



Σχεδιασμός και Σύνθεση αναστολέων της p38 κινάσης: Σύνθεση απαραίτητου ενδιάμεσου αρυλοβορονικού οξέος



Σουσαφίρη Χριστιάννα

Φοιτήτρια Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

AM: 1452201400107

Επιβλέπων Καθηγητής: Ιωάννης Κ. Κωστάκης

Αθήνα, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Κ. Κωστάκης (Επιβλέπων – Επίκουρος Καθηγητής)

Λουγιάκης Νικόλαος (Επίκουρος Καθηγητής)

Παπαναστασίου Ιωάννης (Επίκουρος Καθηγητής)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Επίκουρο Καθηγητή Ι. Κ. Κωστάκη για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, την υπομονή, τις γνώσεις και τις ικανότητες που μου έδωσε τη δυνατότητα να αποκτήσω. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Λουγιάκη Νικόλαο και τον Επίκουρο καθηγητή Παπαναστασίου Ιωάννη για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω Καλαμπαλίκη Αμαλία για την αμέριστη προσοχή και υπομονή, τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου, η οποία ήταν καθοριστικής σημασίας για την υλοποίηση της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστώ όλους για αυτήν την όμορφη εμπειρία, ήταν τιμή μου που εκπόνησα την πτυχιακή μου εργασία πλάι σε αυτούς τους υπέροχους ανθρώπους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σχεδιασμός και Σύνθεση αναστολέων της p38 MAP κινάσης: Σύνθεση απαραίτητου ενδιάμεσου αρυλοβορονικού οξέος.

Ο καρκίνος αποτελεί μάστιγα της σύγχρονης εποχής, προσβάλλοντας καθημερινώς ολοένα και περισσότερους ανθρώπους, ανεξαρτήτως φύλου και ηλικίας. Η κατάσταση αυτή έκανε επιτακτική την ανάγκη εύρεσης νέων, εκλεκτικών και λιγότερων τοξικών για τον άνθρωπο, αντικαρκινικών φαρμακευτικών ενώσεων. Οι κινάσες είναι ένζυμα όπου ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα, μέσω ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, η οικογένεια των p38 MAP κινασών, με την οποία θα ασχοληθούμε και στην παρούσα πτυχιακή εργασία, βρέθηκε να συμβάλει στην έναρξη και πρόοδο διαφόρων παθογενετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου και του καρκινικού. Αναστολείς των κινασών αυτών, έδειξαν να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην θεραπεία διαφόρων τύπων κακοηθειών. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση ενός απαραίτητου ενδιάμεσου αρυλοβορονικού οξέος, για τη σύνθεση αναλόγων πυράζολο – πυριδίνης με πιθανή ανασταλτική δράση έναντι των p38 MAP κινασών.

ABSTRACT

Design and Synthesis of p38 MAP kinase inhibitors: Synthesis of essential arylboronic acid intermediate.

Cancer is one of the leading causes of deaths nowadays, affecting continuously more people, regardless of their gender and age; thus, there is an indispensable need to synthesize new, selective and less toxic drugs for humans with intended anticancer activity. Kinases are very important enzymes that trigger a cascade of biological signals by activating and / or deactivating many other proteins. More specifically, p38 MAP kinases family has been found to contribute to the initiation and progression of various pathogenic mechanisms, including cancer. Inhibitors of this family of kinases have been showing remarkable results in different malignancies. In this project, our aim is the synthesis of an important arylboronic acid, as an intermediate for the synthesis of pyrazole – pyridine analogues, with a possible inhibitory action against p38 kinases.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα παγκοσμίως. Οι στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί την δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες. Ο καρκίνος αποτελεί μια κυτταρική νόσο. Συνήθως προσβάλλει ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, υπάρχουν όμως και οι μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμα και σε παιδιά. Στην ιατρική ορολογία, ο καρκίνος είναι η νόσος που προκαλείται από άναρχο και αφύσικο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων στους ιστούς του σώματος, που συνακόλουθα, μπορούν να προκαλέσουν το σχηματισμό κακοήθων όγκων στον οργανισμό.¹

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία αναπτύσσονται, διαιρούνται και οδηγούνται τελικά σε κυτταρικό θάνατο με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται και μεγαλώνουν ανεξέλεγκτα, οδηγώντας στην συσσώρευση μίας μάζας κυττάρων που ονομάζεται όγκος. Για την μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό πρέπει να γίνουν μία ή περισσότερες μεταλλάξεις σε πολλά γονίδια, που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση (κυρίως τα ογκογονίδια, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα microRNA γονίδια). Οι γενετικές αλλαγές μπορεί να συμβούν σε διαφορετική κλίμακα και με διαφορετικούς μηχανισμούς.²

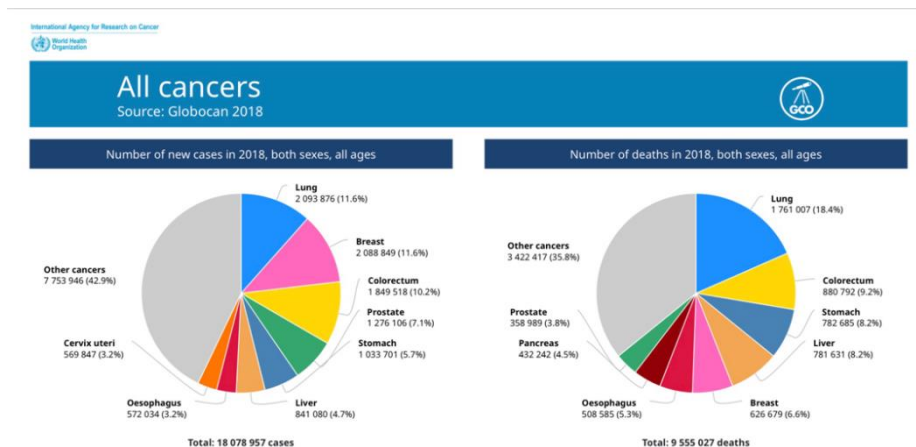
Μέχρι σήμερα έχουν σημειωθεί πάνω από 200 διαφορετικά είδη καρκίνου. Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Ερευνών για τον Καρκίνο (IARC- International Agency for Research on Cancer), για το έτος 2018, τα συχνότερα εμφανιζόμενα είδη καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα είναι τα ακόλουθα (Εικόνα 1):

1. Καρκίνος του πνεύμονα
2. Καρκίνος μαστού

¹ Bunkusi Isam : Πρακτική Προσέγγιση στην κλινική ογκολογία, επιμέλεια- μετάφραση Ζωγράφος Γεώργιος, επίτομος, 2η έκδοση, επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα 2012, σ. 16-20, 54-72

² 1. (a) D.A. Karnofsky, Mechanism of action of anticancer drugs at a cellular level CA Cancer J Clin. 1968 18, 232–234, b) Hickman J.A. Apoptosis induced by anticancer drugs, Cancer Met. Rev. 1992 11, 122-139.

3. Καρκίνος παχέος εντέρου
4. Καρκίνος του προστάτη
5. Καρκίνος του στομάχου
6. Καρκίνος του ήπατος
7. Καρκίνος του οισοφάγου
8. Καρκίνος του θυρεοειδούς)³

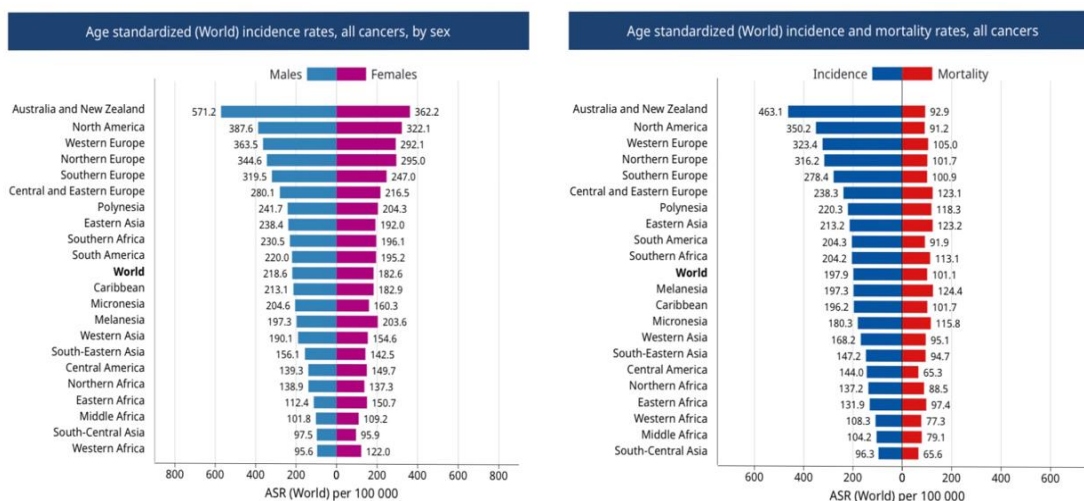


Εικόνα 1: Τα συχνότερα εμφανιζόμενα είδη καρκίνου σε παγκόσμια κλίμακα. Αριστερά, με βάση τον αριθμό νέων περιστατικών, δεξιά, με βάση τη θνησιμότητα.

Ο καρκίνος είναι μία πολυπαραγοντική νόσος. Κάποιοι από τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς την εμφάνιση ή την εξέλιξη της είναι ηλικία, το αλκοόλ, καρκινογόνες ουσίες, χρόνιες φλεγμονές, διατροφή, ορμόνες, ανοσοκαταστολή, ραδιενέργεια, υπεριώδης ακτινοβολία και κάπνισμα (Εικόνα 2).⁴

³ International Agency Research for Cancer, World Health Organization, <https://gco.iarc.fr>

⁴ National Cancer Institute at the National Institutes of Health <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>



Εικόνα 2: Αριστερά: περιστατικά ανά χώρα ανά φύλο. Δεξιά: περιστατικά και θνησιμότητα ανά χώρα.

Δυστυχώς, τα αντικαρκινικά φάρμακα που διαθέτουμε μέχρι σήμερα δεν εμφανίζουν εκλεκτική δράση, δρώντας τόσο στα καρκινικά κύτταρα στόχους όσο και στα φυσιολογικά κύτταρα, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Στα πλαίσια του σχεδιασμού και της ανάπτυξης νέων χημικοθεραπευτικών μέσων γίνονται προσπάθειες βελτίωσης της εκλεκτικότητας τους και ως εκ τούτου μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.⁵

Οι μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές ενώσεις για την αντινεοπλασματική θεραπεία παρουσιάζουν σύνθετο τρόπο δράσης, για αυτό και η κατηγοριοποίηση τους είναι αρκετά δύσκολη και όχι τόσο ακριβής. Ωστόσο, γίνεται προσπάθεια για την κατηγοριοποίηση τους με τον πλέον διαδεδομένο, αυτόν που κατατάσσει τα φάρμακα σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους, όπως φαίνεται παρακάτω.

1. **Αντιμεταβολίτες:** Μοιάζουν σε δομή με φυσιολογικούς μεταβολίτες του οργανισμού, αλλά χωρίς να είναι λειτουργικοί για το κύτταρο. Σε γενικές γραμμές, παρακωλύουν την κυτταρική λειτουργία και διαίρεση είτε μέσω ενσωμάτωσης σε μονοπάτια του κυτταρικού κύκλου είτε αναστέλλοντας κάποια βασικά ένζυμα για την κυτταρική λειτουργία και τη σύνθεση του DNA και του RNA. Παραδείγματα: μεθοτρεξατή (σχετίζεται δομικά με το

⁵ Harvey R.A. & Champe P.C. Φαρμακολογία, 3^η έκδοση, (Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Παπαδόπουλος Ι.Στ.) (2007).

φυλλικό οξύ και δρα σαν ανταγωνιστής αυτής της βιταμίνης), 6-Μερκαπτοπουρίνη, 6-Θειογουανίνη κ.α.

2. Αντιβιοτικά: Οφείλουν την κυτταροτοξική τους δράση στις αλληλεπιδράσεις με το DNA, οι οποίες αποδιοργανώνουν την λειτουργία του. Παραδείγματα: Δακτινομυκίνη, Δοξορουβικήνη, Μπλεομυκίνη, κ.α..

3. Αλκυλιωτικοί παράγοντες: Εκτός από κυτταροτοξικοί, είναι και μεταλλαξιογόνοι και καρκινογόνοι. Παραδείγματα: Μεχλωραιθαμίνη, νιτροζουρίες, κυκλοφωσφαμίδη και ιφωσφαμίδη, κ.α..

4. Αναστολείς μικροσωληνίσκων: Παραδείγματα: Βινκριστίνη και βινμπλαστίνη (σταματούν την μίτωση στην φάση της μετάφρασης), Ταξόλη, κ.α..

5. Στεροειδείς ορμόνες και ανταγωνιστές τους: Πρεδνιζόνη, Ταμοξιφαίνη (ανταγωνιστής οιστρογόνων), Λευπρολίδη και γοσερελίνη (ανταγωνιστές LHRH), Φλουταμίδη, Αμινογλουταιθιμίδη.

6. Άλλες χημειοθεραπευτικές ουσίες: Σισπλατίνη, Καρβοπλατίνη, Προκαρβαζίνη, L-Ασπαραγινάση.⁶

Τα τελευταία χρόνια γίνεται μια προσπάθεια εύρεσης πιο εκλεκτών φαρμάκων για των καρκίνο. Ο καρκίνος ως κυτταρική νόσος, οφείλεται σε μια πληθώρα βιολογικών αποκρίσεων και είναι αποτέλεσμα πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών των κυττάρων. Σε αυτά εμπλέκονται πλήθος πρωτεϊνών, ενζύμων και άλλων παραγόντων, όπως οι κινάσες, οι τοποϊσομεράσες, κτλ. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου φαίνεται να διαδραματίζουν οι πρωτεϊνικές κινάσες, με τη μη φυσιολογική λειτουργία τους να διεγείρει πλήθος άλλων σημάτων, προκαλώντας δυσλειτουργία στην ανάπτυξη, αντιγραφή μεταγραφή, μετάφραση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

1.2 ΚΙΝΑΣΕΣ

⁶ J. Dancey, S. Arbut, Cancer Drugs and Cancer Drug Development for the New Millennium. In: Khayat D, Hortobagyi GN (eds). Progress in anti-cancer chemotherapy

, Volume IV. 2000, 91–107.

Οι κινάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά μίας φωσφορικής ομάδας από το ATP σε μία πρωτεΐνη και συγκεκριμένα σε κατάλοιπα σερίνης, θρεονίνης ή / και τυροσίνης. Η δράση αυτών των οικογενειών ενζύμων ελέγχει ποικίλες δράσης των κυττάρων, συνήθως ως απόκριση ενός εξωτερικού ερεθίσματος, μέσω ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης πρωτεϊνών. Οι κινάσες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην καρκινογένεση και στην μετάσταση.

1.3 Κινάσες MAPK ή Map (Mitogen-activated protein kinase)

Πρόκειται για έναν τύπο πρωτεϊνικής κινάσης που είναι ειδικός για τα αμινοξέα σερίνη και θρεονίνη. Εμπλέκονται στην κυτταρική απόκριση ενεργοποιούμενες από μία σειρά από ερεθίσματα, όπως κυτοκίνες, υπεριώδη ακτινοβολία, θερμικό σοκ και ωσμωτικό σοκ. Ρυθμίζουν τις κυτταρικές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού, της γονιδιακής έκφρασης, της διαφοροποίησης, της μίτωσης, της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης.⁷ Σε περίπτωση υπερέκφρασης των γονιδίων που τις κωδικοποιούν προάγεται η ογκογένεση. Ύστερα από εκτενή μελέτη του γονιδιώματος αποκαλύφθηκε ότι ύπαρξη μεταλλάξης σε γονίδια οδηγούν σε απώλεια της ανασταλτικής ρυθμιστικής δράσης αυτών των ενζύμων, οδηγώντας σε υπερ-πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στη G1/S φάση του κυτταρικού κύκλου, που σχετίζεται με εμφάνιση κακοήθειας στον άνθρωπο. Πέρα από την καρκινογένεση, μεταλλάξεις σε γονίδια κινασών σχετίζονται και με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα αλλά και χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους⁸.

Πιο συγκεκριμένα, η p38 MAP κινάση (Cytokinins specific binding protein) συμμετέχει σε έναν καταρράκτη σηματοδότησης που ενεργοποιείται ως απόκριση σε κυτοκίνες και στρες.⁹ Έχουν αναγνωριστεί τέσσερις p38 MAP κινάσες, η p38-α, η p38-β, η p38-γ και η p38-δ. Η p38-α συναντάται σε διαφορετικούς ιστούς και με μεγαλύτερη συχνότητα από τις άλλες τρεις. Οι p38-α και p38-β εκφράζονται στους περισσότερους τύπους κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων, των αστροκυττάρων, των

⁷ Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (Apr 2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions". Endocrine Reviews. 22 (2): 153–83.

⁸ Venerable DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. (2002) Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. J Med Chem. (12):2615-23.

⁹ Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (Αύγουστος 1994). "Μια κινάση MAP που στοχεύει η ενδοτοξίνη και η υπερομομοριακότητα σε κύτταρα θηλαστικών". Επιστήμη . 265 (5173): 808–11.

μικρογλοίων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και του νωτιαίου μυελού.¹⁰ Η p38-γ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στους μυς και στο ήπαρ, ωστόσο συναντάται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους περισσότερους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο. Η έκφραση της p38-δ είναι πιο περιορισμένη και συναντάται στο εξωκρινές και ενδοκρινές πάγκρεας, στο δέρμα, το λεπτό έντερο και τα νεφρά.

1.3.1 ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ P38 MAPKs

Στα θηλαστικά, έχουν αναγνωριστεί τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν τις p38 MAP κινάσες: MAPK14 (για την p38α), MAPK11 (για την p38β), MAPK12 (για την p38γ) και MAPK13 (για την p38δ).¹¹ Ο τύπος έκφρασης των ισομορφών p38 επηρεάζεται επίσης από την κατάσταση διαφοροποίησης του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, μη διαφοροποιημένα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν τις ισομορφές α, β και γ, ενώ τα διαφοροποιημένα κύτταρα εκφράζουν τις ισομορφές α, γ και δ.¹²

Όσον αφορά την p38α, έχουν αναφερθεί τρεις διαφορετικοί υπότυποι της ισομορφής. Η πρώτη είναι ο υπότυπος Mxi2, ο οποίος είναι πανομοιότυπος με την p38α στα αμινοξέα 1-280, εμφανίζοντας, όμως, μειωμένη σύνδεση με το υπόστρωμα της p38α MAP κινάσης. Ο δεύτερος υπότυπος είναι ο Exir, ο οποίος αποτελείται από ένα μοναδικό τελικό άκρο 53 αμινοξέων και δεν είναι ευαίσθητος στα συνήθη ερεθίσματα ενεργοποίησης. Φαίνεται να ρυθμίζει τη μονοπάτι της NFκB σηματοδότησης. Τέλος, ο CSB1 παρουσιάζει μία διαφορά 25 αμινοξέων στην εσωτερική του αλληλουχία, αλλά η συμβολή του είναι άγνωστη.¹³

Η μέγιστη δράση των κινασών p38 επιτυγχάνεται στη φωσφορυλιωμένη τους μορφή.¹⁴ Ενεργοποιούνται μετά από φωσφορυλίωση υπολειμμάτων Thr και Tyr σε ένα μοτίβο Thr-Gly-

¹⁰ Da Silva et al., 1997, Lee S.H. et al., 2000, Nito et al., 2008, Fitzsimmons et al., 2010 Lawson et al., 2013, Haines et al., 2015.

¹¹ Mechanisms and function of p38 MAPK signaling. Cuadrado A, Nebraska AR, Biochem J. 2010 Aug 1; 429(3):403-17.

¹² A novel cell type-specific role of p38α in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnoli R, Ingravalle G, Monica S, Lo Sasso G, Moschetta A, Guanti G, Simone C. Cell Death Differ. 2007 April; 14(4):693-702.

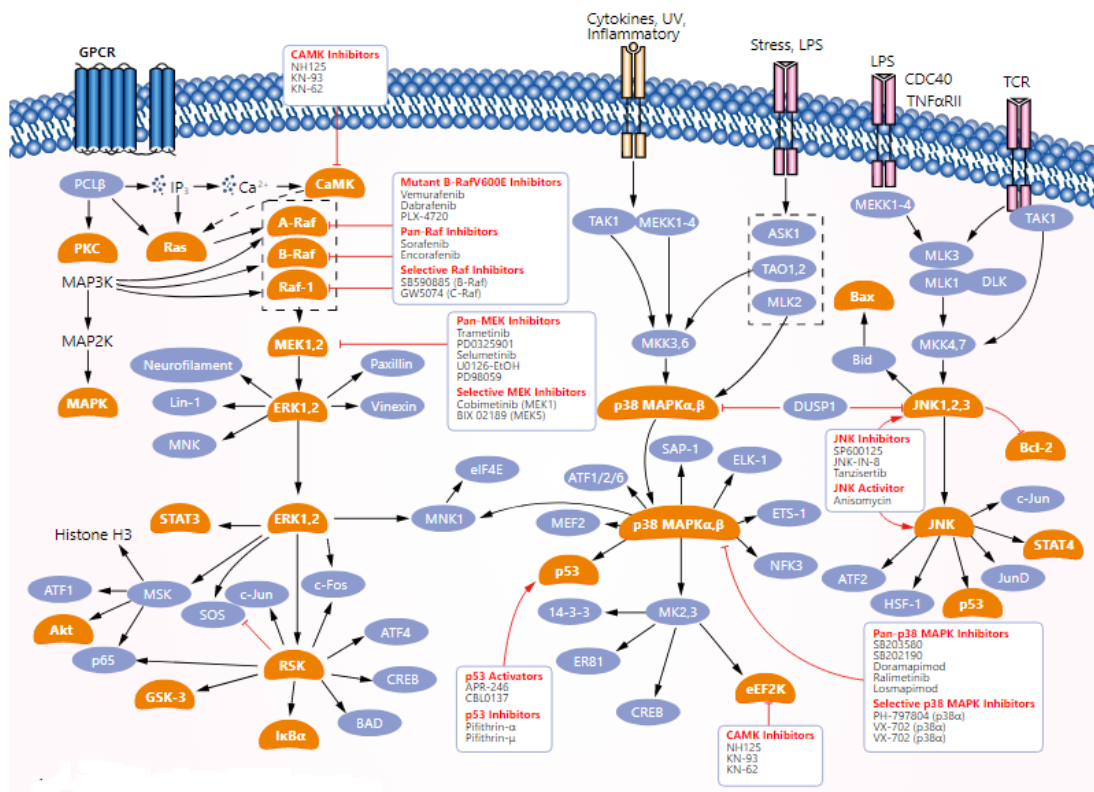
¹³ A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, Strickler JE, McLaughlin MM, Siemens IR, Fisher SM, Livi GP, White JR, Adams JL, Young PR

Nature. 1994 Dec 22-29; 372(6508):739-46.

¹⁴ Wilson KP, Fitzgibbon MJ, Caron PR, Griffith JP, Chen W, McCaffrey PG, Chambers SP, Su MS. Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem. 1996;271:27696-27700.

Tyr. Έχουν αναφερθεί πολλοί συνδυασμοί κινασών που σχετίζονται με το μηχανισμό ενεργοποίησής τους. Οι δυο κύριοι ενεργοποιητές είναι οι MAPKK3 και MAPKK6, οι οποίες ενεργοποιούνται με τη σειρά τους από τις κινάσες MTK1 (MEKK4) και την ASK1, που ρυθμίζει το σήμα απόπτωσης (Εικόνα 3).¹⁵



Εικόνα 3: Σηματοδοτικό μονοπάτι των p38 MAP κινασών.

Ακολούθως, οι φωσφορυλιωμένες p38 πρωτεΐνες μπορεί να ενεργοποιήσουν με τη σειρά τους, διάφορους παράγοντες μεταγραφής, αλλά και μία ποικιλία διαφόρων κινασών, που εμπλέκονται στον έλεγχο κυτταροπλασματικών ή και πυρηνικών δικτύων σηματοδότησης και απόκρισης σε κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, τοξίνες και φαρμακολογικά φάρμακα.

1.3.2 p38 MAP κινάσες και καρκίνος

Το μονοπάτι ενεργοποίησης p38 MAP κινασών, μαζί με άλλους καταρράκτες σηματοδότησης (JNK, ERK, AMPK και PI3K) συμμετέχουν στην ρύθμιση ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής επιβίωσης και του κυτταρικού θανάτου, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη διαφόρων κακοηθειών. Πιο συγκεκριμένα, οι p38 μπορούν να παίξουν διπλό ρόλο, είτε μεσολαβώντας

¹⁵ p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases.

στην επιβίωση των κυττάρων, είτε προάγοντας τον κυτταρικό θάνατο μέσω διαφορετικών μηχανισμών.

Έχει αποδειχθεί ότι οι p38 δρουν ογκοκατασταλτικά κατά την έναρξη του κυτταρικού μετασχηματισμού, ενώ στις περιπτώσεις που έχει εκδηλωθεί ο καρκινικός φαινότυπος, ενισχύουν την ανάπτυξη κυτταρικών όγκων. Η φωσφορυλιωμένη μορφή τους έχει συσχετιστεί δυσμενώς με την επιβίωση ασθενών με καρκίνο του μαστού και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.¹⁹ Επιπλέον, εμπλέκονται στην διατήρηση της ανάπτυξης του όγκου σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως των ωοθηκών, του λεμφώματος, των πνευμόνων, του θυρεοειδούς, του παχέος εντέρου, του μαστού, γλοιώματα και καρκινώματα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και λαιμού.²⁰

Σύμφωνα με έρευνες, η p38-α και η p38-β είναι μεσολαβητές απόπτωσης σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως οι νευρώνες ή καρδιακά κύτταρα.²¹ Ειδικότερα, η p38-α συμβάλλει στην επιβίωση ή και τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων σε καρκίνους του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του δέρματος.²²

1.3.3 Αναστολείς p38 MAP κινασών

Από την ανακάλυψη της p38α MAP κινάσης, το 1994, οι γνώσεις μας για την βιολογική της δράση έχουν αυξηθεί δραματικά, ωστόσο, έντονο ενδιαφέρον σημειώνεται στην ανακάλυψη νέων αναστολέων. Μέχρι στιγμής, οι κυριώτεροι αναστολείς των p38 κινασών περιορίζονται στις ισομορφές p38α και p38β, οι οποίοι δρουν ως **ανταγωνιστές του ATP**. Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή της επηρεάζει την έναρξη και την εξέλιξη διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η αρθρίτιδα, τη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, το άσθμα, τη νόσο Alzheimer κ.α.²³

¹⁹ Wang SN, Lee KT, Tsai CJ, Chen YJ, Yeh YT. Phosphorylated p38 and JNK MAPK proteins in hepatocellular carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 2012;42:1295–1301.

²⁰ Hsieh YH, Wu TT, Huang CY, Hsieh YS, Hwang JM, Liu JY. p38 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in protein kinase Calpha-regulated invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2007;67

²¹ Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Zwiller J, Revel MO, Aunis D, Bader MF. Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. *J Biol Chem.* 2001;276

²² Schindler EM, Hindes A, Gribben EL, Burns CJ, Yin Y, Lin MH, Owen RJ, Longmore GD, Kissling GE, Arthur JS, et al. p38delta Mitogen-activated protein kinase is essential for skin tumor development in mice. *Cancer Res.* 2009;69

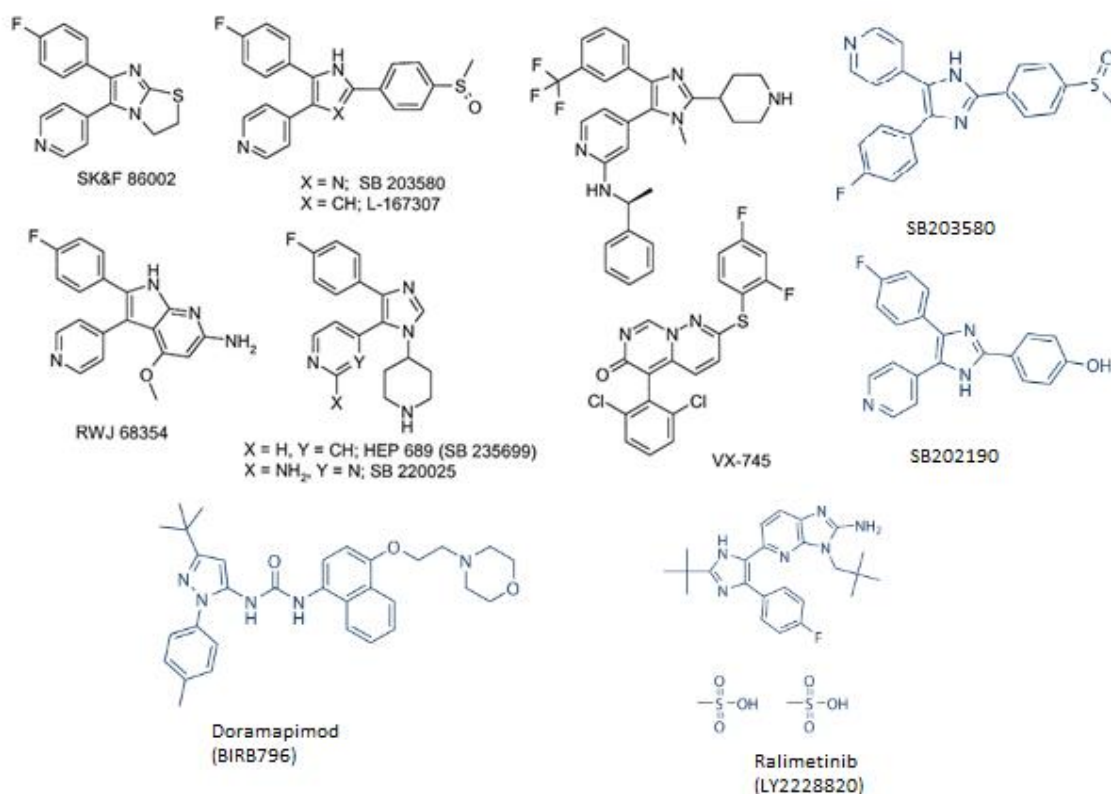
23 Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy

John C. Lee, Sanjay Kumar, Don E. Griswold, David C. Underwood, Bartholomew J. Votta, Jerry L. Adams SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406, USA

Συνάμα, σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, η χορήγηση αναστολέων p38α μειώνει ή εμποδίζει την ανάπτυξη όγκων που προκαλούνται από την έκφραση του πολυώματος T (PyMT) σε ποντίκια. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα, υψηλά επίπεδα φωσφορυλιωμένης p38 MAPK σχετίζονται με μεταστάσεις σε λεμφαδένες, αντοχή στην Ταμοξιφαίνη και αρνητικές επιπτώσεις στην εξέλιξη της νόσου των ασθενών. Η p38α ρυθμίζει την ομοιόσταση και την ακεραιότητα των επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου. Η χορήγηση αναστολέων σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου. Γενικότερα, τα υψηλά επίπεδα ενεργούς p38α προκαλούν απόπτωση των αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ορισμένων μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων, συμμετέχουν στον σχηματισμό του γλοιώματος και είναι απαραίτητα για την επιβίωση καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος. **Cancer Res. 2015 Oct 1;75(19):3997-4002.**

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0173.

Ορισμένα συνθετικά παράγωγα, αναστολείς p38 MAP κινασών, φαίνονται στην παρακάτω εικόνα 4.



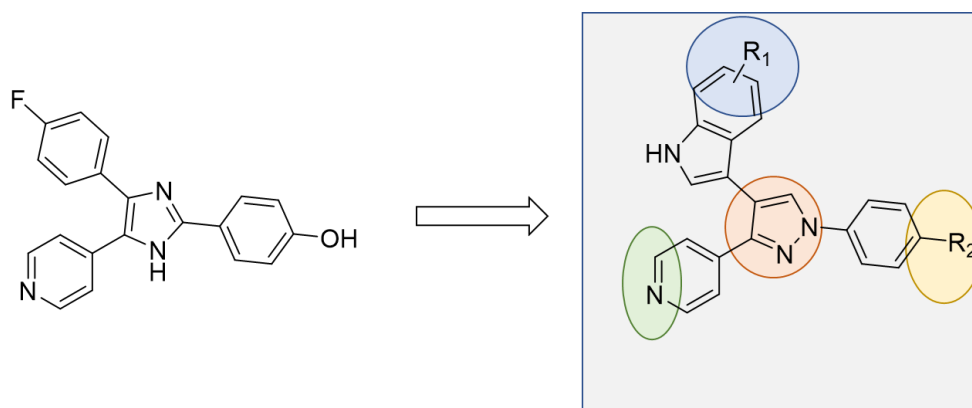
Εικόνα 4: Γνωστοί αναστολείς των p38 MAP κινασών.

Από τους πιο γνωστούς αναστολείς είναι τα παράγωγα ιμιδαζολίου τα οποία φέρουν υποκατάσταση πυριδίνης και δύο επιπλέον άρυλο ή ετεροάρυλο υποκαταστάτες. Σε κάποια από τα παράγωγα το ιμιδαζόλιο είναι συμπυκνωμένο με δακτύλιο θειαζολίου ή πυριδίνης ενώ σε άλλα έχει αντικατασταθεί από δακτύλιο πυραζολίου. Η πλειοψηφία των ενώσεων αυτών δεν είναι εκλεκτικοί αναστολείς έναντι μίας συγκεκριμένης ισομορφής, αλλά αποτελούν γενικούς αναστολείς αυτών των ενζύμων. Η κλινική τους δράση περιορίζεται, λόγω της μειωμένης βιοδιαθεσιμότητας τους, διάφορων προβλημάτων φαρμακοκινητικής, καθώς και την εμφάνιση τοξικότητας.

2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

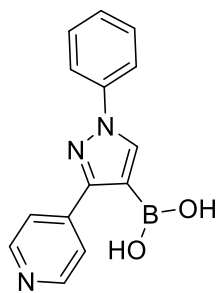
Από τα παραπάνω προκύπτει η επιτακτική ανάγκη για την ανακάλυψη νέων, πιο εκλεκτικών αναστολέων των p38 MAP κινασών, με σκοπό τη στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία, για τη μείωση των προβλημάτων που παρουσιάζουν οι ήδη υπάρχουσες φαρμακευτικές ενώσεις.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων αναστολέων των κινασών αυτών με εκλεκτική και ισχυρή δράση. Χρησιμοποιώντας, ως ενώσεις – οδηγούς διάφορους αναστολείς των p38 κινασών, παραγώγων ιμιδαζολοπυριδίνης αποφασίσαμε να συνθέσουμε αντίστοιχα ανάλογα πυραζολοπυριδίνης. Για να επιτευχθεί αυτό, θεωρήσαμε ενδιαφέρουσα την αντικατάσταση του ιμιδαζολικού δακτυλίου με αυτόν του πυραζολίου, ενώ κρατήσαμε και την υποκατάσταση του ενός από τα δύο πυραζολικά άζωτα, η οποία είναι απαραίτητη για τη δράση, όπως φαίνεται από τους γνωστούς αναστολείς. Επιπλέον, αντικαταστήσαμε τον έναν αρωματικό υποκαταστάτη, με τον ετεροαρωματικό δακτύλιο του ινδολίου, που όπως είναι γνωστό διαθέτει αντικαρκινικές ιδιότητες και υπάρχει σε πολλά αντικαρκινικά φάρμακα. Στις νέες ενώσεις διατηρήθηκε ο δακτύλιος της πυριδίνης ως υποκαταστάτης του πυραζολικού δακτυλίου, καθώς φαίνεται ιδιαίτερα σημαντικός για τη δράση (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Επιθυμητά μόρια – στόχοι, παράγωγα πυραζολοπυριδίνης.

Για τη σύνθεση των τελικών παραγώγων αυτής της δομής ήταν η απαραίτητη η σύνθεση του ενδιάμεσου αρυλοβορονικού οξέος, που παρουσιάζεται στην εικόνα 5. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση αυτού του απαραίτητου ενδιάμεσου για τη συνθετική μας πορεία και την παραλαβή των επιθυμητών προϊόντων.

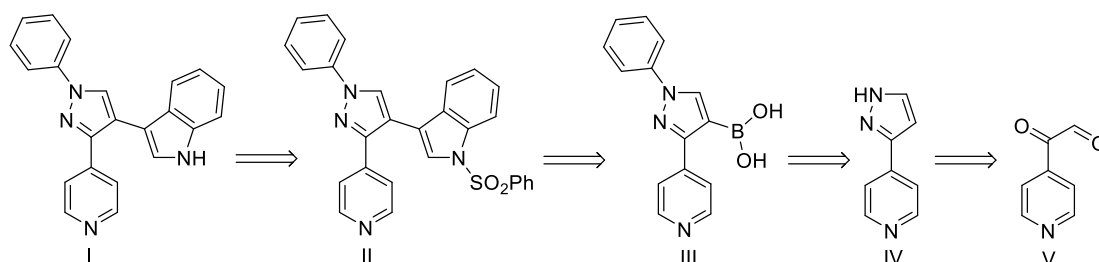


Είκονα 6: Επιθυμητά μόριο – στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας- απαραίτητο δομικό ενδιάμεσο.

3 ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

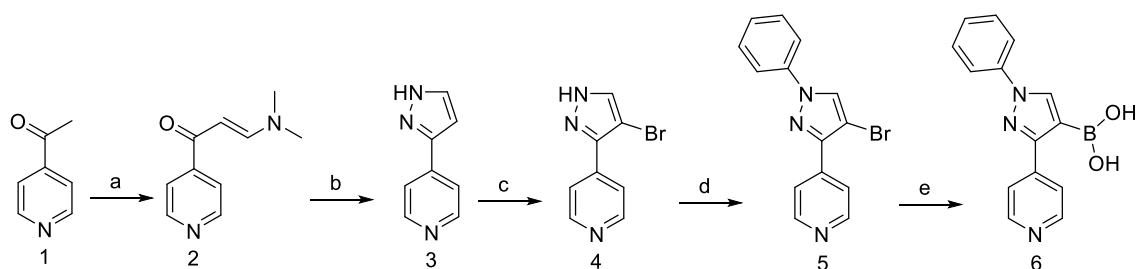
Στη συνέχεια ακολουθεί η συνθετική πορεία, από την οποία προκύπτουν τα τελικά μόρια-στόχοι, ανάλογα ινδολο - πυριδίνης.

Σύμφωνα με το ρετροσυνθετικό σχήμα (Σχήμα 1), τα τελικά παράγωγα της μορφής I μπορούν να παραληφθούν μετά από αποπροστασία των παραγώγων II. Αυτά με τη σειρά τους, μπορούν να παραληφθούν έπειτα από αντίδραση σύζευξης (coupling) τύπου Suzuki από το κατάλληλα υποκατεστημένο βορονικό οξύ της μορφής III. Τέλος, το παράγωγο της μορφής III μπορεί να παραληφθεί μέσω μιας σειράς αντιδράσεων από το παράγωγο της μορφής IV, το οποίο μπορεί να παραληφθεί από την κατάλληλη υποκατεστημένη 4-ακυλο-πυριδίνη V.



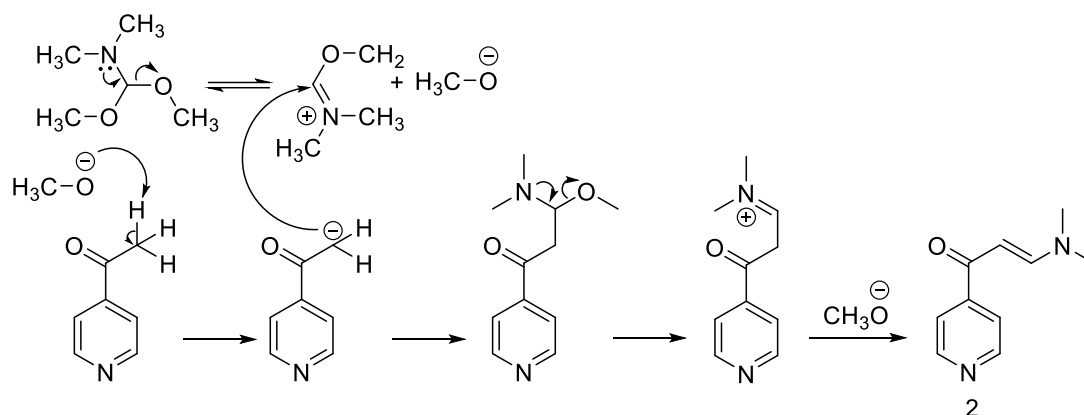
Σχήμα 1: Ρετροσύνθεση τελικών μορίων- στόχων αναλόγων ινδολο-πυριδίνης.

Αρχικά λοιπόν, με επίδραση *N,N*-διμεθυλακετάλης του *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF-DMA) επί της εμπορικά διαθέσιμης 4-ακετυλοπυριδίνης (**1**), σε άνυδρο τολουόλιο στους 110 °C λαμβάνεται το παράγωγο **2** (Σχήμα 2).



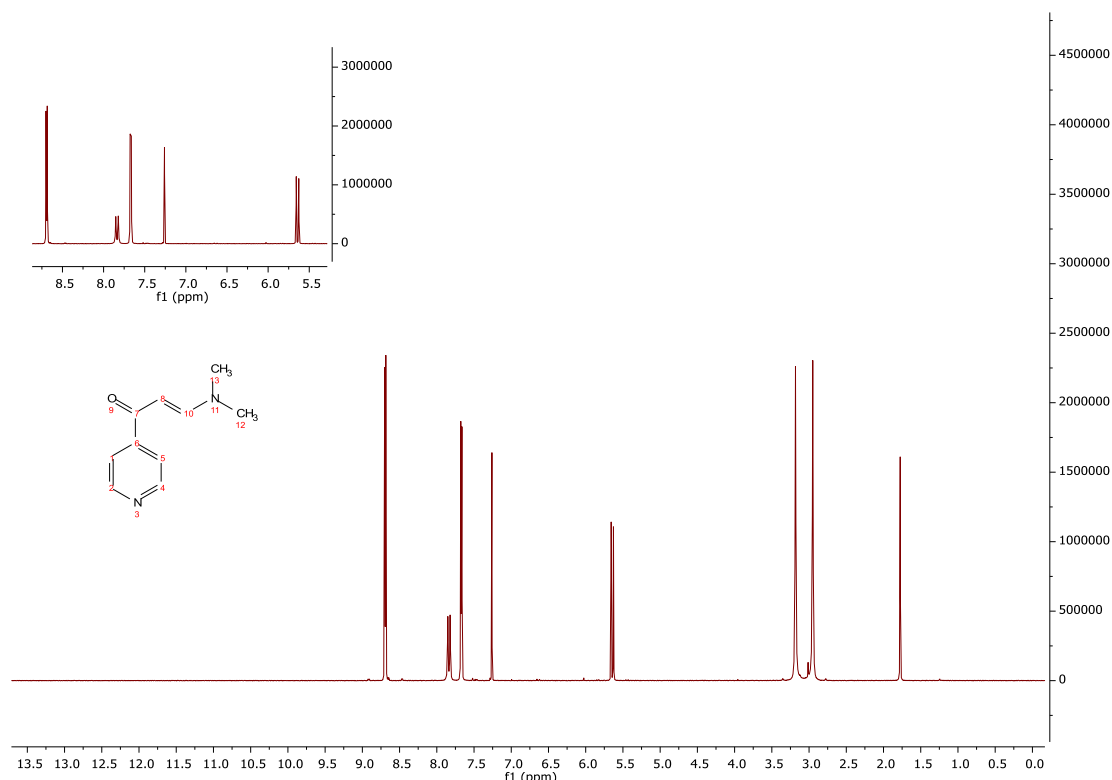
Σχήμα 2: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. DMF-DMA, άνυδρο τολουόλιο, 110 °C; b. $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, EtOH, 60 °C; c. Br_2 , AcONa, AcOH, CHCl_3 , 0 °C – θ.π.; d. φαινυλοβορονικό οξύ, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Et_2NH , άνυδρο CH_2Cl_2 , -40 °C; e. (1) *n*-BuLi (διάλυμα 2.5 M σε εξάνιο), άνυδρο THF, -78 °C, (2) $(\text{MeO})_3\text{B}$, -78 °C – θ.π..

Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, το DMF-DMA βρίσκεται σε ισορροπία με την πρωτονιωμένη του μορφή, η οποία λειτουργεί ως πολύ καλό ηλεκτρονιόφιλο²⁴. Έτσι, με επίδραση επί της 4-ακετυλοπυριδίνης, λαμβάνεται το επιθυμητό παράγωγο **2** (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Μηχανισμός φορμυλίωσης μέσω του DMF-DMA.

Με τη λήψη φάσματος ¹H NMR έγιναν εμφανείς οι δύο απλές χαρακτηριστικές κορυφές στα 5.64 και 7.84 ppm που αντιστοιχούν στην απορρόφηση των μεθινίων του διπλού δεσμού, καθώς και η ύπαρξη δύο ανισοδύναμων μεθυλίων στα 3.18 και 2.95 ppm (Εικόνα 7).



24 H. Elguero, A.R. Katritzky, O.V. Denisco, Prototropic Tautomerism of Heterocycles: Heteroaromatic Tautomerism-General Overview and Methology, Adv. Heterocycl. Chem. 2000 76, 1-84.

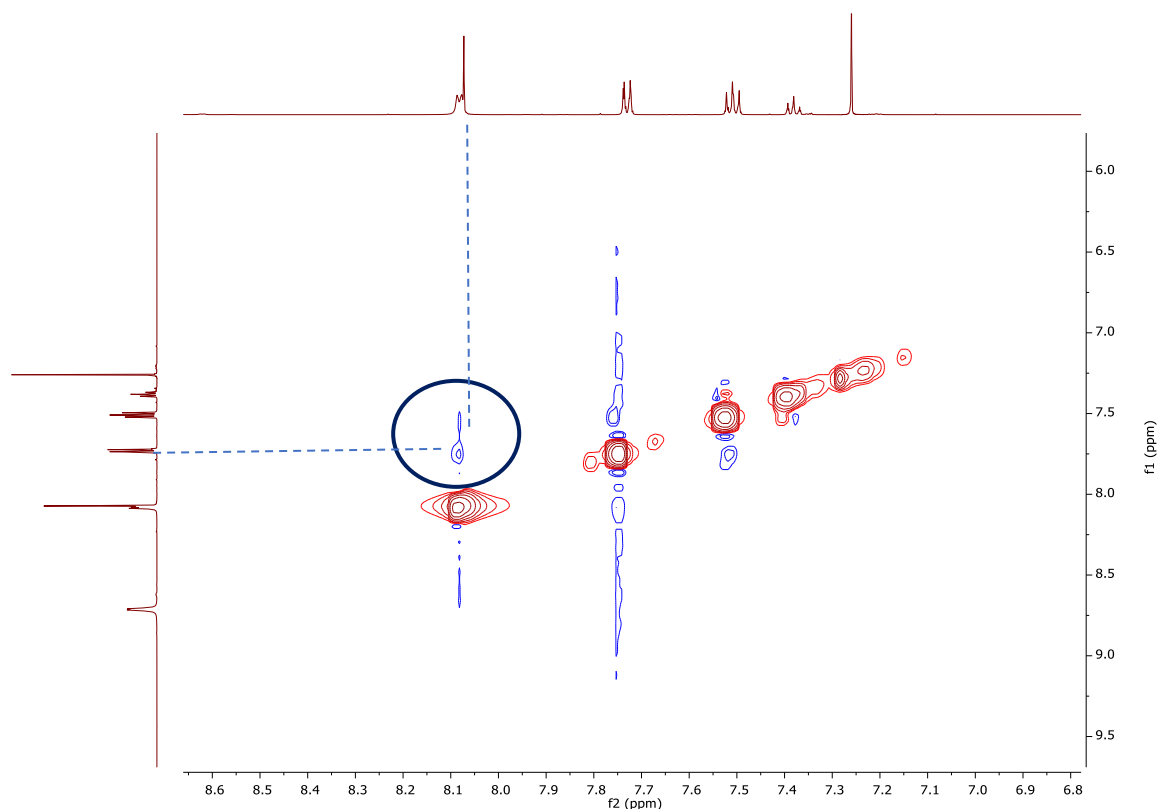
Εικόνα 7: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **2** σε CDCl_3 .

Στη συνέχεια από το παράγωγο **2**, με επίδραση υδραζίνης στους $60\text{ }^\circ\text{C}$, μέσω δύο πυρηνόφιλων αντιδράσεων παρασκευάζεται το κυκλωμένο παράγωγο **3**. Dalton trans, 2005, 1910-1923

Για την παρασκευή του βρωμιωμένου παραγώγου **4**, πραγματοποιείται βρωμίωση εντός οξικού οξέος, παρουσία οξικού νατρίου στους $0\text{ }^\circ\text{C}$ επί του παραγώγου **3**. Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί, ότι αρχικά επιχειρήθηκε η προσθήκη της ομάδας του φαινυλίου επί του παραγώγου **3**, πριν τη βρωμίωση, ωστόσο η αντίδραση σύζευξης δεν πραγματοποιήθηκε. Adv.Synth.Catal. 2007, 349, 2673-2676

Από το παράγωγο **4** με επίδραση οξικού χαλκού, διαιθυλαμίνης σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο στους $-40\text{ }^\circ\text{C}$ και έπειτα προσθήκης φαινυλοβορονικού οξέος πραγματοποιείται η σύνθεση του φαινυλο - υποκατεστημένου παραγώγου **5**.

Για την επιβεβαίωση της παραλαβής του επιθυμητού προϊόντος **5**, με το φαινύλιο στη θέση 1 του πυραζολικού δακτυλίου χρειάστηκαν πειράματα NMR μιας και δυο διαστάσεων. Από το φάσμα NOESY, είναι εμφανής η ύπαρξη σύζευξης μεταξύ της διπλής κορυφής του φαινολικού δακτυλίου στα 7.72 ppm με την απλή κορυφή που αντιστοιχεί στο μεθίλιο του πυραζολικού στα 8.07 ppm , το οποίο είναι εφικτό μόνο στο επιθυμητό παράγωγο και όχι στο αντίστοιχο 2- φαινύλο παράγωγο (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Φάσμα NOESY παραγώγου **5** σε CDCl_3 .

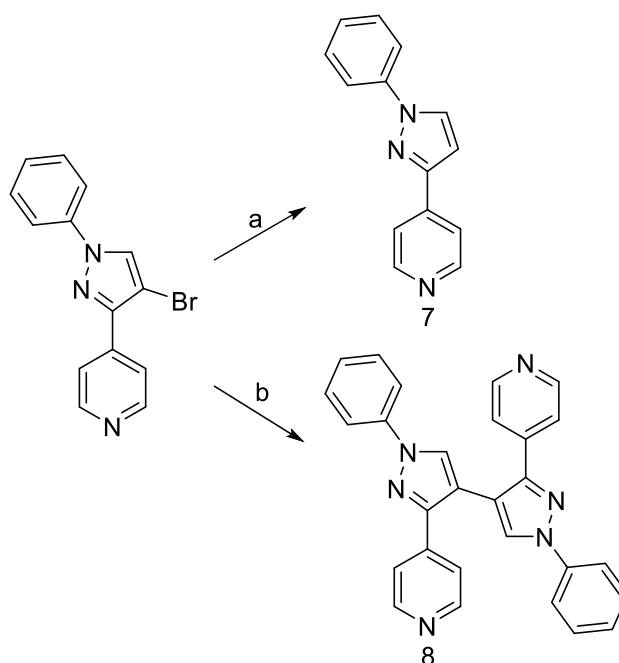
Η αντίδραση παραλαβής του επιθυμητού ενδιάμεσου – στόχου της παρούσας πτυχιακής εργασίας **6**, αποδείχθηκε ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία. Για τη σύνθεση του επιθυμητού αρυλοβορονικού οξέος δοκιμάστηκαν αρκετοί διαφορετικοί τρόποι, με μια ποικιλία διαλυτών, καταλυτών και συνθηκών, οι οποίοι παρουσιάζονται στον πίνακα 1. **Org. Biomol. Chem.**, 2016, 14, 963-969, *J. Nat. Prod.* 2017, 80, 1205–1209, *J. Org. Chem.* 2016, 81, 6808–6815, Toth, John E.; Mundla, Sreenivasa R.; Voss, Matthew; Boyer, Robert D.; Sawyer, J. Scott [Tetrahedron, 2007, vol. 63, # 47, p. 11763 - 11770], NOVEL COMPOUNDS AS PHARMACEUTICAL AGENTS ELI LILLY AND COMPANY - WO2004/50659, 2004, A1

Ά υλη	Διαλύτης	Καταλύτης	Δ	Βάση	Αντιδραστή ριο	Διάρκεια	Προϊόν
5	Διοξάνη	Pd(dppf)Cl_2	100°C	AcOK	$\text{Bis}_2(\text{pin})_2$	12 h	5 + 7
5	Διοξάνη	Pd(dppf)Cl_2	100°C	AcOK	$\text{Bis}_2(\text{pin})_2$	7.3 h	5 + 7
5	THF	Pd(dppf)Cl_2	70°C	Et_3N	$\text{Bis}_2(\text{pin})_2$	24 h	5
5	Dioxane	$\text{Pd(PPh}_3)_4$	120°C	AcOK	$\text{Bis}_2(\text{pin})_2$	12 h	7
5	DMSO	Pd(dppf)Cl_2	80°C	AcOK	$\text{Bis}_2(\text{pin})_2$	2,3 h	7 + 8

5	DMSO	Pd(dppf)Cl ₂	85°C	1. AcOK 2. Na ₂ CO ₃	1. Bis ₂ (pin) ₂ 2. 3-βρωμο-1-(φαινυλοσουλφονυλ)-1 <i>H</i> -ινδόλιο	24 h	7 + 5
5	Dioxane	Pd(PPh ₃) ₄ Τρικυκλοεξυλοφωσφίνη	110°C 400 W (MW)	AcOK	Bis ₂ (pin) ₂	1.50 h	7 + 5

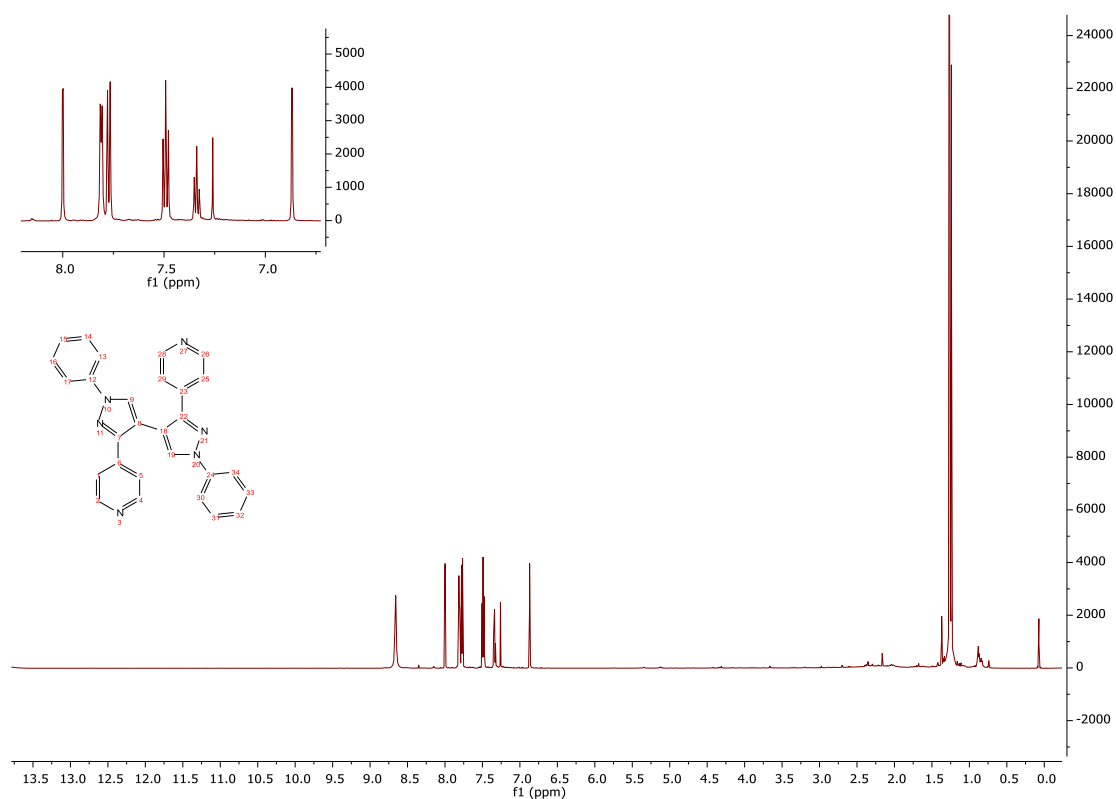
Πίνακας 1: Προσπάθειες σύνθεσης βορονικού οξέος **6** μέσω αντιδράσεων βορυλίωσης τύπου Suzuki – Miyaura.

Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι κατά την αντίδραση σε άνυδρη διοξάνη, παρουσία 1,1'-δισ(διφαινυλφωσφίνο)φεροκκενιο]διχλωροπαλλάδιο (II) και οξικού καλίου με προσθήκη 4,4,4',4',5,5,5',5'-οκταμεθυλο-2,2'-δι-1,3,2-διοξοβορολανίου στους 100 °C, παραλαμβάνεται το αφυδραλογονωμένο παράγωγο **7**. Ωστόσο κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης με επίδραση ίδιων καταλυτών, στους 80 °C σε άνυδρο DMSO, παραλαμβάνεται το διμερές παραπροϊόν **8** (Σχήμα 4).



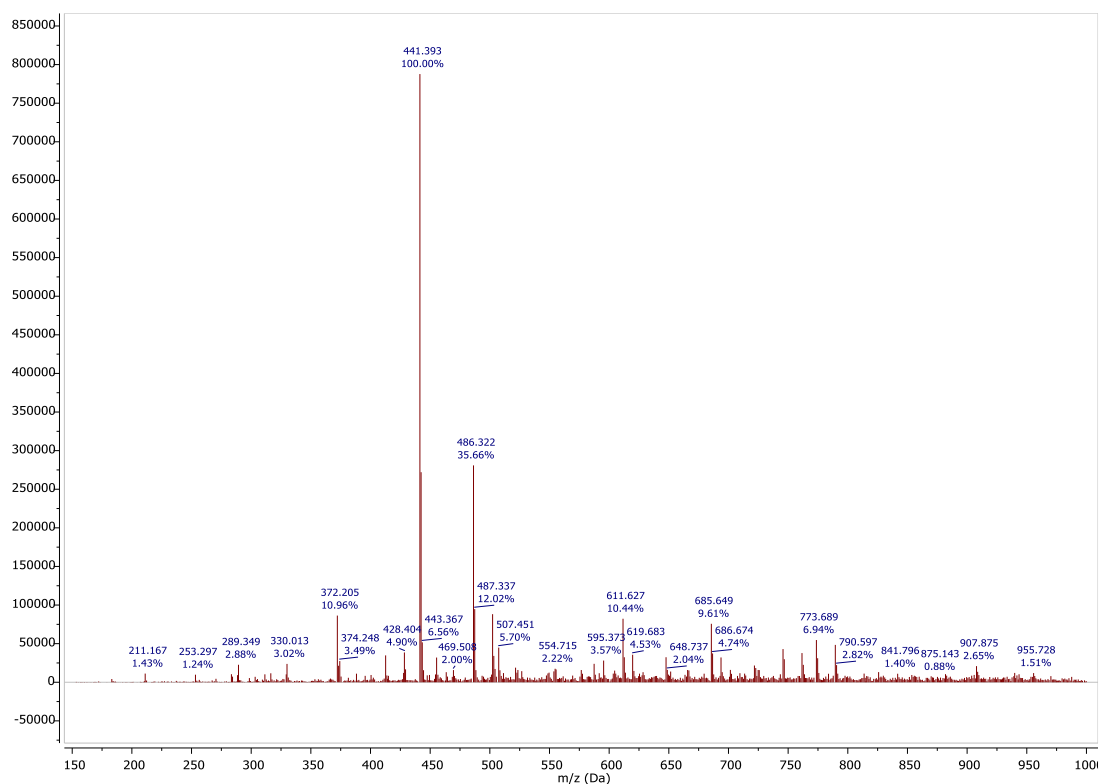
Σχήμα 4: Αντιδραστήρια και συνθήκες: a. B₂(pin)₂, Pd(dppf)Cl₂, KOAc, άνυδρη διοξάνη, 100°C; b. B₂(pin)₂, Pd(dppf)Cl₂, KOAc, άνυδρο DMSO, 80°C.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 9 για το παράγωγο **8**, στο φάσμα του μορίου σε CDCl_3 παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές για το φαινύλιο κορυφές στα 7.56 (διπλή), 7.52 (τριπλή) και 7.37 (τριπλή) ppm, καθώς επίσης, εμφανίζεται και μια απλή κορυφή στα 8.01 ppm χαρακτηριστική για το μεθίνιο του πυραζολικού δακτυλίου.



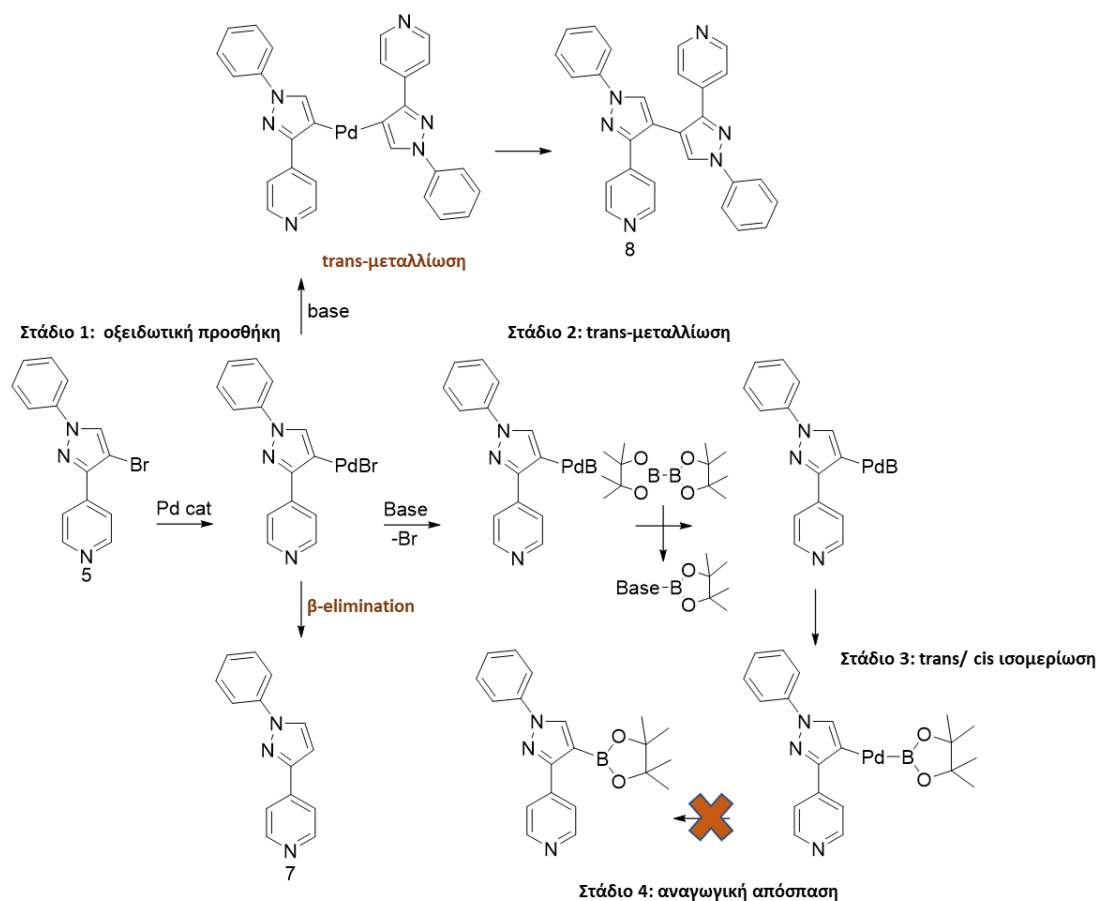
Εικόνα 9: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **8** σε CDCl_3 .

Η δομή επιβεβαιώθηκε και με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας, που είναι χαρακτηριστική ευρεθείσα τιμή στα 441.393 (Εικόνα 10).



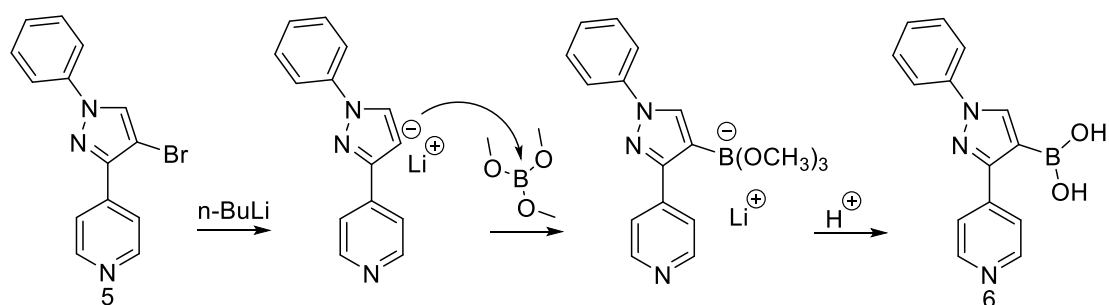
Εικόνα 10 : Φάσμα παραγώγου **8** IT – HRMS, υπολογισθέν ως προς $C_{28}H_{21}N_6^+[MH]^+$: 441, 1822, ευρεθέν 441,393

Σύμφωνα με το μηχανισμό της αντίδρασης, αρχικά σχηματίζεται ένα σύμπλοκο του καταλύτη με το αρυλο βρωμίδιο **2** μέσω οξειδωτικής προσθήκης και στη συνέχεια μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης του διβορονικού εστέρα και μιας σειράς αντιδράσεων παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν. Ωστόσο, μπορούν να συμβούν και παράπλευρες αντιδράσεις, όπως β-απόσπαση, προς παραλαβή του αναγμένου παραπροϊόντος **7** ή **trans-μετάλλωσης** στο στάδιο της οξειδωτικής προσθήκης του καταλύτη και παραλαβή του διμερούς παραπροϊόντος **8** (Σχήμα 5).



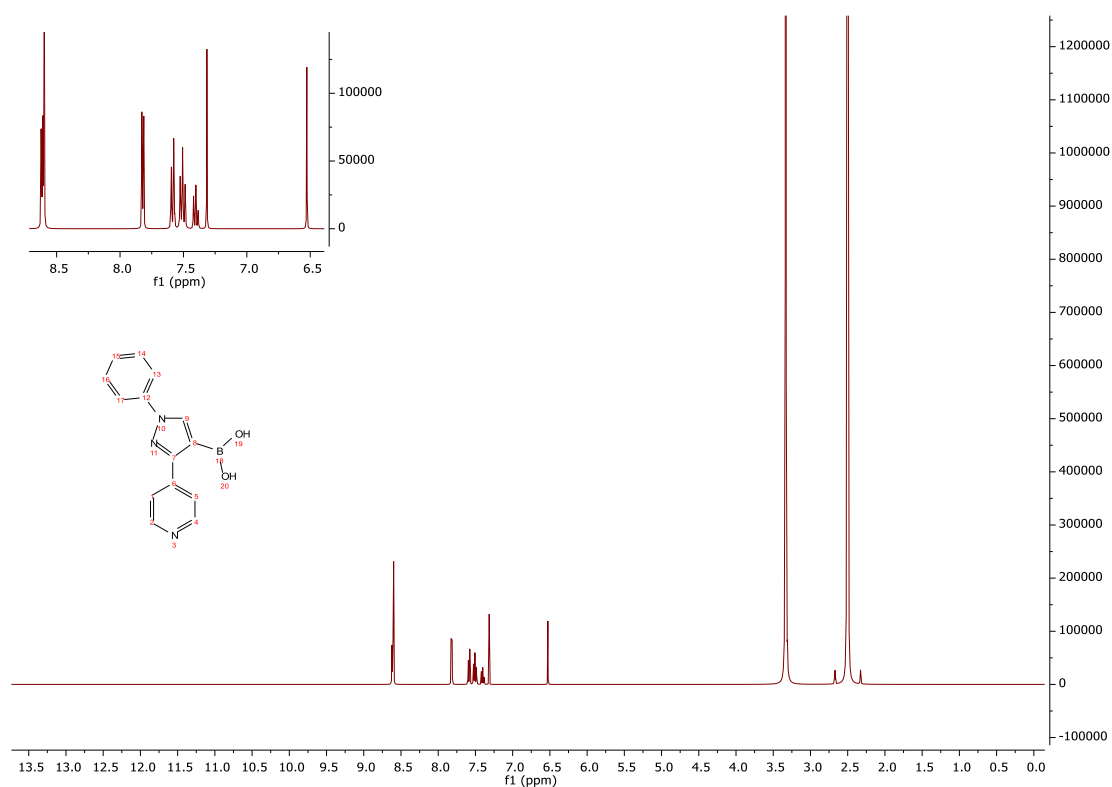
Σχήμα 5: Μηχανισμός βορυλίωσης κατά Suzuki-Miyaura. Μηχανισμοί σχηματισμού των παραπροϊόντων **7** και **8**. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 27, 8001–8006, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 7508

Τελικά από τους διάφορους τρόπους που δοκιμάστηκαν, η αντίδραση σχηματισμού του επιθυμητού ενδιάμεσου της παρούσας πτυχιικής **6** πραγματοποιήθηκε με τη χρήση άνυδρου *n*-βουτυλολιθίου στους $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια προσθήκη του βορικού τριμεθυλεστέρα στην ίδια θερμοκρασία. Η αντίδραση αυτή αποτελεί έναν κλασσικό τρόπο βορυλίωσης αρυλοβρωμιδίων και αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική, με απόδοση 79.7%. Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται αναλυτικά στο σχήμα 6.



Σχήμα 6: Μηχανισμός βορυλίωσης με τη χρήση βάσης *n*-βουτυλολιθίου προς σχηματισμό του ενδιάμεσου **6**. *Catalysts* **2017**, *7*(5), 146

Στο φάσμα ^1H NMR σε $\text{DMSO}-d_6$ του επιθυμητού ενδιάμεσου **6**, παρατηρούνται δυο απλές κορυφές στα 8.60 και 6.52 ppm, που αντιστοιχούν στα ευκίνητα υδρογόνα των υδροξυλίων του βορονικού οξέος, ενώ στα 7.31 ppm παρατηρείται η χαρακτηριστική μονή κορυφή του πυραζολικού δακτυλίου (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Φάσμα ^1H NMR παραγώγου **6** σε $\text{DMSO}-d_6$.

4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) Silica gel 60_{F254}. Οι χρωματογραφικές στήλες πραγματοποιήθηκαν με Silica gel 60 AC (SDS35-70 mm) ή Silica gel 200 mm. Τα φάσματα ¹H NMR και ¹³C NMR λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance 400 στα 400 MHz και Bruker Avance III στα 600 MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*₆). Το φάσμα μάζας λήφθηκε σε φασματοφωτόμετρο μαζών LTQ Orbitrap Discovery με πηγή ιονισμού Ionmax. Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα.

Σύνθεση της 3-(διμεθυλαμινο)-1-(πυριδιν-4-υλο)προπ-2-εν-1-όνης (2).

Σε σφαιρική που φέρει διάλυμα 4-ακετυλοπυριδίνης (**1**, 5 g, 0.04 mol) σε άνυδρο τολουόλιο (10 mL) προστίθεται διμεθυλακετάλη του *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF-DMA) (8.2 mL, 0.06 mol) και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία βρασμού για 4 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ψύχεται, διηθείται υπό κενό και το στερεό εκπλένεται με διαιθυλαιθέρα (Et₂O). Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό, και το ελαιώδες υπόλειμμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) / νερό (H₂O) (3 x 30 mL) και η υδατική στιβάδα με πλένεται διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) (3 x 30 mL). Συνολικά, λαμβάνονται 3.9 g (55.4 %) του παραγώγου **2**, πρακτικά καθαρού, το οποίο χρησιμοποιείται ως έχει στο επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας. Σ.τ.: 130 – 131 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 – 8.67 (m, 2H), 7.84 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 7.69 – 7.65 (m, 2H), 5.64 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 3.18 (s, 3H), 2.95 (s, 3H).

Σύνθεση της 4-(1*H*-πυραζολ-3-υλ)πυριδίνης (3).

Σε σφαιρική που φέρει το παράγωγο **2** (3.9 g, 0.022 mol) σε άνυδρη αιθανόλη (20 mL), προστίθεται ένυδρη υδραζίνη (1.62 mL, 0.033 mol) και το διάλυμα θερμαίνεται στους 60°C για 1 ώρα. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ψύχεται στους 0 °C και διηθείται υπό κενό για τη παραλαβή στερεού προϊόντος **3**. Στο διήθημα προστίθεται H₂O και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂ (4 x 30 mL). Οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται, ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου (Na₂SO₄) και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία

στήλης (Silica gel 60 mm) με σύστημα έκλουσης CH_2Cl_2 / MeOH 20 / 1. Συνολικά, λαμβάνονται 3.06 g (95.7 %) του παραγώγου **3**. Σ.τ.: 159 – 1560 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) (μίγμα ταυτομερών δομών σε αναλογία 3 / 1) δ 10.31 (s, 1H), 8.66 – 8.64 (m, 2H), 8.63 – 8.62 (ταυτομερής δομή) (m, 1H), 7.70 – 7.68 (m, 2H), 7.67 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.57 – 7.55 (ταυτομερής δομή) (m, 1H), 6.75 (d, J = 2.4 Hz, 1H).

Σύνθεση της 4-(4-βρωμο-1H-πυραζολ-3-υλ)πυριδίνης (4).

Σφαιρική φιάλη που φέρει το παράγωγο **3** (3.93 g, 0.034 mol), οξικό νάτριο (2.79 g, 0.034 mol), οξικό οξύ (52 mL) σε άνυδρο χλωροφόρμιο (52 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι πλήρους διάλυσης (30 λεπτά). Στη συνέχεια, το μίγμα ψύχεται στους 0 °C και προστίθεται στάγδην βρώμιο (1.75 mL, 0.07 mol) και η ανάδευση συνεχίζεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται υπό κενό, συμπυκνώνεται και το ελαιώδες υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Silica gel 60 mm) με σύστημα έκλουσης κυκλοεξανίου / EtOAc 2 / 1 - 1 / 1. Λαμβάνονται 6.77 g (89.3 %) του βρωμοπαραγώγου **4**. Σ.τ.: >200 °C. ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.94 – 8.92 (m, 2H), 8.45 (m, 2H), 8.30 (s, 1H).

Σύνθεση της 4-(4-βρωμο-1-φαίνυλο-1H-πυραζολ-3-υλ)πυριδίνης (5).

Σε σφαιρική που φέρει διάλυμα του βρωμοπαραγώγου **4** (2 g, 0.009 mol), διαιθυλαμίνη (9.3 mL, 0.09 mol) και οξικό χαλκό (1.8 g, 0.009 mol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (30 mL) στους -80°C, προστίθεται το φαινυλοβορονικό οξύ (1.04 g, 0.0085 mol) και η αντίδραση αναδεύεται σε αυτή τη θερμοκρασία για 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται από κελίτη και το διήθημα εκχυλίζεται με CH_2Cl_2 / 2 % διάλυμα αμμωνίας 25% (3 x 15 mL), εκπλένεται με H_2O (15 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 και συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Silica gel 60mm) με σύστημα έκλουσης CH_2Cl_2 / MeOH 100 / 0.1 – 98 / 2. Λαμβάνονται 750 mg (27.9 %) του επιθυμητού παραγώγου **5**. Σ.τ.: 103 °C. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.72 (s, 2H), 8.14 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 8.08 (s, 1H), 7.73 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.51 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.4 Hz, 1H).

Σύνθεση του [1-φαίνυλο-3-(πυριδιν-4-υλ)-1H-πυραζολ-4-υλ]βορονικού οξέος (6).

Σε σφαιρική που περιέχει διάλυμα του παραγώγου **5** (320 mg, 1.07 mmol) σε άνυδρο και απαερωμένο τετραϋδροφουράνιο (THF) (20 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, στους - 78°C, προστίθεται στάγδην *n*-βουτυλολίθιο (διάλυμα 2.5M σε εξάνιο) (1.6 mL, 5.1 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται σε αυτή τη θερμοκρασία για 30 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται στάγδην βορικός τριμεθυλεστέρας (298 μ L / 1 mL THF, 2.68 mmol) και η αντίδραση αναδεύεται για άλλα 30 λεπτά στους -78°C, και στη συνέχεια για 1 ώρα με σταδιακή άνοδο της θερμοκρασίας ως τους - 10°C. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθεται 10 % διάλυμα χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl). Ακολουθεί εκχύλιση με AcOEt (3 x 30 mL), οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται, εκπλένονται με H₂O (10 mL), ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Στο υπόλειμμα γίνεται κατεργασία με CH₂Cl₂ και διηθείται υπό κενό. Λαμβάνεται 226 mg (79.7 %) του επιθυμητού βορονικού οξέος **6**. Σ.τ.: > 200 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 – 8.60 (m, 2H), 8.60 (s, D₂O exch, 1H), 7.84 – 7.81 (m, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.51 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, D₂O exch, 1H).

Σύνθεση της 4-(1-φαινυλ-1*H*-πυραζολ-3-υλ)πυριδίνης (7).

Σε σφαιρική που φέρει το βορονικό οξύ **5** (50 mg, 0.17 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-οκταμεθυλο-2,2'-δι-1,3,2-διοξοβορολάνιο (64.75 mg, 0.26 mmol), 1,1'-δισ(διφαινυλφωσφινό)φεροκκενιο]διχλωροπαλλάδιο (II) (12.73 mg, 0.017 mmol) και οξικό κάλιο (50 mg, 0.51 mmol) προστίθεται άνυδρη και απαερωμένη διοξάνη (10 mL) και το διάλυμα αναδεύεται στους 100 °C για 7.5 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα πτητικά απομακρύνονται υπό ελαττωμένη πίεση και το μίγμα εκχυλίζεται με AcOEt / H₂O (3 x 30 mL), η οργανική στιβάδα συλλέγεται, ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Silica gel 60mm) με σύστημα έκλουσης, κυκλοεξανίου / AcOEt 5 / 1 – 3 / 1. Λαμβάνονται 35 mg (93.1 %) του παραγώγου **7**. Σ.τ.: 134 – 135 °C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (s, 2H), 8.00 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H).

Σύνθεση του 1,1'-διφαινυλ-3,3'-δι(πυριδιν-4-υλ)-1*H*,1'*H*-4,4'-διπυραζολίου (8).

Σε τρίλαιμη σφαιρική που φέρει το βορονικό οξύ **5** (50 mg, 0.17 mmol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-οκταμεθυλο-2,2'-δι-1,3,2-διοξοβορολάνιο (64.75 mg, 0.26 mmol), 1,1'-

δισ(διφαινυλφωσφινο)φεροκκενο]διχλωροπαλλάδιο (II) (12.73 mg, 0,017 mmol) και οξικό κάλιο (50,05 mg, 0,51 mmol) προστίθεται άνυδρο και απαερωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) (10mL) και το διάλυμα αναδεύεται στους 80 °C για 2.5 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, στο μίγμα προστίθεται νερό και εκχυλίζεται με AcOEt (3 x 30 mL), οι οργανικές στιβάδες συλλέγονται, ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό ελαττωμένη πίεση. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Silica gel 60mm) με σύστημα έκλουσης, κυκλοεξανίου / AcOEt 3 / 1 – 0 / 100. Λαμβάνονται 12 mg (31.9 %) του παραγώγου **9** και 20 mg (26.7 %) του διμερούς παραγώγου **8**. Σ.τ.: >200 °C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (s, 2H), 8.01 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 7.52 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H).

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ