

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΝΕΕΣ ΠΥΡΑΖΟΛΟΠΥΡΙΔΙΝΕΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ  
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΠΑΠΑΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ  
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

*Αφιερώνεται στους γονείς μου Νίκο και Κατερίνα,  
ως ελάχιστη αναγνώριση της αγάπης  
και της στήριξής τους,  
στον αδερφό μου Δημήτρη  
και στη Μελίνα*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θέλω να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κο Παναγιώτη Μαράκο και στην Καθηγήτρια κα Νικολαΐδα Πουλή για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή πνευματική καθοδήγηση και επίβλεψη, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας και το ιδανικό εργασιακό περιβάλλον. Ευχαριστώ θερμά το τρίτο μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κο Ιωάννη Κωστάκη για τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια της διόρθωσης της Εργασίας και για τη βοήθειά του. Θα ήταν σοβαρότατη παράλειψη και λάθος από μέρους μου να μην ευχαριστήσω θερμά το Διδάκτορα κο Νικόλαο Λουγιάκη για την καθημερινή, ασταμάτητη και πολυτιμότατη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της Εργασίας και για την άριστη φιλική μας σχέση. Επίσης, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κο Ευάγγελο Γκίκα για τη λήψη των φασμάτων Μάζας (MS) καθώς και τη Διδάκτορα κα Δήμητρα Μπενάκη για τις συμβουλές της στη λήψη φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Ευχαριστώ όλα τα παιδιά του Εργαστηρίου για το φιλικό κλίμα και για την άριστη συνεργασία μας. Τέλος, εκφράζω από καρδιάς ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ και βαθειά ευγνωμοσύνη στους γονείς μου Νίκο και Κατερίνα για την αγάπη, τη στήριξη και τις θυσίες που έχουν κάνει για μένα από τότε που ήμουν μικρό παιδί μέχρι σήμερα...

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΑΚΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

**ΝΙΚΟΛΑΪΣ ΠΟΥΛΗ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΩΣΤΑΚΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	Σελ. 3
<b>ABSTRACT</b> .....	Σελ. 4
<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	Σελ. 5
I.1 Πρόλογος.....	Σελ. 5
I.2 Πρωτεϊνικές Κινάσες-ορισμός και είδη.....	Σελ. 5
I.3 Δομή και λειτουργία του ενεργού κέντρου.....	Σελ. 7
I.4 Η σχέση των πρωτεϊνικών κινασών με την καρκινογένεση.....	Σελ. 9
I.5 Φάρμακα που δρουν ως αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών.....	Σελ. 10
I.6 Σχεδιασμός και σύνθεση νέων πουρινικών αναλόγων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι πρωτεϊνικών κινασών.....	Σελ. 14
<b>II. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	Σελ. 17
II.1 Συνθετική πορεία.....	Σελ. 17
II.1.1 Σύνθεση της 7-χλωρο-3-νιτρο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (10) και των <i>N</i> <sup>1</sup> -και <i>N</i> <sup>2</sup> -μεθυλοπαραγώγων της (11 και 12).....	Σελ. 17
II.1.2 Σύνθεση των 3-ακεταμιδούποκατεστημένων παραγώγων της 7-φαινυλαμινο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (16-18) και της 7-φαινυλαμινο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (25-26).....	Σελ. 20
II.1.3 Σύνθεση των 3-ακεταμιδούποκατεστημένων παραγώγων της 7-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (30-32) και της 7-κυκλοεξυλαμινο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (39).....	Σελ. 22
II.1.4 Σύνθεση παραγώγων ουρίας των πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδινών (40-41), για περαιτέρω συγκριτική φαρμακολογική αξιολόγηση και μελέτη.....	Σελ. 24
II.2 Φασματοσκοπική μελέτη των ενώσεων.....	Σελ. 25
II.2.1 Απόδοση των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα NMR.....	Σελ. 25
<b>III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	Σελ. 34
III.1 Γενικά πειραματικά στοιχεία.....	Σελ. 34
III.2 Σύνθεση της 7-χλωρο-3-νιτρο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (10) και των <i>N</i> <sup>1</sup> -και <i>N</i> <sup>2</sup> -μεθυλοπαραγώγων της (11 και 12).....	Σελ. 34

III.3 Σύνθεση των 3-ακεταμιδούποκατεστημένων παραγώγων της 7-φαινυλαμινο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (16-18) και της 7-φαινυλαμινο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (25-26).....	Σελ. 38
III.4 Σύνθεση των 3-ακεταμιδούποκατεστημένων παραγώγων της 7-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (30-32) και της 7-κυκλοεξυλαμινο-1 <i>H</i> -πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδίνης (39).....	Σελ. 44
III.5 Σύνθεση άλλων υποκατεστημένων πυραζόλο[3,4- <i>c</i> ]πυριδινών, για περαιτέρω συγκριτική φαρμακολογική αξιολόγηση και μελέτη (40-42).....	Σελ. 49
<b>IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>Σελ. 52</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Νέες Πυραζολοπυριδίνες ως Πιθανοί Αναστολείς Πρωτεϊνικών Κινασών

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου. Τα κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα παρά τη δραστικότητά τους στερούνται εκλεκτικότητας, με αποτέλεσμα την εμφάνιση παρενεργειών και έχουν μειωμένη δραστικότητα, λόγω της ανάπτυξης αντοχής. Η σταδιακή πρόοδος των βιολογικών επιστημών συνέβαλε στην πληρέστερη κατανόηση των καρκινογενετικών μηχανισμών και αποκάλυψε πληθώρα μοριακών στόχων, που μπορούν να αξιοποιηθούν στα πλαίσια της ανάπτυξης μιας πιο ορθολογικής και πιο στοχευμένης καταπολέμησης των διαφόρων μορφών καρκίνου. Μεταξύ αυτών σημαντική θέση καταλαμβάνουν οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, που υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα και ελέγχουν βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός, η διαφοροποίηση και η κυτταρική διαίρεση. Αρκετοί αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών που έχουν λάβει έγκριση χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία, ενώ ένας πολύ μεγαλύτερος αριθμός τους βρίσκεται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών. Τα παράγωγα αδενίνης Olomoucine, Roscovitine και Purvalanol, όπως και διάφορες αζα- και δεαζαπουρίνες, που φέρουν ποικιλία υποκαταστατών, ανταγωνίζονται το ATP για την ίδια, συντηρημένη θέση δέσμευσης και ασκούν ισχυρή ανασταλτική δράση επί κυκλινοεξαρτώμενων και άλλων κινασών. Με βάση τη μελέτη των σχέσεων δομής-δράσης αυτών των παραγώγων, σε συνάρτηση με τις κρυσταλλογραφικές δομές ισχυρών αναστολέων επί του ενεργού κέντρου, σχεδιάζονται και αναπτύσσονται νέοι πιθανοί αναστολείς, που φέρουν κατάλληλες τροποποιήσεις του πουρινικού σκελετού ή/και των υποκαταστατών του.

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν παράγωγα της πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης, που φέρουν 1-μεθυλομάδα ή δεν φέρουν υποκαταστάτη στη θέση 1, αρυλο- ή αλκυλαμινομάδα στη θέση 7 και αμινικούς υποκαταστάτες στη θέση 3. Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των εν λόγω παραγώγων χρησιμοποιήθηκε η 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνη, η οποία με σειρά χημικών αντιδράσεων οδήγησε στην 3-ακεταμιδο-2-χλωρο-4-μεθυλοπυριδίνη, που υπεβλήθη διαδοχικά σε διαζώτωση, ενδομοριακή κύκλωση και νίτρωση, παρέχοντας την 7-χλωρο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη. Το μόριο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως κοινό ενδιάμεσο για τη σύνθεση των αμινούποκατεστημένων τελικών παραγώγων, που προέκυψαν μετά από υποκατάσταση του χλωρίου από ανιλίνη ή κυκλοεξυλαμίνη, αναγωγή, χλωρακετυλίωση και επίδραση της εκάστοτε κατάλληλης αμίνης. Για συγκριτικούς λόγους συντέθηκαν και ορισμένα παράγωγα ουρίας, που αναμένεται ότι θα βιοθήσουν στην αξιολόγηση των σχέσεων δομής-δράσης. Τα νέα παράγωγα πρόκειται να δοκιμασθούν ως αναστολείς κυτταρικών κινασών.

## ABSTRACT

### New Pyrazolopyridines as Potential Kinase Inhibitors

Cancer is currently considered responsible for many deaths worldwide. Conventional chemotherapy, although directed toward certain macromolecules or enzymes, typically does not discriminate effectively between rapidly divided normal and cancer cells, thus leading to several toxic side effects. Tumor responses are usually partial and brief, due to the development of multidrug resistance. In contrast, targeted therapies, which interfere with estimated molecular targets related to carcinogenesis became possible during the last years, due to the scientific and technological progress. The continuous investigation in order to discover new anticancer drugs has focused on the design and synthesis of protein kinase inhibitors, as aberrant kinase activity has been observed in many diseases, including cancer. Protein kinases catalyze protein biophosphorylation, an important post-translational modification triggered in response to extracellular signals, which represent a universal mechanism for the control of fundamental cellular processes, including metabolic pathways, cell growth, division and differentiation. Small molecules which inhibit protein kinases, have been approved or are in clinical trials, and among them adenosine analogues Olomoucine, Roscovitine and Purvalanol, together with a number of aza- and deaza- purine derivatives compete with the conserved ATP binding site. Based on the structure-activity relationship studies and crystal structure data of the more potent derivatives, new compounds are being developed via chemical modifications of the purine scaffold.

Based on the above mentioned considerations we describe in this study the design and synthesis of some new substituted pyrazolo[3,4-*c*]pyridines. The new derivatives possess a 1-methyl group or hydrogen at position 1, a 7-aryl or alkylamino side chain, as well as a variety of 3-aminoalkyl substituents. The compounds were prepared using 2-amino-4-methylpyridine as starting material, which in a few steps led to 3-acetamido-2-chloro-4-methylpyridine. Then, through diazotation, ring closure and nitration the above mentioned pyridine was converted to the corresponding 7-chloro-3-nitro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine. This analogue was used as a common synthetic intermediate which upon substitution, reduction and chloroacetylation provided the route for the synthesis of the aminosubstituted derivatives. Moreover, we prepared certain urea substituted pyrazolo[3,4-*c*]pyridine derivatives for further comparative pharmacological evaluation. The aim of the project is to study the new derivatives against a panel of kinases and extract structure-activity relationships concerning this scaffold.

# I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## I.1 Πρόλογος

Σήμερα, η προσπάθεια για ανακάλυψη νέων μέσων ίασης διαφόρων ασθενειών είναι εντατικότερη από ποτέ. Τα εργαλεία για τη συλλογή γνώσης είναι πολύ περισσότερα από παλαιότερα με αποτέλεσμα τη βαθειά κατανόηση της λειτουργίας των ασθενειών τόσο σε κυτταρικό, όσο και σε μοριακό επίπεδο. Η Φαρμακευτική Χημεία, η Φαρμακολογία και ευρύτερα οι Βιολογικές Επιστήμες έχουν συμβάλλει αποφασιστικά στις προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων.<sup>1</sup> Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη νέων συνθετικών μεθόδων, η φαρμακολογική αξιολόγηση των νέων ενώσεων, η εξαγωγή ποσοτικών και ποιοτικών σχέσεων δομής-δράσης και η συνεχής μελέτη και ο εμπλουτισμός των θεραπευτικών στόχων αποτελούν βήματα της βασικής έρευνας για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ενώσεων. Παρόλα αυτά, περιορισμένος αριθμός από τις νέες ενώσεις εισέρχονται στις χρονοβόρες φάσεις των κλινικών μελετών. Η πρόοδος της τεχνολογίας με την ανάπτυξη του μοριακού μοντελισμού και της μοριακής προσομοίωσης έχει περιορίσει σημαντικά τον εξαιρετικά υψηλό αριθμό νέων ενώσεων. Αποτέλεσμα είναι η μείωση του χρόνου που απαιτείται για την ανακάλυψη μιας ένωσης-οδηγού από την οποία θα ξεκινήσει η ερευνητική δραστηριότητα.<sup>2</sup>

Όσον αφορά πολύπλοκες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, η ερευνητική δραστηριότητα των τελευταίων χρόνων κατάφερε να συγκεντρώσει πλήθος πληροφοριών σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο δρουν οι ασθένειες αυτές. Συγκεκριμένα, είναι πλέον γνωστοί οι μηχανισμοί που διαταράσσονται στα καρκινικά κύτταρα, έχουν εντοπιστεί τα υπεύθυνα γονίδια και συνεχώς μελετώνται φαρμακευτικές επεμβάσεις σε νέους θεραπευτικούς στόχους με σκοπό την πολύπλευρη αντιμετώπιση του καρκίνου.<sup>3</sup> Ένας από τους θεραπευτικούς στόχους που μελετάται έντονα σήμερα είναι οι πρωτεΐνικές κινάσες. Συγκεκριμένα, αναπτύσσονται νέες ενώσεις με ανασταλτική δράση επί των εν λόγω ενζύμων.

## I.2 Πρωτεΐνικές Κινάσες-ορισμός και είδη

Μετά το τέλος της διαδικασίας της μετάφρασης του ώριμου m-RNA οι πρωτεΐνες που έχουν συντεθεί, εισέρχονται σε διαδικασίες ελέγχου σχετικά με τη λειτουργικότητα και τη δραστικότητά τους. Είναι προφανές ότι αν μία ή περισσότερες πρωτεΐνες δεν έχουν την αναμενόμενη δομή ή/και δεν είναι

λειτουργικές, οι κυτταρικές λειτουργίες διαταράσσονται. Οι διαδικασίες ελέγχου ρυθμίζονται από το ίδιο το κύτταρο και είναι ζωτικής σημασίας για τη μετέπειτα ζωή του. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες υφίστανται δομικές τροποποιήσεις σε επίπεδο αμινοξέων. Οι διαδικασίες αυτές που ακολουθούν τη μετάφραση καλούνται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Μία εκ των πλέον σημαντικών μετα-μεταφραστικών διεργασιών είναι οι αντιδράσεις της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών. Η πρώτη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική διαίρεση, ο μεταβολισμός, η διαφοροποίηση, η κυτταρική απόπτωση, η επιβίωση και η αγγειογένεση και καταλύνεται από συγκεκριμένα ένζυμα που καλούνται πρωτεϊνικές κινάσες. Η αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης καταλύνεται από άλλα ένζυμα που καλούνται πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Οι πρωτεϊνικές κινάσες καταλύνουν τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο-δότη (ATP ή GTP) σε υδροξύλιο-δέκτη του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Το υπόστρωμα ποικίλει και μπορεί να είναι πρωτεΐνες, ένζυμα μεταβολισμού και κινάσες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Κατά την εξέλιξη των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών με σκοπό τον έλεγχο της δραστικότητάς τους, λαμβάνει χώρα φωσφορυλίωση των υδροξυλίων των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη. Από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος ταυτοποιήθηκαν 518 πρωτεϊνικές κινάσες που λαμβάνουν μέρος στον έλεγχο όλων των πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών.<sup>4</sup> Οι πρωτεϊνικές κινάσες υποδιαιρούνται σε δύο μεγάλες ομάδες ανάλογα με το ποιο αμινοξύ φωσφορυλιώνουν κάθε φορά:

- α) τις κινάσες του αρωματικού υδροξυλίου της τυροσίνης (tyrosine kinases) που φωσφορυλιώνουν την τυροσίνη. Οι κινάσες αυτές ταυτοποιήθηκαν πρώτες και έχουν περιγραφεί λεπτομερώς.<sup>5</sup>
- β) τις κινάσες του αλειφατικού υδροξυλίου σερίνης ή θρεονίνης (serine-threonine kinases) που φωσφορυλιώνουν τη σερίνη ή τη θρεονίνη.
- γ) Επιπλέον, υπάρχουν κινάσες μικτής λειτουργίας που πραγματοποιούν ταυτόχρονα και τις δύο φωσφορυλιώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Πρόσφατα, βρέθηκε ότι και οι κινάσες ιστιδίνης, που φωσφορυλιώνουν ένα ιμιδαζολικό άζωτο στην ιστιδίνη, είναι ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος.<sup>5,6</sup>

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

- α) υποδοχείς (receptors) (π.χ. EGFR, VEGFR, οι οποίοι συμμετέχουν στην αγγειογένεση, στην κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου).<sup>7</sup> Οι κινάσες αυτές είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και διαθέτουν μία εξωκυτταρική θέση πρόσδεσης,

στην οποία προσδένονται αυξητικοί παράγοντες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενδοκυτταρικού τους καταλυτικού τμήματος.

β) μη υποδοχείς (non-receptors) (π.χ. Abl, Src, JAKs). Παρουσιάζουν δομικές διαφοροποιήσεις από τους υποδοχείς καθώς δεν διαθέτουν εξωκυτταρική θέση πρόσδεσης και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και λαμβάνουν μηνύματα από τις κινάσες-υποδοχείς καθώς και από άλλους υποδοχείς, όπως οι συζευγμένοι υποδοχείς με G-πρωτεΐνες και οι υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων.<sup>6</sup>

Οι κινάσες που είναι υποδοχείς ή μη υποδοχείς είναι ως επί το πλείστον κινάσες τυροσίνης. Η δραστικότητα των ενζύμων αυτών υπόκειται σε κυτταρικό έλεγχο. Αυτό δηλώνει ότι κύτταρα τα οποία δεν πολλαπλασιάζονται, έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών στην τυροσίνη.<sup>7</sup>

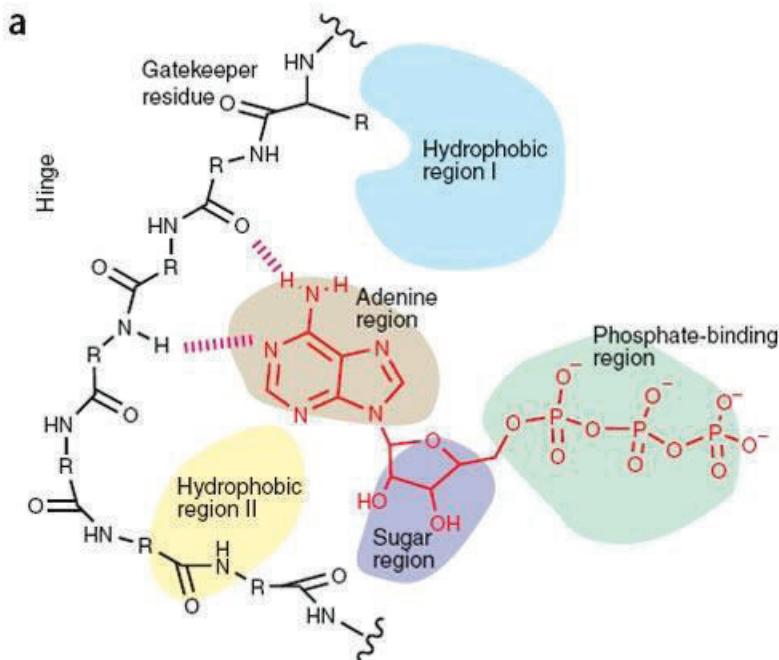
γ) μεταγωγείς σήματος (π.χ. MAPKs). Ενεργοποιούνται ως απόκριση σε κυτταρικά ερεθίσματα και στη συνέχεια ενεργοποιούν διαδικασίες κυτταρικών μηνυμάτων. Συγκεκριμένα, οι MAPKs που αναφέρθηκαν σαν παράδειγμα, ενεργοποιούνται από μιτογόνα μηνύματα.<sup>6</sup>

δ) κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs). Μετά τη λήψη μηνυμάτων για την έναρξη της διαδικασίας της μίτωσης, τα κύτταρα εισέρχονται στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, η φυσιολογική εξέλιξη του οποίου ρυθμίζεται από τις κινάσες αυτές. Η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ελέγχεται και από άλλα είδη κινασών, όπως οι Aurora, Plk-1, Bub1, BubR1, Mps1, Nek, καθώς και οι κινάσες Chk1 και 2 που ρυθμίζουν το σημείο ελέγχου της μιτωτικής διαδικασίας.<sup>7</sup>

### I.3 Δομή και λειτουργία του ενεργού κέντρου

Όλες οι πρωτεΐνικές κινάσες των ευκαρυωτικών κυττάρων διαθέτουν ένα γενετικά διατηρημένο καταλυτικό κέντρο. Η δομή του αποδόθηκε, αρχικά, για την κυκλική AMP-εξαρτώμενη κινάση. Οι κρυσταλλικές δομές που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα έχουν συμβάλλει τα μέγιστα στην εμπεριστατωμένη κατανόηση της δομής και της λειτουργίας του ενεργού κέντρου. Συγκεκριμένα, διαθέτει μία αμινοτελική και μία καρβοξυτελική περιοχή, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλη δομική πολυπλοκότητα. Συγκεκριμένα, η αμινοτελική περιοχή αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και μία α-έλικα, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή αποτελείται μόνο από α-έλικες. Οι δύο περιοχές της κινάσης συνδέονται μέσω ενός ευκίνητου πολυπεπτιδικού τμήματος που λειτουργεί σαν άρθρωση γύρω από την οποία οι δύο περιοχές περιστρέφονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη. Πρέπει να αναφερθεί ότι η περιστροφή αυτή δεν επηρεάζει τη δευτεροταγή δομή του

ενζύμου και λαμβάνει χώρα κατά την πρόσδεση του υποστρώματος της κινάσης και της τριφωσφορικής αδενοσίνης που δρα ως δότης της φωσφορικής ομάδας για να είναι δυνατή στη συνέχεια η αντίδραση της φωσφορυλίωσης από την κινάση.<sup>6</sup>



**Εικόνα I.1** Τυπική εικόνα της θέσης πρόσδεσης του ATP μεταξύ της αμινοτελικής και καρβοξυτελικής περιοχής της κινάσης

Το ATP συνδέεται σε μία στενή υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου. Η περιοχή αυτή βρίσκεται στο κεντρικό αρθρωτό τμήμα του ενζύμου και διαθέτει ένα αμινοξύ-δότη δεσμού υδρογόνου και δύο αμινοξέα-δέκτες δεσμού υδρογόνου.<sup>8</sup> Επομένως, κατά την πρόσδεση του ATP αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της αδενίνης και των απέναντι αμινοξέων του ενζύμου που βρίσκονται στο αρθρωτό τμήμα. Η ριβόζη διευθετείται στερεοχημικά προς την καρβοξυτελική περιοχή της κινάσης, στην οποία βρίσκεται η καταλυτική περιοχή του ενζύμου (catalytic loop). Στην καταλυτική περιοχή υπάρχει μία ομάδα τριών αμινοξέων (ασπαρτικό οξύ, φαινυλαλανίνη, γλυκίνη) που είναι η αλληλουχία ενεργοποίησης και είναι γνωστή ως DFG μοτίβο και είναι σημαντική για τη ρύθμιση της δραστικότητας της κινάσης. Οι ακραίες διαμορφώσεις της κινάσης είναι: α) η φωσφορυλιωμένη που είναι καταλυτικά ενεργή (DFG-in) και β) η μη φωσφορυλιωμένη που είναι καταλυτικά ανενεργή (DFG-out). Στη δεύτερη, η αλληλουχία ενεργοποίησης εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος καθώς η τριπλέτα των αμινοξέων περιστρέφεται εκτός του ενεργού κέντρου αφήνοντας μία κενή υδρόφοβη κοιλότητα. Το ασπαρτικό οξύ συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου με την τριφωσφορική ομάδα του ATP και είναι σημαντικό για τη μεταφορά της ομάδας.<sup>9,10</sup> Στην πραγματικότητα οι περισσότερες πρωτεΐνικές κινάσες φωσφορυλιώνονται, όπως αναφέρθηκε, στα αμινοξέα τυροσίνη, σερίνη, θρεονίνη που βρίσκονται σε έναν υδρόφιλο βρόγχο της

θέσης πρόσδεσης του ATP που ονομάζεται βρόγχος ενεργοποίησης (activation loop). Αποτέλεσμα αυτής της φωσφορυλίωσης είναι η ενεργοποίηση της κινάσης.

#### I.4 Η σχέση των πρωτεΐνικών κινασών με την καρκινογένεση

Σήμερα, είναι γνωστό ότι η λανθασμένη ενεργοποίηση των πρωτεΐνικών κινασών εμπλέκεται στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνικές κινάσες τυροσίνης παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη, καρκίνου αλλά και φλεγμονωδών καταστάσεων, όπως για παράδειγμα η εμφάνιση και η εξέλιξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Σχετικά με την καρκινογένεση, πολλά είδη καρκινικών όγκων οφείλονται σε δυσλειτουργία κινασών-υποδοχέων ή μη υποδοχέων. Συγκεκριμένα, υπερέκφραση ή/και ανεξέλεγκτη ενεργότητά τους μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές των μονοπατιών που σχετίζονται με τη μετάδοση του σήματος και τον κυτταρικό κύκλο με αποτέλεσμα την εμφάνιση καρκινογένεσης.<sup>6</sup>

Ένα γνωστό και διεξοδικά μελετημένο παράδειγμα είναι η περίπτωση της υβριδικής Bcr-Abl tyrosine κινάσης που είναι συνεχώς ενεργή και ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας στον άνθρωπο.<sup>41</sup> Η δημιουργία της κινάσης αυτής είναι αποτέλεσμα μίας χρωμοσωμικής μετατόπισης η οποία όμως διατηρεί την καταλυτική ιδιότητα του ενζύμου.<sup>7,11,12</sup> Συγκεκριμένα, στη νόσο αυτή παρατηρείται μία χρωμοσωμική ανωμαλία που ονομάζεται «χρωμόσωμα της Φιλαδέλφειας»<sup>45</sup> και χαρακτηρίζεται από αμοιβαία ανταλλαγή τμημάτων των χρωμοσωμάτων 8 και 22, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται δύο υβριδικά χρωμοσώματα. Αποτέλεσμα της ανωμαλίας αυτής είναι η σύντηξη της κινάσης σερίνης-θρεονίνης Bcr με την κινάση τυροσίνης Abl και ο σχηματισμός της υβριδικής κινάσης Bcr-Abl που προκαλεί μετάλλαξη στα πρόδρομα B-λεμφοκύτταρα, η οποία οδηγεί στην εμφάνιση λευχαιμίας. Επιπλέον, είναι γνωστή η περίπτωση του αγγειακού-ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) που προκαλεί αγγειογένεση και κατά συνέπεια αύξηση των μεγέθους των στερεών όγκων. Αυτή η διαταραχή οφείλεται σε υπερέκφραση της κινάσης ή σε παντελή απώλεια του ελέγχου έκφρασής της.<sup>13,14</sup> Επίσης, η υπερέκφραση του PDGFR έχει αναφερθεί ως η αιτία για πολλές μορφές καρκίνου στον άνθρωπο, όπως γλοιόματα, σαρκώματα, μελανώματα, καθώς επίσης και καρκίνους του μαστού, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, των οστών, του πνεύμονα και των ωθηκών. Ένα άλλο παράδειγμα υπερέκφρασης κινάσης που σχετίζεται με την καρκινογένεση είναι η περίπτωση του EGFR, όπου η υπερέκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε μορφές καρκίνου όπως το γλοιοβλάστωμα και ο καρκίνος του πνεύμονα. Η υπερέκφραση της κινάσης αυτής οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση και αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.<sup>7</sup>

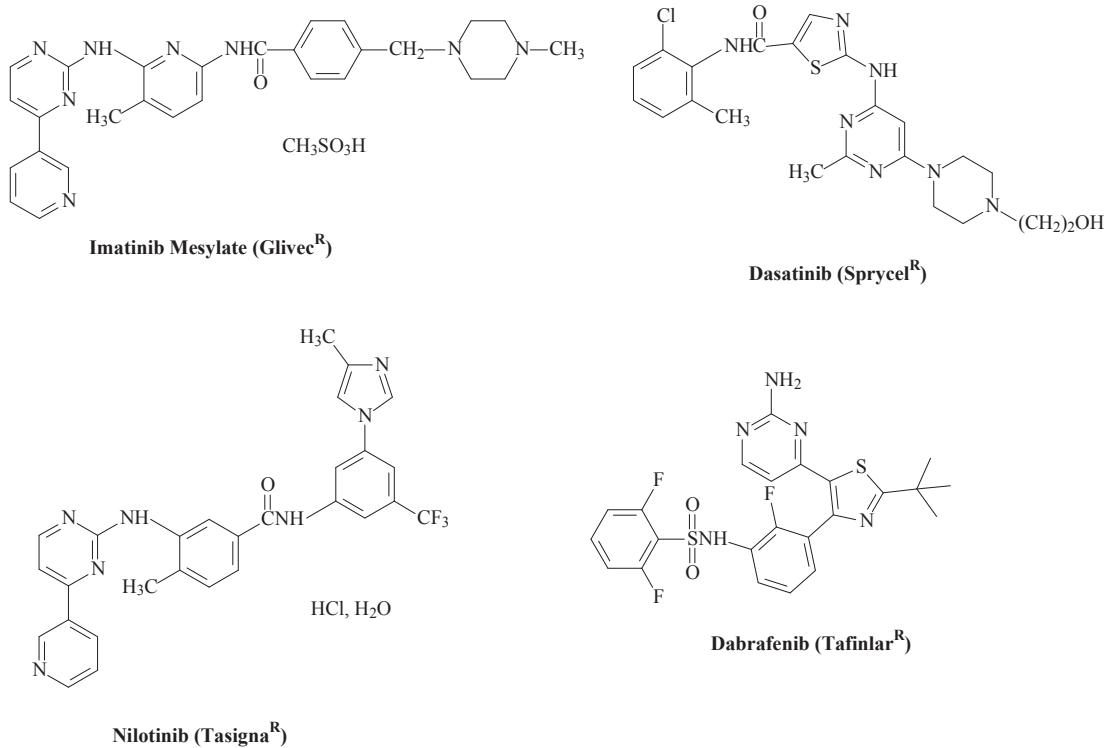
## I.5 Φάρμακα που δρουν ως αναστολείς των πρωτεΐνικών κινασών

Στα συμβατικά χημειοθεραπευτικά σχήματα χρησιμοποιούνται φάρμακα που προκαλούν βλάβες στο DNA ή αναστέλλουν τη σύνθεσή του ή παρεμβαίνουν στη λειτουργία της τουμπουλίνης. Δυστυχώς, τα φάρμακα αυτά δεν μπορούν να διακρίνουν τα καρκινικά από τα φυσιολογικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση των γνωστών σοβαρών παρενεργειών. Σήμερα, η ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων και η ανακάλυψη νέων κατηγοριών αντικαρκινικών φαρμάκων αποτελεί ένα άκρως ενδιαφέρον και αναπτυσσόμενο πεδίο της φαρμακευτικής έρευνας. Σχετικά με τις πρωτεΐνικές κινάσες ως θεραπευτικό στόχο στην αντικαρκινική θεραπεία, η ερευνητική προσπάθεια προσανατολίζεται στην ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων για τον εκάστοτε συνδυασμό κινασών που ευθύνεται για την εμφάνιση της νεοπλασίας.

Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι οι αναστολείς πρωτεΐνικών κινασών εμφανίζουν εκλεκτική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων με ταυτόχρονη μικρή τοξικότητα. Ως εκ τούτου, αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων. Όλα τα κλινικά δεδομένα υποστηρίζουν την άποψη ότι οι αναστολείς των πρωτεΐνικών κινασών χορηγούνται σε συνδυασμό με τους γνωστούς κυτταροτοξικούς παράγοντες προκειμένου να ενισχυθεί η αντικαρκινική δράση. Οι μέχρι σήμερα γνωστοί αναστολείς πρωτεΐνικών κινασών που έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας ως φάρμακα, προσομοιάζουν δομικά και δρουν ανταγωνιστικά ως προς το ATP και μη ανταγωνιστικά ως προς το υπόστρωμα της κινάσης.<sup>10,44</sup> Αυτό είναι πολύ λογικό αν σκεφτεί κανείς πως θεωρητικά ένας αναστολέας πρέπει να είναι δομικό ανάλογο του υπόστρωματος του ενζύμου, προκειμένου να δράσει ως ψευδές υπόστρωμα ή να είναι δομικό ανάλογο του ATP για να καταλάβει αντ' αυτού τη θέση πρόσδεσης. Επιπλέον, ένας αναστολέας μπορεί να δράσει μπλοκάροντας την κινάση στην ανενεργή διαμόρφωσή της.

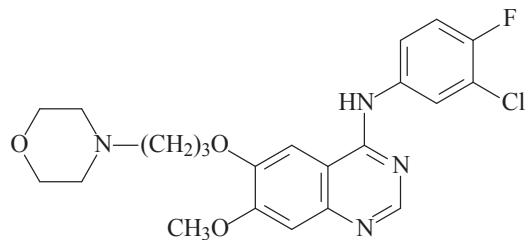
Οι αναστολείς των πρωτεΐνικών κινασών που είναι γνωστοί μέχρι σήμερα είναι τόσο φυσικά προϊόντα (π.χ. Ιντιρουμπίνη, Σταυροσπορίνη και ανάλογά τους, Φλαβοπιριδόλη, Βουτυρολακτόνη I)<sup>15-18</sup>, όσο και συνθετικά μόρια που ανταγωνίζονται το ATP στη θέση πρόσδεσης της κινάσης, καθώς και μονοκλωνικά αντισώματα.<sup>19,20,45</sup> Σχετικά με τα συνθετικά μόρια που δρουν ως ανταγωνιστές του ATP, οι χημικές ομάδες στις οποίες ανήκουν, ποικίλουν. Παρακάτω παρατίθενται οι δομές των φαρμάκων που έχουν πάρει έγκριση κυκλοφορίας, οι ενδείξεις και οι κινάσες που αναστέλλουν.<sup>21</sup>

α) Πυριμιδίνες

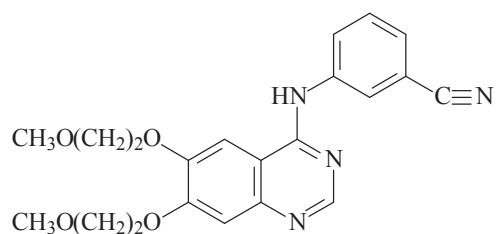


Τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν την Bcr-Abl υβριδική κινάση και χορηγούνται στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Η Μεθανοσουλφονική Ιματινίμπη αναστέλλει επίσης και τις PDGFR και c-Kit και χορηγείται και σε μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου. Η Ιματινίμπη ήταν ο πρώτος αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών που πήρε έγκριση κυκλοφορίας το 2001 και δρα μιμούμενη τη δομή του ATP.<sup>22,45</sup> Με τον τρόπο αυτό, σταθεροποιεί την ανενεργή διαμόρφωση του ενζύμου εμποδίζοντας την ενεργοποίηση και επομένως τη δράση του.<sup>23</sup> Κατά την πάροδο του χρόνου αναπτύχθηκε αντοχή στο φάρμακο με αποτέλεσμα να σχεδιαστούν νέες ενώσεις κατάλληλες για χορήγηση σε χρόνια μυελογενή λευχαιμία ανθεκτική στην Ιματινίμπη. Έτσι, σχεδιάστηκαν η Δαζατινίμπη και η Νιλοτινίμπη. Η Δαβραφενίμπη αναστέλλει τις κινάσες RAS και BRAF και συγχορηγείται με την Τραμετινίμπη σε μεταστατικό μελάνωμα. Η Τραμετινίμπη αναστέλλει τις κινάσες MEK και RAS. Η συγχορήγηση πραγματοποιείται όταν αναπτυχθεί αντοχή σε μονοθεραπεία με Δαβραφενίμπη. Η συγχορήγηση συμβάλλει στο να υπερκεραστεί η αντοχή που αναπτύσσει ο καρκινικός όγκος.<sup>24</sup>

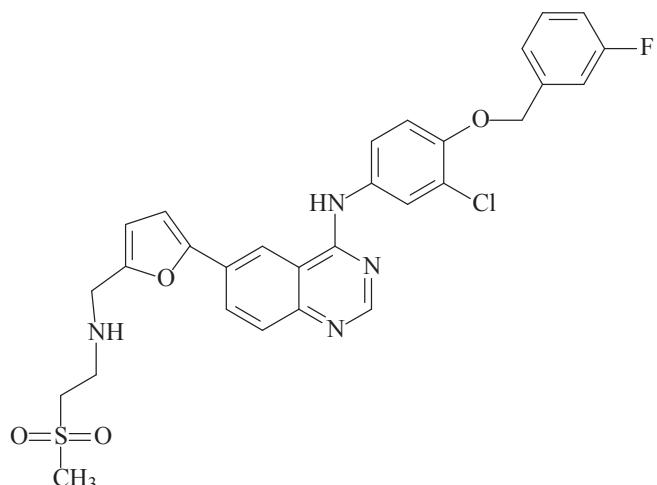
### β) Κιναζολίνες



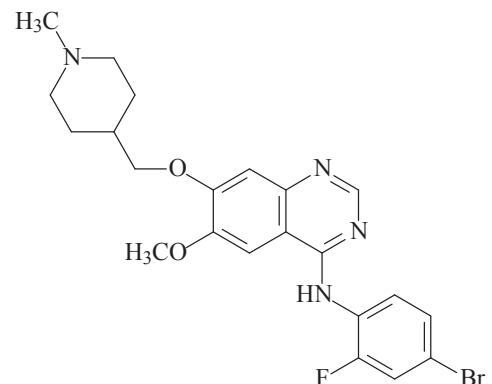
**Gefitinib (Iressa<sup>R</sup>)**



**Erlotinib (Tarceva<sup>R</sup>)**



**Lapatinib (Tyverb<sup>R</sup>)**

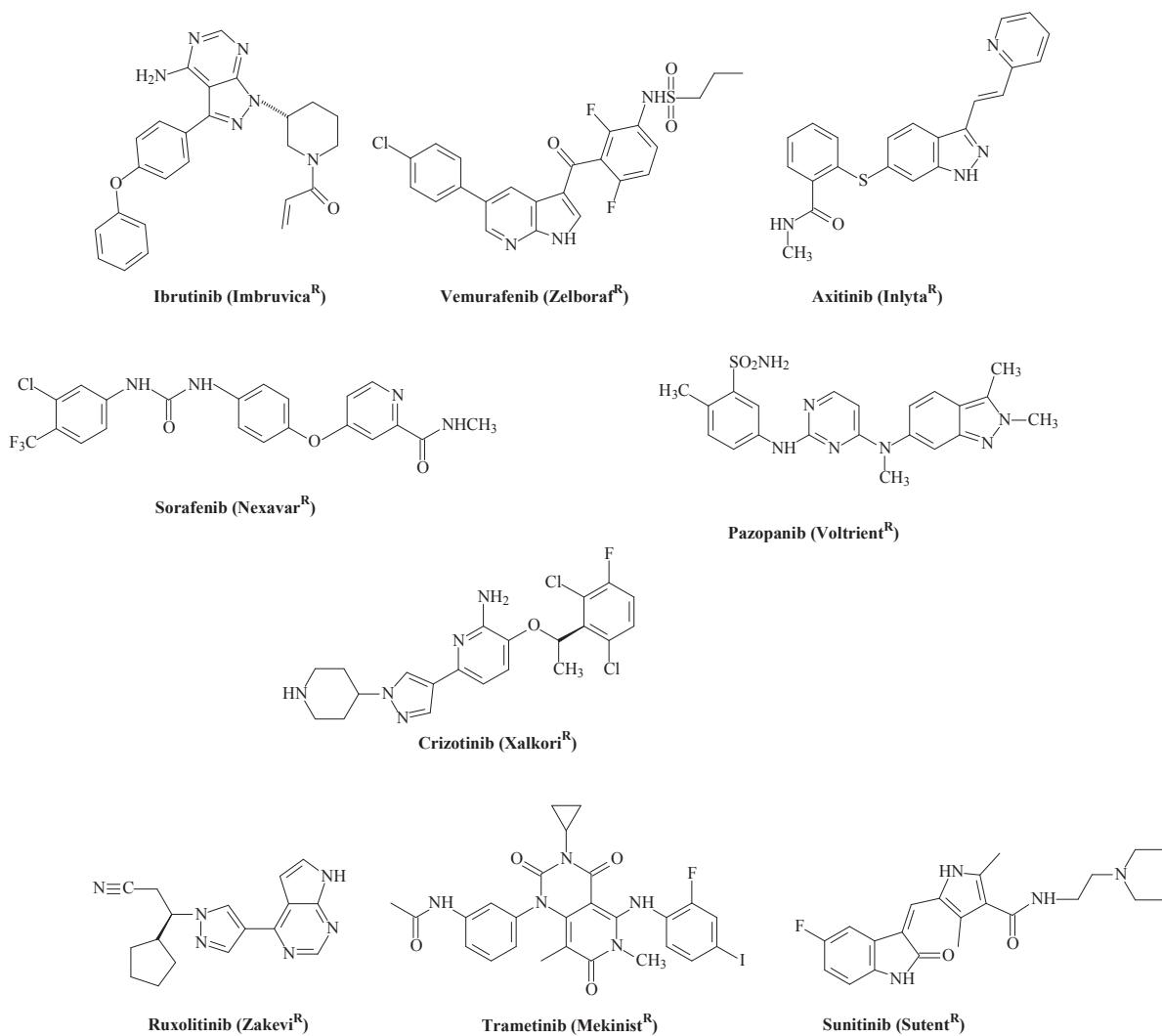


**Vandetanib (Caprelsa<sup>R</sup>)**

Τα φάρμακα αυτά αναστέλλουν τον EGFR. Η Ζεφιτινίμπη και η Ερλοτινίμπη χορηγούνται στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και στον καρκίνο του παγκρέατος.<sup>40,43</sup> Η Λαπατινίμπη χορηγείται στον καρκίνο του μαστού. Η Βαντετανίμπη αναστέλλει και τις κινάσες VEGFR2, RET, ErbB-1 και χορηγείται στον καρκίνο του θυρεοειδούς αδένα.

### γ) Φάρμακα ποικίλης δομής

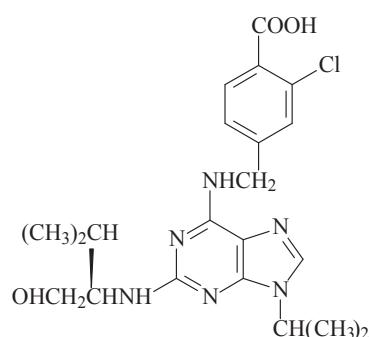
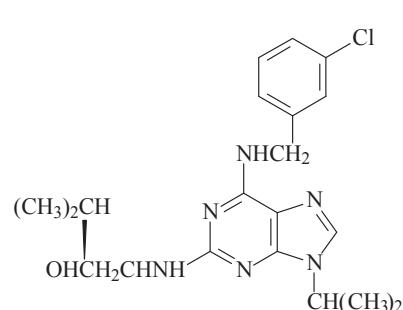
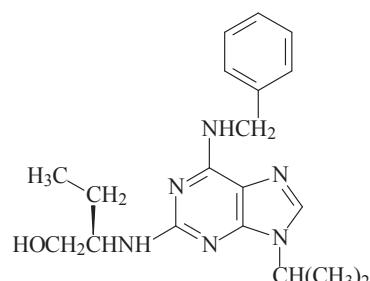
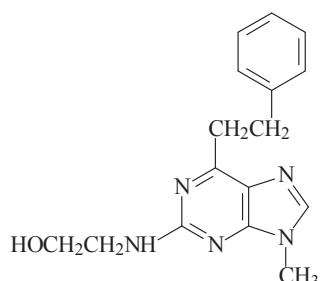
Πρόκειται για φάρμακα που περιέχουν στη δομή τους ποικιλία μονοκυκλικών ή δικυκλικών ετεροκυκλικών συστημάτων.



Οι Σουνιτινίμπη, Σοραφενίμπη, Παζοπανίμπη και Αξιτινίμπη αναστέλλουν τις κινάσες VEGFR, PDGFR και KIT και χορηγούνται σε καρκινώματα νεφρικών και ηπατικών κυττάρων, καθώς και σε καρκίνους του παγκρέατος και του παχέος εντέρου.<sup>42</sup> Η Κριζοτινίμπη αναστέλλει την κινάση ALK/c-MET και χορηγείται στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ενώ η Βεμουραφενίμπη αναστέλλει την κινάση b-RAF και χορηγείται στο μελάνωμα. Η Ρουξολιτινίμπη αναστέλλει τις κινάσες JAKs 1 και 2 και χορηγείται στη μυελοΐδωση. Η Ιβρουτινίμπη αναστέλλει την κινάση Brt και επάγει την απόπτωση των B-λεμφοκυττάρων. Χορηγείται σε χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία. Πρόκειται για καινούριο φάρμακο και ήδη μελετάται η συγχορήγησή της με μονοκλωνικά αντισώματα.<sup>25</sup>

## I.6 Σχεδιασμός και σύνθεση νέων πουρινικών αναλόγων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι πρωτεϊνικών κινασών

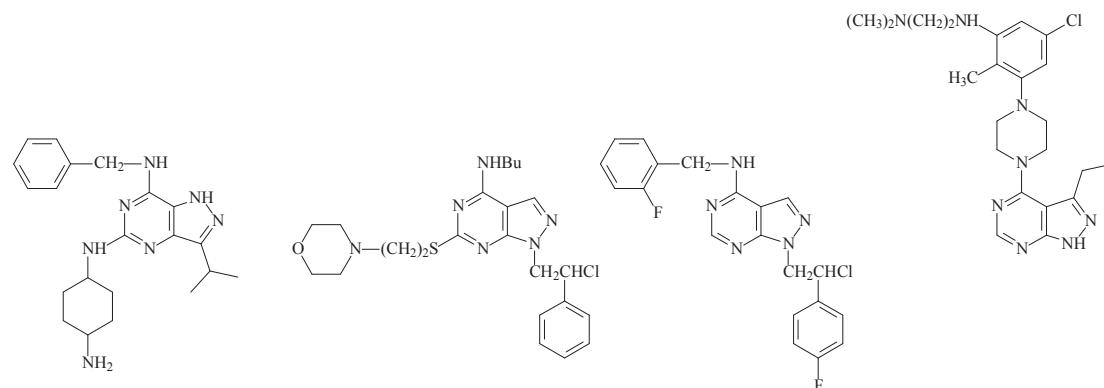
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αναστολείς των πρωτεϊνικών κινασών που χρησιμοποιούνται σήμερα στη θεραπευτική, μιμούνται και ανταγωνίζονται το ATP για τη θέση πρόσδεσης της κινάσης. Ήταν, επομένως, επακόλουθο να αναπτυχθεί μία τάση για την ανάπτυξη μικρών κατά προτίμηση μορίων που θα εμφανίζουν ανασταλτική δράση επί των πρωτεϊνικών κινασών και με δεδομένο το γεγονός ότι αυτή η ομάδα ενώσεων προσομοιάζουν το ATP, ήταν λογικό να έχουν ως βάση τον πουρινικό σκελετό. Παραδείγματα αποτελούν οι ενώσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα I.1, οι οποίες βρέθηκε ότι έχουν αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι ενός είδους κινασών που καλούνται κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (cyclin dependent kinases, CDKs).<sup>26,27</sup>



### Σχήμα I.1

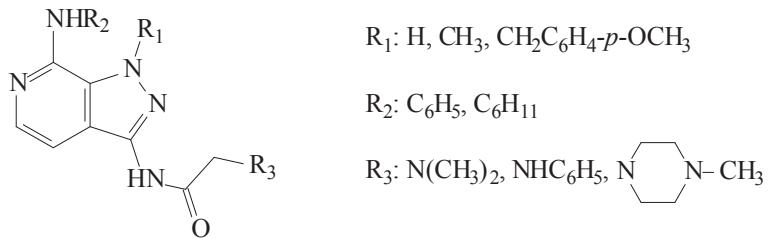
Επί σειρά ετών η ερευνητική δραστηριότητα προσανατολίζεται, βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων, σε χημικές παρεμβάσεις στον πουρινικό σκελετό και συγκεκριμένα στην αντικατάσταση αζώτου από άνθρακα ή/και το αντίθετο.

Αποτέλεσμα της προσπάθειας αυτής ήταν η ανάπτυξη πληθώρας νέων ενώσεων που εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι πολλών ειδών πρωτεΐνικών κινασών. Ανάλογες προσπάθειες έγιναν και για το σχεδιασμό νέων δομικών αναλόγων των ενώσεων που παρουσιάστηκαν στο Σχήμα I.1.<sup>28</sup> Ήδη έχουν συντεθεί υποκατεστημένα παράγωγα πυραζολοπυριμιδίνης ως αναστολείς πρωτεΐνικών κινασών παρουσιάζοντας αξιόλογα φαρμακολογικά αποτελέσματα.<sup>29,30</sup> Στο Σχήμα I.2 παρατίθενται παραδείγματα των εν λόγω παραγώγων της πυραζολοπυριμιδίνης.



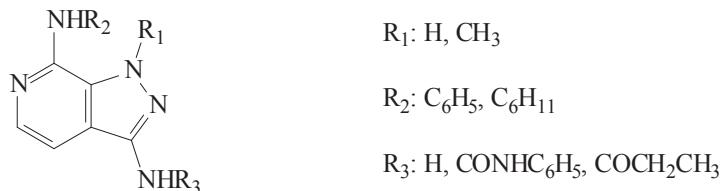
### **Σχήμα I.2**

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν υποκατεστημένες πυραζολο[3,4-c]πυριδίνες. Η επιλογή του είδους των υποκαταστατών βασίστηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα και στην εμπειρία της ερευνητικής μας ομάδας σχετικά με το σχεδιασμό και τη σύνθεση πουρινικών αναλόγων που παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι των CDKs. Στα πλαίσια της ερευνητικής μας προσπάθειας έχουμε συνθέσει κατά το παρελθόν πυραζολο[3,4-c]πυριδίνες που έφεραν αλκυλαμινο- ή αρυλαμινο- υποκαταστάτες στις θέσεις 3 και 5. Τα πρώτα αποτελέσματα της φαρμακολογικής αξιολόγησης έδειξαν ότι διαθέτουν ενδιαφέρουσα ανασταλτική δράση έναντι κάποιων CDKs σε λευχαιμικές κυτταρικές σειρές. Ως συνέχεια των προηγούμενων μελετών αποφασίσαμε να συνθέσουμε, κατ' αντιστοιχία με τις ενώσεις που έχουν παρασκευαστεί κατά το παρελθόν, πυραζολο[3,4-c]πυριδίνες που φέρουν μεθύλιο στη θέση 1 ή δεν έχουν υποκαταστάτη στη θέση 1 καθώς επίσης και αρυλαμινο- ή αλκυλαμινο- ομάδα στη θέση 7, ενώ διαφοροποιούνται στη θέση 3, όπου φέρουν κατάλληλες αμινικές αλυσίδες (Σχήμα I.3).



### Σχήμα I.3

Επιπλέον, συνθέσαμε ορισμένες επιλεγμένες υποκατεστημένες πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνες για περαιτέρω συγκριτική φαρμακολογική αξιολόγηση-μελέτη, συγκεκριμένα, μια *N,N'*-δις υποκατεστημένη ουρία, ένα προπαναμίδιο και μια διαμίνη (Σχήμα I.4). Η φαρμακολογική αξιολόγηση των παραγώγων αυτών, σε αντιπαραβολή με τα όσα ήδη γνωρίζουμε, θα μας βοηθήσει να εξάγουμε πληρέστερες σχέσεις δομής-δράσης σχετικά με αυτή την ομάδα ενώσεων.



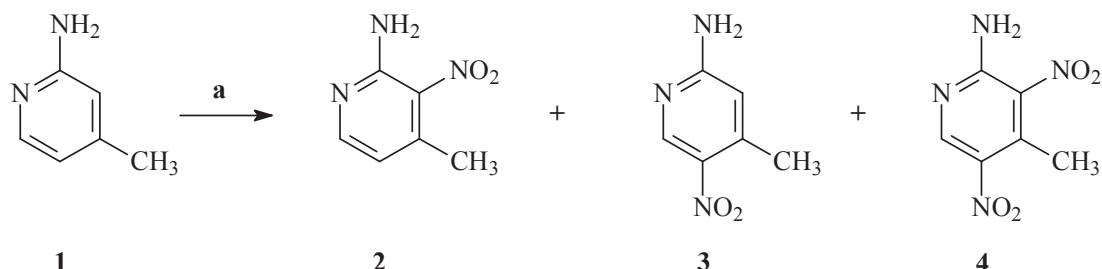
### Σχήμα I.4

## II. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### II.1 Συνθετική πορεία

#### II.1.1 Σύνθεση της 7-χλωρο-3-νιτρο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνης (**10**) και των *N*<sup>1</sup>- και *N*<sup>2</sup>-μεθυλοπαραγώγων της (**11** και **12**)

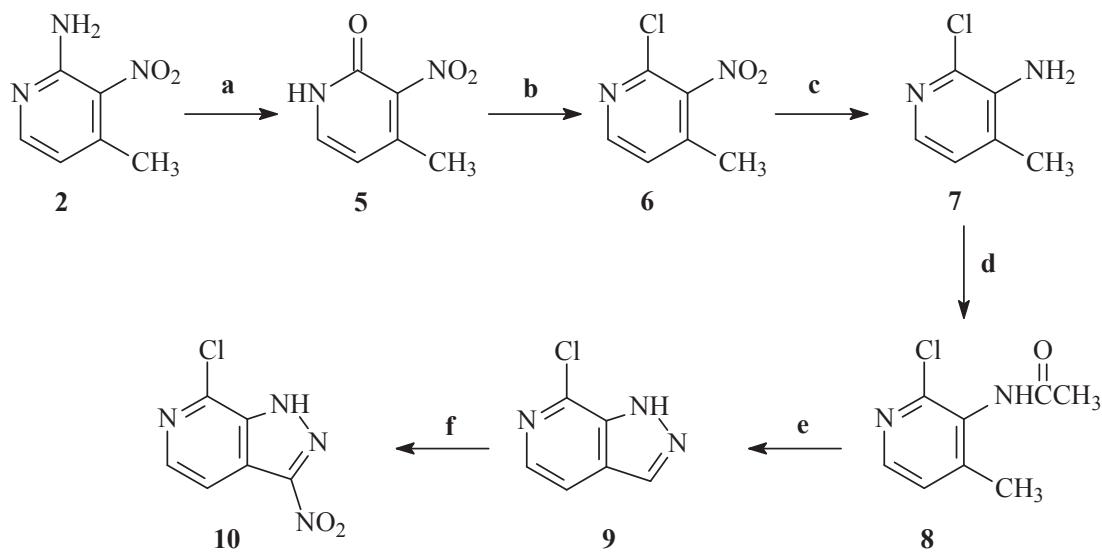
Για τη σύνθεση των ανωτέρω παραγώγων χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 2-αμινο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (**2**), η οποία συντέθηκε με νίτρωση της 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνης (**1**) (Σχήμα II.1). Από την αντίδραση αυτή λήφθηκε μίγμα των τριών δυνατών νιτροπαραγώγων,<sup>31</sup> τα οποία διαχωρίστηκαν αρχικά μέσω κατεργασίας με θερμό διχλωρομεθάνιο, όπου διαλύεται το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγώγου **2**, ενώ στη συνέχεια ο πλήρης διαχωρισμός των τριών ισομερών έγινε χρωματογραφικά και η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR.



a) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%, HNO<sub>3</sub> 65%, 60 °C, 20 hrs

#### Σχήμα II.1

Επίδραση νιτρώδους νατρίου στη 2-αμινο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (**2**) οδήγησε στην πυριδινόνη **5**<sup>38</sup> (Σχήμα II.2), η οποία αντέδρασε με οξυχλωριούχο φώσφορο και παρελήφθη η 2-χλωρο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (**6**).<sup>39</sup> Κατόπιν, έγινε αναγωγή της νιτρομάδας με διχλωριούχο κασσίτερο και ακετυλίωση του σχηματιζόμενου αμινοπαραγώγου **7** με οξικό ανυδρίτη, οπότε παρελήφθη το ακεταμίδιο **8**. Ακολούθησε αντίδραση διαζώτωσης και ενδομοριακής κύκλωσης<sup>36</sup> του ακεταμίδιου, που οδήγησε στη λήψη της 7-χλωροπυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνης (**9**), ενώ στη συνέχεια το συμπυκνωμένο ετεροκυκλικό σύστημα νιτρώθηκε<sup>37</sup> και παραλήφθηκε το νιτροπαράγωγο **10**.

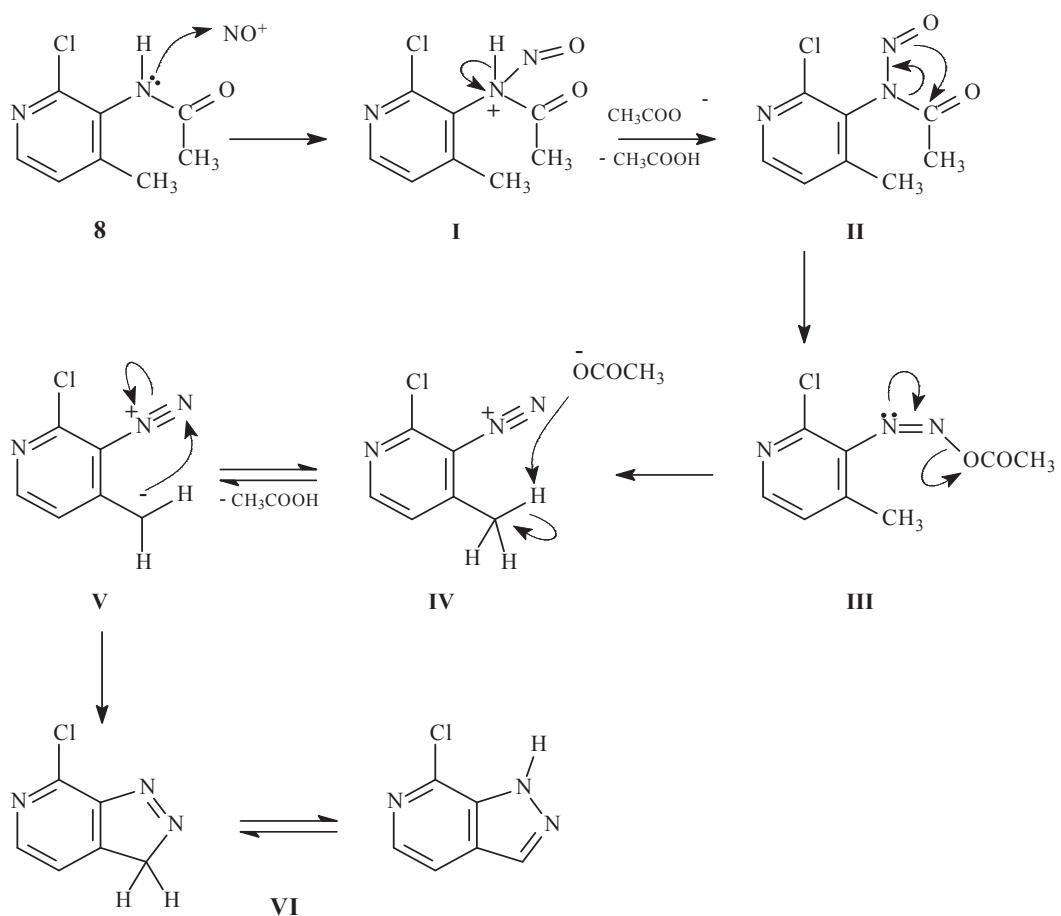


a)  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$  (1/10), r.t., 2 hrs b)  $\text{POCl}_3$ ,  $110^\circ\text{C}$ , 3 hrs c)  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{HCl}$  36%,  $50^\circ\text{C}$ , 15 min

d)  $\text{Ac}_2\text{O}$ , r.t., 72 hrs e)  $\text{AcOK}$ , isoamyl nitrite, toluene dry, Ar,  $95^\circ\text{C}$ , 12 hrs f)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96%,  $\text{HNO}_3$  65%,  $95^\circ\text{C}$ , 1 hr

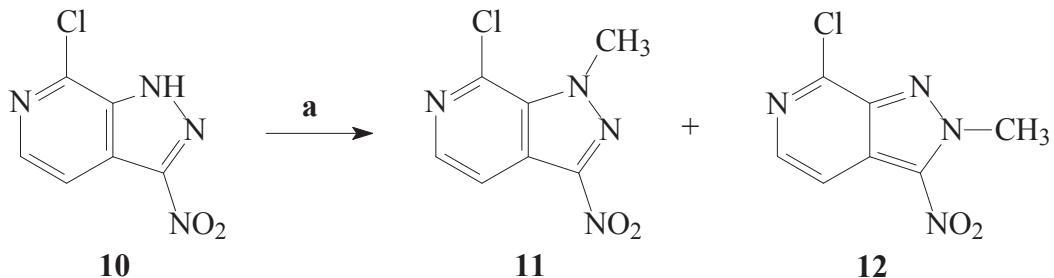
## Σχήμα II.2

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



**Σχήμα II.3 Μηχανισμός της αντίδρασης ενδομοριακής κύκλωσης**

Στη συνέχεια, από την πυραζολοπυριδίνη **10** με επίδραση μεθυλοϊωδιδίου παρουσία ανθρακικού καλίου ελήφθησαν τα μεθυλοπαράγωγα **11** και **12** (Σχήμα II.4). Η απομόνωση των προϊόντων της παραπάνω αντίδρασης από το αντίστοιχο μίγμα πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης και η δομή τους διαπιστώθηκε με τη χρήση φασμάτων NMR (Φάσματα Ετεροπυρηνικής Σύζευξης  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , όπου για το ισομερές **12** φαίνεται η σύζευξη των πρωτονίων της 2-μεθυλομάδας με τον C-3, ενώ σχετικά με το ισομερές **11**, φαίνεται η σύζευξη των πρωτονίων της 1-μεθυλομάδας με τον C-7).



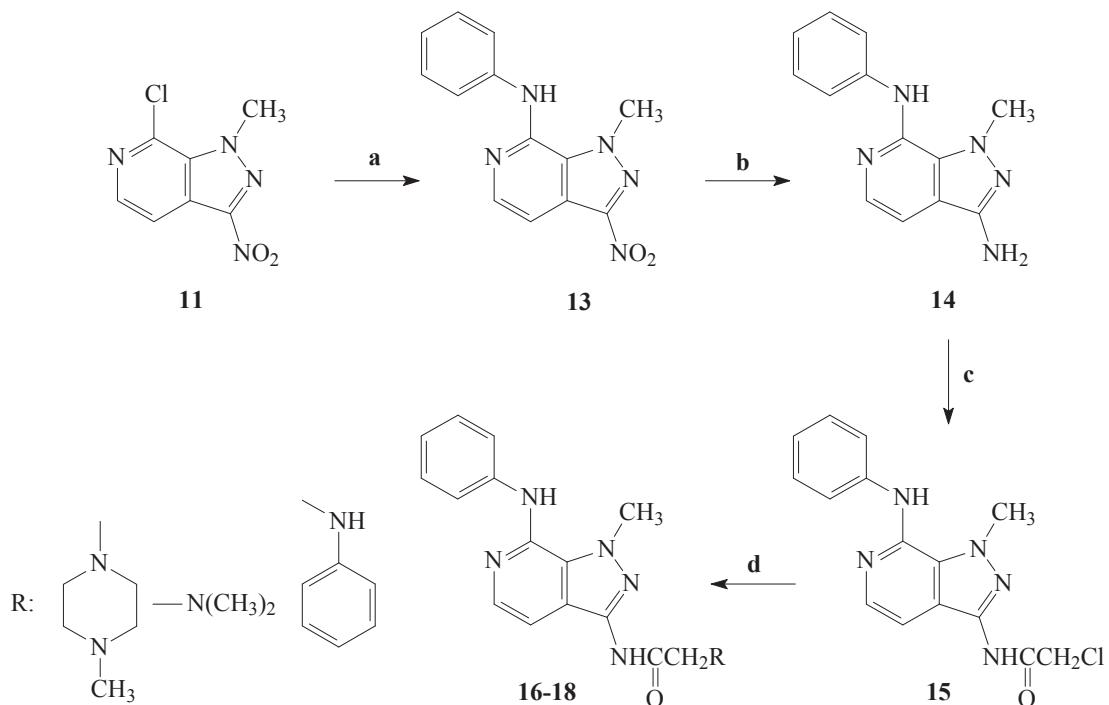
a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{I}$ , acetonitrile dry, Ar,  $50^\circ\text{C}$ , 5 hrs

### *Σχήμα II.4*

**II.1.2 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 7-φαινυλαμινο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνης (16-18) και της 7-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνης (25-26)**

Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των μεθυλιωμένων επί του πυραζόλιου παραγώγων χρησιμοποιήθηκε η 7-χλωρο-1-μεθυλο-3-νιτροπυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνη (**11**), ενώ τα αντίστοιχα μη υποκατεστημένα επί του πυραζόλιου παράγωγα παρασκευάστηκαν από την 7-χλωρο-3-νιτρο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνη (**10**) (Σχήμα II.5 και Σχήμα II.6 αντίστοιχα).

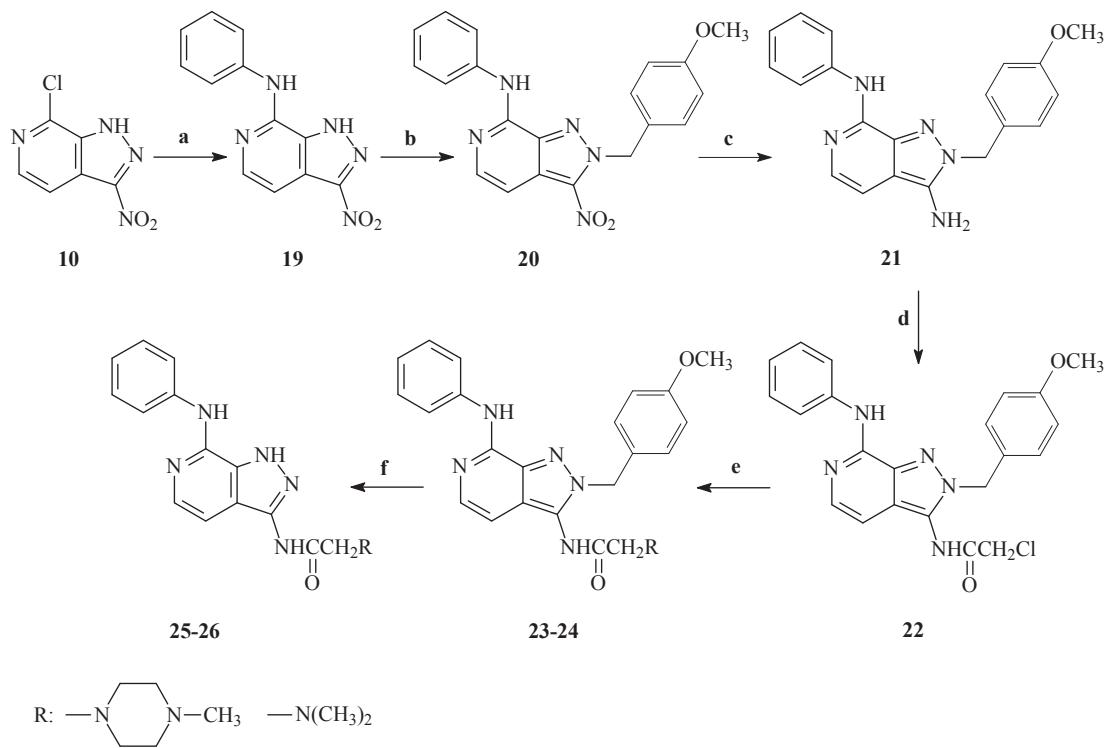
Τα  $N^1$ -μεθυλοπαράγωγα παρασκευάστηκαν με πυρηνόφιλη προσβολή ανιλίνης επί του 7-χλωρίου του νιτροπαραγώγου **11** που οδήγησε στο παράγωγο **13** (Σχήμα II.5). Ακολούθησε αναγωγή της νιτρομάδας με καταλυτική υδρογόνωση και παρελήφθη το αμινοπαράγωγο **14** επί του οποίου επέδρασε χλωρακετυλοχλωρίδιο παρουσία τριαιθυλαμίνης και παρελήφθη το χλωρακεταμίδιο **15**. Από το χλωρακεταμίδιο με επίδραση  $N$ -μεθυλοπιπεραζίνης, διμεθυλαμίνης ή ανιλίνης παρασκευάστηκαν τα παράγωγα **16-18** αντίστοιχα.



a) aniline, 2-ethoxyethanol, Ar, 130 °C, 3 hrs b) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH abs., 55 psi, r.t., 3 hrs  
 c) chloroacetyl chloride, Et<sub>3</sub>N, THF dry, r.t., 1 hr d) **16**: *N*-methylpiperazine, EtOH abs., reflux, 2 hrs  
**17**: dimethylamine (5.6M in EtOH), EtOH abs., reflux, 3 hrs **18**: aniline, EtOH abs., reflux, 4 hrs

## Σχήμα II.5

Τα αντίστοιχα με τα **16-18** 3,7-δις υποκατεστημένα παράγωγα της πυραζολοπυριδίνης **25-26** παρασκευάστηκαν με ανάλογη πορεία αλλά στην περίπτωση αυτή ήταν αναγκαία η προστασία του πυραζολικού υδρογόνου αφού, σε αντίθετη περίπτωση, κατά την αντίδραση της χλωρακετυλίωσης θα παραγόταν δις υποκατεστημένο προϊόν στις θέσεις 1 και 3. Έτσι, συντέθηκε αρχικά το 7-υποκατεστημένο παράγωγο **19** (Σχήμα II.6). Επιλέχθηκε ως προστατευτική ομάδα η 4-μεθοξυβενζυλομάδα, η οποία εισήχθη μετά από επίδραση 4-μεθοξυβενζυλοχλωριδίου παρουσία ανθρακικού καλίου και λήφθηκε το παράγωγο **20**. Πρέπει να σημειωθεί ότι, σε αντίθεση με τα μεθυλοπαράγωγα **11** και **12**, δεν παρελήφθη το αντίστοιχο 1-ισομερές πιθανώς λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από τον ογκώδη 7-υποκαταστάτη. Η πέραν αμφισβήτησης απόδειξη της θέσης βενζυλίωσης έγινε με λήψη φάσματος NOESY-NMR στο παράγωγο **23** που έπεται στη συνθετική πορεία. Μετά από αναγωγή της νιτρομάδας και χλωρακετυλίωση, επέδρασαν στο παράγωγο **22** *N*-μεθυλοπιπεραζίνη και διμεθυλαμίνη και παρελήφθησαν τα ακεταμίδια **23-24**. Τέλος, η επίδραση τριφθοροξικού οξέος στα **23-24** είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας και την παραλαβή των 3-υποκατεστημένων 7-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών **25-26**.



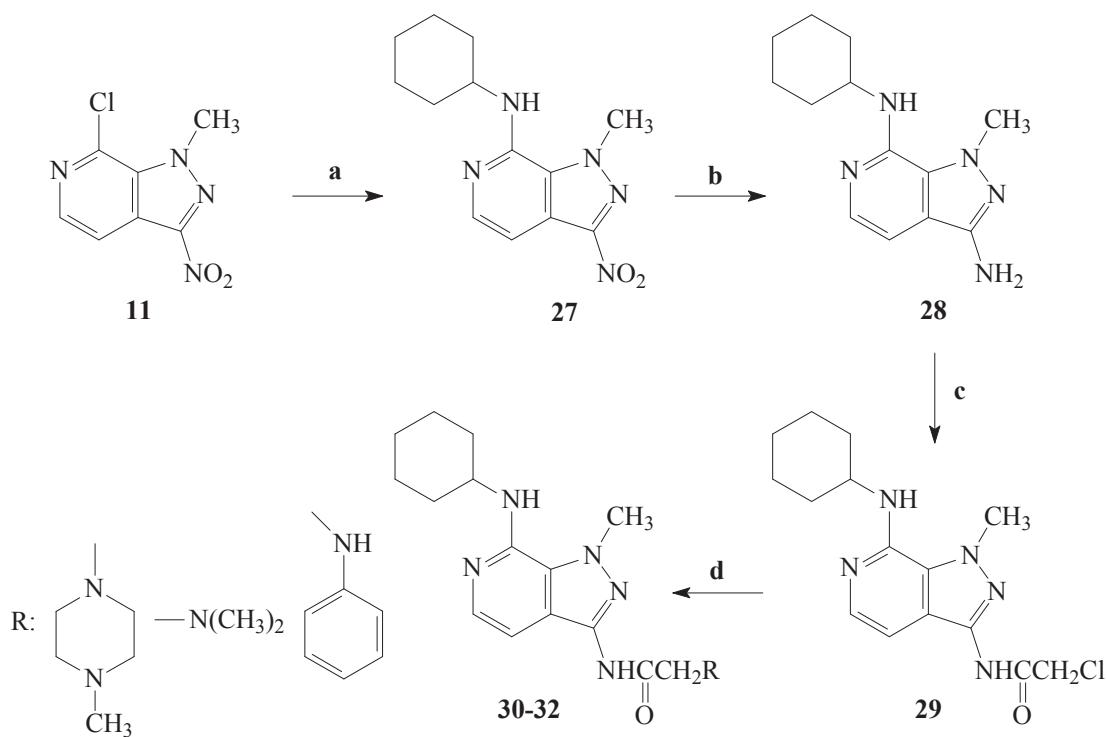
a) aniline, 1,4-dioxane, Ar, 100 °C, 12 hrs b)  $K_2CO_3$ , 4-methoxybenzyl chloride, acetonitrile dry, Ar, 50 °C, 24 hrs  
 c)  $H_2$ , Pd/C, EtOH abs., 55 psi, r.t., 5 hrs d) chloroacetyl chloride,  $Et_3N$ , THF dry, r.t., 5 hrs e) **23**: *N*-methylpiperazine, EtOH abs., reflux, 2 hrs **24**: dimethylamine (5.6M in EtOH), EtOH abs., reflux, 3 hrs f)  $CF_3CO_2H$ , 70 °C, 65-72 hrs

## *Σχήμα II.6*

### II.1.3 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 7-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**30-32**) και της 7-κυκλοεξυλαμινο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (**39**)

Ανάλογα με όσα παρουσιάστηκαν στο υποκεφάλαιο II.1.2, ως πρώτες ύλες για τη σύνθεση των παραπάνω μορίων χρησιμοποιήθηκαν η 7-χλωρο-1-μεθυλο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**11**) για τα μεθυλοπαράγωγα (Σχήμα II.7) και η 7-χλωρο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**10**) για το μη υποκατεστημένο ανáλογό τους (Σχήμα II.8).

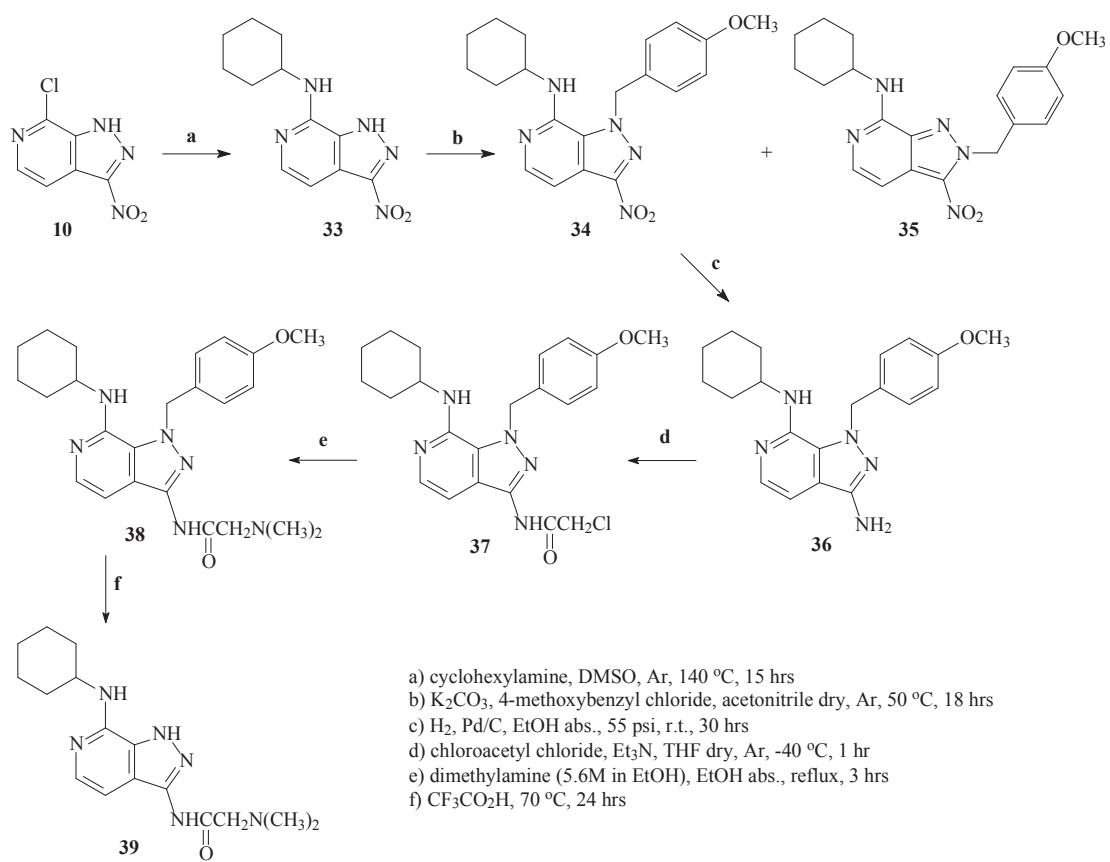
Τα 7-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλοπαράγωγα **30-32** (Σχήμα II.7) παρασκευάστηκαν από την πυραζολοπυριδίνη **11** με μέθοδο ανάλογη αυτής των 7-αρυλαμινοαναλόγων τους.



a) cyclohexylamine, DMSO, Ar, 140 °C, 2 hrs b) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH abs., 55 psi, r.t., 3 hrs  
 c) chloroacetyl chloride, Et<sub>3</sub>N, THF dry, Ar, -40 °C, 20 min d) **30**: *N*-methylpiperazine, EtOH abs., reflux, 2 hrs  
**31**: dimethylamine (5.6M in EtOH), EtOH abs., reflux, 3 hrs **32**: aniline, EtOH abs., reflux, 36 hrs

## Σχήμα II.7

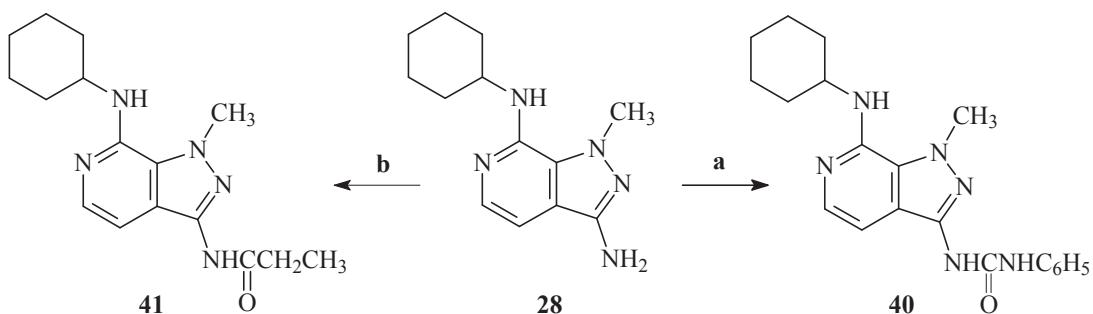
Το αντίστοιχο μη υποκατεστημένο επί του πυραζόλικου αζώτου παράγωγο συντέθηκε επίσης με ανάλογη μέθοδο, στην περίπτωση αυτή όμως είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι κατά την προστασία του πυραζόλικου αζώτου του νιτροπαραγώγου **33** λήφθηκαν και τα δύο ισομερή **34** και **35** (Σχήμα II.8). Φαίνεται δηλαδή ότι στο μόριο αυτό, η στερεοχημική παρεμπόδιση δεν παίζει καθοριστικό ρόλο, σε αντίθεση με το παράγωγο **20**. Τα δύο ισομερή προϊόντα διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά και ταυτοποιήθηκαν με λήψη φασμάτων NOESY-NMR. Επιλέχθηκε το ισομερές **34** και μετά από αναγωγή, χλωρακετυλίωση και επίδραση διμεθυλαμίνης παραλήφθηκε το παράγωγο **38** που μετά την αποπροστασία οδήγησε στο **39**.



### Σχήμα II.8

**II.1.4 Σύνθεση παραγώγων ουρίας των πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινών (40-41), για περαιτέρω συγκριτική φαρμακολογική αξιολόγηση και μελέτη**

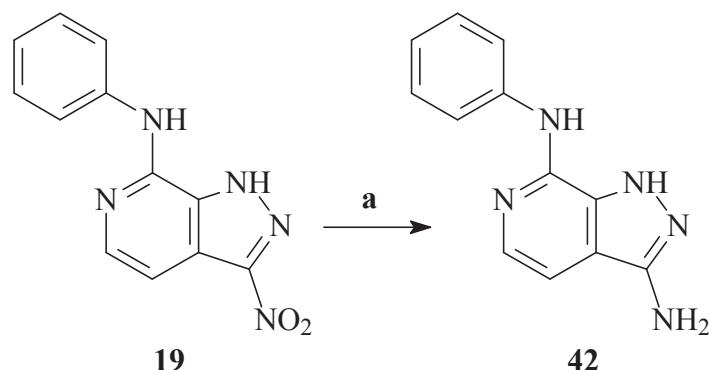
Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των παραγώγων **40** και **41** χρησιμοποιήθηκε η διαμίνη **28**. Έτσι, με επίδραση ισοκυανικού φαινυλεστέρα επί της αμινομάδας λήφθηκε η *N,N'*-δις υποκατεστημένη ουρία **40**, ενώ με επίδραση προπιονυλοχλωριδίου παρουσία τριαιθυλαμίνης λήφθηκε το προπαναμίδιο **41** (Σχήμα II.9).



a) phenyl isocyanate, THF dry, 50 °C, 18 hrs  
 b) propionyl chloride, Et<sub>3</sub>N, THF dry, Ar, -40 °C, 20 min

### Σχήμα II.9

Τέλος, για την πληρέστερη μελέτη των σχέσεων δομής-δράσης των μορίων που παρασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία, συντέθηκε και η αμίνη **42** (Σχήμα II.10) μετά από καταλυτική υδρογόνωση του νιτροπαραγώγου **19**.



a) H<sub>2</sub>, Pd/C, EtOH abs., 55 psi, r.t., 3 hrs

### Σχήμα II.10

## II.2 Φασματοσκοπική μελέτη των ενώσεων

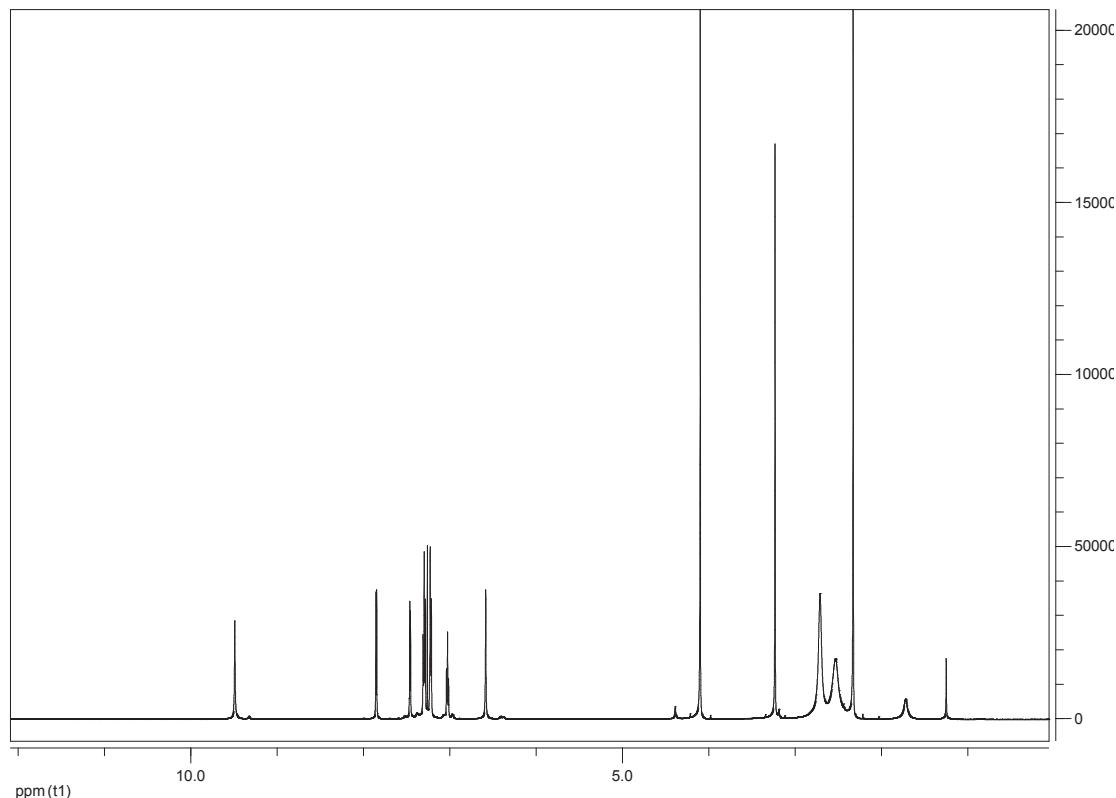
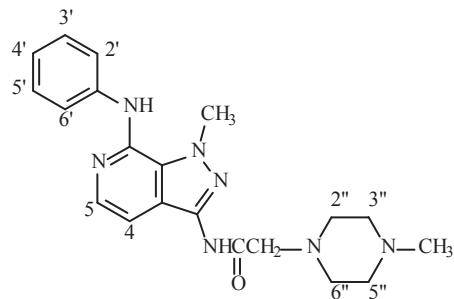
### II.2.1 Απόδοση των χημικών μετατοπίσεων στα φάσματα NMR

Οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C των παραγώγων αποδόθηκαν με τη βοήθεια των αντίστοιχων πειραμάτων 1D και 2D NMR <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C gHMQC, gHMBC και NOESY. Τα φάσματα NMR πραγματοποιήθηκαν στους 295 °K.

Παρακάτω αναλύονται ενδεικτικά φάσματα των παραγώγων που παρασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία.

Στην Εικόνα II.1 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του παραγώγου **16**. Στην αλειφατική περιοχή παρατηρούνται η απλή κορυφή του μεθυλίου της πιπεραζίνης (2.34 ppm), δύο ευρείες κορυφές των πιπεραζινικών μεθυλενίων H-3'', H-5'' (2.50-2.60 ppm) και H-2'', H-6'' (2.65-2.80 ppm), καθώς και οι απλές κορυφές του αμιδικού μεθυλενίου (3.23 ppm) και του πυραζολικού μεθυλίου (4.10 ppm).

Το -NH- της ανιλίνης εμφανίζεται ως ευρεία κορυφή (6.58 ppm), ενώ στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται οι χημικές μετατοπίσεις των H-4' (7.03 ppm, τριπλή κορυφή), H-2', H-6' (7.22 ppm, διπλή κορυφή), H-3', H-5' (7.30 ppm, τριπλή κορυφή), H-4 και H-5 (7.46 και 7.85 ppm, διπλές κορυφές). Τέλος, το ακεταμιδικό -NH- συντονίζεται ως ευρεία κορυφή στα 9.49 ppm.

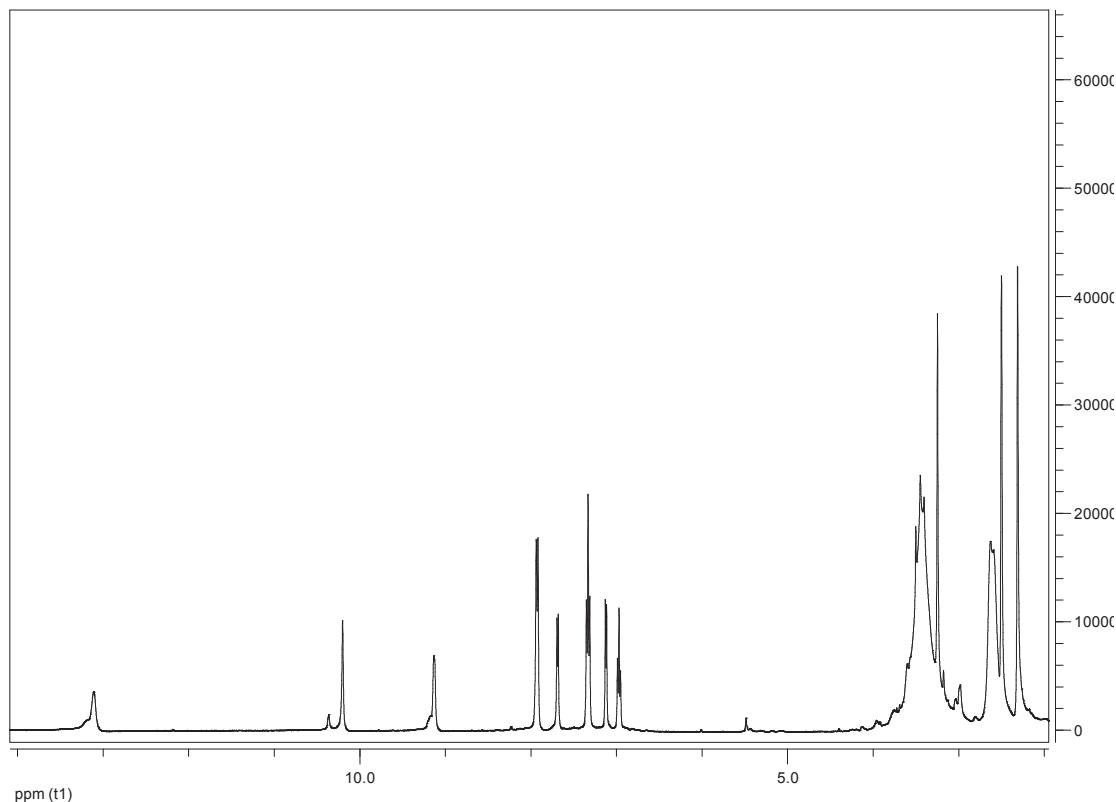
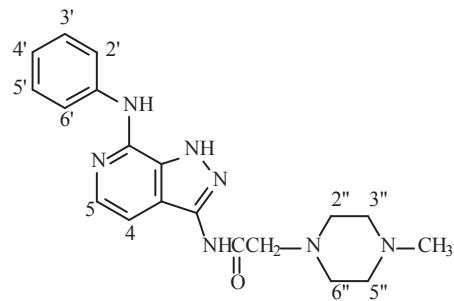


**Εικόνα II.1**

Στην Εικόνα II.2 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του παραγώγου **25**. Φαίνονται η απορρόφηση της μεθυλομάδας (2.31 ppm, απλή κορυφή), των

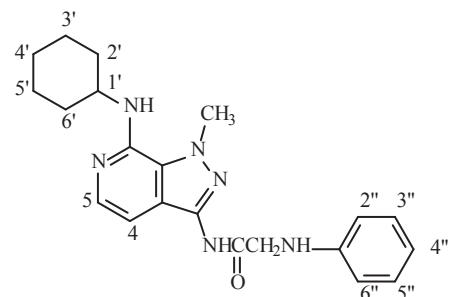
πιπεραζινικών μεθυλενίων (2.52-2.70 ppm, ευρεία κορυφή) και του ακεταμιδικού μεθυλενίου (3.25 ppm, απλή κορυφή).

Στην αρωματική περιοχή συντονίζονται τα H-4' (6.97 ppm, τριπλή κορυφή), το H-4 (7.12 ppm, διπλή κορυφή), τα H-3', H-5' (7.33 ppm, τριπλή κορυφή), τα H-5 και H-2', H-6' (7.69 και 7.93 ppm, διπλές κορυφές). Τέλος, στα 9.13, 10.20 και 13.11 ppm εμφανίζονται τρεις ευρείες κορυφές που αποδίδονται στα -NH- της ανιλινικής υποκατάστασης, της ακεταμιδικής αλυσίδας και του πυραζολίου αντίστοιχα.

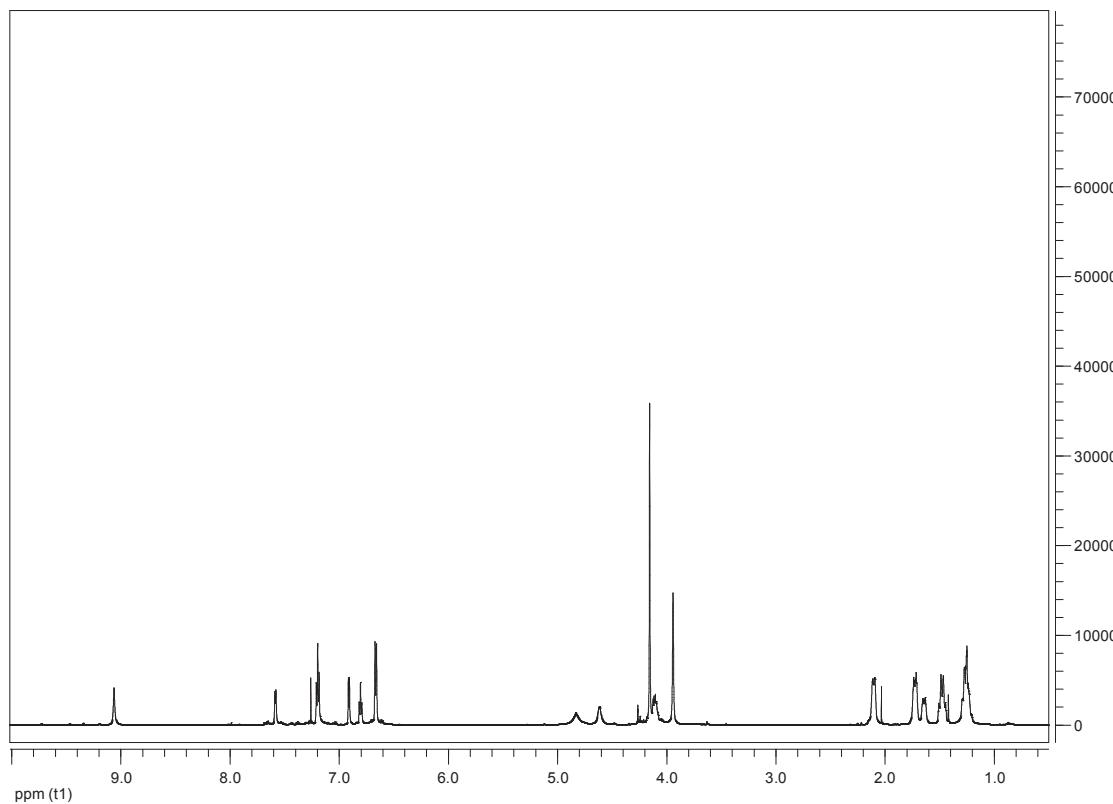


**Εικόνα II.2**

Στην Εικόνα II.3 παρουσιάζεται το φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του παραγώγου **32**, όπου παρατηρούνται αντίστοιχες με τα προηγούμενα χημικές μετατοπίσεις, ενώ στην περιοχή 1.20-2.15 ppm παρατηρούνται πέντε πολλαπλές κορυφές που αποδίδονται στα αξονικά και ισημερινά πρωτόνια της κυκλοεξυλαμίνης (H-2',6', H-3',5' και H-4') και στα 4.06-4.14 ppm συντονίζεται το H-1' της κυκλοεξυλαμίνης ως πολλαπλή κορυφή.

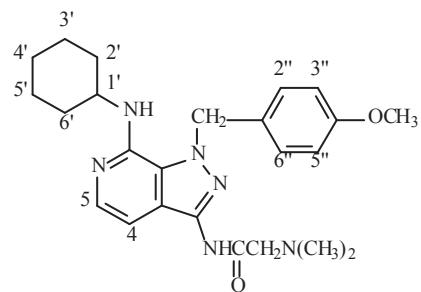


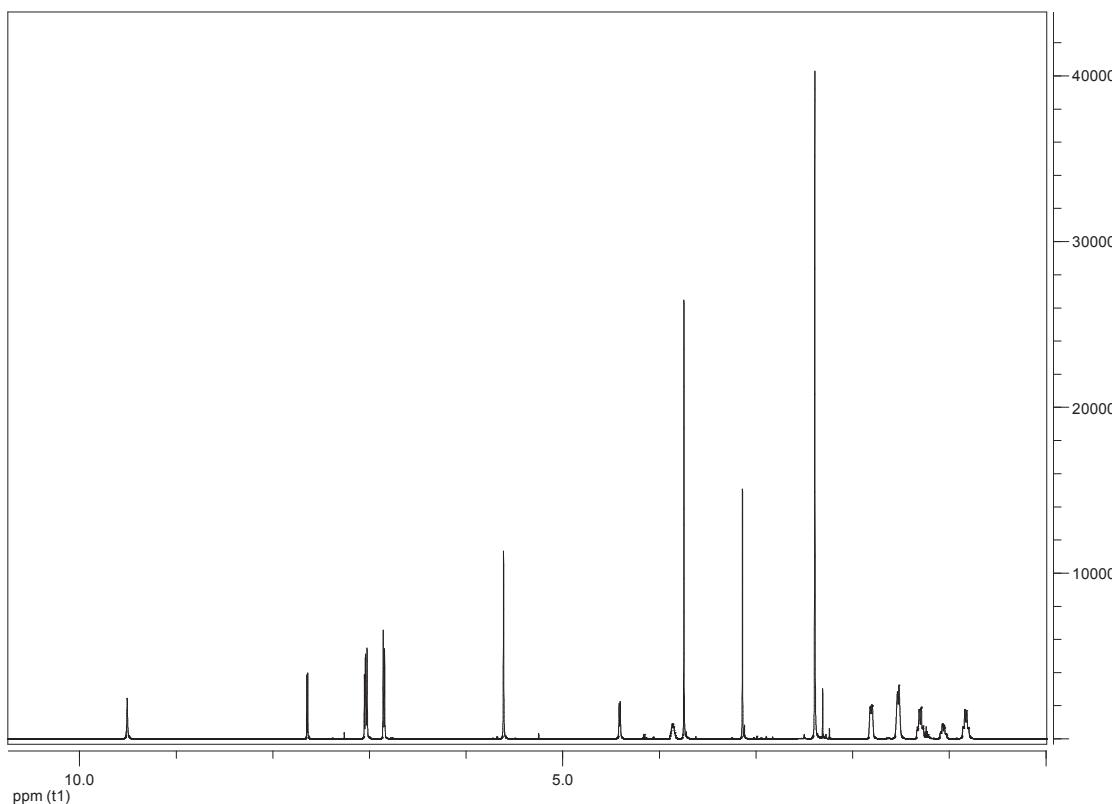
Τα αμινικά πρωτόνια συντονίζονται ως ευρείες κορυφές στα 4.62 (-NH-κυκλοεξυλαμίνης), 4.83 (-NH- ανιλίνης) και 9.06 ppm (-NH- ακεταμιδικής αλυσίδας).



**Εικόνα II.3**

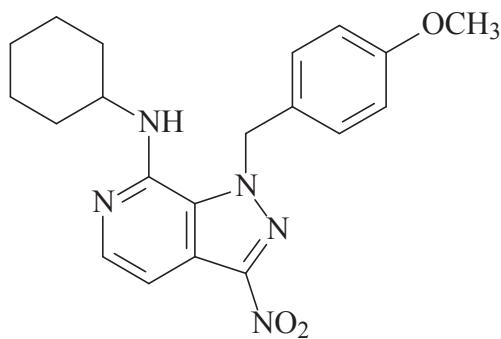
Στην Εικόνα II.4 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR του παραγώγου **39**, στο οποίο είναι εμφανείς οι απορροφήσεις των πρωτονίων της προστατευτικής ομάδας (3.75 ppm μεθοξυλίου, 5.61 ppm μεθυλενίου και 6.85 ppm των H-2'', H-6'' και 7.01-7.06 ppm των H-3'', H-5'').



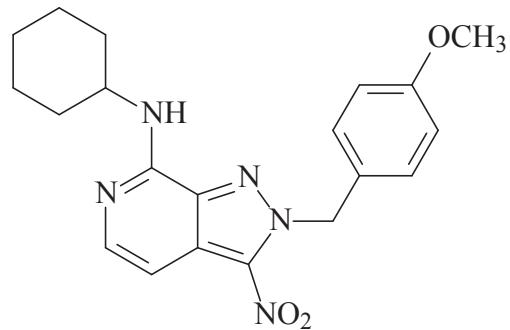


*Εικόνα II.4*

Στις Εικόνες II.5 και II.6 παρουσιάζονται τα φάσματα NOESY-NMR των παραγώγων **34** και **35** αντίστοιχα.

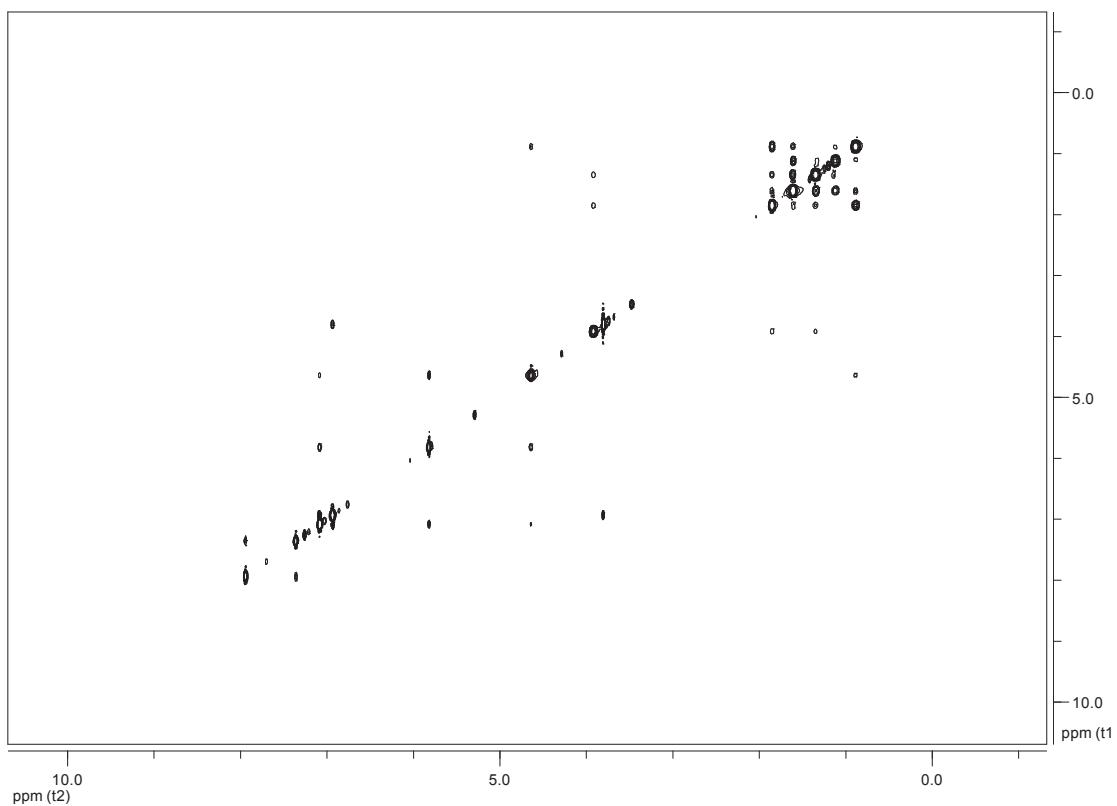


**34**

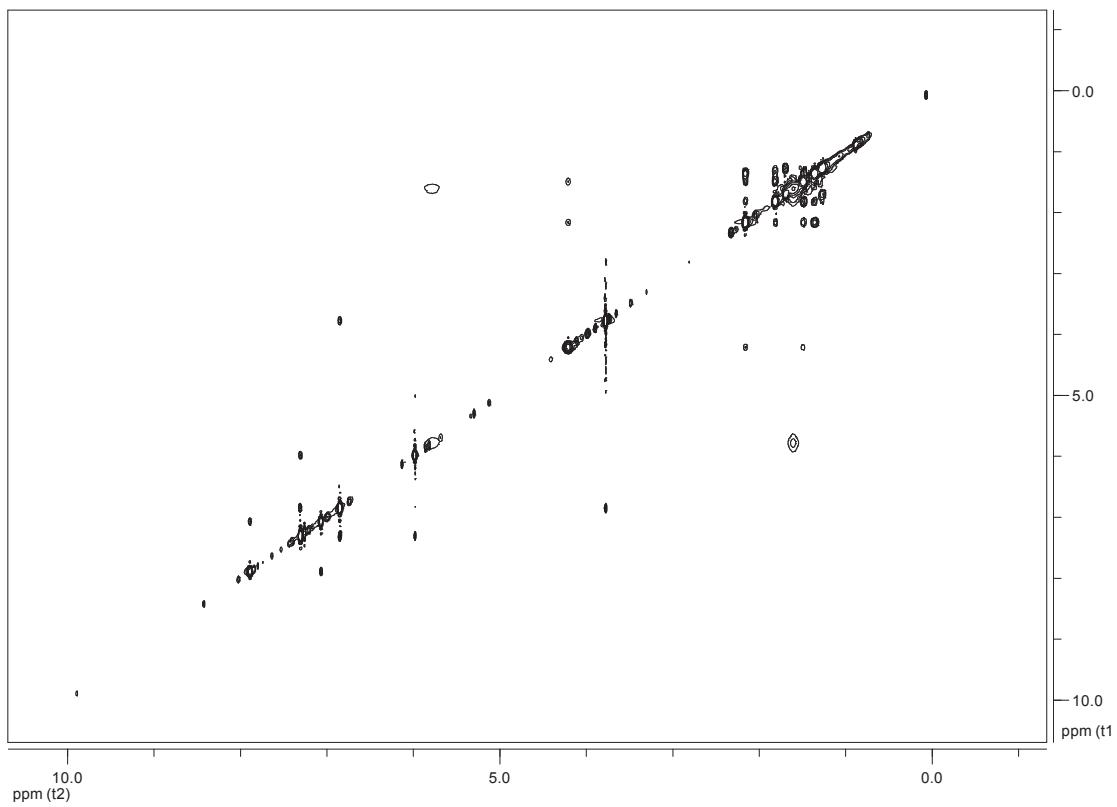


**35**

Στην Εικόνα II.5 παρατηρείται κορυφή διασταύρωσης μεταξύ του -NH- της κυκλοεξυλαμίνης (4.64 ppm) και του μεθυλενίου της προστατευτικής ομάδας (5.82 ppm), γεγονός που αποδεικνύει ότι το παράγωγο **34** είναι το 1-ισομερές. Στην Εικόνα II.6 δεν παρατηρείται αυτή η κορυφή διασταύρωσης μεταξύ των αντίστοιχων χημικών μετατοπίσεων (5.80 ppm -NH- και 5.98 ppm μεθυλενίου).

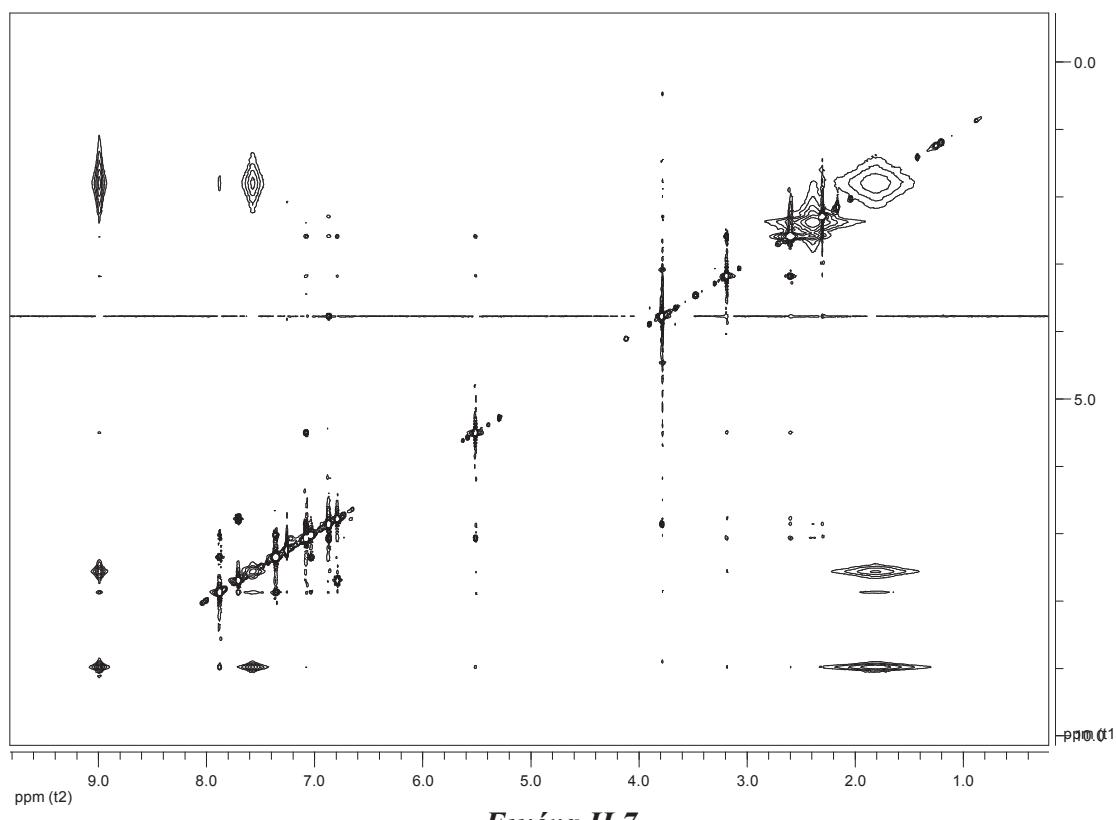
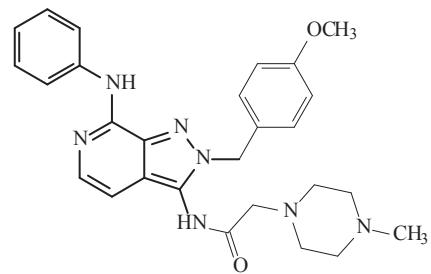


*Εικόνα II.5*



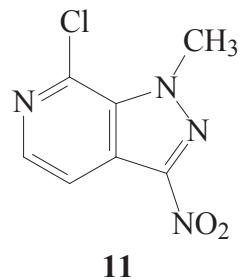
*Εικόνα II.6*

Στην Εικόνα II.7 παρουσιάζεται το φάσμα NOESY-NMR του παραγώγου **23**. Παρατηρείται κορυφή διασταύρωσης μεταξύ του μεθυλενίου της ακεταμιδικής αλυσίδας (3.17 ppm) και του μεθυλενίου της προστατευτικής ομάδας (5.49 ppm), οπότε αποδεικνύεται ότι η προστατευτική ομάδα βρίσκεται στη θέση 2 της πυραζολοπυριδίνης.

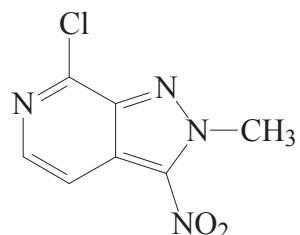


**Εικόνα II.7**

Στις Εικόνες II.8 και II.9 παρουσιάζονται τα φάσματα HMBC-NMR των παραγώγων **11** και **12** αντίστοιχα.



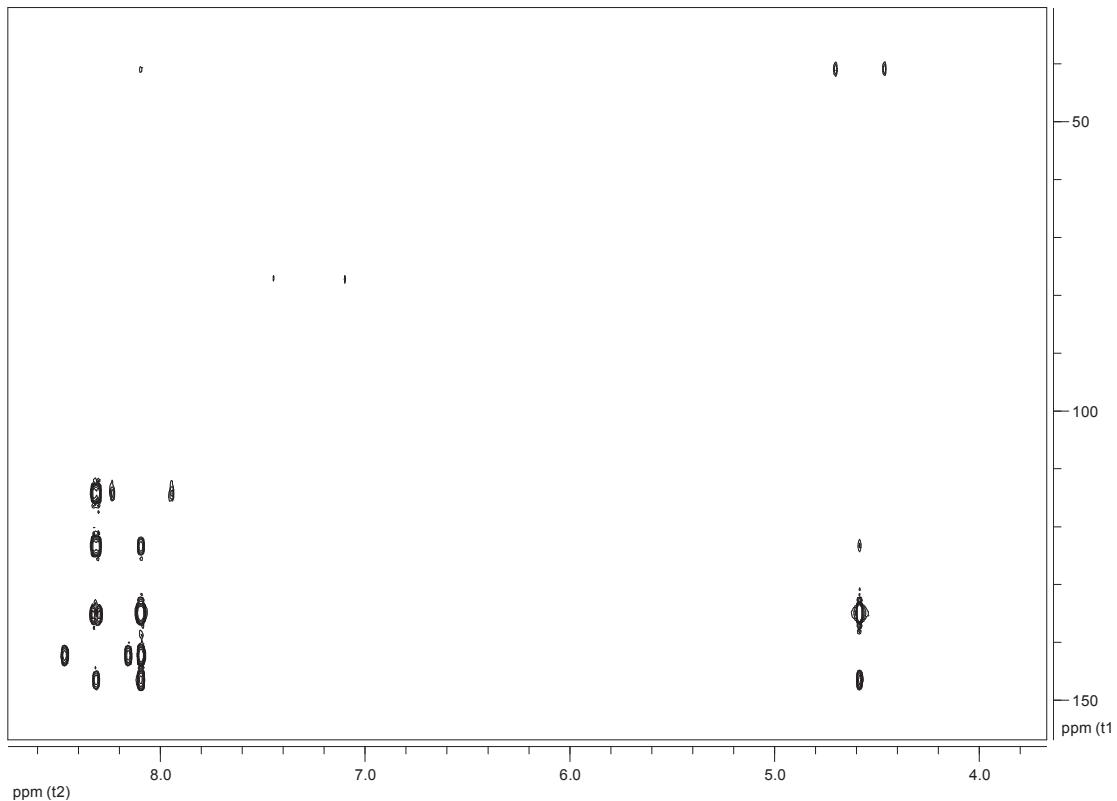
**11**



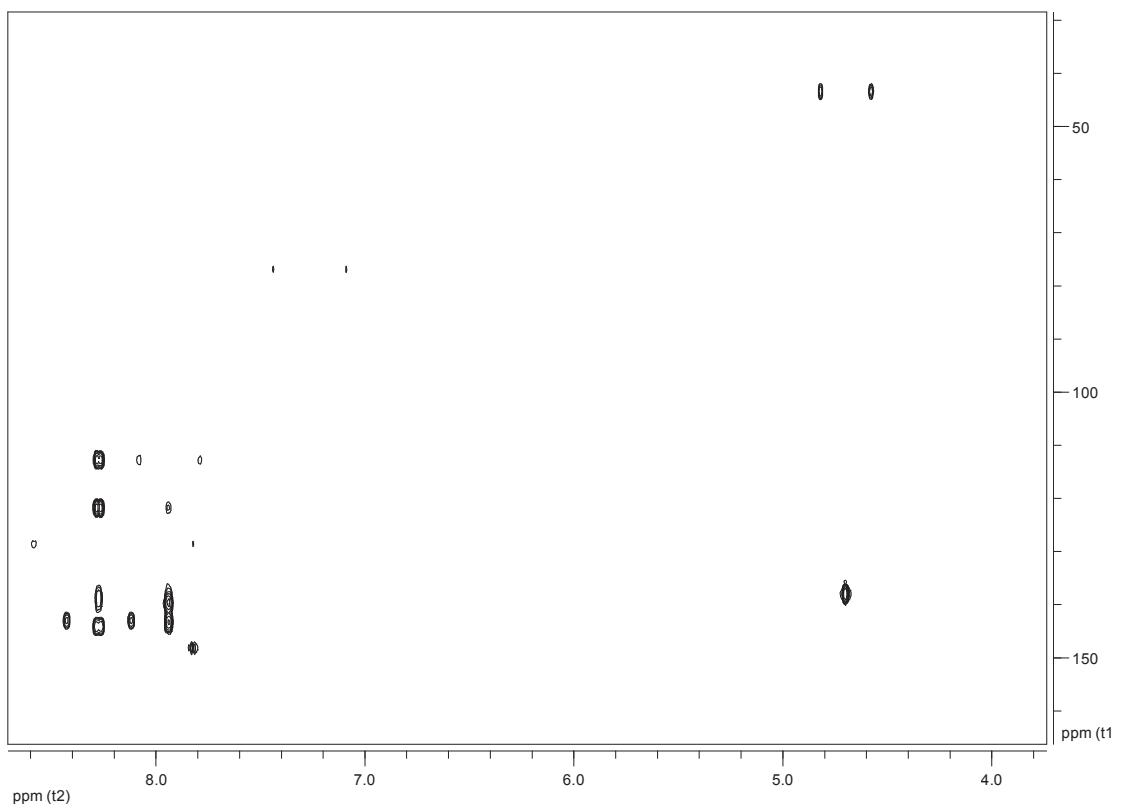
**12**

Στην Εικόνα II.8 παρατηρείται κορυφή διασταύρωσης μεταξύ των πρωτονίων της μεθυλομάδας (4.57 ppm) και του C-7 (146.78 ppm), γεγονός που αποδεικνύει ότι το

παράγωγο **11** είναι το 1-ισομερές. Στην Εικόνα II.9 παρατηρείται κορυφή διασταύρωσης μεταξύ των πρωτονίων της μεθυλομάδας (4.70 ppm) και του C-3 (140.24 ppm), γεγονός που αποδεικνύει ότι το παράγωγο **12** είναι το 2-ισομερές.



*Εικόνα II.8*



*Εικόνα II.9*

### III. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### III.1 Γενικά πειραματικά στοιχεία

Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel 60 AC.C (SDS 35-70 μμ). Η παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες Silica gel 60F<sub>254</sub>. Για τη λήψη φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος Bruker Avance 400 στα 400 MHz, ενώ για τη λήψη φασμάτων <sup>13</sup>C-NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων HMBC-NMR, HSQC-NMR και NOESY-NMR χρησιμοποιήθηκαν φασματογράφοι Bruker AC200 στα 50 MHz και Bruker Avance 600 στα 600 MHz αντίστοιχα. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub>), δευτεριωμένη μεθανόλη (CD<sub>3</sub>OD) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d<sub>6</sub>). Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Buchi και δεν είναι διορθωμένα.

#### III.2 Σύνθεση της 7-χλωρο-3-νιτρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (10) και των N<sup>1</sup>-και N<sup>2</sup>-μεθυλοπαραγώγων της (11 και 12)

##### 4-Μεθυλο-3-νιτρο-πυριδιν-2-αμίνη (2)<sup>31</sup>

Η 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνη (1) (15 g, 0.14 mol) διαλύεται σε πυκνό θεικό οξύ (72 ml) υπό ψύξη. Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην υπό ψύξη το μίγμα θεικού-νιτρικού οξέος (10.50 ml από το κάθε οξύ) και το διάλυμα θερμαίνεται στους 60 °C για 20 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, απόχυση του μίγματος σε πάγο και εξουδετέρωση με διάλυμα αμμωνίας 25% μέχρι pH 7-8. Κατόπιν, το μίγμα διηθείται υπό κενό για απαλλαγή από τα αμμωνιακά άλατα των οξέων που σχηματίστηκαν κατά την εξουδετέρωση και το μίγμα των δύο ισομερών κατεργάζεται με θερμό διχλωρομεθάνιο, το οποίο διαλύει το επιθυμητό 3-νιτροπαραγώγο 2, ενώ παραμένει αδιάλυτο το 5-νιτρο-παραγώγο 3. Με διήθηση υπό κενό παραλαμβάνονται το ισομερές 3 (52% και 7% του 3,5-δινιτροπαραγώγου 4) και το παραγώγο 2 (25%).

4-Μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (2): Σ.τ.: 134-136 °C (EtOAc) (Βιβλ.<sup>31</sup> 136 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.52 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 6.27 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 6.58 (d, 1H, H-5, J=4.9 Hz), 8.07 (d, 1H, H-6, J=4.9 Hz).

**4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2-αμίνη (3):** Σ.τ.: 220 °C (EtOAc) (Βιβλ.<sup>31</sup> 220 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.58 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 5.10 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 6.29 (s, 1H, H-3), 8.90 (s, 1H, H-6).

**3,5-Δινιτρο-4-μεθυλοπυριδιν-2-αμίνη (4):** Σ.τ.: 170-171 °C (EtOAc) (Βιβλ.<sup>32</sup> 170-172 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.65 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 6.21 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 8.90 (s, 1H, H-6).

#### **4-Μεθυλο-3-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (5)<sup>33</sup>**

Σε διάλυμα της νιτροπυριδίνης **2** (5 g, 32.68 mmol) εντός θειικού οξέος (96%, 8.60 ml) και νερού (86 ml) προστίθεται ταχέως στους 10 °C κορεσμένο διάλυμα νιτρώδους νατρίου (5 g, 72.46 mmol σε 7 ml νερό). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά μέχρι το σημείο βρασμού, ώστε να απομακρυνθούν οι νιτρώδεις ατμοί. Μετά από ψύξη καθιζάνει το στερεό προϊόν **5**, το οποίο διηθείται, εκπλένεται και ξηραίνεται υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου (4.61 g, 91.5%). Σ.τ.: 235 °C (EtOH) (Βιβλ.<sup>33</sup> 234-235 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.32 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 6.27 (d, 1H, H-5, J=6.7 Hz), 7.45 (d, 1H, H-6, J=6.7 Hz).

#### **2-Χλωρο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (6)<sup>34</sup>**

Διάλυμα της πυριδινόνης **5** (4.61 g, 29.93 mmol) εντός οξυγλωριούχου φωσφόρου (14.22 ml) θερμαίνεται στους 110 °C για 3 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό μέχρι πλήρους εκδίωξης του οξυγλωριούχου φωσφόρου, προσθήκη μικρής ποσότητας πάγου και διήθηση υπό κενό του στερεού προϊόντος **6** (4.56 g, 88%). Σ.τ.: 40 °C (Et<sub>2</sub>O-*n*-pentane) (Βιβλ.<sup>34</sup> 40-41 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.34 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7.22 (d, 1H, H-5, J=5.0 Hz), 8.32 (d, 1H, H-6, J=5.0 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 17.0 (4-CH<sub>3</sub>), 125.2 (C-5), 142.0 (C-4), 145.8 (C-3), 146.6 (C-2), 149.8 (C-6).

## 2-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-αμίνη (7)<sup>35</sup>

Το χλωροπαράγωγο **6** (4.56 g, 26.43 mmol) διαλύεται υπό ψύξη εντός πυκνού υδροχλωρικού οξέος (36%, 68.24 ml), κατόπιν προστίθεται σε δόσεις διχλωριούχους κασσίτερος (20.50 g, 108.12 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο της φιάλης, αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο και ακολουθεί εξουδετέρωση υπό ψύξη με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 40% μέχρι pH 11. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, έκπλυνση με νερό, ξήρανση ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και συμπύκνωση της οργανικής φάσης (3.67 g, 97%). Σ.τ.: 69-70 °C (Βιβλ.<sup>35</sup> 68-70 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.22 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3.82 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 6.92 (d, 1H, H-5, J=5.5 Hz), 7.70 (d, 1H, H-6, J=5.5 Hz).

## *N*-(2-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-3-υλ)ακεταμίδιο (8)<sup>36</sup>

Στην αμίνη **7** (4 g, 28.07 mmol) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (4 ml) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 72 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται αιθέρας και σχηματίζεται το στερεό προϊόν **8**, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση (5.14 g, 99%). Σ.τ.: 119-120 °C (Βιβλ.<sup>36</sup> 119-120 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 2.18 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2.22 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7.00 (d, 1H, H-5, J=6.0 Hz), 7.60-7.80 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-), 7.95 (d, 1H, H-6, J=6.0 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 18.8 (4-CH<sub>3</sub>), 23.2 (CH<sub>3</sub>-CO), 125.1 (C-5), 130.0 (C-3), 146.8 (C-6), 148.2 (C-4), 148.4 (C-2), 168.8 (-COCH<sub>3</sub>).

## 7-Χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (9)<sup>36</sup>

Σε διάλυμα του ακεταμιδίου **8** (7.52 g, 40.75 mmol) εντός άνυδρου τολουολίου (60 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, οξικό κάλιο (5.99 g) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C. Στη θερμοκρασία αυτή προστίθεται νιτρώδες ισοαμύλιο (31.45 ml, 244.50 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται για 12 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, διήθηση υπό κενό (απομάκρυνση οξικού καλίου) και συμπύκνωση του διηθήματος. Στη συνέχεια, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2, 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **9** (3.88 g, 62%). Σ.τ.: 163 °C (Βιβλ.<sup>36</sup> 161-163 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.20 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-), 7.75 (d, 1H, H-4, J=6.0 Hz), 8.04 (d, 1H, H-5, J=6.0 Hz), 8.18 (s, 1H, H-3).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 114.6 (C-4), 128.8 (C-3a), 134.6 (C-7a), 135.1 (C-7), 135.3 (C-3), 138.8 (C-5).

### 7-Χλωρο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (10)<sup>37</sup>

Σε διάλυμα της πυραζολοπυριδίνης **9** (490 mg, 3.19 mmol) εντός πυκνού θεικού οξέος (9.50 ml) υπό ψύξη, προστίθεται στάγδην μίγμα θεικού-νιτρικού οξέος (οξύ νίτρωσης) (0.49 ml από το κάθε οξύ). Το διάλυμα αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 95 °C για 1 ώρα. Έπειτα, το μίγμα επανέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο και ρυθμίζεται το pH σε 7-8 με προσθήκη διαλόματος αμμωνίας 25% στάγδην και υπό ψύξη. Ακολουθεί έκπλυση του μίγματος με νερό, για να διαλυθούν τα αμμωνιακά άλατα των οξέων που σχηματίστηκαν κατά την εξουδετέρωση και στη συνέχεια εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, ξηρανση (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και συμπύκνωση της οργανικής φάσης (600 mg, 94%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 172-173 °C (EtOAc).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.03 (d, 1H, H-4, J=5.6 Hz), 8.27 (d, 1H, H-5, J=5.6 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 113.92 (C-4), 122.09 (C-3a), 136.39 (C-7a), 137.53 (C-3), 141.46 (C-5), 149.61 (C-7).

### 7-Χλωρο-1-μεθυλο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (11) και 7-Χλωρο-2-μεθυλο-3-νιτρο-2*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (12)

Σε διάλυμα του παραγώγου **10** (540 mg, 2.72 mmol) εντός άνυδρου ακετονιτριλίου (21.60 ml) προστίθεται, υπό αργό στους 0 °C, ανθρακικό κάλιο (529.20 mg) και το μίγμα αναδεύεται υπό ψύξη για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται μεθυλοϊωδίδιο (0.22 ml, 3.53 mmol) στάγδην και υπό ψύξη. Ακολουθεί επαναφορά του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου και θέρμανση στους 50 °C για 5 ώρες. Το μίγμα συμπυκνώνεται και στη συνέχεια πραγματοποιείται έκπλυση του υπολείμματος με νερό και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 και λαμβάνονται τα παράγωγα **11** (230 mg, 39%) και **12** (60 mg, 0.1%).

7-Χλωρο-1-μεθυλο-3-νιτρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (**11**): Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 160-161 °C (EtOAc).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.57 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 8.08 (d, 1H, H-4, J=5.6 Hz), 8.30 (d, 1H, H-5, J=5.6 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 41.14 (-CH<sub>3</sub>), 114.51 (C-4), 123.62 (C-3a), 135.19 (C-7a), 135.43 (C-3), 142.49 (C-5), 146.78 (C-7).

7-Χλωρο-2-μεθυλο-3-νιτρο-2*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνη (**12**): Υποκίτρινο στερεό. Σ.τ.: 202-203 °C (EtOAc).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.70 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7.93 (d, 1H, H-4, J=5.9 Hz), 8.27 (d, 1H, H-5, J=5.9 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 43.92 (-CH<sub>3</sub>), 113.22 (C-4), 122.27 (C-3a), 129.02 (C-7a), 140.24 (C-3), 143.50 (C-5), 144.60 (C-7).

### III.3 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 7-φαινυλαμινο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνης (**16-18**) και της 7-φαινυλαμινο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδίνης (**25-26**)

#### 1-Μεθυλο-3-νιτρο-*N*-φαινυλο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (**13**)

Σε διάλυμα του παραγώγου **11** (80 mg, 0.37 mmol) εντός 2-αιθοξυαιθανόλης (2 ml) σε θερμοκρασία δωματίου και υπό αργό, προστίθεται ανιλίνη (0.17 ml, 1.87 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 130 °C για 3 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση του μίγματος, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και λαμβάνεται το παράγωγο **13** (60 mg, 59%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 197-198 °C (EtOAc).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.34 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 7.14 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.28 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.6 Hz), 7.36 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.5 Hz), 7.57 (brs, 1H, H-4), 7.88 (brs, 1H, H-5).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 41.42 (-CH<sub>3</sub>), 107.65 (C-4), 119.63 (C-3a), 120.73 (C-2', C-6'), 124.60 (C-4'), 129.89 (C-3', C-5'), 130.55 (C-7a), 134.86 (C-5), 140.89 (C-3), 142.61 (C-1'), 147.28 (C-7).

#### 1-Μεθυλο-*N*<sup>7</sup>-φαινυλο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδινο-3,7-διαμίνη (**14**)

Σε διάλυμα του παραγώγου **13** (120 mg, 0.44 mmol) εντός απόλυτης αιθανόλης (55 ml) προστίθεται παλλάδιο επί άνθρακα (40 mg) και το μίγμα υδρογονώνται υπό πίεση 55 psi σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ακολουθεί διήθηση από κελλίτη, συμπύκνωση του διηθήματος, καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 5-5, 2-8 και λαμβάνεται το παράγωγο **14** (80 mg, 75%). Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 119-122 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-*n*-hexane).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 3.93 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 5.52 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 6.90 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.20 (d, 1H, H-4, J=5.6 Hz), 7.25 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.8 Hz), 7.44 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.8 Hz), 7.60 (d, 1H, H-5, J=5.6 Hz), 8.37 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 37.55 (-CH<sub>3</sub>), 108.34 (C-4), 118.81 (C-2', C-6'), 119.74 (C-3a), 120.64 (C-4'), 128.42 (C-3', C-5'), 129.84 (C-7a), 134.01 (C-5), 141.57 (C-3), 142.19 (C-1'), 148.37 (C-7).

## 2-Χλωρο-*N*-{1-μεθυλο-7-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (15)

Σε διάλυμα της διαμίνης **14** (200 mg, 0.83 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (19.34 ml) και σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται χλωρακετυλοχλωρίδιο (0.09 ml, 1.07 mmol) και τριαιθυλαμίνη (0.14 ml, 1 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ακολουθεί συμπύκνωση και το υπόλειμμα χρησιμοποιείται απευθείας, χωρίς περαιτέρω κατεργασία, για τις επόμενες αντιδράσεις λόγω εύκολης υδρόλυσης του χλωρίου στην ακεταμιδική αλυσίδα.

## *N*-{1-Μεθυλο-7-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (16)

Σε διάλυμα του παραγώγου **15** (50 mg, 0.16 mmol) εντός απόλυτης αιθανόλης (5.72 ml) και σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται *N*-μεθυλοπιπεραζίνη (0.04 ml, 0.31 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 85 °C για 2 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται και ακολουθεί έκπλυση του υπολείμματος με νερό και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και συμπυκνωθεί, καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.8-0.2 έως 9-1 και λαμβάνεται το παράγωγο **16** (60 mg, 99%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 202-204 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.34 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> piperazine), 2.50-2.60 (brs, 4H, H-3'', H-5''), 2.65-2.80 (brs, 4H, H-2'', H-6''), 3.23 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 4.10 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> pyrazole), 6.58 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 7.03 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.22 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.8 Hz), 7.30 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.9 Hz), 7.46 (d, 1H, H-4, J=5.8 Hz), 7.85 (d, 1H, H-5, J=5.8 Hz), 9.49 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 38.90 (-CH<sub>3</sub> pyrazole), 46.11 (-CH<sub>3</sub> piperazine), 53.71 (C-2'', C-6''), 55.30 (C-3'', C-5''), 61.66 (-CH<sub>2</sub>-), 111.14 (C-4), 119.06 (C-2', C-6'), 122.74 (C-4'), 122.81 (C-3a), 129.46 (C-3', C-5'), 130.63 (C-7a), 136.89 (C-5), 138.66 (C-3), 141.84 (C-7), 142.10 (C-1'), 168.66 (-CO-).

### **N-{1-Μεθυλο-7-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (17)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **15** σε απόδοση 97% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **16**, ύστερα από θέρμανση για 3 ώρες και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.95-0.05 έως 9.5-0.5. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 140-142 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.44 (s, 6H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.19 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 4.09 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> pyrazole), 6.77 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 7.02 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.21 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.6 Hz), 7.29 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.7 Hz), 7.45 (brs, 1H, H-4), 7.79 (brs, 1H, H-5), 9.62 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 38.94 (-CH<sub>3</sub> pyrazole), 46.12 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 63.05 (-CH<sub>2</sub>-), 111.03 (C-4), 119.16 (C-2', C-6'), 122.68 (C-3a, C-4'), 129.47 (C-3', C-5'), 130.64 (C-7a), 136.58 (C-5), 138.66 (C-3), 141.87 (C-1'), 142.26 (C-7), 168.92 (-CO-).

### **N-{1-Μεθυλο-7-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (18)**

Σε διάλυμα του παραγώγου **15** (50 mg, 0.16 mmol) εντός απόλυτης αιθανόλης (6.67 ml), σε θερμοκρασία δωματίου και υπό αργό, προστίθεται ανιλίνη (0.06 ml, 0.63 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 4 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση του μίγματος, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα σταδιακά έως 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **18** (30 mg, 51%). Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 180-181 °C (EtOH-Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 3.94 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 4.22 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 6.05 (m, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCH<sub>2</sub>-), 6.56-6.65 (m, 3H, H-2'', H-6'', H-4''), 6.94 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.09-7.15 (m, 3H, H-4, H-3', H-5'), 7.28 (t, 2H, H-3'', H-5'', J=7.9 Hz), 7.48 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.1 Hz), 7.65 (d, 1H, H-5, J=5.7 Hz), 8.48 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 10.45 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 38.81 (-CH<sub>3</sub>), 46.61 (-CH<sub>2</sub>-), 109.39 (C-4), 112.34 (C-2'', C-6''), 116.50 (C-4''), 119.38 (C-2', C-6'), 121.23 (C-4'), 122.53 (C-3a), 128.52 (C-3'', C-5''), 128.93 (C-3', C-5'), 129.41 (C-7a), 135.44 (C-5), 138.35 (C-3), 141.74 (C-1''), 142.33 (C-7), 148.25 (C-1'), 169.69 (-CO-).

### **3-Νιτρο-Ν-φαινυλο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (19)**

Σε διάλυμα του παραγώγου **10** (800 mg, 4.03 mmol) εντός 1,4-διοξάνης (10 ml) προστίθεται, υπό αργό σε θερμοκρασία δωματίου, ανιλίνη (1.10 ml, 12 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 12 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση του μίγματος, έκπλυση του υπολείμματος με νερό και εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και λίγη μεθανόλη λόγω δυσδιαλυτότητας του μορίου. Η οργανική φάση, αφού ξηρανθεί ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και συμπυκνωθεί, εκπλένεται με αιθέρα προκειμένου να καθαριστεί από τα υπολείμματα της ανιλίνης, οπότε λαμβάνεται καθαρό το επιθυμητό προϊόν **19** (980 mg, 95%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 259-262 °C (EtOAc).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 7.11 (t, 1H, H-4', J=7.1 Hz), 7.38-7.44 (m, 3H, H-3', H-5', H-4), 7.82 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.8 Hz), 7.95 (brs, 1H, H-5), 9.30 (brs, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exchang., -NH- aniline).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 104.64 (C-4), 120.04 (C-2', C-6'), 120.45 (C-3a), 123.15 (C-4'), 129.09 (C-3', C-5'), 130.13 (C-7a), 139.16 (C-3, C-1'), 142.80 (C-5), 148.79 (C-7).

### **2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-Ν-φαινυλο-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (20)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **19** σε απόδοση 45% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τα παράγωγα **11** και **12**, ύστερα από θέρμανση για 24 ώρες και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα-διχλωρομεθάνιο 9-1-0.3, 8.5-1.5-0.4. Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 175-177 °C (MeOH).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.78 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 6.04 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.87 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.6 Hz), 7.12 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.29 (d, 1H, H-4, J=6.0 Hz), 7.35 (d, 2H, H-3'', H-5'', J=8.6 Hz), 7.41 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.8 Hz), 7.70 (brs, 1H,  $\text{D}_2\text{O}$  exchang., -NH-), 7.89 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.8 Hz), 8.05 (d, 1H, H-5, J=6.0 Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 55.45 (-OCH<sub>3</sub>), 57.98 (-CH<sub>2</sub>-), 104.46 (C-4), 114.46 (C-2'', C-6''), 119.93 (C-2', C-6'), 122.16 (C-3a), 123.44 (C-4'), 126.36 (C-7a), 129.24 (C-3', C-5'), 129.88 (C-3'', C-5''), 134.74 (C-1''), 137.28 (C-3), 139.06 (C-1'), 144.69 (C-5), 147.78 (C-7), 160.15 (C-4'').

### **$N^7$ -Φαινυλο-2-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζόλο[3,4-*c*]πυριδινο-3,7-διαμίνη (21)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **20** σε απόδοση 96% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τη διαμίνη **14** και καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica

gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3 έως 5-5. Καφέ στερεό. Σ.τ.: 49-56 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-*n*-hexane).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 3.71 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.40 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.23 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 6.87-6.91 (m, 3H, H-4', H-2'', H-6''), 6.95 (d, 1H, H-4, J=5.9 Hz), 7.17 (d, 2H, H-3'', H-5'', J=8.5 Hz), 7.25 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.8 Hz), 7.31 (d, 1H, H-5, J=5.9 Hz), 8.04 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.7 Hz), 8.57 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 50.35 (-CH<sub>2</sub>-), 55.07 (-OCH<sub>3</sub>), 105.95 (C-4), 109.31 (C-3a), 113.83 (C-2'', C-6''), 118.93 (C-2', C-6'), 120.65 (C-4'), 128.20 (C-3', C-5', C-7a), 128.56 (C-3'', C-5''), 128.86 (C-1''), 130.96 (C-5), 135.77 (C-3), 141.25 (C-1'), 145.78 (C-7), 158.58 (C-4'').

### 2-Χλωρο-*N*-(2-(4-μεθοξυβενζυλο)-7-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (22)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **21** με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **15**. Το χλωρακετυλοχλωρίδιο προστίθεται ενώ το διάλυμα της πρώτης ύλης εντός του άνυδρου τετραϋδροφουρανίου βρίσκεται υπό ψύξη, προκειμένου να αποφευχθεί η δις υποκατάσταση. Το προϊόν χρησιμοποιείται απευθείας για τις επόμενες αντιδράσεις.

### *N*-(2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-7-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (23)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **22** σε απόδοση 97% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **16** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.5-0.5. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 159-160 °C (EtOAc-Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.27 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.30-2.40 (brs, 4H, H-3''', H-5'''), 2.55-2.59 (brs, 4H, H-2''', H-6'''), 3.17 (s, 2H, -NHCOCH<sub>2</sub>-), 3.77 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.49 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>- pyrazole), 6.79 (d, 1H, H-4, J=6.1 Hz), 6.86 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.7 Hz), 7.02 (t, 1H, H-4', J=7.4 Hz), 7.07 (d, 2H, H-3'', H-5'', J=8.7 Hz), 7.35 (t, 2H, H-3', H-5', J=8.0 Hz), 7.58 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 7.70 (d, 1H, H-5, J=6.1 Hz), 7.88 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.6 Hz), 9.00 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 45.96 (-CH<sub>3</sub>), 53.60 (C-2''', C-6'''), 54.31 (-CH<sub>2</sub>- pyrazole), 55.00 (C-3''', C-5'''), 55.42 (-OCH<sub>3</sub>), 61.29 (-NHCOCH<sub>2</sub>-), 104.41 (C-4), 114.61 (C-2'', C-6''), 118.21 (C-3a), 119.34 (C-2', C-6'), 122.26 (C-4').

127.28 (C-7a), 127.87 (C-1''), 128.28 (C-3'', C-5''), 129.04 (C-3', C-5'), 136.18 (C-3), 136.97 (C-5), 140.12 (C-1'), 147.33 (C-7), 159.70 (C-4''), 169.04 (-CO-).

### **N-{2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-7-(φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (24)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **22** σε απόδοση 98% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **16**, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.8-0.2 έως 9.4-0.6. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 183-185 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 2.32 (s, 6H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.11 (s, 2H, -NHCOCH<sub>2</sub>-), 3.76 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.45 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>- pyrazole), 6.83-6.87 (m, 3H, H-4, H-2'', H-6''), 7.02 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.12 (d, 2H, H-3'', H-5'', J=8.5 Hz), 7.35 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.8 Hz), 7.68 (d, 1H, H-5, J=6.1 Hz), 7.87 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.9 Hz), 8.70-9.40 (vbrs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 46.06 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 54.32 (-CH<sub>2</sub>- pyrazole), 55.40 (-OCH<sub>3</sub>), 62.83 (-NHCOCH<sub>2</sub>-), 104.66 (C-4), 114.43 (C-2'', C-6''), 118.05 (C-3a), 119.36 (C-2', C-6'), 122.21 (C-4'), 127.12 (C-7a), 128.03 (C-1''), 128.71 (C-3''), C-5''), 128.99 (C-3', C-5'), 136.12 (C-3), 136.63 (C-5), 140.12 (C-1'), 147.25 (C-7), 159.73 (C-4''), 169.46 (-CO-).

### **N-{7-(Φαινυλαμινο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (25)**

Διάλυμα του παραγώγου **23** (60 mg, 0.12 mmol) εντός τριφθοροξικού οξέος (2 ml) θερμαίνεται στους 70 °C υπό άνυδρες συνθήκες για 65 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό, στο υπόλειμμα προστίθεται νερό, το μίγμα εξουδετερώνεται με όξινο ανθρακικό νάτριο μέχρι pH 7-8 και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική φάση ξηραίνεται (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), συμπυκνώνεται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2, οπότε λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **25** (43 mg, 95%). Μπεζ υγροσκοπικό στερεό.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 2.31 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2.52-2.70 (brs, 8H, H-2'', H-6'', H-3'', H-5''), 3.25 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.97 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.12 (d, 1H, H-4, J=5.8 Hz), 7.33 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.8 Hz), 7.69 (d, 1H, H-5, J=5.8 Hz), 7.93 (d, 2H, H-2', H-6', J=7.8 Hz), 9.13 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 10.20 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-), 13.11 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- pyrazole).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 44.98 (-CH<sub>3</sub>), 51.91 (C-2'', C-6''), 54.20 (C-3''), C-5''), 60.50 (-CH<sub>2</sub>-), 107.44 (C-4), 116.30 (C-3a), 118.41 (C-2', C-6'), 119.70

(C-7a), 121.26 (C-4'), 128.67 (C-3', C-5'), 135.31 (C-5), 140.92 (C-3), 141.85 (C-7), 158.11 (C-1'), 168.24 (-CO-).

### N-{7-(Φαινυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμιδιο (26)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **24** σε απόδοση 92% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **25**, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2. Μπεζ κόμμι.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 2.32 (s, 6H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.16 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.97 (t, 1H, H-4', J=7.3 Hz), 7.12 (d, 1H, H-4, J=5.8 Hz), 7.34 (t, 2H, H-3', H-5', J=8.0 Hz), 7.69 (d, 1H, H-5, J=5.8 Hz), 7.89 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.0 Hz), 8.95 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 10.17 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-), 12.90 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- pyrazole).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 45.29 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 62.24 (-CH<sub>2</sub>-), 107.44 (C-4), 116.33 (C-3a), 118.43 (C-2', C-6'), 119.90 (C-7a), 121.29 (C-4'), 128.70 (C-3', C-5'), 135.31 (C-5), 140.84 (C-3), 141.72 (C-7), 157.90 (C-1'), 168.72 (-CO-).

### III.4 Σύνθεση των 3-ακεταμιδοϋποκατεστημένων παραγώγων της 7-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (30-32) και της 7-κυκλοεξυλαμινο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (39)

#### 7-Κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-3-νιτρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (27)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής του παραγώγου **13**, με πρώτες ύλες το παράγωγο **11** (1.46 mmol) και κυκλοεξυλαμίνη (8.11 mmol) εντός διμεθυλοσουλφοξειδίου και θέρμανση στους 140 °C για 2 ώρες. Ο καθαρισμός γίνεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3, 6-4 (89%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: 170-173 °C (EtOAc-Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.20-2.20 (m, 10H, cyclohexyl-H), 4.12-4.24 (m, 1H, H-1'), 4.45 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4.78 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-), 7.33 (d, 1H, H-4, J=5.8 Hz), 7.95 (d, 1H, H-5, J=5.8 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 24.99 (cyclohexyl-C), 25.90 (cyclohexyl-C), 33.42 (cyclohexyl-C), 41.08 (-CH<sub>3</sub>), 49.75 (C-1'), 104.00 (C-4), 123.02 (C-3a), 128.77 (C-7a), 142.68 (C-5), 145.20 (C-3), 146.99 (C-7).

### **N<sup>7</sup>-Κυκλοεξυλο-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινο-3,7-διαμίνη (28)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **27** σε απόδοση 78% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τη διαμίνη **14** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 6-4 έως 3-7. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 144-146 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-petroleum ether).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.20-2.00 (m, 10H, cyclohexyl-H), 3.92 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 3.93-3.98 (m, 1H, H-1'), 5.27 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 5.62 (d, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-, J=7.3 Hz), 6.82 (d, 1H, H-4, J=5.7 Hz), 7.44 (d, 1H, H-5, J=5.7 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 24.94 (cyclohexyl-C), 25.65 (cyclohexyl-C), 32.31 (cyclohexyl-C), 37.80 (-CH<sub>3</sub>), 48.95 (C-1'), 104.01 (C-4), 118.23 (C-3a), 128.32 (C-7a), 134.47 (C-5), 144.92 (C-3), 148.00 (C-7).

### **2-Χλωρο-N-{7-(κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (29)**

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής του παραγώγου **15**, από τη διαμίνη **28** σε θερμοκρασία -40 °C προκειμένου να αποφευχθεί ο σχηματισμός δις υποκατεστημένου προϊόντος. Το προϊόν χρησιμοποιείται απευθείας για τις επόμενες αντιδράσεις.

### **N-{7-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-3-υλο}-2-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)ακεταμίδιο (30)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **29** σε απόδοση 96% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **16** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.8-0.2 έως 8-2. Κίτρινο έλαιο.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.20-2.15 (m, 10H, cyclohexyl-H), 2.32 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> piperazine), 2.50-2.60 (brs, 4H, H-3'', H-5''), 2.65-2.80 (brs, 4H, H-2'', H-6''), 3.19 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 4.06-4.14 (m, 1H, H-1'), 4.24 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> pyrazole), 4.60 (d, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine, J=7.0 Hz), 6.94 (d, 1H, H-4, J=5.9 Hz), 7.65 (d, 1H, H-5, J=5.9 Hz), 9.31 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 24.94 (cyclohexyl-C), 25.95 (cyclohexyl-C), 33.48 (cyclohexyl-C), 39.24 (-CH<sub>3</sub> pyrazole), 45.87 (-CH<sub>3</sub> piperazine), 49.32 (C-1'), 53.38 (C-2'', C-6''), 55.10 (C-3'', C-5''), 61.50 (-CH<sub>2</sub>-), 105.35 (C-4), 121.72 (C-3a), 128.41 (C-7a), 137.13 (C-5), 137.80 (C-3), 145.17 (C-7), 168.51 (-CO-).

### N-{7-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (31)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **29** σε απόδοση 97% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **16**, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9.5-0.5, 8.5-1.5. Μπεζ στερεό. Σ.τ.: 139-147 °C (Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.20-2.15 (m, 10H, cyclohexyl-H), 2.40 (s, 6H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.15 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 4.06-4.14 (m, 1H, H-1'), 4.22 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> pyrazole), 4.64 (d, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine, J=6.1 Hz), 7.00 (d, 1H, H-4, J=5.9 Hz), 7.63 (d, 1H, H-5, J=5.9 Hz), 9.43 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 24.92 (cyclohexyl-C), 25.93 (cyclohexyl-C), 33.44 (cyclohexyl-C), 39.23 (-CH<sub>3</sub> pyrazole), 46.07 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 49.41 (C-1'), 63.07 (-CH<sub>2</sub>-), 105.58 (C-4), 121.69 (C-3a), 128.38 (C-7a), 136.68 (C-5), 137.97 (C-3), 145.05 (C-7), 168.87 (-CO-).

### N-{7-(Κυκλοεξυλαμινο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(φαινυλαμινο)ακεταμίδιο (32)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **29** σε απόδοση 48% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **18**, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση χλωροφόρμιο και στη συνέχεια χλωροφόρμιο-μεθανόλη 10-0.2. Υποκίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C (EtOAc).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.20-2.15 (m, 10H, cyclohexyl-H), 3.94 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 4.06-4.14 (m, 1H, H-1'), 4.16 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4.62 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine), 4.83 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 6.67 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=7.9 Hz), 6.81 (t, 1H, H-4'', J=7.3 Hz), 6.91 (d, 1H, H-4, J=5.9 Hz), 7.20 (t, 2H, H-3'', H-5'', J=7.8 Hz), 7.58 (d, 1H, H-5, J=5.9 Hz), 9.06 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 24.87 (cyclohexyl-C), 25.86 (cyclohexyl-C), 33.31 (cyclohexyl-C), 39.32 (-CH<sub>3</sub>), 49.15 (-CH<sub>2</sub>-), 49.78 (C-1'), 105.41 (C-4), 113.48 (C-2'', C-6''), 119.44 (C-4''), 121.96 (C-3a), 128.12 (C-7a), 129.60 (C-3'', C-5''), 135.69 (C-5), 137.63 (C-3), 144.77 (C-1''), 147.08 (C-7), 169.74 (-CO-).

### **3-Νιτρο-Ν-κυκλοεξυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (33)**

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής του παραγώγου **27** και θέρμανση στους 140 °C για 15 ώρες. Ο καθαρισμός γίνεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 5-5 έως 1-9. (88%). Κίτρινο στερεό. Σ.τ.: >300 °C (MeOH).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.10-2.00 (m, 10H, cyclohexyl-H), 3.88 (brs, 1H, H-1'), 7.16 (d, 1H, H-4, J=6.5 Hz), 7.49 (brs, 1H, H-5), 8.57 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine), 12.59 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- pyrazole).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 24.58 (cyclohexyl-C), 24.97 (cyclohexyl-C), 31.91 (cyclohexyl-C), 50.20 (C-1'), 103.08 (C-4), 120.20 (C-3a), 133.70 (C-7a), 145.12 (C-5, C-3), 150.44 (C-7).

### **1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-Ν-κυκλοεξυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (34) και 2-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-Ν-κυκλοεξυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (35)**

Λαμβάνονται από το παράγωγο **33** σε αποδόσεις 63% και 5% αντίστοιχα, με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τα παράγωγα **11** και **12**, ύστερα από θέρμανση για 18 ώρες και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 9.9-0.1 έως 9-1.

**1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-Ν-κυκλοεξυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (34):** Πορτοκαλί στερεό. Σ.τ.: 152-154 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.85-1.90 (m, 10H, cyclohexyl-H), 3.81 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.88-3.96 (m, 1H, H-1'), 4.64 (d, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine, J=6.4 Hz), 5.82 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.94 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.7 Hz), 7.09 (d, 2H, H-3'', H-5'', J=8.7 Hz), 7.36 (d, 1H, H-4, J=5.8 Hz), 7.94 (d, 1H, H-5, J=5.8 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 25.10 (cyclohexyl-C), 25.86 (cyclohexyl-C), 33.42 (cyclohexyl-C), 49.40 (C-1'), 55.40 (-OCH<sub>3</sub>), 57.71 (-CH<sub>2</sub>-), 101.67 (C-4), 114.36 (C-2'', C-6''), 122.41 (C-3a), 126.60 (C-7a), 129.74 (C-3'', C-5''), 134.65 (C-1''), 136.96 (C-3), 145.36 (C-5), 150.18 (C-7), 160.01 (C-4'').

**2-(4-Μεθοξυβενζυλο)-3-νιτρο-Ν-κυκλοεξυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-7-αμίνη (35):** Ερυθρό έλαιο.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.20-2.20 (m, 10H, cyclohexyl-H), 3.78 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.14-4.26 (m, 1H, H-1'), 5.80 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-

cyclohexylamine), 5.98 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.85 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.7 Hz), 7.07 (d, 1H, H-4, J=6.1 Hz), 7.31 (d, 2H, H-3'', H-5'', J=8.7 Hz), 7.90 (d, 1H, H-5, J=6.1 Hz).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 25.10 (cyclohexyl-C), 25.86 (cyclohexyl-C), 33.44 (cyclohexyl-C), 49.63 (C-1'), 55.45 (-OCH<sub>3</sub>), 57.80 (-CH<sub>2</sub>), 101.73 (C-4), 114.41 (C-2'', C-6''), 122.49 (C-3a), 126.58 (C-7a), 129.80 (C-3'', C-5''), 134.64 (C-1''), 137.05 (C-3), 145.33 (C-5), 150.13 (C-7), 160.07 (C-4'').

### **N<sup>7</sup>-Κυκλοεξυλο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινο-3,7-διαμίνη (36)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **34** σε απόδοση 78% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τη διαμίνη **14**, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 5-5, 3-7. Γκρι στερεό. Σ.τ.: 125-132 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-*n*-hexane).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.10-2.00 (m, 10H, cyclohexyl-H), 3.70 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.94 (brs, 1H, H-1'), 5.31 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 6.14 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 6.31 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine), 6.69 (d, 1H, H-4, J=6.1 Hz), 6.88 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.5 Hz), 7.06-7.16 (m, 3H, H-5, H-3'', H-5'').

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 24.99 (cyclohexyl-C), 25.34 (cyclohexyl-C), 32.49 (cyclohexyl-C), 48.59 (C-1'), 50.31 (-CH<sub>2</sub>-), 55.07 (-OCH<sub>3</sub>), 102.97 (C-4), 108.36 (C-3a), 113.81 (C-2'', C-6''), 128.64 (C-3'', C-5''), 128.92 (C-7a, C-1''), 135.21 (C-5), 140.97 (C-3), 147.80 (C-7), 158.58 (C-4'').

### **2-Χλωρο-Ν-{1-(4-μεθοξυβενζυλο)-7-(κυκλοεξυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}ακεταμίδιο (37)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **36** με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **29** και χρησιμοποιείται απευθείας για τις επόμενες αντιδράσεις.

### **N-{1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-7-(κυκλοεξυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (38)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **37** σε απόδοση 76% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **16**, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση οξικό αιθυλεστέρα-μεθανόλη 9.5-0.5, 9-1. Λευκό στερεό. Σ.τ.: 138-139 °C (Et<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 0.80-1.85 (m, 10H, cyclohexyl-H), 2.39 (s, 6H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.14 (s, 2H, -NHCOCH<sub>2</sub>-), 3.75 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.82-3.90 (m, 1H, H-1'),

4.41 (d, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine, J=7.2 Hz), 5.61 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-pyrazole), 6.85 (d, 2H, H-2'', H-6'', J=8.7 Hz), 7.01-7.06 (m, 3H, H-4, H-3'', H-5''), 7.64 (d, 1H, H-5, J=5.9 Hz), 9.51 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 24.70 (cyclohexyl-C), 25.86 (cyclohexyl-C), 32.96 (cyclohexyl-C), 46.11 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 49.06 (C-1'), 55.08 (-CH<sub>2</sub>- pyrazole), 55.41 (-OCH<sub>3</sub>), 63.20 (-NHCOCH<sub>2</sub>-), 105.52 (C-4), 114.78 (C-2'', C-6''), 122.16 (C-3a), 127.48 (C-3'', C-5''), 128.23 (C-7a), 128.88 (C-1''), 137.19 (C-5), 138.43 (C-3), 144.99 (C-7), 159.78 (C-4''), 168.93 (-CO-).

### **N-{7-(Κυκλοεξυλαμινο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-3-υλο}-2-(διμεθυλαμινο)ακεταμίδιο (39)**

Λαμβάνεται από το παράγωγο **38** σε απόδοση 99% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **25**, μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-μεθανόλη 9-1, 9-2. Μπεζ έλαιο.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.10-2.10 (m, 10H, cyclohexyl-H), 2.35 (s, 6H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.21 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.93-4.05 (m, 1H, H-1'), 6.55 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine), 6.80 (d, 1H, H-4, J=5.9 Hz), 7.49 (d, 1H, H-5, J=5.9 Hz), 10.11 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-), 12.77 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- pyrazole).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 24.58 (cyclohexyl-C), 25.49 (cyclohexyl-C), 32.67 (cyclohexyl-C), 45.14 (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 48.44 (C-1'), 61.89 (-CH<sub>2</sub>-), 104.01 (C-4), 119.04 (C-3a), 127.84 (C-7a), 135.96 (C-5), 139.75 (C-3), 144.44 (C-7), 168.17 (-CO-).

### **III.5 Σύνθεση άλλων υποκατεστημένων πυραζολο[3,4-c]πυριδινών, για περαιτέρω συγκριτική φαρμακολογική αξιολόγηση και μελέτη (40-42)**

#### **N<sup>1</sup>-φαινυλο-N<sup>2</sup>-{7-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-(πυραζολο[3,4-c]πυριδιν-3-υλο)}ουρία (40)**

Σε διάλυμα της διαμίνης **28** (40 mg, 0.16 mmol) εντός άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (2.50 ml) και σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται ισοκυανικός φαινυλεστέρας (0.025 ml, 0.24 mmol) και κατόπιν το μίγμα θερμαίνεται στους 50 °C για 18 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση

κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 7-3, 5-5 και λαμβάνεται η *N,N'*-δις υποκατεστημένη ουρία **40** (50 mg, 84%). Λευκό στερεό. Σ.τ.: 236-238 °C (CHCl<sub>3</sub>).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 1.20-2.00 (m, 10H, cyclohexyl-H), 3.95-4.01 (m, 1H, H-1'), 4.21 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 5.87 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-cyclohexylamine), 6.98-7.06 (m, 2H, H-4, H-4''), 7.30 (t, 2H, H-3'', H-5'', J=7.8 Hz), 7.50-7.56 (m, 3H, H-5, H-2'', H-6''), 9.31 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH-phenyl), 9.53 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 24.91 (cyclohexyl-C), 25.62 (cyclohexyl-C), 32.15 (cyclohexyl-C), 38.81 (-CH<sub>3</sub>), 49.15 (C-1'), 104.34 (C-4), 118.75 (C-2'', C-6''), 119.68 (C-3a), 122.33 (C-4''), 127.88 (C-7a), 128.80 (C-3'', C-5''), 135.79 (C-5), 139.29 (C-3), 139.56 (C-1''), 145.06 (C-7), 152.25 (-CO-).

### *N*{7-κυκλοεξυλαμινο-1-μεθυλο-(πυραζολο[3,4-*c*]πυριδιν-3-υλο)}προπαναμίδιο (41)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **28** σε απόδοση 81% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για το παράγωγο **29** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2 έως 5-5. Ελαιώδες προϊόν.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.20-2.15 (m, 10H, cyclohexyl-H), 2.44 (q, 2H, -CH<sub>2</sub>-, J=7.3 Hz), 4.02-4.31 (m, 7H, H-1', -CH<sub>3</sub> pyrazole, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.67 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- cyclohexylamine), 6.91 (d, 1H, H-4, J=5.5 Hz), 7.59 (d, 1H, H-5, J=5.5 Hz), 8.16 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NHCO-).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 24.97 (cyclohexyl-C), 25.99 (cyclohexyl-C), 29.81 (-CH<sub>2</sub>-), 33.53 (cyclohexyl-C), 39.21 (-CH<sub>3</sub> pyrazole), 49.46 (C-1'), 58.50 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 105.86 (C-4), 122.11 (C-3a), 128.49 (C-7a), 136.78 (C-5), 138.33 (C-3), 145.14 (C-7), 172.29 (-CO-).

### *N*<sup>7</sup>-φαινυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδινο-3,7-διαμίνη (42)

Λαμβάνεται από το παράγωγο **19** σε απόδοση 96% με μέθοδο ανάλογη αυτής που περιγράφηκε για τη διαμίνη **14** και μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 3-7, 2-8. Γκρι στερεό. Σ.τ.: 147-152 °C (*n*-hexane).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 5.45 (brs, 2H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH<sub>2</sub>), 6.95 (t, 1H, H-4', J=7.1 Hz), 7.09 (d, 1H, H-4, J=5.6 Hz), 7.32 (t, 2H, H-3', H-5', J=7.8 Hz), 7.61 (d, 1H, H-5, J=5.6 Hz), 7.86 (d, 2H, H-2', H-6', J=8.1 Hz), 8.62 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- aniline), 11.40 (brs, 1H, D<sub>2</sub>O exchang., -NH- pyrazole).

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 106.22 (C-4), 116.98 (C-3a), 118.20 (C-2', C-6'), 121.00 (C-4'), 128.08 (C-7a), 128.73 (C-3', C-5'), 133.89 (C-5), 141.15 (C-3), 141.23 (C-1'), 149.82 (C-7).

## IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. I. Collins, P. Workman, New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nature Chem. Biol.* **2006**, *2*, 689-700.
2. I. Kola, J. Landis, Can pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 711-715.
3. <http://cancerwatch.com/patient/drugs/druglist.html>
4. T. Hunter, Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **1995**, *80*, 225-236.
5. H. Saito, Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2497-2510.
6. G. Scapin, Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discov. Today* **2002**, *7*, 601-611.
7. I. Shchemelinin, L. Sefc, E. Necas, Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and other Diseases. *Folia Biologica (Praha)* **2006**, *52*, 81-101.
8. J. A. Adams, Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271-2290.
9. O. Hantschel, G. Superti-Furga, Regulation of the c-Abl and BCR Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev.* **2004**, *5*, 33-44.
10. A. K. Ghose, T. Herbertz, D. A. Pippin, J. M. Salvino, J. P. Mallamo, Knowledge Based Prediction of Ligand Binding Modes and Rational Inhibitor Design for Kinase Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5149-5171.
11. T. Mikaelson, N. Gerits, U. Moens, Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy. *Biotechn. Ann. Rev.* **2006**, *12*, 153-223.
12. T. G. Lugo, O. N. Witte, The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with c-myc. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 1263-1270.
13. S. Madhusudan, T. S. Ganesan, Tyrosine Kinase Inhibitors in cancer therapy. *Clin. Biochem.* **2004**, *37*, 618-635.
14. F. M. Uckun, C. Mao, Tyrosine Kinases as new molecular targets in treatment of inflammatory disorders and leukemia. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1083-1091.
15. a) S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi, R. Masuma, A new alkaloid AM-2282 of Streptomyces origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J. Antibiot.* **1977**, *4*, 275-282.

- b) T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, F. Tomita, Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid  $\text{Ca}^{2+}$  dependent kinase. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* **1986**, *135*(2), 397-402.
16. R. Hoessl, S. Leclerc, J. A. Endicott, M. E. M. Nobel, A. Lawrie, P. Tunna, M. Leost, E. Damiens, D. Marie, D. Marko, E. Niederberger, W. Tang, G. Eisenbrand and L. Meijer, Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 60-67.
17. M. Kitagawa, T. Okabe, H. Ogino, H. Matsumoto, I. Suzuki-Takahashi, T. Kokubo, H. Higashi, S. Saitoh, Y. Taya, H. Yasuda, Butyrolactone I, a selective inhibitor of cdk2 and cdc2 kinase. *Oncogene* **1993**, *9*, 2425-2432.
18. W. F. De Azevedo Jr, H.-J. Mueller-Dieckmann, U. Schulze-Gahmen, P. J. Worland, E. Sausville and S.-H. Kim, Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2735-2740.
19. a) R. Steinbrook, The Price of Sight-Ranibizumab, Bevacizumab, and the Treatment of Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1409-1412.  
b) Εθνικό Συνταγολόγιο 2007 σελ. 453-455, 463-464.
20. T. O' Hare, D. K. Walters, M. W. N. Deininger and B. J. Druker, AMN107 tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 117-119.
21. A. Kontzias, A. Laurence, M. Gadina, J. O' Shea, Kinase inhibitors in the treatment of immune mediated disease. *F1000 Medicine Reports* **2012**, *4*:(5).
22. B. J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann and N. B. Lydon, Effects of selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **1996**, *5*, 561-566.
23. Y. Liu, N. S. Gray, Rational design of inhibitors that bind to inactive Kinase conformations. *Nature Chemical Biology* **2006**, *2*, 358-364.
24. K. T. Flaherty, J. R. Infante, A. Daud, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1694-1703.
25. J. C. Chavez, E. Sahakian, J. Pinilla-Ibarz, Ibrutinib: an evidence-based review of its potential in the treatment of advanced chronic lymphocytic leukemia. *Core Evid.* **2013**, *8*, 37-45.
26. W. F. De Azevedo, S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, S. H. Kim, Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 518-526.

27. J. Wesierska-Gadek, M. Gueorguieva, J. Wojciechowski, M. Horky, Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: a comparison of the effects exerted by roscovitine and olomoucine. *Pol. J. Pharmacol.* **2004**, *56*, 635-641.
28. R. Jorda, L. Havlicek, I. McNae, M. D. Walkinshaw, A. Sturc, J. Navratilova, M. Kuzma, M. Mistrik, J. Bartek, M. Strnad, V. Krystof, Pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2980-2993.
29. M. Chaudan, R. Kumar, Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines: A review. *Biorg. And Med. Chem.* **2013**, *21*, 5657-5668.
30. a) S. B. Weitensteiner, J. Liebl, V. Krystof, L. Havlicek, T. Gucky, M. Strnad, R. Furst, A. M. Vollmar, S. Zahler, Trisubstituted pyrazolopyrimidines as novel angiogenesis inhibitors. *PLoS One* **2013**, *8*(1), e54607.  
b) B. M. Desai, J. Villanueva and M. Herlyn, The Anti-Melanoma Activity of Dinaciclib, a Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Is Dependent on p53 Signaling. *PLoS One* **2013**, *8*(3), e59588.
31. L. N. Pino, S. Winfield, III Zehrung, Preparation of Pure 2-Aminonitropyridines and 2-Aminonitropicolines. Rapid Separations by Sublimation. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*(11), 3154-3155.
32. V. N. Kourafalos, P. Marakos, N. Pouli, L. B. Townsend, The Synthesis of a New Pyrazolo[3,4-*c*]pyridine C-Nucleoside, Structurally Related to Formycin B. *Synlett* **2002**, 1479-1482.
33. G. R. Lappin and F. B. Slezak, New Compounds, Some Derivatives of the 3- and 5-Nitro-2-aminopicolines. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*(6), 2806-2807.
34. E. V. Brown, Syntheses and Decarboxylation of the Isomeric Nitropyridinecarboxylic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*(12), 3167-3168.
35. M. H. Norman, D. J. Minick, G. E. Martin, Structural elucidation of an oxazolo[5,4-*b*]pyridine: An alternative cyclization product related to nevirapine. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, *30*(3), 771-779.
36. a) P. Marakos, N. Pouli, D. S. Wise, L. B. Townsend, A New and Facile Method for the preparation of 3-Substituted Pyrazolo[3,4-*c*]pyridines. *Synlett* **1997**, 561-562.  
b) D. Chapman, J. Hurst, Pyrazolopyridines. Part 5. Preparation and reactions of pyrazolo[3,4-*c*]pyridines. *J. Med. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1980**, 2398-2404.

37. J. C. Milhavet, A. Gueiffier, L. Bernal and J. C. Teulade, Synthesis, Reactivity and  $^{13}\text{C}$ -NMR of 1*H*-Pyrazolo[3,4-*c*]pyridine Derivatives. *Heterocycles* **1999**, *51*(7), 1661-1667.
38. A. G. Burton, P. J. Halls, A. R. Katritzky, The selective 3- and 5-nitration of 2-pyridones. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12*(24), 2211-2212.
39. A. Roe, R. B. Seligman, The Preparation of 3-Fluoroisonicotinic Acid and Related Compounds. *J. Org. Chem.* **1955**, *20*(12), 1729-1732.
40. C. Ozvegy-Laczka, J. Cserepes, N. Barry Elkind, B. Sarkadi, Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates* **2005**, *8*, 15-26.
41. S. Faderl, M. Talaz, Z. Estrov, S. O' Brien, R. Kurzrock and H. M. Kantarjian, The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 164-172.
42. S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science (Wash DC)* **1998**, *279*, 577-580.
43. C. L. Arteaga and D. H. Johnson, Tyrosine kinase inhibitors-ZD1839 (Iressa). *Curr. Opin. Oncol.* **2001**, *6*, 491-498.
44. J. Zhang, P. L. Yang and N. S. Gray, Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature* **2009**, *9*, 28-38.
45. M. A. Pearson and D. Fabbro, Targeting protein kinases in cancer therapy: a success? *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2004**, *4*(6), 1113-1124.