



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ 3-
ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΠΥΡΑΖΟΛΟ[3,4-c]ΠΥΡΙΔΙΝΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΩΝ
ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ**

ΒΑΣΙΛΗΣ ΚΟΝΣΤΑΝΤΙΝ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

2017 – 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΑΚΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ)

Ν. ΠΟΥΛΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ι. Κ. ΚΩΣΤΑΚΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη διαδικασία για την ανάπτυξη και μετάσταση των συμπαγών όγκων, ωστόσο, παρόλο που η πρόληψή της αποτελεί μια αποδεδειγμένη αντικαρκινική στρατηγική, η έρευνα στο πεδίο αυτό βρίσκεται προς το παρόν σε πρώιμα στάδια. Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια της συνεχούς προσπάθειας της ερευνητικής μας ομάδας, με στόχο την ανακάλυψη νέων αντι-αγγειογενετικών παραγόντων. Ως αποτέλεσμα, αναφέρθηκε πρόσφατα η σύνθεση και η ταυτοποίηση μιας σειράς παραγώγων με πολλά υποσχόμενες αντι-αγγειογενετικές δράσεις. Αυτά τα ενθαρρυντικά δεδομένα παρέχουν ένα σημαντικό σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη νέων παραγώγων με δυνητικά βελτιωμένες ιδιότητες μέσω δομικών αλλαγών του πλέον δραστικού μορίου. Σχεδιάστηκαν λοιπόν νέα παράγωγα, μετά από ορθολογικές τροποποιήσεις σε επιλεγμένα τμήματα των ανακαλυφθέντων ενώσεων, μέσω της χρήσης κατάλληλων υποκαταστατών με συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες. Με τον τρόπο αυτό θα επιτραπεί η διεξοδική διερεύνηση της σχέσης δομής-δραστικότητας αυτής της ενδιαφέρουσας κατηγορίας ενώσεων.

Οι νέες ενώσεις που σχεδιάστηκαν, είναι 1,3,5,7-τετραϋποκατεστημένα παράγωγα πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης. Η σύνθεσή τους έγινε με τη χρήση της 2-αμινο-4-πικολίνης ως πρώτη ύλη, η οποία υποβλήθηκε σε διαδοχικές αντιδράσεις νίτωσης, διαζώτωσης, χλωρίωσης, αναγωγής και θερμικής κύκλωσης και μετατράπηκε προς το σημαντικό ενδιάμεσο παράγωγο 5-χλωροπυραζολο[3,4-c]πυριδίνη. Στο τελευταίο έγινε μετά από τις κατάλληλες χημικές τροποποιήσεις διαδοχική εισαγωγή των επιλεγμένων υποκαταστατών στις θέσεις 1, 3, 7 και 5 του κεντρικού ετεροκυκλικού συστήματος. Τα μόρια στόχοι θα εξεταστούν για να διαπιστωθεί η πιθανή αντιαγγειογενετική δράση τους.

Λέξεις-κλειδιά: πυραζολοπυριδίνη; σύνθεση; ισοστερή πουρίνης; αγγειογένεση

ABSTRACT

Design and synthesis of new 3-fluorophenylpyrazolo[3,4-c]pyridines as potential anti-angiogenic agents

Angiogenesis is a necessary procedure for the continuous growth and proliferation of solid tumors and even if its prevention is a proven strategy for the treatment of disease states, it is still considered as an important unmet need. The present study consists a follow-up of an ongoing project of our research group, aiming in the discovery of new antiangiogenic agents. We have previously identified a series of derivatives with very promising activity and this fact provides us an important starting point for the amelioration of their properties through alterations of the structure of the most interesting analogue. We have thus planned the rational modification of selected parts of this lead compound, through the use of selected substituents with suitable physicochemical properties, a strategy that will potentially allow us to investigate in depth the molecular mechanism of action of this important class of compounds and produce more effective agents.

The new compounds are derivatives of 1,3,5,7-tetrasubstituted pyrazolo[3,4-c]pyridine and their synthesis was effected using 2-amino-4-picoline as starting material. This compound was subjected in successive nitration, diazotation, chlorination, reduction and thermal cyclization and was converted to the important intermediate 5-chloropyrazolo[3,4-c]pyridine. The synthetic procedure includes suitable manipulation of the above mentioned intermediate in order to allow the appropriate insertion of the selected substituents in the central heterocyclic scaffold. The biological evaluation of the new compounds is in progress, in order to identify their anti-angiogenic potential.

Key-words: pyrazolopyridine; synthesis; purine isosteres; angiogenesis

I) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Καρκίνος και αντικαρκινική θεραπεία

Ο καρκίνος είναι σύνολο ασθενειών που χαρακτηρίζεται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και διασπορά στο σώμα ανώμαλων μορφών κυττάρων του ίδιου του σώματος. Ο πρώτος ο οποίος έδωσε στην νόσο το όνομα «καρκίνος» ήταν ο Ιπποκράτης, που παρομοίασε την ανάπτυξη του όγκου με την εικόνα του κάβουρα (καρκίνου). Μεταγενέστερα, το 1704 ο Valsalva, υποστήριξε ότι ο καρκίνος είναι αρχικά τοπική διαταραχή και μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά, ενώ σε πιο προχωρημένο στάδιο διασπείρεται μέσω των λεμφαγγείων σε άλλους ιστούς του σώματος. Ο όρος καρκίνος αναφέρεται στα κακοήθη νεοπλασμάτα Η δημιουργία ενός καρκινικού όγκου είναι πολύπλοκη διαδικασία και επέρχεται ως αποτέλεσμα μίας η περισσότερων μεταλλάξεων στο ανθρώπινο DNA. Οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί να είναι επίκτητες ή κληρονομούμενες. Το κυριότερο χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι οι μη ελεγχόμενες κυτταρικές διαιρέσεις, η αποδιαφοροποίηση, η απώλεια της λειτουργικότητας, η διεισδυτικότητα και η μετάσταση [1]. Σήμερα ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες στα ανεπτυγμένα κράτη. Υπολογίζεται ότι το 25% των κατοίκων των Η.Π.Α. θα μάθουν κάποια στιγμή στη ζωή τους ότι πάσχουν από καρκίνο, αφού κάθε χρόνο γίνεται διάγνωση σε ένα εκατομμύριο νέους καρκινοπαθείς. Σημαντικό είναι όμως να τονιστεί ότι ο καρκίνος είναι κυρίως εκφυλιστική νόσος, συχνότερη στους ηλικιωμένους και καθώς η πρόοδος στα Συστήματα Δημόσιας Υγείας, και στις Επιστήμες Υγείας αυξάνουν το προσδόκιμο επιβίωσης, αναμένεται αύξηση του αριθμού των ασθενών ζουν μέχρι την ηλικία που είναι πιθανότερο να νοσήσουν [2].

Παρόλο που οι υπάρχουσες θεραπείες έχουν συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της επιβίωσης και της ποιότητας ζωής των ασθενών, η επιβίωση μακράς διάρκειας και η πλήρης ίαση εξακολουθούν να είναι ζητούμενα για την ασθένεια αυτή. Όσον αφορά στην θεραπεία του καρκίνου, υπάρχουν τρεις βασικές προσεγγίσεις: χειρουργική αφαίρεση, ακτινοβολία και χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μόνη της, είτε να συνδυαστεί με άλλους τρόπους προσέγγισης της νόσου. Στόχος της αντικαρκινικής χημειοθεραπείας είναι η πρόκληση θανατηφόρας κυτταροτοξικής βλάβης στα κύτταρα του όγκου. Το ιδανικό θα ήταν αυτά τα φάρμακα να παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες που χαρακτηρίζουν αποκλειστικά τα κακοήθη κύτταρα. Ωστόσο, τα αντικαρκινικά φάρμακα που διαθέτουμε σήμερα δεν προσβάλλουν ειδικά τα νεοπλασματικά κύτταρα, αλλά επιδρούν σε όλα γενικά τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, τόσο τα φυσιολογικά, όσο και τα καρκινικά. Εκτός της τοξικότητας, υπάρχουν και άλλα, σημαντικά μειονεκτήματα στη σύγχρονη αντικαρκινική θεραπεία και αυτά αφορούν κυρίως στην ανάπτυξη αντοχής (ειδικά της πολυαντοχής) στα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως και στο γεγονός ότι σε πολλούς όγκους η καταστροφή της συνολικής μάζας των κακοήθων κυττάρων δεν είναι εφικτή με τις συνήθεις θεραπευτικές δόσεις και η ανοσολογική απάντηση του ασθενούς συχνά δεν επαρκεί για να αντιμετωπίσει τα υπολειπόμενα κύτταρα. Οι επιστήμονες βρίσκονται σε συνεχή επαγρύπνιση και γίνονται διεθνώς εκτεταμένες προσπάθειες για την αντιμετώπιση του προβλήματος [1].

Η αλματώδης πρόοδος που έχει σημειωθεί τα τελευταία χρόνια στην αποκωδικοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών και η σημαντική αποσαφήνιση των κυτταρικών παραγόντων που

εμπλέκονται στην γένεση, την ανάπτυξη, την εξάπλωση του καρκίνου, έχει στρέψει ένα σημαντικό κομμάτι της επιστημονικής κοινότητας προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης στοχευμένων φαρμάκων. Η εξειδικευμένη αναστολή συγκεκριμένων μοριακών στόχων, που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και την μείωση των τοξικών παρενεργειών, όμως παραμένει το πρόβλημα της ανάπτυξης αντοχής, που προοδευτικά μειώνει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Πρωτεϊνικές Κινάσες: Ορισμός, σημασία και είδη πρωτεϊνικών κινασών

Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες και λειτουργικά σημαντικότερες οικογένειες ενζύμων, καθώς παίζουν καθοριστικό ρόλο στον συντονισμό της κυτταρικής λειτουργίας. Καταλύουν τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας ενός τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου, (συνήθως της τριφωσφορικής αδενοσίνης, ATP) προς ένα αμινοξικό υπόλοιπο πρωτεΐνης, το οποίο φωσφορυλιώνεται. Μέσω αυτών των φωσφορυλιώσεων και των αντίστοιχων αποφωσφορυλιώσεων που ελέγχονται από φωσφατάσες, ρυθμίζεται η λειτουργικότητα όλων των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία μεταγωγής του σήματος και ελέγχονται αυστηρά οι σημαντικές και σύνθετες κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός, η διαφοροποίηση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιβίωση ή απόπτωση, η αγγειογένεση και η ικανότητα μετάστασης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες αποτελούν σήμερα τον δεύτερο πιο σημαντικό στόχο φαρμάκων, μετά από τους υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται συχνά υπερέκφραση ή/και υπερενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών. Εξαιτίας του πολύ σημαντικού φυσιολογικού και παθολογικού ρόλου που έχουν οι κινάσες, η έρευνα που σχετίζεται με αυτά τα ένζυμα ζωτικής σημασίας κατέχει σημαντική θέση στον τομέα της ογκολογίας, των αυτοάνοσων παθήσεων, των διαταραχών του μεταβολισμού και βεβαίως στην διαδικασία της ανακάλυψης νέων φαρμάκων.

Από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος ταυτοποιήθηκαν μέχρι σήμερα 518 πρωτεϊνικές κινάσες που υποδιαιρούνται σε δύο μεγάλες ομάδες, ανάλογα με το αμινοξικό υπόλοιπο που φωσφορυλιώνουν:

α) οι κινάσες του αρωματικού υδροξυλίου της τυροσίνης (tyrosine kinases), είναι αυτές που ταυτοποιήθηκαν πρώτες [3].

β) οι κινάσες του αλειφατικού υδροξυλίου σερίνης ή θρεονίνης (serine-threonine kinases) [4].

γ) οι κινάσες μικτής λειτουργίας, που πραγματοποιούν ταυτόχρονα και τις δύο φωσφορυλιώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω [3].

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και κινάσες ιστιδίνης, ως ένζυμα που συμμετέχουν στη μεταγωγή του σήματος σε κατώτερους οργανισμούς, φωσφορυλιώνοντας το ιμιδαζολικό άζωτο της ιστιδίνης [4].

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

α) **κινάσες - υποδοχείς (receptors)**: Οι κινάσες αυτές είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και διαθέτουν μία εξωκυτταρική θέση πρόσδεσης, στην οποία επιδρούν συνήθως διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF, ή ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενδοκυτταρικού τους καταλυτικού τμήματος, που λειτουργεί ως κινάση. Οι κινάσες - υποδοχείς είναι ως επί το πλείστον κινάσες τυροσίνης (Receptors Protein Kinases, RTK) [4].

β) **κινάσες - μη υποδοχείς (non-receptors)**: πρόκειται για ένζυμα (π.χ. Abl, Src, JAK κινάσες) που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, ή στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και λαμβάνουν μηνύματα από τις κινάσες-υποδοχείς, αλλά και από άλλους υποδοχείς, όπως είναι πχ οι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες (GPCRs) και οι υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων. Λειτουργούν ως μεταγωγείς του σήματος και ενεργοποιούνται ως απόκριση σε διάφορα κυτταρικά ερεθίσματα, ενώ με τη σειρά τους συνεχίζουν με συγκεκριμένο τρόπο τη μετάδοση του μηνύματος, φωσφορυλιώνοντας κάποιο υπόστρωμα τους [3].

γ) **κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs)**. Πρόκειται για πρωτεϊνικές κινάσες, που ενεργοποιούνται μόνο όταν συνδεθούν με μια κατάλληλη ρυθμιστική πρωτεΐνη, την αντίστοιχη κυκλίνη. Οι ενεργές κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες είναι συνεπώς ετεροδιμερή, τα οποία αφού σχηματισθούν παίζουν καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η τελευταία, ως εξαιρετικής σημασίας διαδικασία ελέγχεται και από άλλα είδη πρωτεϊνικών κινασών, όπως οι Aurora, Plk-1, Bub1, BubR1, Mps1, Nek, καθώς και από τις κινάσες των σημείων ελέγχου (Checkpoint kinases, Chk1 και 2) [4].

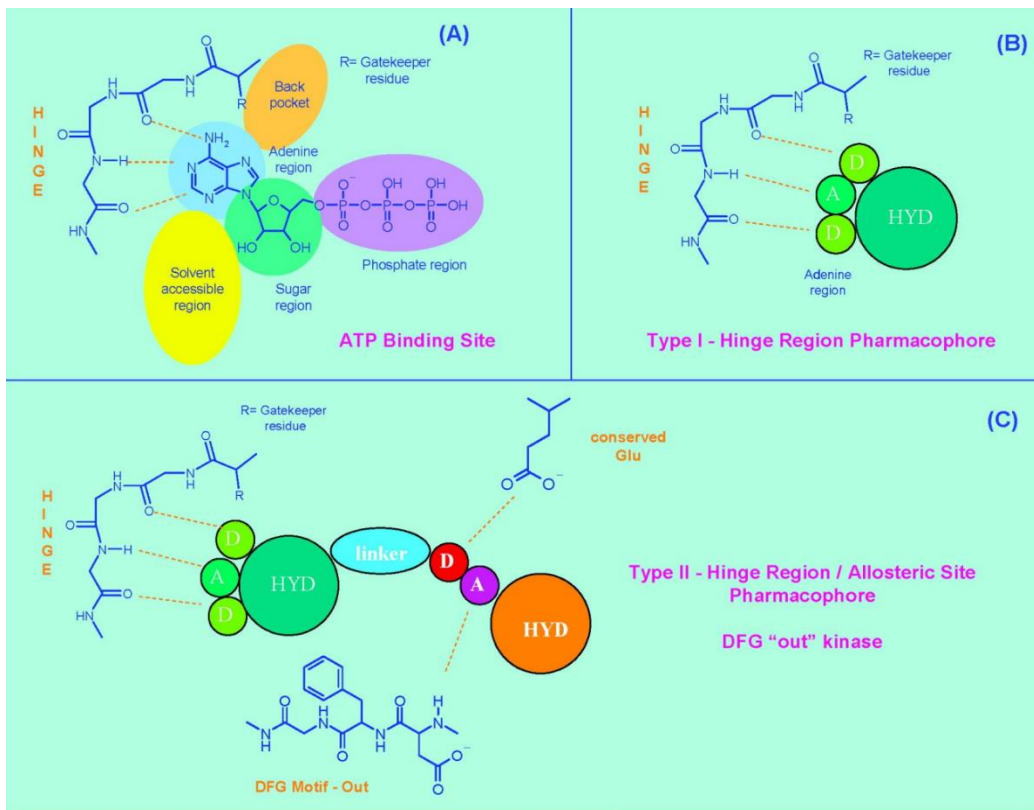
Δομή και λειτουργία του ενεργού κέντρου των κινασών.

Οι κρυσταλλική δομή του ενεργού κέντρου μεγάλου αριθμού πρωτεϊνικών κινασών που έχει αναλυθεί μέχρι σήμερα (Εικόνα 1.1), συνέβαλε τα μέγιστα στην εμπειριστατωμένη κατανόηση της δομής και της λειτουργίας αυτών των ενζύμων. Συγκεκριμένα, το ενεργό κέντρο διαθέτει διαμορφωμένη αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή, που και οι δύο χαρακτηρίζονται από μεγάλη δομική πολυπλοκότητα. Η αμινοτελική περιοχή αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και μία α-έλικα, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή αποτελείται μόνο από α-έλικες. Αυτές οι περιοχές της κινάσης συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός ευκίνητου πολυπεπτιδικού τμήματος, που λειτουργεί σαν άρθρωση, γύρω από την οποία οι δύο περιοχές στρέφονται ανεξάρτητα η μία από την άλλη.

Η πρόσδεση του ATP γίνεται σε μία στενή υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου των κινασών και σταθεροποιείται με πλήθος δεσμών υδρογόνου και ιοντικών αλληλεπιδράσεων των φωσφορικών ομάδων με διάφορα αμινοξικά υπόλοιπα της θέσης δέσμευσης. Η περιοχή αυτή εντοπίζεται στο κεντρικό αρθρωτό τμήμα του ενζύμου και διαθέτει ένα αμινοξύ-δότη δεσμού υδρογόνου και δύο αμινοξέα-δέκτες δεσμού υδρογόνου [5]. Επομένως, κατά την

πρόσδεση του ATP η αδενίνη συνδέεται με τρεις τουλάχιστον δεσμούς H με τα απέναντι αμινοξικά υπόλοιπα, ενώ η ριβόζη διευθετείται προς την καρβοξυτελική περιοχή της κινάσης, στην οποία εντοπίζεται η καταλυτική περιοχή του ενζύμου (**catalytic loop**). Στην καταλυτική περιοχή υπάρχει μία χαρακτηριστική ομάδα τριών αμινοξέων, (ασπαρτικό οξύ, φαινυλαλανίνη και γλυκίνη, το γνωστό ως DFG μοτίβο), που αποτελούν την αλληλουχία ενεργοποίησης. Ονομάζεται έτσι επειδή η διαμόρφωση αυτού του μοτίβου είναι καθοριστική για την ενεργοποίηση της κινάσης. Το ασπαρτικό οξύ συμμετέχει στη δημιουργία συμπλόκου με την τριφωσφορική ομάδα του ATP και είναι σημαντικό για τη μεταφορά της τελικής φωσφορικής ομάδας. Οι ακραίες διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει η κινάση είναι: α) η καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση (DFG-in) και β) η καταλυτικά ανενεργή διαμόρφωση (DFG-out). Όταν η κινάση λάβει την ανενεργή διαμόρφωση, η αλληλουχία ενεργοποίησης έχει μετακινηθεί με τρόπο που εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος, καθώς τα τρία αμινοξέα περιστρέφονται εκτός του ενεργού κέντρου, αποκαλύπτοντας μία κενή υδρόφοβη κοιλότητα [6,7]

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι πρωτεϊνικές κινάσες φωσφορυλιώνονται σε αμινοξικά υπόλοιπα τυροσίνης, σερίνης, ή θρεονίνης που συνήθως βρίσκονται σε έναν υδρόφιλο βρόγχο κοντά στη θέση πρόσδεσης του ATP, που ονομάζεται βρόγχος ενεργοποίησης (**activation loop**). Αποτέλεσμα αυτής της φωσφορυλίωσης είναι η μετακίνηση αυτού του βρόγχου και η ενεργοποίηση της κινάσης.



Εικόνα 1.1: (A) Θέση δέσμευσης του ATP στο ενεργό κέντρο κινάσης. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαριστώνται με διακεκομμένες γραμμές χρώματος πορτοκαλί. (B) και (C) Θέση σύνδεσης αναστολέων τύπου I και τύπου II στο καταλυτικό κέντρο της κινάσης.

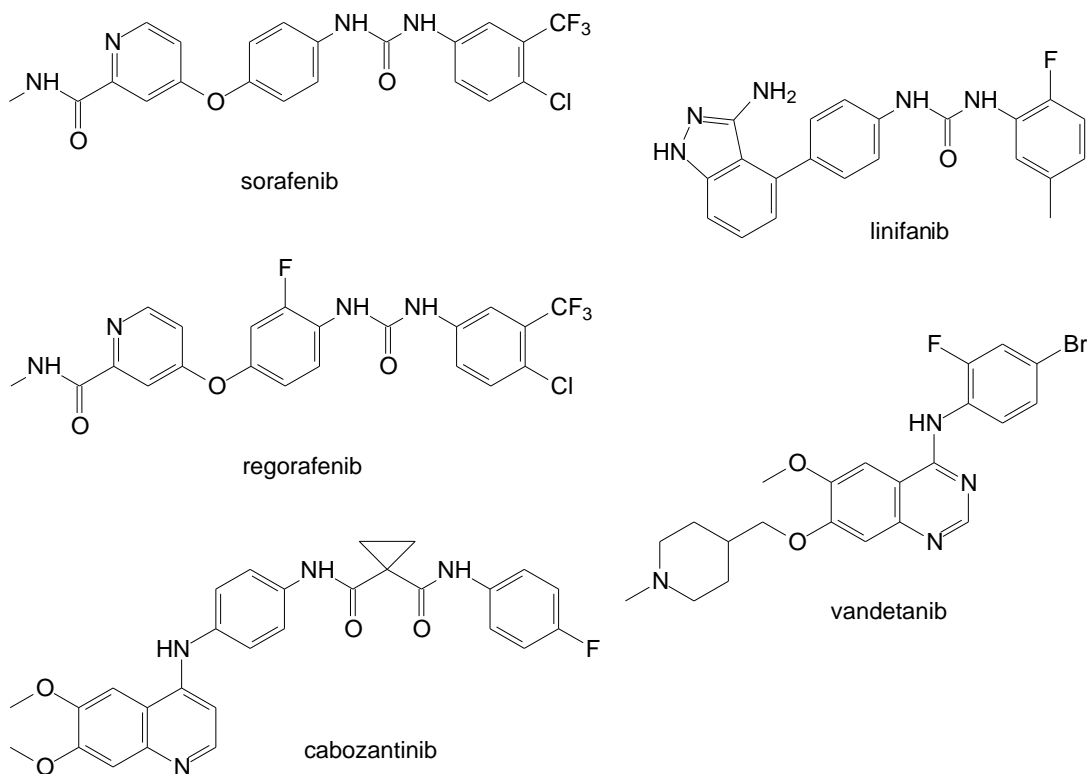
Η σχέση των πρωτεϊνικών κινασών με την αγγειογένεση

Με τον όρο αγγειογένεση περιγράφεται ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων από αγγεία που προϋπάρχουν και είναι μηχανισμός επέκτασης, αύξησης του μεγέθους και της πολυπλοκότητας του αγγειακού δικτύου [8]. Πρόκειται για μια σύνθετη διαδικασία, που λαμβάνει χώρα σε όλα τα όργανα και περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, τη μετανάστευση, ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων και λείων μυϊκών ινών, με σκοπό, σε φυσιολογικές συνθήκες την επιδιόρθωση του εσωτερικού τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων. Η αγγειογένεση είναι σημαντική για την ανάπτυξη του εμβρύου, την επούλωση πληγών και την επαρκή αιμάτωση διαφόρων οργάνων [9]. Επάγεται, αλλά και αναστέλλεται από διάφορους παράγοντες και χημικά σήματα, η ισορροπία των οποίων είναι απολύτως απαραίτητη για την διατήρηση της ομοιοστασίας. Σε παθολογικές καταστάσεις όμως, διαταράσσεται η ισορροπία και η αγγειογένεση μπορεί να επιβραδυνθεί, ή να επιταχυνθεί υπερβολικά, οπότε μετατρέπεται σε παθολογική αγγειογένεση, η οποία συνεισφέρει στη νοσηρότητα. Για παράδειγμα, απώλεια της ισορροπίας και ανεπαρκής αγγειογένεση επιδεινώνει τα συμπτώματα έλκους, εγκεφαλικού και καρδιακού επεισοδίου, ενώ αντίθετα υπερβολική αγγειογένεση παρατηρείται κατά την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, όπου συμβάλλει στην απώλεια της όρασης, στην περίπτωση χρόνιας φλεγμονής, όπως στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, σε ψωρίαση και στον σχηματισμό στερεών όγκων [10, 11]. Μάλιστα, ο σχηματισμός νέων αγγείων θεωρείται σημαντικός για την οξυγόνωση των όγκων, την τροφοδότηση τους με θρεπτικά υλικά, την αύξηση του μεγέθους τους και τη διασπορά τους σε άλλους ιστούς (μετάσταση) [12]. Συγκεκριμένα, η χαρακτηριστική υποξία που αναπτύσσεται στους καρκινικούς ιστούς, και κυρίως στο εσωτερικό των στερεών όγκων αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, όμως ευνοεί τις προ-αγγειογενετικές διαδικασίες και διεγείρει την έκλυση προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως προσταγλανδίνες, ιοστρογόνα, ιντερλευκίνες, TNF-α και αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούν πρωτεολυτικά ένζυμα, κυρίως πρωτεάσες και κολλαγενάσες που οδηγούν σε αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης των γειτονικών αγγείων [13]. Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες επάγουν τη μετατροπή αδιαφοροποίητων προγονικών κυττάρων του μυελού των οστών σε ενδοθηλιακά κύτταρα και λειτουργούν ως χημειοτακτικοί παράγοντες για τον σχηματισμό νέων αγγείων, ευνοώντας τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων στις εστίες των νεοπλασιών, με αποτέλεσμα το σχηματισμό χαρακτηριστικών αγγειακών αυλών [14].

Ενώ αρκετοί παράγοντες και μοριακά μονοπάτια επηρεάζουν αμέσως ή εμμέσως το σχηματισμό νέων αγγείων εντός των καρκινικών όγκων, οι περισσότερες προσπάθειες παρεμπόδισης της de novo αγγειογένεσης επικεντρώνονται στην εκλεκτική αναστολή των κύριων προ-αγγειογενετικών σηματοδοτικών μονοπατιών, που λειτουργούν μέσω του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του υποδοχέα του (VEGFR), που αποτελεί μέλος της υπερικογενείας υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης (RTK). Τα μέλη της οικογένειας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), θεωρούνται ως οι

πλέον κρίσιμοι ενδοθηλιακοί μεσολαβητές της καρκινικής αγγειογένεσης. Η αλληλεπίδρασή τους με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους (VEGFR-1, VEGFR-2, και VEGFR-3), επάγει τον διμερισμό των υποδοχέων, που ενδοκυτταρικά λειτουργούν ως κινάσες τυροσίνης και αυτοφωσφορυλιώνονται σε συγκεκριμένες θέσεις, πυροδοτώντας μια σειρά διαδοχικών φωσφορυλιώσεων (σηματοδοτικοί καταρράκτες) εντός του κυττάρου, που αποσκοπούν στη μεταγωγή του μιτογόνου και αγγειογενετικού σήματος [15]. Τα σημαντικότερα μονοπάτια που ενεργοποιούνται με την ανωτέρω διαδικασία είναι αυτά των κινασών Ras/MAPK/ERK και FAK, καθώς και των κινασών PI3K/Akt/mTOR που προάγουν σημαντικά την ανάπτυξη νέων αγγείων. Μεταξύ των υποδοχέων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, ο VEGFR-2 εκφράζεται ευρύτατα και σχεδόν αποκλειστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα και υπερεκφράζεται σε συνθήκες υποξίας στερεών όγκων. Η μέσω σηματοδότησης ενεργοποίηση από τον VEGFR-2 των κινασών ERK1/2 και p38MAPK χειροτερεύει σημαντικά τη πρόγνωση της νόσου, γεγονός που αποτέλεσε επιχείρημα για την στόχευση του συγκεκριμένου υποδοχέος κατά τις προσπάθειες ανάπτυξης αντι-αγγειογενετικής θεραπείας [16].

Πάνω σε αυτή τη βάση αναπτύχθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν το εξωκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, με κυριότερο το bevacizumab (Avastin) που αποτελεί το πρωτότυπο ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα (IgG) που προσδένεται στο VEGF-A, σταματώντας τη δημιουργία νέων αγγείων και την αιμάτωση του όγκου [17]. Αντίστοιχα, βρίσκεται σε εξέλιξη σημαντική ερευνητική προσπάθεια για την ανάπτυξη μορίων μικρού μοριακού βάρους (MB μικρότερο του 600), που στοχεύουν το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, λειτουργώντας αναστολείς τυροσινικής κινάσης (RTKs). Ενώ πολλά παράγωγα αυτής της κατηγορίας βρίσκονται σε προκλινική φάση ανάπτυξης, ή σε κλινικές μελέτες, εννέα αναστολείς του VEGFR-2 μεταξύ των οποίων τα sorafenib, linifanib και vandetanib, (Εικόνα 1.2), έχουν ήδη λάβει έγκριση από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), για τη θεραπεία διαφόρων τύπων στερεών όγκων [18].



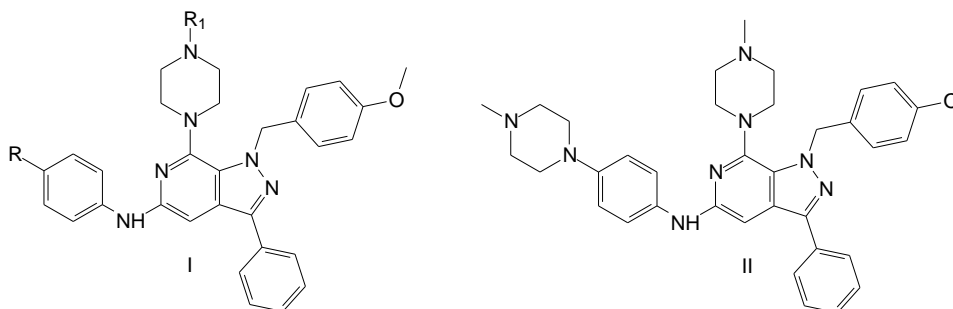
Εικόνα 1.2. Αναστολείς του VEGFR-2.

Όλα τα παράγωγα αναστέλλουν τη λειτουργία του VEGFR-2 ισχυρά, αλλά όχι εκλεκτικά, λειτουργώντας ως ATP-ανταγωνιστικοί, μη εξειδικευμένοι αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών, που δεσμεύονται στη καλά συντηρημένη θέση δέσμευσης της πουρίνης (αδενίνης) στο ενεργό κέντρο αυτών των ενζύμων [19]. Η έλλειψη εκλεκτικότητας δεν συμπεριλαμβάνονται στα μειονεκτήματα αυτών των αναστολέων, καθώς φάνηκε στην πράξη ότι η αναστολή ομάδας πρωτεϊνικών κινασών λειτουργεί συχνά υπέρ της αποτελεσματικότητας της θεραπείας.

Η κλινική σημασία αυτών των φαρμάκων είναι αδιαμφισβήτητη, καθώς η κυκλοφορία τους βελτίωσε θεαματικά το προσδόκιμο επιβίωσης, αλλά και την ποιότητα ζωής πολλών ασθενών. Δεν λείπουν όμως και προβληματισμοί, κυρίως οι σχετικοί με την προσδευτική ανάπτυξη αντοχής εκ μέρους των καρκινικών κυττάρων, που συχνά περιορίζουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Άλλοι προβληματισμοί σχετίζονται με την επιδείνωση της υποξίας, που εκ των πραγμάτων περιορίζει την δυνατότητα μεταφοράς του φαρμάκου στην περιοχή του καρκινικού όγκου, όπου πρέπει να δράσει. Ίσως μπορούν να βελτιωθεί η κλινική αποτελεσματικότητα με εφαρμογή συνδυαστικών σχημάτων, στα οποία συνδυάζονται αναστολείς κινασών με κλασικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, ή με ακτινοβολία του όγκου [20]. Η αξιολόγηση αυτών των θεραπειών έχει δώσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ότι αφορά την αποτελεσματικότητα, αλλά και τη μείωση της τοξικότητας. Εξ άλλου, κάθε προσπάθεια βελτίωσης και ανάπτυξης νέων αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων δεν μπορεί παρά να βασίζεται στην αποσαφήνιση των βιολογικών μηχανισμών και την πληρέστερη κατανόηση του συνόλου των σύνθετων αλληλεπιδράσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων, με τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, τους αυξητικούς παράγοντες, τα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και τα εμπλεκόμενα στην αγγειογένεση των καρκινικών ιστών ένζυμα.

Σχεδιασμός ενώσεων της παρούσας εργασίας

Στο εργαστήριό μας έχει ξεκινήσει ερευνητικό πρόγραμμα, με στόχο τη μελέτη της βιολογικής δράσης νέων ισοστερών πουρινών, με έμφαση στη διερεύνηση των πιθανών κυτταροτοξικών, αντιπολλαπλασιαστικών και αντιαγγειογενετικών ιδιοτήτων τους. Στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής δραστηριότητας, ανακαλύφθηκαν υποκατεστημένα παράγωγα πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (γενικός τύπος I, Εικόνα 1.3) τα οποία σε πρώτη φάση αξιολογήθηκαν ως αναστολείς του πολλαπλασιασμού και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.



Εικόνα 1.3. Παράγωγα πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (I) και δραστικότερο ανάλογο (II).

Κατόπιν, μελετήθηκε και διαπιστώθηκε η αντιαγγειογενετική δράση των πλέον δραστικών μορίων (εκπρόσωπος της κατηγορίας είναι το παράγωγο II, Εικόνα 1.3) υπό την επίδραση του αυξητικού παράγοντα VEGF [21]. Στο επίπεδο της κυτταρικής μεταγωγής σήματος βρέθηκε ότι οι επιλεγμένοι αναστολείς εμποδίζουν την μέσω VEGF επαγόμενη φωσφορυλίωση της Tyr-1175 στην ενδοκυτταρική περιοχή με ιδιότητες κινάσης (RTK) του VEGFR2 και σε συμφωνία με αυτό βρέθηκε ότι επιπλέον τα παράγωγα αυτά αναστέλλουν και την επαγόμενη από τον αυξητικό παράγοντα VEGF φωσφορυλίωση των κινασών AKT και ERK1/2. Επίσης, τα παράγωγα προκαλούν *in vivo* σημαντική συρρίκνωση των Lewis καρκινωμάτων πνεύμονα (Lewis Lung Carcinomas, LLC) σε πειραματόζωα, ενώ μειώνουν σημαντικά την πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων του όγκου, χωρίς να επιφέρουν σημαντικές παρενέργειες. Τα ενθαρρυντικά αυτά αποτελέσματα κατέδειξαν τη σημασία διερεύνησης ανάλογων μορίων, που φέρουν τροποποιήσεις στον βασικό σκελετό, επιδιώκοντας την ανακάλυψη νέων, πιο αποτελεσματικών παραγώγων με βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα και φυσικοχημικές ιδιότητες. Η μελέτη της δράσης τους σε μοριακό επίπεδο, αναμένεται να συμβάλει στη διευκρίνιση του μηχανισμού δράσης και στον αμплουτισμό των σχέσεων δομής-δράσης αυτής της κατηγορίας βιοδραστικών μορίων.

Στην προσπάθεια να γίνει κατά το δυνατόν πληρέστερη η μελέτη και να συμβάλλουμε στην εξαγωγή κατάλληλων σχέσεων δομής-δράσης αυτής της κατηγορίας μορίων, αποφασίσαμε να συνθέσουμε και να παρουσιάσουμε στην παρούσα εργασία, επιπλέον παράγωγα του συγκεκριμένου ετεροκυκλικού συστήματος. Διατηρήθηκε σταθερή η υποκατάσταση του δραστικού παραγώγου II στη θέση 5 του κεντρικού σκελετού του μορίου (4-

μεθυλοπιπεραζινοανιλίνη), καθώς η πλειοψηφία των έως τώρα μελετηθέντων παραγώγων διέθεταν αυτή την συγκεκριμένη υποκατάσταση και επήλθαν οι εξής αλλαγές:

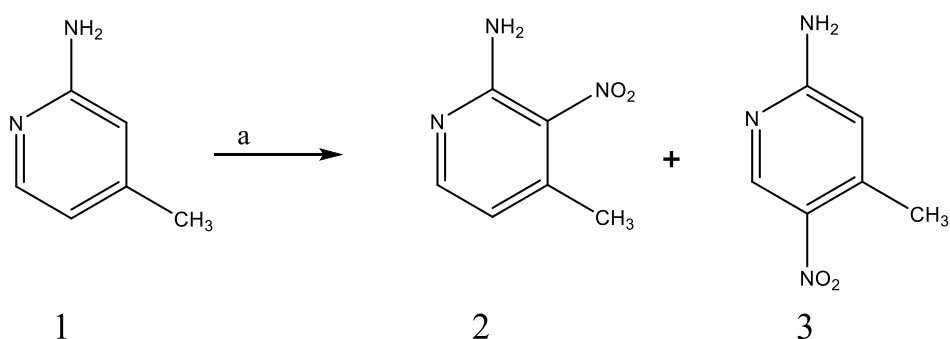
- Παρασκευάστηκαν σειρές μορίων με N1-μεθυλο-, καθώς και N1-4-μεθοξυβενζυλο-υποκαταστάτες, ώστε να μελετηθεί επιπλέον η επίπτωση που θα έχει στη δράση η παρουσία ομάδων μικρού όγκου στην θέση 1.
- Έγινε εισαγωγή ατόμου φθορίου επί του 3-φαινυλίου, καθώς είναι επιβεβαιωμένα τα φαρμακοφόρα χαρακτηριστικά του φθορίου, τα οποία οφείλονται στον ισχυρό ηλεκτραρνητικό του χαρακτήρα, καθώς και στην ιδιότητά του να συμμετέχει στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου.
- Τέλος, εκτός του πιπεραζινικού υποκαταστάτη στη θέση 7-, εισήχθησαν επιπλέον μορφολιν-4-υλομάδα και φαινυλοξυ-υποκατάσταση, ώστε να μελετηθούν παράγωγα με διαφορετικό ετεροκυκλικό υποκαταστάτη καθώς και μόρια που φέρουν αιθερικό δεσμό.

II) ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.1 Συνθετική πορεία

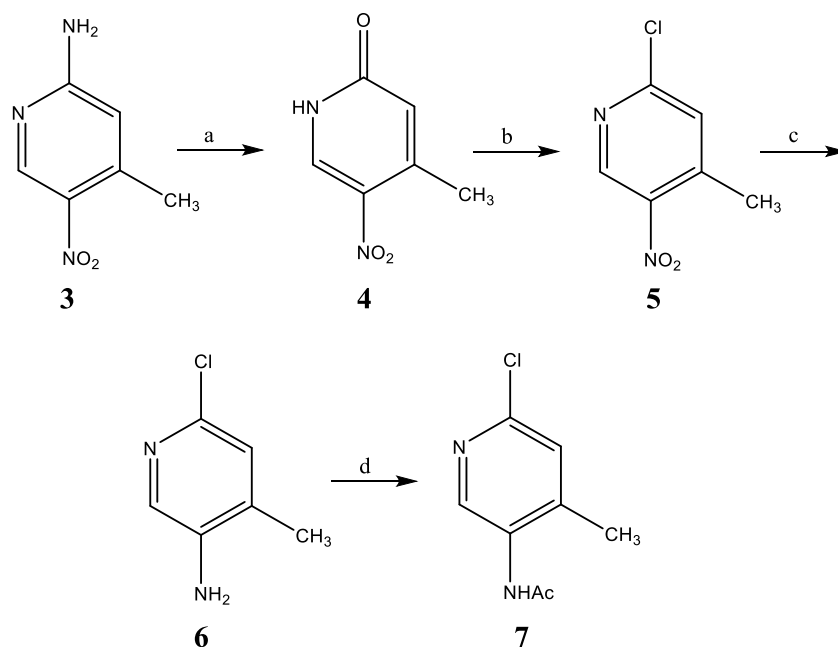
II.1.1 Σύνθεση της 5-χλωρο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (9).

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



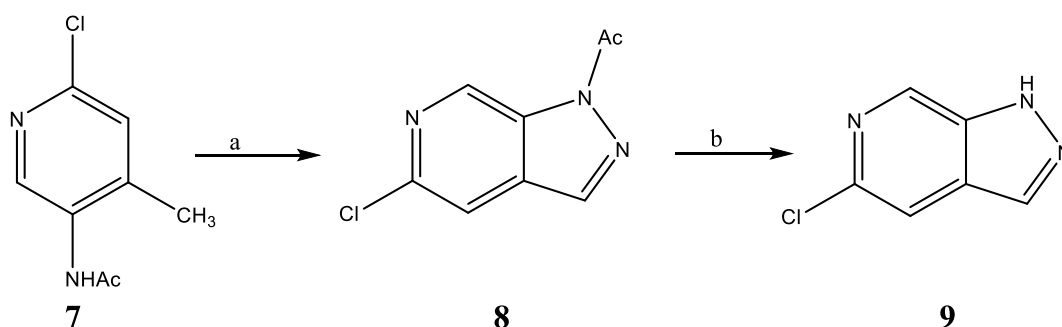
Σχήμα II.1. a) H₂SO₄ 96%, HNO₃ 65%, 65 °C, 20 h.

Στη συνέχεια, το παραγώγο **3** μετατράπηκε σε διαζωνιακό άλας το οποίο στη συνέχεια υδρολύθηκε παρέχοντας την αντίστοιχη πυριδινόνη (**4**, Σχήμα II.2), η οποία αντέδρασε με οξυχλωριούχο φώσφορο και παρελήφθη η 2-χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (**5**). Κατόπιν, έγινε αναγωγή της νιτρομάδας με διχλωριούχο κασσίτερο και ακετυλίωση του σχηματιζόμενου αμινοπαραγώγου **6** με οξικό ανυδρίτη, οπότε παρελήφθη το ακεταμίδιο **7**.



Σχήμα II.2. a) NaNO_2 , H_2SO_4 , H_2O , b) PCl_5 , POCl_3 , 130°C , c) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HCl , 55°C , d) Ac_2O , CH_2Cl_2 , r.t.

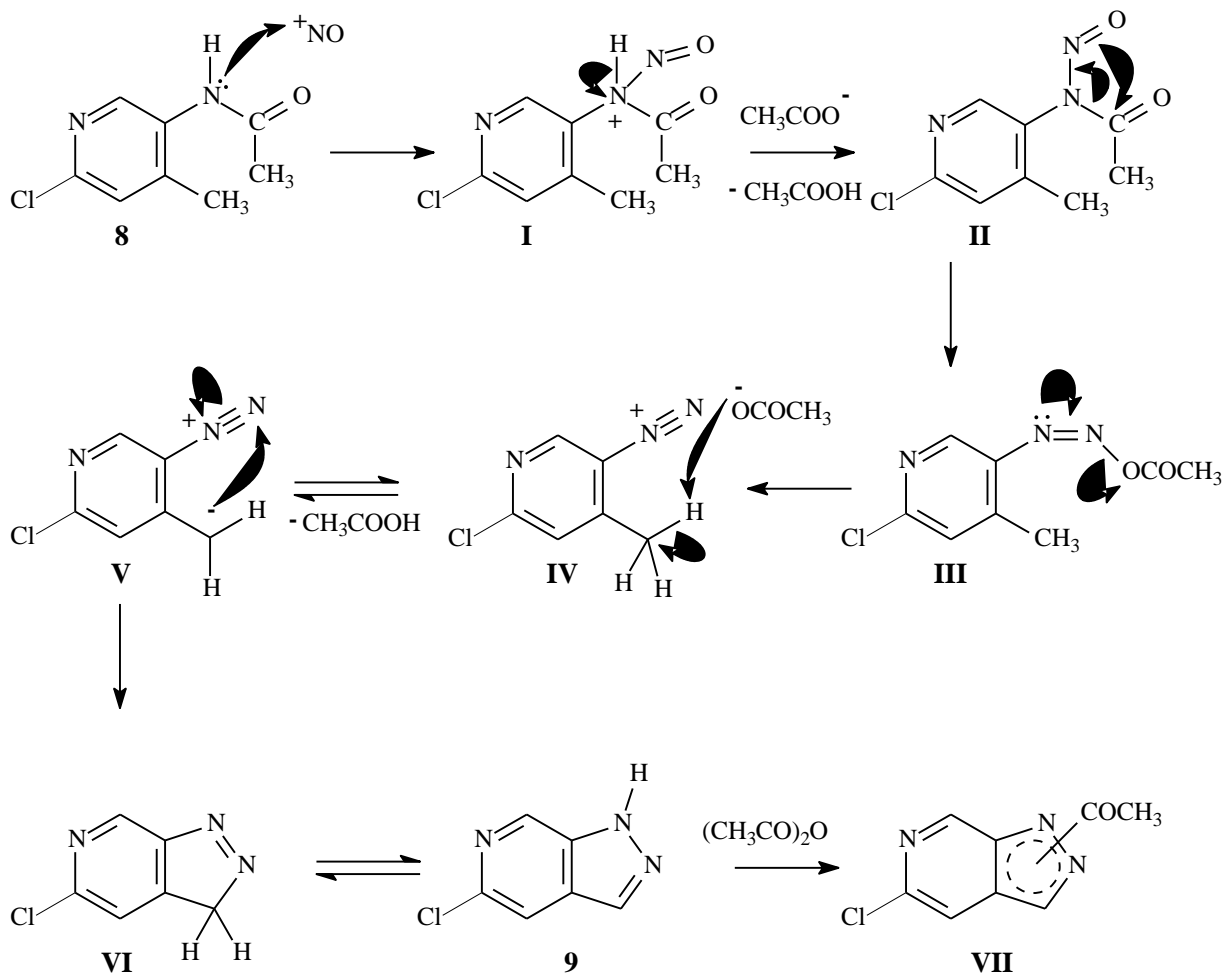
Το ακεταμίδιο **7** που προέκυψε υπέστη αντίδραση ενδομοριακής κύκλωσης, με τη χρήση νιτρώδους ισοαμυλίου, οξικού καλίου και οξικού ανυδρίτη, παρέχοντας την 1-ακετυλο-5-χλωροπυραζολοπυριδίνη (**8**, Σχήμα II.3). Κατόπιν απομακρύνθηκε το πυραζολικό ακετύλιο με επίδραση μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας, παρέχοντας σχεδόν ποσοτικά την 5-χλωρο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη **9**.



Σχήμα II.3. a.) AcOK , Ac_2O , *isoamyl nitrite*, benzene, reflux, b.) $\text{NH}_3(\text{g})$, MeOH , r.t.

Σύμφωνα με το μηχανισμό που προτείνεται (Σχήμα II.4), το νιτρωδοκατιόν προσβάλλει το άζωτο του ακεταμιδίου και σχηματίζεται το αντίστοιχο *N*-νιτρωδοακεταμίδιο **I**. Ακολουθεί ενδομοριακή μετάθεση, από την οποία λαμβάνεται αρχικά το ενδιάμεσο *O*-ακετυλοδιαζωνικό οξύ **III** και στη συνέχεια το οξικό άλας του διαζωνίου **IV**. Τελικά, με απόσπαση οξικού οξέος

πραγματοποιείται η κύκλωση προς την πυραζολοπυριδίνη **9**, η οποία ακετυλιώνεται από τον οξικό ανυδρίτη και έτσι λαμβάνεται το μίγμα των 1- και 2- ακεταμιδίων **VII** [22].

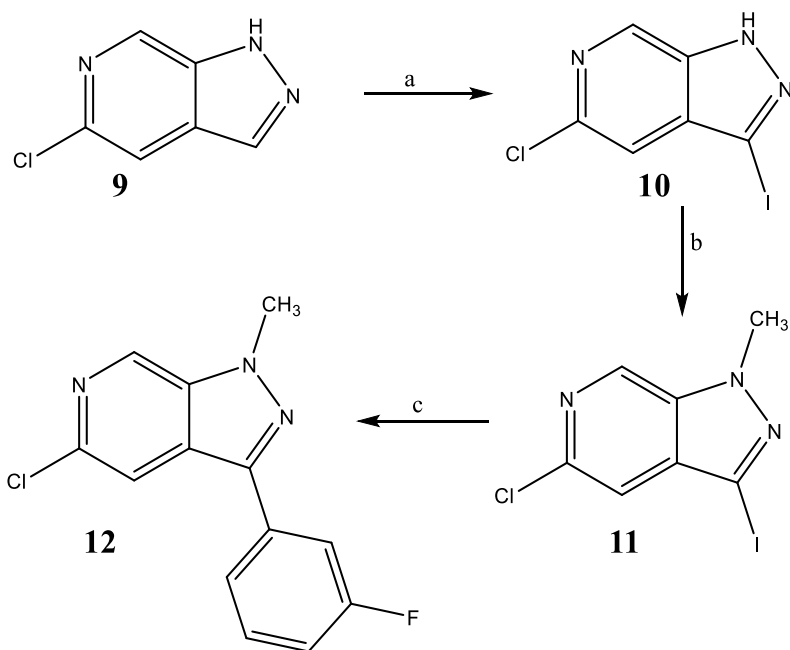


ΣΧΗΜΑ II.4 Μηχανισμός ενδομοριακής κύκλωσης.

II.1.3. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-μεθυλο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (**14**).

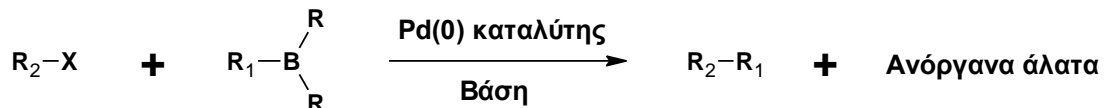
Για τη σύνθεση του ανωτέρω παραγώγου χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η πυραζολοπυριδίνη **9**, που υποβλήθηκε σε αντίδραση ιωδίωσης με την επίδραση N-ιωδοσουλφιμιδίου εντός άνυδρης μεθανόλης και οδήγησε στην 5-χλωρο-3-ιωδοπυραζολοπυριδίνη (**10**, Σχήμα II.5). Η αντίδραση αυτή είναι γρήγορη και γίνεται σε υψηλή απόδοση λόγω της ιδιότητας της 3 θέσης του πυραζολίου να δίνει εύκολα αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης. Στην συνέχεια με επίδραση μεθυλοϊωδιδίου παρουσία υδροξειδίου του καλίου λήφθηκε το 1-μεθυλοπαραγώγο **11**, το οποίο

χρησιμοποιήθηκε για αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki με τη χρήση 3-φθοροφαινυλοβορονικού οξέος, παρουσία ως καταλύτη τετρακισ-τριφαινυλοφωσφινοπαλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] και ως βάσης NaHCO₃ και παρελήφθη το υποκατεστημένο παράγωγο **12**.



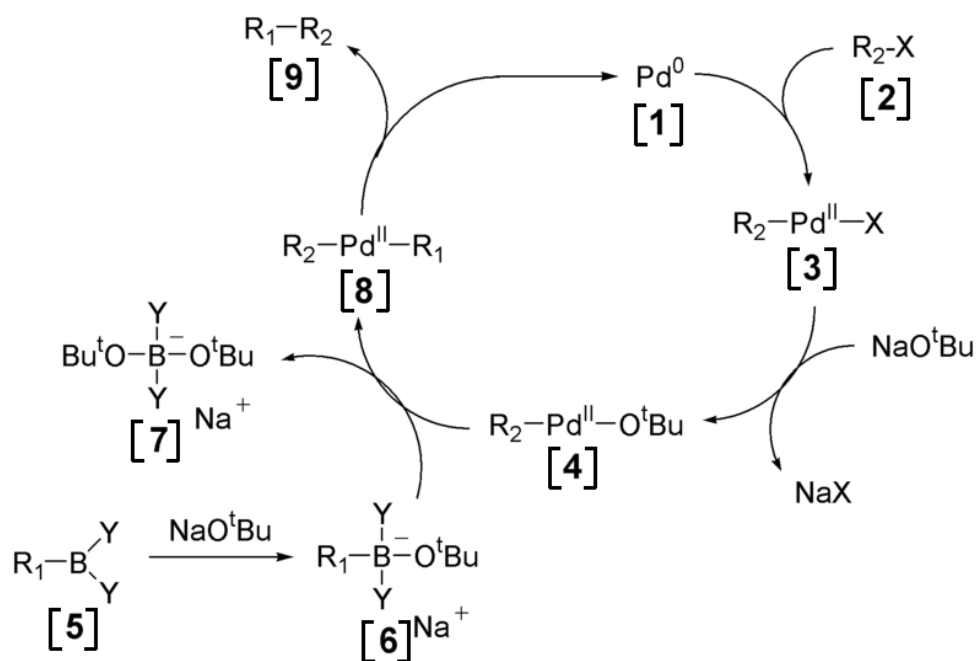
Σχήμα II.5 a) NIS, CH₃OH, r.t., b) KOH, CH₃I, acetone, r.t., c) 3-fluorophenylboronic acid, NaHCO₃, Pd(PPh₃)₄, Toluene/EtOH, Ar, 100 °C, 20h.

Η αντίδραση σύζευξης Suzuki αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1979 από τους A. Suzuki και N. Miyaura και αρχικά αφορούσε στη σύζευξη αλκενοβορονικών παραγώγων με αλκενυλοβρωμίδια, η οποία οδηγούσε στο σχηματισμό δεσμού άνθρακα-άνθρακα υπό την καταλυτική επίδραση του παλλαδίου [23]. Σήμερα η αντίδραση αυτή εφαρμόζεται σε ευρύτερο φάσμα περιπτώσεων, με τη χρήση μεγαλύτερης ποικιλίας αλογονιδίων, βορονικών παραγώγων αλλά και καταλυτών παλλαδίου (Σχήμα II.6) [24].



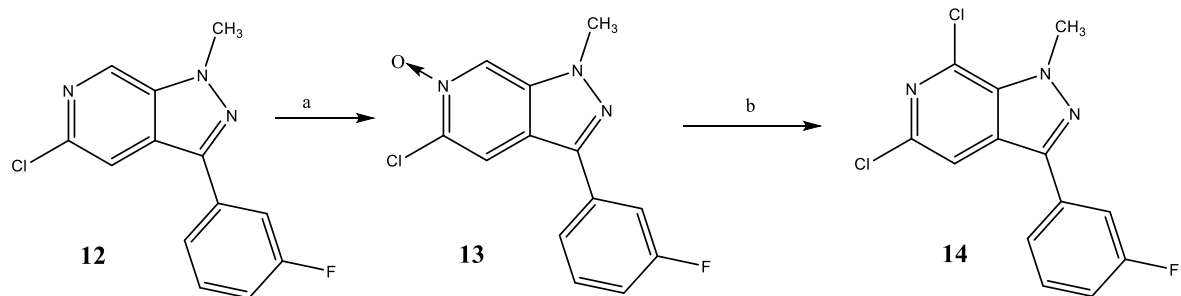
Σχήμα II.6 R : αλκυλο, OH, O-αλκυλο; R₁: αλκυλο, αλλυλο, αλκενυλο, αλκυνυλο, αρυλο; R₂: αλκυλο, αλκενυλο, αρυλο; X: Cl, Br, I, OTf; Βάση: Na₂CO₃, NaOH, K₃PO₄, M(O-αλκυλο).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης Suzuki περιγράφεται στο Σχήμα II.7. Το πρώτο στάδιο είναι η οξειδωτική προσθήκη του παλλαδίου [1] στο ιωδίδιο [2] και ο σχηματισμός του οργανοπαλλαδικού ενδιάμεσου [3]. Το στάδιο της οξειδωτικής προσθήκης αποτελεί συνήθως το καθοριστικό βήμα στον καταλυτικό κύκλο, ενώ η σχετική δραστηριότητα των αλογονιδίων ακολουθεί τη σειρά I>Br>>Cl. Στις αντιδράσεις σύζευξης Suzuki χρησιμοποιείται μια μεγάλη ποικιλία καταλυτών παλλαδίου(0) με πλέον χρησιμοποιούμενο το τετρακίς (τριφαινυλοφωσφίνο) παλλάδιο. Η αντίδραση του οργανοπαλλαδικού αλογονιδίου με βάση δίνει το ενδιάμεσο [4], το οποίο με αντίδραση τρανσμετάλλωσης με το βορονικό σύμπλοκο [6] δίνει το οργανοπαλλαδικό ενδιάμεσο [8]. Το τελευταίο υφίσταται αναγωγική απόσπαση του επιθυμητού προϊόντος σύζευξης [9], ενώ αναγεννάται και ο καταλύτης [1].



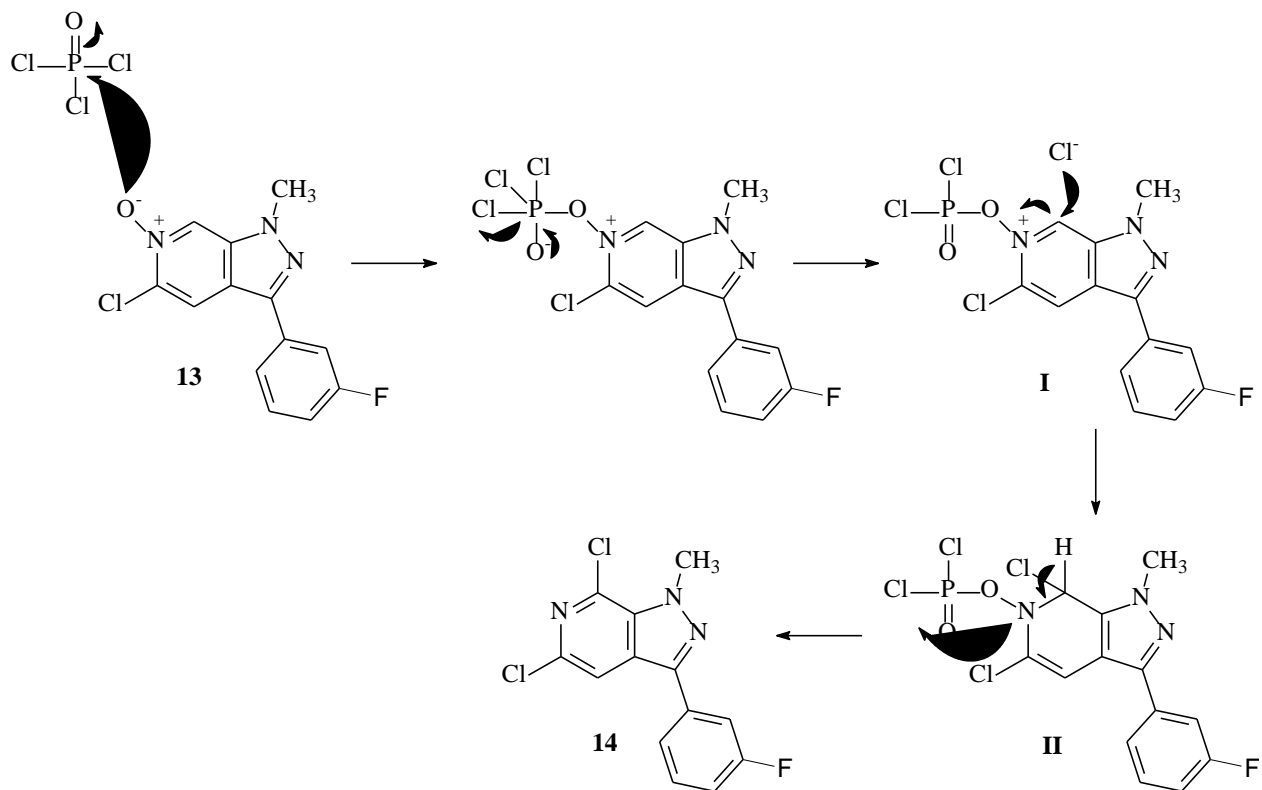
Σχήμα II.7 Ο καταλυτικός κύκλος της αντίδρασης σύζευξης Suzuki.

Κατόπιν, το παράγωγο **12** οξειδώθηκε με τη χρήση μ-χλωροϋπερβενζοϊκού οξέος (m-CPBA) προς το πυριдино-N-οξύδιο **13** (Σχήμα II.8). Ακολούθησε επίδραση οξυχλωριούχου φωσφόρου (POCl₃) επί του **13** και μέσω μετάθεσης του N-οξειδίου παρελήφθη το διχλωροπαράγωγο **14**.



Σχήμα II.8 a) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , r.t., 3 days, b) POCl_3 , THF dry, Ar, r.t. 18h.

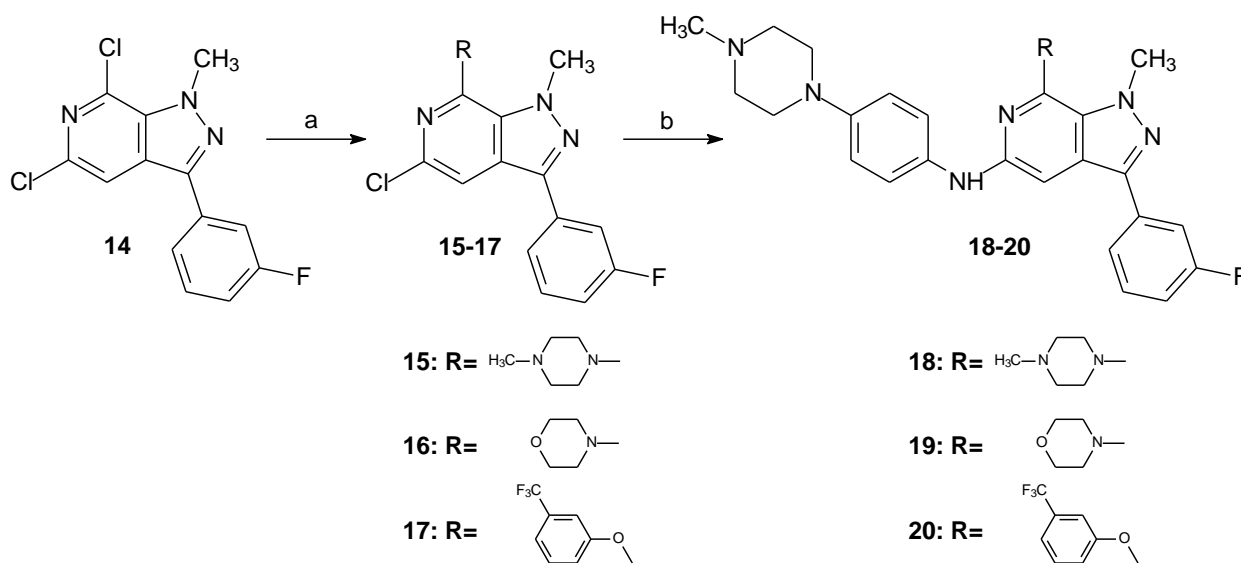
Στο Σχήμα II.9 φαίνεται ο μηχανισμός της μετάθεσης χλωρίου. Σύμφωνα με αυτόν, από την επίδραση του οξυχλωριούχου φωσφόρου επί του *N*-οξειδίου **13** σχηματίζεται το ενδιάμεσο άλας **I**, από το οποίο με επίδραση ανιόντος χλωρίου και ταυτόχρονης απόσπασης υδρογόνου από το ενδιάμεσο **II**, σχηματίζεται το επιθυμητό διχλωροπαράγωγο **14** [25].



Σχήμα II.9 Μηχανισμός της αντίδρασης μετάθεσης χλωρίου

II.1.4. Σύνθεση των 5,7-δισυποκατεστημένων-1-μεθυλο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 18-20.

Τα παραπάνω ανάλογα συντέθηκαν από το διχλωρίδιο **14**, από το οποίο με πυρηνόφιλη προσβολή μετά από επίδραση N-μεθυλοπιπεραζίνης, μορφολίνης ή 3-τριφθοροφαινυλοφαινοξειδίου ελήφθησαν τα 7-υποκατεστημένα ανάλογα **15-17** αντίστοιχα (Σχήμα II.10).



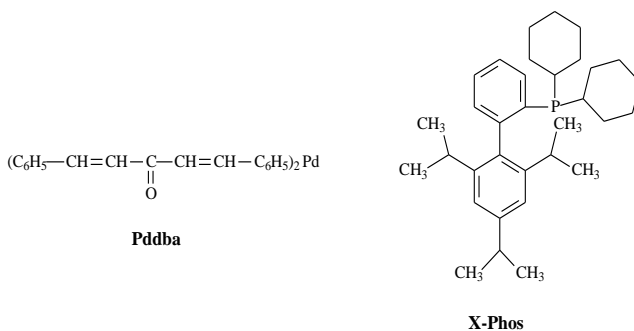
Σχήμα II.10. a) *N*-methyl-*N'*-(4-aminophenyl)piperazine, or morpholine, or 3-(trifluorophenyl)phenol/ K_2CO_3 , DMSO, b) $CsCO_3$, XPhos, $Pd_2(dba)_3$, toluene dry, Ar, reflux, 20h.

Ακολούθησε αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης του ατόμου χλωρίου της θέσης 5 των παραγώγων **15-17** από 4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλ)ανιλίνη, προς λήψη των μορίων-στόχων **18-20**. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με επίδραση της ανιλίνης επί αυτών, παρουσία ανθρακικού καυσίου και με τη χρήση ως καταλύτη του δις(διβενζυλιδενοακετονο)παλλαδίου [bis(dibenzylideneacetone)palladium, Pd(dba)₃] [26] και ως προσδέματος (ligand) του 2-δικυκλοεξυλοφωσφίνο-2',4',6'-τριισοπροπυλοδιφαινυλίου (2-dicyclohexylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphenyl, X-Phos, Σχήμα II.11) [27].

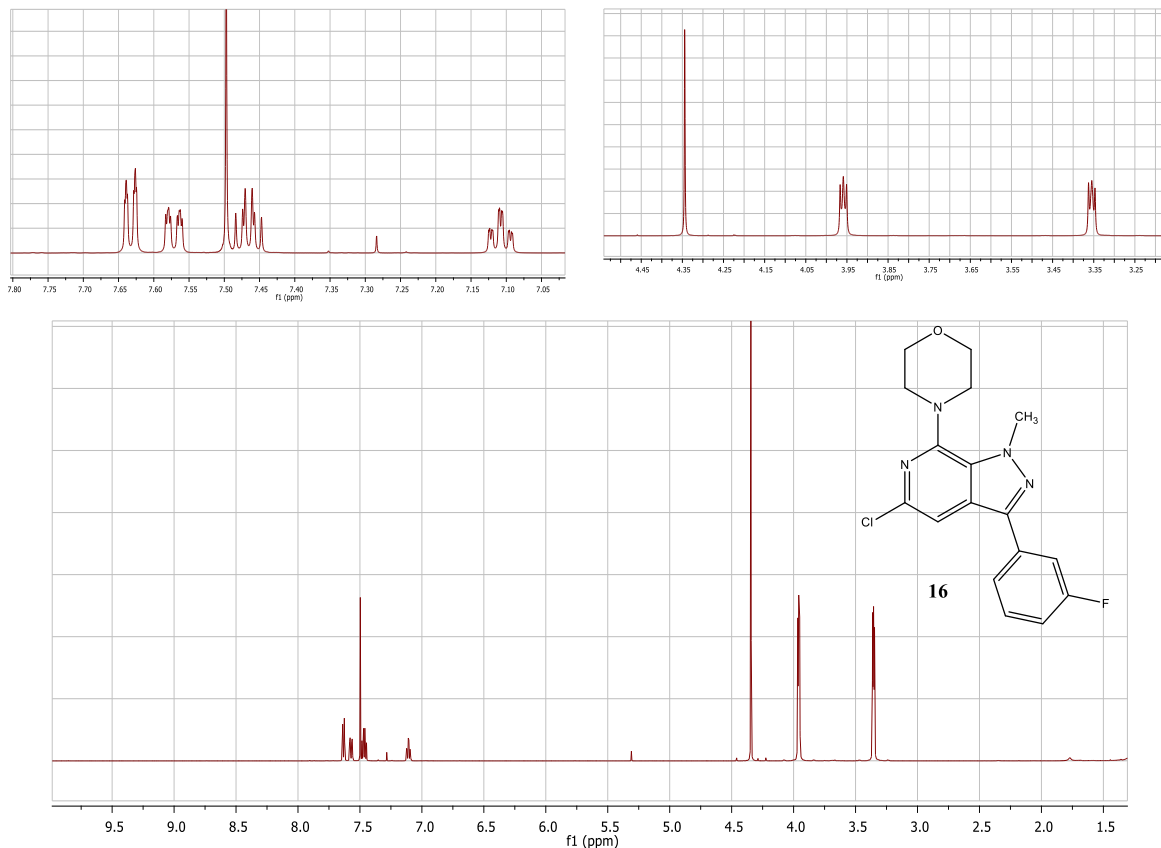
Στο σχήμα II.12 παρατίθεται το φάσμα πρωτονίου ¹H-NMR της 5-χλωρο-7-(μορφολιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (παράγωγο **16**). Στην αλειφατική περιοχή εμφανίζεται η κορυφή συντονισμού του μεθυλίου στα 4.34 ppm, ενώ τα πρωτόνια της

μορφολίνης εμφανίζονται με τη μορφή δύο τριπλών κορυφών στα 3.35 και 3.96 ppm, αντίστοιχα. Στην αρωματική περιοχή του φάσματος παρατηρούμε μία απλή κορυφή στα 7.50 ppm, που αντιστοιχεί στο H-4, ενώ είναι χαρακτηριστικές και οι τέσσερις πολλαπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα υδρογόνα της 3-φθοροφαίνυλο ομάδας.

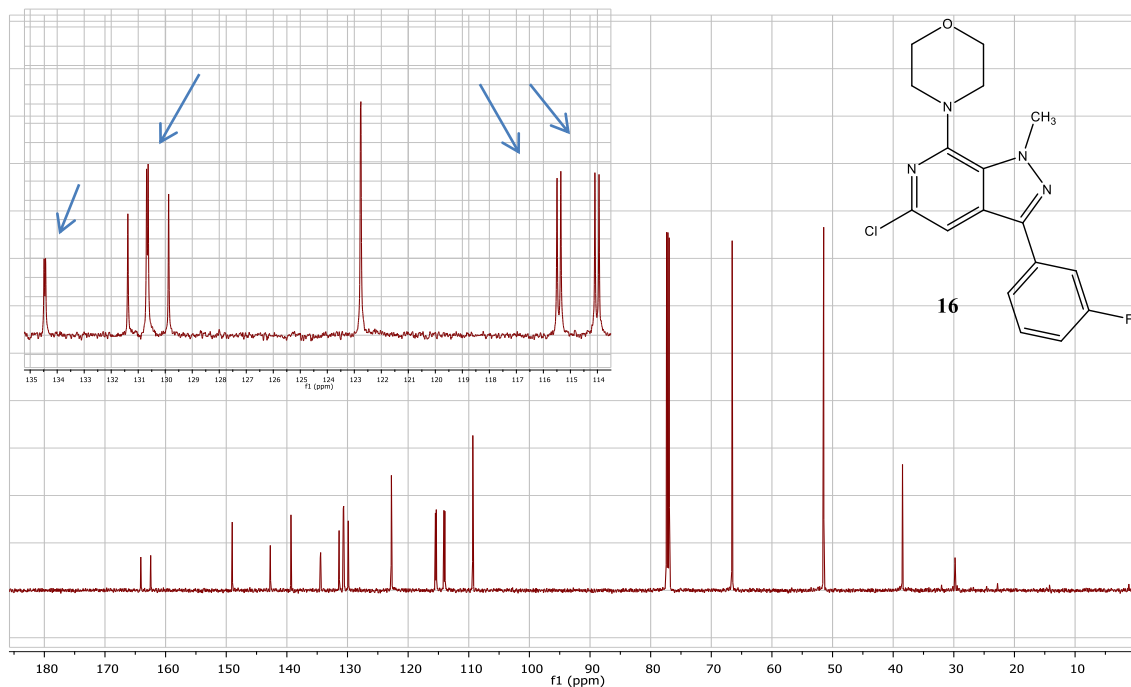
Στο σχήμα II.13 παρατίθεται το φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C-NMR}$ του παραγώγου **16** σε διαλύτη CDCl_3 . Στην αρωματική περιοχή του φάσματος είναι χαρακτηριστική η σχάση που προκαλείται στις κορυφές της 3-φθοροφαίνυλο ομάδας από την παρουσία του ατόμου φθορίου στον δακτύλιο. Έτσι, ο άνθρακας 3', που φέρει το φθόριο, είναι πολύ αποθωρακισμένος και σχάζει σε δύο συνιστώσες κορυφές, στα 162.5 και 164.1 ppm. Ανάλογες σχάσεις παρατηρούνται και στα 4 πρωτόνια που βρίσκονται σε ορθο και σε μετα θέση ως προς το φθόριο.



Σχήμα II.11 Οι δομές του καταλύτη του παλλαδίου *Pdoba* και του προσδέματος *X-Phos*.

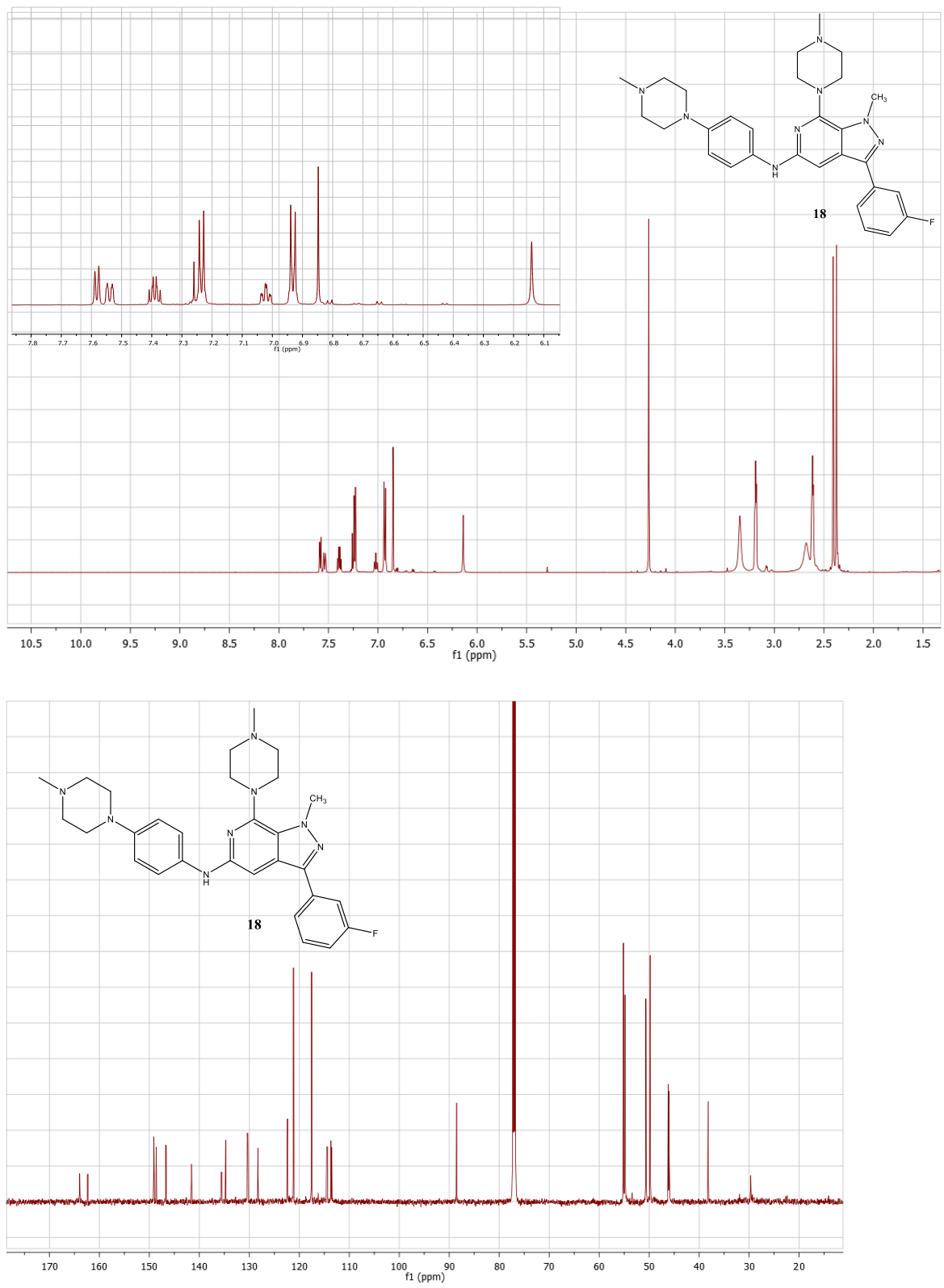


Σχήμα II.12 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του παραγώγου **16** σε διαλύτη CDCl_3 , και μεγέθυνση της αρωματικής και της αλειφατικής περιοχής αντίστοιχα.



Σχήμα II.13 Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του παραγώγου **16** σε διαλύτη CDCl_3 . Σε μεγέθυνση μέρος της αρωματικής περιοχής, όπου υποδεικνύονται οι σχάσεις των ατόμων άνθρακα στον 3-φθοροφαινυλο υποκαταστάτη.

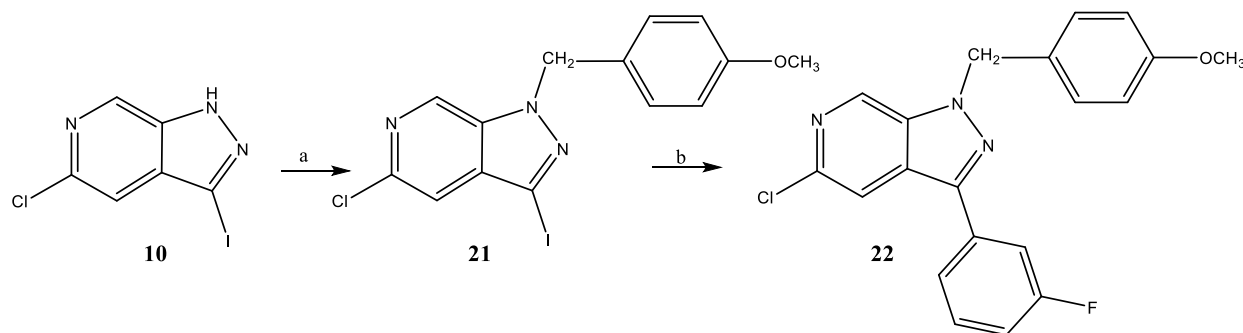
Στο σχήμα II.14 παρατίθενται τα φάσματα πρωτονίου $^1\text{H-NMR}$ και άνθρακα $^{13}\text{C-NMR}$ της 5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (παραγώγο **18**) σε διαλύτη CDCl_3 . Στο φάσμα πρωτονίου της ένωσης **18** είναι χαρακτηριστική η παρουσία δύο κορυφών συντονισμού στα 2.37 και στα 2.41 ppm που οφείλονται στα δύο μεθύλια των πιπεραζινικών ομάδων, ενώ στην αρωματική περιοχή του φάσματος είναι εμφανής η παρουσία του παρα υποκατεστημένου συστήματος της ανιλίνης στη θέση 5 του μορίου, με τη μορφή δύο διπλών κορυφών στα 6.93 και στα 7.23 ppm. Στο φάσμα άνθρακα της ένωσης **18** είναι πολύ χαρακτηριστική η θωράκιση του υδρογόνου H-4 της πυραζολοπυριδίνης, που συντονίζεται στα 88.5 ppm, λόγω του θετικού συζυγιακού φαινομένου από το άζωτο της ανιλίνης στη θέση 5, αλλά και από την παρουσία του αρωματικού ανιλινικού δακτυλίου που προκαλεί μαγνητική ανισοτροπία.



Σχήμα II.14 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ του παραγώγου **18** σε διαλύτη CDCl_3 .

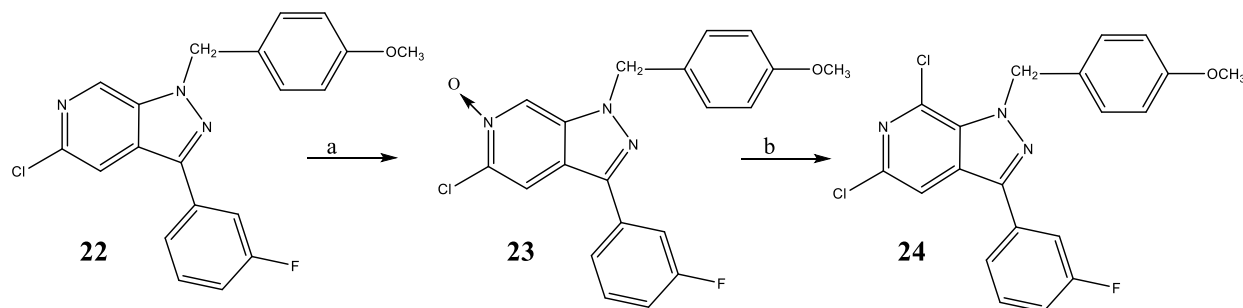
II.1.5. Σύνθεση της 5,7-διχλωρο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (**24**).

Το χλωρίδιο **22** (Σχήμα II.15) παρασκευάστηκε με μέθοδο ανάλογη αυτής που αναφέρθηκε για τη σύνθεση του παραγώγου **12**, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το ιωδίδιο **10**, επί του οποίου επέδρασε αρχικά 4-μεθοξυβενζυλοχλωρίδιο.



Σχήμα II.15. a) KOH, CH₃I, acetone, r.t., b) 3-fluorophenylboronic acid, NaHCO₃, Pd(PPh₃)₄, Toluene/EtOH (1/7.5), Ar, 100 °C, 20h.

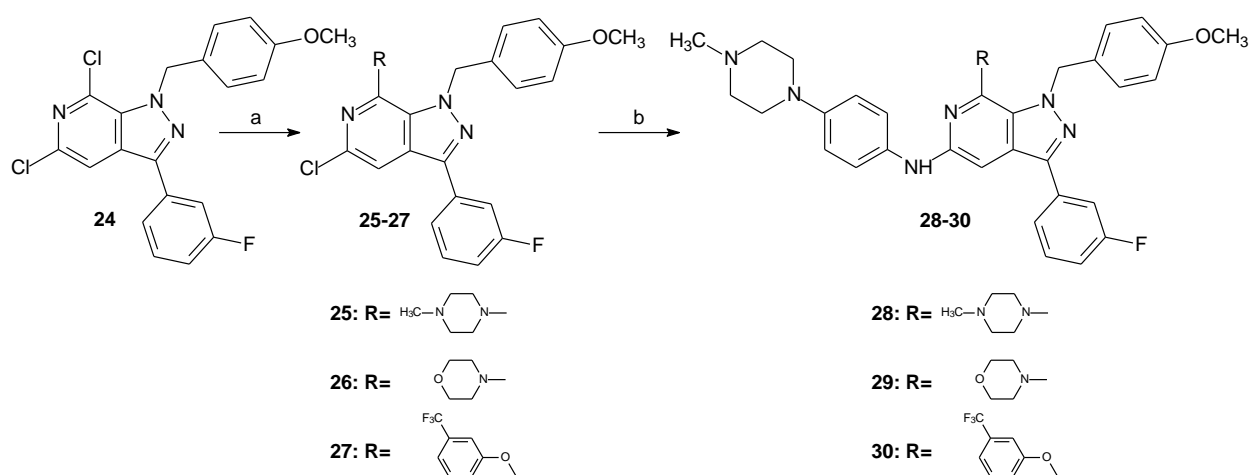
Κατόπιν, από το παράγωγο **22**, παρασκευάστηκε το διχλωρίδιο **24** (Σχήμα II.16) κατ' ανάλογο τρόπο με αυτόν που αναφέρθηκε κατά τη σύνθεση του αντίστοιχου παραγώγου **14**.



Σχήμα II.16. a) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, r.t., 3days, b) POCl₃, THF dry, Ar, r.t., 18h.

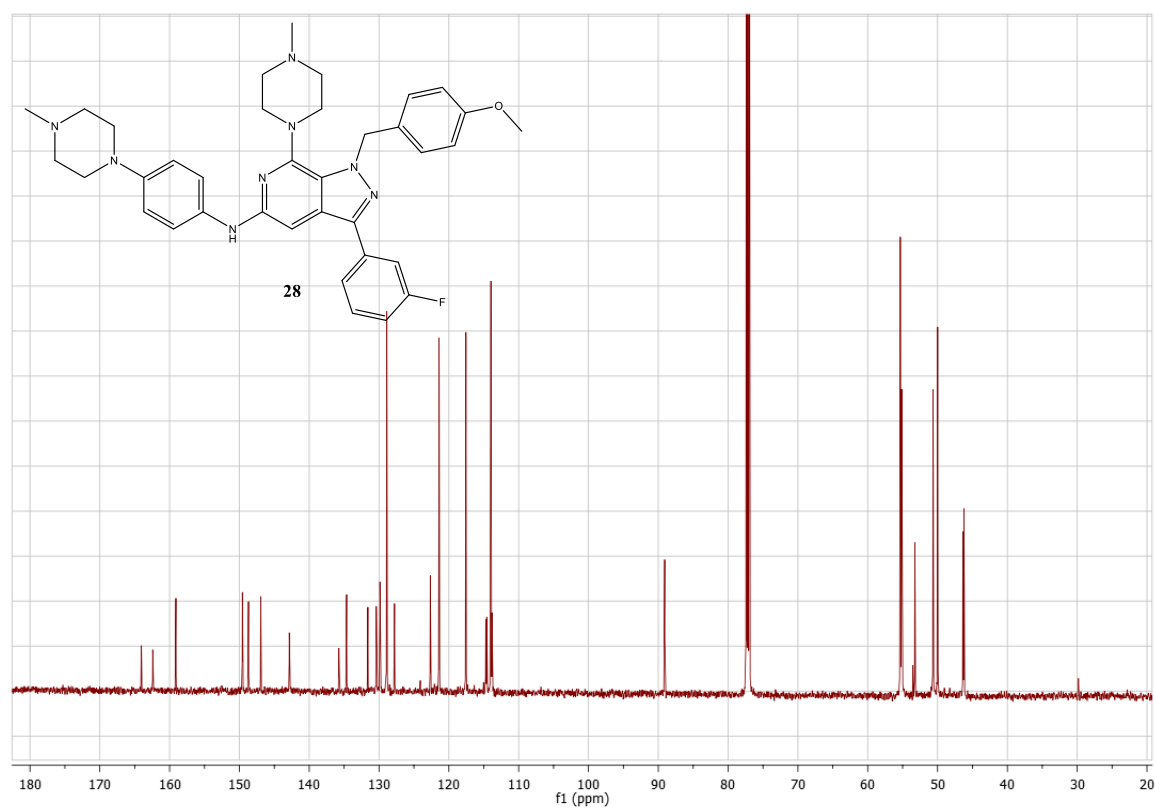
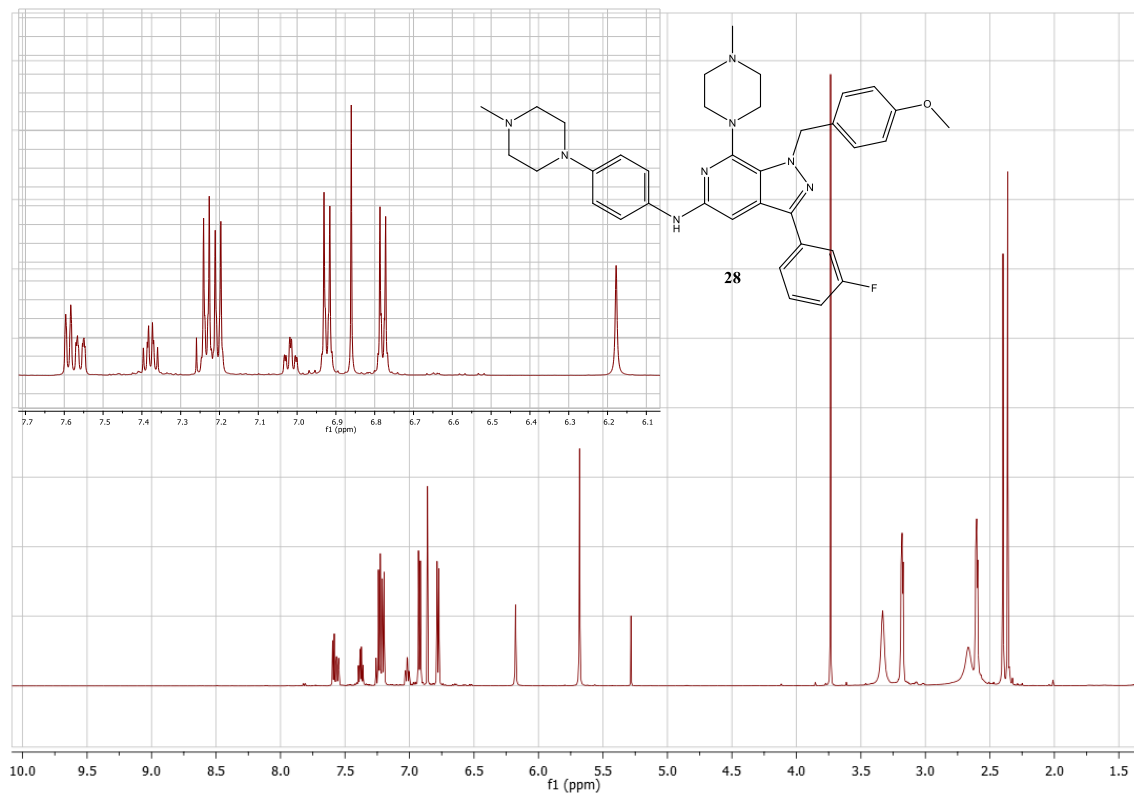
II.1.4. Σύνθεση των 5,7-δισυποκατεστημένων-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδινών 28-30.

Τα παραπάνω μόρια-στόχοι παρασκευάστηκαν από το διχλωρίδιο **24**, με τρόπο ανάλογο αυτού που παρουσιάστηκε κατά τη σύνθεση των αντίστοιχων παραγώγων **18-20**, όπως φαίνεται στο Σχήμα II.17.



Σχήμα II.17. a) *N*-methyl-*N'*-(4-aminophenyl)piperazine, or morpholine, or 3-(trifluorophenyl)phenol/NaH, DMSO, b) CsCO₃, XPhos, Pd₂(dba)₃, toluene dry, Ar, reflux, 20h.

Στο σχήμα II.18 παρατίθενται τα φάσματα πρωτονίου ¹H-NMR και άνθρακα ¹³C-NMR της 5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (παράγωγο **28**) σε διαλύτη CDCl₃. Στο φάσμα πρωτονίου της ένωσης **28** είναι χαρακτηριστική η παρουσία του μεθυλίου της μεθόξυ ομάδας με την μορφή μιας απλής κορυφής στα 3.73 ppm, του μεθυλενίου της π-μεθοξυβενζυλομάδας με τη μορφή επίσης μιας απλής κορυφής στα 5.68 ppm και των τεσσάρων διπλών κορυφών με ολοκλήρωση για δύο πρωτόνια η κάθε μια, που αντιστοιχούν στα δύο παρα συστήματα του μορίου, αυτό της π-μεθοξυβενζυλομάδας και αυτό της ανιλίνης στη θέση 5.



Σχήμα II.18 Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ του παραγώγου **28** σε διαλύτη CDCl_3 .

III) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

III.1. Γενικά πειραματικά στοιχεία

Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel 60 AC.C (SDS 35-70 μm). Η παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες Silica gel 60_{F254}. Για τη λήψη φασμάτων ¹H-NMR χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος Bruker Avance 400 στα 400 MHz, ενώ για τη λήψη φασμάτων ¹³C-NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων HMBC, HSQC και NOESY, χρησιμοποιήθηκαν φασματογράφοι Bruker AC200 στα 50 MHz και Bruker Avance 600 στα 151 MHz αντίστοιχα. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃), δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*₆). Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Buchi και δεν είναι διορθωμένα.

2-Αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (3).

Η 2-αμινο-4-μεθυλοπυριδίνη (1) (15 g, 0.14 mol) διαλύεται σε πυκνό θειικό οξύ (72 ml) υπό ψύξη. Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην υπό ψύξη το μίγμα θειικού-νιτρικού οξέος (10.50 ml από το κάθε οξύ) και το διάλυμα θερμαίνεται στους 60 °C για 20 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου, απόχυση του μίγματος σε πάγο και εξουδετέρωση με διάλυμα αμμωνίας 25% μέχρι pH 7-8. Κατόπιν, το μίγμα διηθείται υπό κενό για απαλλαγή από τα αμμωνιακά άλατα των οξέων που σχηματίστηκαν κατά την εξουδετέρωση και το μίγμα των δύο ισομερών κατεργάζεται με θερμό διχλωρομεθάνιο, το οποίο διαλύει το επιθυμητό 3-νιτροπαράγωγο 2, ενώ παραμένει αδιάλυτο το 5-νιτρο-παραίγωγο 3. Με διήθηση υπό κενό παραλαμβάνονται το ισομερές 3 (59%) και το παράγωγο 2 (25%).

Μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης silica gel, με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 4 / 6, διαχωρίζονται τα νιτροπαραίγωγα.

2-Αμινο-4-μεθυλο-3-νιτροπυριδίνη (2).

Απόδοση: 25%. Στ: 134-136 °C (EtOAc), [28] ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 6.27 (brs, 2H, D₂O exchang., NH₂), 6.58 (d, 1H, H-5, J= 4.9 Hz), 8.07 (d, 1H, H-6, J= 4.9 Hz).

2-Αμινο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (3).

Απόδοση: 47%. Στ: 220 °C (EtOAc), [28]. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.58 (s, 3H, CH₃), 5.1 (brs, 2H, D₂O exchang., NH₂), 6.29 (s, 1H, H-3), 8.90 (s, 1H, H-6).

4-Μεθυλο-5-νιτροπυριδιν-2(1H)-όνη (4) .

Σε διάλυμα της νιτροπυριδίνης **3** (5 g, 32.68 mmol) εντός θεικού οξέος (96%, 8.60 ml) και νερού (86 ml) προστίθεται ταχέως στους 10 °C κορεσμένο διάλυμα νιτρώδους νατρίου (5 g, 72.46 mmol σε 7 ml νερό). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά μέχρι το σημείο βρασμού, ώστε να απομακρυνθούν οι νιτρώδεις ατμοί. Μετά από ψύξη καθιζάνει το στερεό προϊόν **4**, το οποίο διηθείται, εκπλένεται και ξηραίνεται υπεράνω πεντοξειδίου του φωσφόρου (4.61 g, 91.5) σε απόδοση 89%. Στ: 189-190 °C (EtOH) [29]. ¹H-NMR (DMSO- *d*₆) δ 2.42 (s, 3H, CH₃), 6.31 (s, 1H, H-3), 8.56 (s, 1H, H-6), 12.50 (brs, 1H, D₂O exchang., NH).

2-Χλωρο-4-μεθυλο-5-νιτροπυριδίνη (5).

Διάλυμα της πυριδινόνης **4** (4.61 g, 29.93 mmol) εντός οξυχλωριούχου φωσφόρου (14.22 ml) θερμαίνεται στους 110 °C για 3 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση υπό κενό μέχρι πλήρους εκδίωξης του οξυχλωριούχου φωσφόρου, προσθήκη μικρής ποσότητας πάγου και διήθηση υπό κενό του στερεού προϊόντος **5** (4.56 g, 88%). %. Στ: 40-42 °C [30]. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.65 (s, 3H, CH₃), 7.35 (s, 1H, H-3), 8.98 (s, 1H, H-6).

2-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-5-αμίνη (6).

Σε διάλυμα του νιτροπαραγώγου **5** (3.25 g, 18.84 mmol) εντός πυκνού υδροχλωρικού οξέος (48.5 ml) προσθέεται στους 0 °C διχλωριούχος κασσίτερος (14.6 g) και το μίγμα θερμαίνεται στους 55 °C για 15 λεπτά. Το περιεχόμενο της φιάλης, αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, αποχύνεται σε πάγο. Ακολουθεί εξουδετέρωση με ανθρακικό νάτριο (pH= 11), εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο οπότε λαμβάνεται καθαρή η αμίνη **6** (2.5 g, 94 %) ως υποκίτρινο στερεό. Στ: 69-71 °C (Et₂O) [31]. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.09 (s, 3H, CH₃), 3.84 (brs, 2H, D₂O exchang., NH₂), 6.93 (s, 1H, H-3), 7.71 (s, 1H, H-6).

N-(2-Χλωρο-4-μεθυλοπυριδιν-5-υλ)ακεταμίδιο (7).

Στην αμίνη **7** (4 g, 28.07 mmol) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (4 ml) και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 72 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται αιθέρας και σχηματίζεται το στερεό προϊόν **8**, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση (5.14 g, 99%) %. Στ: 155-6 °C. [31]. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.20 (s, 3H, CH₃CO), 2.24 (s, 3H, CH₃), 7.17 (s, 1H, H-3), 7.37 (brs, 1H, D₂O exchang., NH), 8.54 (s, 1H, H-6).

1-Ακετυλο-5-χλωροπυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (8).

Σε διάλυμα του ακεταμιδίου **8** (7.52 g, 40.75 mmol) εντός άνυδρου τολουολίου (60 ml) προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό αργό, οξικό κάλιο (5.99 g) και το μίγμα θερμαίνεται στους 80 °C. Στη θερμοκρασία αυτή προστίθεται νιτρώδες ισοαμύλιο (31.45 ml, 244.50 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται σε βρασμό για 12 ώρες. Ακολουθεί επαναφορά του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, διήθηση υπό κενό (απομάκρυνση οξικού καλίου) και συμπύκνωση του διηθήματος. Στη συνέχεια, το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση κυκλοεξάνιο-οξικό αιθυλεστέρα 8-2, 5-5 και λαμβάνεται το παράγωγο **8**. Στ: 132-3°C [31]. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2.79 (s, 3H, COCH₃), 7.67 (s, 1H, H-4), 8.15 (s, 1H, H-3), 9.52 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 22.62, 114.88, 133.84, 134.73, 137.86, 138.01, 144.69, 170.37.

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

Σε διάλυμα του **8** (3g, 15.35 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (15 ml) στους 0 °C διαβιβάζεται αέρια αμμωνία για 10 λεπτά. Ακολούθως η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίζεται υπό κενό, το υπόλειμμα που λαμβάνεται προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση μίγμα κυκλοεξανίου / οξικού αιθυλεστέρα 1 / 1 παρέχοντας παράγωγο **9** (96%). Στ: 185 °C [31]. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.86 (s, 1H, H-4), 8.20 (s, 1H, H-3), 8.88 (s, 1H, H-7), 13.83 (brs, 1H, D₂O exchang., NH). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 114.17, 129.34, 132.79, 134.68, 136.38, 139.15.

5-Χλωρο-3-ιωδο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (10).

Σε διάλυμα της χλωροπυριδίνης **9** (1.4 g, 9.12 mmol) εντός άνυδρης μεθανόλης (70 ml) και υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται 3.14 g (13.96 mmol) του *N*-ιωδοσουκινιμιδίου και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2.5 ώρες. Ακολούθως ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση, το υπόλειμμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με υδατικό διάλυμα θειοθειικού νατρίου 5%. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με θειικό νάτριο και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα 60 / 40 οπότε λαμβάνονται 2.1 g του ιωδοπαραγώγου **10**. Απόδοση 82 %. Λευκό στερεό. Σ.τ. 225 °C (EtOAc). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 7.52 (s, 1H, H-4), 8.87 (s, 1H, H-7), 14.23 (brs, 1H, D₂O exchang., NH). ¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 92.12, 113.78, 133.60, 135.20, 136.94, 139.88.

5-χλωρο-3-ιωδο-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (11).

Σε διάλυμα της ιωδοπυραζολοπυριδίνης **10** (710 mg, 2.54 mmol) εντός 20 ml ακετόνης και υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται, στους 0 °C, 213 mg (3.80 mmol) καυστικού καλίου και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στη θερμοκρασία αυτή για 20 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 0.158 ml (2.54 mmol) μεθυλοϊωδιδίου και η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, στο υπόλειμμα προστίθεται νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με θειϊκό νάτριο και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο / οξικό αιθυλεστέρα 95 / 5 οπότε λαμβάνονται 500 mg της μεθυλιωμένης πυραζολοπυριδίνης **11**. Απόδοση 67%. Λευκό στερεό. Σ.τ. 144 °C (EtOAc).

¹H-NMR (CDCl₃) δ 4.18 (s, 3H, CH₃), 7.33 (s, 1H, H-4), 8.64 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 36.99, 88.31, 114.56, 133.11, 135.09, 136.85, 141.43.

5-χλωρο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (12)

Σε διάλυμα του **11** (950mg, 3,24 mmol) εντός μίγματος τολουολίου/αιθανόλης/νερού (80/12/4 ml) προστίθεται 3-φθοροφαινυλοβορονικό οξύ (452 mg, 3,24 mmol), Pd(PPh₃)₄ (190 mg) και NaHCO₃ (816 mg, 9,71 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 30 ώρες. Ακολούθως ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται. Η οργανική φάση συμπυκνώνεται υπό κενό, προσροφάται σε silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 99-1 έως 98-2, οπότε λαμβάνονται 770 mg (87%) του **12**, ως λευκό στερεό. Σ.τ. 140-141 °C (CH₂Cl₂/Et₂O). ¹H-NMR (CDCl₃) δ 4.18 (s, 3H, CH₃), 7.80 (s, 1H, H-4), 8.64 (s, 1H, H-7), 7.15 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.5 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.57 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.63 (s, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 36.99, 88.31, 114.56, 133.11, 135.09, 136.85, 141.43, 114,09, 115,7, 130,78, 130,75, 134,35, 163,3.

N^o-οξείδιο της 5-χλωρο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνης (13)

Σε διάλυμα του **12** (730 mg, 2,8 mmol) εντός CH₂Cl₂ (15 ml) προστίθεται m-CPBA (757 mg, 3,01 mmol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για τρεις ημέρες. Ακολούθως ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται. Η οργανική φάση συλλέγεται και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο / μεθανολη σε αναλογία 99/1 έως 96/4, οπότε λαμβάνονται 380 mg (52%) του **13**, ως μπεζ στερεό. Σ.τ. 247-248 °C (EtOAc). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (s, 3H, CH₃), 7.16 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.50 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.57 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.63 (m, 1H, fluorophenyl-H6), 8.08 (s, 1H, H-4), 8.85 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR

(50 MHz, CDCl₃) δ 36.99, 88.31, 114.56, 133.11, 135.09, 136.85, 141.43, 114,09, 115,7 , 130,78 , 130,75 , 134,35 . 163,3.

5,7-διχλωρο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (14).

Σε διάλυμα του **13** (390 mg, 0.71 mmol), εντός THF (14 ml) προστίθεται υπό ψύξη και ατμόσφαιρα αργού POCl₃ (0.65 ml, 7.05 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες. Ακολούθως ο διαλύτης συμπυκνώνεται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται. Το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξανιο / οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 7/3 έως 6/4, οπότε λαμβάνονται 380 mg (91%) του **14**, ως ελαφρώς υποκίτρινο στερεό. Σ.τ. 123-125 °C (CH₂Cl₂/Et₂O). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.47 (s, 3H, CH₃), 7.13 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.48 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.56 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.62 (m, 1H, fluorophenyl-H6), 7.79 (s, 1H, H-4). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 39.49, 114.10, 114.14, 114.30, 115.87, 116.01, 122.89, 130.35, 130.85, 130.91, 133.28, 133.69, 133.74, 134.50, 139.46, 142.20, 162.52, 164.16.

5-χλωρο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (15)

Διάλυμα του **14** (70 mg, 0,23 mmol) εντός N-μεθυλοπιπεραζίνης(1 ml) θερμαίνεται στους 155°C για 30 λεπτά. Κατόπιν προστίθεται νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο / μεθανολη σε αναλογία 99/1 έως 97/3, οπότε λαμβάνονται 80 mg (94%) του **15** ως μπεζ στερεό. Σ.τ. 140-141 °C (CH₂Cl₂/ n-pentane). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.38 (s, 3H, CH₃-piperazine), 2.65 (br s, 4H, 3,5-piperazine-H), 3.35 (br s, 4H, 2,6-piperazine H), 4.29 (s, 3H, CH₃), 7.09 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7,45 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.48 (s, 1H, H-4), 7.52 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.59 (m, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 38.53, 46.27, 50.87, 54.69, 108.75, 113.91, 114.06, 115.26, 115.40, 122.74, 129.69, 130.59, 130.65, 131.41, 134.54, 134.59, 139.29, 142.62, 142.63, 149.22, 162.45, 164.08.

5-χλωρο-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (16)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **15**. Απόδοση 86%. Σ.τ. 176-177 °C (CH₂Cl₂/Et₂O). Μπεζ στερεό. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.33 (m, 4H, 3,5-morpholine H), 3.93 (m, 4H, 2,6-morpholine H), 4.32 (s, 3H, CH₃), 7.08 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.44 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.47 (s, 1H, H-4), 7.55 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.61 (m, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 38.47, 51.47, 66.56, 109.34, 113.95, 114.10, 115.36, 115.50, 122.77, 129.88, 130.64, 130.69, 131.39, 134.44, 134.49, 139.33, 142.74, 149.02, 162.47, 164.10.

5-χλωρο-7-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλοξυ]-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (17)

Σε διάλυμα 3-(τριφθορομεθυλο)φαινόλης (50 mg, 0,17 mmol) εντός ανύδρου DMSO (3,5 ml) προστίθεται NaH (14 mg, 0,34 mmol), το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, για 40 λεπτά και στο τέλος αυτού του χρόνου προστίθεται το παράγωγο **14**. Το μίγμα κατόπιν θερμαίνεται στους 120-125 °C για 20 ώρες και μετά από προσθήκη νερού, εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Ο διαλύτης ξηραίνεται, αποστάζεται υπό κενό και το υπόλειμμα προσροφάται σε μικρή ποσότητα silica gel και φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξανίο / διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 8/2 έως 5/5, οπότε λαμβάνονται 40 mg (56 %) του **17**, ως λευκό στερεό. Σ.τ. 149 °C (Ether). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 4.44 (s, 3H, CH₃), 7.12 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.47 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.53-7.62 (m, 6H, 4 x CF₃-phenyl-H, fluorophenyl-H2, H-4), 7.66 (m, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 39.34, 110.18, 113.95, 114.10, 115.49, 115.63, 118.76, 118.78, 121.03, 122.53, 122.54, 122.73, 122.84, 124.65, 125.17, 126.45, 127.47, 130.37, 130.67, 130.74, 130.79, 132.05, 132.26, 132.48, 132.70, 134.35, 134.40, 137.66, 142.31, 147.63, 152.63, 162.55, 164.18.

5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1H-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (18)

Σε διάλυμα του **15** (22 mg, 0,061 mmol) εντός άνυδρου τολουολίου (6ml) προστίθεται υπό αργό N-μεθυλο-N'(4-αμινο-φαινυλο)-πιπεραζίνη (24 mg, 0,1098 mmol), ανθρακικό καίσιο (100 mg, 0,305 mmol), 2-δικυκλοεξυλοφωσφινό-2',4',6'-τρισοπροπυλοδιφαινύλιο (Xphos, 2 mg, 0,00305 mmol) και δις(διβενζυλιδενοσακετονο)παλλάδιο (Pd(dba)₂, 4 mg, 0,0030 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται σε βρασμό για 18 ώρες. Κατόπιν, προστίθεται νερό και εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται (Na₂SO₄) και συμπυκνώνεται. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης silica gel με κινητή φάση διχλωρομεθάνιο – μεθανόλη 95-15 έως 80-20 και λαμβάνεται το παράγωγο **18** (20 mg ως λαδι, αποδοχή 65%). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.37 (s, 3H, anilino*pip*erazine CH₃), 2.41 (s, 3H, pyridino*pip*erazine CH₃), 2.61 (m, 4H, 3,5 anilino*pip*erazine H), 2.68 (brs, 4H, 3,5 pyridino*pip*erazine H), 3.19 (m, 4H, 2,6 anilino*pip*erazine H), 3.35 (brs, 4H, 2,6 pyridino*pip*erazine H), 4.27 (s, 3H, CH₃), 6.14 (br s, 1H, NH, D₂O exch.), 6.85 (s, 1H, H-4), 6.93 (d, 2H, 3,5/aniline H, J= 6.95 Hz), 7.02 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.23 (d, 2H, 2,6/aniline H, J= 6.95 Hz), 7.39 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.54 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.58 (m, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 38.33, 46.16, 46.32, 49.95, 50.80, 54.98, 55.30, 88.66, 113.65, 113.80, 114.50, 114.64, 117.68, 121.31, 122.51, 128.40, 130.42, 130.48, 130.52, 134.86, 135.70, 135.75, 141.70, 146.83, 148.77, 149.23, 162.48, 164.10.

5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-(μορφολιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (19)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **18**. Απόδοση 69%. 60mg ως λαδι. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 2,37 (s, 3H, piperazine-CH₃), 2.61 (m, 4H, 3,5 piperazine H), 3.23 (m, 4H, 2,6 piperazine H), 3.17 (m, 4H, 3,5 morpholine H), 3.79 (m, 4H, 2,6 morpholine H), 4.33 (s, 3H, CH₃), 7.12 (s, 1H, C-4), 6,10 (s, 1H, -NH), 6.93 (d, 2H, J=6.86, 3,5 phenyl H), 7.17 (d, 2H, J=7.16, 2,6 phenyl H), 7.02 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.37 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.52 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.57 (s, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 38.16, 46.20, 49.54, 51.24, 55.12, 66.39, 99.89, 113.78, 114.69, 117.00, 122.60, 127.64, 129.18, 130.44, 130.22, 135.39, 138.87, 142.47, 147.72, 148.54, 150.42, 163.28.

5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλοξυ]-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-μεθυλο-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (20) :

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **18**. Απόδοση 20 %. 8mg ως λαδι. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.37 (s, 3H, piperazine-CH₃), 2.62 (m, 4H, 3,5 anilino*piperazine* H), 3.18 (m, 4H, 2,6 anilino*piperazine* H), 4.38 (s, 3H, CH₃), 5.96 (br s, 1H, NH, D₂O exch.), 6.83-6.87 (m, 3H, 3,5/aniline H, H-4), 7.04 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.10 (d, 2H, 2,6/aniline H, J= 6.95 Hz), 7.41 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.50 (m, 1H, CF₃-pheny-H), 7.53-7.62 (m, 5H, 3 x CF₃-pheny-H, fluorophenyl-H2, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 39.11, 46.08, 49.78, 55.21, 88.80, 113.61, 113.76, 114.61, 114.75, 117.57, 119.28, 119.30, 121.54, 122.06, 122.08, 122.43, 122.95, 124.08, 124.75, 125.69, 130.24, 130.51, 130.56, 131.85, 131.93, 132.15, 132.37, 132.58, 134.08, 135.54, 135.59, 141.03, 147.07, 147.87, 148.48, 153.30, 162.52, 164.15.

5-Χλωρο-3-ιωδο-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1*H*-πυραζολο[3,4-*c*]πυριδίνη (21).

Σε διάλυμα της ιωδοπυραζολοπυριδίνης **10** (790 mg, 2.83 mmol) εντός 15 ml άνυδρου τετραϋδροφουρανίου και υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται 147 mg (3.68 mmol) νατριοϋδριδίου (60 % εναιώρημα σε παραφινέλαιο) στους 0 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, ακολούθως ψύχεται εκ νέου στους 0 °C όπου προστίθενται 0.384 ml (2.83 mmol) του 4-μεθοξυβενζυλοχλωριδίου. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 ώρες οπότε η αντίδραση ολοκληρώνεται. Στην φιάλη προστίθεται 0.5 ml νερού, οι διαλύτες απομακρύνονται υπό ελαττωμένη πίεση και το υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με θειικό νάτριο και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα φέρεται σε χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση κυκλοεξάνιο / οξικό αιθυλεστέρα 60 / 40 οπότε και λαμβάνονται 780 mg του παραγώγου **21**. Απόδοση 69 %. Λευκό στερεό. Σ.τ. 126-7 °C (EtOAc). ¹H-NMR (CDCl₃) δ 3.77 (s, 3H, OCH₃), 5.59 (s, 2H, CH₂), 6.85 (d, 2H, 3,5/PMB, J=8.53 Hz), 7.22 (d, 2H, 2,6/PMB, J=8.53 Hz), 7.90 (s, 1H, H-4), 8.51 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (50 MHz,

CDCl₃) δ 54.45 , 55.31 , 88.94 , 114.42 , 122,67 , 126.89 , 129.18 , 133.59 , 135.61 , 136.19 , 141.45 , 159.77.

5-Χλωρο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (22).

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **12**. Απόδοση 96 %. Σ.τ. 140-141 °C (Λευκό στερεό, CH₂Cl₂/Et₂O). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.78 (s, 3H, OCH₃), 5.64 (s, 2H, CH₂), 6.87 (d, 2H, 3,5/PMB, J=6.86 Hz), 7.14 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.26 (d, 2H, 2,6/PMB, J=6.86 Hz), 7.49 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.66 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.71 (m, 1H, fluorophenyl-H6), 7.88 (s, 1H, H-4), 8.61 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 54.12, 55.44, 114.03, 114.18, 114.58, 115.59, 115.73, 122.79, 127.36, 128.73, 129.18, 130.75, 130.80, 133.83, 134.31, 134.36, 136.98, 141.85, 142.12, 159.90, 162.54, 164.17.

N⁶-οξειδίο της 5-χλωρο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνης (23)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **13**. Απόδοση 48 %. Σ.τ. 200-201°C (CH₂Cl₂). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.82 (s, 3H, OCH₃), 5.54 (s, 2H, CH₂), 6.91 (d, 2H, 3,5/PMB, J= 6.91 Hz), 7.20 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.28 (d, 2H, 2,6/PMB, J= 6.91 Hz), 7.54 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.64 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.69 (m, 1H, fluorophenyl-H6), 8.08 (s, 1H, H-4), 8.68 (s, 1H, H-7).

5,7-διχλωρο-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (24).

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **14**. Απόδοση 95%. Σ.τ. 171,8 -172 °C (Λευκό στερεό, EtOAc). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.76 (s, 3H, OCH₃), 5.96 (s, 2H, CH₂), 6.85 (d, 2H, 3,5/PMB, J= 6.86 Hz), 7.15 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.25 (d, 2H, 2,6/PMB, J= 6.86 Hz), 7.50 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.61 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.66 (m, 1H, fluorophenyl-H6), 7.82 (s, 1H, H-4). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 54.33, 55.39, 114.16, 114.31, 114.45, 115.94, 116.08, 123.02, 128.72, 128.84, 130.82, 130.85, 130.88, 132.91, 133.70, 133.76, 133.98, 139.60, 142.89, 159.59, 162.50, 164.14.

5-χλωρο-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (25)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **15**. Απόδοση 94,2% , 120 mg ως λάδι . ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.39 (s, 3H, CH₃ piperazine), 2.66 (brs, 4H, 3,5-piperazine H), 3.37 (brs, 4H, 2,6-piperazine H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.73 (s, 2H, CH₂), 6.79 (d, 2H, 3,5/PMB, J= 6.80 Hz), 7.09 (m ,1H, fluorophenyl-H4), 7.19 (d, 2H, 2,6/PMB, J= 6.80 Hz), 7.44 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.48 (s, 1H, H-4), 7.58 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.63 (m, 1H,

fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 46.27, 50.63, 53.45, 54.78, 55.33, 109.18, 114.12, 114.14, 114.29, 115.40, 115.54, 122.93, 128.88, 129.10, 130.57, 130.63, 130.80, 130.99, 134.55, 134.61, 139.64, 143.79, 149.16, 159.30, 162.45, 164.08.

5-χλωρο-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (26)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **15**. Απόδοση 80%. 90mg ως λάδι. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.31 (m, 4H, 3,5-morpholine H), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (m, 4H, 2,6-morpholine H), 5.76 (s, 2H, CH₂), 6.80 (d, 2H, 3,5/PMB, J= 6.80 Hz), 7.09 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.18 (d, 2H, 2,6/PMB, J= 6.80 Hz), 7.44 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.54 (s, 1H, H-4), 7.60 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.65 (m, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 51.23, 53.55, 55.35, 66.65, 109.77, 114.20, 114.31, 115.49, 115.63, 122.96, 128.62, 129.03, 130.62, 130.68, 130.91, 131.03, 134.45, 134.50, 139.68, 143.82, 148.99, 159.33, 162.47, 164.10.

5-χλωρο-7-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλοξυ]-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (27)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **17**. Απόδοση 50%. 25mg Λευκό στερεό. Σ.τ. 148°C (EtOAc). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 3.78 (s, 3H, OCH₃), 5.87 (s, 2H, CH₂), 6.84 (d, 2H, 3,5/PMB, J= 6.83 Hz), 7.14 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.25 (d, 2H, 2,6/PMB, J= 6.83 Hz), 7.39 (s, 1H, CF₃-phenyl-H), 7.43 (m, 1H, CF₃-phenyl-H), 7.51 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.55-7.62 (m, 3H, 2 x CF₃-phenyl-H, H-4), 7.67 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.72 (m, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 55.38, 55.49, 110.22, 114.11, 114.25, 115.54, 115.68, 118.85, 118.87, 121.01, 122.56, 122.58, 122.86, 124.62, 125.35, 126.43, 126.80, 129.04, 129.09, 130.36, 130.72, 130.78, 131.27, 132.03, 132.24, 132.46, 132.68, 134.41, 134.47, 137.93, 142.70, 147.58, 152.58, 159.64, 162.55, 164.18.

5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (28)

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **18**. Απόδοση 48 %. 45mg ως λάδι. ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 2.36 (s, 3H, anilino*pip*erazine CH₃), 2.40 (s, 3H, pyridino*pip*erazine CH₃), 2.60 (m, 4H, 3,5 anilino*pip*erazine H), 2.67 (brs, 4H, 3,5 pyridino*pip*erazine H), 3.18 (m, 4H, 2,6 anilino*pip*erazine H), 3.33 (brs, 4H, 2,6 pyridino*pip*erazine H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.69 (s, 2H, CH₂), 6.18 (br s, 1H, NH, D₂O exch.), 6.78 (d, 2H, 3,5/PMB, J= 6.78 Hz), 6.86 (s, 1H, H-4), 6.93 (d, 2H, 3,5/aniline H, J= 6.92 Hz), 7.02 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.20 (d, 2H, 2,6/PMB, J= 6.78 Hz), 7.24 (d, 2H, 2,6/aniline H, J= 6.92 Hz), 7.38 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.56 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.59 (m, 1H, fluorophenyl-H6). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 46.22, 46.37, 49.98, 50.64, 53.25, 55.13, 55.33, 89.08, 113.81,

113.97, 114.57, 114.71, 117.55, 121.40, 122.65, 127.78, 128.88, 129.87, 130.34, 130.39, 131.59, 134.64, 135.70, 135.75, 142.85, 146.94, 148.70, 149.57, 159.09, 162.41, 164.04.

5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-(μορφολιν-4-υλο)-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (29).

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **18**. Απόδοση 75 %. 60mg ως λαδι. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 2.37 (s, 3H, piperazine- CH_3), 2.60 (m, 4H, 3,5 anilinopiperazine H), 3.19 (m, 4H, 2,6 anilinopiperazine H), 3.28 (m, 2H, 3,5-morpholine H), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (m, 2H, 2,6-morpholine H), 5.71 (s, 2H, CH_2), 6.18 (br s, 1H, NH, D_2O exch.), 6.78 (d, 2H, 3,5/PMB, $J=6.78$ Hz), 6.89 (s, 1H, H-4), 6.94 (d, 2H, 3,5/aniline H, $J=6.94$ Hz), 7.03 (m, 1H, fluorophenyl-H4), 7.18 (d, 2H, 2,6/PMB, $J=6.78$ Hz), 7.23 (d, 2H, 2,6/aniline H, $J=6.94$ Hz), 7.39 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.57 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.60 (m, 1H, fluorophenyl-H6). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 46.26, 49.97, 51.20, 53.36, 55.35, 66.91, 89.40, 113.83, 113.98, 114.04, 114.64, 114.79, 117.53, 121.59, 122.65, 127.76, 128.63, 129.79, 130.37, 130.43, 131.74, 134.43, 135.60, 135.66, 142.86, 147.13, 148.47, 149.71, 159.13, 162.43, 164.05.

5-[4-(4-μεθυλοπιπεραζιν-1-υλο)φαινυλαμινο]-7-[3-(τριφθορομεθυλο)φαινυλοξυ]-3-(3-φθοροφαινυλο)-1-(4-μεθοξυβενζυλο)-1H-πυραζολο[3,4-c]πυριδίνη (30).

Παρασκευάζεται με μέθοδο ανάλογη αυτής που συντέθηκε το παράγωγο **18**. Απόδοση 72 % , 60mg ως λαδι. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 2.36 (s, 3H, piperazine- CH_3), 2.59 (m, 4H, 3,5 anilinopiperazine H), 3.15 (m, 4H, 2,6 anilinopiperazine H), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 5.79 (s, 2H, CH_2), 5.95 (br s, 1H, NH, D_2O exch.), 6.81 (d, 2H, 3,5/PMB, $J=6.81$ Hz), 6.84 (d, 2H, 3,5/aniline H, $J=6.84$ Hz), 6.86 (s, 1H, H-4), 7.03-7.09 (m, 3H, 2,6/aniline, fluorophenyl-H4), 7.25 (d, 2H, 2,6/PMB H, $J=6.81$ Hz), 7.36 (m, 1H, CF_3 -pheny-H), 7.39 (s, 1H, CF_3 -pheny-H), 7.42 (m, 1H, fluorophenyl-H5), 7.52-7.56 (m, 2H, CF_3 -pheny-H), 7.61 (m, 1H, fluorophenyl-H2), 7.65 (m, 1H, fluorophenyl-H6). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 46.23, 49.88, 55.18, 55.30, 55.36, 88.81, 113.72, 113.87, 114.09, 114.62, 114.76, 117.40, 119.32, 119.34, 121.11, 121.63, 122.02, 122.03, 122.52, 122.92, 123.25, 124.72, 125.80, 126.53, 128.96, 129.81, 130.17, 130.45, 130.51, 131.86, 132.08, 132.29, 132.45, 132.51, 133.84, 135.59, 135.65, 141.42, 147.23, 147.73, 148.74, 153.24, 159.42, 162.49, 164.12.

IV) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Rang, H., P., Dale, M., M., Ritter, J., M., Moore., P., K. Φαρμακολογία *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε Αθήνα, 5^η έκδοση, σελ. 748-749*
2. Harvey, R., A., Champe, P., C., Howland, R., D., Mycek, M., J., Φαρμακολογία *Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε. Αθήνα, 3^η έκδοση, σελ. 501-503*
3. G. Scapin, Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 601-611.
4. I. Shchemelinin, L. Sefc, E. Necas, Protein Kinases, Their Function and Implication in Cancer and other Diseases. *Folia Biologica (Praha)* **2006**, 52, 81-101.
5. 8. J. A. Adams, Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2271-2290.
6. O. Hantschel, G. Superti-Funga, Regulation of the c-Abl and BCR Abl tyrosine kinases. *Nat. Rev.* **2004**, 5, 33-44.
7. A. K. Ghose, T. Herbertz, D. A. Pippin, J. M. Salvino, J. P. Mallamo, Knowledge Based Prediction of Ligand Binding Modes and Rational Inhibitor Design for Kinase Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5149-5171.
8. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **2000**, 6, 389–395.
9. Swift M.R., Weinstein B.M. Arterial–venous specification during development. *Circ. Res.* **2009**, 104, 576–88.
10. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 273-286.
11. Koch A.E., Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: Rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* **2007**, 9 (Suppl. 2), S3.
12. Jayson G. C., Kerbel, R., Ellis, L. M., Harris, A. L. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* **2016**, 388, 518–529.
13. Fagiani E., Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* **2013**, 328, 18–26.
14. Laurenzana A., Fibbi G., Margheri F., Biagioni A., Luciani C., Del Rosso M., et al. Endothelial progenitor cells in sprouting angiogenesis: proteases pave the way. *Curr. Mol. Med.* **2015**, 15, 606–20.
15. Huang L., Huang Z., Bai Z., Xie R., Sun L., Lin K. Development and strategies of VEGFR-2/KDR inhibitors. *Future Med. Chem.* **2012**, 4, 1839–1852.

16. Al-Abd, A. M., Alamoudi J. A., Abdel-Naim B. A., Neamatallah, A. T., Ashour, M. O. Anti-angiogenic agents for the treatment of solid tumors: Potential pathways, therapy and current strategies – A review *J. Adv. Res.* **2017**, 8, 591–605.
17. Tewari K.S., Sill M.W., Long III H.J., Penson R.T., Huang H., Ramondetta L.M., et al. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 734–43.
18. Ricciuti, B., Foglietta, J., Chiari, R., Sahebkar, A., Banach, M., Bianconi, V., Matteo Pirro, M. Emerging enzymatic targets controlling angiogenesis in cancer: preclinical evidence and potential clinical applications *Med. Oncology* **2018**, 35, 4.
19. Chiu Y. L., Carlson D.M., Pradhan R.S., Ricker J.L. Exposure-response (safety) analysis to identify linifanib dose for a Phase III study in patients with hepatocellular carcinoma *Clin. Ther.* **2013**, 35, 1770-1777.
20. Ma J., Waxman D.J. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 3670–84.
21. Novel pyrazolopyridine derivatives as potential angiogenesis inhibitors: Synthesis, biological evaluation and transcriptome-based mechanistic analysis. M. Michailidou, V. Giannouli, V. Kotsikoris, O. Papadodima, G. Kontogianni, I. K. Kostakis, N. Lougiakis, A. Chatziioannou, F. N. Kolisis, P. Marakos, N. Pouli, H. Loutrari *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 121, 143-157.
22. V. N. Kourafalos, P. Marakos, N. Pouli, L. B. Townsend, Synlett., 11 (2002), 1479-1482.; D. Chapman, J. Hurst, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1980**, 2398-2402.
23. Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A., *Tetrahedron Lett.* **1979**, (36), 3437-3440.
24. Kurti L., Czako, B. Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis: Elsevier Academic Press **2005**
25. J. A. Joule, K. Mills, Heterocyclic Chemistry at a Glance 2013, 2nd edition.
26. Ukai T., Kawazura H., Ishii Y., Bonnet J.J. and Ibers J.A. *J. Organomet. Chem.* **1974**, 65, 253-266.
27. Huang X., Anderson K.W., Zim D., Jiang L., Klapars A. and Buchwald S.L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6653-6655.
28. Pino L.N., Zehring W.S.III *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 3154
29. Burton et al. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 2211.
30. Roe A., Seligman R. B. *J. Org. Chem.* **1955**, 20, 1729-1731.
31. Chapman D., Hurst J. *J. Chem. Soc. Perkin, Trans I*, **1980**, 2398