

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ
ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΥΡΑΖΟΛΟΠΥΡΙΔΙΝΩΝ
ΚΑΙ ΠΥΡΙΔΟΠΥΡΑΖΙΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ**

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΠΑΠΑΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΙΘΑΚΗ

Σά βγείς στόν πηγαιμό γιά τήν Ιθάκη,
νά εύχεσαι νάναι μακρύς ο δρόμος,
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.
Τούς Λαιστρυγόνας καί τούς Κύκλωπας,
τόν θυμωμένο Ποσειδώνα μή φοβάσαι,
τέτοια στόν δρόμο σου ποτέ σου δέν θά βρείς,
άν μέν' η σκέψις σου υψηλή, άν εκλεκτή
συγκίνησης τό πνεύμα καί τό σώμα σου αγγίζει.

Τούς Λαιστρυγόνας καί τούς Κύκλωπας,
τόν άγριο Ποσειδώνα δέν θά συναντήσεις,
άν δέν τούς κουβανείς μές στήν ψυχή σου,
άν η ψυχή σου δέν τούς στήνει εμπρός σου.

Νά εύχεσαι νάναι μακρύς ο δρόμος.
Πολλά τά καλοκαιρινά πρωϊά νά είναι
πού μέ τί ευχαρίστησι, μέ τί χαρά
θά μπαίνεις σέ λιμένας πρωτοειδωμένους·
νά σταματήσεις σ' εμπορεία Φοινικικά,
καί τές καλές πραγμάτειες ν' αποκτήσεις,
σεντέφια καί κοράλλια, κεχριμπάρια κ' έβενους,
καί ηδονικά μυρωδικά κάθε λογής,
όσο μπορείς πιό άφθονα ηδονικά μυρωδικά·
σέ πόλεις Αιγυπτιακές πολλές νά πάς,
νά μάθεις καί νά μάθεις απ' τούς σπουδασμένους.

Πάντα στόν νού σου νάχεις τήν Ιθάκη.
Τό φθάσιμον εκεί είν' ο προορισμός σου.
Αλλά μή βιάζεις τό ταξείδι διόλου.
Καλλίτερα χρόνια πολλά νά διαρκέσει·
καί γέρος πιά ν' αράξεις στό νησί,
πλούσιος μέ όσα κέρδισες στόν δρόμο,
μή προσδοκώντας πλούτη νά σέ δώσει η Ιθάκη.

Η Ιθάκη σ' έδωσε τ' ωραίο ταξείδι.
Χωρίς αυτήν δέν θάβγαινες στόν δρόμο.
Άλλα δέν έχει νά σέ δώσει πιά.

Κι άν πτωχική τήν βρείς, η Ιθάκη δέν σέ γέλασε.
Έτσι σοφός πού έγινες, μέ τόση πείρα,
ήδη θά τό κατάλαβες η Ιθάκες τί σημαίνουν.

Κωνσταντίνος Π. Καβάφης

Αφιερώνεται στους γονείς μου Νίκο και Κατερίνα και στον αδερφό μου Δημήτρη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θέλω να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κο Παναγιώτη Μαράκο και στην Καθηγήτρια κα Νικολαΐδα Πουλή για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή πνευματική καθοδήγηση και επίβλεψη, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας και το ιδανικό εργασιακό περιβάλλον. Ευχαριστώ θερμά το τρίτο μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κο Ιωάννη Κωστάκη για τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια της διόρθωσης της Διατριβής, για τη βοήθειά του και για την τεχνογνωσία που μου προσέφερε σχετικά με τη διενέργεια χημικών αντιδράσεων με τη χρήση των μικροκυμάτων. Ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τους Καθηγητές κο Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη και κο Ανδρέα Τσοτίνη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Αγγελική Κουρουνάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή κο Ιωάννη Παπαναστασίου για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους κατά τη συγγραφή της Διατριβής. Ευχαριστώ τις ερευνητικές ομάδες του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ» και του ερευνητικού κέντρου «City of Hope» (City of Hope Comprehensive Cancer Center, Molecular Medicine, Beckman Research Institute, Duarte, CA, USA) για τη φαρμακολογική αξιολόγηση των παραγώγων της πυραζολοπυριδίνης και της πυριδοπυραζίνης αντίστοιχα. Επίσης, ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Μαρία Χαλαμπαλάκη, τους Διδάκτορες Job Tchoumtchoua και Vincent Brieudes και τον Υποψήφιο Διδάκτορα Σταύρο Μπετεινάκη για τη λήψη των φασμάτων Μάζας (MS). Ευχαριστώ τη Διδάκτορα κα Δήμητρα Μπενάκη για τις συμβουλές της στη λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κο Νικόλαο Λουγιάκη και όλα τα παιδιά του Εργαστηρίου για το φιλικό κλίμα και για την άριστη συνεργασία μας. Τέλος, εκφράζω από καρδιάς ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ και βαθιά ευγνωμοσύνη στους γονείς μου Νίκο και Κατερίνα και στον αδερφό μου Δημήτρη για την αγάπη και τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια...

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΑΚΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΝΙΚΟΛΑΪΣ ΠΟΥΛΗ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΩΣΤΑΚΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΑΚΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΝΙΚΟΛΑΪΣ ΠΟΥΛΗ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΛΕΞΙΟΣ-ΛΕΑΝΔΡΟΣ ΣΚΑΛΤΣΟΥΝΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΣΟΤΙΝΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΚΟΥΡΟΥΝΑΚΗ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΩΣΤΑΚΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΙΟΥ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	Σελ. 3
ABSTRACT.....	Σελ. 4
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	Σελ. 5
I.1 Πρόλογος.....	Σελ. 5
I.2 Αντικαρκινική θεραπεία.	
Παραδοσιακές προσεγγίσεις και σύγχρονες τάσεις.....	Σελ. 8
I.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου	Σελ. 10
I.4 Φαρμακευτική παρέμβαση σε θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες.	
Κυτταρική επικοινωνία και μεταγωγή σήματος	Σελ. 19
I.5 Ανακάλυψη και ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών	Σελ. 23
I.6 Δομή και λειτουργία πρωτεϊνικών κινασών	Σελ. 24
I.7 Κυτταρικός κύκλος και κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs)	Σελ. 32
I.8 Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints) και οι πρωτεϊνικές κινάσες ελέγχου Chk1 και Chk2.....	Σελ. 36
I.9 Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στην καρκινογένεση	Σελ. 37
I.10 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών	Σελ. 38
I.11 Φάρμακα που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές	Σελ. 51
I.12 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής.....	Σελ. 53
II. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	Σελ. 57
II.1 Πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνες	Σελ. 57
II.1A Μη υποκατεστημένα επί των θέσεων 3 και 7 παράγωγα (καρβοξαμιδίνες 17-22, 26-28, 35-40 και καρβοξαμίδια 29, 31-32, 41).....	Σελ. 57
II.1B 3-φαινυλοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (50-58)	Σελ. 82
II.1Γ 3-φαινυλο-7-αμινοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (67-84).....	Σελ. 91
II.2 Πυριδο[2,3- <i>b</i>]πυραζίνες	Σελ. 100
II.2A 3-αρυλαμινοϋποκατεστημένα παράγωγα ουρίας (100-110)	Σελ. 100

III. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	Σελ. 109
III.1 Πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνες	Σελ. 109
III.2 Πυριδο[2,3- <i>b</i>]πυραζίνες	Σελ. 120
IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	Σελ. 123
IV.1 Γενικά πειραματικά στοιχεία	Σελ. 123
IV.2 Πυραζολο[3,4- <i>c</i>]πυριδίνες	Σελ. 123
IV.2A Μη υποκατεστημένα επί των θέσεων 3 και 7 παράγωγα (καρβοξαμιδίνες 17-22, 26-28, 35-40 και καρβοξαμίδια 29, 31-32, 41).....	Σελ. 123
IV.2B 3-φαινυλοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (50-58).....	Σελ. 141
IV.2Γ 3-φαινυλο-7-αμινοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (67-84)	Σελ. 149
IV.3 Πυριδο[2,3- <i>b</i>]πυραζίνες.....	Σελ. 164
IV.3A 3-αρυλαμινοϋποκατεστημένα παράγωγα ουρίας (100-110).....	Σελ. 164
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σελ. 178

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σχεδιασμός και Σύνθεση Νέων Υποκατεστημένων Πυραζολοπυριδινών και Πυριδοπυραζινών και Μελέτη της Κυτταροτοξικής Δράσης τους

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή περιγράφεται ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης νέων υποκατεστημένων πυραζολοπυριδινών και πυριδοπυραζινών. Ως ενώσεις-οδηγοί χρησιμοποιήθηκαν γνωστοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών πουρινικής δομής, καθώς και παράγωγα που παρασκευάστηκαν πρόσφατα από την ερευνητική μας ομάδα και έδειξαν αξιόλογη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών.

Τα μόρια που συντέθηκαν διακρίνονται σε δύο ενότητες. Στην πρώτη ενότητα περιγράφονται παράγωγα της πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης, τα οποία φέρουν ή δεν φέρουν υποκαταστάτες στις θέσεις 1, 2, 3 και 7, ενώ η θέση 5 φέρει ποικιλία αρυλοκαρβοξυμιδαμιδο-υποκαταστατών. Στη δεύτερη ενότητα περιγράφονται παράγωγα της πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνης, τα οποία φέρουν ποικιλία αρυλαμινο-υποκαταστατών στις θέσεις 3 και 7.

Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των παραγώγων της πρώτης ενότητας χρησιμοποιήθηκε η 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνη, η οποία με σειρά χημικών αντιδράσεων οδήγησε στην 5-ακεταμιδο-2-χλωρο-4-μεθυλοπυριδίνη, που υπεβλήθη διαδοχικά σε διαζώτωση και ενδομοριακή κύκλωση, παρέχοντας την 5-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη. Το μόριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως κοινό ενδιάμεσο για τη σύνθεση των τελικών παραγώγων, που προέκυψαν μετά από υποκατάσταση του χλωρίου της θέσης 5 από κυανομάδα και στη συνέχεια από αρυλοκαρβοξυμιδαμιδομάδα, εισαγωγή φαινυλομάδας στη θέση 3 με εφαρμογή της αντίδρασης Suzuki και υποκατάσταση του χλωρίου της θέσης 7 από την εκάστοτε κατάλληλη αμίνη.

Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των παραγώγων της δεύτερης ενότητας χρησιμοποιήθηκε η 2-αμινο-6-μεθυλοπυριδίνη, η οποία με σειρά χημικών αντιδράσεων οδήγησε στην 3-χλωρο-6-μεθυλο-7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζίνη. Το μόριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως κοινό ενδιάμεσο για τη σύνθεση των τελικών παραγώγων, που προέκυψαν μετά από υποκατάσταση του χλωρίου από την εκάστοτε κατάλληλη ανιλίνη, αναγωγή και επίδραση του εκάστοτε κατάλληλου ισοκυανικού φαινυλεστέρα.

Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών. Σημαντικός αριθμός παραγώγων έδειξε αξιόλογη δραστηριότητα, παρουσιάζοντας τιμές IC₅₀ 0.64-12.8 μΜ.

ABSTRACT

Design, Synthesis and Study of Cytotoxic Activity of New Substituted Pyrazolopyridines and Pyridopyrazines

The present PhD Thesis deals with the design, synthesis and study of cytotoxic activity of new substituted pyrazolopyridines and pyridopyrazines. Purine analogues, which are established protein kinase inhibitors, were used as lead-compounds, as well as some derivatives previously synthesized by our research team, which demonstrated significant cytotoxic activity against several cancer cell lines.

The prepared compounds are divided into two groups. The first group includes derivatives of pyrazolo[3,4-*c*]pyridine, which bear or not substituents at the positions 1, 2, 3, 7 and a variety of arylcarboximidamido-substituents at the position 5. The second group includes derivatives of pyrido[2,3-*b*]pyrazine, which bear a variety of arylamino-substituents at the positions 3 and 7.

The preparation of the compounds of the first group was made using 2-amino-4-methylpyridine as starting material, which in a few steps led to 5-acetamido-2-chloro-4-methylpyridine. Then, through diazotation and ring closure the above mentioned pyridine was converted to the corresponding 5-chloro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine. This analogue was used as a common synthetic intermediate which upon substitution, application of a Suzuki-type coupling to result in the corresponding 3-phenyl analogue and substitution of position 7 by suitable amines, gave the target derivatives.

The preparation of the compounds of the second group was made using 2-amino-6-methylpyridine as starting material, which in a few steps led to 3-chloro-6-methyl-7-nitropyrido[2,3-*b*]pyrazine. This analogue was used as a common synthetic intermediate which upon substitution, reduction and reaction with suitable phenyl isocyanates, gave the target derivatives.

The new compounds have been evaluated for their cytotoxic activity against several cancer cell lines. A number of the derivatives proved to be active, showing IC₅₀ values within the range of 0.64-12.8 μM.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1 Πρόλογος

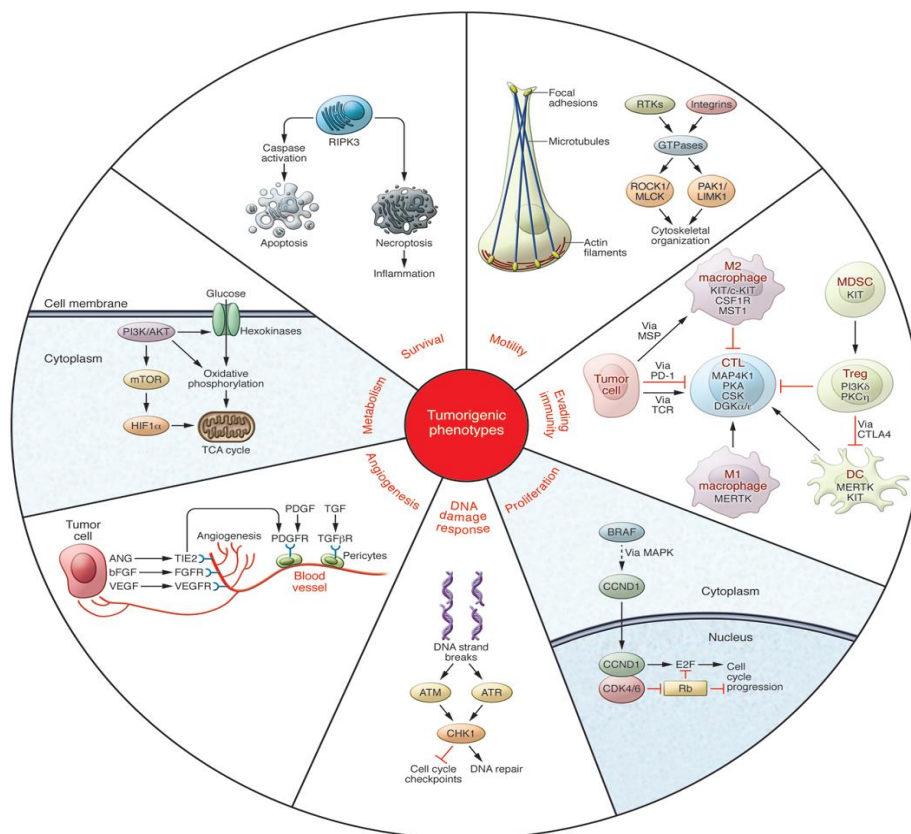
Η προσπάθεια για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων και νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση ασθενειών είναι σήμερα εντατικότερη από ποτέ. Η ενίσχυση της ερευνητικής προσπάθειας σε διεθνές επίπεδο, σε συνδυασμό με τη βελτίωση των διαθέσιμων εργαλείων συνέβαλλε στον εμπλουτισμό των γνώσεών μας, για μία καλύτερη, αν και όχι ακόμα πλήρη κατανόηση του παθοφυσιολογικού υποβάθρου των ασθενειών, σε κυτταρικό και σε μοριακό επίπεδο. Η Φαρμακευτική Χημεία, η Φαρμακολογία και ευρύτερα οι Βιολογικές Επιστήμες πρωτοστατούν στις επίπονες, πολυπαραγοντικές και πολυεπίπεδες διαδικασίες ανακάλυψης και ανάπτυξης νέων φαρμάκων.¹

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων έχει παραδοσιακά βασιστεί στη λεγόμενη «μη κατευθυνόμενη» προσέγγιση, η οποία συνίσταται αφενός στην εμπειρική παρατήρηση των φαρμακολογικών επιδράσεων δραστικών ενώσεων, προερχόμενων συνήθως από φυσικά προϊόντα και αφετέρου στον προσδιορισμό, την απομόνωση, τον καθαρισμό και τη βελτιστοποίηση των πλέον δραστικών εξ αυτών, ώστε μέσω κατάλληλων χημικών τροποποιήσεων, να αναπτυχθούν περαιτέρω ως φάρμακα. Η συντριπτική πλειοψηφία των φαρμάκων που έχουν κυκλοφορήσει στο εμπόριο μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί βάσει της συγκεκριμένης προσέγγισης, η οποία εξακολουθεί να είναι επίκαιρη και σημαντική. Τα φάρμακα αυτά αποτελούν μέχρι σήμερα τη βάση όλων των χημειοθεραπευτικών σχημάτων. Παράλληλα όμως, η διαρκώς διογκούμενη γνώση μας πάνω στους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που ευθύνονται για τις ανθρώπινες ασθένειες, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη πληθώρας πειραματικών εργαλείων, που επιτρέπουν την παρακολούθηση των επιδράσεων των υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, έχουν καταστήσει δυνατή την ανάπτυξη καινοτόμων, κατευθυνόμενων προσεγγίσεων στο σχεδιασμό και τη χημική σύνθεση νέων «στοχευμένων» δραστικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή νέων συνθετικών μεθόδων και τεχνικών διαχωρισμού, η πρόοδος των μεθόδων ταυτοποίησης νέων μορίων, η δυνατότητα εκτέλεσης κρυσταλλογραφικών δομών υψηλής ευκρίνειας, καθώς και μελετών μοριακής προσομοίωσης, αποτελούν σημαντικά βήματα της βασικής έρευνας για την ανακάλυψη νέων ενώσεων, ικανών να αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς στόχους που διαδραματίζουν καίριο ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Αυτό επιτρέπει την εξειδίκευση της δράσης, με αποτέλεσμα ισχυρή θεραπευτική δράση και λιγότερες παρενέργειες. Για την περαιτέρω ανάπτυξη μίας τέτοιας δραστικής ένωσης εφαρμόζεται η συνήθης πρακτική, που εμπλουτίζεται συνεχώς με ορισμένες πιο επεξεργασμένες προσεγγίσεις, όπως η σύνθεση αναλόγων προηγουμένως επικυρωμένων δραστικών ενώσεων (analogue synthesis), ο

σχεδιασμός μορίων βάσει της μοριακής δομής της πρωτεΐνης-στόχου (structure-based design) και η ανακάλυψη νέων μορίων μέσω συνδυασμού των δραστικών τμημάτων άλλων, επικυρωμένων δραστικών ουσιών (fragment-based discovery).

Παράλληλα, η αύξηση του αριθμού και η βελτιστοποίηση των μεθόδων για *in vitro* δοκιμές, η ανακάλυψη διαφόρων νέων μοντέλων πειραματοζώων για την πληρέστερη φαρμακολογική αξιολόγηση των νέων ενώσεων, η συστηματικότερη εξαγωγή ποιοτικών και ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης, η δυνατότητα μελέτης των εμπλεκόμενων μεταβολικών διεργασιών, καθώς και ο εμπλουτισμός των θεραπευτικών στόχων συνεισφέρουν επίσης στη διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων, που βασιζόμενη πλέον σε πληθώρα δεδομένων, μοιάζει σήμερα ορθολογικότερη από ποτέ. Παρόλα αυτά, ο αριθμός των νέων μορίων που εισέρχονται στις χρονοβόρες φάσεις των κλινικών μελετών είναι περιορισμένος και ακόμη πιο περιορισμένος είναι ο αριθμός των ενώσεων που τελικά θα πάρουν έγκριση να κυκλοφορήσουν ως φάρμακα.²

Σε ό,τι αφορά ασθένειες σύνθετες, ετερογενείς και πολυπαραγοντικές, όπως ο καρκίνος, η αναγκαιότητα για ανάπτυξη στοχευμένων φαρμάκων είναι έκδηλη, καθώς οι κοινές, διαθέσιμες θεραπείες παραδοσιακά βασίζονται στη χορήγηση μη εξειδικευμένων κυτταροτοξικών φαρμάκων, που καταστέλλουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες, προκαλώντας σοβαρότατες παρενέργειες και καθιστώντας την πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης των ασθενών ουσιαστικά αδύνατη. Η ερευνητική δραστηριότητα των τελευταίων ετών ανέδειξε τη σημασία του χαρακτηρισμού του ακριβούς τύπου της νόσου και την πολυπλοκότητα των μηχανισμών καρκινογένεσης σε κυτταρικό επίπεδο, με την εμπλοκή πλήθους διαταραχών, που οδηγούν στη σημαντική τροποποίηση θεμελιωδών φυσιολογικών λειτουργιών, όπως η κυτταρική διαίρεση, η μεταβολική δραστηριότητα και η ικανότητα επιβίωσης, που χαρακτηρίζουν το σχηματισμό και τη διατήρηση του καρκινικού φαινότυπου (Εικόνα I.1).³



Εικόνα 1.1 Η εμπλοκή σηματοδοτικών μονοπατιών στις λειτουργίες του καρκινικού φαινότυπου

Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών καρκινογένεσης έχει οδηγήσει στην κατανόηση του ρόλου αρκετών κυτταρικών μονοπατιών στην παθογένεια του καρκίνου και έχει αποκαλύψει πληθώρα φαρμακευτικών στόχων, δυνητικά χρήσιμων για την κατευθυνόμενη ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών θεραπειών. Στην ανακάλυψη και επικύρωση τέτοιων στόχων έχει συντελέσει τα τελευταία χρόνια η πρόοδος της γονιδιωματικής και ειδικότερα της ογκογονιδιωματικής, που αποβλέπει στην ταυτοποίηση του συνόλου των γονιδίων που ενέχονται στους μηχανισμούς καρκινογένεσης, αλλά και της φαρμακογονιδιωματικής, η οποία επιδιώκει περαιτέρω τη χαρτογράφηση και το λειτουργικό χαρακτηρισμό των παραλλαγών του γονιδιώματος που επηρεάζουν τη φαρμακολογική ανταπόκριση των ασθενών στις στοχευμένες θεραπείες. Άλλοι, ραγδαία εξελισσόμενοι επιστημονικοί και τεχνολογικοί κλάδοι, όπως της δομικής και χημικής βιολογίας, της βιοπληροφορικής, της πρωτεομικής, της βιολογίας συστημάτων, της κυτταρικής απεικόνισης, αλλά και της συνδυαστικής χημείας, διαδραματίζουν επίσης ρόλο στην ταυτοποίηση και επικύρωση νέων φαρμακευτικών στόχων, στον κατευθυνόμενο σχεδιασμό και τη σύνθεση φαρμακευτικών μορίων, καθώς και στην πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης, με βάση τις τυχόν ιδιαιτερότητες του στόχου και το γενετικό προφίλ του όγκου. Έτσι, ανάλογα με τη μορφή του καρκίνου, αξιολογείται η δυνατότητα φαρμακευτικής επέμβασης σε συγκεκριμένους μοριακούς στόχους, με σκοπό την αύξηση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής του ασθενούς.³ Η συσσώρευση όλης

αυτής της γνώσης έχει καταστήσει έκδηλη την ανάγκη για καταγραφή των μοριακών παραμέτρων των όγκων σε κλινικό επίπεδο, ειδικά εφόσον αυτές επηρεάζουν την ανταπόκριση στη θεραπεία με κάποιο στοχευμένο αντικαρκινικό φάρμακο.

Στα πλαίσια αυτών των προσπαθειών, οι πρωτεϊνικές κινάσες έχουν εδραιωθεί ως δημοφιλείς στόχοι για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων, με περίπου 30 από τα 518 χαρακτηρισμένα μέλη της οικογένειας να αποτελούν επικυρωμένους στόχους των ήδη εγκεκριμένων από τον FDA ογκολογικών φαρμάκων αυτής της κατηγορίας μικρομοριακών αναστολέων,⁴ όπως και πληθώρας άλλων, που έχουν φθάσει μέχρι σήμερα σε κλινικό στάδιο ανάπτυξης. Η επιτυχία αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τη δράση πρωτεϊνικών κινασών, που αποτελούν πρωτογενείς αιτιολογικούς παράγοντες των συγκεκριμένων τύπων καρκίνου. Η μελέτη των μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης, που φυσιολογικά λειτουργούν με αυστηρή ρύθμιση της δραστηριότητας πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών, απέδειξε ότι στα καρκινικά κύτταρα η λειτουργία των εμπλεκόμενων ενζύμων απορρυθμίζεται, μέσω της συσσώρευσης σωματικών μεταλλάξεων ή γονιδιωματικών ανακατατάξεων, που οδηγούν σε υπερέκφραση των γονιδίων τους ή σε ιδιοσυστατική ενεργότητα φωσφορυλίωσης των υποστρωμάτων τους. Η κυκλοφορία των νέων φαρμάκων βασίστηκε στην εμφάνιση σαφούς κλινικού αποτελέσματος, έναντι των παλαιότερων θεραπειών και μάλιστα σε υποσύνολα ασθενών, που επιλέγονται στη βάση μοριακών στόχων. Ωστόσο, η αποδοτικότητα αυτών των στοχευμένων θεραπειών ποικίλει μεταξύ των ασθενών, γεγονός που εξαρτάται είτε από την παρουσία μεταλλαγών στο ογκογονίδιο-στόχο, είτε από άλλους ενδογενείς κυτταρικούς παράγοντες. Οι ογκολόγοι εκτιμούν ότι το κεφάλαιο της κλινικής αποτελεσματικότητας αυτών των φαρμάκων βρίσκεται ακόμα στην αρχή του. Η εμπειρία περίπου δύο δεκαετιών κλινικής εφαρμογής ανέδειξε το μείζον θέμα της ανάπτυξης αντοχής εκ μέρους των καρκινικών κυττάρων, οι μηχανισμοί της οποίας μελετώνται εκτενώς. Σε πολλές περιπτώσεις αποδείχθηκε εφικτός ο σχεδιασμός μίας επόμενης γενιάς φαρμάκων, δραστικών στα φαρμακοάντοχα κύτταρα, ενώ μελετάται εκτεταμένα η σύνθεση των συνδυαστικών σχημάτων.

Πρακτικά, η εφαρμογή όλων των σύγχρονων προσεγγίσεων σχεδιασμού και ανάπτυξης στοχευμένων αντικαρκινικών μορίων αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα σημαντικό πεδίο δραστηριότητας για την ανακάλυψη ενζυμικών αναστολέων, που θα χρησιμεύσουν ως νέα, στοχευμένα ογκολογικά φάρμακα.

1.2 Αντικαρκινική θεραπεία. Παραδοσιακές προσεγγίσεις και σύγχρονες τάσεις

Ο καρκίνος αποτελεί σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας, καθώς στον ανεπτυγμένο κόσμο αποτελεί τη δεύτερη σε συχνότητα αιτία θανάτου, μετά από τις

καρδιαγγειακές παθήσεις, ενώ σύντομα αναμένεται να αποβεί η συχνότερη αιτία θανάτου. Η ασθένεια αυτή εμφανίζεται ως αποτέλεσμα μίας προοδευτικής συσσώρευσης γενετικών παρεκκλίσεων και επιγενετικών αλλαγών, που επιτρέπουν την παρέκκλιση από τους κανονικούς κυτταρικούς και περιβαλλοντικούς ελέγχους, με αποτέλεσμα τα κύτταρα σε κάποιο σημείο του σώματος να αυξάνονται ανεξέλεγκτα. Στα νεοπλασματικά κύτταρα παρατηρούνται πολυάριθμες επίκτητες γενετικές ανωμαλίες, όπως ανευπλοειδία, χρωμοσωμικές αναδιοργανώσεις, διαγραφές, αναδιοργανώσεις γονιδίων και μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα την απώλεια ή την ενίσχυση κάποιας λειτουργίας τους. Πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει τη σημασία των επιγενετικών αλλαγών σε ορισμένα γονίδια, που οδηγούν στην αδρανοποίηση των λειτουργιών τους. Αυτές οι παρεκκλίσεις οδηγούν σε ανώμαλη συμπεριφορά, κοινή για όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα: ακανόνιστη αύξηση, γενετική αστάθεια και ροπή για τη μετάσταση.

Ιδανικός στόχος της αντικαρκινικής θεραπείας είναι η εξάλειψη της νόσου, με την ελάχιστη δυνατή διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Σε κυτταρικό επίπεδο αυτό μεταφράζεται στην εκλεκτική εξάλειψη των μεταλλαγμένων κυττάρων καρκινικού φαινότυπου, χωρίς να επηρεάζεται η επιβίωση των φυσιολογικών. Το αποτέλεσμα της εφαρμοζόμενης μέχρι σήμερα θεραπείας κρίνεται 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 πλειοψηφία των παλαιότερων ογκολογικών φαρμάκων ασκεί κυτταροτοξική δράση μέσω αναστολής της σύνθεσης του DNA. Κατά συνέπεια, είναι τοξικά για όλα τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση διαίρεσης, χωρίς να διαθέτουν κάποιου είδους εκλεκτικότητα. Μαζί με τα καρκινικά καταστρέφονται και ταχέως διαιρούμενα υγιή κύτταρα, γεγονός που αυξάνει τις τοξικές παρενέργειες και περιορίζει την αποτελεσματικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων στην κλινική πρακτική. Βελτιώσεις των ιδιοτήτων τους μπορεί να προκύψουν μέσω της διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών της κυτταροτοξικής δράσης τους, σε αντιδιαστολή με τους τρόπους ανάπτυξης των παρενεργειών και σε συνδυασμό με μελέτες σχέσεων δομής-δράσης, για κάθε κατηγορία. Επίσης, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι σημαντικές διαφοροποιήσεις που παρουσιάζουν τα υποσύνολα των καρκινικών κυττάρων και αφορούν τη μορφολογία, το ρυθμό ανάπτυξης, την ικανότητα μετάστασης και την ανταπόκριση στο φάρμακο. Συνέπεια της απουσίας εκλεκτικότητας είναι το γεγονός ότι η χημειοθεραπεία αυτή συχνά συνοδεύεται από σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως μεταλλάξεις και μυελοτοξικότητα. Η περιορισμένη εκλεκτικότητα αυτών των φαρμάκων ανέδειξε τη σημασία γνώσης του βιολογικού υποβάθρου, της ταυτοποίησης συγκεκριμένων (ογκο)γονιδίων και των εμπλεκόμενων μονοπατιών μεταγωγής του σήματος και τη συσχέτιση τους με συγκεκριμένες καρκινογενετικές

διεργασίες και δυσλειτουργίες του καρκινικού κυττάρου, ανάλογα με τον τύπο της ασθένειας. Η ερευνητική προσπάθεια προσανατολίζεται σε μοριακούς στόχους που σχετίζονται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και διαδικασίες που σχετίζονται με την απόπτωση, την αγγειογένεση και την ικανότητα μετάστασης.⁵ Αναδεικνύονται συνεχώς νέοι δυνητικοί στόχοι, χρήσιμοι για το σχεδιασμό εξειδικευμένων αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα νεότερα φάρμακα χαρακτηρίζονται πράγματι από μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και μικρότερη τοξικότητα, όμως παραμένει και μάλιστα ενισχύεται το πρόβλημα της ανάπτυξης αντοχής εκ μέρους των καρκινικών κυττάρων, που οδηγεί συχνά σε αποτυχία μία αρχικά επιτυχημένη φαρμακευτική αγωγή. Η μελέτη των συνδυαστικών χημειοθεραπευτικών σχημάτων και η προσθήκη καινοτόμων φαρμάκων αναμένεται να αυξήσει τελικά την αποτελεσματικότητα της θεραπείας του καρκίνου, που προς το παρόν δεν είναι ικανοποιητική.

1.3 Θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι αντιμετώπισης του καρκίνου, που εξελίσσονται στη βάση όλων των νέων δεδομένων, ενώ αναπτύσσονται και βελτιώνονται συνεχώς και οι διαθέσιμες θεραπευτικές τεχνικές. Συχνά, η χρήση μίας μόνο μεθόδου δεν είναι επαρκής για την πλήρη ίαση, αφού όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο καρκίνος είναι πολυπαραγοντική και ετερογενής νόσος. Ο συνδυασμός των μεθόδων που εφαρμόζεται σε κάθε περιστατικό εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου, το εστιακό του σημείο και το στάδιο εξέλιξής του. Επιπλέον, πρέπει να συνεκτιμάται και η εν γένει κατάσταση του ασθενούς, προκειμένου να ληφθεί η ορθότερη απόφαση για τη δυνητικά πιο ελπιδοφόρα θεραπευτική αντιμετώπιση. Παρακάτω παρατίθενται οι συνηθέστερες μέθοδοι αντικαρκινικής θεραπείας.

α) Χειρουργική επέμβαση

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις χειρουργήσιμων στερεών όγκων. Πολλές φορές, σε καρκίνους που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο, επιτυγχάνεται πλήρης ίαση. Επιπλέον, η χειρουργική επέμβαση εξασφαλίζει τη δυνατότητα λήψης δείγματος βιοψίας, ώστε να γίνει ακριβής εκτίμηση του σταδίου εξέλιξης του αφαιρούμενου όγκου από τις απαραίτητες ιστολογικές εξετάσεις.

β) Ακτινοθεραπεία

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για περισσότερα από 100 χρόνια και περιλαμβάνει την τοπική εφαρμογή ιονίζουσας ακτινοβολίας που καταστρέφει τον καρκινικό όγκο,

οδηγώντας σε θάνατο τα καρκινικά κύτταρα. Στο 50% τουλάχιστον των περιπτώσεων συνδυάζεται με χειρουργική επέμβαση ή/και χημειοθεραπεία, ενώ εφαρμόζεται και για την ανακούφιση από τα συμπτώματα του καρκίνου. Επιπλέον, χρησιμοποιείται μετά από τη χειρουργική αφαίρεση των καρκινικών όγκων, ως ενισχυτική θεραπεία, στοχεύοντας στην αποφυγή επανεμφάνισης της νόσου. Σε καρκίνους που είναι εστιασμένοι σε ένα μόνο σημείο του σώματος, όπως του εγκεφάλου και του οισοφάγου, μπορεί να εφαρμοστεί ως μονοθεραπεία.

γ) Ανοσοθεραπεία

Στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των καρκινικών κυττάρων εντοπίζονται διάφορα καρκινικά αντιγόνα, τα οποία προκαλούν απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. Με την ανοσοθεραπεία ενεργοποιείται η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να επιτεθεί στα καρκινικά αντιγόνα (ενεργητική ανοσοθεραπεία). Σε άλλες περιπτώσεις, η ήδη υπάρχουσα ανοσολογική απόκριση ενισχύεται με τη χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων, λεμφοκυττάρων και κυτοκινών, όπως ιντερφερόνες και ιντερλευκίνες (παθητική ανοσοθεραπεία).⁶

δ) Ορμονοθεραπεία

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων, όπως του προστάτη, του μαστού, του ενδομητρίου και των επινεφριδίων. Συγκεκριμένα, ο στόχος είναι το ενδοκρινικό σύστημα και η εξωγενής χορήγηση στεροειδών ορμονών ή φαρμάκων που αναστέλλουν την παραγωγή και τη δράση των ορμονών αυτών. Οι στεροειδείς ορμόνες επάγουν τη γονιδιακή έκφραση, επομένως η μείωση των επιπέδων τους στο αίμα ή η αναστολή της δράσης τους μπορεί να οδηγήσει σε καθυστέρηση της εξέλιξης του καρκίνου, ή ακόμα και στο θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η χειρουργική αφαίρεση των εμπλεκόμενων ενδοκρινών αδένων μπορεί να λειτουργήσει βοηθητικά στην ορμονοθεραπεία.

ε) Χημειοθεραπεία

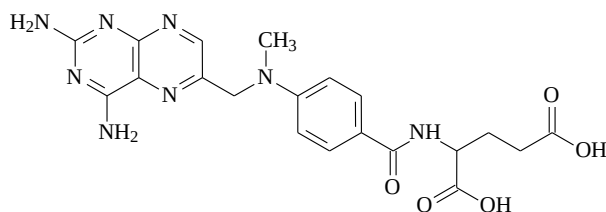
Ο όρος αναφέρεται στη χορήγηση ογκολογικών φαρμάκων. Πρόκειται για την πλέον χρησιμοποιούμενη θεραπευτική μέθοδο, η αποτελεσματικότητα της οποίας εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο εξέλιξής του.⁷ Σε συνδυασμό με τη χειρουργική επέμβαση επιδεικνύει πολύ καλά αποτελέσματα σε καρκίνους του μαστού, του εντέρου, του παγκρέατος, των όρχεων, των ωοθηκών και του πνεύμονα. Ως μονοθεραπεία είναι αρκετά αποτελεσματική σε διάφορους τύπους λευχαιμίας,^{8,9} ενώ υστερεί σε καρκίνους του εγκεφάλου,¹⁰ και στο μελάνωμα.¹¹ Σε περιπτώσεις που δεν μπορεί να παρέχει πλήρη ίαση, η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται για την

ελάττωση του μεγέθους ενός καρκινικού όγκου και για την ανακούφιση εκ των συμπτωμάτων της νόσου.

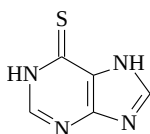
Οι κυριότερες κατηγορίες των εν χρήσει χημειοθεραπευτικών φαρμάκων έχουν ως στόχο το DNA και τα ένζυμα που σχετίζονται με τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων. Αν και πρόκειται για φάρμακα που συχνά διακρίνονται από σύνθετο τρόπο δράσης, κατατάσσονται σε κατηγορίες, ανάλογα με τον κύριο μηχανισμό δράσης τους.

- **Αντιμεταβολίτες**

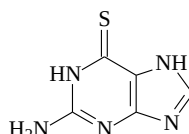
Τα φάρμακα αυτά παρεμβαίνουν στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων, μέσω αναστολής της παραγωγής των δομικών τους στοιχείων άμεσα (αναστολή αναβολισμού νουκλεοτιδίων), έμμεσα (ανταγωνισμός των ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση νουκλεοτιδίων) ή μέσω ενσωμάτωσης στα νουκλεϊκά οξέα. Διακρίνονται περαιτέρω σε τρεις υποκατηγορίες: ανταγωνιστές του φολικού οξέος (Μεθοτρεξάτη), ανάλογα πουρινών (6-Μερκαπτοπουρίνη (6-MP) και 6-Θειογουανίνη (6-TG)) και ανάλογα πυριμιδινών (5-Φθοροουρακίλη (5-FU) και Κυταραβίνη (ara-C)).



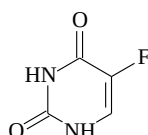
Methotrexate



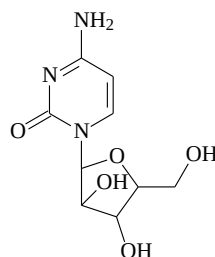
6-MP



6-TG



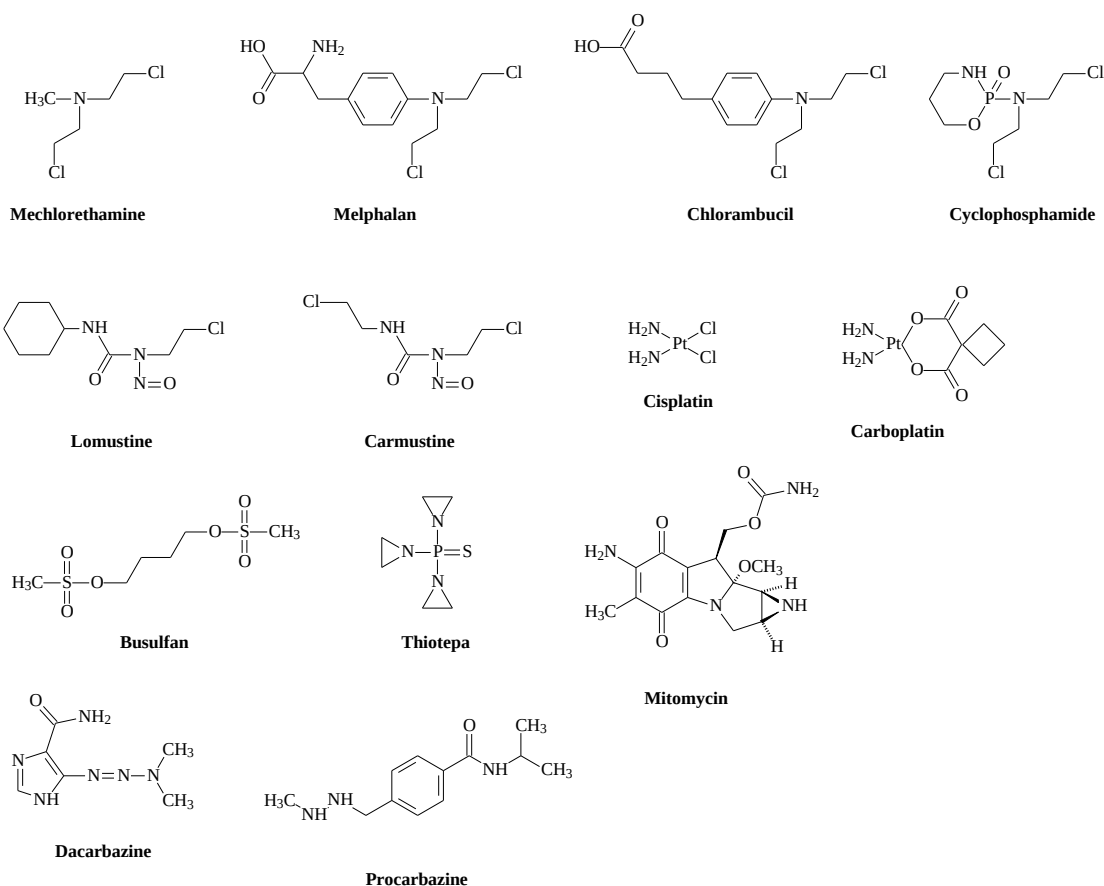
5-FU



ara-C

- **Αλκυλιωτικοί παράγοντες**

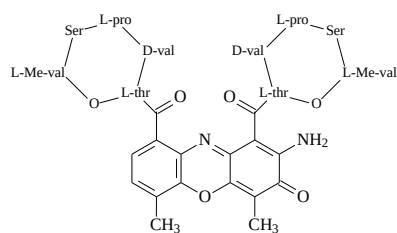
Τα φάρμακα αυτά προκαλούν αλκυλίωση σε πυρηνόφιλες ομάδες των νουκλεϊκών οξέων (N-7 της γουανίνης), ή σε μόρια πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας φαρμάκων είναι οι μουστάρδες αζώτου (Μεχλωραιθαμίνη, Μελφαλάνη, Χλωραμπουκίλη και Κυκλοφωσφαμίδιο), οι νιτροζουρίες (Λομουστίνη και Καρμουστίνη), ενώσεις του λευκόχρυσου, που σχηματίζουν μη αντιστρεπτούς δεσμούς Pt-N με τις βάσεις των νουκλεϊκών οξέων (Σισπλατίνη και Καρβοπλατίνη) και διάφοροι άλλοι αλκυλιωτικοί παράγοντες, όπως αλκυλοσουλφονικοί εστέρες (Μπουσουλφάνη), αζιριδίνες (Θειοτέπα και Μιτομυκίνη) και παράγοντες που προκαλούν μεθυλίωση (Δακαρβαζίνη και Προκαρβαζίνη).



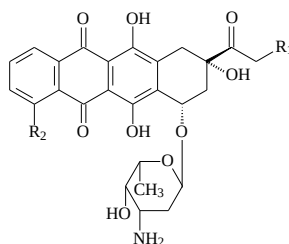
- **Φάρμακα που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με το DNA, χωρίς να συνδέονται με ομοιοπολικό δεσμό**

Πρόκειται για παράγοντες ενδοπαρεμβολής και αναστολείς ενζύμων, που αλληλεπιδρούν με τα νουκλεϊκά οξέα μέσω δεσμών υδρογόνου, δεσμών Wan der Waals, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ή ηλεκτροστατικών δεσμών, προκαλώντας μεταβολές στη δομή και τη λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων, που οδηγούν το

κύτταρο σε απόπτωση. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά (Δακτινομυκίνη και Μπλεομυκίνη), οι ανθρακυκλίνες και η Μιτοξαντρονή. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων εκδηλώνεται η κυτταροτοξικότητα αυτών των ενώσεων δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα γνωστά στοιχεία, η δραστηριότητά τους εξαρτάται και είναι άμεση συνέπεια της διευθέτησης του επίπεδου αρωματικού τους συστήματος ανάμεσα στις έλικες του DNA.



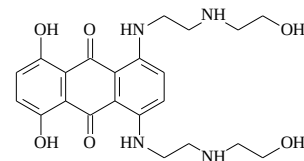
Dactinomycin (Actinomycin D)



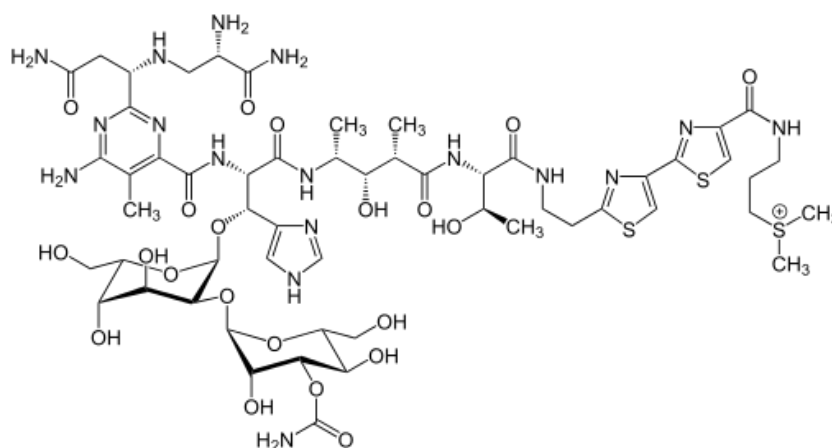
Doxorubicin: R₁=OH
R₂=OCH₃

Daunorubicin: R₁=H
R₂=OCH₃

Idarubicin: R₁, R₂=H



Mitoxantrone

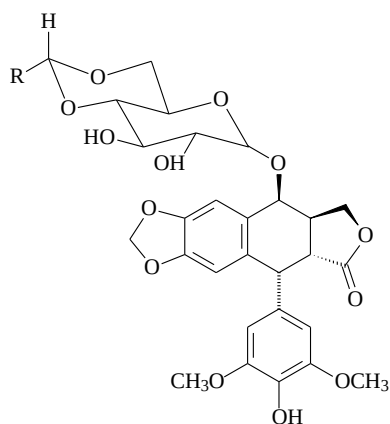


Bleomycin

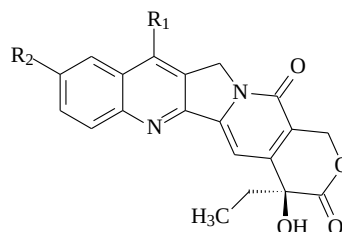
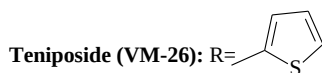
- **Αναστολείς της κυτταρικής διαίρεσης**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναστολείς της λειτουργίας των τοποϊσομερασών, που προκαλούν αντιστρεπτή σχάση σε συγκεκριμένα τμήματα του ενός ή και των δύο κλώνων του DNA, έτσι ώστε να επιτραπεί η αντιγραφή, ο ανασυνδυασμός, ή η μεταγραφή του (επιποδοφυλλοτοξίνες, Καμπτοθεκίνη και

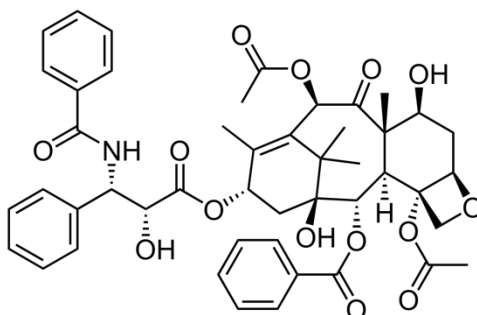
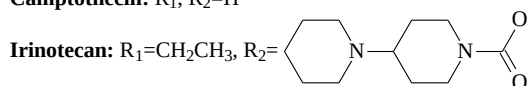
Ιρινοτεκάνη) και οι αναστολείς της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων (αλκαλοειδή της *Vinca* και Πακλιταξέλη).



Etoposide (VP-16): R=CH₃



Camptothecin: R₁, R₂=H



Paclitaxel

Οι νεότερες αντικαρκινικές θεραπείες είναι ως επί το πλείστον στοχευμένες. Πρόκειται για θεραπευτικά μέσα, τα οποία κατευθύνονται σε συγκεκριμένους στόχους εντός του καρκινικού κυττάρου, παρεμβαίνοντας στην καρκινογένεση ή εμποδίζοντας την ανάπτυξη του όγκου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναστολείς κινάσων και άλλων κυτταρικών ενζύμων, οι επαγωγείς κυτταρικής διαφοροποίησης, οι αναστολείς ειδικών υποδοχέων, καθώς και οι αναστολείς της αγγειογένεσης.

Εκτός των καθιερωμένων μεθόδων αντικαρκινικής θεραπείας, αναπτύσσονται και άλλες, οι οποίες βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο. Παρακάτω παρατίθενται μερικές από τις νέες αυτές μεθόδους.

στ) Μικροοργανισμοί

Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν μελετηθεί για την αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρησιμοποίηση του βακτηρίου *Corynebacterium parvum* στον καρκίνο των ωοθηκών. Πιθανολογείται ότι η δράση του οφείλεται στην προκαλούμενη αύξηση της συγκέντρωσης των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων.¹²

ζ) Ένζυμα

Η ασπαραγινάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη μετατροπή του αμινοξέος ασπαραγίνης σε ασπαρτικό οξύ και αμμωνία. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται στη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και του λεμφώματος non-Hodgkin. Τα εν λόγω καρκινικά κύτταρα έχουν χαμηλά επίπεδα ασπαραγίνης, η οποία είναι απαραίτητη για την ανάπτυξή τους και συνεπώς πρέπει να τη λαμβάνουν από εξωγενείς πηγές. Αντίθετα, τα υγιή κύτταρα βιοσυνθέτουν την ποσότητα της ασπαραγίνης που χρειάζονται.¹³ Με τη χορήγηση ασπαραγινάσης τα επίπεδα ασπαραγίνης μειώνονται στον οργανισμό, με αποτέλεσμα να σταματά η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, χωρίς ταυτόχρονα να επηρεάζεται σημαντικά η λειτουργία των φυσιολογικών κυττάρων.¹⁴

η) Ιντερφερόνες

Η συνδυαστική θεραπεία με χορήγηση ιντερφερόνης, συμπληρωματικά με άλλα φάρμακα ή ακτινοβολία, εφαρμόζεται σε λευχαιμίες, λεμφώματα και μελανώματα.^{15,16} Οι ιντερφερόνες είναι γλυκοπρωτεΐνες και ανήκουν στην κατηγορία των κυτοκινών. Συντίθενται από τα κύτταρα ως αποτέλεσμα ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού στην παρουσία διαφόρων ξενιστών, αλλά και νεοπλασματικών κυττάρων.^{17,18} Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 20 διαφορετικές ιντερφερόνες, που κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, τις α, β και γ. Οι ιντερφερόνες α είναι οι πλέον μελετημένες για αντικαρκινική θεραπεία, αλλά ο μηχανισμός δράσης τους παραμένει άγνωστος.¹⁵ Υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι έχουν διπλή δράση, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και επάγοντας ταυτόχρονα την παραγωγή των μακροφάγων. Οι ιντερφερόνες α χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του σαρκώματος Kaposi,¹⁹ καθώς και σε καρκίνους ωοθηκών,²⁰ παγκρέατος²¹ και εντέρου²² σε συνδυασμό με συμβατική φαρμακευτική αγωγή.

θ) Ιντερλευκίνες

Οι ιντερλευκίνες ανήκουν στην κατηγορία των κυτοκινών. Είναι φυσιολογικές πρωτεΐνες του οργανισμού και ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση

και τη λειτουργία των T- και B-λεμφοκυττάρων, καθώς και άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 36 διαφορετικές ιντερλευκίνες, που μελετώνται μεταξύ άλλων και για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου.²³

ι) Παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF)

Με αυτόν τον όρο καλείται ένα σύνολο κυτοκινών, που επάγουν την κυτταρική απόπτωση. Διαταραχές στην παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών ευθύνονται για την εμφάνιση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου.²⁴ Ο TNF-α είναι η πλέον μελετημένη κυτοκίνη για αντικαρκινική θεραπεία. Χρησιμοποιείται ως τοπική θεραπεία σε προχωρημένα σαρκώματα μαλακών ιστών και σε μεταστατικά μελανώματα, αλλά μελετάται η εφαρμογή του και σε άλλους τύπους καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι αν χορηγηθεί σε συνδυασμό με φαρμακευτική αγωγή, η αποπτωτική του δράση στα καρκινικά κύτταρα ενισχύεται, ενώ ως μονοθεραπεία δεν παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα.²⁵ Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι βοηθά στην αύξηση της συγκέντρωσης των αντικαρκινικών φαρμάκων στους πάσχοντες ιστούς.^{26,27}

ια) Προφάρμακα και τεχνικές στόχευσης των φαρμάκων

Σήμερα, αναπτύσσονται και μελετώνται τεχνικές που αποσκοπούν στην όσο το δυνατόν ακριβέστερη στόχευση των φαρμάκων στην περιοχή των καρκινικών κυττάρων και στην ενεργοποίησή τους όταν βρεθούν σε αυτήν την περιοχή. Μία μέθοδος, που βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο, είναι η ενεργοποίηση μη τοξικών προφαρμάκων στην περιοχή των καρκινικών κυττάρων, μέσω ακτινοβολίας με συγκεκριμένο μήκος κύματος.²⁸

Άλλη μέθοδος είναι η συμπλοκοποίηση αντικαρκινικών φαρμάκων με αντισώματα.²⁹⁻

³¹ Τα σύμπλοκα αυτά είναι σχεδιασμένα ώστε να στοχεύουν και να καταστρέφουν αποκλειστικά τα καρκινικά κύτταρα, επηρεάζοντας ελάχιστα τα υγιή.^{32,33} Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι γίνεται συνδυασμός της χημικής εξειδίκευσης των αντισωμάτων, που συνδέονται σε συγκεκριμένα κυτταρικά υποστρώματα και της κυτταροτοξικής δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων. Δύο μέθοδοι που έχουν μελετηθεί αρκετά είναι οι ADEPT (Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy) και GDEPT (Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy). Πρόκειται για μεθόδους με παρεμφερή μηχανισμό δράσης. Στην πρώτη χρησιμοποιούνται ένζυμα, τα οποία εισάγονται στον οργανισμό με τεχνητό τρόπο, προκειμένου να μετατρέψουν προφάρμακα στις δραστικές τους μορφές στο πάσχον σημείο του οργανισμού.³⁴⁻³⁶ Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα στερούνται εκλεκτικότητας και οι απαιτούμενες δόσεις για την επίτευξη του θεραπευτικού αποτελέσματος είναι συνήθως τοξικές για τους υγιείς ιστούς. Η μέθοδος ADEPT βοηθά στη μείωση της συστηματικής τοξικότητας του φαρμάκου, επιτυγχάνοντας υψηλά επίπεδα της δραστικής μορφής

του μόνο στην εστία του καρκινικού όγκου. Το ένζυμο που εισάγεται στον οργανισμό έχει προηγουμένως συζευχθεί με ένα ειδικό αντίσωμα, σχεδιασμένο κατάλληλα για να αναγνωρίσει το καρκινικό αντιγόνο. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η εκλεκτική σύνδεση του ενζύμου με το καρκινικό αντιγόνο. Στη συνέχεια, χορηγείται το προφάρμακο, το οποίο θα μετατραπεί από το ένζυμο στη δραστική μορφή, αποκλειστικά και μόνο στην περιοχή των καρκινικών κυττάρων. Πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι η μέθοδος ADEPT έχει ικανοποιητικά θεραπευτικά αποτελέσματα σε χοριοκαρκινώματα, καθώς και σε καρκίνους του εντέρου και του μαστού.³⁷ Η μέθοδος GDEPT διαφέρει από την ADEPT στο ότι δεν χορηγούνται απευθείας ένζυμα, αλλά επιχειρείται η εισαγωγή ειδικών γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, που επάγουν την παραγωγή των ενζύμων, που θα μετατρέψουν τα προφάρμακα στις δραστικές μορφές.³⁴

ιβ) Θεραπεία με τη χρήση antisense νουκλεϊκών οξέων

Ο όρος αυτός δεν έχει αποδοθεί στην ελληνική γλώσσα. Πρόκειται για μέθοδο θεραπείας γονιδιακής ανωμαλίας. Όταν είναι γνωστό ότι η αλληλουχία βάσεων ενός συγκεκριμένου γονιδίου ευθύνεται για την εμφάνιση ασθένειας, είναι πιθανό να συντεθεί εργαστηριακά ένας συμπληρωματικός, ως προς τη συγκεκριμένη αλληλουχία κλώνος νουκλεϊκού οξέος (DNA ή RNA). Αυτός, συνδεδεμένος στο αντίστοιχο mRNA, οδηγεί ουσιαστικά στην αδρανοποίηση του γονιδίου, αφού το ώριμο mRNA πρέπει να είναι μονόκλωνο για να εισέλθει στη διαδικασία της μετάφρασης.³⁸ Το νουκλεϊκό οξύ καλείται antisense ολιγονουκλεοτίδιο γιατί η αλληλουχία των βάσεων του είναι συμπληρωματική της αλληλουχίας των βάσεων του mRNA-στόχου, η οποία καλείται sense αλληλουχία. Τα antisense ολιγονουκλεοτίδια μελετώνται για τη θεραπεία καρκίνου του πνεύμονα, του εντέρου, του παγκρέατος, του κακοήθους γλοιώματος και του μελανώματος.³⁹

ιγ) Γονιδιακή θεραπεία

Ο καρκίνος είναι από τις πρώτες ασθένειες, στις οποίες μελετήθηκε η γονιδιακή θεραπεία. Σήμερα, περισσότερες από το 60% του συνόλου των κλινικών δοκιμών της γονιδιακής θεραπείας έχουν ως στόχο διάφορους τύπους καρκίνου. Έχει αναπτυχθεί ποικιλία μεθόδων, ενώ άλλες βρίσκονται σε πειραματικό στάδιο. Σκοπός της γονιδιακής θεραπείας είναι η εισαγωγή εξειδικευμένων γονιδίων στα καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να πυροδοτηθούν κυτταροστατικές διαδικασίες. Συγκεκριμένα, τα γονίδια αυτά είναι ικανά να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα, να ενεργοποιήσουν αντικαρκινικά φάρμακα, να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, ή να αντικαταστήσουν γονίδια που έχουν υποστεί βλάβη. Επιπλέον, μπορεί να εκφράζουν την παραγωγή κυτοκινών. Η ποσότητα του γενετικού υλικού που φέρει τα επιθυμητά γονίδια μπορεί να εισαχθεί στα καρκινικά κύτταρα με διάφορους τρόπους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση ιών ως φορέων των

επιθυμητών γονιδίων. Η μέθοδος αυτή είναι η πλέον αποτελεσματική για *in vivo* μεταφορά. Οι ιοί που χρησιμοποιούνται είναι αδενοϊοί, ρετροϊοί (συμπεριλαμβανομένου και του HIV), ιοί εμβολίων, αδενοσχετιζόμενοι ιοί και βακιλοϊοί.⁴⁰ Οι μέθοδοι μεταφοράς του γενετικού υλικού διαφέρουν ως προς την αποτελεσματικότητα και το χρονικό διάστημα έκφρασης των εισαγόμενων γονιδίων, καθώς και ως προς το επίπεδο ασφάλειάς τους. Ο ιδανικός γονιδιακός φορέας πρέπει να στοχεύει εκλεκτικά τον πάσχοντα ιστό, να είναι σταθερός και να εξυπηρετεί τη γονιδιακή έκφραση, χωρίς να προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες και ανοσολογικές αποκρίσεις. Δυστυχώς, κανένας φορέας δεν συγκεντρώνει όλα αυτά τα στοιχεία, γεγονός που εντείνει τις ερευνητικές προσπάθειες. Η γονιδιακή θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως του εγκεφάλου, του πνεύμονα, του μαστού, του παγκρέατος, του ήπατος, του εντέρου, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του οισοφάγου, του δέρματος, των ωοθηκών και των επινεφριδίων.⁴¹

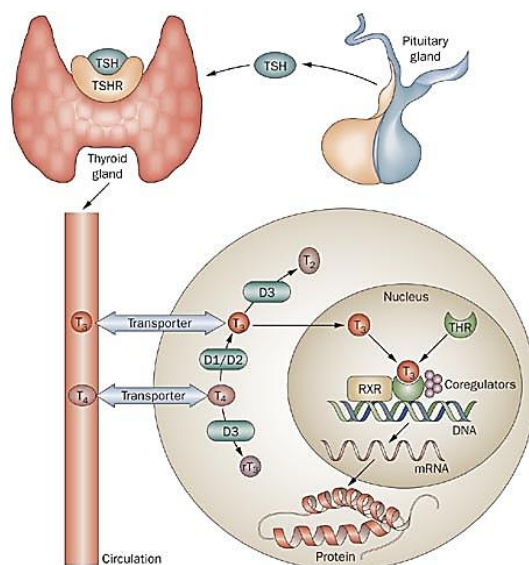
1.4 Φαρμακευτική παρέμβαση σε θεμελιώδεις κυτταρικές λειτουργίες. Κυτταρική επικοινωνία και μεταγωγή σήματος

Τα κύτταρα, στα πλαίσια της διακυτταρικής επικοινωνίας, δέχονται ερεθίσματα-σήματα από το περιβάλλον τους. Η πρόσληψη του σήματος λαμβάνει χώρα όταν μία αγγελιαφόρος ουσία συνδεθεί σε ειδικό υποδοχέα, που βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτής είναι η ενεργοποίηση του υποδοχέα μέσω αλλαγής της διαμόρφωσής του, που ενεργοποιεί μία αλυσίδα βιοχημικών γεγονότων εντός του κυττάρου, προκαλώντας τελικά την κυτταρική απόκριση.^{42,43} Με τον όρο «μεταγωγή σήματος» περιγράφεται όλη αυτή η διαδικασία ενεργοποίησης του μεμβρανικού υποδοχέα από το εξωκυττάριο μόριο-σηματοδότη και της μεταβολής από αυτόν ενδοκυττάρια μορίων, που μετατρέπονται σε δευτερεύοντες αγγελιαφόρους, προωθώντας το σήμα εντός του κυττάρου και προάγοντας τη βιολογική απόκριση. Τα κύτταρα επεξεργάζονται το σήμα και αποκρίνονται με την παραγωγή άλλων σημάτων, συμμετέχοντας με αυτόν τον τρόπο στη διακυτταρική και ενδοκυτταρική επικοινωνία. Ανάλογα με το είδος του κυττάρου, η απόκριση στο ερέθισμα μπορεί να μεταβάλλει το μεταβολισμό, το σχήμα, τη γονιδιακή έκφραση, καθώς και το ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης.⁴⁴ Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το σήμα μπορεί να ενισχυθεί σε οποιοδήποτε στάδιο της μεταγωγής του, αφού μία ουσία-αγγελιαφόρος μπορεί να προκαλέσει πολλές κυτταρικές αποκρίσεις.⁴⁵

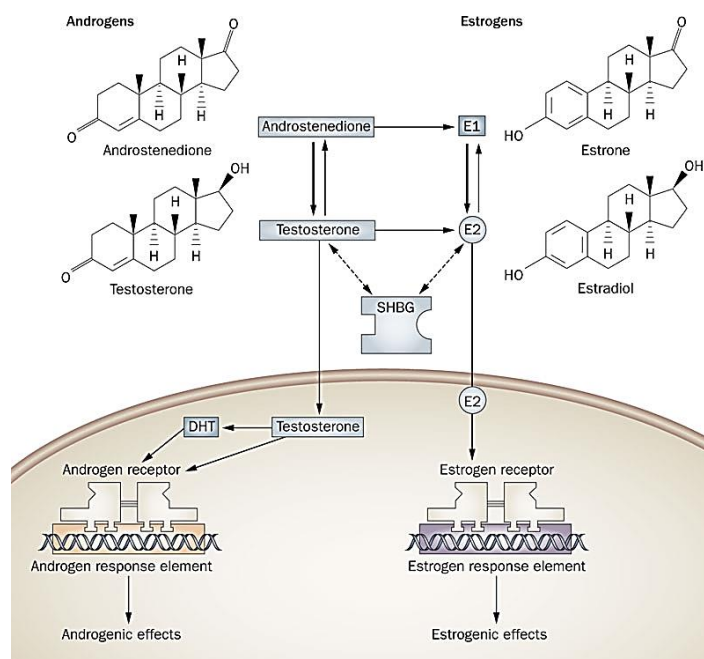
Έχουν περιγραφεί λεπτομερώς τέσσερα κύρια μονοπάτια μεταγωγής του σήματος, που πυροδοτούνται από την ενεργοποίηση των αντίστοιχων υποδοχέων:

α) Το μονοπάτι των θυρεοειδών και στεροειδών ορμονών

Οι θυρεοειδείς ορμόνες (τριωδοθυρονίνη (T_3) και θυροξίνη (T_4)), οι στεροειδείς ορμόνες (τεστοστερόνη και οιστραδιόλη), η βιταμίνη Α και το 9-*cis* ρετινοϊκό οξύ, αφού διέλθουν την κυτταρική μεμβράνη, συνδέονται σε κυτταροπλασματικούς ή πυρηνικούς υποδοχείς, προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωσή τους. Η αλλαγή αυτή έχει ως αποτέλεσμα αυτοί οι υποδοχείς να μετατρέπονται σε ενεργοποιημένους παράγοντες μεταγραφής και στη συνέχεια να συνδέονται είτε σε χαρακτηριστικές αλληλουχίες των ρυθμιστικών περιοχών του DNA, είτε να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που επιδρούν στο DNA σε επόμενη φάση.⁴⁶ Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά τα μονοπάτια μετάδοσης σήματος που συμμετέχουν.



Εικόνα 1.2 Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των θυρεοειδών ορμονών



Εικόνα 1.3 Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος των στεροειδών ορμονών

β) Νευροδιαβιβαστές και ιοντοτροπικοί υποδοχείς

Νευροδιαβιβαστές, όπως η ακετυλοχολίνη, προσδένονται σε υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης που αποτελεί τμήμα διαύλου ιόντων. Αποτέλεσμα της πρόσδεσης αυτής είναι η αλλαγή της διαμόρφωσης του υποδοχέα, γεγονός που επιτρέπει τη δίοδο ιόντων μέσω του διαύλου, με συνέπεια την εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης.⁴⁷

γ) Προσδέματα υποδοχών GPCRs

Ορμόνες, αγγειοδραστικά πεπτίδια, νευροδιαβιβαστές και αυξητικοί παράγοντες προσδένονται σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνη (G-Protein-Coupled Receptor, GPCR) και ένα μεταδότη σήματος. Οι GPCRs αποτελούν μία υπεροικογένεια υποδοχών της κυτταρικής μεμβράνης, που απαρτίζεται από περισσότερα από 1000 μέλη και είναι καθοριστικής σημασίας για τη μεταγωγή του σήματος.^{48,49} Δυσλειτουργία των GPCRs έχει συνδεθεί με πολλές ασθένειες, όπως ο διαβήτης, η κατάθλιψη, καρδιαγγειακά νοσήματα, αλλεργίες, διαταραχές της όρασης και κάποιες μορφές καρκίνου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι κυτταρικοί στόχοι για περισσότερα από τα μισά σύγχρονα φάρμακα είναι GPCRs. Οι υποδοχείς αυτοί διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές α-έλικες, μερικώς εκτεθειμένες αφενός στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και αφετέρου στο περιβάλλον του κυτταροπλάσματος. Αυτοοργανώνονται σε μία τεταρτοταγή πρωτεϊνική δομή που προσομοιάζει με βαρέλι, με τις επτά α-έλικες να σχηματίζουν μία κοιλότητα, εντός της οποίας γίνεται η πρόσδεση του «σηματοδότη». Όταν ένα μόριο-σηματοδότης προσδεθεί με υποδοχέα GPCR, επάγει μία αλλαγή στη διαμόρφωση του τελευταίου, που πυροδοτεί την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης.⁵⁰ Οι G-πρωτεΐνες (guanine nucleotide binding proteins) μπορούν να προσομοιαστούν με βιοχημικούς διακόπτες: όταν είναι συνδεδεμένες με GTP βρίσκονται στη θέση «on», ενώ όταν είναι συνδεδεμένες με GDP βρίσκονται στη θέση «off». Ρυθμίζουν τη λειτουργία μεταβολικών ενζύμων, ιοντικών διαύλων και πρωτεϊνικών μεταφορέων, όπως επίσης και τη μεταγραφή του DNA σε RNA. Πρόκειται για ετεροτριμερείς πρωτεΐνες, που αποτελούνται από τρεις διαφορετικές υπομονάδες, τις α, β και γ. Οι α υπομονάδες διαφέρουν στα επιμέρους μέλη της οικογένειας, ενώ οι υπομονάδες β και γ είναι κοινές. Η πρόσδεση του σηματοδότη επιτρέπει στον υποδοχέα να αντικαταστήσει το μόριο GDP, που βρίσκεται συνδεδεμένο στην α υπομονάδα (θέση «off»), με ένα μόριο GTP (θέση «on»). Αυτή η ανταλλαγή προκαλεί την απόσπαση της α υπομονάδας από το ετεροτριμερές. Το σύμπλοκο GTP-υπομονάδα α, αλλά και το διμερές βγ, ενεργοποιούν διαφορετικές εκτελεστικές πρωτεΐνες (effector proteins) και μονοπάτια δευτερογενών αγγελιαφόρων, ανάλογα με τον υποτύπο της α υπομονάδας. Στη συνέχεια, η α υπομονάδα χάρη στην ενδογενή ενζυμική της δραστηριότητα, υδρολύει το προσδεδεμένο GTP προς GDP, γεγονός που επιτρέπει την επανασυμπλοκοποίησή της με το διμερές βγ και την αναγέννηση του ετεροτριμερούς αβγ, ώστε να μπορεί να αρχίσει ξανά ο κύκλος. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν κοινά

δομικά στοιχεία μεταξύ των διαφόρων G-πρωτεϊνών, εντούτοις παρουσιάζονται μεγάλες λειτουργικές διαφορές, που οφείλονται προφανώς στην αλληλεπίδρασή τους με διαφορετικούς κάθε φορά υποδοχείς.⁵¹ Οι διαφορετικές κατηγορίες G-πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την παρουσία διαφορετικών τύπων υποδοχέα για ένα πρόσδεμα, παρέχουν το μηχανισμό μέσω του οποίου ένα κοινό σήμα μπορεί να προκαλέσει διακριτή κυτταρική απόκριση, ανάλογα με τον εκάστοτε ιστό.

δ) Πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες

Οι παράγοντες αυτοί, όπως για παράδειγμα ο αυξητικός επιδερμικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) προσδένονται σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς, που ενδοκυτταρικά δρουν ως πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης (Receptor Tyrosine Kinases, RTKs) (Εικόνα Ι.4). Οι RTKs αποτελούνται από μία εξωκυττάρια περιοχή, που φέρει το αμινοτελικό άκρο του πολυπεπτιδίου και στην οποία προσδένεται το μόριο-σηματοδότης, μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή 25-38 αμινοξέων διατεταγμένων σε α-έλικα και μία ενδοκυττάρια, που φέρει το καρβοξυτελικό άκρο, που είναι υπεύθυνο για τη δραστηριότητα κινάσης, καθώς καταλύει τόσο την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, όσο και τη φωσφορυλίωση υποστρωμάτων των RTKs. Έτσι, η φωσφορυλίωση σε υπόλοιπο τυροσίνης πυροδοτεί τη μεταγωγή του σήματος στον ενδοκυττάριο χώρο. Ο μηχανισμός με τον οποίο η πρόσδεση του μορίου-σηματοδότη στον υποδοχέα ενεργοποιεί την κινάση τυροσίνης δεν είναι πλήρως κατανοητός, είναι όμως σαφές ότι περιλαμβάνει το διμερισμό του υποδοχέα, όταν επιδράσει σε αυτόν ένας παράγοντας ανάπτυξης (growth factor). Εκτεταμένη έκφραση των υποδοχέων κινασών τυροσίνης οδηγεί σε υπέρμετρο, για τα δεδομένα των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών και του χώρου, πολλαπλασιασμό των κυττάρων και συνεπώς στην εκδήλωση καρκίνου. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες μπορεί να αποσυντονιστούν οι φυσιολογικοί αυστηροί μηχανισμοί ελέγχου, περιλαμβάνουν την ανεξέλεγκτη παραγωγή παραγόντων ανάπτυξης, καθώς και γονιδιακές μεταλλάξεις, που μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση του υποδοχέα.

Συμπερασματικά, οι διαδικασίες φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών παίζουν σημαντικότατο ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, αφού ελέγχουν όλα τα στάδια της μετάδοσης του σήματος, από την ενδοκυττάρια περιοχή του υποδοχέα, που πυροδοτείται η διαδικασία, μέχρι τα κυτταρικά οργάνδια και τον πυρήνα.⁵² Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η φωσφορυλίωση από τις πρωτεϊνικές κινάσες, τα ένζυμα που τροποποιούν άλλες πρωτεΐνες εισάγοντας σε αυτές φωσφορικές ομάδες, αναλύεται σε επόμενη ενότητα.

διαθέσιμα κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών πρέπει να χορηγούνται σε συνδυασμό με τους γνωστούς κυτταροτοξικούς παράγοντες, προκειμένου να ενισχυθεί η αντικαρκινική δράση. Η ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων αυτής της κατηγορίας προσανατολίζεται στην ανακάλυψη εκλεκτικών αναστολέων για τον εκάστοτε συνδυασμό κινασών, που ευθύνεται για την εμφάνιση συγκεκριμένης νεοπλασίας.

Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας, προσομοιάζουν δομικά και δρουν ανταγωνιστικά ως προς το ATP και μη ανταγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα της κινάσης.^{53,54} Αυτό είναι λογικό, αν σκεφτεί κανείς πως θεωρητικά ένας αναστολέας πρέπει να είναι δομικό ανάλογο του υποστρώματος του ενζύμου, προκειμένου να δράσει ως ψευδές υπόστρωμα. Στην προκειμένη περίπτωση ο αναστολέας μπορεί επίσης να είναι δομικό ανάλογο του ATP, ώστε να καταλάβει αντ' αυτού τη θέση πρόσδεσης. Επιπλέον, ένας αναστολέας των συγκεκριμένων ενζύμων μπορεί να δράσει αναστέλλοντας την ενεργή, ή την ανενεργή τους διαμόρφωση. Στην περίπτωση που η πρωτεΐνη με ιδιότητα κινάσης είναι κυτταρικός υποδοχέας, η αναστολή της μπορεί να επιτευχθεί και με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν στη θέση σύνδεσης του προσδέματος της κινάσης και είναι γνωστό ότι οι κινάσες-υποδοχείς είναι κινάσες που φωσφορυλιώνουν υπόλοιπα τυροσίνης.⁵⁵

Τα φάρμακα που λειτουργούν ως αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών είναι φυσικά προϊόντα,⁵⁶⁻⁶⁰ μικρά μόρια που ανταγωνίζονται το ATP στη θέση πρόσδεσης της κινάσης και μονοκλωνικά αντισώματα,⁶¹⁻⁶³ που αναστέλλουν τη λειτουργία κυτταρικών υποδοχέων με ιδιότητα κινάσης. Το κόστος αυτού του είδους αντικαρκινικής θεραπείας είναι γενικά υψηλό και καθίσταται υψηλότερο στην περίπτωση των μονοκλωνικών αντισωμάτων, λόγω της πολυδάπανης παραγωγής τους.

1.6 Δομή και λειτουργία πρωτεϊνικών κινασών

Μετά το τέλος της μετάφρασης του ώριμου mRNA οι πρωτεΐνες που έχουν συντεθεί, εισέρχονται σε διαδικασίες ελέγχου σχετικά με τη λειτουργικότητα και τη δραστηρότητά τους. Είναι προφανές ότι αν μία ή περισσότερες πρωτεΐνες δεν έχουν την αναμενόμενη δομή ή/και δεν είναι λειτουργικές, οι κυτταρικές λειτουργίες διαταράσσονται. Οι διαδικασίες ελέγχου ρυθμίζονται από το ίδιο το κύτταρο και είναι ζωτικής σημασίας για τη μετέπειτα ζωή του. Οι πρωτεΐνες υφίστανται δομικές τροποποιήσεις σε επίπεδο αμινοξέων, που ακολουθούν τη μετάφραση και καλούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Μία εκ των πλέον σημαντικών μετα-μεταφραστικών διεργασιών είναι οι αντιδράσεις της φωσφορυλίωσης και της

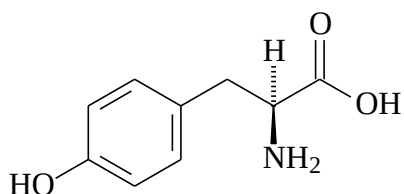
αποφωσφορυλίωσης υπολοίπων αμινοξέων. Η φωσφορυλίωση παίζει πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαίρεση, ο μεταβολισμός, η διαφοροποίηση, η κυτταρική απόπτωση, η επιβίωση και η αγγειογένεση και καταλύεται από τις πρωτεϊνικές κινάσες. Τα εν λόγω ένζυμα ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1950 από τους E. H. Fischer και E. G. Krebs (Βραβείο Nobel Ιατρικής 1992).⁶⁴ Η αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης καταλύεται από τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύουν τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο-δότη (ATP ή GTP) σε υδροξύλιο-δέκτη του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Το υπόστρωμα ποικίλει και μπορεί να είναι κάποια δομική ή λειτουργική πρωτεΐνη, μεταβολικό ένζυμο, ακόμα και κινάση που συμμετέχει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Είναι γνωστό ότι οι πρωτεϊνικές κινάσες ρυθμίζουν την πλειοψηφία των κυτταρικών μονοπατιών και ιδιαίτερα αυτά που σχετίζονται με τη μετάδοση του σήματος. Οι πρωτεϊνικές κινάσες απαντούν επίσης στα βακτήρια και στα φυτά.

Κατά την εξέλιξη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών με σκοπό τον έλεγχο της δραστηριότητάς τους, λαμβάνει χώρα φωσφορυλίωση των υδροξυλίων των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη. Από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος ταυτοποιήθηκαν 518 πρωτεϊνικές κινάσες που λαμβάνουν μέρος στον έλεγχο όλων των πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών και αποτελούν το 2% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων.⁶⁵⁻⁶⁷

Η κατάταξη των πρωτεϊνικών κινάσεων είναι πολύπλοκη και εν πολλοίς διφορούμενη, αφού από καιρού εις καιρόν έχουν ταξινομηθεί με βάση διαφορετικά κριτήρια κάθε φορά. Ακολουθώντας την ευρέως αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα κατάταξη, οι πρωτεϊνικές κινάσες υποδιαιρούνται σε δύο μεγάλες ομάδες ανάλογα με το ποιο αμινοξύ φωσφορυλιώνουν κάθε φορά:^{68,69}

α) Κινάσες αρωματικού υδροξυλίου τυροσίνης (tyrosine kinases)

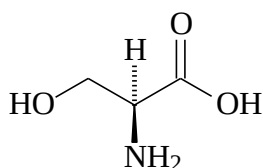
Φωσφορυλιώνουν την τυροσίνη. Οι κινάσες αυτές ταυτοποιήθηκαν πρώτες και έχουν περιγραφεί λεπτομερώς.⁷⁰



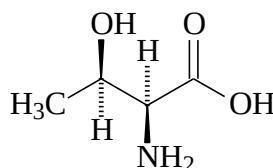
L-tyrosine

β) Κινάσες αλειφατικού υδροξυλίου σερίνης ή θρεονίνης (serine-threonine kinases)

Φωσφορυλιώνουν τη σερίνη ή τη θρεονίνη.



L-serine

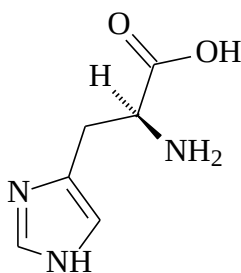


L-threonine

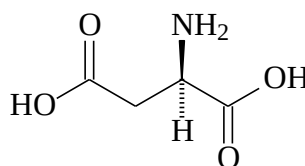
γ) Κινάσες μικτής λειτουργίας (dual specificity kinases)

Πραγματοποιούν ταυτόχρονα και τις δύο φωσφορυλιώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω.^{71,72}

Έχει βρεθεί ότι και οι κινάσες ιστιδίνης, που φωσφορυλιώνουν ένα ιμιδαζολικό άζωτο στην ιστιδίνη, είναι ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος.^{70,73,74} Οι κινάσες ιστιδίνης βρίσκονται κατά κόρον στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Σχετικά με τη συμμετοχή τους στους μηχανισμούς της μετάδοσης του σήματος, η φωσφορική ομάδα του ATP μεταφέρεται αρχικά σε ένα υπόλοιπο ιστιδίνης της κινάσης και στη συνέχεια σε ένα υπόλοιπο ασπαρτικού οξέος που εντοπίζεται σε άλλη πρωτεΐνη ή, σε κάποιες περιπτώσεις, ακόμα και στην ίδια την κινάση. Η φωσφορυλίωση του ασπαρτικού οξέος καθιστά την κινάση ενεργή, οπότε λαμβάνει μέρος στη μετάδοση του σήματος.⁷⁵



L-histidine



L-aspartic acid

Ένας άλλος τρόπος κατάταξης των πρωτεϊνικών κινασών είναι με βάση τη θέση τους κατά τη μεταγωγή του σήματος. Έτσι, διακρίνονται σε:

α) Υποδοχείς (receptors)

Ως παραδείγματα αναφέρονται ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) και ο υποδοχέας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR)). Οι EGFR και VEGFR πυροδοτούν καταρράκτες κυτταρικών μονοπατιών που ρυθμίζουν σημαντικές λειτουργίες, όπως η αγγειογένεση, η κυτταρική επιβίωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση.⁷⁶ Οι υποδοχείς αυτοί είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, που διαθέτουν μία εξωκυτταρική θέση πρόσδεσης, στην οποία προσδένονται οι αυξητικοί παράγοντες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενδοκυτταρικού τους καταλυτικού τμήματος, που έχει ιδιότητες κινάσης.

β) Μη υποδοχείς (non-receptors)

Ως παραδείγματα αναφέρονται οι κινάσες Abl, Src και JAKs. Παρουσιάζουν δομικές διαφοροποιήσεις από τους υποδοχείς και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και την εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Λαμβάνουν μηνύματα από τις κινάσες-υποδοχείς, καθώς και από άλλους υποδοχείς.⁷³

Οι πρωτεϊνικές κινάσες-υποδοχείς ή μη υποδοχείς είναι ως επί το πλείστον κινάσες τυροσίνης. Η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών υπόκειται σε αυστηρό κυτταρικό έλεγχο. Αυτό δηλώνει ότι κύτταρα τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται, έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα πρωτεϊνών με φωσφορυλιωμένα υπόλοιπα τυροσίνης.⁷⁶ Έχουν βρεθεί 90 γονίδια που κωδικοποιούν κινάσες τυροσίνης.⁷⁷ Από αυτές τις 90 κινάσες τυροσίνης, οι 58 είναι υποδοχείς και χωρίζονται σε υποοικογένειες ανάλογα με τη δομική οργάνωση και την αλληλουχία των αμινοξέων της καταλυτικής τους περιοχής.⁷⁸ Με βάση το ίδιο κριτήριο, οι υπόλοιπες 32 κινάσες τυροσίνης, που δεν είναι υποδοχείς, χωρίζονται επίσης σε υποοικογένειες.⁷⁹

γ) Μεταγωγείς σήματος

Ως παράδειγμα αναφέρονται οι μιτωτικές κινάσες (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPKs). Ενεργοποιούνται ως απόκριση σε κυτταρικά ερεθίσματα και στη συνέχεια ενεργοποιούν διαδικασίες κυτταρικών μηνυμάτων. Συγκεκριμένα, οι MAPKs που αναφέρθηκαν σαν παράδειγμα, ενεργοποιούνται από μιτογόνα μηνύματα.⁷³ Συμμετέχουν στις άμεσες κυτταρικές αποκρίσεις που πυροδοτούνται από διάφορα ερεθίσματα, όπως τα μιτογόνα σήματα, το οσμωτικό στρες, το θερμικό σοκ και οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ρυθμίζουν κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η γονιδιακή έκφραση, η διαφοροποίηση, η μίτωση, η επιβίωση και η απόπτωση.⁸⁰

δ) Κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cyclin-Dependent Kinases, CDKs)

Μετά τη λήψη μηνυμάτων για την έναρξη της διαδικασίας της μίτωσης, τα κύτταρα εισέρχονται στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, η φυσιολογική εξέλιξη του οποίου ρυθμίζεται από τις κινάσες αυτές. Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται και από άλλα είδη κινασών, όπως οι Aurora, Plk-1, Bub1, BubR1, Mps1, Nek, καθώς και οι κινάσες Chk1 και 2 που ρυθμίζουν το σημείο ελέγχου της μιτωτικής διαδικασίας.⁷⁶ Οι CDKs, εκτός από τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, συμμετέχουν στη ρύθμιση της διαδικασίας της μεταγραφής και στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων. Είναι παρούσες σε όλους τους γνωστούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς.⁸¹

Ένας άλλος τρόπος κατάταξης των πρωτεϊνικών κινασών είναι με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων της καταλυτικής τους περιοχής. Το ανθρώπινο κίνωμα (Εικόνα Ι.5), το σύνολο δηλαδή των πρωτεϊνικών κινασών του ανθρώπου,⁶⁵ χωρίζεται σε επτά κύριες οικογένειες:

α) Οικογένεια AGC

Περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες που εξαρτώνται από ασβέστιο-φωσφολιπίδια (πρωτεϊνικές κινάσες C) ή από κυκλικά νουκλεοτίδια (πρωτεϊνικές κινάσες A, οι οποίες ενεργοποιούνται από την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) και πρωτεϊνικές κινάσες G, οι οποίες ενεργοποιούνται από την κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cGMP)).

Οι πρωτεϊνικές κινάσες A εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιπέδων του σακχάρου και του γλυκογόνου στο αίμα και στο μεταβολισμό των λιπιδίων. Οι πρωτεϊνικές κινάσες G εμπλέκονται στη ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων, τον κυτταρικό κύκλο, τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και τη χάλαση των λείων μυϊκών ινών. Τέλος, οι πρωτεϊνικές κινάσες C συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες και ενεργοποιούνται από την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου και της διακυλογλυκερόλης.

β) Οικογένεια CAMK

Περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες που αλληλεπιδρούν με το σύμπλεγμα Ca^{2+} /καλμοδουλίνη. Πρόκειται για κινάσες που συμμετέχουν στις διαδικασίες της μάθησης και της μνήμης,⁸² καθώς και στην ομοιόσταση του ασβεστίου και την πρόσληψή του από τα μυοκαρδιοκύτταρα,⁸³ και την πρόσληψη των ιόντων χλωρίου από τα επιθηλιακά κύτταρα.⁸⁴

γ) Οικογένεια CK-1 (Casein Kinases-1)

Πρόκειται για κινάσες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση και τη μεταγραφή του DNA.⁸⁵

δ) Οικογένεια CMGC

Περιλαμβάνει τις CDKs, τις MAPKs, την κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου (Glycogen Synthase Kinase-3, GSK-3) και την κινάση CLK-1 (CDC-Like Kinase-1). Οι πρωτεΐνες CDC (Cell-Division Control Proteins) ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση. Η κινάση CLK-1 συμμετέχει ενεργά στη διαδικασία βιοσύνθεσης του mRNA.

ε) Οικογένεια STE (Sterility Kinases)

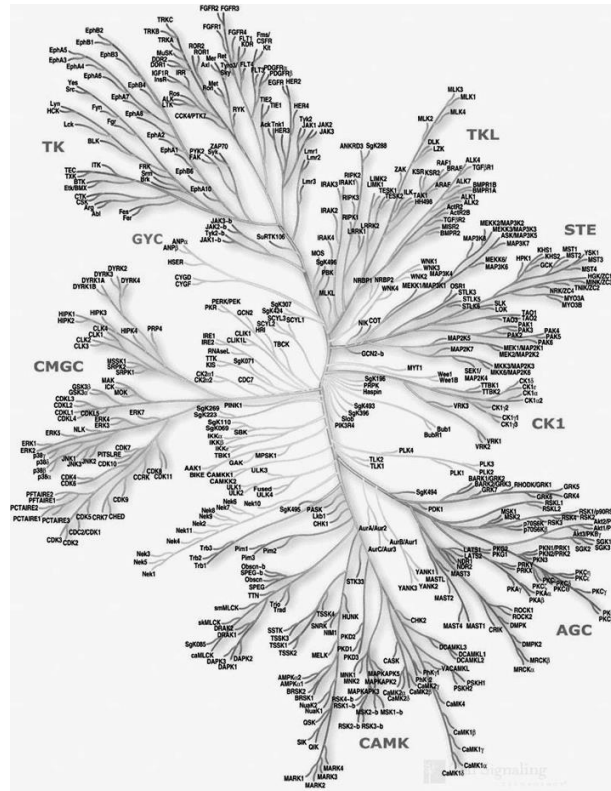
Πρόκειται για οικογένεια κινασών που αποτελείται από τρεις υποοικογένειες (Ste20, Ste11, Ste7), οι οποίες ενεργοποιούν διαδοχικά η μία την άλλη με τελικό στόχο την ενεργοποίηση των MAPKs.⁸⁶

στ) Οικογένεια TK (Tyrosine Kinases)

Πρόκειται για την οικογένεια των κινασών τυροσίνης. Κύρια λειτουργία τους είναι η μεταγωγή σημάτων από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου.⁸⁷

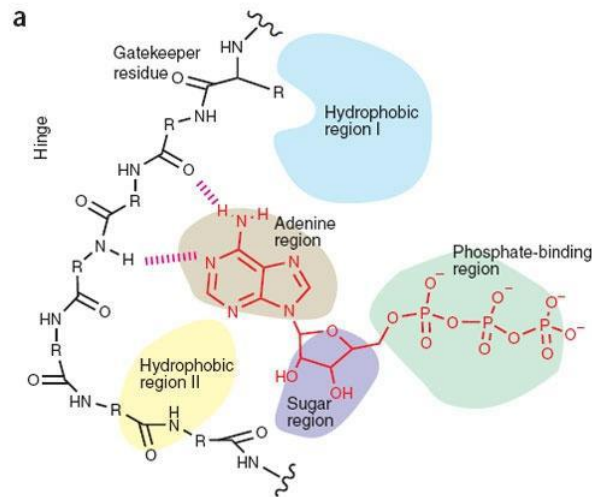
ζ) Οικογένεια TKL (Tyrosine Kinase-Like)

Περιλαμβάνει πρωτεϊνικές κινάσες που προσομοιάζουν κινάσες τυροσίνης. Έχουν βρεθεί 43 γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση αυτών των πρωτεϊνικών κινασών.⁷⁷



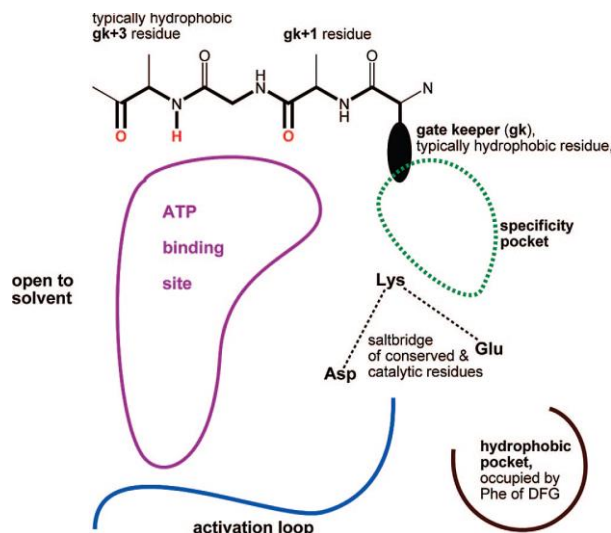
Εικόνα 1.5 Φυλογενετικό δένδρο του ανθρώπινου κινώματος

Όλες οι πρωτεϊνικές κινάσες των ευκαρυωτικών κυττάρων διαθέτουν ένα γενετικά διατηρημένο καταλυτικό κέντρο.⁸⁸⁻⁹¹ Η δομή του αποδόθηκε, αρχικά, για την κυκλική AMP-εξαρτώμενη κινάση. Οι κρυσταλλικές δομές που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα έχουν συμβάλει τα μέγιστα στην εμπειρισταωμένη κατανόηση της δομής και της λειτουργίας του ενεργού κέντρου. Συγκεκριμένα, διαθέτει μία αμινοτελική και μία καρβοξυτελική περιοχή, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλη δομική πολυπλοκότητα. Συγκεκριμένα, η αμινοτελική περιοχή αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και μία α-έλικα, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή αποτελείται μόνο από α-έλικες. Οι δύο περιοχές της κινάσης συνδέονται μέσω ενός ευκίνητου πολυπεπτιδικού τμήματος που λειτουργεί σαν άρθρωση γύρω από την οποία οι δύο περιοχές περιστρέφονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Πρέπει να αναφερθεί ότι η περιστροφή αυτή δεν επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή του ενζύμου και λαμβάνει χώρα κατά την πρόσδεση του υποστρώματος της κινάσης και της τριφωσφορικής αδενοσίνης που δρα ως δότης της φωσφορικής ομάδας για να είναι δυνατή στη συνέχεια η αντίδραση της φωσφορυλίωσης από την κινάση.⁷³



Εικόνα 1.6 Τυπική εικόνα της θέσης πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο της πρωτεϊνικής κινάσης

Το ATP συνδέεται σε μία στενή υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου. Η περιοχή αυτή βρίσκεται στο κεντρικό αρθρωτό τμήμα του ενζύμου και διαθέτει ένα αμινοξύ-δότη δεσμού υδρογόνου και δύο αμινοξέα-δέκτες δεσμού υδρογόνου.⁹² Επομένως, κατά την πρόσδεση του ATP αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της αδενίνης και των απέναντι αμινοξέων του ενζύμου, που βρίσκονται στο αρθρωτό τμήμα. Η ριβόζη διευθετείται στερεοχημικά προς την καρβοξυτελική περιοχή της κινάσης, στην οποία βρίσκεται η καταλυτική περιοχή του ενζύμου (catalytic loop). Στην καταλυτική περιοχή υπάρχει μία ομάδα τριών αμινοξέων (ασπαρτικό οξύ, φαινυλαλανίνη, γλυκίνη) που είναι η αλληλουχία ενεργοποίησης και είναι γνωστή ως DFG μοτίβο και είναι σημαντική για τη ρύθμιση της δραστηριότητας της κινάσης. Οι ακραίες διαμορφώσεις της κινάσης είναι: α) η φωσφορυλιωμένη που είναι καταλυτικά ενεργή (DFG-in) και β) η μη φωσφορυλιωμένη που είναι καταλυτικά ανενεργή (DFG-out). Στη δεύτερη, η αλληλουχία ενεργοποίησης εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος, καθώς η τριπλέτα των αμινοξέων περιστρέφεται εκτός του ενεργού κέντρου αφήνοντας μία κενή υδρόφοβη κοιλότητα. Το ασπαρτικό οξύ συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου με την τριφωσφορική ομάδα του ATP και είναι σημαντικό για τη μεταφορά της ομάδας.^{53,93,94} Στην πραγματικότητα οι περισσότερες πρωτεϊνικές κινάσες φωσφορυλιώνονται, όπως αναφέρθηκε, στα αμινοξέα τυροσίνη, σερίνη, θρεονίνη που βρίσκονται σε έναν υδρόφιλο βρόγχο της θέσης πρόσδεσης του ATP που ονομάζεται βρόγχος ενεργοποίησης (activation loop). Αποτέλεσμα αυτής της φωσφορυλίωσης είναι η ενεργοποίηση της κινάσης. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι σημαντικότερο ρόλο παίζει το αμινοξύ-θυρωρός (gatekeeper), που εντοπίζεται στη στενή είσοδο του ενεργού κέντρου. Το μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος-θυρωρού ποικίλει στις διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες και καθορίζει εν πολλοίς την προσβασιμότητα στο λιπόφιλο ενεργό τους κέντρο.⁹⁵



Εικόνα I.7 Δισδιάστατη απεικόνιση της θέσης πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο των πρωτεϊνικών κινασών

I.7 Κυτταρικός κύκλος και κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs)

Η κυτταρική διαίρεση είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική λειτουργία των πολυκύτταρων οργανισμών, καθώς τούς επιτρέπει να αυξάνονται σε μέγεθος και να αντικαθιστούν τα φθαρμένα κύτταρα με νέα, με αποτέλεσμα να διατηρούν περίπου σταθερό συνολικό αριθμό κυττάρων. Η κυτταρική διαίρεση των ευκαρυωτικών κυττάρων ακολουθεί μία πολύ συγκεκριμένη και ελεγχόμενη αλληλουχία γεγονότων, τον κυτταρικό κύκλο, που η διάρκειά του ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και τις εκάστοτε επικρατούσες συνθήκες και κυμαίνεται από λίγα λεπτά έως και ένα έτος, στην περίπτωση των ηπατικών κυττάρων των θηλαστικών.

Ο κυτταρικός κύκλος χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις. Οι φάσεις G1, S και G2 αποτελούν τη μεσόφαση, κατά την οποία το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος, συνθέτει πρωτεΐνες και κυτταρικά οργανίδια και επιπλέον, αντιγράφει το γενετικό του υλικό. Η τέταρτη φάση είναι η μίτωση, κατά την οποία από το αρχικό κύτταρο προκύπτουν δύο θυγατρικά. Στη φάση G1 το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος, ενώ διαθέτει το φυσιολογικό διπλοειδές DNA. Ακολουθεί η φάση S, όπου συνεχίζεται η αύξηση του μεγέθους και η αντιγραφή των χρωμοσωμάτων, ενώ στη φάση G2 η αύξηση του μεγέθους είναι ακόμα μεγαλύτερη και το κύτταρο που είναι έτοιμο να διαιρεθεί, διαθέτει διπλάσια ποσότητα γενετικού υλικού.

Η κυτταρική διαίρεση βασίζεται σε δύο πολύ σημαντικές διαδικασίες: τη μίτωση και την κυτοκίνηση. Από τις διαδικασίες αυτές παράγονται δύο νέα θυγατρικά κύτταρα πανομοιότυπα τόσο μεταξύ τους, όσο και με το αρχικό. Κατά τη μίτωση, τα

διπλασιασμένα χρωμοσώματα που βρίσκονται στον πυρήνα του αρχικού κυττάρου, διαιρούνται και μοιράζονται στους δύο θυγατρικούς πυρήνες. Κατά την κυτοκίνηση λαμβάνει χώρα διαίρεση του κυτταροπλάσματος.

Η διαδικασία της μίτωσης διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις:

α) Πρόφαση

Οι ίνες της χρωματίνης συμπυκνώνονται σχηματίζοντας χρωμοσώματα. Κάθε διπλασιασμένο χρωμόσωμα αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες ενωμένες σε μία δομή που λέγεται κεντρομερίδιο. Στο κυτταρόπλασμα, η μιτωτική άτρακτος σχηματίζεται από μικροσωληνίσκους και συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Στα ζωικά κύτταρα, η άτρακτος σχηματίζεται ανάμεσα σε δύο ζεύγη κεντροσωμάτων, που κινούνται απέναντι το ένα από το άλλο κατά την πρόφαση. Προς το τέλος της πρόφασης, η πυρηνική μεμβράνη και οι πυρηνίσκοι εξαφανίζονται, ενώ η άτρακτος καταλαμβάνει τον πυρήνα και αντιδρά με τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα. Δέσμες μικροσωληνίσκων εκτείνονται από κάθε πόλο προς τον ισημερινό του κυττάρου. Κάθε μία από τις αδελφές χρωματίδες ενός χρωμοσώματος έχει μία εξειδικευμένη δομή στην περιοχή του κεντρομεριδίου που ονομάζεται κινητοχώρος. Οι μικροσωληνίσκοι που συνδέονται στον κινητοχώρο ονομάζονται μικροσωληνίσκοι κινητοχώρου και βοηθούν στην κίνηση των χρωμοσωμάτων προς το κέντρο του κυττάρου.

β) Μετάφαση

Στη φάση αυτή, η μιτωτική άτρακτος είναι πλήρως σχηματισμένη, με μιτωτικούς πόλους στα άκρα του κυττάρου. Τα χρωμοσώματα συγκεντρώνονται στη μεταφασική πλάκα εγκάρσια προς το ισημερινό επίπεδο της ατράκτου, μεταξύ των δύο πόλων. Τα κεντρομερίδια όλων των χρωμοσωμάτων ευθυγραμμίζονται μεταξύ τους στη μεταφασική πλάκα. Οι κινητοχώροι των αδελφών χρωματίδων κάθε χρωμοσώματος τοποθετούνται απέναντι στους δύο πόλους του κυττάρου. Επομένως, πανομοιότυπες χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος είναι συνδεδεμένες με μικροσωληνίσκους κινητοχώρου που εκτείνονται από τα απέναντι άκρα του μητρικού κυττάρου.

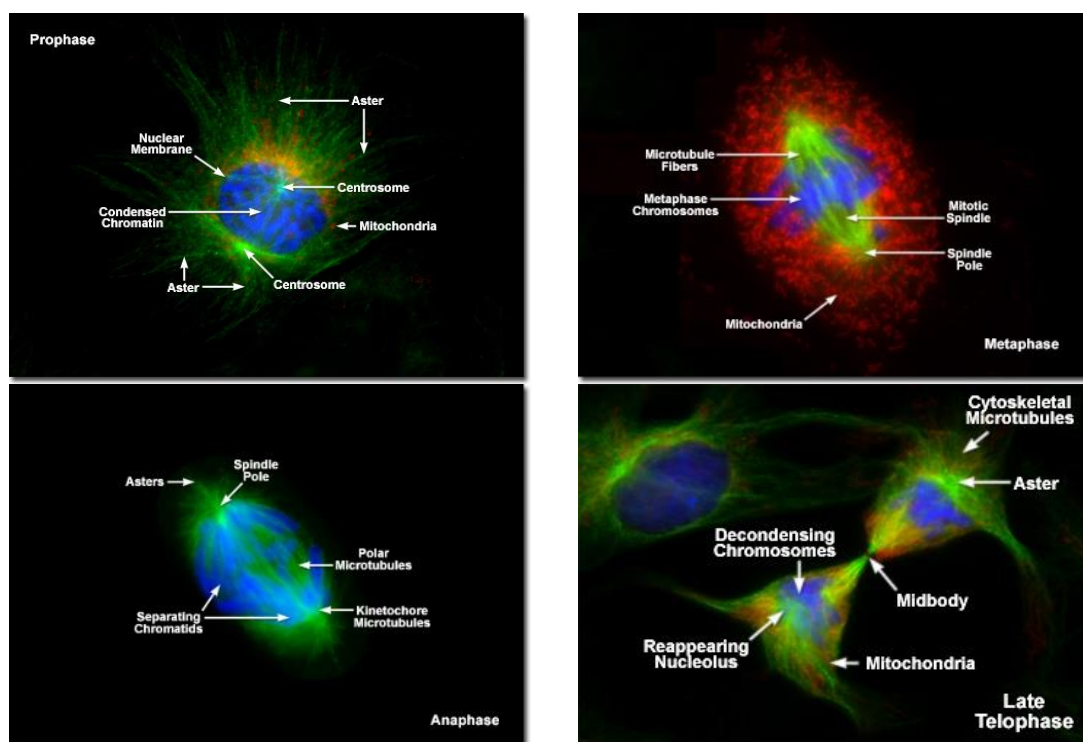
γ) Ανάφαση

Η ανάφαση αρχίζει όταν τα ζευγαρωμένα κεντρομερίδια κάθε χρωμοσώματος χωρίζονται, ελευθερώνοντας τις αδελφές χρωματίδες. Κάθε χρωματίδα είναι πλέον ένα πλήρες χρωμόσωμα, το θυγατρικό. Οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου που είναι συνδεδεμένοι στους κινητοχώρους συρρικνώνονται, με αποτέλεσμα τα θυγατρικά χρωμοσώματα να κινούνται προς τους απέναντι πόλους της ατράκτου. Ταυτόχρονα,

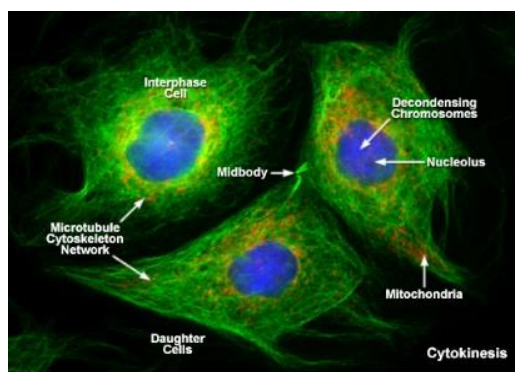
οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου που δεν συνδέονται σε κινητοχώρους, επιμηκύνονται. Η επιμήκυνση φαίνεται να απομακρύνει τους πόλους ακόμα περισσότερο, επιμηκύνοντας το κύτταρο. Η ανάφαση ολοκληρώνεται όταν πλήρεις και ίσες ποσότητες χρωμοσωμάτων έχουν τοποθετηθεί στους δύο πόλους της ατράκτου.

δ) Τελόφαση

Η επιμήκυνση του κυττάρου συνεχίζεται και αρχίζει ο σχηματισμός θυγατρικών πυρήνων στους πόλους του κυττάρου. Η πυρηνική μεμβράνη σχηματίζεται γύρω από τα χρωμοσώματα, οι πυρηνίσκοι επανεμφανίζονται και οι ίνες της χρωματίνης κάθε χρωμοσώματος αποπολυμερίζονται. Στο τέλος της τελόφασης, η μιτωτική άτρακτος εξαφανίζεται και η μίτωση έχει ολοκληρωθεί.⁹⁶



Εικόνα 1.8 Οι τέσσερις φάσεις της μίτωσης



Εικόνα 1.9 Το φαινόμενο της κυτοκίνησης

Οι CDKs ελέγχουν την ομαλή λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Πρόκειται για κινάσες σερίνης-θρεονίνης και η ενεργοποίησή τους γίνεται μέσω συμπλοκοποίησής τους με κατάλληλες λειτουργικές πρωτεϊνικές υπομονάδες που καλούνται κυκλίνες.⁹⁷⁻¹⁰⁰ Οι κυκλίνες αυτές καθαυτές μολονότι είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση των CDKs, εντούτοις δεν παρουσιάζουν ενζυμική ενεργότητα.¹⁰¹ Μέχρι σήμερα στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν ταυτοποιηθεί 14 κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες και 34 κυκλίνες.^{102,103} Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι CDKs ενεργοποιούνται τόσο μέσω της σύνδεσής τους με κατάλληλες κάθε φορά κυκλίνες, όσο και μέσω φωσφορυλίωσής τους από άλλες κινάσες.¹⁰⁴ Κατά τη διάρκεια των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων οι CDKs ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται διαδοχικά, με αποτέλεσμα να μην είναι όλες ενεργοποιημένες σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου.¹⁰⁵ Συγκεκριμένα, μόλις μία CDK επιτελέσει την προβλεπόμενη λειτουργία της, απενεργοποιείται είτε μέσω χημικής αντίδρασης στην κινάση, είτε μέσω στοχευμένης αποδόμησης της εκάστοτε κυκλίνης από το πρωτεάσωμα 26 S.

Τα πρωτεασώματα είναι πρωτεϊνικά σύμπλοκα που απαντούν στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα και στόχος τους είναι η εκλεκτική αποικοδόμηση μη λειτουργικών ή επικίνδυνων για την ομαλή λειτουργία του κυτάρου πρωτεϊνών.¹⁰⁶ Τα φαινόμενα της ενεργοποίησης-απενεργοποίησης των CDKs είναι άρρηκτα συνδεδεμένα με τις σχετικές συγκεντρώσεις των εν λόγω κινασών με τις κατάλληλες κυκλίνες. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των CDKs είναι σταθερή, ενώ των κυκλινών μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Αύξηση της συγκέντρωσης των κυκλινών οδηγεί σε σύνδεσή τους με τις CDKs και επομένως σε ενεργοποίηση των τελευταίων, ενώ αντίθετα μείωση οδηγεί σε απώλεια της καταλυτικής ενεργότητας.¹⁰⁴ Κάθε κυκλίνη συνδέεται με μία συγκεκριμένη ομάδα CDKs και το παραγόμενο σύμπλοκο διαθέτει υψηλή ενζυμική ενεργότητα αποκλειστικά και μόνο σε μία ορισμένη φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποίηση των CDKs επιτρέπει την ομαλή μετάβαση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην επόμενη. Σε περίπτωση βλαβών στο DNA, πυροδοτούνται μηχανισμοί αναστολής των CDKs με αποτέλεσμα το κύτταρο να εισέρχεται σε φάση ηρεμίας, προκειμένου να γίνουν οι απαραίτητες επιδιορθώσεις του DNA.¹⁰⁷

1.8 Τα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints) και οι πρωτεϊνικές κινάσες ελέγχου Chk1 και Chk2

Η ομαλή και σωστή λειτουργία του κυττάρου είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την ανάπτυξη και την επιβίωση του οργανισμού. Επομένως, είναι ευνόητο ότι είναι απαραίτητη η παρουσία ενός συνόλου κυτταρικών μηχανισμών που εξασφαλίζουν την απόλυτα αλάνθαστη αλληλουχία των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους ελέγχουν κάθε στάδιο της διαδικασίας προτού αυτή προχωρήσει παρακάτω. Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχουν πολλά σημεία ελέγχου. Τα πλέον σημαντικά είναι αυτό που ελέγχει το πέρασμα από τη φάση G1 στη φάση S (σημείο G1/S) και αυτό που ελέγχει το πέρασμα από τη φάση G2 στη φάση M (σημείο G2/M).

Το σημείο G1/S ελέγχει την έναρξη της σύνθεσης του DNA, εμποδίζοντάς την στην περίπτωση που αυτό δεν είναι ακέραιο και αν δεν έχουν εξασφαλιστεί τα απαραίτητα για τη διαδικασία θρεπτικά συστατικά. Τα σημεία ελέγχου που σχετίζονται με τον αναδιπλασιασμό και τη μίτωση, σταματούν τη διαδικασία του κυτταρικού κύκλου στην περίπτωση που δεν έχει ολοκληρωθεί η σύνθεση του θυγατρικού DNA και δεν έχει σχηματιστεί σωστά η άτρακτος. Η ενεργοποίηση των κυτταρικών μονοπατιών των σημείων ελέγχου είναι άμεση σε περιπτώσεις λαθών κατά την αντιγραφή του DNA, βλάβης του, ή ακόμα και ανόμοιου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων.¹⁰⁸ Οι στόχοι αυτού του καλά οργανωμένου συστήματος είναι πολλαπλοί.¹⁰⁹ Αφού εντοπίσει το λάθος, πρέπει να πυροδοτήσει διαδικασίες μεταγωγής σήματος προς εξειδικευμένα μακρομόρια, για την αντιμετώπιση του προβλήματος. Για παράδειγμα, καθυστερεί την εξέλιξη του κύκλου, προκειμένου να διευκολυνθούν οι διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA, ενώ σε περίπτωση εντοπισμού μη επιδιορθώσιμης βλάβης, σταματά οριστικά την εξέλιξη του κύκλου. Στην τελευταία αυτή περίπτωση θα πυροδοτήσει ταυτόχρονα τη μεταγωγή σήματος κυτταρικής απόπτωσης, ώστε να εξαλειφθούν τα προβληματικά κύτταρα, στα πλαίσια μίας αμυντικής διαδικασίας, που προστατεύει τον οργανισμό από την καρκινογένεση. Στην περίπτωση προσωρινής παύσης του κύκλου, το κύτταρο μπαίνει σε μία φάση ηρεμίας, ώστε να επιδιορθωθεί η βλάβη και στη συνέχεια επανέρχεται στον κύκλο και μάλιστα στο σημείο όπου αυτός είχε διακοπεί.

Το σημείο G2/M ελέγχει τις βλάβες του αναδιπλασιασμένου DNA μέσω της ενεργοποίησης των κινάσων Chk1 και Chk2. Πρόκειται για κινάσες σερίνης-θρεονίνης που ενεργοποιούνται σε περιπτώσεις βλαβών στο DNA.¹¹⁰ Οι κινάσες αυτές έχουν πολλά κοινά ενζυμικά υποστρώματα. Μετά την ενεργοποίησή τους φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες, οι οποίες μεταδίδουν το σήμα των σημείων ελέγχου. Τα κυτταρικά γεγονότα που πυροδοτούνται στη συνέχεια μπορεί να είναι η έναρξη της επιδιόρθωσης του DNA, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η κυτταρική απόπτωση ή η αναδόμηση της χρωματίνης.

Η κινάση Chk2 εκφράζεται καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου¹¹¹ και είναι ανενεργή όταν δεν υπάρχουν βλάβες στο DNA. Ενεργοποιείται από την κινάση ATM όταν υπάρχει διακοπή της διπλής έλικας του DNA, που οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες, όπως φάρμακα που επεμβαίνουν στο DNA. Η ενεργοποίησή της περιλαμβάνει διμερισμό και αυτοφωσφορυλίωση.

Η κινάση Chk1 περιορίζεται στις φάσεις S και G2¹¹¹ και είναι ενεργή ακόμα και όταν δεν υπάρχουν διαδικασίες επιδιόρθωσης βλαβών του DNA.¹¹² Ενεργοποιείται από την κινάση ATR μετά από επίδραση υπερϊώδους ακτινοβολίας, ή αντικαρκινικών φαρμάκων και σε κάποιες περιπτώσεις και από την κινάση ATM.¹¹³ Η ενεργοποίησή της είναι εντονότερη σε περιπτώσεις βλαβών του DNA ή καθυστέρησης στην αντιγραφή και δεν απαιτεί διμερισμό και αυτοφωσφορυλίωση, όπως συμβαίνει στην κινάση Chk2.

I.9 Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινασών στην καρκινογένεση

Όπως προαναφέρθηκε, είμαστε σε θέση σήμερα να υποστηρίξουμε με πολλά στοιχεία ότι η υπερέκφραση και υπερενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών εμπλέκεται στην εμφάνιση πολλών σοβαρών ασθενειών, μεταξύ άλλων του σακχαρώδους διαβήτη και της φλεγμονής, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την εξέλιξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του καρκίνου. Έχει τεκμηριωθεί ότι η απορρύθμιση της λειτουργίας πρωτεϊνικών κινασών παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνισή τους. Πολλά είδη καρκινικών όγκων οφείλονται σε δυσλειτουργία κινασών-υποδοχέων ή μη υποδοχέων. Η υπερέκφραση ή/και ανεξέλεγκτη ενεργότητα κινασών διαταράσσει τη λειτουργία μονοπατιών που σχετίζονται με τη μεταγωγή του σήματος και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκινογένεσης.⁷³ Μεταξύ των μεταλλάξεων οι οποίες απαντώνται στους διάφορους καρκίνους, οι μεταλλάξεις γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεϊνικές κινάσες, κατέχουν τη μερίδα του λέοντος.¹¹⁴

Ένα γνωστό και διεξοδικά μελετημένο παράδειγμα είναι η περίπτωση της υβριδικής Bcr-Abl κινάσης που είναι συνεχώς ενεργή και ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας.¹¹⁵ Στη νόσο αυτή παρατηρείται μία χρωμοσωμική ανωμαλία που ονομάζεται «χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας»,⁶³ που χαρακτηρίζεται από αμοιβαία ανταλλαγή τμημάτων των χρωμοσωμάτων 8 και 22.^{76,116,117} Αποτέλεσμα της ανωμαλίας αυτής είναι η σύντηξη της κινάσης σερίνης-θρεονίνης Bcr με την κινάση τυροσίνης Abl και ο σχηματισμός της υβριδικής Bcr-Abl κινάσης στα πρόδρομα B-λεμφοκύτταρα, που οδηγεί στην εμφάνιση λευχαιμίας. Άλλο παράδειγμα αφορά την υπερέκφραση κυτταρικών υποδοχέων με ιδιότητα κινάσης, όπως ο υποδοχέας του αγγειακού-ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR) που

επάγει την αγγειογένεση και κατά συνέπεια την αύξηση του μεγέθους των στερεών όγκων.^{77,118} Επίσης, η υπερέκφραση του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor Receptor, PDGFR) έχει αναφερθεί ως αιτία για πολλές μορφές καρκίνου, γλοιώματα, σαρκώματα, μελάνωμα, καρκίνο του μαστού, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, των οστών, του πνεύμονα και των ωοθηκών. Επίσης, η υπερέκφραση του EGFR σχετίζεται με την καρκινογένεση και έχει εντοπισθεί σε γλοιοβλαστώματα και καρκίνο του πνεύμονα.⁷⁶

Σχετικά με τις CDKs που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχει βρεθεί ότι η CDK2 υπερεκφράζεται στους καρκίνους του παχέος εντέρου και του πνεύμονα, ενώ οι CDKs 4 και 6 σε σαρκώματα, σε ορισμένους τύπους λευχαιμίας, σε γλοιώματα, σε καρκίνους του μαστού, σε λεμφώματα και σε μελάνωμα.^{104,119} Η σωστή λειτουργία των κινασών Chk1 και Chk2 είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση του κυττάρου σε περιπτώσεις βλαβών του DNA. Επομένως, είναι σαφές ότι μεταλλάξεις στα γονίδια που τις κωδικοποιούν μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση νεοπλασιών. Σε κάποιες περιπτώσεις καρκίνου του στομάχου,¹²⁰ του εντέρου και του ενδομητρίου¹²¹ έχουν παρατηρηθεί μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί την κινάση Chk1. Σχετικά με την κινάση Chk2, η μετάλλαξη του γονιδίου που την κωδικοποιεί, οδηγεί σε απώλεια της λειτουργίας της και στην εμφάνιση του συνδρόμου Li-Fraumeni.¹²² Πρόκειται για μία κληρονομική μορφή καρκίνου που παρατηρείται σε νεαρά άτομα και οι νεοπλασίες που εμφανίζονται είναι κατά κύριο λόγο στερεοί όγκοι μαστού και σαρκώματα. Επιπλέον, κληρονομικές μεταλλάξεις τέτοιου τύπου έχουν παρατηρηθεί σε καρκίνους προστάτη, μαστού,¹²³ πνεύμονα,¹²⁴ κόλπου,¹²⁵ ωοθηκών,¹²⁶ καθώς και σε οστεοσαρκώματα και λεμφώματα.^{127,128}

I.10 Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών

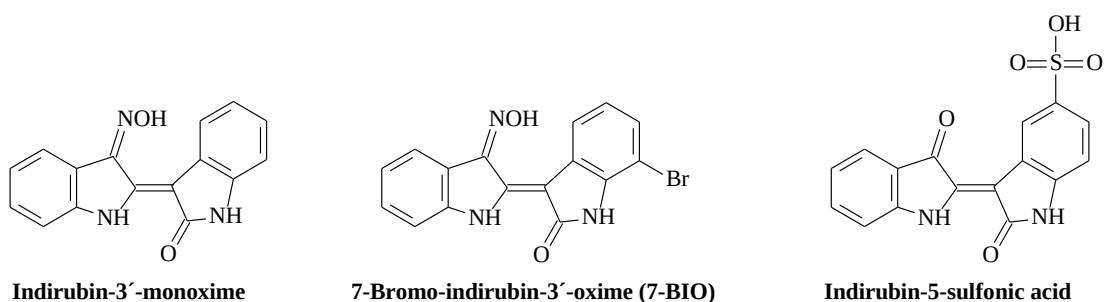
I) Φυσικά προϊόντα

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί, ταυτοποιηθεί και αξιολογηθεί φαρμακολογικά πολλά φυσικά προϊόντα έναντι διαφόρων θεραπευτικών στόχων.^{129,130} Παρακάτω παρατίθενται μερικά από τα σημαντικότερα φυσικά προϊόντα που δρουν ως αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.

α) Ιντιρουμπίνη και ανάλογά της

Πρόκειται για το δραστικό συστατικό ενός μίγματος 11 βοτάνων που ονομάζεται *Danggui Longhui Wan*, το οποίο χρησιμοποιείται πάνω από 4000 χρόνια στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική για τη θεραπεία χρόνιων ασθενειών,

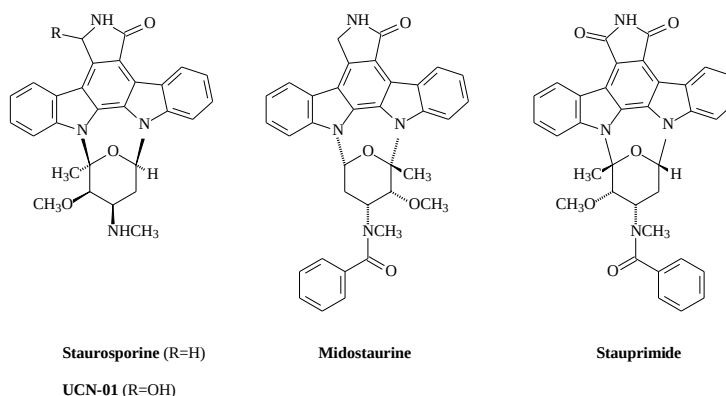
συμπεριλαμβανομένης της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η Ιντιρουμπίνη αναστέλλει τη σύνθεση του DNA σε διάφορες καρκινικές σειρές, ενώ παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα. Συγκεκριμένα, αναστέλλει τις CDKs, μπλοκάροντας με αυτόν τον τρόπο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις φάσεις G1 και G2/M του κυτταρικού κύκλου. Παρουσιάζει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (άρα και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα αφού δεν απορροφάται εύκολα από τους ιστούς), με αποτέλεσμα να καταβάλλεται συνεχώς προσπάθεια για τη σύνθεση νέων αναλόγων με βελτιωμένες ιδιότητες.^{58,131} Ανάμεσα στα παράγωγα της Ιντιρουμπίνης που έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα, ξεχωρίζουν η Ιντιρουμπινο-3'-μονοξίμη που αναστέλλει τις CDKs 1 και 2, καθώς και την GSK-3,¹³² το Ιντιρουμπινο-5-σουλφονικό οξύ που αναστέλλει τις CDKs 1, 2 και 5¹³³⁻¹³⁵ και η 7-Βρωμο-ιντιρουμπινο-3'-οξίμη. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το μόριο αυτό διαφέρει από τα υπόλοιπα παράγωγα της Ιντιρουμπίνης καθώς δεν αναστέλλει τις CDKs και την GSK-3, αφού αδυνατεί να εισέλθει στο ενεργό τους κέντρο. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση που προκαλεί το άτομο του βρωμίου.¹³⁶ Εντούτοις, περαιτέρω πειράματα έδειξαν ότι είναι δραστική έναντι των κινασών Aurora B και C.¹³⁷ Παρακάτω παρατίθενται οι δομές των προαναφερθέντων παραγώγων.



β) Σταυροσπορίνη και ανάλογά της

Πρόκειται για φυσικό αλκαλοειδές που απομονώθηκε το 1977 από το βακτήριο *Streptomyces staurosporeus*. Είναι αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών, αφού ανταγωνίζεται το ATP στη θέση πρόσδεσης της κινάσης. Η σύνδεσή της με την κινάση χαρακτηρίζεται από μεγάλη συγγένεια αλλά μικρή εκλεκτικότητα.^{56,138} Έχει βρεθεί ότι η Σταυροσπορίνη επάγει την κυτταρική απόπτωση. Ο μηχανισμός όμως δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστός. Εντούτοις, πιστεύεται ότι επάγει την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της κασπάσης-3.^{139,140} Επίσης, προκαλεί αναστολή της φάσης G1 σε πολλές καρκινικές σειρές.^{141,142} Παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα κατά τη χρήση της ως θεραπευτικό μέσο αλλά είναι χρήσιμη σε *in vitro* μελέτες ως κυτταροστατικός παράγοντας και προστατεύει τα υγιή κύτταρα από τις τοξικές δράσεις των αντικαρκινικών φαρμάκων.¹⁴³ Χρησιμοποιώντας ως ένωση-οδηγό τη Σταυροσπορίνη έχουν συντεθεί διάφορα ανάλογα μόρια. Αναφέρεται η Μιδοσταυρίνη, που είναι αναστολέας πολλών πρωτεϊνικών κινασών και έχει δοκιμασθεί στη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου. Μετά την

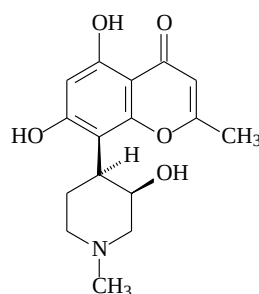
επιτυχία που σημείωσε στη φάση II των κλινικών δοκιμών, προχώρησε στη φάση III και συγχρηγήθηκε με Δαουνορουβική και Κυταραβίνη σε οξεία μυελογενή λευχαιμία, ενώ δεν είναι δραστική σε μεταστατικό μελάνωμα.^{144,145} Επίσης, αναφέρεται το Σταυπριμίδιο, που είναι ημισυνθετικό ανάλογο της Σταυροσπορίνης. Εισήχθη ως πιθανός αντικαρκινικός παράγοντας το 1994 σε δοκιμές σχέσεων δομής-δράσης που αποσκοπούσαν στη βελτίωση της εκλεκτικής αναστολής της κινάσης C. Πρόσφατα βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με το γονίδιο NME2, το οποίο κωδικοποιεί τη διφωσφορική νουκλεοσιδική κινάση B (Nucleoside Diphosphate Kinase, NDK), επάγοντας τη διαφοροποίηση των κυττάρων του εμβρυακού στελέχους.^{146,147} Το UCN-01 είναι ένα υδροξυλιωμένο παράγωγο της Σταυροσπορίνης, το οποίο απομονώθηκε από ένα βακτήριο του γένους *Streptomyces* και παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στην πρωτεϊνική κινάση C σε σχέση με τη Σταυροσπορίνη.¹⁴⁸ Σε *in vitro* και *in vivo* προκλινικές μελέτες βρέθηκε ότι έχει αντικαρκινικές¹⁴⁹⁻¹⁵¹ και κυτταροστατικές ιδιότητες^{152,153} και έχει ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης Chk1.¹⁵⁴ Επάγει την απόπτωση μέσω αναστολής κάποιων αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών.^{155,156} Παρακάτω παρατίθενται οι δομές της Σταυροσπορίνης και των αναλόγων της.



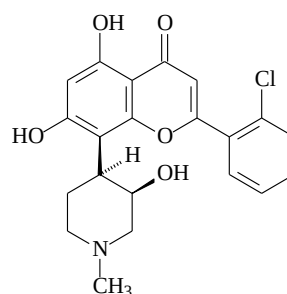
γ) Φλαβοπυριδόλη

Πρόκειται για ημισυνθετική φλαβόνη, η δομή της οποίας βασίζεται στο φυσικό φλαβονοειδές Ροχιτουκίνη, που απομονώνεται από τα ενδογενή φυτά της Ινδίας *Amoora rohituka* και *Dysoxylum binectariferum* της οικογένειας *Meliaceae*.^{157,158} Η Φλαβοπυριδόλη είναι ένωση η οποία συντέθηκε, μαζί με πολλές άλλες, κατά τη διάρκεια μελετών σχέσεων δομής-δράσης. Οι μηχανισμοί δράσης της δεν είναι μέχρι σήμερα πλήρως γνωστοί. Αρχικά, είχε παρατηρηθεί ότι αναστέλλει τον υποδοχέα της κινάσης τυροσίνης (RTK)¹⁵⁹ και τις κινάσες A και C. Παρόλα αυτά, είναι γνωστό πλέον ότι αναστέλλει και τις CDKs και πολλές αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει εκλεκτικότητα έναντι των συμπλόκων κυκλίνης B/CDK1, κυκλίνης D/CDK4 και κυκλίνης D/CDK6, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου στις φάσεις G1 και G2/M.¹⁵⁹⁻¹⁶³ Η Φλαβοπυριδόλη είναι ο πρώτος αναστολέας των CDKs που παρουσιάζει επιτυχία στις κλινικές δοκιμές και αποτελεί αντικείμενο ενδεδειγμένου έρευνας λόγω της ισχυρής ανασταλτικής δράσης της σε

πολλές καρκινικές σειρές.^{153,164-166} Συγκεκριμένα, ανταγωνίζεται το ATP στη θέση πρόσδεσης των εν λόγω κινασών. Σήμερα, υποβάλλεται σε δοκιμές φάσης I και II, χορηγούμενη είτε μόνη,¹⁶⁷⁻¹⁷² είτε σε συνδυασμό με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες^{173,174} σε ένα ευρύ φάσμα καρκινικών σειρών, συμπεριλαμβανομένων των λευχαιμιών, των λεμφωμάτων και των στερεών συμπαγών όγκων. Πειράματα έχουν δείξει ότι οι κυτταρικές σειρές του καρκίνου του προστάτη και του μελανώματος είναι ευαίσθητες σε μικρές συγκεντρώσεις της Φλαβοπυριδόλης, ενώ παρουσιάζει συνέργεια όταν συγχρηρηθεί με Πακλιταξέλη, Κυταραβίνη, Τοποτεκάνη και Δοξορουβικίνη. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι επάγει την απόπτωση,^{157,175,176} τη διαφοροποίηση και αναστέλλει τη διαδικασία της αγγειογένεσης.^{162,176-181} Τέλος, παρουσιάζει σημαντική δράση έναντι μορφών αρθρίτιδας¹⁸² και του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας.¹⁸³ Παρακάτω παρατίθενται οι δομές της Ροχιτουκίνης και της Φλαβοπυριδόλης.



Rohitukine



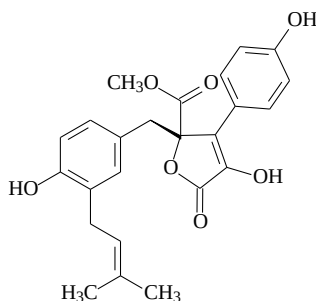
Flavopiridol

Τα φλαβονοειδή είναι μία ομάδα περισσότερων από 4000 παραγώγων, τα οποία απαντούν σε φυτικής προέλευσης τροφές και σε διάφορα φαρμακευτικά φυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν στη λαϊκή θεραπευτική σε όλο τον κόσμο και ιδιαίτερα στην Κίνα.¹⁸⁴⁻¹⁸⁸ Τα φλαβονοειδή φέρουν στη χημική δομή τους το σκελετό της φαινυλβενζοπυρόνης και κατατάσσονται σε χημικές υποκατηγορίες, ανάλογα με το βαθμό κορεσμού του πυρανικού δακτυλίου.^{189,190} Στο παρελθόν, έχουν μελετηθεί πολλά τέτοια παράγωγα έναντι διαφόρων σειρών καρκινικών κυττάρων, όπως του μαστού,^{191,192} του θυρεοειδούς αδένος,^{193,194} του πνεύμονα,^{195,196} του παχέος εντέρου,¹⁹⁷⁻²⁰¹ και του προστάτη.²⁰²⁻²⁰⁵ Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι πολλά φλαβονοειδή επάγουν την απόπτωση μέσω διαφόρων μηχανισμών. Ως παραδείγματα αναφέρονται η αναστολή των κινασών τυροσίνης,^{206,207} της κινάσης C²⁰⁸ και των κινασών PIP₃,^{209,210} η αναστολή της αγγειογένεσης²¹¹⁻²¹³ και η επαγωγή της διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων.^{197,214-217}

δ) Βουτυρολακτόνη I

Πρόκειται για δευτερογενή μεταβολίτη του μύκητα *Aspergillus terreus*. Έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τις CDKs των ευκαρυωτικών κυττάρων, ενώ δεν παρουσιάζει έντονη ανασταλτική δράση έναντι άλλων πρωτεϊνικών κινασών, όπως τις MAPKs και την

κινάση C. Συγκεκριμένα, πειράματα έδειξαν ότι η Βουτυρολακτόνη I αναστέλλει ιδιαίτερα αποτελεσματικά τις CDKs 1 και 2 με χαμηλές τιμές IC₅₀ (2.6 και 0.8 μM αντίστοιχα), ενώ αντίθετα για την αναστολή μη κυκλινοεξαρτώμενων κινασών η αντίστοιχη τιμή ανέρχεται πάνω από τα 100 μM.^{59,218} Παρακάτω παρατίθεται η δομή της Βουτυρολακτόνης I.

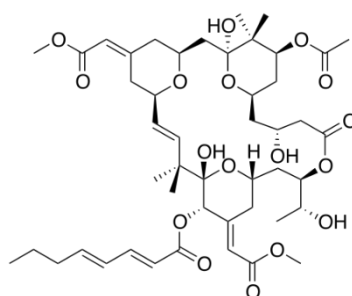


Butyrolactone I

ε) Βρυοστατίνη 1

Οι Βρυοστατίνες είναι μία ομάδα μακροκυκλικών λακτονών, οι οποίες απομονώθηκαν τη δεκαετία του 1960 από εκχυλίσματα ενός είδους βρυοζώου που ονομάζεται *Bugula neritina*. Η δομή της Βρυοστατίνης 1 αποδόθηκε το 1982²¹⁹ και μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 20 διαφορετικές Βρυοστατίνες.²²⁰ Οι Βρυοστατίνες είναι πιθανοί ρυθμιστές της κινάσης C. Βρίσκονται υπό διερεύνηση ως αντικαρκινικοί παράγοντες και ως ενισχυτικοί παράγοντες της μνήμης. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι η Βρυοστατίνη 1 έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση και την αγγειογένεση, ενώ επάγει τη διαφοροποίηση και την απόπτωση σε κυτταρική σειρά της χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι δρα συνεργιστικά με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες. Η συνδυασμένη χορήγηση αντικαρκινικών παραγόντων είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα έναντι διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων. Αντίστοιχες έρευνες που έγιναν σε ζώα έδωσαν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, κάτι που δεν συνέβη όταν δοκιμάστηκε ως μονοθεραπεία σε φάση II σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του μελανώματος και του παχέος εντέρου. Ως συνέπεια αυτών των κλινικών παρατηρήσεων, σήμερα μελετάται η συγχορήγηση της με αντικαρκινικούς παράγοντες, όπως η Γεμισταβίνη, η Βινκριστίνη, η Σισπλατίνη και η Πακλιταξέλη. Επιπλέον, έχει μελετηθεί σε κλινικές φάσεις I και II σε καρκίνους του προστάτη, του πνεύμονα, στο λέμφωμα non-Hodgkin, στους καρκίνους του μαστού, των νεφρών, των ωοθηκών, του οισοφάγου, του στομάχου και του τραχήλου της μήτρας.²²¹ Η Βρυοστατίνη 1 διαθέτει επιπλέον και ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες.²²² Λόγω της χαμηλής περιεκτικότητας του βρυοζώου στη Βρυοστατίνη 1, κρίθηκε αναγκαία η ολική σύνθεσή της. Εξαιτίας της δομικής πολυπλοκότητας των Βρυοστατινών, λίγες μέθοδοι ολικής σύνθεσης έχουν δημοσιευθεί. Συγκεκριμένα, είναι γνωστές οι ολικές συνθέσεις των Βρυοστατινών 1, 2, 3, 7, 9 και 16.²²³⁻²²⁹

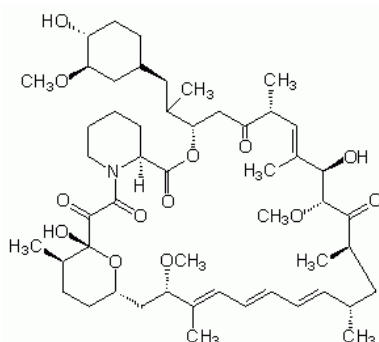
Επίσης, έχουν συντεθεί δομικά ανάλογα της Βρυοστατίνης 1, τα οποία είναι εξίσου ή πλέον δραστικά από το μητρικό μόριο.²³⁰ Παρακάτω παρατίθεται η δομή της Βρυοστατίνης 1.



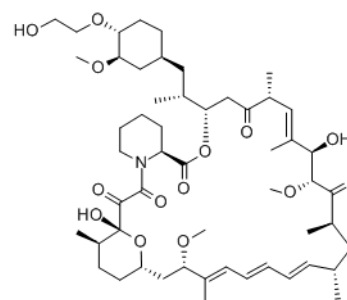
Bryostatin 1

στ) Ραπαμυκίνη (Sirolimus) και το παράγωγό της RAD001 (Everolimus)

Η Ραπαμυκίνη είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο απομονώθηκε το 1975 από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus*.^{231,232} Αρχικά, μελετήθηκε ως αντιμυκητιασικός παράγοντας αλλά περαιτέρω έρευνες αποκάλυψαν και τις αντικαρκινικές ιδιότητές της. Η Ραπαμυκίνη αναστέλλει την κινάση σερίνης-θρεονίνης mTOR, η οποία ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, καθώς και την πρωτεϊνσύνθεση και τη μεταγραφή.²³³ Έχει βρεθεί ότι η Ραπαμυκίνη εμποδίζει την εξέλιξη του σαρκώματος Kaposi σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρών. Το RAD001 είναι το 40-O-(2-υδροξυαιθυλο) παράγωγο της Ραπαμυκίνης, αναστέλλει την ίδια κινάση και υποβάλλεται σε δοκιμές έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως το γλοιοβλάστωμα, το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και το λέμφωμα. Βρίσκεται ήδη σε κλινική εφαρμογή ως ανοσοκατασταλτικό για την αποφυγή απορρίψεων μοσχευμάτων,²³⁴ σε θεραπείες προχωρημένου καρκίνου του νεφρού, καθώς και σε προχωρημένους ή μεταστατικούς μη χειρουργήσιμους παγκρεατικούς νευροενδοκρινείς όγκους. Επίσης, χορηγείται σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που βρίσκονται στη μετα-εμμηνοπαυσιακή περίοδο. Παρακάτω παρατίθενται οι δομές της Ραπαμυκίνης και του RAD001.



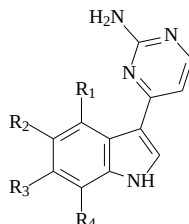
Rapamycin (Rapamune^R)



RAD001 (Afinitor^R)

ζ) Μεριδιανίνες

Πρόκειται για βρωμιωμένα 3-(2-αμινοπυριμιδιν)-ινδόλια, τα οποία απομονώνονται από έναν οργανισμό που απαντά στο Νότιο Ατλαντικό Ωκεανό και ονομάζεται *Aplidium meridianum*. Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών, όπως οι CDKs, η GSK-3, οι PKA και PKG, καθώς και οι CK-1. Οι Μεριδιανίνες εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας την απόπτωση.²³⁵



Meridianin A: R₁=OH
R₂, R₃, R₄=H

Meridianin E: R₁=OH
R₂, R₃=H
R₄=Br

Meridianin B: R₁=OH
R₂, R₄=H
R₃=Br

Meridianin F: R₁, R₄=H
R₂, R₃=Br

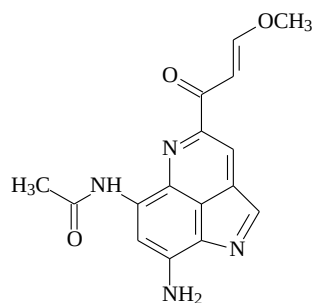
Meridianin C: R₁, R₃, R₄=H
R₂=Br

Meridianin G: R₁, R₂, R₃, R₄=H

Meridianin D: R₁, R₂, R₄=H
R₃=Br

η) Λεμφοστίνη

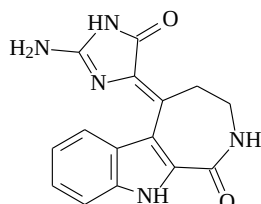
Πρόκειται για τρικυκλικό αρωματικό αλκαλοειδές που διαθέτει πυρήνα πυρρολοκινολίνης, το οποίο ανακαλύφθηκε στα πλαίσια έρευνας για ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες από βακτήρια του είδους *Streptomyces*.^{236,237} Βρέθηκε ότι αναστέλλει τις κινάσες Src, PI3K²³⁸ και mTOR.²³⁹ Η ολική σύνθεσή της δημοσιεύθηκε το 2004, έχοντας ως πρώτη ύλη το αμινοξύ τρυπτοφάνη.²⁴⁰ Παρακάτω παρατίθεται η δομή της Λεμφοστίνης.



Lymphostin

θ) Υμενιαλδισίνη

Απομονώθηκε το 1982 από θαλάσσιους σπόγγους των ειδών *Acanthella* και *Axinella* των οικογενειών *Agelasidae*, *Axinellidae* και *Haliichondridae*.²⁴¹⁻²⁴⁴ Δρα ανταγωνιζόμενη το ATP στη θέση πρόσδεσης της κινάσης, με τον πυρρολοαζεπινικό δακτύλιο να αντικαθιστά την αδείνη. Αναστέλλει τις CDKs 1, 2 και 5, την GSK-3, τις CK-1²⁴⁵ και τη MEK-1.²⁴⁶ Παρακάτω παρατίθεται η δομή της Υμενιαλδισίνης.

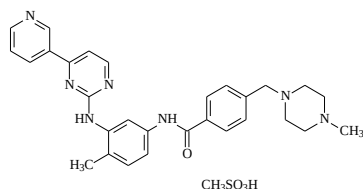


Hymenialdisine

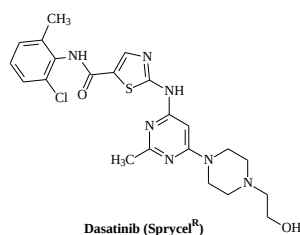
Π) Συνθετικά μόρια-ανταγωνιστές του ATP

Οι χημικές ομάδες στις οποίες ανήκουν, ποικίλουν. Παρακάτω παρατίθενται οι δομές των φαρμάκων που έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας, οι ενδείξεις και οι κινήσεις που αναστέλλουν.²⁴⁷

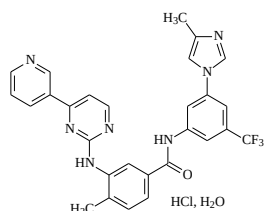
α) Πυριμιδίνες



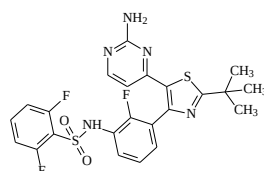
Imatinib Mesylate (Gleevec[®])



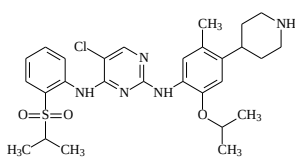
Dasatinib (Sprycel[®])



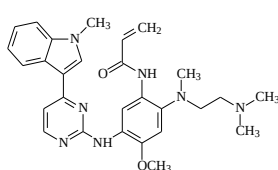
Nilotinib (Tasigna[®])



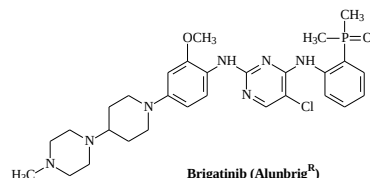
Dabrafenib (Tafinlar[®])



Ceritinib (Zykadia[®])



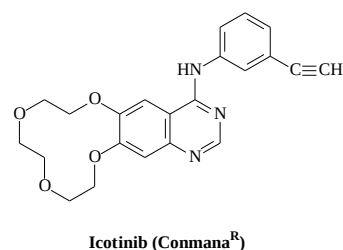
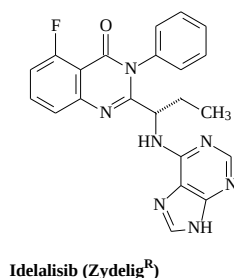
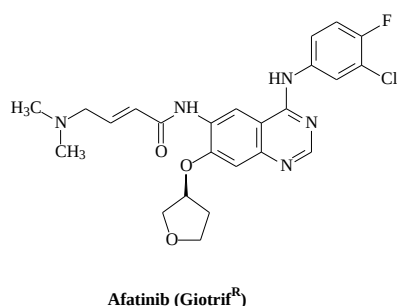
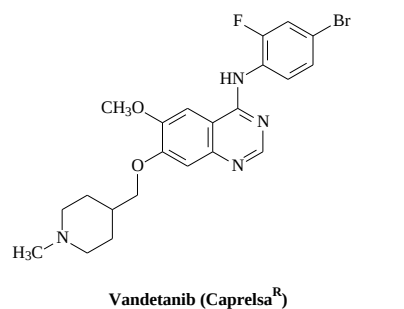
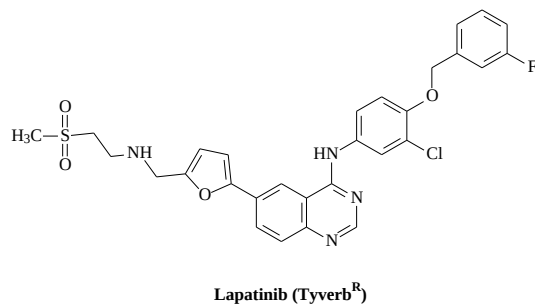
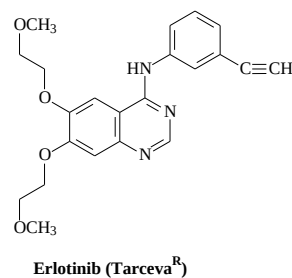
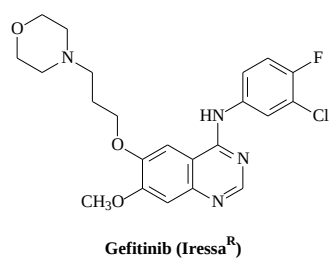
Osimertinib (Tagrisso[®], Tagrix[®])



Brigatinib (Alunbrig[®])

Τα τρία πρώτα φάρμακα (Ιματινίμπη, Δαζατινίμπη και Νιλοτινίμπη) αναστέλλουν την Bcr-Abl υβριδική κινάση και χορηγούνται στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Η Μεθανοσουλφονική Ιματινίμπη αναστέλλει επίσης και τις PDGFR και c-Kit και χορηγείται και σε μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Η Ιματινίμπη ήταν ο πρώτος αναστολέας πρωτεϊνικών κινάσων που πήρε έγκριση κυκλοφορίας το 2001 και δρα μιμούμενη τη δομή του ATP και συνδέεται στη θέση πρόσδεσης του ATP.²⁴⁸ Με τον τρόπο αυτό, σταθεροποιεί την ανενεργή διαμόρφωση του ενζύμου εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και επομένως τη δράση του.^{249,250} Οι αναστολείς αυτού του είδους, που εμφανίζουν χημική συγγένεια με κινάσες που βρίσκονται στην ανενεργή διαμόρφωσή τους, ονομάζονται αναστολείς τύπου-II (type II inhibitors) και παρουσιάζουν αυξημένη εκλεκτικότητα έναντι αναστολέων που προσδένονται σε ενεργοποιημένες κινάσες (αναστολείς τύπου-I, type I inhibitors).²⁴⁹ Το εν λόγω φάρμακο αποδείχθηκε επιτυχημένο διότι συνδυάζει θεραπευτική αποτελεσματικότητα και απουσία σοβαρών παρενεργειών. Κατά την πάροδο του χρόνου αναπτύχθηκε αντοχή στο φάρμακο με αποτέλεσμα να σχεδιαστούν νέες ενώσεις κατάλληλες για χορήγηση σε χρόνια μυελογενή λευχαιμία ανθεκτική στην Ιματινίμπη. Έτσι, σχεδιάστηκαν η Δαζατινίμπη και η Νιλοτινίμπη.²⁵¹ Η Δαβραφενίμπη αναστέλλει τις κινάσες RAS και BRAF και συγχορηγείται με την Τραμετινίμπη σε μεταστατικό μελάνωμα. Η Τραμετινίμπη αναστέλλει τις κινάσες MEK και RAS. Η συγχορήγηση πραγματοποιείται όταν αναπτυχθεί αντοχή σε μονοθεραπεία με Δαβραφενίμπη. Η συγχορήγηση συμβάλλει στο να υπερκεραστεί η αντοχή που αναπτύσσει ο καρκινικός όγκος.²⁵² Οι Σεριτινίμπη και Οσιμερτινίμπη αναστέλλουν τις κινάσες ALK και EGFR αντίστοιχα,²⁵³⁻²⁵⁵ ενώ η Βριγατινίμπη αναστέλλει και τις δύο κινάσες.^{256,257} Χορηγούνται στο μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.^{253,258,259} Η Σεριτινίμπη χορηγείται σε ασθενείς στους οποίους έχει αποτύχει η θεραπεία με Κριζοτινίμπη. Η Βριγατινίμπη υπερνικά την αντοχή σε Οσιμερτινίμπη όταν συγχορηγηθεί με Σετουξιμάμπη ή Πανιτουμουμάμπη.²⁶⁰

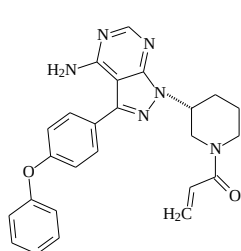
β) Κιναζολίνες



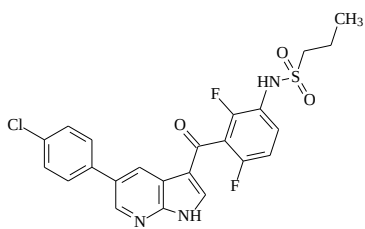
Τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τον EGFR, εκτός από την Ιδελαλισίμπη, που αναστέλλει την κινάση PI3K.²⁶¹ Η Ζεφτινίμπη και η Ερλοτινίμπη χορηγούνται στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και στον καρκίνο του παγκρέατος.^{262,263} Η Λαπατινίμπη χορηγείται στον καρκίνο του μαστού. Η Βαντετανίμπη αναστέλλει και τις κινάσες VEGFR2, RET, ErbB-1 και χορηγείται στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα. Η Αφατινίμπη αναστέλλει και τον HER-2 (ErbB-2) και είναι φάρμακο πρώτης γραμμής στη θεραπεία του μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα,²⁶⁴ ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να ενισχύσει τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.²⁶⁵ Η Ιδελαλισίμπη είναι φάρμακο δεύτερης γραμμής στη θεραπεία της χρόνιας υποτροπιάζουσας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας.²⁶⁶ Επιπλέον, χορηγείται στο λέμφωμα non-Hodgkin. Η Ικοτινίμπη είναι φάρμακο δεύτερης και τρίτης γραμμής στη θεραπεία του προχωρημένου ή μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.²⁶⁷ Χορηγείται σε ασθενείς στους οποίους έχει αποτύχει η θεραπεία με ενώσεις Λευκόχρυσου.

γ) Πουρινικά ανάλογα και συναφή ετεροκυκλικά παράγωγα

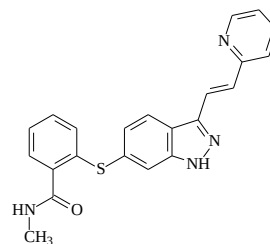
Πρόκειται για φάρμακα που περιέχουν στη δομή τους ποικιλία μονοκυκλικών ή δικυκλικών ετεροκυκλικών συστημάτων.



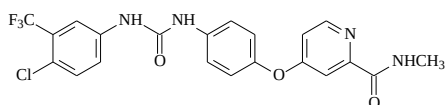
Ibrutinib (Imbruvica[®])



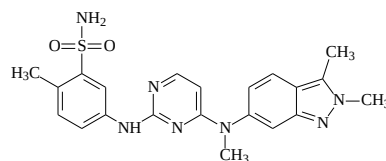
Vemurafenib (Zelboraf[®])



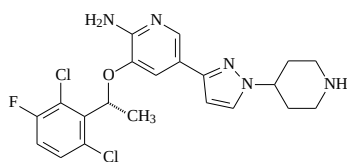
Axitinib (Inlyta[®])



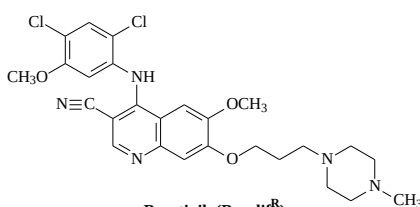
Sorafenib (Nexavar[®])



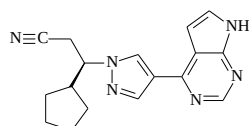
Pazopanib (Votrient[®])



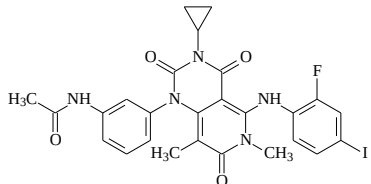
Crizotinib (Xalkori[®])



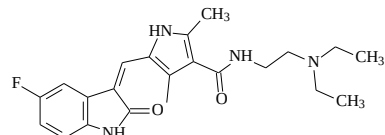
Bosutinib (Bosulif[®])



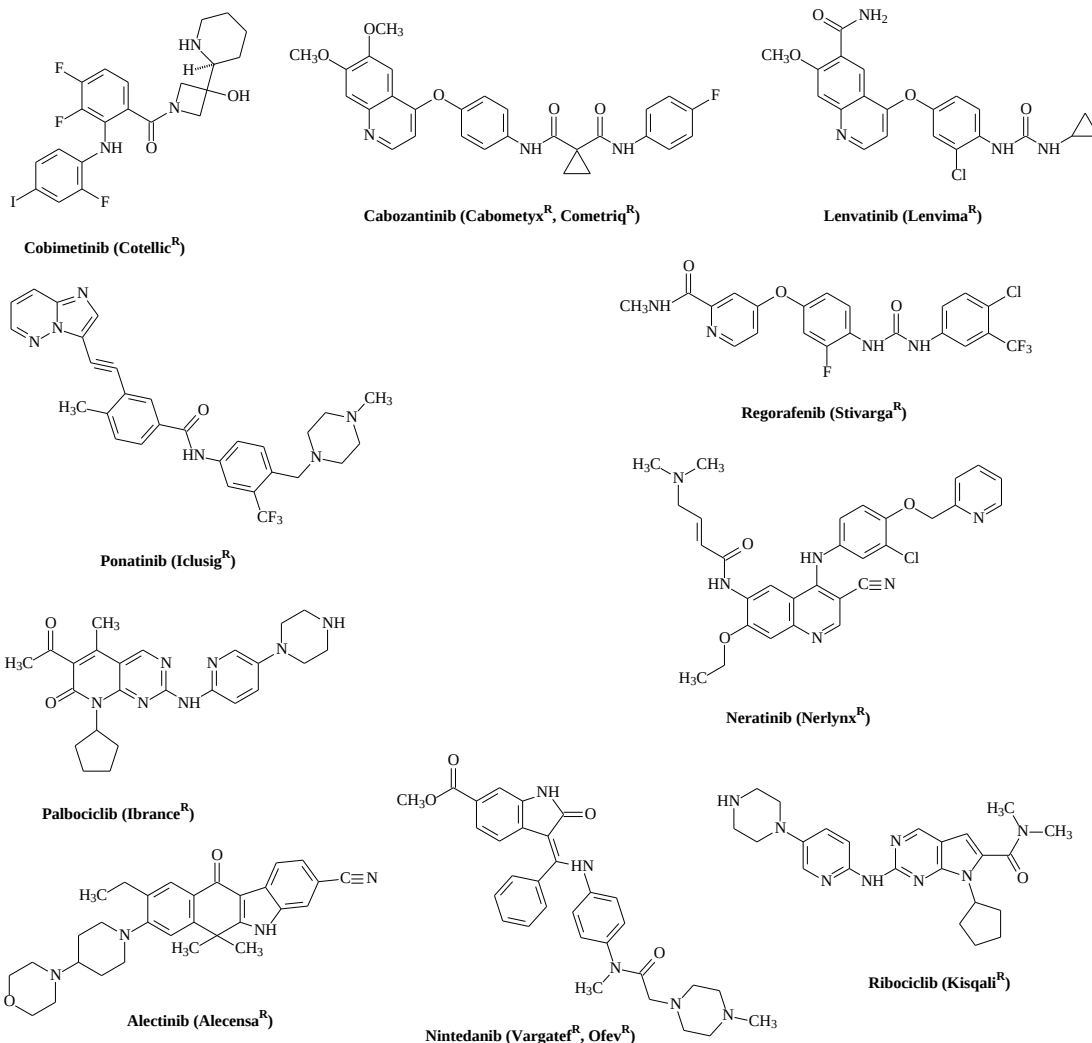
Ruxolitinib (Jakavi[®])



Trametinib (Mekinist[®])



Sunitinib (Sutent[®])



Οι Σουνιτινίμπη, Σοραφενίμπη, Παζοπανίμπη και Αξιτινίμπη αναστέλλουν τις κινάσες VEGFR, PDGFR και KIT και χορηγούνται σε καρκινώματα νεφρικών και ηπατικών κυττάρων, καθώς και σε καρκίνους του παγκρέατος και του παχέος εντέρου.^{268,269} Η Κριζοτινίμπη αναστέλλει την κινάση ALK/c-MET και χορηγείται στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ η Βεμουραφενίμπη αναστέλλει την κινάση b-RAF και χορηγείται στο μελάνωμα. Η Ρουξολιτινίμπη αναστέλλει τις κινάσες JAKs 1 και 2 και χορηγείται στη μυελοϊνωση. Η Ιβρουτινίμπη αναστέλλει την κινάση Bcr και επάγει την απόπτωση των Β-λεμφοκυττάρων. Χορηγείται σε χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Πρόκειται για καινούριο φάρμακο και ήδη μελετάται η συγχορήγησή της με μονοκλωνικά αντισώματα.²⁷⁰ Η Μποζουτινίμπη είναι επίσης νέο φάρμακο και αναστέλλει την υβριδική Bcr-Abl tyrosine κινάση, καθώς ανταγωνίζεται το ATP στη θέση πρόσδεσης της κινάσης. Επίσης, εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι των κινάσων Src, Lyn και Hck.²⁷¹ Χορηγείται σε χρόνια μυελογενή λευχαιμία σε περιπτώσεις αντοχής ή δυσανεξίας στη θεραπεία με Ιματινίμπη.^{272,273}

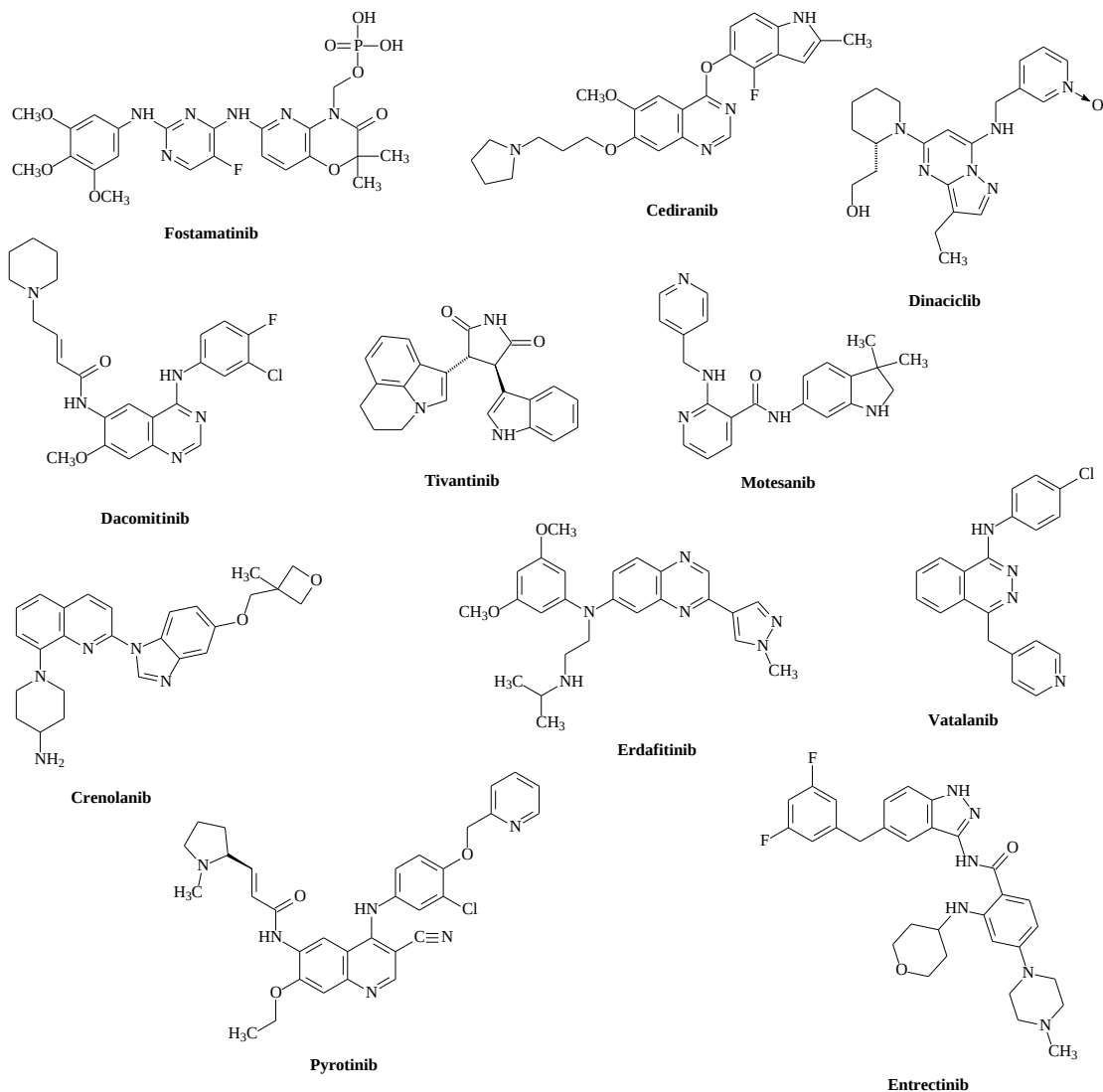
Η Κοβιμετινίμπη αναστέλλει την κινάση MEK και συγχωρηγείται με τη Βεμουραφενίμπη σε προχωρημένο μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα.²⁷⁴ Η Καβοξαντινίμπη αναστέλλει τις κινάσες c-MET, VEGFR2, AXL και RET και χορηγείται στο μυελώδη καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος,²⁷⁵ ενώ είναι φάρμακο δεύτερης γραμμής στη θεραπεία του καρκίνου του νεφρού.²⁷⁶ Η Λενβατινίμπη αναστέλλει τους VEGFRs 1, 2 και 3²⁷⁷ και χορηγείται στον εστιασμένο, προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του θυρεοειδούς αδένος²⁷⁸ και στον προχωρημένο καρκίνο του νεφρού.²⁷⁹ Η Πονατινίμπη αναστέλλει την κινάση Bcr-Abl και χορηγείται στη χρόνια μυελογενή και στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.^{280,281} Η Ρεγοραφενίμπη αναστέλλει διάφορες κινάσες και χορηγείται στο μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου²⁸² και σε στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού συστήματος.²⁸³ Οι Παλβοσικλίμπη και Ριβοσικλίμπη αναστέλλουν τις CDKs 4 και 6 και χορηγούνται στον προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού.²⁸⁴⁻²⁸⁸ Η Ριβοσικλίμπη μελετάται για τη θεραπεία και άλλων τύπων καρκίνου. Η Νερατινίμπη αναστέλλει τους HER-2 (ErbB-2) και EGFR και χορηγείται στον καρκίνο του μαστού.^{289,290} Οι Αλεκτινίμπη και Νιντεδανίμπη αναστέλλουν τις κινάσες ALK και VEGFR, PDGFR και FGFR αντίστοιχα και χορηγούνται στον προχωρημένο ή μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.²⁹¹⁻²⁹³

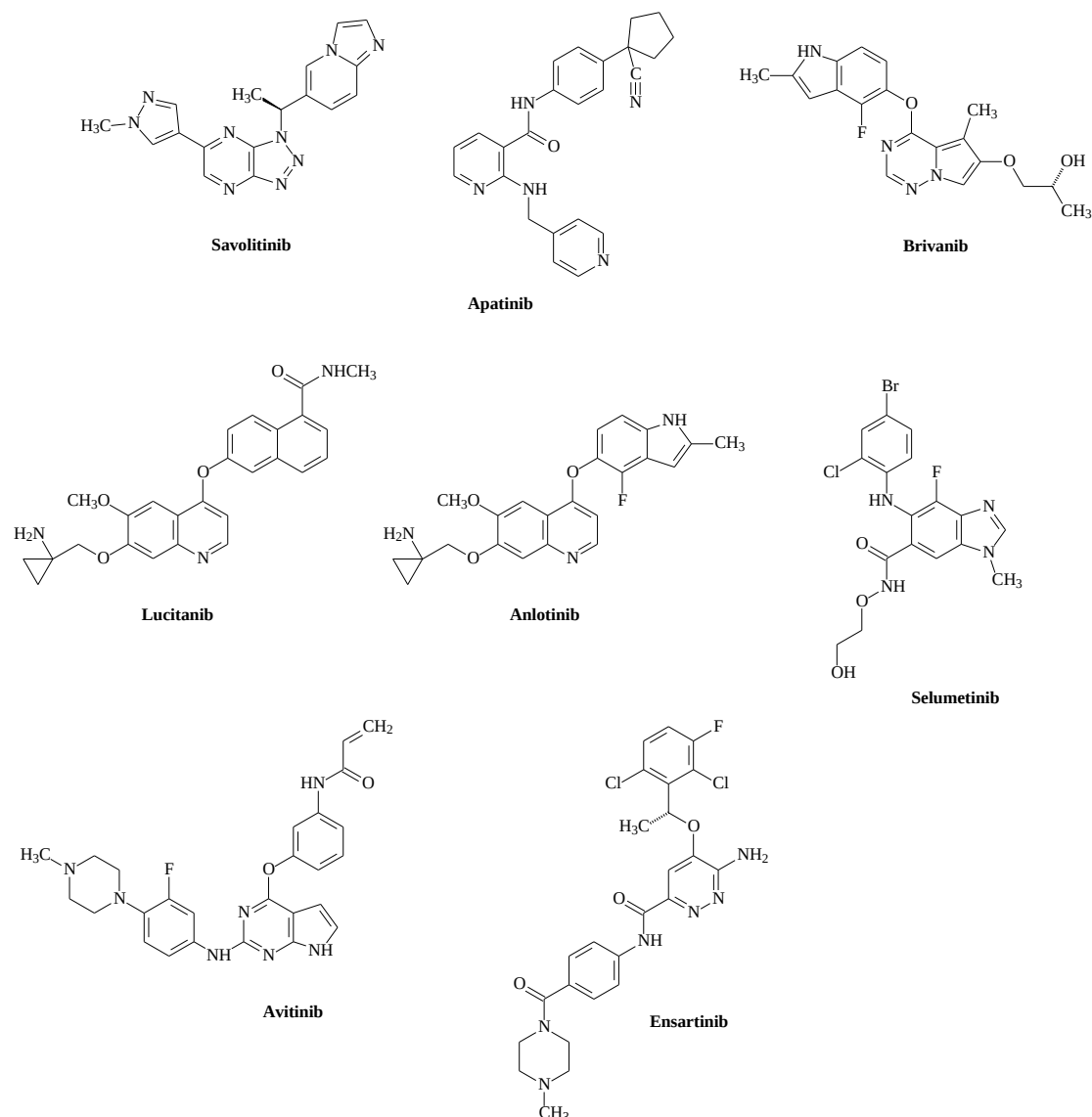
III) Μονοκλωνικά αντισώματα

Σήμερα, στην αντικαρκινική θεραπεία χρησιμοποιούνται η Τραστουζουμάμπη (Trastuzumab, Herceptin^R), η Σετουξιμάμπη (Cetuximab, Erbitux^R), η Μπεβακιζουμάμπη (Bevacizumab, Avastin^R), η Πανιτουμουμάμπη (Panitumumab, Vectibix^R) και η Ρανιμπιζουμάμπη (Ranibizumab, Lucentis^R). Η Τραστουζουμάμπη ήταν το πρώτο φάρμακο που πήρε έγκριση κυκλοφορίας το 1998 και δρα έναντι του υποδοχέα HER-2 (ErbB-2) της οικογένειας των EGFRs, οι οποίοι εκφράζονται στο 30% των περιπτώσεων διηθητικού καρκίνου του μαστού.²⁹⁴ Η Σετουξιμάμπη δρα έναντι των υποδοχέων της οικογένειας των EGFRs²⁹⁵ και είναι φάρμακο δεύτερης και τρίτης γραμμής στη θεραπεία μεταστατικών τύπων καρκίνου του εντέρου σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στην Ιρινοτεκάνη. Η Μπεβακιζουμάμπη συνδέεται στον VEGFR, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης.²⁹⁶ Αποτελεί φάρμακο πρώτης εκλογής στη θεραπεία του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς και για το μεταστατικό καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο της ρινικής κοιλότητας, σε συνδυασμό με Πακλιταξέλη και Ιντερφερόνη αντίστοιχα. Η Πανιτουμουμάμπη δρα έναντι των υποδοχέων της οικογένειας των EGFRs και χρησιμοποιείται στη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του εντέρου.²⁹⁷ Τέλος, η Ρανιμπιζουμάμπη αναστέλλει τον VEGF-A και χρησιμοποιείται έναντι της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας.²⁹⁸

I.11 Φάρμακα που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές

Εκτός από τα προαναφερθέντα φάρμακα που βρίσκονται ήδη σε κλινική εφαρμογή, έχουν συντεθεί και βρίσκονται σε στάδια κλινικών δοκιμών πολλές νέες ενώσεις που αναστέλλουν πρωτεϊνικές κινάσες. Οι ενώσεις αυτές μιμούνται δομικά το ATP, όπως και τα προαναφερθέντα φάρμακα. Παρακάτω παρατίθενται οι δομές μερικών από αυτούς τους νέους αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.



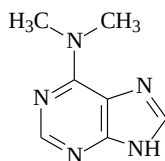


Οι Φοσταματινίμπη και Ερδαφινιτίνιμπη αναστέλλουν τις κινάσες Syk και FGFR αντίστοιχα²⁹⁹ και βρίσκονται στη φάση II των κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος λεμφώματος,³⁰⁰ του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, των καρκίνων του στομάχου, του οισοφάγου και του χολαγγειοκαρκινώματος. Οι Σεδιρανίμπη και Απατινίμπη αναστέλλουν τον VEGFR³⁰¹⁻³⁰³ και βρίσκονται στις φάσεις III και IV για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος και διαφόρων τύπων καρκίνου αντίστοιχα.³⁰⁴ Οι Δινασικλίμπη και Σαβολιτινίμπη αναστέλλουν τις CDKs και την κινάση c-MET αντίστοιχα³⁰⁵ και βρίσκονται στη φάση II για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα,³⁰⁶ του προχωρημένου καρκίνου του μαστού,³⁰⁷ του πολλαπλού μυελώματος,³⁰⁸ του προχωρημένου μελανώματος,³⁰⁹ του καρκίνου του νεφρού και του αδενοκαρκινώματος. Οι Δακομιτινίμπη, Αβιτινίμπη και Πυροτινίμπη αναστέλλουν τον EGFR και βρίσκονται στις φάσεις III (η πρώτη) και I για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του μεταστατικού καρκίνου του μαστού αντίστοιχα.³¹⁰⁻³¹² Οι Τιβαντινίμπη και

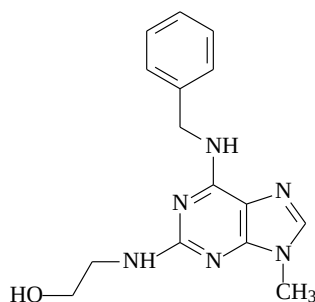
Μπριβανίμπη αναστέλλουν τις κινάσες MET και VEGFR, FGFR αντίστοιχα και βρίσκονται στη φάση III για τη θεραπεία του προχωρημένου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος.^{313,314} Οι Μοτεσανίμπη, Ανλοτινίμπη και Λουσιτανίμπη αναστέλλουν τους VEGFR, PDGFR, SCFR και FGFR και βρίσκονται στις φάσεις III (οι δύο πρώτες) και II για τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος, του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και προχωρημένων στερεών όγκων αντίστοιχα.^{315,316} Η Κρενολανίμπη αναστέλλει τις κινάσες FLT3 και PDGFR και βρίσκεται στη φάση II για τη θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας³¹⁷ και προχωρημένων στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού συστήματος. Η Βαταλανίμπη αναστέλλει τους VEGFR, PDGFR και την κινάση c-Kit^{318,319} και βρίσκεται στη φάση III για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου.³²⁰ Η Εντρεκτινίμπη αναστέλλει τις κινάσες Trk, ROS1 και ALK και βρίσκεται στη φάση II για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, των καρκίνων του παχέος εντέρου, των σιελογόνων αδένων, του θυρεοειδούς αδένος, καθώς και του μελανώματος, του λεμφώματος, του αστροκυτώματος, του σαρκώματος, του γλοιοβλαστώματος και του χολαγγειοκαρκινώματος. Οι Σελουμετινίμπη και Ενσαρτινίμπη αναστέλλουν τις κινάσες MEK και ALK αντίστοιχα^{321,322} και βρίσκονται στη φάση III για τη θεραπεία του καρκίνου του θυρεοειδούς αδένος και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

I.12 Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

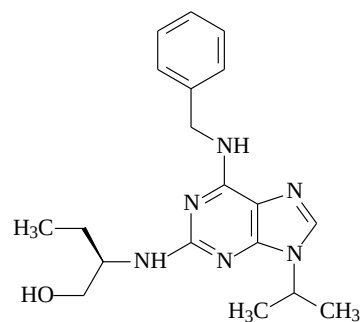
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών που χρησιμοποιούνται σήμερα στη θεραπευτική, μιμούνται και ανταγωνίζονται το ATP για τη θέση πρόσδεσης της κινάσης. Ήταν, επομένως, επακόλουθο να αναπτυχθεί μία τάση για την ανάπτυξη μικρών κατά προτίμηση μορίων που θα εμφανίζουν ανασταλτική δράση επί των πρωτεϊνικών κινασών και με δεδομένο το γεγονός ότι αυτή η ομάδα ενώσεων προσομοιάζουν το ATP, ήταν λογικό να έχουν ως βάση τον πουρινικό σκελετό. Παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις που παρουσιάζονται παρακάτω, οι οποίες βρέθηκε ότι έχουν αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι των CDKs.^{323,324}



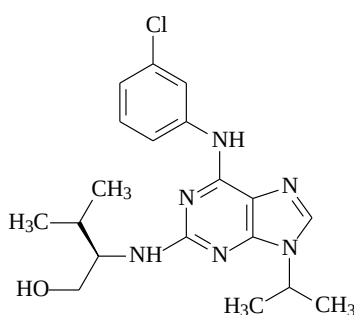
6-Dimethylaminopurine



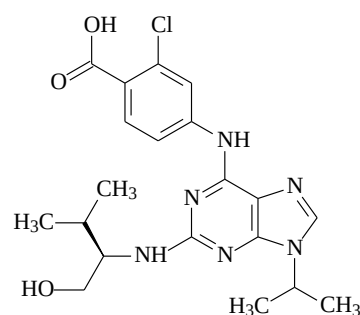
Olomoucine



Roscovitine



Purvalanol A



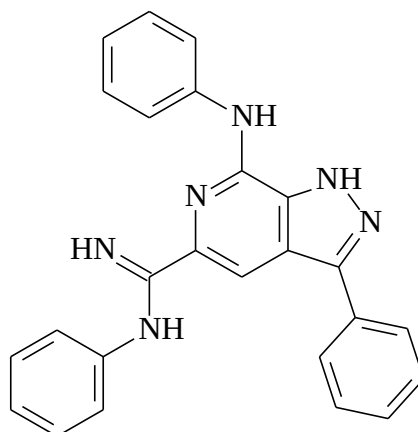
Purvalanol B

Η 6-διμεθυλαμινοπουρίνη ήταν η πρώτη ένωση που βρέθηκε ότι αναστέλλει τις CDKs.³²⁵ Η ιδιότητά της να ανταγωνίζεται το ATP στη θέση πρόσδεσης της κινάσης ερμηνεύεται από το γεγονός ότι μοιάζει δομικά με το αδευνλικό του τμήμα, αφού πρόκειται για τη N^6, N^6 -διμεθυλοαδεΐνη. Η επίδρασή της σε ωκύτταρα ποντικού απέδειξε ότι ο κύριος μοριακός στόχος της είναι η CDK1 και ότι προκαλεί ανωμαλίες στο σχηματισμό της ατράκτου, προβληματική συμύκνωση των χρωματίδων σε χρωμοσώματα και σχηματισμό νέου πυρηνικού φακέλου γύρω από τις χρωματίδες, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η συμύκνωσή τους.³²⁶ Στη συνέχεια, μελέτες ενός μεγάλου αριθμού 2,6,9-τριυποκατεστημένων πουρινών οδήγησαν στην ανακάλυψη ισχυρών αναστολέων των CDKs. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι η Ολομουκίνη και η (R)-Ροσκοβιτίνη, οι οποίες φέρουν ογκώδεις υποκαταστάτες στις θέσεις 2 και 9 και αναστέλλουν ισχυρά τις CDKs 1, 2 και 5, ενώ είναι δραστικές και έναντι άλλων πρωτεϊνικών κινασών.^{323,327} Η Ολομουκίνη παρουσιάζει δοσοεξαρτώμενη αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης και της προόδου του κυτταρικού κύκλου σε καλλιέργειες πολλών καρκινικών σειρών, όπως τα κύτταρα SIIA (καρκίνος του στομάχου)³²⁸ και MCF-7 (καρκίνος του μαστού),³²⁴ μείωση της σύνθεσης του DNA σε κύτταρα του εγκεφαλικού φλοιού και απόπτωση σε νευρώνες της παρεγκεφαλίδας.³²⁹ Η (R)-Ροσκοβιτίνη αποτελεί μία τροποποιημένη παραλλαγή της Ολομουκίνης με το ίδιο προφίλ εκλεκτικότητας αλλά με δεκαπλάσια ενεργότητα.^{324,328,329} Βρίσκεται σε

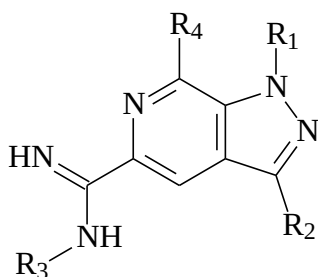
κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, ενώ είναι δραστική και έναντι του πολλαπλού μυελώματος³³⁰ και των ιών HIV-1 (τύπος του ιού του AIDS)³³¹ και HSV (απλός ερπητοϊός).³³² Η Πουρβαλανόλη Α αναστέλλει ισχυρά τις CDKs 1, 2 και 5, παρουσιάζοντας σημαντική αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών σειρών που σχετίζονται με τον καρκίνο του ορθού, όπως οι SW480 και HT29.³³³ Αντίστοιχη αλλά ασθενέστερη δράση παρουσιάζει η Πουρβαλανόλη Β. Η μειωμένη δράση της αποδίδεται σε χαμηλότερη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης λόγω της ύπαρξης της καρβοξυλομάδας.

Επί σειρά ετών η ερευνητική δραστηριότητα προσανατολίζεται, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, σε χημικές παρεμβάσεις στον πουρινικό σκελετό και συγκεκριμένα στην αντικατάσταση αζώτου από άνθρακα ή/και το αντίθετο. Αποτέλεσμα της προσπάθειας αυτής ήταν η ανάπτυξη πληθώρας νέων ενώσεων που εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι πολλών ειδών πρωτεϊνικών κινασών. Ανάλογες προσπάθειες έγιναν και για το σχεδιασμό νέων δομικών αναλόγων των ενώσεων που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο σχήμα.³³⁴

Στην ερευνητική μας ομάδα ασχολούμαστε επί σειρά ετών με το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων ισοστερών πουρίνης με πιθανή αντικαρκινική δράση. Στα πλαίσια της διερεύνησης του μοριακού μηχανισμού δράσης των νέων μορίων, ελέγχεται και η αλληλεπίδρασή τους με συγκεκριμένες κυτταρικές κινάσες, καθώς τα παράγωγα που συντίθενται διαθέτουν το βασικό σκελετό και υποκαταστάτες που θα δικαιολογούσαν την πρόσδεση σε ενεργά κέντρα κινασών. Κατά τη μελέτη υποκατεστημένων πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών προέκυψε, ως μη επιδιωκόμενο προϊόν, καρβοξαμιδίνη, η οποία όταν αξιολογήθηκε φαρμακολογικά έδειξε ιδιαίτερα ισχυρή κυτταροτοξική δράση, αλλά και σημαντικές αντιαγγειογενετικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκε σε ποικιλία καρκινικών σειρών (τις καρκινικές σειρές μαστού MCF7, T47D, MDA-MB-231 και HCC1954, την παγκρεατική σειρά MIA PaCa-2 και την ωοθηκική σειρά SCOV3) και παρουσίασε τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν από 0.97 έως 3 μΜ. Αυτό το γεγονός κατέδειξε τη σημασία εξαντλητικής διερεύνησης του μορίου, μέσω της εισαγωγής υποκαταστατών, που θα επιτρέψουν τη λεπτομερή φαρμακολογική μελέτη του και την εξαγωγή σχέσεων δομής-δράσης. Παρακάτω παρατίθεται η δομή του εν λόγω μορίου.



Επομένως, αποφασίσαμε να συνθέσουμε ανάλογα της ένωσης-οδηγού, που έχουν τον παρακάτω γενικό τύπο.



R₁: H, CH₃, CH₂C₆H₄-*p*-OCH₃

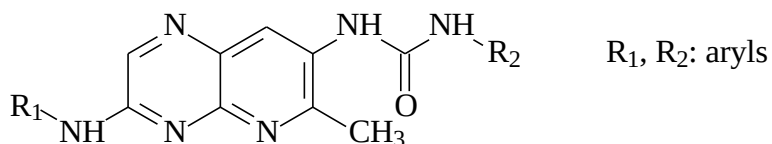
R₂: H, C₆H₅

R₃: aryls

R₄: H, C₉H₁₂NO₃, C₆H₁₂N, C₄H₈NO

Σχήμα I.1

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή συντέθηκαν επίσης ορισμένα παράγωγα πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνης, καθώς έχουμε ήδη αναπτύξει και παρουσιάσει ανάλογα μόρια με σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών του μαστού.³³⁵ Στα πλαίσια της μελέτης των σχέσεων δομής-δράσης, αποφασίσαμε να συνθέσουμε ανάλογα των παραγώγων αυτών, που έχουν τον παρακάτω γενικό τύπο.



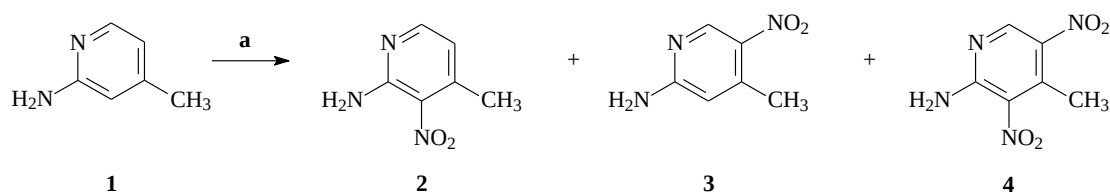
Σχήμα I.2

II. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.1 Πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνες

II.1A Μη υποκατεστημένα επί των θέσεων 3 και 7 παράγωγα (καρβοξαμιδίνες 17-22, 26-28, 35-40 και καρβοξαμίδια 29, 31-32, 41)

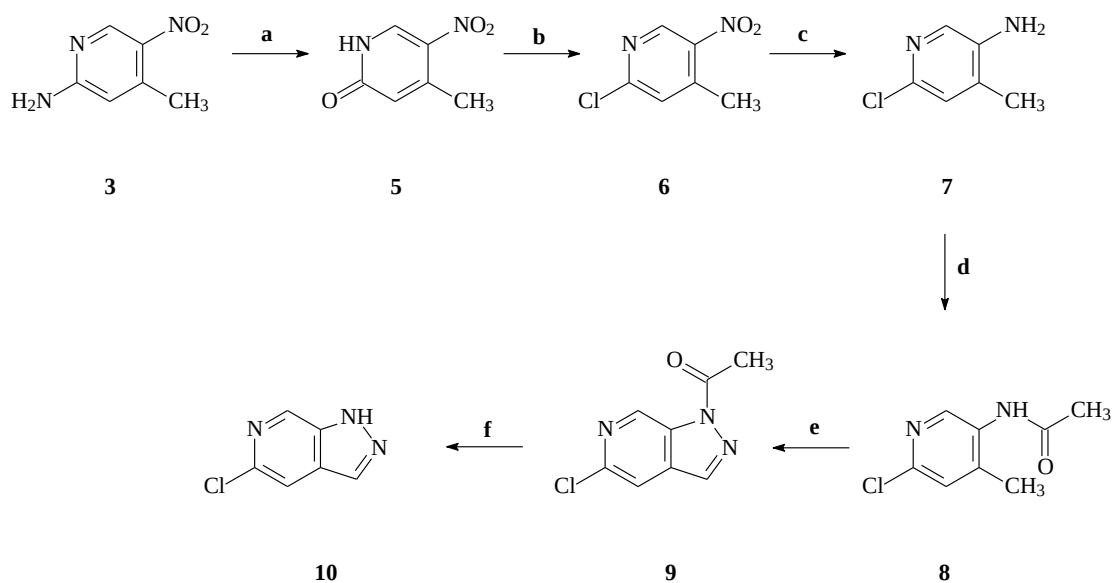
Για τη σύνθεση των ανωτέρω παραγώγων χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 2-αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**3**), η οποία συντέθηκε με νίτρωση της 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνης (**1**) (Σχήμα II.1). Από την αντίδραση αυτή λήφθηκε μίγμα των τριών δυνατών νιτροπαραγώγων,³³⁶ τα οποία διαχωρίστηκαν αρχικά μέσω κατεργασίας με θερμό διχλωρομεθάνιο, όπου διαλύεται το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγώγου **2**, ενώ στη συνέχεια ο πλήρης διαχωρισμός των τριών ισομερών έγινε χρωματογραφικά και η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων ¹H-NMR.



a) H₂SO₄ 96%, HNO₃ 65%, 60 °C, 20 hrs

Σχήμα II.1

Επίδραση νιτρώδους νατρίου στη 2-αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**3**) οδήγησε στην πυριδινόνη **5** (Σχήμα II.2),³³⁷ η οποία αντέδρασε με οξυχλωριούχο φώσφορο και παρελήφθη η 2-χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**6**).³³⁸ Κατόπιν, έγινε αναγωγή της νιτρομάδας με διχλωριούχο κασσίτερο και ακετυλίωση του σχηματιζόμενου αμινοπαραγώγου **7** με οξικό ανυδρίτη, οπότε παρελήφθη το ακεταμίδιο **8**. Ακολούθησε αντίδραση διαζώτωσης και ενδομοριακής κύκλωσης του ακεταμιδίου,³³⁹ που οδήγησε σε μίγμα των *N*¹- και *N*²-ακετυλοπαραγώγων, στο οποίο υπερισχύει κατά πολύ το παράγωγο **9**. Το τελευταίο απακετυλιώθηκε στη συνέχεια με επίδραση μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας προς την 5-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**10**).

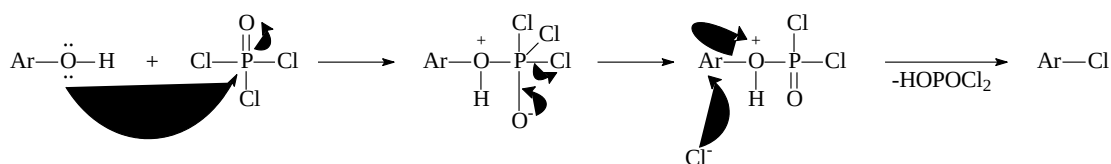


a) NaNO_2 , $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ (1/10), r.t., 2 hrs b) POCl_3 , 110 °C, 3 hrs c) SnCl_2 , HCl 36%, 50 °C, 15 min

d) Ac_2O , CH_2Cl_2 , r.t., 12 hrs e) AcOK , Ac_2O , isoamyl nitrite, toluene dry, Ar, 100 °C, 12 hrs f) NH_3 (g), MeOH dry, r.t., 2 hrs

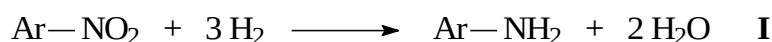
Σχήμα II.2

Η πυριδινόνη **5** υφίσταται υπό δύο μορφές (ενολική και κετο-μορφή), οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία. Στην πραγματικότητα, η κετο-μορφή υπερσχύει της ενολικής. Στο Σχήμα II.3 φαίνεται ο γενικός μηχανισμός της χλωρίωσης.

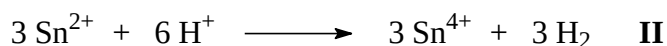
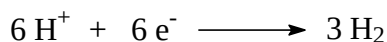
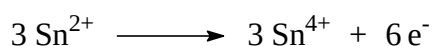


Σχήμα II.3 Γενικός μηχανισμός της αντίδρασης χλωρίωσης

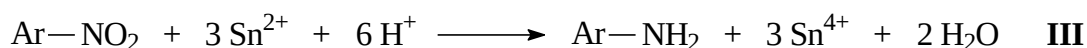
Η αναγωγή της νιτρομάδας του παραγώγου **6** πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διχλωριούχου κασσιτέρου. Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη.



Το απαιτούμενο για την αναγωγή υδρογόνο σχηματίζεται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τον κασσίτερο σύμφωνα με την παρακάτω οξειδοαναγωγή.



Από τις επιμέρους αντιδράσεις **I** και **II** προκύπτει η τελική αντίδραση οξειδοαναγωγής **III**.



Ο διχλωριούχος κασσίτερος χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την παρασκευή αλδεϋδών από νιτρίλια (αναγωγή Stephen).³⁴⁰ Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρέως για ήπιες-εκλεκτικές αναγωγές νιτρομάδων που συνυπάρχουν με αλογόνα σε αρωματικά συστήματα. Αυτό γίνεται προκειμένου να αποφευχθεί η αναγωγή των αλογόνων, κάτι που δεν επιτυγχάνεται συνήθως με άλλες αναγωγικές μεθόδους, όπως η καταλυτική υδρογόνωση.³⁴¹

Η αναγωγή αρωματικών νιτροπαραγώγων προς τα αντίστοιχα αμινοπαραγωγα μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, εκτός της μεθόδου που προαναφέρθηκε. Παρακάτω παρατίθενται οι σημαντικότεροι από αυτούς.

α) Με διαβίβαση υδρογόνου υπό υψηλή πίεση παρουσία καταλυτών, όπως παλλάδιο επί άνθρακα,³⁴² οξείδιο του λευκόχρυσου (αναγωγή Adams),³⁴³ νικέλιο του Raney³⁴⁴

β) Με χρήση μετάλλων, όπως σίδηρος και ψευδάργυρος, παρουσία υδροχλωρικού ή οξικού οξέος^{345,346}

Η αναγωγή αρωματικών νιτροπαραγώγων προς τις αντίστοιχες ανιλίνες με τη χρήση σιδήρου και υδροχλωρικού οξέος καλείται αναγωγή Bechamp και αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία για πρώτη φορά το 1854.³⁴⁷

γ) Με χρήση υδραζίνης παρουσία σιδήρου³⁴⁸ ή ψευδαργύρου³⁴⁹ ή παλλαδίου επί άνθρακα³⁵⁰

δ) Με χρήση σαμαρίου και χλωριούχου αμμωνίου υπό την επίδραση υπερήχων³⁵¹

ε) Με χρήση βοριούχου νικελίου παρουσία πυκνού υδροχλωρικού οξέος ή πυκνής αμμωνίας³⁵²

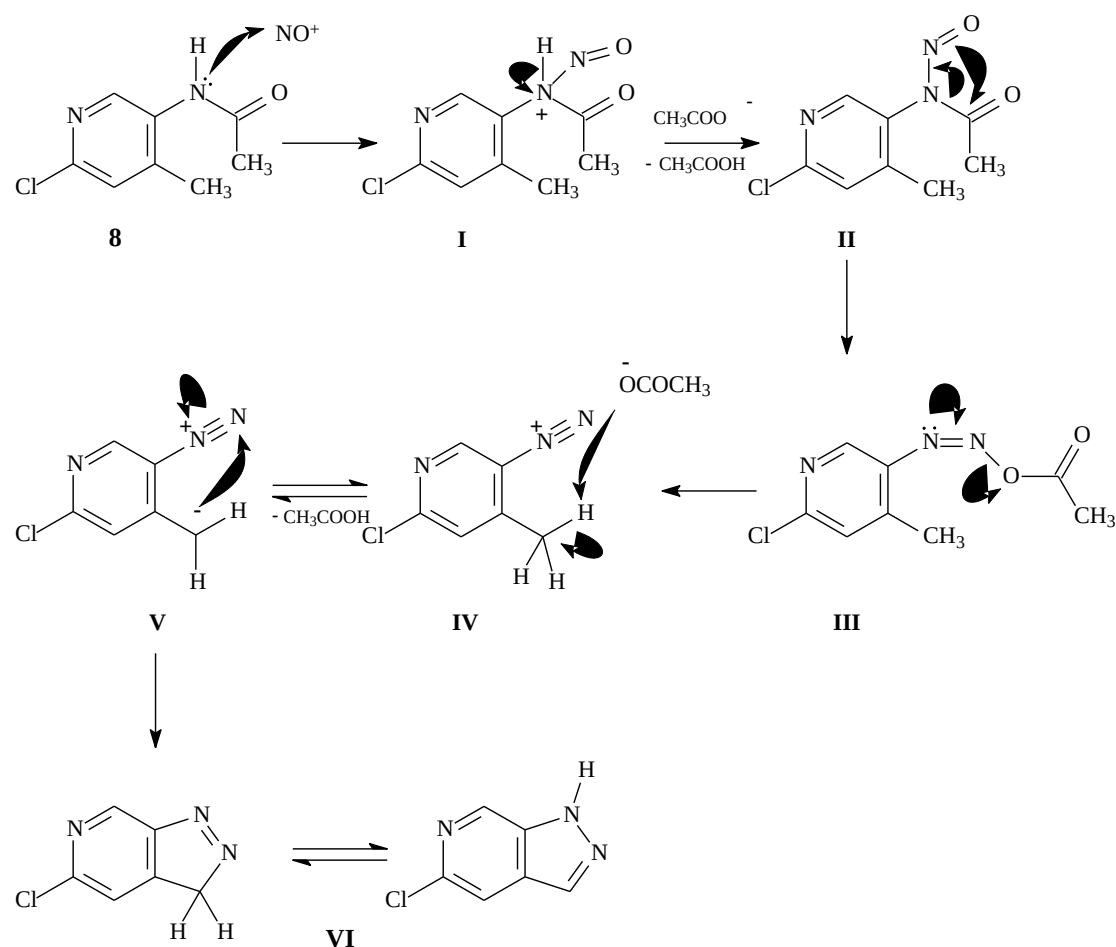
στ) Με χρήση θειούχων αλάτων, όπως όξινο θειούχο νάτριο και θειούχο αμμώνιο³⁵³

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται συνήθως για την εκλεκτική αναγωγή παραγώγων που φέρουν περισσότερες από μία νιτρομάδες.

ζ) Με χρήση τριαιθυλοσιλανίου παρουσία καταλύτη παλλαδίου

Αυτή η μέθοδος περιγράφεται εκτενέστερα στην ενότητα II.2A.

Στο Σχήμα II.4 φαίνεται ο μηχανισμός κύκλωσης κατά το σχηματισμό του δακτυλίου της πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης. Σύμφωνα με αυτόν, το νιτρωδοκατιόν, που απελευθερώνεται από τη θερμική διάσπαση του νιτρώδους ισοαμυλίου, προσβάλλει το άζωτο του ακεταμιδίου **8** 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.

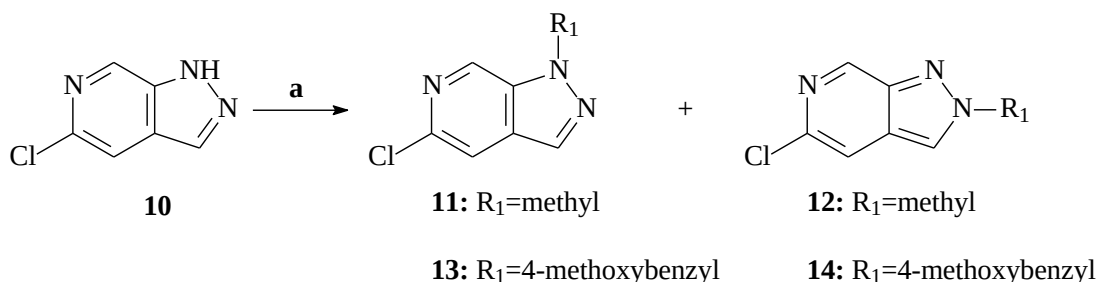


Σχήμα II.4 Μηχανισμός της αντίδρασης ενδομοριακής κύκλωσης

Η ακετυλιωμένη πυραζολοπυριδίνη **9** υφίσταται όπως αναφέρθηκε, υπό τη μορφή δύο ακετυλοϊσομερών. Εντούτοις, τα ισομερή είναι σχετικά ασταθή με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολη η απομόνωσή τους. Συγκεκριμένα, υφίστανται μερική απακετυλίωση προς τη σταθερή πυραζολοπυριδίνη **10** πριν ακόμα επιδράσει σε αυτά μεθανολικό διάλυμα αέριας αμμωνίας.

Επίδραση μεθυλοϊωδιδίου παρουσία υδροξειδίου του καλίου ή 4-μεθοξυβενζυλοχλωριδίου παρουσία υδριδίου του νατρίου επί της πυραζολοπυριδίνης **10** οδήγησε στα παράγωγα **11-12** και **13-14**³⁵⁴ αντίστοιχα (Σχήμα II.5). Η απομόνωση των εν λόγω ισομερών από τα αντίστοιχα μίγματα πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης και η δομή τους διαπιστώθηκε με τη χρήση φασμάτων HMBC-NMR. Η 4-μεθοξυβενζυλομάδα επιλέχθηκε και ως προστατευτική ομάδα. Είναι γνωστό από βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν τη σύνθεση ανάλογων μορίων³⁵⁵ ότι η παρουσία προστατευτικής ομάδας στη θέση 1 του πυραζολίου αυξάνει σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης διασταυρούμενης σύζευξης, η οποία

πραγματοποιείται παρακάτω. Η συγκεκριμένη ομάδα είναι ανθεκτική στο αλκαλικό περιβάλλον της αντίδρασης σύζευξης που ακολουθεί, ενώ η απομάκρυνσή της μπορεί να γίνει σχετικά εύκολα σε όξινο περιβάλλον και σε πολύ υψηλές αποδόσεις.



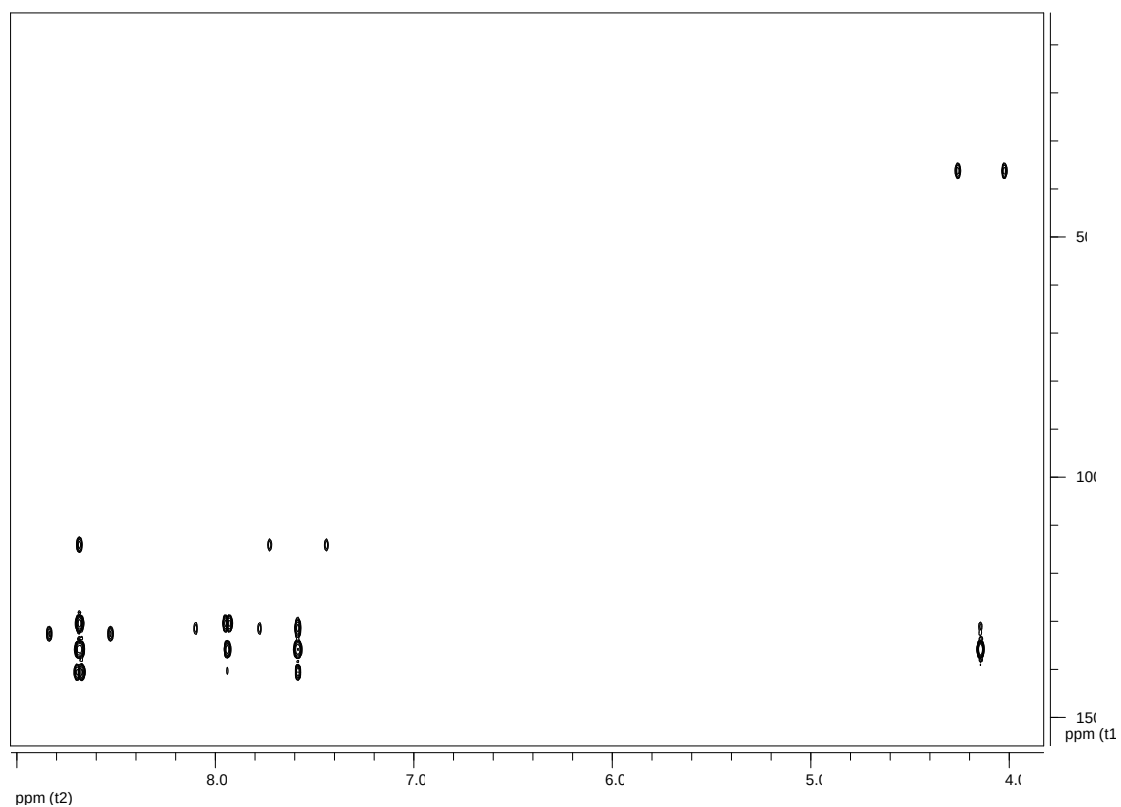
a) **11-12:** KOH, CH₃I, acetone, Ar, r.t., 1 hr

13-14: NaH (60% in paraffin oil), 4-methoxybenzyl chloride, DMF dry, Ar, r.t., 30 min

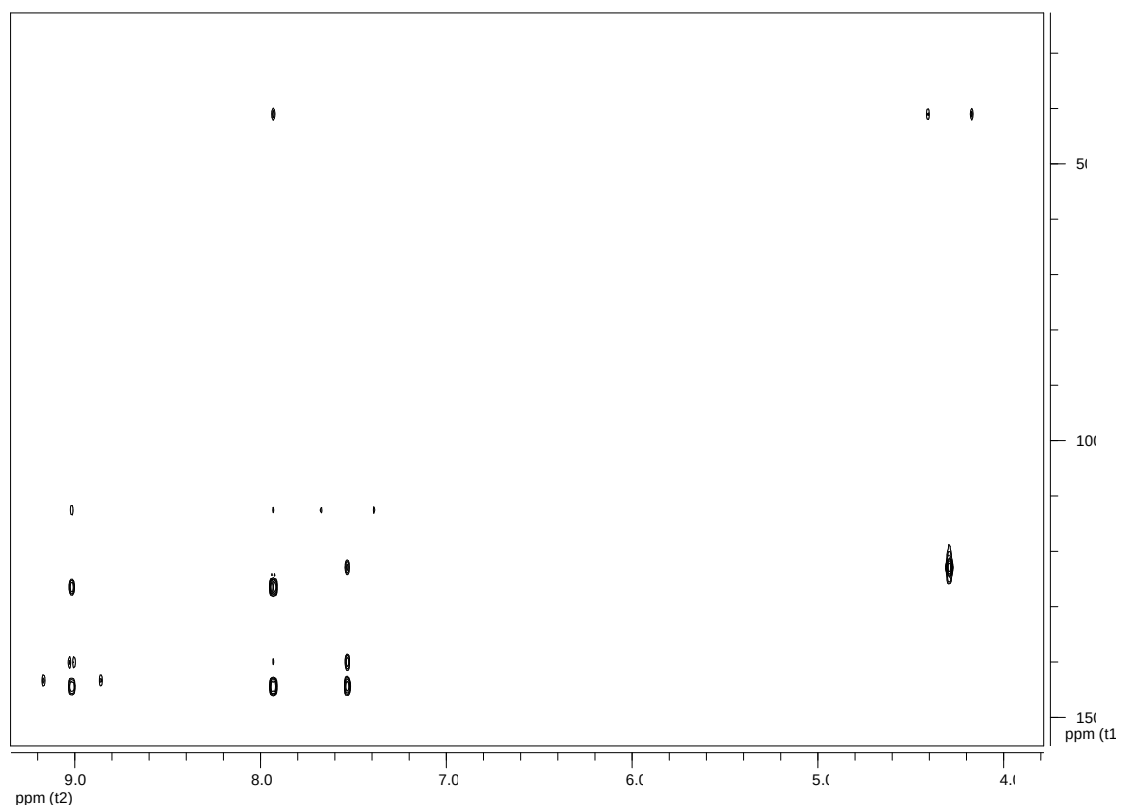
Σχήμα II.5

Στις Εικόνες II.1 και II.2 παρουσιάζονται τα φάσματα HMBC-NMR των παραγώγων **11** και **12** αντίστοιχα.

Στην Εικόνα II.1 παρατηρείται κορυφή διασταύρωσης μεταξύ των πρωτονίων της μεθυλομάδας (4.15 ppm) και του C-7a (136.05 ppm), γεγονός που αποδεικνύει ότι το παράγωγο **11** είναι το 1-ισομερές. Στην Εικόνα II.2 παρατηρείται κορυφή διασταύρωσης μεταξύ των πρωτονίων της μεθυλομάδας (4.26 ppm) και του C-3 (123.17 ppm), γεγονός που αποδεικνύει ότι το παράγωγο **12** είναι το 2-ισομερές.

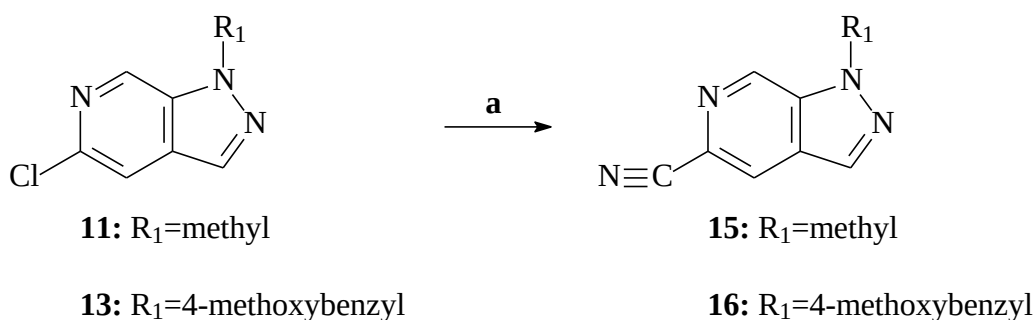


*Εικόνα II.1 Φάσμα HMBC-NMR του παραγώγου **11** σε $CDCl_3$*



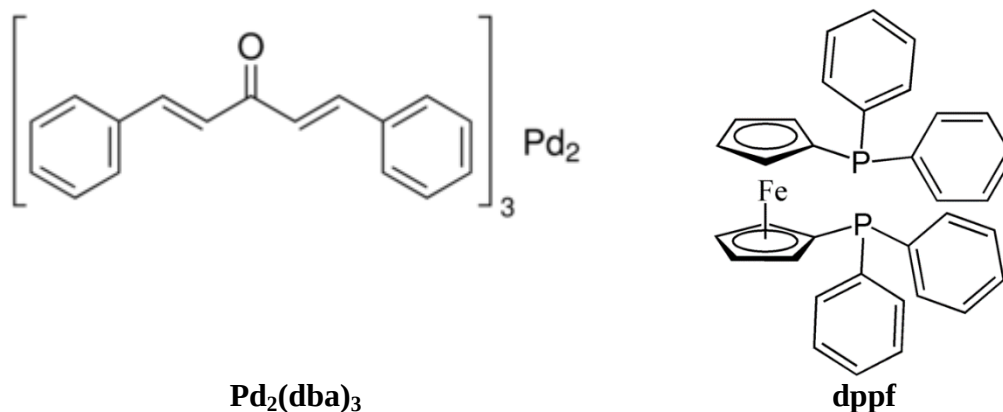
*Εικόνα II.2 Φάσμα HMBC-NMR του παραγώγου **12** σε $CDCl_3$*

Κατόπιν, τα ισομερή **11** και **13** οδήγησαν στα καρβονιτρίλια **15-16** αντίστοιχα με αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης (Σχήμα II.6).³⁵⁶ Ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε το τρις(διβενζυλιδενακετονο)διπαλλάδιο(0) ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) και ως πρόσδεμα το 1,1'-δις(διφαινυλοφωσφινό)φερροκένιο (dppf) (Σχήμα II.7). Η υποκατάσταση του χλωρίου από την κυανομάδα διαπιστώθηκε με φάσματα ^{13}C -NMR και IR.



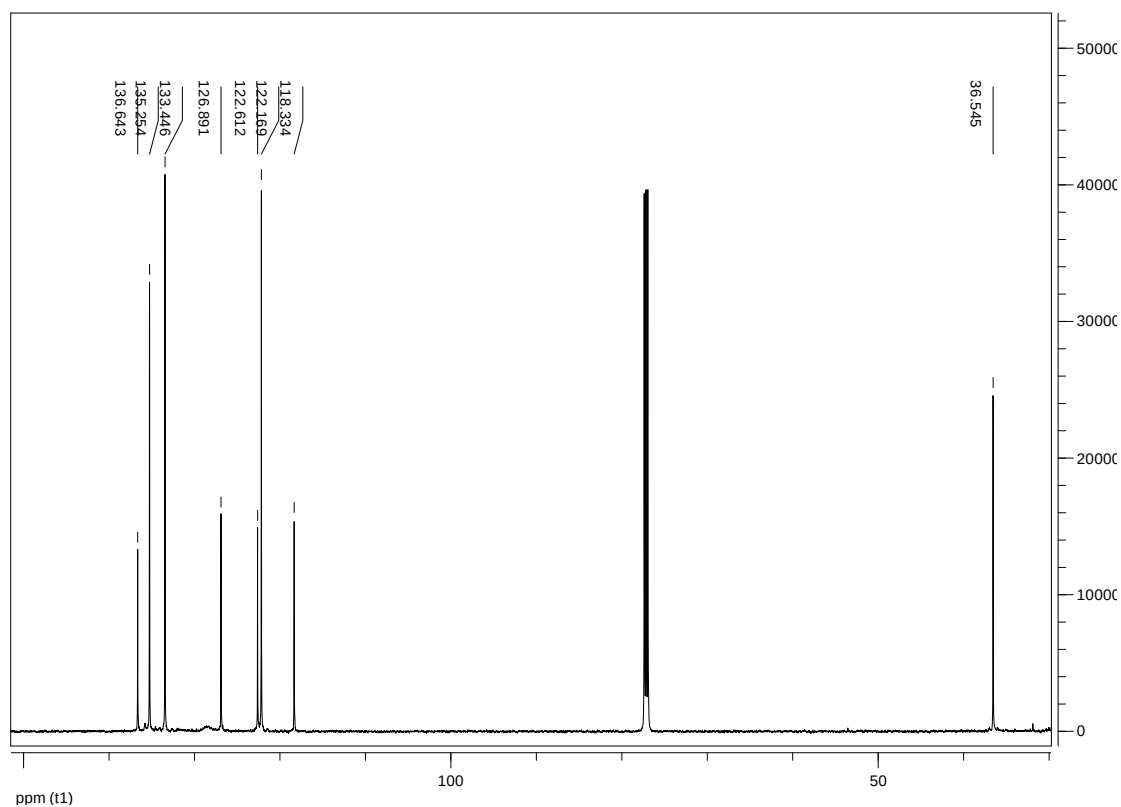
a) $\text{Zn}(\text{CN})_2$, Zn powder, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, dppf, DMA dry, Ar, 180°C , 2 hrs

Σχήμα II.6



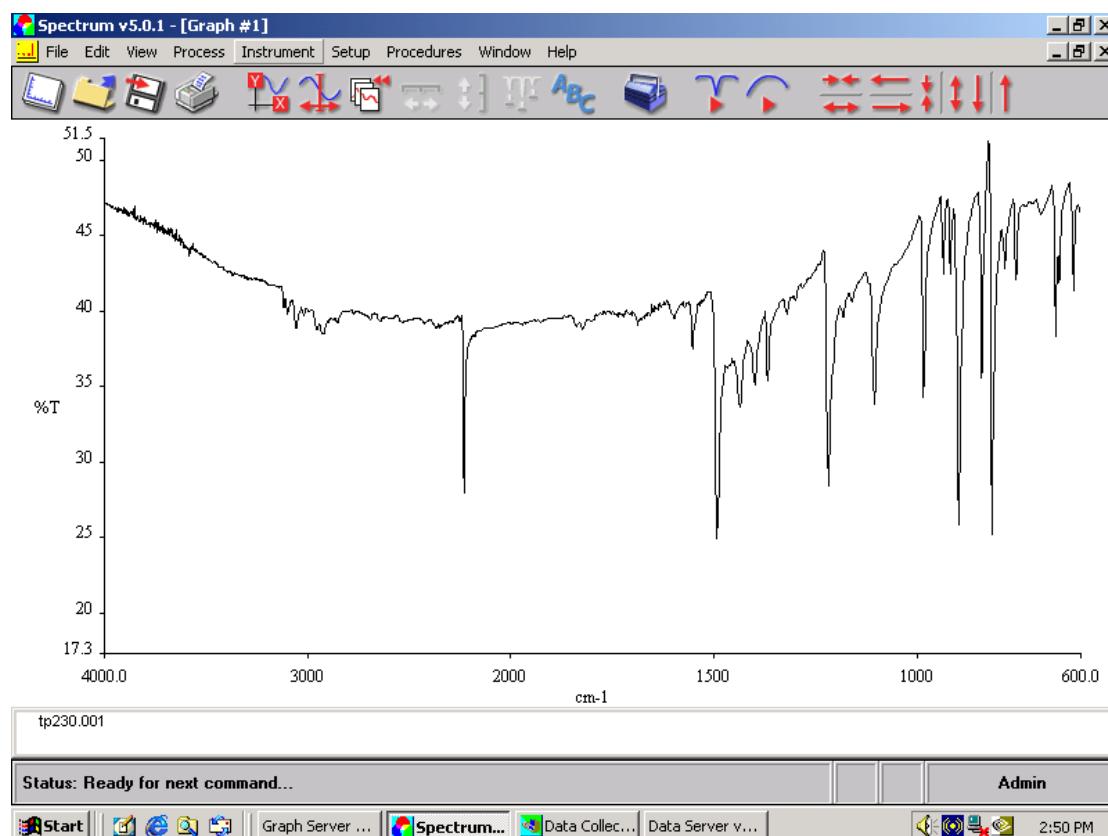
Σχήμα II.7

Στην Εικόνα II.3 παρουσιάζεται το φάσμα ^{13}C -NMR του παραγώγου **15**. Στα 118.33 ppm παρατηρείται ο άνθρακας της κυανομάδας.



Εικόνα II.3 Φάσμα ^{13}C -NMR του παραγώγου **15** σε CDCl_3

Στην Εικόνα II.4 παρουσιάζεται το φάσμα IR του παραγώγου **15**. Στα 2200 cm^{-1} παρατηρείται η χαρακτηριστική απορρόφηση της κυανομάδας.



Εικόνα II.4 Φάσμα IR του παραγώγου 15

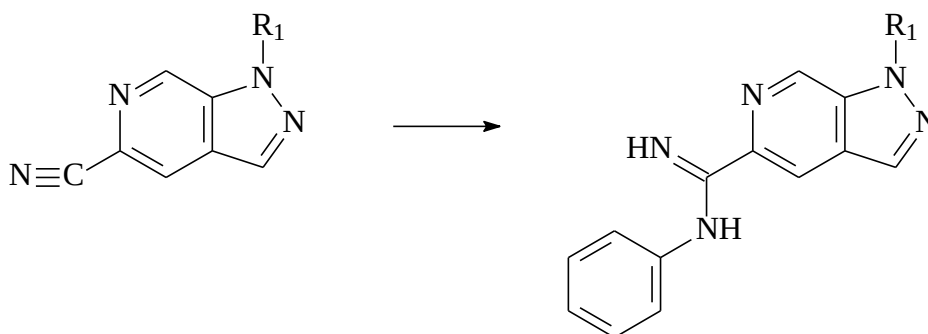
Η καταλυόμενη από ενώσεις παλλαδίου κυάνωση αρυλαλογονιδίων είναι σημαντικότερη και διεξοδικά μελετημένη αντίδραση στην Οργανική Χημεία. Πρόκειται για αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης. Παραδοσιακά, η σύνθεση των νιτριλίων πραγματοποιείται μέσω των αντιδράσεων Rosenmund-von Braun³⁵⁷ και Sandmeyer.³⁵⁸ Σύμφωνα με τις μεθόδους των αντιδράσεων αυτών, απαιτούνται στοιχειομετρικές ποσότητες κυανιούχου υποχαλκού, ενώ οι κατεργασίες είναι επίπονες και οι πειραματικές συνθήκες εξαιρετικά έντονες.³⁵⁹ Επιπλέον, η μικρή δραστηριότητα των χλωριωμένων και βρωμιωμένων παραγώγων οδηγεί συχνά στη χρήση ακριβών-ασύμφορων ιωδιωμένων αναλόγων.^{357,360-362}

Το 1973 έγινε η πρώτη βιβλιογραφική αναφορά της καταλυτικής από ενώσεις παλλαδίου κυάνωσης αρυλαλογονιδίων, όπου χρησιμοποιείτο κυανιούχο κάλιο ως δότης κυανομάδας.³⁶³ Έκτοτε, έχουν δημοσιευθεί διάφοροι τρόποι πραγματοποίησης της αντίδρασης αυτής, όπου χρησιμοποιείται μία ποικιλία καταλυτών παλλαδίου και κυανιούχων ενώσεων που λειτουργούν ως δότες κυανομάδας, όπως κυανιούχο νάτριο, κυανιούχος ψευδάργυρος, τριμεθυλοσιλυλοκυανίδιο και κυανυδρίνες ακετόνης.³⁶⁴⁻³⁶⁸ Ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση σιδηροκυανιούχου καλίου ($K_4[Fe(CN)_6]$) με αξιόλογα αποτελέσματα, ενώ ταυτόχρονα πλεονεκτεί έναντι των άλλων, αφού στερείται τοξικότητας.³⁶⁹⁻³⁷⁵ Η συγκεκριμένη μέθοδος δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά το 2004 στα πλαίσια μίας προσπάθειας για χρησιμοποίηση μη τοξικών

κυανιούχων ενώσεων.³⁷⁶ Η δημοσίευση αυτή έδωσε το έναυσμα για την ανάπτυξη παραλλαγών της συνθετικής μεθόδου, όπου χρησιμοποιείται το εν λόγω άλας ή το συγγενές του σιδηρικούκυανιούχο κάλιο ($K_3[Fe(CN)_6]$) με διάφορους συνδυασμούς καταλυτών παλλαδίου και προσδεμάτων τους (ligands).³⁷⁷

Η σύνθεση νιτριλίων με τη χρήση καταλυτών παλλαδίου είναι οικονομικά συμφέρουσα μέθοδος, καθώς χρησιμοποιούνται φθηνά αντιδραστήρια ως δότες κυανομάδας, ενώ οι καταλύτες παρά το γεγονός ότι είναι ακριβοί, χρησιμοποιούνται σε πολύ μικρές ποσότητες. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η ισχυρή σύνδεση του καταλύτη με τα ανιόντα κυανίου προκαλεί τη δηλητηρίασή του. Συγκεκριμένα, πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι αύξηση της συγκέντρωσης του κυανιούχου άλατος οδηγεί σε σημαντική μείωση της ταχύτητας και της απόδοσης της αντίδρασης.³⁶⁴ Ο μηχανισμός της αντίδρασης θεωρείται ότι ακολουθεί τον κλασσικό οξειδοαναγωγικό κύκλο των αντιδράσεων σύζευξης, ο οποίος αναλύεται στην ενότητα II.1B.³⁶⁴

Για τη σύνθεση των επιθυμητών καρβοξαμιδινών από τα εκάστοτε αντίστοιχα καρβονιτρίλια δοκιμάστηκαν διάφορες συνθετικές μέθοδοι, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία χωρίς όμως ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η αρωματική αμίνη που χρησιμοποιήθηκε για τις εν λόγω δοκιμές ήταν η ανιλίνη, ως η απλούστερη της χημικής κατηγορίας (Σχήμα II.8). Συγκεκριμένα, οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν αναφέρονται επιγραμματικά παρακάτω μαζί με τις πειραματικές συνθήκες.



Σχήμα II.8

Συνθετική μέθοδος 1: Απευθείας πυρηνόφιλη προσβολή με επίδραση ανιλίνης, σε θερμοκρασία βρασμού ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 24 ώρες και σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας

Συνθετικές μέθοδοι 2 και 3: Πυρηνόφιλη προσβολή μέσω σχηματισμού ανιόντος³⁷⁸⁻³⁸⁵ με επίδραση ανιλίνης παρουσία υδριδίου του νατρίου ή καλιούχου

εξαμεθυλοδισλαζιδίου, εντός άνυδρου διμεθυλοφορμαμίδιου ή τετραϋδροφουρανίου, σε θερμοκρασία 60 °C ή δωματίου για 24 ή 16 ώρες αντίστοιχα και σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας

Συνθετική μέθοδος 4: Πυρηνόφιλη προσβολή στον ιμινοαιθέρα του καρβονιτριλίου³⁸⁶⁻³⁸⁸ με επίδραση ανιλίνης παρουσία μεθοξειδίου του νατρίου, εντός άνυδρης μεθανόλης, σε θερμοκρασία 75 °C για 12 ώρες και σε συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας

Συνθετική μέθοδος 5: Απευθείας πυρηνόφιλη προσβολή με επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στη συχνότητα των μικροκυμάτων (200 Watt) και ανιλίνης, εντός 2-αιθοξυαιθανόλης, σε θερμοκρασία 180 °C για 30 λεπτά

Συγκρίνοντας τις παραπάνω συνθετικές μεθόδους, παρατηρείται ότι ακολουθείται μία βαθμιαία αύξηση τόσο στην πολυπλοκότητά τους, όσο και στην ένταση των πειραματικών συνθηκών. Συγκεκριμένα, για την απλούστερη συνθετική μέθοδο 1 έγινε πειραματική αλλαγή με βελτίωση της πυρηνόφιλης ισχύος της ανιλίνης μέσω σχηματισμού ανιόντος (συνθετικές μέθοδοι 2 και 3). Στη συνέχεια, αφού συμπεράναμε ότι η προσβολή δεν είναι εύκολη για τα συγκεκριμένα καρβονιτρίλια, προσανατολιστήκαμε στη δημιουργία ενδιάμεσου που φέρει αποχωρούσα ομάδα (συνθετική μέθοδος 4). Τέλος, η συνθετική μέθοδος 5 πραγματοποιείται υπό τις πλέον έντονες πειραματικές συνθήκες σε σχέση με τις υπόλοιπες, λόγω της επίδρασης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Μετά από αυτές τις αποτυχημένες δοκιμές, οδηγηθήκαμε στην ενεργοποίηση της κυανομάδας μέσω σχηματισμού συμπλόκου.

Επίδραση ανιλίνης στο καρβονιτρίλιο **15** παρουσία χλωριούχου αργιλίου οδήγησε στην καρβοξαμιδίνη **17** (Σχήμα II.9).³⁸⁹⁻³⁹³ Λόγω μη εμφάνισης των αμινικών πρωτονίων (-NH-) στα φάσματα ¹H-NMR, ο σχηματισμός της εν λόγω καρβοξαμιδίνης διαπιστώθηκε με φάσματα MS. Το χλωριούχο αργίλιο σχηματίζει σύμπλοκο με την κυανομάδα, καθιστώντας την με αυτόν τον τρόπο περισσότερο επιδεκτική για πυρηνόφιλη υποκατάσταση. Το γεγονός ότι η καρβοξαμιδίνη **17** παρελήφθη σε χαμηλή απόδοση (13%) μάς οδήγησε στην τροποποίηση των πειραματικών συνθηκών με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στη συχνότητα των μικροκυμάτων, με σαφώς καλύτερα αποτελέσματα (απόδοση 55%).

Τα μικροκύματα αποτελούν εφαρμογή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε συχνότητες 300 MHz-300 GHz. Η πρώτη εφαρμογή στην οργανική σύνθεση

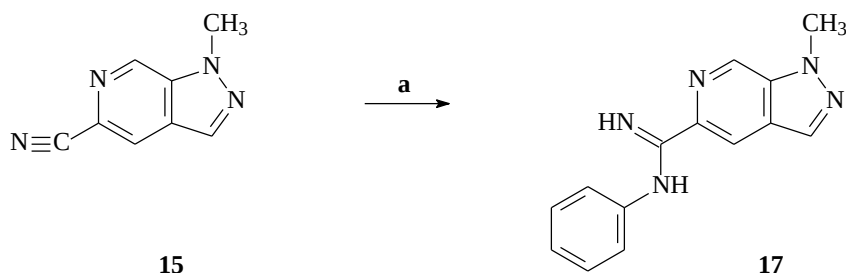
αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία το 1986^{394,395} και από τότε χρησιμοποιείται κατά κόρον ως μέθοδος που βρίθει πλεονεκτημάτων.³⁹⁶ Η ενέργεια των μικροκυμάτων αποτελείται από ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο. Μόνο το ηλεκτρικό πεδίο μεταφέρει ενέργεια για τη θέρμανση του μίγματος της αντίδρασης. Η ενέργεια που φέρουν τα μικροκύματα είναι πολύ χαμηλή σε σχέση με την ενέργεια που απαιτείται για τη σχάση μοριακών δεσμών, οπότε δεν επηρεάζεται η δομή ενός οργανικού μορίου κατά την ακτινοβολήση.³⁹⁷

Τα τελευταία χρόνια, τα μικροκύματα χρησιμοποιούνται με σκοπό την απλούστευση και τη βελτίωση των πειραματικών συνθηκών πολλών κλασσικών χημικών αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις που γίνονται υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι ταχύτερες, καθαρότερες, φιλικότερες στο περιβάλλον και δίνουν σαφώς καλύτερες αποδόσεις σε σχέση με το αν πραγματοποιηθούν με τις συμβατικές πειραματικές συνθήκες.³⁹⁷ Επιπλέον, η χρήση των μικροκυμάτων δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης χημικών μετατροπών, οι οποίες δεν είναι δυνατό να γίνουν με τη χρήση της συμβατικής θέρμανσης, αφού τα μικροκύματα μεταφέρουν απευθείας ενέργεια στα μόρια των αντιδρώντων και του διαλύτη (μοριακή θέρμανση), ενώ δεν θερμαίνεται ο περιέκτης. Το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση, όπου η θερμότητα από μία εξωτερική πηγή περνά από τα τοιχώματα της φιάλης στο μίγμα της αντίδρασης με τις θερμικές απώλειες να είναι υπαρκτές.

Η θέρμανση μέσω μικροκυματικής ακτινοβολήσης οφείλεται σε δύο μηχανισμούς: τη διπολική πόλωση (dipolar polarization) και την ιοντική μεταγωγή (ionic conduction). Όταν τα δίπολα ή τα ιόντα του μίγματος ακτινοβολούνται σε συχνότητες μικροκυμάτων, ευθυγραμμίζονται ως προς το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Στην πραγματικότητα, καθώς το ηλεκτρικό πεδίο ταλαντεύεται, το διπολικό ή ιοντικό πεδίο προσπαθώντας να ευθυγραμμισθεί με το ηλεκτρικό πεδίο, χάνει ενέργεια με τη μορφή θερμότητας.³⁹⁸ Σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις που πραγματοποιούνται με μικροκυματική ακτινοβολήση παίζει ο εκάστοτε χρησιμοποιούμενος διαλύτης. Συγκεκριμένα, η παράμετρος που είναι σημαντική είναι η πολικότητα του διαλύτη. Έχει βρεθεί ότι όσο αυξάνεται η πολικότητα ενός διαλύτη, τόσο αυξάνεται και η ευκολία με την οποία απορροφά ενέργεια μικροκυματικής ακτινοβολίας.³⁹⁷ Αυτό σημαίνει ότι σε αντιδράσεις που γίνονται σε πολικούς διαλύτες, η αύξηση της θερμοκρασίας είναι ταχύτερη σε σχέση με τις αντιδράσεις που γίνονται σε άπολους διαλύτες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ταχύτητα των αντιδράσεων που γίνονται σε πολικούς διαλύτες να είναι μεγαλύτερη.

Επιπλέον, παραλλαγή της συνθετικής μεθόδου 2 που αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιώντας άνυδρο διμεθυλοσουλφοξείδιο αντί για άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο σε θερμοκρασία δωματίου και όχι υπό θέρμανση, οδήγησε στην επιθυμητή καρβοξαμιδίνη **17** με ακόμα καλύτερα αποτελέσματα (απόδοση 96%),

οπότε χρησιμοποιήθηκε αυτή η μέθοδος και για τα υπόλοιπα παράγωγα (Σχήμα II.10).

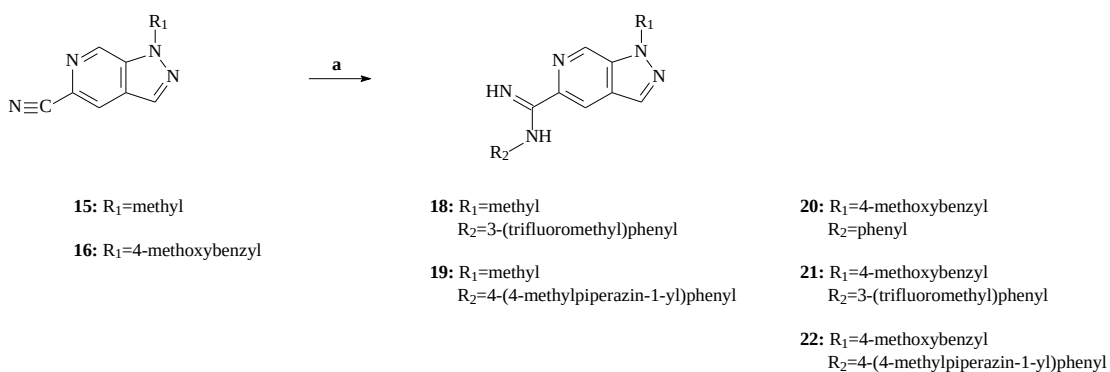


a) AlCl_3 , aniline, nitrobenzene, Ar, 160 °C, 1 hr (yield 13%)

AlCl_3 , aniline, 1,2-dichloroethane, microwave irradiation, 300 Watt, 115 °C, 1 hr (yield 55%)

NaH (60% in paraffin oil), aniline, DMSO dry, Ar, r.t., 3 hrs (yield 96%)

Σχήμα II.9

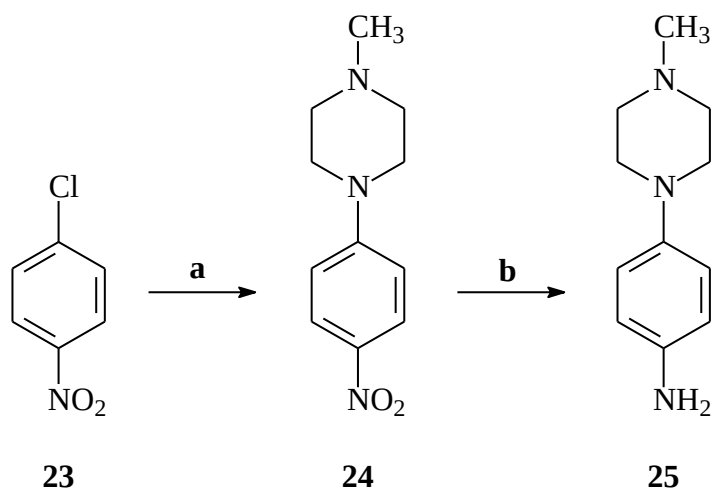


a) NaH (60% in paraffin oil), anilines, DMSO dry, Ar, r.t., 3 hrs

Σχήμα II.10

Οι ανιλίνες που χρησιμοποιήθηκαν είναι εμπορικά διαθέσιμες εκτός από την 1-(4-αμινοφαινυλο)-4-μεθυλοπιπεραζίνη (25), η οποία συντέθηκε από απλούστερες πρώτες ύλες.

Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση της ανιλίνης **25** χρησιμοποιήθηκε το 1-χλωρο-4-νιτροβενζόλιο (**23**), στο οποίο επέδρασε *N*-μεθυλοπιπεραζίνη και σχηματίστηκε το αμινοϋποκατεστημένο νιτροπαράγωγο **24**.^{399,400} Αναγωγή της νιτρομάδας με καταλυτική υδρογόνωση οδήγησε στην επιθυμητή ανιλίνη **25** (Σχήμα II.11).^{400,401}

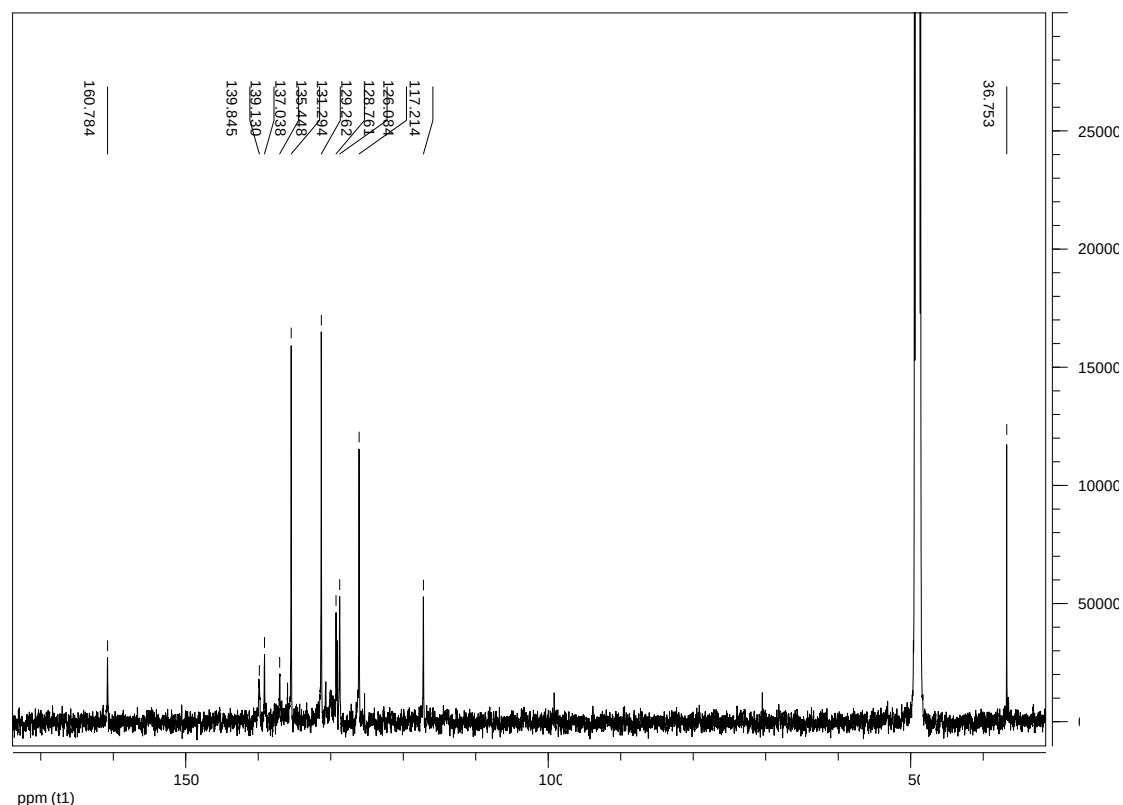


a) *N*-methylpiperazine, 140 °C, 3 hrs

b) H₂, Pd/C, MeOH/EtOAc, 55 psi, r.t., 4 hrs

Σχήμα II.11

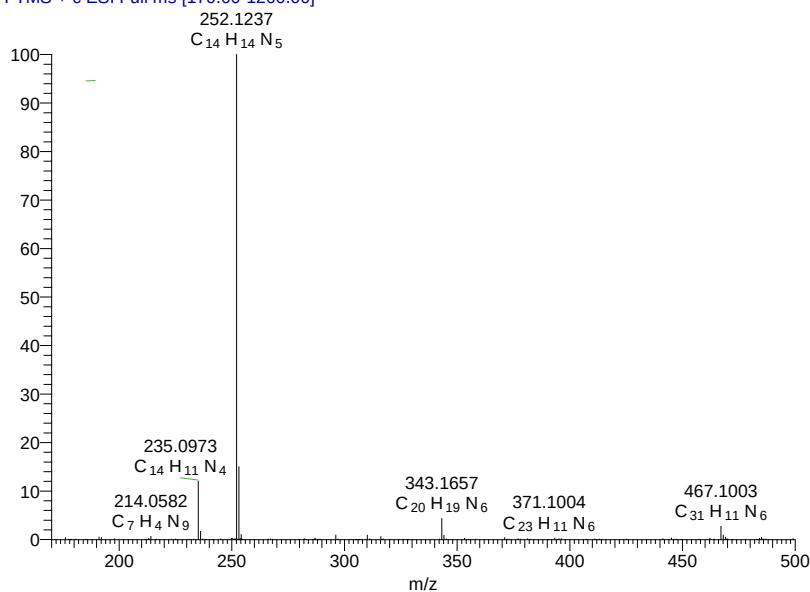
Στην Εικόνα II.5 παρουσιάζεται το φάσμα ¹³C-NMR του παραγώγου **17**. Στα 160.78 ppm παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή του αμιδινικού άνθρακα.



Εικόνα II.5 Φάσμα ^{13}C -NMR του παραγώγου **17** σε CD_3OD

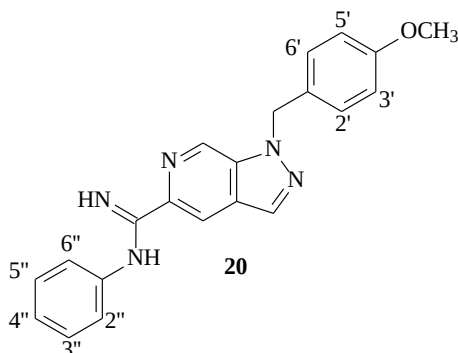
Στην Εικόνα II.6 παρουσιάζεται το φάσμα MS του παραγώγου **17**. Παρατηρείται η κορυφή του μοριακού ιόντος (252.1237) που υποδηλώνει το μοριακό βάρος του εν λόγω παραγώγου. Κατά τη λήψη του φάσματος MS πραγματοποιήθηκε θετικός ιονισμός, οπότε εμφανίζεται το μοριακό βάρος αυξημένο κατά μία μονάδα.

TP259A_FTMS_fullscan_ESI+ #30 RT: 0.24 AV: 1 NL: 3.07E7
T: FTMS + c ESI Full ms [170.00-1200.00]

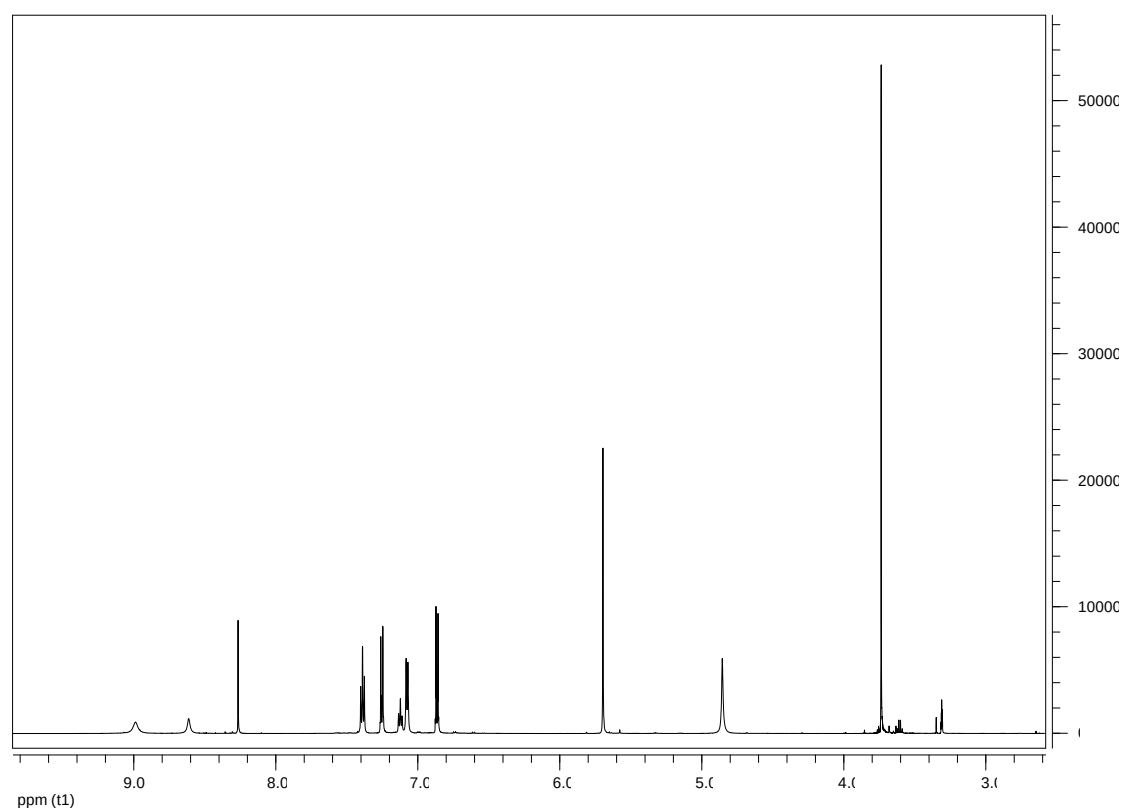


Εικόνα II.6 Φάσμα MS του παραγώγου **17**

Στην Εικόνα II.7 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **20**. Προς διευκόλυνση παρουσιάζεται παρακάτω η αρίθμηση των υποκαταστατών.

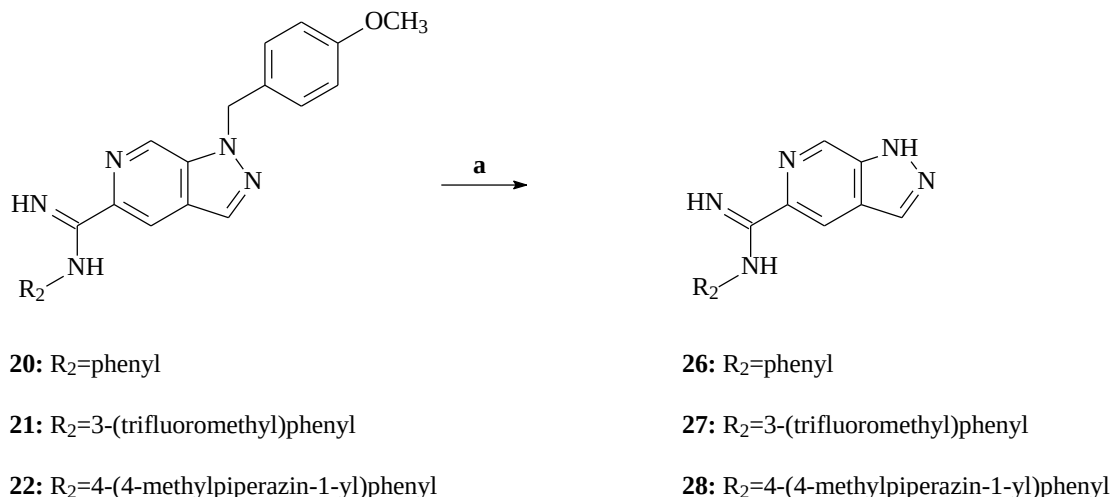


Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται οι απλές κορυφές του μεθοξυλίου και του μεθυλενίου της προστατευτικής ομάδας (3.74 και 5.70 ppm αντίστοιχα). Στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται οι διπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα H-2', H-6' (6.87 ppm) και στα H-3', H-5' (7.25 ppm) της προστατευτικής ομάδας. Επιπλέον, στην αρωματική περιοχή συντονίζονται τα H-2'', H-6'' (7.08 ppm, διπλή κορυφή), το H-4'' (7.12 ppm, τριπλή κορυφή), καθώς και τα H-3'', H-5'' (7.39 ppm, τριπλή κορυφή) της ανιλινικής υποκατάστασης.



Εικόνα II.7 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **20** σε CD_3OD

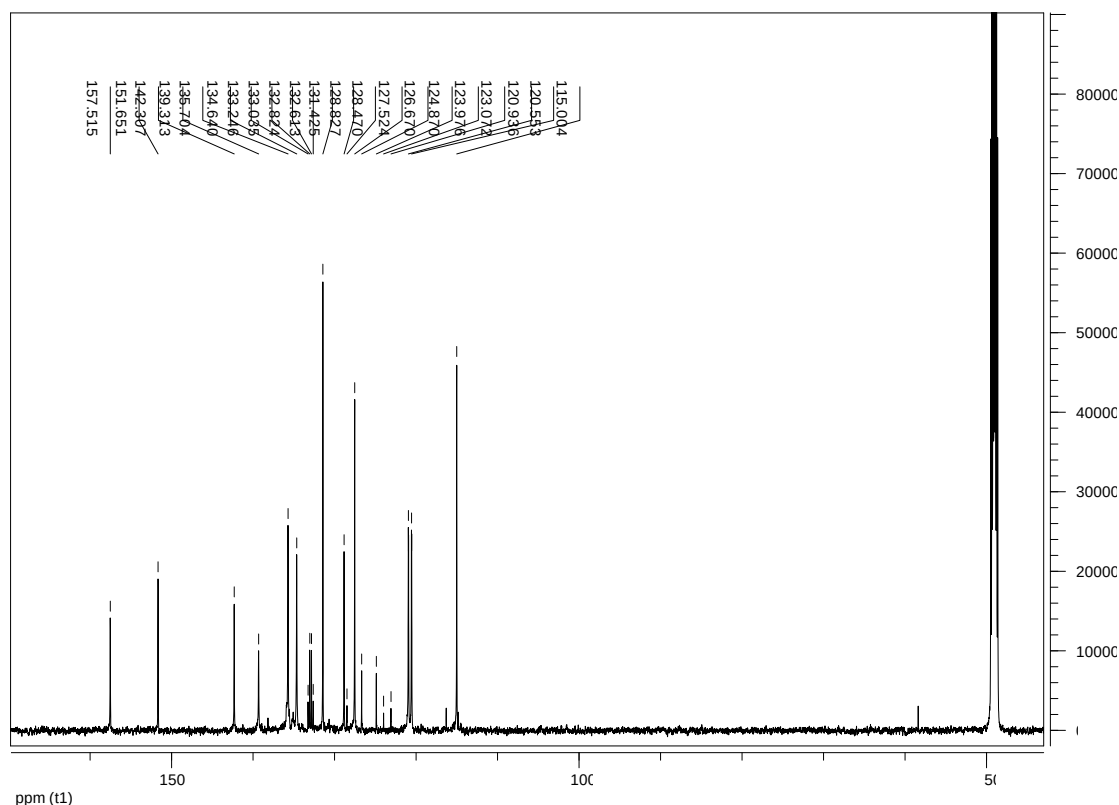
Η επίδραση τριφθοροξικού οξέος στα παράγωγα **20-22** είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας και την παραλαβή των παραγώγων **26-28** αντίστοιχα (Σχήμα II.12).



a) CF₃CO₂H, 70 °C, 5 hrs

Σχήμα II.12

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φάσματα ¹³C-NMR των παραγώγων που φέρουν 3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλαμινομάδα. Ενδεικτικά, στην Εικόνα II.8 παρουσιάζεται το φάσμα ¹³C-NMR του παραγώγου **27**. Η παρουσία των ατόμων του φθορίου προκαλεί τη σχάση των κορυφών των C-3' και -CF₃ σε πολλαπλές. Συγκεκριμένα, ο C-3' συντονίζεται με τη μορφή απλών κορυφών σε πέντε χημικές μετατοπίσεις (123.07, 123.98, 124.87, 126.67, 128.47 ppm), ενώ ο -CF₃ ως τέσσερις απλές κορυφές με παραπλήσιες τιμές χημικών μετατοπίσεων (132.61, 132.82, 133.04, 133.25 ppm), που ομοιάζουν ως τετραπλή κορυφή. Η παρουσία των ατόμων του φθορίου προκαλεί σημαντική αποθωράκιση του -CF₃, καθώς παρά το γεγονός ότι είναι αλειφατικός, συντονίζεται στην αρωματική περιοχή.⁴⁰²



Εικόνα II.8 Φάσμα ^{13}C -NMR του παραγώγου **27** σε CD_3OD

Η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Παρακάτω παρατίθενται μερικοί από αυτούς.

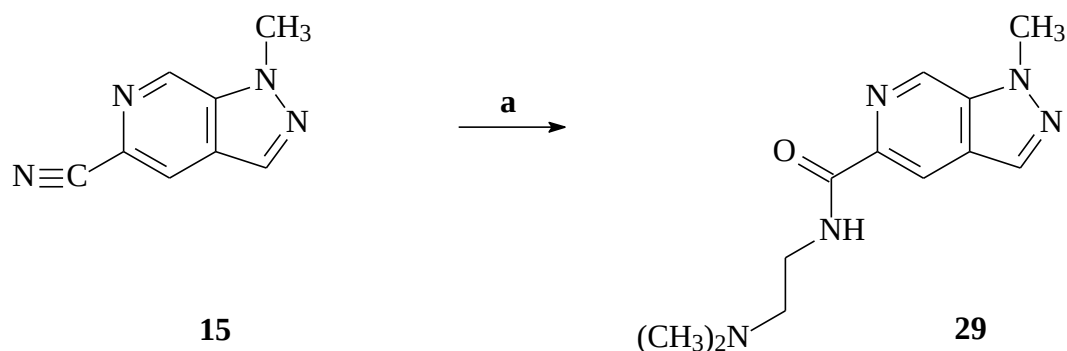
α) Με χρήση ήπιων οξειδωτικών παραγόντων, όπως 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (DDQ),⁴⁰³ εναμμόνιο νιτρικό δημήτριο (CAN),⁴⁰⁴ 9,10-δικυανοανθρακένιο (DCA)⁴⁰⁵

β) Με χρήση νατριοκυανοβοροϋδριδίου και διαιθυλαιθερικού τριφθοριούχου βορίου⁴⁰⁶

γ) Με χρήση τριφθοροξικού οξέος⁴⁰⁷

δ) Με χρήση συμπλόκων οξέων κατά Lewis, όπως χλωριούχο αργίλιο με αιθανοθειόλη,⁴⁰⁸ διχλωριούχος κασσίτερος με τριμεθυλοσιλυλογλωρίδιο,⁴⁰⁹ και βρωμιούχο μαγνήσιο με διαιθυλαιθέρα⁴¹⁰

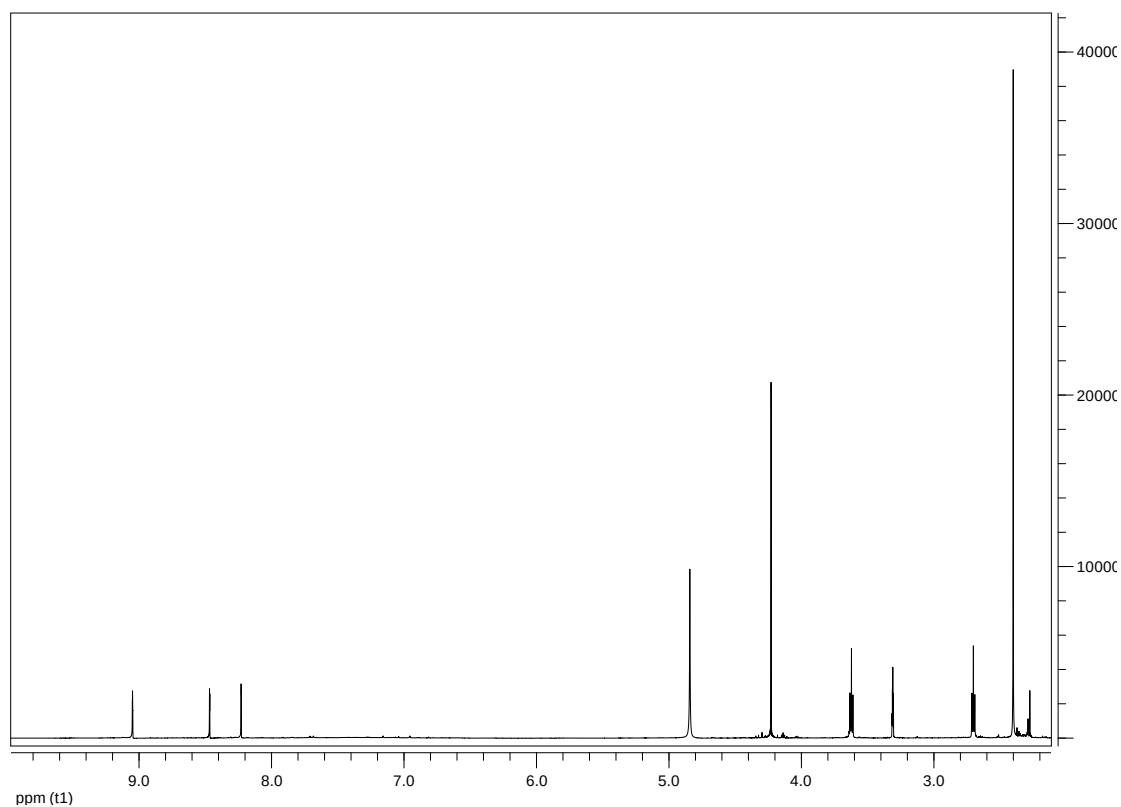
Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι όταν δοκιμάστηκε η μέθοδος με επίδραση αλειφατικής αμίνης στο καρβονιτρίλιο **15** παρουσία χλωριούχου αργιλίου, δεν παρελήφθη η αναμενόμενη καρβοξαμιδίνη, αλλά το αντίστοιχο καρβοξαμίδιο **29** (Σχήμα II.13), κάτι που διαπιστώθηκε και με τη λήψη φάσματος MS.



a) AlCl_3 , 2-dimethylaminoethanol, nitrobenzene, Ar, 160 °C, 1 hr

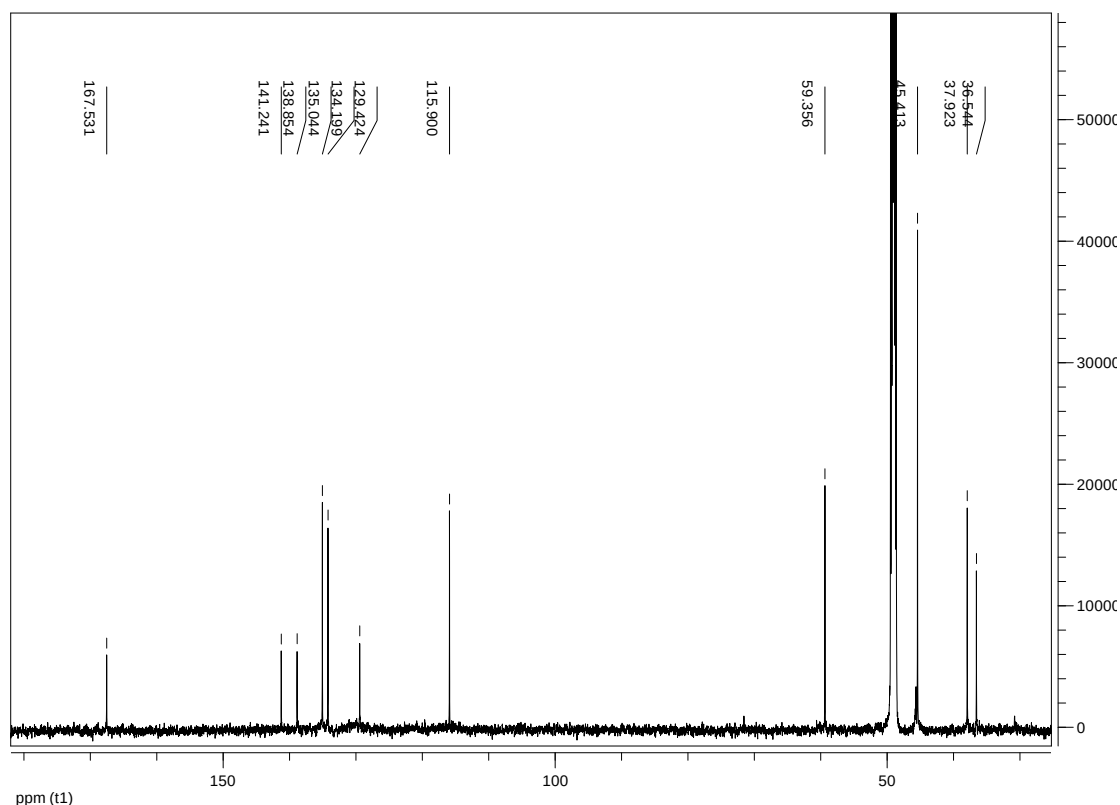
Σχήμα II.13

Στην Εικόνα II.9 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **29**. Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται η απλή κορυφή της διμεθυλαμινομάδας (2.40 ppm), δύο τριπλές κορυφές των μεθυλενίων της αλειφατικής αλυσίδας (2.70 ppm για το $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ και 3.62 ppm για το $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), καθώς και η απλή κορυφή του πυραζολικού μεθυλίου (4.23 ppm). Στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται οι απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα H-3 (8.23 ppm), H-4 (8.47 ppm) και H-7 (9.05 ppm).



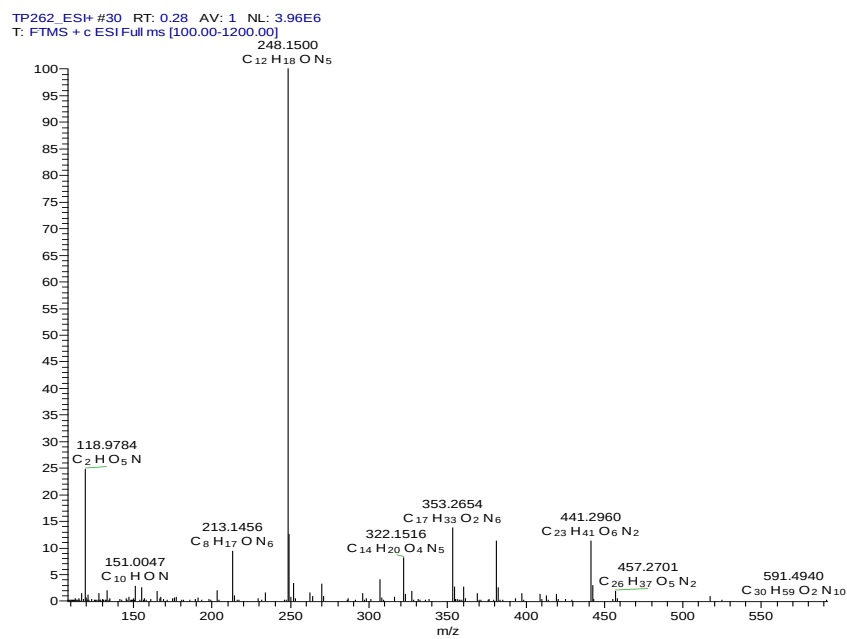
Εικόνα II.9 Φάσμα ^1H -NMR του παραγώγου **29** σε CD_3OD

Στην Εικόνα II.10 παρουσιάζεται το φάσμα ^{13}C -NMR του παραγώγου **29**. Στα 167.53 ppm παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή του καρβονυλίου.



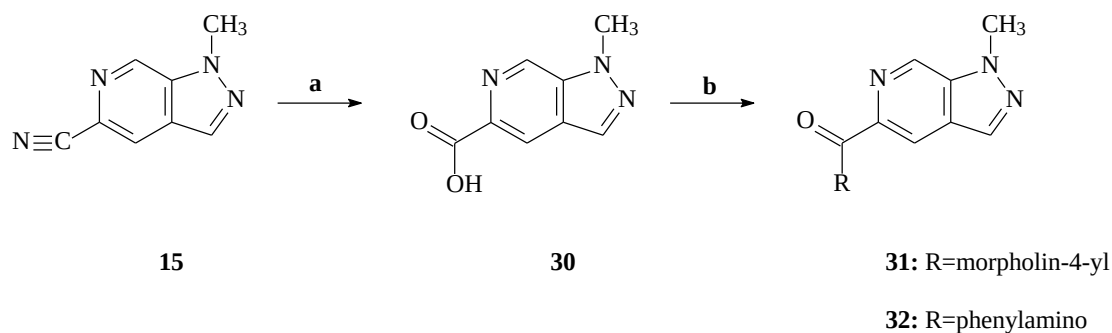
Εικόνα II.10 Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του παραγώγου **29** σε CD_3OD

Στην Εικόνα II.11 παρουσιάζεται το φάσμα MS του παραγώγου **29**. Παρατηρείται η κορυφή του μοριακού ιόντος (248.1500) που υποδηλώνει το μοριακό βάρος του εν λόγω παραγώγου. Κατά τη λήψη του φάσματος MS πραγματοποιήθηκε θετικός ιονισμός, οπότε εμφανίζεται το μοριακό βάρος αυξημένο κατά μία μονάδα.



Εικόνα II.11 Φάσμα MS του παραγώγου **29**

Η μη προσχεδιασμένη παρασκευή του καρβοξαμιδίου **29** ήταν η αφορμή για τη σύνθεση μερικών επιπλέον καρβοξαμιδίων, για περαιτέρω συγκριτική φαρμακολογική αξιολόγηση-μελέτη. Έτσι, αλκαλική υδρόλυση του καρβονιτριλίου **15** οδήγησε στο αντίστοιχο καρβοξυλικό οξύ **30**,⁴¹¹ από το οποίο με επίδραση μορφολίνης και ανιλίνης παρουσία *N,N'*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου (DCC) παρελήφθησαν τα καρβοξαμίδια **31-32** αντίστοιχα (Σχήμα II.14).⁴¹²

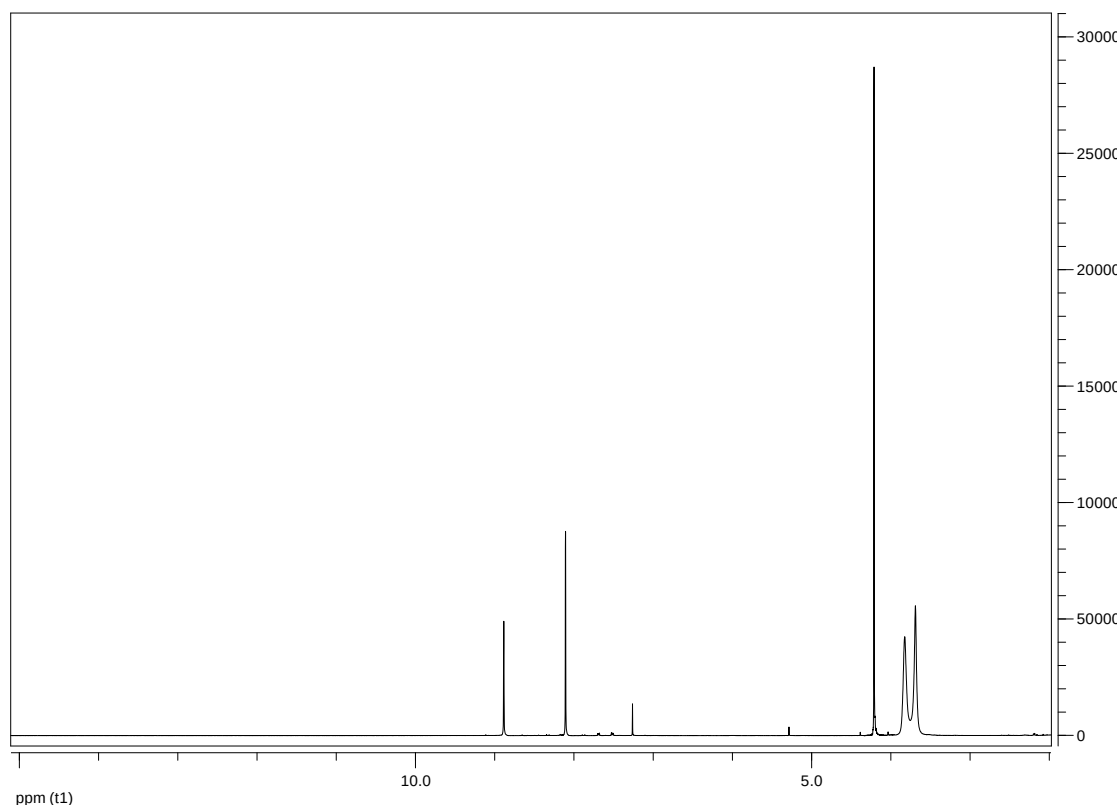


a) NaOH (aq.) 20%, EtOH, 70 °C, 2 hrs

b) DCC, morpholine or aniline, CH₂Cl₂, Ar, r.t., 4 or 6 days

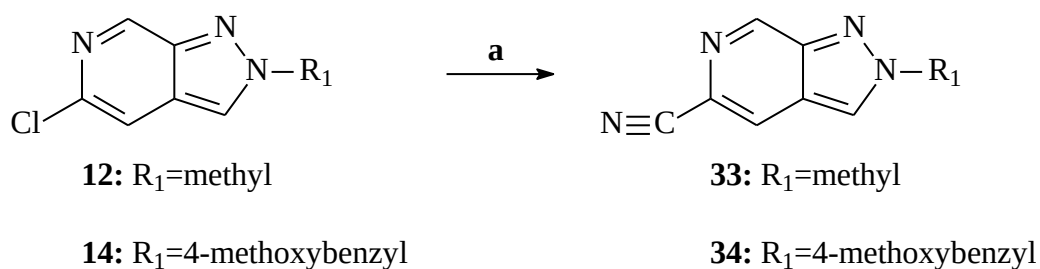
Σχήμα II.14

Στην Εικόνα II.12 παρουσιάζεται το φάσμα ¹H-NMR του παραγώγου **31**. Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται δύο ευρείες κορυφές που αντιστοιχούν στα μορφολινικά μεθυλένια H-3', H-5' (3.69 ppm) και H-2', H-6' (3.82 ppm). Οι απλές κορυφές των H-3 και H-4 συμπίπτουν στα 8.11 ppm.



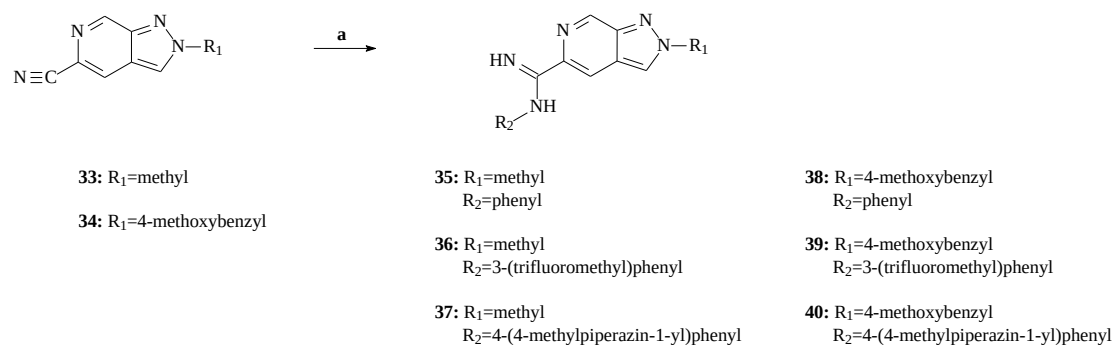
Εικόνα II.12 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **31** σε CDCl_3

Με μεθόδους ανάλογες αυτών που περιγράφηκαν για τις καρβοξαμιδίνες **17-19** και **20-22**, παρασκευάστηκαν τα 2-ισομερή ανάλογά τους **35-37** και **38-40**, χρησιμοποιώντας ως πρώτες ύλες τα παράγωγα **12** και **14** αντίστοιχα (Σχήματα II.15 και II.16).



a) $\text{Zn}(\text{CN})_2$, Zn powder, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, dppf, DMA dry, Ar, 180°C , 2 hrs

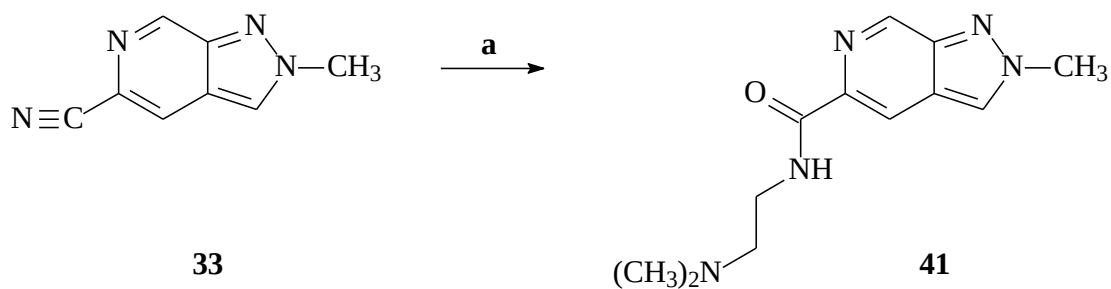
Σχήμα II.15



a) NaH (60% in paraffin oil), anilines, DMSO dry, Ar, r.t., 3 hrs

Σχήμα II.16

Προκειμένου να μελετηθεί η φαρμακολογική δράση σε επίπεδο ισομερών θέσης, αντίστοιχα με το καρβοξαμίδιο **29**, παρασκευάστηκε το 2-ισομερές ανάλογό του **41** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το καρβονιτρίλιο **33** (Σχήμα II.17).

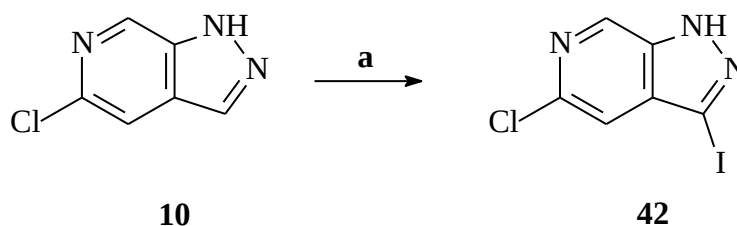


a) AlCl₃, 2-dimethylaminoethylamine, nitrobenzene, Ar, 160 °C, 1 hr

Σχήμα II.17

II.1B 3-φαινυλοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (50-58)

Για τη σύνθεση των ανωτέρω παραγώγων χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η πυραζολοπυριδίνη **10**, η οποία με επίδραση *N*-ιωδοσουκκινιμιδίου (NIS) οδήγησε στο ιωδοπαραγόγο **42** (Σχήμα II.18).³⁵⁴ Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε μικρό χρονικό διάστημα και σε υψηλή απόδοση λόγω της ιδιότητας της θέσης 3 του πυραζολίου να δίνει εύκολα αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης.



a) NIS, MeOH dry, Ar, r.t., 3 hrs

Σχήμα II.18

Η ιωδίωση πυραζολίων και πυρρολίων με τη χρήση *N*-ιωδοσουκκινιμιδίου είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη αντίδραση στην Οργανική Χημεία.^{413,414} Παρόλα αυτά, μπορεί να γίνει και με άλλους τρόπους. Παρακάτω παρατίθενται μερικοί από αυτούς.

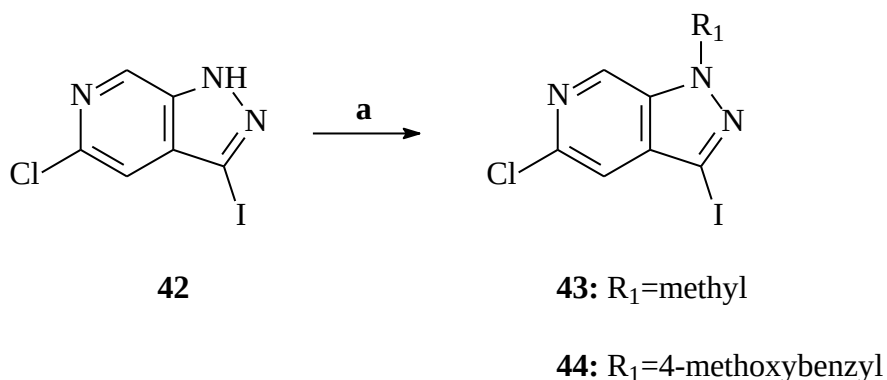
α) Με χρήση στοιχειακού ιωδίου και ισχυρής βάσης, όπως καυστικό κάλιο⁴¹⁵

β) Με χρήση στοιχειακού ιωδίου, ανθρακικού καλίου ή νατρίου και ιωδιούχου καλίου ή νατρίου^{416,417}

γ) Με χρήση στοιχειακού ιωδίου και ιωδικού οξέος⁴¹⁸

Με μεθόδους ανάλογες αυτών που περιγράφηκαν για τα παράγωγα **11-12** και **13-14**, παρασκευάστηκαν τα παράγωγα **43-44** (Σχήμα II.19).³⁵⁴ Είναι προφανές ότι υπήρχε θεωρητικά η δυνατότητα να ληφθούν δύο ισομερή παράγωγα σε κάθε αντίδραση, επί των θέσεων 1 και 2, όπως ακριβώς συνέβη και στην περίπτωση των

παραγώγων **11-12** και **13-14**. Παρόλα αυτά, στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, στις αντιδράσεις αυτές ελήφθησαν αποκλειστικά τα 1-ισομερή. Η θέση των ομάδων διαπιστώθηκε με τη χρήση φασμάτων NOESY-NMR. Η εκλεκτικότητα αυτής της αντίδρασης οφείλεται πιθανώς στη στεreoχημική παρεμπόδιση που προκαλεί η παρουσία του ογκώδους ατόμου του ιωδίου (ατομική ακτίνα: 140 pm) στη θέση 3 του πυραζολίου, που δεν επιτρέπει στη μεθυλομάδα και την 4-μεθοξυβενζυλομάδα να προσεγγίσουν εύκολα τη θέση 2. Φαίνεται, δηλαδή, ότι ο όγκος της εκάστοτε επιθυμητής χημικής ομάδας δεν παίζει ρόλο στο αν θα υποκατασταθεί το πυραζόλιο στη θέση 2 και ότι μόνο η παρουσία του ατόμου του ιωδίου οδηγεί τελικά στο σχηματισμό των 1-ισομερών. Σε αντίθετη περίπτωση η μεθυλομάδα, που δεν είναι ογκώδης, θα μπορούσε να προσεγγίσει τη θέση 2.

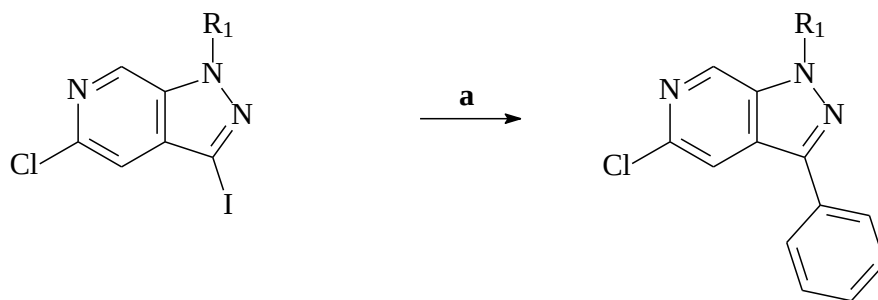


a) **43:** KOH, CH₃I, acetone, Ar, r.t., 16 hrs

44: NaH (60% in paraffin oil), 4-methoxybenzyl chloride, DMF dry, Ar, r.t., 2 hrs

Σχήμα II.19

Τα παράγωγα **43-44** οδήγησαν στα 3-φαινυλοϋποκατεστημένα παράγωγα **45-46** αντίστοιχα, με αντιδράσεις σύζευξης τύπου Suzuki (Σχήμα II.20).³⁵⁴ Ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε το τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)παλλάδιο(0) (Pd(PPh₃)₄).



43: R₁=methyl

44: R₁=4-methoxybenzyl

45: R₁=methyl

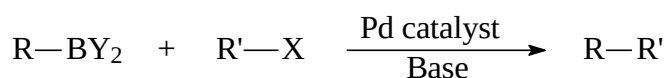
46: R₁=4-methoxybenzyl

a) phenylboronic acid, Pd(PPh₃)₄, toluene/EtOH, NaHCO₃/H₂O, Ar, 100 °C, 15 or 30 hrs

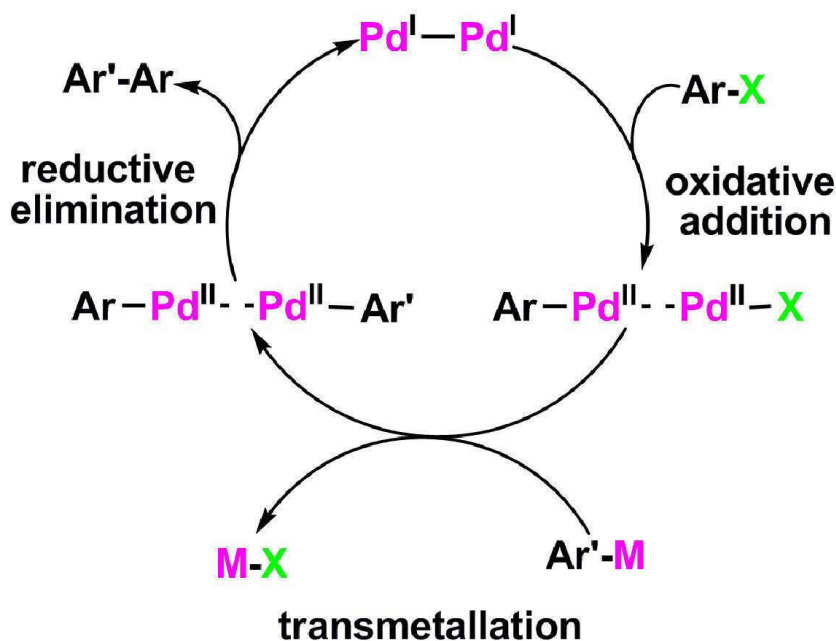
Σχήμα II.20

Οι αντιδράσεις σύζευξης καλύπτουν ένα ευρύτατο φάσμα αντιδράσεων στην Οργανική Χημεία και αποτελούν ένα από τα πλέον μελετημένα θέματα μέχρι σήμερα. Κατά τις αντιδράσεις αυτές λαμβάνει χώρα σύζευξη δύο υδρογονανθρακικών ριζών παρουσία μεταλλικού καταλύτη προς το σχηματισμό δεσμού μεταξύ δύο ατόμων άνθρακα. Οι αντιδράσεις σύζευξης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις αντιδράσεις ομο-σύζευξης (homocoupling reactions), κατά τις οποίες δύο μόρια του ίδιου αρυλαλογονιδίου σχηματίζουν ένα συμμετρικό διαρύλιο (αντιδράσεις Wurtz,⁴¹⁹ Glaser,^{420,421} Ullmann⁴²² και Gomberg-Bachmann⁴²³) και τις αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης (cross-coupling reactions), κατά τις οποίες συζεύγονται δύο διαφορετικά μόρια (αντιδράσεις Suzuki-Miyaura,⁴²⁴ Castro-Stephens,⁴²⁵ Kumada,⁴²⁶ Heck,⁴²⁷ Sonogashira,⁴²⁸ Negishi,⁴²⁹ Stille,⁴³⁰ Hiyama,⁴³¹ Buchwald-Hartwig,⁴³²⁻⁴⁴⁰ Fukuyama,⁴⁴¹ Liebeskind-Srogl⁴⁴² και MacMillan⁴⁴³).

Η αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε, αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία για πρώτη φορά το 1979 από τους A. Suzuki (Βραβείο Nobel Χημείας 2010) και N. Miyaura και χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη σύζευξη αλκενοβορονικών παραγώγων με αλκενυλοβρωμίδια, η οποία οδηγούσε στο σχηματισμό δεσμού άνθρακα-άνθρακα υπό την καταλυτική επίδραση παλλαδίου.⁴²⁴ Από τότε έχει γίνει σημαντική πρόοδος στην εφαρμογή της αντίδρασης αυτής, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται σήμερα πληθώρα αλκεν-, αλκυν-, αλκυλ- και αρυλαλογονιδίων και επιπλέον μεγάλος αριθμός καταλυτών του παλλαδίου, ώστε η αντίδραση αυτή να κατέχει εξέχουσα θέση ως μέθοδος σχηματισμού δεσμού άνθρακα-άνθρακα και να βρίσκει πολλές εφαρμογές στην οργανική σύνθεση. Η γενική αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η ακόλουθη.

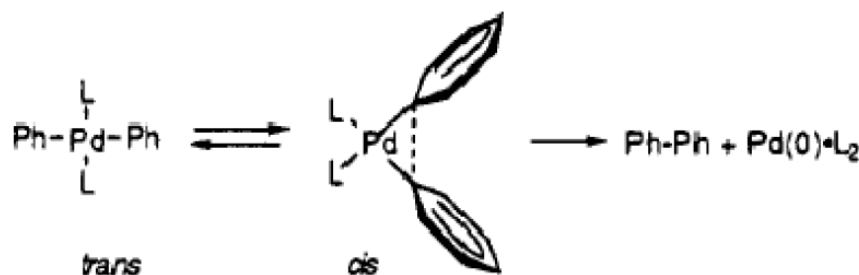


Ο γενικός μηχανισμός του καταλυτικού κύκλου της αντίδρασης σύζευξης τύπου Suzuki περιλαμβάνει τρία στάδια: οξειδωτική προσθήκη (oxidative addition), μεταφορά μετάλλου (transmetallation) και αναγωγική απόσπαση (reductive elimination) (Σχήμα II.21).⁴⁴⁴ Παρά το γεγονός ότι κάθε στάδιο περιλαμβάνει και ενδιάμεσες διαδικασίες, η ύπαρξη των ενδιάμεσων Ar-Pd(II)-X (ενδιάμεσο **I**) και Ar-Pd(II)-Ar' (ενδιάμεσο **II**) δεν επιτρέπει αμφισβήτηση, καθώς έχουν χαρακτηριστεί μέσω απομόνωσης ή φασματοσκοπικής ανάλυσης. Η οξειδωτική προσθήκη των 1-αλκεν-, 1-αλκυν-, 1-αλκυλ- και αρυλαλογονιδίων στο σύμπλοκο του παλλαδίου(0) παρέχει ένα σταθερό *trans*-σ-Pd(II) σύμπλοκο (**I**). Η οξειδωτική προσθήκη είναι συχνά το καθοριστικό βήμα για τον καταλυτικό κύκλο. Η σχετική δραστηριότητα μειώνεται με τη σειρά $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl}$, ενώ τα αρυλ- και 1-αλκεναλογονίδια ενεργοποιούνται από την παρουσία ομάδων ηλεκτρονιοδεκτών και είναι δραστηρότερα στην οξειδωτική προσθήκη σε σχέση με τα αντίστοιχα που διαθέτουν ομάδες ηλεκτρονιοδότες. Μεγάλη ποικιλία καταλυτών του παλλαδίου(0) ή προδρόμων αυτού χρησιμοποιούνται στην αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki. Το τετρακίς(τριφαινυλοφωσφίνο)παλλάδιο(0) ($\text{Pd(PPh}_3)_4$) είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο, καθώς επίσης και το δις(τριφαινυλοφωσφίνο)διχλωροπαλλάδιο ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$) και το δις(οξικό)παλλάδιο (Pd(OAc)_2) σε συνδυασμό με τριφαινυλοφωσφίνη (PPh_3).



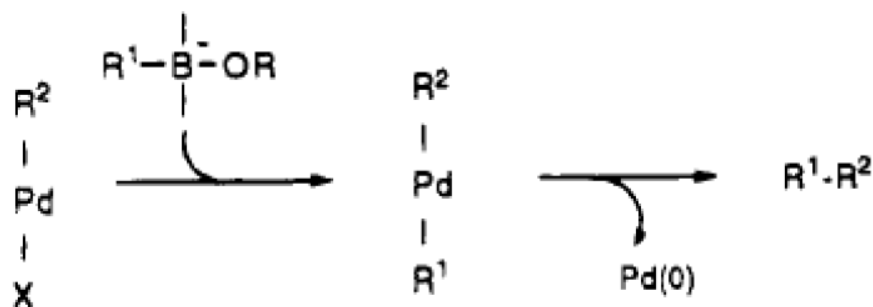
Σχήμα II.21 Γενικός μηχανισμός του καταλυτικού κύκλου της αντίδρασης σύζευξης τύπου Suzuki ($\text{X}=\text{αλογόνο}$, $\text{M}=\text{B(OH)}_2$)

Κατά την αναγωγική απόσπαση των δύο οργανικών συμμετεχόντων του ενδιάμεσου **II**, το σύμπλοκο του παλλαδίου(0) αναγεννάζεται. Η αντίδραση πραγματοποιείται από τη *cis*-μορφή του **II**, ενώ η *trans*- αντιδρά έπειτα από την ισομερίωσή της προς τη *cis*-μορφή (Σχήμα II.22). Η σειρά της δραστηριότητας είναι: διαρυλο- >(αλκυλ)αρυλο- >διαλκυλοπαλλάδιο(II), γεγονός που αποδεικνύει τη συμμετοχή των π -τροχιακών των αρυλομάδων κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του δεσμού.⁴⁴⁴



Σχήμα II.22

Παρά το γεγονός ότι τα στάδια της οξειδωτικής προσθήκης και της αναγωγικής απόσπασης είναι επαρκώς μελετημένα και τεκμηριωμένα και φαίνεται πως είναι κοινές διαδικασίες για όλες τις αντιδράσεις σύζευξης των οργανομεταλλικών παραγώγων, δεν συμβαίνει το ίδιο και με το στάδιο της μεταφοράς μετάλλου, λόγω του ότι ο μηχανισμός εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το οργανομεταλλικό παράγωγο και από τις συνθήκες της αντίδρασης που χρησιμοποιούνται για τη σύζευξη. Τα οργανοβορονικά παράγωγα είναι πολύ δύσκολο να συμμετάσχουν στον καταλυτικό κύκλο της αντίδρασης σύζευξης ως έχουν και δεν αντιδρούν με τα οργανοπαλλάδιο(II)αλογονίδια, όπως το $\text{PhPdI}(\text{PPh}_3)_2$, λόγω της ελαττωμένης πυρηνόφιλης ισχύος της οργανικής ομάδας που συνδέεται με το άτομο του βορίου. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η χρήση μίας αρνητικά φορτισμένης βάσης, όπως το όξινο ανθρακικό νάτριο, το ανθρακικό νάτριο ή κάλιο, το φωσφορικό και το καυστικό νάτριο. Η βάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υδατικό διάλυμα ή σε μορφή εναιωρήματος εντός διμεθυλοφορμαμίδιου ή διοξάνης και έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του βορικού παραγώγου σε ένα επίπεδο τεταρτοταγές αρνητικά φορτισμένο σύμπλοκο, γεγονός που έχει ως επακόλουθο τη σημαντική αύξηση της πυρηνόφιλης ισχύος της οργανικής ομάδας που συνδέεται με το άτομο του βορίου, η οποία πλέον μπορεί να αλληλεπιδράσει με το οργανοπαλλάδιο(II)αλογονίδιο (Σχήμα II.23).⁴⁴⁴



Σχήμα Η.23

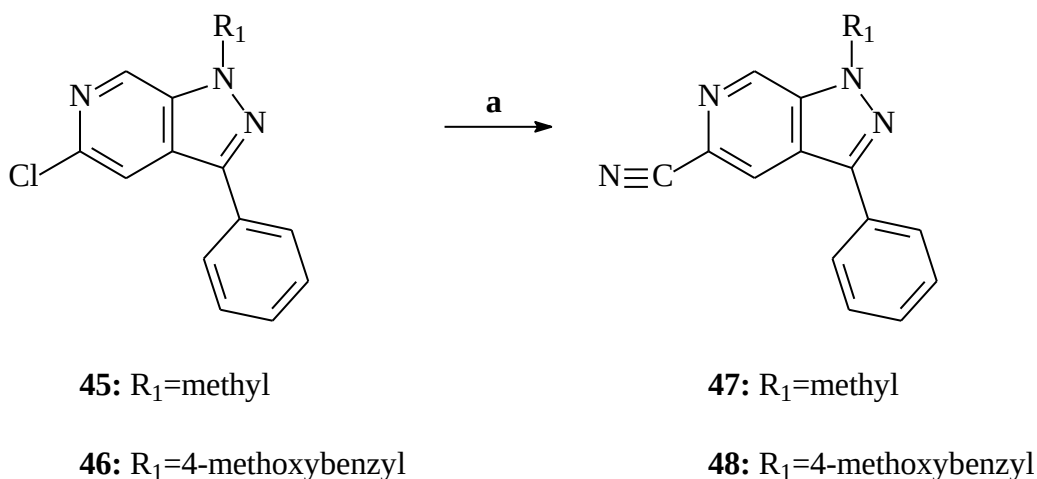
Η αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki έχει μεγάλη σημασία στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η δημιουργία δεσμού μεταξύ δύο αρυλομάδων, γιατί δίνει τη δυνατότητα να συντεθούν μόρια με πολύπλοκη δομή, καθώς και μόρια με φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Όσον αφορά τα πουρινικά ανάλογα, που είναι και το αντικείμενο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, η εν λόγω αντίδραση έχει εφαρμοστεί σε πυρρόλια,⁴⁴⁵ ινδαζόλια,⁴⁴⁶ πυρρολοπυριμιδίνες⁴⁴⁷ και πυραζολοπυριδίνες.⁴⁴⁸ Επίσης, χρησιμοποιείται στη σύνθεση πολυολεφινών, στυρενίων και υποκατεστημένων διφαινυλίων.⁴⁴⁹

Η αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki παρουσιάζει κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, τα χρησιμοποιούμενα βορονικά οξέα είναι εμπορικά διαθέσιμα, οι συνθήκες των αντιδράσεων είναι ήπιες και επιπλέον τα αντιδραστήρια έχουν σχετικά μικρή τοξικότητα. Τα βορονικά οξέα είναι φιλικότερα στο περιβάλλον σε σχέση με τα οργανοκασιτερικά και τα οργανοψευδαργυρικά ανάλογά τους. Επιπλέον, οι κατεργασίες των αντιδράσεων είναι ευκολότερες, αφού τα ανόργανα παραπροϊόντα δεν απομακρύνονται επίπονα. Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας φθηνά και εύκολα παρασκευάσιμα αντιδραστήρια. Επίσης, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης το νερό,⁴⁵⁰ γεγονός που καθιστά την αντίδραση πιο οικονομική, οικολογική και δίνει τη δυνατότητα χρήσης αντιδραστηρίων διαλυτών στο νερό. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki, κάτι που επιτρέπει ένα μεγάλο εύρος χημικών συνθέσεων. Υπάρχουν πειραματικές συνθήκες που επιτρέπουν τη χρήση αρυλο- ή βινυλοβορονικών αλογονιδίων, καθώς και αλκυλοβρωμιδίων.⁴⁵¹ Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται και με τη χρήση ψευδοαλογονιδίων αντί για αλογονίδια. Ως παράδειγμα αναφέρονται οι τριφθορομεθανοσουλφονικοί εστέρες ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{R}$).⁴⁵² Επίσης, βορονικοί εστέρες ($\text{RB}(\text{OR})_2$) και οργανοτριφθοροβορονικά άλατα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί για βορονικά οξέα.^{453,454}

Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί διάφορες παραλλαγές της αντίδρασης σύζευξης τύπου Suzuki σχετικά με τους χρησιμοποιούμενους καταλύτες. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα για την ανάπτυξη νέων παραλλαγών έχει προσανατολιστεί στη χρήση

καταλύτη νικελίου αντί για παλλάδιο με ενδιαφέροντα αποτελέσματα.⁴⁵⁵ Η πρώτη αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki με νικέλιο δημοσιεύθηκε από το N. Miyaoura και τους συνεργάτες του.⁴⁵⁶ Η παραλλαγή αυτή συνέβαλλε στη σύνθεση παραγώγων, τα οποία δεν μπορούσαν να παραχθούν με την κλασσική αντίδραση, όπου χρησιμοποιείται καταλύτης παλλαδίου.⁴⁵⁵ Ως παραδείγματα οργανικών υποστρωμάτων στα οποία εφαρμόστηκε η εν λόγω παραλλαγή αναφέρονται φαινόλες, αρυλαιθέρες, εστέρες, φωσφορικά οξέα και φθορίδια.⁴⁵⁵ Επιπλέον, έχουν μελετηθεί παραλλαγές στις οποίες χρησιμοποιούνται καταλύτες σιδήρου^{457,458} και χαλκού,⁴⁵⁹ οι οποίοι είναι μη τοξικοί και φθηνοί. Τέλος, έχουν πραγματοποιηθεί και πειραματικές δοκιμές χρησιμοποιώντας καταλύτη ρουθηνίου.⁴⁶⁰ Η αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki είναι διαφορετική από τις άλλες αντιδράσεις σύζευξης λόγω του γεγονότος ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διαστικά⁴⁶¹ ή μόνο υδατικά περιβάλλοντα και όχι αποκλειστικά και μόνο σε έναν οργανικό διαλύτη.⁴⁵⁰ Οι βάσεις που χρησιμοποιούνται ευρύτερα στη συγκεκριμένη αντίδραση, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, είναι το ανθρακικό κάλιο,⁴⁶¹ το *tert*-βουτοξυκάλιο,⁴⁶² το ανθρακικό καίσιο,⁴⁶³ το φωσφορικό κάλιο,⁴⁶⁴ το καυστικό νάτριο⁴⁶⁵ και η τριαμιθλαμίνη.⁴⁶⁶

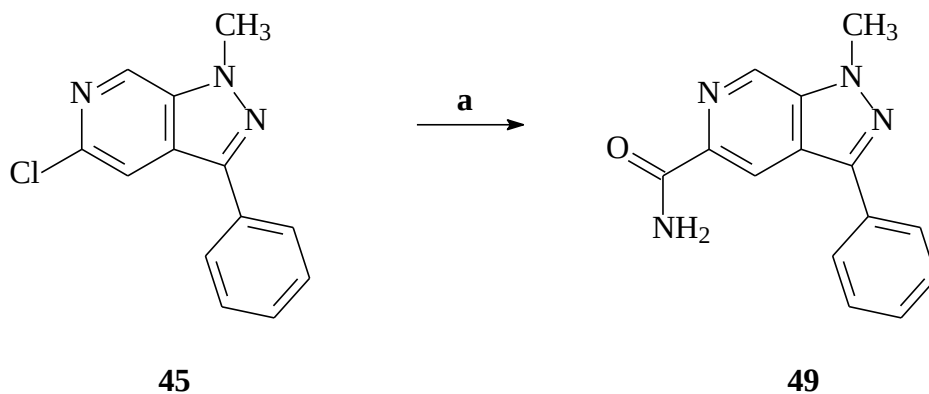
Με μεθόδους ανάλογες αυτών που περιγράφηκαν για τις καρβοξαμίδινες της ενότητας II.1A, παρασκευάστηκαν οι καρβοξαμίδινες **50-58** (Σχήματα II.24, II.26 και II.27).



a) Zn(CN)₂, Zn powder, Pd₂(dba)₃, dppf, DMA dry, Ar, 120 °C, 3 hrs

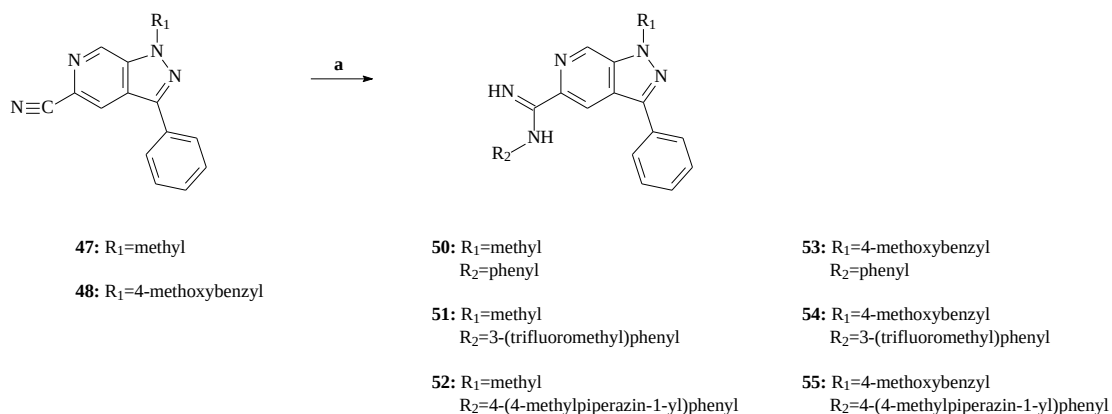
Σχήμα II.24

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η θερμοκρασία των αντιδράσεων σύζευξης για την παρασκευή των καρβονιτριλίων **47-48** είναι αρκετά χαμηλότερη (120 °C) από τη θερμοκρασία των αντίστοιχων αντιδράσεων για την παρασκευή των καρβονιτριλίων **15-16** και **33-34** (180 °C). Αυτό συνέβη διότι όταν η αντίδραση δοκιμάστηκε στο παράγωγο **45** σε συνθήκες βρασμού, δεν παρελήφθη το αναμενόμενο καρβονιτρίλιο **47**, αλλά το αντίστοιχο πρωτοταγές αμίδιο **49**, παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν αυστηρά άνυδρες (Σχήμα II.25).



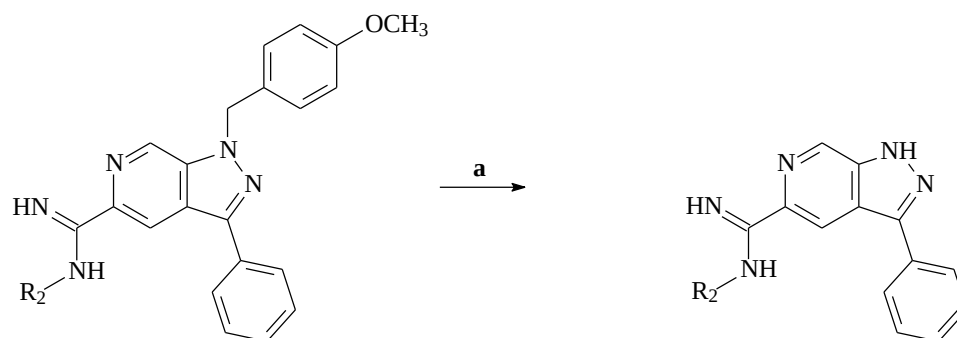
a) $\text{Zn}(\text{CN})_2$, Zn powder, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, dppf, DMA dry, Ar, 180 °C, 2 hrs

Σχήμα II.25



a) NaH (60% in paraffin oil), anilines, DMSO dry, Ar, r.t., 3 hrs

Σχήμα II.26



53: R₂=phenyl

56: R₂=phenyl

54: R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

57: R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

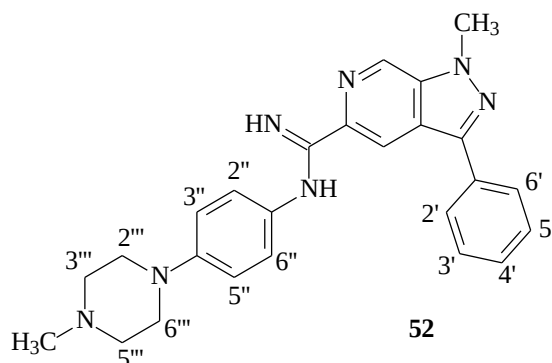
55: R₂=4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl

58: R₂=4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl

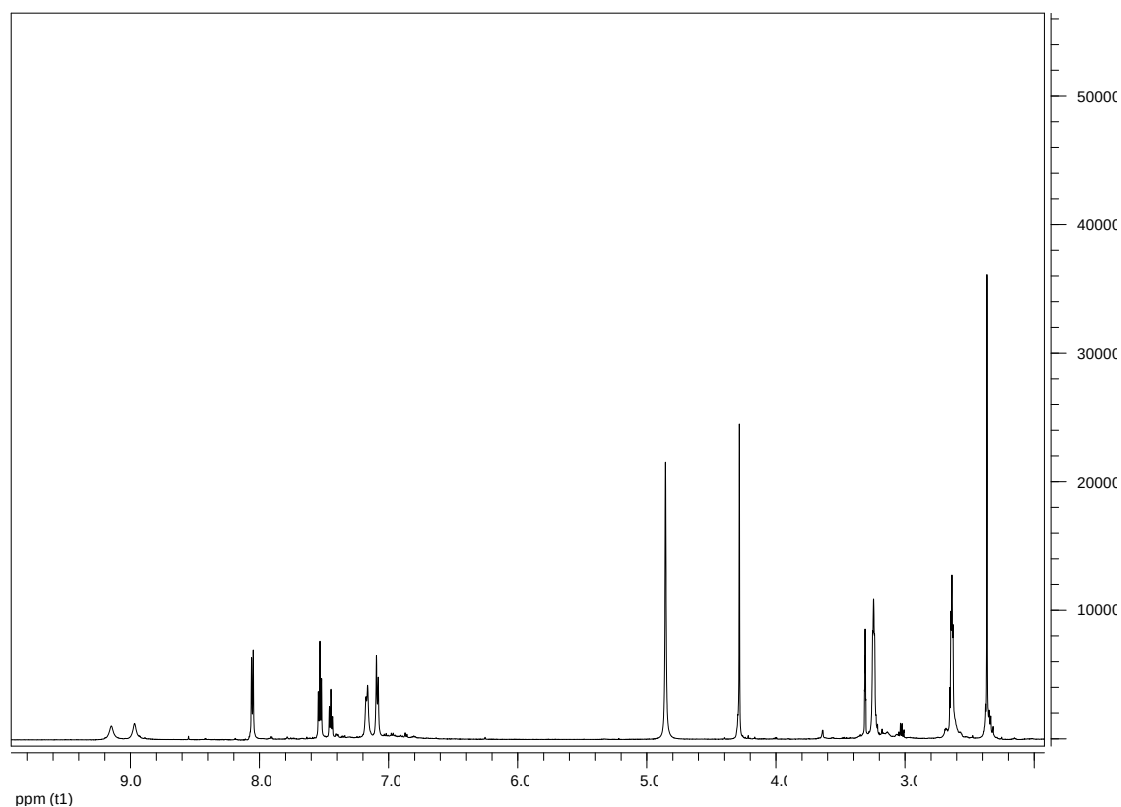
a) CF₃CO₂H, 70 °C, 5 hrs

Σχήμα II.27

Στην Εικόνα II.13 παρουσιάζεται το φάσμα ¹H-NMR του παραγώγου **52**, του οποίου η αρίθμηση των υποκαταστατών φαίνεται παρακάτω.



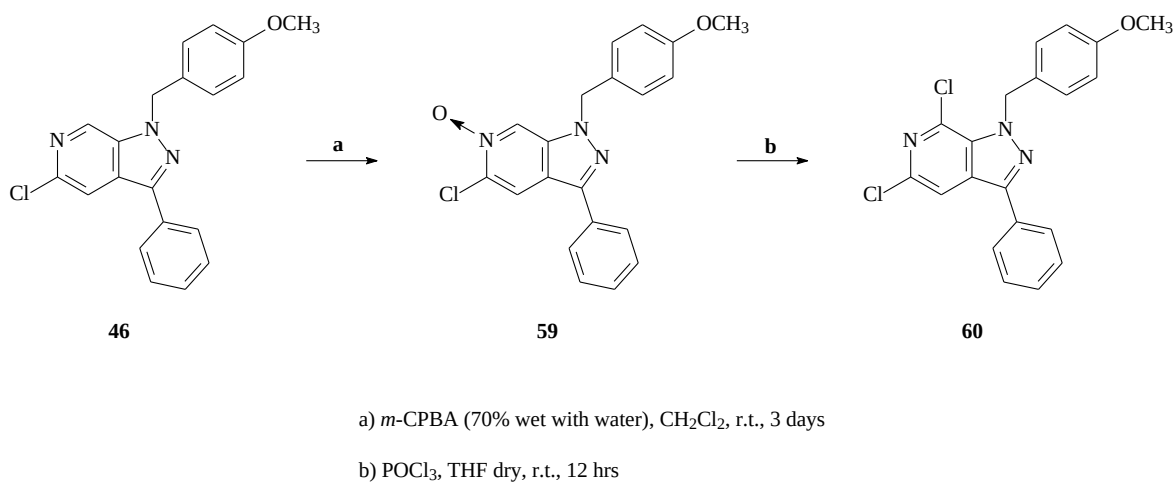
Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται η απλή κορυφή του μεθυλίου της πιπεραζίνης (2.37 ppm), δύο τριπλές κορυφές των πιπεραζινικών μεθυλενίων H-3''', H-5''' (2.64 ppm) και H-2'', H-6'' (3.24 ppm), καθώς και η απλή κορυφή του πυραζολικού μεθυλίου (4.28 ppm). Στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται οι διπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα H-3'', H-5'' (7.09 ppm) και στα H-2'', H-6'' (7.17 ppm), καθώς και οι χημικές μετατοπίσεις των H-4' (7.45 ppm, τριπλή κορυφή), H-3', H-5' (7.53 ppm, τριπλή κορυφή) και H-2', H-6' (8.06 ppm, διπλή κορυφή).



Εικόνα II.13 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **52** σε CD_3OD

II.1Γ 3-φαινυλο-7-αμινοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (67-84)

Για τη σύνθεση των ανωτέρω παραγώγων χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το παράγωγο **46**, το οποίο με επίδραση 3-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος (*m*-CPBA) οδήγησε στο αντίστοιχο *N*-οξείδιο **59**. Στη συνέχεια, με αντίδραση μετάθεσης χλωρίου, σχηματίστηκε το διχλωροπαράγωγο **60** (Σχήμα II.28).³⁵⁴



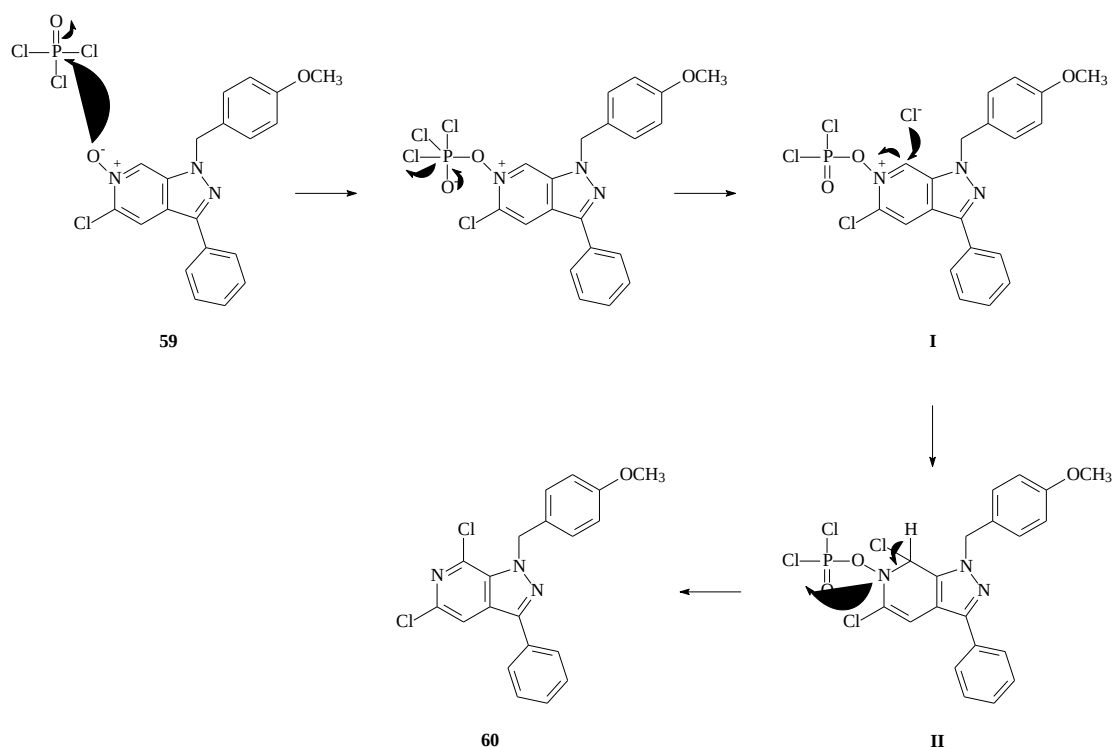
Σχήμα II.28

Το 3-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ (*m*-CPBA) είναι ένα υπεροξυκαρβοξυλικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως ως οξειδωτικό μέσο στην οργανική σύνθεση. Χρησιμοποιείται συχνά για μετατροπές αλδευδών και κετονών προς εστέρες (οξείδωση Baeyer-Villiger),^{467,468} για εποξειδώσεις αλκενίων προς εποξείδια (αντίδραση Prilezhaev) και για οξειδώσεις σουλφιδίων προς σουλφοξείδια και σουλφόνες, καθώς και αμινών προς αμινοξείδια.⁴⁶⁹ Χρησιμοποιείται επίσης και για τη σύνθεση πυριδινικών *N*-οξειδίων.⁴⁷⁰⁻⁴⁷³

Τα πυριδινικά *N*-οξείδια αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την Ετεροκυκλική Χημεία, καθώς λόγω της ομάδας N-O μπορούν να δράσουν ως δότες και ως δέκτες ηλεκτρονίων. Η ικανότητά τους αυτή τα καθιστά χρήσιμα ως προσδέματα σε σύμπλοκα μετάλλων,⁴⁷⁴ ως καταλύτες,⁴⁷⁵ καθώς και ως προστατευτικές ομάδες και οξειδωτικά.⁴⁷⁵ Οι συνθετικές μέθοδοι για το σχηματισμό πυριδινικών *N*-οξειδίων ποικίλουν. Η σύνθεση επιτυγχάνεται είτε από μετάθεση μέσω διάνοιξης ισοξαζολικών παραγώγων,⁴⁷⁶ είτε από απευθείας οξείδωση πυριδινικών παραγώγων με χρήση οξειδωτικών μέσων. Αναφέρεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε συνδυασμούς με οξικό οξύ,⁴⁷⁷⁻⁴⁸⁰ με τετρακίς(2,6-διχλωροφαινυλο)πορφυρίνη [Mn(TDCPP)Cl],⁴⁸¹ με μεθυλοτριοξορήνιο (MTO)^{482,483} και με ουρία.⁴⁸⁴ Επιπλέον, άλλα οξειδωτικά μέσα που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πυριδινικών *N*-οξειδίων είναι το διμεθυλοδιοξिरάνιο (DMD, αναφέρεται και ως αντιδραστήριο του Murray),⁴⁸⁵⁻⁴⁸⁷ το δις(τριμεθυλοσιλυλ)υπεροξείδιο (BTSP),⁴⁸⁸ το οξύ του Caro (H₂SO₅)⁴⁸⁹ και οι οξαζιριδίνες.⁴⁹⁰ Τέλος, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η σύνθεση πυριδινικών *N*-οξειδίων μέσω αντιδράσεων κυκλοπροσθήκης.⁴⁹¹

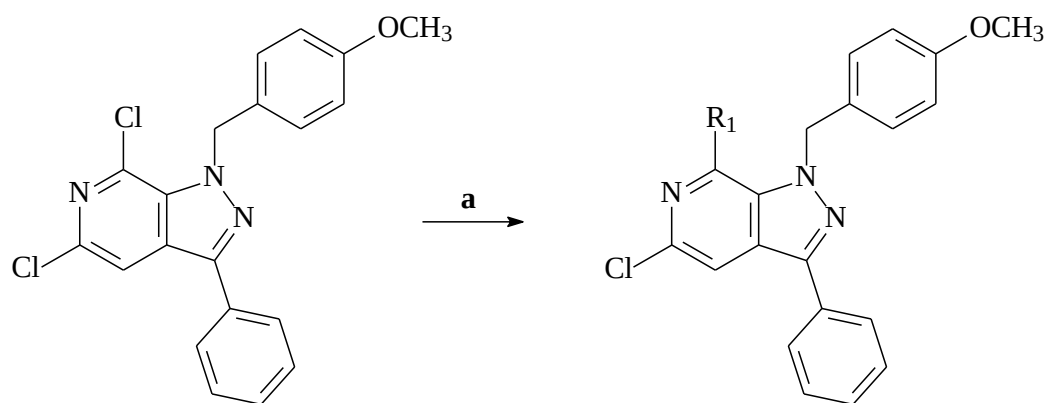
Τα παράγωγα της 2-χλωροπυριδίνης είναι πολύ χρήσιμα για τη σύνθεση φαρμακευτικών ενώσεων.⁴⁹² Οι πλέον κοινές μέθοδοι για τη σύνθεση των εν λόγω παραγώγων είναι η απευθείας χλωρίωση των πυριδινών με επίδραση υποχλωριώδους ακετυλίου, η οποία δίνει χαμηλές αποδόσεις,^{493,494} καθώς και η χλωρίωση των αντίστοιχων πυριδινικών *N*-οξειδίων με επίδραση χλωριούχων αντιδραστηρίων, όπως οξυχλωριούχος φώσφορος,⁴⁹⁵ θειονυλοχλωρίδιο,⁴⁹⁶ φωσγένιο,⁴⁹² τριχλωρακετυλοχλωρίδιο,⁴⁹⁷ βενζολοσουλφονυλοχλωρίδιο,⁴⁹⁸ ή *π*-τολουολοσουλφονυλοχλωρίδιο.⁴⁹²

Στο Σχήμα II.29 φαίνεται ο μηχανισμός της μετάθεσης χλωρίου. Σύμφωνα με αυτόν, από την επίδραση του οξυχλωριούχου φωσφόρου επί του *N*-οξειδίου **59** σχηματίζεται το ενδιάμεσο άλας **I**, από το οποίο με επίδραση ανιόντος χλωρίου και ταυτόχρονης απόσπασης υδρογόνου από το ενδιάμεσο **II**, σχηματίζεται το επιθυμητό διχλωροπαράγωγο **60**.⁴⁹⁹



Σχήμα II.29 Μηχανισμός της αντίδρασης μετάθεσης χλωρίου

Με πυρηνόφιλη προσβολή επιλεγμένων πρωτοταγών ή δευτεροταγών αμινών, συγκεκριμένα 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνης, κυκλοεξυλαμίνης και μορφολίνης στο διχλωροπαράγωγο **60** ελήφθησαν τα 7-αμινοϋποκατεστημένα παράγωγα **61-63** αντίστοιχα (Σχήμα II.30).⁵⁰⁰



60

61: R_1 =3,4,5-trimethoxyphenylamino

62: R_1 =cyclohexylamino

63: R_1 =morpholin-4-yl

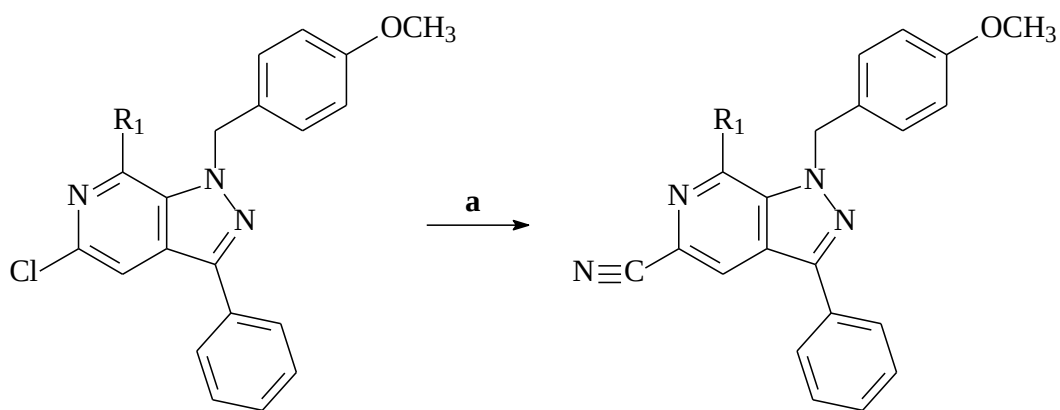
a) **61:** NaH (60% in paraffin oil), 3,4,5-trimethoxyaniline, DMF dry, Ar, 110 °C, 2 hrs

62: cyclohexylamine, 2-ethoxyethanol, Ar, 140 °C, 12 hrs

63: morpholine, Ar, 130 °C, 1 hr

Σχήμα II.30

Με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τα καρβονιτρίλια της ενότητας II.1A, παρασκευάστηκαν τα καρβονιτρίλια **64-66** (Σχήμα II.31).



61: R₁=3,4,5-trimethoxyphenylamino

64: R₁=3,4,5-trimethoxyphenylamino

62: R₁=cyclohexylamino

65: R₁=cyclohexylamino

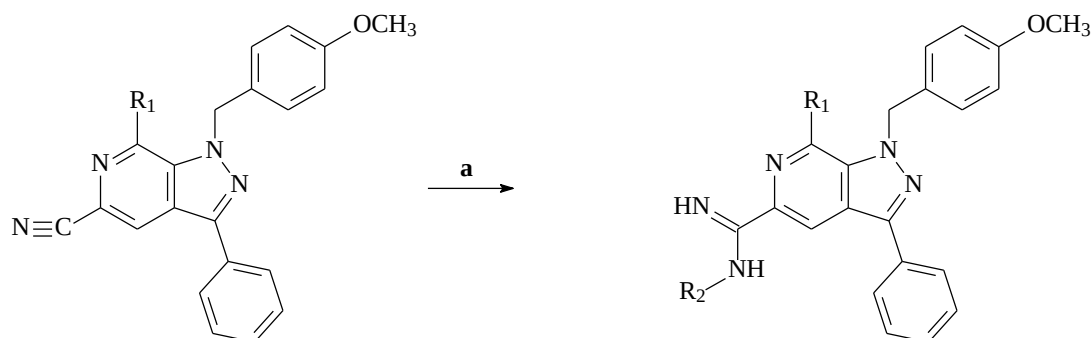
63: R₁=morpholin-4-yl

66: R₁=morpholin-4-yl

a) Zn(CN)₂, Zn powder, Pd₂(dba)₃, dppf, DMA dry, Ar, 180 °C, 2 hrs

Σχήμα II.31

Με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τις καρβοξαμιδίνες **17-22**, παρασκευάστηκαν οι καρβοξαμιδίνες **67-75** (Σχήμα II.32). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η μέθοδος με το χλωριούχο αργίλιο που περιγράφηκε στην ενότητα II.1A δεν ήταν αποτελεσματική, πιθανώς λόγω της παρουσίας του αμινικού αζώτου στη θέση 7 του ετεροκυκλικού συστήματος. Συγκεκριμένα, το αμινικό άζωτο μπορεί να δεσμεύσει το χλωριούχο αργίλιο, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο σχηματισμός του συμπλόκου με την κυανομάδα και κατ' επέκταση να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Λόγω του γεγονότος αυτού χρησιμοποιήθηκε περίσσεια χλωριούχου αργιλίου, σε διάφορες αναλογίες ως προς το εκάστοτε καρβονιτρίλιο αλλά χωρίς το επιθυμητό αποτέλεσμα.



64: R₁=3,4,5-trimethoxyphenylamino

65: R₁=cyclohexylamino

66: R₁=morpholin-4-yl

67: R₁=3,4,5-trimethoxyphenylamino
R₂=phenyl

68: R₁=3,4,5-trimethoxyphenylamino
R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

69: R₁=3,4,5-trimethoxyphenylamino
R₂=4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl

70: R₁=cyclohexylamino
R₂=phenyl

71: R₁=cyclohexylamino
R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

72: R₁=cyclohexylamino
R₂=4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl

73: R₁=morpholin-4-yl
R₂=phenyl

74: R₁=morpholin-4-yl
R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

75: R₁=morpholin-4-yl
R₂=4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl

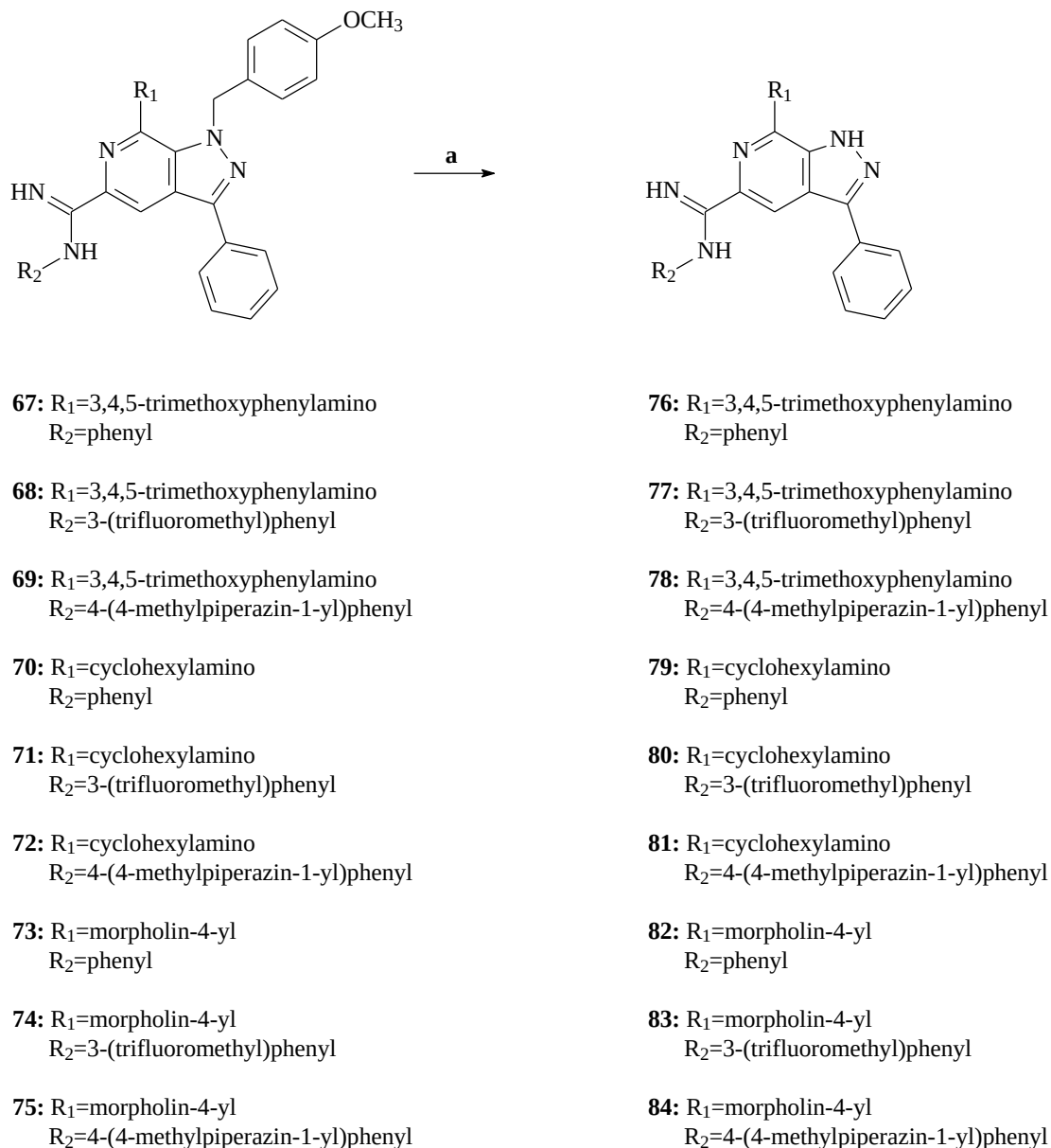
a) NaH (60% in paraffin oil), anilines, DMSO dry, Ar, r.t., 3 hrs

Σχήμα II.32

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι αποδόσεις των αντιδράσεων παρασκευής των καρβοξαμιδινών **67-75** διαφέρουν ανάλογα με το είδος της εκάστοτε αμινικής υποκατάστασης στη θέση 7. Συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις παρασκευής των καρβοξαμιδινών **67-72**, που φέρουν υποκαταστάσεις από πρωτοταγείς αμίνες (3,4,5-τριμεθοξυανιλίνη και κυκλοεξυλαμίνη), δίνουν αποδόσεις της τάξεως 32-40%. Αντίθετα, οι αντίστοιχες αντιδράσεις για τις καρβοξαμιδίνες **73-75**, που φέρουν

υποκατάσταση από δευτεροταγή αλκυκυκλική αμίνη (μορφολίνη), δίνουν αποδόσεις της τάξεως 60-96%.

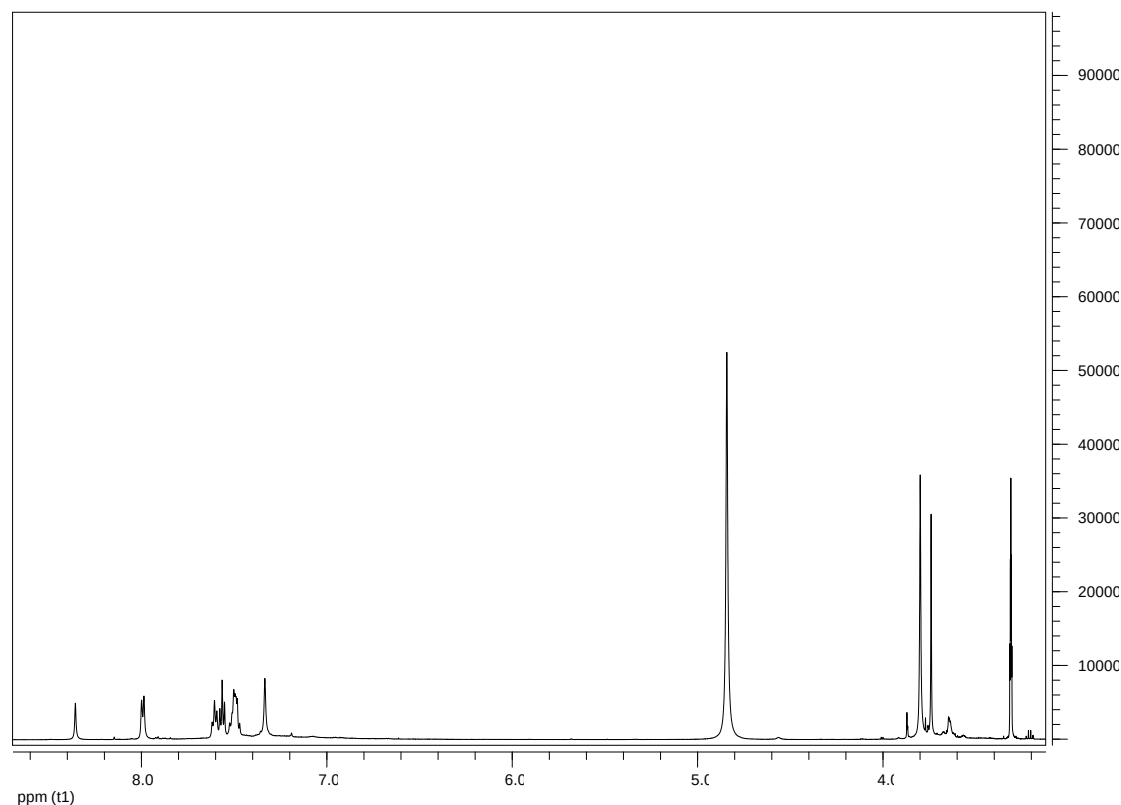
Με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τις καρβοξαμιδίνες **26-28**, παρασκευάστηκαν οι καρβοξαμιδίνες **76-84** (Σχήμα II.33).



a) CF₃CO₂H, 70 °C, 5 hrs

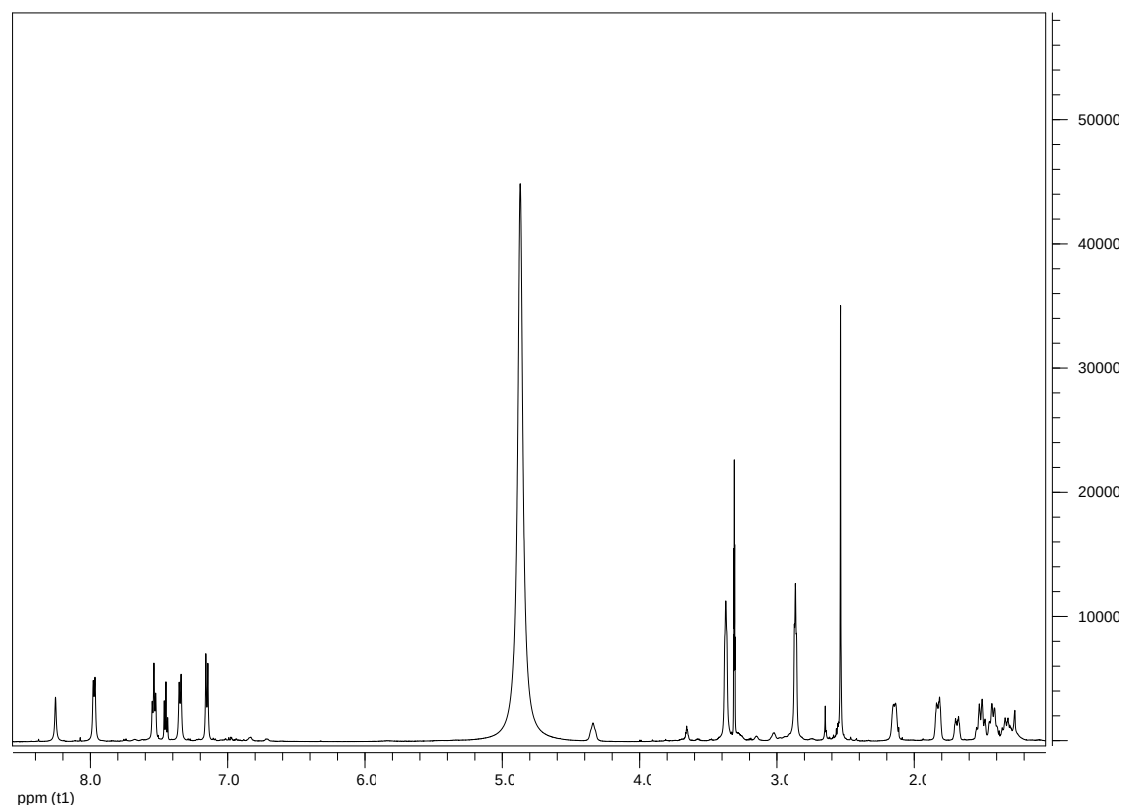
Σχήμα II.33

Στην Εικόνα II.14 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **76**. Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται οι απλές κορυφές των μεθοξυλίων ($4''\text{-OCH}_3$ και τα χημικώς ισοδύναμα $3''\text{-OCH}_3$ και $5''\text{-OCH}_3$) της ανιλινικής υποκατάστασης της θέσης 7 (3.74 και 3.80 ppm αντίστοιχα). Στην αρωματική περιοχή εμφανίζεται η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στα χημικώς ισοδύναμα H-2'', H-6'' (7.33 ppm).



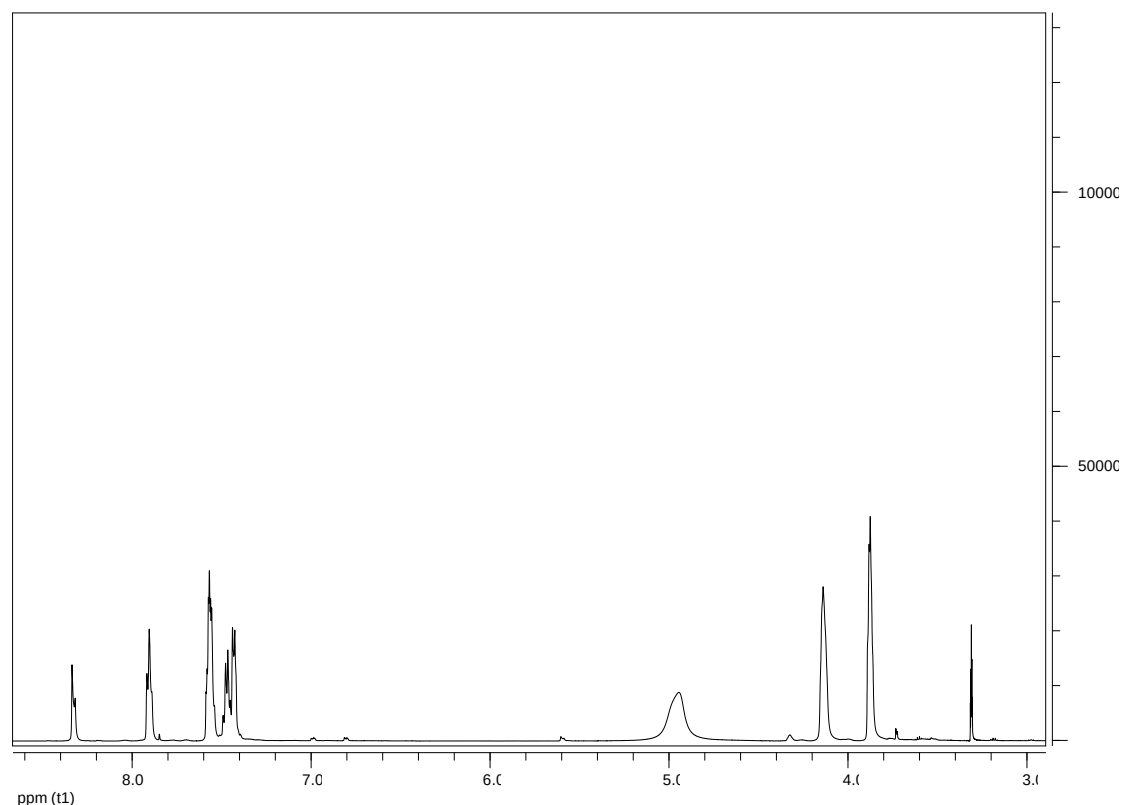
Εικόνα II.14 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **76** σε CD_3OD

Στην Εικόνα II.15 παρουσιάζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **81**. Στην αλειφατική περιοχή (1.31-2.18 ppm) παρατηρούνται έξι πολλαπλές κορυφές που αποδίδονται στα αξονικά και ισημερινά πρωτόνια της κυκλοεξυλαμίνης (H-2'', 6'', H-3'', 5'' και H-4''). Στα 4.30-4.38 ppm συντονίζεται το H-1'' της κυκλοεξυλαμίνης ως πολλαπλή κορυφή.



Εικόνα II.15 Φάσμα ^1H -NMR του παραγώγου **81** σε CD_3OD

Στην Εικόνα II.16 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H -NMR του παραγώγου **82**. Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται δύο τριπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα μορφολινικά μεθυλένια H-2'', H-6'' (3.87 ppm) και H-3'', H-5'' (4.11 ppm).

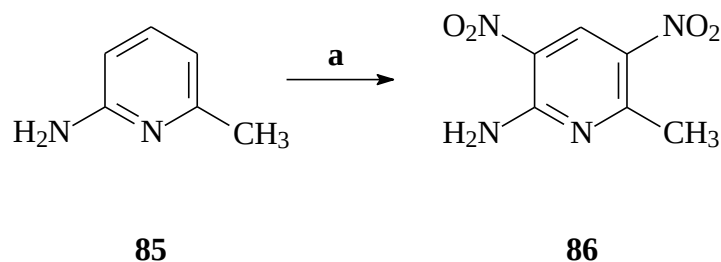


Εικόνα II.16 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **82** σε CD_3OD

II.2 Πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνες

II.2A 3-αρυλαμινοϋποκατεστημένα παράγωγα ουρίας (100-110)

Για τη σύνθεση των ανωτέρω παραγώγων χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 2-αμινο-3,5-δινιτρο-6-μεθυλοπυριδίνη (**86**), η οποία συντέθηκε σε πολύ ικανοποιητική απόδοση, με νίτρωση της 2-αμινο-6-μεθυλοπυριδίνης (**85**) με τη χρήση διμοριακής ποσότητας οξέος νίτρωσης (Σχήμα II.34).⁴⁸⁰

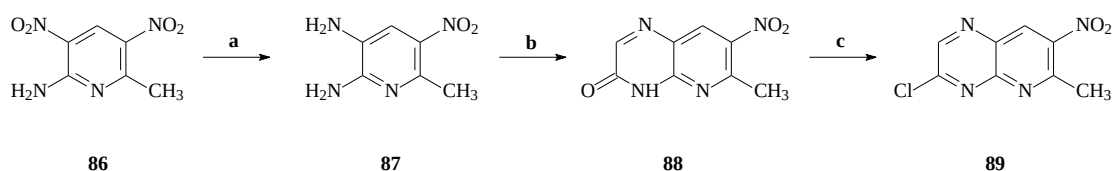


a) H₂SO₄ 96%, HNO₃ 65%, 60 °C, 5 hrs

Σχήμα II.34

Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι η ανάλογη αντίδραση με χρήση ισομοριακής ποσότητας οξέος νίτρωσης οδηγεί σε μίγμα των δύο ισομερών νιτροπαραγώγων (απόδοση 24% για το 3-νιτροπαραγόγο και 45% για το 5-νιτροπαραγόγο, ενώ σχηματίζεται περίπου 2% από το δινιτροπαραγόγο **86**).

Εκλεκτική αναγωγή της 3-νιτρομάδας με υδατικό διάλυμα θειούχου αμμωνίου οδήγησε στη διαμίνη **87**,⁵⁰¹ η οποία αντέδρασε με γλυοξαλικό αιθυλεστέρα και παρελήφθη η πυριδοπυραζινόνη **88**. Τέλος, επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου στο παράγωγο **88** παρουσία τριαιθυλαμίνης οδήγησε στο σχηματισμό της 3-χλωρο-6-μεθυλο-7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζίνης (**89**) (Σχήμα II.35).³³⁵



a) (NH₄)₂S (20% in water), MeOH, r.t. 40 min, then reflux 1 hr

b) ethyl glyoxalate (50% in toluene), EtOH absolute, 80 °C, 3 hrs

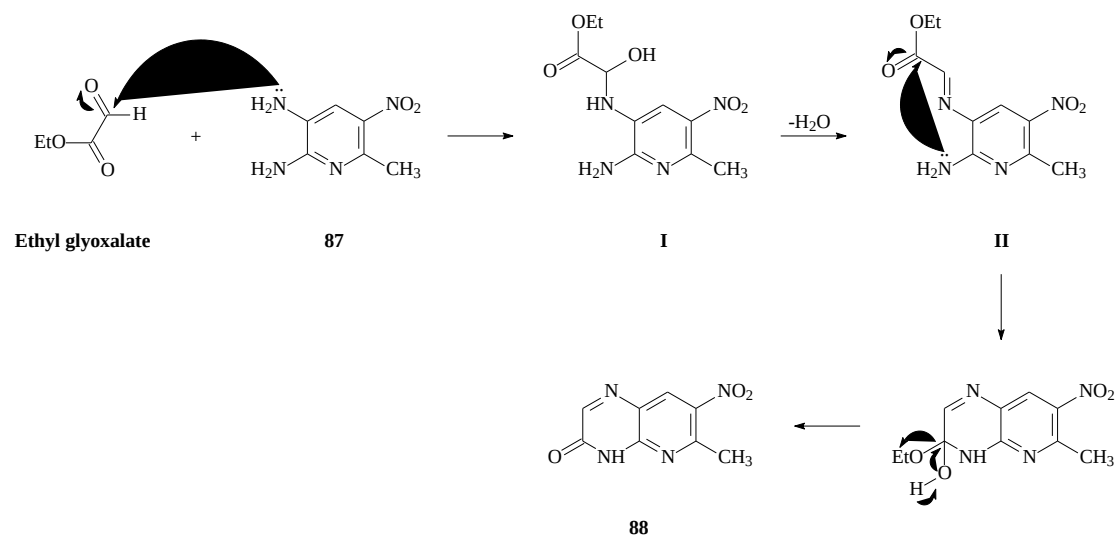
c) 1) Et₃N, CHCl₃, Ar, r.t., 10 min

2) POCl₃, 65 °C, 2 hrs

Σχήμα II.35

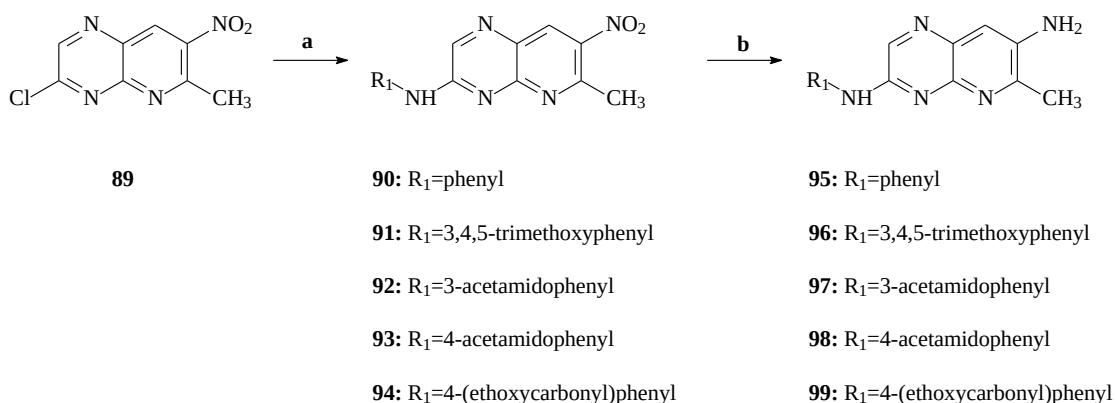
Στο Σχήμα II.36 φαίνεται ο μηχανισμός κύκλωσης κατά το σχηματισμό του δακτυλίου της πυριδο[2,3-*b*]πυραζινόνης. Σύμφωνα με αυτόν, η αμινομάδα της θέσης 3 του παραγώγου **87** προσβάλλει το αλδεϋδικό καρβονύλιο του γλυοξαλικού αιθυλεστέρα και σχηματίζεται το ενδιάμεσο **I**, το οποίο με αφυδάτωση οδηγεί στο

ενδιάμεσο **II**. Στη συνέχεια, με ανάλογο τρόπο, η αμινομάδα της θέσης 2 προσβάλλει το εστερικό καρβονύλιο και με ενδομοριακή κύκλωση και απομάκρυνση του αιθοξυλίου, σχηματίζεται η πυριδοπυραζινόνη **88**.⁵⁰²



Σχήμα II.36 Μηχανισμός της αντίδρασης ενδομοριακής κύκλωσης

Με πυρηνόφιλη προσβολή κατάλληλων ανιλινών στο χλωροπαράγωγο **89** ελήφθησαν τα 3-αρυλαμινοϋποκατεστημένα νιτροπαραγωγα **90-94**, τα οποία με καταλυτική αναγωγή των νιτρομάδων, οδήγησαν στα αντίστοιχα αμινοπαραγωγα **95-99** (Σχήμα II.37).



a) anilines, EtOH absolute, 80 °C, 1 hr

b) Pd/C, Et₃SiH, MeOH dry, Ar, r.t., 3 hrs

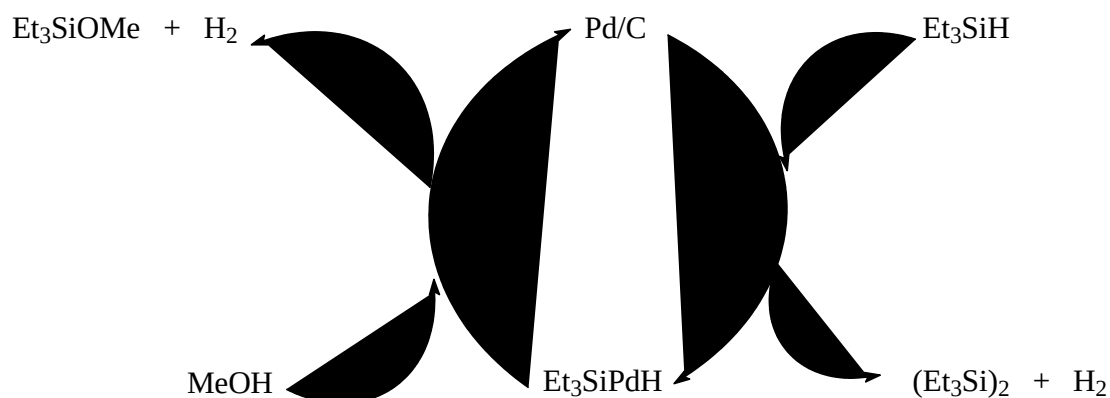
Σχήμα II.37

Η εν τω γεννάσθαι (*in situ*) παραγωγή μοριακού υδρογόνου μέσω προσθήκης τριαιθυλοσιλανίου σε παλλάδιο επί άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία αναγωγή πολλαπλών δεσμών, αζιδίων, ιμινών, νιτρομάδων, καθώς και την αποπροστασία βενζυλικών και αλλυλικών ομάδων υπό ήπιες πειραματικές συνθήκες. Η καταλυτική μεταφορά υδρογόνου είναι ευρέως αποδεκτή εναλλακτική μέθοδος, η οποία δεν απαιτεί την εξωγενή διαβίβαση αερίου υδρογόνου. Έτσι, το αέριο υδρογόνο αντικαθίσταται από ένα δότη υδρογόνου, όπως το 1,4-κυκλοεξαδιένιο, η υδραζίνη, το μυρμηκικό οξύ, το μυρμηκικό αμμώνιο, το φωσφινικό οξύ, ή το υποφωσφορώδες νάτριο σε συνδυασμό με παλλάδιο επί άνθρακα ως καταλύτη. Μολονότι οι μέθοδοι αυτές είναι εύχρηστες, κάποιοι μεταφορείς υδρογόνου απαιτούν υψηλή θερμοκρασία ή δεν είναι δυνατή η χρήση τους σε υποστρώματα ευαίσθητα σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον. Οι συνθήκες της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των αμινοπαραγώγων **95-99** είναι ουδέτερες, οπότε μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα υποστρώματα, ανεξάρτητα αν αυτά είναι ευαίσθητα σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον.⁵⁰³

Τα υδρίδια του πυριτίου βρίσκουν εφαρμογή σε αντιδράσεις υποκατάστασης, αναγωγής και προσθήκης.^{504,505} Συγκεκριμένα, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση υδριδίων του πυριτίου σε συνδυασμό με παλλάδιο(II) για την αναγωγή βάσεων του Schiff,⁵⁰⁶ τη σύνθεση αλογονοσιλανίων,^{507,508} την πυρηνόφιλη υποκατάσταση σε άτομο πυριτίου,^{509,510} καθώς και για την αποπροστασία αμινοξέων ή πεπτιδίων.^{511,512} Επιπλέον, είναι γνωστή η μέθοδος ιονικής υδρογόνωσης διπλών δεσμών και καρβονυλίων με τη χρήση τριαιθυλοσιλανίου σε συνδυασμό με περίσσεια τριφθοροξικού οξέος.⁵¹³ Οι συνήθειες καταλύτες που χρησιμοποιούνται με το τριαιθυλοσιλάνιο είναι το διχλωριούχο παλλάδιο (PdCl₂), το δις(οξικό)παλλάδιο

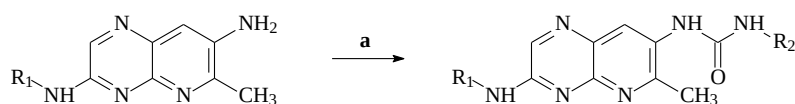
(Pd(OAc)₂) και το παλλάδιο επί άνθρακα (Pd/C). Τα συστήματα του τριαιθυλοσιλανίου με τους προαναφερθέντες καταλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αναγωγή ολεφινών προς αλκάνια, καθώς και για την ισομερίωση 1-αλκενίων προς 2- και 3-αλκένια.⁵¹⁴ Επιπλέον, το διχλωριούχο παλλάδιο έχει χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή αλογονιδίων προς τα αντίστοιχα αλκάνια,⁵¹⁵⁻⁵¹⁷ αλκοολών προς τα αντίστοιχα αλογονίδια και αλκάνια ή προς τους αντίστοιχους σιλυλαιθέρες, καθώς και για τη σχάση τριαιθυλοσιλυλαιθέρων προς τις μητρικές αλκοόλες.⁵¹⁸

Στο Σχήμα II.38 φαίνεται ο μηχανισμός της *in situ* παραγωγής μοριακού υδρογόνου. Σύμφωνα με αυτόν, η οξειδωτική προσθήκη του τριαιθυλοσιλανίου στο παλλάδιο(0) οδηγεί ταυτόχρονα στο σχηματισμό του συμπλόκου Et₃SiPdH, εξααιθυλοδισιλαζανίου ((Et₃Si)₂) και μοριακού υδρογόνου. Στη συνέχεια, η επίδραση της μεθανόλης στο σύμπλοκο έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό τριαιθυλομεθυλοσιλυλαιθέρα (Et₃SiOMe), μοριακού υδρογόνου και αναγέννηση του καταλύτη.⁵¹⁹



Σχήμα II.38 Μηχανισμός του καταλυτικού κύκλου της αντίδρασης *in situ* παραγωγής μοριακού υδρογόνου

Επίδραση κατάλληλα υποκατεστημένων ισοκυανικών φαινυλεστέρων στα αμινοπαράγωγα **95-99** οδήγησε στις *N,N'*-δισ υποκατεστημένες ουρίες **100-108** (Σχήμα II.39).



95: R₁=phenyl

96: R₁=3,4,5-trimethoxyphenyl

97: R₁=3-acetamidophenyl

98: R₁=4-acetamidophenyl

99: R₁=4-(ethoxycarbonyl)phenyl

100: R₁=phenyl
R₂=4-(methylthio)phenyl

101: R₁=phenyl
R₂=2,4-dichlorophenyl

102: R₁=3,4,5-trimethoxyphenyl
R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

103: R₁=3-acetamidophenyl
R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

104: R₁=3-acetamidophenyl
R₂=3-chloro-4-fluorophenyl

105: R₁=4-acetamidophenyl
R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

106: R₁=4-acetamidophenyl
R₂=3-chloro-4-fluorophenyl

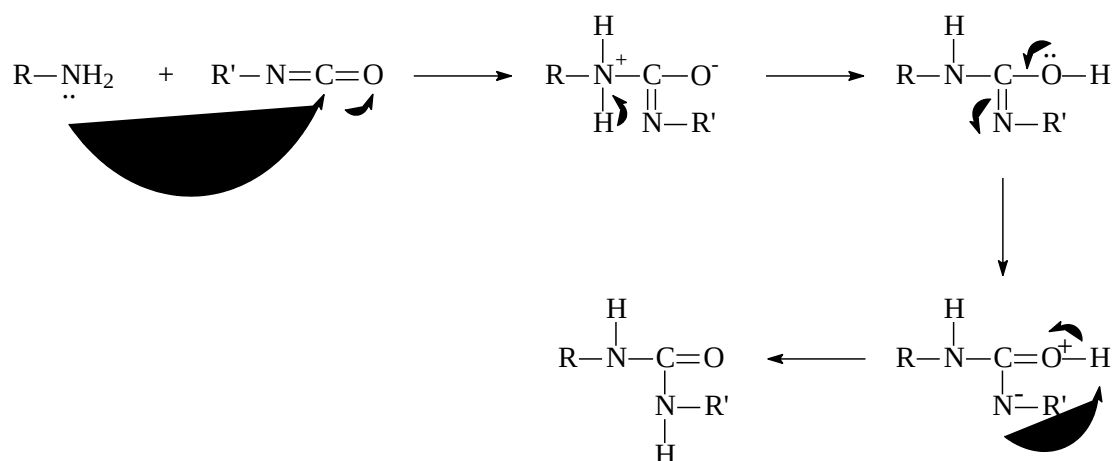
107: R₁=4-(ethoxycarbonyl)phenyl
R₂=3-(trifluoromethyl)phenyl

108: R₁=4-(ethoxycarbonyl)phenyl
R₂=3-chloro-4-fluorophenyl

a) substituted phenyl isocyanate, THF dry, Ar, 80 °C, 20 hrs

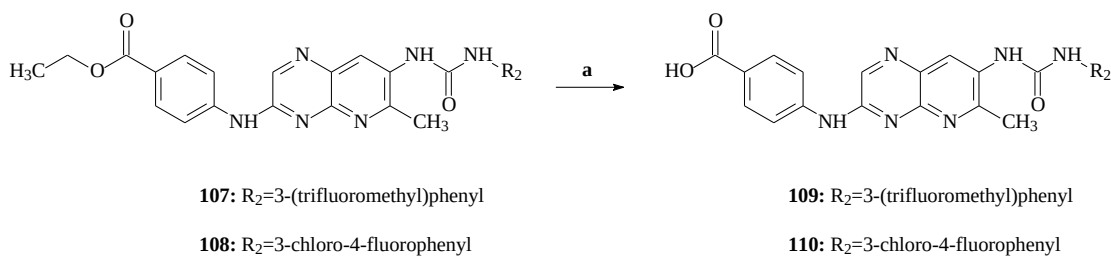
Σχήμα II.39

Στο Σχήμα II.40 φαίνεται ο γενικός μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού των παραγώγων ουρίας.



Σχήμα II.40 Γενικός μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού των παραγώγων ουρίας

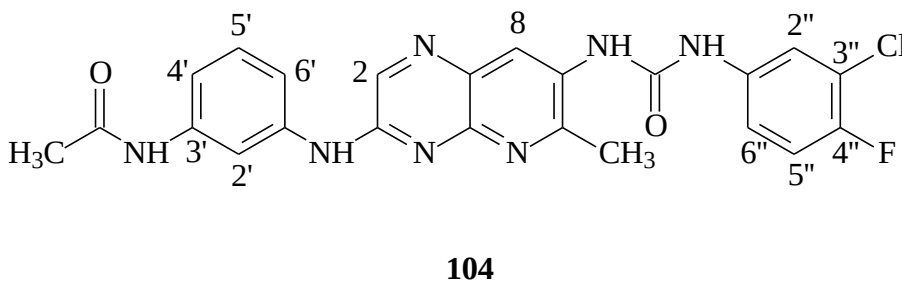
Αλκαλική υδρόλυση των εστέρων **107-108** οδήγησε στα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα **109-110** (Σχήμα II.41).⁵²⁰



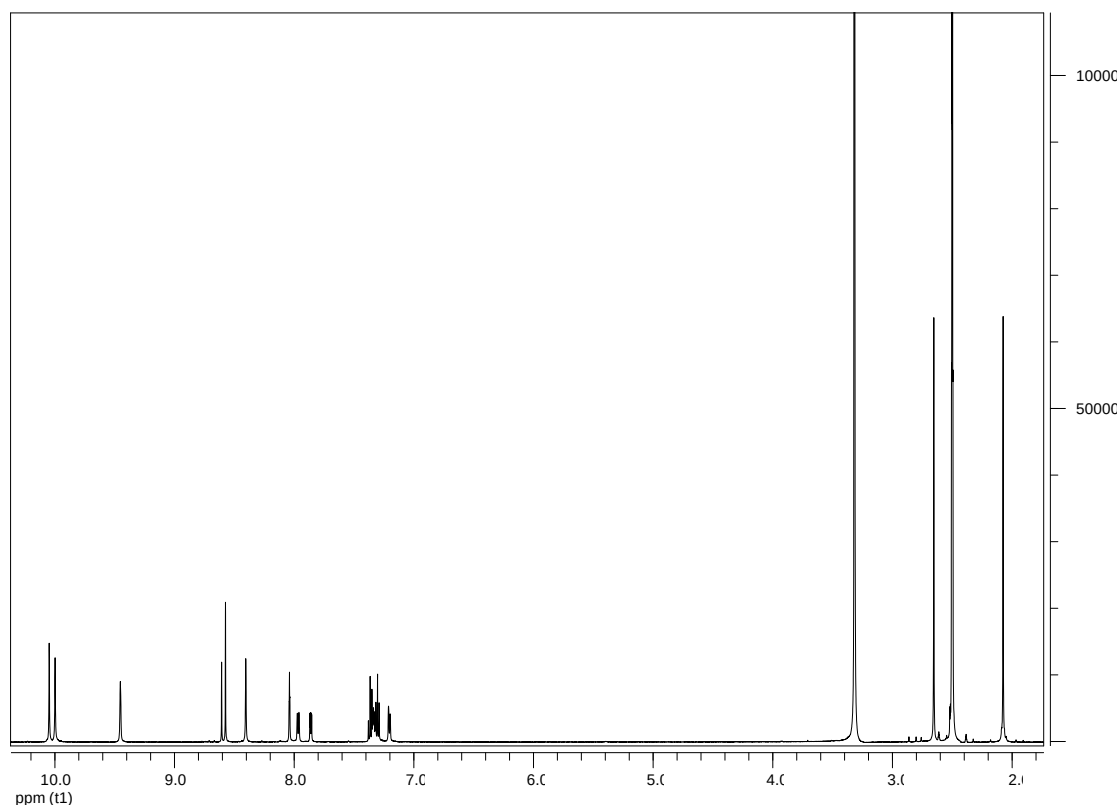
a) NaOH (aq.) 40%, EtOH, 80 °C, 2 hrs

Σχήμα II.41

Στην Εικόνα II.17 παρουσιάζεται το φάσμα ¹H-NMR του παραγώγου **104**.



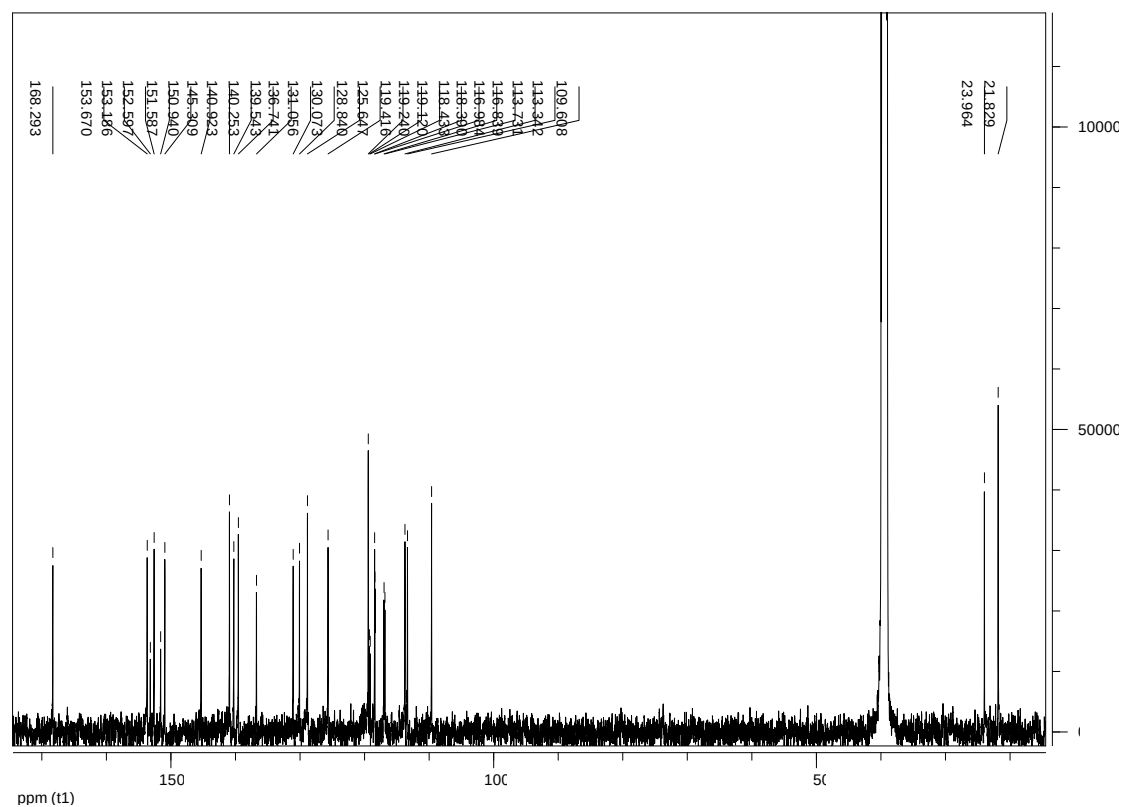
Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται οι απλές κορυφές των μεθυλίων του ακετυλίου και της πυριδίνης (2.07 και 2.65 ppm αντίστοιχα). Στην αρωματική περιοχή συντονίζονται τα H-4' και H-6' της ανιλινικής υποκατάστασης (7.20 και 7.97 ppm αντίστοιχα, διπλές κορυφές), το H-2' (8.04 ppm, τριπλή κορυφή με μικρή τιμή σταθεράς σύζευξης ($J=2.0$ Hz), λόγω της μ -σύζευξης με τα H-4' και H-6'), καθώς και το H-5', το οποίο συντονίζεται στην ίδια περιοχή με τα H-5'' και H-6'' της 3-χλωρο-4-φθοροφαινυλομάδας (7.28-7.39 ppm, πολλαπλή κορυφή). Επιπλέον, παρατηρείται το H-2'' (7.86 ppm, διπλή διπλών κορυφή, λόγω της μ -σύζευξης με το H-6'), το H-2 και το H-8 του ετεροκυκλικού συστήματος (8.57 και 8.61 ppm αντίστοιχα, απλές κορυφές). Τέλος, παρατηρούνται οι απλές κορυφές των -NH- που φέρουν οι υποκαταστάτες. Συγκεκριμένα, τα -NH- της ομάδας της ουρίας συντονίζονται στα 8.40 (-CONH-pyridine) και 9.45 ppm (-CONH-aryl), ενώ το ακεταμιδικό και το ανιλινικό -NH- στα 10.00 και 10.05 ppm αντίστοιχα.



Εικόνα II.17 Φάσμα ^1H -NMR του παραγώγου **104** σε $\text{DMSO}-d_6$

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα φάσματα ^{13}C -NMR των παραγώγων που φέρουν 3-χλωρο-4-φθοροφαινυλομάδα. Ενδεικτικά, στην Εικόνα II.18 παρουσιάζεται το φάσμα ^{13}C -NMR του παραγώγου **104**.

Η παρουσία του ατόμου του φθορίου προκαλεί τη σχάση των κορυφών των C-3'', C-4'', C-5'' και C-6''. Συγκεκριμένα, οι C-3'', C-5'' και C-6'' εμφανίζονται με απλές κορυφές με παραπλήσιες τιμές χημικών μετατοπίσεων (116.84, 116.98 ppm για τον C-5'', 118.39, 118.43 ppm για τον C-6'' και 119.12, 119.24 ppm για τον C-3''), με αποτέλεσμα να ομοιάζουν με διπλές κορυφές. Αντίθετα, ο C-4'' εμφανίζεται με απλές κορυφές με διαφορά τιμών χημικών μετατοπίσεων άνω του 1 ppm (151.59 και 153.19 ppm).



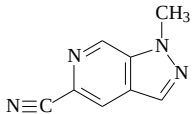
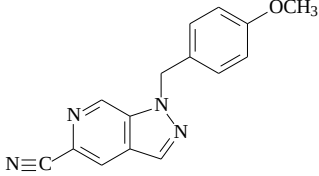
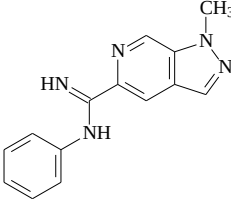
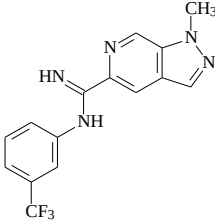
Εικόνα II.18 Φάσμα ^{13}C -NMR του παραγώγου **104** σε DMSO-d_6

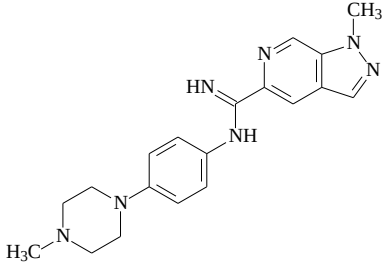
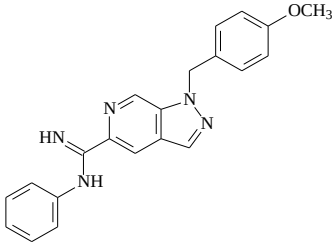
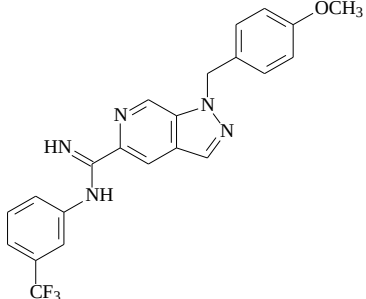
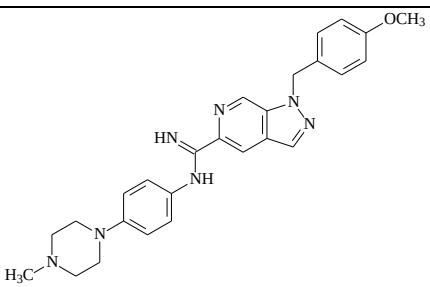
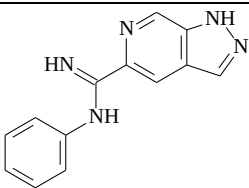
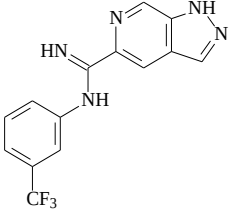
III. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

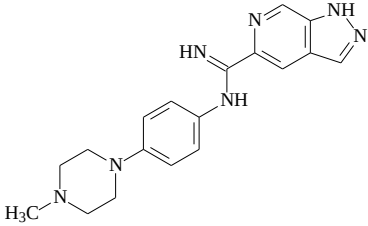
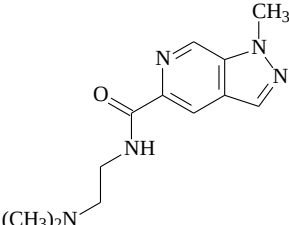
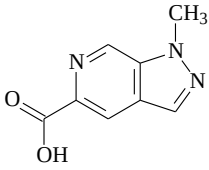
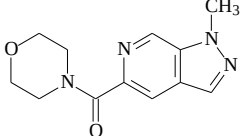
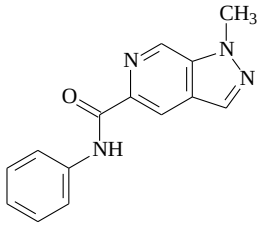
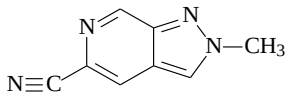
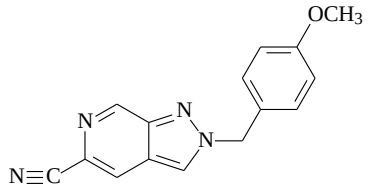
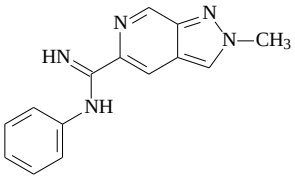
III.1 Πυραζολο[3,4-c]πυριδίνες

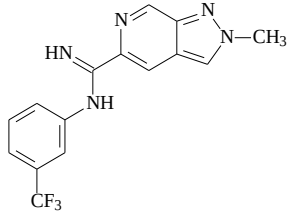
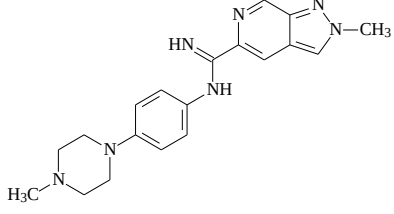
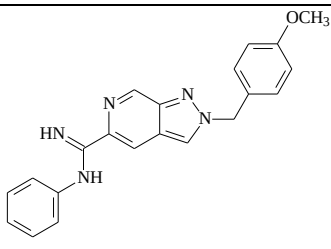
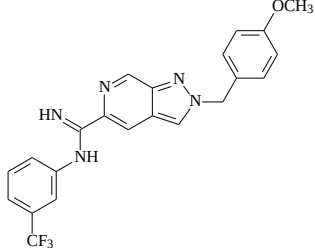
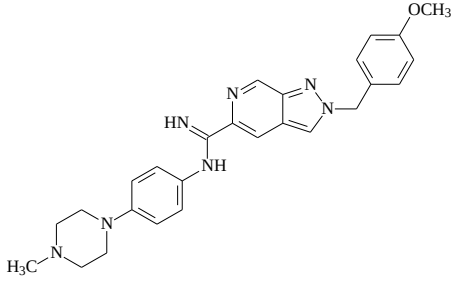
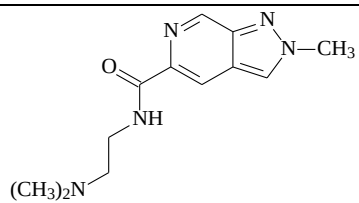
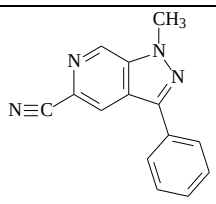
Η φαρμακολογική αξιολόγηση των παραγώγων της πυραζολοπυριδίνης που συντέθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιείται στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

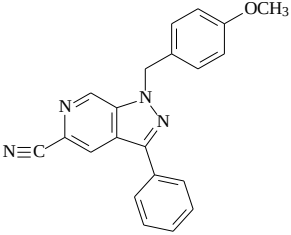
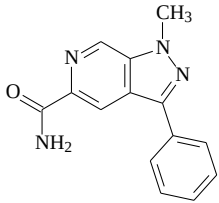
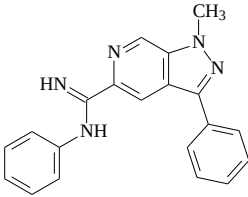
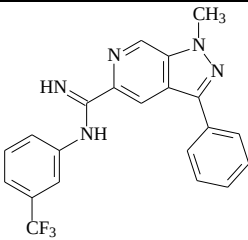
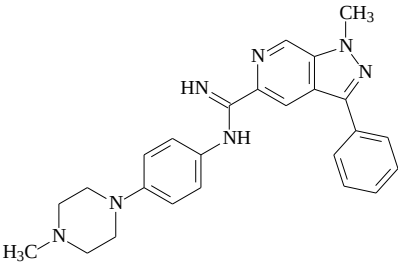
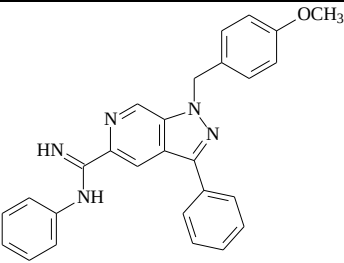
Η *in vitro* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης έχει ολοκληρωθεί για τις ακόλουθες καρκινικές σειρές: καρκίνος του μαστού MDA-MB-231, ινοβλαστικό σάρκωμα HT-1080 και καρκίνος του προστάτη PC-3. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα III.1, όπου παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ σε μΜ. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η Δοξορουβικίνη.

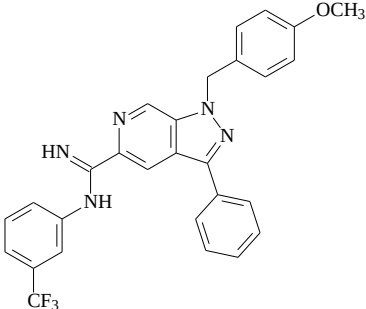
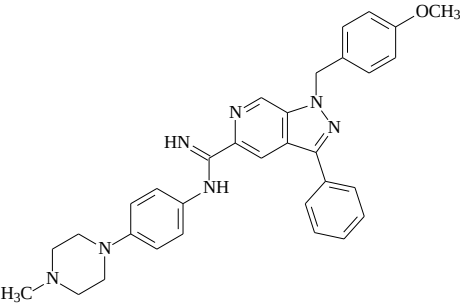
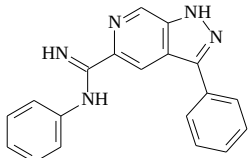
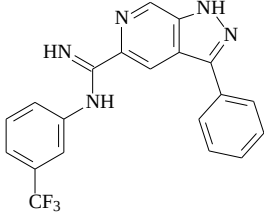
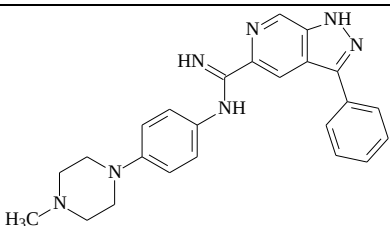
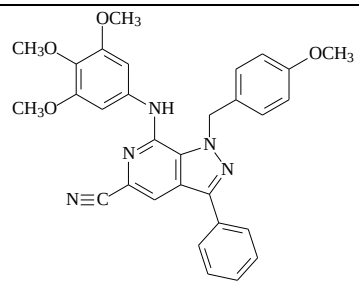
ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΡΙΟΥ	ΔΟΜΗ	MDA-MB-231	HT-1080	PC-3
15		>50	N.T.	N.T.
16		>50	N.T.	N.T.
17		>50	N.T.	N.T.
18		>50	32.9	>50

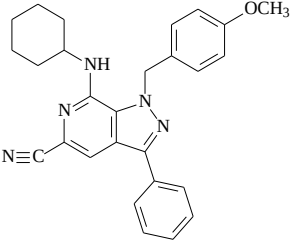
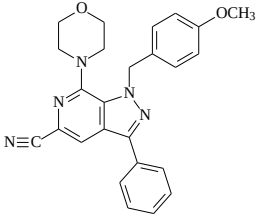
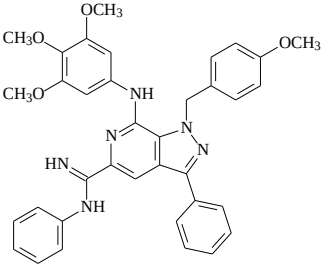
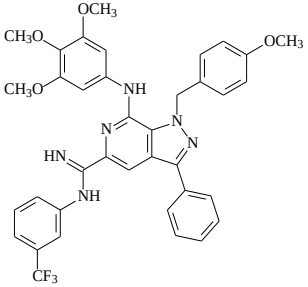
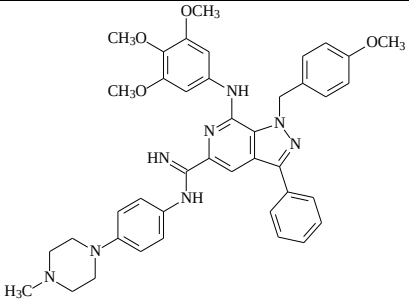
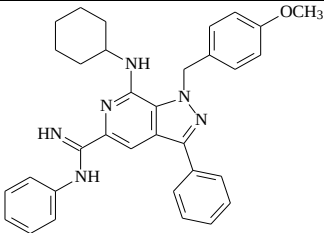
19		26.8	18.1	32.4
20		29.8	24.8	38.0
21		27.4	21.9	30.1
22		5.4	N.T.	N.T.
26		>50	N.T.	N.T.
27		>50	32.0	>50

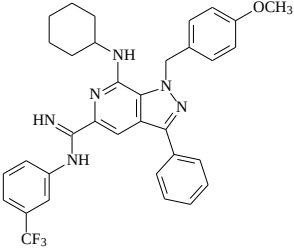
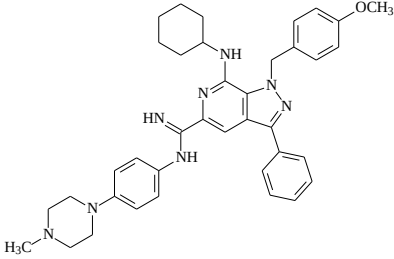
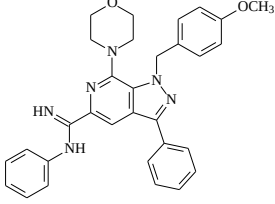
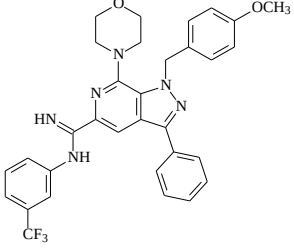
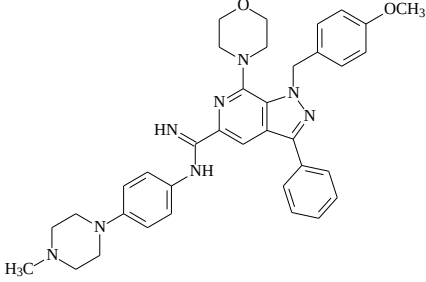
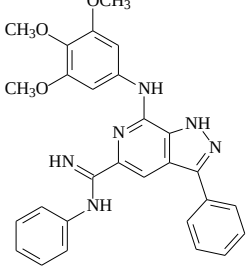
28		46.7	31.7	47.7
29		>50	>50	>50
30		>50	N.T.	N.T.
31		N.T.	>50	>50
32		>50	N.T.	N.T.
33		>50	N.T.	N.T.
34		>50	N.T.	N.T.
35		>50	N.T.	N.T.

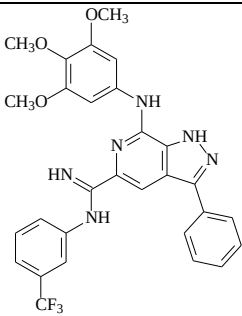
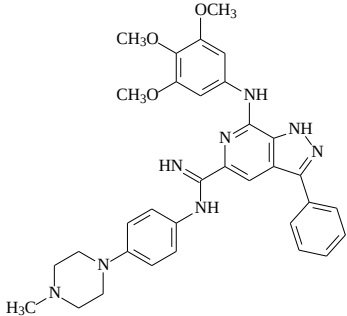
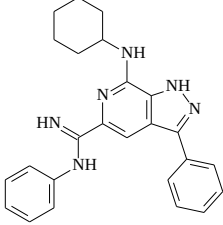
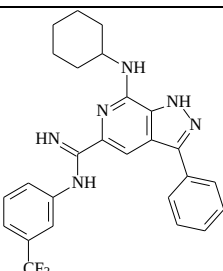
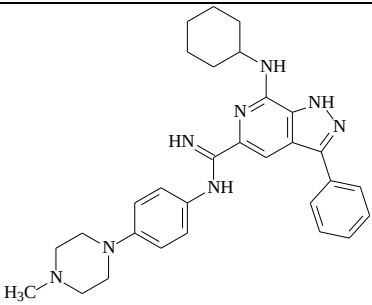
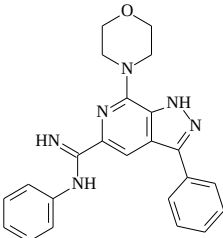
36		>50	N.T.	N.T.
37		10.9	12.0	19.6
38		1.52 ±0.01	1.13 ±0.34	2.04 ±0.91
39		9.9	4.9	6.1
40		7.3	4.4	13.3
41		>50	N.T.	N.T.
47		>50	37.4	>50

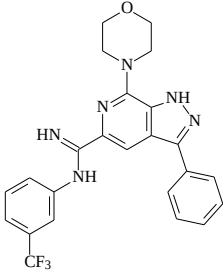
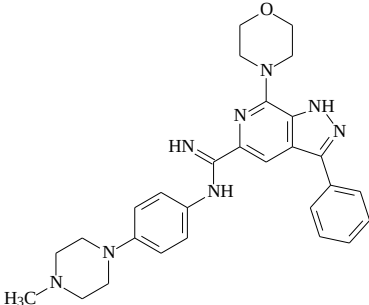
48		>50	N.T.	N.T.
49		>50	>50	>50
50		6.4	15.5	16.2
51		21.5	16.9	25.4
52		4.9	1.4	5.9
53		4.8	4.6	7.1

54		>50	44.7	>50
55		1.76 ±1.01	1.09 ±0.38	3.99 ±1.13
56		7.6	24.8	24.5
57		20.7	24.1	19.6
58		13.6	4.6	15.2
64		>50	N.T.	N.T.

65		>50	N.T.	N.T.
66		>50	N.T.	N.T.
67		39.2	7.1	>50
68		>50	N.T.	N.T.
69		0.89 ±0.00	1.20 ±0.64	1.24 ±0.35
70		3.4	3.4	1.1

71		>50	N.T.	N.T.
72		1.29 ±0.37	0.64 ±0.07	3.54 ±0.70
73		19.3	4.2	18.9
74		>50	N.T.	N.T.
75		1.13 ±0.18	0.70 ±0.02	4.58 ±0.43
76		3.5	2.7	4.8

77		6.4	4.2	14.1
78		4.5	3.0	3.8
79		1.71 ±1.09	0.85 ±0.25	1.73 ±0.94
80		23.6	16.7	21.0
81		1.50 ±0.27	0.65 ±0.08	4.63 ±0.70
82		7.2	3.6	8.3

83		18.1	4.9	22.5
84		4.6	3.8	8.7
Doxorubicin		0.19 ±0.23	0.008 ±0.003	0.38 ±0.20

N.T.: δεν έχει ελεγχθεί (Non Tested)

Πίνακας III.1

Από τη μελέτη του Πίνακα III.1 εξάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα, σχετικά με τη δραστηριότητα των παραγώγων στις καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν:

Τα 5-καρβονιτρίλια είναι στη μεγάλη τους πλειοψηφία αδρανή, τόσο τα μη υποκατεστημένα στη θέση 3 (**15-16**, **33-34**), όσο και τα 3-φαινυλο ανάλογά τους (**47-48**) ή τα 3-φαινυλο-7-υποκατεστημένα παράγωγα (**64-66**). Μόνο το παράγωγο **47** εμφανίζει μία μικρή κυτταροτοξική δράση (37.4 μ M) έναντι του ινοβλαστικού σαρκόματος.

Επίσης, αδρανή αποδείχθηκαν και όσα καρβοξαμίδια παρασκευάστηκαν, υποκατεστημένα ή μη στη θέση 3 (**29**, **31-32**, **41**, **49**).

Σε ό,τι όμως αφορά στα ουσιαστικά μόρια-στόχους της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, τα αποτελέσματα του βιολογικού ελέγχου ήταν αρκετά ενθαρρυντικά και όπως θα αναπτυχθεί στη συνέχεια, είναι δυνατό να εξαχθούν σημαντικές σχέσεις δομής-δράσης μεταξύ τους.

Από τα παράγωγα που δεν φέρουν υποκαταστάτη στη θέση 3, τόσο τα N^1 -μεθυλοπαράγωγα **17-19**, όσο και τα N^2 -ισομερή τους **35-37** εμφανίζουν μηδενική (**17**, **35-36**) έως ασθενή (**18-19**, **37**) κυτταροτοξική δράση. Τα δραστικότερα μεταξύ αυτών είναι το ανάλογα υποκατεστημένο ζεύγος **19** και **37**, όπου αμφότερα φέρουν την 5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)βενζολο-1-καρβοξυμιδαμιδο]-υποκατάσταση (στο

εξής για συντομία ΠΒΑ υποκατάσταση). Μάλιστα, η δράση του 2-μεθυλοπαραγώγου **37** είναι σημαντικά υψηλότερη (10.9-19.6 μM).

Τα αντίστοιχα N^1 -μεθοξυβενζυλοπαραγώγα **20-22** και κατά κύριο λόγο τα N^2 -ισομερή τους **38-40**, διαθέτουν όλα από μέτρια (21-38 μM) έως ισχυρή (1-13 μM) κυτταροτοξική δράση, έναντι όλων των καρκινικών σειρών που μελετήθηκαν. Στην περίπτωση αυτή το πλέον ενδιαφέρον παράγωγο ήταν το N^2 -υποκατεστημένο ανάλογο **38**, που είναι δραστικό σε μικρομοριακές συγκεντρώσεις (1-2 μM).

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα παράγωγα **26-28**, τα οποία προέκυψαν από την αποβενζυλίωση των **20-22**, επομένως δεν είναι υποκατεστημένα επί των πυραζολικών αζώτων, εμφανίζουν καθόλου έως πολύ ασθενή δράση (32-47 μM).

Στη συνέχεια θα σχολιασθούν τα 3-φαινυλοϋποκατεστημένα παράγωγα.

Τα N^1 -μεθυλοπαραγώγα **50-52** παρουσιάζουν μέτρια (15-25 μM) έως καλή δράση (1.4-6.4 μM), ενώ δύο από τα αντίστοιχα N^1 -μεθοξυβενζυλο ανάλογα **53-55** έχουν καλή έως αρκετά ισχυρή δράση (1.1-7.1 μM). Αδρανές στην τελευταία κατηγορία είναι το παράγωγο **54**, ενώ και το αντίστοιχο N^1 -μεθυλοπαραγώγο **51** είναι το λιγότερο δραστικό της σειράς. Τη σημαντικότερη κυτταροτοξικότητα εμφανίζουν πάλι τα 5-ΠΒΑ-υποκατεστημένα παράγωγα, τόσο το N^1 -μεθυλοπαραγώγο **52** (1.4-5.9 μM) και κυρίως το N^1 -μεθοξυβενζυλο ανάλογο **55** (1.1-4 μM). Ομοίως, στην περίπτωση αυτή η απομάκρυνση του πυραζολικού υποκαταστάτη (μεθύλιο ή 4-μεθοξυβενζύλιο) έχει αρνητική επίπτωση επί της δράσης των μορίων **56-58** (5-25 μM), όχι όμως τόσο εκτενή όσο των παραγώγων της προηγούμενης κατηγορίας που στερούνται του 3-φαινυλίου.

Σχετικά με τις καρβοξαμιδίνες **67-75** που φέρουν N^1 -μεθοξυβενζυλομάδα και επιπλέον 7-υποκαταστάτη, ο οποίος είναι 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνη, κυκλοεξυλαμίνη ή μορφολίνη, παρατηρούνται τα παρακάτω:

Στην περίπτωση που η ομάδα της καρβοξαμιδίνης φέρει μη υποκατεστημένο φαινύλιο (**67, 70, 73**), τα ανάλογα έχουν μέτρια έως ασθενή δράση, με την εξαίρεση του 7-κυκλοεξυλαμινοπαραγώγου **70**, που εμφανίζει σχετικά ισχυρή κυτταροτοξικότητα (1.1-3.4 μM). Όλα τα μόρια στα οποία η καρβοξαμιδίνη φέρει την τριφθορομεθυλομάδα (**68, 71, 74**), είναι αδρανή και αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με όσα αναφέρθηκαν στις προηγούμενες κατηγορίες. Αντίθετα, στα μόρια στα οποία η καρβοξαμιδίνη φέρει την ΠΒΑ ομάδα (**69, 72, 75**), η δράση αυξάνεται κατακόρυφα σε όλες τις καρκινικές σειρές (0.64-4.68 μM). Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η δράση των 7-αλκυλοϋποκατεστημένων παραγώγων **72** και **75** έναντι του ινοβλαστικού σαρκώματος, σε επίπεδο νανομοριακής συγκέντρωσης.

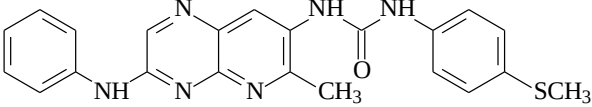
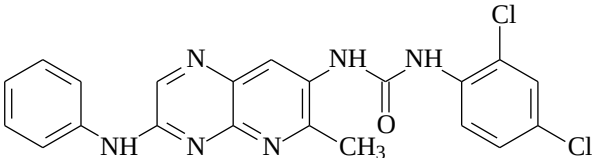
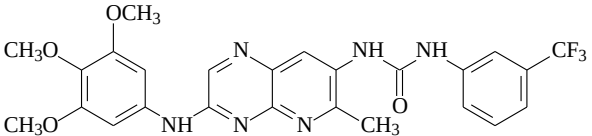
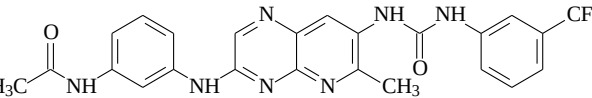
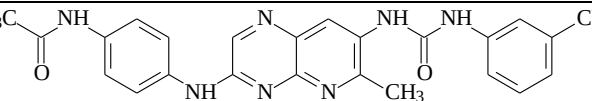
Τα μόρια **76-84**, στα οποία έχει απομακρυνθεί η N^1 -υποκατάσταση, εμφανίζουν μέτρια έως ισχυρή δράση και αυτό βρίσκεται σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις που εξήχθησαν για τα παράγωγα όπου απουσιάζει ο 3- ή ο 7-υποκαταστάτης (**26-28** ή **56-58** αντίστοιχα). Στην κατηγορία αυτή, τα παράγωγα στα οποία η καρβοξαμιδίνη φέρει την τριφθορομεθυλομάδα (**77, 80, 83**), εμφανίζονται μετρίως δραστικά, είναι από τα λιγότερο ενδιαφέροντα ανάλογα, όχι όμως αδρανή, όπως παρουσιάζονταν στις

προηγούμενες κατηγορίες. Τα πλέον δραστικά μόρια είναι τα 7-κυκλοεξυλαμινοϋποκατεστημένα παράγωγα **79** και **81**, τα οποία εμφανίζουν πολύ ισχυρή δράση έναντι του ινοβλαστικού σαρκόματος, σε αντιστοιχία με το ανάλογο μόριο **72**.

III.2 Πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνες

Η φαρμακολογική αξιολόγηση των παραγώγων της πυριδοπυραζίνης που συντέθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματοποιείται στο ερευνητικό κέντρο «City of Hope» (City of Hope Comprehensive Cancer Center, Molecular Medicine, Beckman Research Institute, Duarte, CA, USA).

Η *in vitro* μελέτη της αντικαρκινικής δράσης έχει ολοκληρωθεί για τις ακόλουθες καρκινικές σειρές: μεταστατικό μελάνωμα A2058 και καρκίνος του προστάτη DU145. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα III.2, όπου παρουσιάζεται η % επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μετά την επίδραση συγκέντρωσης διαλύματος 10 μ M των παραγώγων.

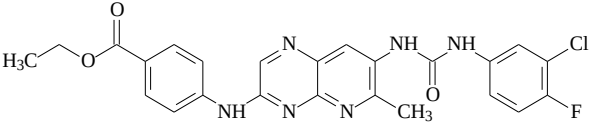
ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΡΙΟΥ	ΔΟΜΗ	A2058	DU145
100		7	6
101		60	50
102		116	81
103		119	62
105		109	55

107		37	48
109		113	77
104		118	64
106		65	76
108		35	40
110		98	82

Πίνακας III.2

Στα πλέον δραστικά μόρια έγινε μελέτη της τιμής IC₅₀. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα III.3, όπου παρουσιάζονται οι τιμές IC₅₀ σε μΜ.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΟΡΙΟΥ	ΔΟΜΗ	A2058	DU145
100		1.3	2.4
107		6.1	12.8

108		7.1	9.9
-----	--	-----	-----

Πίνακας III.3

Τα συγκεκριμένα παράγωγα πυριδοπυραζίνης συντέθηκαν για να διερευνηθούν οι σχέσεις δομής-δράσης αναλόγων μορίων, καρβοξαμιδίων ή παραγώγων ουρίας, που έχουν ήδη παραχθεί στο Εργαστήριό μας και φέρουν μη υποκατεστημένη 3-φαινυλαμινομάδα επί του συμπυκνωμένου συστήματος. Αρκετά από τα μόρια αυτά παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξική δράση της τάξεως 1-3 μM στις καρκινικές σειρές που προαναφέρθηκαν. Επομένως, παρασκευάστηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, οι επίσης μη υποκατεστημένες επί του ανιλινικού δακτυλίου ουρίες **100-101**, καθώς και δύο κατηγορίες παραγώγων με ποικιλία ομάδων επί του ανιλινικού υποκαταστάτη, οι οποίες έφεραν επίσης επί του ετέρου ατόμου αζώτου της ουρίας 3-τριφθορομεθυλοφαινυλομάδα (**102-103**, **105**, **107**, **109**), καθώς και 3-χλωρο-4-φθοροφαινυλομάδα (**104**, **106**, **108**, **110**). Από τα μέχρι στιγμής δεδομένα φαίνεται ότι η υποκατάσταση επί του ανιλινικού δακτυλίου δεν ευνοεί την κυτταροτοξική δράση των μορίων. Το γεγονός αυτό καταδεικνύεται και από το ότι το πλέον δραστικό παράγωγο από τα νέα μόρια που παρασκευάστηκαν, είναι το **100**, το οποίο διαθέτει σημαντική δράση και επί των δύο καρκινικών σειρών (1.3 και 2.4 μM). Το ανάλογο παράγωγο **101** εμφανίζει μέτρια μόνο δράση.

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων του Πίνακα III.2 φαίνεται ότι σε γενικές γραμμές τα νέα μόρια εμφανίζονται δραστικότερα έναντι της προστατικής καρκινικής σειράς DU145. Τα πλέον δραστικά μόρια, εκτός του **100**, είναι οι αιθυλεστέρες **107-108** (6.1-12.8 μM). Στην περίπτωση αυτή δηλαδή, το είδος και η θέση των υποκαταστατών της φαινυλομάδας του ενός ατόμου αζώτου της ουρίας, δεν φαίνεται να παίζει τόσο σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της δράσης. Επιπλέον, σημαντικό είναι το ότι η σαπωνοποίηση των μορίων προς τα καρβοξυλικά οξέα **109-110** αντίστοιχα, οδήγησε σε σημαντική απώλεια της δράσης, σε ποσοστό 50-60%. Τα παράγωγα που φέρουν μ - ή π -ακεταμιδομάδα επί του ανιλινικού δακτυλίου (**103-106**), δεν παρουσιάζουν αξιόλογη δράση.

IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

IV.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}. Για τη λήψη φασμάτων ^1H -NMR χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος Bruker Avance 400 στα 400 MHz, ενώ για τη λήψη φασμάτων ^{13}C -NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων HMBC-NMR, HSQC-NMR και NOESY-NMR χρησιμοποιήθηκαν φασματογράφοι Bruker AC200 στα 50 MHz και Bruker Avance 600 στα 600 MHz αντίστοιχα. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3), δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD), δευτεριωμένη ακετόνη ($\text{Acetone-}d_6$) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO-}d_6$). Για τη λήψη φασμάτων Μάζας (MS) χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο LTQ Orbitrap Discovery με πηγή ιονισμού Ionmax. Για τη λήψη φασμάτων Υπερύθρου (IR) χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Spectrum RXI). Για τις αντιδράσεις που έλαβαν χώρα υπό την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας μικροκυμάτων Milestone. Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα.

IV.2 Πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνες

IV.2A Μη υποκατεστημένα επί των θέσεων 3 και 7 παράγωγα (καρβοξαμιδίνες 17-22, 26-28, 35-40 και καρβοξαμίδια 29, 31-32, 41)

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (3)³³⁶

Η 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνη (1) (15 g, 140 mmol) διαλύεται σε πυκνό θειικό οξύ (72 ml) υπό ψύξη. Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην υπό ψύξη μίγμα θειικού-νιτρικού οξέος (10.50 ml από το κάθε οξύ) και το διάλυμα θερμαίνεται στους 60 °C για 20 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, απόχυση του μίγματος σε πάγο και εξουδετέρωση με διάλυμα αμμωνίας 25% μέχρι pH 7-8. Κατόπιν, το μίγμα διηθείται υπό κενό για απαλλαγή από τα αμμωνιακά άλατα των οξέων που σχηματίστηκαν κατά την εξουδετέρωση και το μίγμα των δύο ισομερών κατεργάζεται με θερμό διχλωρομεθάνιο, το οποίο διαλύει το 3-νιτροπαράγωγο 2, ενώ παραμένει αδιάλυτο το επιθυμητό 5-νιτροπαράγωγο 3. Με διήθηση υπό κενό

παραλαμβάνονται το ισομερές **3** (52% και 7% του 3,5-δινιτροπαραγώγου **4**) και το παράγωγο **2** (25%).

4-Μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (**2**): Σ.τ.: 134-136 °C (EtOAc) (Βιβλ.³³⁶ 134-136 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.52 (s, 3H, -CH₃), 6.27 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 6.58 (d, 1H, H-5, *J*=4.9 Hz), 8.07 (d, 1H, H-6, *J*=4.9 Hz).

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (**3**): Σ.τ.: 220 °C (EtOAc) (Βιβλ.³³⁶ 220 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.58 (s, 3H, -CH₃), 5.10 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 6.29 (s, 1H, H-3), 8.90 (s, 1H, H-6).

3,5-Δινιτρο-4-μεθυλοπυριδιν-2-αμίνη (**4**): Σ.τ.: 170-171 °C (EtOAc) (Βιβλ.⁵²¹ 170-172 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.65 (s, 3H, -CH₃), 6.21 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 8.90 (s, 1H, H-6).

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (5**)**^{337,522}

Σε διάλυμα της νιτροπυριδίνης **3** (5 g, 32.68 mmol) εντός θεικού οξέος (96%, 8.60 ml) και νερού (86 ml) προστίθεται ταχέως στους 10 °C κορεσμένο διάλυμα νιτρώδους νατρίου (5 g, 72.46 mmol σε 7 ml νερό). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά μέχρι το σημείο βρασμού, ώστε να απομακρυνθούν οι νιτρώδεις ατμοί. Στη συνέχεια, το μίγμα, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο, οπότε καθιζάνει το στερεό προϊόν **5**, το οποίο διηθείται, εκπλένεται και ξηραίνεται υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου (4.71 g, 94%). Σ.τ.: 189-190 °C (EtOH) (Βιβλ.³³⁷ 188-190 °C).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.42 (s, 3H, -CH₃), 6.31 (s, 1H, H-3), 8.56 (s, 1H, H-6), 12.50 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

2-Χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (6**)**^{523,524}

Διάλυμα της πυριδινόνης **5** (7.35 g, 47.72 mmol) εντός οξυχλωριούχου φωσφόρου (23.50 ml) θερμαίνεται στους 110 °C για 3 ώρες. Ακολουθεί συμπίκνωση υπό κενό μέχρι πλήρους εκδίωξης του οξυχλωριούχου φωσφόρου, προσθήκη μικρής

ποσότητας πάγου και διήθηση υπό κενό του στερεού προϊόντος **6** (8.13 g, 99%). Σ.τ.: 40-41 °C (petroleum ether) (Βιβλ.⁵²³ 40-44 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.68 (s, 3H, -CH₃), 7.38 (s, 1H, H-3), 8.98 (s, 1H, H-6).

6-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-αμίνη (7)^{525,526}

Το χλωροπαράγωγο **6** (5.70 g, 33.04 mmol) διαλύεται υπό ψύξη εντός πυκνού υδροχλωρικού οξέος (36%, 85 ml), κατόπιν προστίθεται σε δόσεις διχλωριούχος κασσίτερος (25.60 g, 135.02 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της φιάλης, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο και ακολουθεί εξουδετέρωση υπό ψύξη με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 40% μέχρι pH 11. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, έκπλυση με νερό, ξήρανση (Na₂SO₄) και συμπύκνωση της οργανικής φάσης (4.61 g, 98%). Σ.τ.: 69-71 °C (Et₂O) (Βιβλ.⁵²⁵ 69-71 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.13 (s, 3H, -CH₃), 3.85 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 6.96 (s, 1H, H-5), 7.74 (s, 1H, H-2).

N-(6-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-yl)ακεταμίδιο (8)³³⁹

Σε διάλυμα της αμίνης **7** (4.60 g, 32.28 mmol) εντός διχλωρομεθανίου (50 ml) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (4.60 ml) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται και στο υπόλειμμα προστίθεται αιθέρας και σχηματίζεται το στερεό προϊόν **8**, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό (5.70 g, 96%). Σ.τ.: 155-156 °C (Βιβλ.³³⁹ 155-156 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.20 (s, 3H, -COCH₃), 2.24 (s, 3H, -CH₃), 7.17 (s, 1H, H-5), 7.37 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 8.54 (s, 1H, H-2).

1-Ακετυλο-5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (9)³³⁹

Σε διάλυμα του ακεταμιδίου **8** (5.70 g, 30.89 mmol) εντός άνυδρου τολουολίου (120 ml) προστίθενται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, οξικό κάλιο (4.25 g) και οξικός ανυδρίτης (11.70 ml) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C. Στη θερμοκρασία αυτή προστίθεται νιτρώδες ισοαμύλιο (9.50 ml, 73.86 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται για 12 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, διήθηση υπό κενό (απομάκρυνση οξικού καλίου) και συμπύκνωση του διηθήματος. Το υπόλειμμα χρησιμοποιείται απευθείας, χωρίς περαιτέρω κατεργασία, για την επόμενη αντίδραση. Σ.τ.: 132-133 °C (cyclohexane) (Βιβλ.³³⁹ 133 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 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 (ppm) 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 (10)^{339,527}

Σε διάλυμα του παραγώγου **9** (5.90 g, 30.18 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (200 ml) διαβιβάζεται υπό ψύξη αέρια αμμωνία για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου και αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση του κορεσμένου μίγματος και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **10** (4.50 g, 97%). Σ.τ.: 185 °C (toluene) (Βιβλ.³³⁹ 184-185 °C).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.86 (s, 1H, H-4), 8.20 (s, 1H, H-3), 8.88 (s, 1H, H-7), 13.83 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 114.2 (C-4), 129.5 (C-3a), 132.8 (C-3), 134.7 (C-7), 136.5 (C-7a), 139.3 (C-5).

5-Χλωρο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (11) και 5-Χλωρο-2-μεθυλο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (12)

Σε διάλυμα του παραγώγου **10** (800 mg, 5.21 mmol) εντός ακετόνης (55 ml), υπό ψύξη και υπό αργό, προστίθεται υδροξείδιο του καλίου (440 mg) και το μίγμα αναδεύεται υπό ψύξη για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται μεθυλοϊωδίδιο (0.35 ml, 5.21 mmol) στάγδην και υπό ψύξη και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Το μίγμα συμπυκνώνεται, το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 3-7 και λαμβάνονται τα παράγωγα **11** (440 mg, 50%) και **12** (410 mg, 47%).

5-Χλωρο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**11**): Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 103-105 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.15 (s, 3H, -CH₃), 7.59 (s, 1H, H-4), 7.94 (s, 1H, H-3), 8.69 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.41 (-CH₃), 114.27 (C-4), 130.63 (C-3a), 131.68 (C-3), 132.79 (C-7), 136.05 (C-7a), 140.80 (C-5).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $C_7H_7N_3Cl^+$ $[M+H]^+$: 168.0323

Ευρεθέν: 168.0337

5-Χλωρο-2-μεθυλο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**12**): Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 142-144 °C (CH_2Cl_2 - Et_2O).

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.26 (s, 3H, $-CH_3$), 7.50 (s, 1H, H-4), 7.90 (s, 1H, H-3), 8.99 (s, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 41.27 ($-CH_3$), 112.80 (C-4), 123.17 (C-3), 126.75 (C-3a), 140.35 (C-5), 143.60 (C-7), 144.73 (C-7a).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $C_7H_7N_3Cl^+$ $[M+H]^+$: 168.0323

Ευρεθέν: $[M+Na]^+$: 190.0159

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (13**) και 5-Χλωρο-2-(4-μεθοξυβενζυλο)-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**14**)³⁵⁴**

Σε διάλυμα του παραγώγου **10** (1.50 g, 9.77 mmol) εντός άνυδρου *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (20 ml), υπό ψύξη και υπό αργό, προστίθεται υδρίδιο του νατρίου (60% εναιώρημα σε παραφινέλαιο) (587 mg, 14.66 mmol) και το μίγμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται 4-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο (2 ml, 14.66 mmol) στάγδην και υπό ψύξη και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Ακολούθως, προστίθεται αιθανόλη (1 ml) (καταστροφή περίσσειας υδριδίου του νατρίου) και το μίγμα συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na_2SO_4) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1 έως 6-4 και λαμβάνονται τα παράγωγα **13** (1.30 g, 49%) και **14** (910 mg, 35%).

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**13**): Σ.τ.: 117-119 °C ($EtOAc$) (Βιβλ.³⁵⁴ 117-119 °C).

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 3.79 (s, 3H, $-OCH_3$), 5.61 (s, 2H, $-CH_2-$), 6.87 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.5$ Hz), 7.22 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.5$ Hz), 7.64 (s, 1H, H-4), 8.03 (s, 1H, H-3), 8.62 (s, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 53.7, 55.3, 114.4, 127.4, 129.0, 131.1, 132.0, 133.2, 135.4, 140.8, 159.7.

5-Χλωρο-2-(4-μεθοξυβενζυλο)-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**14**): Σ.τ.: 92-94 °C (EtOAc) (Βιβλ.³⁵⁴ 92-94 °C).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.81 (s, 3H, -OCH₃), 5.58 (s, 2H, -CH₂-), 6.91 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.5 Hz), 7.30 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.5 Hz), 7.51 (s, 1H, H-4), 7.88 (s, 1H, H-3), 9.07 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 55.35, 57.99, 112.79, 114.56, 121.96, 126.42, 126.51, 129.96, 140.41, 143.94, 144.58, 160.12.

1-Μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (**15**)

Σε διάλυμα του παραγώγου **11** (440 mg, 2.61 mmol) εντός άνυδρου *N,N*-διμεθυλακεταμιδίου (3 ml) προστίθενται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, κυανιούχος ψευδαργυρος (183 mg, 1.54 mmol) και σκόνη ψευδαργύρου (19 mg, 2.91 mmol). Στη συνέχεια, προστίθενται τρις(διβενζυλιδενάκετονο)διπαλλάδιο(0) (48 mg, 0.02 mmol) και 1,1'-δις(διφαινυλοφωσφίνο)φερροκένιο (58 mg, 0.11 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 180 °C για 2 ώρες. Ακολούθως, το μίγμα, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται εκ νέου με νερό και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (brine), ξηραίνεται (Na₂SO₄), συμπυκνώνεται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **15** (280 mg, 68%). Υποκίτρινο στερεό. Σ.τ.: 168-169 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.26 (s, 3H, -CH₃), 8.12 (s, 1H, H-4), 8.17 (s, 1H, H-3), 9.01 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.55 (-CH₃), 118.33 (-CN), 122.17 (C-4), 122.61 (C-3a), 126.89 (C-5), 133.45 (C-3), 135.25 (C-7), 136.64 (C-7a).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₈H₇N₄⁺ [M+H]⁺: 159.0665

Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 181.0499

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (**16**)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **13** σε απόδοση 60% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1 έως 9-3. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 137-139 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.78 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.66 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.87 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.4$ Hz), 7.23 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.4$ Hz), 8.10 (s, 1H, H-4), 8.19 (s, 1H, H-3), 8.87 (s, 1H, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 54.14 ($-\text{CH}_2-$), 55.43 ($-\text{OCH}_3$), 114.64 (C-3', C-5'), 118.34 ($-\text{CN}$), 122.29 (C-4), 122.94 (C-3a), 127.00 (C-1'), 127.57 (C-5), 129.24 (C-2', C-6'), 133.75 (C-3), 135.69 (C-7), 136.20 (C-7a), 160.00 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ON}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 265.1084

Ευρεθέν: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 287.0900

1-Μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (17)

• Μέθοδος Α

Σε διάλυμα του παραγώγου **15** (50 mg, 0.32 mmol) εντός νιτροβενζολίου (1 ml), υπό ψύξη και υπό αργό, προστίθεται χλωριούχο αργίλιο (42 mg, 0.32 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται ανιλίνη (0.03 ml, 0.32 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 160 °C για 1 ώρα. Ακολούθως, το μίγμα, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο, φέρεται σε pH 1 με προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 9% και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (απομάκρυνση νιτροβενζολίου). Η οργανική φάση απορρίπτεται. Κατόπιν, η υδατική φάση φέρεται σε pH 10 με προσθήκη ανθρακικού νατρίου και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na_2SO_4) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1 και λαμβάνεται το παράγωγο **17** (10 mg, 13%).

• Μέθοδος Β

Σε διάλυμα του παραγώγου **15** (100 mg, 0.64 mmol) εντός 1,2-διχλωροαιθανίου (8 ml), υπό ψύξη και υπό αργό, προστίθεται χλωριούχο αργίλιο (84 mg, 0.64 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρεται σε σωληνάκι αυτοκλείστου (sealed tube), προστίθεται ανιλίνη (0.12 ml, 1.26 mmol) και θερμαίνεται στους 115 °C για 1 ώρα, δεχόμενο την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (300 Watt) στη συχνότητα των μικροκυμάτων. Ακολούθως, το μίγμα, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου, αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά και στη συνέχεια εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο και μετά με οξικό αιθυλεστέρα. Οι συνδυασμένες οργανικές φάσεις, αφού ξηρανθούν (Na_2SO_4) και συμπυκνωθούν, καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας

ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1 και λαμβάνεται το παράγωγο **17** (90 mg, 55%).

• Μέθοδος Γ

Σε διάλυμα ανιλίνης (0.60 ml, 6.30 mmol) εντός άνυδρου διμεθυλοσουλφοξειδίου (5 ml), υπό ψύξη και υπό αργό, προστίθεται υδρίδιο του νατρίου (60% εναιώρημα σε παραφινέλαιο) (165 mg, 4.20 mmol) και το μίγμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται το παράγωγο **15** (60 mg, 0.39 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ακολούθως, προστίθεται αιθανόλη (3 ml) και το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση πλένεται εκ νέου με νερό και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (brine) και διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 4% (απομάκρυνση περίσσειας ανιλίνης), ξηραίνεται (Na_2SO_4), συμπυκνώνεται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1 και λαμβάνεται το παράγωγο **17** (90 mg, 96%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 133-135 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 4.26 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.12-7.22 (m, 3H, H-2', H-6', H-4'), 7.45 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.6$ Hz), 8.27 (s, 1H, H-3), 8.65 (brs, 1H, H-4), 9.14 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 36.75 ($-\text{CH}_3$), 117.21 (C-4), 126.08 (C-2', C-6'), 128.76 (C-4'), 129.26 (C-3a), 131.29 (C-3', C-5'), 135.45 (C-3, C-7), 137.04 (C-5), 139.13 (C-7a), 139.85 (C-1'), 160.78 ($-\text{CNH}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 252.1244

Ευρεθέν: 252.1237

1-Μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδινη (18)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **15** σε απόδοση 81% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.8-0.2. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 123-125 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 4.23 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.28-7.32 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.37 (d, 1H, H-4', $J=7.8$ Hz), 7.55 (t, 1H, H-5', $J=7.8$ Hz), 8.23 (s, 1H, H-3), 8.63 (brs, 1H, H-4), 9.06 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 36.49 ($-\text{CH}_3$), 114.93 (C-4), 120.45 (C-2'), 120.82 (C-4'), 123.08, 124.88, 126.68 (C-3'), 127.44 (C-6'), 128.48 (C-3'), 129.71

(C-3a), 131.40 (C-5'), 132.58, 132.79, 133.00, 133.22 (-CF₃), 133.77 (C-7), 134.80 (C-3), 138.67 (C-7a), 142.43 (C-5), 151.92 (C-1'), 157.28 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₅H₁₃N₅F₃⁺ [M+H]⁺: 320.1118

Ευρεθέν: 320.1119

1-Μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (19)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **15** σε απόδοση 60% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη-τριαιθυλαμίνη 8-2-0.01. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 190-192 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.36 (s, 3H, -CH₃ piperazine), 2.64 (t, 4H, H-3'', H-5'', *J*=4.9 Hz), 3.21 (t, 4H, H-2'', H-6'', *J*=4.9 Hz), 4.25 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 7.05-7.09 (m, 4H, H-3', H-5', H-2', H-6'), 8.25 (s, 1H, H-3), 8.61 (brs, 1H, H-4), 9.11 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 36.59 (-CH₃ pyrazole), 46.16 (-CH₃ piperazine), 50.39 (C-2'', C-6''), 56.05 (C-3'', C-5''), 115.63 (C-4), 118.82 (C-3', C-5'), 125.39 (C-2', C-6'), 129.50 (C-3a), 134.45 (C-7), 135.01 (C-3), 137.91 (C-4'), 138.79 (C-7a), 140.32 (C-5), 150.24 (C-1'), 158.87 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₉H₂₄N₇⁺ [M+H]⁺: 350.2088

Ευρεθέν: 350.2073

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (20)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **16** σε απόδοση 91% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1. Μπεζ έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 5.70 (s, 2H, -CH₂-), 6.87 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.8 Hz), 7.08 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.5 Hz), 7.12 (t, 1H, H-4'', *J*=7.5 Hz), 7.25 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 7.39 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.8 Hz), 8.27 (s, 1H, H-3), 8.61 (brs, 1H, H-4), 8.99 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 54.21 (-CH₂-), 55.77 (-OCH₃), 115.15 (C-4), 115.29 (C-3', C-5'), 123.91 (C-2'', C-6''), 125.06 (C-4''), 129.62 (C-1'), 130.19 (C-

2', C-6'), 130.24 (C-3a), 130.71 (C-3'', C-5''), 134.13 (C-3), 135.21 (C-7), 138.10 (C-7a), 142.18 (C-5), 149.27 (C-1'), 157.36 (-CNH-), 161.16 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $C_{21}H_{20}ON_5^+$ $[M+H]^+$: 358.1663

Ευρεθέν: 358.1646

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδινη (21)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **16** σε απόδοση 81% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 3-7. Κίτρινο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 5.67 (s, 2H, -CH₂-), 6.85 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.24 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 7.27 (d, 1H, H-6'', *J*=8.0 Hz), 7.30 (brs, 1H, H-2''), 7.36 (d, 1H, H-4'', *J*=7.8 Hz), 7.52 (t, 1H, H-5'', *J*=7.9 Hz), 8.24 (s, 1H, H-3), 8.62 (brs, 1H, H-4), 8.95 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 54.19 (-CH₂-), 55.75 (-OCH₃), 115.08 (C-4), 115.28 (C-3', C-5'), 120.44 (C-2''), 120.79 (C-6''), 123.07, 123.96, 124.87, 126.67 (C-3''), 127.40 (C-4''), 128.47 (C-3'), 129.62 (C-1'), 130.17 (C-2', C-6'), 130.27 (C-3a), 131.38 (C-5''), 132.56, 132.77, 132.98, 133.20 (-CF₃), 133.94 (C-7), 135.17 (C-3), 138.07 (C-7a), 142.56 (C-5), 151.89 (C-1'), 157.13 (-CNH-), 161.13 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $C_{22}H_{19}ON_5F_3^+$ $[M+H]^+$: 426.1536

Ευρεθέν: 426.1521

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδινη (22)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **16** σε απόδοση 60% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη-τριαιθυλαμίνη 8-2-0.01. Καστανόχρωμο άμορφο στερεό.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.37 (s, 3H, -CH₃), 2.64 (t, 4H, H-3''', H-5''', *J*=4.9 Hz), 3.26 (t, 4H, H-2''', H-6''', *J*=4.9 Hz), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 5.76 (s, 2H, -CH₂-), 6.89 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.11 (d, 2H, H-3'', H-5'', *J*=8.9 Hz), 7.20 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=8.9 Hz), 7.29 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 8.36 (s, 1H, H-3), 8.67 (brs, 1H, H-4), 9.13 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 46.13 ($-\text{CH}_3$), 49.78 (C-2''', C-6'''), 54.41 ($-\text{CH}_2-$), 55.80 ($-\text{OCH}_3$), 55.96 (C-3''', C-5'''), 115.34 (C-3', C-5'), 117.03 (C-4), 118.38 (C-3'', C-5''), 126.64 (C-2'', C-6''), 129.42 (C-1'), 129.86 (C-3a), 130.31 (C-2', C-6'), 131.81 (C-4'), 135.46 (C-7), 135.73 (C-3), 137.60 (C-7a), 138.44 (C-5), 151.71 (C-1''), 160.55 ($-\text{CNH}-$), 161.27 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{ON}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 456.2506

Ευρεθέν: 456.2497

4-Μεθυλο-1-(4-νιτροφαινυλο)πιπεραζίνη (24)^{528,529}

Διάλυμα του 1-χλωρο-4-νιτροβενζολίου (**23**) (5.04 g, 32 mmol) εντός *N*-μεθυλοπιπεραζίνης (11.13 ml) θερμαίνεται στους 140 °C για 3 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο, οπότε καθιζάνει το στερεό προϊόν **24**, το οποίο διηθείται υπό κενό (5.30 g, 75%). Σ.τ.: 109-110 °C (Βιβλ.⁵²⁸ 108-110 °C).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 2.35 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.55 (t, 4H, H-3, H-5, $J=5.1$ Hz), 3.43 (t, 4H, H-2, H-6, $J=5.1$ Hz), 6.82 (d, 2H, H-2', H-6', $J=9.5$ Hz), 8.12 (d, 2H, H-3', H-5', $J=9.5$ Hz).

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 45.9 ($-\text{CH}_3$), 46.8 (C-2, C-6), 54.4 (C-3, C-5), 112.5 (C-2', C-6'), 125.8 (C-3', C-5'), 138.2 (C-4'), 154.7 (C-1').

1-(4-Αμινοφαινυλο)-4-μεθυλοπιπεραζίνη (25)^{528,530}

Σε διάλυμα του παραγώγου **24** (600 mg, 2.71 mmol) εντός μίγματος μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (10 και 20 ml αντίστοιχα) προστίθεται παλλάδιο επί άνθρακα (60 mg) και το μίγμα υδρογονώνεται υπό πίεση 55 psi σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Ακολουθεί διήθηση από κελλίτη και συμπύκνωση του διηθήματος (500 mg, 97%). Σ.τ.: 90-91 °C (EtOH) (Βιβλ.⁵³⁰ 92 °C).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 2.34 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.57 (t, 4H, H-3, H-5, $J=4.6$ Hz), 3.06 (t, 4H, H-2, H-6, $J=5.3$ Hz), 3.06 (brs, 2H, D_2O exchang., $-\text{NH}_2$), 6.65 (d, 2H, H-2', H-6', $J=9.1$ Hz), 6.82 (d, 2H, H-3', H-5', $J=9.1$ Hz).

1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (26)

Διάλυμα του παραγώγου **20** (110 mg, 0.31 mmol) εντός τριφθοροοξικού οξέος (5 ml) θερμαίνεται στους 70 °C υπό άνυδρες συνθήκες για 5 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό, στο υπόλειμμα προστίθεται νερό, το μίγμα φέρεται σε pH 10

με προσθήκη ανθρακικού νατρίου και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na_2SO_4) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2 και λαμβάνεται το παράγωγο **26** (50 mg, 70%). Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 153-155 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 7.20-7.27 (m, 3H, H-2', H-6', H-4'), 7.45 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.8$ Hz), 8.32 (s, 1H, H-3), 8.69 (brs, 1H, H-4), 9.10 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 114.79 (C-4), 123.75 (C-2', C-6'), 124.73 (C-4'), 128.81 (C-3a), 130.67 (C-3', C-5'), 134.64 (C-7), 135.65 (C-3), 139.32 (C-7a), 142.44 (C-5), 150.14 (C-1'), 157.27 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 238.1087

Ευρεθέν: 238.1081

1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (27)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **21** σε απόδοση 70% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2. Μπεζ έλαιο.

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 7.29-7.34 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.38 (d, 1H, H-4', $J=7.8$ Hz), 7.55 (t, 1H, H-5', $J=7.8$ Hz), 8.30 (s, 1H, H-3), 8.68 (brs, 1H, H-4), 9.03 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 115.00 (C-4), 120.55 (C-2'), 120.94 (C-4'), 123.07, 123.98, 124.87, 126.67 (C-3'), 127.52 (C-6'), 128.47 (C-3'), 128.83 (C-3a), 131.43 (C-5'), 132.61, 132.82, 133.04, 133.25 (-CF₃), 134.64 (C-7), 135.70 (C-3), 139.31 (C-7a), 142.31 (C-5), 151.65 (C-1'), 157.52 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{F}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 306.0961

Ευρεθέν: 306.0950

1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (28)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **22** σε απόδοση 70% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη-τριαιθυλαμίνη 8-2-0.01. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 228-230 °C (Et_2O).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.36 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 2.63 (t, 4H, H-3'', H-5'', $J=4.6$ Hz), 3.20 (t, 4H, H-2'', H-6'', $J=4.6$ Hz), 7.05-7.09 (m, 4H, H-3', H-5', H-2', H-6'), 8.32 (s, 1H, H-3), 8.65 (brs, 1H, H-4), 9.07 (brs, 1H, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 46.16 ($-\text{CH}_3$), 50.35 (C-2'', C-6''), 56.05 (C-3'', C-5''), 115.81 (C-4), 118.80 (C-3', C-5'), 125.56 (C-2', C-6'), 128.60 (C-3a), 135.47 (C-7), 135.86 (C-3), 137.23 (C-4'), 139.72 (C-7a), 139.92 (C-5), 150.45 (C-1'), 159.24 ($-\text{CNH}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 336.1931

Ευρεθέν: 336.1935

1-Μεθυλο-[N-(2-διμεθυλαμινο)αιθυλο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβοξαμίδιο (29)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **15** σε απόδοση 18% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Α που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2. Καστανόχρωμο έλαιο.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.40 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.70 (t, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $J=6.6$ Hz), 3.62 (t, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, $J=6.6$ Hz), 4.23 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ pyrazole), 8.23 (s, 1H, H-3), 8.47 (s, 1H, H-4), 9.05 (s, 1H, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 36.54 ($-\text{CH}_3$ pyrazole), 37.92 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 45.41 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 59.36 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 115.90 (C-4), 129.42 (C-3a), 134.20 (C-7), 135.04 (C-3), 138.85 (C-7a), 141.24 (C-5), 167.53 ($-\text{CO}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{ON}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 248.1506

Ευρεθέν: 248.1500

1-Μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβοξυλικό οξύ (30)

Σε διάλυμα του παραγώγου **15** (130 mg, 0.82 mmol) εντός αιθανόλης (3 ml) προστίθεται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 20% (3 ml) και το μίγμα θερμαίνεται στους 70 °C για 2 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και φέρεται σε pH 3-4 με προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 9%. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, ξήρανση (Na_2SO_4) και συμπύκνωση της οργανικής φάσης χωρίς θέρμανση (κίνδυνος αποκαρβοξυλίωσης) (120 mg, 83%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 216-218 °C με αποσύνθεση (EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 4.23 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 8.35 (s, 1H, H-3), 8.51 (s, 1H, H-4), 9.22 (s, 1H, H-7), 12.90 (brs, 1H, D_2O exchang., $-\text{OH}$).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 36.51 (-CH₃), 118.48 (C-4), 127.53 (C-3a), 133.98 (C-7), 134.33 (C-3), 136.64 (C-7a), 136.95 (C-5), 165.80 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₈H₆O₂N₃⁻ [M-H]⁻: 176.0466

Ευρεθέν: 176.0470

4-(1-Μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονυλο)μορφολίνη (31)

Σε διάλυμα του παραγώγου **30** (60 mg, 0.34 mmol) εντός διχλωρομεθανίου (15 ml) προστίθενται υπό αργό, *N,N'*-δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (70 mg, 0.34 mmol) και μορφολίνη (0.04 ml, 0.41 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ημέρες. Ακολουθεί διήθηση από κελλίτη (απομάκρυνση *N,N'*-δικυκλοεξυλουρίας) και το διήθημα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.6-0.4 και λαμβάνεται το παράγωγο **31** (30 mg, 36%). Μπεζ έλαιο.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.69 (brs, 4H, H-3', H-5'), 3.82 (brs, 4H, H-2', H-6'), 4.21 (s, 3H, -CH₃), 8.11 (s, 2H, H-3, H-4), 8.89 (s, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.35 (-CH₃), 43.24 (C-2'), 48.20 (C-3'), 67.02 (C-6'), 67.14 (C-5'), 116.98 (C-4), 128.22 (C-3a), 131.80 (C-7), 133.43 (C-3), 136.51 (C-7a), 143.42 (C-5), 168.21 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₂H₁₅O₂N₄⁺ [M+H]⁺: 247.1189

Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 269.1006

1-Μεθυλο-*N*-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβοξαμίδιο (32)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **30** σε απόδοση 25% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **31** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 3-7. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 171-173 °C (Et₂O).

^1H -NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.25 (s, 3H, -CH₃), 7.14 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.39 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.9 Hz), 7.80 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.6 Hz), 8.19 (s, 1H, H-3), 8.68 (s, 1H, H-4), 8.89 (s, 1H, H-7), 10.09 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.53 (-CH₃), 115.61 (C-4), 119.81 (C-2', C-6'), 124.25 (C-4'), 128.82 (C-3a), 129.20 (C-3', C-5'), 131.64 (C-7), 134.23 (C-3), 137.62 (C-7a), 138.21 (C-1'), 140.50 (C-5), 162.67 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₄H₁₃ON₄⁺ [M+H]⁺: 253.1084

Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 275.0901

2-Μεθυλο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (33)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **12** σε απόδοση 50% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 6-4 έως 3-7. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 220-221 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.34 (s, 3H, -CH₃), 8.05 (s, 1H, H-4), 8.15 (s, 1H, H-3), 9.21 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 41.60 (-CH₃), 118.65 (-CN), 122.20 (C-3a), 122.42 (C-4), 123.38 (C-5), 125.65 (C-3), 145.33 (C-7a), 145.46 (C-7).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₈H₇N₄⁺ [M+H]⁺: 159.0665

Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 181.0482

2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (34)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **14** σε απόδοση 66% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 5-5. Υποκίτρινο στερεό. Σ.τ.: 137-138 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.80 (s, 3H, -OCH₃), 5.64 (s, 2H, -CH₂-), 6.92 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.2 Hz), 7.34 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.2 Hz), 8.02 (s, 1H, H-4), 8.18 (s, 1H, H-3), 9.21 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 55.26 (-OCH₃), 58.00 (-CH₂-), 114.51 (C-3', C-5'), 118.70 (-CN), 121.74 (C-3a), 122.47 (C-4), 122.94 (C-5), 124.58 (C-3), 126.01 (C-1'), 130.02 (C-2', C-6'), 145.00 (C-7a), 145.45 (C-7), 160.08 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₅H₁₃ON₄⁺ [M+H]⁺: 265.1084

Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 287.0898

2-Μεθυλο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (35)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **33** σε απόδοση 93% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 157-159 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 4.33 (s, 3H, -CH₃), 7.10 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.8 Hz), 7.14 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.41 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.7 Hz), 8.49 (s, 1H, H-3), 8.57 (brs, 1H, H-4), 9.13 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 41.29 ($-\text{CH}_3$), 114.94 (C-4), 124.05 (C-2', C-6'), 125.11 (C-4'), 126.09 (C-3a), 128.16 (C-3), 130.72 (C-3', C-5'), 141.04 (C-5), 142.87 (C-7), 147.30 (C-7a), 149.16 (C-1'), 157.89 ($-\text{CNH}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 252.1244

Ευρεθέν: 252.1235

2-Μεθυλο-2H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (36)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **33** σε απόδοση 81% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.7-0.3. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 147-149 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 4.33 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.28-7.32 (m, 2H, H-2', H-6'), 7.37 (d, 1H, H-4', $J=7.8$ Hz), 7.55 (t, 1H, H-5', $J=7.8$ Hz), 8.48 (s, 1H, H-3), 8.58 (brs, 1H, H-4), 9.13 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 41.27 ($-\text{CH}_3$), 114.84 (C-4), 120.57 (C-2'), 120.85 (C-4'), 123.09, 124.89 (C-3'), 126.14 (C-3a), 126.69 (C-3'), 127.56 (C-6'), 128.10 (C-3), 128.49 (C-3'), 131.42 (C-5'), 132.60, 132.81, 133.02, 133.24 ($-\text{CF}_3$), 141.48 (C-5), 142.73 (C-7), 147.31 (C-7a), 151.85 (C-1'), 157.77 ($-\text{CNH}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{F}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 320.1118

Ευρεθέν: 320.1262

2-Μεθυλο-2H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (37)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **33** σε απόδοση 58% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη-τριαιθυλαμίνη 8-2-0.01. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 215-217 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.35 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ piperazine), 2.63 (t, 4H, H-3'', H-5'', $J=4.9$ Hz), 3.21 (t, 4H, H-2'', H-6'', $J=4.9$ Hz), 4.33 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ pyrazole), 7.06 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.9$ Hz), 7.10 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.9$ Hz), 8.52 (s, 1H, H-3), 8.57 (s, 1H, H-4), 9.16 (s, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 41.37 ($-\text{CH}_3$ pyrazole), 46.16 ($-\text{CH}_3$ piperazine), 50.33 (C-2'', C-6''), 56.04 (C-3'', C-5''), 115.86 (C-4), 118.77 (C-3', C-

5'), 125.58 (C-2', C-6'), 125.85 (C-3a), 128.51 (C-3), 139.05 (C-4'), 139.18 (C-5), 143.37 (C-7), 147.31 (C-7a), 150.39 (C-1'), 159.36 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₉H₂₄N₇⁺ [M+H]⁺: 350.2088

Ευρεθέν: 350.2076

2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-2H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-(N¹-φαινυλο)καρβοξαμίδίνη (38)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **34** σε απόδοση 91% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.5-0.5. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 112-114 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 5.66 (s, 2H, -CH₂-), 6.92 (d, 2H, H-3', H-5', J=8.7 Hz), 7.10 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=7.5 Hz), 7.14 (t, 1H, H-4'', J=7.4 Hz), 7.36 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.7 Hz), 7.40 (t, 2H, H-3'', H-5'', J=7.9 Hz), 8.51 (s, 1H, H-3), 8.55 (brs, 1H, H-4), 9.14 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 55.81 (-OCH₃), 58.56 (-CH₂-), 115.18 (C-4), 115.39 (C-3', C-5'), 124.12 (C-2'', C-6''), 125.26 (C-4'), 125.94 (C-3a), 127.13 (C-3), 128.78 (C-1'), 130.75 (C-3'', C-5''), 131.04 (C-2', C-6'), 140.81 (C-5), 143.23 (C-7), 147.27 (C-7a), 148.70 (C-1'), 157.99 (-CNH-), 161.53 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₁H₂₀ON₅⁺ [M+H]⁺: 358.1663

Ευρεθέν: 358.1666

2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-2H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (39)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **34** σε απόδοση 81% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 6-4. Κίτρινο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.73 (s, 3H, -OCH₃), 5.60 (s, 2H, -CH₂-), 6.88 (d, 2H, H-3', H-5', J=8.5 Hz), 7.27 (d, 1H, H-6'', J=7.7 Hz), 7.29-7.37 (m, 4H, H-2'', H-2', H-6', H-4''), 7.51 (t, 1H, H-5'', J=7.8 Hz), 8.44 (s, 1H, H-3), 8.54 (brs, 1H, H-4), 9.09 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 55.84 (-OCH₃), 58.57 (-CH₂-), 115.17 (C-4), 115.41 (C-3', C-5'), 120.72 (C-2''), 121.13 (C-4'), 122.26, 124.05, 124.85 (C-3''), 126.01 (C-3a), 126.65 (C-3''), 127.16 (C-3), 127.70 (C-6''), 128.44 (C-3''), 128.81

(C-1'), 131.05 (C-2', C-6'), 131.49 (C-5''), 132.67, 132.85, 133.05, 133.28 (-CF₃), 141.19 (C-5), 143.13 (C-7), 147.30 (C-7a), 151.18 (C-1''), 158.02 (-CNH-), 161.54 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₂H₁₉ON₅F₃⁺ [M+H]⁺: 426.1536

Ευρεθέν: 426.1522

2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-2H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδινη (40)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **34** σε απόδοση 58% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη-τριαιθυλαμίνη 8-2-0.01. Καστανόχρωμο άμορφο στερεό.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.36 (s, 3H, -CH₃), 2.63 (t, 4H, H-3'', H-5'', J=4.7 Hz), 3.21 (t, 4H, H-2'', H-6'', J=4.7 Hz), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 5.67 (s, 2H, -CH₂-), 6.93 (d, 2H, H-3', H-5', J=8.7 Hz), 7.04-7.08 (m, 4H, H-3'', H-5'', H-2'', H-6''), 7.37 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.7 Hz), 8.54 (s, 1H, H-3), 8.55 (brs, 1H, H-4), 9.16 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 46.16 (-CH₃), 50.58 (C-2'', C-6''), 55.83 (-OCH₃), 56.08 (C-3'', C-5''), 58.60 (-CH₂-), 115.40 (C-4, C-3', C-5'), 118.95 (C-3'', C-5''), 125.12 (C-2'', C-6''), 125.89 (C-3a), 127.25 (C-3), 128.78 (C-1'), 131.06 (C-2', C-6'), 139.38 (C-4''), 141.13 (C-5), 143.40 (C-7), 147.31 (C-7a), 149.87 (C-1''), 158.77 (-CNH-), 161.55 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₆H₃₀ON₇⁺ [M+H]⁺: 456.2506

Ευρεθέν: 456.2504

2-Μεθυλο-[N-(2-διμεθυλαμινο)αιθυλο]-2H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβοξαμίδιο (41)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **33** σε απόδοση 15% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Α που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2. Καστανόχρωμο έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.42 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 2.72 (t, 2H, -NHCH₂CH₂-, J=6.6 Hz), 3.63 (t, 2H, -NHCH₂CH₂-, J=6.6 Hz), 4.32 (s, 3H, -CH₃ pyrazole), 8.43 (s, 1H, H-4), 8.49 (s, 1H, H-3), 9.09 (s, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 37.82 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 41.26 ($-\text{CH}_3$ pyrazole), 45.35 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 59.34 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 116.01 (C-4), 125.81 (C-3a), 128.47 (C-3), 140.34 (C-5), 143.01 (C-7), 147.44 (C-7a), 167.90 ($-\text{CO}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{ON}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 248.1506

Ευρεθέν: 248.1506

IV.2B 3-φαινυλοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (50-58)

5-Χλωρο-3-ιωδο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (42)⁵³¹

Σε διάλυμα του παραγώγου **10** (2.44 g, 15.90 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (100 ml) προστίθεται υπό αργό, *N*-ιωδοσουκκινιμίδιο (5.48 g, 24.35 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται, το υπόλειμμα εκπλένεται με διάλυμα θειοθειικού νατρίου 5% (δέσμευση ιωδίου) και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na_2SO_4) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 6-4 και λαμβάνεται το παράγωγο **42** (4 g, 90%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 224-225 °C (EtOAc).

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7.52 (s, 1H, H-4), 8.87 (s, 1H, H-7), 14.23 (brs, 1H, D_2O exchange, $-\text{NH}-$).

^{13}C -NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 92.1 (C-3), 113.8 (C-4), 133.6 (C-3a), 135.2 (C-7), 136.9 (C-7a), 139.9 (C-5).

5-Χλωρο-3-ιωδο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (43)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **42** σε απόδοση 68% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τα παράγωγα **11** και **12** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.8-0.2. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 144 °C (EtOAc).

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.18 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.33 (s, 1H, H-4), 8.64 (s, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 36.99, 88.31, 114.56, 133.11, 135.09, 136.85, 141.43.

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_3\text{Cl}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 293.9289

Ευρεθέν: 293.9276

5-Χλωρο-3-ιωδο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (44)⁵³¹

Λαμβάνεται από το παράγωγο **42** σε απόδοση 88% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τα παράγωγα **13** και **14** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 126-127 °C (EtOAc).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 5.59 (s, 2H, -CH₂-), 6.85 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.6 Hz), 7.22 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.6 Hz), 7.38 (s, 1H, H-4), 8.51 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 54.4 (-CH₂-), 55.3 (-OCH₃), 88.9 (C-3), 114.4 (C-3', C-5', C-4), 126.9 (C-3a), 129.2 (C-2', C-6'), 133.6 (C-7a), 135.6 (C-1'), 136.2 (C-7), 141.4 (C-5), 159.8 (C-4').

5-Χλωρο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (45)

Σε διάλυμα του παραγώγου **43** (350 mg, 1.19 mmol) εντός μίγματος τολουολίου-αιθανόλης (30 και 4.30 ml αντίστοιχα) προστίθενται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, φαινυλοβορονικό οξύ (161 mg, 1.32 mmol) και τετρακίς(τριφαινυλοφωσφινό)παλλάδιο(0) (70 mg, 0.06 mmol). Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (302 mg σε 1.39 ml νερό) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 30 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται, το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.8-0.2 και λαμβάνεται το παράγωγο **45** (280 mg, 95%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 141 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.14 (s, 3H, -CH₃), 7.39 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.47 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.7 Hz), 7.77 (s, 1H, H-4), 7.82 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.5 Hz), 8.64 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.30, 114.42, 126.86, 127.85, 128.55, 129.03, 131.93, 132.97, 137.24, 141.12, 142.80.

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₃H₁₁N₃Cl⁺ [M+H]⁺: 244.0636

Ευρεθέν: 244.0642

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (46)³⁵⁴

Λαμβάνεται από το παράγωγο **44** σε απόδοση 100% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **45** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.9-0.1. Σ.τ.: 73-75 °C (MeOH) (Βιβλ.³⁵⁴ 73-75 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.71 (s, 3H, -OCH₃), 5.56 (s, 2H, -CH₂-), 6.83 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.5 Hz), 7.23 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.5 Hz), 7.40 (t, 1H, H-4'', *J*=7.5 Hz), 7.49 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.5 Hz), 7.83 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.5 Hz), 8.58 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 53.5, 55.0, 114.1, 114.5, 126.8, 127.3, 128.3, 128.4, 128.8, 129.0, 131.8, 133.3, 136.5, 141.1, 142.8, 159.4.

1-Μεθυλο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (47)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **45** σε απόδοση 94% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 5-5. Υποκίτρινο στερεό. Σ.τ.: 160-162 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.24 (s, 3H, -CH₃), 7.43 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.49 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.4 Hz), 7.83 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.4 Hz), 8.24 (s, 1H, H-4), 8.96 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 36.54 (-CH₃), 118.37 (-CN), 122.37 (C-4), 122.95 (C-3a), 124.41 (C-5), 127.14 (C-2', C-6'), 129.17 (C-4'), 129.21 (C-3', C-5'), 131.26 (C-1'), 135.52 (C-7), 137.96 (C-7a), 144.81 (C-3).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₄H₁₁N₄⁺ [M+H]⁺: 235.0978

Ευρεθέν: [M+Na]⁺: 257.0799

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (48)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **46** σε απόδοση 72% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 88-90 °C (CH₂Cl₂-Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 5.69 (s, 2H, -CH₂-), 6.87 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.2 Hz), 7.28 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.2 Hz), 7.47 (t, 1H, H-4'',

$J=7.4$ Hz), 7.54 (t, 2H, H-3'', H-5'', $J=7.5$ Hz), 7.92 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J=7.5$ Hz), 8.33 (s, 1H, H-4), 8.87 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 54.19 ($-\text{CH}_2-$), 55.40 ($-\text{OCH}_3$), 114.59 (C-3', C-5'), 118.34 ($-\text{CN}$), 122.64 (C-4), 123.13 (C-3a), 125.26 (C-5), 126.99 (C-1'), 127.41 (C-2'', C-6''), 129.24 (C-2', C-6'), 129.31 (C-3'', C-5'', C-4''), 131.39 (C-1''), 136.00 (C-7), 137.51 (C-7a), 145.14 (C-3), 159.94 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ON}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 341.1397

Ευρεθέν: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 363.1215

1-Μεθυλο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβοξαμίδιο (49)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **45** σε απόδοση 21% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.5-0.5. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 235-237 °C (CH_2Cl_2 - Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.27 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 5.82 (brs, 1H, D_2O exchang., $-\text{NH}-$), 7.44 (t, 1H, H-4', $J=6.7$ Hz), 7.52 (t, 2H, H-3', H-5', $J=6.5$ Hz), 7.94 (brs, 1H, D_2O exchang., $-\text{NH}-$), 8.00 (d, 2H, H-2', H-6', $J=6.9$ Hz), 8.88 (brs, 2H, H-4, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 36.55 ($-\text{CH}_3$), 116.15 (C-4), 126.16 (C-3a), 127.43 (C-2', C-6'), 128.96 (C-4'), 129.21 (C-3', C-5'), 132.02 (C-1'), 132.28 (C-7), 139.04 (C-7a), 140.46 (C-5), 145.55 (C-3), 167.33 ($-\text{CO}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ON}_4^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 253.1084

Ευρεθέν: $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 275.0906

1-Μεθυλο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(N^1 -φαινυλο)καρβοξαμίδινη (50)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **47** σε απόδοση 96% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.2-0.8. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 88-90 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 4.25 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.08-7.17 (m, 3H, H-2'', H-6'', H-4''), 7.39-7.45 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-4'), 7.52 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.7$ Hz), 8.05 (d, 2H, H-2', H-6', $J=7.4$ Hz), 8.93 (brs, 1H, H-4), 9.05 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 36.60 ($-\text{CH}_3$), 115.25 (C-4), 124.00 (C-2'', C-6''), 125.18 (C-4'), 126.82 (C-3a), 128.28 (C-2', C-6'), 129.77 (C-4'), 130.11 (C-3', C-5'), 130.76 (C-3'', C-5''), 133.49 (C-1'), 134.30 (C-7), 140.13 (C-7a), 142.24 (C-5), 145.90 (C-3), 149.07 (C-1''), 157.45 ($-\text{CNH}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 328.1557

Ευρεθέν: 328.1558

1-Μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (51)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **47** σε απόδοση 84% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.94-0.06. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 154-156 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 4.21 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 7.30 (d, 1H, H-6'', $J=7.8$ Hz), 7.34 (brs, 1H, H-2''), 7.36-7.43 (m, 2H, H-4'', H-4'), 7.50 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.6$ Hz), 7.55 (t, 1H, H-5'', $J=7.8$ Hz), 8.02 (d, 2H, H-2', H-6', $J=7.7$ Hz), 8.87 (brs, 1H, H-4), 8.99 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 36.59 ($-\text{CH}_3$), 115.16 (C-4), 120.60 (C-2''), 121.02 (C-4'), 123.97, 124.89, 126.68 (C-3'), 126.89 (C-3a), 127.57 (C-6''), 128.28 (C-2', C-6'), 128.49 (C-3''), 129.77 (C-4'), 130.13 (C-3', C-5'), 131.47 (C-5''), 132.66, 132.86, 133.07, 133.25 ($-\text{CF}_3$), 133.53 (C-1'), 134.21 (C-7), 140.16 (C-7a), 142.63 (C-5), 145.90 (C-3), 151.60 (C-1''), 157.43 ($-\text{CNH}-$).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{F}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 396.1431

Ευρεθέν: 396.1432

1-Μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-{N¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (52)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **47** σε απόδοση 63% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Καστανόχρωμο άμορφο στερεό.

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 2.37 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ piperazine), 2.64 (t, 4H, H-3'', H-5'', $J=4.7$ Hz), 3.24 (t, 4H, H-2'', H-6'', $J=4.7$ Hz), 4.28 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ pyrazole), 7.09 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.1$ Hz), 7.17 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.1$ Hz),

7.45 (t, 1H, H-4', $J=7.4$ Hz), 7.53 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.6$ Hz), 8.06 (d, 2H, H-2', H-6', $J=7.5$ Hz), 8.97 (brs, 1H, H-4), 9.15 (brs, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 36.79 (-CH₃ pyrazole), 46.14 (-CH₃ piperazine), 49.93 (C-2'', C-6''), 55.97 (C-3'', C-5''), 116.76 (C-4), 118.49 (C-3', C-5'), 126.34 (C-2', C-6'), 126.47 (C-3a), 128.39 (C-2', C-6'), 130.02 (C-4'), 130.19 (C-3', C-5'), 133.16 (C-1'), 135.40 (C-7), 135.55 (C-4''), 138.40 (C-7a), 140.36 (C-5), 146.38 (C-3), 151.32 (C-1'), 159.96 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_7^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 426.2400

Ευρεθέν: 426.2397

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμίδίνη (53)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **48** σε απόδοση 94% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.7-0.3 έως 9.3-0.7. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 170-172 °C (Et_2O).

^1H -NMR (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 5.76 (s, 2H, -CH₂-), 6.90 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.7$ Hz), 7.07 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J=7.4$ Hz), 7.12 (t, 1H, H-4'', $J=7.5$ Hz), 7.34 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.7$ Hz), 7.39 (t, 2H, H-3'', H-5'', $J=7.8$ Hz), 7.44 (t, 1H, H-4', $J=7.4$ Hz), 7.54 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.7$ Hz), 8.10 (d, 2H, H-2'', H-6'', $J=7.3$ Hz), 8.97 (s, 1H, H-4), 9.01 (s, 1H, H-7).

^{13}C -NMR (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 54.32 (-CH₂-), 55.78 (-OCH₃), 115.16 (C-4), 115.36 (C-3', C-5'), 123.72 (C-2'', C-6''), 124.74 (C-4''), 127.60 (C-3a), 128.42 (C-2', C-6'), 129.65 (C-1'), 129.84 (C-4'), 130.14 (C-3'', C-5''), 130.24 (C-2', C-6'), 130.70 (C-3'', C-5''), 133.55 (C-1'), 134.42 (C-7), 139.58 (C-7a), 143.12 (C-5), 146.24 (C-3), 150.25 (C-1''), 157.09 (-CNH-), 161.22 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{ON}_5^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 434.1975

Ευρεθέν: 434.1971

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (54)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **48** σε απόδοση 84% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.5-0.5 έως 9.2-0.8. Μπεζ έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.71 (s, 3H, -OCH₃), 5.67 (s, 2H, -CH₂-), 6.85 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.25-7.30 (m, 3H, H-2', H-6', H-6'''), 7.32 (brs, 1H, H-2'''), 7.37 (d, 1H, H-4''', *J*=7.7 Hz), 7.40 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.48-7.55 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-5'''), 8.05 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.4 Hz), 8.92 (brs, 2H, H-4, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 54.90 (-CH₂-), 55.74 (-OCH₃), 115.32 (C-3', C-5', C-4), 120.51 (C-2'''), 120.90 (C-4'''), 123.96, 124.88, 126.67 (C-3'''), 127.51 (C-6''', C-3a), 128.37 (C-2'', C-6'', C-3'''), 129.54 (C-1'), 129.81 (C-4''), 130.11 (C-3'', C-5''), 130.22 (C-2', C-6'), 131.41 (C-5'''), 132.59, 132.80, 133.01, 133.22 (-CF₃), 133.47 (C-1'), 134.28 (C-7), 139.51 (C-7a), 142.84 (C-5), 146.14 (C-3), 151.75 (C-1'''), 157.19 (-CNH-), 161.16 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₈H₂₃ON₅F₃⁺ [M+H]⁺: 502.1849

Ευρεθέν: 502.1841

1-(4-Μεθοξυβενζύλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-ύλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (55)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **48** σε απόδοση 63% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 188-190 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.38 (s, 3H, -CH₃), 2.65 (t, 4H, H-3, H-5 piperazine, *J*=4.6 Hz), 3.28 (t, 4H, H-2, H-6 piperazine, *J*=4.6 Hz), 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 5.80 (s, 2H, -CH₂-), 6.91 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.12 (d, 2H, H-3''', H-5''', *J*=7.7 Hz), 7.25 (d, 2H, H-2''', H-6''', *J*=7.7 Hz), 7.36 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 7.47 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.56 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.7 Hz), 8.10 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.3 Hz), 9.03 (brs, 1H, H-4), 9.17 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 46.10 (-CH₃), 49.59 (C-2, C-6 piperazine), 54.54 (-CH₂-), 55.81 (-OCH₃), 55.92 (C-3, C-5 piperazine), 115.40 (C-3', C-5'), 117.61 (C-4), 118.27 (C-3''', C-5'''), 127.00 (C-2''', C-6'''), 127.06 (C-3a), 128.59 (C-2'', C-6''), 129.34 (C-1'), 130.20 (C-4'', C-4'''), 130.24 (C-3'', C-5''), 130.39 (C-2', C-6'), 133.02 (C-1'), 136.00 (C-7), 137.12 (C-5), 139.92 (C-7a), 146.97 (C-3), 152.09 (C-1'''), 160.87 (-CNH-), 161.32 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₂H₃₄ON₇⁺ [M+H]⁺: 532.2819

Ευρεθέν: 532.2810

3-Φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (56)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **53** σε απόδοση 75% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 163-165 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 7.14-7.23 (m, 3H, H-2'', H-6'', H-4'), 7.42-7.48 (m, 3H, H-3'', H-5'', H-4'), 7.53 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.7 Hz), 8.07 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.4 Hz), 9.00 (brs, 2H, H-4, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 115.88 (C-4), 124.53 (C-2'', C-6''), 125.81 (C-3a), 126.00 (C-4'), 128.44 (C-2', C-6'), 129.85 (C-4'), 130.14 (C-3', C-5'), 130.84 (C-3'', C-5''), 133.59 (C-1'), 136.30 (C-7), 140.71 (C-7a), 141.06 (C-5), 147.14 (C-3), 149.87 (C-1''), 158.28 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₉H₁₆N₅⁺ [M+H]⁺: 314.1400

Ευρεθέν: 314.1406

3-Φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (57)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **54** σε απόδοση 75% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1 έως 5-5. Μπεζ έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 7.31-7.36 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.39 (d, 1H, H-4'', *J*=7.8 Hz), 7.44 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.52-7.59 (m, 3H, H-3', H-5', H-5''), 8.08 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.6 Hz), 8.98 (brs, 1H, H-4), 9.05 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 115.27 (C-4), 120.63 (C-2''), 121.07 (C-4'), 123.07, 123.99, 124.87 (C-3''), 126.16 (C-3a), 126.67 (C-3'), 127.62 (C-6''), 128.42 (C-2', C-6', C-3''), 129.81 (C-4'), 130.14 (C-3', C-5'), 131.48 (C-5''), 132.66, 132.87, 133.08, 133.29 (-CF₃), 133.68 (C-1'), 135.00 (C-7), 140.87 (C-7a), 142.54 (C-5), 147.01 (C-3), 151.44 (C-1''), 157.62 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₀H₁₅N₅F₃⁺ [M+H]⁺: 382.1274

Ευρεθέν: 382.1279

3-Φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (58)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **55** σε απόδοση 75% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη-τριαιθυλαμίνη 8-2-0.01. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 148-150 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.37 (s, 3H, -CH₃), 2.65 (t, 4H, H-3''', H-5''', *J*=4.9 Hz), 3.27 (t, 4H, H-2''', H-6''', *J*=4.9 Hz), 7.12 (d, 2H, H-3'', H-5'', *J*=8.7 Hz), 7.22 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=8.7 Hz), 7.47 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.57 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.7 Hz), 8.10 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.1 Hz), 9.05 (brs, 1H, H-4), 9.16 (brs, 1H, H-7).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 46.15 (-CH₃), 49.78 (C-2''', C-6'''), 55.98 (C-3''', C-5'''), 117.28 (C-4), 118.39 (C-3'', C-5''), 125.74 (C-3a), 126.76 (C-2'', C-6''), 128.56 (C-2', C-6'), 130.08 (C-4'), 130.23 (C-3', C-5'), 133.35 (C-1'), 136.56 (C-7, C-4'), 137.50 (C-7a), 140.35 (C-5), 147.55 (C-3), 151.83 (C-1''), 160.72 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₄H₂₆N₇⁺ [M+H]⁺: 412.2244

Ευρεθέν: 412.2239

IV.2Γ 3-φαινυλο-7-αμινοϋποκατεστημένες καρβοξαμιδίνες (67-84)

N-Οξείδιο της 5-χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (59)³⁵⁴

Σε διάλυμα του παραγώγου **46** (3 g, 8.58 mmol) εντός διχλωρομεθανίου (80 ml) προστίθεται 3-χλωροϋπερβενζοϊκό οξύ (70% βρεγμένο με νερό) (5 g, 28.94 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ημέρες, ενώ διατηρείται μακριά από το φως (φωτοευαίσθητη αντίδραση). Το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3 έως 2-8 και λαμβάνεται το παράγωγο **59** (2.04 g, 65%). Σ.τ.: 142-144 °C (EtOH) (Βιβλ.³⁵⁴ 142-144 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.73 (s, 3H, -OCH₃), 5.46 (s, 2H, -CH₂-), 6.81 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 7.21 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.40 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.48 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.4 Hz), 7.83 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.8 Hz), 7.99 (s, 1H, H-4), 8.58 (s, 1H, H-7).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 53.9, 55.3, 114.5, 117.4, 119.1, 123.6, 126.7, 127.1, 129.0, 129.1, 129.2, 131.2, 136.1, 136.5, 144.0, 159.8.

5,7-Διχλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (60)³⁵⁴

Σε διάλυμα του παραγώγου **59** (2.50 g, 6.84 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (28 ml), υπό ψύξη, προστίθεται οξυχλωριούχος φώσφορος (3.10 ml, 34.31 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Το μίγμα αποχύνεται σε νερό, φέρεται σε pH 10 με προσθήκη ανθρακικού νατρίου και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1 και λαμβάνεται το παράγωγο **60** (2.40 g, 92%). Σ.τ.: 126-127 °C (Et₂O-*n*-hexane) (Βιβλ.³⁵⁴ 126-127 °C).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.76 (s, 3H, -OCH₃), 5.95 (s, 2H, -CH₂-), 6.83 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 7.24 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.45 (t, 1H, H-4'', *J*=7.6 Hz), 7.52 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.7 Hz), 7.83 (s, 1H, H-4), 7.87 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.6 Hz).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 54.1, 55.3, 114.2, 114.4, 127.4, 128.8, 128.9, 129.1, 129.2, 131.0, 131.5, 132.7, 133.9, 139.2, 144.1, 159.4.

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (61)⁵⁰⁰

Σε διάλυμα 3,4,5-τριμεθοξυανιλίνης (260 mg, 1.42 mmol) εντός άνυδρου *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (15 ml), υπό ψύξη και υπό αργό, προστίθεται υδρίδιο του νατρίου (60% εναιώρημα σε παραφινέλαιο) (70 mg, 1.71 mmol) και το μίγμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται το παράγωγο **60** (500 mg, 1.30 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 110 °C για 2 ώρες. Ακολούθως, το μίγμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται αιθανόλη (1 ml) και συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 6-4 και λαμβάνεται το παράγωγο **61** (530 mg, 82%). Σ.τ.: 183-185 °C (EtOAc) (Βιβλ.⁵⁰⁰ 183-185 °C).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 3.66 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.67 (s, 3H, 4'''-OCH₃), 3.78 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 6.01 (s, 2H, -CH₂-), 6.86 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.9 Hz), 6.94 (s, 2H, H-2''', H-6'''), 7.12 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.9 Hz), 7.46 (t, 1H, H-4'', *J*=8.0 Hz), 7.52 (s, 1H, H-4), 7.55 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=8.0 Hz), 7.97 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=8.0 Hz), 8.54 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 54.8 (-CH₂-), 55.4 (4'-OCH₃), 56.1 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 60.5 (4'''-OCH₃), 98.5 (C-2''', C-6'''), 105.7 (C-4), 114.6 (C-3', C-5'), 127.2 (C-2'', C-6''), 128.0 (C-3a), 128.7 (C-2', C-6'), 128.8 (C-4'), 129.5 (C-3'', C-5''), 129.5 (C-1'), 132.2 (C-1''), 133.5 (C-4'''), 136.4 (C-1'''), 138.6 (C-7a), 141.6 (C-7), 141.7 (C-5), 142.9 (C-3), 153.0 (C-3''', C-5'''), 159.2 (C-4').

5-Χλωρο-*N*-κυκλοεξυλο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (62)

Σε διάλυμα του παραγώγου **60** (150 mg, 0.39 mmol) εντός 2-αιθοξυαιθανόλης (2 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, κυκλοεξυλαμίνη (0.45 ml, 3.90 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 140 °C για 12 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται, το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1 και λαμβάνεται το παράγωγο **62** (150 mg, 86%). Μπεζ έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.84-0.95 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.08-1.18 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.31-1.41 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.54-1.62 (m, 3H, cyclohexyl-H), 1.82-1.89 (m, 2H, cyclohexyl-H), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 3.91-3.98 (m, 1H, H-1'''), 4.65 (d, 1H, D₂O exchang., -NH-, *J*=7.2 Hz), 5.75 (s, 2H, -CH₂-), 6.91 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.08 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 7.14 (s, 1H, H-4), 7.40 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.50 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.8 Hz), 7.91 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.2 Hz).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 24.65 (C-3''', C-5'''), 25.86 (C-4'''), 32.76 (C-2''', C-6'''), 49.30 (C-1'''), 55.53 (-OCH₃, -CH₂-), 102.53 (C-4), 115.01 (C-3', C-5'), 127.22 (C-2'', C-6'', C-1'), 127.54 (C-2', C-6'), 128.26 (C-4'), 128.62 (C-7a), 128.99 (C-3'', C-5''), 129.35 (C-3a), 132.79 (C-1''), 140.42 (C-5), 142.99 (C-7), 144.38 (C-3), 160.02 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₆H₂₆ON₄Cl⁺ [M-H]⁺: 445.1800

Ευρεθέν: 445.1787

5-Χλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (63)

Διάλυμα του παραγώγου **60** (600 mg, 1.56 mmol) εντός μορφολίνης (5 ml) θερμαίνεται στους 130 °C υπό αργό για 1 ώρα. Το μίγμα συμπυκνώνεται, το υπόλειμμα εκπλένεται με νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης

silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3 και λαμβάνεται το παράγωγο **63** (530 mg, 78%). Μπεζ έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.31 (t, 4H, H-3''', H-5''', J=4.5 Hz), 3.71 (s, 3H, -OCH₃), 3.91 (t, 4H, H-2''', H-6''', J=4.5 Hz), 5.76 (s, 2H, -CH₂-), 6.80 (d, 2H, H-3', H-5', J=8.7 Hz), 7.20 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.7 Hz), 7.39 (t, 1H, H-4'', J=7.4 Hz), 7.48 (t, 2H, H-3'', H-5'', J=7.6 Hz), 7.58 (s, 1H, H-4), 7.89 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=7.3 Hz).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 51.03 (C-3''', C-5'''), 53.23 (-CH₂-), 55.10 (-OCH₃), 66.46 (C-2''', C-6'''), 109.89 (C-4), 113.96 (C-3', C-5'), 127.21 (C-2'', C-6''), 128.39 (C-2', C-6'), 128.51 (C-4'), 128.89 (C-3'', C-5''), 129.07 (C-1', C-7a), 130.85 (C-3a), 132.18 (C-1''), 139.19 (C-5), 144.85 (C-3), 148.71 (C-7), 159.07 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₄H₂₄O₂N₄Cl⁺ [M+H]⁺: 435.1582

Ευρεθέν: 435.1414

1-(4-Μεθοξυβενζύλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (64)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **61** σε απόδοση 90% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 2-1. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 188-190 °C (EtOAc-cyclohexane).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.70 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.71 (s, 3H, 4'''-OCH₃), 3.73 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 5.87 (s, 2H, -CH₂-), 6.45 (s, 2H, H-2''', H-6'''), 6.90 (d, 2H, H-3', H-5', J=8.0 Hz), 7.17 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.0 Hz), 7.39 (t, 1H, H-4'', J=8.0 Hz), 7.47 (t, 2H, H-3'', H-5'', J=8.0 Hz), 7.76 (s, 1H, H-4), 7.83 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.0 Hz).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 52.3 (4'-OCH₃), 55.61 (-CH₂-), 55.9 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 60.8 (4'''-OCH₃), 97.4 (C-2''', C-6'''), 114.9 (C-4), 115.18 (C-3', C-5'), 118.6 (-CN), 121.2 (C-5), 126.6 (C-3a), 127.3 (C-2'', C-6''), 127.7 (C-1'), 127.8 (C-2', C-6'), 128.9 (C-7a), 129.0 (C-4'), 129.1 (C-3'', C-5''), 131.4 (C-1''), 133.8 (C-4'''), 134.7 (C-1'''), 142.6 (C-7), 144.9 (C-3), 153.0 (C-3''', C-5'''), 160.2 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₀H₂₈O₄N₅⁺ [M+H]⁺: 522.2136

Ευρεθέν: 522.2141

7-Κυκλοεξυλαμινο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (65)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **62** σε απόδοση 95% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1, 8-2. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 155-157 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 0.87-0.96 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.09-1.18 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.31-1.40 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.56-1.65 (m, 3H, cyclohexyl-H), 1.82-1.90 (m, 2H, cyclohexyl-H), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.89-3.99 (m, 1H, H-1''), 4.78 (d, 1H, D₂O exchang., -NH-, *J*=6.2 Hz), 5.80 (s, 2H, -CH₂-), 6.92 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.09 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 7.43 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.52 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.6 Hz), 7.62 (s, 1H, H-4), 7.88 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.4 Hz).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 24.69 (C-3'', C-5''), 25.78 (C-4''), 32.65 (C-2'', C-6''), 49.47 (C-1''), 55.50 (-OCH₃), 55.68 (-CH₂-), 112.82 (C-4), 115.06 (C-3', C-5'), 119.39 (-CN), 122.12 (C-5), 125.80 (C-7a), 127.34 (C-2'', C-6''), 127.52 (C-2', C-6'), 128.12 (C-1'), 128.76 (C-4'), 128.91 (C-3a), 129.10 (C-3'', C-5''), 132.01 (C-1'), 144.57 (C-7), 145.54 (C-3), 160.09 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₇H₂₈ON₅⁺ [M+H]⁺: 438.2288

Ευρεθέν: 438.2286

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-καρβονιτρίλιο (66)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **63** σε απόδοση 86% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 153-155 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.33 (brs, 4H, H-3'', H-5''), 3.74 (s, 3H, -OCH₃), 3.93 (brs, 4H, H-2'', H-6''), 5.82 (s, 2H, -CH₂-), 6.81 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.21 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.7 Hz), 7.44 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.50 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.6 Hz), 7.86 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.3 Hz), 8.01 (s, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 51.05 (C-3'', C-5''), 53.63 (-CH₂-), 55.24 (-OCH₃), 66.44 (C-2'', C-6''), 114.14 (C-3', C-5'), 118.50 (-CN), 118.68 (C-4), 121.39 (C-5), 127.47 (C-2'', C-6''), 127.56 (C-7a), 128.55 (C-2', C-6'), 128.63 (C-1'), 129.11 (C-4'', C-3'', C-5''), 131.53 (C-1'), 132.31 (C-3a), 146.51 (C-3), 150.49 (C-7), 159.30 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₅H₂₄O₂N₅⁺ [M+H]⁺: 426.1925

Ευρεθέν: 426.1926

**1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-
πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμίδίνη (67)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **64** σε απόδοση 40% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα-μεθανόλη 9.5-0.5. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 139-141 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 3.66 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.69 (s, 3H, 4'''-OCH₃), 3.73 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 6.25 (brs, 2H, -CH₂-), 6.79 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.4 Hz), 6.95 (brs, 2H, H-2'', H-6''), 7.20 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.4 Hz), 7.27 (t, 1H, H-4'', *J*=6.8 Hz), 7.32 (t, 1H, H-4 aniline, *J*=6.9 Hz), 7.36-7.43 (m, 4H, H-3'', H-5'', H-2, H-6 aniline), 7.47 (t, 2H, H-3, H-5 aniline, *J*=6.9 Hz), 8.17 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=6.5 Hz), 8.95 (brs, 1H, D₂O exchange, -NH-), 9.06 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 56.50 (4'-OCH₃), 57.47 (-CH₂-, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 61.64 (4'''-OCH₃), 99.90 (C-2'', C-6''), 112.19 (C-4), 115.99 (C-3', C-5'), 126.57 (C-2, C-6 aniline), 129.00 (C-4 aniline), 129.26 (C-2'', C-6''), 130.12 (C-4''), 130.44 (C-2', C-6'), 130.61 (C-3'', C-5'', C-7a), 131.26 (C-1'), 131.76 (C-3, C-5 aniline), 132.45 (C-3a), 133.48 (C-1''), 134.66 (C-5), 135.57 (C-4''), 138.23 (C-1'''), 139.89 (C-1 aniline), 143.22 (C-7), 147.12 (C-3), 155.09 (C-3'', C-5''), 159.55 (-CNH-), 161.37 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₆H₃₅O₄N₆⁺ [M+H]⁺: 615.2714

Ευρεθέν: 615.2678

**1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-
πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (68)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **64** σε απόδοση 36% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 128-130 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 3.69 (s, 3H, 4'''-OCH₃), 3.77 (s, 9H, 4'-OCH₃, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 6.07 (brs, 2H, -CH₂-), 6.70 (brs, 2H, H-2'', H-6''), 6.99 (brs, 2H, H-3', H-5'), 7.22-7.36 (m, 4H, H-2', H-6', H-2, H-6 aniline), 7.42-7.54 (m, 3H, H-4'', H-4, H-5 aniline), 7.57 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.5 Hz), 8.06 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.6 Hz), 8.55 (brs, 1H, H-4 pyrazolopyridine).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 56.62 (4'-OCH₃), 56.94 (-CH₂-), 57.43 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 61.66 (4'''-OCH₃), 100.05 (C-2'', C-6''), 108.19 (C-4), 116.51 (C-3', C-5'), 120.58 (C-2 aniline), 124.48, 125.87, 126.87 (C-3 aniline), 127.75 (C-6 aniline), 127.82 (C-3a), 128.03 (C-1'), 128.53 (C-3 aniline), 129.10 (C-2'', C-6''), 129.26 (C-1'), 130.19 (C-2', C-6'), 130.36 (C-4 aniline), 130.63 (C-7a), 130.87 (C-3'', C-5''), 132.00 (C-4'', C-5 aniline), 133.01 (-CF₃), 134.46 (C-3 aniline, C-5), 134.65 (C-1'''), 135.87 (C-4'''), 136.34 (C-1 aniline), 142.81 (C-7), 146.42 (C-3), 155.41 (C-3'', C-5''), 161.76 (C-4'), 169.01 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₇H₃₄O₄N₆F₃⁺ [M+H]⁺: 683.2588

Ευρεθέν: 683.2575

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (69)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **64** σε απόδοση 40% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 136-138 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 2.26 (s, 3H, -CH₃), 2.49 (t, 4H, H-3, H-5 piperazine, *J*=4.7 Hz), 3.14 (t, 4H, H-2, H-6 piperazine, *J*=4.7 Hz), 3.69 (s, 3H, 4'''-OCH₃), 3.70 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.74 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 6.15 (s, 2H, -CH₂-), 6.83-6.90 (m, 4H, H-2'', H-6'', H-3, H-5 aniline), 6.93 (d, 2H, H-2, H-6 aniline, *J*=8.7 Hz), 7.05 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.4 Hz), 7.25 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.4 Hz), 7.33 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.45 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.6 Hz), 8.10 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.6 Hz), 8.37 (brs, 1H, D₂O exchange, -NH-), 8.80 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 47.30 (-CH₃), 51.18 (C-2, C-6 piperazine), 56.61 (4'-OCH₃), 56.95 (C-3, C-5 piperazine, -CH₂-), 57.41 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 61.65 (4'''-OCH₃), 99.78 (C-2'', C-6''), 108.30 (C-4), 116.44 (C-3', C-5'), 118.79 (C-3, C-5 aniline), 124.72 (C-2, C-6 aniline), 129.10 (C-2'', C-6'', C-1'), 130.19 (C-2', C-6', C-1'), 130.35 (C-4'), 130.78 (C-3'', C-5'', C-7a), 131.15 (C-3a), 134.49 (C-5), 135.65 (C-4'''), 138.10 (C-1'''), 141.93 (C-4 aniline), 142.65 (C-7), 146.38 (C-3), 149.57 (C-1 aniline), 155.33 (C-3'', C-5''), 155.55 (-CNH-), 161.71 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₄₁H₄₅O₄N₈⁺ [M+H]⁺: 713.3558

Ευρεθέν: 713.3514

7-Κυκλοεξυλαμινο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (70)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **65** σε απόδοση 36% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα-μεθανόλη 9-1. Μπεζ άμορφο στερεό.

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 1.18-1.26 (m, 3H, cyclohexyl-H), 1.32-1.42 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.55-1.61 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.62-1.69 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.93-1.99 (m, 2H, cyclohexyl-H), 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 4.01-4.09 (m, 1H, H-1'''), 5.36 (d, 1H, D₂O exchang., -NH- cyclohexylamine, *J*=6.5 Hz), 5.98 (s, 2H, -CH₂-), 6.96 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.4 Hz), 7.03-7.09 (m, 3H, H-2, H-6, H-4 aniline), 7.21 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.4 Hz), 7.34 (t, 2H, H-3, H-5 aniline, *J*=7.7 Hz), 7.43 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.55 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.6 Hz), 8.10 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.7 Hz), 8.47 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 26.47 (C-3''', C-5'''), 27.58 (C-4'''), 34.22 (C-2''', C-6'''), 51.51 (C-1'''), 56.68 (-OCH₃), 56.95 (-CH₂-), 105.32 (C-4), 116.43 (C-3', C-5'), 124.09 (C-2, C-6 aniline), 124.56 (C-4 aniline), 129.03 (C-2'', C-6''), 129.45 (C-3a), 129.74 (C-2', C-6'), 130.01 (C-4'), 130.57 (C-7a), 130.78 (C-3'', C-5''), 131.11 (C-3, C-5 aniline), 131.28 (C-1'), 134.88 (C-1''), 142.37 (C-5), 145.56 (C-7), 145.98 (C-3), 151.11 (C-1 aniline), 155.77 (-CNH-), 161.72 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₃H₃₅ON₆⁺ [M+H]⁺: 531.2867

Ευρεθέν: 531.2866

7-Κυκλοεξυλαμινο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (71)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **65** σε απόδοση 32% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1. Μπεζ έλαιο.

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 1.21-1.26 (m, 3H, cyclohexyl-H), 1.27-1.35 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.52-1.57 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.58-1.64 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.90-1.96 (m, 2H, cyclohexyl-H), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 3.77-3.79 (m, 1H, H-1'''), 5.87 (s, 2H, -CH₂-), 5.96 (d, 1H, D₂O exchang., -NH- cyclohexylamine, *J*=9.0 Hz), 6.82 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.20-7.28 (m, 4H, H-2', H-6', H-2, H-6 aniline), 7.30 (d, 1H, H-4 aniline, *J*=7.6 Hz), 7.45 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.52 (t, 1H, H-5 aniline, *J*=7.8 Hz), 7.56 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.7 Hz), 8.03 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=8.0 Hz), 8.66 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 26.49 (C-3''', C-5'''), 27.61 (C-4'''), 34.26 (C-2''', C-6'''), 55.49 (-CH₂-), 56.44 (-OCH₃), 56.68 (C-1'''), 110.38 (C-4), 115.63 (C-3', C-5'), 120.28 (C-4 aniline), 120.42 (C-2 aniline), 125.61, 127.41 (C-3 aniline), 127.61 (C-6 aniline), 128.99 (C-3 aniline), 129.06 (C-2'', C-6''), 129.75 (C-3a), 130.34 (C-4'), 130.80 (C-7a), 130.87 (C-3'', C-5''), 131.03 (C-2', C-6'), 131.61 (C-1'), 131.96 (C-5 aniline), 132.76, 132.97, 133.16 (-CF₃), 134.16 (C-5), 134.67 (C-1''), 147.61 (C-3), 151.50 (C-7), 153.94 (C-1 aniline), 155.15 (-CNH-), 161.19 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₄H₃₄ON₆F₃⁺ [M+H]⁺: 599.2741

Ευρεθέν: 599.2753

7-Κυκλοεξυλαμινο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (72)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **65** σε απόδοση 36% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 133-135 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 1.21-1.26 (m, 3H, cyclohexyl-H), 1.27-1.35 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.52-1.57 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.58-1.64 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.90-1.96 (m, 2H, cyclohexyl-H), 2.27 (s, 3H, -CH₃), 2.51 (t, 4H, H-3, H-5 piperazine, *J*=4.5 Hz), 3.15 (t, 4H, H-2, H-6 piperazine, *J*=4.5 Hz), 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 3.88-3.98 (m, 1H, H-1'''), 5.67 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-cyclohexylamine), 6.03 (s, 2H, -CH₂-), 6.88-6.99 (m, 4H, H-3', H-5', H-2, H-6 aniline), 7.11 (brs, 2H, H-3, H-5 aniline), 7.19 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.5 Hz), 7.39 (t, 1H, H-4'', *J*=7.2 Hz), 7.51 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.5 Hz), 8.21 (brs, 2H, H-2'', H-6''), 8.71 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 26.50 (C-3''', C-5'''), 27.60 (C-4'''), 34.25 (C-2''', C-6'''), 47.35 (-CH₃), 51.36 (C-1''', C-2, C-6 piperazine), 56.68 (-OCH₃), 56.93 (-CH₂-), 57.04 (C-3, C-5 piperazine), 105.74 (C-4), 116.44 (C-3, C-5 aniline), 118.88 (C-3', C-5'), 124.56 (C-2, C-6 aniline), 129.02 (C-2'', C-6''), 129.53 (C-3a), 129.75 (C-2', C-6'), 130.00 (C-4'), 130.47 (C-7a), 130.78 (C-3'', C-5''), 131.30 (C-1'), 134.43 (C-4 aniline), 134.96 (C-1''), 142.97 (C-5), 145.47 (C-7), 145.91 (C-3), 149.58 (C-1 aniline), 156.79 (-CNH-), 161.60 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₈H₄₅ON₈⁺ [M+H]⁺: 629.3711

Ευρεθέν: 629.3770

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (73)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **66** σε απόδοση 96% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα-μεθανόλη 8-2. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 150-152 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 3.36 (brs, 4H, H-3''', H-5'''), 3.69 (s, 3H, -OCH₃), 3.86 (brs, 4H, H-2''', H-6'''), 5.82 (s, 2H, -CH₂-), 6.83 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.7 Hz), 7.15 (t, 1H, H-4 aniline, *J*=6.9 Hz), 7.24-7.37 (m, 7H, H-2, H-6 aniline, H-2', H-6', H-3, H-5 aniline, H-4''), 7.41 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.6 Hz), 8.15 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=6.7 Hz), 9.11 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 52.99 (C-3''', C-5'''), 55.48 (-CH₂-), 56.50 (-OCH₃), 68.03 (C-2''', C-6'''), 115.17 (C-4), 115.78 (C-3', C-5'), 126.42 (C-2, C-6 aniline), 128.18 (C-4 aniline), 129.42 (C-2'', C-6''), 130.22 (C-3a), 130.48 (C-4'', C-7a), 130.70 (C-2', C-6'), 130.84 (C-3'', C-5''), 131.27 (C-1'), 131.57 (C-3, C-5 aniline), 133.62 (C-1''), 134.72 (C-5), 141.76 (C-1 aniline), 148.31 (C-3), 150.98 (C-7), 159.06 (-CNH-), 161.22 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₁H₃₁O₂N₆⁺ [M+H]⁺: 519.2503

Ευρεθέν: 519.2498

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (74)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **66** σε απόδοση 81% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα-μεθανόλη 9-1. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 114-116 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 3.35 (brs, 4H, H-3''', H-5'''), 3.71 (s, 3H, -OCH₃), 3.91 (brs, 4H, H-2''', H-6'''), 5.86 (s, 2H, -CH₂-), 6.84 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.4 Hz), 7.28 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.4 Hz), 7.35-7.60 (m, 7H, H-4'', H-2, H-6, H-4 aniline, H-3'', H-5'', H-5 aniline), 8.12 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.2 Hz), 9.00 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 52.96 (C-3''', C-5'''), 55.34 (-CH₂-), 56.47 (-OCH₃), 68.04 (C-2''', C-6'''), 113.54 (C-4), 115.71 (C-3', C-5'), 121.95 (C-4 aniline), 122.45 (C-2 aniline), 125.29, 127.09 (C-3 aniline), 129.06 (C-6 aniline), 129.22 (C-2'', C-6''), 130.41 (C-4'', C-3a), 130.51 (C-7a), 130.60 (C-2', C-6'), 130.80 (C-3'', C-5''), 131.33 (C-1'), 132.25 (C-5 aniline), 132.62, 132.83, 133.04,

133.25 (-CF₃), 133.98 (C-5), 134.38 (C-1'), 147.93 (C-3), 150.54 (C-7, C-1 aniline), 157.45 (-CNH-), 161.12 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₂H₃₀O₂N₆F₃⁺ [M+H]⁺: 587.2377

Ευρεθέν: 587.2377

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμίδίνη (75)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **66** σε απόδοση 60% με μέθοδο ανάλογη της μεθόδου Γ που περιγράφηκε για το παράγωγο **17** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 103-105 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 2.32 (s, 3H, -CH₃), 2.59 (t, 4H, H-3, H-5 piperazine, *J*=4.9 Hz), 3.18 (t, 4H, H-2, H-6 piperazine, *J*=4.9 Hz), 3.39 (t, 4H, H-3'', H-5'', *J*=4.6 Hz), 3.72 (s, 3H, -OCH₃), 3.95 (t, 4H, H-2'', H-6'', *J*=4.6 Hz), 5.90 (s, 2H, -CH₂-), 6.84 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.8 Hz), 6.96 (d, 2H, H-3, H-5 aniline, *J*=8.8 Hz), 7.02 (d, 2H, H-2, H-6 aniline, *J*=8.8 Hz), 7.28 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 7.43 (t, 1H, H-4'', *J*=7.4 Hz), 7.54 (t, 2H, H-3'', H-5'', *J*=7.7 Hz), 8.07 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=7.6 Hz), 8.89 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆) δ (ppm) 46.99 (-CH₃), 50.72 (C-2, C-6 piperazine), 53.04 (C-3'', C-5''), 55.40 (-CH₂-), 56.47 (-OCH₃), 56.69 (C-3, C-5 piperazine), 68.11 (C-2'', C-6''), 112.66 (C-4), 115.74 (C-3', C-5'), 118.71 (C-3, C-5 aniline), 125.54 (C-2, C-6 aniline), 129.19 (C-2'', C-6'', C-3a), 130.44 (C-4'), 130.68 (C-2', C-6'), 130.76 (C-7a), 130.88 (C-3'', C-5''), 131.50 (C-1'), 134.23 (C-1'), 134.29 (C-5), 139.39 (C-4 aniline), 147.87 (C-3), 150.18 (C-1 aniline), 150.56 (C-7), 156.74 (-CNH-), 161.19 (C-4').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₆H₄₁O₂N₈⁺ [M+H]⁺: 617.3347

Ευρεθέν: 617.3340

3-Φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμίδίνη (76)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **67** σε απόδοση 90% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 230-232 °C (Et₂O).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 3.74 (s, 3H, 4''-OCH₃), 3.80 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 7.33 (s, 2H, H-2'', H-6''), 7.46-7.53 (m, 4H, H-4', H-2''', H-6''', H-4'''), 7.56 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.6$ Hz), 7.61 (t, 2H, H-3''', H-5''', $J=7.6$ Hz), 7.99 (d, 2H, H-2', H-6', $J=7.5$ Hz), 8.36 (brs, 1H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 56.62 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 61.32 (4''-OCH₃), 98.63 (C-2'', C-6''), 110.53 (C-4), 125.83 (C-3a), 126.58 (C-4''', C-2''', C-6'''), 128.42 (C-2', C-6'), 129.38 (C-1'), 130.10 (C-7a), 130.23 (C-4'), 130.35 (C-3', C-5'), 131.57 (C-3''', C-5'''), 134.51 (C-4'), 134.80 (C-5), 136.18 (C-1'''), 137.56 (C-1''), 140.15 (C-7), 146.12 (C-3), 154.58 (C-3'', C-5''), 163.22 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_6^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 495.2139

Ευρεθέν: 495.2134

3-Φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (77)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **68** σε απόδοση 90% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 5-5. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 142-144 °C (Et_2O).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 3.74 (s, 3H, 4''-OCH₃), 3.82 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 7.19 (s, 2H, H-2'', H-6''), 7.37-7.47 (m, 4H, H-2''', H-6''', H-4''', H-4'), 7.50 (t, 2H, H-3', H-5', $J=7.6$ Hz), 7.59 (t, 1H, H-5''', $J=7.8$ Hz), 7.97 (d, 2H, H-2', H-6', $J=7.5$ Hz), 8.31 (brs, 1H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 56.62 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 61.33 (4''-OCH₃), 98.15 (C-2'', C-6''), 107.68 (C-4), 121.33 (C-2'''), 122.07 (C-4'''), 124.75 (C-3a), 124.96, 126.55 (C-3'''), 128.21 (C-2', C-6', C-6'''), 129.80 (C-4'), 130.16 (C-3', C-5'), 130.67 (C-7a), 131.64 (C-5'''), 132.75 (-CF₃, C-1'), 132.90 (-CF₃), 132.96 (-CF₃, C-5), 133.17 (-CF₃), 134.41 (C-4'), 137.97 (C-1''), 139.58 (C-7), 143.84 (C-3), 148.68 (C-1'''), 154.60 (C-3'', C-5''), 159.37 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{N}_6\text{F}_3^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 563.2013

Ευρεθέν: 563.2010

3-Φαινυλο-7-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (78)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **69** σε απόδοση 90% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία

στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 165-167 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.49 (s, 3H, -CH₃), 2.79 (t, 4H, H-3, H-5 piperazine, *J*=4.0 Hz), 3.35 (t, 4H, H-2, H-6 piperazine, *J*=4.0 Hz), 3.74 (s, 3H, 4''-OCH₃), 3.78 (s, 6H, 3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 7.14 (d, 2H, H-3''', H-5''', *J*=8.7 Hz), 7.28 (s, 2H, H-2'', H-6''), 7.33 (d, 2H, H-2''', H-6''', *J*=8.7 Hz), 7.46 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.54 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.6 Hz), 7.97 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.5 Hz), 8.31 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 45.61 (-CH₃), 48.91 (C-2, C-6 piperazine), 55.60 (C-3, C-5 piperazine), 56.62 (3''-OCH₃, 5''-OCH₃), 61.33 (4''-OCH₃), 98.51 (C-2'', C-6''), 110.25 (C-4), 118.21 (C-3''', C-5'''), 123.94 (C-3a), 127.03 (C-4'''), 127.51 (C-2''', C-6'''), 128.36 (C-2', C-6'), 130.17 (C-4'), 130.31 (C-3', C-5', C-7a), 132.30 (C-1'), 134.24 (C-5), 134.70 (C-4'), 137.57 (C-1'), 141.18 (C-7), 146.09 (C-3), 152.54 (C-1'''), 154.54 (C-3'', C-5''), 163.07 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₃H₃₇O₃N₈⁺ [M+H]⁺: 593.2983

Ευρεθέν: 593.2950

7-Κυκλοεξυλαμινο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (79)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **70** σε απόδοση 97% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 165-167 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 1.30-1.38 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.39-1.47 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.48-1.57 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.67-1.73 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.80-1.87 (m, 2H, cyclohexyl-H), 2.13-2.19 (m, 2H, cyclohexyl-H), 4.31-4.38 (m, 1H, H-1'), 7.42-7.50 (m, 4H, H-4', H-2''', H-6''', H-4'''), 7.53 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.7 Hz), 7.59 (t, 2H, H-3''', H-5''', *J*=7.8 Hz), 7.98 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.4 Hz), 8.26 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 26.00 (C-3'', C-5''), 26.97 (C-4'), 34.03 (C-2'', C-6''), 50.30 (C-1'), 107.46 (C-4), 126.22 (C-3a), 126.76 (C-4''', C-2''', C-6'''), 128.32 (C-2', C-6'), 129.85 (C-4'), 129.98 (C-7a), 130.21 (C-3', C-5'), 131.44 (C-1', C-3''', C-5'''), 134.46 (C-5), 136.61 (C-1'''), 146.35 (C-3), 147.13 (C-7), 162.37 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₅H₂₇N₆⁺ [M+H]⁺: 411.2292

Ευρεθέν: 411.2299

7-Κυκλοεξυλαμινο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (80)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **71** σε απόδοση 97% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3 έως 5-5. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 102-104 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 1.31-1.37 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.38-1.47 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.48-1.57 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.66-1.73 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.80-1.87 (m, 2H, cyclohexyl-H), 2.11-2.18 (m, 2H, cyclohexyl-H), 4.23 (brs, 1H, H-1''), 7.33 (d, 1H, H-2''', J=7.5 Hz), 7.35-7.40 (m, 2H, H-6''', H-4'''), 7.43-7.47 (m, 1H, H-4'), 7.52-7.60 (m, 3H, H-3', H-5', H-5'''), 8.03 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.0 Hz), 8.47 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 26.10 (C-3'', C-5''), 26.80 (C-4''), 34.81 (C-2'', C-6''), 54.27 (C-1''), 108.18 (C-4), 119.72 (C-2'''), 121.35 (C-4'''), 124.87 (C-3a), 125.62, 126.68 (C-3'''), 127.80 (C-6'''), 128.29 (C-2', C-6'), 129.88 (C-4'), 130.11 (C-7a), 130.24 (C-3', C-5'), 131.51 (C-5'''), 132.05 (C-1'), 132.71, 132.88, 133.10, 133.20 (-CF₃), 134.41 (C-5), 146.25 (C-3), 150.12 (C-1'''), 151.15 (C-7), 158.48 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₆H₂₆N₆F₃⁺ [M+H]⁺: 479.2166

Ευρεθέν: 479.2140

7-Κυκλοεξυλαμινο-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (81)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **72** σε απόδοση 97% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Καστανόχρωμο άμορφο στερεό.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 1.31-1.37 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.38-1.47 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.48-1.57 (m, 2H, cyclohexyl-H), 1.66-1.73 (m, 1H, cyclohexyl-H), 1.80-1.87 (m, 2H, cyclohexyl-H), 2.11-2.18 (m, 2H, cyclohexyl-H), 2.54 (s, 3H, -CH₃), 2.87 (t, 4H, H-3, H-5 piperazine, J=4.5 Hz), 3.37 (t, 4H, H-2, H-6 piperazine, J=4.5 Hz), 4.30-4.38 (m, 1H, H-1''), 7.15 (d, 2H, H-3''', H-5''', J=8.5 Hz), 7.35 (d, 2H, H-2''', H-6''', J=8.5 Hz), 7.45 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.54 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.5 Hz), 7.97 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.3 Hz), 8.25 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 25.98 (C-3'', C-5''), 26.95 (C-4''), 34.00 (C-2'', C-6''), 45.26 (-CH₃), 48.68 (C-2, C-6 piperazine), 50.30 (C-1''), 55.41 (C-3, C-5 piperazine), 107.40 (C-4), 118.34 (C-3''', C-5'''), 123.63 (C-3a), 127.24 (C-4'''),

127.80 (C-2'', C-6''), 128.35 (C-2', C-6'), 130.00 (C-4', C-7a), 130.23 (C-3', C-5'), 132.67 (C-1'), 134.13 (C-5), 146.57 (C-3), 148.28 (C-7), 152.35 (C-1''), 162.62 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₃₀H₃₇N₈⁺ [M+H]⁺: 509.3136

Ευρεθέν: 509.3128

7-(Μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-(*N*¹-φαινυλο)καρβοξαμιδίνη (82)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **73** σε απόδοση 99% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.6-0.4 έως 9.2-0.8. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 171-173 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.87 (t, 4H, H-2'', H-6'', *J*=4.5 Hz), 4.11 (t, 4H, H-3'', H-5'', *J*=4.5 Hz), 7.40 (d, 2H, H-2''', H-6''', *J*=7.6 Hz), 7.42-7.48 (m, 2H, H-4', H-4'''), 7.53-7.58 (m, 4H, H-3', H-5', H-3''', H-5'''), 7.90 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.8 Hz), 8.31 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 48.53 (C-3'', C-5''), 68.02 (C-2'', C-6''), 108.59 (C-4), 125.03 (C-3a), 125.75 (C-2'', C-6''), 127.93 (C-4'''), 128.26 (C-2', C-6'), 129.99 (C-4'), 130.32 (C-3', C-5'), 131.10 (C-3'', C-5'''), 131.37 (C-1'), 136.07 (C-1'''), 137.74 (C-5), 141.46 (C-7a), 142.50 (C-3), 150.41 (C-7), 160.68 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₃H₂₃ON₆⁺ [M+H]⁺: 399.1928

Ευρεθέν: 399.1949

7-(Μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (83)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **74** σε απόδοση 99% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.8-0.2 έως 9.4-0.6. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 149-151 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 3.84 (brs, 4H, H-2'', H-6''), 3.85 (brs, 4H, H-3'', H-5''), 7.33 (brs, 1H, H-6'''), 7.36-7.43 (m, 3H, H-4', H-2''', H-4'''), 7.44-7.50 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.52-7.57 (m, 1H, H-5'''), 7.88 (brs, 2H, H-2', H-6'), 8.25 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 48.62 (C-3'', C-5''), 67.97 (C-2'', C-6''), 107.56 (C-4), 121.22 (C-2'''), 121.67 (C-4'''), 124.74 (C-3a), 125.91, 126.54 (C-3'''), 128.13 (C-6'''), 128.20 (C-2', C-6'), 129.71 (C-4'), 130.19 (C-3', C-5'), 131.52 (C-5'''), 132.06 (C-1'), 132.63, 132.84, 133.06, 133.27 (-CF₃), 136.36 (C-5), 139.28 (C-7a), 143.05 (C-3), 149.48 (C-7), 149.64 (C-1'''), 158.91 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₄H₂₂ON₆F₃⁺ [M+H]⁺: 467.1802

Ευρεθέν: 467.1802

7-(Μορφολιν-4-υλο)-3-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-5-{*N*¹-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλο]}καρβοξαμιδίνη (84)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **75** σε απόδοση 99% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **26** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη-τριαιθυλαμίνη 8-2-0.01. Καστανόχρωμο στερεό. Σ.τ.: 178-180 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 2.38 (s, 3H, -CH₃), 2.65 (brs, 4H, H-3, H-5 piperazine), 3.35 (brs, 4H, H-2, H-6 piperazine), 3.89 (brs, 4H, H-2'', H-6''), 4.18 (brs, 4H, H-3'', H-5''), 7.13 (d, 2H, H-3''', H-5''', *J*=8.0 Hz), 7.31 (d, 2H, H-2''', H-6''', *J*=8.0 Hz), 7.50 (t, 1H, H-4', *J*=7.2 Hz), 7.59 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.2 Hz), 7.92 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=6.8 Hz), 8.33 (brs, 1H, H-4).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD) δ (ppm) 46.10 (-CH₃), 48.41 (C-3'', C-5''), 49.47 (C-2, C-6 piperazine), 55.88 (C-3, C-5 piperazine), 68.11 (C-2'', C-6''), 109.32 (C-4), 118.05 (C-3''', C-5'''), 124.46 (C-3a), 127.44 (C-4'''), 127.72 (C-2''', C-6'''), 128.42 (C-2', C-6'), 130.33 (C-4'), 130.51 (C-3', C-5'), 133.79 (C-1'), 138.48 (C-5), 139.90 (C-7a), 142.22 (C-3), 151.19 (C-7), 152.71 (C-1'''), 162.56 (-CNH-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₈H₃₃ON₈⁺ [M+H]⁺: 497.2772

Ευρεθέν: 497.2746

IV.3 Πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνες

IV.3A 3-αρυλαμινοϋποκατεστημένα παράγωγα ουρίας (100-110)

3,5-Δινιτρο-6-μεθυλοπυριδιν-2-αμίνη (86)⁴⁸⁰

Η 2-αμινο-6-μεθυλοπυριδίνη (**85**) (5.50 g, 50.92 mmol) διαλύεται σε πυκνό θειικό οξύ (50 ml) υπό ψύξη. Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην υπό ψύξη μίγμα

θεικού-νιτρικού οξέος (8 ml από το κάθε οξύ) και το διάλυμα θερμαίνεται στους 60 °C για 5 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, απόχυση του μίγματος σε πάγο και διήθηση υπό κενό του στερεού προϊόντος **86** (6.37 g, 64%). Σ.τ.: 176 °C (EtOH) (Βιβλ.⁴⁸⁰ 174-175 °C).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.72 (s, 3H, -CH₃), 8.55 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-), 8.97 (s, 1H, H-4), 9.06 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

6-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2,3-διαμίνη (87)⁵⁰¹

Σε εναιώρημα του παραγώγου **86** (5.50 g, 27.78 mmol) εντός μεθανόλης (230 ml) προστίθεται υδατικό διάλυμα θειούχου αμμωνίου 20% (47.70 ml) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Στη συνέχεια, το ερυθρού χρώματος προκύπτον μίγμα φέρεται σε βρασμό για 1 ώρα. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό, στο υπόλειμμα προστίθεται νερό και πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Το στερεό καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 4-6 και λαμβάνεται το παράγωγο **87** (4.30 g, 92%). Σ.τ.: 231-232 °C με αποσύνθεση (EtOAc) (Βιβλ.⁵⁰¹ 231-232 °C).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.52 (s, 3H, -CH₃), 5.10 (brs, 2H, D₂O exchang., 3-NH₂), 6.89 (brs, 2H, D₂O exchang., 2-NH₂), 7.39 (s, 1H, H-4).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 24.19 (-CH₃), 112.43 (C-4), 128.07 (C-3), 134.71 (C-5), 143.62 (C-6), 151.64 (C-2).

6-Μεθυλο-7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3(4*H*)-όνη (88)³³⁵

Σε εναιώρημα του παραγώγου **87** (3.50 g, 20.83 mmol) εντός απόλυτης αιθανόλης (60 ml) και σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται γλυοξαλικός αιθυλεστέρας (50% διάλυμα σε τολουόλιο) (4.27 ml, 22.91 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 3 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 6-4 και λαμβάνεται το παράγωγο **88** (3.30 g, 77%). Σ.τ.: 206-207 °C (EtOAc) (Βιβλ.³³⁵ 206-207 °C).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.81 (s, 3H, -CH₃), 8.29 (s, 1H, H-2), 8.79 (s, 1H, H-8), 13.27-13.37 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 24.06 (-CH₃), 124.79 (C-8a), 133.34 (C-8), 140.99 (C-7), 145.65 (C-4a), 154.46 (C-2), 155.10 (C-6), 156.48 (C-3).

3-Χλωρο-6-μεθυλο-7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζίνη (89)³³⁵

Σε εναιώρημα του παραγώγου **88** (410 mg, 2 mmol) εντός χλωροφορμίου (8 ml), υπό αργό, προστίθεται τριαιθυλαμίνη (0.28 ml, 2 mmol) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, στο ερυθρού χρώματος προκύπτον μίγμα προστίθεται οξυχλωριούχος φώσφορος (0.37 ml, 4 mmol) στάγδην και ακολουθεί θέρμανση στους 65 °C για 2 ώρες. Κατόπιν, το μίγμα, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na₂SO₄) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.8-0.2 και λαμβάνεται το παράγωγο **89** (400 mg, 89%). Σ.τ.: 132 °C (Et₂O) (Βιβλ.³³⁵ 132 °C).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.01 (s, 3H, -CH₃), 8.92 (s, 1H, H-2), 8.98 (s, 1H, H-8).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 24.64 (-CH₃), 133.84 (C-8a), 134.74 (C-8), 145.93 (C-7), 147.89 (C-2), 150.05 (C-4a), 153.40 (C-3), 158.11 (C-6).

6-Μεθυλο-7-νιτρο-*N*-φαινυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-αμίνη (90)

Σε διάλυμα του παραγώγου **89** (110 mg, 0.49 mmol) εντός απόλυτης αιθανόλης (5 ml) και σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται ανιλίνη (0.10 ml, 1.08 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 1 ώρα. Το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9-1 έως 6-4 και λαμβάνεται το παράγωγο **90** (110 mg, 80%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C με αποσύνθεση (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.85 (s, 3H, -CH₃), 7.15 (t, 1H, H-4', *J*=7.3 Hz), 7.43 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.8 Hz), 7.98 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.8 Hz), 8.62 (s, 1H, H-2), 8.77 (s, 1H, H-8), 10.63 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 24.52 (-CH₃), 119.99 (C-2', C-6'), 123.87 (C-4'), 128.31 (C-8a), 129.06 (C-3', C-5'), 133.62 (C-8), 138.96 (C-1'), 141.50 (C-7), 144.18 (C-2), 152.20 (C-4a), 153.20 (C-3), 155.46 (C-6).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₄H₁₂O₂N₅⁺ [M+H]⁺: 282.0986

Ευρεθέν: 282.0980

6-Μεθυλο-7-νιτρο-*N*-(3,4,5-τριμεθοξυ)φαινυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-αμίνη (91)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **89** σε απόδοση 85% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **90** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία

στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 5-5. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 266-268 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.87 (s, 3H, -CH₃), 3.68 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.83 (s, 6H, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 7.37 (s, 2H, H-2', H-6'), 8.63 (s, 1H, H-2), 8.80 (s, 1H, H-8), 10.59 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 24.56 (-CH₃), 55.92 (3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 60.11 (4'-OCH₃), 98.39 (C-2', C-6'), 128.19 (C-8a), 133.38 (C-8), 134.72 (C-1', C-4'), 141.35 (C-7), 143.88 (C-2), 152.04 (C-4a), 152.79 (C-3', C-5'), 153.02 (C-3), 155.26 (C-6).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₇H₁₈O₅N₅⁺ [M+H]⁺: 372.1303

Ευρεθέν: 372.1292

***N*-{6-Μεθυλο-7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-υλο}-3-αμινοακετανιλίδιο (92)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **89** σε απόδοση 87% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **90** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.08 (s, 3H, -COCH₃), 2.88 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 7.27 (d, 1H, H-4', *J*=5.8 Hz), 7.36 (t, 1H, H-5', *J*=7.5 Hz), 7.97 (d, 1H, H-6', *J*=6.3 Hz), 8.11 (s, 1H, H-2'), 8.69 (s, 1H, H-2), 8.81 (s, 1H, H-8), 10.06 (brs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 10.66 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 23.96 (-COCH₃), 24.29 (-CH₃ pyridine), 110.56 (C-2'), 114.66 (C-4'), 114.76 (C-6'), 128.18 (C-8a), 129.01 (C-5'), 133.42 (C-8), 139.00 (C-3'), 139.65 (C-1'), 141.37 (C-7), 144.12 (C-2), 152.06 (C-4a), 153.11 (C-3), 155.16 (C-6), 168.37 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₆H₁₅O₃N₆⁺ [M+H]⁺: 339.1200

Ευρεθέν: 339.1192

***N*-{6-Μεθυλο-7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-υλο}-4-αμινοακετανιλίδιο (93)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **89** σε απόδοση 88% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **90** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Ερυθρό στερεό. Σ.τ.: 186-188 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.05 (s, 3H, -COCH₃), 2.87 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 7.64 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 7.94 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.8 Hz), 8.75 (s, 1H, H-2), 8.78 (s, 1H, H-8), 10.06 (brs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 10.92 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 23.81 (-COCH₃), 24.37 (-CH₃ pyridine), 119.33 (C-2', C-6'), 120.26 (C-3', C-5'), 128.08 (C-8a), 133.32 (C-8), 133.95 (C-4'), 135.38 (C-1'), 141.07 (C-7), 144.20 (C-2), 152.34 (C-4a), 152.91 (C-3), 155.17 (C-6), 168.00 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₆H₁₅O₃N₆⁺ [M+H]⁺: 339.1200

Ευρεθέν: 339.1194

***N*-{6-Μεθυλο-7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-υλο}-4-αμινοβενζοϊκός αιθυλεστέρας (94)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **89** σε απόδοση 98% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **90** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.5-0.5. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 298-300 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 1.33 (t, 3H, -CH₂CH₃, *J*=7.1 Hz), 2.89 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 4.31 (q, 2H, -CH₂-, *J*=7.1 Hz), 8.02 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.5 Hz), 8.13 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.5 Hz), 8.71 (s, 1H, H-2), 8.85 (s, 1H, H-8), 10.95 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 14.16 (-CH₂CH₃), 24.26 (-CH₃ pyridine), 60.42 (-CH₂-), 119.10 (C-3', C-5'), 124.29 (C-4'), 128.65 (C-8a), 130.31 (C-2', C-6'), 133.63 (C-8), 141.85 (C-7), 143.28 (C-1'), 143.95 (C-2), 151.46 (C-4a), 152.83 (C-3), 155.33 (C-6), 165.25 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₇H₁₆O₄N₅⁺ [M+H]⁺: 354.1197

Ευρεθέν: 354.1188

6-Μεθυλο-*N*³-φαινυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3,7-διαμίνη (95)

Σε εναιώρημα του παραγώγου **90** (110 mg, 0.39 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (5 ml), υπό αργό, προστίθεται παλλάδιο επί άνθρακα (16 mg) και τριαιθυλοσιλάνιο (0.63 ml, 3.95 mmol) στάγδην και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ακολουθεί διήθηση από κελλίτη, συμπίκνωση του διηθήματος, καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή

φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.7-0.3 έως 9.2-0.8 και λαμβάνεται το παράγωγο **95** (80 mg, 82%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C με αποσύνθεση (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.49 (s, 3H, -CH₃), 5.41 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 6.98 (t, 1H, H-4', *J*=7.4 Hz), 7.27 (s, 1H, H-8), 7.35 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.9 Hz), 7.95 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.6 Hz), 8.42 (s, 1H, H-2), 9.70 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 21.45 (-CH₃), 114.83 (C-8), 118.09 (C-2', C-6'), 121.32 (C-4'), 128.71 (C-3', C-5'), 131.95 (C-8a), 139.44 (C-2), 140.79 (C-1'), 141.29 (C-7), 141.86 (C-4a), 149.02 (C-3), 150.99 (C-6).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₄H₁₄N₅⁺ [M+H]⁺: 252.1244

Ευρεθέν: 252.1238

6-Μεθυλο-*N*³-(3,4,5-τριμεθοξυ)φαινυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3,7-διαμίνη (96)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **91** σε απόδοση 68% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **95** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.6-0.4. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 265-267 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.48 (s, 3H, -CH₃), 3.65 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.81 (s, 6H, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 5.38 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 7.25 (s, 1H, H-8), 7.33 (s, 2H, H-2', H-6'), 8.37 (s, 1H, H-2), 9.61 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 21.57 (-CH₃), 55.85 (3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 60.11 (4'-OCH₃), 96.56 (C-2', C-6'), 114.77 (C-8), 131.87 (C-4'), 132.47 (C-8a), 136.81 (C-1'), 139.25 (C-2), 141.15 (C-7), 141.74 (C-4a), 148.99 (C-3), 150.88 (C-6), 152.77 (C-3', C-5').

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₇H₂₀O₃N₅⁺ [M+H]⁺: 342.1561

Ευρεθέν: 342.1555

***N*-{7-Αμινο-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-υλο}-3-αμινοακετανιλίδιο (97)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **92** σε απόδοση 81% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **95** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.3-0.7. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 239-241 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.07 (s, 3H, -COCH₃), 2.49 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 5.40 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 7.15 (d, 1H, H-4', *J*=8.6 Hz), 7.23-

7.28 (m, 2H, H-5', H-8), 7.91 (d, 1H, H-6', $J=8.1$ Hz), 7.99 (t, 1H, H-2', $J=2.0$ Hz), 8.44 (s, 1H, H-2), 9.70 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline), 9.95 (brs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 21.35 (-CH₃ pyridine), 23.96 (-COCH₃), 109.08 (C-2'), 112.63 (C-4'), 113.17 (C-6'), 114.84 (C-8), 128.76 (C-5'), 131.90 (C-8a), 139.48 (C-1'), 139.51 (C-2), 140.90 (C-3'), 141.20 (C-7), 141.81 (C-4a), 149.01 (C-3), 150.85 (C-6), 168.26 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₆H₁₇ON₆⁺ [M+H]⁺: 309.1458

Ευρεθέν: 309.1457

***N*-{7-Αμινο-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-υλο}-4-αμινοακετανιλίδιο (98)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **93** σε απόδοση 66% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **95** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.2-0.8 έως 9-1. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 275-277 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.03 (s, 3H, -COCH₃), 2.53 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 5.61 (brs, 2H, D₂O exchang., -NH₂), 7.43 (s, 1H, H-8), 7.57 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.8$ Hz), 7.88 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.8$ Hz), 8.50 (s, 1H, H-2), 9.93 (brs, 1H, D₂O exchang., -NHCO-), 10.02 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 20.12 (-CH₃ pyridine), 23.82 (-COCH₃), 117.42 (C-8), 118.83 (C-3', C-5'), 119.62 (C-2', C-6'), 131.63 (C-8a), 133.83 (C-1'), 135.60 (C-4'), 140.78 (C-2), 140.82 (C-4a), 141.19 (C-7), 149.24 (C-3, C-6), 167.95 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₆H₁₇ON₆⁺ [M+H]⁺: 309.1458

Ευρεθέν: 309.1451

***N*-{7-Αμινο-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-3-υλο}-4-αμινοβενζοϊκός αιθυλεστέρας (99)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **94** σε απόδοση 88% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **95** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.6-0.4 έως 9.4-0.6. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 257-259 °C (Et₂O).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 1.32 (t, 3H, -CH₂CH₃, $J=7.1$ Hz), 2.51 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 4.29 (q, 2H, -CH₂-, $J=7.1$ Hz), 5.52 (brs, 2H, D₂O exchang., -

NH₂), 7.29 (s, 1H, H-8), 7.95 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 8.06 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.8 Hz), 8.48 (s, 1H, H-2), 10.12 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 14.19 (-CH₂CCH₃), 21.42 (-CH₃ pyridine), 60.09 (-CH₂-), 114.28 (C-8), 117.06 (C-3', C-5'), 121.86 (C-4'), 130.25 (C-2', C-6'), 132.56 (C-8a), 139.27 (C-2), 141.28 (C-7), 141.82 (C-4a), 145.14 (C-1'), 148.14 (C-3), 151.48 (C-6), 165.42 (-CO-).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₁₇H₁₈O₂N₅⁺ [M+H]⁺: 324.1455

Ευρεθέν: 324.1448

***N*-{6-Μεθυλο-3-(φαινυλαμινο)πυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N*'-[4-(μεθυλοθειο)φαινυλ]ουρία (100)**

Σε διάλυμα του παραγώγου **95** (30 mg, 0.12 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (6 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, 4-(μεθυλοθειο)ισοκυανικός φαινυλεστέρας (0.03 ml, 0.18 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 20 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **100** (40 mg, 78%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 229-231 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.45 (s, 3H, -SCH₃), 2.66 (s, 3H, -CH₃), 7.05 (t, 1H, H-4', *J*=7.3 Hz), 7.25 (d, 2H, H-3'', H-5'', *J*=8.5 Hz), 7.39 (t, 2H, H-3', H-5', *J*=7.8 Hz), 7.47 (d, 2H, H-2'', H-6'', *J*=8.5 Hz), 8.00 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=7.9 Hz), 8.31 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.55 (s, 1H, H-2), 8.66 (s, 1H, H-8), 9.24 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 10.02 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH-aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 15.84 (-SCH₃), 21.82 (-CH₃), 118.64 (C-2', C-6'), 118.91 (C-2'', C-6''), 122.07 (C-4'), 124.91 (C-8), 127.70 (C-3'', C-5''), 128.71 (C-3', C-5'), 130.13 (C-4''), 130.19 (C-8a), 131.42 (C-7), 137.09 (C-1'), 140.10 (C-1'), 140.72 (C-2), 145.01 (C-4a), 150.78 (C-3), 152.50 (-CO-), 153.34 (C-6).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₂H₂₁ON₆S⁺ [M+H]⁺: 417.1492

Ευρεθέν: 417.1475

***N*-{6-Μεθυλο-3-(φαινυλαμινο)πυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-(2,4-διχλωροφαινυλ)ουρία (101)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **95** σε απόδοση 74% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 6-4. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.68 (s, 3H, -CH₃), 7.05 (t, 1H, H-4', *J*=7.3 Hz), 7.37-7.43 (m, 3H, H-3', H-5', H-5''), 7.65 (d, 1H, H-3'', *J*=2.3 Hz), 8.00 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.0 Hz), 8.20 (d, 1H, H-6'', *J*=8.9 Hz), 8.55 (s, 1H, H-2), 8.63 (s, 1H, H-8), 8.99 (d, 2H, D₂O exchang., -NHCONH-, *J*=7.8 Hz), 10.04 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 22.05 (-CH₃), 118.69 (C-2', C-6'), 122.13 (C-4'), 122.81 (C-6''), 122.98 (C-2''), 125.90 (C-8), 126.43 (C-4''), 127.55 (C-5''), 128.56 (C-3''), 128.72 (C-3', C-5'), 129.98 (C-8a), 130.90 (C-7), 134.99 (C-1''), 140.04 (C-1'), 140.84 (C-2), 145.32 (C-4a), 150.92 (C-3), 152.35 (-CO-), 153.63 (C-6).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₁H₁₇ON₆Cl₂⁺ [M+H]⁺: 439.0835

Ευρεθέν: 439.0815

***N*-{6-Μεθυλο-3-[(3,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)αμινο]πυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλ]ουρία (102)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **96** σε απόδοση 78% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.8-0.2 έως 9.4-0.6. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 222-224 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.65 (s, 3H, -CH₃), 3.66 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.83 (s, 6H, 3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 7.32-7.40 (m, 3H, H-4'', H-2', H-6'), 7.55 (t, 1H, H-5'', *J*=7.6 Hz), 7.61 (d, 1H, H-6'', *J*=7.6 Hz), 8.05 (brs, 1H, H-2''), 8.41 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.51 (s, 1H, H-2), 8.62 (s, 1H, H-8), 9.56 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 9.98 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 22.00 (-CH₃), 55.91 (3'-OCH₃, 5'-OCH₃), 60.13 (4'-OCH₃), 97.28 (C-2', C-6'), 114.03 (C-2''), 118.25 (C-4''), 121.74 (C-6''), 123.21, 125.02 (C-3''), 125.74 (C-8), 129.29, 129.44, 129.65, 129.83 (-CF₃), 130.00 (C-5''), 130.08 (C-8a), 130.95 (C-7), 133.11 (C-4'), 136.10 (C-1'), 140.30 (C-1''), 140.73 (C-2), 145.35 (C-4a), 150.94 (C-3), 152.61 (-CO-), 152.80 (C-3', C-5'), 153.77 (C-6).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₅H₂₄O₄N₆F₃⁺ [M+H]⁺: 529.1806

Ευρεθέν: 529.1782

***N*-{3-[(3-Ακεταμιδοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλ]ουρία (103)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **97** σε απόδοση 94% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.4-0.6 έως 9-1. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 218-220 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.08 (s, 3H, -COCH₃), 2.66 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 7.21 (d, 1H, H-6', *J*=8.0 Hz), 7.31 (t, 1H, H-5', *J*=8.1 Hz), 7.35 (d, 1H, H-4'', *J*=7.7 Hz), 7.55 (t, 1H, H-5'', *J*=8.0 Hz), 7.62 (d, 1H, H-6'', *J*=8.5 Hz), 7.97 (d, 1H, H-4', *J*=8.0 Hz), 8.05 (m, 2H, H-2', H-2''), 8.40 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.58 (s, 1H, H-2), 8.62 (s, 1H, H-8), 9.55 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 10.00 (brs, 1H, D₂O exchang., -NHCOCH₃), 10.05 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 21.76 (-CH₃ pyridine), 23.96 (-COCH₃), 109.62 (C-2'), 113.35 (C-6'), 113.74 (C-4'), 114.04 (C-2''), 118.26 (C-4''), 121.74 (C-6''), 123.21, 125.00 (C-3''), 125.84 (C-8), 128.85 (C-5'), 129.22, 129.43, 129.64, 129.85 (-CF₃), 129.99 (C-5''), 130.07 (C-8a), 130.96 (C-7), 139.55 (C-3'), 140.24 (C-1''), 140.30 (C-1'), 140.96 (C-2), 145.39 (C-4a), 150.97 (C-3), 152.61 (-NHCONH-), 153.75 (C-6), 168.29 (-COCH₃).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₄H₂₁O₂N₇F₃⁺ [M+H]⁺: 496.1703

Ευρεθέν: 496.1691

***N*-{3-[(3-Ακεταμιδοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ)ουρία (104)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **97** σε απόδοση 90% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.4-0.6 έως 9-1. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 225-227 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.07 (s, 3H, -COCH₃), 2.65 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 7.20 (d, 1H, H-6', *J*=8.2 Hz), 7.28-7.39 (m, 3H, H-5', H-5'', H-6''), 7.86 (dd, 1H, H-2'', *J*=2.5 Hz, *J*=6.8 Hz), 7.97 (d, 1H, H-4', *J*=8.3 Hz), 8.04 (t, 1H, H-2', *J*=2.0 Hz), 8.40 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.57 (s, 1H, H-2), 8.61 (s, 1H, H-8), 9.45 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 10.00 (brs, 1H, D₂O exchang., -NHCOCH₃), 10.05 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 21.83 (-CH₃ pyridine), 23.96 (-COCH₃), 109.61 (C-2'), 113.34 (C-6'), 113.73 (C-4'), 116.84, 116.98 (C-5'), 118.39, 118.43 (C-6'), 119.12, 119.24 (C-3'), 119.42 (C-2'), 125.65 (C-8), 128.84 (C-5'), 130.07 (C-8a), 131.06 (C-7), 136.74 (C-1'), 139.54 (C-3'), 140.25 (C-1'), 140.92 (C-2), 145.31 (C-4a), 150.94 (C-3), 151.59 (C-4'), 152.60 (-NHCONH-), 153.19 (C-4'), 153.67 (C-6), 168.29 (-COCH₃).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₃H₂₀O₂N₇FCI⁺ [M+H]⁺: 480.1346

Ευρεθέν: 480.1331

***N*-{3-[(4-Ακεταμιδοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-(3-τριφθορομεθυλο)φαινυλ)ουρία (105)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **98** σε απόδοση 83% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.2-0.8 έως 9-1. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 227-229 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.04 (s, 3H, -COCH₃), 2.68 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 7.34 (d, 1H, H-4', *J*=7.6 Hz), 7.54 (t, 1H, H-5', *J*=7.9 Hz), 7.58-7.66 (m, 3H, H-3', H-5', H-6'), 7.91 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 8.04 (brs, 1H, H-2'), 8.55 (s, 1H, H-2), 8.65 (brs, 2H, -CONH-pyridine, H-8), 9.93 (brs, 2H, D₂O exchang., -CONH-aryl, -NHCOCH₃), 10.11 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 21.62 (-CH₃ pyridine), 23.79 (-COCH₃), 113.90 (C-2'), 118.15 (C-4'), 119.16 (C-2', C-6'), 119.49 (C-3', C-5'), 121.61 (C-6'), 123.21, 125.02 (C-3'), 126.31 (C-8), 129.41, 129.62, 129.83 (-CF₃), 129.95 (C-5', C-8a), 130.87 (C-7), 134.16 (C-4'), 135.18 (C-1'), 140.38 (C-2), 141.19 (C-1'), 145.18 (C-4a), 150.89 (C-3), 152.69 (-NHCONH-), 153.23 (C-6), 167.83 (-COCH₃).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₄H₂₁O₂N₇F₃⁺ [M+H]⁺: 496.1703

Ευρεθέν: 496.1685

***N*-{3-[(4-Ακεταμιδοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ)ουρία (106)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **98** σε απόδοση 86% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.3-0.7 έως 9-1. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 233-235 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.04 (s, 3H, -COCH₃), 2.65 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 7.31-7.39 (m, 2H, H-5'', H-6''), 7.59 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.9 Hz), 7.86 (dd, 1H, H-2'', *J*=2.5 Hz, *J*=6.8 Hz), 7.90 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.9 Hz), 8.54 (s, 1H, H-2), 8.58 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.62 (s, 1H, H-8), 9.74 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 9.92 (brs, 1H, D₂O exchang., -NHCOCH₃), 10.06 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 21.73 (-CH₃ pyridine), 23.78 (-COCH₃), 116.82, 116.97 (C-5''), 118.28, 118.33 (C-6''), 119.10 (C-2', C-6'), 119.22, 119.25 (C-3''), 119.30 (C-2''), 119.49 (C-3', C-5'), 125.95 (C-8), 129.94 (C-8a), 130.91 (C-7), 134.10 (C-4'), 135.24 (C-1'), 136.81 (C-1''), 141.04 (C-2), 145.23 (C-4a), 150.85 (C-3), 151.54 (C-4''), 152.63 (-NHCONH-), 153.14 (C-4'), 153.30 (C-6), 167.82 (-COCH₃).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₃H₂₀O₂N₇FCl⁺ [M+H]⁺: 480.1346

Ευρεθέν: 480.1328

***N*-{3-[(4-Αιθοξυκαρβονυλοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N*'-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλ]ουρία (107)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **99** σε απόδοση 93% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 1.33 (t, 3H, -CH₂CH₃, *J*=7.1 Hz), 2.70 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 4.30 (q, 2H, -CH₂-, *J*=7.1 Hz), 7.35 (d, 1H, H-4'', *J*=7.7 Hz), 7.55 (t, 1H, H-5'', *J*=7.9 Hz), 7.62 (d, 1H, H-6'', *J*=8.6 Hz), 7.99 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.8 Hz), 8.05 (brs, 1H, H-2''), 8.12 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 8.51 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.61 (s, 1H, H-2), 8.69 (s, 1H, H-8), 9.71 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 10.43 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 14.16 (-CH₂CH₃), 21.91 (-CH₃ pyridine), 60.18 (-CH₂-), 113.96 (C-2''), 117.76 (C-2', C-6'), 118.24 (C-4''), 121.68 (C-6''), 122.71 (C-1'), 123.18, 124.99 (C-3''), 125.11 (C-8), 129.20, 129.41, 129.61, 129.83 (-CF₃), 129.96 (C-5''), 130.23 (C-3', C-5'), 130.63 (C-8a), 131.68 (C-7), 140.24 (C-1''), 140.71 (C-2), 144.51 (C-4'), 144.71 (C-4a), 150.28 (C-3), 152.53 (-NHCONH-), 153.96 (C-6), 165.34 (-COOCH₂CH₃).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₅H₂₂O₃N₆F₃⁺ [M+H]⁺: 511.1700

Ευρεθέν: 511.1679

***N*-{3-[(4-Αιθοξυκαρβονυλοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ)ουρία (108)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **99** σε απόδοση 96% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **100** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 1.33 (t, 3H, -CH₂CH₃, *J*=7.1 Hz), 2.68 (s, 3H, -CH₃ pyridine), 4.31 (q, 2H, -CH₂-, *J*=7.1 Hz), 7.31-7.39 (m, 2H, H-5'', H-6''), 7.87 (dd, 1H, H-2'', *J*=2.5 Hz, *J*=6.8 Hz), 8.00 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.8 Hz), 8.13 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 8.42 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.62 (s, 1H, H-2), 8.68 (s, 1H, H-8), 9.43 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 10.43 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 14.18 (-CH₂CH₃), 21.89 (-CH₃ pyridine), 60.22 (-CH₂-), 116.85, 116.99 (C-5''), 117.78 (C-2', C-6'), 118.43, 118.47 (C-6''), 119.14, 119.26 (C-3''), 119.46 (C-2''), 122.74 (C-1'), 125.06 (C-8), 130.25 (C-3', C-5'), 130.65 (C-8a), 131.75 (C-7), 136.64 (C-1''), 140.71 (C-2), 144.52 (C-4'), 144.69 (C-4a), 150.28 (C-3), 151.63 (C-4''), 152.49 (-NHCONH-), 153.23 (C-4'), 153.92 (C-6), 165.38 (-COOCH₂CH₃).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₄H₂₁O₃N₆FCl⁺ [M+H]⁺: 495.1342

Ευρεθέν: 495.1327

***N*-{3-[(4-Υδροξυκαρβονυλοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλ]ουρία (109)**

Σε εναιώρημα του παραγώγου **107** (100 mg, 0.20 mmol) εντός αιθανόλης (6 ml) προστίθεται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 40% (2 ml) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C για 2 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα φέρεται σε pH 3-4 με προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 9%. Το σχηματιζόμενο στερεό διηθείται υπό κενό και αφού ξηρανθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2 και λαμβάνεται το παράγωγο **109** (80 mg, 85%). Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: >300 °C (EtOAc).

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 2.73 (s, 3H, -CH₃), 7.33 (d, 1H, H-4'', *J*=7.7 Hz), 7.54 (t, 1H, H-5'', *J*=7.9 Hz), 7.67 (d, 1H, H-6'', *J*=8.2 Hz), 7.97 (d, 2H, H-3', H-5', *J*=8.8 Hz), 8.04 (brs, 1H, H-2''), 8.13 (d, 2H, H-2', H-6', *J*=8.8 Hz), 8.66 (s, 1H, H-2), 8.71 (s, 1H, H-8), 8.92 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 10.37 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 10.52 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline), 12.61 (brs, 1H, D₂O exchang., -OH).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 22.45 (-CH₃), 113.72 (C-2''), 117.71 (C-2', C-6'), 118.02 (C-4''), 121.45 (C-6''), 123.25 (C-3''), 123.77 (C-1'), 124.73 (C-8), 125.05 (C-3'), 129.21, 129.42, 129.62, 129.83 (-CF₃), 129.91 (C-5''), 130.39 (C-3', C-5'), 130.60 (C-8a), 131.84 (C-7), 140.58 (C-1''), 140.80 (C-2), 144.31 (C-4'), 144.65 (C-4a), 150.40 (C-3), 152.84 (-NHCONH-), 153.87 (C-6), 167.15 (-COOH).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₃H₁₈O₃N₆F₃⁺ [M+H]⁺: 483.1387

Ευρεθέν: 483.1369

***N*-{3-[(4-Υδροξυκαρβονυλοφαινυλ)αμινο]-6-μεθυλοπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-7-υλο}-*N'*-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ)ουρία (110)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **108** σε απόδοση 82% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **109** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 8-2. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: >300 °C (EtOAc).

^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 2.69 (s, 3H, -CH₃), 7.32-7.39 (m, 2H, H-5'', H-6''), 7.86 (dd, 1H, H-2'', $J=2.4$ Hz, $J=6.7$ Hz), 7.98 (d, 2H, H-3', H-5', $J=8.7$ Hz), 8.11 (d, 2H, H-2', H-6', $J=8.7$ Hz), 8.50 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-pyridine), 8.63 (s, 1H, H-2), 8.69 (s, 1H, H-8), 9.55 (brs, 1H, D₂O exchang., -CONH-aryl), 10.43 (brs, 1H, D₂O exchang., -NH- aniline), 12.61 (brs, 1H, D₂O exchang., -OH).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 21.74 (-CH₃), 116.84, 116.98 (C-5''), 117.78 (C-2', C-6'), 118.38, 118.43 (C-6''), 119.13, 119.25 (C-3''), 119.41 (C-2''), 123.74 (C-1'), 125.40 (C-8), 130.43 (C-3', C-5'), 130.58 (C-8a), 131.73 (C-7), 136.66 (C-1''), 140.91 (C-2), 144.15 (C-4'), 144.56 (C-4a), 150.38 (C-3), 151.62 (C-4''), 152.53 (-NHCONH-), 153.21 (C-4''), 153.72 (C-6), 166.96 (-COOH).

ESI-HRMS Υπολογισθέν ως προς C₂₂H₁₇O₃N₆FCI⁺ [M+H]⁺: 467.1029

Ευρεθέν: 467.1020

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. I. Collins & P. Workman, New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nature Chemical Biology* **2006**, 2(12), 689-700.
2. I. Kola and J. Landis, Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, 3(8), 711-715.
3. D. Hanahan and R. A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, 144(5), 646-674.
4. <http://cancerwatch.com/patient/drugs/druglist.html>
5. J. K. Buolamwini, Cell Cycle Molecular Targets in Novel Anticancer Drug Discovery. *Current Pharmaceutical Design* **2000**, 6(4), 379-392.
6. K. V. Korneev, K.-S. N. Atretkhany, M. S. Drutskaya, S. I. Grivennikov, D. V. Kuprash, S. A. Nedospasov, TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine* **2017**, 89, 127-135.
7. M. J. Lind, Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine* **2008**, 36(1), 19-23.
8. L. J. Nastoupil, A. C. Rose, and C. R. Flowers, Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Current Treatment Approaches. *Oncology* **2012**, 26(5), 488-495.
9. A. Freedman, Follicular lymphoma: 2012 update on diagnosis and management. *American Journal of Hematology* **2012**, 87(10), 988-995.
10. R. Rampling, A. James, V. Papanastassiou, The Present and Future Management of Malignant Brain Tumours: Surgery, Radiotherapy, Chemotherapy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **2004**, 75(Supplement 2), ii24-ii30.
11. V. Madan, J. T. Lear, R.-M. Szeimies, Non-melanoma skin cancer. *The Lancet* **2010**, 375(9715), 673-685.
12. R. C. Knapp, R. S. Berkowitz, *Corynebacterium parvum* as an immunotherapeutic agent in an ovarian cancer model. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **1977**, 128(7), 782-786.
13. H. S. Fernandes, C. S. Silva Teixeira, P. A. Fernandes, M. J. Ramos & N. M. F. S. A. Cerqueira, Amino acid deprivation using enzymes as a targeted therapy for cancer and viral infections. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2017**, 27(3), 283-297.
14. J. D. Broome, L-Asparaginase: discovery and development as a tumor-inhibitory agent. *Cancer Treatment Reports* **1981**, 65(Supplement 4), 111-114.

15. D. Goldstein, J. Laszlo, The Role of Interferon in Cancer Therapy: A Current Perspective. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **1988**, 38(5), 258-277.
16. A. Hauschild, H. Gogas, A. Tarhini, M. R. Middleton, A. Testori, B. Dreno, J. M. Kirkwood, Practical Guidelines for the Management of Interferon- α -2b Side Effects in Patients Receiving Adjuvant Treatment for Melanoma. *Cancer* **2008**, 112(5), 982-994.
17. M. de Andrea, R. Ravera, D. Gioia, M. Gariglio, S. Landolfo, The interferon system: an overview. *European Journal of Paediatric Neurology* **2002**, 6(Supplement A), A41-A46.
18. J. Parkin, B. Cohen, An overview of the immune system. *The Lancet* **2001**, 357(9270), 1777-1789.
19. E. Tur, S. Brenner, R. Michalewicz, Low Dose Recombinant Interferon Alfa Treatment for Classic Kaposi's Sarcoma. *Archives of Dermatology* **1993**, 129(10), 1297-1300.
20. C. E. Welander, Use of Interferon in the Treatment of Ovarian Cancer as a Single Agent and in Combination With Cytotoxic Drugs. *Cancer* **1987**, 59(S3), 617-619.
21. K. Hoffmann, S. Mehrle, J. Schmidt, M. W. Buchler and A. Marten, Interferon-alpha Restitutes the Chemosensitivity in Pancreatic Cancer. *Anticancer Research* **2008**, 28(3A), 1499-1508.
22. S. Wadler, E. L. Schwartz, New Advances in Interferon Therapy of Cancer. *The Oncologist* **1997**, 2(4), 254-267.
23. T. Yoshimoto, N. Morishima, M. Okumura, Y. Chiba, M. Xu & J. Mizuguchi, Interleukins and cancer immunotherapy. *Immunotherapy* **2009**, 1(5), 825-844.
24. R. M. Locksley, N. Killeen, and M. J. Lenardo, The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* **2001**, 104(4), 487-501.
25. R. van Horssen, T. L. M. ten Hagen, A. M. M. Eggermont, TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist* **2006**, 11(4), 397-408.
26. A. H. van der Veen, J. H. W. de Wilt, A. M. M. Eggermont, S. T. van Tiel, A. L. B. Seynhaeve and T. L. M. ten Hagen, TNF- α augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF- α -based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects. *British Journal of Cancer* **2000**, 82(4), 973-980.
27. J. H. W. de Wilt, T. L. M. ten Hagen, G. de Boeck, S. T. van Tiel, E. A. de Bruijn and A. M. M. Eggermont, Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. *British Journal of Cancer* **2000**, 82(5), 1000-1003.

28. T. Ito, K. Tanabe, H. Yamada, H. Hatta and S.-i. Nishimoto, Radiation- and Photo-induced Activation of 5-Fluorouracil Prodrugs as a Strategy for the Selective Treatment of Solid Tumors. *Molecules* **2008**, *13*(10), 2370-2384.
29. L. Ducry and B. Stump, Antibody-Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*(1), 5-13.
30. Y. V. Kovtun, C. A. Audette, Y. Ye, H. Xie, M. F. Ruberti, S. J. Phinney, B. A. Leece, T. Chittender, W. A. Blattler, and V. S. Goldmacher, Antibody-Drug Conjugates Designed to Eradicate Tumors with Homogeneous and Heterogeneous Expression of the Target Antigen. *Cancer Research* **2006**, *66*(6), 3214-3221.
31. Y. V. Kovtun, V. S. Goldmacher, Cell killing by antibody-drug conjugates. *Cancer Letters* **2007**, *255*(2), 232-240.
32. J. F. Di Joseph, D. C. Armellino, E. R. Boghaert, K. Khandke, M. M. Dougher, L. Sridharan, A. Kunz, P. R. Hamann, B. Gorovits, C. Udata, J. K. Moran, A. G. Popplewell, S. Stephens, P. Frost, and N. K. Damle, Antibody-targeted chemotherapy with CMC-544: a CD22-targeted immunoconjugate of calicheamicin for the treatment of B-lymphoid malignancies. *Blood* **2004**, *103*(5), 1807-1814.
33. A. Mullard, Maturing antibody-drug conjugate pipeline hits 30. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*(5), 329-332.
34. Z. Karjoo, X. Chen, A. Hatefi, Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *99*(Part A), 113-128.
35. J. B. Zawilska, J. Wojcieszak, A. B. Olejniczak, Prodrugs: A challenge for the drug development. *Pharmacological Reports* **2013**, *65*(1), 1-14.
36. N. Schellmann, P. M. Deckert, D. Bachran, H. Fuchs and C. Bachran, Targeted Enzyme Prodrug Therapies. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2010**, *10*(10), 887-904.
37. K. D. Bagshawe, Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2006**, *6*(10), 1421-1431.
38. P. A. Morcos, Achieving targeted and quantifiable alteration of mRNA splicing with Morpholino oligos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *358*(2), 521-527.
39. B. Weiss, G. Davidkova and L.-W. Zhou, Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1999**, *55*(3), 334-358.
40. M. Finer and J. Glorioso, A brief account of viral vectors and their promise for gene therapy. *Gene Therapy* **2017**, *24*(1), 1-2.

41. T. Wirth and S. Yla-Herttuala, Gene Therapy Used in Cancer Treatment. *Biomedicines* **2014**, 2(2), 149-162.
42. H. Lodish, A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell, *Molecular Cell Biology* **2003**, 5th edition.
43. D. U. Silverthorn, *Human Physiology* **2007**, 4th edition.
44. G. Krauss, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation* **2008**, 4th edition, 15.
45. N. A. Campbell, J. B. Reece, *Biology* **2002**, 6th edition.
46. M.-J. Tsai and B. W. O' Malley, Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry* **1994**, 63, 451-486.
47. J.-P. Changeux, A. Devillers-Thiery, P. Chemouilli, Acetylcholine Receptor: An Allosteric Protein. *Science* **1984**, 225(4668), 1335-1345.
48. A. G. Gilman, G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annual Review of Biochemistry* **1987**, 56, 615-649.
49. J. Bockaert, V. Homburger and B. Rouot, GTP binding proteins: a key role in cellular communication. *Biochimie* **1987**, 69(4), 329-338.
50. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry* **2002**, 5th edition.
51. K. Qin, C. Dong, G. Wu & N. A. Lambert, Inactive-state preassembly of G_q-coupled receptors and G_q heterotrimers. *Nature Chemical Biology* **2011**, 7(10), 740-747.
52. J. Schlessinger and A. Ullrich, Growth Factor Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Neuron* **1992**, 9(3), 383-391.
53. A. K. Ghose, T. Herbertz, D. A. Pippin, J. M. Salvino, and J. P. Mallamo, Knowledge Based Prediction of Ligand Binding Modes and Rational Inhibitor Design for Kinase Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51(17), 5149-5171.
54. J. Zhang, P. L. Yang and N. S. Gray, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* **2009**, 9(1), 28-39.
55. Y. Hinoda, S. Sasaki, T. Ishida and K. Imai, Monoclonal antibodies as effective therapeutic agents for solid tumors. *Cancer Science* **2004**, 95(8), 621-625.
56. S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi and R. Masuma, A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin

taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *The Journal of Antibiotics* **1977**, 30(4), 275-282.

57. T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomita, Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1986**, 135(2), 397-402.

58. R. Hoessel, S. Leclerc, J. A. Endicott, M. E. M. Nobel, A. Lawrie, P. Tunnah, M. Leost, E. Damiens, D. Marie, D. Marko, E. Niederberger, W. Tang, G. Eisenbrand and L. Meijer, Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nature Cell Biology* **1999**, 1(1), 60-67.

59. M. Kitagawa, T. Okabe, H. Ogino, H. Matsumoto, I. Suzuki-Takahashi, T. Kokubo, H. Higashi, S. Saitoh, Y. Taya, H. Yasuda, Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* **1993**, 8(9), 2425-2432.

60. W. F. De Azevedo, Jr., H.-J. Mueller-Dieckmann, U. Schulze-Gahmen, P. J. Worland, E. Sausville, and S.-H. Kim, Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1996**, 93(7), 2735-2740.

61. R. Steinbrook, The Price of Sight-Ranibizumab, Bevacizumab, and the Treatment of Macular Degeneration. *The New England Journal of Medicine* **2006**, 355(14), 1409-1412.

62. T. O' Hare, D. K. Walters, M. W. N. Deininger, and B. J. Druker, AMN107: Tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell* **2005**, 7(2), 117-119.

63. M. A. Pearson and D. Fabbro, Targeting protein kinases in cancer therapy: a success? *Expert Review of Anticancer Therapy* **2004**, 4(6), 1113-1124.

64. E. H. Fischer and E. G. Krebs, Conversion of Phosphorylase *b* to Phosphorylase α in Muscle Extracts. *The Journal of Biological Chemistry* **1955**, 216(1), 121-132.

65. G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, 298(5600), 1912-1934.

66. M. Kostich, J. English, V. Madison, F. Gheyas, L. Wang, P. Qiu, J. Greene and T. M. Laz, Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biology* **2002**, 3(9).

67. T. Hunter, Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell* **1995**, 80(2), 225-236.

68. A. M. Edelman, D. K. Blumenthal, E. G. Krebs, Protein Serine/Threonine Kinases. *Annual Review of Biochemistry* **1987**, 56, 567-613.

69. W. J. Fantl, D. E. Johnson, and L. T. Williams, Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Annual Review of Biochemistry* **1993**, 62, 453-481.
70. H. Saito, Histidine Phosphorylation and Two-Component Signaling in Eukaryotic Cells. *Chemical Reviews* **2001**, 101(8), 2497-2509.
71. N. Dhanasekaran and E. Premkumar Reddy, Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* **1998**, 17(11), 1447-1455.
72. W. Becker and H.-G. Joost, Structural and Functional Characteristics of Dyrk, a Novel Subfamily of Protein Kinases with Dual Specificity. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **1998**, 62, 1-17.
73. G. Scapin, Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discovery Today* **2002**, 7(11), 601-611.
74. P. G. Besant, E. Tan, P. V. Attwood, Mammalian protein histidine kinases. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2003**, 35(3), 297-309.
75. P. M. Wolanin, P. A. Thomason and J. B. Stock, Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology* **2002**, 3(10), 3013, 3013.1-3013.8.
76. I. Shchemelinin, L. Sevc, E. Necas, Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and Other Diseases. *Folia Biologica (Praha)* **2006**, 52(3), 81-101.
77. S. Madhusudan and T. S. Ganesan, Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry* **2004**, 37(7), 618-635.
78. M. R. Dewji, Early Phase I Data on an Irreversible Pan-Erb Inhibitor: CI-1033. What Did We Learn? *Journal of Chemotherapy* **2004**, 16(Supplement 4), 44-48.
79. D. S. Krause, and R. A. Van Etten, Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *The New England Journal of Medicine* **2005**, 353(2), 172-187.
80. G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson, B.-E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb, Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews* **2001**, 22(2), 153-183.
81. D. O. Morgan, *The Cell Cycle: Principles of Control* **2007**, 1st edition.
82. T. Yamauchi, Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 28(8), 1342-1354.
83. M. E. Anderson, Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacology & Therapeutics* **2005**, 106(1), 39-55.

84. M. Fahrmann, M.-A. Kaufhold, Functional partitioning of epithelial protein kinase CaMKII in signal transduction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* **2006**, 1763(1), 101-109.
85. L. Behrend, M. Stoter, M. Kurth, G. Rutter, J. Heukeshoven, W. Deppert, U. Knippschild, Interaction of casein kinase 1 delta (CK1 δ) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. *European Journal of Cell Biology* **2000**, 79(4), 240-251.
86. G. Zhu, K. Fujii, Y. Liu, V. Codrea, J. Herrero, and S. Shaw, A Single Pair of Acidic Residues in the Kinase Major Groove Mediates Strong Substrate Preference for P-2 or P-5 Arginine in the AGC, CAMK, and STE Kinase Families. *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280(43), 36372-36379.
87. S. B. Bhise, A. D. Nalawade and H. Wadhawa, Role of protein tyrosine kinase inhibitors in cancer therapeutics. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **2004**, 41(5), 273-280.
88. S. K. Hanks, Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology* **2003**, 4(5), 111.
89. S. K. Hanks and T. Hunter, The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal* **1995**, 9(8), 576-596.
90. T. Hunter, Protein Kinase Classification. *Methods in Enzymology* **1991**, 200, 3-37.
91. S. K. Hanks and A. M. Quinn, Protein Kinase Catalytic Domain Sequence Database: Identification of Conserved Features of Primary Structure and Classification of Family Members. *Methods in Enzymology* **1991**, 200, 38-62.
92. J. A. Adams, Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chemical Reviews* **2001**, 101(8), 2271-2290.
93. O. Hantschel and G. Superti-Furga, Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, 5(1), 33-44.
94. D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Science* **1991**, 253(5018), 407-414.
95. L. N. Johnson, M. E. M. Noble, and D. J. Owen, Active and Inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* **1996**, 85(2), 149-158.
96. J. Pines and C. L. Rieder, Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nature Cell Biology* **2001**, 3(1), E3-E6.

97. L. M. Schang, Advances on Cyclin-dependent Kinases (CDKs) as Novel Targets for Antiviral Drugs. *Current Drug Targets-Infectious Disorders* **2005**, 5(1), 29-37.
98. L. M. Schang, Effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors on viral transcription and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2004**, 1697(1-2), 197-209.
99. M. Malumbres and M. Barbacid, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2001**, 1(3), 222-231.
100. N. P. Pavletich, Mechanisms of Cyclin-dependent Kinase Regulation: Structures of Cdk's, their Cyclin Activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *Journal of Molecular Biology* **1999**, 287(5), 821-828.
101. M. Malumbres and M. Barbacid, Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **2005**, 30(11), 630-641.
102. J. Liu and E. T. Kipreos, Evolution of Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) and CDK-Activating Kinases (CAKs): Differential Conservation of CAKs in Yeast and Metazoa. *Molecular Biology and Evolution* **2000**, 17(7), 1061-1074.
103. M. A. Shah, G. K. Schwartz, Cyclin dependent kinases as targets for cancer therapy. *Update on Cancer Therapeutics* **2006**, 1(3), 311-332.
104. S. Blagden and J. de Bono, Drugging Cell Cycle Kinases in Cancer Therapy. *Current Drug Targets* **2005**, 6(3), 325-335.
105. C. Banchio, L. M. Schang, and D. E. Vance, Phosphorylation of Sp1 by Cyclin-dependent Kinase 2 Modulates the Role of Sp1 in CTP: Phosphocholine Cytidylyltransferase α Regulation during the S Phase of the Cell Cycle. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279(38), 40220-40226.
106. J.-M. Peters, W. W. Franke, and J. A. Kleinschmidt, Distinct 19 S and 20 S Subcomplexes of the 26 S Proteasome and Their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269(10), 7709-7718.
107. Z. A. Knight and K. M. Shokat, Features of Selective Kinase Inhibitors. *Chemistry & Biology* **2005**, 12(6), 621-637.
108. B.-B. S. Zhou & S. J. Elledge, The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **2000**, 408(6811), 433-439.
109. A. Zetterberg, O. Larsson and K. G. Wiman, What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology* **1995**, 7(6), 835-842.
110. R. T. Abraham, Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development* **2001**, 15(17), 2177-2196.

111. C. Lukas, J. Bartkova, L. Latella, J. Falck, N. Mailand, T. Schroeder, M. Sehested, J. Lukas, and J. Bartek, DNA Damage-activated Kinase Chk2 Is Independent of Proliferation or Differentiation Yet Correlates with Tissue Biology. *Cancer Research* **2001**, 61(13), 4990-4993.
112. Y. Kaneko, N. Watanabe, H. Morisaki, H. Akita, A. Fujimoto, K. Tominaga, M. Terasawa, A. Tachibana, K. Ikeda and M. Nakanishi, Cell cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene* **1999**, 18(25), 3673-3681.
113. C. Storgaard Sorensen, R. G. Syljuasen, J. Falck, T. Schroeder, L. Ronnstrand, K. K. Khanna, B.-B. Zhou, J. Bartek, and J. Lukas, Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **2003**, 3(3), 247-258.
114. S. Knuutila, A.-M. Bjorkqvist, K. Autio, M. Tarkkanen, M. Wolf, O. Monni, J. Szymanska, M. L. Larramendy, J. Tapper, H. Pere, W. El-Rifai, S. Hemmer, V.-M. Wasenius, V. Vidgren, and Y. Zhu, DNA Copy Number Amplifications in Human Neoplasms. *The American Journal of Pathology* **1998**, 152(5), 1107-1123.
115. S. Faderl, M. Talpaz, Z. Estrov, S. O' Brien, R. Kurzrock, and H. M. Kantarjian, The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* **1999**, 341(3), 164-172.
116. T. Mikalsen, N. Gerits and U. Moens, Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy. *Biotechnology Annual Review* **2006**, 12, 153-223.
117. T. G. Lugo and O. N. Witte, The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. *Molecular and Cellular Biology* **1989**, 9(3), 1263-1270.
118. F. M. Uckun, C. Mao, Tyrosine Kinases as New Molecular Targets in Treatment of Inflammatory Disorders and Leukemia. *Current Pharmaceutical Design* **2004**, 10(10), 1083-1091(9).
119. M. Malumbres and M. Barbacid, Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* **2009**, 9(3), 153-166.
120. A. Menoyo, H. Alazzouzi, E. Espin, M. Armengol, H. Yamamoto, and S. Schwartz, Jr., Somatic Mutations in the DNA Damage-Response Genes *ATR* and *CHK1* in Sporadic Stomach Tumors with Microsatellite Instability. *Cancer Research* **2001**, 61(21), 7727-7730.
121. F. Bertoni, A. M. Codegoni, D. Furlan, M. G. Tibiletti, C. Capella, and M. Broggin, *CHK1* Frameshift Mutations in Genetically Unstable Colorectal and Endometrial Cancers. *Genes, Chromosomes & Cancer* **1999**, 26(2), 176-180.
122. D. W. Bell, J. M. Varley, T. E. Szydlo, D. H. Kang, D. C. R. Wahrer, K. E. Shannon, M. Lubratovich, S. J. Verselis, K. J. Isselbacher, J. F. Fraumeni, J. M.

Birch, F. P. Li, J. E. Garber, D. A. Haber, Heterozygous Germ Line *hCHK2* Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Science* **1999**, 286(5449), 2528-2531.

123. A. Sullivan, M. Yuille, C. Repellin, A. Reddy, O. Reelfs, A. Bell, B. Dunne, B. A. Gusterson, P. Osin, P. J. Farrell, I. Yulug, A. Evans, T. Ozcelik, M. Gasco and T. Crook, Concomitant inactivation of p53 and Chk2 in breast cancer. *Oncogene* **2002**, 21(9), 1316-1324.

124. N. Haruki, H. Saito, Y. Tatematsu, H. Konishi, T. Harano, A. Masuda, H. Osada, Y. Fujii, and T. Takahashi, Histological Type-selective, Tumor-predominant Expression of a Novel *CHK1* Isoform and Infrequent *in Vivo* Somatic *CHK2* Mutation in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* **2000**, 60(17), 4689-4692.

125. A. Reddy, M. Yuille, A. Sullivan, C. Repellin, A. Bell, J. A. Tidy, D. J. Evans, P. J. Farrell, B. Gusterson, M. Gasco and T. Crook, Analysis of *CHK2* in vulval neoplasia. *British Journal of Cancer* **2002**, 86(5), 756-760.

126. C. W. Miller, T. Ikezoe, U. Krug, W.-K. Hofmann, S. Tavor, V. Vegesna, K. Tsukasaki, S. Takeuchi, and H. P. Koeffler, Mutations of the *CHK2* Gene Are Found in Some Osteosarcomas, But Are Rare in Breast, Lung, and Ovarian Tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer* **2002**, 33(1), 17-21.

127. W.-K. Hofmann, C. W. Miller, K. Tsukasaki, S. Tavor, T. Ikezoe, D. Hoelzer, S. Takeuchi, H. P. Koeffler, Mutation analysis of the DNA-damage checkpoint gene *CHK2* in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leukemia Research* **2001**, 25(4), 333-338.

128. A. Hangaishi, S. Ogawa, Y. Qiao, L. Wang, N. Hosoya, K. Yuji, Y. Imai, K. Takeuchi, S. Miyawaki and H. Hirai, Mutations of *Chk2* in primary hematopoietic neoplasms. *Blood* **2002**, 99(8), 3075-3077.

129. J. Liu, Y. Hu, D. L. Waller, J. Wang and Q. Liu, Natural products as kinase inhibitors. *Natural Product Reports* **2012**, 29(3), 392-403.

130. G. M. Cragg, P. G. Grothaus, and D. J. Newman, Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. *Chemical Reviews* **2009**, 109(7), 3012-3043.

131. X. M. Liu, L. G. Wang, H. Y. Li and X. J. Ji, Induction of Differentiation and Down-Regulation of *c-myc* Gene Expression in ML-1 Human Myeloblastic Leukemia Cells by the Clinically Effective Anti-Leukemia Agent Meisoindigo. *Biochemical Pharmacology* **1996**, 51(11), 1545-1551.

132. E. Damiens, B. Baratte, D. Marie, G. Eisenbrand and L. Meijer, Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. *Oncogene* **2001**, 20(29), 3786-3797.

133. D. Marko, S. Schatzle, A. Friedel, A. Genzlinger, H. Zankl, L. Meijer and G. Eisenbrand, Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *British Journal of Cancer* **2001**, 84(2), 283-289.
134. T. G. Davies, P. Tunnah, L. Meijer, D. Marko, G. Eisenbrand, J. A. Endicott, and M. E. M. Noble, Inhibitor Binding to Active and Inactive CDK2: The Crystal Structure of CDK2-Cyclin A/Indirubin-5-Sulphonate. *Structure* **2001**, 9(5), 389-397.
135. S. Leclerc, M. Garnier, R. Hoessel, D. Marko, J. A. Bibb, G. L. Snyder, P. Greengard, J. Biernat, Y.-Z. Wu, E.-M. Mandelkow, G. Eisenbrand, and L. Meijer, Indirubins Inhibit Glycogen Synthase Kinase-3 β and CDK5/P25, Two Protein Kinases Involved in Abnormal Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease A Property Common to Most Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors? *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276(1), 251-260.
136. Y. Ferandin, K. Bettayeb, M. Kritsanida, O. Lozach, P. Polychronopoulos, P. Magiatis, A.-L. Skaltsounis, and L. Meijer, 3'-Substituted 7-Halogenoindirubins, a New Class of Cell Death Inducing Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49(15), 4638-4649.
137. V. Myrianthopoulos, P. Magiatis, Y. Ferandin, A.-L. Skaltsounis, L. Meijer, and E. Mikros, An Integrated Computational Approach to the Phenomenon of Potent and Selective Inhibition of Aurora B and C by a Series of 7-Substituted Indirubins. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 50(17), 4027-4037.
138. F. Meggio, A. Donella Deana, M. Ruzzene, A. M. Brunati, L. Cesaro, B. Guerra, T. Meyer, H. Mett, D. Fabbro, P. Furet, G. Dobrowolska and L. A. Pinna, Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *European Journal of Biochemistry* **1995**, 234(1), 317-322.
139. H.-J. Chae, J.-S. Kang, J.-O. Byun, K.-S. Han, D.-U. Kim, S.-M. Oh, H.-M. Kim, S.-W. Chae and H.-R. Kim, Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacological Research* **2000**, 42(4), 373-381.
140. M. W. Karaman, S. Herrgard, D. K. Treiber, P. Gallant, C. E. Atteridge, B. T. Campbell, K. W. Chan, P. Ciceri, M. I. Davis, P. T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J. P. Hunt, D. J. Lockhart, Z. V. Milanov, M. J. Morrison, G. Pallares, H. K. Patel, S. Pritchard, L. M. Wodicka & P. P. Zarrinkar, A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nature Biotechnology* **2008**, 26(1), 127-132.
141. D. M. Gadbois, S. Peterson, E. Morton Bradbury, and B. E. Lehnert, CDK4/Cyclin D1/PCNA Complexes during Staurosporine-Induced G1 Arrest and G0 Arrest of Human Fibroblasts. *Experimental Cell Research* **1995**, 220(1), 220-226.

142. T. K. Kwon, M. A. Buchholz, P. Ponsalle, F. J. Chrest, and A. A. Nordin, The Regulation of p27^{Kip1} Expression Following the Polyclonal Activation of Murine G₀ T Cells. *The Journal of Immunology* **1997**, 158(12), 5642-5648.
143. X. Chen, M. Lowe, T. Herliczek, M. J. Hall, C. Danes, D. A. Lawrence, K. Keyomarsi, Protection of Normal Proliferating Cells Against Chemotherapy by Staurosporine-Mediated, Selective, and Reversible G₁ Arrest. *Journal of the National Cancer Institute* **2000**, 92(24), 1999-2008.
144. T. Fischer, R. M. Stone, D. J. DeAngelo, I. Galinsky, E. Estey, C. Lanza, E. Fox, G. Ehninger, E. J. Feldman, G. J. Schiller, V. M. Klimek, S. D. Nimer, D. G. Gilliland, C. Dutreix, A. Huntsman-Labed, J. Virkus, and F. J. Giles, Phase IIB Trial of Oral Midostaurin (PKC412), the FMS-Like Tyrosine Kinase 3 Receptor (FLT3) and Multi-Targeted Kinase Inhibitor, in Patients With Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome With Either Wild-Type or Mutated FLT3. *Journal of Clinical Oncology* **2010**, 28(28), 4339-4345.
145. M. J. Millward, C. House, D. Bowtell, L. Webster, I. N. Olver, M. Gore, M. Copeman, K. Lynch, A. Yap, Y. Wang, P. S. Cohen and J. Zalcberg, The multikinase inhibitor midostaurin (PKC412A) lacks activity in metastatic melanoma: a phase IIA clinical and biologic study. *British Journal of Cancer* **2006**, 95(7), 829-834.
146. G. Caravatti, T. Meyer, A. Fredenhagen, U. Trinks, H. Mett, and D. Fabbro, Inhibitory Activity and Selectivity of Staurosporine Derivatives Towards Protein Kinase C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, 4(3), 399-404.
147. S. Zhu, H. Wurdak, J. Wang, C. A. Lyssiotis, E. C. Peters, C. Y. Cho, X. Wu, A Small Molecule Primes Embryonic Stem Cells for Differentiation. *Cell Stem Cell* **2009**, 4(5), 416-426.
148. I. Takahashi, E. Kobayashi, K. Asano, M. Yoshida, H. Nakano, UCN-01, a Selective Inhibitor of Protein Kinase C from *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics* **1987**, 40(12), 1782-1784.
149. S. Akinaga, K. Gomi, M. Morimoto, T. Tamaoki, and M. Okabe, Antitumor Activity of UCN-01, a Selective Inhibitor of Protein Kinase C, in Murine and Human Tumor Models. *Cancer Research* **1991**, 51(18), 4888-4892.
150. C. M. Seynaeve, M. Stetler-Stevenson, S. Sebers, G. Kaur, E. A. Sausville, and P. J. Worland, Cell Cycle Arrest and Growth Inhibition by the Protein Kinase Antagonist UCN-01 in Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Research* **1993**, 53(9), 2081-2086.
151. Q. Wang, P. J. Worland, J. L. Clark, B. A. Carlson, and E. A. Sausville, Apoptosis in 7-Hydroxystaurosporine-treated T Lymphoblasts Correlates with Activation of Cyclin-dependent Kinases 1 and 2. *Cell Growth & Differentiation* **1995**, 6(8), 927-936.

152. A. Gescher, Analogs of Staurosporine: Potential Anticancer Drugs? *General Pharmacology: The Vascular System* **1998**, 31(5), 721-728.
153. A. M. Senderowicz, Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy. *Oncogene* **2000**, 19(56), 6600-6606.
154. Q. Wang, S. Fan, A. Eastman, P. J. Worland, E. A. Sausville, P. M. O' Connor, UCN-01: a Potent Abrogator of G₂ Checkpoint Function in Cancer Cells With Disrupted p53. *Journal of the National Cancer Institute* **1996**, 88(14), 956-965.
155. A. Antonsson and J. L. Persson, Induction of Apoptosis by Staurosporine Involves the Inhibition of Expression of the Major Cell Cycle Proteins at the G₂/M Checkpoint Accompanied by Alterations in Erk and Akt Kinase Activities. *Anticancer Research* **2009**, 29(8), 2893-2898.
156. S. Kitada, J. M. Zapata, M. Andreeff, and J. C. Reed, Protein kinase inhibitors flavopiridol and 7-hydroxy-staurosporine down-regulate antiapoptosis proteins in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2000**, 96(2), 393-397.
157. F. Arguello, M. Alexander, J. A. Sterry, G. Tudor, E. M. Smith, N. T. Kalavar, J. F. Greene, Jr, W. Koss, C. D. Morgan, S. F. Stinson, T. J. Siford, W. G. Alvord, R. L. Klabansky, and E. A. Sausville, Flavopiridol Induces Apoptosis of Normal Lymphoid Cells, Causes Immunosuppression, and Has Potent Antitumor Activity In Vivo Against Human Leukemia and Lymphoma Xenografts. *Blood* **1998**, 91(7), 2482-2490.
158. A. D. Harmon and U. Weiss, The Structure of Rohitukine, The Main Alkaloid of Amoor Rohituka (Syn. Aphanamixis polystachya) (Meliaceae). *Tetrahedron Letters* **1979**, 20(8), 721-724.
159. M. D. Losiewicz, B. A. Carlson, G. Kaur, E. A. Sausville and P. J. Worland, Potent Inhibition of CDC2 Kinase Activity by the Flavonoid L86-8275. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, 201(2), 589-595.
160. G. Kaur, M. Stetler-Stevenson, S. Sebers, P. Worland, H. Sedlacek, C. Myers, J. Czech, R. Naik, E. Sausville, Growth Inhibition With Reversible Cell Cycle Arrest of Carcinoma Cells by Flavone L86-8275. *Journal of the National Cancer Institute* **1992**, 84(22), 1736-1740.
161. H. H. Sedlacek, Mechanisms of action of flavopiridol. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2001**, 38(2), 139-170.
162. A. Rapella, A. Negrioli, G. Melillo, S. Pastorino, L. Varesio and M. C. Bosco, Flavopiridol Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Production Induced by Hypoxia or Picolinic Acid in Human Neuroblastoma. *International Journal of Cancer* **2002**, 99(5), 658-664.

163. B. A. Carlson, M. M. Dubay, E. A. Sausville, L. Brizuela, and P. J. Worland, Flavopiridol Induces G₁ Arrest with Inhibition of Cyclin-dependent Kinase (CDK) 2 and CDK4 in Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Research* **1996**, 56(13), 2973-2978.
164. A. M. Senderowicz, The Cell Cycle as a Target for Cancer Therapy: Basic and Clinical Findings with the Small Molecule Inhibitors Flavopiridol and UCN-01. *The Oncologist* **2002**, 7(Supplement 3), 12-19.
165. A. R. Tan and S. M. Swain, Review of Flavopiridol, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, as Breast Cancer Therapy. *Seminars in Oncology* **2002**, 29(3, Supplement 11), 77-85.
166. S. Zhai, A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, and W. D. Figg, Flavopiridol, a Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, in Clinical Development. *Annals of Pharmacotherapy* **2002**, 36(5), 905-911.
167. A. M. Senderowicz, D. Headlee, S. F. Stinson, R. M. Lush, N. Kalil, L. Villalba, K. Hill, S. M. Steinberg, W. D. Figg, A. Tompkins, S. G. Arbuck, and E. A. Sausville, Phase I trial of continuous infusion flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with refractory neoplasms. *Journal of Clinical Oncology* **1998**, 16(9), 2986-2999.
168. W. M. Stadler, N. J. Vogelzang, R. Amato, J. Sosman, D. Taber, D. Liebowitz, and E. E. Vokes, Flavopiridol, A Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, in Metastatic Renal Cancer: A University of Chicago Phase II Consortium Study. *Journal of Clinical Oncology* **2000**, 18(2), 371-375.
169. G. K. Schwartz, D. Ilson, L. Saltz, E. O'Reilly, W. Tong, P. Maslak, J. Werner, P. Perkins, M. Stoltz, and D. Kelsen, Phase II Study of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Administered to Patients With Advanced Gastric Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **2001**, 19(7), 1985-1992.
170. G. I. Shapiro, J. G. Supko, A. Patterson, C. Lynch, J. Lucca, P. F. Zaccarola, A. Muzikansky, J. J. Wright, T. J. Lynch, Jr., and B. J. Rollins, A Phase II Trial of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol in Patients with Previously Untreated Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **2001**, 7(6), 1590-1599.
171. S.-H. Chao, K. Fujinaga, J. E. Marion, R. Taube, E. A. Sausville, A. M. Senderowicz, B. M. Peterlin, and D. H. Price, Flavopiridol Inhibits P-TEFb and Blocks HIV-1 Replication. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275(37), 28345-28348.
172. S.-H. Chao and D. H. Price, Flavopiridol Inactivates P-TEFb and Blocks Most RNA Polymerase II Transcription *in Vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276(34), 31793-31799.

173. M. Motwani, T. M. Delohery, and G. K. Schwartz, Sequential Dependent Enhancement of Caspase Activation and Apoptosis by Flavopiridol on Paclitaxel-treated Human Gastric and Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research* **1999**, 5(7), 1876-1883.
174. J. Almenara, R. Rosato and S. Grant, Synergistic induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells by flavopiridol and the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Leukemia* **2002**, 16(7), 1331-1343.
175. A. Konig, G. K. Schwartz, R. M. Mohammad, A. Al-Katib, and J. L. Gabrilove, The Novel Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Downregulates Bcl-2 and Induces Growth Arrest and Apoptosis in Chronic B-Cell Leukemia Lines. *Blood* **1997**, 90(11), 4307-4312.
176. V. Patel, A. M. Senderowicz, D. Pinto, Jr., T. Igishi, M. Raffeld, L. Quintanilla-Martinez, J. F. Ensley, E. A. Sausville, and J. S. Gutkind, Flavopiridol, a Novel Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas by Inducing Apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* **1998**, 102(9), 1674-1681.
177. J. Khazir, B. A. Mir, L. Pilcher, D. L. Riley, Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters* **2014**, 7(1), 173-181.
178. J. P. Thomas, K. D. Tutsch, J. F. Cleary, H. H. Bailey, R. Arzoomanian, D. Alberti, K. Simon, C. Feierabend, K. Binger, R. Marnocha, A. Dresen, G. Wilding, Phase I clinical and pharmacokinetic trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2002**, 50(6), 465-472.
179. A. M. Senderowicz, Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Investigational New Drugs* **1999**, 17(3), 313-320.
180. G. K. Schwartz, D. Ilson, L. Saltz, E. O' Reilly, W. Tong, P. Maslak, J. Werner, P. Perkins, M. Stoltz, and D. Kelsen, Phase II Study of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Flavopiridol Administered to Patients With Advanced Gastric Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **2001**, 19(7), 1985-1992.
181. G. Melillo, E. A. Sausville, K. Cloud, T. Lahusen, L. Varesio, and A. M. Senderowicz, Flavopiridol, a Protein Kinase Inhibitor, Down-Regulates Hypoxic Induction of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Monocytes. *Cancer Research* **1999**, 59(21), 5433-5437.
182. C. Sekine, T. Sugihara, S. Miyake, H. Hirai, M. Yoshida, N. Miyasaka, and H. Kohsaka, Successful Treatment of Animal Models of Rheumatoid Arthritis with Small-Molecule Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *The Journal of Immunology* **2008**, 180(3), 1954-1961.

183. J. Ruef, A. S. Meshel, Z. Hu, C. Horaist, C. A. Ballinger, L. J. Thompson, V. D. Subbarao, J. A. Dumont, C. Patterson, Flavopiridol Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation In Vitro and Neointimal Formation In Vivo After Carotid Injury in the Rat. *Circulation* **1999**, 100(6), 659-665.
184. G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo, and F. Capasso, Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. *Life Sciences* **1999**, 65(4), 337-353.
185. W. J. Craig, Health-promoting properties of common herbs. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1999**, 70(3), 491S-499S.
186. C. Kadarian, A. M. Broussalis, J. Mino, P. Lopez, S. Gorzalczany, G. Ferraro and C. Acevedo, Hepatoprotective Activity of *Achyrocline Satureioides* (LAM) D. C. *Pharmacological Research* **2002**, 45(1), 57-61.
187. M. E. Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. Sanchez Mata, A. Villar, Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* **2001**, 76(3), 201-214.
188. A. B. Samuelsen, The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 71(1-2), 1-21.
189. W. Ren, Z. Qiao, H. Wang, L. Zhu, L. Zhang, Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews* **2003**, 23(4), 519-534.
190. J. B. Harborne, C. A. Williams, Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, 55(6), 481-504.
191. C. Pouget, F. Lauthier, A. Simon, C. Fagnere, J.-P. Basly, C. Delage and A.-J. Chulia, Flavonoids: Structural Requirements for Antiproliferative Activity on Breast Cancer Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11(24), 3095-3097.
192. D.-H. Han, H. Tachibana, and K. Yamada, Inhibition of Environmental Estrogen-Induced Proliferation of Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells by Flavonoids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **2001**, 37(5), 275-282.
193. F. Yin, A. E. Giuliano, A. J. Van Herle, Signal pathways involved in apigenin inhibition of growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO). *Anticancer Research* **1999**, 19(5B), 4297-4303.
194. F. Yin, A. E. Giuliano, and A. J. Van Herle, Growth Inhibitory Effects of Flavonoids in Human Thyroid Cancer Cell Lines. *Thyroid* **1999**, 9(4), 369-376.
195. F. Bai, T. Matsui, N. Ohtani-Fujita, Y. Matsukawa, Y. Ding, T. Sakai, Promoter activation and following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is involved in G₁ phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *FEBS Letters* **1998**, 437(1-2), 61-64.

196. S. Caltagirone, F. O. Ranelletti, A. Rinelli, N. Maggiano, A. Colasante, P. Musiani, F. B. Aiello, and M. Piantelli, Interaction with Type II Estrogen Binding Sites and Antiproliferative Activity of Tamoxifen and Quercetin in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **1997**, *17*(1), 51-59.
197. U. Wenzel, S. Kuntz, M. D. Brendel, and H. Daniel, Dietary Flavone Is a Potent Apoptosis Inducer in Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Research* **2000**, *60*(14), 3823-3831.
198. H. Kamei, Y. Hashimoto, T. Koide, T. Kojima, and M. Hasegawa, Anti-tumor Effect of Methanol Extracts from Red and White Wines. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **1998**, *13*(6), 447-452.
199. S. Kuntz, U. Wenzel, H. Daniel, Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* **1999**, *38*(3), 133-142.
200. S.-M. Kuo, H. F. Morehouse Jr., C.-P. Lin, Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Letters* **1997**, *116*(2), 131-137.
201. S.-M. Kuo, Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letters* **1996**, *110*(1-2), 41-48.
202. L. M. Knowles, D. A. Zigrossi, R. A. Tauber, C. Hightower & J. A. Milner, Flavonoids Suppress Androgen-Independent Human Prostate Tumor Proliferation. *Nutrition and Cancer* **2000**, *38*(1), 116-122.
203. N. Bhatia and R. Agarwal, Detrimental Effect of Cancer Preventive Phytochemicals Silymarin, Genistein and Epigallocatechin 3-gallate on Epigenetic Events in Human Prostate Carcinoma DU145 Cells. *The Prostate* **2001**, *46*(2), 98-107.
204. M. Kampa, A. Hatzoglou, G. Notas, A. Damianaki, E. Bakogeorgou, C. Gemetzi, E. Kouroumalis, P.-M. Martin, and E. Castanas, Wine Antioxidant Polyphenols Inhibit the Proliferation of Human Prostate Cancer Cell Lines. *Nutrition and Cancer* **2000**, *37*(2), 223-233.
205. R. Agarwal, Cell Signaling and Regulators of Cell Cycle as Molecular Targets for Prostate Cancer Prevention by Dietary Agents. *Biochemical Pharmacology* **2000**, *60*(8), 1051-1059.
206. D. R. Ferry, A. Smith, J. Malkhandi, D. W. Fyfe, P. G. deTakats, D. Anderson, J. Baker, and D. J. Kerr, Phase I Clinical Trial of the Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence for *in Vivo* Tyrosine Kinase Inhibition. *Clinical Cancer Research* **1996**, *2*(4), 659-668.

207. J. Markovits, C. Linassier, P. Fosse, J. Couprie, J. Pierre, A. Jacquemin-Sablon, J.-M. Saucier, J.-B. Le Pecq, and A. K. Larsen, Inhibitory Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor Genistein on Mammalian DNA Topoisomerase II. *Cancer Research* **1989**, 49(18), 5111-5117.
208. J.-K. Lin, Y.-C. Chen, Y.-T. Huang, and S.-Y. Lin-Shiau, Suppression of Protein Kinase C and Nuclear Oncogene Expression as Possible Molecular Mechanisms of Cancer Chemoprevention by Apigenin and Curcumin. *Journal of Cellular Biochemistry* **1997**, 67(Supplements 28/29), 39-48.
209. T. Sato, L. Koike, Y. Miyata, M. Hirata, Y. Mimaki, Y. Sashida, M. Yano, and A. Ito, Inhibition of Activator Protein-1 Binding Activity and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway by Nobiletin, a Polymethoxy Flavonoid, Results in Augmentation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Production and Suppression of Production of Matrix Metalloproteinases-1 and -9 in Human Fibrosarcoma HT-1080 Cells. *Cancer Research* **2002**, 62(4), 1025-1029.
210. G. Weber, F. Shen, N. Prajda, H. Yang, W. Li, A. Yeh, B. Csokay, E. Olah and K. Y. Look, Regulation of the Signal Transduction Program by Drugs. *Advances in Enzyme Regulation* **1997**, 37, 35-55.
211. D. H. Paper, Natural Products as Angiogenesis Inhibitors. *Planta Medica* **1998**, 64(8), 686-695.
212. F. Tosetti, N. Ferrari, S. de Flora, and A. Albini, 'Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *The FASEB Journal* **2002**, 16(1), 2-14.
213. T. Fotsis, M. S. Pepper, R. Montesano, E. Aktas, S. Breit, L. Schweigerer, S. Rasku, K. Wahala, H. Adlercreutz, Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* **1998**, 12(4), 649-666.
214. T. Takahashi, M. Kobori, H. Shinmoto, and T. Tsushida, Structure-activity Relationships of Flavonoids and the Induction of Granulocytic-or Monocytic-Differentiation in HL60 Human Myeloid Leukemia Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **1998**, 62(11), 2199-2204.
215. Y. Jing, K. Nakaya, R. Han, Differentiation of promyelocytic leukemia cells HL-60 induced by daidzein in vitro and in vivo. *Anticancer Research* **1993**, 13(4), 1049-1054.
216. Y. Honma, J. Okabe-Kado, T. Kasukabe, M. Hozumi, K. Umezawa, Inhibition of abl oncogene tyrosine kinase induces erythroid differentiation of human myelogenous leukemia K562 cells. *Japanese Journal of Cancer Research* **1990**, 81(11), 1132-1136.

217. A. Constantinou, K. Kiguchi, and E. Huberman, Induction of Differentiation and DNA Strand Breakage in Human HL-60 and K-562 Leukemia Cells by Genistein. *Cancer Research* **1990**, 50(9), 2618-2624.
218. T. G. Schimmel, A. D. Coffman, and S. J. Parsons, Effect of Butyrolactone I on the Producing Fungus, *Aspergillus terreus*. *Applied and Environmental Microbiology* **1998**, 64(10), 3707-3712.
219. G. R. Pettit, C. L. Herald, D. L. Doubek, and D. L. Herald, Isolation and Structure of Bryostatin 1. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104(24), 6846-6848.
220. K. J. Hale and S. Manaviazar, New Approaches to the Total Synthesis of the Bryostatin Antitumor Macrolides. *Chemistry-An Asian Journal* **2010**, 5(4), 704-754.
221. J. Mann, Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer* **2002**, 2(2), 143-148.
222. H. J. Mackay and C. J. Twelves, Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature Reviews Cancer* **2007**, 7(7), 554-562.
223. G. E. Keck, Y. B. Poudel, T. J. Cummins, A. Rudra, and J. A. Covell, Total Synthesis of Bryostatin 1. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133(4), 744-747.
224. D. A. Evans, P. H. Carter, E. M. Carreira, A. B. Charette, J. A. Prunet, and M. Lautens, Total Synthesis of Bryostatin 2. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121(33), 7540-7552.
225. K. Ohmori, Y. Ogawa, T. Obitsu, Y. Ishikawa, S. Nishiyama, and S. Yamamura, Total Synthesis of Bryostatin 3. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39(13), 2290-2294.
226. M. Kageyama and T. Tamura, Synthesis of Bryostatin 7. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112(20), 7407-7408.
227. Y. Lu, S. K. Woo, and M. J. Krische, Total Synthesis of Bryostatin 7 via C-C Bond-Forming Hydrogenation. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133(35), 13876-13879.
228. P. A. Wender and A. J. Schrier, Total Synthesis of Bryostatin 9. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133(24), 9228-9231.
229. B. M. Trost & G. Dong, Total synthesis of bryostatin 16 using atom-economical and chemoselective approaches. *Nature* **2008**, 456(7221), 485-488.
230. P. A. Wender, J. L. Baryza, C. E. Bennett, F. C. Bi, S. E. Brenner, M. O. Clarke, J. C. Horan, C. Kan, E. Lacote, B. Lippa, P. G. Nell, and T. M. Turner, The Practical

Synthesis of a Novel and Highly Potent Analogue of Bryostatin. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124(46), 13648-13649.

231. C. Vezina, A. Kudelski and S. N. Sehgal, Rapamycin (AY-22,989), A New Antifungal Antibiotic Taxonomy of the Producing Streptomycete and Isolation of the Active Principle. *The Journal of Antibiotics* **1975**, 28(10), 721-726.

232. D. I. Pritchard, Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens. *Drug Discovery Today* **2005**, 10(10), 688-691.

233. N. Hay and N. Sonenberg, Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* **2004**, 18(16), 1926-1945.

234. R. N. Formica Jr, K. M. Lorber, A. L. Friedman, M. J. Bia, F. Lakkis, J. D. Smith, and M. I. Lorber, The Evolving Experience Using Everolimus in Clinical Transplantation. *Transplantation Proceedings* **2004**, 36(2), S495-S499.

235. M. Gompel, M. Leost, E. B. De Kier Joffe, L. Puricelli, L. H. Franco, J. Palermo and L. Meijer, Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the Ascidian *Aplidium meridianum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, 14(7), 1703-1707.

236. H. Nagata, K. Ochiai, Y. Aotani, K. Ando, M. Yoshida, I. Takahashi and T. Tamaoki, Lymphostin (LK6-A), a Novel Immunosuppressant from *Streptomyces* sp. KY11783: Taxonomy of the Producing Organism, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *The Journal of Antibiotics* **1997**, 50(7), 537-542.

237. Y. Aotani, H. Nagata and M. Yoshida, Lymphostin (LK6-A), a Novel Immunosuppressant from *Streptomyces* sp. KY11783: Structural Elucidation. *The Journal of Antibiotics* **1997**, 50(7), 543-545.

238. H. Nagata, H. Yano, K. Sasaki, S. Sato, S. Nakanishi, I. Takahashi, and T. Tamaoki, Inhibition of Lymphocyte Kinase Lck and Phosphatidylinositol 3-kinase by a Novel Immunosuppressant, Lymphostin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2002**, 66(3), 501-507.

239. A. Miyanaga, J. E. Janso, L. McDonald, M. He, H. Liu, L. Barbieri, A. S. Eustaquio, E. N. Fielding, G. T. Carter, P. R. Jensen, X. Feng, M. Leighton, F. E. Koehn, and B. S. Moore, Discovery and Assembly-Line Biosynthesis of the Lymphostin Pyrroloquinoline Alkaloid Family of mTOR Inhibitors in *Salinispora* Bacteria. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133(34), 13311-13313.

240. K. Tatsuta, K. Imamura, S. Itoh and S. Kasai, The first total synthesis of lymphostin. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45(13), 2847-2850.

241. C. A. Mattia, L. Mazzarella and R. Puliti, 4-(2-Amino-4-oxo-2-imidazolin-5-ylidene)-2-bromo-4,5,6,7-tetrahydropyrrolo-[2,3-c]azepin-8-one Methanol Solvate: a New Bromo Compound from the Sponge *Acanthella Aurantiaca*. *Acta*

Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry **1982**, 38(9), 2513-2515.

242. G. Cimino, S. De Rosa, S. De Stefano, L. Mazzarella, R. Puliti and G. Sodano, Isolation and X-ray Crystal Structure of a Novel Bromo-compound from Two Marine Sponges. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23(7), 767-768.

243. I. Kitagawa, M. Kobayashi, K. Kitanaka, M. Kido, and Y. Kyogoku, Marine Natural Products. XII. On the Chemical Constituents of the Okinawan Marine Sponge *Hymeniacidon aldis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1983**, 31(7), 2321-2328.

244. J.-C. Braekman, D. Daloze, C. Stoller and R. W. M. Van Soest, Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae). *Biochemical Systematics and Ecology* **1992**, 20(5), 417-431.

245. L. Meijer, A.-M. W. H. Thunnissen, A. W. White, M. Garnier, M. Nikolic, L.-H. Tsai, J. Walter, K. E. Cleverley, P. C. Salinas, Y.-Z. Wu, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, S.-H. Kim and G. R. Pettit, Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 β and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chemistry & Biology* **2000**, 7(1), 51-63.

246. D. Tasdemir, R. Mallon, M. Greenstein, L. R. Feldberg, S. C. Kim, K. Collins, D. Wojciechowicz, G. C. Mangalindan, G. P. Concepcion, M. K. Harper, and C. M. Ireland, Aldisine Alkaloids from the Philippine Sponge *Stylissa massa* Are Potent Inhibitors of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase-1 (MEK-1). *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45(2), 529-532.

247. A. Kontzias, A. Laurence, M. Gadina and J. J. O' Shea, Kinase inhibitors in the treatment of immune-mediated disease. *F1000 Medicine Reports* **2012**, 4(1), 5.

248. 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. *Nature Medicine* **1996**, 2(5), 561-566.

249. Y. Liu & N. S. Gray, Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nature Chemical Biology* **2006**, 2(7), 358-364.

250. T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W. Todd Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. *Science* **2000**, 289(5486), 1938-1942.

251. H. Zhong and J. P. Bowen, Molecular Design and Clinical Development of VEGFR Kinase Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2007**, 7(14), 1379-1393.

252. K. T. Flaherty, J. R. Infante, A. Daud, R. Gonzalez, R. F. Kefford, J. Sosman, O. Hamid, L. Schuchter, J. Cebon, N. Ibrahim, R. Kudchadkar, H. A. Burris III, G. Falchook, A. Algazi, K. Lewis, G. V. Long, I. Puzanov, P. Lebowitz, A. Singh, S.

Little, P. Sun, A. Allred, D. Ouellet, K. B. Kim, K. Patel, and J. Weber, Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *The New England Journal of Medicine* **2012**, 367(18), 1694-1703.

253. A. T. Shaw, D.-W. Kim, R. Mehra, D. S. W. Tan, E. Felip, L. Q. M. Chow, D. Ross Camidge, J. Vansteenkiste, S. Sharma, T. De Pas, G. J. Riely, B. J. Solomon, J. Wolf, M. Thomas, M. Schuler, G. Liu, A. Santoro, Y. Y. Lau, M. Goldwasser, A. L. Borat, and J. A. Engelman, Ceritinib in *ALK*-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* **2014**, 370(13), 1189-1197.

254. D. Ayeni, K. Politi, and S. B. Goldberg, Emerging Agents and New Mutations in EGFR-Mutant Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **2015**, 21(17), 3818-3820.

255. C.-S. Tan, D. Gilligan, S. Pacey, Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology* **2015**, 16(9), e447-e459.

256. W.-S. Huang, S. Liu, D. Zou, R. M. Thomas, Y. Wang, T. Zhou, J. Romero, A. Kohlmann, F. Li, J. Qi, L. Cai, T. A. Dwight, Y. Xu, R. Xu, R. Dodd, A. V. Toms, L. Parillon, X. Lu, R. Anjum, S. Zhang, F. Wang, J. Keats, S. D. Wardwell, Y. Ning, Q. Xu, L. E. Moran, Q. M. Mohemmad, H. G. Jang, T. Clackson, N. I. Narasimhan, V. M. Rivera, X. Zhu, D. C. Dalgarno, and W. C. Shakespeare, Discovery of Brigatinib (AP26113), a Phosphine Oxide-Containing, Potent, Orally Active Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59(10), 4948-4964.

257. L. V. Sequist, B. A. Waltman, D. Dias-Santagata, S. Digumarthy, A. B. Turke, P. Fidias, K. Bergethon, A. T. Shaw, S. Gettinger, A. K. Cosper, S. Akhavanfard, R. S. Heist, J. Temel, J. G. Christensen, J. C. Wain, T. J. Lynch, K. Vernovsky, E. J. Mark, M. Lanuti, A. J. Iafrate, M. Mino-Kenudson, J. A. Engelman, Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine* **2011**, 3(75), 75ra26.

258. S. S. Ramalingam, J. C.-H. Yang, C. K. Lee, T. Kurata, D.-W. Kim, T. John, N. Nogami, Y. Ohe, H. Mann, Y. Rukazenzov, S. Ghiorghiu, D. Stetson, A. Markovets, J. C. Barrett, K. S. Thress, and P. A. Janne, Osimertinib As First-Line Treatment of *EGFR* Mutation-Positive Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2018**, 36(9), 841-849.

259. M. Das, Brigatinib effective in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology* **2017**, 18(6), e310.

260. K. Uchibori, N. Inase, M. Araki, M. Kamada, S. Sato, Y. Okuno, N. Fujita & R. Katayama, Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *Nature Communications* **2017**, 8, 14768.

261. M. Wu, A. Akinleye and X. Zhu, Novel agents for chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* **2013**, 6(1), 36.
262. C. Ozvegy-Laczka, J. Cserepes, N. Barry Elkind, B. Sarkadi, Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates* **2005**, 8(1-2), 15-26.
263. C. L. Arteaga, and D. H. Johnson, Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). *Current Opinion in Oncology* **2001**, 13(6), 491-498.
264. G. M. Keating, Afatinib: A Review of Its Use in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs* **2014**, 74(2), 207-221.
265. N. U. Lin, E. P. Winer, D. Wheatley, L. A. Carey, S. Houston, D. Mendelson, P. Munster, L. Frakes, S. Kelly, A. A. Garcia, S. Cleator, M. Uttenreuther-Fischer, H. Jones, S. Wind, R. Vinisko, T. Hickish, A phase II study of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker, in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing after trastuzumab. *Breast Cancer Research and Treatment* **2012**, 133(3), 1057-1065.
266. R. R. Furman, J. P. Sharman, S. E. Coutre, B. D. Cheson, J. M. Pagel, P. Hillmen, J. C. Barrientos, A. D. Zelenetz, T. J. Kipps, I. Flinn, P. Ghia, H. Eradat, T. Ervin, N. Lamanna, B. Coiffier, A. R. Pettitt, F. R. C. Path, S. Ma, S. Stilgenbauer, P. Cramer, M. Aiello, D. M. Johnson, L. L. Miller, D. Li, T. M. Jahn, R. D. Dansey, M. Hallek, and S. M. O' Brien, Idelalisib and Rituximab in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine* **2014**, 370(11), 997-1007.
267. J. Qu, Y.-N. Wang, P. Xu, D.-X. Xiang, R. Yang, W. Wei, Q. Qu, Clinical efficacy of icotinib in lung cancer patients with different *EGFR* mutation status: a meta-analysis. *Oncotarget* **2017**, 8(20), 33961-33971.
268. S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G. M. Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, Y. Kitamura, Gain-of-Function Mutations of *c-kit* in Human Gastrointestinal Stromal Tumors. *Science* **1998**, 279(5350), 577-580.
269. S. Wilhelm, C. Carter, M. Lynch, T. Lowinger, J. Dumas, R. A. Smith, B. Schwartz, R. Simantov and S. Kelley, Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5(10), 835-844.
270. J. C. Chavez, E. Sahakian, J. Pinilla-Ibarz, Ibrutinib: an evidence-based review of its potential in the treatment of advanced chronic lymphocytic leukemia. *Core Evidence* **2013**, 8, 37-45.

271. A. I. Daud, S. S. Krishnamurthi, M. N. Saleh, B. J. Gitlitz, M. J. Borad, P. J. Gold, E. G. Chiorean, G. M. Springett, R. Abbas, S. Agarwal, N. Bardy-Bouxin, P.-H. Hsyu, E. Leip, K. Turnbull, C. Zacharchuk, and W. A. Messersmith, Phase I Study of Bosutinib, a Src/Abl Tyrosine Kinase Inhibitor, Administered to Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* **2012**, *18*(4), 1092-1100.
272. J. E. Cortes, H. M. Kantarjian, T. H. Brummendorf, D.-W. Kim, A. G. Turkina, Z.-X. Shen, R. Pasquini, H. J. Khoury, S. Arkin, A. Volkert, N. Besson, R. Abbas, J. Wang, E. Leip and C. Gambacorti-Passerini, Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* **2011**, *118*(17), 4567-4576.
273. J. E. Cortes, D.-W. Kim, H. M. Kantarjian, T. H. Brummendorf, I. Dyagil, L. Griskevicius, H. Malhotra, C. Powell, K. Gogat, A. M. Countouriotis, and C. Gambacorti-Passerini, Bosutinib Versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: Results From the BELA Trial. *Journal of Clinical Oncology* **2012**, *30*(28), 3486-3492.
274. J. Larkin, P. A. Ascierto, B. Dreno, V. Atkinson, G. Liskay, M. Maio, M. Mandala, L. Demidov, D. Stroyakovskiy, L. Thomas, L. de la Cruz-Merino, C. Dutriaux, C. Garbe, M. A. Sovak, I. Chang, N. Choong, S. P. Hack, G. A. McArthur, and A. Ribas, Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF*-Mutated Melanoma. *The New England Journal of Medicine* **2014**, *371*(20), 1867-1876.
275. R. Elisei, M. J. Schlumberger, S. P. Muller, P. Schoffski, M. S. Brose, M. H. Shah, L. Licitra, B. Jarzab, V. Medvedev, M. C. Kreissl, B. Niederle, E. E. W. Cohen, L. J. Wirth, H. Ali, C. Hessel, Y. Yaron, D. Ball, B. Nelkin, and S. I. Sherman, Cabozantinib in Progressive Medullary Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, *31*(29), 3639-3646.
276. A. Abdelaziz, U. Vaishampayan, Cabozantinib for Renal Cell Carcinoma: Current and Future Paradigms. *Current Treatment Options in Oncology* **2017**, *18*(3), 18.
277. J. Matsui, Y. Funahashi, T. Uenaka, T. Watanabe, A. Tsuruoka, and M. Asada, Multi-Kinase Inhibitor E7080 Suppresses Lymph Node and Lung Metastases of Human Mammary Breast Tumor MDA-MB-231 via Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 Kinase. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*(17), 5459-5465.
278. J. E. Frampton, Lenvatinib: A Review in Refractory Thyroid Cancer. *Targeted Oncology* **2016**, *11*(1), 115-122.
279. W. Kuznar, Lenvatinib Extends Survival in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *American Health & Drug Benefits* **2015**, *8*(Special Issue), 18.

280. W.-S. Huang, C. A. Metcalf, R. Sundaramoorthi, Y. Wang, D. Zou, R. M. Thomas, X. Zhu, L. Cai, D. Wen, S. Liu, J. Romero, J. Qi, I. Chen, G. Banda, S. P. Lentini, S. Das, Q. Xu, J. Keats, F. Wang, S. Wardwell, Y. Ning, J. T. Snodgrass, M. I. Broudy, K. Russian, T. Zhou, L. Commodore, N. I. Narasimhan, Q. K. Mohemmad, J. Iulucci, V. M. Rivera, D. C. Dalgarno, T. K. Sawyer, T. Clackson, and W. C. Shakespeare, Discovery of 3-[2-(Imidazo[1,2-*b*]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-*N*-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a Potent, Orally Active Pan-Inhibitor of Breakpoint Cluster Region-Abelson (BCR-ABL) Kinase Including the T315I Gatekeeper Mutant. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53(12), 4701-4719.
281. K. E. Price, N. Saleem, G. Lee, M. Steinberg, Potential of ponatinib to treat chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *OncoTargets and Therapy* **2013**, 6, 1111-1118.
282. A. Grothey, E. Van Cutsem, A. Sobrero, S. Siena, A. Falcone, M. Ychou, Y. Humblet, O. Bouche, L. Mineur, C. Barone, A. Adenis, J. Tabernero, T. Yoshino, H.-J. Lenz, R. M. Goldberg, D. J. Sargent, F. Cihon, L. Cupit, A. Wagner, D. Laurent, Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* **2013**, 381(9863), 303-312.
283. Y. Komatsu, T. Doi, A. Sawaki, T. Kanda, Y. Yamada, I. Kuss, G. D. Demetri, T. Nishida, Regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumors following imatinib and sunitinib treatment: a subgroup analysis evaluating Japanese patients in the phase III GRID trial. *International Journal of Clinical Oncology* **2015**, 20(5), 905-912.
284. R. S. Finn, J. Dering, D. Conklin, O. Kalous, D. J. Cohen, A. J. Desai, C. Ginther, M. Atefi, I. Chen, C. Fowst, G. Los and D. J. Slamon, PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines *in vitro*. *Breast Cancer Research* **2009**, 11(5), R77.
285. N. C. Turner, J. Ro, F. Andre, S. Loi, S. Verma, H. Iwata, N. Harbeck, S. Loibl, C. H. Bartlett, K. Zhang, C. Giorgetti, S. Randolph, M. Koehler, and M. Cristofanilli, Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine* **2015**, 373(3), 209-219.
286. A. Rocca, A. Farolfi, S. Bravaccini, A. Schirone & D. Amadori, Palbociclib (PD 0332991): targeting the cell cycle machinery in breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2014**, 15(3), 407-420.
287. L. Spring, A. Bardia, and S. Modi, Targeting the cyclin D-cyclin-dependent kinase (CDK)4/6-retinoblastoma pathway with selective CDK 4/6 inhibitors in

hormone receptor-positive breast cancer: rationale, current status, and future directions. *Discovery Medicine* **2016**, 21(113), 65-74.

288. P. M. Goodwin, Ribociclib+Letrozole Delayed Advanced Breast Cancer. *Oncology Times* **2016**, 38(22), 37.

289. Y. Minami, T. Shimamura, K. Shah, T. LaFramboise, K. A. Glatt, E. Liniker, C. L. Borgman, H. J. Haringsma, W. Feng, B. A. Weir, A. M. Lowell, J. C. Lee, J. Wolf, G. I. Shapiro, K.-K. Wong, M. Meyerson and R. K. Thomas, The major lung cancer-derived mutants of ERBB2 are oncogenic and are associated with sensitivity to the irreversible EGFR/ERBB2 inhibitor HKI-272. *Oncogene* **2007**, 26(34), 5023-5027.

290. I. Echavarria, S. Lopez-Tarruella, I. Marquez-Rodas, Y. Jerez and M. Martin, Neratinib for the treatment of HER2-positive early stage breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2017**, 17(8), 669-679.

291. K. McKeage, Alectinib: A Review of Its Use in Advanced ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs* **2015**, 75(1), 75-82.

292. S. Dhillon, Nintedanib: A Review of Its Use as Second-Line Treatment in Adults with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology. *Targeted Oncology* **2015**, 10(2), 303-310.

293. L. Wollin, E. Wex, A. Pautsch, G. Schnapp, K. E. Hostettler, S. Stowasser and M. Kolb, Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal* **2015**, 45(5), 1434-1445.

294. D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton, Use of Chemotherapy Plus A Monoclonal Antibody Against HER2 for Metastatic Breast Cancer that Overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine* **2001**, 344(11), 783-792.

295. S. Li, K. R. Schmitz, P. D. Jeffrey, J. J. W. Witzius, P. Kussie, and K. M. Ferguson, Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **2005**, 7(4), 301-311.

296. J. Marx, Encouraging Results for Second-Generation Antiangiogenesis Drugs. *Science* **2005**, 308(5726), 1248-1249.

297. R. G. Amado, M. Wolf, M. Peeters, E. V. Cutsem, S. Siena, D. J. Freeman, T. Juan, R. Sikorski, S. Suggs, R. Radinsky, S. D. Patterson, and D. D. Chang, Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2008**, 26(10), 1626-1634.

298. The CATT Research Group, Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *The New England Journal of Medicine* **2011**, 364(20), 1897-1908.

299. S. Braselmann, V. Taylor, H. Zhao, S. Wang, C. Sylvain, M. Baluom, K. Qu, E. Herlaar, A. Lau, C. Young, B. R. Wong, S. Lovell, T. Sun, G. Park, A. Argade, S. Jurcevic, P. Pine, R. Singh, E. B. Grossbard, D. G. Payan, and E. S. Masuda, R406, an Orally Available Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor Blocks Fc Receptor Signaling and Reduces Immune Complex-Mediated Inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2006**, 319(3), 998-1008.
300. I. W. Flinn, N. L. Bartlett, K. A. Blum, K. M. Ardeshta, A. S. LaCasce, C. R. Flowers, A. R. Shustov, K. S. Thress, P. Mitchell, F. Zheng, J. M. Skolnik, J. W. Friedberg, A phase II trial to evaluate the efficacy of fostamatinib in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *European Journal of Cancer* **2016**, 54, 11-17.
301. S. R. Wedge, J. Kendrew, L. F. Hennequin, P. J. Valentine, S. T. Barry, S. R. Brave, N. R. Smith, N. H. James, M. Dukes, J. O. Curwen, R. Chester, J. A. Jackson, S. J. Boffey, L. L. Kilburn, S. Barnett, G. H. P. Richmond, P. F. Wadsworth, M. Walker, A. L. Bigley, S. T. Taylor, L. Cooper, S. Beck, J. M. Jurgensmeier, and D. J. Ogilvie, AZD2171: A Highly Potent, Orally Bioavailable, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Tyrosine Kinase Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Cancer Research* **2005**, 65(10), 4389-4400.
302. G. Goss, F. A. Shepherd, S. Laurie, I. Gauthier, N. Leighl, E. Chen, R. Feld, J. Powers, L. Seymour, A phase I and pharmacokinetic study of daily oral cediranib, an inhibitor of vascular endothelial growth factor tyrosine kinases, in combination with cisplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer: A study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *European Journal of Cancer* **2009**, 45(5), 782-788.
303. P. Nikolinakos, and J. V. Heymach, The Tyrosine Kinase Inhibitor Cediranib for Non-small Cell Lung Cancer and Other Thoracic Malignancies. *Journal of Thoracic Oncology* **2008**, 3(6, Supplement 2), S131-S134.
304. T. T. Batchelor, P. Mulholland, B. Neyns, L. B. Nabors, M. Campone, A. Wick, W. Mason, T. Mikkelsen, S. Phuphanich, L. S. Ashby, J. DeGroot, R. Gattamaneni, L. Cher, M. Rosenthal, F. Payer, J. M. Jurgensmeier, R. K. Jain, A. G. Sorensen, J. Xu, Q. Liu, and M. van den Bent, Phase III Randomized Trial Comparing the Efficacy of Cediranib As Monotherapy, and in Combination With Lomustine, Versus Lomustine Alone in Patients With Recurrent Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, 31(26), 3212-3218.
305. D. Parry, T. Guzi, F. Shanahan, N. Davis, D. Prabhavalkar, D. Wiswell, W. Seghezzi, K. Paruch, M. P. Dwyer, R. Doll, A. Nomeir, W. Windsor, T. Fischmann, Y. Wang, M. Oft, T. Chen, P. Kirschmeier, and E. M. Lees, Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics* **2010**, 9(8), 2344-2353.

306. J. J. Stephenson, J. Nemunaitis, A. A. Joy, J. C. Martin, Y.-M. Jou, D. Zhang, P. Statkevich, S.-L. Yao, Y. Zhu, H. Zhou, K. Small, R. Bannerji, M. J. Edelman, Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2014**, 83(2), 219-223.
307. M. M. Mita, A. A. Joy, A. Mita, K. Sankhala, Y.-M. Jou, D. Zhang, P. Statkevich, Y. Zhu, S.-L. Yao, K. Small, R. Bannerji, C. L. Shapiro, Randomized Phase II Trial of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Dinaciclib (MK-7965) Versus Capecitabine in Patients With Advanced Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* **2014**, 14(3), 169-176.
308. S. K. Kumar, B. LaPlant, W. J. Chng, J. Zonder, N. Callander, R. Fonseca, B. Fruth, V. Roy, C. Erlichman, and A. K. Stewart, Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* **2015**, 125(3), 443-448.
309. M. Gonzalez-Cao, J. Rodon, N. Karachaliou, J. Sanchez, M. Santarpia, S. Viteri, S. Pilotto, C. Teixido, A. Riso, R. Rosell, Other targeted drugs in melanoma. *Annals of Translational Medicine* **2015**, 3(18), 266.
310. Y.-L. Wu, Y. Cheng, X. Zhou, K. H. Lee, K. Nakagawa, S. Niho, F. Tsuji, R. Linke, R. Rosell, J. Corral, M. R. Migliorino, A. Pluzanski, E. I. Sbar, T. Wang, J. Liang White, S. Nadanaciva, R. Sandin, T. S. Mok, Dacomitinib versus gefitinib as first-line treatment for patients with *EGFR*-mutation-positive non-small-cell lung cancer (ARCHER 1050): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **2017**, 18(11), 1454-1466.
311. F. Ma, Q. Li, S. Chen, W. Zhu, Y. Fan, J. Wang, Y. Luo, P. Xing, B. Lan, M. Li, Z. Yi, R. Cai, P. Yuan, P. Zhang, Q. Li, and B. Xu, Phase I Study and Biomarker Analysis of Pyrotinib, a Novel Irreversible Pan-ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **2017**, 35(27), 3105-3112.
312. X. Xu, Parallel phase 1 clinical trials in the US and in China: accelerating the test of avitinib in lung cancer as a novel inhibitor selectively targeting mutated *EGFR* and overcoming T790M-induced resistance. *Chinese Journal of Cancer* **2015**, 34(3), 27.
313. E. Rota Caremoli & R. Labianca, Tivantinib: critical review with a focus on hepatocellular carcinoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2014**, 23(11), 1563-1574.
314. P. J. Johnson, S. Qin, J.-W. Park, R. T. P. Poon, J.-L. Raoul, P. A. Philip, C.-H. Hsu, T.-H. Hu, J. Heo, J. Xu, L. Lu, Y. Chao, E. Boucher, K.-H. Han, S.-W. Paik, J. Robles-Avina, M. Kudo, L. Yan, A. Sobhonslidsuk, D. Komov, T. Decaens, W.-Y. Tak, L.-B. Jeng, D. Liu, R. Ezzeddine, I. Walters, and A.-L. Cheng, Brivanib Versus Sorafenib As First-Line Therapy in Patients With Unresectable, Advanced

Hepatocellular Carcinoma: Results From the Randomized Phase III BRISK-FL Study. *Journal of Clinical Oncology* **2013**, 31(28), 3517-3524.

315. J.-C. Soria, F. DeBraud, R. Bahleda, B. Adamo, F. Andre, R. Dientsmann, A. Delmonte, R. Cereda, J. Isaacson, J. Litten, A. Allen, F. Dubois, C. Saba, R. Robert, M. D' Incalci, M. Zucchetti, M. G. Camboni & J. Tabernero, Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors. *Annals of Oncology* **2014**, 25(11), 2244-2251.

316. B. Han, K. Li, Y. Zhao, Q. Wang, L. Zhang, J. Shi, Z. Wang, J. He, Y. Shi, Y. Cheng, W. Chen, X. Wang, Y. Luo, K. Nan, F. Jin, J. Dong, B. Li, J. Zhou, Y. Chen, D. Wang, X. Zhou, Y. Yu, L. Chen, A. Liu, J. Huang, C. Huang, B. Cao, J. Chen, R. Ma, Z. Yu, C. Ding, H. Wang, A Randomized Phase III Clinical Trial of Anlotinib Hydrochloride in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Oncology* **2017**, 12(1, Supplement), S886-S887.

317. E. M. Stein, Molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia. *Hematology* **2015**, 2015(1), 579-583.

318. L. M. Jost, H.-P. Gschwind, T. Jalava, Y. Wang, C. Guenther, C. Souppart, A. Rottmann, K. Denner, F. Waldmeier, G. Gross, E. Masson, and D. Laurent, Metabolism and Disposition of Vatalanib (PTK787/ZK-222584) in Cancer Patients. *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, 34(11), 1817-1828.

319. J. M. Wood, G. Bold, E. Buchdunger, R. Cozens, S. Ferrari, J. Frei, F. Hofmann, J. Mestan, H. Mett, T. O' Reilly, E. Persohn, J. Rosel, C. Schnell, D. Stover, A. Theuer, H. Towbin, F. Wenger, K. Woods-Cook, A. Menrad, G. Siemeister, M. Schirner, K.-H. Thierauch, M. R. Schneider, J. Dreves, G. Martiny-Baron, F. Totzke, and D. Marme, PTK787/ZK 222584, a Novel and Potent Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases, Impairs Vascular Endothelial Growth Factor-induced Responses and Tumor Growth after Oral Administration. *Cancer Research* **2000**, 60(8), 2178-2189.

320. M. Los, J. M. L. Roodhart, E. E. Voest, Target Practice: Lessons from Phase III Trials with Bevacizumab and Vatalanib in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer. *The Oncologist* **2007**, 12(4), 443-450.

321. T. Troiani, L. Vecchione, E. Martinelli, A. Capasso, S. Costantino, L. P. Ciuffreda, F. Morgillo, D. Vitagliano, E. D. Aiuto, R. De Palma, S. Tejpar, E. Van Cutsem, M. De Lorenzi, M. Caraglia, L. Berrino and F. Ciardiello, Intrinsic resistance to selumetinib, a selective inhibitor of MEK1/2, by cAMP-dependent protein kinase A activation in human lung and colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer* **2012**, 106(10), 1648-1659.

322. L. Horn, Y.-L. Wu, M. Reck, C. Liang, F. Tan, and K. Harrow, eXalt3: A phase III study of ensartinib (X-396) in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive non-

small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology* **2017**, 35(15, Supplement), TPS8578.

323. W. F. De Azevedo, S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad and S.-H. Kim, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *European Journal of Biochemistry* **1997**, 243(1-2), 518-526.

324. 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. *Polish Journal of Pharmacology* **2004**, 56(5), 635-641.

325. I. Neant and P. Guerrier, 6-Dimethylaminopurine Blocks Starfish Oocyte Maturation by Inhibiting a Relevant Protein Kinase Activity. *Experimental Cell Research* **1988**, 176(1), 68-79.

326. M. S. Szollosi, J. Z. Kubiak, P. Debey, H. de Pennart, D. Szollosi and B. Maro, Inhibition of protein kinases by 6-dimethylaminopurine accelerates the transition to interphase in activated mouse oocytes. *Journal of Cell Science* **1993**, 104(3), 861-872.

327. E. A. Sausville, Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends in Molecular Medicine* **2002**, 8(4), S32-S37.

328. H. Iseki, T. C. Ko, X. Y. Xue, A. Seapan, M. R. Hellmich, and C. M. Townsend, Jr., Cyclin-dependent kinase inhibitors block proliferation of human gastric cancer cells. *Surgery* **1997**, 122(2), 187-195.

329. J. S. Yakisich, A. Siden, V. I. Vargas, P. Eneroth, and M. Cruz, Early Inhibition of DNA Synthesis in the Developing Rat Cerebral Cortex by the Purine Analogues Olomoucine and Roscovitine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, 243(3), 674-677.

330. D. E. MacCallum, J. Melville, S. Frame, K. Watt, S. Anderson, A. Gianella-Borradori, D. P. Lane, and S. R. Green, Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) Induces Cell Death in Multiple Myeloma Cells by Inhibition of RNA Polymerase II-Dependent Transcription and Down-regulation of Mcl-1. *Cancer Research* **2005**, 65(12), 5399-5407.

331. E. Agbottah, C. de la Fuente, S. Nekhai, A. Barnett, A. Gianella-Borradori, A. Pumfery, and F. Kashanchi, Antiviral Activity of CYC202 in HIV-1-infected Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280(4), 3029-3042.

332. L. M. Schang, A. Rosenberg, and P. A. Schaffer, Roscovitine, a Specific Inhibitor of Cellular Cyclin-Dependent Kinases, Inhibits Herpes Simplex Virus DNA Synthesis in the Presence of Viral Early Proteins. *Journal of Virology* **2000**, 74(5), 2107-2120.

333. T. Hikita, C. Oneyama and M. Okada, Purvalanol A, a CDK inhibitor, effectively suppresses Src-mediated transformation by inhibiting both CDKs and c-Src. *Genes to Cells* **2010**, 15(10), 1051-1062.
334. R. Jorda, L. Havlicek, I. W. McNae, M. D. Walkinshaw, J. Voller, A. Sturc, J. Navratilova, M. Kuzma, M. Mistrik, J. Bartek, M. Strnad, and V. Krystof, Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54(8), 2980-2993.
335. O. Argyros, N. Lougiakis, E. Kouvari, A. Papafotika, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, S. Christoforidis, N. Pouli, P. Marakos, C. Tamvakopoulos, Design and synthesis of novel 7-aminosubstituted pyrido[2,3-*b*]pyrazines exhibiting anti-breast cancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 126, 954-968.
336. L. N. Pino and W. S. Zehring III, Preparation of Pure 2-Aminonitropyridines and 2-Aminonitropicolines. Rapid Separations by Sublimation. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77(11), 3154-3155.
337. A. G. Burton, P. J. Halls, and A. R. Katritzky, The selective 3- and 5-nitration of 2-pyridones. *Tetrahedron Letters* **1971**, 12(24), 2211-2212.
338. A. Roe and R. B. Seligman, The Preparation of 3-Fluoroisonicotinic Acid and Related Compounds. *The Journal of Organic Chemistry* **1955**, 20(12), 1729-1732.
339. D. Chapman and J. Hurst, Pyrazolopyridines. Part 5. Preparation and Reactions of Pyrazolo[3,4-*c*]pyridines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1980**, 2398-2404.
340. H. Stephen, A New Synthesis of Aldehydes. *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1925**, 127, 1874-1877.
341. F. D. Bellamy, K. Ou, Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Stannous Chloride in Non Acidic and Non Aqueous Medium. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25(8), 839-842.
342. S. Sestito, G. Nesi, S. Daniele, A. Martelli, M. Digiacomo, A. Borghini, D. Pietra, V. Calderone, A. Lapucci, M. Falasca, P. Parrella, A. Notarangelo, M. C. Breschi, M. Macchia, C. Martini, S. Rapposelli, Design and synthesis of 2-oxindole based multi-targeted inhibitors of PDK1/Akt signaling pathway for the treatment of glioblastoma multiforme. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 105, 274-288.
343. S. Chandrasekhar, S. J. Prakash, and C. L. Rao, Poly(ethylene Glycol) (400) as Superior Solvent Medium against Ionic Liquids for Catalytic Hydrogenations with PtO₂. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71(5), 2196-2199.
344. **Patent:** WO2016/011390 A1, **2016**, 62.

345. R. Hesse, K. K. Gruner, O. Kataeva, A. W. Schmidt, and H.-J. Knolker, Efficient Construction of Pyrano[3,2- α]carbazoles: Application to a Biomimetic Total Synthesis of Cyclized Monoterpenoid Pyrano[3,2- α]carbazole Alkaloids. *Chemistry-A European Journal* **2013**, 19(42), 14098-14111.
346. G. Sheng, X. Wu, X. Cai, W. Zhang, Cooperation of a Reductant and an Oxidant in One Pot To Synthesize Amides from Nitroarenes and Aldehydes. *Synthesis* **2015**, 47(7), 949-954.
347. M. A. Bechamp, De l' Action des Protosels de Fer Sur la nitronaphtaline et la nitrobenzine. Nouvelle methode de formation des bases organiques artificielles de Zinin. *Annales de chimie et de physique* **1854**, 42, 186-196.
348. D. Cantillo, M. Baghbanzadeh, and C. O. Kappe, In Situ Generated Iron Oxide Nanocrystals as Efficient and Selective Catalysts for the Reduction of Nitroarenes using a Continuous Flow Method. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51(40), 10190-10193.
349. S. Gowda & D. C. Gowda, Zinc/hydrazine: A low cost-facile system for the reduction of nitro compounds. *Indian Journal of Chemistry* **2003**, 42B(1), 180-183.
350. F. Li, B. Frett, H.-y. Li, Selective Reduction of Halogenated Nitroarenes with Hydrazine Hydrate in the Presence of Pd/C. *Synlett* **2014**, 25(10), 1403-1408.
351. M. K. Basu, F. F. Becker and B. K. Banik, Ultrasound-promoted highly efficient reduction of aromatic nitro compounds to the aromatic amines by samarium/ammonium chloride. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41(30), 5603-5606.
352. A. Nose and T. Kudo, Selective Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Nickel Boride. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1989**, 37(3), 816-818.
353. J. P. Idoux, Selective Reduction of Nitroaromatic Compounds. *Journal of the Chemical Society C: Organic* **1970**, (3), 435-437.
354. M. Michailidou, V. Giannouli, V. Kotsikoris, O. Papadodima, G. Kontogianni, I. K. Kostakis, N. Lougiakis, A. Chatziioannou, F. N. Kollis, P. Marakos, N. Pouli, H. Loutrari, Novel pyrazolopyridine derivatives as potential angiogenesis inhibitors: Synthesis, biological evaluation and transcriptome-based mechanistic analysis. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 121, 143-157.
355. V. Collot, P. Dallemagne, P. R. Bovy, and S. Rault, Suzuki-Type Cross-Coupling Reaction of 3-Iodoindazoles with Aryl Boronic Acids: a General and Flexible Route to 3-Arylindazoles. *Tetrahedron* **1999**, 55(22), 6917-6922.
356. F. Jin and P. N. Confalone, Palladium-catalyzed cyanation reactions of aryl chlorides. *Tetrahedron Letters* **2000**, 41(18), 3271-3273.

357. K. W. Rosenmund und E. Struck, Das am Ringkohlenstoff gebundene Halogen und sein Ersatz durch andere Substituenten. I. Mitteilung: Ersatz des Halogens durch die Carboxylgruppe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1919**, 52(8), 1749-1756.
358. T. Sandmeyer, Ueber die Ersetzung der Amidgruppe durch Chlor in den aromatischen Substanzen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1884**, 17(2), 1633-1635.
359. J.-P. Corbet and G. Mignani, Selected Patented Cross-Coupling Reaction Technologies. *Chemical Reviews* **2006**, 106(7), 2651-2710.
360. J. Lindley, Copper Assisted Nucleophilic Substitution of Aryl Halogen. *Tetrahedron* **1984**, 40(9), 1433-1456.
361. R. G. R. Bacon and H. A. O. Hill, Metal Ions and Complexes in Organic Reactions. Part I. Substitution Reactions between Aryl Halides and Cuprous Salts in Organic Solvents. *Journal of the Chemical Society* **1964**, 1097-1107.
362. J. v. Braun und G. Manz, Fluoranthen und seine Derivate. III. Mitteilung. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1931**, 488(1), 111-126.
363. K. Takagi, T. Okamoto, Y. Sakakibara, and S. Oka, Palladium(II) Catalyzed Synthesis of Aryl Cyanides from Aryl Halides. *Chemistry Letters* **1973**, 2(5), 471-474.
364. P. Anbarasan, T. Schareina and M. Beller, Recent developments and perspectives in palladium-catalyzed cyanation of aryl halides: synthesis of benzonitriles. *Chemical Society Reviews* **2011**, 40(10), 5049-5067.
365. T. Schareina, A. Zapf, A. Cotte, M. Gotta, and M. Beller, A Versatile Protocol for Copper-Catalyzed Cyanation of Aryl and Heteroaryl Bromides with Acetone Cyanohydrin. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, 353(5), 777-780.
366. M. Sundermeier, A. Zapf, M. Beller and J. Sans, A new palladium catalyst system for the cyanation of aryl chlorides. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42(38), 6707-6710.
367. U. Yapuri, S. Palle, O. Gudaparthi, S. Reddy Narahari, D. K. Rawat, K. Mukkanti, J. Vantikommu, Ligand-free nano copper oxide catalyzed cyanation of aryl halides and sequential one-pot synthesis of 5-substituted-1*H*-tetrazoles. *Tetrahedron Letters* **2013**, 54(35), 4732-4734.
368. C. Yang and J. Michael Williams, Palladium-Catalyzed Cyanation of Aryl Bromides Promoted by Low-Level Organotin Compounds. *Organic Letters* **2004**, 6(17), 2837-2840.
369. J.-T. Hou, Potassium Hexacyanoferrate(II). *Synlett* **2010**, (20), 3115-3116.

370. T. D. Senecal, W. Shu, and S. L. Buchwald, A General, Practical Palladium-Catalyzed Cyanation of (Hetero)aryl Chlorides and Bromides. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52(38), 10035-10039.
371. Y.-n. Cheng, Z. Duan, T. Li, Y. Wu, Cyanation of Aryl Chlorides with Potassium Hexacyanoferrate(II) Catalyzed by Cyclopalladated Ferrocenylimine Tricyclohexylphosphine Complexes. *Synlett* **2007**, (4), 543-546.
372. P. Y. Yeung, C. P. Tsang, F. Y. Kwong, Efficient cyanation of aryl bromides with $K_4[Fe(CN)_6]$ catalyzed by a palladium-indolyl phosphine complex. *Tetrahedron Letters* **2011**, 52(52), 7038-7041.
373. T. Schareina, A. Zapf, M. Beller, Improving palladium-catalyzed cyanation of aryl halides: development of a state-of-the-art methodology using potassium hexacyanoferrate(II) as cyanating agent. *Journal of Organometallic Chemistry* **2004**, 689(24), 4576-4583.
374. A. R. Hajipour, K. Karami and A. Pirisedigh, Palladium-catalyzed cyanation reaction of aryl halides using $K_4[Fe(CN)_6]$ as non-toxic source of cyanide under microwave irradiation. *Applied Organometallic Chemistry* **2010**, 24(6), 454-457.
375. Y.-Z. Zhu and C. Cai, Pd/C: A Recyclable Catalyst for Cyanation of Aryl Halides with $K_4[Fe(CN)_6]$. *Synthetic Communications* **2007**, 37(19), 3359-3366.
376. T. Schareina, A. Zapf and M. Beller, Potassium hexacyanoferrate(II)-a new cyanating agent for the palladium-catalyzed cyanation of aryl halides. *Chemical Communications* **2004**, 10(12), 1388-1389.
377. D. N. Sawant and B. M. Bhanage, $Pd(OAc)_2/DPPF$ -catalysed microwave-assisted cyanide-free synthesis of aryl nitriles. *Journal of Chemical Sciences* **2014**, 126(2), 319-324.
378. G. Brasche and S. L. Buchwald, C-H Functionalization/C-N Bond Formation: Copper-Catalyzed Synthesis of Benzimidazoles from Amidines. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47(10), 1932-1934.
379. Y. Wang, H. Wang, J. Peng, and Q. Zhu, Palladium-Catalyzed Intramolecular $C(sp^2)$ -H Amidination by Isonitrile Insertion Provides Direct Access to 4-Aminoquinazolines from *N*-Arylamidines. *Organic Letters* **2011**, 13(17), 4604-4607.
380. B. Singh and J. C. Collins, Simple New Synthesis of 4,6-Diaryl-2-hydroxy-s-triazines and Amidines. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* **1971**, (10), 498-499.
381. L. Hu, D. W. Boykin, A Novel and Convenient Synthesis of 'Reversed' Diamidino 2,5-Aryl- and 2,5-Azaheterocycle-Substituted Furans. *Synthesis* **2009**, (13), 2143-2145.

382. I. K. Khanna, Y. Yu, R. M. Huff, R. M. Weier, X. Xu, F. J. Koszyk, P. W. Collins, J. N. Cogburn, P. C. Isakson, C. M. Koboldt, J. L. Masferrer, W. E. Perkins, K. Seibert, A. W. Veenhuizen, J. Yuan, D.-C. Yang, and Y. Y. Zhang, Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Heteroaryl Modified 1,2-Diarylimidazoles Are Potent, Orally Active Antiinflammatory Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43(16), 3168-3185.
383. Y. Sugimoto, K. Kobayashi, M. Asai, A. Ohno, K. Yamada, S. Ozaki, H. Ohta, O. Okamoto, Synthesis and biological evaluation of imidazole derivatives as novel NOP/ORL1 receptor antagonists: Exploration and optimization of alternative pyrazole structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19(16), 4611-4616.
384. J. H. M. Lange, H. H. van Stuivenberg, H. K. A. C. Coolen, T. J. P. Adolfs, A. C. McCreary, H. G. Keizer, H. C. Wals, W. Veerman, A. J. M. Borst, W. de Looff, P. C. Verveer, and C. G. Kruse, Bioisosteric Replacements of the Pyrazole Moiety of Rimonabant: Synthesis, Biological Properties, and Molecular Modeling Investigations of Thiazoles, Triazoles, and Imidazoles as Potent and Selective CB₁ Cannabinoid Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48(6), 1823-1838.
385. X. Li, L. Wang, L. Long, J. Xiao, Y. Hu, S. Li, Synthesis and biological evaluation of 1,2,4-trisubstituted imidazoles and 1,3,5-trisubstituted pyrazoles as inhibitors of transforming growth factor β type 1 receptor (ALK5). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19(16), 4868-4872.
386. N. H. Theodoulou, P. Bamborough, A. J. Bannister, I. Becher, R. A. Bit, K. Hing Che, C.-w. Chung, A. Dittmann, G. Drewes, D. H. Drewry, L. Gordon, P. Grandi, M. Leveridge, M. Lindon, A.-M. Michon, J. Molnar, S. C. Robson, N. C. O. Tomkinson, T. Kouzarides, R. K. Prinjha, and P. G. Humphreys, Discovery of I-BRD9, a Selective Cell Active Chemical Probe for Bromodomain Containing Protein 9 Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, 59(4), 1425-1439.
387. S. Arya, N. Kumar, P. Roy, S. M. Sondhi, Synthesis of amidine and bis amidine derivatives and their evaluation for anti-inflammatory and anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 59, 7-14.
388. S. M. Sondhi, R. Rani, P. Roy, S. K. Agrawal, and A. K. Saxena, Synthesis, Anti-Inflammatory, and Anticancer Activity Evaluation of Some Heterocyclic Amidine and Bis-Amidine Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2011**, 48(4), 921-926.
389. T. Hisano, M. Tasaki, K. Tsumoto, T. Matsuoka, and M. Ichikawa, Synthesis and Antiinflammatory Activity of N¹-(Substitutedphenyl)pyridinecarboxamidines. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1983**, 31(7), 2484-2490.
390. J. I. Ogonor, Preparation of N-Substituted Amidines. *Tetrahedron* **1981**, 37(16), 2909-2910.

391. K. Pan, M. K. Scott, D. H. S. Lee, L. J. Fitzpatrick, J. J. Crooke, R. A. Rivero, D. I. Rosenthal, A. H. Vaidya, B. Zhao and A. B. Reitz, 2,3-Diaryl-5-anilino[1,2,4]thiadiazoles as Melanocortin MC4 Receptor Agonists and Their Effects on Feeding Behavior in Rats. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, *11*(2), 185-192.
392. J. Grimshaw and S. Armstrong Hewitt, Electrochemical Cyclization of 1-Phenyl-2-(-1'-chlorophenyl)-substituted Five-membered Nitrogen Heterocycles. Application to the Synthesis of Phenanthridines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1990**, (11), 2995-2998.
393. S. Aikawa, C. Sekiguchi, Y. Yamazaki, M. Hattori, T. Isaka, Y. Yoshida, and S. Ihara, Synthesis of 2-Arylquinazolin-4(3*H*)-ones by *N*-Aryl Benamidines with Aromatic Carbonates. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2014**, *51*(2), 343-348.
394. R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, L. Baldisera, L. Laberge and J. Rousell, The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*(3), 279-282.
395. R. J. Giguere, T. L. Bray, S. M. Duncan, and G. Majetich, Application of Commercial Microwave Ovens to Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*(41), 4945-4948.
396. A. Loupy, *Microwaves in Organic Synthesis* **2006**, 2nd edition.
397. B. L. Hayes, *Microwave Synthesis Chemistry at the Speed of Light* **2002**.
398. P. Lidstrom, J. Tierney, B. Wathey and J. Westman, Microwave assisted organic synthesis-a review. *Tetrahedron* **2001**, *57*(45), 9225-9283.
399. **Patent:** US6762180 B1, **2004**, 39.
400. M. N. Romanelli, D. Manetti, S. Scapecchi, P. A. Borea, S. Dei, A. Bartolini, C. Ghelardini, F. Gualtieri, L. Guandalini, and K. Varani, Structure-Affinity Relationships of a Unique Nicotinic Ligand: N¹-Dimethyl-N⁴-phenylpiperazinium Iodide (DMPP). *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*(23), 3946-3955.
401. R. P. Tangallapally, R. Yendapally, R. E. Lee, A. J. M. Lenaerts, and R. E. Lee, Synthesis and Evaluation of Cyclic Secondary Amine Substituted Phenyl and Benzyl Nitrofuranyl Amides as Novel Antituberculosis Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*(26), 8261-8269.
402. W. R. Dolbier, Jr., *Guide to Fluorine NMR for Organic Chemists* **2016**, 2nd edition.
403. K. Horita, T. Yoshioka, T. Tanaka, Y. Oikawa and O. Yonemitsu, On the Selectivity of Deprotection of Benzyl, MPM (4-Methoxybenzyl) and DMPM (3,4-

Dimethoxybenzyl) Protecting Groups for Hydroxy Functions. *Tetrahedron* **1986**, 42(11), 3021-3028.

404. N. N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements* **1993**, 1st edition.

405. I. Leray, M. Ayadim, C. Ottermans, J. L. Habib Jiwan, J. Ph. Soumilion, Photoinduced electron transfer sensitization of anisyl ether cleavage: studies in homogeneous solution and at the surface of one or two solids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2000**, 132(1), 43-52.

406. A. Srikrishna, R. Viswajanani, J. A. Sattigeri, and D. Vijaykumar, A New, Convenient Reductive Procedure for the Deprotection of 4-Methoxybenzyl (MPM) Ethers to Alcohols. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60(18), 5961-5962.

407. L. Yan and D. Kahne, p-Methoxybenzyl Ethers as Acid-Labile Protecting Groups in Oligosaccharide Synthesis. *Synlett* **1995** (SI), 523-524.

408. A. Bouzide and G. Sauve, Lewis Acid-Catalyzed Deprotection of p-Methoxybenzyl Ether. *Synlett* **1997**, (10), 1153-1154.

409. T. Akiyama, H. Shima, S. Ozaki, Trimethylsilyl Chloride-Tin(II) Chloride-Anisole: A Novel Selective p-Methoxybenzyl Ether Cleavage Reagent. *Synlett* **1992**, (5), 415-416.

410. T. Onoda, R. Shirai and S. Iwasaki, A Mild and Selective Deprotection of p-Methoxybenzyl (PMB) Ether by Magnesium Bromide Diethyl Etherate-Methyl Sulfide. *Tetrahedron Letters* **1997**, 38(8), 1443-1446.

411. G. Liu, B. T. Campbell, M. W. Holladay, J. M. Ford Pulido, H. Hua, D. Gitnick, M. F. Gardner, J. James, M. A. Breider, D. Brigham, B. Belli, R. C. Armstrong, and D. K. Treiber, Discovery of AC710, a Globally Selective Inhibitor of Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Family Kinases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 3(12), 997-1002.

412. **Patent:** EP1500655 A1, **2005**, 10.

413. J. B. Cross, J. Zhang, Q. Yang, M. F. Mesleh, J. A. C. Romero, B. Wang, D. Bevan, K. M. Poutsiaka, F. Epie, T. Moy, A. Daniel, J. Shotwell, B. Chamberlain, N. Carter, O. Andersen, J. Barker, M. D. Ryan, C. A. Metcalf, III, J. Silverman, K. Nguyen, B. Lippa, and R. E. Dolle, Discovery of Pyrazolopyridones as a Novel Class of Gyrase B Inhibitors Using Structure Guided Design. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 7(4), 374-378.

414. S. Hikishima, M. Hashimoto, L. Magnowska, A. Bzowska, T. Yokomatsu, Structural-based design and synthesis of novel 9-deazaguanine derivatives having a phosphate mimic as multi-substrate analogue inhibitors for mammalian PNPs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18(6), 2275-2284.

415. F. Padilla, N. Bhagirath, S. Chen, E. Chiao, D. M. Goldstein, J. C. Hermann, J. Hsu, J. J. Kennedy-Smith, A. Kuglstatter, C. Liao, W. Liu, L. E. Lowrie, Jr., K. C. Luk, S. M. Lynch, J. Menke, L. Niu, T. D. Owens, C. O-Yang, A. Railkar, R. C. Schoenfeld, M. Slade, S. Steiner, Y.-C. Tan, A. G. Villasenor, C. Wang, J. Wanner, W. Xie, D. Xu, X. Zhang, M. Zhou, and M. C. Lucas, Pyrrolopyrazines as Selective Spleen Tyrosine Kinase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56(4), 1677-1692.
416. **Patent:** WO2010/068242 A1, **2010**, 118.
417. E. B. Tsupak, Y. N. Tkachenko, and A. F. Pozharskii, Pyrrolopyrimidines. 1. Electrophilic Substitution Reactions of 1,3-Dimethylpyrrolo[3,2-d]pyrimidine-2,4-dione. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **1994**, 30(9), 1077-1082.
418. B. J. Demopoulos, H. J. Anderson, C. E. Loader, and K. Faber, Pyrrole chemistry. XXVI. A synthesis of porphobilinogen from pyrrole. *Canadian Journal of Chemistry* **1983**, 61(10), 2415-2422.
419. C.-A. Wurtz, Sur une Nouvelle Classe de Radicaux Organiques. *Annales de chimie et de physique* **1855**, 44, 275-313.
420. C. Glaser, Beitrage zur Kenntnifs des Acetenylbenzols. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1869**, 2(1), 422-424.
421. C. Glaser, Untersuchungen uber einige Derivate der Zimmtsaeure. *Annalen der Chemie und Pharmacie* **1870**, 154(2), 137-171.
422. F. Ullmann und J. Bielecki, Ueber Synthesen in der Biphenylreihe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, 34(2), 2174-2185.
423. M. Gomberg and W. E. Bachmann, The Synthesis of Biaryl Compounds by Means of the Diazo Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **1924**, 46(10), 2339-2343.
424. N. Miyaura, K. Yamada, and A. Suzuki, A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Letters* **1979**, 20(36), 3437-3440.
425. R. D. Stephens and C. E. Castro, The Substitution of Aryl Iodides with Cuprous Acetylides. A Synthesis of Tolanes and Heterocyclics. *The Journal of Organic Chemistry* **1963**, 28(12), 3313-3315.
426. K. Tamao, K. Sumitani, M. Kumada, Selective Carbon-Carbon Bond Formation by Cross-Coupling of Grignard Reagents with Organic Halides. Catalysis by Nickel-Phosphine Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 94(12), 4374-4376.

427. R. F. Heck and J. P. Nolley, Jr, Palladium-Catalyzed Vinylic Hydrogen Substitution Reactions with Aryl, Benzyl, and Styryl Halides. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37(14), 2320-2322.
428. K. Sonogashira, Y. Tohda, and N. Hagihara, A Convenient Synthesis of Acetylenes: Catalytic Substitutions of Acetylenic Hydrogen with Bromoalkenes, Iodoarenes, and Bromopyridines. *Tetrahedron Letters* **1975**, 16(50), 4467-4470.
429. A. O. King, N. Okukado, and E. Negishi, Highly General Stereo-, Regio-, and Chemo-selective Synthesis of Terminal and Internal Conjugated Enynes by the Pd-catalysed Reaction of Alkynylzinc Reagents with Alkenyl Halides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1977**, (19), 683-684.
430. D. Milstein, J. K. Stille, A General, Selective, and Facile Method for Ketone Synthesis from Acid Chlorides and Organotin Compounds Catalyzed by Palladium. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, 100(11), 3636-3638.
431. Y. Hatanaka, T. Hiyama, Cross-Coupling of Organosilanes with Organic Halides Mediated by Palladium Catalyst and Tris(diethylamino)sulfonium Difluorotrimethylsilicate. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, 53(4), 918-920.
432. J. F. Hartwig, Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides: Mechanism and Rational Catalyst Design. *Synlett* **1997**, (4), 329-340.
433. J. F. Hartwig, Transition Metal Catalyzed Synthesis of Arylamines and Aryl Ethers from Aryl Halides and Triflates: Scope and Mechanism. *Angewandte Chemie International Edition* **1998**, 37(15), 2046-2067.
434. J. P. Wolfe, S. Wagaw, J.-F. Marcoux, and S. L. Buchwald, Rational Development of Practical Catalysts for Aromatic Carbon-Nitrogen Bond Formation. *Accounts of Chemical Research* **1998**, 31(12), 805-818.
435. J. F. Hartwig, Carbon-Heteroatom Bond-Forming Reductive Eliminations of Amines, Ethers, and Sulfides. *Accounts of Chemical Research* **1998**, 31(12), 852-860.
436. J. F. Hartwig, Approaches to catalyst discovery. New carbon-heteroatom and carbon-carbon bond formation. *Pure and Applied Chemistry* **1999**, 71(8), 1417-1423.
437. A. R. Muci, S. L. Buchwald, Practical Palladium Catalysts for C-N and C-O Bond Formation. *Topics in Current Chemistry* **2002**, 219, 131-209.
438. D. S. Surry and S. L. Buchwald, Biaryl Phosphane Ligands in Palladium-Catalyzed Amination. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47(34), 6338-6361.
439. J. F. Hartwig, Evolution of a Fourth Generation Catalyst for the Amination and Thioetherification of Aryl Halides. *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41(11), 1534-1544.

440. D. S. Surry and S. L. Buchwald, Dialkylbiaryl phosphines in Pd-catalyzed amination: a user's guide. *Chemical Science* **2011**, (2), 27-50.
441. H. Tokuyama, S. Yokoshima, T. Yamashita, and T. Fukuyama, A Novel Ketone Synthesis by a Palladium-Catalyzed Reaction of Thiol Esters and Organozinc Reagents. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39(20), 3189-3192.
442. L. S. Liebeskind and J. Srogl, Thiol Ester-Boronic Acid Coupling. A Mechanistically Unprecedented and General Ketone Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122(45), 11260-11261.
443. J. A. Terrett, J. D. Cuthbertson, V. W. Shurtleff & D. W. C. MacMillan, Switching on elusive organometallic mechanisms with photoredox catalysis. *Nature* **2015**, 524(7565), 330-334.
444. N. Miyaura and A. Suzuki, Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Reviews* **1995**, 95(7), 2457-2483.
445. S. T. Handy, H. Bregman, J. Lewis, X. Zhang and Y. Zhang, An unusual dehalogenation in the Suzuki coupling of 4-bromopyrrole-2-carboxylates. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44(3), 427-430.
446. L. Bouissane, S. El Kazzouli, S. Leonce, B. Pfeiffer, E. M. Rakib, M. Khouili and G. Guillaumet, Synthesis and biological evaluation of *N*-(7-indazolyl)benzenesulfonamide derivatives as potent cell cycle inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14(4), 1078-1088.
447. V. Bambuch, M. Otmar, R. Pohl, M. Masojdkova and A. Holy, C-Functionalization of 9-deazapurines by cross-coupling reactions. *Tetrahedron* **2007**, 63(7), 1589-1601.
448. G. Lavecchia, S. Berteina-Raboin and G. Guillaumet, Synthesis and functionalisation of 1H-pyrazolo[3,4-*b*]pyridines involving copper and palladium-promoted coupling reactions. *Tetrahedron Letters* **2004**, 45(11), 2389-2392.
449. A. Suzuki, Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles, 1995-1998. *Journal of Organometallic Chemistry* **1999**, 576(1-2), 147-168.
450. A. L. Casalnuovo and J. C. Calabrese, Palladium-Catalyzed Alkylations in Aqueous Media. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112(11), 4324-4330.
451. J. H. Kirchhoff, M. R. Netherton, I. D. Hills, and G. C. Fu, Boronic Acids: New Coupling Partners in Room-Temperature Suzuki Reactions of Alkyl Bromides. Crystallographic Characterization of an Oxidative-Addition Adduct Generated under Remarkably Mild Conditions. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124(46), 13662-13663.

452. N. E. Dixon, G. A. Lawrance, P. A. Lay, A. M. Sargeson, and H. Taube, Trifluoromethanesulfonates and Trifluoromethanesulfonato-O Complexes. *Inorganic Syntheses* **1990**, 28, 70-76.
453. S. Darses and J.-P. Genet, Potassium Organotrifluoroborates: New Perspectives in Organic Synthesis. *Chemical Reviews* **2008**, 108(1), 288-325.
454. G. A. Molander and N. Ellis, Organotrifluoroborates: Protected Boronic Acids That Expand the Versatility of the Suzuki Coupling Reaction. *Accounts of Chemical Research* **2007**, 40(4), 275-286.
455. F.-S. Han, Transition-metal-catalyzed Suzuki-Miyaura cross-coupling reactions: a remarkable advance from palladium to nickel catalysts. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42(12), 5270-5298.
456. S. Saito, M. Sakai, and N. Miyaura, A Synthesis of Biaryls via Nickel(0)-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Chloroarenes with Phenylboronic Acids. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37(17), 2993-2996.
457. R. B. Bedford, M. A. Hall, G. R. Hodges, M. Huwe and M. C. Wilkinson, Simple mixed Fe-Zn catalysts for the Suzuki couplings of tetraarylborates with benzyl halides and 2-halopyridines. *Chemical Communications* **2009**, (42), 6430-6432.
458. T. Hatakeyama, T. Hashimoto, K. K. A. D. S. Kathriarachchi, T. Zenmyo, H. Seike, and M. Nakamura, Iron-Catalyzed Alkyl-Alkyl Suzuki-Miyaura Coupling. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51(35), 8834-8837.
459. C.-T. Yang, Z.-Q. Zhang, Y.-C. Liu, and L. Liu, Copper-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of Organoboron Compounds with Primary Alkyl Halides and Pseudohalides. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50(17), 3904-3907.
460. Y. Na, S. Park, S. B. Han, H. Han, S. Ko, and S. Chang, Ruthenium-Catalyzed Heck-Type Olefination and Suzuki Coupling Reactions: Studies on the Nature of Catalytic Species. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126(1), 250-258.
461. D. D. Dolliver, B. T. Bhattarai, A. Pandey, M. L. Lanier, A. S. Bordelon, S. Adhikari, J. A. Dinser, P. F. Flowers, V. S. Wills, C. L. Schneider, K. H. Shaughnessy, J. N. Moore, S. M. Raders, T. S. Snowden, A. S. McKim, and F. R. Fronczek, Stereospecific Suzuki, Sonogashira, and Negishi coupling reactions of N-alkoxyimidoyl iodides and bromides. *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78(8), 3676-3687.
462. B. Saito and G. C. Fu, Alkyl-Alkyl Suzuki Cross-Couplings of Unactivated Secondary Alkyl Halides at Room Temperature. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129(31), 9602-9603.
463. J. V. Kingston and J. G. Verkade, Synthesis and Characterization of $R_2PN=P(iBuNCH_2CH_2)_3N$: A New Bulky Electron-Rich Phosphine for Efficient Pd-

Assisted Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72(8), 2816-2822.

464. C. Baillie, L. Zhang, and J. Xiao, Ferrocenyl Monophosphine Ligands: Synthesis and Applications in the Suzuki-Miyaura Coupling of Aryl Chlorides. *The Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69(22), 7779-7782.

465. J. Han, Y. Liu, and R. Guo, Facile Synthesis of Highly Stable Gold Nanoparticles and Their Unexpected Excellent Catalytic Activity for Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reaction in Water. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131(6), 2060-2061.

466. B. H. Lipshutz, T. B. Petersen, and A. R. Abela, Room-Temperature Suzuki-Miyaura Couplings in Water Facilitated by Nonionic Amphiphiles. *Organic Letters* **2008**, 10(7), 1333-1336.

467. J. Y. Kim, H. Rhee, and M. Kim, Conversion of Cyclic Acetals to Hydroxy Esters by MCPBA Oxidation. *Journal of the Korean Chemical Society* **2002**, 46(5), 479-483.

468. L. Zhou, X. Liu, J. Ji, Y. Zhang, X. Hu, L. Lin, and X. Feng, Enantioselective Baeyer-Villiger Oxidation: Desymmetrization of Meso Cyclic Ketones and Kinetic Resolution of Racemic 2-Arylcyclohexanones. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134(41), 17023-17026.

469. N. K. Jana and J. G. Verkade, Phase-Vanishing Methodology for Efficient Bromination, Alkylation, Epoxidation, and Oxidation Reactions of Organic Substrates. *Organic Letters* **2003**, 5(21), 3787-3790.

470. S. Y. Rhie and E. K. Ryu, An Improved Procedure for the Preparation of Aromatic Heterocyclic N-Oxides. *Heterocycles* **1995**, 41(2), 323-328.

471. D. Cartwright, J. R. Ferguson, T. Giannopoulos, G. Varvounis and B. J. Wakefield, Abnormal Nucleophilic Substitution in 3-Trichloromethylpyridine, its N-Oxide and 3,5-Bis(trichloromethyl)pyridine. *Tetrahedron* **1995**, 51(47), 12791-12796.

472. X. Huang, B. Borhan, B. H. Rickman, K. Nakanishi, and N. Berova, Zinc Porphyrin Tweezer in Host-Guest Complexation: Determination of Absolute Configurations of Primary Monoamines by Circular Dichroism. *Chemistry-A European Journal* **2000**, 6(2), 216-224.

473. P. M. Carabateas, R. P. Brundage, K. O. Gelotte, M. D. Gruett, R. R. Lorenz, C. J. Opalka, Jr., B. Singh, W. H. Thielking, G. L. Williams and G. Y. Leshner, 1-Ethyl-1,4-dihydro-4-oxo-7-(pyridinyl)-3-quinolinecarboxylic Acids. II. Synthesis. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1984**, 21(6), 1857-1863.

474. C. J. O'Connor, E. Sinn, and R. L. Carlin, Structural and Magnetic Properties of $[M(C_5H_5NO)_6]L_2$ ($M=Cu, Zn$; $L=ClO_4^-, BF_4^-$). *Inorganic Chemistry* **1977**, 16(12), 3314-3320.
475. A. Albini, Synthetic Utility of Amine *N*-Oxides. *Synthesis* **1993**, (3), 263-277.
476. A. W. Chucholowski and S. Uhlendorf, Base Catalyzed Rearrangement of 5-Cyanomethyl-2-isoxazolines; Novel Pathway for the Formation of 2-Aminopyridine *N*-Oxides. *Tetrahedron Letters* **1990**, 31(14), 1949-1952.
477. J. Epsztajn, A. Bieniek, M. W. Plotka and K. Suwald, Application of Organolithium and Related Reagents in Synthesis. Part 7. Synthesis and Metallation of 4-Methoxypicolin- and 2-Methoxyisonicotin- Anilides. A Useful Method for Preparation of 2,3,4-Trisubstituted Pyridines. *Tetrahedron* **1989**, 45(23), 7469-7476.
478. J. Epsztajn, A. Bieniek and J. A. Kowalska, Application of Organolithium and Related Reagents in Synthesis. Part 9. Synthesis and Metallation of 4-Chloropicolin- and 2-Chloroisonicotin- Anilides. A Useful Method for Preparation of 2,3,4-Trisubstituted Pyridines. *Tetrahedron* **1991**, 47(9), 1697-1706.
479. R. A. Hollins, L. H. Merwin, R. A. Nissan, W. S. Wilson and R. Gilardi, Aminonitropyridines and their *N*-Oxides. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1996**, 33(3), 895-904.
480. H. Ritter and H. H. Licht, Synthesis and Reactions of Dinitrated Amino and Diaminopyridines. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1995**, 32(2), 585-590.
481. A. Thellend, P. Battioni, W. Sanderson, D. Mansuy, Oxidation of *N*-Heterocycles by H_2O_2 Catalyzed by a Mn-Porphyrin: An Easy Access to *N*-Oxides Under Mild Conditions. *Synthesis* **1997**, (12), 1387-1388.
482. R. W. Murray, K. Iyanar, J. Chen, and J. T. Wearing, Oxidation of Organonitrogen Compounds by the Methyltrioxorhenium-Hydrogen Peroxide System. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37(6), 805-808.
483. C. Coperet, H. Adolfsson, T.-A. V. Khuong, A. K. Yudin, and K. Barry Sharpless, A Simple and Efficient Method for the Preparation of Pyridine *N*-Oxides. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63(5), 1740-1741.
484. R. S. Varma and K. P. Naicker, The Urea-Hydrogen Peroxide Complex: Solid-State Oxidative Protocols for Hydroxylated Aldehydes and Ketones (Dakin Reaction), Nitriles, Sulfides, and Nitrogen Heterocycles. *Organic Letters* **1999**, 1(2), 189-191.
485. M. Ferrer, F. Sanchez-Baeza and A. Messegue, On the Preparation of Amine *N*-Oxides by Using Dioxiranes. *Tetrahedron* **1997**, 53(46), 15877-15888.
486. W. Adam, K. Briviba, F. Duschek, D. Golsch, W. Kiefer and H. Sies, Formation of Singlet Oxygen in the Deoxygenation of Heteroarene *N*-Oxides by

Dimethyldioxirane. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1995**, (18), 1831-1832.

487. R. W. Murray, Dioxiranes. *Chemical Reviews* **1989**, 89(5), 1187-1201.

488. C. Coperet, H. Adolfsson, J. P. Chiang, A. K. Yudin, and K. Barry Sharpless, A Simple and Efficient Method for the Preparation of Pyridine-*N*-oxides II. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39(8), 761-764.

489. A. R. Gallopo, J. O. Edwards, Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Pyridine by Caro's Acid Catalyzed by Ketones. *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, 46(8), 1684-1688.

490. R. Bernardi, B. Novo and G. Resnati, Reactivity of perfluoro-(*cis*-2,3-dialkyloxaziridines) with heteroaromatic nitrogen compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1996**, (20), 2517-2521.

491. R. Nesi, D. Giomi, S. Papaleo, and S. Turchi, Polyfunctionalized 3-Nitropyridine Derivatives by [4+2] Cycloadditions of 4-Nitro-3-phenylisoxazole-5-carboxylates with Enamines: Applications and Limits. *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57(13), 3713-3716.

492. J.-C. Jung, Y.-J. Jung, and O.-S. Park, Preparation of 2-Chloropyridine. *Synthetic Communications* **2001**, 31(16), 2507-2511.

493. T. Umemoto and G. Tomizawa, Base-Initiated Reactions of *N*-Fluoropyridinium Salts; A Novel Cyclic Carbene Proposed As A Reactive Species. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28(24), 2705-2708.

494. D. Hebel, S. Rozen, Chlorination, Bromination, and Oxygenation of the Pyridine Ring Using AcOF Made from F₂. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, 53(5), 1123-1125.

495. M. L. Ash and R. G. Pews, The Synthesis of 2-Chloromethylpyridine from 2-Picoline-*N*-Oxide. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1981**, 18(5), 939-940.

496. E. C. Constable and K. R. Seddon, A Novel Rearrangement of 2,2'-Bipyridine *N,N'*-Dioxides The Characterisation of Dipyrdo[1,2-*b*:2,3-*d*]isoxazolinium Salts As Intermediates in the Formation of 3-Hydroxy-2,2'-bipyridines. *Tetrahedron* **1983**, 39(2), 291-295.

497. T. Koenig and J. S. Wieczorek, The Reactions of Trichloroacetyl Chloride with 2-Picoline *N*-Oxide and Pyridylcarbinols. *The Journal of Organic Chemistry* **1968**, 33(4), 1530-1532.

498. J. F. Vozza, Reactions of 2-Picoline 1-Oxide with Reactive Halides. *The Journal of Organic Chemistry* **1962**, 27(11), 3856-3860.

499. J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry at a Glance* **2013**, 2nd edition.
500. V. Giannouli, N. Lougiakis, I. K. Kostakis, N. Pouli, P. Marakos, A.-L. Skaltsounis, S. Nam, R. Jove, D. Horne, R. Tenta, H. Pratsinis, D. Kletsas, The discovery of new cytotoxic pyrazolopyridine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 26(21), 5229-5233.
501. N. Lougiakis, P. Marakos, N. Pouli, E. Fragopoulou, and R. Tenta, Synthesis of New Nebularine Analogues and Their Inhibitory Activity against Adenosine Deaminase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2015**, 63(2), 134-142.
502. J. Khalafy, A. Poursattar Marjani and M. Haghipour, Regioselective synthesis of 3-arylpyrido[2,3-*b*]pyrazines by reaction of arylglyoxals with 2,3-diaminopyridine. *Current Chemistry Letters* **2013**, 2(1), 21-26.
503. P. K. Mandal and J. S. McMurray, Pd-C-Induced Catalytic Transfer Hydrogenation with Triethylsilane. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72(17), 6599-6601.
504. C. Chatgililoglu, Organosilanes as Radical-Based Reducing Agents in Synthesis. *Accounts of Chemical Research* **1992**, 25(4), 188-194.
505. C. Chatgililoglu, Structural and Chemical Properties of Silyl Radicals. *Chemical Reviews* **1995**, 95(5), 1229-1251.
506. I. Ojima, T. Kogure and Y. Nagai, A Novel Method for the Reduction of Schiff Bases Using Catalytic Hydrosilylation. *Tetrahedron Letters* **1973**, 14(27), 2475-2478.
507. J. D. Citron, J. E. Lyons, and L. H. Sommer, Palladium-Catalyzed Reactions of Triorganosilicon Hydrides with Halocarbons. *The Journal of Organic Chemistry* **1969**, 34(3), 638-640.
508. A. Kunai, T. Sakurai, E. Toyoda, M. Ishikawa, and Y. Yamamoto, Versatile Method for the Synthesis of Iodosilanes. *Organometallics* **1994**, 13(8), 3233-3236.
509. L. H. Sommer and J. E. Lyons, Stereospecific Substitution Reactions of Optically Active R₃Si*H Catalyzed by Palladium and Nickel. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, 89(6), 1521-1522.
510. L. H. Sommer and J. E. Lyons, Stereochemistry of Asymmetric Silicon. XVI. Transition Metal Catalyzed Substitution Reactions of Optically Active Organosilicon Hydrides. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, 91(25), 7061-7067.
511. L. Birkofer, E. Bierwirth und A. Ritter, Decarbobenzoxylierungen mit Triäthylsilan. *Chemische Berichte* **1961**, 94(3), 821-824.

512. G. R. Pettit, R. L. Smith, A. K. Das Gupta, and J. L. Occolowitz, Structural biochemistry. IV. 3 β -Hydroxy-17 β -(L-prolyl)amino-androst-5-ene. *Canadian Journal of Chemistry* **1967**, 45(5), 501-507.
513. D. N. Kursanov, Z. N. Parnes, G. I. Bassova, N. M. Loim and V. I. Zdanovich, Ionic Hydrogenation of the Ethylene Bond and the Double Bond of the Carbonyl Group. *Tetrahedron* **1967**, 23(5), 2235-2242.
514. M. Mirza-Aghayan, R. Boukherroub, M. Bolourtchian, M. Hoseini, K. Tabar-Hydar, A novel and efficient method for double bond isomerization. *Journal of Organometallic Chemistry* **2003**, 678(1-2), 1-4.
515. R. Boukherroub, C. Chatgililoglu, and G. Manuel, PdCl₂-Catalyzed Reduction of Organic Halides by Triethylsilane. *Organometallics* **1996**, 15(5), 1508-1510.
516. C. Ferreri, C. Costantino, C. Chatgililoglu, R. Boukherroub, G. Manuel, The versatile behavior of the PdCl₂/Et₃SiH system. Conversion of alcohols to the corresponding halides and alkanes. *Journal of Organometallic Chemistry* **1998**, 554(2), 135-137.
517. M. Mirza-Aghayan, R. Boukherroub, M. Bolourtchian and M. Hosseini, Palladium-catalyzed reduction of olefins with triethylsilane. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44(24), 4579-4580.
518. M. Mirza-Aghayan, R. Boukherroub, M. Bolourtchian, Palladium-catalyzed protection of alcohols and cleavage of triethylsilyl ethers. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690(9), 2372-2375.
519. M. Mirza-Aghayan, R. Boukherroub and M. Bolourtchian, A mild and efficient palladium-triethylsilane system for reduction of olefins and carbon-carbon double bond isomerization. *Applied Organometallic Chemistry* **2006**, 20(3), 214-219.
520. Y. Yang, Z. Wang, J. Yang, T. Yang, W. Pi, W. Ang, Y. Lin, Y. Liu, Z. Li, Y. Luo, Y. Wei, Design, synthesis and evaluation of novel molecules with a diphenyl ether nucleus as potential antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22(2), 954-957.
521. V. N. Kourafalos, P. Marakos, N. Pouli, L. B. Townsend, The Synthesis of a New Pyrazolo[3,4-*c*]pyridine C-Nucleoside, Structurally Related to Formycin B. *Synlett* **2002**, (9), 1479-1482.
522. A. G. Burton, P. J. Halls, and A. R. Katritzky, The Kinetics and Mechanism of the Electrophilic Substitution of Heteroaromatic Compounds. Part XXX. The Orientation of the Nitration of 2-Pyridones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II* **1972**, (13), 1953-1958.

523. D. M. Besly and A. A. Goldberg, Antimalarial 2-Alkoxy-6-chloro-9-dialkylaminoalkylamino-1:10-diaza-anthracenes. *Journal of the Chemical Society* **1954**, 2448-2455.
524. **Patent:** WO2008/101682 A2, **2008**, 61.
525. M. Sklepari, N. Lougiakis, A. Papastathopoulos, N. Pouli, P. Marakos, V. Myrianthopoulos, T. Robert, S. Bach, E. Mikros, and S. Ruchaud, Synthesis, Docking Study and Kinase Inhibitory Activity of a Number of New Substituted Pyrazolo[3,4-c]pyridines. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2017**, 65(1), 66-81.
526. **Patent:** EP1405852 A1, **2004**, 244.
527. J.-C. Milhavet, A. Gueiffier, L. Bernal, and J.-C. Teulade, Synthesis, Reactivity and ¹³C-NMR of 1*H*-Pyrazolo[3,4-*c*]pyridine Derivatives. *Heterocycles* **1999**, 51(7), 1661-1667.
528. S. Kumari, C. B. Mishra, M. Tiwari, Design, synthesis and pharmacological evaluation of *N*-[4-(4-(alkyl/aryl/heteroaryl)-piperazin-1-yl)-phenyl]-carbamic acid ethyl ester derivatives as novel anticonvulsant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25(5), 1092-1099.
529. G. Toma and R. Yamaguchi, Cobalt-Catalyzed C-N Bond-Forming Reaction between Chloronitrobenzenes and Secondary Amines. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, 33, 6404-6408.
530. B. N. Saglik, Y. Ozkay, U. D. Ozkay, and H. K. Gencer, Synthesis and Biological Evaluation of Some Novel Dithiocarbamate Derivatives. *Journal of Chemistry* **2014**, 2014, 1-9.
531. E. J. Hanan, C. Eigenbrot, M. C. Bryan, D. J. Burdick, B. K. Chan, Y. Chen, J. Dotson, R. A. Heald, P. S. Jackson, H. La, M. D. Lainchbury, S. Malek, H. E. Purkey, G. Schaefer, S. Schmidt, E. M. Seward, S. Sideris, C. Tam, S. Wang, S. K. Yeap, I. Yen, J. Yin, C. Yu, I. Zilberleyb, and T. P. Heffron, Discovery of Selective and Noncovalent Diaminopyrimidine-Based Inhibitors of Epidermal Growth Factor Receptor Containing the T790M Resistance Mutation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57(23), 10176-10191.