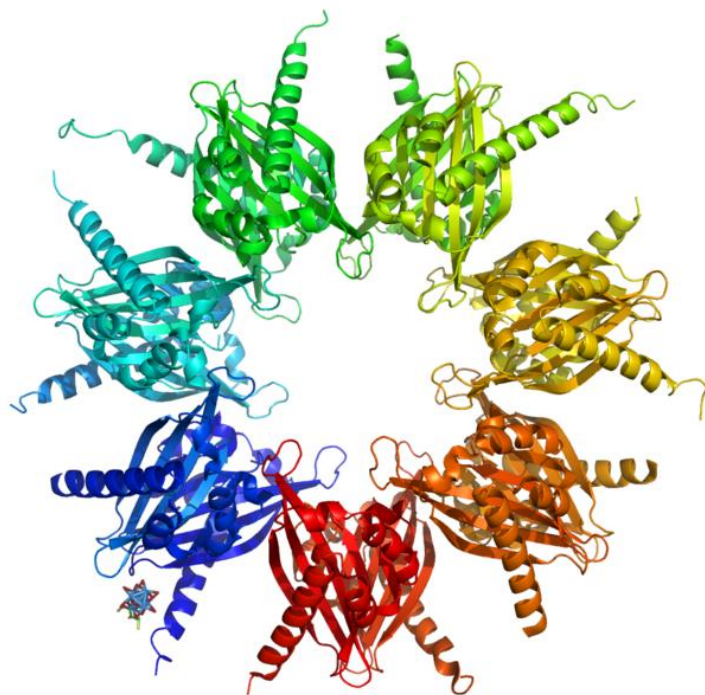




ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σχεδιασμός και Σύνθεση Νέων
Αμινοϋποκατεστημένων Πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών,
ως Πιθανών Αναστολέων Πρωτεϊνικών Κινασών



Μερόπη Σκλεπάρη

Φαρμακοποιός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αθήνα 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γ. Β. ΦΩΣΚΟΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Π. ΜΑΡΑΚΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ)

Ν. ΠΟΥΛΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	Σελ. 3
ABSTRACT.....	Σελ. 4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	Σελ. 5
1.1 Ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών με αντικαρκινική δράση.....	Σελ. 7
1.2 Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.....	Σελ. 13
1.3 Ανάλογα πουρινών που δρουν ως αναστολείς κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.....	Σελ. 16
2. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	Σελ. 20
2.1 Συνθετική πορεία.....	Σελ.20
2.1.1 Σύνθεση της 5-χλωρο-3-νιτροπυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (9) και των <i>N</i> 1 και <i>N</i> 2 μεθυλο- και π-μεθοξυβενζυλο- παραγώγων της (10-13).....	Σελ.20
2.1.2 Σύνθεση των 3-υποκατεστημένων παραγώγων της 5-φαινυλαμινο-1-μεθυλοπυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (17-19) και της 5-φαινυλαμινο-1- <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (26-28).....	Σελ. 23
2.1.3 Σύνθεση των 3-υποκατεστημένων παραγώγων της 5-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλοπυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (32-34) και της 5-κυκλοεξυλαμινο-1- <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (41-43).....	Σελ. 25
2.2 Φασματοσκοπική μελέτη των ενώσεων.....	Σελ. 28
2.2.1 Απόδοση των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα NMR.....	Σελ. 28
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	Σελ. 35
3.1 Γενικά πειραματικά στοιχεία.....	Σελ. 35
3.2 Σύνθεση της 5-χλωρο-3-νιτροπυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (9) και των <i>N</i> 1 και <i>N</i> 2 μεθυλο- (11 και 10) και π-μεθοξυβενζυλο- (13 και 12) παραγώγων της.....	Σελ. 35
3.3 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 5-φαινυλαμινο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (17-19) και της 5-φαινυλαμινο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (26-28).....	Σελ. 40
3.4 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 5-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλοπυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (32-34) και της 5-κυκλοεξυλαμινο-1- <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνης (41-43).....	Σελ. 47
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σελ. 55

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σχεδιασμός και Σύνθεση Νέων Αμινοϋποκατεστημένων Πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών, ως Πιθανών Αναστολέων Πρωτεϊνικών Κινασών

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, η ανάγκη για βελτιστοποίηση της θεραπείας του καρκίνου, μίας από τις συνηθέστερες αιτίες θανάτου του σύγχρονου κόσμου, έχει συγκεντρώσει το ερευνητικό ενδιαφέρον στην αξιολόγηση των μοριακών στόχων που εμπλέκονται στην ασθένεια, καθώς και στην πρόβλεψη της δραστικότερης δομής των πιθανών φαρμάκων. Οι πληροφορίες για τους ποικίλους μηχανισμούς καρκινογένεσης που έχουν συλλεγεί μέχρι σήμερα, έχουν οδηγήσει μεταξύ άλλων στην προσπάθεια για ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, ενζύμων καθοριστικών στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, εφόσον μέσω της αντίδρασης φωσφορυλίωσης που καταλύουν ρυθμίζουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πληθώρας ενζύμων και δομικών πρωτεϊνών. Μη φυσιολογική ενεργοποίηση των ενζύμων αυτών ή απουσία των φυσικών αναστολέων τους, οδηγεί σε σοβαρές διαταραχές θεμελιωδών κυτταρικών λειτουργιών ή ακόμα και σε απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες αναστολέων των κινασών που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, ξεχωρίζουν τα olomoucine, roscovitine και purvalanol A και B, μορίων που φέρουν πουρινικό σκελετό και παρουσιάζουν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.

Έχοντας ως αφετηρία τις μελέτες που έχουν προηγηθεί, αποφασίσαμε να εξετάσουμε υποκατεστημένα παράγωγα πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης, συμπτυκνωμένου ετεροκυκλικού συστήματος που μπορεί να θεωρηθεί ως η 8-αζα-3,9-δεαζαπουρίνη. Σχεδιάστηκαν λοιπόν στην παρούσα εργασία και συντέθηκαν πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνες που φέρουν 1-μεθυλομάδα ή δεν έχουν υποκαταστάτη στην θέση 1, καθώς επίσης και 5-αλκυλ- ή αρυλαμινομάδα, ενώ στη θέση 3 φέρουν κατάλληλους αμινικούς υποκαταστάτες. Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των ανωτέρω αναλόγων χρησιμοποιήθηκε η 2-αμινο-4-πικολίνη, η οποία με σειρά αντιδράσεων οδήγησε στην 3-ακεταμιδο-6-χλωρο-4-πικολίνη, που υποβλήθηκε κατόπιν διαδοχικά σε διαζώτωση, ενδομοριακή κύκλωση, απακετυλίωση και νίτρωση, παρέχοντας την 5-χλωρο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη. Το μόριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως κοινό ενδιάμεσο για τη σύνθεση των αμινοϋποκατεστημένων τελικών μορίων-στόχων, που προέκυψαν έπειτα από υποκατάσταση του χλωρίου από ανιλίνη ή κυκλοεξυλαμίνη, αναγωγή, χλωρακετυλίωση και επίδραση της κατάλληλης κάθε φορά αμίνης. Σκοπός της εργασίας είναι η φαρμακολογική αξιολόγηση των νέων αυτών παραγώγων έναντι διαφόρων κυτταρικών κινασών και η εξαγωγή σχέσεων δομής-δράσης σχετικά με αυτή την ομάδα μορίων.

ABSTRACT

The Design and Synthesis of New Aminosubstituted Pyrazolo[3,4-*c*]pyridines as Potential Kinase Inhibitors

Nowadays, cancer is regarded responsible for many deaths and one of the most common diseases in the present world. During the last years, the need for the improvement of the cure of cancer emerged and the scientific research has focused on the estimation of molecular targets and on the prediction of the structure of potential drugs. The continuous investigation led to the knowledge of some of the various mechanisms of carcinogenesis and as a result, to the idea of developing pharmacological inhibitors of kinases as very promising targets. Kinases are enzymes that control cell cycle via protein biophosphorylation, an important reaction in the post translational regulation of enzymes and structural proteins. Abnormal activation of kinases or absence of their naturally occurring inhibitors results in many human disorders and even to the loss of control of cell proliferation. A number of diverse classes of kinase inhibitors have been reported at the present and many of them have derived from the purine scaffold, like the established inhibitors of cyclin depended kinases olomoucine, roscovitine and purvalanol A and B.

Based on the above mentioned considerations we describe in this study the design and synthesis of some new substituted pyrazolo[3,4-*c*]pyridines, which can be regarded as the 8-aza-3,9-deazapurine condensed heterocyclic system. As a result, the derivatives that were synthesized, possess a methyl group or no group at the position 1, a 5-aryl or alkylamine side chain, as well as a variety of 3-aminoalkyl substituents. The compounds were prepared using 2-amino-4-picoline as starting material, which after a series of reactions led to 3-acetamido-6-chloro-4-picoline which through diazotation, ring closure and nitration provided the corresponding 5-chloro-3-nitro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine. This analogue was used as a common intermediate which upon substitution, reduction and chloroacetylation provided the route for the synthesis of the aminosubstituted target derivatives. The aim of the project is to study the new derivatives against a panel of kinases and extract structure activity relationships concerning this scaffold.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων στηρίζεται εν πολλοίς στην δημιουργική αλληλεπίδραση δύο βασικών επιστημών: της Χημείας και της Βιολογίας. Διαδοχικοί κύκλοι σύνθεσης νέων ενώσεων, αποτίμησης της βιολογικής τους δραστηριότητας, εξαγωγής σχέσεων δομής-δράσης και επαλήθευσης παλαιών ή νέων θεραπευτικών στόχων, μέσω της φαρμακολογικής μελέτης των νέων δραστικών ενώσεων επαναλαμβάνονται αρκετές φορές, μέχρις ότου αιτιολογηθεί η κλινική αξιολόγηση που θα οδηγήσει στην ανάπτυξη κάποιου νέου υποψήφιου φαρμάκου.¹ Η μεγάλη τεχνολογική πρόοδος των τελευταίων ετών συνέβαλε αποφασιστικά στη σημαντική μείωση του απαιτούμενου χρόνου ολοκλήρωσης των ανωτέρω κύκλων και έτσι η βελτιστοποίηση μιας ένωσης – οδηγού είναι δυνατόν να ολοκληρωθεί σε 12 έως 18 μήνες. Μικρότερη πρόοδος επιτελέσθηκε όμως στον τομέα των κλινικών μελετών, που εξακολουθούν ακόμη και σήμερα να διαρκούν ολόκληρα χρόνια. Η σύγχρονη αντίληψη ανάπτυξης νέων φαρμάκων επικεντρώνεται λοιπόν σαφώς στην βελτιστοποίηση της προκλινικής αξιολόγησης των νέων θεραπευτικών στόχων και των νέων ενώσεων, ώστε να αυξηθεί στο μέγιστο η πιθανότητα επιτυχίας όσων εξ αυτών εισέρχονται στις χρονοβόρες και ακριβές κλινικές μελέτες.²

Ειδικά σε ότι αφορά τα νέα ογκολογικά φάρμακα, η εντατική ερευνητική ενασχόληση των τελευταίων ετών κατέληξε στην συλλογή μεγάλου όγκου νέας πληροφορίας και αδιαμφισβήτητα έδωσε ώθηση σε όλα τα επίπεδα, από την πληρέστερη κατανόηση των μηχανισμών που διαταράσσονται στα νεοπλασματικά κύτταρα, μέχρι την εμπλοκή συγκεκριμένων γονιδίων ανά περιστατικό νόσου, ή τη δυνατότητα διερεύνησης φαρμακευτικών παρεμβάσεων σε νέους στόχους. Παρόλ' αυτά, όχι μόνον δεν σταμάτησε η απόσυρση αντικαρκινικών φαρμάκων από προχωρημένα στάδια κλινικών μελετών, αλλά σύμφωνα με στοιχεία του FDA που αφορούν την τελευταία δεκαετία, ένα νέο ογκολογικό φάρμακο που εισέρχεται σε κλινικές δοκιμές έχει μόνο 5% πιθανότητα να λάβει τελικά έγκριση κυκλοφορίας, ποσοστό που υπολείπεται σημαντικά από τον μέσο όρο των φαρμάκων όλων των κατηγοριών, που ανέρχεται στο 11%.³ Οι κύριες αιτίες απόσυρσης κατά το παρελθόν σχετίζονταν με προβλήματα βιοδιαθεσιμότητας και φαρμακοκινητικής συμπεριφοράς, ενώ σήμερα φαίνεται ότι υπερτερούν προβλήματα τοξικότητας και ανεπαρκούς δραστηριότητας.⁴ Η επιλογή των νέων υποψήφιων φαρμάκων στηρίζεται όλο και περισσότερο στη γνώση του μηχανισμού αντικαρκινικής δράσης, καθώς επίσης και στην αξιολόγηση των μοριακών στόχων του φαρμάκου, που πρέπει βεβαίως να έχουν κριθεί ως σημαντικοί.⁵ Όσον αφορά στη βελτιστοποίηση της δομής τους, ώστε να μπορέσει να προκύψει η πιθανότητα ασφαλούς θεραπευτικής εφαρμογής, απαιτείται επίμονη και προσεκτική εργασία που στηρίζεται στην κλασσική φαρμακοχημεία, αλλά επωφελείται όλο και περισσότερο από την εφαρμογή των νέων τεχνικών και τεχνολογιών που προκύπτουν από τη ραγδαία ανάπτυξη των βιολογικών επιστημών.⁶

Το πρόβλημα της μη αποτελεσματικής αντικαρκινικής θεραπείας είναι ευρύτερα γνωστό. Στον ανεπτυγμένο κόσμο ο καρκίνος αποτελεί σήμερα την δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου, μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις, σύντομα όμως αναμένεται να αποβεί η συχνότερη αιτία θανάτου.⁷ Το αποτέλεσμα της εφαρμοζόμενης θεραπείας θεωρείται σχετικά ικανοποιητικό στην περίπτωση των παιδιατρικών και αιματολογικών καρκίνων, αλλά υπολείπεται σημαντικά στους επιθηλιακούς κυρίως καρκίνους των ενηλίκων, όπου χαρακτηρίζεται κατά μέσο όρο ως μέτριο, στην καλύτερη των περιπτώσεων. Σπάνια επιτυγχάνεται η πλήρης ίαση, ενώ συνήθως η φαρμακευτική αντιμετώπιση αποσκοπεί στην παράταση του προσδόκιμου επιβίωσης και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής. Η ερευνητική ενασχόληση απέδειξε ότι η ποικιλομορφία της νόσου είναι πολύ μεγάλη και καταλήγει στην εμφάνιση σημαντικών αποκλίσεων και διαφορών, ακόμη και μεταξύ «ίδιων» καρκίνων, τόσο σε ανατομικό, όσο και σε λειτουργικό /μοριακό επίπεδο.⁸ Κατά συνέπεια και η θεραπευτική αντιμετώπιση δεν μπορεί να είναι ενιαία, όπως είναι σε μεγάλο βαθμό μέχρι σήμερα, αλλά πρέπει να παρουσιάζει διαφορές, που μάλιστα στο εγγύς μέλλον αναμένεται να αυξηθούν.

Η προσπάθεια για την διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών καρκινογένεσης δεν είναι καινούργια. Ήδη από την δεκαετία 1960-1970 χαρακτηρίστηκαν διάφοροι ογκογενετικοί ιοί και εντοπίστηκαν αρκετές καρκινογόνες χημικές ουσίες, την δεκαετία 1970-1980 ταυτοποιήθηκαν τα πρώτα ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, ενώ κατά την δεκαετία 1980-1990 μελετήθηκαν οι οδοί μεταγωγής σήματος, καθώς και οι διαταραχές που παρατηρούνται στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων.⁹ Κατά τα τελευταία χρόνια παρατηρείται κυρίως μια αλλαγή νοοτροπίας σχετικά με την έμφαση που δίδεται στους μοριακούς μηχανισμούς, με σκοπό την ορθολογική ανάπτυξη μιας πραγματικά στοχευμένης αντικαρκινικής θεραπείας.¹⁰

Η πρώτη γενιά ογκολογικών φαρμάκων, που αποτελεί μέχρι σήμερα τη βάση όλων των χημειοθεραπευτικών σχημάτων, χαρακτηρίζεται από υψηλή κυτταροτοξική δράση. Ανακαλύφθηκαν πολλές φορές «τυχαία», ως ενώσεις που αναστέλλουν γενικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυρίως των ταχέως διαιρούμενων καρκινικών κυττάρων. Η πλειοψηφία αυτών των φαρμάκων έχει ως στόχο το DNA, καθώς και τα ένζυμα που σχετίζονται με τη σύνθεση των δομικών του λίθων, δηλαδή των νουκλεοτιδίων. Πρόκειται για φάρμακα που δρουν κυρίως ως αντιμεταβολίτες, ως παράγοντες ενδοπαρεμβολής και ως αναστολείς της μίτωσης, τις περισσότερες μάλιστα φορές διακρίνονται από σύνθετο τρόπο δράσης. Αντίθετα, η δεύτερη γενιά των αντικαρκινικών φαρμάκων προέρχεται από την λεπτομερή μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται σε κάθε μορφή καρκίνου και στοχεύουν σε συγκεκριμένο κάθε φορά καρκινικό φαινότυπο, σε μια προσπάθεια προσέγγισης του ιδεατού στόχου της εξατομικευμένης θεραπείας. Το φάρμακο πρέπει να αναστέλλει τον βασικό ογκογενετικό μηχανισμό, που λειτουργεί κάθε φορά σε κυτταρικό επίπεδο. Επίσης, γίνεται προσπάθεια να αντιμετωπισθούν οι χαρακτηριστικές ιδιότητες των νεοπλασματικών κυττάρων, που φαίνεται ότι δεν υπακούουν στους κανόνες ομοιοστασίας του οργανισμού και παρουσιάζουν ανώμαλη αύξηση της επιβίωσης και μείωση της απόπτωσης, ενώ παράλληλα αναπτύσσουν μηχανισμούς διήθησης,

μετάστασης και αγγειογένεσης.¹¹ Είναι φανερό ότι αυτή η δεύτερη γενιά των αντικαρκινικών φαρμάκων χαρακτηρίζεται από σημαντικά μειωμένα, αλλά όχι και μηδενική πιθανότητα για τοξική δράση στα υγιή κύτταρα. Γενικά καταβάλλεται προσπάθεια πρόβλεψης του θεραπευτικού τους εύρους με την ανάπτυξη κατάλληλων πειραματοζώων, καθώς και με την σχολαστική αξιολόγηση των ενώσεων στην προκλινική φάση ανάπτυξης. Απομένει πάντα η απόδειξη της αποτελεσματικότητας τους στην πράξη και κυρίως η αντιμετώπιση της ανάπτυξης αντοχής, κατά τη μακροχρόνια χορήγηση τους.

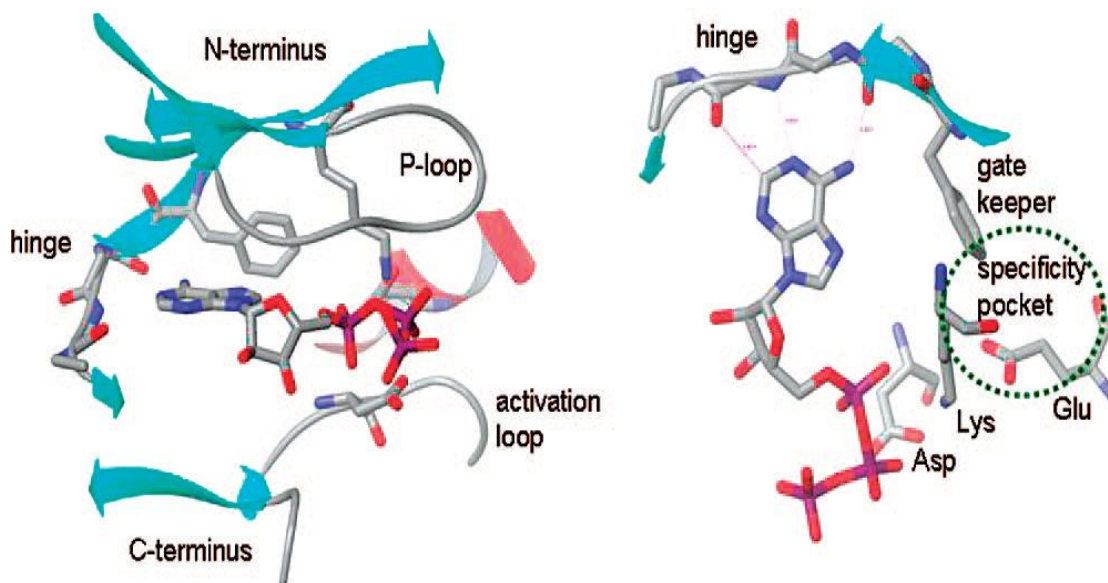
1.1 Ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών με αντικαρκινική δράση

Μεταξύ των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίστανται οι πρωτεΐνες με σκοπό τον έλεγχο της δραστηριότητάς τους, εξέχουσα θέση καταλαμβάνει η αντίδραση φωσφορυλίωσης του υδροξυλίου των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη, καθώς εκτιμάται ότι το ένα τρίτο περίπου (30%) των πρωτεϊνών του κυττάρου φωσφορυλιώνονται, έστω και παροδικά. Από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος ταυτοποιήθηκαν 518 πρωτεϊνικές κινάσες, που λαμβάνουν μέρος στη μεταγωγή σήματος και επομένως στον έλεγχο όλων των πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών, που περιλαμβάνουν τις μεταβολικές οδούς, την κυτταρική διαίρεση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση. Ανταγωνιστικό ρόλο ως προς τις πρωτεϊνικές κινάσες παίζουν οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές φωσφατάσες, που καταλύουν την ακριβώς αντίθετη αντίδραση της φωσφορύλωσης, που είναι βεβαίως απαραίτητη για τον έλεγχο της διάρκειας δράσης του σήματος.¹²

Καθώς οι πρωτεϊνικές κινάσες «μεταφράζουν» ουσιαστικά τα διάφορα ερεθίσματα σε βιοχημικά γεγονότα είναι φυσικό να διασπείρονται κυριολεκτικά παντού, από την κυτταρική μεμβράνη, όπου το ενδοκυτταρικό τμήμα πολλών υποδοχέων της ασκεί λειτουργία κινάσης, έως και τον πυρήνα του κυττάρου, όπου οι περισσότεροι ρυθμιστές της μεταγραφής των γονιδίων είναι κινάσες. Ενδιάμεσα μεσολαβούν οι καταρράκτες των διαδοχικών αντιδράσεων φωσφορυλίωσης, που χρησιμοποιείται συχνά, σε διάφορες οδούς όχι μόνο για την μετάδοση, αλλά και για την ενίσχυση του σήματος. Η κατάλληλη ρύθμιση του βαθμού ενεργότητας των πρωτεϊνικών κινασών παίζει καθοριστικό ρόλο όχι απλά για τη ρύθμιση της λειτουργίας, αλλά και για την ίδια την τύχη του κυττάρου. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων 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 σε καρκινικό φαινότυπο.¹³ Όλες οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του νεοπλασματικού κυττάρου, η ανεξέλεγκτη διαίρεση, η ικανότητα διήθησης, μετάστασης και αγγειογένεσης αποδείχθηκε ότι σχετίζονται με διαταραχή της λειτουργικότητας ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών, σε σημείο που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι διάφορες μορφές καρκίνου θα μπορούσαν να περιγραφούν ως ασθένειες με βάση τις

παρατηρούμενες διαταραχές στη λειτουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών και τα αντίστοιχα προβλήματα στη μεταγωγή του σήματος.¹⁴

Πάνω από το 50% των πρωτεϊνικών κινασών συσχετίζονται με την εμφάνιση κακοήθειας στον άνθρωπο όταν λειτουργούν ανεξέλεγκτα, γεγονός που μπορεί βεβαίως να οφείλεται 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 της υπόλοιπης πρωτεΐνης. Είναι γνωστή η περίπτωση της υβριδικής Bcr-Abl κινάσης, που είναι συνεχώς ενεργή και ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας στον άνθρωπο.¹⁵ Άλλος μηχανισμός καρκινογένεσης αφορά την εμφάνιση κάποιας γονιδιακής μετάλλαξης, που καθιστά επίσης την αντίστοιχη κινάση ανεξέλεγκτα ενεργή, όπως είναι για παράδειγμα η c-Kit κινάση των όγκων του γαστρεντερικού συστήματος. Ένας τρίτος μηχανισμός έχει σχέση με αυξημένη έκφραση, ή και την πλήρη απώλεια ελέγχου της έκφρασης της κινάσης, όπως συμβαίνει για τον αγγειακό/ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα και τον υποδοχέα του (VEGF και VEGFR, αντίστοιχα), που προκαλούν αγγειογένεση και 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 για παράδειγμα στην περίπτωση της απώλειας ελέγχου που ασκεί η φωσφατάση PTEN στην Akt κινάση. Προέκυψε λοιπόν, ως φυσικό επακόλουθο αυτών των παρατηρήσεων, η προσπάθεια για την ανάπτυξη διαφόρων αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, που θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμοι στην αντικαρκινική θεραπεία.^{16a,b,c} Μετά την επιτυχία της μεθανοσουλφονικής ιματινίμπης (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.

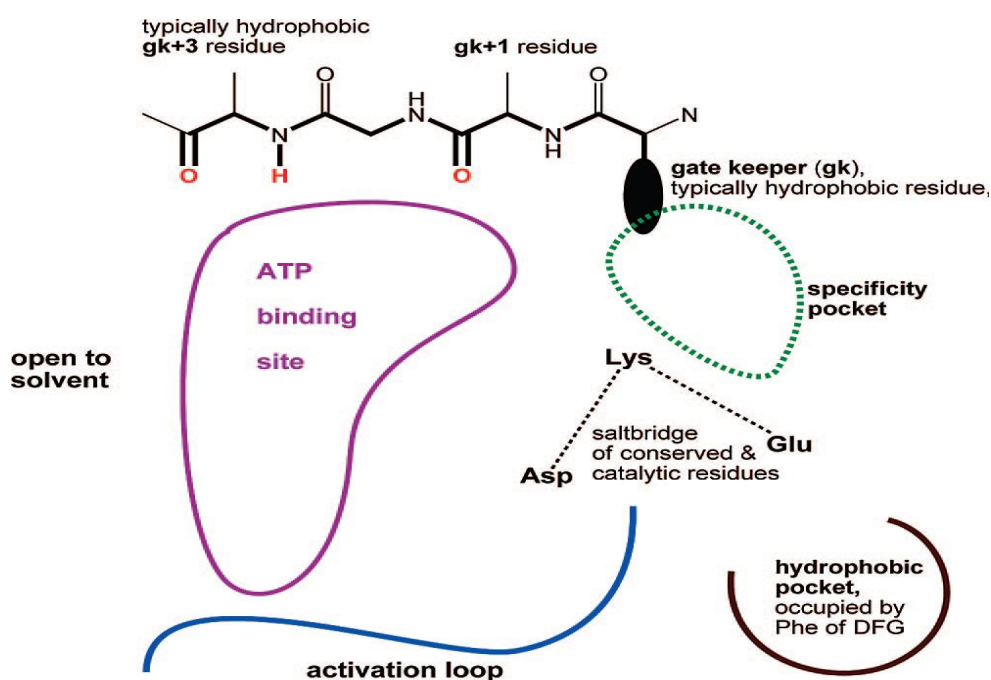


Σχήμα 1.1 Τυπική εικόνα της θέσης πρόσδεσης του ATP, μεταξύ της αμινοτελικής και καρβοξυτελικής περιοχής της κινάσης. Στο δεξί σχήμα φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται με το ευκίνητο, αρθρωτό τμήμα του ενζύμου, η DFG τριπλέτα και οι ομάδες που ελέγχουν την είσοδο στη ειδική θέση.

Για λόγους κατάταξης οι πρωτεϊνικές κινάσες διαιρούνται σε δύο υποοικογένειες, τις κινάσες του αρωματικού υδροξυλίου της τυροσίνης, που μπορεί να είναι υποδοχείς ή μη υποδοχείς και τις κινάσες του αλειφατικού υδροξυλίου σερίνης ή θρεονίνης. Υπάρχουν κινάσες μικτής λειτουργίας, σερίνης/θρεονίνης, όπως και ορισμένες κινάσες ιστιδίνης, που προσθέτουν φωσφορική ομάδα στο άζωτο του ιμιδαζολίου αυτού του αμινοξέος και ανακαλύφθηκαν κάπως αργότερα.¹⁷ Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες των ευκαρυωτικών κυττάρων παρουσιάζουν ένα γενετικά διατηρημένο καταλυτικό κέντρο ανάλογης δομής, που μελετήθηκε με κρυσταλλογραφία για πρώτη φορά στις πρωτεϊνικές κινάσες Α (PKA), που ενεργοποιούνται από το c-AMP.¹⁸ Γενικά, 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 της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), που χρησιμεύει ως δότης της φωσφορικής ομάδας για την αντίδραση της φωσφορυλίωσης (Σχήμα 1.1).¹⁹

Το ATP προσδένεται σε μια στενή υδρόφοβη κοιλότητα του ενεργού κέντρου, που εντοπίζεται στο κεντρικό, αρθρωτό τμήμα του ενζύμου και διαθέτει συνήθως ένα αμινοξύ-δότη

δεσμού υδρογόνου, που περιστοιχίζεται από δύο αμινοξέα-δέκτες δεσμού υδρογόνου.²⁰ Κατά την πρόσδεση του ATP αναπτύσσεται λοιπόν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ του ετεροκυκλικού τμήματος της αδενίνης και των απέναντι αμινοξέων του ενζύμου, ενώ η ριβόζη διευθετείται προς την αρχή της καρβοξυτελικής περιοχής, όπου εντοπίζεται η καταλυτική περιοχή της κινάσης (catalytic loop). Στο κέντρο της καταλυτικής περιοχής υπάρχει μια καλά συντηρημένη τριπλέτα αμινοξέων, που απαρτίζεται από ασπαρτικό οξύ, φαινυλαλανίνη και γλυκίνη (DFG μοτίβο). Το ασπαρτικό οξύ συμμετέχει, μαζί με δύο μεταλλοϊόντα και μια συντηρημένη 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 διπλανά αμινοξέα, δηλαδή την γλυκίνη και την φαινυλαλανίνη. Η μετακίνηση της τελευταίας 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.²¹ Για την περαιτέρω σταθεροποίηση του ATP στη θέση πρόσδεσης και κυρίως για τη σταθεροποίηση του μεταβατικού συμπλόκου (transition state) της αντίδρασης αναπτύσσονται επιπλέον ορισμένες πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φωσφορικών ομάδων και της πλούσιας σε γλυκίνη περιοχής του ενζύμου, που βρίσκεται στην οροφή του ενεργού κέντρου (αναφέρεται ως GXGXXG μοτίβο, G-loop, ή P-loop).



Σχήμα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης πρόσδεσης του ATP. Στο επάνω μέρος φαίνεται η οροφή του ενεργού κέντρου και το αμινοξύ-θυρωρός (gate keeper, gk), ενώ το κάτω μέρος καταλαμβάνεται από το ευκίνητο activation loop.

Πολύ σημαντικό ρόλο αποδείχθηκε ότι μπορεί να παίζει το αμινοξύ-θυρωρός (gate keeper), που βρίσκεται στην στενή είσοδο του ενεργού κέντρου και λαμβάνεται μάλιστα ως σημείο αναφοράς, για τον καθορισμό της θέσης των αμινοξέων που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με το ATP (Σχήμα 1.2). 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.

Οι πρωτεϊνικές 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 σε έναν υδρόφιλο βρόγχο της θέσης πρόσδεσης του ATP, που ονομάζεται βρόγχος ενεργοποίησης (activation loop). Αποτέλεσμα αυτής της φωσφορυλίωσης είναι η τροποποίηση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης, με μετακίνηση του υδρόφοβου τμήματος του βρόγχου προς τη περιοχή του διαλύτη και αύξηση της προσβασιμότητας του ενεργού της κέντρου. Φαίνεται όμως ότι με τη φωσφορυλίωση επηρεάζεται και ευρύτερα η λειτουργικότητα της κινάσης, ενώ πολλές φορές αλλάζει ακόμα και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της.²² Εκτός της φωσφορυλίωσης, υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης των κινασών, που αφορούν την αλληλεπίδρασή τους με μόρια δευτέρων αγγελιοφόρων (όπως το c-AMP για την πρωτεϊνική κινάση A, ή το σύμπλοκο 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.²³

Αν και μεγάλο μέρος του ενεργού κέντρου των κινασών διατηρήθηκε σταθερό κατά την εξέλιξη, οι μηχανισμοί αναστολής τους είναι αρκετά διαφορετικοί, ώστε να επιτρέπουν την προσδοκία μιας σχετικά εκλεκτικής δράσης κάποιου αναστολέα τους. Θεωρητικά, ένας αναστολέας κινάσης μπορεί να είναι δομικό ανάλογο του υποστρώματός της, για να δράσει ως ψευδές υπόστρωμα. Εναλλακτικά, μπορεί να είναι δομικό ανάλογο του ATP, για να καταλάβει αντ' αυτού τη θέση πρόσδεσής του, ή κάποιο μόριο που μπορεί να «κλειδώσει» το ένζυμο στην ανενεργή του διαμόρφωση. Οι έως σήμερα γνωστοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών και μάλιστα όσοι εξ αυτών έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας ως φάρμακα, είναι στην πλειοψηφία τους μόρια που προσομοιάζουν δομικά και δρουν ανταγωνιστικά ως προς το ATP και μη ανταγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα της κινάσης.²⁴ Αυτό συμβαίνει παρά την ύπαρξη μιας σειράς από λόγους που δίνουν σαφές πλεονέκτημα σε κάποιον αναστολέα-δομικό ανάλογο υποστρώματος. Μπορεί κανείς εύκολα να αναφερθεί στη μεγάλη πιθανότητα εξειδίκευσης ενός τέτοιου παραγώγου και εκλεκτικής αναστολής της συγκεκριμένης κινάσης, όμως πολύ σημαντική είναι επίσης και η έλλειψη σοβαρού ανταγωνισμού μέσα στο κυτταρικό περιβάλλον. Όλοι οι αναστολείς που είναι δομικά ανάλογα του

ATP είναι απαραίτητο να διαθέτουν πολύ υψηλή συνάφεια με την κινάση που αναστέλλουν, αφού υφίστανται ανταγωνισμό από το ίδιο το ATP, με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητάς τους. Πράγματι, ενώσεις που αναστέλλουν ισχυρά διάφορες κινάσες σε νανομοριακή συγκέντρωση, πρέπει να χορηγηθούν σε πολλαπλάσια συγκέντρωση (της τάξεως του millimolar) στην κυτταρική καλλιέργεια, όπου συνυπάρχει συνήθως υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ATP.²⁵ 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 πληροφορίες, που θεωρούνται απαραίτητες για τον σχεδιασμό φαρμάκων. Έτσι, μπορεί να δοθεί κάποια εξήγηση του παράδοξου που αναφέρθηκε προηγουμένως, χωρίς αυτό βεβαίως να αποκλείει τις προσπάθειες για μίμηση του υποστρώματος, που αν και είναι προς το παρόν περιορισμένες, φαίνεται ότι επιβεβαιώνουν στην πράξη τις προσδοκίες για εξειδικευμένη δράση και χαμηλή τοξικότητα.^{26a,b}

Είναι προφανές ότι για τους αναστολείς κινασών που είναι δομικά ανάλογα του ATP τίθεται ένα σημαντικό ερώτημα, σχετικά με την εκλεκτικότητα της αναστολής, που σχετίζεται άμεσα με την ασφάλεια της κλινικής εφαρμογής τους. Εκτός της πληθώρας των πρωτεϊνικών κινασών που απαντώνται σε κάθε κύτταρο, πρέπει να λάβουμε υπόψη το γεγονός ότι και άλλα ένζυμα αναγνωρίζουν ως υποστρώματα ή ως συμπαράγοντες τις πουρίνες, επομένως δεν είναι απίθανο να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μόριο που μιμείται την δομή πουρινών. Η εμπειρία απέδειξε ότι η συντήρηση της θέσης σύνδεσης του ATP δεν είναι απόλυτη και είναι εφικτή η εύρεση αναστολέων που επιδεικνύουν αρκετά μεγάλη εκλεκτικότητα για ορισμένες κινάσες. Καταβάλλονται επίσης αξιόλογες προσπάθειες για αύξηση της εκλεκτικότητας, μεταξύ των οποίων ξεχωρίζουν η εκμετάλλευση του όγκου των ομάδων του θυρωρού, η σύνδεση σε περιοχές που γειτνιάζουν με το ενεργό κέντρο, καθώς και η ανάπτυξη μη αντιστρεπτών αναστολέων, που αντιδρούν με μια δραστική κυστεϊνή που εντοπίζεται σε ορισμένες κινάσες στην πλούσια σε γλυκίνη περιοχή του ενεργού κέντρου. Μόνο 19 από τις 491 κινάσες που μελετήθηκαν παρουσιάζουν το συγκεκριμένο δομικό χαρακτηριστικό και μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με κατάλληλα σχεδιασμένους αναστολείς. Το επιπλέον πλεονέκτημα ενός τέτοιου αναστολέα είναι η μικρή πιθανότητα για ανάπτυξη ανοχής, καθώς πρέπει να συμβούν τουλάχιστον δύο κατάλληλες μεταλλάξεις για να χάσει τη δραστηριότητά του.^{27a,b}

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 μάλλον και όχι απόλυτη εξειδίκευση. Λαμβανομένου υπόψη του γεγονότος ότι μόνο ένα μέρος των 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 κάποιο συγκεκριμένο παθογενετικό μηχανισμό.²⁸

1.2 Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου

Οι πρωτεϊνικές κινάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων.²⁹ Η κυτταρική διαίρεση (Mitotic phase, M) καταλαμβάνει μόλις το 10% της ζωής του κυττάρου και απαρτίζεται από τα τέσσερα διακριτά στάδια της μίτωσης (πρόφαση, μετάφαση, ανάφαση, τελόφαση) και την κυτοκίνηση. Η κυτοκίνηση δε θεωρείται στάδιο της μίτωσης αλλά περιλαμβάνει το διαχωρισμό του κυτταροπλάσματος, των οργανιδίων και της μεμβράνης, ώστε τελικά να προκύψουν δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Η χρονική περίοδος που παρεμβάλλεται ανάμεσα σε δύο διαδοχικές φάσεις μίτωσης ονομάζεται μεσόφαση. Αυτή, αν και ποικίλει σε διάρκεια, αποτελεί το μεγαλύτερο διάστημα της ζωής του κυττάρου (~90%). και περιλαμβάνει τις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, την φάση G₁ (Gap 1, «πρώτο χάσμα»), τη φάση S (Synthesis) και τη φάση G₂ (Gap 2, «δεύτερο χάσμα»). Κατά τη διάρκεια της μεσόφασης το κύτταρο μεταγράφει τα γονίδιά του, βιοσυνθέτει πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα και άλλα συστατικά του και αυξάνεται σε μέγεθος. Εκτός αυτών των τεσσάρων φάσεων υπάρχει και η φάση G₀ (φάση ηρεμίας). Το διαιρεμένο κύτταρο που έχει προκύψει από τη μίτωση, εισέρχεται στη φάση G₁ του επόμενου κύκλου, αντί όμως να συνεχίσει σε αυτήν μπορεί να μεταβεί σε μια φάση αδράνειας, ανάλογα με τις συνθήκες και τις ανάγκες του οργάνου, του ιστού ή του οργανισμού. Η μόνιμη παραμονή στην φάση G₀ συμβαίνει φυσιολογικά σε ιστούς που δεν αναπαράγονται, αλλά μπορεί να επέλθει και ως απόκριση του κυττάρου σε βλάβες του DNA, όταν και τα θυγατρικά κύτταρα δε θα ήταν βιώσιμα. Στην περίπτωση αυτή, η επιβεβλημένη παραμονή στην G₀ αποτελεί μέρος της διαδικασίας γήρανσης (*senescence*) του κυττάρου και συνιστά εναλλακτική βιοχημική λύση έναντι του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης).

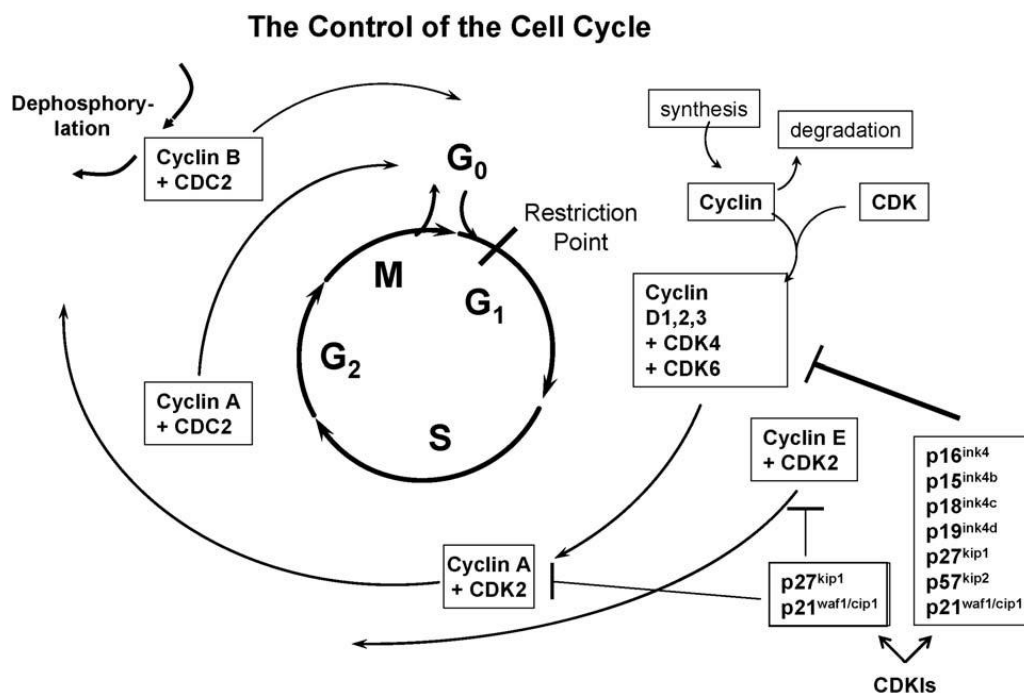
Η λειτουργική ακεραιότητα των διαδικασιών που εγγυώνται την επιτυχία της κυτταρικής διαίρεσης εξασφαλίζεται με την ύπαρξη μηχανισμών που ονομάζονται σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (*cell cycle checkpoints*). Επαληθεύεται σε κάθε φάση του κύκλου ότι όλες οι διαδικασίες έχουν εκτελεστεί με την προβλεπόμενη ακρίβεια, προτού επιτραπεί η μετάβαση στην επόμενη φάση.³⁰ Όταν εντοπιστεί βλάβη, το σημείο ελέγχου χρησιμοποιεί ειδικά βιοχημικά σήματα, προκειμένου να καθυστερήσει τον κύκλο μέχρι να γίνουν οι απαραίτητες επιδιορθώσεις, ή, εφόσον η βλάβη δεν είναι διορθώσιμη, στοχοποιείται το κύτταρο για καταστροφή μέσω της ενεργοποίησης των μηχανισμών της απόπτωσης. Αυτό το σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου βασίζεται στην κυκλική ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των κατάλληλων πρωτεϊνικών κινασών, που πυροδοτούν

ή ρυθμίζουν την αντιγραφή του DNA, τη μίτωση και τη κυτοκίνηση. Οι πρωτεϊνικές κινάσες του συστήματος ελέγχου είναι παρούσες σε όλες τις φάσεις του κύκλου, αλλά ενεργοποιούνται για ορισμένες μόνο χρονικές περιόδους, μέσω της πρόσδεσής τους σε μία δεύτερη ομάδα πρωτεϊνών του συστήματος ελέγχου, τις κυκλίνες.³¹ Οι ίδιες οι κυκλίνες δεν διαθέτουν ενζυμική ενεργότητα, αλλά είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των κινασών, αφού μόνο το σχηματιζόμενο ετεροδιμερές σύμπλοκο συμπεριφέρεται ως ενεργή κυκλινοεξαρτώμενη κινάση (cyclin-dependent protein kinases, CDK).³² 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 CDK.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο δεκατέσσερις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, και τριαντατέσσερις κυκλίνες. Τα σύμπλοκά τους ενεργοποιούνται και αυτά με φωσφορυλίωση ή φωσφορόλυση σε συγκεκριμένες θέσεις από κινάσες ή φωσφατάσες, αντίστοιχα.³³ Οι μοριακοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη διακοπή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου, περιλαμβάνουν σε ορισμένες περιπτώσεις και ειδικούς αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, οι οποίοι εμποδίζουν τη συναρμολόγηση ή τη δράση ενός ή περισσότερων συμπλόκων κυκλίνης/κινάσης.³⁴

Τα βασικά σημεία ελέγχου στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι το G₁/S, το G₂/M, καθώς και το σημείο ελέγχου της μίτωσης (Σχήμα 1.3), ή σημείο ελέγχου της ατράκτου (*Spindle assembly checkpoint* / SAC). Το σημείο G₁/S βρίσκεται στα τελευταία στάδια της φάσης G₁ και αναφέρεται επίσης ως περιοριστικό σημείο ελέγχου (Restriction Point). Καθορίζει αν το κύτταρο θα βγει από τον κύκλο της διαίρεσης και θα παραμείνει σε φάση ηρεμίας, ή αν θα συνεχίσει στην επόμενη φάση S. Μετά τη δίοδο από το περιοριστικό σημείο, το κύτταρο παύει να υπακούει στους εξωγενείς παράγοντες και η πορεία του είναι προδιαγεγραμμένη, μέχρι την ολοκλήρωση της μίτωσης. Στα καρκινικά κύτταρα το σημείο G₁/S είναι ελαττωματικό, γεγονός που καθιστά προφανές ότι η απουσία αυτής της δικλίδας ασφαλείας, που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μεταλλαγμένων κυττάρων ή τον καθυστερεί μέχρι να διορθωθεί το πρόβλημα, έχει ως αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη και επαναλαμβανόμενη πραγματοποίηση του κύκλου της διαίρεσης.³⁵ Οι κινάσες που εμπλέκονται στη λειτουργία του περιοριστικού σημείου είναι οι CDK 2, 4 και 6. Συγκεκριμένα, οι CDK 4 και 6 συμπλοκοποιούνται με την κυκλίνη D και η ενεργή πρωτεΐνη που προκύπτει αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο που σχηματίζει η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (Rb) με τον παράγοντα μεταγραφής E2F. Η φωσφορυλίωση της υπομονάδας Rb προκαλεί την αποδέσμευση του E2F, που επάγει την έκφραση της κυκλίνης E, η οποία αλληλεπιδρά με την CDK 2, ώστε να επιτραπεί η μετάβαση από τη φάση G₁ στην S.³⁶ Αν έχει υποστεί βλάβη το DNA, το σημείο ελέγχου πρέπει να σταματήσει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G₁ και να εξασφαλίσει ότι το DNA δεν θα αντιγραφεί. Πράγματι, οι βλάβες του DNA προκαλούν αύξηση της συγκέντρωσης και της

δραστικότητας της ρυθμιστικής πρωτεΐνης p53, η οποία διεγείρει την έκφραση της πρωτεΐνης p21, η οποία προσδένεται στα ενεργά σύμπλοκα κυκλινών/CDK και αναστέλλει τη δράση τους.



Σχήμα 1.3 Σχηματική απεικόνιση του κυτταρικού κύκλου και των σημείων ελέγχου του. Διακρίνεται ο ρόλος των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDKs και η αλληλεπίδρασή τους με άλλους παράγοντες που παρεμβαίνουν κατά την εξέλιξή του.

Η απουσία της πρωτεΐνης p53 συνοδεύεται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων, με συνέπεια να παράγονται κύτταρα που μπορεί να είναι και καρκινικά. Επίσης, οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των περισσότερων μορφών καρκίνου στον άνθρωπο.³⁷

Το δεύτερο σημείο ελέγχου G₂/M, που βρίσκεται στο τέλος της φάσης G₂, καθορίζει την είσοδο του κυττάρου στη φάση της μίτωσης. Ενεργοποιείται το σύμπλοκο CDK1-κυκλίνη B, που αναφέρεται και ως παράγοντας που προάγει τη μίτωση (Mitosis-Promoting Factor, MPF). Η βιοσύνθεση του MPF ελέγχεται αυστηρά, μεταξύ άλλων και από την κινάση ενεργοποίησης των CDK (CDK-Activating kinase / CAK). Πρόκειται για το σύμπλοκο CDK7/cyclin H, το οποίο ενεργοποιεί τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες με φωσφορυλίωση.³⁸ Το σημείο ελέγχου G₂/M ελέγχει τις βλάβες του αναδιπλασιασμένου DNA μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνικών κινασών Chk1 και Chk2. Αυτές οι κινάσες είναι δομικά ανόμοιες, αλλά λειτουργικά επικαλυπτόμενες κινάσες σερίνης / θρεονίνης, που ενεργοποιούνται σε απάντηση τοξικών προσβολών του γενετικού υλικού αναμεταδίδοντας και τα σήματα ελέγχου της οικογένειας των κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3.³⁹

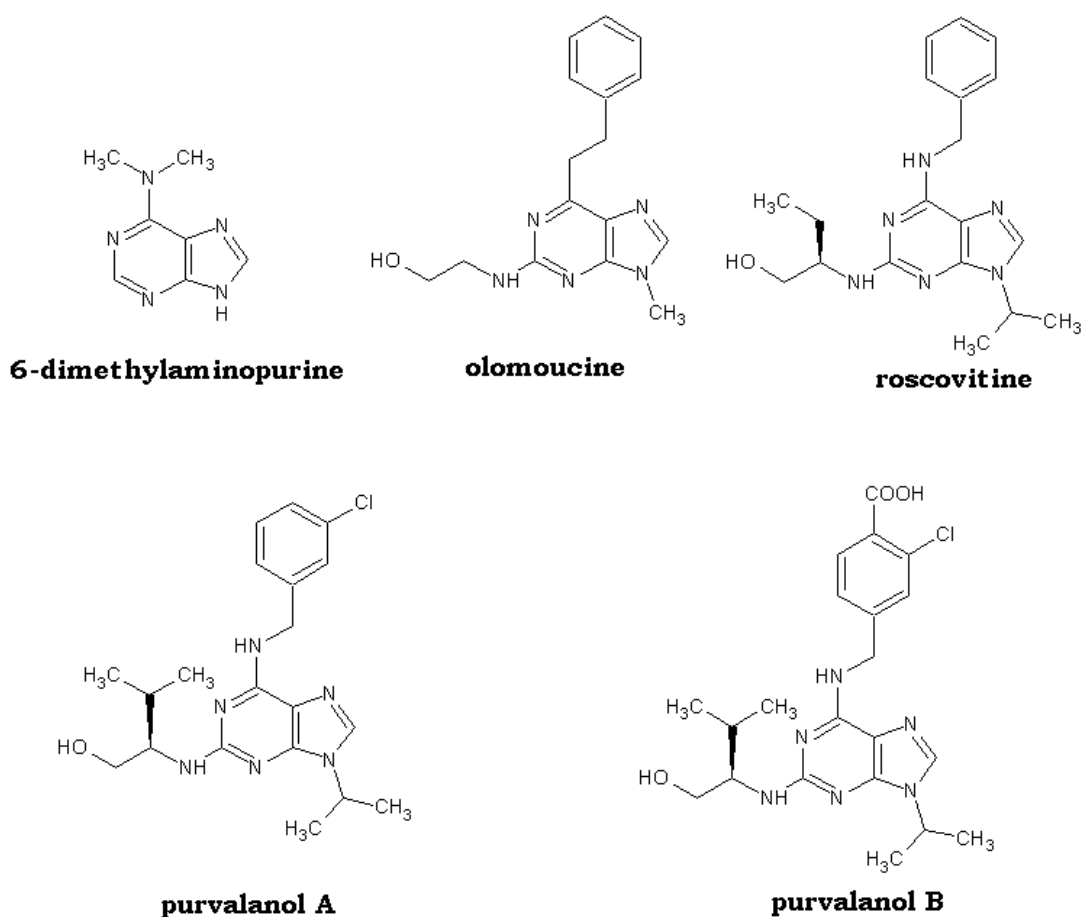
1.3 Ανάλογα πουρινών που δρουν ως αναστολείς κυκλινοεξαρτώμενων κινασών

Οι κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες, όπως και άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται λειτουργικά με αυτές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, αφού επεμβαίνουν σε διάφορες φάσεις και με διαφορετικό τρόπο κάθε φορά, ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες και τα ερεθίσματα που δέχεται ανά πάσα στιγμή το κύτταρο. Εξάλλου, η απουσία των φυσικών αναστολέων τους βρέθηκε ότι συνδέεται άμεσα με καρκινογένεση. Ήταν επόμενο να προκύψει ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με την εύρεση κατάλληλα σχεδιασμένων αναστολέων τους, που θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως φάρμακα και να δράσουν θεραπευτικά σε νόσους που σχετίζονται με την απώλεια ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως ο καρκίνος.⁴⁰ Η αντικαρκινική δράση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών είναι σύνθετη, αλλά παράλληλα και εκλεκτική για τα καρκινικά κύτταρα. Στα φυσιολογικά κύτταρα προκαλούν μόνο μια αντιστρεπτή αναστολή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, εξ' αιτίας της απρόσκοπτης λειτουργίας του σημείου ελέγχου G1/S. Δηλαδή τα φυσιολογικά κύτταρα απλώς παραμένουν περισσότερο στη φάση G1, ή καθυστερούν τη μετάβαση G2/M. Αντίθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα, στα οποία το ανωτέρω σημείο ελέγχου δεν λειτουργεί κανονικά, οδηγούνται σε απόπτωση.

Οι πρώτοι αναστολείς κυκλινοεξαρτώμενων κινασών προέκυψαν από τη μελέτη της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας διαφόρων κινασών από ποικιλία χημικών ενώσεων. Ακολούθησε, όπως συνήθως συμβαίνει, η βελτιστοποίηση της δομής τους, στην οποία συνέβαλε μεταξύ άλλων η κρυστάλλωση ορισμένων αναστολέων μέσα στο ενεργό κέντρο κάποιας συγκεκριμένης κινάσης. Η χαρτογράφηση του ενεργού κέντρου και η συλλογή πληροφοριών χρησίμευσαν ακολούθως για τον σχεδιασμό μορίων που παρουσιάζουν υψηλότερη συνάφεια με τη κινάση και κατά συνέπεια ισχυρότερη και εκλεκτικότερη ανασταλτική δράση.⁴¹ Η πρώτη ένωση που βρέθηκε ότι αναστέλλει τη δράση των CDK ήταν η 6-διμεθυλαμινοπουρίνη. Η ιδιότητά της να ανταγωνίζεται την πρόσδεση του ATP ερμηνεύεται από το γεγονός πως μοιάζει με το αδενυλικό του τμήμα, αφού στην ουσία πρόκειται για την N^6, N^6 -διμεθυλοαδερίνη. Η επίδρασή της σε ωκύτταρα ποντικού απέδειξε ότι ο κύριος μοριακός στόχος της είναι η CDK1 και ότι προκαλεί ανωμαλίες στο σχηματισμό της ατράκτου και προβληματική συμπίκνωση των χρωματίδων σε χρωμοσώματα.⁴² Ακολούθησε η μελέτη της N^6 -ισοπεντυλαδερίνης, που ασκεί ισχυρότερη και εκλεκτικότερη δράση, καθώς και μιας μεγάλης σειράς 2,6,9-τρισυποκατεστημένων πουρινών, που κατέληξε στην ανακάλυψη ισχυρών αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι οι Olomoucine και (R)-Roscovitine, (Σχήμα 1.4), που διαθέτουν ογκώδεις υποκαταστάτες στην 2- και την 9-θέση και αναστέλλουν ισχυρά τις CDKs 1, 2 και 5, ενώ διατηρούν δραστηριότητα και έναντι άλλων πρωτεϊνικών κινασών.⁴³ Η Olomoucine παρουσιάζει δοσοεξαρτώμενη αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης και της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε καλλιέργειες πολλών καρκινικών σειρών. Προϊόντα μιας περαιτέρω διερεύνησης των σχέσεων δομής δράσης αυτών των μορίων είναι

οι Purvalanol A και B, που είναι ισχυρότεροι αναστολείς των ενζύμων. Η Purvalanol A επιδεικνύει επίσης πολύ ισχυρή αναστολή της ανάπτυξης ορισμένων κυτταρικών σειρών στερεών όγκων (SW480 και HT29), ενώ αντίστοιχη αλλά ασθενέστερη δράση διαθέτει και η Purvalanol B, γεγονός που αποδίδεται σε χαμηλότερη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω της ύπαρξης του καρβοξυλίου.

Η (R)-Roscovitine (seliciclib) είναι μια τροποποιημένη παραλλαγή του Olomoucine με το ίδιο προφίλ εκλεκτικότητας, αλλά σχεδόν δεκαπλάσια ενεργότητα.⁴⁴ Αν και είναι λιγότερο δραστική από την Purvalanol A ως αναστολέας του συμπλόκου Cdk1/cyclin B (IC_{50} : 7nM έναντι IC_{50} : 4nM), παρουσιάζει σαφώς υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα μετά από χορήγηση από το στόμα. Βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (non-small cell lung cancer), ενώ έχει βρεθεί δραστική και έναντι του πολλαπλού μυελώματος και της αναπαραγωγής των ιών HIV-1 και HSV.⁴⁵



Σχήμα 1.4

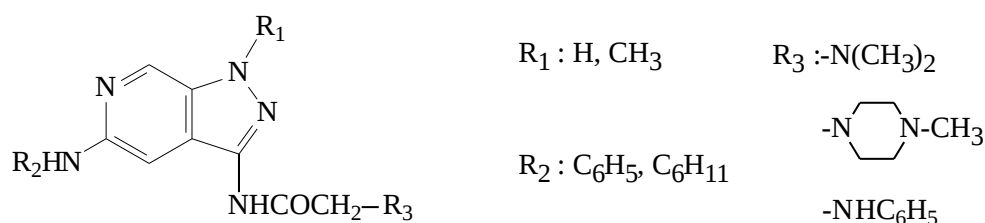
Επειδή αυτά τα παράγωγα των πουρινών επεμβαίνουν και στην κυτταρική διαφοροποίηση και κυρίως πυροδοτούν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα, ενώ προστατεύουν από την απόπτωση τα φυσιολογικά κύτταρα, υπάρχει ενδιαφέρον για μελέτη της συγχορήγησής τους με κυτταροτοξικούς παράγοντες, με σκοπό την συνέργεια της αντικαρκινικής τους δράσης και τη μείωση των κλασσικών παρενεργειών των κυτταροτοξικών φαρμάκων, πχ της αλωπεκίας.

Η προσπάθεια για τη μεγιστοποίηση της αλληλεπίδρασης των πουρινικών παραγώγων με το ενεργό κέντρο της CDK2 απέδειξε ότι ο πουρινικός τους δακτύλιος διευθετείται πολλές φορές διαφορετικά από τον δακτύλιο του ATP. Επίσης, αποκάλυψε και την παρουσία μιας υδρόφοβης κοιλότητας, που καταλαμβάνεται από τον 6-υποκαταστάτη και ενώ προφανώς δεν χρησιμεύει για την σύνδεση του δακτυλίου της αδενίνης του ATP, είναι σε ορισμένες περιπτώσεις χρήσιμη για τη σύνδεση και άλλων αναστολέων των CDK, που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες.

Παρόλο που το πλήθος των πληροφοριών σχετικά με τον σχεδιασμό νέων αναστολέων κινασών είναι τεράστιο και υπάρχουν πολύ αξιόλογες προσπάθειες για την κατηγοριοποίηση, συστηματοποίηση και ορθή χρήση αυτής της γνώσης, δεν είμαστε ακόμη σε θέση να προβλέψουμε ασφαλώς ούτε το φάσμα δράσης, ούτε το μέγεθος της αναστολής κάποιου νέου παραγώγου.^{46a,b} Οι υπολογιστικές μέθοδοι μοριακής προσομοίωσης, όπως και τεχνικές *in Silico drug design* χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά με πιο κλασσικές μεθόδους (όπως είναι πχ η υποκατάσταση με βιοϊσοστερή ομάδα) για τον σχεδιασμό νέων παραγώγων. Στο πεδίο των φαρμακολογικά δραστικών δομικών αναλόγων πουρινών εφαρμόζεται επί σειρά ετών η αντικατάσταση αζώτου του ετεροκυκλικού σκελετού της πουρίνης από άνθρακα ή/και το αντίθετο, η αντικατάσταση άνθρακα από άζωτο, που οδήγησε στην εύρεση πολλών νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων. Ανάλογες προσπάθειες έχουν εφαρμοσθεί και για το σχεδιασμό δομικών αναλόγων της Roscovitine και κατέληξε στην εύρεση πλήθους αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, που είναι παράγωγα αζα- και δεαζαπουρινών.^{47a-f}

Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκαν υποκατεστημένα παράγωγα πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης, συμπτυκνωμένο ετεροκυκλικό σύστημα που μπορεί να θεωρηθεί ως η 8-αζα-3,9-δεαζαπουρίνη. Το είδος των υποκαταστατών επιλέχθηκε με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα και την εμπειρία της ερευνητικής μας ομάδας σχετικά με τον σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων που παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα δράση σε κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες.⁴⁸ Στα πλαίσια αυτά, έχουμε κατά το παρελθόν συνθέσει 1,5-δισ-υποκατεστημένες πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνες που φέρουν επιπλέον 3-αρυλομάδα. Μεταξύ αυτών των αναλόγων αρκετά παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση κυρίως έναντι των Aurora και των Polo-like κινασών αλλά και συγκεκριμένων της ομάδας CDK. Ιδιαίτερα δραστικά αποδείχθηκαν τα 1-μεθυλοπαράγωγα, ενώ αντίθετα η ύπαρξη ογκώδους 1-υποκαταστάτη δεν ήταν ευνοϊκή για τη δράση. Ως συνέχεια των προηγούμενων μελετών αποφασίσαμε να διερευνήσουμε την επίπτωση που έχει στη δράση των μορίων αυτής της κατηγορίας η παρουσία 3-αμινομάδας. Σχεδιάστηκαν λοιπόν στην παρούσα εργασία και συντέθηκαν πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνες

που κατ'αναλογία με τα μόρια που έχουν παρασκευασθεί κατά το παρελθόν φέρουν 1-μεθυλομάδα, ή δεν έχουν υποκαταστάτη στην θέση 1, καθώς επίσης και 5-αλκυλο ή αρυλαμινομάδα, ενώ είναι διαφοροποιημένα στη θέση 3, όπου φέρουν κατάλληλες αμινικές αλυσίδες (Σχήμα 1.5). Η φαρμακολογική αξιολόγηση αυτών των παραγώγων σε αντιπαραβολή με τα όσα ήδη γνωρίζουμε θα επιτρέψει την εξαγωγή πληρέστερων σχέσεων δομής-δράσης σχετικά με αυτή την ομάδα μορίων.



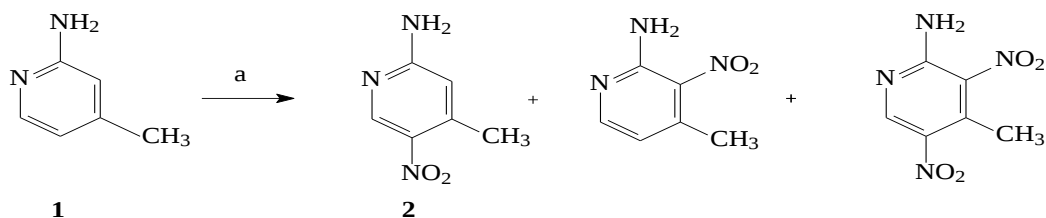
Σχήμα 1.5

2. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Συνθετική πορεία

2.1.1 Σύνθεση της 5-χλωρο-3-νιτροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**9**) και των *N*¹ και *N*² μεθυλο- και π-μεθοξυβενζυλο- παραγώγων της (**10-13**)

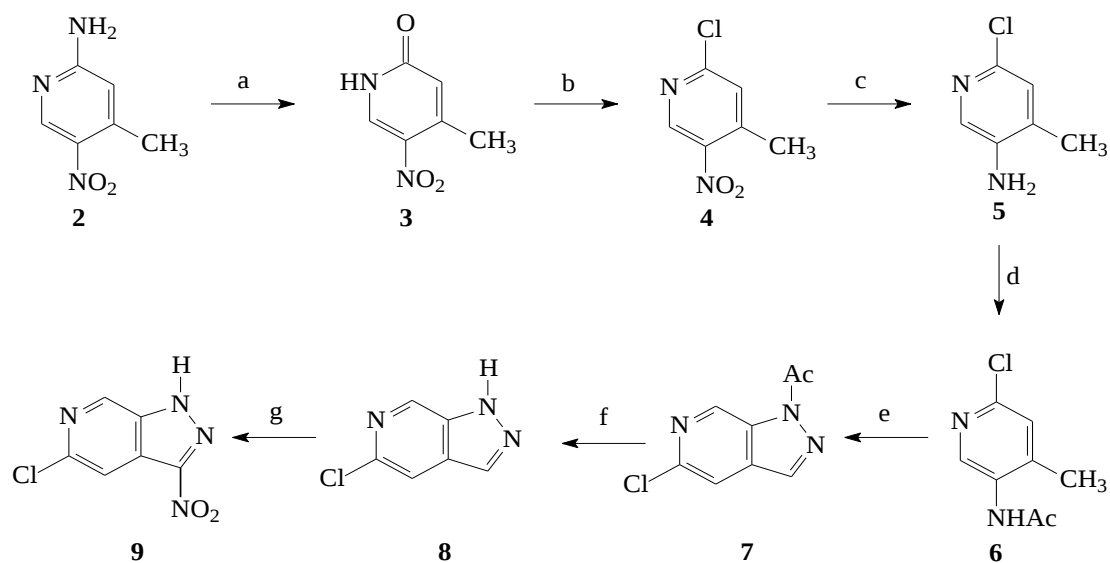
Για τη σύνθεση των ανωτέρω παραγώγων, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 2-αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**2**), η οποία συντέθηκε με νίτρωση της 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνης (**1**) (Σχήμα 2.1). Από την αντίδραση αυτή λήφθηκε μίγμα των τριών δυνατών νιτροπαραγώγων,⁴⁹ τα οποία διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης και ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια φασμάτων ¹H-NMR.



a) H₂SO₄ (c.), HNO₃ 65%, 60 °C, 12hrs.

Σχήμα 2.1

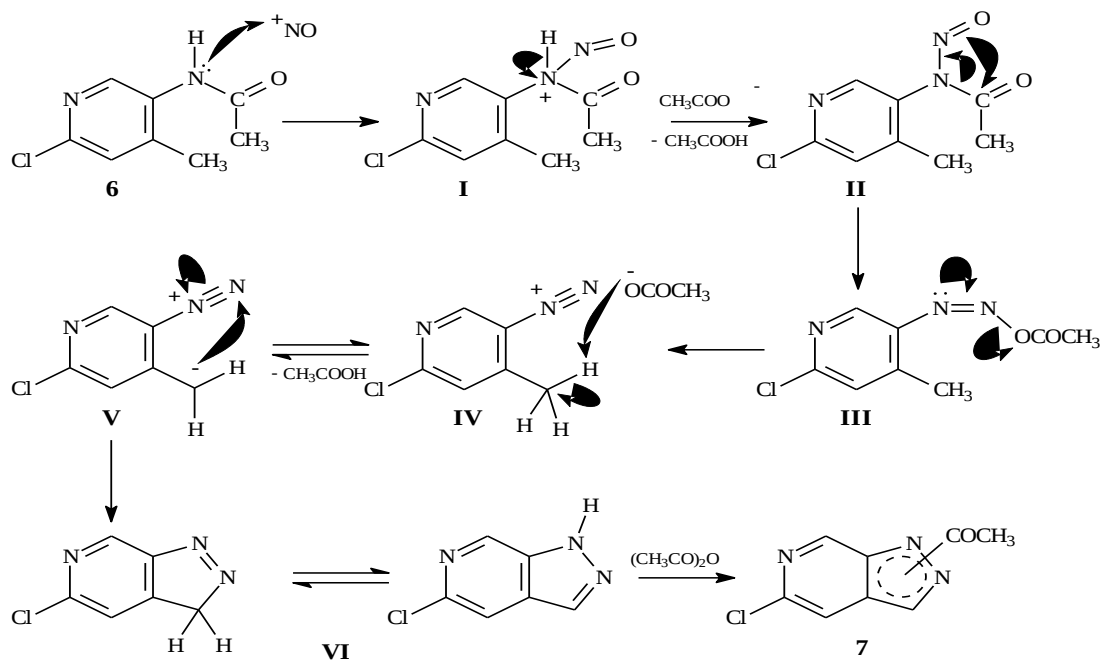
Επίδραση νιτρώδους νατρίου στην 2-αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**2**), οδήγησε στο κετοπαραγώγο **3**⁵⁰ (Σχήμα 2.2), το οποίο αντέδρασε με οξυχλωριούχο φωσφόρο και παρελήφθη η 2-χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**4**).⁵¹ Ακολούθησε αναγωγή της νιτρομάδας με διχλωριούχο κασσίτερο και ακετυλίωση του σχηματιζόμενου αμινοπαραγώγου **5** με οξικό ανυδρίτη, οδηγώντας στο ακεταμίδιο **6**. Η 5-χλωρο-3-νιτροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**9**), σχηματίστηκε με αντίδραση διαζώτωσης και ενδομοριακής κύκλωσης^{52a,b} του ακεταμιδίου, που ακολουθήθηκε από εύκολη απακετυλίωση⁵³ και νίτρωση⁵⁴ του συμπτυκνωμένου ετεροκυκλικού συστήματος.



a) NaNO_2 , H_2SO_4 / H_2O (1/10), r.t., 2hrs b) POCl_3 , 110°C , 3hrs c) SnCl_2 , HCl , 50°C , 15min
 d) Ac_2O , CH_2Cl_2 , r.t., 12hrs e) AcOK , Ac_2O , isoamyl nitrite, toluene dry, 105°C , 12hrs
 f) NH_3 (g.), MeOH dry, r.t., 1hr g) H_2SO_4 96%, HNO_3 65%, 90°C , 1hr.

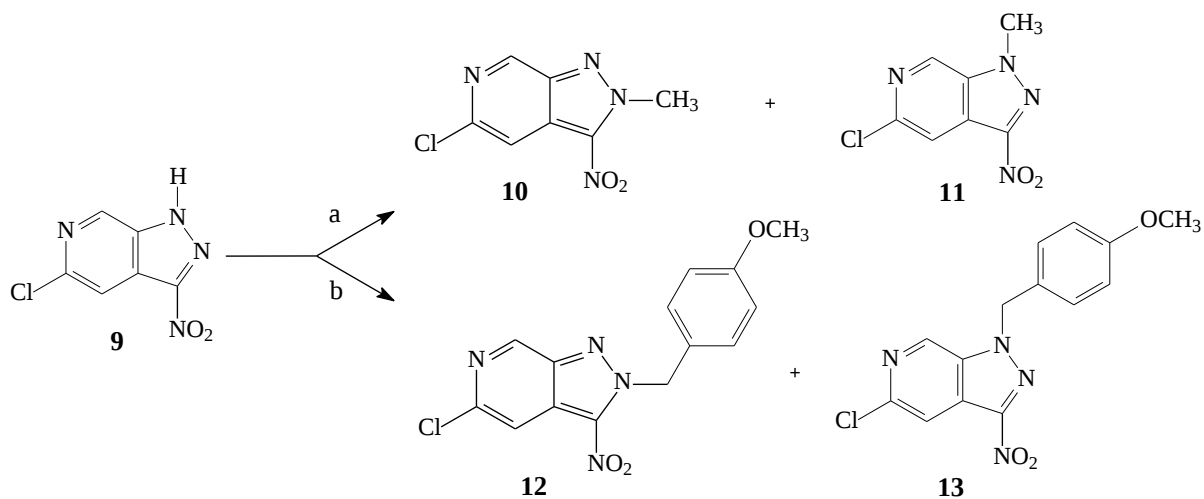
Σχήμα 2.2

Στο σχήμα 2.3 φαίνεται ο μηχανισμός κύκλωσης και σχηματισμού της πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης. Σύμφωνα με αυτόν, το νιτροδωκατιόν που απελευθερώνεται από τη θερμική διάσπαση του νιτρώδους ισοαμυλίου προσβάλλει το άζωτο του ακεταμιδίου και σχηματίζεται το αντίστοιχο N-νιτρωδοακεταμίδιο **I**. Ακολουθεί ενδομοριακή μετάθεση, απ' όπου λαμβάνεται ο ενδιάμεσος οξικός εστέρας **III** και κατόπιν το οξικό άλας του διαζωνίου **IV**. Τελικά με απόσπαση οξικού οξέος πραγματοποιείται η κύκλωση προς την πυραζολοπυριδίνη **VI** η οποία ακετυλιώνεται από τον οξικό ανυδρίτη.



Σχήμα 2.3 Μηχανισμός της αντίδρασης ενδομοριακής κύκλωσης.

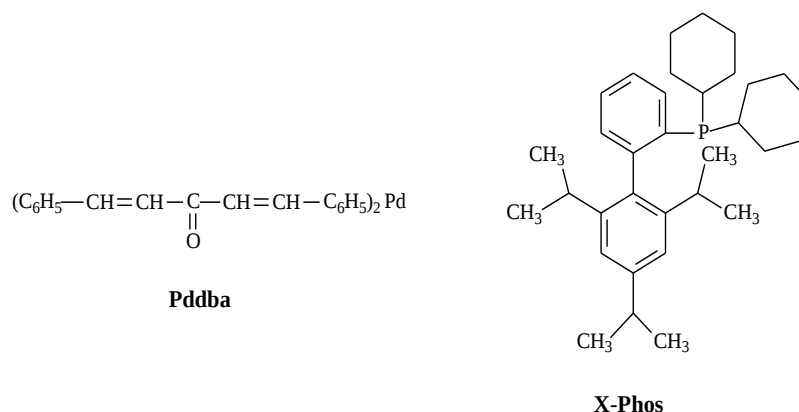
Τέλος, από την πυραζολοπυριδίνη **9** με επίδραση μεθυλοϊωδιδίου παρουσία ανθρακικού καλίου λήφθησαν τα μεθυλοπαράγωγα **10** και **11**, ενώ με επίδραση π -μεθοξυβενζυλοχλωριδίου τα δύο 4-μεθοξυβενζυλοϊσομερή **12** και **13** (Σχήμα 2.4). Η απομόνωση των προϊόντων των παραπάνω αντιδράσεων από τα αντίστοιχα μίγματα πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης και η δομή τους διαπιστώθηκε με τη χρήση φασμάτων NMR.



a) K_2CO_3 , methyl iodide, acetonitrile, 50 °C, 12hrs b) K_2CO_3 , PMBCl, acetonitrile, 60 °C, 12hrs.

Σχήμα 2.4

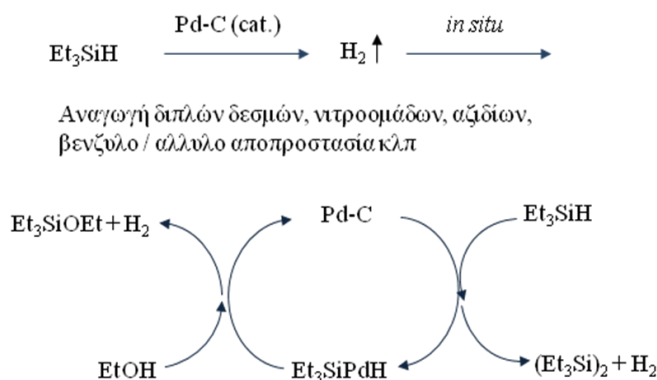
Η αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης του ατόμου χλωρίου της θέσης 5 από ανιλίνη πραγματοποιήθηκε με επίδραση της αμίνης επί των παραγώγων **11** ή **13**, παρουσία ανθρακικού καυσίου και με τη χρήση ως καταλύτη του δις(διβενζυλιδενοακετονο)παλλαδίου [bis(dibenzylideneacetone)palladium, Pddba]⁵⁵ και ως προσδέματος (ligand) του 2-δικυκλοεξυλοφωσφίνο-2',4',6'-τριισοπροπυλοδιφαινυλίου (2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl, X-Phos, Σχήμα 2.6).⁵⁶



Σχήμα 2.6 Οι δομές του καταλύτη του παλλαδίου Pddba και του προσδέματος X-Phos.

Ακολούθησε καταλυτική υδρογόνωση του 1-μεθυλοπαραγώγου, η οποία έδωσε την αμίνη **15**, ενώ για την αναγωγή του 1-(4-μεθοξυβενζυλο)αναλόγου χρησιμοποιήθηκε ως δότης υδριδίου το τριαιθυλοσιλάνιο, παρέχοντας το επιθυμητό αμινοπαραγώγο **21**.

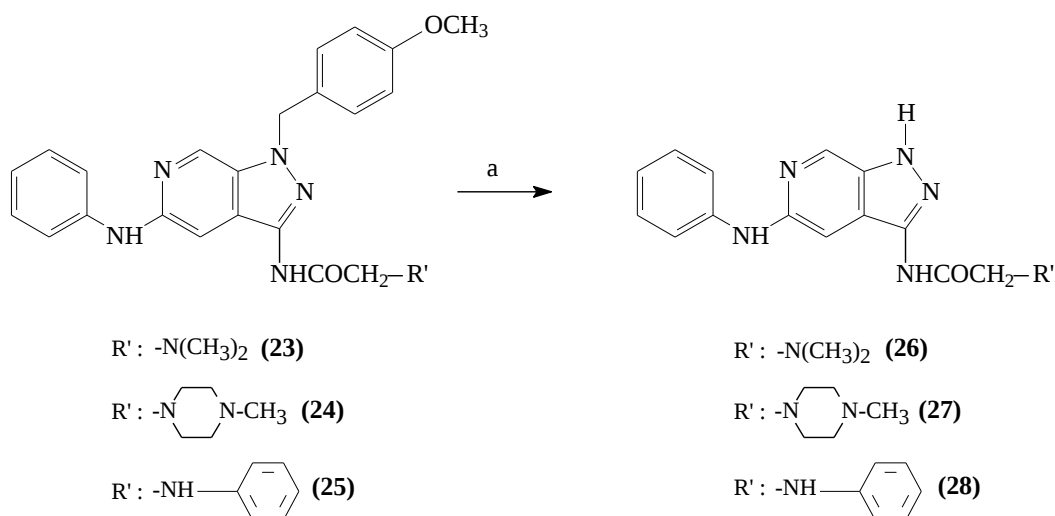
Η αναγωγή με τριαιθυλοσιλάνιο πλεονεκτεί στην περίπτωση του νιτροπαραγώγου **20**, λόγω των ήπιων και ουδέτερων συνθηκών⁵⁷ που εξασφαλίζει, μειώνοντας τον κίνδυνο αποκοπής της π-μεθοξυβενζυλομάδας. Είναι αρκετά διαδεδομένη και αποτελεσματική για την αναγωγή πολλαπλών δεσμών, νιτρομάδων, αζιδίων, καθώς και υποστρωμάτων ευαίσθητων σε όξινο ή βασικό περιβάλλον. Ο μηχανισμός⁵⁸ της (Σχήμα 2.7) στηρίζεται στην *in situ* παραγωγή μοριακού υδρογόνου κατόπιν οξειδωτικής προσθήκης του αντιδραστηρίου στην ανηγμένη (μεταλλική) μορφή του καταλύτη (Pd/C) και έπειτα από την επίδραση αιθανόλης (ή μεθανόλης).



Σχήμα 2.7 Μηχανισμός αναγωγής με τριαιθυλοσιλάνιο.

Η επίδραση χλωρακετυλοχλωριδίου επί των παραπάνω αμινών, παρουσία τριαιθυλαμίνης, οδήγησε αρχικά στα χλωρακεταμίδια **16** και **22**, ενώ τα επιθυμητά αμινοακεταμίδια προέκυψαν κατόπιν με επίδραση της κατάλληλης αμίνης. Στη συνέχεια οι αντιδράσεις των **16** και **22** με διμεθυλαμίνη, *N*-μεθυλοπιπεραζίνη και ανιλίνη έδωσαν τα 1-μεθυλοπαράγωγα **17-19** και τα 1-(4-μεθοξυβενζυλο)ανάλογά τους **23-25** αντίστοιχα.

Τέλος, η επίδραση τριφθοροξικού οξέος στα 1-(4-μεθοξυβενζυλο)αμινοακεταμίδια **23-25** είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας και την παραλαβή των 3-υποκατεστημένων-5-φαινυλαμινο-1-*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **26-28** (Σχήμα 2.8).



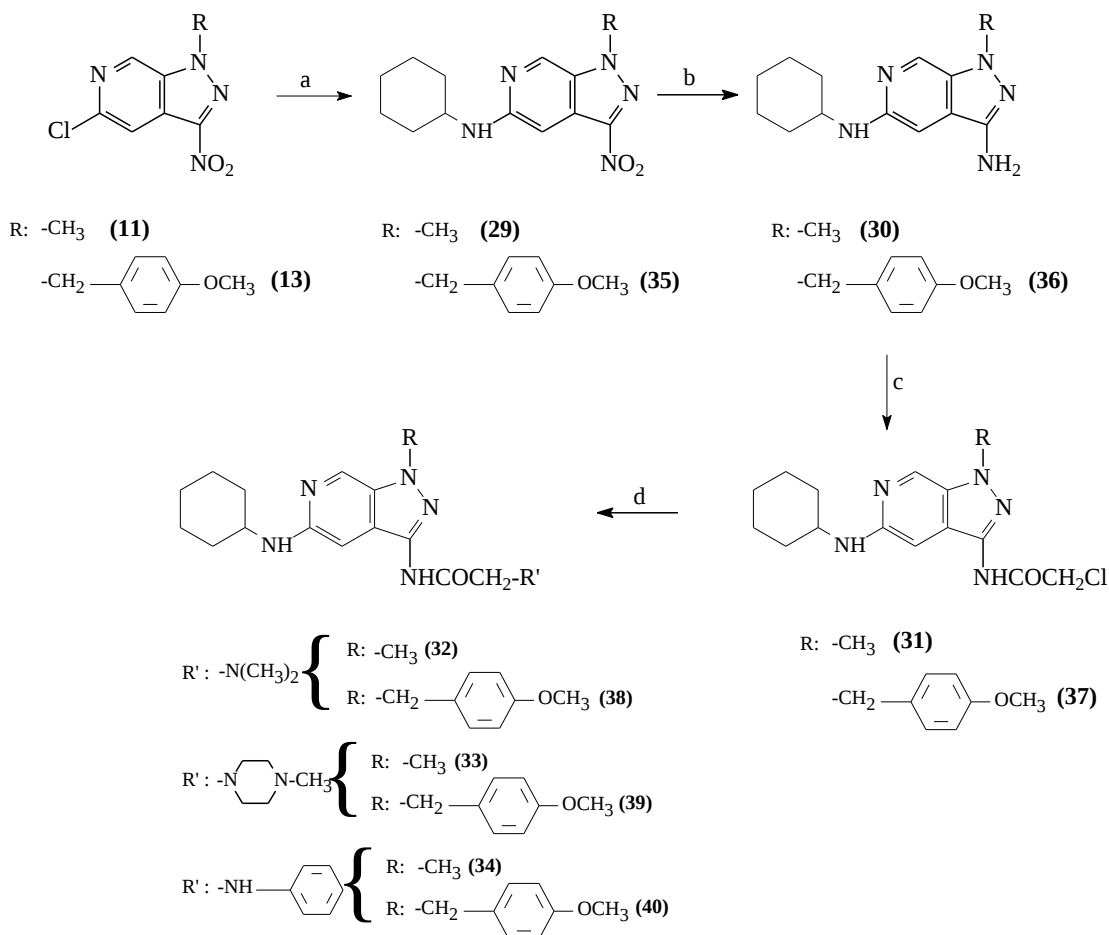
a) CF₃COOH, 60-70 °C, 76hrs (R': dimethylamine) / 96hrs (R': N-methylpiperazine) / 55hrs (R': aniline)

Σχήμα 2.8

2.1.3 Σύνθεση των 3-υποκατεστημένων παραγώγων της 5-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**32-34**) και της 5-κυκλοεξυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**41-43**)

Ανάλογα με όσα παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 2.1.2, ως πρώτες ύλες για τη σύνθεση των ανωτέρω προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν η 5-χλωρο-1-μεθυλο-3-νιτροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**11**) για τα μεθυλοπαράγωγα και η 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-νιτροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**13**) για τα μη υποκατεστημένα ανάλογά τους. Έτσι, με πυρηνόφιλη προσβολή κυκλοεξυλαμίνης επί του χλωρίου της 5-θέσης του παραγώγου **11** (Σχήμα 2.9), και παρατεταμένη θέρμανση (135-140 °C, 15 ώρες) σε διμεθυλοσουλφοξείδιο, λήφθηκε το 5-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλοπαράγωγο **29**, ενώ για τη σύνθεση του αντίστοιχου 1-π-μεθοξυβενζυλοπαραγώγου **35**, έγινε χρήση ακτινοβολίας

μικροκυμάτων (60 Watt) για 2 ώρες στους 158 °C, οδηγώντας στη λήψη του προϊόντος σε πολύ καλή απόδοση. Ακολούθησε αναγωγή της νιτρομάδας των δύο νιτροπαραγώγων με καταλυτική υδρογόνωση οπότε παρελήφθησαν οι αμίνες **30** και **36**, οι οποίες στη συνέχεια έδωσαν τα χλωρακεταμιδοπαραγώγα **31** και **37** με επίδραση χλωρακετυλοχλωριδίου παρουσία τριαιθυλαμίνης κατ' αναλογία με όσα περιγράφησαν προηγουμένως.



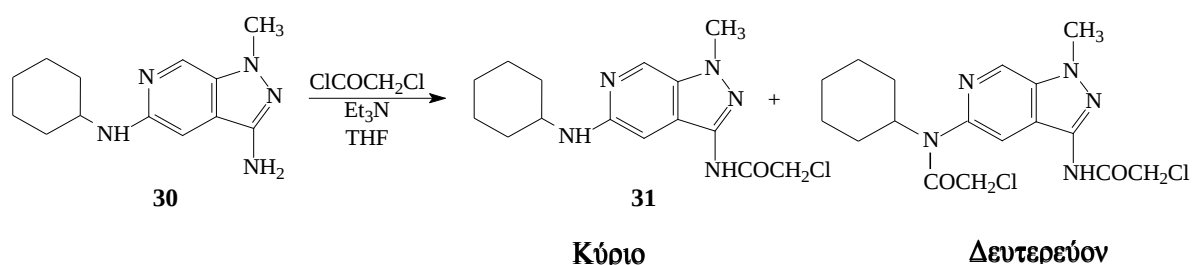
a) **29**: Cyclohexylamine, DMSO, 135-140 °C, 12hrs; **35**: Cyclohexylamine, DMSO, microwave irradiation, 60 Watt, 158 °C, 2hrs b) H₂, Pd/C, EtOH (abs.), 56 psi, 3hrs (R: methyl) / 5.5hrs (R: p-methoxybenzyl)
 c) chloroacetyl chloride, Et₃N, THF, -40 °C, 5-10min d) **32**, **38**: dimethylamine (sol. in EtOH 5.6M), EtOH (abs.), 90 °C, 3hrs; **33**, **39**: N-methylpiperazine, EtOH (abs.), 85 °C, 5hrs; **34**, **40**: aniline, EtOH (abs.), 100 °C, 48hrs (R: methyl) / 30hrs (R: p-methoxybenzyl).

Σχήμα 2.9

Αξιοσημείωτο είναι ότι στην περίπτωση των κυκλοεξυλαμινοπαραγώγων, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα φαινυλαμινοανάλογα, κατά την αντίδραση χλωρακετυλίωσης λαμβάνονται σε σημαντικό ποσοστό και τα αντίστοιχα δισυποκατεστημένα αμίδια.

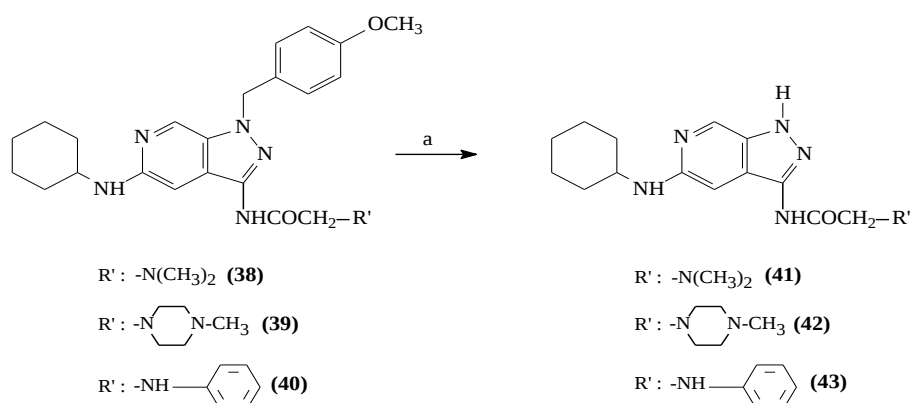
Τ °C	Κύριο : Δευτερεύον
25	5 : 3
0	2 : 1
-14	5 : 2
-25	3 : 1
-40	4 : 1

Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην 3-αμινο-5-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλοπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (30) παρατηρήθηκε ότι, σε χαμηλότερη θερμοκρασία, αυξανόταν η αναλογία του επιθυμητού προϊόντος εις βάρος του δευτερεύοντος, ενώ ταυτόχρονα ότι η αντίδραση ολοκληρωνόταν σε αρκετά μικρότερο χρονικό διάστημα (Σχήμα 2.10).



Σχήμα 2.10 Μεταβολή της αναλογίας των δύο προϊόντων στην αντίδραση της χλωρακετυλίωσης, σε σχέση με τη θερμοκρασία.

Στη συνέχεια τα χλωρακεταμίδια **31** και **37** αντέδρασαν με κατάλληλες αμίνες (Σχήμα 2.9) και παραλήφθηκαν τα τελικά 1-μεθυλοπαράγωγα **32-34**, καθώς και τα 1-π-μεθοξυβενζυλοπαράγωγα **38-40**. Τα τελευταία αποπροστατεύτηκαν με επίδραση τριφθοροξικού οξέος, οδηγώντας στα προϊόντα **41-43** αντίστοιχα (Σχήμα 2.11).



a) CF_3COOH , reflux, 40hrs (R': dimethylamine) / 60-70 $^\circ\text{C}$, 72hrs (R': N-methylpiperazine) / reflux, 24hrs (R': aniline).

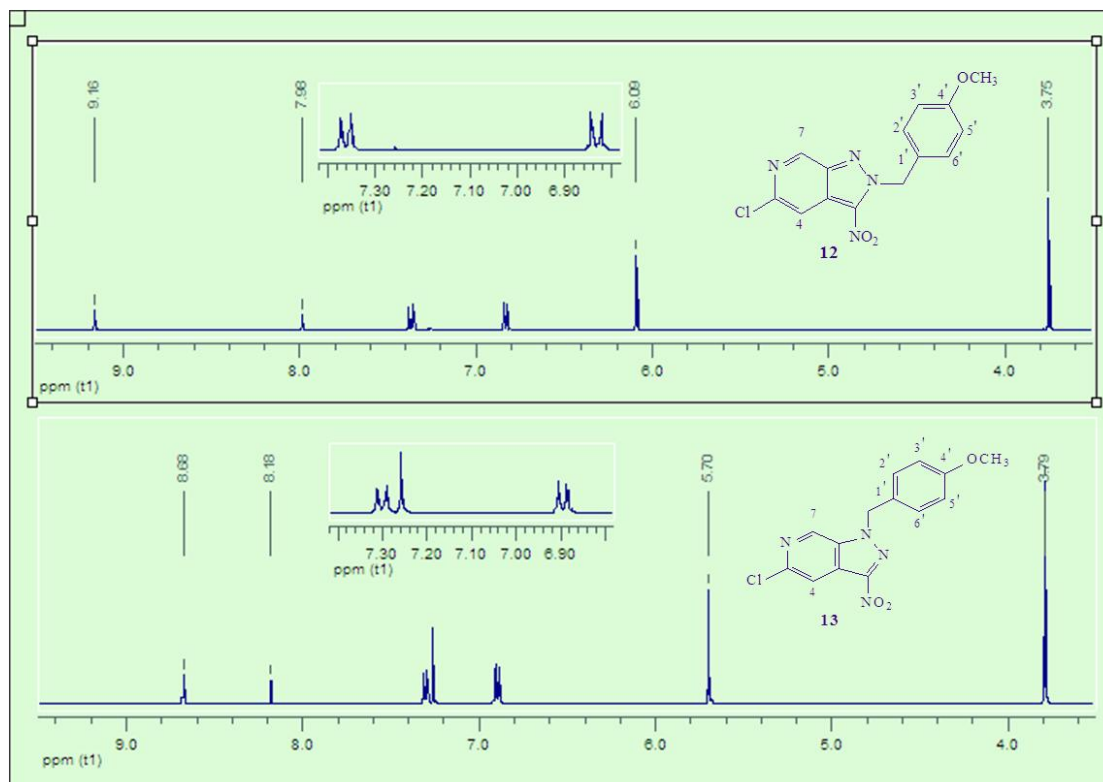
Σχήμα 2.11

2.2 Φασματοσκοπική μελέτη των ενώσεων

2.2.1 Απόδοση των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα NMR

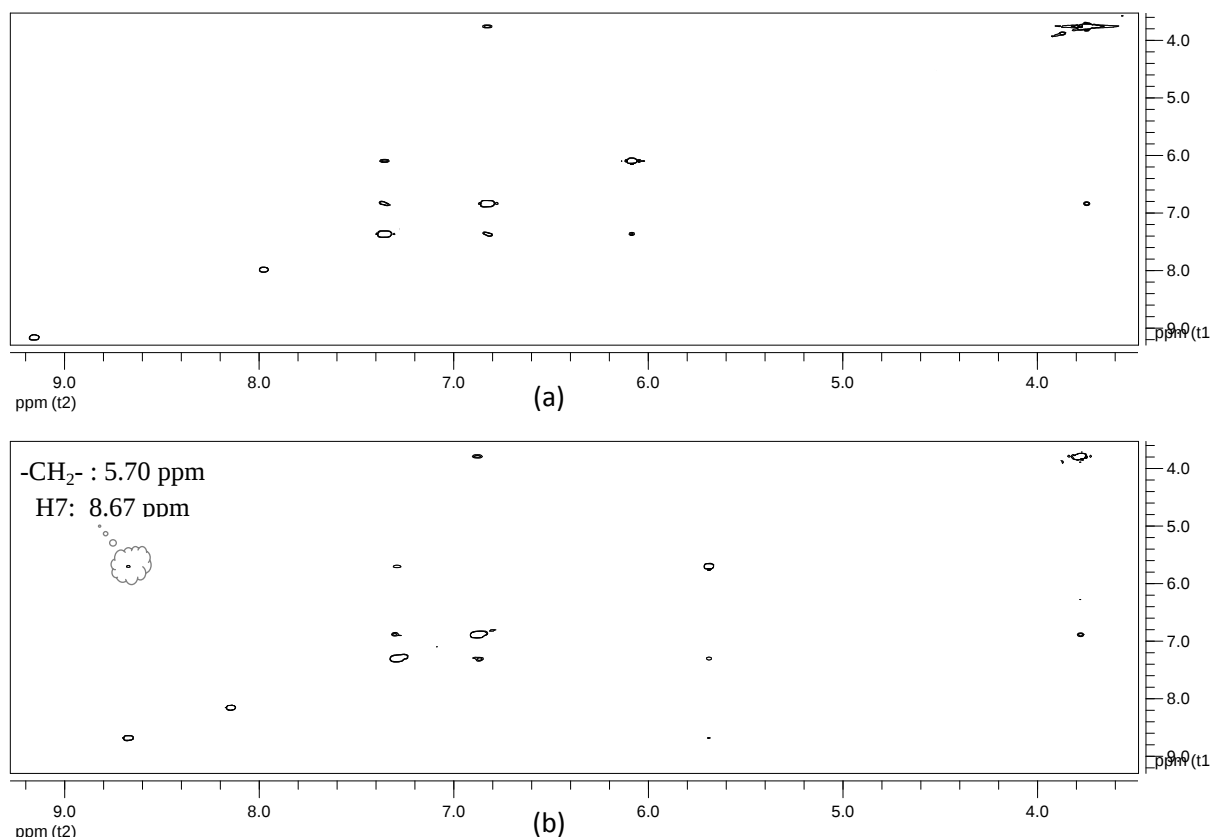
Οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^1H , ^{13}C των παραγώγων αποδόθηκαν με τη βοήθεια των αντίστοιχων πειραμάτων 1D και 2D NMR ^1H - ^{13}C gHMQC, ^1H - ^{13}C gHMBC και NOESY. Τα πειράματα NMR πραγματοποιήθηκαν στους 295 K. Παρακάτω αναλύονται ενδεικτικά φάσματα των παραγώγων που παρασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία.

Στην Εικόνα 2.1 παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H -NMR των ισομερών **12** και **13**. Και για τα δύο μόρια, παρατηρούνται στην αρωματική περιοχή δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του πυριδινικού δακτυλίου, δύο διπλές κορυφές για τα πρωτόνια της προστατευτικής ομάδας και στην αλειφατική περιοχή δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στο μεθυλένιο και το μεθοξύλιο. Συγκεκριμένα οι κορυφές στα 9.16 και 8.68 ppm αποδίδονται στο H7 των παραγώγων **12** και **13**, καθώς αυτό είναι πιο αποθωρακισμένο από το H4, στο οποίο αποδίδονται οι κορυφές στα 7.98 και 8.18 ppm, τα πρωτόνια H2',6' της προστασίας συντονίζονται στα 7.36 και 7.30 ppm και τα πρωτόνια H3',5' στα 6.83 και 6.90 ppm, οι κορυφές στα 6.09 και 5.70 ppm αποδίδονται στο μεθυλένιο και οι κορυφές στα 3.75 και 3.79 ppm αντίστοιχα αποδίδονται στο μεθοξύλιο.



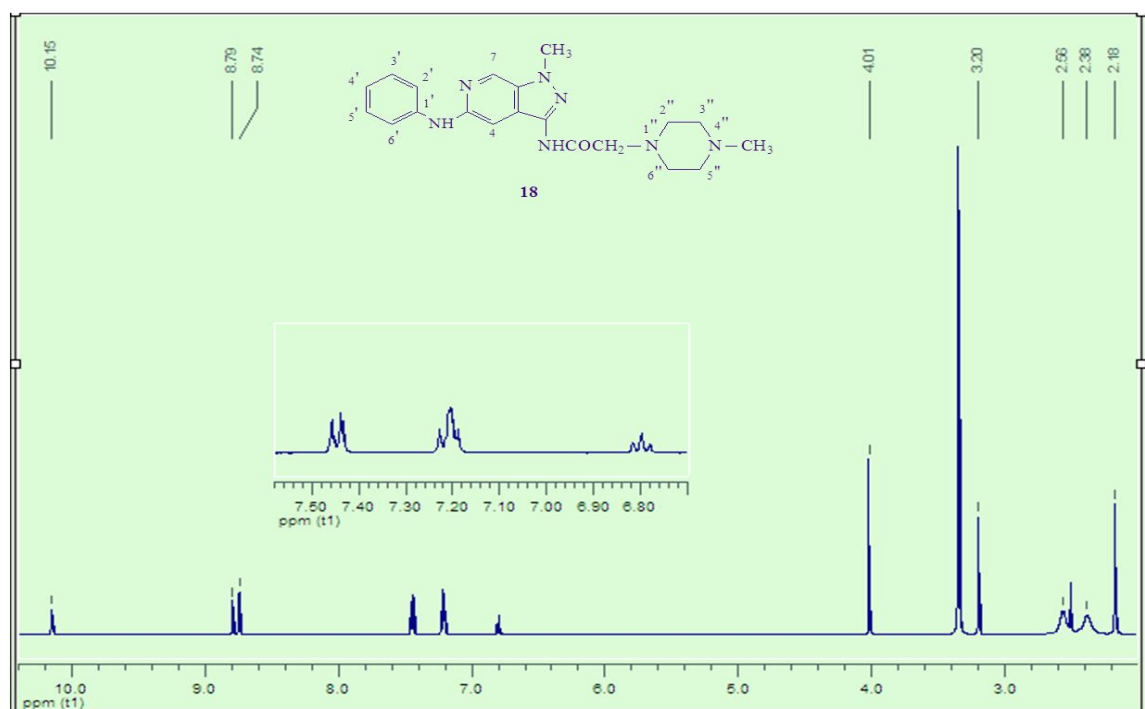
Εικόνα 2.1

Από τα φάσματα NOE που ακολουθούν (Εικόνα 2.2) για τα παράγωγα **12** (a) και **13** (b), συμπεραίνεται ότι πρόκειται για τα *N2* και *N1* 4-μεθοξυβενζυλοπαράγωγα αντίστοιχα, εφόσον από το φάσμα του ισομερούς **12** (a) απουσιάζει η κορυφή διασταύρωσης του H7 με το μεθυλένιο, που φαίνεται καθαρά στο φάσμα του παραγώγου **13** (b), αποδεικνύοντας ότι η προστασία βρίσκεται στη *N1* θέση. Ομοίως στα μεθυλοπαράγωγα, η παρουσία ή μη της κορυφής διασταύρωσης του H7 με το μεθύλιο, αποδεικνύει ότι πρόκειται για το ισομερές **11** ή **10**.



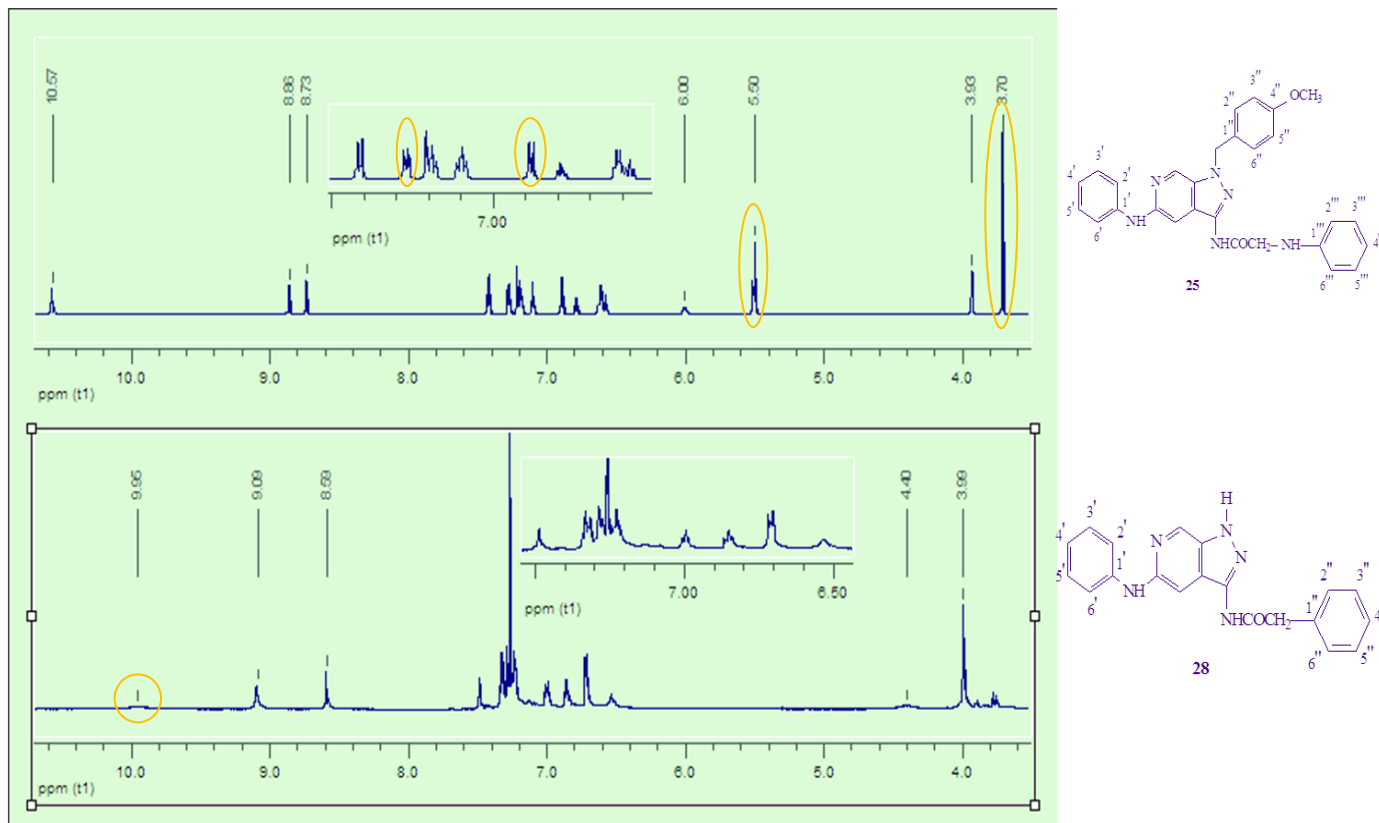
Εικόνα 2.2 (a) Φάσμα NOE του *N2* ισομερούς **12**. (b) Φάσμα NOE του *N1* ισομερούς **13**.

Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **18**. Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται μία απλή κορυφή στα 2.18 ppm που αντιστοιχεί στο μεθύλιο ($4''\text{-NCH}_3$) της πιπεραζίνης, δύο ευρείες κορυφές στα 2.38 και 2.56 ppm που αποδίδονται στα μεθυλένια $\text{H-3}''$, $5''$ και $\text{H-2}''$, $6''$ της πιπεραζίνης αντίστοιχα και δύο απλές κορυφές στα 3.20 και 4.01 ppm που αποδίδονται στο μεθυλένιο του ακεταμιδίου και στο *N1*-μεθύλιο του ετεροκυκλικού δακτυλίου αντίστοιχα. Στην αρωματική περιοχή παρατηρείται μια τριπλή κορυφή στα 6.80 ppm που αποδίδεται στο πρωτόνιο $\text{H4}'$ της ανιλίνης, μία πολλαπλή κορυφή στα 7.21 ppm που αντιστοιχεί στα $\text{H-3}'$, $5'$ της ανιλίνης και στο H4 του ετεροκυκλικού δακτυλίου, τα $\text{H-2}'$, $6'$ συντονίζονται στα 7.45 ppm (διπλή κορυφή), το -NH- της ανιλίνης και το H7 συντονίζονται στα 8.74 και 8.80 ppm αντίστοιχα, ενώ το -NH- του ακεταμιδίου συντονίζεται στα 10.15 ppm.



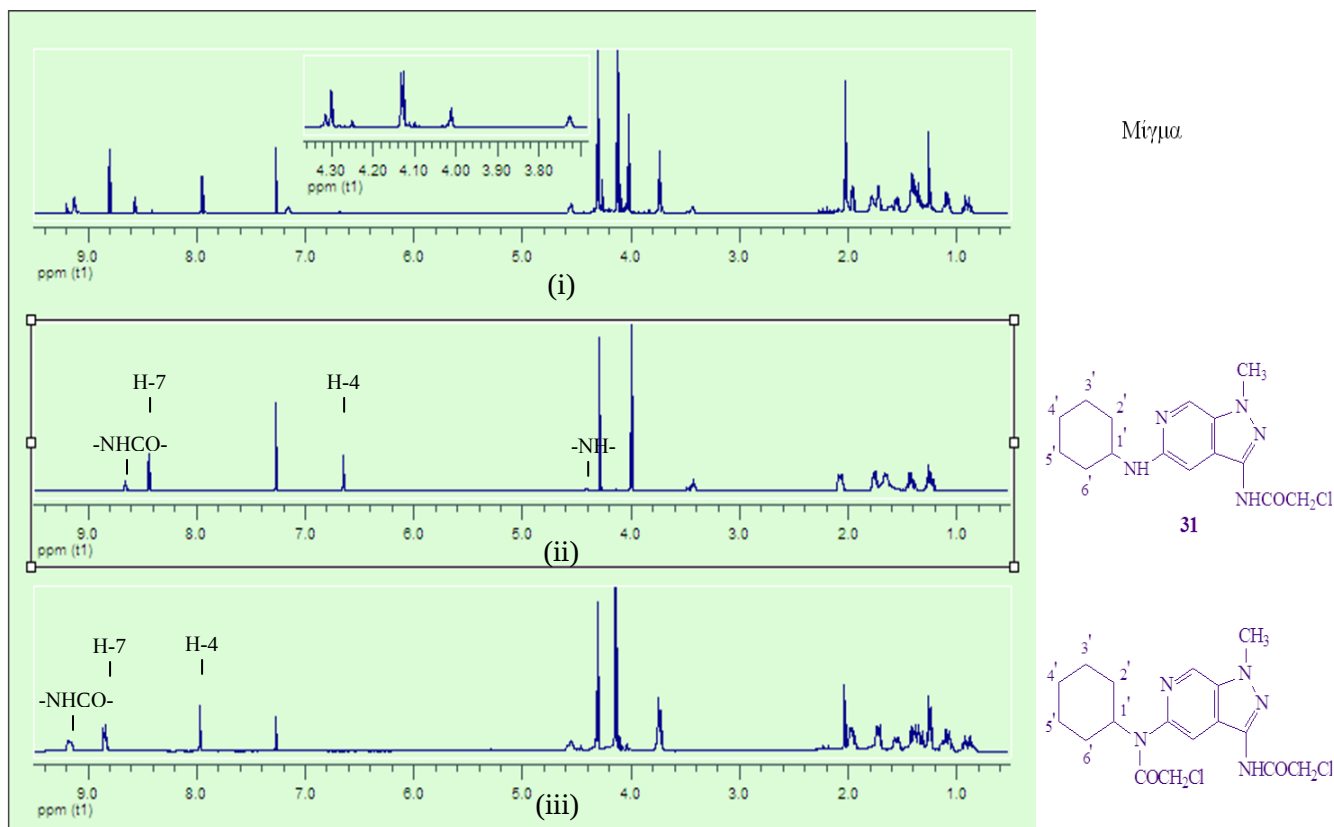
Εικόνα 2.3

Στην Εικόνα 2.4 παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των παραγώγων **25** και **28**. Και για τα δύο παράγωγα, παρατηρείται στην αλειφατική περιοχή μία απλή κορυφή στα 3.93 και 3.99 ppm αντίστοιχα, που αποδίδεται στο μεθυλένιο του ακεταμιδίου ($-\text{COCH}_2\text{NH}-$), και μία ευρεία κορυφή στα 6.00 και 4.40 ppm, που αντιστοιχεί στο $-\text{NH}-$ της ανιλίνης του ακεταμιδίου ($-\text{COCH}_2\text{NH}-$), ενώ από το φάσμα του τελικού προϊόντος **28** απουσιάζουν οι δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στο μεθοξύλιο και στο μεθυλένιο της προστατευτικής ομάδας και εμφανίζονται στα 3.70 και 5.50 ppm (παράγωγο **25**). Ομοίως, στην αρωματική περιοχή του φάσματος του προστατευμένου παραγώγου παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές στα 6.88 και 7.27 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια $\text{H-3}''$, $\text{5}''$ και $\text{H-2}''$, $\text{6}''$ της π-μεθοξυβενζυλομάδας. Αντί αυτών, στο φάσμα του προϊόντος αποπροστασίας **28** παρατηρείται μία ευρεία κορυφή στα 9.95 ppm που αντιστοιχεί στο 1-NH του ετεροκυκλικού δακτυλίου, ενώ οι υπόλοιπες κορυφές είναι κοινές και για τα δύο μόρια. Πιο συγκεκριμένα για τα **25** και **28** αντίστοιχα, το H4 συντονίζεται ως απλή κορυφή στα 7.19 και 7.49 ppm, όπως και το H7 στα 8.86 και 8.59 ppm. Το 5-NH- συντονίζεται στα 8.73 και 6.53 ppm και τα πρωτόνια της 5-φαινυλομάδας εμφανίζονται ως μία τριπλή κορυφή ($\text{H4}'$) στα 6.79 και 7.00 ppm, μια τριπλή ($\text{H-3}'$, $\text{5}'$) στα 7.19 και 7.33 ppm και μία διπλή κορυφή ($\text{H-2}'$, $\text{6}'$) στα 7.41 και 7.28 ppm. Το $-\text{NHCO}-$ συντονίζεται στα 10.57 και 9.09 ppm, ενώ τα φαινολικά πρωτόνια επί της αμιδομάδας εμφανίζονται υπό τη μορφή που περιγράφηκε παραπάνω και συντονίζονται στα 6.58 ($\text{H4}''$), 7.10 ($\text{H-3}''$, $\text{5}''$), 6.61 ($\text{H-2}''$, $\text{6}''$) ppm για το παράγωγο **25**, και στα 6.85 ($\text{H4}''$), 7.23 ($\text{H-3}''$, $\text{5}''$), 6.71 ($\text{H-2}''$, $\text{6}''$) για το παράγωγο **28**.



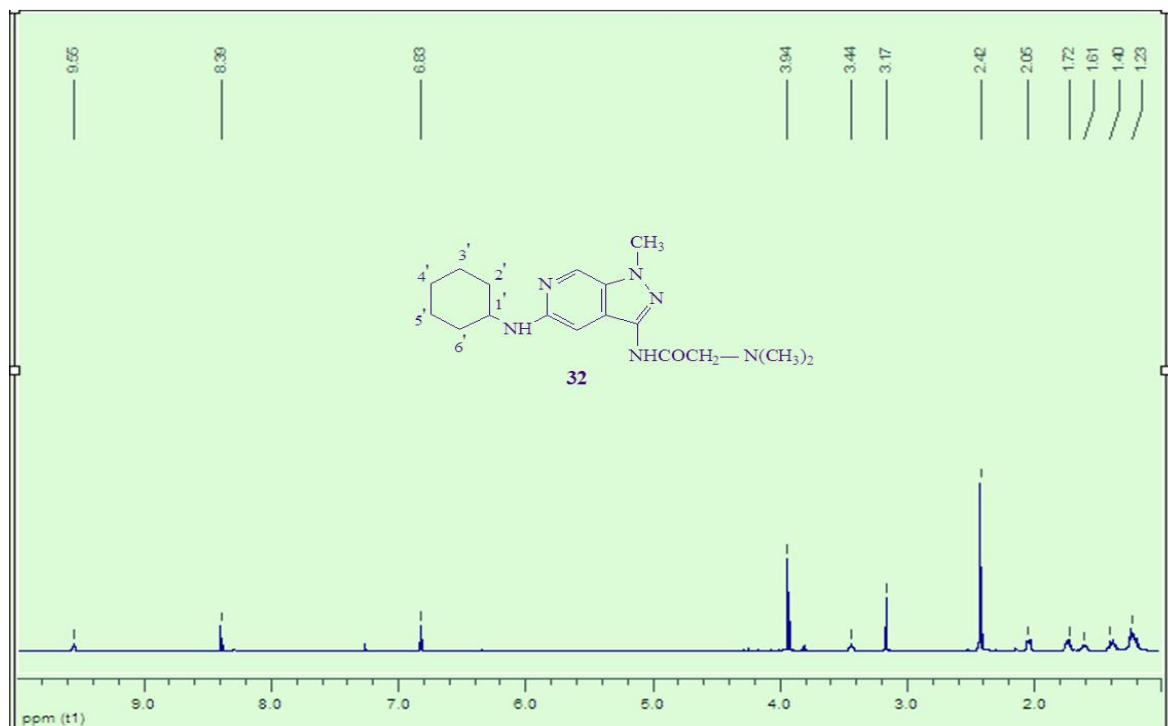
Εικόνα 2.4

Στην Εικόνα 2.5 παρουσιάζονται τα φάσματα ^1H -NMR: i) του μίγματος των δύο κυκλοεξυλαμινοπαραγώγων της αντίδρασης χλωρακετυλίωσης, ii) του κύριου προϊόντος **31** και iii) του δευτερεύοντος προϊόντος, που φέρει δύο χλωρακετυλομάδες. Και στα τρία φάσματα, τα πρωτόνια της κυκλοεξυλαμίνης συντονίζονται στην περιοχή 1.00-2.10 ppm, με την εξαίρεση του $\text{H1}'$ που στο κύριο προϊόν **31** συντονίζεται στα 3.43 ppm, ενώ στο δευτερεύον παρουσιάζει αξιοσημείωτη μετατόπιση στα 4.58 ppm, προφανώς λόγω της πρόσθετης χλωρακετυλομάδας. Οι υπόλοιπες κορυφές της αλειφατικής περιοχής στο φάσμα του μίγματος, αντιστοιχούν στο μεθύλιο του ετεροκυκλικού δακτυλίου (4.01 για το κύριο και στα 4.14 ppm για το δευτερεύον προϊόν), στο μεθυλένιο του 3-χλωρακεταμιδίου (4.31 και 4.30 ppm αντίστοιχα), ενώ το μεθυλένιο του 5-χλωρακεταμιδίου του δευτερεύοντος προϊόντος συντονίζεται στα 3.75 ppm. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος (i), το H4 συντονίζεται στα 7.16 στο παράγωγο **31** και στα 7.94 ppm στο παραπροϊόν, το H7 στα 8.56 και στα 8.80 ppm, ενώ το $-\text{NH}-$ του 3-χλωρακεταμιδίου συντονίζεται στα 9.22 και 9.16 ppm αντίστοιχα. Τέλος, στο φάσμα (ii) παρατηρείται μία επιπλέον ευρεία κορυφή που αντιστοιχεί στο $-\text{NH}-$ της θέσης 5 του παραγώγου **31** στα 4.43 ppm.



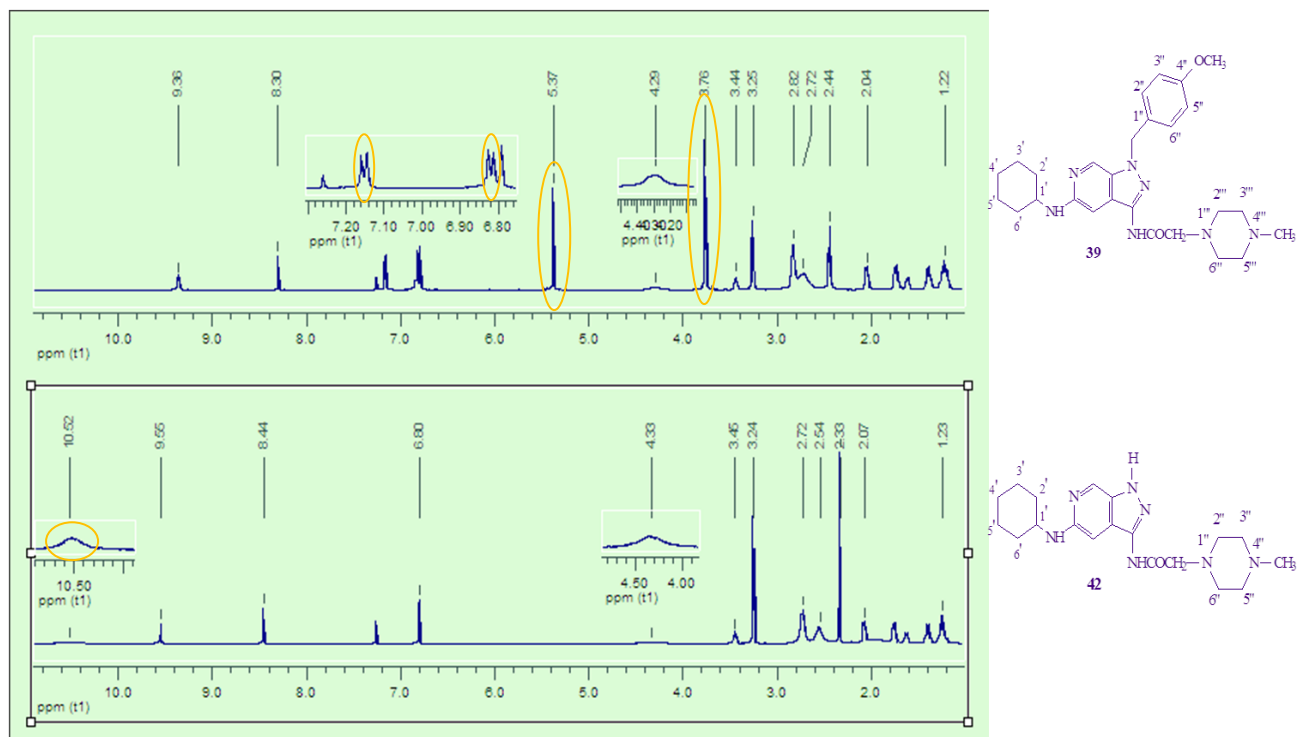
Εικόνα 2.5

Στην Εικόνα 2.6 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H -NMR του παραγώγου **32**. Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται πέντε πολλαπλές κορυφές στα 1.20-2.10 ppm που αντιστοιχούν στα ισημερινά και αξονικά πρωτόνια της κυκλοεξυλαμίνης (H-2',6', H-3',5' και H4'), μία απλή κορυφή στα 2.42 ppm που αποδίδεται στα έξι πρωτόνια της διμεθυλαμινομάδας, δύο απλές κορυφές στα 3.17 και 3.94 ppm που αποδίδονται στο μεθυλένιο του ακεταμιδίου και στο N1-μεθύλιο του ετεροκυκλικού δακτυλίου αντίστοιχα, καθώς και μία πολλαπλή κορυφή στα 3.44 ppm που αποδίδεται στο H1' της κυκλοεξυλαμίνης. Στην αρωματική περιοχή παρατηρούνται η απλή κορυφή στα 6.83 ppm που αποδίδεται στο πρωτόνιο H4 της πυραζολοπυριδίνης, το H7 συντονίζεται στα 8.39 ppm, ενώ το -NH- του ακεταμιδίου συντονίζεται στα 9.55 ppm.



Εικόνα 2.6

Στην Εικόνα 2.7 παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των παραγώγων **39** και **42**. Και στα δύο παράγωγα, παρατηρούνται στην αλειφατική περιοχή οι πέντε πολλαπλές κορυφές των πρωτονίων της κυκλοεξυλαμίνης (1.22-2.07 ppm), μία απλή κορυφή στα 2.44 για το **39** και 2.33 ppm για το **42** που αποδίδεται στο μεθύλιο της μεθυλοπιπεραζίνης, μία απλή κορυφή στα 3.25 και 3.24 ppm αντίστοιχα, που αποδίδεται στο μεθυλένιο του ακεταμιδίου ($-\text{NHCO}\underline{\text{CH}_2}-$), το $\text{H1}'$ της κυκλοεξυλαμίνης συντονίζεται στα 3.44 και 3.45 ppm ως μία πολλαπλή κορυφή, ενώ οι δύο ευρείες κορυφές στα 2.72 ($\text{H-3}''',5'''$) και 2.82 ($\text{H-2}''',6'''$) ppm για το παράγωγο **39** και στα 2.54 ($\text{H-3}''',5'''$) και 2.72 ($\text{H-2}''',6'''$) ppm για το παράγωγο **42** αποδίδονται στα μεθυλένια της μεθυλοπιπεραζίνης. Το $-\text{NH}-$ της κυκλοεξυλαμίνης συντονίζεται στα 4.29 και 4.33 ppm ως μία ευρεία κορυφή, ενώ στο φάσμα του προστατευμένου προϊόντος **39** παρουσιάζονται δύο επιπλέον απλές κορυφές στα 3.76 και 5.37 ppm που αντιστοιχούν στο μεθοξύλιο και στο μεθυλένιο της προστασίας. Ομοίως, στην αρωματική περιοχή του φάσματος του προστατευμένου παραγώγου παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές στα 6.83 και 7.15 ppm, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια $\text{H-3}''',5'''$ και $\text{H-2}''',6'''$ της μεθοξυβενζυλομάδας. Αντί αυτών, στο φάσμα του προϊόντος αποπροστασίας **42** παρατηρείται μία ευρεία κορυφή στα 10.52 ppm που αντιστοιχεί στο 1-NH του ετεροκυκλικού δακτυλίου, ενώ οι υπόλοιπες κορυφές είναι κοινές και για τα δύο μόρια. Πιο συγκεκριμένα για τα φάσματα των **39** και **42**, το H4 συντονίζεται ως απλή κορυφή στα 6.80 ppm, το H7 στα 8.30 και 8.44 ppm, ενώ το $-\text{NHCO}-$ συντονίζεται στα 9.36 και 9.55 ppm αντίστοιχα.



Εικόνα 2.7

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Γενικά πειραματικά στοιχεία

Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel 60 AC.C (SDS 35-70 μm). Η παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες Silica gel 60_{F254}. Χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας μικροκυμάτων CEM Discover Labmate. Για τη λήψη φασμάτων ^1H -NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκε Φασματοφωτόμετρο Bruker Avance 400 στα 400 MHz, ενώ για τη λήψη φασμάτων ^{13}C -NMR χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Bruker AC200 στα 50 MHz. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Τα σημεία τήξεως λήφθησαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα.

3.2 Σύνθεση της 5-χλωρο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (9) και των *N*¹ και *N*² μεθυλο- (11 και 10) και π-μεθοξυβενζυλο- (13 και 12) παραγώγων της

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (2)⁴⁹

Σε διάλυμα της αμινοπικολίνης **1** (15 g, 0.14 mol) σε θειικό οξύ (98%, 72ml) στους 0 °C και υπό συνεχή ανάδευση, προστίθεται στάγδην το οξύ νίτρωσης αποτελούμενο από θειικό οξύ (98%, 10.5 ml) και νιτρικό οξύ (65%, 10.5 ml). Το μίγμα θερμαίνεται στους 60 °C για 24 ώρες. Ακολουθεί απόχυση του μίγματος σε πάγο και εξουδετέρωση με προσθήκη διαλύματος αμμωνίας. Το στερεό που προκύπτει διηθείται υπό κενό και τα συστατικά του διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 2 / 3, απ' όπου λαμβάνονται τρία νιτροπαραγώγα.

i) 4-Μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη

Απόδοση: 25%. Στ: 134-136 °C (EtOAc), (Βιβλ.⁴⁹ 136 °C).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.52 (s, 3H, CH_3), 6.27 (brs, 2H, D_2O exchang., NH_2), 6.58 (d, 1H, H-5, $J = 4.9$ Hz), 8.07 (d, 1H, H-6, $J = 4.9$ Hz).

ii) 4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (2)

Απόδοση: 52%. Στ: 220 °C (EtOAc), (Βιβλ.⁴⁹ 220 °C).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.58 (s, 3H, CH_3), 5.10 (brs, 2H, D_2O exchang., NH_2), 6.29 (s, 1H, H-3), 8.90 (s, 1H, H-6).

iii) 3,5-Δινιτρο-4-μεθυλοπυριδιν-2-αμίνη

Απόδοση: 7%. Στ: 170-171 °C (EtOAc), (Βιβλ.⁴⁸ 220 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.65 (s, 3H, CH_3), 6.21 (brs, 2H, D_2O exchang., NH_2), 8.90 (s, 1H, H-6).

➤ **4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (3)**⁵⁰

Σε διάλυμα της νιτροπυριδίνης **2** (5 g, 32.68 mmol) σε μίγμα θεικού οξέος και νερού (94.6 ml σε αναλογία 1:10) στους 0 °C και υπό ανάδευση προστίθεται ταχέως κορεσμένο διάλυμα νιτρώδους νατρίου (5 g σε 7 ml νερού, 72.46 mmol). Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται μέχρι το σημείο βρασμού (reflux) ώστε να απομακρυνθούν οι νιτρώδεις ατμοί. Το διάλυμα ρίχνεται σε πάγο και καθιζάνει η πυριδινόνη, η οποία διηθείται υπό κενό και αφήνεται προς ξήρανση. Η πυριδινόνη **3** λαμβάνεται ως κίτρινο στερεό (4.7 g, 94%). Στ: 189-190 °C (EtOH). (Βιβλ.⁵⁰ 188-190 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.42 (s, 3H, CH_3), 6.31 (s, 1H, H-3), 8.56 (s, 1H, H-6), 12.50 (brs, 1H, D_2O exchang., NH).

➤ **2-Χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (4)**⁵¹

Η νιτροπυριδινόνη **3** (5.5g, 35.71 mmol) διαλύεται σε οξυχλωριούχο φωσφόρο (17 ml) υπό ψύξη. Το μίγμα θερμαίνεται στους 110 °C για 3 ώρες. Στη συνέχεια, αφού το μίγμα έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο στους 0 °C ώστε να υδρολυθεί ο οξυχλωριούχος φωσφόρος. Το χλωροπαράγωγο **4** καθιζάνει ως καστανόχρωμο ίζημα το οποίο διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται υπεράνω CaCl_2 (5.7 g, 93%). Στ: 40-41 °C (Βιβλ.⁵¹ 40-44 °C).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.65 (s, 3H, CH_3), 7.35 (s, 1H, H-3), 8.98 (s, 1H, H-6).

➤ **6-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-αμίνη (5)**^{52a,b}

Η χλωροπυριδίνη **4** (5.7 g, 33.04 mmol) διαλύεται σε υδροχλωρικό οξύ 36% (85 ml) υπό ψύξη. Στη συνέχεια προστίθεται διχλωριούχος κασσίτερος (25.6 g, 135.02 mmol) σε δόσεις και το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C για 15 min. Το περιεχόμενο της φιάλης, αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο και εξουδετερώνεται με ανθρακικό νάτριο μέχρι pH= 11. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, ξήρανση (Na_2SO_4) και συμπύκνωση, οπότε λαμβάνεται η αμίνη **5** (4.6 g, 98%) ως υποκίτρινο στερεό. Στ: 69-71 °C (Et_2O).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.09 (s, 3H, CH_3), 3.84 (brs, 2H, D_2O exchang., NH_2), 6.93 (s, 1H, H-3), 7.71 (s, 1H, H-6).

♣ ***N*-(6-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-υλ)ακεταμίδιο (6)**^{52a,b}

Η αμινοπυριδίνη **5** (4.6 g, 32.28 mmol) διαλύεται σε 50 ml διχλωρομεθάνιο και προστίθενται 4.6 ml οξικού ανυδρίτη. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης προσθέτεται νερό στη φιάλη και το μίγμα εξουδετερώνεται με ανθρακικό νάτριο μέχρι pH= 8-10. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, ξήρανση (Na₂SO₄) και συμπύκνωση, οπότε λαμβάνεται το ακεταμίδιο **6** (5.7 g, 96%). Στ: 155-6 °C. (Βιβλ.^{52a,b} 155-6 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.20 (s, 3H, CH₃CO), 2.24 (s, 3H, CH₃), 7.17 (s, 1H, H-3), 7.37 (brs, 1H, D₂O exchang., NH), 8.54 (s, 1H, H-6).

♣ **1-Ακετυλο-5-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (7)**

Σε διάλυμα του ακεταμιδίου **6** (5.7 g, 30.89 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (120 ml) προστίθενται, υπό ατμόσφαιρα αργού, οξικό κάλιο (4.25 g) και οξικός ανυδρίτης (11.7 ml). Το μίγμα φέρεται σε βρασμό και στη θερμοκρασία αυτή προστίθεται νιτρώδες ισοαμύλιο (9.5 ml). Η θερμοκρασία σταθεροποιείται στους 105 °C και η αντίδραση αφήνεται για 12 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί. Ακολουθεί διήθηση του μίγματος υπό κενό και τα στερεά ανόργανα υπολείμματα εκπλένονται με διχλωρομεθάνιο. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη υπό κενό και στο υπόλειμμα προστίθεται ξανά διχλωρομεθάνιο ώστε να αζεοτροπίσουν και τα τελευταία ίχνη οξικού ανυδρίτη, οπότε λαμβάνεται το προϊόν **7** (5.9 g, 97%) το οποίο χρησιμοποιείται στην επόμενη αντίδραση χωρίς περαιτέρω κατεργασία. Στ: 132-3°C. (Βιβλ.^{52a,b} 133 °C).

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.79 (s, 3H, COCH₃), 7.67 (s, 1H, H-4), 8.15 (s, 1H, H-3), 9.52 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.62, 114.88, 133.84, 134.73, 137.86, 138.01, 144.69, 170.37.

♣ **5-Χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (8)**

Σε διάλυμα της χλωροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης **7** (5.9 g, 30.18 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (200 ml) στους 0 °C διαβιβάζεται αέρια αμμωνία. Αφαιρείται η ψύξη και η διαβίβαση αμμωνίας συνεχίζεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης το κορεσμένο διάλυμα εξατμίζεται υπό κενό, ενώ το υπόλειμμα που λαμβάνεται προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 1 / 1, παρέχοντας το επιθυμητό προϊόν **8** (4.5 g, 97%). Στ: 185 °C. (Βιβλ.^{52a,b} 184-5 °C).

^1H –NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.86 (s, 1H, H-4), 8.20 (s, 1H, H-3), 8.88 (s, 1H, H-7), 13.83 (brs, 1H, D₂O exchange, NH). ^{13}C -NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 114.17 (C-4), 129.34 (C-3a), 132.79 (C-3), 134.68 (C-7), 136.38 (C-7a), 139.15 (C-5).

♣ **5-Χλωρο-3-νιτρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (9)**⁵⁴

Η πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη **8** (2.3 g, 14.98 mmol) διαλύεται σε πυκνό θειικό οξύ (98%, 17.6 ml) στους 0 °C, και υπό συνεχή ανάδευση προστίθεται στάγδην το οξύ νίτρωσης αποτελούμενο από θειικό οξύ (98%, 4.8 ml) και νιτρικό οξύ (65%, 4.8 ml). Το μίγμα θερμαίνεται στους 90 °C για μία ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε πάγο και εξουδετερώνεται με την προσθήκη διαλύματος αμμωνίας. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, ξήρανση (Na₂SO₄) και συμπύκνωση, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **9** ως κίτρινο στερεό (2.8 g, 94%), το οποίο υφίσταται κατεργασία με διχλωρομεθάνιο για περαιτέρω καθαρισμό. Στ: 195-197 °C.

^1H –NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.10 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-4), 9.16 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-7). ^{13}C -NMR (20.115 MHz, DMSO- d_6) δ 113.3 (C-4), 122.1 (C-3a), 137.1 (C-7), 137.8 (C-7a), 144.0 (C-3).

♣ **5-Χλωρο-1-μεθυλο-3-νιτρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (11) και 5-Χλωρο-2-μεθυλο-3-νιτρο-2H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (10)**

Σε διάλυμα της πυραζολοπυριδίνης **9** (2.8 g, 14.10 mmol) σε ακετονιτρίλιο (95 ml) στους 0 °C και υπό αργό, προστίθεται ανθρακικό κάλιο (2.7 g). Το μίγμα αφήνεται για μισή ώρα υπό ανάδευση και ψύξη και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην διάλυμα μεθυλοϊωδιδίου (1.14 ml, 18.31 mmol) σε ακετονιτρίλιο (3 ml). Η ψύξη αφαιρείται και το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C για 12 ώρες. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, ξήρανση (Na₂SO₄) και συμπύκνωση του μίγματος. Τα συστατικά του στερεού που προέκυψε διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 7 / 3, απ' όπου λαμβάνονται τα δύο ισομερή :

i) 5-Χλωρο-1-μεθυλο-3-νιτρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**11**) (2.4 g, 80%) ως υποκίτρινο στερεό. Στ: 171.5 °C (κατεργασία με Et₂O).

^1H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.34 (s, 3H, N-CH₃), 8.16 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-4), 8.89 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-7). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 38.0 (N-CH₃), 114.4 (C-4), 123.3 (C-3a), 134.2 (C-7), 137.5 (C-7a), 145.9 (C-3).

ii) 5-Χλωρο-2-μεθυλο-3-νιτρο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (10) (430 mg, 14%) υποκίτρινο στερεό. Στ: 177°C (κατεργασία με Et₂O).

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.67 (s, 3H, N-CH₃), 8.03 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-4), 9.13 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 43.8 (N-CH₃), 112.7 (C-4), 122.6 (C-3a), 136.9 (C-7a), 141.5 (C-5), 144.8 (C-7), 147.3 (C-3).

➤ **5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (13) και 5-Χλωρο-2-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (12)**

Λαμβάνονται με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση των παραγώγων **10** και **11**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυραζολοπυριδίνη **9** (3.8 g, 19.14 mmol) και π-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο (3.61 ml, 26.62 mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε στους 70 °C για 12 ώρες, η εκχύλιση έγινε με διχλωρομεθάνιο και τα στερεά διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα / διχλωρομεθανίου 90 / 5 / 5. Παρελήφθησαν τα δύο ισομερή :

i) 5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (13) (4.9 g, 80.3%) ως κίτρινο στερεό. Στ: 185 °C (EtOAc).

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 5.7 (s, 2H, -NCH₂-), 6.9 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-3'',5''), 7.3 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-2'',6''), 8.18 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-4), 8.67 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 55.3 (-OCH₃), 55.9 (-NCH₂-), 114.5 (C-4), 114.8 (C-3'',5''), 123.8 (C-3a), 124.7 (C-1''), 129.5 (C-2'',6''), 134.8 (C-7), 136.9 (C-7a), 145.7 (C-3), 160.4 (C-4'').

ii) 5-Χλωρο-2-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (12) (410 mg, 6.7%) κίτρινο στερεό. Στ: 156.5 °C.

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 6.09 (s, 2H, -NCH₂-), 6.83 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-3'',5''), 7.36 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-2'',6''), 7.99 (s, 1H, H-4), 9.16 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 55.3 (-OCH₃), 58.7 (-NCH₂-), 112.9 (C-4), 114.4 (C-3'',5''), 122.9 (C-3a), 125.3 (C-1''), 130.1 (C-2'',6''), 136.9 (C-7a), 141.6 (C-5), 145.1 (C-7), 147.3 (C-3), 160.2 (C-4'').

3.3 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 5-φαινυλαμινο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (17-19) και της 5-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (26-28)

♣ 1-Μεθυλο-3-νιτρο-*N*-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-αμίνη (14)

Σε διάλυμα της 3-νιτροπυραζολοπυριδίνης **11** (900 mg, 4.24 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (72 ml) προστίθενται, υπό αργό, ανθρακικό καΐσιο (7.29 g) ως βάση, X-phos (172 mg) και $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (207 mg) και ανιλίνη (0.99 ml, 10.86 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 125 °C για 20 ώρες, ακολουθεί συμπίκνωση για απομάκρυνση του τολουολίου, εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, ξήρανση (Na_2SO_4), συμπίκνωση και καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση αρχικά διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια μίγμα διχλωρομεθανίου / οξικού αιθυλεστέρα 97 / 3. Από τη χρωματογραφία στήλης, παρήχθησαν 200 mg πρώτης ύλης, καθώς και το επιθυμητό παράγωγο **14** ως ερυθρό στερεό (670 mg, 75%). Στ: 171-172 °C.

^1H –NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.27 (s, 3H, N- CH_3), 6.94 (td, 1H, $J_o = 7.2$ Hz, $J_m = 0.7$ -1 Hz, H-4'), 7.30 (t, 2H, $J_o = 7.3$ Hz, H-3',5'), 7.38 (d, 1H, $J_{4,7} = 1$ Hz, H-4), 7.55 (dd, 2H, $J_o = 8$ Hz, $J_m = 0.7$ -1 Hz, H-2',6'), 9.07 (d, 1H, $J_{4,7} = 1$ Hz, H-7), 9.29 (s, 1H, D_2O exchang., -NH-). ^{13}C -NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 37.8 (N- CH_3), 93.9 (C-4), 118.2 (C-2',6'), 120.9 (C-4'), 123.4 (C-3a), 128.7 (C-3',5'), 134.3 (C-7a), 134.9 (C-7), 141.5 (C-1'), 144.9 (C-3), 152.9 (C-5).

♣ 1-Μεθυλο-*N*⁵-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3,5-διαμίνη (15)

Σε διάλυμα της 3-νιτροπυραζολοπυριδίνης **14** (550 mg, 2.05 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (100 ml) προστίθεται παλλάδιο επί άνθρακα (100 mg) και το μίγμα υδρογονώνεται υπό πίεση (56 psi) για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί διήθηση μέσω κελλίτη προς απομάκρυνση του καταλύτη και συμπίκνωση του διαλύτη. Μετά από χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο, λαμβάνεται η αμίνη **15** (400 mg, 82%). Στ: 178-179 °C (EtOAc, πράσινο στερεό).

^1H –NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.75 (s, 3H, N- CH_3), 5.61 (bs, 2H, D_2O exchang., - NH_2), 6.78 (td, 1H, $J_o = 7.2$ Hz, $J_m = 0.9$ Hz, H-4'), 7.21 (m, 3H, $J_o = 7.3$ Hz, $J_{4,7} = 1$ Hz, H-3',5', H-4), 7.37 (dd, 2H, $J_o = 8$ Hz, $J_m = 0.9$ Hz, H-2',6'), 8.56 (d, 2H, $J_{4,7} = 1$ Hz, H-7, D_2O exchang., -NH). ^{13}C -NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 35.1 (N- CH_3), 97.9 (C-4), 116.2 (C-2',6'), 118.8 (C-4'), 121.1 (C-3a), 128.6 (C-3',5'), 130.4 (C-7), 134.8 (C-7a), 143.5 (C-1'), 146.4 (C-5), 147.3 (C-3).

♣ **2-Χλωρο-*N*-{1-μεθυλο-5-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (16)**

Σε διάλυμα της διαμίνης **15**, (300 mg, 1.26 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο (29 ml), προστίθεται χλωρακετυλογλωρίδιο (0.13 ml, 1.63 mmol) και τριαιθυλαμίνη (0.20 ml, 1.43 mmol) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Ακολουθεί υδρόλυση της περισσείας του χλωρακετυλογλωριδίου με νερό και συμπύκνωση του διαλύτη. Στη συνέχεια προστίθεται νερό, το διάλυμα εξουδετερώνεται με όξινο ανθρακικό νάτριο και εκχylίζεται με διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν προσροφάται σε silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / οξικού αιθυλεστέρα 9 / 1, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό χλωρακεταμίδιο **16** (300 mg, 83%) ως κίτρινο στερεό. Στ: 170-171 °C.

¹H –NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 4.02 (s, 3H, N-CH₃), 4.35 (s, 2H, -CH₂-), 6.80 (t, 1H, *J*_o= 7.2 Hz, H-4'), 7.21 (m, 3H, *J*_o= 7.3 Hz, *J*_{4,7}= 1 Hz, H-3',5', H-4), 7.45 (d, 2H, *J*_o= 8 Hz, H-2',6'), 8.77 (bs, 1H, -NH-), 8.80 (d, 1H, *J*_{4,7}= 1 Hz, H-7), 10.88 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*₆) δ 35.6 (N-CH₃), 42.6 (-CH₂-), 98.2 (C-4), 116.5 (C-2',6'), 119.2 (C-4'), 122.8 (C-3a), 128.6 (C-3',5'), 131.9 (C-7), 134.1 (C-7a), 136.8 (C-3), 143.1 (C-1'), 147.9 (C-5), 164.6 (-CO-).

♣ ***N*-{1-Μεθυλο-5-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (17)**

Η πυραζολοπυριδίνη **16** (80 mg, 0.254 mmol) διαλύεται σε απόλυτη αιθανόλη (11 ml) και προστίθεται περίσσεια διμεθυλαμίνης (δλμ 5.6M σε EtOH, 0.23 ml, 1.27 mmol). Η αντίδραση θερμαίνεται στους 90 °C για 4 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη και εκχylιση με διχλωρομεθάνιο. Το υπόλειμμα φέρεται σε χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 99 / 1, οπότε λαμβάνεται το προϊόν **17** (70 mg, 85%) ως πράσινο στερεό. Στ: 166-167 °C (EtOH).

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.41 [s, 6H, N-(CH₃)₂], 3.15 (s, 2H, -CH₂-), 4.00 (s, 3H, N-CH₃), 6.64 (s, 1H, -NH-), 6.95 (t, 1H, *J*_o= 7.2 Hz, *J*_m= 1.9 Hz, H-4'), 7.30 (m, 4H, H-2',6', H-3',5'), 7.57 (d, 1H, *J*_{4,7}= 1.2 Hz, H-4), 8.54 (d, 1H, *J*_{4,7}= 1.2 Hz, H-7), 9.59 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 35.7 (N-CH₃), 46.0 [N-(CH₃)₂], 63.0 (-CH₂-), 98.7 (C-4), 117.8 (C-2',6'), 121.1 (C-4'), 123.2 (C-3a), 129.2 (C-3',5'), 131.5 (C-7), 135.0 (C-7a), 137.5 (C-3), 142.1 (C-1'), 147.9 (C-5), 168.8 (-CO-).

♣ ***N*-{1-Μεθυλο-5-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (18)**

Λαμβάνεται από την πυραζολοπυριδίνη **16** (90 mg, 0.285 mmol) κατόπιν προσθήκης της *N*-μεθυλοπιπεραζίνης (0.07 ml, 0.631 mmol) κατ' αντιστοιχία με τη μέθοδο που ακολουθήθηκε για το παράγωγο **17**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 6 ώρες στους 85 °C και για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 91 / 9. Το παράγωγο **18** (100 mg, 93%) παραλήφθηκε ως κίτρινο στερεό. Στ: 196-197 °C (EtOH).

¹H –NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 2.18 (s, 3H, 4''-N-CH₃), 2.38 (bs, 4H, H-3'',5''), 2.57 (bs, 4H, H-2'',6''), 3.20 (s, 2H, -CH₂-), 4.01 (s, 3H, 1-N-CH₃), 6.80 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 7.21 (m, 3H, H-3',5', H-4), 7.45 (d, 2H, J_o= 8 Hz, H-2',6'), 8.74 (s, 1H, D₂O exchang., -NH-), 8.80 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-7), 10.14 (bs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*₆) δ 35.5 (1-N-CH₃), 45.6 (4''-N-CH₃), 52.6 (C-2'',6''), 54.5 (C-3'',5''), 60.8 (-CH₂-), 98.4 (C-4), 116.5 (C-2',6'), 119.2 (C-4'), 123.2 (C-3a), 128.6 (C-3',5'), 131.8 (C-7), 134.2 (C-7a), 137.2 (C-3), 143.1 (C-1'), 147.8 (C-5), 168.2 (-CO-).

♣ ***N*-{1-Μεθυλο-5-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (19)**

Λαμβάνεται από την πυραζολοπυριδίνη **16** (90 mg, 0.285 mmol) κατόπιν προσθήκης ανιλίνης (0.104 ml, 1.14 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που χρησιμοποιήθηκε για το παράγωγο **17**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 30 ώρες στους 110 °C, ενώ η κινητή φάση για τη χρωματογραφία στήλης silica gel που πραγματοποιήθηκε, ήταν μίγμα διχλωρομεθανίου / οξικού αιθυλεστέρα 1 / 1. Το παράγωγο **19** (70 mg, 66%) παραλήφθηκε ως κίτρινο στερεό. Στ: 180-181 °C (EtOH).

¹H –NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 3.95 (d, 2H, J= 6 Hz, -CH₂-NH-), 4.01 (s, 3H, N-CH₃), 6.04 (bt, 1H, J= 6 Hz, -CH₂-NH-), 6.60 (m, 3H : d, J_o= 8 Hz, H-2'',6'' & t, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 6.80 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 7.11 (t, 2H, J_o= 7.7 Hz, H-3'',5''), 7.20 (m, 3H : t, J_o= 7.8 Hz, H-3',5' & d, J_{4,7}= 0.8 Hz, H-4), 7.42 (d, 2H, J_o= 7.8 Hz, H-2',6'), 8.72 (s, 1H, D₂O exchang., -NH), 8.79 (d, 1H, J_{4,7}= 0.8 Hz, H-7), 10.50 (bs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*₆) δ 36.1 (N-CH₃), 47.0 (-CH₂-), 98.9 (C-4), 112.7 (C-2'',6''), 116.9 (C-4'), 117.0 (C-2',6'), 119.7 (C-4'), 123.6 (C-3a), 129.1 (C-3',5'), 129.4 (C-3'',5''), 132.4 (C-7), 134.7 (C-7a), 137.9 (C-3), 143.7 (C-1'), 148.3 (C-5), 148.7 (C-1''), 169.9 (-CO-).

♣ **1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-Ν-φαινυλο-1Η-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-αμίνη (20)**

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται η προστατευμένη νιτροπυραζολοπυριδίνη **13** (100 mg, 0.31 mmol), η οποία αντιδρά με ανιλίνη (0.11 ml, 1.12 mmol) υπό την παρουσία καταλυτικού συμπλέγματος και βάσης, κατ' αντιστοιχία με τη μέθοδο που αναφέρθηκε για το παράγωγο **14**. Στη χρωματογραφία στήλης silica gel που πραγματοποιείται για τον καθαρισμό του προϊόντος, χρησιμοποιείται ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 7 / 3, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **20** (80 mg, 68%) ως κόκκινο στερεό. Στ: 179 °C (EtOAc).

^1H –NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 5.79 (s, 2H, -NCH₂-), 6.92 (m, 3H : d, J_o = 8.7 Hz, H-3'',5'' & t, J_o = 7.5 Hz, H-4'), 7.29 (t, 2H, J_o = 7.5 Hz, H-3',5'), 7.40 (m, 3H : d, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-4 & d, J_o = 8.7 Hz, H-2'',6''), 7.54 (d, 2H, J_o = 7.5 Hz, H-2',6'), 9.15 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-7), 9.31 (s, 1H, D₂O exchang., -NH-). ^{13}C -NMR (50 MHz, DMSO- d_6) δ 53.8 (-NCH₂-), 55.0 (-OCH₃), 94.3 (C-4), 114.2 (C-3'',5''), 118.3 (C-2',6'), 121.0 (C-4'), 123.8 (C-3a), 126.9 (C-1'), 128.7 (C-3',5'), 129.7 (C-2'',6''), 133.6 (C-7a), 134.7 (C-7), 141.4 (C-1'), 145.6 (C-3), 152.9 (C-5), 159.2 (C-4').

♣ **N⁵-Φαινυλο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1Η-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3,5-διαμίνη (21)**

Σε διάλυμα της πυραζολοπυριδίνης **20** (80 mg, 0.213 mmol) σε μεθανόλη (5 ml) και υπό αργό, προστίθεται παλλάδιο επί άνθρακα (4 mg) και τριαιθυλοσιλάνιο (0.34 ml, 2.13 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ακολουθεί διήθηση μέσω κελλίτη και συμπύκνωση του διαλύματος. Το υπόλειμμα φέρεται σε χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 8 / 2, οπότε λαμβάνεται η αμίνη **21** (60 mg, 82%). Στ: 148 °C με αποσύνθεση (Με Et₂O λαμβάνονται κρύσταλλοι χρώματος ανοιχτού καφέ).

^1H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 4.64 (bs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 5.27 (s, 2H, -NCH₂-), 6.84 (d, 2H, J_o = 8.6 Hz, H-3'',5''), 7.06 (m, 2H : t, J_o = 7.6 Hz, H-4' & s, H-4), 7.18 (d, 2H, J_o = 8.6 Hz, H-2'',6''), 7.23 (d, 2H, J_o = 7.6 Hz, H-2',6'), 7.32 (t, 2H, J_o = 7.6 Hz, H-3',5'), 7.58 (bs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 8.20 (s, 1H, H-7). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 53.1 (-NCH₂-), 55.3 (-OCH₃), 96.7 (C-4), 114.3 (C-3'',5''), 120.6 (C-2',6'), 123.5 (C-4'), 124.2 (C-3a), 127.0 (C-7), 127.9 (C-1'), 128.9 (C-2'',6''), 129.6 (C-3',5'), 133.2 (C-7a), 140.1 (C-1'), 146.2 (C-3), 146.5 (C-5), 159.6 (C-4').

♣ **2-Χλωρο-*N*-{1-(4-μεθοξυβενζυλο)-5-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (22)**

Λαμβάνεται από την αμινοπυραζολοπυριδίνη **21** (480 mg, 1.39 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του χλωρακεταμιδίου **16**. Για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 7 / 3, οπότε λήφθηκε το παράγωγο **22** (450 mg, 77%) ως υποκίτρινο στερεό. Στ: >350 °C (MeOH).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 4.34 (s, 2H, -COCH₂-), 5.52 (s, 2H, -NCH₂-), 6.80 (t, 1H, *J*_o= 7.2 Hz, H-4'), 6.89 (d, 2H, *J*_o= 8.6 Hz, H-3'',5'), 7.20 (m, 3H : t, *J*_o= 7.7 Hz, H-3',5' & s, H-4), 7.28 (d, 2H, *J*_o= 8.6 Hz, H-2'',6''), 7.46 (d, 2H, *J*_o= 8 Hz, H-2',6'), 8.80 (s, 1H, -NH-), 8.90 (s, 1H, H-7), 10.97 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*₆) δ 42.6 (-COCH₂-), 51.7 (-NCH₂-), 55.0 (-OCH₃), 98.6 (C-4), 113.9 (C-3'',5'), 116.6 (C-2',6'), 119.2 (C-4'), 123.3 (C-3a), 128.5 (C-3',5'), 128.8 (C-1'), 129.1 (C-2'',6''), 131.9 (C-7), 133.5 (C-7a), 137.5 (C-3), 143.0 (C-1'), 148.1 (C-5), 158.8 (C-4'), 164.6 (-CO-).

♣ ***N*-{1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-5-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (23)**

Λαμβάνεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε στην περίπτωση του παραγώγου **17**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωρακεταμίδιο **22** (210 mg, 0.497 mmol) και κατόπιν θερμάνσεως στους 100 °C, σε απόδοση 98%. Στ: 142.5 °C (Με Et₂O λαμβάνονται κρύσταλλοι χρώματος υποπράσινου).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.36 [s, 6H, -N(CH₃)₂], 3.12 (s, 2H, -COCH₂-), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 5.36 (s, 2H, 1-N-CH₂-), 6.82 (d, 2H, *J*_o= 8.7 Hz, H-3'',5'), 6.90 (m, 2H, H-4', -NH-), 7.17 (d, 2H, *J*_o= 8.7 Hz, H-2'',6''), 7.26 (m, 4H, H-2',6', H-3',5'), 7.59 (d, 1H, *J*_{4,7}= 1 Hz, H-4), 8.45 (d, 1H, *J*_{4,7}= 1 Hz, H-7), 9.69 (bs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 46.0 [-N(CH₃)₂], 53.0 (1-N-CH₂-), 55.3 (-OCH₃), 63.0 (-COCH₂-), 99.1 (C-4), 114.3 (C-3'',5'), 117.9 (C-2',6'), 121.1 (C-4'), 123.8 (C-3a), 128.1 (C-1'), 128.9 (C-2'',6''), 129.2 (C-3',5'), 131.9 (C-7), 134.5 (C-7a), 138.1 (C-3), 142.2 (C-1'), 148.1 (C-5), 159.5 (C-4'), 168.9 (-CO-).

♣ ***N*-{1-(4-Μεθοξυβενζύλο)-5-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-ύλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-ύλο)ακεταμίδιο (24)**

Λαμβάνεται από το χλωρακεταμίδιο **22** (100 mg, 0.237 mmol) κατόπιν προσθήκης της *N*-μεθυλοπιπεραζίνης (0.06 ml, 0.541 mmol) κατ' αντιστοιχία με τη μέθοδο που ακολουθήθηκε για το παράγωγο **17**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 6 ώρες στους 85 °C και για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 98 / 2, οπότε παραλήφθηκε το επιθυμητό μόριο **24** (80 mg, 70%). Στ: 133.5 °C (Μετά από κατεργασία με μίγμα CH₂Cl₂ - Et₂O, λαμβάνονται κρύσταλλοι χρώματος υποπράσινου).

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.31 (s, 3H, 4'''-N-CH₃), 2.52 (bs, 4H, H-3'',5''), 2.68 (bs, 4H, H-2'',6''), 3.18 (s, 2H, -COCH₂-), 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 5.40 (s, 2H, 1-N-CH₂-), 6.74 (bs, 1H, -NH-), 6.82 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-3'',5''), 6.92 (m, 1H, H-4'), 7.17 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-2'',6''), 7.26 (m, 4H, H-2',6', H-3',5'), 7.51 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-4), 8.42 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-7), 9.51 (bs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 45.8 (4'''-N-CH₃), 53.1 (1-N-CH₂-), 53.3 (C-2'',6''), 54.9 (C-3'',5''), 55.3 (-OCH₃), 61.4 (-COCH₂-), 98.7 (C-4), 114.3 (C-3',5'), 118.0 (C-2',6'), 121.2 (C-4'), 123.9 (C-3a), 128.0 (C-1'), 128.8 (C-2'',6''), 129.2 (C-3',5'), 132.0 (C-7), 134.5 (C-7a), 137.8 (C-3), 142.1 (C-1'), 148.1 (C-5), 159.5 (C-4'), 168.4 (-CO-).

♣ ***N*-{1-(4-Μεθοξυβενζύλο)-5-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-ύλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (25)**

Λαμβάνεται από το χλωρακεταμίδιο **22** (110 mg, 0.26 mmol) κατόπιν προσθήκης της ανιλίνης (0.121 ml, 1.33 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που χρησιμοποιήθηκε για το παράγωγο **17**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 80 ώρες στους 110 °C, ενώ η κινητή φάση για τη χρωματογραφία στήλης silica gel που πραγματοποιήθηκε, ήταν μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 99 / 1. Το παράγωγο **25** (80 mg, 64%) παραλήφθηκε ως μπεζ στερεό. Στ: 208-209 °C (CHCl₃-Et₂O).

¹H –NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 3.93 (bs, 2H, -CH₂NH-), 5.50 (s, 2H, 1-N-CH₂-), 6.00 (bs, 1H, -CH₂NH-), 6.58 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4''), 6.61 (d, 2H, J_o= 7.8 Hz, H-2'',6''), 6.79 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 6.88 (d, 2H, J_o= 8.5 Hz, H-3'',5''), 7.10 (t, 2H, J_o= 7.5 Hz, H-3'',5''), 7.19 (m, 3H: t, J_o= 7.5 Hz, H-3',5' & s, H-4), 7.27 (d, 2H, J_o= 8.5 Hz, H-2'',6''), 7.41 (d, 2H, J_o= 8.2 Hz, H-2',6'), 8.73 (s, 1H, D₂O exchang., -NH-), 8.86 (s, 1H, H-7), 10.57 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*₆) δ 46.4 (-CH₂NH-), 51.6 (1-N-CH₂-), 55.0 (-OCH₃), 98.7 (C-4), 112.2 (C-2'',6''), 113.9 (C-3',5'), 116.3 (C-4''), 116.6 (C-2',6'), 119.2 (C-4'), 123.5 (C-3a), 128.6 (C-3',5'), 128.9 (C-3'',5''), 129.0 (C-

1''), 129.2 (C-2'',6''), 131.9 (C-7), 133.6 (C-7a), 138.0 (C-3), 143.0 (C-1'), 147.9 (C-5), 148.1 (C-1''), 158.8 (C-4'), 169.4 (-CO-).

♣ ***N*-{5-Φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (26)**

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται η πυραζολοπυριδίνη **23** (180 mg, 0.419 mmol), η οποία υφίσταται εύκολη αντίδραση αποπροστασίας στο όξινο περιβάλλον του τριφθοροξικού οξέος (7 ml). Το μίγμα θερμαίνεται στους 60-70 °C για 76 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση, εξουδετέρωση με όξινο ανθρακικό νάτριο και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Το προϊόν προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 98 / 2, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο **26** (110 mg, 85%) ως υποπράσινο στερεό. Στ: 194 °C (κατεργασία με Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 2.33 [s, 6H, N-(CH₃)₂], 3.16 (s, 2H, -COCH₂-), 6.78 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 7.20 (m, 3H : t, J_o= 7.6 Hz, H-3',5' & d, J_{4,7}= 0.8 Hz, H-4), 7.46 (d, 2H, J_o= 7.8 Hz, H-2',6'), 8.66 (d, 1H, J_{4,7}= 0.8 Hz, H-7), 8.69 (s, 1H, D₂O exchang., -NH-), 10.14 (bs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 12.87 (s, 1H, D₂O exchang., 1-NH). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*₆) δ 45.2 [N-(CH₃)₂], 62.1 (-COCH₂-), 98.5 (C-4), 116.4 (C-2',6'), 119.0 (C-4'), 123.0 (C-3a), 128.6 (C-3',5'), 132.0 (C-7), 134.4 (C-7a), 138.6 (C-3), 143.2 (C-1'), 147.7 (C-5), 168.7 (-CO).

♣ ***N*-{5-(Φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (27)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **24** (90 mg, 0.186 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για το μόριο **26**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 96 ώρες, ενώ για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 95 / 5. Το επιθυμητό προϊόν **27** παραλήφθηκε υπό τη μορφή στερεού, χρώματος λαδί σε απόδοση 74%. Στ: 186 °C (trituration με Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- *d*₆) δ 2.18 (s, 3H, 4''-N-CH₃), 2.40 (bs, 4H, H-3'',5''), 2.58 (bs, 4H, H-2'',6''), 3.20 (s, 2H, -COCH₂-), 6.78 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 7.20 (m, 3H : t, J_o= 7.7 Hz, H-3',5' & s, H-4), 7.45 (d, 2H, J_o= 8.0 Hz, H-2',6'), 8.66 (s, 1H, H-7), 8.70 (s, 1H, D₂O exchang., -NH-), 10.12 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 12.88 (s, 1H, D₂O exchang., 1-NH). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO- *d*₆) δ 45.5 (4''-N-CH₃), 52.5 (C-2'',6''), 54.4 (C-3'',5''), 60.7 (-COCH₂-), 98.5 (C-4), 116.5 (C-2',6'), 119.0 (C-4'), 122.8 (C-3a), 128.5 (C-3',5'), 132.0 (C-7), 134.5 (C-7a), 138.6 (C-3), 143.2 (C-1'), 147.7 (C-5), 168.2 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (28)**

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται το μόριο **25** (60 mg, 0.126 mmol) και η μέθοδος που ακολουθείται είναι όμοια με αυτήν που έχει αναφερθεί για το παράγωγο **26**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 55 ώρες, ενώ για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 5 / 5. Το επιθυμητό προϊόν **28** παραλήφθηκε υπό τη μορφή στερεού, χρώματος μπεζ σε απόδοση 80%. Στ: 126 °C με αποσύνθεση (Et₂O-pentane).

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.00 (s, 2H, -CH₂NH-), 4.40 (bs, 1H, -CH₂NH-), 6.53 (bs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 6.71 (d, 2H, J_o= 7.8 Hz, H-2',6'), 6.85 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 7.00 (t, 1H, J_o= 7.1 Hz, H-4'), 7.23 (t, 2H, J_o= 7.7 Hz, H-3',5'), 7.28 (d, 2H, J_o= 7.7 Hz, H-2',6'), 7.33 (t, 2H, J_o= 7.6 Hz, H-3',5'), 7.49 (s, 1H, H-4), 8.59 (s, 1H, H-7), 9.09 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 9.95 (bs, 1H, D₂O exchang., 1-NH). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 49.3 (-CH₂NH-), 97.9 (C-4), 113.5 (C-2',6'), 118.4 (C-2',6'), 119.8 (C-4'), 121.7 (C-4'), 123.4 (C-3a), 129.4 (C-3',5'), 129.6 (C-3',5'), 132.4 (C-7), 135.1 (C-7a), 139.8 (C-3), 141.6 (C-1'), 146.6 (C-1'), 148.4 (C-5), 169.3 (-CO-).

3.4 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 5-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (32-34) και της 5-κυκλοεξυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (41-43)

♣ **5-Κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (29)**

Σε διάλυμα της 5-χλωροπυραζολοπυριδίνης **11** (500 mg, 2.35 mmol) σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (1.2 ml) προστίθεται, υπό αργό, περίσσεια κυκλοεξυλαμίνης (1.5 ml, 13.08 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 135-140 °C για 12 ώρες. Το μίγμα αποχύνεται σε πάγο και στη συνέχεια εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Το προϊόν **29** παραλαμβάνεται ως πορτοκαλί στερεό (320 mg, 50%) μετά από χρωματογραφία στήλης silica gel, στην οποία ως κινητή φάση χρησιμοποιείται μίγμα κυκλοεξανίου / διχλωρομεθανίου 1 / 9, και έπειτα από trituration με διαιθυλαιθέρα. Στ: 148-149 °C (EtOAc).

¹H –NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.25-1.34 (m, 3H, H-4' & H-2',6'), 1.46 (m, 2H, H-3',5'), 1.68 (m, 1H, H-4'), 1.80 (m, 2H, H-3',5'), 2.09 (m, 2H, H-2',6'), 3.50 (m, 1H, H-1'), 4.22 (s, 3H, 1-N-CH₃), 5.24 (bs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 6.96 (s, 1H, H-4), 8.69 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.8 (C-3',5'), 25.8 (C-4'), 32.8 (C-2',6'), 38.0 (1-N-CH₃), 51.3 (C-1'), 91.1 (C-4), 125.6 (C-3a), 132.4 (C-7), 133.8 (C-7a), 146.0 (C-3), 155.0 (C-5).

➤ ***N*⁵-Κυκλοεξυλο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινό-3,5-διαμίνη (30)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **29** (100 mg, 0.36 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για το μόριο **15**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 3 ώρες, ενώ για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 99 / 1. Η αμίνη **30** παραλήφθηκε σε απόδοση 56% (50 mg). Στ: 179-180 °C (EtOAc, κίτρινο στερεό).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.11-1.24 (m, 3H, H-4' & H-2',6'), 1.32 (m, 2H, H-3',5'), 1.60 (m, 1H, H-4'), 1.72 (m, 2H, H-3',5'), 2.02 (m, 2H, H-2',6'), 3.29 (m, 1H, H-1'), 3.80 (s, 3H, 1-N-CH₃), 4.18 (bs, 3H, D₂O exchang., -NH₂ & -NH-), 6.33 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-4), 8.28 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.9 (C-3',5'), 25.8 (C-4'), 33.1 (C-2',6'), 35.3 (1-N-CH₃), 51.7 (C-1'), 91.5 (C-4), 122.5 (C-3a), 130.3 (C-7), 134.3 (C-7a), 145.4 (C-3), 150.9 (C-5).

➤ **2-Χλωρο-*N*-{5-(κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (31)**

Σε διάλυμα της 3-αμινοπυραζολοπυριδίνης **30** (160 mg, 0.653 mmol) σε τετραϋδροφουράνιο (11.5 ml), στους -40 °C και υπό αργό, προστίθενται η τριαιθυλαμίνη (0.10 ml, 0.718 mmol) και το χλωρακετυλοχλωρίδιο (0.060 ml, 0.718 mmol). Μετά από 10 λεπτά η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί και η περίσσεια του χλωρακετυλοχλωριδίου υδρολύεται με προσθήκη μικρής ποσότητας νερού. Ακολουθεί συμπύκνωση του διαλύτη και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Στη συνέχεια, το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 5 / 5, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό χλωρακεταμίδιο **31** (100 mg, 48%) ως κίτρινο στερεό. Στ: 107 °C με αποσύνθεση (CHCl₃-Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.42 (m, 2H, H-3',5'), 1.64 (m, 1H, H-4'), 1.76 (m, 2H, H-3',5'), 2.07 (m, 2H, H-2',6'), 3.43 (m, 1H, H-1'), 3.99 (s, 3H, 1-N-CH₃), 4.28 (s, 2H, -COCH₂-), 4.43 (bs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 6.65 (s, 1H, H-4), 8.43 (s, 1H, H-7), 8.65 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 25.0 (C-3',5'), 26.1 (C-4'), 33.2 (C-2',6'), 36.1 (1-N-CH₃), 42.7 (-COCH₂-), 51.4 (C-1'), 92.8 (C-4), 124.3 (C-3a), 131.6 (C-7), 134.2 (C-7a), 135.7 (C-3), 152.3 (C-5), 164.2 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (32)**

Λαμβάνεται από την πυραζολοπυριδίνη **31** (70 mg, 0.218 mmol) με την ίδια μέθοδο που περιγράφηκε για το προϊόν **17**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 3 ώρες και το επιθυμητό μόριο **32** παραλήφθηκε ως πράσινο λάδι (30 mg, 42%) έπειτα από την κατεργασία και τη χρωματογραφία στήλης που πραγματοποιήθηκαν.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.22 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.40 (m, 2H, H-3',5'), 1.61 (m, 1H, H-4'), 1.73 (m, 2H, H-3',5'), 2.05 (m, 2H, H-2',6'), 2.42 [s, 6H, N-(CH_3)₂], 3.17 (s, 2H, -COCH₂-), 3.44 (m, 1H, H-1'), 3.94 (s, 3H, 1-N-CH₃), 6.83 (s, 1H, H-4), 8.39 (s, 1H, H-7), 9.55 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 24.8 (C-3',5'), 25.9 (C-4'), 33.2 (C-2',6'), 35.7 (1-N-CH₃), 46.0 [N-(CH_3)₂], 51.2 (C-1'), 63.0 (-CH₂-), 93.8 (C-4), 123.9 (C-3a), 131.3 (C-7), 134.2 (C-7a), 136.9 (C-3), 152.0 (C-5), 168.6 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (33)**

Λαμβάνεται από το χλωρακεταμίδιο **31** (60 mg, 0.187 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για το παράγωγο **18**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 5 ώρες, και για τη χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 94 / 6. Το παράγωγο **33** (20 mg, 28%) παραλήφθηκε ως στερεό. Στ: 154 °C (Et₂O) με αποσύνθεση.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.23 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.40 (m, 2H, H-3',5'), 1.62 (m, 1H, H-4'), 1.74 (m, 2H, H-3',5'), 2.06 (m, 2H, H-2',6'), 2.39 (s, 3H, 4''-N-CH₃), 2.63 (bs, 4H, H-3'',5''), 2.77 (bs, 4H, H-2'',6''), 3.24 (s, 2H, -COCH₂-), 3.45 (m, 1H, H-1'), 3.96 (s, 3H, 1-N-CH₃), 6.78 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-4), 8.41 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-7), 9.40 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 24.9 (C-3',5'), 26.0 (C-4'), 33.3 (C-2',6'), 35.8 (1-N-CH₃), 45.7 (4''-N-CH₃), 51.3 (C-1'), 53.1 (C-2'',6''), 55.0 (C-3'',5''), 61.5 (-COCH₂-), 93.6 (C-4), 124.0 (C-3a), 131.6 (C-7), 134.3 (C-7a), 136.8 (C-3), 152.1 (C-5), 168.2 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (34)**

Λαμβάνεται από το χλωρακεταμίδιο **31** (90 mg, 0.280 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που χρησιμοποιήθηκε για το προϊόν **19**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 48 ώρες στους 100 °C υπό ατμόσφαιρα αργού, ενώ η κινητή φάση για τη χρωματογραφία στήλης silica gel που

πραγματοποιήθηκε, ήταν μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 99 / 1. Το παράγωγο **34** (30 mg, 28%) παραλήφθηκε ως στερεό. Στ: 175-176 °C (trituration με Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.20-1.31 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.42 (m, 2H, H-3',5'), 1.66 (m, 1H, H-4'), 1.78 (m, 2H, H-3',5'), 2.07 (m, 2H, H-2',6'), 3.44 (m, 1H, H-1'), 3.91 (s, 3H, 1-N-CH₃), 4.00 (s, 2H, -COCH₂-), 4.57 (bs, 1H, D₂O exchang., -C-1'-NH-), 6.71 (d, 2H, J_o= 7.9 Hz, H-2'',6''), 6.74 (s, 1H, H-4), 6.85 (t, 1H, J_o= 7.3 Hz, H-4'), 7.24 (t, 2H, J_o= 7.5 Hz, H-3'',5''), 8.38 (s, 1H, H-7), 9.10 (bs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.8 (C-3',5'), 25.9 (C-4'), 33.1 (C-2',6'), 35.7 (1-N-CH₃), 49.1 (-COCH₂-), 51.2 (C-1'), 93.2 (C-4), 113.4 (C-2'',6''), 119.5 (C-4'), 124.4 (C-3a), 129.5 (C-3'',5''), 131.1 (C-7), 134.0 (C-7a), 136.4 (C-3), 147.0 (C-1'), 151.9 (C-5), 169.2 (-CO-).

♣ 5-Κυκλοεξυλαμινο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-νιτροπυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (**35**)

Σε διάλυμα της 5-χλωροπυραζολοπυριδίνης **13** (2.5 g, 7.85 mmol) σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (8 ml), προστίθεται περίσσεια κυκλοεξυλαμίνης (9 ml, 78.47 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 158 °C για 2 ώρες, δεχόμενη την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (60 Watt) στη συχνότητα των μικροκυμάτων. Ακολουθεί εκχύλιση του μίγματος με διχλωρομεθάνιο και το υπόλειμμα που λαμβάνεται, φέρεται σε χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 5 / 5, οπότε προκύπτει το επιθυμητό προϊόν **35** (2.0 g, 66%) ως πορτοκαλί στερεό. Στ: 125-126 °C (CHCl₃-Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.44 (m, 2H, H-3',5'), 1.66 (m, 1H, H-4'), 1.78 (m, 2H, H-3',5'), 2.07 (m, 2H, H-2',6'), 3.48 (m, 1H, H-1'), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 4.90 (bs, 1H, D₂O exchang., -C-1'-NH-), 5.58 (s, 2H, -NCH₂-), 6.87 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-3'',5''), 6.91 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-4), 7.28 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-2'',6''), 8.40 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.6 (C-3',5'), 25.7 (C-4'), 32.7 (C-2',6'), 51.1 (C-1'), 55.3 (-OCH₃), 55.6 (-NCH₂-), 91.0 (C-4), 114.7 (C-3'',5''), 125.6 (C-1'), 125.8 (C-3a), 129.4 (C-2'',6''), 132.8 (C-7a), 133.1 (C-7), 145.4 (C-3), 155.0 (C-5), 160.2 (C-4').

♣ N⁵-Κυκλοεξυλο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινό-3,5-διαμίνη (**36**)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **35** (960 mg, 2.52 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για το μόριο **15**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 5.5 ώρες, ενώ για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / οξικού αιθυλεστέρα 8 / 2. Η αμίνη **36** παραλήφθηκε ως κίτρινο στερεό, σε απόδοση 85% (750 mg). Στ: 142-143 °C (Et₂O).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.20 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.33 (m, 2H, H-3',5'), 1.60 (m, 1H, H-4'), 1.72 (m, 2H, H-3',5'), 2.02 (m, 2H, H-2',6'), 3.29 (m, 1H, H-1'), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 4.14 (bs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 5.21 (s, 2H, -NCH₂-), 6.32 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-4), 6.78 (d, 2H, J_0 = 8.7 Hz, H-3'',5''), 7.13 (d, 2H, J_0 = 8.7 Hz, H-2'',6''), 8.20 (d, 1H, $J_{4,7}$ = 1 Hz, H-7). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 25.0 (C-3',5'), 25.9 (C-4'), 33.2 (C-2',6'), 51.6 (C-1'), 52.6 (-NCH₂-), 55.3 (-OCH₃), 91.2 (C-4), 114.1 (C-3'',5''), 123.0 (C-3a), 128.8 (C-2'',6''), 129.2 (C-1'), 131.4 (C-7), 133.9 (C-7a), 145.8 (C-3), 151.4 (C-5), 159.2 (C-4'').

♣ **2-Χλωρο-*N*-{5-(κυκλοεξυλαμινο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (37)**

Λαμβάνεται από την αμίνη **36** (820 mg, 2.34 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για το μόριο **31**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 10 λεπτά, ενώ για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / διχλωρομεθανίου / οξικού αιθυλεστέρα 4 / 4 / 2. Το χλωρακεταμίδιο **37** παραλήφθηκε ως κίτρινο στερεό, σε απόδοση 74% (740 mg). Στ: 139-140 °C (CHCl_3 -Et₂O).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.25 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.40 (m, 2H, H-3',5'), 1.62 (m, 1H, H-4'), 1.75 (m, 2H, H-3',5'), 2.04 (m, 2H, H-2',6'), 3.41 (m, 1H, H-1'), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 4.27 (s, 2H, -COCH₂-), 4.81 (bs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 5.37 (s, 2H, -NCH₂-), 6.75 (s, 1H, H-4), 6.83 (d, 2H, J_0 = 8.3 Hz, H-3'',5''), 7.17 (d, 2H, J_0 = 8.3 Hz, H-2'',6''), 8.29 (s, 1H, H-7), 8.75 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 24.8 (C-3',5'), 25.9 (C-4'), 33.1 (C-2',6'), 42.5 (-COCH₂-), 51.1 (C-1'), 53.2 (-NCH₂-), 55.3 (-OCH₃), 93.2 (C-4), 114.3 (C-3'',5''), 124.7 (C-3a), 127.9 (C-1''), 128.9 (C-2'',6''), 131.8 (C-7), 133.4 (C-7a), 136.2 (C-3), 152.0 (C-5), 159.5 (C-4''), 164.1 (-CO-).

♣ ***N*-{5-Κυκλοεξυλαμινο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (38)**

Λαμβάνεται από την πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη **37** (200 mg, 0.468 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το προϊόν **17**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 3 ώρες και το επιθυμητό μόριο **38** παραλήφθηκε ως κίτρινο λάδι (100 mg, 50%) έπειτα από την κατεργασία και τη χρωματογραφία στήλης που πραγματοποιήθηκαν.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.18 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.36 (m, 2H, H-3',5'), 1.57 (m, 1H, H-4'), 1.69 (m, 2H, H-3',5'), 2.01 (m, 2H, H-2',6'), 2.36 [s, 6H, N-(CH₃)₂], 3.11 (s, 2H, -COCH₂-), 3.42 (m, 1H, H-1'), 3.70 (s, 3H, -OCH₃), 4.30 (bs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 5.32 (s, 2H, -NCH₂-), 6.77 (d, 2H, J_0 = 8.6 Hz, H-3'',5''), 6.84 (s, 1H, H-4), 7.11 (d, 2H, J_0 = 8.6 Hz, H-2'',6'').

2'',6''), 8.28 (s, 1H, H-7), 9.55 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.6 (C-3',5'), 25.7 (C-4'), 33.0 (C-2',6'), 45.9 [N-(CH₃)₂], 50.9 (C-1'), 52.7 (-NCH₂-), 55.0 (-OCH₃), 62.9 (-COCH₂-), 93.9 (C-4), 114.0 (C-3'',5''), 124.2 (C-3a), 128.1 (C-1'), 128.5 (C-2'',6''), 131.6 (C-7), 133.5 (C-7a), 137.3 (C-3), 151.8 (C-5), 159.2 (C-4''), 168.5 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (39)**

Λαμβάνεται από το χλωρακεταμίδιο **37** (150 mg, 0.351 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για το παράγωγο **18**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 5 ώρες, και για τη χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 96 / 4. Το παράγωγο **39** (170 mg, 99%) παραλήφθηκε ως στερεό μετά από ανακρυστάλλωση σε σύστημα δύο διαλυτών. Στ: 157-158 °C (CHCl₃-Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.40 (m, 2H, H-3',5'), 1.62 (m, 1H, H-4'), 1.74 (m, 2H, H-3',5'), 2.04 (m, 2H, H-2',6'), 2.47 (s, 3H, -NCH₃), 2.74 (bs, 4H, H-3'',5''), 2.84 (bs, 4H, H-2'',6''), 3.26 (s, 2H, -COCH₂-), 3.44 (m, 1H, H-1'), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 4.29 (bs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 5.37 (s, 2H, -NCH₂-), 6.80 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-4), 6.83 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-3'',5''), 7.16 (d, 2H, J_o= 8.7 Hz, H-2'',6''), 8.31 (d, 1H, J_{4,7}= 1 Hz, H-7), 9.34 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.9 (C-3',5'), 26.0 (C-4'), 33.3 (C-2',6'), 45.4 (-NCH₃), 51.2 (C-1'), 52.7 (C-2'',6''), 53.1 (-NCH₂-), 54.8 (C-3'',5''), 55.4 (-OCH₃), 61.5 (-COCH₂-), 94.0 (C-4), 114.4 (C-3'',5''), 124.6 (C-3a), 128.4 (C-1'), 128.9 (C-2'',6''), 132.1 (C-7), 133.8 (C-7a), 137.3 (C-3), 152.2 (C-5), 159.6 (C-4''), 168.0 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (40)**

Λαμβάνεται από το χλωρακεταμίδιο **37** (160 mg, 0.374 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που χρησιμοποιήθηκε για το προϊόν **19**. Το μίγμα θερμάνθηκε για 30 ώρες στους 100 °C υπό ατμόσφαιρα αργού, ενώ η κινητή φάση για τη χρωματογραφία στήλης silica gel που πραγματοποιήθηκε, ήταν μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 99 / 1. Το παράγωγο **40** (67 mg, 37%) παραλήφθηκε ως κίτρινο στερεό. Στ: 152 °C (CHCl₃-Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.24 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.40 (m, 2H, H-3',5'), 1.64 (m, 1H, H-4'), 1.75 (m, 2H, H-3',5'), 2.05 (m, 2H, H-2',6'), 3.44 (m, 1H, H-1'), 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 3.97 (d, 2H, J_o= 5.2 Hz, -COCH₂NH-), 4.32 (bs, 1H, D₂O exchang., -C-1'-NH-), 4.45 (t, 1H, J_o= 5.2 Hz, -COCH₂NH-), 5.31 (s, 2H, -NCH₂-), 6.70 (d, 2H, J_o= 7.7 Hz, H-2'',6''),

6.76 (s, 1H, H-4), 6.78 (d, 2H, $J_o = 8.5$ Hz, H-3'',5''), 6.84 (t, 1H, $J_o = 7.2$ Hz, H-4'''), 7.11 (d, 2H, $J_o = 8.5$ Hz, H-2'',6''), 7.23 (t, 2H, $J_o = 7.5$ Hz, H-3''',5'''), 8.30 (s, 1H, H-7), 9.05 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.8 (C-3',5'), 25.9 (C-4'), 33.0 (C-2',6'), 49.3 (-COCH₂NH-), 51.2 (C-1'), 53.2 (-NCH₂-), 55.3 (-OCH₃), 94.1 (C-4), 113.5 (C-2''',6'''), 114.3 (C-3'',5''), 119.7 (C-4'''), 125.0 (C-3a), 127.9 (C-1'), 128.8 (C-2'',6''), 129.6 (C-3''',5'''), 130.9 (C-7), 133.3 (C-7a), 136.9 (C-3), 146.9 (C-1'''), 151.6 (C-5), 159.5 (C-4'), 169.0 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (41)**

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται η πυραζολοπυριδίνη **38** (110 mg, 0.252 mmol) και η μέθοδος αποπροστασίας που ακολουθείται είναι ίδια με αυτήν που περιγράφηκε για το παράγωγο **26**. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μετά από 40 ώρες θέρμανσης και η χρωματογραφία στήλης silica gel που πραγματοποιείται, χρησιμοποιεί ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 95 / 5, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **41** (60 mg, 75%) ως κιτρινοπράσινο στερεό. Στ: 132-133 °C (Et₂O-pentane).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.32 (m, 2H, H-3',5'), 1.57 (m, 1H, H-4'), 1.68 (m, 2H, H-3',5'), 2.01 (m, 2H, H-2',6'), 2.38 [s, 6H, N-(CH₃)₂], 3.17 (s, 2H, -COCH₂-), 3.40 (m, 1H, H-1'), 4.23 (bs, 1H, D₂O exchang., -C-1'-NH-), 6.80 (s, 1H, H-4), 8.37 (s, 1H, H-7), 9.62 (bs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 11.62 (bs, 1H, D₂O exchang., 1-NH). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.7 (C-3',5'), 25.8 (C-4'), 33.0 (C-2',6'), 46.0 [N-(CH₃)₂], 51.2 (C-1'), 63.0 (-COCH₂-), 93.3 (C-4), 123.3 (C-3a), 132.6 (C-7), 134.2 (C-7a), 138.4 (C-3), 151.8 (C-5), 169.2 (-CO-).

♣ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (42)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **39** (140 mg, 0.285 mmol) με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για το μόριο **26**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 72 ώρες, ενώ για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 9 / 1. Το επιθυμητό προϊόν **42** παραλήφθηκε υπό τη μορφή στερεού, χρώματος υποκίτρινου σε απόδοση 86% (90 mg). Στ: 145 °C (Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.23 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.40 (m, 2H, H-3',5'), 1.63 (m, 1H, H-4'), 1.74 (m, 2H, H-3',5'), 2.06 (m, 2H, H-2',6'), 2.33 (s, 3H, -NCH₃), 2.54 (bs, 4H, H-3'',5''), 2.72 (bs, 4H, H-2'',6''), 3.24 (s, 2H, -COCH₂-), 3.44 (m, 1H, H-1'), 4.33 (bs, 1H, D₂O

exchang., -C-1'-NH-), 6.80 (s, 1H, H-4), 8.44 (s, 1H, H-7), 9.55 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO), 10.52 (bs, 1H, D₂O exchang., 1-NH). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.8 (C-3',5'), 25.9 (C-4'), 33.2 (C-2',6'), 45.9 (-N-CH₃), 51.2 (C-1'), 53.5 (C-2'',6''), 55.1 (C-3'',5''), 61.5 (-COCH₂-), 93.3 (C-4), 123.6 (C-3a), 132.4 (C-7), 134.2 (C-7a), 139.0 (C-3), 152.2 (C-5), 168.5 (-CO-).

➤ ***N*-{5-(Κυκλοεξυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (43)**

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται το ανάλογο μόριο **40** (66 mg, 0.136 mmol) και η μέθοδος που ακολουθείται είναι όμοια με αυτήν που έχει αναφερθεί για το παράγωγο **26**. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 24 ώρες θέρμανσης στο σημείο reflux, ενώ για τη χρωματογραφία στήλης silica gel χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση μίγμα διχλωρομεθανίου / μεθανόλης 96 / 4. Το επιθυμητό προϊόν **43** παραλήφθηκε υπό τη μορφή στερεού, κίτρινου χρώματος σε απόδοση 71% (35 mg). Στ: 166 °C (CHCl₃).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.23 (m, 3H, H-2',6' & H-4'), 1.41 (m, 2H, H-3',5'), 1.64 (m, 1H, H-4'), 1.75 (m, 2H, H-3',5'), 2.05 (m, 2H, H-2',6'), 3.41 (m, 1H, H-1'), 4.01 (s, 2H, -COCH₂-), 4.49 (s, 1H, -CH₂NH-), 6.69 (s, 1H, H-4), 6.72 (d, 2H, J_o= 8.0 Hz, H-2'',6''), 6.85 (t, 1H, J_o= 7.2 Hz, H-4'), 7.24 (t, 2H, J_o= 7.7 Hz, H-3'',5''), 8.42 (s, 1H, H-7), 9.07 (s, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 10.19 (bs, 1H, D₂O exchang., 1-NH). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 24.8 (C-3',5'), 25.9 (C-4'), 33.1 (C-2',6'), 49.2 (-COCH₂-), 51.2 (C-1'), 93.0 (C-4), 113.5 (C-2'',6''), 119.7 (C-4'), 123.9 (C-3a), 129.6 (C-3'',5''), 132.2 (C-7), 134.0 (C-7a), 138.6 (C-3), 146.8 (C-1'), 152.1 (C-5), 169.4 (-CO-).

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. I. Collins, P. Workman, New approaches to molecular cancer therapeutics, *Nature Chem. Biol.* **2006**, 2, 689-700.
2. I. Kola, J. Landis, Can pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 711-715.
3. <http://cancerwatch.com/patient/drugs/druglist.html>.
4. S. Whitebread, J. Harnon, D. Bojanic, L. Urban, In vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development, *Drug Discov. Today* **2005**, 10, 1421-1433.
5. P. Workman, How much it gets there and what does it do? The need for better pharmacokinetic and pharmacodynamic endpoints in contemporary drug discovery and development, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, 9, 891-902.
6. W. S. Dalton, S. H. Friend Cancer biomarkers – an invitation to the table *Science* **2006**, 312, 1165-1168.
7. H. Varmus The new era in cancer research. *Science* **2006**, 312, 1162-1165.
8. A. Kamb, S. Wee, C. Lengauer Why is cancer drug discovery so difficult? *Nat. Rev Drug Discov.* **2007**, 6, 115–20.
9. H. Varmus, The new era in cancer research, *Science* **2006**, 312, 1162-1165.
10. P. Workman Genomics and the second golden era in cancer drug development, *Mol. Biosyst.* **2005**, 1, 17-26.
11. B. Vogelstein, K. W. Kinzler, Cancer genes and the pathways they control *Nat. Med.* **2004**, 10, 789-799.
12. T. Hunter, Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell*, **1995**, 80, 225–236.
13. U. Muller-Ladner Molecular and cellular interactions in rheumatoid synovium. *Curr. Opin. Rheumatol.* **1996**, 8, 210–220.
14. T. Mikaelson, N. Gerits, U. Moens, Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy, *Biotechn. Ann. Rev.* **2006**, 12, 153-223.
15. 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.
16. a) P. Traxler Tyrosine kinases as targets in cancer therapy – successes and failures *Expert. Opin. Ther. Targets* **2003**, 7, 215–234.
 b) T. K. Sawyer Novel oncogenic protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2004**, 4, 449–455.
 c) J. Luo, N. L. Solimini, S. J. Elledge. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* **2009** 136, 823–37.
17. H. Saito, Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2497–2510.
18. D. R. Knighton, *et al* Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* **1991**, 253, 407–414.
19. G. Scapin, Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors, *Drug Discv. Today* **2002**, 7, 601-611.
20. J. A. Adams, Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2271–2290.

21. O. Hantschel, G. Superti-Furga, Regulation of the c-Abl and BCR Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev.* **2004**, 5, 33–44.
22. L. N. Johnson *et al.* Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **1996**, 85, 149–158.
23. P. J. Kennelly, Protein phosphatases – a phylogenetic perspective. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2291–2312.
24. 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.
25. A. Levitzki, Protein Kinase Inhibitors as a Therapeutic Modality *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 462–469.
26. a) 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.
b) G. Blum, *et al.* Substrate competitive inhibitors of IGF-1 receptor kinase. *Biochemistry* **2000**, 39, 15705–15712.
27. a) G. Ahn, K. A. Resing, Cell biology. Lessons in rational drug design for protein kinases. *Science* **2005**, 308, 1266–1267.
b) M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science* **2005**, 308, 1318–1321.
28. E. A. Sausville, Protein kinase antagonists: interim challenges and issues. *Anticancer Drug Des.* **2000**, 15, 1–3.
29. W. Zachariae, Progression into and out of mitosis *Current Opinion in Cell Biology*, **1999**, 11, 708–716.
30. A. Zetterberg, O. Larson, K. G. Wiman, What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, 835.
31. M. Malumbres, M. Barbacid, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2001**, 1, 222–231.
32. M. Malumbres, M. Barbacid, Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, 30, 630–641.
33. M. A. Shah, G. K. Schwartz, Cyclin dependent kinases as targets for cancer therapy. *Upd. Canc. Ther.* **2006**, 1, 311–332.
34. D. G. Johnson, C. L. Walker, Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, 39, 295–312.
35. C. J. Sherr, Cancer Cell Cycles *Science* **1996**, 274, 1672–1677.
36. G. Johnson, J. K. Schwarz, W. D. Cress, J. R. Nevins, Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **1993**, 365, 349–352.
37. J.-C. Bourdon, p53 and its isoforms in cancer. *Br. J. Cancer* **2007**, 97, 277–282.
38. P. Kaldis, A. A. Russo, H. S. Chou, N. P. Pavletich, M. J. Solomon, Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol. Biol. Cell* **1998**, 9, 2545–2560.
39. R. T. Abraham, Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* **2001**, 15, 2177–2196.
40. Brooks, G., La Thangue, N. B. The cell cycle and drug discovery: the promise and the hope. *Drug Discov. Today* **1999**, 4, 455–463.

41. Schulze-Gahmen, U. et al. Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1995**, 22, 378–391.
42. I. Neant, P. Guerrier, 6-Dimethylaminopurine blocks starfish oocyte maturation by inhibiting a relevant protein kinase activity. *Exp. Cell Res.* **1988**, 176, 68–79.
43. W. F. De Azevedo, S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, S. H. Kim, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 243, 518 – 526.
44. J. Wesierska-Gadek, M. Gueorguieva, J. Wojciechowski, M. Horky Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: a comparison of the effects exerted by roscovitine and olomoucine. *Pol. J. Pharmacol.* **2004**, 56, 635–41.
45. E. Agbottah, C. de La Fuente, S. Nekhai, A. Barnett, A. Gianella-Borradori, A. Pumfery, F. Kashanchi. Antiviral activity of CYC202 in HIV-1-infected cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 3029–42.
46. a) J. J.- L. Liao Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors, *J. Med. Chem.* 2007, 50, 409-424.
b) 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.* 2007, 50, 409-424.
47. a) A. Zask, J. C. Verheijen, K. Curran, J. Kaplan, D. J. Richard, P. Nowak, D. J. Malwitz, N. Brooijmans, J. Bard, K. Svenson, J. Lucas, L. Toral-Barza, W. G. Zhang, I. Hollander, J. J. Gibbons, R. T. Abraham, S. Ayral-Kaloustian, T. S. Mansour, K. Yu, ATP-competitive inhibitors of the mammalian target of rapamycin: design and synthesis of highly potent and selective pyrazolopyrimidines. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5013–5016.
b) F. Popowycz, G. Fournet, C. Schneider, K. Bettayeb, Y. Ferandin, C. Lamigeon, O. M. Tirado, S. Mateo-Lozano, V. Notario, P. Colas, P. Bernard, L. Meijer, B. Joseph, Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 655–663.
c) D. A. Heathcote, H. Patel, S. H. Kroll, P. Hazel, M. Periyasamy, M. Alikian, S. K. Kanneganti, A. S. Jogalekar, B. Scheiper, M. Barbazanges, A. Blum, J. Brackow, A. Siwicki, R. D. Pace, M. J. Fuchter, J. P. Snyder, D. C. Liotta, P. S. Freemont, E. O. Aboagye, R. C. Coombes, A. G. 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.
d) D. S. Williamson, M. J. Parratt, J. F. Bower, J. D. Moore, C. M. Richardson, P. Dokurno, A. D. Cansfield, G. L. Francis, R. J. Hebdon, R.; Howes, P. S. Jackson, A. M. Lockie, J. B. Murray, C. L. Nunns, J. Powles, A. Robertson, A. E. Surgenor, C. J. Torrance, Structure-guided design of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines as inhibitors of human cyclin-dependent kinase 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 863–867.
e) C. M. Richardson, D. S. Williamson, M. J. Parratt, J. Borgognoni, A. D. Cansfield, P. Dokurno, G. L. Francis, R. Howes, J. D. Moore, J. B. Murray, A. Robertson, A. E. Surgenor, C. J. Torrance, Triazolo[1,5-a]pyrimidines as novel CDK2 inhibitors: protein structure- guided design and SAR. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1353–1357.
f) R. Jorda, L. Havlicek, I. McNae, M. D. Walkinshaw, A. Sturc J. Navratilova, M. Kuzma, M. Mistrik, J. Bartek, M. Strnad, V. Krystof, Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2980-2993.

48. N.Lougiakis, PhD Thesis, Athens 2008.
49. Pino, L.N., Zehrunge, W.S.III *J. Am. Chem. Soc.* (1955), 3154.
50. Burton et al. *Tetrahedron Lett.* (1971), 2211.
51. Roe, A., Seligman R. B., *J. Org. Chem.* **20** (1955), 1729-1731.
52. a) Marakos, P., Pouli, N., Wise, D. S., Townsend, L. B. *Synlett* (1997), 561-562.
b) Chapman D., Hurst J. *J. Chem. Soc. Perkin, Trans I*, **1980**, 2398.
53. Foster H. E., Hurst J., *J. Chem. Soc. Perkin, Trans I*, (1973), 2901.
54. J. C. Milhavet, A. Gueiffier, L. Bernal, J. C. Teulade, *Heterocycles*, **1999**, 51 (7), 1661-1667.
55. Ukai T., Kawazura H., Ishii Y., Bonnet J.J. and Ibers J.A. *J. Organomet. Chem.* **1974**, 65, 253-266.
56. Huang X., Anderson K.W., Zim D., Jiang L., Klapars A. and Buchwald S.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6653-6655.
57. Pijus K. Mandal and John S. McMurray *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6599-6601.
58. Maryam Mirza-Aghayan, Rabah Boukherroub and Mohammad Bolourtchian *Appl. Organometal. Chem.* **2006**, 20, 214-219.