



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ**

**Σχεδιασμός και σύνθεση νέων 3,7-δισυποκατεστημένων
πυραζολο[4,3-*d*]πυριμιδινών με πιθανή κυτταροτοξική
δράση.**



**Αθανάσιος Πούσιος
Φαρμακοποιός**

**Διπλωματική εργασία
2021-2022**

Αθήνα 2021

Τριμελής επιτροπή

Παναγιώτης Μαράκος, Καθηγητής, επιβλέπων εργασίας

Νικολαΐς Πουλή, Καθηγήτρια

Νικόλαος Λουγιάκης, Επίκουρος Καθηγητής

Περίληψη

Οι πουρίνες και τα ανάλογά τους είναι μόρια μεγάλης βιολογικής σημασίας, που λαμβάνουν μέρος σε ουσιώδεις διεργασίες στον οργανισμό. Η τροποποίηση της δομής τους, μέσω ισοστερών αλλαγών του πουρινικού σκελετού και διαφοροποίησης των υποκαταστατών, έχει οδηγήσει σε πληθώρα συνθετικών παραγώγων με εφαρμογή σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις. Στα πλαίσια των ερευνητικών μας δραστηριοτήτων έχουμε ανακαλύψει ορισμένες 3,7-δισ-υποκατεστημένες πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνες με σημαντική κυτταροτοξική δράση *in vitro* και στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νέων 7-υποκατεστημένων αναλόγων που φέρουν στην 3-θέση φαινυλομάδα ή νιτροφαινυλομάδα, με σκοπό να γίνουν μελέτες δομής-δράσης και να αξιολογηθούν για την κυτταροτοξική δράση τους. Η σύνθεση των νέων μορίων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη ακετοφαινόνη που μετατράπηκε με σειρά αντιδράσεων με τη χρήση υδραζίνης στον αιθυλο-4-νιτρωδο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικό εστέρα. Από τον προηγούμενο εστέρα, με αναγωγή και κυκλοποίηση προέκυψε υποκατεστημένη πυραζολοπυριμιδινόνη, που μετατράπηκε στο αντίστοιχο χλωρίδιο μέσω του οποίου έγινε δυνατή η εισαγωγή επιλεγμένων ανιλινών για να προκύψουν τα επιθυμητά 7-αμινοπαράγωγα. Παρασκευάστηκαν επιπλέον τα αντίστοιχα ανάλογα μετά από νίτρωση του 3-φαινυλίου.

Abstract

Design and synthesis of new 3,7-disubstituted pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with potential antiproliferative activity

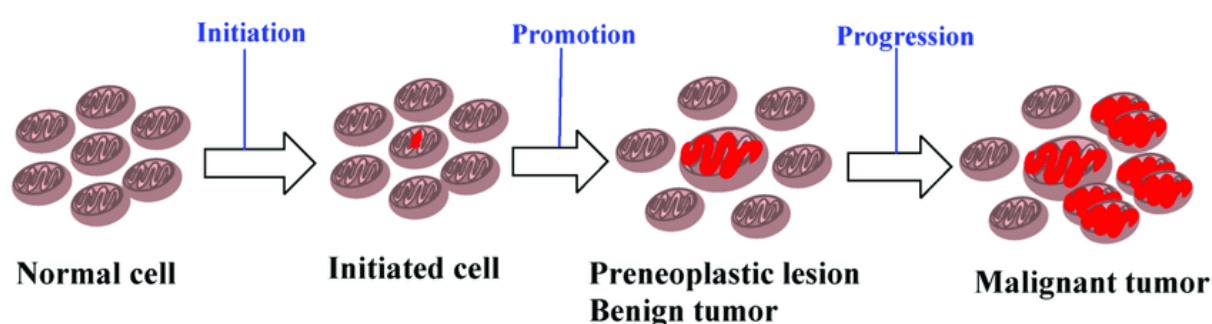
Purines and their analogues are important bioactive substances that take place in multiple biological processes. Isosteric replacement of their main scaffold and the insertion of various substituents has resulted in numerous synthetic compounds which have been applied in various pathological conditions. In the course of our research activity for the discovery of new antiproliferative agents, we have previously found some 3,7-disubstituted pyrazolo[4,3-d]pyrimidines with potent cytotoxic activity against a number of cancer cell lines. With the aim to study in depth this interesting class of compounds we present in this study the synthesis of new pyrazolo[4,3-d]pyrimidines through the introduction of selected 7-amino-substituents in a scaffold that bears a 3-phenyl or a 3-(4-nitro)phenyl group. The target compounds were prepared using acetophenone as starting material, which upon manipulation and reaction with hydrazine was converted to ethyl 4-nitroso-3-phenyl-1H-pyrazole-5-carboxylate. This compound was first reduced and upon cyclization provided a substituted pyrazolopyrimidinone which was converted to the corresponding chloride and then provided the target compounds through the insertion at position 7 of selected anilines. In parallel, the corresponding derivatives substituted with a 3-(4-phenyl)group have been synthesized using an analogous reaction sequence.

Περιεχόμενα

Περίληψη	2
Εισαγωγή.....	4
Χημικό μέρος	14
i) Σύνθεση αναλόγων 3-φαινυλο-1H- πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης	14
ii) Σύνθεση αναλόγων 3-(4-νιτροφαινυλο)-1H- πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης.....	20
Πειραματικό μέρος.....	28
Βιβλιογραφία.....	36

Εισαγωγή

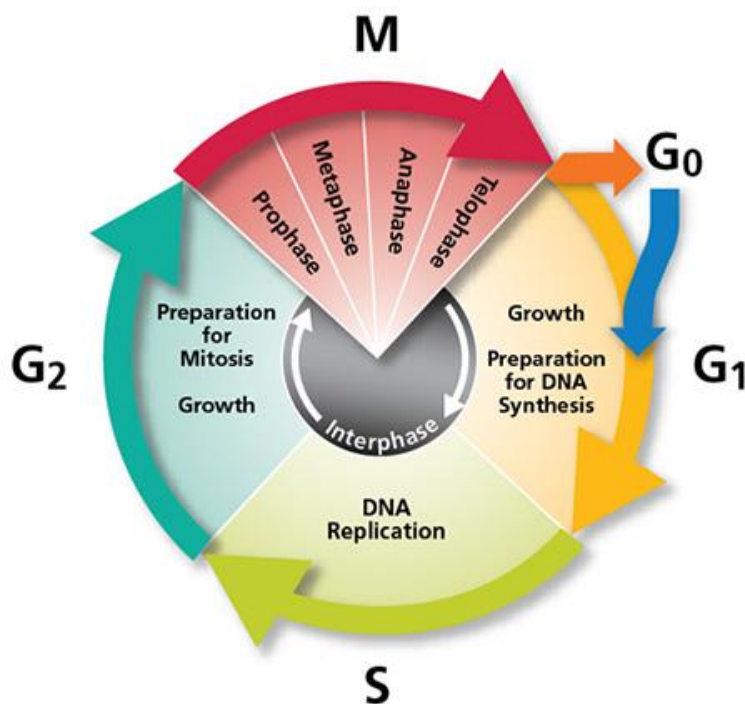
Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυπαραγοντική νόσο και είναι η δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Τα στάδια δημιουργίας του καρκίνου είναι η έναρξη, η προαγωγή και η προώθηση(**Εικόνα 1**). Στο στάδιο της έναρξης, που αποτελεί μη αντιστρεπτό βήμα, συμβαίνουν διάφορες μεταλλάξεις. Η προαγωγή περιλαμβάνει τον κλωνικό πολλαπλασιασμό των μεταλλαγμένων κυττάρων για την δημιουργία καλοθών βλαβών και αποτελεί αντιστρεπτό βήμα, ενώ στο στάδιο της προώθησης αυτές οι καλοήθειες μετατρέπονται σε κακοήθειες.(Cohen & Arnold, 2011)



Εικόνα 1: Στάδια καρκινογένεσης.(Basu, 2018)

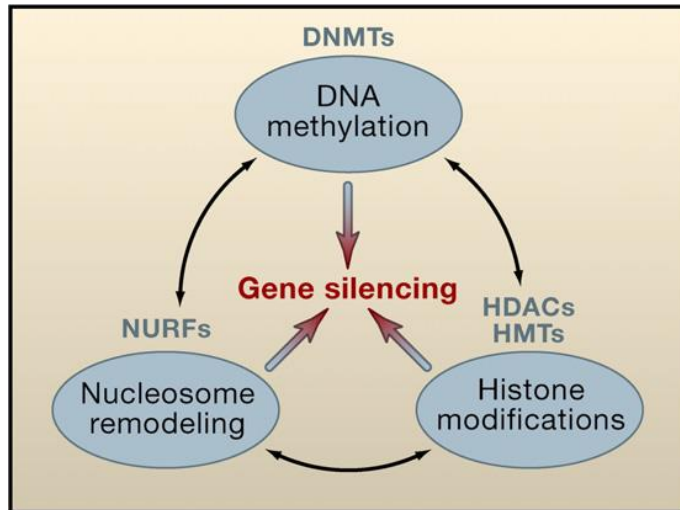
Γενικά, η εμφάνιση καρκίνου σχετίζεται με αποτυχία των μηχανισμών ομοιοστασίας και αναποτελεσματικό έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, που οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τα φυσιολογικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται μόνον όταν δεχτούν τα κατάλληλα ερεθίσματα, ενώ, αντίθετα τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν από τους φυσιολογικούς ελεγκτικούς μηχανισμούς και πολλαπλασιάζονται συνεχώς, ανεξάρτητα ακόμη και από την παρουσία ελατωματικού DNA. Επιπλέον, διαφεύγουν της απόπτωσης κ. α. μηχανισμών κυτταρικού θανάτου, ενώ αναπτύσσουν ικανότητα διείσδυσης σε γειτονικούς, αλλά και απομακρυσμένους ιστούς (μετάσταση). Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό προκύπτει από την συσσώρευση διάφορων μεταλλάξεων σε συγκεκριμένα γονίδια, κυρίως σε πρώτο-ογκογονίδια και σε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Μεταλλάξεις στα πρωτο-ογκογονίδια μπορούν να τα μετατρέψουν σε ογκογονίδια (*rad*, *myc*), που ευνοούν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αφού επάγουν την έκκριση αυξητικών παραγόντων και την είσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο. Αντίστοιχα, η συσσώρευση μεταλλάξεων σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (*p53* και *pRB*) μπορεί να καταλήξει στην απενεργοποίησή τους.

Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από 4 φάσεις (G_1 , S, G_2 και M) (**Εικόνα 2**). Στην φάση G_1 τα κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος και ετοιμάζονται για αντιγραφή που πραγματοποιείται στην φάση S. Αφού τα χρωμοσώματα έχουν διπλασιαστεί, περνάνε στην φάση G_2 όπου προετοιμάζονται για την μίτωση (φάση M), κατά την οποία τα μητρικά κύτταρα διαιρούνται για να παραχθούν τα θυγατρικά κύτταρα. Αυτά, με τη σειρά τους μπορούν να εισέλθουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο και να γίνει επανάληψη της διαδικασίας. (Weinberg, 1996) Η μετάβαση των κυττάρων από μία φάση του κυτταρικού κύκλου σε διαδοχική φάση, ελέγχεται από συγκεκριμένες κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (CDKs), που η δράση τους αναστέλλεται από ανασταλτικές πρωτεΐνες (CKI) οι οποίες συνδέονται στις CDKs, ή στο σύμπλεγμα κινάσης-κυκλίνης. (Deshpande et al., 2005)



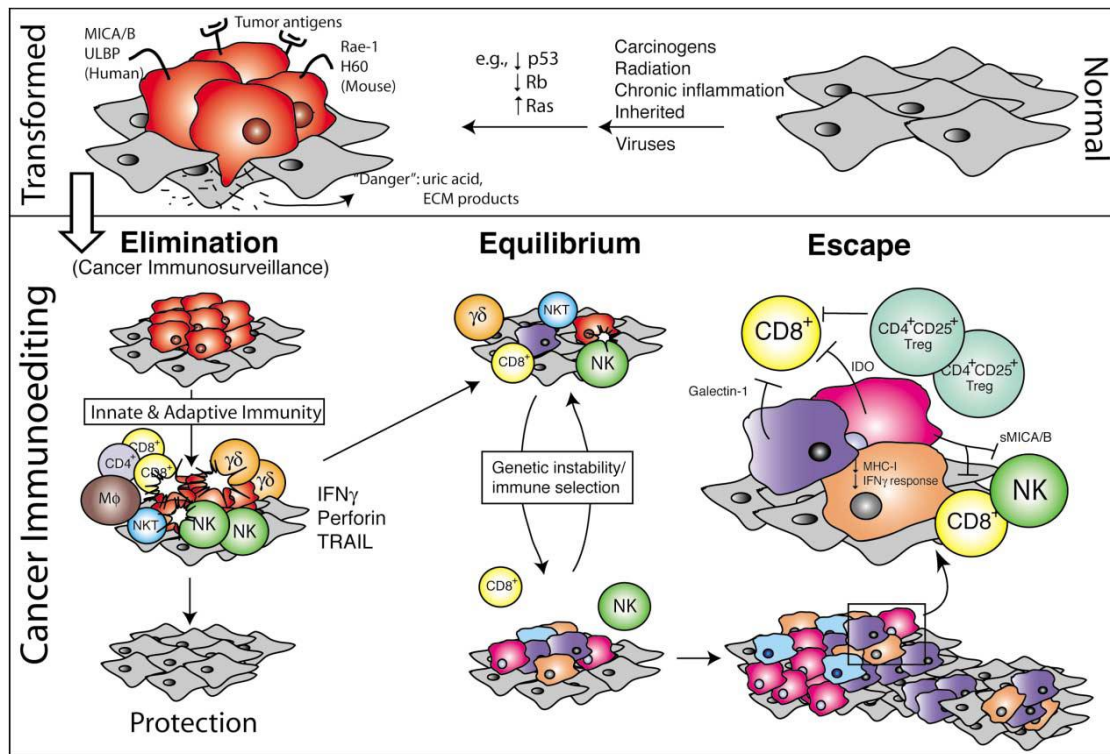
Εικόνα 2: Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου. (“Cell Cycle, Checkpoints, and the Effect of Oncogenes,” 2013)

Χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του καρκίνου είναι η ανώμαλη γονιδιακή λειτουργία και η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση. Επιγενετικές ανωμαλίες και γενετικές αλλαγές φαίνεται να προκαλούν αυτήν την απορρύθμιση και περιλαμβάνονται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της νόσου. Η γονιδιακή αποσιωποποίηση επιτυγχάνεται μέσω μεθυλίωσης βάσεων του DNA, τροποποιήσεις των ιστονών και αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων (**Εικόνα 3**). (Jones & Baylin, 2007)



Εικόνα 3: Τρόποι επίτευξης της γονιδιακής αποσιωποίησης. (Jones & Baylin, 2007)

Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινωμάτων, αλλά είναι επίσης πιθανό να ευνοήσει την ανάπτυξη όγκων μειωμένης ανοσογονικότητας, οι οποίοι διαφεύγουν τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αντιμετώπιση του καρκίνου από το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται από τρεις φάσεις: την εξάλειψη, την ισορροπία και τη διαφυγή(**Εικόνα 4**). Το στάδιο της εξάλειψης περιλαμβάνει την προστασία του ξενιστή από την δημιουργία όγκων, μέσω συστατικών της έμφυτης και επίκτητης ανοσίας. Αν αποτύχει αυτή η διαδικασία, τότε τα καρκινικά κύτταρα περνάνε στην φάση ισορροπίας, όπου μπορεί σταδιακά να δημιουργηθούν νέες παραλλαγές των καρκινικών κυττάρων, που εμφανίζουν αντοχή στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στη τελική φάση, τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν από τους ελέγχους του ανοσοποιητικού συστήματος, πολλαπλασιάζονται και αυξάνουν σε μέγεθος.(Dunn et al., 2004)



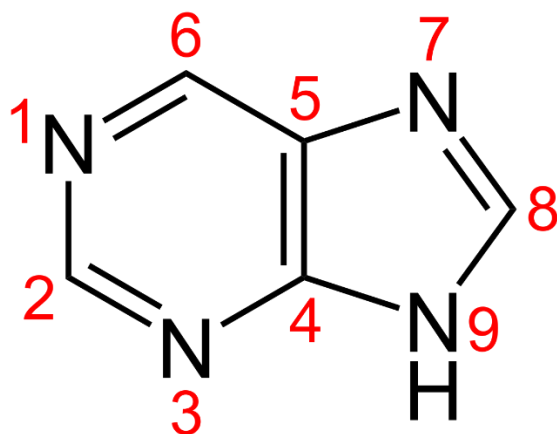
Εικόνα 4: Αντιμετώπιση καρκίνου από το ανοσοποιητικό σύστημα. (Dunn et al., 2004)

Ο άνθρωπος κατά τη διάρκεια της ζωής του εκτίθεται σε ποικιλία χημικών ενώσεων και διαδικασιών που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA και να προάγουν την καρκινογένεση, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, διάφορες αρωματικές αμίνες, νιτροζαμίνες, υπεριώδης και ιονίζουσα ακτινοβολία κ.α. (Barnes et al., 2018). Τα γονίδια που ευθύνονται για την επιδιόρθωση τυχόν βλαβών (p53, ATM, AT, ATR κινάσες) συμμετέχουν στην επισκευή εκτομής νουκλεοτιδίων, σε λανθασμένο ζεύγος βάσεων, σε ομόλογο και μη ανασυνδυασμό. Δυσλειτουργίες σε αυτά τα γονίδια παρατηρούνται σε αρκετά είδη καρκίνου, ενώ η υπερλειτουργία τους συνδέεται με την ανάπτυξη ανοχής στην αντικαρκινική θεραπεία. (Broustas & Lieberman, 2014)

Οι διαθέσιμες θεραπείες για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι η εγχείρηση, η χημειοθεραπεία, οι ακτινοβολίες, καθώς και ο συνδυασμός τους. Ωστόσο συχνά, μέσω αυτών των θεραπευτικών αντιμετώπισεων δεν σημειώνονται μεγάλα ποσοστά επιτυχίας, εξαιτίας της μειωμένης εκλεκτικότητας των θεραπευτικών μέσων για τα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με τα υγιή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή στόχευση των καρκινικών κυττάρων από τα φάρμακα, καθώς επίσης την εμφάνιση συστημικής τοξικότητας και διασταυρούμενης ανοχής (MDR). Έτσι, κατά τα τελευταία χρόνια γίνεται μεγάλη προσπάθεια για την ανάπτυξη φαρμάκων, τα οποία θα είναι σχετικώς εκλεκτικά ως προς τα εκάστοτε καρκινικά κύτταρα και λιγότερο ή καθόλου τοξικά για τα φυσιολογικά κύτταρα,

μειώνοντας σημαντικά τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Η στοχευμένη αυτή θεραπεία περιλαμβάνει φάρμακα που εμποδίζουν τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, προωθούν τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και επάγουν την απόπτωση ή την αυτοφαγία.(Padma, 2015) Σε αυτό το πλαίσιο, φάρμακα και συναφείς δραστικές ενώσεις, παράγωγα πυραζολοπυριμιδίνης, δομής βιοϊσοστερούς των φυσικών πουρινών, έχουν δείξει πολύ ενδιαφέρουσα αντικαρκινική, αντιϊκή, ανοσοκατασταλτική ή αντιμικροβιακή δράση. (Traut, 1994)

Οι πουρίνες χαρακτηρίζονται από τη συμπύκνωση πυριμιδινικού και ιμιδαζολικού δακτυλίου(**Εικόνα 5**). Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται η αδείνη και η γουανίνη, τα νουκλεοτίδια των οποίων απαρτίζουν τους δομικούς λίθους των νουκλεϊνικών οξέων, DNA και RNA. Εκτός αυτού όμως, είναι μόρια σημαντικότητας λειτουργικότητας, καθώς συμμετέχουν σε πληθώρα μεταβολικών και σηματοδοτικών διαδικασιών.



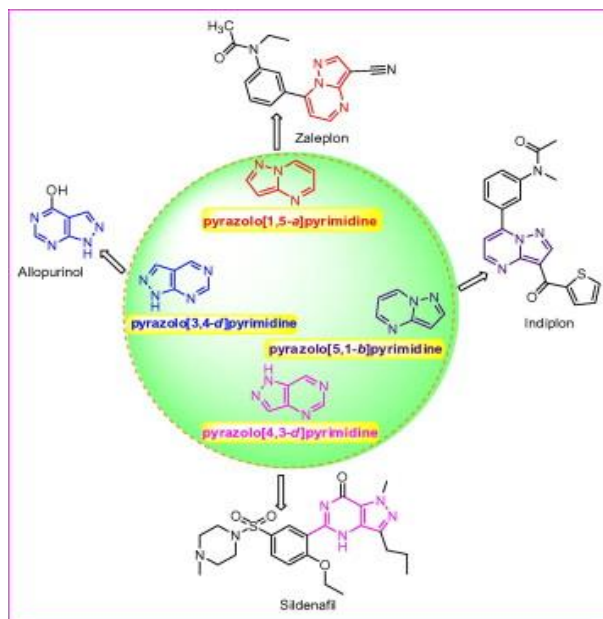
Εικόνα 5: Δομή της πουρίνης.

Η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) είναι το κυρίαρχο νουκλεοτίδιο σε όλα τα κύτταρα και χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας και ως δότης φωσφορικών ομάδων για διάφορες κινάσες. Τα νουκλεοτίδια των πουρινών συντίθενται κυρίως ακολουθώντας τη de novo βιοσυνθετική οδό, κατά την οποία ενδιάμεσα παράγεται ο μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP), ή μονοφωσφορική ουριδίνη (UMP). Εναλλακτικά, επιστρατεύεται το μονοπάτι διάσωσης (salvage pathway), όπου οι διαθέσιμες βάσεις ή οι νουκλεοζίτες μετατρέπονται στα αντίστοιχα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια.

Η βιοσύνθεση των πουρινών αυξάνεται όταν τα κύτταρα είναι ενεργοποιημένα, έχουν υποστεί βλάβη, ή στρες. Έχει φανεί ότι η υπερβολική παρουσία αδενοσίνης και τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μπορεί να έχει κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Η αδενοσίνη μπορεί να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, ενώ το ATP μέσω νέκρωσης,

ή απόπτωσης. (Pill, n.d.) Η αδενοσίνη και το ATP εντοπίζονται στο περιβάλλον του όγκου, ρυθμίζουν την απόκριση των ανοσοκυττάρων και την απελευθέρωση κυτοκινών. Και τα δυο αυτά συστατικά μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Οι κακοήθεις όγκοι πυροδοτούν μια ισχυρή φλεγμονώδη αντίδραση και χαρακτηρίζονται από την παρουσία εστιών νέκρωσης και συσσώρευση του ATP στον εξωκυττάριο χώρο. Η αδενοσίνη συνδέεται στους πουρινικούς P1 υποδοχείς, ενώ το ATP συνδέεται στους υποδοχείς P2. Η αδενοσίνη συνδέεται κυρίως στους A2A και στους A3 υποδοχείς και ρυθμίζει την κυτταρική αύξηση, ασκώντας παράλληλα και ισχυρή ανοσοκατασταλτική δράση. Αντίστοιχα, το ATP δρα ως προ-φλεγμονώδης παράγοντας, μέσω σύνδεσης στους P2Y και P2X υποδοχείς, ως ανοσοκατασταλτικό, μέσω σύνδεσης στον P2Y11 υποδοχέα και ως παράγοντας προώθησης της ανάπτυξης των κυττάρων, μέσω σύνδεσης στους P2Y1, P2Y2 και P2X7 υποδοχείς. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος συσχετίζονται με την πρόσδεση των κατάλληλων προσδεμάτων στους πουρινεργικούς υποδοχείς. (Burnstock & Verkhratsky, 2012)

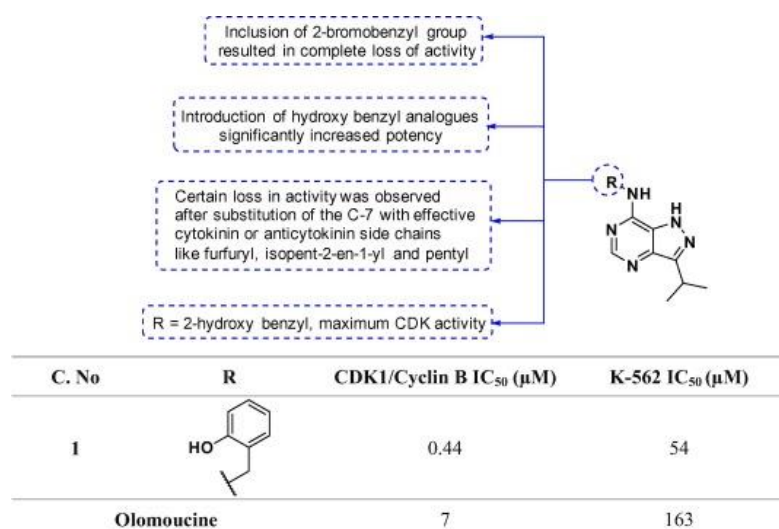
Ανάλογα με το τρόπο συμπύκνωσης του πυραζολικού με τον πυριμιδινικό δακτύλιο, προκύπτουν ισομερείς πυραζολοπυριμιδίνες, όπως οι πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνες, πυραζολο[3,4-d]πυριμιδίνες και οι πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνες. Όλα τα παραπάνω μόρια θεωρούνται ισοστερή πουρινών και παράγωγα τους παρουσιάζουν αξιόλογη αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιική και αντιφλεγμονώδη δράση ή/και αναστέλλουν ένζυμα, όπως οι CDKs και η οξειδάση της ξανθίνης. (Chauhan & Kumar, 2013) Παράγωγα πυραζολοπυριμιδίνης είναι και εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα, όπως η αλλοπουρινόλη, η δινασικλίμπη, η ροσκοβιτίνη και η ολομουκίνη (**Εικόνα 6**). (Cherukupalli et al., 2018)



Εικόνα 6: Εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα παράγωγα πυραζολοπυριμιδίνης. (Chauhan & Kumar, 2013)

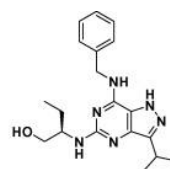
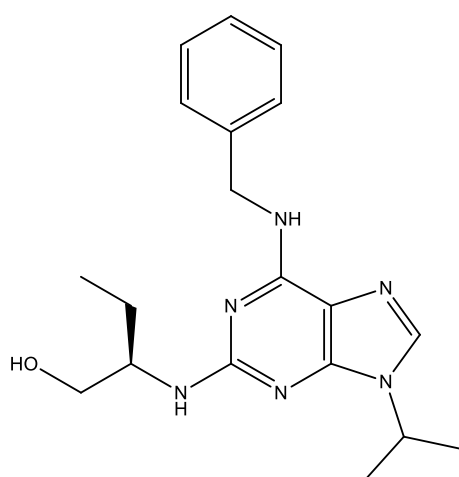
Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την αποτελεσματική δράση των αναλόγων πυραζολοπυριμιδίνης έναντι των καρκινικών κυττάρων καθώς και την πληθώρα των παραγόντων που στοχεύουν.

Ο Moravcova et al, συνέθεσε υποκατεστημένα μόρια πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης και εξέτασε την δράση τους έναντι της CDK1/κυκλίνης B κινάσης, η οποία ευθύνεται για την έναρξη της μίτωσης, και την ανασταλτική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού κυτταρικής σειράς μυελοειδούς λευχαιμίας. Όλα τα υπό εξέταση μόρια έδειξαν σημαντική αποτελεσματικότητα τόσο ως αναστολείς της CDK1/κυκλίνης B κινάσης, όσο και έναντι της κυτταρικής σειράς, με το πιο δραστικό μόριο να είναι η ένωση που απεικονίζεται στην **εικόνα 7**. Από μελέτες δομής - δράσης (SAR) φάνηκε ότι η ύπαρξη υδροξυβενζυλαμινομάδας στον C₇ είναι απαραίτητη και για τις δυο αυτές δράσεις. (Moravcová et al., 2003)



Εικόνα 7: Αποτελέσματα αντικαρκινικής δράσης στην CDK1/κυκλίνης Β κινάση και σε κυτταρική σειρά μυελοειδούς λευχαιμίας K-562. (Cherukupalli et al., 2018)

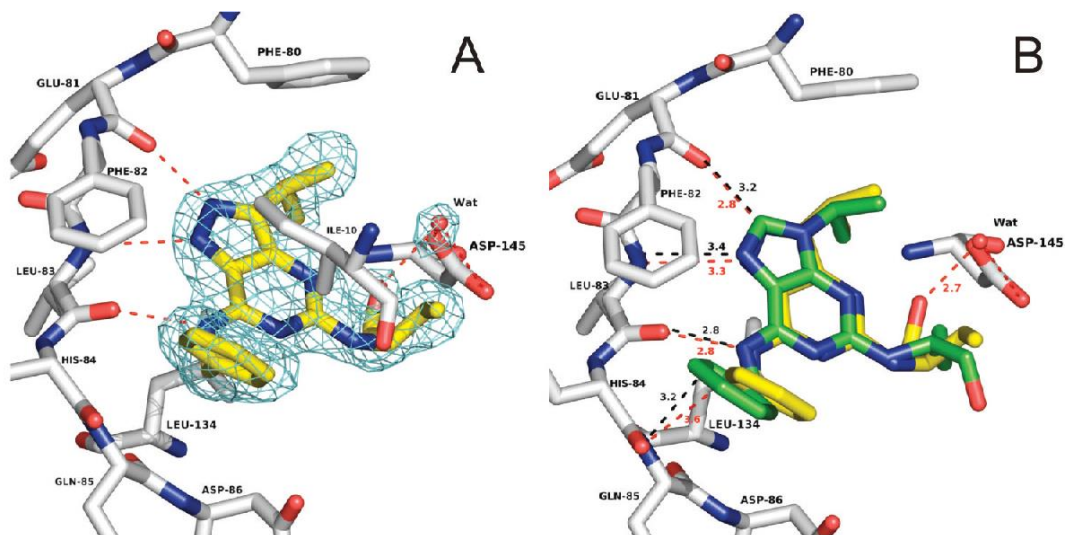
Η ροσκοβιτίνη (**εικόνα 8**) αναστέλλει κυκλινοεξαρτώμενες και άλλες πρωτεϊνικές κινάσες, επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την έκφραση του p53 και την επαγωγή της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα. Οι Jorda et al συνέθεσαν την ένωση που φαίνεται στην **εικόνα 8** και δοκίμασαν την αντι-πολλαπλασιαστική της δράση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές και την ανασταλτική δράση της σε αρκετές CDKs, τις CDK2, CDK5, CDK7 και CDK9. (Jorda et al., 2011)



C. No	Human tumor Cell lines	IC ₅₀ (μM)
3	MCF-7	7.5 ± 2.3
	HCT-116	11.0 ± 1.8
	RPMI-8226	3.6 ± 0.3
	CEM	3.8 ± 0.8
	G-361	4.8 ± 1.6
	A-549	7.1 ± 2.1
	A-431	7.7 ± 0.3

C. No	IC ₅₀ (μM)			
	CDK2/Cyclin E	CDK5/P35	CDK7/Cyclin H/MAT1	CDK9/Cyclin T1
3	0.04	0.20	0.16	1.00

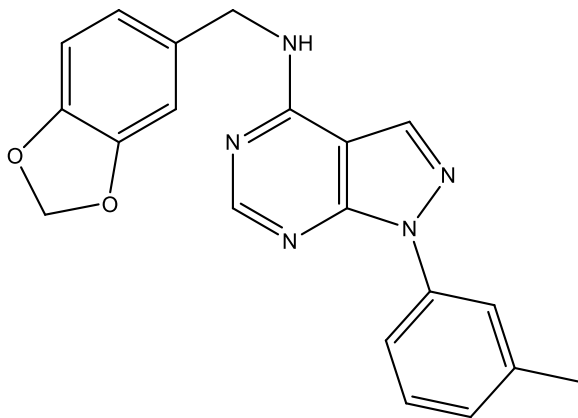
Εικόνα 8: αριστερά) Δομή ροσκοβιτίνης, δεξιά) ανάλογο ροσκοβιτίνης και αντικαρκινική δράση. (Cherukupalli et al., 2018)



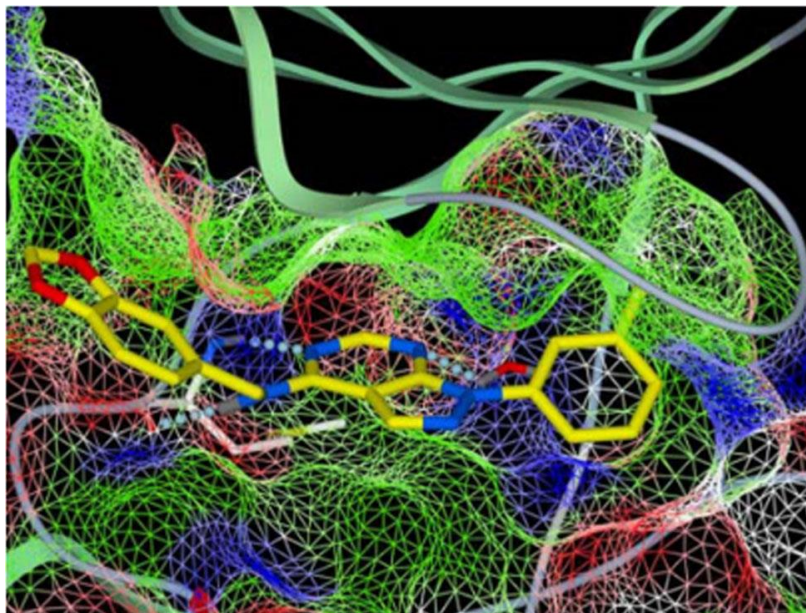
(A) Refined electron density for ligand compound 7 within the active site of CDK2. $2|F_o| - |F_c|$ density is colored cyan and is cont

Εικόνα 9: Α) Αλληλεπίδραση της ένωσης 3 με το ενεργό κέντρο της CDK2. Β) Αλληλεπίδραση της ένωσης 3 και της ροσκοβιτίνης με το ενεργό κέντρο της CDK2. (Jorda et al., 2011)

Παράγωγα πυραζολοπυριμιδίνης ασκούν επίσης ανασταλτική δράση έναντι άλλων πρωτεϊνικών κινασών, όπως είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), που συχνά υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα. Η δέσμευση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια και συμβάλλει στην αύξηση του όγκου, τον πολλαπλασιασμό, την μετάσταση και την αγγειογένεση. Η αναστολή αυτού του ενζύμου από το μόριο της **εικόνας 10** έδειξε ότι συσχετίζεται με τη σημαντική αντιπολλαπλασιαστική δράση του, σε κυτταρικό επίπεδο. Στην **εικόνα 11** φαίνεται η δέσμευση της ένωσης στον υποδοχέα. Οι κύριες αλληλεπιδράσεις φαίνεται ότι εντοπίζονται στο σχηματισμό δεσμών H του NH και του N₅ της πυριμιδίνης με το M769, στους δH που σχηματίζουν τα μόρια νερού με το N₇ της πυριμιδίνης και το T766 και σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει ο 3-μεθυλοφαινυλοϋποκατάστατης. (Cavasotto et al., 2006)



Εικόνα 10: Δομή αναλόγου πυραζολο[3,4-d]πυριμιδίνης



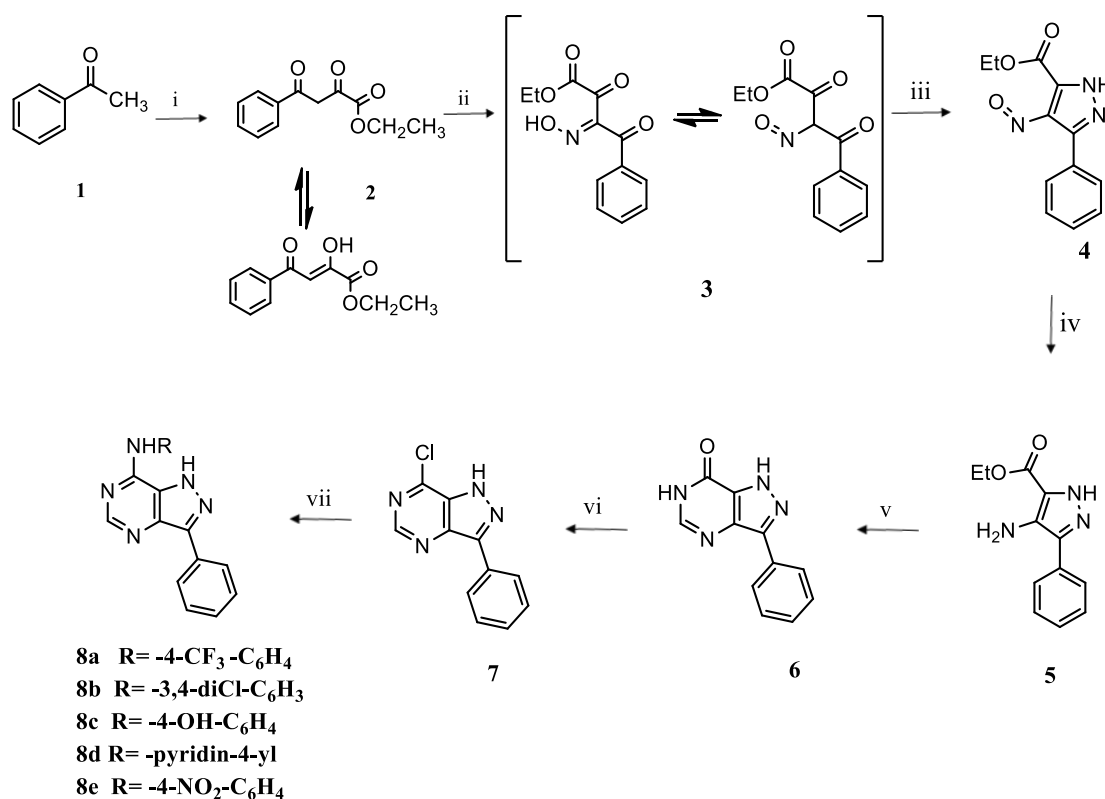
Εικόνα 11: Αλληλεπίδραση του μορίου με τον EGFR. (Abdellatif & Bakr, 2021)

Στα πλαίσια της ενασχόλησης της ερευνητικής μας ομάδας με τη σύνθεση αναλόγων πουρινών και τη διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης, έχουμε παρασκευάσει μια σειρά 3,7-δισ-υποκατεστημένων πυραζολο[4,3-d]πυριμιδινών, ορισμένες από τις οποίες έδειξαν σημαντική κυτταροτοξική δράση παρουσιάζοντας τιμές IC_{50} της τάξης των 0.5-9.7 μ M. Επιδιώκοντας την εις βάθος μελέτη αυτής της ενδιαφέρουσας κατηγορίας βιοδραστικών μορίων και με σκοπό την εξαγωγή σχέσεων δομής δράσης προσπαθούμε να συνθέσουμε ανάλογα με τροποποιημένους υποκαταστάτες. Παρουσιάζεται λοιπόν στην παρούσα εργασία η σύνθεση νέων αναλόγων με επιλεγμένους 7-υποκαταστάτες, που στην 3-θέση της πυραζολοπυριδίνης φέρουν φαινυλομάδα ή νιτροφαινυλομάδα.

Χημικό μέρος

i) Σύνθεση αναλόγων 3-φαινυλο-1H- πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης

Προκειμένου να συντεθούν τα νέα ανάλογα πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης έγινε η σειρά αντιδράσεων που παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.

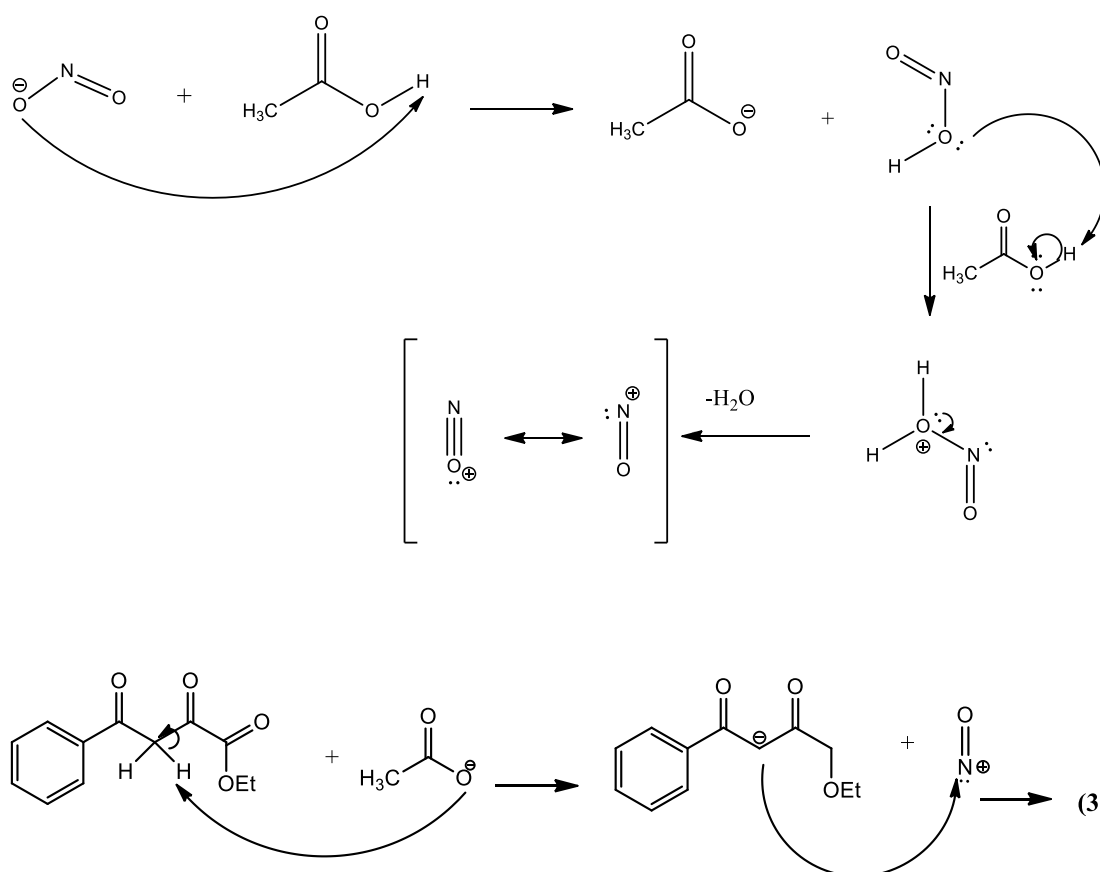


Σχήμα 1: Συνθήκες και αντιδραστήρια: i) EtOH, Na, (CH₃CH₂OCO)₂, (a)rt, 1h; (b) 0°C, 1h, ii) CH₃COOH, NaNO₂, 10°C, 1h, iii) CH₃COOH, NH₂NH₂.H₂O, 5-10°C, 30min, iv) EtOH, Pd/C, rt, 50psi, 5h, v) HN=CHNH₂.CH₃COOH, CH₃CH₂CH₂CH₂OH, reflux, 12h, vi) POCl₃, DIPEA, 100°C, 3h, vii) EtOH, R-NH₂, reflux, 2h.

Αρχίζοντας με πρώτη ύλη την εμπορικά διαθέσιμη ακετοφαινόνη συντέθηκε ο αιθυλο-2,4-διοξο-4-φαινυλβουτανοϊκός εστέρας (**2**). Αρχικά παρασκευάστηκε in situ το αιθοξυνάτριο (EtONa) και κατόπιν προστέθηκε η ακετοφαινόνη, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ανιόντος της, με απόσπαση του όξινου H του -CH₃ από το EtONa. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη οξαλικού διαιθυλεστέρα και πραγματοποιήθηκε πυρηνόφιλη προσβολή που οδήγησε στον σχηματισμό της ένωσης **2** και την απομάκρυνση ενός μορίου αιθανόλης από τον οξαλικό διαιθυλεστέρα.

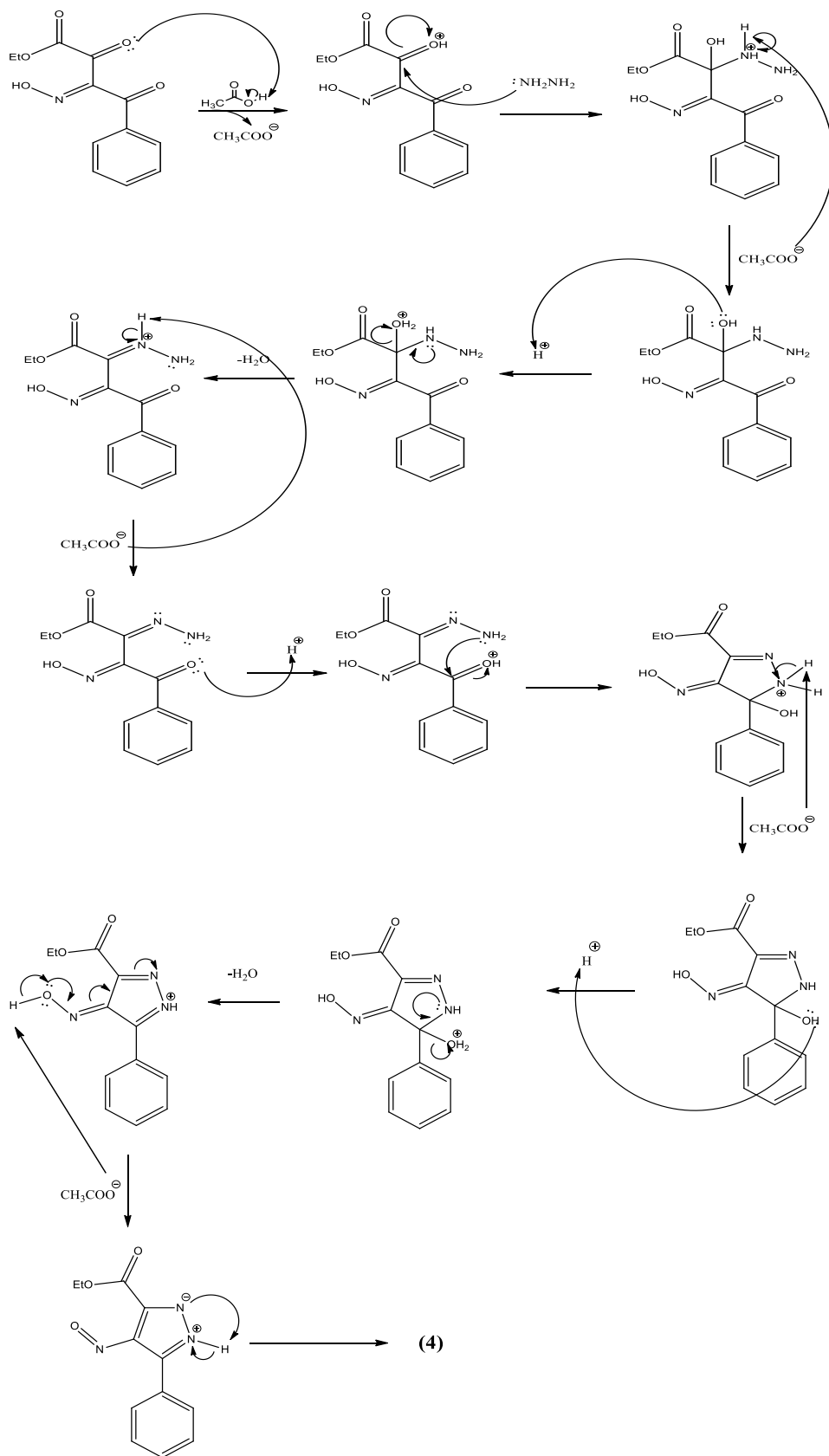
Ακολούθως συντέθηκε η ένωση **3**, η οποία δεν απομονώθηκε καθώς μόλις ολοκληρώθηκε η αντίδραση, μέσω παρακολούθησης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, προστέθηκε η μονοένυδρη υδραζίνη (NH₂NH₂.H₂O) για την παρασκευή του αιθυλο-4-νιτρωδο-3-φαινυλο-

1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικού εστέρα (**4**). Αρχικά, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2**, σχηματίστηκε το κατιόν του μονοξειδίου του αζώτου με τη χρήση οξικού οξέος και νιτρώδους νατρίου. Στη συνέχεια το ιόν του οξικού οξέος που έχει σχηματιστεί από την παραπάνω διαδικασία αποσπά ένα όξινο πρωτόνιο από τον C₃ της ένωσης **2** με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ανιόντος στη θέση αυτή. Για να σχηματιστεί η ενδιάμεση ένωση **3** πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσβολή του κατιόντος του μονοξειδίου του αζώτου από το ανιόν.



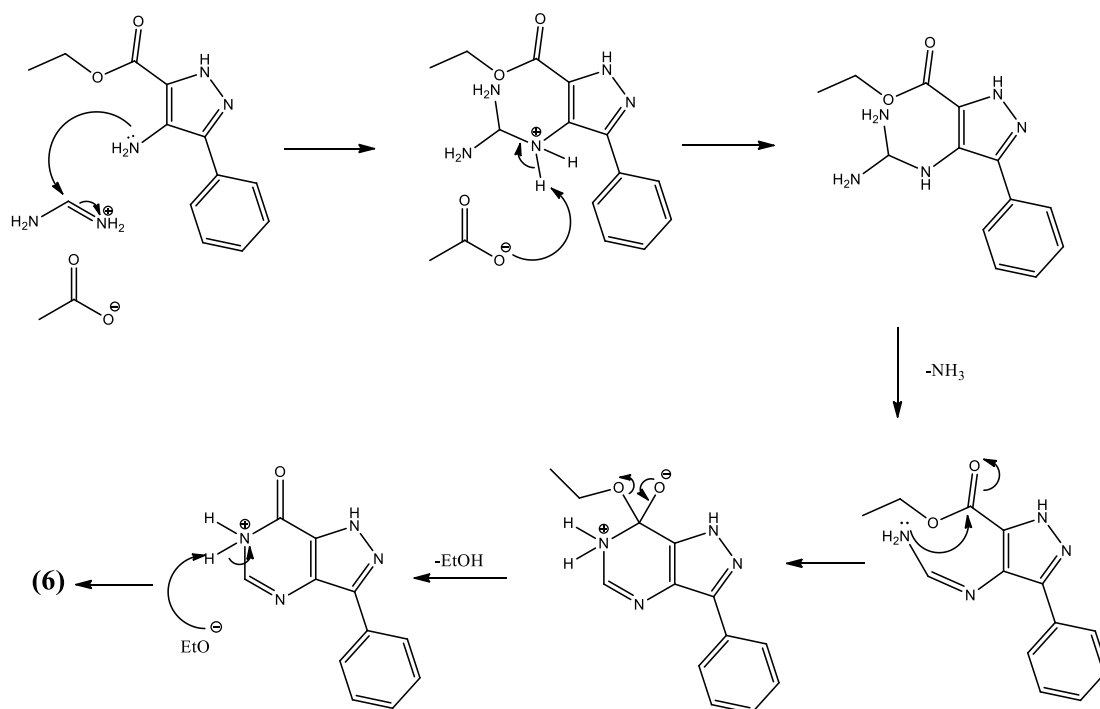
Σχήμα 2: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού της ένωσης **3**.

Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω αντίδρασης, έγινε στο μίγμα προσθήκη $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ προκειμένου να δημιουργηθεί το ενδιάμεσο προϊόν **4**. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3**, αρχικά πρωτονιώνεται το οξυγόνο στη θέση 2. Με την προσθήκη της υδραζίνης πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσβολή στη θέση αυτή. Στη συνέχεια μετά από συνεχείς πρωτονιώσεις και αποπρωτονιώσεις της υδραζίνης και των $-\text{OH}$ πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσβολή του C₄ από την αμινομάδα με αποτέλεσμα την δημιουργία του πυραζολικού δακτυλίου. Το $-\text{OH}$ στη θέση 3 απομακρύνεται ύστερα από πρωτονίωση και απομάκρυνση ενός μορίου H_2O .



Σχήμα 3: Μηχανισμός αντίδρασης για τον σχηματισμό της ένωσης 4

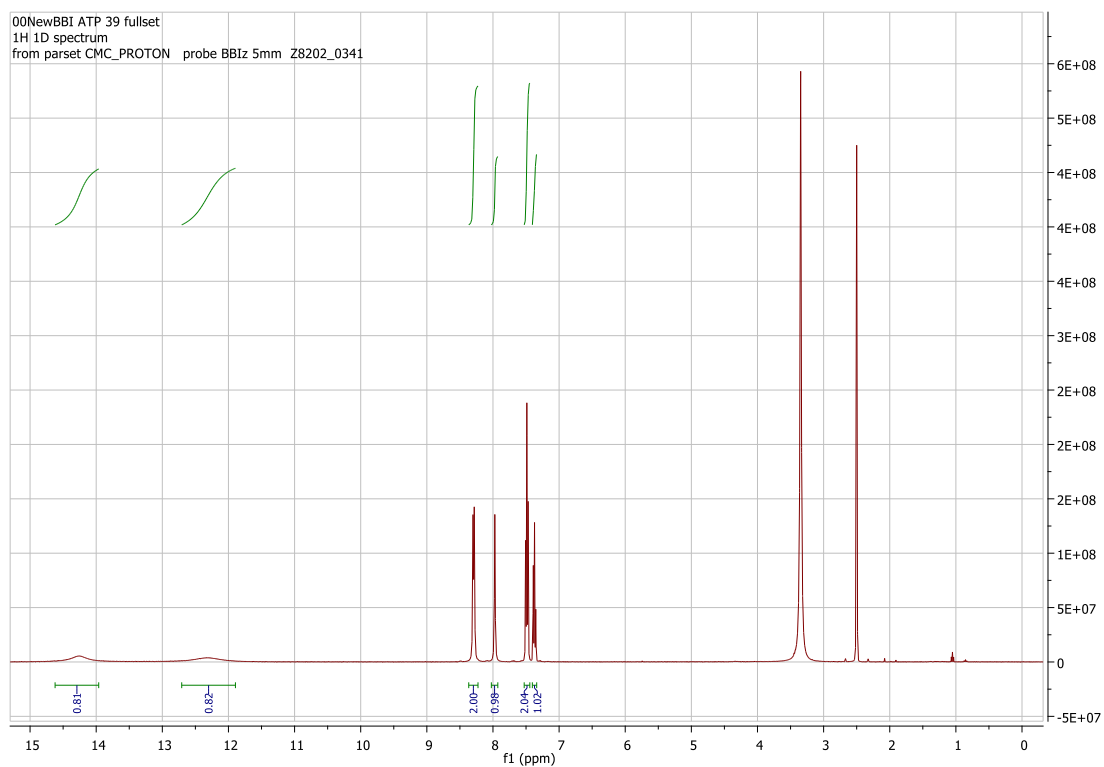
Ακολούθησε η σύνθεση του αμινοεστέρα **5**, που έγινε με υδρογόνωση με την χρήση αιθανόλης ως διαλύτη και Pd/C ως καταλύτη, κατά την οποία η πίεση διατηρήθηκε καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης στα 50 psi. Στη συνέχεια με επίδραση οξικού άλατος της φορμαμιδίνης (HN=CHNH₂·CH₃COOH) επί του αμινοεστέρα **5**, συντέθηκε μέσω κύκλωσης η πυραζολοπυριμιδινόνη **6**. Ο μηχανισμός της συγκεκριμένης αντίδρασης φαίνεται στο **Σχήμα 4**.



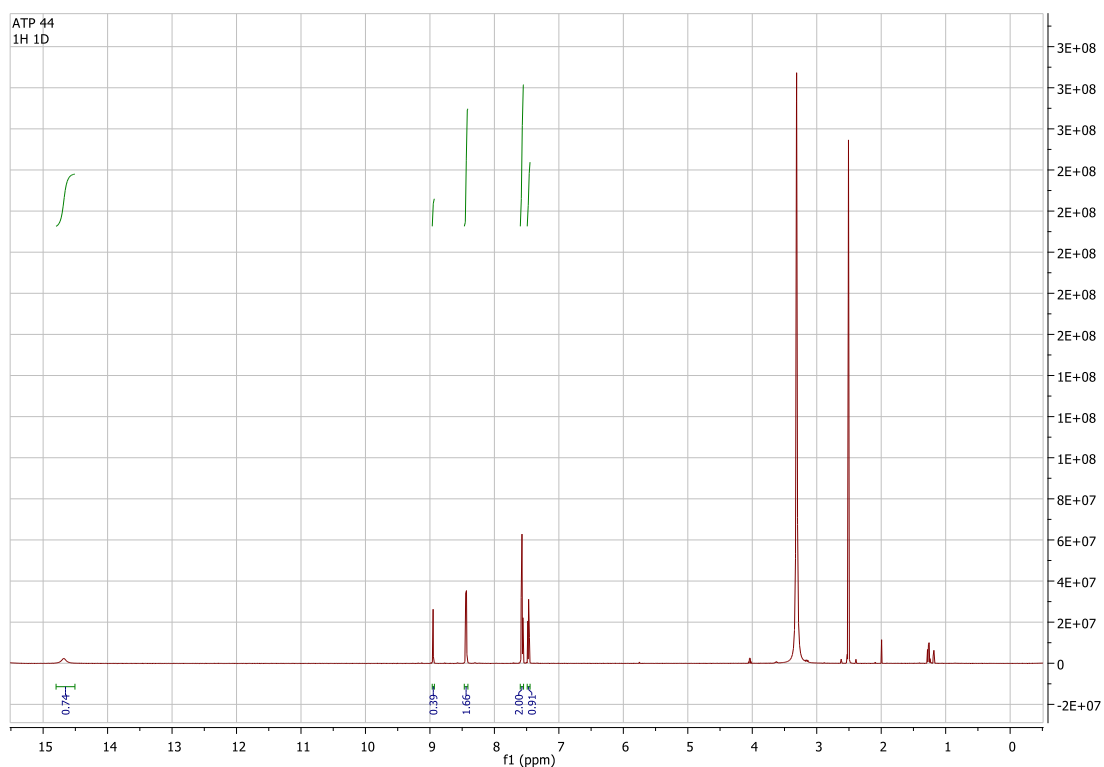
Σχήμα 4: Μηχανισμός αντίδρασης για τον σχηματισμό της ένωσης **6**.

Τέλος με την χρήση POCl₃ και *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (DIPEA) παρασκευάστηκε το χλωρίδιο **7**, το οποίο αποδείχτηκε σχετικά ασταθές καθώς, εάν δεν γίνει προσεκτική υδρόλυση του POCl₃ υπάρχει κίνδυνος υδρόλυσής του προς την πυριμιδινόνη **6**.

Η επιβεβαίωση της επιτυχούς πραγματοποίησης της αντίδρασης προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία του -Cl στη θέση 7 έγινε με την χρήση του NMR. Στην **εικόνα 12**, όπου παρουσιάζεται το φάσμα που αντιστοιχεί στην πυριμιδινόνη **6**, παρατηρείται ότι η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο -H του C₅ συντονίζεται στα 7.97 ppm, μεταξύ των αρωματικών -H του 3-φαινυλίου. Επίσης είναι χαρακτηριστικές οι απορροφήσεις των δυο αμινομάδων του πυραζολίου και της πυριμιδίνης στα 12.31 και 14.26 ppm αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά στο φάσμα που αντιστοιχεί στο χλωρίδιο **7** (**εικόνα 13**) παρατηρείται μια εμφανής αποπροστασία της απλής κορυφής, που πλέον συντονίζεται στα 8.9 ppm. Επιπλέον παρατηρείται πλέον μόνο η κορυφή της αμινομάδας του πυραζολίου στα 14.62 ppm.



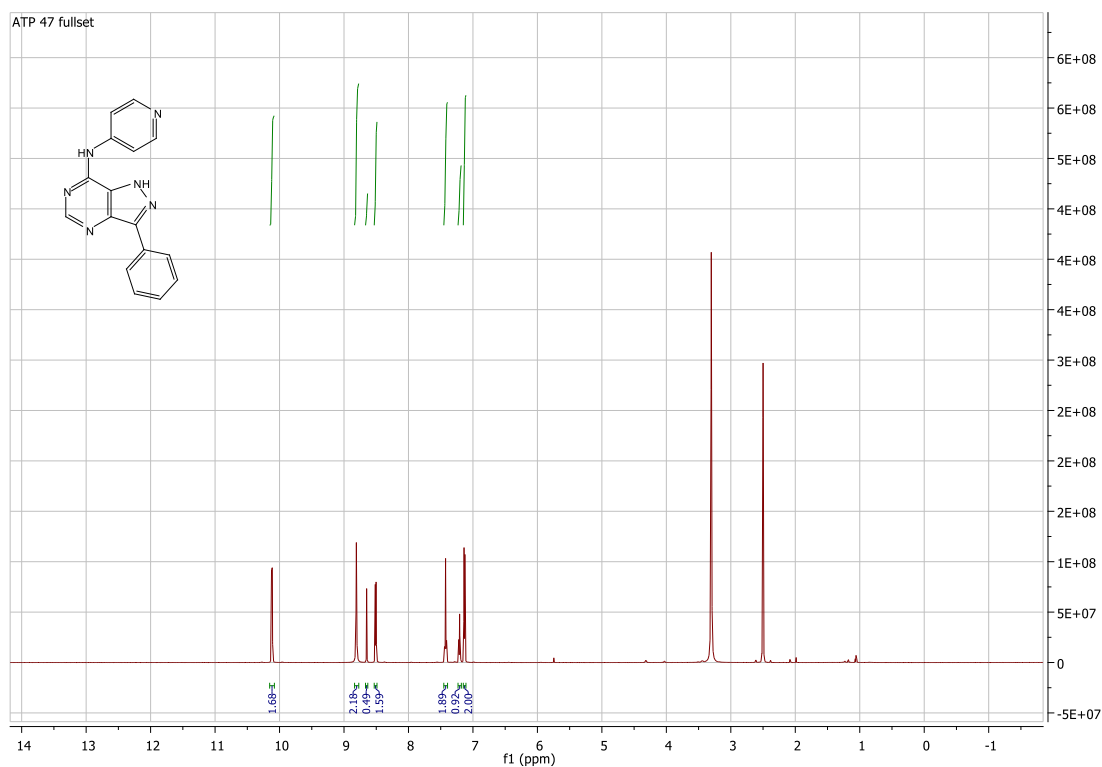
Εικόνα 12 : Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **6**.



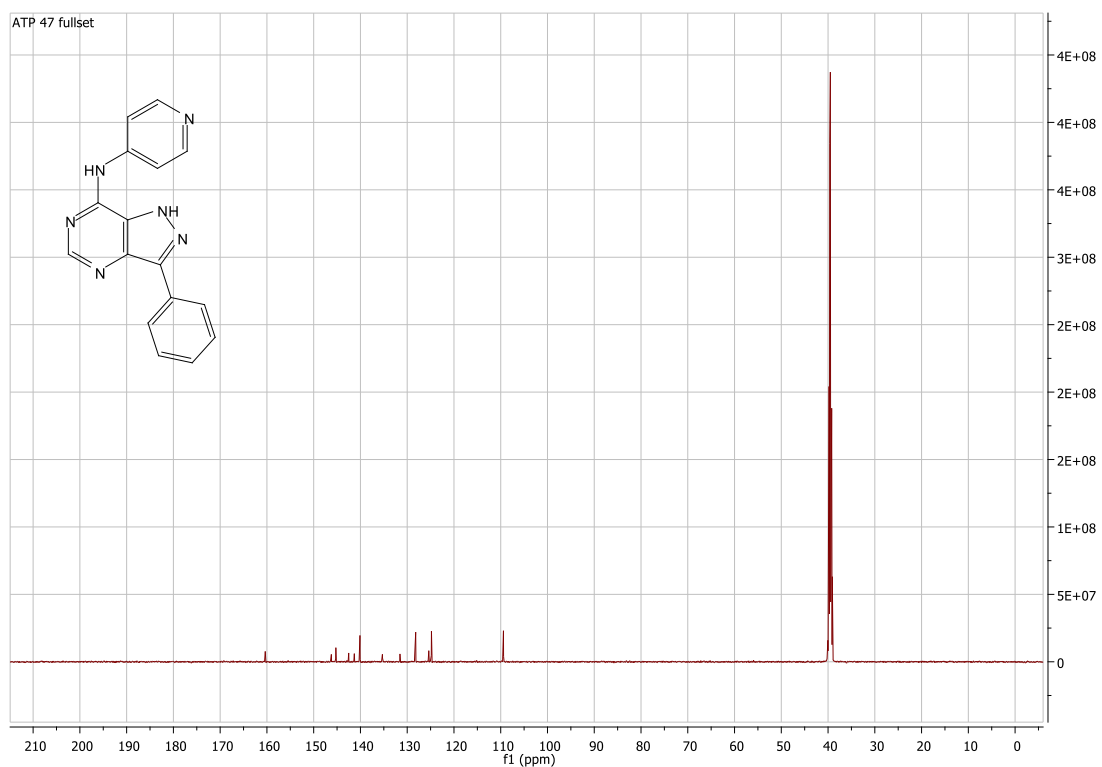
Εικόνα 13: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **7**.

Τέλος, τα επιθυμητά προϊόντα **8a-8e** παρασκευάστηκαν με πυρηνόφιλη προσβολή του $-\text{Cl}$ στη θέση 7 της ένωσης **7** από την κατάλληλη κάθε φορά αμίνη. Παρακάτω φαίνονται

ενδεικτικά τα φάσματα ^1H και ^{13}C του προϊόντος **8d**, όπου είναι εμφανείς οι απορροφήσεις των πρωτονίων και ανθράκων αντίστοιχα, της εισερχόμενης πυριδινικής ομάδας.



Εικόνα 14: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **8d**.

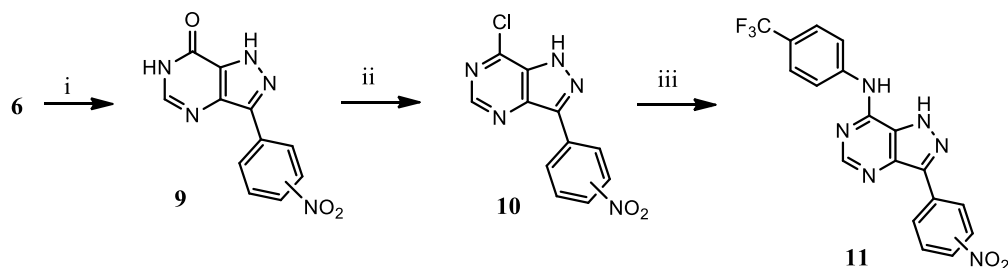


Εικόνα 15: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **8d**.

ii) Σύνθεση αναλόγων 3-(4-νιτροφαινυλο)-1H- πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης

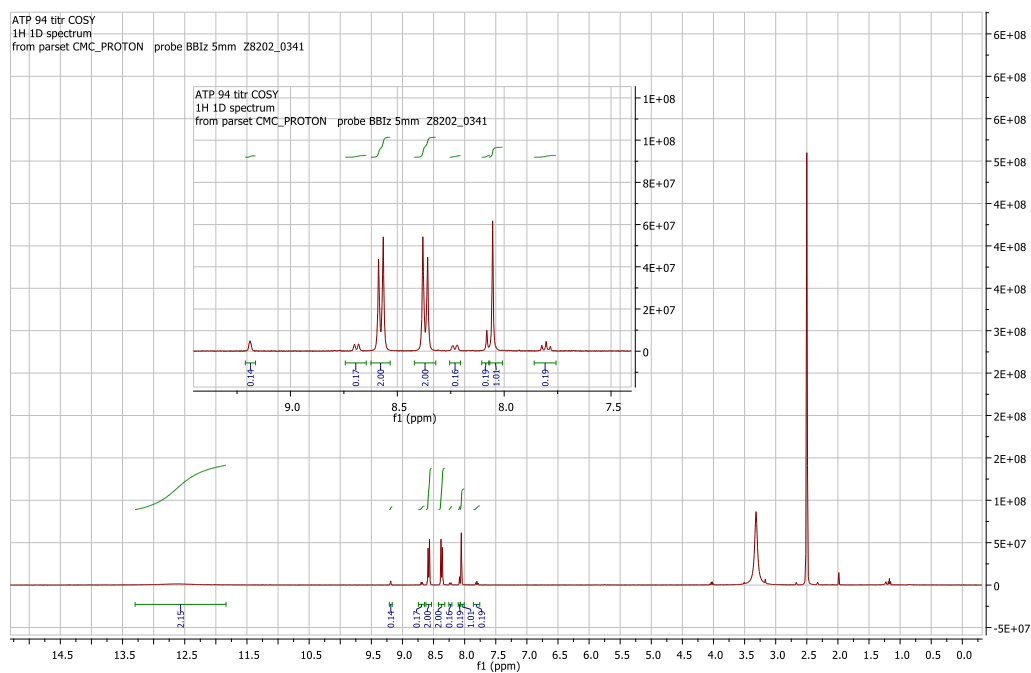
Στη συνέχεια, ξεκινώντας από το παράγωγο **6**, επιδιώξαμε νίτρωση του φαινυλίου προκειμένου να συντεθούν νέα νιτροπαράγωγα πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης.

Για την πραγματοποίηση της νίτρωσης χρησιμοποιήθηκε αρχικά H_2SO_4 96% και αμύζον HNO_3 (3.7 eq) και παρατηρήσαμε ότι η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί μετά από παρέλευση 90 λεπτών (Σχήμα 5).



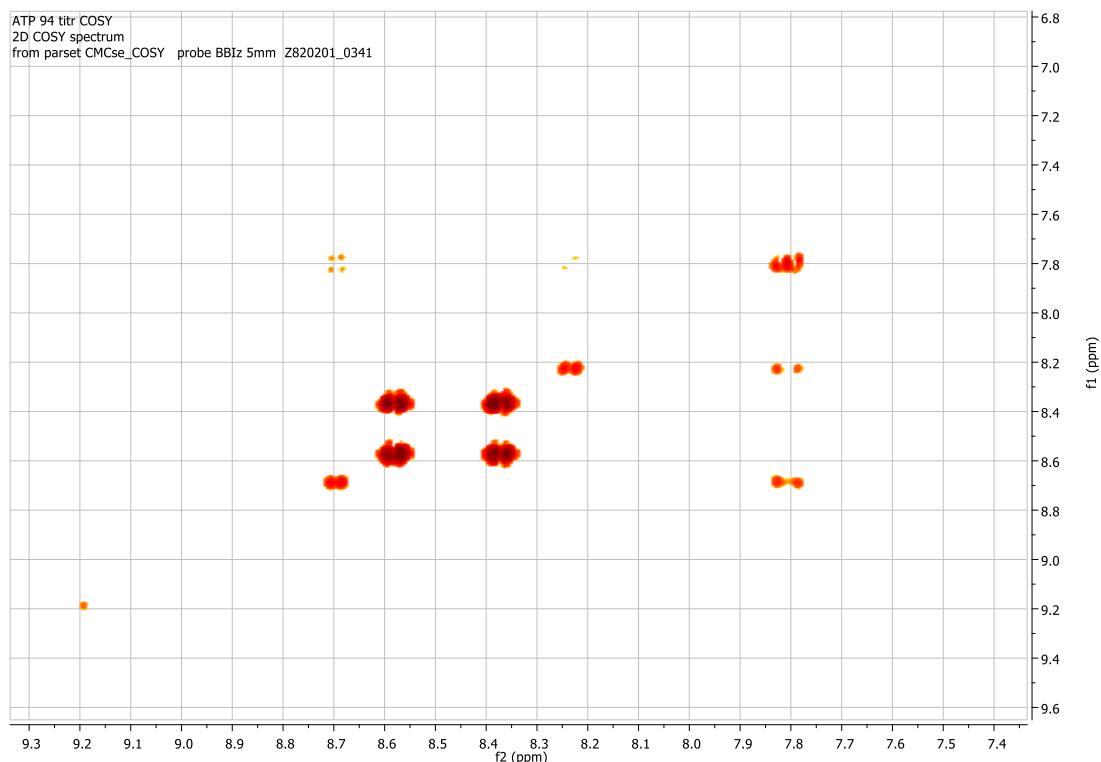
Σχήμα 5: Συνθήκες και αντιδραστήρια: i) H_2SO_4 96%, αμύζον HNO_3 , 0°C , 1.5h, ii) POCl_3 , DIPEA, 100°C , 3h, iii) EtOH, 4-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη, reflux, 2h.

Ωστόσο, μετά τον καθαρισμό του μίγματος της αντίδρασης διαπιστώθηκε από τη μελέτη του φάσματος ^1H NMR (εικόνα 16) ότι από την αντίδραση προέκυψε μίγμα των p- και m- νιτροπαράγωγων **9** σε αναλογία p:m 1:0,1. Κάτι τέτοιο δεν ήταν εμφανές κατά την παρακολούθηση της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, καθώς και τα δύο παράγωγα είχαν παραπλήσιο Rf.

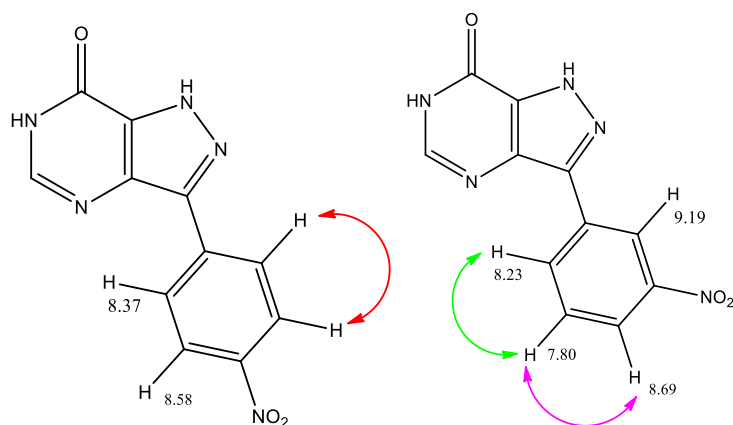


Εικόνα 16: Φάσμα ^1H NMR του μίγματος **9**.

Η απόδειξη ότι η ένωση **9** αποτελεί μίγμα των δυο ισομερών *p*- και *m*- έγινε μέσω πειράματος COSY. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 17** υπάρχει σύζευξη των πρωτονίων στα 8.37 και 8.58 ppm που αντιστοιχούν στο *p*- σύστημα του ενός ισομερούς που βρίσκεται στη μεγαλύτερη αναλογία (**εικόνα 18**). Σχετικά με το δεύτερο ισομερές, παρατηρείται σύζευξη της κορυφής του H που συντονίζεται στα 7.80 ppm με δύο κορυφές στα 8.23 και 8.69 ppm. Από τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι το ισομερές που βρίσκεται στην μικρότερη αναλογία στο μίγμα είναι το *m*- παράγωγο.



Εικόνα 17: Φάσμα COSY ένωσης **9**.



Εικόνα 18: Συζεύξεις ^1H του ισομερούς *p*- (αριστερά) και *m*- (δεξιά) του μίγματος **9**.

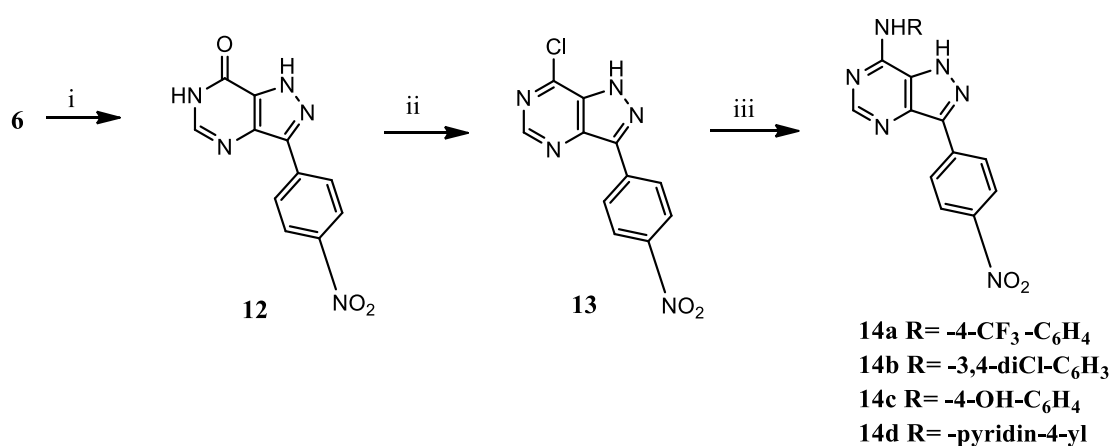
Για τον διαχωρισμό των δυο ισομερών πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική στήλη με σύστημα διαλυτών 95/5-80/20 DCM/MeOH καθώς και 7/3/1 DCM/EtOAc/ακετόνη. Και στις δυο περιπτώσεις τα δυο ισομερή εκλούσθηκαν από την στήλη ως μίγμα, χωρίς να γίνει δυνατός ο διαχωρισμός τους. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να διαχωριστούν μέσω ανακρυστάλλωσης αλλά λόγω της σημαντικής δυσδιαλυτότητας του μίγματος σε πληθώρα διαλυτών και μιγμάτων τους αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί απλός καθαρισμός (trituration), χρησιμοποιώντας διαδοχικά EtOAc, EtOH και MeOH. Ωστόσο από τα φάσματα NMR φάνηκε ότι η αναλογία των δυο ισομερών παρέμενε σχεδόν ίδια με το αρχικό δείγμα. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε άλλες τρεις φορές αλλά μόνο με MeOH και αυτή την φορά υπό θέρμανση, χωρίς όμως επιτυχία. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η πραγματοποίηση της νίτρωσης με τη χρήση H₂SO₄ 96% και HNO₃ 65% (1eq) για 2h καθώς και με H₂SO₄ 96% και KNO₃ (2eq) για 30 min. Και στις δυο περιπτώσεις δημιουργήθηκε το μίγμα των δυο ισομερών, στην ίδια αναλογία, χωρίς να είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους.

Αφού τα δυο ισομερή δεν απομονώθηκαν σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιήθηκε η χλωρίωση του μίγματος χρησιμοποιώντας POCl₃ και DIPEA. Παρελήφθη μίγμα των δύο ισομερών χλωριδίων **10** (Σχήμα 5), επιχειρήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός με τη χρήση μίγματος διαλυτών DCM/MeOH 100/0-95/5 χωρίς πάλι να είναι εφικτή η απομόνωση των χλωροπαραγώγων. Τέλος πραγματοποιήθηκε πυρηνόφιλη προσβολή στο μίγμα των χλωροπαραγώγων με 4-(τριφθορομεθυλ)ανιλίνη, όμως πάλι, τα δύο ισομερή **11**, δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν από το μίγμα, τόσο με χρωματογραφία στήλης, όσο και με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

Καθώς οι παραπάνω δοκιμές απέτυχαν η νίτρωση του φαινυλίου πραγματοποιήθηκε στο χλωρίδιο **7**. Οι συνθήκες και το αποτέλεσμα των αντιδράσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

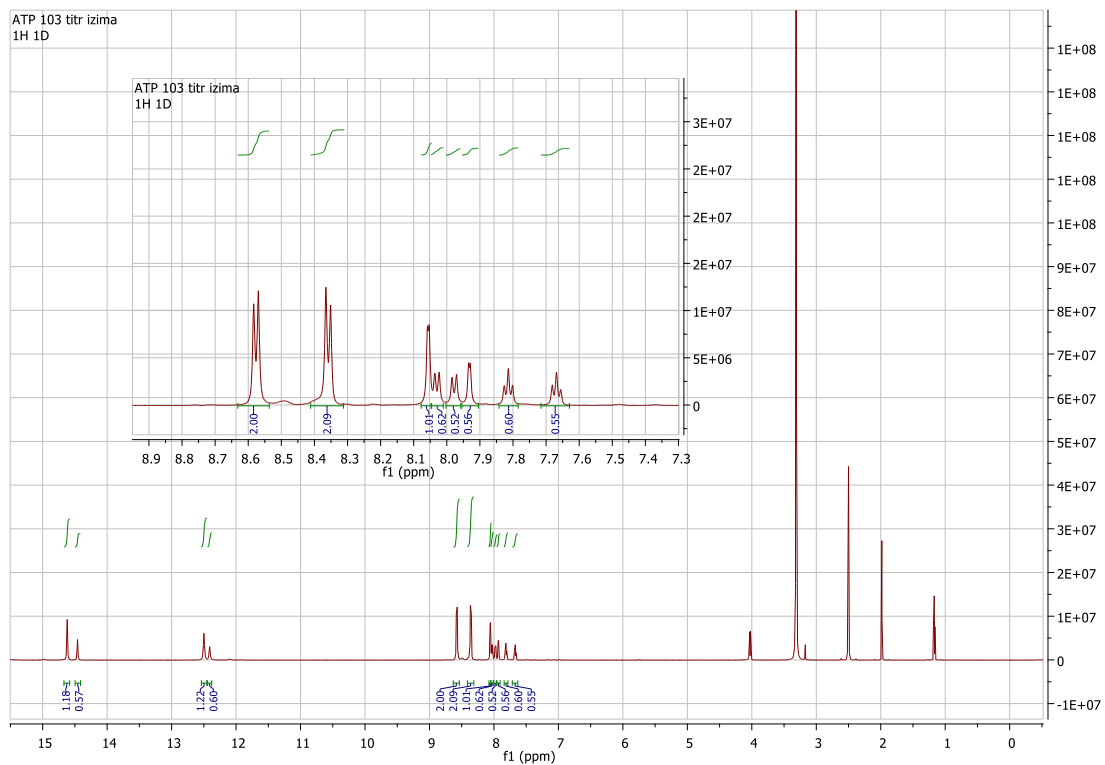
Αντιδραστήρια και συνθήκες	Χρόνος αντίδρασης (h)	Αποτέλεσμα αντίδρασης
H ₂ SO ₄ 96% + ατμίζον HNO ₃ (3.7 eq), 0°C	0.5	Υδρόλυση -Cl και μίγμα ισομερών -p και -m
CF ₃ COOH + ατμίζον HNO ₃ (1.5eq), 0°C	1	Υδρόλυση -Cl και λήψη μόνον ενός ισομερούς και πρώτης ύλης (2:1)
CH ₃ COOH + ατμίζον HNO ₃ (5eq), 0°C	12	Υδρόλυση -Cl χωρίς να γίνει νίτρωση

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και βασιζόμενοι στο γεγονός ότι έχοντας ως διαλύτη το CF_3COOH σχηματίζεται το ένα ισομερές πραγματοποιήθηκε πάλι νίτρωση στην ένωση **6**. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε HNO_3 65% (1eq) και η αντίδραση αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση και ψύξη για 2h. Από τη μελέτη φασμάτων NMR παρατηρήθηκε ότι είχε σχηματιστεί μόνο το p- ισομερές αλλά το μίγμα περιείχε σημαντικό ποσοστό πρώτης ύλης, σε αναλογία 1:2. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε αμίζον HNO_3 (3eq) και η αντίδραση αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση και ψύξη για 3h και επιπλέον μισή ώρα χωρίς ψύξη. Από φάσμα NMR διαπιστώθηκε πάλι ότι είχε σχηματιστεί μόνο το -p ισομερές αλλά σε αναλογία 2:1 ως προς την πρώτη ύλη. Τελικά, για την σύνθεση των νιτροπαραγώγων πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνης έγινε η σειρά αντιδράσεων που παρουσιάζεται στο σχήμα 6.

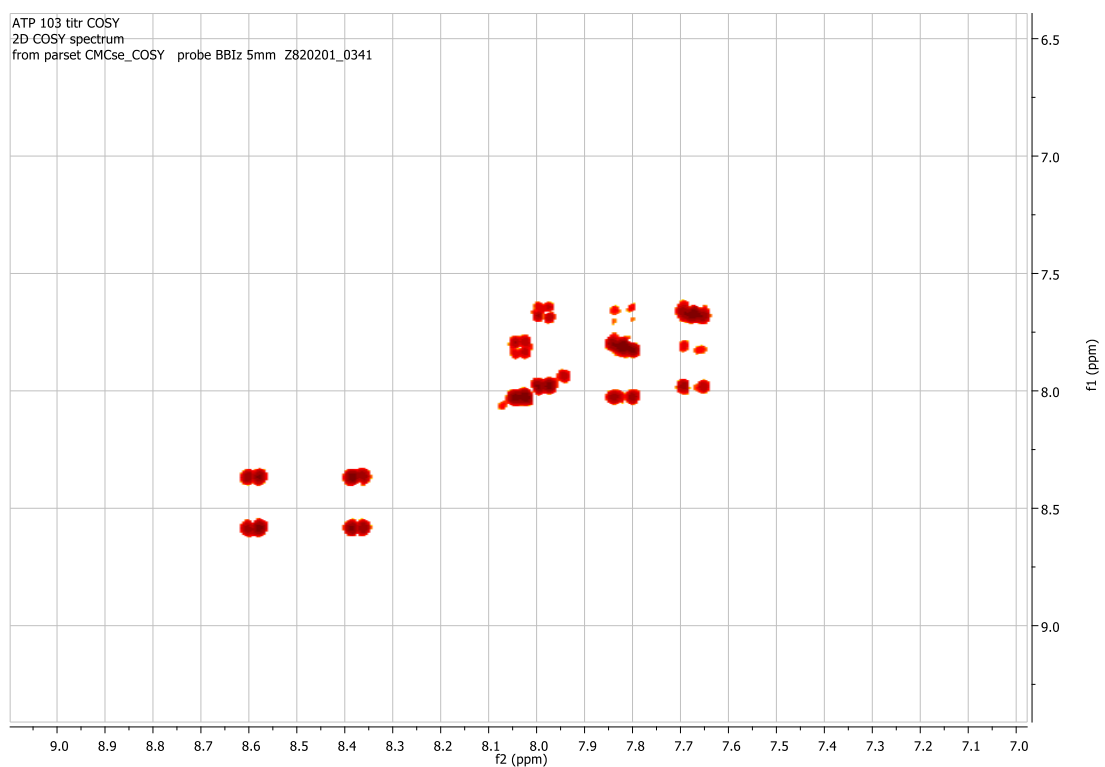


Σχήμα 6: Συνθήκες και αντιδραστήρια: i) CF_3COOH , αμίζον HNO_3 , rt, 3h, ii) POCl_3 , DIPEA, 100°C , 3h, iii) EtOH, R- NH_2 , reflux, 2h.

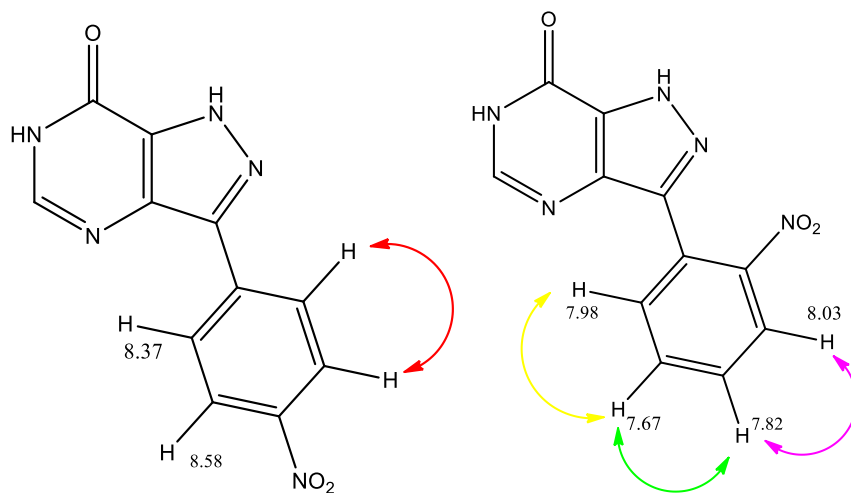
Η αντίδραση της νίτρωσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Από το NMR διαπιστώθηκε ότι είχε σχηματιστεί το p-νιτροπαραγώγο **12** και ένα μικρό ποσοστό του αντίστοιχου o- νιτροπαραγώγου σε αναλογία p:o 1:0,3 (εικόνα **19**). Η απόδειξη της παρουσίας των δυο αυτών ισομερών έγινε μέσω πειράματος COSY. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 20** υπάρχει σύζευξη των πρωτονίων στα 8.37 και 8.58 ppm που αντιστοιχούν στο p-σύστημα. Αντίστοιχα για το o- ισομερές βλέπουμε την σύζευξη του H στα 7.67 ppm με δύο γειτονικά H στα 7.98 και 7.82 ppm και ταυτόχρονα την κορυφή διασταύρωσης της απορρόφησης του H στα 7.82 ppm με το H στα 8.03 ppm. Τα παραπάνω συνηγορούν στην παρουσία του o-υποκατεστημένου παραγώγου, που βρίσκεται σε μικρή αναλογία στο μίγμα (εικόνα **21**).



Εικόνα 19: Φάσμα ^1H του μίγματος p- και o- της ένωσης **12**.

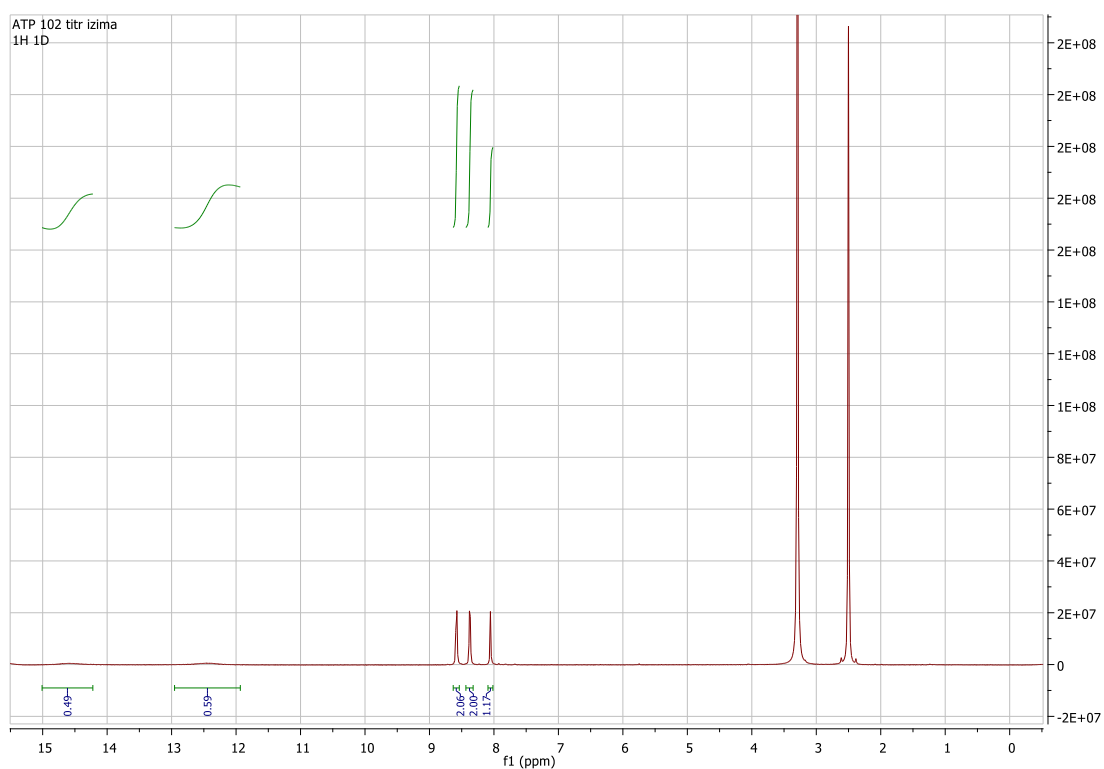


Εικόνα 20: Φάσμα COSY του μίγματος p- και o- της ένωσης **12**.



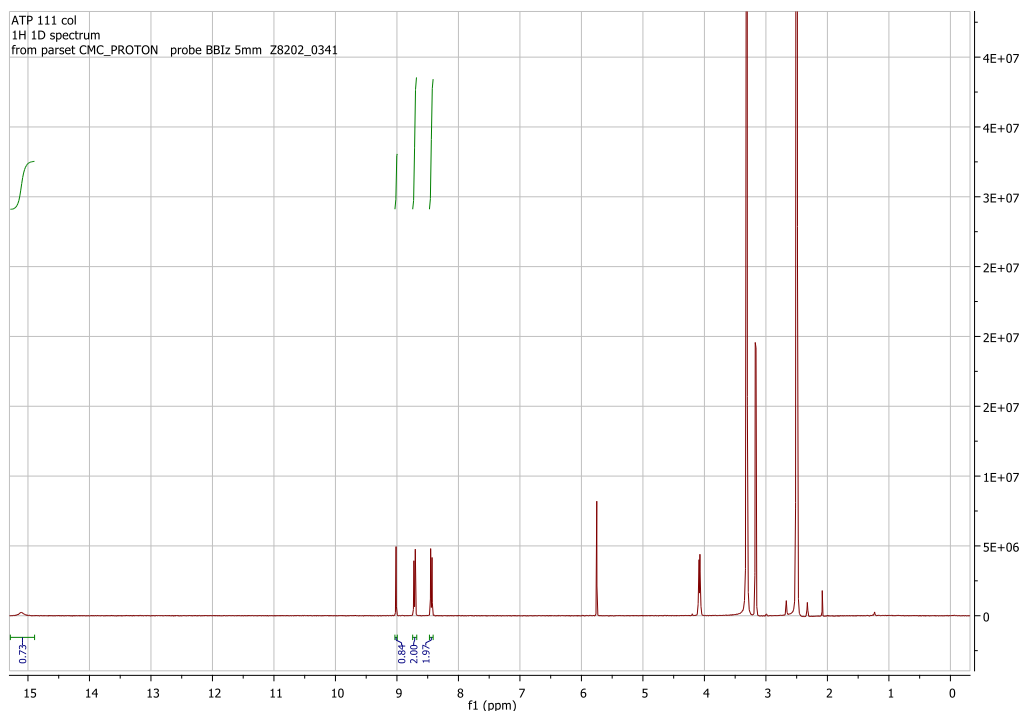
Εικόνα 21: Συζεύξεις ^1H του ισομερούς p- (αριστερά) και o- (δεξιά) ένωσης **12**.

Προκειμένου να προκύψει καθαρή η ένωση **12** πραγματοποιήθηκαν διαδοχικοί καθαρισμοί (trituration) με MeOH (**εικόνα 22**).



Εικόνα 22: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **12**.

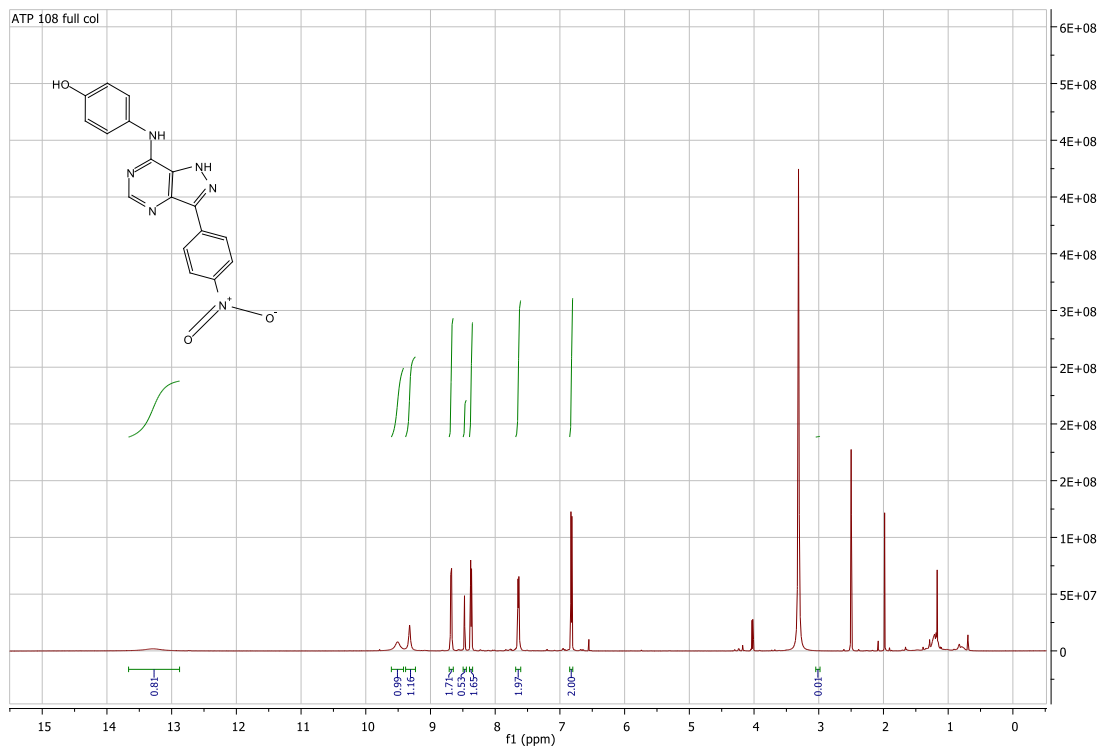
Τέλος με την χρήση POCl_3 και *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνης (DIPEA) παρασκευάστηκε το χλωρίδιο **13**.



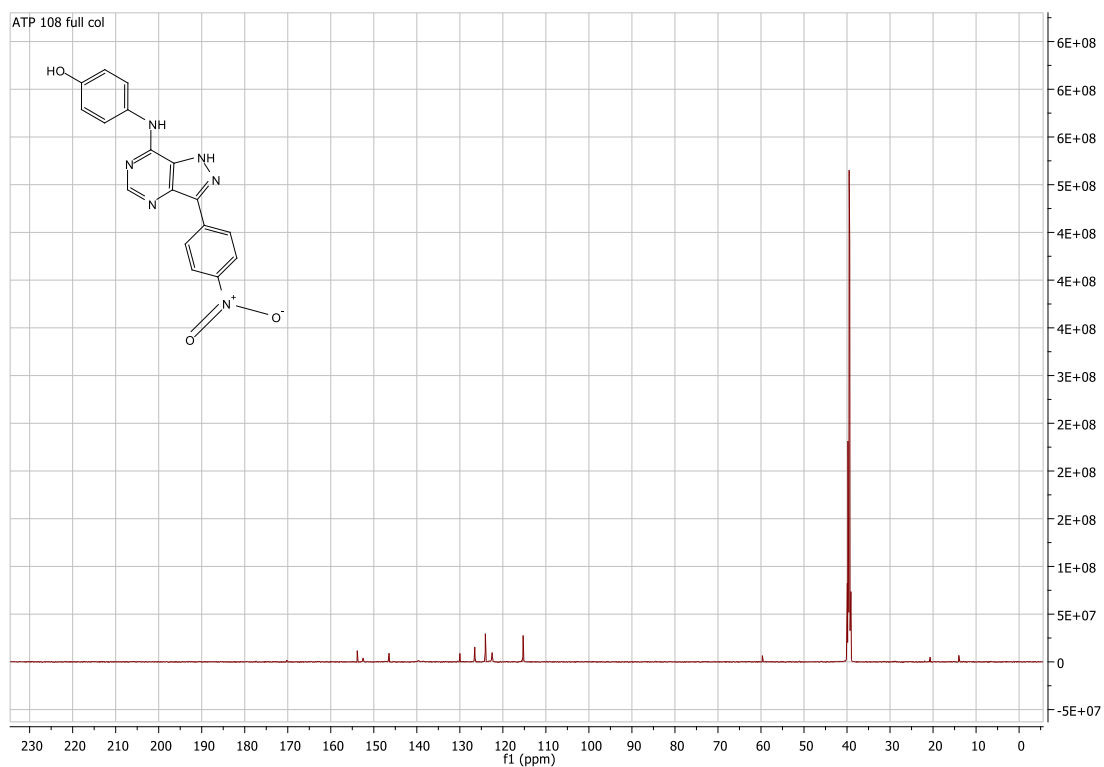
Εικόνα 23: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **13**.

Η επιβεβαίωση της επιτυχούς πραγματοποίησης της αντίδρασης προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία του $-\text{Cl}$ στη θέση 7 έγινε με την χρήση του NMR. Στο φάσμα που αντιστοιχεί στην ένωση **12** (εικόνα 22), παρατηρείται ότι η απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο $-\text{H}$ του C_5 συντονίζεται στα 8,05 ppm, και είναι επιπλέον εμφανείς οι απορροφήσεις των δυο αμινομάδων, του πυραζολίου και της πυριμιδίνης, στα 12.45 και 14.61 ppm αντίστοιχα. Αντίστοιχα, στο φάσμα του χλωριδίου **13** (εικόνα 23) παρατηρείται εμφανής αποπροστασία της απλής κορυφής στα 9,01 ppm, έχει εξαφανιστεί η κορυφή της αμινομάδας της πυριμιδίνης και παρατηρείται μόνο η κορυφή της αμινομάδας του πυραζολίου στα 15,11 ppm.

Προκειμένου να σχηματιστούν τα τελικά προϊόντα **14a-14d** πραγματοποιήθηκε πυρηνόφιλη προσβολή του $-\text{Cl}$ στη θέση 7 της ένωσης **13** από την κατάλληλη κάθε φορά αμίνη. Παρακάτω φαίνονται ενδεικτικά τα φάσματα ^1H και ^{13}C του προϊόντος **14c**, όπου είναι εμφανείς οι απορροφήσεις των πρωτονίων και ανθράκων αντίστοιχα, της εισερχόμενης 4-υδροξυφαινυλομάδας.



Εικόνα 24: Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **14c**.



Εικόνα 25: Φάσμα ^{13}C NMR της ένωσης **14c**.

Πειραματικό μέρος

Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel 60 AC.C (SDS 35-70 μm). Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) σε πλάκες Silica gel 60_{F254}. Για τη λήψη φασμάτων ¹H-NMR, ¹³C-NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτόμετρα Bruker Avance 400 ή 600. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃), δευτεριωμένη μεθανόλη (CD₃OD) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*₆).

2,4-διοξο-4-φαινυλοβουτανοϊκός αιθυλεστέρας (2): Εντός διαλύματος αιθοξυνατρίου, που σχηματίζεται από προσθήκη Na (2.3 g, 101 mmol, 1.2 eq) εντός EtOH (52 mL) σε περιβάλλον Ar στους 0°C, προστίθεται ακετοφαινόνη (10 mL, 85.8 mmol) και το μίγμα αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστίθεται οξαλικός διαιθυλεστέρας (14 mL, 103 mmol, 1.2 eq) και η ανάδευση συνεχίζεται για 1 h στους 0°C. Ακολουθεί εξουδετέρωση με διάλυμα αραιού HCl μέχρι pH 2-3 και το κίτρινο στερεό που καθιζάνει διηθείται υπό κενό, εκπλένεται με νερό και ξηραίνεται υπεράνω CaCl₂, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος **2**.

Κίτρινο στερεό; απόδοση: 90%; Σ.Τ.: 43 °C (CDCl₃/πετρελαϊκός αιθέρας); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 1.4 (t, 3H, J = 7.1 Hz, O-CH₂-CH₃), 4.4 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH₂-CH₃), 7.08 (s, 1H, CH), 7.5 (t, 2H, J = 7.7 Hz, φαινυλο-H₂), 7.61 (t, 1H, 7.3 Hz, φαινυλο-H₃), 7.99 (d, 2H, J = 7.6 Hz, φαινυλο-H₁); ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 14.29 (O-CH₂-CH₃), 62.81 (O-CH₂-CH₃), 98.14 (=CH), 128.09 (φαινυλο-C₂), 129.1 (φαινυλο-C₃), 133.98 (φαινυλο-C₄), 135.12 (φαινυλο-C₁), 162.41 (COO), 170.03 (=CHCOH), 190.92 (C₆H₅-CO).

4-νιτρωδο-3-φαινυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (4): Σε διάλυμα του δικετοεστέρα **2** (1.5 g, 6.81 mmol) εντός οξικού οξέος (6 mL) στους 10 °C, προστίθεται NaNO₂ (10.22 mmol, 1.5 eq) και το μίγμα αναδεύεται για 1 h στους 10 °C. Κατόπιν προστίθεται υπό ψύξη NH₂NH₂·H₂O (0.3 mL, 6 mmol, 0.3 eq) και το διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται για 30 min και αποκτά χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα. Ακολουθεί εξουδετέρωση με διάλυμα NaOH 1N, εκχύλιση με EtOAc, ξήρανση της οργανικής στοιβάδας (Na₂SO₄) και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα c.Hexane/EtOAc 80/20.

Πράσινο άμορφο στερεό; απόδοση: 38%; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 1.38 (t, 3H, J = 7.1 Hz, O-CH₂-CH₃), 4.38 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH₂-CH₃), 7.46-7.52 (m, 2H, φαινυλο-H₂), 7.52-7.58 (m, 1H, φαινυλο-H₃), 8.01 (m, φαινυλο-H₁); ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ ppm: 14.01 (O-CH₂-

\underline{C}_3), 62.6 (O- \underline{C}_2 -CH₃), 126.47 (φαίνυλο-C₁), 129.28 (φαίνυλο-C₃), 129.35(φαίνυλο-C₂), 131 (=C-CO), 131.47 (φαίνυλο-C₄), 145.91 (C₆H₅- \underline{C} =), 155.76 (=C-NO), 161.72 (=C-CO).

4-Αμινο-3-φαίνυλο-1H-πυραζολο-5-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας (5): Σε διάλυμα του **4** (1.3 g, 5.3 mmol) εντός EtOH (30 mL) προστίθεται Pd/C (100 mg) και το μίγμα υδρογονώνεται σε πίεση 50 psi για 4,5 h. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό με κελλίτη και απομάκρυνση του διαλύτη.

Πορτοκαλί στερεό; απόδοση: 85%; Σ.Τ.: 152 °C (EtOAc); ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 1.32 (t, 3H, J = 7.1 Hz, O-CH₂- \underline{C}_3), 4.32 (q, 2H, J = 7.1 Hz, O-CH₂-CH₃), 4.9 (s, 2H, NH₂), 7.3 (t, 1H, J = 7.4 Hz, φαίνυλο-H₃), 7.44 (t, 2H, J = 7.7 Hz, φαίνυλο-H₂), 7.73 (d, 2H, J = 7.6 Hz, φαίνυλο-H₁), 13.17 (s, 1H, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 14.28 (O-CH₂- \underline{C}_3), 59.73 (O-CH₂-CH₃), 125.52 (φαίνυλο-C₂), 126.75 (φαίνυλο-C₄), 128.42 (C₆H₅- \underline{C} =), 128.57 (φαίνυλο-C₃), 132.3 (φαίνυλο-C₁), 141.45 (C₅), 161.02(=C-CO), 174.64 (C₄).

3-φαίνυλο-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7(6H)-όνη (6): Σε εναιώρημα του αμινοεστέρα **5** (920 mg, 3.98 mmol) εντός n-βουτανόλης (11.4 mL) προστίθεται οξική φορμαμιδίνη (964.4 mg, 9.2 mmol, 2.3 eq) και το μίγμα αναδεύεται σε βρασμό για 12 h. Ακολουθεί προσθήκη χλωροφορμίου και διήθηση υπό κενό.

Μωβ στερεό; απόδοση: 84%; Σ.Τ.: >300 °C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.37 (t, 1H, J = 7.4 Hz, φαίνυλο-H₃), 7.49 (t, 2H, J = 7.6 Hz, φαίνυλο-H₂), 7.97 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 8.29 (d, 2H, J=7.5 Hz, φαίνυλο-H₁), 12.34 (s, NH πυριμιδίνης ανταλλάξιμο), 14.27 (s, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 126 (φαίνυλο-C₂), 128.06 (φαίνυλο-C₃), 128.67 (φαίνυλο-C₄), 132.15 (φαίνυλο-C₁), 136.58 (C_{3a}), 142.6 (C₃), 143.28 (C₅), 153.09 (C₇).

7-χλωρο-3-φαίνυλο-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνη (7): Σε εναιώρημα της πυριμιδινόνης **6** (800 mg, 3.77 mmol) εντός POCl₃ (6 mL) προστίθεται υπό Ar N,N-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (1 mL) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 3 h. Κατόπιν υδρολύεται ο POCl₃ με προσθήκη πάγου και νερού και γίνεται εξουδετέρωση με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ μέχρι pH 5-6. Καθιζάνει κίτρινο στερεό. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, έκπλυση με νερό και ξήρανση υπεράνω CaCl₂. Πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα c.Hexane/EtOAc 70/30 για να προκύψει καθαρό το παράγωγο **7**.

Λευκό στερεό; απόδοση: 90%; Σ.Τ.: 224 °C (DCM); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.43 (t, 1H, J = 7.4 Hz, φαίνυλο-H₃), 7.53 (t, 2H, J = 7.6 Hz, φαίνυλο-H₂), 8.39 (d, 2H, J = 7.6 Hz, φαίνυλο-H₁), 8.90 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 14.62 (s, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR

(DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 126.26 (φαίνυλο-C₂), 128.74(φαίνυλο-C₁, φαίνυλο-C₃) , 130.85 (φαίνυλο-C₁), 141.95(C_{3a}) , 142.45(C₃) , 144.5 (C_{7a}), 150.43 (C₅ & C₇).

Γενική μέθοδος παρασκευής τελικών προϊόντων (8a-8e): Σε διάλυμα του χλωριδίου **7** (80 mg, 0.347 mmol) εντός EtOH (5mL) προστίθεται υπό Ag η κατάλληλη αμίνη (3eq) και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2 h. Κατόπιν αποχύνεται σε πάγο και νερό και το αποβαλλόμενο στερεό διηθείται υπό κενό, πλένεται με νερό και ξηραίνεται υπεράνω CaCl₂. Το προϊόν καθαρίζεται στη συνέχεια με χρωματογραφία στήλης (silica gel).

3-φαίνυλο-N-(4-(τριφθορομεθυλο)φαίνυλο)-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (8a):

Η ένωση **8a** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα 70/30 c.Hexane/EtOAc.

Λευκό στερεό; απόδοση: 90%; Σ.Τ.: 291 °C (EtOAc/n-pentane); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.41 (t, 1H, J = 7.4 Hz, φαίνυλο-H₃), 7.54 (t, 2H, J=7.6 Hz, φαίνυλο-H₂), 7.78 (d, 2H, J=8.4 Hz, τριφθορομεθυλοφαίνυλο-H₂), 8.19 (s, 2H, τριφθορομεθυλοφαίνυλο-H₁), 8.43 (d, 2H, J = 7.2 Hz, φαίνυλο-H₁), 8.6 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 10.06 (s, 1H, NH αμίνης ανταλλάξιμο), 13.06 (s, 1H, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο) ; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 119.97 (τριφθορομεθυλοφαίνυλο-C₂), 122.8 (τριφθορομεθυλοφαίνυλο-C₄), 123.6 (-CF₃), 126.07 (φαίνυλο-C₂ & τριφθορομεθυλοφαίνυλο-C₃), 128.23 (φαίνυλο-C₄), 128.72 (φαίνυλο-C₃), 131.89 (φαίνυλο-C₁), 140 (C_{3a}), 142.25 (C₃), 142.8 (τριφθορομεθυλοφαίνυλο-C₁), 146.4 (C_{7a}), 151.2 (C₇), 151.27 (C₅).

N-(3,4-διχλωροφαίνυλο)-3-φαίνυλο-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (8b): Η ένωση **8b** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 100/0-95/5.

Λευκό στερεό; απόδοση: 81%; Σ.Τ.: 298 °C (EtOAc); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.41 (t, 1H, J=7.3 Hz, φαίνυλο-H₃), 7.53 (t, 2H, J=7.5 Hz, φαίνυλο-H₂), 7.64 (d, 1H, J=8.7 Hz, διχλωροφαίνυλο-H₃), 7.82 (s, 1H, διχλωροφαίνυλο-H₂), 8.42 (d, 2H, J = 7.1 Hz, φαίνυλο-H₁), 8.46 (s, 1H, διχλωροφαίνυλο-H₂), 8.58 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 10.11 (s, 1H, NH αμίνης ανταλλάξιμο), 13.18 (s, 1H, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 120.24 (διχλωροφαίνυλο-C₆), 121.4 (διχλωροφαίνυλο-C₂), 124.39, (διχλωροφαίνυλο-C₄) 126 (φαίνυλο-C₂), 128.19 (φαίνυλο-C₄), 128.7 (φαίνυλο-C₃), 130.54 (διχλωροφαίνυλο-C₅),

130.8 (διχλωροφαινυλο-C₃), 131.7 (φαινυλο-C₁), 139.27 (διχλωροφαινυλο-C₁), 151.28 (C₅ & C₇).

N-(4-υδροξυφαινυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (8c): Η ένωση **8c** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 100/0-95/5.

Καφέ στερεό; απόδοση: 80%; Σ.Τ.: 288 °C (EtOAc); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 6.82 (d, 2H, J=8.6 Hz, υδροξυφαινυλο-H₂), 7.39 (t, 1H, J=7.3 Hz, φαινυλο-H₃), 7.51 (t, 2H, J=7.6 Hz, φαινυλο-H₂), 7.67 (d, 2H, J=8.6 Hz, υδροξυφαινυλο-H₁) 8.42 (d, 3H, φαινυλο-H₁ και CH πυριμιδίνης), 9.3 (s, 1H, -OH), 9.5 (s, 1H, NH αμίνης ανταλλάξιμο), 12.95 (s, 1H, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 115.27 (υδροξυφαινυλο-C₃), 122.5 (υδροξυφαινυλο-C₂), 126.03 (φαινυλο-C₂), 127.99 (φαινυλο-C₄), 128.63 (φαινυλο-C₃), 130.29 (υδροξυφαινυλο-C₁), 131.72 (φαινυλο-C₁), 139.1 (C_{3a}), 141.5 (C₃), 151.8 (C₅ & C₇), 153.71 (υδροξυφαινυλο-C₄).

3-φαινυλο-N-(πυριδιν-4-υλο)-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (8d): Η ένωση **8d** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 95/5-80/20.

Κίτρινο στερεό; απόδοση: 86%; Σ.Τ.: 225 °C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.14 (d, 2H, J=7.6 Hz, πυριδιν-4-υλο-H₁), 7.21 (t, 1H, J=7.3 Hz, φαινυλο-H₃), 7.43 (t, 2H, J=7.7 Hz, φαινυλο-H₂), 8.52 (d, 2H, J=7.4 Hz, φαινυλο-H₁), 8.66 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 8.82 (s, 2H, NH ανταλλάξιμα), 10.13 (d, 2H, J=7.6 Hz, πυριδιν-4-υλο-H₂); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 109.43 (πυριδιν-4-υλο-C₂), 124.82 (φαινυλο-C₂), 125.39 (φαινυλο-C₄), 128.2 (φαινυλο-C₃), 135.31 (φαινυλο-C₁), 140.12 (πυριδιν-4-υλο-C₃), 141.32 (C₃), 142.62 (C_{3a}), 145.27 (C₅ & C₇), 146.23 (C_{7a}), 160.37 (πυριδιν-4-υλο-C₁).

N-(4-νιτροφαινυλο)-3-φαινυλο-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (8e): Η ένωση **8e** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 95/5-80/20.

Κίτρινο στερεό; απόδοση: 89%; Σ.Τ.: >300 °C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 7.4 (t, 1H, J = 7.4 Hz, φαινυλο-H₃), 7.53 (t, 2H, J = 7.6 Hz, φαινυλο-H₂), 8.28 (d, 2H, J = 9.3 Hz, νιτροφαινυλο-H₁), 8.35 (d, 2H, J = 9.2 Hz, νιτροφαινυλο-H₂), 8.42 (d, 2H, J = 7.5 Hz, φαινυλο-

H₁), 8.66 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 11.19 (s, NH αμίνης ανταλλάξιμο), 14.06 (s, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ ppm: 119.27 (νιτροφαινυλο-C₃), 125.05 (νιτροφαινυλο-C₂), 126.25 (φαινυλο-C₂), 128.33 (φαινυλο-C₄), 128.81 (φαινυλο-C₃), 132.07 (φαινυλο-C₁), 140.2 (C_{3α}), 141.7 (νιτροφαινυλο-C₁), 141.9 (C₃), 145.96 (νιτροφαινυλο-C₄), 146.4 (C₇), 151.16 (C₅ & C₇).

Μίγμα p- και m- (9): Σε διάλυμα της πυραζολοπυριμιδινόνης **6** (1 g, 4.72 mmol) εντός H₂SO₄ 96% (14 mL) προστίθεται ατμίζον HNO₃ (0.7 mL, 3.7 eq) και το διάλυμα αναδεύεται στους 0°C για 1.5 h. Κατόπιν αποχύνεται σε πάγο και νερό και γίνεται εξουδετέρωση με NH₃ 25% μέχρι pH 6. Καθιζάνει πορτοκαλί στερεό. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και έκπλυση με νερό. Ακολουθεί χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/EtOAc/ακετόνη 7/3/1.

Μίγμα p- και m- (10): Σε εναιώρημα του μίγματος **9** (150 mg, 0.56 mmol) εντός POCl₃ (1 mL) προστίθεται υπό Ar *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (0.15 mL) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 3 h. Κατόπιν υδρολύεται ο POCl₃ με προσθήκη πάγου και νερού και γίνεται εξουδετέρωση με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ μέχρι pH 5-6. Καθιζάνει κίτρινο στερεό. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, έκπλυση με νερό και ξήρανση υπεράνω CaCl₂ για να προκύψει το μίγμα **10**.

Μίγμα p- και m- (11): Σε εναιώρημα του μίγματος **10** (50 mg, 0.18 mmol) εντός EtOH (5mL) προστίθεται υπό Ar η 4-(τριφθορομεθυλο)ανιλίνη (0.1 mL, 2.5eq) και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2 h. Κατόπιν αποχύνεται σε πάγο και νερό και το αποβαλλόμενο στερεό διηθείται υπό κενό, πλένεται με νερό και ξηραίνεται υπεράνω CaCl₂. Το προϊόν καθαρίζεται στη συνέχεια με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 100/0-99/1.

3-(4-νιτροφαινυλο)-1H-πυραζολο[4,3-*d*]πυριμιδιν-7(6H)-όνη (12): Σε διάλυμα της πυραζολοπυριμιδινόνης **6** (1 g, 4.72 mmol) εντός CF₃COOH (10 mL) προστίθεται ατμίζον HNO₃ (1.2 mL, 6 eq) και το διάλυμα αναδεύεται σε rt για 3 h. Κατόπιν αποχύνεται σε πάγο και νερό και γίνεται εξουδετέρωση με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ μέχρι pH 7. Καθιζάνει μπεζ στερεό. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και έκπλυση με νερό. Ακολουθεί καθαρισμός (trituration) με MeOH για να προκύψει καθαρό το παράγωγο **12**.

Μπεζ στερεό; απόδοση: 50%; Σ.Τ. >300 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 8.05 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 8.37 (d, 2H, J = 8.5 Hz, νιτροφαινυλο-H₁), 8.58 (d, 2H, J = 8.4 Hz, νιτροφαινυλο-H₂), 12.45 (s, NH πυριμιδίνης ανταλλάξιμο), 14,61 (s, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR

(DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 124.23 (νιτροφαινυλο-C₂), 126.61 (νιτροφαινυλο-C₂), 137.8 (C_{3a}), 139 (C₃), 140.8 (νιτροφαινυλο-C₁), 144.31 (C₅), 146.9 (νιτροφαινυλο-C₄), 153.7 (C₇).

7-γλωρο-3-(4-νιτροφαινυλο)-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδίνη (13): Σε εναιώρημα της πυριμιδινόνης **12** (560 mg, 2.19 mmol) εντός POCl₃ (3.5 mL) προστίθεται υπό Ar *N,N*-δισοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (0.5 mL) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100 °C για 3 hr. Κατόπιν υδρολύεται ο POCl₃ με προσθήκη πάγου και νερού και γίνεται εξουδετέρωση με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ μέχρι pH 5-6. Καθιζάνει κίτρινο στερεό. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, έκπλυση με νερό και ξήρανση υπεράνω CaCl₂ για να προκύψει καθαρό το παράγωγο **13**.

Κίτρινο στερεό; απόδοση: 66%; Σ.Τ.: 259 °C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 8.42 (d, 2H, J = 8.9 Hz, , νιτροφαινυλο-H₁), 8.70 (d, 2H, J = 8.9 Hz, , νιτροφαινυλο-H₂), 8.99 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 15.11 (s, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 124.25 (νιτροφαινυλο-C₂), 126.9 (νιτροφαινυλο-C₃), 137.46 (C₃), 140.64 (νιτροφαινυλο-C₁), 142.48 (C_{3a}), 144.85 (C_{7a}), 147 (νιτροφαινυλο-C₄), 150.85 (C₅), 151.1 (C₇).

Γενική μέθοδος παρασκευής τελικών προϊόντων (14a-14d): Σε εναιώρημα του χλωριδίου **13** (50 mg, 0.18 mmol) εντός EtOH (5mL) προστίθεται υπό Ar η κατάλληλη αμίνη (2.5eq) και το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2 h. Κατόπιν αποχύνεται σε πάγο και νερό και το αποβαλλόμενο στερεό διηθείται υπό κενό, πλένεται με νερό και ξηραίνεται υπεράνω CaCl₂. Το προϊόν καθαρίζεται στη συνέχεια με χρωματογραφία στήλης (silica gel).

3-(4-νιτροφαινυλο)-N-(4-(τριφθορομεθυλο)φαινυλο)-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (14a): Η ένωση **14a** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 100/0-80/20.

Κίτρινο στερεό; απόδοση: 70%; Σ.Τ.: >300°C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.78 (d, 2H, J=8.5 Hz, τριφθορομεθυλοφαινυλο-H₂), 8.23 (d, 2H, J=7.9 Hz, τριφθορομεθυλοφαινυλο-H₁), 8.40 (d, 2H, J=8.8 Hz, νιτροφαινυλο-H₁), 8.66 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 8.71 (d, 2H, J = 8.8 Hz, νιτροφαινυλο-H₂), 10.57 (s, 1H, NH αμίνης ανταλλάξιμο), 14.01 (s, 1H, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο) ; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 119.86 (τριφθορομεθυλοφαινυλο-C₂), 122.98 (τριφθορομεθυλοφαινυλο-C₄), 123.61 (-CF₃), 124.14 (νιτροφαινυλο-C₂), 126.06 (τριφθορομεθυλοφαινυλο-C₃), 126.63 (νιτροφαινυλο-C₃), 138.2 (C₃), 140.2 (C_{3a}), 142.7 (τριφθορομεθυλοφαινυλο-C₁), 146.6 (νιτροφαινυλο-C₄), 151.99 (C₅ & C₇).

N-(3,4-διχλωροφαινυλο)-3-(4-νιτροφαινυλο)-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (14b):

Η ένωση **14b** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα c. Hexane/EtOAc 60/40-50/50.

Κίτρινο στερεό; απόδοση: 69%; Σ.Τ.: >300°C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.68 (d, 1H, J=8.6 Hz, διχλωροφαινυλο-H₂), 7.80 (s, 1H, διχλωροφαινυλο-H₃), 8.40 (d, 2H, J=8.9 Hz, νιτροφαινυλο-H₁), 8.47 (s, 1H, διχλωροφαινυλο-H₁), 8.66 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 8.71 (d, 2H, J=8.7 Hz, νιτροφαινυλο-H₂), 10.15 (s, 1H, NH αμίνης ανταλλάξιμο), 13.42 (s, 1H, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 120.23 (διχλωροφαινυλο-C₆), 121.5 (διχλωροφαινυλο-C₂), 124.2 (νιτροφαινυλο-C₂), 124.5 (διχλωροφαινυλο-C₄), 126.5 (νιτροφαινυλο-C₃), 130.7 (διχλωροφαινυλο-C₅), 130.9 (διχλωροφαινυλο-C₃), 138.1 (C_{3a}), 139.2 (διχλωροφαινυλο-C₁), 146.3 (νιτροφαινυλο-C₄), 151.7 (C₅), 151.9 (C₇).

N-(4-υδροξυφαινυλο)-3-(4-νιτροφαινυλο)-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (14c): Η

ένωση **14c** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 60/40-30/70.

Πορτοκαλί-καφέ στερεό; απόδοση: 63%; Σ.Τ.: >300°C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 6.82 (d, 2H, J=8.8 Hz, υδροξυφαινυλο-H₁), 7.64 (d, 2H, J=8.3 Hz, υδροξυφαινυλο-H₂), 8.37 (d, 2H, J=7.8 Hz, νιτροφαινυλο-H₁), 8.47 (s, 1H, CH πυριμιδίνης), 8.68 (d, 2H, J=8.1 Hz, νιτροφαινυλο-H₂), 9.32 (s, 1H, OH), 9.51 (s, 1H, NH αμίνης ανταλλάξιμο), 13.3 (s, 1H, NH πυραζολίου ανταλλάξιμο); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 115.3 (υδροξυφαινυλο-C₂), 122.5 (υδροξυφαινυλο-C₃), 124 (νιτροφαινυλο-C₂), 126.5 (νιτροφαινυλο-C₃), 130 (υδροξυφαινυλο-C₄), 138.5 (C₃), 139.6 (νιτροφαινυλο-C₁), 139.6 (C_{3a}), 146.5 (νιτροφαινυλο-C₄), 147.3 (C_{7a}), 152.5 (C₅ & C₇), 153.88 (υδροξυφαινυλο-C₁).

3-(4-νιτροφαινυλο)-N-(πυριδιν-4-υλο)-1H-πυραζολο[4,3-d]πυριμιδιν-7-αμίνη (14d): Η

ένωση **14d** συντέθηκε σύμφωνα με την παραπάνω γενική μέθοδο. Ο καθαρισμός του προϊόντος έγινε με χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα DCM/MeOH 90/10-80/20.

Πορτοκαλί στερεό; απόδοση: 66%; Σ.Τ.: >300°C (MeOH); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 7.14 (d, 2H, J=7.9 Hz, πυριδιν-4-υλο-H₁), 8.32 (d, 2H, J=9.1 Hz, νιτροφαινυλο-H₁), 8.77 (d, 3H, J=9 Hz, νιτροφαινυλο-H₁ & CH πυριμιδίνης), 8.87 (s, 2H, NH ανταλλάξιμο), 10.07 (d, 2H, J=7.7 Hz, πυριδιν-4-υλο-H₂); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 600 MHz) δ ppm: 109.55 (πυριδιν-4-υλο-C₂),

124.13 (νιτροφαινυλο-C₂), 124.51 (νιτροφαινυλο-C₃), 139.4 (νιτροφαινυλο-C₁), 140.14 (πυριδιν-4-υλο-C₃), 141.8 (C₃), 143 (C_{3a}), 144.4 (νιτροφαινυλο-C₄), 146.67 (C₅), 147.2 (C₇), 160.5 (πυριδιν-4-υλο-C₁).

Βιβλιογραφία

1. Abdellatif, K. R. A., & Bakr, R. B. (2021). Pyrimidine and fused pyrimidine derivatives as promising protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Medicinal Chemistry Research*, 30(1), 31–49. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02656-8>
2. Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., & Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213–1224. <https://doi.org/10.1042/BST20180519>
3. Basu, A. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>
4. Broustas, C. G., & Lieberman, H. B. (2014). DNA Damage Response Genes and the Development of Cancer Metastasis. *Radiation Research*, 181(2), 111–130. <https://doi.org/10.1667/RR13515.1>
5. Burnstock, G., & Verkhatsky, A. (2012). Receptors for Purines and Pyrimidines. In G. Burnstock & A. Verkhatsky (Eds.), *Purinergic Signalling and the Nervous System* (pp. 119–244). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28863-0_5
6. Cavasotto, C. N., Ortiz, M. A., Abagyan, R. A., & Piedrafita, F. J. (2006). In silico identification of novel EGFR inhibitors with antiproliferative activity against cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6.
7. Cell Cycle, Checkpoints, and the Effect of Oncogenes. (2013, November 19). *Oncogenes and Their Role in Cancer*. <https://oncogenesandcancer.wordpress.com/cell-cycle-checkpoints-and-effect-of-oncogenes-2/>
8. Chauhan, M., & Kumar, R. (2013). Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(18), 5657–5668. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.07.027>
9. Cherukupalli, S., Hampannavar, G. A., Chinnam, S., Chandrasekaran, B., Sayyad, N., Kayamba, F., Reddy Aleti, R., & Karpoormath, R. (2018). An appraisal on synthetic and pharmaceutical perspectives of pyrazolo[4,3-d]pyrimidine scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(2), 309–339. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.012>
10. Cohen, S. M., & Arnold, L. L. (2011). Chemical Carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 120(suppl_1), S76–S92. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq365>
11. Deshpande, A., Sicinski, P., & Hinds, P. W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: A perspective. *Oncogene*, 24(17), 2909–2915. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208618>

12. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
13. Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128(4), 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>
14. Jorda, R., Havlíček, L., McNae, I. W., Walkinshaw, M. D., Voller, J., Šturc, A., Navrátilová, J., Kuzma, M., Mistrík, M., Bártek, J., Strnad, M., & Kryštof, V. (2011). Pyrazolo[4,3-d]pyrimidine Bioisostere of Roscovitine: Evaluation of a Novel Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases with Antiproliferative Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(8), 2980–2993. <https://doi.org/10.1021/jm200064p>
15. Moravcová, D., Kryštof, V., Havlíček, L., Moravec, J., Lenobel, R., & Strnad, M. (2003). Pyrazolo[4,3-d]pyrimidines as new generation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(18), 2989–2992. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(03\)00631-0](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00631-0)
16. Padma, V. V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, 5(4), 19. <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0019-4>
17. PII: S0028-3908(97)00123-8 | Elsevier Enhanced Reader. (n.d.). [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00123-8)
18. Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00928361>
19. Weinberg, R. A. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*, 275(3), 62–70.