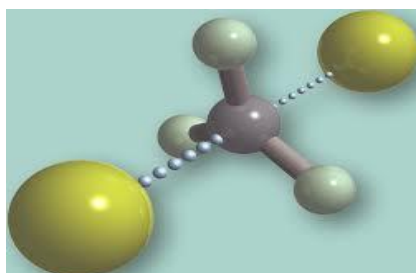


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Ν. ΤΖΑΝΕΤΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΕΡΚΟ Α. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ
SYNTHESIS OF NOVEL MOLECULES WITH ANTICANCER ACTIVITY

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑΣ Ν. ΤΖΑΝΕΤΟΥ (Χημικός, M.Sc.)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΕΡΚΟ Α. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σέρκο Α. Χαρουτουνιάν, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)
Βιολέτα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α. (μέλος)
Εμμανουήλ Πιτσινός, Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος (μέλος)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σέρκο Α. Χαρουτουνιάν, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Βιολέτα Κωνσταντίνου-Κόκοτου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
Ιωάννης Πολίτης, Καθηγητής Γ.Π.Α.
Σοφία Μητάκου, Καθηγήτρια Ε.Κ.Π.Α.
Στυλιανή Χαδιώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
Κωνσταντίνος Αθανασόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Π.Π.
Νικόλαος Φωκιαλάκης, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ' όλα, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου, Καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουιάν, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, σε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η βοήθειά του στο σχεδιασμό και τη πραγμάτωση των στόχων της διατριβής, καθώς και στην υπερπήδηση δυσκολιών που ανέκυψαν στη διάρκειά της, ήταν καταλυτική. Επίσης, τον ευχαριστώ από καρδιάς, για την ελευθερία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, ώστε να συνεχίσω και να ολοκληρώσω τη διδακτορική μου διατριβή, παρόλη την ανάγκη να εργάζομαι παράλληλα με την πραγματοποίησή της, τα τελευταία τρία χρόνια.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Το μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγήτρια Βιολέτα Κωνσταντίνου-Κόκοτου για τη συμπαράστασή της, ως επίσης και το έτερο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, Τακτικό Ερευνητή του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, Εμμανουήλ Πιτσινό για τη συμπαράστασή του ιδιαίτερα την πρώτη περίοδο του διδακτορικού μου.

Είμαι ευγνώμων επίσης στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διατριβής μου, Καθηγήτρια Σοφία Μητάκου, Καθηγητή Ιωάννη Πολίτη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Στυλιανή Χαδιώ, και τους Επίκουρους Καθηγητές Νικόλαο Φωκιαλάκη και Κωνσταντίνο Αθανασόπουλο, που δέχθηκαν πρόθυμα να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή και για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στον Επίκουρο Καθηγητή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του ΕΚΠΑ κ. Νικόλαο Φωκιαλάκη για την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε με τη λήψη των φασμάτων NMR στο μεγαλύτερο μέρος της διατριβής, αλλά και τη βοήθεια στην ερμηνεία των τελευταίων και την ευπρεπή παρουσίασή τους σε επίπεδο επιστημονικών δημοσιεύσεων. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Καθηγήτρια Sandra Liekens του Rega Instituut KU Leuven και τον Λέκτορα Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δημήτριο Στάγκο για την πραγματοποίηση των *in vitro* βιοδοκιμασιών, στα τελικά μόρια. Σημαντική ήταν και η συνεισφορά του Δρ. Αντρέα Αφαντίτη στους

υπολογισμούς μοριακής μηχανικής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από το εργαστήριο τη Δρ. Σοφία Κουλοχέρη για τις χρήσιμες συμβουλές και τη βοήθειά της. Ευχαριστώ επίσης και τη συνάδελφό μου από το εργαστήριο Κα Άννα Αποστόλου για τη συνεργασία, τη παρέα και το αρμονικό κλίμα, καθώς επίσης και όλα τα μέλη και συναδέλφους από το Εργαστήριο Χημείας.

Πάνω απ' όλα, είμαι ευγνώμων στους γονείς μου, Μαρία και Νικόλαο Τζανέτο για την ολόψυχη αγάπη και υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και ειδικότερα για την οικονομική τους στήριξη τα πρώτα χρόνια. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου Δρ. Κωνσταντίνο Κασιώτη, Ερευνητή Β' στο Τμήμα Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων & Φυτοφαρμακευτικής του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, για την σημαντική του βοήθεια, ποικίλης σημασίας σε όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής. Ο σύζυγός μου είναι ο συνεμπνευστής και παρακινήτης της συμμετοχής μου σε αυτό το διδακτορικό, σε μια περίοδο της ζωής μου που είχα διαγράψει την επιθυμία να αποκτήσω έναν διδακτορικό τίτλο, για το λόγο αυτό του το αφιερώνω.

Ευαγγελία Ν. Τζανέτου

Μάρτιος 2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

«Σύνθεση νέων μορίων με αντικαρκινική δράση»

Το σημαντικό βιολογικό/φαρμακευτικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι αζαετεροκυκλικές ενώσεις έχει αποτελέσει έναυσμα για τη διενέργεια πλήθους ερευνητικών εργασιών με αντικείμενο το σχεδιασμό και την ανάπτυξη μεθοδολογιών σύνθεσης νέων βιοδραστικών μορίων που εμπεριέχουν στη δομή τους ποικίλους αζαετεροκυκλικούς δακτυλίους. Η παρούσα διατριβή εντάσσεται στην προσπάθεια αυτή και επικεντρώνεται στην ανάπτυξη μιας σειράς νέων παραγώγων των **πυραζολίων** και **ισοξαζολίων**, μορίων με αζαετεροκυκλικούς δακτύλιους και πολυδιάστατη βιολογική δράση. Απώτερος στόχος ήταν η ανάπτυξη νέων μορίων με αντικαρκινική ή/και αντιαγγειογενετική δράση.

Στο πλαίσιο εκπόνησης της διατριβής, σχεδιάστηκαν, συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν νέα παράγωγα των:

- πυραζολίων, που συντέθηκαν με συμπύκνωση υδραζινών με ποικίλες 1,3-δικετόνες
- ισοξαζολίων, τα οποία παρασκευάστηκαν μέσω της συμπύκνωσης της υδροξυλαμίνης με ποικίλες 1,3-δικετόνες,
- πυραζολο[1,5a]πυριμιδινών, μορίων που είναι ανάλογα της ντορσομορφίνης

στη συνέχεια, τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών των παραπάνω μορίων –σε συνδυασμό με τη χημική τους δομή– χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη & πιστοποίηση ενός νέου **in silico** μοντέλου για τον περαιτέρω σχεδιασμό, σύνθεση και μελέτη βιοδραστικότητας μιας επιπλέον σειράς νέων μορίων-στόχων με προσδόκιμη αντικαρκινική δραστηριότητα.

Οι δομές όλων των νέων μορίων διαλευκάνθηκαν με σειρά πειραμάτων φασματοσκοπίας NMR (^1H , ^{13}C , 2D , κλπ), ενώ η αντικαρκινική τους ικανότητα αξιολογήθηκε μέσω ποικίλων *in vitro* δοκιμασιών προσδιορισμού της ανασταλτικής τους δράσης κατά του πολλαπλασιασμού διαφόρων ενδοθηλιακών και καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τέλος, η αντι-αγγειογενετική τους δράση πιστοποιήθηκε σε δοκιμασίες αναστολής του σχηματισμού μικροσωληνίσκων και του βαθμού της κυτταρικής μετανάστευσης.

Αναλυτικότερα, κατά τη διενέργεια της διατριβής υλοποιήθηκαν οι παρακάτω δράσεις:

α) Σύνθεση 59 νέων μορίων-στόχων. Από αυτά, τα 23 είναι παράγωγα του πυραζολίου, τα 20 ισοξαζολίου και τα 16 είναι νέα ανάλογα της ντορσομορφίνης.

β) Αναπτύχθηκε, επικυρώθηκε και δοκιμάστηκε ένα νέο *in silico* μοντέλο για τον εντοπισμό-επιλογή νέων μορίων με πιθανή βιοδραστικότητα. Στη συνέχεια, το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό και τη σύνθεση των νέων ισοξαζολικών παραγώγων.

γ) Προσδιορίστηκε η αντικαρκινική δράση όλων των μορίων που συντέθηκαν. Οι δοκιμές ανέδειξαν το πυραζολικό παράγωγο **Π-9** ως το πλέον δραστικό κατά της καρκινικής σειράς μαστού MCF-7, με τιμή $\text{IC}_{50} = 1.5 \pm 0.4$, ενώ τα ισοξαζολικά παράγωγα **Π-35** και **Π-38** (προήλθε από την εφαρμογή του *in silico* μοντέλου επιλογής), εμφάνισαν τις καλύτερες αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις με τιμές IC_{50} μικρότερες από $1\mu\text{M}$ έναντι των περισσότερων κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν.

δ) Συντέθηκαν νέα ανάλογα της ντορσομορφίνης, από τα οποία τα **Π-46**, **Π-50** και **Π-57** εμφάνισαν την καλύτερη αντι-πολλαπλασιαστική δράση με τιμές IC_{50} κάτω από $10\mu\text{M}$ εναντίον σειράς καρκινικών κυτταρικών σειρών.

ε) Μελετήθηκε η αντιαγγειογενετική δράση όλων των παραπάνω μορίων σε πειράματα αναστολής σχηματισμού μικροσωληνίσκων, αναδεικνύοντας ως πλέον δραστικά τα παράγωγα πυραζολίου **Π-12** και ισοξαζολίου **Π-35** και **Π-38**. Επίσης, επιβεβαιώθηκε ότι ο τα μόρια **Π-22**, **Π-23**, **Π-36** και **Π-38** αναστέλλουν την αγγειογένεση μέσω της απενεργοποίησης του VEGF.

στ) Προσδιορίστηκε ότι το νέο ανάλογο της ντορσομορφίνης **Π-46** διαθέτει μια αξιοσημείωτη αντιική δράση εναντίον ποικίλων ιών έρπητα.

Λέξεις-Κλειδιά: Σύνθεση βιοδραστικών μορίων, Μικροκυματική σύνθεση, Πυραζόλια, Ινδαζόλια, Ισοξαζόλια, Πυραζολοπυριμιδίνες, Ντορσομορφίνη, Κυτταροστατική δράση, Αναστολή της αγγειογένεσης, Αντικαρκινική δράση, Σχηματισμός μικροσωληνίσκων, Μοντέλο πρόβλεψης βιοδραστικότητας.

SUMMARY

«Synthesis of novel molecules with anticancer activity»

The significant biological/pharmaceutical interest of azaheterocyclic compounds has initiated a vigorous research activity towards the development of methodologies for the efficient synthesis of novel bioactive molecules containing in their structural frameworks diverse azaheterocyclic rings. The endeavor herein falls within this initiative, focusing on the development of several novel derivatives of pyrazoles and isoxazoles, molecules containing the azaheterocyclic ring residue and displaying multidimensional biological activities. Final goal was the development of novel molecules with potent anticancer and/or antiangiogenic activities.

In this respect, we designed, synthesized and determined the bioactivities of novel derivatives of:

- 1) pyrazoles, synthesized *via* the condensation of 1,3-diketones with hydrazines,
- 2) isoxazoles, prepared by the condensation of 1,3-diketones with hydroxylamines,
- 3) pyrazole[1,5a]pyrimidines, analogues of the bioactive molecule dorsomorphin

Subsequently, the biological activities of the novel compounds, along with their chemical structures were utilized for the development and validation of an *in silico* model, used for the design, synthesis and bioactivity determination of several additional target molecules with anticipated anticancer activities.

The structures of all novel molecules were elucidated using NMR spectroscopy (¹H, ¹³C, 2D, etc) experiments, while their anticancer activity was evaluated through several *in vitro* assays determining the inhibition of endothelial and cancer

cells proliferation. Finally, their antiangiogenic activity was evaluated by *in vitro* assays of the inhibition of cell tubes formation and cell migration.

In particular, during the implementation of this thesis the following activities were performed:

a) Synthesis of 59 novel molecules, which had been set as the target compounds. Amongst them, 23 are pyrazole derivatives, 20 isoxazole and 16 are analogues of dorsomorphin.

b) Development, validation and utilization of novel *in silico* model for the discovery of potentially bioactive molecules. The model was used for the design and synthesis of novel derivatives of isoxazole.

c) Determination of the anticancer activities of all novel molecules synthesized herein. The results pointed out the pyrazolic compound **Π-9** as the most active against the MCF-7 cells, displaying $IC_{50} = 1.5 \pm 0.4 \mu M$, while isoxazoles **Π-35** and **Π-38** (developed using the classification model) exhibited the best antiproliferative activities, with IC_{50} values below $1 \mu M$ against most cell lines tested.

d) Synthesis of novel dorsomorphine analogues, with compounds **Π-46**, **Π-50** and **Π-57** showing the most potent antiproliferative activity with IC_{50} values below $10 \mu M$ against most cancer cell lines.

e) Evaluation of all novel compounds as inhibitors of angiogenesis through the assessment of their tube formation inhibition potencies, highlighting as the most actives the derivatives of pyrazole **Π-12** and isoxazole **Π-35** and **Π-38**. In addition, the antiangiogenic mechanism of compounds **Π-22**, **Π-23**, **Π-36** and **Π-38** was found to proceed through the deactivation of VEGF pathway.

f) It was found that the novel pyrazolo[1,5a]pyrimidine derivative **Π-46** exhibits significant antiviral activity against a variety of herpes viruses.

Keywords: Synthesis of bioactive compounds, Microwave synthesis, Pyrazoles, Indazoles, Isoxazoles, Pyrazolopyrimidines, Dorsomorphine, Antiproliferative activity, Inhibition of angiogenesis, Anti-cancer activity, Tube formation, Bioactivity prediction model.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1	3
Εισαγωγή.....	3
1.1 Ιστορική αναδρομή για τον Καρκίνο	3
1.2.Επιδημιολογικές μελέτες για τον καρκίνο.....	5
1.3. Παράγοντες κινδύνου.....	10
1.4. Τι είναι ο καρκίνος.....	12
1.5 Καρκινογένεση	13
1.6 Θεραπεία του καρκίνου.....	15
1.6.1. Κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων	16
1.6.2. Περιορισμοί των σύγχρονων θεραπειών	20
1.7 Αγγειογένεση	23
1.7.1. Παράγοντες που ελέγχουν την αγγειογένεση	25
1.7.2 . Αγγειογένεση των όγκων.....	28
1.7.3 Αγγειογενετική ισορροπία	32
1.7.4. Αντι-αγγειογενετική θεραπεία.....	34
Κεφάλαιο 2	39
Ανάπτυξη-Σύνθεση Νέων Πυραζολικών Παραγώγων και Αποτίμηση της Βιολογικής τους Δράσης	39
2.1. Οι αζαετεροκυκλικές ενώσεις στη φαρμακευτική χημεία	39
2.2. Πυραζόλια.....	42
2.3. Πυραζολικά αντι-νεοπλασματικά φαρμακα.....	43
2.4 Έρευνες σχετικά με των αντικαρκινική δράση των πυραζολίων.....	46
2.5 Μέθοδοι παρασκευής νέων πυραζολικών παραγώγων	48
2.6. Σύνθεση των νέων αζαετεροκυκλικών μορίων	49
2.7 Σύνθεση νέων πυραζολικών και ινδαζολικών παραγώγων	50
2.8. Αποτίμηση της βιολογικής δράσης των νέων πυραζολικών και ινδαζολικών παραγώγων.....	56
2.8.1. Αναστολή πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών και των καρκινικών κυττάρων	57
2.8.2. Αναστολή σχηματισμού μικροσωληνίσκων σε ενδοθηλιακά κύτταρα.....	60
2.8.3 Μοριακός μηχανισμός δράσης των δραστικών πυραζολίων	61
2.9 Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	62
2.10. Πειραματικό μέρος –Σύνθεση πυραζολίων	64
Κεφάλαιο 3.....	95

Σύνθεση Νέων Ισοξαζολικών Παραγώγων με αντι-Πολλαπλασιαστική και αντι-Αγγειογενετική Δράση.....	95
3.1. Ισοξαζόλια.....	95
3.2 Σύνθεση ισοξαζολίων	98
3.3 Σύνθεση νέων ισοξαζολικών παραγώγων	99
3.4. Κυτταροστατικές ιδιότητες των ισοξαζολικών παραγώγων.....	101
3.5 Υπολογιστικό μέρος- Μοριακή μηχανική.....	103
3.5.1. Εισαγωγή.....	103
3.5.2. Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης.....	104
3.5.3. Διαχωρισμός ανάμεσα σε ένα σύνολο ελέγχου και εκπαίδευσης.....	107
3.5.4. <i>In silico</i> αναζήτηση βιοδραστικών μορίων	112
3.6 Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	115
3.7. Πειραματικό μέρος- Σύνθεση ισοξαζολίων	117
Κεφάλαιο 4	144
Πυραζολικά παράγωγα της Ντορσομορφίνης	144
4.1 Εισαγωγή στις πυραζολοπυριμιδίνες (ΠΖΠΜΔ)	144
4.1.1 Σύνθεση του δακτυλίου και των πυραζολοπυριμιδινών παραγώγων	145
4.2. Μικροκυματική Σύνθεση Αζαετεροκυκλικών μορίων.....	148
4.3. Ιστορικό της Σύνθεσης Ντορσομορφίνης και των αναλόγων της.....	151
4.4 Σύνθεση νέων παραγώγων της ντορσομορφίνης.....	154
4.5. Αναστολή πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων.....	160
4.6. Αντιϊκή δράση.....	162
4.7. Συμπεράσματα.....	165
4.8 Πειραματικό Μέρος- Σύνθεση παραγώγων της ντορσομορφίνης.....	166
Βιβλιογραφία	186
Συντμήσεις	205
Soft tissue sarcomas.....	205
Quantitative Structure Activity and Relationships.....	206
Magnesium sulfate	207
Ammonium chloride.....	207
Γενικές πειραματικές τεχνικές.....	208
Παράρτημα	211
NMR Φάσματα	211

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή για τον Καρκίνο

Τα πρώτα «ίχνη» του καρκίνου εντοπίζονται στις μούμιες της αρχαίας Αιγύπτου, σε απολιθωμένα οστά κεφαλής και αυχένα, αναφερόμενα σε περιπτώσεις καρκίνου των οστών. Η πρώτη γραπτή περιγραφή της συγκεκριμένης νόσου είναι αποτυπωμένη σε πάπυρο, ο οποίος υπολογίζεται ότι γράφτηκε περί το 1600 π.Χ. και αποτελεί το πρώτο επιστημονικό χειρόγραφο που αφορά τον καρκίνο. Ονομάζεται ως πάπυρος Edwin Smith, από το όνομα του κατόχου του, και αναφέρεται σε οκτώ περιπτώσεις όγκων ή ελκών του μαστού, οι οποίες αντιμετωπίστηκαν με καυτηριασμό. Χαρακτηριστικά, στον πάπυρο αναφέρεται ότι: **«Πρόκειται για μια πολύ σοβαρή ασθένεια για την οποία δεν υπάρχει θεραπεία»**. Το ευρύτερο κοινωνικό σύνολο της αρχαίας Αιγύπτου πίστευε πως η ασθένεια αυτή, που δεν είχε βαπτιστεί την εποχή εκείνη, αποτελούσε την τιμωρία των Θεών στους ασεβείς για τις αμαρτωλές τους πράξεις.

Η νόσος ονοματίστηκε για πρώτη φορά με τη λέξη «Καρκίνος» στα κείμενα του Ιπποκράτη. Στην Ελληνική γλώσσα η λέξη αυτή παραπέμπει στο καβούρι, το οποίο κατά κάποιο τρόπο θυμίζει τον καρκίνο, αφού οι ακτινωτές μεταστάσεις των καρκινικών κυττάρων φέρνουν αμυδρά στο μυαλό τη μορφή που έχουν τα πόδια και οι δαγκάνες του καβουριού. Η αιτιολογία της εμφάνισης της νόσου αυτής βασίστηκε στη θεώρηση του Ιπποκράτη το 460-370 π.χ. για τους τέσσερεις χυμούς του ανθρώπου (αίμα, φλέγμα, κίτρινη και μαύρη χολή), οι οποίοι υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκονται πάντοτε σε ισορροπία. Όμως, όταν διαταραχτεί η ισορροπία αυτή και συσσωρευτεί σε ένα συγκεκριμένο μέρος του σώματος υπερβολική ποσότητα μαύρης χολής, τότε δημιουργείται ο καρκίνος. Η θεωρία των χυμών επέζησε για πολλούς αιώνες φτάνοντας έως και τη Ρωμαϊκή εποχή, κατά την οποία υιοθετήθηκε και διαδόθηκε περαιτέρω από τον Γαληνό, ένα διάσημο γιατρό της εποχής. Αποτέλεσε δε την κυρίαρχουσα άποψη για την ασθένεια αυτή έως περίπου το 1300 μ.Χ. Η μακρόχρονη διατήρηση της θεωρίας αυτή οφείλεται στην αυστηρή απαγόρευση της μελέτης του ανθρώπινου

σώματος, η οποία είχε επιβληθεί για θρησκευτικούς λόγους σε όλο το χρονικό αυτό διάστημα. Ως αποτέλεσμα, την περίοδο αυτή –αλλά και για πολλά από τα μετέπειτα χρόνια– η νόσος θεωρείτο ως ανίατη, έστω και εάν υποβάλλονταν ο ασθενής σε κάποιου είδους χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση του όγκου (American Cancer Society, 2015).

Μετά τον 15ο αιώνα ξεκίνησε σταδιακά η υιοθέτηση ορισμένων περισσότερο επιστημονικών μεθόδων για τη μελέτη των ασθενειών. Σημαντικό ορόσημο αποτέλεσε το έτος 1628 κατά το οποίο άρχισε να χρησιμοποιείται η μέθοδος της αυτοψίας, η οποία αποκάλυψε σημαντικά στοιχεία για το ανθρώπινο σώμα και την κυκλοφορία του αίματος μέσω της καρδιάς και των υπόλοιπων οργάνων. Όμως θα πρέπει να επισημανθεί ότι μόλις το 1761 ο Morgagni χρησιμοποίησε πρώτος τη νεκροψία για να συνδέσει τα παθολογικά ευρήματά της με την αρρώστια που έπασχε ο ασθενής. Η πρακτική αυτή έθεσε τα πρώτα θεμέλια για την επιστημονική μελέτη του καρκίνου και την ανάπτυξη της επιστήμης της ογκολογίας. Την ίδια περίπου περίοδο ο Σκωτσέζος John Hunter (1728-1793) εισήγαγε τη **θεωρία της λέμφου**, σύμφωνα με την οποία κύρια αιτία δημιουργίας του καρκίνου αποτελούσε η αλλαγή στη σύσταση και πυκνότητα του υγρού που κυκλοφορεί στο σώμα μέσω του λεμφικού συστήματος, της λέμφου. Πίστευε πως οι όγκοι δημιουργούνταν από τη λέμφο και μεταφέρονταν με τη βοήθεια του αίματος, ενώ παράλληλα εισηγήθηκε τη χειρουργική αφαίρεση ορισμένων τύπων καρκίνου, κυρίως όσων δεν είχαν ακόμα «εισβάλει» σε κάποιο ιστό (Gallucci, 1985).

Θα έπρεπε όμως να περάσει ένας επιπλέον αιώνας, και να αναπτυχθεί η μέθοδος της αναισθησίας, για να γίνει επί της ουσίας δυνατή η ανάπτυξη των επεμβατικών χειρουργικών μεθόδων για την καταπολέμηση του καρκίνου. Παράλληλα, τον 19ο αιώνα γεννήθηκε και ο κλάδος της επιστημονικής ογκολογίας, ως απόρροια της συστηματικής πλέον χρήσης του μικροσκοπίου και της ανάπτυξης της επιστήμης της κυτταρικής παθολογίας από τον Rudolf Virchow. Έτσι, έγινε πλέον εφικτή η μελέτη των ανθρώπινων ιστών που αφαιρούνται μετά από μια χειρουργική επέμβαση, με αποτέλεσμα να υπάρχει μια σαφέστερη εικόνα της ασθένειας αυτής και να είναι δυνατή η ακριβέστερη διάγνωσή της. Όλες αυτές οι εξελίξεις είχαν ως τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη και εμπέδωση της πεποίθησης ότι ο καρκίνος αποτελείται από κύτταρα που δεν είναι φυσιολογικά.

Όμως, παράλληλα με την ανάπτυξη της ιατρικής γνώσης, κατά την διάρκεια των αιώνων παρουσιάστηκαν ποικίλες θεωρίες ή αντιλήψεις για τη φύση και το μηχανισμό πρόκλησης (και διάδοσης) του καρκίνου. Χαρακτηριστική σχετική περίπτωση αποτελεί μια θεωρία του 17^{ου}–18^{ου} αιώνα, η οποία χαρακτήριζε τον καρκίνο ως μια μεταδοτική νόσο που προκαλείται από παράσιτα στο σώμα, αναφέροντας ως παράδειγμα ένα σκουλήκι το οποίο θεωρούσε υπεύθυνο για την πρόκληση του καρκίνου του στομάχου. Η διάδοση της θεωρίας αυτής οδήγησε στην απομάκρυνση του πρώτου αντικαρκινικού νοσοκομείου από το κέντρο του Παρισιού το 1779, για να μην μολυνθεί ο υγιής πληθυσμός. Μια άλλη αντίληψη που επικράτησε από τα τέλη του 19^{ου} έως τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, θεωρούσε ότι ο καρκίνος προκαλείται από κάποιο τραύμα και τη μετέπειτα επιδείνωσή του. Η θεωρία αυτή εγκαταλείφθηκε σύντομα, μετά από αλληπάλληλες αποτυχημένες προσπάθειες να προκληθεί με τραυματισμό καρκίνος σε πειραματόζωα (Kardinal and Yarbrow, 1979).

Όμως, ακόμα και σήμερα που η επιστήμη έχει κάνει μια αξιοσημείωτη πρόοδο ως προς την κατανόηση και αντιμετώπιση της ασθένειας αυτής, **η οποία πλέον χαρακτηρίζεται ως η μάστιγα του αιώνα**, υπάρχουν μεμονωμένες περιπτώσεις επιστημόνων που ακόμα αναπτύσσουν ποικίλες θεωρίες για τον καρκίνο. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του Ιταλού γιατρού Tullio Simoncini, ο οποίος υποστηρίζει ότι ο καρκίνος είναι ένας μύκητας που προκαλείται από τον *Candida*, έναν οργανισμό που ζει σε μικρές ποσότητες στο σώμα των υγιών ανθρώπων. Υποστηρίζει δε ότι η χρήση μαγειρικής σόδας (όξινο ανθρακικό νάτριο, sodium bicarbonate), η οποία ως ισχυρός καταστροφέας του μύκητα μπορεί να αντιμετωπίσει με επιτυχία την εξέλιξη της νόσου (Cancer Tutor, 2015).

1.2.Επιδημιολογικές μελέτες για τον καρκίνο

Είναι αναμφισβήτητο γεγονός ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες ο **καρκίνος** αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου, καθώς η δημιουργία και η εξάπλωσή του συνεχίζουν να αντιστέκονται στις προόδους που σημειώνει η σύγχρονη ιατρική. Παρότι ορισμένες μορφές καρκίνου αντιμετωπίζονται στις μέρες μας με σχετική επιτυχία, υπάρχουν όμως και αρκετές μορφές που εξακολουθούν να καταπολεμούνται πολύ δύσκολα, αποτελώντας τη βασική αιτία θνησιμότητας ανθρώπων οποιασδήποτε εθνικότητας.

Η επιδημιολογία είναι η μελέτη της εμφάνισης της νόσου στον πληθυσμό και όχι στα μεμονωμένα άτομα. Ο ιδανικός πληθυσμός για την εκτίμηση των ποσοστών εμφάνισης καρκίνου θα ήταν ένας μεγάλος, πολυσχιδής πληθυσμός, με μικρή μετανάστευση και σύστημα υγείας που θα παρείχε φροντίδα υψηλής ποιότητας από τη γέννηση ως το θάνατο του κάθε ατόμου. Παγκοσμίως, τα πλέον αξιόπιστα επιδημιολογικά δεδομένα εξάγονται από τις Η.Π.Α και σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, από τις Σκανδιναβικές χώρες. Στις Η.Π.Α. τα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν την εμφάνιση του καρκίνου συλλέγονται, από το 1973, μέσω του προγράμματος παρακολούθησης επιδημιολογίας και του εθνικού αντικαρκινικού ινστιτούτου (NCI). Οι διεθνείς στατιστικές σχετικά με την εμφάνιση του καρκίνου συγκεντρώνονται από το Διεθνές Γραφείο Έρευνας του Καρκίνου (International Agency for Research on Cancer, IARC) και από άλλες υπηρεσίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (W.H.O.) (Μαρία Παπαδάκου, 2007).

Σύμφωνα με στοιχεία των πρόσφατων στατιστικών, ο καρκίνος θα προσβάλει ένα στα τρία άτομα πριν από την ηλικία των 75, ενώ ένα στα τέσσερα άτομα θα πεθάνει από επιπλοκές της ασθένειας αυτής. Έτσι, ετησίως περίπου 10 εκατομμύρια άνθρωποι θα διαγιγνώσκονται με καρκίνο και 7 εκατομμύρια θα χάνουν τη ζωή τους από την ασθένεια αυτή, ποσοστό που αντιστοιχεί στο 12% του συνόλου των καταγεγραμμένων θανάτων σε παγκόσμιο επίπεδο (Vander et al., 2001). Οι πιο συχνές αιτίες θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως (ανά έτος) είναι:

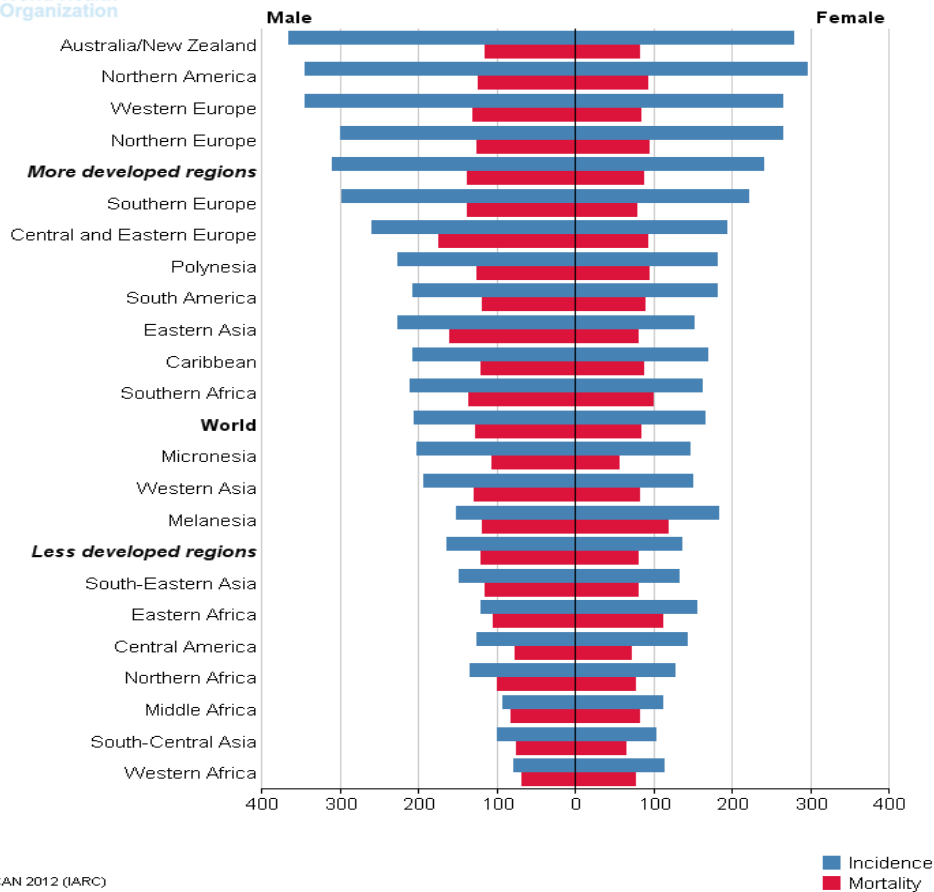
- Ο καρκίνος του πνεύμονα με 1,3 εκατομμύρια θανάτους
- Ο καρκίνος του στομάχου με 1 εκατομμύριο θανάτους
- Ο καρκίνος του ήπατος με 662.000 θανάτους
- Ο καρκίνος του παχέος εντέρου με 665.000 θανάτους
- Ο καρκίνος του μαστού με 502.000 θανάτους (World Health Organization, 2013).

Όσον αφορά το φύλο των ασθενών, παγκοσμίως οι πιο συχνές αιτίες θανάτου από καρκίνο για τους άνδρες είναι οι καρκίνοι του πνεύμονα, στομάχου, ήπατος, παχέος εντέρου, οισοφάγου και προστάτη. Οι αντίστοιχες στατιστικές για τις γυναίκες αναδεικνύουν ως πλέον συχνές αιτίες θανάτου τους καρκίνους σε μαστό, πνεύμονα, στομάχι, παχύ έντερο και ενδομήτριο.

Σε έρευνα που διενεργήθηκε το έτος 2010 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), διαπιστώθηκε πως μεταξύ των 15 κύριων αιτιών θανάτου, ο καρκίνος κατατάσσεται στη δεύτερη θέση μετά από τις καρδιακές παθήσεις,

αντιστοιχώντας στο 24% περίπου του συνόλου των θανάτων στη χώρα (Centers for disease control and prevention, 2013). Οι αντίστοιχοι αριθμοί ήταν το ίδιο ανησυχητικοί και για το 2011, αφού ο συνολικός αριθμός των νέων διαγνωσμένων περιπτώσεων καρκίνου στις ΗΠΑ και των οφειλόμενων σε αυτές θανάτων απαριθμούνταν αντίστοιχα σε 1.596.670 και 571.950 άτομα (Siegel et al., 2011). Το αμέσως επόμενο έτος (2012), με βάση τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (**Health World Organization, WHO**) σε όλο τον κόσμο διαγνώστηκαν 14,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου και 8,2 εκατομμύρια θάνατοι σχετίστηκαν με την ασθένεια αυτή, ενώ διαπιστώθηκε ότι 32,6 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν με τον καρκίνο (5 χρόνια μετά από την αρχική του διάγνωση). Είναι επίσης αξιοσημείωτο, πως το 57% των νέων περιπτώσεων καρκίνου (8 εκατομμύρια άτομα) και το 65% των θανάτων από καρκίνο (5,3 εκατομμύρια άτομα) εντοπίστηκαν στις λιγότερο αναπτυγμένες περιφέρειες. Στους άντρες, τα ποσοστά εμφάνισης του καρκίνου ποικίλουν στις διάφορες περιοχές του κόσμου, κυμαινόμενα (για 100.000 άνδρες) από 79 στη Δυτική Αφρική έως τους 365 σε Αυστραλία/Νέα Ζηλανδία (με ιδιαίτερα υψηλά τα ποσοστά καρκίνου του προστάτη). Αντίστοιχα, η διακύμανση εμφάνισης του καρκίνου είναι μικρότερη στις γυναίκες, αφού τα σχετικά ποσοστά (ανά 100.000 γυναίκες) κυμαίνονται από 103 στη Νότιο-Κεντρική Ασία έως τις 295 στη Βόρεια Αμερική.

Όσον αφορά τη θνησιμότητα, η περιφερειακή μεταβλητότητα είναι μικρότερη σε σχέση με τη συχνότητα εκδήλωσης της ασθένειας. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά για τους άνδρες είναι κατά 15% υψηλότερα στις περισσότερο ανεπτυγμένες περιφέρειες σε σύγκριση με τις λιγότερο ανεπτυγμένες. Για τις γυναίκες τα ποσοστά για τις περιφέρειες αυτές είναι υψηλότερα μόνο κατά 8%. Αναλυτικότερα, για τους άνδρες τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (ανά 100.000) παρατηρούνται στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη (173) και τα χαμηλότερα στη Δυτική Αφρική (69). Αντίθετα, για τις γυναίκες τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας εμφανίζονται στη Μελανησία (119) και την Ανατολική Αφρική (111) και τα χαμηλότερα σε Κεντρική Αμερική (72) και Νότιο-Κεντρική Ασία (**Εικόνα 1.1**, World Health Organization).



GLOBOCAN 2012 (IARC)

■ Incidence
■ Mortality

Εικόνα 1.1 Όλες οι μορφές καρκίνου (με εξαίρεση τον καρκίνο του δέρματος που δεν είναι μελάνωμα). Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης, θνησιμότητα και παγκόσμια επικράτηση για το έτος 2012 *Estimated age-standardised rates (World) per 100,000.

Στην Ευρώπη, εκτιμάται ότι το έτος 2006 διεγνώσθησαν περίπου 3,2 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου, δηλαδή 300.000 περισσότερες από τις αντίστοιχες καταγραφές του 2004. Από αυτές, το 53% αφορούσαν άνδρες και 47% γυναίκες (Ferlay et al., 2007). Από τα στοιχεία της ίδιας μελέτης φαίνεται ότι το 2006 ο αριθμός των θανάτων έφτασε τα 1,7 εκατομμύρια (56% άνδρες και 44% γυναίκες).

Σε αντιστοιχία με τις περισσότερες χώρες του κόσμου, στην Ελλάδα ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008). Σύμφωνα με τα στοιχεία του Ο.Ο.Σ.Α (Οργανισμός για την Οικονομική Συνεργασία και Ανάπτυξη), η θνησιμότητα από καρκίνο στην Ελλάδα είναι γενικά χαμηλότερη σε

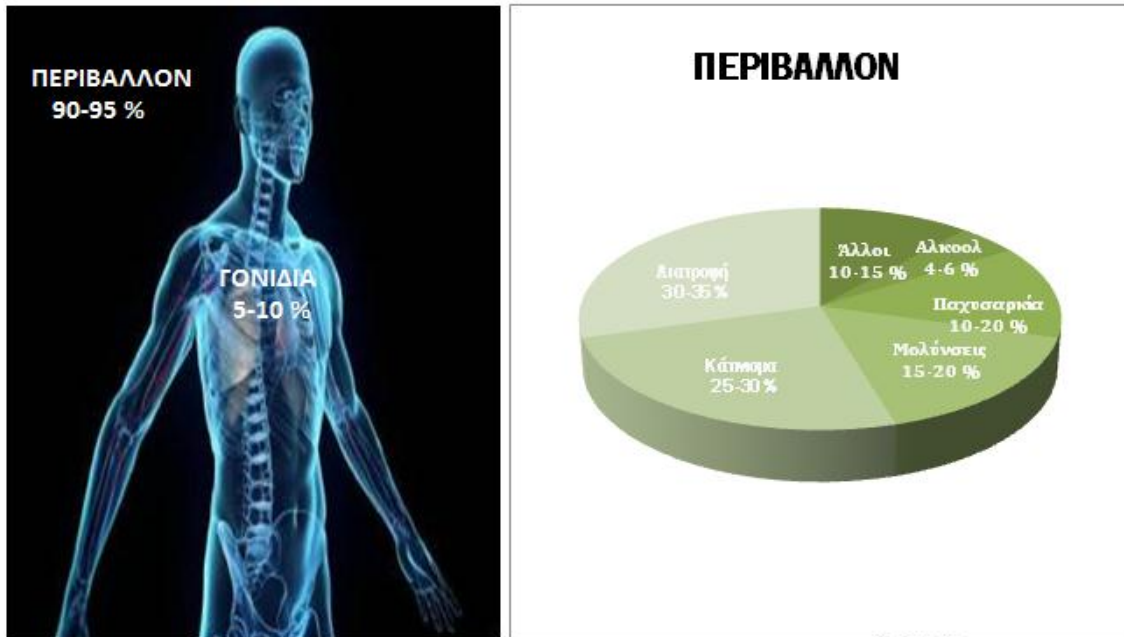
σύγκριση με τις υπόλοιπες ανεπτυγμένες χώρες της Δυτικής και Κεντρικής Ευρώπης, του Καναδά και της Ν. Ζηλανδίας (World Health Organization, 2010). Μεταξύ των 34 χωρών μελών του Ο.Ο.Σ.Α, το 2004 η Ελλάδα κατατασσόταν στη 19η θέση ως προς τη θνησιμότητα από καρκίνο στους άνδρες και την 23η στις γυναίκες. Όμως, η ευνοϊκή θέση της χώρας είναι **σε κάποιο βαθμό πλασματική**, κυρίως λόγω ελλείψεων στη διάγνωση, σφαλμάτων στην ταξινόμηση και κυρίως λόγω της έλλειψης ενός εθνικού αρχείου νεοπλασιών. Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι για τη χώρα μας, σε αντίθεση με τις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, παρατηρείται μεταξύ των ετών 1980-2004 μια σταθερή αυξητική τάση στους θανάτους από καρκίνο τόσο για τους άνδρες όσο και τις γυναίκες. Στους άνδρες (πλέον τώρα και στις γυναίκες) ο καρκίνος του πνεύμονα καταγράφεται ως η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο και ακολουθούν αυτοί του προστάτη και του παχέος εντέρου. Στις γυναίκες, μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα ακολουθούν αυτοί του μαστού και του παχέος εντέρου. Παράλληλα, σε αρκετές μελέτες φαίνεται ότι η θνησιμότητα από καρκίνο διαφοροποιείται μεταξύ των γεωγραφικών διαμερισμάτων της χώρας, στοιχείο που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Πάντως, για τα πιο συχνά νεοπλάσματα παρατηρείται υψηλότερη συχνότητα στο Βορρά σε σχέση με το Νότο, εύρημα το οποίο έχει επιβεβαιωθεί με αρκετές μελέτες (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2015).

Συνοψίζοντας, περίπου 12 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο, αριθμός που αναμένεται να αυξηθεί και εκτιμάται ότι θα φτάσει τα 16 εκατομμύρια μέχρι το 2020. Ο καρκίνος είναι από τις πρώτες αιτίες θανάτου παγκοσμίως και το 70% αυτών συμβαίνουν στις χώρες με χαμηλό και μεσαίο εισόδημα. Σε αντιδιαστολή με τα παραπάνω στοιχεία είναι η αξιοσημείωτη μείωση της θνησιμότητας που οφείλεται στις καρδιαγγειακές παθήσεις, με αποτέλεσμα να αναμένεται στα επόμενα 5-10 χρόνια ο καρκίνος να αποτελεί πλέον την κύρια αιτία θανάτου.

1.3. Παράγοντες κινδύνου

Σε γενικές γραμμές, ο κόσμος θεωρεί τον καρκίνο ως μια ασθένεια που προκαλείται από ανεξέλεγκτους παράγοντες: το 89% πιστεύει πως εμφανίζεται σε όσους έχουν γενετική προδιάθεση, ενώ παράλληλα το 80% θεωρεί πως οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η βιομηχανική μόλυνση, αποτελούν μια ιδιαίτερα σημαντική αιτία πρόκλησης του καρκίνου. Τέλος, μια εκπληκτική πλειοψηφία που αγγίζει το 92% συνδέει το κάπνισμα με τον καρκίνο.

Όμως, η επιστήμη έχει σήμερα καταλήξει σε μια σειρά από **ατομικούς και εξωτερικούς παράγοντες** οι οποίοι έχει αποδειχθεί ότι είναι δυνατόν να προκαλέσουν την έναρξη της διαδικασίας καρκινογένεσης στον άνθρωπο. Οι ατομικοί παράγοντες (με διαφορετική συμμετοχή ο καθένας, ανάλογα με την επιδημιολογική μελέτη) σχετίζονται με τις συνήθειες και τον τρόπο ζωής του σύγχρονου ανθρώπου, όπως για παράδειγμα το κάπνισμα, η υπερβολική κατανάλωση οινοπνεύματος, η κακή διατροφή, η έλλειψη σωματικής άσκησης, η παχυσαρκία κλπ. Από τις αιτίες αυτές, το κάπνισμα έχει διαπιστωθεί ότι αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης 14 διαφορετικών μορφών καρκίνου, όπως του πνεύμονα, για την ανάπτυξη του οποίου ευθύνεται κατά 87%. Παράλληλα, υπάρχουν και εξωτερικοί παράγοντες οι οποίοι δεν σχετίζονται με τη θέληση και τις συνήθειες του ατόμου, όπως η γενετική προδιάθεση - κληρονομικότητα, η ηλικία, οι χημικές ουσίες, η υπεριώδης ακτινοβολία, η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι ακτίνες Χ, η περιβαλλοντική ρύπανση, το βεβαρημένο εργασιακό περιβάλλον κ.α. Είναι αξιοσημείωτο πως οι οικογενείς μορφές καρκίνου δεν είναι συχνές, ενώ μόνο το 5-10 % των καρκίνων οφείλονται σε κληρονομικές μεταλλάξεις. Στην παρακάτω **Εικόνα 1.2** παρουσιάζεται επακριβώς το ποσοστό που συνεισφέρει κάθε εξωγενής παράγοντας στην εμφάνιση του καρκίνου (Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, 2008).



Εικόνα 1.2. Ο ρόλος των γονιδίων και του περιβάλλοντος στην εμφάνιση του καρκίνου και η ποσοστιαία συνεισφορά κάθε περιβαλλοντικού παράγοντα στην εμφάνιση καρκίνου.

Τέλος, αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι το κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο ενός ατόμου σχετίζεται με την πιθανότητα εμφάνισης κάποιων μορφών καρκίνου. Έτσι, οι καρκίνοι σε πνεύμονα, στομάχι και οισοφάγο εμφανίζονται συχνότερα στα κατώτερα οικονομικά και κοινωνικά στρώματα. Στις γυναίκες, ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται συχνότερα στα ανώτερα κοινωνικά στρώματα, ενώ του τραχήλου της μήτρας στα κατώτερα. Είναι όμως γεγονός ότι το σύνολο της θνησιμότητας από κακοήθεις νεοπλασίες σχετίζεται άμεσα και ισχυρά με το χαμηλό κοινωνικο-οικονομικό επίπεδο, τη χρόνια ψυχο-κοινωνική επιβάρυνση με καταστάσεις όπως το στρες και η ανεργία κλπ. Επίσης έχει πλήρως τεκμηριωθεί ότι για τις περισσότερες μορφές καρκίνου (π.χ. πνεύμονα, παχέος εντέρου, τραχήλου και μαστού) επειδή τα άτομα χαμηλότερου κοινωνικο-οικονομικού επιπέδου έχουν μειωμένη πρόσβαση στις υπηρεσίες υγείας και τις προληπτικές εξετάσεις, η διάγνωσή τους γίνεται σε πιο προχωρημένα στάδια, με αποτέλεσμα να είναι προβληματική η αντιμετώπισή τους (National Reference Institute).

1.4. Τι είναι ο καρκίνος

Από επιστημονική άποψη ο καρκίνος είναι κατά πρώτο και κύριο λόγο μια ασθένεια του κυττάρου, του οποίου μια διαταραχή στη λειτουργία μπορεί να οδηγήσει σε κάποια μορφή καρκινογένεσης. Όταν ένα κύτταρο δέχεται ένα είδος εξωτερικής εισβολής από κάποια καρκινογόνο ουσία, έναν ιό ή υπερβολικό αριθμό ελευθέρων ριζών, η πρώτη αντίδρασή του είναι να αμυνθεί στη δοκιμασία μεταλλάσσοντας τα γονίδιά του. Όμως, όταν οι επιθέσεις αυτές είναι συχνές κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου, είναι πιθανό κάποια κύτταρα να υποστούν τόσο σημαντικές βλάβες και να μεταλλαχθούν σε τέτοιο βαθμό που πλέον λησμονούν το βασικό τους ρόλο ως τμήμα ενός γενικότερου οργανισμού. Μια τέτοια μετάλλαξη ενός κυττάρου δεν είναι απαραίτητο να μετεξελιχθεί σε καρκίνο, καθώς οι περισσότερες από αυτές συμβαίνουν σε μεμονωμένα μη αναπαραγωγικά κύτταρα που δεν έχουν επιπτώσεις στη λειτουργία του συνόλου του οργανισμού, ακόμη και εάν οδηγούν στο θάνατο το συγκεκριμένο κύτταρο. Όμως, εάν η μετάλλαξη προκαλέσει βλάβες σε συστήματα ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης και με τη διαδικασία αυτή σχηματιστούν καρκινικά κύτταρα, αυτά θα διαθέτουν την ικανότητα να διαιρούνται ανεξέλεγκτα οδηγώντας στην εμφάνιση και ανάπτυξη της νόσου. Οι ανεξέλεγκτες αυτές κυτταρικές διαιρέσεις, οδηγούν στο σχηματισμό μιας μάζας ιστού γνωστής με το όνομα **όγκος**. Εάν τα καρκινικά κύτταρα δεν διεισδύσουν σε γειτονικούς ιστούς ο όγκος θεωρείται ως καλοήθης. Όμως, εάν εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς ή διασκορπιστούν –μέσω του κυκλοφορικού συστήματος- σε άλλες περιοχές του σώματος δημιουργώντας μεταστάσεις, τότε πλέον ο όγκος καλείται **κακοήθης** όρος συνώνυμος με τον καρκίνο.

Η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό είναι μια διαδικασία η οποία πραγματοποιείται σε πολλά στάδια, στα οποία εκτός από τους μηχανισμούς της κυτταρικής διαίρεσης εμπλέκονται και μηχανισμοί που ελέγχουν τη διεισδυτικότητα του καρκινικού κυττάρου και την ικανότητά του να διαφεύγει από τους αμυντικούς μηχανισμούς του σώματος, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν και να καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα από την πρώτη στιγμή της εμφάνισής τους. Είναι φανερό ότι ένα καρκινικό κύτταρο δεν αποκτά την πλήρη κακοήθειά του με μια μόνο μετάλλαξη, αλλά χρειάζεται να περάσει από πολλές διαδοχικές μεταλλάξεις. Το 90% των καρκίνων εμφανίζονται σε επιθηλιακά κύτταρα και είναι γνωστοί ως καρκινώματα. Όσοι καρκίνοι

αναπτύσσονται σε συνδετικό ή μυϊκό ιστό καταγράφονται ως σαρκώματα, ενώ όσοι εμφανίζονται σε κύτταρα του αίματος χαρακτηρίζονται ως λευχαιμίες ή λεμφώματα.

Οι παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα μετατροπής ενός φυσιολογικού κύτταρου σε καρκινικό, ονομάζονται **καρκινογόνοι**. Παραδείγματα καρκινογόνων της κατηγορίας αυτής είναι ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτινοβολίες, ορισμένα μικρόβια, διάφορα συνθετικά χημικά που βρίσκονται στο περιβάλλον, τις τροφές, τα χρώματα κλπ. Κάποια από αυτά δρουν απευθείας στο DNA, ενώ άλλα μετατρέπονται πρώτα στο σώμα του ανθρώπου σε ουσίες, οι οποίες στη συνέχεια επιδρούν στο DNA με αποτέλεσμα να το μεταλλάξουν (National Reference Institute) .

1.5 Καρκινογένεση

Οι σύγχρονες αντιλήψεις συγκλίνουν στη διαπίστωση ότι η καρκινογένεση στον οργανισμό του ανθρώπου είναι ένα πολύπλοκο γεγονός και μια σχετικά μακροχρόνια διαδικασία, η οποία διακρίνεται στις παρακάτω τέσσερις επιμέρους φάσεις:

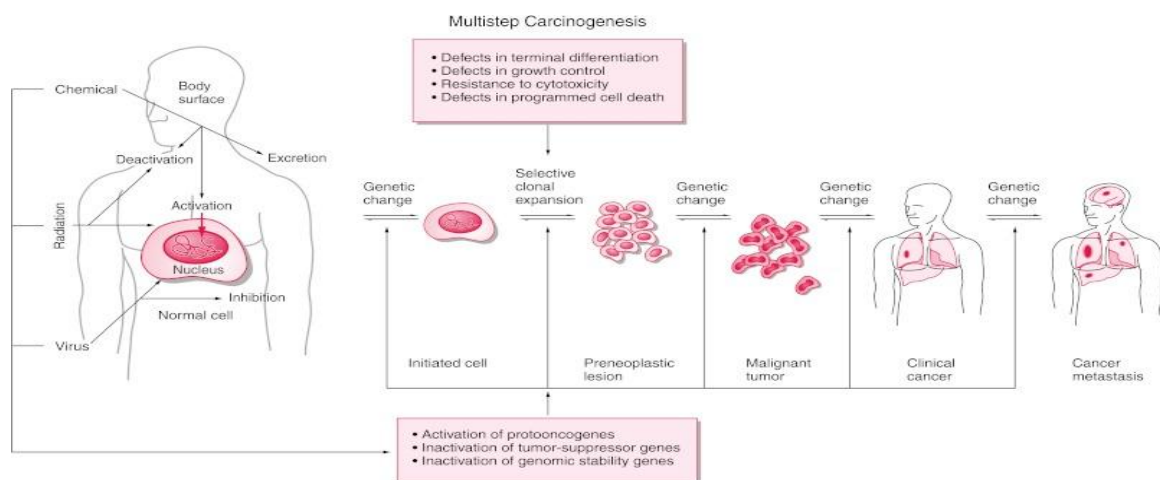
1. **Φάση έναρξης**. Μετά από πολύχρονες μελέτες οι επιστήμονες έχουν πλέον εδραιώσει την πεποίθηση ότι η φάση πρόκλησης του καρκίνου διαρκεί περίπου 15 ± 5 χρόνια. Αυτό σημαίνει ότι για να ξεκινήσει η διαδικασία της καρκινογένεσης απαιτείται μια μακροχρόνια έκθεση σε καρκινογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η φάση πρόκλησης μπορεί να είναι συντομότερη σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. προσβολή από ακτινογενή λευχαιμία) ή υπάρχουν γενετικά καθορισμένοι όγκοι της βρεφικής ηλικίας, οι οποίοι υπάρχουν αφανώς από τη στιγμή της γέννησης και εξελίσσονται μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό είναι βασικό για την καρκινογένεση και σε αυτό βρίσκεται η αλληλεπίδραση των καρκινογόνων παραγόντων.

2. **Τοπική φάση (*in situ*)**. Σήμερα είναι αποδεκτό ότι η προοδευτική βαριά δυσπλασία μετατρέπεται, στις περισσότερες περιπτώσεις, σε *in situ* καρκίνωμα. Αυτό, μετά από μια πολύπλοκη διαδικασία που διαρκεί δέκα ή περισσότερα χρόνια, τελικά καταλήγει σε διηθητικό καρκίνο. Το στάδιο αυτό διαρκεί 6 ± 5 χρόνια.

3. **Φάση της διήθησης**. Τα κύτταρα που έχουν κακοήγη χαρακτηριστικά πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς και έχουν τη δυνατότητα -αφού

διασπάζουν τη βασική μεμβράνη- να εισέλθουν στους γειτονικούς τους ιστούς, φτάνοντας έως τα αγγεία του αίματος ή της λέμφου. Το τρίτο στάδιο διαρκεί 3 ± 2 χρόνια.

4. Φάση της διασποράς. Τα καρκινικά κύτταρα διηθούν όλο και περισσότερους ιστούς γύρω από την περιοχή της αρχικής ανάπτυξης, αυξάνοντας κατακόρυφα την πιθανότητα μεταστάσεων. Μπορούν να μεταφέρονται μεμονωμένα ή κατά ομάδες, με τη βοήθεια του αίματος και του λεμφικού συστήματος, σε απομακρυσμένα σημεία του οργανισμού δημιουργώντας διάσπαρτες μεταστάσεις. Το στάδιο αυτό διαρκεί επίσης 3 ± 2 χρόνια.



Εικόνα 1.3. Οι τέσσερις φάσεις της καρκινογένεσης (1.tumor initiation, 2.tumor promotion, 3 malignant conversion, 4. tumor progression).

Όπως είναι φανερό, η πρόληψη και πρώιμη διάγνωση έχουν τεράστια σημασία, ακόμη και όταν έχει αρχίσει η καρκινογένεση. Μετά την έναρξη της ανάπτυξης του καρκίνου, υπάρχει μία περίοδος κατά την οποία δεν είναι ακόμα δυνατή η ανίχνευση του ογκιδίου, αφού η καρκινική μάζα είναι τόσο μικρή που είναι δύσκολο να εντοπιστεί με οποιαδήποτε διαγνωστική μέθοδο. Ύστερα από πολλούς μήνες (ή και χρόνια), το μέγεθος του όγκου γίνεται πλέον ορατό σε ακτινογραφικό έλεγχο. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι κάτω του ενός εκατοστού μικροί όγκοι είναι πολύ δύσκολο έως αδύνατο να εντοπιστούν με ακτινολογικές μεθόδους και πλέον απεικονίζονται με αξονική ή/και μαγνητική τομογραφία (Nagel et al., 2007). Παράλληλα, οι καρκινικοί όγκοι αρχίζουν να προκαλούν διάφορες δυσλειτουργίες ή συμπτώματα όπως πόνο ή αιμορραγία.

1.6 Θεραπεία του καρκίνου

Σήμερα, η σημαντική πρόοδος της Ιατρικής, της Φαρμακευτικής Χημείας και της Ακτινολογίας (διαγνωστική και θεραπευτική) έχει ως αποτέλεσμα να θεραπεύονται σχεδόν οι μισοί από τους καρκίνους που διαγιγνώσκονται. Για αρκετές μάλιστα μορφές καρκίνου υπάρχουν περιπτώσεις που μπορούμε πλέον να μιλάμε για οριστική θεραπεία χωρίς την πιθανότητα περαιτέρω υποτροπών. Με την πάροδο του χρόνου και την πρόοδο της επιστήμης, αυξάνεται διαρκώς η μερίδα των μορφών αυτών, κάτι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό για το μέλλον. Βέβαια, υπάρχουν πάντοτε προϋποθέσεις, αφού -σε αντίθεση με άλλες ασθένειες- όλες οι μορφές και περιπτώσεις καρκίνου δεν αντιμετωπίζονται με μια παγκόσμια αποδεκτή μέθοδο. Η μορφή, το μέγεθος, η θέση στο σώμα, το στάδιο της ασθένειας καθώς επίσης και η γενική κατάσταση του ασθενή αποτελούν σημαντικές παραμέτρους όσον αφορά την επιλογή της καλύτερης θεραπευτικής στρατηγικής για έναν καρκίνο. Σήμερα, υπάρχουν οι παρακάτω στρατηγικές για την αντιμετώπιση του καρκίνου:

- αφαίρεση του όγκου με εγχείρηση,
- χημειοθεραπεία
- ακτινοθεραπεία
- ορμονοθεραπεία
- ανοσοθεραπεία, και
- «στοχευμένες ή βιολογικές θεραπείες»

Στις περισσότερες περιπτώσεις προηγείται η χειρουργική επέμβαση και ακολουθούν η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία (ή ένας συνδυασμός τους), με σκοπό την ολοκληρωτική καταστροφή των εναπομεινάντων στην περιοχή καρκινικών κυττάρων.

A) Χειρουργική επέμβαση

Η εγχείρηση αποτελεί μέχρι και σήμερα έναν από τους αρχικούς και βασικούς τρόπους αντιμετώπισης της εμφάνισης κάποιας μορφής καρκίνου. Στόχος της είναι να αφαιρέσει τον όγκο ή και ολόκληρο το προσβεβλημένο όργανο, ενώ συχνά αφαιρείται και ένα μέρος του γύρω υγιούς ιστού για να εξασφαλιστεί ότι έχει αφαιρεθεί όλος ο καρκινικός ιστός. Ο βασικός περιορισμός της εγχείρησης είναι πως είναι πιθανό να μην εξουδετερώσει όλα τα καρκινικά κύτταρα, κυρίως τις μικροεστίες όπου υπάρχουν μικροί μη ανιχνεύσιμοι όγκοι.

B) Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία γνωστή και ως θεραπεία ακτινών X έχει ως στόχο να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα και να συρρικνώσει τους όγκους. Αποτελεί μια τοπική θεραπεία, η οποία εκτός από τα καρκινικά βλάπτει και τα γύρω υγιή κύτταρα, αν και τα περισσότερα από αυτά μπορούν μετέπειτα να λειτουργήσουν κανονικά. Πρόκειται για ένα είδος θεραπείας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες μορφές καρκίνου και χρησιμοποιείται εκτεταμένα σε συνδυασμό με την εγχείρηση και τη χημειοθεραπεία.

Γ) Χημειοθεραπεία (μετά το 1965)

Στόχος της αντικαρκινικής χημειοθεραπείας είναι η πρόκληση θανατηφόρας κυτταροτοξικής βλάβης στα κύτταρα του όγκου. Αποτελεί το πλέον αμφισβητούμενο είδος αντιμετώπισης του καρκίνου, όχι μόνο από τους καρκινοπαθείς αλλά και από ένα μεγάλο κομμάτι της επιστημονικής κοινότητας, εξαιτίας των παρενεργειών που μπορεί να εμφανίσει ο ασθενής. Σημαντικότερο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αναφέρεται στο αδιαμφισβήτητο γεγονός πως τα αντι-καρκινικά φάρμακα που διαθέτουμε σήμερα δεν προσβάλλουν μόνο τα προβληματικά κύτταρα, αλλά και όλα τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, φυσιολογικά και καρκινικά. Δεν μπορεί βέβαια να μην αναφερθεί ότι ένας σημαντικός αριθμός φυσιολογικών κυττάρων που προσβάλλονται, είναι δυνατόν να επισκευαστούν-επανακτηθούν μετά το τέλος της χημειοθεραπείας (Paras, 2001; Kufe et al., 2003; Wikipedia, 2015a).

Σήμερα, για την αποδοτικότερη αντιμετώπιση της ασθένειας, συνήθως επιλέγεται η συστηματική αντιμετώπιση του καρκίνου μέσω της συνδυαστικής χορήγησης χημειοθεραπευτικών, ορμονοθεραπευτικών, ανοσοθεραπευτικών κλπ φαρμάκων, μια πρακτική που είναι γνωστή ως **χημειοθεραπεία συνδυασμού**. Οι δυνατότητες της συστηματικής αυτής θεραπείας αυξάνονται διαρκώς καθώς νέα φάρμακα και νέες θεραπευτικές μέθοδοι έρχονται να προστεθούν στο οπλοστάσιό της.

1.6.1. Κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων

Ένας σημαντικός αριθμός καρκινοπαθών θα υποστεί τις συνέπειες της χημειοθεραπείας αφού όταν αυτή επιτύχει τον στόχο της, στις περισσότερες περιπτώσεις αυξάνει το προσδόκιμο ζωής και εξασφαλίζοντας συχνά μια καλή

ποιότητα ζωής. Η ανάπτυξη συγκεκριμένων κλάδων της χημείας επέτρεψε την παρασκευή και δοκιμή εκατοντάδων μορίων με φαρμακευτική δράση. Από το 1960 έως και σήμερα έχουν εγκριθεί από τον **Οργανισμό Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA)** και τον αντίστοιχο **Ευρωπαϊκό Οργανισμό (EMA)** περισσότερα από 1.000 νέα αντικαρκινικά φάρμακα, με πωλήσεις ορισμένων από αυτά να ξεπερνούν το 1 δις ετησίως. Από όλα τα νέα φάρμακα που μελετά και αναπτύσσει μια εταιρία Βιοτεχνολογίας ή Φαρμακευτικών, μόνο ένα από τα χίλια θα καταφέρει να φτάσει στην αγορά. Θα πρέπει όμως να περάσει με επιτυχία δοκιμές σε κυτταρικές σειρές, σε καλλιέργειες και επίμυες, και τέλος θα δοκιμαστεί στις φάσεις I, II, και III των κλινικών δοκιμών σε εθελοντές ασθενείς. Η συνολική διαδικασία είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα (10-12 χρόνια), με ένα το κόστος της να υπερβαίνει το 1 δις ευρώ.

Τα αντικαρκινικά φάρμακα χορηγούνται από διάφορες οδούς: το στόμα, ενδοφλέβια, ενδοπεριτοναϊκά ή ενδοαρτηριακά. Τα φάρμακα της χημειοθεραπείας μπορούν να χωριστούν σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους, τη χημική τους δομή και τη σχέση τους με άλλα φάρμακα. Η γνώση του μηχανισμού δράσης ενός χημειοθεραπευτικού φαρμάκου είναι σημαντική για τον καθορισμό των πιθανών παρενεργειών, αλλά και για να γνωρίζουν οι ογκολόγοι ποιος συνδυασμός φαρμάκων είναι πιθανότερο να δράσει καλύτερα ανά περίπτωση. Επιπλέον, η πληροφορία αυτή τους βοηθά να καθορίσουν με ποια σειρά και πόσο συχνά θα πρέπει να χορηγείται κάθε φάρμακο του χημειοθεραπευτικού σχήματος που τυχόν θα επιλέξουν. Συγκεκριμένα, ανάλογα με τη χημική σύσταση και τον τρόπο δράσης τους υπάρχουν 6 κατηγορίες αντικαρκινικών φαρμάκων σύμφωνα με τον **FDA** και τον **EMA (Εικόνα 1.4)**:

1. Σύμπλοκα Λευκοχρύσου. Τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, τουλάχιστον 23 σύμπλοκα λευκοχρύσου εγκρίθηκαν για κλινικές δοκιμές, με τρία εξ' αυτών, τις σισπλατίνη (cisplatin), καρβοπλατίνη (carboplatin) και οξαλιπλατίνη (oxaliplatin) να κερδίζουν το παγκόσμιο marketing και την ευρύτερη αποδοχή της επιστημονικής κοινότητας. Λόγω του μηχανισμού της δράσης τους, τα μόρια αυτά παρόλο που δεν φέρουν κάποια αλκυλομάδα θα μπορούσαν να ενταχθούν και στην τέταρτη κατηγορία των αλκυλιωτικών, επειδή καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα με παρόμοιο τρόπο (Lind, 2008).

2. **Αντιμεταβολίτες.** Οι αντιμεταβολίτες αποτελούν μια οικογένεια φαρμάκων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των DNA και RNA των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιούνται συχνά για τη θεραπεία ποικίλων περιπτώσεων καρκίνου, όπως λευχαιμία, όγκοι σε μαστό, ωοθήκες, έντερο κλπ. Στους αντιμεταβολίτες ανήκουν η μεθοτρεξάτη, η γεμισιταμπίνη, η 6-μερκαπτοπουρίνη, η κυταραβίνη, 6-θειογουανίνη, η 5 φλουορο-ουρακίλη, η καπεσιταβίνη, η ραλιτρεξέδη, η εμισιταβίνη, η τεγκαφούρη, η 5-αζακυτιδίνη, η κλαδριβίνη, η φλουδαραβίνη, η πεντοστατίνη και η πεμετρεξέδη.

3. **Αντικαρκινικά αντιβιοτικά.** Τα αντικαρκινικά αντιβιοτικά είναι φυσικά προϊόντα προερχόμενα από κάποια είδη του μύκητα του εδάφους «*Streptomyces*». Τα φάρμακα αυτά επηρεάζουν τα ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή των καρκινικών κυττάρων και δρουν παρεμβαλλόμενα μεταξύ των βάσεων του DNA με αποτέλεσμα να το αδρανοποιούν. Χρησιμοποιούνται στις περισσότερες μορφές καρκίνου με κυριότερους εκπρόσωπους τα φάρμακα, δακτινομικίνη, μπλεομικίνη, μιτομικίνη C, βλεομυσίνη, μιθραμυσίνη και μιτοξαντρόνη, τις χημικές ενώσεις της οικογένειας των ανθρακυκλινών όπως, η δοξορουβικίνη, δαουνορουβικίνη, ακλαρουμπισίνη, επιρουμπισίνη και ιδαρουμπισίνη, ενώσεις γνωστές ως ποδοφυλοτοξίνες, όπως η ετοποσίδη, τενιποσίδη και τέλος, ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των καμφοθεκινών όπως το ιρινοτεκάν και το τοποτεκάν.

4. **Αλκυλιωτικοί παράγοντες.** Τα μόρια αυτά αλκυλιώνουν το DNA των καρκινικών κυττάρων, προκαλώντας σε αυτό βλάβες με συνέπεια το θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση διαφορετικών μορφών καρκίνου όπως η οξεία και η χρόνια λευχαιμία, το λέμφωμα, η νόσος του Hodgkin, το πολλαπλούν μύελωμα, τα σαρκώματα και οι καρκίνοι σε πνεύμονα, μαστό και ωοθήκες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα παρακάτω φάρμακα (Wheate et al., 2010):

1. Αέρια μoustάρδας: μεχλωραιθαμίνη, χλωραμβουκίλη, κυκλοφωσφαμίδη, η φωσφαμίδη και μελφαλάνη.

2. Νιτροζουρίες: στρεπτοζοτοκίνη, φοτεμουστίνη, καρμουστίνη, σεμουστίνη και λομουστίνη.

3. Αλκυλοσουλφονικά άλατα: βουσουλφάνη.

4. Τριαζίνες: δακαρβαζίνη και τεμοζολαμίδη.

5. Αιθυλεναμίνες: θειοτέπα και εξαμεθυλμελαμίνη.

5. **Αναστολείς της μίτωσης.** Τα φάρμακα αυτά συχνά προέρχονται από τα φυτά και δρουν σταματώντας τον κυτταρικό μηχανισμό της μίτωσης ή αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων που παράγουν πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου, όπως μαστού, πνεύμονα, καθώς και για τα μυελώματα, τα λεμφώματα και τις λευχαιμίες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ταξάνες όπως οι πακλιταξέλη και δοσεταξέλη, οι εποθιλόνες (πχ ιξαβεπιλόνη), τα αλκαλοειδή της vinca βινβλαστίνη, βινκριστίνη, βινδεσίνη, βινορελβίνη και η εστραμουστίνη. Όλες είναι αζωτούχες ουσίες πολύπλοκης οργανικής σύστασης και φυτικής προέλευσης οι οποίες εμποδίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων.

6. **Όλα τα υπόλοιπα χημειοθεραπευτικά φάρμακα που δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες.** Η έκτη κατηγορία περιλαμβάνει πλήθος ουσιών, όπως για παράδειγμα φυσικά προϊόντα, ουσίες με αντι-αγγειογενετική δράση, μόρια που στοχεύουν εξειδικευμένα κυτταρικά μόρια μεταφοράς σήματος, ανασυνδυασμένα (εξανθρωποποιημένα) μονοκλωνικά αντισώματα όπως το avastin οι πωλήσεις του οποίου ξεπέρασαν τα 4 δισεκατομμύρια δολάρια. Επίσης η 6η κατηγορία περιλαμβάνει ενώσεις που επικεντρώνονται στην γονιδιακή θεραπεία, αφού έχει υπολογιστεί ότι υπάρχουν τουλάχιστον 1000 γονίδια-στόχοι με αντικαρκινική δράση. Έτσι, όταν αυτά μεταφερθούν στους ιστούς των ασθενών, θα μεταφραστούν από τα κύτταρά τους με στόχο να συνθέσουν τις κατάλληλες θεραπευτικές πρωτεΐνες που θα μειώνουν (ή σταματούν) την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων ή/και θα οδηγήσουν σε θάνατο τους καρκινικούς όγκους, αφήνοντας ανεπηρέαστα τα καρκινικά κύτταρα. Τέλος, έχει δοκιμαστεί σε πειραματικό στάδιο η θεραπεία με κύτταρα – βλαστοκύτταρα ή καρκινικά κύτταρα του ασθενούς– που έχουν υποστεί σχετική κατεργασία σε καλλιέργεια με γονίδια και στη συνέχεια επανατοποθετούνται στον οργανισμό του ασθενούς.



Εικόνα 1.4. Οι έξι κατηγορίες των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σύμφωνα με το FDA/EMEA

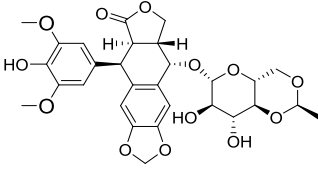
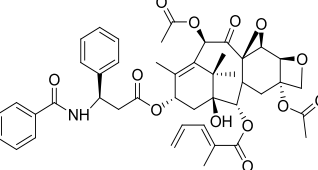
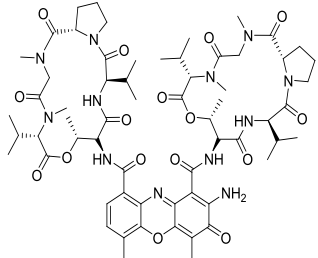
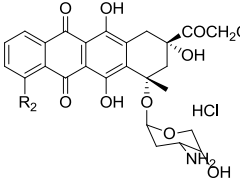
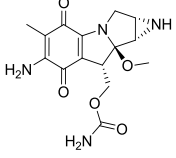
1.6.2. Περιορισμοί των σύγχρονων θεραπειών

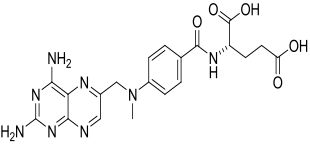
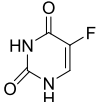
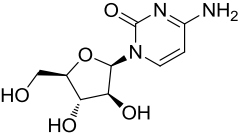
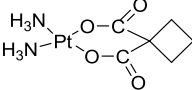
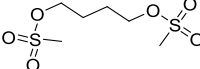
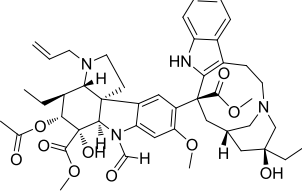
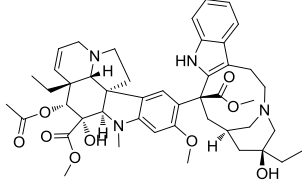
Παρά τις πολυπληθείς έρευνες δεκαετιών και τη διάθεση σημαντικών κονδυλίων ύψους πολλών δισεκατομμυρίων δολαρίων, είναι ακόμα πολύ δύσκολη έως αδύνατη η αντιμετώπιση ενός μεγάλου αριθμού καρκίνων, με αποτέλεσμα το μακροπρόθεσμο ποσοστό επιβίωσης των ασθενών είναι πολλές φορές πολύ μικρότερο του αναμενόμενου. Επίσης, είναι γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις καινούργια φάρμακα που προκάλεσαν στην αρχή μεγάλο ενθουσιασμό, στη συνέχεια αποδείχτηκαν λιγότερο αποτελεσματικά. Η αποτυχία αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ο καρκίνος είναι μια σύνθετη ασθένεια και θα πρέπει οπωσδήποτε να κατανοήσουμε πολύ καλά όλες τις εκφάνσεις και πτυχές του και να μελετήσουμε τις αδυναμίες του. Μόνο έτσι θα είμαστε σε θέση να τις εκμεταλλευτούμε για να μπορέσουμε να τον καταπολεμήσουμε αποτελεσματικά.

Οι τρεις βασικές θεραπείες καταπολέμησης του καρκίνου που προαναφέρθηκαν, καταφέρνουν να μειώσουν σημαντικά το μέγεθος ενός καρκινικού όγκου, όμως είναι πολύ δύσκολο να εξαλείψουν πλήρως την ασθένεια και να εγγυηθούν στον ασθενή ένα ευοίωνο μέλλον.

Σε αρκετές περιπτώσεις, το φορτίο από τις χημειοθεραπείες και τις ακτινοβολίες, επιβαρύνει υπέρμετρα το ανοσοποιητικό σύστημα το οποίο είτε έχει κατασταλεί ή καταστραφεί, με αποτέλεσμα ο ασθενής να υποκύψει σε διάφορα είδη μολύνσεων ή επιπλοκών. Επιπλέον, η χημειοθεραπεία και η ακτινοβολία μπορούν να προκαλέσουν τη μετάλλαξη των καρκινικών κυττάρων, ούτως ώστε αυτά να γίνουν πιο ανθεκτικά και να καταστρέφονται δυσκολότερα. Τέλος, υπάρχει η σοβαρή πιθανότητα μέσω μιας χειρουργικής επέμβασης τα καρκινικά κύτταρα να εξαπλωθούν και σε άλλες περιοχές. Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται κάποια από τα γνωστότερα αντικαρκινικά φάρμακα και παρουσιάζονται η δράση αλλά και οι παρενέργειές τους (**Πίνακας 1.1**).

Πίνακας 1.1. Τα γνωστότερα αντικαρκινικά φάρμακα: δράσεις και παρενέργειες

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΔΟΜΗ	ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ	ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ
Ετοποσιδης		Σάρκωμα Καρσι, καρκίνος πνευμόνων, όρχεων και ορισμένα είδη λευχαιμίας	Αλωπεκία, υπόταση, μεταλλική γεύση μυελοκαταστολή
Πακλιταξέλη		Καρκίνος ωθηκών, μαστού, πνευμόνων, σάρκωμα Καρσι	Ναυτία, εμετός, αρθραλγίες, μυοδιάσματα, εξάντληση, στειρότητα
Δακτινομυκίνη (Ακτινομυκίνη D)		Ραβδο Χοριοκαρκίνωμα, όγκος του Wilms, οστεοσάρκωμα, σάρκωμα Καρσι, σάρκωμα Ewing, όγκοι των όρχεων, ραβδομυοσάρκωμα, κακώθες μελάνωμα	Μυελοτοξικότητα, ανοσοκαταστολή, ναυτία έμετοι, διάρροια, αλωπεκία, ακμή, ερύθημα
Δοξορουβικίνη		Οξείες λευχαιμίες, όγκος του Wilms	Μυελοτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα, ναυτία, έμετοι, διάρροια, Εξάνθημα, αλωπεκία
Μιτομυκίνη		Καρκίνος ουροδόχου κύστης	Ανορεξία, εξάντληση

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΔΟΜΗ	ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ	ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ
Μεθοτρεξάτη		Χοριοκαρκίνωμα, Καρκίνος ωθηκών και πνευμόνων	Εξελκώσεις στόματος, Τοξικότητα γαστρεντερικού συστήματος, Μυελοκαταστολή
Φθόριουρακίλη		Καρκίνος ουροδόχου κύστης και μαστού, Αδενοκαρκίνωμα στομάχου, παχέος εντέρου και παγκρέατος, Ηπάτωμα, Καρκίνωμα ωθηκών και τραχήλου της μήτρας, Βασικοκυτταρικό καρκίνωμα δέρματος	Μυελοκαταστολή γαστρεντερικές διαταραχές
Κυτταραβίνη		Οξείες λευχαιμίες, Λεμφώματα	Ναυτία, μυελοκαταστολή, μεγαλοβλάστωση
Cis πλατίνη		Σαρκώματα, Ορισμένα καρκινώματα, Λεμφώματα	Γαστρεντερικές διαταραχές, νεφροτοξικότητα, νευροτοξικότητα
Βουσουλφανη		Χρόνια μυελογενής λευχαιμία	Αλωπεκία, Γαστρεντερικές διαταραχές Αιμορραγία, Μυελοκαταστολή
Βινκριστίνη		Λέμφωμα Hodgkin	Αλωπεκία, Γαστρεντερικές διαταραχές Περιφερική νευροπάθεια, Υπονατρίαμια
Βινβλαστίνη		Καρκίνος πνευμόνων, όρχεων και μαστού	Αλωπεκία Γαστρεντερικές διαταραχές Αιμορραγίες

Όλα τα παραπάνω, οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης ενός αποτελεσματικότερου τρόπου αντιμετώπισης και καταπολέμησης των καρκίνων. Στο πλαίσιο αυτό, το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια έχει εστιαστεί –μεταξύ ποικίλων εναλλακτικών θεραπευτικών μηχανισμών– στην πιο ενδελεχή μελέτη της 6ης ομάδας αντικαρκινικών φαρμάκων και κυρίως των

μορίων που δρουν ως αναστολείς της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση, μια διαδικασία που εξασφαλίζει τη θρέψη και την ενέργεια των κυττάρων (και των καρκινικών), είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και η κατανόησή της μπορεί να αποφέρει σημαντικά εφόδια για την αντιμετώπιση της ανάπτυξης και μετάστασης των καρκινικών κυττάρων και όγκων. Άλλωστε, είναι λογικό ότι η αναστολή της αγγειογένεσης θα οδηγήσει στη διακοπή της παροχής τροφής και ενέργειας στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την εξασθένηση και αδυναμία του πολλαπλασιασμού τους. Σήμερα, η έρευνα για την αναστολή της αγγειογένεσης αποτελεί πλέον έναν τομέα που ταυτίζεται με την έρευνα για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

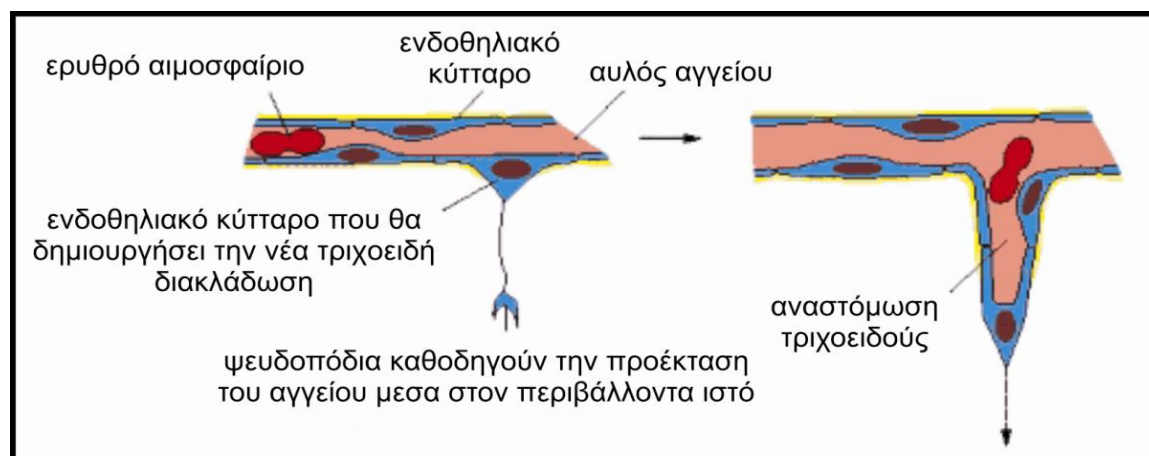
1.7 Αγγειογένεση

Ο όρος **αγγειογένεση** χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη διαδικασία που χρησιμοποιούν τα νέα κύτταρα για να δημιουργήσουν αιμοφόρα αγγεία, τα οποία θα εξασφαλίσουν την παροχή θρέψης και ενέργειας. Η **φυσιολογική αγγειογένεση** εμφανίζεται κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης (για την ανάπτυξη του οργανισμού και τη δημιουργία των οργάνων), ενώ στους ενήλικες παρατηρείται μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην επούλωση των τραυμάτων, την έμμηνο ρύση κλπ. Ο όρος αγγειογένεση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1835 από τον Hertig για να περιγράψει τη φυσιολογική διαδικασία σχηματισμού ενός πολύπλοκου δικτύου αιμοφόρων αγγείων σε πλακούντα πιθήκου (Boulikas and Tsogas, 2008). Η διαδικασία αυτή αποτελείται από πολλά στάδια και περιλαμβάνει μια σειρά πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός πλήθους διαλυτών παραγόντων, υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια και συστατικών του εξωκυτταρικού πλέγματος (Hertig A., 1935; Liekens et al., 2001).

Γενικά, μόνο το 0,01% (1 στα 10.000) των ενδοθηλιακών κυττάρων διαιρούνται στην ενήλικη ζωή. Ο σχηματισμός των φυσιολογικών αιμοφόρων αγγείων περιλαμβάνει δύο συγγενείς αλλά ξεχωριστές διαδικασίες. Η πρώτη, γνωστή ως πρώιμη **εμβρυική αγγειογένεση** ή **νέο-αγγειογένεση (vasculogenesis)**, λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και αφορά τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από πρόδρομα κύτταρα, τους αγγειοβλάστες και τον επακόλουθο *de novo* σχηματισμό του αγγειακού δικτύου του εμβρύου (Folkman, 2007), ενώ η δεύτερη, αναφέρεται στο

σχηματισμό νέων τριχοειδών αγγείων από προϋπάρχοντα, τόσο στο έμβρυο όσο και στους ενήλικες και ονομάζεται **δευτερογενής αγγειογένεση (angiogenesis)** (Carmeliet and Jain, 2011)

Η διαδικασία της αγγειογένεσης σε έναν ενήλικο οργανισμό ξεκινά ως απόκριση σε συγκεκριμένα μηνύματα και τα νέα αγγεία εκβλαστάνουν με τη μορφή τριχοειδών από ήδη υπάρχοντα μικρά αγγεία. Μάλιστα, κάποιες φορές σε φυσικά διαφανείς σχηματισμούς –όπως ο κερατοειδής χιτώνας του ματιού– η αγγειογένεση μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που πρόκειται να σχηματίσουν νέα τριχοειδή, προέρχονται από ένα υπάρχον τριχοειδές ή μικρό αγγείο και προεκτείνουν ψευδοπόδια, ξεκινώντας το σχηματισμό ενός τριχοειδούς εκβλαστήματος που κοιλαίνει για να σχηματίσει ένα σωλήνα. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου η εκβλάστηση συναντήσει ένα άλλο τριχοειδές αγγείο, με το οποίο ενώνεται επιτρέποντας έτσι την κυκλοφορία του αίματος (**Εικόνα 1.5**) (Becker et al., 2011).



Εικόνα 1.5. Αγγειογένεση: Το νέο αγγείο δημιουργείται με την προέκταση ενδοθηλιακών κυττάρων από το τοίχωμα ενός ήδη υπάρχοντος αγγείου

Στα ενήλικα άτομα η αγγειογένεση απαντάται κατά την παραγωγική φάση του κύκλου της γυναίκας στην αναγέννηση του ενδομήτριου, στο σχηματισμό και τη λειτουργία του πλακούντα κατά την εγκυμοσύνη, όπως και κατά την ίαση τραυμάτων ή την επιδιόρθωση των ιστών σε περιπτώσεις φλεγμονής.

Πέρα από τη φυσιολογική αγγειογένεση, η εμφάνιση υπερβολικής-ανεξέλεγκτης ή ανεπαρκούς αγγειογένεσης συνδέονται με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών. Συγκεκριμένα, η ανεξέλεγκτη αγγειογένεση μπορεί να οδηγήσει στην

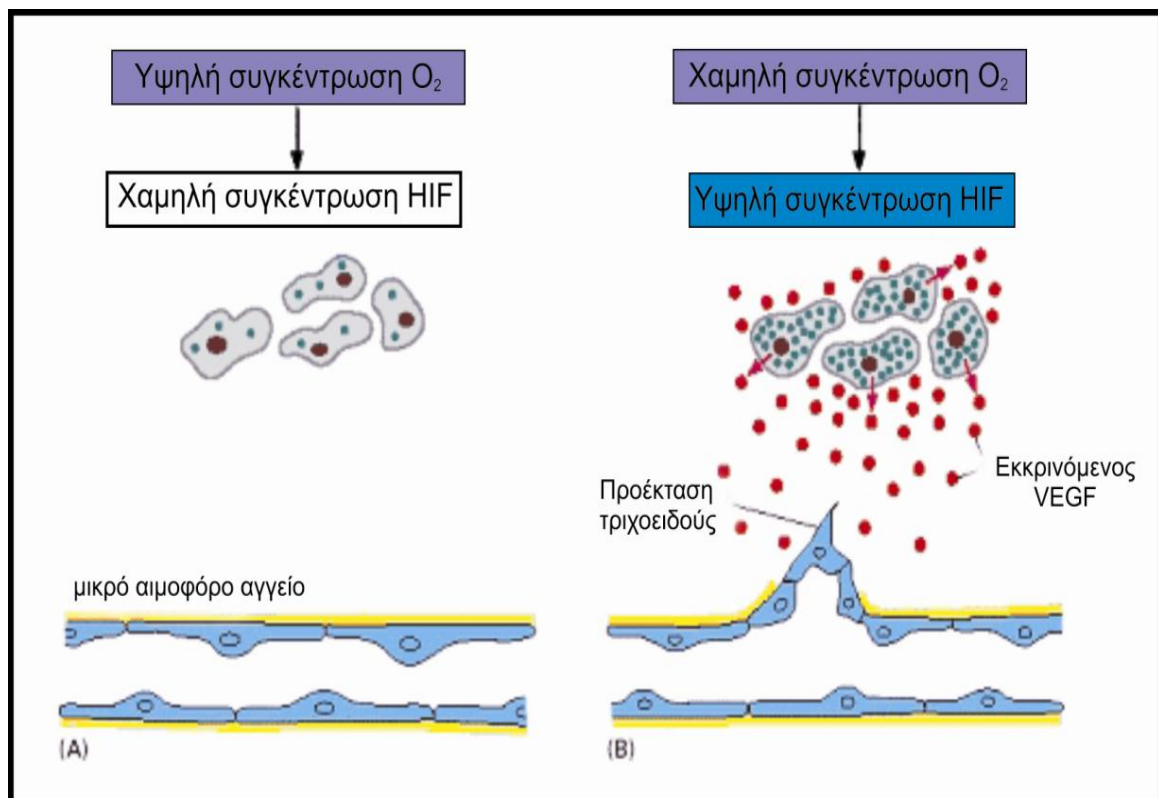
εμφάνιση νοσημάτων όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια αλλά και στην ανάπτυξη νεοπλασμάτων ή/και καρκίνου. Η ομάδα αυτή των νοσημάτων αυξάνεται διαρκώς, περιλαμβάνοντας νοσήματα όπως η παχυσαρκία, το άσθμα, η αθηροσκλήρυνση, το αιμαγγείωμα και οι λοιμώδεις νόσοι. Στην παθολογική αναδημιουργία των αγγείων οφείλονται επίσης διάφορες συγγενείς ή κληρονομικές παθήσεις. Για παράδειγμα, η ανεπαρκής αύξηση των αγγείων και η παθολογική μείωση του αριθμού τους μπορεί όχι μόνο να προκαλέσει ισχαιμία στον εγκέφαλο και την καρδιά, αλλά να οδηγήσει και στην εκφύλιση των νευρώνων, την υπέρταση, την προεκλαμψία, την αναπνευστική δυσχέρεια, την οστεοπόρωση και σε ποικίλες άλλες διαταραχές (Risau and Lemmon, 1988; Folkman, 1995; Augustin, 1998; Boyle et al., 2000; Alberts B. et al., 2002).

1.7.1. Παράγοντες που ελέγχουν την αγγειογένεση

Στους ιστούς των σπονδυλωτών σχεδόν κάθε κύτταρο απέχει περίπου 50-100 μm από ένα τριχοειδές αγγείο, ενώ υπάρχει και ένας μηχανισμός που εξασφαλίζει ότι το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων διακλαδίζεται σε κάθε γωνία και σχισμή. Αυτός προσαρμόζεται τέλεια στις τοπικές ανάγκες των ιστών, όχι μόνο υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά και σε κάθε είδους παθολογική κατάσταση. Για παράδειγμα, ο τραυματισμός προκαλεί μια έκρηξη δημιουργίας τριχοειδών γύρω από την περιοχή της ζημιάς, προκειμένου να ικανοποιηθούν οι αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις της διαδικασίας της επούλωσης. Τοπικοί ερεθισμοί και μολύνσεις επίσης προκαλούν πολλαπλασιασμό των νέων τριχοειδών, τα περισσότερα από τα οποία θα οπισθοχωρήσουν και θα εξαφανιστούν όταν υποχωρήσει η μόλυνση.

Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανταποκρίνονται σε μηνύματα που παράγονται από τον ιστό στον οποίο διεισδύουν. Τα μηνύματα είναι πολύπλοκα, αλλά κεντρικό ρόλο διαδραματίζει μια πρωτεΐνη η οποία είναι γνωστή ως αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (**Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF**) ή **αγγειακός παράγοντας διαπερατότητας (VPF)** (Sagar and Yaylali, 2011). Ο αυξητικός παράγοντας VEGF, ανακαλύφθηκε –και περιεγράφηκε– για πρώτη φορά το 1989 από τον Napoleone Ferrara στα εργαστήρια της Genentech. Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στη βράβευσή του με το Lasker Clinical Award, το οποίο απονέμεται σε

επιστήμονες με σημαντική συνεισφορά στην ιατρική επιστήμη. Έως σήμερα, ο VEGF αποτελεί τον πλέον γνωστό και μελετημένο «πυροδότη» του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων, αφού η ρύθμιση της ανάπτυξης των αγγείων για να ανταποκριθούν στις ανάγκες ενός ιστού εξαρτάται από τον έλεγχο της παραγωγής του VEGF, μέσω αλλαγών στο mRNA και του ρυθμού της μεταγραφής του. Ο έλεγχος του ρυθμού της μεταγραφής του γονιδίου του VEGF είναι σχετικά αποσαφηνισμένος. Σε κάθε τύπο κυττάρου η έλλειψη οξυγόνου προκαλεί ενδοκυτταρικά αύξηση της συγκέντρωσης της ενεργής μορφής του μεταγραφικού παράγοντα **HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1)**. Ο HIF-1 διεγείρει τη μεταγραφή του γονιδίου του VEGF και άλλων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα είναι απαραίτητα όταν είναι μειωμένη η παροχή οξυγόνου. Έτσι, ο VEGF εκκρίνεται από το κύτταρο, διαχέεται στον ιστό, και δρα στα παρακείμενα ενδοθηλιακά κύτταρα (**Εικόνα 1.6**). Καθώς αναπτύσσονται τα νέα αγγεία μεταφέροντας αίμα στον ιστό, η συγκέντρωση του οξυγόνου αυξάνεται, η ενεργότητα του HIF-1 μειώνεται, οπότε σταματά η παραγωγή VEGF και ολοκληρώνεται η αγγειογένεση (Filder I.J. et al., 2005).



Εικόνα 1.6. Μηχανισμός που ελέγχει την αγγειογένεση ανάλογα με την ανάγκη ενός ιστού σε οξυγόνο. Έλλειψη οξυγόνου ενεργοποιεί την έκκριση VEGF, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την αγγειογένεση.

Ο τύπος του VEGF που περιεγράφηκε αναφέρεται ως ο **VEGF-A**, ενώ έως σήμερα έχουν ανακαλυφθεί και περιγραφεί τουλάχιστον τέσσερα επιπλέον μέλη, οι **VEGF-B**, **VEGF-C**, **VEGF-D** και ο **πλακούντιος αυξητικός παράγοντας PIGF 1 και 2**. Στην ίδια ομάδα ανήκουν και οι υποδοχείς **VEGFR-1**, **VEGFR-2**, και **VEGFR-3** με δράση στην κινάση της τυροσίνης και οι νευροπιλίνες **NRP-1** και **NRP-25**. Επίσης έχει ανακαλυφθεί και ένας αριθμός πρωτεϊνών, που είναι κωδικοποιημένες στο γενετικό υλικό ιών (**VEGF-E**) καθώς και στο δηλητήριο κάποιων φιδιών (**VEGF-F**). Παρακάτω παρουσιάζονται οι κυριότεροι αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας VEGF καθώς και η δράση τους (**Πίνακας 1.2**) (Risau, 1997).

Πίνακας 1.2.: Ομάδα των VEGF ως επαγωγείς της αγγειογένεσης

ΕΙΔΟΣ	ΔΡΑΣΗ
VEGF-A	1. Αγγειογένεση <ul style="list-style-type: none"> • Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων • Μίτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων • Δραστηριότητες της μονοοξυγενάσης του μεθανίου • Δραστηριότητες του αβν3
	2. Χημειοταξία για μακροφάγα και κοκκιοκύτταρα
	3. Αγγειοδιαστολή (έμμεσα μέσω της απελευθέρωσης NO)
VEGF-B	Εμβρυική αγγειογένεση
VEGF-C	Λεμφοαγγειογένεση
VEGF-D	Ανάπτυξη λεμφοαγγειακού δικτύου που περιβάλλει τα βρογχιόλια του πνεύμονα
PIGF	1. Εμβρυική αγγειογένεση
	2. Συμμετοχή σε αγγειογένεση σχετιζόμενη με ισχαιμία, φλεγμονή, επούλωση τραύματος και καρκίνο

Μόριο αντίστοιχο του VEGF που έχει την ικανότητα να διεγείρει μία αγγειογενετική αντίδραση, είναι ο **βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (bFGF)**, ο οποίος αποτελεί τον πρώτο προ-αγγειογενετικό παράγοντα που αναγνωρίστηκε και μελετήθηκε. Η οικογένεια των **FGF**

περιλαμβάνει τουλάχιστον 20 μέλη με σημαντικότερους τους **FGF-1** και **FGF-2**, οι οποίοι στερούνται κυτταροπλασματικής αλληλουχίας για εξαγωγή από το κύτταρο, σε αντίθεση με τους περισσότερους αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Βασικός τους υποδοχέας είναι ο FGFR-1, που σχετίζεται με την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σημάτων όπως το μονοπάτι RAS, η οικογένεια των κινασών της τυροσίνης Src και η πρωτεΐνη P13K (Shing et al., 1984).

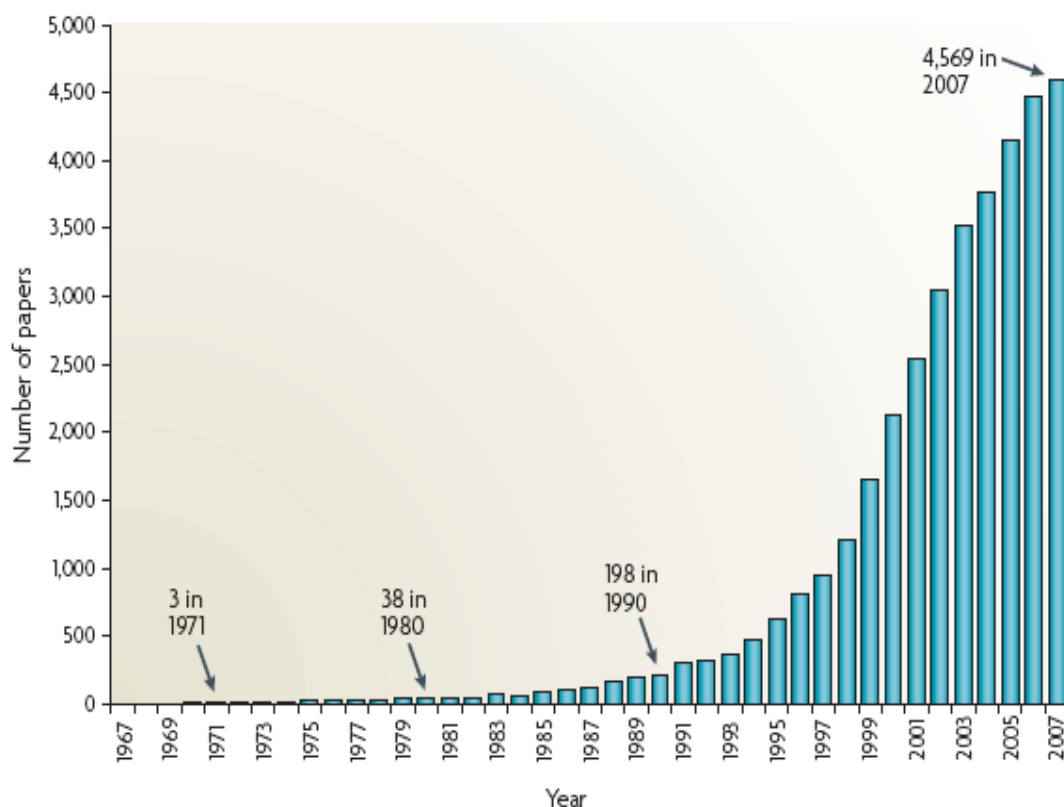
Μια άλλη οικογένεια ειδικών μορίων των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι η οικογένεια των **αγγειοποιητινών (ANG)**. Οι **ANG-1**, **ANG-2**, **ANG-3** και **ANG-4**, δεσμεύονται στον ειδικό υποδοχέα της **κινάσης της τυροσίνης (Tie-2 ή RTK1)** των ενδοθηλιακών κυττάρων, κατά τρόπο παρόμοιο με αυτό των υποδοχέων **VEGFs** (Yancopoulos et al., 1984). Η **ANG-1** είναι η περισσότερο μελετημένη αγγειοποιητίνη και ενεργεί ως αγωνιστής, συμβάλλοντας στη διαφοροποίηση και τη σταθεροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ η **ANG-2** δεσμεύεται στον **Tie-2** εμποδίζοντας τη σύνδεση της με την **ANG-1**.

Τέλος, υπάρχουν πολυάριθμα μη ειδικά αγγειογενετικά μόρια που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και έχουν επιπτώσεις όχι μόνο στην αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και στην αύξηση κυττάρων άλλου τύπου. Οι παράγοντες αυτοί (που έχουν μελετηθεί λιγότερο) είναι ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων **PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)**, ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας **TGF (Transforming Growth Factors-β)**, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων **TNF (Tumor Necrosis Factor)**, η αγγειογενίνη, η κυκλοξυγενάση, διάφορες μεταλλοπρωτεϊνάσες, οι αγγειακές ιντεγκρίνες, οι ιντερλευκίνες 1, 4, 6, 8, 15, οι εφρίνες, οι καδερίνες κ.α. Τα μόρια αυτά αποκτούν διαφορετική σημασία στην νεο-αγγείωση (φυσιολογική και παθολογική) των διαφορετικών οργάνων (Leung et al., 1989; Baltegay et al., 1994; Carmeliet, 2003; Lee and Secord, 2014).

1.7.2 . Αγγειογένεση των όγκων

Η παρατήρηση ότι γύρω από καρκινικούς όγκους λαμβάνει χώρα αγγειογένεση καταγράφηκε από τον Goldman το 1907. Όμως, η υπόθεση ότι οι όγκοι παράγουν μια διαχεόμενη “αγγειογενετική” ουσία προτάθηκε για πρώτη φορά το 1968 (Greenblatt and Shubik, 1968). Το 1971 ο Δρ Judah Folkman, ένας χειρουργός της ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου του Χάρβαρντ, με

άρθρο του στο *New England Journal of Medicine* ισχυρίστηκε ότι η ανάπτυξη όγκων και η μετάσταση τους εξαρτάται από την αγγειογένεση (Folkman, 1971). Με την ανακοίνωση αυτή δικαίως θεωρείται ως ο πατέρας της θεωρίας η οποία συνδυάζει την αγγειογένεση με την ανάπτυξη-μετάσταση των καρκινικών όγκων. Την περίοδο της θητείας του, ως χειρουργός του ναυτικού των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής, ο Folkman ερευνούσε υποκατάστατα του αίματος για χρήση σε χειρουργεία εν πλω και ειδικότερα διερευνούσε εάν τα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσαν να επιβιώσουν με τέτοια υποκατάστατα. Η μελέτη του έδειξε ότι θα μπορούσαν, αλλά μόνο σε πολύ μικρό μέγεθος, ενώ όταν η μελέτη του επεκτάθηκε σε πειραματόζωα οι όγκοι αυτοί αναπτύχθηκαν και εξαπλώθηκαν ταχύτατα. Προβληματισμένος και συνεπαρμένος από τον εκπληκτικό αριθμό των αιμοφόρων αγγείων που είχε παρατηρήσει στις βιοψίες των όγκων, ο Folkman διατύπωσε την υπόθεση ότι η παρουσία των αγγείων αυτών ήταν απαραίτητη για την επιβίωση και ανάπτυξη του όγκου. Παράλληλα, θεώρησε πως εάν κάποιος είχε τη δύναμη να εμποδίσει το σχηματισμό των αγγείων αυτών, τότε θα μπορούσε να πετύχει και τη διακοπή της εξέλιξης του όγκου, ελέγχοντας έτσι την ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω της παρεμπόδισης της τροφοδότησης τους (Folkman, 2000).



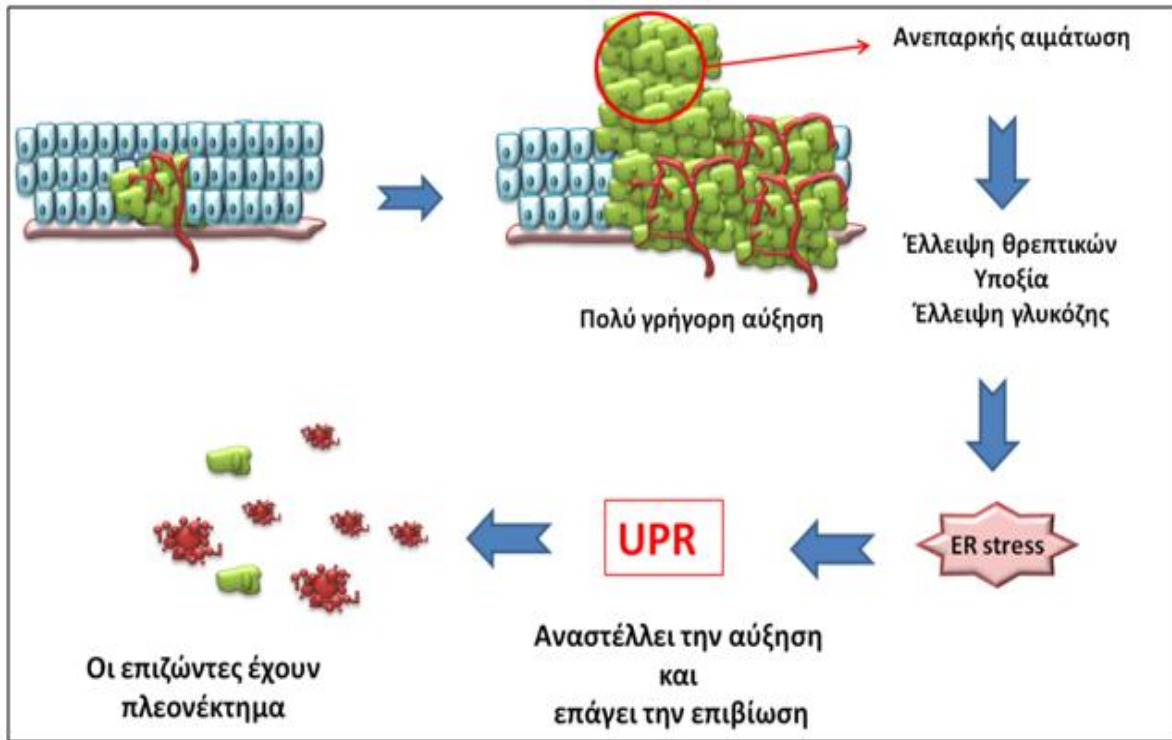
Εικόνα 1.7. Εξελικτικό γράφημα πλήθους δημοσιεύσεων που αφορούν την αγγειογένεση από το 1969 έως το 2007.

Η συγκεκριμένη υπόθεση συνάντησε στην αρχή τον χλευασμό των επιστημόνων. Όμως, με την πάροδο του χρόνου κίνησε το ενδιαφέρον για την έρευνα με στόχο τη δημιουργία μορίων-φαρμάκων με προ- και αντι-αγγειογενετική δράση, δηλαδή με δυνατότητα παρεμπόδισης της ανάπτυξης των όγκων μέσω της αναστολής της διαδικασίας σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων. Στην πορεία αυτή συνεισέφερε και ο Gullino το 1976, ο οποίος δημοσίευσε –ως επιστέγασμα σειράς πειραμάτων- ότι τα προκαρκινικά κύτταρα, κατά την πορεία της εξέλιξης τους σε καρκινικά, αποκτούν αγγειογενετική δράση. Έτσι από το 1980 και μετά άρχισε να αυξάνεται εκθετικά το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με την αγγειογένεση και την σχέση της με τον καρκίνο (**Εικόνα 1.7**), (Carmeliet and Jain, 2000; Zetter, 2008).

Σήμερα, το φαινόμενο του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων με σκοπό την ανταπόκριση στις ενεργειακές ανάγκες των όγκων ονομάζεται **νεοπλασματική αγγειογένεση**. Μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα μπορεί να ξεφύγουν από έναν όγκο, να εισέλθουν στο φλεβικό αίμα και να μεταφερθούν σε μια απόμακρη περιοχή, όπου μπορούν να εμφυτευτούν και να αρχίσει η ανάπτυξη ενός δευτερογενούς όγκου. Κατά συνέπεια, η αγγειογένεση απαιτείται όχι μόνο για την επιβίωση και ανάπτυξη ενός πρωτοπαθούς καρκίνου, αλλά και για τη μετάσταση και εν συνεχεία διατήρηση ενός μεταστατικού καρκίνου.

Συγκεκριμένα, στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του όγκου όλα τα καρκινικά κύτταρα έχουν επαρκή αιμάτωση. Όσο όμως περνά ο χρόνος, η έντονη αγγειογένεση δεν είναι ικανή να καλύψει τις ανάγκες όλων των κυττάρων, λόγω του πολύ έντονου πολλαπλασιασμού των. Καθώς ο συμπαγής όγκος μεγαλώνει, αναπόφευκτα μερικά κύτταρα απομακρύνονται από το θρεπτικό αγγειακό στρώμα, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η παροχή σε αυτά θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Η κατάσταση αυτή πυροδοτεί την έναρξη μεταβολικού **στρες** και κυτταρικής **υποξίας** που αποτελούν το ερέθισμα-σήμα για τη δημιουργία πρόσθετων αιμοφόρων αγγείων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ενός όγκου, συνήθως υπερβαίνει το ρυθμό ανάπτυξης των νέων αγγείων, με αποτέλεσμα οι όγκοι να παραμένουν σε συνθήκες υποξίας για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Όμως, η υποξία αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες

που επάγουν την αγγειογένεση, αφού δημιουργεί τον παράγοντα HIF-1 μέσω ενός μηχανισμού γονιδιακής έκφρασης της πρωτεΐνης **VHL (Von-Hippel Lindau)**. Η μειωμένη τάση οξυγόνου σταθεροποιεί τον HIF-1 και προωθεί τη συσσώρευσή του στον πυρήνα, και αρχίζει η μεταγραφική υπερέκφραση διάφορων γονιδίων που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, τη διείσδυση και τη μετάσταση. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα δέχονται μειωμένες ποσότητες θρεπτικών συστατικών (αμινοξέα, γλυκόζη κλπ.), προκαλώντας προβλήματα στην παραγωγή **ATP** και τη γλυκοζυλίωση των προς έκκριση πρωτεϊνών. Έτσι, συσσωρεύονται ποικίλες μη ορθώς αναδιπλούμενες πρωτεΐνες (**unfolded protein response, UPR**) στον αυλό του **ενδοπλασματικού δικτύου-ΕΔ**. Οι καταστάσεις αυτές προκαλούν στα κύτταρα των όγκων στρες του ΕΔ, με αποτέλεσμα οι UPR να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση αλλά και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι εάν το στρες είναι παρατεταμένο, τα περισσότερα κύτταρα οδηγούνται τελικά σε απόπτωση. Όμως, κάποια κύτταρα καταφέρνουν να επιβιώσουν, κυρίως λόγω των γενετικών τους χαρακτηριστικών. Όσα τελικά καταφέρνουν να επιβιώσουν θα έχουν το πλεονέκτημα της επιβίωσης και για τα επόμενα στάδια (π.χ. μετάσταση), λόγω των ευεργετικών επιπτώσεων του σκέλους UPR που επάγει την επιβίωση (**Εικόνα 1.8**), (Feldman et al., 2005; Fels and Koumenis, 2006; Fu and Lee, 2006; Lee and Hendershot, 2006; Healy et al., 2009; Schonthal, 2012).

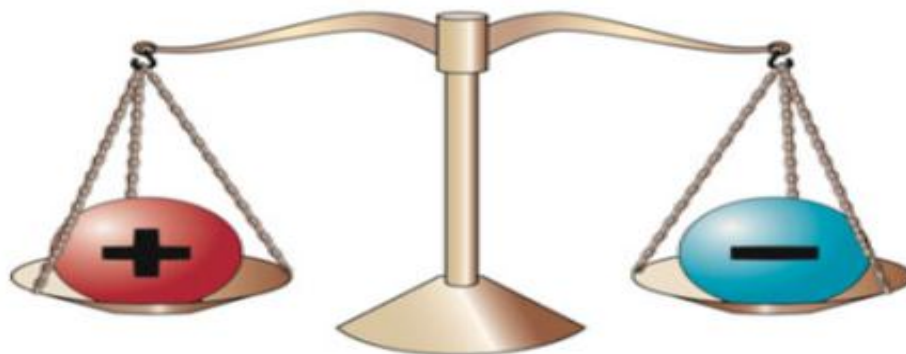


Εικόνα 1.8. Δημιουργία και επιπτώσεις του στρες του ΕΔ σε έναν πραγματικό όγκο.

1.7.3 Αγγειογενετική ισορροπία

Τα αγγειογενετικά ή προαγγειογενετικά μόρια μαζί με τα αντι-αγγειογενετικά μόρια είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση μιας ισορροπίας γνωστής ως **αγγειογενετική ισορροπία**. Είναι πλέον γνωστό, πως η ανάπτυξη των όγκων είναι αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ των παραγόντων που ενεργοποιούν την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων και αυτών που την αποτρέπουν. Όταν η ζυγαριά κλείνει προς την ανάπτυξη, τα μόρια αυτά καταλύουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης και τροποποιώντας επιλεκτικά τα χαρακτηριστικά των ενδοθηλιακών κυττάρων και των σχετικών περιαγγειακών δομών. Εάν επικρατήσει η αντιαγγειογένεση, τότε περιορίζεται η ανάπτυξη του όγκου (**Εικόνα 1.9**).

Αγγειογενετική Ισορροπία



Ενεργοποιητές

Αγγειογενίνη
Αγγειοτροπίνη
Βασικός Ινοβλάστης GF
Ηπατοκύτταρα GF
Ιντερλευκίνη 8
Πλακούντα GF
Αγγειακού ενδοθηλίου GF

Αναστολείς

Αγγειοστατίνη
Ενδοστατίνη
2-Μεθοξυεστραδιόλη
Ιντερφερόνη
Ιντερλευκίνη 12
TIMP1
Θρομβοσπονδίνη

Εικόνα 1.9. Ο Folkman θεώρησε πως η ενεργοποίηση-αναστολή της αγγειογένεσης αποτελούν μέρος μιας ισορροπημένης εξίσωσης. Στους περισσότερους ιστούς, η αγγειογένεση πραγματοποιείται υπό έλεγχο από αυστηρές ρυθμίσεις ποσότητες διεγερτικές και ανασταλτικές παράγοντες. Όταν απαιτείται, η αγγειογένεση μπορεί να επιτευχθεί είτε με την αύξηση του επιπέδου των αγγειογενετικών ενεργοποιητών ή μειώνοντας το επίπεδο - δραστικότητα των αγγειογενετικών αναστολέων (Bruce, 2008).

Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι εάν υπάρχει απουσία νέων αγγείων, τότε η διάμετρος των κακοήθων όγκων δεν αναπτύσσεται περισσότερο από 1 με 2 χιλιοστά, δηλαδή ένα μέγεθος που είναι ικανό να προκαλέσει ανεπανόρθωτη βλάβη στον περιβάλλοντα ιστό. Έτσι, με τη διαδικασία αυτή υπάρχει η δυνατότητα να αντιμετωπιστούν με σημαντική επιτυχία οι πρώιμοι καρκινικοί όγκοι. Όμως και οι υγροί όγκοι, όπως αυτοί της λευχαιμίας, απαιτούν την αγγειοποίηση του μυελού των οστών, οπότε υπάρχει πάλι η δυνατότητα να ανταποκριθούν σε μια θεραπεία με αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες. Στα μόρια αυτά περιλαμβάνονται οι θρομβοσπονδίνη, η αγγειοστατίνη, η ενδοστατίνη, η ιντερφερόνη, η ιντερλευκίνη 12, οι ιστικοί αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών TIMP 1 και 2, ο αιμοπεταλιακός παράγων 4 κ.α. Στον παρακάτω πίνακα

κατηγοριοποιούνται οι βασικότεροι ρυθμιστές της ισορροπίας αυτής (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Ενδογενείς ενεργοποιητές και αναστολείς της αγγειογένεσης

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	Ενεργοποιητές	Αναστολείς
Κυτταροκίνες	IL-6 , IL-8	IL-1, IL-4, IL-10, IL-12, IFN-α, IFN-β, IFN-γ
Ενδογενείς ρυθμιστές	ανβ3 ιντεγκρίνη Αγγειοποιητίνη-1 Αγγειοστατίνη II(υποδοχέας AT 1) Ενδοθηλίνη Ερυθροποιητίνη Υποξία Συνθάση νιτρικού οξέος Ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων Προσταγλανδίνη, Θρομβοποιητίνη	Αγγειοτενσίνη Αγγειοτενσίνη II(υποδοχέας AT 2) Αγγειοποιητίνη-2(απουσία VEGF) Καβεολίνη-1,-2 Ενδοστατίνη IFN-α, Ισοφλαβόνες Αιμοπεταλιακός παράγοντας -4 Προλακτίνη (τμήμα 16 kd) Θρομβοσπονδίνη, Τροπονίνη-1
Αυξητικοί παράγοντες	Αγγειογενίνη, Αγγειοτροπίνη EGF, FGF, G-CSF, HGF, PDGF, TNF- α, VEGF	
Ογκογονίδια	c-myc, ras, c-src, v-raf, c-jun	p53, Rb
Πρωτεάσες– αναστολείς πρωτεασών	Καθεψίνη Ζελατινάση A, B Στρωμελίσίνη Ενεργοποιητής πλασμινογόνου (u-PA)	TIMP-1,TIMP-2 ,TIMP-3 Αναστολέας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1(PAI-1)
Ένζυμα ενδοκυττάριας μετάδοσης σήματος	Φωσφορυλάση θυμιδίνης Φαρνεσυλτρανσφεράση Γερανυλ γερανυλτρανσφεράση	
Στοιχεία	Χαλκός	Πυρίτιο

1.7.4. Αντι-αγγειογενετική θεραπεία

Η αναγνώριση του καθοριστικού ρόλου της αγγειογένεσης στην προώθηση της καρκινογένεσης οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών αναστολέων της αγγειογένεσης ως πιθανά αντικαρκινικά φάρμακα. Οι αναστολείς αυτοί διακρίνονται στους άμεσους, οι οποίοι στοχεύουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα «χαλιναγωγώντας» τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευσή τους και στους έμμεσους, οι οποίοι δρουν στα καρκινικά κύτταρα ανακόπτοντας την παραγωγή από αυτά των αγγειογενετικών ουσιών (Ribatti, 2014).

Οι παραπάνω παράγοντες δρουν μέσω ενός πλήθους μηχανισμών, οι οποίοι εντάσσονται σε μία από τις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες αναστολής μέσω:

α. παρεμπόδισης των κυττάρων του όγκου να απελευθερώσουν ενεργοποιητές της αγγειογένεσης, όπως οι ιντερφερόνες α και β.

β. εξουδετέρωσης της δράσης των αγγειογενετικών παραγόντων που εκκρίνονται από τους όγκους, και όπως η σουραμίνη.

γ. πρόσδεσης στους υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων, εμποδίζοντας έτσι τη δράση αγγειογενετικών παραγόντων, όπως η ενδοστατίνη, και η θρομβοσπονδίνη.

δ. επαγωγής της απόπτωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και αποδόμησης της εξωκυττάριας ουσίας.

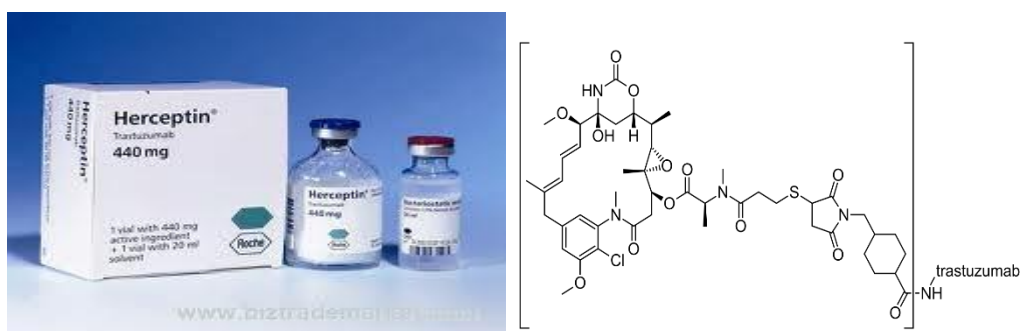
Στη συνέχεια απαριθμούνται ορισμένα φάρμακα που είναι δραστικοί αναστολείς της αγγειογένεσης και έχουν εγκριθεί από το U.S. FDA προς συνταγογράφηση στο πλαίσιο της αντιμετώπισης του καρκίνου. Συνήθως, τα φάρμακα αυτά χορηγούνται συνδυαστικά με άλλες μορφές θεραπείας, όπως η χημειοθεραπεία.

Η **μπεβασιζουμάβη (bevacizumab)** της Genentech Inc., με εμπορική ονομασία **AVASTIN**, είναι ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα με δράση κατά του VEGF που αναστέλλει τη δέσμευσή του από τους υποδοχείς. Είναι ο πρώτος εμπορικά διαθέσιμος αναστολέας και η εμπορική του χρήση εγκρίθηκε το 2009 (Ferrara et al., 2004; Shih and Lindley, 2006). Χορηγείται ενδοφλέβια –σε συνδυασμό με την κλασσική χημειοθεραπεία– ως βασική θεραπεία για το μεταστατικό καρκίνωμα του παχέος εντέρου και του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Επίσης, έχει επιδείξει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του καρκίνου του νεφρού, των ωθηκών και του μαστού. Οι συνηθέστερες παρενέργειές του είναι διάρροια, ναυτία και άλγος (**Εικόνα 1.10**).



Εικόνα 1.10. Δομή και εμπορική μορφή avastin (bevacizumab)

Η **τραστουζουμάμπη (Trastuzumab)** της Roche Registration Ltd, με εμπορική ονομασία **Herceptin**, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ικανό να αναγνωρίζει και να δεσμεύει τον υποδοχέα Her2 (**Εικόνα 1.11**). Ασκεί αντινεοπλασματική δράση μη επιτρέποντας τη δημιουργία του σήματος, καθώς καταλαμβάνει τη θέση όπου φυσιολογικά προσδένεται ο αυξητικός παράγοντας, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Παράλληλα, βοηθά το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού να αναγνωρίσει τα καρκινικά κύτταρα και να τα καταστρέψει. Το Herceptin χορηγείται κυρίως σε ασθενείς των οποίων οι όγκοι υπερεκφράζουν τον HER2 υποδοχέα, όπως οι ασθενείς με πρώιμο καρκίνο του μαστού που είναι θετικοί στον HER2 και έχουν υποστεί χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία (εισαγωγική ή επικουρική) και ακτινοθεραπεία (εφόσον έχει εφαρμογή). Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί –σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία– για τη θεραπεία του καρκίνου του στομάχου που έχει εξαπλωθεί πέρα από το στομάχι (μεταστατικό ή προχωρημένο γαστρικό καρκίνο) (Vogel et al., 2002).



Εικόνα 1.11. Δομή και εμπορική μορφή Herceptin (bevacizumab)

Η **πανιτουμουμάμπη (Panitumumab)** της Amgen Europe B.V., με εμπορική ονομασία **Vectibix** είναι ένα μονοκλωνικό ανθρώπινο IgG2 αντίσωμα, το οποίο στοχεύει την επιφάνεια των κυττάρων και συνδέεται με τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) (**Εικόνα 1.12**). Η σύνδεσή της με τον EGFR έχει ως αποτέλεσμα την εσωτερίκευση του υποδοχέα, την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, την επαγωγή της απόπτωσης και τη μείωση της παραγωγής της ιντερλευκίνης 8 και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα. Το panitumumab (Vectibix) ενδείκνυται για την αγωγή ασθενών με μεταστατικό ορθοκολικό καρκίνο (Hoy and Wagstaff, 2006).



Εικόνα 1.12. Εμπορική μορφή Vectibix (Panitumumab)

Η δράση του VEGF αναστέλλεται και από την **αφλιμπερσέπτη (aflicbercept)**, που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του πρωτοπαθούς ή/και μεταστατικού καρκίνου του παχέος έντερου (και του μεταστατικού) (Stewart et al., 2012) με το εμπορικό όνομα **ZALTRAP** για την Sanofi-Aventis France (2012, έγκριση από FDA). Παράλληλα, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας που παρουσιάζεται κυρίως στους ηλικιωμένους με την εμπορική ονομασία **EYLEA** για την Bayer Pharma AG (2011, έγκριση από FDA) (Stewart et al., 2012).

Πέρα από τα μονοκλωνικά αντισώματα, το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων αντιαγγειογενετικών παραγόντων έχει εστιαστεί και προς την πλευρά της ανάπτυξης μικρών χημικών μορίων που αναστέλλουν τη μεταγωγή του σήματος που προκαλείται από τον VEGF. Ίδεατά, τα μόρια αυτά θα πρέπει να διαθέτουν την ικανότητα να μπλοκάρουν τους υποδοχείς του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ένα μόριο της κατηγορίας αυτής, με ανασταλτική δράση για τον υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης (RTK1), είναι η **σοραφενίμπη (NEVAXAR)** που έχει εγκριθεί για την αντιμετώπιση του μεταστατικού νεφρικού καρκίνου και των καρκίνων στο ήπαρ και τον θυροειδή.

Η **παζοπανίμπη (pazopanib)** της Glaxo Group Ltd, με εμπορικό όνομα **Votrient**, είναι ένας πολύ ισχυρός –και εκλεκτικός– αναστολέας των πρωτεϊνικών κινασών. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων οι οποίοι συμμετέχουν στην ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων, όπως οι υποδοχείς VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α/β , και c-kit. Αναστέλλοντας τη δράση των εν λόγω ενζύμων, η παζοπανίμπη μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου κυρίως με αναστολή της

αγγειογένεσης (Γαληνός, 2015). Ένας επιπλέον αναστολέας των κινασών της τυροσίνης είναι η **σουνιτινίμπη (sunitinib) (SU11248, SUTENT)**, μόριο που επιδρά στους υποδοχείς VEGFR και PDGFR. Το φάρμακο που έχει βρεθεί να διαθέτει και αντι-καρκινικές ιδιότητες και εγκρίθηκε πρόσφατα από τον FDA για τη θεραπεία του προχωρημένου σταδίου του καρκίνου του νεφρού. Στην ίδια κατηγορία των μικρών μορίων αναστολέων της RTK1, ανήκουν και τα φάρμακα **axitinib** (AG013736), **cetinarib** (AZD2171, RECENTIN), **vandetanib** (ZD6474, ZACTIMA) και **vatalanib** (PTK787/ZK222584) Τέλος, ένα δραστικό μόριο είναι η **λαπατινίμπη (Tyverb)**, η οποία δρά στο ενδοκυττάριο τμήμα των υποδοχέων (ανήκει στα «μικρά μόρια» της στοχευμένης θεραπείας τα οποία δρουν στο εσωτερικό των κυττάρων και όχι στην επιφάνειά τους όπως το μονοκλωνικά αντισώματα), εμποδίζοντας την μετάδοση των εντολών, που προκύπτουν από την σύνδεση του αυξητικού παράγοντα στον υποδοχέα, και την ανεξέλεγκτη διαίρεση και ανάπτυξη των κυττάρων.

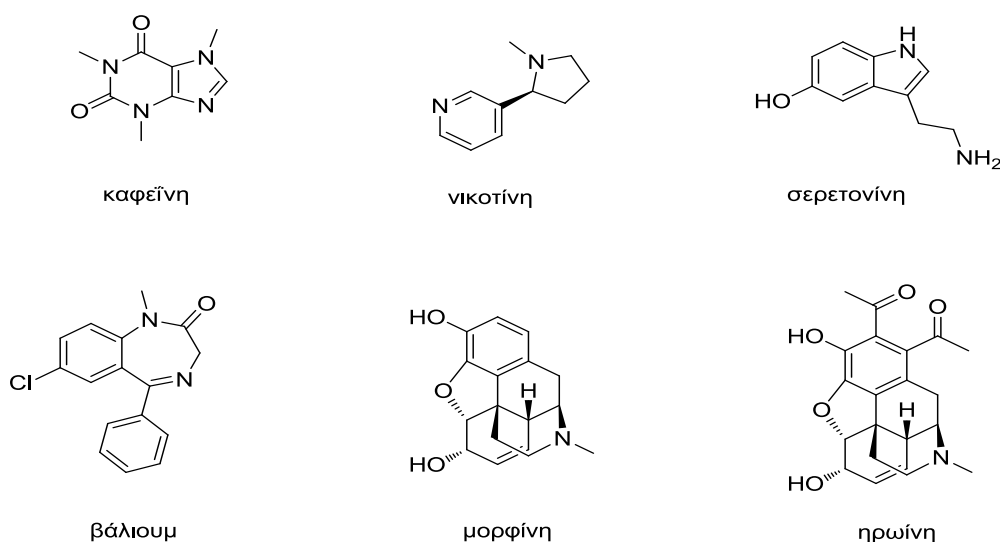
Στο πλαίσιο διενέργειας της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν και συνεκτιμήθηκαν όλα τα παραπάνω δεδομένα, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στις διαφορετικές χημικές δομές των έως τώρα χρησιμοποιούμενων βιοδραστικών μορίων, τις μελέτες σχετικά με τη σχέση δομής-δράσης τους και πως αυτές εξειδικεύονται ανάλογα με το βιολογικό στόχο. Έτσι, σχεδιάστηκε και συντέθηκε μία σειρά νέων αζαετεροκυκλικών ενώσεων που εμπεριέχουν τον πυραζολικό δακτύλιο και την ισοξαζολική ομάδα, με σκοπό την εκτίμηση της αντικαρκινικής-αντιαγγειογενετικής τους δράσης. Στα ισοξαζολικά παράγωγα χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση της μοριακής μηχανικής, με στόχο την ανάπτυξη ενός μοντέλου συσχέτισης δομής-βιοδραστικότητας το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των μορίων στόχων. Τα μόρια αυτά συντέθηκαν και η βιοδραστικότητα που επέδειξαν χρησιμοποιήθηκε για να επικυρωθεί το νέο αυτό μοντέλο. Στα κεφάλαια που ακολουθούν παρουσιάζεται η σύνθεση των νέων μορίων χωρισμένη με βάση τον ετεροκυκλικό δακτύλιο που εμπεριέχουν (πυραζόλια, ισοξαζόλια) και παράλληλα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αξιολόγησης της βιοδραστικότητάς τους.

Κεφάλαιο 2

Ανάπτυξη-Σύνθεση Νέων Πυραζολικών Παραγώγων και Αποτίμηση της Βιολογικής τους Δράσης

2.1. Οι αζαετεροκυκλικές ενώσεις στη φαρμακευτική χημεία

Ετεροκυκλικές ονομάζονται –σύμφωνα με τον ορισμό της IUPAC– οι χημικές ενώσεις των οποίων η δομή εμπεριέχει τουλάχιστον έναν κυκλικό δακτύλιο, ο οποίος συνίσταται από τουλάχιστον δύο διαφορετικά χημικά στοιχεία. Πολλές δεκαετίες πριν από την ανάπτυξη της σύγχρονης Οργανικής-Φαρμακευτικής Χημείας, η πλειοψηφία των χρησιμοποιούμενων παραδοσιακών φυσικών θεραπευτικών-ιατρικών σκευασμάτων, είχαν ως ενεργό συστατικό κάποιο ετεροκυκλικό αλκαλοειδές. Ορισμένα από αυτά, όπως η μορφίνη (**Εικόνα 2.1**), χρησιμοποιούνται ακόμη και στις μέρες μας. Κοινό χαρακτηριστικό των μορίων αυτών είναι η παρουσία του **Αζώτου** ως το επιπλέον άτομο άνθρακα που συμμετέχει στο σχηματισμό του δακτυλίου (αζαετεροκυκλικά μόρια). Η σύγχρονη Φαρμακευτική Χημεία χρησιμοποιεί ευρύτατα τα φυσικά και συνθετικά ανάλογα των μορίων αυτών, αφού έχει προσδιοριστεί ότι διαθέτουν αξιοσημείωτες βιολογικές δράσεις.

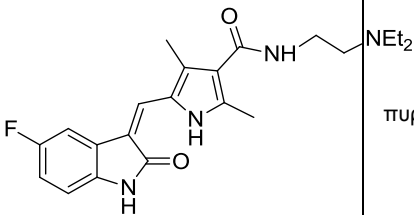


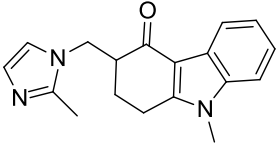
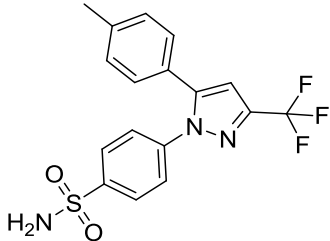
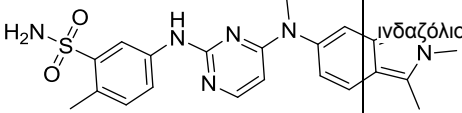
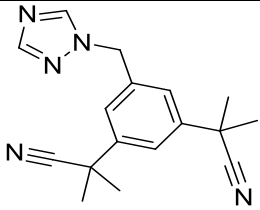
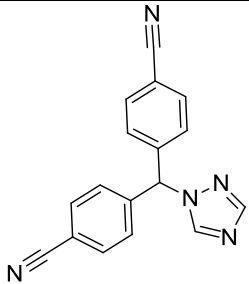
Εικόνα 2.1. Ορισμένες σημαντικές βιοδραστικές αζαετεροκυκλικές ενώσεις

Η αξιόλογη και πολυδιάστατη βιοδραστικότητα που διαθέτουν τα αζαετεροκυκλικά μόρια έχει λειτουργήσει διαχρονικά ως σημαντικό κίνητρο για την ενασχόληση ενός πλήθους επιστημόνων με τη διαδικασία πρόσβασης σε γνωστές ή νέες δομές αζαετεροκυκλικών μορίων και η βιβλιογραφία να βρίθει από εργασίες σχετικές με την ανάπτυξη μεθοδολογιών σύνθεσης νέων αζαετεροκυκλικών μορίων. Άλλωστε, είναι χαρακτηριστικό ότι στις μέρες μας η ανάπτυξη νέων παραγώγων των αζαετεροκυκλικών ενώσεων αποτελεί το σημαντικότερο τμήμα της έρευνας στην οργανική σύνθεση που διενεργείται από τα ερευνητικά-πανεπιστημιακά ιδρύματα και τις φαρμακευτικές και αγροχημικές βιομηχανίες (Isacson et al., 1984; Penning et al., 1997; Becker et al., 1999; Devery et al., 2009; Dadiboyena and Hamme, 2011).

Όμως, θα πρέπει να επισημανθεί ότι από το σύνολο των βιοδραστικών αζαετεροκυκλικών μορίων, ένα αξιοσημείωτο ποσοστό αφορά μόρια που εμπεριέχουν έναν απλό (ή συμπυκνωμένο) πενταμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο με άζωτο (Lednicer and Mitscher, 1997). Στο άρθρο των Marcus Baumann et al. που παρουσιάζει λεπτομερώς τα 200 περισσότερα εμπορικά φάρμακα της τελευταίας δεκαετίας, αναφέρεται ότι 50 μόρια με ένα μεγάλο εύρος φαρμακευτικής δράσης εμπεριέχουν πενταμελείς ετεροκυκλικούς δακτυλίους (Baumann et al., 2011). Από αυτά έχουμε επιλέξει και παρουσιάζουμε στον **Πίνακα 2.1** τις δομές και βιοδραστικότητες όσων κατατάσσονται στην κατηγορία των αντινεοπλασματικών φαρμάκων (National library of medicine, 2015; Wikipedia, 2015b; Γαληνος, 2015).

Πίνακας 2.1. Αντινεοπλασματικά Φάρμακα με πενταμελή αζαετεροκυκλικό δακτύλιο

ΟΝΟΜΑ	ΔΟΜΗ	ΟΜΑΔΑ	ΔΡΑΣΗ
Σουνιτινίμπη (sunitinib)		πυρόλιο	Αναστέλλει πολλαπλούς υποδοχείς τυροσινικών κινασών (RTKs) που εμπλέκονται στην αύξηση του όγκου, τη νεοαγγειογένεση και τη μεταστατική εξέλιξη του καρκίνου. Η σουνιτινίμπη προσδιορίστηκε ως αναστολέας των υποδοχέων του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFRα και PDGFRβ), των υποδοχέων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3), του υποδοχέα του παράγοντα αρχέγονων κυττάρων (KIT), της ομοιάζουσας με το Fms τυροσινικής κινάσης-3 (FLT3), του υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης αποικιών

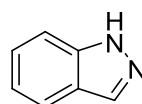
			(CSF-1R) και του υποδοχέα νευρογλοιακού νευροτροφικού παράγοντα (RET). Αντινεοπλασματικά φάρμακα-Αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών
Ονδανσετρόνη (ondansetron)		ιμιδαζόλιο	Είναι ένας ειδικός αναστολέας των υποδοχέων της 5-HT ₃ σεροτονίνης δρώντας τόσο περιφερικά (μπλοκάροντας τους υποδοχείς της περιφέρειας των σπλαχνικών προσαγωγών νευρικών ινών), όσο και κεντρικά (μπλοκάροντας τους υποδοχείς της εκλυτικής ζώνης χημειούποδοχέων στον εγκέφαλο). αντιεμετικό – αντιιλιγγικό επικουρικό της χημειοθεραπείας.
Σελεκοξίμπη (celecoxib)		πυραζόλιο	Είναι ένα αντιφλεγμονώδες φάρμακο, το οποίο ανήκει σε μια κατηγορία φαρμάκων που ονομάζονται ειδικοί αναστολείς της COX-2 . Βοηθά στην ανακούφιση του πόνου, του οιδήματος και του πυρετού, που προκαλούνται από την αρθρίτιδα. Δρα μέσω της μείωσης του επιπέδου των προσταγλανδινών, που παράγονται από τον οργανισμό και οι οποίες προκαλούν πόνο, οίδημα και πυρετό. αντιφλεγμονώδες αντιρευματικό, απινεοπλασματικό
Παζοπανίμπη (pazopanib)		ινδαζόλιο	Είναι ένας ισχυρός και εκλεκτικός, πολλαπλών-στόχων, αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης. Αυτό σημαίνει ότι αναστέλλει συγκεκριμένα ένζυμα, γνωστά ως πρωτεϊνικές κινάσες. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται σε ορισμένους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων, όπως οι υποδοχείς VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-α/β, και c-kit. Αναστέλλοντας τη δράση των εν λόγω ενζύμων, μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου κυρίως με αναστολή της αγγειογένεσης. αντινεοπλασματικό, αναστολέας πρωτεϊνικών κινασών
Αναστροζόλη (anastrozole)		1,2,4, τριαζόλιο	Είναι ένας ισχυρός και σε μεγάλο βαθμό εκλεκτικός μη-στεροειδής αναστολέας της αρωματάσης και ανασοτροποποιητικό αναστολείς ενζύμων στεροειδών και μη
Λετροζόλη (letrozole)		1,2,4, τριαζόλιο	Είναι ένας μη στεροειδής αναστολέας της αρωματάσης. Αναστέλλει το ένζυμο αρωματάση, δεσμεύοντας ανταγωνιστικά την αίμη του κυτοχρώματος P450 της αρωματάσης, με αποτέλεσμα τη μείωση της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων σε όλους τους ιστούς όπου αυτό υπάρχει. αντινεοπλασματικό και ανασοτροποποιητικό αναστολείς ενζύμων στεροειδών και μη

2.2. Πυραζόλια

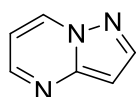
Από τα μόρια που φέρουν έναν πενταμελή αζαετεροκυκλικό δακτύλιο ως κύριο συστατικό της δομής τους, τα **πυραζόλια** έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν την πλέον αξιοσημείωτη βιολογική δράση. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι η βασική τους δομή (δακτύλιος) αποτελείται από τρεις άνθρακες και δυο άζωτα σε γειτονικές θέσεις. Άλλα σημαντικά μόρια-παράγωγα των πυραζολίων είναι το **ινδαζόλιο** (πυραζόλιο συμπυκνωμένο με ένα βενζολικό δακτύλιο, **Εικόνα 2.2**) και τα παράγωγα της **πυριμιδίνης**, τα οποία –μεταξύ άλλων– αποτελούν κύριο συστατικό του DNA (προϊόντα συμπύκνωσης ενός πυραζολικού δακτυλίου με έναν εξαμελή αζαετεροκυκλικό).



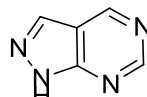
πυραζόλιο



1H-ινδαζόλιο



πυραζολο[1,5a]πυριμιδίνη



1H-πυραζολο[3,4d]πυριμιδίνη

Εικόνα 2.2. Πυραζόλιο και παράγωγα

Τα πυραζολικά παράγωγα εμφανίζουν ένα ευρύτατο φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως αντιβακτηριακή, αντιπυρετική, αντι-φλεγμονώδης, υπογλυκαιμική, αντι-υπεργλυκαιμική, αναλγητική και κατευναστική-υπνωτική (Flynn et al., 1991; Ashton et al., 1993; Fink et al., 1999; Kraichely et al., 2000; Stauffer et al., 2000; Stauffer et al., 2001; Baraldi et al., 2005).

Όμως, στις μέρες μας έχει καταδειχθεί ότι διάφορα πυραζολικά παράγωγα είναι δυνατόν να επιδείξουν και κάποιες –περισσότερο εξειδικευμένες– φαρμακευτικές δράσεις. Για παράδειγμα, το γνωστό φυσικό αντικαρκινικό βότανο **κουρκουμίνη**, έχει αποτελέσει αφετηρία για τη σύνθεση πυραζολικών παραγώγων με αξιοσημείωτες αντιοξειδωτικές ιδιότητες και σημαντική δράση κατά νοσημάτων, όπως το Αλτσχάιμερ και το Πάρκισσον.(Narlawar et al., 2008) Τέλος, πολλά πυραζολικά παράγωγα έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν σημαντικές αντικαρκινικές, αντιλευχαιμικές, αντιπολλαπλασιαστικές και αντι-αγγειογενετικές δράσεις, οι οποίες έχουν πιστοποιηθεί από σειρά μελετών και δημοσιευμένων εργασιών (Bouabdallah et al., 2007; Havrylyuk et al., 2009; Christodoulou et al., 2010; Lv et al., 2010; Shaharyar et al., 2010; Chauhan et al., 2014).

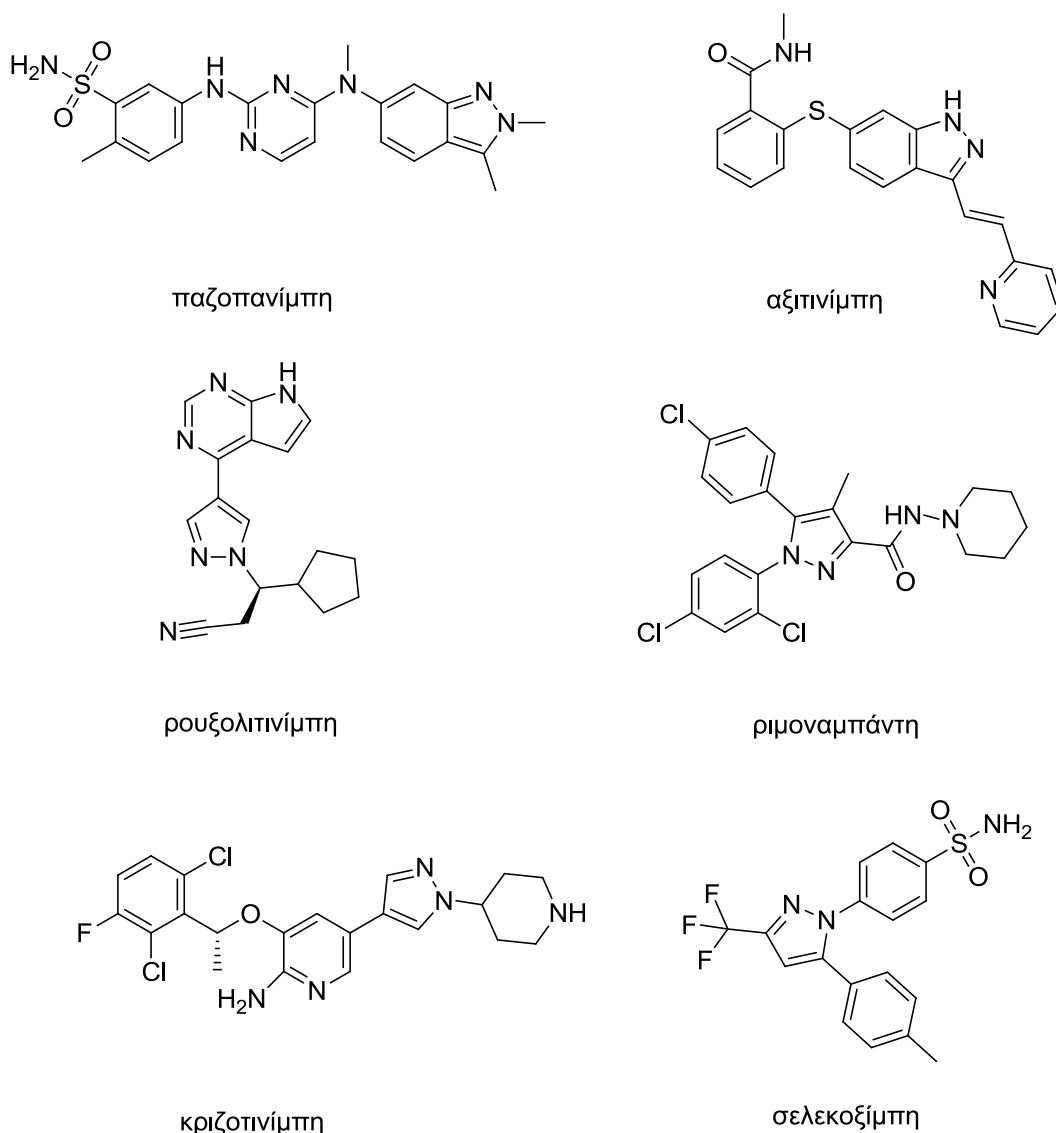
2.3. Πυραζολικά αντι-νεοπλασματικά φάρμακα

Έως σήμερα, ένας σημαντικός αριθμός μορίων που εμπεριέχουν στη δομή τους πυραζολικούς δακτυλίους έχουν λάβει έγκριση για κυκλοφορία ως αντικαρκινικά φάρμακα (**Εικόνα 2.3**). Χαρακτηριστικά μόρια της κατηγορίας αυτής είναι τα:

- I. **Pazopanib** (παζομπανίμπη) ή GW786034 (Votrient™), της GlaxoSmithKline (GSK), ένας ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης (TKI) στους υποδοχείς VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-α / β και c-kit. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι διαθέτει άριστη αντι-αγγειογενετική και αντικαρκινική δράση (Bhargava and Robinson, 2011). Έχει λάβει έγκριση προς χρήση –από πολυάριθμες ρυθμιστικές διοικητικές αρχές σε όλο τον κόσμο (συμπεριλαμβανομένου του FDA, Οκτώβριος 2009)– ως φάρμακο για την πρώτη γραμμή θεραπεία του προχωρημένου νεφροκυτταρικού καρκίνου (**RCC**) και για ασθενείς με προχωρημένη νόσο που έχουν προηγουμένως λάβει θεραπεία με κυτοκίνες. Επίσης ενδείκνυται για τη θεραπεία ενήλικων ασθενών με επιλεγμένους τύπους προχωρημένου Σαρκώματος Μαλακών Μορίων (**STS**). (European Medicines Agency, 2015) Τέλος, συνεχίζονται οι μελέτες και για τη διερεύνηση της δράσης του έναντι άλλων μορφών καρκίνου, όπως για παράδειγμα του μαστού (Slamon et al., 2008) και του πνεύμονα. (Altorki et al., 2008)

- II. **Celecoxib** (σελεκοξίμπη) με την εμπορική ονομασία ACRALEX ή ONCENAL των Bayer Hellas ή Bayer Ltd αντίστοιχα και CELECOXIB της Teva Pharmaceuticals. Είναι μια τρικυκλική ένωση που εμπεριέχει έναν πυραζολικό δακτύλιο και επιδεικνύει σημαντική βιολογική δράση. Ανήκει στην κατηγορία των αντιφλεγμονωδών φαρμάκων που είναι ειδικοί αναστολείς της COX-2 και χρησιμοποιείται κλινικά για την θεραπεία της οστεοαρθρίτιδας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Stam et al., 2012). Όμως, ως αναστολέας της COX-2 εντάσσεται και στην κατηγορία των αντινεοπλασματικών φαρμάκων, παρουσιάζοντας διαπιστωμένη αντι-αγγειογενετική και αντικαρκινική δράση κατά του καρκίνου του παγκρέατος (Wei et al., 2004; Xu et al., 2011). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι πρόσφατες μελέτες για το μόριο αυτό αναφέρουν ότι η αντικαρκινική του δράση δεν θα πρέπει να σχετίζεται με την αναστολή της COX-2, καθώς παράγωγά του όπως το 2,5, διμεθυλο-celecoxib παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση απουσία αναστολής του COX-2 (Chuang et al., 2008; Schonthal, 2012).
- III. **Ruxolitinib** (ρουξολιτινίμπη) με εμπορικό όνομα Jakafi™ της Novartis που δρα αναστέλλοντας μια ομάδα ενζύμων γνωστών ως κινασών Janus (**JAK**), τα οποία συμμετέχουν στην παραγωγή και στην αύξηση των αιμοσφαιρίων. Εγκρίθηκε από το FDA το 2011 ως αντικαρκινικό φάρμακο προς χορήγηση σε ασθενείς με προχωρημένη μυελοϊνώση, έναν καρκίνο του αίματος με περιορισμένη δυνατότητα πρόγνωσης και περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές (Mascarenhas and Hoffman, 2012).
- IV. **Crizotinib** (κριζοτινίμπη) με εμπορική ονομασία Xalkri™ της Pfizer, ένας αναστολέας της ATK που συμμετέχει στην ανάπτυξη και εξάπλωση συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων, αλλά και την ανάπτυξη των νέων αιμοφόρων αγγείων που τα τροφοδοτούν. Έλαβε έγκριση από τον FDA ως αντικαρκινικό φάρμακο τον Νοέμβριο του 2011 και δρα αναστέλλοντας κυρίως την κινάση της τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένων περιπτώσεων στις οποίες υπάρχει γενετική μετάλλαξη. Έτσι, περιορίζει την ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων στον ALK-θετικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Forde and Rudin, 2012).
- V. **Axitinib** (αξιτινίμπη) ή AG013736 με εμπορικό όνομα Inlyta της Pfizer, η οποία δρα αναστέλλοντας τις κινάσες της τυροσίνης που εντοπίζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων στους υποδοχείς του «αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα» (VEGF). Οι υποδοχείς αυτοί συμμετέχουν στον

πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων, καθώς και στην ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τους όγκους. Αναστέλλοντας τη δράση των συγκεκριμένων υποδοχέων, η αζιτινίμη μειώνει τη ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου, ενώ διακόπτει και την παροχή αίματος στα καρκινικά κύτταρα αποτρέποντας την ανάπτυξή τους. Εγκρίθηκε από τον FDA τον Ιανουάριο του 2012 για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (**RCC-Renal Cell Carcinoma**) εάν προηγουμένως αποτύχει η θεραπεία με sunitinib ή κυτοκίνες (Rugo et al., 2005; Food and Drug Administration, January 27, 2012).



Εικόνα 2.3. Πυραζολικά μόρια με αντικαρκινική δράση

2.4 Έρευνες σχετικά με των αντικαρκινική δράση των πυραζολίων

Εκτός από τα επισήμως εγκεκριμένα φάρμακα που κυκλοφορούν ήδη στην αγορά, υπάρχει ένα επιπλέον πλήθος συνθετικών πυραζολικών μορίων για τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι διαθέτουν αξιόλογη αντικαρκινική και αντι-αγγειογενετική δράση και ήδη βρίσκονται στα στάδια I, II η ακόμα III των κλινικών δοκιμών. Από το πλήθος των πυραζολίων που εντάσσονται στα παραπάνω μόρια, οι **πυραζολοπυριμιδίνες** –και ειδικά οι πυραζολο[3,4-d] πυριμιδίνες– αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα παραγώγων του πυραζολίου που επιδεικνύουν σημαντικότερη αντικαρκινική και αντι-αγγειογενετική δράση, (Manetti et al., 2007; Chauhan and Kumar, 2013) δρώντας σε διαφορετικούς στόχους όπως οι VEGF και PDGF, οι ιντεγκρίνες και οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP), (Cheung et al., 2005; Penning et al., 2006; Wasyluk et al., 2008). Μεταξύ των μορίων της κατηγορίας αυτής είναι το **TAK-593**, ένα υποκατεστημένο πυράζολο καρβοξαμίδιο που ανακαλύφθηκε και συντέθηκε από την ερευνητική ομάδα Ιαπωνικής φαρμακευτικής εταιρείας Takeda Oncology Company. Πρόκειται για έναν ισχυρότατο αναστολέα του VEGFR2 και του υποδοχέα που προέρχεται από αιμοπετάλια αυξητικού παράγοντα (PDGFR β) που δρα μέσω ενός μηχανισμού πρόσδεσης σε δύο στάδια (Iwata et al., 2011; Miyamoto et al., 2013). Σε χαμηλή δοσολογία, το TAK-593 επιδεικνύει μια σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του VEGFR2, παρόμοια με εκείνη του axitinib και είναι σε κλινική μελέτη για τη θεραπεία ποικίλων συμπαγών όγκων. Σύμφωνα με το National Cancer Institute, έχει κλείσει η μελέτη φάσης I και βρίσκεται σε εξέλιξη η φάση II (National Cancer Institute, 2015).

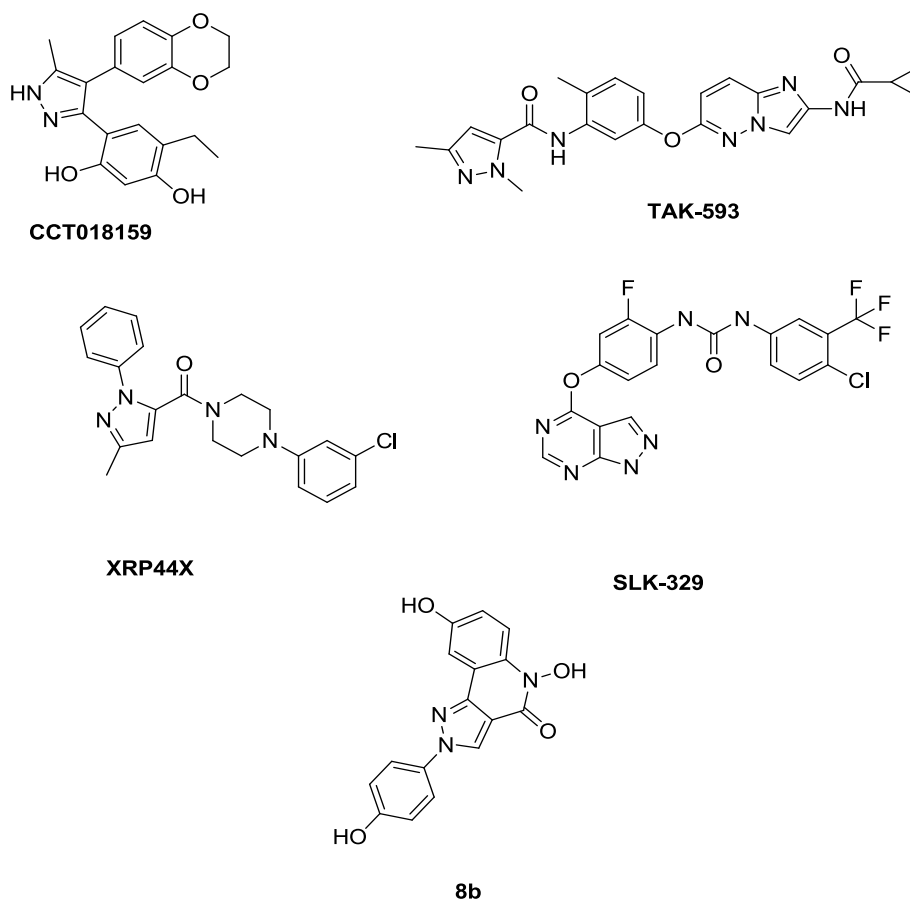
Δυο επιπλέον μόρια της κατηγορίας αυτής με πυραζολικό δακτύλιο είναι το **CCT018159** που αποτελεί έναν ειδικό αναστολέα της Hsp90 με αποδεδειγμένη αντι-αγγειογενετική δράση και επίσης βρίσκεται στη φάση των κλινικών μελετών (Cheung et al., 2005). Η πυραζόλη **XRP44X**, είναι ένα μόριο που αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα μεταγραφής Net, με αποτέλεσμα τη καταστολή της ανάπτυξης των πολλαπλών τύπων κυττάρων ($IC_{50} \sim 2 \mu M$) και την αναστολή της αγγειογένεσης. Η ένωση αυτή έχει προσδιοριστεί ότι εμφανίζει μια σημαντική αντι-αγγειογενετική δράση (Wasyluk et al., 2008).

Μια άλλη κατηγορία πυραζολίων με αντι-πολλαπλασιαστική και αντι-αγγειογενετική δράση είναι οι πυραζολο[4,3-c]κινολίνες, μόρια με αξιοσημείωτη

ανασταλτική δράση έναντι του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών και άλλων καρκινικών κυττάρων, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες, όπως το μόριο **8b** που συμπεριλαμβάνεται στη διδακτορική του M. Christodoulou που εκπονήθηκε στο ΓΠΑ στο πλαίσιο μελετών της ερευνητικής μας ομάδας (Christodoulou et al., 2010).

Τέλος, το **SKLB-329** εμφανίζει μια σημαντική ανασταλτική δράση κατά της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων, της μετανάστευσης, της εισβολής και του σχηματισμού μικροσωληνίσκων, ενώ έδειξε ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση στο διαγονιδιακό μοντέλο ψάρι zebra (Zhong et al., 2014).

Στην παρακάτω **Εικόνα 2.4** παρουσιάζεται η δομή των προαναφερόμενων πυραζολικών μορίων που έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν σημαντικές αντικαρκινικές δράσεις.



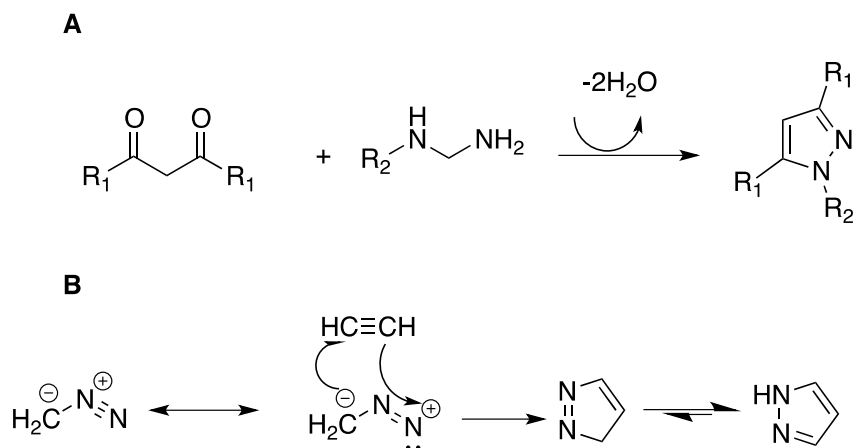
Εικόνα 2.4. Πυραζολικά μόρια με αντικαρκινική δράση που βρίσκονται υπό εξέλιξη κλινικών δοκιμών και το μόριο **8b** που έχει αναπτυχθεί από την ερευνητική μας ομάδα.

2.5 Μέθοδοι παρασκευής νέων πυραζολικών παραγώγων

Όπως τονίστηκε προηγουμένως, η σύνθεση νέων βιοδραστικών πυραζολικών παραγώγων αποτελεί ερευνητικό στόχο πολλών ερευνητικών ομάδων που δραστηριοποιούνται στον τομέα της συνθετικής οργανικής-φαρμακευτικής χημείας. Είναι λοιπόν ευνόητο η βιβλιογραφία να βρίθεται από αναφορές και περιγραφές για τη σύνθεση αναρίθμητων πυραζολίων με πολυποίκιλες δομές. Ο συνηθέστερος τρόπος σχηματισμού ενός πυραζολικού δακτυλίου είναι η συμπύκνωση ενός 1,3-δικετονικού παραγώγου με υδραζίνη ή μονοϋποκατεστημένα παράγωγά της (Σχήμα 2.1.-πορεία Α). Το 1883 ο Knorr συνέθεσε τις πρώτες ενώσεις με το σύστημα αυτό, χρησιμοποιώντας την αντίδραση της ακετο-οξικού αιθυλέστερα με τη φαινυλο υδραζίνη. Συγκεκριμένα, συνέθεσε την 1-φαινυλο-3-μεθυλο-πυραζολόνη την οποία ονόμασε σύμφωνα με την πρότασή του να ονοματίζονται ως πυραζόλια όλα τα μόρια της κατηγορίας αυτής (Knorr, L., 1883).

Με την πάροδο των ετών, η συνθετική αυτή οδός «κέρδισε» ένα σημαντικό εύρος χρήσης, εξαιτίας των περιορισμένων συνθετικών βημάτων που απαιτεί και των καλών αποδόσεων που εξασφαλίζει. Αντίθετα, οι μέθοδοι που δεν χρησιμοποιούν τις 1,3-δικετόνες απαιτούν σαφώς περισσότερα συνθετικά στάδια (Aggarwal et al., 2003). Άλλες σημαντικές συνθετικές οδοί είναι η 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη των διαζωαλκανίων (ή άλλων διαζοπαραγώγων) σε αλκύνια (Σχήμα 2.1, πορεία Β) και η αντίδραση των α,β-ακόρεστων αλδευδών και κετονών με υδραζίνες.

Τέλος, άλλες σχετικές μέθοδοι δημοσιεύτηκαν I) το 2005 από τον Ahmed και συνεργάτες, οι οποίοι παρασκεύασαν πυραζολικά παράγωγα μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης τεσσάρων συστατικών, συγκεκριμένα ενός τελικού αλκυνίου, υδραζίνης, μονοξειδίου του άνθρακα και καταλύτη παλλαδίου, (Mohamed Ahmed et al., 2005) και II) τους Panda και Jena το 2012 οι οποίοι συνέθεσαν πυραζόλια από διαρυλο υδραζόνες και διόλες, με καταλύτη το χλωριούχο σίδηρο (Panda and Jena, 2012).



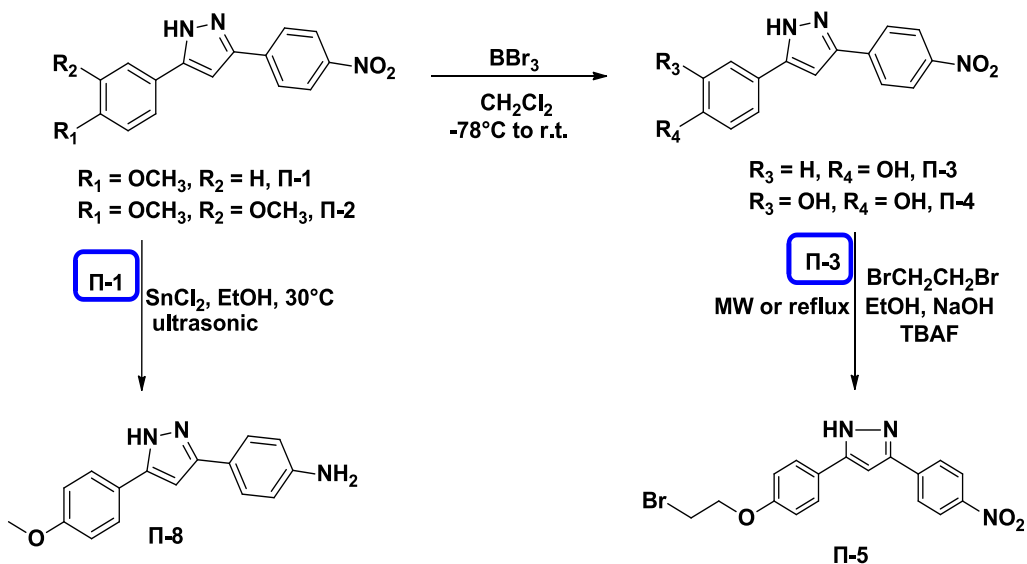
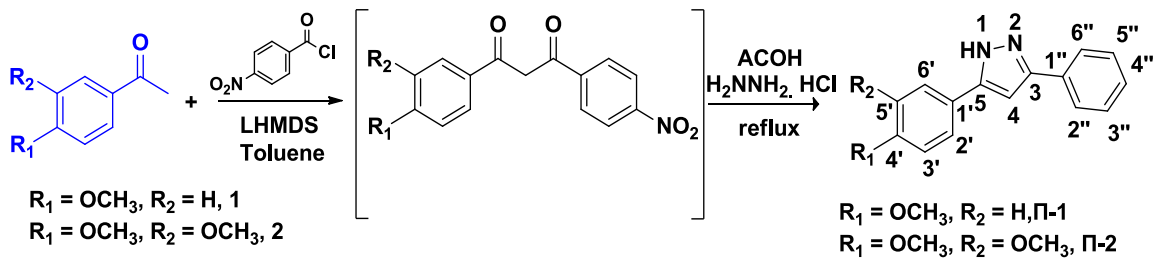
Σχήμα 2.1. Σύνθεση πυραζολίων. Α. μέσω της συμπύκνωσης των 1,3 δικετονών με την υδραζίνη Β. μέσω 1,3 διπολικής κυκλοπροσθήκης διαζωαλκανίων σε αλκύνια

2.6. Σύνθεση των νέων αζαετεροκυκλικών μορίων

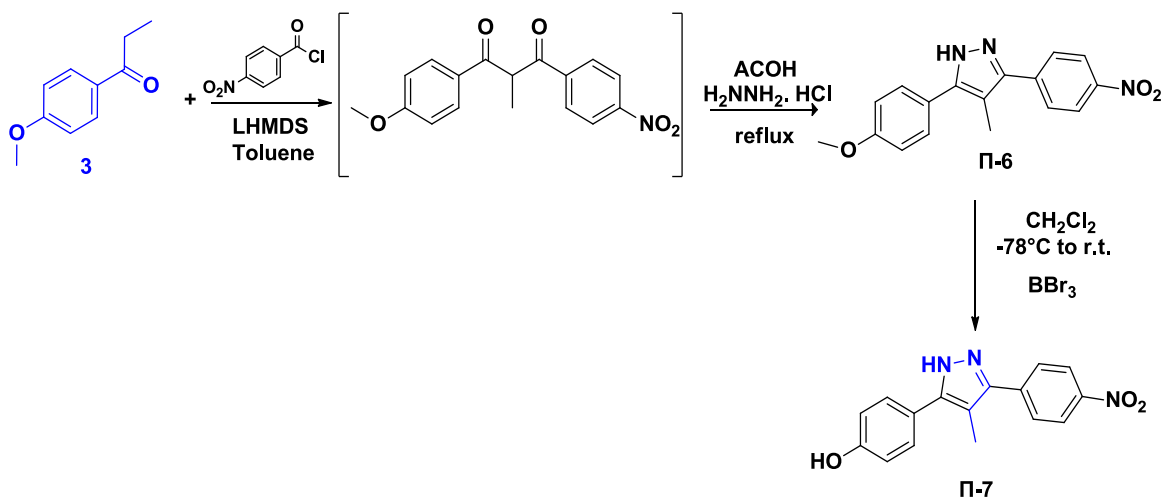
Στο πλαίσιο διενέργειας της διατριβής που αποσκοπούσε στην ανάπτυξη νέων μορίων με αντιαγγειογενετική δράση, σχεδιάστηκε η σύνθεση μιας σειράς νέων αζαετεροκυκλικών παραγώγων. Η μεθοδολογία που επιλέχθηκε να εφαρμοστεί αφορά στη συμπύκνωση των υδραζινών με ποικίλες 1,3-δικετόνες, αφού η συνθετική αυτή διαδικασία αποτελεί την πλέον αποδοτική μέθοδο παρασκευής των επιθυμητών πυραζολικών δακτυλίων (Bishop et al., 2004; Bhat et al., 2005; Mohamed Ahmed et al., 2005). Παράλληλα, συντέθηκαν μόρια των οποίων ο σκελετός αποτελεί συνδυασμό πυραζολικού και ινδολικού δακτυλίου, στοχεύοντας στην περαιτέρω βελτίωση των αντικαρκινικών και αντιπολλαπλασιαστικών τους ιδιοτήτων. Η σύνθεση των παραγώγων αυτών επιτεύχθηκε είτε μέσω συμβατικής χημικής σύνθεσης ή με τη χρήση της ακτινοβολίας μικροκυμάτων (MW). Η δομή των νέων μορίων επιβεβαιώθηκε με πειράματα ποικίλα πειράματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και η βιοδραστικότητά τους αξιολογήθηκε μέσω *in vitro* δοκιμασιών πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και του σχηματισμού μικροσωληνίσκων.

2.7 Σύνθεση νέων πυραζολικών και ινδαζολικών παραγώγων

Για τη σύνθεση των νέων πυραζολικών παραγώγων χρησιμοποιήθηκαν ως πρώτες ύλες-υποστρώματα οι ακετοφαινόνες **1**, **2** και **3** (Σχήμα 2.2 και Σχήμα 2.3). Οι ακετοφαινόνες αυτές σε άνυδρες συνθήκες και παρουσία της βάσης εξαμεθυλοδισιλαζένιο του λιθίου (LHMDS), χάνουν το όξινο α-καρβονυλικό τους πρωτόνιο παράγοντας ένα ανιόν, το οποίο στη συνέχεια είναι δυνατόν να συμπυκνωθεί με το 4-νιτροβενζοϋλοχλωρίδιο δίνοντας ένα 1,3-δικετονικό παράγωγο (Heller and Natarajan, 2006). Τέλος, η *in situ* συμπύκνωση του τελευταίου με υδραζίνη οδήγησε σε ένα στάδιο στο σχηματισμό-παραλαβή των επιθυμητών πυραζολικών μορίων **Π-1**, **Π-2** και **Π-6** (με συνολική απόδοση 45-50%). Επίσης, διερευνήθηκε η ακυλίωση της φαινόλης **Π-3** χρησιμοποιώντας ως αλκυλιωτικό το 1,2-διβρωμοαιθάνιο, παρουσία τετραβουτυλοφθοριούχου αμμωνίου TBAF (Brik et al., 2005; Dong et al., 2009). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η χρήση του TBAF βελτίωσε κατά πολύ την απόδοση της αντίδρασης, ενώ η ακτινοβολήση με μικροκύματα (MW) ελάττωσε σημαντικά το χρόνο της αντίδρασης από 24 ώρες σε περίπου 30 λεπτά. Όμως, γενικά η απόδοση της αντίδρασης αυτής ήταν χαμηλή. Τέλος, προκειμένου να διερευνηθεί η αναγωγή της αρωματικής νίτρο ομάδας του πυραζολίου **Π-1**, δοκιμάστηκαν τρεις μέθοδοι αναγωγής-υδρογόνωσης (χρησιμοποιώντας Fe, SnCl₂ ή Pd/C). Η καλύτερη απόδοση επιτεύχθηκε με τη χρήση όταν του SnCl₂ ως αναγωγικού μέσου με την αντίδραση να λαμβάνει χώρα με ακτινοβολήση με μικροκύματα (Gamble et al., 2007).

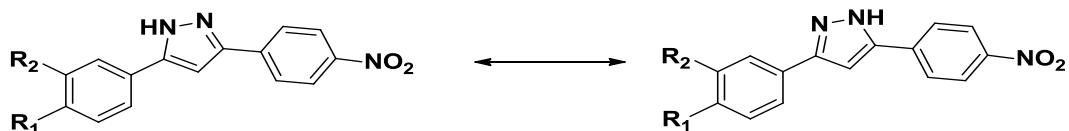


Σχήμα 2.2. Σύνθεση πυραζολικών παραγώγων από πρόδρομες ακετοφαινόνες



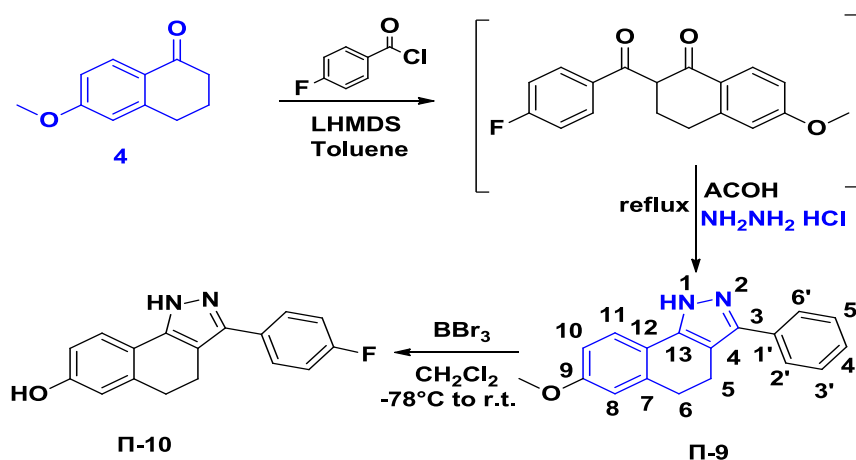
Σχήμα 2.3. Σύνθεση πυραζολικών παραγώγων από πρόδρομη προπιοφαινόνη

Με δεδομένο ότι ο μηχανισμός που εμπλέκεται στη συμπύκνωση της υδραζίνης χωρεί μέσω της πυρηνόφιλης προσβολής των καρβονυλίων, η χρήση των δικετονών ως υποστρώματα ενέχει την πιθανότητα σχηματισμού ταυτομερών μορφών. Ωστόσο, η μετανάστευση των πρωτονίων μεταξύ των ατόμων αζώτου του πυραζολικού δακτυλίου προς σχηματισμό παραγώγων με παρόμοιες ηλεκτρονικές ιδιότητες είναι πολύ ταχεία, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διάκριση των επιμέρους ταυτομερών, τα οποία δεν μπορούν να απομονωθούν ή/και ανιχνευτούν με φάσματα NMR (**Σχήμα 2.4**) (Dzvinchuk and Lozinski, 2011). Το γεγονός αυτό εξηγεί την αδυναμία ανίχνευσης του πυραζολικού πρωτονίου στα παράγωγα που συντέθηκαν με τη χρήση κλασσικών πειραμάτων NMR, μιας ή/και δύο διαστάσεων (1D ή 2D NMR).

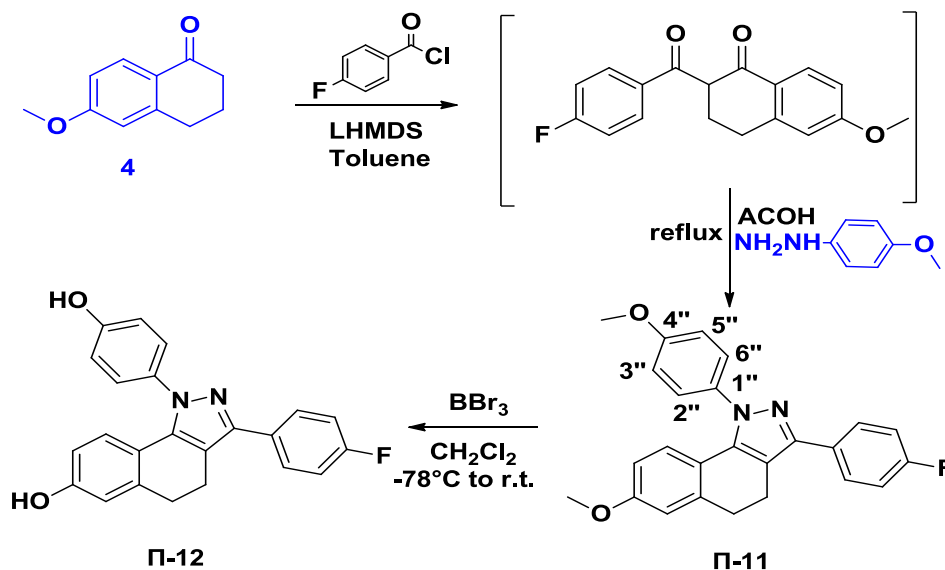


Σχήμα 2.4. Ταυτομερικές μορφές για νέα πυραζολικά παράγωγα που συντέθηκαν

Παρόμοια συνθετική στρατηγική χρησιμοποιήθηκε και για τη συμπύκνωση της 6-μεθοξυ-1-τετραλόνης **4** με υδραζίνη ή τη 4-μεθοξυ-φαινυλυδραζίνη (**Σχήμα 2.5** και **Σχήμα 2.6**). Με τη μέθοδο αυτή έγινε δυνατή η σύνθεση ποικίλων νέων παραγώγων του ινδαζολίου, δηλαδή μορίων που προέρχονται από τη συμπύκνωση της τετραλόνης με το πυραζόλιο. Στην περίπτωση αυτή, τα μόρια-στόχοι συντέθηκαν σε πολύ καλύτερες συνολικές αποδόσεις (63-70%).

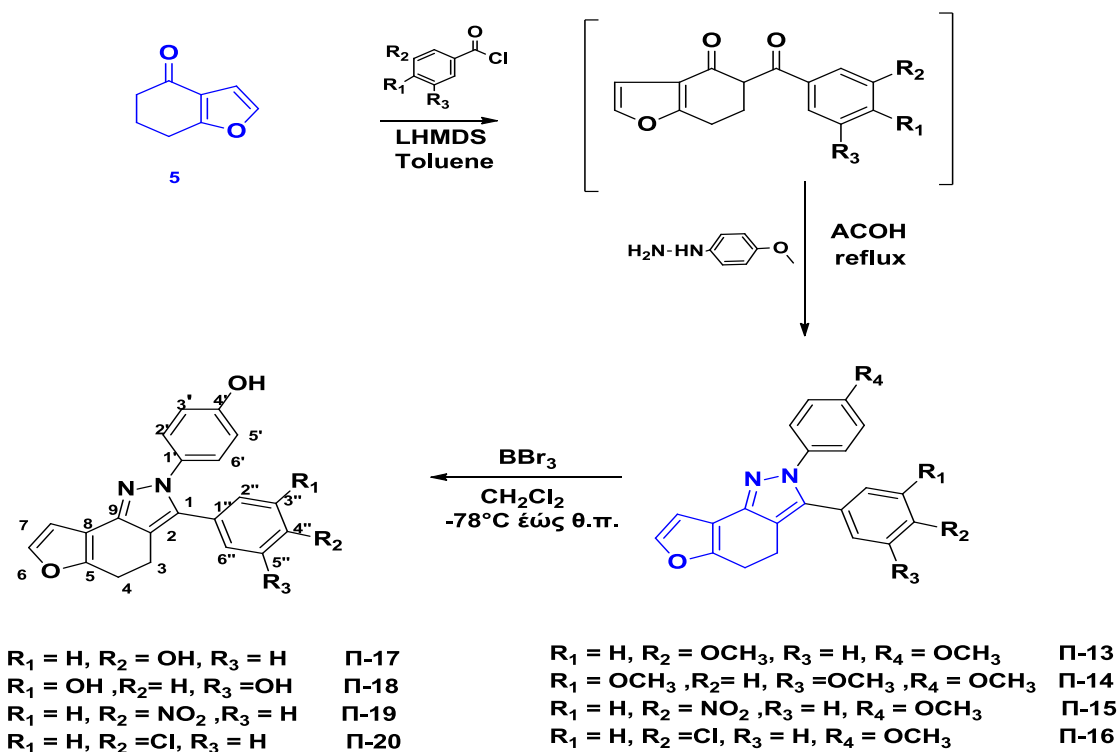


Σχήμα 2.5. Σύνθεση ινδαζολικών παραγώγων από την 6-μεθοξυ-1 τετραλόνη και υδροχλωρική υδραζίνη



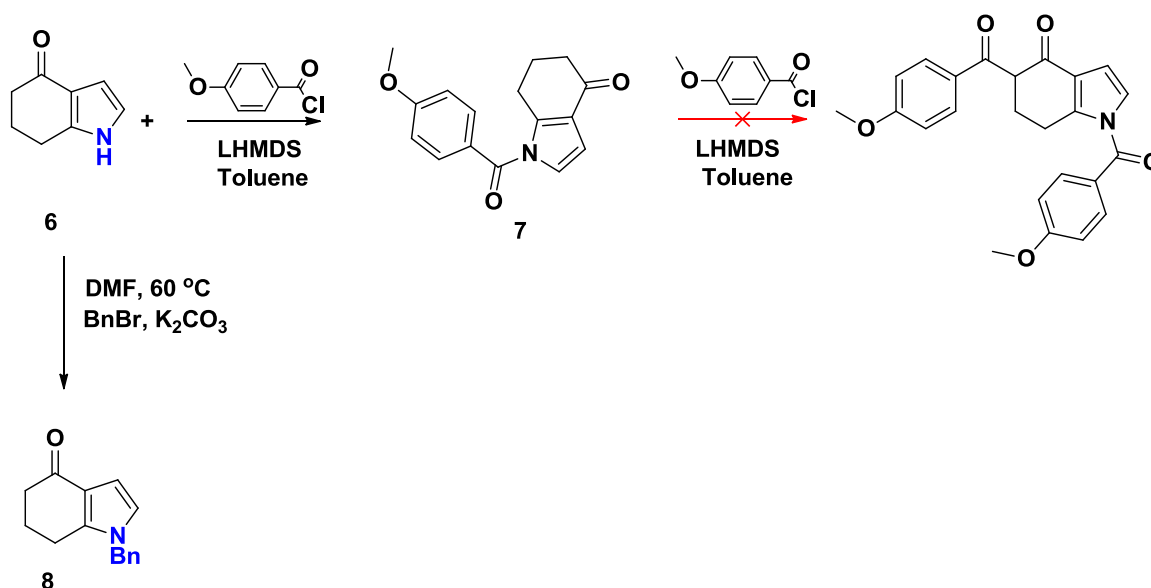
Σχήμα 2.6. Σύνθεση ινδαζολικών παραγώγων από την 6-μεθοξυ-1 τετραλόνη και μεθοξυ φαινυλιδραζίνη

Η συμπύκνωση της 6,7-διϋδροϊσοβενζοφουρανο-4(5H)-όνης **5** με τη 4-μεθοξυφαινυλοϋδραζίνη οδήγησε στο σχηματισμό των συμπυκνωμένων ετεροκυκλικών δακτυλίων που απεικονίζονται στο **Σχήμα 2.7**, με αποδόσεις 55-70 %.



Σχήμα 2.7. Σύνθεση ινδαζολικών παραγώγων με πρώτη ύλη την 6,7 διυδρο-βενζοφουρανόνη

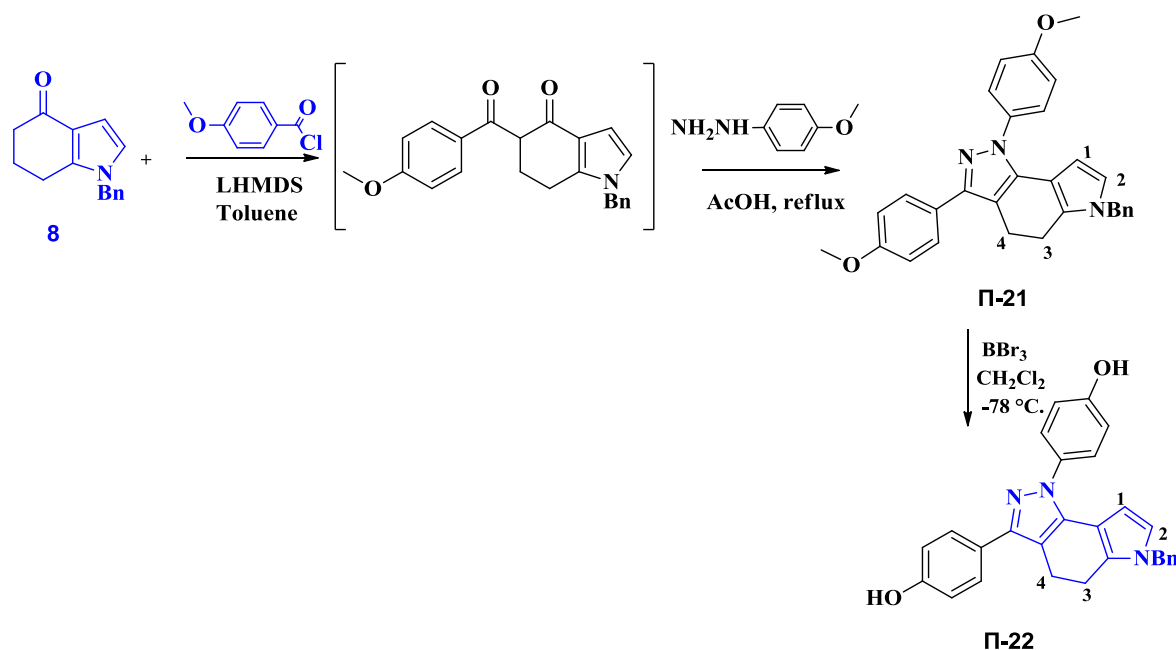
Τέλος, σε μια προσπάθεια να διευρυνθεί η ομάδα των κετονών που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα, διερευνήθηκε η χρήση της 6,7-διυδρο-1*H*-ινδολ-4(5*H*)-όνης, **6**, με στόχο τη σύνθεση μιας σειράς νέων ινδαζολικών παραγώγων. Όμως, λόγω της παρουσίας του πρωτονίου που φέρει το άτομο του αζώτου, τελικά η αντίδραση της **6** με το π-ανισούλοχλωρίδιο οδήγησε στο επιλεκτικό σχηματισμό μόνο της μεθοξυβενζυλοϊνδολόνης **7**, η δομή της οποίας επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης. Η προσπάθεια να συντεθεί η επιθυμητή δικετόνη σε δεύτερο στάδιο, δηλαδή μέσω της συμπύκνωσης του μορίου **7** με το π-ανισούλοχλωρίδιο, ήταν και αυτή ανεπιτυχής (**Σχήμα 2.8**). Έτσι, αποφασίστηκε να προηγηθεί η βενζυλίωση της 6,7-διυδρο-1*H*-ινδολ-4(5*H*)-όνης **6** –για να απομακρυνθεί το ινδολικό πρωτόνιο– και στη συνέχεια να επιχειρηθεί η συμπύκνωση της βενζυλιωμένης ινδολόνης **8** προϊόντος, ευελπιστώντας ότι έτσι θα γίνει δυνατή η συνθετική προσέγγιση των νέων παραγώγων της ινδαζόλης.



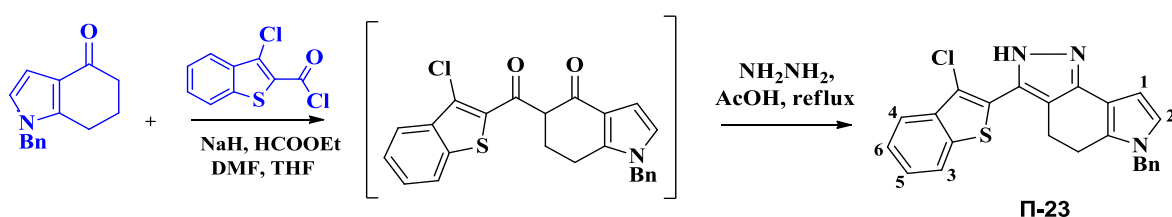
Σχήμα 2.8. Βενζυλίωση της 6,7-διυδρο-1*H*-ινδολ-4(5*H*)-όνης, **6**

Πράγματι, η αντίδραση της βενζυλιωμένης ινδολόνης **8** με π-ανισούλοχλωρίδιο και βενζοθειοφαινοκαρβονυλοχλωρίδιο οδήγησε στο σχηματισμό των επιθυμητών αντίστοιχων 1,3-δικετονικών παραγώγων, τα οποία στη συνέχεια με *in situ* συμπύκνωση με τις μεθοξυφαινυλο υδραζίνη ή υδραζίνη τελικά οδήγησαν σε ένα στάδιο στο σχηματισμό των επιθυμητών πυραζολικών

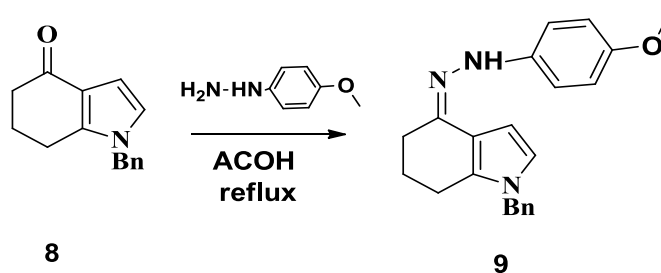
παραγώγων Π-21 και Π-23 αντίστοιχα (Σχήμα 2.9 και Σχήμα 2.10). Οι μέτριες αποδόσεις του συνθετικού αυτού μονοπατιού μπορεί να εξηγηθούν εάν αναλογιστούμε ότι είναι δυνατή και η παράλληλη διενέργεια της ανταγωνιστικής αντίδρασης σχηματισμού της ιμίνης **9** της μη ακυλιωμένης ινδολόνης **8**, γεγονός που μειώνει την τελική απόδοση της αντίδρασης (Σχήμα 2.11). Τέλος, το παράγωγο Π-21 αποπροστατεύτηκε σχεδόν ποσοτικά δίνοντας το διφαινολικό παράγωγο Π-22.



Σχήμα 2.9. Σύνθεση ινδαζολικών παραγώγων από βενζυλιωμένη ινδολόνη, **8** και μεθοξυ βενζοϋλο χλωριδίο

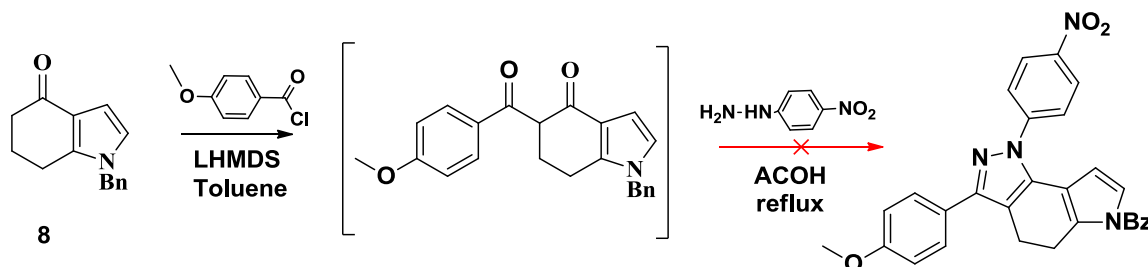


Σχήμα 2.10. Σύνθεση ινδαζολικών παραγώγων από βενζυλιωμένη ινδολόνη, **8** και θειοφαινικό καρβονυλο χλωριδίο



Σχήμα 2.11. Ανταγωνιστική αντίδραση σχηματισμού της ιμίνης **9**

Πρέπει να σημειωθεί πως και η απόπειρα σύνθεσης του νιτροϊνδαζολο παραγώγου που απεικονίζεται στο **Σχήμα 2.12**, μέσω συμπύκνωσης με την π-νιτρο-φαινυλοϋδραζίνη, δεν ήταν επιτυχής. Η αποτυχία αυτή αποδίδεται πιθανότατα στην παρουσία της ηλεκτρονιοελκτικής νιτρομάδας σε θέση παρα στον βενζολικό δακτύλιο, η οποία εξασθενίζει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα του αντιδραστήριου.



Σχήμα 2.11. Αποτυχία σύνθεσης του νιτρο-ινδαζολο παραγώγου

2.8. Αποτίμηση της βιολογικής δράσης των νέων πυραζολικών και ινδαζολικών παραγώγων

Στο πλαίσιο διενέργειας της διατριβής προσδιορίστηκε η κυτταροστατική και αντιαγγειογενετική δράση των νέων μορίων που συντέθηκαν. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι για τη μελέτη διαφόρων σταδίων της αντιαγγειογενετικής διαδικασίας έχουν αναπτυχθεί αρκετές *in vitro* και *in vivo* δοκιμασίες, συμπεριλαμβανομένου των προσδιορισμών του πολλαπλασιασμού των

ενδοθηλιακών κυττάρων και του σχηματισμού των μικροσωληνίσκων (Kleinman and Martin, 2005; Crawford et al., 2011). Όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα διασπείρονται στο επάνω μέρος του matrigel, το οποίο είναι ένα πρωτεϊνικό μίγμα πλούσιο σε λαμινίνη [το οποίο εκκρίνεται από κύτταρα σαρκόματος ποντικού **Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)**] σχηματίζονται μικροσωληνίσκοι-δομές που είναι συγκρίσιμες με τα αιμοφόρα αγγεία. Το δε matrigel χρησιμοποιείται εκτενώς για το σκοπό αυτό, αφού αποτελεί το κατάλληλο υπόστρωμα στο οποίο τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσκολλώνται, μεταναστεύουν και σχηματίζουν μορφές σαν τριχοειδείς αυλούς μέσα σε 18 ώρες (Kleinman and Martin, 2005).

2.8.1. Αναστολή πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών και των καρκινικών κυττάρων

Η κυτταροστατική δράση των νέων πυραζολίων της διατριβής προσδιορίστηκε σε δυο ενδοθηλιακές κυτταρικές σειρές (HMEC-1 και MBEC) και δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές (HeLa και MCF-7). Τα σχετικά αποτελέσματα συνοψίζονται στον **Πίνακα 2.2**, δείχνοντας ότι τα ινδαζολικά παράγωγα της 6-μεθοξυ-1-τετραλόνης (**Π-9**, **Π-10**, **Π-11** και **Π-12**) εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη κυτταροστατική δράση κατά όλων των κυτταρικών σειρών, με τιμές IC_{50} (ανασταλτική συγκέντρωση 50%) να κυμαίνονται από 1.5 σε 40 μM . Συγκεκριμένα, οι ενώσεις **Π-9** και **Π-10** εμφάνισαν τη μεγαλύτερη δράση έναντι των σειρών MCF-7, με τιμές IC_{50} $1.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ και $5.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$, αντίστοιχα. Το μόριο **Π-12** επίσης ήταν δραστικό στη σειρά MCF-7, ενώ παράλληλα επέδειξε μέτρια δραστηριότητα έναντι των μικροαγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων HMEC-1. Συνολικά, η ένωση **Π-9** αποδείχθηκε 2-5 φορές περισσότερο δραστική σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μόρια, με τιμές IC_{50} να κυμαίνονται από $1.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$ (MCF-7 cells) έως $13 \pm 3.2 \mu\text{M}$ (HMEC-1). Αντίθετα, τα παράγωγα **Π-1**, **Π-2**, **Π-5**, **Π-6**, **Π-7** και **Π-8** δεν ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συγκεντρώσεις κατώτερες των 100 μM .

Πίνακας 2.2. Κυτταροστατική δραστηριότητα των πυραζολίων σε ενδοθηλιακές και καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Ένωση	*IC ₅₀ (μM)			
	HMEC-1	MBEC	Hela	MCF-7
Π-1	> 100	> 100	> 100	> 100
Π-2	> 100	> 100	> 100	> 100
Π-3	>100	33.2	29.7	>100
Π-5	≥ 100	> 100	≥ 100	> 100
Π-6	≥ 100	> 100	≥ 100	> 100
Π-7	≥ 100	> 100	≥ 100	77 ± 19
Π-8	> 100	> 100	> 100	> 100
Π-9	13 ± 3.2	11 ± 2.8	13 ± 1.9	1.5 ± 0.4
Π-10	21 ± 9.2	13 ± 2.5	21 ± 3.1	5.6 ± 2.5
Π-11	36 ± 18	39 ± 4.6	40 ± 4.2	34 ± 2.2
Π-12	17 ± 6.1	25 ± 4.8	40 ± 1.4	11 ± 1.5

Τα πυραζολικά παράγωγα που προέρχονται από τη βενζοφουρανόνη και προστετευμένη ινδολόνη μελετήθηκαν ως προς την κυτταροστατική τους δράση σε κάποιες επιπλέον ενδοθηλιακές κυτταρικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Το σύνολο των κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν ήταν: 1) Hela: human cervical carcinoma cells (κύτταρα ανθρώπινου τραχηλικού καρκινώματος), 2) HMEC-1: human microvascular endothelial cells (ανθρώπινα μικροαγγειακά επιθηλιακά κύτταρα), 3) MBEC: mouse brain endothelial cells (εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα επίμυες), 4) MCF-7: human breast carcinoma cells (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού), 5) BAEC: bovine aortic endothelial cells (ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοοειδών), L1210: Murine leukemia cells (κύτταρα λευχαιμικά ποντικού), 6) CEM: Human T-lymphocyte cells (ανθρώπινα T-λεμφοκύτταρα), και 7) HepG2: Liver hepatocellular carcinoma (ανθρώπινα

καρκινικά κύτταρα επίμυων). Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αυτών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.3** υποδεικνύοντας ως πλέον δραστικά τα παράγωγα **Π-13**, **Π-14** και **Π-19** με τιμές IC_{50} να κυμαίνονται από 22 ± 10 (HMEC-1) σε 71 ± 6 (BAEC) και από 17 ± 0 (CEM) σε 91 ± 27 (Hela) μM . Αντίθετα, τα **Π-15**, **Π-16** και **Π-18** δεν κατάφεραν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συγκεντρώσεις κατώτερες των $100 \mu\text{M}$ για τις ενδοθηλιακές σειρές και $250 \mu\text{M}$ για τις καρκινικές σειρές.

Πίνακας 2.3. Κυτταροστατική δραστηριότητα των βενζοφουρανικών πυραζολίων σε ενδοθηλιακές και καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Ένωση	* IC_{50} (μM)							
	HMEC-1	MBEC	BAEC	CEM	Hela	MCF-7	HepG2	L1210
Π-13	41 ± 4		48 ± 3	23 ± 4	91 ± 27			24 ± 3
Π-14	39 ± 3		71 ± 6	21 ± 3	41 ± 15			23 ± 1
Π-15	> 100		> 100	> 250	> 250			> 250
Π-16	> 100		> 100	85 ± 30	102 ± 13			82 ± 12
Π-17	43 ± 1	> 100	≥ 100	78 ± 12	> 100	> 100		92 ± 1
Π-18	34 ± 5	43 ± 5	> 100	> 250	33 ± 7	14 ± 5		> 250
Π-19	33 ± 5	41 ± 7	41 ± 14	17 ± 0	20 ± 0	47 ± 9		22 ± 1
Π-20	22 ± 10		> 100	48 ± 17	85 ± 15			97 ± 5
Π-21	> 100	> 100			12.9 ± 3.2	19.8 ± 5.9	33.2 ± 6.5	
Π-22	34.5 ± 5	43 ± 5			3.3 ± 0.9	5.0 ± 2.1	3.0 ± 1.1	
Π-23	78 ± 20	41 ± 7			6.9 ± 2.4	12.2 ± 9	7.1 ± 5.0	

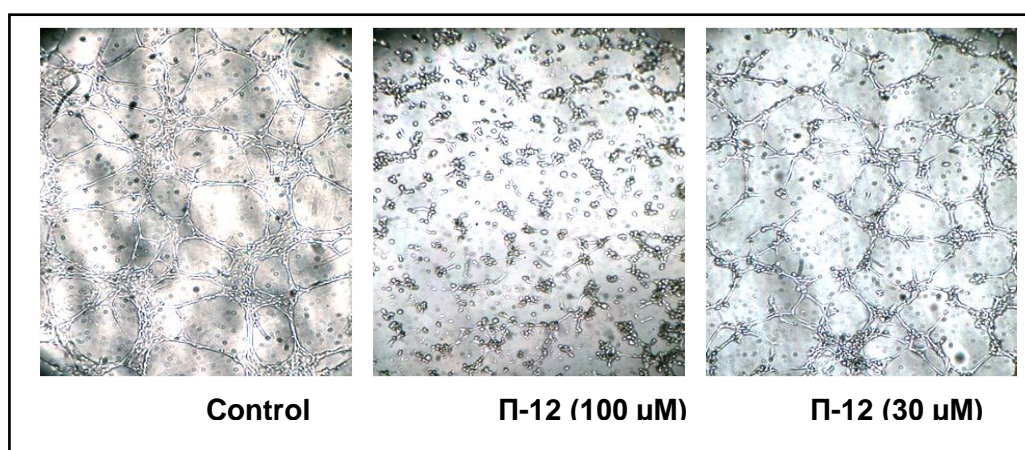
* IC_{50} = συγκέντρωση ένωσης που μειώνει των κυτταρικό πολλαπλασιασμό κατά 50%

Με βάση τις τιμές που παρουσιάζονται στους **Πίνακες 2.2** και **2.3** παρατηρούμε πως έναντι της καρκινικής σειράς MCF-7 το μόριο **Π-9** επέδειξε την καλύτερη δράση με τιμή $IC_{50} = 1.5 \pm 0.4$.

2.8.2. Αναστολή σχηματισμού μικροσωληνίσκων σε ενδοθηλιακά κύτταρα

Η αντιαγγειογενετική δράση των πυραζολικών παραγώγων των υπό εξέταση μορίων αξιολογήθηκε με δοκιμές αναστολής σχηματισμού μικροσωληνίσκων, σε διάφορες συγκεντρώσεις της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς HMEC-1. Τα κύτταρα της σειράς αυτής διασπάρθηκαν στο πάνω μέρος του matrigel απουσία ή παρουσία πυραζολικών παραγώγων και η αγγειογενετική τους ικανότητα αξιολογήθηκε μετά από 6h επώασης. Τα σχετικά αποτελέσματα εκφράζονται στον **Πίνακα 2.4** ως σκορ σε κλίμακα από 0 έως 3, δείχνοντας ότι στη συγκέντρωση των 100 μM όλες οι νέες ενώσεις αναστέλλουν το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η δράση των περισσότερων πυραζολικών παραγώγων χάνεται και μόνο το διφαινολικό πυραζόλιο **Π-12** διατηρεί τη δράση του και σε συγκέντρωση 10 μM , υποδεικνύοντας την καταλληλότητά του να θεωρηθεί ως μόριο οδηγός (lead compound) για την ανάπτυξη νέων μορίων με πιθανή αντιαγγειογενετική δράση.

Είναι αντιπροσωπευτικές οι φωτογραφίες που ελήφθησαν από το μικροσκόπιο κατά την εξέλιξη του πειράματος αναστολής των μικροσωληνίσκων για το μόριο **Π-12** στις συγκεντρώσεις 100 και 30 μM σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (control, DMSO).



Εικόνα 2.5. Σχηματισμός μικροσωληνίσκων σε matrigel για το μόριο **Π-12** σε σχέση με το control.

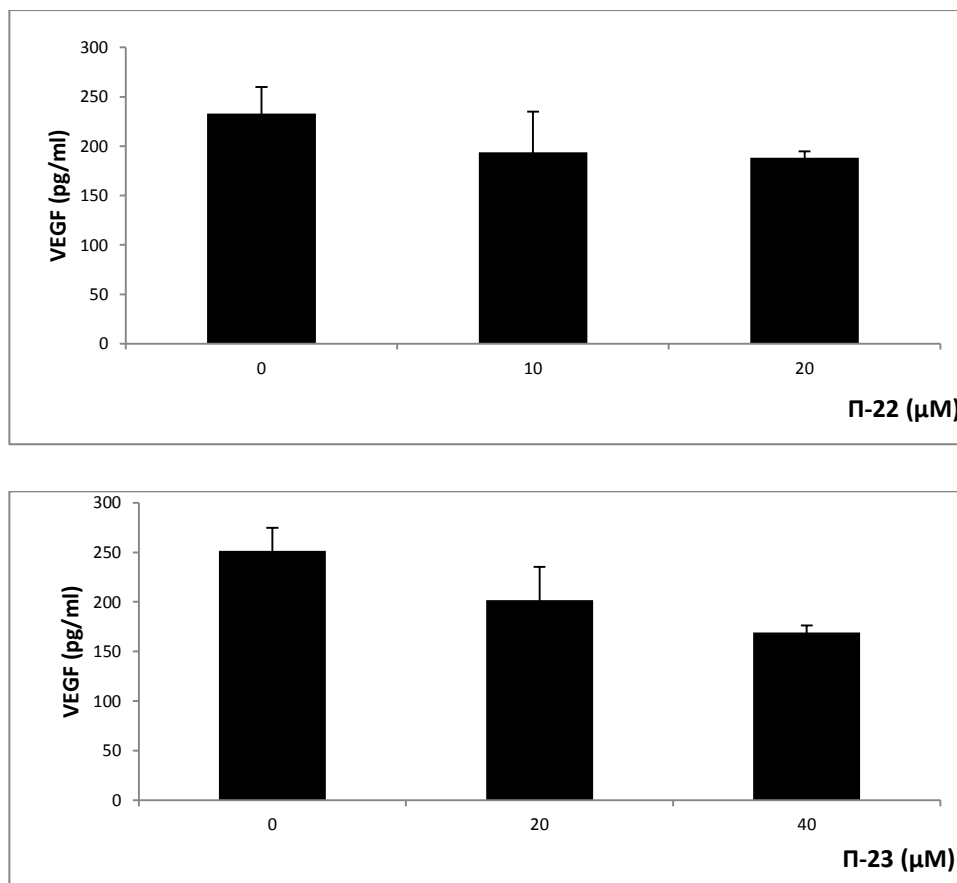
Πίνακας 2.4. Εκτίμηση της *in vitro* αντι-αγγειογενετικής δράσης των πυραζολικών παραγώγων χρησιμοποιώντας δοκιμασία σχηματισμού μικροσωληνίσκων σε HMEC-1 ενδοθηλιακές κυτταρικές σειρές.

Ένωση	Σχηματισμός μικροσωληνίσκων HMEC - 1 (*Σκορ)			
	100 μ M	30 μ M	10 μ M	3 μ M
Π-1	3	3		
Π-2	1.5	3		
Π-3	2	3		
Π-4	1.5	3		
Π-5	0.5-1	2	3	
Π-6	1.5	2.5	3	
Π-7	1-1.5	1.5-2	3	
Π-9	2	2.5	3	
Π-10	3	3		
Π-12	0.5	1.5	2.5	3
Π-21	3	3		
Π-22	2.0	2.5	3	
Π-23	1.5	2	3	

*Σκορ 0 = πλήρη αναστολή; 1 = μερικοί μικροσωληνίσκοι; 2 = αναστολή; 3 = καμία αναστολή

2.8.3 Μοριακός μηχανισμός δράσης των δραστικών πυραζολίων

Για να αποσαφηνιστεί ο μοριακός μηχανισμός της αντι-αγγειογενετικής δράσης των νέων πυραζολίων, έγιναν δοκιμασίες προσδιορισμού της επίδρασής τους στην έκφραση του VEGF σε HeLa καρκινικά κύτταρα. Από τις ενώσεις που μελετήθηκαν, ότι οι **Π-22** και **Π-23** προσδιορίστηκαν ως ισχυροί αναστολείς του VEGF σε καλλιέργειες HeLa κυττάρων (**Εικόνα 2.6**). Η ένωση **Π-22** αποδείχθηκε ως η πλέον δραστική, αφού στη συγκέντρωση 20 μ M παρεμποδίζει τα επίπεδα του VEGF κατά 35%.



Εικόνα 2.6. Επιδράσεις των παραγώγων Π-22 και Π-23 επί της έκφρασης του VEGF στα κύτταρα HeLa.

2.9 Συζήτηση- Συμπεράσματα

Συντέθηκαν όλα τα πυραζολικά και ινδαζολικά παράγωγα που είχαν τεθεί ως μόρια-στόχοι, χρησιμοποιώντας ένα αποτελεσματικό συνθετικό πρωτόκολλο που βασίζεται στη γνωστή αντίδραση συμπύκνωσης δικετονικών συστημάτων με υδραζίνη και υδραζινικά παράγωγα. Το πρωτόκολλο αυτό απαιτεί ελάχιστα συνθετικά στάδια και χρησιμοποιεί ως πρώτες ύλες κετόνες που είναι εμπορικά διαθέσιμες και πολύ φτηνές. Έτσι, οι συνθέσεις του συγκεκριμένου κεφαλαίου είναι ιδιαίτερα «φιλικές» και μπορεί επάνω τους να βασιστεί η σύνθεση νέων αναλόγων των δραστικών μορίων. Το χαρακτηριστικό αυτό αποτελεί σημείο-κλειδί για τη σύνθεση μεγάλης κλίμακας, έναν διαρκή στόχο των συνθετικών χημικών στην φαρμακευτική έρευνα.

Λεπτομερέστερα, η σύνθεση των νέων μορίων επιτεύχθηκε με αντίδραση ενός σταδίου της αρχικής κετόνης, δηλαδή του ανισοϋλοχλωριδίου, που αποτελεί τη βάση της δημιουργίας του ενδιαμέσου και την εν συνεχεία *in situ* συμπύκνωση

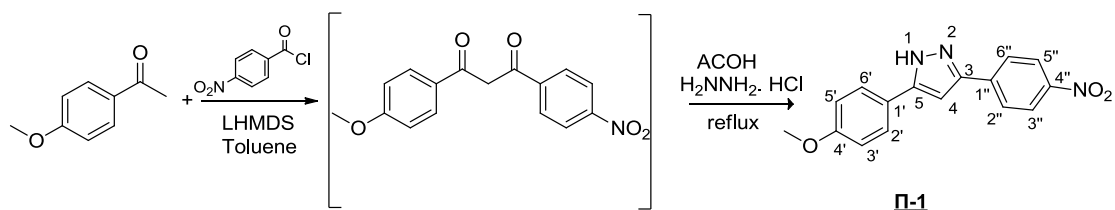
που οδηγεί στα πυραζολικά παράγωγα. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων είναι ικανοποιητικές, με εξαίρεση τα στάδια της παρασκευής του τελικού βρώμο-παραγωγού **Π-5** ή ορισμένες αντιδράσεις αποπροστασίας. Για τις αντιδράσεις αυτές δοκιμάστηκαν μια σειρά εναλλακτικές μέθοδοι, χωρίς όμως σημαντική αύξηση της απόδοσής τους. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, αλλά και της χαμηλής βιοδραστικότητας που επέδειξε το προϊόν **Π-5**, δεν έγινε περαιτέρω προσπάθεια σύνθεσης των αντίστοιχων βρωμοπαραγώγων για τα υπόλοιπα φαινολικά πυραζόλια (όπως πχ το **Π-7**).

Σε ότι αφορά τη βιοδραστικότητα των νέων μορίων της διατριβής, τα ινδαζολικά παράγωγα αποδείχθηκαν ιδιαίτερα δραστικά. Το παράγωγο **Π-22** παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης ποικίλων κυτταρικών σειρών, με αντίστοιχες τιμές IC_{50} 3, 3.3 και 5 μ M για τα καρκινικά κύτταρα HepG2, HeLa και MCF-7. Τα παραπάνω αποτελέσματα το καθιστούν ως δυνητικό υπόβαθρο, στη δομή του οποίου μπορούν να σχεδιαστούν ακόμα πιο δραστικά μόρια με πιθανή αντικαρκινική δράση. Επίσης, οι ενώσεις **Π-9** και **Π-10** εμφάνισαν σημαντική δράση έναντι των κυττάρων MCF-7, με τιμές IC_{50} $1.5 \pm 0.4 \mu$ M και $5.6 \pm 2.5 \mu$ M, αντίστοιχα. Όσον αφορά, την αντι-αγγειογενετική δράση των νέων ενώσεων, καταγράφηκε ένα μικτό προφίλ δραστηριότητας αφενός στη δοκιμασία σχηματισμού μικροσωληνίσκων σε HMEC-1 κύτταρα και αφετέρου στη δοκιμασία αναστολής του VEGF. Αναλυτικότερα, η ένωση **Π-23** απεδείχθη ως η πλέον δραστική στη δοκιμασία σχηματισμού μικροσωληνίσκων, ενώ η αντι-αγγειογενετική δράση της ένωσης **Π-22** πιστοποιήθηκε ότι χωρεί μέσω του μονοπατιού αναστολής της έκφρασης του VEGF. Επομένως τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν πως ο πυραζολικός δακτύλιος που είναι εμπλουτισμένος και έχει μορφή ινδαζολικού πυρήνα εμφανίζει ενισχυμένη αντικαρκινική σε σχέση με τον προγενέστερο. Άλλωστε, απεδείχθη ότι στο σύνολό τους τα πυραζολικά παράγωγα αποτυγχάνουν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συγκεντρώσεις κατώτερες των 100 μ M.

Για την περαιτέρω αξιοποίηση των δομών αυτών, θα πρέπει σε μελλοντικές προσπάθειες να δοκιμαστεί η στοχευμένη μοριακή μοντελοποίηση-μηχανική, σε συνδυασμό με εικονικές προσεγγίσεις διαλογής, προκειμένου να σχεδιαστούν νέα παράγωγα που ενδέχεται να διαθέτουν ενισχυμένη αντικαρκινική δράση. Μία τέτοια προσέγγιση αναπτύσσεται με λεπτομέρεια στο Κεφάλαιο 3.

2.10. Πειραματικό μέρος –Σύνθεση πυραζολίων

5-(4-Μεθοξυφαινυλο)-3-(4-νιτροφαινυλο)-1Η-πυραζόλιο, Π-1



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
45%	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	295.29	112	R _f = 0.46 Hex/EtOAc 4:6

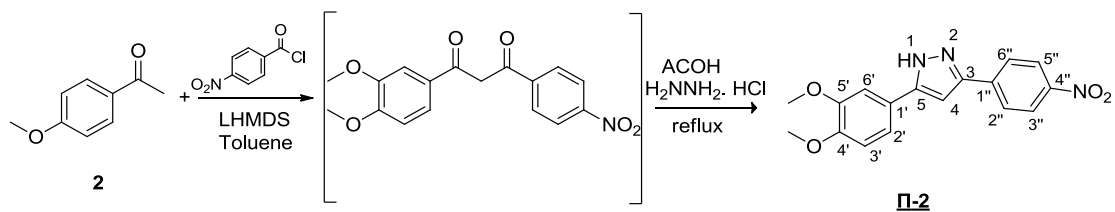
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 4-μεθοξυακετοφαινόνης (0.5 g, 3.3 mmol), **1** σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψυχθεί στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση και σε μια δόση, 3.5 mL LHMDS (1.0 M σε THF, 3.5 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη διαλύματος 4-νιτροβενζοΐλο χλωριδίου (0.31 g, 1.65 mmol) σε 3 mL DMF, η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθενται διαδοχικά 4 mL AcOH, 17 mL EtOH και 4 mL THF, ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα στο οποίο προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδραζίνης (0.7 mL, 13.2 mmol). Το μίγμα αναδεύεται υπό βρασμό για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Η αντίδραση διακόπτεται με τη προσθήκη NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOAc (3 × 10 mL). Η οργανική στοιβάδα εκπλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με κινητή φάση n-hexane/EtOAc (7.5:2.5) δίνοντας το προϊόν **Π-1** (0.44 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 3.86 (3H, s, OCH₃), 7.06 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.23 (1H, s, H-4), 7.80 (2H, d, J 8.5 Hz, H-2', H-6'), 8.17 (2H, d, J 9.0 Hz, H-2'', H-6''), 8.30 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3'', H-5'').

Στοιχεική Ανάλυση για $C_{16}H_{13}N_3O_3$: Θεωρητικά: C, 65.08; H, 4.44; N, 14.23;
Πειραματικά: C, 65.08; H, 4.44; N, 14.23.

5-(3,4-Διμεθοφαινυλο)-3-(4-νιτροφαινυλο)-1Η-πυραζόλιο, Π-2



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
47%	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₄	325.32	121	R _f = 0.38 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

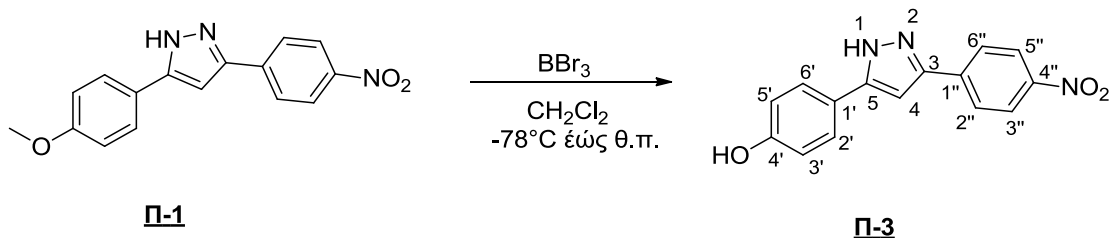
Το προϊόν **Π-2** παρασκευάστηκε όπως και το **Π-1** από τα μόρια 2,5-διμεθοξυακετοφαινόνη (0.5 g, 2.8 mmol, **2** και 4-νιτροβενζοΐλο χλωριδίο (0.26 g, 1.4 mmol). Το υπόλειμμα ανακρυσταλλώνεται από Et₂O δίνοντας κίτρινο κρυσταλλικό προϊόν **Π-2** (0.43 g)

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.91 (3H, s, OCH₃), 7.07 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'), 7.27 (1H, s, H-4), 7.42 (1H, dd, *J* 2.0, 8.5 Hz, H-2'), 7.49 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-6'), 8.17 (2H, d, *J* 9.0 Hz, H-2'', H-6''), 8.31 (2H, d, *J* 9.0 Hz, H-3'', H-5'').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 55.3 (2×OCH₃), 100.1 (C-4), 109.3 (C-6'), 112.1 (C-3'), 117.9 (C-2'), 123.9 (C-3'', C-5''), 125.8 (C-2'', C-6''), 127.8 (C-1'), 139.8 (C-1''), 145.9 (C-5), 146.9 (C-4''), 148.6 (C-3), 149.7 (C-4'), 150.1 (C-5').

Στοιχεική Ανάλυση για C₁₇H₁₅N₃O₄: Θεωρητικά: C, 62.76; H, 4.65; N, 12.92; Πειραματικά: C, 62.70; H, 4.60; N, 12.82.

4-[3-(4-Νιτροφαινυλο)-1Η-πυραζολ-5-υλο]φαινόλη, Π-3



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
93%	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	281.27	110	R _f = 0.2 Hex/EtOAc 5:5

Μέθοδος Παρασκευής:

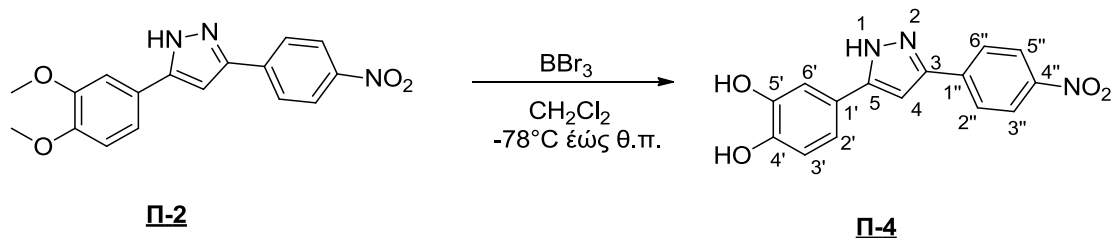
Διάλυμα **Π-1** (0.1 g, 0.34 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (15 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78 °C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr₃ (2.38 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 2.38 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOAc (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται από Et₂O δίνοντας το **Π-3** (0.89 g) ως πράσινο κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 6.97 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.19 (1H, s, H-4), 7.7 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6'), 8.17 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2'', H-6''), 8.31 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'', H-5'').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 100.0 (C-4), 115.3 (C-3' and C-5'), 120.0 (C-1'), 123.5 (C-3'' and C-5''), 126.2 (C-2'', C-6''), 126.7 (C-2', C-6'), 137.9 (C-1''), 146.2 (C-5), 147.4 (C-4''), 148.5 (C-3), 157.9 (C-4').

Στοιχεική Ανάλυση για C₁₅H₁₁N₃O₃: Θεωρητικά: C, 64.05; H, 3.94; N, 14.94; Πειραματικά: C, 64.00; H, 3.99; N, 14.79.

4-[3-(4-Νιτροφαινυλο)-1Η-πυραζολ-5-υλο]βενζενο-1,2-διόλη, Π-4



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₄	297.27	114	R _f = 0.1 Hex/EtOAc 4:6

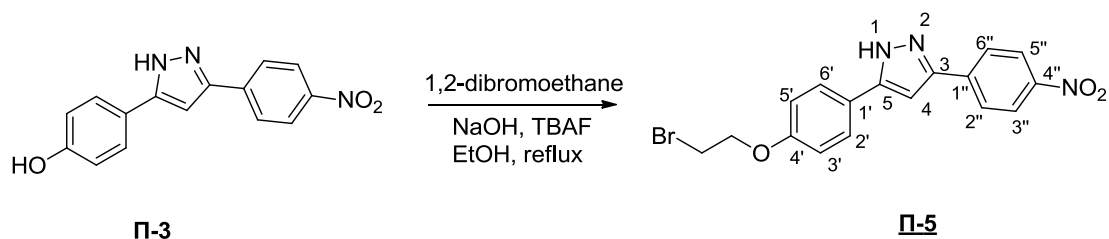
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν **Π-4** προήλθε από την αποπροστασία του **Π-2** (0.1 g, 0.31) όπως περιγράφηκε λεπτομερώς παραπάνω για το προϊόν **Π-3** και ελήφθησαν 0.078 g ασθενούς πράσινου κρυσταλλικού προϊόντος.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 6.93 (1H, d, J 8.5 Hz, H-3'), 7.15 (1H, s, H-4), 7.10 (1H, dd, J 8.5, 2.0 Hz, H-2'), 7.25 (1H, d, J 2.0 Hz H-6'), 8.16 (2H, d, J 8.5 Hz, H-2'', H-6''), 8.33 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3'', H-5'').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₅H₁₁N₃O₄: Θεωρητικά: C, 60.61; H, 3.73; N, 14.14; Πειραματικά: C, 60.55; H, 3.76; N, 14.11.

5-[4-(Βρομομεθοξυ)φαινυλο]-3-(4-νιτροφαινυλο)-1Η-πυραζόλη, Π-5



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
30%	C ₁₆ H ₁₂ BrN ₃ O ₃	374.19	135	R _f = 0.55 Hex/EtOAc 4:6

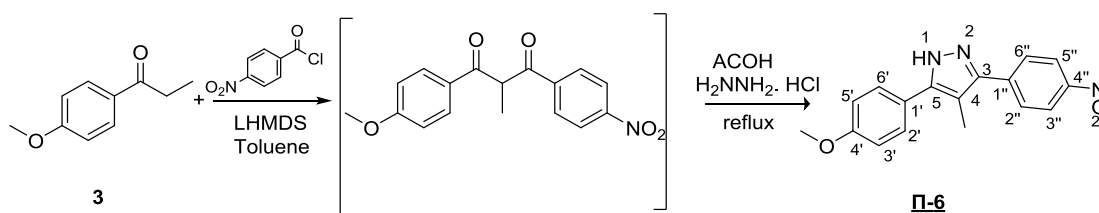
Μέθοδος Παρασκευής:

Μίγμα της φαινόλης **Π-3** (0.1 g, 0.36 mmol), NaOH (0.17 g, 0.43 mmol), TBAF (0.02 mL, 1M σε THF, 0.02 mmol), και EtOH (2 mL) αναδεύεται για 20 min στους 30 °C και όταν φθάσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθεται στάγδην το 1,2-διβρωμοαιθάνιο (0.1 mL, 1.08 mmol) σε χρονικό διάστημα 1h και το μίγμα που σχηματίζεται αναδεύεται με κάθετο ψυκτήρα στους 120 °C για 24 h (ή με χρήση MW στους 50°C για 30'). Το διάλυμα συμπυκνώνεται, διηθείται και εκχυλίζεται με EtOH (10 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με νερό, εξαλατώνεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με Hex/EtOAc 7:3 και ανακρυσταλλώνεται από Et₂O δίνοντας το προϊόν **Π-5** και συγκεκριμένα 30 mg για αντίδραση με ψυκτήρα και 42 mg για αντίδραση με **MW** σαν κίτρινους κρυσταλλούς.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 3.82 (2H, t, *J* 5.5 Hz, -CH₂Br), 4.45 (2H, t, *J* 5.5 Hz, -OCH₂-), 7.11 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.26 (1H, s, H-4), 7.84 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6'), 8.19 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2'', H-6''), 8.32 (2H, d, *J* 9.0 Hz, H-3'', H-5'').

Στοιχεική Ανάλυση για C₁₆H₁₂BrN₃O₃: Θεωρητικά: C, 51.36; H, 3.23; N, 11.23; Br, 20.58; Πειραματικά: C, 51.31; H, 3.13; N, 11.20; Br, 20.62.

5-(4-Μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-3-(4-νιτροφαινυλο)-1Η-πυραζόλιο, Π-6



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
46%	C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₃	309.32	140	R _f = 0.58 Hex/EtOAc 5:5

Μέθοδος Παρασκευής:

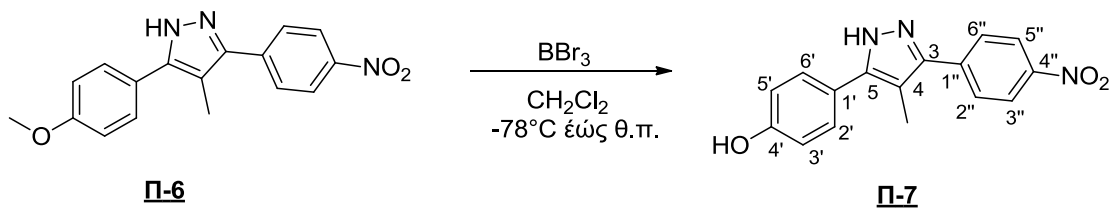
Το προϊόν **Π-6** παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο που αναφέρθηκε για τη σύνθεση των πυραζολίων χρησιμοποιώντας 4-μεθοξυπροπιοφαινόνη, **3** (0.5 g, 3.0 mmol) και 4-νιτροβενζοΐλο χλωρίδιο (0.28 g, 1.5 mmol) ως αντιδρώντα. Το προϊόν που παράχθηκε ανακρυσταλλώθηκε με Et₂O ώστε να παραχθούν 0.46 g του τελικού προϊόντος ως λευκοί κρύσταλλοι.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 2.39 (3H, s, -CH₃), 3.87 (3H, s, OCH₃), 7.09 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.59 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6'), 8.05 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2'', H-6''), 8.34 (2H, d, *J* 9.0 Hz, H-3'', H-5'').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 9.4 (-CH₃), 54.6 (-OCH₃), 11.0 (C-4), 114.2 (C-3' and C-5'), 128.4 (C-1'), 123.5 (C-3'', C-5''), 127.7 (C-2'', C-6''), 129.0 (C-2', C-6'), 140.9 (C-1''), 142.6 (C-5), 146.9 (C-4''), 147.1 (C-3), 159.9 (C-4').

Στοιχεική Ανάλυση για C₁₇H₁₅N₃O₃: Θεωρητικά: C, 66.01; H, 4.89; N, 13.58; Πειραματικά: C, 66.12; H, 4.81; N, 13.47.

4-[4-Μεθυλο-3-(4-νιτροφαινυλο)-1Η-πυραζολ-5-υλο]φαινόλη, Π-7



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
50%	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$	295.29	146	$R_f = 0.2$ Hex/EtOAc 4:6

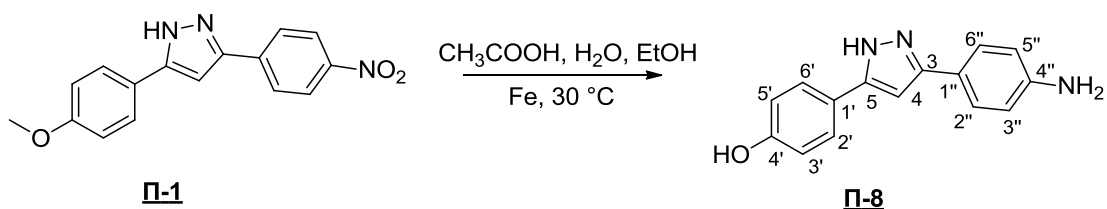
Μέθοδος Παρασκευής:

Παράχθηκε από την αποπροστασία του **Π-6** (0.1 g, 0.32 mmol) δίνοντας το **Π-7** (0.89 g) ως κίτρινο κρυσταλλικό προϊόν.

$^1\text{H NMR}$ (MeOH- d_4) $\delta = 2.34$ (3H, s, -CH₃), 6.97 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.50 (2H, d, J 8.5 Hz, H-2', H-6'), 7.91 (2H, d, J 8.5 Hz, H-2'', H-6''), 8.40 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3'', H-5'').

Στοιχεική Ανάλυση για $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$: Θεωρητικά: C, 65.08; H, 4.44; N, 14.23; Πειραματικά: C, 65.23; H, 4.40; N, 14.30

4-[5-(4-Μεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολ-3-υλο]ανιλίνη, Π-8



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
35% (Α) ή 40% (Β) ή 38% (Γ)	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O	265.31	130	R _f = 0.14 Hex/EtOAc 5:5

Μέθοδος Παρασκευής Α:

Σε διάλυμα του **Π-1** (0.1 g, 0.34 mmol) με τους διαλύτες CH₃COOH (1 mL), EtOH (1 mL) και H₂O (0.5 mL), προστίθεται σκόνη Fe (0.095 g, 17 mmol). Το τελικό μίγμα εκτίθεται σε ακτινοβολία υπερήχου για 1 h στους 30 °C. Το τέλος της αντίδρασης πιστοποιείται με TLC. Το διάλυμα της αντίδρασης φιλτράρεται ώστε να απομακρυνθεί ο Fe και πλένεται με EtOAc (10 mL). Στο διάλυμα προστίθεται KOH 2 M και εκχυλίζεται με EtOH (3×15 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα ανακρυσταλλώνεται με Et₂O δίνοντας το προϊόν **Π-8** (31.6 mg) υπό την μορφή πορτοκαλί κρυστάλλων.

Μέθοδος Παρασκευής Β:

Σε διάλυμα του **Π-1** (0.1 g, 0.34 mmol) με EtOH (2 mL) προστίθεται SnCl₂ (0.64 g, 3.4 mmol). Το τελικό μίγμα εκτίθεται σε ακτινοβολία υπερήχου για 2 h στους 30 °C. Το τέλος της αντίδρασης πιστοποιείται με TLC. Στο διάλυμα προστίθεται KOH 2 M και εκχυλίζεται με EtOH (3×15 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα ανακρυσταλλώνεται με Et₂O δίνοντας το προϊόν **Π-8** (0.036 g) υπό την μορφή πορτοκαλί κρυστάλλων.

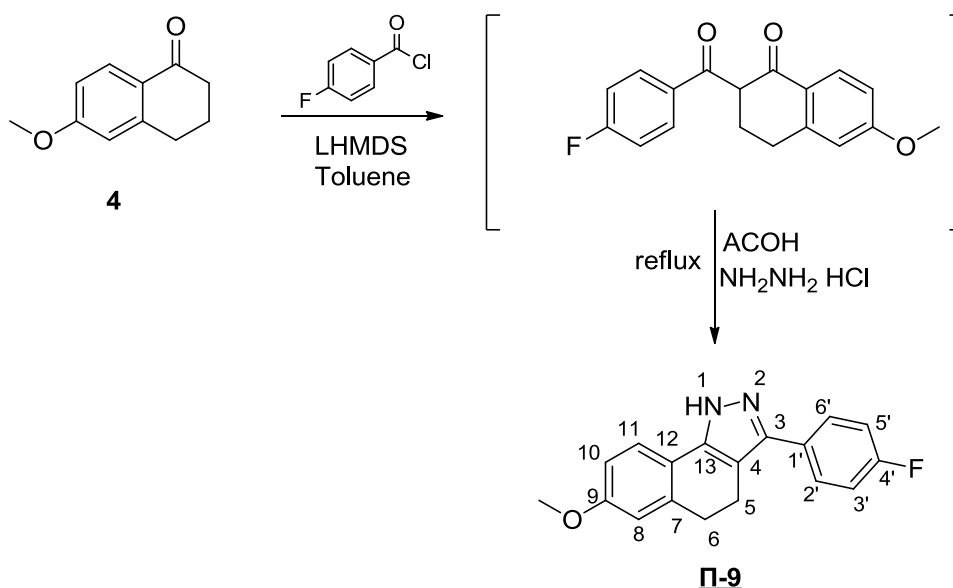
Μέθοδος Παρασκευής Γ:

Ένα διάλυμα της ουσίας **Π-1** (0.1 g, 0.34 mmol) με 10 mg παλλαδίου Pd/C (10%) σε άνυδρο THF (30 mL) υδρογονώνεται για 24 h (1 bar pressure), οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης με TLC. Το μίγμα της αντίδρασης φιλτράρεται με γη διατόμων (celite®) και διαλύεται σε EtOAc (3 × 15 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα ανακρυσταλλώνεται με Et₂O δίνοντας το προϊόν **Π-8** (0.034 g) υπό την μορφή πορτοκαλί κρυστάλλων.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 3.86 (3H, s, OCH₃), 6.76 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'', H-5''), 7.80 (1H, s, H-4), 6.95 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.55 (2H, d, *J* 9.0 Hz, H-2', H-6'), 7.80 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-2'', H-6'').

Στοιχεική Ανάλυση για C₁₆H₁₅N₃O: Θεωρητικά: C, 72.43; H, 5.70; N, 15.84; Πειραματικά: C, 72.23; H, 5.79; N, 15.95.

3-(4-Φθοροφαινυλο)-7-μεθοξυ-4,5-διυδρο-1H-βενζο[g]ινδαζόλιο, Π-9



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
67%	C ₁₈ H ₁₅ FN ₂ O	294.32	151	R _f = 0.37 Hex/EtOAc 4:6

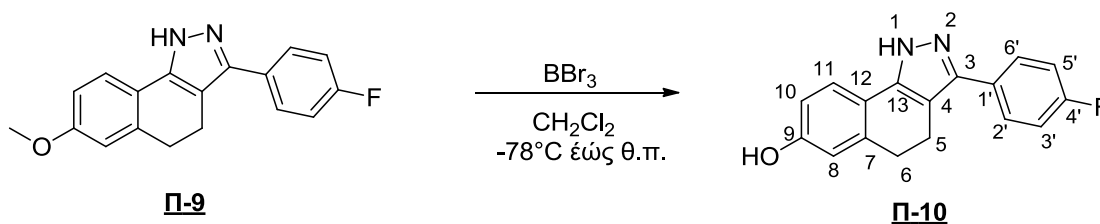
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 6-μεθοξυ-4-τετραλόνης, **4** (0.5 g, 2.8 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (3.0 mL, 1.0 M σε THF, 3.0 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του 4-φθοροβενζοϋλο χλωρίδιο (0.17 mL, 1.4 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL), EtOH (17 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδραζίνης (0.5 mL, 10 mmol). Το μίγμα βράζει υπό ανάδευση και θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOH (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα n-hexane/EtOAc 3:7, δίνοντας το προϊόν **Π-9** (0.55 g) υπό την μορφή κρυστάλλων στο χρώμα της ώχρας.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 2.85 (2H, m, H-5), 2.87(2H, m H-6), 3.78 (3H, -OCH₃), 6.45 (1H, dd, *J* 8.5, 2.4 Hz, H-10), 6.52 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-11), 6.76 (1H, d, *J* 2.4 H-8), 7.49 (2H, m, H-3', H-5'), 7.87 (2H, m, H-2', H-6').

Στοιχειακή ανάλυση για C₁₈H₁₅FN₂O: Θεωρητικά: C, 73.45; H, 5.14; N, 9.52; F, 6.45. Πειραματικά: C, 73.25; H, 5.24; N, 9.46; F, 6.41.

3-(4-Φθοροφαινυλο)-4,5-διυδρο-1H-βενζο[g]ινδαζολ-7-όλιο, Π-10



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
77%	C ₁₇ H ₁₃ FN ₂ O	280.30	148	R _f = 0.36 Hex/EtOAc 5:5

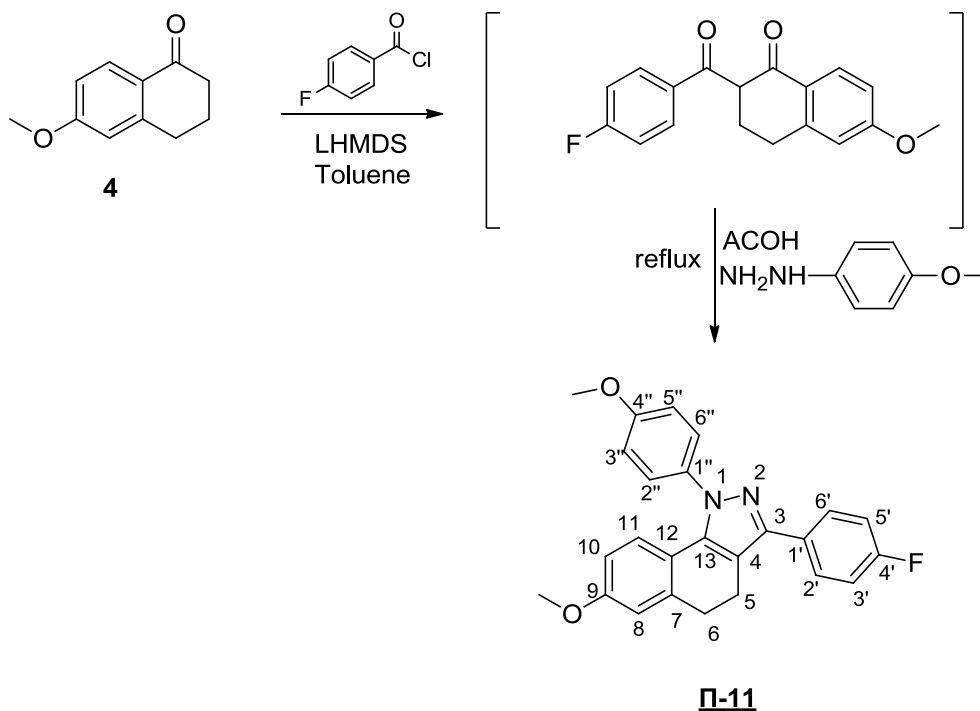
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα του **Π-9** (0.1 g, 0.34 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (15 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78 °C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr₃ (4.74 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 4.74 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOAc (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με Et₂O δίνοντας το **Π-10** (0.07 g) ως πορτοκαλί κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 2.85 (2H, m, H-5), 2.87(2H, m H-6), 6.43 (1H, dd, *J* 8.5, 2.4 Hz, H-10), 6.51 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-11), 6.73 (1H, d, *J* 2.4 H-8), 7.50 (2H, m, H-3', H-5'), 7.70 (2H, m, H-2', H-6').

Στοιχειακή ανάλυση για C₁₇H₁₃FN₂O: Θεωρητικά: C, 72.85; H, 4.67; N, 9.99; Πειραματικά: 72.66; H, 4.58; N, 9.99.

3-(4-Φθοροφαινυλο)-7-μεθοξυ-1-(4-μεθοξυφαινυλο)-4,5-διυδρο-1-βενζο[g]ινδαζόλιο, Π-11



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
62%	C ₂₅ H ₂₁ FN ₂ O ₂	400.44	169	R _f = 0.67 Hex/EtOAc 5:5

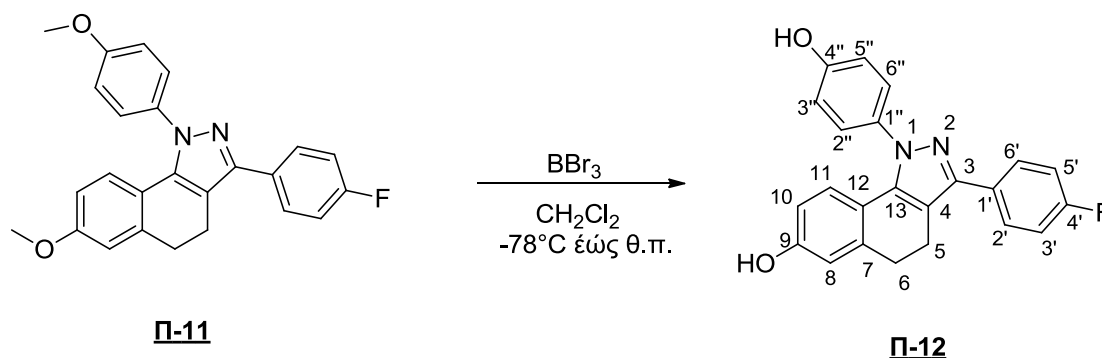
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν αυτό παρασκευάστηκε όπως ακριβώς και το **Π-9** με τη χρήση της 6-μεθοξυ-4-τετραλόνης, **4** (0.5 g, 2.8 mmol) και των 4-φθοροβενζοϋλο χλωριδίου (0.17 mL, 1.4 mmol) και 4-μεθοξυφαινυλυδραζίνης υδροχλωρικής (1.74 g, 10 mmol). Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα n-hexane/EtOAc 8:2, δίνοντας το προϊόν **Π-11** (0.70 g) υπό την μορφή λευκών κρυστάλλων.

¹H NMR (CHCl₃-d₆): δ = 2.96 (2H, m, H-5), 3.03 (2H, m H-6), 3.81 (3H, -OCH₃), 3.91 (3H, -OCH₃), 6.59 (1H, dd, *J* 8.5, 2.4 Hz, H-10), 6.77 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-11), 6.89 (1H, d, *J* 2.4 Hz, H-8), 7.03 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'' and H-5''), 7.16 (2H, m, H-2'', H-6''), 7.49 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.78 (2H, m, H-2', H-6').

Στοιχειακή ανάλυση για C₂₅H₂₁FN₂O₂: Θεωρητικά: C, 74.98; H, 5.29; N, 7.00. Πειραματικά: C, 75.12; H, 5.35; N, 6.82.

3-(4-Φθοροφαινυλο)-1-(4-υδροξυφαινυλο)-4,5-διυδρο-1Η-βενζο[g]ινδαζολ-7-όλιο Π-12



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
81%	C ₂₃ H ₁₇ FN ₂ O ₂	372.39	161	R _f = 0.59 Hex/EtOAc 5:5

Μέθοδος Παρασκευής:

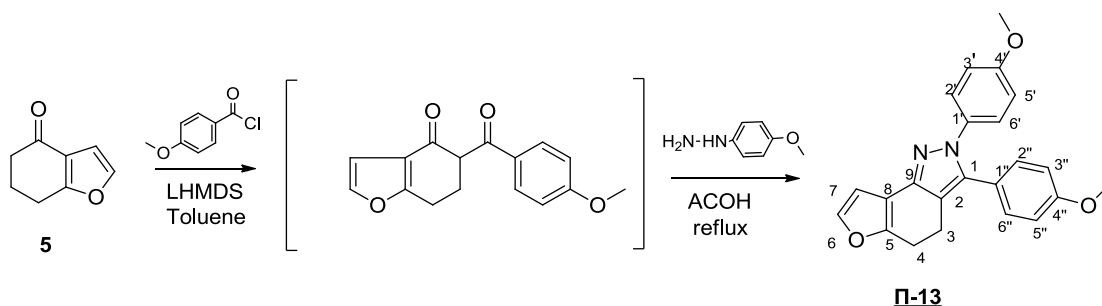
Ακολουθώντας τη γενική μέθοδο αποπροστασίας το **Π-11** (0.1 g, 0.23 mmol) έδωσε το **Π-12** (0.08 g) ως λαδί κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 2.86 (2H, m, H-5), 2.88 (2H, m H-6), 6.44 (1H, dd, *J* 8.5, 2.4 Hz, H-10), 6.53 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-11), 6.76 (1H, d, *J* 2.4 H-8), 6.89 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'', H-5''), 7.27 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2'', H-6''), 7.28 (2H, m, H-3', H-5'), 7.72 (2H, m, H-2', H-6')

¹³C NMR (DMSO-d₆): δ = 20.5 (C-5), 30.8 (C-6), 113.4 (C-10), 115.1 (C-4), 115.9 (C-2'' και C-6''), 116.0 (C-8), 116.2 (C-3'', C-5''), 118.0 (C-12), 124.0 (C-11), 127.8 (C-3' και C-5'), 129.1 (C-2', C-6'), 130.4 (C-1'), 132.4 (C-1''), 139.4 (C-7), 146.2 (C-3), 149.0 (C-13), 157.4 (C-9), 158.0 (C-4''), 162.0 (C-4').

Στοιχειακή ανάλυση για C₂₃H₁₇FN₂O₂: Θεωρητικά: C, 74.18; H, 4.60; N, 7.52; Πειραματικά: C, 74.31; H, 4.68; N, 7.42.

2,3-δισ-(4-Μεθοξυφαινυλο)-4,5-διυδρο-2-φουρο[2,3-g]ινδαζόλιο, Π-13



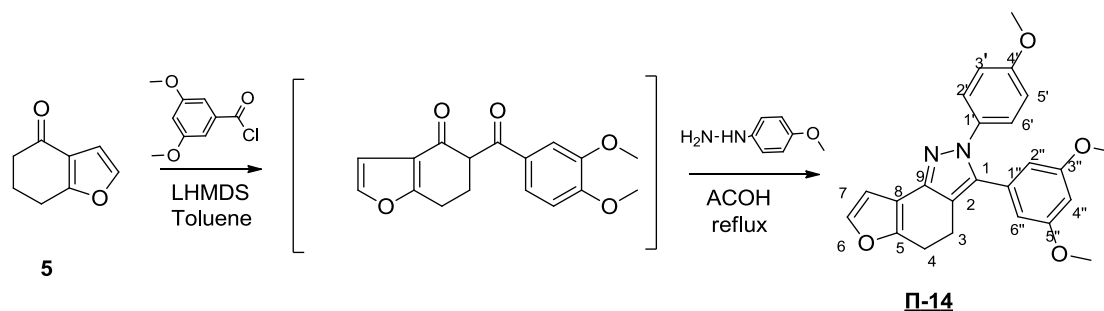
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
55%	C ₂₃ H ₂₀ N ₂ O ₃	372.42	175-176	R _f = 0.81 EtOAc/ Hex 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 6,7-διυδρο βενζοφουραν-4(5H)-όνης, **5** (0.5 g, 3.7 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (6mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψυχθεί στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (3.7 mL, 1.0 M σε THF, 2.3 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-βενζουλοχλωριδίου (0.25 mL, 1.9 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (2 mL), EtOH (10 mL) και THF (5 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής 4-μεθοξυφαινυλδραζίνης (0.785 g, 14,8 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται διάλυμα 1 M NaOH και εκχυλίζεται με EtOAc (20 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/Hexane 2:8, δίνοντας το προϊόν **Π-13** (0.76 g) υπό την μορφή κιτρινοπορτοκαλί κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.99 (4H, m, H-3, H-4), 3.81 (3H, s, -OCH₃-), 3.83 (3H, s, -OCH₃-), 6.85 (2H, d, J 8.9 Hz, ArH), 6.88 (3H, m, 2ArH, H-7), 7.13 (2H, d, J 8.9 Hz, ArH), 7.23 (2H, d, J 8.9 Hz, ArH), 7.39 (1H, d, J 1.5 Hz, H-6).

3-(3,4-Διμεθοξυφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-4,5-διϋδρο-2H-φουρο[2,3-g]ινδαζόλιο, Π-14



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
70%	C ₂₂ H ₁₇ N ₂ O ₃	357.38	185-187	R _f = 0.74 EtOAc/ Hex 4:6

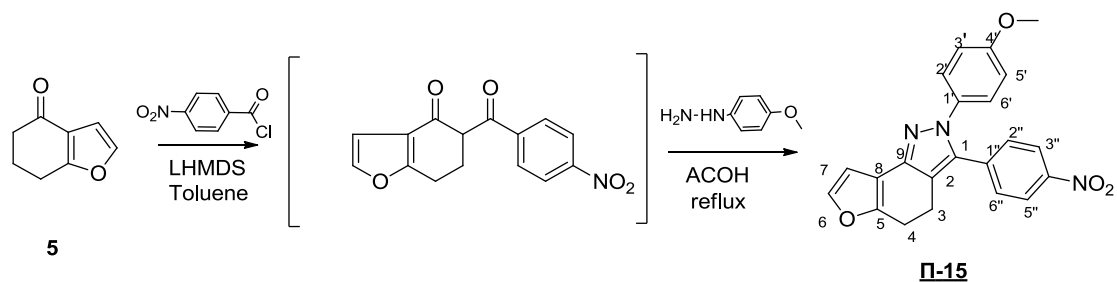
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν **Π-14** παρασκευάστηκε όπως και το **Π-13** από τα μόρια 6,7-διϋδρο βενζοφουραν-4(5H)-όνης, **5** (0.5 g, 3.7 mmol) και του 3,5 μεθοξυ διβενζοϋλο χλωριδίου (0.37 g, 1.85 mmol σε 2 ml DMF). Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/ Hex 1:9, δίνοντας το προϊόν **Π-14** (0.93 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.01 (4H, t, *J* 3.5 Hz, H-3, H-4), 3.69 (3H, s, -OCH₃-), 3.82 (3H, s, -OCH₃-), 3.92 (3H, s, -OCH₃-), 6.63 (1H, d, *J* 1.9 Hz, H-7), 6.86 (5H, m, H-3', H-5', H-3'', H-5'', H-7), 7.23 (4H, d, *J* 7.5 Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 7.42 (1H, d, *J* 1.5 Hz, H-6).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₄H₂₂N₂O₄: Θεωρητικά: C, 71.63; H, 5.51; N, 6.96; Πειραματικά: C, 74.03; H, 5.71; N, 6.87.

**2-(4-Μεθοξυφαινυλο)-3-(4-νιτροφαινυλο)-4,5-διυδρο-2Η-φουρο[2,3-
g]ινδαζόλιο, Π-15**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
63%	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₄	387,39	158	R _f = 0.75 EtOAc/ Hex 5:5

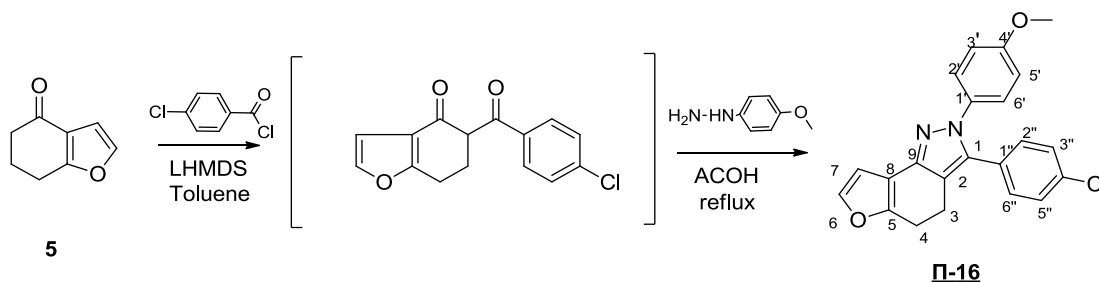
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν **Π-15** παρασκευάστηκε όπως και το **Π-13** από τα μόρια 6,7-διϋδρο βενζοφουραν-4(5Η)-όνης, **5** (0.5 g, 3.7 mmol) και του 4 νιτρο-βενζοϋλο χλωριδίου (0.34 g, 1.85 mmol σε 2 ml DMF). Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/ Hexane 1:9, δίνοντας το προϊόν **Π-15** (0.90 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.98 (4H, m, H-3, H-4), 3.88 (3H, s, -OCH₃-), 6.83 (1H, d, *J* 1.5 Hz, H-7), 6.97 (2H, d, *J* 7.5 Hz, H-3', H-5'), 7.18 (2H, d, *J* 7.0 Hz, H-2', H-6'), 7.46 (3H, m, *J* 7.5 Hz, H-6, H-2'', H-6''), 8.16 (2H, d, *J* 7.5 Hz, H-3'', H-5'').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₁₇N₃O₄: Θεωρητικά: C, 68.21; H, 4.42; N, 10.85; Πειραματικά: C, 69.51; H, 4.62; N, 10.41;

**3-(4-Χλωροφαινυλο)-2-(4-μεθοξυφαινυλο)-4,5-διυδρο-2Η-φουρο[2,3-
g]ινδαζόλιο, Π-16**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
62%	C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂ O ₂	376.84	143	R _f = 0.60 EtOAc/ Hex 2.5:7.7

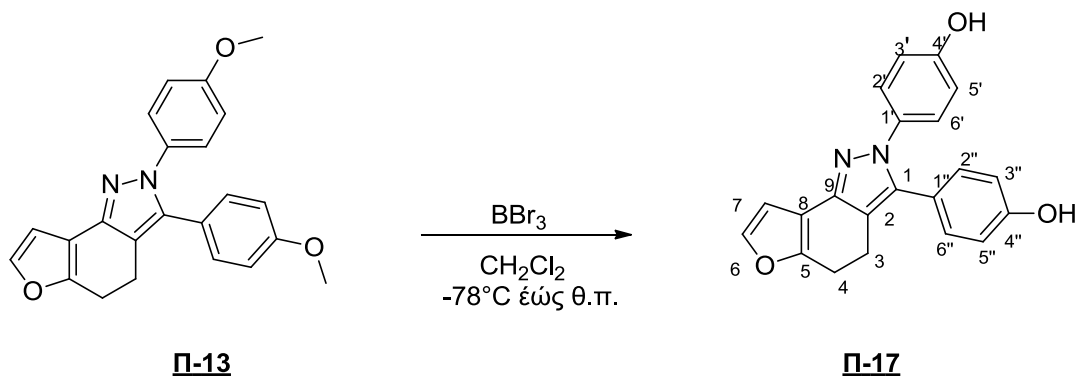
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν **Π-16** παρασκευάστηκε όπως και το **Π-13** από τα μόρια 6,7-διυδρο βενζοφουραν-4(5Η)-όνης, **5** (0.5 g, 3.7 mmol) και του 4 χλωρο-βενζοϋλο χλωριδίου (0.32 g, 1.85 mmol σε 2 ml DMF). Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/ Hex 0.5:9.5, δίνοντας το προϊόν **Π-16** (0.86 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.98 (4H, m, H-3, H-4), 3.88 (3H, s, -OCH₃-), 6.83 (1H, d, *J* 1.5 Hz, H-7), 6.97 (2H, d, *J* 7.5 Hz, H-3', H-5'), 7.18 (2H, d, *J* 7.0 Hz, H-2', H-6'), 7.46 (3H, m, *J* 7.5 Hz, H-6, H-2'', H-6''), 8.16 (2H, d, *J* 7.5 Hz, H-3'', H-5'').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₁₇N₃O₄: Θεωρητικά: C, 68.21; H, 4.42; N, 10.85; Πειραματικά: C, 68.11; H, 4.45; N, 10.79.

3-(4-Υδροξυφαινυλο)-4,5-διϋδροναφθο[2,1-d]ισοξαζολ-7-όλη, Π-17



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
89%	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₃	334.36	131-132	R _f = 0.31 CH ₂ Cl ₂ / MeOH 9.6:0.4

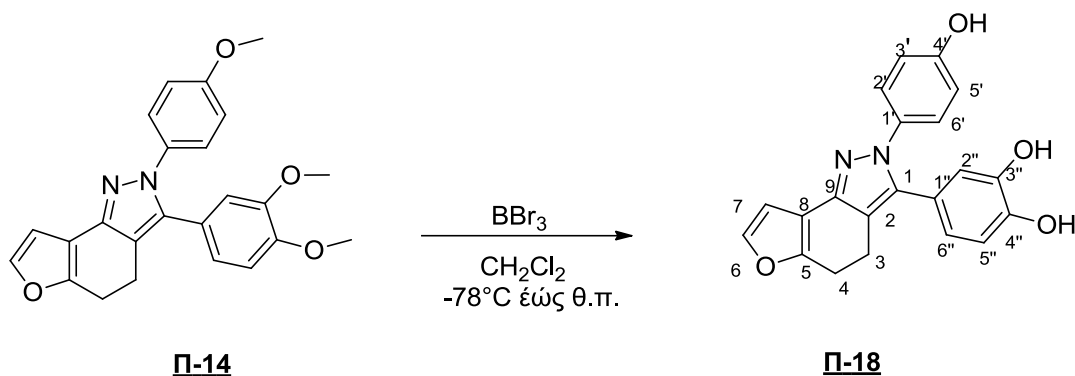
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα **Π-13** (0.2 g, 0.57 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (30 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78 °C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr₃ (5.7 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 5.7 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOAc (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το πράσινο στερεό που προκύπτει χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης CH₂Cl₂/ MeOH 9.8:0.2 δίνοντας 169.6 mg πορτοκαλοκίτρινου προϊόντος **Π-17**.

¹H NMR (Methanol-d₄): δ = 3.33 (4H, m, H-3, H-4), 6.87 (4H, d, J 8.4 Hz, H-5', H-5', H-3'' and H-3'), 7.26 (5H, m, H-6'', H-6'', H-2'', H-2' and H-7), 7.86 (1H, d, J 2.0 Hz, H-6) .

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₁₆N₂O₃: Θεωρητικά: C, 73.24; H, 4.68; N, 8.13; Πειραματικά: C, 73.29; H, 4.62; N, 8.15;

4-[2-(4-Υδροξυφαινυλο)-4,5-διυδρο-2H-φουρο[2,3-g]ινδαζολ-3-υλο]βενζεν-1,2-διόλη, Π-18



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
70%	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₄	357.38	150	R _f = 0.15 CH ₂ Cl ₂ / MeOH 9.6:0.4

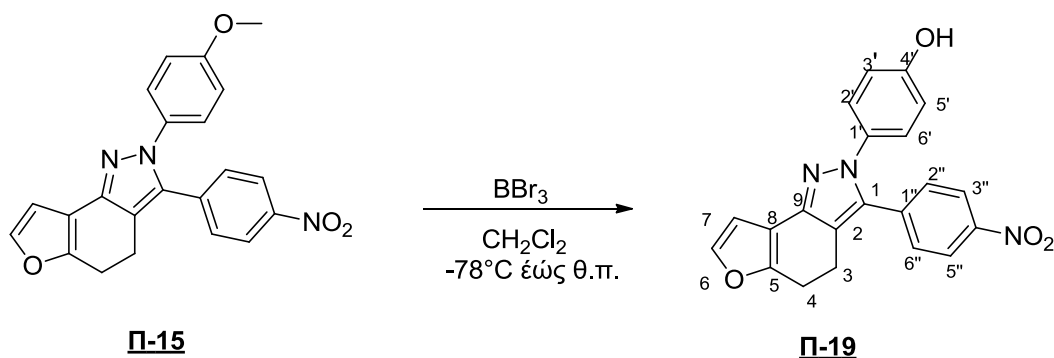
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν **Π-18** (0.2 g, 0.56 mmol) παρασκευάστηκε όπως και το **Π-17** με τη χρήση διαλύματος BBr₃ (8.4 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 8.4 mmol). Το πράσινο στερεό που προκύπτει χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH (9.8:0.2) δίνοντας 169.6 mg πορτοκαλοκίτρινου προϊόντος **Π-18**.

¹H NMR (MeOH-d₄): δ = 3.40 (4H, m, H-3, H-4), 6.66 (1H, d, J 3.0 Hz H-7), 6.83 (4H, m, H-5'', H-5', H-3'' and H-3'), 7.45 (4H, m, H-6'', H-6', H-2'', H-2'), 7.87 (1H, d, J 7 Hz, 1.5, H-6).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₁₆N₂O₃: Θεωρητικά: C, 69.99; H, 4.48; N, 7.77; Πειραματικά: C, 72.14; H, 4.61; N, 7.59.

**4-[3-(4-Νιτροφαινυλο)-4,5-διυδρο-2H-φουρο[2,3-g]ινδαζολ-2-υλο]φαινόλη,
Π-19**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
72%	C ₂₁ H ₁₅ N ₃ O ₄	373.36	170	R _f = 0.64 EtOAc/ Hex 5:5

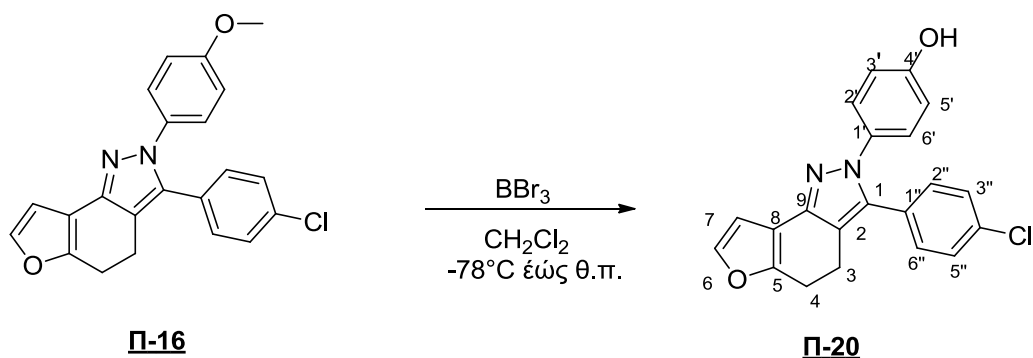
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν **Π-19** (0.25 g, 0.65 mmol) παρασκευάστηκε όπως και το **Π-15** με διάλυμα BBr₃ (9.7 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 9.7 mmol). Το πράσινο στερεό που προκύπτει χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH 9.8:0.2 δίνοντας 190 mg πορτοκαλί προϊόντος.

¹H NMR (MeOH-d₄): δ = 2.97 (4H, m, H-3, H-4), 6.96 (1H, d, J 2.3 Hz, H-7), 7.02 (2H, J 8.2 Hz, H-3', H-5'), 7.47 (2H, J 8.2 Hz, H-2', H-6'), 7.90 (1H, d, J 2.3 Hz, 1.5, H-6), 8.07 (2H, d, J 8.0 Hz, H-2'', H-6''), 8.21 (2H, d, J 8.0 Hz, H-3'', H-5'')

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₁₅N₃O₄: Θεωρητικά: C, 67.56; H, 4.05; N, 11.25; Πειραματικά: C, 67.49; H, 4.02; N, 11.19.

4-(3-(4-Χλωροφαινυλο)-4,5-διυδρο-2H-φουρο[2,3-g]ινδαζολ-2-υλο]φαινόλη, Π-20



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
62%	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	362,81	165-166	R _f = 0.60 EtOAc/ Hex 5:5

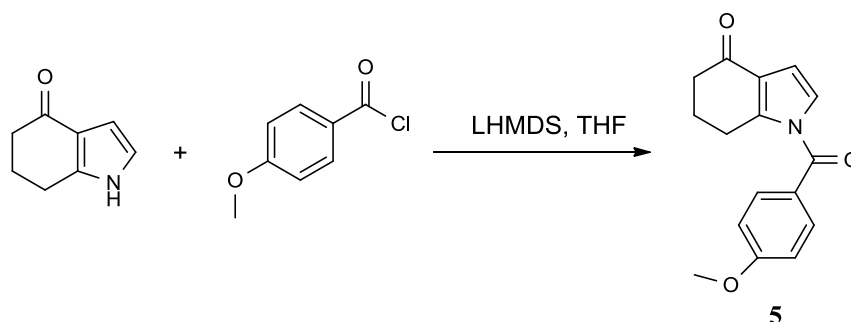
Μέθοδος Παρασκευής:

Το προϊόν **Π-16** (0.25 g, 0.66 mmol) αποπροστατεύτηκε όπως και το **Π-15** με διάλυμα BBr₃ (9.7 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 9.7 mmol). Το πράσινο στερεό που προκύπτει χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης CH₂Cl₂/ MeOH 9.8:0.2 δίνοντας 150.0 mg πορτοκαλί προϊόντος **Π-20**.

¹H NMR (MeOH-d₄): δ = 2.72 (4H, m, H-3, H-4), 6.51 (1H, d, *J* 2.9 Hz, H-7), 6.82 (2H, d, *J* 3 Hz, H-3', H-5'), 7.42 (5H, m, H-2', H-6', H-6, H-2'', H-5''), 7.89 (2H, d, *J* 3 Hz, H-3'', H-6'').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₁₅ClN₂O₂: Θεωρητικά: C, 67.56; H, 4.05; N, 11.25; Cl, 9.77; Πειραματικά: C, 67.49; H, 4.02; N, 11.19; Cl, 9.69.

1-(4-Μεθοξυβενζυλο)-6,7-διυδρο-1H-ινδολ-4(5H)-όνη (ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝ)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
65%	C ₁₆ H ₁₇ NO ₂	255.31	95-97	R _f = 0.62 Hex/EtOAc 4:6

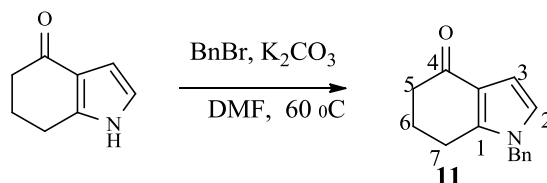
Μέθοδος Παρασκευής:

Σε διάλυμα της ινδαλόνης (0.4 g, 3.02 mmol) σε άνυδρο THF (40 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται υπό ανάδευση και σε διάρκεια 30 min, διάλυμα LHMDS (3.02 mL, 1.0 M σε THF, 3.02 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για επιπλέον 15 min και έπειτα προστίθεται το π-ανιδουόλχλωριδίο (0.41 mL, 3.02 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30 min μετά την προσθήκη του τελευταίου. Στη συνέχεια το διάλυμα εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl (8 mL) και κατανέμεται σε EtOH (30 mL) και H₂O (15 mL). Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται, εξαλατώνεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και εξατμίζεται υπό κενό. Το κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3, δίνοντας το παραπροϊόν **Π-5** (0.6 g) υπό την μορφή ροζ κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): 7.78 (d, 2H, J 8.61 Hz, ArH), 7.02 (d, 2H, J 8.61 Hz, ArH), 6.92 (d, 1H, J 3.16 Hz, -CH-N), 6.61 (d, 1H, J 3.16 Hz, -HC=CH-N), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (t, 2H, J 6.02 Hz, -CH₂CN), 2.56 (t, 2H, J 6.29 Hz, -CH₂C=O),

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₅NO₃: Θεωρητικά: C, 71.36; H, 5.61; N, 5.20; Πειραματικά: C, 72.20; H, 5.82; N, 5.35.

1-Βενζυλο-6,7-διϋδρο-1H-ινδολ-4(5H)-όνη



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
60%	C ₁₅ H ₁₅ NO	225.29	190	R _f = 0.44 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

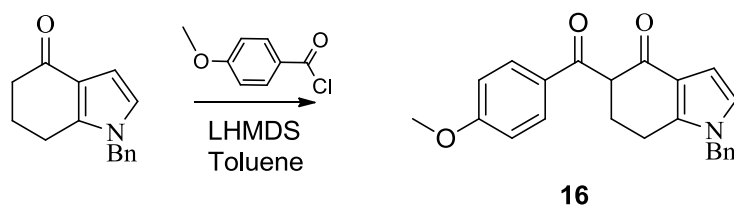
Σε διάλυμα της ινδαλόνης (0.5 g, 3.6 mmol) σε 2 mL άνυδρο DMF προστίθενται υπό ανάδευση K₂CO₃ (0.63 g, 0.46 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται στους 60 °C και αναδεύεται για συνολικά 4 h. Στη συνέχεια το διάλυμα της αντίδρασης αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθενται BnBr (0.69 g, 3.96 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται στην θερμοκρασία αυτή για επιπλέον 12 h, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Η αντίδραση εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl (8 mL) και το μίγμα εκχυλίζεται με EtOH (2×25 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3, δίνοντας το προϊόν **Π-11** (0.49 g) υπό την μορφή ροζ κρυστάλλων, ως λευκό, άμορφο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.13 (2H, m, H-6), 2.47 (2H, t, J 6.5 Hz, H-7), 2.66 (2H, t, J 6.0 Hz H-5), 5.05 (2H, s, NCH₂Bz), 6.61 (1H, d, J 7.8 Hz, H-3), 7.07 (1H, d, J 7.8 Hz, H-2), 7.27-7.37 (5H, m, ArH).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₅H₁₅NO: Θεωρητικά: C, 79.97; H, 6.71; N, 6.22; Πειραματικά: 80.27; H, 6.84; N, 6.32;

1-Βενζυλο-5-(4-μεθοξυβενζοϋλο)-6,7-διϋδρο-1Η-ινδολ-4(5Η)-όνη



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
33%	C ₂₃ H ₂₁ NO ₃	359.42	129-130	R _f = 0.47 Hex/EtOAc 6:4

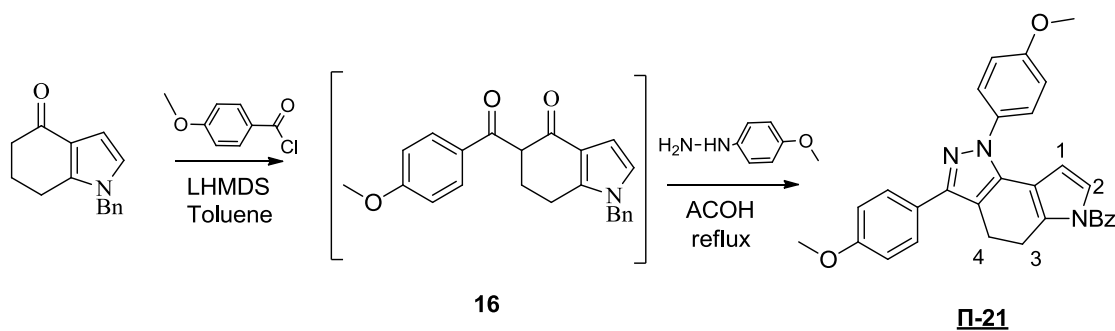
Μέθοδος Παρασκευής:

Σε διάλυμα **Π-11** (0.3 g, 1.33 mmol) σε άνυδρο THF (16 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, προστίθεται υπό ανάδευση και σε διάρκεια 30 min, διάλυμα LHMDS (1.33 mL, 1.0 M σε THF, 1.33 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για επιπλέον 15 min και έπειτα προστίθεται το π-ανιδουϋλχλωριδίο (0.18 mL, 1.33 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 30 min μετά την προσθήκη του τελευταίου. Στη συνέχεια το διάλυμα εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl (4 mL) και κατανέμεται σε EtOH (15 mL) και H₂O (10 mL). Η οργανική στοιβάδα διαχωρίζεται, εξαλατώνεται, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και εξατμίζεται υπό κενό. Το κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3, δίνοντας το παραπροϊόν **Π-16** (0.16 g) υπό την μορφή καφέ κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): 2.41 (2H, m, H-1), 2.87 (2H, m, H-2), 3.89 (3H, s, OCH₃), 3.89(3H, m, OCH₃, H-3), 5.07 (2H, s, NCH₂Bz), 5.68 (1H, dd, *J* Hz, H-pyrrole), 6.66 (2H, m, ArH), 6.94(2H, m, ArH), 7.22 (2H, m, ArH), 7.30 (2H, m, ArH), 8.07 (2H, m, ArH).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₃H₂₁NO₃: Θεωρητικά: C, 76.86; H, 5.89; N, 3.90; Πειραματικά: C, 76.80; H, 5.79; N, 3.80.

**6-Βενζυλο-1,3-δισ(4-μεθοξυφαινυλο)-1,4,5,6-τετραϋδροπυρολ[2,3-
g]ινδαζόλη, Π-21**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
60%	C ₃₀ H ₂₇ N ₃ O ₂	461.21	161	R _f = 0.74 Hex/EtOAc 5:5

Μέθοδος Παρασκευής:

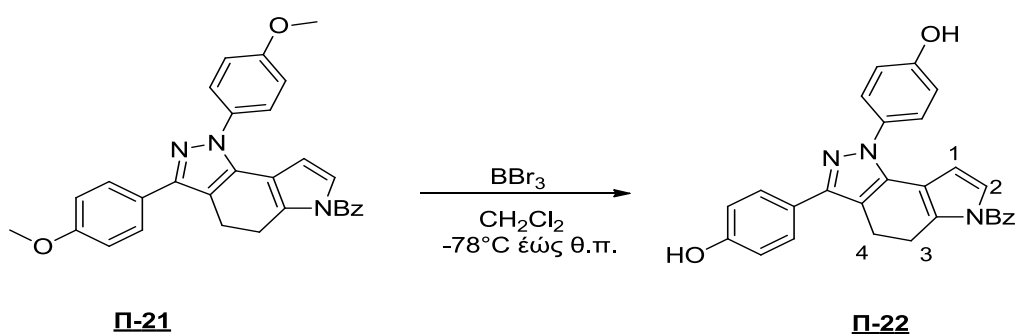
Διάλυμα **Π-11** (0.50 g, 2.2 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (7 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (2.33 mL, 1.0 M σε THF, 2.33 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανιδοϋλχλωριδίου (0.15 mL, 1.11 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (2 mL). EtOH (10 mL) και THF (5 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής (4-μεθοξυφαινυλ)υδραζίνης (1.73 g, 10 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOH (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2, δίνοντας το προϊόν **21** (0.61 g) υπό την μορφή ροζ κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.79 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H; H-3), 3.04 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H; H-4), 3.85 (s, 3H; CH₃O), 3.89 (s, 3H; CH₃O), 5.08 (s, 2H; NCH₂Bz), 5.81 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H; πυρόλιο), 6.51 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H; πυρόλιο), 6.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H; ArH),

7.01 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H; ArH), 7.06 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H; ArH), 7.26-7.33 (m, 3H; ArH), 7.58 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H; ArH), 7.69 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H; ArH); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 160, 146, 134, 132, 127, 119, 115, 95, 54, 22$.

Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$: Θεωρητικά: C, 78.07; H, 5.90; N, 9.10; O, 6.93 ; Πειραματικά: , 77.72, H, 5.72, N, 9.28.

**[1,3-δισ(4-Υδροξυφαινουολ)-4,5-διϋδροπυρολ[2,3-g]ινδαζόλη-6(1H)-
υλ](φαινουλο)μεθανόνη, Π-22**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
85%	C ₂₈ H ₂₃ N ₃ O ₂	433.50	190	R _f = 0.74 Hex/EtOAc 5:5

Μέθοδος Παρασκευής:

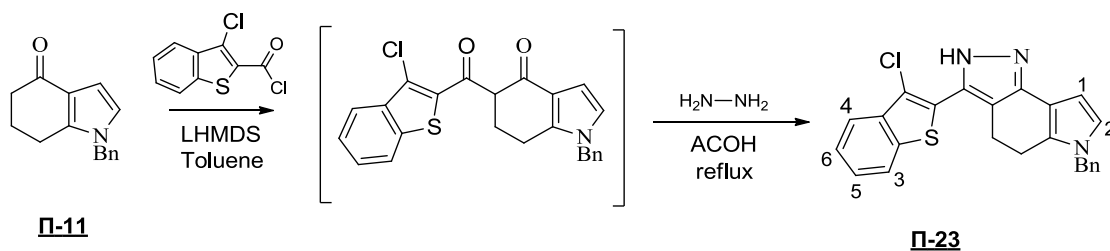
Διάλυμα **21** (0.1 g, 0.29 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (15 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78 °C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr₃ (4.06 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 4.06 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOH (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το πράσινο στερεό που προκύπτει χρωματογραφείται με μίγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 δίνοντας 0.11 g της διφαινόλης **22** που ανακρυσταλλώνεται από Et₂O ως ροζ κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 2.80 (t, J = 8.0 Hz, 2H; H-3), 2.99 (t, J = 8.0 Hz, 2H; H-4), 5.21 (s, 2H; NCH₂Bz), 5.78 (d, J = 2.8 Hz, 1H; pyrrole), 6.68 (1H, d, J = 2.6 Hz, πυρόλη), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 2H; ArH), 6.99 (d, J = 8.5 Hz, 2H; ArH), 7.15 (d, J = 7.5 Hz, 2H; ArH), 7.26-7.34 (m, 3H; ArH), 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 2H; ArH), 7.60 (d, J = 8.6 Hz, 2H; ArH), 8.40 (s, 1H; OH), 8.75 (s, 1H; OH);

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 155, 144, 134, 132, 127, 118, 115, 95, 54, 21.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₈H₂₃N₃O₂: Θεωρητικά: C, 77.58; H, 5.35; N, 9.69; O, 7.38 ; Πειραματικά: C, C, 78.34, H, 5.22, N, 10.18.

**6-Βενζυλο-3-(3-χλωροβενζο[b]θειοφαιν-2-υλο)-2,4,5,6-
τετραυδροπυρρολο[2,3-g]ινδαζόλη, Π-23**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
49%	C ₂₄ H ₁₈ ClN ₃ S	415.94	144-146	R _f = 0.59 EtOAc/ Hex 4.5:5.5

Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της βενζυλιωμένης ινδαλόνης **Π-11** (0.5 g, 2.2 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (6mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (2.3 mL, 1.0 M σε THF, 2.3 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανισουϋλχλωριδίου (0.15 mL, 1.1 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (2 mL), EtOH (10 mL) και THF (5 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.45 g, 1.1 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOH (20 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/ Hex 9:1, δίνοντας το προϊόν **Π-23** (0.27 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 2.80 (t, J = 8.0 Hz, 2H; H-3), 2.97 (t, J = 8.5 Hz, 2H; H-4), 5.22 (s, 2H; -CH₂Bz), 6.38 (d, J = 2.6 Hz, 1H; H-1_{πυρόλιο}), 6.82 (d, J = 2.8 Hz, 1H; H-2_{πυρόλιο}), 7.15 (d, J = 7.5 Hz, 2H; ArH), 7.36 (m, 3H; ArH), 7.49 (t, J =

8.0 Hz, 1H; H-5), 7.55 (t, J 8.0 Hz, 1H; H-6), 7.87 (d, J = 7.7 Hz, 1H; H-4), 7.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H; H-3);

^{13}C NMR (Acetone- d_6): δ = 140, 134, 128, 125, 120, 116, 98, 54, 22, 18;

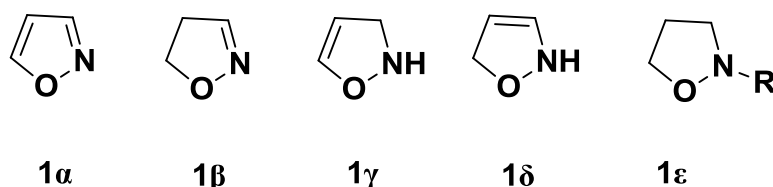
Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$: Θεωρητικά: C, 69.30; H, 4.36; Cl, 8.52; N, 10.10; S, 7.71; Πειραματικά: C, 71.03; H, 4.16; Cl, 8.75; N, 9.76; S, 7.61.

Κεφάλαιο 3

Σύνθεση Νέων Ισοξαζολικών Παραγώγων με αντι-Πολλαπλασιαστική και αντι-Αγγειογενετική Δράση

3.1. Ισοξαζόλια

Το ισοξαζόλιο (**1α**) είναι ένα πενταμελές ακόρεστο ετεροκυκλικό μόριο που περιέχει άτομα οξυγόνου και αζώτου σε θέσεις 1, 2 (**Σχήμα 1.1**). Τα μερικώς κορεσμένα του ανάλογά του ονοματίζονται ως ισοξαζολίνες (**1β-δ**), ενώ τα πλήρως κορεσμένα ως παράγωγα της ισοξαζολιδίνης (**1ε**).



Σχήμα 3.1. Ισοξαζόλιο και τα παράγωγά του

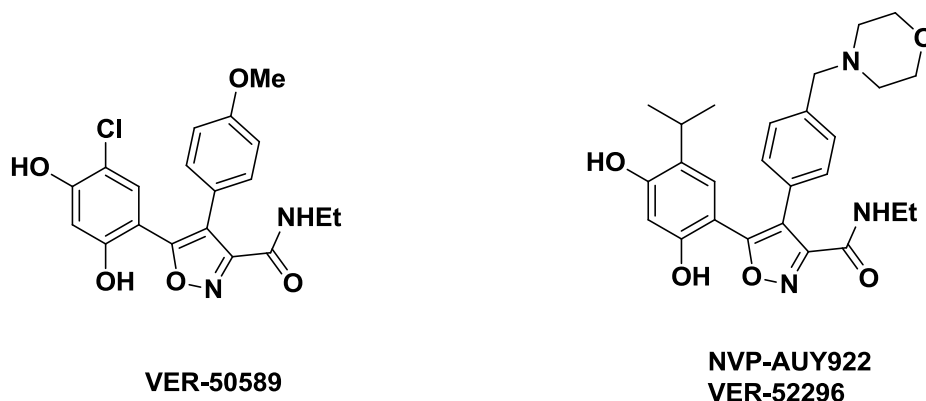
Από τα παραπάνω μόρια, οι ισοξαζολίνες αποτελούν μια νέα σχετικά τάξη χημικών ενώσεων, των οποίων η μελέτη διενεργείται-εξελισσεται κατά την τρέχουσα δεκαετία. Η πρώτη εμπορική τους εκμετάλλευση ολοκληρώθηκε μόλις το 2013 και αναφέρεται στη δράση τους ως κτηνιατρικών φαρμάκων για την καταπολέμηση των τσιμπουριών και ψύλλων στα σκυλιά, αλλά είναι επίσης αποτελεσματικά και για την καταπολέμηση ποικίλων κτηνιατρικών και γεωργικών παρασίτων.

Αντίθετα, τα ισοξαζόλια συνιστούν μια πολύ γνωστή κατηγορία ετεροκυκλικών ενώσεων, που χρησιμοποιούνται ευρύτατα είτε ως εντομοκτόνα στη γεωργία ή ως δραστικά συστατικά σε φάρμακα, της σημαντικής αντιβακτηριακής, αντικαρκινικής, αντιμυκητιακής, αντιβιοτικής, αντιφλεγμονώδους και αντιφυματικής τους δράσης. Πολλά παράγωγα του ισοξαζολίου αποτελούν τη βάση για διάφορα φάρμακα που κυκλοφορούν στην

αγορά, όπως το αντιρρευματικό φάρμακο λεφλουνομίδη (leflunomide), ο αναστολέας του COX-2 βαλδεκοξίβη (valdecoxib) και αντισπασμωδικό φάρμακο ζονισαμίδη (zonisamide) (Shawl et al., 2012).

Κατά την τελευταία δεκαετία τα ισοξαζόλια έχουν αναδειχθεί ανάμεσα στις πλέον ελπιδοφόρες αζαετεροκυκλικές πενταμελείς ενώσεις σε σχέση με την αντικαρκινική τους δράση, αφού τα παράγωγα τους θεωρούνται αξιοσημείωτοι αναστολείς των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, **HSPs**) (Dymock et al., 2005; Didelot et al., 2007; Taldone et al., 2008; Staufer and Stoeltzing, 2010). Οι **HSPs** έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή καθώς η παρουσία τους έχει επιβεβαιωθεί στα καρκινικά κύτταρα, παράλληλα με την ιδιαίτερη σημασία τους για την επιβίωσή τους. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν μια κατηγορία μοριακών «συνοδών» (γνωστά ως **chaperones**) που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των πρωτεϊνών, υποστηρίζοντας την αναδίπλωση της τριτοταγούς δομής όσων έχουν υποστεί βλάβη (Audisio et al., 2010). Εκτός από την άμεση αντικαρκινική τους δράση, οι αναστολείς της HSP90 εμφανίζουν και αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες είτε επηρεάζοντας το **PI-3K/Akt/eNOS** μονοπάτι μεταγωγής σήματος στα ενδοθηλιακά κύτταρα ή μέσω της ρύθμισης προς τα κάτω του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα του υποδοχέα-2 (VEGFR-2) έκφρασης, ένα πολύ κρίσιμο συστατικό της αγγειογενετικής διαδικασίας. Επιπλέον, οι αναστολείς της HSP90 μπλοκάρουν την έκκριση και έκφραση των καρκινικών κυττάρων που προέρχονται από προ-αγγειογενετικούς παραγόντες και κυτοκίνες, οδηγώντας έτσι σε "έμμεση" αντι-αγγειογενετική δράση.

Ειδικότερα, τα ισοξαζολικά αμίδια με τις κωδικές ονομασίες **NVP-AUY922 (VER-52296)** και το **VER-50589 (Σχήμα 3.2)**, έχει προσδιοριστεί ότι είναι ισχυροί αναστολείς της **HSP90** (Brough et al., 2008; Eccles et al., 2008; Jensen et al., 2008). Ειδικότερα, το μόριο NVP-AUY922 αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Παράλληλα, εμφανίζει σημαντικές αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες αφού έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει το σχηματισμό μικροσωληνίσκων στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, μειώνοντας την πυκνότητα των μικροαγγείων στους όγκους. Σήμερα, είναι στη Φάση I των κλινικών δοκιμών για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού.



Σχήμα 3.2. Χημική δομή των ισοξαζολίων VER-50589 και NVP-AUY922 που αναστέλλουν την HSP90.

Οι προαναφερθείσες δράσεις αποτέλεσαν έναυσμα για τη διεξαγωγή λεπτομερούς έρευνας σχετικά με τη βιοδραστικότητα των ισοξαζολικών παραγώγων, η οποία απέδειξε τη σημασία του 3,4-ισοξαζολοδιαμιδικού σκελετού στην αναστολή της HSP90. Πράγματι, κάποια ισοξαζολικά παράγωγα της κατηγορίας αυτής (δηλαδή όσα διαθέτουν άτομο αζώτου που συνδέεται με τον C-4 του ετεροκυκλικού τους δακτυλίου), επιδεικνύουν σημαντική ανασταλτική δράση για την πρωτεΐνη HSP90, ενώ τα αλκυλο- και αρυλο- ετεροαρυλαμιδικά παράγωγα διαθέτουν ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης και ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των κυττάρων (Baruchello et al., 2011).

Τα παραπάνω αποτελέσματα είχαν ως επακόλουθο την κατεύθυνση της επιστημονικής έρευνας προς τη διεξοδικότερη διερεύνηση των αντικαρκινικών ιδιοτήτων όλων των μορίων που εμπεριέχουν ισοξαζολικούς δακτυλίους. Στο πλαίσιο αυτό, συντέθηκαν ποικίλα μόρια σύζευξης ισοξαζολών με βενζοδιαζεπίνες (Kamal et al., 2010), ενώ ένα 3,5-διαρυλο-ισοξαζολικό παράγωγο βρέθηκε να εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος (**Retinoic Acid Receptor, RAR**) και σημαντική επιλεκτική αποπρωτική δράση (Simoni et al., 2001). Επιπλέον, διάφορα ινδόλια που φέρουν στο μόριό τους το σκελετό των 3,5-διαρυλοϊσοξαζολίων μελετήθηκαν ως πιθανά προ-αποπρωτικά αντικαρκινικά μόρια (Md Tohid et al., 2012). Τέλος, μόρια σύζευξης κινάζολινών με ισοξαζολικά παράγωγα προσδιορίστηκαν ως ισχυροί αναστολείς του μονοπατιού ενεργοποίησης της κινάσης της μιτωτικής πρωτεΐνης (**Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK**) (Rowbottom et al., 2012).

3.2 Σύνθεση ισοξαζολίων

Οι έως σήμερα οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την παρασκευή ισοξαζολικών δακτυλίων μπορούν να συνοψιστούν στις παρακάτω κύριες αντιδράσεις, που αφορούν την:

- i) κυκλοπροσθήκη αλκενίων ή αλκυνίων σε οξείδια νιτριλίων,
- ii) προσθήκη υδροξυλαμίνης σε 1,3-δικετόνες, 1,3- διαλκύνια ή α, β- ακόρεστες κετόνες, αλδεΐδες ή νιτρίλια,
- iii) κυκλοποίηση αλκυνολοξίμης αιθέρων και
- iv) καταλυόμενη από παλλάδιο σύζευξη τεσσάρων συστατικών, όπως περιγράφηκε το 2005 από τους Ahmed et al., και η οποία αναφέρεται και στη σύνθεση των πυραζολίων (Ahmed et al., 2005).

Στο πλαίσιο της μακρόχρονης ερευνητικής ενασχόλησης της ερευνητικής μας ομάδας για την ανάπτυξη νέων βιοδραστικών αζαετεροκυκλικών ενώσεων (Tzanetou et al., 2012), τα παραπάνω βιβλιογραφικά στοιχεία χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό και σύνθεση μιας σειράς νέων ενώσεων που εμπεριέχουν ισοξαζολικούς δακτυλίους στο δομικό τους πλαίσιο. Η σύνθεση των νέων αυτών μορίων-στόχων επιτεύχθηκε με την προσθήκη υδροξυλαμίνης σε μίγμα τετραλόνης-ακετοφαινόνης, όλα με αντίδραση ενός σταδίου. Οι αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες των νέων μορίων αξιολογήθηκαν σε δυο ενδοθηλιακές και δυο καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα που εξήχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την ανάπτυξη και επικύρωση ενός νέου *in silico* μοντέλου. Το μοντέλο που αναπτύχθηκε αφορά μόρια των οποίων ο ανθρακικός σκελετός αποτελεί συνδυασμό πυραζολίου με παράγωγα του ισοξαζολίου και έχει σχέση με τις αντιπολλαπλασιαστικές τους ιδιότητες. Στο πλαίσιο δε της διατριβής απεδείχθη ότι μπορεί να αποτελέσει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον εντοπισμό νέων μορίων-στόχων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Άλλωστε, είναι ευρέως αποδεκτό ότι η ανάπτυξη τέτοιων μεθόδων μοντελοποίησης ελαττώνει κατά πολύ το χρόνο και το κόστος που συνδέεται με την ανάπτυξη νέων μορίων (Deswal and Roy, 2007; Toropov et al., 2010; Mouchlis et al., 2012). Το μοντέλο που αναπτύχθηκε βασίστηκε στην αναστολή των κυτάρων HeLa και έχει πλήρως επικυρωθεί ως προς την ακρίβεια και το εύρος του, αφού εφαρμόστηκε στο επόμενο στάδιο της διατριβής για να σχεδιαστούν νέες δομές, οι οποίες όταν τελικά συντέθηκαν επιβεβαιώθηκε και πειραματικά ότι διαθέτουν αρκετές από τις αναμενόμενες ιδιότητες.

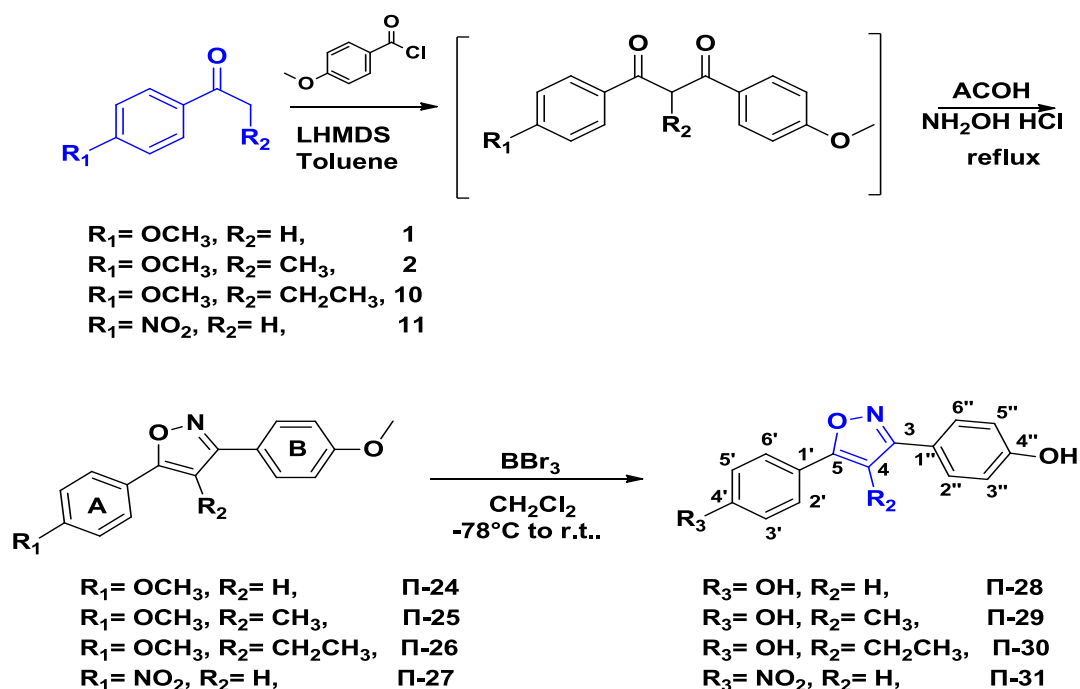
3.3 Σύνθεση νέων ισοξαζολικών παραγώγων

Για την εκπόνηση της διατριβής, αφού δοκιμάστηκαν ποικίλες εναλλακτικές συνθετικές οδοί, αποφασίστηκε ότι οι καλύτερες αποδόσεις εξασφαλίζονται όταν η σύνθεση των ισοξαζολίων πραγματοποιείται μέσω μιας παραλλαγής-προσαρμογής της μεθοδολογίας που έχει δημοσιευτεί από τους Heller et al. το 2006, και αναφέρεται στην προσθήκη υδραζινών σε 1,3-δικετόνες για την *in situ* σύνθεση των πυραζολίων (Heller and Natarajan, 2006). Η αντίδραση αυτή χωρεί μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την προσθήκη υδροξυλαμίνης σε ποικίλες 1,3-δικετόνες και αποτελεί μια γρήγορη και αποτελεσματική συνθετική οδό για τη σύνθεση διαφόρων ισοξαζολίων ή/και συμπυκνωμένων δακτυλίων που περιλαμβάνουν τον ισοξαζολικό δακτύλιο.

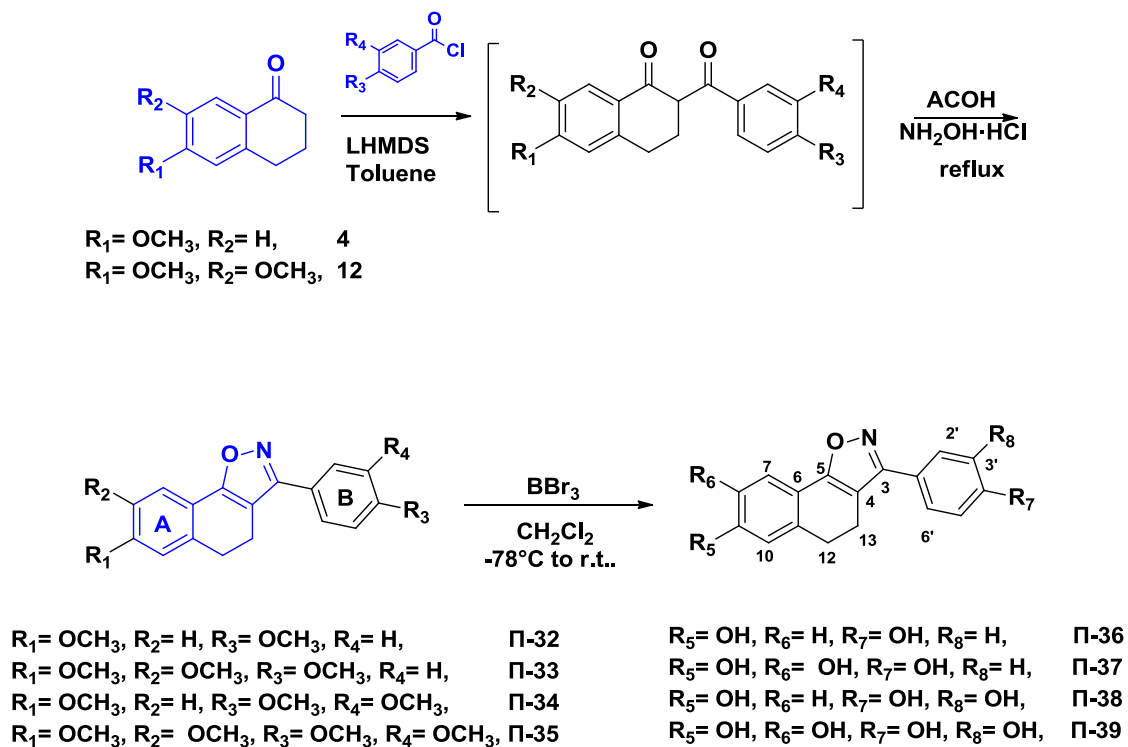
Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ως πρώτες ύλες χρησιμοποιήθηκαν ποικίλα ακετοφαινονικά παράγωγα, τα οποία παρουσία του εξαμεθυλοδισιλαζενίου του λιθίου (**Lithium Hexamethyl Disilazane, LHMDs**) και άνυδρες συνθήκες, μετατρέπονται στα αντίστοιχα ανιόντα. Αυτά, όταν στη συνέχεια συμπυκνωθούν με το 4-μεθοξυανισοϋλχλωρίδιο οδηγούν στην παραλαβή ποικίλων 3-δικετονικών παραγώγων (**Σχήμα 3.3**), τα οποία όταν συμπυκνωθούν *in situ* με υδροξυλαμίνη δίνουν τελικά –όλα σε ένα στάδιο– τα επιθυμητά ισοξαζολικά παράγωγα (ενώσεις **Π24-Π27**) σε συνολικές αποδόσεις 64-80%. Τέλος, η αποπροστασία των ισοξαζολίων αυτών επιτυγχάνεται με τριβρωμιούχο βόριο (BBr_3) στους -78°C δίνοντας τα αντίστοιχα φαινολικά παράγωγα **Π28-Π31**. Με τον ίδιο τρόπο, η αντίδραση της μεθοξυ και διμεθοξυ τετραλόνης με διάφορα βενζοϋλοχλωρίδια δίνει σε καλές συνολικές αποδόσεις (49 έως 67%) τα αντίστοιχα παράγωγα που περιέχουν τον συμπυκνωμένο δακτύλιο ισοξαζολίου-τετραλόνης **Π32-Π35**, **Π40** και **Π42** (**Σχήμα 3.4** και **Σχήμα 3.5**), οι οποίες αποπροστατεύονται με σχεδόν ποσοτικές αποδόσεις παρέχοντας τελικά τα μόρια-στόχους **Π36**, **Π37** και **Π41** και **Π43**.

Η δομή όλων των παραπάνω ισοξαζολίων προσδιορίστηκε-διαλευκάνθηκε με τη χρήση ποικίλων πειραμάτων NMR δυο διαστάσεων, όπως τα COSY, HSQC και HMBC. Αναλυτικότερα, η διαμόρφωση των ενώσεων **Π24-Π31** αποσαφηνίστηκε μέσω της μεγάλης εμβέλειας συσχέτισης των C-5 (προς τα κάτω > 166 ppm) με τα πρωτόνια H-6 'και H-2', η οποία είναι χαρακτηριστική για όλες τις παρόμοιες ενώσεις και ενδεικτική των προτεινόμενων δομών. Ομοίως, η

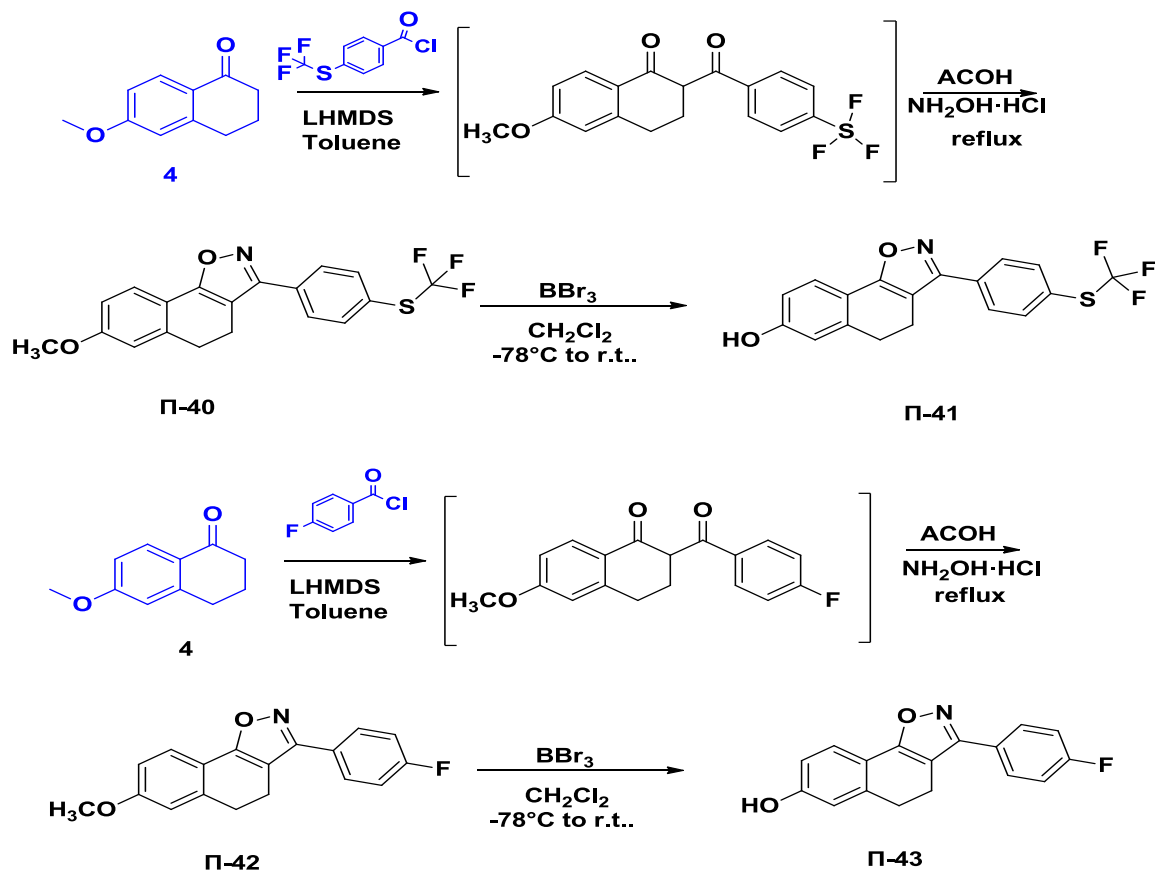
αντιστοιχία μεταξύ C-5 και H-7 και H-13 στο πείραμα HMBC για τα ισοξαζόλια
Π32-Π43 χρησιμοποιήθηκε για την αποσαφήνιση των προτεινόμενων δομών.



Σχήμα 3.3. Σύνθεση ισοξαζολίων από την ακετοφαινόνη



Σχήμα 3.4. Σύνθεση παραγώγων ισοξαζόλης από την τετραλόνη



Σχήμα 3.5. Σύνθεση παραγώγων ισοξαζόλης από την τετραλόνη

3.4. Κυτταροστατικές ιδιότητες των ισοξαζολικών παραγώγων

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των νέων ισοξαζολικών παραγώγων $\Pi-24$ έως $\Pi-42$ αξιολογήθηκε σε τέσσερις κυτταρικές σειρές, δύο ενδοθηλιακών κυττάρων [ανθρώπινα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (Human Microvascular Endothelial Cells, HMEC-1) και ενδοθηλιακά κύτταρα εγκεφάλου μύς (Murine Brain Endothelial Cells, MBEC)] και δύο σειρών ανθρώπινων καρκινικών όγκων [τραχήλου (Henrietta Lack's cervical cancer cells, HeLa cells) και μαστού (Michigan Cancer Foundation-7, MCF-7 cells)]. Τα σχετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1** εκφρασμένα ως IC_{50} , η οποία εκφράζει τη συγκέντρωση της ένωσης που μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 50% (ανασταλτική συγκέντρωση 50%).

Από τα νέα μόρια της κατηγορίας αυτής που συντέθηκαν και μελετήθηκαν στο πλαίσιο διενέργειας της διατριβής, τα μόρια **Π-24**, **Π-25**, **Π-26** και **Π-27** με υποκαταστάτες O-CH₃ ή NO₂ σε θέση R₁ δεν έδειξαν αντιπολλαπλασιαστική δράση σε καμία από τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (IC₅₀ >100 μM). Τα μόρια **Π-28** και **Π-30** (χωρίς υποκατάσταση ή με αιθυλο ομάδα στη θέση R₂) έδειξαν αξιοσημείωτη κυτταροστατική δράση στις ενδοθηλιακές και καρκινικές σειρές HMEC-1 και MCF-7 τιμές IC₅₀ χαμηλότερες των 10 μM. Αντίστοιχα, το μόριο **Π-31** (διαθέτει NO₂ στη θέση R₃ και κανένα υποκαταστάτη στη θέση R₂), έδειξε μέτρια κυτταροστατικότητα με τιμές IC₅₀ να κυμαίνονται μεταξύ 27 και 57 μM. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι για τη συγκεκριμένη ομάδα μορίων η παρουσία υδροξυλομάδας θέση R₃ σε συνδυασμό με την απουσία υποκαταστάτη στη θέση R₂ είναι η καλύτερη δομική διάταξη για αυξημένη αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε ενδοθηλιακές και καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η αντι-πολλαπλασιαστική δράση των ισοξαζολικών παραγώγων που συντέθηκαν από την τετραλόνη. Σε αντιστοιχία με τα προηγούμενα μόρια, οι ενώσεις **Π-32**, **Π-33** και **Π-34** που έχουν OCH₃ στη θέση R₁ δεν ήταν δραστικές, ανεξάρτητα εάν περιείχαν ένα ή δύο επιπλέον OCH₃ στις θέσεις R₂, R₃ ή/και R₄. Ωστόσο, η **Π-35** ένωση που περιέχει OCH₃ ομάδες στις θέσεις R₁, R₂, R₃ και R₄ αποδείχθηκε κατά δέκα φορές περισσότερο δραστική σε σύγκριση με το ελεύθερης διαμόρφωσης ευκίνητο (flexible) μόριο **Π-28**, επιδεικνύοντας –ανάλογα με την κυτταρική σειρά– τιμές IC₅₀ μεταξύ 0.36 και 1.1 μM. Η αξιοσημείωτη αυτή δραστικότητα αναδεικνύουν το μόριο αυτό ως ένωση οδηγός (lead compound) για περαιτέρω εξέλιξη. Η απομεθυλίωση του **Π-35** οδήγησε σε μείωση της κυτταροστατικής του δράσης. Το παράγωγο αυτό (μόριο **Π-39**) είναι λιγότερο δραστικό σε σύγκριση με το **Π-35**, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία της μεθοξυ ομάδας στη συγκεκριμένη θέση είναι απαραίτητη για την εμφάνιση βιοδραστικότητας. Τέλος, οι ενώσεις **Π-40**, **Π-41**, **Π-42** έδειξαν μέτρια αντιπολλαπλασιαστική δράση (IC₅₀ μεταξύ 34-81 μM για τα αποπροστατευμένα μόρια).

Πίνακας 3.1. Αντιπολλαπλασιαστική δράση των ισοξαζολίων

Ένωση	IC ₅₀ (μM)			
	HMEC-1	MBEC	HeLa	MCF-7
Π-24	>100	>100	>100	>100
Π-25	>100	>100	>100	>100
Π-26	>100	>100	>100	>100
Π-27	>100	>100	>100	>100
Π-28	6.3 ± 0.5	2.5 ± 0.2	6 ± 0.9	5.2 ± 0.3
Π-29	47 ± 1	19 ± 3	15 ± 3	48 ± 2
Π-30	9.7 ± 1.1	13 ± 2	16 ± 1	9.8 ± 0.4
Π-31	27 ± 7	42 ± 1	57 ± 6	53 ± 2
Π-32	>100	>100	>100	>100
Π-33	>100	>100	>100	>100
Π-34	>100	>100	>100	>100
Π-35	0.56 ± 0.12	1.1 ± 0.1	0.59 ± 0.08	0.36 ± 0.05
Π-37	7.4 ± 0.8	6.8 ± 0.1	10 ± 1	2.1 ± 0.1
Π-39	4.2 ± 2.2	10 ± 1	9.1 ± 0.6	2.1 ± 0.1
Π-40	>100	>100	>100	>100
Π-41	65 ± 20	67 ± 20	55 ± 36	81 ± 19
Π-42	>100	>100	34 ± 15	>100

3.5 Υπολογιστικό μέρος- Μοριακή μηχανική

3.5.1. Εισαγωγή

Σήμερα, τα περισσότερα φάρμακα προκύπτουν με τη χρήση του Ορθολογικού Σχεδιασμού Φαρμάκων (**Rational Drug Design**), ως αποτέλεσμα μιας κυκλικής διαδικασίας τριών φάσεων που περιλαμβάνει: Σχεδιασμό, Σύνθεση και Δοκιμή.(Leach and Ji Gillet, 2003). Κεντρικό ρόλο στη διαδικασία αυτή διαδραματίζει η Υπολογιστική Χημεία (**Computational Chemistry**), η οποία αναφέρεται στο συνδυασμό της χρήσης των μεθοδολογιών που προσφέρει η σύγχρονη χημεία και η τεχνολογία των υπολογιστών και πληροφορικής. Τέτοια εργαλεία αποτελούν η μοριακή μοντελοποίηση (molecular modelling), οι υπολογισμοί μοριακών τροχιακών (MO calculations), μοριακής μηχανικής (molecular mechanics) και μοριακής δυναμικής (molecular dynamics), οι

αλγόριθμοι αναζήτησης διαμορφώσεων (conformational analysis), οι αλγόριθμοι Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR), οι μελέτες Απορρόφησης, Κατανομής, Μεταβολισμού, Απέκκρισης, Τοξικότητας (Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Toxicity, ADMET) και οι μελέτες πρόσδεσης σε μακρομόρια-πρωτεΐνες (docking).

Η **Ποσοτική Σχέση Δομής Δράσης (QSAR)** είναι η μαθηματική αναπαράσταση της βιολογικής δράσης μιας σειράς ομόλογων μορίων με όρους δομικών χαρακτηριστικών. Ο κύριος σκοπός της QSAR είναι η αναζήτηση νέων μορίων που διαθέτουν κάποιες επιθυμητές ιδιότητες, χρησιμοποιώντας μια μαθηματικά ποσοτικοποιημένη και υπολογισμένη μορφή. Η βασική αρχή είναι ότι η επαλήθευση τέτοιων συσχετισμών οδηγεί στη συνέχεια στην ασφαλή πρόβλεψη της δομής ενός μεγάλου αριθμού ομοειδών μορίων, τα οποία επίσης μπορεί να διαθέτουν τις επιθυμητές ιδιότητες. Έτσι, με τη μεθοδολογία QSAR αποθηκεύονται οι σχετικές γνώσεις και χρησιμοποιούνται για την επίσπευση της διαδικασίας ανάπτυξης νέων μορίων και φαρμάκων. Η επιτυχία της QSAR στην ανάπτυξη νέων μορίων και φαρμάκων, όπως και για την πρόβλεψη της τοξικότητας των μορίων είναι υψηλής σημασίας. Η βασική υπόθεση που ενυπάρχει σε κάθε μοντέλο QSAR είναι ότι οι φυσικές και χημικές ιδιότητες μιας χημικής ένωσης, καθώς και η βιολογική της δράση, σχετίζονται με τα δομικά της χαρακτηριστικά (Johnson and Maggiora, 1990; Krieger, 1996; Parthasarathi et al., 2004). Φυσικές και χημικές ιδιότητες, καθώς και δεδομένα βιολογικής δράσης αποθηκεύονται σε μια βάση γνώσης, η οποία δρα ως βιβλιοθήκη χαρακτηριστικών, αποτελώντας τελικά βάση δεδομένων διαχείρισης πληροφοριών. Στην παρούσα διατριβή αξιοποιήθηκε η στρατηγική αυτή για τη δημιουργία αρχικά μιας βάσης χημικών δεδομένων, και στη συνέχεια την επιλογή κατάλληλων δομικά συσχετισμένων ομάδων μορίων από τα οποία εξήχθησαν μοντέλων Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (QSAR).

3.5.2. Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης

Για την προ-επεξεργασία, μοντελοποίηση και επικύρωση των δεδομένων μας, χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα **KNIME (Konstanz Information Miner)**, η οποία κρίθηκε ως η πλέον κατάλληλη για την εκτέλεση βήμα προς βήμα όλων των υπολογιστικών εργασιών οι οποίες είναι σημαντικές για την ανάπτυξη του επικυρωμένου μοντέλου (Melagraki and Afantitis, 2013). Συγκεκριμένα, η KNIME

αποτελεί μια ανοικτή πηγή ανάλυσης δεδομένων που ενσωματώνει διάφορα εξαρτήματα για μηχανική μάθηση και εξόρυξη δεδομένων με στόχο την υλοποίηση ενός μοντέλου πρόβλεψης, ακολουθώντας τη σειρά που περιγράφεται ως εξής:

- Αρχικά, εισήχθησαν και υπέστησαν προ-επεξεργασία οι δομές των μορίων και οι πληροφορίες από τις δοκιμές βιοδραστικότητας,
- στη συνέχεια, για κάθε ένωση προσδιορίστηκαν οι κρίσιμες παράμετροι (γνωστοί ως **descriptors**) που σχετίζονται με τα χημικά, φυσικοχημικά, ηλεκτρονικά και κβαντικά της χαρακτηριστικά
- από αυτούς επιλέχθηκε ένας αριθμός, ο αλγόριθμος που βασίζεται στην τεχνική **των Τυχαίων Δασών (the Random Forest algorithm)**,
- η εφαρμογή του οποίου έδωσε το ζητούμενο μοντέλο που στη συνέχεια επικυρώθηκε και προσδιορίστηκε ο τομέας εφαρμογής του.

Μετά τη βελτιστοποίηση των γεωμετρικών χαρακτηριστικών κάθε ένωσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο **PM6** που περιλαμβάνεται στο λογισμικό κβαντικής χημείας **MOPAC2009** (Stewart, 2007, 2008), για κάθε ένωση καθορίστηκαν-υπολογίστηκαν 294 περιγραφείς (**descriptors**) χρησιμοποιώντας την ανοικτής πρόσβασης βιβλιοθήκη **Chemistry Development Kit (CDK)** (Steinbeck et al., 2003). Επειδή ορισμένοι από τους περιγραφείς δεν απεικονίζουν κάποια μεταβολή και δεν προσφέρουν καμία ουσιαστική διάκριση, εφαρμόστηκε ένα φίλτρο για την κατάργησή τους. Τελικά, παρέμειναν συνολικά 159 περιγραφείς οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως πιθανοί είσοδοι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μοντέλου QSAR.

Πριν από την πραγματοποίηση της κατάταξης, οι πλέον σημαντικές ιδιότητες των 159 διαθέσιμων περιγραφέων προ-επιλέχθηκαν με τη χρήση του γνωστού στο χώρο της στατιστικής λογισμικού **Weka (Waikato Environment for Knowledge Analysis)**, το οποίο περιλαμβάνει τα κατάλληλα εργαλεία απεικόνισης και αλγορίθμους για την ανάλυση δεδομένων και την προγνωστική μοντελοποίηση (Hall et al., 2009). Ο αλγόριθμος συσχέτισης με βάση την επιλογή χαρακτηριστικών από υποσύνολα (**CfsSubset**) αξιολόγησε την αξία ενός υποσυνόλου χαρακτηριστικών λαμβάνοντας υπόψη την ατομική προβλεπτική ικανότητα του κάθε χαρακτηριστικού, μαζί με το βαθμό πλεονασμού μεταξύ τους. Ανάμεσα στους 159 διαθέσιμους περιγραφείς, επιλέχθηκαν μόνο τέσσερις ως οι

πιο σημαντικοί για την ανάπτυξη του μοντέλου. Συγκεκριμένα, οι BCUTp-1L, Wlambda3unity, Wnu2unity και Weta1unity.

Από αυτούς, ο BCUT είναι ένας μοριακός παράγοντας που λαμβάνει υπόψη τόσο τη συνδεσιμότητα, όσο και τις ατομικές ιδιότητες ενός μορίου (Burden, 1997; Pearlman and Smith, 1999). Αντίστοιχα, οι Wlambda3unity, Wnu2unity και Weta1unity ανήκουν στους σταθμισμένους ολιστικά αμετάβλητους μοριακούς παράγοντες (WHIM descriptors) που υπολογίζονται με βάση τις προβλέψεις των ατόμων κατά μήκος βασικών αξόνων (Todeschini and Gramatica, 1998). Οι WHIM περιγραφείς κωδικοποιούν πληροφορίες σχετικές με την τρισδιάστατη (3D) μοριακή δομή, το μέγεθος, το σχήμα, την συμμετρία, και την ατομική κατανομή σε σχέση με το αμετάβλητο πλαίσιο του μορίου (Todeschini and Consonni, 2009).

Όσον αφορά τις μεθόδους μοντελοποίησης, τα **Τυχαία Δάση (Random Forest, RF)** είναι μια μηχανική μέθοδος μάθησης, που αποτελείται από πολλά δενδρογράμματα απόφασης για να εξάγει μια πρόβλεψη η οποία συνδυάζει το αποτέλεσμα που δίνεται από τα μεμονωμένα δένδρα (Breiman, 2001). Για την κατασκευή ενός δέντρου απόφασης ανατίθεται αρχικά στη ρίζα του το σύνολο των δειγμάτων εκπαίδευσης. Κάθε ενδιάμεσος κόμβος περιέχει υποσύνολο των δειγμάτων το οποίο μέσω της εφαρμογής ενός κατάλληλου ελέγχου διαχωρίζεται σε δυο ή περισσότερα μικρότερα υποσύνολα στο επόμενο επίπεδο. Ο έλεγχος συνήθως αφορά ένα υποσύνολο των χαρακτηριστικών των δειγμάτων εκπαίδευσης. Τα δέντρα του δάσους αναπτύσσονται στο μέγιστο μέγεθός τους, χωρίς κλάδεμα. Η διαδικασία ταξινόμησης «άγνωστων» παραδειγμάτων πραγματοποιείται μέσω της διάσχισης των δέντρων του δάσους ξεκινώντας από τη ρίζα και καταλήγοντας σε ένα από τα φύλλα του δέντρου και στη συνέχεια συνδυάζοντας τις προβλέψεις των ταξινομητών σύμφωνα με ένα πλειοψηφικό σύστημα ψηφοφορίας (majority voting scheme). Κάθε παράδειγμα ανατίθεται στην κατηγορία με τη μεγαλύτερη συχνότητα (Breiman, 2001).

Για την επικύρωση του μοντέλου που αναπτύχθηκε χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές (Tropsha, 2010), ενώ τα σχετικά αποτελέσματα ταξινομήθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου Cooper (Cooper et al., 1979) στον τομέα της στατιστικής, κατηγοριοποιούμενα σε τέσσερις περιπτώσεις: Οι **δραστικές ενώσεις** που προβλέπονται ως **δραστικές** χαρακτηρίζονται ως **TP (True Positive)** ενώ όσες προβλέπονται ως **μη δραστικές** χαρακτηρίζονται ως **FN (False Negative)**. Αντίστοιχα, οι μη δραστικές ενώσεις που προβλέπονται ως

μη δραστικές χαρακτηρίζονται ως **TN (true negative)** και αυτές που προβλέπονται ως δραστικές FP (False Positive).

Ειδικότερα, τα προτεινόμενα μοντέλα ταξινόμησης επικυρώθηκαν πλήρως, χρησιμοποιώντας τις τέσσερις προαναφερόμενες περιπτώσεις, με βάση τις παρακάτω μετρήσεις:

$$\text{Πιστότητα} = \frac{TP}{TP+FP} \quad (1)$$

$$\text{Ευαισθησία, (Sensitivity, S)} = \frac{TP}{TP+FN} \quad (2)$$

Αποτελεί το μέτρο των θετικών ενώσεων που έχουν προβλεφθεί σωστά. Ένα καλό μοντέλο έχει υψηλή ευαισθησία.

$$\text{Εκλεκτικότητα, (Specificity, SP)} = \frac{TN}{TN+FP} \quad (3)$$

Αποτελεί το μέτρο των αρνητικών ενώσεων που έχουν προβλεφθεί σωστά. Πολλές φορές αναφέρεται και η παράμετρος 1- SP.

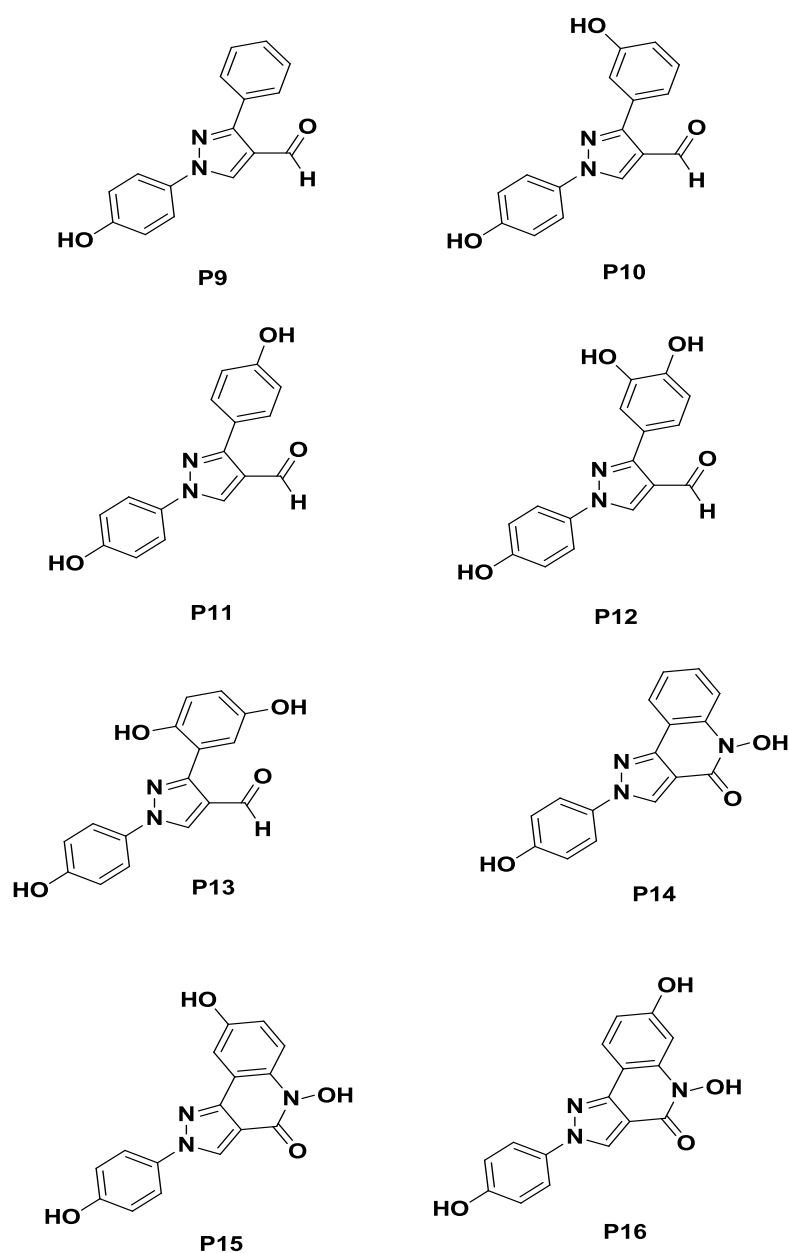
$$\text{Ακρίβεια, (Accuracy, A)} = \frac{TP+TN}{TP+FP+FN+TN} \quad (4)$$

Αποτελεί το μέτρο της ορθότητας της πρόβλεψης. Δίνει μια γενική εκτίμηση των λαθών που έγιναν και όσο πιο μεγάλη είναι τόσο καλύτερο θεωρείται το μοντέλο.

3.5.3. Διαχωρισμός ανάμεσα σε ένα σύνολο ελέγχου και εκπαίδευσης

Σε μια προσπάθεια να αναπτυχθούν (σχεδιαστούν, συντεθούν και δοκιμαστούν) νέα μόρια με βελτιωμένη αντιπολλαπλασιαστική δραστικότητα, αναλύθηκε-μελετήθηκε υπολογιστικά ένα σύνολο 33 δομών μορίων –κυρίως ισοξαζολικά και πυραζολικά παραγώγα– με μελετημένη τη δράση τους ως αναστολείς του πολλαπλασιασμού των κυττάρων HeLa. Δεκαεπτά από τα μόρια αυτά είναι ισοξαζόλια που περιγράφονται στο τρέχον κεφάλαιο (Π-24 έως Π-35, Π-37 και Π-39 έως Π-42) και τα δεκαέξι πυραζολικά παράγωγα, οκτώ από τα οποία έχουν ήδη παρουσιαστεί στο δεύτερο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής

(Π-5 έως Π-12), ενώ τα εναπομείναντα οκτώ (P9 έως P16) έχουν μελετηθεί δημοσιευθεί προηγουμένως από την ερευνητική μας ομάδα (Christodoulou et al. 2010) (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Οι δομές πυραζολίων P9-P16 που έχουν αναπτυχθεί προηγουμένως από την ερευνητική μας ομάδα (Christodoulou *et al.* 2010)

Για να παραχθεί το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο θα ταξινομηθούν τα δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο δεδομένων γνωστών κατηγοριών για την εκπαίδευση του μοντέλου (σύνολο εκπαίδευσης – training set) και ένα άλλο σύνολο για τον έλεγχο του (σύνολο ελέγχου – test set), με σκοπό να γίνει

δυνατή η ταξινόμηση μελλοντικών δεδομένων. Αυτό, δεν αρκεί απλώς να χωρέσει τα γνωστά δεδομένα, αλλά θα πρέπει να είναι σε θέση και να γενικεύει άγνωστα δεδομένα. Ως εκ τούτου θα πρέπει οπωσδήποτε να επικυρωθεί. Ο παραδοσιακός τρόπος επικύρωσης προβλέπει το χωρισμό του συνόλου των πληροφοριών σε δύο μέρη, στο υποσύνολο εκπαίδευσης και στο υποσύνολο ελέγχου. Το υποσύνολο εκπαίδευσης χρησιμοποιείται για την κατασκευή του μοντέλου και τα δεδομένα που περιλαμβάνει σχετίζονται με τον αλγόριθμο. Το μοντέλο στη συνέχεια δοκιμάζεται με το υποσύνολο ελέγχου, των οποίων τα δεδομένα δεν έχουν δοθεί στον αλγόριθμο. Με τον τρόπο αυτό το υποσύνολο εκπαίδευσης χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του μοντέλου QSAR, όπως περιγράφεται κατωτέρω, ενώ το σύνολο ελέγχου δεν συμμετείχε σε κανένα στάδιο της ανάπτυξής του (Mitchell, 2014).

Το αρχικό σύνολο δεδομένων των 33 ενώσεων με δεδομένα για την αναστολή των κυττάρων HeLa, διαμοιράστηκε τυχαία σε σετ εκπαίδευσης και σετ ελέγχου, σε αναλογία 70:30 που αποτελούνται από 24 και 9 αντίστοιχα ενώσεις. Ο διαχωρισμός του συνόλου των δεδομένων έγινε με τη χρήση του κόμβου διαχωρισμού KNIME εφαρμόζοντας την προεπιλεγμένη τυχαία διασπορά. Η χρήση της τυχαίας διασποράς παρέχει επαναλήψιμα αποτελέσματα με την εκ νέου εκτέλεση του κόμβου. Οι 10 ενώσεις που αποτελούσαν το σύνολο των δοκιμών δεν είχαν εμπλακεί με οποιονδήποτε τρόπο στην εκπαιδευτική διαδικασία. Το σετ εκπαίδευσης περιλαμβάνει 24 μόρια από τα οποία τα 15 είναι “δραστικά” και τα 9 “μη δραστικά” ενώ και το σετ ελέγχου περιλαμβάνει 9 μόρια από τα οποία τα 5 είναι “δραστικά” και 4 “μη δραστικά”. Η τιμή **όριο** για τη διάκριση μεταξύ “δραστικών” και “μη δραστικών” ορίστηκε στα **IC₅₀ > 100 μΜ**.

Ένα μοντέλο κατηγοριοποίησης αναπτύχθηκε ώστε να διαχωριστούν τα “δραστικά” από τα “μη δραστικά” με την τεχνική κατάταξης με δεκαπέντε δέντρα Random Forest, που περιλαμβάνεται στο WEKA πρόγραμμα (Hall et al., 2009). Μετά την εφαρμογή του μοντέλου κατάταξης, έλαβε θέση η πρόβλεψη σχετικά με την δραστικότητα των μορίων. Οι πειραματικές τιμές και τα αποτελέσματα πρόβλεψης και για τα δύο σύνολα, εμφανίζονται στους παρακάτω **Πίνακες 3.2, 3.3 και 3.4**. Η απόδοση του μοντέλου εκτιμήθηκε με βάση τις μετρήσεις επικύρωσης που περιεγράφηκαν προηγουμένως. Η ειδικότητα, η ευαισθησία, η πιστότητα και ακρίβεια του μοντέλου απεικονίζονται από τα αντίστοιχα στατιστικά στοιχεία, **Πίνακας 3.5**. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του μοντέλου στα τεστ εκπαίδευσης παρήγαγε τα εξής στατιστικά αποτελέσματα:

πιστότητα = 92,9 %,
 ευαισθησία = 86,725 %,
 ειδικότητα = 88,9 %, και
 ακρίβεια = 87,5 %.

Αντίστοιχα, η εφαρμογή του μοντέλου στα τεστ ελέγχου έδωσε τα εξής στατιστικά αποτελέσματα :

πιστότητα = 100%,
 ευαισθησία = 83,3 %,
 ειδικότητα = 100%, και
 ακρίβεια = 89 %.

Πίνακας 3.2. Πειραματικές τιμές και προβλέψεις (*Τα μόρια που συμπεριλαμβάνονται στο σύνολο ελέγχου)

Κωδικοποίηση Μορίων	Κατάταξη βάση παρατήρησης	Κατάταξη βάση πρόβλεψης
Π-24	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-25	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-26	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-27*	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-28	Δραστικό	Δραστικό
Π-29*	Δραστικό	Δραστικό
Π-30	Δραστικό	Δραστικό
Π-31	Δραστικό	Δραστικό
Π-32	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-33*	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-34	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-35	Δραστικό	Δραστικό
Π-37	Δραστικό	Δραστικό
Π-39*	Δραστικό	Δραστικό
Π-40	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-41	Δραστικό	Δραστικό
Π-42	Δραστικό	Δραστικό
Π-5*	Μη δραστικό	Μη δραστικό

Π-6	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-7	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-8	Μη δραστικό	Μη δραστικό
Π-9*	Δραστικό	Δραστικό
Π-10	Δραστικό	Δραστικό
Π-11	Δραστικό	Δραστικό
Π-12	Δραστικό	Δραστικό
P9	Δραστικό	Δραστικό
P10*	Δραστικό	Δραστικό
P11	Δραστικό	Δραστικό
P12*	Δραστικό	Δραστικό
P13*	Μη δραστικό	Δραστικό
P14	Δραστικό	Δραστικό
P15	Δραστικό	Δραστικό
P16	Δραστικό	Δραστικό

Πίνακας 3.3. Σύνολο εκπαίδευσης Confusion Matrix (Training Set, 10-fold Crossvalidation) Random Trees.

	Θετική πρόβλεψη	Αρνητική πρόβλεψη
Θετική παρατήρηση (Δραστικά)	13	2
Αρνητική παρατήρηση (Μη δραστικά)	1	8

Πίνακας 3.4. Σύνολο ελέγχου Confusion Matrix (Test Set) Random Trees.

	Θετική πρόβλεψη	Αρνητική πρόβλεψη
Θετική παρατήρηση (Δραστικά)	5	0
Αρνητική παρατήρηση (Μη δραστικά)	1	3

Πίνακας 3.5. Ειδικότητα, ευαισθησία, πιστότητα και ακρίβεια στατιστικά (Random Trees).

	Ειδικότητα	Ευαισθησία	Πιστότητα	Ακρίβεια
Διασταυρώμενη επικύρωση	0.889	0.867	0.929	0.875
Εξωτερική επικύρωση	1	0.833	1	0.89

3.5.4. *In silico* αναζήτηση βιοδραστικών μορίων

Με τον όρο εικονική επιλογή (virtual ή *in silico* screening) εννοούμε τη χρήση υπολογιστικών διαδικασιών υψηλής απόδοσης για την ανάλυση μεγάλων συνόλων από χημικά συστατικά, με στόχο τον προσδιορισμό πιθανών υποψηφίων φαρμάκων. Πρόκειται για μια διαδικασία που συμπληρώνει τις τρέχουσες επιτεύξεις στη διαδικασία χημικής σύνθεσης υψηλής απόδοσης (high throughput screening) και τις βιολογικές δοκιμές. Το υπολογιστικό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση νέων ενώσεων και το πεδίο εφαρμογής του θα πρέπει να οριστεί ώστε μόνο οι προβλέψεις για τις ενώσεις που εμπίπτουν σε αυτόν τον τομέα να θεωρηθούν αξιόπιστες. Μετρήσεις ομοιότητας που βασίζονται στις Ευκλείδεια απόσταση –μεταξύ όλων των ενώσεων ελέγχου και εκπαίδευσης– χρησιμοποιήθηκαν για να οριστεί το πεδίο εφαρμογής των δύο μοντέλων. Η απόσταση μιας ένωσης δοκιμής από τον πλησιέστερο γείτονά του (στο σύνολο κατάρτισης) σε σχέση με την προκαθορισμένη περιοχή εφαρμογής (APD) προσδιορίστηκε ως κατώφλι. Η πρόβλεψη θεωρήθηκε αναξιόπιστη όταν η απόσταση ήταν μεγαλύτερη από το κατώφλι APD.

Το APD υπολογίστηκε ως εξής :

$$APD = \langle d \rangle + Z\sigma \quad (6)$$

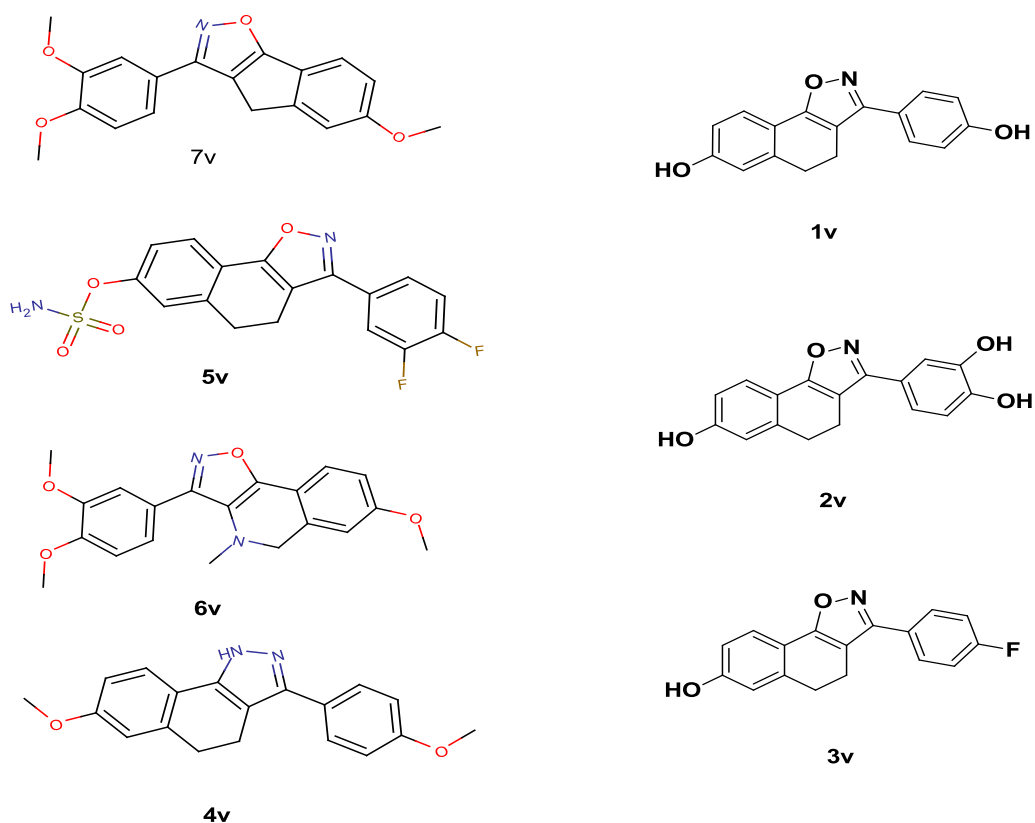
Υπολογισμός της $\langle d \rangle$ και σ διεξήχθη ως εξής: Αρχικά υπολογίστηκε ο μέσος όρος των Ευκλείδειων αποστάσεων μεταξύ όλων των ζευγών των ενώσεων κατάρτισης. Στη συνέχεια, διαμορφώθηκε το σύνολο των αποστάσεων που ήταν χαμηλότερες του μέσου όρου. Τελικά τα $\langle d \rangle$ και σ υπολογίστηκαν ως ο μέσος όρος και τυπική απόκλιση όλων των αποστάσεων που περιλαμβάνονται

σε αυτό το σύνολο. Το Z αποτέλεσε μια εμπειρική τιμή αποκοπής, η οποία για τη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε να είναι ίσο με 0.5, ενώ ο υπολογισμός του πεδίου εφαρμογής έγινε χρησιμοποιώντας το κόμβο ENALOS KNIME. Η προτεινόμενη μέθοδος, λόγω απλότητας και υψηλής προβλεπτικής της ικανότητας (Melagraki et al., 2007; Afantitis et al., 2008; Melagraki et al., 2010) μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο βοήθημα για τα δαπανηρά και χρονοβόρα πειράματα που αφορούν τη σύνθεση παραγώγων πυραζολίων και ισοξαζολίων και τον προσδιορισμό της αναστολής του τραχηλικού καρκινώματος σε ανθρώπινα κύτταρα (Hela). Ο σχεδιασμός των νέων ενεργών μορίων με την προσθήκη διαγραφή ή τροποποίηση των υποκαταστατών σε διαφορετικές θέσεις του μορίου θα μπορούσε επομένως να καθοδηγείται από το προτεινόμενο μοντέλο.

Για να αποδειχθεί η χρησιμότητα του μοντέλου δημιουργήθηκε μια εικονική οθόνη για τον εντοπισμό πιθανών νέων δραστικών στόχων εντός των ορίων του επιλεγμένου τομέα εφαρμογής. Ο πρωταρχικός στόχος της εικονικής οθόνης ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσον το *in silico* μοντέλο που αναπτύχθηκε μπορούσε να κατατάξει δομές που δεν περιλαμβάνονταν στα σύνολα εκπαίδευσης ή ελέγχου, ως δραστικά ή μη δραστικά. Ο δεύτερος στόχος ήταν να προσδιορίσει ποιες διαρθρωτικές αλλαγές στη δομή τους, θα μπορούσαν να γίνουν ανεκτές, χρησιμοποιώντας το πεδίο εφαρμογής. Ο τελικός ρόλος της *in silico* οθόνης ήταν να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για τον εντοπισμό των πιο ελπιδοφόρων μορίων-στόχων.

Κατά τη διαδικασία εικονικής επιλογής (virtual screening) για την ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων, σχεδιάστηκαν τα μόρια **1v-7v** που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.2**. Από αυτά, το πυραζολικό παράγωγο **4v** επιλέχθηκε ως μια βάση μοριακής σύγκρισης με τα πυραζόλια του Κεφαλαίου 2. Τα ισοξαζόλια **1v** και **2v** διαφέρουν μόνο κατά μία υδροξυλομάδα στον Β δακτύλιο και το μοντέλο τα κατατάσσει ως δραστικές ουσίες. Το ισοξαζόλιο **3v** έχει σχεδιαστεί για να συσχετιστεί η παρουσία της υδροξυλομάδας με την αντι-πολλαπλασιαστική δραστηριότητα και συγκεκριμένα η επίδραση της α) προστασίας της, και β) αντικατάστασής της με ένα άτομο φθορίου. Παρόλο που το μοντέλο χαρακτηρίζει την ένωση αυτή ως δραστική η πειραματική επικύρωση δείχνει το ακριβώς αντίθετο. Το ισοξαζόλιο **5v** σχεδιάστηκε ως εναλλακτική πρόταση για το παράγωγο **2v**. Σε αυτό, η υδροξυλομάδα του Α δακτυλίου έχει αντικατασταθεί από μια σουλφαμική ομάδα (δρα ως δότης ηλεκτρονίων), ενώ οι άλλες δύο

ομάδες υδροξυλίου έχουν αντικατασταθεί με το άτομο φθορίου. Με βάση το μοντέλο, η υποκαταστάσεις αυτές οδηγούν σε μια μη δραστική ένωση. Η ένωση **6v** αποτελεί ένα μέθοξυ-προστατευμένο ανάλογο της ένωσης **2v** όπου ο τετραλονικός πυρήνας του **6v** έχει υποκατασταθεί από μια χαρακτηριστική ομάδα κινολίνης. Και η τροποποίηση του μορίου οδηγεί σε μία μη δραστική ένωση (**6v**) με βάση το μοντέλο. Η αντικατάσταση του πυρήνα τετραλόνης με ένα πιο ευέλικτο πυρήνα ινδανόνης, δημιούργησε την ένωση **7v** ως μια προσπάθεια να αποσαφηνιστεί η επίδραση στη βιολογική δραστηριότητα της αλλαγής του άκαμπτου σκελετού. Η ένωση **7v** επίσης προβλέφθηκε ως μη δραστική. Οι ενώσεις **4v** και **7v** που παρουσιάστηκαν ως ανενεργές ενώσεις σύμφωνα με το μοντέλο δεν ερευνήθηκαν περαιτέρω πειραματικά.



Εικόνα 3.2. Εικονική Μελέτη Επιλογής Ισοξαζολικών Μορίων (Chemistry Driven Virtual Screening Molecules)

Με βάση το μοντέλο που αναπτύχθηκε, από τις προτεινόμενες δομές μόνο τρία μόρια ταυτοποιήθηκαν ως δυνητικώς δραστικοί αναστολείς (**2v**, **2v** και **3v**). Τα μόρια αυτά συντέθηκαν σύμφωνα με τις πορείες που παρουσιάζονται στα **Σχήματα 3.4** και **3.5** και περιγράφονται λεπτομερώς στο πειραματικό μέρος. Οι πορείες αυτές περιλαμβάνουν την αρχική σύνθεση των μορίων **Π-32**, **Π-34** και **Π-42**, τα οποία στη συνέχεια αποπροστατεύτηκαν με σχεδόν ποσοτικές αποδόσεις δίνοντας τα προϊόντα **Π-36 (1v)**, **Π-38 (2v)** και **Π-43 (3v)**, αντίστοιχα. Για να επικυρωθούν τα αποτελέσματα της *in silico* πρόβλεψης, η βιοδραστικότητα των και τα σχετικά αποτελέσματα απεικονίζονται στον **Πίνακα 3.6**. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, δύο από τα προτεινόμενα μόρια, οι ενώσεις **Π-36** και **Π-38** επαληθεύτηκαν και πειραματικά ως δραστικά, ενώ η ένωση **Π-43** προσδιορίστηκε να διαθέτει μέτρια έως ελάχιστη αντι-πολλαπλασιαστική δράση. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι το τρι-υποκατεστημένο παράγωγο **Π-38** είχε την καλύτερη δραστηριότητα, με τιμές IC_{50} κάτω από 1 μM .

Πίνακας 3.6. Βιοδραστικότητα των νέων ενώσεων που συντέθηκαν με βάση τους *in silico* υπολογισμούς

Ένωση	IC_{50} (μM)			
	HMEC-1	MBEC	HeLa	MCF-7
Π-36	6.7 ± 0.1	4.6 ± 1.7	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.8
Π-38	0.42 ± 0.12	0.96 ± 0.4	0.97 ± 0.08	0.72 ± 0.14
Π-43	46 ± 15	38 ± 9	>100	>100

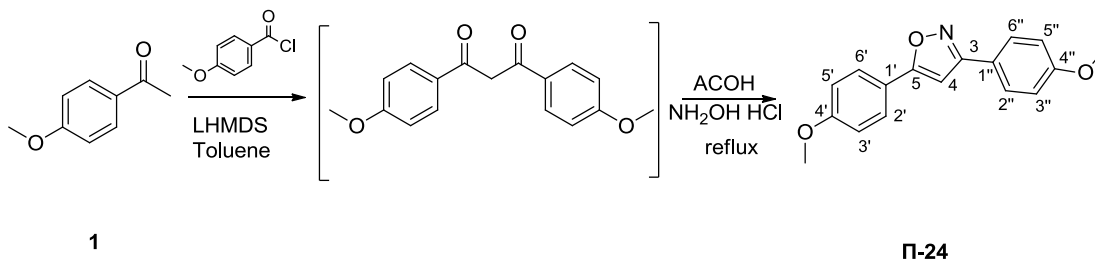
3.6 Συζήτηση- Συμπεράσματα

Μια σειρά νέων ισοξαζολικών παραγώγων συντέθηκαν χρησιμοποιώντας μια απλή διαδικασία που βασίζεται στην τροποποίηση μεθοδολογίας του 2006 για την *in situ* σύνθεση πυραζολίων, η οποία προσαρμόστηκε για να χρησιμοποιηθεί για τα ισοξαζόλια. Η βιοδραστικότητα των μορίων σε σχέση με την αντιπολλαπλασιαστική τους δράση προσδιορίστηκε σε τέσσερις διαφορετικές κυτταρικές γραμμές. Από τα μόρια που συντέθηκαν τα ισοξαζολικά παράγωγα **28** και **30** επέδειξαν τη σημαντικότερη κυτταροστατική δραστηριότητα.

Με βάση τα αποτελέσματα της βιοδραστικότητας των ισοξαζολίων κατά των κυττάρων HeLa –και των αντίστοιχων αποτελεσμάτων των πυραζολίων του Κεφαλαίου 2– αναπτύχθηκε ένα μοντέλο ταξινόμησης που επιτρέπει την πρόβλεψη της αντι-πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας των ισοξαζολικών και πυραζολικών παραγώγων. Μετά τον υπολογισμό ενός σημαντικού αριθμού περιγραφών, επιλέχθηκαν αυτοί που περιγράφουν για κάθε μόριο πληρέστερα τα υπεύθυνα για την ανασταλτική τους δράση χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια, το σύνολο δεδομένων αυτών μοντελοποιήθηκε με βάση τα τυχαία δάση και αναπτύχθηκε ένα ακριβές και αξιόπιστο μοντέλο που επικυρώθηκε πλήρως με βάση τις τεχνικές της διασταυρούμενης επικύρωσης και της εξωτερικής πρόβλεψης. Το μοντέλο που παρήχθη χρησιμοποιήθηκε για το σχεδιασμό νέων δραστικών παραγώγων μέσω της διενέργειας εικονικής μελέτης επιλογής (virtual screening). Σύμφωνα με σενάριο, το μοντέλο ταξινόμησης εφαρμόστηκε για τον αποκλεισμό των μη δραστικών ενώσεων, ενώ το πεδίο εφαρμογής χρησίμευσε ως ένα πολύτιμο εργαλείο για να φιλτράρει "ανόμοιους" συνδυασμούς. Τελικά, με βάση τα αποτελέσματα των υπολογισμών, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν τέσσερα επιπλέον νέα μόρια, από οποία το ισοξαζολικό παράγωγο **35** και η προταθείσα από τους *in silico* υπολογισμούς ένωση **38**, αποδείχθηκαν τουλάχιστον 10 φορές περισσότερο δραστικές σε σύγκριση με την ένωση **28**, με τιμές IC₅₀ κοντά και κάτω από 1 μM. Εν κατακλείδι, συντέθηκε μια νέα σειρά ενώσεων ισοξαζολικών παραγώγων και κάποιες από αυτές να παρουσίασαν πολλά υποσχόμενη κυτταροστατική δράση. Περαιτέρω μελέτες για την υποκατάσταση του ισοξαζολικού πυρήνα μπορεί να προσφέρουν ενώσεις με κυτταροστατική δράση σε επίπεδο nM. Σε αυτή την κατεύθυνση η *in silico* προσέγγιση που περιεγράφηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη συλλογή βάσεων και τον προσδιορισμό μέσα από αυτές νέων μορίων-στόχων.

3.7. Πειραματικό μέρος- Σύνθεση ισοξαζολίων

3,5-δισ(4-Μεθοξυφαινυλο)ισοξαζόλη (Π-24)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	281.31	119	R _f = 0.86 CH ₂ Cl ₂ / Hex 9:1.

Μέθοδος Παρασκευής:

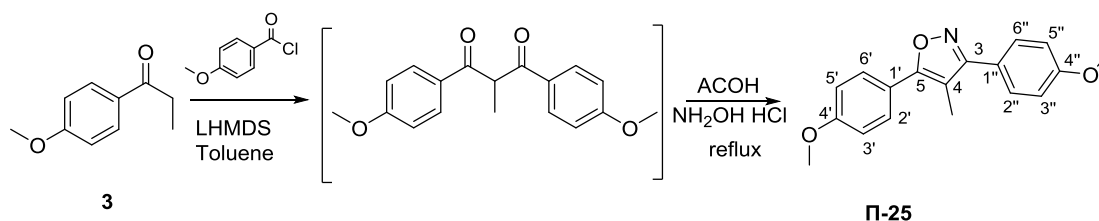
Διάλυμα της 4-μεθοξυακετοφαινόνης, **1** (0.5 g, 3.3 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση το LHMDS (3.5 mL, 1.0 M σε THF, 3.5 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανισουύλχλωριδίου (0.23 mL, 1.65 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για άλλα 2 min και έπειτα προστίθενται διαδοχικά, EtOH (17 mL) και THF (4 mL) ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (1.03 g, 15 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται 5 mL NaOH 1.0 M και εκχυλίζεται με EtOAc (2 × 20 mL). Η οργανική στοιβάδα εκπλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 9:1, δίνοντας το προϊόν **Π-24** (0.75 g, 3.2 mmol) υπό την μορφή λευκών κρυστάλλων

¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.89 (6H, s, -OCH₃), 6.67 (1H, s, H-4), 7.01 (4H, d, J 8.5 Hz, H-3', H-5', H-3'', H-5''), 7.80 (4H, d, J 8.5 Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6'').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 55.3 (-OCH₃, -OCH₃), 95.8 (C-4), 114.3 (C-3', C-5', C-3'', C-5''), 121.0 (C-1', C-1''), 128.0 (C-2', C-6', C-2'', C-6''), 160.9 (C-4', C-4''), 162.4 (C-3), 169.9 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₁₅NO₃: Θεωρητικά: C, 72.58; H, 5.37; N, 4.98;
Πειραματικά: C, 72.32; H, 5.30; N, 5.09

3,5-δισ(4-Μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλοξαζόλη (Π-25)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
76%	C ₁₈ H ₁₇ NO ₃	295.33	134-135	R _f = 0.81 CH ₂ Cl ₂ /Hex 8.5:1.5

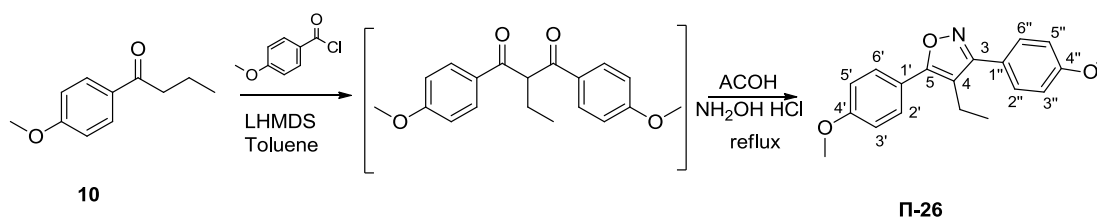
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 4-μεθοξυπροπιοφαινόνης, **3** (0.5 g, 3.0 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (3.18 mL, 1.0 M σε THF, 3.18 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανισουύλχλωριδίου (0.2 mL, 1.5 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (17 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (1.03 g, 15 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται 5 mL NaOH 1.0 M και εκχυλίζεται με EtOAc (2 × 20 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 8.5:1.5, δίνοντας το προϊόν **Π-25** (0.67 g, 2.27 mmol) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων

¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.95 (3H, s, CH₃), 3.89 (6H, s, -OCH₃), 7.04 (4H, m, H-3'', H-5'', H-3', H-5'), 7.64 (2H, d, J 9.0 Hz, H-2'', H-6''), 7.71 (2H, d, J 9.0 Hz, H-2', H-6').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₇NO₃: Θεωρητικά: C, 73.20; H, 5.80; N, 4.74; O, 16.25 ; Πειραματικά: C, 73.00; H, 5.94; N, 4.64

4-Αιθυλο-3,5-δισ(4-μεθοξυφαινυλο)ισοξαζόλη (Π-26)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
64%	C ₁₉ H ₁₉ NO ₃	309.36	144	R _f = 0.53 Hex/EtOAc 7:3

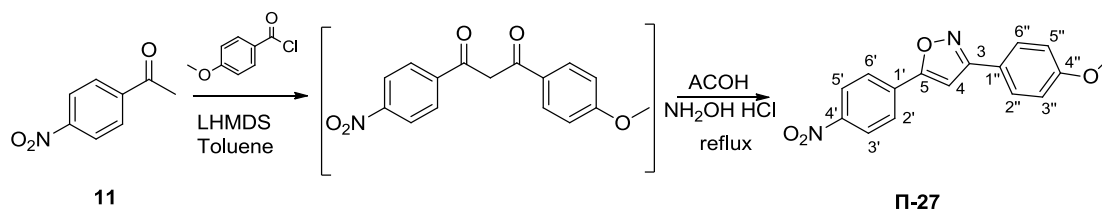
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 4-μεθοξυβουτυροφαινόνης, **10** (0.5 g, 2.8 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (2.97 mL, 1.0 M σε THF, 2.97 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανισοϋλχλωριδίου (0.19 mL, 1.4 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (16 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.96 g, 13.9 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOH (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με Et₂O δίνοντας το προϊόν **Π-26** (0.55 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων

¹H NMR (CDCl₃): δ = 1.17 (3H, t, *J* 7.5 Hz, CH₃), 2.73 (2H, q, *J* 7.5 Hz, -CH₂-), 3.88 (3H, s, -OCH₃), 3.89 (3H, s, -OCH₃), 7.35 (4H, m, H-3'', H-5'', H-3', H-5'), 7.6 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2'', H-6''), 7.7 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₉NO₃: Θεωρητικά: C, 73.77; H, 6.19; N, 4.53
Πειραματικά: C, 73.97; H, 6.29; N, 4.44.

3-(4-Μεθοξυφαινυλο)-5-(4-νιτροφαινυλο)ισοξαζόλη (Π-27)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
75%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₄	296.28	163-165	R _f = 0.77 CH ₂ Cl ₂ / Hex 9:1.

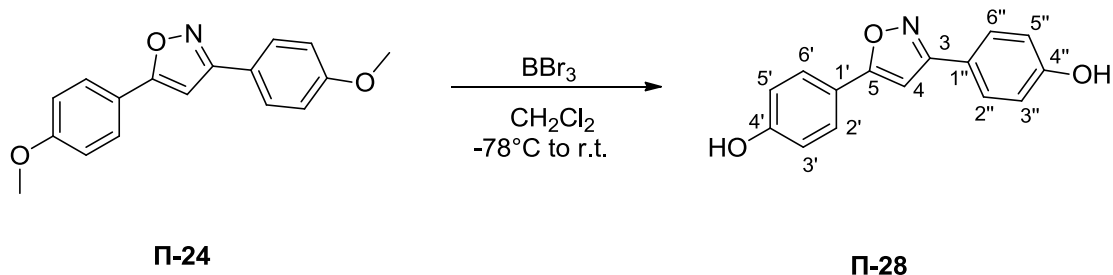
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 4-νιτροακετοφαινόνης, **11** (0.5g, 3.0 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (3.18 mL, 1.0 M σε THF, 3.18 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανισουύλχλωριδίου (0.2 mL, 1.5 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (17 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (1.03 g, 15 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOH (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 8:2, δίνοντας το προϊόν **Π-27** (0.6 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων

¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.92 (3H, s, -OCH₃), 6.85 (1H, s, H-4), 7.02 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3', H-5'), 8.02 (2H, d, J 8.5 Hz, H-2', H-6'), 8.13 (2H, d, J 9.0 Hz, H-2'', H-6''), 8.34 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3'', H-5'').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₂N₂O₄: Θεωρητικά: C, 64.86; H, 4.08; N, 9.46; Πειραματικά: C, 64.75; H, 4.00; N, 9.50.

4,4'-(Ισοξαζολο-3,5-διυλ)διφαινόλη (Π-28)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
88%	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	253.25	132	R _f = 0.37 Hex/EtOAc 4:6

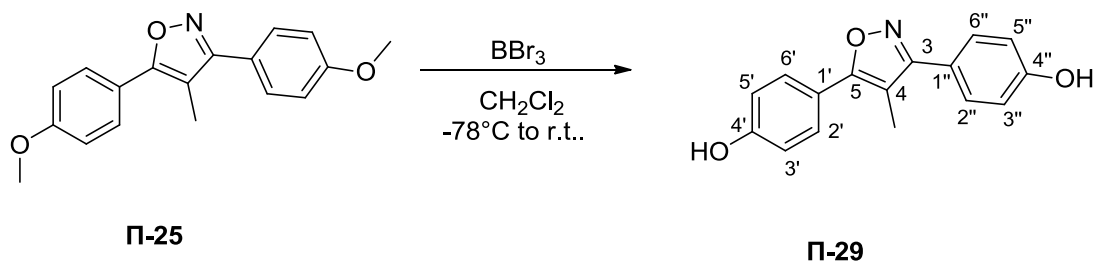
Διάλυμα **Π-24** (0.1 g, 0.36 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (15 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78 °C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr₃ (4.74 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 4.74 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOH (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται από Et₂O ή χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/Hex 6:4 δίνοντας **Π-28** (0.08 g, 0.32 mmol) ως πράσινο κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (CD₃OD): δ = 6.92 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3'', H-5''), 6.96 (2H, H-3', H-5'), 7.33 (1H, s, H-4), 7.48 (2H, J 8.5, H-2'', H-6''), 7.62 (2H, d, J 8.5 Hz, H-2', H-6').

¹³C NMR (CD₃OD): δ = 9.0 (CH₃), 98.4 (C-4), 115.6 (C-3', C-5', C-3'', C-5''), 121.1 (C-1', C-1''), 129.2 (C-2', C-6'), 130.4 (C-2'', C-6''), 160.2 (C-4', C-4''), 164.9 (C-3), 166.5 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₅H₁₁NO₃: Θεωρητικά: C, 71.14; H, 4.38; N, 5.24; Πειραματικά: C, 71.24; H, 4.29; N, 5.32.

3,4'-(4-Μεθυλισοξαζολο-3,5-διυλ)διφαινόλη (Π-29)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
87%	C ₁₆ H ₁₃ NO ₃	267.28	143	R _f = 0.55 Hex/EtOAc 4:6

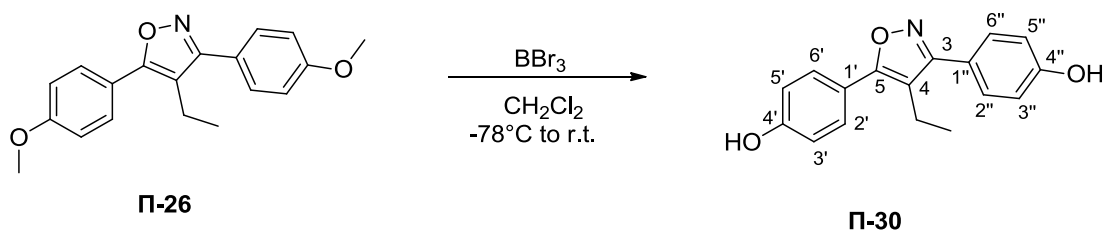
Μέθοδος Παρασκευής:

Όμοια με την αποπροστασία του **Π-24**, διάλυμα του **Π-25** (0.1 g, 0.34 mmol) αποπροστατεύτηκε δίνοντας κίτρινους δίνοντας του **Π-29** ως πράσινο κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.27 (3H, CH₃), 6.95 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'', H-5''), 6.96 (2H, H-3', H-5'), 7.51 (2H, *J* 8.5, H-2', H-6''), 7.62 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 9.0 (CH₃), 107.4 (C-4), 116.2 (C-3', C-5', C-3'', C-5''), 120.7 (C-1', C-1''), 129.3 (C-2', C-6'), 130.4 (C-2'', C-6''), 160.0 (C-4', C-4''), 164.9 (C-3), 167.0 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₃NO₃: Θεωρητικά: C, 71.90; H, 4.90; N, 5.24; Πειραματικά: C, 71.80; H, 4.83; N, 5.18.

4, 4'-(4-Αιθυλοισοξαζόλη-3,5-διυλ)διφαινόλη (Π-30)[Office1]

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	281.31	144	R _f = 0.35 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

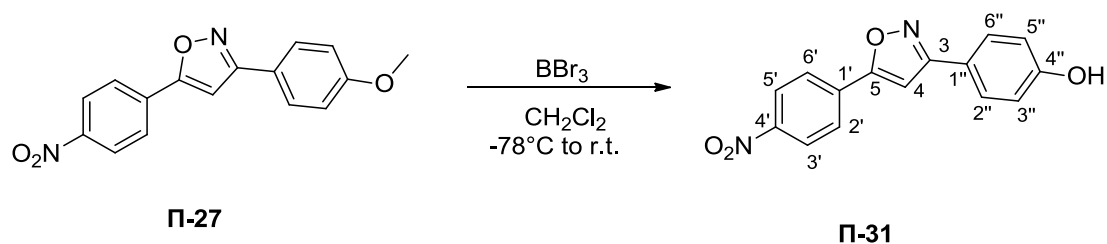
Το προϊόν αυτό παραλήφθηκε από την αποπροστασία του **Π-30** με απόδοση 90%.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 1.16 (3H, t, *J* 7.5 Hz, CH₃), 2.79 (2H, q, *J* 7.5 Hz, -CH₂-), 7.05 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'', H-5''), 7.08 (2H, d, *J* 8.5, H-3', H-5'), 7.59 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2'', H-6'') 7.68 (2H, d, *J* 8.5, H-2', H-6')

¹³C NMR(Acetone-d₆): δ = 13.6 (-CH₃), 15.6 (-CH₂-), 115.5 (C-3'', C-5''), 115.7 (C-3', C-5'), 119.7 (C-1'), 121.2 (C-1''), 128.3 (C-2', C-6'), 129.5 (C-2'', C-6''), 158.2 (C-4', C-4''), 162.7 (C-3), 165.1 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₅H₁₁NO₃: Θεωρητικά C, 72.58; H, 5.37; N, 4.98
Πειραματικά: C, 72.44; H, 5.29; N, 4.92.

4-(4-Μεθυλο-5-(4-νιτροφαινυλο)ισοξαζ-3-ολη)φαινόλη (Π-31)



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₄	282.25	122	R _f = 0.40 Hex/EtOAc 4:6

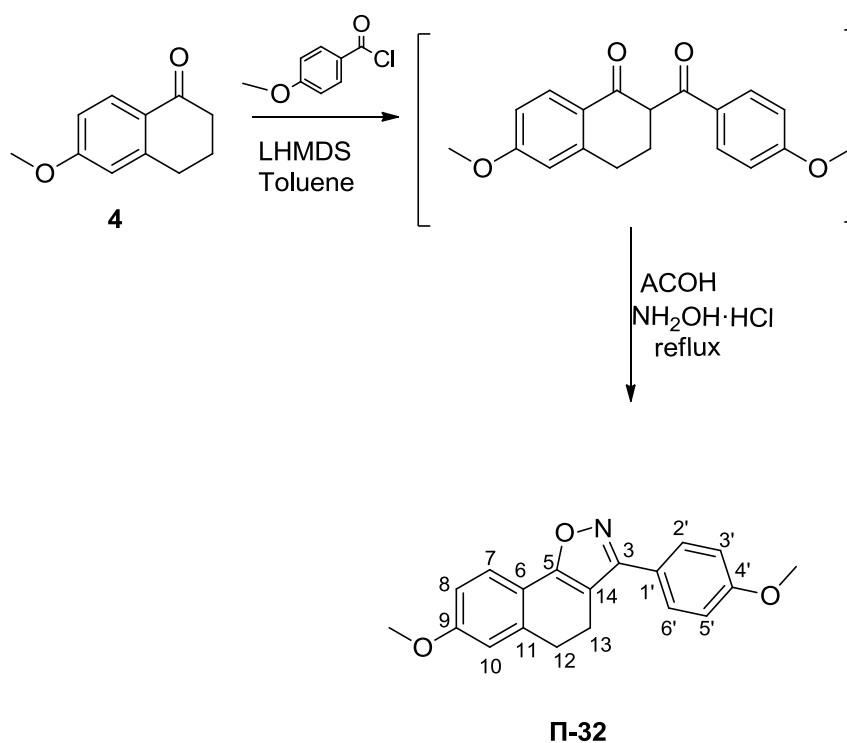
Διάλυμα του προϊόντος **Π-27** (0.5 g, 1.69 mmol) αποπροστατεύτηκε δίνοντας κίτρινους κρυστάλλους του **Π-31** (0.45 g, 1.6 mmol).

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 7.01 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3'', H-5''), 7.33 (1H, s, H-4), 7.82 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6'), 8.23 (2H, *J* 8.5, H-2'', H-6'') 8.40 (2H, H-3', H-5').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 97.0 (C-4), 116.6 (C-3', C-5'), 124.8 (C-3'', C-5''), 128.2 (C-2', C-6'), 128.6 (C-2'', C-6''), 120.4 (C-1'), 137.2 (C-1''), 150.3 (C-4''), 161.2 (C-4'), 162.3 (C-3), 173.2 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₅H₁₀N₂O₄: Θεωρητικά: C, 63.83; H, 3.57; N, 9.92; Πειραματικά: C, 63.87; H, 3.49; N, 10.01.

7-Μεθοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4,5-διϋδροναφθο[2,1-d]ισοξαζόλιο (Π-32)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
67%	C ₁₉ H ₁₇ NO ₃	307.34	132	R _f = 0.33 CH ₂ Cl ₂ / Hex 8.5:1.5

Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 6-μεθοξυ-4-τετραλόνης, **4** (0.5 g, 2.8 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψυχθεί στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (3.0 mL, 1.0 M σε THF, 3.0 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανιδουϋλχλωριδίου (0.19 mL, 1.4 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (17 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.7 g, 10 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1

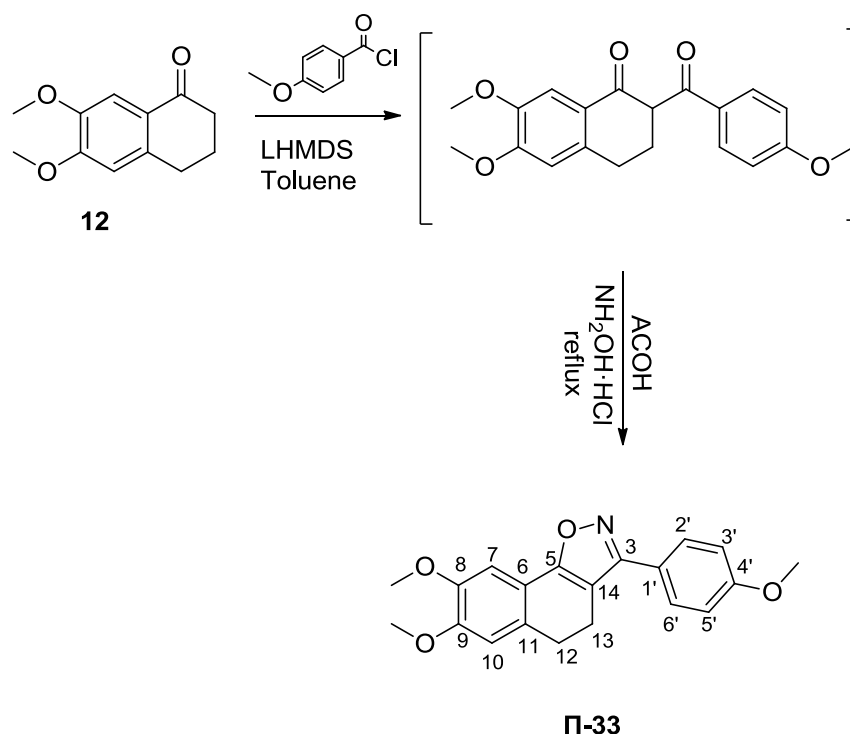
Μ και εκχυλίζεται με EtOH (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 8.5:1.5, δίνοντας το προϊόν **Π-32** (0.57 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.95 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-13), 3.07 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-12), 3.87 (6H, m, -OCH₃), 6.86 (1H, dd, *J* 9.0, 2.0 Hz, H-8), 6.88 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-10), 7.02 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.67 (1H, d, *J* 9.0 Hz, H-7) 7.72 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 19.4 (C-13), 29.5 (C-12), 55.3 (-OCH₃, -OCH₃), 108.9 (C-4), 111.8 (C-8), 114.2 (C-10, C-3', C-5'), 118.7 (C-6), 122.0 (C-1'), 123.4 (C-7), 128.9 (C-2', C-6'), 138.4 (C-11), 160.0 (C-3), 160.4 (C-9, C-4'), 166.0 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₇NO₃: Θεωρητικά: C, 78.07; H, 5.90; N, 9.10; O, 6.93; Πειραματικά: C, 77.94; H, 5.85; N, 9.21

7,8-Διμεθοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4,5-διϋδροναφθο[2,1-d]ισοξαζόλιο (Π-33)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
51%	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	337.37	130	R _f = 0.75 CH ₂ Cl ₂ / Hex 9:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 6,7-διμεθοξυ-1-τετραλόνης, **12** (0.5 g, 2.5 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (2.75 mL, 1.0 M σε THF, 2.75 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανισουϋλχλωριδίου (0.17 mL, 1.25 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (16 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.96 g, 13.9 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε

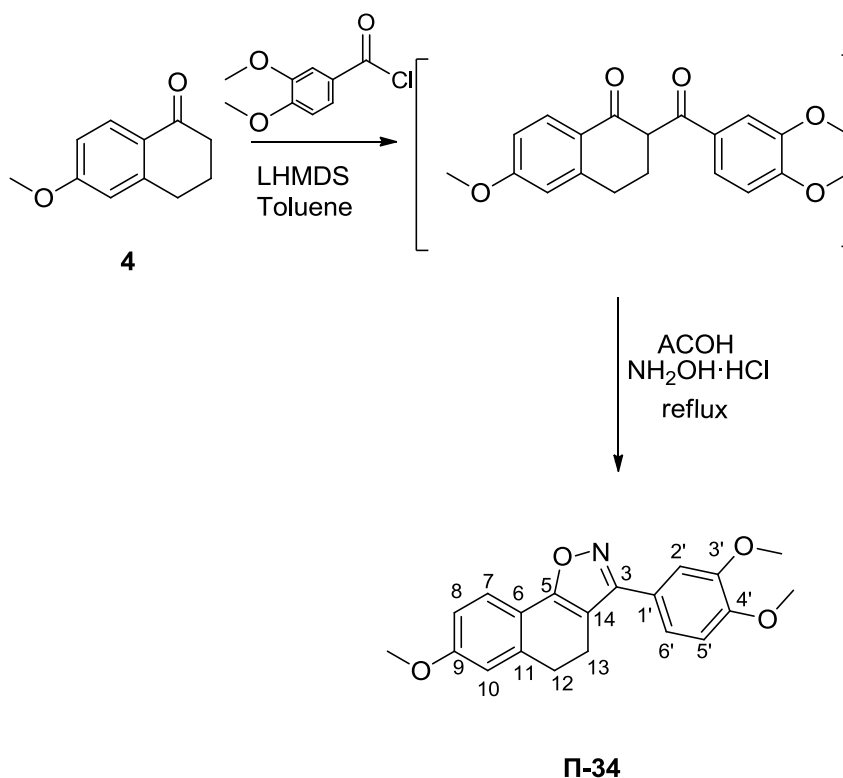
και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOH (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 9:1, δίνοντας το προϊόν **Π-33** (0.43 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.95 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-13), 3.03 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-12), 3.88 (3H, C-4'-OCH₃), 3.94 (3H, C-9-OCH₃), 3.97 (3H, C-8-OCH₃), 6.83 (1H, s, H-10), 7.02 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.67 (1H, s, H-7) 7.72 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 19.7 (C-13), 28.8 (C-12), 55.3 (C-4'-OCH₃), 56.0 (C-9-OCH₃), 56.1 (C-8-OCH₃), 108.8 (C-4), 105.3 (C-7), 111.5 (C-10), 114.2 (C-3', C-5'), 118.2 (C-6), 122.1 (C-1'), 128.9 (C-2', C-6'), 129.4 (C-11), 148.1 (C-8), 149.7 (C-9), 159.5 (C-3), 160.1 (C-4'), 166.3 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₉NO₄: Θεωρητικά: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; Πειραματικά: C, 71.30; H, 5.75; N, 4.18.

3-(3,4-Διμεθοξυφαινυλο)-7-μεθοξυ-4,5-διϋδροναφθο[2,1-d]ισοξαζόλιο (Π-34)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
67%	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	337.37	182	R _f = 0.62 CH ₂ Cl ₂ / Hex 7.5:2.5

Μέθοδος Παρασκευής:

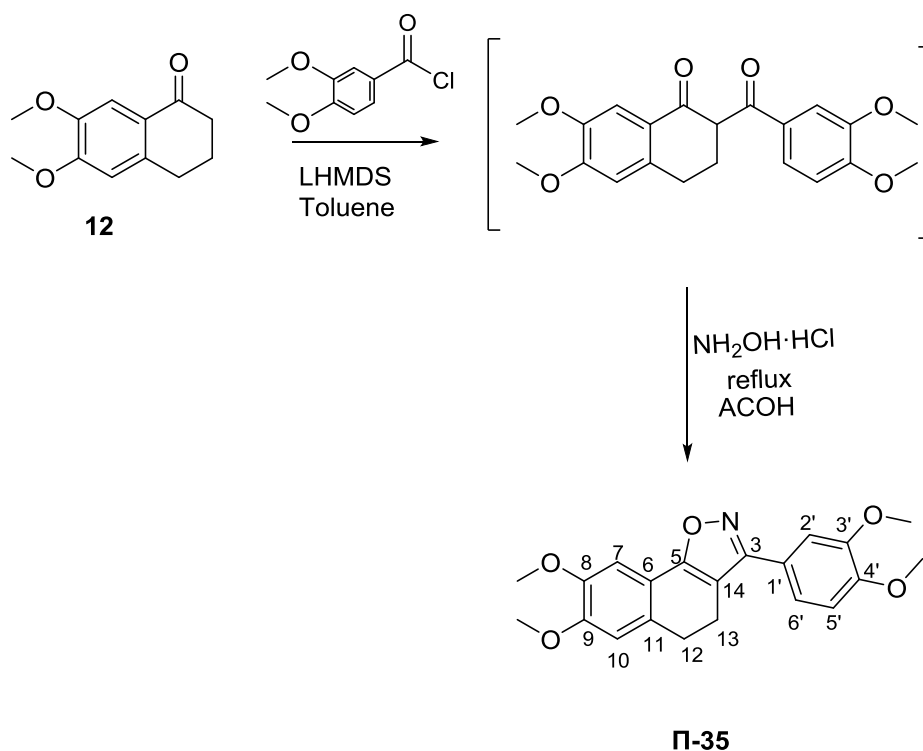
Διάλυμα της 6-μεθοξυ-1-τετραλόνης, **4** (0.5 g, 2.8 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (2.75 mL, 1.0 M σε THF, 2.75 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του π-ανισοϋλχλωριδίου (0.17 mL, 1.25 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (16 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.96 g, 13.9 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1

Μ και εκχυλίζεται με EtOAc (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 9:1, δίνοντας το προϊόν **Π-34** (0.65 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.98 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-13), 3.07 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-12), 3.86 (3H, C-4'-OCH₃), 3.95 (3H, C-9-OCH₃), 3.97 (3H, C-8-OCH₃), 6.86 (2H, m, H-8, H-10), 6.97 (1H, d, *J* 8.5 Hz H-5'), 7.27 (1H, d, *J* 8.5, H-7), 7.4 (1H, dd, *J* 8.5, H-6'), 7.67 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-2').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₁₂FNO₂: Θεωρητικά: C, 71.20; H, 5.68; N, 4.15; Πειραματικά: C, 71.37; H, 5.77; N, 4.21

**3-(3,4-Διμεθοξυφαινυλο)-7,8-διμεθοξυ-4,5-διϋδροναφθο[2,1-d]ισοξαζόλιο
(Π-35)**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
63%	C ₂₁ H ₂₁ NO ₅	367.4		R _f = 0.69 CH ₂ Cl ₂ / Hex 9:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 6,7-διμεθοξυ-1-τετραλόνης, **12** (0.5 g, 2.5 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (2.75 mL, 1.0 M σε THF, 2.75 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του διαλύματος 3,4-διμεθοξυβενζουλο χλωριδίου (0.26 g, 1.25 mmol) σε 2 mL άνυδρου DMF, υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (16 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.96 g, 13.9 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και

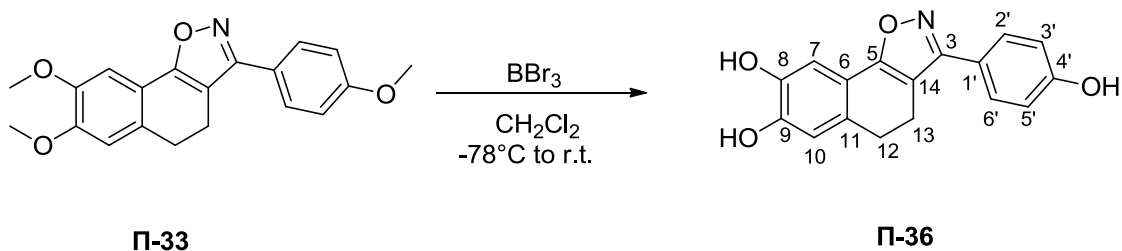
πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOAc (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με Et₂O δίνοντας το προϊόν **Π-35** (0.58 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.97 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-13), 3.05 (2H, t, *J* 7.5 Hz, H-12), 3.95 (3H, C-4'-OCH₃), 3.96 (3H, C-9-OCH₃), 3.98 (6H, m, C-8-OCH₃, C-3'-OCH₃), 6.85 (1H, s, H-10), 6.99 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-5'), 7.27 (1H, s, H-7), 7.28 (1H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.39 (1H, d, *J* 1.8 Hz, H-2').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 19.7 (C-13), 28.9 (C-12), 56.0 (-OCH₃, -OCH₃, -OCH₃, -OCH₃), 108.8 (C-4), 105.3 (C-7), 110.4 (C-2'), 110.9 (C-5'), 111.4 (C-10), 117.9 (C-6), 120.4 (C-6'), 122.2 (C-1'), 129.0 (C-11), 148.1 (C-8), 149.0 (C-3'), 149.6 (C-4'), 150.0 (C-9), 159.5 (C-3), 166.4 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₂₁NO₅: Θεωρητικά: C, 68.65; H, 5.76; N, 3.81; Πειραματικά: C, 68.77; H, 5.81; N, 3.91.

3-(4-Υδροξυφαινυλο)-4,5-διϋδروναφθο[2,1-d]ισοξαζολ-7,8-διόλη (Π-36)



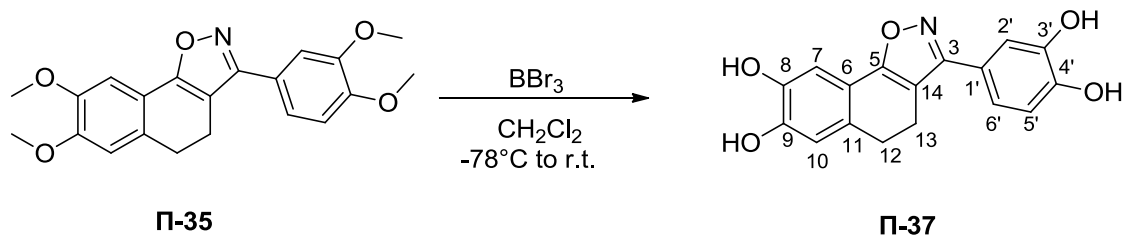
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
89%	C ₁₇ H ₁₃ NO ₄	295.29	177-179	R _f = 0.36 Hex/EtOAc 4:6

Το προϊόν **Π-57** προήλθε από την αποπροστασία του ισοξαζολίου **Π-33** και έδωσε κίτρινους κρυστάλλους με απόδοση 89%.

¹H NMR (DMSO): δ = 2.85 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-13), 2.96 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-12), 6.90 (1H, s, H-10), 6.95 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.48 (1H, s, H-7), 7.53 (2H, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₁₃NO₄: Θεωρητικά: C, 69.15; H, 4.44; N, 4.74; Πειραματικά: C, 69.30; H, 4.37; N, 4.69.

3-(3,4-Διϋδροφαινυλο-4,5-διϋδοναφθο[2,1-d]ισοξαζολ-7,8-διόλη (Π-37)



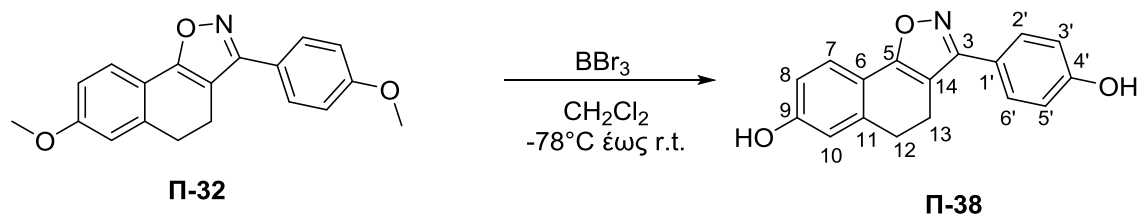
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
93%	C ₁₇ H ₁₃ NO ₅	311.29	201-203	R _f = 0.32 Hex/EtOAc 4:6

Το προϊόν αυτό προήλθε από την αποπροστασία του ισοξαζολίου **Π-35** και έδωσε κίτρινους κρυστάλλους με απόδοση 93%.

¹H NMR (DMSO): δ =2.84 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-13), 2.96 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-12), 6.87 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-5'), 6.90 (1H, d, *J* 2.1 Hz H-10), 7.03 (1H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.18 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-2'), 7.48 (1H, s, H-7).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₁₃NO₅: Θεωρητικά: C, 65.59; H, 4.21; N, 4.50;; Πειραματικά: C, 65.50; H, 4.19; N, 4.47.

3-(4-Υδροξυφαινυλο)-4,5-διϋδροναφθο[2,1-d]ισοξαζολ-7-όλη, Π-38



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
92%	C ₁₇ H ₁₃ NO ₃	279.29	210	R _f = 0.33 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

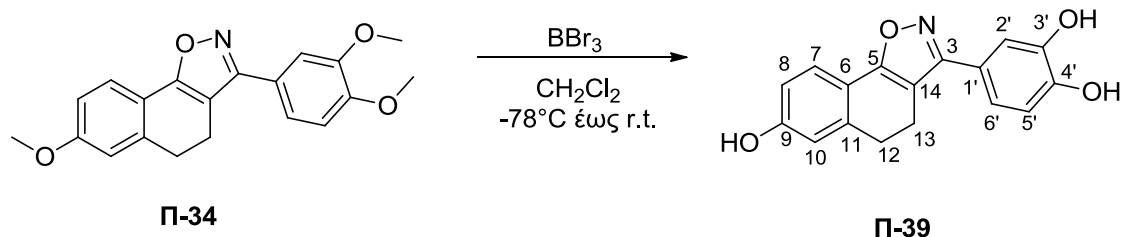
Διάλυμα **Π-32** (0.1 g, 0.32 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (15 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78 °C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr₃ (4.48 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 4.48 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOH (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται από Et₂O δίνοντας 0.8 g της διφαινόλης **Π-38** ως πράσινο κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (DMSO): δ = 2.84 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-13), 2.96 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-12), 6.70 (1H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz H-8), 6.79 (1H, d, *J* 2.0 Hz H-10), 6.95 (2H, d, *J* 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.51 (2H, *J* 8.5 Hz, H-2', H-6'), 7.48 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-7).

¹³C NMR (DMSO): δ = 18.9 (C-13), 28.5 (C-12), 108.7 (C-4), 113.3 (C-8), 114.2 (C-2'), 115.3 (C-10), 115.7 (C-5'), 116.3 (C-6), 117.4 (C-3'), 118.7 (C-6'), 120.7 (C-1'), 122.7 (C-7), 146.2 (C-4'), 159.4 (C-3), 159.7 (C-9), 166.3 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₁₃NO₃: Θεωρητικά: C, 73.11; H, 4.69; N, 5.02; Πειραματικά: C, 72.97; H, 4.58; N, 4.91.

4-(7-Υδροξυ-4,5-διϋδροναφθο[2,1-d]ισοξαζολ-3-υλο)βενζενο-1,2-διόλη (Π-39)



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
91%	C ₁₇ H ₁₃ NO ₄	295.29	192-193	R _f = 0.36 Hex/EtOAc 4:6

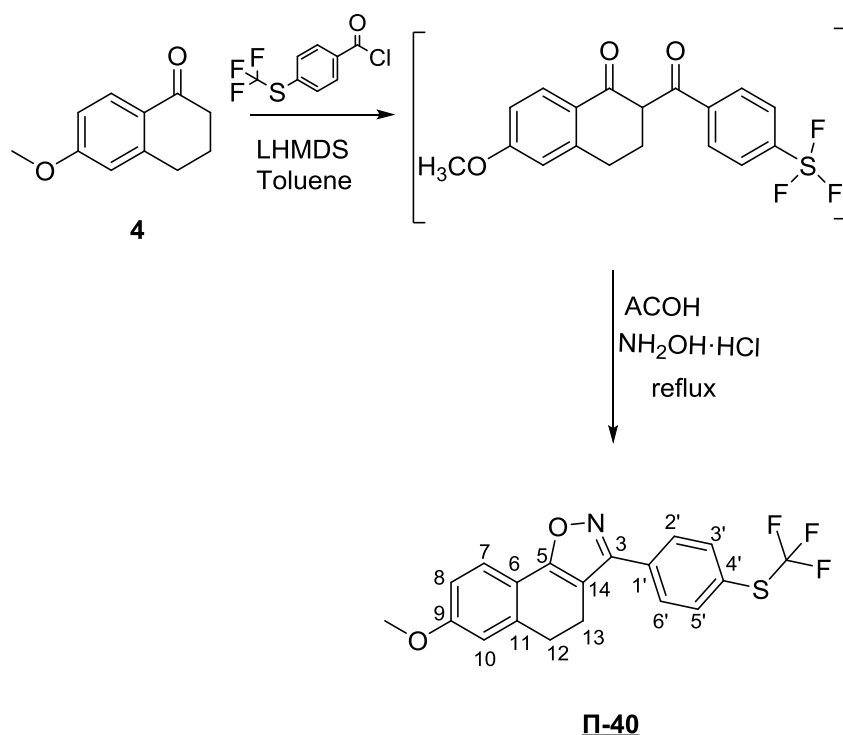
Το προϊόν αυτό προήλθε από την αποπροστασία του ισοξαζολίου **Π-34** και έδωσε κίτρινους κρυστάλλους με απόδοση 91%.

¹H NMR (DMSO): δ = 2.85 (2H, t, H-13), 2.96 (2H, t, H-12), 6.73 (1H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz H-8), 6.78 (1H, d, *J* 2.0 Hz H-10), 6.85 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-5'), 7.03 (1H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 7.18 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-2'), 7.45 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-7).

¹³C NMR (DMSO): δ = 18.6 (C-13), 28.4 (C-12), 108.7 (C-4), 113.5 (C-8), 114.2 (C-2'), 115.3 (C-10), 115.7 (C-5'), 116.3 (C-6), 118.7 (C-6'), 120.7 (C-1'), 122.7 (C-7), 138.6 (C-11), 146.2 (C-4'), 159.4 (C-3'), 159.4 (C-3), 159.5 (C-9), 165.6 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₁₃NO₄: Θεωρητικά: C, 69.15; H, 4.44; N, 4.74; Πειραματικά: C, 69.25; H, 4.39; N, 4.67.

**7-Μεθοξυ-3-(4-(τριφθορομεθυλθειο)φαινυλο)-4,5-διυδροναφθολο[2,1-
d]ισοξαζόλη, Π-40**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
49%	C ₁₉ H ₁₄ F ₃ NO ₂ S	377.38	211	R _f = 0.72 CH ₂ Cl ₂ / Hex 7.5:2.5

Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα της 6-μεθοξυ-4-τετραλόνης (0.5 g, 2.8 mmol), **4** σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (3.0 mL, 1.0 M σε THF, 3.0 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του 4-(τριφθορομεθυλθειο)-βενζοϋλοχλωρίδιο (0.24 mL, 1.4 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (17 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να

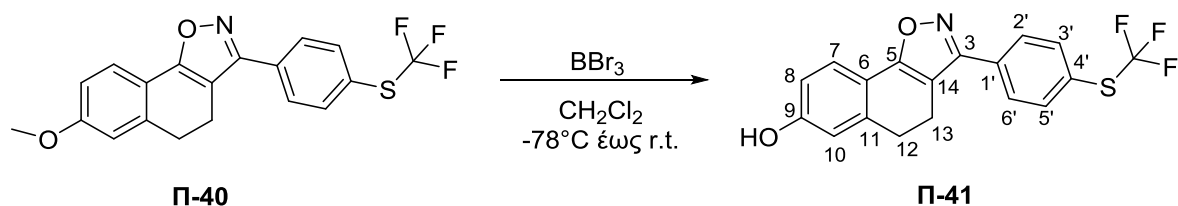
σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.7 g, 10 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται NaOH 1 M και εκχυλίζεται με EtOAc (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 8.5:1.5, δίνοντας το προϊόν **Π-40** (0.52 g) υπό την μορφή καφέ κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.98 (2H, t, H-13), 3.09 (2H, t, H-12), 3.87 (3H, -OCH₃), 6.87 (1H, d, *J* 2 Hz, H-10), 6.88 (1H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-8), 7.68 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-7), 7.79 (2H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-3', H-5'), 7.84 (2H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-2', H-6').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 19.7 (C-13), 28.9 (C-12), 56.0 (-OCH₃), 108.8 (C-4), 112.0 (C-8), 114.4 (C-10), 118.2 (C-6), 123.6 (C-7), 128.4 (C-2', C-6'), 132.2 (C-1'), 136.6 (C-3', C-4' C-5'), 138.2 (C-11), 158.8 (C-3), 160.9 (C-9), 167.1 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₄F₃NO₂S: Θεωρητικά: C, 60.47; H, 3.74; F, 15.10; N, 3.71; S, 8.50; Πειραματικά: : C, 60.59; H, 3.84; F, 15.18; N, 3.81; S, 8.43.

**3-[4-(Τριφθορομεθυλθειο)φαινυλο]-4,5-διυδροναφθο[2,1-d]ισοξαζολ-7-όλη,
Π-41**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
94%	C ₁₈ H ₁₂ F ₃ NO ₂ S	363.35	213-215	R _f = 0.8 Hex/EtOAc 4:6

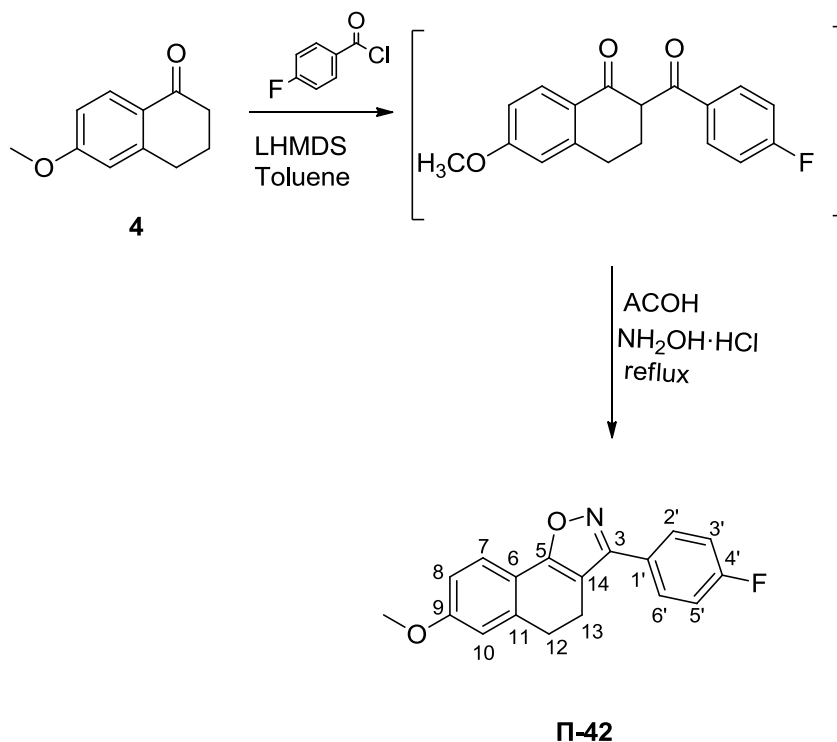
Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα **Π-40** (0.1 g, 0.26 mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (15 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78 °C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr₃ (4.74 mL, 1M σε CH₂Cl₂, 4.74 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H₂O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOH (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με Et₂O δίνοντας το **Π-41** (0.09 g) ως πράσινο κρυσταλλικό προϊόν.

¹H NMR (Acetone-d₆): δ = 3.01 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-13), 3.07 (2H, t, *J* 7.4 Hz, H-12), 6.87 (2H, m, ArH), 7.56 (1H, d, *J* 8.0 Hz, ArH), 7.90 (2H, d, *J* 8.0 Hz, ArH), 7.98 (2H, d, *J* 8.5 Hz, ArH).

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₂F₃NO₂S: Θεωρητικά: C, 59.50; H, 3.33; F, 15.69; N, 3.85; S, 8.82 Πειραματικά: C, 60.59; H, 3.84; F, 15.78; N, 3.81; S, 8.69.

3-(4-Φθοροφαινυλο)-7-μεθοξυ-4,5-διυδροναφθολ[2,1-d]ισοξαζόλη, Π-42



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
63%	C ₁₈ H ₁₄ FNO ₂	295.31	178-179	R _f = 0.63 CH ₂ Cl ₂ / Hex 7.5:2.5

Μέθοδος Παρασκευής:

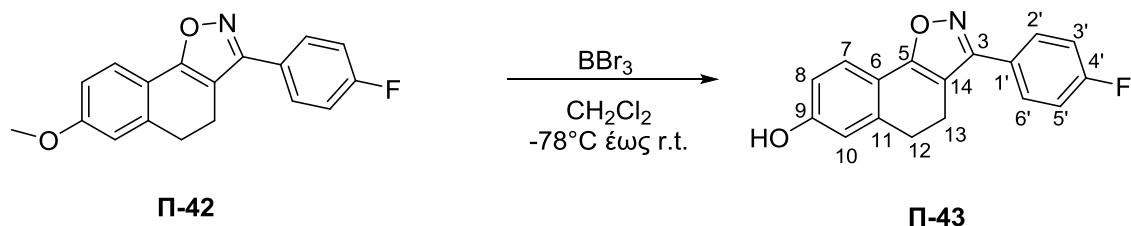
Διάλυμα της 6-μεθοξυ-4-τετραλόνης (0.5 g, 2.8 mmol), 4 σε άνυδρο τολουόλιο (9 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, αφήνεται να ψύχθει στους 0 °C, και προστίθεται υπό ανάδευση, σε μια δόση LHMDS (3.0 mL, 1.0 M σε THF, 3.0 mmol). Το σχηματιζόμενο ανιόν αφήνεται σε ηρεμία για 1 min πριν την προσθήκη του 4-φθοροβενζοϋλο χλωρίδιο (0.17 mL, 1.4 mmol) η οποία πραγματοποιείται και πάλι σε μια δόση και υπό ανάδευση. Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 min και έπειτα προστίθεται υπό ανάδευση AcOH (4 mL). EtOH (17 mL) και THF (4 mL) προστίθενται ώστε να σχηματιστεί ένα ομογενές μίγμα, έπειτα προστίθεται περίσσεια υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (0.7 g, 10 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση με reflux για 15 min, οπότε και

πιστοποιείται το τέλος της αντίδρασης (TLC). Στο διάλυμα προστίθεται διάλυμα 1 M NaOH και εκχυλίζεται με EtOAc (30 mL). Η οργανική στοιβάδα πλένεται με αλατόνερο, ξηραίνεται με Na₂SO₄ και συμπυκνώνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα χρωματογραφείται με μίγμα CH₂Cl₂/Hex 8:2, δίνοντας το προϊόν **Π-42** (0.52 g) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.98 (2H, t, H-13), 3.09 (2H, t, H-12), 3.87 (3H, -OCH₃), 6.87 (1H, d, *J* 2 Hz, H-10), 6.88 (1H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-8), 7.68 (1H, d, *J* 8.5 Hz, H-7), 7.79 (2H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-3', H-5'), 7.84 (2H, dd, *J* 8.5, 2.0 Hz, H-2', H-6').

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₄FNO₂: Θεωρητικά: C, 73.21; H, 4.78; F, 6.43; N, 4.74; Πειραματικά: C, 73.31; H, 4.84; F, 6.50; N, 4.79.

3-(4-Φθοροφαινυλο)-4,5-διυδροναφθο[2,1-d]ισοξαζολ-7-όλη



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
94%	$\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FNO}_2$	281.28	169-171	$R_f = 0.65$ Hex/EtOAc 5:5

Μέθοδος Παρασκευής:

Διάλυμα **Π-46** (0.1 g, 0.34 mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (15 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού, ψύχεται υπό ανάδευση στους -78°C και προστίθεται κατά σταγόνες διάλυμα BBr_3 (4.74 mL, 1M σε CH_2Cl_2 , 4.74 mmol). Το διάλυμα αφήνεται να πάρει την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και αναδεύεται για συνολικά 18 h. Στη συνέχεια προστίθεται H_2O (15 mL), η υδατική φάση διαχωρίζεται και εκχυλίζεται με EtOAc (3×15 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με Na_2SO_4 και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το στερεό που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με Et_2O δίνοντας το **Π-51** (0.09 g)

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 2.93$ (2H, t, H-13), 3.05 (2H, t, H-12), 6.78 (1H, dd, J 8.5, 2.0 Hz H-8), 6.81 (1H, d, J 2.0 Hz H-10), 7.29 (2H, d, J 8.5 Hz, H-3', H-5'), 7.53 (1H, d, J 8.5, Hz, H-7), 7.80 (2H, dd, J 8.5, 2.0 Hz, H-2', H-6').

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 18.7$ (C-13), 28.8 (C-12), 108.7 (C-4), 113.6 (C-8), 115.6/115.1 (C-3', C-5'), 115.1 (C-10), 116.6 (C-6), 122.9/129.3 (C-2', C-6'), 125.8 (C-1'), 159.2 (C-3), 159.5 (C-9), 164.1 (C-4'), 166.4 (C-5).

Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{FNO}_2$: Θεωρητικά: C, 72.59; H, 4.30; F, 6.75; N, 4.98; Πειραματικά: C, 72.74; H, 4.23; F, 6.80; N, 4.89.

Κεφάλαιο 4

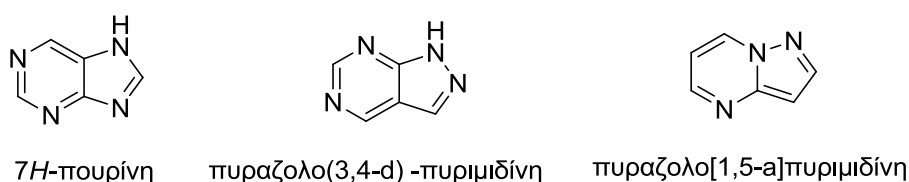
Πυραζολικά παράγωγα της Ντορσομορφίνης

4.1 Εισαγωγή στις πυραζολοπυριμιδίνες (ΠΖΠΜΔ)

Όπως παρουσιάστηκε και αναλύθηκε επαρκώς στο Κεφάλαιο 2 της με τη σύνθεση σειράς νέων βιοδραστικών πυραζολικών παραγώγων, διαχρονικά ο πυραζολικός δακτύλιος αποτελεί το σκελετό για τη σύνθεση πολλών μορίων με φαρμακευτική δράση. Μεταξύ των ποικίλων βιοδραστικών πυραζολικών μορίων και των παραγώγων τους, οι **πυραζολοπυριμιδίνες (ΠΖΠΜΔ)** αποτελούν για τον τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας συνθετικά οργανικά μόρια ιδιαίτερα δημοφιλή, λόγω της αξιοσημείωτης βιολογικής τους δράσης (Alcaro et al., 2010). Μεταξύ αυτών, οι πυραζολο[3,4-b]πυριμιδίνες και πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνες αποτελούν πολύ αξιόλογα μόρια τα οποία συχνά αποτελούν βάση για περαιτέρω τροποποιήσεις προς ανακάλυψη σημαντικών νέων παραγώγων με σημαντική βιολογική δράση. Η δραστηριότητα των μορίων αυτών αποδίδεται στην ομοιότητα της δομής τους με το μόριο της πουρίνης (**Εικόνα 4.1**), αφού η μόνη διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι ο πυριμιδινικός δακτύλιος της πουρίνης ενώνεται με ιμιδαζόλιο, ενώ στην περίπτωση των πυραζολοπυριμιδινών με πυραζόλιο. Διάφορες διαρθρωτικές αλλαγές στη δομή των φυσικών πουρινών έχουν συχνά οδηγήσει στην ανακάλυψη μορίων με έντονη βιολογική δράση. Σε σχέση με την αντικαρκινική τους δράση, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μόρια της 8-αζα-γουανίνης, 6-μερκαπτοπουρίνης, 6-χλωροπουρίνης και 6-θειογουανίνης (Montgomery, 1984). Η σύνθεση της πυραζολο-[3,4-d]πυριμιδίνης σχεδιάστηκε με στόχο να προκύψουν νέες ενώσεις, ισομερείς με τις βιολογικά ενεργές πουρίνες με πιθανές αντικαρκινικές ιδιότητες και με τον τρόπο αυτό να αξιολογηθεί η σημασία της πουρίνης.

Θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι μικρά μόρια τα οποία περιέχουν τη δομική ομάδα της πουρίνης όπως η **τριφωσφορική αδενοσίνη, (adenosine triphosphate, ATP)** και η **τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate, GTP)** είναι διαδεδομένα στη φύση και αναγνωρίζονται σχετικά εύκολα από διάφορες πρωτεΐνες όπως οι κινάσες και οι GTPάσες. Αυτό είχε ως συνέπεια την αξιοποίηση τέτοιων μορίων ως ανταγωνιστές των ATP κινάσων

όπως είναι ο υποδοχέας του επιδερμοειδούς αυξητικού παράγοντα (**Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR**) αλλά και άλλων όπως οι PDGF-R, FGF-R and c-Src. Η επιλογή των παραγώγων των πυραζολοπυριμιδινών που συντίθενται, παίζει καθοριστικό ρόλο για τη δραστικότητα και της εκλεκτικότητας των μορίων αυτών ως προς τις διάφορες πρωτεΐνες. Σημαντικό άρθρο ανασκόπησης σχετικά με τις πυραζολοπυριμιδίνες δημοσιεύτηκε το 2013 από τους Chauhan και Kumar όπου γίνεται εκτενής αναφορά στην αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση τους (Chauhan and Kumar, 2013).

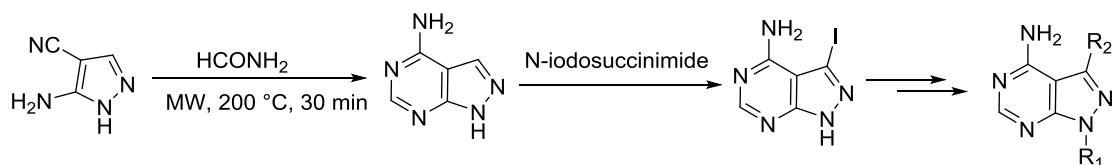


Εικόνα 4.1. Η δομές της πουρίνης και των 3,4 και 1,5 πυραζολοπυριμιδινών

4.1.1 Σύνθεση του δακτυλίου και των πυραζολοπυριμιδινών παραγώγων

Όπως είναι φυσικό, η σύνθεση νέων παραγώγων των ΠΖΠΜΔ έχει απασχολήσει (και απασχολεί) πολλές ερευνητικές ομάδες σε παγκόσμιο επίπεδο, με αποτέλεσμα να έχουν αναπτυχθεί ποικίλες συνθετικές οδοί για την παρασκευή τους. Μία σημαντική προσέγγιση για τις πυραζολο[3,4-b]πυριμιδίνες αναφέρεται στη σύνθεση αρχικά ενός υποκατεστημένου πυραζολίου και την εν συνεχεία οικοδόμηση του δακτυλίου της ΠΖΠΜΔ. Για παράδειγμα, η σύνθεση των Traxler et al., (Traxler et al., 1997) χρησιμοποιεί από το εμπορικά διαθέσιμο 3,3-δισ(μεθυλ-θειο)-2-κυανοακρυλονιτρίλιο, περιλαμβάνει μια αντίδραση υποκατάστασης στο διπλό δεσμό που οδηγεί στο σχηματισμό ενδιάμεσων, τα οποία όταν αντιδράσουν με τη φαινυλοϋδραζίνη οδηγούν στη σύνθεση ποικίλων υποκατεστημένων κυανοπυραζολίων. Τα τελευταία είναι δυνατόν να μετατραπούν σε ΠΖΠΜΔ με τους παρακάτω δυο τρόπους: 1) σχηματισμό και κλείσιμο δακτυλίου με αντίδραση με υδροχλωρική γουανιδίνη και β) αντίδραση με φορμαμίδιο. Στο **Σχήμα 4.1** περιγράφεται η αντίδραση ενός καρβονιτριλικού πυραζολίου με το φορμαμίδιο, η οποία λαμβάνει χώρα με θέρμανση με

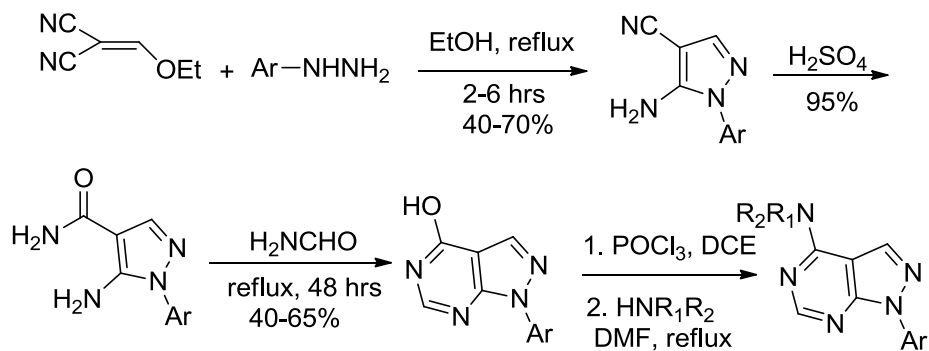
μικροκύματα, οδηγώντας στο σχηματισμό της βασικής ΠΖΠΜΔ, η οποία ακολουθώντας υπόκειται υποκατάσταση στο βασικό της δακτύλιο.



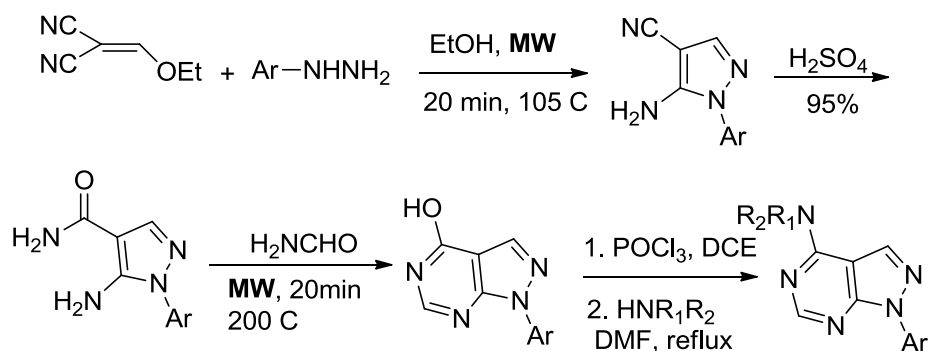
Σχήμα 4.1. Σύνθεση των ΠΖΠΜΔ κατά Traxler et al.

Το 2003 δημοσιεύτηκε η υποβοηθούμενη από μικροκύματα αντίδραση παρασκευής ποικίλων 4,5-διυποκατεστημένων ΠΖΠΜΔ (Wu et al., 2003). Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε δυο στάδια, από τα οποία το πρώτο είναι μια S_NAr αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης του χλωρίου της 1*H*-πυραζολο[3,4-*d*]πυριμιδίνης με διάφορες ανιλίνες και αμίνες, και η δεύτερη που αποτελεί μια αντίδραση σύζευξης τύπου Suzuki. Όμως, για να επιτευχθεί η αντίδραση αυτή θα πρέπει να έχει προηγηθεί η παρασκευή του δακτυλίου της πυραζολοπυριμιδίνης, με βάση τη σύνθεση των Robins et al. (Robins, 1956). Χρησιμοποιώντας ακτινοβολία μικροκυμάτων τα προϊόντα παράγονται ταχύτατα, σε πολύ καλές αποδόσεις, και χαμηλά επίπεδα παραπροϊόντων.

Άλλη μια κλασική αντίδραση σύνθεσης των πυραζολο[3,4-*d*]πυριμιδίνων περιεγράφηκε από τους Daniels et al. (Daniels et al., 2008) και επίσης βελτιστοποιήθηκε με τη χρήση μικροκυμάτων (**Σχήμα 4.2**). Η κλασική αντίδραση περιλαμβάνει την κατεργασία της αρυλυδραζίνης με αιθοξυμεθυλενομαλονιτρίλιο και βρασμό σε αιθανόλη για 2-6 ώρες (απόδοση 50-70%). Στη συνέχεια, το νιτρίλιο του κυανοαμινοπυραζολίου υδρολύεται με θειϊκό οξύ για να δώσει το καρβοξαμίδιο, το οποίο με το φορμαμίδιο αντιδρά για δυο ημέρες δίνοντας σε απόδοση 40-65% το επιθυμητό προϊόν (Ktsuhiko et al., 1994; Tiberghien et al., 2005).



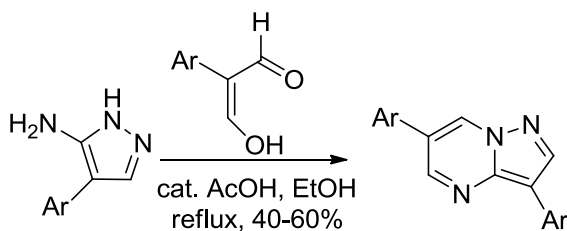
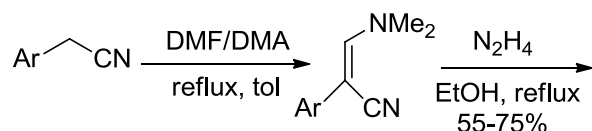
A.



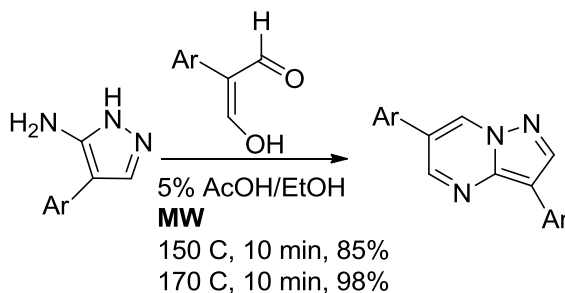
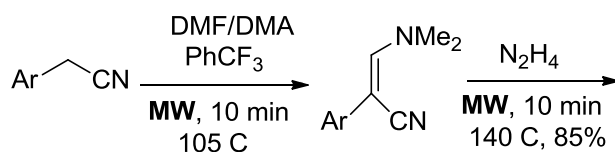
B.

Σχήμα 4.2. A. Κλασσική αντίδραση σύνθεσης πυραζολο[3,4-d]πυριμιδινών, **B.** Βελτιωμένη αντίδραση σύνθεσης πυραζολο[3,4-d]πυριμιδινών με μικροκύματα

Στην περίπτωση των πυραζολο[1,5-a]πυριμιδινών η κλασσική αντίδραση σύνθεσής τους περιλαμβάνει βρασμό σε αιθανόλη για 24 ώρες (με επαναροή) της 5-αμινο-4-αρυλ-πυραζολής με 2-αρυλμαλονοδιαδεύδη και καταλύτη οξικό οξύ, με τις αποδόσεις τους να κυμαίνονται περίπου στο 40-60%. Το αρυλπυραζόλιο που χρησιμοποιείται είναι δυνατόν να προκύψει από το ακετονιτρίλιο με μια αντίδραση δυο σταδίων υπό βρασμό, παρουσία DMF/DMA (διμεθυλοφορμαμιδιο/διμεθυλο ακετάλη) και στη συνέχεια προσθήκη υδραζίνης (**Σχήμα 4.3**). Συνολικά, η αντίδραση αυτή ολοκληρώνεται σε τρεις ημέρες (Winters et al., 1984; Fraley et al., 2002a; Fraley et al., 2002b). Για τη βελτιστοποίηση της παραπάνω αντίδρασης, οι Daniels et al. χρησιμοποίησαν μικροκύματα με αξιοσημείωτα αποτελέσματα (Daniels et al., 2008).



A.



B.

Σχήμα 4.3. **A.** Κλασική αντίδραση σύνθεσης πυραζολο[1,5-*a*]πυριμιδινών, **B.** Βελτιωμένη αντίδραση σύνθεσης πυραζολο[1,5-*a*]πυριμιδινών με μικροκύματα

4.2. Μικροκυματική Σύνθεση Αζαιτεροκυκλικών μορίων

Η θέρμανση με μικροκύματα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην οργανική σύνθεση το 1986, από τις ομάδες των Gedye και Giguere-Majetich (Gedye et al., 1986). Σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία αφού εξασφαλίζει υψηλές αποδόσεις σε ηπιότερες και φιλικότερες προς το περιβάλλον συνθήκες, με μικρότερη κατανάλωση ενέργεια και συχνά χωρίς την κατανάλωση διαλυτών. Πλέον, η μικροκυματική θέρμανση εφαρμόζεται σε αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης, ετη σύνθεση ραδιοϊσοτόπων, ετη χημεία των πολυμερών, των ετεροκυκλικών ενώσεων και υδρογονανθράκων, στην ομογενή

και ετερογενή κατάλυση, ετην ιατρική και συνδυαστική χημεία αλλά και στην πράσινη χημεία (Giguere et al., 1986; Karpe, 2004; de la Hoz et al., 2005; Karpe, 2008; Caddick and Fitzmaurice, 2009).

Η μικροκυματική ακτινοβόληση προκαλεί θέρμανση κυρίως μέσω δύο μηχανισμών, τη διπολική πόλωση και την ιοντική μεταγωγή. Παρόλο που τα δίπολα του μίγματος (π.χ., τα μόρια του πολικού διαλύτη) συμμετέχουν στο αποτέλεσμα της διπολικής πόλωσης, τα φορτισμένα σωματίδια του δείγματος (συνήθως ιόντα) επηρεάζονται από ιοντική μεταγωγή. Όταν τα δίπολα ή ιόντα του μίγματος ακτινοβολούνται σε συχνότητες μικροκυμάτων, αυτά ευθυγραμμίζονται με το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται. Όταν το εφαρμοζόμενο πεδίο ταλαντεύεται, το διπολικό ή ιοντικό πεδίο προσπαθεί να ευθυγραμμισθεί με το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο και κατ' αυτήν την διεργασία, χάνεται ενέργεια, με την μορφή θερμότητας, λόγω μοριακών τριβών και διηλεκτρικών απωλειών.

Ενώ τα πρώτα και πρωτοποριακά πειράματα έγιναν σε οικιακούς φούρνους μικροκυμάτων, από το 2001 και μετά η τάση είναι αναμφισβήτητα να χρησιμοποιούνται ειδικά κατασκευασμένοι μικροκυματικοί αντιδραστήρες για να είναι ελεγχόμενη η μικροκυματική σύνθεση. Ένας τυπικός τέτοιος αντιδραστήρας διαθέτει μαγνητικούς αναδευτήρες και διάταξη άμεσου ελέγχου της θερμοκρασίας του μίγματος με οπτικές ίνες ή εξωτερικούς υπέρυθρους αισθητήρες, οι οποίοι επιτρέπουν τον άμεσο κατά την διεργασία έλεγχο θερμοκρασίας και πίεσης, μέσω της ρύθμισης της παρεχόμενης μικροκυματικής ισχύος.

Επιπρόσθετα, για την παρακολούθηση της αντίδρασης είναι δυνατή η επικοινωνία με φασματοσκοπία UV, IR και Raman καθώς και τη χρήση ψηφιακών φωτογραφικών μηχανών. Οι χρησιμοποιούμενες συσκευές διακρίνονται σε συσκευές ενός ή πολλαπλών υποδοχέων (monomode or multimode). Το 90% των δημοσιευθέντων σχετικών πρωτοκόλλων σύνθεσης βασίζονται στη χρήση αντιδραστήρων μικροκυμάτων ενός υποδοχέως και διεργασίες σε σφραγισμένα δοχεία.

Οι υψηλές αποδόσεις, οι ηπιότερες περιβαλλοντικές συνθήκες και οι συντομότεροι χρόνοι της αντίδρασης αποδεικνύονται πολύ χρήσιμα στοιχεία, που επιτρέπουν την ουσιαστική βελτίωση πολλών χημικών διεργασιών. Οι ιδιότητες αυτές της μικροκυματικής θέρμανσης καθιστούν εφικτές ακόμη και αντιδράσεις που ούτε καν θα προχωρούσαν με κλασικές μεθόδους θέρμανσης, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται και αλλαγή της εκλεκτικότητας των αντιδράσεων. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η χρήση της μικροκυματικής θέρμανσης

και από τη σκοπιά της πράσινης χημείας (Green Chemistry). Μεταξύ των 12 αρχών της πράσινης χημείας η «επιθυμία της χρήσης ασφαλέστερων διαλυτών» και εκείνη για «σχεδιασμό με στόχο την ενεργειακή αποδοτικότητα» είναι βασικής σημασίας για τους ερευνητές της χημικής σύνθεσης. Από την άποψη του συνολικού ενεργειακού ισοζυγίου της αντίδρασης, η θέρμανση υπό συνθήκες μικροκυματικής ακτινοβολήσης μπορεί να χαρακτηριστεί σαν πράσινη χημεία γιατί όπως προκύπτει από μελέτες για τους περισσότερους χημικούς μετασχηματισμούς, παρατηρείται σημαντικότερη εξοικονόμηση ενέργειας –έως και 85 φορές– όταν χρησιμοποιούνται τα μικροκύματα ως πηγή ενέργειας σε αντιδράσεις εργαστηριακής κλίμακας.

Η δυνατότητα εκτέλεσης αντιδράσεων με απευθείας αλληλεπίδραση της μικροκυματικής ενέργειας στο μίγμα της αντίδρασης για πολύ μικρούς χρόνους, σε αντιδιαστολή προς την έμμεση μεταφορά ενέργειας με τη χρήση ελαιόλουτρου ή παρόμοιας συσκευής, καθιστά την πρώτη, ως «**πράσινη**» διεργασία, όχι μόνον λόγω της μειωμένης κατανάλωσης ενέργειας αλλά και λόγω της οικονομίας χρόνου, δηλαδή της αυξημένης αποτελεσματικότητά της.

Φυσικά, οι διαλύτες είναι αναπόσπαστο τμήμα κάθε χημικής διεργασίας, είτε στο εργαστήριο ή στο εργοστάσιο. Η αναπόφευκτη επιλογή συγκεκριμένου διαλύτη, πέρα από τα καθαρά τεχνικά αποτελέσματα, μπορεί να έχει σημαντικές οικονομικές, περιβαλλοντικές αλλά και, κοινωνικές επιπτώσεις. Σε κάποιο βαθμό, η πιεστική ανάγκη ανάπτυξης εναλλακτικών διαλυτών προκύπτει, από την ευαισθησία για τις ανωτέρω επιπτώσεις, ως στρατηγική επιλογή της πράσινης χημείας. Εκτός από τις διεργασίες χωρίς διαλύτη ως εναλλακτικοί διαλύτες προτείνονται υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, ιοντικά υγρά, υπερφθοριωμένοι διαλύτες, και βέβαια νερό.

Στη μικροκυματική σύνθεση χωρίς διαλύτες τα αντιδραστήρια αντιδρούν «καθαρά», ή με προ-προσρόφηση, επί ανόργανου φορέα στήριξης, ο οποίος είναι, είτε μικροκυματικά διαφανής (οξείδιο πυριτίου, οξείδιο αργιλίου, άργιλος), είτε ισχυρά απορροφητικός (γραφίτης). Πρόσφατα, παρουσιάστηκαν μικροκυματικά υποβοηθούμενες αντιδράσεις που χρησιμοποιούν ιοντικά υγρά ως διαλύτες. Τα ιοντικά υγρά αλληλοεπιδρούν πολύ αποτελεσματικά με τα μικροκύματα, μέσω ενός μηχανισμού ιοντικής μεταγωγής και θερμαίνονται με ρυθμούς που ξεπερνούν τους 10 °C ανά δευτερόλεπτο, χωρίς κάποια σημαντική αύξηση της πίεσης. Έτσι, τα προβλήματα ασφαλείας, λόγω υπερβολικής πίεσης των σφραγισμένων δοχείων των αντιδράσεων, ελαχιστοποιούνται. Επίσης έχουν

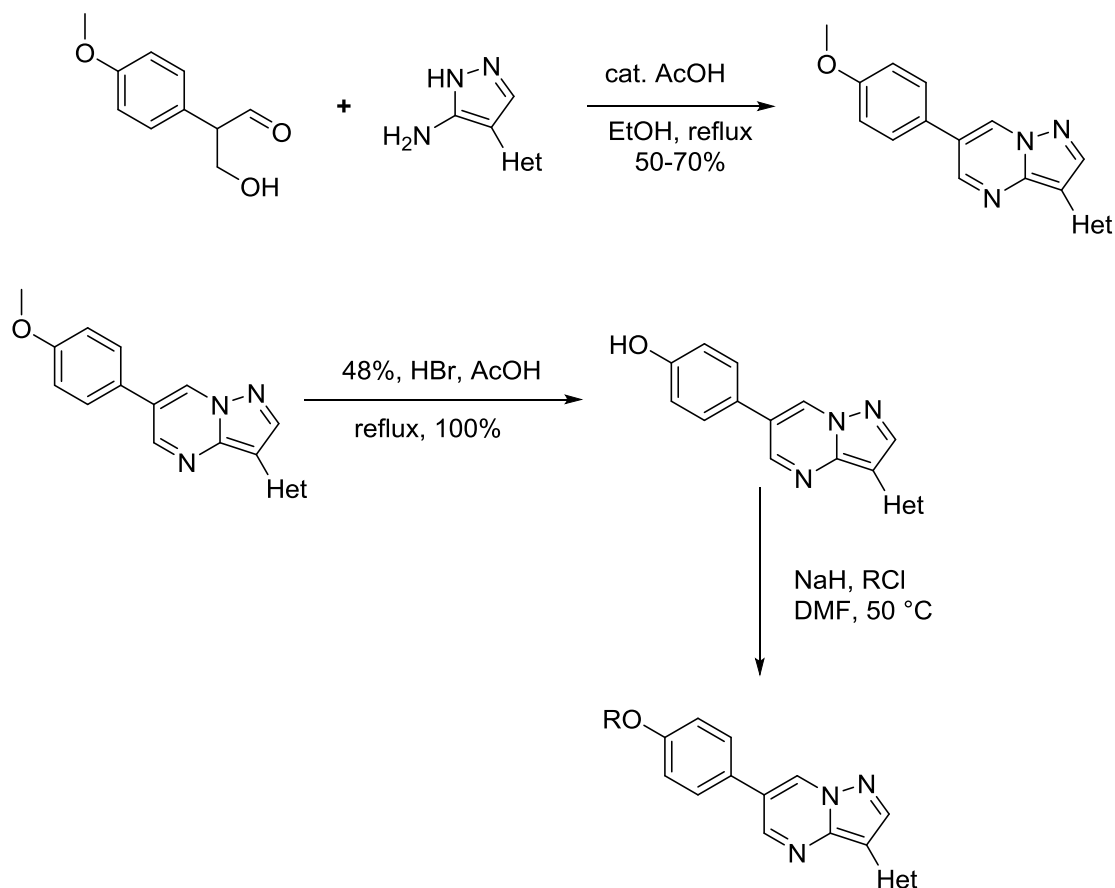
αναφερθεί εφαρμογές μικροκυμάτων σε συνδυασμό με την χρήση φθοριούχων διαλυτών ή φθοριούχων αντιδραστηρίων / κατάλυσης. Το πλεονέκτημα της μικροκυματικής θέρμανσης είναι η ταχεία σύμφυση της οργανικής και της φθοριούχου φάσης και ο σχηματισμός ομογενών διαλυμάτων.

Ο πρασινότερος/οικολογικότερος διαλύτης είναι το νερό και τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο και αυξανόμενο ενδιαφέρον συγκεντρώνει η χρήση του νερού ως διαλύτη σε οργανικές μετατροπές με εφαρμογή της μικροκυματικής ακτινοβολίας (Dallinger and Karpe, 2007). Το νερό, ως πολικό μέσο, απορροφά τα μικροκύματα θερμαίνεται γρήγορα σε πολύ ψηλές θερμοκρασίες στις οποίες λειτουργεί ως ψευδο-οργανικός διαλύτης.

4.3. Ιστορικό της Σύνθεσης Ντορσομορφίνης και των αναλόγων της

Πρώτη αναφορά στην **ένωση C** (6-[4-(2-πιπεριδινό- 1-υλ αιθοξυ) φαινυλο] -3-πυριδινό-4-υλοπυραζολο[1,5-α]πυριμιδίνη), επίσης γνωστή ως **ντορσομορφίνη (dorsomorphin, NTO, Σχήμα 4.6.)**, έγινε το 2001 από τους Zhou et al. με διαφορετικό βιολογικό στόχο σε σχέση με εκείνο για τον οποίο έγινε τελικά γνωστή. Στην εργασία αυτή η **ένωση C** μελετήθηκε ως ένας αναστολέας της **AMP-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK)**, η οποία αποτελεί έναν εξαιρετικά ευαίσθητο αισθητήρα κυτταρικής ενέργειας που παρακολουθεί την κατανάλωση ενέργειας και μειώνει τις βιοχημικές διαδικασίες που καταναλώνουν ATP, όταν ενεργοποιηθεί (Zhou et al., 2001; Polshettiwar and Varma, 2008). Επιπλέον, η **ένωση C** βρέθηκε σε ποικίλα πειράματα ότι αναστέλλει τις προ-αποπτωτικές και αντι-αποπτωτικές δράσεις της AMPK μπλοκάροντας εξαρτώμενη από την AMPK αυτοφαγία σε διαφορετικούς τύπους φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων (Lu et al., 2014).

Το τμήμα της φαρμακευτικής χημείας και έρευνας του καρκίνου της φαρμακευτικής εταιρείας Merck ανέπτυξε μία σειρά από πυραζολο[1,5-α]πυριμιδινών. Στην έρευνα αυτή έγινε και η πρώτη περιγραφή της σύνθεσης της NTO στα πλαίσια της σύνθεσης 3,6-διυποκατεστημένων πυραζολοπυριμιδινών, ομάδας στην οποία ανήκει και η NTO (Fraleley et al., 2002a; Fraley et al., 2002b). Η σύνθεση των Fraley et al., (Fraleley et al., 2002a; Fraley et al., 2002b) περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα 4.4 (Fraleley et al., 2002b).

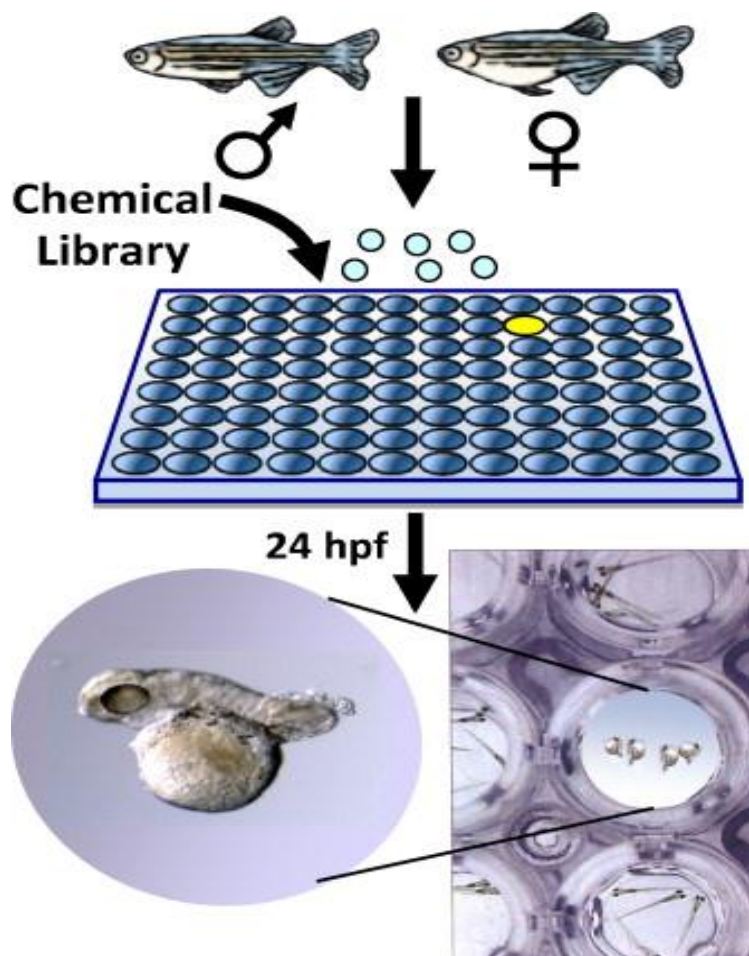


Σχήμα 4.4. Σύνθεση των 3,6-διυποκατεστημένων πυραζολο[1,5-α]πυριμιδινών (Fraleley *et al.*, 2002a)

Το μόριο αυτό αποτελεί και τον πρώτο γνωστό αναστολέα των υποδοχέων των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (**Bone Morphogenetic Proteins, BMP**), η οποία αναγνωρίστηκε σε μια σάρωση για ενώσεις που διαταράσσουν τον εμβρυϊκά σπονδυλοκοιλιακό άξονα των **zebrafish**. Οι συγκεκριμένες τύπου I και II πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των κινασών σερίνης-θρεονίνης, οι οποίες με τη σειρά τους ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των TGF- β υποδοχέων (Hao *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008; Vucicevic *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2012).

Το zebrafish (ελληνικά: ψάρι-ζέβρα), γνωστό στον επιστημονικό κόσμο ως *Danio rerio*, είναι ένα τροπικό ψάρι του γλυκού νερού που ανήκει στην οικογένεια των *Cyprinidae* της τάξης των *Cypriniformes*. Το zebrafish μπορεί κάποιος να το συναντήσει στα ρεύματα της νοτιοανατολικής περιοχής των Ιμαλαίων, στο Πακιστάν, στο Μπαγκλαντές, στο Νεπάλ και στη Μιανμάρ και ζει συνήθως σε ρυάκια, υδάτινα κανάλια και τάφρους καθώς και σε λίμνες. Το ενδιαφέρον για αυτό το είδος έχει εκτιναχθεί τα τελευταία χρόνια και το zebrafish αποτελεί ένα

από τα σημαντικότερα μοντέλα οργανισμούς για την ανακάλυψη βιοδραστικών μικρών μορίων (Σχήμα 4.5) (Hong and Yub, 2009; Hao et al., 2010).



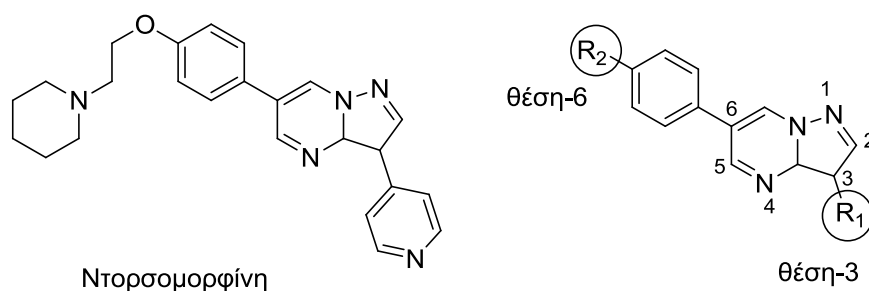
Σχήμα 4.5. Σχηματική αναπαράσταση της χημικής σάρωσης χρησιμοποιώντας έμβρυα του zebrafish.

Το θεραπευτικό δυναμικό των μικρών μορίων που δρουν ως αναστολείς σηματοδότησης περιορίζεται συχνά από τις παράλληλες, εκτός στόχου, ανεπιθύμητες δράσεις. Στις εργασίες αυτές αποδείχτηκε ότι η dorsomorphin έχει σημαντική «εκτός στόχου» δράση κατά του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) τύπου-2 υποδοχέα (PIk1/KDR) και διαταράσσει την αγγειογένεση στο zebrafish. Δεδομένου ότι τα σήματα των BMP και VEGF είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην αγγειακή ανάπτυξη, η συγκεκριμένη ομάδα επιδίωξε να διαπιστώσει εάν η αντι-αγγειογενετική δράση της dorsomorphin οφείλεται στην επίδραση της, επί των σημάτων BMP ή VEGF μέσω της

ανάπτυξης των αναλόγων που στοχεύουν την BMP αλλά όχι την σηματοδότηση μέσω της VEGF και αντίστροφα.

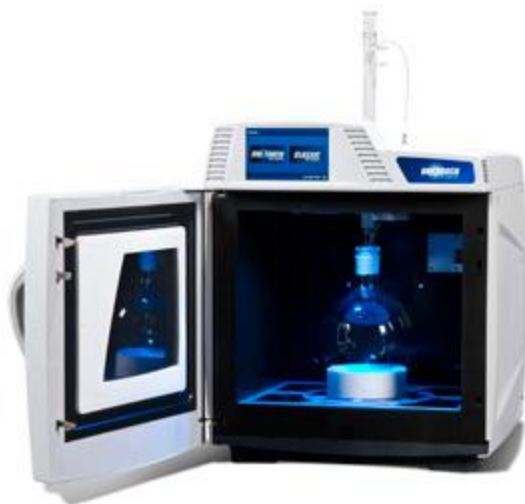
4.4 Σύνθεση νέων παραγώγων της ντορσομορφίνης

Η σημαντική αυτή δράση της ντορσομορφίνης που περιεγράφηκε από τους Hao et al. (Hao et al., 2008) μας ενέπνευσε να επιχειρήσουμε τον σχεδιασμό των αναλόγων της, πάντα με στόχο την ανακάλυψη νέων βιοδραστικών μορίων. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 4.6** οι R₁ και R₂ ομάδες της ντορσομορφίνης είναι δυνατόν να τροποποιηθούν για να συντεθούν νέα παράγωγα.



Σχήμα 4.6 Δομή ντορσομορφίνης και γενική δομή παραγώγων της

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η σύνθεση πυραζολο[1,5-a]πυριμιδινών με βάση το πρωτόκολλο σύνθεσης με χρήση μικροκυμάτων και κάθετο ψυκτήρα επαναρροής (reflux-**Σχήμα 4.7**) που περιγράφεται στο άρθρο του Daniels et al. Οι πυριμιδίνες αυτές χρησιμοποιήθηκαν αφενός για την αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης και αφετέρου ως ενδιάμεσα μόρια για τη παρασκευή νέων παραγώγων. Μάλιστα, συντέθηκε και η πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνη (**1c**) σύμφωνα με το άρθρο του Daniels, για να αποτελέσει ενδιάμεσο μόριο στη σύνθεση νέων προϊόντων. Για τα προϊόντα που συντέθηκαν αξιολογήθηκε η αντιπολλαπλασιαστική και αντιαγγειογενετική τους δραστηριότητα.



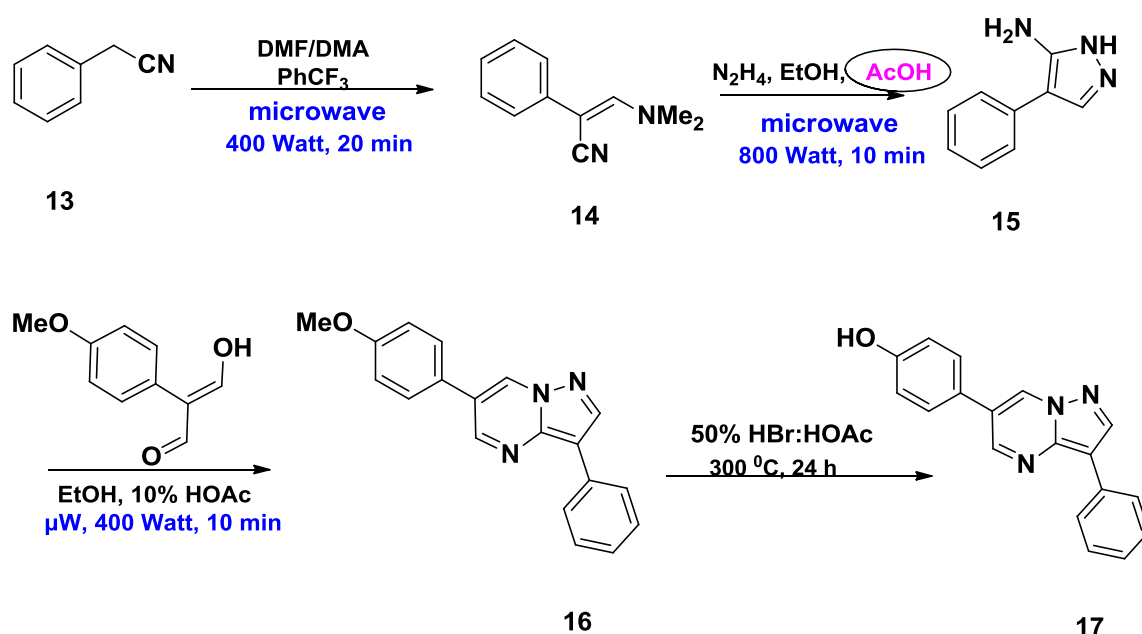
Σχήμα 4.7. Αντιδράσεις με κάθετο ψυκτήρα και μικροκύματα

Ως πρώτο στάδιο υλοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση του 3-(διμεθυλαμινο)-2-φαινυλοακρυλονιτριλίου, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε η διεξαγωγή σειράς δοκιμαστικών πειραμάτων με διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης (χρόνο, ισχύ), ώστε να προσδιοριστούν οι κατάλληλες συνθήκες για τη σύνθεση των πυριδιμινών σε τρία στάδια. Άλλωστε, μια βασική διαφορά της συσκευής παραγωγής μικροκυμάτων, σε σχέση με τις εμπορικά διαθέσιμες και προσαρμοσμένες για την οργανική σύνθεση, ήταν πως στην περίπτωση μας δεν είχε ρυθμιστή θερμοκρασίας, επομένως έπρεπε να δοκιμαστούν διάφορες συνθήκες.

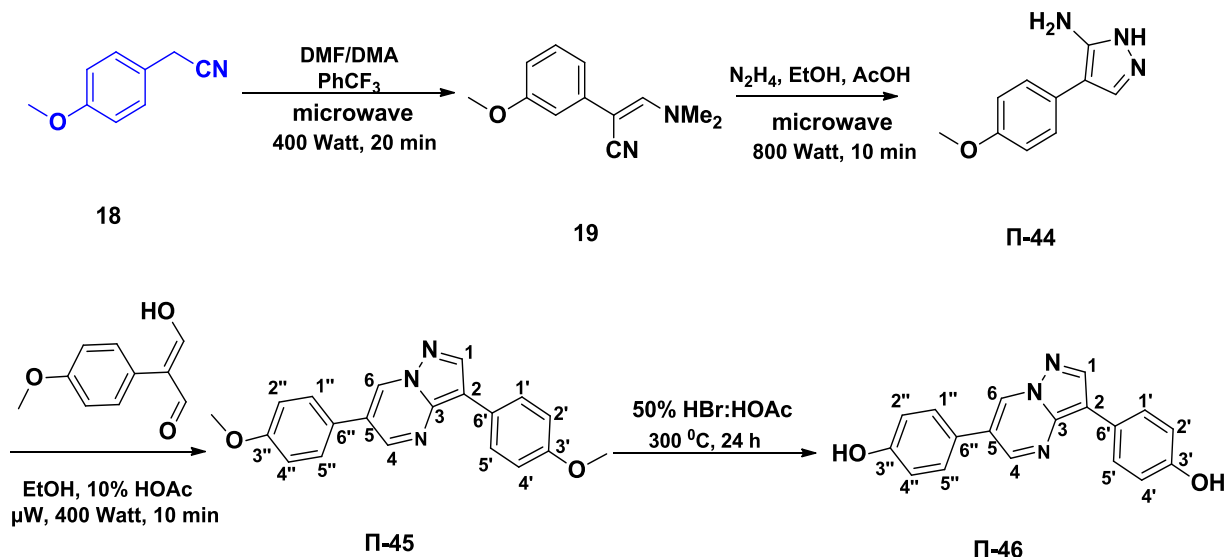
Δυστυχώς, η σύνθεση της 5-αμινοπυραζόλης στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης ήταν ανεπιτυχής. Όταν ακολουθήθηκαν επακριβώς οι συνθήκες που περιγράφονται στο άρθρο των Daniels et al., το (Z)-3-διμεθυλαμινο-2-φαινυλοακρυλονιτρίλιο (**ε**) που συντέθηκε δεν αντέδρασε περαιτέρω χρησιμοποιώντας είτε μικροκύματα ή με συμβατική μέθοδο (βρασμός με επαναρροή) σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών σχετιζόμενων με θερμοκρασία, το χρόνο και τη συγκέντρωση των αντιδρώντων. Τελικά, η αντίδραση κυκλοποίησης πραγματοποιήθηκε επιτυχώς σε όξινες συνθήκες με βάση προηγούμενη μελέτη των Velcicky et al. (Velcicky et al., 2010), στην οποία αναλύεται ότι σε βασικές συνθήκες και παρουσία υδραζίνης υπερισχύει η σύνθεση της 3-αμινοπυραζόλης, ενώ υπό όξινες συνθήκες η τοποεκλεκτικότητα της αντίδρασης κυκλοποίησης

κλίνει προς την πλευρά του 5-αμινοπυραζολίου (Harvey et al., 1997; Silvestri et al., 2008; Velcicky et al., 2010).

Το τρίτο στάδιο για τη σύνθεση της πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνης πραγματοποιήθηκε με χρήση μικροκυμάτων υπό κάθετο ψυκτήρα σύμφωνα με τη μέθοδο των Daniels et al. οδηγώντας στη σύνθεση των **16** και **1c** (Σχήμα 4.8). Στη συνέχεια, η αντίδραση αποπροστασίας σύμφωνα με το παραπάνω άρθρο (με HBr και AcOH σε μικροκύματα) προς το μόριο **17** έλαβε χώρα σε πολύ χαμηλή απόδοση, η οποία βελτιώθηκε φτάνοντας το 20-30%) με τη χρήση 50% AcOH/EtOH και 1000 Watt για 15 min. Τελικά, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με σχεδόν ποσοτικές αποδόσεις (80-90%) όταν έλαβε χώρα με συμβατική θέρμανση. Πρέπει να αναφερθεί ότι η αποπροστασία δοκιμάστηκε και με χρήση BBr₃, αλλά πάλι η απόδοση που επιτεύχθηκε δεν ήταν ικανοποιητική (25-30 %). Τέλος, παρότι η αποπροστασία για τη σύνθεση του **Π-46** έγινε με τη χρήση μικροκυμάτων σε καλύτερες αποδόσεις (65-70%), όμως και στην περίπτωση αυτή –όπως και στις υπόλοιπες αντιδράσεις αποπροστασίας του κεφαλαίου αυτού– επειδή πρόκειται για μια ισχυρά εξώθερμη αντίδραση προτιμήθηκε τελικά η χρησιμοποίηση της συμβατικής οδού (Σχήμα 4.8).

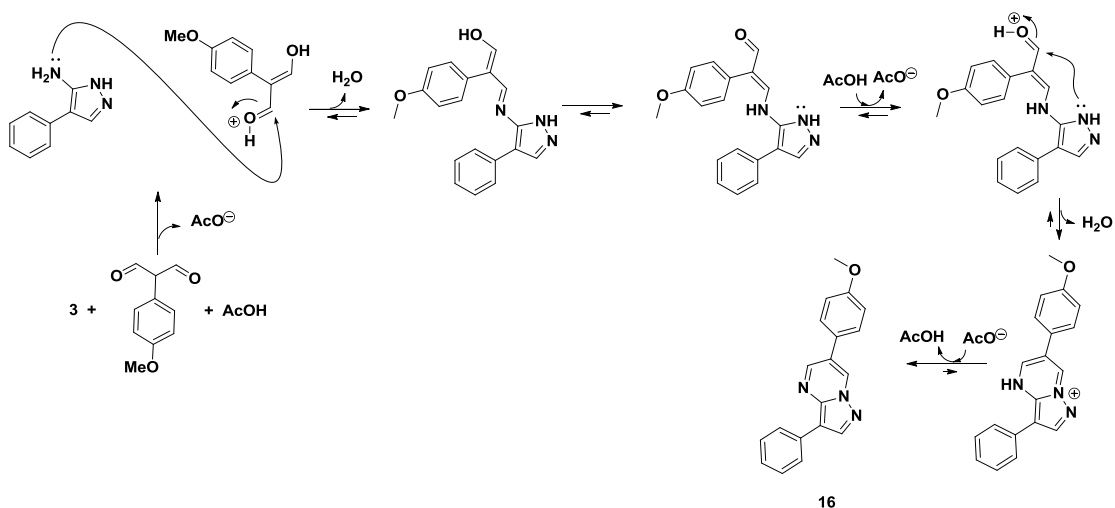


Σχήμα 4.7. Σύνθεση του μορίου **17** που έχει συντεθεί από τους Daniel's et al. και αποτελεί ενδιάμεσο για τη σύνθεση παραγώγων ντορσομορφίνης.



Σχήμα 4.8. Σύνθεση της 4,4'-(πυραζολ[1,5-α]πυριμιδιν-3,6-διυλ)διφαινόλης

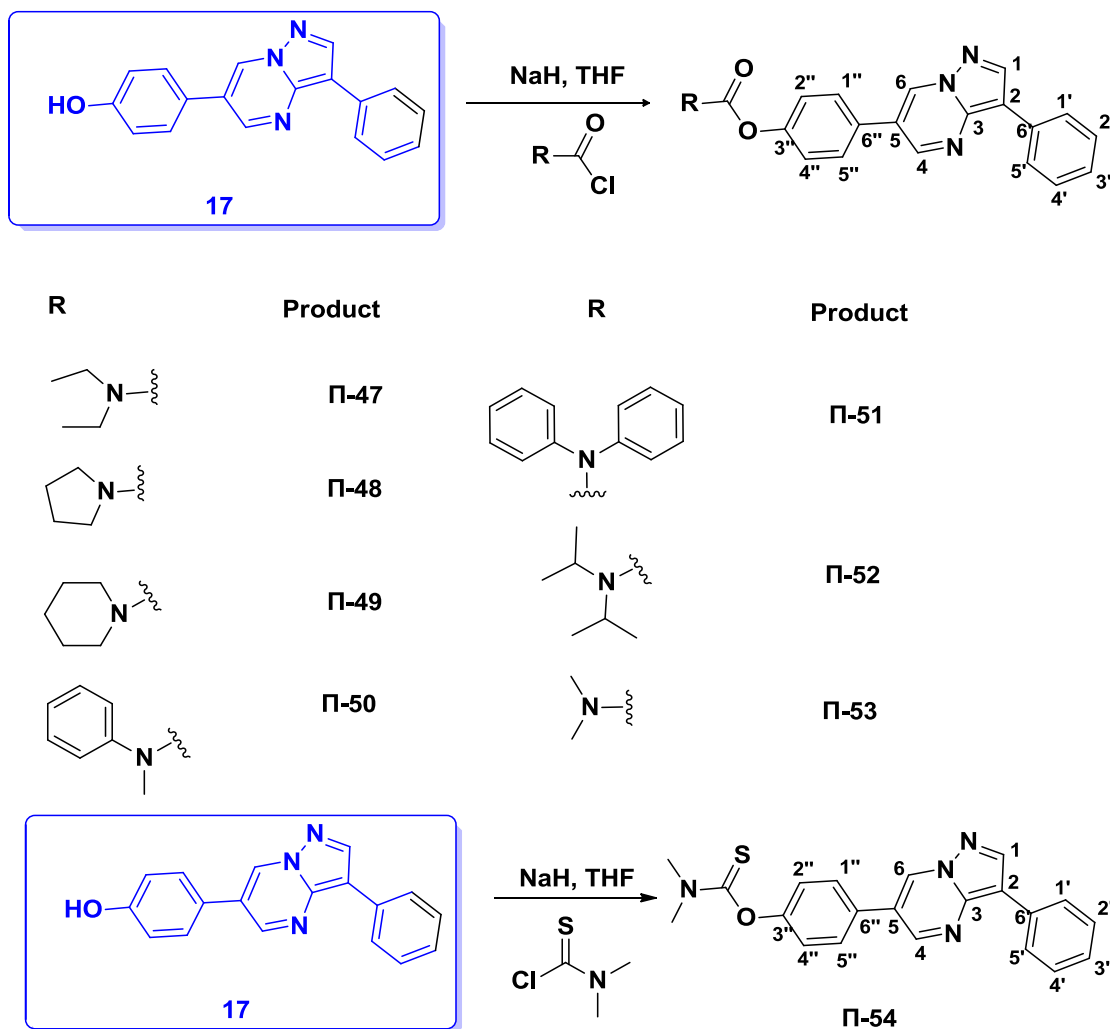
Στο **Σχήμα 4.9** αναλύεται ο μηχανισμός της σύνθεσης των παραγώγων της ντορσομορφίνης που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια διενέργειας της διατριβής. Ο μηχανισμός της αντίδρασης λαμβάνει χώρα μέσω του σχηματισμού ιμίνης από μία διαλδεΐδη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αρχικής όξινης ενεργοποίησης των καρβονυλομάδων και στα δύο στάδια του μηχανισμού και παράλληλη ενεργοποίηση της διαδικασίας της αφυδάτωσης.



Σχήμα 4.9. Μηχανισμός σύνθεσης παραγώγων ντορσομορφίνης στη συγκεκριμένη διατριβή

Το μόριο **17** (που έχει συντεθεί και στο παρελθόν) αποτέλεσε το ενδιάμεσο-κλειδί για τη σύνθεση των νέων παραγώγων **Π-47** έως και **Π-53** - **Π-54** (Σχήμα

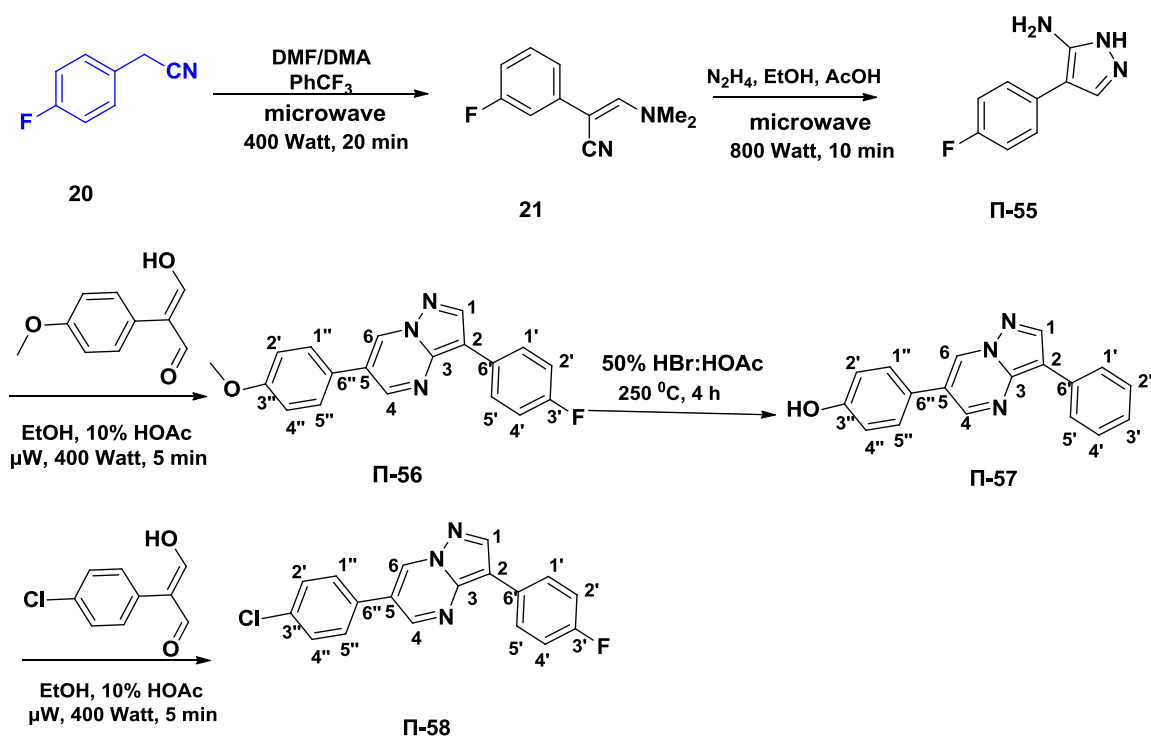
4.10). Στη συνέχεια, τα επιθυμητά παράγωγα ελήφθησαν με αντίδραση παραγωγοποίησης της φαινόλης η οποία έλαβε χώρα σε βασικό περιβάλλον με διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο και περαιτέρω αντίδραση με ποικίλα καρβαμυλόξυ χλωριδίων, σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 4.10. Παράγωγα ντορσομορφίνης προερχόμενα από το ενδιάμεσο μόριο **17**, με αλλαγές στη θέση 6 της βασικής δομής της.

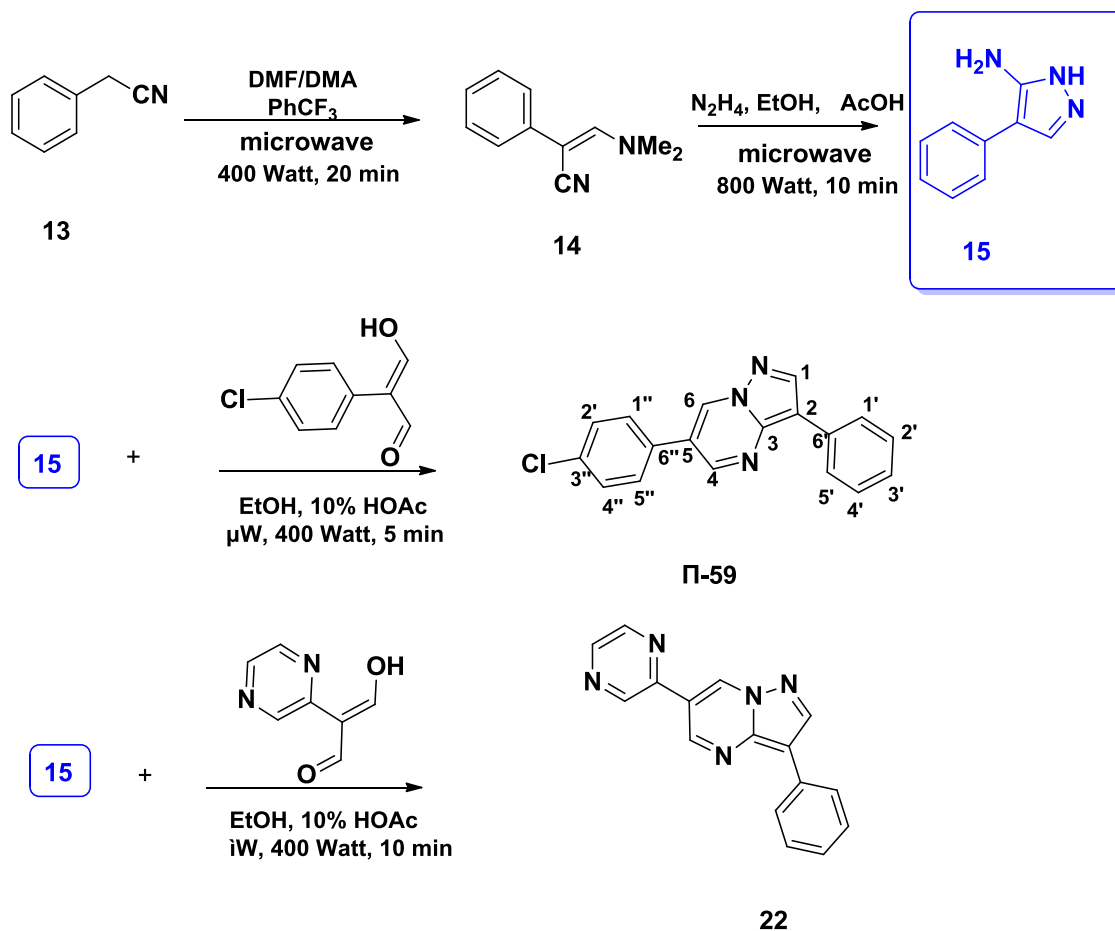
Η ίδια πορεία ακολουθήθηκε και όταν χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το 2-(4-φλουοροφαινυλο) ακετονιτρίλιο, **20** δίνοντας τα προϊόν **Π-55** το οποίο και συμπυκνώθηκε με την (E)-3-υδροξυ-2-(4-μεθοξυφαινυλο)ακεταλδεύδη. Το **Π-56** που παραλήφθηκε από την παραπάνω αντίδραση αποπροστατεύτηκε το **Π-57**.

Αντίστοιχα, το **Π-58** παραλήφθηκε, με συμπύκνωση του **Π-55** με την (E)-2-(4-χλωροφαινυλο)-3-υδροξυακεταλδεΐδη (Σχήμα 4.11).



Σχήμα 4.11 Παράγωγα ντορσομορφίνης από 2-(4-φλουοροφαινυλ) ακετονιτρίλιο

Επίσης για τις ανάγκες της εργασίας, συντέθηκε και μελετήθηκε ως προς τη βιολογική του δράση και το μόριο **22**, η σύνθεση του οποίου έχει ωστόσο αναφερθεί στο παρελθόν σε πατέντα (DeFeo Jones et al. 2002, US 2002/0041880, Pub. Date), αλλά και το προϊόν **Π-59** που προήλθε από τη συμπύκνωση του πυραζολίου **15** με την (E)-2-(4-χλωροφαινυλο)-3-υδροξυακεταλδεΐδη, (Σχήμα 4.12).



Σχήμα 4.12. Παράγωγα ντορσομορφίνης από 2-φαίνυλο ακετονιτρίλιο

4.5. Αναστολή πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση παραγώγων της ντορσομορφίνης αξιολογήθηκε σε δύο ενδοθηλιακές (HMEC-1 και BAEC) και τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές (HeLa, CEM, και L1210). Τα σχετικά αποτελέσματα για τις δυο ενδοθηλιακές σειρές συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1, αναδεικνύοντας το ρόλο των μορίων Π-46 και Π-50 ως ισχυρών αναστολέων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην κυτταρική σειρά BAEC, με τιμές IC₅₀ 2.4 ± 0.2 μM και 5.8 ± 2.2 μM, αντίστοιχα. Παρότι το μόριο Π-50 στη σειρά BAEC ήταν ιδιαίτερα δραστικό, στη σειρά HMEC-1 η δραστηριότητά του μειώθηκε κατά μία τάξη μεγέθους. Το γεγονός αυτό αποτυπώνει τη συσχέτιση των δομικών χαρακτηριστικών των μορίων με τη βιολογική δράση η οποία καταγράφεται στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές μέσω των τιμών του IC₅₀. Τα μόρια Π-47, Π-51, Π-57 και Π-59 δρουν ανασταλτικά στη σειρά HMEC-1 σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τα 100 μM. Όμως, από τα τέσσερα αυτά μόρια, εκείνα που

χρήζουν περαιτέρω αξιολόγησης είναι μόνο τα **Π-51** και **Π-57** λαμβάνοντας αφενός υπόψη τις τιμές IC₅₀ αλλά ειδικά για το μόριο **Π-57** επειδή είναι «δεκτικό» σε τροποποιήσεις της χημικής του δομής με αντίδραση παραγωγοποίησης ή σύζευξης του φαινολικού υδροξυλίου του. Από τα υπόλοιπα αποτελέσματα διαφαίνεται ότι αρκετά από τα παράγωγα της ντορσομορφίνης που συντέθηκαν δεν καταφέρνουν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε συγκεντρώσεις ανώτερες των 100 μΜ.

Πίνακας 4.1. Κυτταροστατική δραστικότητα των πυραζολίων σε ενδοθηλιακές σειρές.

Ένωση	IC ₅₀ * μΜ	
	ΒΑΕC	ΗΜΕC-1
16	> 100	> 100
Π-20	> 100	> 100
Π-45	> 100	≥ 100
Π-46	2.4 ± 0.2	5.9 ± 2.3
Π-47	> 100	73 ± 24
Π-48	> 100	> 100
Π-49	>100	>100
Π-50	5.8 ± 2.2	87 ± 22
Π-51	> 100	39 ± 10
Π-52	>100	>100
Π-53	>100	>100
Π-57	>100	39 ± 24
Π-58	>100	>100
Π-59	> 100	68 ± 27

Τα βιολογικά αποτελέσματα για τις τρεις καρκινικές σειρές παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.2** υποδεικνύοντας –όπως και στις ενδοθηλιακές σειρές– ότι οι ενώσεις **Π-46** και **Π-50** είναι τα πλέον δραστικά στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ η **Π-46** εμφανίζει τιμές IC₅₀ κάτω των 10 μΜ για τις κυτταρικές σειρές L1210, CEM. Αντίστοιχα, η ένωση **Π-57** έδειξε σημαντική δράση έναντι της σειράς CEM (6.1 μΜ).

Πίνακας 4.2 Κυτταροστατική δραστικότητα των παραγώγων ντορσομορφίνης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Ένωση	IC ₅₀ * (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
16	> 250	> 250	20 ± 0
Π-20	> 250	> 250	≥ 250
Π-45	> 250	> 250	> 250
Π-46	8.6 ± 5.7	4.2 ± 3.6	198 ± 73
Π-47	> 250	> 250	> 250
Π-48	> 250	84± 8	> 250
Π-49	-	54±26	>100
Π-50	99 ± 4	19 ± 11	14 ± 3
Π-51	≥ 250	145± 35	32 ± 13
Π-52	-	46 ± 3	>100
Π-53	-	54±16	>100
Π-57	-	6.1±1.5	14±0
Π-58	-	>100	>100
Π-59	> 100	36± 6	≥ 250

Καταλήγοντας, τα μόρια **Π-46**, **Π-50** και **Π-57** έδειξαν αξιόλογη αντικαρκινική δράση με τιμές IC₅₀ κάτω από 10 μM σε τουλάχιστον μία καρκινική σειρά. Επομένως σε αυτή τη διατριβή επιβεβαιώθηκε αλλά παράλληλα αναδείχθηκε ένας άλλος διαφορετικός τρόπος δράσης των συγκεκριμένων μορίων ο οποίος «ξεπερνά» το όριο του στόχου των BMP πρωτεϊνών και «αγγίζει» την αντικαρκινική δράση μέσω της αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

4.6. Αντιϊκή δράση

Στα πλαίσια επέκτασης του πεδίου ελέγχου της δράσης των μορίων που συντέθηκαν στη διατριβή αυτή, διενεργήθηκε και η εκτίμηση και της αντιϊκής τους δραστηριότητας. Οι ιοί που μελετήθηκαν ήταν ο ιός του έρπητα και οι τρεις μορφές του [Herpes simplex virus-1 (KOS) και Herpes simplex virus-2 (G), Herpes simplex virus-1 TKKOS ACV], ο ιός vaccinia virus, ο αδενοϊός adeno virus-2, ο ιός Coxsackievirus B4, ο ιός της κυστικής στοματίτιδας (Vesicular stomatitis) και ο

αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (Respiratory syncytial virus). Για την αποτίμηση της δράσης χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση του φαρμάκου που προκαλεί το 50 % της μέγιστης απόκρισης στη κυτταρική σειρά HeLa. Ως μέτρο σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν τα γνωστά αντιικά φάρμακα brivudin, cidofovir, acyclovir, ganciclovir, zalcitabine, και alonudine. Παράλληλα, προσδιορίστηκε και η ελάχιστη κυτταροτοξική τους συγκέντρωση.

Το μόριο **Π-46**, απεδείχθη δραστικό έναντι και των δυο τύπων του έρπητα (herpes simplex virus type 1, type 2), έναντι του ιού της ευλογιάς (vaccinia virus) και του ιού coxsackie B4. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η δράση του στον έρπητα simplex virus-2 (G) είναι συγκρίσιμη με του φαρμάκου cidofovir, και καλύτερη του brivudin. Σε ότι αφορά τον ιό vaccinia είναι λίγο πιο δραστικό σε σχέση με το cidofovir. Όταν όμως συγκριθεί η δράση του με αυτή των φαρμάκων brivudin, ganciclovir και acyclovir παρατηρούμε ότι για τον έρπητα Herpes simplex virus-1 (KOS) και Herpes simplex virus-2 (G) είναι αρκετές τάξεις χαμηλότερη. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι η βιοδραστικότητά του είναι συγκρίσιμη με εκείνη των cidofovir, zalcitabine, alonudine σε ότι αφορά τον αδενοϊό Adeno virus-2. Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν το μόριο **Π-46** ως αξιοσημείωτο που δύναται να τροποποιηθεί δομικά για να βελτιωθεί η αντιική του δραστικότητα, ειδικά έναντι των ιών που ήδη έχει επιδείξει δράση. Στο πλαίσιο αυτό θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι ειδικά το μόριο **Π-46** χρήζει περαιτέρω μελέτης στην ομάδα των ΠΖΠΜΔ, λαμβάνοντας υπόψη την πολυποίκιλη δράση που επέδειξε.

Πίνακας 4.3 . Κυτταροτοξικότητα και Αντιϊκή Δράση παραγώγων της ντορσομορφίνης στα κύτταρα HeLa

Μόριο	Ελάχιστη Κυτταροτοξική Συγκέντρωση (μM)	EC50 ^b (μM)					Adeno virus-2
		Herpes simplex virus-1 (KOS)	Herpes simplex virus-2 (G)	Vaccinia virus	Vesicular stomatitis virus	Herpes simplex virus-1 TKKOS ACV ^r	
16	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Π-45	20	>4	>4	>4	>4	>4	>4
Π-46	20	4.0	2.9	4.0	>4	4.0	4.0
Π-47	≥20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Π-48	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Π-50	≥100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Π-51	≥0.8	>0.8	>0.8	>0.8	>0.8	>0.8	>0.8
Π-59	≥100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Brivudin	>250	0.01	146	17	>250	2.0	-
Cidofovir	>250	1.0	1.0	22	>250	1.2	10
Acyclovir	>250	0.2	0.08	>250	>250	2.0	-
Ganciclovir	>100	0.03	0.03	>100	>100	0.8	-
Zalcitabine	>250	-	-	-	-	-	7.3
Alovudine	>250	-	-	-	-	-	3.4
^a Required to cause a microscopically detectable alteration of normal cell morphology.							
^b Required to reduce virus-induced cytopathogenicity by 50 %.							

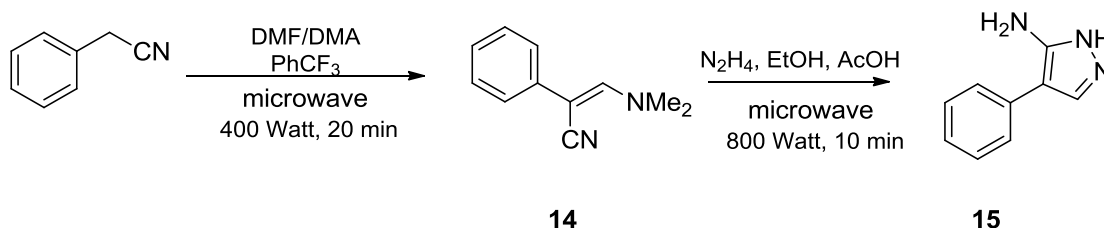
4.7. Συμπεράσματα

Η σημαντική δράση της dorsomorphin που περιγράφεται από τους Hao et al ήταν το έναυσμα για το σχεδιασμό νέων πυραζολο[1,5-a]πυριμιδινών. Που είναι ανάλογα της ντορσομορφίνης και να μελετηθεί η αντιπολλαπλασιαστική τους δράση σε δύο ενδοθηλιακές και τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές. Οι ενώσεις **Π-46** και **Π-50** προσδιορίστηκε ότι αναστέλλουν σε σημαντικό βαθμό τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στην κυτταρική σειρά BAEC, με τιμές IC_{50} $2.4 \pm 0.2 \mu M$ και $5.8 \pm 2.2 \mu M$, αντίστοιχα. Το μόριο **Π-50**, αν και στη σειρά BAEC ήταν ιδιαίτερα δραστικό, στη σειρά HMEC-1 η δραστηριότητά του μειώθηκε κατά μία τάξη μεγέθους. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη συσχέτιση των δομικών χαρακτηριστικών των μορίων με τη βιολογική δράση και πως αυτή αποτυπώνεται στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Τα μόρια **Π-47**, **Π-51**, **Π-57** και **Π-59** προσδιορίστηκε ότι είναι αναστολείς της **HMEC-1** σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 100 μM . Με βάση τις τιμές IC_{50} από τα τέσσερα αυτά μόρια, τα **Π-51** και **Π-57** χρήζουν περαιτέρω αξιολόγησης. Επίσης η εκτίμηση της αντιϊκής δραστηριότητας των νέων αυτών μορίων προσδιόρισε ότι το πυραζολο πυριμιδινικό παράγωγο **Π-46** επιδεικνύει μια αξιοσημείωτη αντιϊκή δράση κατά ποικίλων ιών.

4.8 Πειραματικό Μέρος-

Σύνθεση παραγώγων της ντορσομορφίνης

4-Φαινυλο-1H-πυραζολο-5-αμίνη, **15**



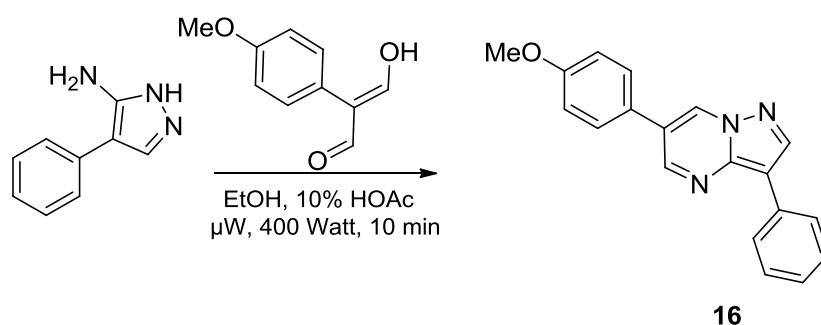
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
65%	C ₉ H ₉ N ₃	159.19	Βιβλιογραφ.	R _f = 0.33 CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9.2:0.8

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε 6 mL (6,09 g, 51.98 mmol) βενζυλοκυανιδίου που είναι διαλυμένα σε 36 mL διαλύματος DMF-DMA: DMF: PhCF₃ (1:1:2) πραγματοποιείται η αντίδραση σε σφαιρική φιάλη με κάθετο ψυκτήρα επαναρροής, ενώ η θέρμανση επιτυγχάνεται με χρήση μικροκυμάτων. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 20 min στα 400 Watt και το τέλος της αντίδρασης διαπιστώνεται με TLC (n-hexane/EtOAc 7:3) (επιβεβαιώθηκε και με NMR), όπου λαμβάνεται το ενδιάμεσο προϊόν **14** (με R_f = 0.47). Απευθείας στη σφαιρική φιάλη που πραγματοποιείται η αντίδραση προστίθεται υδραζίνη (22 mL, 453 mmol) και 100 mL διαλύματος EtOH: H₂O: CH₃COOH (0.9:0.1:1) και συνεχίζεται το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης με χρήση μικροκυμάτων για 10 min στα 800 Watt. Το τέλος της αντίδρασης διαπιστώνεται και πάλι με TLC και το προϊόν παραλαμβάνεται με εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Τέλος, χρωματογραφείται με CH₂Cl₂ δίνοντας καθαρό το προϊόν **15** (5,4 g, 33.92 mmol) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων.

NMR; ίδιο με τη βιβλιογραφία

6-(4-Μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλοπυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνη, **16**



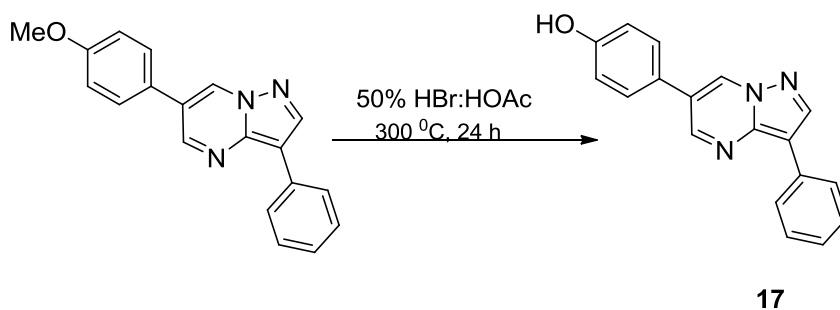
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
81%	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O	301.34	162	R _f = 0.56 Hexane:EtOAc 5.0:5.0

Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο **15** (150mg, 0.94 mmol) διαλύεται σε 7 mL 10 % AcOH σε EtOH και προστίθεται η 2-(4-μεθοξυφαινυλο)μαλονοδιαλδεΰδη (167.5 mg, 0.94 mmol). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα με χρήση μικροκυμάτων για 10 min, ισχύ 400 Watt και κάθετο ψυκτήρα επαναροής. Το διάλυμα που παραλαμβάνεται εξουδετερώνεται με NH₄OH και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική στοιβάδα εξατμίζεται και το προϊόν που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με Hexane/EtOAc 7:3 ή CH₂Cl₂ και λαμβάνεται κίτρινο προϊόν **16** (230 mg, 0.76 mmol).

NMR; Ίδιο με τη βιβλιογραφία

4-(3-Φαινυλοπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινόλη, 17



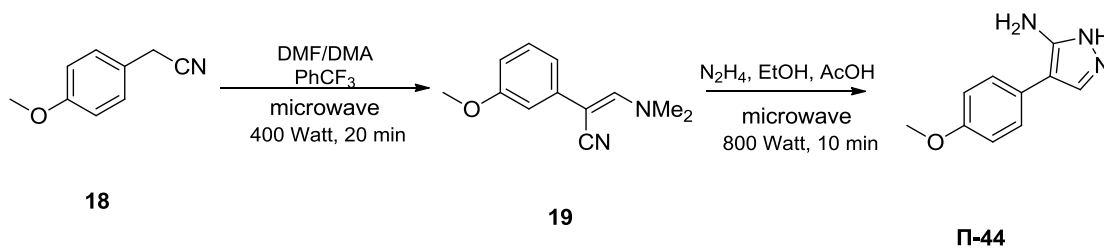
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
88%	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	287.32	181	R _f = 0.67 CH ₂ Cl ₂ :MeOH 4:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο **16** (300mg, 0.99 mmol) διαλύεται σε 10 mL 50 % AcOH/EtOH και ακολουθεί η αντίδραση αποπροστασίας με κάθετο ψυκτήρα επαναροής για μία μέρα στους 300 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης που σηματοδοτείται με TLC γίνεται κατεργασία με CH₂Cl₂ και το προϊόν χρωματογραφείται με EtOAc/Hexane 3:7 για να ληφθεί καθαρό το προϊόν **17** υπό μορφή κίτρινων κρυστάλλων (250 mg, 0.87 mmol).

NMR; ίδιο με τη βιβλιογραφία

4-(4-Μεθοξυφαινυλο)-1H-πυραζολ-5-αμίνη, Π-44

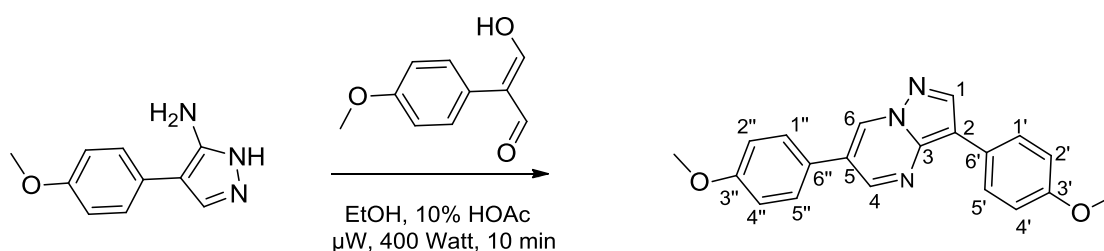


ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
73%	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O	189.21	116	R _f = 0.45 CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9.2:0.8

Μέθοδος Παρασκευής:

Ακολουθήθηκε η ίδια πορεία όπως στην περίπτωση του **16** χρησιμοποιώντας ως αντιδρώντα το 4-μεθοξυφαινυλο ακετονιτρίλιο, **18** (2 mL, 14.7 mmol) και υδραζίνη (7.3 mL, 150 mmol). Το τέλος της αντίδρασης διαπιστώνεται και πάλι με TLC και το προϊόν παραλαμβάνεται με εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Τέλος, χρωματογραφείται με CH₂Cl₂ δίνοντας καθαρό το προϊόν **Π-44** (2020 mg, 10.67 mmol) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων. Το **Π-44**, ελήφθη ως ενδιάμεσο και χρησιμοποιήθηκε απευθείας.

3,6-δισ(4-Μεθοξυφαινυλο)πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνη, Π-45



Π-45

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
97%	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₂	331.37	172	R _f = 0.5 Hexane:EtOAc 5.0:5.0

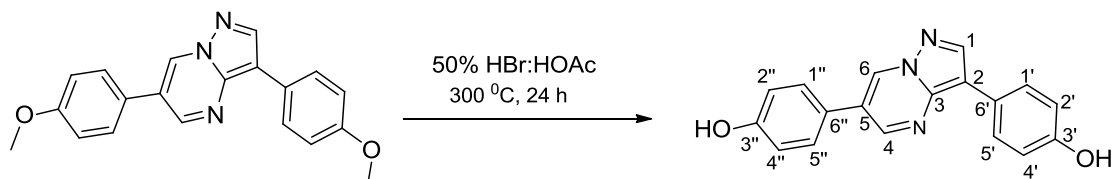
Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο Π-44 (150mg, 0.79 mmol) διαλύεται σε 7 mL 10 % AcOH/EtOH και προστίθεται η 2-(4-μεθοξυφαινυλο) μαλονοδιαλδεΰδη (140.8 mg, 0.79 mmol). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα ακολουθώντας ακριβώς την διαδικασία που περιγράφεται στην σύνθεση και λαμβάνεται το τελικό μίγμα το οποίο χρωματογραφείται με CH₂Cl₂. Το τελικό προϊόν Π-45 λαμβάνεται υπό μορφή κίτρινων κρυστάλλων (240 mg, 0.72 mmol).

¹H NMR (CDCl₃-d₆): 8.82 (2H, s, H-6, H-4), 8.46 (1H, s, H-1), 7.98 (2H, d, J 7.8 Hz, H-1', H-5'), 7.60 (2H, d, J 8.4 Hz, H-1'', H-5''), 7.09 (2H, d, J 7.5 Hz, H-2'', H-4''), 7.05 (2H, d, J 7.5 Hz, H-2', H-4'), H-2'', H-4''), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 149.0 (C-4), 142.17 (C-1), 131.0 (C-6), 110.74 (C-2), 127.65 (C-1', C-5'), 128.08 (C-1'' και C-5''), 115.48 (C-2'', C-4''), 114.41 (C-2', C-4'), 124.4 (C-6'), 126.06 (C-6''), 158.92 (C-3'), 160.16 (C-3''), 122.43 (C-3), 55.63 (OCH₃).

4,4'-(Πυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-3,6-διυλο)διφαινόλη, Π-46



Π-46

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
97 %	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O	287.32	164	R _f = 0.32 CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9.0:1.0

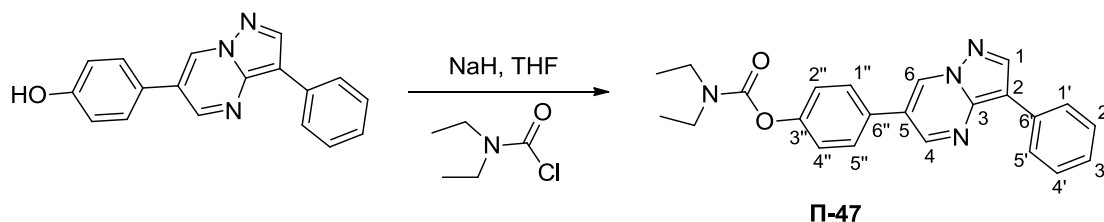
Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο **Π-45** (300 mg, 0.90 mmol) διαλύεται σε 10 mL 50 % AcOH/EtOH και ακολουθεί η αντίδραση αποπροστασίας με κάθετο ψυκτήρα επαναρροής για 10 h στους 250 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης που πιστοποιείται με TLC γίνεται κατεργασία με CH₂Cl₂ και το προϊόν χρωματογραφείται με CH₂Cl₂ για να ληφθεί καθαρό το **Π-46** με μορφή κίτρινων κρυστάλλων (250 mg, 0.87 mmol).

¹H NMR (Acetone): 8.89 (s, 1H, H-6), 8.74 (s, 1H, H-4), 8.33 (s, 1H, H-1), 7.89 (2H, d, J 7.71 Hz, H-1', H-5'), 7.55 (2H, d, J 7.70 Hz, H-1'', H-5''), 6.90 (2H, d, J 7.48 Hz, H-2'', H-4''), 6.81 (2H, d, J 7.91 Hz, H-2', H-4').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 148.95 (C-4), 142.46 (C-1), 131.55 (C-6), 109.8 (C-2), 127.44 (C-1', C-5'), 128.44 (C-1'' και C-5''), 115.66 (C-2', C-4'), 116.27 (C-2'', C-4''), 123.75 (C-6'), 123.66 (C-6''), 155.97 (C-3'), 157.76 (C-3''), 122.43 (C-3), 54.82 (OCH₃)

4-(3-Φαινυλπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6υλο)φαινυλοδισαιθυλοκαρβαμίδιο, Π-47



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
70%	C ₂₂ H ₂₁ N ₄ O ₂	373.43	190	R _f = 0.9 CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9.7:0.3

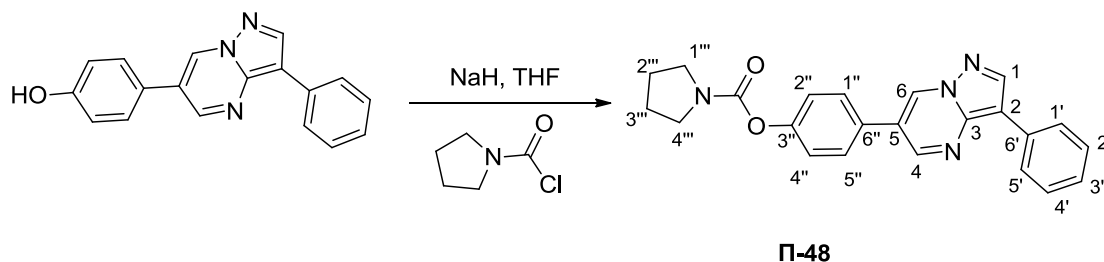
Μέθοδος Παρασκευής:

Σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται στους 0 °C στάγδην και με ανάδευση για 10 λεπτά, διάλυμα του **17** (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF. Μετά την πάροδο μισής ώρας και με τη θερμοκρασία να διατηρείται στους 0 °C προστίθεται διάλυμα διαιθυλοκαρβονυλοχλωριδίου (1.05 mmol, 0.13 mL) σε 0.5 mL άνυδρου DMF. Το μίγμα θερμαίνεται προοδευτικά σε διάστημα μίας ώρας έως τους 250°C, και αναδεύεται στη θερμοκρασία αυτή για επιπλέον μια ώρα. Η αντίδραση εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl και εκχυλίζεται με EtOAc (2 x 25 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με MgSO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το προϊόν χρωματογραφείται με EtOAc/Hexane 5.0/5.0 για να ληφθεί καθαρό το **Π-47** με μορφή κίτρινων κρυστάλλων (200 mg, 0.54 mmol).

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8,8 (m, 2H, H-4, H-6), 8.49 (s, 1H, H-1), 8.08 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-1', H-5'), 7.63 (d, J = 8.4, Hz, 2H, H-1'', H-5''), 7.49 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-2', H-4'), 7.30 (m, 3H, H-3', H-2'', H-4''), 3.50 (dd, J 6.6 Hz, 4H, CH₂CH₃), 1.30 (dt, J 6.6 Hz, 6H, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 149.1 (C-6), 144.21 (C-1), 132.24 (C-4), 110.46 (C-2), 131.21 (C-3, C-5, C-6''), 126.53 (C-1', C-5'), 128.18 (C-1'', C-5''), 128.8 (C-2', C-4'), 126.6 (C-3'), 123.0 (C-2'', C-4''), 152.26 (C-3'').

4-(3-Φαινυλπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινυλπυρρολιδιν-1-καρβοξυλικός εστέρας, Π-48



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
68%	C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₂	384.43	201	R _f = 0.86 CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9.7:0.3

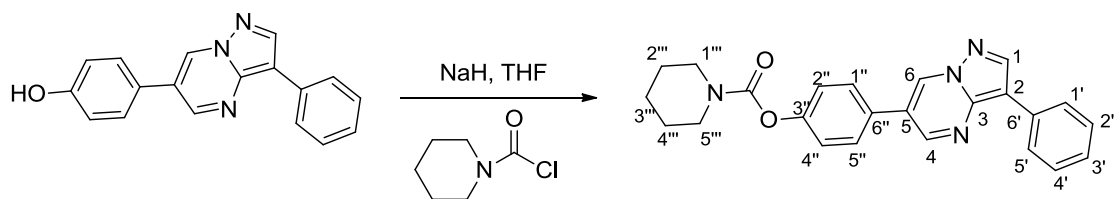
Μέθοδος Παρασκευής:

Σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται στους 0 °C στάγδην και με ανάδευση για 10 λεπτά, διάλυμα του DOS8 (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF. Μετά την πάροδο μισής ώρας και με τη θερμοκρασία να διατηρείται στους 0 °C προστίθεται διάλυμα πυρρολιδινοκαρβονυλοχλωριδίου (1.05 mmol, 0.12 mL) σε 0.5 mL άνυδρου DMF. Το μίγμα θερμαίνεται προοδευτικά σε διάστημα μίας ώρας έως τους 250°C, και αναδεύεται στη θερμοκρασία αυτή για επιπλέον μια ώρα. Η αντίδραση εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl και εκχυλίζεται με EtOAc (2x25 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με MgSO₄ και συμπυκνώνονται υπό κενό. Το προϊόν χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/Hexane 5.0/5.0 για να ληφθεί καθαρό το **Π-48** υπό μορφή κίτρινων κρυστάλλων (200 mg, 0.52 mmol).

¹H NMR (CDCl₃): 8.76 (2H, d, J 7.2 Hz, H-4, H-6), 8.49 (1H, s, H-1), 8.10 (2H, d, J 7.2 Hz, H-1', H-5'), 7.63 (2H, d, J 6.5 Hz, H-1'', H-5''), 6.51 (2H, t, J 7.2 Hz, H-4', H-2'), 7.31 (3H, m, H-3', H-2'', H-4''), 3.65 (2H, s, H-1''', H-4'''), 3.57 (2H, s, H-1''', H-4'''), 2.00 (4H, m, H-2''', H-3''').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 149,16 (C-4), 143,25 (C-1), 132.18 (C-6), 128.87 (C-4', C-2'), 126.57 (C-1', C-5'), 127.86 (C-1'', C-5''), 126.71 (C-3'), 123.40 (C-2'', C-4''), 110.63 (C-2), 131.36 (C-6'), 151.89 (C-3''), 130.53 (C-6''), 46.55 (C-1''', C-4'''), 25.80 and 25.01 (C-2''', C-3''').

4-(3-Φαινυλοπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινυλπιπεριδιν-1-καρβοξυλικός εστέρας, Π-49



Π-49

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
75%	C ₂₄ H ₂₂ N ₄ O ₂	398.46	177	R _f = 0.85 CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9.7:0.3

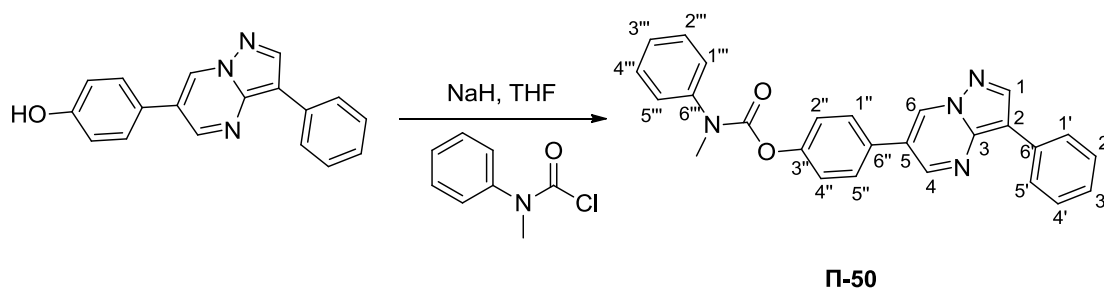
Μέθοδος Παρασκευής:

Ομοίως με το **Π-48**, διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF, **17** (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF και διάλυμα πυπεριδινοκαρβονυλοχλωριδίου (1.05 mmol, 0.13 mL) σε 0.5 mL άνυδρου DMF χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του προϊόντος **Π-49**. Μέγιστη θερμοκρασία που αναπτύσσεται φτάνει και πάλι τους 250°C ενώ το υπόλειμμα της αντίδρασης χρωματογραφείται με μίγμα EtOAc/Hexane 5.0/5.0 για να ληφθεί καθαρό το **Π-49** με μορφή κίτρινων κρυστάλλων (230 mg, 0.58 mmol).

¹H NMR (CDCl₃): 8.85 (2H, q, *J* 3.6 Hz, H-4, H-6), 8.46 (1H, s, H-1), 8.03 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-1', H-5'), 7.65 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-1'', H-5''), 7.53 (2H, t, *J* 7.8 Hz, H-2', H-4'), 7.28 (3H, m, H-3', H-2'', H-4''), 3.60 (6H, m, H-2''', H-3''', H-4'''), 1.7 (4H, m, H-1''', H-5''').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 149,35 (C-6), 143,09 (C-1), 131.85 (C-4), 128.76 (C-4', C-2'), 127.95 (C-1'', C-5''), 126.51 (C-3'), 126.70 (C-1', C-5'), 122.91 (C-2'', C-4''), 151.7 (C-3'''), 130.82 (C-5), 110.897 (C-2), 131.97 (C-6'), 45.61 (C-2''', C-3''', C-4'''), 24.81 (C-1''', C-5''').

**4-(3-Φαινυλοπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινυλο
μεθυλο(φαινυλο)καρβαμίδιο, Π-50**



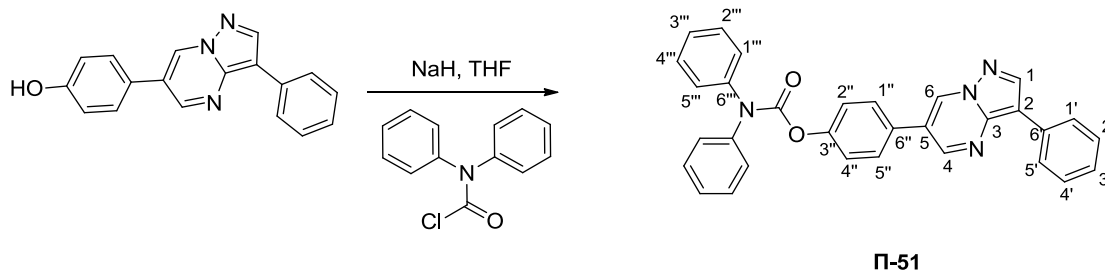
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
83%	C ₂₆ H ₂₀ N ₄ O ₂	420.546	215	R _f = 0.83 CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9.7:0.3

Μέθοδος Παρασκευής:

Ομοίως με το **Π-48**, διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF, **17** (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF και διάλυμα N-μεθυλ-N-φαινυλκαρβαμυλο χλωριδίου (1.05 mmol, 178.1 mg) σε 1 mL άνυδρου DMF χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του προϊόντος **Π-50**. Μέγιστη θερμοκρασία που αναπτύσσεται φτάνει και πάλι τους 250°C ενώ το υπόλειμμα της αντίδρασης χρωματογραφείται με EtOAc/Hexane 5.0/5.0 για να ληφθεί καθαρό το **Π-50** υπό μορφή κίτρινων κρυστάλλων (270 mg, 0.64 mmol).

¹H NMR (CDCl₃): 9,54 (1H, d, J 1,8 Hz, H-6), 9,07 (1H, d, J 2.4 Hz, H-4), 8.82 (1H, s, H-1), 8.19 (2H, d, J 7.2 Hz, H-1', H-5'), 7.94 (2H, d, J 9.0 Hz, H-1'', H-5''), 7.38 (9H, m, ArH), 7.28 (3H, m, ArH H-3''', H-2'', H-4'' σύμφωνα με chemdraw), 4.03 (3H, s, -NCH₃).

4-(3-Φαινυλπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινυλοδιφαινυλοκαρβαμίδιο, Π-51



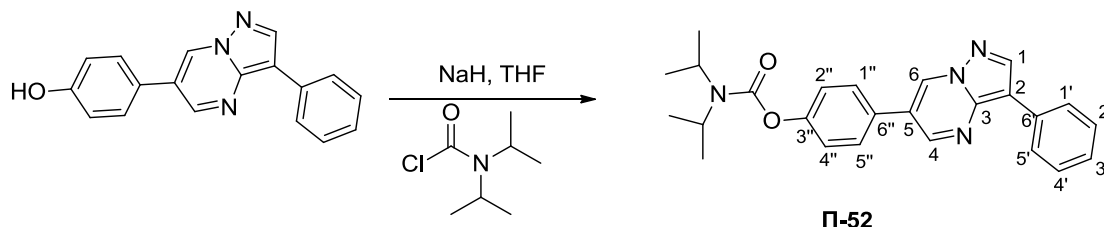
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₉ H ₂₀ N ₄ O ₂	456.49	189	R _f = 0.79 CH ₂ Cl ₂ :MeOH 9.7:0.3

Μέθοδος Παρασκευής:

Ομοίως με το **Π-48**, διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF, **17** (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF και διάλυμα diphenylcarbamoyl chloride (1.05 mmol, 243.3 mg) σε 1 mL άνυδρου DMF χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του προϊόντος **Π-51**. Μέγιστη θερμοκρασία που αναπτύσσεται φτάνει και πάλι τους 250°C ενώ το υπόλειμμα της αντίδρασης χρωματογραφείται με CH₂Cl₂ για να ληφθεί καθαρό το **Π-51** με μορφή κίτρινων κρυστάλλων (300 mg, 0.66 mmol).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 8.83 (2H, d, J 8.8 Hz, H-4, H-6), 8.49 (1H, s, H-1), 8.09 (2H, d, J 8.2 Hz, H-1', H-5'), 7.62 (2H, d, J 8.4 Hz, H-1'', H-5''), 7.5 (2H, t, J 7.5 Hz, H-2', H-4'), 7.44- 7.36 (13H, m, ArH).

4-(3-Φαινυλοπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινυλοδιίσοπροπυλοκαρβαμίδιο, Π-52



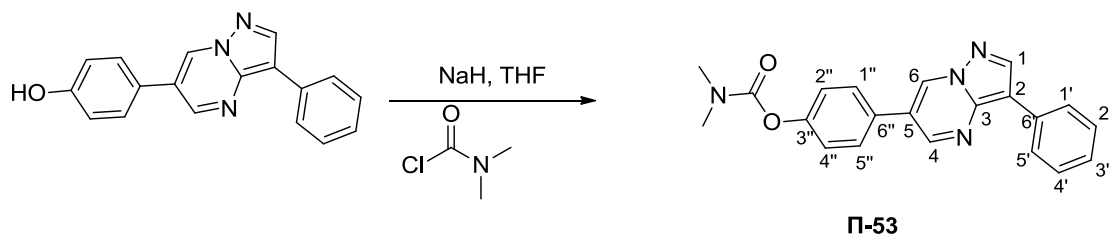
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
69%	C ₂₅ H ₂₆ N ₄ O ₂	414.50	192	R _f = 0.7 EtOAc:Hexane 6:4

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται στους 0 °C στάγδην και με ανάδευση για 10 λεπτά, διάλυμα του **17** (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF. Μετά την πάροδο μισής ώρας και με τη θερμοκρασία να διατηρείται στους 0 °C προστίθεται διάλυμα N,N διισοπροπυλκαρβαμυλ χλωριδίου (1.05 mmol, 171.8 mg) σε 0.5 mL άνυδρου DMF. Το μίγμα θερμαίνεται προοδευτικά σε διάστημα μίας ώρας εως τους 250°C, και αναδεύεται στη θερμοκρασία αυτή για επιπλέον μια ώρα. Η αντίδραση εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl EtOAc(2x25 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με MgSO₄ και συμπυκνώνοντας υπό κενό. Το προϊόν χρωματογραφείται με EtOAc/Hexane 3/7 για να ληφθεί καθαρό το **Π-52** με μορφή κίτρινων κρυστάλλων (200 mg, 0.48 mmol).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 8.74 (2H, m, H-4, H-6), 8.39 (s, 1H, H-1), 7.99 (2H, d, J 7.2 Hz, H-1', H-5'), 7.53 (2H, d, J 8.4Hz, H-1'', H-5''), 7.41 (2H, t, J 7.5 Hz, H-2', H-4'), 7.23 (3H, d, J 8.4 Hz, H-2'', H-4'', H-3'), 3.41 (2H, q, J 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 1.25 (m, 12H, CH(CH₃)₂).

-(3-Φαινυλοπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινυλοδιμεθυλοκαρβαμίδιο, Π-53



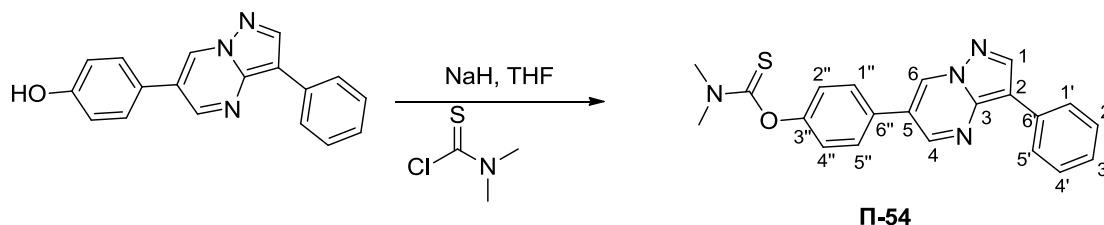
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
71%	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₂	358.39	171	R _f = 0.34 EtOAc:Hexane 6:4

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται στους 0 °C στάγδην και με ανάδευση για 10 λεπτά, διάλυμα του **17** (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF. Μετά την πάροδο μισής ώρας και με τη θερμοκρασία να διατηρείται στους 0 °C προστίθεται διάλυμα διμεθυλκαρβαμυλ χλωριδίου (1.05 mmol, 0.1 mL) σε 0.5 mL άνυδρου DMF. Το μίγμα θερμαίνεται προοδευτικά σε διάστημα μίας ώρας εως τους 250°C, και αναδεύεται στη θερμοκρασία αυτή για επιπλέον μια ώρα. Η αντίδραση εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl EtOAc(x25 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με MgSO₄ και συμπυκνώνοντας υπό κενό. Το προϊόν χρωματογραφείται με EtOAc/Hexane 7/3 για να ληφθεί καθαρό το **Π-53** με μορφή κίτρινων κρυστάλλων (180 mg, 0.50 mmol).

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8,85 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-2, H-3), 8.50 (s, 1H, H-1), 8.09 (dd, J = 7.2 Hz, 2H, H-1', H-2'), 7.62 (d, J = 9.0 Hz, 2H, H-1'', H-2''), 7.50 (t, J = 9.0 Hz, 2H, ArH), 7.32 (m, 3H, ArH), 3.17 (s, 3H, -CH₃), 3.08 (s, 3H, -CH₃).

O-(4-(3-φαινυλοπυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινυλο)διμεθυλοκαρβαμοθειϊκός εστέρας, Π-54



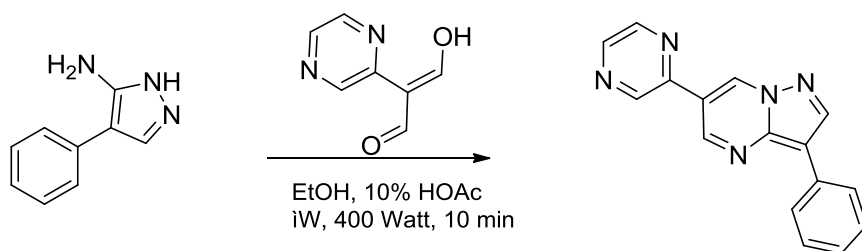
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
65%	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ OS	374.46	167-168	R _f = 0.34 EtOAc:Hexane 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε διάλυμα υδριδίου του νατρίου, 60% (30.8 mg, 0.77mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF υπό ατμόσφαιρα αργού προστίθενται στους 0 °C στάγδην και με ανάδευση για 10 λεπτά, διάλυμα του **17** (200 mg, 0.70 mmol) σε 1 mL άνυδρου DMF. Μετά την πάροδο μισής ώρας και με τη θερμοκρασία να διατηρείται στους 0 °C προστίθεται διάλυμα διμεθυλθειοκαρβαμοϋλο χλωριδίου (1.05 mmol, 129.8 mg) σε 0.5 mL άνυδρου DMF. Το μίγμα θερμαίνεται προοδευτικά σε διάστημα μίας ώρας εως τους 250°C, και αναδεύεται στη θερμοκρασία αυτή για επιπλέον μια ώρα. Η αντίδραση εξουδετερώνεται με προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NH₄Cl EtOAc(2x25 mL). Οι οργανικές στοιβάδες ενώνονται, εξαλατώνονται, ξηραίνονται με MgSO₄ και συμπυκνώνοντας υπό κενό. Το προϊόν χρωματογραφείται με EtOAc/Hexane 3/7 για να ληφθεί καθαρό το **Π-54** με μορφή κίτρινων κρυστάλλων (170 mg, 0.45 mmol).

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8,87 (d, 2H, J = 6.6 Hz, H-4, H-6), 8.50 (s, 1H, H-1), 8.09 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-1', H-5'), 7.67 (d, J = 8.4, Hz, 2H, H-1'', H-5''), 7.51 (t, J = 7.8 Hz, 2H, H-2'', H-4''), 7.29 (t, J = 8.4, Hz, 1H, H-3'), 7.28 (d, J = 8.0, Hz, 2H, H-2'', H-4''), 3.52 (s, 3H, -CH₃), 3.42 (s, 3H, -CH₃).

3-Φαινυλο-6-(πυραζιν-2-υλο)πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνη, 20



20

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
78%	C ₁₆ H ₁₁ N ₅	273.29	117	R _f = 0.5 Hexane:EtOAc 5.0:5.0

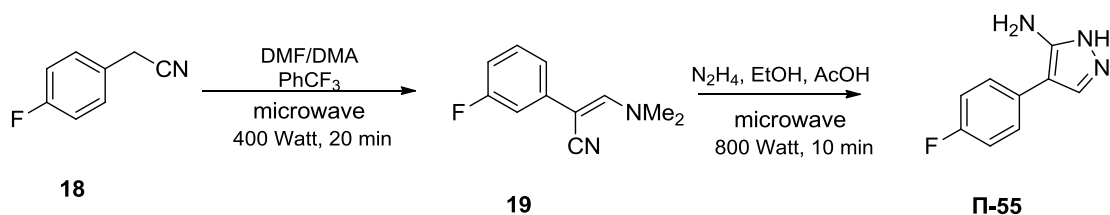
Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο **15** (150mg, 0.94 mmol) διαλύεται σε 7 mL 10 % AcOH/EtOH και προστίθεται η 2-(4-πυριμιδουλ)μαλονοδιαλδεύδη (141.2 mg, 0.94 mmol). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα με χρήση μικροκυμάτων για 10 min, ισχύ 400 Watt και κάθετο ψυκτήρα επαναρροής. Το διάλυμα που παραλαμβάνεται εξουδετερώνεται με NH₄OH και εκχυλίζεται με CH₂Cl₂/H₂O. Η οργανική στοιβάδα εξατμίζεται και το προϊόν που λαμβάνεται καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με Hexane/EtOAc και λαμβάνεται κίτρινο προϊόν **20** (200 mg, 0.73 mmol).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 9.33 (1H, d, J 2.4 Hz, H-6), 9.14 (1H, d, J 2.4 Hz H-4), 9.04 (1H, s, H-3''), 8.63 (1H, s, H-1''), 8.55 (1H, s, H-2''), 8.47 (1H, s, H-1), 8.0 (2H, d, J 8.4 Hz, H-1', H-5'), 7.42 (3H, t, J 7.8 Hz, H-2', H-3', H-4').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 134.08 (C-6), 144.82 (C-1), 147.71 (C-4), 141.3 (C-3''), 144.82 (C-1''), 144.82 (C-2''). 111.68 (C-2), 126.86 (C-4', C-2'), 128.92 (C-1', C-3', C-5'),

4-(4-Φθοροφαινυλο)-1H-πυραζολ-5-αμίνη, Π-55

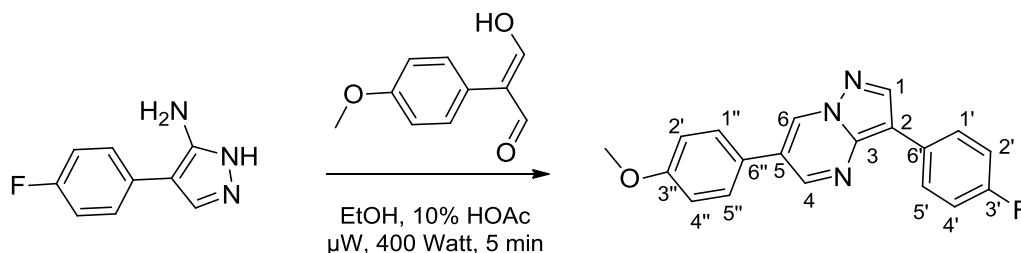


ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
61%	C ₉ H ₁₈ FN ₃	177.18	121	R _f = 0.40 CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9.2:0.8

Μέθοδος Παρασκευής:

Ακολουθήθηκε η ίδια πορεία όπως στην περίπτωση του **16** χρησιμοποιώντας ως αντιδρώντα 2-(4-fluorophenyl)acetonitrile (2 mL, 16.7 mmol) και υδραζίνη (3.7 mL, 120 mmol). Το τέλος της αντίδρασης διαπιστώνεται και πάλι με TLC και το προϊόν παραλαμβάνεται με εκχύλιση με EtOAc/H₂O. Τέλος χρωματογραφείται με CH₂Cl₂ δίνοντας καθαρό το προϊόν **Π-55** (1.8 g, 10.16 mmol) υπό την μορφή κίτρινων κρυστάλλων. Το Π-55 χρησιμοποιήθηκε ως ενδιάμεσο προϊόν.

3-(4-Φθοροφαινουολ)-6-(4-μεθοξυφαινουολ)πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνη, Π-56



Π-56

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
81%	C ₁₉ H ₁₄ FN ₃ O	319.33	175-176	R _f = 0.57 Hexane:EtOAc 5.0:5.0

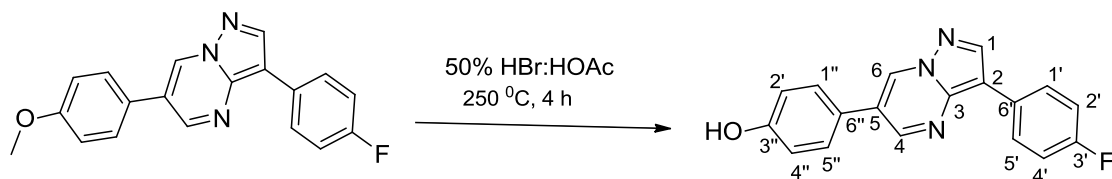
Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο **Π-55** (150mg, 0.85 mmol) διαλύεται σε 7 mL 10 % AcOH/EtOH και προστίθεται η 2-(4-μεθοξυφαινουολ)μαλονοδιαλδεύδη (151.5 mg, 0.85 mmol). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα ακολουθώντας ακριβώς την διαδικασία που περιγράφεται στην σύνθεση του **Π-45** και λαμβάνεται το προϊόν **Π-56** που χρωματογραφείται με CH₂Cl₂ και λαμβάνονται κίτρινοι κρύσταλοι (220 mg, 0.69 mmol).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 8.71 (2H, d, J 8.7 Hz, H-4, H-6), 8.4 (1H, s, H-1), 7.80 (2H, m, H-1', H-5'), 7.47 (2H, d, J 8.4 Hz, H-1'', H-5''), 7.09 (2H, t, J 9.0 Hz, H-2', H-4'), 7.00 (2H, d, J 9.0 Hz, H-2'', H-4''), 3.92 (3H, OCH₃)

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 149.96 (C-4), 143.81 (C-1), 131.539 (C-6), 110.49 (C-2), 128.18 (C-1', C-5'), 127.89 (C-1'', C-5''), 116.04 (C-2', C-4'), 115.18 (C-2'', C-4''), 162.0 (C-3'''), 122.56 (C-6''), 159.68 (C-6'), 55.85 (O-CH₃).

4-(3-(4-Φθοροφαινυλο)πυραζολο[1,5-a]πυριμιδιν-6-υλο)φαινόλη, Π-57



Π-57

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80 %	C ₁₈ H ₁₂ FN ₃ O	305.31	159	R _f = 0.5 Hexane:EtOAc 5.0:5.0

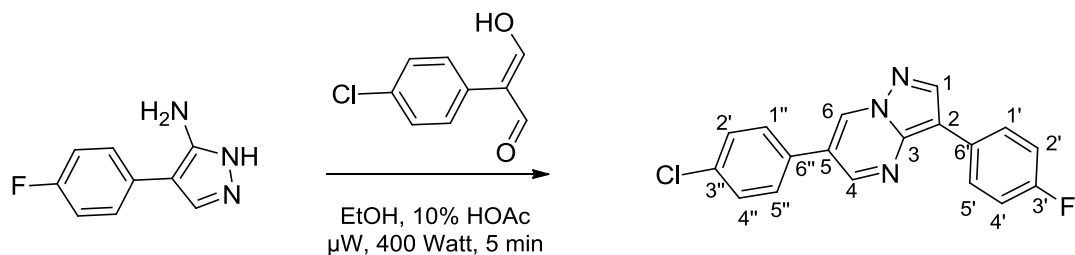
Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο **Π-56** (300mg, 0.94 mmol) διαλύεται σε 10 mL 50 % AcOH/EtOH και ακολουθεί η αντίδραση αποπροστασία με κάθετο ψυκτήρα επαναρροής για 4 h στους 250 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης που σηματοδοτείται με TLC γίνεται work up με CH₂Cl₂ και το προϊόν χρωματογραφείται με Hexane:EtOAc 6:4 για να ληφθεί καθαρό το **Π-57** με μορφή ίτρινων κρυστάλλων (230 mg, 0.75 mmol).

¹H NMR (600 MHz, Acetone): 9.0 (1H, s, H-6), 8.9 (s, 1H, H-4), 8.62 (1H, s, H-1), 8.8 (1H, s, OH), 8.25 (2H, m, H-1', H-5'), 7.72 (2H, d, J 9.0 Hz, H-1'', H-5''), 7.25 (2H, t, J 9.0 Hz, H-2', H-4'), 7.05 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'', H-4'').

¹³C NMR (Acetone-d₆): δ = 149.40 (C-4), 142.19 (C-1), 131.202 (C-6), 108.82 (C-2), 129.79 (C-3), 127.63 (C-1', C-5'), 128.1 (C-1'', C-5''), 115.59 (C-2', C-4'), 116.04 (C-2'', C-4''), 157.76 (C-3'), 147.7 (C-3''), 123.68 (C-6'), 159.68 (C-6'').

6-(4-Χλωροφαινυλο)-3-(4-φθοροφαινυλο)πυραζολο[1,5-a]πυριμιδίνη, Π-58



Π-57

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
80%	C ₁₈ H ₁₁ FCIN ₃	323.75	178	R _f = 0.7 Hexane:EtOAc 5.0:5.0

Μέθοδος Παρασκευής:

Το μόριο **Π-55** (150mg, 0.85 mmol) διαλύεται σε 7 mL 10 % AcOH/EtOH και προστίθεται η 2-(4- χλωροφαινυλο) μαλονοδιαλδεύδη (155.2 mg, 0.85 mmol). Η αντίδραση λαμβάνει χώρα όπως ακριβώς και στη σύνθεση και λαμβάνεται του DOS35 που χρωματογραφείται με Hexane:EtOAc 6:4 και λαμβάνονται κίτρινοι κρύσταλοι **Π-58** (220 mg, 0.68 mmol).

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.76 (d, J = 2.31 Hz, 1H, H-6), 8.72 (d, J = 2.31 Hz, 1H, H-4), 8.36 (s, 1H, H-1), 7.95 (m, 2H, H-1', H-5'), 7.46 (m, 4H, H-1'', H-2'', H-4'', H-5''), 7.10 (t, J = 8.74 Hz, 2H, H-2', H-4').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 148.58 (C-6), 143.91 (C-1), 132.34 (C-4), 110.68 (C-2), 132.51(C-3, C-5, C-6''), 127.85 (C-1', C-5'), 127.97 (C-1'', C-5''), 115.34 (C-2', C-4'), 132.0 (C-2'', C-4'', C-6''), 135.37 (C-3'), 162.02 (C-3').

Βιβλιογραφία

Afantitis, A., Melagraki, G., arimveis, H., Koutentis, A., Markopoulos, J., Igglessi-Markopoulou, O., 2008. Development and evaluation of a QSPR model for the prediction of diamagnetic susceptibility, . *Qsar Comb Sci* 27, 432-436.

Ahmed, M.S.M., Kobayashi, K., Mori, A., 2005. One-pot construction of pyrazoles and isoxazoles with palladium-catalyzed four-component coupling. *Organic letters* 7, 4487-4489.

Aggarwal, V.K., de Vicente, J., Bonnert, R.V., 2003. A novel one-pot method for the preparation of pyrazoles by 1,3-dipolar cycloadditions of diazo compounds generated in situ. *The Journal of organic chemistry* 68, 5381-5383.

Ahmed, M.S.M., Kobayashi, K., Mori, A., 2005. One-pot construction of pyrazoles and isoxazoles with palladium-catalyzed four-component coupling. *Organic letters* 7, 4487-4489.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., 2002. *Molecular Biology of the Cell: Blood Vessels and Endothelial Cells*, 4th ed.

Alcaro, S., Artese, A., Botta, M., Zizzari, A.T., Orallo, F., Ortuso, F., Schenone, S., Brullo, C., Yanez, M., 2010. Hit identification and biological evaluation of anticancer pyrazolopyrimidines endowed with anti-inflammatory activity. *ChemMedChem* 5, 1242-1246.

Altorki, N., Gurarino, M., Lee, P., 2008. Preoperative treatment with pazopanib (GW786034), a multikinase angiogenesis inhibitor in early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC): a proof-of-concept phase II study. *J Clin Oncol*, 26, 7557.

American Cancer Society, 2015. The History of Cancer, <https://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf> , Last accessed on December, 2015.

Ashton, W.T., Hutchins, S.M., Greenlee, W.J., Doss, G.A., Chang, R.S., Lotti, V.J., Faust, K.A., Chen, T.B., Zingaro, G.J., Kivlighn, S.D., et al., 1993. Nonpeptide angiotensin II antagonists derived from 1H-pyrazole-5-carboxylates and 4-aryl-1H-imidazole-5-carboxylates. *J Med Chem* 36, 3595-3605.

- Audisio, D.**, Messaoudi, S., Ijjaali, I., Dubus, E., Petitet, F., Peyrat, J.F., Brion, J.D., Alami, M., 2010. Assessing the chemical diversity of an hsp90 database. *European journal of medicinal chemistry* 45, 2000-2009.
- Augustin, H.G.**, 1998. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 19, 216-222.
- Baltegay, E.J.**, Rupl, J., Irupla-Arispel, J., 1994. *Cell Biol Int* 125, 917-928.
- Becker, C.M.**, Beaudry, P., Funakoshi, T., Benny, O., Zaslavsky, A., Zurakowski, D., Folkman, J., D'Amato, R.J., Ryeom, S., 2011. Circulating Endothelial Progenitor Cells Are Up-Regulated in a Mouse Model of Endometriosis. *Am J Pathol* 178, 1782-1791.
- Becker, A.**, Grecksch, G., Bernsteinn, H.G., Hollt, V., Bogerts, B., 1999. Social behavior in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology* 144, 333-338.
- Baruchello, R.**, Simoni, D., Grisolia, G., Barbato, G., Marchetti, P., Rondanin, R., Mangiola, S., Giannini, G., Brunetti, T., Alloatti, D., Gallo, G., Ciacci, A., Vesci, L., Castorina, M., Milazzo, F.M., Cervoni, M.L., Guglielmi, M.B., Barbarino, M., Fodera, R., Pisano, C., Cabri, W., 2011. Novel 3,4-isoxazolidiamides as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90. *J Med Chem* 54, 8592-8604.
- Baltegay, E.J.**, Rupl, J., Irupla-Arispel, J., 1994. *Cell Biol Int* 125, 917-928.
- Baraldi, P.G.**, Tabrizi, M.A., Romagnoli, R., Fruttarolo, F., Merighi, S., Varani, K., Gessi, S., Borea, P.A., 2005. Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine ligands, new tools to characterize A3 adenosine receptors in human tumor cell lines. *Current medicinal chemistry* 12, 1319-1329.
- Bhat, B.A.**, Puri, S.C., Qurishi, M.A., Dhar, K.L., Qazi, G.N., 2005. Synthesis of 3,5-diphenyl-1H-pyrazoles. *Synthetic Commun* 35, 1135-1142.
- Baruchello, R.**, Simoni, D., Grisolia, G., Barbato, G., Marchetti, P., Rondanin, R., Mangiola, S., Giannini, G., Brunetti, T., Alloatti, D., Gallo, G., Ciacci, A., Vesci, L., Castorina, M., Milazzo, F.M., Cervoni, M.L., Guglielmi, M.B., Barbarino, M., Fodera, R., Pisano, C., Cabri, W., 2011. Novel 3,4-isoxazolidiamides as potent inhibitors of chaperone heat shock protein 90. *J Med Chem* 54, 8592-8604.

Baumann, M., Baxendale, I.R., Ley, S.V., Nikbin, N., 2011. An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals. *Beilstein J. Org. Chem*, 442-495.

Bhargava, P., Robinson, M.O., 2011. Development of second-generation VEGFR tyrosine kinase inhibitors: current status. *Curr Oncol Rep* 13, 103-111.

Bhat, B.A., Puri, S.C., Qurishi, M.A., Dhar, K.L., Qazi, G.N., 2005. Synthesis of 3,5-diphenyl-1H-pyrazoles. *Synthetic Commun* 35, 1135-1142.

Bishop, B.C., Brands, K.M.J., Gibb, A.D., Kennedy, D.J., 2004. Regioselective synthesis of 1,3,5-substituted pyrazoles from acetylenic ketones and hydrazines. *Synthesis-Stuttgart*, 43-52.

Bouabdallah, I., M'Barek, L.A., Zyad, A., Ramdani, A., Zidane, I., Melhaoui, A., 2007. New pyrazolic compounds as cytotoxic agents. *Nat Prod Res* 21, 298-302.

Boulikas, T., Tsogas, I., 2008. Microtubule-targeted antitumor drugs: chemistry, mechanisms and nanoparticle formulations. *Gene Ther Mol Biol* 12b, 313-357.

Boyle, J.J., Wilson, B., Bicknell, R., Harrower, S., Weissberg, P.L., Fan, T.P., 2000. Expression of angiogenic factor thymidine phosphorylase and angiogenesis in human atherosclerosis. *J Pathol* 192, 234-242.

Breiman, L., 2001. Random Forests,. *Machine Learning* 45, 5-32.

Brik, C.Y., Wu, M.D., Best, C.H., Wong, C.H., 2005. *Bioorg. Med. Chem*, 13, 4622-4626.

Brough, P.A., Aherne, W., Barril, X., Borgognoni, J., Boxall, K., Cansfield, J.E., Cheung, K.M., Collins, I., Davies, N.G., Drysdale, M.J., Dymock, B., Eccles, S.A., Finch, H., Fink, A., Hayes, A., Howes, R., Hubbard, R.E., James, K., Jordan, A.M., Lockie, A., Martins, V., Massey, A., Matthews, T.P., McDonald, E., Northfield, C.J., Pearl, L.H., Prodromou, C., Ray, S., Raynaud, F.I., Roughley, S.D., Sharp, S.Y., Surgenor, A., Walmsley, D.L., Webb, P., Wood, M., Workman, P., Wright, L., 2008. 4,5-diarylisoazole Hsp90 chaperone inhibitors: potential therapeutic agents for the treatment of cancer. *J Med Chem* 51, 196-218.

Bruce, R.Z., 2008. *Nature Reviews Cancer* 8, 647-654.

Burden, F.R., 1997. A chemically intuitive molecular index based on the eigenvalues of a modified adjacency matrix, . *Quant Struct-Act Rel* 16, 309-314.

Cancer Tutor, 2015. Dr. Simoncini Baking Soda Treatment For Cancer (NaHCO₃), <http://www.cancertutor.com/simoncini/>, Last accessed on December, 2015.

Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.

Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.

Caddick, S., Fitzmaurice, R., 2009. Microwave enhanced synthesis,. *Tetrahedron Lett* 65, 3325-3355.

Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9, 653-660.

Carmeliet, P., Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Carmeliet, P., Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.

Centers for disease control and prevention, 2013. Deaths: Final Data for 2010. National Vital Statistics Reports, http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr61/nvsr61_04.pdf., Last accessed on January, 2016.

Chauhan, S., Paliwal, S., Chauhan, R., 2014. Anticancer activity of pyrazole via different biological mechanisms. *Synth. Commun*, 44, 1333-1374.

Chauhan, M., Kumar, R., 2013. Medicinal attributes of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines: a review. *Bioorganic & medicinal chemistry* 21, 5657-5668.

Chuang, H.C., Kardosh, A., Gaffney, K.J., Petasis, N.A., Schonthal, A.H., 2008. COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro. *Mol Cancer* 7, 38.

Cheung, K.M., Matthews, T.P., James, K., Rowlands, M.G., Boxall, K.J., Sharp, S.Y., Maloney, A., Roe, S.M., Prodromou, C., Pearl, L.H., Aherne, G.W., McDonald, E., Workman, P., 2005. The identification, synthesis, protein crystal structure and in vitro biochemical evaluation of a new 3,4-diarylpyrazole

class of Hsp90 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 15, 3338-3343.

Christodoulou, M.S., Liekens, S., Kasiotis, K.M., Haroutounian, S.A., 2010. Novel pyrazole derivatives: synthesis and evaluation of anti-angiogenic activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 18, 4338-4350.

Cooper, J.A., 2nd, Saracci, R., Cole, P., 1979. Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br J Cancer* 39, 87-89.

Crawford, A.D., Liekens, S., Kamuhabwa, A.R., Maes, J.M., Busson, R., Rozenski, J., Esguerra, C.V., 2011. Zebrafish bioassay-guided natural product discovery: Isolation of angiogenesis inhibitors from East African medicinal plants. *Plos One*, 6, 1-9.

Dadiboyena, S., Hamme, A.T., 2nd, 2011. One Pot Spiropyrazoline Synthesis via Intramolecular Cyclization/Methylation. *Tetrahedron Lett* 52, 2536-2539.

Dallinger, D., Kappe, C.O., 2007. Microwave-assisted synthesis in water as solvent. *Chem Rev* 107, 2563-2591.

Daniels, R.N., Kim, K., Lebois, E.P., Muchalski, H., Hughes, M., Lindsley, C.W., 2008. Microwave-assisted protocols for the expedited synthesis of pyrazolo[1,5-a] and [3,4-d]pyrimidines. *Tetrahedron Lett.* 49, 305-310.

Dadiboyena, S., Hamme, A.T., 2nd, 2011. One Pot Spiropyrazoline Synthesis via Intramolecular Cyclization/Methylation. *Tetrahedron Lett* 52, 2536-2539.

De la Hoz, A., Diaz-Ortiz, A., Moreno, A., 2005. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev* 34, 164-178.

Deswal, S., Roy, N., 2007. A novel range based QSAR study of human neuropeptide Y (NPY) Y5 receptor inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 42, 463-470.

Devery, J.J., Mohanta, P.K., Casey, B.M., Flowers, R.A., 2009. Facile Route to Tetrasubstituted Pyrazoles Utilizing Ceric Ammonium Nitrate. *Synlett* 9, 1490-1494.

Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Joly, A.L., De Thonel, A., Chiosis, G., Garrido, C., 2007. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins. *Current medicinal chemistry* 14, 2839-2847.

Dong, G.S., Klaasse, E., Hek, V., Brussee, J., Nalos, L., Rook, M.B., Vos, M.A., Van der Heyden, M.A.G., Ijzerman, A.P., 2009. ChemMedChem, 1722-1732.

Dymock, B.W., Barril, X., Brough, P.A., Cansfield, J.E., Massey, A., McDonald, E., Hubbard, R.E., Surgenor, A., Roughley, S.D., Webb, P., Workman, P., Wright, L., Drysdale, M.J., 2005. Novel, potent small-molecule inhibitors of the molecular chaperone Hsp90 discovered through structure-based design. J Med Chem 48, 4212-4215.

Dzvinchuk, I.B., Lozinski, M.O., 2011. Synthesis and tautomerism of 2-(3,5-diaryl-1H-pyrazol-4-yl)-1-methyl-1H-benzimidazole. Chem . Heterocycl. Compd., 46, 1454-1458.

Eccles, S.A., Massey, A., Raynaud, F.I., Sharp, S.Y., Box, G., Valenti, M., Patterson, L., de Haven Brandon, A., Gowan, S., Boxall, F., Aherne, W., Rowlands, M., Hayes, A., Martins, V., Urban, F., Boxall, K., Prodromou, C., Pearl, L., James, K., Matthews, T.P., Cheung, K.M., Kalusa, A., Jones, K., McDonald, E., Barril, X., Brough, P.A., Cansfield, J.E., Dymock, B., Drysdale, M.J., Finch, H., Howes, R., Hubbard, R.E., Surgenor, A., Webb, P., Wood, M., Wright, L., Workman, P., 2008. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. Cancer Res 68, 2850-2860.

European Medicines Agency, 2015. http://www.ema.europa.eu/docs/el_EL/document_library/EPAR_Product_Information/human/001141/WC500094272.pdf. Last accessed on January, 2016.

Feldman, D.E., Chauhan, V., Koong, A.C., 2005. The unfolded protein response: A novel component of the hypoxic stress response in tumors. Mol Cancer Res 3, 597-605.

Fels, D.R., Koumenis, C., 2006. The PERK/eIF2 alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. Cancer Biol Ther 5, 723-728.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P., 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol 18, 581-592.

Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., Novotny, W., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3, 391-400.

Fink, B.E., Mortensen, D.S., Stauffer, S.R., Aron, Z.D., Katzenellenbogen, J.A., 1999. Novel structural templates for estrogen-receptor ligands and prospects for combinatorial synthesis of estrogens. *Chem Biol* 6, 205-219.

Flynn, D.L., Belliotti, T.R., Boctor, A.M., Connor, D.T., Kostlan, C.R., Nies, D.E., Ortwine, D.F., Schrier, D.J., Sircar, J.C., 1991. Styrylpyrazoles, styrylisoxazoles, and styrylisothiazoles. Novel 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *J Med Chem* 34, 518-525.

Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* 285, 1182-1186.

Folkman, J., 1995. Angiogenesis in Cancer, Vascular, Rheumatoid and Other Disease. *Nat Med* 1, 27-31.

Folkman, J., 2000. Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer I* 92, 94-95.

Folkman, J., 2007. Opinion - Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6, 273-286.

Food nad Drug administration, January 27, 2012. FDA Approves Inlyta for Advanced Renal Cell Carcinoma, Drugs.com. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm289423.htm>, Last accessed on January, 2016.

Forde, P.M., Rudin, C.M., 2012. Crizotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy* 13, 1195-1201.

Fraley, M.E., Hoffman, W.F., Rubino, R.S., Hungate, R.W., Tebben, A.J., Rutledge, R.Z., McFall, R.C., Huckle, W.R., Kendall, R.L., Coll, K.E., Thomas, K.A., 2002a. Synthesis and initial SAR studies of 3,6-disubstituted pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: a new class of KDR kinase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 12, 2767-2770.

Fraley, M.E., Rubino, R.S., Hoffman, W.F., Hambaugh, S.R., Arrington, K.L., Hungate, R.W., Bilodeau, M.T., Tebben, A.J., Rutledge, R.Z., Kendall, R.L., McFall, R.C., Huckle, W.R., Coll, K.E., Thomas, K.A., 2002b. Optimization of a pyrazolo[1,5-a]pyrimidine class of KDR kinase inhibitors: improvements in physical properties enhance cellular activity and pharmacokinetics. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 12, 3537-3541.

Fu, Y., Lee, A.S., 2006. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 5, 741-744.

Gallucci, B.B., 1985. Selected concepts of cancer as a disease: From the Greeks to 1900. *Oncol Nurs Forum* 12, 67-71.

Gallucci, B.B., 1985. Selected concepts of cancer as a disease: From the Greeks to 1900. *Oncol Nurs Forum* 12, 67-71.

Gamble, A.B., Garner, J., Gordon, C.P., O'Conner, S.M.J., Keller, P.A., 2007. Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under Ultrasonic Irradiation,. *Synthetic Commun* 37, 2777-2786.

Greenblatt, M., Shubik, P., 1968. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl Cancer Inst* 41, 111-124.

Gedye, R., Smith, F., Westway, K., Ali, H., Laberge, L., Rousell, J., 1986. the use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* 27, 279-282.

Giguere, R.G., Bray, T.L., Duncan, S.M., Majetich, G., 1986. Application of commercial microwave ovens to organic synthesis,. *Tetrahedron Lett.* 27, 4945-4948.

Hao, J., Daleo, M.A., Murphy, C.K., Yu, P.B., Ho, J.N., Hu, J., Peterson, R.T., Hatzopoulos, A.K., Hong, C.C., 2008. Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *Plos One* 3, e2904.

Hao, J., Williams, C.H., Webb, M.E., Hong, C.C., 2010. Large scale zebrafish-based in vivo small molecule screen. *J Vis Exp.*

Harvey, A.L., MacTavish, J., Mullins, S.J., Proctor, J.R., 1997. *J. Chem. Res. Synop.* 11, 420.

Hall, M., Frank, E., Holmes, G., Pfahringer, B., Reutemann, W., I.H., , 2009. The WEKA data mining software: an update., *SIGKDD. Explor. Newsl.* 11, 10-18.

Havrylyuk, D., Zimenkovsky, B., Vasylenko, O., Zaprutko, L., Gzella, A., Lesyk, R., 2009. Synthesis of novel thiazolone-based compounds containing pyrazoline moiety and evaluation of their anticancer activity. *European journal of medicinal chemistry* 44, 1396-1404.

Healy, S.J., Gorman, A.M., Mousavi-Shafaei, P., Gupta, S., Samali, A., 2009. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *European Journal of Pharmacology*.

Heller, S.T., Natarajan, S.R., 2006. 1,3-diketones from acid chlorides and ketones: a rapid and general one-pot synthesis of pyrazoles. *Organic Letters* 8, 2675-2678.

Hertig A., 1935. Contributions to Embryology: Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the Macaque monkey.

Hong, C.C., Kume, T., Peterson, R.T., 2008. Role of crosstalk between phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathways in artery-vein specification. *Circ Res* 103, 573-579.

Hong, C.C., Yub, P.B., 2009. Bone Morphogenetic Proteins,. *Stem Cells and Regenerative Medicine* 20, 409-418.

Hoy, S.M., Wagstaff, A.J., 2006. Panitumumab - In the treatment of metastatic colorectal cancer. *Drugs* 66, 2005-2014.

Filder, I.J., Langley, R.R., Kerbel, R.S., Ellis, L.M., 2005. Angiogenesis, Apoptosis in DeVita VT, *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 7th edition.

International Agency for Research on Cancer (IARC), C.M.I., France. (Available at <http://www-dep.iarc.fr>). , 2008. *Cancer Mondial*, <http://www-dep.iarc.fr>, Last accessed on January, 2016.

Isacson, O., Brundin, P., Kelly, P.A., Gage, F.H., Bjorklund, A., 1984. Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* 311, 458-460.

Iwata, H., Imamura, S., Hori, A., Hixon, M.S., Kimura, H., Miki, H., 2011. Biochemical characterization of TAK-593, a novel VEGFR/PDGFR inhibitor with a two-step slow binding mechanism. *Biochemistry* 50, 738-751.

Jensen, M.R., Schoepfer, J., Radimerski, T., Massey, A., Guy, C.T., Brueggen, J., Quadt, C., Buckler, A., Cozens, R., Drysdale, M.J., Garcia-Echeverria, C., Chene, P., 2008. NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models. *Breast Cancer Res* 10, R33.

Jensen, M.R., Schoepfer, J., Radimerski, T., Massey, A., Guy, C.T., Brueggen, J., Quadt, C., Buckler, A., Cozens, R., Drysdale, M.J., Garcia-Echeverria, C., Chene, P., 2008. NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models. *Breast Cancer Res* 10, R33.

Johnson, M.A., Maggiora, G.M., 1990. *Concepts and Applications of Molecular Similarity*,. Wiley, New York

Kardinal, C.G., Yarbro, J.W., 1979. A conceptual history of cancer. *Semin Oncol* 6, 396-408.

Kappe, C.O., 2004. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 6250-6284.

Kappe, C.O., 2008. Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry,. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1127-1139.

Kamal, A., Reddy, J.S., Ramaiah, M.J., Dastagiri, D., Bharathi, E.V., Azhar, M.A., Sultana, F., Pushpavalli, S.N., Pal-Bhadra, M., Juvekar, A., Sen, S., Zingde, S., 2010. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-diaryl-isoxazoline/isoxazole-pyrrolobenzodiazepine conjugates as potential anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry* 45, 3924-3937.

Kleinman, H.K., Martin, G.R., 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity,. *Semin Cancer Biol.* 20 15, 378-386.

Knorr, L., 1883, *Chem, B.D., Ber. Dtsch. Chem* 16, 1597.

Kraichely, D.M., Sun, J., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 2000. Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology* 141, 3534-3545.

Krieger, J.H., 1996. Combinatorial chemistry spawns new software systems to manage flood of information,. *Chem. and Eng. News*.

Ktsuhiko, N., Kawano, H., Sasaoka, S., Ukawa, C., HIRAMA, T., Takada, A., Cottam, H.B., Robins, R.K., 1994. Reaction of 5-aminopyrazole derivatives with ethoxymethylene-malononitrile and its analogues,. *J. Heterocycl. Chem.* 31, 239-243.

Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., 2003. *Cancer Medicine*.

Lee, A.S., Hendershot, L.M., 2006. ER stress and cancer. *Cancer Biol Ther* 5, 721-722.

Leach, A., Ji Gillet, V., 2003. *An Introduction to Cheminformatics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Lee, P.S., Secord, A.A., 2014. Targeting molecular pathways in endometrial cancer: A focus on the FGFR pathway. *Cancer Treat Rev* 40, 507-512.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N., 1989. Vascular Endothelial Growth-Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* 246, 1306-1309.

Liekens, S., De Clercq, E., Neyts, J., 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61, 253-270.

Lednicer, D., Mitscher, L.A., 1997. In *Organic Chemistry of Drug Synthesis*. Wiley Interscienc newYork, 1, 226.

Lind, M.J., 2008. Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine* 36 (1), 19-23.

Lu, Y., Akinwumi, B.C., Shao, Z., Anderson, H.D., 2014. Ligand activation of cannabinoid receptors attenuates hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 64, 420-430.

Lv, P.C., Li, H.Q., Sun, J., Zhou, Y., Zhu, H.L., 2010. Synthesis and biological evaluation of pyrazole derivatives containing thiourea skeleton as anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* 18, 4606-4614

Manetti, F., Santucci, A., Locatelli, G.A., Maga, G., Spreafico, A., Serchi, T., Orlandini, M., Bernardini, G., Caradonna, N.P., Spallarossa, A., Brullo, C., Schenone, S., Bruno, O., Ranise, A., Bondavalli, F., Hoffmann, O., Bologna, M., Angelucci, A., Botta, M., 2007. Identification of a novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine able to inhibit cell proliferation of a human osteogenic sarcoma in vitro and in a xenograft model in mice. *J Med Chem* 50, 5579-5588.

Mascarenhas, J., Hoffman, R., 2012. Ruxolitinib: the first FDA approved therapy for the treatment of myelofibrosis. *Clin Cancer Res* 18, 3008-3014.

Md Tohid, S.F., Ziedan, N.I., Stefanelli, F., Fogli, S., Westwell, A.D., 2012. Synthesis and evaluation of indole-containing 3,5-diarylisoxazoles as potential pro-apoptotic antitumour agents,. *European Journal of Medicinal Chemistry* 56, 263-270.

Melagraki, G., Afantitis, A., 2013. Enalos KNIME nodes: Exploring corrosion inhibition of steel in acidic medium, . Chemometr Intell Lab, 9-14.

Melagraki, G., Afantitis, A., Sarimveis, H., Igglessi-Markopoulou, O., Koutentis, P.A., Kollias, G., 2010. In Silico Exploration for Identifying Structure-Activity Relationship of MEK Inhibition and Oral Bioavailability for Isothiazole Derivatives, . Chem Biol Drug Des 76, 397-406.

Melagraki, G., Afantitis, A., Sarimveis, H., Koutentis, P.A., Markopoulos, J., Igglessi-Markopoulou, O., 2007. Identification of a series of novel derivatives as potent HCV inhibitors by a ligand-based virtual screening optimized procedure,. Bioorgan Med Chem 15, 7237-7247.

Mitchell, J.B., 2014. Machine learning methods in chemoinformatics. Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci 4, 468-481.

Miyamoto, N., Sakai, N., Hirayama, T., Miwa, K., Oguro, Y., Oki, H., Okada, K., Takagi, T., Iwata, H., Awazu, Y., Yamasaki, S., Takeuchi, T., Miki, H., Hori, A., Imamura, S., 2013. Discovery of N-[5-({2-[(cyclopropylcarbonyl)amino]imidazo[1,2-b]pyridazin-6-yl}oxy)-2-methylphenyl]-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide (TAK-593), a highly potent VEGFR2 kinase inhibitor. Bioorganic & medicinal chemistry 21, 2333-2345.

Mouchlis, V.D., Melagraki, G., Mavromoustakos, T., Kollias, Afantitis, A., 2012. Journal of Chemical Information and Modeling, 52, 711-723.

Montgomery, J.A., 1984. The chemistry and biology of purines and ring analogs. New York: Academic Press,, 19.

Mohamed Ahmed, M.S., Kobayashi, K., Mori, A., 2005. One-pot construction of pyrazoles and isoxazoles with palladium-catalyzed four-component coupling. Organic Letters, 20, 4487-4489.

National Reference Institute, What is cancer, <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>., Last accessed on December, 2015.

Nagel, G., Linseisen, J., Boshuizen, H.C., Pera, G., Del Giudice, G., Westert, G.P., Bueno-De-Mesquita, H.B., Allen, N.E., Key, T.J., Numans, M.E., Peeters, P.H.M., Sieri, S., Siman, H., Berglund, G., Hallmans, G., Stenling, R., Martinez, C., Arriola, L., Barricarte, A., Chirlaque, M.D., Quiros, J.R., Vineis, P., Masala, G., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Bingham, S., Boeing, H., Bergmann, M.M., Overvad, K., Boutron-Ruault, M.C., Clavel-Chapelon, F., Olsen, A., Tjormeland, A., Trichopoulou, A., Bamia, C., Soukara, S., Sabourin,

J.C., Carneiro, F., Slimani, N., Jenab, M., Norat, T., Riboli, E., Gonzalez, C.A., 2007. Socioeconomic position and the risk of gastric and oesophageal cancer in the European Prospective into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int J Epidemiol* 36, 66-76.

Narlawar, R., Pickhardt, M., Leuchtenberger, S., Baumann, K., Krause, S., Dyrks, T., Weggen, S., Mandelkow, E., Schmidt, B., 2008. Curcumin-derived pyrazoles and isoxazoles: Swiss army knives or blunt tools for Alzheimer's disease? *ChemMedChem* 3, 165-172.

National Cancer Institute, 2015. VEGFR/PDGFR dual kinase inhibitor TAK-593,. <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=618858>., Last accessed on December, 2015.

National library of medicine, 2015. <http://chem.sis.nlm.nih.gov>., Last accessed on January, 2016.

Organisation for Economic Co-operation and Development, 2015. Health at a glance 2015, <http://www.oecd.org/health/health-systems/health-at-a-glance-19991312.htm>. Last accessed on January, 2016.

Parthasarathi, R., Subramanian, V., Roy, D.R., Chattaraj, P.K., 2004. Electrophilicity index as a possible descriptor of biological activity. *Bioorganic & medicinal chemistry* 12, 5533-5543.

Panda, N., Jena, A.K., 2012. Fe-catalyzed one-pot synthesis of 1,3-di- and 1,3,5-trisubstituted pyrazoles from hydrazones and vicinal diols. *The Journal of organic chemistry* 77, 9401-9406.

Papac, R.J., 2001. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med* 74, 391-398.

Pearlman, R.S., Smith, K.M., 1999. Metric validation and the receptor-relevant subspace concept,. *J Chem Inf Comp Sci* 39, 28-35.

Penning, T.D., Khilevich, A., Chen, B.B., Russell, M.A., Boys, M.L., Wang, Y., Duffin, T., Engleman, V.W., Finn, M.B., Freeman, S.K., Hanneke, M.L., Keene, J.L., Klover, J.A., Nickols, G.A., Nickols, M.A., Rader, R.K., Settle, S.L., Shannon, K.E., Steininger, C.N., Westlin, M.M., Westlin, W.F., 2006. Synthesis of pyrazoles and isoxazoles as potent $\alpha(v)\beta3$ receptor antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16, 3156-3161.

Penning, T.D., Talley, J.J., Bertenshaw, S.R., Carter, J.S., Collins, P.W., Docter, S., Graneto, M.J., Lee, L.F., Malecha, J.W., Miyashiro, J.M., Rogers, R.S., Rogier, D.J., Yu, S.S., AndersonGd, Burton, E.G., Cogburn, J.N.,

Gregory, S.A., Koboldt, C.M., Perkins, W.E., Seibert, K., Veenhuizen, A.W., Zhang, Y.Y., Isakson, P.C., 1997. Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 40, 1347-1365.

Polshettiwar, V., Varma, R.S., 2008. Aqueous microwave chemistry: a clean and green synthetic tool for rapid drug discovery. *Chem Soc Rev* 37, 1546-1557.

Ribatti, D., 2014. The discovery of angiogenic growth factors: the contribution of Italian scientists. *Vascular cell* 6, 8.

Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.

Risau, W., Lemmon, V., 1988. Changes in the Vascular Extracellular-Matrix during Embryonic Vasculogenesis and Angiogenesis. *Dev Biol* 125, 441-450.

Robins, R.K., 1956. Potential Purine Antagonists. I. Synthesis of Some 4,6-Substituted Pyrazolo [3,4-d] pyrimidines,. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 784-790.

Rowbottom, M.W., Faraoni, R., Chao, Q., Campbell, B.T., Lai, A.G., Setti, E., Ezawa, M., Sprankle, K.G., Abraham, S., Tran, L., Struss, B., Gibney, M., Armstrong, R.C., Gunawardane, R.N., Nepomuceno, R.R., Valenta, I., Hua, H., Gardner, M.F., Cramer, M.D., Gitnick, D., Insko, D.E., Apuy, J.L., Jones-Bolin, S., Ghose, A.K., Herbertz, T., Ator, M.A., Dorsey, B.D., Ruggeri, B., Williams, M., Bhagwat, S., James, J., Holladay, M.W., 2012. Identification of 1-(3-(6,7-dimethoxyquinazolin-4-yloxy)phenyl)-3-(5-(1,1,1-trifluoro-2-methylpropyl)isoxazol-3-yl)urea hydrochloride (CEP-32496), a highly potent and orally efficacious inhibitor of V-RAF murine sarcoma viral oncogene homologue B1 (BRAF) V600E. *J Med Chem* 55, 1082-1105.

Rugo, H.S., Herbst, R.S., Liu, G., Park, J.W., Kies, M.S., Steinfeldt, H.M., Pithavala, Y.K., Reich, S.D., Freddo, J.L., Wilding, G., 2005. Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *J Clin Oncol* 23, 5474-5483.

Sacar, M., Yaylali, Y.T., 2011. Antioangiogenic therapy for cardiovascular diseases, in *Anti-Angiogenesis Drug Discovery and Development*, eds Atta-Ur-Rahman. Bentham.

Saito, S., Furuno, A., Sakurai, J., Park, H.R., Shin-ya, K., Tomida, A., 2012. Compound C prevents the unfolded protein response during glucose

deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. *Plos One* 7, e45845.

Schonthal, A.H., 2012. Targeting endoplasmic reticulum stress for cancer therapy. *Front Biosci* 4, 412-431.

Shaharyar, M., Abdullah, M.M., Bakht, M.A., Majeed, J., 2010. Pyrazoline bearing benzimidazoles: search for anticancer agent. *European journal of medicinal chemistry* 45, 114-119.

Shawl, J., Chen, B., Bourgault, J.P., Jiang, H., Kumar, N., Mishra, J., Valeriote, F.A., Media, J., Bobbitt, K., Pietraszkiewicz, H., Edelstein, M., P.R, A., 2012. Synthesis and Biological Evaluation of Novel N-phenyl-5-carboxamidyl Isoxazoles as Potential Chemotherapeutic Agents for Colon Cancer. *Am. J. Biomed. Sci*, 14, 14-25.

Shih, T., Lindley, C., 2006. Bevacizumab: An angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 28, 1779-1802.

Shing, Y., Fulkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M., 1984. *Science* 223, 1296-1299.

Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., Jemal, A., 2011. The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths. *Ca-Cancer J Clin* 61, 212-236.

Silvestri, R., Cascio, M.G., La Regina, G., Piscitelli, F., Lavecchia, A., Brizzi, A., Pasquini, S., Botta, M., Novellino, E., Di Marzo, V., Corelli, F., 2008. Synthesis, cannabinoid receptor affinity, and molecular modeling studies of substituted 1-aryl-5-(1H-pyrrol-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamides. *J Med Chem* 51, 1560-1576.

Simoni, D., Roberti, M., Invidiata, F.P., Rondanin, R., Baruchello, R., Malagutti, C., Mazzali, A., Rossi, M., Grimaudo, S., Capone, F., Dusonchet, L., Meli, M., Raimondi, M.V., Landino, M., D'Alessandro, N., Tolomeo, M., Arindam, D., Lu, S., Benbrook, D.M., 2001. Top of Form *Journal of Medicinal Chemistry*. *Top of Form Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 2308-2318.

Slamon, D.J., Gomez, H.L., Kabinavar, F.F., 2008. Randomized study of pazopanib and lapatinib alone in patients with HER2-positive advanced or metastatic test cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26.

Stam, W., Jansen, J., Taylor, S., 2012. Efficacy of etoricoxib, celecoxib, lumiracoxib, non-selective NSAIDs, and acetaminophen in osteoarthritis: a mixed treatment comparison. *Open Rheumatol J* 6, 6-20.

Staufer, K., Stoeltzing, O., 2010. Implication of heat shock protein 90 (HSP90) in tumor angiogenesis: a molecular target for anti-angiogenic therapy? *Curr Cancer Drug Targets* 10, 890-897.

Stauffer, S.R., Coletta, C.J., Tedesco, R., Nishiguchi, G., Carlson, K., Sun, J., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., 2000. Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists. *J Med Chem* 43, 4934-4947.

Stauffer, S.R., Huang, Y.R., Aron, Z.D., Coletta, C.J., Sun, J., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A., 2001. Triarylpyrazoles with basic side chains: development of pyrazole-based estrogen receptor antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry* 9, 151-161.

Steinbeck, C., Han, Y., Kuhn, S., Horlacher, O., Luttmann, E., Willighagen, E., 2003. The Chemistry Development Kit (CDK): an open-source Java library for Chemo- and Bioinformatics. *J Chem Inf Comput Sci* 43, 493-500.

Stewart, J.J.P., 2007. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* 13, 1173-1213.

Stewart, J.J.P., 2008. Application of the PM6 method to modeling the solid state. *J Mol Model.*, 499-535.

Stewart, M.W., Gripton, S., Kirkpatrick, P., 2012. Aflibercept. *Nat Rev Drug Discov* 11, 269-270.

Taldone, T., Gozman, A., Maharaj, R., Chiosis, G., 2008. Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Curr Opin Pharmacol* 8, 370-374.

Tiberghien, N., Lumley, J., Reynolds, K., Angell, R.M., Matthews, N., Cockerill, G.S., Barnes, M.C., 2005. WO 047288

Todeschini, R., Consonni, V., 2009. Molecular Descriptors for Chemoinformatics,.

Todeschini, R., Gramatica, P., 1998. New 3D Molecular Descriptors: The WHIM theory and QAR Applications, . *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 355-380.

Toropov, A.A., Toropova, A.P., Benfenati, E., 2010. SMILES-based optimal descriptors: QSAR modeling of carcinogenicity by balance of correlations with ideal slopes. *European journal of medicinal chemistry* 45, 3581-3587.

Tropsha, A., 2010. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation,. *Molecular Informatics* 29, 476–488.

Traxler, P., Bold, G., Frei, J., Lang, M., Lydon, N., Mett, H., Buchdunger, E., Meyer, T., Mueller, M., Furet, P., 1997. Use of a pharmacophore model for the design of EGF-R tyrosine kinase inhibitors: 4-(phenylamino)pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *J Med Chem* 40, 3601-3616.

Tropsha, A., 2010. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation,. *Molecular Informatics* 29, 476–488.

Tzanetou, E., Liekens, S., Kasiotis, K.M., Fokialakis, N., Haroutounian, S.A., 2012. Novel pyrazole and indazole derivatives: synthesis and evaluation of their anti-proliferative and anti-angiogenic activities. *Archiv der Pharmazie* 345, 804-811.

Vander, M.D., Shorman, P.D., Luciano, P.D., Τσακόπουλος, Μ., 2001. Φυσιολογία του Ανθρώπου I.

Velcicky, J., Feifel, R., Hawtin, S., Heng, R., Huppertz, C., Koch, G., Kroemer, M., Moebitz, H., Revesz, L., Scheufler, C., Schlapbach, A., 2010. Novel 3-aminopyrazole inhibitors of MK-2 discovered by scaffold hopping strategy. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20, 1293-1297.

Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S.J., Press, M., 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-726.

Vucicevic, L., Misirkic, M., Janjetovic, K., Vilimanovich, U., Sudar, E., Isenovic, E., Prica, M., Harhaji-Trajkovic, L., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V., 2011. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy* 7, 40-50.

Wasylyk, C., Zheng, H., Castell, C., Debussche, L., Multon, M.C., Wasylyk, B., 2008. Inhibition of the Ras-Net (Elk-3) pathway by a novel pyrazole that affects microtubules. *Cancer Res* 68, 1275-1283.

Wei, D., Wang, L., He, Y., Xiong, H.Q., Abbruzzese, J.L., Xie, K., 2004. Celecoxib inhibits vascular endothelial growth factor expression in and reduces angiogenesis and metastasis of human pancreatic cancer via suppression of Sp1 transcription factor activity. *Cancer Res* 64, 2030-2038.

Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E., Oun, R., 2010. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton T* 39, 8113-8127.

Winters, G., Sala, A., DePaoli, A., Conti, M., 1984. *Synthesis-Stuttgart*, 1050.

Wikipedia, 2015a, <https://en.wikipedia.org/wiki/Cancer#Management>., Last accessed on January, 2016.

Wikipedia, 2015b. <http://chem.sis.nlm.nih.gov>., Last accessed on January, 2016.

World Health Organization, GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx., Last accessed on January, 2016.

World Health Organization, 2010. GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide. International Agency for Research on Cancer, <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2010/globocan2008.php>., Last accessed on January, 2016.

World Health Organization, 2013. 10 facts about cancer, <http://www.who.int/features/factfiles/cancer/en>, Last accessed on January, 2016.

Wu, T.Y., Schultz, P.G., Ding, S., 2003. One-pot two-step microwave-assisted reaction in constructing 4,5-disubstituted pyrazolopyrimidines. *Organic letters* 5, 3587-3590.

Yancopoulos, G.D., Fulkman, J., Klagsbrun, M., 1984. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 93, 661-664.

Zetter, B.R., 2008. The scientific contributions of M. Judah Fulkman to cancer research,. *Nat. Rev. Cancer* 8, 647-654.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108, 1167-1174.

Zhong, L., Fu, X.Y., Zou, C., Yang, L.L., Zhou, S., Yang, J., Cheng, C., Li, L.L., Xiang, R., Chen, L.J., Chen, Y.J., Wei, Y.Q., Yang, S.Y., 2014. A preclinical evaluation of a novel multikinase inhibitor, SKLB-329, as a therapeutic agent against hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*, 135, 2972-2983.

Γαληνος, 2015. Παζοπανίμπη. <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/-votrient#content>. Last accessed on December 2016.

Μαρία Παπαδάκου, κ.α., 2007. Κλινική ογκολογία, Τόμος Α Γενικό Μέρος, Επιδημιολογία του Καρκίνου, Κεφάλαιο 11.

Υπουργείο Υγείας και Κοινωνικής Αλληλεγγύης, 2008. Εθνικό Σχέδιο Δράσης για τη Δημόσια Υγεία. Εθνικό Σχέδιο Δράσης για τον Καρκίνο. 2008-2012. Η Ζωή Νικά τον Καρκίνο, http://ygeiamap.gov.gr/wp-content/uploads/2013/05/karkinos_teliko.pdf. Last accessed on December 2016.

Συντμήσεις

WHO	Health World Organization
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ο.Ο.Σ.Α	Οργανισμός για την Οικονομική Συνεργασία και Ανάπτυξη
FDA	Food and Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
NCI	National Cancer Institute
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
PIGF	Placental growth factor
NRP-1	Neuropilin-1
bFGF	Basic fibroblast growth factor
ANG-1	Angiopoietin-1
Tie-2	Tyrosine kinase
PDGF	Plateled-Derived Growth Factor
TGF	Transforming Growth Factors-β
VHL	Von-Hippel Lindau
ATP	adenosine triphosphate
GTP	guanosine triphosphate
UPR	unfolded protein response
RCC	Renal Cell Carcinoma
BMP	bone morphogenetic proteins
STS	Soft tissue sarcomas
JAK	Janus kinase inhibitors
HSPs	Heat shock proteins
RAR	Retinoic Acid Receptor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
Hela	human cervical carcinoma cells

HMEC-1	human microvascular endothelial cells
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
MBEC	mouse brain endothelial cells
MCF-7	human breast carcinoma cells
BAEC	bovine aortic endothelial cells
L1210	Murine leukemia cells
CEM	Human T-lymphocyte cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
AMPK	AMP-activated protein kinase
QSAR	Quantitative Structure Activity and Relationships
KNIME	Konstanz Information Miner
CDK	Chemistry Development Kit
WEKA	Waikato Environment for Knowledge Analysis
TP	True Positive
FP	False Positive
FN	False Negative
RF	Random Forest
NTO	dorsomorphin
NMR	Nuclear magnetic resonance
TLC	Thin layer chromatography
ΠΖΠΜΔ	πυραζολοπυριμιδίνες
LHMDS	Lithium Hexamethyl Disilazane
TBAF	Tetrabutylammonium fluoride
DMF	Dimethylformamide
THF	TetrahydroFuran
EtOAc	Ethyl Acetate
EtOH	Ethanol
NaOH	Sodium hydroxide
AcOH	Acetic Acid
BnBr	Benzyl Bromide
BBr ₃	Boron tribromide

DMF/DMA	N,N-Dimethylformamide dimethyl acetal
MgSO ₄	Magnesium sulfate
NH ₄ Cl	Ammonium chloride
MW	Microwave
NTO	dorsomorphin
IC ₅₀	Concentration of compound that reduces cell proliferation by 50%.

Γενικές πειραματικές τεχνικές

1. Οργανολογία

Όλες οι άνωδρες αντιδράσεις διεξήχθησαν σε φιάλες προερχόμενες από φούρνο και υπό ατμόσφαιρα αργού. Οι διαλύτες ξηραίνονται με απόσταξη πριν από τη χρήση. Τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία αναφέρθηκαν ως όγκος προς όγκο. Οι χρωματογραφικές στήλες πραγματοποιήθηκαν με silica Merck 60 (230-400 mesh ASTM). Τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από την Aldrich και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι χρωματογραφίες λεπτής στοιβάδας διεξήχθησαν σε γυάλινες πλάκες Merck επικαλυμμένες με πυριτική πηκτή 60 F254 και οι κηλίδες κατέστησαν ορατές με υπεριώδες φως και/ ή ένα αλκοολούχο διάλυμα ανισαλδεΐδης.

Τα ¹H και ²D NMR φάσματα καταγράφηκαν στα 600 MHz σε φασματόμετρο Bruker DRX-600 στους υποδεικνυόμενους δευτεριομένους διαλύτες. Οι σταθερές σύζευξης καταγράφονται σε Hertz (Hz) και οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε μέρη ανά εκατομμύριο (δ, ppm) σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS), το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (με αστερίσκο σημειώνονται οι επικαλυπτόμενες κορυφές). Οι HPLC διαχωρισμοί που διεξήχθησαν σε ορισμένες περιπτώσεις καθαρισμού του τελικού προϊόντος, έγιναν με ένα όργανο Hewlett Packard σειράς 1100 με έναν ανιχνευτή μεταβλητού μήκους κύματος UV και συζευγμένο με Chem.-Station HP χρησιμοποιώντας πακέτο λογισμικού 5.01.

2. Κυτταρικές καλλιέργειες

Σχετικά με τις κυτταρικές καλλιέργειες (της διδακτορικής διατριβής) χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι κυτταρικές σειρές. Εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα επίμυων (Mouse brain endothelial cells, MBEC) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα αορτής βοοειδών (bovine aortic endothelial cells, BAEC) τα οποία παρασχέθηκαν από τον καθηγητή M Presta (Brescia, Ιταλία). Κύτταρα ανθρώπινου τραχηλικού καρκινώματος (Human cervical carcinoma cells, Hela) και ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (Human breast carcinoma cells, MCF- 7) ελήφθησαν από την American Type Culture Collection (ATCC, Middlesex, UK). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τροποποιημένο βασικό μέσο Dulbecco (DMEM, Life Technologies, Inc., Rockville, MD) συμπληρωμένο με 10 mM HEPES [(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, Life Technologies, Inc., Rockville, MD] και 10 % ορού εμβρύου μόσχου (FBS, Harlan Sera -Lab Ltd., Loughborough, Ηνωμένο Βασίλειο). Ανθρώπινα

μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (Human microvascular endothelial cells, HMEC-1) ελήφθησαν από το CDC (Atlanta, USA) και αναπτύχθηκαν σε μέσο ενδοθηλιακών κυττάρων EGM-2 MV BulletKit (Lonza, Verviers, Βέλγιο). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (mouse lymphocytic leukemia cells, L1210) και τα κύτταρα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα (T-lymphoblastoid cell line, CEM). Για επιπρόσθετα πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικές σειρές ανθρωπίνου ήπατος (Human liver cancer, HepG2) τα οποία παρασχέθηκαν από τον καθηγητή Π. Λιάκο (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ελλάδα) και τα καρκινικά κύτταρα MCF-7 και HeLa που λήφθηκαν από τον καθηγητή Α.Μ. Ψαρρά (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ελλάδα). Αυτές οι καρκινικές σειρές όπως και οι παραπάνω αναπτύχθηκαν σε τροποποιημένο βασικό Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, Gibco, UK) με 10% (v/v) ορό εμβρύου μόσχου, 2mM L-γλουταμίνη (Gibco, UK), 100 μονάδες/mL πενικιλίνη, and 100 μονάδες/mL στρεπτομυκίνη (Gibco, UK) σε μιας χρήσης, ειδικά φιαλίδια στους 37 °C και 5% CO₂.

3. Δοκιμές πολλαπλασιασμού των κυττάρων

Όσον αφορά τα πειράματα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, τα παραπάνω κύτταρα διασπάρθηκαν σε πλακίδια 48 πηγαδιών σε αναλογία 10000 κυττάρων ανά cm². Μετά από 16 ώρες, τα κύτταρα επώαστηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό με την παρουσία των υπό δοκιμή ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις (δηλαδή 0,2, 1, 4, 20 και 100 μM). Την 5^η ημέρα, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέα πηγάδια και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με θρυψίνη και μετρήθηκαν με έναν μετρητή Coulter (Analys, Βέλγιο). Η συγκέντρωση της εκάστοτε ένωσης που αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων κατά 50% (δηλαδή IC₅₀) υπολογίστηκε με βάση τον αριθμό των κυττάρων στις καλλιέργειες ελέγχου.

4. Δοκιμές σχηματισμού μικροσωληνίσκων και μετανάστευσης των κυττάρων

Για τη διερεύνηση του σχηματισμού μικροσωληνίσκων, 96 πλακίδια 48 πηγαδιών με αναλογία 10000 κυττάρων ανά cm², επικαλύφθηκαν με 60 μL Matrigel 10 mg/mL, (BD Biosciences, Χαϊδελβέργη, Γερμανία) στους 4 °C. Μετά τη ζελατινοποίηση στους 37 °C για 30 λεπτά, τα HMEC-1 κύτταρα (70,000 κύτταρα) διασπάρθηκαν στην κορυφή του matrigel σε 200 μL DMEM που περιέχει 1 % FBS και τις ενώσεις προς δοκιμή. Μετά από 6 ώρες επώασης, οι κυτταρικές δομές

φωτογραφήθηκαν σε 100 x μεγέθυνση. Ο σχηματισμός σωλήνων ποσοτικοποιήθηκε βάσει σκορκλίμακας από 0 (χωρίς σωλήνες) έως 3 (πλήρες δίκτυο σωληνίσκων). Τα τραύματα δημιουργήθηκαν σε μονοστοιβάδα των προς μελέτη κυττέρων με την άκρη μικροπιπέτας διαμέτρου 1.0 mm. Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάστηκαν με φρέσκο θρεπτικό υλικό και την παρουσία των προς ανάλυση ενώσεων. Μετά από 8 ώρες τα τραυματα φωτογραφήθηκαν και η εισβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων στο τραυμα ποσοτικοποιήθηκε μέσω ανάλυσης με υπολογιστή ψηφιακών εικόνων.

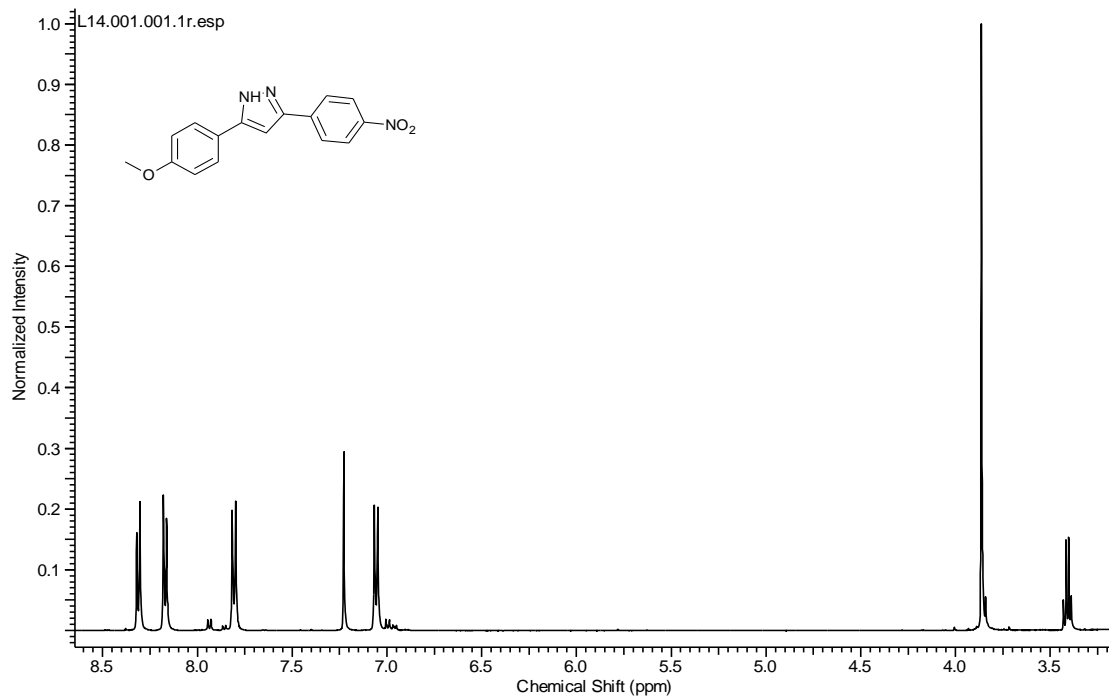
5. Ποσοτικός προσδιορισμός του αγγειοενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα, VEGF σε HeLa κυτταρικές σειρές

Το ανθρώπινο, VEGF Quantakine ELISA kit (R&D Systems, MN, USA) χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του VEGF σε καλλιέργειες HeLa κυτταρικών σειρών. Οι κυτταρικές σειρές επεξεργάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπο δοκιμή ενώσεων για 24 ώρες. Μετά, το υπερκείμενο κομμάτι της καλλιέργειας συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στο VEGF ELISA kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Μετρήθηκε η απορρόφηση με τη χρήση αυτόματου microplate reader Bio-Tek ELx800 (Winooski, VT, USA) στα 450 και 540 nm. Η συγκέντρωση του VEGF-A σε κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με χρήση καμπύλης αναφοράς.

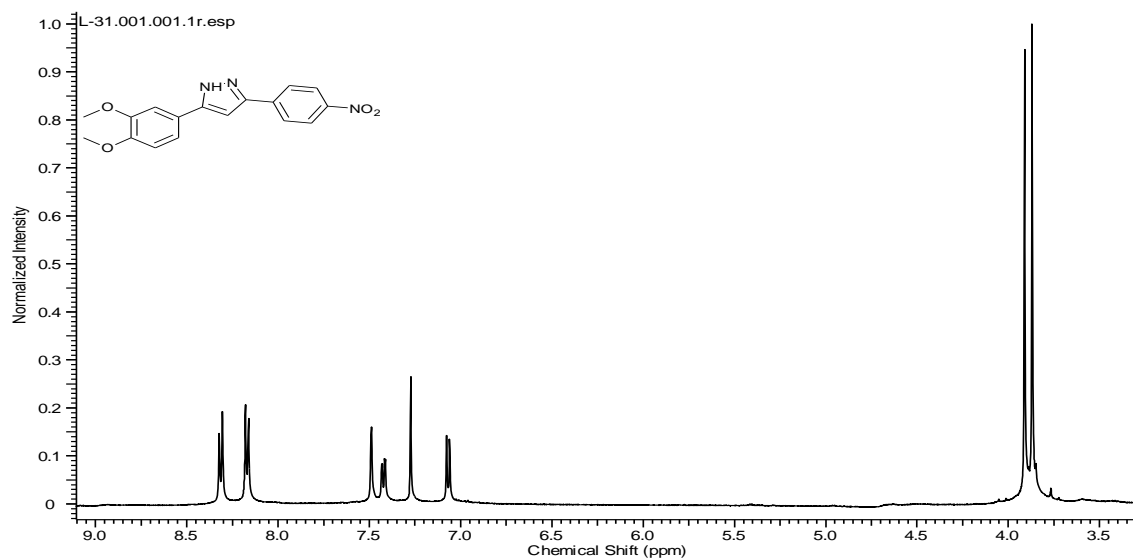
Παράρτημα

NMR Φάσματα

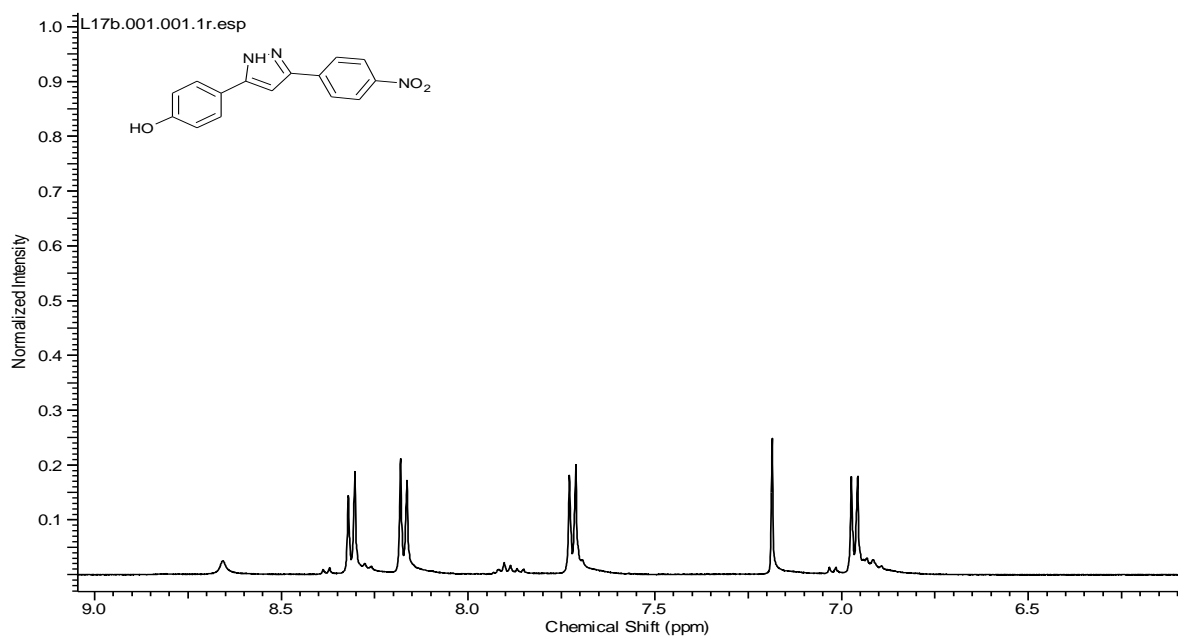
Π-1, Φάσμα ^1H NMR



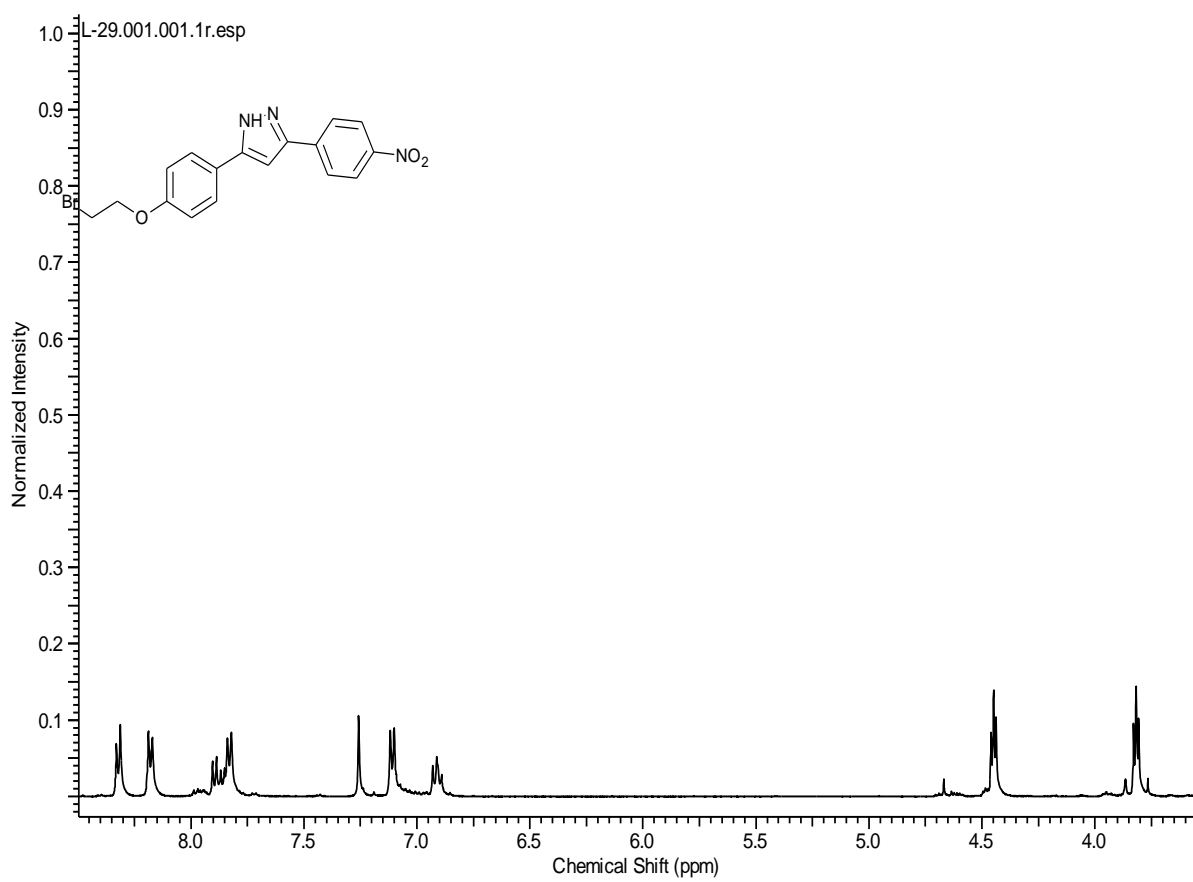
Π-2, Φάσμα ^1H NMR



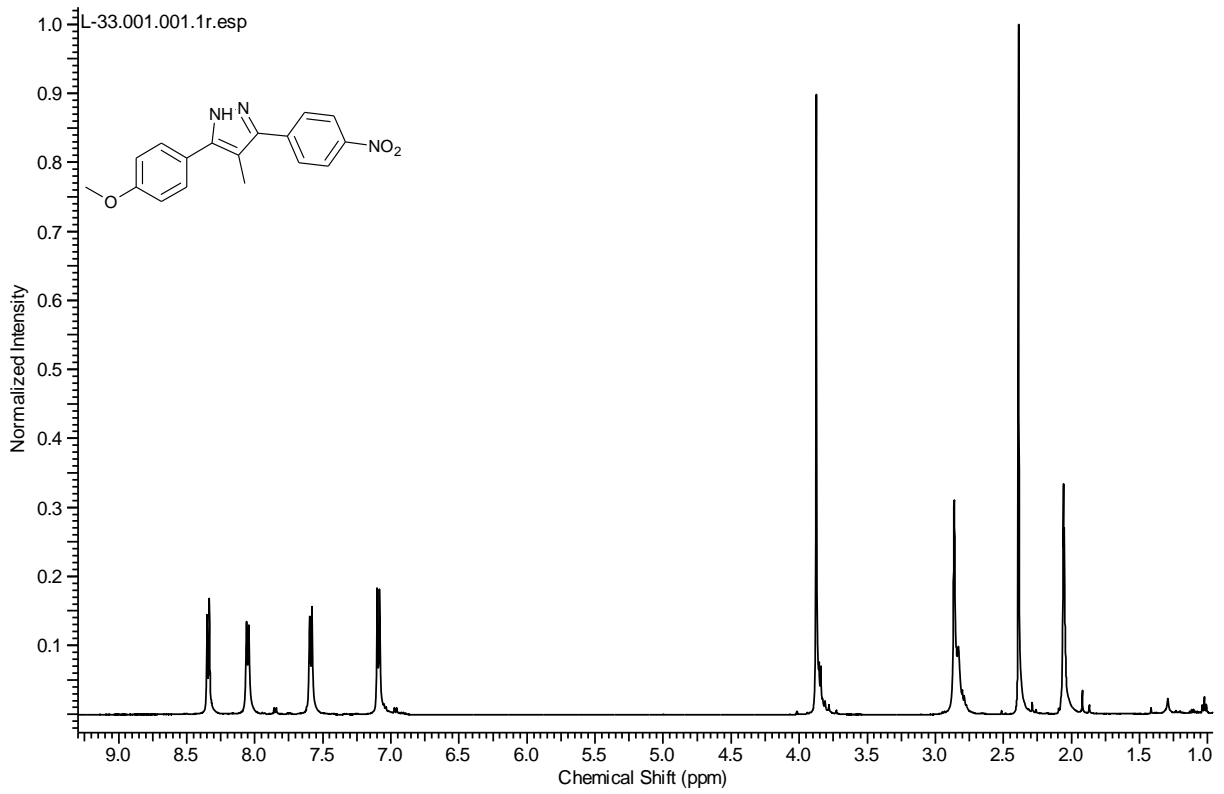
Π-3, Φάσμα ¹H NMR



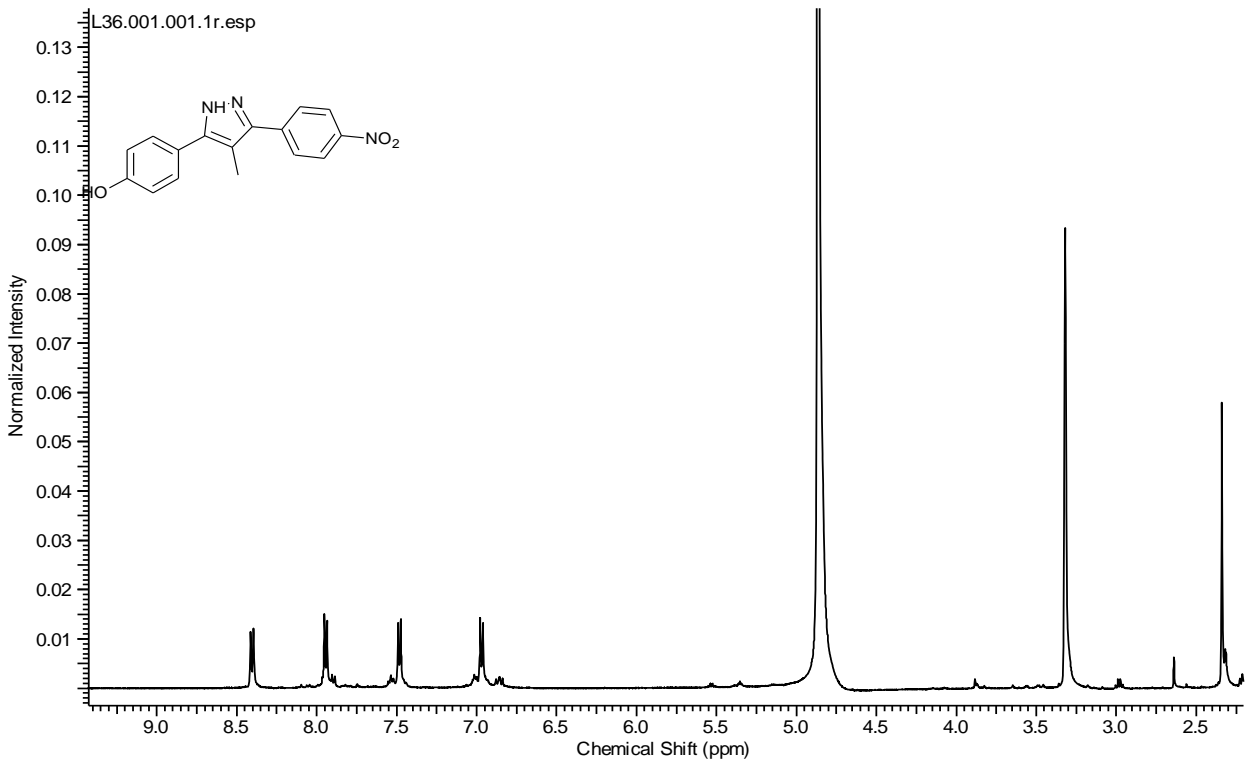
Π-5, Φάσμα ¹H NMR



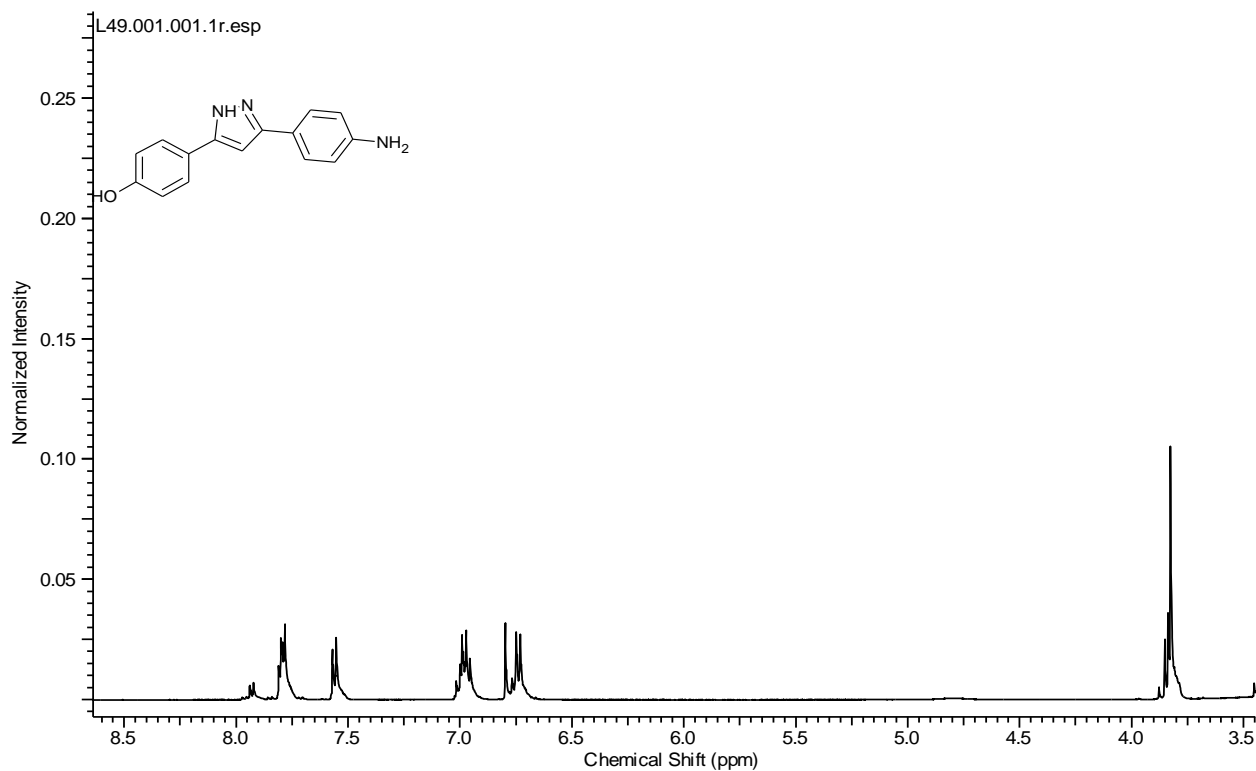
Π-6, Φάσμα ¹H NMR



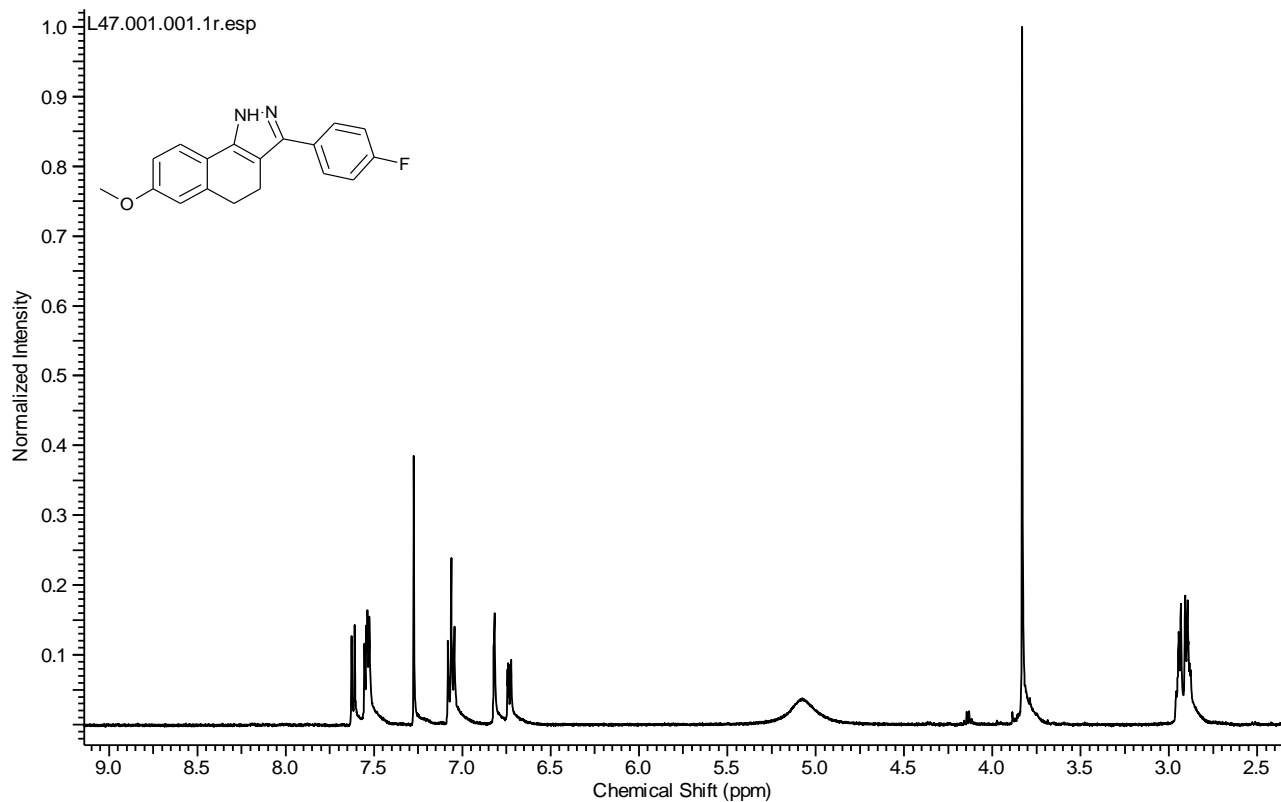
Π-7, Φάσμα ¹H NMR



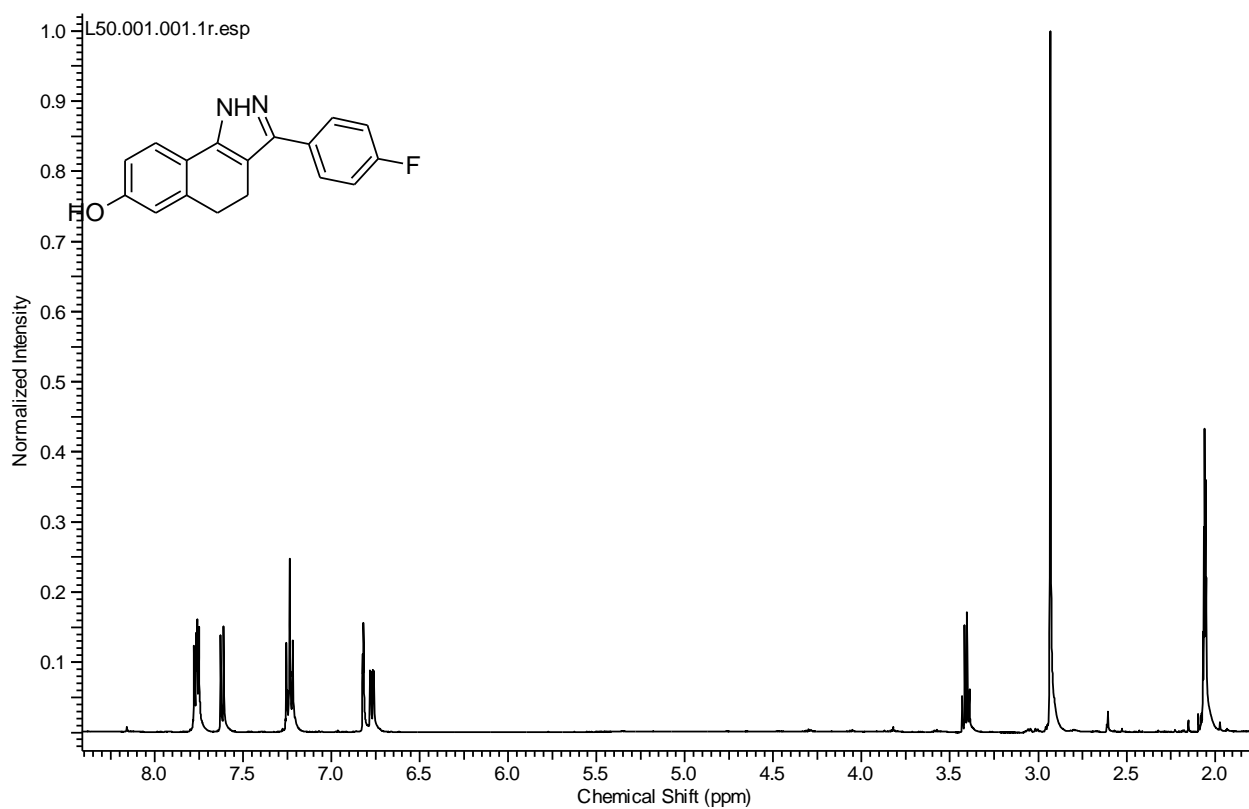
Π-8, Φάσμα ¹H NMR



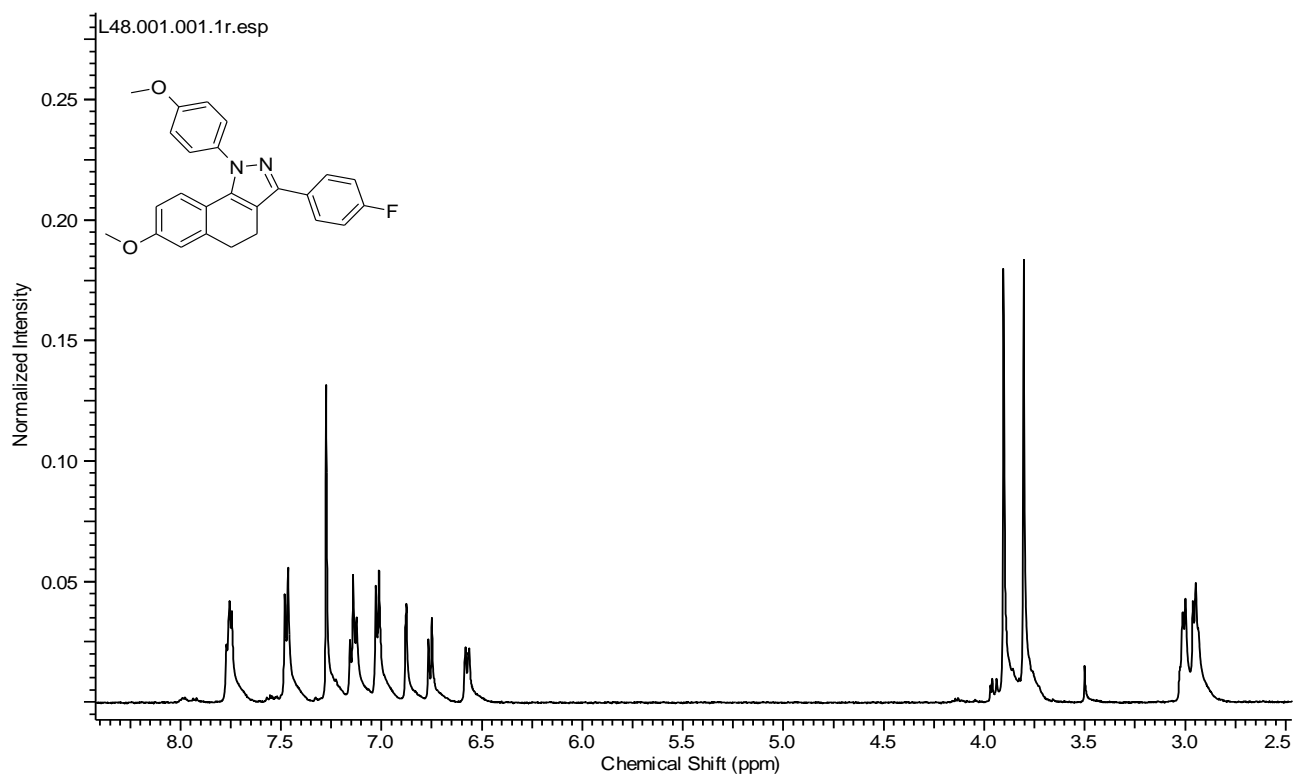
Π-9, Φάσμα ¹H NMR



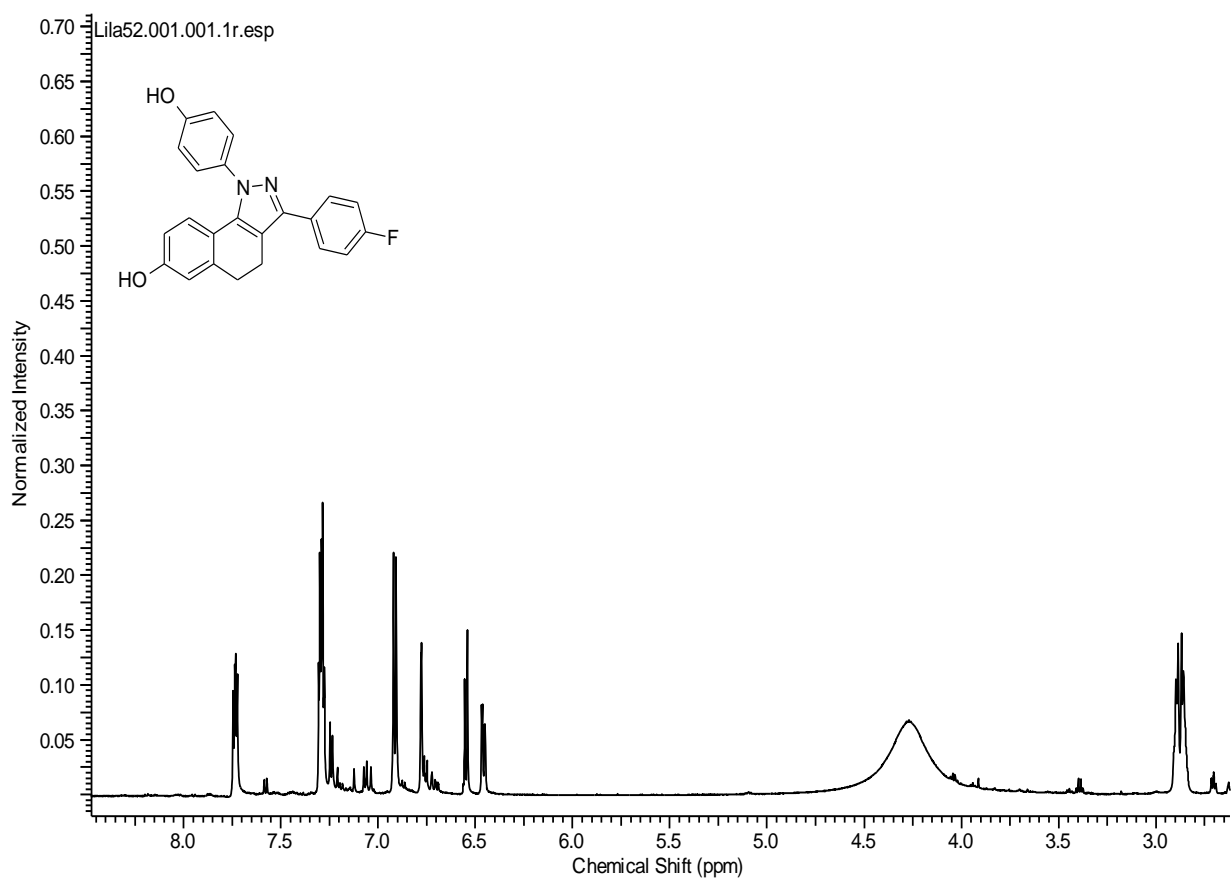
Π-10, Φάσμα ¹H NMR



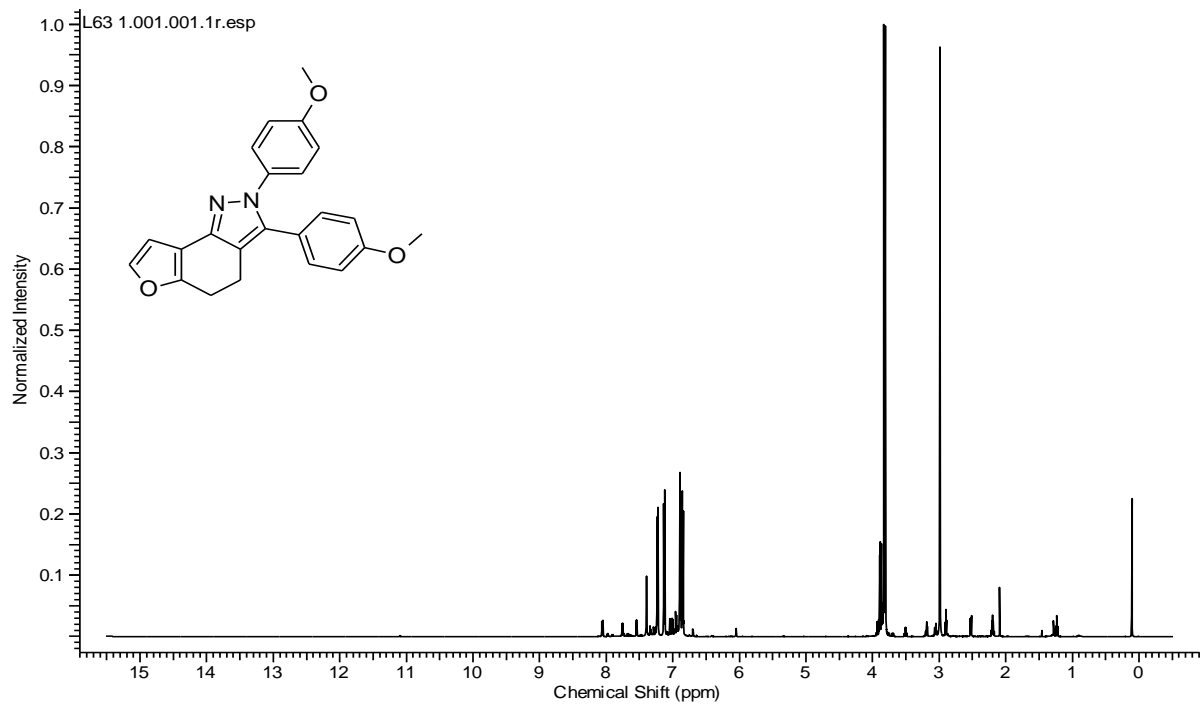
Π-11, Φάσμα ¹H NMR



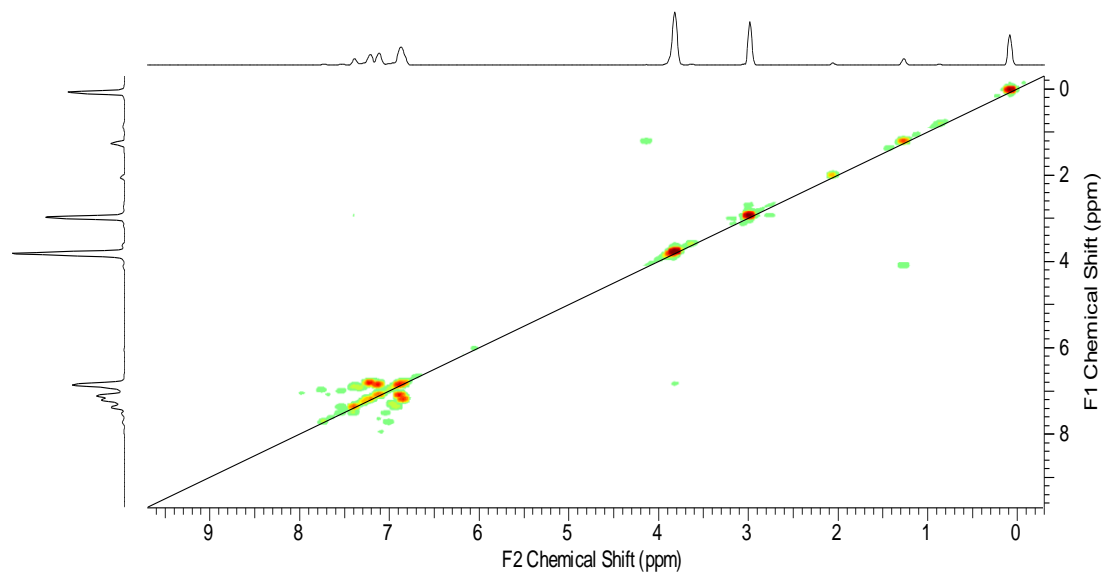
Π-12, Φάσμα ¹H NMR



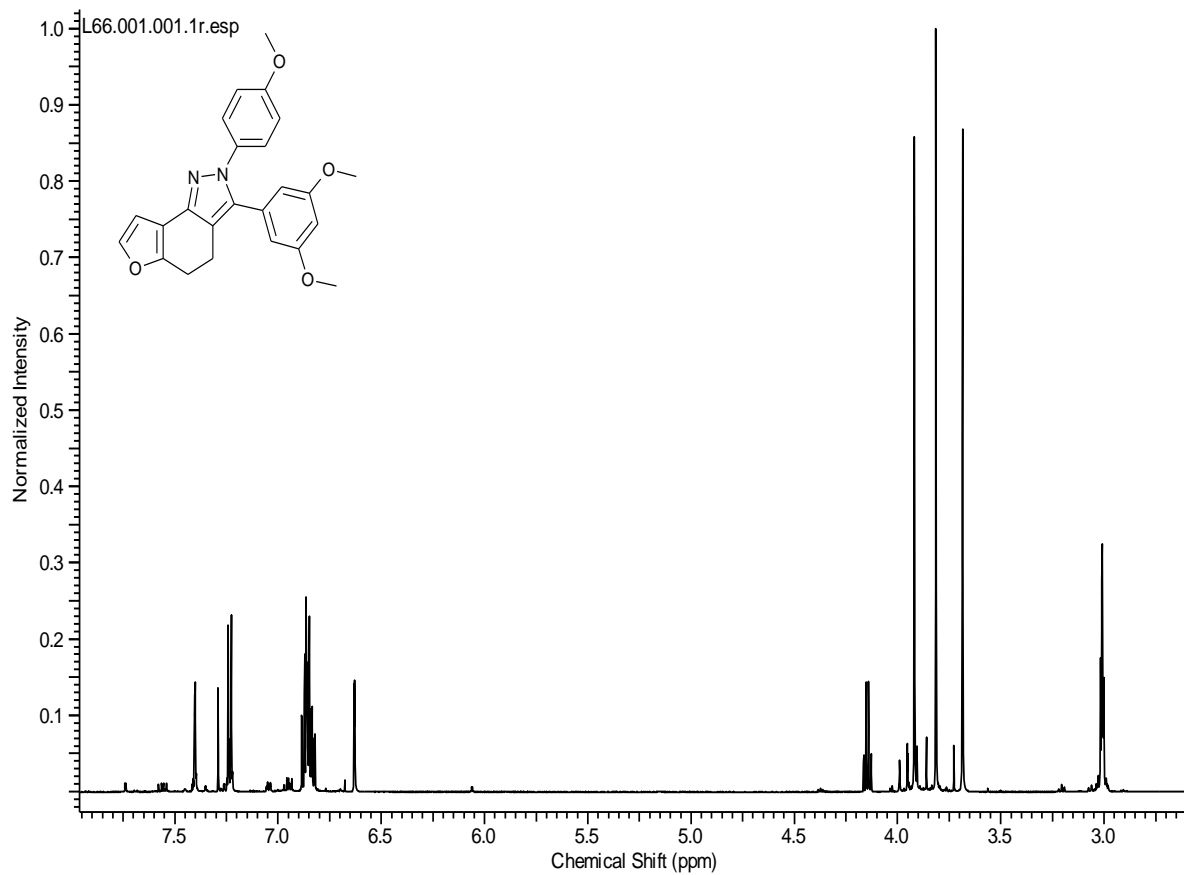
Π-13, Φάσμα ¹H NMR



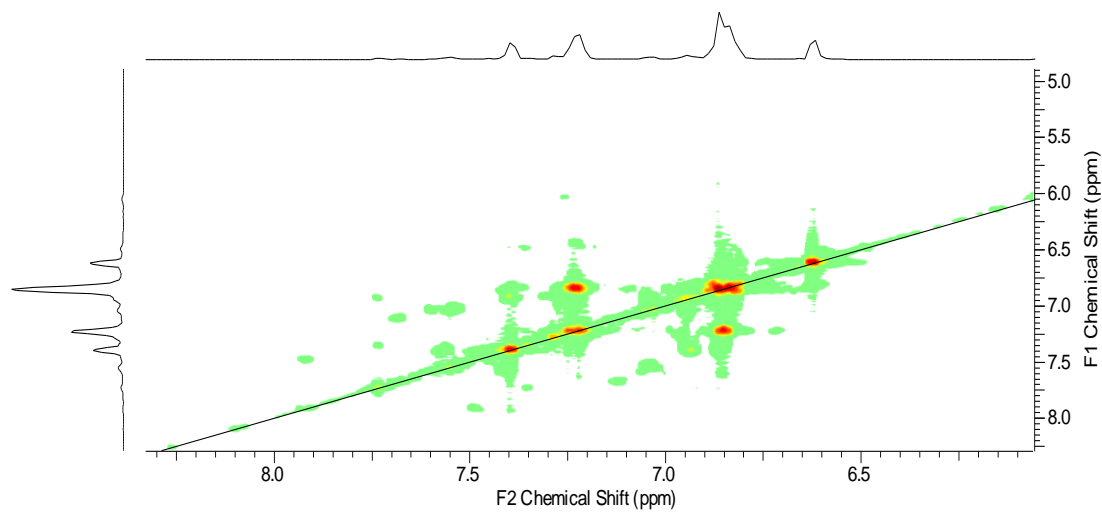
Π-13, Φάσμα ^1H - ^1H COSY NMR



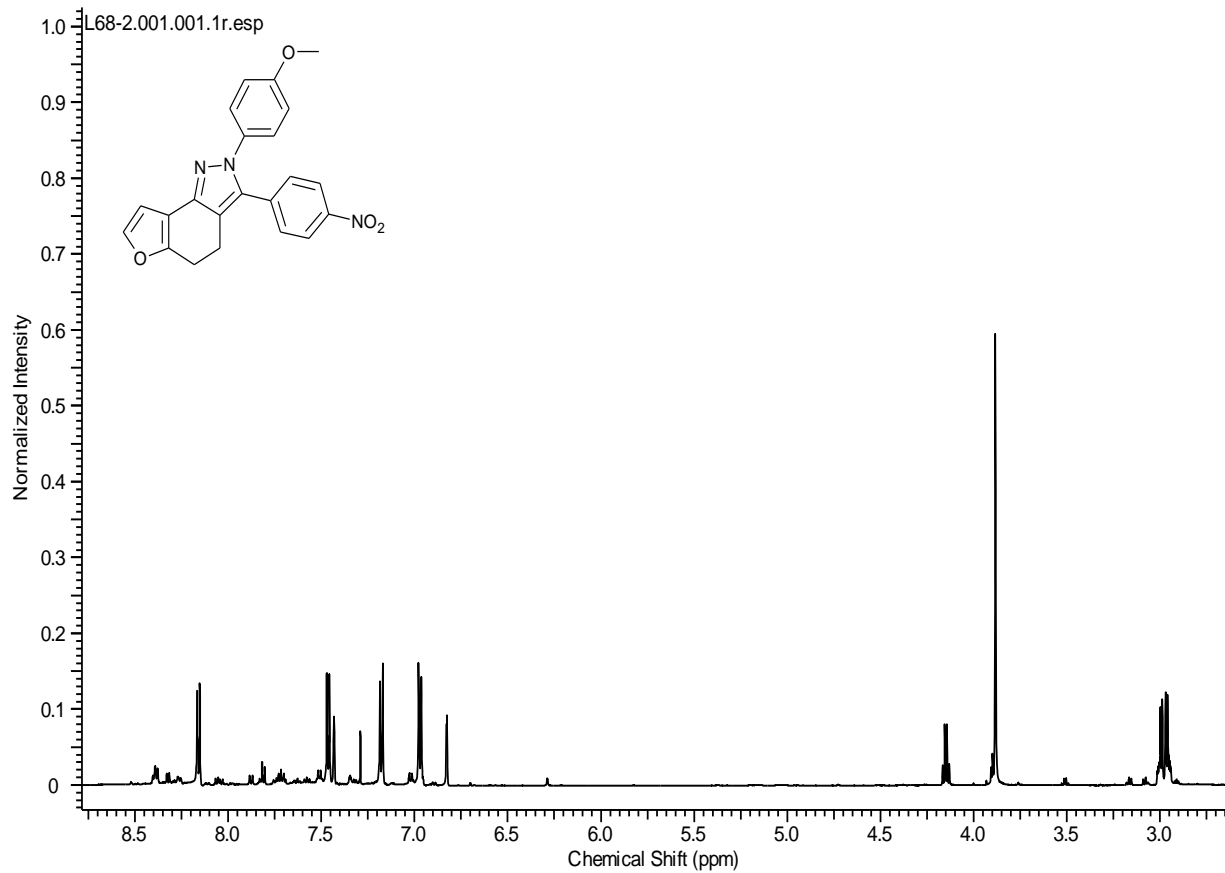
Π-14, Φάσμα ^1H NMR



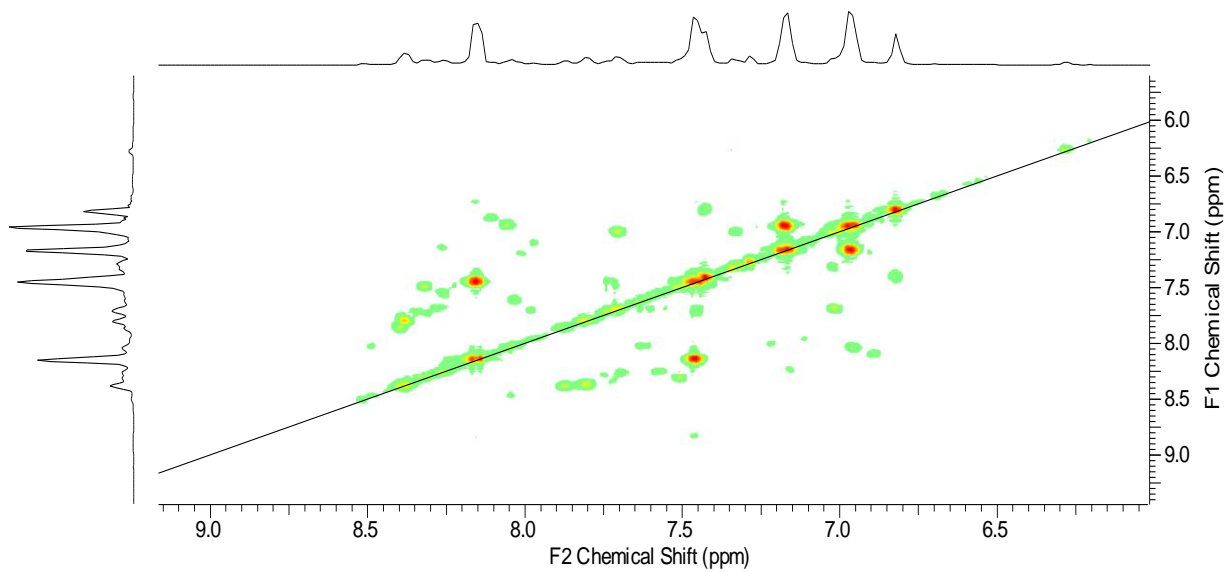
Π-14, Φάσμα ^1H - ^1H COSY NMR



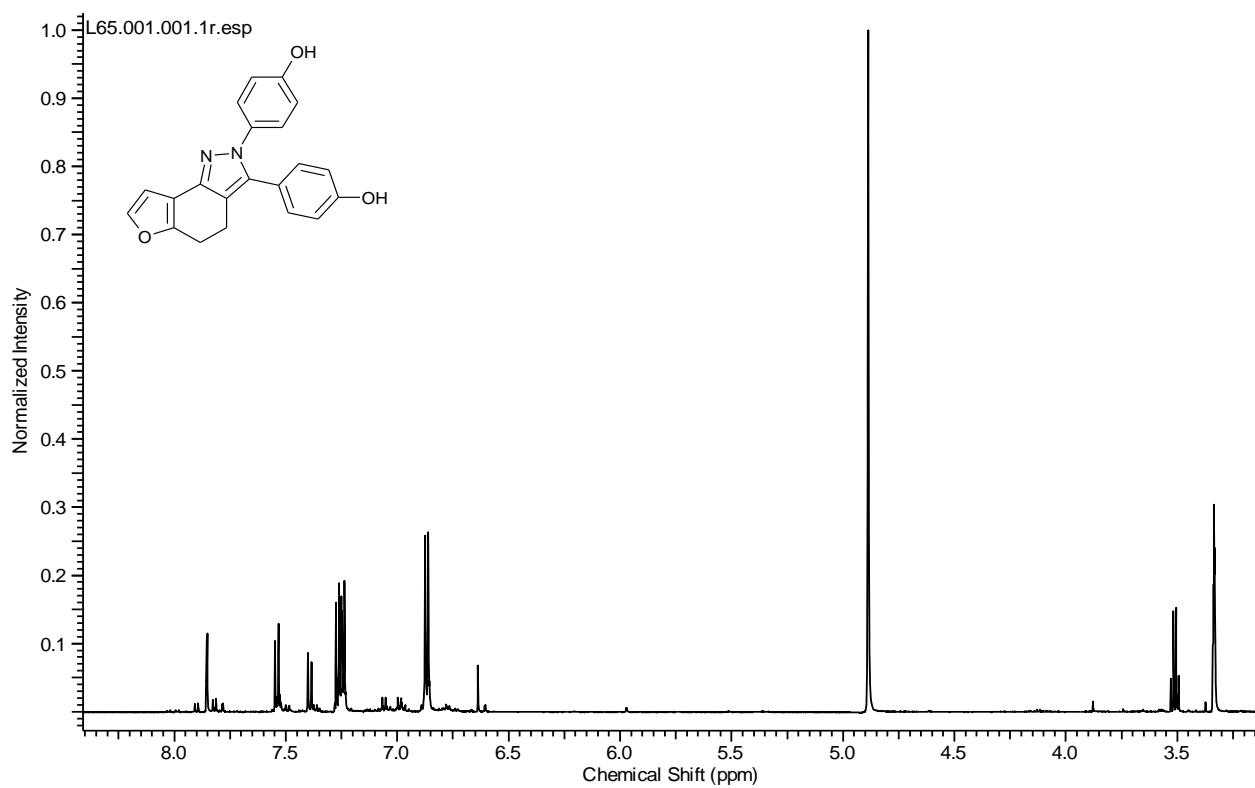
Π-15, Φάσμα ^1H NMR



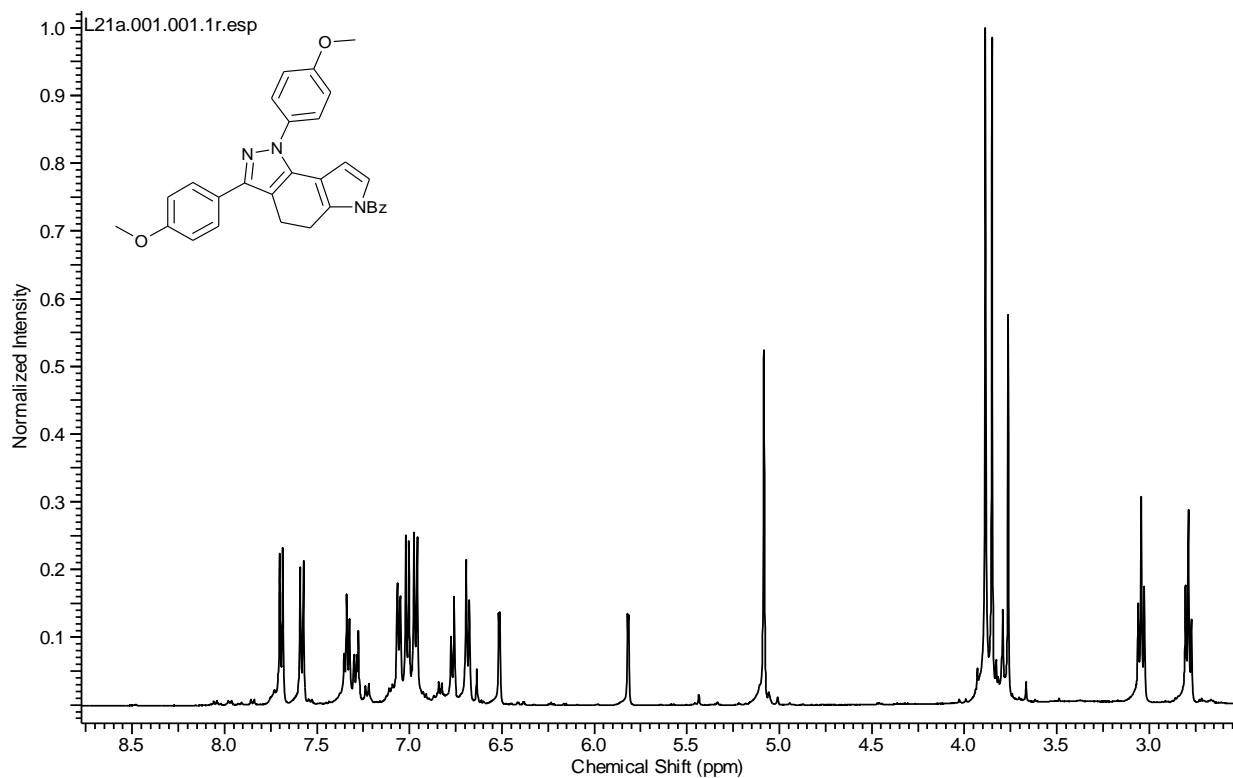
Π-15, Φάσμα ^1H - ^1H COSY NMR



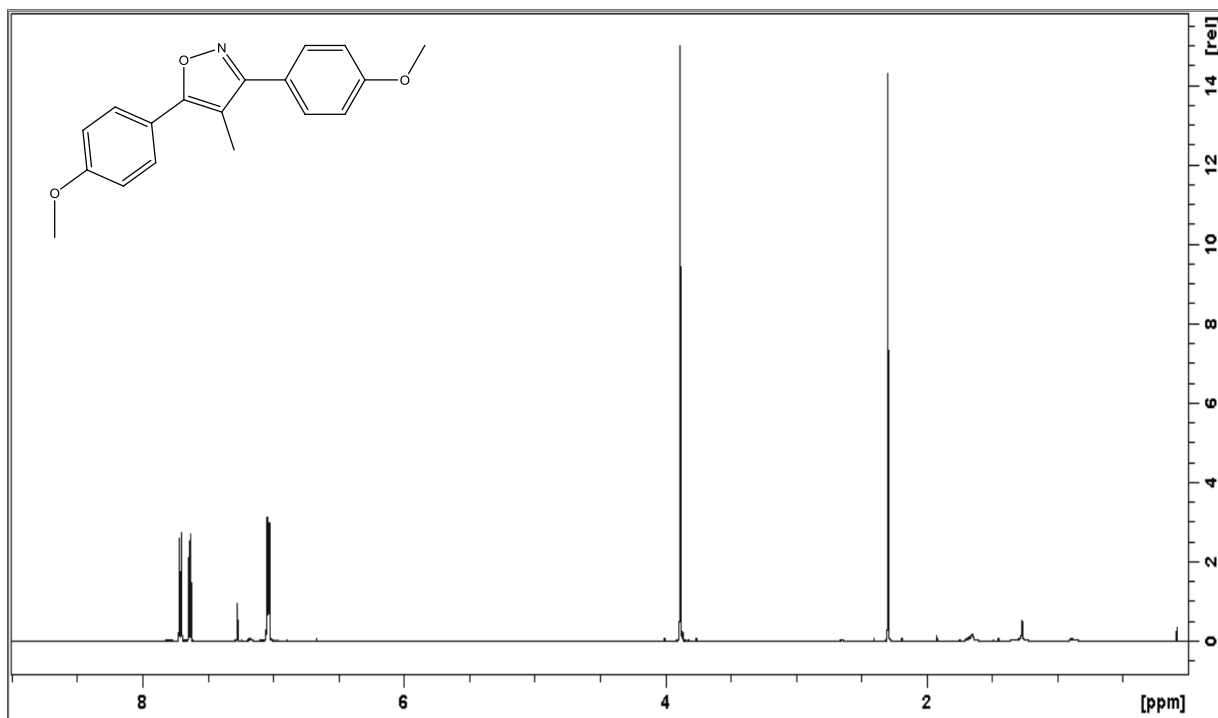
Π-17, Φάσμα ^1H NMR



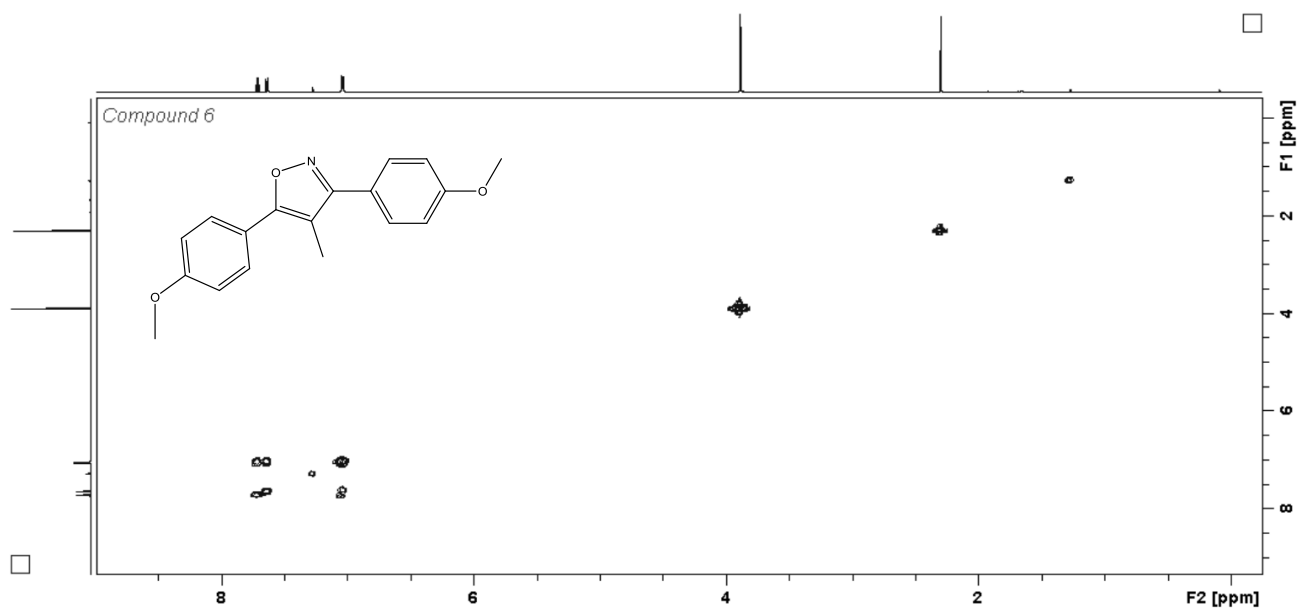
Π-21, Φάσμα ¹H NMR



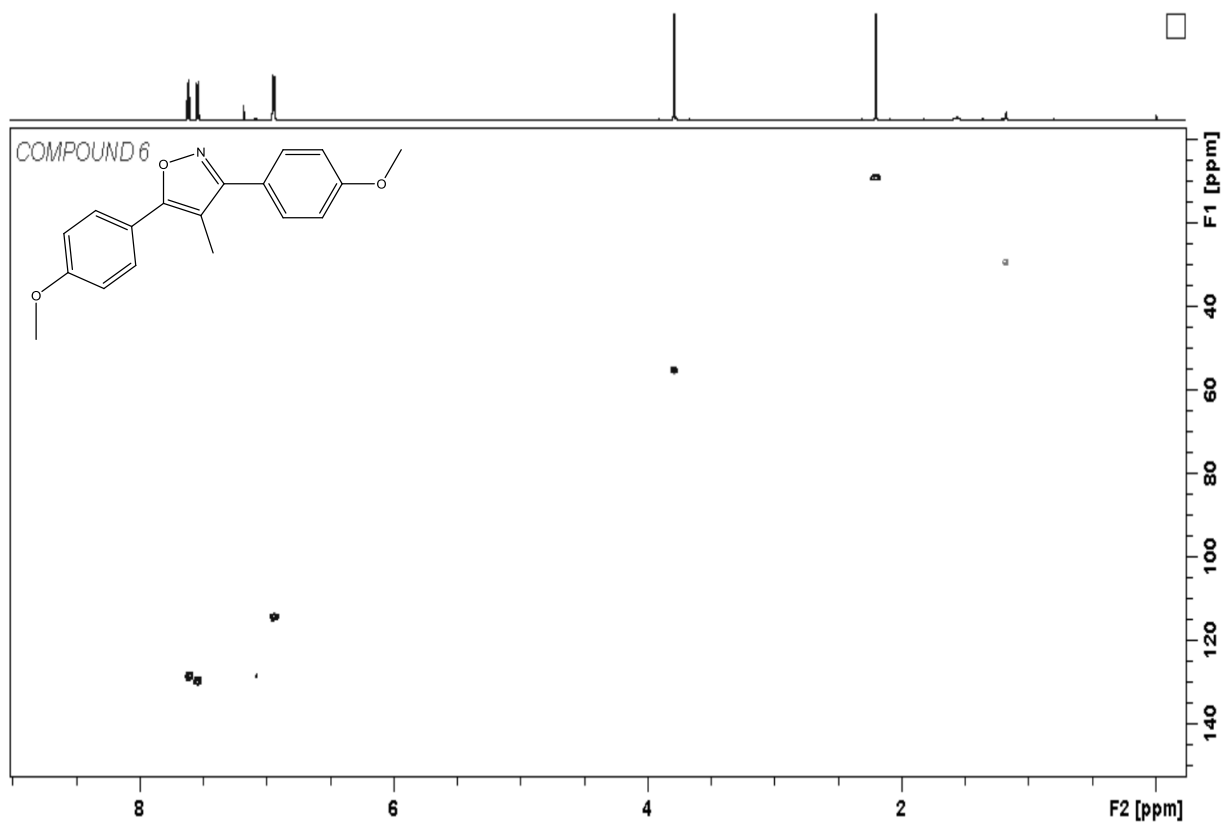
Π-22, ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz)



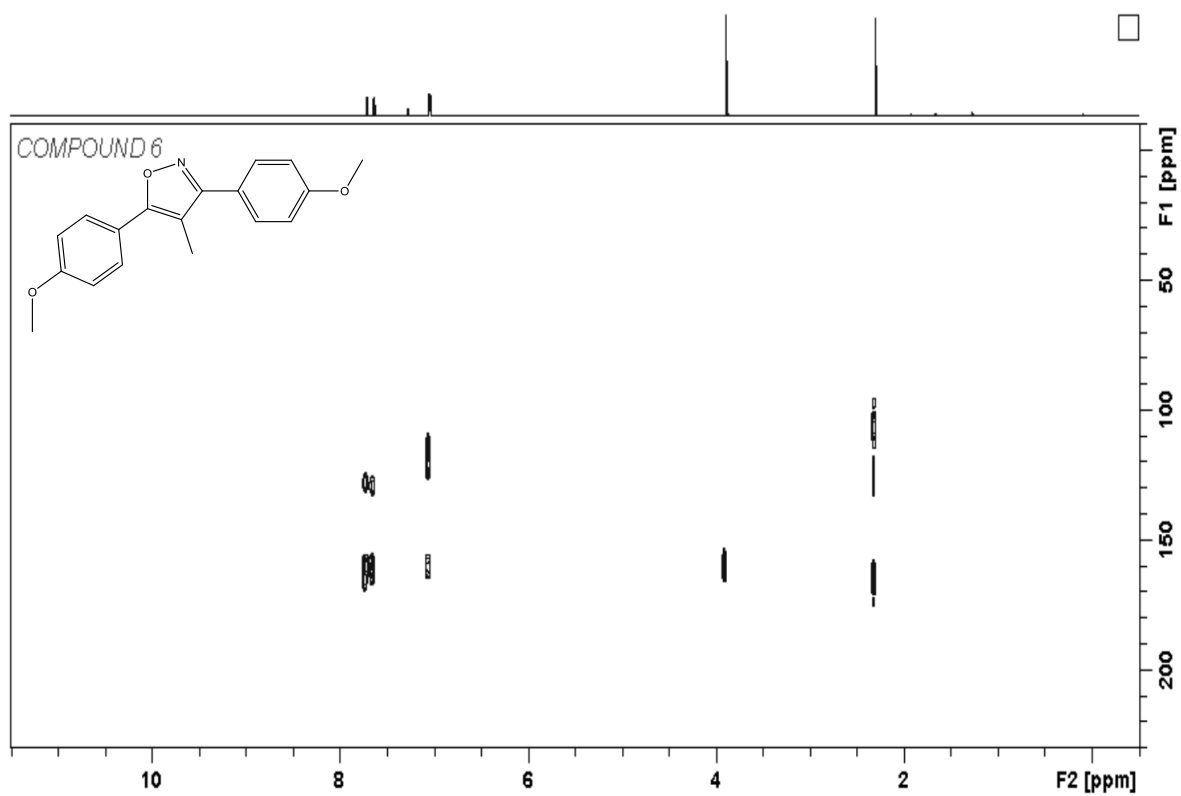
П-25, COSY - NMR (CDCl₃, 600 MHz)



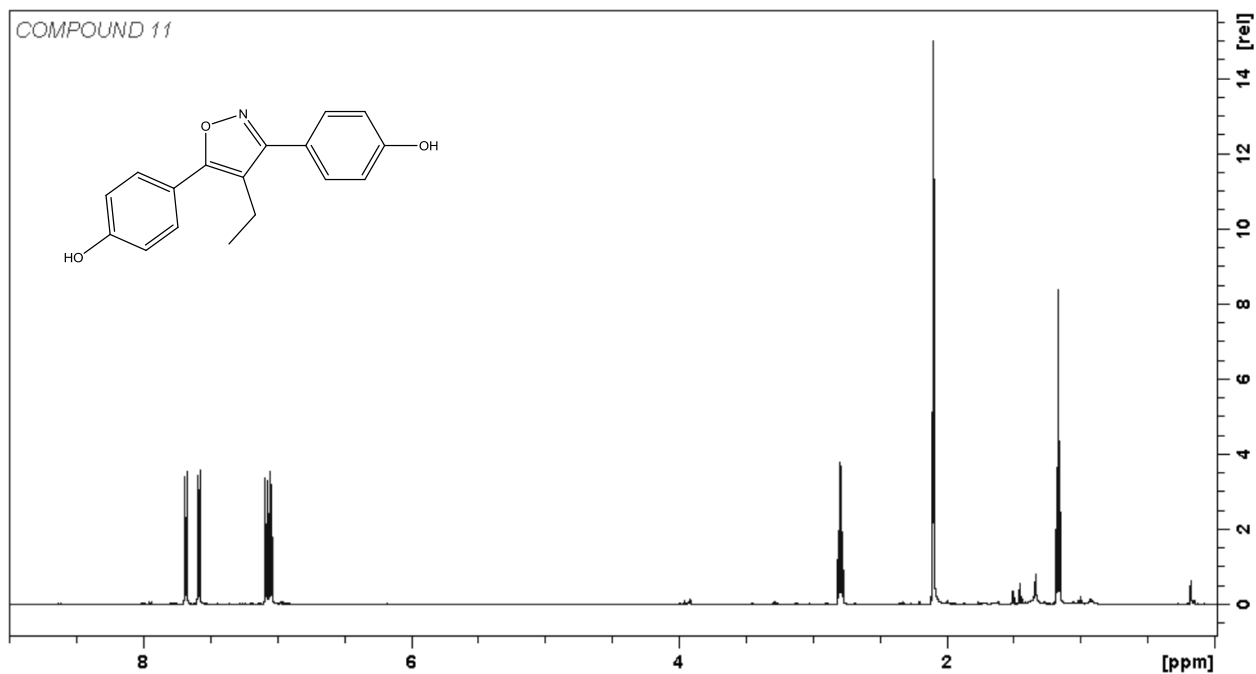
П-25, HSQC - NMR (CDCl₃, 600 MHz)



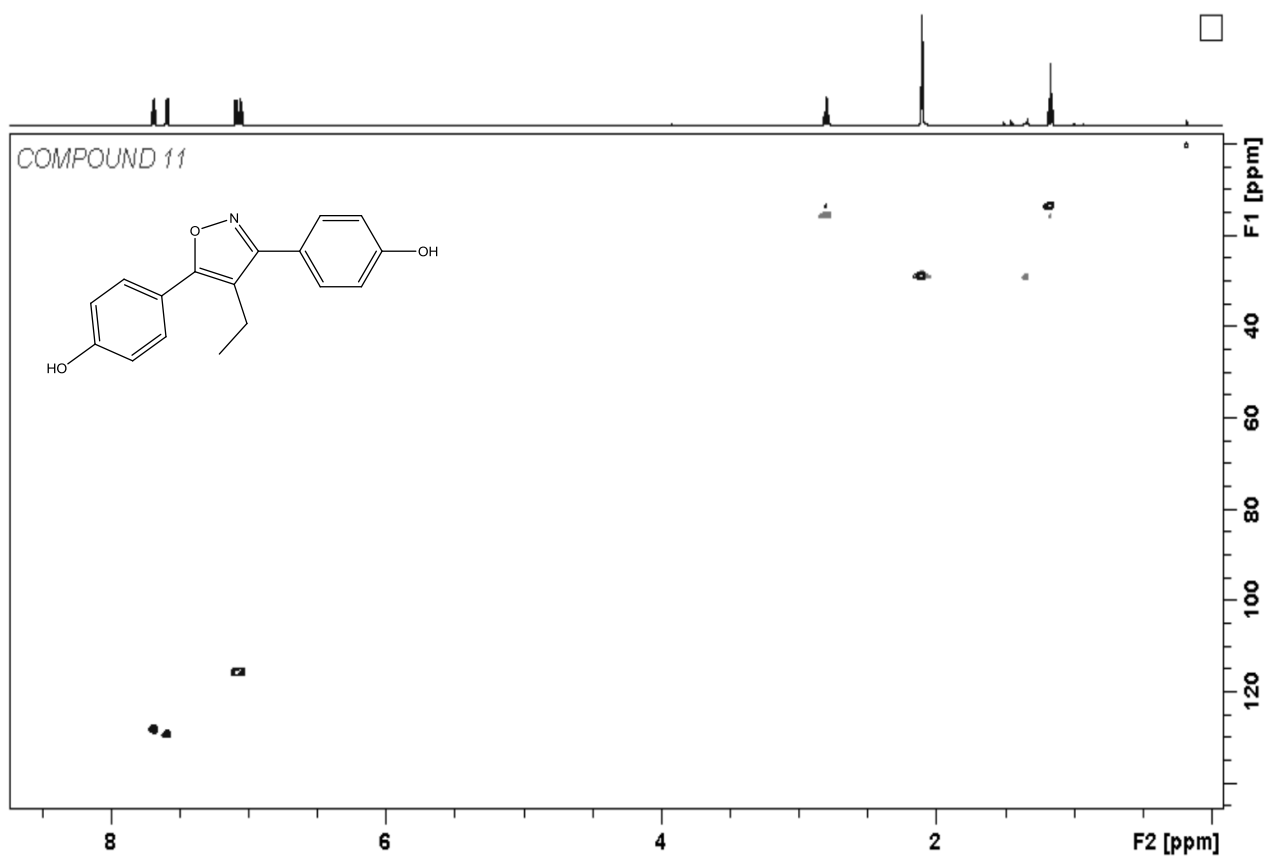
П-25, HMBC - NMR (CDCl₃, 600 MHz)



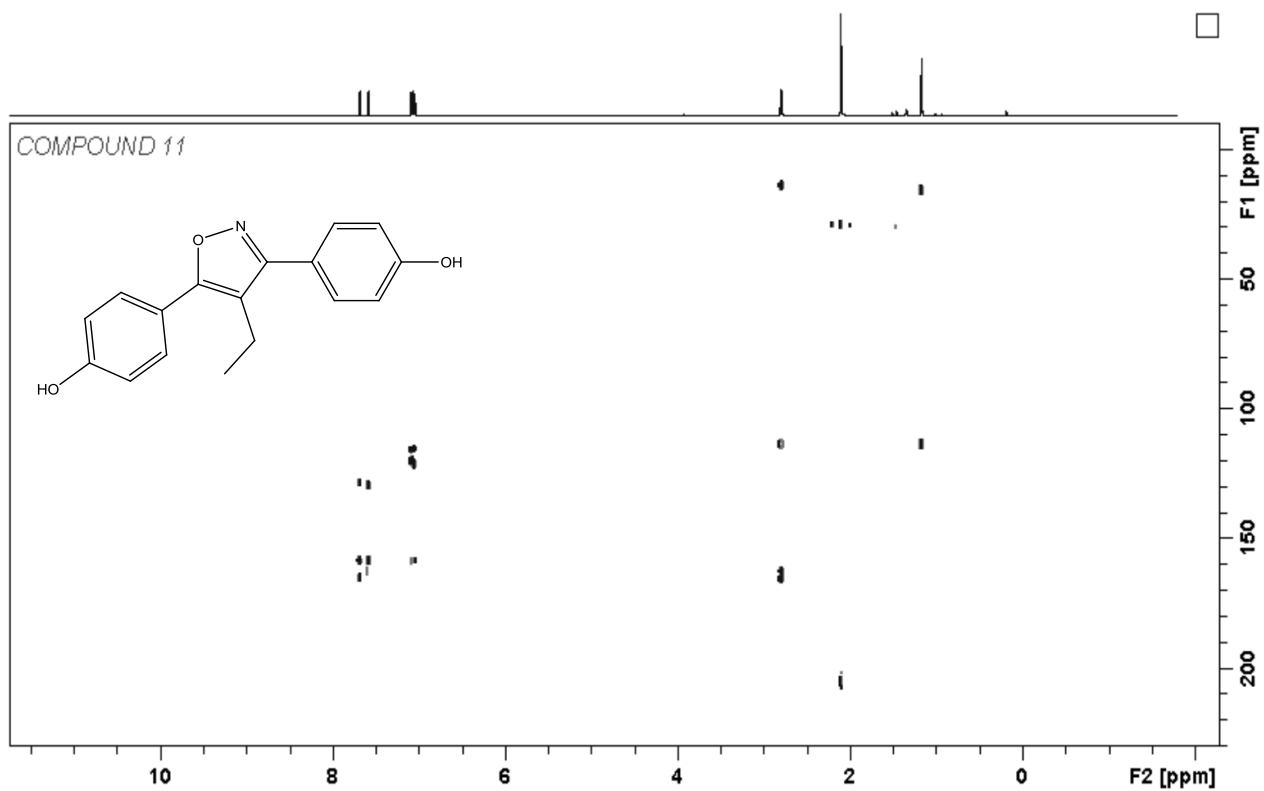
П-30, ¹H-NMR (Acetone-d₆, 600 MHz)



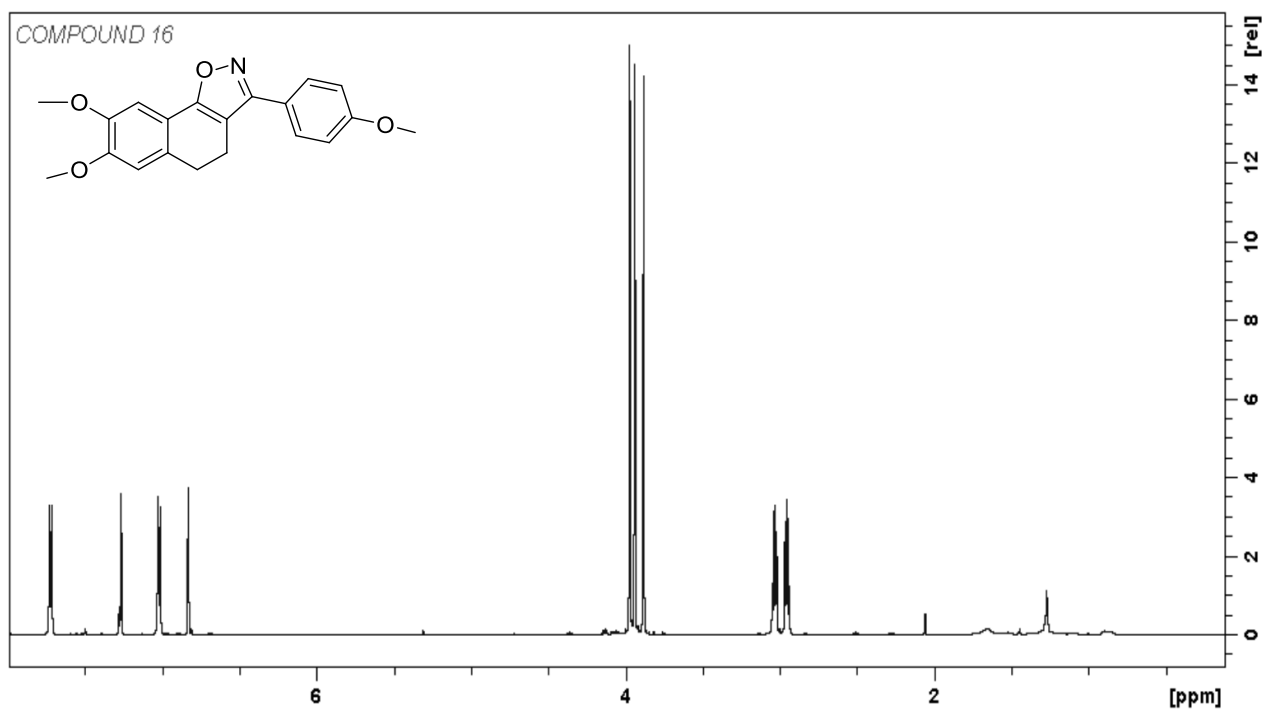
П-30, HSQC - NMR П-30 (Acetone-d6, 600 MHz)



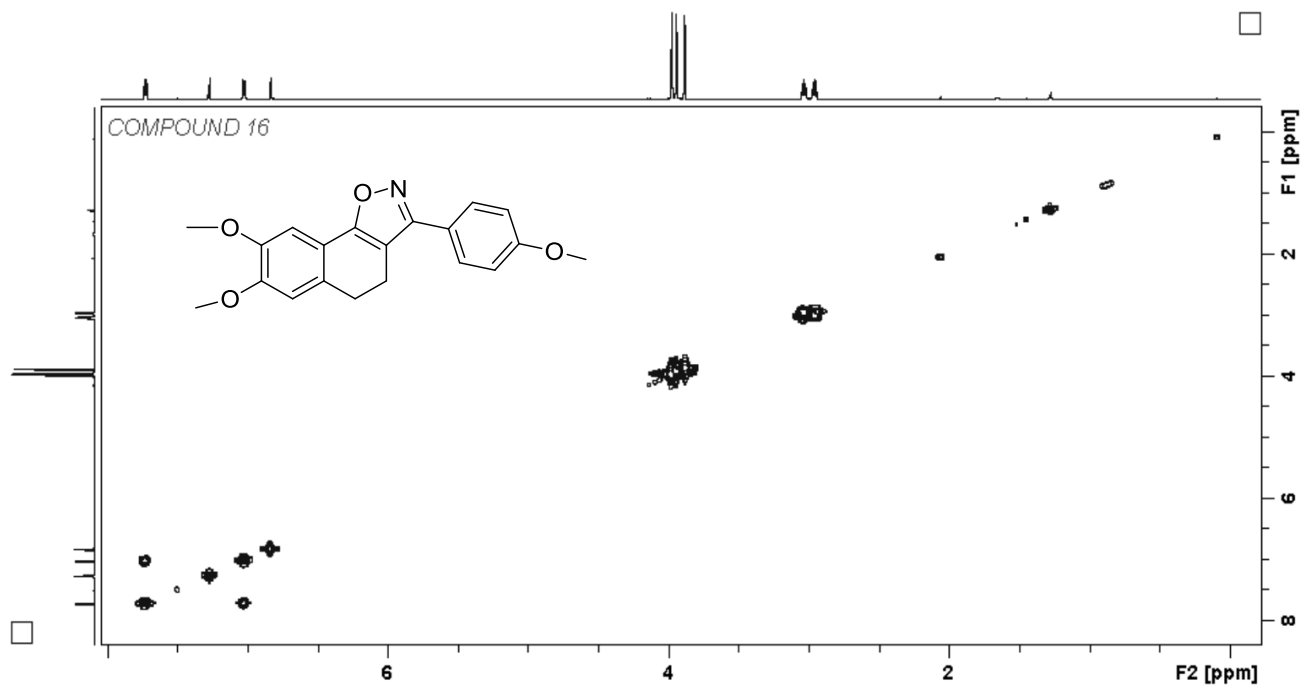
П-30, HMBC - NMR (Acetone-d6, 600 MHz)



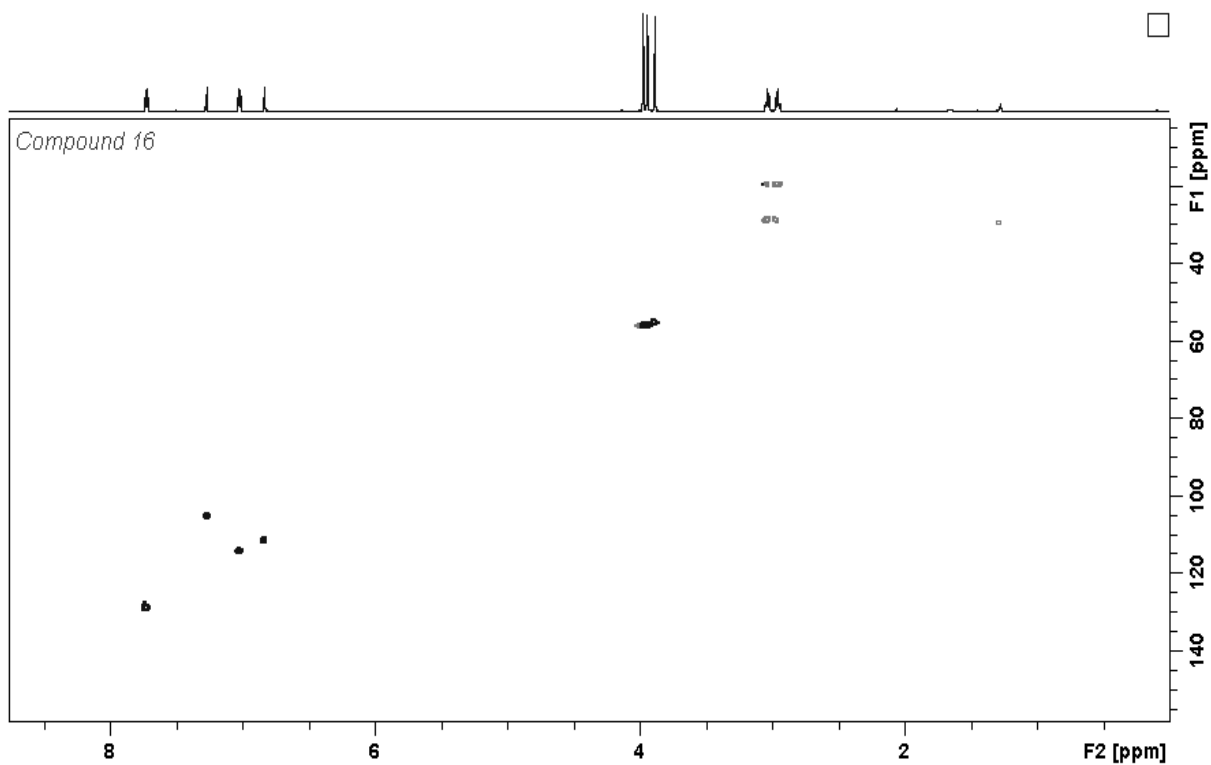
П-33, ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz)



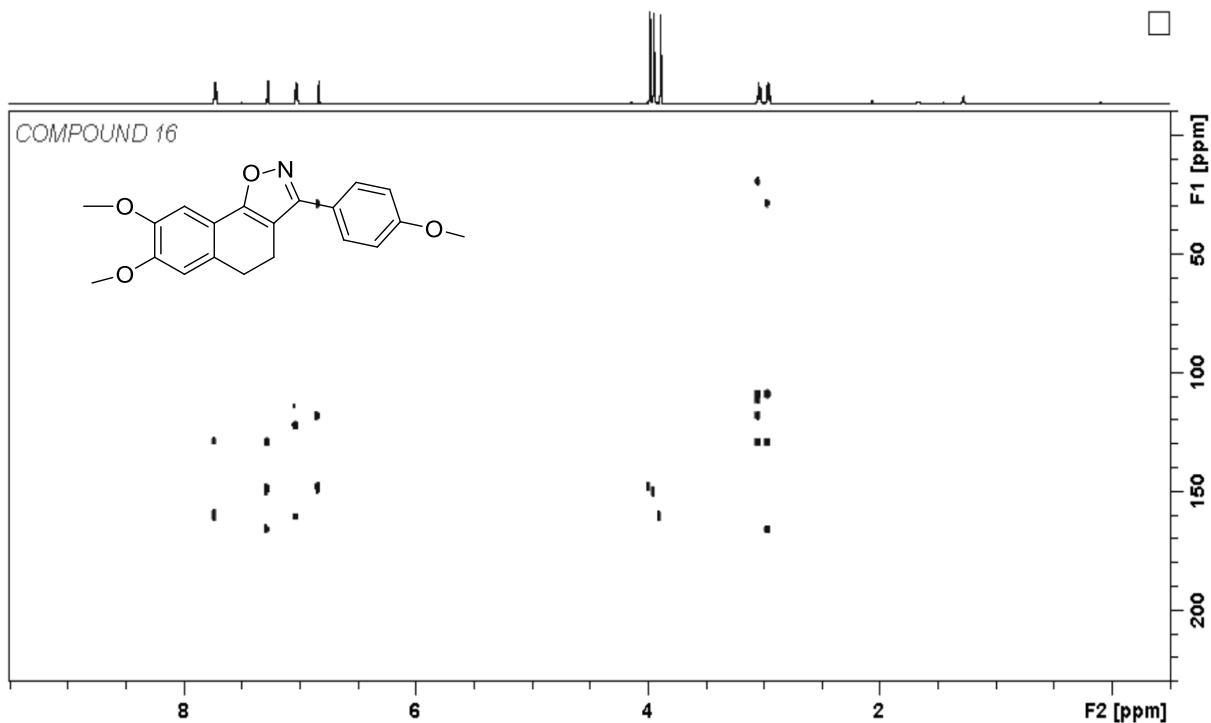
COSY - NMR П-33 (CDCl₃, 600 MHz)



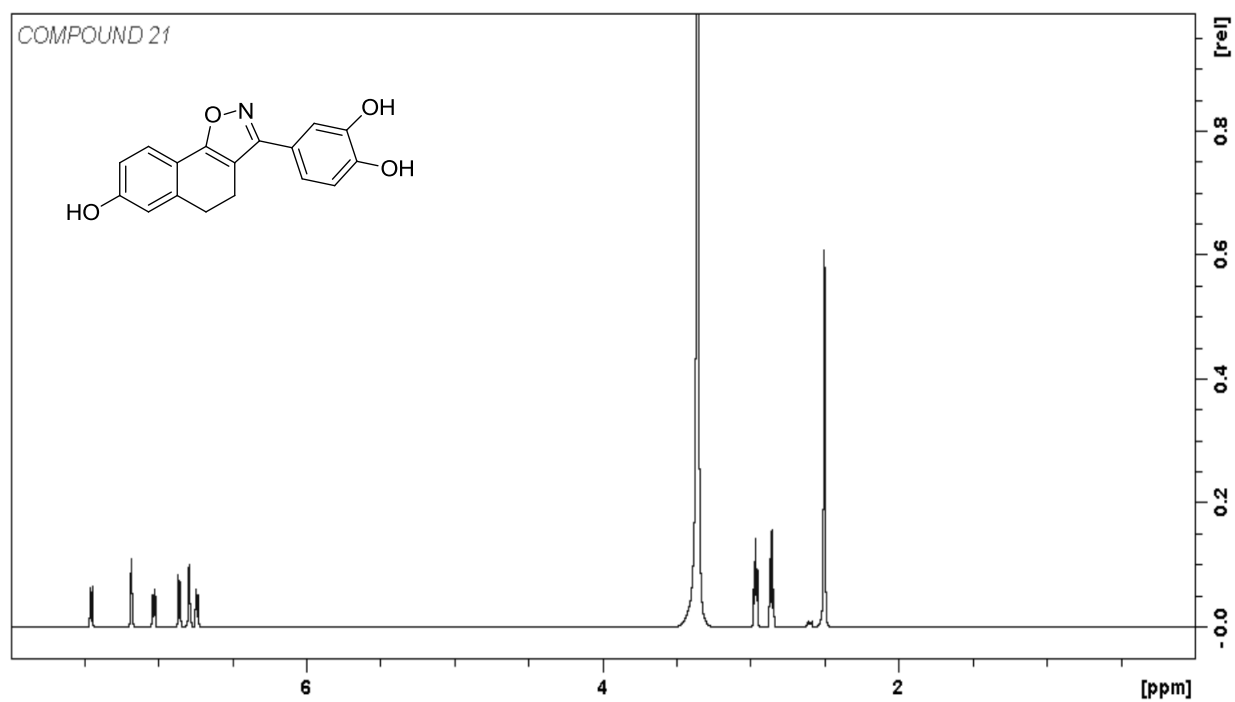
П-33, HSQC - NMR П-33 (CDCl₃, 600 MHz)



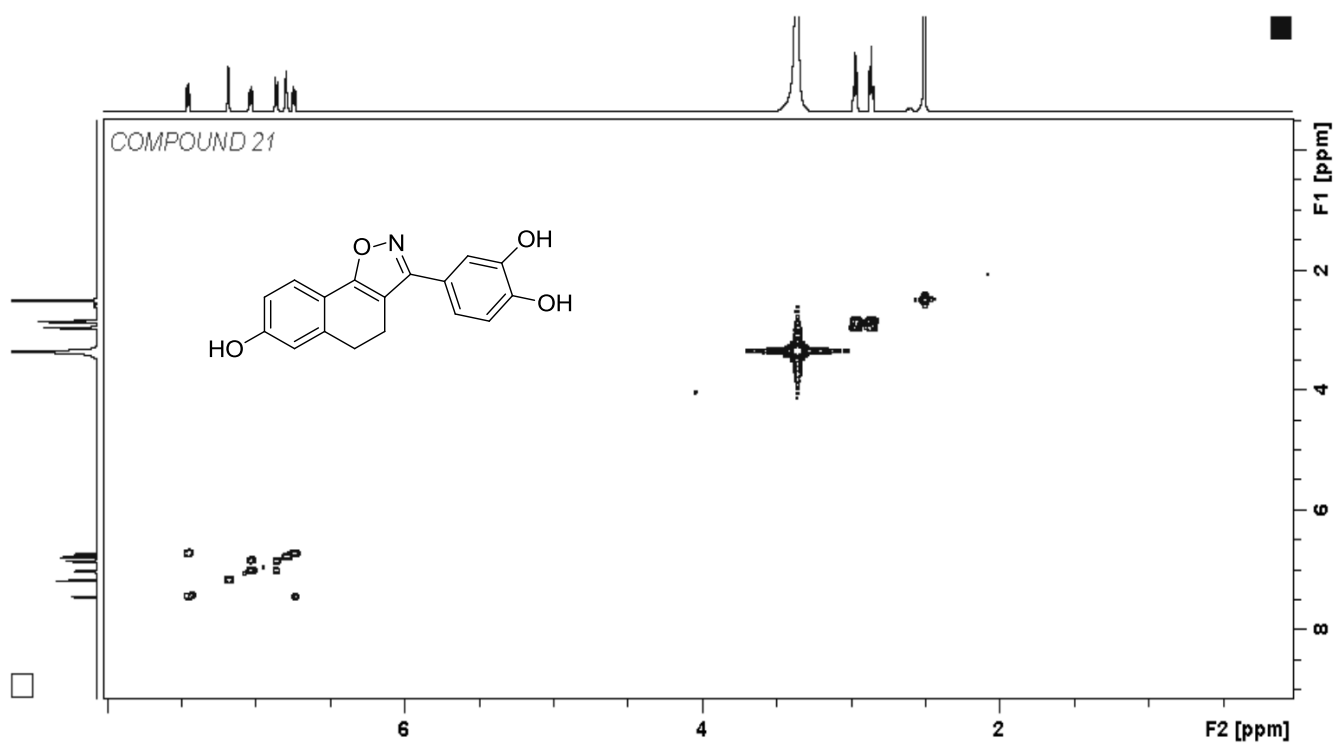
П-33, HMBC - NMR (CDCl₃, 600 MHz)



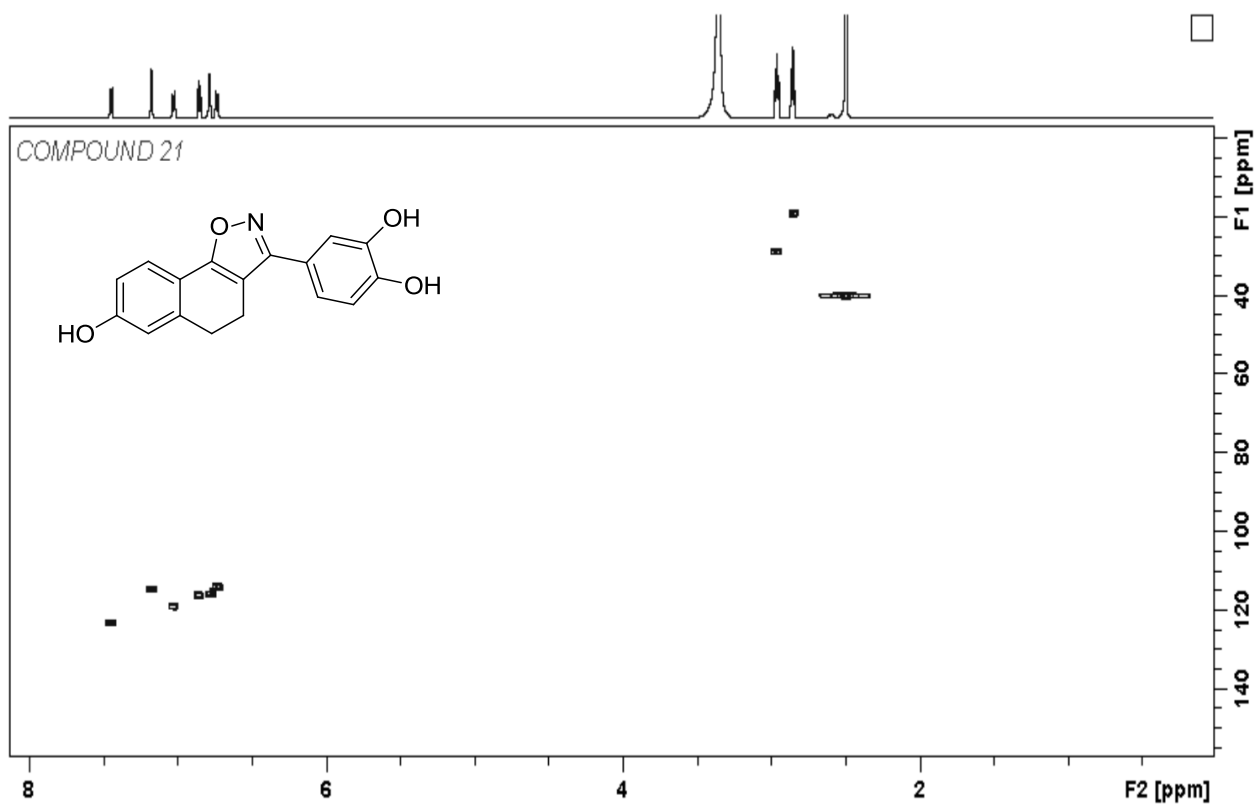
П-39, ¹H-NMR (DMSO, 600 MHz)



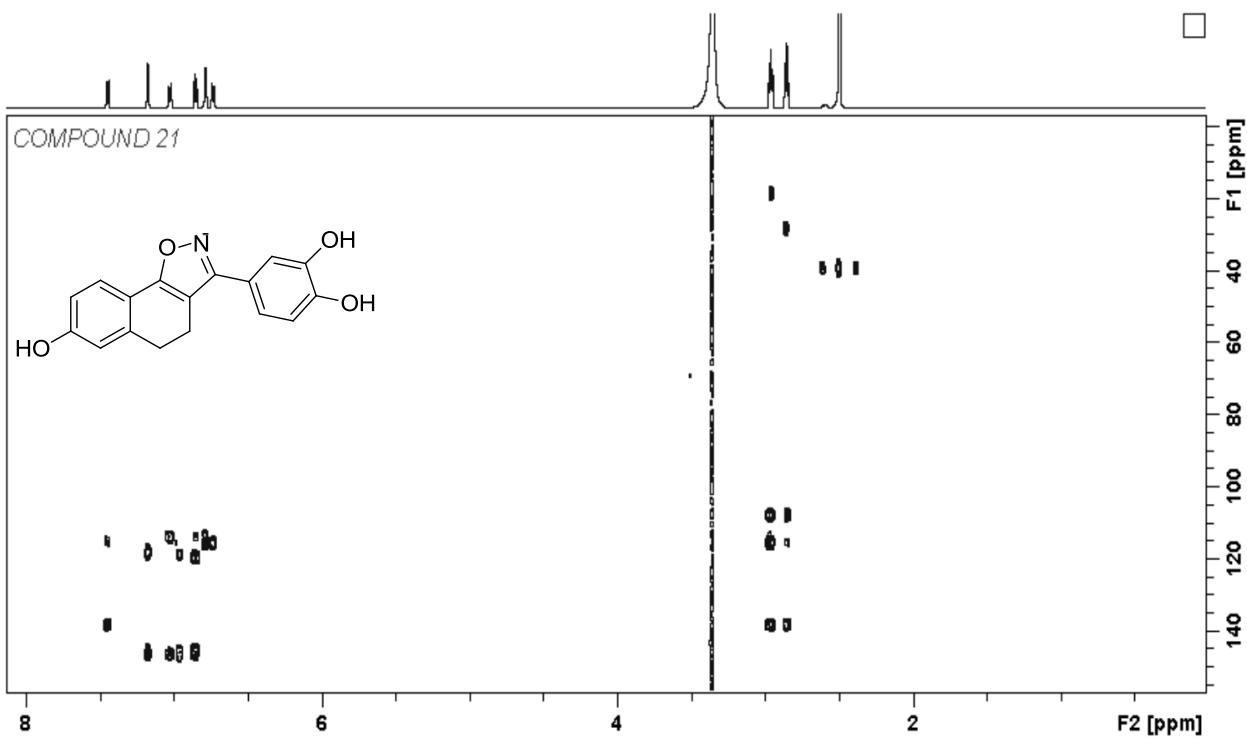
П-39, COSY - NMR (DMSO, 600 MHz)



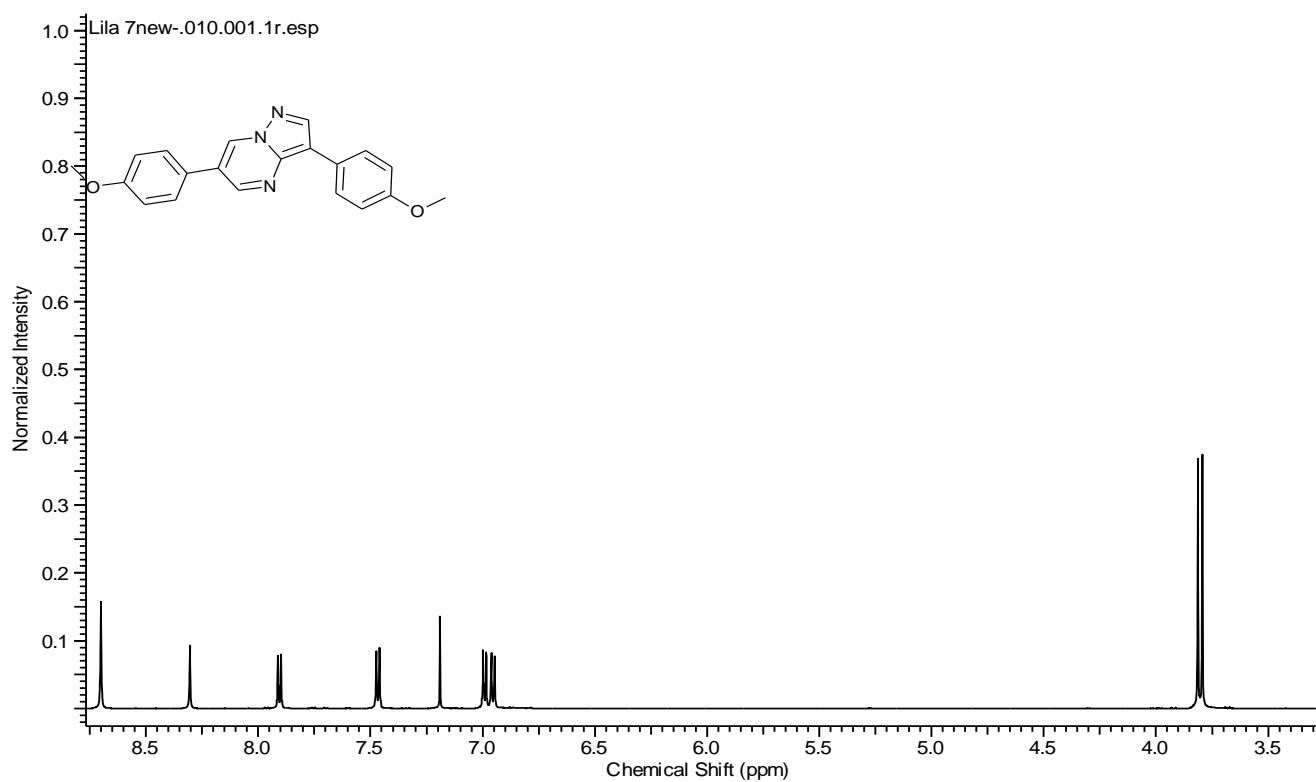
П-39, HSQC - NMR (DMSO, 600 MHz)



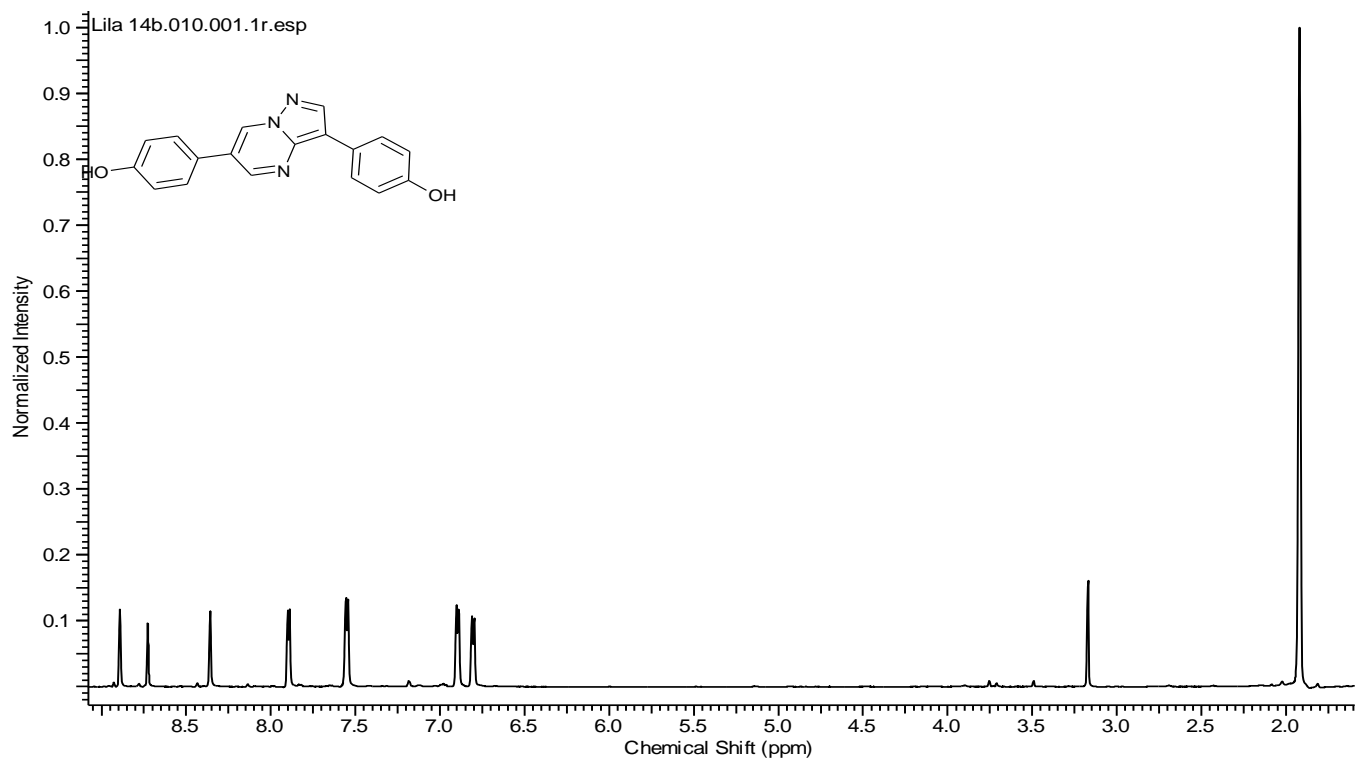
П-39, HMBC - NMR (DMSO, 600 MHz)



Π-45, Φάσματα



Π-46, Φάσματα



Π-47, Φάσματα

