

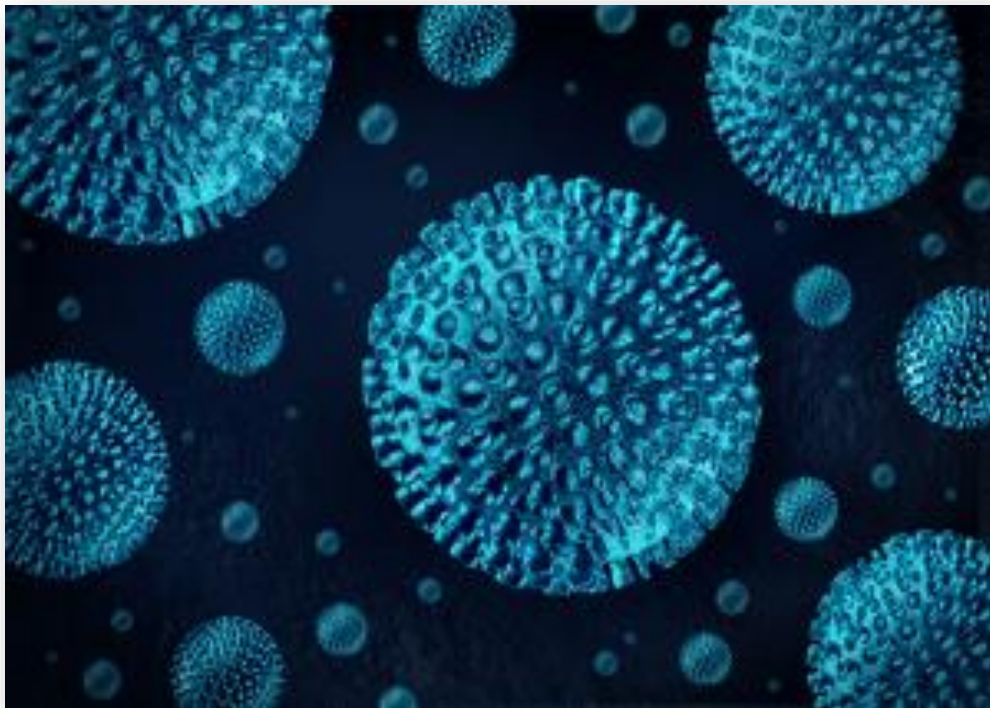


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ
ΙΜΙΔΑΖΟΠΥΡΙΔΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΤΟΥΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ Β**



Γεράση Μαρία

Φαρμακοποιός

Εργασία μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης

ΑΘΗΝΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΑΚΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ν. ΠΟΥΛΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ)

Ι. ΚΩΣΤΑΚΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

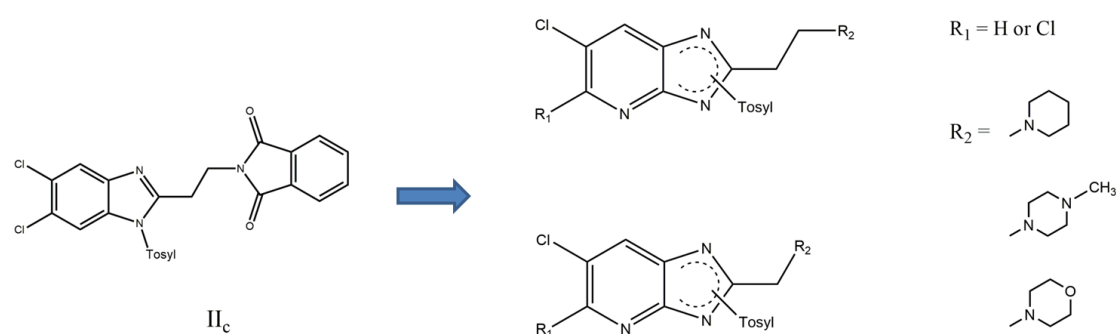
Synthesis of new substituted imidazopyridines and evaluation of their anti-HBV activity

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) infection is the most common cause of chronic liver disease worldwide. In spite of the availability of safe and effective vaccines, the infection is still a global health problem and proper antiviral treatment is the only way to reduce morbidity and mortality from cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Currently, two major classes of agents are utilized in chronic hepatitis B: the interferons and the nucleos(t)ide analogues. However, the approved drugs have several drawbacks that limit their clinical utility. The severe side effects of interferons and the high emergence of HBV drug-resistant strains arising from nucleoside analogues, indicates the clinical need for the discovery of novel classes of antiviral agents for the treatment of hepatitis B. The development of a series of non-nucleoside bezimidazoles provided a promising therapeutic strategy. Among them, compound IIc exhibited high antiviral potency and selectivity index.

In an effort to contribute to the structure-activity relationship studies of these series we have designed and synthesized a number of novel compounds possessing the more purine-like imidazo[4,5-b]pyridine scaffold and investigated their biological activity as potential HBV inhibitors. The new compounds bear different substitution patterns on the fused pyridine ring, while the phthalimide moiety was replaced by alicyclic amines. Furthermore, in order to identify the optimal chain length between the imidazopyridine core and the aminogroup, different alkyl linkers were introduced. Target compounds are also considered the corresponding tosyl derivatives, which were prepared from the tosylation of the heterocyclic base, leading to both 1- and 3-regioisomers of imidazo[4,5-b]pyridine.

Keywords: HBV life-cycle, imidazo[4,5-b]pyridine, anti-HBV activity

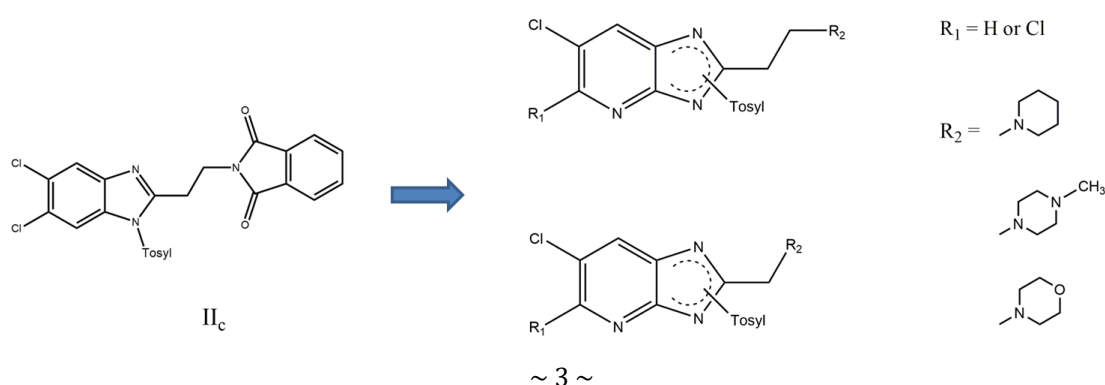


Σύνθεση νέων υποκατεστημένων ιμιδαζοπυριδινών και αξιολόγηση της δράσης τους έναντι του ιού της ηπατίτιδας B

Περίληψη

Η λοίμωξη από τον ιό της Ηπατίτιδας B αποτελεί τη συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ηπατικής νόσου παγκοσμίως. Παρά την ύπαρξη ασφαλών και αποτελεσματικών εμβολίων, η μόλυνση από τον HBV παραμένει σημαντικός κίνδυνος της δημόσιας υγείας και μόνο η κατάλληλη αντιϊκή θεραπεία αποτελεί λύση για τη μείωση της νοσηρότητας και θνητότητας από κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Επι του παρόντος, δύο βασικές κατηγορίες αντιικών παραγόντων χρησιμοποιούνται στη χρόνια ηπατίτιδα B: ιντερφερόνες και νουκλεοζιτικοί/νουκλεοτιδικοί αναστολείς τη αναπαραγωγής του ιού. Ωστόσο, τα εγκεκριμένα φάρμακα παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, τα οποία περιορίζουν την κλινική τους χρησιμότητα. Οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες των ιντερφερονών, καθώς και η συχνή εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του HBV που προκύπτει από τη χρήση των νουκλεοζιτικών παραγόντων, καταδεικνύει την ανάγκη ανακάλυψης νέων αντιικών φαρμάκων για τη θεραπεία της ηπατίτιδας B. Στο πλαίσιο αυτό, η ανάπτυξη μη-νουκλεοζιτικών βενζιμιδαζολικών αναστολέων του HBV έχει προσελκύσει ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς ενώσεις αυτής της κατηγορίας, όπως το παράγωγο Πc, παρουσίασαν αξιολογή αντιϊκή δράση και χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Σε μια προσπάθεια επέκτασης των σχέσεων δομής-δράσης αυτών των μορίων, σχεδιάσαμε και συνθέσαμε νέα μόρια που φέρουν ιμιδαζο[4,5-b]πυριδινικό δακτύλιο και αξιολογήσαμε τη βιολογική τους δράση ως πιθανών αναστολέων έναντι του HBV. Τα νέα παράγωγα φέρουν υποκαταστάτες σε διαφορετικές θέσεις του συμπυκνωμένου πυριδινικού δακτυλίου, ενώ το πλευρικό φθαλιμίδιο αντικαταστάθηκε από αλεικυκλικές αμίνες. Με στόχο τη μελέτη του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας μεταξύ του ιμιδαζοπυριδινικού δακτυλίου και της πλευρικής αμίνης, εισάγαμε αιθυλενική και μεθυλενική αλυσίδα στη 2-θέση του ιμιδαζολίου. Ως μόρια-στόχοι παρασκευάστηκαν επίσης τοξυλικά παράγωγα, τα οποία συντέθηκαν από τα αντίστοιχα ετεροκυκλικά συστήματα μέσω αντίδρασης που οδηγεί στα 1- και 3- ισομερή θέσης.

Λέξεις-κλειδιά: κύκλος ζωής του HBV, ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνες, αντι-HBV δράση



Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	1
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Κατάταξη του HBV	7
1.2 Δομή του ιοσωματίου.....	8
1.3 Οργάνωση του γονιδιώματος	9
1.4 Κύκλος ζωής του ιού	11
1.5 Παθογένεση της ηπατίτιδας Β	14
1.6 Κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από τον HBV.....	16
1.7 Εμβολιασμός	17
1.8 Εγκεκριμένες αντι-HBV θεραπείες	18
1.8.1 Ιντερφερόνες	19
1.8.2 Νουκλεοτιδικοί/Νουκλεοζιτικοί αναστολείς του HBV	19
1.9 Αναπτυσσόμενες θεραπείες έναντι του HBV	23
1.10. Στόχος της εργασίας	25
2.ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
3.ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	47
3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	50
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ALT	alanine aminotransferase
cccDNA	covalently closed circular DNA
dslDNA	double stranded linear DNA
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
EtOH	Ethanol
HBV	Hepatitis B virus
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBcAg	Hepatitis B core antigen
HBeAg	Hepatitis B e antigen
HDV	Hepatitis B virus
HSPG	Heparan sulfate proteoglycan
IFN-a	Interferon-a
MeOH	Methanol
MHC-I	major histocompatibility complex I
MHC-II	major histocompatibility complex II
NaH	sodium hydride
NCS	N-Chlorosuccinimide
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide
ORF	open reading frame
peg-IFN-a	pegylated Interferon-a
PPA	Polyphosphoric acid
rcDNA	relaxed circular DNA
r.t	room temperature
TNF-a	tumor necrosis factor-a

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ηπατίτιδα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, αποτελεί φλεγμονή του ήπατος, η οποία μπορεί σταδιακά να οδηγήσει σε νέκρωση των ηπατικών κυττάρων. Προκαλείται κυρίως από λοίμωξη από κάποιον ηπατοτρόπο ιό, ωστόσο μπορεί να οφείλεται και σε έκθεση του οργανισμού σε τοξικούς παράγοντες ή φάρμακα και σε χρόνια κατανάλωση αλκοόλ (1). Συναντάται επίσης και ηπατίτιδα αυτοάνοσης αιτιολογίας, όπου αντισώματα του οργανισμού αναγνωρίζουν επιτόπους του ήπατος και προκαλούν αλλοιώσεις και καταστροφή του ιστού (2).

Η ιογενής ηπατίτιδα αποτελεί την πιο συχνά απαντώμενη μορφή της νόσου και μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέντε ιοί που την προκαλούν, οι ιοί της ηπατίτιδας Α-Ε, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους τόσο ως προς τον τρόπο μετάδοσης όσο και ως προς το κλινικό τους αποτέλεσμα (3). Πιο συγκεκριμένα, οι Α και Ε μεταδίδονται δια μέσου της πεπτικής οδού ενώ η μετάδοση των Β και C προκύπτει από σεξουαλική επαφή ή επαφή με μολυσμένο αίμα. Για τη μόλυνση από τον ιό της ηπατίτιδας D είναι απαραίτητη η συλλοίμωξη από τον Β, καθώς η παρουσία του τελευταίου είναι απαραίτητη για την είσοδό και τον πολλαπλασιασμό του HDV στα ηπατοκύτταρα (4). Από τους παραπάνω, μόνο οι ιοί της ηπατίτιδας Β, C και D μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνια νόσο και απαιτούν φαρμακευτική αγωγή, ενώ οι Α και Ε προκαλούν οξείες ηπατικές εκδηλώσεις, οι οποίες αντιμετωπίζονται με συμπτωματική θεραπεία (5).

Ο ιός της Ηπατίτιδας Β (Hepatitis B virus-HBV) αποτελεί τη συχνότερη αιτία πρόκλησης χρόνιας ηπατικής νόσου. Η χρόνια λοίμωξη από τον HBV αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας καθώς σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνητότητα. Εκτιμάται ότι 240 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως πάσχουν από χρόνια ηπατίτιδα Β, ενώ αναφέρονται 500.000-600.000 θάνατοι ετησίως από οξεία ηπατίτιδα και κυρίως από κίρρωση ή ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (6).

Τα πρώτα βήματα για την ανακάλυψη του HBV έγιναν το 1963, όπου ο γενετιστής Baruch Blumberg ταυτοποίησε το αντιγόνο επιφανείας, HBsAg (Hepatitis B surface antigen), του ιού. Κατά τη διεξαγωγή ενός ανοσολογικού ελέγχου για εύρεση αντισωμάτων και αντιγόνων παρατήρησε τυχαία μία ασυνήθιστη αντίδραση του πλάσματος ενός αυστραλού γηγενή και ενός αιμορροφιλικού ασθενή που είχε υποστεί πολλές μεταγγίσεις αίματος. Ανακάλυψε με αυτό τον τρόπο ένα νέο αντιγόνο λιποπρωτεϊνικής φύσεως, το οποίο ονόμασε αρχικά «Αυστραλιανό αντιγόνο». Η μεταγενέστερη εμφάνιση ίκτερου σε έναν τεχνικό του εργαστηρίου του Blumberg τον οδήγησε στη σύνδεση του αυστραλιανού αντιγόνου με

ανάπτυξη ιογενούς ηπατίτιδας. (7). Λίγα χρόνια αργότερα, το 1970, ο David Dane παρατήρησε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο το βίριο του HBV από δείγμα ορού ασθενών, το οποίο ονομάστηκε προς τιμήν του «σωματίδιο Dane». Από το σημείο εκείνο η πρόοδος που ακολούθησε ήταν ραγδαία. Ο Blumberg σύντομα ανέπτυξε τις αρχές για την παρασκευή εμβολίου για πρόληψη από τον HBV, το οποίο προέβλεψε ότι θα προέρχεται από πλάσμα ασθενών με υψηλούς τίτλους HBsAg και όχι από κυτταρικές καλλιέργειες όπως ίσχυε μέχρι τότε. Το 1976 βραβεύτηκε με βραβείο Nobel Ιατρικής τόσο για την περιγραφή του ιού όσο και για την καινοτόμα ιδέα του εμβολίου το οποίο σύντομα αναπτύχθηκε (8).

Για να γίνει κατανοητή η κλινική σημασία της λοίμωξης από τον HBV και κυρίως οι ήδη διαθέσιμοι και αναπτυσσόμενοι φαρμακευτικοί στόχοι θα πρέπει να γίνει αναφορά σε κάποια στοιχεία που αφορούν στη δομή και τον κύκλο ζωής του ιού καθώς και στην παθογένεση της ηπατίτιδας B.

1.1 Κατάταξη του HBV

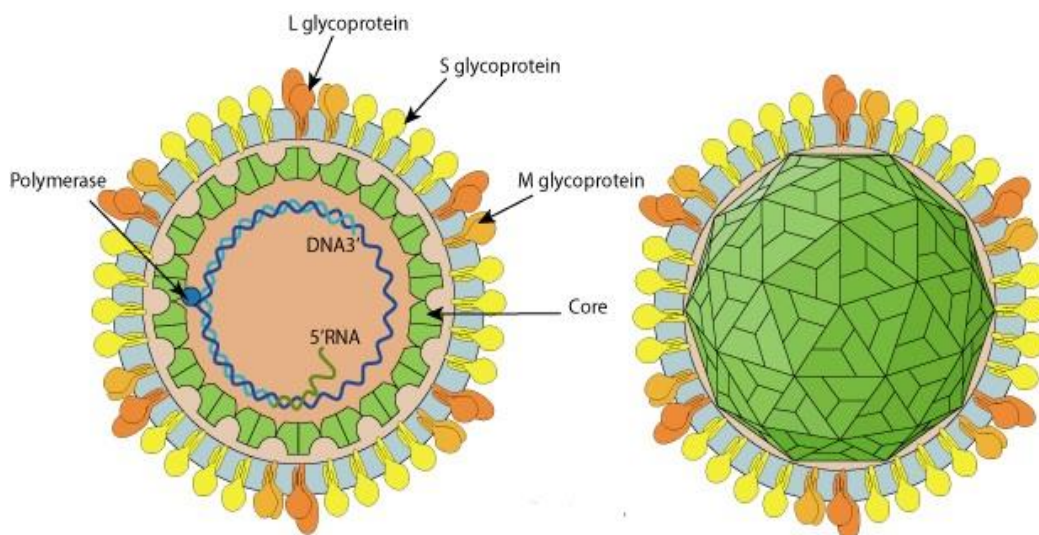
Ο ιός της Ηπατίτιδας B ανήκει στην οικογένεια *Hepadnaviridae* και λόγω της ιατρικής του σημασίας αποτελεί το πιο εξέχον και αντιπροσωπευτικό μέλος της (9). Το όνομα της οικογένειας υποδεικνύει τον ηπατοτροπισμό των μελών της αλλά και τη φύση του γενετικού τους υλικού το οποίο είναι DNA. Χαρακτηρίζονται και ως παραρετροϊοί, καθώς είναι DNA ιοί που πολλαπλασιάζονται μέσω RNA-ενδιαμέσου με αντίστροφη μεταγραφή. Οι επαδνοϊοί συναντώνται τόσο σε πτήνα όσο και σε θηλαστικά και χωρίζονται σε δύο γένη, το *Anihepadnaviridae* και *Orthohepadnaviridae* αντίστοιχα (10).

Το γονιδίωμα του HBV παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια και έτσι διακρίνεται σε οκτώ γονότυπους, τους A-H. Κάθε γονότυπος διαφέρει τουλάχιστον κατά 8% στην αλληλουχία του γονιδιώματός του και εμφανίζει συγκεκριμένη γεωγραφική κατανομή (11). Πληροφορίες σχετικά με τον επιπολασμό του κάθε γονότυπου είναι σημαντικές καθώς οι διαφοροποιήσεις αυτές του γονιδιώματος σχετίζονται άμεσα με την πρόοδο της νόσου, την κλινική έκβαση και την απόκριση στη θεραπεία (12).

1.2 Δομή του ιοσωματίου

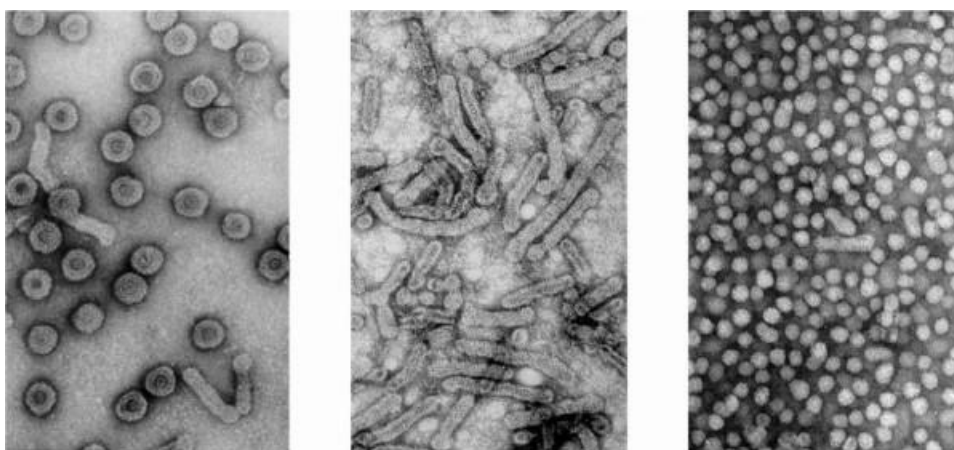
Το μολυσματικό βίριο του HBV έχει διάμετρο 42nm (**Εικόνα 1.1**) και συνίσταται από (13):

1. Τον ϊικό φακέλο, ο οποίος έχει δομή λιπιδικής διπλοστιβάδας και περιλαμβάνει το αντιγόνο επιφανείας HBsAg. Το HBsAg αποτελείται από τρεις γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες διακρίνονται ανάλογα με το μέγεθός τους σε S (small), M (medium) και L (large). Η περιοχή S εντοπίζεται σε όλες τις πρωτεΐνες του φακέλου, η M διαθέτει επιπλέον την pre-S2, ενώ η L είναι η μοναδική που περιλαμβάνει και την pre-S1 περιοχή (14). Η μεγάλη πρωτεΐνη L εκτός από γλυκοζυλιωμένη είναι και μυριστουλιωμένη στο αμινοτελικό της άκρο, γεγονός που δε σχετίζεται με την οργάνωση του φακέλου αλλά με την είσοδο του ιού στα ηπατοκύτταρα (15).
2. Το εικοσαεδρικό νουκλεοκαψίδιο, ή πυρήνα. Η συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου αρχίζει με το σχηματισμό ομοδιμερών της δομικής πυρηνικής πρωτεΐνης HBcAg (Hepatitis B core antigen), τα οποία συγκρατώνται με σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης (16). Στο μολυσμένο ανθρώπινο ήπαρ εντοπίζονται δύο τύποι καψιδίων που αποτελούνται είτε από 90 είτε από 120 διμερή της πυρηνικής πρωτεΐνης (17). Στο νουκλεοκαψίδιο εσωκλείονται το γονιδίωμα και η DNA πολυμεράση του ιού ενώ περιλαμβάνεται επίσης μία εκκρινόμενη διαλυτή πρωτεΐνη, η HBeAg (Hepatitis B e antigen).



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση του βιρίου του HBV.

Κατά την εξέταση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν παρατηρηθεί δύο επιπλέον ξεχωριστές μορφές του HBV (**Εικόνα 1.2**). Μικρά σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 25nm και σωματίδια νηματοειδούς δομής 22nm με ποικίλα μήκη. Τα σωματίδια αυτά δεν περιέχουν ιϊκό DNA και συνεπώς είναι μη λοιμογόνα (18). Αποτελούνται αποκλειστικά από το αντιγόνο επιφανείας και κάποια λιπίδια προερχόμενα από τον ξενιστή. Κατά τη φάση αναπαραγωγής του ιού τα υποϊικά αυτά σωματίδια παράγονται σε περίσσεια 10.000 με 1.000.000 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τα μολυσματικά βίρια. Για το λόγο αυτό, η ανίχνευσή τους στο πλάσμα των ασθενών αποτελεί εξαιρετικά ευαίσθητο διαγνωστικό δείκτη για τη λοίμωξη από τον HBV ακόμα και όταν τα επίπεδα του DNA του ιού στο πλάσμα είναι χαμηλά. Ο ρόλος τους δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος αλλά θεωρείται ότι λειτουργούν ως «αντιπερισπασμός» για το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή συνεισφέροντας έτσι στην εγκαθίδρυση χρόνιας λοίμωξης (19).



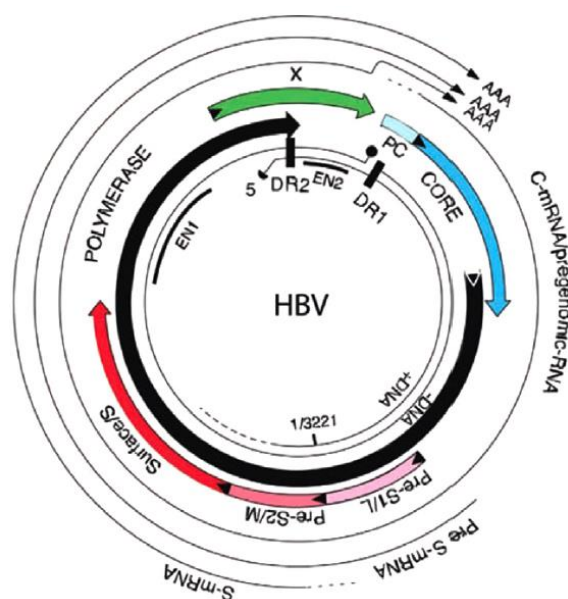
Εικόνα 1.2: Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βιρίου του HBV και των υποϊικών σωματιδίων (20).

1.3 Οργάνωση του γονιδιώματος

Το γονιδίωμα του ιού εντοπίζεται εντός του νουκλεοκαψιδίου με τη μορφή κυκλικού, μερικώς δίκλωνου DNA (relaxed-circular DNA, rc DNA) με μήκος περίπου 3.200 ζεύγη βάσεων. Η ιϊκή πολυμεράση είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5'-άκρο του ενός κλώνου (21). Η μία έλικα είναι ολοκληρωμένη, ενώ η άλλη ελλιπής, αφήνοντας ένα «κενό», το οποίο συμπληρώνεται *in vivo*, μετά την είσοδο του βιρίου στο ηπατοκύτταρο (22).

Το DNA του HBV έχει τέσσερα αλληλεπικαλυπτόμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) που εκφράζουν τις πρωτεΐνες του (23) (**Εικόνα 1.3**) :

1. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη δομική πυρηνική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (HBcAg) και την εκκρινόμενη, μη δομική προπυρηνική πρωτεΐνη HBeAg.
2. Το γονίδιο P, το οποίο κωδικοποιεί την ιϊκή πολυμεράση.
3. Τα PreS1/L, PreS2/M και S-γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν τις τρεις πρωτεΐνες του φακέλου.
4. Το γονίδιο X, υπεύθυνο για την έκφραση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης X.



Εικόνα 1.3: Δομή του γονιδιώματος και τα mRNAs του HBV (22)

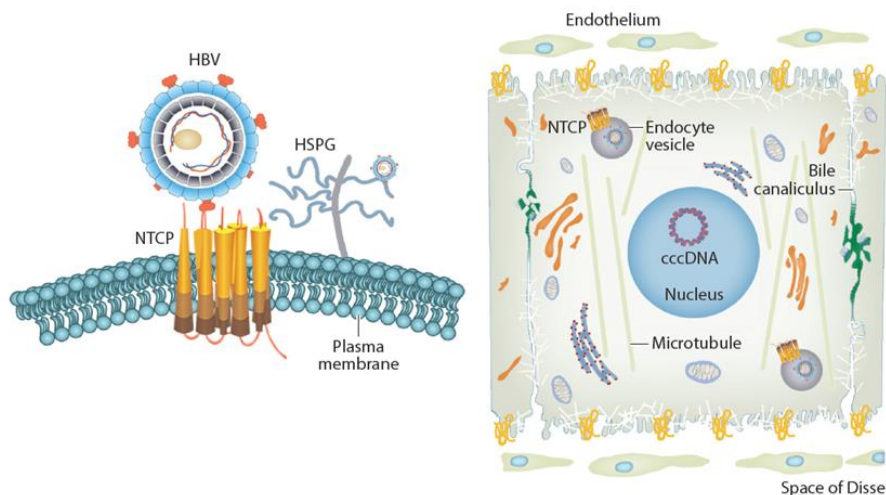
Λόγω του μικρού του μήκους, το γονιδίωμα του HBV εκφράζει περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών, η καθεμία με σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα και την αναπαραγωγή. Η πρωτεΐνη X έχει ποικίλες λειτουργίες, με κύριες τη μεταγωγή σήματος και επιδιορθώσεις σφαλμάτων στο DNA. Επιπλέον, έχει συσχετιστεί με την ογκογενετική δραστηριότητα του HBV, καθώς απενεργοποιεί το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (25). Ο ρόλος της προπυρηνικής πρωτεΐνης HBeAg είναι ασαφής, αλλά φαίνεται να εμπλέκεται στην «διαφυγή» του ιοσωματίου από το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ η παρουσία της στον ορό των ασθενών έχει συνδεθεί με ενεργό πολλαπλασιασμό του ιού (26).

Το μεγαλύτερο πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί τη DNA πολυμεράση του ιού, η οποία έχει τους ακόλουθους λειτουργικούς τομείς:

- ❖ Την αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο και είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του γονιδιώματος. Εκτός από την αντίστροφη μεταγραφή, επιτελεί και ρόλο DNA-εξαρτώμενης-DNA-πολυμεράσης καθώς συνθέτει και τον συμπληρωματικό κλώνο του DNA για να παραχθεί τελικά το rc-DNA.
- ❖ Την RNAάση H, η οποία αποσυνθέτει το προγενωμικό RNA για να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της διπλής έλικας του DNA και εντοπίζεται επίσης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης
- ❖ Την τερματική πρωτεΐνη, στο αμινοτελικό άκρο, με ρόλο την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής και την ενκαψιδίωση του γονιδιώματος (24).

1.4 Κύκλος ζωής του ιού

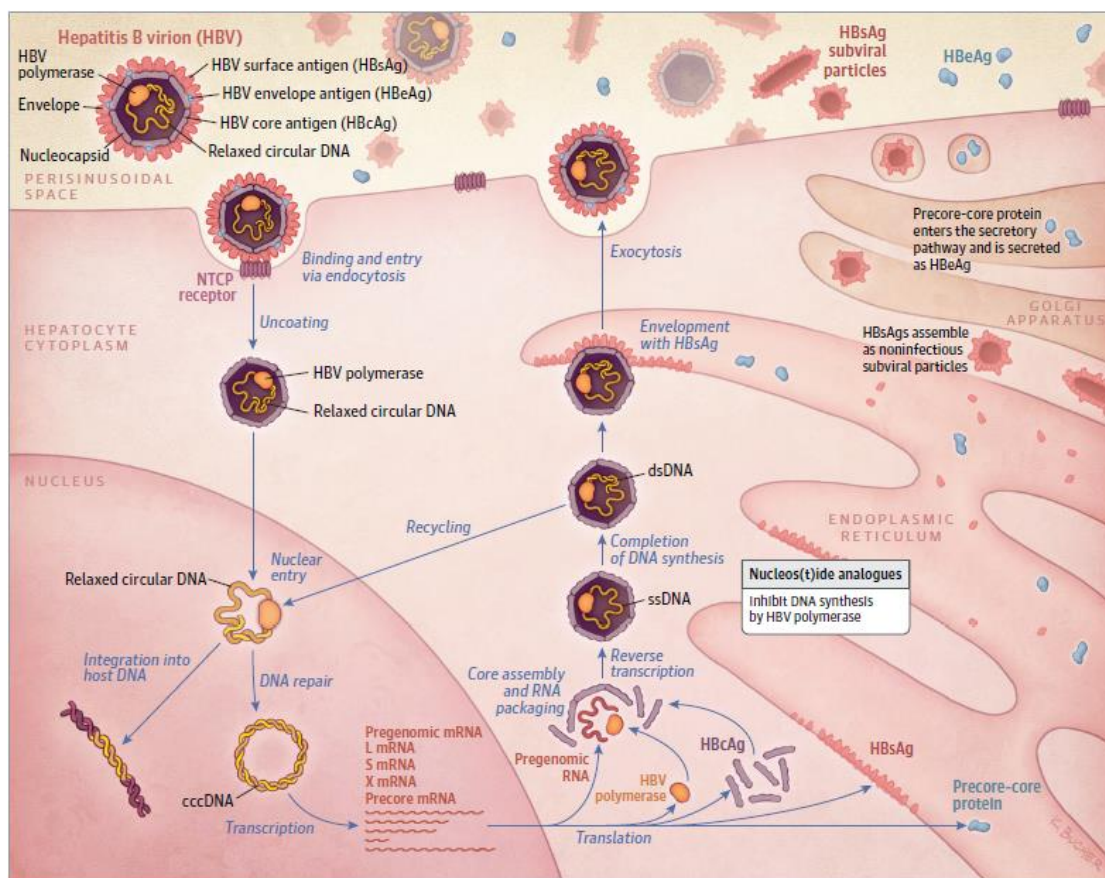
Στο ήπαρ, το βίριο του HBV αρχικά προσκολλάται σε ηπατικές θεϊκές πρωτεογλυκάνες (HSPG) που εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη. Η σύνδεση αυτή είναι μη ειδική και αναστρέψιμη, ωστόσο είναι απαραίτητη καθώς εμπλουτίζει την κυτταρική επιφάνεια με ισοσώματα φέρνοντάς τα τελικά σε εγγύτητα με τον ειδικό υποδοχέα του HBV (25). Ακολουθεί πρόσδεση υψηλής συγγένειας στον υποδοχέα, το συμμεταφορέα ταυροχολικού νατρίου-NTCP, ο οποίος εκφράζεται στη μεμβράνη των ηπατοκυττάρων και με αυτό τον τρόπο πυροδοτείται η ιϊκή είσοδος (26) (**Εικόνα 1.4**). Πιο συγκεκριμένα, ο NTCP είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με φυσιολογικό ρόλο την εξαρτώμενη από το νάτριο επαναπρόσληψη των χολικών οξέων από το αίμα και η εκφρασή του ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες του ήπατος, κυτοκίνες και ορμόνες. Η υψηλή έκφραση του υποδοχέα στο ήπαρ εξηγεί σε μεγάλο βαθμό την ειδικότητα ιστού που εμφανίζει ο HBV (27). Ο ιός συνδέεται στον υποδοχέα με την pre-S1 περιοχή της L πρωτεΐνης του φακέλου και για τη σύνδεση απαιτείται η έκθεση της αμινοτελικής μυριστοϋλιωμένης περιοχής της πρωτεΐνης. Μετά την πρόσδεση στον NTCP πιθανώς ακολουθεί μία διαδικασία ενδοκύττωσης, όπου το νουκλεοκαψίδιο μεταφέρεται στον πυρήνα μέσω κυστιδίων. Έχει επίσης προταθεί και η σύντηξη του ιϊκού φακέλου στην πλασματική μεμβράνη, ωστόσο δεν έχει ακόμη αποδειχτεί ότι ο NTCP οδηγεί στις απαραίτητες για αυτό το σκοπό διαμορφωτικές αλλαγές στο φάκελο και έτσι ο ακριβής μηχανισμός εισόδου του HBV στο κύτταρο παραμένει ασαφής (28), (29). Ο τελικός στόχος είναι η απελευθέρωση του DNA στον πυρήνα του κυττάρου και η έναρξη της λοίμωξης.



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα του HBV (αριστερά) και της εισόδου του ιού στα ηπατοκύτταρα (δεξιά) (28).

Στη συνέχεια, το νουκλεοκαψίδιο κινείται προς τον πυρήνα μέσω του δικτύου των μικροσωληνίσκων και το ιϊκό γονιδίωμα εισέρχεται στο νουκλεόπλασμα μέσω του πυρηνικού πόρου. Στο σημείο αυτό, το κυκλικό μερικώς δίκλωνο DNA «επιδιορθώνεται» τόσο από ιϊκά όσο και από κυτταρικά ένζυμα. Αρχικά, συμπληρώνεται η ημιτελής θετική έλικα του rcDNA από την ιϊκή πολυμεράση και σε επόμενο βήμα η πολυμεράση και οι RNA-εκκινητές απομακρύνονται από ένζυμα του ξενιστή. Τελικά, μετά από ομοιοπολική σύνδεση των δύο άκρων σχηματίζεται το «ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA-covalently closed circular DNA- cccDNA» (30).

Το cccDNA οργανώνεται σε μία δομή χρωματίνης με ιστόνες σχηματίζοντας ένα μικροχρωμόσωμα (31). Ο σχηματισμός του cccDNA, το οποίο συσσωρεύεται στον πυρήνα, ολοκληρώνει την έναρξη της λοίμωξης, καθώς λειτουργεί σαν υπόστρωμα για τη μεταγραφή όλων των ιϊκών RNA χρησιμοποιώντας το μηχανισμό μεταγραφής των κυττάρων του ξενιστή. Συγκεκριμένα η RNA-πολυμεράση II του κυττάρου μεταγράφει το cccDNA σε ένα προγενωμικό και τέσσερα υπογενωμικά RNA (32). Το προγενωμικό RNA χρησιμεύει ως μήτρα για τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος με αντίστροφη μεταγραφή και ως mRNA για τη σύνθεση της πυρηνικής και προπυρηνικής πρωτεΐνης καθώς και της πολυμεράσης του HBV. Τα προϊόντα μετάφρασης των υπογενωμικών RNA είναι η ρυθμιστική πρωτεΐνη X και οι τρεις πρωτεΐνες του φακέλου (33).



Εικόνα 1.5: Αναπαραγωγικός κύκλος του ιού της ηπατίτιδας Β (34).

Μετά τη μετάφραση, η πολυμεράση του ιού προσδένεται με το αμινοτελικό της άκρο σε μία δομή που εντοπίζεται στο 5'-άκρο του προγενωμικού RNA, η οποία ονομάζεται δομή έψιλον (ϵ). Το γεγονός αυτό πυροδοτεί τη συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου. Η περιοχή ϵ είναι απαραίτητη επιπλέον για τη σύνθεση του DNA, καθώς περιλαμβάνει τον εκκινητή για την αντίστροφη μεταγραφή. Αφού προστεθεί το πρώτο ολιγονουκλεοτιδίο, συγκεκριμένα το γουανίνη-αδενίνη-αδενίνη (GAA), η DNA πολυμεράση και οι νέες βάσεις μεταφέρονται στο 3'-άκρο του RNA, όπου συνεχίζεται η αντίστροφη μεταγραφή, για να σχηματιστεί αρχικά κλώνος DNA θετικής πολικότητας. Ταυτόχρονα, δραστηριοποιείται η RNAσση H, η οποία αποσυνθέτει το προγενωμικό RNA αφήνοντας μία ακολουθία 18 νουκλεοτιδίων, η οποία δρα ως RNA-εκκινητής για τη μετέπειτα σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Στην πλειοψηφία των νουκλεοκαψιδίων ο εκκινητής μετακινείται σε άλλη θέση του νεοσχηματισμένου DNA, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται τελικά μερικώς δίκλωνο κυκλικό DNA. Έτσι, ολοκληρώνεται η διαδικασία ωρίμανσης του νουκλεοκαψιδίου στο

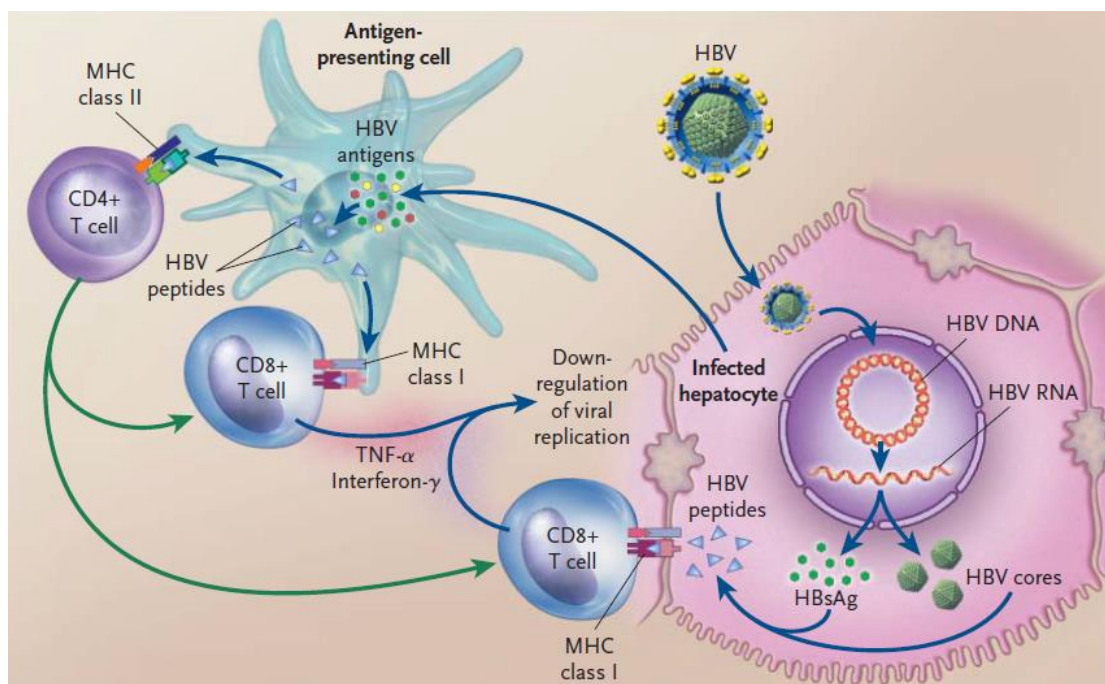
κυτταρόπλασμα, το οποίο έχει δυνητικά δύο λειτουργίες. Μπορεί, είτε να επαναπροωθηθεί στον πυρήνα και να σχηματίσει εκ νέου cccDNA, είτε να μετακινηθεί στο ενδοπλασματικό δίκτυο και μετά από προσάρτηση του φακέλου να εξέλθει από το κύτταρο στην κυκλοφορία (23). Έχει παρατηρηθεί ότι στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, όπου υπάρχει μικρός αριθμός πρωτεϊνών του φακέλου, τα νεοσυντιθέμενα νουκλεοκαψίδια ακολουθούν την οδό προς τον πυρήνα, γεγονός που αποτελεί σημαντικό βήμα για την εγκαθίδρυση επίμονης χρόνιας λοίμωξης (35). Από το ενδοπλασματικό δίκτυο εκκρίνονται επιπλέον τα μη μολυσματικά υποϊικά σωματίδια και το αντιγόνο HBeAg.

Σε ένα μικρό ποσοστό νουκλεοκαψιδίων παράγεται γραμμικό δίκλωνο DNA (double stranded linear DNA, dsDNA), το οποίο προκύπτει από ανεπιτυχή μετατόπιση του RNA εκκινήτη, μετά την αντίστροφη μεταγραφή, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να πραγματοποιηθεί η κύκλωση του γονιδιώματος (36). Το dsDNA είναι επίσης λειτουργικό για τον ιό και μπορεί να μεταφερθεί στον πυρήνα προς σχηματισμό cccDNA, είτε να εξέλθει μετά από προσάρτηση νουκλεοκαψιδίου και φακέλου. Μία επίσης πιθανή κατάληξη του γραμμικού δίκλωνου DNA είναι η ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του ξενιστή. Η ενσωμάτωση συμβαίνει σε 1 στα 10^5 - 10^6 μολυσμένα κύτταρα, ωστόσο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκβαση της νόσου καθώς έχει αποδειχτεί ότι είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ηπατοκαρκινογένεση του ιού (37).

1.5 Παθογένεση της ηπατίτιδας Β

Η λοίμωξη από τον HBV είναι μία δυναμική διαδικασία και το κλινικό της αποτέλεσμα εξαρτάται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ο ιός δεν είναι άμεσα κυτταροτοξικός αλλά η βλάβη του ηπατικού ιστού προκύπτει από τους μηχανισμούς άμυνας που ενεργοποιούνται με την είσοδό του στον οργανισμό (38). Όπως αναφέρθηκε, κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο του ιού παράγονται βίρια και σωματίδια που φέρουν το HBsAg. Οι δύο αυτοί τύποι σωματιδίων προσλαμβάνονται από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, τα οποία διασπούν τις ιϊκές πρωτεΐνες σε μικρότερα πεπτίδια. Η μετέπειτα σύνδεσή τους με το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τύπου I και τύπου II (MHC-I,II) οδηγεί στην αναγνώρισή τους από τα CD8⁺ και CD4⁺ T-λεμφοκύτταρα. Τα CD8⁺ T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τους επίτοπους του HBV απευθείας στα μολυσμένα ηπατοκύτταρα και αυτό μπορεί να οδηγήσει είτε σε άμεση λύση του κυττάρου είτε σε απελευθέρωση ιντερφερονών και του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α), τα οποία αναστέλλουν την ιϊκή αναπαραγωγή (39), (40). Τα CD4⁺ λεμφοκύτταρα από την άλλη αναγνωρίζουν τα πεπτιδικά θραύσματα μόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων.

Στην οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα, όπου η ανοσολογική απάντηση είναι επαρκής, το τελικό αποτέλεσμα είναι η λύση της φλεγμονής καθώς ο αριθμός των ηπατοκυττάρων που απαλλάσσονται από τον ιό είναι μεγαλύτερος από εκείνα που καταστρέφονται. Αντίθετα, στους ασθενείς με χρόνια νόσο η απόκριση του ανοσοποιητικού είναι μη ειδική και δεν μπορεί να ελέγξει τον πολλαπλασιασμό του ιού.



Εικόνα 1.6: Ανοσολογική απόκριση μετά την είσοδο του HBV στα ηπατοκύτταρα (32)

Οι ίδιοι μηχανισμοί που σχετίζονται με την αντιμετώπιση της λοίμωξης και την ανοσοποίηση είναι υπεύθυνοι για την παθογένεση της νόσου (41). Η καταστροφή των ηπατικών κυττάρων από τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα καθώς και η απελευθέρωση φλεγμονωδών παραγόντων και ελευθέρων ριζών οδηγούν στη εμφάνιση του νεκρωτικού ιστού. Εκτός από την προκαλούμενη άμεση ιστολογική βλάβη του ήπατος, η ανοσολογική απόκριση σχετίζεται και με την αύξηση της συγκέντρωσης των ηπατικών ενζύμων και συγκεκριμένα της αμινοτρανφεράσης της αλανίνης (ALT). Επαναλαμβανόμενη αύξηση των τιμών της ALT ενισχύει τον κίνδυνο ανάπτυξης κίρρωσης και ηπατοκυτταρικού καρκίνου (34). Τέλος, εκτός από τις ηπατικές εκδηλώσεις, οι οποίες διαμεσολαβούνται από την κυτταρική ανοσία μπορεί να εμφανισθούν και εξωηπατικά προβλήματα - κυρίως νεφρίτιδα και περιφερική αγγειίτιδα, ως αποτέλεσμα ανισορροπίας στην απελευθέρωση των παραγόντων φλεγμονής (42).

1.6 Κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από τον HBV

Η μόλυνση από τον ιό της Ηπατίτιδας Β μπορεί να οδηγήσει σε υποκλινική ή ασυμπτωματική λοίμωξη, σε οξεία αυτοπεριοριζόμενη ηπατίτιδα, ή σε κεραυνοβόλο μορφή ηπατίτιδας, που απαιτεί άμεση μεταμόσχευση ήπατος. Επιπλέον, οι ασθενείς μπορεί να αναπτύξουν χρόνια HBV λοίμωξη, κατά την οποία μπορεί να προκληθεί κίρρωση ή ηπατοκυτταρικός καρκίνος (43).

1.6.1 Οξεία ηπατίτιδα Β

Η οξεία μορφή της νόσου συναντάται κυρίως σε ενήλικες ασθενείς, οι οποίοι συνήθως μολύνονται μέσω της σεξουαλικής επαφής ή με χρήση μολυσμένης σύριγγας μεταξύ ναρκομανών (44). Μετά την έκθεση στον ιό, ακολουθεί μία περίοδος επώασης, όπου ο ασθενής παραμένει ασυμπτωματικός, με φυσιολογικές τιμές ηπατικών ενζύμων. Η διάρκεια αυτής της περιόδου ποικίλει και εξαρτάται κυρίως από την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, καθώς και από γονιδιακούς παράγοντες σχετιζόμενους με την έκφραση του NTCP στα ηπατοκύτταρα (45). Σε επόμενο στάδιο, ο ασθενής εμφανίζει συνήθως ανορεξία, ναυτία, τάση για έμεση και κοιλιακό πόνο. Τα συμπτώματα αυτά είναι μη-ειδικά και διαρκούν μόνο για μικρό χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα η διάγνωση της ιογενούς λοίμωξης να γίνεται σπάνια (46). Μόνο το 30% των ασθενών εμφανίζει ίκτερο και αναζητά θεραπεία. Τελικά, τα συμπτώματα υποχωρούν στο 95% των περιπτώσεων και η παραγωγή αντισωμάτων για το HBsAg αποτρέπει την επαναμόλυνση από τον ιό (44). Περίπου το 1% των ασθενών με οξεία ηπατίτιδα μπορεί να εμφανίσουν κεραυνοβόλο μορφή, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα ηπατικών ενζύμων, εγκεφαλοπάθεια, ίκτερο και ηπατική ανεπάρκεια. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται άμεση μεταμόσχευση ήπατος, για την επιβίωση του ασθενή (47).

1.6.2 Χρόνια ηπατίτιδα Β

Όπως αναφέρθηκε, η αδυναμία αντιμετώπισης του ιού από το ανοσοποιητικό οδηγεί σε εγκαθίδρυση χρόνιας νόσου. Για να χαρακτηριστεί ως «χρόνια» η ηπατίτιδα, απαιτείται η ανίχνευση του HBsAg στο πλάσμα του ασθενούς για τουλάχιστον 6 μήνες. Διακρίνεται σε δύο μορφές: τη χρόνια εμμένουσα ηπατίτιδα και τη χρόνια ενεργό μορφή ηπατίτιδας (48). Από χρόνια λοίμωξη πάσχουν συνήθως άτομα που μολύνθηκαν κατά την περιγεννητική περίοδο, καθώς και παιδιά που ήρθαν σε επαφή με τον ιό σε ηλικία 3-5 ετών. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών δεν ήταν πλήρως ανεπτυγμένο για να αντιμετωπίσει τη μόλυνση (49).

Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις φάσεις της χρόνιας ηπατίτιδας Β (34):

- ❖ Φάση ανοσολογικής ανοχής: Η φάση χαρακτηρίζεται από αυξημένο πολλαπλασιασμό του ιού με απουσία φλεγμονώδους δραστηριότητας στο ήπαρ καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα παραμένει αδρανές. Έτσι, οι ασθενείς είναι ασυμπτωματικοί, με υψηλό ιϊκό φορτίο αλλά κανονικές τιμές ηπατικών ενζύμων. Κατά την περίοδο αυτή επικρατεί η επαναπροώθηση του cccDNA στον πυρήνα, με αποτέλεσμα να μην απελευθερώνονται τα αντιγόνα που είναι απαραίτητα για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος.
- ❖ Φάση ανοσολογικής κάθαρσης: Στο σημείο αυτό η ανοσολογική ανοχή αίρεται και οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή ενεργοποιούνται με στόχο την εξάλειψη του ιού. Αυτό οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της ηπατικής αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης και σε φλεγμονή του ήπατος, που μπορεί να οδηγήσει σε ίνωση. Στη φάση αυτή οι ασθενείς είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση κίρρωσης ή ηπατοκυτταρικού καρκίνου και χρειάζονται θεραπεία. Ωστόσο, στο σημείο αυτό μπορεί να αναπτυχθούν αντισώματα έναντι του HBeAg. Έτσι, οι ασθενείς μπορεί είτε να παραμείνουν στην φάση ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού με διατήρηση των αλλοιώσεων του ήπατος και των υψηλών επιπέδων ALT, είτε να μεταπέσουν σε μη ενεργό φάση του HBV.
- ❖ Φάση ανενεργούς φορείας: Η σταδιακή απώλεια του HbeAg και η ανάπτυξη αντι-Hbe αντισωμάτων συνδέεται στην πλειοψηφία των ασθενών με την είσοδο σε μια μακροχρόνια φάση ύφεσης της ηπατοκυτταρικής φλεγμονής. Η αναπαραγωγική δραστηριότητα του ιού είναι χαμηλή ενώ σπάνια εμφανίζονται συμπτώματα.

Η αλληλουχία των φάσεων ποικίλει για κάθε ασθενή και είναι επίσης πιθανό οι ανενεργοί φορείς να επανέλθουν σε φάση ενεργοποίησης, συνεπώς είναι απαραίτητος ο έλεγχος των ηπατικών ενζύμων τουλάχιστον κάθε 6 μήνες (50). Η επανεδραστηριοποίηση του ιού μπορεί να συμβεί και αρκετές δεκαετίες αργότερα από τη φάση της ανενεργούς φορείας. Για το λόγο αυτό η καίρια θεραπευτική παρέμβαση είναι απαραίτητη από τα πρώτα κιόλας στάδια της λοίμωξης.

1.7 Εμβολιασμός

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 είναι διαθέσιμο ένα αποτελεσματικό εμβόλιο έναντι του HBV, το οποίο εντάχθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας σε όλα τα εθνικά προγράμματα ανοσοποίησης το 1991 (51). Το εμβόλιο παρασκευάζεται με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA που εκφράζει μόνο το αντιγόνο επιφανείας HBsAg. Τα παγκόσμια προγράμματα εμβολιασμού για την ηπατίτιδα Β έχουν εφαρμοσθεί σε περισσότερες από 160 χώρες ενώ διεθνής οικονομική υποστήριξη έχει διευκολύνει την εισαγωγή του εμβολίου και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η εφαρμογή των προγραμμάτων ανοσοποίησης έχει μειώσει σε μεγάλο ποσοστό τη συχνότητα της μόλυνσης από τον HBV σε έμβρυα, παιδιά και εφήβους σε πολλές χώρες. Η διαθεσιμότητα του εμβολίου μπορεί να έχει περιορίσει την εξάπλωση νέων λοιμώξεων δεν είναι όμως εφικτό να εξαλείψει τη νόσο σε ασθενείς με εγκαθιδρυμένη χρόνια λοίμωξη (52). Πράγματι, τα ποσοστά χρόνιας ηπατίτιδας Β σε ναρκομανείς, άτομα υψηλού κινδύνου λόγω σεξουαλικών δραστηριοτήτων και σε μετανάστες από χώρες υψηλού επιπολασμού παραμένουν ανεβασμένα στις αναπτυγμένες χώρες, ενισχύοντας την ανάγκη βελτίωσης των προληπτικών μέτρων για τις ομάδες αυτές καθώς και ανάπτυξης αποτελεσματικότερης φαρμακευτικής αγωγής (53).

1.8 Εγκεκριμένες αντι-HBV Θεραπείες

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η οξεία λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β περιορίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών στις περισσότερες των περιπτώσεων και έτσι δεν απαιτεί θεραπεία. Συνεπώς, κυρίως η χρόνια μορφή της νόσου επιδέχεται αντιμετώπισης με φάρμακα. Οι βασικοί στόχοι της αντι-HBV θεραπείας είναι η μείωση του ιϊκού φορτίου και η βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, με την προσδοκία ότι αυτό θα οδηγήσει σε αποτροπή ή επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου σε κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (54). Από τη μελέτη τόσο της παθογένεσης της νόσου όσο και του αναπαραγωγικού κύκλου του ιού γίνονται κατανοητοί οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης των εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων έναντι της ηπατίτιδας Β. Έτσι, οι εγκεκριμένοι αντιϊκοί παράγοντες είτε σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, είτε αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του HBV (55). Με βάση τη δομή και το μηχανισμό δράσης τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) ιντερφερόνες και β) νουκλεοτιδικό/νουκλεοζιτικοί αναστολείς της DNA πολυμεράσης.

1.8.1 Ιντερφερόνες

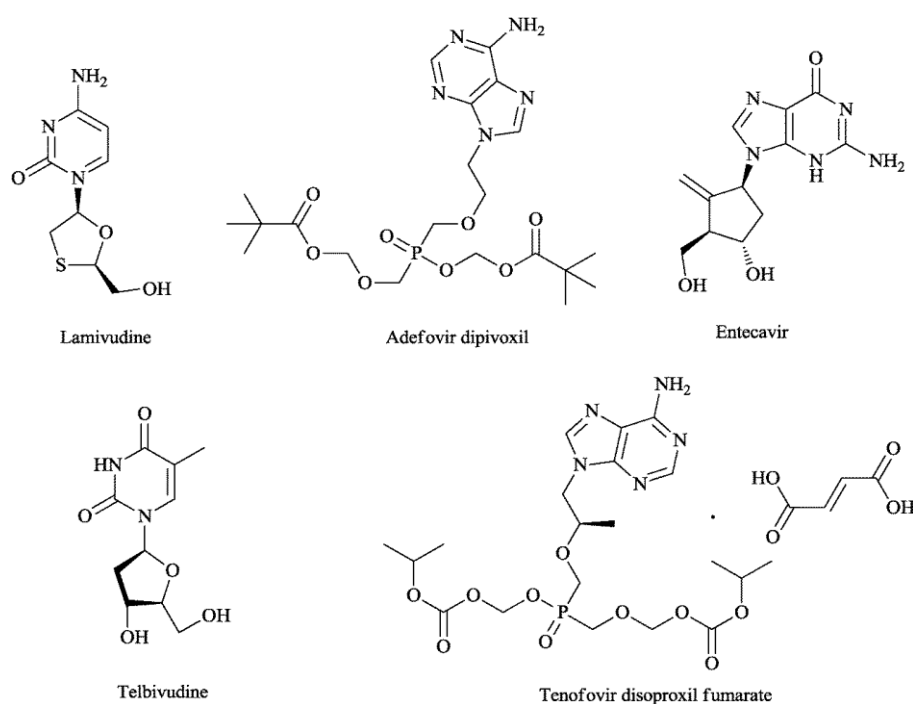
Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνεται η ιντερφερόνη α (IFN-α) και η πεγκυλιωμένη της μορφή (peg-IFNα). Η ιντερφερόνη α ανήκει στις πλειοτροπικές κυτοκίνες και παρουσιάζει αντιϊκή, αντιπολλαπλασιαστική και ανοσοτροποποιητική δράση. Μετά από σύνδεση στον υποδοχέα της οδηγεί σε ενεργοποίηση ποικιλίας δευτερογενών σηματοδοτικών μονοπατιών για την παραγωγή πρωτεϊνών με κεντρικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι της ιϊκής προσβολής. Έχει αποδειχθεί ότι η ιντερφερόνη α αναστέλλει τη μεταγραφή του γονιδιώματος του HBV, τη συγκρότηση του νουκλεοκαψιδίου καθώς και την έξοδο των mRNA του ιού από τον πυρήνα. Εκτός από τις άμεσες αντιϊκές δράσεις, η ανοσορρυθμιστική της ιδιότητα σχετίζεται με ενίσχυση της έκφρασης του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου I (MHC-I) και προάγει την απόκριση των NK κυττάρων και των CD8+ T-λεμφοκυττάρων (56),(57).

Η ιντερφερόνη α έλαβε έγκριση για τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β στις αρχές της δεκαετίας του '90. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλλέγονται η πεπερασμένη διάρκεια θεραπείας (6 μήνες έως ένα χρόνο) και η απουσία εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών. Παρουσιάζει ωστόσο σημαντικά μειονεκτήματα, με κυριότερα την ανάγκη για συχνή παρεντερική χορήγηση (3 φορές εβδομαδιαία) και την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών. Συχνά οι ασθενείς που λαμβάνουν ιντερφερόνη εμφανίζουν γριπώδες σύνδρομο με ημικρανία και μυαλγία, γαστρεντερικές διαταραχές και κατάθλιψη (58). Η χορήγησή της αντενδείκνυται σε εγκύους και ασθενείς με μη αντιρροπούμενη κίρρωση του ήπατος, καθώς και σε πάσχοντες από καρδιακή ή ψυχιατρική νόσο και ηπατίτιδα αυτοάνοσης αιτιολογίας (59), (60).

Η πεγκυλιωμένη ιντερφερόνη α διαθέτει βελτιωμένα φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά. Η πεγκυλίωση επιτρέπει τη βραδύτερη απορρόφηση στο σημείο της ένεσης με αποτέλεσμα τη συνεχή έκθεση του ασθενούς στο φάρμακο και κατά τη διάρκεια των μεσοδιαστημάτων της χορήγησης. Το αυξημένο μοριακό βάρος μειώνει τη νεφρική σπειραματική διήθηση και την αποικοδόμηση από πρωτεολυτικά ένζυμα, οδηγώντας σε αυξημένο χρόνο ημιζωής του φαρμάκου στο πλάσμα των ασθενών. Με αυτό τον τρόπο δίνεται επιπλέον η δυνατότητα αραιώτερου δοσολογικού σχήματος (μία φορά την εβδομάδα υποδορίως), γεγονός που οδηγεί σε καλύτερη συμμόρφωση των ασθενών. (61).

1.8.2 Νουκλεοτιδικοί/Νουκλεοζιτικοί αναστολείς του HBV

Σε αυτή την ομάδα αντιϊκών παραγόντων περιλαμβάνονται μόρια μικρού μοριακού βάρους με κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Μέχρι σήμερα έχουν λάβει έγκριση και κυκλοφούν στην αγορά πέντε ενώσεις αυτής της κατηγορίας: το lamivudine, το adefovir dipivoxil, το entecavir, το telbivudine, και το tenofovir disoproxil fumarate (**Εικόνα 1.7**). Λόγω της ομοιότητάς τους με τα φυσικά νουκλεοτίδια, ενσωματώνονται στο νεοσυντιθέμενο DNA οδηγώντας σε τερματισμό της επιμήκυνσης και τελικά σε αναστολή του ιϊκού πολλαπλασιασμού (62). Δρουν με αυτό τον τρόπο ως συναγωνιστικοί αναστολείς της DNA πολυμεράσης, είτε στο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής, είτε μετέπειτα στην DNA εξαρτώμενη σύνθεση DNA. Το σημαντικότερο μειονέκτημα των φαρμάκων αυτών είναι η υψηλή συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών, γεγονός που περιορίζει την κλινική τους χρησιμότητα. Διάφοροι τύποι μεταλλάξεων μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη ανοχής και αφορούν κατά βάση αλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί την περιοχή της αντίστροφης μεταγραφάσης της DNA πολυμεράσης, προκαλώντας στερικές αλλαγές στην πρωτεΐνη με αποτέλεσμα την αδυναμία δράσης των φαρμάκων (63).



Εικόνα 1.7: Εμπορικά διαθέσιμοι νουκλεοτιδικοί/νουκλεοζιτικοί αναστολείς του HBV

Lamivudine (Zeffix®)

Το lamivudine είναι το πρώτο από του στόματος χορηγούμενο φάρμακο που έλαβε έγκριση για τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β το 1998 (64). Δομικά είναι το L-εναντιομερές της 2',3'-διδεοξυ-3'-θειακυτιδίνης, ένα διδεοξυνουκλεοζιτικό ανάλογο, το οποίο χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες για τη θεραπεία του HIV-1 και ως μονοθεραπεία έναντι του HBV. Η δράση του απαιτεί διαδοχική φωσφορυλίωση από την ενδοκυττάρια κινάση της δεοξυκυτιδίνης για να μετατραπεί στο ενεργό 5'-τριφωσφορικό παράγωγο. Δρα κυρίως αναστέλλοντας την περιοχή της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού χωρίς να έχει σημαντική επίδραση στις πολυμεράσες του ξενιστή (65). Επιπλέον, διαθέτει ένα άτομο θείου στην 3' θέση του σακχάρου με αποτέλεσμα να είναι αδύνατος ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο νουκλεοτίδιο αποτρέποντας την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA (66). Το lamivudine χρησιμοποιείται με αποτελεσματικότητα σε μεγάλο εύρος ασθενών. Ωστόσο, παρατεταμένη λήψη του φαρμάκου οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών στο 14-32% των ασθενών από τον πρώτο κιόλας χρόνο θεραπείας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επανεμφάνιση του ιού και τελικά της ηπατικής βλάβης. Για το λόγο αυτό προτείνεται πλέον ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για τη νόσο (64).

Entecavir (Baraclude®)

Το entecavir αποτελεί καρβοκυκλικό ανάλογο της 2'-δεοξυγουανωσίνης. Μετατρέπεται ταχέως στο αντίστοιχο 5'-τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο και ανταγωνίζεται το φυσικό υπόστρωμα τόσο για την αντίστροφη μεταγραφή της αρνητικής έλικας του DNA από το προγενωμικό RNA όσο και στη μετέπειτα σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Επιπλέον, ως ανάλογο γουανίνης, παρεμβαίνει στην προσθήκη του εκκινητή από την πολυμεράση του HBV (67). Η ανάπτυξη ανθεκτικών στο entecavir στελεχών απαιτεί πολλαπλές μεταλλάξεις στην αντίστροφη μεταγραφάση και έτσι πλεονεκτεί έναντι του lamivudine με το οποίο όμως έχει παρατηρηθεί διασταυρούμενη ανοχή (62). Είναι καλά ανεκτό, με συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες την κεφαλαλγία, λοιμώξεις ανώτερου αναπνευστικού, ρινοφαρυγγίτιδα, κόπωση, ζάλη, και ναυτία (64).

Telbivudine (Sebivo®)

Το telbivudine είναι L-νουκλεοζιτικό παράγωγο θυμιδίνης, που η παρουσία 3' υδροξυλίου στο δακτύλιο της 2'-δεοξυριβόζης του προσφέρει εκλεκτικότητα έναντι του

HBV, αφού δεν είναι δραστικό έναντι ρετροϊών. Μετά την φωσφορυλίωσή του, αλληλεπιδρά με την πολυμεράση του HBV παρεμβαίνοντας στον ιικό πολλαπλασιασμό. Το telbivudine είναι δραστικότερο σε σχέση με το lamivudine και το adefovir ως αναστολέας του ιικού πολλαπλασιασμού. Επιδρά κυρίως στο τελικό στάδιο σχηματισμού του rc-DNA, όπου συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος του DNA. Λόγω υψηλότερης πιστότητας στη διαδικασία σχηματισμού του DNA σε αυτό το σημείο, το telbivudine παρουσιάζει χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με το lamivudine, το οποίο όπως αναφέρθηκε επιδρά κυρίως στην αντίστροφη μεταγραφή (68). Έλαβε έγκριση το 2006 για τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας B και η χρήση του έχει συσχετιστεί με νεφροτοξικότητα και διαταραχές της οστικής μάζας, ειδικά σε ασθενείς με ταυτόχρονη λοίμωξη από τον HIV (69).

Adefovir dipivoxil (Hepsera ®)

Το adefovir dipivoxil είναι προφάρμακο του adefovir και «ανοιχτό» ανάλογο της μονοφωσφορικής αδενοσίνης, που χαρακτηρίζεται από ευρεία αντιϊκή δράση (70). Έλαβε έγκριση από τον FDA το 2002 και κυκλοφόρησε στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2003. Ως νουκλεοτιδικό ανάλογο είναι μονοφωσφορικός εστέρας που ενεργοποιείται μεταβολικά με δύο επιπλέον φωσφορυλίωσεις, μετά από την απομάκρυνση των πιβαλοϋλοξυμεθυλομάδων. Το adefovir αναστέλλει την επιμήκυνση του DNA αλλά έχει αποδειχθεί ότι επιπλέον διεγείρει τη δραστηριότητα των φυσικών φονικών κυττάρων (NK) και προκαλεί ενδογενή παραγωγή ιντερφερονών (71). Διαθέτει παρόμοια δραστικότητα με το lamivudine, πλεονεκτεί ωστόσο στη σπανιότερη εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών (52). Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες που προκύπτουν από τη χρήση του είναι: φαρυγγίτιδα, κοιλιακός πόνος και ναυτία, ενώ η πιθανότητα εμφάνισης νεφροτοξικότητας οδηγεί σε μείωση της δοσολογίας (72).

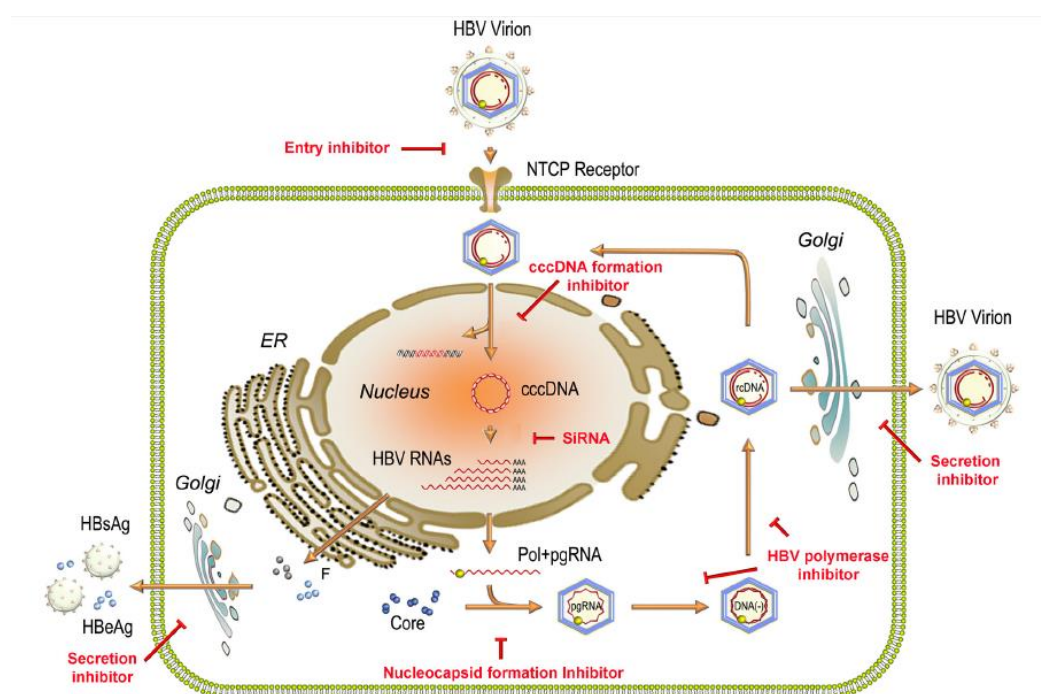
Tenofovir disoproxil fumarate (Viread ® , Vemlidy ®)

Το tenofovir disoproxil fumarate, είναι επίσης «ανοιχτό» νουκλεοτιδικό ανάλογο και προφάρμακο του tenofovir. Έλαβε έγκριση για κυκλοφορία στις Ηνωμένες Πολιτείες από το 2001 για τη θεραπεία του AIDS και το 2008 εισήχθη ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε χρόνια ηπατίτιδα B (73). Εμφανίζει σημαντική δομική ομοιότητα με το adefovir και ενσωματώνεται στο ιικό DNA προκαλώντας αναστολή της DNA πολυμεράσης. Παρά την

ομοιότητα αυτή, παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι του HBV, με ταχύτερη βελτίωση της ιστολογικής μορφής του ήπατος και άμεση μείωση του HBsAg από το πλάσμα των ασθενών. Το tenofovir διαθέτει πολύ καλό προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών χωρίς να υπάρχουν στοιχεία για νεφροτοξικότητα, ενώ δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών (64). Ένα καινούριο προφάρμακο του tenofovir, το tenofovir alafenamide, κυκλοφόρησε το 2017 και παρουσιάζει βελτιωμένη δραστικότητα και βιοδιαθεσιμότητα (74).

1.9 Αναπτυσσόμενες θεραπείες έναντι του HBV

Οι επι του παρόντος διαθέσιμες θεραπείες για τη χρόνια ηπατίτιδα Β είναι αρκετά αποτελεσματικές στην καταστολή του ιϊκού πολλαπλασιασμού και στη βελτίωση του κλινικού αποτελέσματος. Ωστόσο, η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών λόγω του κοινού μηχανισμού δράσης τους περιορίζει σημαντικά τη δυνατότητα μακροχρόνιας χρήσης τους. Επιπλέον, τα νουκλεοζιδικά ανάλογα δεν επιδρούν στο σχηματισμό του cccDNA και έτσι δεν οδηγούν σε πλήρη εξάλειψή του ιού από το εσωτερικό του κυττάρου (75). Για το σκοπό αυτό, η έρευνα έχει στραφεί σε μεγάλο βαθμό στην αναγνώριση νέων μοριακών στόχων, οι οποίοι συνοψίζονται στην εικόνα 1.8.

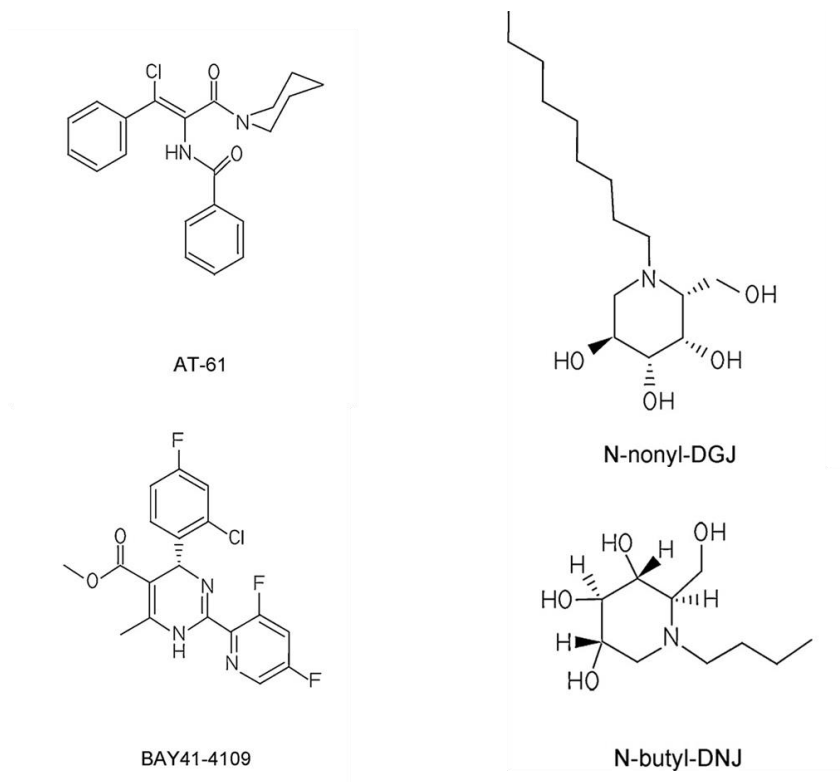


Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση των νέων μοριακών στόχων για την αναστολή του HBV (75).

Οι αναστολείς της ιϊκής εισόδου μπορούν να αποτρέψουν τη μόλυνση νέων κυττάρων από τον ιό, με αποτέλεσμα να συνεισφέρουν τόσο στην πρόληψη της κάθετης μετάδοσης όσο και στην τελική εξάλειψη του ιού από τον οργανισμό. Για το σκοπό αυτό έχουν μελετηθεί ακυλιωμένα πεπτίδια προερχόμενα από την pre-S1 περιοχή της μεγάλης πρωτεΐνης του φακέλου, τα οποία εμποδίζουν την αλληλεπίδραση του HBV με τον υποδοχέα του. Σε αυτά ανήκει το Myrcludex-B, ένα συνθετικό μυριστοϋλιωμένο λιποπεπτίδιο το οποίο αξιολογείται ήδη σε κλινικές μελέτες Φάσης II (75).

Για να επιτευχθεί ουσιαστική θεραπεία έναντι του HBV απαιτείται η στόχευση στο cccDNA του ιού. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε αποτρέποντας το σχηματισμό του είτε παρεμβαίνοντας στη μεταγραφή του. Παράγοντες που επιδρούν στην επιγενετική ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητάς του cccDNA αποτελούν ελπιδοφόρα θεραπευτική προσέγγιση για το μέλλον. Ανάλογα μπορούν να δράσουν και silencing RNAs (siRNAs). Καθώς ο HBV αναπαράγεται μέσω RNA ενδιάμεσου είναι ευαίσθητος στα siRNAs, τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα οδηγώντας σε «παύση» της μεταγραφής και συνεπώς της αναπαραγωγής του ιού (76).

Η διαδικασία προσάρτησης του ιϊκού φακέλου και τελικά έκκρισης των βιρίων από το κύτταρο είναι ένας ακόμη πιθανός αντιϊκός στόχος. Αναστολείς γλυκοσιδάσης έχουν μελετηθεί για το σκοπό αυτό, καθώς περιορίζουν την γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών του φακέλου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα τη διαταραχή στη μορφογένεση και λοιμογονικότητα του HBV (**Εικόνα 1.9-δεξιά**) (77). Τέλος, καθώς η συναρμολόγηση του νουκλεοκαψιδίου είναι σημαντικό στάδιο του αναπαραγωγικού κύκλου του ιού, μικρά μόρια έχουν αναπτυχθεί ήδη για αυτό το στόχο. Τα κυριότερα είναι αρυλοδιϋδροπυριμιδίνες, οι οποίες συνδέονται με την πυρηνική πρωτεΐνη προκαλώντας σχηματισμό αφύσικων δομών, μη συμβατών με το λειτουργικό νουκλεοκαψίδιο, που οδηγούν στην αποδόμησή του (78). Με παρόμοιο τρόπο δρουν και τα φαινυλοπροπαναμίδια που επιδρούν στην ενκαψυλίωση του προγενωμικού RNA μετά τη μεταγραφή (**Εικόνα 1.9-αριστερά**).

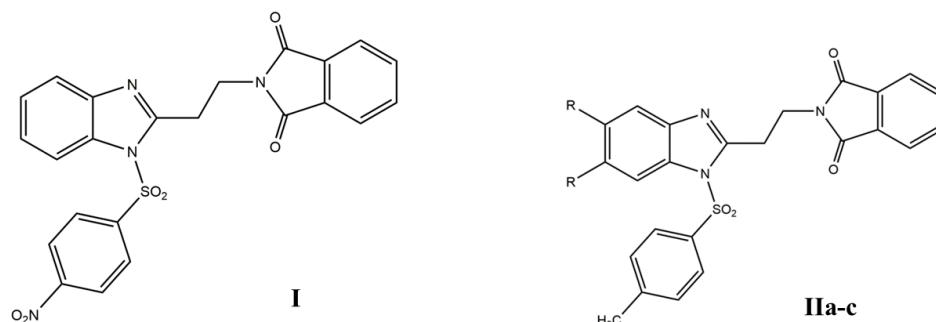


Εικόνα 1.9: Χημικές δομές αναστολέων της συγκρότησης του νουκλεοκαψιδίου (αριστερά) και αναστολέων γλυκοσιδάσης (δεξιά).

1.10. Στόχος της εργασίας

Τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν τα επι του παρόντος διαθέσιμα φάρμακα καθώς και η ταυτοποίηση νέων μοριακών στόχων έχουν επιτείνει το ενδιαφέρον των ερευνητών για την ανάπτυξη νέων αντιικών παραγόντων για τον HBV με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Στα πλαίσια ερευνητικών προσπαθειών προς αυτή την κατεύθυνση αναπτύχθηκε σημαντικός αριθμός μη νουκλεοζιτικών βενζιμιδαζολικών αναλόγων. Λόγω της ισοστερείας του με τον δακτύλιο των πουρινών και του ινδολίου, που εντοπίζονται σε πολλά θεμελιώδη κυτταρικά στοιχεία και βιοδραστικά μόρια, το βενζιμιδαζόλιο αποτελεί μία ενδιαφέρουσα φαρμακοφόρος δομή με ποικιλία δράσεων, όπως αντικαρκινική, αντιϊκή, αντιϊσταμινική και αντιμυκητησιακή (79), (80). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη χαμηλή κυτταροτοξικότητα που εμφανίζουν πολλά παραγωγά του, είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση επιστημονικού ενδιαφέροντος για την ανάπτυξη βενζιμιδαζολικών παραγώγων με πιθανή αντι-HBV δράση.

Αρχικά, το 2006 αναφέρθηκε ότι το βενζιμιδαζολικό ανάλογο **I** (Σχήμα 1.1) έδειξε μέτρια αναστολή του ιϊκού πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά HepG2.2.15 και μικρή κυτταροτοξικότητα, γεγονός που αποτέλεσε αφετηρία για τη μελέτη των σχέσεων δομής-δράσης μορίων αυτής της κατηγορίας.



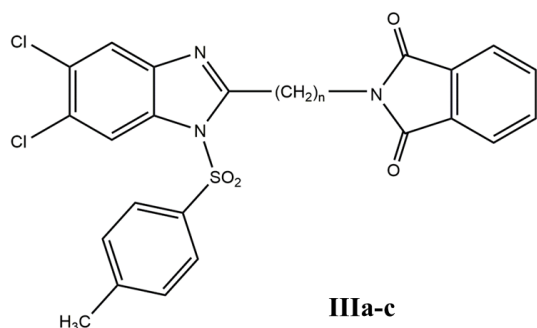
Παράγωγο	R	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
I	-	14.4	200
IIa	H	2.2	164
IIb	F	1.2	31
IIc	Cl	2.9	867
lamivudine	-	0.38	>1000
adefovir	-	1.3	203

Σχήμα 1.1 Φθαλιμιδο- βενζιμιδαζολικά ανάλογα με *in vitro* αντι-HBV δράση.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στην υποκατάσταση του συμπυκνωμένου βενζολικού δακτυλίου και στα άζωτα του ιμιδαζολίου (81). Προέκυψαν έτσι τα ανάλογα **IIa-c** (Σχήμα 1.1) που έφεραν τοξυλικό υποκαταστάτη στο ιμιδαζόλιο και έδειξαν καλύτερη ανασταλτική δράση. Όλα είχαν παρόμοιες τιμές IC₅₀ με το παράγωγο **IIc** να παρουσιάζει όμως σημαντικά μικρότερη κυτταροτοξικότητα *in vitro*, γεγονός που οδήγησε στην επιλογή του για περεταίρω μελέτη.

Συγκεκριμένα, τροποποιήθηκε το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας μεταξύ βενζιμιδαζολίου και φθαλιμιδίου και παρασκευάστηκαν τα παράγωγα **IIIa-c** (Σχήμα 1.2). Φαίνεται ότι η απόσταση μεταξύ των δύο δακτυλίων είναι απαραίτητη για την αναστολή του ιού, καθώς το παράγωγο **IIIa** παρουσίασε σημαντικά μειωμένη δραστηριότητα. Επιπλέον,

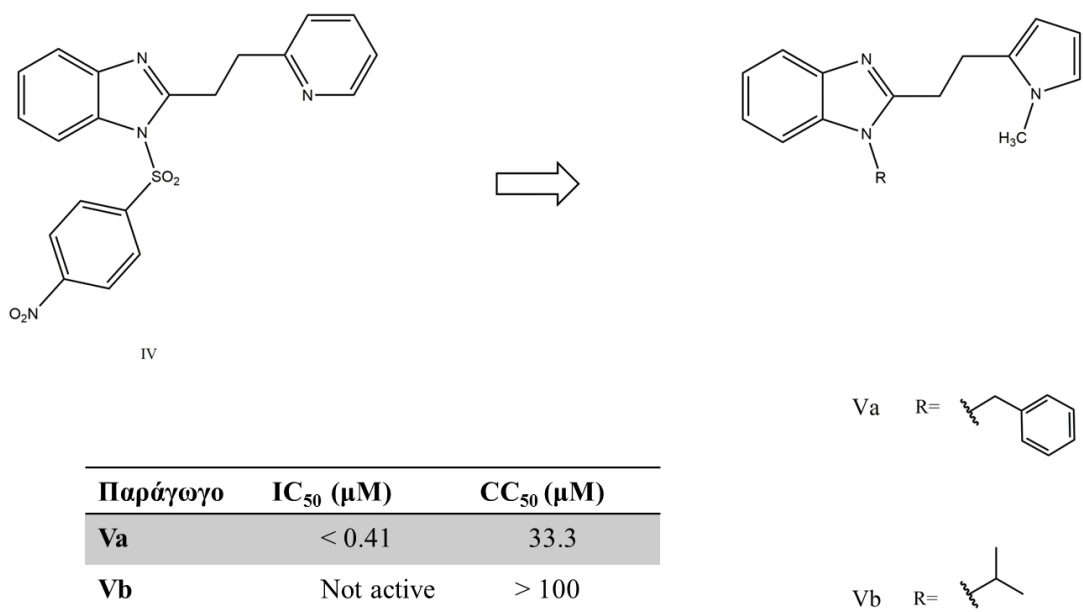
φαίνεται ότι μείωση ή αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας κατά ένα άτομο άνθρακα οδηγεί σε καλύτερη δράση, με σημαντική όμως παράλληλη αύξηση της τοξικότητας.



Παράγωγο	n	IC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
IIIa	0	19.4	122
IIIb	1	0.5	90
IIIc	3	0.34	13

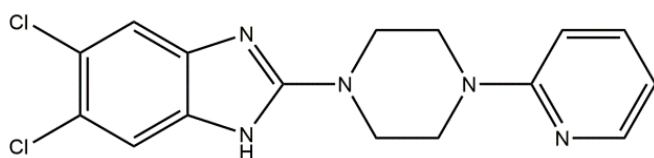
Σχήμα 1.2: Τροποποιήσεις στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας στο παράγωγο **IIIc**

Περεταίρω μελέτη από την ίδια ερευνητική ομάδα το 2011, έδειξε ότι τα παραπάνω παράγωγα, παρά τη δραστηκότητά τους εμφανίζουν μικρή υδατοδιαλυτότητα και από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα, γεγονός που φαίνεται να σχετίζεται με τον πλευρικό φθαλιμιδικό υποκαταστάτη (82). Στη βιβλιογραφία, είχε αναφερθεί ότι το παράγωγο IV του σχήματος **1.3** είχε καλή αντιϊκή δράση με βελτιωμένα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά (83). Με βάση αυτό συντέθηκαν τα μόρια **Va** και **Vb**, όπου το φθαλιμίδιο αντικαταστάθηκε από το δακτύλιο του 1-μεθυλοπυρρολίου, ενώ το ιμιδαζολικό άζωτο έφερε ως υποκαταστάτη βενζυλομάδα, ή ισοπροπυλομάδα αντίστοιχα. Από τις τιμές IC₅₀ που παρατίθενται φαίνεται ότι ο ογκώδης υποκαταστάτης στην 1-θέση είναι απαραίτητος για την εκδήλωση αντι-HBV δράσης. Μελετήθηκε και σε αυτή την περίπτωση το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Στα μόρια αυτά, η αντικατάσταση του αιθυλίου από μεθυλένιο επέφερε δραματική μείωση δραστηκότητας.



Σχήμα 1.3: Σχεδιασμός και in vitro αντι-HBV δράση των παραγώγων Va και Vb.

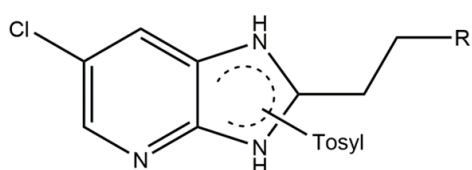
Λίγα χρόνια αργότερα, αποδείχτηκε ότι το βενζιμιδαζολικό ανάλογο BM601 (**Εικόνα 1.4**) αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του HBV χωρίς όμως να επιδρά στη σύνθεση του DNA του ιού. Το BM601 εμποδίζει τη συσσώρευση των πρωτεϊνών του φακέλου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, με αποτέλεσμα να αναστέλλει το μονοπάτι έκκρισης των βιρίων και των υποϊικών σωματιδίων. Με αυτό τον τρόπο σταματά η μόλυνση νέων ηπατοκυττάρων καθώς και η επαγόμενη από το HBsAg ανοσοκαταστολή (84).



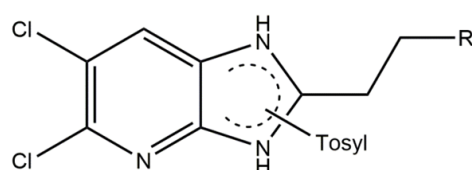
Σχήμα 1.4: Βενζιμιδαζολικός αναστολέας της έκκρισης του HBV -BM601.

Με βάση όλα τα παραπάνω και με στόχο την επέκταση των σχέσεων δομής-δράσης και την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών μορίων έναντι του ιού της ηπατίτιδας B, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας τα ιμιδαζο[4,5-b]πυριδινικά ανάλογα του σχήματος 1.5. Στα νέα μόρια, η φαρμακοφόρος δομή

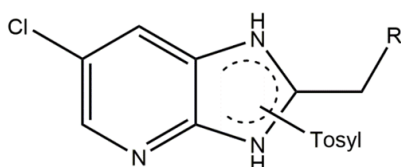
του βενζιμιδαζολίου αντικαταστάθηκε από αυτή της ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης, η οποία λόγω της ισοστερείας της με το δακτύλιο της πουρίνης θα μπορούσε να προσφέρει μεγαλύτερη πιθανότητα αλληλεπίδρασης με ιικά ένζυμα αλλά ίσως και με κυτταρικά στοιχεία. Τα παράγωγα που συντέθηκαν μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες, που διαφοροποιούνται στην υποκατάσταση του πυριδινικού δακτυλίου και στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας στη 2-θέση της ιμιδαζοπυριδίνης. Για την ταυτοποίηση της αναγκαιότητας των υποκαταστατών στην πυριδίνη και τη μελέτη της επίδρασής τους στην τοξικότητα παρασκευάστηκαν 6-χλωρο και 5,6-διχλωροπαράγωγα.



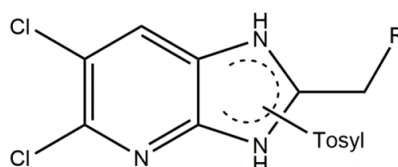
Κατηγορία I



Κατηγορία II



Κατηγορία III



Κατηγορία IV

R:			
----	--	--	--

Σχήμα 1.5: Γενικοί τύποι των μορίων που συντίθενται στην παρούσα εργασία

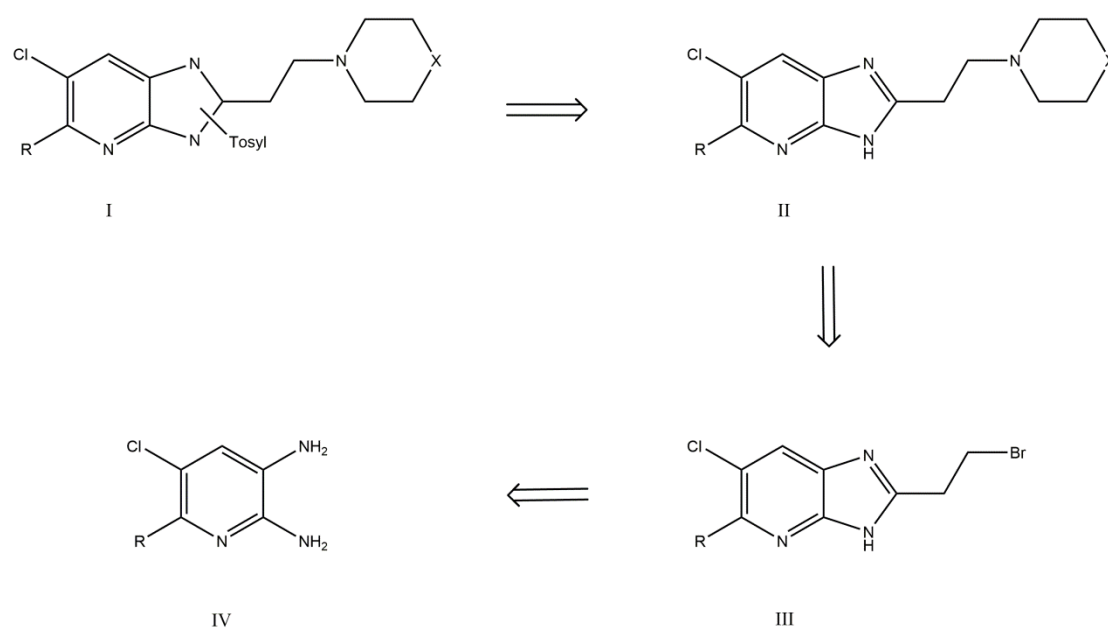
Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του μήκους και της ευκαμψίας της ανθρακικής αλυσίδας στην αντιϊκή δράση συντέθηκαν παράγωγα που φέρουν αλυσίδα ενός και δύο ατόμων άνθρακα μεταξύ του δακτυλίου της ιμιδαζοπυριδίνης και των πλευρικών αμινών. Επιλέχθηκε η χρήση των συγκεκριμένων αλκυκυκλικών αμινών γιατί μπορεί να συνεισφέρουν σε ποικιλία αλληλεπιδράσεων και να εξυπηρετήσουν παράλληλα στην υδατοδιαλυτότητα των

μορίων. Συγκεκριμένα, η πιπεριδίνη δίνει τη δυνατότητα υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ενώ το οξυγόνο της μορφολίνης μπορεί να δράσει ως δέκτης δεσμού υδρογόνου. Επιπλέον, το άζωτο της *N*-μεθυλοπιπεραζίνης μπορεί να φορτιστεί θετικά και πιθανότατα να συμμετέχει σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Τέλος, η τοξυλική ομάδα επιλέχτηκε ως υποκατάσταση των ιμιδαζολικών αζώτων και συντέθηκαν τα N-1 και N-3 ισομερή θέσης.

Τα τοξυλιωμένα προϊόντα καθώς και τα αντίστοιχα ετεροκυκλικά τους ενδιάμεσα αξιολογήθηκαν φαρμακολογικά με σκοπό την εκτίμηση της δράσης τους έναντι του ιού της Ηπατίτιδας Β.

2.ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για τη σύνθεση των μορίων-στόχων της παρούσας εργασίας αρχικά επιχειρήθηκε η πορεία που παρουσιάζεται στο παρακάτω ρετροσυνθετικό σχήμα (**Σχήμα 2.1**). Τα τελικά μόρια με γενικό τύπο I μπορούν να παρασκευαστούν από τα αντίστοιχα ετεροκυκλικά συστήματα (II). Η αρχική προσέγγιση ήταν η υποκατάσταση μίας καλής αποχωρούσας ομάδας, όπως το βρώμιο, από τις επιθυμητές αμίνες και έτσι δοκιμάστηκε η σύνθεση του III από την κατάλληλα υποκατεστημένη διαμίνη IV.



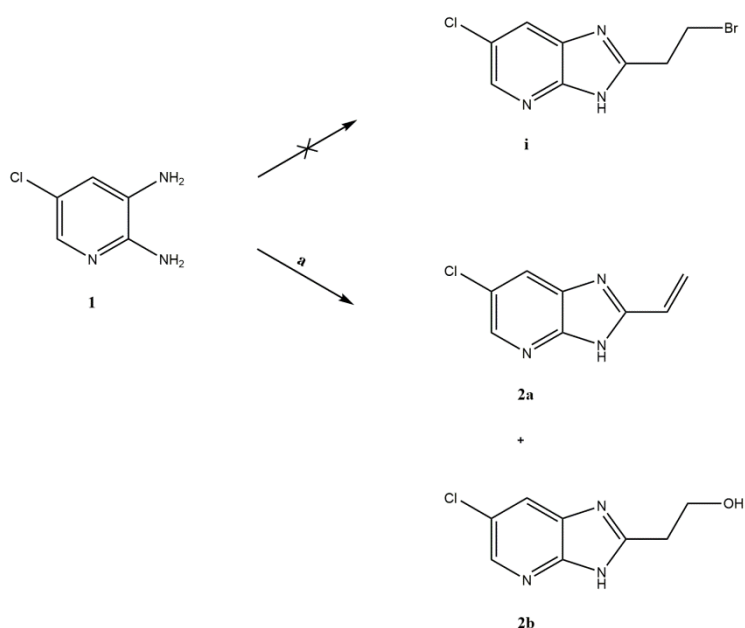
Σχήμα 2.1 Αρχική ρετροσυνθετική πορεία για την παρασκευή των προϊόντων τύπου I

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αρκετοί τρόποι παρασκευής ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών καθώς η ισοστέρειά τους με το δακτύλιο τον πουρινών τους προσδίδει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον τόσο από χημικής όσο και από βιολογικής πλευράς. Από αυτούς, ο συνηθέστερος τρόπος σύνθεσης είναι η κύκλωση της ο-διαμινοπυριδίνης με καρβοξυλικά οξέα ή παράγωγά τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παρασκευή ιμιδαζοπυριδινικών παραγώγων υποκατεστημένων τόσο στην πυριδίνη όσο και στο ιμιδαζόλιο (85). Οι αντιδράσεις αυτές χωρούν συνήθως μέσω ενός ενδιάμεσου σταδίου ακυλίωσης της 2-αμινομάδας της πυριδίνης, η οποία στη συνέχεια κυκλώνει με θέρμανση. Ωστόσο, παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς καθώς απουσία ειδικών ενεργοποιητών ή

αφυδατικών μέσων οι αποδόσεις είναι χαμηλές και η αντίδραση σταματά σε αρχικό στάδιο ακυλίωσης ή οδηγείται σε διακυλιωμένα παράγωγα με αποτέλεσμα οι αποδόσεις να είναι χαμηλές (86).

Αφυδατικά μέσα όπως το πολυφωσφορικό οξύ (PPA), POCl_3 , SOCl_2 , p-τολουολοσουλφονικό οξύ και άλλα ευνοούν σημαντικά την κύκλωση της διαμινοπυριδίνης και αυξάνουν την απόδοση των αντιδράσεων. Το συχνότερα χρησιμοποιούμενο είναι το PPA. Το πολυφωσφορικό οξύ είναι ένα μίγμα πολυμερών φωσφορικού οξέος και είναι καλός διαλύτης για οργανικά μόρια, δότης πρωτονίου αλλά μικρής οξύτητας και ισχυρός αφυδατικός παράγοντας, γεγονός που ευνοεί αντιδράσεις συμπύκνωσης και κυκλοποίησης (87), (88).

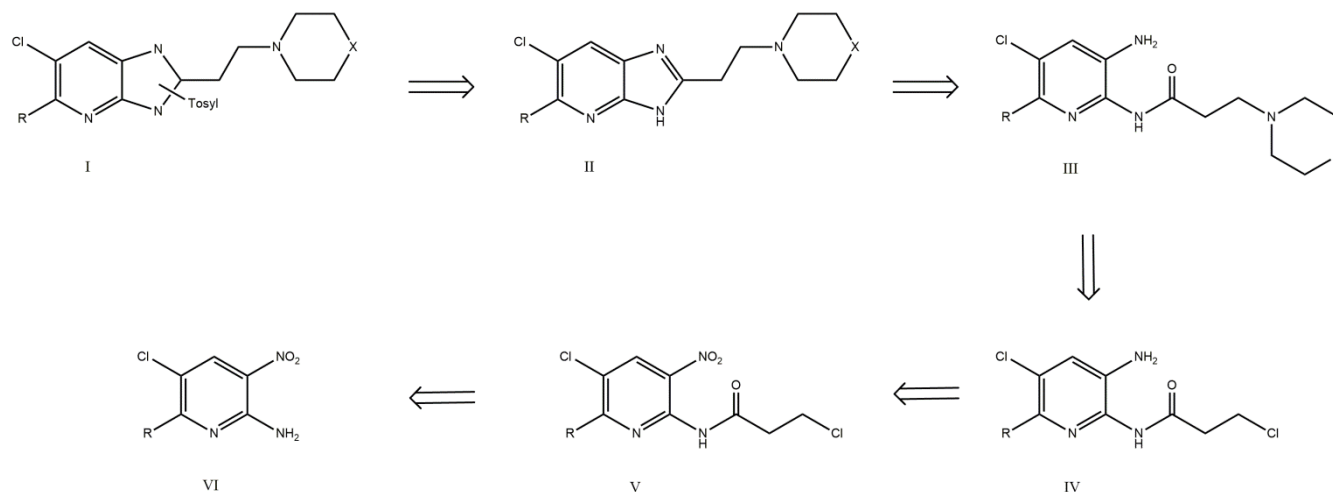
Με βάση την παραπάνω μέθοδο επιχειρήθηκε αρχικά η συμπύκνωση της διαμίνης **1** (που παραλήφθηκε εύκολα μετά τη νίτρωση και αναγωγή της εμπορικά διαθέσιμης 2-αμινο-5-χλωροπυριδίνης) με το 3-βρωμοπροπιονικό οξύ μέσα σε PPA στους 140°C (Σχήμα 2.2). Ωστόσο, το επιθυμητό προϊόν **i** δεν απομονώθηκε ενώ από την αντίδραση σχηματίστηκαν μόνο τα παράγωγα **2a** και **2b**.



Σχήμα 2.2 a) 3-βρωμοπροπανοϊκό οξύ, PPA, 140°C , 4.5 ώρες.

Η αδυναμία παραλαβής του επιθυμητού ετεροκυκλικού παραγώγου οδήγησε σε τροποποίηση της συνθετικής πορείας όπως προτείνεται στο παρακάτω ρετροσυνθετικό σχήμα (Σχήμα 2.3). Συνεπώς, η προσθήκη της αμίνης γίνεται πριν το στάδιο της κύκλωσης στα

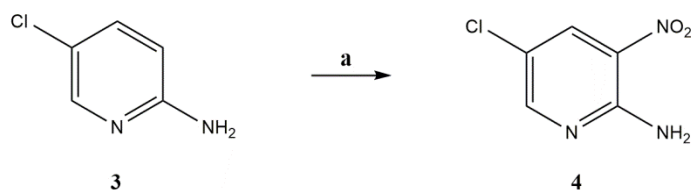
αμινοαμίδια του γενικού τύπου IV, τα οποία προκύπτουν με αμιδοποίηση των νιτροπαραγώγων VI ακολουθούμενη από αναγωγή της νιτροομάδας των ενδιάμεσων V.



Σχήμα 2.3 Τροποποιημένο ρετροσυνθετικό σχήμα για την παραλαβή των προϊόντων τύπου I

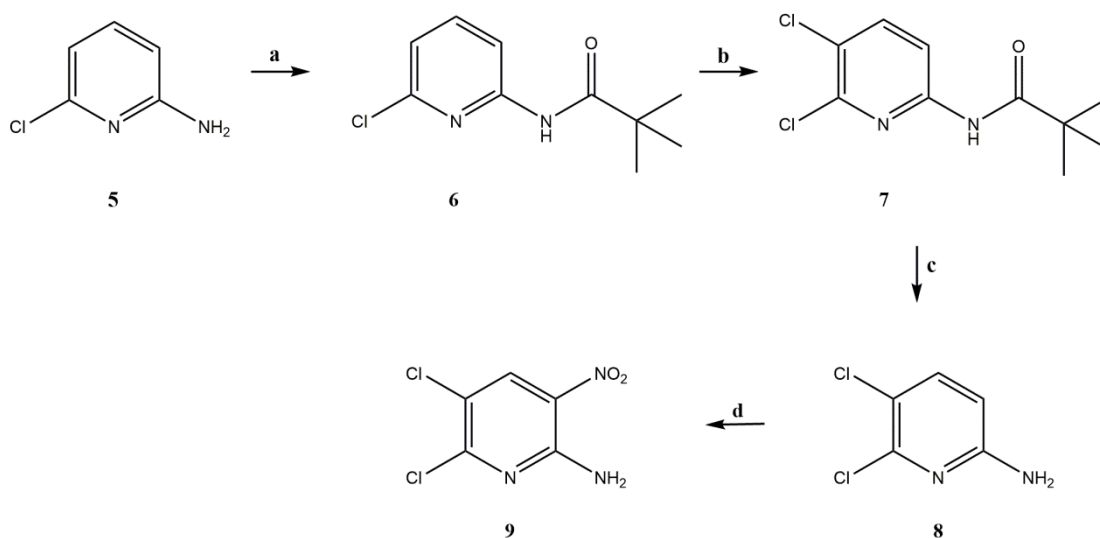
Όλα τα τελικά παράγωγα παρασκευάστηκαν βάσει του ρετροσυνθετικού σχήματος 2.3. Η διαφοροποίηση των παραγώγων που φέρουν ένα χλώριο στο δακτύλιο της πυριδίνης από τα μόρια της δίχλωρο σειράς γίνεται από τα πρώτα στάδια της σύνθετικής πορείας. Για το σκοπό αυτό συντέθηκαν η 5-χλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (**4**) και η 5,6-διχλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (**9**) αντίστοιχα.

Η σύνθεση της νιτροπυριδίνης **4** περιγράφεται στη βιβλιογραφία (89). Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται η χλωροπυριδινάμίνη **3**, η οποία διαλύεται σε πυκνόθειικό οξύ και με προσθήκη πυκνού νιτρικού οξέος υπό θέρμανση παραλαμβάνεται το νιτροπαραίγωγο **4** (Σχήμα 2.4).



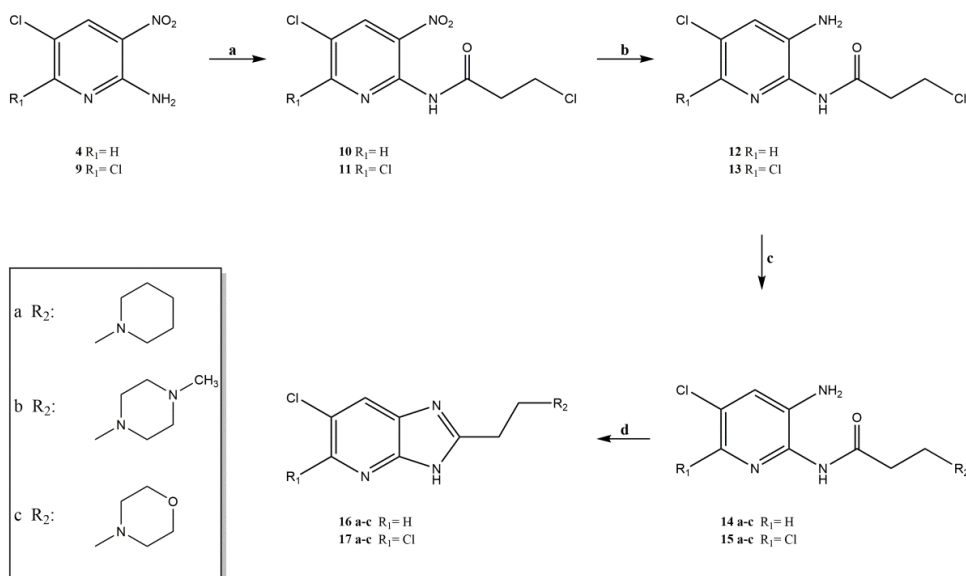
Σχήμα 2.4 α) π. HNO_3 , π. H_2SO_4 , 55°C , 2 ώρες.

Για την παρασκευή της διχλωρονιτροπυριδίνης **9** ακολουθείται διαφορετική πορεία σύνθεσης (**Σχήμα 2.5**). Η 6-χλωρο-πυριδιν-2-αμίνη (**5**) αρχικά προστατεύεται με επίδραση πιβαλοϋλοχλωριδίου και στη συνέχεια χλωριώνεται με N-χλωροσουκκινιμίδιο. Η αμιδοποίηση της 2-αμινομάδας με το ογκώδες χλωρίδιο οξέος κατευθύνει την ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση στην 5-θέση της πυριδίνης με υψηλή εκλεκτικότητα δίνοντας το επιθυμητό παράγωγο **7** σε απόδοση 79%. Ακολουθεί υδρόλυση του αμιδίου **7** με HCl 36% εντός μίγματος αιθανόλης/νερού για την παραλαβή της αμίνης **8**, η οποία με νίτρωση σε πυκνόθειϊκό οξύ δίνει τελικά το νιτροπαράγωγο **9**.

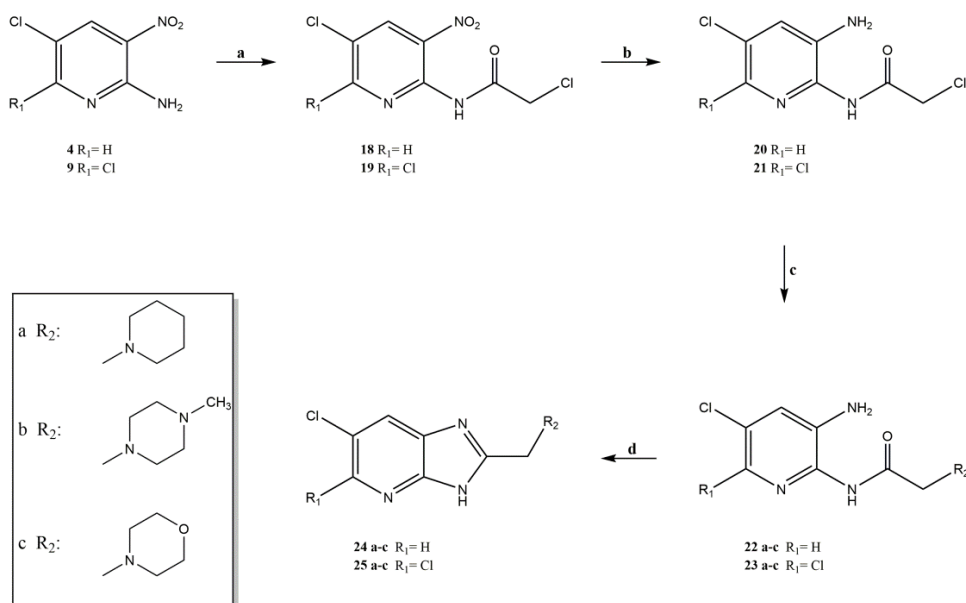


Σχήμα 2.5 α) $(\text{CH}_3)_3\text{CCOCl}$, άνυδρο CH_2Cl_2 , r.t., 20 ώρες, b) NCS , άνυδρο DMF , 100°C , 16 ώρες, c) π. HCl , $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 60°C , 2 ώρες d) π. HNO_3 , π. H_2SO_4 98 %, 40 λεπτά.

Η συνθετική πορεία για την παρασκευή των υποκατεστημένων ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών παρουσιάζεται στα σχήματα **2.6** και **2.7** για τα παράγωγα που φέρουν αιθυλενική και μεθυλενική αλυσίδα στη θέση-2 του δακτυλίου αντίστοιχα.



Σχήμα 2.6 a) 3-χλωροπροπιονυλοχλωρίδιο, άνυδρο DMF, r.t, 16 ώρες, b) H_2 , Raney Ni, EtOH, 57psi, 8 ώρες, c) αμίνη, KI, απόλυτη EtOH, 60 °C, 2 ώρες, d) PPA, 95 °C, 2.5 ώρες.

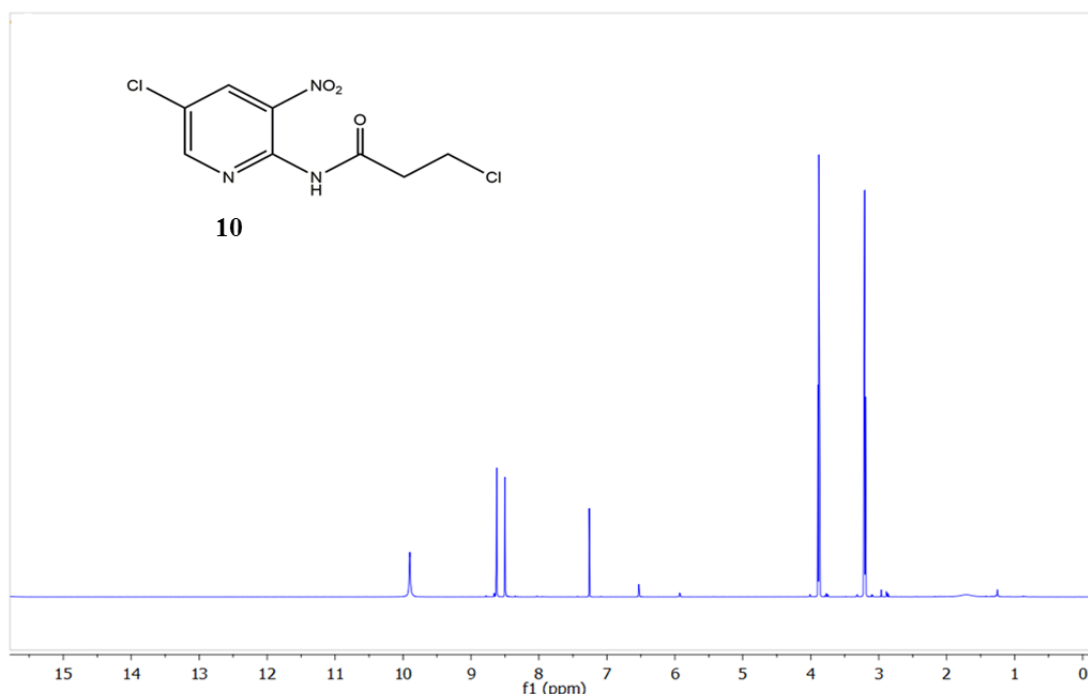


Σχήμα 2.7 a) χλωρακετυλοχλωρίδιο, άνυδρο DMF, r.t, 16 ώρες, b) H_2 , Raney Ni, EtOH, 34 psi, 8 ώρες, c) αμίνη, KI, απόλυτη EtOH, 60 °C, 2 ώρες, d) PPA, 95 °C, 2.5 ώρες.

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αμιδοποίηση των νιτροπυριδινών **4** και **9** με επίδραση 3-χλωροπροπιονυλοχλωριδίου για την παρασκευή των νιτροαμιδίων **10,11** και χλωρακετυλοχλωριδίου για τα **18,19**. Η αντίδραση δοκιμάστηκε αρχικά παρουσία τριαιθυλαμίνης ως βάση για να δεσμεύει το παραγώμενο υδροχλώριο. Ωστόσο, η καταβύθιση της υδροχλωρικής τριαιθυλαμίνης ($Et_3NH^+Cl^-$) στους μικρούς όγκους διαλύτη που

χρησιμοποιήθηκαν καθυστερεί σημαντικά την πρόοδο της αντίδρασης. Έτσι, η αμιδοποίηση πραγματοποιείται απουσία βάσης και δίνει τα επιθυμητά προϊόντα σε καλές αποδόσεις.

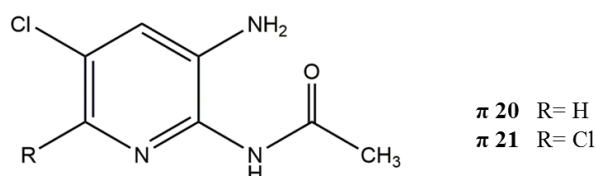
Παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **10** σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (**Εικόνα 2.1**). Σε υψηλές τιμές πεδίου εντοπίζονται τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας που συντονίζονται ως τριπλές κορυφές λόγω της μεταξύ τους σύζευξης. Στην αρωματική περιοχή συντονίζονται τα πρωτόνια της πυριδίνης ως διπλές κορυφές με χαρακτηριστική *m*-σύζευξη. Τα αρωματικά πρωτόνια είναι αρκετά αποθωρακισμένα, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία της γειτονικής νιτρομάδας. Το αμιδικό πρωτόνιο εμφανίζεται στα 9.90 ppm.



Εικόνα 2.1 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **10** σε CDCl_3

Ακολουθεί καταλυτική υδρογόνωση των νιτροαμιδίων με χρήση νικελίου του Raney ως καταλύτη. Στην περίπτωση των παραγώγων που φέρουν αιθυλενική αλυσίδα η πλήρης αναγωγή της νιτρομάδας απαιτεί υψηλές πιέσεις υδρογόνου στα 57psi. Εφαρμογή τέτοιων πιέσεων όμως στα αμίδια **18** και **19** οδήγησε σε μεγάλο ποσοστό σε αναγωγική αφαλογόνωση του αλειφατικού χλωρίου. Στα παράγωγα αυτά, το χλώριο βρίσκεται σε α -θέση ως προς τον ηλεκτραρνητικό άνθρακα του καρβονυλίου και έτσι σχηματίζονται τα παραπροϊόντα (**π20** και

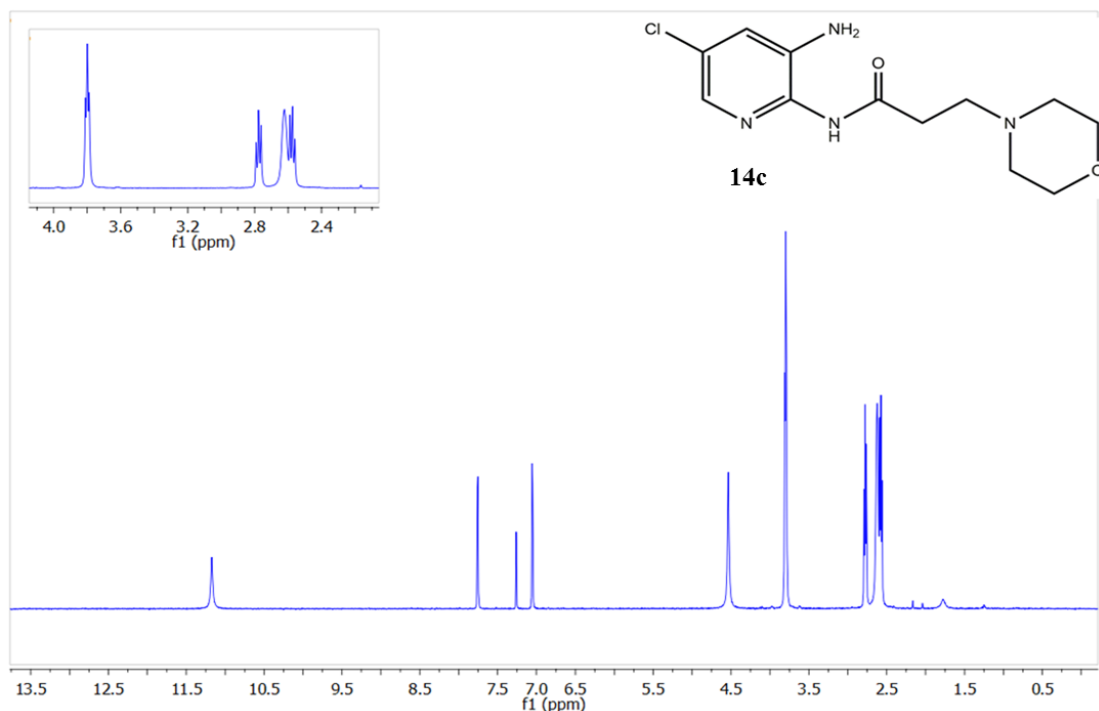
π21) του σχήματος **2.8** σε σημαντικό ποσοστό. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκαν χαμηλότερες πιέσεις υδρογόνου (18 psi) κατά τις οποίες όμως παρατηρήθηκαν ενδιάμεσα παραπροϊόντα λόγω ατελούς αναγωγής. Συνεπώς, η υδρογόνωση αυτών των νιτροαμιδίων πραγματοποιήθηκε τελικά στα 34 psi, όπου το αφαλογονωμένο προϊόν λαμβάνεται σε μικρότερο ποσοστό και η νιτρομάδα ανάγεται πλήρως.



Σχήμα 2.8 Παραπροϊόντα υδρογόνωσης των παραγώγων **18,19**.

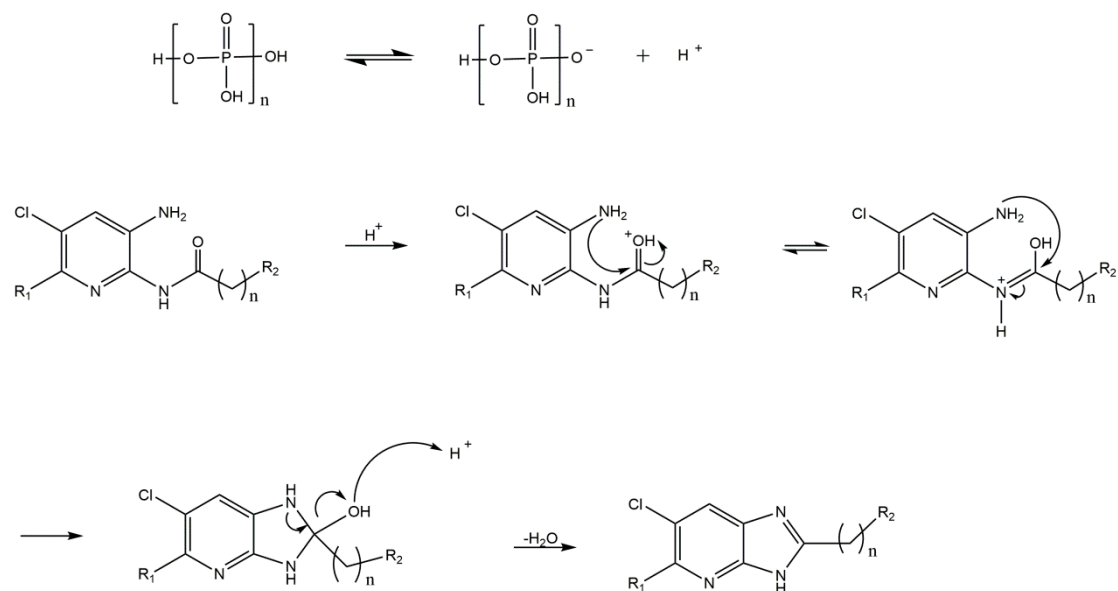
Στη συνέχεια, εισάγονται οι επιθυμητές αμίνες στα χλωροαμίδια **12,13** και **20,21** μέσω μίας S_N2 πυρηνόφιλης αλκυλοϋποκατάστασης στο χλώριο της πλευρικής αλυσίδας. Η αντίδραση επιλέχτηκε να γίνει μετά την αναγωγή της νιτρομάδας καθώς η παρουσία της οδηγεί σε αστάθεια του αμιδίου λόγω του ισχυρού επαγωγικού φαινομένου που ασκεί. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται αρχικά ιωδιούχο κάλιο με σκοπό να πραγματοποιηθεί μερική ανταλλαγή ιωδίου-χλωρίου και να διευκολύνει την υποκατάσταση καθώς το ιώδιο δρα ως καλύτερη αποχωρούσα ομάδα. Μετά την προσθήκη των αντίστοιχων αμινών και θέρμανση σε απόλυτη αιθανόλη λαμβάνονται τα παράγωγα **14 a-c**, **15 a-c** και **22 a-c**, **23 a-c**.

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **14c** διακρίνονται τα πρωtonia της μορφολίνης στα 2.62 και 3.80 ppm που εμφανίζονται ως πολλαπλή και διευρυμένη κορυφή αντίστοιχα λόγω των διαφορετικών διαμορφώσεων που λαμβάνει ο δακτύλιος στο χώρο. Η παρουσία της αμινομάδας στη θέση 2 οδηγεί σε θωράκιση των πυριδινικών πρωτονίων που τώρα συντονίζονται σε χαμηλότερες τιμές ppm. Τα ευκίνητα πρωτόνια του μορίου εντοπίζονται στα 4.54 ppm για την αμινομάδα και στα 11.17 ppm για το αμιδικό υδρογόνο.



Εικόνα 2.2 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **14c** σε CDCl_3 .

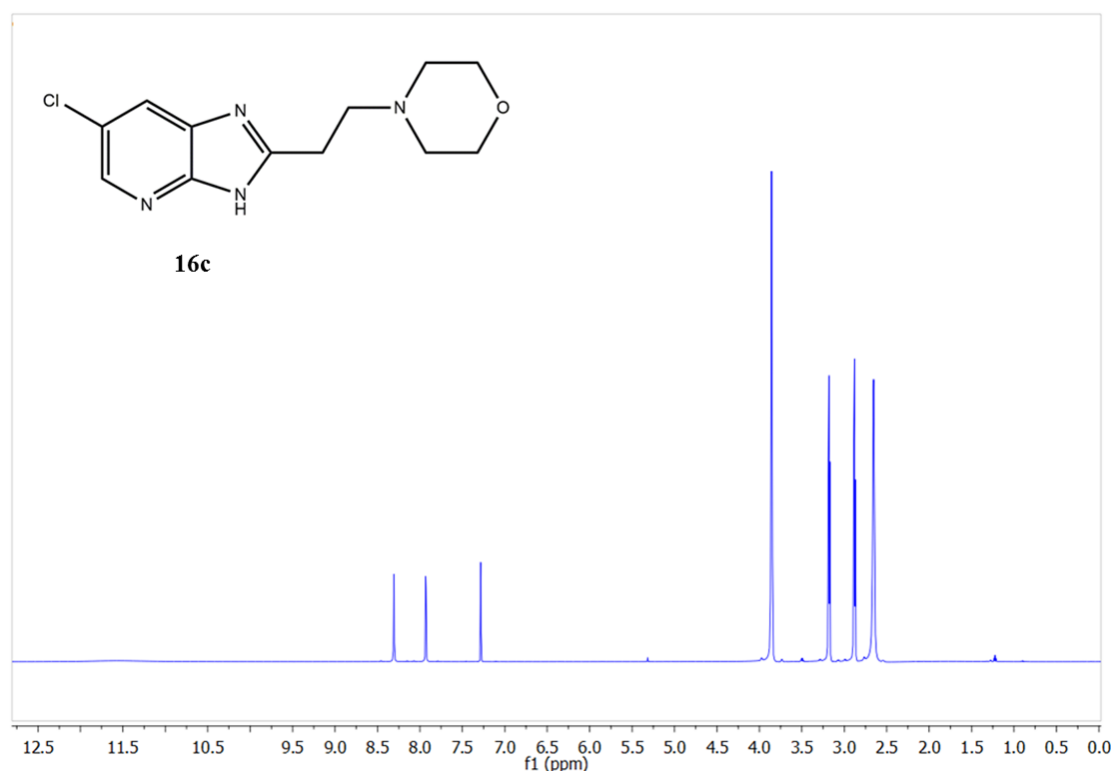
Οι υποκατεστημένες ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνες προκύπτουν τελικά με θέρμανση των αντίστοιχων αμιδίων μέσα σε πολυφωσφορικό οξύ. Ένας πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης αυτής αναπαρίσταται στο σχήμα **2.9**.



Σχήμα 2.9 Προτεινόμενος μηχανισμός κύκλωσης για το σχηματισμό του δακτυλίου της ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης.

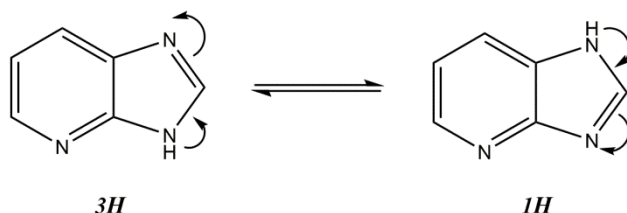
Σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό, σε πρώτο στάδιο το PPA πρωτονιώνει τον καρβονυλικό άνθρακα αυξάνοντας την ηλεκτρονιόφιλη ισχύ του με αποτέλεσμα να ευνοείται η προσβολή του από την αμινομάδα της θέσης -2. Την κύκλωση ακολουθεί η αποβολή ενός μορίου νερού και ταυτόχρονη αρωματοποίηση όπου προκύπτουν τελικά τα επιθυμητά ετεροκυκλικά παράγωγα.

Ενδεικτικά, στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ετεροκυκλικού παραγώγου **16c** (Εικόνα 2.3) παρατηρείται η εξαφάνιση των πρωτονίων της αμινομάδας καθώς και του αμιδικού πρωτονίου λόγω της κύκλωσης. Φαίνεται επίσης η αποθωράκιση των πρωτονίων του πυριδινικού δακτυλίου και της πλευρικής αλυσίδας. Αξιοσημείωτο είναι ότι δεν εντοπίζεται στο φάσμα το ιμιδαζολικό πρωτόνιο, γεγονός που οφείλεται πιθανότατα στην ταχεία εναλλαγή μεταξύ των δύο ταυτομερών δομών του δακτυλίου.



Εικόνα 2.3 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **16c** σε CDCl_3 .

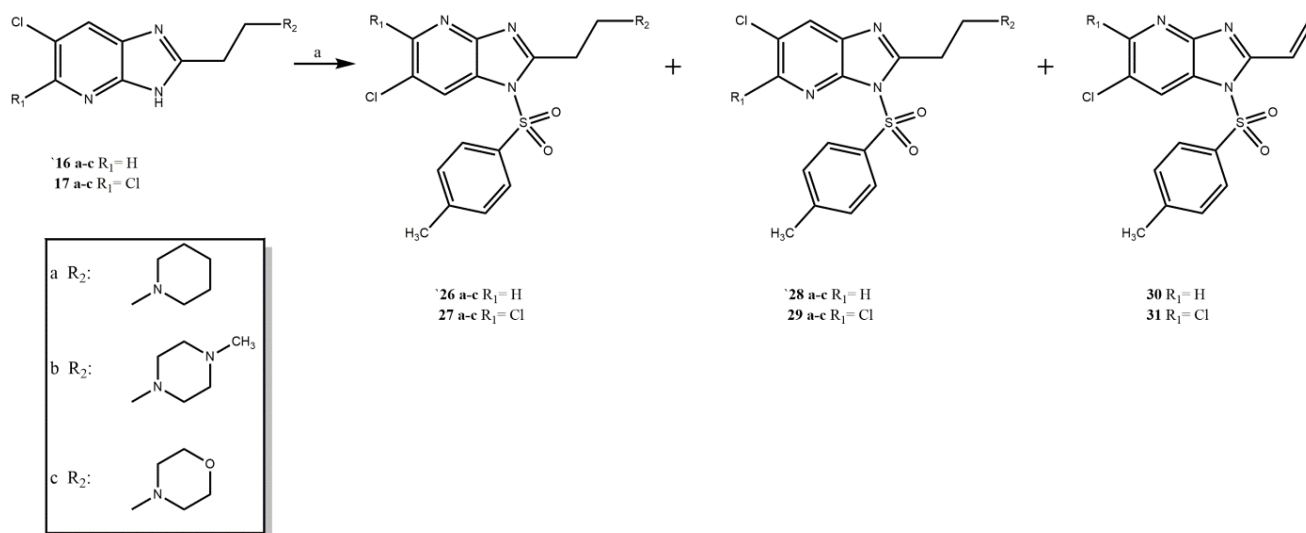
Χαρακτηριστικό των ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών είναι η παρουσία ταυτομέρειας. Στο σχήμα **2.10** παρουσιάζονται οι ταυτομερείς δομές του μη υποκατεστημένου δακτυλίου που είναι συνήθως παρούσες σε διάλυμα (85).



Σχήμα 2.10 Ταυτομερείς δομές ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης.

Η παρουσία ταυτομερών δομών στο δακτύλιο δίνει τη δυνατότητα υποκατάστασης και στα δύο άζωτα του ιμιδαζολικού δακτυλίου, γεγονός που εκμεταλλευτήκαμε στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας, το οποίο αφορά στην παρασκευή των τελικών τοξυλιωμένων προϊόντων.

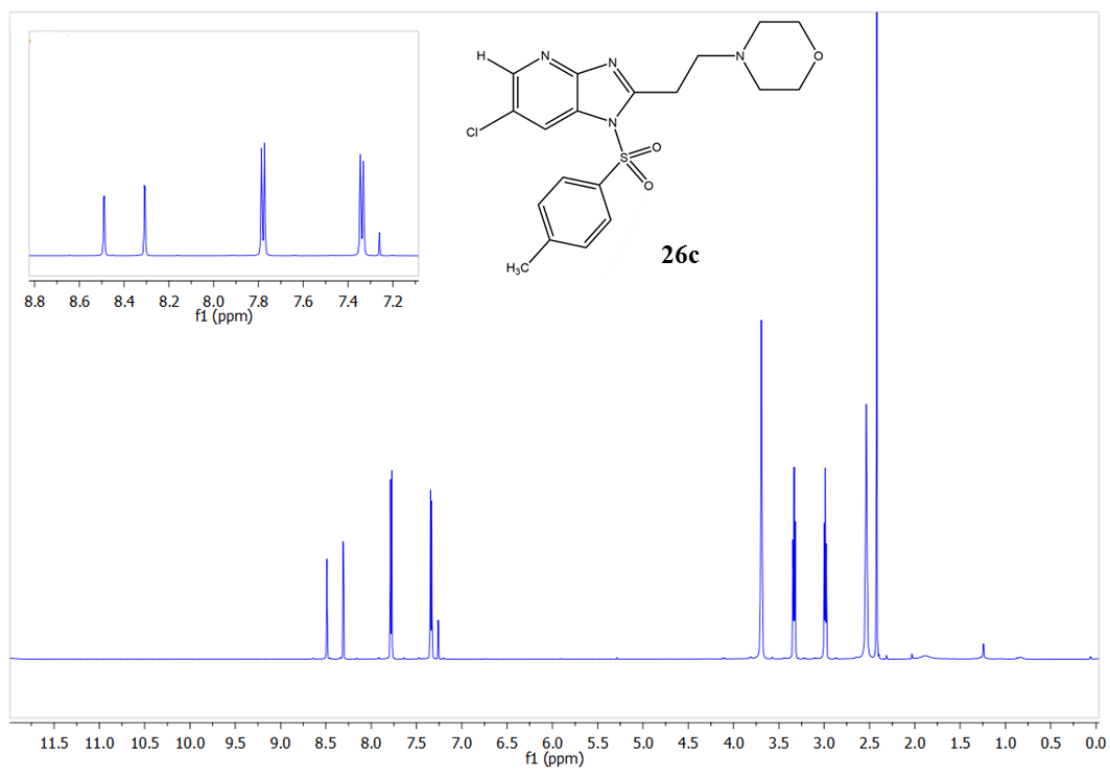
Η αντίδραση τοξυλίωσης πραγματοποιείται μέσω σχηματισμού ανιόντος στο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου με επίδραση νάτριο υδριδίου, το οποίο στη συνέχεια με προσβολή στο *p*-τολουολοσουλφονυλοχλωρίδιο σε θερμοκρασία δωματίου οδηγεί στην παραλαβή των επιθυμητών προϊόντων (**Σχήμα 2.11**).



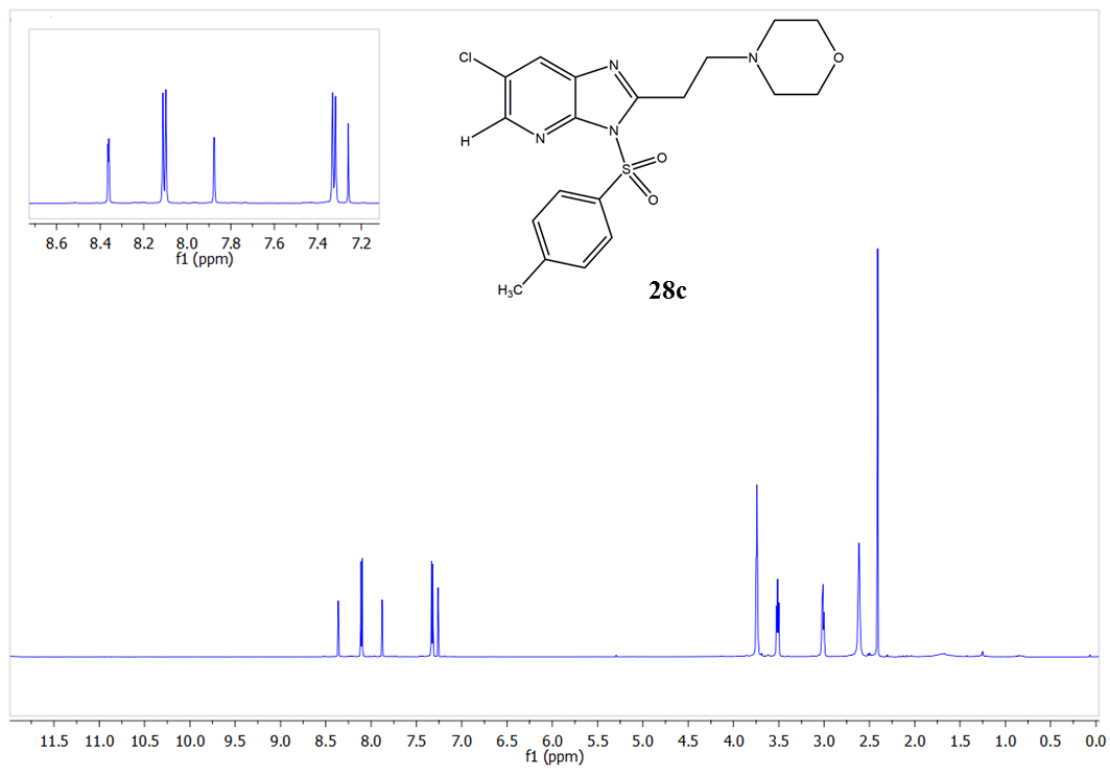
Σχήμα 2.11 a) NaH (60% σε mineral oil), άνυδρο DMF, 0°C, 10 λεπτά, μετά *p*-τοζυλογλωρίδιο, r.t., 20 λεπτά.

Λόγω της ταυτομέρειας του ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινικού δακτυλίου από την αντίδραση αυτή λαμβάνεται τόσο το προϊόν υποκατάστασης της 1- όσο και της 3- θέσης με μεγάλη εκλεκτικότητα για το N-1 ισομερές. Σε κάθε περίπτωση επιχειρήθηκε ο διαχωρισμός και η απομόνωση του κάθε ισομερούς με τη βοήθεια χρωματογραφικής στήλης. Κατά την τοξυλίωση των παραγώγων **17a** και **17b** απομονώθηκαν μόνο τα κύρια ισομερή (**27a** και **27b**). Ο σχηματισμός των N-3 ισομερών (**29a** και **29b**) παρατηρήθηκε σε φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ωστόσο ο διαχωρισμός τους με χρωματογραφική στήλη κατέστη αδύνατος καθώς το ποσοστό τους στο μίγμα ήταν εξαιρετικά χαμηλό και έτσι ελήφθησαν μόνο μίγματα τους με το κύριο προϊόν.

Στις εικόνες **2.4** και **2.5** παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των ενώσεων **26c** και **28c** για το N-1 και N-3 ισομερές αντίστοιχα. Και στα δύο φάσματα στην αρωματική περιοχή παρατηρούνται τα πρωτόνια του τοξυλικού υποκαταστάτη με χαρακτηριστική σχηματομορφή *p*-υποκατάστασης. Στις εστιασμένες περιοχές του φάσματος φαίνονται οι διαφοροποιήσεις στη μετατόπιση των αρωματικών πρωτονίων για το κάθε ισομερές θέσης. Το ίδιο μοτίβο μετατοπίσεων παρατηρείται σε όλα τα μόρια που συντέθηκαν.



Εικόνα 2.4 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **26c** σε CDCl₃.



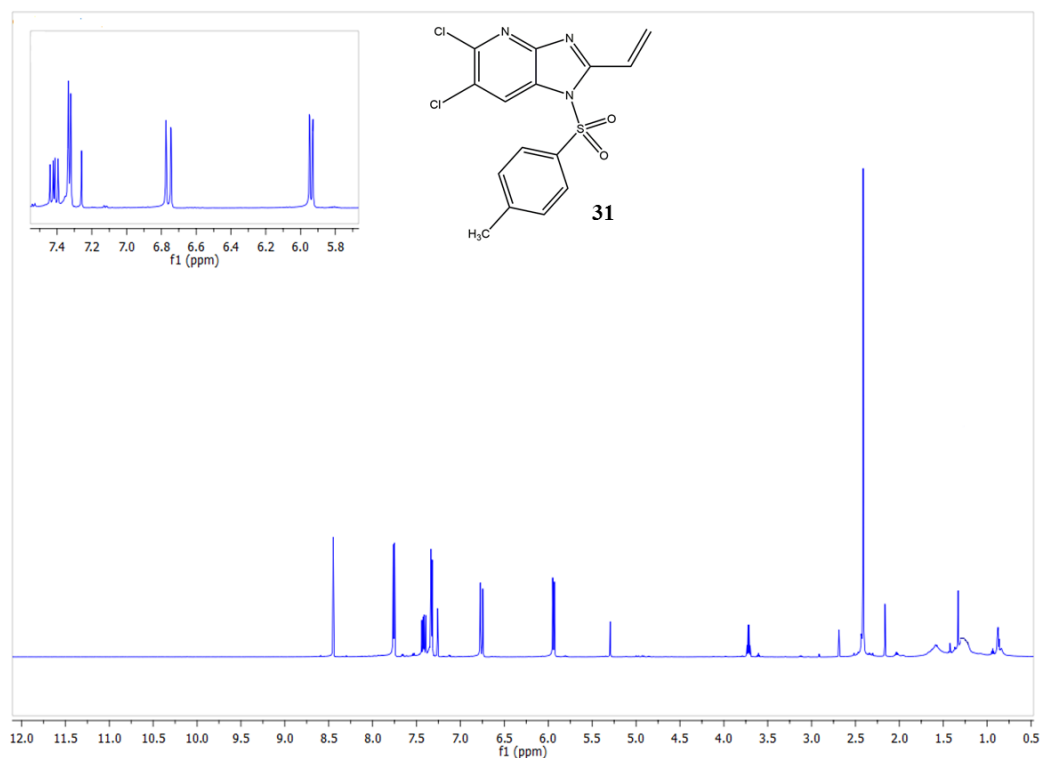
Εικόνα 2.5 Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **28c** σε CDCl₃.

Η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας που μπορεί να επιδρά άμεσα στην εναλλαγή των ταυτομερών δομών του ιμιδαζολικού ανιόντος. Συνεπώς, για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών με στόχο την αύξηση της απόδοσης για το δευτερεύον ισομερές, η αντίδραση σχηματισμού των **26a** και **28a** επιχειρήθηκε σε διάφορες θερμοκρασίες. Στον πίνακα **2.1** φαίνονται οι θερμοκρασίες που εφαρμόστηκαν σε σχέση με τις αποδόσεις για το κάθε ισομερές καθώς και οι συνολικές αποδόσεις των αντιδράσεων. Παρατηρείται, ότι η προσθήκη του *p*-τοζυλοχλωριδίου σε θερμοκρασία δωματίου οδήγησε σε βελτιωμένη απόδοση για το N-3 ισομερές γεγονός που διευκολύνει την απομόνωσή του από το μίγμα της αντίδρασης. Αυτή η μέθοδος επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή όλων των τελικών προϊόντων.

Θερμοκρασία	Απόδοση για το N-1 ισομερές	Απόδοση για το N-3 ισομερές	Συνολική απόδοση
2-5°C	67%	4%	71%
25°C	68%	7%	75%
40°C	24%	2%	26%
80°C	Ίχνη	Δε σχηματίστηκε	Ίχνη

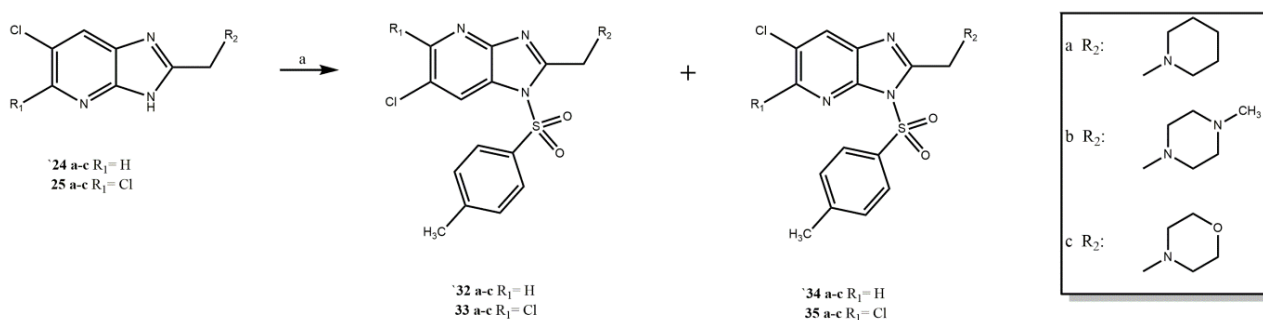
Πίνακας 2.1 Συσχέτιση της θερμοκρασίας με την απόδοση της αντίδρασης σχηματισμού των **26a** και **28a**

Στις αντιδράσεις τοξυλίσωσης των παραγώγων που φέρουν αλυσίδα δύο ατόμων άνθρακα, χαρακτηριστικός ήταν ο σχηματισμός ολεφινικού τοξυλιωμένου προϊόντος που οφείλεται σε απόσπαση της πλευρικής αμίνης. Έτσι, σχηματίστηκαν τα παράγωγα **30** και **31** για τα μόρια της μονοχλώρο και δίχλωρο σειράς αντίστοιχα (**Σχήμα 2.11**). Τα παράγωγα αυτά απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με φάσμα ¹H-NMR (**Εικόνα 2.6**), όπου παρατηρούνται χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων του διπλού δεσμού, καθώς και του τοξυλικού υποκαταστάτη.



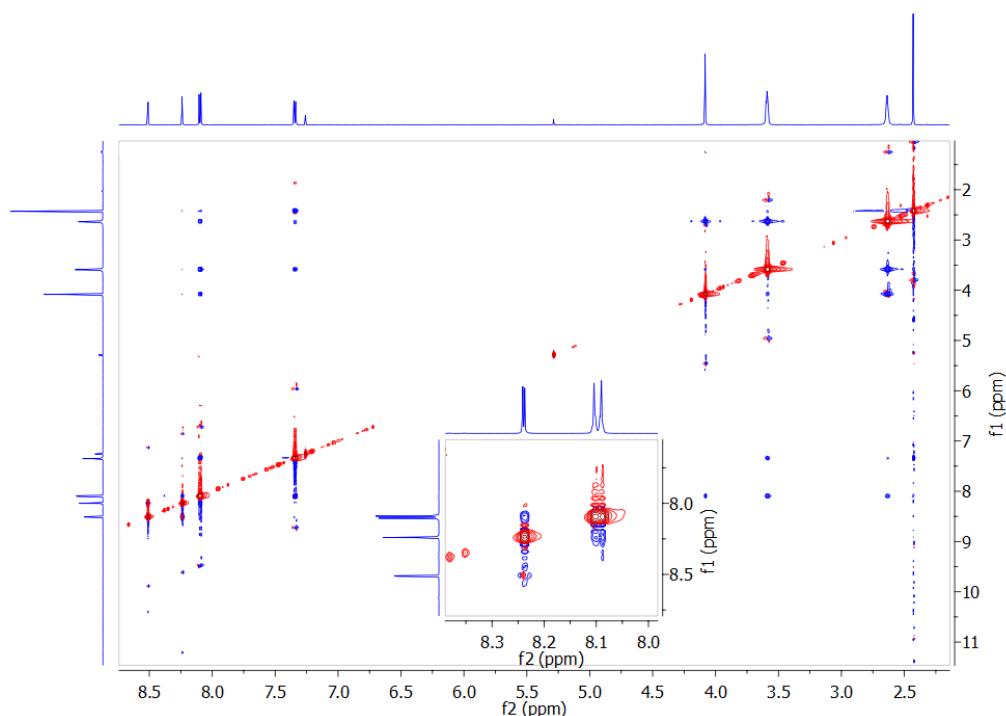
Εικόνα 2.6 Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **32** σε CDCl_3 .

Για τη σύνθεση των τοξυλιωμένων προϊόντων που φέρουν μεθυλενική αλυσίδα στη θέση-2 του ιμιδαζοπυριδινικού δακτυλίου ακολουθήθηκαν οι ίδιες συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω και έτσι παραλάβαμε τα παράγωγα **32 a-c** έως **35 a-c** (Εικόνα 2.12).



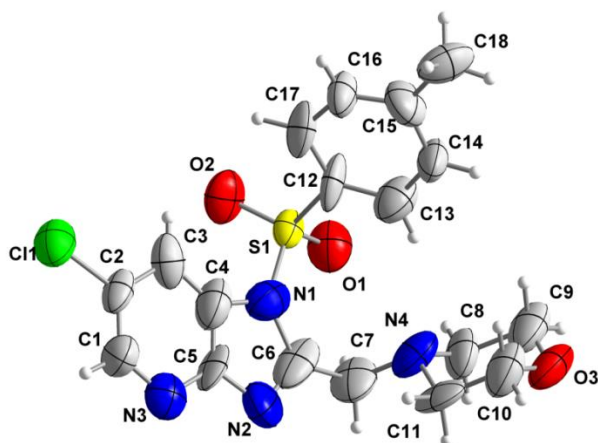
Σχήμα 2.12 α) NaH (60% σε mineral oil), άνυδρο DMF, 0°C , 10 λεπτά, μετά *p*-τοξυλοχλωρίδιο, r.t., 20 λεπτά

Ο προσδιορισμός της θέσης υποκατάστασης στα κύρια και δευτερεύοντα ισομερή θέσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με λήψη ομοπυρηνικού φάσματος δύο διαστάσεων NOESY. Για τα ισομερή της 1-θέσης είναι αναμενόμενη η εμφάνιση κορυφής συσχέτισης των πρωτονίων της τοξυλικής ομάδας με το H-7 του δακτυλίου της ιμιδαζοπυριδίνης. Στο φάσμα NOESY του παραγώγου **32c** (**Εικόνα 2.7**) παρατηρείται πράγματι συσχέτιση του H-7 με το H-2 του τοξυλικού υποκαταστάτη, όπως φαίνεται στην εστιασμένη περιοχή. Επιπλέον, εντοπίστηκαν ισχυρές κορυφές διαστάυρωσης των τοξυλικών πρωτονίων με την πλευρική αμίνη, γεγονός που υποδεικνύει ότι η τοξυλική ομάδα προσανατολίζεται στο χώρο κυρίως προς την πλευρική αλυσίδα.



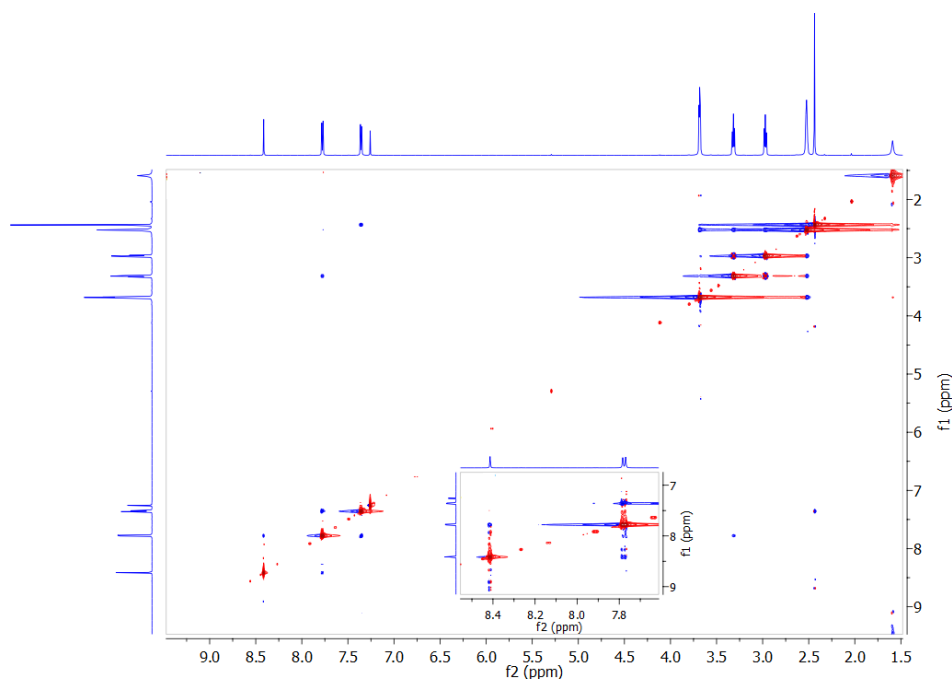
Εικόνα 2.7 Φάσμα NOESY της ένωσης **32c** σε $CDCl_3$.

Για την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση της δομής ελήφθη κρυσταλλογραφία ακτίνων X για το παράγωγο **32c** όπου επιβεβαιώνει πλήρως ότι το κύριο προϊόν της αντίδρασης είναι το ισομερές της 1-θέσης (**Εικόνα 2.8**).



Εικόνα 2.8 Κρυσταλλογραφική δομή του παραγώγου **32c**.

Παρόμοιες κορυφές συσχέτισης παρατηρούνται και για τα μόρια της διχλωρο σειράς με αιθυλενική αλυσίδα όπως φαίνεται στο φάσμα NOESY του παραγώγου **27c** (**Εικόνα 2.9**).



Εικόνα 2.9 Φάσμα NOESY της ένωσης **27c** σε $CDCl_3$.

Συνολικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 56 νέα μόρια, των οποίων η δομή ταυτοποιήθηκε πλήρως. Από αυτά, τα 36 αξιολογήθηκαν για την ανασταλτική τους δράση έναντι του ιού της Ηπατίτιδας Β, ενώ τα υπόλοιπα 20 αποτελούν δομικά ενδιάμεσά τους.

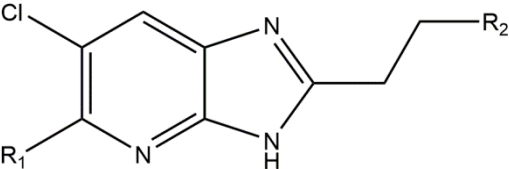
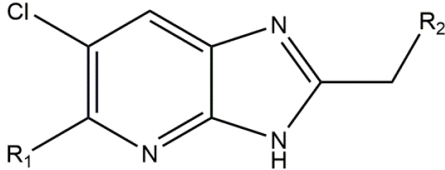
3.ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η φαρμακολογική αξιολόγηση των μορίων που συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Ιολογίας του Ινστιτούτου Παστέρ, υπό την επίβλεψη της Δρ. Νίκης Βασιλάκη.

Η ανασταλτική δράση των νέων μορίων έναντι του HBV μελετήθηκε σε καλλιέργεια του ιού στην κυτταρική σειρά HepG2-NTCP. Τα HepG2-NTCP είναι ανθρώπινα καρκινικά ηπατοκύτταρα, γενετικά τροποποιημένα ώστε να υπερεκφράζουν τον ειδικό υποδοχέα του HBV. Αρχικά, διαφορετικές συγκεντρώσεις των παραγώγων προστέθηκαν στα κύτταρα για να προσδιορισθεί η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία κάθε ένωση αρχίζει να εμφανίζει κυτταροτοξική δράση. Για το σκοπό αυτό, η βιωσιμότητα των κυττάρων συναρτήθηκε με τη συγκέντρωση του ATP, που αποτελεί έναν ευαίσθητο ενδοκυττάριο δείκτη. Το DMSO χρησιμοποιήθηκε για το τυφλό πείραμα, ενώ για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ποσοτικοποιήθηκε η ολική πρωτεΐνη των κυττάρων μέσω αντίδρασης Bradford.

Για τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης των νέων ενώσεων έναντι του HBV χρησιμοποιήθηκαν οι μέγιστες ασφαλείς συγκεντρώσεις των παραγώγων, οι οποίες δεν παρουσίασαν καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των ηπατοκυττάρων. Αρχικά, μη μολυσμένα κύτταρα επωάζονται με τους αναστολείς για 2 ώρες (pretreatment). Ακολουθεί απομάκρυνση των παραγώγων από την καλλιέργεια, μόλυνση με τον HBV και εκ νέου εισαγωγή των μορίων στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Μετά από επώαση για 7 ημέρες, παραλαμβάνονται τα υπερκείμενα των κυττάρων, όπου απομονώνεται το εκκρινόμενο ιϊκό DNA. Σε ολικό ιϊκό DNA πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με ειδικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές για την περιοχή του 3' άκρου του ιού. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA και βασίζεται στην ιδιότητα των αλυσίδων DNA, να αντιγράφονται παρουσία πολυμεράσης (εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτιδίων, κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος κ.α.), όπου παράγονται εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού DNA. Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) είναι η πιο ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης. Η qPCR σε πραγματικό χρόνο μετρά τη συγκέντρωση των προϊόντων PCR, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της αντίδρασης, στηριζόμενη σε αντίδραση φθορισμού. (Real-Time qPCR). Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων, υπολογίζεται η επι τοις εκατό αναστολή του ιϊκού DNA.

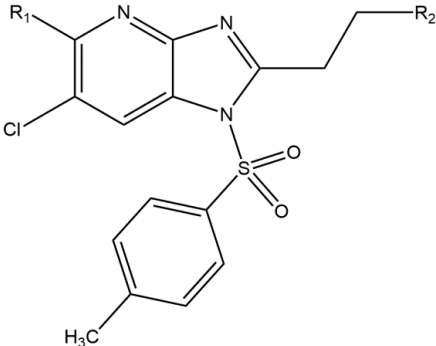
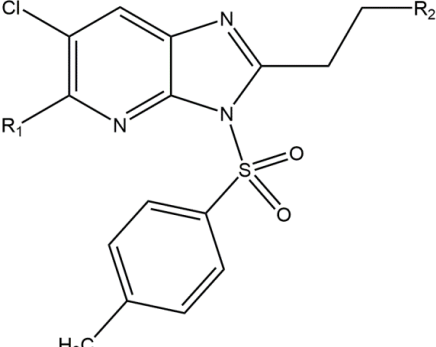
Στους πίνακες **3.1**, **3.2** και **3.3** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της δράσης των νέων μορίων. Είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι τα δεδομένα που παρατίθενται αποτελούν προκαταρκτικά αποτελέσματα, καθώς για την αξιόπιστη σύγκριση των μορίων είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός των τιμών IC₅₀ (συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί 50% αναστολή της σύνθεσης του ιϊκού DNA) και CC₅₀ (συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί θάνατο στο 50% των ηπατικών κυττάρων).

Αποτελέσματα της αξιολόγησης των παραγώγων έναντι του HBV σε ανθρωπίνα ηπατοκύτταρα HepG2-NTCP					
Chemical formula	Compound No	R ₁	R ₂	C (μM)	% Αναστολή του HBV
	16a	H	Piperidine	50	71.27
	16b	H	N-methyl-piperazine	50	54.55
	16c	H	Morpholine	50	38.45
	17a	Cl	Piperidine	10	38.15
	17b	Cl	N-methyl-piperazine	10	0
	17c	Cl	Morpholine	50	45.10
	24a	H	Piperidine	50	64.83
	24b	H	N-methyl-piperazine	50	2.29
	24c	H	Morpholine	50	30.06
	25a	Cl	Piperidine	50	58.90
	25b	Cl	N-methyl-piperazine	50	3.98
	25c	Cl	Morpholine	50	38.93

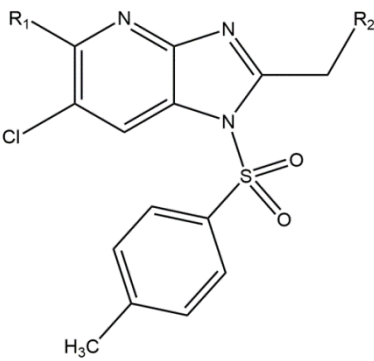
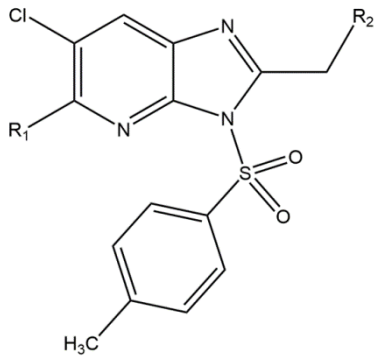
Πίνακας 3.1 Αντι-HBV δράση των ετεροκυκλικών παραγώγων εκφραζόμενη ως %αναστολή του ιϊκού DNA

Από τα δεδομένα του πίνακα **3.1** φαίνεται ότι τα ετεροκυκλικά παράγωγα που φέρουν πιπεριδίνη ως πλευρικό υποκαταστάτη (**16a**, **17a**, **24a** και **25a**) παρουσιάζουν

καλύτερη in vitro αντι-HBV δράση, σε σχέση με τα παράγωγα που διαθέτουν μορφολίνη και *N*-μεθυλοπιπεραζίνη. Φαίνεται ότι το μήκος της πλευρικής αλυσίδας, καθώς και η παρουσία δευτέρου αλογόνου στον ετεροκυκλικό δακτύλιο, δεν επιφέρουν αξιολογή διαφοροποίηση της δράσης των παραγώγων.

Αποτελέσματα της αξιολόγησης των παραγώγων έναντι του HBV σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα HepG2-NTCP					
Chemical formula	Compound No	R ₁	R ₂	C (μM)	% Αναστολή του HBV
	26a	H	Piperidine	2	47.91
	26b	H	N-methyl-piperazine	10	28.06
	26c	H	Morpholine	10	0
	27a	Cl	Piperidine	10	46.09
	27b	Cl	N-methyl-piperazine	10	32.04
	27c	Cl	Morpholine	2	0
	28a	H	Piperidine	10	0
	28b	H	N-methyl-piperazine	10	0
	28c	H	Morpholine	10	8.92
	29a	Cl	Piperidine	-	-
	29b	Cl	N-methyl-piperazine	-	-
	29c	Cl	Morpholine	5	57.00

Πίνακας 3.2 Αντι-HBV δράση των τοξυλοπαραγώγων εκφραζόμενη ως %αναστολή του ιϊκού DNA.

Αποτελέσματα της αξιολόγησης των παραγώγων έναντι του HBV σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα HepG2-NTCP					
Chemical formula	Compound No	R ₁	R ₂	C (μM)	% Αναστολή του HBV
	32a	H	Piperidine	10	55.57
	32b	H	N-methyl-piperazine	10	0
	32c	H	Morpholine	2	15.11
	33a	Cl	Piperidine	10	54.38
	33b	Cl	N-methyl-piperazine	10	42.23
	33c	Cl	Morpholine	10	47.87
	34a	H	Piperidine	10	24.44
	34b	H	N-methyl-piperazine	10	26.57
	34c	H	Morpholine	10	0
	35a	Cl	Piperidine	2	29.02
	35b	Cl	N-methyl-piperazine	10	37.50
	35c	Cl	Morpholine	10	0

Πίνακας 3.3 Αντι-HBV δράση των τοξυλοπαραγώγων εκφραζόμενη ως %αναστολή του ιϊκού DNA.

Ανάλογη εικόνα παρουσιάζουν και τα τοξυλικά παράγωγα (Πίνακες 3.2, 3.3), καθώς τα μόρια που διαθέτουν πιπεριδίνη στην πλευρική αλυσίδα αποδείχτηκαν γενικά δραστικότερα. Το παράγωγο **26a** παρουσίασε την πλέον ενδιαφέρουσα αντι-HBV δράση από τα μόρια της σειράς, καθώς επιτυγχάνει ~48% αναστολή σε συγκέντρωση 2 μM. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων όλων των Πινάκων μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μετακίνηση του τοξυλικού υποκαταστάτη στην 3-θέση των μορίων οδηγεί σε σημαντική μείωση ή και πλήρη απώλεια της αντιϊκής δράσης. Παραδόξως, από τα 3-υποκατεστημένα παράγωγα μόνο το **29c** παρουσίασε 57% αναστολή του HBV σε συγκέντρωση 5 μM. Με βάση τα πρώιμα αυτά αποτελέσματα φαίνεται ότι η εισαγωγή τοξυλικού υποκαταστάτη στην 1-θέση, σε συνδυασμό με την παρουσία πιπεριδινικής ομάδας στην πλευρική αλυσίδα ενισχύει την ανασταλτική δράση των παραγώγων.

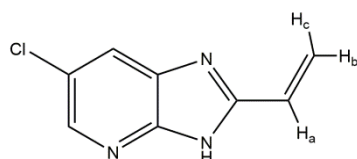
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα σημεία τήξεως ελήφθησαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel 60 AC.C (SDS 35-70 μm). Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) σε πλάκες Silica gel 60_{F254}. Για τη λήψη των φασμάτων ^1H -NMR και δύο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτόμετρα Bruker Avance 400 στα 400 MHz και Bruker Avance III 600 στα 600 MHz, ενώ τα φάσματα ^{13}C -NMR ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker AC 200 στα 50 MHz και Bruker Avance III 600 στα 151 MHz.. Ως διαλύτης για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

6-χλωρο-2-βινυλιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (2a) και 6-χλωρο-2-(2-υδροξυαιθυλ)ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (2b)

Σε εναιώρημα της 5-χλωροπυριδιν-2,3-διαμίνης (**1**) (520 mg, 3.62 mmol) σε PPA υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται το 3-βρωμοπροπιονικό οξύ και το σύστημα θερμαίνεται στους 140°C υπό ανάδευση για 4,5 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε πάγο και αλκαλοποιείται ($\text{pH}=8$) με διάλυμα αμμωνίας. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και το κατέργασμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) με κινητή φάση $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98/2 έως 82/18 v/v), οπότε παραλαμβάνονται τα **2a** και **2b**.

Δεδομένα για **2a**:



^1H -NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm) 5.81 (d, $J_{ab} = 11.5$ Hz, 1H, H_b), 6.42 (d, $J_{ac} = 17.8$, 1H, H_c), 6.78 (dd, $J_{ab} = 11.5$, $J_{ac} = 17.8$, 1H, H_a), 8.09 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7), 8.32 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-5), ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) 124.02 (C-2'), 127.01 (C-1'), 141.24 (C-7), 141.48 (C-6), 143.12 (C-7a), 145.02 (C-5), 162.27 (C-3a), 164.01 (C-2).

Δεδομένα για **2b**: ¹H-NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm) 2.62 (m, 2H, H-1'), 3.43 (m, 2H, H-2'), 6.92 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, OH), 7.95 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-5).

5-χλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (4)

Η 5-χλωροπυριδιν-2-αμίνη (**3**) (4.00 g, 31.13 mmol) διαλύεται υπό ψύξη σε πυκνόθειικό οξύ (20 mL) και στη συνέχεια εφαρμόζεται θέρμανση στους 55°C. Έπειτα προστίθεται στάγδην πυκνό νιτρικό οξύ (2.5 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται για δύο ώρες υπό ανάδευση και θέρμανση. Ακολουθεί απόχυση σε πάγο και εξουδετέρωση με διάλυμα αμμωνίας. Αποβάλλεται κίτρινο στερεό το οποίο διηθείται υπό κενό δίνοντας 3.77 g του **2**. **Απόδοση**: 69%.

2,2-διμεθυλο-N-(6-χλωροπυριδιν-2-υλο)προπαναμίδιο (6)

Η 6-χλωροπυριδιν-2-αμίνη (**5**) (5.00 g, 38.91 mmol) διαλύεται σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (35 mL) με προσθήκη τριαιθυλαμίνης (7.30 mL, 52.33 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται με παγόλουτρο και προστίθεται διάλυμα πιβαλοϋλοχλωριδίου (5.80 mL, 47.09 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (10 mL) στάγδην και υπό έντονη ανάδευση σε διάστημα 30 λεπτών. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, η ψύξη απομακρύνεται και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες. Ακολουθεί κατεργασία της οργανικής στιβάδας με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου και έπειτα από δύο εκχυλίσσεις με διχλωρομεθάνιο, οι οργανικές στιβάδες συνενώνονται, ξηραίνονται (άνυδρο θειικό νάτριο) και με απομάκρυνση των διαλυτών προκύπτει κατέργασμα 8.96 g. Υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) με κινητή φάση CH₂Cl₂ και λαμβάνονται 6.25 g του **6**. **Απόδοση**: 75%.

2,2-διμεθυλο-N-(5,6-διχλωροπυριδιν-2-υλο)προπαναμίδιο (7)

Σε διάλυμα του **6** (8.19 g, 38.54 mmol) σε άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (18 mL) προστίθεται το N-χλωροσουκκινιμίδιο (5.90 g, 44.32 mmol) και το εναιώρημα που προκύπτει θερμαίνεται στους 100°C και αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αργού για 16 ώρες. Με το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε πάγο και αραιώνεται με ψυχρό νερό (850 mL). Το μπεζ στερεό που αποχωρίζεται διηθείται υπό κενό και στη συνέχεια υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) με κινητή φάση cHex/H₂Cl₂ (30:70 έως 10:90, v/v). Συλλέγονται τελικά 7.50 g του **5**. **Απόδοση**: 79%.

5,6-διχλωροπυριδιν-2-αμίνη (8)

Μίγμα του **7** (7.50 g, 30.36 mmol), HCl (36%, 13 mL), αιθανόλη (22 mL) και νερό (13 mL) θερμαίνονται υπό ανάδευση στους 100°C για δύο ώρες. Με απόχυση του μίγματος σε πάγο και αλκαλοποίηση με κορεσμένο διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (pH= 8) αποχωρίζεται λευκό στερεό (4.91 g) το οποίο διηθείται υπό κενό. **Απόδοση:** 99%.

5,6-διχλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (**9**)

Η πυριδιναμίνη **8** (1.20 g, 7.26 mmol) διαλύεται υπό ψύξη σε πυκνόθειικό οξύ (11 mL) και έπειτα προστίθεται στο διάλυμα στάγδην πυκνό νιτρικό οξύ (1.15 mL) στους -10°C. Το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και αφήνεται υπό ανάδευση για 40 λεπτά. Ακολουθεί απόχυση σε πάγο και εξουδετέρωση (pH= 6) με διάλυμα αμμωνίας. Το κίτρινο στερεό που προκύπτει διηθείται υπο κενό και υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm), η οποία εκλούεται με CH₂Cl₂. Λαμβάνονται 951 mg του **9**. **Απόδοση:** 62%.

N-(5-χλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-υλο)-3-χλωροπροπαναμίδιο (**10**)

Η νιτροπυριδιναμίνη **4** (600 mg, 3.46 mmol) απαιωρείται σε άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (1 mL) και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην και υπό ψύξη διάλυμα 3-χλωροπροπιονυλοχλωριδίου σε διμεθυλοφορμαμίδιο (1 mL). Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, το μίγμα αναδεύεται για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αργού. Ακολουθεί απόχυση σε πάγο και αραίωση με ψυχρό νερό οπότε αποβάλλεται στερεό το οποίο διηθείται υπό κενό δίνοντας το αμίδιο **10**. **Απόδοση:** 82%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ:** 130-131°C (EtOAc/n-pentane), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.21 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-2), 3.88 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-3), 8.50 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-4'), 8.62 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6'), 9.90 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 38.88 (C-3), 41.36 (C-2), 126.70 (C-5'), 133.00 (C-3'), 134.43 (C-4'), 143.50 (C-2'), 152.57 (C-6'), 169.09 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₈H₆N₃O₃Cl₂: [M1-H]⁻ = 261.9792, βρέθηκε 261.9793.

N-(5,6-διχλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-υλο)-3-χλωροπροπαναμίδιο (**11**)

Το παράγωγο **11** συντίθεται από την νιτροπυριδιναμίνη **9** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για το αμίδιο **10**. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θέρμανση στους 70°C για 6 ώρες. **Απόδοση:** 77%, Κίτρινο στερεό, **Σ.τ:** 143-144 °C (EtOAc/n-pentane), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.27 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-2), 3.89 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-3), 8.59 (s, 1H, H-4'), 9.96 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 38.63 (C-3), 41.39 (C-2), 124.88 (C-5'), 131.09 (C-3'), 136.90 (C-4'), 142.77 (C-2'), 152.87 (C-6'), 169.20 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₈H₅N₃O₃Cl₃: [M1-H]⁻ = 295.9402, βρέθηκε 295.9391.

N-(5-χλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-υλο)χλωροακεταμίδιο (18)

Το παράγωγο **18** συντίθεται από την νιτροπυριδιναμίνη **4** με επίδραση χλωρακέτυλοχλωριδίου με τη μέθοδο που περιγράφηκε για το αμίδιο **10**. **Απόδοση:** 92%, Υποκίτρινο στερεό, **Σ.τ:** 111-112⁰C (EtOAc/n-pentane), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.35 (s, 2H, H-2), 8.52 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-4'), 8.68 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-6'), 10.73 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 43.64 (C-2), 127.50 (C-5'), 133.57 (C-3'), 134.35 (C-4'), 142.99 (C-2'), 152.72 (C-6'), 164.59 (C-1), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₇H₄Cl₂N₃O₃: [M1-H]⁻ = 247,9624, βρέθηκε 247,9632.

N-(5,6-διχλωρο-3-νιτροπυριδιν-2-υλο)χλωροακεταμίδιο (19)

Το παράγωγο **19** συντίθεται από την νιτροπυριδιναμίνη **9** με επίδραση χλωρακέτυλοχλωριδίου με τη μέθοδο που περιγράφηκε για το αμίδιο **10**. **Απόδοση:** 90%, Κίτρινο στερεό, **Σ.τ:** 128-129⁰C (EtOAc/n-pentane), **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.39 (s, 2H, H-2), 8.60 (s, 1H, H-4'), 10.66 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ 43.75 (C-2), 125.87 (C-5'), 132.02 (C-3'), 136.71 (C-4'), 142.13 (C-2'), 152.99 (C-6'), 164.59 (C-1), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₇H₃N₃O₃Cl₃: [M1-H]⁻ = 281.9235 βρέθηκε 281.9243.

N-(3-άμινο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)-3-χλωροπροπαναμίδιο (12)

Το νιτροαμίδιο **10** (1.00 g, 3.79 mmol) διαλύεται σε απόλυτη αιθανόλη (100 mL) και φέρεται σε φιάλη υδρογονώσεως με προσθήκη νικελίου του Raney ως καταλύτη. Η φιάλη φέρεται σε συσκευή υδρογονώσεως όπου διαβιβάζεται αέριο υδρογόνο (57psi) και ακολουθεί ανάδευση για 8 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται υπό κενό από ηθμό με κελλίτη, ο οποίος εκπλένεται με μίγμα CH₂Cl₂/MeOH (1/1) και το διήθημα συμπυκνώνεται. Το στερεό υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) και κινητή φάση CH₂Cl₂/MeOH (99/1 έως 97/3, v/v), **Απόδοση:** 80%, Λευκό στερεό, **Σ.τ:** 277-278⁰C, (EtOAc, αποσύνθεση), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.92 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-2), 3.88 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-3), 4.45 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4'), 7.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6'), 8.26 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 31.07 (C-3), 39.68 (C-2), 125.22 (C-4'), 130.36 (C-5'), 135.88 (C-6'), 136.59 (C-3'), 137.90 (C-2'), 168.91 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₈H₈N₃OCl₂: [M1-H]⁻ = 232.0050, βρέθηκε 232.0054.

N-(3-αμινο-5,6-διχλωροπυριδιν-2-υλο)-3-χλωροπροπαναμίδιο (13)

Το παράγωγο **13** συντίθεται από το **11** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του αμινοαμιδίου **12**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (99/1 έως

97/3, v/v), **Απόδοση:** 84%, Λευκό στερεό, **Σ.τ:** 148-149 °C (CHCl₃), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.90 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-2), 3.86 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-3), 4.36 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.22 (s, 1H, H-4'), 8.07 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 39.43 (C-3), 39.67 (C-2) 128.13 (C-5'), 128.24 (C-4'), 134.63 (C-6'), 135.39 (C-3'), 136.94 (C-2'), 168.72 (C-1).

N-(3-αμινο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)χλωροακεταμίδιο (20)

Το παράγωγο **20** συντίθεται από το **18** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του αμινοαμιδίου **12**. Η πίεση υδρογόνου διατηρείται στα 34psi. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5 έως 98.5/1.5, v/v), **Απόδοση:** 61%, Λευκό στερεό, **Σ.τ:** 284-285°C (EtOAc, αποσύνθεση), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.23 (s, 2H, H-2), 4.39 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.12 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4'), 7.80 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6'), 8.65 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 42.66 (C-2), 125.42 (C-4'), 130.72 (C-5'), 135.71 (C-3'), 136.65 (C-6'), 137.63 (C-2'), 165.12 (C-1), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₇H₆N₃OCl₂: [M1-H]⁻ = 217.9893, βρέθηκε 217.9892.

N-(3-αμινο-5-χλωροπυριδιν-2-υλ)ακεταμίδιο (π20)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.04 (s, 3H, CH₃), 5.32 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4'), 7.32 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6'), 9.94 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH).

N-(3-αμινο-5,6-διχλωροπυριδιν-2-υλο)χλωροακεταμίδιο (21)

Το παράγωγο **21** συντίθεται από το **19** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του αμινοαμιδίου **12**. Η πίεση υδρογόνου διατηρείται στα 34psi. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5 έως 99/1, v/v), **Απόδοση:** 73 %, Άμορφο στερεό, **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.25 (s, 2H, H-2), 4.40 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.29 (s, 1H, H-4'), 8.66 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 42.54 (C-2), 128.42 (C-5'), 128.69 (C-4'), 134.60 (C-6'), 135.06 (C-3'), 136.84 (C-2'), 165.20 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₇H₅N₃OCl₃: [M1-H]⁻ = 251.9504, βρέθηκε 251.9505.

N-(3-αμινο-5,6-διχλωροπυριδιν-2-υλ)ακεταμίδιο (π21)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.03 (s, 3H, CH₃), 5.38 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.33 (s, 1H, H-4'), 10.08 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH).

N-(3-αμνο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)-3-πιπεριδιν-1-υλοπροπαναμίδιο (14a)

Το χλωροαμίδιο **12** (300 mg, 1.28 mmol) και ιωδιούχο κάλιο (130 mg, 0.78 mmol) διαλύονται σε απόλυτη αιθανόλη (5mL) υπό αργό και διάλυμα πιπεριδίνης (1.30 mL, 12.8 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (2 mL) προστίθενται στάγδην υπό ανάδευση και ψύξη με παγόλουτρο. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 60°C για 2 ώρες. Η αιθανόλη και η περίσσεια της αμίνης εξατμίζονται υπό κενό και το υπόλειμμα αραιώνεται με νερό και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂. Η υδατική στιβάδα εκυλίζεται δύο ακόμη φορές με CH₂Cl₂ και οι οργανικές στιβάδες συνενώνονται, ξηραίνονται (άνυδρο θειϊκό νάτριο) και εξατμίζονται υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) και κινητή φάση CH₂Cl₂/MeOH (99/1 έως 94/6, v/v), **Απόδοση:** 86%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ:** 160-161 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.50 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.69 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.52-2.62 (m, 6H, H-2 και πιπεριδίνη, H-2,4), 2.73 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-3), 4.53 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.04 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4'), 7.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6'), 11.61 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 24.28 (πιπεριδίνη, C-4), 25.88 (πιπεριδίνη, C-3,5), 32.28 (C-2), 53.85 (πιπεριδίνη, C-2,6), 54.24 (C-3), 124.57 (C-4'), 129.16 (C-5'), 136.53 (C-6'), 137.36 (C-3'), 138.08 (C-2'), 171.56 (C-1), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₃H₁₈N₄OCl: [M1-H]⁻ = 281.1164, βρέθηκε 281.1172.

N-(3-αμνο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)-3-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)προπαναμίδιο (14b)

Το παράγωγο **14b** συντίθεται από το **12** με επίδραση N-μεθυλοπιπεραζίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (96/4 έως 82/18, v/v), **Απόδοση:** 70%, Λευκό στερεό, **Σ.τ:** 154-155 °C (Et₂O), **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.40-2.79 (m, 12H, H-2, H-3, πιπεραζίνη, H-2,4 και H-3,5), 4.52 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.04 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-4'), 7.75 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6'), 11.23 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 32.30 (C-2), 46.00 (CH₃), 52.37 (πιπεραζίνη, C-2,6), 53.59 (C-3), 55.06 (πιπεραζίνη, C-3,5), 124.67 (C-4'), 129.27 (C-5'), 136.50 (C-6'), 137.38 (C-3'), 137.94 (C-2'), 171.35 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₃H₁₉N₅OCl: [M1-H]⁻ = 296.1273, βρέθηκε 296.1276.

N-(3-αμνο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)-3-μορφολιν-4-υλοπροπαναμίδιο (14c)

Το παράγωγο **14c** συντίθεται από το **12** με επίδραση μορφολίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης:

CHCl₃/MeOH (97/3 έως 93/7, v/v), **Απόδοση:** 82%, Λευκό στερεό, **Σ.τ:** 147-148 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.57 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H-2), 2.62 (br, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 2.78 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H-3), 3.80 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 4.54 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.05 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-4'), 7.76 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-6'), 11.17 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 32.06 (C-2), 52.92 (μορφολίνη, C-3,5), 54.10 (C-3), 66.94 (μορφολίνη, C-2,6), 124.75 (C-4'), 129.38 (C-5'), 136.47 (C-6'), 137.34 (C-3'), 137.83 (C-2'), 171.15 (C-1), HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₂H₁₆N₄O₂Cl: [M1-H]⁻ = 283.0956, βρέθηκε 283.0969.

N-(3-αμινο-5,6-διγλωροπυριδιν-2-υλο)-3-πιπεριδιν-1-υλοπροπαναμίδιο (15a)

Το παράγωγο **15a** συντίθεται από το **13** με επίδραση πιπεριδίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (97/3 έως 90/10, v/v), **Απόδοση:** 91%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ:** 123-124 °C (EtOAc/n-pentane), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.51 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.70 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.53 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H-2), 2.57 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 2.71 (t, J = 6.0 Hz, 2H, H-3), 4.60 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.14 (s, 1H, H-4'), 11.99 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 24.32 (πιπεριδίνη, C-4), 25.92 (πιπεριδίνη, C-3,5), 32.17 (C-2), 53.74 (πιπεριδίνη, C-2,6), 54.07 (C-3), 126.67 (C-5'), 127.49 (C-4'), 134.64 (C-6'), 136.41 (C-3'), 137.29 (C-2'), 171.71 (C-1), HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₃H₁₇N₄OCl₂: [M1-H]⁻ = 315.0774, βρέθηκε 315.0788.

N-(3-αμινο-5,6-διγλωροπυριδιν-2-υλο)-3-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)προπαναμίδιο (15b)

Το παράγωγο **15b** συντίθεται από το **13** με επίδραση N-μεθυλοπιπεραζίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (97/3 έως 80/20, v/v), **Απόδοση:** 93%, **Σ.τ:** 132-133 °C (Et₂O), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.56 (t, J = 6.2 Hz, 2H, H-2), 2.68 (br, 8H, πιπεραζίνη, H-2,6 και H-3,5), 2.79 (t, J = 6.2 Hz, 2H, H-3), 4.61 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.15 (s, 1H, H-4'), 11.61 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 32.21 (C-2), 45.74 (CH₃), 51.82 (πιπεραζίνη, C-2,6), 53.22 (C-3), 54.80 (πιπεραζίνη, C-3,5), 126.87 (C-5'), 127.58 (C-4'), 134.56 (C-6'), 136.39 (C-3'), 137.05 (C-2'), 171.23 (C-1). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₃H₁₈N₅OCl₂: [M1-H]⁻ = 330.0882, βρέθηκε 330.0898.

N-(3-αμινο-5,6-διγλωροπυριδιν-2-υλ)-3-μορφολιν-4-υλοπροπαναμίδιο (15c)

Το παράγωγο **15c** συντίθεται από το **13** με επίδραση μορφολίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (99/1 έως 94/6, v/v), **Απόδοση**: 84%, Πορτοκαλί στερεό, **Σ.τ**: 137-138 °C (Et₂O), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.58 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-2), 2.65 (br, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 2.79 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-3), 3.83 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 4.59 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.16 (s, 1H, H-4'), 11.39 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 31.95 (C-2), 52.87 (μορφολίνη, C-3,5), 53.94 (C-3), 66.82 (μορφολίνη, C-2,6), 127.05 (C-5'), 127.64 (C-4'), 134.69 (C-6'), 136.42 (C-3'), 136.88 (C-2'), 171.10 (C-1), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₂H₁₅N₄O₂Cl₂: [M1-H]⁻ = 317.0567, βρέθηκε 317.0584.

N-(3-αμινο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)πιπεριδιν-1-υλακεταμίδιο (22a)

Το παράγωγο **22a** συντίθεται από το **20** με επίδραση πιπεριδίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (99/1 έως 98/2, v/v), **Απόδοση**: 86%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 108-109 °C (EtOAc/n-pentane), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.45 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.63 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.55 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 3.10 (s, 2H, H-2), 4.61 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.05 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4'), 7.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6'), 9.57 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 23.68 (πιπεριδίνη, C-4), 26.20 (πιπεριδίνη, C-3,5), 55.11 (πιπεριδίνη, C-2,6), 62.46 (C-2), 124.82 (C-4'), 129.61 (C-5'), 136.14 (C-6'), 137.02 (C-3'), 137.47 (C-2'), 170.26 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₂H₁₆N₄OCl: [M1-H]⁻ = 267.1007, βρέθηκε 267.1019.

N-(3-αμινο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)ακεταμίδιο (22b)

Το παράγωγο **22b** συντίθεται από το **20** με επίδραση N-μεθυλοπιπεραζίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (98/2 έως 88/12, v/v), **Απόδοση**: 78%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 149-150 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.53 (br, 4H, πιπεραζίνη), 2.69 (br, 4H, πιπεραζίνη), 3.18 (s, 2H, H-2), 4.59 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.07 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-4'), 7.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6'), 9.44 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ 46.05 (CH₃), 53.61 (πιπεραζίνη, C-2,6), 55.18 (πιπεραζίνη, C-3,5), 61.60 (C-2), 124.99 (C-4'), 129.79 (C-5'), 136.26 (C-6'), 136.94 (C-3'), 137.48 (C-2'), 169.61 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₂H₁₇N₅OCl: [M1-H]⁻ = 282.1116, βρέθηκε 282.1129.

N-(3-αμινο-5-χλωροπυριδιν-2-υλο)μορφολιν-4-υλακεταμίδιο (22c)

Το παράγωγο **22c** συντίθεται από το **20** με επίδραση μορφολίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (98.5/1.5 έως 96/4, v/v), **Απόδοση:** 89%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ:** 149-150 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.66 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.19 (s, 2H, H-2), 3.78 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 4.58 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.07 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-4'), 7.76 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-6'), 9.40 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 53.95 (μορφολίνη, C-3,5), 62.16 (C-2), 67.05 (μορφολίνη, C-2,6), 125.05 (C-4'), 129.90 (C-5'), 136.29 (C-6'), 136.80 (C-3'), 137.48 (C-2'), 169.21 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₁H₁₄N₄O₂Cl: [M1-H]⁻ = 269.0799 βρέθηκε 269.0811.

N-(3-αμινο-5,6-διγλωροπυριδιν-2-υλο)πιπεριδιν-1-υλακεταμίδιο (23a)

Το παράγωγο **23a** συντίθεται από το **21** με επίδραση πιπεριδίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (99.5/0.5 έως 94/6, v/v), **Απόδοση:** 66%, Λευκό στερεό, **Σ.τ:** 112-113 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.47 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.65 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.56 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 3.10 (s, 2H, H-2), 4.60 (br, 2H, D₂O exch, NH₂), 7.17 (s, 1H, H-4'), 9.57 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 23.69 (πιπεριδίνη, C-4), 26.13 (πιπεριδίνη, C-3,5), 55.17 (πιπεριδίνη, C-2,6), 62.50 (C-2), 127.44 (C-4'), 127.87 (C-5'), 134.60 (C-6'), 136.19 (C-3'), 136.71 (C-2'), 170.43 (C-1). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₂H₁₅N₄OCl₂: [M1-H]⁻ = 301.0617, βρέθηκε 301.0622.

N-(3-αμινο-5,6-διγλωροπυριδιν-2-υλο)-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)ακεταμίδιο (23b)

Το παράγωγο **23b** συντίθεται από το **21** με επίδραση N-μεθυλοπιπεραζίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (97/3 έως 90/10, v/v), **Απόδοση:** 75%, Λευκό στερεό, **Σ.τ:** 176-177 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.51 (br, 4H, πιπεραζίνη), 2.67 (br, 4H, πιπεραζίνη), 3.16 (s, 2H, H-2), 4.58 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.17 (s, 1H, H-4'), 9.41 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 46.07 (CH₃), 53.67 (πιπεραζίνη, C-2,6), 55.07 (πιπεραζίνη, C-3,5), 61.61 (C-2), 127.56 (C-4'), 127.94 (C-5'), 134.60 (C-6'), 135.99 (C-3'), 136.72 (C-2'), 169.73 (C-1), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₂H₁₆N₅OCl₂: [M1-H]⁻ = 316.0726, βρέθηκε 316.0733.

N-(3-αμινο-5,6-διγλωροπυριδιν-2-υλο)μορφολιν-4-υλακεταμίδιο (23c).

Το παράγωγο **23c** συντίθεται από το **21** με επίδραση μορφολίνης με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (99/1 έως 98/2, v/v), **Απόδοση**: 81%, Κόκκινο στερεό, **Σ.τ**: 152-153⁰C (Et₂O), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.65 (br, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.18 (s, 2H, H-2), 3.79 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 4.57 (br, 2H, D₂O ανταλλάξιμο, NH₂), 7.19 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H-4'), 9.38 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 54.00 (μορφολίνη, C-3,5), 62.22 (C-2), 66.99 (μορφολίνη, C-2,6), 127.74 (C-4'), 128.05 (C-5'), 134.75 (C-6'), 135.93 (C-3'), 136.70 (C-2'), 169.35 (C-1).

6-χλωρο-2-[2-(πιπεριдино-1-υλ)αιθυλ]ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (16a)

Το αμινοαμίδιο **14a** (350 mg, 1.24 mmol) απαιωρείται σε PPA υπό ατμόσφαιρα αργού και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 90 °C για 2,5 ώρες. Στη συνέχεια αποχύνεται σε πάγο και αλκαλοποιείται με διάλυμα αμμωνίας έως pH 10. Η υδατική φάση (80 mL) εκχυλίζεται τρεις φορές με CH₂Cl₂ (100 mL) και οι οργανικές στιβάδες συνενώνονται, ξηραίνονται (άνυδρο θειικό νάτριο) και εξατμίζονται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μ m) και εκλύεται με CH₂Cl₂/MeOH (95/5 έως 85/15, v/v) οπότε λαμβάνεται η ιμιδαζοπυριδίνη **16a**, **Απόδοση**: 76%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 184-185 °C (CH₂Cl₂), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.54 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.72 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.59 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 2.83 (t, J = 6.1 Hz, 2H, H-2'), 3.15 (t, J = 6.1 Hz, 2H, H-1'), 7.87 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-7), 8.26 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 24.21 (πιπεριδίνη, C-4), 25.33 (C-1'), 26.04 (πιπεριδίνη, C-3,5), 54.24 (πιπεριδίνη, C-2,6), 55.77 (C-2'), 124.86 (C-7), 125.76 (C-6), 134.26 (C-7a), 142.14 (C-5), 147.83 (C-3a), 158.28 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₃H₁₆N₄Cl: [M1-H]⁻ = 263.1058, βρέθηκε 263.1065.

6-χλωρο-2-[2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)αιθυλ]ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (16b)

Το παράγωγο **16b** συντίθεται από το **14b** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (95/5 έως 80/20, v/v), **Απόδοση**: 65%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 166-168 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.42-2.73 (br, 8H, πιπεραζίνη, H-2,6 και H-3,5), 2.83 (t, J = 6.3 Hz, 2H, H-2'), 3.11 (t, J = 6.3 Hz, 2H, H-1'), 7.86 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.23 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (50 MHz, CDCl₃) δ 25.65 (C-1'), 45.94 (CH₃), 52.79, 55.11 (πιπεραζίνη, C-2,6 και C-3,5), 55.24 (C-2'), 124.97 (C-7), 125.76 (C-6), 134.35 (C-7a), 142.04 (C-5), 147.67 (C-3a), 157.89 (C-2).

6-χλωρο-2-[2-(μορφολιν-1-υλ)αιθυλ]ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (16c)

Το παράγωγο **16c** συντίθεται από το **14c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (97/3 έως 90/10, v/v), **Απόδοση**: 79%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 170-171 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.63 (br, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 2.85 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-2'), 3.15 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-1'), 3.83 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 7.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-7), 8.28 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ 25.18 (C-1'), 53.46 (μορφολίνη, C-3,5), 55.83 (C-2'), 67.06 (μορφολίνη, C-2,6), 126.02 (C-7), 126.06 (C-6), 135.41 (C-7a), 142.32 (C-5), 147.05 (C-3a), 157.68 (C-2), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₂H₁₄N₄OCl: [M1-H]⁺ = 265.0851, βρέθηκε 265.0864.

5,6-διχλωρο-2-[2-(πιπεριδιν-1-υλ)αιθυλ]ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (17a)

Το παράγωγο **17a** συντίθεται από το **15a** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (97/3 έως 82/18, v/v), **Απόδοση**: 72%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 152-153°C (EtOAc), **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.55 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.72 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.59 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 2.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-2'), 3.15 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-1'), 7.98 (s, 1H, H-7), 8.19-9.18 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 24.01 (πιπεριδίνη, C-4), 25.24 (C-1'), 25.79 (πιπεριδίνη, C-3,5), 54.15 (πιπεριδίνη, C-2,6), 55.62 (C-2'), 123.43 (C-6), 127.06 (C-7), 133.21 (C-7a), 141.91 (C-5), 147.13 (C-3a), 158.73 (C-2). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₃H₁₅N₄Cl₂: [M1-H]⁺ = 297.0668, βρέθηκε 297.0688.

5,6-διχλωρο-2-[2-(4-μεθυλοπιπεραζίν-1-υλ)αιθυλ]ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (17b)

Το παράγωγο **17b** συντίθεται από το **15b** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (97/3 έως 82/18, v/v), **Απόδοση**: 82%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 162-163°C (EtOAc), **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.42-2.78 (br, 8H, πιπεραζίνη), 2.83 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-2'), 3.12 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H-1'), 8.00 (s, 1H, H-7), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 25.41 (C-1'), 45.93 (CH₃), 52.79 (πιπεραζίνη, C-2,6), 55.06 (πιπεραζίνη, C-3,5), 55.13 (C-2'), 123.64 (C-6), 127.57 (C-7), 133.69 (C-7a), 142.06 (C-5), 146.62 (C-3a), 158.54 (C-2).

5,6-διχλωρο-2-[2-(μορφολιν-1-υλ)αιθυλ]ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (17c)

Το παράγωγο **17c** συντίθεται από το **15c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (97/3 έως 82/18, v/v), **Απόδοση**: 81%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 173-174 °C (EtOAc/n-pentane), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.63 (br, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 2.86 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-2'), 3.16 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H-1'), 3.83 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 8.00 (s, 1H, H-7), **¹³C-NMR** (151 MHz,

CDCl₃) δ (ppm) 25.09 (C-1'), 53.42 (μορφολίνη, C-3,5), 55.75 (C-2'), 66.96 (μορφολίνη, C-2,6), 123.84 (C-6), 127.91 (C-7), 134.01 (C-7a), 142.25 (C-5), 146.45 (C-3a), 158.20 (C-2), HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₂H₁₃N₄OCl₂: [M1-H]⁻ = 299.0461, βρέθηκε 299.0471.

6-χλωρο-2-(πιπεριδιν-1-υλο)μεθυλιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (24a)

Το παράγωγο **24a** συντίθεται από το **22a** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (98/2 έως 96/4, v/v), **Απόδοση**: 71%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 233-234 °C (CHCl₃), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.50 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.65 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.55 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 3.84 (s, 2H, CH₂), 7.95 (s, 1H, H-7), 8.40 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 23.97 (πιπεριδίνη, C-4), 26.04 (πιπεριδίνη, C-3,5), 55.24 (πιπεριδίνη, C-2,6), 57.74 (CH₂), 125.96 (C-7), 126.57 (C-6), 136.21 (C-7a), 142.41 (C-5), 147.01 (C-3a), 156.71 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₂H₁₄N₄Cl: [M1-H]⁻ = 249.0902, βρέθηκε 249.0907.

6-χλωρο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)μεθυλιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (24b)

Το παράγωγο **24b** συντίθεται από το **22b** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (95/5 έως 85/15, v/v) και CH₂Cl₂/MeOH /Et₃N (84/15/1, v/v), **Απόδοση**: 84%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 217-218 °C (MeOH, αποσύνθεση), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.32 (s, 3H, CH₃), 2.44-2.73 (br, 8H, πιπεραζίνη, H-2,6 και H-3,5), 3.89 (s, 2H, CH₂), 8.00 (br, 1H, 7-H), 8.46 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), 12.58 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 46.08 (CH₃), 53.71 (πιπεραζίνη, C-2,6), 54.99 (πιπεραζίνη, C-3,5), 57.16 (CH₂), 125.89 (C-7), 127.07 (C-6), 136.49 (C-7a), 142.30 (C-5), 147.07 (C-3a), 156.17 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₂H₁₅N₅Cl: [M1-H]⁻ = 264.1010, βρέθηκε 264.1020.

6-χλωρο-2-(μορφολιν-1-υλο)μεθυλιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (24c)

Το παράγωγο **24c** συντίθεται από το **22c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (97/3 έως 89/11, v/v), **Απόδοση**: 96%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 249-250 °C (MeOH), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ 2.61 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.77 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 3.87 (s, 2H, CH₂), 8.00 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-7), 8.37 (s, 1H, H-5), 11.17 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 54.12 (μορφολίνη, C-3,5), 57.36 (CH₂), 67.01 (μορφολίνη, C-2,6), 126.26 (C-7), 126.98 (C-6), 136.34 (C-7a), 142.64 (C-5), 146.60 (C-3a), 155.42 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₁H₁₂N₄OCl: [M1-H]⁻ = 251.0694, βρέθηκε 251.0707.

5,6-διχλωρο-2-(πιπεριδιν-1-υλο)μεθυλιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (25a)

Το παράγωγο **25a** συντίθεται από το **23a** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5 έως 96/4, v/v), **Απόδοση**: 97%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ**: 227-228 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.49 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.61 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.50 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 3.78 (s, 2H, CH₂), 8.02 (s, 1H, H-7), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 23.91 (πιπεριδίνη, C-4), 26.13 (πιπεριδίνη, C-3,5), 55.18 (πιπεριδίνη, C-2,6), 57.32 (CH₂), 124.05 (C-6), 128.06 (C-7), 134.08 (C-7a), 142.72 (C-5), 146.54 (C-3a), 157.04 (C-2). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₂H₁₃N₄Cl₂: [M1-H]⁺ = 283,0512, βρέθηκε 283.0520.

5,6-διχλωρο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)μεθυλιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (25b)

Το παράγωγο **25b** συντίθεται από το **23b** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (95/5 έως 82/18, v/v), **Απόδοση**: 71%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 197-198 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.30 (s, 3H, CH₃), 2.43-2.67 (br, 8H, πιπεραζίνη), 3.85 (s, 2H, CH₂), 8.04 (s, 1H, H-7), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 45.96 (CH₃), 53.49 (πιπεραζίνη, C-2,6), 54.99 (πιπεραζίνη, C-3,5), 56.57 (CH₂), 124.05 (C-6), 128.56 (C-7), 134.65 (C-7a), 142.73 (C-5), 146.58 (C-3a), 156.21 (C-2).

5,6-διχλωρο-2-(μορφολιν-1-υλ)μεθυλιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (25c)

Το παράγωγο **25c** συντίθεται από το **23c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση του **14a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (99/1 έως 96/4, v/v), **Απόδοση**: 88%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ**: 182-183 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.59 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.71 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 3.87 (CH₂), 8.09 (s, 1H, H-7), 10.74 (br, 1H, D₂O ανταλλάξιμο, NH), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 53.98 (μορφολίνη, C-3,5), 56.96 (CH₂), 66.91 (μορφολίνη, C-2,6), 124.21 (C-6), 129.49 (C-7), 135.45 (C-7a), 142.83 (C-5), 145.69 (C-3a), 155.69 (C-2), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₁H₁₁N₄OCl₂: [M1-H]⁺ = 285.0315, βρέθηκε 285.0318.

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-[2-(πιπεριδιν-1-υλ)αιθυλ]-1*H*-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (26a) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-[2-(πιπεριδιν-1-υλ)αιθυλ]-3*H*-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (28a)

Η ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη **16a** (250 mg, 0.88 mmol) διαλύεται σε άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (5 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια το σύστημα φέρεται σε ψύξη με παγόλουτρο και προστίθεται NaH 60% σε mineral oil (95mg, 2.20 mmol), το οποίο έχει προηγουμένως εκπλυθεί δύο φορές με *n*-εξάνιο. Μετά από 5 λεπτά σε ψύξη το μίγμα της

αντίδρασης φέρεται σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται *para*-τολουολοσουλφονυλογλωρίδιο (270 mg, 1.41 mmol) και αναδεύεται για 20 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης η περίσσεια του NaH εξουδετερώνεται με αιθανόλη και το διμεθυλοφορμαμίδιο εκδιώκεται υπό κενό. Ακολουθεί κατεργασία με 100 mL κορεσμένου διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου και εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με CH₂Cl₂ (2x100 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται (άνυδρο θεικό νάτριο) και μετά από εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) και κινητή φάση CH₂Cl₂/EtOAc (70/30 έως 90/10). Λαμβάνονται τελικά τα παράγωγα **26a** και **28a**.

Δεδομένα για **26a**: **Απόδοση**: 75%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ**: 128-129 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.45 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.61 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.52 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 3.00 (t, *J* = 2.1Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 3.38 (t, *J* = 6.1Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 7.33 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.30 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.47 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.84 (CH₃), 24.21 (πιπεριδίνη, C-4), 25.86 (πιπεριδίνη, C-3,5), 27.23 (CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 54.47 (πιπεριδίνη, C-2,6), 56.21 (CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 121.59 (C-7), 126.26 (C-7a), 127.15 (τοξυλομάδα, C-2,6), 128.03 (C-6), 130.75 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.79 (τοξυλομάδα, C-1), 145.68 (C-5), 147.01 (τοξυλομάδα, C-4), 152.94 (C-3a), 157.38 (C-2), HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₂₀H₂₃ClN₄O₂SNa: [M1+Na]⁺ = 441,1122, βρέθηκε 441,1114.

Δεδομένα για **28a**: **Αποδοση**: 7%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 124-125 °C (petroleum ether), **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.47 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.64 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.40 (s, 3H, CH₃), 2.57 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 2.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 3.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.87 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-7), 8.11 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.36 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.86 (CH₃), 24.31 (πιπεριδίνη, C-4), 25.94 (πιπεριδίνη, C-3,5), 29.84 (CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 54.55 (πιπεριδίνη, C-2,6), 56.55 (CH₂CH₂-πιπεριδίνη), 127.08 (C-7), 126.42 (C-7a), 128.50 (τοξυλομάδα, C-2,6), 130.12 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.84 (C-6), 135.15 (τοξυλομάδα, C-1), 143.70 (C-5), 145.37 (τοξυλομάδα, C-4), 146.53 (C-3a), 156.59 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-[2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)αιθυλ]-1H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (26b) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-[2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)αιθυλ]-3H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη (28b)

Τα παράγωγα **26b** και **28b** παραλαμβάνονται από το **16b** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (97/3, v/v).

Δεδομένα για **26b**: **Απόδοση**: 56%, **Σ.τ**: 136-137⁰C (Et₂O), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.29 (s, 3H, πιπεραζίνη, CH₃), 2.37-2.50 (m, 7H, πιπεραζίνη, H-3,5 και τοζυλομάδα, CH₃), 2.60 (s, 4H, πιπεραζίνη, H-2,6), 3.01 (t, J = 7.60 Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 3.34 (t, J = 7.60 Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-3,5), 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-2,6), 8.31 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-7), 8.49 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.88 (τοζυλομάδα, CH₃), 27.28 (CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 46.18 (πιπεραζίνη, CH₃), 53.04 (πιπεραζίνη, C-2,6), 55.20 (πιπεραζίνη (C-3,5), 55.59 (CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 121.64 (C-7), 126.30 (C-7a), 127.10 (τοζυλομάδα, C-2,6), 128.11 (C-6), 130.77 (τοζυλομάδα, C-3,5), 134.91 (τοζυλομάδα, C-1), 145.79 (C-5), 147.05 (τοζυλομάδα, C-4), 153.00 (C-3a), 157.32 (C-2), HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₂₀H₂₄ClN₅O₂SNa: [M1+Na]⁺ 456,1231, βρέθηκε 456,1231.

Δεδομένα για **28b**: **Απόδοση**: 6%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 133-134 ⁰C (petroleum ether), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.31 (s, 3H, πιπεραζίνη, CH₃), 2.40 (s, 3H, τοζυλομάδα, CH₃), 2.48 (br, 4H, πιπεραζίνη, H-3,5), 2.66 (br, 4H, πιπεραζίνη, H-2,6), 3.02 (t, J = 7.60 Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 3.50 (t, J = 7.60 Hz, 2H, CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 7.32 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-3,5), 7.87 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-7), 8.10 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-2,6), 8.36 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.87 (τοζυλομάδα, CH₃), 28.44 (CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 46.15 (πιπεραζίνη, CH₃), 53.11 (πιπεραζίνη, C-2,6), 55.21 (πιπεραζίνη, C-3,5), 55.86 (CH₂CH₂-πιπεραζίνη), 127.10 (C-7), 128.44 (τοζυλομάδα, C-2,6 και C-6), 130.12 (τοζυλομάδα, C-3,5), 134.80 (C-7a), 135.12 (τοζυλομάδα, C-1), 143.73 (C-5), 145.33 (C-3a), 146.55 (τοζυλομάδα, C-4), 156.36 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-[2-(μορφολιν-1-υλ)αιθυλ]-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (26c) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-[2-(μορφολιν-1-υλ)αιθυλ]-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (28c)

Τα παράγωγα **26c** και **28c** παραλαμβάνονται από το **16c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (99.5/0.5 έως 97/3, v/v).

Δεδομένα για **26c**: **Απόδοση**: 86%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 140-141⁰C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.54 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 2.99 (t, J = 7.50 Hz, 2H, CH₂CH₂-μορφολίνη), 3.33 (t, J = 7.50 Hz, 2H, CH₂CH₂-μορφολίνη), 3.69 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-3,5), 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 2H,

τοξυλομάδα, H-2,6), 8.31 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7), 8.49 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 21.87 (CH_3), 27.27 (CH_2CH_2 -μορφολίνη), 53.60 (μορφολίνη, C-3,5), 55.97 (CH_2CH_2 -μορφολίνη), 67.03 (μορφολίνη, C-2,6), 121.63 (C-7), 126.28 (C-7a), 127.06 (τοξυλομάδα, C-2,6), 128.13 (C-6), 130.76 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.88 (τοξυλομάδα, C-1), 145.80 (C-5), 147.07 (τοξυλομάδα, C-4), 152.095 (C-3a), 157.15 (C-2).

Δεδομένα για **28c**: **Απόδοση**: 15%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 139-139 $^\circ\text{C}$ (Et_2O), $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.61 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.01 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H, CH_2CH_2 -μορφολίνη), 3.51 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H, CH_2CH_2 -μορφολίνη), 3.74 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.88 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7), 8.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-5), $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 21.88 (CH_3), 28.30 (CH_2CH_2 -μορφολίνη), 53.70 (μορφολίνη, C-2,6), 56.31 (CH_2CH_2 -μορφολίνη), 67.06 (μορφολίνη, C-3,5), 127.13 (C-7), 128.45 (τοξυλομάδα, C-2,6), 128.47 (C-6), 130.13 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.77 (C-7a), 135.08 (τοξυλομάδα, C-1), 143.79 (C-5), 145.31 (C-3a), 146.61 (τοξυλομάδα, C-4), 156.17 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-[2-(πιπεριδιν-1-υλ)αιθυλ]-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (27a)

Το παράγωγο **27a** παραλαμβάνεται από το **17a** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (99/1 έως 50/50, v/v). **Απόδοση**: 46%, Έλαιο, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 1.44 (m, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.59 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.49 (s, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 2.97 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H, CH_2CH_2 -πιπεριδίνη), 3.35 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H, CH_2CH_2 -πιπεριδίνη), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.41 (s, 1H, H-7), $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 21.91 (CH_3), 24.33 (πιπεριδίνη, C-4), 26.04 (πιπεριδίνη, C-3,5), 27.41 (CH_2CH_2 -πιπεριδίνη), 54.58 (πιπεριδίνη, C-2,6), 56.17 (CH_2CH_2 -πιπεριδίνη), 124.05 (C-7), 125.38, 126.35 (C-6 και C-7a), 127.22 (τοξυλομάδα, C-2,6), 130.82 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.74 (τοξυλομάδα, C-1), 145.65 (C-5), 147.27 (τοξυλομάδα, C-4), 152.23 (C-3a), 157.61 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-[2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)αιθυλ]-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (27b)

Το παράγωγο **27a** παραλαμβάνεται από το **17a** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99/1 έως 85/15, v/v). **Απόδοση**: 26%, Έλαιο, $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 2.30 (s, 3H, πιπεραζίνη, CH_3), 2.42 (s, 3H, τοξυλομάδα, CH_3), 2.37-2.69 (br, 8H, πιπεραζίνη, H-3,5 και H-2,6), 2.98 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H, CH_2CH_2 -πιπεραζίνη), 3.31 (t, $J = 7.60$ Hz, 2H, CH_2CH_2 -

πιπεραζίνη), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.75 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.41 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-7).

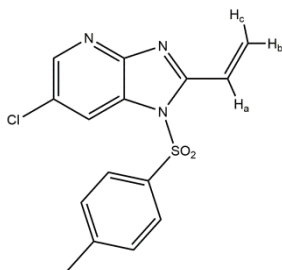
1-(4-μεθυλοβενζοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-[2-(μορφολιν-1-υλ)αιθυλ]-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (27c) και 3-(4-μεθυλοβενζοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-[2-(μορφολιν-1-υλ)αιθυλ]-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (29c)

Τα παράγωγα **27c** και **29c** παραλαμβάνονται από το **17c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CHCl₃/MeOH (99.5/0.5 έως 98.5/1.5, v/v).

Δεδομένα για **27c**: **Απόδοση**: 89%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 179-180⁰C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.54 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 2.98 (t, $J = 7.20$ Hz, 2H, CH₂CH₂-μορφολίνη), 3.33 (t, $J = 7.20$ Hz, 2H, CH₂CH₂-μορφολίνη), 3.70 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 7.32 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.76 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.41 (s, 1H, H-7), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.91 (CH₃), 27.28 (CH₂CH₂-μορφολίνη), 53.36 (μορφολίνη, C-3,5), 55.54 (CH₂CH₂-μορφολίνη), 66.65 (μορφολίνη, C-2,6), 124.20 (C-7), 125.51, 126.54 (C-6 και C-7a), 127.31 (τοξυλομάδα, C-2,6), 130.99 (τοξυλομάδα, C-3,5), 135.00 (τοξυλομάδα, C-1), 145.84 (C-5), 147.49 (τοξυλομάδα, C-4), 149.54 (C-3a), 156.11 (C-2).

Δεδομένα για **29c**: **Απόδοση**: 5%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 162-163⁰C (Et₂O), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.58 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.08 (t, $J = 7.20$ Hz, 2H, CH₂CH₂-μορφολίνη), 3.51 (t, $J = 7.20$ Hz, 2H, CH₂CH₂-μορφολίνη), 3.70 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 7.36 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.99 (s, 1H, H-7), 8.13 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.94 (CH₃), 28.29 (CH₂CH₂-μορφολίνη), 53.69 (μορφολίνη, C-3,5), 56.26 (CH₂CH₂-μορφολίνη), 67.04 (μορφολίνη, C-2,6), 126.68 (C-7), 128.99 (τοξυλομάδα, C-2,6), 129.41 (C-7a), 130.13 (τοξυλομάδα, C-3,5), 133.83 (C-6), 133.92 (τοξυλομάδα, C-1), 134.52 (C-5), 143.91 (τοξυλομάδα, C-4), 146.94 (C-3a), 156.36 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-βινυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (30)



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.41 (s, 3H, CH₃), 5.88 (d, J_{ab} = 11.5 Hz, 1H, H_b), 6.76 (d, J_{ac} = 17.8, 1H, H_c), 7.33 (d, 2H, J = 8.9 Hz, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.44 (dd, J_{ab} = 11.5, J_{ac} = 17.8, 1H, H_a), 7.76 (d, 2H, J = 8.9 Hz, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.36 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.52 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO) δ (ppm) 21.43 (CH₃), 121.98 (C-7), 123.20 (C-2'), 127.14 (τοξυλομάδα, C-2,6), 129.16 (C-1'), 130.69 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.90 (C-6), 139.48 (C-7a), 146.57 (C-5), 146.96 (τοξυλομάδα, C-1), 153.23 (τοξυλομάδα, C-4), 153.74 (C-3a), 158.44 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-βινυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (31)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.41 (s, 3H, CH₃), 5.94 (d, J_{ab} = 11.0 Hz, 1H, H_b), 6.76 (d, J_{ac} = 17, 1H, H_c), 7.34 (d, 2H, J = 8.9 Hz, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.43 (dd, J_{ab} = 11, J_{ac} = 17, 1H, H_a), 7.76 (d, 2H, J = 8.9 Hz, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.45 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO) δ (ppm) 21.87 (CH₃), 122.89 (C-7), 124.41 (C-2'), 127.14 (τοξυλομάδα, C-2,6), 129.92 (C-1'), 130.83 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.60 (C-7a), 146.43 (C-6), 147.34 (C-5), 152.29 (τοξυλομάδα, C-1), 154.40 (τοξυλομάδα, C-4), 158.14 (C-3a), 159.76 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-(πιπεριδιν-1-υλο)μεθυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (32a) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-(πιπεριδιν-1-υλο)μεθυλ-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (34a)

Τα παράγωγα **32a** και **34a** παραλαμβάνονται από το **24a** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/EtOAc (95/5 έως 50/50, v/v) και CH₂Cl₂/MeOH (99/1, v/v).

Λεδομένα για **32a**: **Απόδοση**: 89%, Λευκό στερεό, Σ.τ: 162-162⁰C, **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.41-1.52 (m, 6H, πιπεριδίνη, H-3,4,5), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.56 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 4.03 (s, 2H, CH₂), 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 8.21 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.23 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.50 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.86 (CH₃), 24.17 (πιπεριδίνη, C-4), 25.83 (πιπεριδίνη, C-3,5), 54.78 (πιπεριδίνη, C-2,6), 56.35 (CH₂), 121.65 (C-7), 126.46 (C-7a), 128.20 (τοξυλομάδα, C-2,6), 128.32 (C-6), 130.10 (τοξυλομάδα, C-3,5), 135.24 (τοξυλομάδα, C-1), 145.82 (C-5), 146.56 (τοξυλομάδα, C-4), 152.51 (C-3a), 155.18 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₉H₂₁ClN₄O₂SNa: [M+Na]⁺ = 427.0965, βρέθηκε 427,0975

Λεδομένα για **34a**: **Απόδοση**: 8%, Λευκό στερεό, Σ.τ: 145-146⁰C, **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.49 (br, 2H, πιπεριδίνη, H-4), 1.57 (m, 4H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.55 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 4.03 (s, 2H, CH₂), 7.31 (d, J = 8.2 Hz, 2H,

τοξυλομάδα, H-3,5), 7.92 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7), 8.40 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-5), 8.45 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 21.89 (CH_3), 24.30 (πιπεριδίνη, C-4), 26.02 (πιπεριδίνη, C-3,5), 54.93 (πιπεριδίνη, C-2,6), 57.45 (CH_2), 127.59 (C-7), 128.35 (C-6), 129.43 (τοξυλομάδα, C-2,6), 129.58 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.34 (C-7a), 135.22 (τοξυλομάδα, C-1), 144.28 (C-5), 145.61 (C-3a), 146.25 (τοξυλομάδα, C-4), 154.45 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)μεθυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (32b) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)μεθυλ-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (34b)

Τα παράγωγα **32b** και **34b** παραλαμβάνονται από το **24b** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (99/1, v/v).

Δεδομένα για **32b**: **Απόδοση**: 70%, **Σ.τ.**: 151-152 $^{\circ}\text{C}$ (EtOAc), $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 2.26 (s, 3H, CH_3 , πιπεραζίνη), 2.43 (s, 3H, CH_3 , τοξυλομάδα), 2.33, 2.67 (br, 8H, πιπεραζίνη), 4.08 (s, 2H, CH_2), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 8.14 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.22 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7), 8.51 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-5), $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 21.82 (τοξυλομάδα, CH_3), 46.24 (πιπεραζίνη, CH_3), 53.30 (πιπεραζίνη, C-2,6), 54.83 (πιπεραζίνη, C-3,5), 55.45 (CH_2), 121.63 (C-7), 126.44 (C-7a), 127.92 (τοξυλομάδα, C-2,6), 128.41 (C-6), 130.20 (τοξυλομάδα, C-3,5), 135.20 (τοξυλομάδα, C-1), 145.88 (C-5), 146.54 (τοξυλομάδα, C-4), 152.40 (C-3a), 154.58 (C-2), HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{ClN}_4\text{O}_3\text{SNa}$: $[\text{M}1+\text{Na}]^+ = 443.0915$, βρέθηκε 443.0940.

Δεδομένα για **34b**: **Απόδοση**: 5%, **Σ.τ.**: 144-145 $^{\circ}\text{C}$ (EtOAc/n-pentane), $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 2.34 (s, 3H, CH_3 , πιπεραζίνη), 2.42 (s, 3H, CH_3 , τοξυλομάδα), 2.51 (br, 4H, πιπεραζίνη), 2.71 (br, 4H, πιπεραζίνη), 4.10 (s, 2H, CH_2), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-7), 8.37 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.39 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-5), $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 21.89 (τοξυλομάδα, CH_3), 45.87 (πιπεραζίνη, CH_3), 52.92 (πιπεραζίνη, C-2,6), 54.83 (πιπεραζίνη, C-3,5), 56.45 (CH_2), 127.69 (C-7), 128.47 (C-6), 129.27 (τοξυλομάδα, C-2,6), 129.71 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.32 (C-7a), 135.13 (τοξυλομάδα, C-1), 144.43 (C-5), 145.51 (C-3a), 146.39 (τοξυλομάδα, C-4), 153.74 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-(μορφολιν-4-υλο)μεθυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (32c) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-6-χλωρο-2-(μορφολιν-4-υλο)μεθυλ-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (34c)

Τα παράγωγα **32c** και **34c** παραλαμβάνονται από το **24c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης : CHCl₃/MeOH (99.5/0.5 έως 96/4, v/v).

Δεδομένα για **32c**: **Απόδοση**: 65%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 167-168 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.63 (br, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.59 (br, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 4.08 (s, 2H, CH₂), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 8.10 (d, J = 8.1 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.24 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.51 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.86 (CH₃), 53.76 (μορφολίνη, C-3,5), 55.89 (CH₂), 66.71 (μορφολίνη, C-2,6), 121.71 (C-7), 126.47 (C-7a), 127.77 (τοξυλομάδα, C-2,6), 128.56 (C-6), 130.25 (τοξυλομάδα, C-3,5), 135.20 (τοξυλομάδα, C-1), 146.01 (C-5), 146.78 (τοξυλομάδα, C-4), 152.36 (C-3a), 154.11 (C-2), HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για C₁₈H₁₉ClN₄O₃SNa: [M1+Na]⁺ = 429.0758, βρέθηκε 429.0771.

Δεδομένα για **34c**: **Απόδοση**: 7%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 159-160 °C, **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.63 (br, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.71 (br, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 4.11 (s, 2H, CH₂), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.93 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-7), 8.38 (d, J = 8.1 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.41 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H-5), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ 21.91 (CH₃), 53.88 (μορφολίνη, C-3,5), 56.97 (CH₂), 66.92 (μορφολίνη, C-2,6), 127.73 (C-7), 128.52 (C-6), 129.22 (τοξυλομάδα, C-2,6), 129.73 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.27 (C-7a), 135.06 (τοξυλομάδα, C-1), 144.53 (C-5), 152.36 (C-3a), 146.53 (τοξυλομάδα, C-4), 153.26 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-(πιπεριδιν-1-υλο)μεθυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (33a) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-(πιπεριδιν-1-υλο)μεθυλ-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (35a)

Τα παράγωγα **33a** και **35a** παραλαμβάνονται από το **25a** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης : cHex/EtOAc (90/10, v/v).

Δεδομένα για **33a**: **Απόδοση**: 56%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ**: 147-148 °C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.42-1.51 (m, 6H, πιπεριδίνη, H-3,4,5), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.56 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 4.02 (s, 2H, CH₂), 7.34 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 8.20 (d, J = 8.2 Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.31 (s, 1H, H-7). **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.89 (CH₃), 24.12 (πιπεριδίνη, C-4), 25.82 (πιπεριδίνη, C-3,5), 54.75 (πιπεριδίνη, C-2,6), 56.24 (CH₂), 124.11 (C-7), 125.67, 126.55 (C-6 και C-7a), 128.19 (τοξυλομάδα, C-2,6), 130.20 (τοξυλομάδα, C-3,5), 134.99 (τοξυλομάδα, C-1), 145.68 (C-5), 146.82 (τοξυλομάδα,

C-4), 151.67 (C-3a), 156.13 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για $C_{19}H_{20}Cl_2N_4O_2SNa$: $[M+Na]^+$ 461,0576 βρέθηκε 461,0571.

Δεδομένα για **35a**: **Απόδοση**: 5%, Μπεζ στερεό, **Σ.τ**: 158-159°C (petroleum ether), **1H -NMR** (600 MHz, $CDCl_3$) δ 1.43 (br, 6H, πιπεριδίνη, H-4), 1.62 (br, 6H, πιπεριδίνη, H-3,5), 2.45 (s, 3H, CH_3), 2.55 (br, 4H, πιπεριδίνη, H-2,6), 3.99 (s, 2H, CH_2), 7.36 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 7.99 (s, 1H, H-7), 8.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), **^{13}C -NMR** (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 21.94 (CH_3), 24.28 (πιπεριδίνη, C-4), 26.04 (πιπεριδίνη, C-3,5), 54.93 (πιπεριδίνη, C-2,6), 57.37 (CH_2), 126.61 (C-7), 129.65 (τοξυλομάδα, C-2,6), 129.74 (τοξυλομάδα, C-3,5), 129.87, 133.46 (C-6 και C-7a), 134.70 (τοξυλομάδα, C-1), 144.27 (C-5), 144.37 (C-3a), 146.60 (τοξυλομάδα, C-4), 154.70 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)μεθυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (33b) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)μεθυλ-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (35b)

Τα παράγωγα **33b** και **35b** παραλαμβάνονται από το **25b** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: $CH_2Cl_2/MeOH$ (94/6 έως 88/12, v/v).

Δεδομένα για **33b**: **Απόδοση**: 81%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 178-179°C, **1H -NMR** (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 2.22-2.49 (m, 10H, πιπεραζίνη, H-3,5, CH_3 και H-3,5, τοξυλικό CH_3), 2.68 (br, 4H, πιπεραζίνη, H-2,6), 4.07 (s, 2H, CH_2), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 8.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), 8.33 (s, 1H, H-7). **^{13}C -NMR** (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 21.89 (τοξυλομάδα, CH_3), 46.14 (πιπεραζίνη, CH_3), 53.19 (πιπεραζίνη, C-2,6), 54.81 (πιπεραζίνη, C-3,5), 55.36 (CH_2), 124.17 (C-7), 125.71, 126.78 (C-6 και C-7a), 127.93 (τοξυλομάδα, C-2,6), 130.38 (τοξυλομάδα, C-3,5), 135.03 (τοξυλομάδα, C-1), 145.87 (C-5), 146.90 (τοξυλομάδα, C-4), 151.63 (C-3a), 155.57 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Υπολογισμένο για $C_{19}H_{21}Cl_2N_5O_2SNa$: $[M+Na]^+ = 476,0685$, βρέθηκε 476,0696.

Δεδομένα για **35b**: **Απόδοση**: 3%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 156-157°C, **1H -NMR** (600 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 2.33 (s, 3H, τοξυλομάδα CH_3), 2.40-2.54 (m, 7H, πιπεραζίνη, H-3,5 και CH_3), 2.68 (br, 4H, πιπεραζίνη, H-2,6), 4.09 (s, 2H, CH_2), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-3,5), 8.00 (s, 1H, H-7). 8.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, τοξυλομάδα, H-2,6), **^{13}C -NMR** (151 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 21.95 (τοξυλομάδα, CH_3), 46.28 (πιπεραζίνη, CH_3), 53.36 (πιπεραζίνη, C-2,6), 55.12 (πιπεραζίνη, C-3,5), 56.50 (CH_2), 126.70 (C-7), 129.71

(τοζυλομάδα, C-2,6), 129.74 (τοζυλομάδα, C-3,5), 129.96, 133.44 (C-6 και C-7a), 134.61 (τοζυλομάδα, C-1), 144.20 (C-5), 144.56 (C-3a), 146.73 (τοζυλομάδα, C-4), 154.05 (C-2).

1-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-(μορφολιν-1-υλο)μεθυλ-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (33c) και 3-(4-μεθυλοβενζολοσουλφονυλο)-5,6-διχλωρο-2-(μορφολιν-1-υλο)μεθυλ-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (35c)

Τα παράγωγα **33c** και **35c** παραλαμβάνονται από το **25c** με τη μέθοδο που περιγράφηκε για τη σύνθεση των **26a** και **28a**. Σύστημα έκλουσης χρωματογραφικής στήλης: CH₂Cl₂/MeOH (99.5/0.5 έως 98/2, v/v).

Δεδομένα για **33c**: **Απόδοση**: 69%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 176-177⁰C (EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ(ppm) 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.63 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.59 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 4.07 (s, 2H, CH₂), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-3,5), 8.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-2,6), 8.35 (s, 1H, H-7), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.91 (CH₃), 53.79 (μορφολίνη, C-3,5), 55.83 (CH₂), 66.74 (μορφολίνη, C-2,6), 124.20 (C-7), 125.71, 126.88 (C-6 και C-7a), 127.80 (τοζυλομάδα, C-2,6), 130.38 (τοζυλομάδα, C-3,5), 135.00 (τοζυλομάδα, C-1), 145.95 (C-5), 147.08 (τοζυλομάδα, C-4), 151.56 (C-3a), 155.11 (C-2). HR-MS (ESI) *m/z*: Υπολογισμένο για C₁₈H₁₈Cl₂N₄O₃SNa: [M1+Na]⁺ = 463,0369, βρέθηκε 463,0365.

Δεδομένα για **35c**: **Απόδοση**: 6%, Λευκό στερεό, **Σ.τ**: 161-162 ⁰C(EtOAc), **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.44 (s, 3H, CH₃), 2.65 (m, 4H, μορφολίνη, H-3,5), 3.71 (m, 4H, μορφολίνη, H-2,6), 4.09 (s, 2H, CH₂), 7.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-3,5), 8.01 (s, 1H, H-7), 8.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, τοζυλομάδα, H-2,6), **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 21.97 (CH₃), 53.91 (μορφολίνη, C-3,5), 56.97 (CH₂), 66.98 (μορφολίνη, C-2,6), 126.80 (C-7), 129.58 (τοζυλομάδα, C-2,6), 129.77 (τοζυλομάδα, C-3,5), 130.00, 133.43 (C-6 και C-7a), 134.60 (τοζυλομάδα, C-1), 144.60 (C-5), 146.86 (C-3a), 146.90 (τοζυλομάδα, C-4), 153.67 (C-2).

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. WHO | What is hepatitis? WHO. [cited 2018 Jun 10]. Available from: <http://www.who.int/features/qa/76/en/>
2. Vergani D, Mackay IR, Mieli-Vergani G. Hepatitis. In: The Autoimmune Diseases. Elsevier; 2014 [cited 2018 Jul 7]. p. 889–907.
3. Hoofnagle JH. Therapy of acute and chronic viral hepatitis. *Adv Intern Med*. 1994;39:241–75.
4. Zuckerman AJ. Hepatitis Viruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*, 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996
5. Zuckerman AJ. Viral hepatitis. *Transfus Med*. 1993 Mar;3(1):7–19.
6. Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication. *Trends Microbiol*. 1993 Sep 1;1(6):221–8.
7. Lee WM. Hepatitis B Virus Infection. *N Engl J Med*. 1997 Dec 11;337(24):1733–45.
8. Trepo C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int*. 2014 Feb;34:29–37.
9. Nassal M, Schaller H. Hepatitis B virus replication-an update. *J Viral Hepat*. 1996 Sep;3(5):217–26.
10. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):14.
11. Norder H, Couroucé A-M, Coursaget P, Echevarria JM, Lee S-D, Mushahwar IK, et al. Genetic Diversity of Hepatitis B Virus Strains Derived Worldwide: Genotypes, Subgenotypes, and HB_sAg Subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289–309.
12. Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5427.
13. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol*. 2007 Jan 7;13(1):65–73.
14. Yokosuka O, Arai M. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol*. 2006 Sep 1;39(3):113–20.
15. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2000 Mar;64(1):51–68.
16. Chang C, Zhou S, Ganem D, Standring DN. Phenotypic mixing between different hepadnavirus nucleocapsid proteins reveals C protein dimerization to be cis preferential. *J Virol*. 1994 Aug;68(8):5225–31.

17. Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res.* 2004 Dec;106(2):199–209.
18. Kaito M, Ohba H, Chiba J, Kohara M, Tanaka H, Fujita N, et al. The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus. *Med Mol Morphol.* 2006 Sep 1;39(3):136–45.
19. Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J. Properties of Subviral Particles of Hepatitis B Virus. *J Virol.* 2008 Aug 15;82(16):7812–7.
20. Gerlich WH. Medical Virology of Hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology.* 2013;10(1):239.
21. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell.* 1980 Oct;21(3):801–9.
22. Seeger C, Mason WS. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology.* 2015 May;479–480:672–86.
23. Grimm D, Thimme R, Blum HE. HBV life cycle and novel drug targets. *Hepatol Int.* 2011 Jun;5(2):644–53.
24. Clark DN, Hu J. Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies. *Future Virol.* 2015 Mar;10(3):283–95.
25. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol.* 2007
26. Verrier ER, Schuster C, Baumert TF. Advancing hepatitis B virus entry inhibitors. *J Hepatol.* 2017 Apr;66(4):677–9.
27. Yan H, Liu Y, Sui J, Li W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.* 2015 Sep;121:24–30.
28. Li W. The hepatitis B virus receptor. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015;31:125–47.
29. Urban S, Schulze A, Dandri M, Petersen J. The replication cycle of hepatitis B virus. *J Hepatol.* 2010 Feb;52(2):282–4.
30. Nassal M. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res.* 2008 Jun;134(1–2):235–49.
31. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2009 Sep;51(3):581–92.
32. Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med.* 2004 Mar 11;350(11):1118–29.
33. Knaus T, Nassal M. The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. *Nucleic Acids Res.* 1993 Aug 25;21(17):3967–75.
34. Tang LSY, Covert E, Wilson E, Kottlilil S. Chronic Hepatitis B Infection: A Review. *JAMA.* 2018 May 1;319(17):1802.

35. Gao W, Hu J. Formation of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA: Removal of Genome-Linked Protein. *J Virol.* 2007 Jun 15;81(12):6164–74.
36. Yang W, Summers J. Integration of Hepadnavirus DNA in Infected Liver: Evidence for a Linear Precursor. *J Virol.* 1999 Dec 1;73(12):9710–7.
37. Tu T, Budzinska M, Shackel N, Urban S. HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Viruses.* 2017 Apr 10;9(4):75.
38. de Franchis R, Meucci G, Vecchi M, Tatarella M, Colombo M, Del Ninno E, et al. The natural history of asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Ann Intern Med.* 1993 Feb 1;118(3):191–4.
39. Jung M-C, Diepolder HM, Pape GR. T cell recognition of hepatitis B and C viral antigens. *Eur J Clin Invest.* 1994 Oct;24(10):641–50.
40. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1472–7.
41. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B Virus Immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 1995 Apr;13(1):29–60.
42. Trépo C, Chan HLY, Lok A. Hepatitis B virus infection. *The Lancet.* 2014 Dec;384(9959):2053–63.
43. Shepard CW. Hepatitis B Virus Infection: Epidemiology and Vaccination. *Epidemiol Rev.* 2006 Jun 1;28(1):112–25.
44. Shiffman ML. Management of Acute Hepatitis B. *Clin Liver Dis.* 2010 Feb;14(1):75–91.
45. Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol.* 2007 Jan 7;13(1):22–38.
46. McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP, et al. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis.* 1985 Apr;151(4):599–603.
47. Lee W. Etiologies of Acute Liver Failure. *Semin Liver Dis.* 2008 May;28(2):142–52.
48. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology.* 1994 Jun;19(6):1513–20.
49. McMahon BJ. Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Med Clin North Am.* 2014 Jan;98(1):39–54.
50. McMahon BJ. Natural history of chronic hepatitis B - clinical implications. *Medscape J Med.* 2008 Apr 16;10(4):91.
51. Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2005 Dec;34 Suppl 1:S1–3.
52. Raney AK, Hamatake RK, Hong Z. Agents in clinical development for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Investig Drugs.* 2003 Aug;12(8):1281–95.

53. Liaw Y-F, Chu C-M. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 2009 Feb;373(9663):582–92.
54. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2007 Feb;45(2):507–39.
55. Dusheiko G, Antonakopoulos N. Current treatment of hepatitis B. *Gut*. 2007 May 14;57(1):105–24.
56. Gish RG, Given BD, Lai C-L, Locarnini SA, Lau JYN, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Res*. 2015 Sep;121:47–58.
57. Robinson WS, Garcia G. Interferon and hepatitis B. *Hepatology*. 1985 Mar;5(2):336–7.
58. Goodbourn S, Randall RE, Didcock L. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2000 Oct 1;81(10):2341–64.
59. Woo ASJ, Kwok R, Ahmed T. Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Ann Transl Med*. 2017 Apr;5(7):159.
60. Rijckborst V, Janssen HLA. The Role of Interferon in Hepatitis B Therapy. *Curr Hepat Rep*. 2010 Nov;9(4):231–8.
61. Craxi A, Cooksley WG. Pegylated interferons for chronic hepatitis B. *Antiviral Res*. 2003 Oct;60(2):87–9.
62. Stein LL, Loomba R. Drug targets in hepatitis B virus infection. *Infect Disord Drug Targets*. 2009 Apr;9(2):105–16.
63. Tacke F, Kroy DC. Treatment for hepatitis B in patients with drug resistance. *Ann Transl Med*. 2016 Sep;4(18):334–334.
64. Kayaaslan B, Guner R. Adverse effects of oral antiviral therapy in chronic hepatitis B. *World J Hepatol*. 2017;9(5):227.
65. Palumbo E. Lamivudine for chronic hepatitis B: a brief review. *Braz J Infect Dis [Internet]*. 2008 Oct [cited 2018 Jun 10];12(5).
66. Karayiannis P. Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Apr 1;51(4):761–85.
67. Cheng P-N, Chang T-T. Entecavir: a potent antiviral with minimal long-term resistance in nucleoside-naïve chronic hepatitis B patients. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008 Oct;6(5):569–79.
68. Lui YY, Chan HL. Treatment of chronic hepatitis B: focus on telbivudine. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Apr;7(3):259–68.
69. Fung J, Lai C-L, Seto W-K, Yuen M-F. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec 1;66(12):2715–25.
70. Dando T, Plosker G. Adefovir dipivoxil: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs*. 2003;63(20):2215–34.

71. Calìò R, Villani N, Balestra E, Sesa F, Holy' A, Balzarini J, et al. Enhancement of natural killer activity and interferon induction by different acyclic nucleoside phosphonates. *Antiviral Res.* 1994 Jan;23(1):77–89.
72. Marcellin P, Chang T-T, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, et al. Adefovir Dipivoxil for the Treatment of Hepatitis B e Antigen–Positive Chronic Hepatitis B. *N Engl J Med.* 2003 Feb 27;348(9):808–16.
73. Fontana RJ. Side effects of long-term oral antiviral therapy for hepatitis B. *Hepatology.* 2009 May;49(S5):S185–95.
74. Scott LJ, Chan HLY. Tenofovir Alafenamide: A Review in Chronic Hepatitis B. *Drugs.* 2017 Jun;77(9):1017–28.
75. Wang. Y-J, Yang L, Zuo J-P. Recent developments in antivirals against hepatitis B virus. *Virus Res.* 2016 Feb;213:205–13.
76. Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, Jensen K, Lockridge JA, Dickinson B, et al. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology.* 2005 Jun;41(6):1349–56.
77. Durantel D, Alotte C, Zoulim F. Glucosidase inhibitors as antiviral agents for hepatitis B and C. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. 2007 Feb;8(2):125–9.
78. Bourne C, Lee S, Venkataiah B, Lee A, Korba B, Finn MG, et al. Small-Molecule Effectors of Hepatitis B Virus Capsid Assembly Give Insight into Virus Life Cycle. *J Virol.* 2008 Oct 15;82(20):10262–70.
79. Tonelli M, Novelli F, Tasso B, Vazzana I, Sparatore A, Boido V, et al. Antiviral activity of benzimidazole derivatives. III. Novel anti-CVB-5, anti-RSV and anti-Sb-1 agents. *Bioorg Med Chem.* 2014 Sep;22(17):4893–909.
80. Luo Y, Yao J-P, Yang L, Feng C-L, Tang W, Wang G-F, et al. Synthesis and Anti-Hepatitis B Virus Activity of a Novel Class of Thiazolylbenzimidazole Derivatives. *Arch Pharm (Weinheim).* 2011 Feb;344(2):78–83.
81. Li Y-F, Wang G-F, He P-L, Huang W-G, Zhu F-H, Gao H-Y, et al. Synthesis and Anti-Hepatitis B Virus Activity of Novel Benzimidazole Derivatives. *J Med Chem.* 2006 Jul;49(15):4790–4.
82. Luo Y, Yao J-P, Yang L, Feng C-L, Tang W, Wang G-F, et al. Design and synthesis of novel benzimidazole derivatives as inhibitors of hepatitis B virus. *Bioorg Med Chem.* 2010 Jul;18(14):5048–55.
83. Garuti L, Roberti M, Rossi T, Cermelli C, Portolani M, Malagoli M, et al. Synthesis, antiviral and antiproliferative activity of some N-benzenesulphonyl-2(2- or 3-pyridylethyl)-benzimidazoles. *Anticancer Drug Des.* 1998 Jul;13(5):397–406.
84. Xu Y-B, Yang L, Wang G-F, Tong X-K, Wang Y-J, Yu Y, et al. Benzimidazole derivative, BM601, a novel inhibitor of hepatitis B virus and HBsAg secretion. *Antiviral Res.* 2014 Jul;107:6–15.

85. Yutilov YM. Imidazopyridines: 1- and 3-Deazapurines. In: *Advances in Heterocyclic Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2005 [cited 2018 Aug 18]. p. 159–270.
86. Bukhryakov KV, Kurkin AV, Yurovskaya MA. Synthetic approaches to imidazo[4,5-b]pyridine derivatives (review). *Chem Heterocycl Compd*. 2011 Aug;47(5):533–57.
87. Popp FD, McEwen WE. Polyphosphoric Acids As A Reagent In Organic Chemistry. *Chem Rev*. 1958 Apr;58(2):321–401.
88. Krongauz ES, Rusanov AL, Renard TL. Polyphosphoric Acid in Cyclisation and Polycyclisation Reactions. *Russ Chem Rev*. 1970 Sep 30;39(9):747–65.
89. Ding Z-C, Ma X, Zhou W. Convenient and Practical Synthesis of 6-Chloro-2-(chloromethyl)-thiazolo[5,4-b]pyridine. *Synth Commun*. 2012 Oct;42(19):2791–6.