$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.49 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.40 (t,  $J = 8$  Hz, 1H, H-4''), 7.31 (s, 1H, H-4), 7.23 (s,  $J = 8$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.73 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 4.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.89 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.81 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 152.6 (C-3', C-5'), 143.3 (C-5), 142.8 (C-3, C-7), 136.2 (C-1'), 132.5 (C-4'), 131.6 (C-1'') 129.6 (C-7a), 128.3 (C-3'', C-5''), 127.8 (C-4''), 126.4 (C-2'', C-6''), 123.7 (C-3a), 103.6 (C-4), 96.6 (C-2', C-6'), 60.1 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.2 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 45.0 (CH<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 406.1874, ευρεθέν 406.1880.

#### 4.3.2.4. Σύνθεση των N-υποκατεστημένων 1-{7-αρυλαμινο-3-φαινυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδino}μεθαναμινών **60 - 65**

##### N-Φαινυλομεθυλο-1-{7-φαινυλαμινο-3-φαινυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδino} μεθαναμίνη (60)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **58** (150 mg, 0.48 mmol) και επιδρώντας με βενζαλδεΰδη (68  $\mu$ l, 0.67

mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 9 / 1. Απόδοση 80 % (130 mg). Σ.Τ. 156 – 158 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Πετρελαϊκός αιθέρας). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.70 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.54 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.39 – 7.35 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-4''), 7.34 – 7.30 (m, 5H, H-benzylamine), 7.15 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-3', H-5'), 7.06 (s, 1H, H-4), 6.95 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - phenyl), 3.88 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 144.5 (C-5), 143.1 (C-3), 140.9 (C-7), 140.1 (C-1'), 137.8 (C-1'''), 132.2 (C-1''), 128.8 (C-3'', C-5''), 128.7 (C-3', C-5'), 128.6 (C-2''', C-3''', C-5''', C-6'''), 128.0 (C-7a), 127.6 (C-4''), 127.0 (C-2'', C-6''), 126.9 (C-4'''), 124.3 (C-3a), 122.3 (C-4'), 119.6 (C-3', C-6'), 104.4 (C-4), 53.6 (CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 52.8 (CH<sub>2</sub> - phenyl). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 406.2026, ευρεθέν 406.2036.

***N*-Φαινυλομεθυλο-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-3-φαινυλο-5-1*H*-πυραζολο [3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (61)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **59** (150 mg, 0.37 mmol) και επιδρώντας με βενζαλδεΰδη (53 μl, 0.52 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση οξικού αιθυλεστέρα / μεθανόλης σε αναλογία 7 / 1. Απόδοση 82 % (150 mg). Σ.Τ. 118 – 120 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Πετρελαϊκός αιθέρας). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 7.80 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.41 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.28-7.37 (m, 5H, H-benzylamine), 7.25 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.17 (s, 1H, H-4), 6.92 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 3.90 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - phenyl), 3.79, (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.60 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 153.00 (C-3', C-5'), 146.07 (C-5), 143.15 (C-3, C-7), 139.07 (C-1'''), 136.5 (C-1'), 132.9 (C-4'), 132.2 (C-1''), 130.3 (C-7a), 128.8 (C-3'', C-5''), 128.5 (C-2''', C-6'''), 128.4 (C-3''', C-5'''), 128.1 (C-4''), 127.3 (C-4'''), 126.8 (C-2'', C-6''), 124.5 (C-3a), 104.2 (C-4), 97.2 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 56.9 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 54.5 (CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 53.4 (CH<sub>2</sub> - phenyl). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 496.2243, ευρεθέν 496.2341.

***N*-(3-Πυριδινυλομεθυλο)-1-{7-φαινυλαμινο-3-φαινυλο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριдино}μεθαναμίνη (62)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **58** (190 mg, 0.60 mmol) και επιδρώντας με 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη (79 μl, 0.84 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα οξικού αιθυλεστέρα / μεθανόλης σε αναλογία 7 / 1. Απόδοση 86 % (180 mg). Σ.Τ. 122 – 124 °C (EtOAc – Πετρελαϊκός αιθέρας). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.48 (d, *J* = 1 Hz, 1H, pyridine – 2H), 8.45 (dd, *J* = 5 Hz, *J* = 1 Hz, 1H, pyridine – 6H), 7.82 (d, *J* = 8 Hz, 1H, pyridine – 4H), 7.77 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.71 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.41 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.34 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.28 (dd, *J* = 8 Hz, *J* = 5 Hz, 1H, pyridine – 5H), 7.24 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.17 (s, 1H, H-4), 6.96 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 3.92 (s, 2H, CH<sub>2</sub> – pyrazolopyridine), 3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub> – pyridine). <sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 149.9 (pyridine – 2C), 149.0 (pyridine – 6C), 144.6 (C-5), 140.5 (C-3, C-7), 137.4 (pyridine – 4C, C-1'), 135.7 (pyridine – 3C), 134.0 (C-1''), 132.6 (C-7a), 129.3 (C-3'', C-5''), 129.2 (C-3', C-5'), 128.6 (C-4''), 127.3 (C-2'', C-6''), 124.2 (pyridine – 5C), 124.0 (C-3a), 122.7 (C-4'), 119.6 (C-2', C-6'), 105.1 (C-4), 53.9 (CH<sub>2</sub> – pyrazolopyridine), 50.0 (CH<sub>2</sub> – pyridine). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 407.1982, ευρεθέν 407.1982.

***N*-(3-Πυριδινυλομεθυλο)-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-3-φαινυλο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριдино}μεθαναμίνη (63)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **59** (150 mg, 0.37 mmol) και επιδρώντας με 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη (49 μl, 0.52 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα οξικού αιθυλεστέρα / μεθανόλης 7 / 1. Απόδοση 87 % (160 mg). Σ.Τ. 117 – 119 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Πετρελαϊκός αιθέρας). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.55 (d, *J* = 2 Hz, 1H, pyridine – 2H), 8.45 (dd, *J* = 5 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, pyridine – 6H), 7.81 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.68 (t, *J* = 8 Hz, 1H, pyridine – 4H), 7.39 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.31 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.20 (dd, *J*

= 5 Hz,  $J$  = 2 Hz, 1H, pyridine – 5H), 7.17 (s, 1H, H-4), 6.95 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 3.84 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyridine), 3.76 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.60 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 149.5 (pyridine – 2C), 148.2 (pyridine – 6C), 146.3 (C-3), 143.4 (C-5), 143.0 (C-7), 136.6 (pyridine – 4C), 136.3 (C-1'), 135.5 (pyridine – 3C), 132.9 (C-4'), 132.1 (C-1''), 128.9 (C-3'', C-5''), 128.1 (C-4''), 126.8 (C-2'', C-6''), 124.4 (C-3a), 123.6 (pyridine – 5C), 104.1 (C-4), 97.1 (C-2', C-6'), 60.4 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 54.6 (CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 50.4 (CH<sub>2</sub> - pyridine). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 497.2296, ευρεθέν 497.2300.

***N*-(1-Μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-1-{7-φαινυλαμινο-3-φαινυλο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (64)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη αμίνη **58** (150 mg, 0.48 mmol) και επιδρώντας με 1-μεθυλο-4-πιπεριδινόνη (77  $\mu$ l, 0.67 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 4 / 1. Απόδοση 85 % (170 mg). Σ.Τ. 162 – 164 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 7.97 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.88 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.56 (t,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.45 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H, H-4''), 7.38 (t,  $J$  = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.37 (s, 1H, H-4), 7.06 (s, 1H, H-4'), 3.94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.92 – 2.87 (m, 2H, piperidine - 2H, piperidine - 6H), 2.71 – 2.62 (m, 1H, piperidine – 4H), 2.26 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.05 – 1.98 (m, 2H, piperidine - 3H, piperidine - 5H), 1.64 – 1.50 (m, 2H, piperidine - 3H, piperidine - 5H). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm) 148.0 (C-5), 144.8 (C-3), 142.0 (C-7, C-1'), 133.8 (C-1''), 130.2 (C-7a), 130.1 (C-3'', C-5''), 129.9 (C-3', C-5'), 129.4 (C-4''), 128.1 (C-2'', C-6''), 126.0 (C-3a), 123.2 (C-4'), 120.3 (C-2', C-6'), 105.1 (C-4), 55.3 (piperidine – 2C, piperidine – 6C), 54.6 (piperidine – 4C), 52.4 (CH<sub>2</sub>), 46.1 (N-CH<sub>3</sub>), 32.7 (piperidine – 3C, piperidine – 5C). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 413.2448, ευρεθέν 413.2453.

***N*-(1-Μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-3-φαινυλο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (65)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **59** (250 mg, 0.62 mmol) και επιδρώντας με 1-μεθυλο-4-πιπεριδινόνη (100 μl, 0.86 mmol). Το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 4 / 1. Απόδοση 84 % (260 mg). Σ.Τ. 100 – 102 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Πετρελαϊκός αιθέρας). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.77 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.34 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.12 (s, 3H, H-2', H-6', H-4), 6.48 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 3.82 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 2.72 – 2.70 (m, 2H, piperidine - 2H, piperidine - 6H), 2.58 – 2.41 (m, 1H, piperidine - 4H), 2.17 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 2.11 – 1.96 (m, 2H, piperidine - 2H, piperidine - 6H), 1.91 – 1.74 (m, 2H, piperidine - 3H, piperidine - 5H), 1.59 – 1.36 (m, 2H, piperidine - 3H, piperidine - 5H). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 146.8 (C-5), 143.4 (C-3), 143.0 (C-7), 137.1 (C-7), 136.6 (C-1'), 132.8 (C-1''), 129.8 (C-7a), 128.7 (C-3'', C-5''), 127.8 (C-4''), 126.9 (C-2'', C-6''), 124.6 (C-3a), 103.8 (C-4), 96.9 (C-2', C-6'), 60.9 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 54.4 (piperidine - 2C, piperidine - 6C), 54.0 (piperidine - 4C), 52.5 (CH<sub>2</sub>), 46.0 (N-CH<sub>3</sub>), 32.4 (piperidine - 3C, piperidine - 5C). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 503.2765, ευρεθέν 503.2762.

#### **4.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III**

##### **4.4.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 7-AMINO-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΚΑΙ 7-AMINO-5-ΧΛΩΡΟ-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟ-ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III**

##### **4.4.1.1α. Σύνθεση της 1-ακετυλο-5,7-διχλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (75)**

##### **2,6-Διχλωρο-4-μεθυλοπυριδίνη (67)<sup>230</sup>**

Εντός ανύδρου τετραϋδροφουρανίου (30 ml), προστίθεται στους –80 °C στάγδην και υπό αργό διάλυμα *n*-βουτυλολιθίου 1.6 M σε εξάνιο (18.75 ml, 30 mmol). Κατόπιν προστίθεται στάγδην στην ίδια θερμοκρασία διάλυμα της 2,6-διχλωροπυριδίνης

(**66**, 4.4 g, 30 mmol) εντός ανύδρου τετραϋδροφουρανίου (30 ml). Η θερμοκρασία του διαλύματος παραμένει στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά, σχηματίζεται ροδόχρουν ανιόν και τότε προστίθεται στάγδην μεθυλοιωδίδιο (4.56 ml, 30 mmol). Η αντίδραση αφήνεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά και κατόπιν ακολουθεί σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται υδρόλυση με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα και νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 9 / 1 και λαμβάνεται το προϊόν **67** ως ελαιώδες στερεό σε απόδοση 62 % (500 mg).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.06 (s, 2H, H-3, H-5), 2.32 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

#### **1-(2,6-Διχλωροπυριδιν-4-υλο)-2-μεθυλοπροπαν-2-όλη (**68**)**

Σε διάλυμα της διχλωροπυριδίνης **67** (600 mg, 3.70 mmol) εντός ανύδρου τετραϋδροφουρανίου (30 ml), προστίθεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  στάγδην και υπό αργό διάλυμα *n*-βουτυλολιθίου 1.6 M σε εξάνιο (2.78 ml, 4.44 mmol). Η θερμοκρασία του διαλύματος παραμένει στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά και στη συνέχεια αυξάνεται σταδιακά έως τους  $-45^{\circ}\text{C}$  όπου διατηρείται για μία ώρα οπότε σχηματίζεται πορτοκαλόχρουν ανιόν. Η θερμοκρασία κατόπιν φέρεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και προστίθεται στάγδην διάλυμα ακετόνης (0.24 ml, 4.074 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (4 ml). Η αντίδραση αφήνεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά και ακολουθεί σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί υδρόλυση με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα και νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 7 / 1 και λαμβάνεται το προϊόν **68** ως ελαιώδες στερεό σε απόδοση 62 % (500 mg).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.16 (s, 1H, H-3, H-5), 2.70 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.38 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 153.4 (C-4), 149.9 (C-2, C-6), 124.8 (C-3, C-5), 70.5 (C-OH), 48.2 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $(\text{CH}_3)_2$ ).

**2,6-διχλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)πυριδίνη (71)**

Σε διάλυμα της αλκοόλης **68** (1 g, 4.5 mmol) εντός ανύδρου τετραϋδροφουρανίου (50 ml) προστίθεται στους 0 °C στάγδην τριαιθυλαμίνη (1.88 ml, 13.5 mmol) και μεθανοσουλφονυλοχλωρίδιο (3.88 ml, 5 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο, ο οργανικός διαλύτης ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο και εξατμίζεται υπό κενό.

Το υπόλειμμα περιέχει το μίγμα των ολεφινικών ισομερών **69 - 70** (1 g, 4.95 mmol), το οποίο διαλύεται σε απόλυτη αιθανόλη (40 ml) και υδρογονώνεται παρουσία 10% Νικελίου του Raney, σε πίεση 50 psi και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας της αντίδρασης (10 ώρες), το μίγμα διηθείται υπό κελίτη, συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και νερό. Ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 95 / 5, οπότε και λαμβάνεται 300 mg ελαιώδους προϊόντος. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.00 (s, 1H, H-3, H-5), 2.40 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.92 – 1.78 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.87 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 154.36 (C-4), 148.13 (C-2, C-6), 124.36 (C-3, C-5), 44.38 (CH<sub>2</sub>), 30.06 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.02 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**2,6-Διχλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-νιτροπυριδίνη (72)**

Διάλυμα της πυριδίνης **71** (200 mg, 0.98 mmol) σε τριφθοροξικό ανυδρίτη (580 ml, 2.42 mmol) αναδεύεται στους 0 °C για 2 ώρες, στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα ατμίζοντος νιτρικού οξέος (110 μl, 2.08 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Κατόπιν προστίθεται διάλυμα μεταδιθειώδους νατρίου (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (185 mg, 2.42 mmol, σε 1.5 ml νερού) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αλκαλοποιείται με αραιό διάλυμα ανθρακικού νατρίου 5% (pH = 8) εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο, ο οργανικός διαλύτης ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το υπόλειμμα φέρεται σε χρωματογραφία στήλης silica gel όπου καθαρίζεται χρησιμοποιώντας ως

κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 9 / 1 και λαμβάνεται το ελαιώδες προϊόν **72** σε απόδοση 80 % (190 mg). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.25 (s, 1H, H-5), 2.47 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.99 – 1.86 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.91 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 150.6 (C-6), 148.1 (C-4), 145.6 (C-3), 141.6 (C-2), 125.0 (C-5), 39.9 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### **2,6-Διχλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)πυριδιν-3-αμίνη (73)**

Σε διάλυμα του νιτροπαραγώγου **72** (220 mg, 1.13 mmol) εντός πυκνού υδροχλωρικού οξέος (5 ml) προστίθεται στους 0 °C διχλωριούχος κασσίτερος (877 mg). Το μίγμα αφήνεται σε ανάδευση υπό ψύξη για 10 λεπτά και κατόπιν θερμαίνεται στους 50 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ψύχεται και προστίθεται στάγδην πυκνό διάλυμα καυστικού νατρίου στους 0 °C μέχρι αλκαλοποίησης. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο οπότε λαμβάνεται καθαρή η αμίνη **73** (180 g, 92 %) ως ελαιώδες στερεό. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.94 (s, 1H, H-5), 4.07 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 2.37 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.06 – 1.86 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.96 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 138.3 (C-6), 137.6 (C-4), 137.2 (C-3), 135.1 (C-2), 124.3 (C-5), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### **N-[2,6-Διχλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-πυριδιν]ακεταμίδιο (74)**

Σε διάλυμα της αμίνης **73** (500 mg, 2.28 mmol) εντός άνυδρου τολουολίου (10 ml) προστίθεται ισομοριακή ποσότητα οξικού ανυδρίτη (230 μl). Το μίγμα αφήνεται προς ανάδευση σε θερμοκρασία βρασμού για 1 ώρα υπό άνυδρες συνθήκες. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό, ενώ το προϊόν λαμβάνεται σε καθαρή μορφή από το υπόλειμμα μετά από χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 7 / 1, ως λευκό στερεό (530 mg, 90%). Σ.Τ. 118 – 120 °C (Et<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.23 (brs, D<sub>2</sub>O exch, 1H, NH), 7.07 (s, 1H, H-5), 2.36 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.11 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.85 – 1.77 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.82 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 169.9 (C=O), 154.7 (C-2), 149.0 (C-4), 147.9 (C-6), 129.5 (C-3), 124.3 (C-5), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.9 (COCH<sub>3</sub>), 22.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**1-Ακετυλο-5,7-διχλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (75)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για τη λήψη του παραγώγου **9**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ακεταμίδιο **74** (140 mg, 0.54 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 7 / 1. Απόδοση 30% (40 mg). Σ.τ. 64 – 66 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.56 (s, 1H, H-4), 3.31 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.78 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.42 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 168.4 (C=O), 154.7 (C-7), 142.4 (C-3), 136.7 (C-5), 136.2 (C-7a), 134.2 (C-3a), 113.3 (C-4), 27.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.9 (COCH<sub>3</sub>), 21.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**4.4.1.16. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (89)****(4-Μεθυλοπυριδιν-2-υλο)καρβαμιδικός *tert* – βουτυλεστέρας (76)** <sup>231</sup>

Εντός *tert*-βουτανόλης (30 ml) προστίθεται 2-αμινο-4-πικολίνη (**1**, 15 g, 0.139 mol), και κατόπιν δι-*tert*-βουτυλικός ανυδρίτης (33.23 g, 0.153 mol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 3 ώρες και στη συνέχεια η *tert*-βουτανόλη απομακρύνεται υπό κενό, στο υπόλειμμα προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας, το μίγμα θερμαίνεται και ακολουθεί διήθηση. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπο κενό, το υπόλειμμα κατεργάζεται με μεθανόλη, οπότε και απομονώνεται καθαρό το παράγωγο **76**, ως λευκό στερεό. Απόδοση 90% (25 g). Σ.τ. 117 – 119 °C (EtOAc). (Βιβλ. <sup>230</sup> 119 °C). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.85-8.80 (brs, D<sub>2</sub>O exch, 1H, NH), 8.16 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-6), 7.82 (s, 1H, H-3), 6.78 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-5), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.54 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**[4-(2-Μεθυλοπροπυλο)πυριδιν-2-υλο]καρβαμιδικός *tert* – βουτυλεστέρας (77)**

Σε διάλυμα της πυριδίνης **76** (2 g, 9.61 mmol) εντός ανύδρου τετραϋδροφουρανίου (30 ml), προστίθεται στους – 80 °C στάγδην και υπό αργό διάλυμα *n*-βουτυλολιθίου 1.6 M σε εξάνιο (14.89 ml, 23.82 mmol). Κατόπιν το μίγμα έρχεται σταδιακά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όπου και παραμένει για 50 λεπτά. Σχηματίζεται

πορτοκαλέρυθρο ανιόν και στη συνέχεια η θερμοκρασία φέρεται εκ νέου στους  $-80^{\circ}\text{C}$  όπου και προστίθεται στάγδην ισοπροπυλοβρωμίδιο (1.33 ml, 14.11 mmol). Η αντίδραση αφήνεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 30 λεπτά και κατόπιν ακολουθεί σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας. Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται υδρόλυση με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1 και λαμβάνεται το ελαιώδες προϊόν **77** σε απόδοση 65 % (1.56 g).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.11 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-6), 8.00 (s, 1H, H-3), 6.70 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-5), 2.40 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.92 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.51 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ). 0.93 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 153.3 (C-2), 151.3 (C-4), 144.5 (C-6), 114.8 (C-5), 109.6 (C-3), 83.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 44.8 ( $\text{CH}_2$ ), 32.0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 29.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.3 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### 4-(2-Μεθυλοπροπυλο)πυριδιν-2-αμίνη (**78**)<sup>232</sup>

Σε διάλυμα του παραγώγου **83** (3 g, mmol) εντός απόλυτης αιθανόλης (20 ml) προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 18% (4 ml) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αλκαλοποιείται υπό ψύξη με αραιό διάλυμα καυστικού νατρίου 10 % και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο θειϊκό νάτριο, ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 97% (1.75 g). Σ.Τ. 67- 69  $^{\circ}\text{C}$  ( $\text{Et}_2\text{O}$ -Cyclohexane).  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.96 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-6), 6.48 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-5), 6.31 (s, 1H, H-3), 4.42 (brs, 2H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch,  $\text{NH}_2$ ), 2.36 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.88 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.92 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 158.4 (C-2), 152.4 (C-4), 147.6 (C-6), 115.5 (C-5), 108.9 (C-3), 44.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.3 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### 4-(2-Μεθυλοπροπυλο)-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (80)

Λαμβάνεται με τη μέθοδο νίτρωσης που εφαρμόστηκε για τη λήψη των παραγώγων **2** και **3** (**3.1.1.1.**) χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυριδίνη **78** (13 g, 86.77 mmol). Από την αντίδραση λαμβάνονται δύο ισομερή (**79** και **80**) τα οποία διαχωρίζονται μέσω χρωματογραφίας στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 52% (8.9 g). Σ.τ. 154 - 156 °C (Et<sub>2</sub>O-Cyclohexane). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.70 (s, 1H, H-6), 7.25 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 6.22 (s, 1H, H-3), 2.67 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.74 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.84 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.6 (C-2), 148.7 (C-4), 148.2 (C-6), 137.9 (C-5), 109.6 (C-3), 42.5 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 4-(2-Μεθυλοπροπυλο)-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (79)

Απόδοση 24% (4 g). Σ.τ. 77 - 79 °C (Et<sub>2</sub>O-Cyclohexane). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.09 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-6), 6.56 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-5), 6.07 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 2.73 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.01 – 1.85 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.95 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.0 (C-2), 150.8 (C-6), 149.0 (C-4), 131.5 (C-3), 116.9 (C-5), 42.1 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 4-(2-Μεθυλοπροπυλο)-5-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (81)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή της πυριδινόνης **5**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **80** (8 g, 41.03 mmol). Απόδοση 83% (6.64 g). Σ.τ. 155 – 157 °C (EtOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.58 (s, 1H, H-6), 6.22 (s, 1H, H-3), 2.69 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.74 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.87 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 161.8 (C-2), 148.2 (C-4), 140.3 (C-6), 131.6 (C-5), 119.6 (C-3), 41.8 (CH<sub>2</sub>), 27.7 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 2-Χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-5-νιτροπυριδίνη (82)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του χλωριδίου **6**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυριδινόνη **81** (6 g, 27.97 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως

κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 20 / 1, και λαμβάνεται ως ελαιώδες σώμα. Απόδοση 91% (6 g).  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.85 (s, 1H, H-6), 7.28 (s, 1H, H-3), 2.79 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.97 – 1.82 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.90 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 154.7 (C-2), 148.6 (C-5), 146.2 (C-6), 145.2 (C-4), 126.9 (C-3), 40.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.2 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### 6-Χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)πυριδιν-3-αμίνη (83)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή της αμίνης **7**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τη νιτροπυριδίνη **82** (5 g, 23.31 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 8 / 1, οπότε και λαμβάνονται 3.27 g (76%) ελαιώδους παραγώγου.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.73 (s, 1H, H-2), 6.88 (s, 1H, H-5), 4.61 (brs, 2H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch,  $\text{NH}_2$ ), 2.28 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.89 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.93 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 140.6 (C-3), 139.6 (C-6), 137.7 (C-4), 135.9 (C-2), 124.6 (C-5), 39.7 ( $\text{CH}_2$ ), 26.9 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

#### N-[6-Χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-πυριδιν]ακεταμίδιο (84)

Ακολουθείται αντίδραση ακετυλίωσης ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για τη λήψη του ακεταμιδίου **8**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **83** (3 g, 13.24 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 89% (3.28 g).  $\Sigma.τ.$  137 - 139 °C ( $\text{EtOAc} - n\text{-pentane}$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.57 (s, 1H, H-2), 7.64 (brs,  $\text{D}_2\text{O}$  exch, 1H, NH), 7.15 (s, 1H, H-5), 2.44 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.21 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.97 – 1.80 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.93 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 169.0 (C=O), 147.5 (C-6), 147.2 (C-4), 146.1 (C-2), 131.8 (C-3), 125.0 (C-5), 39.8 ( $\text{CH}_2$ ), 28.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.7 ( $\text{COCH}_3$ ), 22.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### 1-Ακετυλο-5-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (85)

Ακολουθείται αντίδραση ενδομοριακής κύκλωσης ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για τη λήψη του παραγώγου **9**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ακεταμίδιο **84** (1.62 g, 7.15 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 93% (1.60 g). Σ.τ. 100 - 102 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-pentane). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.47 (s, 1H, H-7), 7.64 (s, 1H, H-4), 3.36 – 3.30 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.75 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.45 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 170.1 (C=O), 155.6 (C-3), 144.1 (C-5), 138.0 (C-7), 135.6 (C-3a), 132.8 (C-7a), 114.4 (C-4), 27.7 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.4 (COCH<sub>3</sub>), 21.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### 5-Χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (86)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του παραγώγου **10**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυραζολοπυριδίνη **85** (1.1 g, 4.57 mmol). Απόδοση 94% (850 mg). Σ.τ. 159 - 161 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.87 (s, 1H, H-7), 7.71 (s, 1H, H-4), 3.42 – 3.38 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.46 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 151.3 (C-3), 139.0 (C-5), 137.3 (C-7a), 133.9 (C-7), 127.9 (C-3a), 114.4 (C-4), 27.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.9 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### 5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (87)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του παραγώγου **17**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυραζολοπυριδίνη **86** (1.34 g, 7.38 mmol). Το ελαιώδες προϊόν λαμβάνεται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 72% (1.55 g). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.48 (s, 1H, H-7), 7.61 (s, 1H, H-4), 7.16 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.82 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 5.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.40 – 3.28 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.4 (C-4'), 150.0 (C-3), 139.6 (C-5), 136.4 (C-7a), 133.0

(C-7), 129.0 (C-1'), 128.8 (C-2', C-6'), 127.8 (C-3a), 114.2 (C-3', C-5', C-4), 55.1 (CH<sub>2</sub>), 53.2 (OCH<sub>3</sub>), 27.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>OCl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 316.1211, ευρεθέν 316.1220.

**6-Οξείδιο της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (88)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του *N*-οξειδίου **19**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το παράγωγο **87** (1.22 g, 4.07 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα οξικού αιθυλεστέρα / μεθανόλης σε αναλογία 10 / 1. Απόδοση 75% (960 mg). Σ.Τ. 150 - 152 °C (MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.71 (s, 1H, H-7), 7.83 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.85 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 5.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.77 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.34 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.45 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 159.4 (C-4'), 147.4 (C-3), 138.2 (C-5), 128.9 (C-7a, C-1'), 128.7 (C-2', C-6'), 124.3 (C-7), 122.0 (C-3a), 117.5 (C-4), 113.8 (C-3', C-5'), 113.3, 54.2 (CH<sub>2</sub>), 52.5 (OCH<sub>3</sub>), 27.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.9 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**5,7-Διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (89)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του διχλωριδίου **20**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το *N*-οξείδιο **88** (900 mg, 2.71 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 6 / 1. Απόδοση 89% (880 mg). Σ.Τ. 83 - 85 °C (Et<sub>2</sub>O - *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.53 (s, 1H, H-4), 7.12 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.79 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 5.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.31 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.2 (C-4'), 150.8 (C-3), 137.7 (C-7), 133.4 (C-5), 132.2 (C-1'), 131.3 (C-7a), 129.3 (C-3a), 128.4 (C-2', C-6'), 114.0 (C-3', C-5'), 113.8 (C-4), 55.2 (CH<sub>2</sub>), 53.5 (OCH<sub>3</sub>), 27.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>OCl<sub>2</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 350.0821, ευρεθέν 350.0827.

#### 4.4.1.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλοαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 90-91

Για τη σύνθεση των πυραζολοπυριδινών **90** – **91**, ακολουθήθηκε η γενική μέθοδος παρασκευής των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών **21** - **22**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλοαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**89**).

##### 5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλοαιθυλο)-N-φαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (**90**)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο επιδρώντας με ανιλίνη (173 μl, 1.9 mmol) επί του παραγώγου **89** (400 mg, 1.27 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 4 / 1. Απόδοση (85%, 400 mg). Σ.τ. 190 – 192 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.28 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.24 81 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.15 (m, 3H, H-2'', H-6'', H-4), 7.01 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 6.99 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 6.69 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 5.71 (s, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.39 – 3.32 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.50 (t, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.0 (C-4''), 150.0 (C-3), 140.6 (C-7), 139.6 (C-1'), 137.9 (C-5), 130.5 (C-7a), 128.9 (C-3', C-5'), 128.9 (C-1''), 127.6 (C-2'', C-6''), 127.3 (C-3a), 122.6 (C-4'), 119.0 (C-2', C-6'), 115.1 (C-3'', C-5''), 105.8 (C-4), 55.4 (CH<sub>2</sub>), 54.8 (OCH<sub>3</sub>), 27.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>OCl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 407.1633, ευρεθέν 407.1639.

##### 5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλοαιθυλο)-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-7-αμίνη (**91**)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο επιδρώντας με 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνη (400 mg, 2.22 mmol) επί του παραγώγου **89** (460 mg, 1.46 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1. Απόδοση 80% (540 mg). Σ.τ. 124 – 126 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 7.29 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.25 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.22 (s, 1H, H-4), 7.00 (d, *J* = 8 Hz,

2H, H-3'', H-5''), 6.86 (s, 2H, H-2', H-6'), 5.91 (s, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.81 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.70 (s, 3H, 4''-OCH<sub>3</sub>), 3.39 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.45 (t, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 160.8 (C-4''), 154.2 (C-3', C-5'), 150.7 (C-3), 141.9 (C-7), 138.2 (C-1'), 136.8 (C-5), 134.7 (C-1''), 131.4 (C-4'), 130.3 (C-7a), 128.8 (C-2'', C-6''), 127.8 (C-3a), 115.6 (C-3'', C-5''), 105.7 (C-4), 98.5 (C-2', C-6'), 60.6 (4'-OCH<sub>3</sub>), 56.3 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 55.6 (CH<sub>2</sub>), 55.3 (4''-OCH<sub>3</sub>), 28.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.3 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 496.1877, ευρεθέν 496.1884.

#### 4.4.1.3. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών 92 – 93

##### 5-Χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-*N*-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (92)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας των πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **21** - **22**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-*N*-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**90**, 120 mg, 0.32 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 93% (75 mg). Σ.τ. 166 – 168 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.81 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.34 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.05 (s, 1H, H-4), 7.04 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 3.36 – 3.29 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 (t, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, MeOD) δ (ppm) 149.9 (C-3), 142.1 (C-7), 139.8 (C-1'), 137.2 (C-5), 129.4 (C-7a), 128.6 (C-3', C-5'), 125.8 (C-3a), 122.4 (C-4'), 118.8 (C-2', C-6'), 103.6 (C-4), 27.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.3 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 287.1058, ευρεθέν 287.1064.

##### 5-Χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (93)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας των πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **21** - **22**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυφαινυλομεθυλο)-3-(1-μεθυλαιθυλο)-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**91**) (150 mg, 0.33 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται

με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 91% (100 mg). Σ.τ. 238 – 240 °C (Et<sub>2</sub>O – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.07 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.09 (s, 1H, H-4), 6.97 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.85 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.34 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.44 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 150.5 (C-3), 142.1 (C-7), 137.3 (C-5), 135.7 (C-1'), 133.3 (C-4'), 129.0 (C-7a), 126.7 (C-3a), 104.2 (C-4), 97.8 (C-2', C-6'), 61.1 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.8 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 27.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.9 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Cl<sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 377.1375, ευρεθέν 377.1380.

#### 4.4.1.4. Σύνθεση των αφαλογονομένων 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 5-χλωρο-3-(1-μεθυλοαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών 94 – 95

##### 3-(1-Μεθυλοαιθυλο)-N-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (94)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **25** - **26**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-3-(1-μεθυλοαιθυλο)-N-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**92**) (100 mg, 0.40 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 1. Απόδοση 83% (70 mg). Σ.τ. 170 - 172 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>- *n*-hexane). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.65 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H-5), 7.51 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.21 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.03 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H-4), 6.97 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 3.35 – 3.28 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.39 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 150.7 (C-3), 143.4 (C-7), 138.6 (C-1'), 133.2 (C-5), 129.6 (C-7a), 129.2 (C-3', C-5'), 124.5 (C-3a), 124.1 (C-4'), 121.5 (C-2', C-6'), 106.3 (C-4), 27.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 253.1448, ευρεθέν 253.1453.

##### 3-(1-Μεθυλοαιθυλο)-N-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (95)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **25** - **26**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 5-χλωρο-3-(1-

μεθυλαιθυλο)-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**93**) (120 mg, 0.35 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 1 / 2. Απόδοση 88% (95 mg). Σ.τ. 160 - 162 °C (EtOAc - Et<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.65 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 6.95 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-4), 6.62 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.55 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.48 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.30 – 3.21 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 151.3 (C-3), 143.7 (C-7), 136.2 (C-5), 135.6 (C-4'), 133.2 (C-1'), 129.5 (C-7a), 124.6 (C-3a), 106.2 (C-4), 98.5 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 27.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 343.1765, ευρεθέν 343.1771.

#### 4.4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ 3-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΟΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ III, *R* = -CN, -CH<sub>2</sub>NHAr, -CH<sub>2</sub>NHR

##### 4.4.2.1. Σύνθεση του 7-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτριλίου (**102**)

##### 4-(2-Μεθυλοπροπυλο)-3-νιτροπυριδίν-2(1*H*)-όνη (**96**)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή της πυριδινόνης **5**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (**79**, 4 g, 20.51 mmol). Απόδοση 85% (3.4 g). Σ.τ. 228 - 230 °C (EtOH). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 7.58 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-6), 6.27 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-5), 2.32 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.96 – 1.85 (oct, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.88 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 155.09 (C-2), 147.4 (C-4), 142.3 (C-3), 137.2 (C-6), 106.3 (C-5), 39.5 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

##### 2-Χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-νιτροπυριδίνη (**97**)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του χλωριδίου **6**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυριδινόνη **96** (3 g, 13.99 mmol). Το ελαιώδες προϊόν λαμβάνεται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού

αιθυλεστέρα σε αναλογία 20 / 1. Απόδοση 89% (2.93 g).  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.29 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-6), 7.20 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-5), 2.39 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.89 – 1.78 (oct,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.80 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 149.6 (C-6), 146.5 (C-3), 145.2 (C-4), 141.3 (C-2), 124.8 (C-5), 39.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.0 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.0 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### 2-Χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)πυριδιν-3-αμίνη (98)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που ακολουθήθηκε για την παρασκευή της αμίνης **7**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τη νιτροπυριδίνη **97** (2.5 g, 11.66 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 8 / 1, οπότε λαμβάνονται 1.81 g ελαιώδους παραγώγου (απόδοση 84%).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.67 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-6), 6.83 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-5), 4.05 (brs, 2H,  $\text{D}_2\text{O}$  exch,  $\text{NH}_2$ ), 2.35 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.94 (oct,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.91 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 138.2 (C-3), 137.3 (C-6), 137.0 (C-4), 135.0 (C-2), 124.5 (C-5), 40.3 ( $\text{CH}_2$ ), 26.7 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### N-[2-χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-πυριδιν]ακεταμίδιο (99)

Ακολουθείται διαδικασία ακετυλίωσης ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για τη λήψη του ακεταμιδίου **8**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **98** (2.42 g, 13.11 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 86% (2.55 g).  $\Sigma.τ.$  111 - 113 °C ( $\text{EtOAc} - n\text{-pentane}$ ).  $^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.08 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-6), 7.03 (d,  $J = 5$  Hz, 1H, H-5), 2.39 (d,  $J = 7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.11 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.80 (oct,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.79 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 169.5 (C=O), 152.3 (C-2), 149.8 (C-4), 146.9 (C-6), 130.2 (C-3), 124.4 (C-5), 40.9 ( $\text{CH}_2$ ), 28.5 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 23.0 ( $\text{COCH}_3$ ), 22.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### N-Οξείδιο του [2-χλωρο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-πυριδιν]ακεταμιδίου (100)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του N-οξειδίου **27**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ακεταμίδιο **99** (6 g, 26.49 mmol). Το

προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα οξικού αιθυλεστέρα / μεθανόλης σε αναλογία 10 / 1. Απόδοση 79% (5.07 g). Σ.τ. 208 - 208 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.39 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H-6), 7.39 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-5), 4.85 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 2.51 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.20 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.96 – 1.84 (oct, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.91 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 169.6 (C=O), 143.4 (C-4), 142.1 (C-3), 137.9 (C-6), 134.4 (C-2), 124.0 (C-5), 40.6 (CH<sub>2</sub>), 28.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.9 (COCH<sub>3</sub>), 22.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### ***N*-[2-Χλωρο-6-κυανο-4-(2-μεθυλοπροπυλο)-3-πυριδιν]ακεταμίδιο (101)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του κυανο-ακεταμιδίου **28**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το *N*-οξείδιο **100** (4 g, 16.49 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 2 / 1. Απόδοση 88% (3.65 g). Σ.τ. 145 - 147 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.92 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.52 (s, 1H, H-5), 2.52 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.22 (s, 3H, COCH<sub>3</sub>), 1.96 – 1.87 (oct, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.88 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 169.2 (C=O), 153.0 (C-2), 150.7 (C-4), 134.0 (C-3), 130.1 (C-6), 129.1 (C-5), 115.9 (CN), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 28.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.12 (COCH<sub>3</sub>), 22.3 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **7-Χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό-5-καρβονιτρίλιο (102)**

Λαμβάνεται από το ακεταμίδιο **101** (3 g, 11.93 mmol) με αντίδραση ενδομοριακής κύκλωσης ανάλογης αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **9**, οπότε μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 3 / 1, προκύπτουν 2.26 g (86%) της πυραζολοπυριδίνης **102**. Σ.τ. 174 - 176 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.13 (s, 1H, H-4), 3.51 – 3.44 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.51 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 154.6 (C-3), 136.8 (C-7), 135.9 (C-7a), 125.8 (C-3a), 121.8 (C-4), 121.4 (C-5), 117.2 (CN), 28.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### 4.4.2.2. Σύνθεση των 7-αρυλαμινο-υποκατεστημένων 3-(1-μεθυλοαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιων 103 – 104

##### 3-(1-Μεθυλαιθυλο)-7-(φαινυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (103)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του παραγώγου **30**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 7-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (**102**, 1 g, 4.54 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 6 / 4. Απόδοση 80% (1 g). Σ.Τ. 233 - 235 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.72 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exch, NH), 7.98 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.82 (s, 1H, H-4), 7.36 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.05 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 3.55 – 3.37 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.45 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 150.8 (C-3), 140.1 (C-7, C-1'), 129.2 (C-7a), 128.7 (C-3', C-5'), 122.5 (C-4'), 119.8 (C-3a), 119.4 (C-2', C-6'), 119.3 (C-5), 119.2 (CN), 114.6 (C-4), 26.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 278.1400, ευρεθέν 278.1406.

##### 3-(1-Μεθυλαιθυλο)-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (104)

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που εφαρμόστηκε για την παρασκευή του παραγώγου **31**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το 7-χλωρο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (**102**, 1.1 g, 4.99 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 6 / 4. Απόδοση 72% (1.32 g). Σ.Τ. 220 - 222 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.57 (s, 1H, H-4), 7.09 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.80 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.40 – 3.31 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.3 (C-3', C-5'), 151.2 (C-3), 144.6 (C-7), 134.5 (C-4'), 134.2 (C-1'), 131.6 (C-7a), 121.8 (C-3a), 117.8 (CN), 116.9 (C-5), 115.0 (C-4), 98.9 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 56.1 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 27.3 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 368.1717, ευρεθέν 368.1722.

#### 4.4.2.3. Σύνθεση των 1-{7-αρυλαμινο-3-ισοπροπυλο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό}μεθαναμινών 105- 106

##### 1-{3-(1-Μεθυλαιθυλο)-7-φαινυλαμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό}μεθαναμίνη (105)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-αμινομεθυλο-υποκατεστημένων πυραζολοπυριδινών **32 – 33**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το καρβονιτρίλιο **103** (430 mg, 1.55 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται μεσω χρωματογραφίας στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 5 / 1. Απόδοση 73% (320 mg). Σ.Τ. 167 - 169 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.88 (d, *J* = 2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.35 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.10 (s, 1H, H-4), 7.02 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 4.91 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 3.87 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.42 – 3.37 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.45 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, MeOD) δ (ppm) 150.4 (C-3), 147.7 (C-5), 142.6 (C-7), 140.7 (C-1'), 129.1 (C-7a), 128.3 (C-3', C-5'), 124.6 (C-3a), 121.4 (C-4'), 118.5 (C-2', C-6'), 102.0 (C-4), 46.6 (CH<sub>2</sub>), 27.2 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 282.1713, ευρεθέν 282.1719.

##### 1-{3-(1-Μεθυλαιθυλο)-7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-5-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό}μεθαναμίνη (106)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-αμινομεθυλο-υποκατεστημένων πυραζολοπυριδινών **32 – 33**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το καρβονιτρίλιο **104** (690 mg, 1.88 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται μεσω χρωματογραφίας στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 4 / 1. Απόδοση 70% (490 mg). Σ.Τ. 128 - 130 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD) δ (ppm) 7.29 (s, 2H, H-2', H-6'), 7.03 (s, 1H, H-4), 5.02 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exch, NH<sub>2</sub>), 3.85 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.74 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.35 – 3.28 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, MeOD) δ (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 150.2 (C-3), 147.2 (C-5), 142.7 (C-7), 137.4 (C-1'), 132.3 (C-4'), 129.3 (C-7a), 124.5 (C-3a), 101.9 (C-4), 96.1 (C-2', C-6'), 59.9 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.1 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 47.0 (CH<sub>2</sub>), 27.1

(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 21.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 372.2030, ευρεθέν 372.2037.

#### 4.4.2.4. Σύνθεση των *N*-υποκατεστημένων 1-{7-αρυλαμινο-3-ισοπροπυλο-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμινών 107 - 112

##### *N*-Φαινυλομεθυλο-1-{7-φαινυλαμινο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (107)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **105** (110 mg, 0.39 mmol) και επιδρώντας με βενζαλδεΐδη (56 μl, 0.55 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 9 / 1. Απόδοση 72 % (105 mg). Σ.Τ. 68 - 70 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.49 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.36 – 7.25 (m, 5H, H-benzylamine), 7.16 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.94 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 6.93 (s, 1H, H-4), 3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 3.88 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - phenyl), 3.29 – 3.20 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 150.5 (C-3), 144.4 (C-5), 142.9 (C-7), 140.2 (C-1'), 138.9 (C-1''), 129.5 (C-7a), 128.8 (C-3', C-5'), 128.5 (C-2'', C-6''), 128.4 (C-3'', C-5''), 127.2 (C-4''), 125.0 (C-3a), 122.3 (C-4'), 119.7 (C-2', C-6'), 104.2 (C-4), 53.8 (CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 52.9 (CH<sub>2</sub> - phenyl), 27.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 372.2183, ευρεθέν 372.2188.

##### *N*-Φαινυλομεθυλο-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (108)

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **106** (70 mg, 0.19 mmol) και επιδρώντας με βενζαλδεΐδη (27 μl, 0.26 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 8 / 1. Απόδοση 84 % (75 mg). Σ.Τ. 120 - 122 °C (EtOAc – *n*-hexane). <sup>1</sup>H-

**NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.36 – 7.25 (m, 5H, H-benzylamine), 7.03 (s, 1H, H-2', 6'), 6.99 (s, 1H, H-4), 3.91 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 3.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - phenyl), 3.80 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.64 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 3.28 – 3.21 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.39 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.0 (C-3', C-5'), 150.6 (C-3), 144.0 (C-5), 142.8 (C-7), 140.8 (C-1''), 136.8 (C-1''), 132.8 (C-4'), 129.7 (C-7a), 128.5 (C-2'', C-6''), 128.4 (C-3'', C-5''), 127.4 (C-4''), 124.7 (C-3a), 104.16 (C-4), 97.0 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.7 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5'-OCH<sub>3</sub>), 53.0 (CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 50.2 (CH<sub>2</sub> - phenyl), 27.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.9 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **ESI-HRMS** υπολογισθέν ως προς C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 462.2500, ευρεθέν 422.2506.

***N*-(3-Πυριδινυλομεθυλο)-1-{7-φαινυλαμινο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-5-1*H*-πυραζολο [3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (109)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **105** (140 mg, 0.49 mmol) και επιδρώντας με 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη (66 μl, 0.70 mmol). Το ελαιώδες προϊόν λαμβάνεται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 9 / 1. Απόδοση 86 % (155 mg). **<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.53 (d, *J* = 2 Hz, 1H, pyridine – 2H), 8.43 (dd, *J* = 5 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, pyridine – 6H), 7.71 (d, *J* = 7 Hz, 1H, pyridine – 4H), 7.48 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.19 (dd, *J* = 5 Hz, *J* = 7 Hz, 1H, pyridine – 5H), 7.11 (t, *J* = 8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.94 (s, 1H, H-4), 6.86 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H-4'), 3.85 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 3.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub> - pyridine), 3.28 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.37 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 150.5 (C-3), 149.5 (pyridine – 2C), 148.1 (pyridine – 6C), 145.0 (C-5), 143.0 (C-7), 140.3 (C-1'), 136.5 (pyridine – 4C), 135.8 (pyridine – 3C), 130.0 (C-7a), 128.8 (C-3', C-4'), 125.0 (C-3a), 123.7 (pyridine – 5C), 122.2 (C-4'), 119.2 (C-2', C-6'), 104.2 (C-4), 54.2 (CH<sub>2</sub> - pyrazolopyridine), 50.2 (CH<sub>2</sub> - pyridine), 27.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). **ESI-HRMS** υπολογισθέν ως προς C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 373.2135, ευρεθέν 373.2141.

***N*-(3-Πυριδινυλομεθυλο)-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (110)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **106** (70 mg, 0.19 mmol) και επιδρώντας με 3-πυριδινοκαρβοξαλδεΐδη (25 μl, 0.26 mmol). Το ελαιώδες προϊόν λαμβάνεται μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης σε αναλογία 8 / 1. Απόδοση 88 % (75 mg). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.56 (d, *J* = 2 Hz, 1H, pyridine – 2H), 8.49 (dd, *J* = 5 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, pyridine – 6H), 7.73 (d, *J* = 7 Hz, 1H, pyridine – 4H), 7.24 (dd, *J* = 5 Hz, *J* = 7 Hz, 1H, pyridine – 5H), 6.98 (s, 1H, H-4), 6.90 (s, 2H, H-2', H-6'), 3.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-pyrazolopyridine), 3.88 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-pyridine), 3.78 (s, 3H, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.64 (s, 6H, 3'-OCH<sub>3</sub>, 5-OCH<sub>3</sub>), 3.29 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.39 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.2 (C-3', C-5'), 150.4 (C-3), 149.7 (pyridine – 2C), 148.5 (pyridine – 6C), 144.5 (C-5), 143.2 (C-7), 136.4 (pyridine – 4C), 136.4 (C-1'), 135.1 (pyridine – 3C), 133.5 (C-4'), 129.7 (C-7a), 125.0 (C-3a), 123.6 (pyridine – 5C), 104.1 (C-4), 97.8 (C-2', C-6'), 61.0 (4'-OCH<sub>3</sub>), 55.9 (3'-OCH<sub>3</sub>, 5-OCH<sub>3</sub>), 54.4 (CH<sub>2</sub>-pyrazolopyridine), 50.4 (CH<sub>2</sub>-pyridine), 27.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [MH<sup>+</sup>]: 463.2452, ευρεθέν 463.2458.

***N*-(1-Μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-1-{7-φαινυλαμινο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό}μεθαναμίνη (111)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **105** (100 mg, 0.36 mmol) και επιδρώντας με 1-μεθυλο-4-πιπεριδινόνη (58 μl, 0.50 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης / τριαιθυλαμίνης σε αναλογία 10 / 1 / 0.5. Απόδοση 81 % (110 mg). Σ.Τ. 148 - 150 °C (EtOAc). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.90 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 6H), 7.36 (m, 7H), 7.21 (s, 4H), 7.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 4.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.44 – 3.34 (sept, *J* = 7 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.06 – 3.00 (m, 2H, piperidine – 2H, piperidine – 6H), 2.99 – 2.93 (m, 1H, piperidine – 4H), 2.37 (s, 1H, NCH<sub>3</sub>), 2.26 – 2.20 (m, 2H, piperidine – 2H,

piperidine – 6H), 2.17 – 2.06 (m, 2H, piperidine – 3H, piperidine – 5H), 1.77 – 1.59 (m, 2H, piperidine – 3H, piperidine – 5H), 1.46 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 150.6 (C-3), 144.0 (C-5), 142.6 (C-7), 140.6 (C-1'), 129.4 (C-7a), 128.7 (C-3', C-5'), 124.9 (C-3a), 121.9 (C-4'), 119.2 (C-2', C-6'), 104.0 (C-4), 54.1 (piperidine – 2C, piperidine – 6C), 53.7 (piperidine – 4C), 51.6 ( $\text{CH}_2$ ), 45.8 ( $\text{NCH}_3$ ), 31.6 (piperidine – 3C, piperidine – 5C), 27.4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.0 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_6^+$  [ $\text{MH}^+$ ]: 379.2605, ευρεθέν 379.2610.

***N*-(1-Μεθυλοπιπεριδιν-4-υλο)-1-{7-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο-3-(1-μεθυλαιθυλο)-5-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-6-υλο}μεθαναμίνη (112)**

Λαμβάνεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής των 5-υποκατεστημένων 7-αρυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **36 – 41**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **106** (70 mg, 0.19 mmol) και επιδρώντας με 1-μεθυλο-4-πιπεριδινόνη (30  $\mu\text{l}$ , 0.26 mmol). Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης / τριαιθυλαμίνης σε αναλογία 10 / 1 / 0.5. Απόδοση 82 % (70 mg). Σ.τ. 136 – 138 °C ( $\text{EtOAc}$ ).  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.24 (s, 2H, H-2, H-6'), 6.95 (s, 1H, H-4), 3.95 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.80 (s, 6H, 3'- $\text{OCH}_3$ , 5'- $\text{OCH}_3$ ), 3.77 (s, 3H, 4'- $\text{OCH}_3$ ), 3.22 – 3.09 (sept,  $J = 7$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.03 – 2.96 (m, 2H, piperidine – 2H, piperidine – 6H), 2.93 – 2.82 (m, 1H, piperidine – 4H), 2.36 (s, 1H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.31 – 2.20 (m, 2H, piperidine – 2H, piperidine – 6H), 2.13 – 2.02 (m, 2H, piperidine – 3H, piperidine – 5H), 1.83 – 1.67 (m, 2H, piperidine – 3H, piperidine – 5H), 1.30 (d,  $J = 7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 153.1 (C-3', C-5'), 150.6 (C-3), 145.2 (C-5), 142.9 (C-7), 137.0 (C-1'), 133.1 (C-4'), 129.3 (C-7a), 125.0 (C-3a), 103.7 (C-4), 97.5 (C-2', C-6'), 61.0 (4'- $\text{OCH}_3$ ), 56.0 (3'- $\text{OCH}_3$ , 5'- $\text{OCH}_3$ ), 54.3 (piperidine – 2C, piperidine – 6C), 54.0 (piperidine – 4C), 52.4 ( $\text{CH}_2$ ), 46.0 ( $\text{NCH}_3$ ), 32.12 (piperidine – 3C, piperidine – 5C), 27.5 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.1 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ). ESI-HRMS υπολογισθέν ως προς  $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_3^+$  [ $\text{MH}^+$ ]: 469.2922, ευρεθέν 469.2930.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) I. Shchemelinin, L. Šefc, E. Nečas, Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and Other Diseases, *Folia Biologica (Praha)* 52, 81-101 (2006).
- 2) Gomperts, BD.; Kramer, IM. Tatham, PER. (2002). *Signal transduction*. Academic Press.
- 3) McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20(3), 321–344.
- 4) Tsai, M.-J.; O'Malley, B.W. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members, *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63, 451-486.
- 5) Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, and Leonard E. White (2008). *Neuroscience*. 4th ed.. Sinauer Associates. pp. 156–7.
- 6) Changeux, J.-P., Devilliers-Thierry, A., and Chemouli, P. (1984) Acetylcholine receptor: An allosteric protein. *Science* 225, 1335-1345.
- 7) Cascio M (2004). "Structure and function of the glycine receptor and related nicotinicoid receptors". *J. Biol. Chem.* 279 (19): 19383–6.
- 8) Campagna-Slater V, Weaver DF (January 2007). "Molecular modelling of the GABAA ion channel protein". *J. Mol. Graph. Model.* 25 (5): 721–30.
- 9) Wettschureck N, Offermanns S (October 2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions". *Physiol. Rev.* 85 (4): 1159–204.
- 10) Downward J (January 2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy". *Nat. Rev. Cancer*, 3 (1): 11–22.
- 11) Gilman, A.G. (1987) G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615-649.
- 12) Khafizov K, Lattanzi G, Carloni P (2009). "G protein inactive and active forms investigated by simulation methods". *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* 75 (4): 919–30.
- 13) Neves S R, Ram P T, Iyengar R (May 2002). "G protein pathways". *Science* 296 (5573): 1636–9.
- 14) Bockaert, J., Homburger, V., and Rouot, B. (1987) GTP-binding proteins: A key role in biological communications. *Biochimie* 69, 329-338.
- 15) Herbst RS (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology". *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59 (2 Suppl): 21–6.
- 16) Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- 17) <http://www.cellsignal.com/reference/kinase/overview.html>
- 18) Huang D, Zhou T, Lafleur K, Nevado C, Caflich A. Kinase selectivity potential for inhibitors targeting the ATP binding site: a network analysis. *Bioinformatics*. 2010 Jan 15;26(2):198-204. Epub 2009 Nov 26.

- 19) Liao, J. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors *Journal of Medicinal Chemistry*. 50: 409-420 (2007).
- 20) Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*. **1988**, 241(4861):42-52.
- 21) Liu, Y., Gray, N. S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature Chem.Biol.* 2, 358–364 (2006).
- 22) Fabbro, D., Ruetz, S., Buchdunger, E., Cowan-Jacob, SW., Fendrich, G., Liebetanz, J., Mestan, J., O'Reilly, T., Traxler, P., Chaudhuri, B., Fretz, H., Zimmermann, J., Meyer, T., Caravatti, G., Furet, P., and Manley, PW. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther.*, **2002**. 93: 79-98.
- 23) Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H (2005). "A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling". *Mol. Syst. Biol.* **1** (1): 2005.0010.
- 24) Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. **1995** May;9(8):576-96.
- 25) Eng, R. A., Bossemeyer, D. (2002) Structural aspects of protein kinase control – role of conformational flexibility. *Pharmacol. Ther.* 93, 99-111.
- 26) G. Scapin, Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors, *Drug Discv. Today* **2002**, 7, 601-611.
- 27) O. Hantschel, G. Superti-Furga, Regulation of the c-Abl and BCR Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev.* **2004**, 5, 33–44.
- 28) Miranda-Saavedra D, Barton GJ (2007) Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins* 68: 893–914.
- 29) Robinson DR, Wu YM, Lin SF. (2000). "The protein tyrosine kinase family of the human genome". *Oncogene* 19 (49): 5548–5557.
- 30) Krause, D. S., Van Etten, R. A. (2005) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* 353, 172-187.
- 31) Oppermann H, Levinson AD, Varmus HE, Levintow L, Bishop JM (1979). "Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src)". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76 (4): 1804–8.
- 32) Abram, C. L., and Courtneidge, S. A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp. Cell Res.* 254, 1–13.
- 33) Russell RB, Breed J, Barton GJ (June 1992). "Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains". *FEBS Lett.* 304 (1): 15–20.
- 34) [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/14\\_16.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-14/14_16.jpg).
- 35) Bublil EM and Yarden Y. (2007). "The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics". *Curr. Opin. Cell Biol.* 19 (2): 124–134.

- 36) Ornitz DM. and Itoh, N. (2001). "Fibroblast growth factors". *Genome Biol.* 2 (3): reviews3005.1–reviews3005.12.
- 37) Robinson, CJ and Stringer, SE. (2001). "The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors". *J. Cell. Sci.* 114 (5): 853–865.
- 38) Williams LT (March 1989). "Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor". *Science* 243 (4898): 1564–70.
- 39) Rönstrand L (October 2004). "Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit". *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (19–20): 2535–48.
- 40) Zwick, E. Bange, J. Ullrich, A. (2001). "Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies". *Endocr. Relat. Cancer* 8 (3): 161–173.
- 41) Kennelly PJ, Krebs EG. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem.* 1991 Aug 25;266(24):15555-8.
- 42) Krebs EG, Graves DJ, Fischer EH (1959). "Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase". *J Biol Chem* 234: 2867–2873.
- 43) Elsevier B.V. (2008) Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, Chapter 9, Drugs that inhibit signaling pathways for tumor cell growth and proliferation, p 251-253.
- 44) E. Tan, P. Besant, P. Attwood, Mammalian histidine kinases: do they REALLY exist?, *Biochemistry*, 41 (2002), pp. 3843–3851.
- 45) Patricia S Steeg, Diane Palmieri, Taoufik Ouatas, Massimiliano Salerno Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer *Cancer Letters*, Volume 190, Issue 1, 10 February 2003, Pages 1–12.
- 46) Parker, P. J., and Parkinson, S. J. (2001). AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 860–863.
- 47) Francis, S. H., and Corbin, J. D. (1999). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: Intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 52, 275–328.
- 48) Mellor H, Parker PJ. "The extended protein kinase C superfamily". *Biochem. J.* (1998) 332 ( Pt 2): 281–92.
- 49) Eigenthaler M, Lohmann SM, Walter U, Pilz RB. Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;135: 173–209.
- 50) Yamauchi, Takashi. "Neuronal Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II—Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2005) 28 (8): 1342–54.
- 51) Anderson, M. "Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias". *Pharmacology & Therapeutics* (2005) 106: 39–55.

- 52) Cegielska, A.; Cegielska, A; Getman, ME; Landes, GM; Virshup, DM. "Isolation and Characterization of Human Casein Kinase I[IMAGE] (CKI), a Novel Member of the CKI Gene Family". *Journal of Biological Chemistry* (1995) 270 (25): 14875–83.
- 53) Liu, J., Kipreos, E. T. Evolution of cyclin-dependent kinases (CDKs) and CDK-activating kinases (CAKs): differential conservation of CAKs in yeast and metazoa. *Mol. Biol. Evol.* (2000) 17, 1061-1074.
- 54) Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374:131.
- 55) Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". *Endocr. Rev.*(April 2001) 22 (2): 153–83.
- 56) Grimes, C.A., Jope, R.S., The multi-faceted roles of glycogen synthase kinase-3b in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* (2001) 65, 391–426.
- 57) Ben-David Y, Letwin K, Tannock L, *et al.* "A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators". *EMBO J.* (1991) 10 (2): 317–25.
- 58) Dél  ris P, Trost M, Topisirovic I, Tanguay PL, Borden KL, Thibault P, Meloche S "Activation loop phosphorylation of ERK3/ERK4 by group I p21-activated kinases (PAKs) defines a novel PAK-ERK3/4-MAPK-activated protein kinase 5 signaling pathway". *J. Biol. Chem.* (February 2011) 286 (8): 6470–8.
- 59) Good M, Tang G, Singleton J, Rem  nyi A, Lim WA. "The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation". *Cell* (March 2009)136 (6): 1085–97.
- 60) Maton A, Hopkins JJ, LaHart S, Quon Warner D, Wright M, Jill D. (1997). *Cells: Building Blocks of Life*. New Jersey: Prentice Hall. pp. 70–4.
- 61) Ohi R, Gould KL (1999) Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11: 267–273.
- 62) Pardee, A. (1989). "G1 events and regulation of cell proliferation". *Science* 246 (4930): 603–8.
- 63) Xiongwei Zhu, Arun K. Raina, Mark A. Smith , Cell Cycle Events in Neurons : Proliferation or Death? *Am J Pathol.* 1999 August; 155(2): 327–329.
- 64) Stephen J. Elledge (6 December 1996). "Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis". *Science* 274 (5293): 1664–1672.
- 65) Fung TK, Poon RY (2005). "A roller coaster ride with the mitotic cyclins". *Semin. Cell Dev. Biol.* 16 (3): 335–42.
- 66) Banchio, C., Schang, L. M., Vance, D. E. (2004) Phosphorylation of Sp1 by cyclin-dependent kinase 2 modulates the role of Sp1 in CTP: phosphocholine cytidyl transferase alpha regulation during the S phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem*, 279, 40220-40226.
- 67) Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA. Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem.* 1982 Mar 10;257(5):2543–2548.

- 68) Malumbres, Marcos; Barbacid, Mariano (2001). "Milestones in Cell Division to Cycle or Not to Cycle: A Critical Decision in Cancer". *Nature Reviews Cancer* 1(3): 222–31.
- 69) Robbins and Cotran; Kumar, Abbas, Fausto (2004). *Pathological Basis of Disease*. Elsevier.
- 70) Pardee, Arthur B. (1974). "A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71(4): 1286–90.
- 71) Yao, Guang; Lee, Tae Jun; Mori, Seiichi; Nevins, Joseph R.; You, Lingchong (2008). "A bistable Rb–E2F switch underlies the restriction point". *Nature Cell Biology* 10 (4): 476–82.
- 72) Hall M, Peters G (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and CDK inhibitors in human cancer. *Adv. Cancer Res.* 68, 67.
- 73) Iida H, Towatari M, Tanimoto M, Morishita Y, Koder Y, Saito H (1997) Overexpression of cyclin E in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 90, 3707.
- 74) Keyomarsi K, Conte D, Toyofuku W, Fox MP (1995) Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene* 11, 941.
- 75) Blagden, S., de Bono, J. (2005) Drugging cell cycle kinases in cancer therapy. *Curr. Drug Targets*, 6, 325–335.
- 76) Strausfeld U, Labbé JC, Fesquet D, et al. (May 1991). "Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein". *Nature*, 351 (6323): 242–5.
- 77) Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177–2196.
- 78) Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L., Falck, J., Mailand, N., Schroeder, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2001). DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res.* 61, 4990–4993.
- 79) Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Rønstrand, L., Zhou, B.-B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S-phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247–258.
- 80) Kristjánsdóttir K, Rudolph J (August 2004). "Cdc25 phosphatases and cancer". *Chem. Biol.* 11 (8): 1043–51.
- 81) Bertoni, F., Codegóni, A.M., Furlan, D., Tibiletti, M.G., Capella, C., and Brogginì, M. (1999). CHK1 frameshift mutations in genetically unstable colorectal and endometrial cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 26, 176–180.
- 82) Menoyo, A., Alazzouzi, H., Espín, E., Armengol, M., Yamamoto, H., and Schwartz, S. (2001). Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Research* 61, 7727–7730.

- 83) Bell, D.W., Varley, J.M., Szydlo, T.E., Kang, D.H., Wahrer, D.C., Shannon, K.E., Lubratovich, M., Verselis, S.J., Isselbacher, K.J., Fraumeni, J.F., et al. **1999**. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286, 2528–2531.
- 84) Bolanos-garcia V M. Aurora kinases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (**2005**) 1572–1577.
- 85) Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.***2003**;4:842–54.
- 86) Crane R., Gadea B., Littlepage L., Wu H. and Ruderman J.V. Aurora A, Meiosis and Mitosis. *Biology of the Cell* 96 (**2003**) 215–229.
- 87) Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y: Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/lpl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem* 274: 7334–7340, **1999**.
- 88) Sasai, K., Katayama, H., Stenoiien, D. L., Fujii, S., Honda, R., Kimura, M., et al. (**2004**). Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 59, 249–263.
- 89) J.M. Scholey, I. Brust-Mascher, A. Mogilner, Cell division, *Nature* 422 (**2003**) 746– 752.
- 90) P.A. Eysers, E. Erikson, L.G. Chen, J.L. Maller, A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora-A, *Curr. Biol.* 13 (**2003**) 647– 691.
- 91) R. Giet, R. Uzbekov, F. Cubizolles, K. LeGuellec, C. Prigent, The *Xenopus laevis* aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XIEg5, *J. Biol. Chem.* 274 (**1999**) 15005– 15013.
- 92) Kapoor T, Mitchison TJ (**2001**). Eg5 is static in bipolar spindles relative to tubulin: evidence for a static spindle matrix. *J Cell Biol* 154, 1125–1133.
- 93) Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53 / cells. *EMBO J* **2002**;21:483 – 92.
- 94) Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S., Ishigatsubo, Y., **2002**. Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem* 277, 10719–10726.
- 95) Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., et al., **1998**. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *Embo J* 17, 3052–3065.
- 96) Li, D., Zhu, J., Firozi, P.F., Abbruzzese, J.L., Evans, D.B., Cleary, K., Friess, H., Sen, S., **2003**. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/AuroraA kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 9, 991–997.

- 97) Sen S, Zhou H, Zhang RD, Yoon DS, Vakar-Lopez F, Ito S, Jiang F, Johnston D, Grossman HB, Ruifrok AC, Katz RL, Brinkley W, Czerniak B: Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 94: 1320–1329, **2002**.
- 98) Zirkle, R. E. (1970). "Ultraviolet-Microbeam Irradiation of Newt-Cell Cytoplasm: Spindle Destruction, False Anaphase, and Delay of True Anaphase". *Radiation Research* 41 (3): 516–37.
- 99) Gruber S, Haering CH, Nasmyth K (March **2003**). "Chromosomal cohesin forms a ring". *Cell* 112 (6): 765–77.
- 100) Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, ed. (2002). "Chapter 17. The Cell Cycle and Programmed Cell Death". *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland Science.
- 101) Rieder, C. L.; Cole, RW; Khodjakov, A; Sluder, G (1995). "The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores". *The Journal of Cell Biology* 130 (4): 941–8.
- 102) Morrow CJ, Tighe A, Johnson VL, Scott MI, Ditchfield C, Taylor SS. Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci* **2005**;118:3639 – 52.
- 103) Townsley FM, Ruderman JV: Proteolytic ratchets that control progression through mitosis. *Trends Cell Biol* 8: 238–244, **1998**.
- 104) M. Petronczki, M.F. Siomos, K. Nasmyth. Un menage a quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 112 (2003), pp. 423–440.
- 105) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917–921, **1997**.
- 106) Tatsuka M, Katayama H, Ota T, Tanaka T, Odashima S, Suzuki F, Terada Y: Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and lpl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res* 58: 4811–4816, **1998**.
- 107) Kerbel R.S. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* **2006**, 312, 1171–5.
- 108) Ghosh, S. *et al.* Structure-based design of potent inhibitors of EGF-receptor tyrosine kinase as anti-cancer agents. *Anticancer Drug Des.* 14, 403–410 (1999).
- 109) Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM and Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. *Cell Mol Life Sci* **2004**, 61, 2965–2978
- 110) Bicknell R and Harris AL. Novel angiogenic signalling pathways and vascular targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2004**, 44, 219–238.
- 111) Jones AV and Cross NCP. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* **2004**, 61, 2912–2923.
- 112) Kitamura Y and Hirota S. KIT as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cell Mol Life Sci* **2004** 61, 2924–2931.

- 113) Stirewalt DL and Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 650–665.
- 114) Pulford K, Morris SW and Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol* **2004** 199 330–358.
- 115) Ren R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005, 5, 172–183.
- 116) Ihle, J.N. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv. Immunol.* 60, 1–35 (**1995**).
- 117) Witthuhn, B.A. *et al.* Differential substrate recognition capabilities of Janus family protein tyrosine kinases within the interleukin 2 receptor (IL2R) system: Jak3 as a potential molecular target for treatment of leukemias with a hyperactive Jak–Stat signaling machinery. *Leuk. Lymphoma* 32, 289–297(**1999**).
- 118) T. Mikalsen, N. Gerits, U. Moens Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy *Biotechn. Ann. Rew.* 12, 153- 223, (**2006**).
- 119) C. Garcia-Echeverria, W.R. Sellers Drug discovery approaches targeting the PI3K pathway *Oncogene* (**2008**) 27, 5511–5526.
- 120) Bellacosa A., Kumar C.C. Cristofano A.D., Testa J.R. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv. Cancer Res.* 2005 94, 29–86.
- 121) T. L. Yuan, L.C. Cantley PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme *Oncogene* (2008) 27, 5497–5510.
- 122) Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD *et al.* Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell Biol.* 16, 1722–1733(**1996**).
- 123) Yuan H, Barnes KR, Weissleder R, Cantley L, Josephson L. Covalent reactions of wortmannin under physiological conditions *Chem. Biol.* 14: 321–328 (**2007**).
- 124) Walker E.H., Pacold M.E., Perisic O., Stephens L., Hawkins P.T., Wymann.M.P. *et al.* Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell* 6, 909–919 (**2000**).
- 125) Yaguchi S., Fukui Y., Koshimizu I., Yoshimi H., Matsuno T., Gouda H *et al.* Antitumor activity of ZSTK474, a new phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *J. Natl. Cancer Inst.* 98:545–556 (**2006**).
- 126) Knight Z.A., Gonzalez B., Feldman M.E., Zunder E.R., Goldenberg D.D., Williams O. *et al.* A pharmacological map of the PI3-Kfamily defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* 125, 733–747 (**2006**).
- 127) B. J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, N. B. Lydon, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **1996**, 2, 561-6.

- 128) Weinstein, I. B. & Joe, A. K. Mechanisms of disease: Oncogene addiction — a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clin. Pract. Oncol.* **3**, 448–457 (2006).
- 129) T. K.Sawyer Novel oncogenic protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2004**, 4, 449–455.
- 130) J. Luo, N. L. Solimini, S. J. Elledge. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* **2009** 136, 823–37
- 131) Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, 351, 95–105 (2000).
- 132) Lombardo, L. J. *et al.* Discovery of *N*-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J. Med. Chem.* 47, 6658–6661 (2004).
- 133) O'Brien, S. G. *et al.* Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 348, 994–1004 (2003).
- 134) L. N. Johnson *et al.* Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **1996**, 85, 149–158.
- 135) P. J. Kennelly, Protein phosphatases – a phylogenetic perspective. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2291–2312.
- 136) Samuels, Y. *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**, 554 (2004).
- 137) Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
- 138) Wang, J. Y., Wilcoxen, K. M., Nomoto, K. & Wu, S. Recent advances of MEK inhibitors and their clinical progress. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 1364–1378 (2007).
- 139) Faivre, S., Kroemer, G. & Raymond, E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Rev. Drug Discov.* 5, 671–688 (2006).
- 140) Geiger, T. R. & Peeper, D. S. Critical role for TrkB kinase function in anoikis suppression, tumorigenesis, and metastasis. *Cancer Res.* **67**, 6221–6229 (2007).
- 141) A. K. Ghose, T. Herbertz, D. A. Pippin, J. M. Salvino, J. P. Mallamo Knowledge Based Prediction of Ligand Binding Modes and Rational Inhibitor Design for Kinase Drug Discovery, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5149-5171.
- 142) Levitzki, Protein Kinase Inhibitors as a Therapeutic Modality *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 462-469.
- 143) J. E. Sevransky, G. Shaked, A. Novogrodsky, A. Levitzki, A. Gazit, A. Hoffman, R. J. Elin, Z. M. Quezado, B. D. Freeman, P. Q. Eichacker, R. L. Danner, S. M. Banks, J. Bacher, M. L. Thomas, C. Natanson, Tyrphostin AG 556 improves survival and reduces multiorgan failure in canine Escherichia coli peritonitis *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 1966-73.

- 144) G. Blum, *et al.* Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 15705–15712.
- 145) G. Ahn, K A. Resing, Cell biology. Lessons in rational drug design for protein kinases. *Science* **2005**, *308*, 1266–1267.
- 146) M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science* **2005**, *308*, 1318–1321.
- 147) Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W. & Mestan, J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1754**, 3–13 (**2005**).
- 148) Wan, P. T. *et al.* Mechanism of activation of the RAF–ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* **116**, 855–867 (**2004**).
- 149) Ohren, J. F. *et al.* Structures of human MAP kinase kinase 1 (describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nature Struct. Mol. Biol.* **11**, 1192–1197 (**2004**).
- 150) Schirmer, A., Kennedy, J., Murli, S., Reid, R., Santi, D. V. Targeted covalent inactivation of protein kinases by resorcylic acid lactone polyketides *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **103**, 4234–4239 (**2006**).
- 151) E. A. Sausville, Protein kinase antagonists: interim challenges and issues. *Anticancer Drug Des.* **2000**, *15*, 1–3.
- 152) Li, B., Liu, Y., Uno, T., Gray, N. Creating chemical diversity to target protein kinases. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **7**, 453–472 (**2004**).
- 153) Gill, A. New lead generation strategies for protein kinase inhibitors — fragment based screening approaches. *Mini Rev. Med. Chem.* **4**, 301–311 (**2004**).
- 154) J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors *Nature* **9**, 28–39 (**2009**).
- 155) Dubinina, G. G. *et al.* *In silico* design of protein kinase inhibitors: successes and failures. *Anticancer Agents Med. Chem.* **7**, 171–188 (**2007**).
- 156) Kraker, A. J. *et al.* Biochemical and cellular effects of c-Src kinase-selective pyrido[2,3-*d*]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 885–898 (**2000**).
- 157) Mohammadi, M. *et al.* Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *EMBO J.* **17**, 5896–5904 (**1998**).
- 158) Lenart, P. *et al.* The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr. Biol.* **17**, 304–315 (**2007**).
- 159) Sapkota, G. P. *et al.* BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. J.* **401**, 29–38 (**2007**).
- 160) K. Bettayeb, H. Sallam, Y. Ferandin, F. Popowycz, G. Fournet, M. Hassan, A. Echaliér, P. Bernard, J. Endicott, B. Joseph, L. Meijer N-&N, a new class of cell death-inducing kinase inhibitors derived from the purine roscovitine *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 2713–2724.
- 161) D. A. Heathcote, H. Patel, S. H. B. Kroll, P. Hazel, M. Periyasamy, M. Alikian, S. K. Kanneganti, A. S. Jogalekar, B. Scheiper, M. Barbazanges, A. Blum, J. Brackow, A.

Siwicka, R. D. M. Pace, M. J. Fuchter, J. P. Snyder, D. C. Liotta, P. S. Freemont, E. O. Aboagye, R. C. Coombes, A. G.M. Barrett, S. Ali, A Novel Pyrazolo[1,5-a]pyrimidine Is a Potent Inhibitor of Cyclin-Dependent Protein Kinases 1, 2, and 9, Which Demonstrates Antitumor Effects in Human Tumor Xenografts Following Oral Administration, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8508–8522.

162) M. Radi, E. Dreassi, C. Brullo, E. Crespan, C. Tintori, V. Bernardo, M. Valoti, C. Zamperini, H. Daigl, F. Musumeci, F. Carraro, A. Naldini, I. Filippi, G. Maga, S. Schenone, M. Botta Design, Synthesis, Biological Activity, and ADME Properties of Pyrazolo[3,4-d]pyrimidines Active in Hypoxic Human Leukemia Cells: A Lead Optimization Study, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2610–2626.

163) K. Yu, L. Toral-Barza, C. Shi, W.-G. Zhang, J. Lucas, B. Shor, J. Kim, J. Verheijen, K. Curran, D. J. Malwitz, D. C. Cole, J. Ellingboe, S. Ayril-Kaloustian, T. S. Mansour, J. J. Gibbons, R. T. Abraham, P. Nowak, A. Zask Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin, *Cancer Res*, **2009**, 69, 6232-6240.

164) Pino, L.N., Zehring, W.S.III *J. Am. Chem. Soc.* 3154 (**1955**).

165) E. V. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3167 (**1954**)

166) Chapman, D., Hurst, J., *J. Chem. Soc. Perkin, Trans I*, 2398 (**1980**).

167) Kourafalos, V.N.; Marakos, P.; Pouli, N.; Terzis A.; Townsend, L.B.; *Heterocycles*, **2002**, 57, 2335-2344.

168) Joule J.A., *Heterocyclic chemistry at a glance*, Blackwell publishing, **2007**, 16-27.

169) Albini, A.; Pietra, S. *Heterocyclic N-oxides* CRC Press: Boca Raton. 1991.

170) Albini, A. *Synthesis* **1993**, 263.

171) O'Connor, C.J.; Sinn, E.; Carlin, R.L. *Inorg. Chem.* **1977**, 16, 3314.

172) Chucholowski, A. W.; Uhlenndorf, S. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1949.

173) Epszajn, J.; Bieniek, A.; Kowalska, J. A. *Tetrahedron* **1991**, 47, 1697.

174) Thellend, A; Battioni, P.; Sanderson, W.; Mansuy, D. *Synthesis* **1997**, 1387.

175) Rudolph, J.; Reddy K. L.; Chiang J. P.; Sharpless K. B. *J.Am.Chem.Soc.* **1997**, 119, 6185.

176) Murray, R. W.; Iyanar, K.; Chen, J.; Wearing, J. T. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 805.

177) R. S. Varma, K. P. Naicker, *Org. Lett.*, **1999**, 1, 189-191.

178) Murray, R. W.; Iyanar, K.; Chen, J.; Wearing, J. T. *J.Org.Chem.* **1996**, 61, 8099.

179) Gregory, J. R.; Edward, J. B. *J.Chem.Res.(S)* **1993**, 412.

180) Cartwright, D.; Ferguson, J. R.; Giannopoulos, T.; Varvounis, G.; Wakefield, B. J. *Tetrahedron* **1995**, 51, 12791.

181) Horita, K.; Yoshioka, T.; Tanaka, T.; Oikawa, Y.; Yonemitsu O. On the selectivity of deprotection of benzyl, mpm (4-methoxybenzyl) and dmpm (3,4-dimethoxybenzyl) protecting groups for hydroxy functions. *Tetrahedron*, Volume 42, Issue 11, **1986**, Pages 3021–3028.

- 182) Greenwood, N. N.; Earnshaw, A.. *Chemie prvku (Chemistry of the Elements)*. Informatorium, Prague, **1993**, p. 241, 1542.
- 183) Leray I.; Ayadim M.; Ottermans C.; Habib Jiwan J.L.; Soumillion J.P. Photoinduced electron transfer sensitization of anisyl ether cleavage: studies in homogeneous solution and at the surface of one or two solids. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, Volume 132, Number 1, 20 March **2000** , pp. 43-52(10).
- 184) A. Srikrishna , R. Viswajanani , J. A. Sattigeri , D. Vijaykumar A new, convenient reductive procedure for the deprotection of 4-methoxybenzyl (MPM) ethers to alcohols, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60 (18), pp 5961–5962.
- 185) Yan, L.; Kahne, D.; *p*-Methoxybenzyl Ethers as Acid-Labile Protecting Groups in Oligosaccharide Synthesis, *Synlett* **1995** (SI): 523-524.
- 186) Bouzide, A.; Sauvé, G.; Lewis Acid-Catalyzed Deprotection of *p*-Methoxybenzyl Ether, *Synlett*. **1997**(10): 1153-1154.
- 187) Akiyama T.; Shima H.; Ozaki, S. Trimethylsilyl chloride-tin(II) chloride anisol: a novel selective *p*-methoxybenzyl ether cleavage reagent. *Synlett* **1992**, p.415-416.
- 188) Onoda, T.; Shirai, R.; Iwasaki, S. A mild and selective deprotection of *p*-methoxybenzyl (PMB) ether by magnesium bromide diethyl etherate-methyl sulfide. *Tetrahedron Lett.* 38 **1997**, p. 1443-1446.
- 189) Morris Freifelder, *Practical Catalytic Hydrogenation, Techniques and applications*, John Wiley & Sons, New York, **1971**, 446-491.
- 190) Gedye, R.; Smith, F.; Westway, K.; Ali, H.; Laberge, L.; Rousell, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 279-282.
- 191) Giguere, R. G.; Bray, T. L.; Duncan, S. M.; Majetich, G. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4945-4948.
- 192) Andre Loupy, *Microwaves in organic synthesis*, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim* **2002**.
- 193) C. Oliver Kappe, Alexander Stadler ; *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- 194) Pelle Lidström, Jason Tierney, Bernard Wathey, Jacob Westman. Corrigendum to “Microwave assisted organic synthesis—a review”. *Tetrahedron* 57 (**2001**) 9225–9283.
- 195) Hayes, B.L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*; CEM Publishing: Matthews, NC, **2002**.
- 196) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A., *Tet. Lett.* **1979**, (36), 3437-3440.
- 197) Kurti L., Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*: Elsevier Academic Press **2005**.
- 198) King, A. O.; Yasuda, N., *Topics Organomet. Chem.* **2004**, 6, 205-245.
- 199) ScienceDaily, Oct. 6, **2010**.
- 200) Miyaura, N.; Suzuki, A., *Chem. Rev.* **1995**, 95, (7), 2457-2483.
- 201) J. Tsuji, *Transition Metal Reagents and Catalysts—Innovations in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Chichester, **2000**.

- 202) L. Brandsma, S. F. Vasilevsky and H. D. Verkruijsse, *Application of Transition Metal Catalysts in Organic Synthesis*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, **1999**, pp. 149–177.
- 203) G. P. Ellis and T. M. Romney-Alexander, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 779–794.
- 204) R. F. Heck, *Palladium Reagents in Organic Syntheses*, Academic Press, London, **1985**.
- 205) J. Lindley, *Tetrahedron*, **1984**, 40, 1433–1456.
- 206) R. G. R. Bacon and H. A. O. Hill, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 1097–1107.
- 207) J. von Braun and G. Manz, *Liebigs Ann. Chem.*, **1931**, 488, 111–126.
- 208) K. W. Rosenmund and E. Struck, *Chem. Ber.*, 1919, 52, 1749–1756.
- 209) Meister, Lucius, and Bruning, DE 271,790, 1913.
- 210) Anbarasan, P.; Schareina, T.; Beller, M. Recent developments and perspectives in palladium-catalyzed cyanation of aryl halides: synthesis of benzonitriles. *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5049–5067.
- 211) D. F. McMillen and D. M. Golden, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1982, 33, 493–532.
- 212) J. D. Cox and G. Pilcher, *Thermochemistry of Organic and Organometallic Compounds*, Academic Press, London, 1970.
- 213) F. Jin, P.N. Confalone, Palladium-catalyzed cyanation reactions of aryl chlorides, *Tetrahedron Lett.*, 41 (**2000**), p. 3271-73.
- 214) Katritzky, A.R.; Ridgewell, B.J. *J. Chem. Soc.* **1963**, (7), 3753-3764, 3882-3883.
- 215) Katritzky, A.R.; Fan, W.Q. *Heterocycles* **1992**, 34 (11), 2179-2229.
- 216) Bakke, J. M.; Hegbom, I.; Oevreeide, E.; Aaby, K. *Acta Chem. Scand.* **1994**, 48 (12), 1001-1006.
- 217) Bakke, J. M.; Ranes, E. *Synthesis* **1997**, (3), 281-283.
- 218) Bakke, J. M.; Ranes, E.; Riha, J.; Svensen, H. *Acta Chem. Scand.* **1999**, 53 (2), 141-144.
- 219) Arnestad, B.; Bakke, J.M.; Hegbom, I.; Ranes, E. *Acta Chem. Scand.* **1996**, 50 (6), 556-557.
- 220) Katritzky, A. R.; Scriven, E.F.V.; Majumder, S.; Akhmedova, R.G.; Vakulenko, A.V.; Akhmedov, N.G.; Murugan, R.; Abboud, K.A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3 (3), 538-541.
- 221) Bakke, J.M. ;Svensen, H.; Ranes, E.*J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, (11), 2477-2481.
- 222) Bakke, J.M.; Ranes, E.*J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, (10), 1919-1923.
- 223) Bakke, J.M.; Hegbom, I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, (6), 1211-1215.
- 224) Kourafalos V.N., Marakos P., Pouli N., Townsend L.B. *Synlett* **2002**, 1479.
- 225) G. R. Lappin and F. B. Slezak, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2806 (**1950**).
- 226) Xin Ge, Han-geng Chen Chang-hui Cao, Jin-qiang Liu, Chao Qian, Xin-zhi Chen. A concise synthesis of 2-chloro-3-amino-4-methylpyridine. *Res Chem Intermed* (**2011**) 37:599–604.
- 227) Burton et al. *Tetrahedron Lett.* 2211 (**1971**).

- 228) Roe, A., Seligman R. B., *J. Org. Chem.* **20** (1955) 1729-1731.
- 229) Aldrich BLN00034.
- 230) Radinov, R.; Chanev, C.; Haimova, M. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4793– 4796.
- 231) Ihle, N. C.; Krause, A. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 4810–4811.
- 232) Imidazo(1,2-A) Pyridine compounds as VEGF-R2 Inhibitors, International Publication Number WO 2006/091671 A1.