



*ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ*

*ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ*

*ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ*

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



*Κουτσούκη Κλοντιάνα*

*ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ*

*ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ*

*ΑΘΗΝΑ 2015*

*ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ*

Π. ΜΑΡΑΚΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ)

Ν. ΠΟΥΛΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ε. ΜΙΚΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ABSTRACT.....	- 9 -
DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW SUBSTITUTED PYRAZOLOPYRIDAZINES AS POTENTIAL KINASE INHIBITORS.....	- 9 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	- 10 -
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΥΡΑΖΟΛΟΠΥΡΙΔΑΖΙΝΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ.....	- 10 -
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:.....	- 11 -
Αντιμεταβολίτες:.....	- 12 -
Αλκυλιωτικοί παράγοντες:.....	- 13 -
Ενώσεις που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με το DNA: .....	- 13 -
Αναστολείς της κυτταρικής διαίρεσης:.....	- 14 -
Στοχευμένες θεραπείες: .....	- 14 -
Ανοσοθεραπεία: .....	- 14 -
1.1 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ: .....	- 16 -
1.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ:.....	- 20 -
1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ:.....	- 25 -
1.4 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ: .....	- 27 -
1.5 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ. ....	- 32 -
1. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	- 34 -
Α) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ N-ΜΕΘΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ I ΚΑΙ II.....	- 34 -
Β) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ N-BENZΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ III ΚΑΙ IV.....	- 43 -
Γ) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ V.....	- 50 -
Δ) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ N-ΜΕΘΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ VI ΚΑΙ VII. ....	- 52 -
Ε) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ N-BENZΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ VIII ΚΑΙ IX, ΟΠΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΠΟΒΕΝΖΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ X. ....	- 58 -
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	- 63 -
5-μεθυλο-2,4-διοξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (2) <sup>30</sup> .....	- 63 -
3(5)-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5(3)-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (3) <sup>31</sup> .....	- 63 -
3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (4).....	- 64 -

5-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (5) .....	65 -
4-βρωμομεθυλο-3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (6) -	65 -
3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (7).....	65 -
3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (8) .....	66 -
4-βρωμομεθυλο-5-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (9) -	66 -
5-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (10) .....	67 -
3-ισοπροπυλο-2-μεθυλο-2,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (11) .....	67 -
3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-7-χλωρο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (12) .....	67 -
3-ισοπροπυλο-2-μεθυλο-7-χλωρο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (16).....	67 -
1-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (13) .....	68 -
1-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (14) ...	68 -
<i>N</i> -βενζυλο-1-μεθυλο-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-αμίνη (15).....	69 -
2-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (17).....	69 -
2-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (18) .-	69 -
<i>N</i> -βενζυλο-2-μεθυλο-3-ισοπροπυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-αμίνη (19) .....	70 -
<i>N,N</i> -διμεθυλο- <i>N'</i> -(2-μεθυλο-3-ισοπροπυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-υλ)αιθανο-1,2- διαμίνη (20) .....	70 -
1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (21).....	71 -
1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (23)-	71 -
-	
1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (24) .....	72 -
1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-1,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (25) .....	72 -
1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-7-χλωρο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (26) .....	73 -
1-βενζυλο-7-(4-μεθυλο-πιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (27)-	73 -
1-βενζυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (28).....	73 -
1-βενζυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλο-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-αμίνη (29).....	74 -
1-βενζυλο-5-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (22).....	74 -
1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-5-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (30)....	75 -
75 -	
1-βενζυλο-5-ισοπροπυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (31) .....	75 -
2-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-2,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (32).....	76 -
2-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-7-χλωρο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (33) .....	76 -

2-βενζυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (34)	- 76 -
2-βενζυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (35)	..... - 77 -
2-βενζυλο- <i>N,N</i> -διμεθυλο-3-ισοπροπυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-αμίνη (36)	..... - 77 -
7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> (2 <i>H</i> )-πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (37)	..... - 78 -
7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> (2 <i>H</i> )-πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (38)	..... - 78 -
<i>N,N</i> -διμεθυλο-3-ισοπροπυλο-1 <i>H</i> (2 <i>H</i> )-πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-αμίνη (39)	..... - 79 -
4-φαινυλο-2,4-διοξοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας (41) <sup>32</sup>	..... - 79 -
3(5)-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5(3)-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (42)	..... - 79 -
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (43)	..... - 80 -
4-βρωμομεθυλο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (45)	..... - 80 -
1-μεθυλο-3-φαινυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (46)	..... - 81 -
1-μεθυλο-3-φαινυλο-1,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (47)	..... - 81 -
1-μεθυλο-3-φαινυλο-7-χλωρο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (48)	..... - 81 -
1-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (49)	..... - 81 -
1-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (50)	..... - 82 -
<i>N</i> -βενζυλο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-αμίνη (51)	..... - 82 -
1-μεθυλο-5-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (44)	..... - 83 -
4-βρωμομεθυλο-1-μεθυλο-5-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (52)	..... - 83 -
1-μεθυλο-5-φαινυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (53)	..... - 83 -
2-μεθυλο-3-φαινυλο-2,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (54)	..... - 84 -
2-μεθυλο-3-φαινυλο-7-χλωρο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (55)	..... - 84 -
2-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (56)	..... - 84 -
2-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (57)	..... - 85 -
<i>N</i> -βενζυλο-2-μεθυλο-3-φαινυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-αμίνη (58)	..... - 85 -
1-βενζυλο-3-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (59)	..... - 86 -
1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-3-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (61)	..... - 86 -
1-βενζυλο-3-φαινυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (62)	..... - 87 -
1-βενζυλο-3-φαινυλο-1,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (63)	..... - 87 -
1-βενζυλο-5-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (60)	..... - 87 -
1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-5-φαινυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (64)	... - 88 -
1-βενζυλο-5-φαινυλο-4-φορμυλο-1 <i>H</i> -πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (65)	..... - 88 -
2-βενζυλο-3-φαινυλο-2,6-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνη (66)	..... - 89 -

3-φαινυλο-1,6(2,6)-διϋδρο-7 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζιν-7-όνης (67) .....	89 -
2-βενζυλο-3-φαινυλο-7-χλωρο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (68).....	90 -
2-βενζυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (69) .....	90 -
2-βενζυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-2 <i>H</i> -πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (70).....	90 -
7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-1 <i>H</i> (2 <i>H</i> )-πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (71) .....	91 -
7-(4-μεθυλο-πιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-1 <i>H</i> (2 <i>H</i> )-πυραζολο[3,4- <i>d</i> ]πυριδαζίνη (72).....	91 -
3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	92 -

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Π. Μαράκουπρος τον οποίο εκφράζω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου για την καθοδήγηση και την αμέριστη συμπαράστασή του.

Επίσης, πολλές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια Ν. Πουλή για την πολύ μεγάλη και σημαντική βοήθειά της καθ'όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής μου εργασίαςόπως και ένα μεγάλο ευχαριστώ στο τρίτο μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή Ε. Μικρό.

Θερμά ευχαριστώ τον Ν. Λουγιάκη για την πολύτιμη βοήθειά του στην επιτυχή περάτωση της παρούσας εργασίας όπως και τον Επίκουρο Καθηγητή Ι. Κωστάκη για τις συμβουλές και τις υποδείξεις κατά την συγγραφή της εργασίας.

Επίσης ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την οποιαδήποτε βοήθειά τους και για το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε καθ'όλη την διάρκεια της εργασίας.

Και τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου που με συμβουλεύει και με στηρίζει σε όλες τις αποφάσεις μου, όπως και στις φίλες και τους φίλους που είναι δίπλα μου και μου προσφέρουν πάντα απλόχερα την βοήθειά τους.

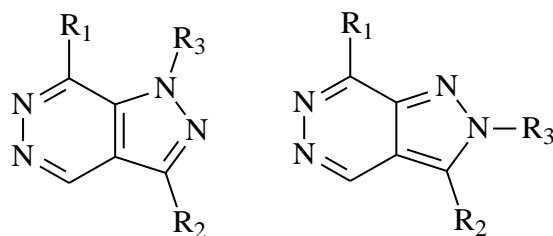




## ABSTRACT.

### DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW SUBSTITUTED PYRAZOLOPYRIDAZINES AS POTENTIAL KINASE INHIBITORS

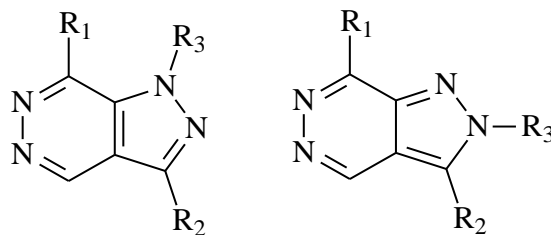
Cell division, a process which is instrumental to the development and progression of tumors, has been an attractive target for antitumor therapy. In normal cells the mitotic process is under heavy post-translational control by several regulatory mechanisms, concerning protein localization, proteolysis and phosphorylation performed by a number of serine/threonine mitotic kinases. Mitotic entry and exit as well as many other key events associated with mitosis, are brought about by the activation of kinases. A protein kinase is an enzyme that modifies other proteins by chemically adding phosphate groups to them, a process which is called phosphorylation. Phosphorylation usually results in a functional change of the target protein (substrate) by changing enzyme activity, cellular location or association with other proteins. Cancer cells in contrast, are often characterized by the loss of control of important regulatory cell cycle checkpoints, and the incorrect segregation of chromosomes during mitosis results in aneuploidy and chromosome instability. Amplification of several mitotic kinase genes are frequently observed in human tumors. Determining the functions of kinases is currently an active area of research and a great deal of investigations is directed towards identifying selective kinase inhibitors as anticancer agents. Taking into account that many purine-like heterocyclic systems have shown interesting activities against mitotic kinases and in the course of a research project aimed to develop novel kinase inhibitors, we have designed some new substituted pyrazolo[3,4-d]pyridazines with the following general formulas ( $R_1$ : aliphatic or aromatic amine,  $R_2$ : aryl, alkyl,  $R_3$ : H,  $CH_3$ ,  $CH_2C_5H_6$ ), with the aim to investigate their potential kinase inhibitory activities.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

Η κυτταρική διαίρεση, η οποία είναι μια διαδικασία καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη και την εξέλιξη των όγκων, είναι ένας ελκυστικός στόχος της αντικαρκινικής θεραπείας. Στα φυσιολογικά κύτταρα η μιτωτική διαίρεση ελέγχεται από διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, όπως η πρωτεόλυση και η φωσφορυλίωση, διαδικασίες όπου μεσολαβούν έναν αριθμό πρωτεϊνικών κινασών σερίνης / θρεονίνης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα που τροποποιούν πρωτεΐνες του κυττάρου προσθέτοντας σε αυτές φωσφορικές ομάδες και καταυτών τον τρόπο μεταβάλουν την ενζυμική τους δραστηριότητα και την σύνδεσή τους με άλλες πρωτεΐνες. Τα καρκινικά κύτταρα όμως, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, συχνά χαρακτηρίζονται από απώλεια ελέγχου των σημαντικών ρυθμιστικών μηχανισμών λειτουργίας του κυτταρικού κύκλου, με συνέπεια τον ανώμαλο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά την διάρκεια της μίτωσης που οδηγεί σε ανευπλοειδία και χρωμοσωμική αστάθεια. Ο καθορισμός της λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών, αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας, με κύριο στόχο την εύρεση εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ως πιθανών αντικαρκινικών φαρμάκων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι πολλά μόρια που παρουσιάζουν δομική αναλογία προς τις πουρίνες έχουν δείξει αξιόλογη δράση έναντι μιτωτικών κινασών και στα πλαίσια ενός ερευνητικού προγράμματος με στόχο να αναπτυχθούν νέοι αναστολείς κινασών, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ορισμένα νέα παράγωγα, συγκεκριμένα υποκατεστημένες πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνες των παρακάτω γενικών τύπων ( $R_1$ : αλειφατικές ή αρωματικές αμίνες,  $R_2$ : αρύλιο, αλκύλιο,  $R_3$ : H,  $CH_3$ ,  $CH_2C_5H_6$ ) με σκοπό να μελετηθεί η πιθανή δράση τους ως αναστολείς κινασών.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Ο καρκίνος ως ασθένεια χαρακτηρίζεται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και τη διασπορά στο σώμα κυττάρων του ίδιου του οργανισμού, που παρουσιάζουν μορφολογικές και λειτουργικές διαφοροποιήσεις συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά κύτταρά του. Ο ανώμαλος αυτός πολλαπλασιασμός των κυττάρων οφείλεται σε κληρονομική ή επίκτητη μετάλλαξη που οδηγεί σε δυσλειτουργία των υγιών ιστών, με ταυτόχρονη προώθηση της ανεξέλεγκτης αγγειογένεσης που τροφοδοτεί την επιβίωση του καρκινικού όγκου. Ο καρκινικός φαινότυπος χαρακτηρίζεται από απώλεια ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, απώλεια της φυσιολογικής κυτταρικής λειτουργικότητας και της ικανότητας διαφοροποίησης, τάση διείσδυσης και μετάστασης σε άλλους ιστούς<sup>1</sup>. Στα ανεπτυγμένα κράτη ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις, ενώ είναι υπεύθυνος για την εμφάνιση περισσότερων από 100 διακριτών ασθενειών και την πρόκληση ενός στους οχτώ θανάτους παγκοσμίως. Συγκεκριμένα, στις Η.Π.Α. εκτιμάται ότι το 25% του πληθυσμού θα προσβληθεί από αυτή τη νόσο, αφού κάθε χρόνο πραγματοποιούνται ένα εκατομμύριο νέες διαγνώσεις. Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι επειδή ο καρκίνος είναι εκφυλιστική ασθένεια και εμφανίζεται συχνότερα στους ηλικιωμένους αναμένεται στατιστικά αύξηση των περιστατικών λόγω αύξησης του μέσου όρου ζωής<sup>2</sup>.

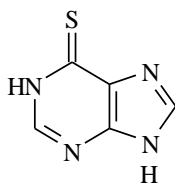
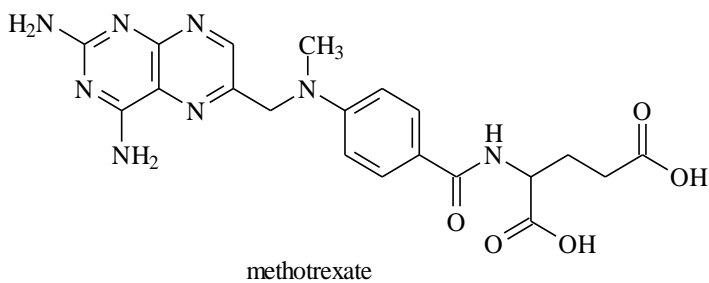
Παρόλο που οι υπάρχουσες θεραπείες έχουν επιφέρει σημαντικά αποτελέσματα, η πλήρης ίαση, ή η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης εξακολουθούν να είναι ζητούμενα για την πλειοψηφία των περιστατικών. Η αντιμετώπιση της νόσου δεν είναι ενιαία και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος της νεοπλασίας, το στάδιο εξέλιξής της, η κατάσταση της υγείας του ασθενούς, το φύλο και η ηλικία του. Επιδιώκεται η εκλεκτική απομάκρυνση ή θανάτωση των καρκινικών κυττάρων, που επιχειρείται συνήθως με συνδυασμό ακτινοβολίας, εγχείρησης και χημειοθεραπείας. Εκτός από τους προαναφερθέντες τρόπους αντιμετώπισης του καρκίνου υπάρχουν και πιο νέες και

εξελιγμένες θεραπείες όπως η ορμονοθεραπεία και η θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν στην εύρεση θεραπείας με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες<sup>3</sup>. Τα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά σχήματα γίνονται πιο πολύπλοκα με την πάροδο του χρόνου, καθώς προστίθενται συνεχώς νέα φάρμακα και νέες κατηγορίες φαρμάκων. Επιπλέον, η εκτενέστερη μελέτη και κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών του καρκίνου αποκαλύπτει την τεράστια ανομοιογένεια της νόσου και συμβάλλει στην ανάπτυξη όλο και πιο εξατομικευμένης θεραπείας.

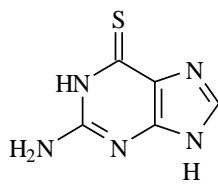
Οι σημαντικότερες κατηγορίες των χρησιμοποιούμενων αντικαρκινικών φαρμάκων είναι:

#### Αντιμεταβολίτες:

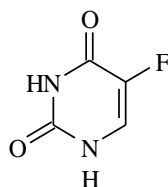
Πρόκειται για παράγωγα που παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό του DNA μέσω αναστολής της παραγωγής των δομικών του στοιχείων άμεσα (αναστολή αναβολισμού νουκλεοτιδίων), ή έμμεσα (ανταγωνισμός των ενζύμων που σχετίζονται με τη σύνθεση νουκλεοτιδίων) ή ενσωματώνονται στο ίδιο το DNA. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι ανταγωνιστές του φολικού οξέος (methotrexate), τα ανάλογα πουργινών (6-mercaptopurine, 6-thioguanine) και πυριμιδινών (5-fluorouracil, cytarabine)



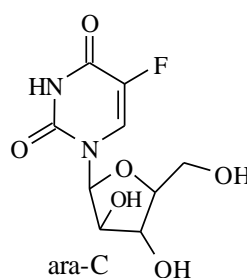
6-MP



6-TG



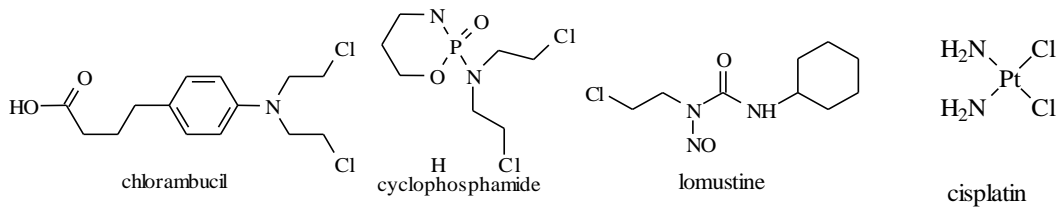
5-FU



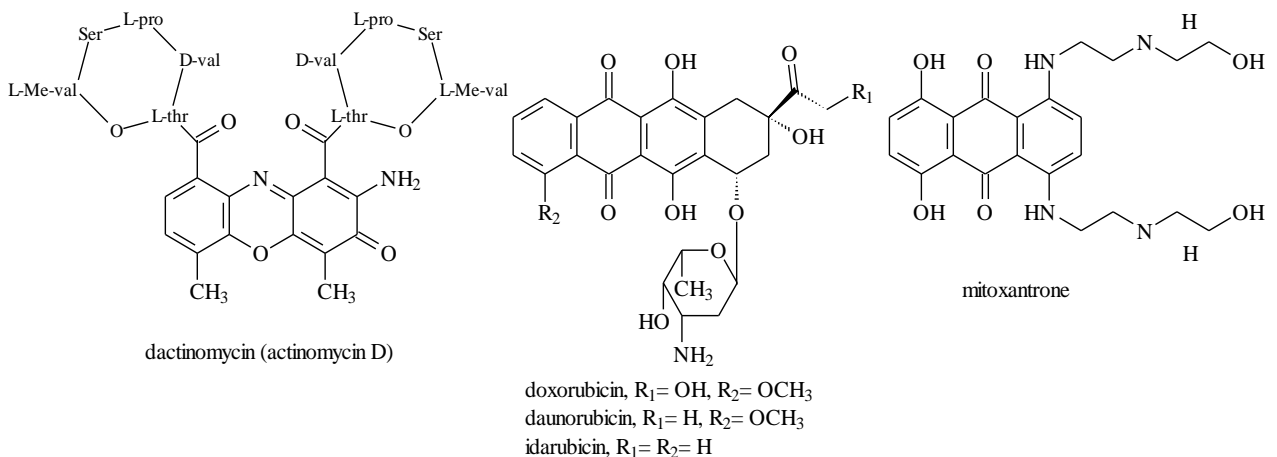
ara-C

**Αλκυλιωτικοί παράγοντες:**

Είναι τα φάρμακα που προκαλούν αλκυλίωση σε πυρηνόφιλες ομάδες των νουκλεϊκών οξέων, όπου το N-7 της γουανίνης είναι ο πιο κοινός στόχος τους, ή σε μόρια πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν οι μουστάρδες του αζώτου (chlorambucil, cyclophosphamide), οι νιτροζουρίες (carmustine), και ενώσεις του λευκοχρύσου, όπως το cisplatin.

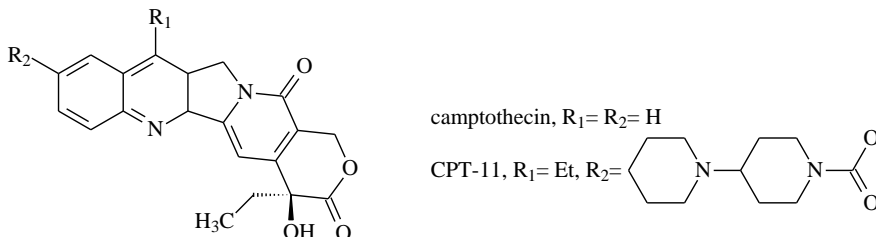
**Ενώσεις που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με το DNA:**

Δρουν μέσω δημιουργίας μη ομοιοπολικών δεσμών που προκαλούν μεταβολές στη δομή των νουκλεϊκών οξέων με αποτέλεσμα να διακόπτονται οι φυσιολογική λειτουργία τους και να οδηγείται το κύτταρο σε απόπτωση. Από τα πλέον χρησιμοποιούμενα φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι τα dactinomycin (actinomycin D), bleomycin, οι ανθρακυκλίνες (doxorubicin) και το mitoxantrone.



### Αναστολείς της κυτταρικής διαίρεσης:

Σε αυτή τη κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων ανήκουν οι αναστολείς της λειτουργίας των τοποϊσομερασών (camptothecin και ανάλογά του) και οι αναστολείς της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων (τα αλκαλοειδή της Vinca, και η ταξόλη).



### Στοχευμένες θεραπείες:

Πρόκειται για μια κατηγορία νέων θεραπευτικών μέσων, τα οποία κατευθύνονται σε συγκεκριμένους στόχους εντός του καρκινικού κυττάρου, παρεμβαίνοντας στην καρκινογένεση ή εμποδίζοντας την ανάπτυξη του όγκου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, αναστολείς διαφόρων άλλων κυτταρικών ενζύμων, τα antisense ολιγονουκλεοτίδια, οι επαγωγείς κυτταρικής διαφοροποίησης, οι αναστολείς ειδικών υποδοχέων καθώς και οι αναστολείς της αγγειογένεσης.

### Ανοσοθεραπεία:

Στόχος αυτής της θεραπείας είναι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, ή η ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς του, που ενδεικτικά επιτυγχάνεται με εφαρμογή εμβολίων, μονοκλωνικών αντισωμάτων, μετατροπένων της βιολογικής απόκρισης κ.α.

Στην ιδανική περίπτωση, τα αντικαρκινικά φάρμακα πρέπει να παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες που χαρακτηρίζουν αποκλειστικά τα κακοήθη κύτταρα. Όμως, τα περισσότερα φάρμακα που διαθέτουμε σήμερα δεν χαρακτηρίζονται από τόσο υψηλή εξειδίκευση και προσβάλλουν ανεξέλεγκτα όλα τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ταχέως. Η προσβολή των υγιών κυττάρων ευθύνεται για την ανάπτυξη των πολλών και συχνά σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών που εμφανίζονται προοδευτικά, κατά την εφαρμογή των διαφόρων χημειοθεραπευτικών σχημάτων, με αποτέλεσμα την υποχρεωτική

μεταβολή ή και διακοπή της θεραπείας. Από τους φυσιολογικούς ιστούς, εκείνοι που πολλαπλασιάζονται με ρυθμό ίσο ή και μεγαλύτερο από τους καρκινικούς, δηλαδή ο μυελός των οστών, το επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα και οι θύλακες των τριχών, παρουσιάζουν τις πιο συχνές και πιο επικίνδυνες παρενέργειες. Η αιματολογική τοξικότητα αποτελεί επίσης σημαντική παρενέργεια των αντικαρκινικών φαρμάκων. Η λευκοπενία μπορεί να οδηγήσει σε βαριά λοίμωξη και θάνατο, όπως και η θρομβοπενία που μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγία και στον θάνατο. Η αναιμία αποτελεί μικρότερο πρόβλημα και αντιμετωπίζεται σχετικά εύκολα. Η εισαγωγή τα τελευταία χρόνια στην κλινική πράξη των αυξητικών αιμοποιητικών παραγόντων έχει βοηθήσει σημαντικά την πρόληψη και αντιμετώπιση της λευκοπενίας. Επίσης η γαστρεντερική τοξικότητα που εκδηλώνεται συνήθως με ανορεξία, ναυτία και εμετούς αποτελεί σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια που μπορεί να εμφανιστεί κατά την θεραπεία με χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η αλωπεκία είναι επίσης ένα συχνό επακόλουθο της χημειοθεραπείας. Δημιουργεί πολλά ψυχολογικά προβλήματα αλλά είναι σχεδόν πάντα αναστρέψιμη. Τέλος, πιο σπάνιες αλλά εξίσου σοβαρές παρενέργειες της χημειοθεραπείας είναι η ανοσοκαταστολή, οι δερματικές εκδηλώσεις, η ηπατοτοξικότητα, η πνευμονική τοξικότητα, η καρδιοτοξικότητα, η νεφροτοξικότητα, η στείρωση, οι συγγενείς ανωμαλίες και η καρκινογένεση<sup>4, 5, 6</sup>.

Ακόμα σοβαρότερο όμως πρόβλημα κατά τη χρήση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων αποτελεί η ανάπτυξη αντοχής (ειδικά η διασταυρούμενη χημειοαντοχή) στα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως και το γεγονός ότι σε πολλούς όγκους η καταστροφή της συνολικής μάζας των κακοήθων κυττάρων δεν είναι εφικτή με τις συνήθεις θεραπευτικές δόσεις.<sup>7</sup> Γνωρίζοντας τους ανασταλτικούς αυτούς παράγοντες η επιστημονική κοινότητα κάνει μεγάλες και σημαντικές προσπάθειες στο να βελτιώσει την εκλεκτικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων και ως εκ τούτου να συμβάλει στη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών. Μια από τις σημαντικότερες προσπάθειες αφορά στην εκλεκτική μεταφορά των κυτταροτοξικών παραγόντων στα καρκινικά κύτταρα η οποία μεταφορά μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφόρων τρόπων όπως : α) με προφάρμακα που ενεργοποιούνται από ενδογενή ένζυμα τα οποία υπάρχουν κυρίως στα καρκινικά κύτταρα β) με εξειδικευμένα εξωγενή ένζυμα τα οποία εισάγονται εντός των κυτταρικών ιστών μέσω

γενετικής τεχνολογίας και γ) με σύζευξη διάφορων αντινεοπλασματικών παραγόντων με χημικές δομικές ομάδες που δύνανται να αναγνωρίζουν τα καρκινικά κύτταρα, όπως μονοκλωνικά αντισώματα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, φυλλικό οξύ, υαλουρονικό οξύ και πεπτιδία<sup>8,9</sup>.

Η αλματώδης πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην αποκωδικοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών και η σημαντική αποσαφήνιση των κυτταρικών στοιχείων που εμπλέκονται στην γένεση, την ανάπτυξη, την εξάπλωση του καρκίνου, όπως και η ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας, Βιοχημείας, Γενετικής, Γονιδιωματικής και Βιοτεχνολογίας στο να εντοπίζονται νέοι μοριακοί στόχοι έναντι του καρκίνου, έχει στρέψει ένα σημαντικό κομμάτι της επιστημονικής κοινότητας προς την κατεύθυνση ανακάλυψης εκλεκτικών αντινεοπλασματικών παραγόντων, αναστολέων του κυτταρικού κύκλου (π.χ. αναστολείς της τυροσίνης των κινασών), ώστε να εξασφαλίζεται η αποτελεσματικότητα της θεραπείας και η μείωση των τοξικών παρενεργειών, των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων<sup>10</sup>.

## 1.1 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΕΣ ΚΙΝΑΣΕΣ:

Μεταξύ των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίστανται οι πρωτεΐνες, εξέχουσα θέση καταλαμβάνει η αντίδραση φωσφορυλίωσης του υδροξυλίου των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη, καθώς εκτιμάται ότι το ένα τρίτο περίπου (30%) των πρωτεϊνών του κυττάρου φωσφορυλιώνονται, έστω και παροδικά. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι ένζυμα τα οποία τροποποιούν άλλες πρωτεΐνες προσθέτοντας σε αυτές χημικά φωσφορικές ρίζες, δηλαδή φωσφορυλιώνουν τις παραπάνω πρωτεΐνες στόχους μέσω της μεταφοράς φωσφορικών ομάδων από υψηλής ενέργειας μόρια δότες, όπως το ATP, σε συγκεκριμένα υποστρώματα, τα οποία αποκαλούνται μόρια δέκτες. Η φωσφορυλίωση τυπικά προκαλεί μια λειτουργική αλλαγή της πρωτεΐνης-στόχου και η αλλαγή αυτή συμβαίνει είτε μεταβάλλοντας την ενζυμική δραστηριότητα της πρωτεΐνης, είτε αλλάζοντας την κυτταρική της θέση, είτε τροποποιώντας την συσχέτιση της με άλλες πρωτεΐνες. Είναι



γνωστό, ότι οι κινάσες ρυθμίζουν τα σημαντικότερα κυτταρικά μονοπάτια τα οποία είναι ο κυτταρικός μετασχηματισμός και ο κυτταρικός κύκλος, και ειδικότερα οι κινάσες ρυθμίζουν τα μονοπάτια που σχετίζονται με τη μεταβίβαση σημάτων (σηματοδοτικά μονοπάτια). Οι κινάσες όμως δεν δρουν αποκλειστικά σε πρωτεΐνες. Μπορούν επιπλέον να φωσφορυλιώσουν λιπίδια, υδατάνθρακες, αμινοξέα, νουκλεοτίδια όπως και αλλά μικρά μόρια<sup>11,12</sup>. Η αντίδραση της φωσφορυλίωσης είναι μια απαραίτητη, γρήγορη και αναστρέψιμη αντίδραση της οποίας ο βασικός στόχος είναι να μεταβάλλει λειτουργικά μια πρωτεΐνη για όσο χρονικό διάστημα χρειάζεται και να την καταστήσει ενεργή. Χρησιμοποιεί σαν πρώτη ύλη το ενδοκυττάριο ATP. Με την φωσφορυλίωση προκαλείται στερεοτακτική διαμόρφωση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα κάποιο ενεργό κέντρο να ενεργοποιείται ή να απενεργοποιείται, κάποιο υπόστρωμα ή μόριο προσαρμογής να δεσμεύεται ή να αποδεσμεύεται και αυτό με τη σειρά του να σηματοδοτεί περαιτέρω αντιδράσεις μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών της μεταγωγής σήματος. Η φωσφορυλίωση, μπορεί επίσης να αλλάξει τη θέση της πρωτεΐνης στο κύτταρο επιτρέποντας την μετακίνηση της προς τον πυρήνα, όπου ασκεί πλέον διαφορετική δράση και τέλος μπορεί να στοχοποιήσει μια πρωτεΐνη για καταστροφή από το πρωτεολυτικό μηχανισμό του κυττάρου<sup>13</sup>.

Από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος ταυτοποιήθηκαν 518 πρωτεϊνικές κινάσες, εκ των οποίων οι 478 χαρακτηρίζονται ως κλασικές κινάσες, ενώ οι υπόλοιπες 40 ως μη κλασικές κινάσες. Οι κλασικές πρωτεϊνικές κινάσες διαθέτουν ένα ανάλογης δομής καταλυτικό κέντρο, που αποτελείται από ένα αμινοτελικό άκρο και μία μεγαλύτερη καρβοξυτελική περιοχή, ενώ διαχωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες: τις κινάσες που καταλύουν τη φωσφορυλίωση των αμινοξέων σερίνη και θρεονίνη (388 κινάσες) και αυτές που καταλύουν τη φωσφορυλίωση του αμινοξέος τυροσίνη (90 κινάσες). Οι μη κλασικές κινάσες είναι πρωτεΐνες που επιτελούν την ίδια λειτουργία με τις κλασικές, διαφέρουν όμως σημαντικά ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων που τις αποτελούν<sup>14</sup>.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι πρωτεϊνικές κινάσες λαμβάνουν μέρος στη μεταγωγή σήματος και στον έλεγχο πολύπλοκων κυτταρικών διεργασιών, που περιλαμβάνουν τις

μεταβολικές οδούς, την κυτταρική διαίρεση, τη διαφοροποίηση, τη γήρανση και την απόπτωση. Συμπληρωματικό ρόλο παίζουν οι αντίστοιχες πρωτεϊνικές φωσφατάσες, που καταλύουν την ακριβώς αντίθετη αντίδραση της φωσφορόλυσης, που είναι βεβαίως απαραίτητη για τον έλεγχο της διάρκειας δράσης του σήματος<sup>15</sup>.

Καθώς οι πρωτεϊνικές κινάσες «μεταφράζουν» ουσιαστικά τα διάφορα ερεθίσματα σε βιοχημικά γεγονότα είναι φυσικό να διασπείρονται κυριολεκτικά παντού, από την κυτταρική μεμβράνη, όπου το ενδοκυτταρικό τμήμα πολλών υποδοχέων της ασκεί λειτουργία κινάσης, έως και τον πυρήνα του κυττάρου, όπου οι περισσότεροι ρυθμιστές της μεταγραφής των γονιδίων είναι κινάσες. Ενδιάμεσα μεσολαβούν οι καταρράκτες των διαδοχικών αντιδράσεων φωσφορύλιωσης, διαδικασίας που χρησιμοποιείται συχνά, σε διάφορες οδούς όχι μόνο για τη μετάδοση, αλλά και για την ενίσχυση του σήματος. Η κατάλληλη ρύθμιση του βαθμού ενεργότητας των πρωτεϊνικών κινασών παίζει καθοριστικό ρόλο όχι απλά για τη ρύθμιση της λειτουργίας, αλλά και για την ίδια την τύχη του κυττάρου. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση αυτών των ενζύμων οδηγεί σε διαταραχή όλων των θεμελιωδών κυτταρικών λειτουργιών και συνδέεται με την εμφάνιση σοβαρών νοσημάτων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η φλεγμονή, ενώ συχνά καταλήγει σε καρκινικό φαινότυπο. Όλες οι χαρακτηριστικές ιδιότητες του νεοπλασματικού κυττάρου, η ανεξέλεγκτη διαίρεση, η ικανότητα διήθησης, μετάστασης και αγγειογένεσης αποδείχθηκε ότι σχετίζονται με διαταραχή της λειτουργικότητας ορισμένων πρωτεϊνικών κινασών, σε σημείο που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι διάφορες μορφές καρκίνου θα μπορούσαν να περιγραφούν ως ασθένειες με βάση τις παρατηρούμενες διαταραχές στη λειτουργία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών κινασών και τα αντίστοιχα προβλήματα στη μεταγωγή του σήματος.<sup>16</sup>

Πάνω από το 50% των πρωτεϊνικών κινασών συσχετίζονται με την εμφάνιση κακοήθειας στον άνθρωπο όταν λειτουργούν ανεξέλεγκτα, γεγονός που μπορεί βεβαίως να οφείλεται σε διάφορες αιτίες. Για παράδειγμα μια χρωμοσωμική μετατόπιση μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό υβριδικής κινάσης, η οποία διατηρεί την καταλυτική ιδιότητα του ενζύμου, αλλά όχι και τον ελεγκτικό μηχανισμό της υπόλοιπης πρωτεΐνης. Είναι γνωστή η

περίπτωση της υβριδικής Bcr-Abl κινάσης, που είναι συνεχώς ενεργή και ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας στον άνθρωπο<sup>17</sup>. Συγκεκριμένα προκαλείται σύντηξη μιας πρωτεΐνης-τυροσινικής κινάσης με μια άλλη πρωτεΐνη ως αποτέλεσμα μιας ισορροπημένης χρωμοσωμικής μετάθεσης. Στην περίπτωση αυτή για να είναι ογκογόνος η χιμαιρική πρωτεΐνη που προκύπτει, πρέπει η πρωτεΐνη παρτενέρ να έχει την ικανότητα να προκαλεί συνεχή ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης ακόμα και στην απουσία φυσιολογικού σήματος στον υποδοχέα.

Άλλος μηχανισμός καρκινογένεσης αφορά την εμφάνιση γονιδιακής μετάλλαξης, που καθιστά επίσης την αντίστοιχη κινάση ανεξέλεγκτα ενεργή, όπως είναι για παράδειγμα η c-Kit κινάση των όγκων του γαστρεντερικού συστήματος. Ένας τρίτος μηχανισμός έχει σχέση με αυξημένη έκφραση, ή και την πλήρη απώλεια ελέγχου της έκφρασης της κινάσης, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις ενεργοποίησης κάποιου ογκογονιδίου, ή αντίστοιχα απενεργοποίησης κάποιου ογκοκατασταλτικού γονιδίου. Σημαντική, επίσης, είναι η παρουσία μεταλλάξεων οι οποίες αλλάζουν τον τρόπο δράσης της κινάσης. Έτσι, οι μεταλλάξεις του EGFR στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα οδηγούν σε ανεξάρτητη από το συνδέτη ενεργοποίηση ή παρατεταμένη δραστικότητα μετά από σήμανση. Σημαντικό ρόλο φαίνεται επίσης ότι παίζει η υπερέκφραση του υποδοχέα ή η πολυσωμία. Στον καρκίνο του πνεύμονα η υπερέκφραση όσο και η πολυσωμία έχουν σχετιστεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων και απάντησης σε θεραπεία με μικρού μοριακού βάρους αναστολείς του EGFR, ωστόσο ο ακριβής τους ρόλος στην ογκογένεση δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί<sup>18</sup>.

Ως φυσικό επακόλουθο αυτών των παρατηρήσεων προέκυψε μια εντατική προσπάθεια για την εύρεση και τη μελέτη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών, που θα μπορούσαν να φανούν χρήσιμοι όχι μόνο στην αντικαρκινική θεραπεία, αλλά και στην αντιμετώπιση αυτοάνοσων παθήσεων και διαταραχών του μεταβολισμού. Αναφέρεται ότι σήμερα οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν τον δεύτερο πιο σημαντικό στόχο φαρμάκων, μετά τους υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες<sup>19</sup>.

## 1.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ:

Για λόγους κατάταξης οι πρωτεϊνικές κινάσες διαιρούνται σε δύο ομάδες:

A) Με βάση την εξειδίκευσή τους ως προς τα αμινοξέα που φωσφορυλιώνουν κατατάσσονται σε τέσσερις υποομάδες : 1. τις κινάσες του αλειφατικού υδροξυλίου σερίνης ή θρεονίνης, 2. τις κινάσες του αρωματικού υδροξυλίου της τυροσίνης, 3. τις κινάσες μικτής λειτουργίας, σερίνης/θρεονίνης/τυροσίνης και 4. τις κινάσες ιστιδίνης, που προσθέτουν φωσφορική ομάδα στο άζωτο του ιμιδαζολίου αυτού του αμινοξέος και ανακαλύφθηκαν κάπως αργότερα,

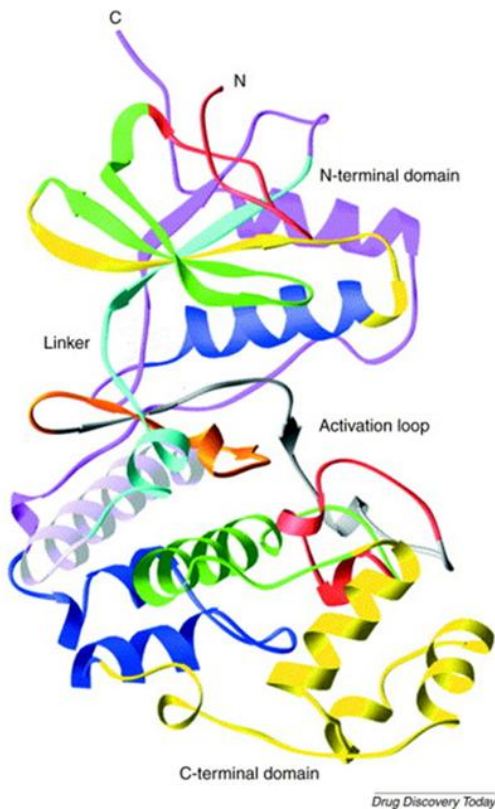
B) Με βάση την δομή και την κυτταρική εντόπισή τους κατατάσσονται σε δύο υποομάδες : 1. τους υποδοχείς, που αποτελούνται από μία υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή που διαπερνάει την πλασματική μεμβράνη, ένα εξωκυττάριο τμήμα σύνδεσης του προσδέτη το οποίο είναι γλυκοζυλιωμένο και ένα τμήμα που εντοπίζεται στον κυτταροπλασματικό χώρο, 2. τους μη υποδοχείς, οι οποίοι σε αντίθεση με τους υποδοχείς δεν διαθέτουν το εξωκυττάριο και το διαμεμβρανικό τμήμα, ενώ προσδέονται στην φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα μέσω μη ομοιοπολικής σύνδεσης με έναν μεμβρανικό υποδοχέα<sup>20</sup>. Οι υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς. Αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα το οποίο δεσμεύει το μόριο συνδέτη. Το εξωκυττάριο τμήμα μπορεί να αποτελεί ανεξάρτητο τμήμα το οποίο συνδέεται με τον υπόλοιπο υποδοχέα μέσω ενός δισουλφιδικού δεσμού. Το διαμεμβρανικό τμήμα αποτελεί μια μονή άλφα έλικα. Τέλος, στο ενδοκυττάριο κομμάτι βρίσκεται το καταλυτικό τμήμα της κινάσης, το οποίο μπορεί να δεσμεύσει και να φωσφορυλιώσει διάφορα υποστρώματα. Απουσία του μορίου συνδέτη, ένας υποδοχέας αυξητικών παραγόντων βρίσκεται στη μονομερή του μορφή. Το διαμεμβρανικό τμήμα του δεν είναι καθηλωμένο, αλλά μπορεί να κινείται. Οι συνδέτες μπορεί να εμφανίζουν μία ή δύο υπομονάδες σύνδεσης με υποδοχείς (μονομερής ή διμερής συνδέτης). Η σύνδεση ενός διμερούς συνδέτη με τον υποδοχέα οδηγεί στη δημιουργία ενός συμπλέγματος, το οποίο κινείται στην κυτταρική μεμβράνη μέχρι να συναντήσει έναν ελεύθερο υποδοχέα στον οποίο θα συνδεθεί. Ο δεύτερος υποδοχέας μπορεί να είναι όμοιος με τον πρώτο σχηματίζοντας ένα ομοδιμερές, είτε μπορεί να είναι της ίδιας οικογένειας σχηματίζοντας ένα ετεροδιμερές. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του Epidermal Growth

Factor Receptor (EGFR), ο Epidermal Growth Factor (EGF) ή ο Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) είναι μονομερής συνδέτης, φέρει δηλαδή μόνο μία υπομονάδα σύνδεσης με τον υποδοχέα. Η σύνδεση του συνδέτη στον υποδοχέα οδηγεί το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα να αλλάξει στερεοτακτική διαμόρφωση και να εμφανίσει περιοχές ομοδιμερισμού. Καθώς το σύμπλοκο κυκλοφορεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη θα συναντήσει ένα άλλο σύμπλοκο και θα επέλθει ο διμερισμός. Καθώς τα ενδοκυττάρια τμήματα των υποδοχέων έρχονται σε επαφή τα τμήματα που περιέχουν τις τυροσινικές κινάσες ετεροφωσφορυλιώνονται. Το γεγονός της αυτοφωσφορυλίωσης μπορεί να συμβεί *in trans* (μεταξύ μορίων του υποδοχέα μέσα στο διμερές) ή και *in cis* (μέσα σε ένα υποδοχέα μέσα στο διμερές). Αυτές οι φωσφορυλιώσεις ενεργοποιούν τις κινάσες, αλλάζουν την τριτοταγή διαμόρφωσή τους ανοίγοντας την θέση σύνδεσης του ATP (στην ανενεργή τους μορφή οι καταλυτικές υπομονάδες των κινασών έχουν τέτοια θέση που δεν επιτρέπουν την σύνδεση του ATP). Οι ενεργοποιημένες κινάσες προσελκύουν ενδοκυττάρια μόρια σύνδεσης, τα οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν ξεκινώντας το σηματοδοτικό μονοπάτι<sup>21</sup>.

Όλες οι κλασικές πρωτεϊνικές κινάσες των ευκαρυωτικών κυττάρων παρουσιάζουν ένα γενετικά διατηρημένο καταλυτικό κέντρο ανάλογης δομής, που αποτελείται από περίπου 290 αμινοξέα. Το ενεργό αυτό κέντρο βρίσκεται αναδιπλωμένο μεταξύ ενός μικρού N-τελικού λοβού, που αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες και μια  $\alpha$ -έλικα (την C-έλικα) και ενός μεγαλύτερου C-τελικού λοβού, και μελετήθηκε για πρώτη φορά με κρυσταλλογραφία στις πρωτεϊνικές κινάσες A (PKA), που ενεργοποιούνται από το c-AMP. Γενικά, τόσο η αμινοτελική, όσο και η καρβοξυτελική περιοχή των κινασών παρουσιάζουν δομική πολυπλοκότητα και μάλιστα υποδιαιρούνται σε 11 υπομονάδες (Εικόνα 1.1).

Η καρβοξυτελική περιοχή αποτελείται κυρίως από  $\alpha$ -έλικες και περιλαμβάνει το τμήμα ενεργοποίησης, το οποίο είναι μία μικρή περιοχή αποτελούμενη από 20-35 αμινοξέα, που βρίσκεται μεταξύ ενός καλά διατηρημένου μοτίβου τριών αμινοξέων : ασπαρτικού οξέος, φαινυλαλανίνης και γλυκίνης, (DFGmotif, asparticacid, phenylalanine, glycine) και ενός

μεταβαλλόμενου μοτίβου άλλων τριών αμινοξέων : αλανίνης, προλίνης και γλουταμικού οξέος (APEmotif, alanine, proline, glutamic acid).



### Εικόνα

**1.1:** Διάγραμμα του ενεργού κέντρου της ERK2 (extracellular-signal-regulated kinase) (Protein Data Bank code ERK1). Οι έντεκα υπομονάδες του ενεργού κέντρου εμφανίζονται με διαφορετικό χρώμα.<sup>22</sup>

Μεταξύ των δύο λοβών παρεμβάλλεται ένα ευκίνητο πολυπεπτιδικό τμήμα, που λειτουργεί ως άρθρωση, έτσι ώστε τόσο η αμινοτελική, όσο και η καρβοξυτελική περιοχή να μπορούν να κινούνται και να περιστρέφονται ανεξάρτητα, χωρίς αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης (Εικόνα 1.2a). Αυτό ακριβώς συμβαίνει κατά την πρόσδεση του υποστρώματος της κινάσης και της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), που χρησιμεύει ως δότης της φωσφορικής ομάδας για την αντίδραση της φωσφορυλίωσης.<sup>22</sup>





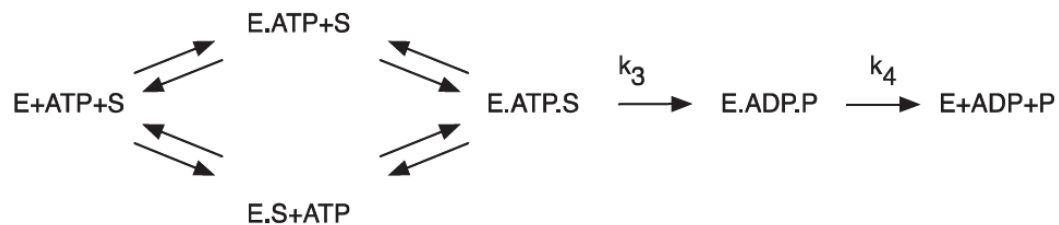
1.2b). Η αδενίνη, σταθεροποιείται με δίκτυο δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των N1 και N6 με τα απέναντι αμινοξέα της ραχοκοκαλιάς του ενζύμου, όπως και με μία σειρά αλληλεπιδράσεων van der Waals μεταξύ του πουρινικού δακτυλίου και των αλειφατικών μη πολικών ομάδων των αμινοξέων της κινάσης, ενώ παράλληλα δημιουργούνται και ιοντικές αλληλεπιδράσεις από τις φορτισμένες φωσφορικές ομάδες της ριβόζης, που διευθετείται προς την αρχή της καρβοξυτελικής περιοχής, όπου εντοπίζεται το καταλυτικό κέντρο (catalytic loop). Η τριφωσφορική ομάδα του ATP προσανατολίζεται καταλλήλως ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά της γ φωσφορικής ομάδας στο πεπτιδικό υπόστρωμα, ενώ παράλληλα ένα γλουταμικό οξύ που εντοπίζεται συγκεκριμένα στη C-έλικα της αμινοτελικής περιοχής όπως και μία λυσίνη που βρίσκεται στη β3-πτυχωτή επιφάνεια, συνεισφέρουν στην βέλτιστη τοποθέτηση των α και β φωσφορικών ομάδων του ATP. Η απαραίτητη για την πρόσδεση και κατάλυση σταθεροποίηση του ATP, επιτυγχάνεται και μέσω δημιουργίας χηλικών συμπλόκων μεταξύ των α και γ φωσφορικών ομάδων όπως και του ασπαρτικού οξέος από το DFGmotif και μίας ασπαργίνης με τη διαμεσολάβηση ενός ιόντος μαγνησίου. Η επίτευξη της φωσφορυλίωσης αποτελεί για πολλές κινάσες το έναυσμα για τη λήψη της ενεργής διαμόρφωσης της περιοχής πρόσδεσης του πεπτιδικού υποστρώματος, δημιουργώντας τις βέλτιστες συνθήκες ώστε το τμήμα ενεργοποίησης, που αποτελεί και το ουσιαστικότερο κομμάτι της περιοχής πρόσδεσης, να λάβει την κατάλληλη διαμόρφωση που απαιτείται για την πρόσδεση. Σε όλες τις κινάσες το υπόστρωμα προσανατολίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε το υδροξύλιο να βρίσκεται πλησίον του ασπαρτικού οξέος του DFGmotif. Στις κινάσες σερίνης/θρεονίνης μία λυσίνη, η οποία βρίσκεται δύο αμινοξέα μακριά από το ασπαρτικό, σταθεροποιεί το αρνητικό φορτίο που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της κατάλυσης. Όσον αφορά στις κινάσες τυροσίνης, το σταθεροποιητικό αμινοξύ βρίσκεται τέσσερα αμινοξέα μακριά και είναι μία αργινίνη. Σε αντίθεση με την ενεργή μορφή, στην ανενεργή διαμόρφωση το ασπαρτικό οξύ του DFGmotif δεν δημιουργεί χηλικό σύμπλοκο με το ιόν μαγνησίου, ενώ το αμινοξύ φαινυλαλανίνη του ίδιου μοτίβου στρέφεται προς τη θέση πρόσδεσης του ATP (Εικόνα 1.2c). Επιπλέον στην ανενεργή διαμόρφωση οι κινάσες



χαρακτηρίζονται από δομική ποικιλομορφία που οφείλεται στην έλλειψη καταλυτικών απαιτήσεων, αν και παρατηρούνται ορισμένα κοινά δομικά στοιχεία<sup>23</sup>.

### 1.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ:

Οι πρωτεϊνικές κινάσες, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, καταλύουν την μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP στο υδροξύλιο των αμινοξέων σερίνη, θρεονίνη ή τυροσίνη του πρωτεϊνικού υποστρώματος, μια διαδικασία που μπορεί να συνοψιστεί στο παρακάτω σχήμα:

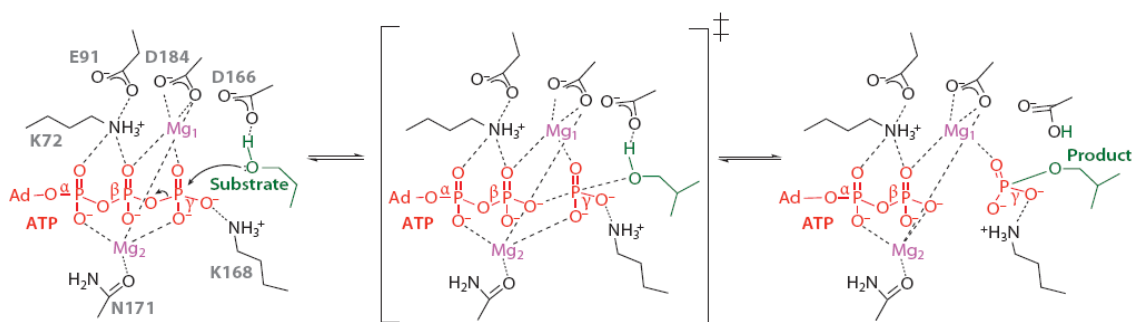


**Σχήμα 1.1** : Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης των πρωτεϊνικών κινασών. όπου με E έχει σημειωθεί η κινάση, με S και P σημειώνονται το πρωτεϊνικό υπόστρωμα και το προϊόν αντίστοιχα, η  $k_3$  είναι η σταθερά ταχύτητας της μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας, ενώ η  $k_4$  αποτελεί τη σταθερά ταχύτητας για τον διαχωρισμό των προϊόντων<sup>23</sup>.

Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης, δηλαδή η μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας, είναι μία χημικά εύκολη και γρήγορη διαδικασία που εξαρτάται μόνο από τον σωστό προσανατολισμό των δύο υποστρωμάτων, της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP και του υδροξυλίου που πρόκειται να φωσφορυλιωθεί. Αντιθέτως, το δεύτερο στάδιο της απελευθέρωσης των προϊόντων (του ADP και των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών) είναι μία αργή και χρονοβόρα διαδικασία και συνεπώς καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Ανάλογα συμπεράσματα λήφθηκαν και μέσω κινητικών μελετών σε διαλύτες με

διαφορετικό ιξώδες, που επέτρεπαν τη διάκριση των διαδικασιών δέσμευσης και διάσπασης σε διαφορετικά χημικά καταλυτικά στάδια, που επίσης απέδειξαν πως το πρώτο καταλυτικό στάδιο ήταν γρήγορο ( $k_3 \sim 300-500 \text{ s}^{-1}$ ) ενώ το στάδιο της απελευθέρωσης των προϊόντων ήταν αργό ( $k_4 \sim 20-30 \text{ s}^{-1}$ ).

Μία πιο λεπτομερής αναπαράσταση του μηχανισμού κατάλυσης μιας κινάσης παρουσιάζεται στο σχήμα 1.2 που ακολουθεί:



**Σχήμα 1.2:** Σχηματικό διάγραμμα του μηχανισμού κατάλυσης μιας πρωτεϊνικής κινάσης.

Η καταλυόμενη από κινάση μεταφορά της φωσφορικής ομάδας, μπορεί να περιγραφεί ως το σύνολο τριών βασικών βημάτων: 1. κατάλληλος προσανατολισμός των υποστρωμάτων, 2. πυρηνόφιλη προσβολή από την υδροξυλομάδα του πρωτεϊνικού υποστρώματος και 3. βασική κατάλυση από το ασπαρτικό οξύ του DFGmotif ακολουθούμενη από όξινη κατάλυση για τη μεταφορά πρωτονίου από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα στο ασπαρτικό οξύ. Συγκεκριμένα το υδροξύλιο του πρωτεϊνικού υποστρώματος προσανατολίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου να ευθυγραμμιστεί, μέσω του ατόμου του γ φωσφόρου, με τη βγ γέφυρα οξυγόνου του ATP. Συνεπώς, έχουν δημιουργηθεί έτσι, οι κατάλληλες συνθήκες που ευνοούν την πυρηνόφιλη προσβολή του ζεύγους ηλεκτρονίων του οξυγόνου και την δημιουργία ενδιάμεσου μεταφωσφορικού προϊόντος, όπου το σπάσιμο του δεσμού της βγ γέφυρας οξυγόνου προηγείται του σχηματισμού του νέου δεσμού μεταξύ του οξυγόνου του πρωτεϊνικού υποστρώματος και

της  $\gamma$ -φωσφορικής ομάδας του ATP. Το αρνητικό φορτίο της  $\gamma$ -φωσφορικής ομάδας εξισορροπείται από τα ιόντα μαγνησίου και τις κοντινές λυσίνες. Ενώ η αντίδραση προχωράει, ο όξινος χαρακτήρας του υδροξυλίου του υποστρώματος αυξάνεται, με συνέπεια το  $pK_a$  του να γίνει μικρότερο από το  $pK_a$  του γειτονικού ασπαρτικού οξέος, επιτρέποντας έτσι τη μεταφορά του πρωτονίου από την υδροξυλομάδα του υποστρώματος στο ασπαρτικό οξύ. Τελικά το πρωτόνιο αυτό μεταφέρεται στο φωσφορικό διανιόν του προϊόντος με αποτέλεσμα την επαναφορά του ασπαρτικού οξέος στην ανιονική καρβοξυλική του μορφή<sup>23</sup>.

#### 1.4 ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΙΝΑΣΩΝ:

Οι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών προσελκύουν το ενδιαφέρον των ερευνητών προς δύο κατευθύνσεις: ως θεραπευτικοί παράγοντες και ως παράγοντες για τη διερεύνηση και κατανόηση του φυσιολογικού ρόλου των ενζύμων αυτών.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες προκειμένου να εκτελέσουν τον καταλυτικό τους ρόλο ως ένζυμα, θα πρέπει προηγουμένως να δεσμεύσουν στο καταλυτικό τους κέντρο, τα απαραίτητα για την διεκπεραίωση του έργου τους στοιχεία, δηλαδή το ATP και το υπόστρωμα που πρόκειται να φωσφορυλιωθεί. Οπότε η παρεμπόδιση της πρόσδεσης του ATP, της πρόσδεσης του υποστρώματος ή η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας, είτε και ο συνδυασμός όλων των παραπάνω θα μπορούσε να αποτελέσει την βάση για τον σχεδιασμό δραστικών ενώσεων που θα αναστέλλουν την δράση των πρωτεϊνικών κινασών. Η έρευνα έχει συμβάλλει σε πολύ μεγάλο βαθμό στον εμπλουτισμό των γνώσεών μας σχετικά με την δομή, τη λειτουργία και τη ρύθμιση των πρωτεϊνικών κινασών. Αν και μέχρι σήμερα μόνο για το 10% των ανθρώπινων πρωτεϊνικών κινασών είναι γνώστη η τρισδιάστατη δομή τους, με την βοήθεια όμως της κρυσταλλογραφίας των ακτινών X λαμβάνονται χρήσιμες και πολύτιμες πληροφορίες που βοηθάνε στον ορθολογικό σχεδιασμό αναστολέων κινασών.

Αρχικά, η ανάπτυξη αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών ως αντικαρκινικά φάρμακα, αντιμετώπισε πολλά εμπόδια με το πιο σημαντικό να αφορά τις ίδιες τις κινάσες

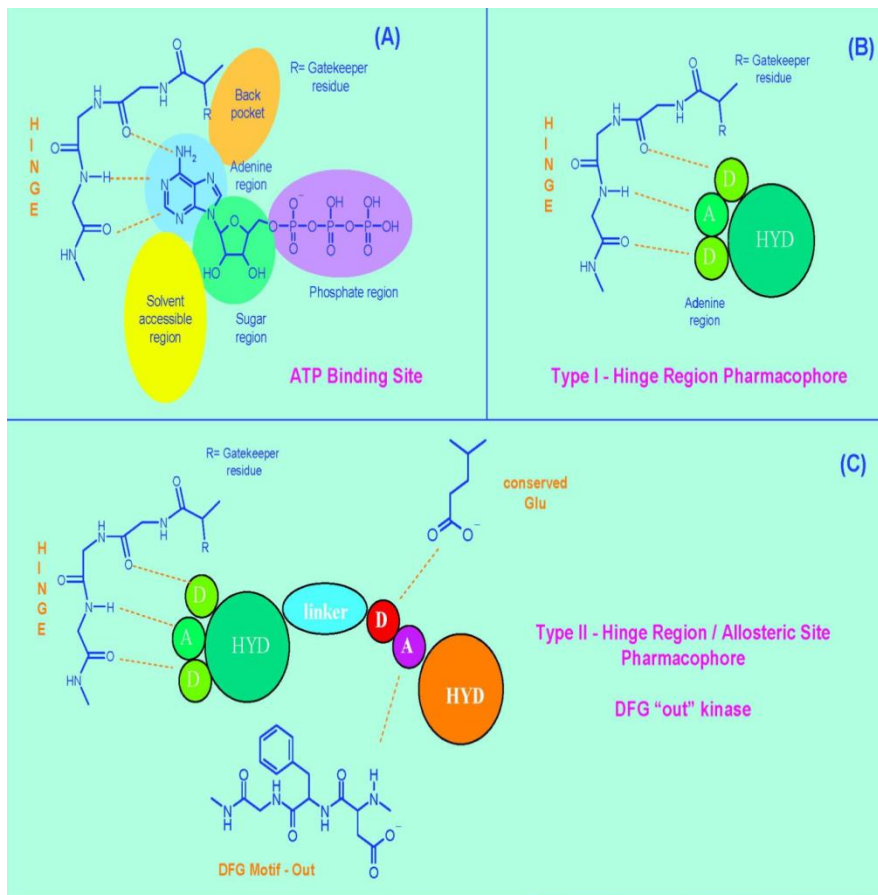
οι οποίες θεωρήθηκαν ακατάλληλος στόχος για δύο βασικούς λόγους. Ο πρώτος λόγος είχε να κάνει με το επιχείρημα πως η πολύ υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ATP θα ελάττωνε λόγω ανταγωνισμού, την αποτελεσματικότητα των παραγώγων που μιμούνται τη δομή του και ο δεύτερος λόγος αφορούσε τον κοινό καταλυτικό μηχανισμό των κινασών που καθιστούσε αδύνατο να σχεδιαστούν εξειδικευμένοι αναστολείς, επειδή αναστέλλοντας την καταλυτική δράση των πρωτεϊνών αυτών επηρεάζονταν και άλλες φυσιολογικές και ζωτικής σημασίας λειτουργίες, η οποίες θα επέφεραν δυσμενείς ανεπιθύμητες ενέργειες.

Παρόλα αυτά όμως, οι χημικές βιβλιοθήκες που αποτελούνταν από εκατοντάδες χιλιάδες χημικές ενώσεις, σαρώθηκαν με σκοπό την εύρεση των πρώτων κατευθυντήριων γραμμών στον δρόμο της ανάπτυξης δραστικών ενώσεων με ανασταλτική δράση έναντι των πρωτεϊνικών κινασών. Το φιλτράρισμα της μεγάλης πληροφορίας βασίστηκε στην πραγματική δομή της περιοχής πρόσδεσης του ATP (structure-based library design) είτε στην δομή παραγώγων που ήταν ήδη γνωστό πως ανταγωνίζονται το ATP για την ίδια περιοχή πρόσδεσης στην κινάση (ligand-based library design). Κατ' αυτόν τον τρόπο σχεδιάστηκαν τα πρώτα παράγωγα που συνδέονται στην περιοχή σύνδεσης του ATP και συνεπώς είναι ενώσεις που μιμούνται την δομή της αδενίνης. Τα παράγωγα αυτά τροποποιήθηκαν με σκοπό την αύξηση του δυναμικού τους προς τον καλύτερο ανταγωνισμό του ATP ως προς την ίδια θέση πρόσδεσης στην πρωτεΐνη, με επακόλουθο την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος που δεν ήταν άλλος από την αναστολή των πρωτεϊνικών κινασών. Ο βαθμός συγγένειας των αναστολέων με τις πρωτεΐνες στόχους πρέπει να είναι πολλές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος από τον βαθμό συγγένειας που παρουσιάζει το ATP με τις παραπάνω πρωτεΐνες, εφόσον η συγκέντρωση ενός αναστολέα κυμαίνεται σε τάξη mM-nM σε αντίθεση με την τάξη mM της συγκέντρωσης του ATP. Εκτός όμως από το υψηλό βαθμό συγγένειας, τα παράγωγα που αναστέλλουν την ενζυμική δράση των κινασών θα πρέπει να παρουσιάζουν και υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας με σκοπό να ελαττωθούν οι πιθανότητες εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών. Τον τελευταίο καιρό η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί σε μία νέα προσέγγιση που χρησιμοποιεί φίλτρα επιλεκτικότητας (selectivity filters) στοχεύοντας στον σχεδιασμό πιο εκλεκτικών

αναστολέων. Με βάση την παραπάνω μέθοδο ένας αναστολέας θα πρέπει να στοχεύει σε δυο καθοριστικούς παράγοντες της περιοχής πρόσδεσης του ATP. Ο πρώτος παράγοντας είναι το τμήμα “Gatekeeper” που εντοπίζεται στο πρόσθιο μέρος της περιοχής σύνδεσης του ATP. Το δεύτερο κομβικό σημείο αποτελεί ύπαρξη ή όχι μιας κυστεΐνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Από τις 518 πρωτεϊνικές κινάσες, μόνο οι 19 περιέχουν κυστεΐνη εντός μιας πολύ σημαντικής για την πρόσδεση του ATP περιοχής του ενεργού κέντρου, που ονομάζεται glycine loop και αποτελείται από μία αλληλουχία αμινοξέων με χαρακτηριστική την παρουσία γλυκίνης. Ακολουθώντας την παραπάνω προσέγγιση, σχεδιάστηκε ένας εκλεκτικός αναστολέας των κινασών p90 ribosomal S6 kinases RSK1 και RSK2 ο οποίος αλληλεπιδρά με την υδρόφοβη περιοχή “Gatekeeper” και ταυτόχρονα αλκυλιώνει μη αντιστρεπτά την κυστεΐνη του glycine loop. Επιπρόσθετα, η διπλή στόχευση του ενεργού κέντρου, εξασφαλίζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ελαττώνει τις πιθανότητες ανάπτυξης αντοχής, λόγω του ότι θα πρέπει να επέλθει διπλή μετάλλαξη για την επαγωγή αντίστασης στο χορηγούμενο φάρμακο<sup>24</sup>.

Οι αναστολείς διακρίνονται σε δύο κατηγορίες και χαρακτηρίζονται ως αναστολείς τύπου I και II. Οι αναστολείς τύπου I μιμούνται το ATP και συνδέονται στην ενεργό μορφή της κινάσης. Στην περίπτωση αυτή το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε μία «ανοικτή διαμόρφωση» η οποία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, επηρεάζεται ιδιαίτερα από την θέση των τριών αμινοξέων: ασπαρτικού οξέος, φαινυλαλανίνης και γλυκίνης του DFG motif, είτε του τμήματος “Gatekeeper”. Στην κλειστή διαμόρφωση του ενεργού κέντρου της κινάσης, τα τρία αμινοξέα βρίσκονται σε διαφορετική θέση καθιστώντας το ένζυμο ανενεργό. Στη διαμόρφωση αυτή εμφανίζεται επιπλέον και μία νέα υδρόφοβη περιοχή. Οι αναστολείς τύπου II συνδέονται στην ανενεργό μορφή της κινάσης, αλληλεπιδρώντας τόσο με το ενεργό κέντρο όσο και με την υδρόφοβη περιοχή (αλλοστερική αλληλεπίδραση) (Εικόνα 1.3)<sup>25,26</sup>.

Όπως αναφέρθηκε, εκτός από την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του ATP στο ενεργό κέντρο του ενζύμου μέσω των αναστολέων που μιμούνται την δομή της αδεΐνης, και η παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποστρώματος αποτελεί στρατηγική για την σύνθεση αναστολέων κινασών.

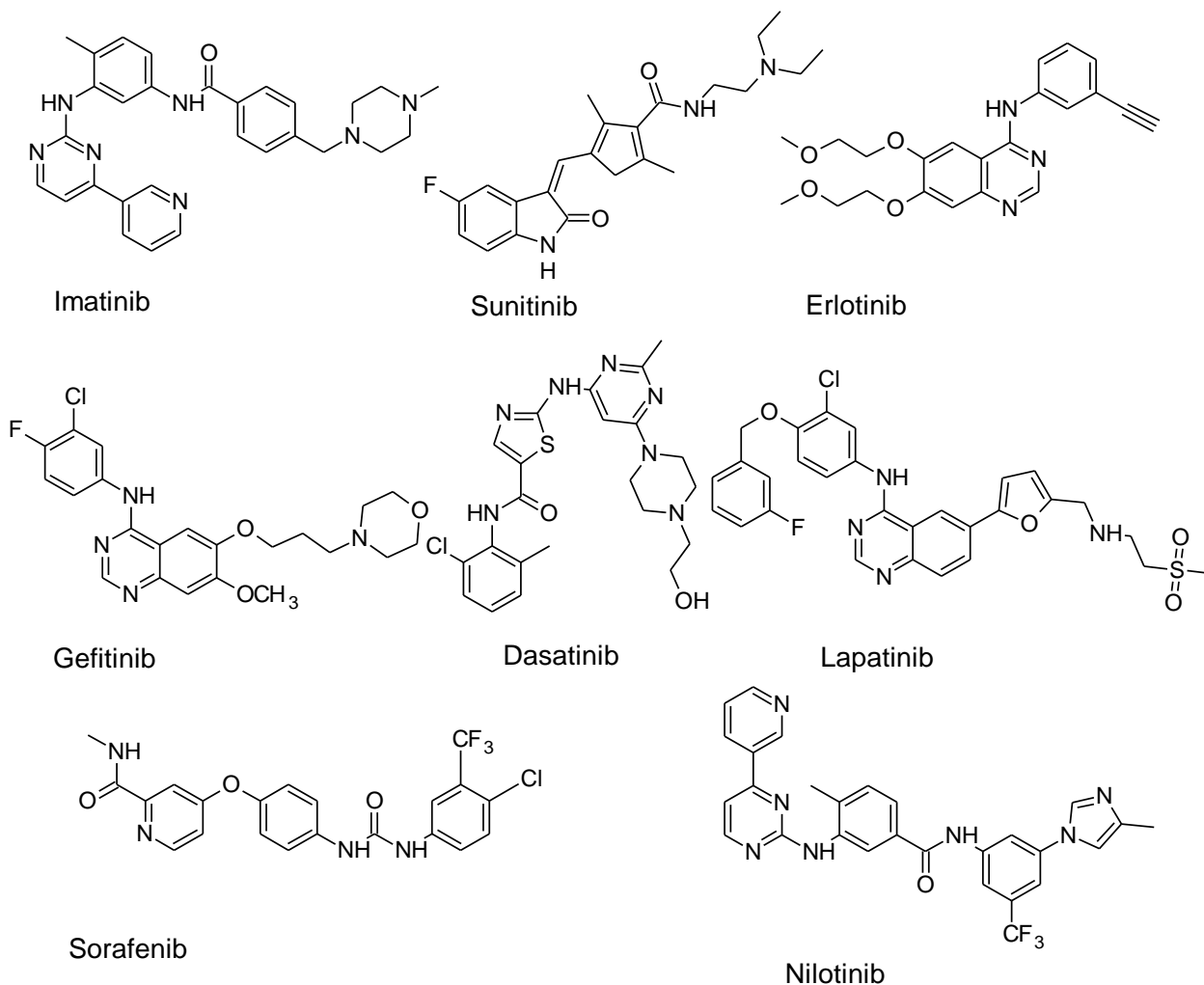


**Εικόνα.3:**(A) Θέση δέσμευσης του ATP στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Οι δεσμοί υδρογόνου παρίστανται με πορτοκαλί διακεκομμένες γραμμές. (B) Θέση σύνδεσης των τύπου I αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης. (C) Θέση σύνδεσης των τύπου II αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης, όπου φαίνεται και η αλληλεπίδραση των αναστολέων με την υδρόφοβη περιοχή<sup>25,26</sup>.

Στην προκειμένη περίπτωση τα παράγωγα αυτά ανταγωνίζονται το φυσιολογικό για την πρωτεΐνη υπόστρωμα, ως προς την φωσφορυλίωση ελεύθερων χημικών ομάδων υδροξυλίου. Μέχρι τώρα όμως δεν έχει χρησιμοποιηθεί η περιοχή σύνδεσης του πρωτεϊνικού υποστρώματος ως μοντέλο για την σύνθεση πρωτεϊνικών αναστολέων, παρόλο που θεωρείται ότι τα παράγωγα που αναστέλλουν την δράση του ενζύμου μέσω ανταγωνισμού του πρωτεϊνικού υποστρώματος, μπορεί να πλεονεκτούν σε σχέση με τα παράγωγα που μιμούνται την δομή του ATP. Αυτό οφείλεται στο ότι η υψηλή ενδοκυττάρια συγκέντρωση του ATP ελαττώνει λόγω ανταγωνισμού την

αποτελεσματικότητα των παραγώγων που μιμούνται τη δομή του και επιπλέον επειδή οι αναστολείς που σχεδιάζονται βασιζόμενοι στον ανταγωνισμό του πρωτεϊνικού υποστρώματος μπορεί να είναι περισσότερο ειδικοί και εκλεκτικοί<sup>22</sup>. Η εκλεκτικότητα δράσης των αναστολέων όπως έχει αναφερθεί και τονιστεί και προηγουμένως είναι ένας πολύ σημαντικός στόχος του σχεδιασμού αναστολέων πρωτεϊνικών κινασών. Η δυνατότητα ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού θανάτου μέσω αναστολής μίας εξειδικευμένης κινάσης, ή ομάδας κινασών προσφέρει την δυνατότητα στοχευμένης αντικαρκινικής θεραπείας.

Το πρώτο συνθετικό παράγωγο που εγκρίθηκε ως φάρμακο είναι το imatinib (Gleevec, Novartis), το οποίο ανήκει στην δεύτερη κατηγορία αναστολέων (Σχήμα 1.3).



**Σχήμα 1.3:** Αναστολείς κινασών τύπου I και II

Το imatinib είναι ευρέως αναγνωρισμένο ως το κλασικό παράδειγμα στοχευμένης ανάπτυξης φαρμακευτικών ουσιών και το φάρμακο το οποίο επικύρωσε τη στρατηγική της αναστολής της μεταγωγής σήματος. Πρόκειται για αναστολέα της πρωτεϊνικής Bcr-Abl τυροσινικής κινάσης, που παράγεται παθολογικά από το χρωμόσωμα Φιλαδέλφειας στην χρόνια μυελογενή λευκαϊμία<sup>25</sup>.

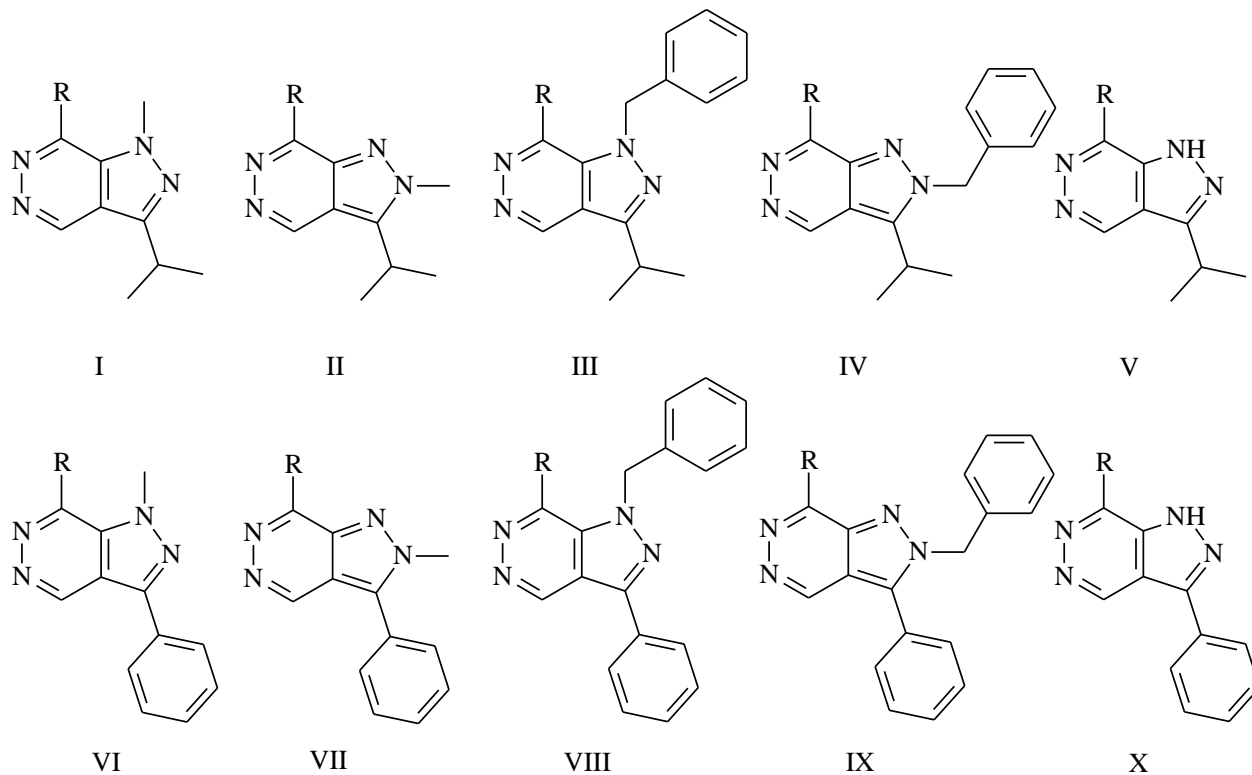
Σήμερα 8 παράγωγα, αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, έχουν λάβει έγκριση από το FDA για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Τα παράγωγα αυτά είναι όλα ανταγωνιστές του ATP που ανήκουν είτε στον πρώτο τύπο αναστολέων κινασών όπως τα sunitinib, erlotinib, gefitinib, dasatinib, και lapatinib, είτε στον δεύτερο τύπο αναστολέων κινασών, όπως τα imatinib, sorafenib και nilotinib (Σχήμα 1.3)<sup>26</sup>.

## 1.5 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.

Ως συνέχεια των ερευνητικών προσπαθειών του εργαστηρίου μας, που σκοπεύουν στο σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων ενώσεων με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι πρωτεϊνικών κινασών, αποφασίσαμε να μελετήσουμε παράγωγα της πυραζολοπυριδαζίνης. Αυτό το ετεροκυκλικό σύστημα μπορεί να θεωρηθεί ως βιοϊσοστερές του πουρινικού σκελετού, δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα έναντι του συγκεκριμένου φαρμακολογικού στόχου και η προσθήκη κατάλληλων υποκαταστατών μπορεί να δώσει ενδιαφέρουσες πληροφορίες σχετικά με τις σχέσεις δομής - δράσης αυτής της κατηγορίας μορίων.

Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η μέθοδος σύνθεσης των υποκατεστημένων πυραζολοπυριδαζινών I-X του σχήματος 1.4.



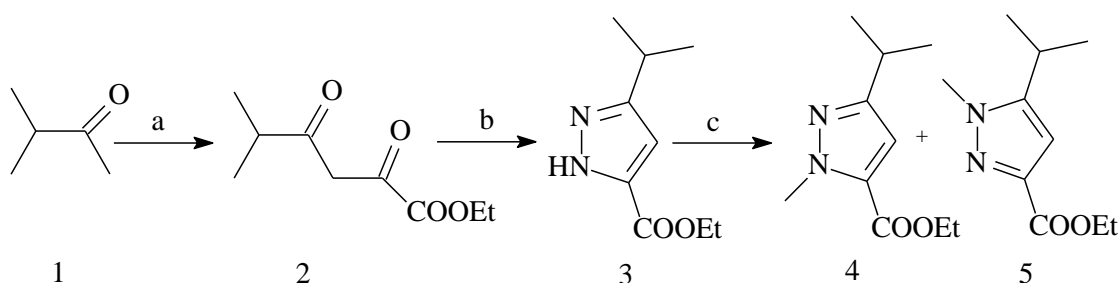


**Σχήμα 1.4:** Γενικοί τύποι των προϊόντων της παρούσας διπλωματικής εργασίας όπου R είναι διάφορες αρωματικές και αλειφατικές αμίνες.

## 2 ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

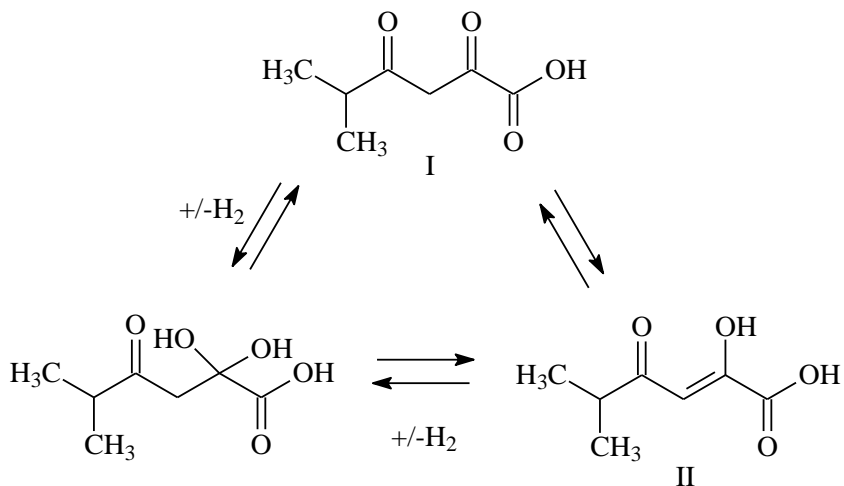
### 2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ *N*-ΜΕΘΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ I ΚΑΙ II.

Για την σύνθεση των *N*-μεθυλο υποκατεστημένων αναλόγων των γενικών τύπων I και II (Σχήμα 1.2) έγινε αρχικά, επίδραση του ανιόντος της ισοπροπυλομεθυλοκετόνης επί του οξαλικού διαιθυλεστέρα και λήφθηκε ο δικετοεστέρας 2 (Σχήμα 2.1)<sup>30</sup>.



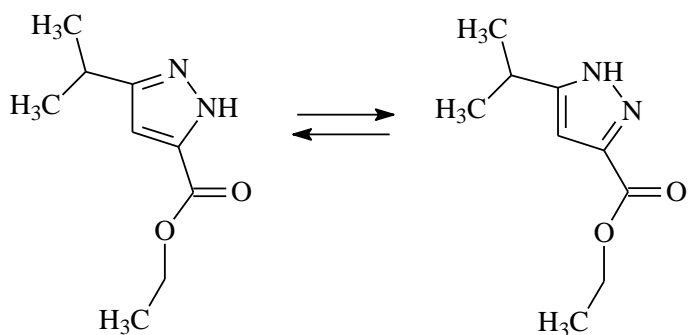
**Σχήμα 2.1:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Οξαλικός διαιθυλεστέρας, NaH 60%, τολουόλιο; (b) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 80%, EtOH; (c) CH<sub>3</sub>I, NaH 60%, DMF άνυδρο.

Σε μελέτες που έχουν γίνει έχει αποδειχθεί ότι ανάλογα παράγωγα, σε υδατικό διάλυμα, βρίσκονται κυρίως υπό την μορφή των δύο ταυτομερών δομών I και II με την ενολική μορφή II να υπερτερεί λόγω της ύπαρξης ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου (Σχήμα 2.2)<sup>27</sup>.



**Σχήμα 2.2:** Ταυτομερείς δομές των δικετοκαρβόξυ παραγώγων σε υδατικό διάλυμα.

Στην συνέχεια με επίδραση υδραζίνης στο δικετοπαραγόγο **2** λήφθηκε ο πυραζολοκαρβοξυλικός αιθυλεστέρας **3**, ο οποίος βρίσκεται υπό την μορφή των δύο ταυτομερών δομών του σχήματος 2.3<sup>31</sup>.

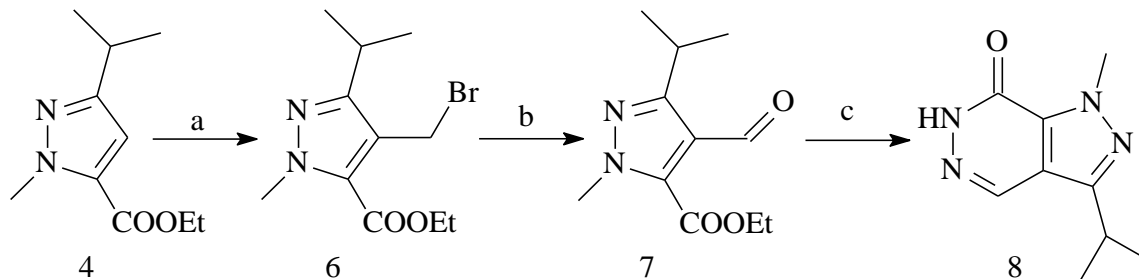


**Σχήμα 2.3:** Ταυτομερείς δομές του παραγώγου **3**.

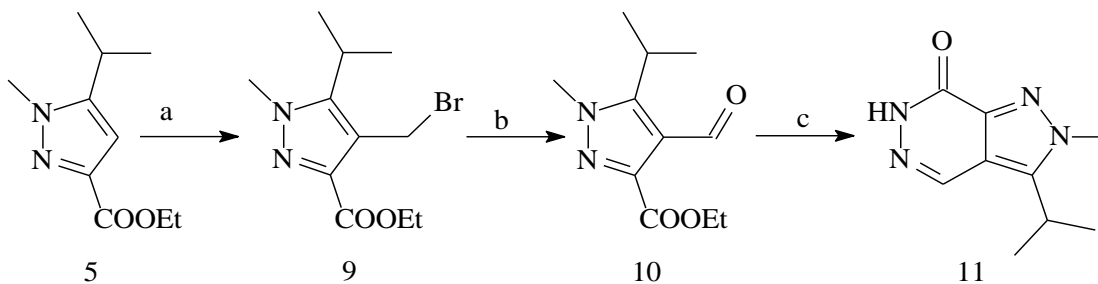
Ακολουθώς, με επίδραση ιωδομεθανίου παρουσία υδριδίου του νατρίου ως βάσης και διμεθυλοφορμαμίδιου ως διαλύτη λήφθηκαν τα δύο ισομερή θέσης **4** και **5** τα οποία διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης, ενώ η ταυτοποίηση της δομής των δύο ισομερών έγινε σε επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας (όπως θα αναφερθεί παρακάτω) με την βοήθεια φασματοσκοπίας NMR μίας ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) και δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC, NOESY).

Είναι ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι κατά τη μεθυλίωση της ένωσης **3** με τη χρήση ιωδομεθανίου, υδριδίου του νατρίου ως βάσης και τετραϋδροφουρανίου ως διαλύτη παρελήφθη αποκλειστικά το μεθυλοπαράγωγο **5**.

Στη συνέχεια, με επίδραση παραφορμαλδεΰδης στα μεθυλοπαράγωγα **4** και **5** παρουσία διαλύματος υδροβρωμίου σε οξικό οξύ, λήφθηκαν αντίστοιχα τα βρωμομεθυλο- ανάλογα **6** (Σχήμα 2.4) και **9** (Σχήμα 2.5).

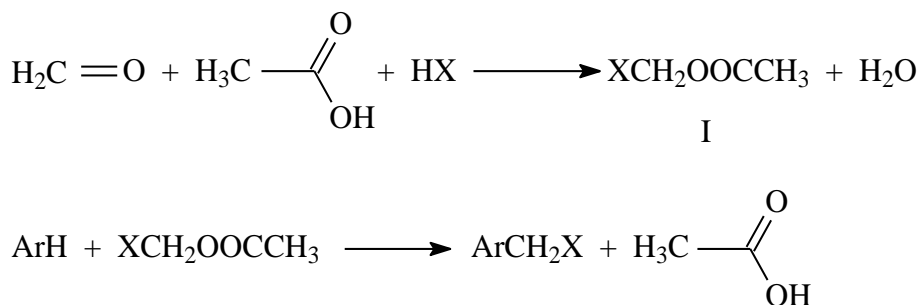


**Σχήμα 2.4:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80%  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ , HCl 36%, EtOH.



**Σχήμα 2.5:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80% NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, HCl 36%, EtOH.

Ο μηχανισμός της αλογονομεθυλίωσης έχει μελετηθεί διεξοδικά. Αρχικά ο Darzens και οι συνεργάτες του θεωρούσαν ότι η αντίδραση της αλογονομεθυλίωσης προχωρούσε μέσω του δραστικού εστέρα I ως μια κλασσική ηλεκτρονιόφιλη αντίδραση (Σχήμα 2.6)<sup>28</sup>.

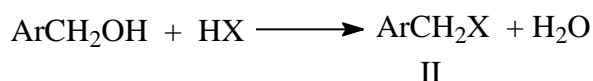
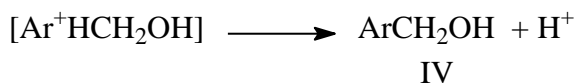
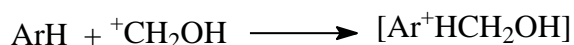
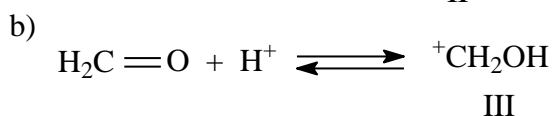
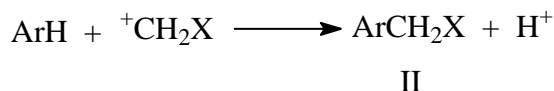
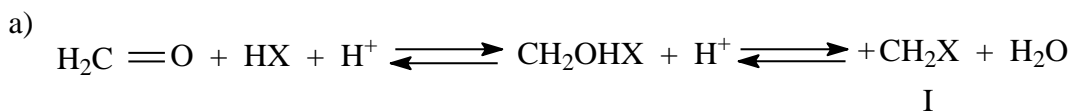


X = Cl, Br

**Σχήμα 2.6:** Μηχανισμός της αντίδρασης αλογονομεθυλίωσης κατά Darzens

Όμως οι Brown και Nelson απέδειξαν ότι η αντίδραση χλωρομεθυλίωσης του βενζολίου με τον αντίστοιχο εστέρα I (Σχήμα 2.6), σε υψηλές θερμοκρασίες, ακόμα και με την χρήση καταλύτη ZnCl<sub>2</sub> ήταν ανεπιτυχής και προτάθηκαν δύο επιπλέον 'ιοντικοί' μηχανισμοί.<sup>13</sup> Έτσι, είναι πιθανό να σχηματίζεται το δραστικό ηλεκτρονιόφιλο I από το οποίο με αρωματική ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση λαμβάνεται το επιθυμητό αλογονομεθυλιωμένο παράγωγο II (Σχήμα 2.7a). Εναλλακτικά, μπορεί με αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης

αρωματικής υποκατάστασης, μέσω του δραστικού ενδιάμεσου III, να σχηματίζεται η αλκοόλη IV, από την οποία τελικά λαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο II (Σχήμα 2.7b). Μετά από πειράματα χλωρο- και βρωμο- μεθυλίωσης σε μονοαλκυλιωμένα βενζόλια λαμβάνονται σε ίδιες αναλογίες τα π- και ο-υποκατεστημένα παράγωγα κάτι που δείχνει ότι το δραστικό ενδιάμεσο είναι το III και όχι το I και συνεπώς είναι πιθανότερος ο δεύτερος από τους προτεινόμενους μηχανισμούς<sup>28</sup>.

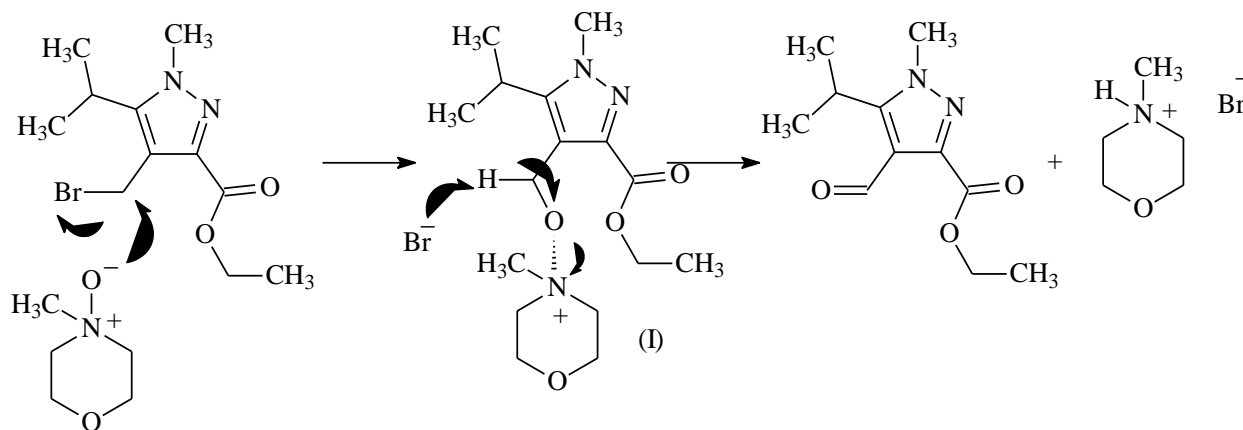


X = Cl, Br

**Σχήμα 2.7:** Οι δύο προτεινόμενοι 'ιοντικοί' μηχανισμοί για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αλογονομεθυλίωσης.

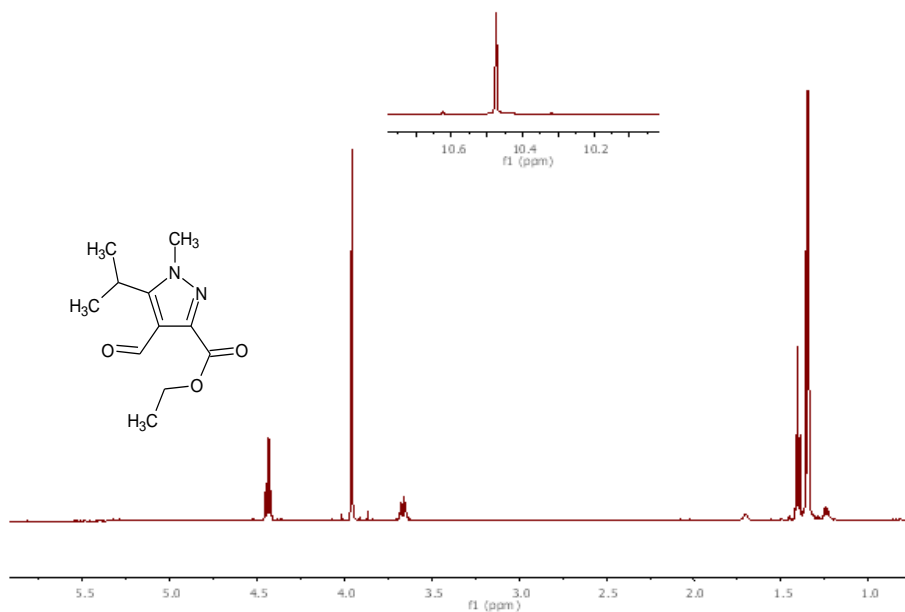
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε οξείδωση της βρωμομεθυλομάδας για τη σύνθεση των αλδευδών **7** (Σχήμα 2.4) και **10** (Σχήμα 2.5) με τη χρήση του *N*-οξειδίου της *N*-μεθυλομορφολίνης. Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιλαμβάνει προσβολή του

αλκυλαλογονιδίου από το *N*-οξείδιο, λήψη του ενδιάμεσου I, από το οποίο με απόσπαση πρωτονίου παρουσία βάσης, λαμβάνεται η επιθυμητή αλδεΐδη (Σχήμα 2.8)<sup>29</sup>.



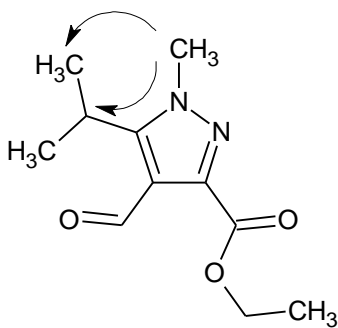
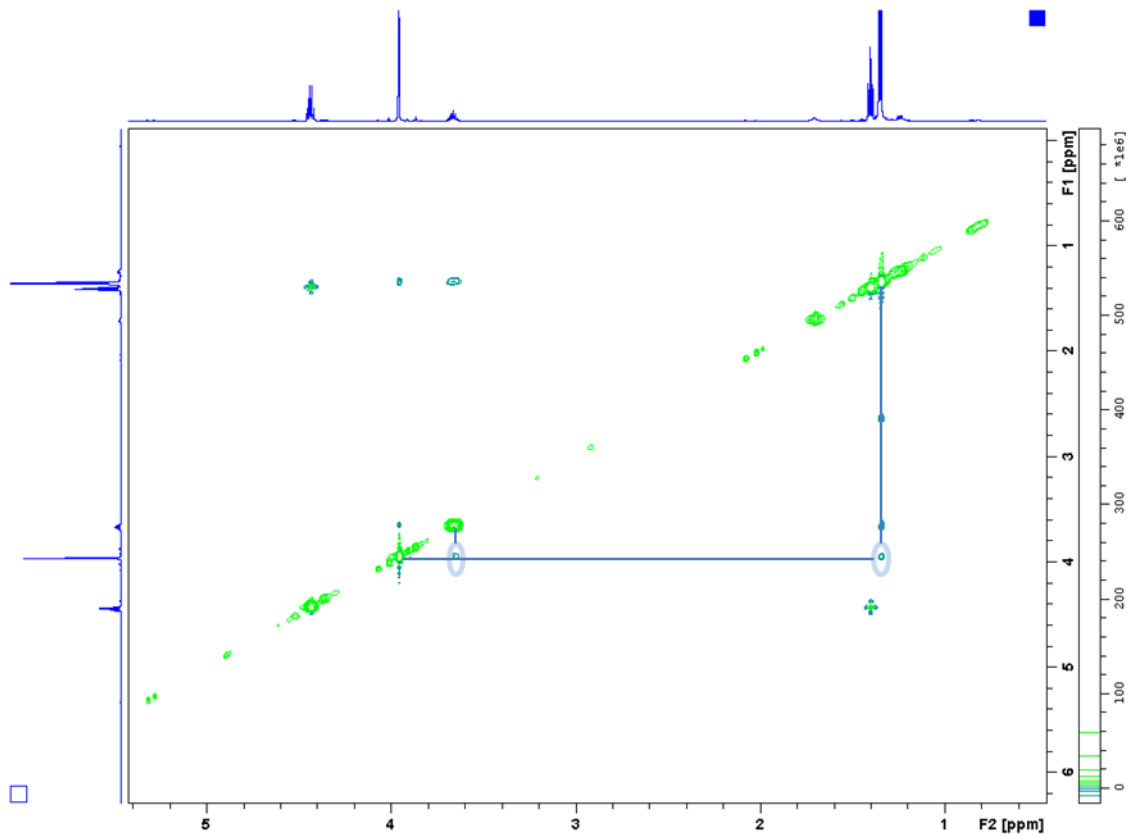
Σχήμα 2.8: Μηχανισμός της αντίδρασης οξείδωσης.

Στο φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του παραγώγου **10**, φαίνεται χαρακτηριστικά το πρωτόνιο της αλδεΐδης που συντονίζεται στα 10.50 ppm ως απλή κορυφή (Εικόνα 2.1).

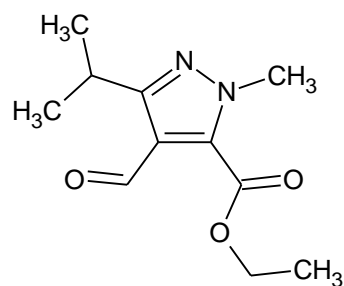


Εικόνα 2.1: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **10**.

Αντίστοιχα στο φάσμα NOE είναι εμφανής η σύζευξη των πρωτονίων του N-CH<sub>3</sub> με τα μεθύλια και το μεθίνιο της ισοπροπυλομάδας που είναι δυνατή μόνο στην αλδεΐδη **10** και όχι στο ισομερές θέσης, δηλαδή την αλδεΐδη **7** (Εικόνα2.2).



10

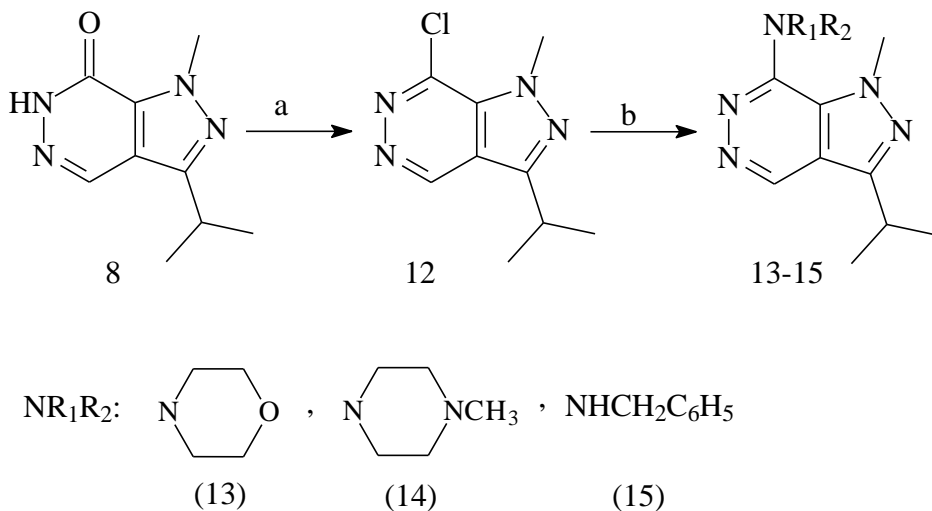


7

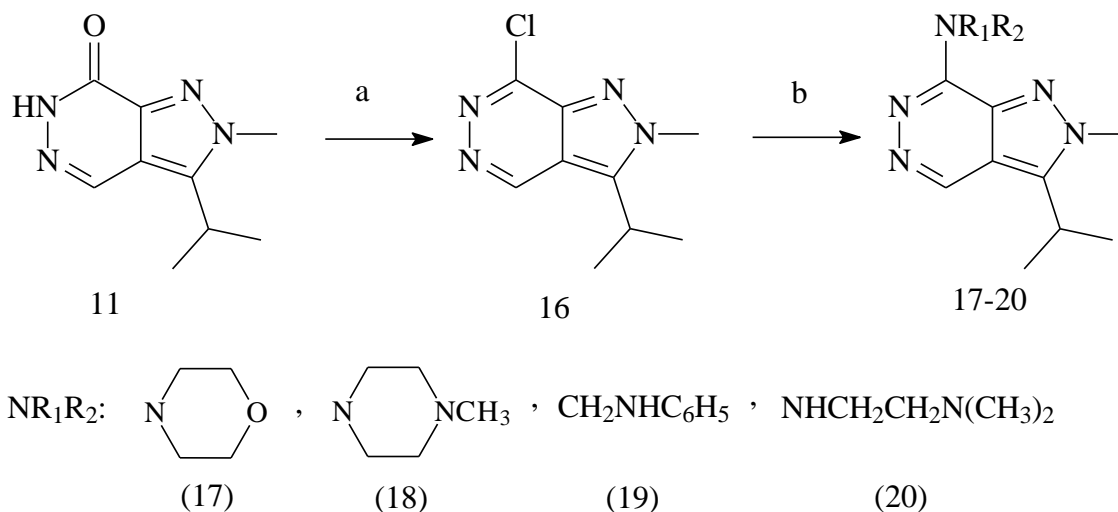
Εικόνα2.2:Φάσμα NOESY του καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **10**.



Ακολουθώς, με επίδραση υδραζίνης επί των αλδεϋδών **7** και **10** παρασκευάστηκαν αντίστοιχα οι πυριδαζιόνες **8** (Σχήμα 2.4) και **11** (Σχήμα 2.5). Από τις τελευταίες, με βρασμό εντός οξυχλωριούχου φωσφόρου παρελήφθησαν τα αντίστοιχα χλωροπαράγωγα **12** (Σχήμα 2.9) και **16** (Σχήμα 2.10). Κατά την αντίδραση αυτή τα χλωρίδια λαμβάνονται πρακτικά καθαρά και χρησιμοποιούνται ως έχουν για το επόμενο στάδιο λόγω του κινδύνου υδρόλυσης.



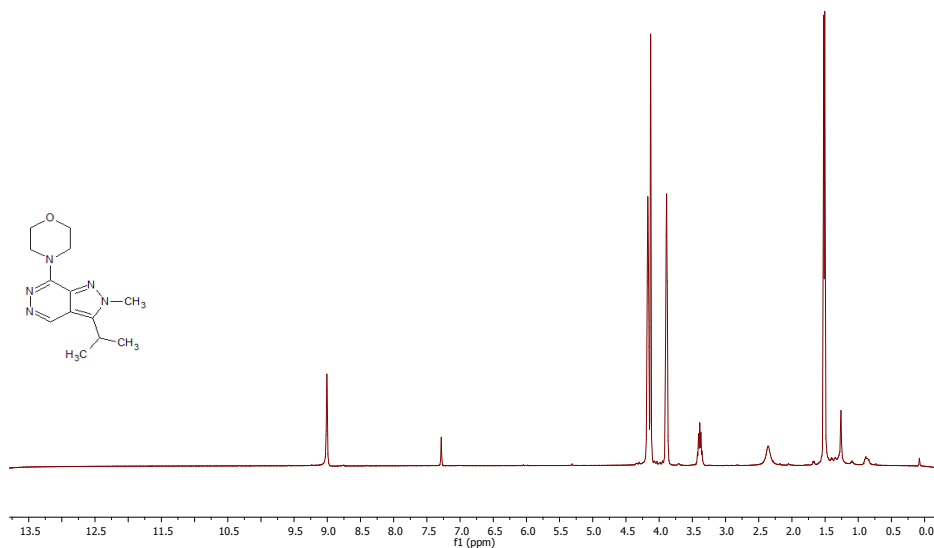
**Σχήμα 2.9:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a)  $\text{POCl}_3$ ; (b)  $\text{HNR}_1\text{R}_2$ , αιθανόλη, βρασμός.



**Σχήμα 2.10:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a)  $\text{POCl}_3$ ; (b)  $\text{HNR}_1\text{R}_2$ , αιθανόλη, βρασμός.

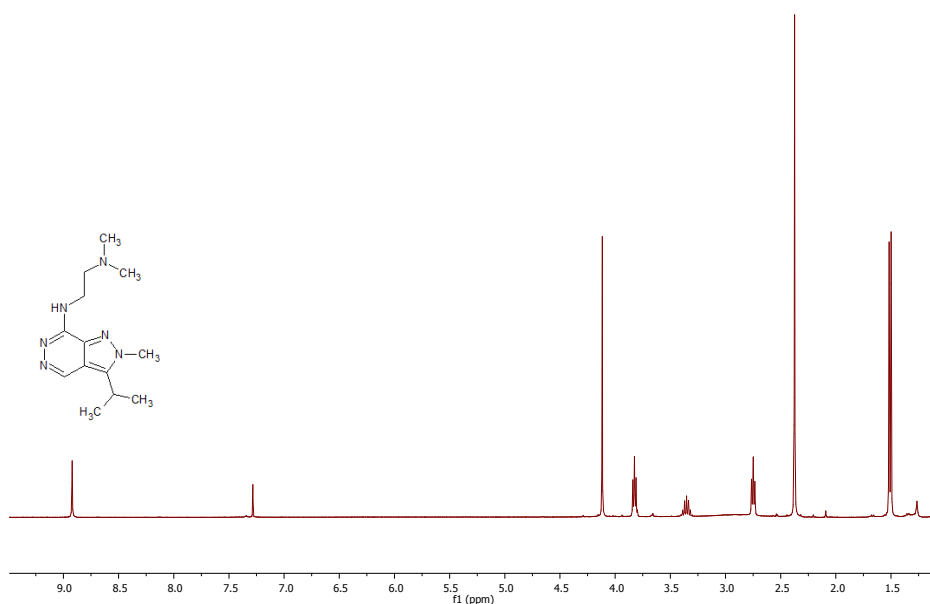
Τα τελικά παράγωγα **13-15** (Σχήμα 2.9) και **17-20** (Σχήμα 2.10) παρασκευάστηκαν με επίδραση των κατάλληλων αμινών επί των χλωροπαραγώγων **12** και **16** αντίστοιχα. Παρακάτω σχολιάζονται ενδεικτικά τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  των αμινοπαραγώγων **17** και **20**.

Στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του παραγώγου **17** είναι χαρακτηριστική η πολλαπλή κορυφή στα 4.15 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια των μεθυλενίων που γειτνιάζουν με το οξυγόνο της μορφολίνης, ενώ τα πρωτόνια των  $\alpha$  μεθυλενίων συντονίζονται στα 3.87 ppm (Εικόνα 2.3).



**Εικόνα 2.3:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της 2-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνης (**17**).

Αντίστοιχα, στο φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του παραγώγου **20** παρατηρούνται δύο τριπλές κορυφές, στα 3.82 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του  $\alpha$  μεθυλενίου ως προς τον αρωματικό δακτύλιο και στα 2.75 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του  $\beta$  μεθυλενίου. Επίσης τα πρωτόνια της διμεθυλαμινομάδας συντονίζονται, ως απλή κορυφή, στα 2.38 ppm (Εικόνα 2.4).

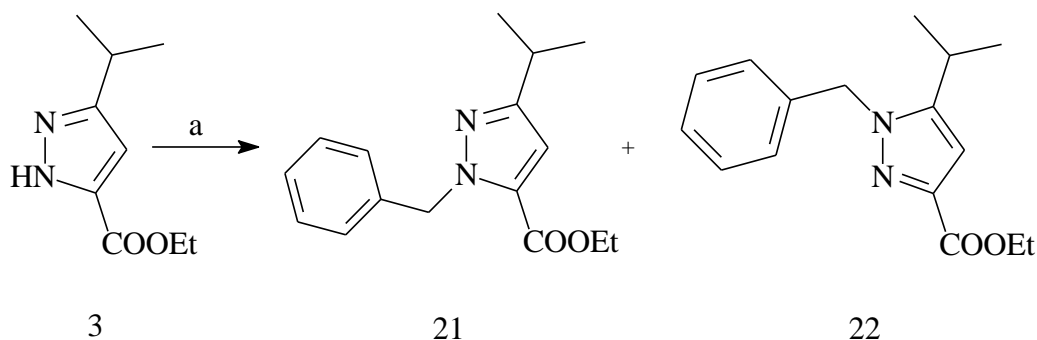


**Εικόνα 2.4:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της *N,N*-διμεθυλο-*N'*-(2-μεθυλο-3-ισοπροπυλο-2*H*-πυραζολο[3,4-*d*]πυριδαζιν-7-υλ)αιθανο-1,2-διαμίνης (**20**).

## 2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ *N*-ΒΕΝΖΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ III ΚΑΙ IV.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση των παραγώγων των γενικών τύπων **III** και **IV** (Σχήμα 1.2) ήταν ανάλογη με αυτήν της σύνθεσης των παραγώγων των γενικών τύπων **I** και **II**.

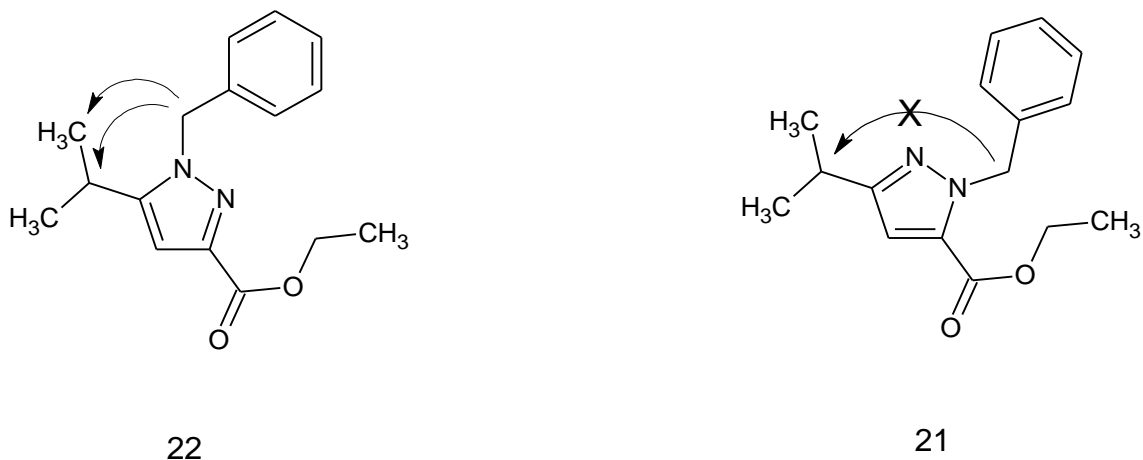
Αρχικά με επίδραση βενζυλοβρωμιδίου επί του παραγώγου **3**, παρουσία NaH εντός DMF, παρελήφθη μίγμα των δύο ισομερών θέσης **21** και **22** (Σχήμα 2.11).



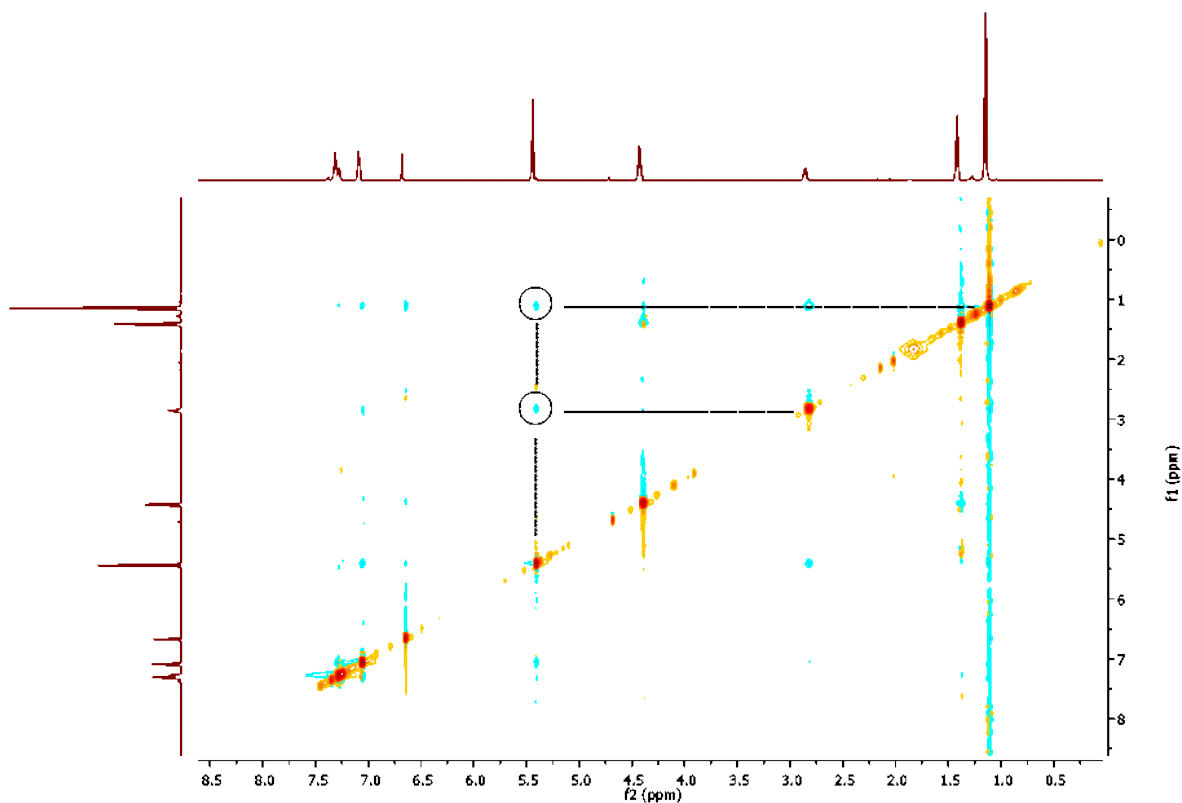
**Σχήμα 2.11:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) Βενζυλοβρωμίδιο, NaH 60%, DMF.

Η ταυτοποίηση της δομής των δύο ισομερών έγινε με την βοήθεια φασματοσκοπίας NMR μίας ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) και δύο διαστάσεων (HMQC, HMBC, NOESY).

Στο φάσμα NOE του παραγώγου **22** (Εικόνα 2.5), είναι εμφανής η σύζευξη των πρωτονίων του μεθυλενίου της βενζυλομάδας με τα μεθύλια αλλά και με το μεθίλιο της ισοπροπυλομάδας, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί μόνο στο ισομερές **22** και όχι στο ισομερές **21** (Σχήμα 2.12).



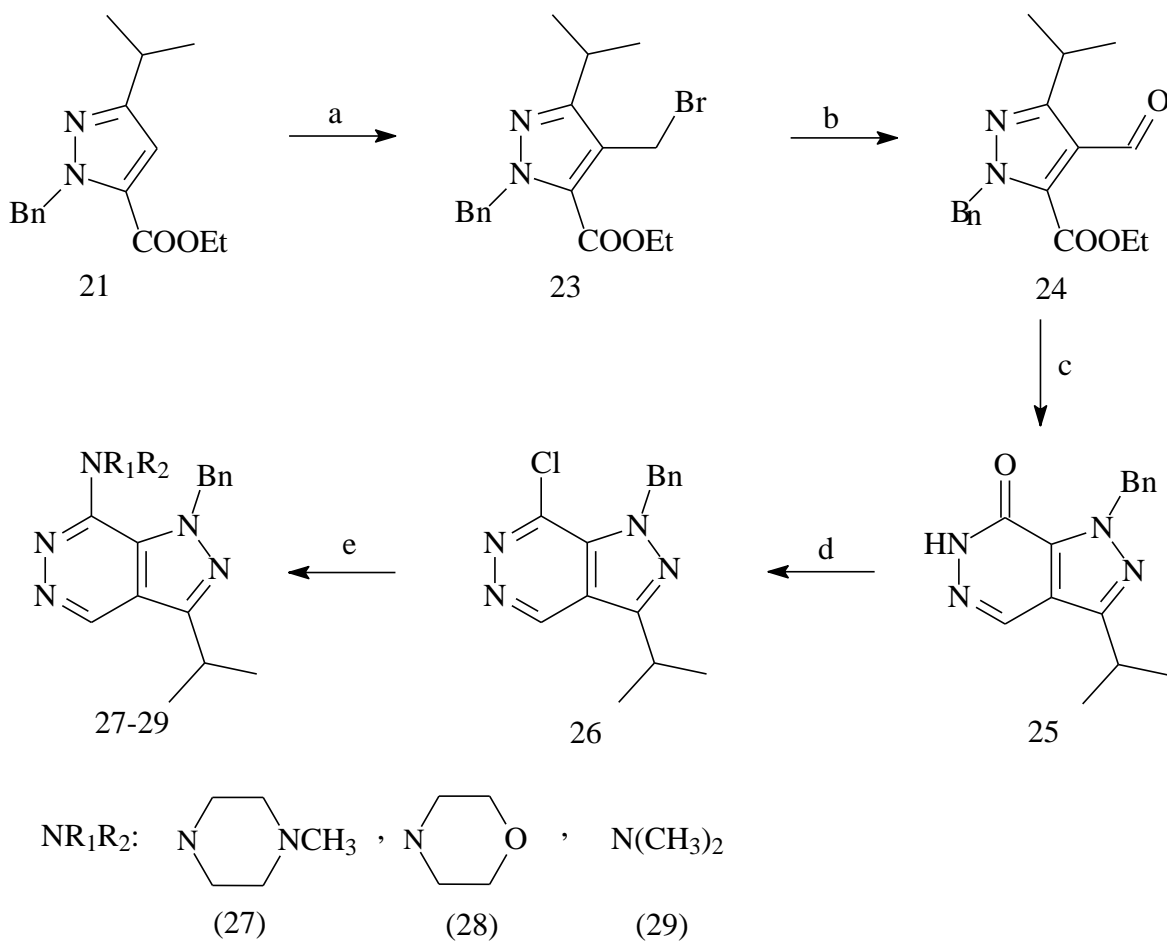
**Σχήμα 2.12:** Σχηματική αναπαράσταση των συζεύξεων των παραγώγων **22** και **21** μέσω του φαινομένου NOE.



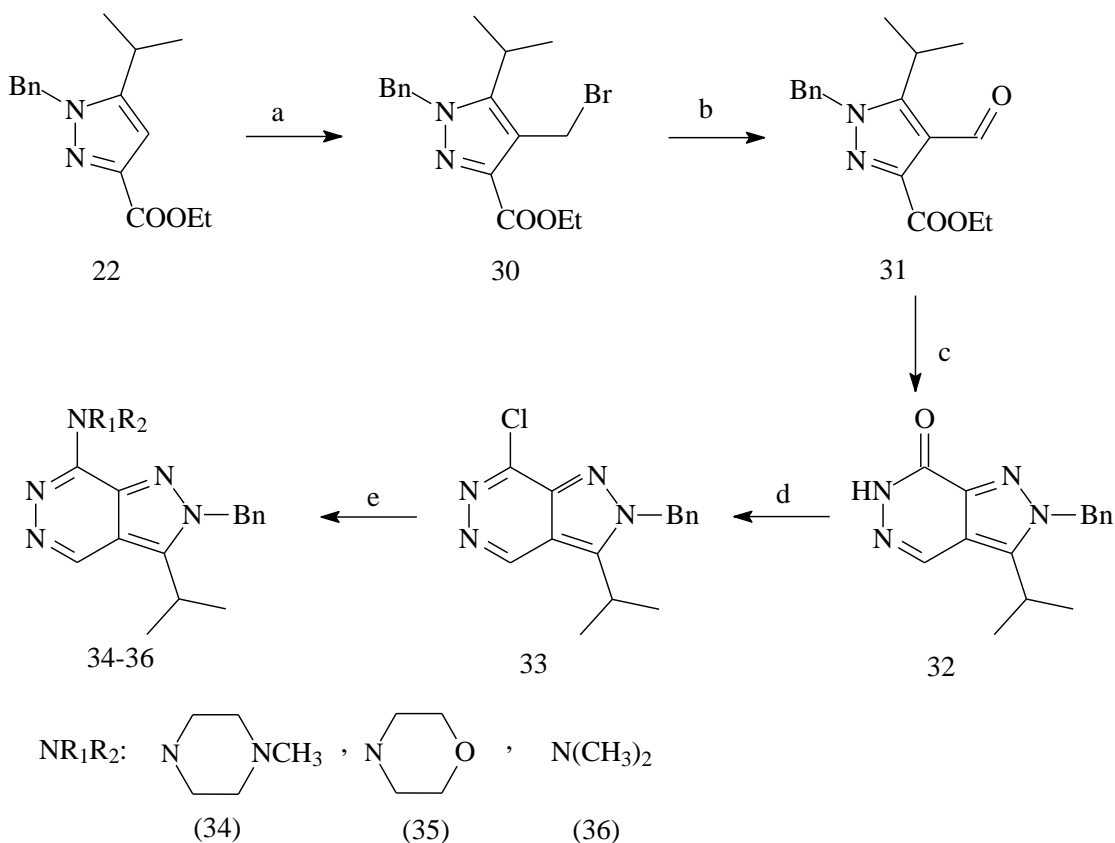
**Εικόνα 2.5:** Φάσμα NOESY του 1-βενζυλο-5-ισοπροπυλο-1*H*-πυραζολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**22**).

Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά από προσπάθεια βενζυλίωσης του πυραζολίου **3** με τη χρήση βενζυλοβρωμιδίου, υδριδίου του νατρίου ως βάσης και τετραϋδροφουρανίου ως διαλύτη δεν παρελήφθη κανένα από τα δύο ισομερή θέσεως. Επιπλέον δοκιμάστηκε η αντίδραση βενζυλίωσης με χρήση βενζυλοχλωριδίου, παρουσία NaH σε DMF με αποτέλεσμα τη λήψη των δύο ισομερών θέσης, όμως με μικρότερες αποδόσεις συγκριτικά με τη χρήση βενζυλοβρωμιδίου.

Μετά το διαχωρισμό των παραγώγων **21** και **22** με χρωματογραφία στήλης ακολουθήθηκαν ανάλογες συνθετικές πορείες με αυτές που αναφέρθηκαν για τα παράγωγα των γενικών τύπων I και II. Έτσι, σε κάθε ισομερές έγιναν διαδοχικά αντιδράσεις βρωμομεθυλίωσης, οξείδωσης, κυκλοποίησης, χλωρίωσης και τέλος με επίδραση κατάλληλων αμινών παρασκευάστηκαν τα τελικά προϊόντα **27-29** και **34-36** (Σχήματα 2.13 και 2.14).

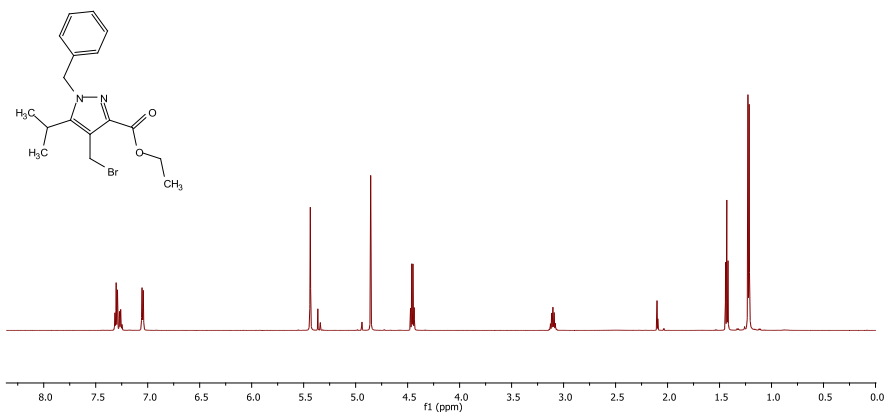


**Σχήμα 2.13:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80% NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, HCl 36%, EtOH; (d) POCl<sub>3</sub>; (e) HNR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, αιθανόλη, βρασμός.



**Σχήμα 2.14:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80%  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ , HCl 36%, EtOH; (d)  $\text{POCl}_3$ ; (e)  $\text{HNR}_1\text{R}_2$ , αιθανόλη, βρασμός.

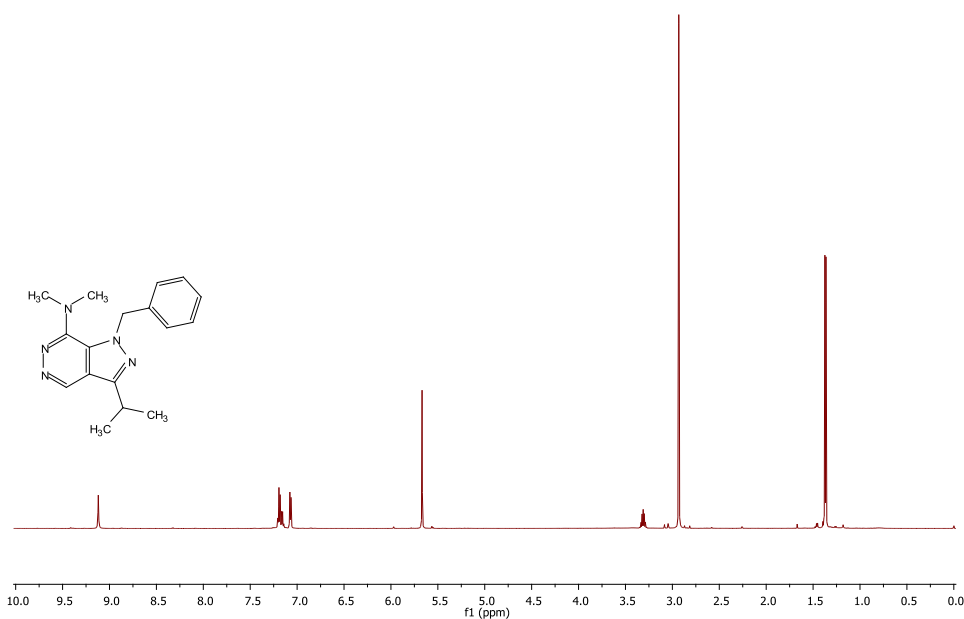
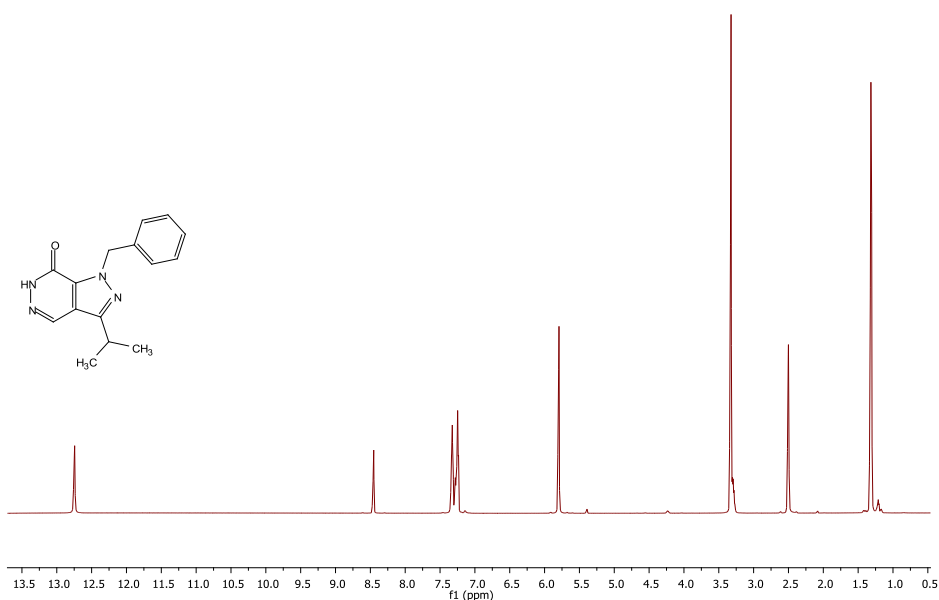
Ενδεικτικά στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του εστέρα **30**. Είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη δύο απλών κορυφών στα 4.9 και 5.4 ppm περίπου, στις οποίες συντονίζονται τα πρωτόνια των μεθυλενίων της βρωμομεθυλομάδας και της βενζυλομάδας αντίστοιχα. Εξάλλου είναι εμφανής η απουσία της απλής κορυφής στα 6.5 ppm περίπου, που αντιστοιχούσε στο αρωματικό πρωτόνιο του πυραζολίου **22** (Εικόνα2.6).



**Εικόνα 2.6:** Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR του καρβοξυλικού αιθυλεστέρα **30**.

Στην εικόνα 2.7 παρουσιάζονται τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR της πυριδαζινόνης **25** και της αμίνης **29** όπου είναι εμφανής η ύπαρξη της διμεθυλαμινομάδας στα 2.99 ppm. Επίσης είναι χαρακτηριστική η αποθωράκιση του αρωματικού πρωτονίου, το οποίο στο φάσμα της πυριδαζινόνης **25** συντονίζεται στα 8.26 ppm, ενώ στο φάσμα της αμίνης **29** συντονίζεται στα 9.17 ppm.

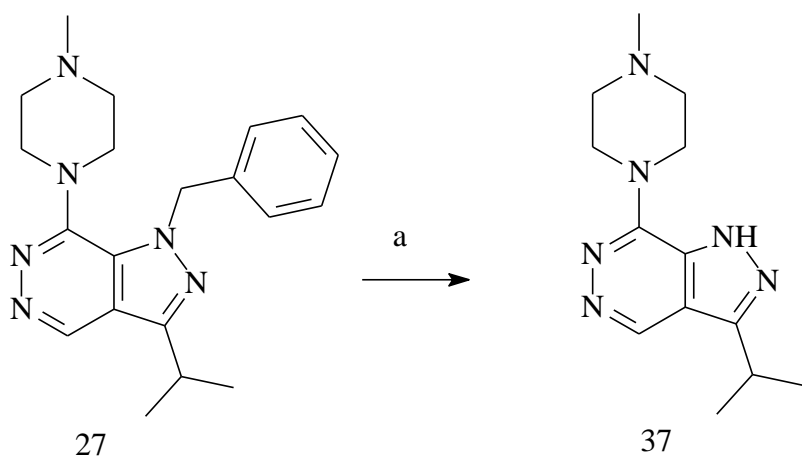




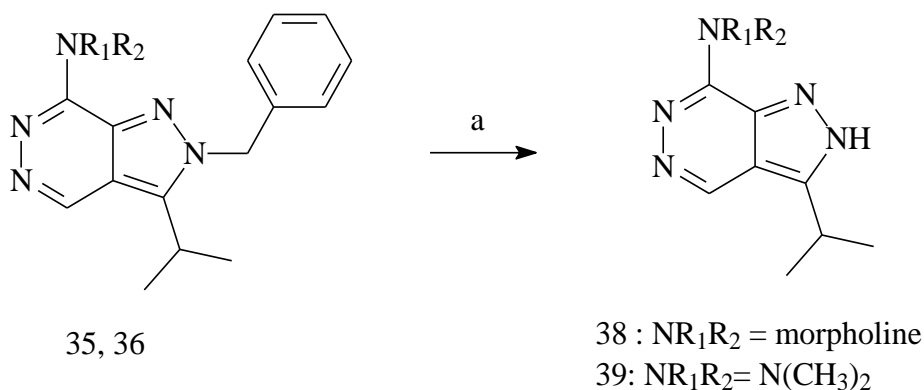
Εικόνα 2.7: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR της πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνης **25** (επάνω) και της πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιναμίνης **29** (κάτω).

### 2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ V.

Η επιθυμητή αμίνη **37** παρασκευάστηκε μετά από αναγωγική αποβενζυλίωση του παραγώγου **27**, με επίδραση μυρμηκικού οξέος παρουσία παλλαδίου επί άνθρακα (Σχήμα 2.15) ενώ τα παράγωγα **38** και **39** συντέθηκαν από τα αντίστοιχα βενζυλοπαραγώγα **35** και **36** με επίδραση τριχλωριούχου αργιλίου εντός ανύδρου τολουολίου (Σχήμα 2.16).



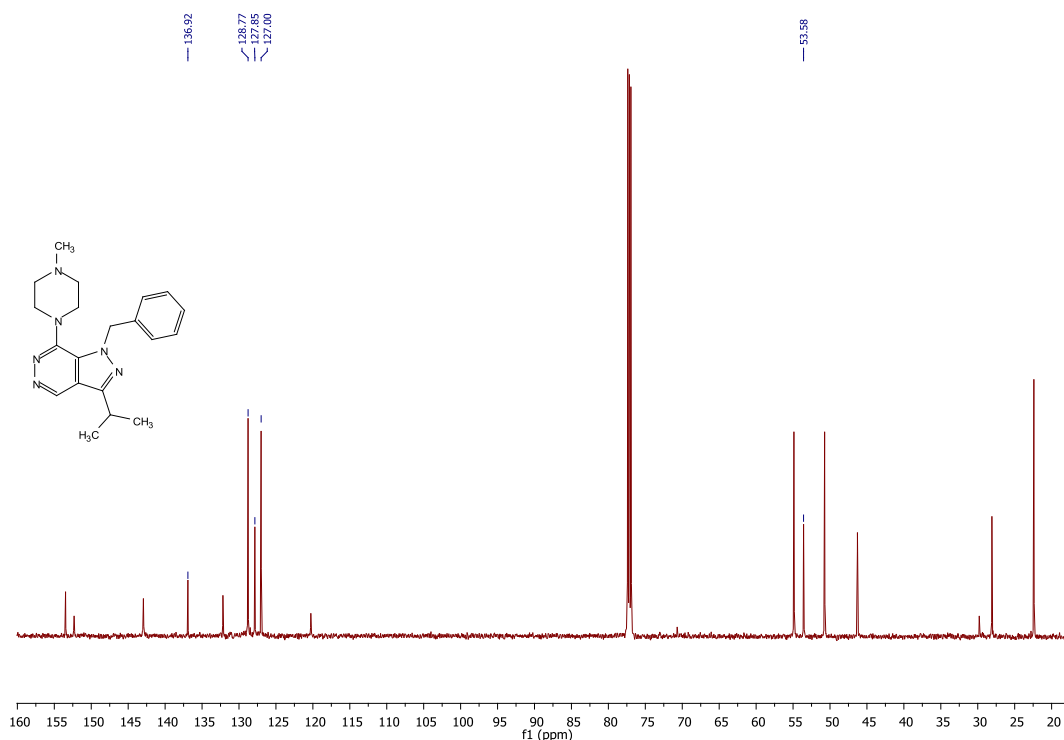
Σχήμα 2.15: Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) 10% Pd/C, μυρμηκικό οξύ, αιθανόλη, βρασμός.

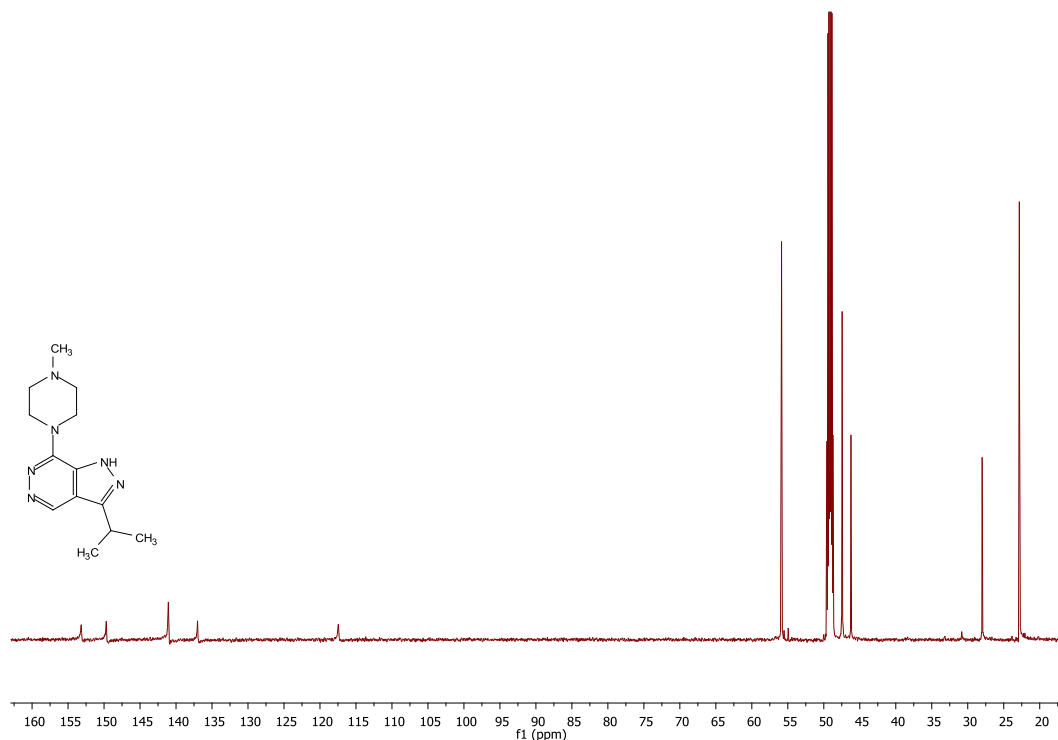


Σχήμα 2.16: Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) AlCl<sub>3</sub>, άνυδρο τολουόλιο.

Αρχικά έγινε προσπάθεια αποβενζυλίωσης και των αμινών **35** και **36** χρησιμοποιώντας παλλάδιο επί άνθρακα σε μυρμηκικό οξύ, όμως τα προϊόντα λήφθηκαν σε πολύ μικρή απόδοση (2%) και έτσι η αποπροστασία έγινε με επίδραση  $\text{AlCl}_3$ , οπότε τα παράγωγα **38** και **39** παρασκευάστηκαν σε απόδοση περίπου 65%.

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται τα φάσματα  $^{13}\text{C}$ -NMR της αμίνης **27** και του αποβενζυλιωμένου παραγώγου **37**. Στο φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR του **37** είναι εμφανής η απουσία των κορυφών στα 136.92, 128.77, 127.85, 127.00 και 53.58 ppm, που αντιστοιχούσαν στους άνθρακες της βενζυλομάδας (Εικόνα 2.8).



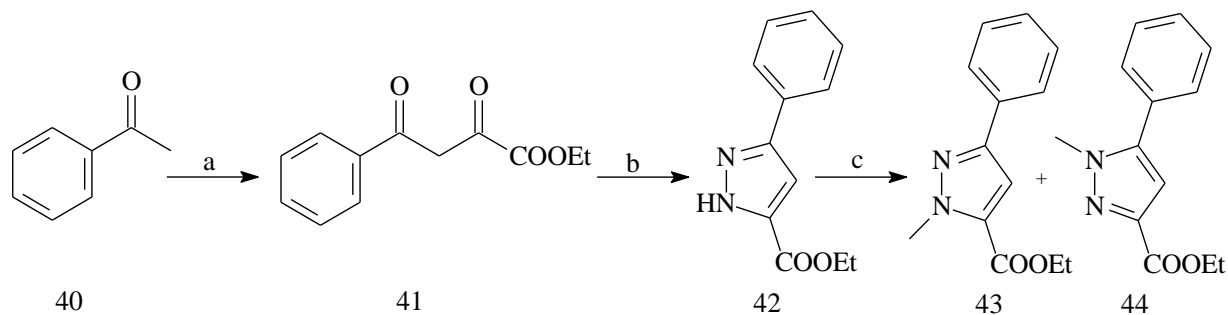


Εικόνα 2.8: Φάσμα  $^{13}\text{C}$ -NMR των παραγώγων 27 (επάνω) και 37 (κάτω).

## 2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ Ν-ΜΕΘΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ VI ΚΑΙ VII.

Για την σύνθεση των *N*-μεθυλο-υποκατεστημένων αναλόγων των γενικών τύπων VI και VII (Σχήμα 1.2) χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η φαινυλομεθυλοκετόνη (40). Μετά από επίδραση του ανιόντος της φαινυλομεθυλοκετόνης επί του οξαλικού διαιθυλεστέρα λήφθηκε ο επιθυμητός δικετοεστέρας 41 (Σχήμα 2.17)<sup>32</sup>.

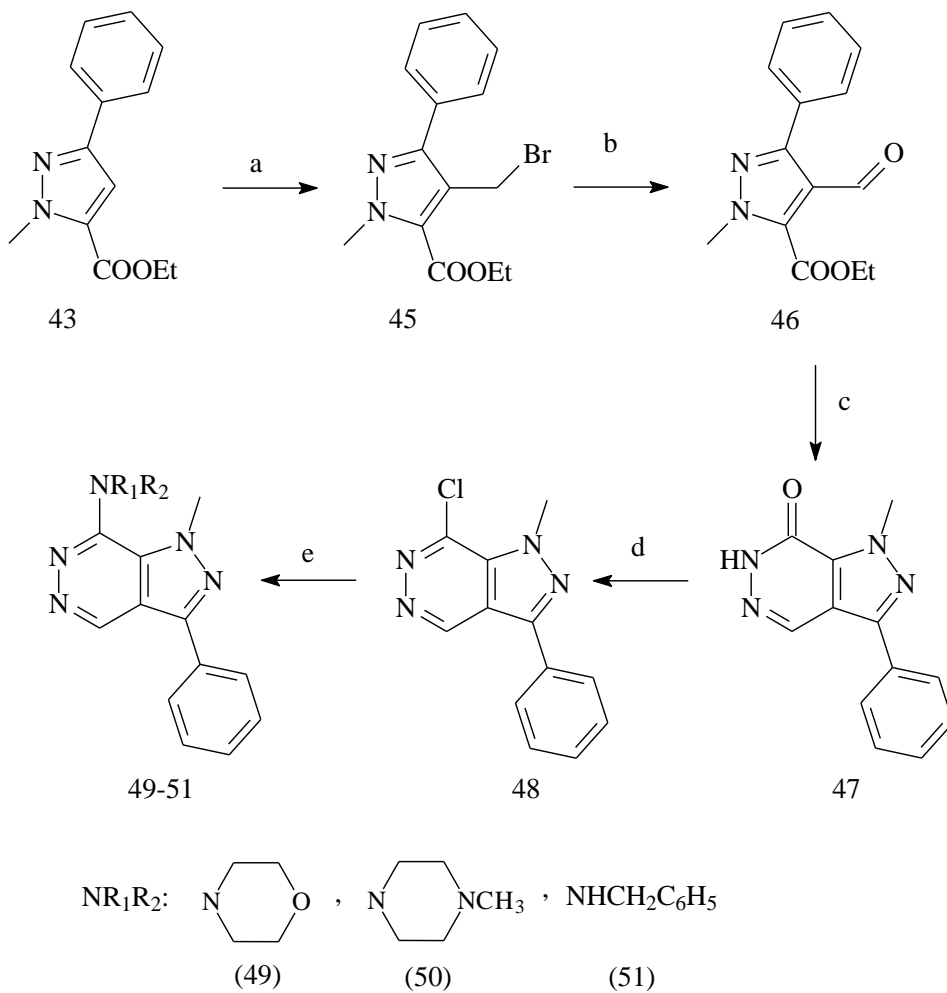
Στην συνέχεια, με επίδραση υδραζίνης στο δικετοπαραγώγο 41 συντέθηκε το πυραζόλιο 42, το οποίο μεθυλιώθηκε με επίδραση μεθυλοϊωδιδίου. Η μεθυλίωση του παραγώγου 42 οδήγησε στη λήψη των δύο ισομερών θέσεως 43 και 44 σε αναλογία περίπου 2 : 1.



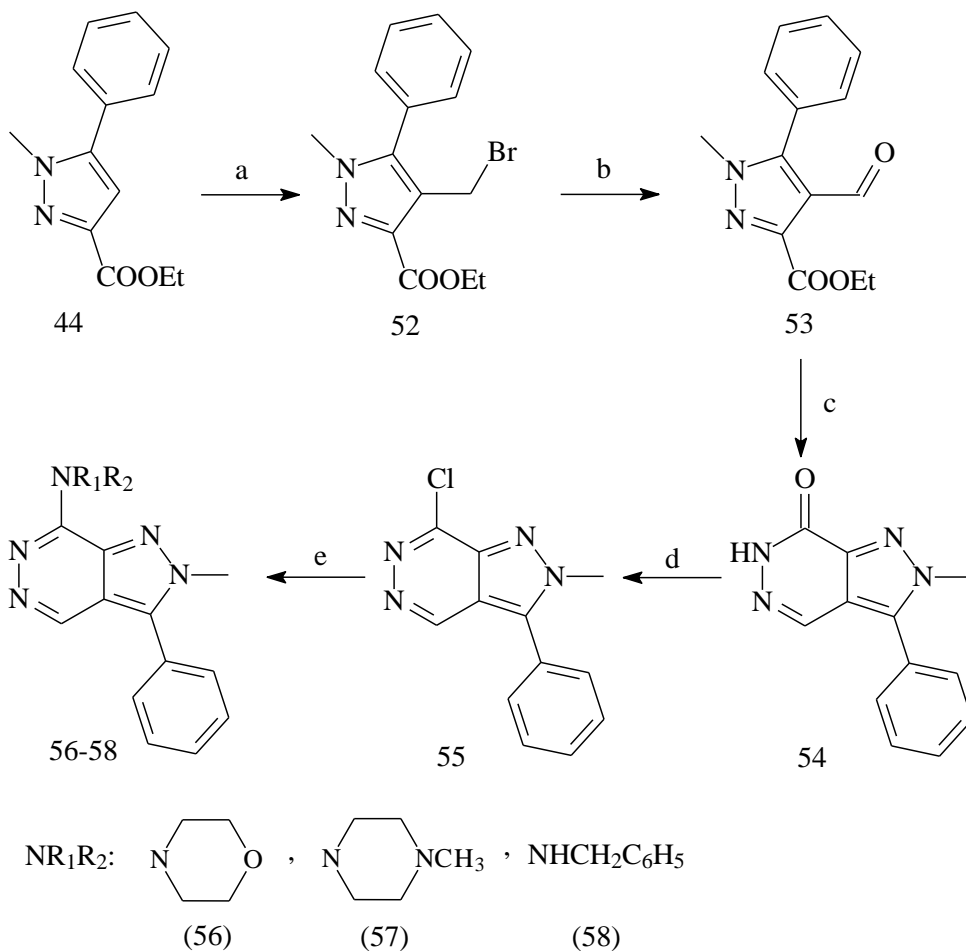
**Σχήμα 2.17:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Οξαλικός διαιθυλεστέρας, NaH 60%, τολουόλιο; (b)  $\text{NH}_2\text{NH}_2$  80%, EtOH; (c)  $\text{CH}_3\text{I}$ , NaH 60%, DMF άνυδρο.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κατά τη μεθυλίωση της ένωσης **3**, χρησιμοποιώντας ακριβώς τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης όπως αυτές που χρησιμοποιήθηκαν και στην περίπτωση του παραγώγου **42**, η αναλογία λήψεως των δύο ισομερών **4** και **5** ήταν πολύ διαφορετική (η αναλογία του **5** ήταν σχεδόν τριπλάσια από του μεθυλοπαραγώγου **4**, Σχήμα 2.1).

Μετά τον επιτυχή διαχωρισμό των μεθυλοπαραγώγων **43** και **44** με χρωματογραφία στήλης, ακολούθησαν ανάλογες με τα προαναφερθέντα συνθετικές πορείες για κάθε ισομερές (Σχήματα 2.18 και 2.19).

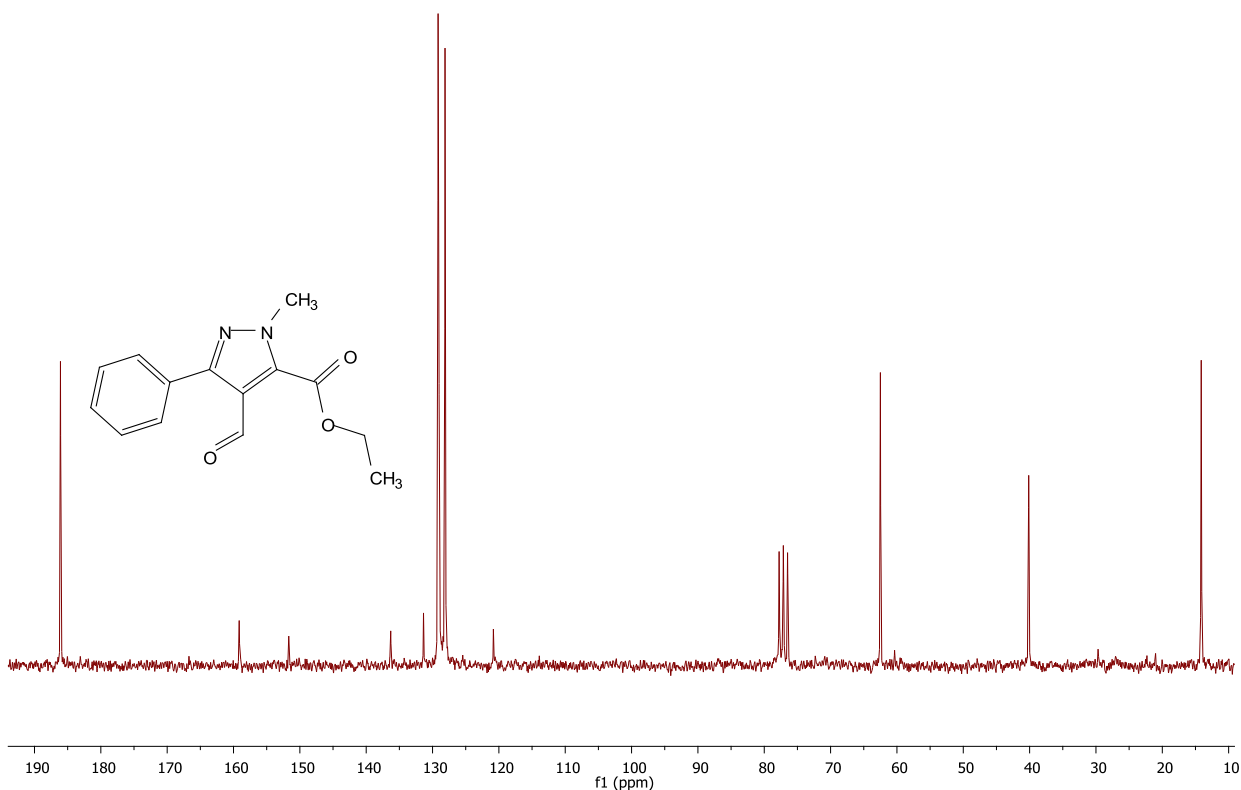


**Σχήμα 2.18:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80% NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, HCl 36%, EtOH; (d) POCl<sub>3</sub>; (e) HNR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, αιθανόλη, βρασμός.



**Σχήμα 2.19:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80% NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, HCl 36%, EtOH; (d) POCl<sub>3</sub>; (e) HNR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, αιθανόλη, βρασμός.

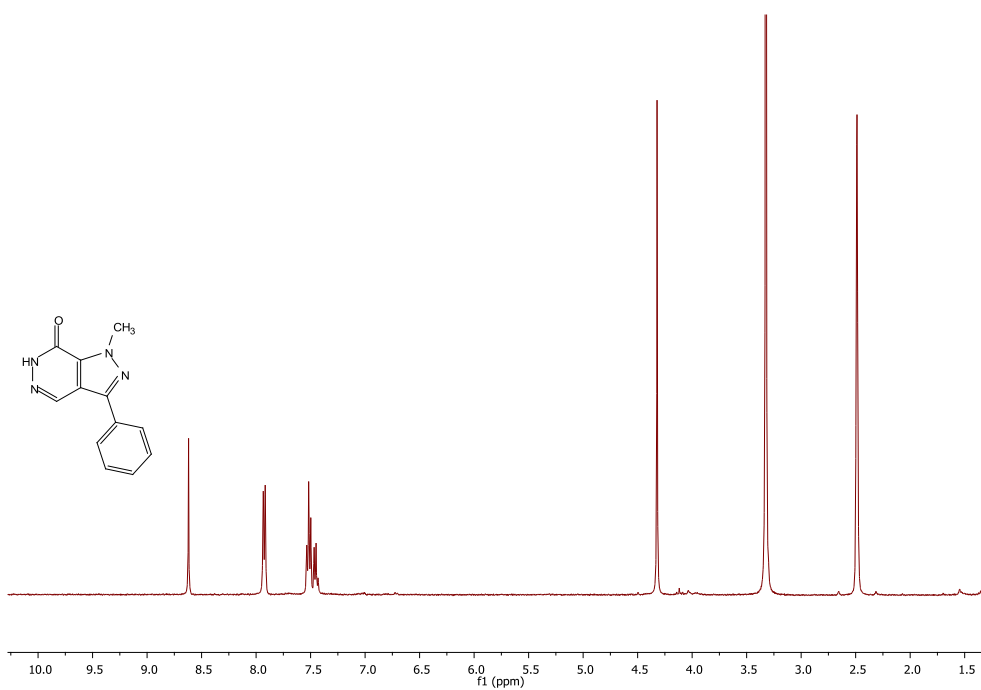
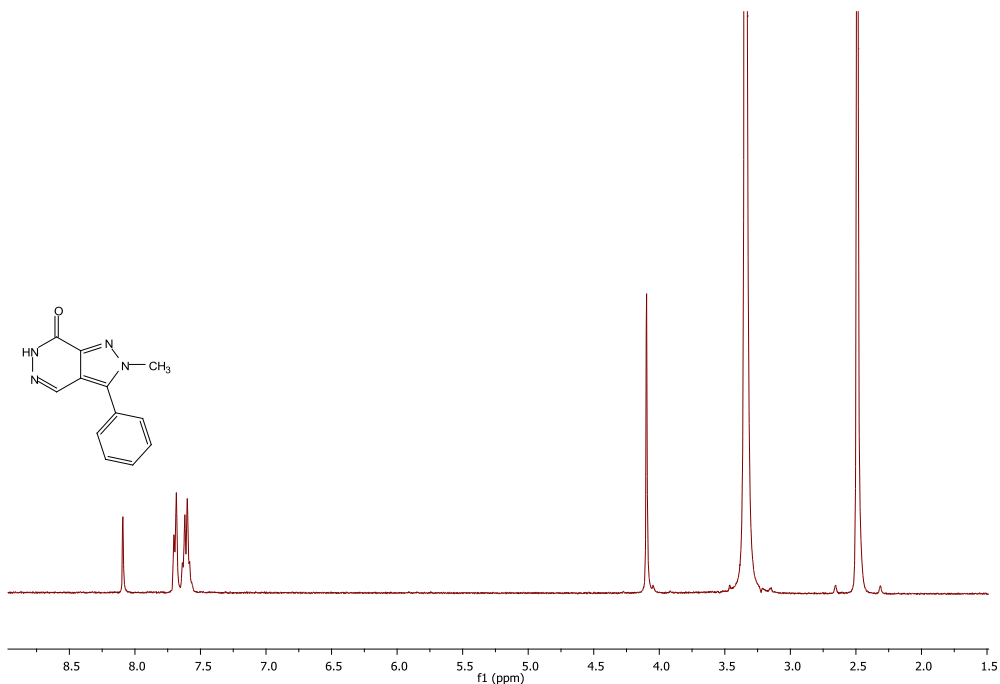
Σχετικά με την απόδοση της δομής των παραγώγων, στηνεικόνα2.9, παρουσιάζεται ενδεικτικά το φάσμα άνθρακα της αλδεΰδης 46όπου φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή (187 ppm) που αντιστοιχεί στην απορρόφηση της αλδεΰδομάδας.



**Εικόνα2.9:** Φάσμα<sup>1</sup>H-NMR του 1-μεθυλο-3-φαινυλο-4-φορμυλο-1*H*-πυραζολ-5-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**46**).

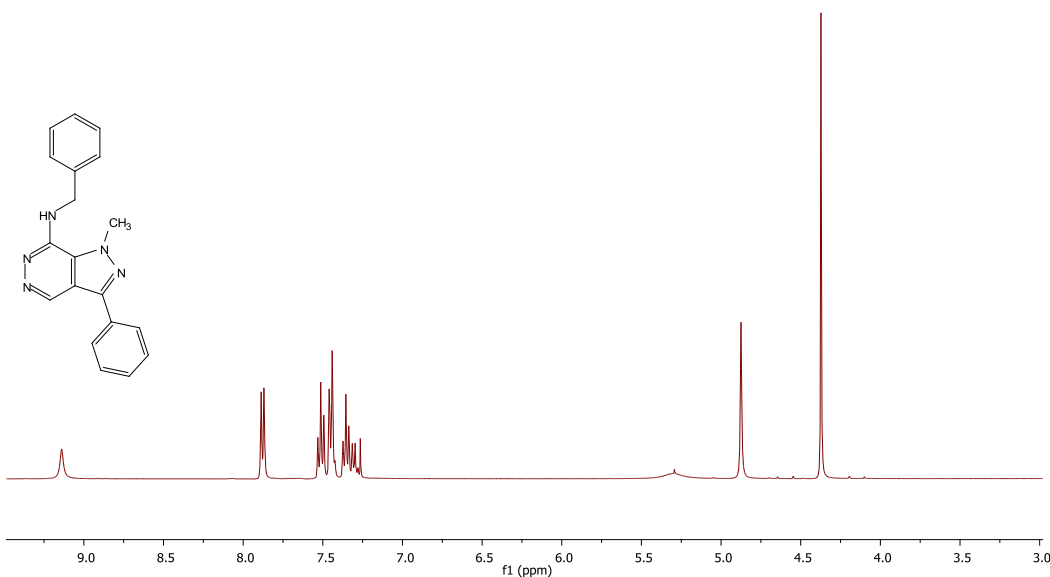
Στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR των παραγώγων **47** και **54** είναι εμφανής η αποθωράκιση του αρωματικού πρωτονίου του δακτυλίου της πυραζολοπυριδαζινόνης καθώς και των α-πρωτονίων του φαινυλίου του παραγώγου **47** σε σχέση με το παράγωγο **54** πιθανώς λόγω της διαφοράς του αρωματικού χαρακτήρα των δακτυλίων. Συγκεκριμένα, το αρωματικό πρωτόνιο του **47** συντονίζεται στα 8.62 ppm σε αντίθεση με αυτό του **54** που συντονίζεται στα 8.09 ppm. Επίσης η διπλή κορυφή του φαινυλίου της πυριδαζινόνης **47** εμφανίζεται στα 7.92 ppm, σαφώς αποθωρακισμένη συγκριτικά με αυτή της πυριδαζινόνης **54** που εμφανίζεται στα 7.69 ppm (Εικόνα2.10).





Εικόνα 2.10: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR των μεθυλοπυραζολο[3,4-d]πυριδαζινονών 54 (επάνω) και 47 (κάτω).

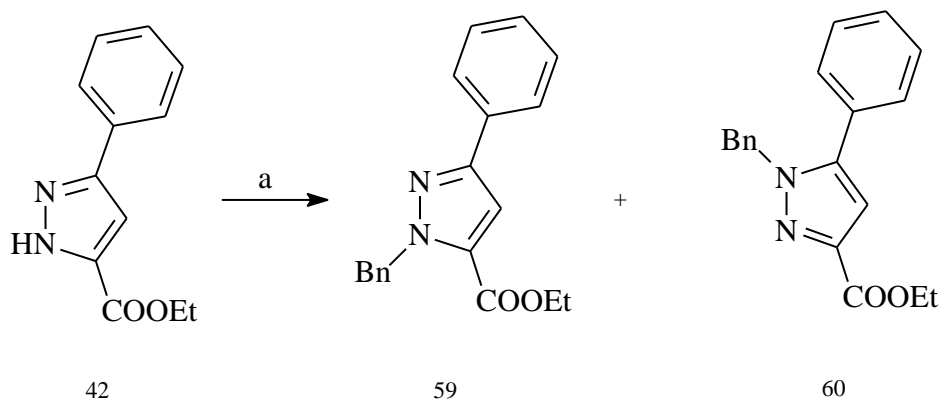
Τέλος, στηνεικόνα2.11 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  της αμίνης **51**, όπου στην περιοχή των αλειφατικών παρατηρούνται δύο απλές κορυφές, μία στα 4.37 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του  $\text{N-CH}_3$  και η άλλη στα 4.87 ppm στην οποία συντονίζονται τα πρωτόνια του μεθυλενίου της βενζυλομάδας.



Εικόνα2.11: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$  της πυραζολο[3,4-*d*]πυριδαζιναμίνης **51**.

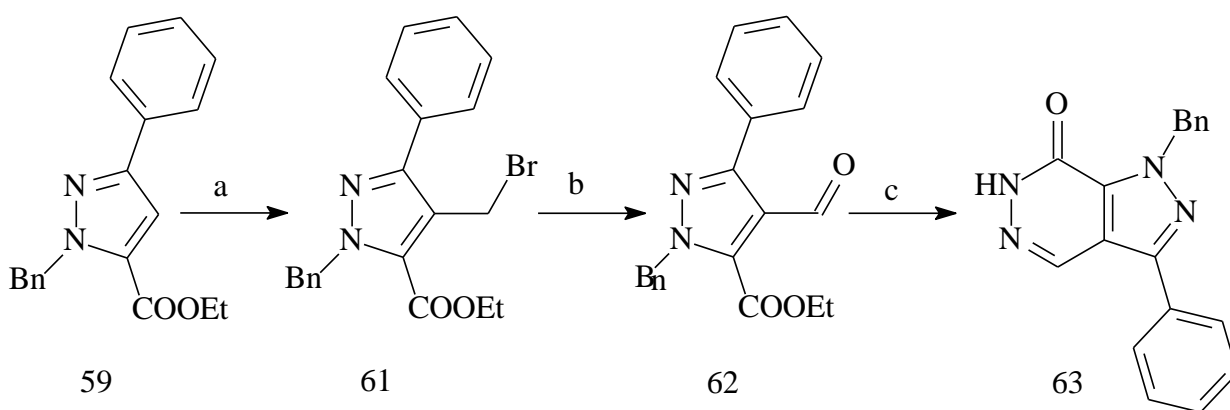
## 2.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ *N*-ΒΕΝΖΥΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΩΝ ΓΕΝΙΚΩΝ ΤΥΠΩΝ VIII ΚΑΙ IX, ΟΠΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΠΟΒΕΝΖΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥΧ.

Η πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των παραγώγων των γενικών τύπων VIII και IX ήταν ανάλογη με αυτήν της σύνθεσης των *N*-μεθυλο υποκατεστημένων παραγώγων των γενικών τύπων I και II. Αρχικά με επίδραση βενζυλοβρωμιδίου επί του παραγώγου **42**, παρουσία  $\text{NaH}$  σε DMF, παρελήφθη μίγμα των δύο ισομερών θέσεως **59** και **60** σε αναλογία 3 : 1 (Σχήμα 2.20).

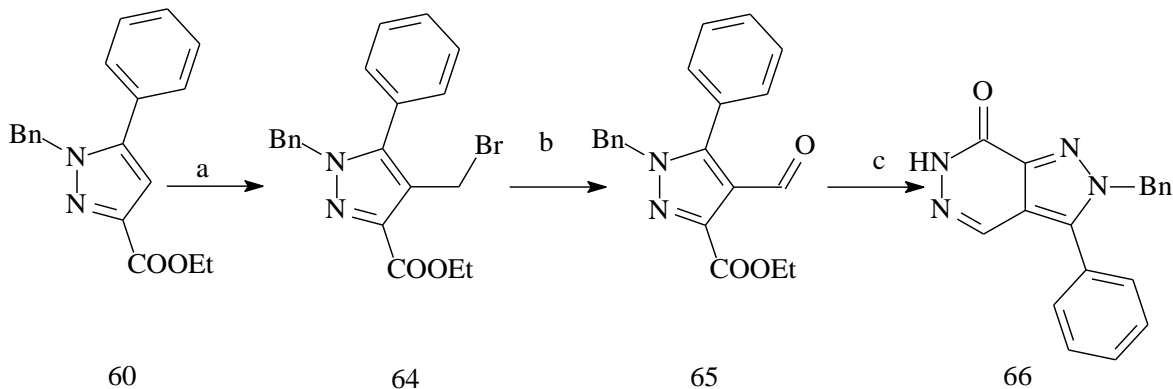


**Σχήμα 2.20:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Βενζυλοβρωμίδιο, NaH 60%, DMF.

Μετά τον επιτυχή χρωματογραφικό διαχωρισμό των δύο ισομερών **59** και **60** ακολούθησαν αντιδράσεις ανάλογες με αυτές που έχουν περιγραφεί νωρίτερα και λήφθηκαν τα παράγωγα **63** και **66** αντίστοιχα (Σχήματα 2.21 και 2.22).

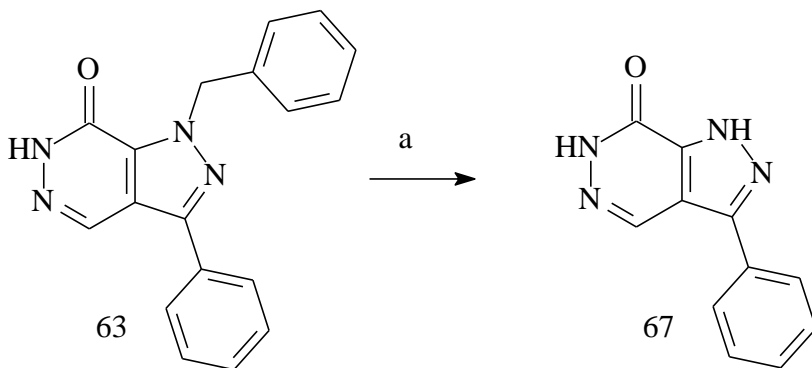


**Σχήμα 2.21:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80% NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, HCl 36%, EtOH.



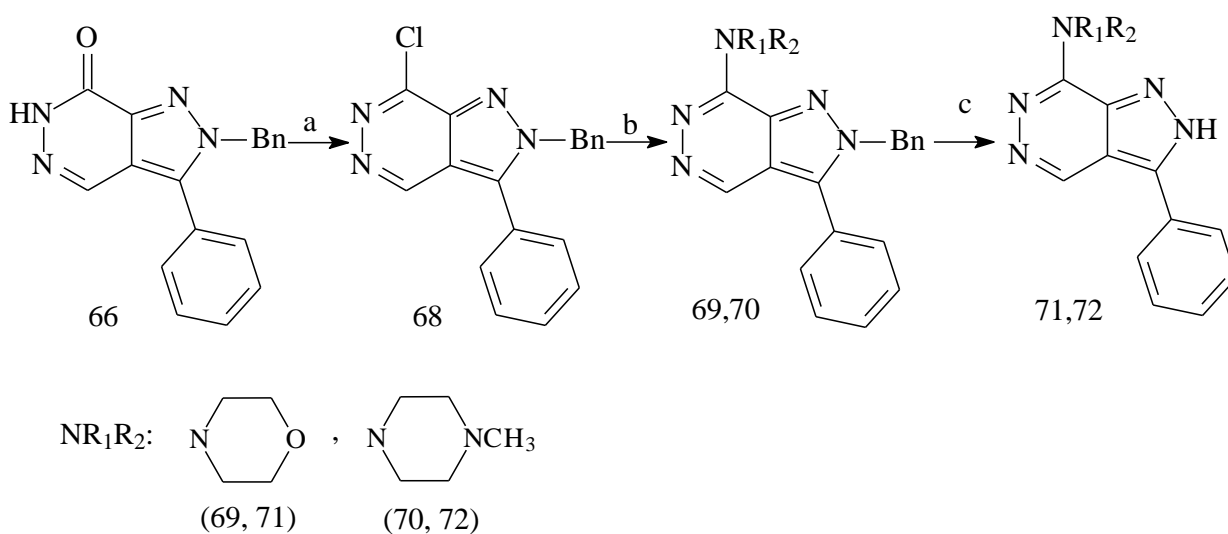
**Σχήμα 2.22:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a) Παραφορμαλδεΰδη, 33% HBr σε οξικό οξύ; (b) *N*-μεθυλομορφολινο-*N*-οξείδιο, ACN; (c) 80%  $\text{NH}_2\text{NH}_2$ , HCl 36%, EtOH.

Ακολούθως έγινε προσπάθεια χλωρίωσης της πυραζολοπυριδαζινόνης **63** με τη χρήση οξυχλωριούχου φωσφόρου, όπως περιγράφηκε και για τις υπόλοιπες πυραζολοπυριδαζινόνες της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Στην προκειμένη περίπτωση όμως, παρόλο που το μίγμα θερμάνθηκε στους  $110^\circ\text{C}$  για 72 ώρες, η αντίδραση δεν πραγματοποιήθηκε, πιθανώς για ηλεκτρονικούς και στερεοχημικούς λόγους ή και για λόγους διαλυτότητας. Χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον ως διαλύτες: τολουόλιο, πυριδίνη, άνυδρο THF, χωρίς όμως επιτυχία. Επίσης, επιχειρήθηκε αναγωγική αποβενζυλίωση της πυριδαζινόνης **63** με τη χρήση τριχλωριούχου αργιλίου, για την παραλαβή του παραγώγου **67** (Σχήμα 2.23).



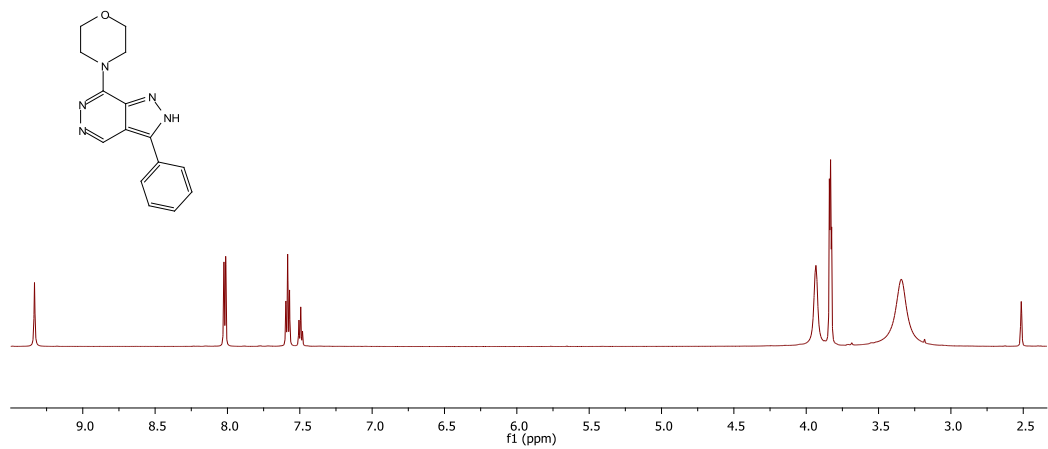
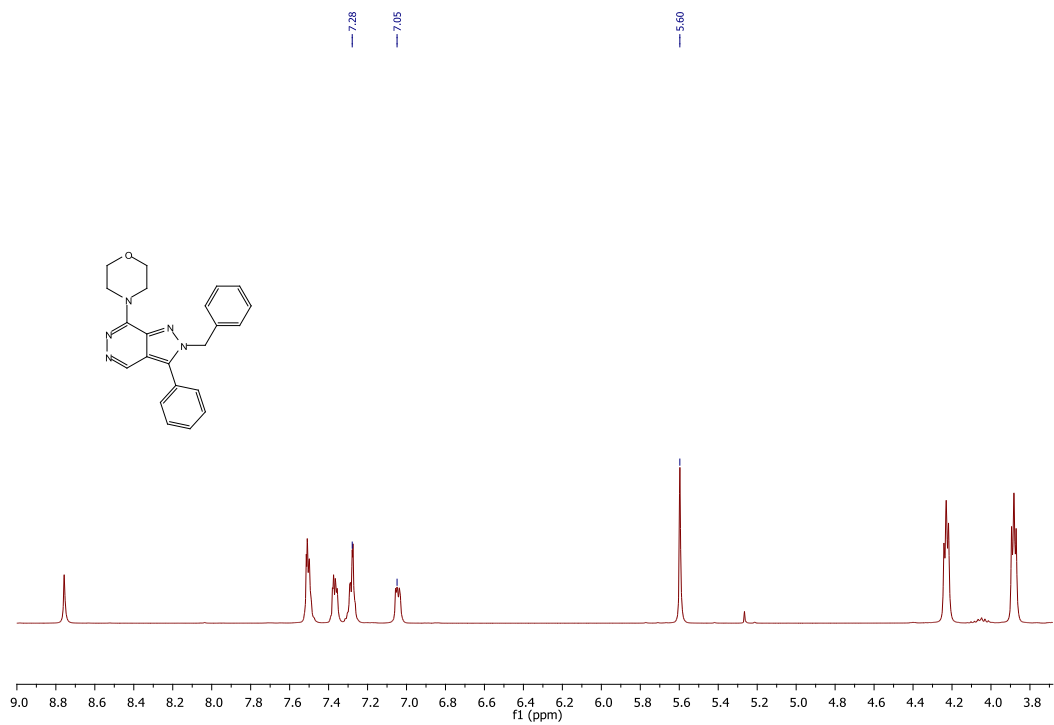
**Σχήμα 2.23:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a)  $\text{AlCl}_3$ , άνυδρο τολουόλιο.

Το παράγωγο **67** θερμάνθηκε στη συνέχεια σε οξυχλωριούχο φωσφόρο για 24 ώρες σε υψηλή θερμοκρασία αλλά δεν προέκυψε το επιθυμητό χλωρίδιο. Για το λόγο αυτό, η πορεία συνεχίστηκε με τη χρήση μόνο του ισομερούς της θέσης 2 (**66**). Το χλωρίδιο **68** συντέθηκε με βρασμό του παραγώγου **66** σε  $\text{POCl}_3$  (Σχήμα 2.24) και αντέδρασε με κατάλληλες αμίνες (μορφολίνη και *N*-μεθυλοπιπεραζίνη) για την παρασκευή των ενώσεων **69** και **70**. Τα τελικά παράγωγα **71** και **72** συντέθηκαν με επίδραση τριχλωριούχου αργιλίου επί των αμινών **69** και **70** αντίστοιχα.



**Σχήμα 2.24:** Αντιδραστήρια και συνθήκες: (a)  $\text{POCl}_3$ ; (b)  $\text{HNR}_1\text{R}_2$ , αιθανόλη, βρασμός; (c)  $\text{AlCl}_3$ , άνυδρο τολουόλιο.

Στην εικόνα 2.12 παρουσιάζονται τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  της βενζυλιωμένης πυραζολοπυριδαζινώνης **69** και του αποβενζυλιωμένου παραγώγου **71**. Στο φάσμα του **71** είναι εμφανής η απουσία των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του δακτυλίου της βενζυλομάδας (7.28ppm, και 7.05ppm) όπως και της απλής κορυφής που αντιστοιχεί στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας (5.60ppm).



Εικόνα 2.12: Φάσμα <sup>1</sup>H-NMR των πυραζολο[3,4-d]πυριδαζινών **69** (επάνω) και **71** (κάτω).

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silicagel 60 AC.C (SDS 35-70  $\mu\text{m}$ ). Η παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες Silicagel 60<sub>F254</sub>. Τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR και δύο διαστάσεων, λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο BrukerAvance400 στα 400 MHz και BrukerAvance 600 στα 600 MHz με τη χρήση δευτεριωμένου χλωροφορμίου (CDCl<sub>3</sub>), μεθανόλης (CD<sub>3</sub>OD) και διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO-*d*<sub>6</sub>) ως διαλύτη.

#### *5-μεθυλο-2,4-διοξοεξανοϊκός αιθυλεστέρας (2)*<sup>30</sup>

Σε εναιώρημα NaH (0.92 g, 23 mmol, 60 % σε εξάνιο) σε τολουόλιο (50 mL) στους 0°C, προστίθεται ισοπροπυλομεθυλοκετόνη (2.5 mL, 23 mmol, **1**) και οξαλικός διαιθυλεστέρας (3.1 mL, 23 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Προσοχή! Η αντίδραση είναι ιδιαιτέρως εξώθερμη). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η περίσσεια του NaH υδρολύεται με αιθανόλη και το μίγμα οξινίζεται με διάλυμα HCl 9% (pH~5-6). Ακολουθεί εκχύλιση με EtOAc, ξήρανση υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου και συμπύκνωση υπό κενό. Λαμβάνεται ελαιώδες προϊόν (4.0 g, 93.5%), πρακτικά καθαρό, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει για την επόμενη αντίδραση. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 6.41 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>), 4.36 (q, 2H, J=7.14 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.67 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.37 (t, 3H, J=7.14 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.19 (d, 6H, J=7.01 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 208.68 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCO), 168.19 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCO), 61.18(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 45.36(COCH<sub>2</sub>CO), 39.56(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 18.43(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.70(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### *3(5)-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο-5(3)-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (3)*<sup>31</sup>

Σε διάλυμα του 5-μεθυλο-2,4-διοξοεξανοϊκού αιθυλεστέρα (23g, 123.65 mmol, **2**) σε αιθανόλη (180 mL) προστίθεται στάγδην, στους 0°C, υδραζίνη (4.96 mL, 123.65 mmol, 80 % σε νερό) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80°C για 90 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της

αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3Χ100 mL). Τα οργανικά κλάσματα συνενώνονται, ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θειϊκού νατρίου, συμπυκνώνονται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης σύστημα κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 6/4-1/1. Λαμβάνονται 21.92 g (97.4%) του επιθυμητού παραγώγου **3**, με τη μορφή λευκού στερεού. Στ: 65-67°C(διαιθυλαιθέρας-*n*-πεντάνιο). (βιβλ.<sup>31</sup> 61-63 °C).<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.13 (s, D<sub>2</sub>Oexchang., 1H, NH), 6.60 (s, 1H, H-4), 4.35 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.07 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.05 (C=O), 154.15 (C-3), 141.05(C-5), 104.64 (C-4), 60.92(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26.35(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.42(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.34 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (4)**

Σε διάλυμα του πυραζολίου **3** (5g, 27mmol) σε άνυδρο DMF(25mL), στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται NaH (1.3 g, 32.4mmol, 60 % σε εξάνιο) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 10 min. Στη συνέχεια προστίθεται CH<sub>3</sub>I (2.5mL, 32.4mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η περίσσεια του NaH υδρολύεται με προσθήκη μικρής ποσότητας αιθανόλης και το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα που λαμβάνεται εκχυλίζεται με χλωροφόρμιο/νερό, τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και συμπυκνώνονται υπό κενό. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 10/1-10/2. Λαμβάνονται 1.5g άχρωμου ελαιώδους προϊόντος (28%).<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.63 (s, 1H, H-4), 4.31 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.10 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.95 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.24 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.86 (C=O), 157.29 (C-3), 132.58(C-5), 107.41 (C-4), 60.59 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.93(NCH<sub>3</sub>), 27.52(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.61(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.12(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).



**5-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (5)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 4. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 72%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.58 (s, 1H, H-4), 4.38 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.88 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.94 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.26 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.25 (C=O), 150.58 (C-5), 141.84 (C-3), 104.59 (C-4), 60.32 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 36.62 (NCH<sub>3</sub>), 25.15 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.83 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.12 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**4-βρωμομεθυλο-3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (6)**

Σε διάλυμα HBr33 %σε οξικό οξύ (3mL) προστίθεται ο εστέρας 4(0.2g, 1.0mmol) και παραφορμαλδεΐδη (98mg, 3.3mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 90 °C για 3.5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε πάγο, αλκαλοποιείται με διάλυμα NaHCO<sub>3</sub>(pH~8) και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3X30 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silicagel) με σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιου/οξικού αιθυλεστέρα 10/0.3-10/1 και λαμβάνονται 0.1g (33%) του ελαιώδους εστέρα 6. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4.40 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.09 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.04 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.30 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.87 (C=O), 156.17 (C-3), 130.48 (C-5), 119.21 (C-4), 61.41 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.10 (NCH<sub>3</sub>), 26.08 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.14 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.34 (CH<sub>2</sub>Br), 14.26 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (7)**

Σε διάλυμα του βρωμοπαραγώγου 6(150mg, 0.5mmol) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (2mL) προστίθεται N-μεθυλομορφολινο-N-οξειδίο (120mg, 1.0mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αργού για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα που λαμβάνεται

εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα/νερό. Τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και συμπυκνώνονται υπό κενό. Λαμβάνεται ελαιώδες προϊόν (100mg, 86%), πρακτικά καθαρό, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει για την επόμενη αντίδραση.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 10.32 (s, 1H, CHO), 4.40 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4.07 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.47 (hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.37 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.20 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 187.34 (CHO), 159.19 (C=O), 158.82 (C-3), 135.57 (C-5), 120.36 (C-4), 62.18 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 39.89 ( $\text{NCH}_3$ ), 27.06 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 21.42 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 14.13 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

### **3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (8)**

Σε διάλυμα του καρβοξυλικού αιθυλεστέρα 7 (0.11g, 0.49mmol) σε αιθανόλη (2.5 mL) προστίθεται στάγδην υδραζίνη (20  $\mu\text{L}$ , 0.49mmol, 80 % σε νερό) και 3 σταγόνες HCl 36% και το μίγμα θερμαίνεται στους 90°C για 1 ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3x20 mL). Τα οργανικά κλάσματα συνενώνονται, ξηραίνονται ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), συμπυκνώνονται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 8/2-7/4. Λαμβάνονται 60 mg (67%) λευκού στερεού παραγώγου 8. Σ.τ.: 178-180 °C (EtOAc).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 12.63 (s,  $\text{D}_2\text{O}$ exchang., 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H-4), 4.18 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.26 (hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.29 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 154.40 (C=O), 151.68 (C-3), 133.08 (C-4), 132.83 (C-7a), 116.97 (C-3a), 37.73 ( $\text{NCH}_3$ ), 26.84 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.27 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### **4-βρωμομεθυλο-5-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (9)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 6. Λήφθηκε ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 60%.  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4.79 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ), 4.38 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.88 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.19 (hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.36-1.39 (m, 9H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 162.22 (C=O), 148.01 (C-5), 139.48 (C-3), 118.08 (C-4), 60.95

(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.46 (NCH<sub>3</sub>), 25.78 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.01 (CH<sub>2</sub>Br), 20.47 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.39 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### **5-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (10)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 7. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 60%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.47 (s, 1H, CHO), 4.44 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.96 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.65 (hept, J = 7.2 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.40 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35 (d, J = 7.2 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>CNMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 187.61 (CHO), 161.72 (C=O), 152.75 (C-5), 143.87 (C-3), 120.17 (C-4), 61.61 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.66 (NCH<sub>3</sub>), 25.59 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 19.16 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.31 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### **3-ισοπροπυλο-2-μεθυλο-2,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (11)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 8. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 214-216 °C (EtOAc) σε απόδοση 69%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.27 (s, 1H, H-4), 4.11 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.34 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.48 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 157.57 (C=O), 145.37 (C-3), 141.41 (C-7a), 133.64 (C-4), 116.12 (C-3a), 38.36 (NCH<sub>3</sub>), 26.98 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.10 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### **3-ισοπροπυλο-1-μεθυλο-7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (12)**

Μίγμα του παραγώγου 8 (40 mg, 0.2mmol) σε οξυχλωριούχο φώσφορο (2mL) θερμαίνεται στους 110°C για 8 ώρες. Η περίσσεια του οξυχλωριούχου φωσφόρου απομακρύνεται υπό κενό και το χλωρίδιο χρησιμοποιείται ως έχει για το επόμενο στάδιο λόγω της σχετικής του αστάθειας.

### **3-ισοπροπυλο-2-μεθυλο-7-χλωρο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (16)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 12, με την μόνη διαφορά ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της

συγκεκριμένης αντίδρασης ήταν πολύ μικρότερος (περίπου 2 ώρες). Το χλωρίδιο χρησιμοποιήθηκε ως είχε για το επόμενο στάδιο.

#### **1-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (13)**

Σε διάλυμα της χλωροπυραζολοπυριδαζίνης **12** (42mg, 0.2mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (3mL) προστίθεται μορφολίνη (0.054mL, 0.6mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 80°C για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3X20 mL). Τα οργανικά κλάσματα συνενώνονται, ξηραίνονται (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), συμπυκνώνονται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 1/1-0/1 και κατόπιν οξικό αιθυλεστέρα/μεθανόλη 10/0.1-10/0.3. Λαμβάνονται 20mg του προϊόντος **13** (40%) με την μορφή κόμπος. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.19 (s, 1H, H-4), 4.26 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.95 (t, 4H, βΗτηςμορφολίνης), 3.42 (t, 4H, αΗτηςμορφολίνης), 3.37 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.44 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 152.67 (C-3), 152.06 (C-7), 143.11 (C-4), 132.10 (C-7a), 119.83 (C-3a), 66.69 (βCτηςμορφολίνης), 51.49 (αCτηςμορφολίνης), 38.09 (NCH<sub>3</sub>), 27.97 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.45 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **1-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (14)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 32%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.17 (s, 1H, H-4), 4.26 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.47 (t, 4H, αΗτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 3.36 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.70 (t, 4H, βΗτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.41 (s, 3H, NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 1.44 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 152.39 (C-7), 152.05 (C-3), 142.74 (C-4), 132.03 (C-7a), 119.52 (C-3a), 54.67 (βCτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 50.74 (αCτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 46.16 (NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 37.99 (NCH<sub>3</sub>), 27.81 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.31 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

***N*-βενζυλο-1-μεθυλο-3-ισοπροπυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*d*]πυριδαζιν-7-αμίνη (15)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 137-140 °C (διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 20%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.94 (s, 1H, H-4), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλαμίνης), 7.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλαμίνης), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-4 της βενζυλαμίνης), 5.00 (s, 1H, NH), 4.86 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλαμίνης), 4.24 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.32 (hept, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 151.51 (C-3), 147.15 (C-7), 139.75 (C-4), 138.80 (C-1 της βενζυλαμίνης), 128.83 (C-3, C-5 της βενζυλαμίνης), 128.72 (C-7a), 128.17 (C-2, C-6 της βενζυλαμίνης), 127.66 (C-4 της βενζυλαμίνης), 118.57 (C-3a), 46.11 (CH<sub>2</sub> της βενζυλαμίνης), 38.84 (NCH<sub>3</sub>), 27.75 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.33 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

***2*-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-2*H*-πυραζολο[3,4-*d*]πυριδαζίνη (17)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυραζολοπυριδαζίνη **16**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμμεος σε απόδοση 32%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.99 (s, 1H, H-4), 4.15 (t, 4H, βΗ της μορφολίνης), 4.11 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.87 (t, 4H, αΗ της μορφολίνης), 3.37 (hept, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.49 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 151.84 (C-7), 143.55 (C-3), 139.32 (C-4), 136.45 (C-7a), 116.49 (C-3a), 67.16 (αC της μορφολίνης), 47.05 (βC της μορφολίνης), 38.35 (NCH<sub>3</sub>), 27.11 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.10 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

***2*-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-2*H*-πυραζολο[3,4-*d*]πυριδαζίνη (18)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυραζολοπυριδαζίνη **16**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμμεος σε απόδοση 39%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.00 (s, 1H, H-4), 4.31 (t, 4H, αΗ της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 4.13 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.39 (hept, *J* = 7.2 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.73 (t, 4H,

βΗτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.45 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 1.51 (d, J = 7.2 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 150.23 (C-7), 142.75 (C-3), 138.58 (C-4), 135.34 (C-7a), 115.57 (C-3a), 53.45 (βCτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 44.29 (NCH<sub>3</sub>της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 44.24 (αCτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 37.43, (NCH<sub>3</sub>), 26.15 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.12 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### *N-βενζυλο-2-μεθυλο-3-ισοπροπυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-αμίνη (19)*

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυραζολοπυριδαζίνη**16**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 31%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.90 (s, 1H, H-4), 7.44 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλαμίνης), 7.33 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλαμίνης), 7.27 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-4 της βενζυλαμίνης), 4.95 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλαμίνης), 4.09 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.36 (hept, J = 7.2 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.50 (d, J = 7.2 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 150.53(C-7), 144.34(C-3), 138.85(C-1 της βενζυλαμίνης), 138.70(C-4), 135.42(C-7a), 128.74(C-3, C-5 της βενζυλαμίνης), 128.29(C-2, C-6 της βενζυλαμίνης), 127.58(C-4 της βενζυλαμίνης), 114.94(C-3a), 45.69(CH<sub>2</sub>της βενζυλαμίνης), 38.34(NCH<sub>3</sub>), 27.22(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.12(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### *N,N-διμεθυλο-N'-(2-μεθυλο-3-ισοπροπυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-υλ)αιθανο-1,2-διαμίνη (20)*

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυριδαζίνη**16**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 10%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.92 (s, 1H, H-4), 4.12 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.82 (t, 2H, J = 7.2 Hz, αΗτης διμεθυλαμινοαιθυλαμίνης), 3.35 (hept, J = 7.2 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.75 (t, 2H, J = 7.2 Hz, βΗτης διμεθυλαμινοαιθυλαμίνης), 2.37 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.51 (d, J = 7.2 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 149.43(C-7), 143.52(C-3), 137.72(C-7a), 134.24(C-4), 113.69(C-3a), 56.67(βCτης διμεθυλαμινοαιθυλαμίνης), 43.34 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>),

37.36(NCH<sub>3</sub>), 37.02 (αCτης διμεθυλαμινοαιθυλαμίνης), 26.09 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 20.97 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (21)**

Σε διάλυμα του πυραζολίου **3** (0.3g, 1.6mmol) σε άνυδρο DMF (2mL), στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται NaH (78mg, 1.92mmol, 60 % σε εξάνιο) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 10 min. Στη συνέχεια προστίθεται βενζυλοβρωμίδιο (0.26mL, 2.24mmol) και η ανάδευση συνεχίζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η περίσσεια του NaH υδρολύεται με προσθήκη μικρής ποσότητας αιθανόλης και το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα /νερό. Τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) και συμπυκνώνονται υπό κενό. Ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 10/1-9/1. Λαμβάνονται 120mgυποκίτρινου ελαιώδους προϊόντος(30%).<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.30 – 7.19 (m, J = 7.6 Hz, 5H, H-2, H-6, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 6.71 (s, 1H, H-4), 5.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.28 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.02 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.28 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.90 (C=O), 158.27 (C-3), 137.75 (C-1 της βενζυλομάδας), 132.58 (C-5), 128.55 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.55 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.40 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 108.36 (C-4), 60.97 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 54.80 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 27.83 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.93 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.33 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-3-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (23)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **6** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τον εστέρα **21**. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 60%.<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.32 – 7.22 (m, 3H, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 7.18 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4.35 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.11 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.37 (m, 9H,



CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.53 (C=O), 156.65 (C-3), 137.41 (C-1 της βενζυλομάδας), 130.10 (C-5), 128.52 (C-3, C-5, της βενζυλομάδας), 127.59 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.27 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 119.87 (C-4), 61.36 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.44 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 26.17 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.00 (CH<sub>2</sub>Br), 22.32 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.12 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (24)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 7 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την ένωση 23. Λήφθηκε άχρωμο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 37%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.29 (s, 1H, CHO), 7.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλομάδας), 7.18 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-4 της βενζυλομάδας), 7.14 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.30 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.50 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.23 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 187.51 (CHO), 159.64 (C-3), 159.09 (C=O), 136.57 (C-1 της βενζυλομάδας), 135.45 (C-5), 128.72 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.01 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.52 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 120.98 (C-4), 62.33 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.52 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 27.34 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.61 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.19 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-1,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (25)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 8 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αλδεΐδη 24. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 159-161 °C (EtOAc) σε απόδοση 70%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm) 12.74 (s, D<sub>2</sub>Oexchang., 1H, NH), 8.45 (s, 1H, H-4), 7.36 - 7.22 (m, 5H, H-2, H-6, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 5.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 3.30 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.31 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) 154.25 (C=O), 152.50 (C-3), 137.15 (C-1 της βενζυλομάδας), 133.13 (C-4), 132.63 (C-7a), 128.59, (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.69 (C-4



της βενζυλομάδας), 127.50 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 117.29 (C-3a), 53.40 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 26.96 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.23 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **1-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (26)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **12**. Το χλωρίδιο χρησιμοποιείται ως έχει για το επόμενο στάδιο λόγω της σχετικής του αστάθειας.

#### **1-βενζυλο-7-(4-μεθυλο-πιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (27)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 50%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.25 (s, 1H, H-4), 7.31 (t, J = 7.1 Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλομάδας), 7.27 (t, J = 7.1 Hz, 1H, H-4 της βενζυλομάδας), 7.18 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 3.42 (m, 5H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, αΗτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.65 (t, 4H, βΗτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.41 (s, 3H, NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 1.48 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 153.48 (C-3), 152.32 (C-7), 142.94 (C-4), 136.92 (C-1 της βενζυλομάδας), 132.18 (C-7a), 128.77 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.85 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.00 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 120.28 (C-3a), 54.88 (βCτηςN-μεθυλοπιπεραζίνης), 53.58 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 50.73 (αCτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 46.28 (NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 28.08 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.40 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **1-βενζυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (28)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του παραγώγου **13**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 40%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.21 (s, 1H, H-4), 7.24 – 7.16 (m, 3H, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 7.06 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.71 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 3.80 (t, 4H, βΗτηςμορφολίνης), 3.34

(hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.28 (t, 4H,  $\alpha$ Ητηςμορφολίνης), 1.39 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 152.78 (C-3), 151.05 (C-7), 141.69 (C-4), 135.53 (C-1 της βενζυλομάδας), 131.09 (C-7a), 127.77 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας) 126.88 (C-4 της βενζυλομάδας), 125.63 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 119.28 (C-3a), 65.53 ( $\beta$  Cτηςμορφολίνης), 52.65 ( $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 50.14 ( $\alpha$  Cτηςμορφολίνης), 26.96 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 21.26 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### **1-βενζυλο-*N,N*-διμεθυλο-3-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο[3,4-*d*]πυριδαζιν-7-αμίνη (29).**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 35%.  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 9.12 (s, 1H, H-4), 7.19 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλομάδας), 7.15 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-4 της βενζυλομάδας), 7.07 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.67 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 3.31 (hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.93 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.37 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 153.59 (C-3), 153.23 (C-7), 142.33 (C-4), 136.89 (C-1 της βενζυλομάδας), 132.34 (C-7a), 128.71 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.84 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.29 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 120.11 (C-3a), 53.96 ( $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 42.74 ( $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 28.08 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.39 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### **1-βενζυλο-5-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (22)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **21**. Λήφθηκε κίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 60%.  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.30 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλομάδας), 7.26 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-4 της βενζυλομάδας), 7.08 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 6.66 (s, 1H, H-4), 5.43 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 4.42 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.84 (hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.40 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.14 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 162.80 (C=O), 151.44 (C-5), 142.88 (C-3), 136.53 (C-1 της βενζυλομάδας), 128.85 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.90 (C-4 της βενζυλομάδας), 126.67 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 105.71 (C-4), 60.93

(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.96 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 25.56 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.76 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.54 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-5-ισοπροπυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (30)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **6** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τον εστέρα **22**. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 40%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.30 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλομάδας), 7.26 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-4 της βενζυλομάδας), 7.05 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.86 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4.45 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.10 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.22 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.30 (C=O), 148.23 (C-5), 140.39 (C-3), 136.13 (C-1 της βενζυλομάδας), 128.83 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.96 (C-4 της βενζυλομάδας), 126.49 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 118.59 (C-4), 61.02 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 54.72 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 26.22 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 23.12 (CH<sub>2</sub>Br), 20.87 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.41 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-βενζυλο-5-ισοπροπυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (31)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **7** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την ένωση **30**. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 45%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.47 (s, 1H, CHO), 7.30 - 7.20 (m, 3H, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 7.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.45 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.23 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.38 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.13 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 187.19 (CHO), 161.81 (C=O), 153.19 (C-5), 144.48 (C-3), 135.45 (C-1 της βενζυλομάδας), 128.88 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.15 (C-4 της βενζυλομάδας), 126.57 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 120.84 (C-4), 61.62 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 54.88 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 26.63 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 18.79 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 14.29 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**2-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-2,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (32)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **8** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αλδεΐδη **31**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 196-199 °C (EtOAc) σε απόδοση 70%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO) δ (ppm) 12.25 (s, D<sub>2</sub>Oexchang., 1H, NH), 8.43 (s, 1H, H-4), 7.35 (t, J = 7.2 Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλομάδας), 7.30 (t, J = 7.2 Hz, 1H, H-4 της βενζυλομάδας), 7.17 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 3.44 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.25 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) 156.68 (C=O), 145.69 (C-3), 141.33 (C-7a), 136.27 (C-1 της βενζυλομάδας), 133.08 (C-4), 128.71 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.85 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.10 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 115.73 (C-3a), 53.90 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 25.88 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.98 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**2-βενζυλο-3-ισοπροπυλο-7-χλωρο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (33)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **12**, με τη διαφορά ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της συγκεκριμένης αντίδρασης ήταν πολύ μικρότερος (περίπου 2 ώρες). Το χλωρίδιο χρησιμοποιήθηκε ως είχε για το επόμενο στάδιο λόγω της σχετικής του αστάθειας.

**2-βενζυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (34)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγώγο **33**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 50%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.97 (s, 1H, H-4), 7.31 (m, 3H, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 7.07 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.33 (t, 4H, αΗ της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 3.30 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.71 (t, 4H, βΗ της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.43 (s, 3H, NCH<sub>3</sub> της N-

μεθυλοπιπεραζίνης), 1.32 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 151.68 (C-7), 143.54 (C-3), 139.55 (C-4), 136.73 (C-7a), 135.56 (C-1 της βενζυλομάδας), 129.13 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.47 (C-4 της βενζυλομάδας), 126.82 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 116.78 (C-3a), 55.17 ( $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 54.93 ( $\beta\text{C}$  της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 45.88 ( $\text{NCH}_3$  της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 45.82 ( $\alpha\text{C}$  της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 27.08 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.42 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### **2-βενζυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (35)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγώγο **33**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 20%.  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.97 (s, 1H, H-4), 7.34 – 7.27 (m, 3H, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 7.07 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.60 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 4.19 (t, 4H,  $\beta\text{H}$  της μορφολίνης), 3.87 (t, 4H,  $\alpha\text{H}$  της μορφολίνης), 3.29 (hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.32 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 151.86 (C-7), 143.18 (C-3), 139.53 (C-4), 136.59 (C-7a), 135.43 (C-1 της βενζυλομάδας), 128.93 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.26 (C-4 της βενζυλομάδας), 126.59 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 116.63 (C-3a), 66.99 ( $\alpha\text{C}$  της μορφολίνης), 54.95 ( $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 46.82 ( $\beta\text{C}$  της μορφολίνης), 26.88 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 22.24 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).

### **2-βενζυλο-N,N-διμεθυλο-3-ισοπροπυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-αμίνη (36)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγώγο **33**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 56%.  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.87 (s, 1H, H-4), 7.28 (m, 3H, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 7.09 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.60 (s, 2H,  $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 3.52 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 3.28 (hept,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.30 (d,  $J = 7.0$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 152.43 (C-7), 142.77 (C-3), 138.07 (C-4), 136.81 (C-7a), 135.67 (C-1 της βενζυλομάδας), 128.91 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.20

(C-4 της βενζυλομάδας), 126.72 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 116.28 (C-3a), 54.90 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 39.68 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 26.86 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.24 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-ισοπροπυλο-1H(2H)-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (37)**

Σε διάλυμα της αμίνης **27** (80 mg, 0.24 mmol) σε απόλυτη αιθανόλη (2mL) προστίθεται παλλάδιο επί άνθρακα (17mg) και στη συνέχεια μυρμηκικό οξύ (0.12mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται και θερμαίνεται για 4.5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται υπό κελίτη και εκλούεται με μίγμα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH. Ακολουθεί συμπύκνωση, εξουδετέρωση με NaHCO<sub>3</sub> και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (3X20 mL). Τα οργανικά κλάσματα συνενώνονται, ξηραίνονται (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), συμπυκνώνονται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9/1-7/3. Λαμβάνονται 40 mg (67%) λευκού στερεού παραγώγου **37**. Σ.τ.: 197-200°C (διαιθυλαιθέρας). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 8.98 (s, 1H, H-4), 4.06 (t, 4H, αH της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 3.51 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.67 (t, 4H, βH της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.37 (s, 3H, NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 1.46 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 153.18 (C-7), 149.69 (C-3), 141.07 (C-4), 137.39 (C-7a), 117.45 (C-3a), 55.87 (βC της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 47.45 (αC της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 46.22 (NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 28.00 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.83 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### **7-(μορφολιν-4-υλ)-3-ισοπροπυλο-1H(2H)-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (38)**

Σε διάλυμα της 2-βενζυλοπυραζολοπυριδαζίνης **35** (80mg, 0.24mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (4mL), σεατμόσφαιρα αργού, προστίθεται AlCl<sub>3</sub> (64mg, 0.48mmol) και το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 100°C για 3.5 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αποχύνεται σε νερό, εξουδετερώνεται με NaHCO<sub>3</sub> και εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα. Τα οργανικά εκχυλίσματα συνενώνονται, ξηραίνονται (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) συμπυκνώνονται υπό κενό και το υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100/3-100/7. Λαμβάνονται 40 mg (67%) του στερεού παραγώγου **38**. Σ.τ.: 253-

255°C(διαιθυλαιθέρας).<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 8.96 (s, 1H, H-4), 3.97 (t, 4H, βH της μορφολίνης), 3.80 (t, 4H, αHτηςμορφολίνης), 3.46 (hept, J = 7.0 Hz, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.41 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 153.21 (C-7), 150.03 (C-3), 140.70 (C-4), 126.39 (C-7a), 117.09 (C-3a), 67.82 (αC της μορφολίνης), 48.54 (βC της μορφολίνης), 27.83 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.65 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### *N,N-διμεθυλο-3-ισοπροπυλο-1H(2H)-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-αμίνη (39)*

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **38** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **36**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 242-244 °C (ακετόνη) σε απόδοση 63%.<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 8.84 (s, 1H, H-4), 3.53 – 3.45 (m, 7H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.49 (d, J = 7.0 Hz, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 153.49 (C-7), 149.33 (C-3), 139.33 (C-4), 136.62 (C-7a), 117.06 (C-3a), 40.25 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27.99 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22.84 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

#### *4-φαινυλο-2,4-διοξοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας (41)<sup>32</sup>*

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την φαινυλομεθυλοκετόνη (40).Λήφθηκεκυποκίτρινο στερεό προϊόν με Σ.τ.: 35-37 °C (εξάνιο) σε απόδοση 92%.<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.01 (d, J = 7.5 Hz, 2H,H-2', H-6'), 7.75 - 7.62 (m, 3H,H-3', H-5', H-4'), 7.05 (s, 2H,COCH<sub>2</sub>CO), 4.40 (q, J = 7.5Hz, 2H,CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.45 (t, J = 7.5Hz, 3H,CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 192.00(PhC=O), 170.00(CH<sub>2</sub>COCO), 162.00(COCOO), 134.94 (C-1'), 134.91(C-4'), 133.80(C-3', C-5'), 133.74(C-2', C-6'), 98.00(COCH<sub>2</sub>CO), 63.40(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.32(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### *3(5)-φαινυλο-1H-πυραζολο-5(3)-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (42)*

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **3** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλητον 4-φαινυλο-2,4-διοξοβουτανοϊκό αιθυλεστέρα(**41**). Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.:



140-142 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 70%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.94 (s, D<sub>2</sub>Oexchang., 1H, NH) 7.75 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-4'), 7.07 (s, 1H, H-4), 4.34 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 160.80(C=O), 149.37(C-3), 139.43(C-5), 130.83 (C-1'), 129.04(C-3', C-5'), 128.72(C-4'), 125.84(C-2', C-6'), 105.59(C-4), 61.40(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.32(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (43)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 4. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 63%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.81 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.38 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.29 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-4'), 7.10 (s, 1H, H-4), 4.32 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.19 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.69 (C=O), 149.62 (C-3), 133.66 (C-5), 132.54 (C-1'), 128.59(C-3', C-5'), 127.85 (C-4'), 125.40(C-2', C-6'), 107.71(C-4), 60.91(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 39.49 (NCH<sub>3</sub>), 14.16(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **4-βρωμομεθυλο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (45)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 6 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τον εστέρα 43. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 47-49 °C (πεντάνιο) σε απόδοση 72%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.78 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.50 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.43 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-4'), 4.76 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4.49 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.24 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.51 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.64 (C=O), 149.96 (C-3), 131.91(C-1'), 131.55(C-5), 128.84 (C-3', C-5'), 128.49 (C-4'), 128.21(C-2', C-6'), 120.02 (C-4), 61.65(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.51 (NCH<sub>3</sub>), 24.55(CH<sub>2</sub>Br), 14.22 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).



**1-μεθυλο-3-φαινυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (46)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 7 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την ένωση 45. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 73-75 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-πεντάνιο) σε απόδοση 85%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.37 (s, 1H, CHO), 7.73 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.47 - 7.36 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 4.47 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.19 (s, 3HNCH<sub>3</sub>), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 186.09 (CHO), 159.14 (C=O), 151.67 (C-3), 136.31 (C-5), 131.36 (C-1'), 129.16 (C-2', C-6'), 129.05 (C-4'), 128.12 (C-3', C-5'), 120.83 (C-4), 62.49 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.14 (NCH<sub>3</sub>), 14.13 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**1-μεθυλο-3-φαινυλο-1,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (47)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 8 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αλδεϋδη 46. Λήφθηκε λευκό κρυσταλλικό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 253-255 °C (EtOH) σε απόδοση 82%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm) 12.83 (s, D<sub>2</sub>Oexchang., 1H, NH), 8.62 (s, 1H, H-4), 7.93 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.52 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.46 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-4'), 4.33 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO) δ (ppm) 154.16 (C=O), 144.06 (C-3), 133.65 (C-7a), 133.03 (C-4), 131.22 (C-1'), 129.15 (C-3', C-5'), 128.88 (C-4'), 126.97 (C-2', C-6'), 116.87 (C-3a), 38.31 (NCH<sub>3</sub>).

**1-μεθυλο-3-φαινυλο-7-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (48)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του παραγώγου 12, με τη διαφορά πως ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης ήταν πολύ μικρότερος (περίπου 2,5 ώρες). Το χλωρίδιο χρησιμοποιήθηκε ως είχε για το επόμενο στάδιο λόγω της σχετικής του αστάθειας.

**1-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (49)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 13 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το

χλωροπαράγωγο **48**. Λήφθηκε υποκίτρινο στερεό προϊόν με Σ.τ.: 192-194 °C (διχλωρομεθάνιο-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 77%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.45 (s, 1H, H-4), 7.92 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.54 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.47 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-4'), 4.40 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.99 (t, 4H, βH της μορφολίνης), 3.48 (t, 4H, αH της μορφολίνης). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 152.04 (C-7) 145.57(C-3), 143.39(C-4), 132.52(C-7a), 131.44 (C-1'), 129.37 (C-4'), 129.32 (C-3', C-5'), 127.54 (C-2', C-6'), 119.64 (C-3a), 66.63 (βC της μορφολίνης), 51.56 (αC της μορφολίνης), 38.63 (NCH<sub>3</sub>).

#### **1-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (50)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαράγωγο **48**. Λήφθηκε μπεζ στερεό προϊόν με Σ.τ.: 158-160 °C (διχλωρομεθάνιο-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 85%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.40 (s, 1H, H-4), 7.91 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.52 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.45 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 4.37 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.51 (t, 4H, αH της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.72 (t, 4H, βH της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.42 (s, 3H, NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 152.16 (C-7), 145.41 (C-3), 143.22 (C-4), 132.60 (C-7a), 131.59 (C-1'), 129.30 (C-3', C-5'), 129.30 (C-4'), 127.55 (C-2', C-6'), 119.52 (C-3a), 54.73 (βC της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 50.95 (αC της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 46.28 (NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 38.68 (NCH<sub>3</sub>).

#### **N-βενζυλο-1-μεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-αμίνη (51)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαράγωγο **48**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 208-210 °C (διχλωρομεθάνιο) σε απόδοση 20%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.06 (s, 1H, H-4), 7.80 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.43 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.36 (m, 3H, H-2, H-6, H-4 της βενζυλαμίνης), 7.28 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-3, H-5 της βενζυλαμίνης), 7.22 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-4'), 5.19 (s, 1H, NH), 4.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλαμίνης), 4.29 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 147.19 (C-7), 144.48 (C-3), 139.89 (C-4), 138.83 (C-1 της βενζυλαμίνης),

131.75 (C-1'), 129.33 (C-7a), 129.23 (C-2, C-6 της βενζυλαμίνης), 129.09 (C-4 της βενζυλαμίνης), 128.92 (C-3, C-5 της βενζυλαμίνης), 128.25 (C-3', C-5'), 127.76 (C-4'), 127.45 (C-2', C-6'), 118.47 (C-3a), 46.25 (CH<sub>2</sub> της βενζυλαμίνης), 39.50 (NCH<sub>3</sub>).

#### **1-μεθυλο-5-φαινυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (44)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 4. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 32%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.26 – 7.37 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.73 (s, 1H, H-4), 4.29 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.83 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.28 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.02 (C=O), 144.73 (C-5), 142.32 (C-3), 129.27 (C-1'), 128.70 (C-4'), 128.53 (C-2', C-6'), 128.43 (C-3', C-5'), 108.45 (C-4), 60.52 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 37.96 (NCH<sub>3</sub>), 14.09 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **4-βρωμομεθυλο-1-μεθυλο-5-φαινυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (52)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 6 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τον εστέρα 44. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 48%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.55 – 7.45 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 7.42 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.56 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4.44 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.41 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.01 (C=O), 144.20 (C-5), 139.90 (C-3), 129.74 (C-4'), 129.48 (C-3', C-5'), 129.07 (C-2', C-6'), 127.82 (C-1'), 119.59 (C-4), 61.07 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.09 (NCH<sub>3</sub>), 23.26 (CH<sub>2</sub>Br), 14.36 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-μεθυλο-5-φαινυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (53)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 7 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την ένωση 52. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 79-81 °C (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 89%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.37 (s, 1H, CHO), 7.50 – 7.42 (m, 3H,

H-3', H-5', H-4'), 7.34 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.46 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 3.77 (s,  $3\text{HNCH}_3$ ), 1.40 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 186.06 (CHO), 161.61 (C=O), 146.73 (C-5), 143.39 (C-3), 130.08 (C-4'), 129.77 (C-3', C-5'), 128.64 (C-2', C-6'), 127.54 (C-1'), 120.96 (C-4), 61.73 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 37.75 ( $\text{NCH}_3$ ), 14.30 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

#### **2-μεθυλο-3-φαινυλο-2,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (54)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **8** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αλδεΐδη **53**. Λήφθηκε λευκό κρυσταλλικό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 239-241 °C (EtOH) σε απόδοση 68%.  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 12.34 (s,  $\text{D}_2\text{O}$ exchang., 1H, NH), 8.09 (s, 1H, H-4), 7.70 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.62 (m, 3H, H-3', H-4', H-5'), 4.11 (s, 1H,  $\text{NCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 156.43 (C=O), 140.88 (C-7a), 138.90 (C-3), 132.59 (C-4), 129.85 (C-4'), 129.53 (C-2', C-6'), 129.30 (C-3', C-5'), 127.12 (C-1'), 117.23 (C-3a), 39.10 ( $\text{NCH}_3$ ).

#### **2-μεθυλο-3-φαινυλο-7-χλωρο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (55)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **12**, με τη διαφορά ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης ήταν πολύ μικρότερος (περίπου 2,5 ώρες). Το χλωρίδιο χρησιμοποιήθηκε ως είχε για το επόμενο στάδιο λόγω της σχετικής του αστάθειας.

#### **2-μεθυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (56)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγώγο **55**. Λήφθηκε υποκίτρινο στερεό προϊόν με Σ.τ.: 184-186 °C (διχλωρομεθάνιο-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 46%.  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.82 (s, 1H, H-4), 7.59 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 7.51 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.23 (t, 4H, βΗτης μορφολίνης), 4.19 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.91 (t, 4H, αΗτης μορφολίνης).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151

MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 151.57(C-7), 139.53 (C-4), 137.81 (C-3), 136.67(C-7a), 130.07 (C-4'), 129.54(C-2', C-6',C-3', C-5'), 127.75 (C-1'), 118.21 (C-3a), 67.20(αCτης μορφολίνης), 47.00 (βCτης μορφολίνης), 38.93 (NCH<sub>3</sub>).

#### **2-μεθυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (57)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 13χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγόγο 55. Λήφθηκε στερεό προϊόν με Σ.τ.: 138-142 °C (διχλωρομεθάνιο-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 26%.<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.77 (s, 1H, H-4), 7.62 – 7.52 (m, 3H,H-3', H-5',H-4'), 7.50 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.31 (t, 4H, αH της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 4.17 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.69 (t, 4H, βHτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.42 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>της N-μεθυλοπιπεραζίνης).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 151.25 (C-7), 139.33 (C-4), 137.81 (C-3), 136.59 (C-7a), 130.02(C-4'), 129.49(C-2', C-6', C-3', C-5'), 127.68 (C-1'), 118.12 (C-3a), 54.99(βC της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 45.96 (NCH<sub>3</sub> της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 45.87(αC της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 38.90 (NCH<sub>3</sub>).

#### **N-βενζυλο-2-μεθυλο-3-φαινυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-αμίνη (58)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 13χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγόγο 55. Λήφθηκε στερεό προϊόν με Σ.τ.: 211-214 °C (διχλωρομεθάνιο-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 17%.<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.61 (s, 1H, H-4), 7.78 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.65 (t, J = 7.6 Hz, 2H,H-3', H-5'), 7.55 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-4'), 7.43 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλαμίνης), 7.36 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H-3, H-5 τηςβενζυλαμίνης), 7.31 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-4 της βενζυλαμίνης), 4.78 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλαμίνης), 4.26 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 150.88 (C-7), 146.18 (C-3), 140.49 (C-4), 136.62 (C-1 της βενζυλαμίνης), 135.03 (C-7a), 131.83 (C-4'), 130.28 (C-3', C-5'), 130.05 (C-2', C-6'), 129.10 (C-3, C-5 της βενζυλαμίνης), 128.31 (C-4 της βενζυλαμίνης), 128.27 (C-2, C-6 της βενζυλαμίνης), 124.70 (C-1'), 115.79 (C-3a), 45.69 (CH<sub>2</sub>της βενζυλαμίνης), 40.28 (NCH<sub>3</sub>).

**1-βενζυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (59)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **21**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το πυραζόλιο **42**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 97-99 °C (διχλωρομεθάνιο-διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 73%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.86 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.43 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.34 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-4'), 7.28 – 7.34 (m, 4H, H-2, H-6, H-3 και το H-5 της βενζυλομάδας), 7.27 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-4της βενζυλομάδας), 7.19 (s, 1H, H-4), 5.83 (s, 2H, CH<sub>2</sub>της βενζυλομάδας), 4.33 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 159.74(C=O), 150.39(C-3), 137.37 (C-1 της βενζυλομάδας) 133.60(C-5), 132.73(C-1'), 128.83(C-3', C-5'), 128.63(C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 128.20 (C-4'), 127.74 (C-4 της βενζυλομάδας) 127.60(C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 125.79 (C-2', C-6'), 108.53 (C-4), 61.22(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.26(CH<sub>2</sub>της βενζυλομάδας), 14.34(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (61)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **6** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τον εστέρα **59**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 84-87 °C (διαιθυλαιθέρας) σε απόδοση 25%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.80 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.50 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.43 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-4'), 7.26 – 7.34 (m, 5H, H-2, H-6, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 5.81 (s, 2H, CH<sub>2</sub>της βενζυλομάδας), 4.74 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.43 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm) 159.51(C=O), 150.62(C-3), 136.97(C-1 της βενζυλομάδας), 132.00 (C-1'), 131.27 (C-5), 128.93 (C-3', C-5'), 128.71(C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.65(C-4'), 128.43 (C-2', C-6'), 127.92(C-4 της βενζυλομάδας), 127.69 (C-2, C-6της βενζυλομάδας), 120.67(C-4), 61.78(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.92(CH<sub>2</sub>της βενζυλομάδας), 24.56(CH<sub>2</sub>Br), 14.21(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**1-βενζυλο-3-φαινυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (62)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 7 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την ένωση 61. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 68%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.43 (s, 1H, CHO), 7.90 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.52 – 7.43 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 7.40 – 7.30 (m, 5H, H-2, H-6, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 5.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.35 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 186.25 (CHO), 159.24 (C=O), 152.27 (C-3), 136.21 (C-1 της βενζυλομάδας), 136.01 (C-5), 131.49 (C-1'), 129.43 (C-2', C-6'), 129.27 (C-4'), 128.85 (C-3', C-5'), 128.31 (C-4 της βενζυλομάδας), 128.31 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.82 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 121.35 (C-4), 62.69 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.85 (CH<sub>2</sub>), 14.18 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**1-βενζυλο-3-φαινυλο-1,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (63)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 8 χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αλδεϋδη 62. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 225-227 °C (EtOH) σε απόδοση 85%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.96 (s, D<sub>2</sub>Oexchang., 1H, NH), 8.68 (s, 1H, H-4), 7.94 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.53 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.47 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-4'), 7.39 – 7.28 (m, 5H, H-2, H-6, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 5.94 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 154.11 (C=O), 144.87 (C-3), 136.83 (C-1 της βενζυλομάδας), 133.34 (C-7a), 133.05 (C-4), 131.05 (C-1'), 129.14 (C-2', C-6'), 129.01 (C-4'), 128.67 (C-3', C-5'), 127.87 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.74 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.08 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 117.17 (C-3a), 53.90 (CH<sub>2</sub>).

**1-βενζυλο-5-φαινυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (60)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 21, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το πυραζόλιο 42. Λήφθηκε υποκίτρινο ελαιώδες προϊόν σε απόδοση 22%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.31 – 7.40 (m, 4H, H-3', H-5', H-4', H-4 της βενζυλομάδας), 7.20 – 7.28 (m,



4H, H-2', H-6', H-3 και τοH-5 της βενζυλομάδας), 7.02 (d, 2H, H-2, H-6της βενζυλομάδας), 6.89 (s, 1H, H-4), 5.41 (s, 2H, CH<sub>2</sub>της βενζυλομάδας), 4.43 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.40 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.52 (C=O), 145.56(C-5), 143.28 (C-3), 136.61 (C-1 της βενζυλομάδας), 129.63(C-1'), 129.14 (C-4'), 129.00(C-3', C-5'), 128.75(C-2', C-6'), 128.65(C-3, C-5της βενζυλομάδας), 127.73(C-4 τηςβενζυλομάδας), 126.86(C-2, C-6της βενζυλομάδας), 109.36 (C-4) 61.01 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 54.09(CH<sub>2</sub>της βενζυλομάδας), 14.45 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-βενζυλο-4-βρωμομεθυλο-5-φαινυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (64)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 6, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τον εστέρα 6ο. Λήφθηκε λευκό κρυσταλλικό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 80-83 °C (διαιθυλαιθέρα-πεντάνιο) σε απόδοση 21%.<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.52 – 7.45 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 7.31 (d, 2H, H-2', H-6'), 7.28 – 7.25 (m, 3H, H-3, H-5 καιτο H-4 της βενζυλομάδας), 7.00 (d, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.33 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Br), 4.52 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.49 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.30 (C=O), 144.64 (C-5), 140.60 (C-3), 136.15 (C-1 της βενζυλομάδας), 129.91 (C-4'), 129.86 (C-2', C-6'), 129.04 (C-3', C-5'), 128.74 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.99 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.96 (C-1'), 127.23 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 120.19 (C-4), 61.29 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 54.42 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 23.18 (CH<sub>2</sub>Br), 14.52 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### **1-βενζυλο-5-φαινυλο-4-φορμυλο-1H-πυραζολο-3-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (65)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου 7, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την ένωση 64. Λήφθηκε λευκό άμορφο στερεό σε απόδοση 87%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 10.43 (s, 1H, CHO), 7.52 (t, J = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 7.46 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.30 – 7.23 (m, 5H, H-2', H-6', H-3, H-5 καιτο H-4 της βενζυλομάδας), 7.00 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.53 (q, J = 7.1 Hz,



2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.48 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 186.19 (CHO), 161.78 (C=O), 147.03 (C-5), 143.77 (C-3), 135.30 (C-1 της βενζυλομάδας), 130.08 (C-4'), 129.82 (C-2', C-6'), 128.71 (C-3', C-5'), 128.62 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.17 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.65 (C-1'), 127.32 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 121.40 (C-4), 61.83 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 53.97 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 14.36 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

### **2-βενζυλο-3-φαινυλο-2,6-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνη (66)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **8**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αλδεΐδη **65**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 234-237 °C (EtOH) σε απόδοση 30%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.40 (s, D<sub>2</sub>Oexchang., 1H, NH), 8.08 (s, 1H, H-4), 7.60 (m, J = 7.5 Hz, 5H, H-2', H-6', H-3', H-5', H-4'), 7.34 - 7.26 (m, J = 7.3 Hz, 3H, H-3, H-5, H-4 της βενζυλομάδας), 7.04 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 156.45 (C=O), 141.42 (C-7a), 139.46 (C-3), 135.96 (C-1 της βενζυλομάδας), 132.66 (C-4), 130.02 (C-4'), 129.47 (C-2', C-6'), 129.36 (C-3', C-5'), 128.65 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 127.86 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.10 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 126.95 (C-1'), 117.56 (C-3a), 54.09 (CH<sub>2</sub>).

### **3-φαινυλο-1,6(2,6)-διϋδρο-7H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζιν-7-όνης (67)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του παραγώγου **38**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την πυραζολοπυριδαζινόνη **63**. Λήφθηκε λευκό στερεό προϊόν με Σ.τ.: 234-237 °C (EtOH) σε απόδοση 40%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.65 (s, 1H, H-4), 7.95 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.53 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-4').

**2-βενζυλο-3-φαινυλο-7-χλωρο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (68)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **12**, με τη διαφορά πως ο χρόνος ολοκλήρωσης της συγκεκριμένης αντίδρασης ήταν πολύ μικρότερος (περίπου 1 ώρα). Το χλωρίδιο χρησιμοποιήθηκε ως είχε για το επόμενο στάδιο λόγω της σχετικής του αστάθειας.

**2-βενζυλο-7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (69)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγώγο **68**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 70.5%. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.76 (s, 1H, H-4), 7.53 – 7.48 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 7.37 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.33 – 7.24 (m, 3H, H-3, H-5 και H-4 της βενζυλομάδας), 7.04 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.23 (t, 4H, βΗτηςμορφολίνης), 3.88 (t, 4H, αΗτηςμορφολίνης). <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 151.54 (C=O), 139.48 (C-4), 137.95 (C-3), 136.89 (C-7a), 135.82 (C-1 της βενζυλομάδας), 130.05 (C-4'), 129.56 (C-2', C-6'), 129.35 (C-3', C-5'), 128.89 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.24 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.63 (C-1'), 127.01 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 118.34 (C-3a), 67.08 (αCτηςμορφολίνης), 54.66 (CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 46.88 (βCτηςμορφολίνης).

**2-βενζυλο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-2H-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (70)**

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **13** χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το χλωροπαραγώγο **68**. Λήφθηκε προϊόν με την μορφή κόμπος σε απόδοση 56%. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.69 (s, 1H, H-4), 7.49 – 7.42 (m, 3H, H-3', H-5', H-4'), 7.32 (d, J = 7.5 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.26 – 7.21 (m, 3H, H-3, H-5 και H-4 της βενζυλομάδας), 7.00 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2, H-6 της βενζυλομάδας), 5.54 (s, 2H, CH<sub>2</sub> της βενζυλομάδας), 4.27 (t, 4H, αΗτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.61 (t, 4H, βΗτης N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.34 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>

της N-μεθυλοπιπεραζίνης).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 151.34 (C=O), 139.28 (C-4), 137.88 (C-3), 136.91 (C-7a), 135.86 (C-1 της βενζυλομάδας), 130.00 (C-4'), 129.57 (C-2', C-6'), 129.34 (C-3', C-5'), 128.88 (C-3, C-5 της βενζυλομάδας), 128.22 (C-4 της βενζυλομάδας), 127.70 (C-1'), 127.04 (C-2, C-6 της βενζυλομάδας), 118.34 (C-3a), 55.03 ( $\beta$  C της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 54.64 ( $\text{CH}_2$  της βενζυλομάδας), 46.04 ( $\text{NCH}_3$  της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 45.97 ( $\alpha$  C της N-μεθυλοπιπεραζίνης).

#### 7-(μορφολιν-4-υλ)-3-φαινυλο-1H(2H)-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (71)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **38**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **69**. Λήφθηκε στερεό προϊόν με Σ.τ.:  $>300$  °C (MeOH) σε απόδοση (33%).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.32 (s, 1H, H-4), 8.00 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.57 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.48 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-4'), 3.92 (t, 4H,  $\beta$  H της μορφολίνης), 3.82 (t, 4H,  $\alpha$  H της μορφολίνης).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 150.55 (C=O), 141.32 (C-3), 139.35 (C-4), 134.24 (C-7a), 130.37 (C-1'), 129.24 (C-3', C-5'), 128.83 (C-4'), 126.96 (C-2', C-6'), 116.14 (C-3a), 66.07 ( $\alpha$  C της μορφολίνης), 47.09 ( $\beta$  C της μορφολίνης).

#### 7-(4-μεθυλο-πιπεραζιν-1-υλ)-3-φαινυλο-1H(2H)-πυραζολο[3,4-d]πυριδαζίνη (72)

Η σύνθεση του παραγώγου αυτού έγινε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **38**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την αμίνη **70**. Λήφθηκε υποκίτρινο στερεό προϊόν με Σ.τ.: 290-292 °C(dec)(MeOH) σε απόδοση (37%).  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.27 (s, 1H, H-4), 8.00 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.57 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.47 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H-4'), 3.98 (t, 4H,  $\alpha$  H της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.52 (t, 4H,  $\beta$  H της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 2.27 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$  της N-μεθυλοπιπεραζίνης).  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 150.52 (C=O), 141.45 (C-3), 138.96 (C-4), 134.86 (C-7a), 129.20 (C-3', C-5'), 128.63 (C-4'), 126.88 (C-2', C-6'), 116.11 (C-3a), 54.51 ( $\beta$  C της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 46.37 ( $\text{NCH}_3$  της N-μεθυλοπιπεραζίνης), 45.82 ( $\alpha$  C της N-μεθυλοπιπεραζίνης).

#### 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. Φαρμακολογία *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε Αθήνα*, **5<sup>η</sup> έκδοση**, 2007, 50, 748-749.
- 2) Harvey, R.A.; Champe, P.C.; Howland, R.D.; Mycek, M.J. Φαρμακολογία *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε Αθήνα*, **3<sup>η</sup> έκδοση**, 2007, 39, 501-503.
- 3) Shah, N. P. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* **2004** 305, 399-401.
- 4) Cohen, P. Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Rev. Drug Discov.*, **2002**, 1, 309-315
- 5) Druker, B. J. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, **2006**, 355, 2408-2417.
- 6) Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. & Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, **2000**, 351, 95-105.
- 7) Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. Φαρμακολογία *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε Αθήνα*, **5<sup>η</sup> έκδοση**, 2007, 50, 763-766.
- 8) Blanci, J.; Geney, R.; Menet, C. Type II Kinase Inhibitors: An Opportunity in Cancer for Rational Design. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2013**, 13, 1-17.
- 9) Stratton, M. R.; Campbell, P. J.; Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature*, **2009**, 458, 719-724.
- 10) Hait, W. N. Targeted Cancer Therapeutics. *Cancer Res.*, **2009**, 69, 1263-1267.
- 11) Zhang, J.; Yang, P. L.; Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, **2009**, 9, 28-39.
- 12) Cozza, G.; Bortolato, A.; Menta, E.; Cavalletti, E.; Spinelli, S.; Moro, S. ATP non-competitive Ser/Thr kinase inhibitors as potential anticancer agents. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2009**, 9, 778-786.
- 13) Davis, M. I.; Hunt, J. P.; Herrgard, S.; Cicceri, P.; Wodicka, L. M.; Pallares, G.; Hocker, M.; Treiber, D. K.; Zarrinkar, P. P. Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.*, **2011**, 29, 1046-1051.
- 14) Force, T.; Kolaja, K. L. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2011**, 10, 111-126.

- 15) Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell*, **1995**, *80*, 225-236.
- 16) Mikaelson, T.; Gerits, N.; Moens, U. Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy, *Biotechn. Ann. Rev.*, **2006**, *12*, 153-223.
- 17) Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.*, **1996**, *2*, 561-566.
- 18) Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*, **2004**, *303*, 1800-1805.
- 19) a) Sawyer, T. K. Novel oncogenic protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2004**, *4*, 449-455. b) Luo, J.; Solimini, N. L.; Elledge, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, **2009**, *136*, 823-37. c) Aronov, A. M.; Murcko, M. A. Toward a Pharmacophore for Kinase Frequent Hitters *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5616-5619.
- 20) Cohen, P. Protein kinases, the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2002**, *1*, 309-315.
- 21) Weinmann, H.; Metternich, R. Drug discovery process for kinase inhibitors. *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 455-459.
- 22) Adams, J. A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2271-2290.
- 23) Endicott, J. A.; Noble, M. E. M.; Johnson, L. N. The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **2012**, *81*, 587-613.
- 24) Scapin, G. Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Disc. Today*, **2002**, *7*, 601-611.
- 25) Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M. Through the "Gatekeeper Door": Exploiting the Active Kinase Conformation. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2683.
- 26) Zuccotto, F.; Ardini, E.; Casale, E.; Angiolini, M. Through the "Gatekeeper Door": Exploiting the Active Kinase Conformation. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2681-2694.
- 27) Brecker, L.; Pogorevc, M.; Griengl, H.; Steiner, W.; Kappec, T.; Ribbonsa, D. W. Synthesis of 2,4-diketoacids and their aqueous solution structures *New J. Chem.*, **1999**, *23*, 437-446.
- 28) Belenkii, L. I.; Volkenshtein, Y. B.; Karmanova, I. B. New Data on the Chloromethylation of Aromatic and Heteroaromatic Compounds. *Russ. Chem. Rev.*, **1977**, *46*, 891-903.

- 29) Griffith, W. P.; Jolliffe, J. M.; Ley, S. V.; Springhorn, K. F.; Tiffin, P. D. Oxidation of activated halide to aldehydes and ketones by N-methylmorpholine-N-oxide. *Synthetic communications*, **1992**, *22*, 1967-1971.
- 30) Pei, Y.; Wickham, B. O. S. Regioselective syntheses of 3-aminomethyl-5-substituted isoxazoles: A facile and chemoselective reduction of azide to amine by sodium borohydride using 1,3-propanedithiol as a catalyst. *Tetrahedron Letters*, **1993**, *34*, 7509-7512.
- 31) a) Dang, T. T.; Dang, T. T.; Fischer, C.; Gorls, H.; Langer, P. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 2207-2215.  
b) Rikimaru, K.; Wakabayashi, T.; Abe, H.; Imoto, H.; Maekawa, T.; Ujikawa, O.; Murase, K.; Matsuo, T.; Matsumoto, M.; Nomura, C.; Tsuge, H.; Arimura, N.; Kawakami, K.; Sakamoto, J.; Funami, M.; Mol, C. D.; Snell, G. P.; Bragstad, K. A.; Sang, B. C.; Dougan, D. R.; Tanaka, T.; Katayama, N.; Horiguchi, Y.; Momose, Y. A new class of non-thiazolidinedione, non-carboxylic-acid-based highlyselective peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  agonists: Design and synthesis of benzylpyrazole acylsulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 714-733.
- 32) Fadnavis, N. W.; Radhika, K. R. Enantio- and regiospecific reduction of ethyl-4-phenyl-2,4-dioxobutylate with baker's yeast: preparation of (R)-HPB ester. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 3443-3447.