

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΙΧΑΛΗΣ Σ. ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΙΧΑΛΗΣ Σ. ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ
ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- Σύνθεση νέων πυραζολικών παραγώγων και μελέτη της αντι-αγγειογενετικής και αντικαρκινικής τους δράσης
- Σύνθεση νέων αναστολέων της πρωτεΐνης p53 και αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης
- Σύνθεση νέων αναλόγων της ταμοξιφαίνης και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

ΑΘΗΝΑ 2010

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Γενικό Τμήμα – Εργαστήριο Χημείας

Μιγάλης Σ. Χριστόδουλου
Χημικός

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ
ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Σ. Χαρουτουιάν (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Μέλη: Δ. Παπαϊωάννου (Καθηγητής Παν. Πατρών)
Α. – Λ. Σκαλτσούνης (Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δ. Παπαϊωάννου (Καθηγητής Παν. Πατρών)
Η. Κουλαδούρος (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Σ. Χαρουτουιάν (Καθηγητής Γ.Π.Α.)
Α. – Λ. Σκαλτσούνης (Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α.)
Β. Κωνσταντίνου (Καθηγήτρια Γ.Π.Α.)
Ε. Πιτσινός (Ερευνητής Α' Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος)
Ν. Φωκιαλάκης (Λέκτορας Ε.Κ.Π.Α.)

Αθήνα 2010

“Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Γενικό Τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα”

Νόμος 5343/32, άρθρο 202 §2

*Στους Γονείς μου
Σπύρο και Μαριάνθη*

Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γενικού Τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Σέρκο Χαρουτουγιάν όχι μόνο γιατί μου έδωσε τη δυνατότητα, τα εφόδια και τα κίνητρα να πραγματοποιήσω τη διατριβή μου σε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα αλλά και για την επιστημονική του καθοδήγηση, το προσωπικό ενδιαφέρον, τις πολύτιμες συμβουλές, τη βοήθεια και την εμπιστοσύνη του σε όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής. Επίσης δεν μπορώ να παραλείψω την οικονομική βοήθεια, που μου παρείχε σε όλη την περίοδο της διατριβής καθώς και την αμέριστη συμπαράσταση και συμβολή του για να εκπονήσω μέρος της διατριβής στα εργαστήρια του Πανεπιστημίου του Μπιλμπάο και του Πανεπιστημίου του Μιλάνου.

Επίσης ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Το μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Καθηγητή Διονύσιο Παπαϊωάννου του Πανεπιστημίου Πατρών, για της πολύτιμες συμβουλές του και τη βοήθειά του σε όλα τα στάδια της πορείας μου από την εποχή των σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο Πατρών.

Το έτερο μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Ε.Κ.Π.Α. για τη συνεργασία και τη βοήθειά του.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή Ηλία Κουλαδούρο του Γενικού Τμήματος του Γ.Π.Α., Καθηγήτρια Βιολέτα Κωνσταντίνου του Γενικού Τμήματος του Γ.Π.Α. και Ερευνητή Α' Εμμανουήλ Πιτσινό του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, για τη συνεργασία τους, τις συμβουλές τους και την προθυμία τους συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή.

Το Λέκτορα Νικόλαο Φωκιαλάκη του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του Ε.Κ.Π.Α. για την απόλυτη συμπαράσταση και βοήθεια στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής και για την λήψη και ερμηνεία όλων των φασμάτων NMR.

Τους καθηγητές Daniele Passarella του Πανεπιστημίου του Μιλάνου και Imanol Tellitu του Πανεπιστημίου του Μπιλμπάο για την θερμή υποδοχή και υποστήριξη που μου παρείχαν την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριό τους.

Τους διδάκτορες του εργαστηρίου Γενικής Χημείας Σοφία Κουλοχέρη, Κώστα Κασιώτη, Νατάσα Μίχου και Μανώλη Μπούζα για τις πολύτιμες συμβουλές τους στην πορεία της διδακτορικής διατριβής.

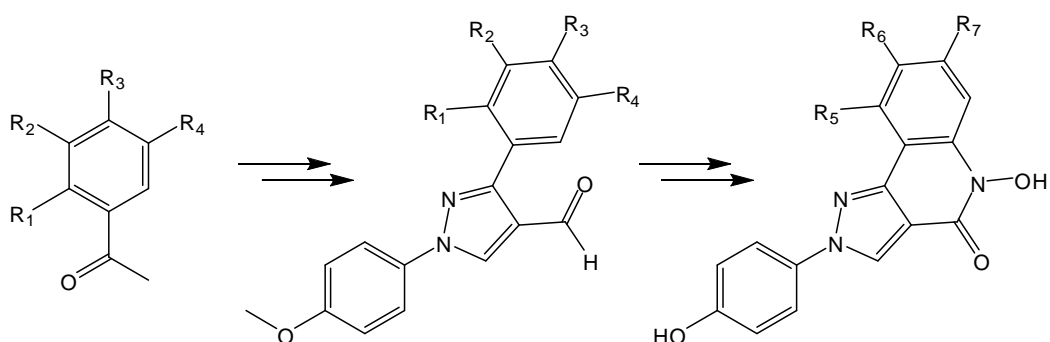
Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σπύρο και Μαριάνθη, τον αδερφό μου Νίκο, τη νονά και το νονό μου, το θείο μου Πάρι και την Ιωαννούλα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Δημήτρη, Γιάννη, Φώτη, Μίλτο, Γιώργο, Κώστα, Σοφία, Ντίνα, Έφη, Andrea, Martin, Francesco, Matt, Gabriella, Stella, Daniela, Stefania καθώς και τους φίλους που έκανα κατά τη διάρκεια της διατριβής στο εργαστήριο χημείας Άννα, Λίλα, Λευτέρη και Ειρήνη.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η μετάλλαξη ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό οφείλεται σε μία από τις έξι δυνητικές αλλαγές στη φυσιολογία του. Οι αλλαγές αυτές αναφέρονται στην: 1) αυτο-επάρκεια στα αυξητικά σήματα (self-sufficiency in growth signals), 2) απώλεια ευαισθησίας στα αντι-αυξητικά σήματα (insensitivity to antigrowth signals), 3) αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, απόπτωση, (evasion of programmed cell death, apoptosis), 4) απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής (limitless replicative potential), 5) διατήρηση της αγγειογένεσης (sustained angiogenesis) και 6) προσβολή του ιστού και μετάσταση (tissue invasion and metastasis).

Οι παραπάνω αλλαγές αποτελούν εν δυνάμει ερευνητικούς-κλινικούς στόχους για την καταπολέμηση του καρκίνου. Έτσι, στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η σύνθεση νέων:

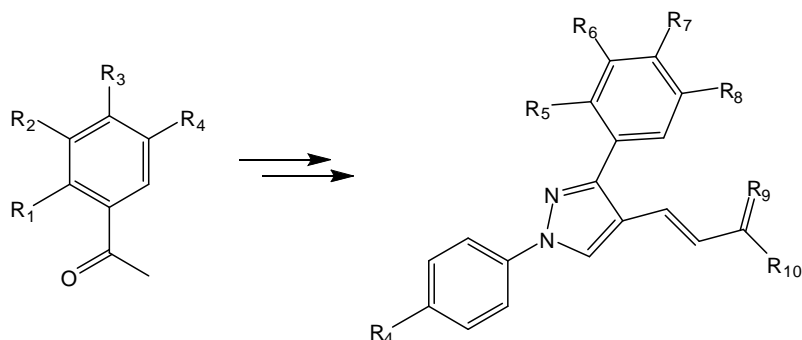
1. τριποκατεστημένων πυραζολικών παραγώγων, τα οποία με αντιδραστήριο PIFA μετατράπηκαν σε πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνες.



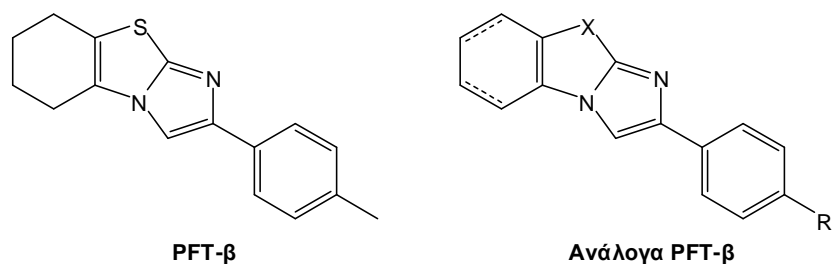
Τα μόρια αυτά βρέθηκε να διαθέτουν ισχυρή αντι-αγγειογενετική *in vivo* δράση και παράλληλα να αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού (MCF-7) και του αυχένα (Hela) *in vitro*.

2. παραγώγων του πυραζολίου, με φαινυλο υποκατάσταση στις θέσεις 1 και 3 του πυραζολικού δακτυλίου και ένα μεγάλο αριθμό λειτουργικών ομάδων στη θέση 4. Κρίσιμο στάδιο για τη σύνθεση των αναλόγων αυτών αποτέλεσε η κυκλοποίηση των πρόδρομων υδραζινών με τη χρήση των αντιδραστηρίων TCT/DMF, η οποία οδήγησε στο σχηματισμό του πυραζολικού σκελετού. Αρκετά από τα μόρια αυτά βρέθηκε να διαθέτουν ισχυρή δράση στις καρκινικές σειρές του προστάτη (DU-145), του

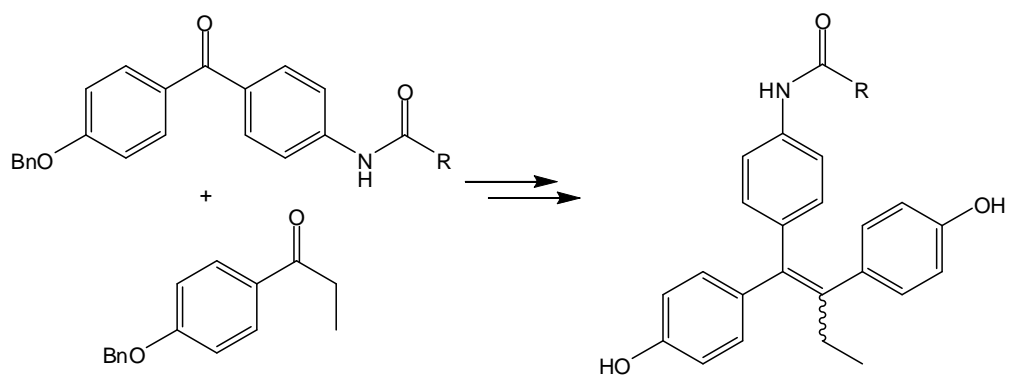
μελανώματος (A-2058) και του μαστού (MCF-7), ενώ ένα από αυτά είχε IC_{50} 10 μ M στην καρκινική σειρά του μαστού MCF-7.



3. ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολίων, ως ισχυρών αναστολέων της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *p53*, η οποία αποτελεί τον πλέον καθοριστικό παράγοντα για τη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η σύνθεση αναλόγων της PFT- β με την εισαγωγή ποικίλων λειτουργικών ομάδων στην παρα-θέση του σκελετού της. Επιπλέον, μελετήθηκε η αντικατάσταση του θείου με διαφορετικές αζο-ομάδες. Τα βιολογικά αποτελέσματα έδειξαν ότι τα μόρια αυτά διαθέτουν ιδιαίτερα ισχυρή ανασταλτική δράση κατά της καρκινική σειράς των ωοθηκών IGROV-1, η οποία έφτασε σε επίπεδα IC_{50} = 10 nM.



4. αναλόγων της ταμοξιφαίνης, ως εκλεκτικών τροποποιητών των οιστρογονικών υποδοχέων στον καρκίνο του μαστού που φέρουν αμιδικά ή ουρικά παράγωγα στην αλειφατική αλυσίδα. Η σύνθεση των μορίων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τη σύζευξη McMurry. Η *in vitro* αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα των επίμυων HC11 (mouse mammary epithelial cells) έδειξε ότι ανάλογα με την υποκατάστασή τους τα μόρια διαθέτουν ισχυρότατη οιστρογόνο ή αντιοιστρογόνο δράση.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	i
SUMMARY	iv

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Τα “μονοπάτια” του καρκίνου	1
1.1.1 Αυτο-επάρκεια στα αυξητικά σήματα	3
1.1.2 Απώλεια ευαισθησίας στα αντι-αυξητικά σήματα	6
1.1.3 Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)	8
1.1.4 Απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής	11
1.1.5 Διατήρηση της αγγειογένεσης	14
1.1.6 Προσβολή του ιστού και μετάσταση	19
1.2 Οιστρογόνα	22
1.2.1 Μηχανισμός δράσης του οιστρογονικού υποδοχέα	23
1.2.2 Οιστρογονικός υποδοχέας	24
1.2.3 Οιστρογονικός υποδοχέας και καρκίνος	26
1.2.3.1 Καρκίνος του μαστού	26
1.2.3.2 Καρκίνος των ωοθηκών	27
1.2.3.3 Καρκίνος του ενδομητρίου	27
1.2.3.4 Καρκίνος του παχέος εντέρου	28
1.2.3.5 Καρκίνος του προστάτη	28
Βιβλιογραφία	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Νέα παράγωγα του πυραζολίου: Σύνθεση και αποτίμηση της αντι-αγγειογενετικής τους δράσης

2.1 Εισαγωγή	33
2.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση	37

2.2.1	Σύνθεση	38
2.2.2	Βιολογική δράση	48
2.2.2.1	Αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων	48
2.2.2.2	Αναστολή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων	49
2.2.2.3	Αναστολή της αγγειογένεσης στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη των κοτόπουλων (CAM)	50
2.2.2.4	Αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων	52
2.2.3	Προοπτική	52
2.3	Πειραματικό Μέρος	53
2.4	Βιβλιογραφία	101

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Σύνθεση και *in vitro* βιολογική αποτίμηση νέων πυραζολικών παραγώγων ως πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων

3.1	Εισαγωγή	103
3.2	Αποτελέσματα – Συζήτηση	105
3.2.1	Σύνθεση ΟΗ-φαινυλο πυράζολο παραγώγων	105
3.2.2	Βιολογική δράση των ΟΗ-φαινυλο πυράζολο παραγώγων	110
3.2.3	Σύνθεση αναλόγων του εστέρα Π-10α	111
3.2.4	Αποτίμηση της βιολογικής δράσης των αναλόγων του εστέρα Π-10α	115
3.2.5	Προοπτική	116
3.3	Πειραματικό Μέρος	117
3.4	Βιβλιογραφία	153

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση νέων ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολο παραγώγων ως αναστολέων της πρωτεΐνης p53

4.1	Εισαγωγή	154
4.1.1	Μηχανισμοί προστασίας του κυττάρου μέσω της πρωτεΐνης p53	155
4.1.1.1	Προστασία του κυττάρου μέσω της απόπτωσης	155
4.1.1.2	Προστασία του κυττάρου μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου	156
4.1.1.3	Προστασία του κυττάρου μέσω της επιδιόρθωσης του DNA	157

4.1.2 Πρωτεΐνη p53 και αγγειογένεση	158
4.1.2.1 Αναστολή του μηχανισμού της υποξίας	158
4.1.2.2 Μειορύθμιση (downregulation) των προ-αγγειογενετικών παραγόντων	159
4.1.2.3 Αυξορύθμιση (upregulation) των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων	160
4.1.3 Γονίδιο p53 και καρκίνος	162
4.1.4 Αναστολείς της πρωτεΐνης p53	163
4.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση	164
4.2.1 Σύνθεση	165
4.2.2 Βιολογική δράση	171
4.3 Πειραματικό Μέρος	174
4.4 Βιβλιογραφία	203

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Σύνθεση νέων αναλόγων της ταμοξιφαΐνης και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

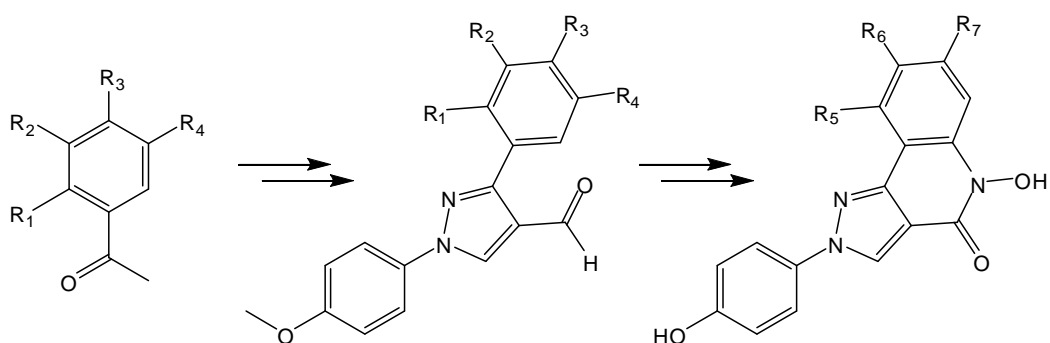
5.1 Εισαγωγή	207
5.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση	211
5.2.1 Εισαγωγή	211
5.2.2 Προκαταρτικές μελέτες	213
5.2.3 Σύνθεση	218
5.2.4 Βιολογική δράση	225
5.2.5 Προοπτική	226
5.3 Πειραματικό Μέρος	227
5.4 Βιβλιογραφία	278
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	279
ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	281

SUMMARY

The mutation of a physiological cell to cancer is a manifestation of one of the six essential alterations in cell physiology. These alterations are related to: 1) self-sufficiency in growth signals, 2) insensitivity to antigrowth signals, 3) evasion of programmed cell death (apoptosis), 4) limitless replicative potential, 5) sustained angiogenesis, and 6) tissue invasion and metastasis.

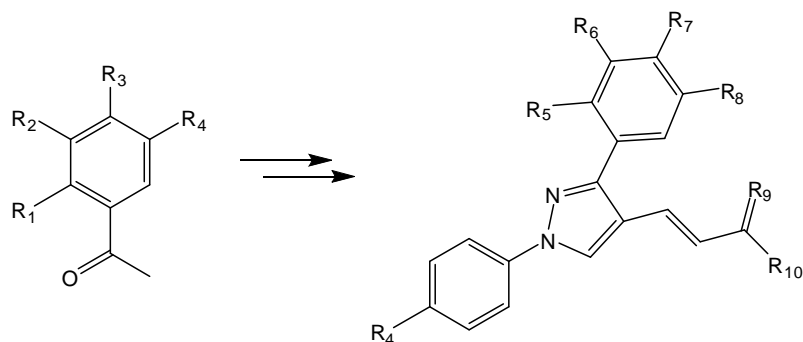
The above changes constitute research-clinical targets for the treatment of cancer. In this context, during the implementation of this thesis we have synthesized a series of novel:

1. trisubstituted pyrazole derivatives, which -via a PIFA mediated conversion- were transformed to fused pyrazolo[4,3-*c*]quinolines.

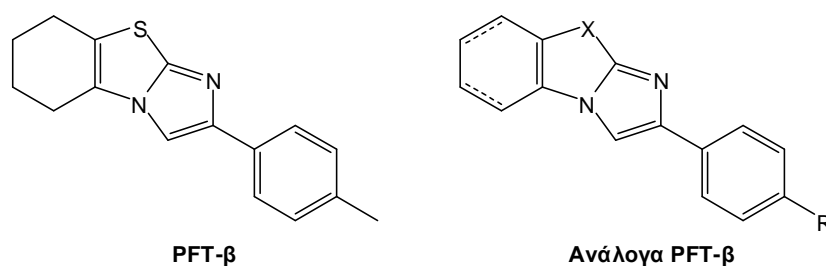


These molecules displayed potent anti-angiogenic *in vivo* activity and also inhibit the growth of human breast (MCF-7) and cervical (Hela) carcinoma cells *in vitro*.

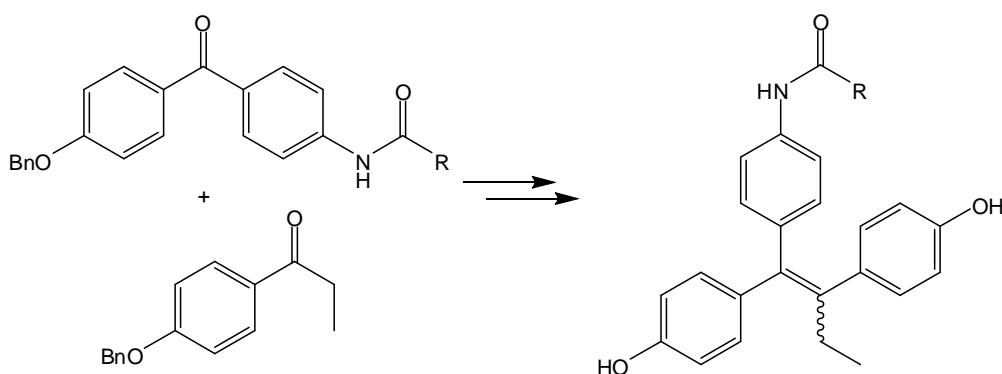
2. pyrazole derivatives bearing aryl substituted groups of positions 1 and 3 of the pyrazole motif and various functional groups of position 4. Critical step for their synthesis was the TCT/DMF promoted cyclization of the corresponding hydrazine precursors, which provided the desired pyrazole skeleton. Many of these molecules displayed potent activity against DU-145 (prostate), A-2058 (melanoma) and MCF-7 (breast cancer) cell lines, while one of them showed IC₅₀ 10 μM in MCF-7 breast cancer cell line.



3. imidazo[2,1-*b*]benzothiazole analogues as potent inhibitors of the mutant protein *p53*, which constitutes the most determinant factor for the regulation of angiogenesis. Specifically, was designed the synthesis of PFT- β analogues with the introduction of various functional groups on para-position of the PFT- β scaffold. Furthermore, was considered the substitution of sulfur atom with differently functionalized nitrogens. The biological results provided compounds with very good inhibition in IGROV-1 cells reaching the levels of $IC_{50} = 10$ nM.



4. tamoxifen analogues as selective estrogen receptor modulators in breast cancer containing amide or urea side chains. These molecules were synthesized via the McMurry coupling pathway. The *in vitro* biological results in mouse mammary epithelial cells HC11 showed that according to their substitution the compounds provided very strong estrogenic or anti-estrogenic activity.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

1.1 Τα “μονοπάτια” του καρκίνου

Η ραγδαία ανάπτυξη της έρευνας για τον καρκίνο έχει δημιουργήσει ένα πλούσιο και περίπλοκο ιστό γνώσης, που υποδεικνύει ότι ο καρκίνος είναι μία ομάδα ασθενειών, που προκαλεί δυναμικές αλλαγές στο γονιδίωμα. Οι παρατηρήσεις αυτές, θεμελιώθηκαν στην μελέτη των μεταλλάξεων, οι οποίες προκαλούν τη(ν): 1) δημιουργία ογκογονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη της νόσου ή/και 2) παραγωγή γονιδίων καταστολής, τα οποία όμως δεν είναι ικανά να εκτελέσουν το σκοπό τους. Οι δύο αυτές τάξεις των καρκινικών γονιδίων μελετήθηκαν είτε μέσω των μεταβολών τους σε ανθρώπινες και ζωικές καρκινικές σειρές ή στις, προερχόμενες από τις τάξεις αυτές, δημιουργίες καρκινικών φαινότυπων σε πειραματικά μοντέλα.¹

Πολλοί υποστηρίζουν ότι η πρόοδος στην αντιμετώπιση του καρκίνου θα ακολουθήσει την ίδια διαδρομή και για τα επόμενα 25 χρόνια, προσθέτοντας επιπλέον δεδομένα στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ωστόσο, υπάρχουν και αρκετοί που πιστεύουν ότι η έρευνα μπορεί να κωδικοποιηθεί -ανεξαρτήτως της πολυπλοκότητας που εμφανίζει στα εργαστήρια και τις κλινικές- σε ένα μικρό αριθμό όρων και αρχών, όπως για παράδειγμα στους κανόνες που αφορούν τη μετατροπή των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε κακοήγη.

Αρκετά στοιχεία πιστοποιούν ότι η δημιουργία όγκων στους ανθρώπους είναι μία πολυεπίπεδη διαδικασία κατά την οποία ποικίλες γενετικές μεταλλάξεις οδηγούν προοδευτικά στην μετατροπή των υγιών κυττάρων σε καρκινικά. Μελέτες σε καρκινικούς ιστούς έχουν αποκαλύψει τα ενδιάμεσα μονοπάτια, που οδηγούν στην προοδευτική μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων -μέσω μιας σειράς προκαρκινικών καταστάσεων- σε κακοήγη όγκους.² Οι παρατηρήσεις αυτές τεκμηριώθηκαν περαιτέρω από ένα πλήθος ευρημάτων, που έδειξαν ότι το γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων έχει τροποποιηθεί αμετάβλητα σε πολλαπλές περιοχές, ως

αποτέλεσμα διασπάσεων, που οφείλονται είτε σε ακαθόριστες βλάβες, είτε σε εμφανείς μεταλλάξεις ή ακόμα και σε αλλαγές στο χρωμόσωμα.³

Τα βήματα για την ανάπτυξη του καρκίνου είναι καθορισμένα τελεολογικά με βασικό σημείο ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν ακολουθούν τον ομαλό κύκλο του πολλαπλασιασμού και της ομοιόστασης των υγιών κυττάρων. Περισσότεροι από 100 ευδιάκριτοι τύποι καρκίνων και ογκιδίων είναι δυνατόν να αναπτυχθούν σε συγκεκριμένα όργανα, γεννώντας ένα πλήθος ερωτημάτων σχετικά με α) τον αριθμό των ευδιάκριτων ομαλών κύκλων που πρέπει να διακοπούν σε ένα φυσιολογικό κύτταρο για να μεταλλαχθεί σε καρκινικό, και β) την εμπλοκή των καρκινικών γονιδίων στην παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών, οι οποίες παράγονται από τα υγιή κύτταρα. Σε κάθε περίπτωση, ο απέραντος κατάλογος των καρκινικών γονιδιωμάτων μπορεί να συρρικνωθεί σε έναν κατάλογο, που περιλαμβάνει έξι δυνητικές αλλαγές στη φυσιολογία του κυττάρου, οι οποίες αθροιστικά είναι δυνατόν να οδηγήσουν στη δημιουργία όγκων (Εικόνα 1.1). Αναλυτικότερα, αυτές αφορούν:



Εικόνα 1.1. Οι έξι δυνητικές αλλαγές, που οδηγούν στη δημιουργία των καρκινικών κυττάρων.

- 1) Αυτο-επάρκεια στα αυξητικά σήματα (self-sufficiency in Growth Signals), 2) Απώλεια ευαισθησίας στα αντι-αυξητικά σήματα (Insensitivity to Antigrowth Signals), 3) Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (Evasion of programmed cell death, apoptosis), 4) Απεριόριστη δυνατότητα

αντιγραφής (limitless replicative potential), 5) Διατήρηση της αγγειογένεσης (sustained angiogenesis) και 6) Προσβολή του ιστού και μετάσταση (tissue invasion and metastasis).

1.1.1 Αυτο-επάρκεια στα αυξητικά σήματα

Τα υγιή κύτταρα πολλαπλασιάζονται με μιτογόνα σήματα αύξησης (Mitogenic Growth Signals, **GS**), τα οποία μεταφέρονται στο κύτταρο μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την πρόσδεση στους υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, εξωκυττάρων συστατικών και μορίων συγκόλλησης-αλληλεπίδρασης μεταξύ των κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων –σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα- δεν απαιτεί τη συμμετοχή όλων των διεγερτικών αυτών παραγόντων. Τα καρκινικά κύτταρα, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολλά από τα σήματα που είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό τους, με αποτέλεσμα να μειώνεται η εξάρτησή τους από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Αυτή η ανεξάρτηση από τα εξωτερικά ερεθίσματα διακόπτει ένα πολύ κρίσιμο σημείο στον ομοιοστατικό μηχανισμό, ο οποίος όταν λειτουργεί κανονικά διασφαλίζει την ομαλή συμπεριφορά των διαφόρων κυττάρων μέσα στον ιστό. Η επίκτητη αυτή αυτονομία ήταν ο πρώτος από τους 6 παράγοντες που αποσαφηνίστηκε από τους ερευνητές καθώς βρέθηκαν τα κυρίαρχα ογκογονίδια της ρύθμισής του. Τα τρία σημαντικότερα μοριακά μονοπάτια για την επίτευξη της αυτονομίας αυτής έχουν διαλευκανθεί και αφορούν διαφοροποιήσεις: 1) που προκαλούνται στα εξωκυττάρια σήματα που συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό, 2) στους διακυτταρικούς μεταγωγείς των σημάτων και 3) στους ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς που μεταφράζουν τα σήματα σε κυτταρική λειτουργία.

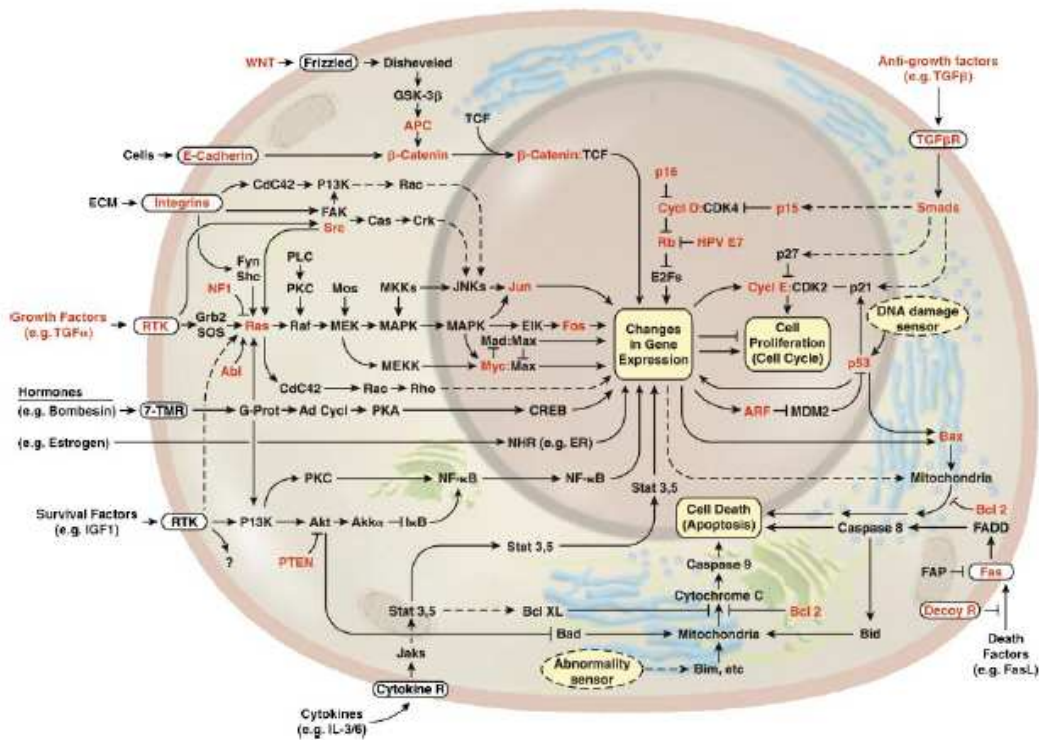
Στα υγιή κύτταρα περισσότεροι διαλυτοί μιτογόνοι αυξητικοί παράγοντες (**Growth Factors, GFs**) δημιουργούνται από ένα κύτταρο και διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό ενός άλλου, ενώ τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να συνθέτουν δικούς τους **GFs** δημιουργώντας έναν εσωτερικό κύκλο διέγερσης και πολλαπλασιασμού. Η παραγωγή, αυξητικών παραγόντων που προέρχονται από αιμοπετάλια (**Platelet-Derived Growth Factors, PDGFs**) και αυξητικών παραγόντων των όγκων α (**Tumor Growth Factors α , TGFs α**) από το γλοιοβλάστωμα και το σάρκωμα αντίστοιχα, αποτελούν δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα.⁴

Οι υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και μεταφέρουν τα σήματα για τον πολλαπλασιασμό στην ενδοκυτταρική πλευρά είναι από μόνοι τους στόχοι όταν το κύτταρο εισάγεται σε κατάσταση παθογένειας, ενώ σε πολλούς καρκίνους παρατηρείται η υπερέκφρασή τους. Η υπερέκφραση αυτή, πιθανότητα, οδηγεί σε υπερευαισθησία του κυττάρου στα συνήθη επίπεδα των **GFs**, που υπό κανονικές συνθήκες δεν θα προκαλούσαν τον πολλαπλασιασμό του.⁴ Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι στους καρκίνους του στομάχου, του μυελού και του μαστού, αυξάνεται ο αριθμός των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (**Epidermal Growth Factor, EGF**), ενώ στο καρκίνωμα του στομάχου και του μαστού αυξάνεται ο αριθμός των υποδοχέων του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (**Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2**).^{5,6} Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση των **GFs** υποδοχέων μπορεί να προκαλέσει την ανεξάρτητη από τον προσδέτη κυτταρική σηματοδότηση,⁷ η οποία μπορεί να προκληθεί ακόμα και από δομικές διαφοροποιήσεις των υποδοχέων.⁴

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αλλάξουν τον τύπο των εξωτερικών υποδοχέων (ιντεγκρίνες) που εκφράζουν, με περισσότερο ευνοούμενους αυτούς που μεταφέρουν προ-πολλαπλασιαστικούς παράγοντες.^{8,9} Οι ετεροδιμερείς αυτοί υποδοχείς (α και β) συνδέουν τα κύτταρα με εξωκυτταρικές υπερκατασκευές, οι οποίες είναι γνωστές ως εξωκυτταρική μήτρα. Η επιτυχής πρόσδεση σε συγκεκριμένες περιοχές της εξωκυτταρικής μήτρας δίνει τη δυνατότητα στους υποδοχείς της ιντεγκρίνης να επάγουν σήματα στο κυτταρόπλασμα, τα οποία επηρεάζουν τη συμπεριφορά του κυττάρου, οδηγώντας το κύτταρο σε αυξημένη κινητικότητα, αντίσταση στην απόπτωση και είσοδο στην ενεργή φάση πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Αντίστροφα, η αποτυχία των ιντεγκρινών να συνδεθούν με τους εξωκυτταρικούς συνδέσμους, μειώνουν την κινητικότητα του κυττάρου, προκαλώντας απόπτωση που οδηγεί στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου.⁹ Τόσο οι **GFs** υποδοχείς όσο και οι προ-αυξητικές ιντεγκρίνες που εμπλέκονται με τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας μπορούν να ενεργοποιήσουν το SOS-Ras-Raf-MAPK μονοπάτι (Εικόνα 1.2).⁹

Οι πλέον πολύπλοκοι μηχανισμοί επίκτητης αυτονομίας σε **GS**, προκύπτουν από τις διαφοροποιήσεις των συστατικών του κυτταροπλασματικού κύκλου, ο οποίος λαμβάνει και επεξεργάζεται σήματα, που εκπέμπονται από ιντεγκρίνες και υποδοχείς **GFs**. Στο σημείο αυτό, το διαδοχικό σύστημα SOS-Ras-Raf-MAPK κατέχει τον κεντρικό ρόλο, αφού στο 25% των ανθρώπινων όγκων οι πρωτεΐνες Ras οδηγούν στην

απελευθέρωση των μιτογονικών σημάτων, χωρίς ωστόσο να προκαλείται η προοδευτική διέγερση των αντίστοιχων αναστολέων τους.¹⁰ Έτσι είναι δυνατόν να συναχθεί ότι σε όλους τους τύπους ανθρώπινων όγκων τα **GS** μονοπάτια απορυθμίζονται. Η υπόθεση αυτή είναι πολύ δύσκολο να αποδεχθεί πλήρως, όμως τα στοιχεία που ήδη υπάρχουν είναι άφθονα και στο μέλλον θα οδηγήσουν στην ολοκλήρωση της απόδειξης αυτής.¹¹ Είναι χαρακτηριστικό ότι στον καρκίνο του παχέος εντέρου (ένας από τους πλέον μελετημένους καρκίνους), οι μισοί καρκινικοί όγκοι περιέχουν μεταλλαγμένα Ras ογκογονίδια.³ Στους υπόλοιπους, πιστεύεται ότι οι καρκινικοί όγκοι μεταφέρουν ατελή σήματα στα υπόλοιπα συστατικά των **GS** μονοπατιών, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του Ras ογκογονιδίου μέσω της φαινοτυπικής μίμησης. Η φύση των διαφοροποιήσεων αυτών απομένει να διευκρινιστεί.



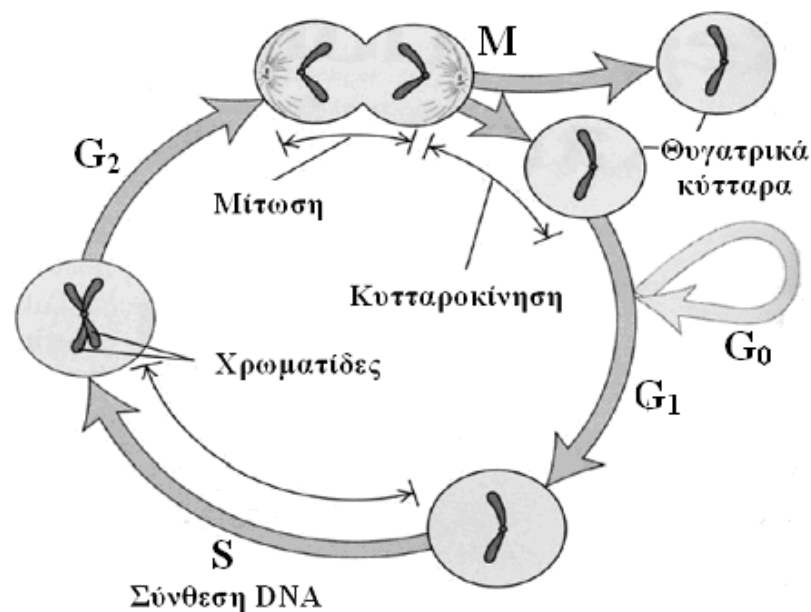
Εικόνα 1.2. Το “κύκλωμα” του κυττάρου.

Μετά από ενδελεχείς μελέτες 20 χρόνων, το διάγραμμα των **GS** μονοπατιών των θηλαστικών κυττάρων έχει διαλευκανθεί (Εικόνα 1.2), ενώ νέα μονοπάτια, που ξεκινούν ακτινωτά από το κεντρικό μιτογονικό διαδοχικό σύστημα SOS-Ras-Raf-MAPK έχουν περιγραφεί με σχετική ακρίβεια.^{11,12} Το σύστημα αυτό είναι επίσης συνδεδεμένο με ένα πλήθος διασταυρούμενων μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν τη

λειτουργία εξωκυτταρικών σημάτων και επακόλουθα ένα μεγάλο πλήθος από τις βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Για παράδειγμα, η απευθείας αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Ras με την P13 κινάση ενεργοποιούν σήματα επιβίωσης μέσα στο κύτταρο.¹³

1.1.2 Απώλεια ευαισθησίας στα αντι-αυξητικά σήματα

Σε ένα φυσιολογικό ιστό, τα πολλαπλά αντι-αυξητικά σήματα λειτουργούν προς την κατεύθυνση της διατήρησης της ηρεμίας του κυττάρου και της ομοιοστάσης του ιστού. Τα σήματα αυτά εμπεριέχουν αφενός ενεργούς αυξητικούς αναστολείς και αφετέρου ακινητοποιημένους αναστολείς, οι οποίοι βρίσκονται είτε στην εξωκυτταρική μήτρα ή/και στην επιφάνεια των γειτονικών κυττάρων. Τα αντι-αυξητικά σήματα, λαμβάνονται μέσω των διαμεμβρανικών υποδοχέων, που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου και συνδέονται με τους αντίστοιχους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς. Η ικανότητα των σημάτων αυτών να μπλοκάρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μπορεί να προκληθεί μέσω δύο διακριτών μηχανισμών, οι οποίοι: 1) οδηγούν τα κύτταρα εκτός του ενεργού κύκλου πολλαπλασιασμού στην κατάσταση ηρεμίας G_0 (Εικόνα 1.3), από την οποία μπορούν



Εικόνα 1.3. Κυτταρικός κύκλος.

να επαναδραστηριοποιηθούν όταν το επιτρέψουν τα κατάλληλα εξωκυτταρικά σήματα και 2) καθοδηγούν τα κύτταρα σε μόνιμη εγκατάλειψη της πολλαπλασιαστική τους ικανότητας, μπαίνοντας σε μετα-μιτωτικές καταστάσεις.

Επιπλέον, τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν το εξωκυτταρικό περιβάλλον τους –και τα εξωκυτταρικά σήματα- αποφασίζοντας πότε πρέπει να πολλαπλασιαστούν, πότε να επέλθουν σε κατάσταση ηρεμίας και πότε να περάσουν σε μετα-μιτωτικές καταστάσεις. Σε μοριακό επίπεδο, πιθανότατα όλα τα αντι-πολλαπλασιαστικά σήματα λειτουργούν μέσω της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (**pRb**) και των δύο συγγενών της **p107** και **p130**. Η **pRb** ασκεί τις περισσότερες λειτουργίες της σε ένα καθορισμένο χρονικό όριο, το οποίο βρίσκεται στα 2/3 της πρώτης φάσης του κυτταρικού κύκλου. Είναι το χρονικό όριο κατά το οποίο τα κύτταρα αποφασίζουν εάν θα πολλαπλασιαστούν ή θα παραμείνουν σε ηρεμία.

Όταν η **pRb** βρίσκεται σε κατάσταση προ-φωσφορυλίωσης ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σταματά μέσω της απομόνωσης και της διαφοροποίησης της λειτουργίας των **E2F** μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη μετάβαση από τη φάση G_1 στην S .¹⁴ Οι **E2F** είναι μία ομάδα τουλάχιστον πέντε διακριτών και συγγενών μεταγραφικών παραγόντων, που βρίσκονται στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων TTTVGC GC. Από τους πέντε αυτούς παράγοντες οι **E2F-1**, **E2F-2** και **E2F-3** βρίσκονται στον απευθείας έλεγχο της **pRb**, ενώ οι **E2F-4** και **E2F-5** είναι υπό τον έλεγχο των **p107** και **p130**.

Ο παράγοντας που βοηθά να μην παρακάμπτεται η λειτουργία της **pRb** είναι ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β (**Transforming Growth Factor β , TGF β**). Οι μηχανισμοί, μέσω των οποίων λειτουργεί ο **TGF β** , εμφανίζονται κυρίως στη φάση G_1 του κυτταρικού κύκλου. Σε κάποιους κυτταρικούς κύκλους, ο **TGF β** καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου *c-myc* που ρυθμίζει τη λειτουργία της G_1 φάσης του κυτταρικού κύκλου, με ένα μηχανισμό που παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος.¹⁵ Έτσι, η διακοπή της G_1 φάσης του κυτταρικού κύκλου από τον **TGF β** σχετίζεται με τη μείωση της δράσης του συμπλόκου κυκλίνη-Cdk (cyclin-Cyclin dependent kinase),¹⁶ το οποίο είναι υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση της **pRb** και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών αναστολέων $p21^{WAF1/Cip1}$, $p15^{INK4B}$ και $p27^{KIP1}$ του συμπλόκου κυκλίνη-Cdk.¹⁷

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να διακόπτουν τη λειτουργία της **pRb**, όπως αυτή ρυθμίζεται από τον **TGF β** , σε ένα μεγάλο αριθμό καρκινικών όγκων.

Σε ορισμένους από αυτούς, η δυσλειτουργία του **TGFβ** οφείλεται στην απορρύθμιση της λειτουργίας των αντίστοιχων υποδοχέων, ενώ σε άλλους παρατηρείται η μετάλλαξη των υποδοχέων αυτών.^{18,19} Παράλληλα, η λειτουργία της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης Smad4, η οποία μεταδίδει σήματα από τους **TGFβ** υποδοχείς στους αντίστοιχους ενδοκυτταρικούς στόχους, είναι δυνατόν να εξαλειφθεί είτε μέσω των μεταλλάξεων του γονιδίου που την εκφράζει²⁰ ή της διαγραφής του σημείου στο οποίο κωδικοποιείται η πρωτεΐνη p15^{INK4B}.²¹ Εναλλακτικά, ο αμέσως επόμενος στόχος είναι η κινάση Cdk4 στην αλληλουχία **TGFβ-p15^{INK4B}-Cdk4-pRb**, η οποία υπόκειται στην ανασταλτική δράση της πρωτεΐνης p15^{INK4B} εξαιτίας μεταλλάξεων, που δημιουργούνται από αντικαταστάσεις αμινοξέων στην περιοχή αλληλεπίδρασής της με τον αναστολέα p15^{INK4B}.²² Τέλος, ο τελευταίος στόχος είναι η λειτουργική πρωτεΐνη **pRb**, η οποία απενεργοποιείται μέσω των μεταλλάξεων του γονιδίου, που την εκφράζει.

Αν και τα συστατικά και οι αλληλοσυνδέσεις μεταξύ των πολυπληθών αντι-αυξητικών σημάτων και του κεντρικού μηχανισμού του κυτταρικού κύκλου δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, η ύπαρξη ενός λεπτομερούς κυκλώματος σηματοδότησης είναι ξεκάθαρη (Εικόνα 1.2), όπως επίσης και η αναγκαιότητα των καρκινικών κυττάρων να παρακάμπτουν το κύκλωμα αυτό προκειμένου να πολλαπλασιαστούν.

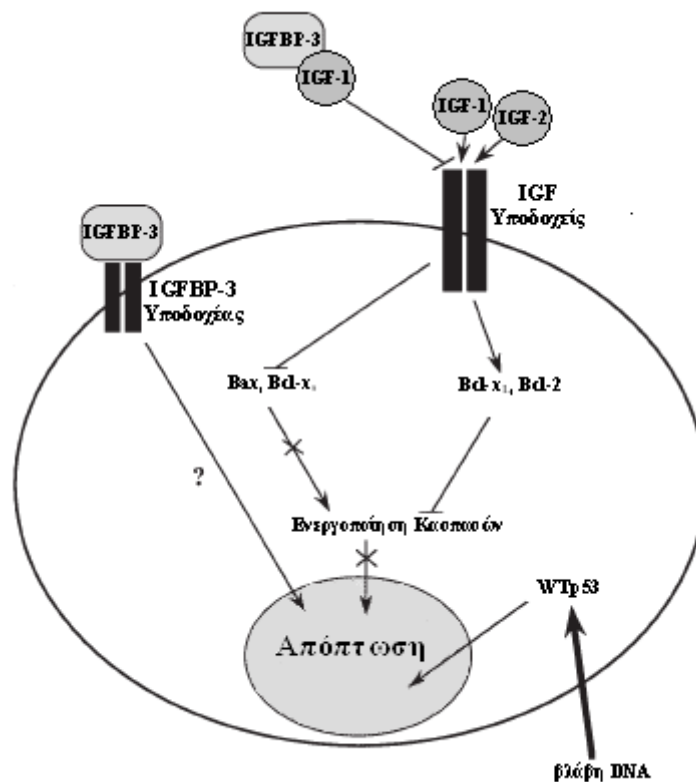
1.1.3 Αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση)

Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να αυξάνονται δεν καθορίζεται μόνο από το βαθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αλλά και από το βαθμό της καταστροφής τους. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ο μηχανισμός της καταστροφής αυτής. Σχετικά ευρήματα σε πειράματα με επίμυες, σε κυτταρικές σειρές και σε βιοψίες σε ανθρώπινους καρκίνους, δείχνει ότι η επίκτητη αντίσταση στην απόπτωση αποτελεί ένα ιδιαίτερο κοινό χαρακτηριστικό όλων των καρκινικών τύπων.

Το αποπτωτικό πρόγραμμα ενυπάρχει -σε μία λανθάνουσα μορφή- σε όλα τα είδη των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Όταν διεγερθεί –ως αποτέλεσμα ενός πλήθους φυσιολογικών σημάτων- το αποπτωτικό πρόγραμμα ξεδιπλώνεται ως μια ακριβής χορογραφία αποτελούμενη από συνεχόμενα βήματα. Αναλυτικότερα, οι κυτταρικές μεμβράνες διασπώνται, ο κυτταροπλασματικός και πυρηνικός σκελετός καταστρέφεται, το διαλυτό κυτταρόπλασμα εκχέεται εκτός του κυττάρου, τα

χρωμοσώματα αποικοδομούνται και ο πυρήνας τεμαχίζεται σε μία χρονική περίοδο 30-120 λεπτών. Τελικά, το κατεστραμμένο κύτταρο εγκολώνεται από γειτονικά κύτταρα και εξαφανίζεται σε διάστημα 24 ωρών.²³

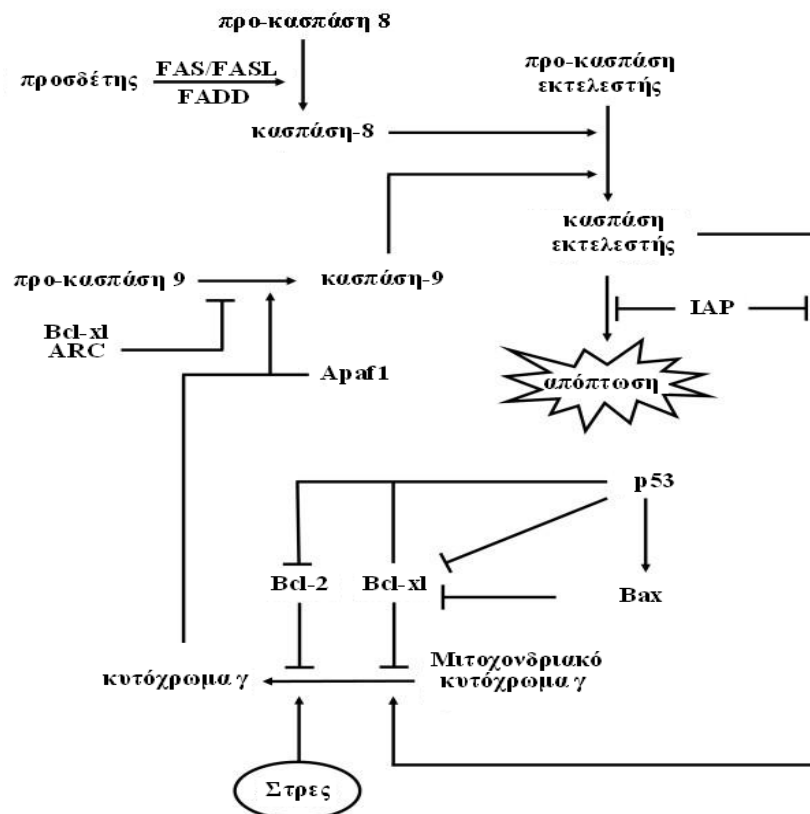
Η απόπτωση μπορεί γενικά να χωριστεί σε δύο κατηγορίες ελεγκτικών μηχανισμών, σε : 1) αισθητήρες και 2) τελεστές. Οι αισθητήρες είναι υπεύθυνοι για τον έλεγχο του εξωκυτταρικού και ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε αντικανονικές καταστάσεις, οι οποίες ανάλογα με την επικινδυνότητά τους υπαγορεύουν στο κύτταρο αν πρέπει να συνεχίσει τη λειτουργία του ή να καταστραφεί. Τα σήματα που προκύπτουν από τους αισθητήρες, ενεργοποιούν τη δεύτερη κατηγορία, τους τελεστές, οι οποίοι λειτουργούν ως αποπτωτικοί μηχανισμοί. Στους αισθητήρες του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, περιλαμβάνονται οι υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων και συνδέονται με παράγοντες επιβίωσης ή θανάτου. Χαρακτηριστικό αισθητήρα αποτελεί ένας αυξητικός παράγοντας που είναι όμοιος με την ινσουλίνη (**I**nsulin-like **G**rowth **F**actor, **IGF**) και είναι ένα μιτογόνο πεπτίδιο με δομικές μονάδες όμοιες με αυτές της ινσουλίνης. Ο **IGF** αποτελείται από δύο ομόλογες υπομονάδες -τις **IGF-1** και **IGF-2**- οι οποίες μπορούν να συντονίσουν τόσο θετικούς (**Bax**, **Bcl-x_S**) όσο και αρνητικούς (**Bcl-x_L**, **Bcl-2**) ρυθμιστές μπλοκάροντας την αποπτωτική οδό (Εικόνα 1.4).²⁴



Εικόνα 1.4. Ο παράγοντας **IGF** που εμποδίζει την απόπτωση.

Αντίθετα, παραδείγματα, που οδηγούν στο θάνατο του κυττάρου είναι τα ζεύγη FAS/FAS(υποδοχέας) και TNF α /TNF-R $_1$ (υποδοχέας), από τους οποίους οι FAS αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών που είναι δομικά ομόλογη με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων **TNF** (Tumor Necrosis Factor). Τα δύο αυτά ζεύγη διεγείρουν τα συστήματα των κασπασών οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση.²⁵ Οι αισθητήρες που είναι υπεύθυνοι για το ενδοκυτταρικό περιβάλλον, ελέγχουν για την ύπαρξη κατεστραμμένου DNA, για την αστάθεια σημάτων που προκαλείται από τη δράση των ογκογονιδίων, για την ανεπάρκεια στους παράγοντες επιβίωσης ή για καταστάσεις υποξίας. Όταν εντοπίσουν οποιαδήποτε ανωμαλία ενεργοποιούν το μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου.²⁶

Οι παράγοντες που προκαλούν απόπτωση είναι μια σειρά ενδοκυτταρικών πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες.²⁷ Συγκεκριμένα, οι κασπάσες 8 και 9 ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς θανάτου, όπως ο FAS ή το κυτόχρωμα γ (απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια). Οι κύριες αυτές κασπάσες ενεργοποιούν τουλάχιστον άλλες δώδεκα, οι οποίες εκτελούν το κυτταρικό πρόγραμμα θανάτου καταστρέφοντας είτε τις υποκυτταρικές δομές (π.χ. μιτοχόνδριο) ή το ίδιο το γονιδίωμα (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5. Ο μηχανισμός δράσης των κασπασών 8 και 9 που οδηγεί στην απόπτωση του κυττάρου.

Η αντίσταση στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω πολλών και διαφορετικών οδών. Σίγουρα ο πλέον γνωστός είναι η απώλεια των προ-αποπτωτικών παραγόντων μέσω μεταλλάξεων και κυρίως αυτής του γονιδίου *p53*. Η επακόλουθη αδρανοποίηση της πρωτεΐνης *p53* έχει παρατηρηθεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των ανθρώπινων καρκίνων, οδηγώντας στην απώλεια του κύριου αισθητήρα για την αναγνώριση του κατεστραμμένου DNA. Ως αποτέλεσμα το κύτταρο δεν είναι σε θέση να εισέλθει στην έναρξη του αποπτωτικού του προγράμματος.²⁸ Επιπρόσθετα, το μονοπάτι της κινάσης P13-AKT/PKB που μεταφέρει αντι-αποπτωτικά σήματα, συμμετέχει συχνά στην μείωση της απόπτωσης σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων καρκίνων. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού μπορεί να προκληθεί είτε από εξωκυτταρικούς παράγοντες όπως οι **IGF-1** και **IGF-2**²⁶ είτε από ενδοκυτταρικά σήματα προερχόμενα από την πρωτεΐνη Ras,¹³ είτε από την απώλεια του καταστολέως των όγκων pTEN.²⁹ Πρόσφατα ανακαλύφθηκε και ένας μηχανισμός που ακυρώνει την απόπτωση μέσω του FAS μηχανισμού σε ένα μεγάλο μέρος καρκινικών σειρών του πνευμόνα και του παχέος εντέρου. Σύμφωνα με αυτόν η ύπαρξη ενός ψεύτικου προσδέτη για τον υποδοχέα FAS, οδηγεί το κύτταρο σε λανθασμένη ανάγνωση του κυτταρικού σήματος για έναρξη της απόπτωσης.³⁰

Ο αποπτωτικός μηχανισμός που παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2 δεν έχει πλήρως αποδειχθεί, όμως τα στοιχεία εμφανίζουν ότι τα περισσότερα συστατικά που τον ρυθμίζουν και τον επηρεάζουν εμφανίζονται σε μειωμένη λειτουργική μορφή. Στο πλαίσιο αυτό η στόχευση των καινούργιων αντικαρκινικών φαρμάκων αποσκοπεί στην επαναδραστηριοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών των καρκινικών όγκων και στην επαναφορά των αποπτωτικών αμυντικών μηχανισμών.

1.1.4 Απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής

Οι επίκτητες ιδιότητες που περιγράφηκαν στις παραγράφους **1.1.1 – 1.1.3** οδηγούν στην απομόνωση του προγράμματος ανάπτυξης του κυττάρου από τα σήματα του περιβάλλοντος του. Σε κάθε περίπτωση η απορρύθμιση στο μηχανισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είναι επαρκής για τη δημιουργία πολυπληθών κυτταρικών πληθυσμών που συγκροτούν τους μακροσκοπικούς όγκους. Σχετικά ερευνητικά αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η επίκτητη διαταραχή στη σηματοδότηση

μεταξύ κυττάρων δεν εξασφαλίζει από μόνη της την ανάπτυξη ενός εκτεταμένου όγκου. Κύρια αιτία του φαινομένου αποτελεί η ύπαρξη στο εσωτερικό των περισσότερων κυττάρων των θηλαστικών ενός αυτόνομου προγράμματος που θέτει όρια στον πολλαπλασιασμό τους. Το πρόγραμμα αυτό λειτουργεί ανεξάρτητα από τη σηματοδότηση μεταξύ των κυττάρων και θα πρέπει να διαταραχθεί σε πάρα πολύ μεγάλο βαθμό έτσι ώστε ένα κλώνος από κύτταρα να μεγαλώσει σε τέτοιο βαθμό, ώστε να αποτελέσει ένα μακροσκοπικό -και επικίνδυνο για τη ζωή- όγκο.

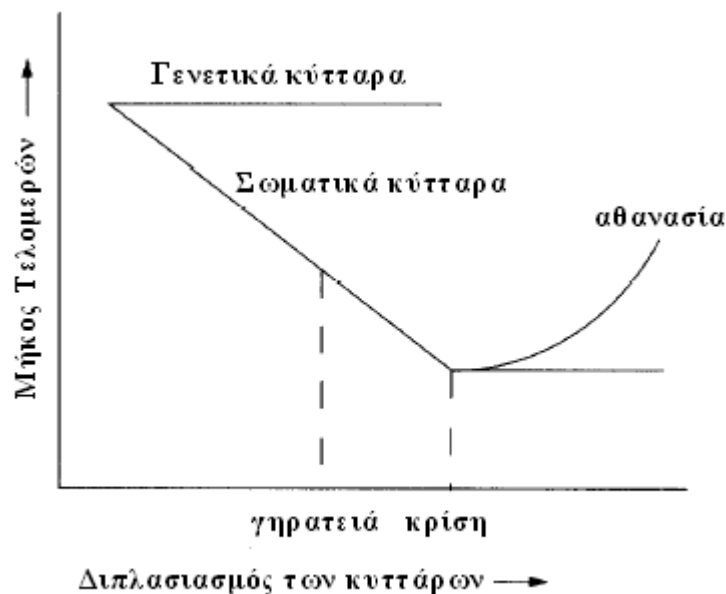
Ποικίλα ερευνητικά αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η ικανότητα αντιγραφής των κυττάρων είναι πεπερασμένη. Όταν ένας κυτταρικός πληθυσμός ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο αριθμό διπλασιασμών, τότε σταματάει να αυξάνεται. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται γήρανση. Η γήρανση στους ανθρώπινους ινοβλάστες μπορεί να παρακαμφθεί με την απενεργοποίηση των πρωτεϊνών **pRb** και **p53**, η οποία επιτρέπει των περαιτέρω πολλαπλασιασμό τους έως ότου εισέλθουν σε μία δεύτερη κατάσταση, η οποία ονομάζεται κρίση. Στην κατάσταση κρίσης παρατηρείται είτε ο μαζικός θάνατος των κυττάρων ή αταξία στο πυρήνα που οδηγεί στην καταστροφή των χρωμοσωμάτων και την τυχαία εμφάνιση ενός παρεκκλίνοντος κυττάρου (1 στα 10^7), το οποίο αποκτά την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται ανεξέλικτα. Η τελευταία κατάσταση καλείται αθανασία.³¹

Οι περισσότεροι τύποι καρκινικών κυττάρων που πολλαπλασιάζονται, είναι σε κατάσταση αθανασίας, υποδεικνύοντας ότι η απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής είναι ένας φαινότυπος που αποκτάται *in vivo* κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του όγκου και είναι θεμελιώδης για τη ανάπτυξή τους σε θανάσιμους καρκινικούς όγκους. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι σε κάποιο σημείο -κατά τη πολυεπίπεδη διαδικασία που απαιτείται για το σχηματισμό ενός όγκου- οι προκαρκινικοί πληθυσμοί εξαντλούν την ικανότητά τους να διπλασιάζονται και συμπληρώνουν την καρκινική τους διαδικασία υπερπηδώντας το φράγμα της θνησιμότητας αποκτώντας απεριόριστη δυνατότητα αντιγραφής.

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται έχει ήδη διευκρινιστεί πριν δύο δεκαετίες. Τα τελομερή, τα οποία βρίσκονται στο τελευταίο κομμάτι των χρωμοσωμάτων, κάθε φορά που διπλασιάζονται μικραίνουν κατά 6 ζεύγη βάσεων. Έτσι, μέχρι το τέλος εκάστου κύκλου ζωής των κυττάρων -που αντιστοιχεί σε 60 έως 70 διπλασιασμούς- παρατηρείται η απώλεια τουλάχιστον 50 έως 100 ζευγών βάσεων τελομερικού DNA (στο τέλος κάθε χρωμοσώματος). Η προοδευτική αυτή μείωση οφείλεται, στην αδυναμία των DNA πολυμερασών να

ολοκληρώσουν την αντιγραφή στο 3' τέλος του χρωμοσωμικού DNA κατά τη διάρκεια εκάστης S φάσης. Ως αποτέλεσμα τα τελομερή χάνουν τη δυνατότητά τους να προστατεύουν την απόληξη του χρωμοσωμικού DNA, οδηγώντας το κύτταρο σε σύντηξη των χρωμοσωμάτων και αναπόφευκτα στον επικείμενο θάνατό τους.³²

Η ύπαρξη του ενζύμου τελομεράση -υπεύθυνο για τη σύνθεση του τελομερικού DNA- είναι εμφανής σε όλους τους τύπους των ανθρώπινων καρκινικών όγκων.³³ Η δε υπερέκφρασή της, η οποία εμφανίζεται στο 85-90% των καρκινικών κυττάρων, έχει ως αποτέλεσμα την προσθήκη των 6 ζευγών βάσεων, τα οποία υπό κανονικές συνθήκες παραλείπονται και τα οδηγούν στην αθανασία (Εικόνα 1.6).³⁴ Το υπόλοιπο 10 με 15% των καρκινικών κυττάρων ενεργοποιεί ένα διαφορετικό μηχανισμό επιμήκυνσης των τελομερών, σύμφωνα με τον οποίο η διατήρηση του μήκους οφείλεται στην επαναδιάταξη των βάσεων της αλληλουχίας, η οποία είναι υπεύθυνη για την έκφραση των τελομερών μέσα στο χρωμόσωμα.³⁵



Εικόνα 1.6. Η υπερέκφραση της τελομεράσης οδηγεί το κύτταρο στην αθανασία.

Πειραματικά στοιχεία που υπογραμμίζουν τη σπουδαιότητα της διατήρησης της τελομεράσης στα καρκινικά κύτταρα προέρχονται από μελέτες σε είδη επίμυων, οι οποίοι αντί της τελομεράσης έχουν τον ομοζυγωτικό αναστολέα p16^{INK4A} του κυτταρικού κύκλου. Αυτοί παρουσιάζουν έντονη προδιάθεση για ανάπτυξη καρκίνων, ιδιαίτερα όταν εκτίθενται σε καρκινογόνους παράγοντες, με αποτέλεσμα οι καρκίνοι τους να εμφανίζουν συγκριτικά αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης. Αντίθετα,

οι επίμυες με έλλειψη του αναστολέα p16^{INK4A} και της τελομεράσης εμφανίζουν μικρότερη πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνων και όσοι καρκινικοί όγκοι δημιουργηθούν παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα της τελομεράσης.³⁶ Τέλος, πειράματα σε ενδοδερμικά κύτταρα που έπρεπε να εισέλθουν στο στάδιο της κρίσης, έδειξαν ότι αυτά συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται όταν τροφοδοτηθούν με τελομεράση.³⁷

Παρότι η διατήρηση των τελομερών αποτελεί τη κύρια προϋπόθεση για την απεριόριστη αντιγραφή, ο μηχανισμός της παράκαμψης της κυτταρικής γήρανσης παραμένει αδιευκρίνιστος. Αρχικά, η γήρανση των κυττάρων αποδόθηκε στην καθυστερημένη αντίδραση των αρχικών κυττάρων να φτάσουν στην κατάσταση του πολλαπλασιασμού με αποτέλεσμα να σχετιστεί με τους μηχανισμούς διαίρεσης του κυττάρου. Νεότερα ευρήματα σε συγκεκριμένες σειρές κυττάρων έδειξαν ότι η κατάσταση της γήρανσης οφείλεται στην υψηλή έκφραση γονιδίων, όπως το ογκογονίδιο Ras.³⁸ Έτσι, η γήρανση των κυττάρων είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός, ο οποίος ενεργοποιείται από την ελάττωση του μήκους των τελομερών και οδηγεί αμετάκλητα τα ανώμαλα κύτταρα στη G₀ φάση του κυτταρικού κύκλου, καθιστώντας τα ανίκανα να πολλαπλασιαστούν.

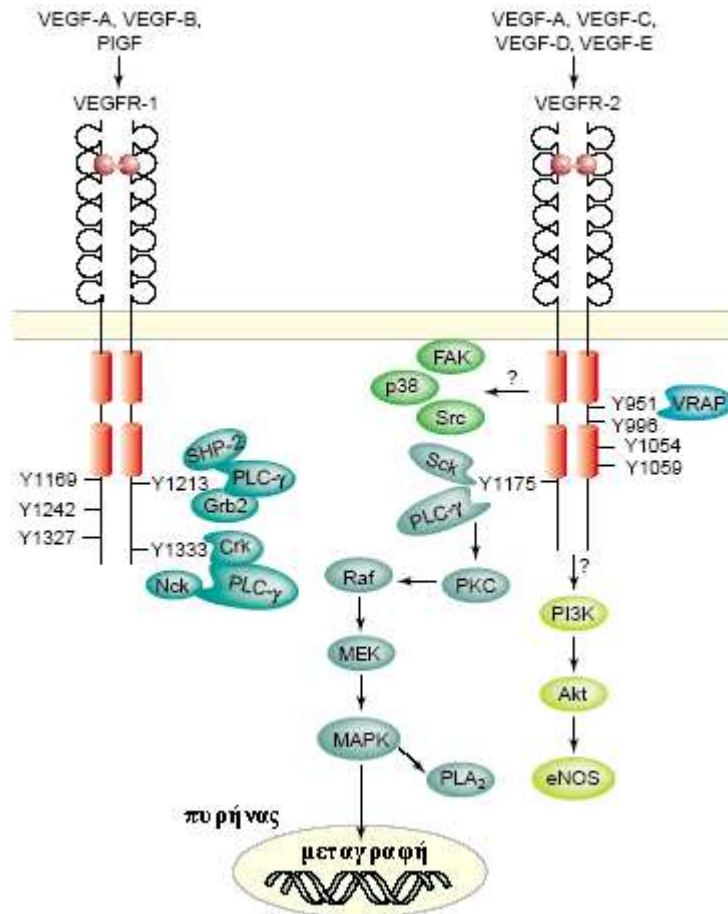
Συμπερασματικά, η *in vivo* παράκαμψη της γήρανσης είναι ένα σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη των όγκων, κυρίως επειδή συμμετέχει στην εν συνεχεία υπερπήδηση του φράγματος της κρίσης. Η διαλεύκανση της πολυπλοκότητας που εμφανίζει η γήρανση είναι σημαντική για να διευκρινιστεί η εξίσωση της ανεξέλικτης αντιγραφής.

1.1.5 Διατήρηση της αγγειογένεσης

Το οξυγόνο καθώς και τα θρεπτικά συστατικά, αποτελούν τον κρισιμότερο παράγοντα της λειτουργίας και επιβίωσης του κυττάρου. Παρέχονται μέσω της αγγείωσης του οργάνου, υποχρεώνοντας ουσιαστικά κάθε κύτταρο να είναι συνδεδεμένο με έναν ιστό μέσω ενός τριχοειδούς αγγείου αίματος διαμέτρου 100μm. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία σχηματισμού ενός ιστού, η ανάπτυξη νέων αγγείων -διαδικασία που καλείται αγγειογένεση- απενεργοποιείται. Λαμβάνει δε χώρα μόνο κατά την διάρκεια της έμμηνου ρήσης των γυναικών, στον πλακούντα (κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης) και κατά τη διαδικασία της επούλωσης μετά από τραυματισμό. Είναι φανερό ότι στα φυσιολογικά κύτταρα ο μηχανισμός της

αγγειογένεσης ρυθμίζεται αυστηρά από το κύτταρο και λειτουργεί μόνο για σύντομες περιόδους (μετά αναστέλλεται πλήρως).³⁹ Αντίθετα, για να πολλαπλασιαστούν τα παθολόγια κύτταρα θα πρέπει να αναπτύξουν αγγειογενετική ικανότητα,⁴⁰ η οποία έχει αποδειχθεί ότι λαμβάνει χώρα μέσω παραγόντων που είναι διαλυτοί στο κύτταρο ή είναι δεσμευμένοι στις μεμβράνες.^{41,42}

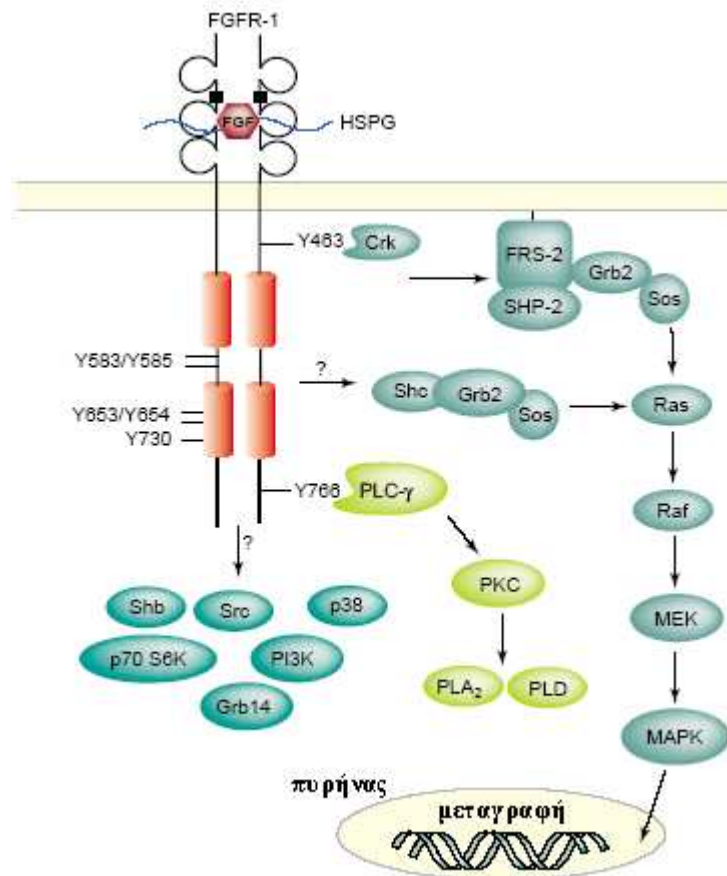
Από τους διαλυτούς στο κύτταρο παράγοντες, ο πλέον σημαντικός είναι ο **VEGF-A** (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor-**A**), ο οποίος είναι ο πλέον μελετημένος από την οικογένεια των **VEGF**, η οποία περιλαμβάνει επίσης τους **VEGF-B**, **VEGF-C**, **VEGF-D**, **VEGF-E** και **PlGF** (**P**lacenta **G**rowth **F**actor). Οι **VEGF-A** και **VEGF-B** εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα, των οποίων η σύνδεση με τους αντίστοιχους υποδοχείς **VEGFR-1** (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor-**1**) και **VEGFR-2** προκαλεί ταυτόχρονα το διμερισμό του υποδοχέα και τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων κατάλοιπων τυροσίνης στην ενδοκυτταρική περιοχή εκάστου υποδοχέα. Στον **VEGFR-1** πολλά μόρια που μεταφέρουν σήματα επιδρούν με τα κατάλοιπα τυροσίνης Y-1213 και Y-1333 από την πλευρά που φέρουν την SHP-2 (SH-2 φωσφατάση). Μόρια της κατηγορίας αυτής είναι η φωσφολιπάση C-γ (PLC-γ), η πρωτεΐνη **Grb2** (**G**rowth factor receptor-boundprotein **2**) και οι πρωτεΐνες που εκφράζονται από το γονίδιο Crk (Εικόνα 1.7). Στον **VEGFR-2** πολλές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που μεταφέρουν σήματα, ενεργοποιούνται απ'ευθείας από αυτόν, όπως η Sck, η PLC-γ και η VRAP. Άλλες πρωτεΐνες όπως οι Akt, FAK, p38, MAPK, eNOS, Src και P13K, επίσης ενεργοποιούνται από τον **VEGFR-2** αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί (Εικόνα 1.7).⁴³



Εικόνα 1.7. Η κυτταρική σηματοδότηση που προκαλείται από τους παράγοντες VEGF.

Ο **bFGF** (**b**asic **F**ibroblast **G**rowth **F**actor), ήταν ο πρώτος προαγγειογεννητικός παράγοντας που αναγνωρίστηκε-μελετήθηκε.⁴⁴ Η οικογένεια των **FGF** περιλαμβάνει τουλάχιστον 20 μέλη, των οποίων η αλληλουχία των αμινοξέων είναι κατά περίπου 30-70% πανομοιότυπη. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι οι **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. Η ισχυρή δέσμευση των **FGF** με τις πρωτεογλυκάνες της θειϊκής ηπαρίνης HSPGs (Heparan Sulfate ProteoGlycans) προκαλεί το διμερισμό του υποδοχέα **FGFR-1** και τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων περιοχών που αποτελούνται από κατάλοιπα τυροσίνης. Από τις περιοχές αυτές, η Y463 είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση των πρωτεϊνών που εκφράζονται από το γονίδιο Crk, οι Y653 και Y 654. Αυτές είναι σημαντικές για τη δραστηριότητα των κινασών, ενώ η Y766 αποτελεί την περιοχή δέσμευσης της φωσφολιπάσης C-γ. Τέλος, πολλά ενδοκυτταρικά σήματα έχει

αποδειχθεί ότι ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα **FGFR-1**, όπως για παράδειγμα το μονοπάτι Ras, η οικογένεια των κινασών της τυροσίνης Src και η πρωτεΐνη P13K (Εικόνα 1.8).⁴³



Εικόνα 1.8. Η κυτταρική σηματοδότηση που προκαλείται από τους παράγοντες **FGF**.

Άλλοι διαλυτοί παράγοντες, που εμπλέκονται με την αγγειογένεση αλλά δεν έχουν μελετηθεί όσο οι **VEGFs** και **bFGFs** είναι οι **Ang1**, **Ang2**, **Ang3** και **Ang4** (**Angiopoietins**), οι **PDGFs** (**Platelet-Derived Growth Factors**) και οι **TGFs-β** (**Transforming Growth Factors-β**). Οι **Ang1**, **Ang2**, **Ang3** και **Ang4** εκφράζονται μέσω των υποδοχέων Tie (κυρίως μέσω του Tie2), κατά τρόπο παρόμοιο με αυτόν των υποδοχέων των **VEGFs**.⁴⁵ Η επίδραση των αυξητικών παραγόντων που προέρχονται από τα αιμοπετάλια (**PDGFs**) στα αγγειακά κύτταρα *in vivo* και *in vitro*, υποδηλώνουν τη συμμετοχή τους στην αγγειογένεση. Η έκφρασή τους -μέσω του υποδοχέα **PDGF-β** στα ενδοθηλιακά κύτταρα- οδηγεί στη σύνθεση του DNA και στη δημιουργία των αγγειογεννητικών ιών και χορδών *in vitro*.⁴⁶ Τέλος, οι μετασχηματιστικοί αυξητικοί παράγοντες **TGFs-β**, χαρακτηρίζονται από προ- και

αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες, αφού σε χαμηλές δόσεις ο **TGFs-β1** συμβάλλει στην αγγειογένεση αυξάνοντας τα επίπεδα των αγγειογενετικών παραγόντων και των πρωτεασών, ενώ σε υψηλές δόσεις αναστέλλει την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και συμβάλλει στην ανασυγκρότηση των μεμβρανών του επιθηλιακού ιστού.⁴⁷

Από τις πρωτεΐνες που είναι δεσμευμένες στις μεμβράνες των κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, ξεχωρίζουν οι ιντεγκρίνες, οι εφρίνες και οι καδερίνες. Αναλυτικότερα, από την οικογένεια των ιντεγκρινών, η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ συμβάλλει στην αγγειογένεση καθώς συνδέεται με τα συστατικά του εξωκυτταρικού χώρου⁴⁸ και με τις μεταλλοπρωτεάσες-2.⁴⁹ Από τις εφρίνες, η εφρίνη-B2 εντοπίζεται μαζί με τον υποδοχέα της (eph-4B) στην επιφάνεια των αρτηριών και των φλεβών κατά το σχηματισμό των πρώτων τριχοειδών κατά την αγγείωση και πριν την αγγειογένεση,⁵⁰ ενώ η καδερίνη-VE εγκαθιστά τη σταθερότητα στη σύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει την επιβίωσή τους προωθώντας τη διάδοση αντι-αποπτωτικών σημάτων που προέρχονται από τους **VEGFs**.⁵¹

Οι καρκινικοί όγκοι έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν το διακόπτη της αγγειογένεσης, αλλάζοντας την ισορροπία μεταξύ των αγγειογενετικών παραγόντων και των αντισταθμιστικών αναστολέων.⁴⁰ Η πλέον κοινή στρατηγική αφορά μεταβολές στη μεταγραφή των γονιδίων. Σε πολλές καρκινικές σειρές παρατηρείται αυξημένη έκφραση των παραγόντων **VEGFs** και **FGFs** σε σύγκριση με τα υγιή, ενώ σε άλλες σειρές παρατηρείται αρνητική ρύθμιση στην έκφραση των ενδογενών αναστολέων όπως η θρομβοσπονδίνη-1 και η β-ιντερφερόνη. Επιπλέον, σε μερικούς καρκινικούς όγκους παρατηρούνται ταυτόχρονα μεταβολές τόσο των αυξητικών παραγόντων όσο και των αναστολέων της αγγειογένεσης.⁵²

Οι μηχανισμοί σύμφωνα με τους οποίους διατηρείται η ισορροπία μεταξύ των αγγειογενετικών ρυθμιστών έχουν πλήρως διαλευκανθεί μόνο σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, έχει διευκρινιστεί ότι ο αναστολέας θρομβοσπονδίνη-1 ρυθμίζει θετικά την έκφραση της πρωτεΐνης καταστολής των όγκων **p53** με αποτέλεσμα η απώλεια λειτουργίας της **p53** -που παρατηρείται στους περισσότερους καρκίνους- προκαλεί την πτώση των επιπέδων της θρομβοσπονδίνης-1 και απελευθερώνει τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την επίδραση των αναστολέων τους.⁵³ Αντίστοιχα, η ενεργοποίηση του Ras ογκογονιδίου ή η απώλεια του γονιδίου καταστολής **VHL** (von Hippel-Lindau) σε συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους προκαλεί την αύξηση της έκφρασης των **VEGFs**.⁵⁴

Μία ακόμα διάσταση στη ρύθμιση της αγγειογενετικής πλάστιγγας αναφέρεται στο σχηματισμό των πρωτεασών που μπορούν να ελέγχουν τη βιοδιαθεσιμότητα των αγγειογενετικών αναστολέων και ενεργοποιητών. Συγκεκριμένα, μία ποικιλία πρωτεασών μπορεί να ελευθερώσει τους **bFGFs** που βρίσκονται στον εξωκυτταρικό χώρο,⁵⁵ ενώ η πλασμίνη, ένα προ-αγγειογενετικό συστατικό του αιμοστατικού μηχανισμού, εμπεριέχει τον αγγειογενετικό αναστολέα την αγγειοστατίνη.⁵⁶ Η συντονισμένη έκφραση των προ- και αντι- αγγειογενετικών μορίων και η διαμόρφωσή τους μέσω της πρωτεόλυσης, αντικατοπτρίζει το πολύπλοκο μηχανισμό της ομοιόστασης και της αγγειακής ακεραιότητας κατά την αγγειογένεση.

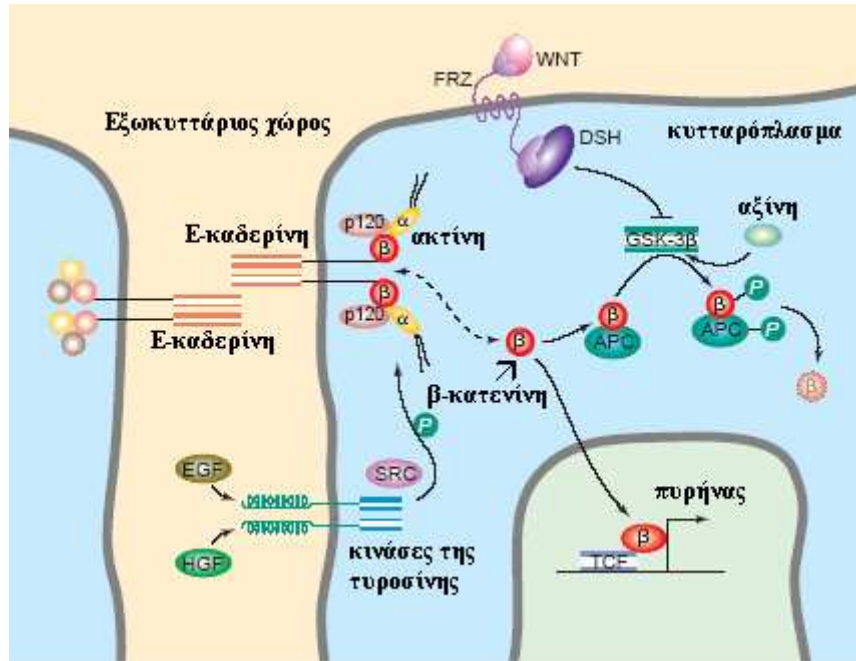
Συμπερασματικά, η μεγάλη πλειοψηφία των καρκινικών όγκων χρησιμοποιεί την αγγειογένεση ως μηχανισμό ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού. Έτσι, ο έλεγχος της αγγειογένεσης αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στην προσπάθεια ανάπτυξης νέων αντικαρκινικών θεραπευτικών μεθόδων. Με δεδομένο ότι οι διαφορετικοί τύποι καρκίνων χρησιμοποιούν διακριτές μοριακές στρατηγικές για να ενεργοποιήσουν τον αγγειογενετικό μηχανισμό, γεννάται το ερώτημα: Είναι επαρκής μία αντι-αγγειογενετική θεραπεία για την αντιμετώπιση όλων των καρκινικών όγκων ή απαιτείται ένα σύνολο θεραπειών που το καθένα χωριστά θα ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένο αγγειογενετικό μηχανισμό.

1.1.6 Προσβολή του ιστού και μετάσταση

Κατά την διάρκεια ανάπτυξης ενός όγκου οι καρκινικές μάζες παράγουν μεταναστευτικά κύτταρα, τα οποία αφού εξέλθουν από τον κύριο όγκο, προσβάλλουν γειτονικούς ιστούς και από εκεί μεταφέρονται σε μακρινά σημεία του οργανισμού όπου δημιουργούν νέες αποικίες. Οι αποικίες αυτές -γνωστές με τον όρο μετάσταση- είναι η κύρια αιτία θανάτου για το 90% των καρκίνων.⁵⁷ Η ικανότητα της μετάστασης καθιστά ικανά τα καρκινικά κύτταρα να ξεφύγουν από την αρχικό όγκο και να αποικήσουν σε καινούργια σημεία του σώματος, στα οποία υπάρχει πληθώρα χώρου και θρεπτικών συστατικών. Οι νέοι όγκοι που δημιουργούνται, αποτελούν μία μίξη καρκινικών και υγιών (του ξενιστή ιστού) κυττάρων. Για να είναι επιτυχής η μετάσταση σε ένα νέο ιστό, θα πρέπει να τηρηθούν όλες οι προαναφερθείσες πέντε θεμελιώδεις αλλαγές στη φυσιολογία των κυττάρων του.

Πολλές κατηγορίες πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην πρόσδεση των κυττάρων με τα περιβάλλοντα του ιστού συστατικά, διαφοροποιούνται στα κύτταρα που έχουν την ικανότητα προσβολής και μετάστασης. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι είτε μέλη της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών ή της οικογένειας των εξαρτώμενων από το ασβέστιο καδερινών, με κύρια λειτουργία την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων, ή τέλος ιντεγκρίνες που συνδέουν το κύτταρο με τα εξωκυτταρικά υποστρώματα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλες οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταφέρουν ρυθμιστικά σήματα στο κάθε κύτταρο.⁵⁸

Η γνωστότερη αλλαγή που έχει παρατηρηθεί σε καρκίνους και αφορά την αλληλεπίδραση ενός κυττάρου με το περιβάλλον του, αφορά την E-καδερίνη, ένα μόριο που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα. Η σύζευξη μεταξύ γειτονικών κυττάρων μέσω της E-καδερίνης, συμβάλλει κυρίως στη μεταφορά αντιπολλαπλασιαστικών παραγόντων μέσω του μονοπατιού E-καδερίνη/β-κατενίνη/ακτίνη (Εικόνα 1.9). Όμως στους περισσότερους καρκίνους των επιθηλιακών κυττάρων παρατηρείται η απώλεια λειτουργίας της E-καδερίνης. Οι κυριότεροι παράγοντες που συμβάλλουν στην απώλεια αυτή αφορούν σε μεταλλάξεις του γονιδίου που εκφράζει την E-καδερίνη ή του γονιδίου που εκφράζει το διαμεσολαβητή β-κατενίνη, στον επαναπροσανατολισμό της χρωματίνης, στην υπερμεθυλίωση της E-καδερίνης και την καταστολή του προαγωγέα της E-καδερίνης.⁵⁹ Ένας έμμεσος δρόμος, που οδηγεί στην εμφάνιση επιθηλιακών καρκίνων και εμπλέκεται στο μονοπάτι E-καδερίνη/β-κατενίνη/ακτίνη, αφορά τη δυσλειτουργία του γονιδίου καταστολής APC και οδηγεί στην υπερέκφραση της β-κατενίνης με επακόλουθη την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα **TCF** στον πυρήνα του κυττάρου(Εικόνα 1.9).⁶⁰



Εικόνα 1.9. Η σύνδεση των κυττάρων μέσω του μονοπατιού Ε-καδερίνη/β-κατενίνη/ακρινή.

Επιπλέον αλλαγές στην έκφραση των **CAMs** (Cell Adhesion Molecules – μόρια προσκόλλησης των κυττάρων) της οικογένειας των ανοσοσφαιρινών, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της προσβολής και μετάστασης.⁶¹ Το πλέον μελετημένο παράδειγμα αφορά τα νευρικά κύτταρα CAM, τα οποία σε περιπτώσεις καρκίνων των πνευμόνων, νευροβλαστώματος και καρκίνου Wilms, υφίστανται αλλαγή στη λειτουργία τους, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή προσκόλληση έως και πλήρης απόθεση.⁶² Πειράματα σε διαγονιδιακούς επίμυες έχουν αναδείξει το λειτουργικό ρόλο της φυσιολογικής μορφής των νευρικών CAM στην καταστολή της μετάστασης.⁶³

Οι αλλαγές που παρατηρούνται στην έκφραση των ιντεγκρινών αποτελούν ένα ακόμα παράγοντα που έχει μελετηθεί για τη διαδικασία της προσβολής και μετάστασης των κυττάρων. Τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα κατά την διάρκεια της μετακίνησής τους εξερευνούν το νέο τους περιβάλλον, το οποίο περιέχει νέα εξωκυτταρικά συστατικά. Άλλωστε, για να είναι επιτυχής η αποικία θα πρέπει τα καρκινικά κύτταρα να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες. Αυτό επιτυγχάνεται κυρίως μέσω των αλλαγών στο φάσμα των ιντεγκρινών α και β των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας τους υπότυπους των ιντεγκρινών να κατέχουν διακριτές προτιμήσεις στα εξωκυτταρικά υποστρώματα. Με τον τρόπο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα διευκολύνουν την προσβολή αλλάζοντας την έκφραση των ιντεγκρινών από

αυτές που προτιμούν τον εξωκυτταρικό χώρο (όπως συμβαίνει στα φυσιολογικά κύτταρα), σε αυτές που προτιμούν να δεσμεύονται σε αποδομημένα συστατικά του στρώματος που προέρχονται από τις εξωκυτταρικές πρωτεάσες, όπως οι ιντεγκρίνες $\alpha_3\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$.⁶⁴

Οι προσπάθειες που έχουν καταβληθεί για να εξηγηθούν οι βιολογικές επιδράσεις των ιντεγκρινών στα κύτταρα σε ένα μικρό αριθμό μηχανιστικών κανόνων δεν είναι ακόμα επιτυχής. Αυτό οφείλεται στο μεγάλο αριθμό διακριτών γονιδίων που εκφράζουν τις ιντεγκρίνες, στον ακόμα μεγαλύτερο αριθμό ετεροδιμερών υποδοχέων (προκύπτουν από το συνδυασμό των πολυπληθών υπομονάδων των α και β υποδοχέων), καθώς και στα πολύπλοκα σήματα που προκύπτουν από τις κυτταροπλασματικές περιοχές των υποδοχέων αυτών.^{58,9} Σε κάθε όμως περίπτωση, δεν υπάρχει καμία αμφιβολία για τον κεντρικό ρόλο που κατέχουν οι υποδοχείς αυτοί στην ικανότητα των καρκινικών κυττάρων για την προσβολή του ιστού και τη μετάσταση.

Η δεύτερη μεγάλη παράμετρος για την προσβολή και μετάσταση αναφέρεται στις εξωκυτταρικές πρωτεάσες.⁶⁵ Τα γονίδια που εκφράζουν τις πρωτεάσες αυτές αυξάνουν τη λειτουργία τους, ενώ οι αναστολείς τους καταστέλλονται και οι αδρανείς προενζυματικές τους μορφές μετατρέπονται σε ενεργά ένζυμα. Οι πρωτεάσες που σχετίζονται με τα αποικοδομήσιμα συστατικά του εξωκυτταρικού χώρου συνδέονται χαρακτηριστικά με την επιφάνεια του κυττάρου, είτε μέσω της σύνδεσής τους με συγκεκριμένους υποδοχείς πρωτεασών ή/και με τη σύνδεσή τους με ιντεγκρίνες.^{66,67} Από τη στιγμή που θα προσομοιάσουν τη λειτουργία των φυσιολογικών πρωτεασών στην επιφάνεια των κυττάρων, είναι σε θέση να διευκολύνουν την προσβολή των καρκινικών κυττάρων στο γειτονικό στρώμα μέσω των αιμοφόρων αγγείων και των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων.⁶⁷

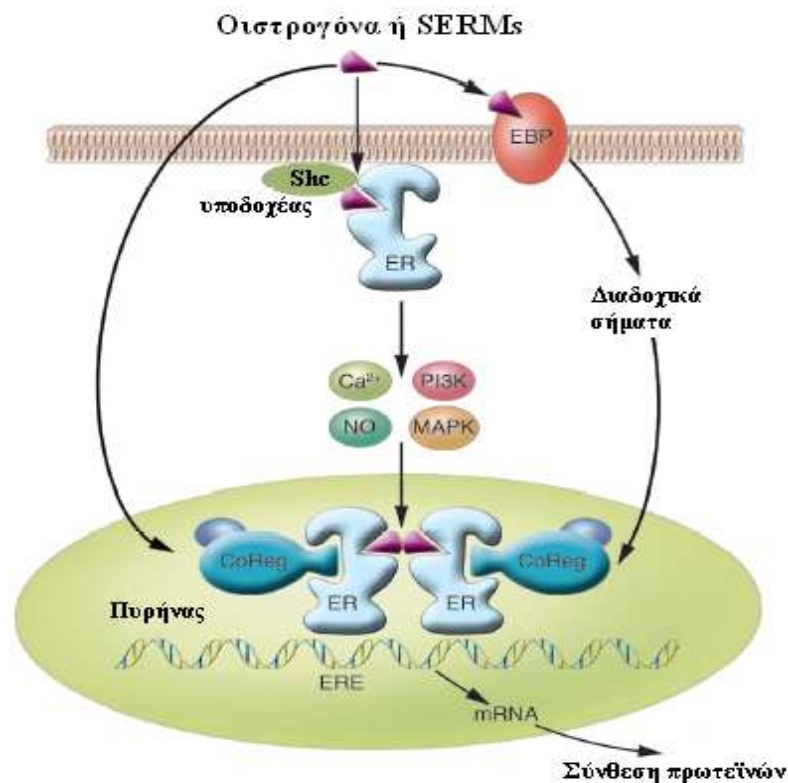
1.2 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα επηρεάζουν ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες των θηλαστικών, με κυριότερες την αναπαραγωγή, την καρδιαγγειακή λειτουργία, τη σκελετική ακεραιότητα και τη συμπεριφορά. Ως αποτέλεσμα του εκτεταμένου ρόλου των οιστρογόνων στην ανθρώπινη φυσιολογία, τα οιστρογόνα εμπλέκονται στην ανάπτυξη ή εξέλιξη ποικίλων ασθενειών ή διαταραχών, όπως ο καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του ενδομητρίου καθώς και

στην οστεοπόρωση, τις νευροεκφυλιστικές και καρδιακές ασθένειες, την αντίσταση στην ινσουλίνη, τον ερυθρηματώδη λύκο και την παχυσαρκία. Στις περισσότερες από τις περιπτώσεις αυτές, τα οιστρογόνα δρουν μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα (Estrogen Receptor, ER), η διαχείριση του οποίου συνιστά τη βάση ποικίλων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

1.2.1 Μηχανισμός δράσης του οιστρογονικού υποδοχέα

Τα οιστρογόνα προκαλούν κυτταρικές αλλαγές μέσω ποικίλων μηχανισμών (Εικόνα 1.10), οι οποίοι έχουν ως κοινό σημείο την πρόσδεσή τους με τον ER. Σύμφωνα με τον κλασικό μηχανισμό, τα οιστρογόνα διαχέονται στο κύτταρο και προσδένονται στον οιστρογονικό υποδοχέα, ο οποίος βρίσκεται στον πυρήνα. Το σύμπλοκο οιστρογόνου-ER προκαλεί την τοπική συγκέντρωση ρυθμιστικών παραγόντων (Estrogen Response Elements, ERE), οι οποίοι παίζουν ρόλο ενεργοποιητή ή καταστολέα, διαφοροποιώντας ανάλογα τα επίπεδα του mRNA με αντίστοιχες συνέπειες στην παραγωγή των πρωτεϊνών με μια χρονοβόρα διαδικασία.



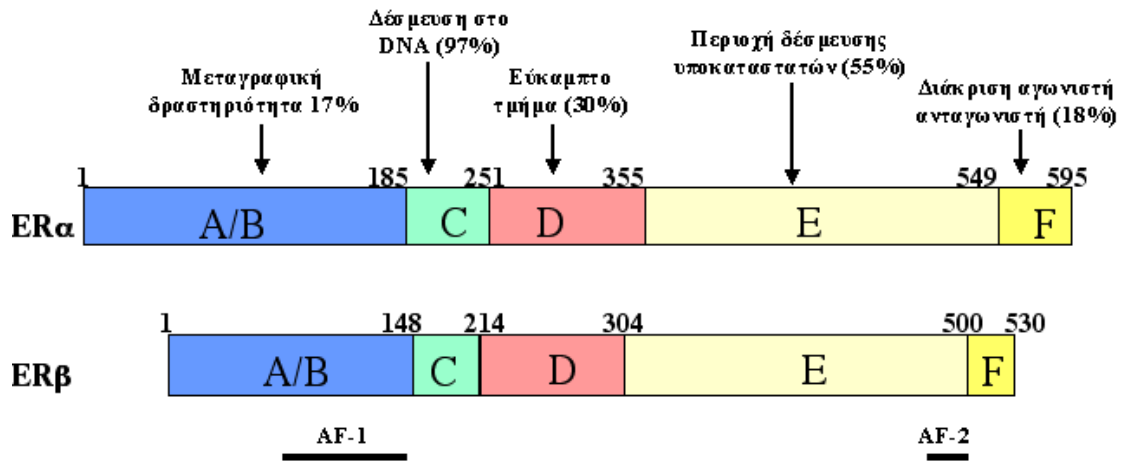
Εικόνα 1.10. Μοντέλο της οιστρογονικής δράσης.

Αντίθετα, όταν τα οιστρογόνα δρουν μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων που βρίσκονται στην πλασμιδική μεμβράνη ή μέσω πρωτεϊνών που τα δεσμεύουν (**Estrogen Binding Proteins, EBP**), η διαδικασία ολοκληρώνεται σε δευτερόλεπτα ή λεπτά (Εικόνα 1.10). Από αυτές, στην πρώτη περίπτωση είναι απαραίτητη η παρουσία πρωτεϊνών υποδοχής (Shc ή caveolin-1) οι οποίες προσδέουν τα οιστρογόνα με τον **ER**, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του και την αύξηση των επιπέδων του NO και των ιόντων Ca^{2+} καθώς και τη διέγερση της δράσης των κινασών P13K και MAPK, οι οποίες διαδοχικά προκαλούν τη μεταγραφή πρωτεϊνών. Στη δεύτερη περίπτωση, η δέσμευση των οιστρογόνων στις **EBP** προκαλεί τη διέγερση διαδοχικών σημάτων, που οδηγούν στην ενεργοποίηση συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών (co-Regulatory proteins, CoReg) με τελικό αποτέλεσμα την πρωτεϊνική σύνθεση.⁶⁸

1.2.2 Οιστρογονικός υποδοχέας

Ο οιστρογονικός υποδοχέας υπάρχει ως δύο κύριες μορφές, ο οιστρογονικός υποδοχέας α (**Estrogen Receptor α, ER_α**) και ο οιστρογονικός υποδοχέας β (**Estrogen Receptor β, ER_β**). Ο **ER_α** ανακαλύφθηκε σε οιστρογόνο-ανταποκρινόμενους ιστούς το 1969 από τους Shyamala και Gorski⁶⁹ και απομονώθηκε από την ομάδα του Chambon το 1985.⁷⁰ Έντεκα χρόνια αργότερα, το 1996, η επιστημονική κοινότητα βρέθηκε μπροστά σε μια μεγάλη έκπληξη όταν η ερευνητική ομάδα του Gustafsson⁷¹ κατάφερε να κλωνοποιήσει τον **ER_β** από την βιβλιοθήκη του συμπληρωματικού DNA (cDNA) του προστάτη.

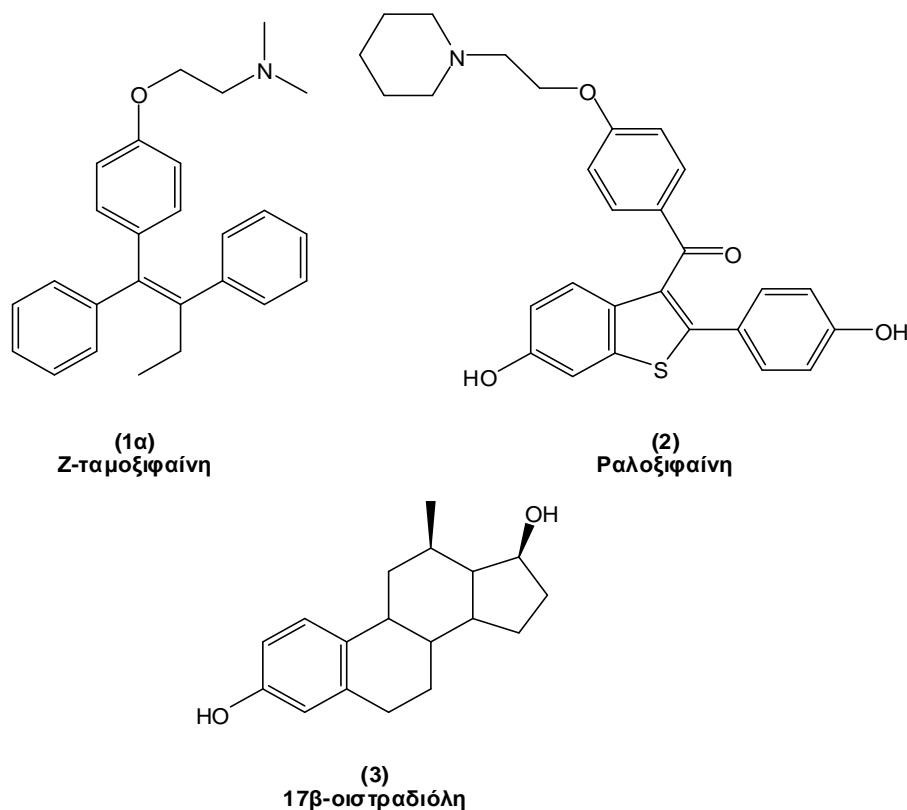
Οι ανθρώπινοι **ER_α** και **ER_β**, όπως όλα τα μέλη των πυρηνικών υποδοχέων, είναι πρωτεΐνες αποτελούμενες από πολλές υπομονάδες. Έχουν δε ποικίλα κοινά τμήματα με τις ονομασίες A/B, C, D, E και F. Τα τμήματα αυτά συμμετέχουν στο σχηματισμό ανεξάρτητων αλλά αλληλεπιδρώντων λειτουργικών περιοχών, οι οποίες είναι: Η N-τελική μεταγραφική περιοχή, η περιοχή δέσμευσης στο DNA, η περιοχή που δίνει ευκαμψία στον υποδοχέα, η περιοχή δέσμευσης των υποκαταστατών και η περιοχή αναγνώρισης των αγωνιστών από τους ανταγωνιστές (Εικόνα 1.11).⁷² Ο **ER_β** είναι μικρότερος από τον **ER_α** αλλά παρουσιάζει παρεμφερή δομή και υπολογίσιμη ομολογία κυρίως στην περιοχή δέσμευσης στο DNA και στην περιοχή δέσμευσης των υποκαταστατών.



Εικόνα 1.11. Λειτουργικές περιοχές των **ER** (% ομολογία μεταξύ του **ER_α** και **ER_β**).

Το τμήμα A/B των οιστρογονικών υποδοχέων συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών⁷³ και στην μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων.⁷⁴ Επίσης, περιέχει την περιοχή AF-1 (Activation Function-1), η οποία διαφέρει στους **ER_α** και **ER_β** τόσο ως προς το μήκος όσο και ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων.⁷⁵ Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε γιατί η περιοχή A/B προστέθηκε στα γονίδια των υποδοχέων μετά την αναπαραγωγή του προγονικού γονιδίου είτε γιατί η περιοχή A/B κατά την εξέλιξή της παρουσίασε αξιοσημείωτη απόκλιση.⁷⁶

Αναλυτικότερα, η περιοχή AF-1 στον **ER_α** είναι πολύ δραστική στην έκφραση γονιδίων από τα ERE, ενώ αντίθετα στον **ER_β** κάτω από τις ίδιες συνθήκες είναι σχεδόν αδρανής.⁷² Μία ακόμα αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των οιστρογονικών υποδοχέων είναι η διαφορετική απόκρισή τους στους εκλεκτικούς τροποποιητές των οιστρογονικών υποδοχέων ή **SERMs** (Selective Estrogen Receptor Modulators), όπως είναι η Z-ταμοξιφαίνη (**1α**) και η ραλοξιφαίνη (**2**) (Εικόνα 1.12). Τα μόρια αυτά είναι μερικοί αγωνιστές της 17β-οιστραδιόλης (**3**) (Εικόνα 1.12) στον **ER_α** αλλά είναι αμιγείς ανταγωνιστές στον **ER_β**. Η διαφοροποίηση στην απόκριση των δύο υποδοχέων στη δράση των **SERMs** πιθανότατα οφείλεται στις παραλλαγές στη N-τελική περιοχή τους. Συγκεκριμένα, στον **ER_α** απαιτούνται δύο διακριτά κομμάτια για την έκφραση της αγωνιστικής δράσης της 17β-οιστραδιόλης και την μερική αγωνιστική δράση της Z-ταμοξιφαίνης,⁷⁷ ενώ αντίθετα στον **ER_β** δεν παρατηρείται η διπλή λειτουργία της AF-1.⁷⁸ Βέβαια, απομένει να διευκρινιστεί η μεταγραφική δραστηριότητα της AF-1 περιοχής του **ER_β**.



Εικόνα 1.12. Δομές των ενώσεων Z-ταμοξιφαίνη, ραλοξιφαίνη και 17β-οιστραδιόλη.

1.2.3 Οιστρογονικός υποδοχέας και καρκίνος

1.2.3.1 Καρκίνος του μαστού

Πολυάριθμες κλινικές και πειραματικές μελέτες έχουν συνδέσει τη δράση των οιστρογόνων με την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα, η συσσωρευμένη έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού σε οιστρογόνα έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί την αύξηση παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού.⁷⁹ Σύμφωνα με την πρώτη θεωρία (από τις δύο που επικρατούν),⁸⁰ η δέσμευση των οιστρογόνων από τον **ER** διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του μαστού, αυξάνοντας έτσι ακόμα περισσότερο τον αριθμό των κυττάρων-στόχων των οιστρογόνων. Η αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης και της σύνθεσης του DNA αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης λαθών στην αντιγραφή, με πιθανή κατάληξη την εμφάνιση μεταλλάξεων που παρεμβαίνουν στις φυσιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός και η επιδιόρθωση του DNA. Με βάση τη δεύτερη θεωρία ο μεταβολισμός των οιστρογόνων οδηγεί στην παραγωγή γονοτοξικών υποπροϊόντων που δημιουργούν

μεταλλάξεις καταστρέφοντας το DNA. Παράλληλα, υπάρχουν ποικίλα πειραματικά στοιχεία που δείχνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να δράσουν συνδυάζοντας και τους δύο παραπάνω μηχανισμούς για να ξεκινήσουν ή να προάγουν τον καρκίνο του μαστού.

1.2.3.2 Καρκίνος των ωοθηκών

Για τον καρκίνο των ωοθηκών, τα πειραματικά αποτελέσματα έχουν αποδείξει ότι οι στεροειδείς ορμόνες είναι οι κύριες υπεύθυνες για την εμφάνισή του. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς έχουν ανιχνευτεί στο 70% των καρκίνων των ωοθηκών με τον **ER_α** να εκφράζεται κυρίως στους καρκίνους των επιθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος, ενώ ο **ER_β** να εκφράζεται κυρίως στον καρκίνο των κοκκιωδών κυττάρων.⁸¹ Επιπλέον, ο ρόλος των οιστρογονικών υποδοχέων έχει επιβεβαιωθεί και σε μελέτες των κυτταρικών καλλιιεργειών στον καρκίνο των ωοθηκών. Συγκεκριμένα, τα οιστρογόνα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών και υγιών κυττάρων των ωοθηκών σε καλλιέργειες,⁸² ενώ οι ανταγωνιστές τους αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.⁸² Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το κυριότερο **SERM**, η ταμοξιφαίνη, δεν αναστέλλει αποτελεσματικά τον καρκίνο των ωοθηκών.

1.2.3.3 Καρκίνος του ενδομητρίου

Περίπου το 70-80% των ενδομητριακών καρκινωμάτων προσδιορίζεται ως τύπος I, ο οποίος αναφέρεται στην υπερπλασία του ενδομητρίου ως αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των οιστρογόνων. Το υπόλοιπο ποσοστό, που χαρακτηρίζεται ως τύπος II, δεν σχετίζεται με τα οιστρογόνα.⁹² Η εμφάνιση των οιστρογονοεξαρτώμενων ενδομητριακών όγκων είναι αποτέλεσμα της παρατεταμένης έκθεσης σε οιστρογόνα και σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη απουσία επαρκών ποσοτήτων προγεστερόνης.⁹³ Τα υψηλά επίπεδα των οιστρογόνων μπορούν να προέλθουν από ενδογενείς παράγοντες, το περιβάλλον, τη λήψη οιστρογόνων (π.χ. αντισυλληπτικά, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης κλπ), τον καρκίνο των ωοθηκών ο οποίος εκκρίνει επιπλέον οιστρογόνα και τη χρήση της ταμοξιφαίνης, η οποία δρα ως αγωνιστής των οιστρογονικών υποδοχέων του ενδομητρίου.

Μηχανιστικά η δράση της ταμοξιφαίνης δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί, ωστόσο μία πρόσφατη μελέτη⁹⁴ έδειξε ότι η ταμοξιφαίνη και η οιστραδιόλη έχουν διακριτά αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενα γονίδια-στόχους. Ένα από τα γονίδια αυτά είναι το PAX2 (paired-box gene 2), στον πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση του ενδομητρίου και εκφράζεται μετά τη χρήση οιστραδιόλης ή ταμοξιφαίνης αλλά μόνο στα καρκινικά (όχι στα υγιή) κύτταρα του ενδομητρίου. Ο οιστρογονικός υποδοχέας που συμβάλει στην ενεργοποίηση του προαγωγέα του PAX2 γονιδίου είναι ο **ER_α**. Αν και ο ρόλος του **ER_α** δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί πιθανολογείται ότι σχετίζεται με την παρατηρούμενη στα καρκινικά κύτταρα υπο-μεθυλίωση του παράγοντα που προάγει το PAX2 γονίδιο, σε σχέση με την υπερ-μεθυλίωση που παρατηρείται στα υγιή κύτταρα του ενδομητρίου.

1.2.3.4 Καρκίνος του παχέος εντέρου

Ο **ER_β** είναι ο κυρίαρχος οιστρογονικός υποδοχέας τόσο στους καρκινικούς όσο και στους υγιείς ιστούς του παχέος εντέρου, καθώς και σε όλες τις κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου.⁸³⁻⁸⁵ Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα του **ER_β** μειώνονται καθώς προχωράμε σε πλέον προχωρημένο στάδιο του καρκίνου του παχέος εντέρου, υποδηλώνοντας τον προστατευτικό ρόλο του **ER_β** στη δημιουργία καρκινικών όγκων.⁸⁶ Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα **SERMs** ταμοξιφαίνη και ραλοξιφαίνη αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων,⁸⁷ ενώ η ανακάλυψη ενός εκλεκτικού ανταγωνιστή του **ER_β** θα αποτελέσει ένα ιδιαίτερα σημαντικό βήμα για την καταπολέμηση του καρκίνου του παχέος εντέρου.

1.2.3.5 Καρκίνος του προστάτη

Από τα τέλη του 1980, ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άντρες.⁸⁸ Είναι γεγονός ότι τα έως σήμερα κλινικά αποτελέσματα δεν έχουν επαρκώς συνδέσει τα υψηλά επίπεδα των οιστρογόνων στο πλάσμα ή την αυξημένη αναλογία οιστρογόνων/ανδρογόνων, με τον υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.⁸⁹ Όμως, αλλεπάλληλα πειραματικά αποτελέσματα σε επίμυες υποστηρίζουν, ότι η παρατεταμένη έκθεση στα οιστρογόνα μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και τη λειτουργία του προστάτη και να

προκαλέσει επιθηλιακή υπερπλασία, συμπεριλαμβανομένης και της δραστηκής διαφοροποίησης της δομής των στεροειδών υποδοχέων.⁹⁰ Τόσο στον ανθρώπινο προστάτη όσο και στον προστάτη των επίμυων, ο **ER_β** εκφράζεται σε υψηλότερο βαθμό από τον **ER_α** και εντοπίζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα (ο **ER_α** εντοπίζεται στα κύτταρα του στρώματος). Παρότι, ο ρόλος των οιστρογονικών υποδοχέων στη φυσιολογία του προστάτη παραμένει αδιευκρίνιστος, σύμφωνα με νέες αναφορές, η έκφραση του **ER_β** ελαττώνεται στον καρκινικά κύτταρα,⁹¹ υποδηλώνοντας ότι η χρήση ενός εξειδικευμένου **ER_β** αγωνιστή είναι δυνατόν να αποδειχθεί ως μια δυναμική θεραπεία.

Βιβλιογραφία

1. Bishop, J. M.; Weinberg, R. A. *Molecular Oncology*, **1996**.
2. Foulds, L. *The experimental Study of Tumor Progression* **1954**.
3. Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *Cell* **1996**, *87*, 159-170.
4. Fedi, P.; Tronick, S. R.; Aaronson, S. A. *Cancer Medicine* **1997**, 41-64.
5. Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. *Science* **1987**, *235*, 177-182.
6. Yarden, Y.; Ullrich, A. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 443-478.
7. DiFiore, P. P.; Pierce, J. H.; Kraus, M. H.; Segatto, O.; King, C. R.; Aaronson, S. A. *Science* **1987**, *237*, 178-182.
8. Lukashev, M. E.; Werb, Z. *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 437-441.
9. Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. *Science* **1999**, *285*, 1028-1032.
10. Medema, R. H.; Bos, J. L. *Crit. Rev. Oncog.* **1993**, *4*, 615-661.
11. Hunter, T. *Cell* **1997**, *88*, 333-346.
12. Rommel, C.; Hafen, E. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1998**, *8*, 412-418.
13. Downward, J. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 262-267.
14. Weinberg, R. A. *Cell* **1995**, *81*, 323-30.
15. Moses, H. L.; Yang, E. Y.; Pietenpol, J. A. *Cell* **1990**, *63*, 245-247.
16. Koff, A.; Ohtsuki, M.; Polyak, K.; Roberts, J. M.; Massague, J. *Science* **1993**, *260*, 536-539.
17. Datto, M. B.; Hu, P. P.; Kowalik, T. F.; Yingling, J.; Wang, X. F. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 2030-2037.
18. Fynac, T. M.; Reiss, M. *Crit. Rev. Oncog.* **1993**, *4*, 493-540.
19. Markowitz, S.; Wang, J.; Meyeroff, L.; Parsons, R.; Sun, L.; Lutterbaugh, J.; Fan, R.; Zborowska, E.; Kinzler, K.; Vogelstein, B. *Science* **1995**, *268*, 1336-1338.
20. Schutte, M.; Hruban, R.; Hedrick, L.; Cho, K.; Nadasdy, G.; Weinstein, C.; Bova, G.; Isaacs, W.; Cairns, P.; Nawroz, H. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 2527-2530.
21. Chin, L.; Pomerantz, J.; DePinho, R. A. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 291-296.

22. Zuo, L.; Wager, J.; Yang, Q.; Goldstein, A. M.; Tucker, M. A.; Walker, G. J.; Hayward, N.; Dracopoli, N. C. *Nat. Genet.* **1996**, *12*, 97-99.
23. Wiley, A. H.; Kerr, J. F.; Currie, A. R. *Int. Rev. Cytol.* **1980**, *68*, 251-306.
24. Butt, A. J.; Firth, S. M.; Baxter, R. C. *Immunol. Cell Biol.* **1999**, *77*, 256-262.
25. Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 255-260.
26. Evan, G.; Littlewood, T. *Science* **1998**, *281*, 1317-1322.
27. Thornberry, N. A.; Lazenbnik, Y. *Science* **1998**, *281*, 1312-1316.
28. Harris, C. C. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1187-1198.
29. Cantley, L. C.; Neel, B. G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 4240-4245.
30. Pitti, R. M.; Marsters, S. A.; Lawrence, D. A.; Roy, M.; Kischkel, F. C.; Dowd, P.; Huang, A.; Donahue, C. J.; Sherwood, S. W.; Baldwin, D. T. *Nature* **1998**, *396*, 699-703.
31. Wright, W. E.; Pereira-Smith, O. M.; Shay, J. W. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 3088-3092.
32. Counter, C. M.; Avilion, A. A.; LeFeuvre, C. E.; Stewart, N. G.; Greider, C. W.; Harley, C. B.; Bacchetti, S. *EMBO J.* **1992**, *11*, 1921-1929.
33. Shay, J. W.; Bacchetti, S. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 787-791.
34. Bryan, T. M.; Cech, T. R. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 318-324.
35. Bryan, T. M.; Englezou, A.; Gupta, J.; Bacchetti, S.; Reddel, R. R. *EMBO J.* **1995**, *14*, 4240-4248.
36. Greenberg, R. A.; Chin, L.; Femino, A.; Lee, K. H.; Gottlieb, G. J.; Singer, R. H.; Greider, C. W.; DePinho, R. A. *Cell* **1999**, *97*, 515-525.
37. Halvorsen, T. L.; Leibowitz, G.; Levine, F. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1864-1870.
38. Serrano, M.; Lin, A. W.; McCurrach, M. E.; Lowe, D. B. S. W. *Cell* **1997**, *88*, 593-802.
39. Folkman, J.; Shing, Y. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934.
40. Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* **1996**, *86*, 353-364.
41. Greenblatt, M.; Shubi, P. *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, *41*, 111-124.
42. Ehrmann, R. I.; Knoth, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, *41*, 1329-1341.
43. Cross, M. J.; Claesson-Welsh, L. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 201-207.
44. Shing, Y.; Folkman, J.; Sullivan, R.; Butterfield, C.; Murray, J.; Klagsbrun, M. *Science* **1984**, *223*, 1296-1299.
45. Yancopoulos, G. D.; Klagsbrun, M.; Folkman, J. *Cell* **1998**, *93*, 661-664.
46. Bategay, E. J.; Rupp, J.; Iruela-Arispe, L. *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 917-928.
47. Carmeliet, P. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 653-660.
48. Hoidalva-Dilke, K. M.; McHugh, K. P.; Tsakiris, D. A. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 229-238.
49. Brooks, P. C.; Stromblad, S.; Sanders, L. C. *Cell* **1996**, *85*, 683-693.
50. Wang, H. U.; Chen, Z. F.; Anderson, D. J. *Cell* **1998**, *93*, 741-753.
51. Carmeliet, P.; Lampugnani, M. G.; Moons, L. *Cell* **1999**, *98*, 147-157.
52. Singh, R. K.; Gutman, M.; Bucana, C. D.; Sanchez, R.; Liansa, N.; Fidler, I. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4562-4566.
53. Dameron, K. M.; Volpert, O. V.; Tainsky, M. A.; Bouck, N. *Science* **1994**, *265*, 1582-1584.
54. Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G.-W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E.; Wykoff, C. C.; Pugh, C. W.; Maher, E. R.; Ratcliffe, P. J. *Nature* **1999**, *399*, 271-275.
55. Whitelock, J. M.; Murdoch, A. D.; Iozzo, R. V.; Underwood, P. A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*.

56. Gately, S.; Twardowski, P.; Stack, M. S.; Cundiff, D. L.; Grella, D.; Castellino, F. J.; Enghild, J.; Kwaan, H. C.; Lee, F.; Kramer, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 10868-10872.
57. Sporn, M. B. *Lancet* **1996**, *347*, 1977-1981.
58. Aplin, A. E.; Howe, A.; Alahari, S. K.; Juliano, R. L. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 197-263.
59. Christofori, G.; Semb, H. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 73-76.
60. Behrens, J.; Von-Kries, J. P.; Köhl, M.; Bruhn, L.; Wedlich, D.; Grosschedl, R.; Birchmeier, W. *Nature* **1996**, *382*, 638-642.
61. Johnson, J. P. *Cancer Metastasis Rev.* **1991**, *10*, 11-22.
62. Kaiser, U.; Auerbach, B.; Oldenburg, M. *Leuk. Lymphoma* **1996**, *20*, 389-395.
63. Perl, A. K.; Dahl, U.; Wilgenbus, P.; Cremer, H.; Semb, H.; Christofori, G. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 286-291.
64. Varner, J. A.; Cheresch, D. A. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 724-730.
65. Coussens, L. M.; Werb, Z. *Chem. Biol.* **1996**, *13*, 895-904.
66. Stetler-Stevenson, W. G. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 1237-1241.
67. Werb, Z. *Cell* **1997**, *91*, 439-442.
68. Deroo, B. J.; Lorach, K. S. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 561-570.
69. Shyamala, G.; Gorski, J. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1097-1103.
70. Walter, P.; Green, S.; Green, G.; Krust, A.; Bornert, J. M.; Jeltsch, J. M.; Staub, A.; Jensen, E.; Scrace, G.; Watrerfield, M.; Chambon, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7889-7893.
71. Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5925-5930.
72. Nilsson, S.; Makela, S.; Treuter, E.; Tujague, M.; Thomsen, J.; Andersson, G.; Enmark, E.; Pettersson, K.; Warner, M.; Gustafsson, J.-A. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 1535-1565.
73. McInerney, E. M.; Katzenellenbogen, B. S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24172-24178.
74. McInerney, E. M.; Weis, K. E.; Sun, J.; Mosselman, S.; Katzenellenbogen, B. S. *Endocrinology* **1998**, *139*, 4513-4522.
75. Kumar, R.; Thompson, E. B. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 1-10.
76. Thornton, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5671-5676.
77. McDonnell, D. P.; Clemm, D. L.; Hermann, T.; Goldman, M. E.; Pike, J. W. *Mol. Endocrinol.* **1995**, *9*, 659-669.
78. Merot, Y.; Metivier, R.; Penot, G.; Manu, D.; Saligaut, C.; Gannon, F.; Pakdel, F.; Kah, O.; Flouriot, G. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 26184-26191.
79. Henderson, B. E.; Feigelson, H. S. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 427-433.
80. Yue, W.; Wang, J.-P.; Li, Y.; Bocchinfuso, W. P.; Korach, K. S.; Devanesan, P. D.; Rogan, E.; Cavalieri, E.; Santen, R. J. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 925s-930s.
81. Chu, S.; Mamers, P.; Burger, H. G.; Fuller, P. J. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 1200-1205.
82. Syed, V.; Ulinski, G.; Mok, S. C.; Yiu, G. K.; Ho, S. M. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6768-6776.
83. Qui, Y.; Waters, C. E.; Lewis, A. E.; Langman, M. J.; Eggo, M. C. *J. Endocrinol.* **2002**, *174*, 369-377.
84. Fiorelli, G.; Picariello, L.; Martinetti, V.; Tonelli, F.; Brandi, M. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 521-527.

85. Arai, N.; Strom, A.; Rafter, J. J.; Gustafsson, J.-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *270*, 425-431.
86. Konstantinopoulos, P. A.; Kominea, A.; Vandoros, G.; Sykiotis, G. P.; Andricopoulos, P.; Varakis, I.; Sotiropoulou-Bonikou, G.; Papavassiliou, A. G. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 1251-1258.
87. Picariello, L.; GFiorelli; Martineti, V.; Tognarini, I.; Pampaloni, B.; Tonelli, F.; Brandi, M. L. *Anticancer Res.* **2003**, *23*, 2419-2424.
88. Jemal, A.; Tiwari, R. C.; Murray, T.; Ghafoor, A.; Samuels, A.; Ward, E.; Feuer, E. J.; Thun, M. J. *Cancer J. Clin.* **2004**, *54*, 8-29.
89. Bosland, M. C. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* **2000**, *27*, 39-66.
90. Harkonen, P. L.; Makela, S. I. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *92*, 297-305.
91. Leav, I.; Lau, K.-M.; Adams, J. Y.; McNeal, J. E.; Taplin, M.-E.; Wang, J.; Singh, H.; Ho, S.-M. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 79-92.
92. Lax, S. F. *Virchows Arch.* **2004**, *444*, 213-223.
93. Grady, D.; Gebretsadik, T.; Kerlikowske, K.; Ernster, V.; Petitti, D. *Obstet. Gynecol.* **1995**, *85*, 304-313.
94. Wu, H.; Chen, Y.; Liang, J.; Shi, B.; Wu, G.; Zhang, Y.; Wang, D.; Li, R.; Yi, X.; Zhang, H.; Sun, L.; Shang, Y. *Nature* **2005**, *438*, 981-987.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Νέα παράγωγα του πυραζολίου: Σύνθεση και αποτίμηση της αντι-αγγειογενετικής τους δράσης

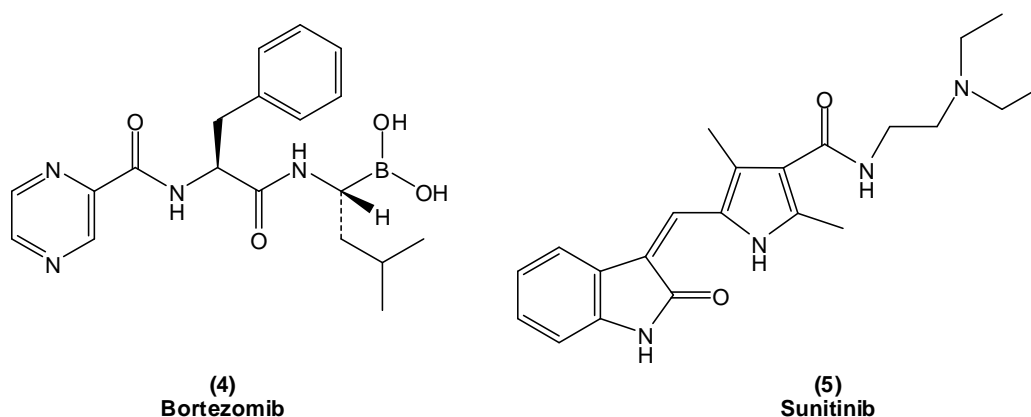
2.1 Εισαγωγή

Η αγγειογένεση, η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται νέα αιμοφόρα αγγεία, είναι ζωτικής σημασίας για την ομαλή διεκπεραίωση ποικίλων φυσιολογικών διαδικασιών των οργανισμών, όπως η εμβρυογένεση, η ανάπτυξη των οργάνων, ο γυναικείος αναπαραγωγικός κύκλος και η επούλωση των τραυμάτων.^{1,2} Σε αντίθεση με τη φυσιολογική, η ανεξέλεγκτη αγγειογένεση έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη ποικίλων ασθενειών όπως ο καρκίνος, η αμφιβληστροειδοπάθεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση, η αθηρωσκλήρυνση και το αιμαγγείωμα.³⁻⁵

Η κατασκευή ενός νέου αγγειακού δικτύου απαιτεί την επιτέλεση διαφορετικών διαδοχικών διεργασιών που αναφέρονται στη(ν): 1) απελευθέρωση πρωτεασών από τα “ενεργοποιημένα” ενδοθηλιακά κύτταρα, 2) αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης που περιβάλλει τα υπάρχοντα κύτταρα, 3) μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον ενδιάμεσο χώρο, 4) εξάπλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τελικά 5) διαμόρφωσή τους σε ώριμα αγγεία αίματος. Οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται από τη δράση ενός μεγάλου εύρους παραγόντων που επάγουν την αγγειογένεση, όπως οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες, τα αγγειογενετικά ένζυμα, οι ενδοθηλιακοί υποδοχείς και τα μόρια διάχυσης. Όταν τελικά τα νέα αγγεία δημιουργηθούν, παρατηρείται μειορύθμιση (downregulation) των αγγειογενετικών παραγόντων και αύξηση της τοπικής συγκέντρωσης των αναστολέων της αγγειογένεσης. Είναι φανερό ότι η επιτέλεση της αγγειογένεσης, απαιτεί πολλές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Έτσι, καθένα από τα παραπάνω στάδια που καθορίζουν/ελέγχουν την αγγειογένεση, αποτελεί και ένα πιθανό στόχο για θεραπευτική προσέγγιση.

Το πρώτο φαρμακευτικό σκεύασμα που εγκρίθηκε από τον Αμερικάνικο οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (U.S.F.D.A. – Food and Drug Administration) για την αναστολή του σχηματισμού των νέων αιμοφόρων αγγείων είναι το

Bevacizumab. Με την εμπορική ονομασία Avastin™, το Bevacizumab -ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύεται και αναστέλλει τη λειτουργία του VEGF- παρουσιάζει εξαιρετικά κλινικά αποτελέσματα, όταν συνδυαστεί με χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου.⁶ Άλλα φάρμακα που έχουν εγκριθεί (Εικόνα 2.1) είναι το Bortezomib (**4**, με την ονομασία Velcade®) για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και το Sunitinib (**5**, με την ονομασία Sutent®) για τη θεραπεία των γαστροεντερικών όγκων.



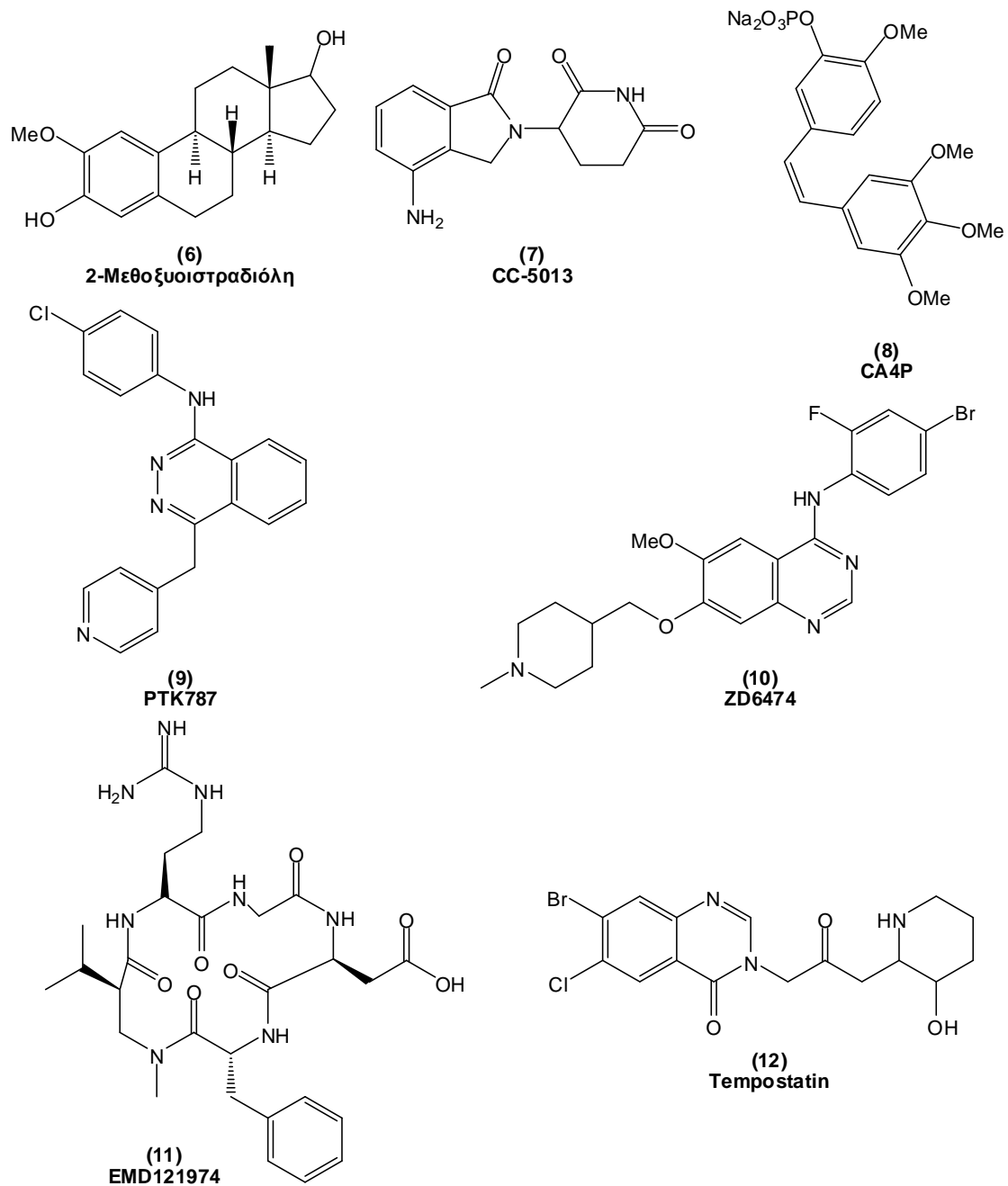
Εικόνα 2.1. Δομές των φαρμάκων Bortezomib και Sunitinib.

Παράλληλα, ένας μεγάλος αριθμός νέων μορίων που σχετίζονται με την αναστολή της αγγειογένεσης βρίσκεται σε ποικίλες φάσεις κλινικών ερευνών. Ενδεικτικά μόρια της κατηγορίας αυτής είναι τα (Εικόνα 2.2):

- 2-μεθοξυιστραδιόλη (**6**), CC-5013 (**7**) και CA4P (**8**) ως αναστολείς της ρήξης της κυτταρικής μεμβράνης,
- PTK787 (**9**) και ZD6474 (**10**) ως αναστολείς των ενεργοποιητών της αγγειογένεσης,
- EMD121974 (**11**) ως αναστολέας των ιντεγκρινών των ενδοθηλιακών κυττάρων, και
- Tempostatin™ (**12**) χωρίς ακόμα προσδιορισμένο μηχανισμό δράσης.

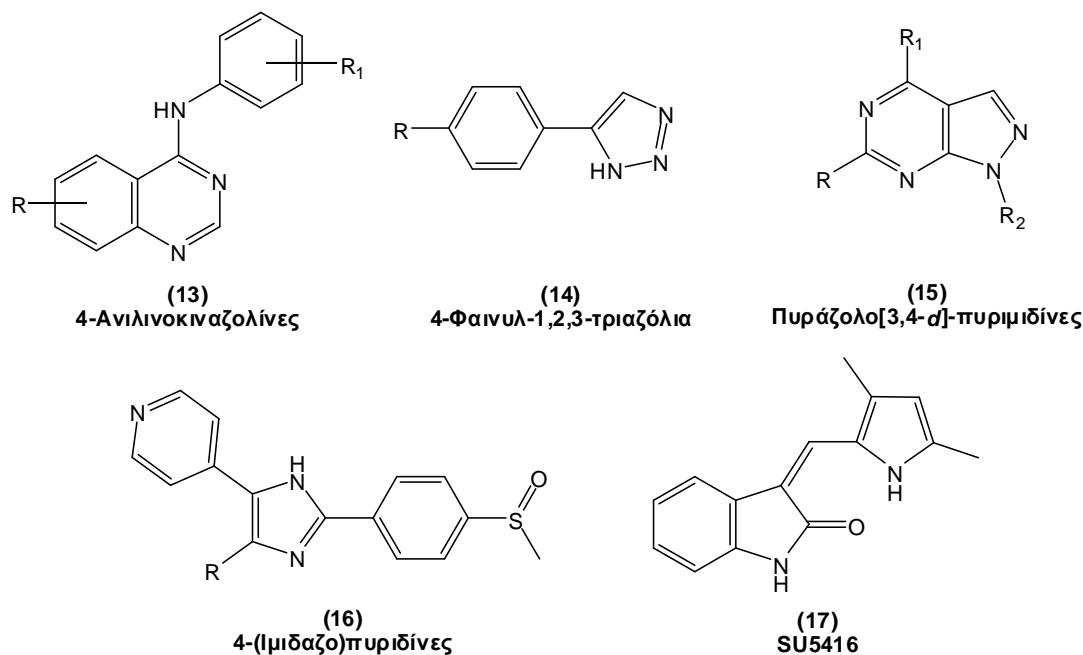
Κατά την τελευταία δεκαετία πολλά μόρια που εμπεριέχουν ποικίλους αζα-ετεροκυκλικούς δακτυλίους έχουν σχεδιαστεί, συντεθεί και μελετηθεί ως πιθανοί αναστολείς της αγγειογένεσης. Έτσι, έχουν συντεθεί παράγωγα των (Εικόνα 2.3):

- 4-ανιλινוקιναζολινών (**13**) ως αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης του VEGFR,⁷



Εικόνα 2.2. Δομές ενώσεων με αντι-αγγειογενετική δράση.

- 4-αρυλ-1,2,3-τριαζολίων (**14**) ως αναστολείς της hMetAP2 (human Methionine AminoPeptidase 2),⁸
- πυραζολο[3,4-*d*]πυριμιδινών (**15**) ως αναστολείς του αντι-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2,⁹
- 4-(ιμιδαζο)πυριδινών (**16**) ως αναστολείς της κινάσης του Tie2 υποδοχέα,¹⁰ και
- του ινδολικού παραγώγου SU5416¹¹ (**17**) που είναι στη φάση III των κλινικών δοκιμών ως αναστολέας του υποδοχέα της κινάσης της τυροσίνης Flk-1/KDR.

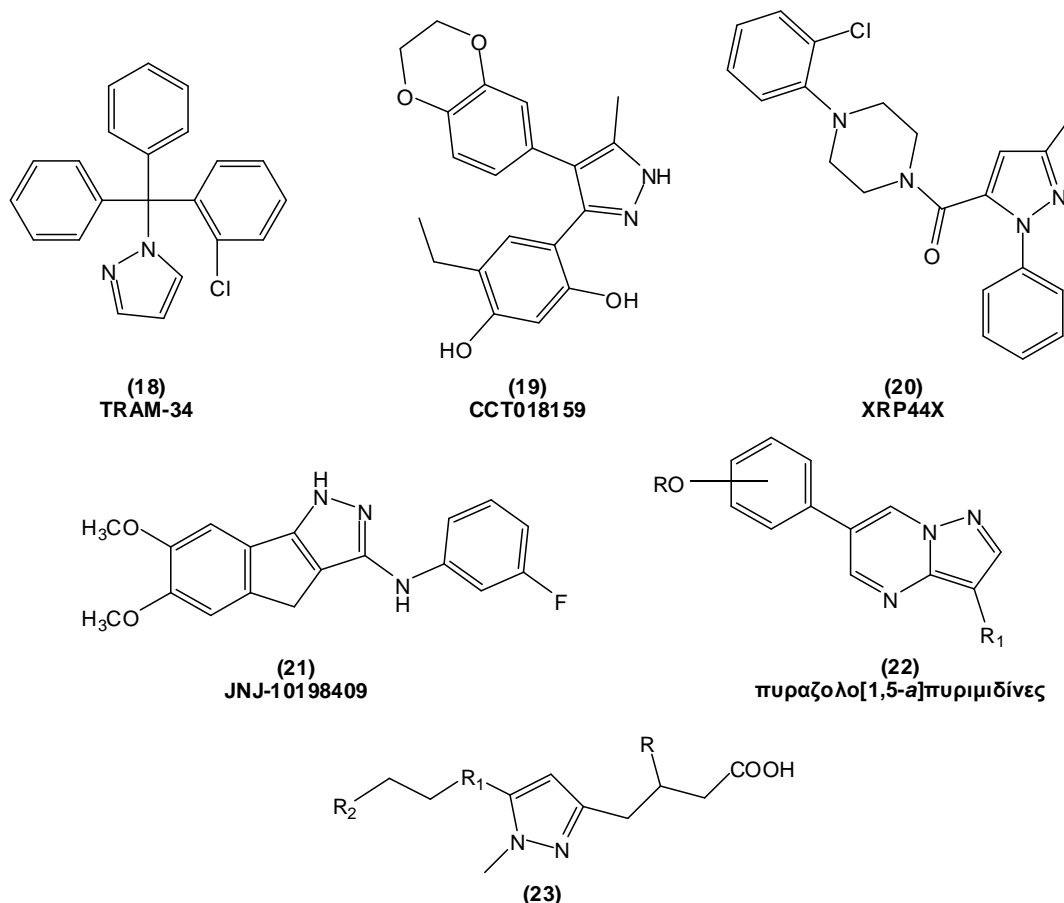


Εικόνα 2.3. Δομές αζα-ετεροκυκλικών μορίων με αντι-αγγειογενετική δράση.

Στο πλαίσιο διερεύνησης των αζα-ετεροκυκλικών παραγώγων, έχει βρεθεί ότι ποικίλα μόρια που περιέχουν τον πυραζολικό δακτύλιο διαθέτουν πολύ ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση. Τα πλέον αξιομνημόνευτα μόρια της κατηγορίας αυτής είναι (Εικόνα 2.4):

- το μόριο TRAM-34 (**18**), που έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και της αγγειογένεσης μπλοκάροντας το κατιονικό κανάλι $\text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ (IKCa1),¹² διότι η αύξηση στην έκφραση του IKCa1 από αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο **bFGF2** και ο **VEGF**, είναι απαραίτητη για την διέγερση της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της αγγειογένεσης *in vivo*,
- τα 3,4-δифαινυλ υποκατεστημένα πυραζόλια, που είναι αναστολείς της πρωτεΐνης του θερμικού σοκ HSP90,¹³
- το μόριο CCT018159 (**19**), που αποτελεί σημείο αναφοράς, αφού αναστέλλει τις λειτουργίες των ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων που εμπλέκονται στην εισβολή των καρκινικών όγκων και στην αγγειογένεση, προκαλώντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G_1 φάση και την απόπτωσή του,
- το πυραζόλιο XRP44X (**20**), που αναστέλλει τον **FGF2** που προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras-Net, το οποίο οδηγεί στην αγγειογένεση,¹⁴
- το JNJ-10198409 (**21**), που αποτελεί το μόριο αναφοράς για την αναστολή της κινάσης της τυροσίνης του **PDGF** υποδοχέα,¹⁵

- τις πυραζολο[1,5-*a*]πυριμιδίνες (**22**), που έχουν συντεθεί ως αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης του **VEGF** υποδοχέα,¹⁶ και
- τα πυραζολικά παράγωγα (**23**), που έχουν αναγνωρισθεί ως ανταγωνιστές της ιντεγκρίνης $\alpha_v\beta_3$, που αυξάνεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την αγγειογένεση.¹⁷

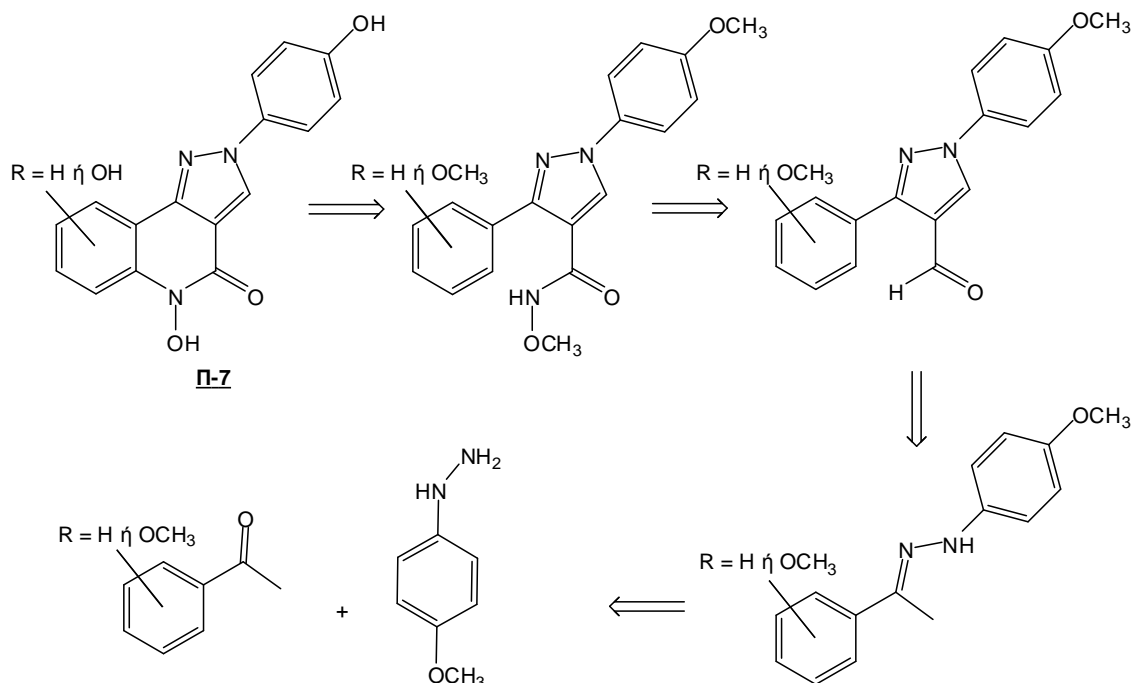


Εικόνα 2.4. Δομές των ενώσεων που φέρουν το δακτύλιο του πυραζολίου με ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση.

2.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Βάση για το σχεδιασμό των νέων μορίων της διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της συνύπαρξης -σε μία ένωση- της φαρμακοφόρου ενός υποκατεστημένου πυραζολικού δακτυλίου και της φαρμακοφόρου ομάδας της κινολίνης.¹⁸ Στόχος ήταν η δημιουργία παραγώγων σταθερής διαμόρφωσης που εμπεριέχουν το σύστημα δακτυλίων της πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνης. Σύμφωνα με την αντίστροφη συνθετική ανάλυση (Σχήμα 2.1), ο δακτύλιος της πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνης είναι δυνατόν να σχηματιστεί με την κυκλοποίηση του αντίστοιχου πρόδρομου μεθοξυ αμιδικού παραγώγου παρουσία του αντιδραστήριου PIFA

[phenyliodine(III)bis(trifluoroacetate)].¹⁹⁻²¹ Αντίστοιχα, ο πυραζολικός δακτύλιος θα προέλθει από την κυκλοποίηση των ενδιάμεσων υδραζινών, οι οποίες μπορούν εύκολα να συντεθούν από τη συμπύκνωση των διαθέσιμων πρώτων υλών.



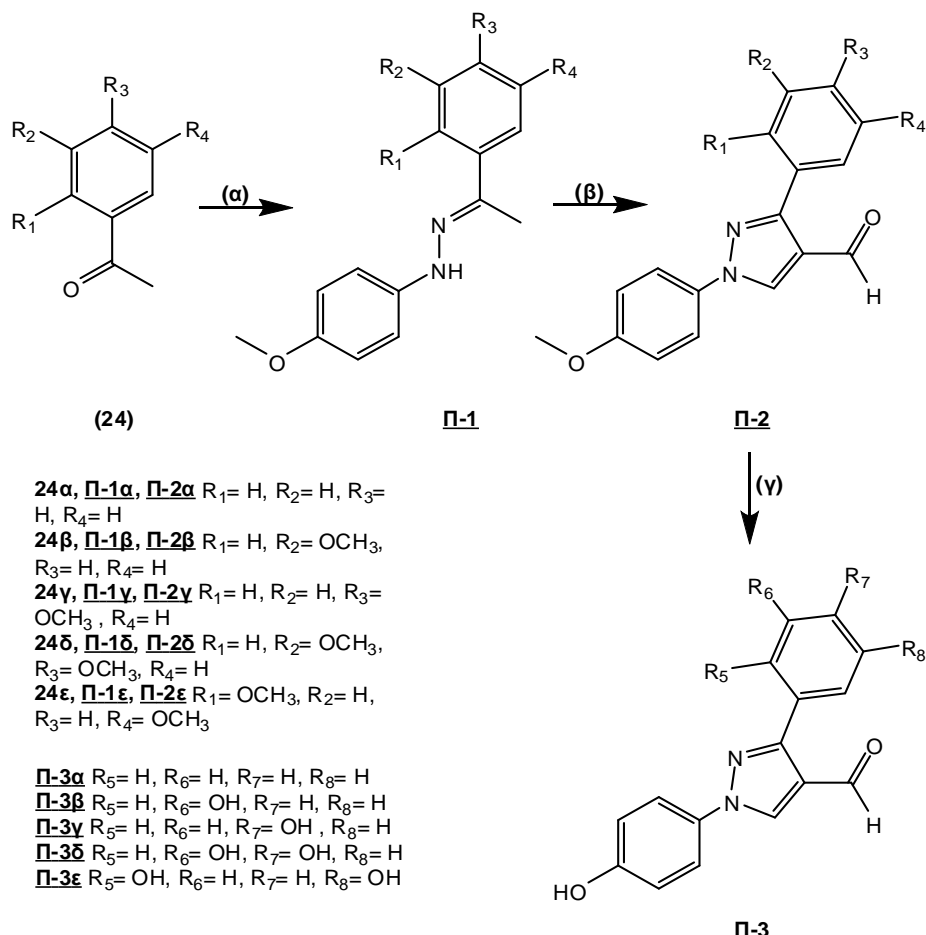
Σχήμα 2.1. Αντίστροφη συνθετική ανάλυση των πυραζολο[4,3-*c*]κινολινών (**II-7**).

Στα πυραζολικά παράγωγα που συντέθηκαν μελετήθηκε η: 1) *in vitro* ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων της αορτής ποντικών, **MAEC** (**M**ouse **A**ortic **E**ndothelial **C**ells), 2) *in vivo* αντι-αγγειογενετική τους δράση σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη των κοτόπουλων, **CAM** (**C**hicken **C**horio**A**llantoic **M**embrane), και 3) *in vitro* ικανότητά τους να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής βοοειδών, **BAEC** (**B**ovine **A**ortic **E**ndothelial **C**ells), στα αυχενικά κύτταρα τους ανθρώπου, **Hela** (**H**uman cervical) και στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, **MCF-7**.

2.2.1 Σύνθεση

Πρώτο βήμα για τη σύνθεση των νέων πυραζολικών παραγώγων είναι η σύζευξη των ακετοφαινονών **24** με την 4-μεθοξυφαινυλδραζίνη για την παραγωγή των ενδιάμεσων υδραζινών **II-1** (Σχήμα 2.2). Επειδή, οι υδραζίνες **II-1** ήταν ασταθείς

ακόμα και στη θερμοκρασία των $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, μετατράπηκαν χωρίς να απομονωθούν (άμεσα) στις αντίστοιχες πυραζολοκαρβοξαλδεύδες **Π-2** (Σχήμα 2.2) παρουσία ιμινιακών αλάτων (παράγονται με προσθήκη της 2,4,6-τριχλωρο[1,3,5]τριαζίνης-TCT στο DMF).²²

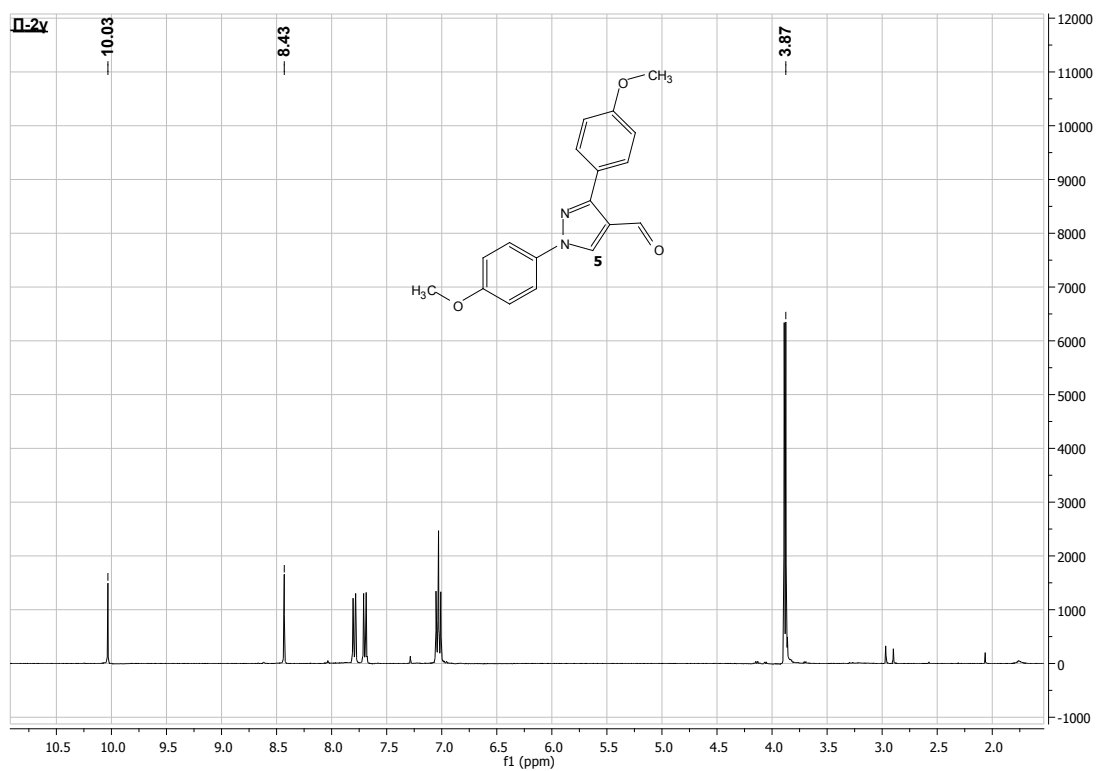
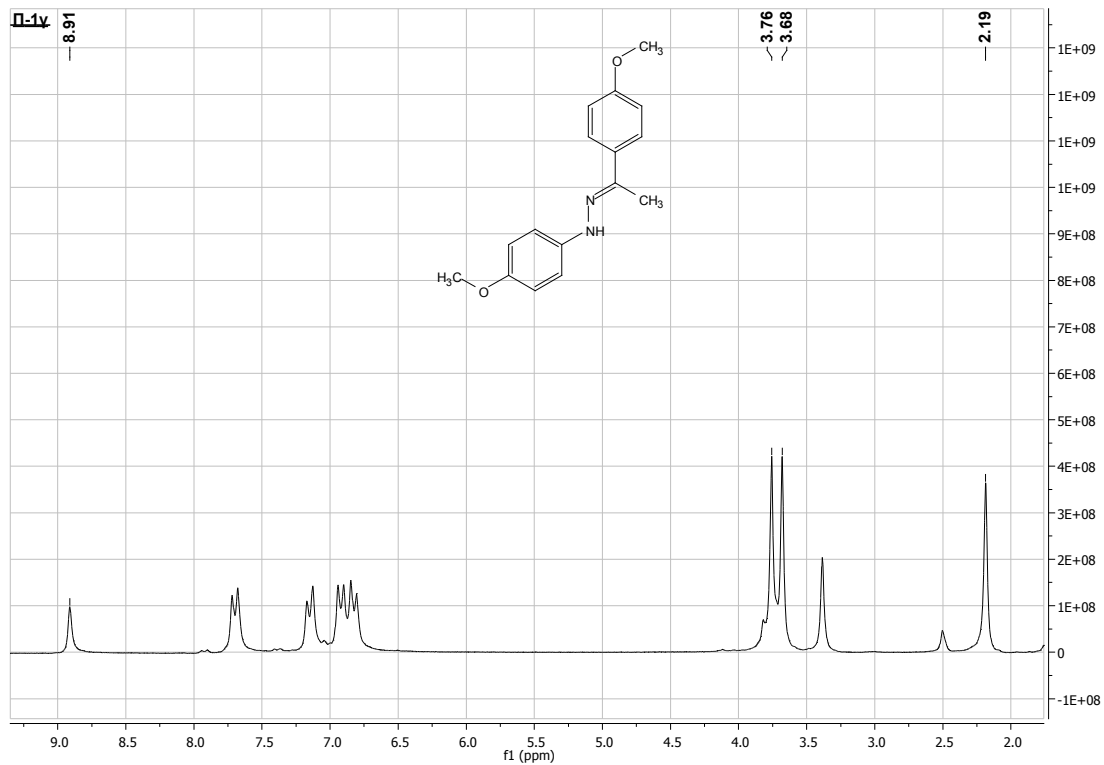


Σχήμα 2.2. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) υδροχλωρική 4-μεθοξυφαινυλδραζίνη, οξικό οξύ, Et_3N , EtOH ; (β) TCT, DMF; (γ) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Η σύνθεση του πυραζολικού παραγώγου **Π-2γ** είναι δυνατόν να πιστοποιηθεί με τη σύγκριση του φάσματος $^1\text{H NMR}$ με αυτό της πρόδρομης **Π-1γ** (Φάσμα 2.1). Συγκεκριμένα, παρατηρείται εξαφάνιση των κορυφών NH (8.91 ppm) και CH_3 (2.19 ppm), οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικές κορυφές της υδραζίνης **Π-1γ**. Παράλληλα εμφανίζονται οι κορυφές του αλδεϋδικού πρωτονίου της ένωσης **Π-2γ** στα 10.0 ppm και του πρωτονίου του νεοσχηματισθέντα πυραζολικού δακτυλίου (H-5) στα 8.43 ppm.

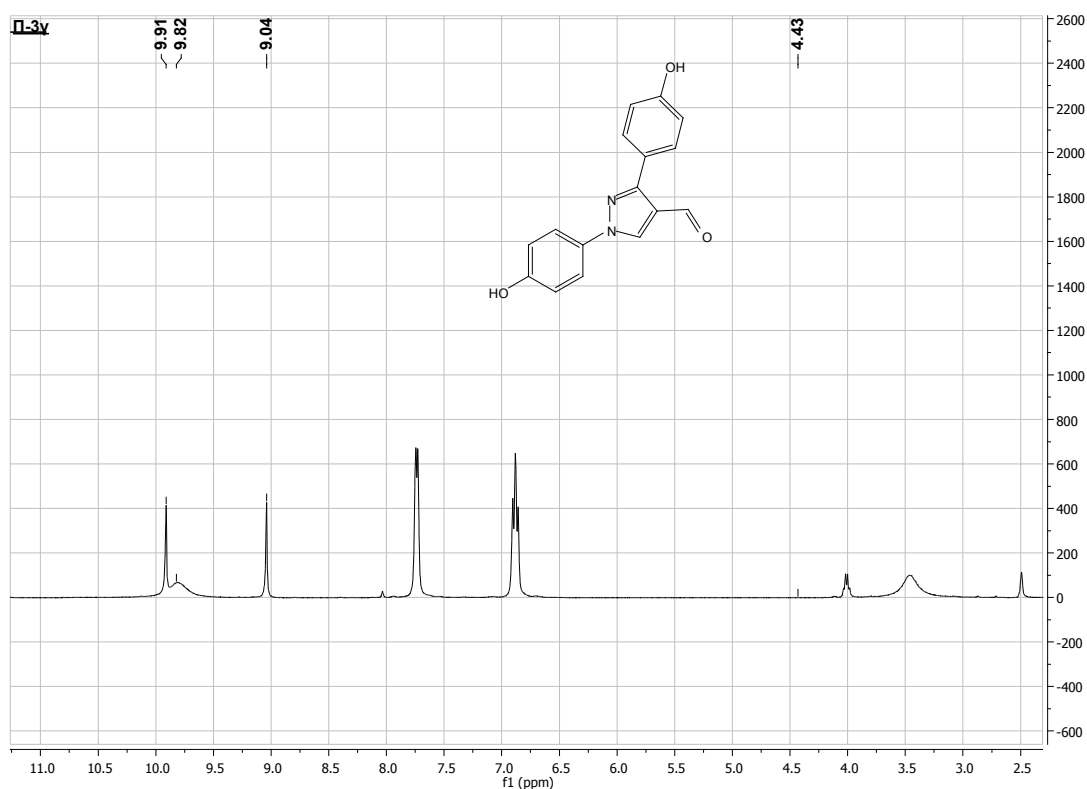
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι η επιλογή των συγκεκριμένων συνθηκών για την πραγματοποίηση της αντίδρασης υπαγορεύτηκε από το γεγονός ότι η χρησιμοποίηση (αρχικά) των συνθηκών Vilsmeier-Haack (DMF-POCl_3 , $80\text{ }^{\circ}\text{C}$),²³

για την επίτευξη της αντίδρασης αυτής οδήγησε στη θερμική διάσπαση και αποικοδόμηση των προϊόντων.



Φάσμα 2.1. ^1H NMR των ενώσεων **Π-1γ** (DMSO) και **Π-2γ** (CDCl_3).

Στη μόνη περίπτωση που ελήφθη προϊόν με τη χρησιμοποίηση των συνθηκών αυτών ήταν για το προϊόν **II-2a**. Άλλωστε μια πρόσφατη σχετική αναφορά²⁴ –για τη μετατροπή των υδραζινών σε πυραζόλια- έδειξε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας ή η χρήση μικροκυμάτων δεν συμβάλλει στην επίτευξη της αντίδρασης. Στη συνέχεια, η αποπροστασία των μεθοξυ-ομάδων με BBr_3 στους $-78\text{ }^\circ\text{C}$ σε διαλύτη DCM οδήγησε στον σχηματισμό των τελικών προϊόντων **II-3** σε συνολική απόδοση 90-95% (Σχήμα 2.2).

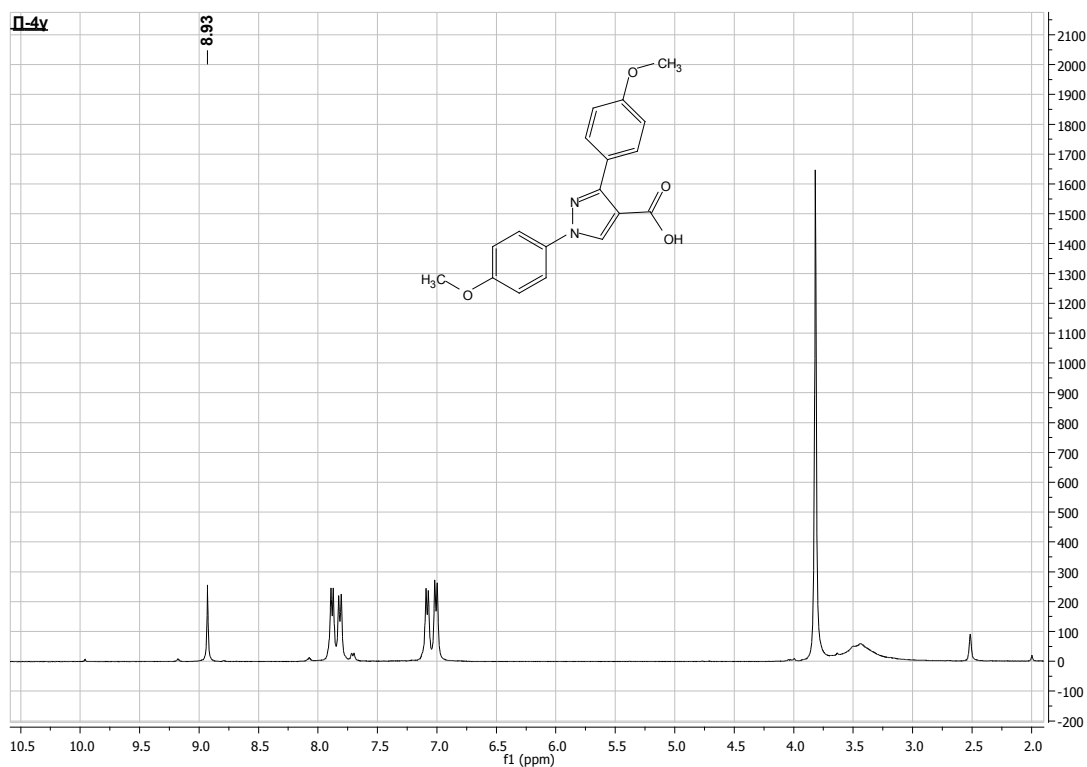


Φάσμα 2.2. ^1H NMR της ένωσης **II-3y** (DMSO).

Η μελέτη του φάσματος ^1H NMR της ένωσης **II-3y** (Φάσμα 2.2) έδειξε την απουσία των πρωτονίων των OCH_3 ομάδων που υπήρχαν στα 3.87 ppm στην πρόδρομή της ένωση **II-2y** (Φάσμα 2.1) και την παρουσία των φαινολικών OH στα 9.82 ppm. Τέλος, τόσο το αλδεϋδικό πρωτόνιο όσο και το H-5 έχουν μετατοπιστεί στα 9.91 και 9.04 ppm αντίστοιχα.

Για τη σύνθεση των πυράζολο[4,3-*c*]κινολινών **II-7**, οι πυραζολοκαρβοξαλδεϋδες **II-2** οξειδώθηκαν –κάτω από ήπιες συνθήκες, με τη χρήση χλωρικού νατρίου (NaOCl_2) και σουλφαμικού οξέος ($\text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$)- σχεδόν ποσοτικά (95%) προς τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα **II-4**²⁵ (Σχήμα 2.3). Η χρήση ισχυρών

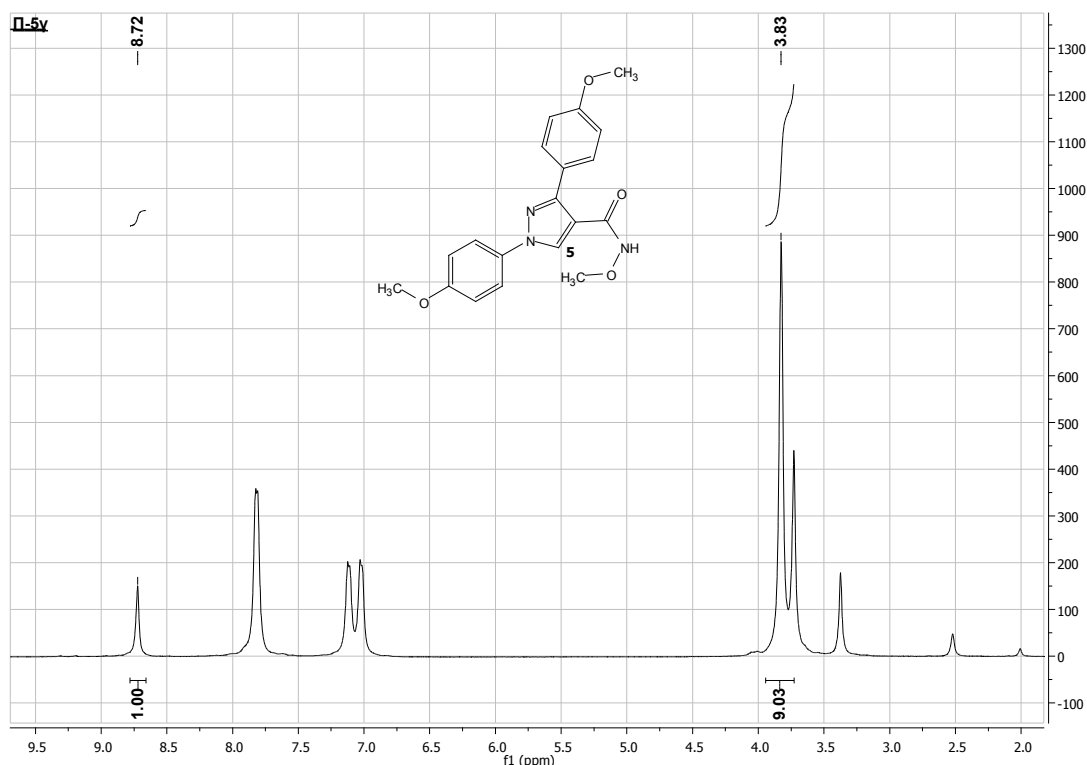
οξειδωτικών (π.χ. αντιδραστήριο Jones) έδωσε τα οξέα **II-4** αλλά με πολύ μικρότερες αποδόσεις (50-60%). Στη συνέχεια, τα καρβοξυλικά οξέα **II-4** μετατράπηκαν στα αμίδια **II-5** με τη χρήση του αντιδραστηρίου σύζευξης TBTU [*N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(benzotriazol-1-yl)uronium tetrafluoroborate]. Τέλος, η χρησιμοποίηση του αντιδραστηρίου PIFA και τριφθοροοξικού οξέος (TFA) είχε ως αποτέλεσμα την κυκλοποίησή τους προς τις πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνες **II-6** σε καλές αποδόσεις (55-57%) (Σχήμα 2.3). Η χρήση του αντιδραστηρίου PIFA προτιμήθηκε έναντι άλλων οξέων κατά Lewis (παράγωγα αργύρου²⁶ ή ψευδαργύρου²⁷) λόγω των ήπιων συνθηκών που απαιτεί, της χαμηλής του τοξικότητας και των καθαρών αντιδράσεων που παρέχει. Η αντικατάσταση του τριφθοροοξικού οξέος με τριφθοροαιθανόλη (TFE) οδήγησε στο σχηματισμό των ίδιων προϊόντων (**II-6**) αλλά σε χαμηλότερες αποδόσεις (~ 35%). Στη συνέχεια, η αποπροστασία των μεθοξομαδών με BBr_3 στους $-78\text{ }^\circ\text{C}$ σε διαλύτη DCM οδήγησε στον σχηματισμό των τελικών προϊόντων **II-7** σε συνολική απόδοση 90-95% (Σχήμα 2.3).



Φάσμα 2.3. ^1H NMR της ένωσης **II-4γ** (DMSO).

Η σύγκριση των φασμάτων των ενώσεων **II-4γ** (Φάσμα 2.3) και **II-2γ** (Φάσμα 2.1) έδειξε την εξαφάνιση του αλδεϋδικού πρωτονίου της ένωσης **II-2γ** στα 10.0 ppm, ενώ

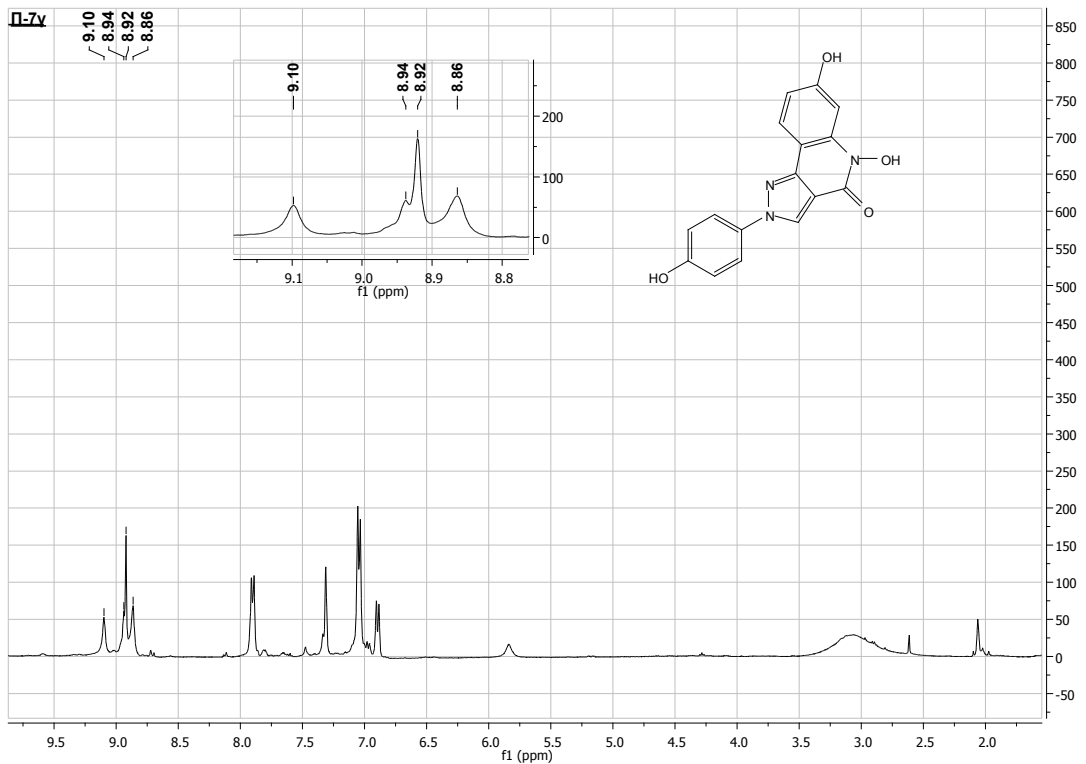
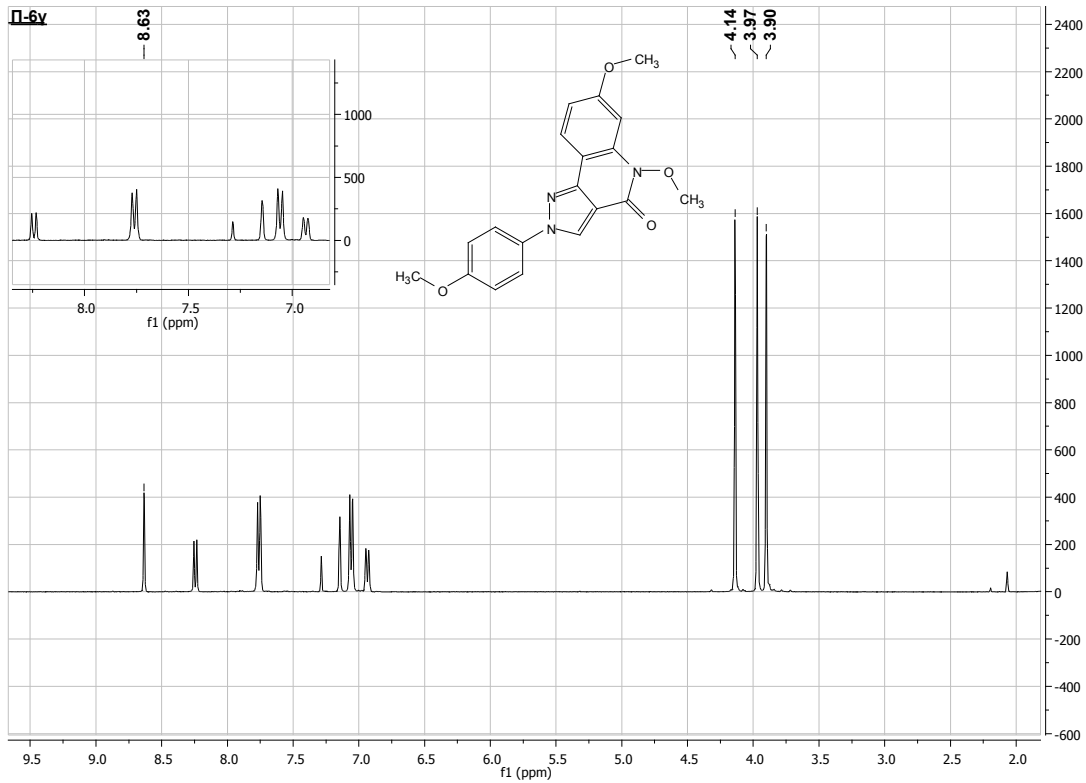
κατά τη μετατροπή του οξέος **II-4γ** στο αμίδιο **II-5γ** (Φάσμα 2.4) η παρουσία των τριών OCH₃ ομάδων πιστοποιήθηκε από την ολοκλήρωση του πρωτονίου H-5 σε σχέση με τα OCH₃ πρωτόνια, η οποία είναι 1 προς 9. Το φάσμα της πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνης **II-6γ** (Φάσμα 2.5) πιστοποιεί την ύπαρξη του κλειστού δακτυλίου από την αλλαγή-ολοκλήρωση στη διαμόρφωση των φαινολικών πρωτονίων. Τέλος, η σύνθεση του αναλόγου **II-7γ** (Φάσμα 2.5) πιστοποιήθηκε από το φάσμα ¹H NMR, στο οποίο δεν παρατηρείται η ύπαρξη OCH₃ ομάδων στην περιοχή 3.9-4.2 ppm. Παράλληλα, εμφανίζονται οι κορυφές των OH στα 9.10, 8.94 και 8.86 ppm.



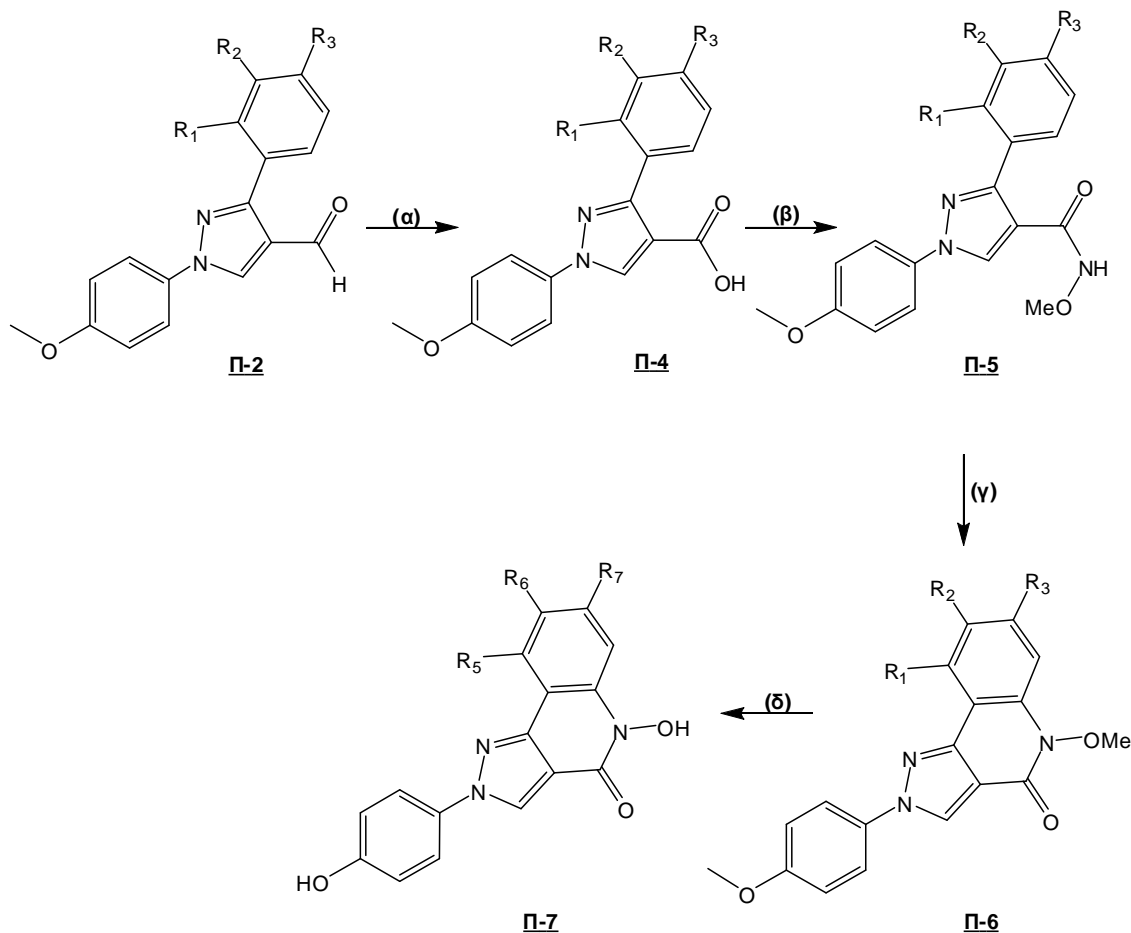
Φάσμα 2.4. ¹H NMR της ένωσης **II-5γ** (DMSO).

Όσο αφορά το μηχανισμό για το σχηματισμό των πυραζολο[4,3-*c*]κινολινών **II-6** αυτός προϋποθέτει τη δημιουργία ενδιάμεσων *N*-ακυλοάζο ιόντων,²⁸ όπου αντιδρούν με το νουκλεόφιλο αρωματικό δακτύλιο σχηματίζοντας ένα νέο ενδομοριακό δεσμό (Σχήμα 2.4). Στην περίπτωση του αμιδίου **II-5γ** παρατηρήθηκε επίσης και ο σχηματισμός του spiro προϊόντος **II-8** (Σχήμα 2.4). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι και τα δύο προϊόντα λαμβάνονται από το ίδιο ενδιάμεσο, όπου στην περίπτωση του spiro προϊόντος **II-8** έχουμε υδρόλυση του ενδιάμεσου κατά τη διαδικασία του work-up, ενώ για το προϊόν **II-6γ** έχουμε 1,2-μετάθεση (Σχήμα 2.4). Η

ύπαρξη του προϊόντος **Π-8** επιβεβαιώνεται και από το φάσμα πρωτονίου του (Φάσμα 2.6) όπου παρατηρούμε –σύμφωνα με την ολοκλήρωση των πρωτονίων- την ύπαρξη δύο μόνο OCH₃ ομάδων.



Φάσμα 2.5. ¹H NMR της ένωσης **Π-6γ** (CDCl₃) και **Π-7γ** (acetone-d₆).



Π-2α, Π-4α, Π-5α, Π-6α $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{H}$

Π-2β, Π-4β, Π-5β, Π-6β $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{H}$

Π-2γ, Π-4γ, Π-5γ, Π-6γ $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OCH}_3$

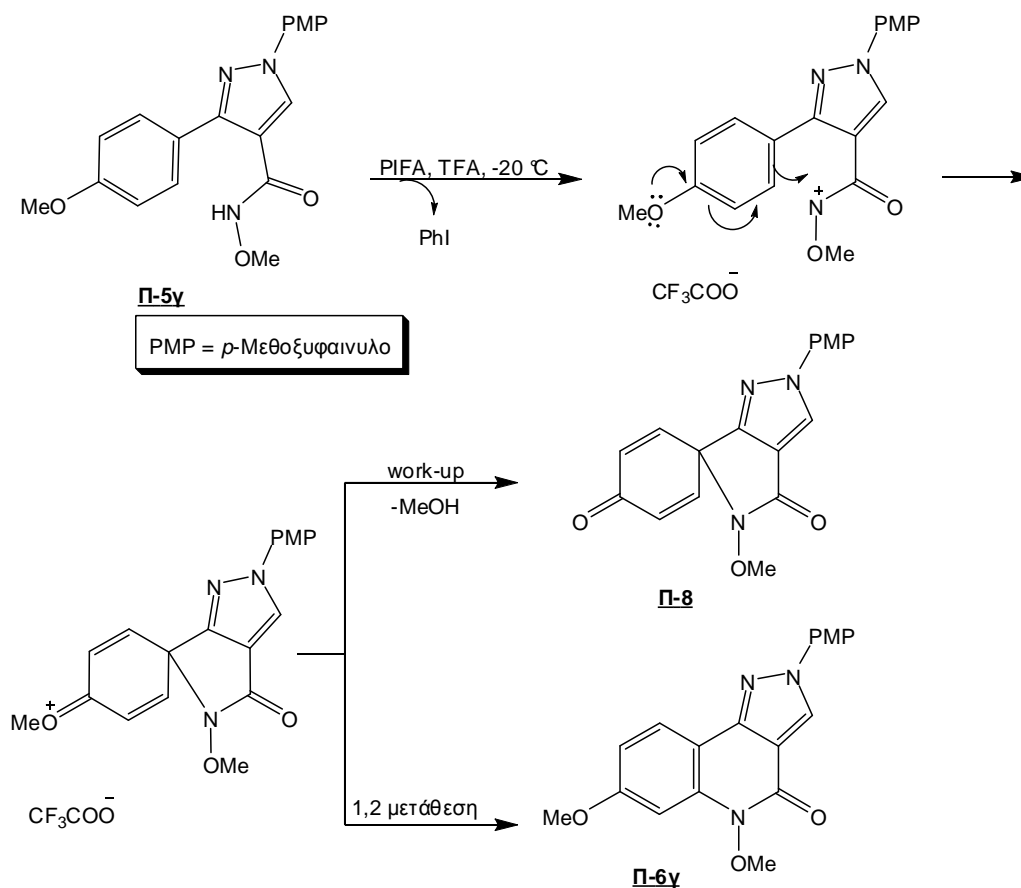
Π-7α $R_5 = \text{H}, R_6 = \text{H}, R_7 = \text{H}$

Π-7β $R_5 = \text{H}, R_6 = \text{OH}, R_7 = \text{H}$

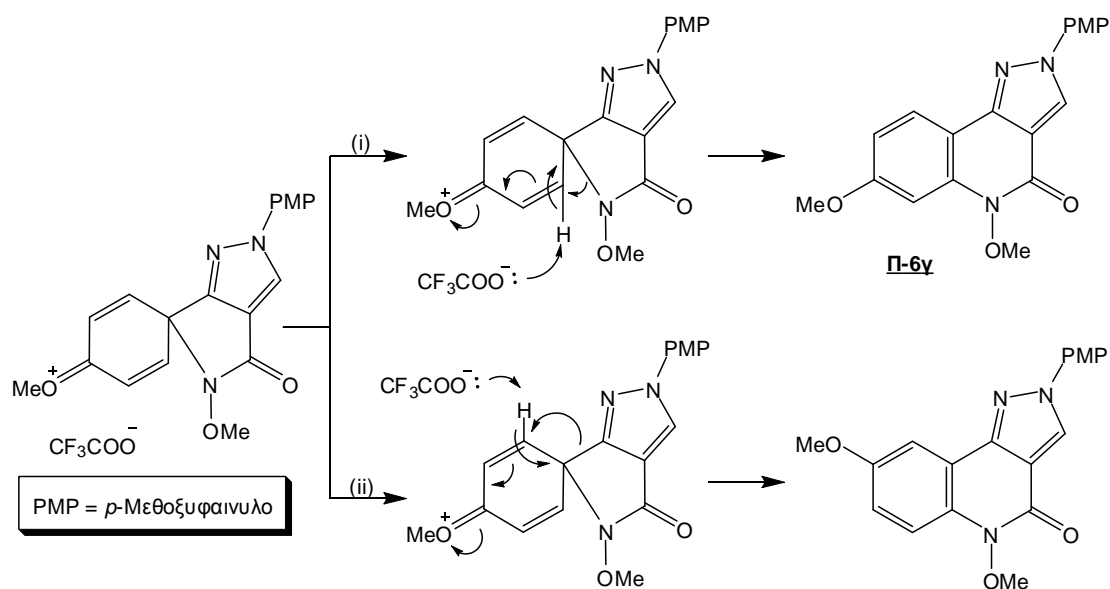
Π-7γ $R_5 = \text{H}, R_6 = \text{H}, R_7 = \text{OH}$

Σχήμα 2.3. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) $\text{NaClO}_2, \text{H}_2\text{NSO}_3\text{H}$, ακετόνη/ H_2O , 0°C ; (β) $\text{Et}_3\text{N}, \text{NH}_2\text{OMe}\cdot\text{HCl}, \text{TBTU}, \text{MeCN}$; (γ) $\text{PIFA}, \text{TFA}, \text{CH}_2\text{Cl}_2$; (δ) $\text{BBr}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2, -78^\circ\text{C}$.

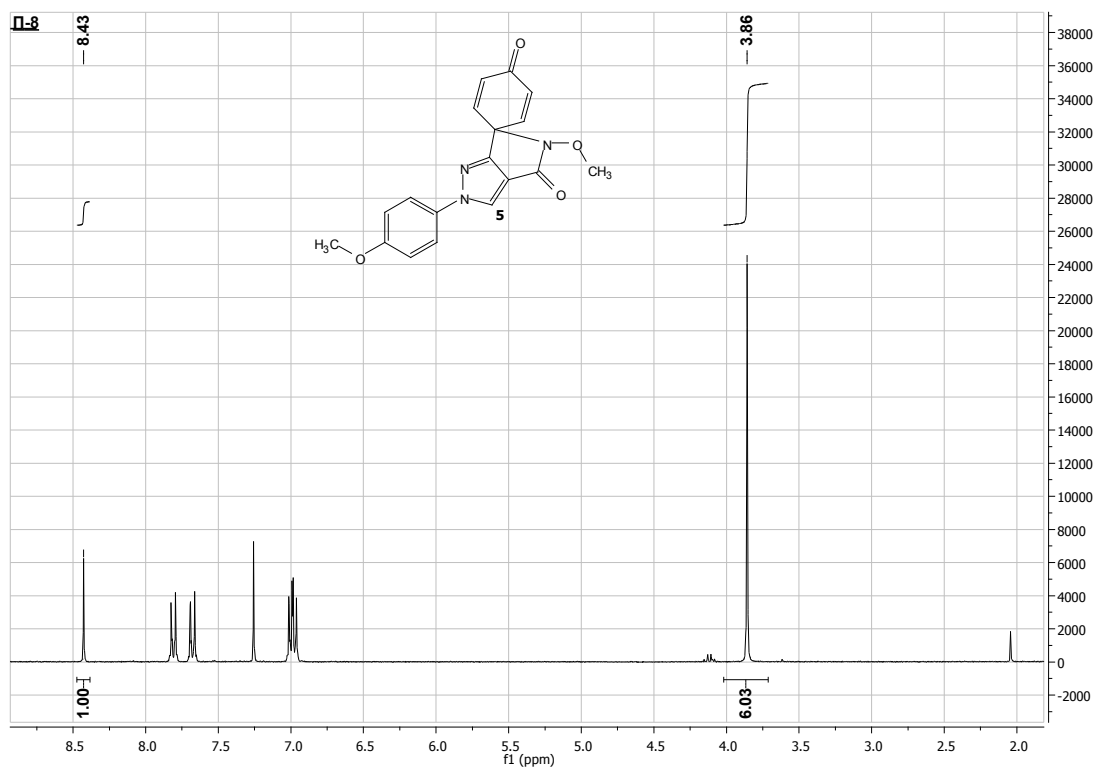
Ωστόσο, κατά την 1,2-μετάθεση του προϊόντος **Π-6γ** μπορούμε σύμφωνα με το Σχήμα 2.5 να λάβουμε δύο διαφορετικά regio-ισομερή, τα οποία θα έχουν ακριβώς την ίδια απεικόνιση στο $^1\text{H-NMR}$. Η πραγματική απεικόνιση του προϊόντος **Π-6γ** εξακριβώθηκε ύστερα από το πείραμα NOESY όπου έδειξε τη συσχέτιση μεταξύ του H-6 και των N-OCH₃ και C7-OCH₃ (Φάσμα 2.7).



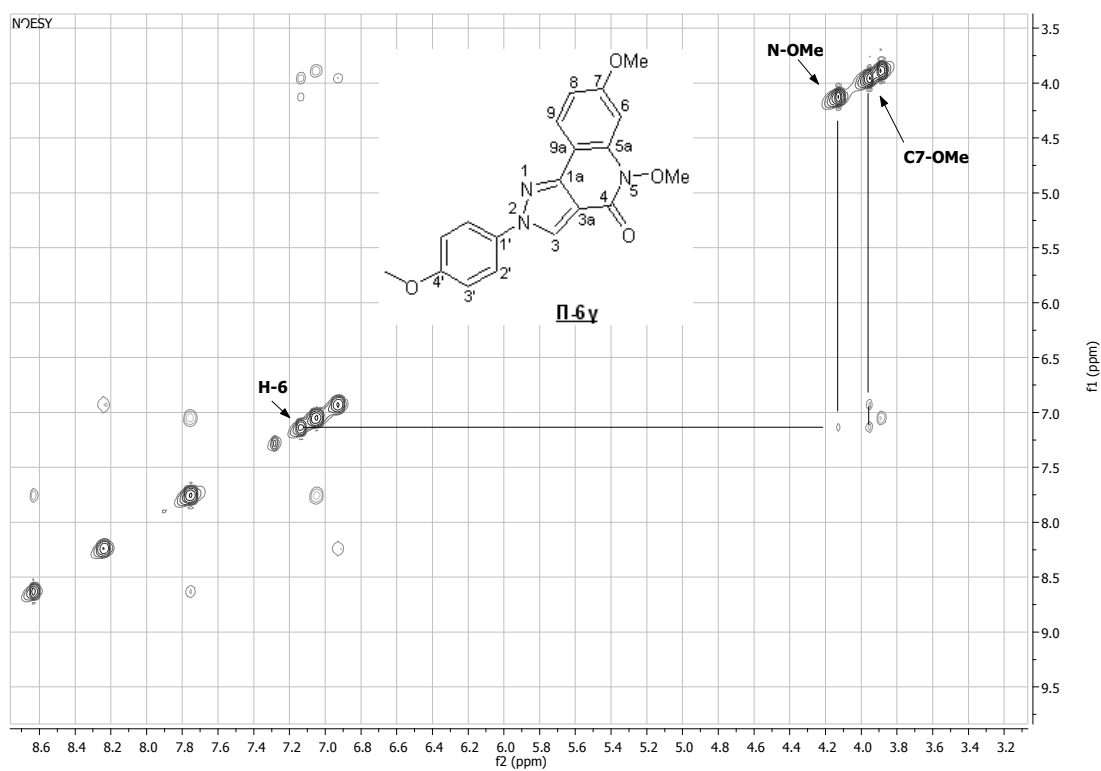
Σχήμα 2.4. Προτεινόμενος μηχανισμός για το σχηματισμό του spiro προϊόντος **II-8** και της πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνης **II-6γ**.



Σχήμα 2.5. Πιθανά προϊόντα κατά την 1,2-μετάθεση του αμιδίου **II-5γ**.

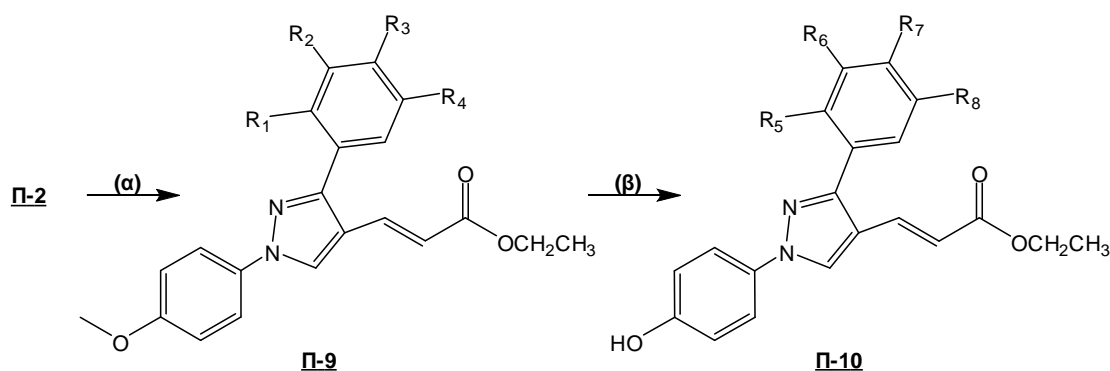


Φάσμα 2.6. ^1H NMR της ενώσης **II-8** (CDCl_3).



Φάσμα 2.7. NOESY NMR της ενώσης **II-6γ**.

Στη συνέχεια, οι πυραζολοκαρβοξαλδεΐδες **Π-2** μετατράπηκαν στους αντίστοιχους α,β-ακόρεστους εστέρες **Π-9** με τη βοήθεια της αντίδρασης Wittig στην οποία χρησιμοποιήθηκε το σταθεροποιημένο υλίδιο του φωσφόρου $\text{Ph}_3\text{PCHCO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ για το σχηματισμό των επιθυμητών *E*-ισομερών. Στη συνέχεια, η αποπροστασία των μεθοξυ-ομάδων με BBr_3 στους $-78\text{ }^\circ\text{C}$ σε διαλύτη DCM οδήγησε στον σχηματισμό των τελικών προϊόντων **Π-10** σε συνολική απόδοση 85% (Σχήμα 2.6).



Π-2α, Π-9α $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{H}, \text{R}_3 = \text{H}, \text{R}_4 = \text{H}$

Π-2β, Π-9β $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{OCH}_3, \text{R}_3 = \text{H}, \text{R}_4 = \text{H}$

Π-2γ, Π-9γ $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{H}, \text{R}_3 = \text{OCH}_3, \text{R}_4 = \text{H}$

Π-2δ, Π-9δ $\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{OCH}_3, \text{R}_3 = \text{OCH}_3, \text{R}_4 = \text{H}$

Π-2ε, Π-9ε $\text{R}_1 = \text{OCH}_3, \text{R}_2 = \text{H}, \text{R}_3 = \text{H}, \text{R}_4 = \text{OCH}_3$

Π-10α $\text{R}_5 = \text{H}, \text{R}_6 = \text{H}, \text{R}_7 = \text{H}, \text{R}_8 = \text{H}$

Π-10β $\text{R}_5 = \text{H}, \text{R}_6 = \text{OH}, \text{R}_7 = \text{H}, \text{R}_8 = \text{H}$

Π-10γ $\text{R}_5 = \text{H}, \text{R}_6 = \text{H}, \text{R}_7 = \text{OH}, \text{R}_8 = \text{H}$

Π-10δ $\text{R}_5 = \text{H}, \text{R}_6 = \text{OH}, \text{R}_7 = \text{OH}, \text{R}_8 = \text{H}$

Π-10ε $\text{R}_5 = \text{OH}, \text{R}_6 = \text{H}, \text{R}_7 = \text{H}, \text{R}_8 = \text{OH}$

Σχήμα 2.6. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) $\text{Ph}_3\text{PCHCO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, MeCN, reflux; (β) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.2 Βιολογική δράση

2.2.2.1 Αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων

Για να αποτιμηθεί η αντι-αγγειογενετική δραστηριότητα, των πυραζολικών παραγώγων, αρχικά μελετήθηκε η *in vitro* αποτελεσματικότητά τους στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των **MAEC** (Πίνακας 2.1).

Όλες σχεδόν οι ενώσεις εμφάνισαν κατά 50% αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων για δοσολογίες από 6 έως 44 μM . Από τις πυραζολοκαρβοξαλδεΐδες **Π-3**, ως πλέον δραστική αποδείχθηκε η **Π-3δ** ($\text{IC}_{50} = 12\text{ } \mu\text{M}$), ενώ η **Π-3α** δεν εμφάνισε καμία ανασταλτική δράση ($\text{IC}_{50} \geq 100\text{ } \mu\text{M}$). Η αντικατάσταση της αλδεΐδομάδας με έναν α,β-ακόρεστο εστέρα (**Π-10**) οδήγησε σε

μικρή βελτίωση της αντι-πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας με τιμές IC_{50} που κυμαίνονται από 6 έως 29 μM . Συγκρίνοντας τη δραστηριότητα των ενώσεων που συντέθηκαν, παρατηρείται ότι η ύπαρξη δύο ΟΗ-ομάδων σε θέσεις μετά και πάρα στον φαινολικό δακτύλιο Β, αυξάνει την δραστηριότητά τους. Τέλος, όσο αφορά τους συμπυκνωμένους δακτυλίους (μόρια **Π-7**), τη μεγαλύτερη δράση διαθέτει η ένωση **Π-7α** με $IC_{50} = 7 \mu M$, η οποία δεν φέρει καμία ΟΗ-ομάδα στον Β φαινολικό της δακτύλιο.

Πίνακας 2.1. Κυτταροστατική δραστηριότητα των πυραζολο παραγώγων στην κυτταρική σειρά MAEC.

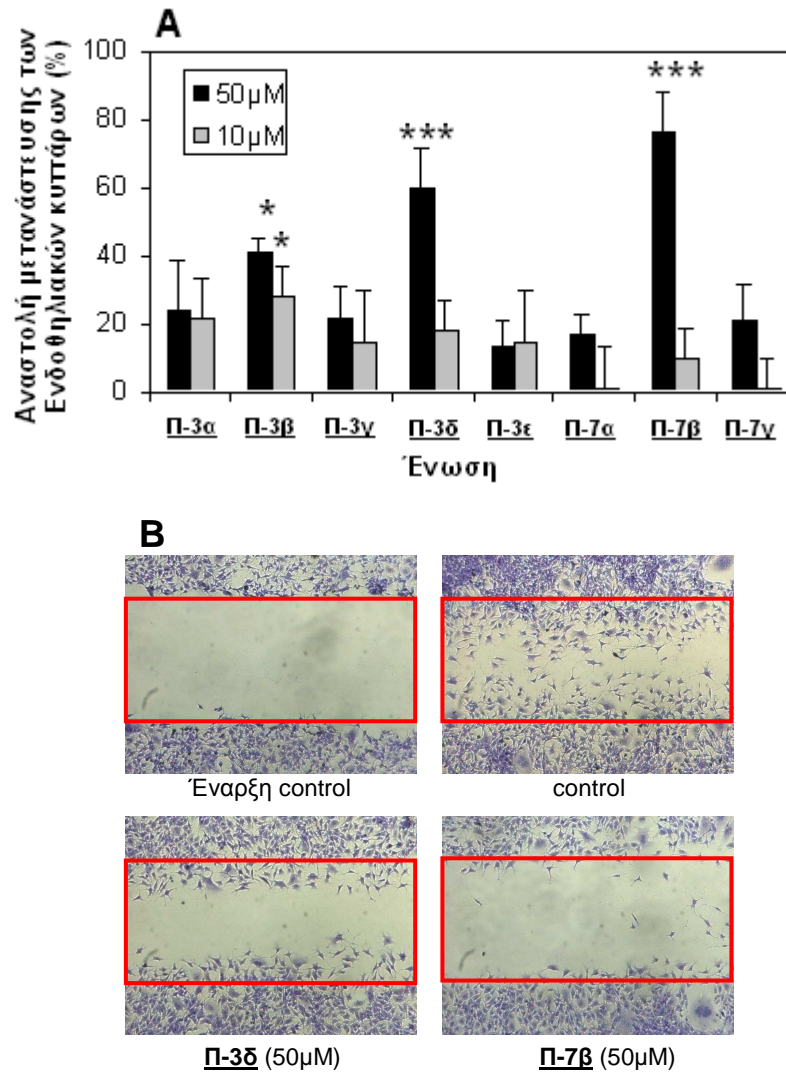
<i>Αλδεΐδες</i>	<u>Π-3α</u>	<u>Π-3β</u>	<u>Π-3γ</u>	<u>Π-3δ</u>	<u>Π-3ε</u>
IC_{50}^*	≥ 100	42 ± 3.4	44 ± 7.2	12 ± 2.9	43 ± 15
<i>Κλειστός δακτύλιος</i>	<u>Π-7α</u>	<u>Π-7β</u>	<u>Π-7γ</u>		
IC_{50}^*	7.0 ± 0.3	25 ± 1.4	42 ± 4.2		
<i>Εστέρες</i>	<u>Π-10α</u>	<u>Π-10β</u>	<u>Π-10γ</u>	<u>Π-10δ</u>	<u>Π-10ε</u>
IC_{50}^*	29 ± 15	14 ± 0.6	25 ± 1.1	6.2 ± 1.3	12 ± 2.8

* IC_{50} = Συγκέντρωση της ένωσης για τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50%. Τα δεδομένα εκφράζονται σε μM συγκεντρώσεις.

2.2.2.2 Αναστολή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων

Για να αποτιμηθεί περαιτέρω η αντι-αγγειογενετική δραστηριότητα των πυραζολικών παραγώγων που συντέθηκαν, μελετήθηκαν διεξοδικότερα οι ενώσεις **Π-3** και **Π-7** που είχαν προσδιοριστεί ως οι πλέον δραστικές. Στα μόρια αυτά προσδιορίστηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία αποτελεί καθοριστικό βήμα για το σχηματισμό των νέων αιμοφόρων αγγείων.

Στους προσδιορισμούς που έγιναν (Εικόνα 2.5), η πυραζολοκαρβοξαλδεΐδη **Π-3β** και κυρίως η **Π-3δ** έδειξαν ότι αναστέλλουν σημαντικά την επούλωση ενός τραύματος με ενδοθηλιακά κύτταρα σε συγκεντρώσεις της τάξης των 50 μM . Όμως, την ισχυρότερη αναστολή (76%) στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, παρουσίασε η ένωση **Π-7β**, στην ίδια συγκέντρωση με τις προηγούμενες ενώσεις.

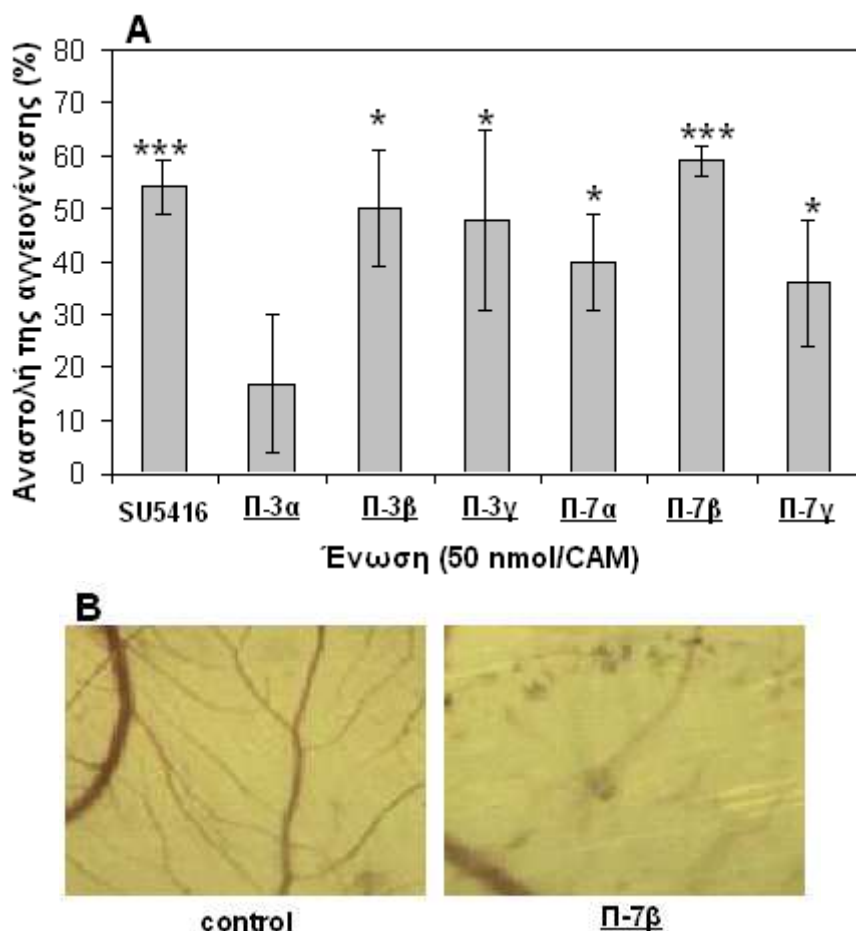


Εικόνα 2.5. (A) Αναστολή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τις ενώσεις **Π-3** και **Π-7** * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. (B) Αντιπροσωπευτικές εικόνες του control (DMSO) στις 0 και 8 h μετά τη δημιουργία τραύματος. Οι ενώσεις **Π-3δ** και **Π-7β** καθυστερούν σημαντικά την επούλωση του τραύματος σε συγκεντρώσεις 50 μM μετά από 8 h.

2.2.2.3 Αναστολή της αγγειογένεσης στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη των κοτόπουλων (CAM)

Η αντι-αγγειογενετική δραστηριότητα των ενώσεων **Π-3** και **Π-7** μελετήθηκε και με τη βιοδοκιμή CAM, η οποία αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την *in vivo* μελέτη της αγγειογένεσης. Ως σημείο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το μόριο SU5416 (Εικόνα 2.3), το οποίο σε συγκεντρώση 50 nmol/CAM, παρουσιάζει αναστολή της αγγειογένεσης κατά 54% ($p < 0.01$) (Εικόνα 2.6). Κατά τους προσδιορισμούς αυτούς η ένωση **Π-3α** δεν έδειξε να διαθέτει κάποια αξιοσημείωτη αντι-αγγειογενετική δραστηριότητα στη συγκέντρωση των 50 nmol/CAM, ενώ

αντίθετα τα μόρια **Π-3β** και **Π-3γ** ανέστειλαν τη δημιουργία των νέων αγγείων στην ίδια συγκέντρωση κατά 50 και 48% αντίστοιχα ($p < 0.05$) (Εικόνα 2.6). Οι ενώσεις **Π-3δ** και **Π-3ε** παρουσίασαν τοξικότητα απέναντι στη **CAM** με αποτέλεσμα να μην μπορεί να αποτιμηθεί η αντι-αγγειογενετική τους δράση. Όσον αφορά τα μόρια **Π-7** αυτά ανέστειλαν σε σημαντικό βαθμό τη δημιουργία νέων αγγείων, με την ένωση **Π-7β** να είναι η ισχυρότερη επιδεικνύοντας 64% αναστολή ($p < 0.01$) σε συγκέντρωση 50 nmol/CAM (Εικόνα 2.6). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά 100% αναστολή της αγγειογένεσης δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί με αυτή τη μέθοδο, αφού τα προυπάρχοντα αγγεία που βρίσκονται ήδη στην ένατη μέρα όταν οι ενώσεις τοποθετούνται στις **CAM**, προσμετρώνται όταν καθορίζεται η αγγειογένεση την ενδέκατη μέρα. Έτσι, η ένωση **Π-7β** αναστέλλει σχεδόν πλήρως το σχηματισμό των νέων αιμοφόρων αγγείων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.4 Β.



Εικόνα 2.6. (A) Αναστολή της αγγειογένεσης από τις ενώσεις **Π-3** και **Π-7** * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$. (B) Οι **CAM** στις οποίες χρησιμοποιήθηκε μόνο το control (DMSO) παρουσίασαν εκτεταμένη εμφάνιση νέων αγγείων, ενώ εκείνες στις οποίες χορηγήθηκε η ένωση **Π-7β** χαρακτηρίζονται από μεγάλες περιοχές χωρίς αγγεία.

2.2.2.4 Αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων

Στη συνέχεια, εξετάστηκε αν οι ενώσεις που έχουν αντι-αγγειογενετική δράση μπορούν να αναστείλουν και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, οι ενώσεις **Π-3** και **Π-7** μελετήθηκαν ως προς τη δραστηκότητά τους στις καρκινικές σειρές **BAEC**, **Hela** και **MCF-7** (Πίνακας 2.2). Όλες οι ενώσεις παρουσίασαν μέτρια δραστηκότητα στις ενδοθηλιακές και καρκινικές σειρές.

Πίνακας 2.2. Κυτταροστατική δραστηκότητα των ενώσεων **Π-3** και **Π-7** σε ενδοθηλιακές και καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Ένωση	*IC ₅₀ (μM)			
	MAEC	BAEC	Hela	MCF-7
Π-3α	≥ 100	64 ± 8.4	79 ± 8.8	47 ± 5.1
Π-3β	42 ± 3.4	29 ± 4.5	37 ± 4.9	29 ± 6.8
Π-3γ	44 ± 7.2	32 ± 8.7	37 ± 9.5	38 ± 6.0
Π-3δ	12 ± 2.9	17 ± 4.2	39 ± 1.4	24 ± 0.4
Π-3ε	43 ± 15	≥ 100	≥ 100	≥ 100
Π-7α	7.0 ± 0.25	4.6 ± 0.9	8.9 ± 0.1	5.8 ± 1.8
Π-7β	25 ± 1.4	38 ± 9.1	37 ± 2.6	26 ± 2.2
Π-7γ	42 ± 4.2	52 ± 11	38 ± 4.3	25 ± 8.1

*IC₅₀ = Συγκέντρωση της ένωσης για τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50%.

2.2.3 Προοπτική

Η ένωση **Π-7β** -που φέρει το σύστημα δακτυλίων πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνη- είναι ένα πολλά υποσχόμενο μόριο, αφού έδειξε αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών καρκινικών κυττάρων *in vitro* και της αγγειογένεσης *in vivo*. Επόμενο βήμα αποτελεί η μελέτη για την πλήρη εξακρίβωση του μονοπατιού μέσω του οποίου αναστέλλεται η αγγειογένεση, το οποίο θα οδηγήσει σε πειράματα μοριακής προσομοίωσης μεταξύ της ένωσης **Π-7β** και του αντίστοιχου υποδοχέα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών θα οδηγήσουν στο σχεδιασμό νέων αναλόγων της ένωσης **Π-7β** με απώτερο στόχο τη μεγαλύτερη αναστολή της αγγειογένεσης *in vivo*.

2.4 Βιβλιογραφία

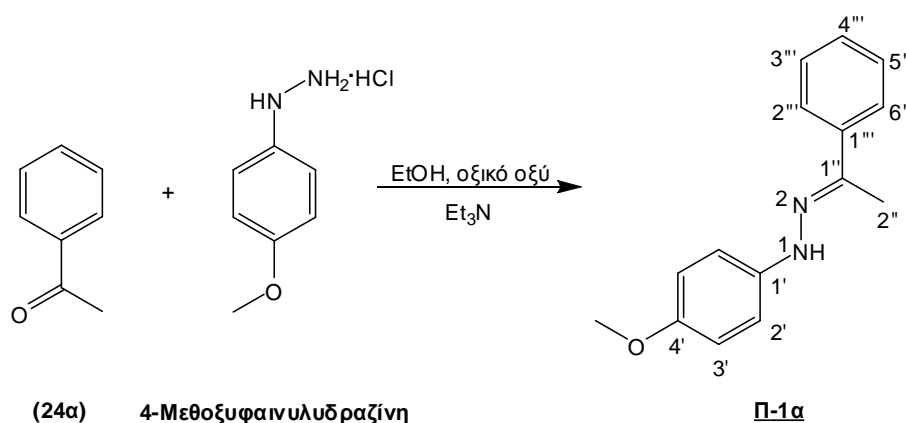
1. Folkman, J. N. *Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186.
2. Liekens, S.; De Clercq, E.; Neyts, J. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 61, 253-270.
3. Carmeliet, P. *Nature* **2005**, 438, 932-936.
4. Folkman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 273-286.
5. Folkman, J. *Nat. Med.* **1995**, 1, 27-31.
6. Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Ferrara, N. *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350, 2335-2342.
7. Hennequin, L. F.; P. Thomas, A.; Johnstone, C.; E. Stokes, E. S.; Plé, P. A.; Lohmann, J. J. M.; ., D. J. O.; Dukes, M.; Wedge, S. R.; Curwen, J. O.; J. Kendrew; Brempt, C. L.-v. d. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 5369-5389.
8. Kallander, L. S.; Lu, Q.; Chen, W.; Tomaszek, T.; Yang, G.; Tew, D.; Meek, T. D.; Hofmann, G. A.; Schulz-Pritchard, C. K.; Smith, W. W.; Janson, C. A.; Ryan, M. D.; Zhang, G.-F.; Johanson, K. O.; Kirkpatrick, R. B.; Ho, T. F.; Fisher, P. W.; Mattern, M. R.; Johnson, R. K.; Hansbury, M. J.; Winkler, J. D.; Ward, K. W.; Veber, D. F.; Thompson, S. K. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 5644-5647.
9. Carraro, F.; Naldini, A.; Pucci, A.; Locatelli, G. A.; Maga, G.; Schenone, S.; Bruno, O.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Brullo, C.; Fossa, P.; Menozzi, G.; Mosti, L.; Modugno, M.; Tintori, C.; Manetti, F.; Botta, M. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 1549-1561.
10. Semones, M.; Feng, Y.; Johnson, N.; Adams, J. L.; JWinklerc; Hansbury, M. *J. Med. Chem.* **2007**, 17, 4756-4760.
11. Fong, T. A. T.; Shawver, L. K.; Sun, L.; Tang, C.; App, H.; Powell, T. J.; Kim, Y. H.; Schreck, R.; Wang, X.; Risau, W.; Ullrich, A.; Hirth, K. P.; McMahon, G. *Cancer Res.* **1999**, 59, 99-106.
12. Ivica Grgic, I. E., Philipp Heinau, Han Si, Susanne Brakemeier, Joachim Hoyer, Ralf Köhler. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, 25, 704-709.
13. Sharp, S. Y.; Boxall, K.; Rowlands, M.; Prodromou, C.; Roe, S. M.; Maloney, A.; Powers, M.; Clarke, P. A.; Box, G.; Sanderson, S.; Patterson, L.; Matthews, T. P.; Cheung, K. M.; Ball, K.; Hayes, A.; Raynaud, F.; Marais, R.; Pearl, L.; Eccles, S.; Aherne, W.; McDonald, E.; Workman, P. *Cancer Res.* **2007**, 67, 2206-2216.
14. Wasylyk, C.; Zheng, H.; Castell, C.; Debussche, L.; Multon, M. C.; Wasylyk, B. *Cancer Res.* **2008**, 67, 1275-1283.
15. Ho, C. Y.; Ludovici, D. W.; Maharroof, U. S. M.; Mei, J.; Sechler, J. L.; Tuman, R. W.; Strobel, E. D.; Andracka, L.; Yen, H.-K.; Leo, G.; Li, J.; Almond, H.; Lu, H.; DeVine, A.; Tominovich, R. M.; Baker, J.; Emanuel, S.; Gruninger, R. H.; Middleton, S. A.; Johnson, D. L.; Galemme, R. A. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 8163-8173.
16. 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 3537-3541.
17. 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, A.; Nickols, M. A.;

- Rader, R. K.; Settle, S. L.; Shannon, K. E.; Steininger, C. N.; Westlinc, M. M.; Westlin, W. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3156-3161.
18. Michael, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 476-493.
19. Varvoglis, A. *Hypervalent Iodine in Organic Synthesis*; Academic Press: London, 1997.
20. Zhdankin, V. V.; Stang, P. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2523-2584.
21. Stang, P. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2997-3008.
22. Gupton, J. T.; Colon, C.; Harrison, C. R.; Lizzi, M. J.; Polk, D. E. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4522-4524.
23. Kira, M. A.; Abdel-Rahman, M. O.; Gadalla, K. Z. *Tetrahedron lett.* **1969**, *10*, 109-110.
24. DeLuca, L.; Giacomelli, G.; Masala, S.; Porcheddu, A. *Synlett* **2004**, *13*, 2299-2302.
25. Montanari, F. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 567-569.
26. Glover, S. A.; Goosen, A.; McClelland, C. W.; Schoonraad, J. L. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2577-2592.
27. Kawase, M.; Miyake, Y.; Sakamoto, T.; Shimada, M.; Kikugawa, Y. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1653-1660.
28. Kikugawa, Y.; Kawase, W. *Chem. lett.* **1990**, *19*, 581-582.

2.3 Πειραματικό Μέρος

2.3.1 Τυπική μέθοδος παρασκευής υδραζινών Π-1α-γ

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-2-(1''-φαινυλαιθυλιδεν) υδραζίνη Π-1α



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O	240.30	–	R _f = 0.25 Hex/EtOAc 9:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευομένο διάλυμα της ακετοφαινόνης **24α** (2.4 mL, 20 mmol) σε 35 mL EtOH και 1.5 mL οξικού οξέος, προστέθηκε ένα διάλυμα υδροχλωρικής 4-μεθοξυφαινυλυδραζίνης (4.3 g, 24 mmol) και Et₃N (4.2 mL, 30 mmol) σε 40 mL EtOH. Το διάλυμα της αντίδρασης αναδεύτηκε ολονύχτια σε r.t. και το σχηματιζόμενο στερεό διηθήθηκε υπό κενό, πλύθηκε με EtOH και DEE και έδωσε την υδραζίνη Π-1α ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

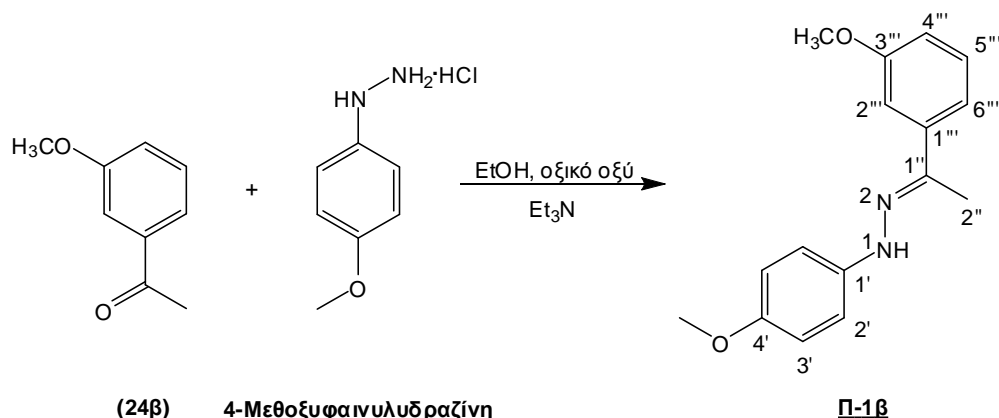
¹H NMR (DMSO): δ = 9.07 (1H, s, NH), 7.78 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-2'' και H-6''), 7.38 (2H, t, *J* 7.2 Hz, H-3'' και H-5''), 7.28 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-4''), 7.19 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 6.86 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 3.70 (3H, s, OCH₃), 2.23 (3H, s, H-2'').
¹³C NMR (DMSO): δ = 153.1 (C-4'), 140.6 (C-1''), 139.8 (C-1'' και C-1'), 128.7

(C-3''' και C-5'''), 127.7 (C-4'''), 125.4 (C-2''' και C-6'''), 114.8 (C-2'), 114.3 (C-3'), 55.68 (C-OCH₃), 13.11 (C-2'').

MS: 241.29 (M+H⁺).

IR (film) ν: 3343 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₅H₁₆N₂O: Θεωρητικά: C, 74.97; H, 6.71; N, 11.66;
Πειραματικά: C, 74.78; H, 6.58; N 11.82.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-2-(1''-(3'''-μεθοξυφαινυλ)αιθυλιδεν) υδραζίνη **Π-1β**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₂	270.33	—	R _f = 0.56 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την τυπική μέθοδο η υδραζίνη **Π-1β** παρασκευάστηκε από την ακετοφαινόνη **24β** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

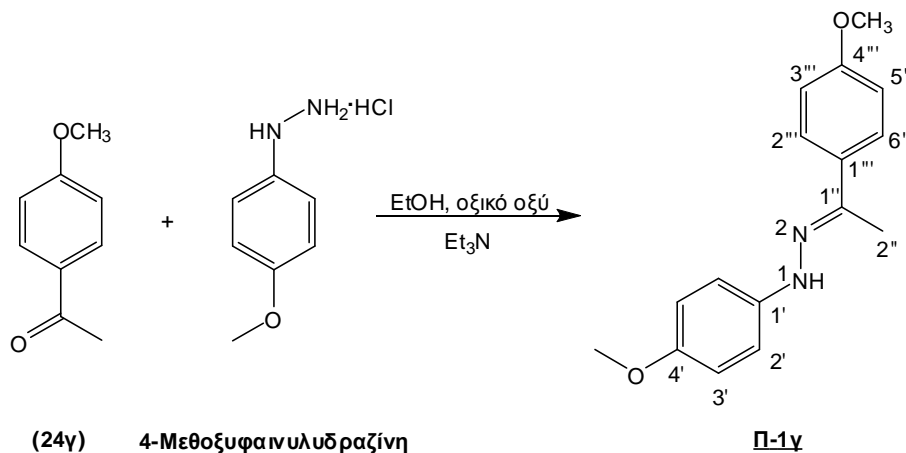
¹H NMR (DMSO): δ = 9.09 (1H, s, NH), 7.34-7.30 (2H, m, H-4''' και H-6'''), 7.27 (1H, t, J 7.6 Hz, H-5'''), 7.18 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2'), 6.86-6.82 (3H, m, H-2''' και H-3'), 3.78 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.68 (3H, s, C4'-OCH₃), 2.20 (3H, s, H-2'').

¹³C NMR (DMSO): δ = 159.7 (C-3'''), 153.1 (C-4'), 141.3 (C-1''), 140.6 (C-1'), 139.5 (C-1'''), 129.7 (C-5'''), 118.0 (C-6'''), 114.8 (C-2'), 114.2 (C-3'), 113.1 (C-4'''), 110.8 (C-2'''), 55.6 (C4'-OCH₃), 55.4 (C3'''-OCH₃), 13.31 (C-2'').

MS: 271.30 (M+H⁺).

IR (film) ν: 3345 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₈N₂O₂: Θεωρητικά: C, 71.09; H, 6.71; N, 10.36; Πειραματικά: C, 70.99; H, 6.60; N 10.52.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-2-(1''-(4'''-μεθοξυφαινυλ)αιθυλιδεν) υδραζίνη **Π-1γ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₂	270.33	—	R _f = 0.43 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την τυπική μέθοδο η υδραζίνη **Π-1γ** παρασκευάστηκε από την ακετοφαινόνη **24γ** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

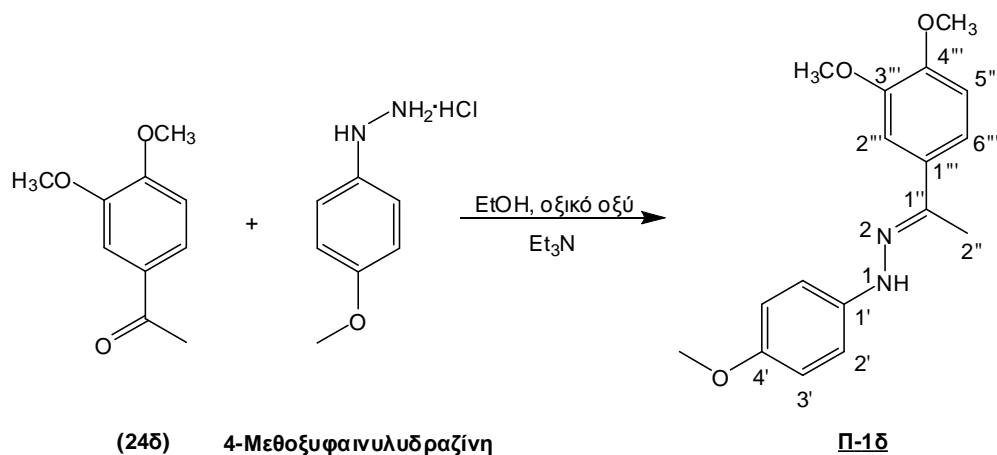
¹H NMR (DMSO): δ = 8.91 (1H, s, NH), 7.70 (2H, d, J 16.8 Hz, H-2''' και H-6'''), 7.15 (2H, d, J 16.8 Hz, H-2'), 6.92 (2H, d, J 16.8 Hz, H-3''' και H-5'''), 6.83 (2H, d, J 16.8 Hz, H-3') 3.76 (3H, s, C4'''-OCH₃), 3.68 (3H, s, C4'-OCH₃), 2.18 (3H, s, H-2'').

¹³C NMR (DMSO): δ = 159.4 (C-4'''), 152.9 (C-4'), 140.9 (C-1'''), 140.0 (C-1'), 132.5 (C-1'''), 126.8 (C-2''' και C-6'''), 114.8 (C-2'), 114.1 (C-3''', C-5''' και C-3'), 55.65 (C4'-OCH₃), 55.54 (C4'''-OCH₃), 13.20 (C-2'').

MS: 271.31 (M+H⁺).

IR (film) ν: 3347 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₈N₂O₂: Θεωρητικά: C, 71.09; H, 6.71; N, 10.36; Πειραματικά: C, 71.19; H, 6.64; N 10.44.

2.3.2 Τυπική μέθοδος παρασκευής υδραζινών **Π-1δ,ε**1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-2-(1''-(3''',4'''-διμεθοξυφαινυλ)αιθυλιδεν) υδραζίνη **Π-1δ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃	300.35	–	R _f = 0.35 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευομένο διάλυμα της ακετοφαινόνης **24δ** (2.30 g, 12.5 mmol) σε 30 mL EtOH και 1.0 mL οξικού οξέος, προστέθηκε ένα διάλυμα υδροχλωρικής 4-μεθοξυφαινυλυδραζίνης (3.10 g, 17.5 mmol) και Et₃N (2.8 mL, 20.1 mmol) σε 30 mL EtOH. Το διάλυμα της αντίδρασης αναδεύτηκε ολονύχτια σε r.t. και το σχηματιζόμενο στερεό διηθήθηκε υπό κενό, πλύθηκε με EtOH και DEE και έδωσε την υδραζίνη **Π-1δ** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.99 (1H, s, NH), 7.42 (1H, s, H-2'''), 7.22 (1H, d, J 8.4 Hz, H-6'''), 7.17 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, J 8.4 Hz, H-5'''), 6.83 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3'), 3.81 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.77 (3H, s, C4'''-OCH₃), 3.69 (3H, s, C4'-OCH₃), 2.21 (3H, s, H-2'').

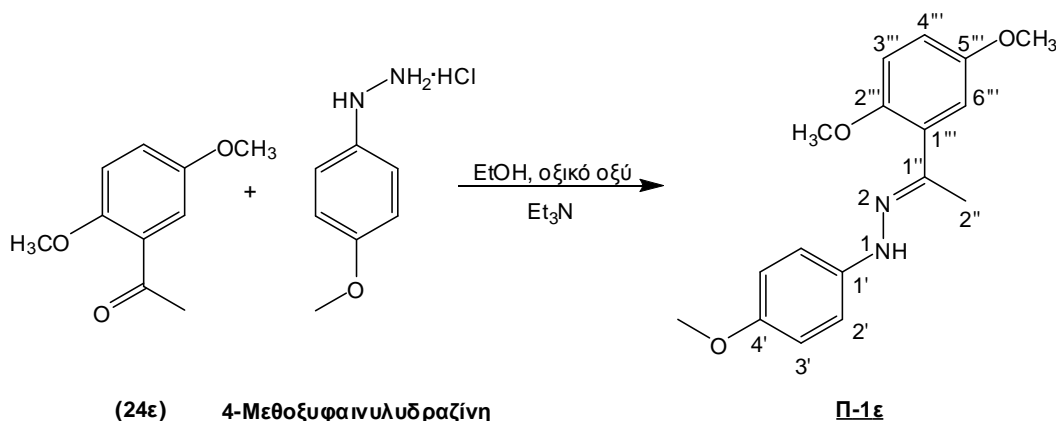
¹³C NMR (DMSO): δ = 152.9 (C-4'), 149.1 (C-4'''), 149.0 (C-3'''), 140.9 (C-1''), 140.1 (C-1'), 132.8 (C-1'''), 118.3 (C-6'''), 114.8 (C-2'), 114.1 (C-3'), 111.7 (C-

5'''), 108.8 (C-2'''), 55.93 (C3'''-OCH₃), 55.80 (C4'''-OCH₃), 55.66 (C4'-OCH₃), 13.23 (C-2'').

MS: 301.34 (M+H⁺).

IR (film) ν: 3341 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₂₀N₂O₃: Θεωρητικά: C, 67.98; H, 6.71; N, 9.33;
Πειραματικά: C, 69.12; H, 6.60; N 9.42.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-2-(1''-(2''',5''')-διμεθοξυφαινυλ)αιθυλιδεν υδραζίνη **Π-1ε**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C).	TLC
95%	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃	300.35	–	R _f = 0.54 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την τυπική μέθοδο η υδραζίνη **Π-1ε** παρασκευάστηκε από την ακετοφαινόνη **24ε** ως κίτρινο λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

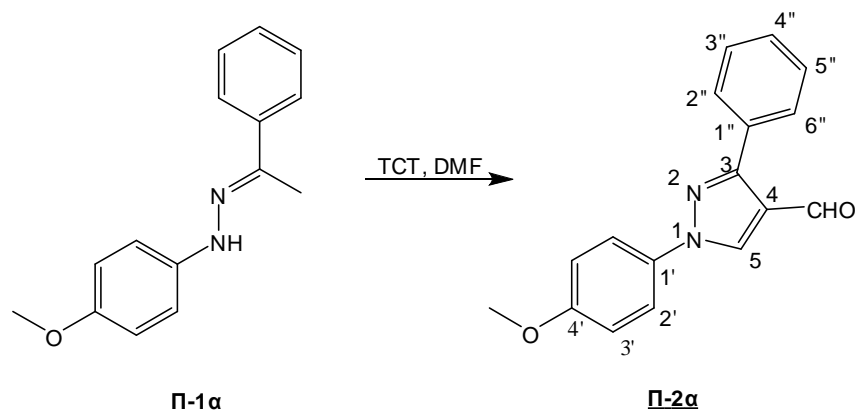
¹H NMR (DMSO): δ = 8.89 (1H, s, NH), 7.10 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 6.96 (1H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.92 (1H, d, *J* 3.2 Hz, H-6'''), 6.87 (1H, dd, *J* 8.8 Hz *J* 3.2 Hz, H-4'''), 6.82 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 3.75 (3H, s, C2'''-OCH₃), 3.73 (3H, s, C5'''-OCH₃), 3.68 (3H, s, C4'-OCH₃), 2.16 (3H, s, H-2'').

¹³C NMR (DMSO): δ = 153.4 (C-4'), 153.0 (C-5'''), 151.6 (C-2'''), 141.8 (C-1''), 140.8 (C-1'), 124.4 (C-1'''), 120.0 (C-2'), 114.8 (C-3'), 114.7 (C-4'''), 114.3 (C-6'''), 113.9 (C-3'''), 55.96 (C4'-OCH₃), 55.83 (C5'''-OCH₃), 55.67 (C2'''-OCH₃), 17.36 (C-2'').

MS: 301.33 (M+H⁺).

IR (film) ν: 3343 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₇H₂₀N₂O₃: Θεωρητικά: C, 67.98; H, 6.71; N, 9.33; Πειραματικά: C, 67.84; H, 6.77; N 9.41.

2.3.3 Γενική μέθοδος παρασκευής πυραζολοκαρβοξαλδεϋδών **Π-2**1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-φαινυλ-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξαλδεϋδή **Π-2α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
60%	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	278.31	123 – 124	R _f = 0.18 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε 8.3 mL DMF προστέθηκε 2,4,6-τριχλωρο-[1,3,5]-τριαζίνη (TCT) (11 g, 60 mmol) και το μείγμα αναδεύτηκε έως την εξαφάνιση της TCT (20 λεπτά) στους 25 °C. Στη συνέχεια, προστέθηκε ένα διάλυμα της υδραζίνης **Π-1α** (3.0 g, 12 mmol) σε DMF (32 mL) και το νέο μείγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες μέχρι ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Κατόπιν, το μείγμα ψύχθηκε στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην νερό και η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-2α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

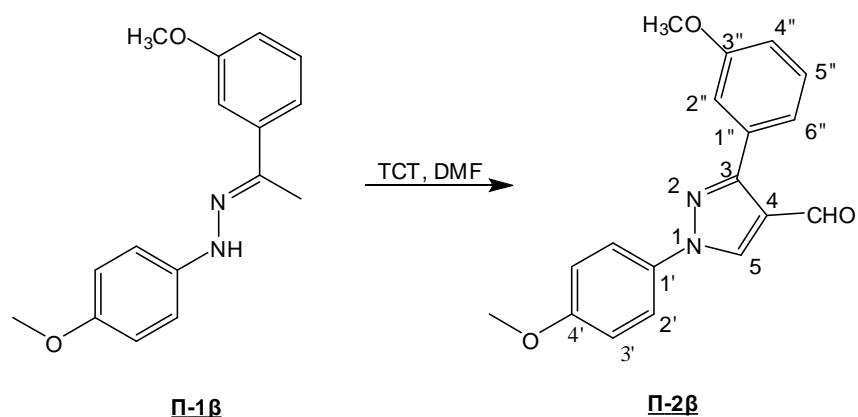
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 10.0$ (1H, s, CHO), 8.46 (1H, s, H-5), 7.83 (2H, d, J 6.8 Hz, H-2'' και H-6''), 7.71 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2'), 7.54-7.49 (3H, m, H-3'', H-4'' και H-5''), 7.03 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3'), 3.88 (3H, s, OCH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 185.2$ (CHO), 159.3 (C-4'), 154.6 (C-3), 132.6 (C-1'), 131.4 (C-5), 130.7 (C-1''), 129.2 (C-4''), 129.0 (C-3'' και C-5''), 128.8 (C-2'' και C-6''), 122.2 (C-4), 121.4 (C-2'), 114.7 (C-3'), 55.64 (OCH_3).

MS: 279.10 ($\text{M}+\text{H}^+$).

IR (film) ν : 1670 cm^{-1} .

Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$: Θεωρητικά: C, 73.37; H, 5.07; N, 10.07; Πειραματικά: C, 73.20; H, 5.14; N 9.93.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-(3''-μεθοξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεϋδη **Π-2β**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
55%	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	308,33	95 – 96	R _f = 0.38 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η πυραζολοκαρβοξυαλδεϋδη **Π-2β** παρασκευάστηκε από την υδραζίνη **Π-1β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

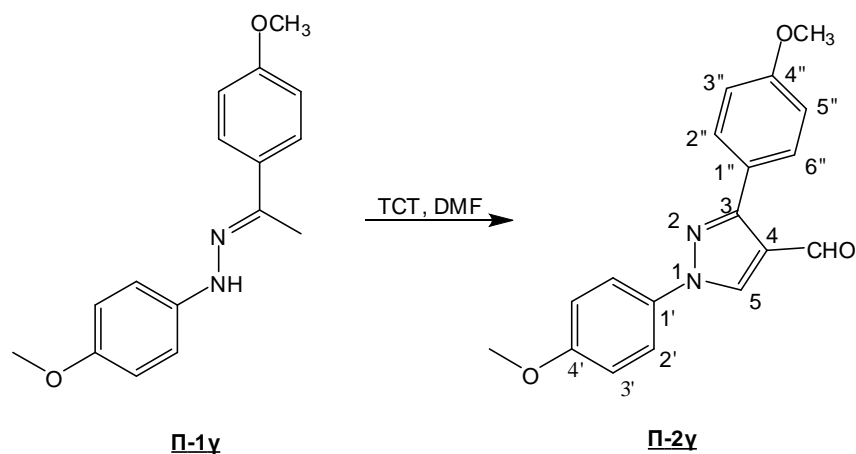
¹H NMR (CDCl₃): δ = 10.0 (1H, s, CHO), 8.46 (1H, s, H-5), 7.71 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2'), 7.43-7.40 (3H, m, H-4'', H-5'', H-6''), 7.05 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-2''), 7.02 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 3.90 (3H, s, C3''-OCH₃), 3.88 (3H, s, C4'-OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 185.3 (CHO), 159.8 (C-3''), 159.3 (C-4'), 154.5 (C-3), 132.6 (C-1'), 132.5 (C-1''), 130.7 (C-5), 129.8 (C-5''), 122.3 (C-4), 121.5 (C-6''), 121.4 (C-2'), 115.2 (C-4''), 114.7 (C-3'), 114.1 (C-2''), 55.64 (C4'-OCH₃), 55.42 (C3''-OCH₃).

MS: 309.14 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1676 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₆N₂O₃: Θεωρητικά: C, 70.12; H, 5.23; N, 9.09; Πειραματικά: C, 70.30; H, 5.14; N 9.19.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-(4''-μεθοξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεϋδη **Π-2γ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
55%	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	308,33	135 – 136	R _f = 0.37 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η πυραζολοκαρβοξυαλδεϋδη **Π-2γ** παρασκευάστηκε από την υδραζίνη **Π-1γ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 10.0 (1H, s, CHO), 8.43 (1H, s, H-5), 7.80 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'' and H-6''), 7.70 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 7.17 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'' and H-5''), 7.02 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 3.89 (3H, s, C4''-OCH₃), 3.87 (3H, s, C4'-OCH₃).

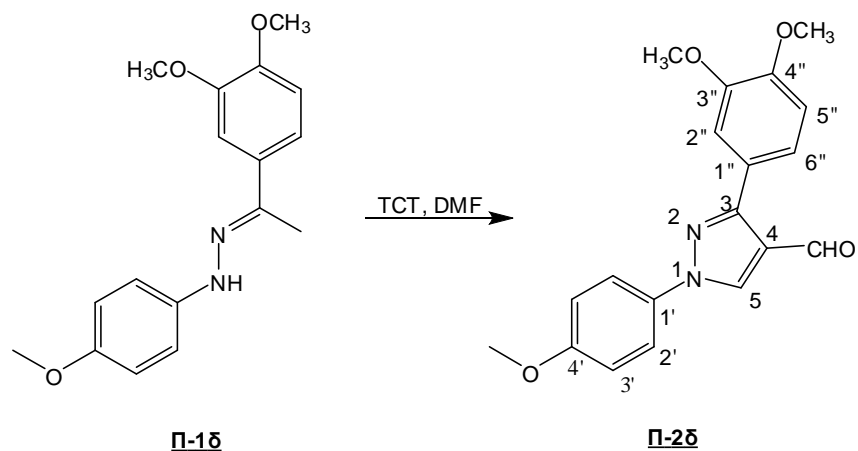
¹³C NMR (CDCl₃): δ = 185.2 (CHO), 160.4 (C-4''), 159.2 (C-4'), 154.3 (C-3), 132.6 (C-1'), 131.0 (C-5), 130.2 (C-2'' and C-6''), 123.9 (C-1''), 122.0 (C-4), 121.3 (C-2'), 114.7 (C-3'' and C-5''), 114.2 (C-3'), 55.64 (C4'-OCH₃), 55.40 (C-4''-OCH₃).

MS: 309.13 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1679 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₆N₂O₃: Θεωρητικά: C, 70.12; H, 5.23; N, 9.09; Πειραματικά: C, 69.98; H, 5.16; N 9.19.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-(3'',4''-διμεθοξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεΐδη
Π-2δ



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
50%	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	338,36	113 – 114	R _f = 0.21 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-2δ** παρασκευάστηκε από την υδραζίνη **Π-1δ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

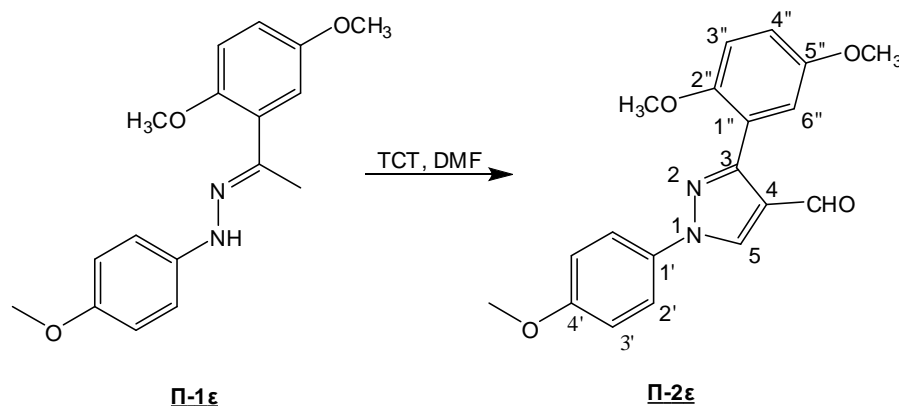
¹H NMR (DMSO): δ = 9.95 (1H, s, CHO), 9.16 (1H, s, H-5), 7.88 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 7.54 (1H, s, H-2''), 7.51 (1H, d, *J* 8.4 Hz, H-6''), 7.10 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 7.06 (1H, d, *J* 8.4 Hz, H-5'') 3.83 (3H, s, C3''-OCH₃), 3.81 (6H, s, C4'-OCH₃ και C4''-OCH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ = 185.1 (CHO), 159.0 (C-4'), 152.9 (C-3), 150.1 (C-4''), 149.0 (C-3''), 134.9 (C-1'), 132.6 (C-5), 124.3 (C-1''), 122.2 (C-4), 121.9 (C-6''), 121.3 (C-2'), 115.2 (C-3'), 112.4 (C-2''), 112.0 (C-5''), 55.98 (C3''-OCH₃, C4''-OCH₃ και C4'-OCH₃).

MS: 339.12 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1686 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₈N₂O₄: Θεωρητικά: C, 67.44; H, 5.36; N, 8.28; Πειραματικά: C, 67.64; H, 5.23; N 8.19.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-(2'',5''-διμεθοξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεΐδη**Π-2ε**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
50%	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄	338,36	120 – 121	R _f = 0.38 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-2ε** παρασκευάστηκε από την υδραζίνη **Π-1ε** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

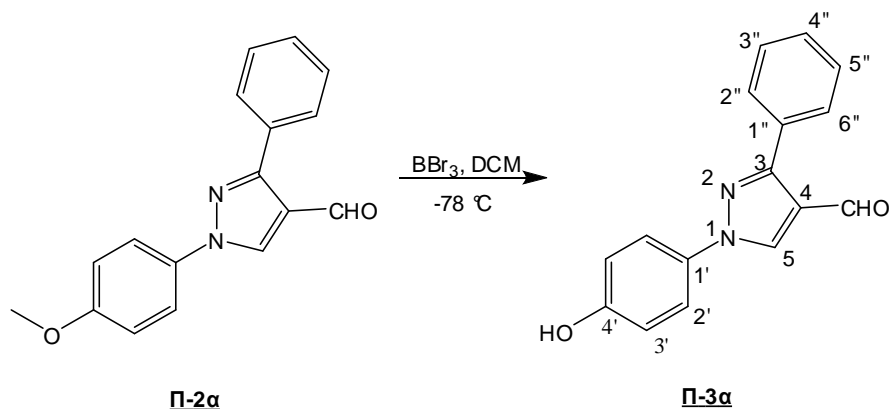
¹H NMR (CDCl₃): δ = 9.79 (1H, s, CHO), 8.42 (1H, s, H-5), 7.69 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 7.19 (1H, d, *J* 3.2 Hz, H-6''), 7.01 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 6.99 (2H, d, *J* 6.8 Hz, H-3'' and H-4''), 3.87 (3H, s, C2''-OCH₃), 3.84 (3H, s, C5''-OCH₃), 3.79 (3H, s, C4'-OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 185.0 (CHO), 159.2 (C-4'), 153.8 (C-3), 151.6 (C-5''), 151.0 (C-2''), 132.6 (C-1'), 130.7 (C-5), 123.2 (C-1''), 122.7 (C-4), 121.1 (C-2'), 117.7 (C-6''), 114.1 (C-3'), 113.0 (C-3''), 110.8 (C-4''), 57.52 (C4'-OCH₃), 57.27 (C5''-OCH₃), 57.02 (C2''-OCH₃).

MS: 339.15 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1688 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₈N₂O₄: Θεωρητικά: C, 67.44; H, 5.36; N, 8.28; Πειραματικά: C, 67.29; H, 5.19; N 8.16.

2.3.4 Γενική μέθοδος αποπροστασίας πυραζολοκαρβοξαλδεϋδών **Π-2**1-(4'-Υδροξυφαινυλ)-3-φαινυλ-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξαλδεϋδη **Π-3α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂	264.28	162 – 163	R _f = 0.25 Hex/EtOAc 6:4

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευομένο διάλυμα της πυραζολοκαρβοξαλδεϋδης **Π-2α** (0.20g, 0.72 mmol) σε CH₂Cl₂ (22 mL) στους -78 °C, προστέθηκε στάγδην BBr₃ (3.6 mmol, 1.0 M σε CH₂Cl₂, 5 ισοδύναμα ανά δεσμό, 3.6 mL). Η αντίδραση αφέθηκε για 1 ώρα στους -78 °C και μετά για 16 ώρες σε r.t.. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C, εξουδετερώθηκε με MeOH και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα HCl 1N. Κατόπιν, η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-3α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως καφέ στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.93 (1H, s, CHO), 9.13 (1H, s, H-5), 7.88 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H-2'' and H-6''), 7.75 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 7.47 (3H, m, H-3'', H-4'' και H-5''), 6.91 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3').

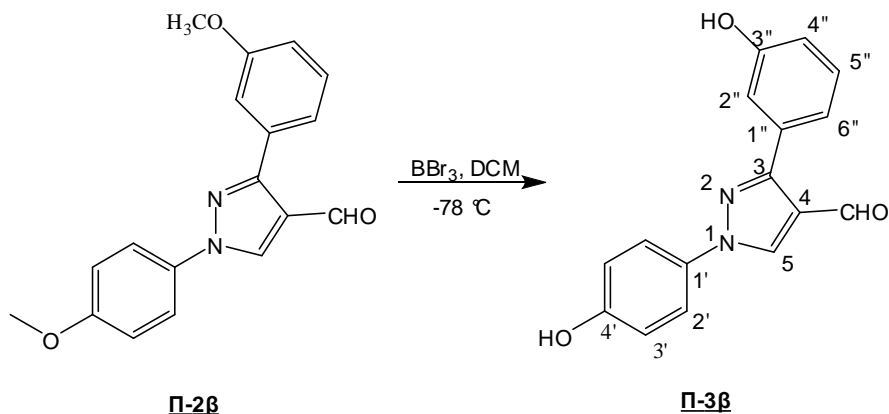
¹³C NMR (DMSO): $\delta = 185.0$ (CHO), 157.5 (C-4'), 152.7 (C-3), 134.6 (C-1'), 131.8 (C-5), 131.3 (C-1''), 129.5 (C-4''), 129.1 (C-3'' και C-5''), 129.0 (C-2'' και C-6''), 122.1 (C-4), 121.5 (C-2'), 116.4 (C-3');

MS: 265.05 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1658 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₂N₂O₂ Θεωρητικά: C, 72.72; H, 4.58; N, 10.60;

Πειραματικά: C, 72.94; H, 4.47; N 10.74.

1-(4'-Υδροξυφαινυλ)-3-(3''-υδροξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεΐδη **Π-3β**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	280.28	224 – 225	R _f = 0.18 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-3β** παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-2β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

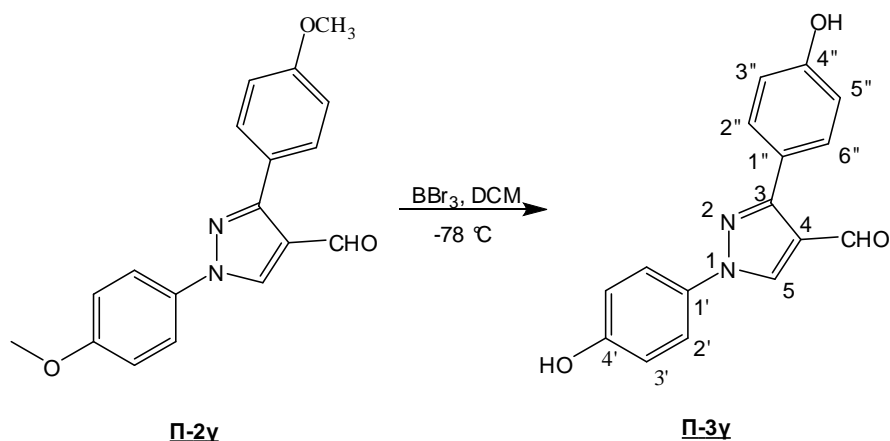
¹H NMR (DMSO): δ = 9.96 (1H, s, CHO), 9.88 (1H, br. s, OH), 9.64 (1H, br. s, OH), 9.09 (1H, s, H-5), 7.76 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 7.31 (3H, m, H-2'', H-4'' και H-6''), 6.92 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 6.88 (1H, ddd, *J* 7.2 Hz *J* 2.4 Hz, H-5'').

¹³C NMR (DMSO): δ = 185.1 (CHO), 157.9 (C-3''), 157.5 (C-4'), 153.0 (C-3), 134.0 (C-1'), 133.0 (C-5), 131.3 (C-5''), 130.1 (C-1''), 122.1 (C-4), 121.5 (C-2'), 120.0 (C-2''), 116.6 (C-4''), 116.4 (C-3'), 115.8 (C-6'').

MS: 281.06 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1662 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₂N₂O₃: Θεωρητικά: C, 68.56; H, 4.32; N, 9.99; Πειραματικά: C, 68.74; H, 4.46; N 10.20.

1-(4'-Υδροξυφαινυλ)-3-(4''-υδροξυφαινυλ)-1H-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεΐδη **Π-3γ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	280.28	216 – 217	R _f = 0.16 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-3γ** παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-2γ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως καφέ στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.91 (1H, s, CHO), 9.82 (2H, br. s, OH), 9.04 (1H, s, H-5), 7.74 (4H, d, J 6.8 Hz, H-2'', H-6'' και H-2'), 6.89 (2H, d, J 9.2 Hz, H-3'' και H-5''), 6.87 (2H, d, J 9.2 Hz, H-3').

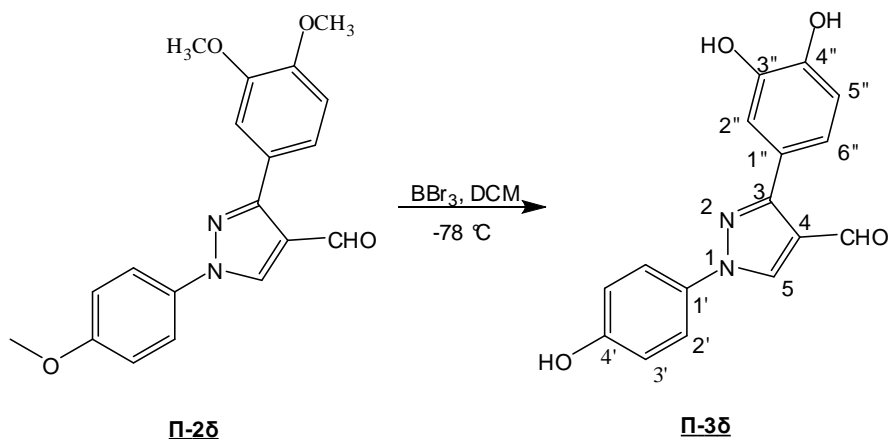
¹³C NMR (DMSO): δ = 185.0 (CHO), 158.8 (C-4''), 157.4 (C-4'), 153.0 (C-3), 134.2 (C-1'), 131.4 (C-5), 130.5 (C-2'' και C-6''), 122.6 (C-1''), 121.8 (C-4), 121.4 (C-2'), 116.3 (C-3'' και C-5''), 115.8 (C-3').

MS: 281.06 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1650 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₂N₂O₃: Θεωρητικά: C, 68.56; H, 4.32; N, 9.99; Πειραματικά: C, 68.41; H, 4.40; N 10.12.

1-(4'-Υδροξυφαινυλ)-3-(3'',4''-διυδροξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεΐδη
Π-3δ



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₄	296.28	–	R _f = 0.23 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-3δ** παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-2δ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως αφρός.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.94 (1H, s, CHO), 9.85 (1H, s, OH), 9.28 (1H, s, OH), 9.18 (1H, s, OH), 9.03 (1H, s, H-5), 7.75 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2'), 7.33 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-2''), 7.23 (1H, dd, *J* 8.0 *J* 2.0 Hz, H-6''), 6.92 (2H, d, *J* 8.8, H-3'), 6.85 (1H, d, *J* 8.0 Hz, H-5').

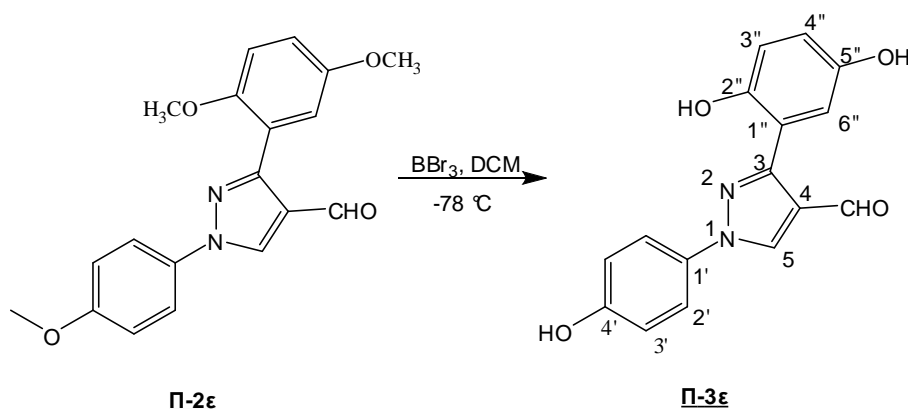
¹³C NMR (DMSO): δ = 185.6 (CHO), 157.0 (C-4'), 153.3 (C-3), 146.6 (C-4''), 145.2 (C-3''), 134.3 (C-1'), 131.4 (C-5), 123.0 (C-1''), 121.6 (C-2' και C-4), 121.0 (C-2''), 116.4 (C-3'), 116.2 (C-5''), 116.0 (C-6'').

MS: 297.06 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1641 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₂N₂O₄: Θεωρητικά: C, 64.86; H, 4.08; N, 9.46; Πειραματικά: C, 64.78; H, 4.01; N 9.38.

1-(4'-Υδροξυφαινυλ)-3-(2'',5''-διδροξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυαλδεΐδη
Π-3ε



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₄	296.28	208 – 209	R _f = 0.13 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-3ε** παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδη **Π-2ε** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως καφέ στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

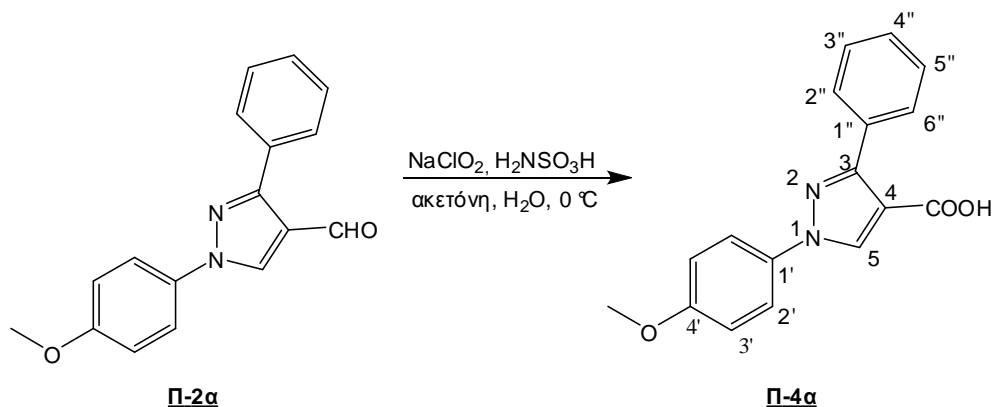
¹H NMR (DMSO): δ = 9.84 (1H, br. s, OH), 9.78 (1H, s, CHO), 9.22 (1H, br. s, OH), 8.94 (2H, s, H-5 και OH), 7.75 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, J 2.4 Hz, H-6''), 6.56 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3'), 6.82 (1H, d, J 8.4, H-3''), 6.74 (1H, d, J 8.0 Hz, H-4'').

¹³C NMR (DMSO): δ = 184.2 (CHO), 157.4 (C-4') 151.9 (C-3), 150.4 (C-5''), 147.8 (C-2''), 131.5 (C-1'), 130.4 (C-5), 122.7 (C-1''), 121.4 (C-2'), 119.2 (C-4), 117.7 (C-3''), 117.3 (C-4''), 117.1 (C-6''), 116.3 (C-3').

MS: 297.02 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1697 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₂N₂O₄: Θεωρητικά: C, 64.86; H, 4.08; N, 9.46; Πειραματικά: C, 64.72; H, 3.99; N 9.35.

2.3.5 Γενική μέθοδος παρασκευής καρβοξυλικών οξέων **Π-4**1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-φαινυλ-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξυλικό οξύ **Π-4α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
95%	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	294.30	203 – 204	R _f = 0.40 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο στους 0 °C διάλυμα της πυραζολοκαρβοξαλδεΐδης **Π-2α** (0.40 g, 1.4 mmol) σε ακετόνη (19 mL), προστέθηκε ένα παγωμένο στους 0 °C διάλυμα NaClO₂ (0.38 g, 3.4 mmol) και H₂NSO₃H (0.38 g, 3.9 mmol) σε H₂O (19 mL) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά στους 0 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 2 φορές με 10% Na₂S₂O₃, 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄ και διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό. Το προϊόν **Π-4α** λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 12.6 (1H, br. s, COOH), 8.97 (1H, s, H-5), 7.89 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2'), 7.84 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-2'' και H-6''), 7.46-7.42 (3H, m, H-3'', H-4'' και H-5''), 7.08 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-3'), 3.82 (3H, s, OCH₃).

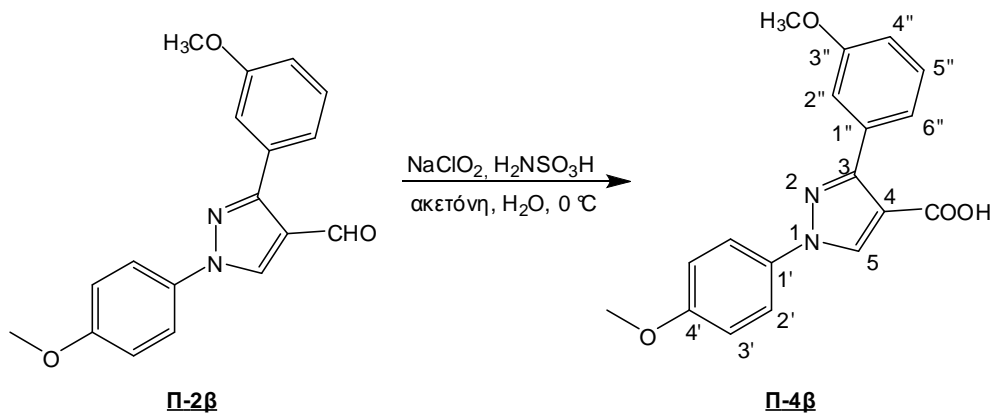
¹³C NMR (DMSO): δ = 164.3 (COOH), 158.8 (C-4'), 152.9 (C-3), 133.8 (C-1'), 132.8 (C-5), 132.7 (C-1''), 129.6 (C-3'' και C-5''), 128.8 (C-4''), 128.2 (C-2'' και C-6''), 121.1 (C-2'), 115.1 (C-3'), 113.9 (C-4), 55.94 (OCH₃).

MS: 295.21 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1697 cm^{-1} .

Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$: Θεωρητικά: C, 69.38; H, 4.79; N, 9.52;
Πειραματικά: C, 69.62; H, 4.89; N 9.40.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-(3''-μεθοξυφαινυλ)-1H-πυραζολο-4-καρβοξυλικό οξύ Π-4β



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$	324.33	217 – 218	$R_f = 0.25$ EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το καρβοξυλικό οξύ Π-4β παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξυαλδεύδη Π-2β και λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): $\delta = 12.5$ (1H, br. s, COOH), 8.96 (1H, s, H-5), 7.89 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2'), 7.45-7.42 (2H, m, H-2'' και H-6''), 7.36 (1H, t, J 8.0 Hz, H-5''), 7.09 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3'), 7.00 (1H, d, J 8.8 Hz, H-4'') 3.82 (3H, s, C3''-OCH₃), 3.81 (3H, s, C4'-OCH₃).

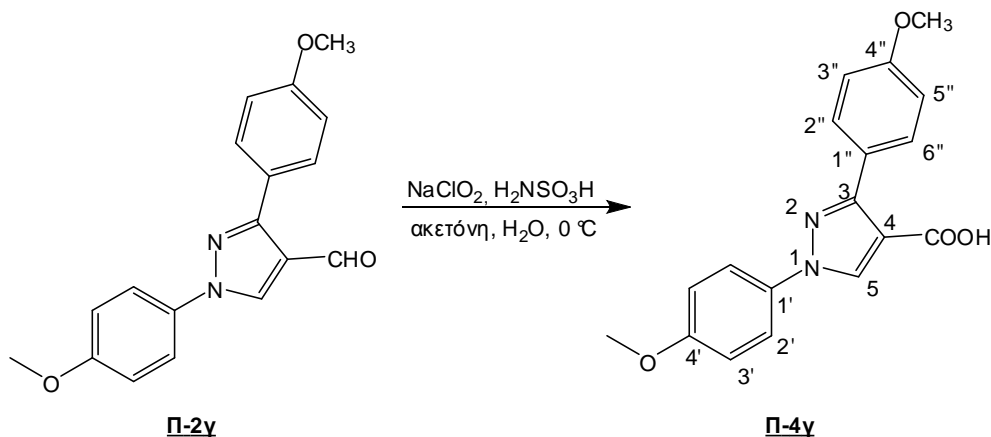
$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO): $\delta = 164.3$ (COOH), 159.1 (C-3''), 158.8 (C-4'), 152.6 (C-3), 133.9 (C-1'), 133.8 (C-5), 132.8 (C-1''), 129.3 (C-5''), 121.8 (C-6''), 121.1 (C-2''), 115.2 (C-4''), 115.1 (C-3'), 114.4 (C-2''), 113.9 (C-4) 55.93 (C4'-OCH₃), 55.51 (C3''-OCH₃).

MS: 325.11 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1696 cm^{-1} .

Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$: Θεωρητικά: C, 66.66; H, 4.97; N, 8.64; Πειραματικά: C, 66.82; H, 4.89; N 8.75.

1-(4'-Μεθοξυφαινυλ)-3-(4''-μεθοξυφαινυλ)-1H-πυραζολο-4-καρβοξυλικό οξύ Π-4γ



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₄	324.33	236 – 237	R _f = 0.29 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το καρβοξυλικό οξύ Π-4γ παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξυαλδεύδη Π-2γ και λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

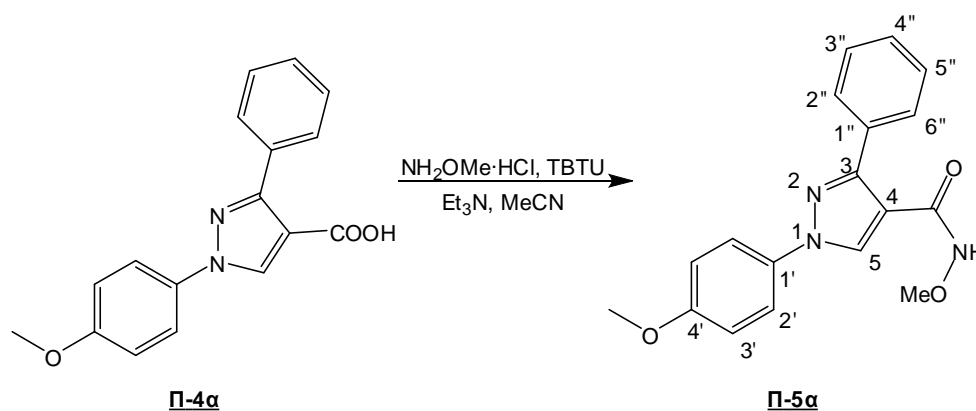
¹H NMR (DMSO): δ = 12.5 (1H, br. s, COOH), 8.93 (1H, s, H-5), 7.85 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'' και H-6''), 7.82 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'), 7.08 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'' και H-5''), 7.01 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'), 3.82 (6H, s, OCH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ = 164.4 (COOH), 159.9 (C-4''), 158.7 (C-4'), 152.7 (C-3), 133.7 (C-1'), 132.8 (C-5), 130.8 (C-2'' και C-6''), 125.0 (C-1''), 121.0 (C-2'), 115.0 (C-3'' και C-5''), 113.7 (C-3'), 113.4 (C-4), 55.92 (C4'-OCH₃), 55.60 (C4''-OCH₃).

MS: 325.11 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1691 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₆N₂O₄: Θεωρητικά: C, 66.66; H, 4.97; N, 8.64; Πειραματικά: C, 66.78; H, 4.88; N 8.56.

2.3.6 Γενική μέθοδος παρασκευής αμιδίων **Π-5***N*-Μεθοξυ-1-(4'-μεθοξυφαινυλ)-3-φαινυλ-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξαμίδιο **Π-5α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₈ H ₁₇ N ₃ O ₃	323.35	157 – 158	R _f = 0.37 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα καρβοξυλικού οξέος **Π-4α** (0.17 g, 0.58 mmol) και NH₂OMe·HCl (0.074 g, 0.87 mmol) σε MeCN (7.0 mL), προστέθηκε στάγδην Et₃N (0.17 mL, 1.2 mmol) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε r.t.. Μετά το πέρας των 30 λεπτών προστέθηκε TBTU (0.28 g, 0.87 mmol) και η ανάδευση συνεχίστηκε για ακόμα 30 λεπτά μέχρι την πλήρη κατανάλωση του αρχικού οξέος. Κατόπιν, προστέθηκε διάλυμα Brine και η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με HCl 1N, 1 φορά με H₂O, 1 φορά με υδατικό διάλυμα 5% NaHCO₃ και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄ και διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό. Το προϊόν **Π-4α** λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 11.4 (1H, s, NH) 8.75 (1H, s, H-5), 7.84 – 7.80 (4H, m, H-2', H-2'' και H-6''), 7.47 – 7.38 (3H, m, H-3'', H-4'' και H-5''), 7.11 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-3'), 3.82 (3H, s, NH-OCH₃), 3.71 (3H, s, C4'-OCH₃).

¹³C NMR (DMSO): $\delta = 161.2$ (CONH), 158.6 (C-4'), 150.9 (C-3), 133.0 (C-1'), 132.6 (C-1''), 130.2 (C-5), 128.7 (C-4''), 128.6 (C-3'' και C-5''), 128.4 (C-2'' και C-6''), 120.8 (C-2'), 115.2 (C-3'), 114.6 (C-4), 63.41 (NH-OCH₃), 55.96 (C4'-OCH₃).

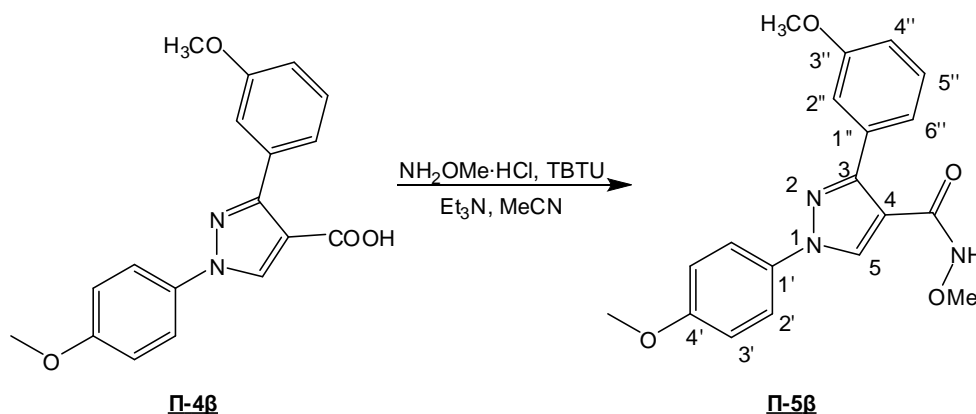
MS: 324.13 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1664 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₇N₃O₃: Θεωρητικά: C, 66.86; H, 5.30; N, 13.00;

Πειραματικά: C, 66.73; H, 5.22; N 13.13.

N*-Μεθοξυ-1-(4'-μεθοξυφαινυλ)-3-(3''-μεθοξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξαμίδιο **Π-5β*



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₄	353.37	176 – 177	R _f = 0.38 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο **Π-5β** παρασκευάστηκε από το καρβοξυλικό οξύ **Π-4β** και λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 11.5 (1H, s, NH), 8.74 (1H, s, H-5), 7.82 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-2'), 7.45-7.42 (2H, m, H-2'' και H-6''), 7.37 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-5''), 7.12 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-3'), 6.99 (1H, d, *J* 6.4 Hz, H-4''), 3.82 (3H, s, NH-OCH₃), 3.81 (3H, s, C3''-OCH₃), 3.72 (3H, s, C4'-OCH₃).

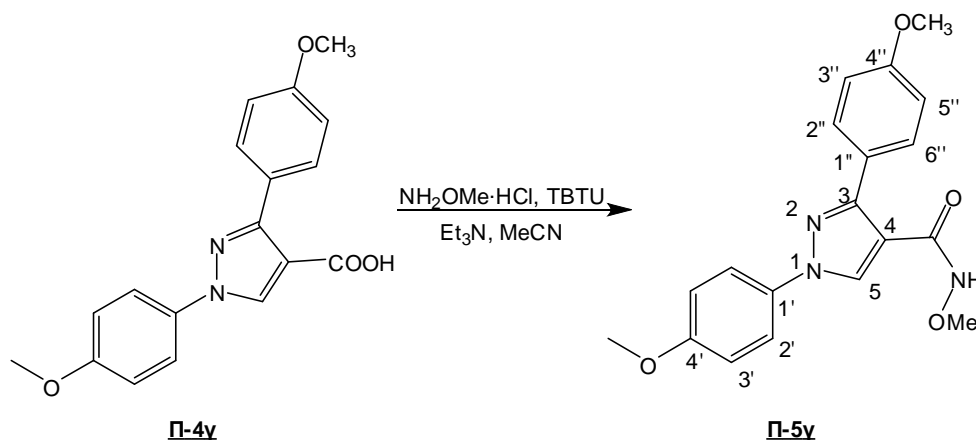
¹³C NMR (DMSO): δ = 161.4 (CONH), 159.5 (C-3''), 158.7 (C-4'), 150.5 (C-3), 133.9 (C-1'), 133.0 (C-5), 130.3 (C-1''), 129.8 (C-5''), 120.8 (C-2'), 120.6 (C-6''), 115.2 (C-3'), 114.7 (C-4), 114.3 (C-4''), 113.9 (C-2''), 63.71 (NH-OCH₃), 55.95 (C4'-OCH₃), 55.93 (C3''-OCH₃).

MS: 354.15 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1643 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₉N₃O₄: Θεωρητικά: C, 64.58; H, 5.42; N, 11.89; Πειραματικά: C, 64.71; H, 5.32; N 12.03.

***N*-Μεθοξυ-1-(4'-μεθοξυφαινυλ)-3-(4''-μεθοξυφαινυλ)-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξαμίδιο Π-5γ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₄	353.37	187 – 188	R _f = 0.31 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο Π-5γ παρασκευάστηκε από το καρβοξυλικό οξύ Π-4γ και λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 11.4 (1H, s, NH), 8.72 (1H, s, H-5), 7.82 (4H, d, *J* 5.6 Hz, H-2', H-2'' και H-6''), 7.12 (2H, d, *J* 6.0 Hz, H-3'' και H-5''), 7.02 (2H, d, *J* 6.0 Hz, H-3'), 3.83 (9H, s, OCH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ = 161.4 (CONH), 159.8 (C-4''), 158.5 (C-4'), 150.7 (C-3), 133.0 (C-1'), 130.1 (C-5), 129.7 (C-2'' και C-6''), 125.0 (C-1''), 120.6 (C-2'), 115.2 (C-3'' και C-5''), 114.0 (C-4 και C-3'), 63.73 (NH-OCH₃), 55.92 (C4'-OCH₃), 55.62 (C4''-OCH₃).

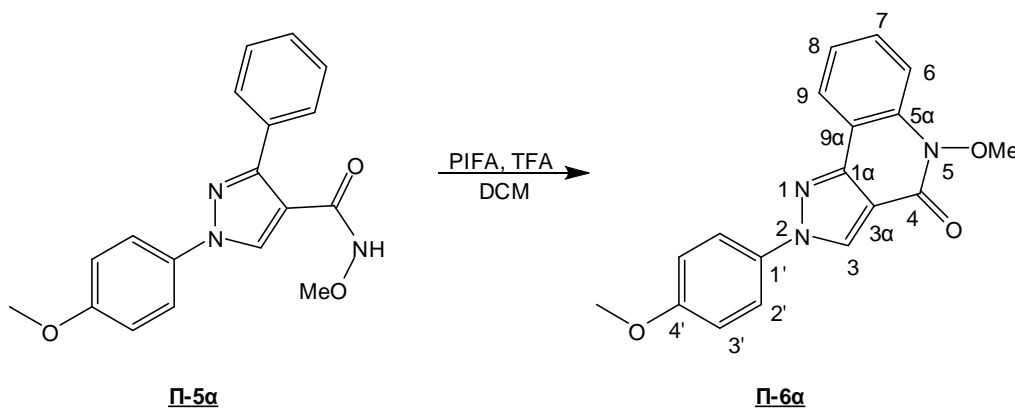
MS: 354.14 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1659 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₉N₃O₄: Θεωρητικά: C, 64.58; H, 5.42; N, 11.89; Πειραματικά: C, 64.69; H, 5.35; N 12.00.

2.3.7 Γενική μέθοδος κυκλοποίησης αμιδίων **Π-5** με τη χρήση του αντιδραστηρίου PIFA:

5-Μεθοξυ-2-(4'-μεθοξυφαινυλ)-2*H*-πυραζολο[4,3-*c*]κινολιν-4(5*H*)-όνη **Π-6α**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
57%	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₃	321.33	200 – 201	R _f = 0.5 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο στους -20 °C διάλυμα του αμιδίου **Π-5α** (0.10 g, 0.31 mmol) σε CH₂Cl₂ (3.1 mL), προστέθηκε ένα διάλυμα PIFA (0.21 g, 0.46 mmol) και TFA (0.070 mL, 0.93 mmol) σε CH₂Cl₂ (6.6 mL) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε στους -20 °C για μία ώρα μέχρι το τέλος της αντίδρασης. Στη συνέχεια, προστέθηκε υδατικό διάλυμα 10% Na₂CO₃ και η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-6α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.68 (1H, s, H-3), 8.36 (1H, d, *J* 7.2 Hz, H-9), 7.78 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-2'), 7.66 (1H, d, *J* 7.2 Hz, H-6), 7.61 (1H, t, *J* 6.4 Hz, H-7), 7.36 (1H, t, *J* 6.4 Hz, H-8), 7.07 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-3'), 4.15 (3H, s, N-OCH₃), 3.90 (3H, s, C4'-OCH₃).

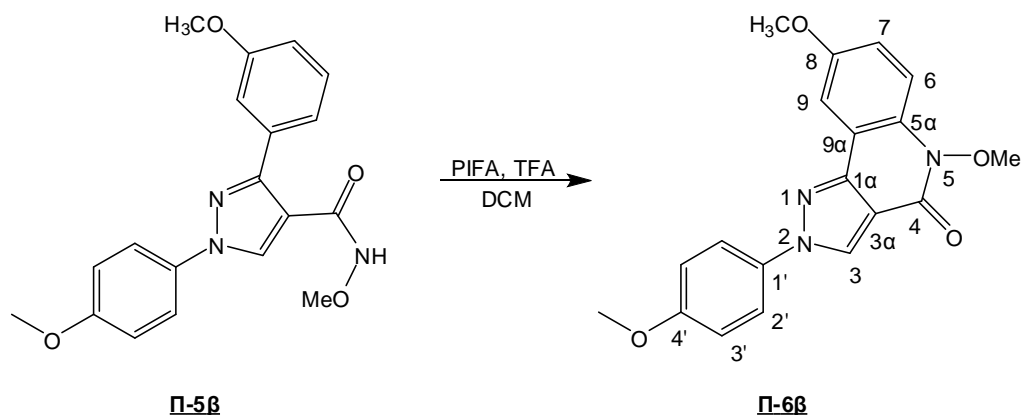
¹³C NMR (CDCl₃): δ =159.5 (C-4), 155.1 (C-4'), 148.0 (C-1a), 136.9 (C-1'), 133.2 (C-5a), 130.0 (C-3), 127.4 (C-7), 123.3 (C-9) 123.2 (C-8), 121.9 (C-2'), 114.8 (C-3' και C-9a), 113.0 (C-6 και C-3a) 62.95 (N-OCH₃) 55.67 (C4'-OCH₃).

MS: 322.22 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1646 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₅N₃O₃: Θεωρητικά: C, 67.28; H, 4.71; N, 13.08;

Πειραματικά: C, 67.41; H, 4.59; N 13.21.

5,8-Διμεθοξυ-2-(4'-μεθοξυφαινυλ)-2H-πυραζολο[4,3-c]κινολιν-4(5H)-όνη **Π-6β**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
55%	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	351.36	166 – 167	R _f = 0.42 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η πυραζολο[4,3-*c*]κινολινόνη **Π-6β** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-5β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

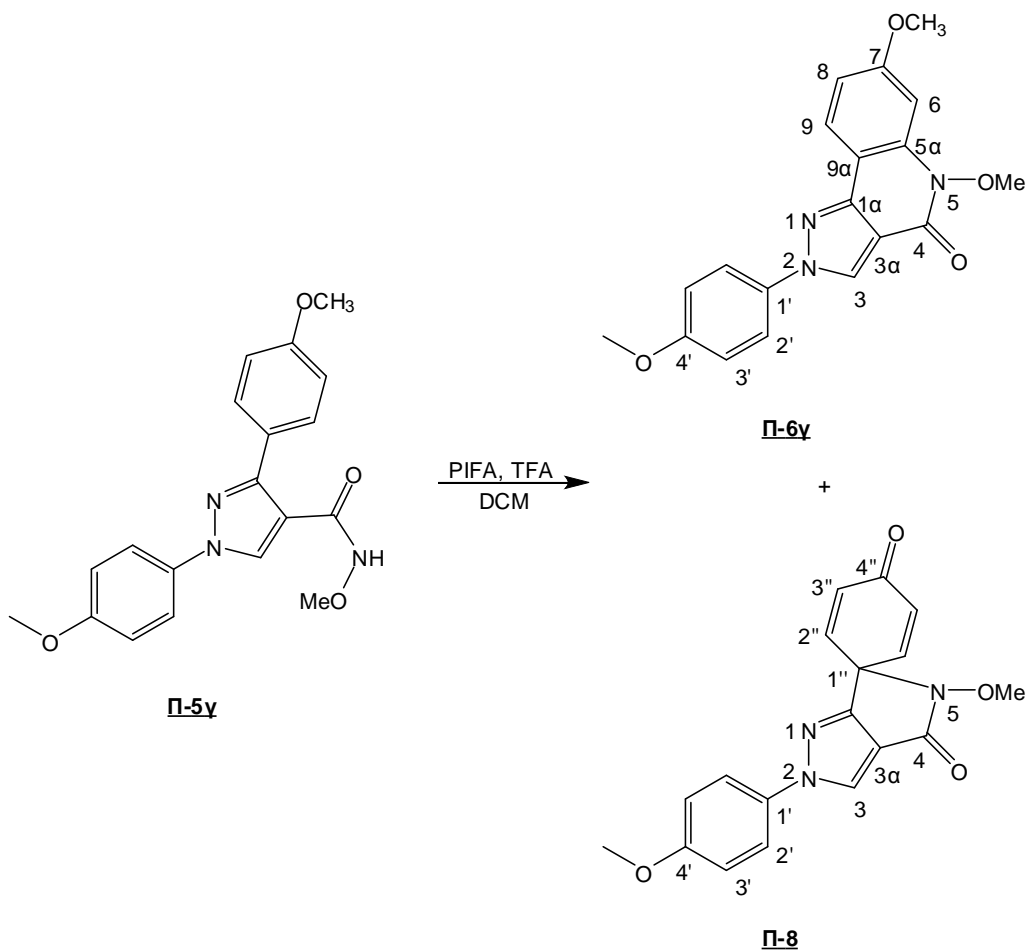
¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.66 (1H, s, H-3), 7.80 (1H, d, *J* 2.8 Hz, H-9), 7.78 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 7.57 (1H, d, *J* 9.2 Hz, H-6), 7.19 (1H, dd, *J* 9.2 Hz *J* 2.8 Hz, H-7), 7.07 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 4.13 (3H, s, N-OCH₃), 3.96 (3H, s, C8-OCH₃), 3.90 (3H, s, C4'-OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 159.5 (C-4), 155.8 (C-8), 154.7 (C-4'), 147.8 (C-1a), 133.1 (C-1'), 131.1 (C-5a), 127.6 (C-3), 122.0 (C-2'), 118.4 (C-7), 115.5 (C-9a), 114.8 (C-3'), 114.6 (C-6), 114.3 (C-3a), 105.5 (C-9), 62.97 (N-OCH₃), 55.90 (C4'-OCH₃), 55.69 (C8-OCH₃).

MS: 352.29 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1663 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₇N₃O₄: Θεωρητικά: C, 64.95; H, 4.88; N, 11.96; Πειραματικά: C, 65.10; H, 4.74; N 11.82.

5,7-Διμεθοξυ-2-(4'-μεθοξυφαινυλ)-2H-πυραζολο[4,3-c]κινολιν-4(5H)-όνη **Π-6γ****Π-6γ:**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
55%	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄	351.36	175 – 176	R _f = 0.38 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η πυραζολο[4,3-c]κινολινόνη **Π-6γ** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-5γ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.63 (1H, s, H-3), 8.24 (1H, d, *J* 8.8 Hz, H-9), 7.76 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 7.14 (1H, s, H-6), 7.06 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 6.94 (1H, d, *J* 8.8 Hz, H-8), 4.14 (3H, s, N-OCH₃), 3.97 (3H, s, C7-OCH₃), 3.91 (3H, s, C4'-OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 161.5 (C-4), 159.4 (C-7), 155.5 (C-4'), 148.0 (C-1a), 138.4 (C-1'), 133.2 (C-5a), 127.4 (C-3), 124.7 (C-9), 121.9 (C-2'), 114.8 (C-3'), 113.0 (C-9a), 110.3 (C-8), 108.1 (C-3a), 97.70 (C-6) 62.88 (N-OCH₃), 55.67 (OCH₃).

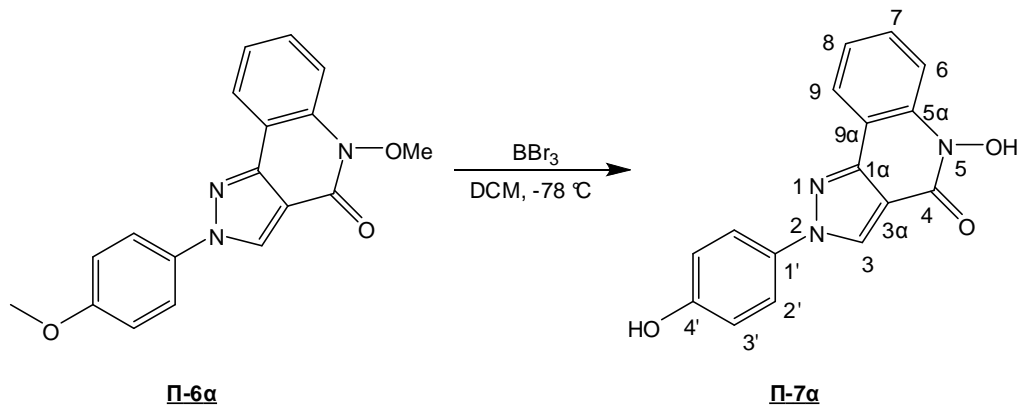
MS: 352.28 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1647 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₇N₃O₄: Θεωρητικά: C, 64.95; H, 4.88; N, 11.96; Πειραματικά: C, 64.81; H, 4.78; N 12.08.

Π-8:**Φασματοσκοπικά Δεδομένα:**

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.43 (1H, s, H-3), 7.81 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2'), 7.68 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.00 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-3'), 6.97 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 3.86 (6H, s, OCH₃).

2.3.8 Γενική μέθοδος αποπροστασίας πυραζολο[4,3-*c*]κινολινών **Π-6**5-Υδροξυ-2-(4'-υδροξυφαινυλ)-2*H*-πυραζολο[4,3-*c*]κινολιν-4(5*H*)-όνη **Π-7α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₃	293.28	269 – 270	R _f = 0.38 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα της πυραζολο[4,3-*c*]κινολίνης **Π-6α** (0.050g, 0.16 mmol) σε CH₂Cl₂ (5,0 mL) στους -78 °C, προστέθηκε στάγδην BBr₃ (1.6 mmol, 1.0 M σε CH₂Cl₂, 5 ισοδύναμα ανά δεσμό, 1.6 mL). Η αντίδραση αφήνεται για 1 ώρα στους -78 °C και μετά για 16 ώρες σε r.t.. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C, εξουδετερώθηκε με MeOH και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα HCl 1N. Κατόπιν, η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πυκνωτή ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-7α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως καφέ στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 11.0 (1H, s, N-OH), 9.90 (1H, s, C4'-OH), 9.30 (1H, s, H-3), 8.19 (1H, d, *J* 7.2 Hz, H-9), 7.89 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H-2'), 7.73 (1H, d, *J* 8.0 Hz, H-6),

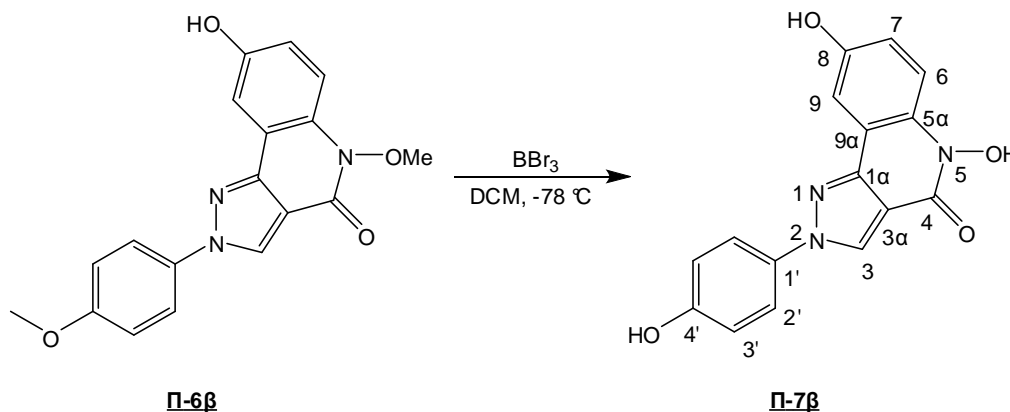
7.62 (1H, t, J 6.8 Hz, H-7), 7.34 (1H, t, J 6.8 Hz, H-8), 6.95 (2H, d, J 8.0 Hz, H-3').

^{13}C NMR (DMSO): δ = 157.7 (C-4), 155.1 (C-4'), 147.0 (C-1a), 138.8 (C-1'), 131.9 (C-5a), 130.3 (C-3), 128.4 (C-7), 123.0 (C-9) 122.7 (C-8), 122.0 (C-2'), 116.4 (C-3') 114.1 (C-9a) 113.9 (C-6) 113.8 (C-3a).

MS: 294.17 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1642 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₁N₃O₃: Θεωρητικά: C, 65.53; H, 3.78; N, 14.33;
Πειραματικά: C, 65.39; H, 3.86; N 14.46.

5,8-Διυδροξυ-2-(4'-υδροξυφαινυλ)-2H-πυραζολο[4,3-c]κινολιν-4(5H)-όνη **Π-7β**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₄	309.28	–	R _f = 0.1 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη πυραζολο[4,3-c]κινολινόνη **Π-7β** παρασκευάστηκε από την πυραζολο[4,3-c]κινολινόνη **Π-6β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

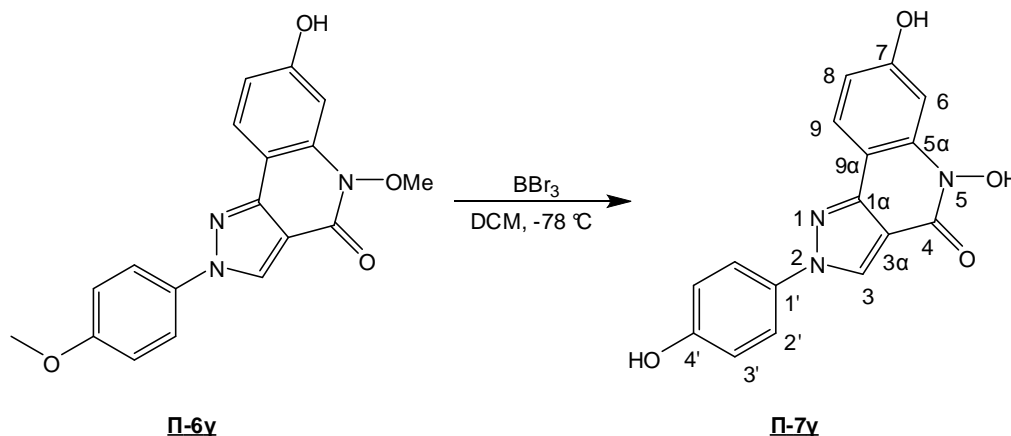
¹H NMR (DMSO): δ = 10.94 (1H, s, N-OH), 9.94 (1H, s, OH), 9.70 (1H, s, OH), 9.23 (1H, s, H-3), 7.87 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'), 7.56 (1H, d, *J* 8.0 Hz, H-6), 7.07 (1H, d, *J* 8.0 Hz, H-7), 6.95 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-3'), 6.58 (1H, s, H-9).

¹³C NMR (DMSO): δ = 157.8 (C-4), 157.7 (C-8), 153.4 (C-4'), 146.9 (C-1a), 132.1 (C-1'), 132.0 (C-5a), 128.3 (C-3), 122.0 (C-2'), 118.5 (C-9a), 116.4 (C-3'), 115.7 (C-7), 114.8 (C-6), 114.2 (C-3a), 107.4 (C-9).

MS: 310.39 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1652 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₁N₃O₄: Θεωρητικά: C, 62.14; H, 3.58; N, 13.59; Πειραματικά: C, 62.27; H, 3.67; N 13.48.

5,7-Διυδροξυ-2-(4'-υδροξυφαινυλ)-2H-πυραζολο[4,3-c]κινολιν-4(5H)-όνη **Π-7γ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₄	309.28	—	R _f = 0.23 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη πυραζολο[4,3-c]κινολινόνη **Π-7β** παρασκευάστηκε από την πυραζολο[4,3-c]κινολινόνη **Π-6β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 9.10 (1H, s, N-OH), 8.94 (1H, s, OH), 8.92 (1H, s, H-3), 8.86 (1H, s, OH), 8.12 (1H, d, *J* 8.4 Hz, H-9), 7.90 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 7.31 (1H, s, H-6), 7.04 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H-3'), 6.90 (1H, d, *J* 8.4 Hz, H-8).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 159.2 (C-4), 157.2 (C-7), 154.6 (C-4'), 147.5 (C-1a), 138.6 (C-1'), 132.5 (C-5a), 126.7 (C-3), 124.1 (C-9), 121.6 (C-2'), 115.9 (C-3'), 111.7 (C-9a), 111.1 (C-8), 106.5 (C-3a), 99.39 (C-6).

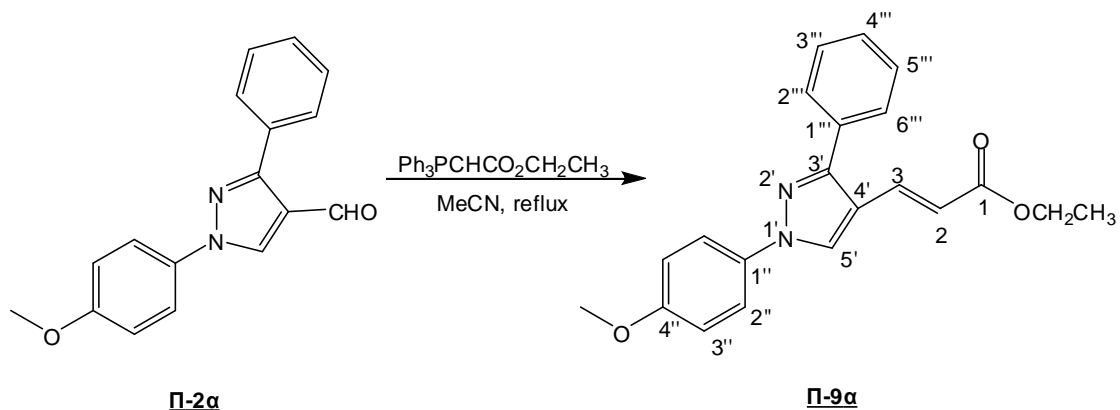
MS: 310.37 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1635 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₆H₁₁N₃O₄: Θεωρητικά: C, 62.14; H, 3.58; N, 13.59; Πειραματικά: C, 61.96; H, 3.69; N 13.44.

2.3.9 Γενική μέθοδος παρασκευής εστέρων **Π-9**

(*E*)-3-(1'-(4'-μεθοξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας **Π-9α**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	348.40	162 – 163	R _f = 0.24 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα της πυραζολοκαρβοξαλδεΐδης **Π-2α** (1.2 g, 4.3 mmol) σε MeCN (14 mL), προστέθηκε Ph₃PCHCO₂CH₂CH₃ (1.6 g, 4.7 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης τέθηκε σε reflux ολονύχτια. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε EtOAc και η οργανική φάση πλύθηκε 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-9α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.16 (1H, s, H-5'), 7.76 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.69 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2''' και H-6'''), 7.68 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.51 (2H, t, *J* 7.2 Hz, H-3''' και H-5'''), 7.45 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-4'''), 7.02 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.28 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 4.26 (2H, q, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.88 (3H, s, OCH₃), 1.34 (3H, t, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

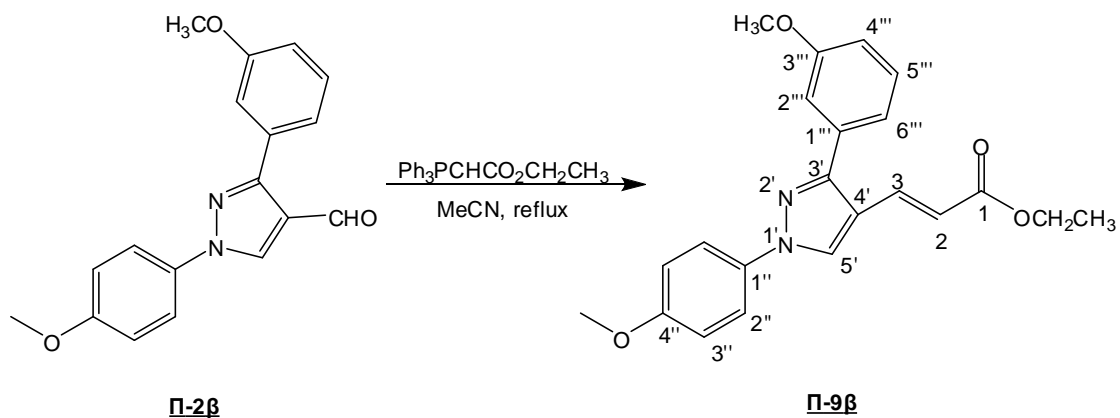
^{13}C NMR (CDCl_3): 167.1 (C-1), 158.8 (C-4''), 153.0 (C-3'), 135.2 (C-4'), 133.2 (C-1''), 132.4 (C-1'''), 128.7 (C-3, C-3''' και C-5'''), 128.6 (C-2''' και C-6'''), 128.5 (C-4'''), 126.4 (C-5'), 121.0 (C-2''), 117.3 (C-2), 114.6 (C-3''), 60.32 (OCH_2CH_3), 55.60 (OCH_3), 14.35 (OCH_2CH_3).

MS: 349.28 ($\text{M}+\text{H}^+$).

IR (film) ν : 1703 cm^{-1} .

Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$: Θεωρητικά: C, 72.40; H, 5.79; N, 8.04; Πειραματικά: C, 72.19; H, 5.69; N 8.20.

**(E)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(3''''-μεθοξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας Π-9β**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
80%	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄	378.42	119 – 120	R _f = 0.42 Hex/EtOAc 7:3

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο εστέρας Π-9β παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξαλδεύδη Π-2β ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.15 (1H, s, H-5'), 7.76 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.68 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.41 (1H, t, J 8.0 Hz, H-5'''), 7.25 (2H, d, J 6.4 Hz, H-2''' και H-6'''), 7.00 (3H, d, J 8.8 Hz, H-3'' και H-4'''), 6.28 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.26 (2H, q, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.89 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.86 (3H, s, C4''-OCH₃), 1.33 (3H, t, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

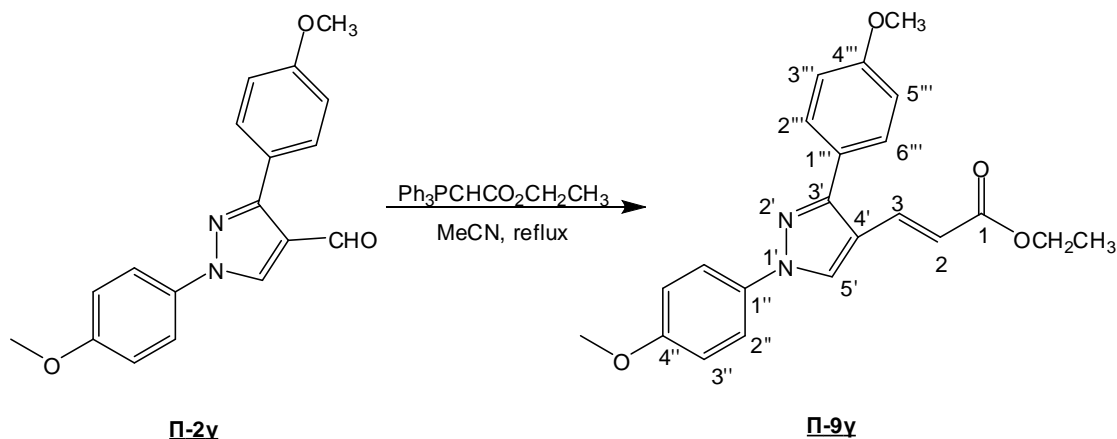
¹³C NMR (CDCl₃): 167.0 (C-1), 159.8 (C-3'''), 158.8 (C-4''), 152.8 (C-3'), 135.2 (C-4'), 133.6 (C-1''), 133.2 (C-1'''), 129.7 (C-3), 126.4 (C-5'''), 121.2 (C-5'), 121.0 (C-2''), 117.3 (C-4''' και C-6'''), 114.6 (C-3'' και C-2'''), 113.7 (C-2), 60.31 (OCH₂CH₃), 55.60 (C4''-OCH₃), 55.36 (C3'''-OCH₃), 14.36 (OCH₂CH₃).

MS: 379.14 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1703 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₂₂N₂O₄: Θεωρητικά: C, 69.83; H, 5.86; N, 7.40; Πειραματικά: C, 70.01; H, 5.73; N 7.53.

(E)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(4'''-μεθοξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας **Π-9γ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₄	378.42	—	R _f = 0.30 Hex/EtOAc 7:3

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο εστέρας **Π-9γ** παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξαλδεύδη **Π-2γ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3 και εξάτμιση του διαλύτη ως αφρό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.13 (1H, s, H-5'), 7.74 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.67 (2H, d, J 9.2 Hz, H-2''' και H-6'''), 7.62 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.03 (2H, d, J 9.2 Hz, H-3''' και H-5'''), 7.01 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3''), 6.27 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.26 (2H, q, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.89 (3H, s, C4'''-OCH₃), 3.88 (3H, s, C4''-OCH₃), 1.34 (3H, t, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

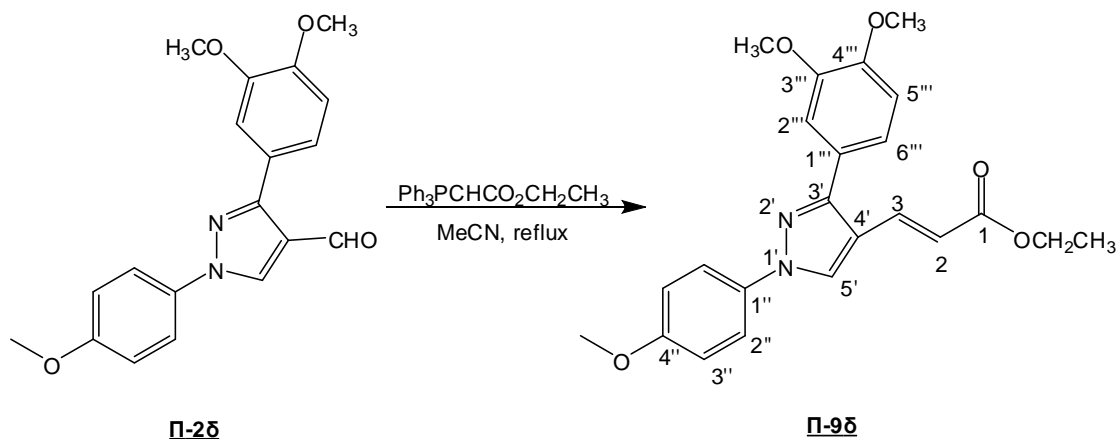
¹³C NMR (CDCl₃): 167.2 (C-1), 160.0 (C-4'''), 158.7 (C-4''), 152.8 (C-3'), 135.4 (C-4'), 133.2 (C-1''), 129.9 (C-2''' και C-6'''), 126.3 (C-3), 124.9 (C-1'''), 121.0 (C-2''), 117.1 (C-5'), 117.0 (C-2), 114.6 (C-3''' και C-5''), 114.2 (C-3''), 60.29 (OCH₂CH₃), 55.60 (C4''-OCH₃), 55.35 (C4'''-OCH₃), 14.34 (OCH₂CH₃).

MS: 379.20 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1703 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₂₂N₂O₄: Θεωρητικά: C, 69.83; H, 5.86; N, 7.40; Πειραματικά: C, 69.99; H, 5.99; N 7.55.

(E)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(3''',4'''-διμεθοξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας **Π-9δ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₅	408.45	122 – 123	R _f = 0.40 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο εστέρας **Π-9δ** παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξαλδεΐδη **Π-2δ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.13 (1H, s, H-5'), 7.76 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.67 (2H, d, J 9.2 Hz, H-2''), 7.24 (1H, d, J 2.0 Hz, H-2'''), 7.20 (1H, dd, J 8.2 Hz J 2.0 Hz, H-6'''), 7.00 (2H, d, J 9.2 Hz, H-3''), 6.99 (1H, d, J 8.2 Hz, H-5'''), 6.27 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.25 (2H, q, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.97 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.96 (3H, s, C4'''-OCH₃), 3.87 (3H, s, C4''-OCH₃), 1.33 (3H, t, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

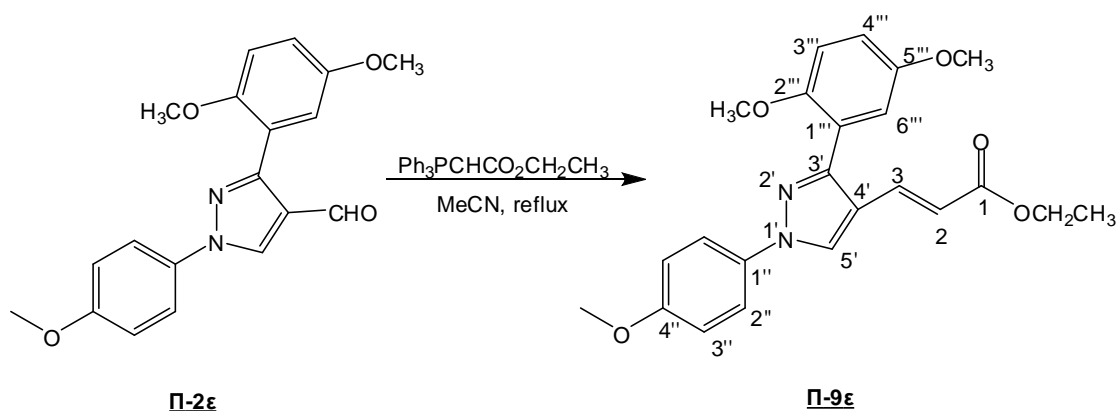
¹³C NMR (CDCl₃): 167.1 (C-1), 158.8 (C-4''), 152.8 (C-3'), 149.5 (C-3'''), 149.2 (C-4'''), 135.4 (C-4'), 133.2 (C-1''), 126.4 (C-1'''), 125.1 (C-3), 121.4 (C-5'), 121.0 (C-2''), 120.9 (C-6'''), 117.1 (C-5'''), 114.6 (C-3''), 111.6 (C-2'''), 111.3 (C-2), 60.29 (OCH₂CH₃), 55.98 (C3'''-OCH₃ και C4'''-OCH₃), 55.59 (C4''-OCH₃), 14.35 (OCH₂CH₃).

MS: 409.34 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1704 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₃H₂₄N₂O₅: Θεωρητικά: C, 67.63; H, 5.92; N, 6.86; Πειραματικά: C, 67.71; H, 5.83; N 6.94.

(*E*)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(2''',5'''-διμεθοξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας **Π-9ε**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₅	408.45	116 – 117	R _f = 0.33 Hex/EtOAc 6:4

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο εστέρας **Π-9ε** παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξαλδεύδη **Π-2ε** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.14 (1H, s, H-5'), 7.69 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2''), 7.68 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.08 (1H, d, *J* 1.6 Hz, H-6'''), 7.00 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-3''), 6.97 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''' και H-4'''), 6.12 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 4.22 (2H, q, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.87 (3H, s, C5'''-OCH₃), 3.83 (3H, s, C2'''-OCH₃), 3.80 (3H, s, C4''-OCH₃), 1.21 (3H, t, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

¹³C NMR (DMSO): 167.3 (C-1), 158.7 (C-4'), 153.7 (C-5'''), 151.4 (C-2'''), 150.6 (C-3'), 136.0 (C-4'), 133.6 (C-1''), 133.3 (C-3), 126.0 (C-5') 121.0 (C-2''), 118.7 (C-1''') 116.7 (C-4'''), 116.0 (C-3'''), 115.8 (C-6'''), 114.6 (C-3''), 112.6 (C-2) 60.12 (OCH₂CH₃), 56.11 (C4''-OCH₃) 55.86 (C5'''-OCH₃) 55.58 (C2'''-OCH₃), 14.35 (OCH₂CH₃).

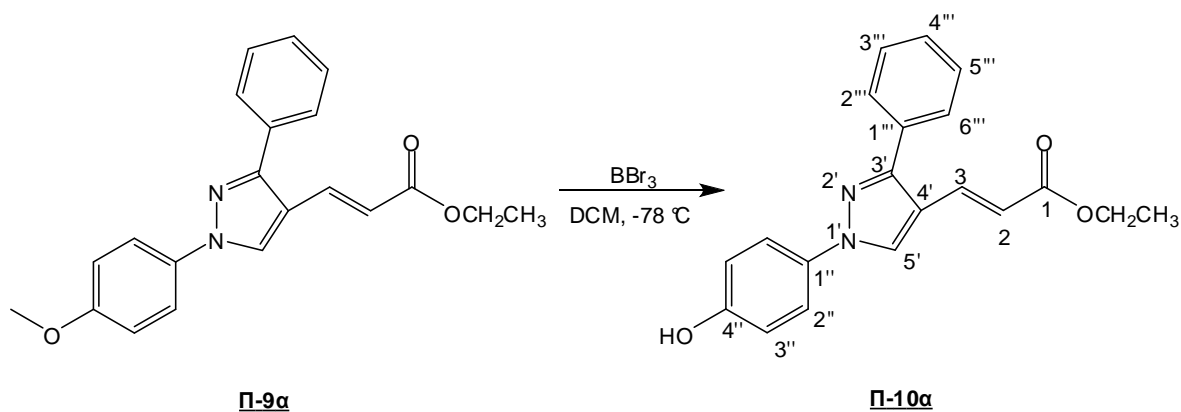
MS: 409.35 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1704 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₃H₂₄N₂O₅: Θεωρητικά: C, 67.63; H, 5.92; N, 6.86; Πειραματικά: C, 67.85; H, 5.78; N 7.01.

2.3.10 Γενική μέθοδος αποπροστασίας εστέρων **Π-9**

(*E*)-3-(1'-(4'-υδροξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας **Π-10α**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
85%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	334.37	158 – 159	R _f = 0.41 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του εστέρα **Π-9α** (0.20g, 0.57 mmol) σε CH₂Cl₂ (18 mL) στους -78 °C, προστέθηκε στάγδην BBr₃ (2.8 mmol, 1.0 M σε CH₂Cl₂, 5 ισοδύναμα ανά δεσμό, 2.8 mL). Η αντίδραση αφέθηκε για 1 ώρα στους -78 °C και μετά για 16 ώρες σε r.t.. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C, εξουδετερώθηκε με MeOH και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα HCl 1N. Κατόπιν, η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-10α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 8.84 (1H, s, H-5'), 7.79 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.71 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.70 (2H, d, J 7.2 Hz, H-2''' και H-6'''), 7.55 (2H, t, J 7.2 Hz, H-3''' και H-5'''), 7.48 (1H, t, J 7.2 Hz, H-4'''), 7.01 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3''), 6.44 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.19 (2H, q, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.27 (3H, t, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

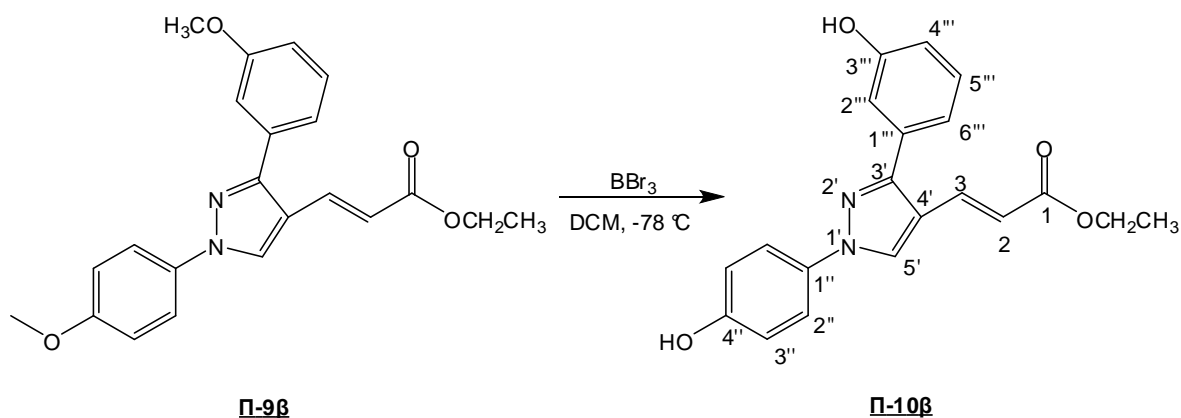
¹³C NMR (acetone-d₆): 166.4 (C-1), 156.7 (C-4''), 152.2 (C-3'), 134.8 (C-4'), 132.9 (C-1''), 132.4 (C-1'''), 128.6 (C-3''' και C-5'''), 128.5 (C-2''' και C-6'''), 128.3 (C-4'''), 127.3 (C-3), 120.6 (C-2''), 117.1 (C-5'), 116.8 (C-2), 115.9 (C-3''), 59.68 (OCH₂CH₃), 13.74(OCH₂CH₃).

MS: 335.22 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1689 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₃: Θεωρητικά: C, 71.84; H, 5.43; N, 8.38; Πειραματικά: C, 71.99; H, 5.52; N 8.21.

**(E)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(3''''-υδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας Π-10β**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	350.37	190 – 191	R _f = 0.31 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο αποπροστατευμένος εστέρας Π-10β παρασκευάστηκε από τον εστέρα Π-9β ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 8.82 (1H, s, H-5'), 7.78 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.73 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.36 (1H, t, J 8.0 Hz, H-5'''), 7.20 (1H, d, J 1.6 Hz, H-2'''), 7.16 (1H, d, J 8.0 Hz, H-4'''), 7.00 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3'), 6.95 (1H, dd, J 8.0 Hz J 1.6 Hz, H-6'''), 6.44 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.19 (2H, q, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.27 (3H, t, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

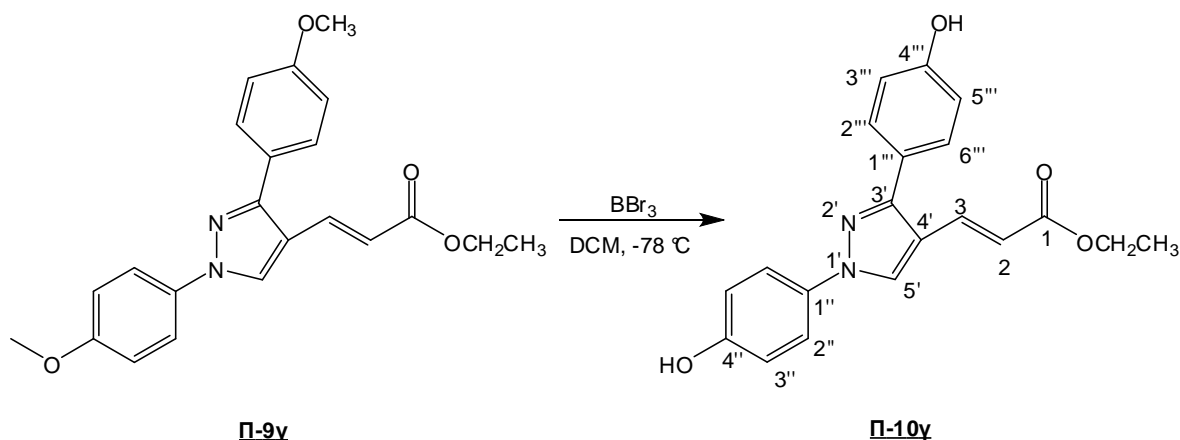
¹³C NMR (acetone-d₆): 166.5 (C-1), 157.7 (C-3'''), 156.7 (C-4''), 152.1 (C-3'), 136.2 (C-4'), 135.0 (C-1'' και C-1'''), 129.7 (C-3), 127.2 (C-5'''), 120.6 (C-5' και C-2''), 119.7 (C-6'''), 116.9 (C-4'''), 115.9 (C-3''), 115.4 (C-2'''), 115.4 (C-2), 59.71 (OCH₂CH₃), 13.78 (OCH₂CH₃).

MS: 351.02 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1692 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₄: Θεωρητικά: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00; Πειραματικά: C, 68.75; H, 5.32; N 8.18.

(E)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(4''''-υδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4''-υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας Π-10γ



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	350.37	248 – 249	R _f = 0.20 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο αποπροστατευμένος εστέρας **Π-10γ** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-9γ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.00 (1H, s, H-5'), 7.67 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2''' και H-6'''), 7.54 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.41 (2H, d, J 8.0 Hz, H-2''), 6.93-6.90 (4H, m, H-3'' H-3''' και H-5'''), 6.46 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.16 (2H, q, J 6.8 Hz, OCH₂CH₃), 1.24 (3H, t, J 6.8 Hz, OCH₂CH₃).

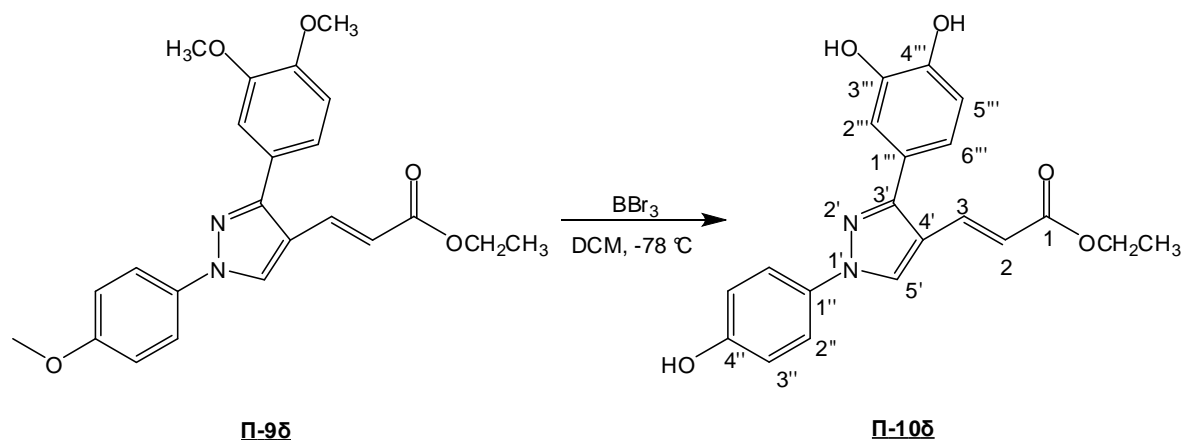
¹³C NMR (DMSO): 167.0 (C-1), 158.3 (C-4'''), 156.9 (C-4''), 152.5 (C-3'), 135.6 (C-4'), 131.8 (C-1''), 130.1 (C-2''' και C-6'''), 128.4 (C-3), 123.9 (C-1'''), 120.8 (C-2''), 116.6 (C-5'), 116.4 (C-2), 116.3 (C-3''' και C-5''), 116.1 (C-3''), 60.26 (OCH₂CH₃), 14.68 (OCH₂CH₃).

MS: 351.10 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1693 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₄: Θεωρητικά: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00; Πειραματικά: C, 68.40; H, 5.31; N 7.88.

(E)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(3''',4'''-διδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας Π-10δ



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	366.37	203 – 204	R _f = 0.36 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο αποπροστατευμένος εστέρας Π-10δ παρασκευάστηκε από τον εστέρα Π-9δ ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως καφέ στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 8.78 (1H, s, H-5'), 7.76 (2H, d, J 9.2 Hz, H-2''), 7.73 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.21 (1H, d, J 2.0 Hz, H-2'''), 7.04 (1H, dd, J 8.0 Hz J 2.0 Hz, H-6'''), 6.99 (2H, d, J 9.2 Hz, H-3''), 6.98 (1H, d, J 8.2 Hz, H-5'''), 6.41 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.19 (2H, q, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.27 (3H, t, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

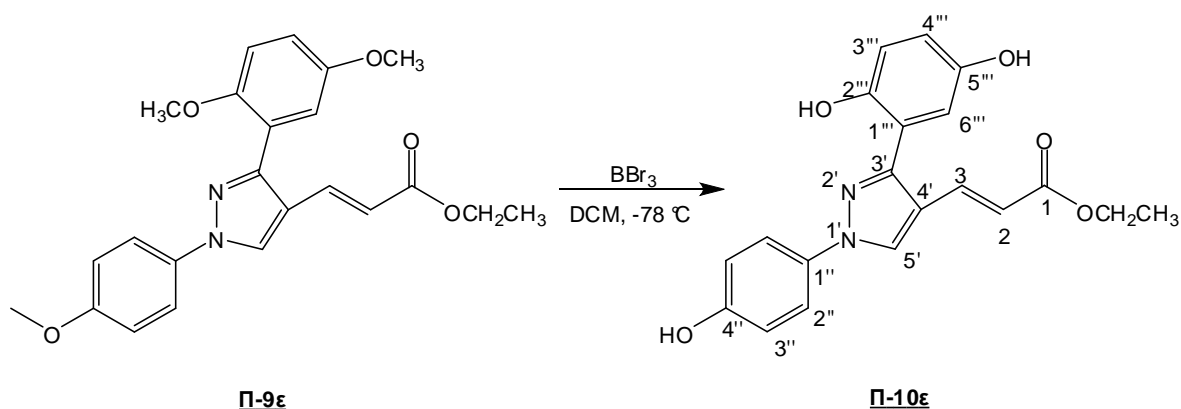
¹³C NMR (acetone-d₆): 166.5 (C-1), 156.4 (C-4'), 152.4 (C-3'), 145.6 (C-3'''), 145.1 (C-4'''), 135.3 (C-4'), 132.5 (C-1''), 127.0 (C-3), 124.7 (C-5'), 120.5 (C-2'' C-1''' και C-6'''), 116.5 (C-5'''), 115.8 (C-3''), 115.5 (C-2'''), 115.3 (C-2), 59.63 (OCH₂CH₃), 13.75 (OCH₂CH₃).

MS: 367.27 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1698 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₅: Θεωρητικά: C, 65.57; H, 4.95; N, 7.65; Πειραματικά: C, 65.75; H, 5.12; N 7.78.

(*E*)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(2''',5'''-διυδροξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας **Π-10ε**



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	366.37	236 – 237	R _f = 0.30 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο αποπροστατευμένος εστέρας **Π-10ε** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-9ε** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.96 (1H, s, H-5'), 7.66 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2''), 7.47 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 6.91 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.80 (1H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.72 (1H, dd, *J* 8.4 Hz *J* 2.8 Hz, H-4'''), 6.71 (1H, d, *J* 2.8 Hz, H-6'''), 6.32 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 4.13 (2H, q, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.22 (3H, t, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

¹³C NMR (DMSO): 167.1 (C-1), 156.9 (C-4''), 150.8 (C-3'), 150.2 (C-5'''), 148.0 (C-2'''), 136.9 (C-4'), 131.9 (C-1'), 127.9 (C-3), 120.7 (C-2''), 119.9 (C-5'), 118.2 (C-4'''), 117.4 (C-3'''), 117.2 (C-6'''), 117.1 (C-1'''), 116.3 (C-3''), 115.7 (C-2), 60.10 (OCH₂CH₃), 14.67 (OCH₂CH₃).

MS: 367.29 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1696 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₅: Θεωρητικά: C, 65.57; H, 4.95; N, 7.65; Πειραματικά: C, 65.77; H, 5.10; N 7.78.

2.4 Βιβλιογραφία

1. Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.
2. Liekens, S.; De Clercq, E.; Neyts, J. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *61*, 253-270.
3. Carmeliet, P. *Nature* **2005**, *438*, 932-936.
4. Folkman, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 273-286.
5. Folkman, J. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
6. Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Ferrara, N. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335-2342.
7. Hennequin, L. F.; P.Thomas, A.; Johnstone, C.; E.Stokes, E. S.; Plé, P. A.; Lohmann, J. J. M.; ., D. J. O.; Dukes, M.; Wedge, S. R.; Curwen, J. O.; J.Kendrew; Brempt, C. L.-v. d. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5369-5389.
8. Kallander, L. S.; Lu, Q.; Chen, W.; Tomaszek, T.; Yang, G.; Tew, D.; Meek, T. D.; Hofmann, G. A.; Schulz-Pritchard, C. K.; Smith, W. W.; Janson, C. A.; Ryan, M. D.; Zhang, G.-F.; Johanson, K. O.; Kirkpatrick, R. B.; Ho, T. F.; Fisher, P. W.; Mattern, M. R.; Johnson, R. K.; Hansbury, M. J.; Winkler, J. D.; Ward, K. W.; Veber, D. F.; Thompson, S. K. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5644-5647.
9. Carraro, F.; Naldini, A.; Pucci, A.; Locatelli, G. A.; Maga, G.; Schenone, S.; Bruno, O.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Brullo, C.; Fossa, P.; Menozzi, G.; Mosti, L.; Modugno, M.; Tintori, C.; Manetti, F.; Botta, M. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1549-1561.
10. Semones, M.; Feng, Y.; Johnson, N.; Adams, J. L.; JWinklerc; Hansbury, M. *J. Med. Chem.* **2007**, *17*, 4756-4760.
11. Fong, T. A. T.; Shawver, L. K.; Sun, L.; Tang, C.; App, H.; Powell, T. J.; Kim, Y. H.; Schreck, R.; Wang, X.; Risau, W.; Ullrich, A.; Hirth, K. P.; McMahon, G. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 99-106.
12. Ivica Grgic, I. E., Philipp Heinau, Han Si, Susanne Brakemeier, Joachim Hoyer, Ralf Koehler. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 704-709.
13. Sharp, S. Y.; Boxall, K.; Rowlands, M.; Prodromou, C.; Roe, S. M.; Maloney, A.; Powers, M.; Clarke, P. A.; Box, G.; Sanderson, S.; Patterson, L.; Matthews, T. P.; Cheung, K. M.; Ball, K.; Hayes, A.; Raynaud, F.; Marais, R.; Pearl, L.; Eccles, S.; Aherne, W.; McDonald, E.; Workman, P. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 2206-2216.
14. Wasylyk, C.; Zheng, H.; Castell, C.; Debussche, L.; Multon, M. C.; Wasylyk, B. *Cancer Res.* **2008**, *67*, 1275-1283.
15. Ho, C. Y.; Ludovici, D. W.; Maharoo, U. S. M.; Mei, J.; Sechler, J. L.; Tuman, R. W.; Strobel, E. D.; Andracka, L.; Yen, H.-K.; Leo, G.; Li, J.; Almond, H.; Lu, H.; DeVine, A.; Tominovich, R. M.; Baker, J.; Emanuel, S.; Gruninger, R. H.; Middleton, S. A.; Johnson, D. L.; Galemno, R. A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8163-8173.
16. 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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3537-3541.
17. 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, A.; Nickols, M. A.; Rader, R. K.; Settle, S. L.; Shannon, K. E.; Steininger, C. N.; Westlinc, M. M.; Westlin, W. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3156-3161.
18. Michael, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 476-493.

19. Varvoglis, A. *Hypervalent Iodine in Organic Synthesis*; Academic Press: London, 1997.
20. Zhdankin, V. V.; Stang, P. J. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2523-2584.
21. Stang, P. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2997-3008.
22. Gupton, J. T.; Colon, C.; Harrison, C. R.; Lizzi, M. J.; Polk, D. E. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4522-4524.
23. Kira, M. A.; Abdel-Rahman, M. O.; Gadalla, K. Z. *Tetrahedron lett.* **1969**, *10*, 109-110.
24. DeLuca, L.; Giacomelli, G.; Masala, S.; Porcheddu, A. *Synlett* **2004**, *13*, 2299-2302.
25. Montanari, F. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 567-569.
26. Glover, S. A.; Goosen, A.; McClelland, C. W.; Schoonraad, J. L. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2577-2592.
27. Kawase, M.; Miyake, Y.; Sakamoto, T.; Shimada, M.; Kikugawa, Y. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 1653-1660.
28. Kikugawa, Y.; Kawase, W. *Chem. lett.* **1990**, *19*, 581-582.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

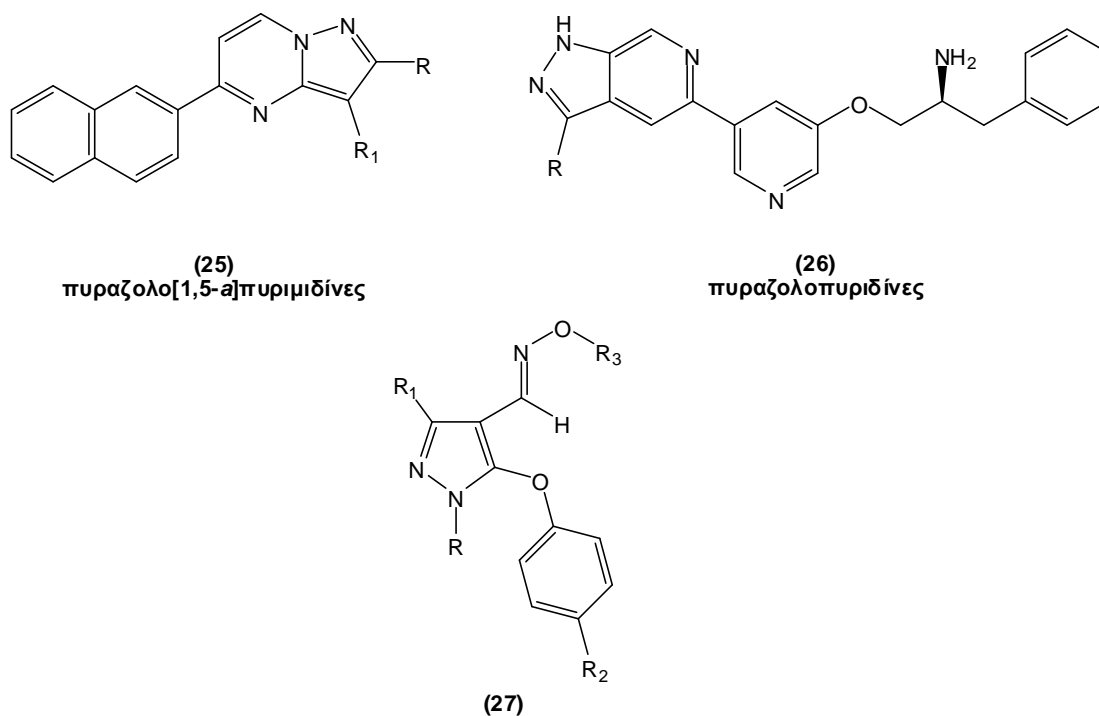
Σύνθεση και *in vitro* βιολογική αποτίμηση νέων πυραζολικών παραγώγων ως πιθανών αντικαρκινικών παραγόντων

3.1 Εισαγωγή

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις πλέον οδυνηρές ασθένειες παγκοσμίως. Παρά τα σημαντικά βήματα που έχουν επιτευχθεί –με την πάροδο του χρόνου- σε ερευνητικό και κλινικό επίπεδο και έχουν οδηγήσει στη δημιουργία αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων για την αντιμετώπιση ποικίλων μορφών κακοηθών όγκων, ο καρκίνος συνεχίζει να αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως.^{1,2} Στα πλαίσια της συνεχιζόμενης προσπάθειας για την αποτελεσματική αντιμετώπιση-θεραπεία του καρκίνου, μια ιδιαίτερα σημαντική προσέγγιση αποτελεί η μελέτη των μονοπατιών που οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Πάγιος στόχος είναι η ανακάλυψη/ανάπτυξη –μέσω της παρεμπόδισης των μονοπατιών αυτών- περισσότερο εκλεκτικών θεραπειών για την αντιμετώπιση των καρκίνων.^{3,4}

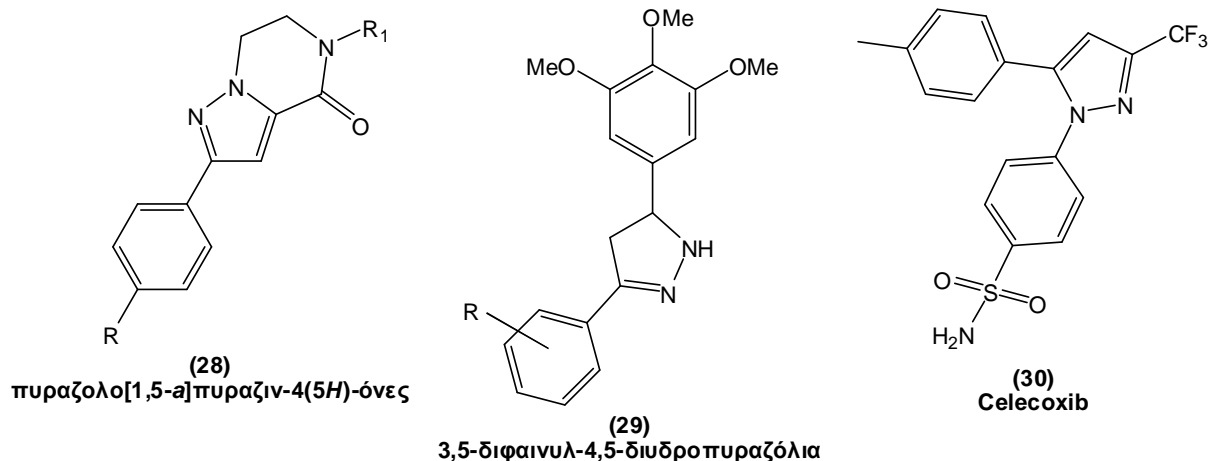
Η ενσωμάτωση ετεροκυκλικών δακτυλίων σε υπό διερεύνηση φάρμακα αποτελεί μία από τις συνηθέστερες στρατηγικές σύνθεσης νέων βιοδραστικών μορίων, η οποία οδηγεί αρκετές φορές στην ανακάλυψη νέων δραστικών/μη τοξικών μορίων. Στο πλαίσιο αυτό, ένα μεγάλο φάσμα αζα-ετεροκυκλικών ενώσεων έχει συντεθεί και μελετηθεί ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Μεταξύ των πενταμελών αζα-ετεροκυκλικών δακτυλίων που έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό, τα πυραζόλια αποτελούν την πλέον αντιπροσωπευτική ομάδα^{5,6} με αποτέλεσμα να έχουν συντεθεί ποικίλες (Σχήμα 3.1):

- πυράζολο[1,5-*a*]πυριμιδίνες (**25**) ως αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης που μεσολαβεί στη μεταφορά μιτογόνων σημάτων,⁷⁻⁹
- πυραζολοπυριδίνες (**26**) ως αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt), η υπερέκφραση της οποίας οδηγεί στην αδρανοποίηση των γονιδίων καταστολής όγκων,^{10,11} και
- τετραϋποκατεστημένα πυραζόλια (**27**) με ισχυρή αντικαρκινική δράση.¹²



Εικόνα 3.1. Δομές πυραζολικών παραγώγων με αντικαρκινική δράση.

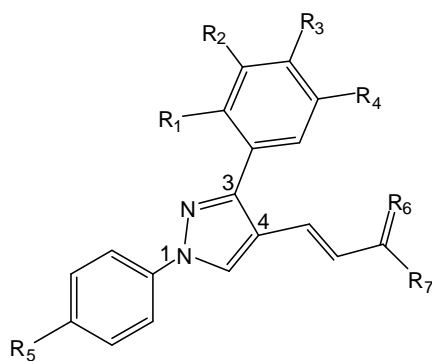
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι εκτεταμένες μελέτες σε ποικίλα φαινυλο-υποκατεστημένα πυραζόλια έδειξαν ότι πολλά από τα μόρια αυτά επιδεικνύουν αξιόλογες αντικαρκινικές ιδιότητες. Τα σημαντικότερα από τα μόρια αυτά είναι οι πυραζολο[1,5-α]πυραζιν-4(5*H*)-όνες **(28)** με δράση ως ισχυροί αναστολείς των καρκινικών κυττάρων των πνευμόνων A549,¹³ τα 3,5-διφαινυλο-4,5-διυδροπυραζόλια **(29)** που διαθέτουν ισχυρή δράση κατά της καρκινικής σειράς των πνευμόνων NCI-H460¹⁴ και κυρίως το Celecoxib **(30)** -ένας γνωστός αναστολέας της κυκλοοξυγενάσης-2¹⁵- ο οποίος τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση κατά του καρκίνου του μαστού,¹⁶ των πνευμόνων¹⁷ και του προστάτη (Εικόνα 3.2).¹⁸



Εικόνα 3.2. Δομές φαινυλο-υποκατεστημένων πυραζολίων με αντικαρκινική δράση.

3.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής σχεδιάστηκαν τρι-υποκατεστημένα πυραζόλια, που φέρουν διάφορες φαινυλομάδες στις θέσεις 1 και 3 του πυραζολικού δακτυλίου και ένα μεγάλο αριθμό λειτουργικών ομάδων στη θέση 4 (Εικόνα 3.3). Ο πυραζολικός δακτύλιος σχηματίστηκε σύμφωνα με τη συνθετική μέθοδο που αναπτύχθηκε στο Κεφάλαιο 2 (με τη χρήση των αντιδραστηρίων TCT/DMF). Η αντικαρκινική δράση των μορίων προσδιορίστηκε με *in vitro* δοκιμασίες στις παρακάτω τρεις χαρακτηριστικές καρκινικές κυτταρικές σειρές: 1) του προστάτη DU145, 2) του μελανώματος A2058 και 3) του μαστού MCF-7.

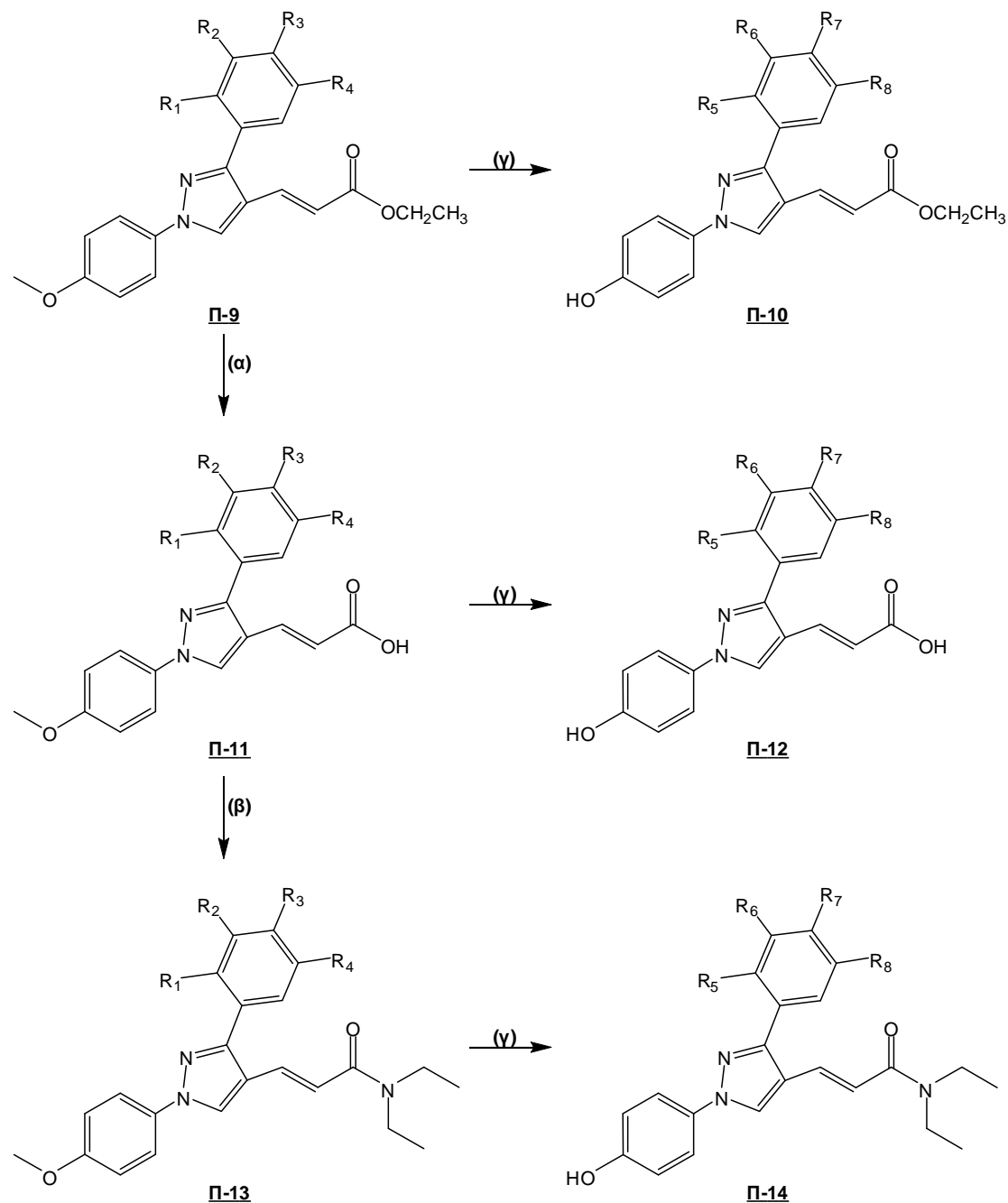


Εικόνα 3.3. Γενική δομή φαινυλο-πυραζόλο παραγώγων με αντικαρκινική δράση.

3.2.1 Σύνθεση ΟΗ-φαινυλο πυράζολο παραγώγων

Οι α,β-ακόρεστοι εστέρες **Π-9**, που συντέθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, υδρολύθηκαν προς τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα **Π-11** σε βασικές συνθήκες και

στη συνέχεια αποπροστατεύτηκαν με τη χρήση BBr_3 δίνοντας ως προϊόν τα ακόρεστα οξέα **Π-12** (Σχήμα 3.1). Η σύνθεση του οξέος **Π-11β** είναι δυνατόν να πιστοποιηθεί με τη σύγκριση του φάσματος 1H NMR με αυτό της πρόδρομης **Π-9β** (Φάσμα 3.1).



Π-9α, Π-11α, Π-13α $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H$

Π-9β, Π-11β, Π-13β $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = H, R_4 = H$

Π-9γ, Π-11γ, Π-13γ $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OCH_3, R_4 = H$

Π-9δ, Π-11δ, Π-13δ $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OCH_3, R_4 = H$

Π-9ε, Π-11ε, Π-13ε $R_1 = OCH_3, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = OCH_3$

Π-10α, Π-12α, Π-14α $R_5 = H, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = H$

Π-10β, Π-12β, Π-14β $R_5 = H, R_6 = OH, R_7 = H, R_8 = H$

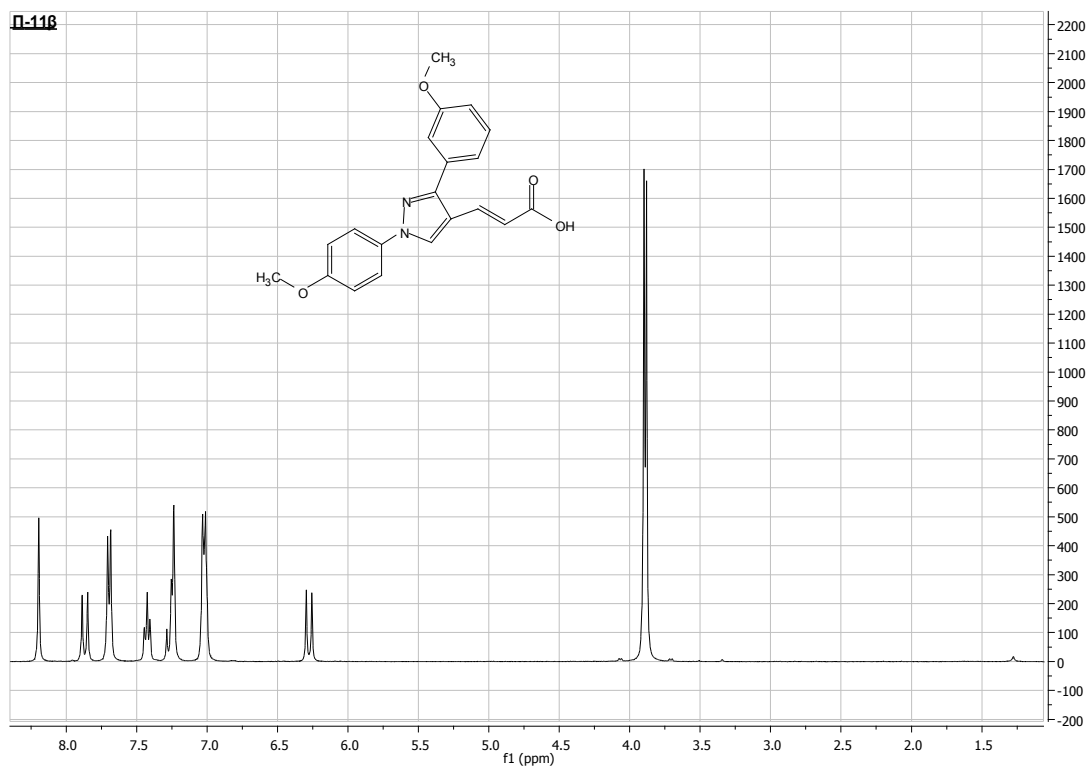
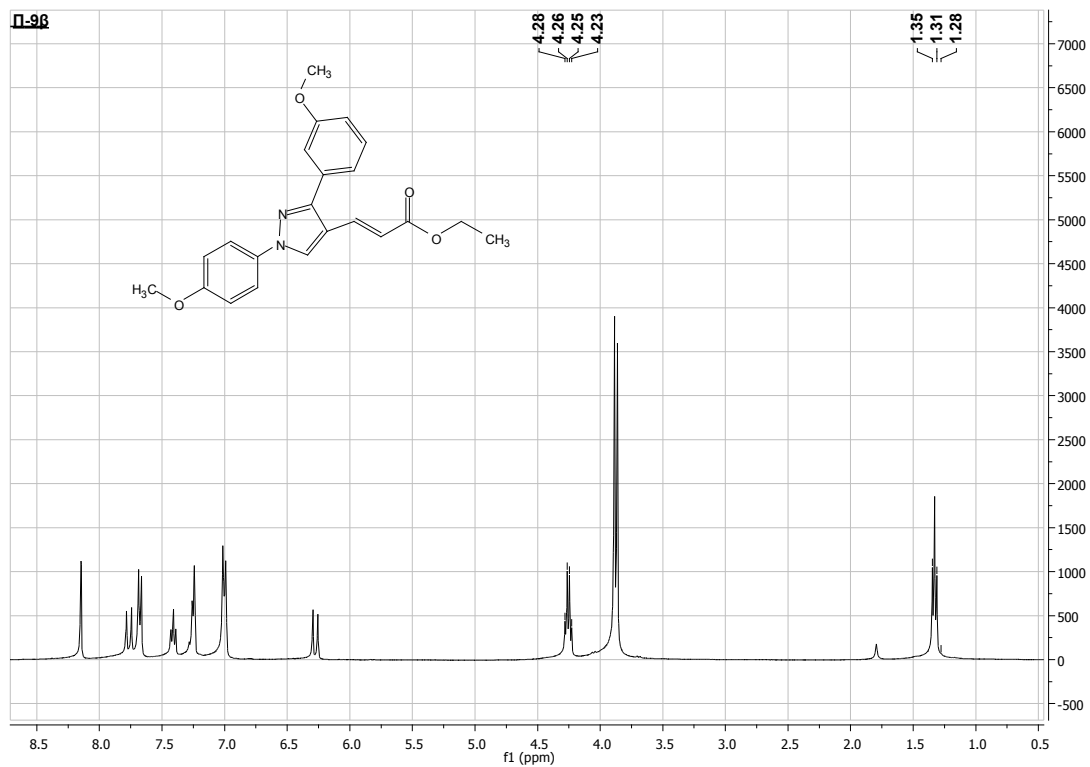
Π-10γ, Π-12γ, Π-14γ $R_5 = H, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$

Π-10δ, Π-12δ, Π-14δ $R_5 = H, R_6 = OH, R_7 = OH, R_8 = H$

Π-10ε, Π-12ε, Π-14ε $R_5 = OH, R_6 = H, R_7 = H, R_8 = OH$

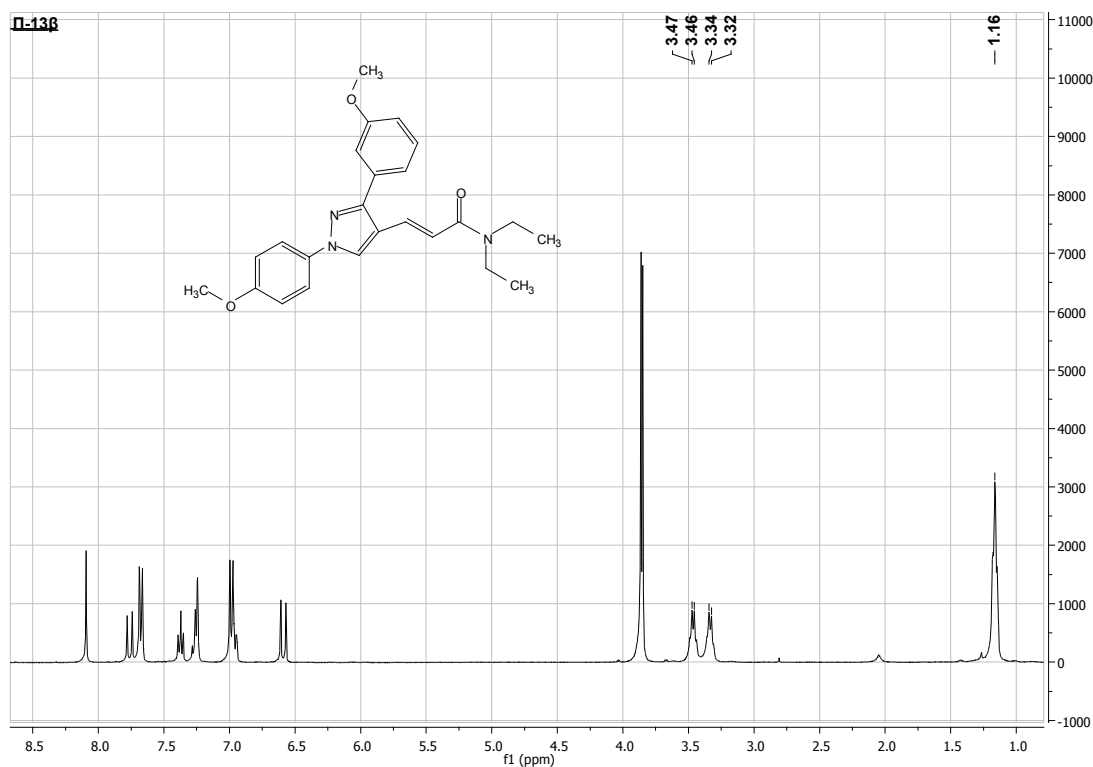
Σχήμα 3.1. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) EtOH, DMSO, NaOH; (β) Διαιθυλαμίνη, TBTU, MeCN; (γ) BBr_3 , CH_2Cl_2 , $-78^\circ C$.

Συγκεκριμένα, παρατηρείται εξαφάνιση των κορυφών OCH_2CH_3 (4.26 ppm) και OCH_2CH_3 (1.31 ppm), οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικές κορυφές του εστέρα **Π-9β**.



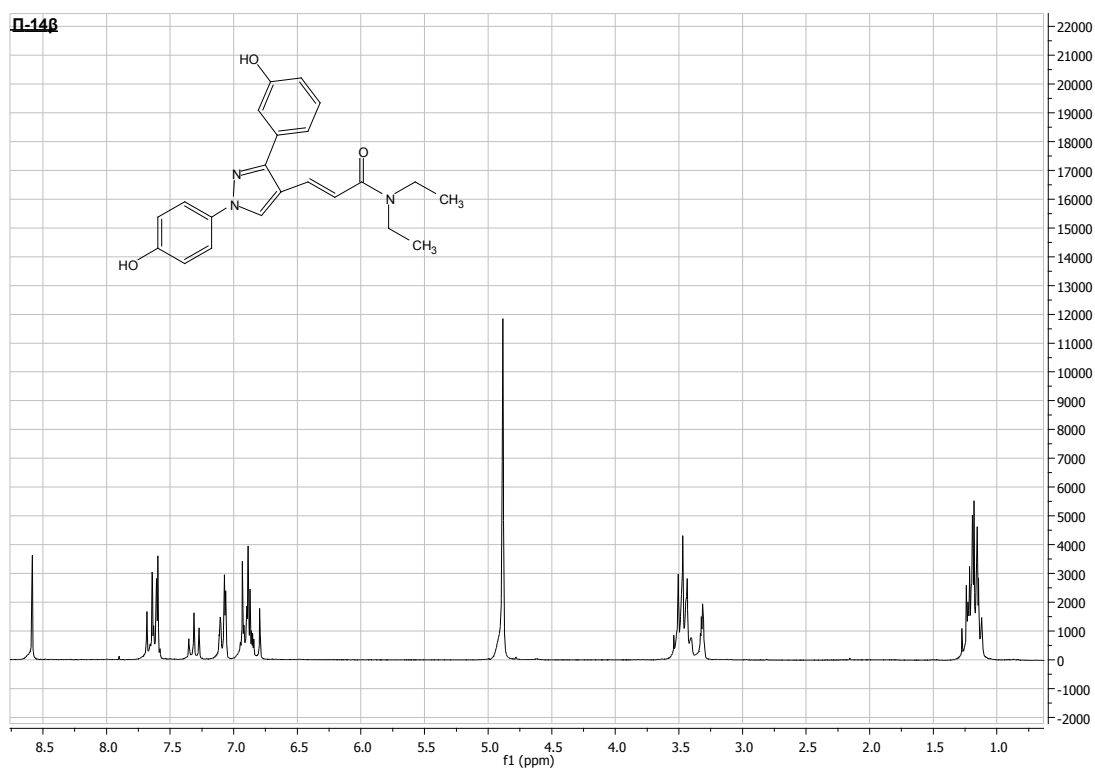
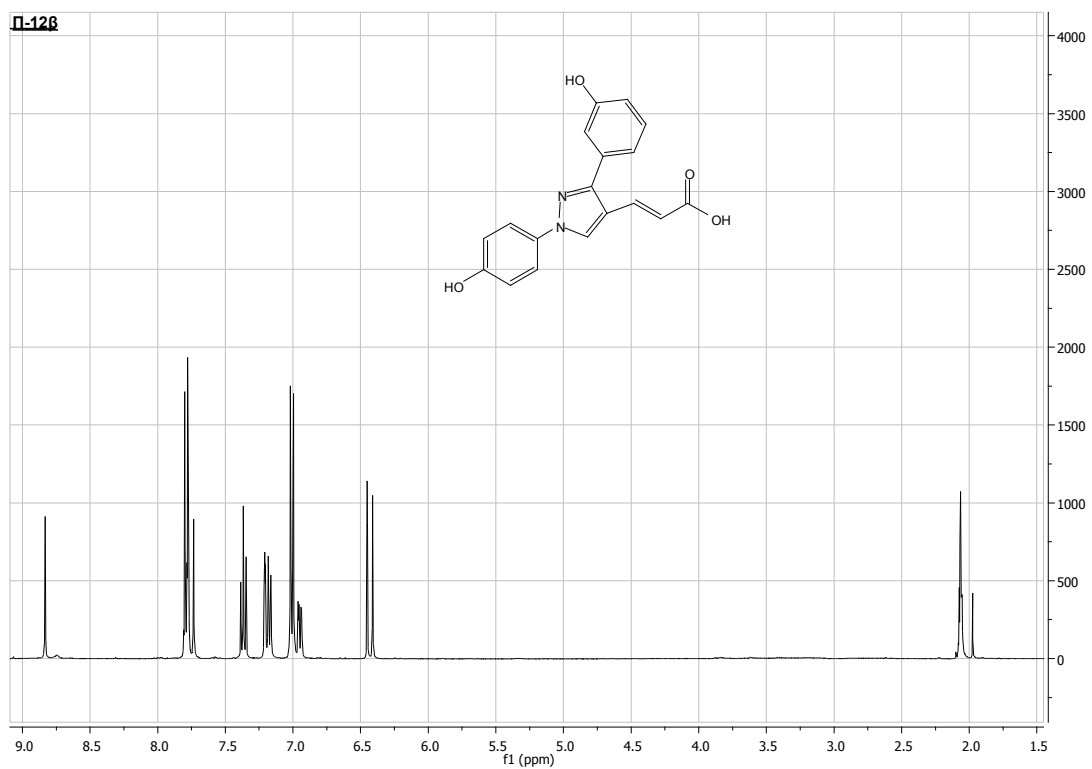
Φάσμα 3.1. ^1H NMR των ενώσεων **Π-9β** (CDCl_3) και **Π-11β** (CDCl_3).

Παράλληλα, μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση των αποπροστατευμένων εστέρων **Π-10**, του προηγούμενου κεφαλαίου. Τα μόρια αυτά δεν διαθέτουν αντιαγγειογενετική δράση, όμως η αντικαρκινική τους μελέτη διενεργήθηκε για να διερευνηθεί η πιθανότητα να δρουν μέσω άλλου μονοπατιού (Σχήμα 3.1). Τέλος, η αντίδραση των οξέων **Π-11** με διαιθυλαμίνη παρουσία του αντιδραστήριου TBTU έδωσε τα **Π-13**, τα οποία αποπροστατεύτηκαν με τη χρήση BBr_3 προς τα φαινολικά παράγωγα **Π-14** (Σχήμα 3.1). Η σύγκριση των φασμάτων των ενώσεων **Π-13β** (Φάσμα 3.2) και **Π-11β** (Φάσμα 3.1) έδειξε την σύνθεση του αμιδίου **Π-13β** με την παρουσία των ομάδων NCH_2CH_3 και NCH_2CH_3 στα 3.46/3.33 και 1.16 ppm αντίστοιχα.



Φάσμα 3.2. 1H NMR της ένωσης **Π-13β** ($CDCl_3$).

Τέλος, η σύνθεση των αποπροστατευμένων αναλόγων **Π-12β** και **Π-14β** (Φάσμα 3.3) πιστοποιήθηκε από το φάσμα 1H NMR, στο οποίο δεν παρατηρείται η ύπαρξη OCH_3 ομάδων στην περιοχή 3.7-4.0 ppm.

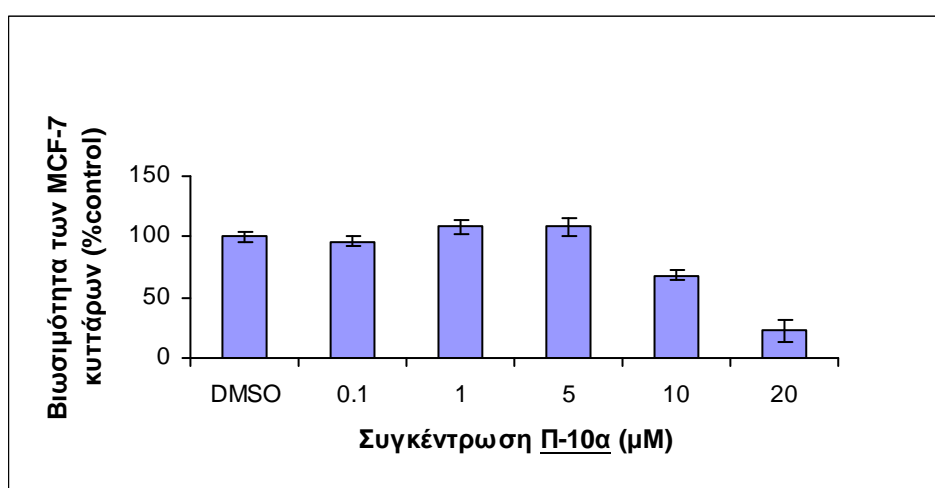


Φάσμα 3.3. ^1H NMR των ενώσεων **Π-12β** ($\text{acetone-}d_6$) και **Π-14β** (CD_3OD).

3.2.2 Βιολογική δράση των ΟΗ-φαινυλο πυράζολο παραγώγων

Για την αποτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των ΟΗ-φαινυλο πυράζολο παραγώγων, τα μόρια **Π-10**, **Π-12**, και **Π-14** προσδιορίστηκε η *in vitro* αποτελεσματικότητά τους -σε συγκέντρωση 20 μM - κατά των καρκινικών κυτταρικών σειρών του μελανώματος A2058, προστάτη DU145 και μαστού MCF-7. Τα αποτελέσματα των παραπάνω προσδιορισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι όλα τα οξέα **Π-12** δεν διαθέτουν δραστηριότητα σε καμία από τις καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν, εκτός των οξέων **Π-12γ** και **Π-12ε**, τα οποία έδειξαν μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων στον προστάτη DU145 κατά 47% και 61% αντίστοιχα. Παρότι σε γενικές γραμμές όλα τα αμίδια **Π-14** ήταν δραστηκότερα των οξέων, μόνο το αμίδιο **Π-14β** (μετα φαινολικό παράγωγο) παρουσίασε μια αξιοσημείωτη μείωση -κατά 50%- της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7.

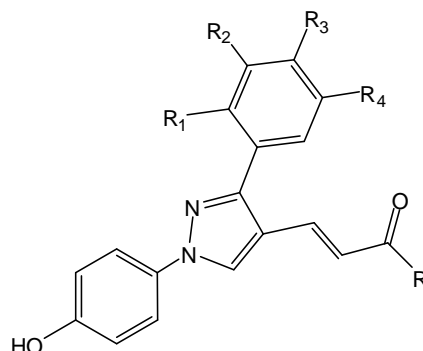
Τη μεγαλύτερη, όμως, δραστηκότητα παρουσίασαν οι εστέρες **Π-10**, οι οποίοι εκτός του εστέρα **Π-10δ** ελάττωσαν τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε όλες τις καρκινικές σειρές. Πιο συγκεκριμένα, ο εστέρας **Π-10α** παρουσίασε αναστολή της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων MCF-7 κατά 79%. Περαιτέρω έρευνα του εστέρα **Π-10α** στην καρκινικά σειρά MCF-7 έδειξε $\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{M}$ (Εικόνα 3.4). Χαρακτηριστικό του μορίου αυτού είναι το γεγονός ότι ο βενζολικός δακτύλιος B δεν είναι υποκατεστημένος.



Εικόνα 3.4. Βιωσιμότητα της καρκινικής σειράς MCF-7 μετά από αγωγή με τον εστέρα **Π-10α** σε συγκεντρώσεις 0.1, 1, 5, 10 και 20 μM . Ο εστέρας **Π-10α** παρουσίασε $\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{M}$.

Πίνακας 3.1

Βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επώαση^α για 48 ώρες στους 37 °C με τις ενώσεις **Π-10α-ε**, **Π-12α-ε** και **Π-14α,β,δ,ε**.



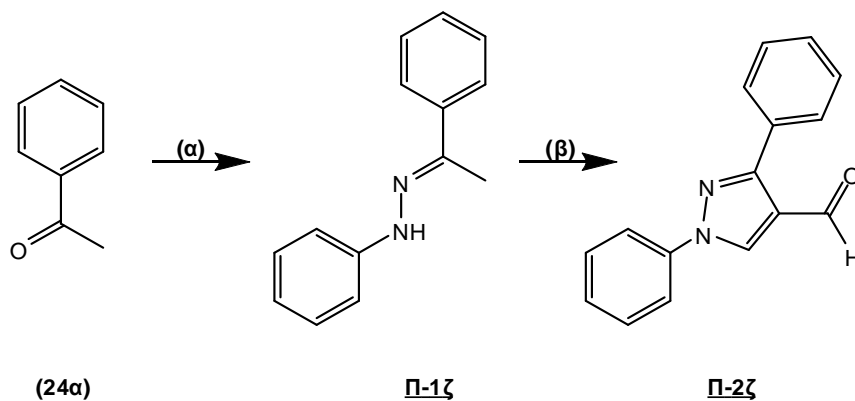
Ενώσεις	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	% Επιβίωση των κυττάρων		
						A2058	DU145	MCF-7
Π-10α	OCH ₂ CH ₃	H	H	H	H	38	32	21
Π-10β	OCH ₂ CH ₃	H	OH	H	H	60	38	50
Π-10γ	OCH ₂ CH ₃	H	H	OH	H	61	39	54
Π-10δ	OCH ₂ CH ₃	H	OH	OH	H	> 100	85	≥ 100
Π-10ε	OCH ₂ CH ₃	OH	H	H	OH	52	50	88
Π-12α	OH	H	H	H	H	95	72	> 100
Π-12β	OH	H	OH	H	H	≥ 100	> 100	> 100
Π-12γ	OH	H	H	OH	H	> 100	53	> 100
Π-12δ	OH	H	OH	OH	H	> 100	94	> 100
Π-12ε	OH	OH	H	H	OH	88	39	77
Π-14α	N(CH ₂ CH ₃) ₂	H	H	H	H	76	67	72
Π-14β	N(CH ₂ CH ₃) ₂	H	OH	H	H	68	79	50
Π-14δ	N(CH ₂ CH ₃) ₂	H	OH	OH	H	> 100	91	92
Π-14ε	N(CH ₂ CH ₃) ₂	OH	H	H	OH	75	62	≥ 100

^α Η αγωγή των κυττάρων έγινε με τις ενώσεις **Π-10α-ε**, **Π-12α-ε** και **Π-14α,β,δ,ε** σε συγκεντρώσεις 20 μM.

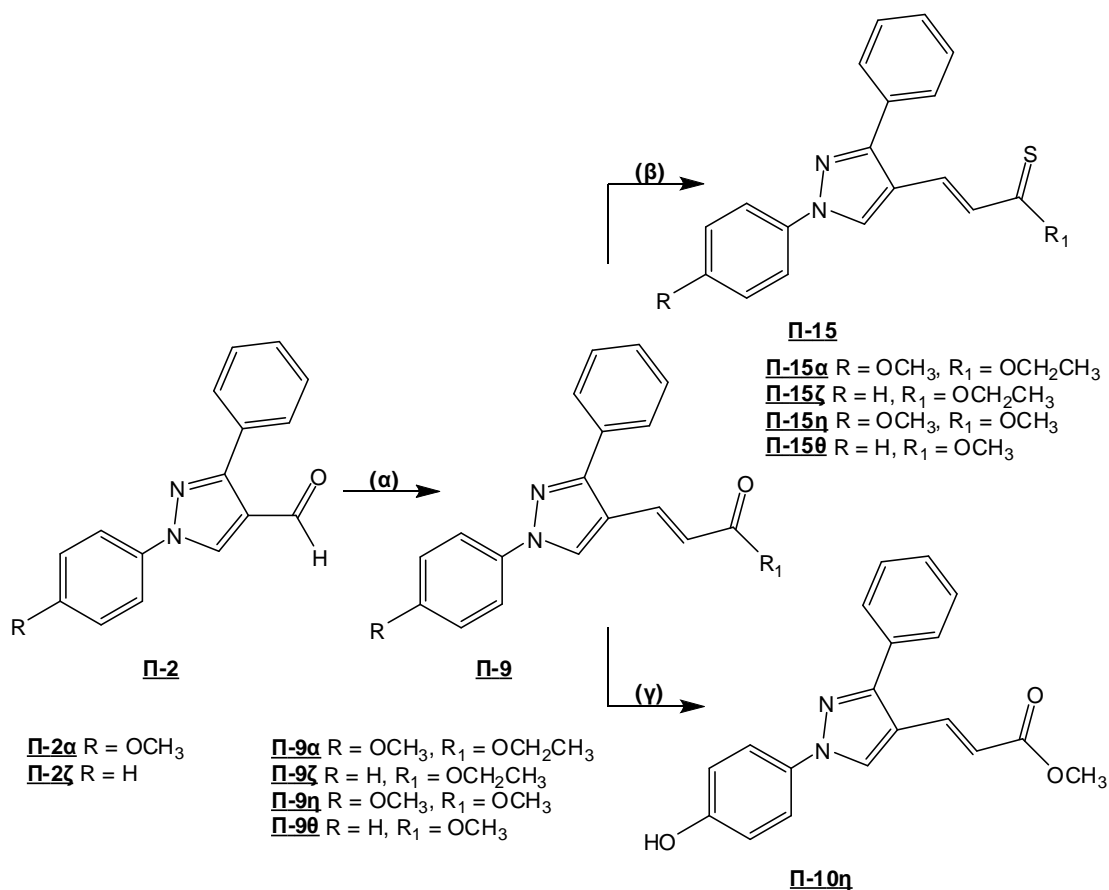
3.2.3 Σύνθεση αναλόγων του εστέρα **Π-10α**

Η δραστηριότητα που παρουσίασε ο εστέρας **Π-10α** κατά της καρκινικής σειράς MCF-7 υπαγόρευσε τη διεξοδικότερη μελέτη του. Έτσι, συντέθηκαν νέα μόρια βασισμένα στη δομή του. Ως πρώτες ύλες για την πορεία σύνθεσης των μορίων αυτών χρησιμοποιήθηκαν οι αλδεΐδες **Π-2α** (η παρασκευή της παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο) και **Π-2ζ**. Η σύνθεση της τελευταίας ξεκίνησε με τη σύζευξη

της ακετοφαινόνης **24α** με την υδροχλωρική φαινυλδραζίνη δίνοντας ως προϊόν την ενδιάμεση υδραζίνη **Π-1ζ**, η οποία χωρίς να απομονωθεί αντέδρασε με TCT/DMF δίνοντας την πυραζολοκαρβοξαλδεύδη **Π-2ζ** (Σχήμα 3.2).

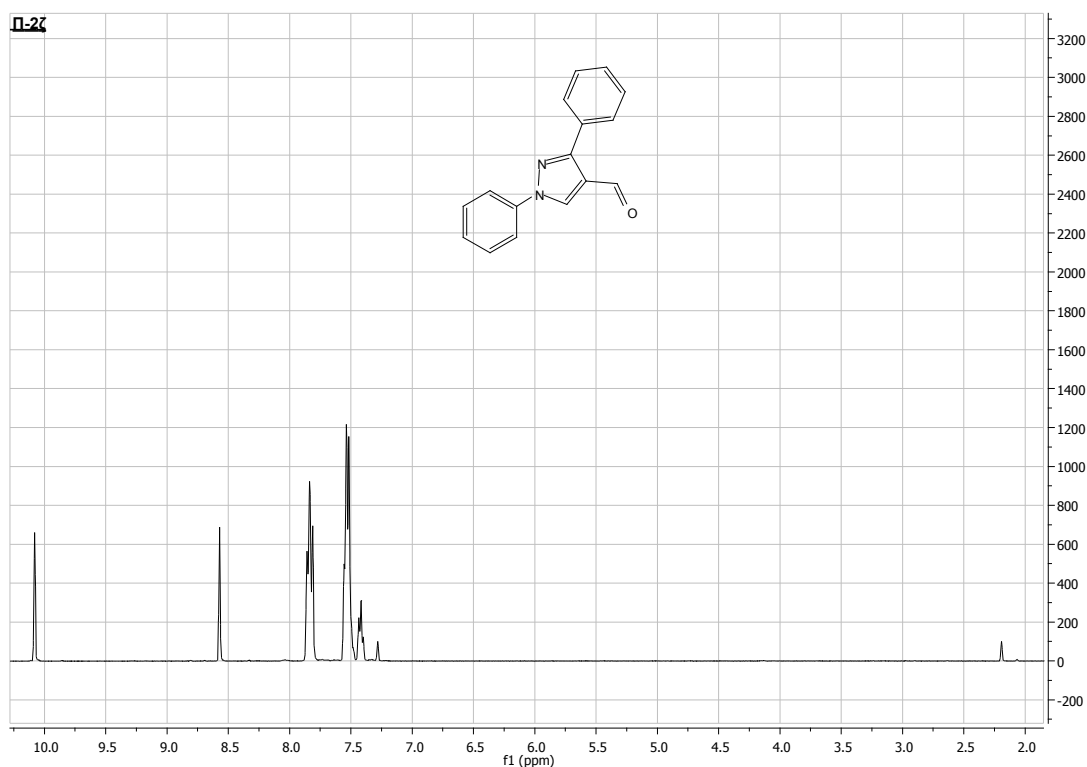


Σχήμα 3.2. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) υδροχλωρική φαινυλδραζίνη, οξικό οξύ, Et₃N, EtOH; (β) TCT, DMF.

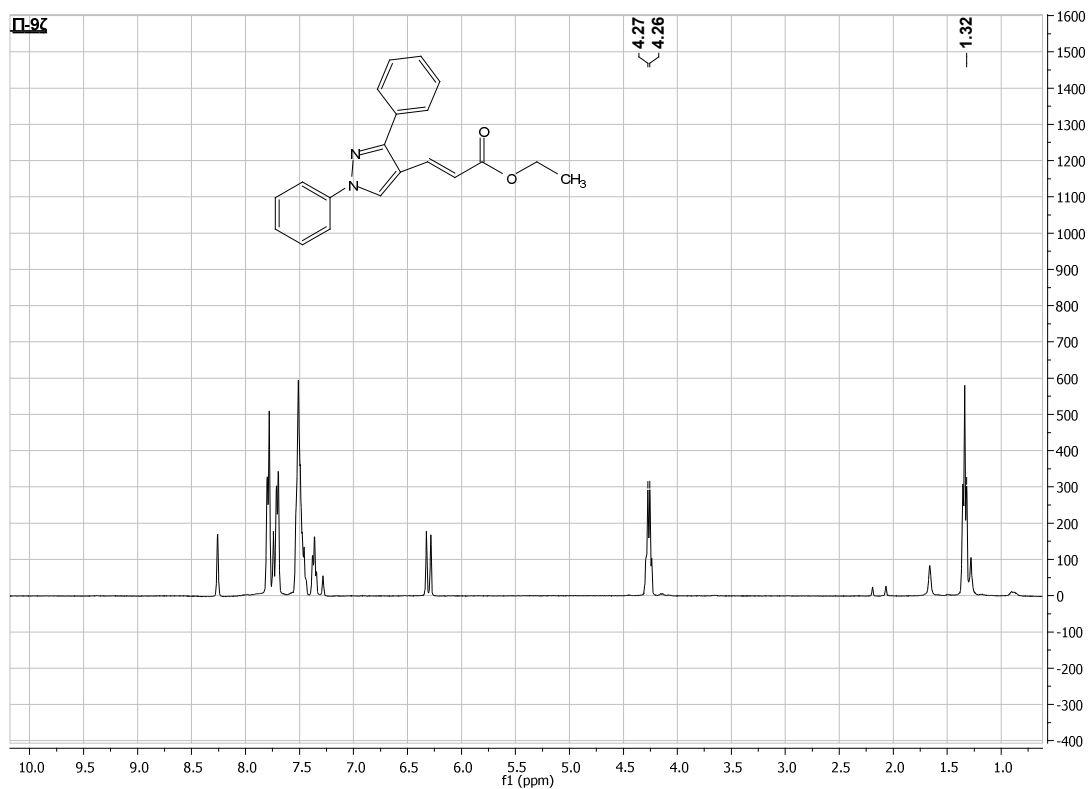


Σχήμα 3.3. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) Ph₃PCHCO₂CH₂CH₃ ή Ph₃PCHCO₂CH₃, MeCN, reflux; (β) Αντιδραστήριο Lawesson's, τολουόλιο, reflux; (γ) BBr₃, CH₂Cl₂, -78 °C.

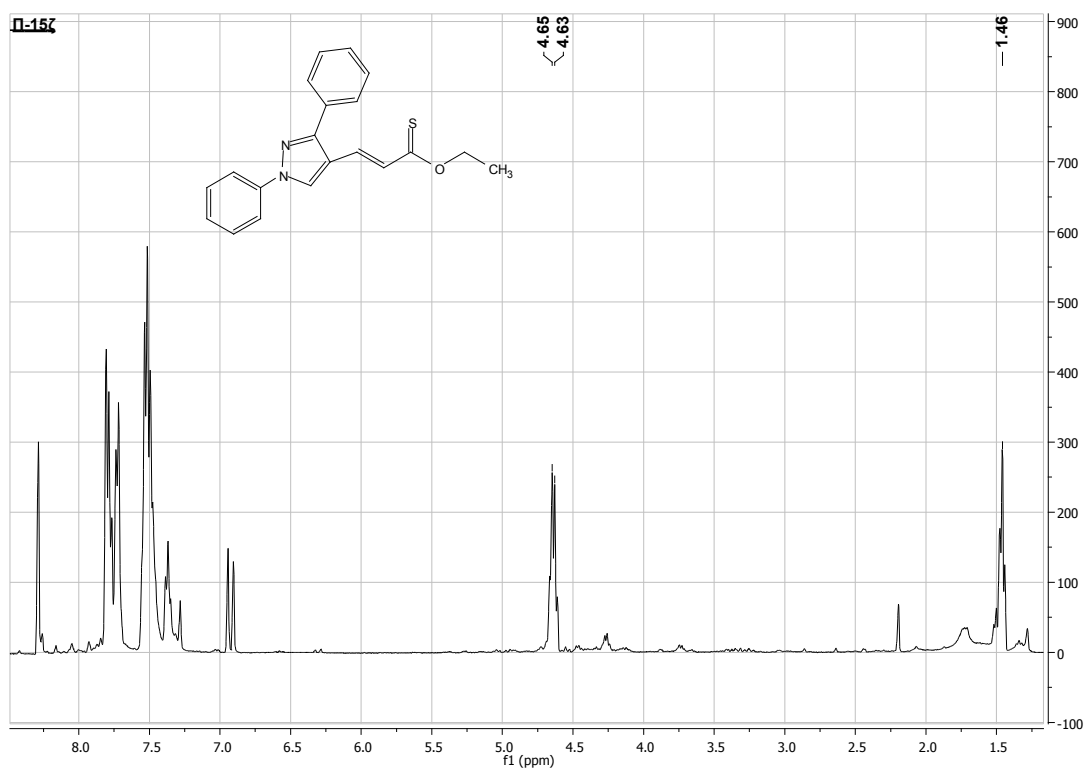
Στη συνέχεια, οι πυραζολοκαρβοξαλδεΐδες **Π-2α** και **Π-2ζ** με αντίδραση Wittig χρησιμοποιώντας τα υλίδια του φωσφόρου $\text{Ph}_3\text{PCHCO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ και $\text{Ph}_3\text{PCHCO}_2\text{CH}_3$ μετατράπηκαν στους αντίστοιχους α,β-ακόρεστους εστέρες **Π-9**, οι οποίοι, παρουσία του αντιδραστηρίου Lawesson's οδήγησαν στο σχηματισμό των θειοεστέρων **Π-15** (Σχήμα 3.3). Τέλος, ο αποπροστατευμένος εστέρας **Π-10η** προήλθε από τον εστέρα **Π-9η** με BBr_3 στους $-78\text{ }^\circ\text{C}$ σε διαλύτη DCM. Η σύνθεση του εστέρα **Π-9ζ** είναι δυνατόν να πιστοποιηθεί συγκρίνοντας το φάσμα του ^1H NMR (Φάσμα 3.5) με αυτό της πρόδρομης ένωσης **Π-2ζ** (Φάσμα 3.4). Συγκεκριμένα, παρατηρείται εξαφάνιση του αλδεϋδικού πρωτονίου της ένωσης **Π-2ζ** στα 10.1 ppm και εμφάνιση των κορυφών OCH_2CH_3 και OCH_2CH_3 στα 4.26 και 1.32 ppm αντίστοιχα. Τέλος, η μελέτη του φάσματος του θειοεστέρα **Π-15ζ** (Φάσμα 3.6) έδειξε την μετατόπιση των κορυφών των OCH_2CH_3 και OCH_2CH_3 πρωτονίων στα 4.64 και 1.46 ppm αντίστοιχα σε σύγκριση με την πρόδρομη ένωση **Π-9ζ**.



Φάσμα 3.4. ^1H NMR της ένωσης **Π-2ζ** (acetone- d_6).



Φάσμα 3.5. ^1H NMR της ένωσης **II-9z** (CDCl_3).



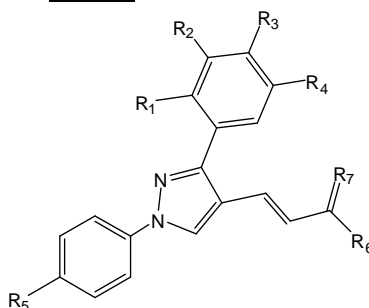
Φάσμα 3.6. ^1H NMR της ένωσης **II-15z** (CDCl_3).

3.2.4 Αποτίμηση της βιολογικής δράσης των αναλόγων του εστέρα **Π-10α**

Για την αποτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων του εστέρα **Π-10α** μελετήθηκε η *in vitro* αποτελεσματικότητά τους σε καρκινικές σειρές του μελανώματος A2058, προστάτη DU145 και μαστού MCF-7. Στην περίπτωση αυτή οι μελέτες έγιναν χρησιμοποιώντας διαλύματα των μορίων σε συγκεντρώσεις των 10 μM (Πίνακας 3.2). Παράλληλα με τα νέα ανάλογα μελετήθηκε και η δραστηριότητα των μεθοξυ προστατευμένων α,β -ακόρεστων εστέρων **Π-9β-ε** (συντέθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο), αφού και αυτοί αποτελούν ανάλογα του εστέρα **Π-10α** (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2

Βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από επώαση^a για 48 ώρες στους 37 °C με τις ενώσεις **Π-9α-θ**, **Π-15α,ζ-θ** και **Π-10η**.



Ενώσεις	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	% Επιβίωση των κυττάρων		
								A2058	DU145	MCF-7
Π-9α	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₂ CH ₃	O	95	82	> 100
Π-9β	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₂ CH ₃	O	85	64	81
Π-9γ	H	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₂ CH ₃	O	76	81	93
Π-9δ	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₂ CH ₃	O	69	62	50
Π-9ε	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₂ CH ₃	O	90	77	59
Π-9ζ	H	H	H	H	H	OCH ₂ CH ₃	O	91	80	79
Π-9η	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	O	81	75	83
Π-9θ	H	H	H	H	H	OCH ₃	O	88	78	68
Π-15α	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₂ CH ₃	S	99	94	> 100
Π-15ζ	H	H	H	H	H	OCH ₂ CH ₃	S	> 100	88	93
Π-15η	H	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	S	88	83	> 100
Π-15θ	H	H	H	H	H	OCH ₃	S	98	87	92
Π-10η	H	H	H	H	OH	OCH ₃	O	74	62	≥ 100

^a Η αγωγή των κυττάρων έγινε με τις ενώσεις **Π-9α-θ**, **Π-15α,ζ-θ** και **Π-10η** σε συγκεντρώσεις 10 μM .

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 παρατηρήθηκε ότι η μετατροπή του αιθυλεστέρα **Π-10α** σε μεθυλεστέρα (**Π-10η**) είχε ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της δραστηριότητας του μορίου στα καρκινικά κύτταρα MCF-7. Αντίστοιχα, ως τελείως αδρανής προσδιορίστηκε ο εστέρας **Π-9α**. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά θα ήταν αναμενόμενο ο εστέρας **Π-9η** να είναι αδρανής στην ίδια σειρά, ωστόσο έδειξε μία μικρή αναστολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά 17%. Μέτρια αναστολή στη σειρά MCF-7 έδειξαν οι εστέρες **Π-9ζ** και **Π-9θ** κατά 21 και 32% αντίστοιχα, οι οποίοι φέρουν άτομο H στη θέση του OH του εστέρα **Π-10α**. Από τους μεθοξυ προστατευμένους εστέρες οι **Π-9β** και **Π-9γ** δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη αναστολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων MCF-7, ωστόσο οι **Π-9δ** και **Π-9ε** έδειξαν πολύ καλή αναστολή των καρκινικών κυττάρων με τον εστέρα **Π-9δ** να παρουσιάζει $IC_{50} = 10 \mu M$. Τέλος η μετατροπή των εστέρων **Π-9α,ζ-θ** στους θειοεστέρες **Π-15α,ζ-θ** δεν οδήγησε στην αναστολή των κυττάρων MCF-7.

Στις άλλες δύο καρκινικές σειρές, A2058 και DU145, τα μόρια **Π-9α-θ**, **Π-15α,ζ-θ** και **Π-10η** δεν εμφάνισαν κάποια αξιοπρόσεχτη αναστολή στη βιωσιμότητα των κυττάρων εκτός από τα **Π-9δ** και **Π-10η**, τα οποία έδειξαν αναστολή κατά 38% στην καρκινική σειρά του προστάτη DU145.

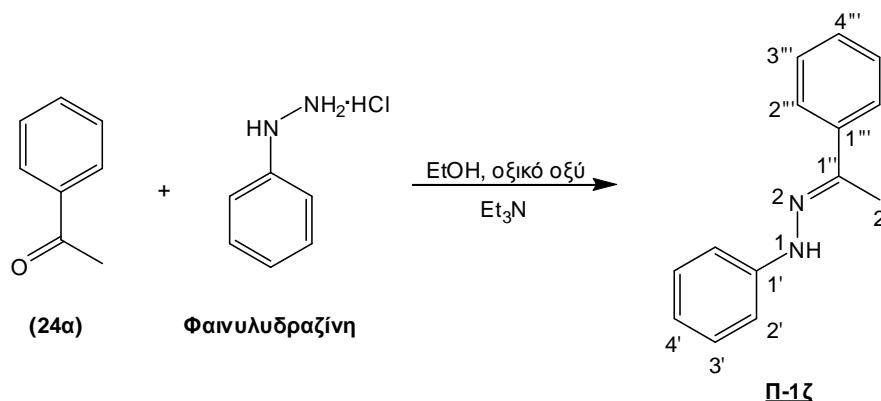
3.2.5 Προοπτική

Την καλύτερη αντικαρκινική δράση από τα μόρια της σειράς αυτής έδειξε ότι διαθέτει το μόριο **Π-9δ** στην καρκινική σειρά του μαστού MCF-7. Όμως η παρουσία της εστερικής ομάδας είναι ανασταλτικός παράγοντας για την περαιτέρω ανάπτυξη του μορίου αυτού και τη διενέργεια *in vivo* δοκιμών. Πλέον θα πρέπει να σχεδιαστούν-συντεθούν “ισοστερή” του εστέρα αυτού τα οποία θα έχουν τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά αλλά δεν θα υπόκεινται σε υδρόλυση *in vivo*.

Βιβλιογραφία

1. Eckhardt, S. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *2*, 419-439.
2. Lee, C. W.; Hong, D. H.; Han, S. B.; Jong, S.-H.; Kim, H. C.; Fine, R. L.; Lee, S.-H.; Kim, H. M. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 473-480.
3. Hu, W.-P.; Yu, H.-S.; Chen, Y.-R.; Tsai, Y.-M.; Chen, Y.-K.; Liao, C.-C.; Chang, L.-S.; Wang, J.-J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5295-5302.
4. Kemnitzer, W.; Jiang, S.; Wang, Y.; Kasibhatla, S.; Crogan-Grundy, C.; Bubenik, M.; Labrecque, D.; Denis, R.; Lamothe, S.; Attardo, G.; Gourdeau, H.; Tseng, B.; Drewe, J.; Cai, S. X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 603-607.
5. Elguero, J.; Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V.; Elsevier Science Ltd. : Oxford, 1996; pp. 1-75.
6. Varvounis, G.; Fiamegos, Y.; Pilidis, G. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2001**, *80*, 75-165.
7. Ahmeda, O. M.; Mohamed, M. A.; Ahmed, R. R.; Ahmed, S. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3519-3523.
8. Angelucci, A.; Schenone, S.; Gravina, G. L.; Muzi, P.; Festuccia, C.; Vicentini, C.; Botta, M.; Bologna, M. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 2838-2845.
9. Kim, D. C.; Lee, Y. R.; Yang, B.; Shin, K. J.; Kim, D. J.; Chung, B. Y.; Yoo, K. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *39*, 525-532.
10. Zhu, G.-D.; Gong, J.; Gandhi, V. B.; Woods, K.; Luo, Y.; Liu, X.; Guan, R.; Klinghofer, V.; Johnson, E. F.; Stoll, V. S.; Mamo, M.; Li, Q.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2441-2452.
11. Vivanco, I.; Sawyers, C. *Nat. Rev.* **2002**, *2*, 489.
12. Park, H.-J.; Lee, K.; Park, S.-J.; Ahn, B.; Lee, J.-C.; Cho, H. Y.; Lee, K.-I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3307-3312.
13. Zhang, J.-H.; Fan, C.-D.; Zhao, B.-X.; Shin, D.-S.; Dong, W.-L.; Xie, Y.-S.; Miao, J.-Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10165-10171.
14. Congiu, C.; Onnis, V.; Vesci, L.; Castorina, M.; Pisano, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6238-6248.
15. Penning, T. D.; Tally, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Carter, J. S.; Collins, P. W.; Doctor, S.; Graneto, M. J.; Lee, L. F.; Malecha, J. W.; Miyashiro, J. M.; Rogers, R. S.; Rogier, D. J.; Yu, S. S.; Anderson, G. D.; 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. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1347.
16. Blumenthal, R. D.; Waskewich, C.; Goldenberg, D. M.; Lew, W.; Flefle, C.; Burton, J. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3178-3185.
17. Liu, X.; Yue, P.; Schonthal, A. H.; Khuri, F. R.; Sun, S.-Y. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11115-11119.
18. Pruthi, R. S.; Derksen, J. E.; Moore, D.; Carson, C. C.; Grigson, G.; Watkins, C.; Wallen, E. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2172-2177.

3.3 Πειραματικό Μέρος

3.3.1 Μέθοδος παρασκευής της 1-φαινυλ-2-(1''-φαινυλαιθυλιδεν) υδραζίνης **Π-1ζ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
95%	C ₁₄ H ₁₄ N ₂	210.27	-	R _f = 0.22 Hex/EtOAc 9:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευομένο διάλυμα της ακετοφαινόνης **24a** (2.4 mL, 20 mmol) σε 35 mL EtOH και 1.5 mL οξικού οξέος, προστέθηκε ένα διάλυμα υδροχλωρικής φαινυλδραζίνης (3.5 g, 24 mmol) και Et₃N (4.2 mL, 30 mmol) σε 40 mL EtOH. Το διάλυμα της αντίδρασης αναδεύτηκε ολονύχτια σε r.t. και το σχηματιζόμενο στερεό διηθήθηκε υπό κενό, πλύθηκε με EtOH και DEE και έδωσε την υδραζίνη **Π-1ζ** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.30 (1H, s, NH), 7.81 (2H, d, *J* 5.6 Hz, H-2''), 7.40-4.26 (7H, m, H-2', H-3', H-3''' και H-4'''), 6.78 (1H, m, H-4'), 2.28 (3H, s, H-2').

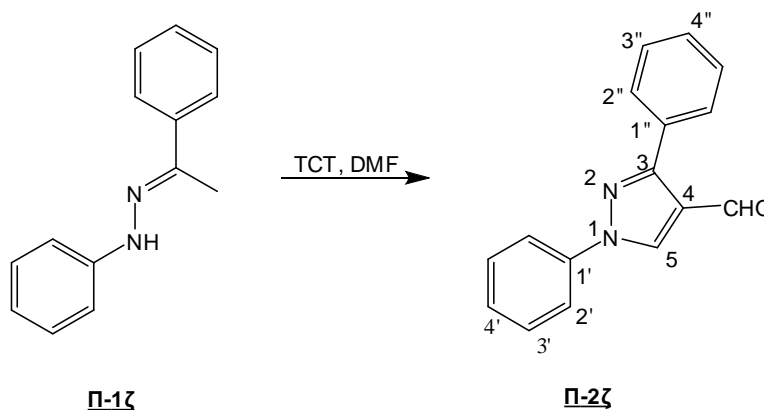
¹³C NMR (DMSO): δ = 146.5 (C-1'), 141.0 (C-1''), 139.9 (C-1'''), 129.3 (C-3'''), 128.7 (C-3'), 127.9 (C-4'''), 125.6 (C-2'''), 119.3 (C-4'), 113.3 (C-2'), 13.26 (C-2').

MS: 211.20 (M+H⁺).

IR (film) ν: 3349 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₄H₁₄N₂: Θεωρητικά: C, 79.97; H, 6.71; N, 13.32; Πειραματικά: C, 79.84; H, 6.57; N 13.47.

3.3.2 Μέθοδος παρασκευής της 1,3-διφαινυλ-1*H*-πυραζολο-4-καρβοξaldeυδης **Π-2ζ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O	248.28	146 – 147	R _f = 0.26 Hex/EtOAc 7:3

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε 6.3 mL DMF προστέθηκε 2,4,6-τριχλωρο-[1,3,5]-τριαζίνη (TCT) (5.3 g, 28 mmol) και το μείγμα αναδεύτηκε έως την εξαφάνιση της TCT (20 λεπτά) στους 25 °C. Στη συνέχεια, προστέθηκε ένα διάλυμα της υδραζίνης **Π-1ζ** (2.0 g, 9.5 mmol) σε DMF (24 mL) και το νέο μείγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες μέχρι ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Κατόπιν, το μείγμα ψύχθηκε στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην νερό και η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με κορεσμένο διάλυμα Na₂CO₃ και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-2ζ** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 10.1 (1H, s, CHO), 8.57 (1H, s, H-5), 7.85 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H-2'), 7.82 (2H, d, *J* 10.4 Hz, H-2''), 7.56-7.52 (5H, m, H-3', H-4' και H-3''), 7.42 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-4'').

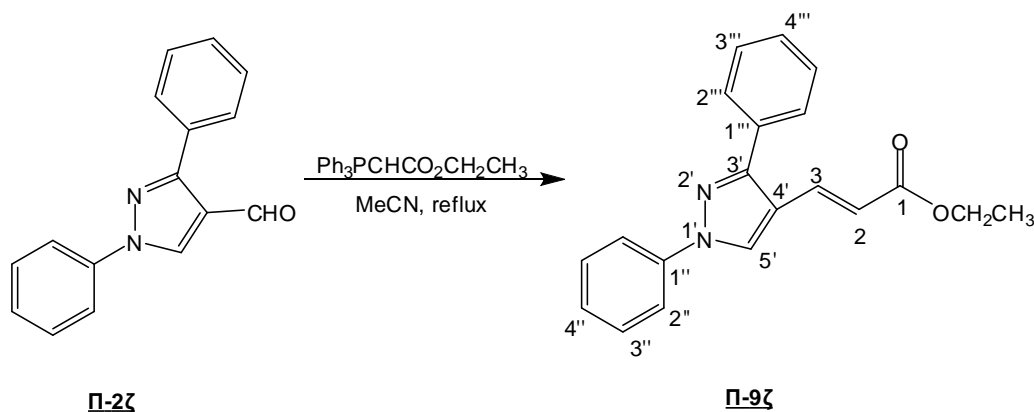
^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 185.2$ (CHO), 154.8 (C-3), 139.0 (C-1'), 131.3 (C-1''), 131.0 (C-5), 129.7 (C-3'), 129.3 (C-4''), 129.0 (C-3''), 128.8 (C-2''), 128.0 (C-4'), 122.5 (C-4), 120.0 (C-2').

MS: 249.18 ($\text{M}+\text{H}^+$).

IR (film) ν : 1672 cm^{-1} .

Στοιχειακή Ανάλυση για $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$: Θεωρητικά: C, 77.40; H, 4.87; N, 11.28;

Πειραματικά: C, 77.29; H, 4.68; N 11.42.

3.3.3 Γενική μέθοδος παρασκευής εστέρων **Π-9****(E)-3-((1',3'-διφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός αιθυλεστέρας **Π-9ζ****

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
80%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂	318.37	133 – 134	R _f = 0.36 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα της πυραζολοκαρβοξυαλδεΐδης **Π-2ζ** (0.20 g, 0.80 mmol) σε MeCN (2.5 mL), προστέθηκε Ph₃PCHCO₂CH₂CH₃ (0.31 g, 0.88 mmol) και το μείγμα της αντίδρασης τέθηκε σε reflux ολονύχτια. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε EtOAc και η οργανική φάση πλύθηκε 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-9ζ** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.26 (1H, s, H-5'), 7.79 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'''), 7.76 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.70 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2''), 7.53-7.44 (5H, m, H-3'', H-4'' και H-3'''), 7.36 (1H, t, *J* 6.8 Hz, H-4'''), 6.30 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 4.26 (2H, q, *J* 6.8 Hz, OCH₂CH₃), 1.32 (3H, t, *J* 6.8 Hz, OCH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 167.0 (C-1), 153.3 (C-3'), 139.5 (C-1''), 135.1 (C-3), 132.6 (C-4'), 129.5 (C-3'' και C-1'''), 128.8 (C-3'''), 128.7 (C-2'''), 128.6 (C-4'''), 127.2 (C-

4''), 126.4 (C-5'), 119.3 (C-2''), 117.6 (C-2), 60.38 (OCH₂CH₃), 14.36 (OCH₂CH₃);

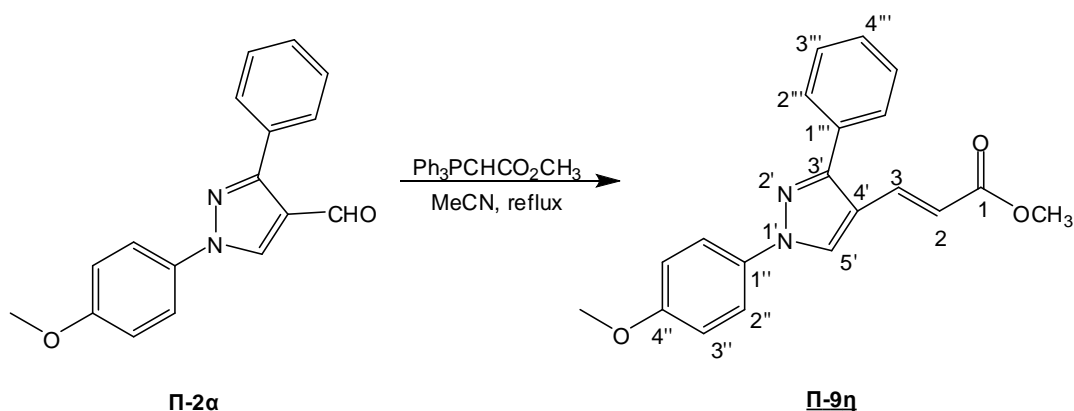
MS: 319.33 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1696 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₂: Θεωρητικά: C, 75.45; H, 5.70; N, 8.80;

Πειραματικά: C, 75.63; H, 5.59; N 8.97.

**(E)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός
μεθυλεστέρας Π-9η**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
80%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₃	334.37	149 – 150	R _f = 0.27 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο εστέρας Π-9η παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξυαλδεύδη Π-2α και το υλίδιο του φωσφόρου Ph₃CHCO₂CH₃ ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

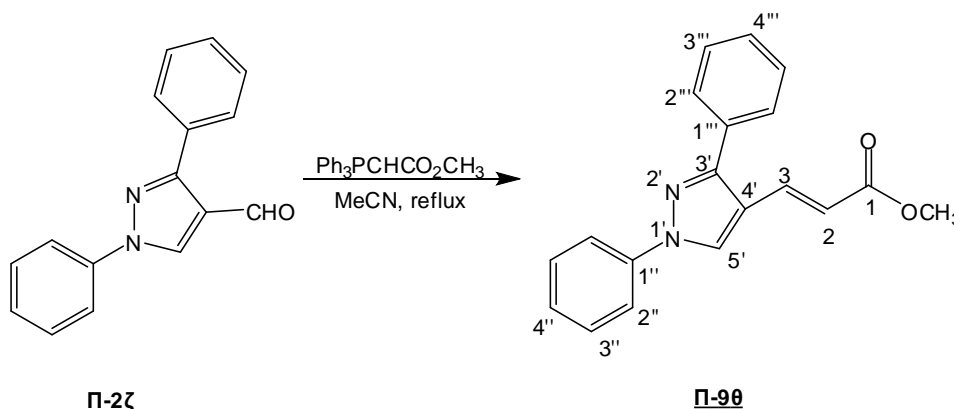
¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.16 (1H, s, H-5'), 7.75 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.68 (4H, d, J 8.8 Hz, H-2'' και H-2'''), 7.51 (2H, t, J 7.2 Hz, H-3'''), 7.45 (1H, t, J 7.2 Hz, H-4'''), 7.01 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3''), 6.28 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 3.88 (3H, s, C4''-OCH₃), 3.80 (3H, s, OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 167.5 (C-1), 158.8 (C-4''), 153.0 (C-3'), 135.5 (C-3), 133.2 (C-1''), 132.3 (C-4'), 128.8 (C-3'''), 128.7 (C-2'''), 128.5 (C-1'''), 126.4 (C-4'''), 121.0 (C-2''), 117.2 (C-5'), 116.8 (C-2), 114.6 (C-3''), 55.61 (C4''-OCH₃), 51.57 (OCH₃).

MS: 335.33 (M+H⁺).

IR (film): 1703 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₃: Θεωρητικά: C, 71.84; H, 5.43; N, 8.38; Πειραματικά: C, 71.63; H, 5.61; N 8.52.

(E)-3-((1',3'-διφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικός μεθυλεστέρας Π-90

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₂	304.34	109 – 110	R _f = 0.34 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο εστέρας Π-90 παρασκευάστηκε από την πυραζολοκαρβοξαλδεύδη Π-2ζ και το υλίδιο του φωσφόρου Ph₃CHCO₂CH₃ ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.26 (1H, s, H-5'), 7.79 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-2'''), 7.76 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.70 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2''), 7.53-7.44 (5H, m, H-3'', H-4'' και H-3'''), 7.36 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-4'''), 6.30 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.80 (3H, s, OCH₃).

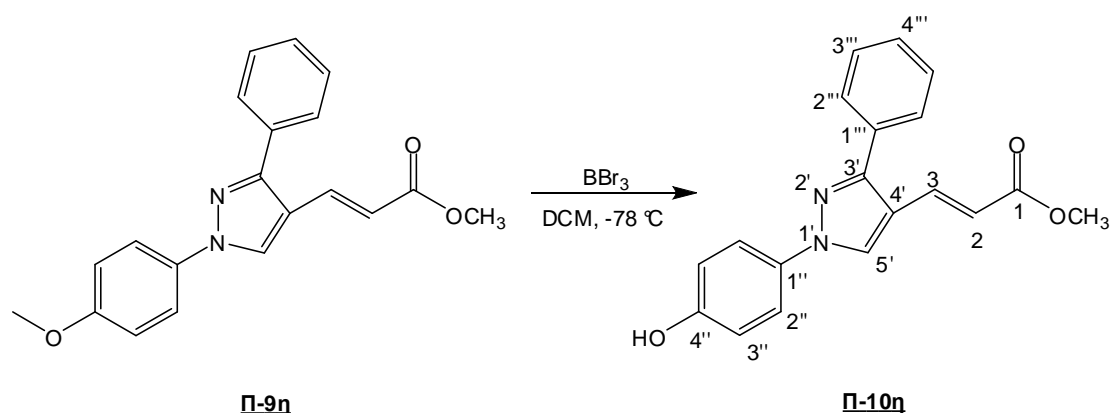
¹³C NMR (CDCl₃): 167.5 (C-1), 153.3 (C-3'), 139.5 (C-1'''), 135.4 (C-3), 132.2 (C-4'), 129.6 (C-3''), 128.8 (C-3'''), 128.7 (C-2'''), 128.6 (C-1'''), 127.2 (C-4'''), 126.4 (C-5'), 119.3 (C-2''), 117.6 (C-4''), 117.1 (C-2), 51.61 (OCH₃).

MS: 305.29 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1712 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₆N₂O₂: Θεωρητικά: C, 74.98; H, 5.30; N, 9.20; Πειραματικά: C, 74.73; H, 5.51; N 9.38.

3.3.4 Μέθοδος παρασκευής του (*E*)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικού μεθυλεστέρα **Π-10η**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₃	320.34	209 – 210	R _f = 0.23 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του εστέρα **Π-9η** (0.060 g, 0.18 mmol) σε CH₂Cl₂ (5.5 mL) στους -78 °C, προστέθηκε στάγδην BBr₃ (0.9 mmol, 1.0 M in CH₂Cl₂, 0.9 mL). Η αντίδραση αφέθηκε για 1 ώρα στους -78 °C και μετά για 16 ώρες σε r.t.. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C, εξουδετερώθηκε με MeOH και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα HCl 1N. Κατόπιν, η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-10η** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 8.85 (1H, s, H-5''), 7.79 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.71 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.70 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-2'''), 7.56 (2H, t, *J* 7.6 Hz, H-3'''), 7.50 (1H, t, *J* 7.6 Hz, H-4'''), 7.01 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.44 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.73 (3H, s, OCH₃).

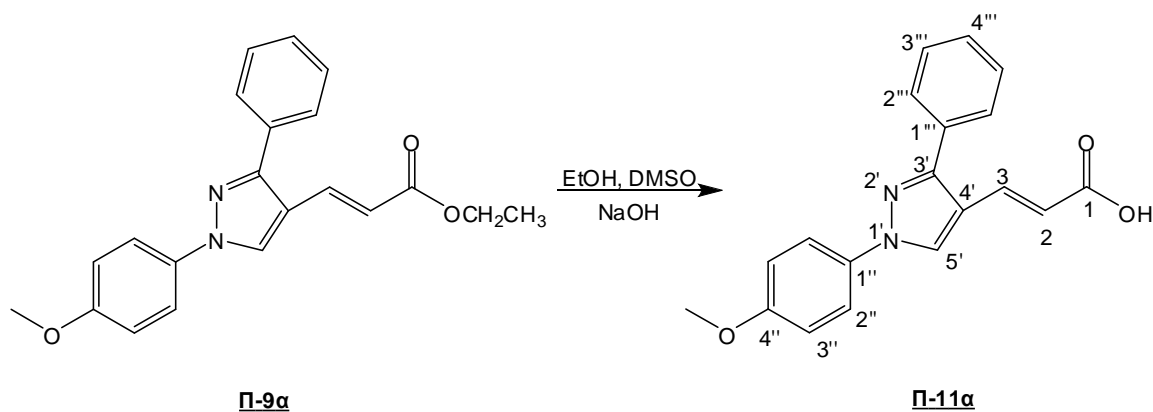
¹³C NMR (acetone-d₆): 166.8 (C-1), 156.6 (C-3' και C-4''), 135.0 (C-3), 132.8 (C-4'), 132.4 (C-1''), 128.6 (C-3'''), 128.5 (C-2'''), 128.4 (C-4'''), 128.0 (C-1'''), 127.3 (C-5'), 120.6 (C-2''), 116.6 (C-2), 115.8 (C-3''), 50.69 (OCH₃).

MS: 321.28 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1670 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₆N₂O₃: Θεωρητικά: C, 71.24; H, 5.03; N, 8.74;

Πειραματικά: C, 71.41; H, 5.18; N 8.97.

3.3.5 Γενική μέθοδος παρασκευής καρβοξυλικών οξέων **Π-11****(E)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'H-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλικό οξύ Π-11α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₃	320.34	205 – 206	R _f = 0.40 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του εστέρα **Π-9α** (0.90 g, 2.6 mmol) σε EtOH/DMSO (26/20 mL), προστέθηκε NaOH (1.8 mL, 5N) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε ολονύχτια σε r.t.. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε DEE και η οργανική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με H₂O. Οι ενωμένες υδατικές φάσεις οξινίστηκαν με HCl (1N) έως pH = 2 και το σχηματιζόμενο στερεό διηθήθηκε υπό κενό, πλύθηκε με H₂O και ξηράνθηκε πάνω από ατμόσφαιρα P₂O₅ για να δώσει το προϊόν **Π-11α** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.11 (1H, s, H-5'), 7.84 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'''), 7.62–7.51 (6H, m, H-3, H-2'', H-3''' και H-4'''), 7.12 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-3''), 6.44 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.82 (3H, s, OCH₃).

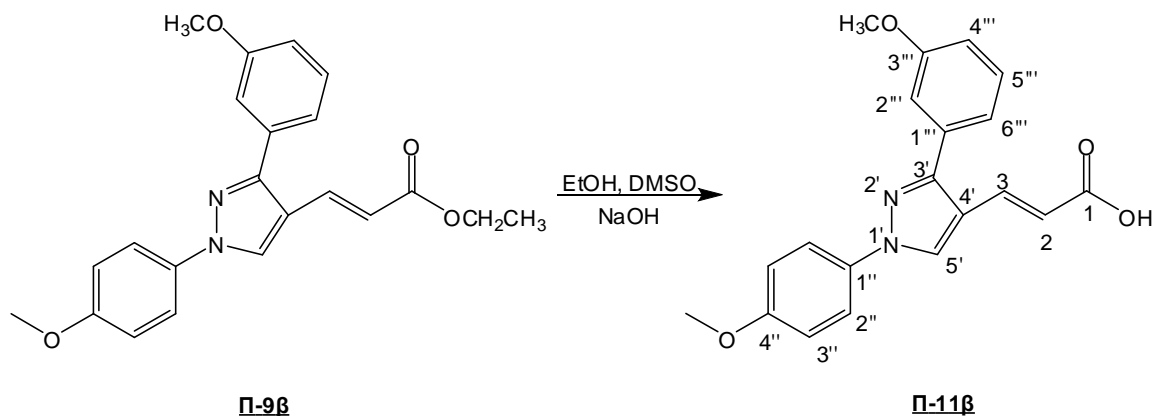
¹³C NMR (DMSO): 168.2 (C-1), 158.7 (C-4''), 152.2 (C-3'), 134.7 (C-3), 133.1 (C-4'), 132.6 (C-1''), 129.3 (C-2'''), 129.0 (C-1'''), 128.8 (C-3'''), 128.6 (C-4'''), 120.7 (C-2''), 118.6 (C-5'), 117.1 (C-2), 115.2 (C-3''), 55.95 (OCH₃).

MS: 321.23 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1693 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₆N₂O₃: Θεωρητικά: C, 71.24; H, 5.03; N, 8.74;
Πειραματικά: C, 71.07; H, 5.12; N 8.88.

**(E)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(3''''-μεθοξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικό οξύ Π-11β**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	350.37	168 – 169	R _f = 0.48 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το οξύ Π-11β παρασκευάστηκε από τον εστέρα Π-9β και λήφθηκε ύστερα από ξήρανση πάνω από ατμόσφαιρα P₂O₅ ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.20 (1H, s, H-5'), 7.87 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.70 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.43 (1H, t, J 8.0 Hz, H-5'''), 7.29 (2H, m, H-2''' and H-6'''), 7.02 (3H, m, H-3'' και H-4'''), 6.28 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 3.90 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.88 (3H, s, C4''-OCH₃).

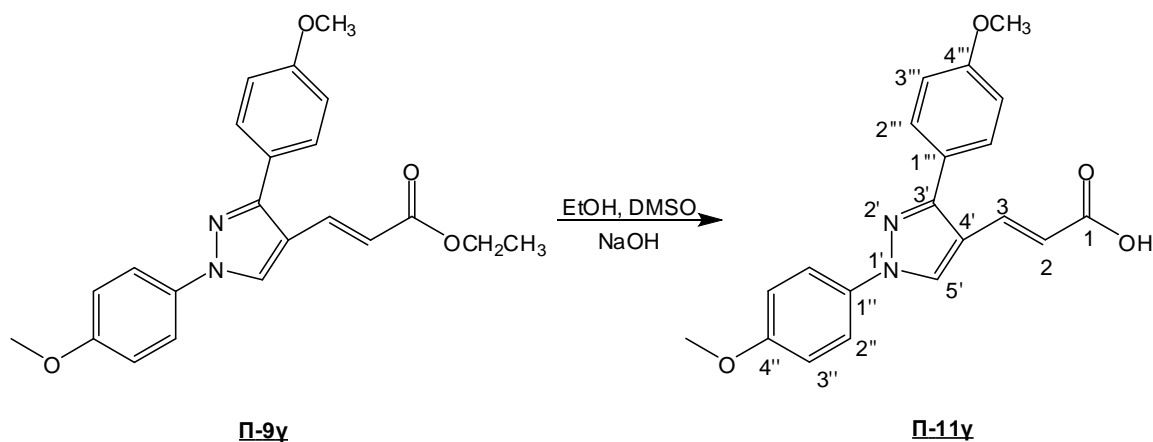
¹³C NMR (CDCl₃): 168.1 (C-1), 159.9 (C-3'''), 158.6 (C-4''), 152.2 (C-3'), 134.8 (C-4'), 133.5 (C-1''), 133.1 (C-1'''), 131.7 (C-3), 127.1 (C-5'''), 122.3 (C-5'), 120.5 (C-2''), 117.8 (C-4''' και C-6'''), 115.0 (C-3'' και C-2'''), 114.0 (C-2), 55.93 (C4''-OCH₃), 55.66 (C3'''-OCH₃).

MS: 351.02 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1685 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₄: Θεωρητικά: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00; Πειραματικά: C, 68.72; H, 5.11; N 8.08.

(*E*)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(4'''-μεθοξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικό οξύ **Π-11γ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₄	350.37	210 – 211	R _f = 0.39 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το οξύ **Π-11γ** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-9γ** και λήφθηκε ύστερα από ξήρανση πάνω από ατμόσφαιρα P₂O₅ ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.02 (1H, s, H-5'), 7.78 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 7.50 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 7.47 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.06 (4H, m, H-3'', H-3'''), 6.36 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.78 (3H, s, C4'''-OCH₃), 3.77 (3H, s, C4''-OCH₃).

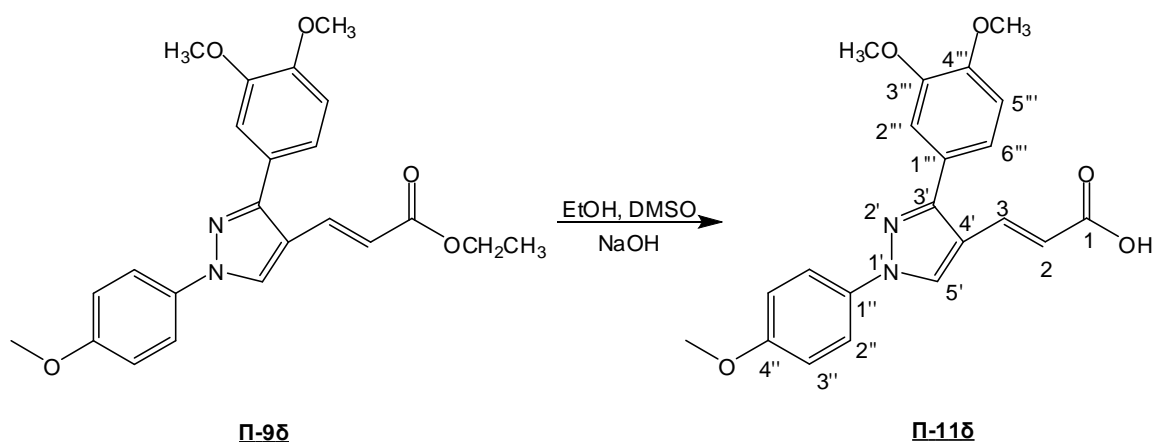
¹³C NMR (DMSO): 168.3 (C-1), 160.0 (C-4'''), 158.7 (C-4''), 152.1 (C-3'), 134.9 (C-4'), 133.1 (C-1''), 130.1 (C-2'''), 128.4 (C-3), 124.9 (C-1'''), 120.6 (C-2''), 118.1 (C-5'), 117.0 (C-2), 115.1 (C-3'''), 114.7 (C-3''), 55.92 (C4''-OCH₃), 55.68 (C4'''-OCH₃).

MS: 351.15 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1693 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₄: Θεωρητικά: C, 68.56; H, 5.18; N, 8.00; Πειραματικά: C, 68.44; H, 5.09; N 7.89.

(*E*)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(3''',4'''-διμεθοξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικό οξύ **Π-11δ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	380.39	173 – 174	R _f = 0.34 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το οξύ **Π-11δ** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-9δ** και λήφθηκε ύστερα από ξήρανση πάνω από ατμόσφαιρα P₂O₅ ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.18 (1H, s, H-5'), 7.85 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.69 (2H, d, *J* 8.0 Hz, H-2''), 7.25 (1H, s, H-2'''), 7.20 (1H, d, *J* 8.0 Hz, H-6'''), 7.02-6.99 (3H, m, H-3'' and H-5'''), 6.27 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.97 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.96 (3H, s, C4'''-OCH₃), 3.88 (3H, s, C4''-OCH₃).

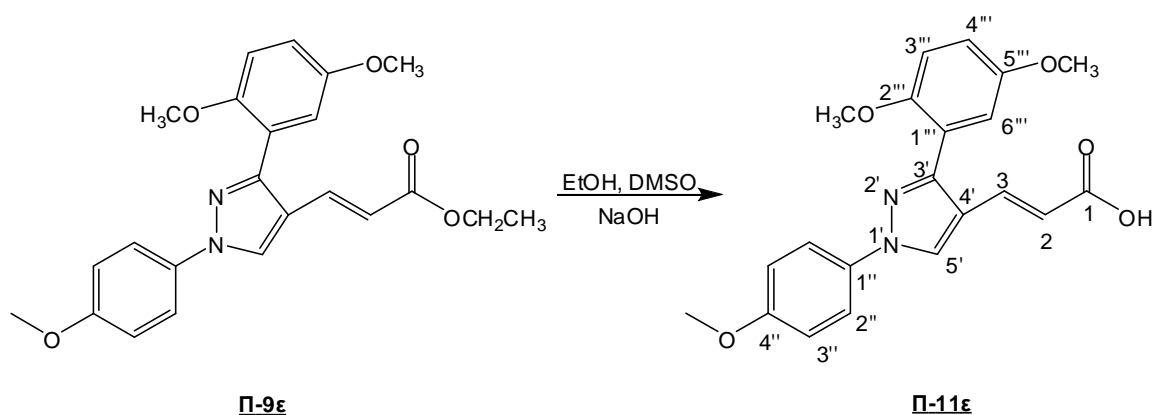
¹³C NMR (CDCl₃): 167.4 (C-1), 158.6 (C-4'), 152.7 (C-3'), 149.7 (C-3'''), 149.3 (C-4'''), 135.0 (C-4'), 132.8 (C-1''), 126.1 (C-1'''), 122.8 (C-3), 121.1 (C-5'), 121.0 (C-2''), 120.9 (C-6'''), 118.4 (C-5'''), 115.0 (C-3''), 112.8 (C-2'''), 112.1 (C-2), 56.21 (C3'''-OCH₃ και C4'''-OCH₃), 55.69 (C4''-OCH₃).

MS: 381.31 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1694 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₂₀N₂O₅: Θεωρητικά: C, 66.31; H, 5.30; N, 7.36; Πειραματικά: C, 66.39; H, 5.23; N 7.42.

(*E*)-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(2''',5'''-διμεθοξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικό οξύ **Π-11ε**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	380.39	187 – 188	R _f = 0.20 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το οξύ **Π-11ε** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-9ε** και λήφθηκε ύστερα από ξήρανση πάνω από ατμόσφαιρα P₂O₅ ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

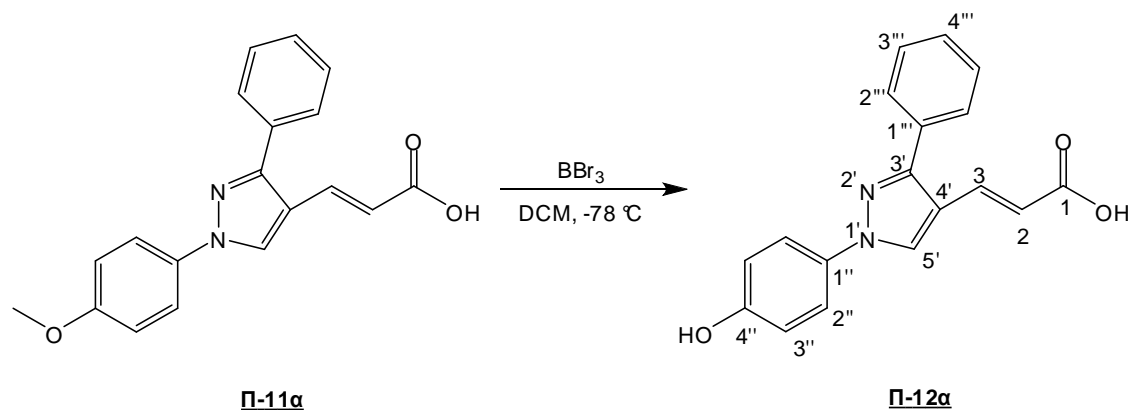
¹H NMR (DMSO): δ = 9.01 (1H, s, H-5'), 7.80 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.23 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.12 (1H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 7.10 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 7.05 (1H, dd, *J* 8.8 Hz *J* 2.8 Hz, H-4'''), 6.94 (1H, d, *J* 2.8 Hz, H-6'''), 6.20 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.82 (3H, s, C5'''-OCH₃), 3.76 (3H, s, C2'''-OCH₃), 3.70 (3H, s, C4''-OCH₃).

¹³C NMR (DMSO): 168.3 (C-1), 158.5 (C-4''), 153.6 (C-3'), 151.4 (C-5'''), 150.2 (C-2'''), 135.7 (C-4'), 133.2 (C-1''), 127.9 (C-3), 122.4 (C-5'), 120.6 (C-2''), 118.6 (C-1'''), 117.0 (C-3'''' και C-4'''), 115.7 (C-6'''), 115.1 (C-3''), 113.5 (C-2), 56.40 (C4''-OCH₃), 55.86 (C2'''-OCH₃ και C5'''-OCH₃).

MS: 381.30 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1685 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₂₀N₂O₅: Θεωρητικά: C, 66.31; H, 5.30; N, 7.36; Πειραματικά: C, 66.44; H, 5.20; N 7.49.

3.3.6 Γενική μέθοδος αποπροστασίας καρβοξυλικών οξέων **Π-11****(E)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικό οξύ **Π-12α****

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
85%	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₃	306.32	190 – 191	R _f = 0.31 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του οξέος **Π-11α** (0.20 g, 0.62 mmol) σε CH₂Cl₂ (19 mL) στους -78 °C, προστέθηκε στάγδην BBr₃ (3.1 mmol, 1.0 M σε CH₂Cl₂, 5 ισοδύναμα ανά δεσμό, 3.1 mL). Η αντίδραση αφέθηκε για 1 ώρα στους -78 °C και μετά για 16 ώρες σε r.t.. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C, εξουδετερώθηκε με MeOH και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα HCl 1N. Κατόπιν, η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πυκνωτή ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως την εμφάνιση στερεού. Το προϊόν **Π-12α** λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.03 (1H, s, H-5'), 7.71 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.61 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'''), 7.54 (2H, t, *J* 7.2 Hz, H-3'''), 7.52 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.47 (1H, 7, *J* 7.2 Hz, H-4'''), 6.92 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.41 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2).

¹³C NMR (DMSO): 168.2 (C-1), 157.0 (C-4''), 152.0 (C-3'), 134.8 (C-3), 132.7 (C-4'), 131.9 (C-1''), 129.3 (C-2'''), 128.9 (C-1'''), 128.8 (C-3'''), 128.5 (C-4'''), 121.0 (C-2''), 118.4 (C-5'), 116.8 (C-2), 116.4 (C-3'').

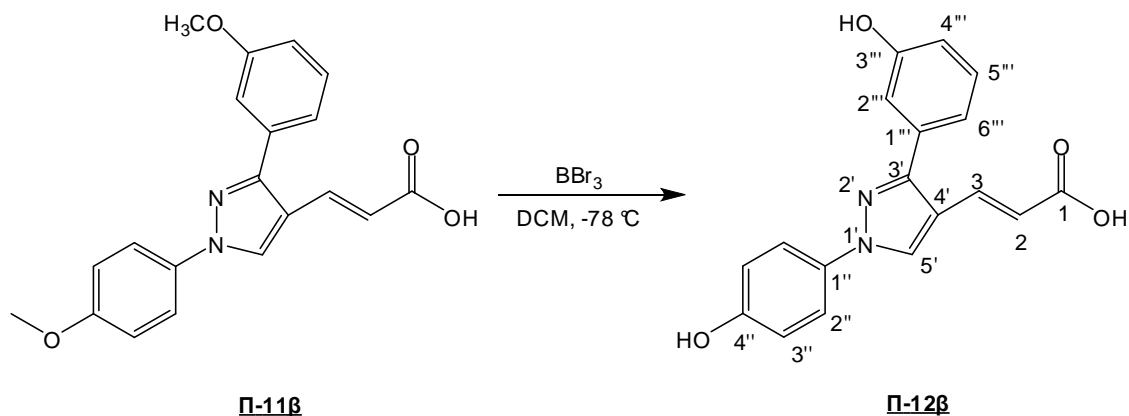
MS: 307.23 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1693 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₄N₂O₃: Θεωρητικά: C, 70.58; H, 4.61; N, 9.15;

Πειραματικά: C, 70.44; H, 4.50; N 9.29.

**(E)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(3''''-υδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικό οξύ Π-12β**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₄	322.31	246 – 247	R _f = 0.35 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο οξύ Π-12β παρασκευάστηκε από το οξύ Π-11β ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 8.83 (1H, s, H-5'), 7.79 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.76 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.37 (1H, t, *J* 7.6 Hz, H-5'''), 7.21 (1H, s, H-2'''), 7.17 (1H, d, *J* 7.6 Hz, H-4'''), 7.01 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.95 (1H, dd, *J* 7.6 Hz *J* 1.6 Hz, H-6'''), 6.43 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2).

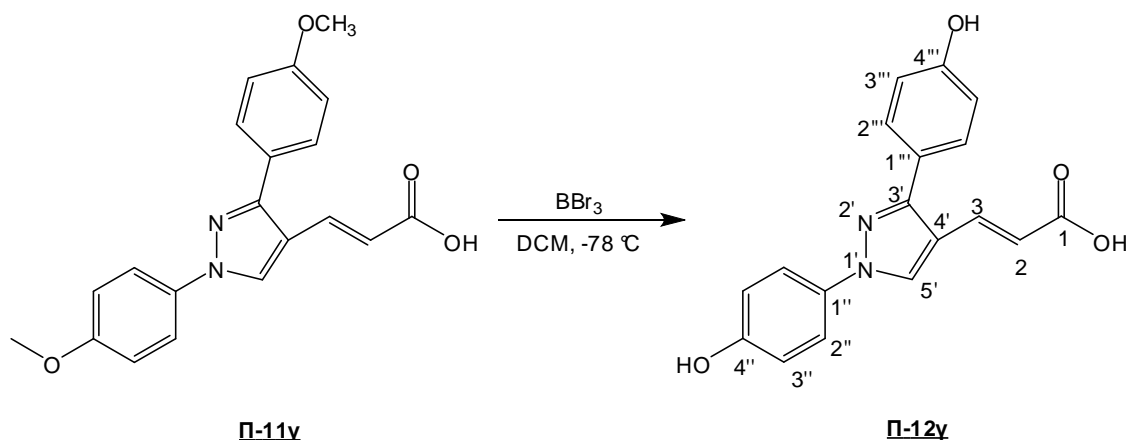
¹³C NMR (acetone-d₆): 167.2 (C-1), 157.6 (C-3'''), 156.6 (C-4''), 152.1 (C-3'), 135.4 (C-4'), 134.1 (C-1''), 132.5 (C-1'''), 129.7 (C-3), 127.2 (C-5'''), 120.6 (C-2'' και C-6'''), 119.8 (C-2), 117.0 (C-5'), 116.8 (C-4'''), 115.9 (C-3''), 115.4 (C-2''').

MS: 323.96 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1682 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₄N₂O₄: Θεωρητικά: C, 67.07; H, 4.38; N, 8.69; Πειραματικά: C, 66.91; H, 4.50; N 8.55.

(*E*)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(4'''-υδροξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-
υλ)ακρυλικό οξύ **Π-12γ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₄	322.31	202 – 203	R _f = 0.26 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο οξύ **Π-12γ** παρασκευάστηκε από το οξύ **Π-11γ** ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 8.78 (1H, s, H-5'), 7.78 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 7.72 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.55 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 7.01 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 7.00 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.40 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2).

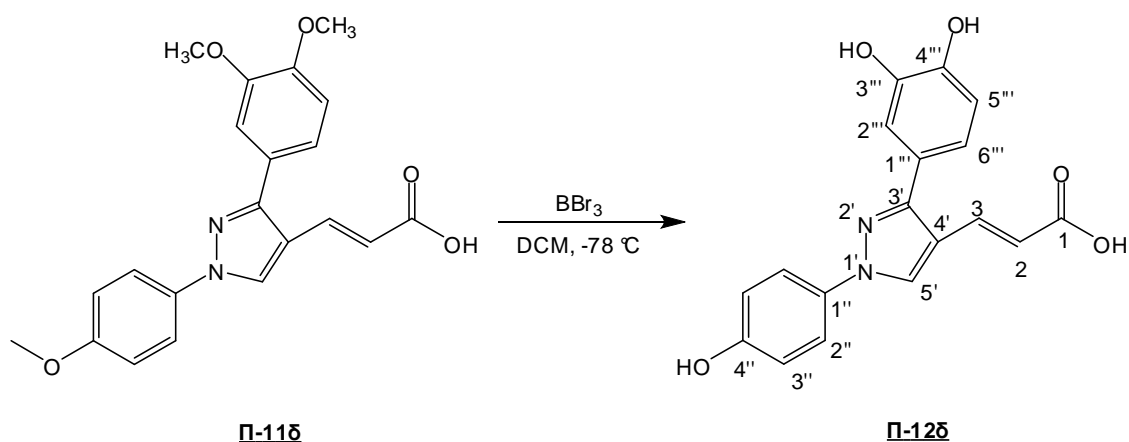
¹³C NMR (acetone-d₆): 167.2 (C-1), 157.9 (C-4'''), 156.5 (C-4''), 152.4 (C-3'), 135.6 (C-4'), 132.5 (C-1'), 129.9 (C-2'''), 127.0 (C-3), 124.1 (C-1'''), 120.5 (C-2''), 116.6 (C-5'), 116.5 (C-2), 115.8 (C-3'''), 115.5 (C-3'').

MS: 323.14 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1682 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₄N₂O₄: Θεωρητικά: C, 67.07; H, 4.38; N, 8.69; Πειραματικά: C, 66.93; H, 4.31; N 8.60.

(E)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(3''',4'''-διυδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικό οξύ Π-12δ



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₅	338.31	237 – 238	R _f = 0.20 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο οξύ Π-12δ παρασκευάστηκε από το οξύ Π-11δ ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 8.78 (1H, s, H-5'), 7.77 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.75 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.22 (1H, d, J 2.0 Hz, H-2'''), 7.05 (1H, dd, J 8.0 Hz J 2.0 Hz, H-6'''), 7.00 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3''), 6.98 (1H, d, J 8.0 Hz, H-5'''), 6.40 (1H, d, J 16 Hz, H-2).

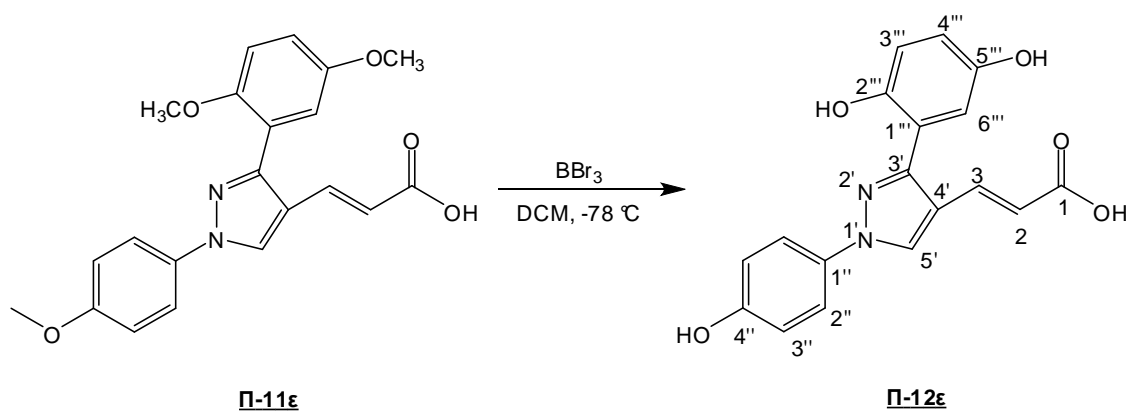
¹³C NMR (acetone-d₆): 167.2 (C-1), 156.5 (C-4'), 152.4 (C-3'), 145.7 (C-3'''), 145.1 (C-4'''), 135.7 (C-4'), 132.5 (C-1''), 127.0 (C-1'''), 124.7 (C-3), 120.4 (C-5' και C-2''), 116.6 (C-6'''), 116.5 (C-2), 115.8 (C-3''), 115.6 (C-2'''), 115.4 (C-5''').

MS: 339.23 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1710 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₄N₂O₅: Θεωρητικά: C, 63.90; H, 4.17; N, 8.28; Πειραματικά: C, 64.03; H, 4.25; N 8.40.

(E)-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(2''',5'''-διυδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ)ακρυλικό οξύ Π-12ε



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ O ₅	338.31	258 – 259	R _f = 0.17 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο οξύ Π-12ε παρασκευάστηκε από το οξύ Π-11ε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.93 (1H, s, H-5'), 7.66 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.42 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 6.75 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3'''), 6.80 (1H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 6.72 (1H, dd, J 8.4 Hz J 3.2 Hz, H-4'''), 6.71 (1H, d, J 3.2 Hz, H-6'''), 6.24 (1H, d, J 16 Hz, H-2).

¹³C NMR (DMSO): 168.5 (C-1), 156.8 (C-4'''), 150.7 (C-3'), 150.2 (C-5'''), 148.0 (C-2'''), 136.4 (C-4'), 132.0 (C-1'), 127.6 (C-3), 120.7 (C-2''), 119.9 (C-5'), 118.3 (C-2), 117.4 (C-6'''), 117.1 (C-3'''' και C-4'''), 116.9 (C-1'''), 116.3 (C-3''').

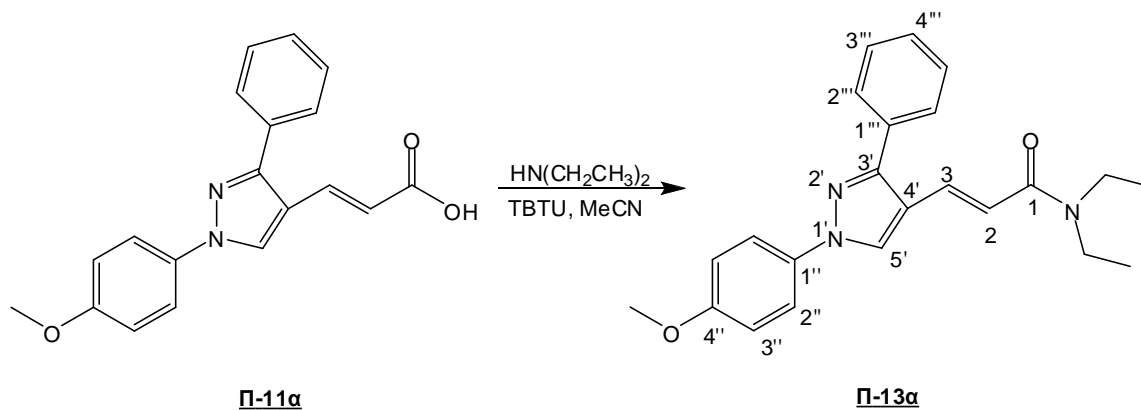
MS: 339.22 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1698 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₈H₁₄N₂O₅: Θεωρητικά: C, 63.90; H, 4.17; N, 8.28; Πειραματικά: C, 64.11; H, 4.27; N 8.44.

3.3.7 Γενική μέθοδος σύνθεσης αμιδίων **Π-13**

(*E*)-*N,N*-διαιθυλ-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο **Π-13α**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
80%	C ₂₃ H ₂₅ N ₃ O ₂	375.46	159 – 160	R _f = 0.28 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του καρβοξυλικού οξέος **Π-11α** (0.35 g, 1.1 mmol) σε MeCN (12 mL), προστέθηκε στάγδην διαιθυλαμίνη (0.40 mL, 3.8 mmol) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε r.t.. Μετά το πέρας των 30 λεπτών προστέθηκε TBTU (0.53 g, 1.6 mmol) και η ανάδευση συνεχίστηκε για ακόμα 30 λεπτά μέχρι την πλήρη κατανάλωση του αρχικού οξέος. Κατόπιν, προστέθηκε διάλυμα Brine και η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με HCl 1N, 1 φορά με H₂O, 1 φορά με υδατικό διάλυμα 5% NaHCO₃ και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄ και διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό. Το προϊόν **Π-13α** λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.12 (1H, s, H-5'), 7.77 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.70 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'''), 7.69 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.47 (2H, t, *J* 7.2 Hz, H-3'''), 7.41 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-4'''), 7.00 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.59 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.87 (3H, s, OCH₃), 3.47 (2H, q, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.35 (2H, q, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.17 (6H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

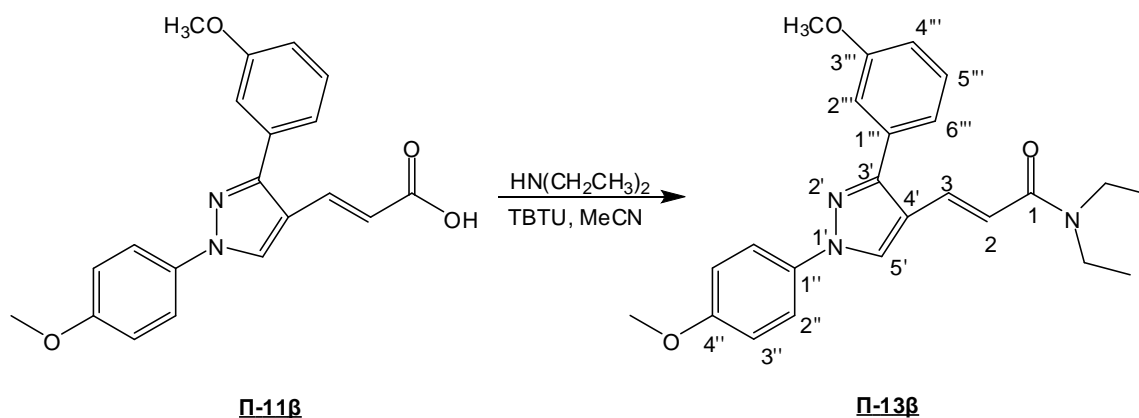
¹³C NMR (CDCl₃): 165.8 (C-1), 158.6 (C-4''), 152.5 (C-3'), 133.3 (C-4'), 132.9 (C-1'), 132.7 (C-3), 128.8 (C-2'''), 128.6 (C-3'''), 128.3 (C-1'''), 126.6 (C-4'''), 120.9 (C-2''), 118.1 (C-5'), 117.1 (C-2), 114.6 (C-3''), 55.60 (OCH₃), 42.75 (NCH₂CH₃), 40.23 (NCH₂CH₃), 13.85 (NCH₂CH₃).

MS: 376.36 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1654 cm⁻¹

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₃H₂₅N₃O₂: Θεωρητικά: C, 73.57; H, 6.71; N, 11.19; Πειραματικά: C, 73.78; H, 6.93; N 11.34.

(*E*)-*N,N*-διαιθυλ-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(3'''-μεθοξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο **Π-13β**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
85%	C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₃	405.49	111 – 112	R _f = 0.27 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο **Π-13β** παρασκευάστηκε από το οξύ **Π-11β** και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.09 (1H, s, H-5'), 7.76 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.68 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.36 (1H, t, *J* 8.0 Hz, H-5'''), 7.28-7.24 (2H, m, H-2''' και H-6'''), 6.98 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.96 (1H, d, *J* 8.0 Hz, H-4'''), 6.59 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.86 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.85 (3H, s, C4''-OCH₃), 3.46 (2H, q, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.33 (2H, q, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.16 (6H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

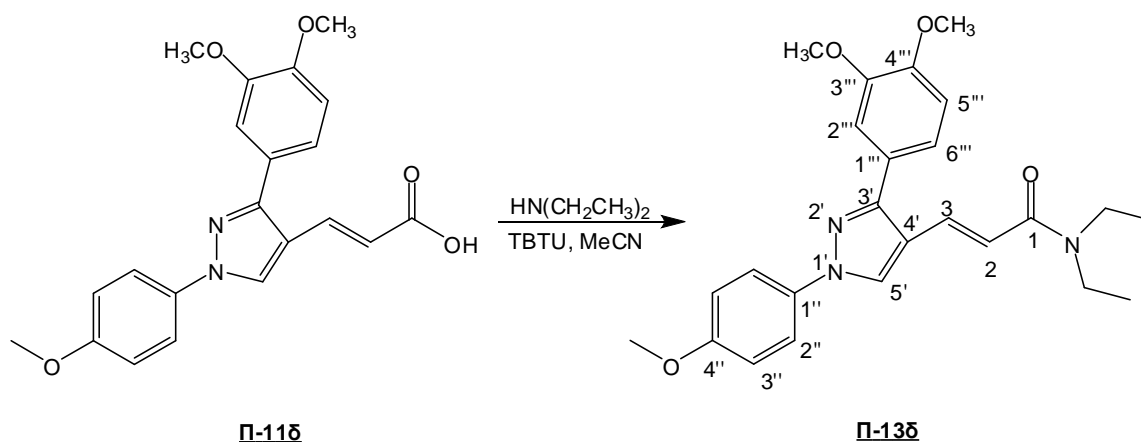
¹³C NMR (CDCl₃): 165.8 (C-1), 159.8 (C-3'''), 158.6 (C-4''), 152.4 (C-3'), 134.2 (C-4'), 133.2 (C-1''), 132.5 (C-3), 129.7 (C-1'''), 126.6 (C-5'''), 121.3 (C-5'), 120.9 (C-2''), 118.1 (C-6'''), 117.2 (C-4'''), 114.5 (C-3'''), 114.4 (C-2'''), 113.8 (C-2), 55.56 (C4''-OCH₃), 55.32 (C3'''-OCH₃), 42.15 (NCH₂CH₃), 40.98 (NCH₂CH₃), 13.36 (NCH₂CH₃) 13.24 (NCH₂CH₃).

MS: 406.13 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1645 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₄H₂₇N₃O₃: Θεωρητικά: C, 71.09; H, 6.71; N, 10.36; Πειραματικά: C, 71.22; H, 6.94; N 10.48.

(*E*)-*N,N*-διαιθυλ-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3''-(3''',4'''-διμεθοξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο **Π-13δ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₄	435.52	137 – 138	R _f = 0.21 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο **Π-13δ** παρασκευάστηκε από το οξύ **Π-11δ** και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.09 (1H, s, H-5'), 7.78 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.68 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.26 (1H, d, *J* 1.6 Hz, H-2'''), 7.22 (1H, dd, *J* 8.4 Hz *J* 1.6 Hz, H-6'''), 7.00 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.96 (1H, d, *J* 8.4 Hz, H-5'''), 6.60 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.96 (3H, s, C3'''-OCH₃), 3.94 (3H, s, C4'''-OCH₃), 3.86 (3H, s, C4''-OCH₃), 3.47 (2H, q, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 3.36 (2H, q, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.18 (6H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

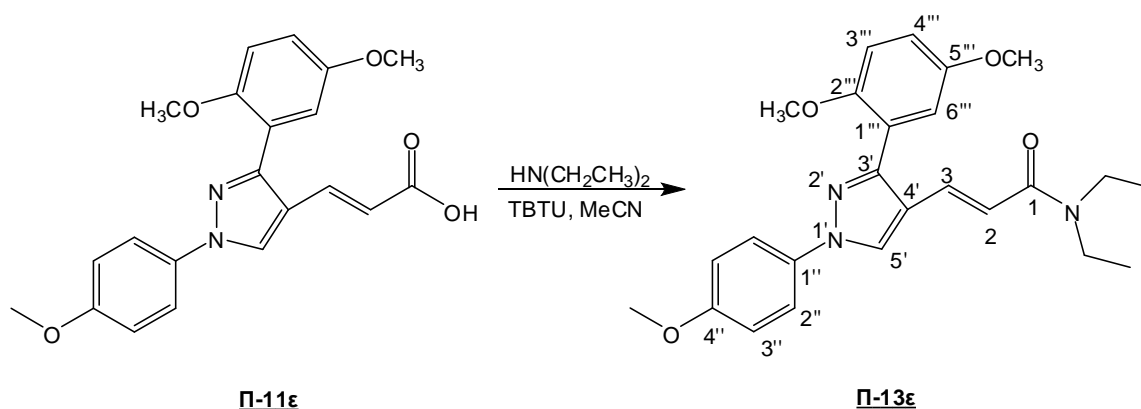
¹³C NMR (CDCl₃): 165.8 (C-1), 158.6 (C-4''), 152.4 (C-3'), 149.3 (C-3'''), 149.1 (C-4'''), 133.3 (C-4'), 132.8 (C-1''), 126.5 (C-1'''), 125.6 (C-3), 121.6 (C-5'), 120.9 (C-2''), 118.0 (C-6'''), 117.0 (C-5'''), 114.6 (C-3''), 111.7 (C-2'''), 111.3 (C-2), 56.01 (C4''-OCH₃), 55.98 (C3'''-OCH₃), 55.58 (C4'''-OCH₃), 42.20 (NCH₂CH₃), 41.00 (NCH₂CH₃), 15.00 (NCH₂CH₃) 13.26 (NCH₂CH₃).

MS: 436.43 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1650 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₅H₂₉N₃O₄: Θεωρητικά: C, 68.95; H, 6.71; N, 9.65; Πειραματικά: C, 69.11; H, 6.92; N 9.79.

(*E*)-*N,N*-διαιθυλ-3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-(2''',5'''-διμεθοξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο **Π-13ε**



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₄	435.52	138 – 139	R _f = 0.20 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο **Π-13ε** παρασκευάστηκε από το οξύ **Π-11ε** και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.08 (1H, s, H-5'), 7.68 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2''), 7.58 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.02 (1H, d, *J* 2.4 Hz, H-6'''), 6.99 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-3''), 6.97 (1H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.96 (1H, dd, *J* 8.8 Hz *J* 2.4 Hz, H-4'''), 6.37 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 3.87 (3H, s, C5'''-OCH₃), 3.81 (3H, s, C2'''-OCH₃), 3.79 (3H, s, C4''-OCH₃), 3.43 (2H, q, *J* 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 3.24 (2H, q, *J* 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 1.11 (6H, t, *J* 6.8 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 166.0 (C-1), 158.5 (C-4''), 153.7 (C-3'), 151.7 (C-5'''), 149.8 (C-2'''), 133.4 (C-4'), 132.8 (C-1''), 128.6 (C-3), 126.6 (C-5'), 120.8 (C-2''), 119.4 (C-1'''), 116.7 (C-4'''), 116.0 (C-3'''), 115.6 (C-6'''), 114.5 (C-3''), 112.6 (C-2), 56.36 (C4''-OCH₃), 55.86 (C5'''-OCH₃), 55.57 (C2'''-OCH₃), 42.12 (NCH₂CH₃), 40.89 (NCH₂CH₃), 14.87 (NCH₂CH₃) 13.24 (NCH₂CH₃).

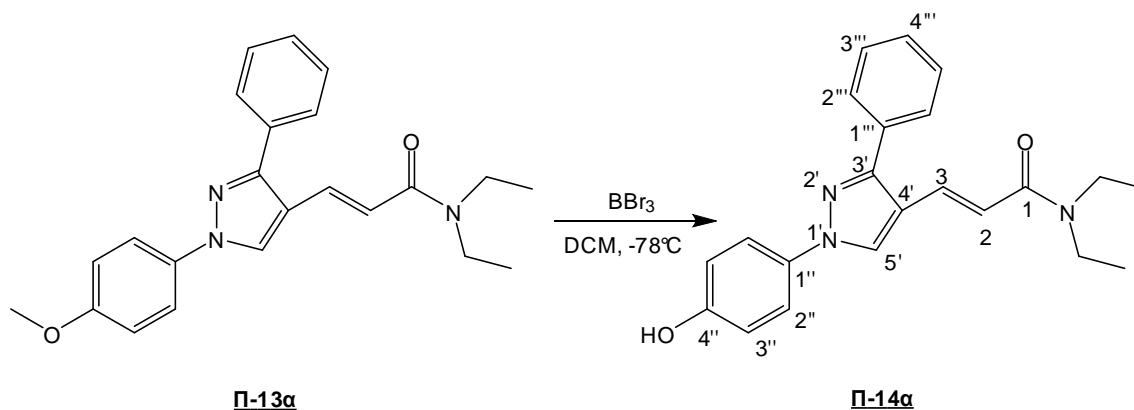
MS: 436.27 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1651 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₅H₂₉N₃O₄: Θεωρητικά: C, 68.95; H, 6.71; N, 9.65; Πειραματικά: C, 69.13; H, 6.93; N 9.81.

3.3.8 Γενική μέθοδος αποπροστασίας αμιδίων **Π-13**

(*E*)-*N,N*-διδαιθυλ-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο **Π-14α**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
85%	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₂	361.44	246 – 247	R _f = 0.23 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του αμιδίου **Π-13α** (0.20 g, 0.53 mmol) σε CH₂Cl₂ (16 mL) στους -78 °C, προστέθηκε στάγδην BBr₃ (2.7 mmol, 1.0 M σε CH₂Cl₂, 5 ισοδύναμα ανά δεσμό, 2.7 mL). Η αντίδραση αφέθηκε για 1 ώρα στους -78 °C και μετά για 16 ώρες σε r.t.. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C, εξουδετερώθηκε με MeOH και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα HCl 1N. Κατόπιν, η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-14α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): $\delta = 9.02$ (1H, s, H-5'), 7.72 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2''), 7.61 (2H, d, J 6.8 Hz, H-2'''), 7.53 (2H, t, J 6.8 Hz, H-3''), 7.49 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.48 (1H, t, J 6.8 Hz, H-4'''), 6.96 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 6.93 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3''), 3.42 (4H, q, J 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.15 (3H, t, J 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.06 (3H, t, J 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

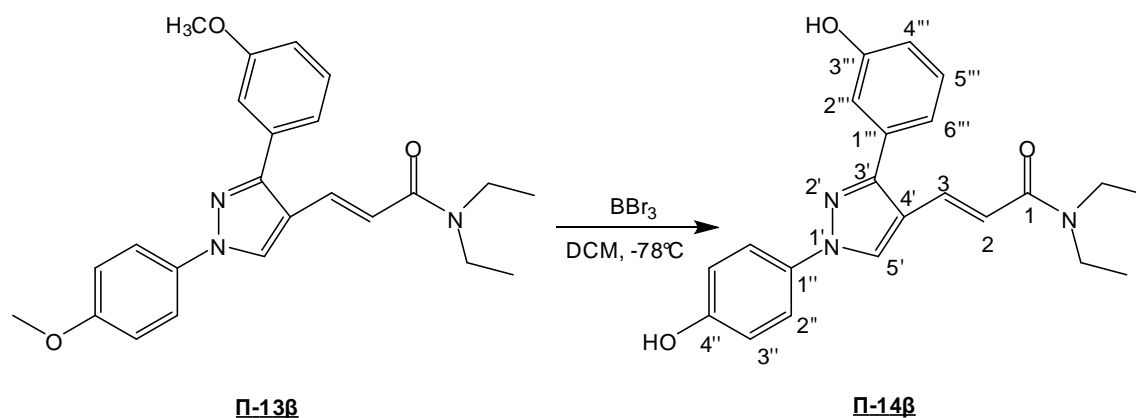
¹³C NMR (DMSO): 165.2 (C-1), 156.9 (C-4''), 151.7 (C-3'), 133.0 (C-4'), 132.0 (C-1''), 131.8 (C-3), 129.2 (C-2'''), 128.8 (C-3''' και C-4'''), 128.1 (C-1'''), 120.9 (C-2''), 117.9 (C-5'), 117.8 (C-2), 116.3 (C-3''), 41.84 (NCH₂CH₃), 15.68 (NCH₂CH₃), 13.68 (NCH₂CH₃).

MS: 362.30 (M+H⁺).

IR (film) ν : 1642 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₂₃N₃O₂: Θεωρητικά: C, 73.11; H, 6.41; N, 11.63; Πειραματικά: C, 73.33; H, 6.24; N 11.81.

(E)-N,N-διαιθυλ-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'- (3'''-υδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο Π-14β



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₃	377.44	233 – 234	R _f = 0.15 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-14β** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-13β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CD₃OD): δ = 8.58 (1H, s, H-5'), 7.64 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.62 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.31 (1H, t, J 8.0 Hz, H-5'''), 7.01 (1H, s, H-2'''), 7.07 (1H, d, J 8.0 Hz, H-6'''), 6.93-6.87 (3H, m, H-3'' και H-4'''), 6.83 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 3.47 (4H, q, J 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.18 (6H, t, J 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

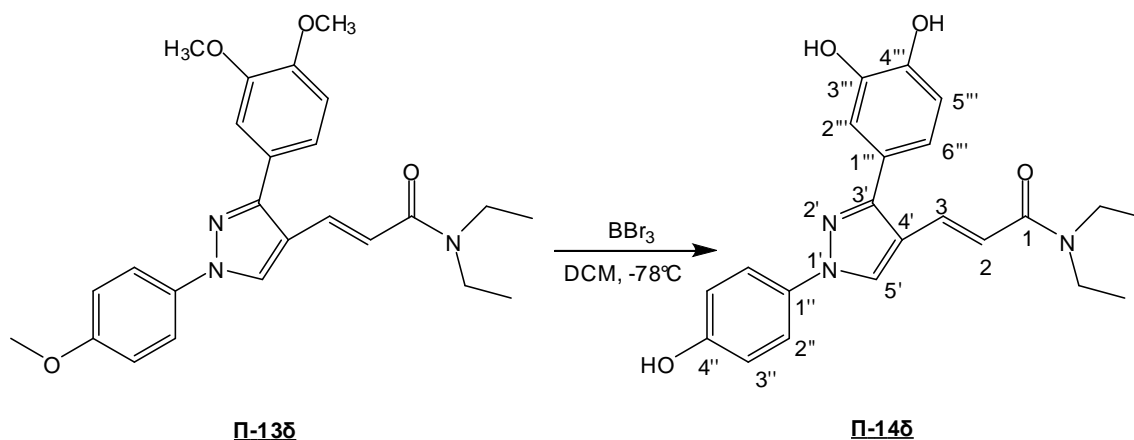
¹³C NMR (CD₃OD): 166.9 (C-1), 157.5 (C-3'''), 156.8 (C-4''), 152.4 (C-3'), 133.8 (C-4'), 132.8 (C-3), 132.0 (C-1''), 129.5 (C-1'''), 127.9 (C-5'''), 121.0 (C-5' και C-2''), 119.7 (C-6'''), 116.3 (C-4'''), 115.5 (C-2'''), 115.3 (C-3''), 115.2 (C-2), 42.16 (NCH₂CH₃), 40.98 (NCH₂CH₃), 13.81 (NCH₂CH₃) 12.04 (NCH₂CH₃).

MS: 378.15 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1650 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₂₃N₃O₃: Θεωρητικά: C, 70.01; H, 6.14; N, 11.13; Πειραματικά: C, 70.29; H, 6.01; N 11.28.

(*E*)-*N,N*-διδαιθυλ-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(3''',4'''-διδυδροξυφαινυλ)-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο **Π-14δ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₄	393.44	257 – 258	R _f = 0.31 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-14δ** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-13δ** ύστερα από καθαρισμό με FCC εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CD₃OD): δ = 8.71 (1H, s, H-5'), 7.74 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.71 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-2''), 7.24 (1H, d, *J* 2.0 Hz, H-2'''), 7.08 (1H, dd, *J* 8.0 Hz *J* 2.0 Hz, H-6'''), 6.99 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 6.98 (2H, d, *J* 9.2 Hz, H-3''), 6.96 (1H, d, *J* 8.0 Hz, H-5'''), 3.47 (4H, q, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.21 (3H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃), 1.14 (3H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₃).

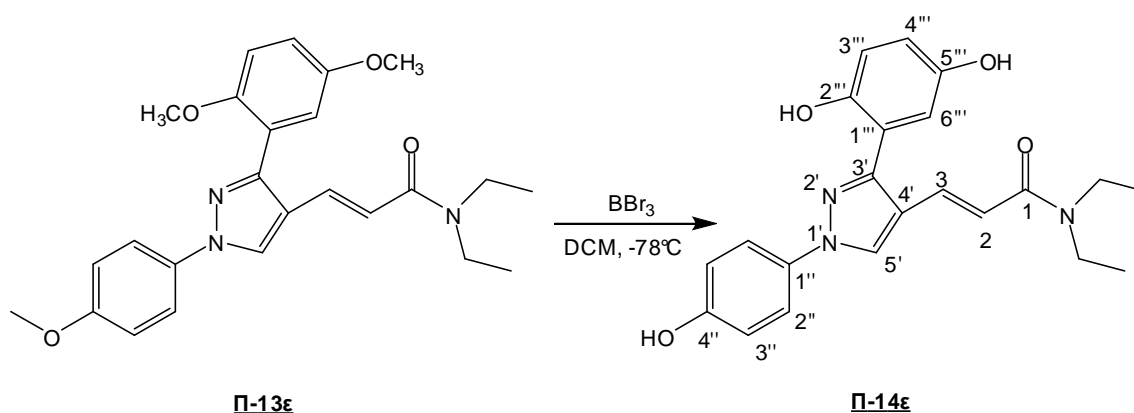
¹³C NMR (CD₃OD): 165.1 (C-1), 156.8 (C-4''), 149.2 (C-3'), 147.8 (C-3'''), 147.6 (C-4'''), 132.9 (C-4'), 132.0 (C-1''), 125.4 (C-1'''), 124.2 (C-3), 120.7 (C-2''), 118.8 (C-5'), 118.3 (C-6'''), 117.9 (C-5'''), 116.4 (C-3''), 115.7 (C-2'''), 114.6 (C-2), 41.78 (NCH₂CH₃), 15.12 (NCH₂CH₃) 13.68 (NCH₂CH₃).

MS: 394.35 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1643 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₂₃N₃O₄: Θεωρητικά: C, 67.16; H, 5.89; N, 10.68; Πειραματικά: C, 67.31; H, 5.74; N 10.83.

(E)-N,N-διαιθυλ-3-(1'-(4''-υδροξυφαινυλ)-3'-(2''',5'''-διυδροξυφαινυλ)-1'H-πυραζολο-4'-υλ) ακρυλαμίδιο Π-14ε



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
85%	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₄	393.44	263 – 264	R _f = 0.13 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο Π-14ε παρασκευάστηκε από το αμίδιο Π-13ε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.90 (1H, s, H-5'), 7.66 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.35 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 6.91 (2H, d, J 8.8 Hz, H-3'''), 6.79 (1H, d, J 7.6 Hz, H-3'''), 6.76 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 6.71 (1H, d, J 2.4 Hz, H-6'''), 6.70 (1H, dd, J 7.6 Hz J 2.4 Hz, H-4'''), 3.36 (4H, q, J 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (3H, t, J 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 1.10 (3H, t, J 6.8 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C NMR (DMSO): 165.3 (C-1), 156.7 (C-4''), 150.3 (C-3'), 150.2 (C-5'''), 148.1 (C-2'''), 133.0 (C-4'), 132.0 (C-1'), 127.5 (C-3), 120.6 (C-2''), 120.3 (C-1'''), 119.1 (C-5'), 117.3 (C-4'''), 117.0 (C-3'''), 116.9 (C-6'''), 116.6 (C-2), 116.3 (C-3''), 41.84 (NCH₂CH₃) 15.65 (NCH₂CH₃) 13.71 (NCH₂CH₃).

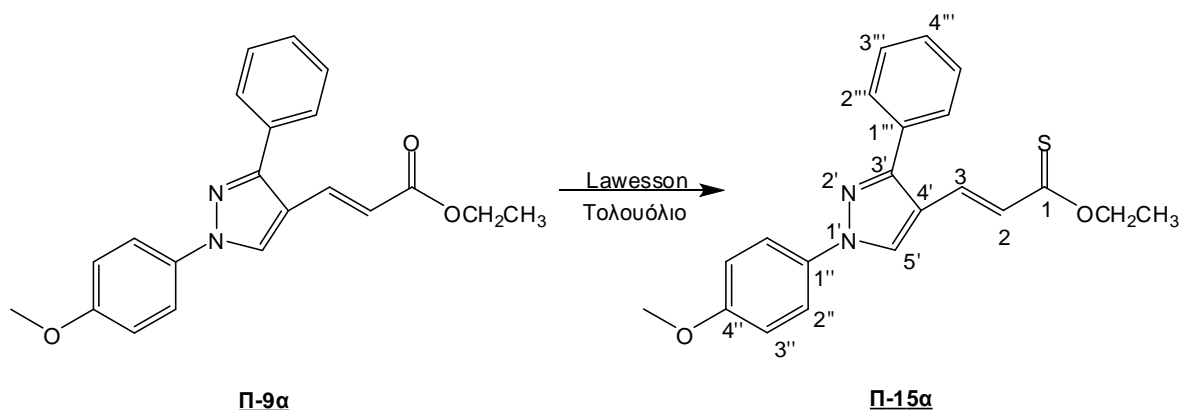
MS: 394.36 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1650 cm⁻¹;

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₂H₂₃N₃O₄: Θεωρητικά: C, 67.16; H, 5.89; N, 10.68; Πειραματικά: C, 67.32; H, 5.72; N 10.85.

3.3.8 Γενική μέθοδος παρασκευής θειοεστέρων **Π-15**

(*E*)-προπ-2-ενικός 3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ) αιθυλ
θειοεστέρας **Π-15α**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
70%	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₂ S	364.46	—	R _f = 0.42 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του εστέρα **Π-9α** (80 mg, 0.23 mmol) σε τολουόλιο (3.0 mL), προστέθηκε το αντιδραστήριο Lawesson (0.74 g, 1.8 mmol) και το μείγμα που προέκυψε τέθηκε σε reflux ολονύκτια. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με FCC με μείγμα έκλουσης (Hex/EtOAc, 8:2) και έδωσε το προϊόν **Π-15α** μετά από εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.19 (1H, s, H-5'), 7.78 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.72-7.68 (4H, m, H-2'' και H-2'''), 7.52 (2H, t, *J* 7.2 Hz, H-3'''), 7.46 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-4'''), 7.02 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 6.91 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 4.63 (2H, q, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.88 (3H, s, OCH₃), 1.46 (3H, t, *J* 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

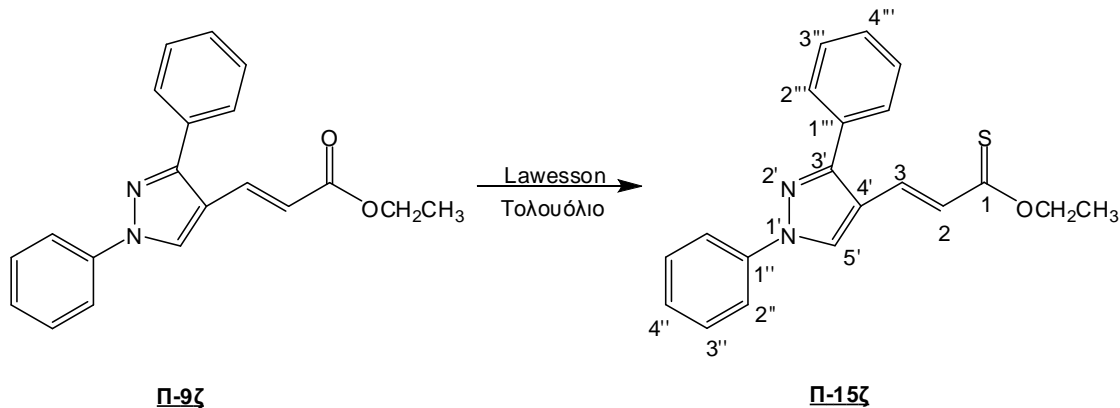
¹³C NMR (CDCl₃): 203.5 (C-1), 158.8 (C-4''), 153.5 (C-3'), 133.1 (C-1''), 132.4 (C-4'), 131.3 (C-3), 128.7 (C-2''' και C-3'''), 128.5 (C-1'''), 128.4 (C-4'''), 126.2 (C-

5'), 121.0 (C-2''), 117.6 (C-2), 114.6 (C-3''), 67.66 (OCH₂CH₃), 55.61 (OCH₃), 13.82 (OCH₂CH₃).

MS: 365.34 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1251 cm⁻¹;

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₁H₂₀N₂O₂S: Θεωρητικά: C, 69.20; H, 5.53; N, 7.69; Πειραματικά: C, 69.32; H, 5.61; N 7.76.

(E)-προπ-2-ενικός 3-(1',3'-διφαινυλ-1'H-πυραζολο-4'-υλ) αιθυλ θειοεστέρας Π-15ζ

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
75%	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ OS	334.43	–	R _f = 0.50 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο θειοεστέρας **Π-15ζ** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-9ζ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.29 (1H, s, H-5'), 7.80 (2H, d, J 8.0 Hz, H-2'''), 7.79 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.78 (2H, d, J 8.0 Hz, H-2''), 7.53-7.48 (5H, m, H-3'', H-4'' και H-3'''), 7.37 (1H, t, J 7.2 Hz, H-4'''), 6.92 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.64 (2H, q, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 1.46 (3H, t, J 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

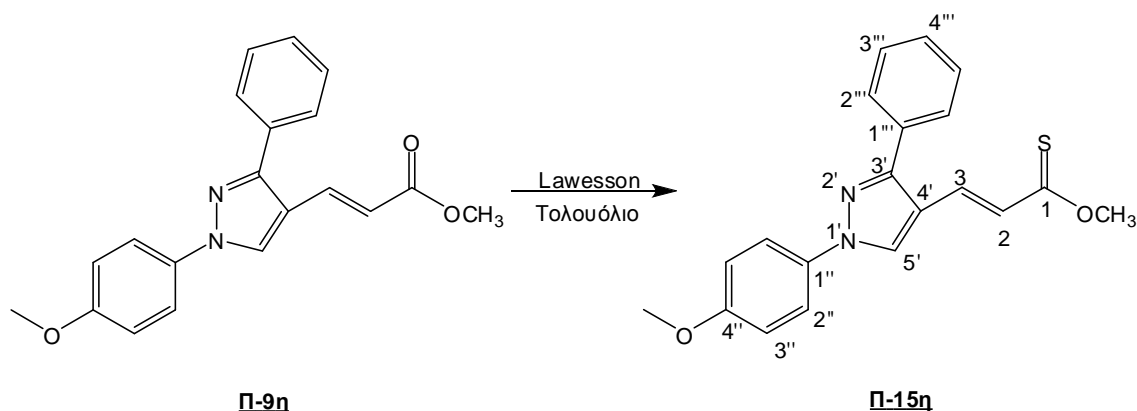
¹³C NMR (CDCl₃): 203.4 (C-1), 153.8 (C-3'), 139.4 (C-1''), 132.3 (C-4'), 131.1 (C-3), 129.6 (C-3'), 129.0 (C-1'''), 128.8 (C-3'''), 128.7 (C-2'''), 128.6 (C-4'''), 128.5 (C-4''), 127.2 (C-5'), 126.1 (C-2), 119.3 (C-2''), 67.72 (OCH₂CH₃), 13.84 (OCH₂CH₃).

MS: 335.27 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1265 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂OS: Θεωρητικά: C, 71.83; H, 5.42; N, 8.38; Πειραματικά: C, 71.97; H, 5.31; N 8.16.

(*E*)-προπ-2-ενικός 3-(1'-(4''-μεθοξυφαινυλ)-3'-φαινυλ-1'*H*-πυραζολο-4'-υλ)μεθυλ θειοεστέρας **Π-15η**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
80%	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₂ S	350.43	–	R _f = 0.36 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο θειοεστέρας **Π-15η** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-9η** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

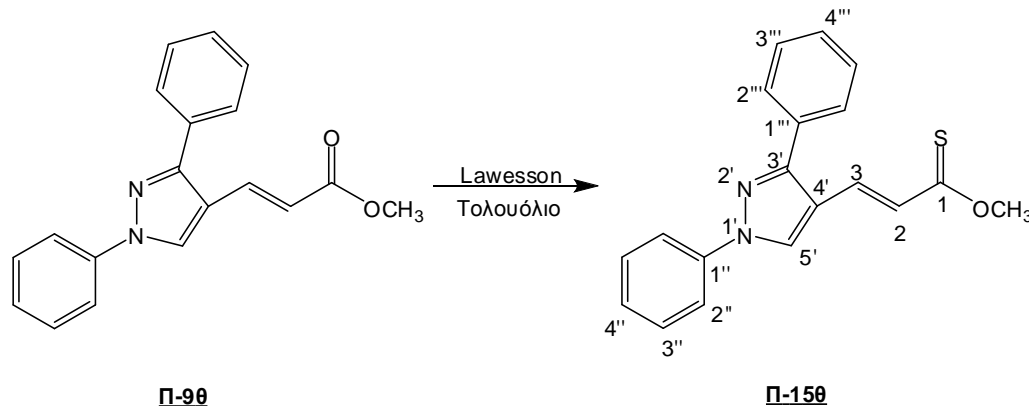
¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.19 (1H, s, H-5'), 7.78 (1H, d, *J* 16 Hz, H-3), 7.70 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'''), 7.69 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 7.53 (2H, t, *J* 7.2 Hz, H-3'''), 7.47 (1H, t, *J* 7.2 Hz, H-4'''), 7.02 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.93 (1H, d, *J* 16 Hz, H-2), 4.18 (3H, s, OCH₃), 3.88 (3H, s, C4''-OCH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): 203.2 (C-1), 158.8 (C-4''), 153.6 (C-3'), 133.1 (C-1'), 132.4 (C-4'), 131.3 (C-3), 128.8 (C-1''', C-2''' και C-3'''), 128.6 (C-4'''), 128.0 (C-5'), 126.2 (C-2), 121.0 (C-2''), 114.6 (C-3''), 58.50 (OCH₃), 55.62 (C4''-OCH₃).

MS: 351.28 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1251 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₂₀H₁₈N₂O₂S: Θεωρητικά: C, 68.55; H, 5.18; N, 7.99; Πειραματικά: C, 68.69; H, 5.31; N 7.76.

(E)-προπ-2-ενικός 3-(1',3'-διφαινυλ-1'H-πυραζολο-4'-υλ) μεθυλ θειοεστέρας Π-150

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
80%	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ OS	320.41	—	R _f = 0.35 Hex/EtOAc 8:2

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο ο θειοεστέρας **Π-150** παρασκευάστηκε από τον εστέρα **Π-90** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.29 (1H, s, H-5'), 7.80 (2H, d, J 7.2 Hz, H-2'''), 7.77 (1H, d, J 16 Hz, H-3), 7.72 (2H, d, J 8.8 Hz, H-2''), 7.55-7.46 (5H, m, H-3'', H-4'' και H-3'''), 7.37 (1H, t, J 7.2 Hz, H-4'''), 6.95 (1H, d, J 16 Hz, H-2), 4.18 (3H, s, OCH₃).
¹³C NMR (CDCl₃): 203.1 (C-1), 153.9 (C-3'), 139.4 (C-1''), 132.3 (C-4'), 131.1 (C-3), 129.6 (C-3''), 128.8 (C-3'''), 128.7 (C-2'''), 128.6 (C-1'''), 128.3 (C-4'''), 127.3 (C-5'), 126.2 (C-2), 119.3 (C-2''), 117.9 (C-4''), 58.53 (OCH₃).

MS: 321.30 (M+H⁺).

IR (film) ν: 1247 cm⁻¹.

Στοιχειακή Ανάλυση για C₁₉H₁₆N₂OS: Θεωρητικά: C, 71.22; H, 5.03; N, 8.74; Πειραματικά: C, 71.37; H, 5.17; N 8.86.

3.4 Βιβλιογραφία

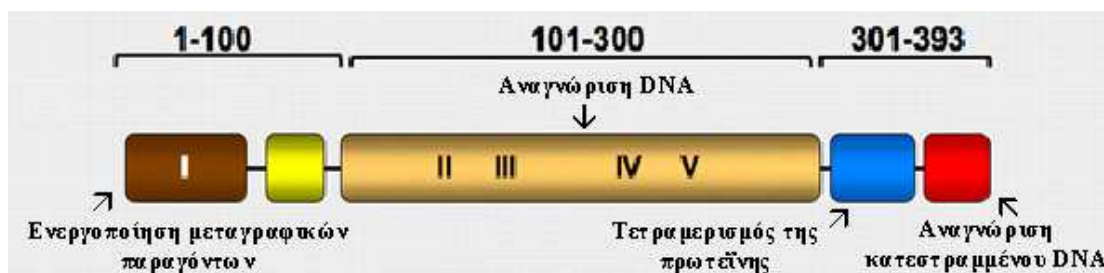
1. Eckhardt, S. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *2*, 419-439.
2. Lee, C. W.; Hong, D. H.; Han, S. B.; Jong, S.-H.; Kim, H. C.; Fine, R. L.; Lee, S.-H.; Kim, H. M. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 473-480.
3. Hu, W.-P.; Yu, H.-S.; Chen, Y.-R.; Tsai, Y.-M.; Chen, Y.-K.; Liao, C.-C.; Chang, L.-S.; Wang, J.-J. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5295-5302.
4. Kemnitzer, W.; Jiang, S.; Wang, Y.; Kasibhatla, S.; Crogan-Grundy, C.; Bubenik, M.; Labrecque, D.; Denis, R.; Lamothe, S.; Attardo, G.; Gourdeau, H.; Tseng, B.; Drewe, J.; Cai, S. X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 603-607.
5. Elguero, J.; Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V.; Elsevier Science Ltd. : Oxford, 1996; pp. 1-75.
6. Varvounis, G.; Fiamegos, Y.; Pilidis, G. *Adv. Heterocycl. Chem.* **2001**, *80*, 75-165.
7. Ahmeda, O. M.; Mohamed, M. A.; Ahmed, R. R.; Ahmed, S. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3519-3523.
8. Angelucci, A.; Schenone, S.; Gravina, G. L.; Muzi, P.; Festuccia, C.; Vicentini, C.; Botta, M.; Bologna, M. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 2838-2845.
9. Kim, D. C.; Lee, Y. R.; Yang, B.; Shin, K. J.; Kim, D. J.; Chung, B. Y.; Yoo, K. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *39*, 525-532.
10. Zhu, G.-D.; Gong, J.; Gandhi, V. B.; Woods, K.; Luo, Y.; Liu, X.; Guan, R.; Klinghofer, V.; Johnson, E. F.; Stoll, V. S.; Mamo, M.; Li, Q.; Rosenberg, S. H.; Giranda, V. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2441-2452.
11. Vivanco, I.; Sawyers, C. *Nat. Rev.* **2002**, *2*, 489.
12. Park, H.-J.; Lee, K.; Park, S.-J.; Ahn, B.; Lee, J.-C.; Cho, H. Y.; Lee, K.-I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3307-3312.
13. Zhang, J.-H.; Fan, C.-D.; Zhao, B.-X.; Shin, D.-S.; Dong, W.-L.; Xie, Y.-S.; Miao, J.-Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10165-10171.
14. Congiu, C.; Onnis, V.; Vesci, L.; Castorina, M.; Pisano, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6238-6248.
15. Penning, T. D.; Tally, J. J.; Bertenshaw, S. R.; Carter, J. S.; Collins, P. W.; Doctor, S.; Graneto, M. J.; Lee, L. F.; Malecha, J. W.; Miyashiro, J. M.; Rogers, R. S.; Rogier, D. J.; Yu, S. S.; Anderson, G. D.; 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. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1347.
16. Blumenthal, R. D.; Waskewich, C.; Goldenberg, D. M.; Lew, W.; Flefle, C.; Burton, J. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3178-3185.
17. Liu, X.; Yue, P.; Schonthal, A. H.; Khuri, F. R.; Sun, S.-Y. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 11115-11119.
18. Pruthi, R. S.; Derksen, J. E.; Moore, D.; Carson, C. C.; Grigson, G.; Watkins, C.; Wallen, E. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2172-2177.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση νέων ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολο παραγώγων ως αναστολέων της πρωτεΐνης *p53*

4.1 Εισαγωγή

Η πρωτεΐνη καταστολής όγκων *p53*, αποτελεί το σημαντικότερο παράγοντα αναστολής για τη δημιουργία καρκινικών όγκων σε πολυκυτταρικούς οργανισμούς. Έχει χαρακτηριστεί ως ο “προστάτης του γονιδιώματος” λόγω της ικανότητάς της να διατηρεί τη σταθερότητα του γονιδιώματος, προλαμβάνοντας τις μεταλλάξεις που προκαλούνται σε αυτό.¹ Το γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη *p53* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17, σε μία περιοχή, η οποία συχνά απουσιάζει από τους καρκινικούς όγκους. Το όνομά της προέρχεται από το 53.000 kDa μοριακό της βάρος. Η πρωτεΐνη *p53* προσδιορίστηκε το 1979 από τους Arnold Levine και William Old στο πανεπιστήμιο του Princeton ως στόχος του ιού SV40, που είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη όγκων. Αρχικά θεωρήθηκε ως ογκοπρωτεΐνη, όμως ο πραγματικός της χαρακτήρας αποκαλύφθηκε μετά από μία δεκαετία, 1989.



Εικόνα 4.1. Δομικές περιοχές της πρωτεΐνης *p53*.

Η πρωτεΐνη *p53* είναι μία φωσφοπρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 393 αμινοξέα και διαχωρίζεται σε τρεις δομικές περιοχές (Εικόνα 4.1), την:

- 1) N-τελική περιοχή (1-93 αμινοξύ), η οποία ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες έχοντας ως απόληξη ένα τμήμα πλούσιο σε προλίνες,
- 2) κεντρική περιοχή (101-300 αμινοξύ), η οποία αναγνωρίζει και δεσμεύεται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, και

3) C-τελική περιοχή (301-393 αμινοξύ), η οποία αποτελείται από την περιοχή που είναι υπεύθυνη για τον τετραμερισμό της πρωτεΐνης και από την περιοχή που αναγνωρίζει το κατεστραμμένο DNA.²

Σύμφωνα με το υπάρχον μοντέλο, η δέσμευση της πρωτεΐνης *p53* σε συγκεκριμένες περιοχές της αλληλουχίας του DNA γίνεται με τη μέγιστη συγγένεια όταν η πρωτεΐνη αποκτά τη μορφή τετραμερούς, με το κάθε μονομερές να αλληλεπιδρά με πέντε ζεύγη βάσεων της αλληλουχίας του DNA, μέσω της κεντρικής περιοχής της πρωτεΐνης.³ Η *WTp53* (*Wild-Type p53*), αποτελεί την πρόδρομη πρωτεΐνη της *p53*, η οποία περιέχει μεγάλες και ανοργάνωτες περιοχές αμινοξέων στα N- και C- τελικά άκρα της *p53*.

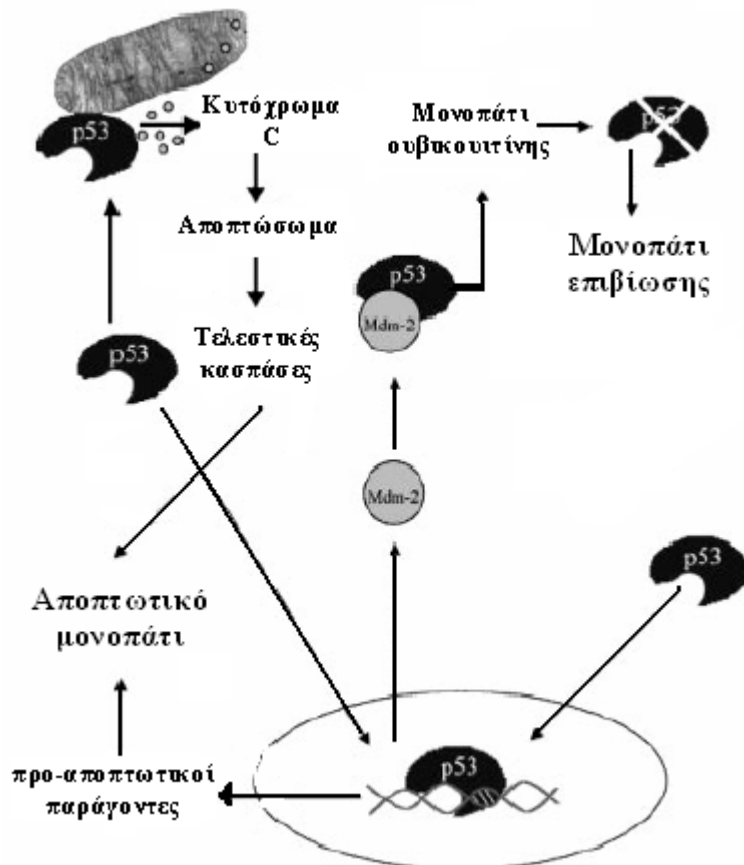
4.1.1 Μηχανισμοί προστασίας του κυττάρου μέσω της πρωτεΐνης *p53*

Η δράση της πρωτεΐνης *p53* ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη MDM2, η οποία όταν συνδεθεί με την *p53* αναστέλλει την ικανότητά της να ενεργοποιεί τους μεταγραφικούς παράγοντες που επάγονται από αυτήν.⁴ Παράλληλα, η MDM2 προάγει την αποικοδόμηση της *p53* μέσω του μονοπατιού της ουβικουιτίνης⁵ (Εικόνα 4.2). Όμως όταν το κύτταρο υποβληθεί σε οποιοδήποτε γονοτοξικό στρες, το οποίο μπορεί να προέρχεται είτε από ακτινοβολία X, είτε από βλάβη στο DNA, είτε την ενεργοποίηση ογκογονιδίων, έχει ως επακόλουθο την αναστολή των παραγόντων που μπλοκάρουν την έκφραση της *p53* με αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου της. Τα υψηλά επίπεδα της *p53* επιφέρουν ένα πλήθος βιολογικών αποκρίσεων που οδηγούν στην προστασία του κυττάρου από το γονοτοξικό στρες μέσω τριών μηχανισμών: 1) τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), 2) την διακοπή του κυτταρικού κύκλου και 3) την επιδιόρθωση του DNA.

4.1.1.1 Προστασία του κυττάρου μέσω της απόπτωσης

Ο εξαρτώμενος από την *p53* κυτταρικός θάνατος λαμβάνει χώρα από την οικογένεια των κασπασών.⁶ Συγκεκριμένα, η δέσμευση της *p53* στο μιτοχόνδριο προκαλεί την απελευθέρωση αποπτωτικών γονιδιακών παραγόντων όπως το κυτόχρωμα c. Η απελευθέρωση αυτή επιτρέπει τη δημιουργία ενός υψηλού μοριακού βάρους συμπλόκου, του αποπτωσώματος, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη υποδοχής Araf-1 και την ενεργοποιημένη μορφή της κασπάσης 9. Η τελευταία έχει τη

δυνατότητα να διασπά και να ενεργοποιεί τις κασπάσες τελεστές 3 και 7, οι οποίες και εκτελούν το αποπτωτικό πρόγραμμα (Εικόνα 4.2).⁷ Παράλληλα, η *p53* έχει τη δυνατότητα να εκφράσει ποικίλους προ-αποπτωτικούς παράγοντες όπως οι πρωτεΐνες *Bax*, *Noxa* και *Puma*, οι οποίες έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν το κυτόχρωμα *c* από το μιτοχόνδριο, με αποτέλεσμα να προκαλούν την απόπτωση του κυττάρου (Εικόνα 4.2).⁷

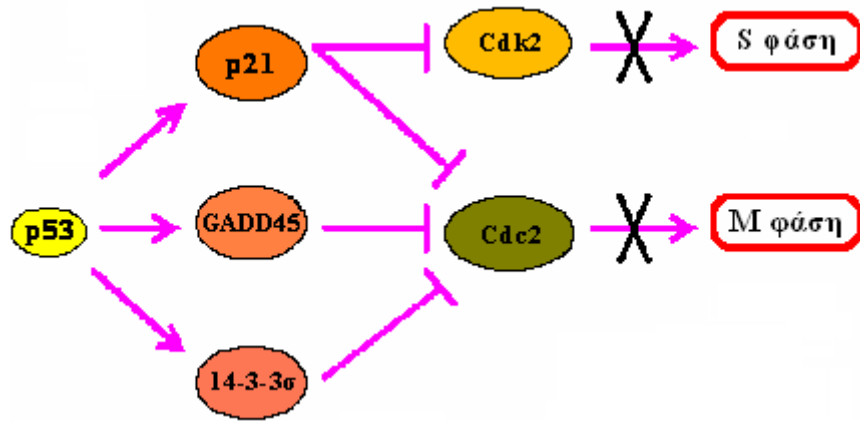


Εικόνα 4.2. Το επαγόμενο από την πρωτεΐνη *p53* αποπτωτικό μονοπάτι.

4.1.1.2 Προστασία του κυττάρου μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου

Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου από την πρωτεΐνη *p53* είναι δυνατόν να λάβει χώρα στα παρακάτω δύο σημεία ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού: α) τη μετάβαση από τη G_1 στην S φάση, και β) τη μετάβαση από την G_2 στην M φάση (Εικόνα 4.3). Στην πρώτη περίπτωση, η δράση του ενζύμου *Cdk2* που είναι υπεύθυνο για τη σωστή λειτουργία του πολλαπλασιασμού, αναστέλλεται από την πρωτεΐνη *p21* η οποία εκφράζεται από την *p53*.^{8,9} Στην δεύτερη περίπτωση, οι πρωτεΐνες *GADD45*

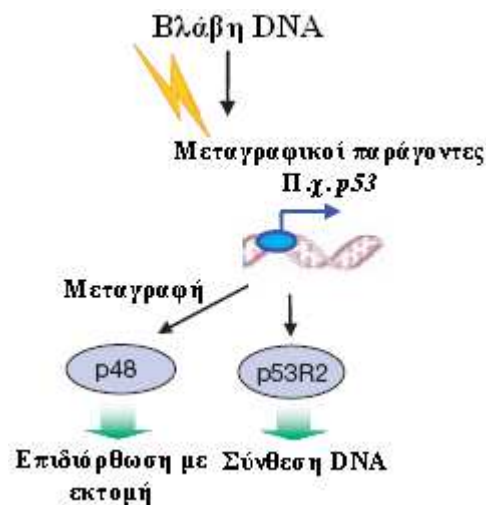
και 14-3-3σ που εκφράζονται από την *p53*, καθώς και η p21 μπορούν να αναστείλουν τη λειτουργία του ενζύμου Cdc2 που είναι υπεύθυνο για τη μετάβαση του κυττάρου από τη G₂ στην M φάση (Εικόνα 4.3).¹⁰⁻¹⁵



Εικόνα 4.3. Η εξαρτώμενη από την *p53* διακοπή του κυτταρικού κύκλου.

4.1.1.3 Προστασία του κυττάρου μέσω της επιδιόρθωσης του DNA

Παρότι η απόπτωση θεωρείται ως η κύρια λειτουργία της *p53*, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αυτή μπορεί να συμβάλλει και στην επιβίωση του κυττάρου μέσω της συνεισφοράς της στην επιδιόρθωση του DNA.¹⁶ Συγκεκριμένα, η *p53* εκφράζει το γονίδιο p48 που είναι υπεύθυνο για την επιδιόρθωση του DNA με εκτομή,¹⁷ καθώς και τη ριβονοκλεοτιδική αναγωγή p53R2, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του DNA¹⁸ (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4. Η *p53* συμβάλλει στην επιδιόρθωση του DNA.

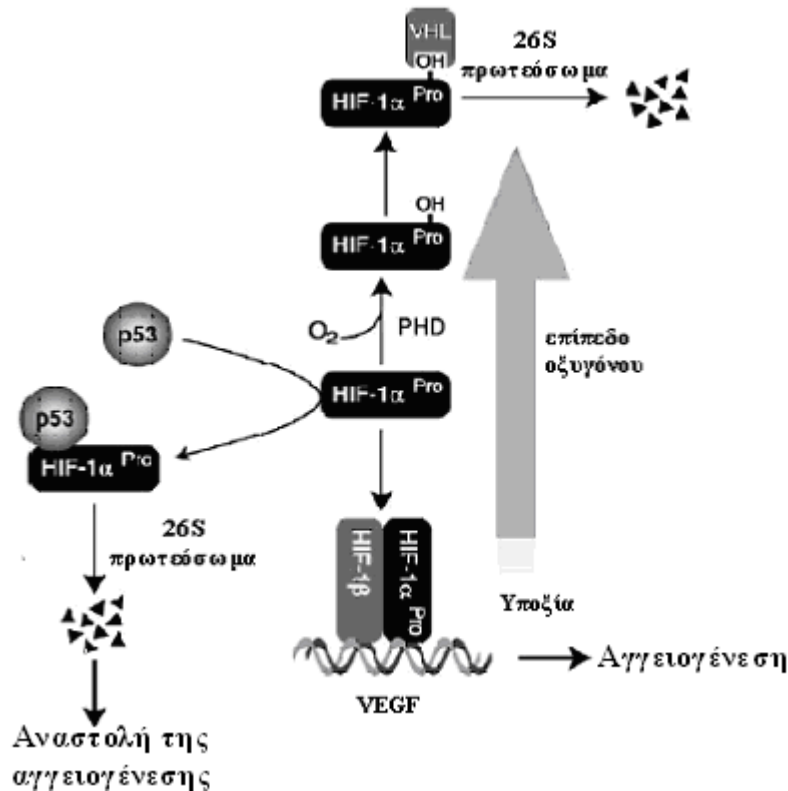
4.1.2 Πρωτεΐνη p53 και αγγειογένεση

Τα τελευταία χρόνια συνεχώς αυξανόμενα στοιχεία-μελέτες δείχνουν ότι η πρωτεΐνη p53 προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό από τη δημιουργία καρκινικών κυττάρων μέσω της καταστολής της μετάστασης και κυρίως μέσω της αναστολής της δημιουργίας νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση). Οι μηχανισμοί με βάση τους οποίους η πρωτεΐνη p53 αναστέλλει την αγγειογένεση είναι: 1) αναστολή του μηχανισμού της υποξίας, 2) μειορύθμιση των προ-αγγειογενετικών παραγόντων και 3) αυξορύθμιση των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων.

4.1.2.1 Αναστολή του μηχανισμού της υποξίας

Ο κεντρικός ρυθμιστικός παράγοντας που αποκρίνεται στα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου στον ανθρώπινο οργανισμό και συνεπώς ρυθμίζει την αύξηση της παραγωγής των νέων αγγείων καλείται HIF (Hypoxia Inducible Factor).¹⁹ Ο HIF είναι ένας ετεροδιμερής μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από δύο υπομονάδες, την HIF-1α και HIF-1β. Όταν τα επίπεδα του οξυγόνου στο αίμα είναι κανονικά, ο HIF-1α υδροξυλιώνεται σε ένα από τα κατάλοιπα της προλίνης που περιέχει από την οικογένεια των ενζύμων PHDs (υδροξυλάσες της προλίνης) και μέσω της πρωτεΐνης von Hippel-Lindau, αποικοδομείται από το σύμπλεγμα των πρωτεοσωμάτων²⁰ (Εικόνα 4.5). Αντίθετα, όταν τα επίπεδα οξυγόνου είναι χαμηλά, η δραστηριότητα των PHDs ελαττώνεται, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των υπομονάδων HIF-1α και HIF-1β. Στη συνέχεια, αυτές δεσμεύονται στο DNA ενεργοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων υπευθύνων για την ανάπτυξη της αγγειογένεσης όπως ο VEGF (Εικόνα 4.5).

Η πρωτεΐνη p53 έχει την ικανότητα να δεσμεύεται από την υπομονάδα HIF-1α και να αναστέλλει τη δράση της, με αποτέλεσμα την αποικοδόμησή της και την αναστολή της δημιουργίας νέων αιμοφόρων αγγείων. Η αναστολή της λειτουργίας του HIF από την p53 δεν λαμβάνει χώρα υπό κανονικές συνθήκες,²¹ αλλά κυρίως σε ακραίο περιβάλλον υποξίας των όγκων ή άλλων μορφών γονοτοξικού στρες, δείχνοντας ότι ο ρόλος της p53 στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκων είναι ουσιαστικά το τελευταίο στάδιο ελέγχου πριν την αγγειογένεση.



Εικόνα 4.5. Αναστολή της αγγειογένεσης από την *p53* μέσω της αναστολής του παράγοντα HIF.

4.1.2.2 Μειορύθμιση (downregulation) των προ-αγγειογενετικών παραγόντων

Η πρωτεΐνη *p53*, καταστέλλει τη δράση των παρακάτω γονιδίων, οι οποίοι κωδικοποιούν ποικίλους προ-αγγειογενετικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη δημιουργία των όγκων: 1) **VEGFs**²², 2) **bFGFs**²³, 3) **bFGF-BP (bFGF-Binding Protein)**,²⁴ και 4) **COX-2 (cyclooxygenase-2)**.²⁵ Αναλυτικότερα, η *p53* αναστέλλει την έκφραση των **VEGFs** με τη δέσμευσή της από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η δέσμευσή του από τον προαγωγέα των **VEGFs** και η επακόλουθη ενεργοποίηση της μεταγραφής των **VEGFs**. Αντίστοιχα, καταστέλλει την έκφραση των **bFGFs** αφού δεσμεύεται απευθείας με τον κεντρικό πυρήνα του προαγωγέα των **bFGFs**, αναστέλλοντας αφενός τη δράση του και αφετέρου τη δέσμευσή της στο γονίδιο που εκφράζει την **bFGF-BP**.

Η καταστολή της **COX-2** λαμβάνει χώρα με βάση ένα μηχανισμό κατά τον οποίο η πρωτεΐνη *p53* ανταγωνίζεται την πρωτεΐνη που δεσμεύεται στις περιοχές ΘΑΘΑ (Θυμίνη-Αδενίνη) (TATA-binding protein) και η οποία δεσμεύεται από τον προαγωγέα της **COX-2**.²⁵ Η **COX-2** είναι ένα ένζυμο που μετατρέπει το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνη H2, ένα ενδιάμεσο που μετατρέπεται σε πολλά άλλα μόρια

γνωστά ως προστανοειδή. Αυτά διαδραματίζουν κύριο ρόλο στις φλεγμονές, ενώ παράλληλα συμβάλλουν στη διέγερση της έκφρασης προ-αγγειογενετικών παραγόντων.^{26,27} Για το λόγο αυτό η απευθείας καταστολή του γονιδίου που εκφράζει την **COX-2** από την πρωτεΐνη **p53** μπορεί να αναστέλλει ένα σημαντικό μονοπάτι της αγγειογένεσης που προκαλείται από τα προστανοειδή.

4.1.2.3 Αυξορύθμιση (upregulation) των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων

Σε αντίθεση με τη μεταγραφική καταστολή που προκαλείται από την πρωτεΐνη **p53** και εκφράζεται μέσω διαφορετικών μηχανισμών, η ενεργοποίηση των αντι-αγγειογενετικών παραγόντων εξαρτάται αυστηρά από τη δέσμευση της **p53** σε κοινές χαρακτηριστικές αλληλουχίες του DNA των γονιδίων-στόχων. Οι αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες που ρυθμίζει η **p53** είναι:

1) το γονίδιο θρομβοσπονδίνη 1 (TSP-1), το πρώτο γονίδιο που αναγνωρίστηκε ως στόχος της **p53** και αποτελεί τον πρώτο ενδογενή παράγοντα που βρέθηκε ότι αναστέλλει την αγγειογένεση.^{28,29} Η μειορύθμιση (downregulation) του γονιδίου TSP-1 οφείλεται στην έκφραση των ογκογονιδίων Src,³⁰ myc,^{31,32} και Ras,^{33,34} δείχνοντας τις αλληλοαναιρούμενες επιπτώσεις των ογκογονιδίων και των καταστολέων των όγκων στην αγγειογένεση. Η δράση της πρωτεΐνης TSP-1 οφείλεται στην απευθείας δέσμευσή της στον υποδοχέα CD36 των ενδοθηλιακών κυττάρων.^{35,36} Επίσης η πρωτεΐνη TSP-1 ενεργοποιεί τον μεταγραφικό αυξητικό παράγοντα-β (**TGF-β**), ο οποίος είναι μια κυτοκίνη με ευρύ φάσμα λειτουργίας, μεταξύ των οποίων και της αναστολής της αγγειογένεσης.^{37,38}

2) το γονίδιο καταστολής της αγγειογένεσης **BAI1** (Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1). Η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το **BAI1** αναγνωρίστηκε αρχικά σε έρευνα στα κύτταρα του γλοιοβλαστώματος για γονίδια που εκφράζονται από την πρωτεΐνη **p53**.³⁹ Η αλληλουχία των αμινοξέων του **BAI1** περιέχει ομόλογα δομικά τμήματα με το **TSP1**, τα οποία καλούνται **TSRs** (ThomboSpondin-1 Repeats). Πειράματα σε επίμυες έδειξαν ότι τα πεπτίδια που περιέχουν τις αλληλουχίες **TSRs** εμφανίζουν αντι-αγγειογενετική δραστηριότητα.⁴⁰

3) το γονίδιο που εκφράζει τον υποδοχέα της εφρίνης A2 (EPHA2).^{41,42} Η πρωτεΐνη που εκφράζεται από το γονίδιο αυτό (EPHA2) αποτελεί μέλος της μεγάλης οικογένειας των υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης και μαζί με τους προσδέτες της (εφρίνες) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση.^{43,44}

4) τα γονίδια που εκφράζουν τα αντι-αγγειογενετικά κολλαγόνα. Τα τελευταία χρόνια, αρκετοί ισχυροί αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες προέρχονται από πρωτεολυτικά τμήματα κολλαγόνων. Τα κολλαγόνα είναι πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών τμημάτων Gly-X-Y στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, όπου το X είναι συνήθως κατάλοιπο προλίνης και το Y είναι συνήθως κατάλοιπο 4-υδροξυπρολίνης. Τα δύο ένζυμα - που διαμορφώνουν τη θέση της προλίνης μέσα στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των κολλαγόνων- καλούνται α[I] και α[II] προλυλ 4-υδροξυλάσες. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη **p53** έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την έκφραση της α[II] προλυλ 4-υδροξυλάσης,⁴⁵ το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο ένζυμο στο πρώιμο στάδιο του καρκίνου των οστών.⁴⁶ Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη **p53** αυξάνοντας τα επίπεδα της α[II] προλυλ 4-υδροξυλάσης, οδηγεί στη βιοσύνθεση των κολλαγόνων α1 κολλαγόνο 18 και α3 κολλαγόνο 4. Τα κολλαγόνα αυτά, παρουσιάζουν ισχυρή αντι-αγγειογενετική δράση στο C-τελικό πρωτεολυτικό θραύσμα που καλείται NC1. Η NC1 περιοχή στο α1 κολλαγόνο 18 περιέχει το αντι-αγγειογενετικό πεπτίδιο ενδοστατίνη, ενώ το α3 κολλαγόνο 4 περιέχει το αντι-αγγειογενετικό πεπτίδιο τουμοστατίνη.

Πίνακας 4.1. Αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες προερχόμενοι από τα κολλαγόνα.

Κολλαγόνο	Αντι-αγγειογενετικό πεπτίδιο
α1 κολλαγόνο 18	Endostatin ⁴⁷
α1 κολλαγόνο 15	Restin ⁴⁸
α1 κολλαγόνο 4	Arresten ⁴⁹
α2 κολλαγόνο 4	Canstatin ⁵⁰
α3 κολλαγόνο 4	Tumstatin ⁵¹
α6 κολλαγόνο 4	Χωρίς όνομα ⁵²
α1 κολλαγόνο 8	Vastatin ⁵³

Επίσης, η πρωτεΐνη **p53** έχει την ικανότητα να αυξάνει απευθείας και τα επίπεδα γονιδίων που εκφράζουν τα αντι-αγγειογενετικά κολλαγόνα. Συγκεκριμένα το γονίδιο COL4A1 που εκφράζει το α1 κολλαγόνο 4 περιέχει το αντι-αγγειογενετικό πεπτίδιο arresten. Έως σήμερα επτά συνολικά κολλαγόνα έχουν προσδιοριστεί να περιέχουν τμήματα με αντι-αγγειογενετική δράση (Πίνακας 4.1). Σε όλα τα παραπάνω η πρωτεΐνη **p53** έχει την δυνατότητα να αυξάνει τη βιοσύνθεσή τους.

4.1.3 Γονίδιο *p53* και καρκίνος

Σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα, στο 50% των καρκινικών το γονίδιο *p53* είναι μεταλλαγμένο,^{54,55} ενώ στο υπόλοιπο 50% ή εκφράζει μόνο τη *WTp53* πρωτεΐνη ή έχει χαθεί. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις αυτές μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: 1) Στην ελαττωματική σύνδεση με το DNA και 2) Σε μεταλλάξεις στη διαμόρφωση του γονιδίου.⁵⁶ Η βιολογική σπουδαιότητα στις μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* εκτείνεται από την πλήρη απώλεια έως την πλήρη λειτουργία. Πολλές *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν ξεκάθαρα δείξει ότι κάποιες μεταλλάξεις του γονιδίου *p53* μπορούν να προσδώσουν νέες λειτουργίες συμβάλλοντας ενεργά στη διατήρηση και στην αύξηση της αντίστασης των όγκων στην συμβατική αντικαρκινική θεραπεία.^{57,58} Σε μοριακό επίπεδο, η πλήρης λειτουργία των μεταλλαγμένων *p53* πρωτεϊνών εμφανίζεται μέσω της δέσμευσης, απομόνωσης και αδρανοποίησης των πρωτεϊνών καταστολής όγκων ή μέσω της μεταγραφικής διαμόρφωσης γονιδίων που εκφράζουν πρωτεΐνες καταστολής όγκων.⁵⁹⁻⁶¹

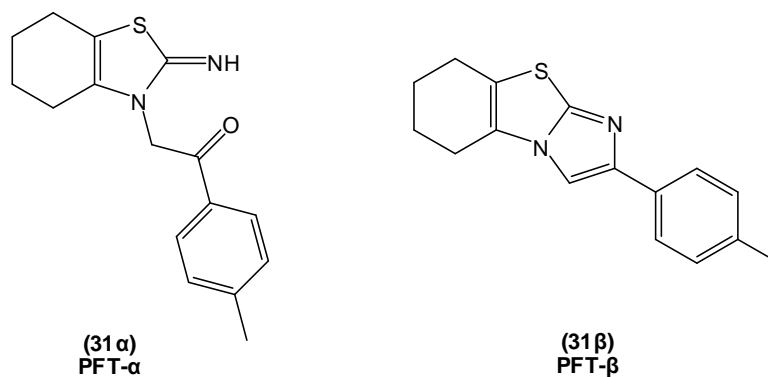
Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *p53* έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B,⁶² οδηγώντας στην αύξηση της σύνθεσης του DNA ως απόκριση στην καταστροφή του DNA, που προκαλείται από την αντικαρκινική θεραπεία. Το σύμπλοκο μεταλλαγμένη *p53*/NF- κ B, ρυθμίζει σε μεταγραφικό επίπεδο όλα τα γονίδια που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου. Πράγματι, τα γονίδια κυκλίνη A, κυκλίνη B1, κυκλίνη B2, cdk1 και cdc25c αυξάνονται παρουσία του συμπλόκου μεταλλαγμένη *p53*/NF- κ B, με αποτέλεσμα την ανώμαλη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, που οδηγεί στην αύξηση των καρκινικών κυττάρων.⁶³

Η ερευνητική ομάδα του Folkman⁶⁴ ανέφερε ότι η χημειοθεραπεία που εφαρμόστηκε στα πλαίσια ενός αντι-αγγειογενετικού προγράμματος ήταν αποτελεσματικότερη στους επίμυες που δεν είχαν το γονίδιο *p53* σε σύγκριση με όσα είχαν το γονίδιο *WTp53*,⁶⁴ δείχνοντας ότι η πρωτεΐνη *WTp53* είναι δυνατόν να παίζει έναν προστατευτικό ρόλο στα καρκινικά ενδοθηλιακά κύτταρα σε συνθήκες γονοτοξικού στρες. Παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός του φαινομένου αυτού δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί, είναι πιθανόν να προσομοιάζει την προστασία που προσφέρει η πρωτεΐνη *p53* στο λεπτό έντερο μετά από ακτινοβολία γ .⁶⁵ Εκεί η πρωτεΐνη *p53* έχει το ρόλο του παράγοντα επιβίωσης, βοηθώντας τα κύτταρα να βρεθούν σε κατάσταση ηρεμίας, μειώνοντας το ρίσκο της μιτωτικής καταστροφής.⁶⁶

Ο ρόλος της πρωτεΐνης **p53** στη θεραπεία του καρκίνου, δεν αφορά μόνο τη συμμετοχή της στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων. Έρευνες σε επίμυες στα οποία το γονίδιο **p53** υπερεκφράζεται σε πολλούς υγιείς ιστούς όπως τα λεμφοειδή και αιμοποιητικά όργανα, τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και οι όρχεις, έδειξαν ότι αυτοί είναι οι πρώτοι ιστοί που καταστρέφονται από την αντικαρκινική θεραπεία.^{67,68} Η εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη **p53** απόπτωση λαμβάνει χώρα στους ευπαθείς αυτούς ιστούς λίγο μετά την ακτινοβολία γ ,^{69,70} με τα πειράματα να δείχνουν ότι οι επίμυες που έχουν έλλειψη της πρωτεΐνης **p53** να επιβιώνουν σε μεγαλύτερες δόσεις ακτινοβολίας γ σε σχέση με αυτά που φέρουν το γονίδιο **p53**.^{71,72} Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η πρωτεΐνη **p53** αποτελεί ένα καθοριστικό παράγοντα στις παρενέργειες της αντικαρκινικής θεραπείας και για το λόγο αυτό **αποτελεί θεραπευτικό στόχο για τη μείωση της καταστροφής των υγιών κυττάρων.**⁷³ Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η θεραπευτική προσέγγιση αφορά μόνο τους καρκινικούς όγκους που χαρακτηρίζονται από την έλλειψη λειτουργικής πρωτεΐνης **p53**.

4.1.4 Αναστολείς της πρωτεΐνης **p53**

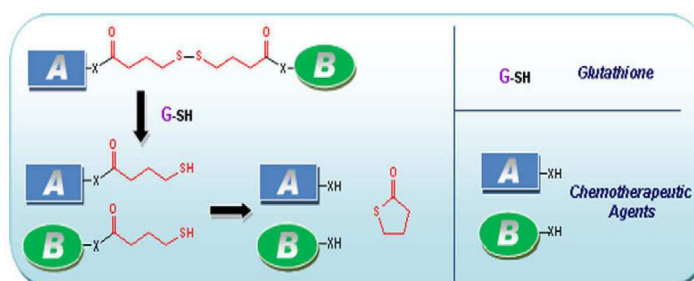
Η συνθετική ένωση **PFT- α** (pifithrin- α , **31 α**) (Εικόνα 4.6), αναγνωρίστηκε αρχικά μέσα από 10.000 ενώσεις ως ικανή να προστατεύει τους επίμυες από το θανάσιμο γονοτοξικό στρες που σχετίζεται με την αντικαρκινική θεραπεία.⁷⁴ Ωστόσο, η ένωση **PFT- α** δεν είναι σταθερή με αποτέλεσμα να υφίσταται αυθόρμητα κλείσιμο του δακτυλίου της προς την ένωση **PFT- β** ⁷⁵ (**31 β**) (Εικόνα 4.6). Η ικανότητά της να μπλοκάρει την πρωτεΐνη **p53** αποδείχθηκε από την ανεπάρκειά της να εμποδίσει το εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη **p53** κυτταρικό θάνατο.⁷⁶ Στην βιβλιογραφία περιγράφεται η σύνθεση ποικίλων αναλόγων των μορίων **PFT- α** και **PFT- β** και η μελέτη τους ως αναστολείς της πρωτεΐνης **p53**.⁷⁷⁻⁷⁹



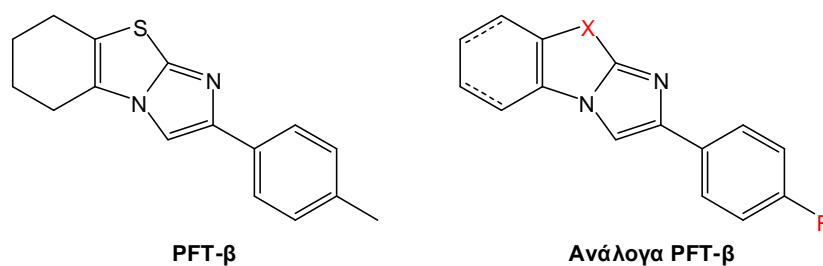
Εικόνα 4.6. Δομές των ενώσεων **PFT-α** και **PFT-β**.

4.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στα πλαίσια εκπόνησης της διατριβής, συμμετέχοντας σε ένα γενικότερο πρόγραμμα για τη σύνθεση μορίων που διαθέτουν δύο *in vivo* δραστικές ομάδες με αντικαρκινική δράση⁸⁰ (Εικόνα 4.7) συντέθηκαν ποικίλα ανάλογα του μορίου **PFT-β**. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η εισαγωγή λειτουργικών ομάδων στην πάρα θέση του βενζολικού δακτυλίου του μορίου **PFT-β**, ενώ παράλληλα αντικαταστάθηκε το άτομο του θείου με ποικίλες αζο-ομάδες (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.7. Νέα μόρια και η πιθανή ενεργοποίησή τους από τη γλουταθειόνη (G-SH). A: ανάλογα του **PFT-β**; B: αντικαρκινικοί παράγοντες π.χ. ταξόλη, θειοκολχικίνη.

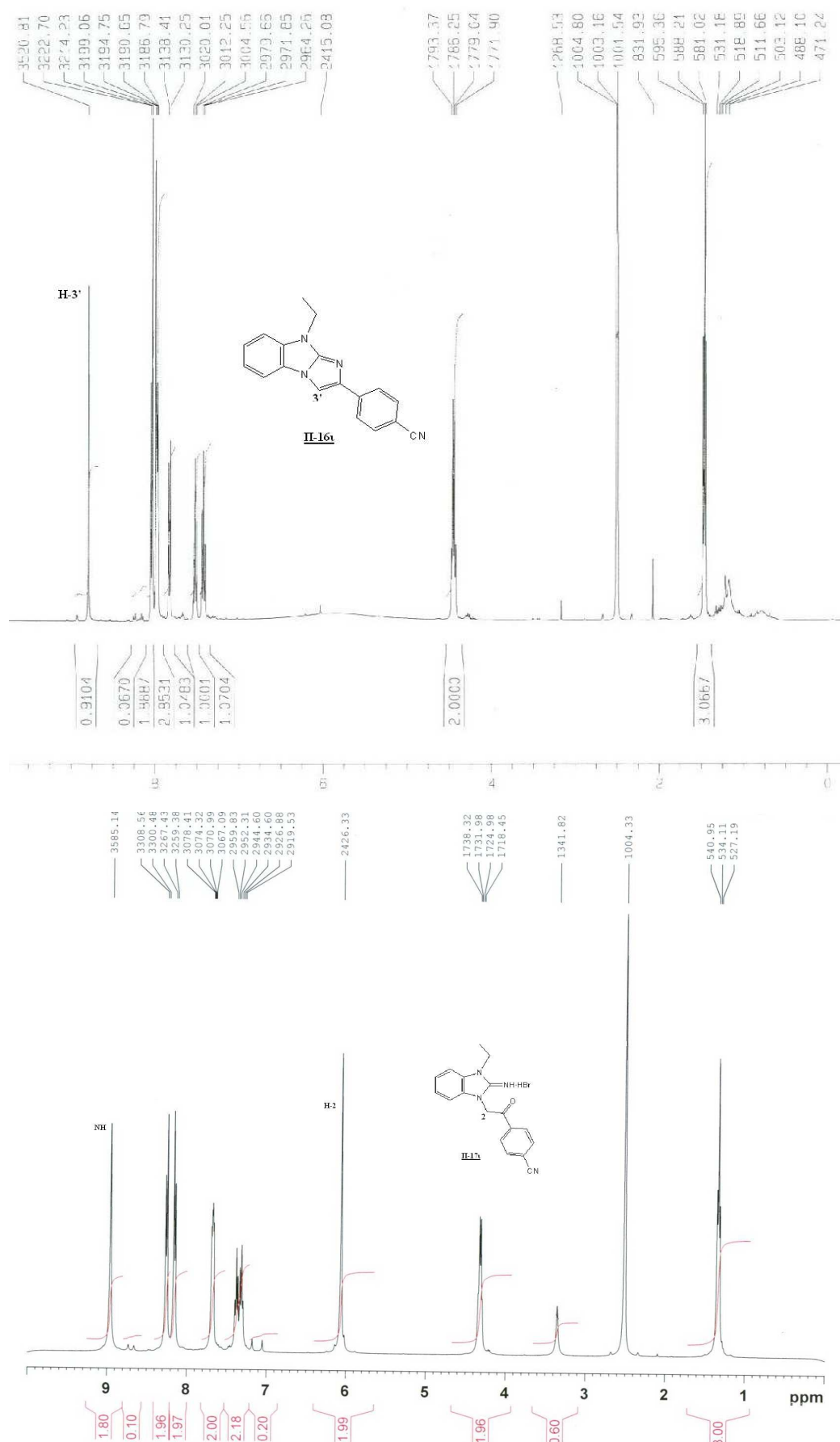


Εικόνα 4.8. Δομή των αναλόγων του **PFT-β** που συντέθηκαν στο πλαίσιο της διατριβής.

4.2.1 Σύνθεση

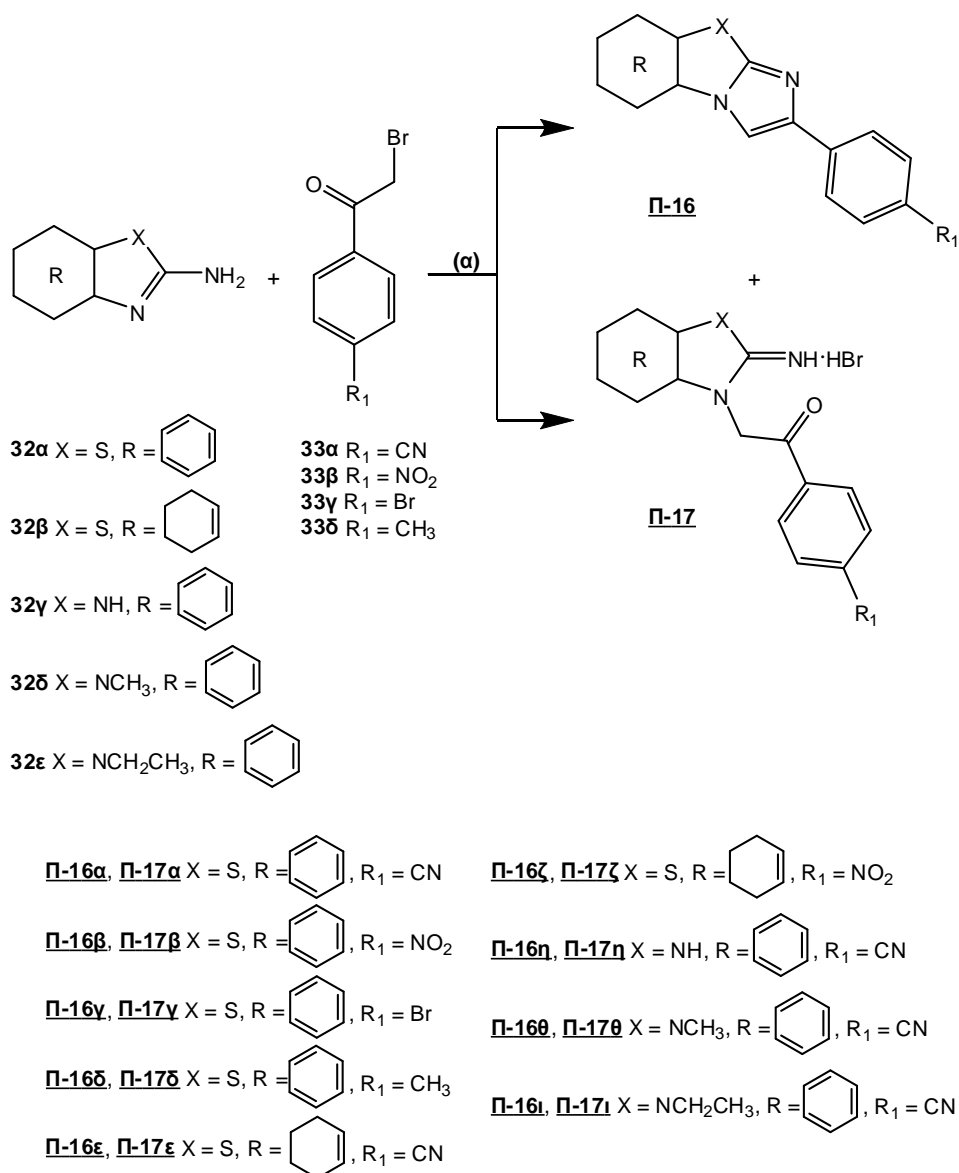
Ως πρώτη ύλη για τη σύνθεση των νέων ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολο παραγώγων **Π-16α-ζ** χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο 2-αμινοβενζοθειαζόλιο (**32α**), ενώ το 2-αμινοτετραϋδροβενζοθειαζόλιο (**32β**) προήλθε από συνθετική πορεία που αναπτύχθηκε από τους King και Hlavacek⁸¹ και αναφέρεται στην αντίδραση της κυκλοεξανόνης με θειουρία παρουσία ιωδίου. Στη συνέχεια, η συμπύκνωση των βενζοθειαζολίων **32α,β** με ποικίλες α-βρωμοακετοφαινόνες (**33**) έδωσε τα προϊόντα **Π-16α-ζ** σε μέτριες αποδόσεις (Σχήμα 4.1). Στα μόρια αυτά πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση τόσο του ατόμου του θείου με αζο-ομάδες όσο και του κυκλοεξενικού δακτυλίου του τετραϋδροβενζοθειαζολίου με βενζολικό δακτύλιο. Για τη σύνθεση των μορίων αυτών ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα 2-αμινοβενζοϊμιδαζόλιο (**32γ**) και 1-μεθυλ-2-αμινοβενζοϊμιδαζόλιο (**32δ**), των οποίων η συμπύκνωση με την 2-Br-4'-CN-ακετοφαινόνη (**33α**) οδήγησε στο σχηματισμό των ανοιχτών μορφών **Π-17η** (60%) και **Π-17θ** (75%) αντίστοιχα. Μόνο στην περίπτωση του 1-μεθυλ-2-αμινοβενζοϊμιδαζολίου (**32δ**) παρατηρήθηκε ένα μικρό ποσοστό της κλειστής μορφής **Π-16θ** (5%) (Σχήμα 4.1). Ο σχηματισμός της κλειστής μορφής **Π-16θ** οδήγησε στην περαιτέρω επιμήκυνση της αλειφατικής αλυσίδας στη θέση N-1. Για το λόγο αυτό, το 1-αιθυλ-2-αμινοβενζοϊμιδαζόλιο (**32ε**) παρασκευάστηκε εύκολα από το 2-αμινοβενζοϊμιδαζόλιο (**32γ**) με τη χρήση αιθυλοϊωδίου παρουσία KOH. Παρόλο που η συμπύκνωση του 1-αιθυλ-2-αμινοβενζοϊμιδαζολίου (**32ε**) με τη 2-Br-4'-CN-ακετοφαινόνη (**33α**) οδήγησε στο σχηματισμό του προϊόντος **Π-16ι** σε υψηλότερη απόδοση (20%), το κύριο προϊόν παρέμεινε η ανοιχτή μορφή **Π-17ι** (60%) (Σχήμα 4.1).

Η σύνθεση των ενώσεων **Π-16ι** και **Π-17ι** πιστοποιήθηκε από τη μελέτη των φασμάτων ¹H NMR τους (Φάσμα 4.1). Συγκεκριμένα, στο φάσμα της ένωσης **Π-16ι** παρατηρείται η ύπαρξη του πρωτονίου 3' στα 8.53 ppm, ενώ στο φάσμα της ένωσης **Π-17ι** παρατηρείται η ύπαρξη του πρωτονίου 2 στα 6.08 ppm.

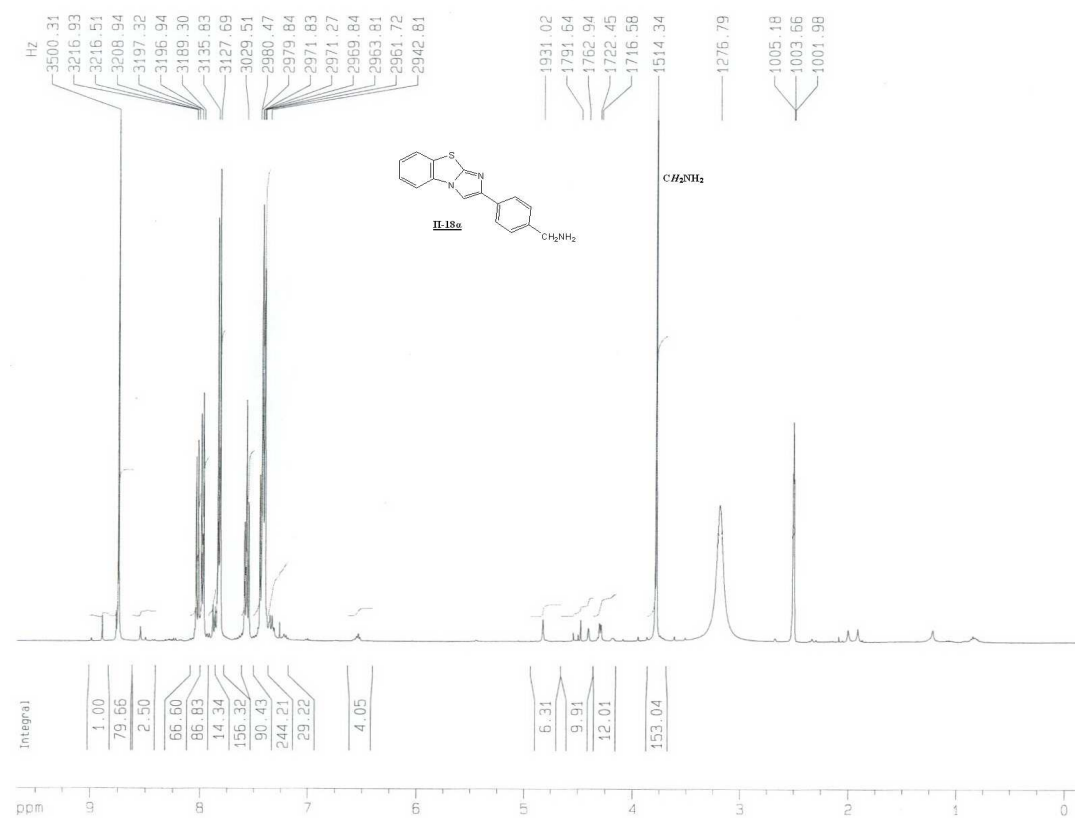
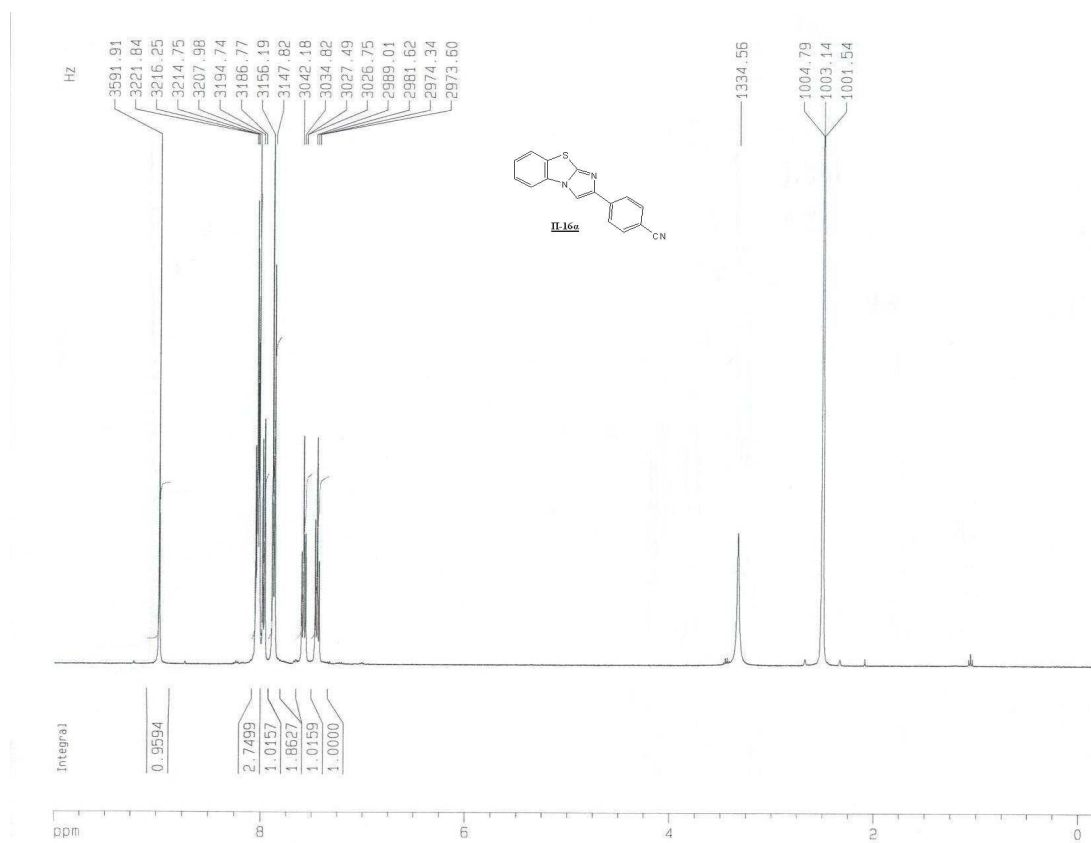


Φάσμα 4.1. ^1H NMR των ενώσεων **II-16i** (DMSO) και **II-17i** (DMSO).

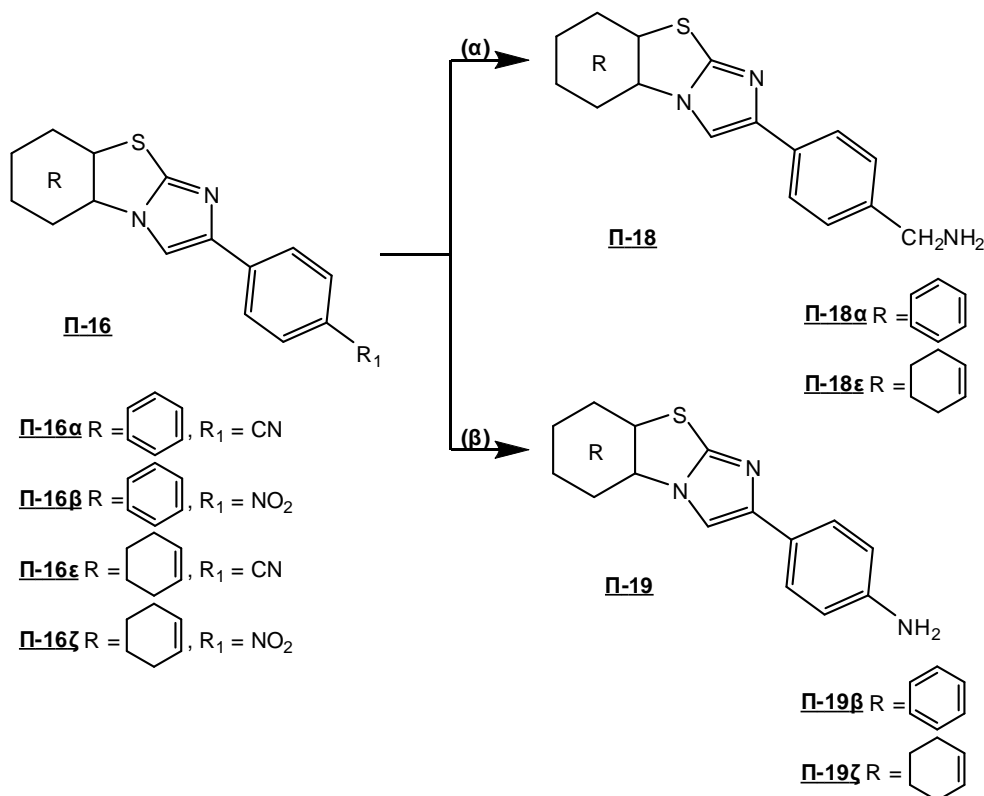
Στη συνέχεια, τα νιτρίλια **Π-16α** και **Π-16ε** με αναγωγή με τη χρήση του αντιδραστήριου DIBALH έδωσαν τις αντίστοιχες πρωτοταγείς αμίνες **Π-18α** και **Π-18ε** σε εξαιρετικές αποδόσεις (90%), ενώ η αναγωγή των νιτρίλιων **Π-16β** και **Π-16ζ** στις αντίστοιχες φαινυλαμίνες **Π-19β** και **Π-19ζ** επιτεύχθηκε με τη χρήση H_2SO_4 παρουσία σκόνης Fe, επίσης σε εξαιρετικές αποδόσεις (89%) (Σχήμα 4.2). Επιπλέον, για να αυξηθεί η διαλυτότητα των αμινών **Π-18** και **Π-19** στο νερό, αυτές μετατράπηκαν στα αντίστοιχα υδροχλωρικά τους άλατα με την προσθήκη κορεσμένου διαλύματος υδροχλωρικού οξέος σε μεθανόλη. Η σύγκριση των φασμάτων των ενώσεων **Π-16α** και **Π-18α** (Φάσμα 4.2), πιστοποίησε τη μετατροπή του νιτρίλιου σε αμίνη, αφού παρατηρείται η ύπαρξη των πρωτονίων CH_2NH_2 στα 3.78 ppm.



Σχήμα 4.1. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) EtOH, reflux.

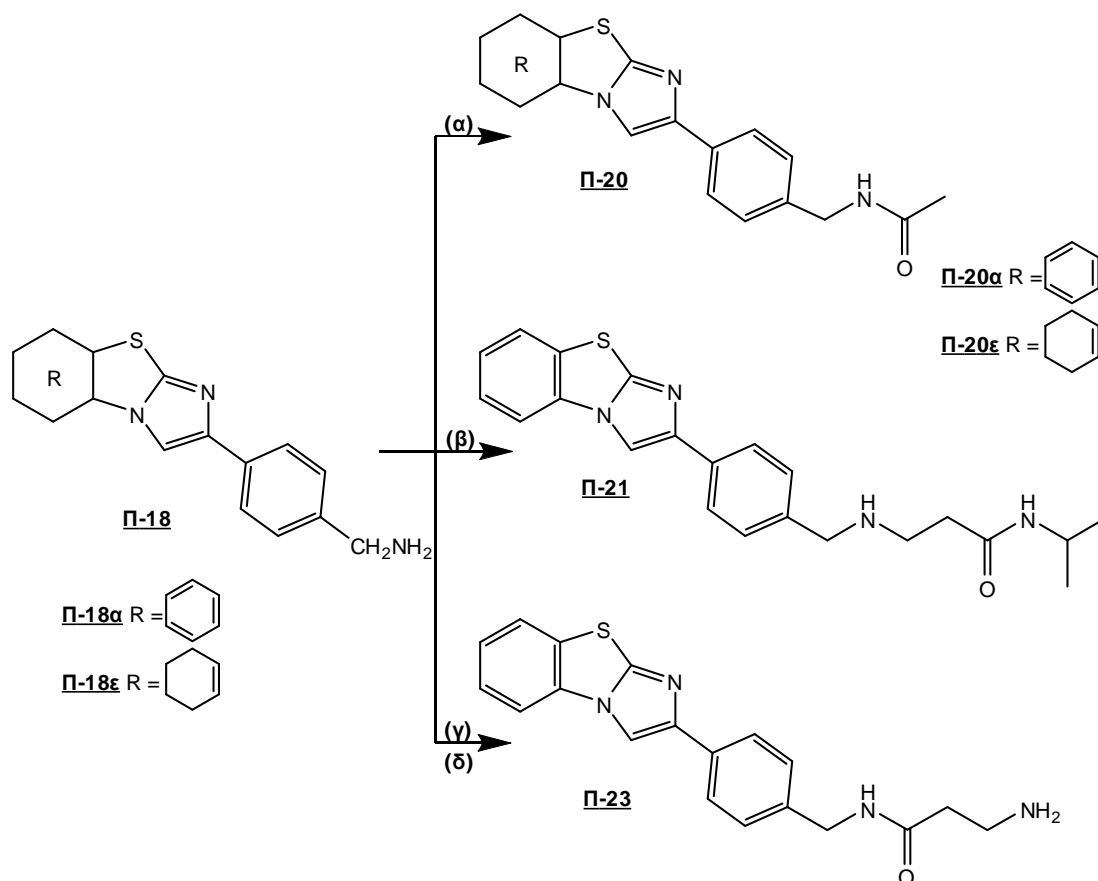


Φάσμα 4.2. ^1H NMR των ενώσεων **II-16a** (DMSO) και **II-18a** (DMSO).



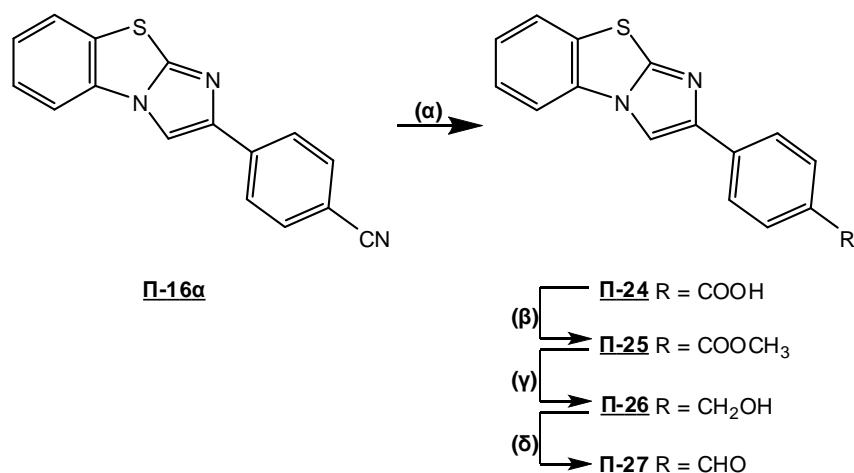
Σχήμα 4.2. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) DIBALH, τολουόλιο, reflux; (β) Fe, H₂SO₄, H₂O, 90 °C.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η υποκατάσταση στην παρα-θέση του βενζολικού δακτυλίου προκρίθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση ποικίλων αναλόγων τους, σε συνάρτηση με την αύξηση της υδροφιλικότητάς τους. Έτσι, οι πρωτοταγείς αμίνες **Π-18α** και **Π-18ε** με αντίδραση με ακετυλοχλωρίδιο μετατράπηκαν στα αμίδια **Π-20α** και **Π-20ε** σε πολύ καλές αποδόσεις (85%) (Σχήμα 4.3). Το ανάλογο **Π-21** συντέθηκε μέσω της αζα-Michael προσθήκης του *N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιου σε H₂O, ενώ το ανάλογο **Π-23** παρασκευάστηκε σε 2 στάδια, όπου το πρώτο αφορά τη σύζευξη της αμίνης **Π-18α** με την *N*-Boc-β-αλανίνη και το δεύτερο στάδιο την αποπροστασία της Boc ομάδας (Σχήμα 4.3). Τέλος, μελετήθηκε η μετατροπή της αμινομάδας στο μόριο **Π-18α** σε άλλες χαρακτηριστικές ομάδες όπως είναι η αλκοόλη **Π-26** και η αλδεΐδη **Π-27** (Σχήμα 4.4). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Η πρώτη αφορούσε τη μετατροπή του νιτριλίου **Π-16α** στην αλδεΐδη **Π-27** και στη συνέχεια την αναγωγή της αλδεΐδης στην αλκοόλη **Π-26**, ενώ η δεύτερη προσέγγιση, η οποία απαιτεί περισσότερα στάδια, αφορούσε πρώτα στο σχηματισμό της επιθυμητής αλκοόλης **Π-26** και στη συνέχεια την οξείδωσή της προς την αντίστοιχη αλδεΐδη **Π-27**.



Σχήμα 4.3. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) ακετυλοχλωρίδιο, Et₃N, DMF; (β) *N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιο, H₂O, reflux; (γ) *N*-Boc-β-αλανίνη, HATU, DIPEA; (δ) TMSCl, MeOH.

Παρόλες τις προσπάθειες που καταβλήθηκαν, η μετατροπή του νιτριλίου **Π-16α** στην αλδεΐδη **Π-27** με τη χρήση του αντιδραστηρίου DIBALH σε διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικούς διαλύτες αποδείχθηκε ανεπιτυχής. Έτσι, το νιτρίλιο **Π-16α** μετατράπηκε πρώτα στο οξύ **Π-24** (Σχήμα 4.4) σε αλκαλικό περιβάλλον σχεδόν ποσοτικά (96%) και στη συνέχεια με LiAlH₄ ανάχθηκε στην αλκοόλη **Π-26**. Η απόδοση της αναγωγής κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα (~10%), με αποτέλεσμα να προτιμηθεί η μετατροπή του οξέος **Π-24** σε μεθυλεστέρα **Π-25** και στη συνέχεια η αναγωγή του εστέρα στην αλκοόλη **Π-26** (Σχήμα 4.4). Τέλος η αλκοόλη **Π-26** οξειδώθηκε στην αλδεΐδη **Π-27** με τη χρήση του αντιδραστηρίου Dess-Martin σε διαλύτη DCM σχεδόν ποσοτικά (98%) (Σχήμα 4.4).

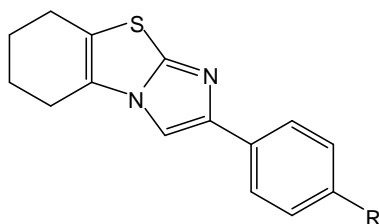


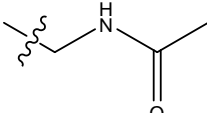
Σχήμα 4.4. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) NaOH, EtOH, H₂O, reflux; (β) τριμεθυλσυλλδιαζομεθάνιο, MeOH; (γ) LiAlH₄, THF, 0 °C; (δ) Dess-Martin, DCM.

4.2.2 Βιολογική δράση

Για την αποτίμηση της βιολογικής δράσης των νέων μορίων που συντέθηκαν, προσδιορίστηκε η *in vitro* δραστηρότητά τους κατά της καρκινικής σειράς IGROV-1 (human ovarian carcinoma cell line). Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα των βιολογικών μελετών παρουσιάζονται στους Πίνακες 4.2 και 4.3. Συγκεκριμένα, τα μόρια που φέρουν το βενζοθειαζολικό δακτύλιο είναι δραστικότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μόρια που φέρουν τον τετραϋδροβενζοθειαζολικό δακτύλιο. Από τα τετραϋδροβενζοθειαζολικά παράγωγα τη μεγαλύτερη βιολογική δράση έδειξε η αμίνη **Π-19ζ** με IC₅₀ = 5 μM, ενώ η αντίστοιχή της **Π-19β** παρουσιάζει IC₅₀ = 1 μM. Από τα μόρια που φέρουν τον τετραϋδροβενζοθειαζολικό δακτύλιο τη μεγαλύτερη βιολογική δράση παρουσίασαν το νιτρίλιο **Π-16α** και η αμίνη **Π-18α** με IC₅₀ = 0.01 μM. Μεγάλη επίσης βιολογική δράση έδειξαν τα ανάλογα **Π-16γ** και **Π-16δ** με IC₅₀ = 0.1 μM, ενώ επίσης αρκετά καλή βιολογική δράση έδειξε το υδροχλωρικό αλάτι της αμίνης **Π-18α** με IC₅₀ = 0.33 μM. Τέλος, τα βενζοϊμιδαζολικά ανάλογα **Π-16θ** και **Π-16ι** παρουσίασαν καλή βιολογική δράση με IC₅₀ 7.2 και 4.5 μM αντίστοιχα.

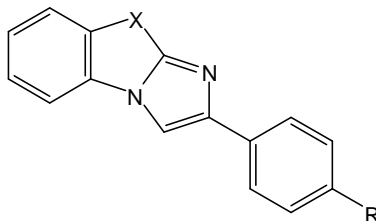
Πίνακας 4.2. Δραστηκότητα των τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειάζολο παραγώγων στην καρκινική σειρά IGROV-1.

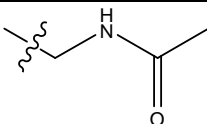


Ένωση	R	IC ₅₀ * (μM)
<u>Π-16ε</u>	CN	10
<u>Π-18ε</u>	CH ₂ NH ₂	10
<u>Π-18ε·HCl</u>		29
<u>Π-19ζ</u>	NH ₂	5
<u>Π-19ζ·HCl</u>		18
<u>Π-20ε</u>		30

*IC₅₀ = Συγκέντρωση της ένωσης για τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50%.

Πίνακας 4.3. Δραστηκότητα των ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειάζολο παραγώγων στην καρκινική σειρά IGROV-1.



Ένωση	X	R	IC ₅₀ * (μM)
<u>Π-16α</u>	S	CN	0.01
<u>Π-16β</u>	S	NO ₂	3
<u>Π-16γ</u>	S	Br	0.1
<u>Π-16δ</u>	S	CH ₃	0.1
<u>Π-16θ</u>	NCH ₃	CN	7.2
<u>Π-16ι</u>	NCH ₂ CH ₃	CN	4.5
<u>Π-18α</u>	S	CH ₂ NH ₂	0.01
<u>Π-18α•HCl</u>			0.33
<u>Π-19β</u>	S	NH ₂	1
<u>Π-19β•HCl</u>			3
<u>Π-20α</u>	S		8
<u>Π-26</u>	S	CH ₂ OH	5.4

*IC₅₀ = Συγκέντρωση της ένωσης για τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά 50%.

Βιβλιογραφία

1. Strachan, T.; Read, A. P. *Human Molecular Genetics 2. Ch. 18, Cancer Genetics* **1999**.
2. Bell, S.; Klein, C.; Muller, L.; Hansen, S.; Buchner, J. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 917-927.
3. El-Deiry, W. S.; Kern, S. E.; Pietenpol, J. A.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *Nature Genet.* **1992**, *1*, 45-49.
4. Momand, J.; Zambetti, G. P.; Olson, D. C.; George, D.; Levine, A. J. *Cell* **1992**, *69*, 1237-1245.
5. Vousden, K. H.; Lu, X. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*.
6. Grutter, M. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 649-655.
7. Schuler, M.; Green, D. R. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 684-688.
8. Padmakumar, V. C.; Aleem, E.; Berthet, C.; Hilton, M. B.; Kaldis, P. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 2582-2593.
9. Zhu, Y.; Alvarez, C.; Doll, R.; Kurata, H.; Schebye, X. M.; Parry, D.; Lees, E. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 6268-6277.
10. Winters, Z. E.; Ongkeko, W. M.; Harris, A. L.; Norbury, C. J. *Oncogene* **1998**, *17*, 673-684.
11. Hung, H.; Pierce, C. K. H.; Chee, S. K.; Lawrence, P.; Hung, N. T. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *204*, 785-791.
12. Jin, S.; Tong, T.; Fan, W.; Fan, F.; Antinore, M. J.; Zhu, X.; Mazzacurati, L.; Li, X.; Petrik, K. L.; Rajasekaran, B.; Wu, M.; Zhan, Q. *Oncogene* **2002**, *21*, 8696-8704.
13. Zhan, Q.; Antinore, M. J.; Wang, X. W.; Carrier, F.; Smith, M. L.; Harris, C. C.; Fornace, A. J. *Oncogene* **1999**, *18*, 2892-2900.
14. Horie-Inoue, K.; Inoue, S. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 235-239.
15. Hermeking, H.; Benzinger, A. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 183-192.
16. Zhou, B. B. S.; Elledge, S. J. *Nature* **2000**, *408*, 433-439.
17. Hwang, B. J.; Ford, J. M.; Hanawalt, P. C.; Chu, G. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 424-428.
18. Tanaka, H.; Arakawa, H.; Yamaguchi, T.; Shiraishi, K.; Fukuda, S.; Matsui, K.; Takei, Y.; Nakamura, Y. *Nature* **2000**, *404*, 42-49.
19. Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 677.
20. Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J. M.; Lane, W. S.; Kaelin, W. G. *J. Science* **2001**, *292*, 464-468.
21. Rempe, D. A.; Lelli, K. M.; Vangeison, G.; Johnson, R. S.; Federoff, H. J. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16187-16201.
22. Pal, S.; Datta, K.; Mukhopadhyay, D. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6952-6957.
23. Ueba, T.; Nosaka, T.; Takahashi, J. A.; Shibata, F.; Florkiewicz, R. Z.; Vogelstein, B.; Oda, Y.; Kikuchi, H.; Hatanaka, M. *Med. Sci.* **1994**, *91*, 9009-9013.
24. Sherif, Z. A.; Nakai, S.; Pirolo, K. F.; Rait, A.; Chang, E. H. *Cancer Gene Ther.* **2001**, *8*, 771-782.
25. Subbaramaiah, K.; Altorki, N.; Chung, W. J.; Mestre, J. R.; Sampat, A.; Dannenberg, A. J. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10911-10915.
26. Tsujii, M.; Kawano, S.; Tsuji, S.; Sawaoka, H.; Hori, M.; DuBois, R. N. *Cell* **1998**, *93*, 705-716.

27. Williams, C. S.; Tsujii, M.; Reese, J.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1589-1594.
28. Good, D. J.; Polverini, P. J.; Rastinejad, F.; Beau, M. M. L.; Lemons, R. S.; Frazier, W. A.; Bouck, N. P. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6624-6628.
29. Tolsma, S. S.; Volpert, O. V.; Good, D. J.; Frazier, W. A.; Polverini, P. J.; Bouck, N. *J. Cell. Biol.* **1993**, *122*, 497-511.
30. Slack, J. L.; Bornstein, P. *Cell Growth Differ.* **1994**, *5*, 1373-1380.
31. Tikhonenko, A. T.; Black, D. J.; Linial, M. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30741-30747.
32. Janz, A.; Seignani, C.; Kenyon, K.; Ngo, C. V.; Tikhonenko, A. T. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2268-2275.
33. Watnick, R. S.; Cheng, Y.-N.; Rangarajan, A.; Ince, T. A.; Weinberg, A. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 219-231.
34. Rak, J.; Mitsushashi, Y.; Sheehan, C.; Tamir, A.; Vilorio-Petit, A.; Filmus, J.; Mansour, S. J.; Ahn, N. G.; Kerbel, R. S. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 490-498.
35. Jimenez, B.; Volpert, O. V.; Crawford, S. E.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L.; Bouck, N. *Nature Med.* **2000**, *6*, 41-48.
36. Hsu, S. C.; Volpert, O. V.; Steck, P. A.; Mikkelsen, T.; Polverini, P. J.; Rao, S.; Chou, P.; Bouck, N. P. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5684-5691.
37. Crawford, S. E.; Stellmach, V.; Murphy-Ullrich, J. E.; Ribeiro, S. M. F.; Lawler, J.; Hynes, R. O.; Boivin, G. P.; Bouck, N. *Cell* **1998**, *93*, 1159-1170.
38. Derynck, R.; Akhurst, R. J.; Balmain, A. *Nature Genet.* **2001**, *29*, 117-129.
39. Soussi, T. *Oncogene* **2007**, *26*, 2145-2156.
40. Miao, W.-M.; Seng, W. L.; Duquette, M.; Lawler, P.; Laus, C.; Lawler, J. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7830-7839.
41. Brantley, D. M.; Cheng, N.; Thompson, E. J.; Lin, Q.; Brekken, R. A.; Thorpe, P. E.; Muraoka, R. S.; Cerretti, D. P.; Pozzi, A.; Jackson, D.; Lin, C.; Chen, J. *Oncogene* **2002**, *21*, 7011-7026.
42. Dohn, M.; Jiang, J.; Chen, X. *Oncogene* **2001**, *20*, 6503-6515.
43. Pasquale, E. B. *Nature Rev.* **2005**, *6*, 462-476.
44. Dodelet, V. C.; Pasquale, E. B. *Oncogene* **2000**, *19*, 5614-5619.
45. Teodoro, J. G.; Parker, A. E.; Zhu, X.; Green, M. R. *Science* **2006**, *313*, 968-971.
46. Nissia, R.; Bohling, T.; Autio-Harmanen, H. *Acta Histochem.* **2004**, *106*, 111-121.
47. O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; G, G. V.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R.; Folkman, J. *Cell* **1997**, *88*, 277-285.
48. Ramchandran, R.; Dhanabal, M.; Volk, R.; Waterman, M. J.; Segal, M.; Lu, H.; Knebelmann, B.; Sukhatme, V. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 735-739.
49. Colorado, P. C.; Torre, A.; Kamphaus, G.; Maeshima, Y.; Hopfer, H.; Takahashi, K.; Volk, R.; Zamborsky, E. D.; Herman, S.; Sarkar, P. K.; Ericksen, M. B.; Dhanabal, M.; Simons, M.; Post, M.; Kufe, D. W.; Weichselbaum, R. R.; Sukhatme, V. P.; Kalluri, R. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2520-2526.
50. Kamphaus, G. D.; Colorado, P. C.; Panka, D. J.; Hopfer, H.; Ramchandran, R.; Torre, A.; Maeshima, Y.; Mier, J. W.; Sukhatme, V. P.; Kalluri, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1209-1215.

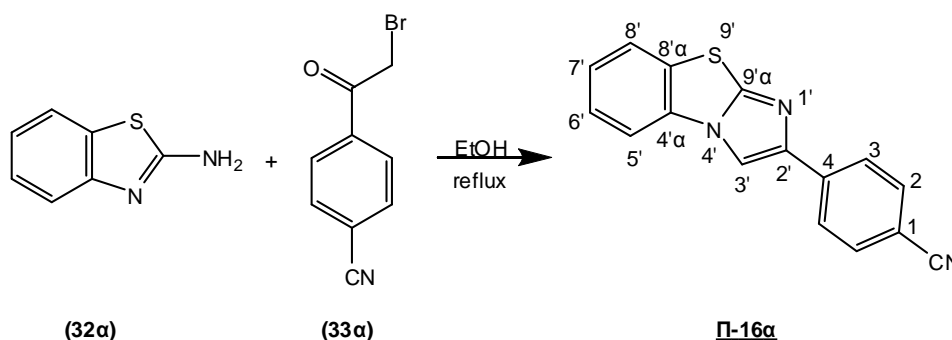
51. Maeshima, Y.; Colorado, P. C.; Torre, A.; Holthaus, K. A.; Grunkemeyer, J. A.; Ericksen, M. B.; Hopfer, H.; Xiao, Y.; Stillman, I. E.; Kalluri, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21340-21348.
52. Petitclerc, E.; Boutaud, A.; Prestayko, A.; Xu, J.; Sado, Y.; Ninomiya, Y.; Sarras, M. P. J.; Hudson, B. G.; Brooks, P. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8051-8061.
53. Xu, R.; Yao, Z. Y.; Xin, L.; Zhang, Q.; Li, T. P.; Gan, R. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 264-268.
54. Hainaut, P.; Hollstein, M. *Adv. Cancer Res.* **2000**, *77*, 81-137.
55. Beroud, C.; Soussi, T. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 200-204.
56. Levine, A. J. *Cell* **1997**, *88*, 323-331.
57. Blandino, G.; Levine, A. J.; Oren, M. *Oncogene* **1999**, *18*, 477-485.
58. Sigal, A.; Rotter, V. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6788-6793.
59. Como, C. J. D.; Urist, M. J.; Babayan, I.; Drobnjak, M.; Hedvat, C. V.; Teruya-Feldstein, J.; Pohar, K.; Hoos, A.; Cordon-Cardo, C. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 494-501.
60. Strano, S.; Fontemaggi, G.; Costanzo, A.; Rizzo, M. G.; Monti, O.; Baccarini, A.; Del-Sal, G.; Levrero, M.; Sacchi, A.; Oren, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18817-18826.
61. Gaiddon, C.; Lokshin, M.; Ahn, J.; Zhang, T.; Prives, C. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 1874-1887.
62. Mantovani, R. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*, 1135-1143.
63. DiAgostino, S.; Strano, S.; Emiliozzi, V.; Zerbini, V.; Mottolese, M.; Sacchi, A.; Blandino, G.; Piaggio, G. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 191-202.
64. Browder, T.; Butterfield, C. E.; Kräling, B. M.; Shi, B.; Marshall, B.; O'Reilly, M. S.; Folkman, J. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1878-1886.
65. Paris, F.; Fuks, Z.; Kang, A.; Capodici, P.; Juan, G.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Cordon-Cardo, C.; Kolesnick, R. *Science* **2001**, *293*.
66. Gudkov, A. V.; Komarova, E. A. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 117-129.
67. Roger, A.; Popliker, M.; Webb, C. G.; Oren, M. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 2851-2855.
68. Komarova, E. A.; Chernov, M. V.; Franks, R.; Wang, K.; Armin, G.; Zelnick, C. R.; Chin, D. M.; Bacus, S. S.; Stark, G. R.; Gudkov, A. V. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1391-1400.
69. Hasegawa, M.; Zhang, Y.; Nübe, H.; Terry, N. H. A.; Meistrich, M. L. *Radiat. Res.* **1998**, *149*, 263-270.
70. Tron, V. A.; Trotter, M. J.; Tang, L.; Krajewska, M.; Reed, J. C.; Ho, V. C.; Li, G. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 579-585.
71. Westphal, C. H.; Hoyes, K. P.; Canman, C. E.; Huang, X.; Kastan, M. B.; Hendry, J. H.; Leder, P. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5637-5639.
72. Westphal, C. H.; Rowan, S.; Schmaltz, C.; Elson, A.; Fisher, D. E.; Leder, P. *Nature Genet.* **1997**, *16*, 397-401.
73. Komarova, E. A.; Gudkov, A. V. *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8*, 389-400.
74. Komarov, P. G.; Komarova, E. A.; Kondratov, R. V.; Christov-Tselkov, K.; Coon, J. S.; Chernov, M. V.; Gudkov, A. V. *Science* **1999**, *285*, 1733-1737.
75. Walton, M. I.; Wilson, S. C.; Hardcastle, I. R.; Mirza, A. R.; Workman, P. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1367-1377.
76. Culmsee, C.; Zhu, X.; Yu, Q. S.; Chan, S. L.; Camandola, S.; Guo, Z.; Greig, N. H.; Mattson, M. P. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 220-228.

-
77. Zhu, X.; Yu, Q.-S.; Cutler, R. G.; Culmsee, C. W.; Holloway, H. W.; Lahiri, D. K.; Mattson, M. P.; Greig, N. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5090-5097.
 78. Pietrancosta, N.; Moumen, A.; Dono, R.; Lingor, P.; Planchamp, V.; Lamballe, F.; Bahr, M.; Kraus, J.-L.; Maina, F. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3645-3652.
 79. Barchechath, S. D.; Tawatao, R. I.; Corr, M.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409-6422.
 80. Passarella, D.; Comi, D.; Vanossi, A.; Paganini, G.; Colombo, F.; Ferrante, L.; Zuco, V.; Danieli, B.; Zunino, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6358-6363.
 81. King, L. C.; Hlavacek, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 3722.

4.3 Πειραματικό Μέρος

4.3.1 Γενική μέθοδος παρασκευής ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολο παραγώγων **Π-16** και κετονών **Π-17**

4-(Ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζονιτρίλιο **Π-16α**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
35%	C ₁₆ H ₉ N ₃ S	275.33	–	R _f = 0.38 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

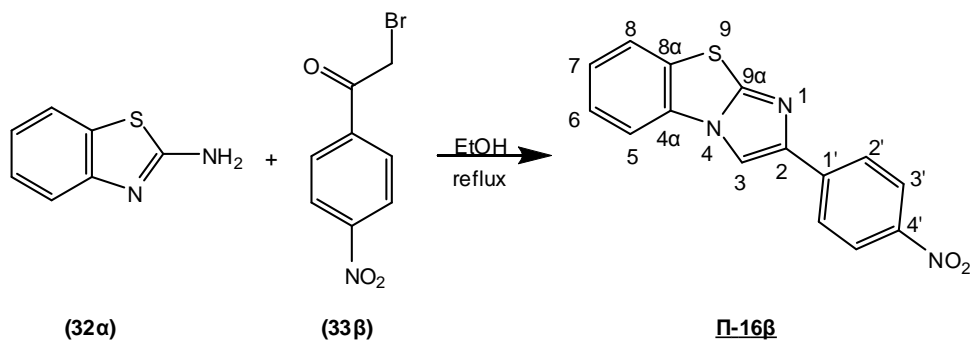
Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του 2-αμινοβενζοθειαζολίου **32α** (0.93 g, 6.0 mmol) σε EtOH (92 mL), προστέθηκε 2-βρωμο-4'-κυανοακετοφαινόνη **33α** (1.5 g, 6.6 mmol) και το διάλυμα αναδεύτηκε για 90 λεπτά σε reflux. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C και το σχηματιζόμενο στερεό, διηθήθηκε υπό κενό και πλύθηκε με EtOH για να δώσει το προϊόν **Π-16α** ως αφρό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.09 (s, 1H, H-3'), 7.98 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-3), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 7.70 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8'), 7.51 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 7.41 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-7').

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 149.7 (C-9'α), 146.4 (C-2'), 138.9 (C-4), 133.2 (C-2), 132.6 (C-4'α), 131.1 (C-8'α), 127.1 (C-6'), 126.2 (C-3), 126.1 (C-7'), 125.2 (C-8'), 119.6 (CN), 113.5 (C-5'), 111.3 (C-1), 109.1 (C-3').

EI/MS: 275 (M).

2-(4'-Νιτροφαινυλ)ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζόλιο **Π-16β***

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
26%	C ₁₅ H ₉ N ₃ O ₂ S	295.32	—	R _f = 0.25 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

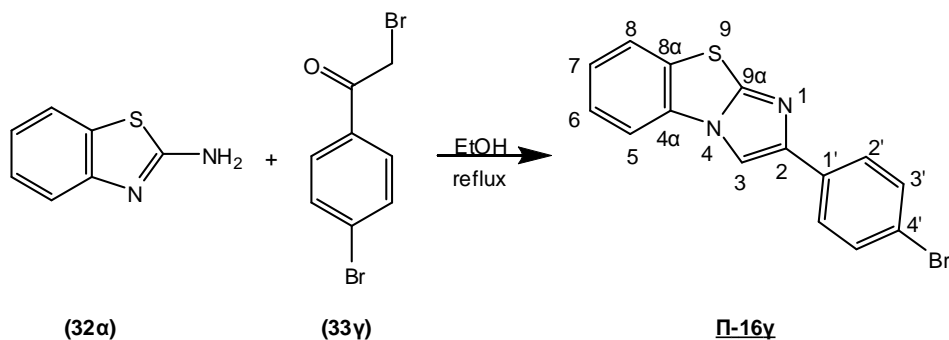
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-16β** παρασκευάστηκε από το 2-αμινοβενζοθειαζόλιο **32α** και την 2-βρωμο-4'-νιτροακετοφαινόνη **33β** ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 9.12 (1H, s, H-3), 8.32 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, H-3'), 8.13 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, H-2'), 8.08 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5), 8.02 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-8), 7.63 (1H, t, *J* = 8.1 Hz, H-6), 7.49 (1H, t, *J* = 8.1 Hz, H-7).

ΕΙ/MS: 295 (M).

*Το μόριο **Π-16β** βρίσκεται σε πατέντα.

2-(4'-Βρωμοφαινυλ)ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζόλιο **Π-16γ***

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
23%	C ₁₅ H ₉ BrN ₂ S	329.21	—	R _f = 0.24 Hex/EtOAc 7:3

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-16γ** παρασκευάστηκε από το 2-αμινοβενζοθειαζόλιο **32α** και την 2,4'-διβρωμοακετοφαινόνη **33γ** ως κίτρινο στερεό.

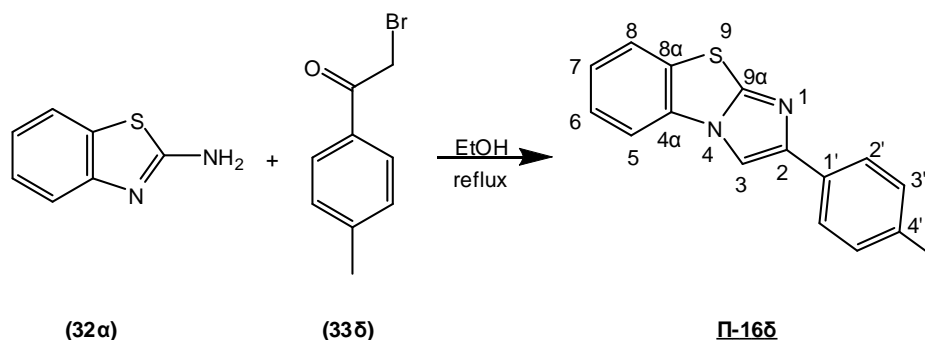
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.86 (s, 1H, H-3), 8.06 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-5), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-2'), 7.64 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-3'), 7.58 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-6), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-7).

¹³C NMR (DMSO): δ = 148.7 (C-9α), 146.1 (C-2), 134.2 (C-4'), 132.8 (C-2'), 130.4 (C-4α), 129.6 (C-6), 127.9 (C-3'), 127.5 (C-8α), 126.5 (C-7), 126.2 (C-8), 121.2 (C-1'), 114.5 (C-5), 110, 8 (C-3).

EI/MS: 329 (M).

*Barchechath, S. D.; Tawatao, R. I.; Corr, M.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409-6422.

2-(4'-Μεθυλφαινυλ)ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζόλιο **Π-16δ***

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
23%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ S	264.34	—	R _f = 0.28 Hex/EtOAc 7:3

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-16δ** παρασκευάστηκε από το 2-αμινοβενζοθειαζόλιο **32α** και την 2-βρωμο-4'-μεθυλακετοφαινόνη **33δ** ως κίτρινο στερεό.

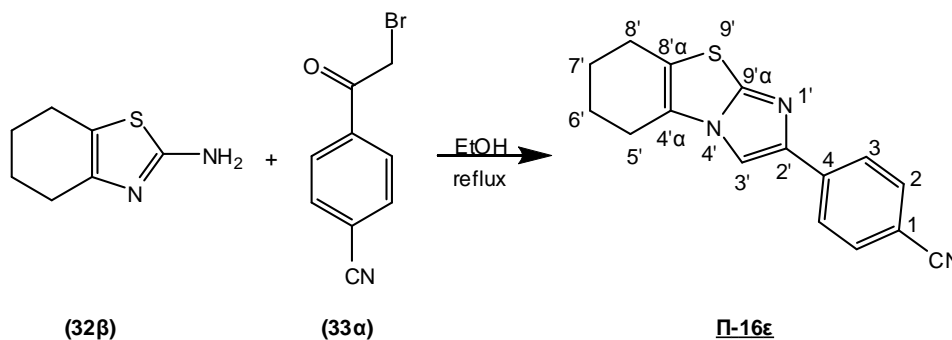
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.93 (s, 1H, H-3), 8.14 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 8.09 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-8), 7.75 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-2'), 7.64 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-6), 7.51 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-7), 7.30 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-3'), 2,34 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO) δ = 148.7 (C-9α), 144.4 (C-2), 138.4 (C-4'), 138.0 (C-1'), 133.6 (C-4α), 130.9 (C-8α), 130.2 (C-3'), 127.7 (C-2'), 127.6 (C-6), 126.7 (C-7), 126.3 (C-5), 114.6 (C-8), 109.8 (C-3), 21.95 (CH₃).

ΕΙ/MS: 264 (M).

* Barchechath, S. D.; Tawatao, R. I.; Corr, M.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409-6422.

4-(5',6',7',8'-Τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζονιτρίλιο **Π-16ε***

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
30%	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ S	279.36	—	R _f = 0.15 Hex/EtOAc 7:3

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-16ε** παρασκευάστηκε από το 2-αμινο-4,5,6,7-τετραϋδροβενζοθειαζόλιο **32β** και την 2-βρωμο-4'-κυανοακετοφαινίνη **33α** ως λευκό στερεό.

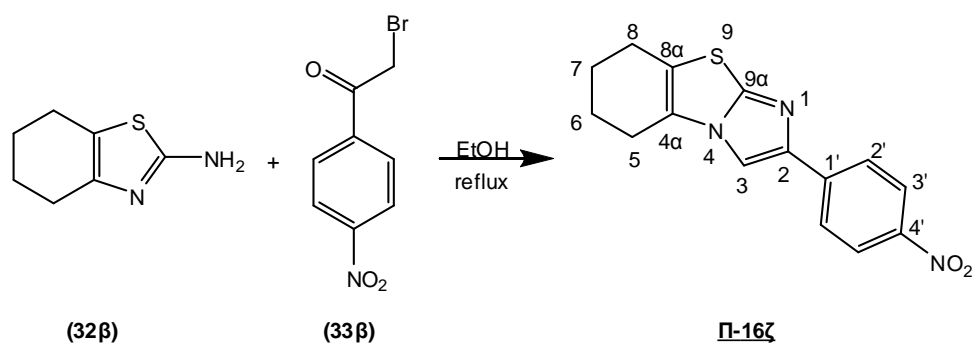
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.42 (s, 1H, H-3'), 8.00 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, H-3), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, H-2), 2.72-2.68 (m, 4H, H-5' και H-8'), 1.90-1.86 (m, 4H, H-6' και H-7').

¹³C NMR (DMSO): δ = 147.8 (C-9'α), 143.4 (C-2'), 139.1 (C-4), 133.1 (C-2), 126.9 (C-4'α), 125.4 (C-3), 122.4 (C-8'α), 119.6 (CN), 110.4 (C-1), 109.3 (C-3'), 24.27 (C-5'), 23.05 (C-7'), 22.54 (C-8'), 21.52 (C-6').

EI/MS: 279 (M).

*Barchechath, S. D.; Tawatao, R. I.; Corr, M.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409-6422.

2-(4'-Νιτροφαινυλ)-5,6,7,8-τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζόλιο **Π-16ζ***

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
40%	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	299.35	—	R _f = 0.28 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

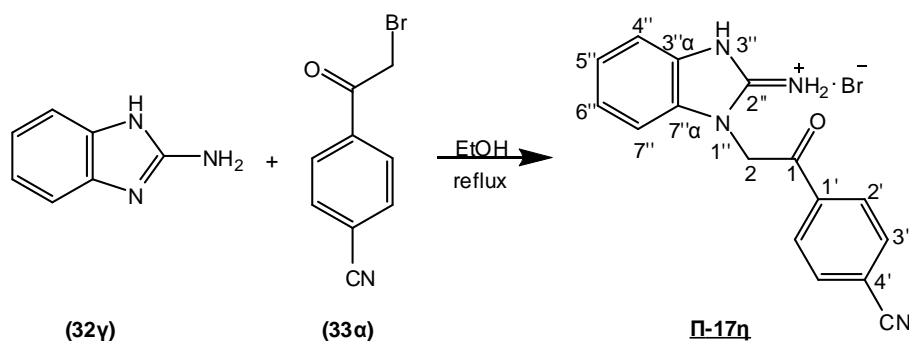
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-16ζ** παρασκευάστηκε από το 2-αμινο-4,5,6,7-τετραϋδροβενζοθειαζόλιο **32β** και την 2-βρωμο-4'-νιτροακετοφαινόνη **33β** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.53 (s, 1H, H-3), 8.27 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H-2'), 8.09 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, H-3'), 2.72-2.70 (m, 4H, H-5 και H-8), 1.91-1.89 (m, 4H, H-6 και H-7).
 EI/MS: 299 (M).

*Barchechath, S. D.; Tawatao, R. I.; Corr, M.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409-6422.

Υδροβρωμικό αλάτι της 1-(4'-κυανοφαινυλ)-2-(2''-υδρο-2''-ιμινο-1*H*-βενζοϊμιδαζολ-1''-yl) αιθανόνης **Π-17η**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
60%	C ₁₆ H ₁₃ BrN ₄ O	357.20	–	R _f = –

Μέθοδος Παρασκευής:

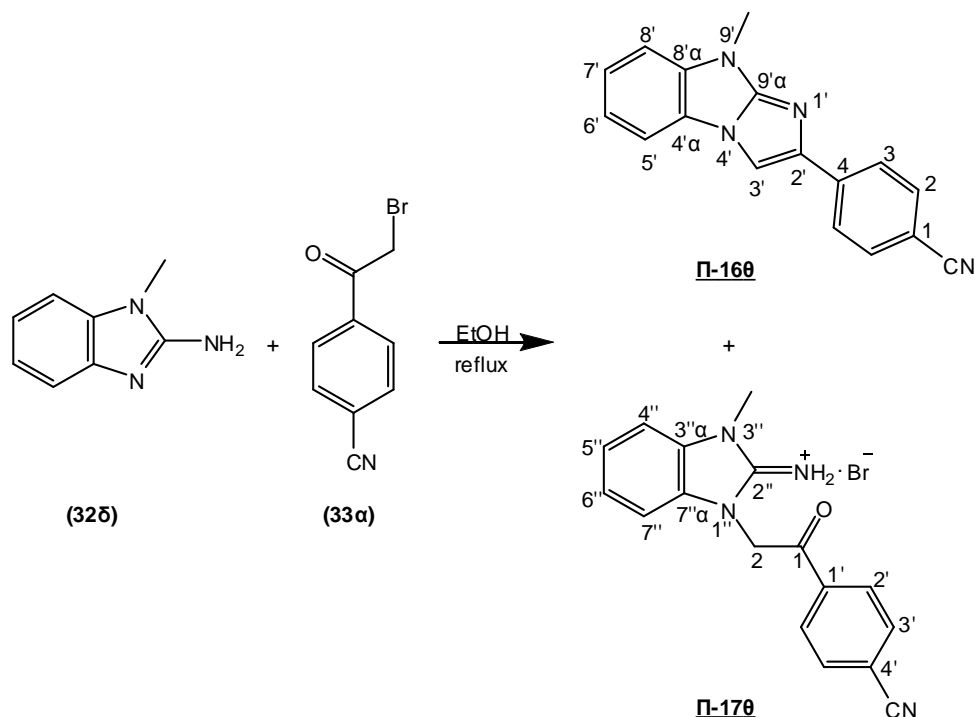
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-17η** παρασκευάστηκε από το 2-αμινοβενζοϊμιδαζόλιο **32γ** και την 2-βρωμο-4'-κυανοακετοφαινόνη **33α** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.95 (s, 2H, NH₂), 8.28 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-2'), 8.19 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-3'), 7.68 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-7''), 7.66 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-4''), 7.29 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-5''), 7.27 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-6''), 6.08 (s, 2H, CH₂CO).
 EI/MS: 277 (M – HBr).

4-(9'-Μεθυλ-9H-ιμιδαζο[1,2-a]βενζοϊμιδαζολ-2'-yl) βενζονιτρίλιο **Π-160**

και

Υδροβρωμικό αλάτι της 1-(4'-κυανοφαινυλ)-2-(2'',3''-διυδρο-2''-ιμινο-3''-μεθυλ-1H-βενζοϊμιδαζολ-1''-yl) αιθανόνης **Π-170****Μέθοδος Παρασκευής:**

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-160** και η κετόνη **Π-170** παρασκευάστηκαν από το 1-μεθυλ-2-αμινοβενζοϊμιδαζόλιο **32δ** και την 2-βρωμο-4'-κυανοακετοφαινόνη **33α** ύστερα από καθαρισμό με FCC με αρχικό μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και κατόπιν με MeOH και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκά στερεά.

Π-160:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
5%	C ₁₇ H ₁₂ N ₄	272.30	–	R _f = 0.19 Hex/EtOAc 1:1

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.44 (s, 1H, H-3'), 8.03 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-3), 7.83 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-2), 7.78 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-5'), 7.56 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-8'), 7.37 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-7'), 7.24 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-6'), 3.79 (s, 3H, CH₃N).

¹³C NMR (DMSO): δ = 150.6 (C-9' α), 141.9 (C-2'), 140.1 (C-4), 136.6 (C-8' α), 133.1 (C-2), 125.4 (C-3), 124.2 (C-7'), 124.1 (C-4' α), 120.7 (C-6'), 119.7 (CN), 111.9 (C-5'), 110.8 (C-8'), 108.8 (C-1), 106.1 (C-3'), 29.54 (CH₃N).

EI/MS: 272 (M).

Π-170:

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
75%	C ₁₇ H ₁₅ BrN ₄ O	371.23	–	R _f = –

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

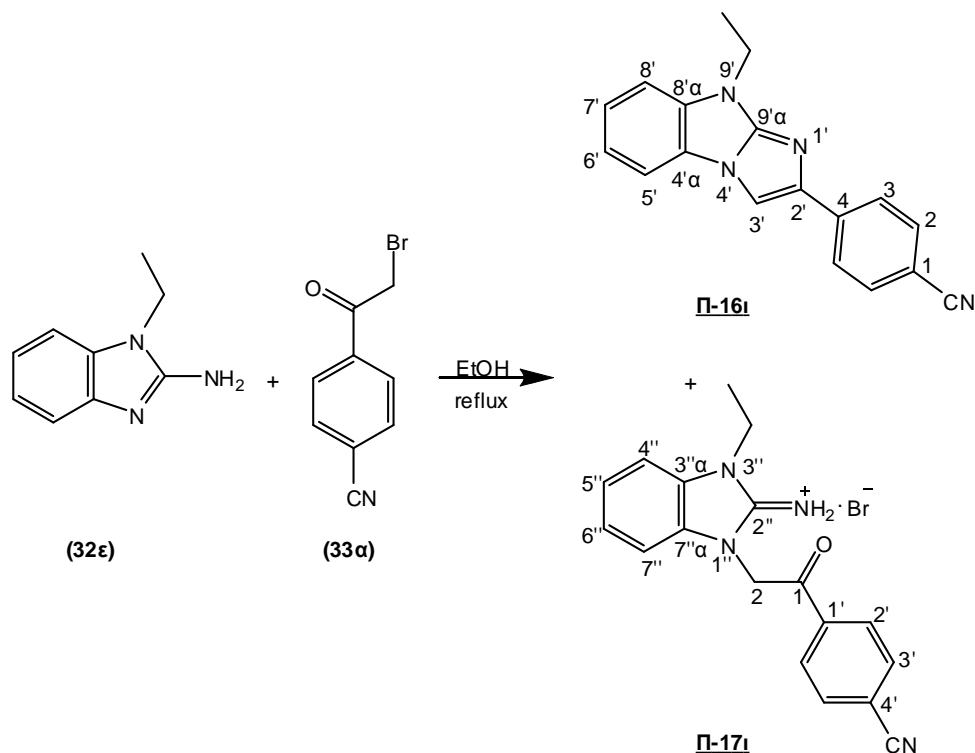
¹H NMR (DMSO): δ = 8.90 (s, 2H, NH₂), 8.26 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-2'), 8.16 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H-3'), 7.66 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-7''), 7.63 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H-4''), 7.38 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-5''), 7.31 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-6''), 6.04 (s, 2H, CH₂CO), 3.75 (s, 3H, CH₃N).

¹³C NMR (DMSO): δ = 192.0 (CH₂CO), 151.8 (C-2''), 138.5 (C-1'), 133.9 (C-3'), 131.3 (C-3'' α), 131.2 (C-7'' α), 130.2 (C-2'), 124.9 (C-5''), 124.7 (C-6''), 119.1 (CN), 117.1 (C-4'), 111.7 (C-7''), 111.5 (C-4''), 51.50 (CH₂CO), 30.87 (CH₃N).

EI/MS: 291 (M – HBr).

4-(9'-Αιθυλ-9H-ιμιδαζο[1,2-*a*]βενζοϊμιδαζολ-2'-yl) βενζονιτρίλιο **Π-16i**

και

Υδροβρωμικό αλάτι της 1-(4'-κυανοφαινυλ)-2-(2'',3''-διυδρο-2''-ιμινο-3''-αιθυλ-1H-βενζοϊμιδαζολ-1''-yl) αιθανόνης **Π-17i****Μέθοδος Παρασκευής:**

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-16i** και η κετόνη **Π-17i** παρασκευάστηκαν από το 1-αιθυλ-2-αμινοβενζοϊμιδαζόλιο **32ε** και την 2-βρωμο-4'-κυανοακετοφαινόνη **33α** ύστερα από καθαρισμό με FCC με αρχικό μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και κατόπιν με MeOH και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο και λευκό στερεό αντίστοιχα.

Π-16i:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
20	C ₁₈ H ₁₄ N ₄	286.33	–	R _f = 0.32 Hex/EtOAc 1:1

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): $\delta = 8.80$ (s, 1H, H-3'), 8.05 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H-3), 7.99 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H-2), 7.98 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 7.84 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-8'), 7.53 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-7'), 7.43 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 4.46 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH₃CH₂N), 1.47 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃CH₂N).

¹³C NMR (DMSO): $\delta = 148.1$ (C-9'α), 136.0 (C-2' και C-4), 135.7 (C-8'α), 134.1 (C-2), 126.5 (C-3), 126.1 (C-7'), 124.8 (C-4'α), 123.0 (C-6'), 119.9 (CN), 113.5 (C-5'), 112.6 (C-8'), 111.1 (C-1), 108.0 (C-3'), 38.90 (CH₃CH₂N), 14.59 (CH₃CH₂N).

EI/MS: 286 (M).

Π-17t:

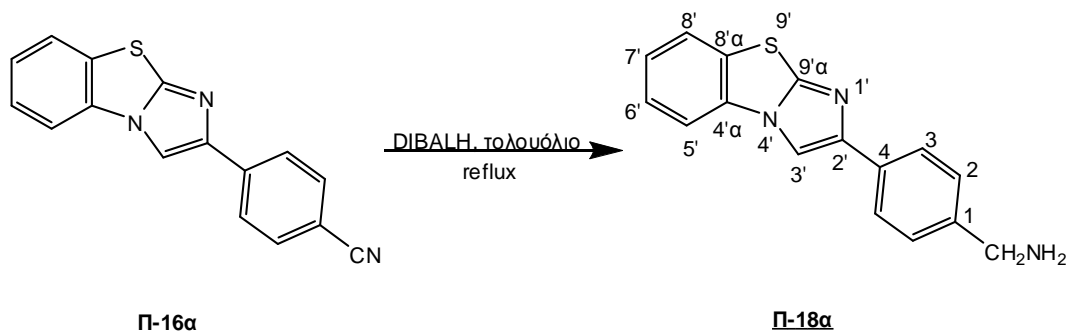
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
60%	C ₁₈ H ₁₇ BrN ₄ O	385.26	–	R _f = –

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): $\delta = 8.96$ (s, 2H, NH₂), 8.26 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-2'), 8.16 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-3'), 7.69 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-4''), 7.68 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-7''), 7.38 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-6''), 7.32 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-5''), 6.06 (s, 2H, CH₂CO), 4.32 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, CH₃CH₂N), 1.34 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, CH₃CH₂N).

¹³C NMR (DMSO): $\delta = 191.4$ (CH₂CO), 150.3 (C-2''), 137.8 (C-1'), 133.3 (C-3'), 130.7 (C-7''α), 129.6 (C-2'), 129.5 (C-3''α), 124.3 (C-5''), 124.1 (C-6''), 118.6 (CN), 116.4 (C-4'), 111.2 (C-7''), 110.8 (C-4''), 50.88 (CH₂CO), 38.41 (CH₃CH₂N), 13.47 (CH₃CH₂N).

EI/MS: 304 (M – HBr).

4.3.2 Γενική μέθοδος παρασκευής βενζυλαμινών **Π-18**4-(Ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθιαζολ-2'-υλ)βενζυλαμίνη **Π-18α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ S	279.36	–	–

Μέθοδος Παρασκευής:

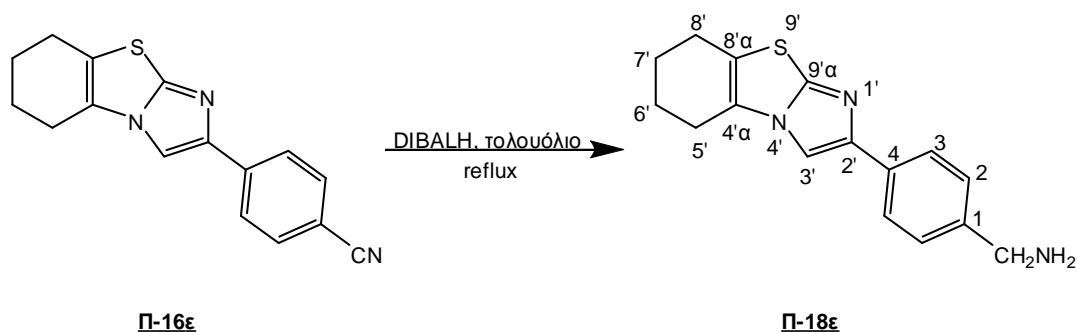
Σε ένα παγωμένο στους 0 °C αναδεύόμενο μείγμα του νιτριλίου **Π-16α** (0.25 g, 0.90 mmol) σε τολουόλιο (5 mL), προστέθηκε DIBALH (4.5 mmol, 1.0 M σε Εξάνιο, 4.5 mL) και το διάλυμα που προέκυψε αναδεύτηκε για 2 ώρες σε reflux. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C και αποχύθηκε σε παγωμένο στους 0 °C νερό (50 mL). Κατόπιν προστέθηκε υδατικό διάλυμα NaOH (1N, 15 mL) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, η οργανική φάση εκχυλίστηκε 3 φορές με DEE και οι ενωμένες οργανικές πλύθηκαν 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως ξηρού για να δώσουν το προϊόν **Π-18α** ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.75 (s, 1H, H-3'), 8.03 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 7.98 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8'), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-3), 7.57 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-6'), 7.43 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-7'), 7.41 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-2), 3.78 (s, 2H, CH₂NH₂).

¹³C NMR (DMSO): δ = 147.9 (C-9'α), 147.6 (C-2'), 143.1 (C-1), 133.4 (C-4), 133.0 (C-4'α), 130.3 (C-8'α), 128.7 (C-2), 127.8 (C-6'), 126.2 (C-8'), 126.1 (C-7'), 126.0 (C-3), 114.4 (C-5'), 109.9 (C-3'), 46.18 (CH₂NH₂).

ΕΙ/MS: 279 (M)

4-(5',6',7',8'-Τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζυλαμίνη **Π-18ε**

ΑΠΟΛΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ S	283.39	—	—

Μέθοδος Παρασκευής:

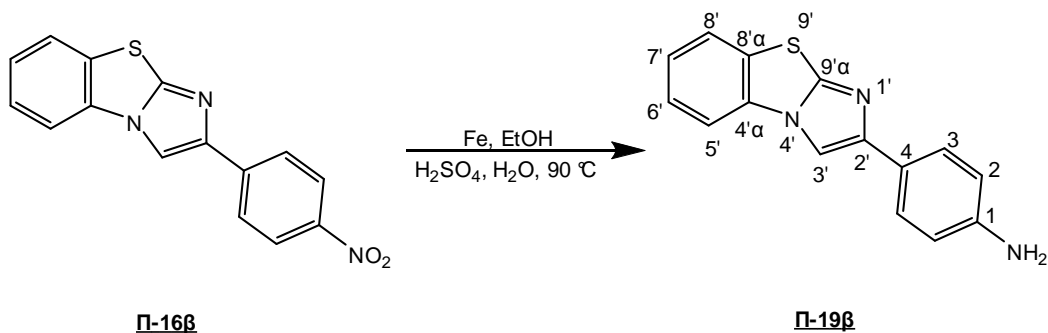
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-18ε** παρασκευάστηκε από το νιτρίλιο **Π-16ε** και λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.14 (s, 1H, H-3'), 7.76 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-3), 7.72 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2), 3.71 (s, 2H, CH₂NH₂), 2.68-2.66 (m, 4H, H-5' και H-8'), 1.88-1.86 (m, 4H, H-6' και H-7').

¹³C NMR (DMSO): δ = 146.9 (C-9'α), 145.7 (C-2'), 142.9 (C-1), 133.0 (C-4), 127.7 (C-2), 126.7 (C-4'α), 124.8 (C-3), 120.9 (C-8'α), 107.6 (C-3'), 45.76 (CH₂NH₂), 24.20 (C-5'), 23.12 (C-7'), 22.58 (C-8'), 21.60 (C-6').

ΕΙ/MS: 283 (M)

4.3.3 Γενική μέθοδος παρασκευής φαινυλαμινών **Π-19**4-(Ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθιαζολ-2'-υλ)φαινυλαμίνη **Π-19β***

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
89%	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ S	265.33	–	R _f = 0.21 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

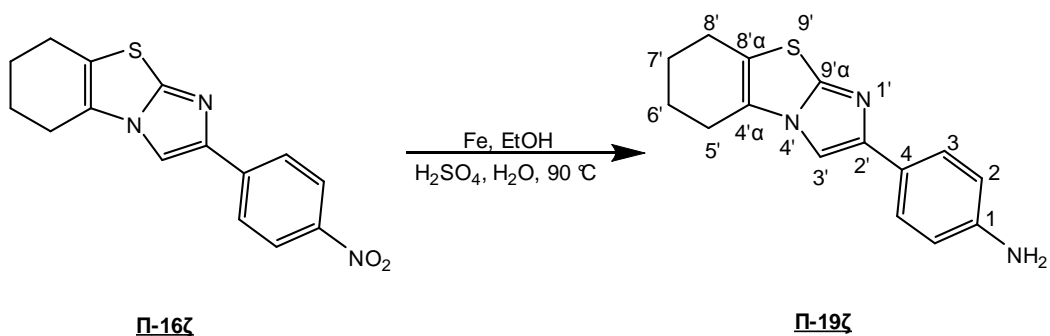
Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του αναλόγου **Π-16β** (2.0 g, 6.7 mmol) σε EtOH (150 mL), προστίθενται σκόνη Fe (7.5 g, 0.134 mol), H₂O (30 mL) και H₂SO₄ (750 mL, 12 N) και το μείγμα που προέκυψε αναδεύτηκε για 1 ώρα στους 90 °C. Στη συνέχεια, το ζεστό μείγμα διηθήθηκε από celite και πλύθηκε με ζεστή EtOH. Κατόπιν ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό κενό και στο υπόλειμμα που προέκυψε προστέθηκε NaHCO₃ (400 mL). Η οργανική φάση εκχυλίστηκε 3 φορές με DCM και οι ενωμένες οργανικές πλύθηκαν 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως ξηρού για να δώσουν το προϊόν **Π-19β** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 8.52 (1H, s, H-3'), 8.05 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5'), 7.95 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-8'), 7.61-7.51 (3H, m, H-3 και H-6'), 7.40 (1H, t, *J* = 8.7 Hz, H-7'), 6.65 (2H, d, *J* = 9.3 Hz, H-2), 5.25 (2H, s, NH₂).

EI/MS: 265 (M).

*Το μόριο **Π-19β** βρίσκεται σε πατέντα.

4-(5',6',7',8'-Τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)φαινυλαμίνη **Π-19ζ***

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
89%	C ₁₅ H ₁₅ N ₃ S	269.36	—	R _f = 0.25 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-19ζ** παρασκευάστηκε από το ανάλογο **Π-16ζ** και λήφθηκε ύστερα από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

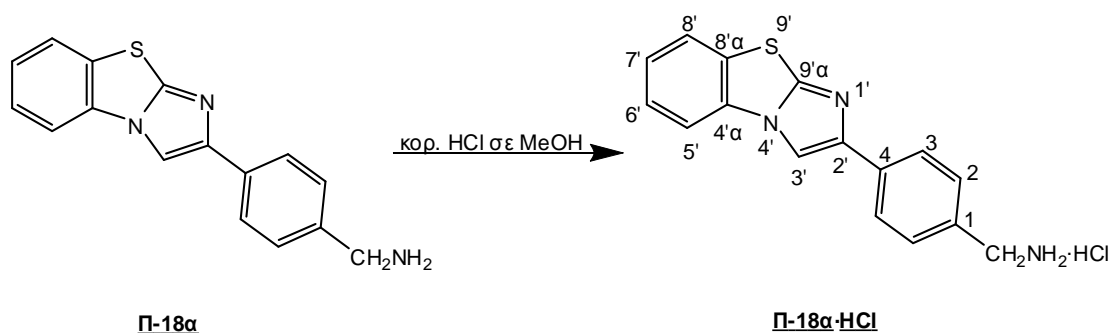
¹H NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 7.87 (s, 1H, H-3'), 7.50 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H-3), 6.58 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H-2), 5.12 (s, 2H, NH₂), 2.68-2.66 (m, 4H, H-5' και H-8'), 1.89-1.87 (m, 4H, H-6' και H-7').

EI/MS: 269 (M).

* Barchechath, S. D.; Tawatao, R. I.; Corr, M.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409-6422.

4.3.4 Γενική μέθοδος παρασκευής υδροχλωρικών αλάτων των αμινών **Π-18** και **Π-19**

Υδροχλωρικό αλάτι της 4-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζυλαμίνης **Π-18α·HCl**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₃ S	315.82	–	–

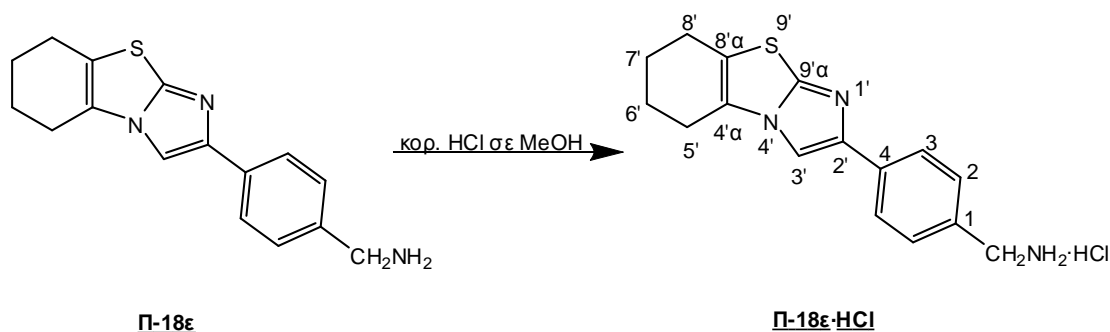
Μέθοδος Παρασκευής:

Ένα διάλυμα που αποτελείται από τη βενζυλαμίνη **Π-18α** (0.25 g, 0.89 mmol) και κορεσμένο HCl σε MeOH (50 mL), αναδεύτηκε για 1 ώρα και κατόπιν συμπυκνώθηκε έως την εμφάνιση στερεού. Στη συνέχεια το στερεό διηθήθηκε υπό κενό και πλύθηκε με DEE για να δώσει το αλάτι **Π-18α·HCl** ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 9.03 (s, 1H, H-3'), 8.13 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 8.01 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8'), 7.94 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-3), 7.66- 7.61 (m, 3H, H-2 και H-6'), 7.51 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-7'), 4.05 (q, 2H, *J* = 5.6 Hz, CH₂NH₂).

Υδροχλωρικό αλάτι της 4-(5',6',7',8'-Τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-
υλ)βενζυλαμίνης **Π-18ε·HCl**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S	319.85	–	–

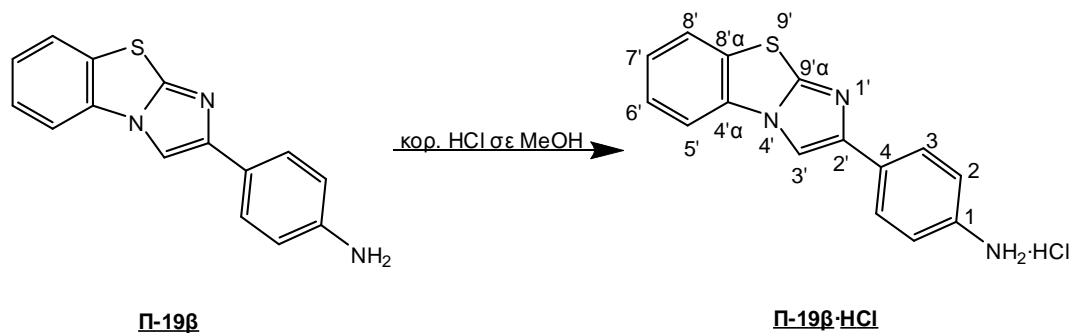
Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-18ε·HCl** παρασκευάστηκε από την αμίνη **Π-18ε** και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.59 (s, 1H, H-3'), 7.95 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H-3), 7.62 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H-2), 4.06 (q, 2H, *J* = 5.8 Hz, CH₂NH₂), 2.77-2.76 (m, 4H, H-5' και H-8'), 1.92-1.87 (m, 4H, H-6' και H-7').

Υδροχλωρικό αλάτι της 4-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)φαινυλαμίνη
Π-19β·HCl



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₅ H ₁₂ ClN ₃ S	301.79	–	–

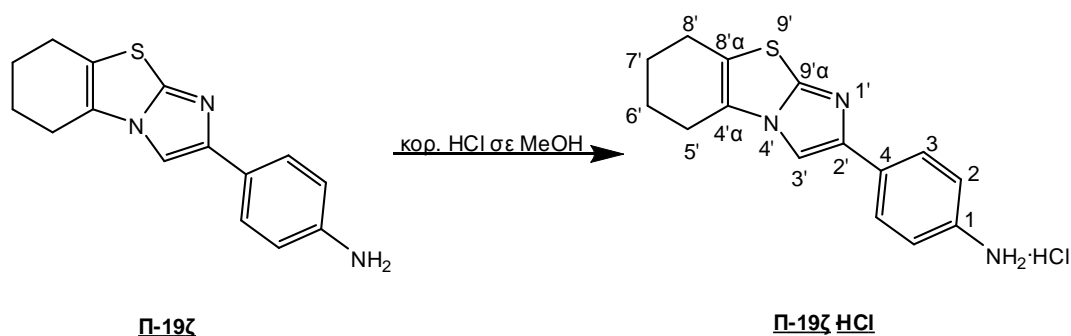
Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-19β·HCl** παρασκευάστηκε από την αμίνη **Π-19β** και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.89 (1H, s, H-3'), 8.08 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 8.04 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-8'), 7.96 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3), 7.61 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-6'), 7.47 (1H, t, *J* = 7.8 Hz, H-7'), 7.44 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2).

Υδροχλωρικό αλάτι της 4-(5',6',7',8'-τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)φαινυλαμίνη **Π-19ζ·HCl**



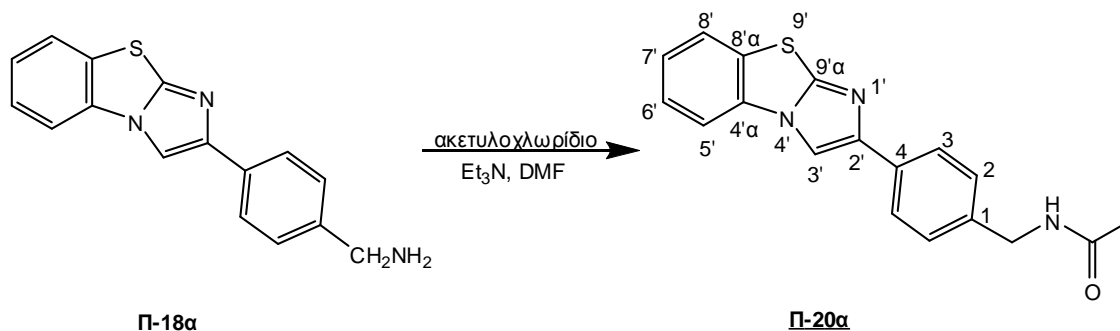
ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ S	305.83	–	–

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το προϊόν **Π-19ζ·HCl** παρασκευάστηκε από την αμίνη **Π-19ζ** και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO, 300 MHz): δ = 8.61 (s, 1H, H-3'), 7.94 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-3), 7.38 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2), 2.78-2.76 (m, 4H, H-5' και H-8'), 1.91-1.89 (m, 4H, H-6' και H-7').

4.3.5 Γενική μέθοδος παρασκευής αμιδίων **Π-20***N*-(4-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζυλ)ακεταμίδιο **Π-20α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ OS	321.40	–	R _f = 0.13 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

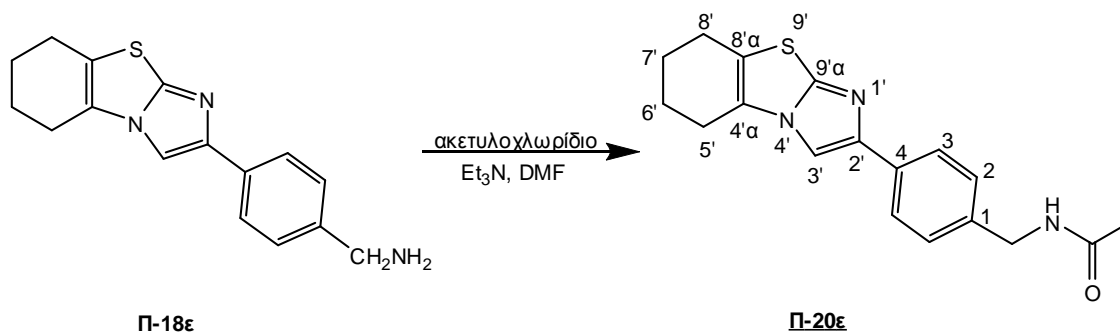
Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα της βενζυλαμίνης **Π-18α** (0.10 g, 0.36 mmol) σε DMF (0.9 mL) προστέθηκε Et₃N (0.33 mL, 2.4 mmol) και το νέο διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C. Κατόπιν προστέθηκε στάγδην ακετυλοχλωρίδιο (0.16 mL, 2.2 mmol) και το διάλυμα της αντίδρασης αναδεύτηκε ολονύχτια σε r.t.. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστέθηκε EtOAc και η οργανική φάση πλύθηκε 1 φορά με υδατικό διάλυμα 5% NH₄Cl, 1 φορά με H₂O και μία φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-20α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.43 (s, 1H, H-3'), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 7.88 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H-8'), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-3), 7.56 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, H-6'), 7.44 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, H-7'), 7.36 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2), 4.40 (s, 2H, CH₂NH), 2.03 (s, 3H, CH₃CO).

¹³C NMR (CD₃OD): δ= 172.0 (CO), 147.5 (C-9'α), 147.1 (C-2'), 138.1 (C-1), 132.5 (C-4), 132.4 (C-4'α), 129.8 (C-8'α), 127.7 (C-2), 126.5 (C-6'), 125.2 (C-7'), 125.0 (C-3), 124.3 (C-8'), 113.0 (C-5'), 108.0 (C-3'), 42.61 (CH₂NH), 21.15 (CH₃CO).

EI/MS: 321 (M).

N*-[4-(5',6',7',8'-τετραϋδροϊμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζυλ]ακεταμίδιο*Π-20ε**

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ OS	325.43	—	R _f = 0.10 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο **Π-20ε** παρασκευάστηκε από την αμίνη **Π-18ε** ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

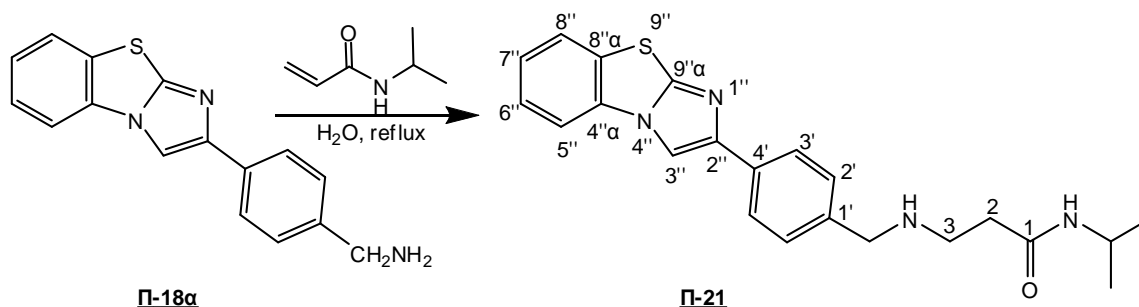
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CD₃OD): δ = 7.87 (s, 1H, H-3'), 7.75 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-3), 7.32 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2), 4.38 (s, 2H, CH₂NH), 2.72-2.70 (m, 4H, H-5' και H-8'), 2.02 (s, 3H, CH₃CO), 1.96-1.94 (m, 4H, H-6' και H-7').

¹³C NMR (CD₃OD): δ = 172.3 (CO), 148.8 (C-9'α), 146.4 (C-2'), 138.3 (C-1), 133.7 (C-4), 128.2 (C-2), 127.1 (C-4'α), 125.5 (C-3), 122.4 (C-8'α), 107.1 (C-3'), 43.30 (CH₂NH), 24.36 (C-5'), 23.45 (C-6'), 22.72 (C-8'), 21.98 (C-7'), 21.81 (CH₃CO).

ΕΙ/MS: 325 (M).

4.3.6 Μέθοδος παρασκευής του 3-(4'-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2''-yl)βενζυλαμινο)-*N*-ισοπροπυλπροπαναμιδίου **Π-21**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
13%	C ₂₂ H ₂₄ N ₄ OS	392.52	–	–

Μέθοδος Παρασκευής:

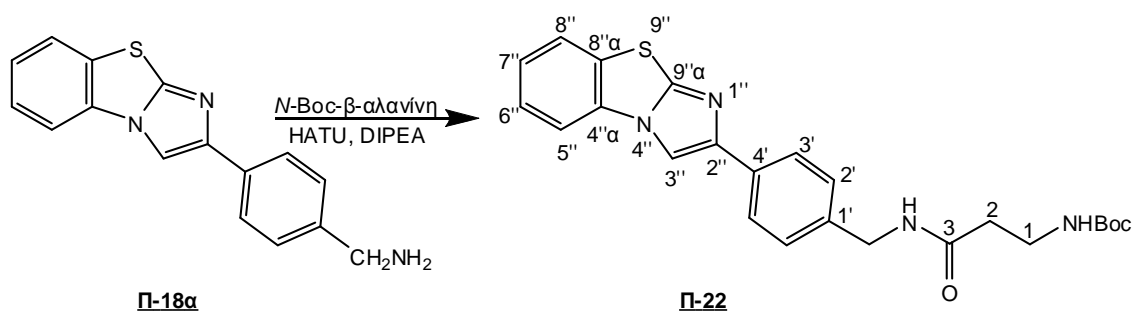
Ένα μείγμα από την αμίνη **Π-18α** (0.051 g, 0.18 mmol) και το *N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιο (0.031 g, 0.27 mmol) σε H₂O (1 mL) τέθηκε σε reflux για 16 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης η οργανική φάση εκχυλίστηκε επαναλαμβανόμενα με EtOAc και οι ενωμένες οργανικές φάσεις στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-21** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης EtOAc/MeOH/Et₃N 9:1:0.01 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.92 (s, 1H, H-3''), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H-3'), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5''), 7.60 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8''), 7.48-7.45 (m, 3H, H-2' και H-6''), 7.32 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-7''), 4.06-3.90 (m, 3H, CH(CH₃)₂ και CH₂NH), 3.06 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂CH₂CO), 2.61 (t, 2H, *J* = 6.0 Hz, CH₂CH₂CO), 1.15 (d, 6H, *J* = 6.0 Hz, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 173.4 (CO), 150.9 (C-9''α), 143.0 (C-2''), 138.7 (C-1'), 136.1 (C-4'), 135.8 (C-4''α), 129.6 (C-8''α), 127.8 (C-2'), 126.8 (C-6''), 125.3 (C-7''), 124.4 (C-3'), 123.8 (C-8''), 113.5 (C-5''), 108.8 (C-3''), 52.58 (CH₂NH), 47.86 (CH₂CH₂CO), 42.90 (CH(CH₃)₂), 35.74 (CH₂CH₂CO), 22.65 (CH(CH₃)₂).

EI/MS: 392 (M).

4.3.7 Μέθοδος παρασκευής του αναλόγου **Π-22**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
85%	C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₃ S	450.22	–	R _f = 0.32 Hex/EtOAc 2:8

Μέθοδος Παρασκευής:

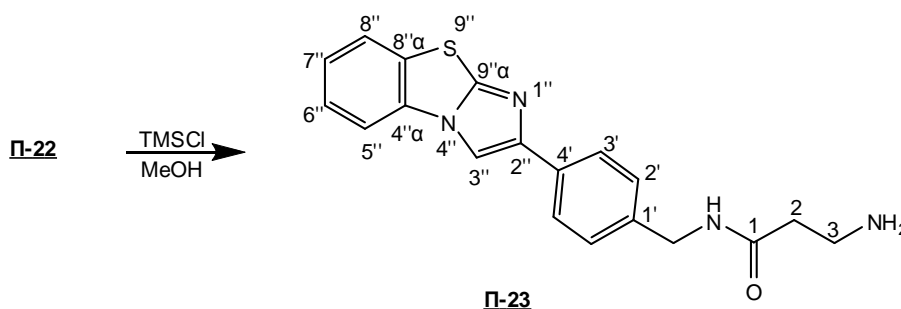
Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα της *N*-Boc-β-αλανίνης (0.034 g, 0.18 mmol) σε THF (1 mL), προστέθηκε DIPEA (0.063 mL, 0.36 mmol) και HATU (0.10 g, 0.27 mmol) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 15 λεπτά σε r.t.. Κατόπιν προστέθηκε η αμίνη **Π-18α** και το διάλυμα αφέθηκε ολονύχτια σε r.t.. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε EtOAc και η οργανική φάση πλύθηκε 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-22** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 2:8 και εξάτμιση του διαλύτη ως κίτρινο στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.76 (s, 1H, H-3''), 8.04 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5''), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8''), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H-3'), 7.58 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-6''), 7.44 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-7''), 7.32 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, H-2'), 4.30 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, CH₂NH), 3.19 (dd, 2H, *J* = 10 Hz, *J* = 7.3 Hz, CH₂CH₂NH), 2.34 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂CH₂NH), 1.39 (s, 9H, Boc).

EI/MS: 450 (M).

4.3.8 Μέθοδος παρασκευής του *N*-(4'-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2''-yl)βενζυλ)-3-αμινοπροπαναμίδιου **Π-23**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
60%	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ OS	350.44	–	–

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του αναλόγου **Π-22** (0.050 g, 0.11 mmol) σε MeOH (3 mL), προστέθηκε στάγδην TMSCl (0.077 mL, 0.50 mmol) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε r.t.. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε NaHCO₃ και η υδατική φάση εκχυλίστηκε 3 φορές με DCM. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως ξηρού για να δώσουν το προϊόν **Π-23** ως κίτρινο στερεό.

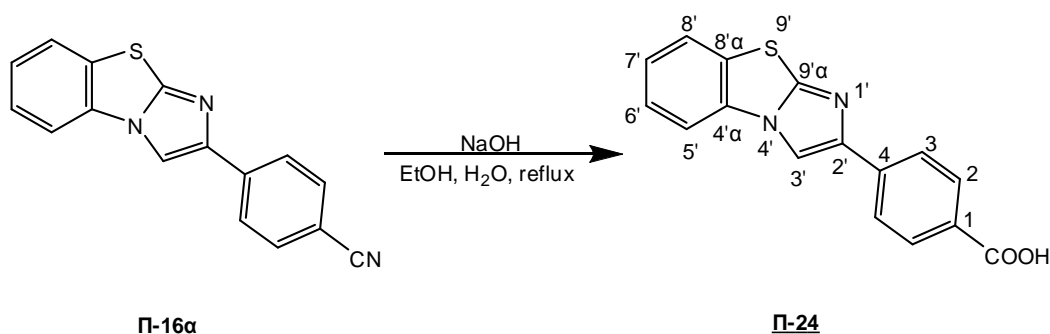
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.74 (s, 1H, H-3''), 8.04 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-5''), 8.00 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8''), 7.84 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-3'), 7.58 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H-6''), 7.47 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H-7''), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2'), 4.32 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, CH₂NH), 2.83 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₂CH₂NH₂), 2.29 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz, CH₂CH₂NH₂).

¹³C NMR (CD₃OD): δ = 172.0 (CO), 147.5 (C-9''α), 146.7 (C-2''), 139.2 (C-1'), 132.9 (C-4'), 132.3 (C-4''α), 129.7 (C-8''α), 128.1 (C-2'), 127.2 (C-6''), 125.6 (C-7''), 125.5 (C-3'), 125.1 (C-8''), 113.8 (C-5''), 109.4 (C-3''), 42.30 (CH₂NH), 40.00 (CH₂CH₂NH₂), 38.90 (CH₂CH₂NH₂).

EI/MS: 350 (M).

4.3.9 Μέθοδος παρασκευής του 4-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζοϊκού οξέος **Π-24**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
96%	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	294.33	–	R _f = 0.16 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Ένα αναδευόμενο μείγμα που περιέχει την αμίνη **Π-16α** (0.50 g, 1.8 mmol) και NaOH (0.92 g, 23 mmol) σε EtOH/H₂O 1:1 (20 mL) τέθηκε σε reflux για 4 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης το διάλυμα συμπυκνώθηκε έως ξηρού και στο υπόλειμμα που προέξυψε προστέθηκε H₂O (50 mL) και κατόπιν υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 1N έως το PH = 1. Το στερεό που προέκυψε διηθήθηκε υπό κενό, πλύθηκε με H₂O, ξηράνθηκε πάνω από ατμόσφαιρα P₂O₅ και έδωσε το προϊόν **Π-24** ως λευκό στερεό.

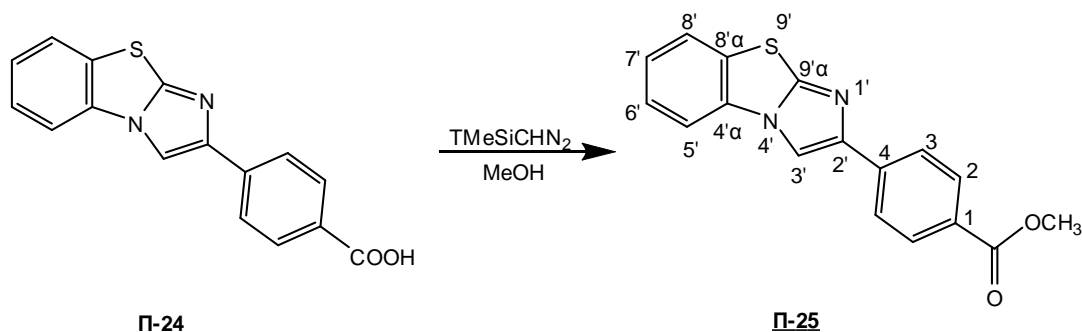
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.94 (s, 1H, H-3'), 8.05 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-8'), 8.02 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, H-2), 8.01-7.98 (m, 3H, H-3 και H-5'), 7.59 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-6'), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-7').

¹³C NMR (DMSO): δ = 168.2 (COOH), 148.6 (C-9'α), 146.4 (C-2'), 139.1 (C-4), 132.8 (C-4'α), 131.0 (C-2), 130.4 (C-1 και C-8'α), 127.9 (C-6'), 126.5 (C-7'), 126.2 (C-8'), 125.7 (C-3), 114.6 (C-5'), 111.7 (C-3').

EI/MS: 294 (M).

4.3.10 Μέθοδος παρασκευής του 4-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζοϊκού μεθυλεστέρα **Π-25**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
70%	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₂ S	308.35	–	R _f = 0.58 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο μείγμα του βενζοϊκού οξέος **Π-24** (0.50 g, 1.7 mmol) σε MeOH (16 mL), προστέθηκε στάγδην τριμεθυλσιλυλδιαζομεθάνιο (4 mL, 2M σε DEE, 8.0 mmol) και το νέο μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε r.t.. Στη συνέχεια, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό, προστέθηκε EtOAc και η οργανική φάση πλύθηκε 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-25** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

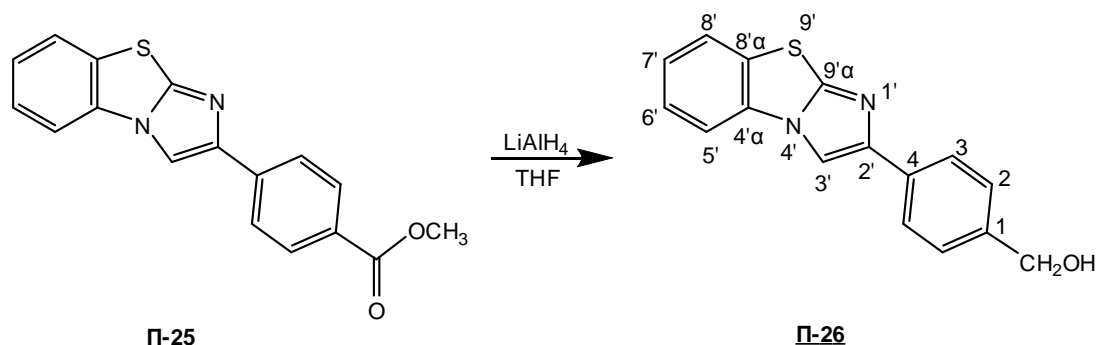
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.94 (s, 1H, H-3'), 8.04 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-8'), 8.02 – 7.98 (m, 5H, H-2, H-3 και H-5'), 7.58 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-6'), 7.44 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-7'), 3.86 (s, 3H, OCH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ = 167.1 (COOCH₃), 146.4 (C-9'a), 146.2 (C-2'), 139.5 (C-4), 132.8 (C-4'a), 131.0 (C-2), 130.6 (C-8'a), 129.1 (C-1), 127.9 (C-6'), 126.6 (C-7'), 126.2 (C-8'), 125.7 (C-3), 114.6 (C-5'), 112.0 (C-3'), 55.16 (COOCH₃).

EI/MS: 308 (M)

4.3.11 Μέθοδος παρασκευής της 4-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζυλικής αλκοόλης **II-26**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
70%	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ OS	280.34	–	R _f = 0.21 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα παγωμένο στους 0 °C αναδευόμενο διάλυμα του εστέρα **II-25** (0.25 g, 0.82 mmol) σε THF (29 mL), προστέθηκε LiAlH₄ (0.021 g, 0.53 mmol) και το μείγμα που προέκυψε αναδεύτηκε για 30 λεπτά στους 0 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε EtOAc και η οργανική φάση πλύθηκε 1 φορά με υδατικό διάλυμα HCl 1N, 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Το προϊόν **II-26** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

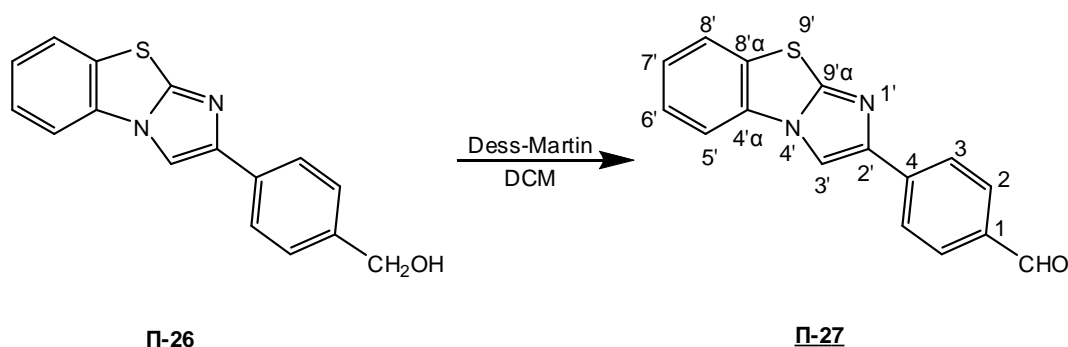
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.77 (s, 1H, H-3'), 8.04 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-8'), 7.99 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 7.84 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-3), 7.57 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-6'), 7.43 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-7'), 7.39 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H-2), 5.23 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, CH₂OH) 4.53 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz, CH₂OH).

¹³C NMR (DMSO): δ = 147.9 (C-9'α), 147.5 (C-2'), 142.7 (C-1), 133.5 (C-4), 133.0 (C-4'α), 130.3 (C-8'α), 128.0 (C-2), 127.8 (C-6'), 126.2 (C-7'), 126.1 (C-8'), 125.6 (C-3), 114.4 (C-5'), 109.9 (C-3'), 63.90 (CH₂OH).

EI/MS: 280 (M).

4.3.12 Μέθοδος παρασκευής της 4-(ιμιδαζο[2,1-*b*]βενζοθειαζολ-2'-υλ)βενζαλδεΐδης **Π-27**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
98%	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ OS	278.33	–	R _f = 0.64 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο μείγμα της αλκοόλης **Π-26** (0.080 g, 0.28 mmol) σε DCM (8 mL), προστέθηκε το αντιδραστήριο Dess – Martin (0.16 g, 0.36 mmol) και το νέο μείγμα αναδεύτηκε για 20 λεπτά σε r.t.. Μετά το τέλος της αντίδρασης ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα που προέκυψε καθαρίστηκε με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και έδωσε το προϊόν **Π-27** μετά από εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 10.0 (s, 1H, CHO), 8.98 (s, 1H, H-3'), 8.01 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H-3), 8.00 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-8'), 7.99 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-5'), 7.96 (d, 2H, J = 8.3 Hz, H-2), 7.59 (t, 1H, J = 8.0 Hz, H-6'), 7.45 (t, 1H, J = 8.0 Hz, H-7').

¹³C NMR (DMSO): δ = 193.4 (CHO), 148.8 (C-9'α), 146.2 (C-2'), 140.7 (C-4), 136.0 (C-1), 132.8 (C-4'α), 131.3 (C-2), 130.5 (C-8'α), 127.9 (C-6'), 126.6 (C-7'), 126.2 (C-8'), 126.1 (C-3), 114.6 (C-5'), 112.4 (C-3').

EI/MS: 278 (M).

4.4 Βιβλιογραφία

1. Strachan, T.; Read, A. P. *Human Molecular Genetics 2. Ch. 18, Cancer Genetics* **1999**.
2. Bell, S.; Klein, C.; Muller, L.; Hansen, S.; Buchner, J. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 917-927.
3. El-Deiry, W. S.; Kern, S. E.; Pietenpol, J. A.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *Nature Genet.* **1992**, *1*, 45-49.
4. Momand, J.; Zambetti, G. P.; Olson, D. C.; George, D.; Levine, A. J. *Cell* **1992**, *69*, 1237-1245.
5. Vousden, K. H.; Lu, X. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*.
6. Grutter, M. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 649-655.
7. Schuler, M.; Green, D. R. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 684-688.
8. Padmakumar, V. C.; Aleem, E.; Berthet, C.; Hilton, M. B.; Kaldis, P. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 2582-2593.
9. Zhu, Y.; Alvarez, C.; Doll, R.; Kurata, H.; Schebye, X. M.; Parry, D.; Lees, E. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 6268-6277.
10. Winters, Z. E.; Ongkeko, W. M.; Harris, A. L.; Norbury, C. J. *Oncogene* **1998**, *17*, 673-684.
11. Hung, H.; Pierce, C. K. H.; Chee, S. K.; Lawrence, P.; Hung, N. T. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *204*, 785-791.
12. Jin, S.; Tong, T.; Fan, W.; Fan, F.; Antinore, M. J.; Zhu, X.; Mazzacurati, L.; Li, X.; Petrik, K. L.; Rajasekaran, B.; Wu, M.; Zhan, Q. *Oncogene* **2002**, *21*, 8696-8704.
13. Zhan, Q.; Antinore, M. J.; Wang, X. W.; Carrier, F.; Smith, M. L.; Harris, C. C.; Fornace, A. J. *Oncogene* **1999**, *18*, 2892-2900.
14. Horie-Inoue, K.; Inoue, S. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 235-239.
15. Hermeking, H.; Benzinger, A. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 183-192.
16. Zhou, B. B. S.; Elledge, S. J. *Nature* **2000**, *408*, 433-439.
17. Hwang, B. J.; Ford, J. M.; Hanawalt, P. C.; Chu, G. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 424-428.
18. Tanaka, H.; Arakawa, H.; Yamaguchi, T.; Shiraishi, K.; Fukuda, S.; Matsui, K.; Takei, Y.; Nakamura, Y. *Nature* **2000**, *404*, 42-49.
19. Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 677.
20. Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J. M.; Lane, W. S.; Kaelin, W. G. *J. Science* **2001**, *292*, 464-468.
21. Rempe, D. A.; Lelli, K. M.; Vangeison, G.; Johnson, R. S.; Federoff, H. J. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16187-16201.
22. Pal, S.; Datta, K.; Mukhopadhyay, D. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6952-6957.
23. Ueba, T.; Nosaka, T.; Takahashi, J. A.; Shibata, F.; Florkiewicz, R. Z.; Vogelstein, B.; Oda, Y.; Kikuchi, H.; Hatanaka, M. *Med. Sci.* **1994**, *91*, 9009-9013.
24. Sherif, Z. A.; Nakai, S.; Pirollo, K. F.; Rait, A.; Chang, E. H. *Cancer Gene Ther.* **2001**, *8*, 771-782.
25. Subbaramaiah, K.; Altorki, N.; Chung, W. J.; Mestre, J. R.; Sampat, A.; Dannenberg, A. J. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10911-10915.
26. Tsujii, M.; Kawano, S.; Tsuji, S.; Sawaoka, H.; Hori, M.; DuBois, R. N. *Cell* **1998**, *93*, 705-716.

27. Williams, C. S.; Tsujii, M.; Reese, J.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 1589-1594.
28. Good, D. J.; Polverini, P. J.; Rastinejad, F.; Beau, M. M. L.; Lemons, R. S.; Frazier, W. A.; Bouck, N. P. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6624-6628.
29. Tolsma, S. S.; Volpert, O. V.; Good, D. J.; Frazier, W. A.; Polverini, P. J.; Bouck, N. *J. Cell. Biol.* **1993**, *122*, 497-511.
30. Slack, J. L.; Bornstein, P. *Cell Growth Differ.* **1994**, *5*, 1373-1380.
31. Tikhonenko, A. T.; Black, D. J.; Linial, M. L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30741-30747.
32. Janz, A.; Seignani, C.; Kenyon, K.; Ngo, C. V.; Tikhonenko, A. T. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2268-2275.
33. Watnick, R. S.; Cheng, Y.-N.; Rangarajan, A.; Ince, T. A.; Weinberg, A. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 219-231.
34. Rak, J.; Mitsushashi, Y.; Sheehan, C.; Tamir, A.; Vilorio-Petit, A.; Filmus, J.; Mansour, S. J.; Ahn, N. G.; Kerbel, R. S. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 490-498.
35. Jimenez, B.; Volpert, O. V.; Crawford, S. E.; Febbraio, M.; Silverstein, R. L.; Bouck, N. *Nature Med.* **2000**, *6*, 41-48.
36. Hsu, S. C.; Volpert, O. V.; Steck, P. A.; Mikkelsen, T.; Polverini, P. J.; Rao, S.; Chou, P.; Bouck, N. P. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5684-5691.
37. Crawford, S. E.; Stellmach, V.; Murphy-Ullrich, J. E.; Ribeiro, S. M. F.; Lawler, J.; Hynes, R. O.; Boivin, G. P.; Bouck, N. *Cell* **1998**, *93*, 1159-1170.
38. Derynck, R.; Akhurst, R. J.; Balmain, A. *Nature Genet.* **2001**, *29*, 117-129.
39. Soussi, T. *Oncogene* **2007**, *26*, 2145-2156.
40. Miao, W.-M.; Seng, W. L.; Duquette, M.; Lawler, P.; Laus, C.; Lawler, J. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7830-7839.
41. Brantley, D. M.; Cheng, N.; Thompson, E. J.; Lin, Q.; Brekken, R. A.; Thorpe, P. E.; Muraoka, R. S.; Cerretti, D. P.; Pozzi, A.; Jackson, D.; Lin, C.; Chen, J. *Oncogene* **2002**, *21*, 7011-7026.
42. Dohn, M.; Jiang, J.; Chen, X. *Oncogene* **2001**, *20*, 6503-6515.
43. Pasquale, E. B. *Nature Rev.* **2005**, *6*, 462-476.
44. Dodelet, V. C.; Pasquale, E. B. *Oncogene* **2000**, *19*, 5614-5619.
45. Teodoro, J. G.; Parker, A. E.; Zhu, X.; Green, M. R. *Science* **2006**, *313*, 968-971.
46. Nissia, R.; Bohling, T.; Autio-Harmainen, H. *Acta Histochem.* **2004**, *106*, 111-121.
47. O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; G, G. V.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R.; Folkman, J. *Cell* **1997**, *88*, 277-285.
48. Ramchandran, R.; Dhanabal, M.; Volk, R.; Waterman, M. J.; Segal, M.; Lu, H.; Knebelmann, B.; Sukhatme, V. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 735-739.
49. Colorado, P. C.; Torre, A.; Kamphaus, G.; Maeshima, Y.; Hopfer, H.; Takahashi, K.; Volk, R.; Zamborsky, E. D.; Herman, S.; Sarkar, P. K.; Ericksen, M. B.; Dhanabal, M.; Simons, M.; Post, M.; Kufe, D. W.; Weichselbaum, R. R.; Sukhatme, V. P.; Kalluri, R. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2520-2526.
50. Kamphaus, G. D.; Colorado, P. C.; Panka, D. J.; Hopfer, H.; Ramchandran, R.; Torre, A.; Maeshima, Y.; Mier, J. W.; Sukhatme, V. P.; Kalluri, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1209-1215.

51. Maeshima, Y.; Colorado, P. C.; Torre, A.; Holthaus, K. A.; Grunkemeyer, J. A.; Ericksen, M. B.; Hopfer, H.; Xiao, Y.; Stillman, I. E.; Kalluri, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21340-21348.
52. Petitclerc, E.; Boutaud, A.; Prestayko, A.; Xu, J.; Sado, Y.; Ninomiya, Y.; Sarras, M. P. J.; Hudson, B. G.; Brooks, P. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8051-8061.
53. Xu, R.; Yao, Z. Y.; Xin, L.; Zhang, Q.; Li, T. P.; Gan, R. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 264-268.
54. Hainaut, P.; Hollstein, M. *Adv. Cancer Res.* **2000**, *77*, 81-137.
55. Beroud, C.; Soussi, T. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 200-204.
56. Levine, A. J. *Cell* **1997**, *88*, 323-331.
57. Blandino, G.; Levine, A. J.; Oren, M. *Oncogene* **1999**, *18*, 477-485.
58. Sigal, A.; Rotter, V. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6788-6793.
59. Como, C. J. D.; Urist, M. J.; Babayan, I.; Drobnjak, M.; Hedvat, C. V.; Teruya-Feldstein, J.; Pohar, K.; Hoos, A.; Cordon-Cardo, C. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 494-501.
60. Strano, S.; Fontemaggi, G.; Costanzo, A.; Rizzo, M. G.; Monti, O.; Baccarini, A.; Del-Sal, G.; Levrero, M.; Sacchi, A.; Oren, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18817-18826.
61. Gaiddon, C.; Lokshin, M.; Ahn, J.; Zhang, T.; Prives, C. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 1874-1887.
62. Mantovani, R. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*, 1135-1143.
63. DiAgostino, S.; Strano, S.; Emiliozzi, V.; Zerbini, V.; Mottolese, M.; Sacchi, A.; Blandino, G.; Piaggio, G. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 191-202.
64. Browder, T.; Butterfield, C. E.; Kräling, B. M.; Shi, B.; Marshall, B.; O'Reilly, M. S.; Folkman, J. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1878-1886.
65. Paris, F.; Fuks, Z.; Kang, A.; Capodici, P.; Juan, G.; Ehleiter, D.; Haimovitz-Friedman, A.; Cordon-Cardo, C.; Kolesnick, R. *Science* **2001**, *293*.
66. Gudkov, A. V.; Komarova, E. A. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 117-129.
67. Roger, A.; Popliker, M.; Webb, C. G.; Oren, M. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 2851-2855.
68. Komarova, E. A.; Chernov, M. V.; Franks, R.; Wang, K.; Armin, G.; Zelnick, C. R.; Chin, D. M.; Bacus, S. S.; Stark, G. R.; Gudkov, A. V. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1391-1400.
69. Hasegawa, M.; Zhang, Y.; Nübe, H.; Terry, N. H. A.; Meistrich, M. L. *Radiat. Res.* **1998**, *149*, 263-270.
70. Tron, V. A.; Trotter, M. J.; Tang, L.; Krajewska, M.; Reed, J. C.; Ho, V. C.; Li, G. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 579-585.
71. Westphal, C. H.; Hoyes, K. P.; Canman, C. E.; Huang, X.; Kastan, M. B.; Hendry, J. H.; Leder, P. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5637-5639.
72. Westphal, C. H.; Rowan, S.; Schmaltz, C.; Elson, A.; Fisher, D. E.; Leder, P. *Nature Genet.* **1997**, *16*, 397-401.
73. Komarova, E. A.; Gudkov, A. V. *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8*, 389-400.
74. Komarov, P. G.; Komarova, E. A.; Kondratov, R. V.; Christov-Tselkov, K.; Coon, J. S.; Chernov, M. V.; Gudkov, A. V. *Science* **1999**, *285*, 1733-1737.
75. Walton, M. I.; Wilson, S. C.; Hardcastle, I. R.; Mirza, A. R.; Workman, P. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1367-1377.
76. Culmsee, C.; Zhu, X.; Yu, Q. S.; Chan, S. L.; Camandola, S.; Guo, Z.; Greig, N. H.; Mattson, M. P. *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 220-228.

77. Zhu, X.; Yu, Q.-S.; Cutler, R. G.; Culmsee, C. W.; Holloway, H. W.; Lahiri, D. K.; Mattson, M. P.; Greig, N. H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5090-5097.
78. Pietrancosta, N.; Moumen, A.; Dono, R.; Lingor, P.; Planchamp, V.; Lamballe, F.; Bahr, M.; Kraus, J.-L.; Maina, F. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3645-3652.
79. Barchechath, S. D.; Tawatao, R. I.; Corr, M.; Carson, D. A.; Cottam, H. B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6409-6422.
80. Passarella, D.; Comi, D.; Vanossi, A.; Paganini, G.; Colombo, F.; Ferrante, L.; Zuco, V.; Danieli, B.; Zunino, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6358-6363.
81. King, L. C.; Hlavacek, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 3722.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

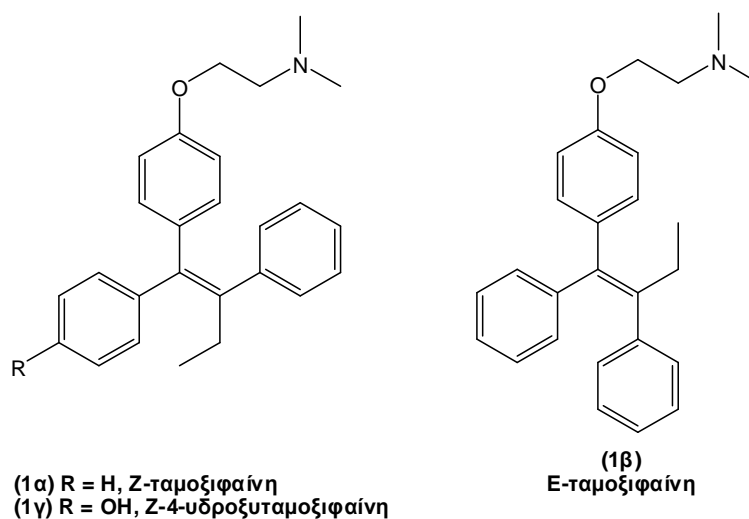
Σύνθεση νέων αναλόγων της ταμοξιφαίνης και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

5.1 Εισαγωγή

Από τους γυναικολογικούς καρκίνους που πλήττουν -σε όλο και αυξανόμενα ποσοστά- τις γυναίκες των ανεπτυγμένων κυρίως χωρών, ένα μεγάλο ποσοστό είναι ορμονοεξαρτώμενοι. Κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η παρουσία μεγάλου αριθμού οιστρογονικών υποδοχέων, οι οποίοι αλληλεπιδρώντας με τις αντίστοιχες ορμόνες ρυθμίζουν στον πυρήνα του κυττάρου την έκφραση σειράς γονιδίων που έχουν σχέση με την κυτταρική αύξηση.

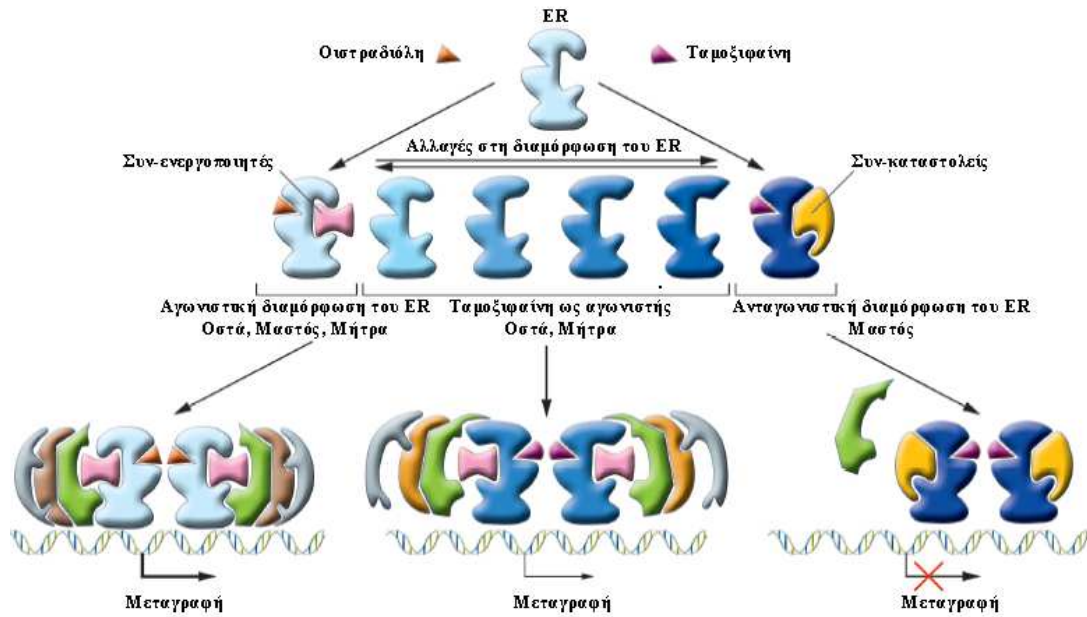
Οι ορμονοεξαρτώμενοι γυναικολογικοί καρκίνοι αντιμετωπίζονται κατά κύριο λόγο με τη χορήγηση ανταγωνιστών των οιστρογόνων ορμονών (αντιοιστρογόνα), τα οποία ανταγωνίζονται τα οιστρογόνα για τις θέσεις πρόσδεσης στους υποδοχείς τους. Το πλέον γνωστό και ευρύτερα συνταγογραφούμενο φάρμακο που χορηγείται για τη καταπολέμηση του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού^{1,2} είναι η Ζ-ταμοξιφαίνη (**1α**) (Εικόνα 5.1) με την εμπορική ονομασία Nolvadex^{MR}. Το μόριο αυτό ανήκει στην κατηγορία των εκλεκτικών τροποποιητών του οιστρογονικού υποδοχέα (**Selective Estrogen Receptor Modulators = SERMs**) και εκφράζει τις αντιοιστρογονικές του ιδιότητες ως ανταγωνιστής των οιστρογονικών θέσεων δέσμευσης των κυττάρων στόχων, όπως είναι τα κύτταρα του μαστού. Η δέσμευση της ταμοξιφαίνης οδηγεί σε αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα, με τη νέα δομή του συμπλόκου ταμοξιφαίνη-υποδοχέα να “στρατολογεί” συν-καταστολείς με τελικό στόχο την αναστολή της μεταγραφής (Εικόνα 5.2). Στον ανθρώπινο οργανισμό η ταμοξιφαίνη υδροξυλιώνεται, με αποτέλεσμα να μετατραπεί σε 4-υδροξυταμοξιφαίνη (**1γ**) (Εικόνα 5.1). Αυτή αποτελεί τον ενεργό μεταβολίτη της ταμοξιφαίνης με αποτέλεσμα -σε σύγκριση με την ταμοξιφαίνη- να έχει μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης με τον υποδοχέα των οιστρογόνων και πολύ μεγαλύτερη αντιοιστρογονική δράση κατά των ορμονοεξαρτώμενων καρκινικών κυττάρων μαστού MCF-7-2a.³

Όμως η χορήγηση της ταμοξιφαίνης έχει σημαντικές παρενέργειες, όπως η αύξηση των φλεβικών θρομβώσεων, ακριβώς όπως συμβαίνει και με τα ενδογενή οιστρογόνα. Επίσης τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι η μακροχρόνια χρήση της έχει σοβαρές επιπτώσεις στο ενδομήτριο, αφού είναι πλέον γνωστό ότι η ταμοξιφαίνη δρα ως αντιοιστρογόνο μόνο στο μαστό και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού. Αντίθετα, στο ενδομήτριο επιδεικνύει οιστρογονική δράση η οποία είναι δυνατόν να προκαλέσει καρκίνο της μήτρας.

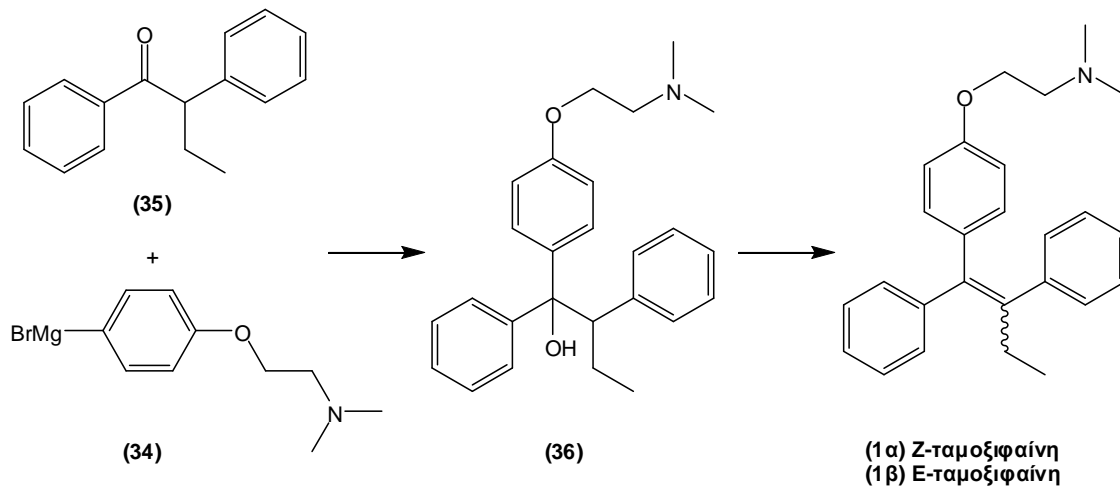


Εικόνα 5.1. Δομές των ενώσεων Z-ταμοξιφαίνη, E-ταμοξιφαίνη και Z-4-υδροξυταμοξιφαίνη.

Οι ερευνητικές προσπάθειες για τη σύνθεση της ταμοξιφαίνης και νέων δραστικών παραγώγων της είναι πολυάριθμες, λόγω του ιδιαίτερου επιστημονικού και εμπορικού ενδιαφέροντος⁴⁻⁶ που παρουσιάζει το μόριο αυτό. Η πρώτη ολοκληρωμένη σύνθεση της ταμοξιφαίνης πραγματοποιήθηκε το 1966 από τους Harper και Walpole,⁷ ενώ σημαντική ήταν και η συνθετική πορεία που αναπτύχθηκε από τους Collins, Hobbs και Emmens το 1971,⁸ (παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1). Το πρώτο στάδιο της συνθετικής αυτής πορείας αναφέρεται στην αντίδραση του οργανομαγνησιακού παραγώγου του π-[2-(N,N-διαιθυλοαμινο)αιθοξυ] βρωμοβενζολίου (**34**) με την 1,2-διφαινυλο-βουταν-1-όνη (**35**), η οποία δίνει την ενδιάμεση καρβινόλη (**36**). Αυτή με αφυδάτωση παράγει την ταμοξιφαίνη ως μείγμα των δύο γεωμετρικών ισομερών της, Z (**1α**) και E (**1β**). Βέβαια, για τη βιολογική δράση της ταμοξιφαίνης είναι σχεδόν αποκλειστικά υπεύθυνο μόνο το Z-ισομερές της.



Εικόνα 5.2. Η δέσμευση της ταμοξιφαίνης στον οιστρογονικό υποδοχέα “στρατολογεί” συν-καταστολείς, που μπλοκάρουν τη διαδικασία της μεταγραφής στο κύτταρο του μαστού.

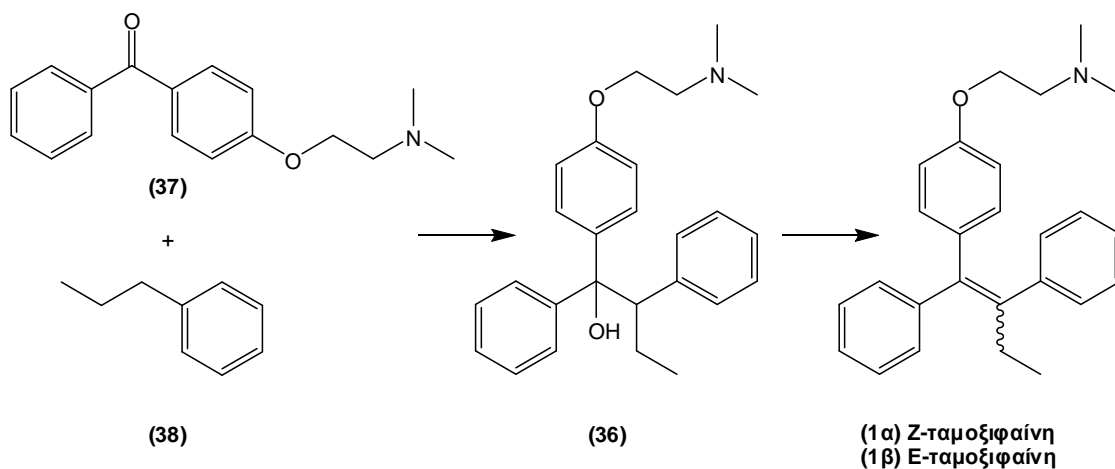


Σχήμα 5.1. Σύνθεση της ταμοξιφαίνης από τους Collins, Hobbs και Emmens.

Θα πρέπει βέβαια να τονιστεί ότι με την πάροδο του χρόνου έκαστο ισομερές μετατρέπεται εν μέρει στο άλλο, με αποτέλεσμα τελικά η ταμοξιφαίνη να υπάρχει ως μείγμα των δυο στερεοϊσομερών. Άλλωστε και το εμπορικό-φαρμακευτικό σκεύασμα της ταμοξιφαίνης (**NOLVADEX**) είναι μείγμα των δύο στερεοϊσομερών του μορίου, αφού βιομηχανικά είναι απλούστερη –και φτηνότερη- η παρασκευή του μείγματος.

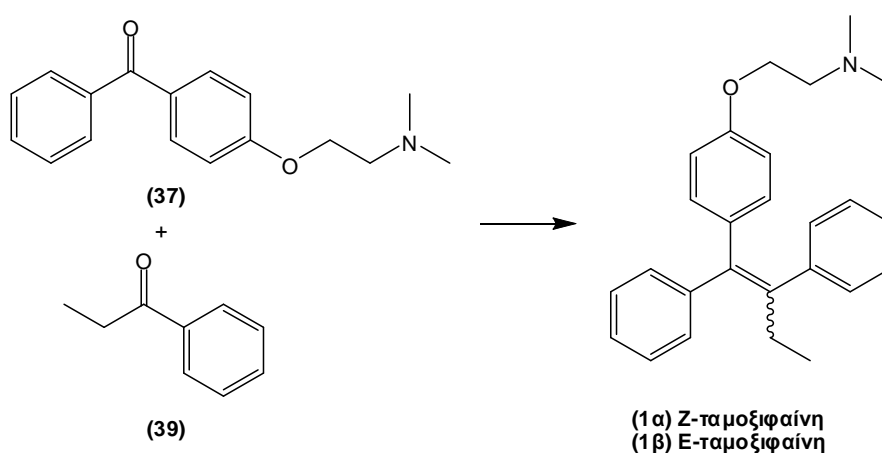
Δυο επιπλέον ενδιαφέρουσες συνθετικές μέθοδοι (από τις πολυάριθμες) που αναπτύχθηκαν για τη σύνθεση της ταμοξιφαίνης αναφέρονται στις συνθέσεις των:

(α) Olier-Reuchet, Aitken, Bucourt και Hanson,⁹ της οποίας το κρισιμότερο στάδιο αφορά τη σύζευξη της κετόνης (**37**) με το ανιόν του προπυλοβενζολίου (Σχήμα 5.2). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, η κετόνη (**37**) προστίθεται στο ανιόν του προπυλοβενζολίου (που παρασκευάζεται *in situ* με εφαρμογή πολύ βασικών συνθηκών στο προπυλοβενζόλιο (**38**) δίνοντας την ενδιάμεση καρβινόλη (**36**), η οποία στη συνέχεια αφυδατώνεται με τη χρήση υδατικών διαλυμάτων ισχυρών οξέων προς την ταμοξιφαίνη ως μείγμα των δύο γεωμετρικών ισομερών της, Z (**1α**) και E (**1β**).



Σχήμα 5.2. Σύνθεση της ταμοξιφαίνης από τους Olier-Reuchet, Aitken, Bucourt και Hanson.

(β) Coe και Scriven,¹⁰ οι οποίοι χρησιμοποιώντας τη σύζευξη McMurry¹¹ μεταξύ της κετόνης **37** και της προπιοφαινόνης (**39**) συνέθεσαν τα ισομερή της ταμοξιφαίνης με αναλογία Z/E 3:1 (Σχήμα 5.3).



Σχήμα 5.3. Σύνθεση της ταμοξιφαίνης από τους Coe και Scriven.

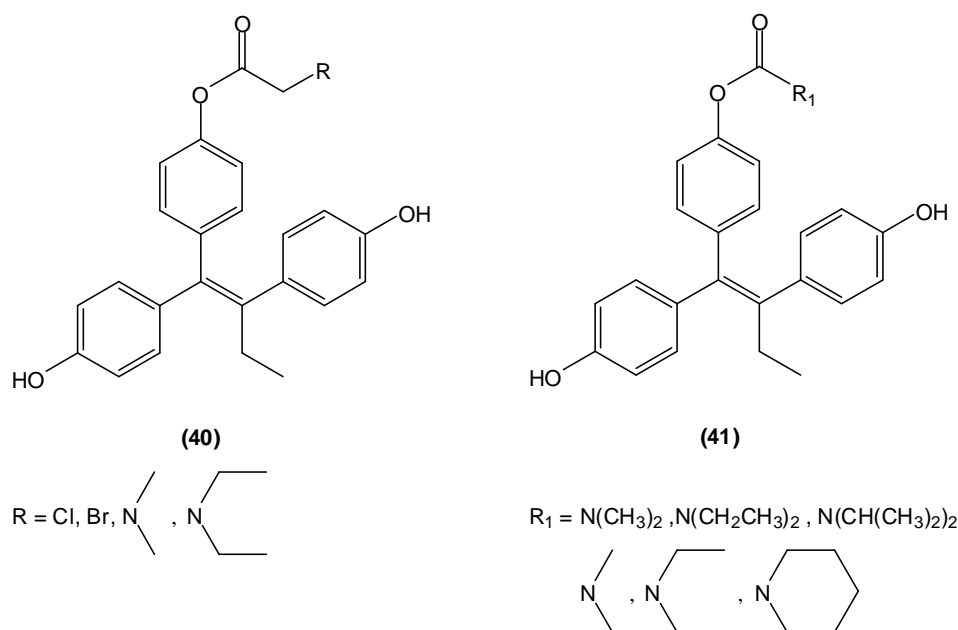
Αρχικά η αντίδραση έλαβε χώρα παρουσία $TiCl_3$ και Li σε ιδιαίτερα άνυδρο περιβάλλον, το οποίο αποτελούσε ανασταλτικό παράγοντα στην περίπτωση εφαρμογής της αντίδρασης σε μεγαλύτερη κλίμακα. Έτσι, τα αντιδραστήρια αυτά αντικαταστάθηκαν με $TiCl_4$ και Zn , τα οποία μάλιστα αποδείχθηκαν αποδοτικότερα αφού η συνολική απόδοση της αντίδρασης έφτασε το 88%.

Έως σήμερα η ταμοξιφαίνη χρησιμοποιείται ως το πρώτης γραμμής φάρμακο για την ενδοκρινική θεραπεία του ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του μαστού.¹² Παράλληλα, η ταμιξιφαίνη χορηγείται προληπτικά για τη μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου.¹³ Πρέπει όμως να τονιστεί ότι εκτός από την αντιοιστρογονική δράση που επιδεικνύει στα καρκινικά κύτταρα μαστού, η ταμοξιφαίνη εμφανίζει και σημαντική οιστρογονική δράση σε άλλους ιστούς στόχους των οιστρογόνων όπως τα οστά, το ενδομήτριο και το ήπαρ.¹⁴ Ένα επιπλέον μειονέκτημα της ταμοξιφαίνης είναι το γεγονός ότι μετά την πάροδο ενός ικανού χρονικού διαστήματος -κατά το οποίο υπάρχει ανταπόκριση στη θεραπεία- παρατηρείται ότι αναπτύσσονται όγκοι ανθεκτικοί στην ταμοξιφαίνη. Επομένως είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων, ισχυρών, μη τοξικών αναλόγων της ταμοξιφαίνης, με ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης στον οιστρογονικό υποδοχέα, αντιοιστρογονική δράση στο μαστό, λιγότερες παρενέργειες, και ευεργετική επίδραση στον οστικό ιστό.

5.2 Αποτελέσματα – Συζήτηση

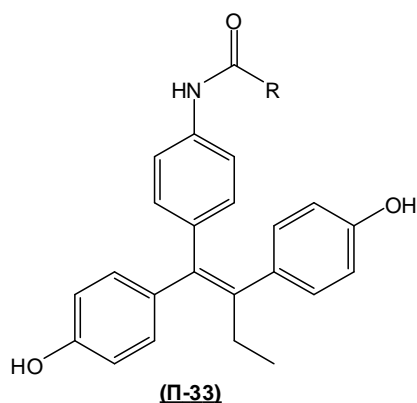
5.2.1 Εισαγωγή

Προκαταρκτικές μελέτες της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου χημείας του Γ.Π.Α. σχετικά με τη μελέτη εισαγωγής μιας καρβονυλομάδας στην αλειφατική πλευρική αλυσίδα της ταμοξιφαίνης και την επίπτωση στη βιοδραστικότητα, έδειξαν ότι οι ενώσεις με γενική δομή **(40)** και **(41)** (Εικόνα 5.3), διαθέτουν *in vitro* αξιολογη ικανότητα πρόσδεσης στους οιστρογονικούς υποδοχείς και σημαντική ανταγωνιστική δράση έναντι της οιστραδιόλης στο μαστό.



Εικόνα 5.3. Γενικές δομές των αναλόγων (40) και (41).

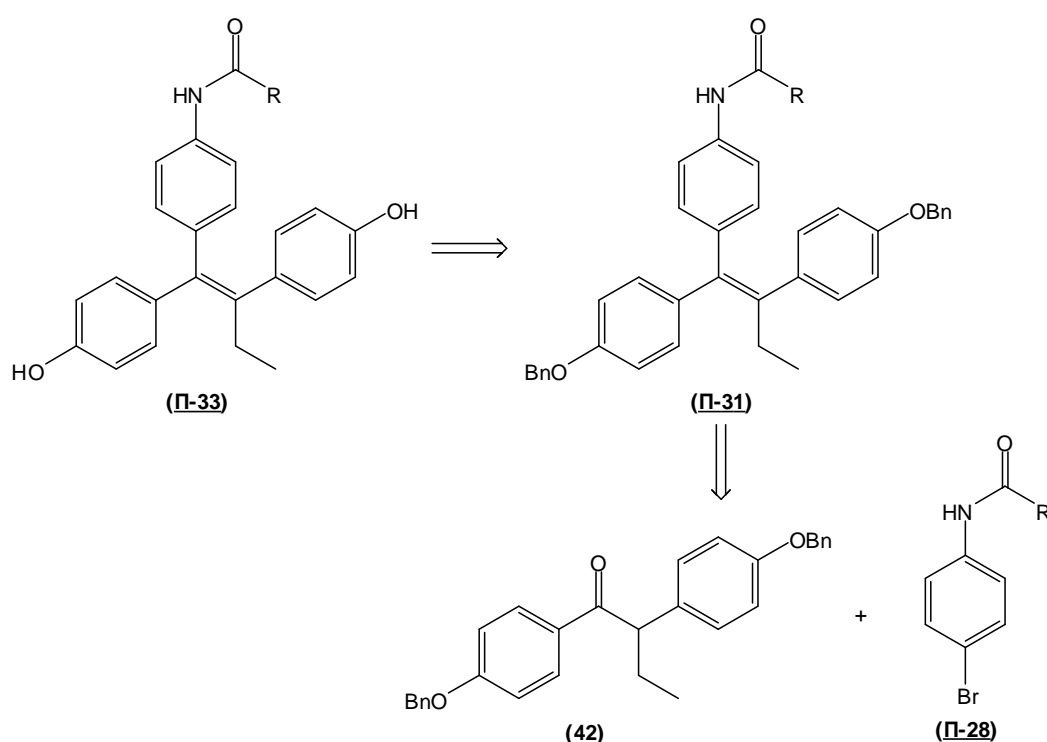
Όμως, η παρουσία της εστερικής ομάδας είναι σημαντικό μειονέκτημα για την περαιτέρω μελέτη-εξέλιξη των μορίων αυτών, αφού αυτή υδρολύεται στις *in vivo* συνθήκες. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια να σχεδιαστούν-συντεθούν νέα ανάλογα των μορίων αυτών (**Π-33**), στα οποία το οξυγόνο της εστερικής ομάδας έχει αντικατασταθεί με άζωτο. Έτσι, έχει δημιουργηθεί ένας σταθερός αμιδικός δεσμός (Εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4. Δομή των αναλόγων της ταμοξιφαίνης (**Π-33**) που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή.

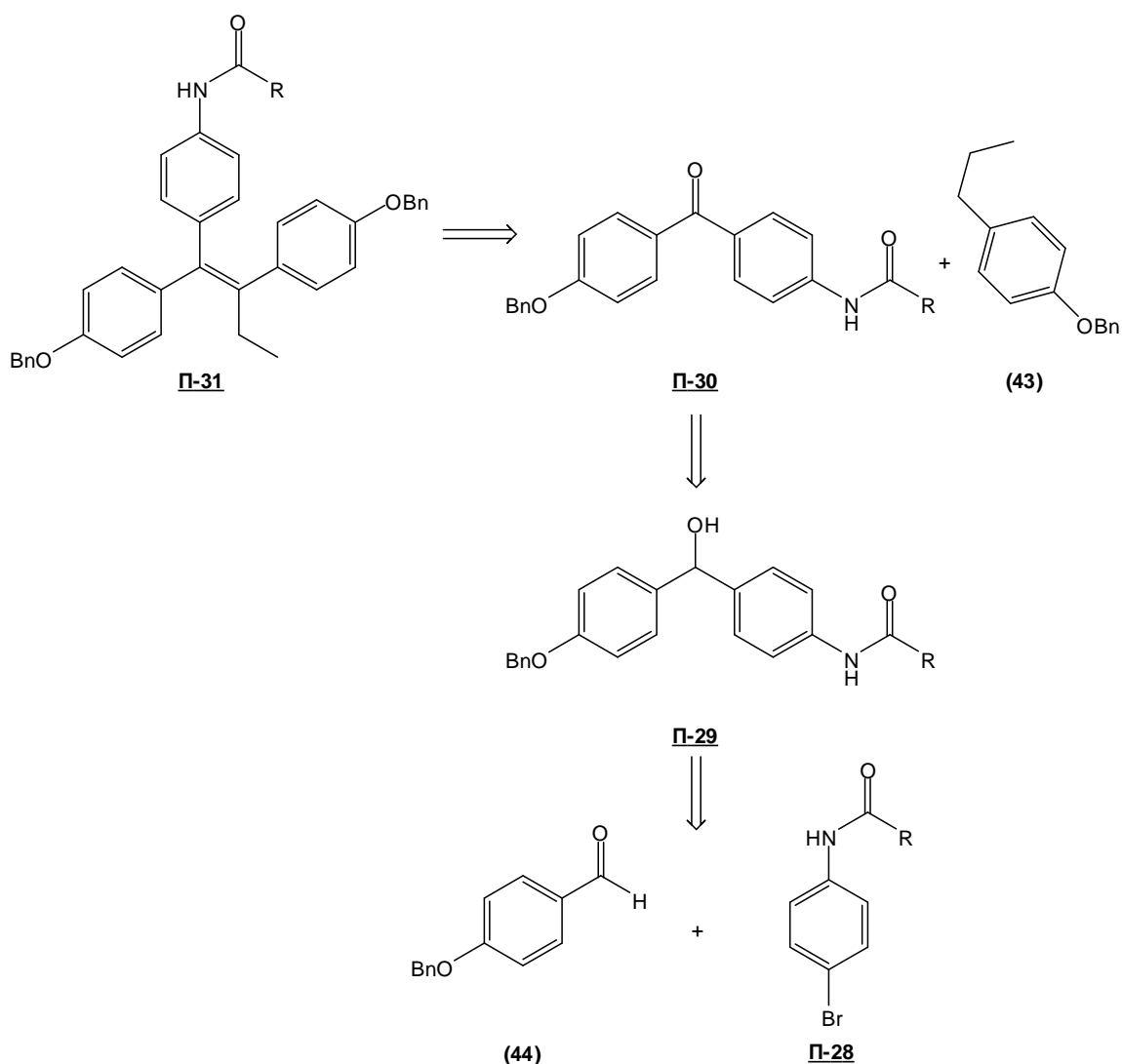
5.2.2 Προκαταρτικές μελέτες

Η αντίστροφη συνθετική ανάλυση (Σχήμα 5.4) για τη σύνθεση των νέων αναλόγων της ταμοξιφαίνης (**Π-33**) υποδεικνύει ότι κρίσιμο στάδιο της πορείας είναι η σύζευξη κετόνης **42** με τα αντίστοιχα 4-βρωμοφαινυλ αμιδίων (**Π-28**), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό των νέων αναλόγων **Π-31** που διαθέτουν τον τριφαινολικό σκελετό της ταμοξιφαίνης. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση αυτή δοκιμάστηκαν ως αντιδραστήρια τα: (α) n-BuLi, -78 °C, (β) HCl, MeOH, τα οποία απέτυχαν να δώσουν το μόριο στόχο.



Σχήμα 5.4. Αντίστροφη συνθετική ανάλυση των αναλόγων της ταμοξιφαίνης (**Π-33**).

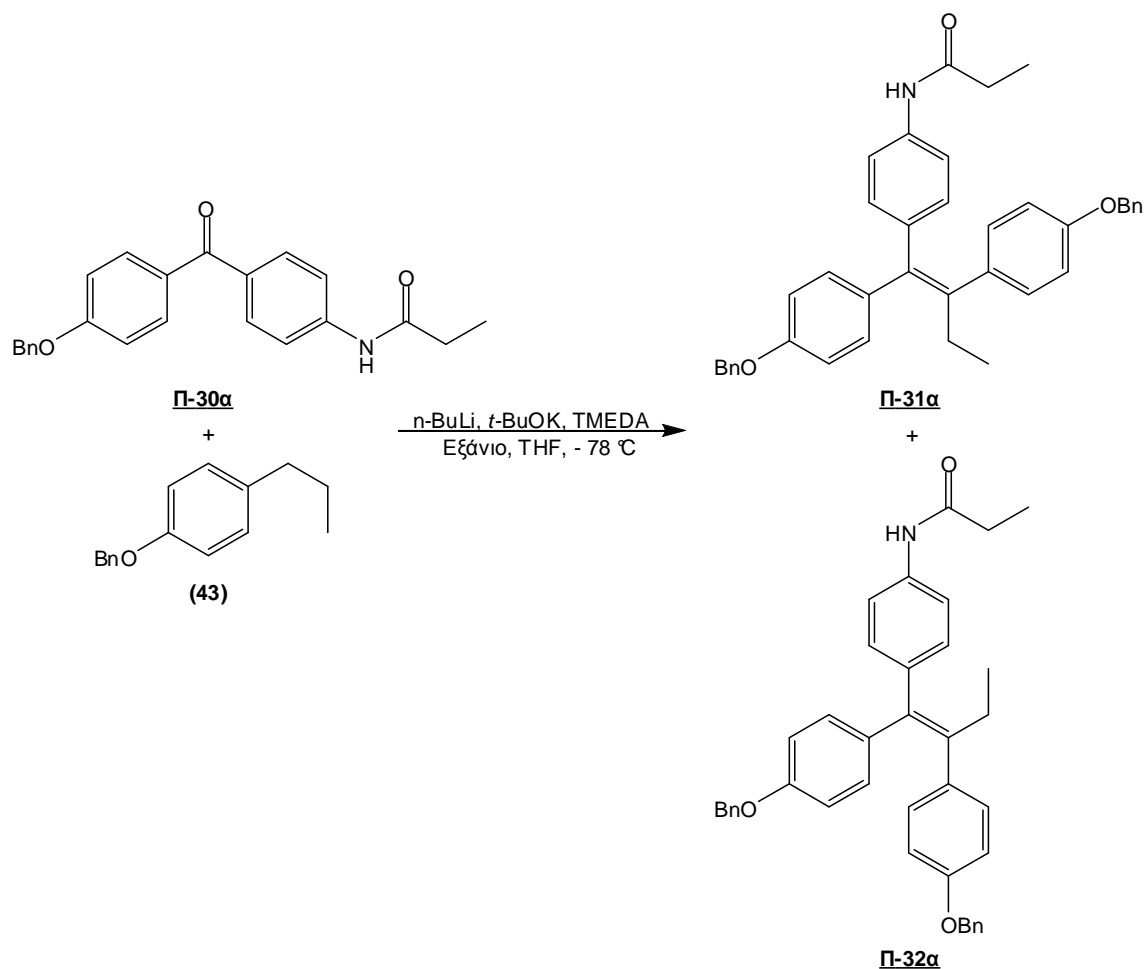
Η δεύτερη συνθετική μέθοδος που επιλέχθηκε για την επίτευξη των κρίσιμων ενδιάμεσων **Π-31** (Σχήμα 5.5) αφορά τη χρησιμοποίηση ακραίων αλκαλικών συνθηκών¹⁵ για την αντίδραση των ενώσεων **Π-30** με το 1-(βενζυλοξυ)-4-προπυλοβενζόλιο (**43**). Για το σκοπό αυτό ο Schlosser¹⁶ είχε χρησιμοποιήσει μείγμα n-BuLi-*t*-BuOK το οποίο αποπρωτονώνει εκλεκτικά τον α-άνθρακα των αιθυλοβενζολίων.¹⁷ Στις συνθήκες αυτές λαμβάνεται σε σχετικά καλή απόδοση το προϊόν στόχος, σε αντίθεση με τη χρησιμοποίηση των αντίστοιχων αντιδραστηρίων Grignard και Wittig.⁹



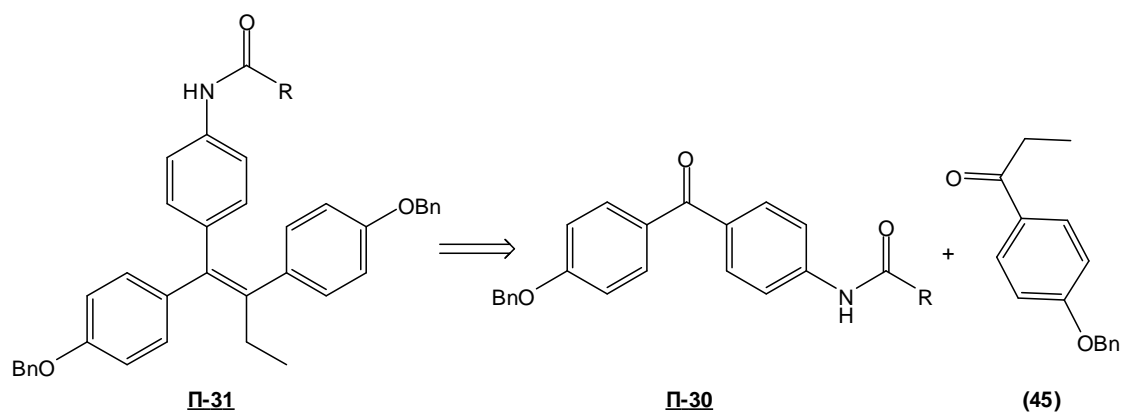
Σχήμα 5.5. Αντίστροφη συνθετική ανάλυση των κρίσιμων αναλόγων **Π-31**.

Η πραγματοποίηση της αντίδρασης των ακραίων αλκαλικών συνθηκών μεταξύ του αμιδίου **Π-30α** και του 1-(βενζυλοξυ)-4-προπυλοβενζολίου (**43**) (Σχήμα 5.6), οδήγησε στη σύνθεση του επιθυμητού αναλόγου **Π-31α** ως μείγμα με την ισομερή της ένωση **Π-32α** σε αναλογία 1:1. Ωστόσο, η χαμηλή συνολική απόδοση (~15%) απέκλεισε την περαιτέρω συνέχιση των αντιδράσεων αυτού του τύπου.

Η τρίτη συνθετική μέθοδος που μελετήθηκε για την παρασκευή των κρίσιμων αναλόγων **Π-31** αφορούσε τη σύνθεση των ολεφινών μέσω της αντίδρασης McMurry¹¹ (Σχήμα 5.7). Στην μέθοδο αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του μετάλλου, με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητη η *in situ* δημιουργία ενός πυρηνόφιλου κέντρου.



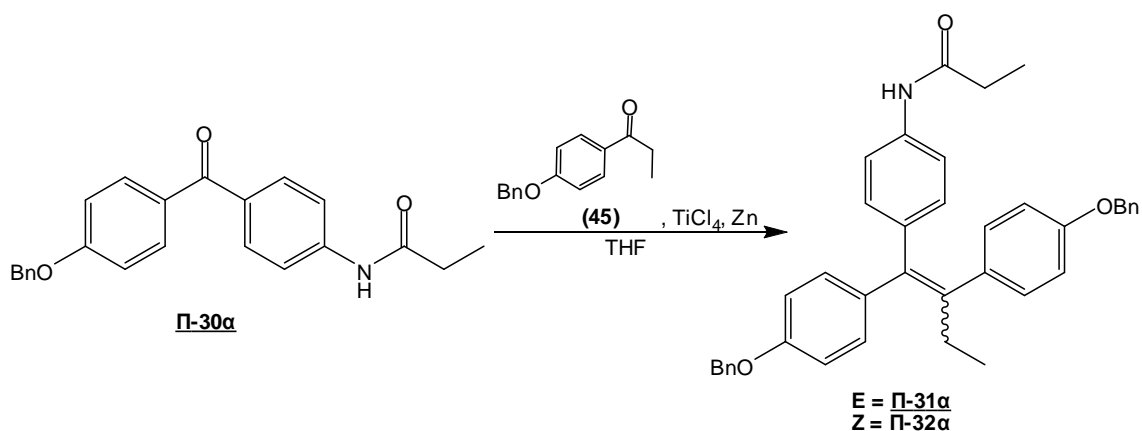
Σχήμα 5.6. Σύνθεση του αναλόγου **Π-31α** με τη χρήση ακραίων αλκαλικών συνθηκών.



Σχήμα 5.7. Αντίστροφη συνθετική ανάλυση των κρίσιμων αναλόγων **Π-31**.

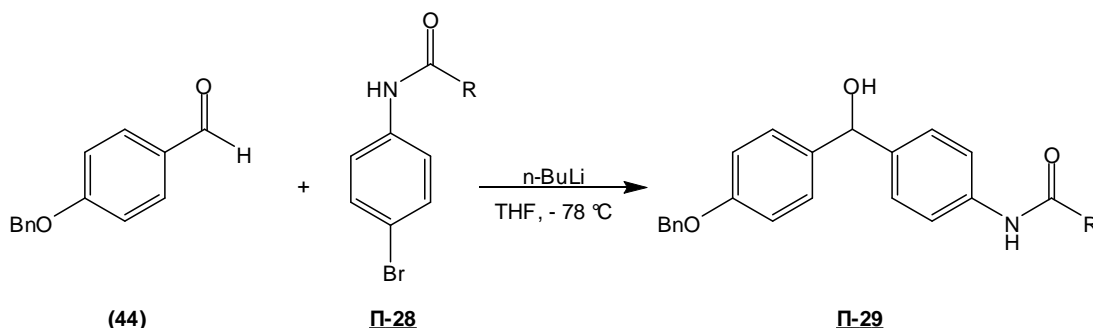
Η αντίδραση του αμιδίου **Π-30α** με την κετόνη **45** –σε συνθήκες McMurry– (Σχήμα 5.8), οδήγησε στη σύνθεση του επιθυμητού αναλόγου **Π-31α**. Αν και οι βιβλιογραφικές αναφορές σε παρεμφερή υποστρώματα¹⁸⁻²⁰ παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το Z προϊόν, στην παρούσα διατριβή τα προϊόντα της

αντίδρασης συντέθηκαν ως μείγματα των διαστερομερών Z/E σε αναλογία 1:1, σε καλή απόδοση (55%).



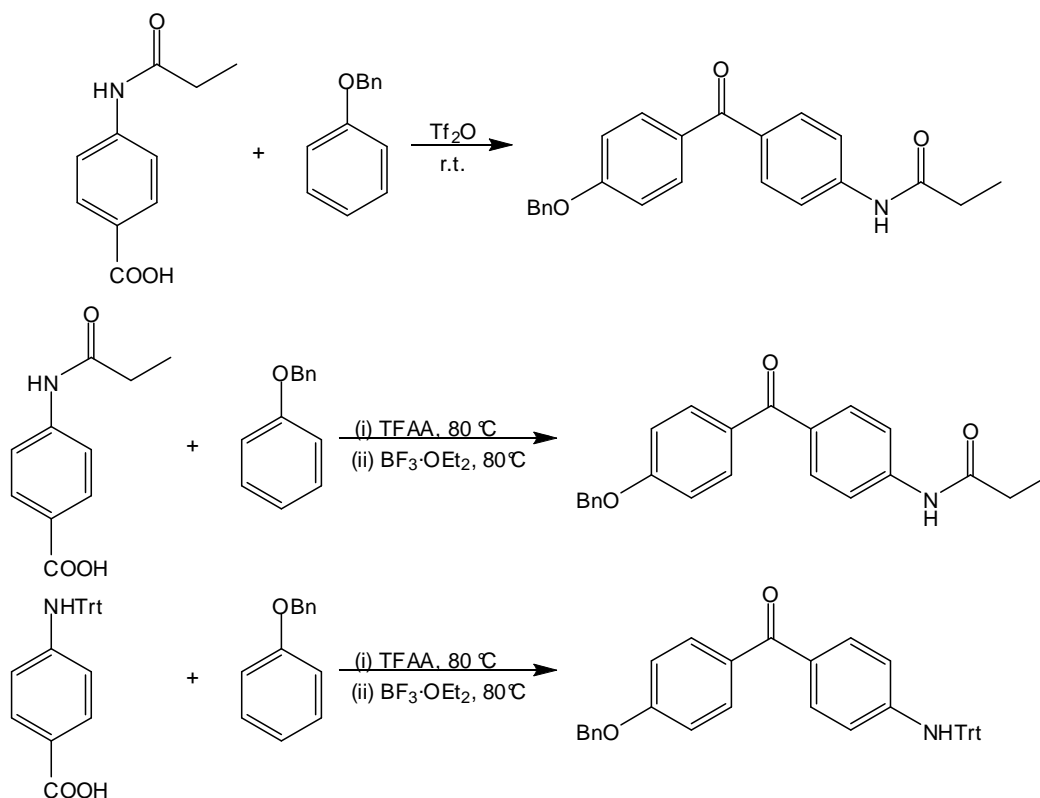
Σχήμα 5.8. Σύνθεση του αναλόγου **Π-31α** μέσω της αντίδρασης McMurry.

Το δεύτερο συνθετικό πρόβλημα που έπρεπε να επιλυθεί αφορούσε τη σύνθεση των πρόδρομων υδροξυ-αναλόγων **Π-29** αφού η γενική αντίδραση, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.9 έδωσε τα επιθυμητά προϊόντα σε μέτριες αποδόσεις (15 – 55%).



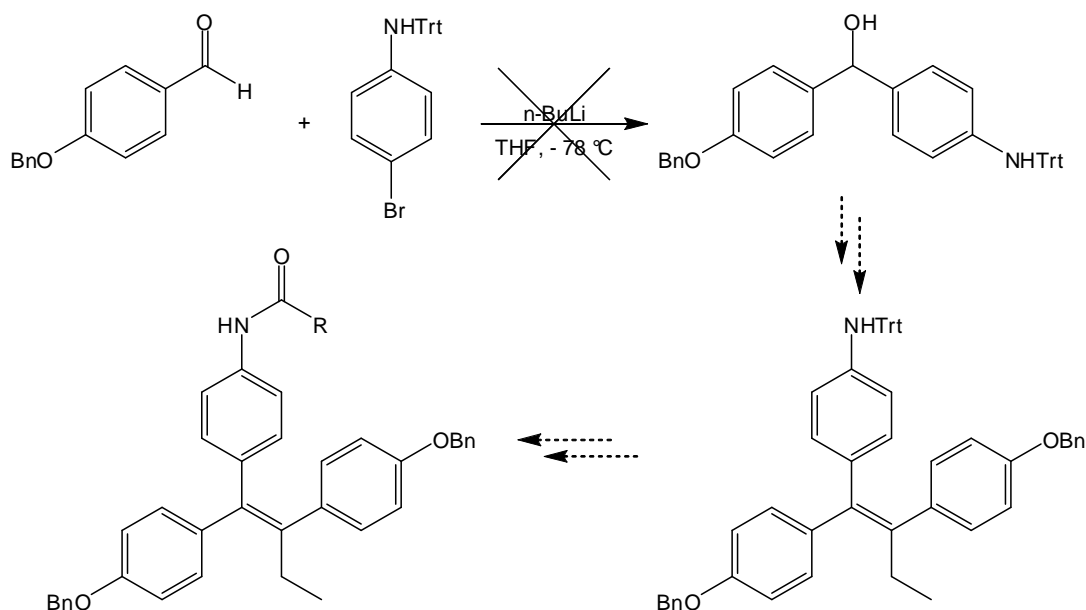
Σχήμα 5.9. Γενική μέθοδος σύνθεσης των ενώσεων **Π-29**.

Η βιβλιογραφική έρευνα έδειξε ότι υπάρχουν 2 διαφορετικές συνθέσεις που οδηγούν απευθείας στις ενδιάμεσες ενώσεις **Π-30**, οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα αποφυγής του σταδίου της οξείδωσης των ενώσεων **Π-29**. Οι συνθέσεις αυτές είναι η: 1) ακυλίωση παρουσία τριφθορομεθυλοσουλφονικού ανυδρίτη (Tf_2O)²¹ (Σχήμα 5.10) και 2) ακυλίωση Friedel-Crafts²² (Σχήμα 5.10). Στη συνέχεια, παρά τις επίμονες προσπάθειες που καταβλήθηκαν, δεν έγινε δυνατή η τελική σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος με τις πορείες αυτές.



Σχήμα 5.10. Ακυλίωση και καταλυτική ακυλίωση Friedel-Crafts.

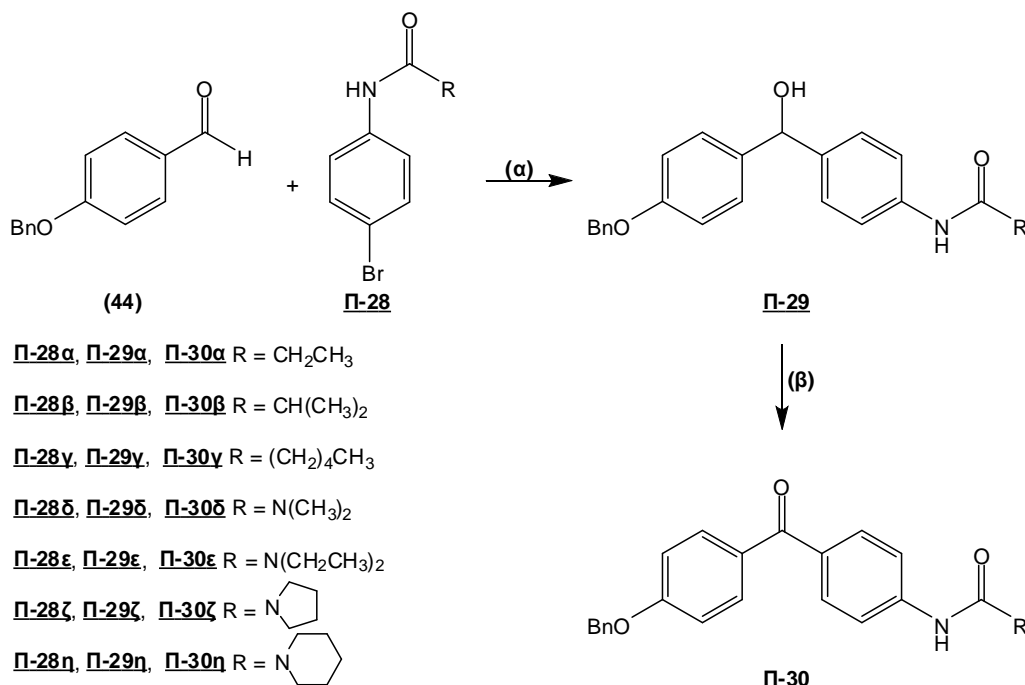
Τέλος, οι προσπάθειες για τη σύνθεση πρώτα του σκελετού των αναλόγων της ταμοξιφαίνης -χρησιμοποιώντας την 4-βρωμο-*N*-τριτυλανιλίνη- και στη συνέχεια τη σύνθεση της πλευρικής αλυσίδας (Σχήμα 5.11) δεν ήταν επιτυχής.



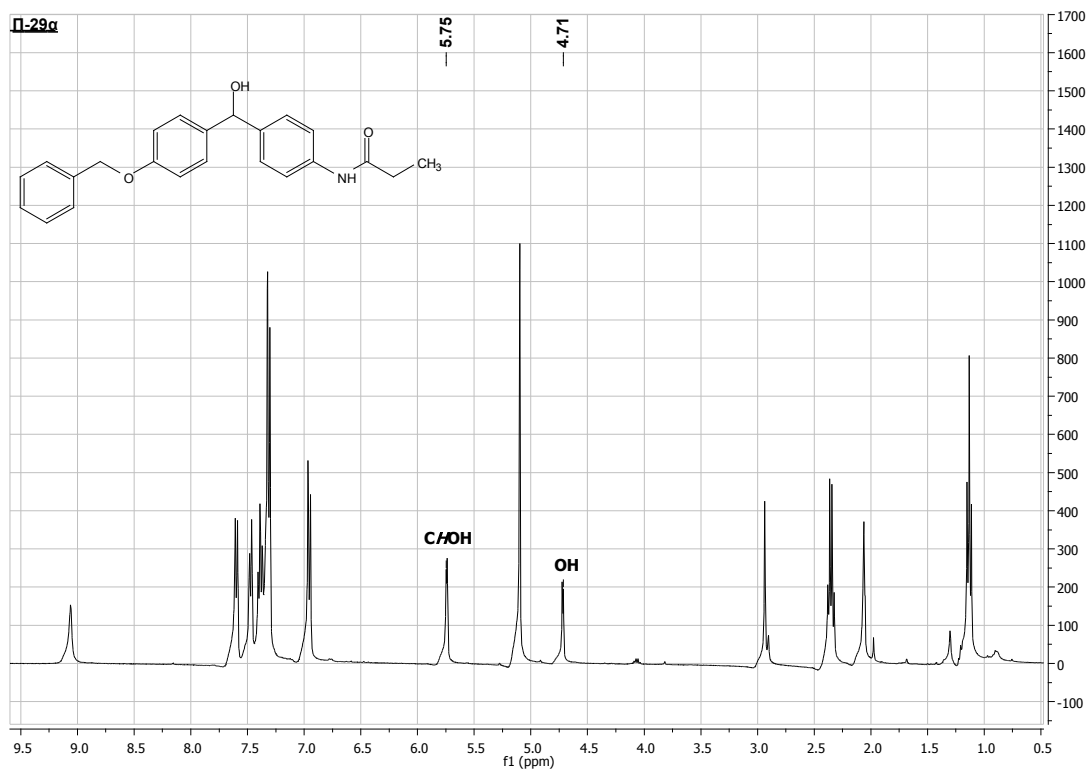
Σχήμα 5.11. Προσπάθεια σύνθεσης του βασικού σκελετού των αναλόγων της ταμοξιφαίνης.

5.2.3 Σύνθεση

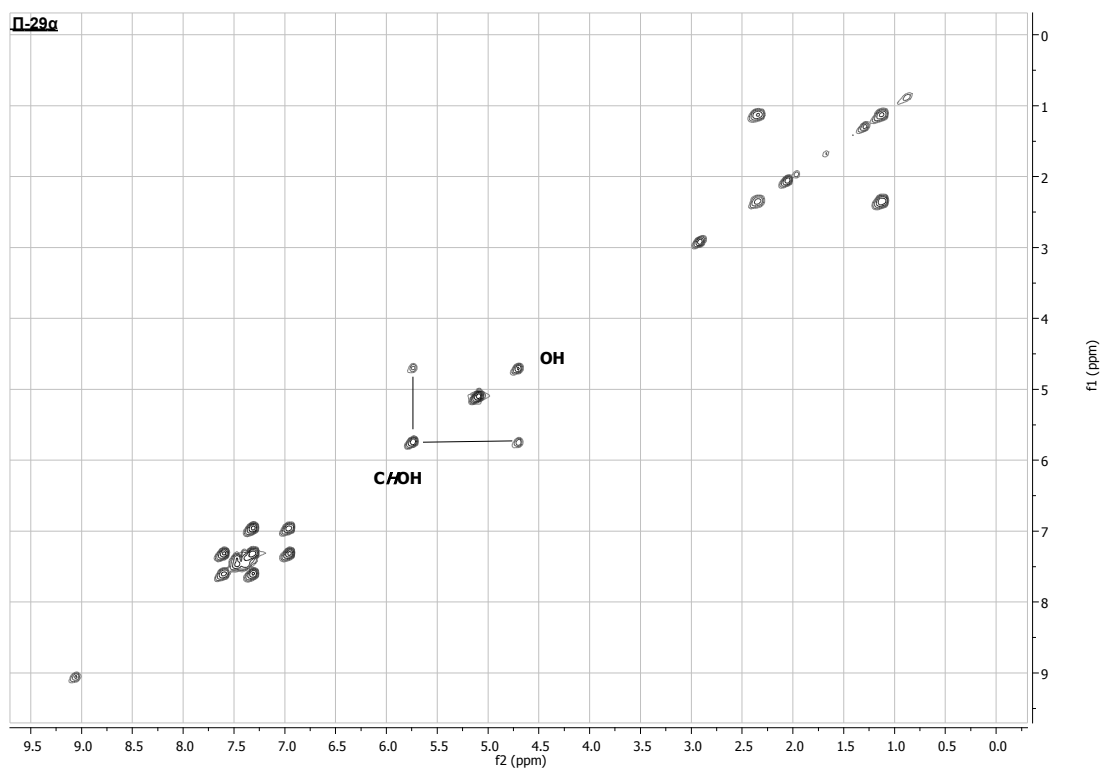
Η σύνθεση των αναλόγων της ταμοξιφαίνης ξεκίνησε με την προσθήκη ποικίλων *N*-(4-βρωμοφαινυλ)αμιδίων **Π-28** στη 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεΐδη (**44**) δίνοντας σε μέτριες αποδόσεις (15 – 55%) τις αντίστοιχες ενώσεις **Π-29**, οι οποίες οξειδώθηκαν σχεδόν ποσοτικά (85 – 95%) με τη χρήση του αντιδραστηρίου Jones στις αντίστοιχες ενώσεις **Π-30** (Σχήμα 5.12). Η επιτυχία της προσθήκης είναι δυνατόν να διαπιστωθεί στο φάσμα COSY NMR της ένωσης **Π-29α** (Φάσμα 5.2), στο οποίο παρατηρείται η σύζευξη του *CHOH* πρωτονίου της ένωσης με το πρωτόνιο της *OH* ομάδας (Φάσμα 5.1). Αντίστοιχα, η οξείδωση του μορίου πιστοποιήθηκε από το φάσμα ¹H NMR της **Π-30α** (Φάσμα 5.3) από την απουσία των δύο αυτών κορυφών. Στη συνέχεια, ακολούθησε η σύζευξη McMurry των **Π-30** με την 1-(4'-(βενζυλοξυ)φαινυλο)πραπαν-1-όνη (**45**) παράγοντας απευθείας το σκελετό της ταμοξιφαίνης **Π-31** και **Π-32**, σε αναλογία 1:1 και καλές αποδόσεις (45 – 65%) (Σχήμα 5.13). Τέλος, η αποπροστασία των **Π-31** και **Π-32** -με τη χρήση BBr₃ στους -78 °C- έδωσε τα επιθυμητά ανάλογα της ταμοξιφαίνης **Π-33** και **Π-34** (Σχήμα 5.13).



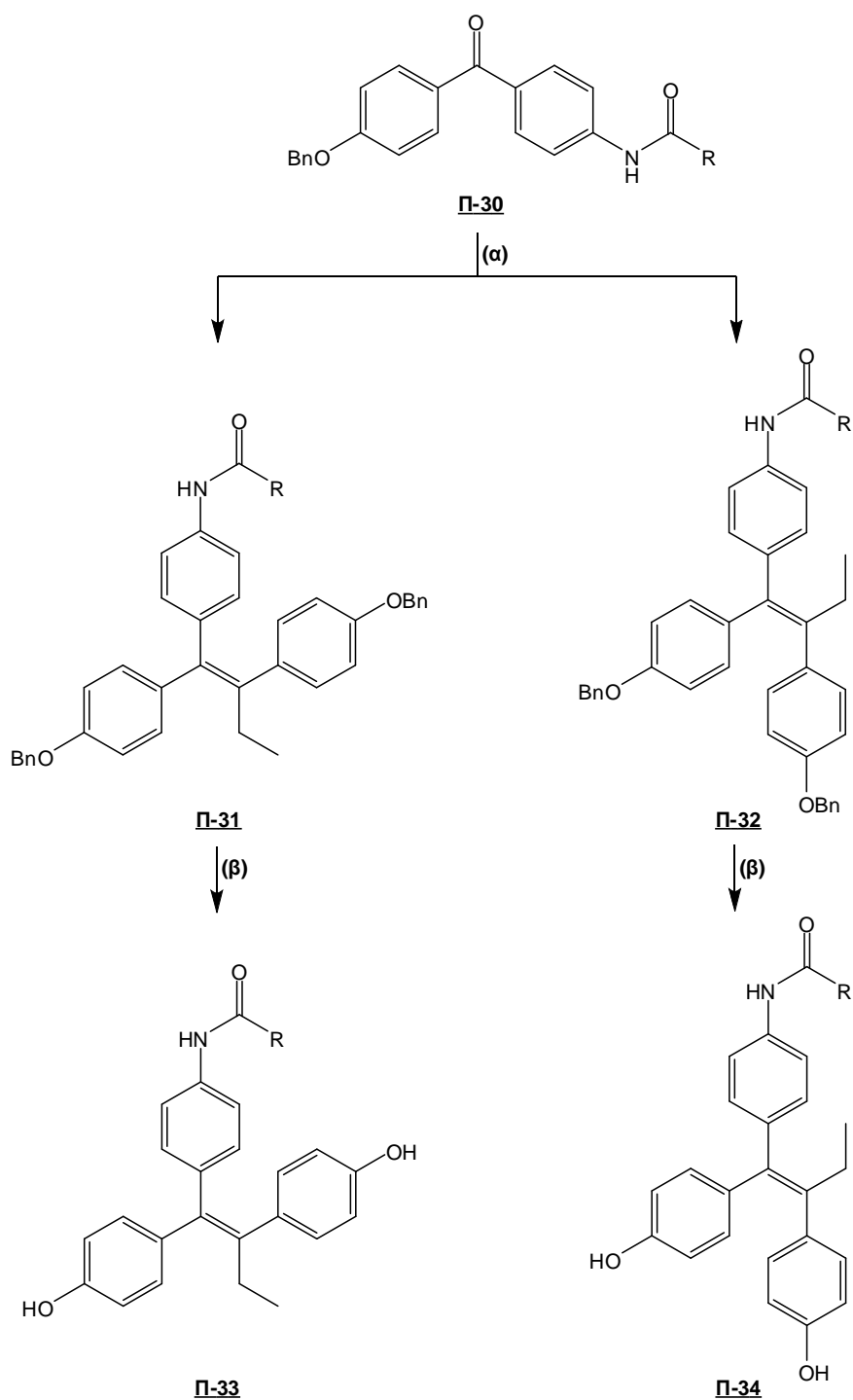
Σχήμα 5.12. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) *n*-BuLi, THF, -78 °C; (β) Αντιδραστήριο Jones, ακετόνη 0 °C.



Φάσμα 5.1. ^1H NMR της ένωσης **Π-29α** (acetone- d_6).



Φάσμα 5.2. COSY NMR της ένωσης **Π-29α**.



Π-30α, Π-31α, Π-32α, Π-33α, Π-34α R = CH₂CH₃

Π-30ε, Π-31ε, Π-32ε, Π-33ε, Π-34ε R = N(CH₂CH₃)₂

Π-30β, Π-31β, Π-32β, Π-33β, Π-34β R = CH(CH₃)₂

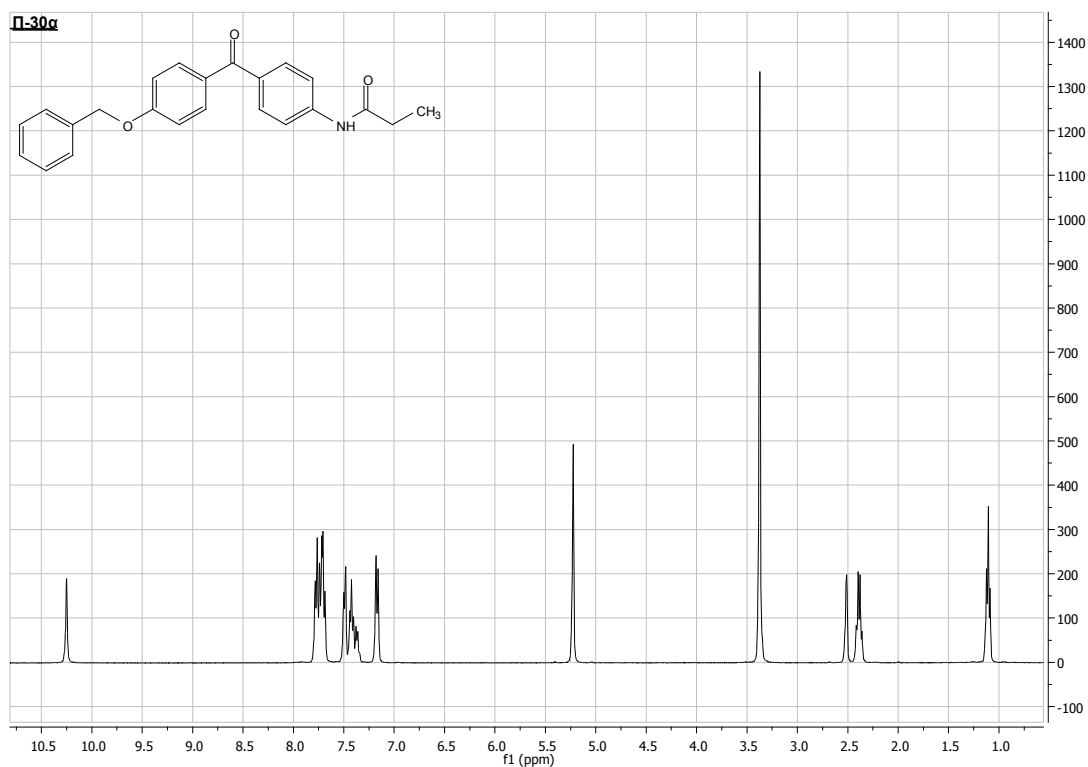
Π-30ζ, Π-31ζ, Π-32ζ, Π-33ζ, Π-34ζ R = N

Π-30γ, Π-31γ, Π-32γ, Π-33γ, Π-34γ R = (CH₂)₄CH₃

Π-30η, Π-31η, Π-32η, Π-33η, Π-34η R = N

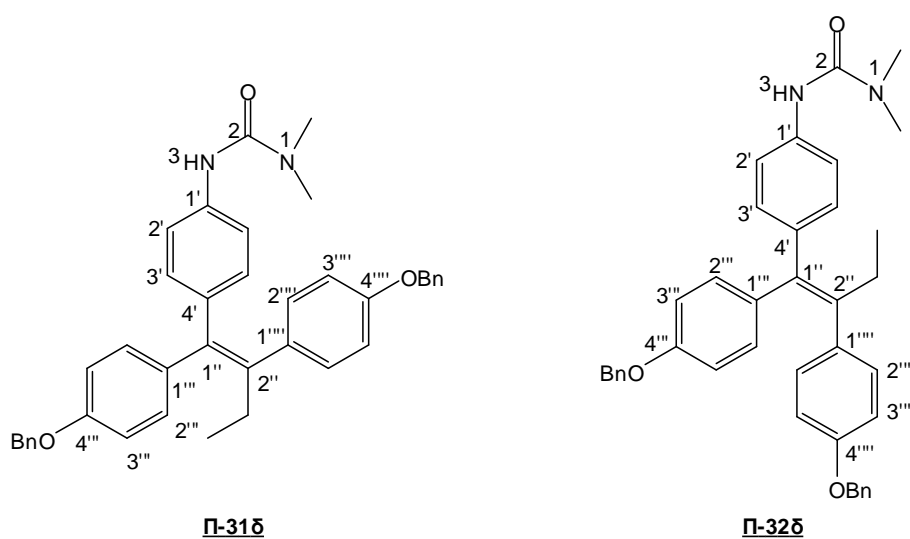
Π-30δ, Π-31δ, Π-32δ, Π-33δ, Π-34δ R = N(CH₃)₂

Σχήμα 5.13. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (α) TiCl₄, Zn, THF 1-(4'-βενζυλοξυ)φαινυλπραπαν-1-όνη; (β) BBr₃, DCM, -78 °C.



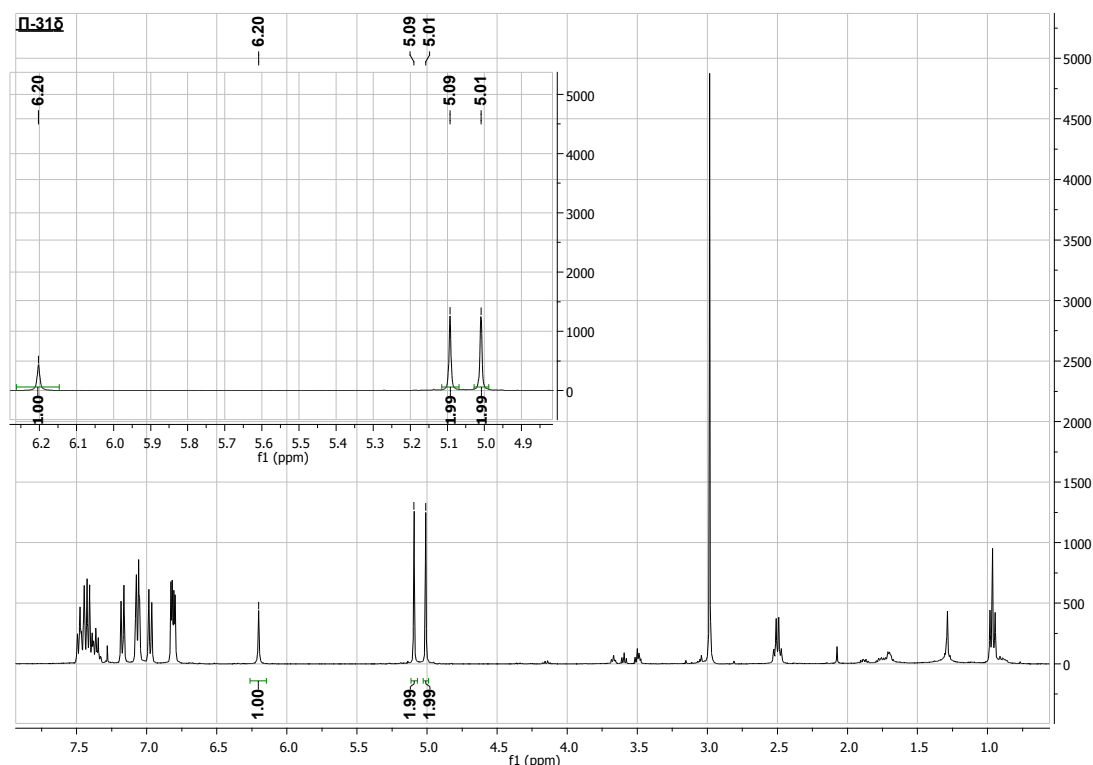
Φάσμα 5.3. ^1H NMR της ένωσης **Π-30α** (DMSO).

Για την πλήρη εξακρίβωση της στεreoχημείας των μορίων **Π-31** και **Π-32** με NMR, εκτός από τα πειράματα με ^1H και ^{13}C , διενεργήθηκαν τα πειράματα HMQC, HMBC και NOESY. Η παραπάνω πειραματισμοί παρουσιάζονται ενδεικτικά για τα μόρια **Π-31δ** και **Π-32δ** (Εικόνα 5.5).

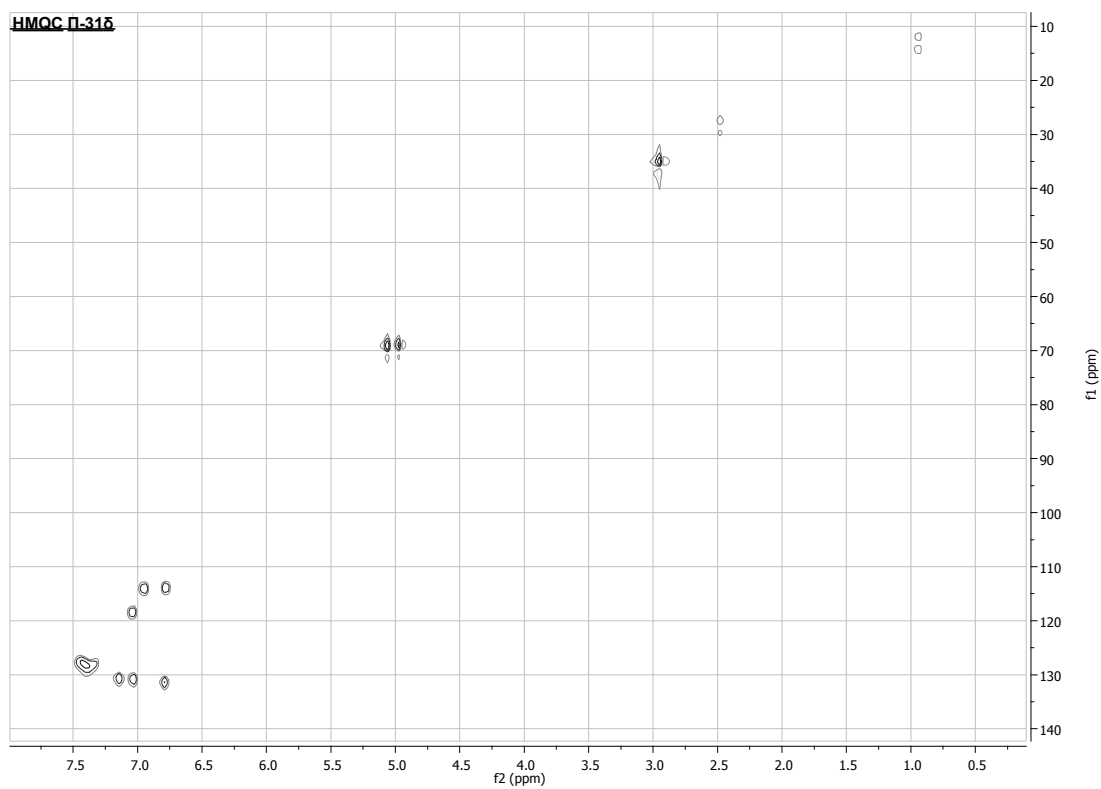


Εικόνα 5.5. Δομές των αναλόγων **Π-31δ** και **Π-32δ**.

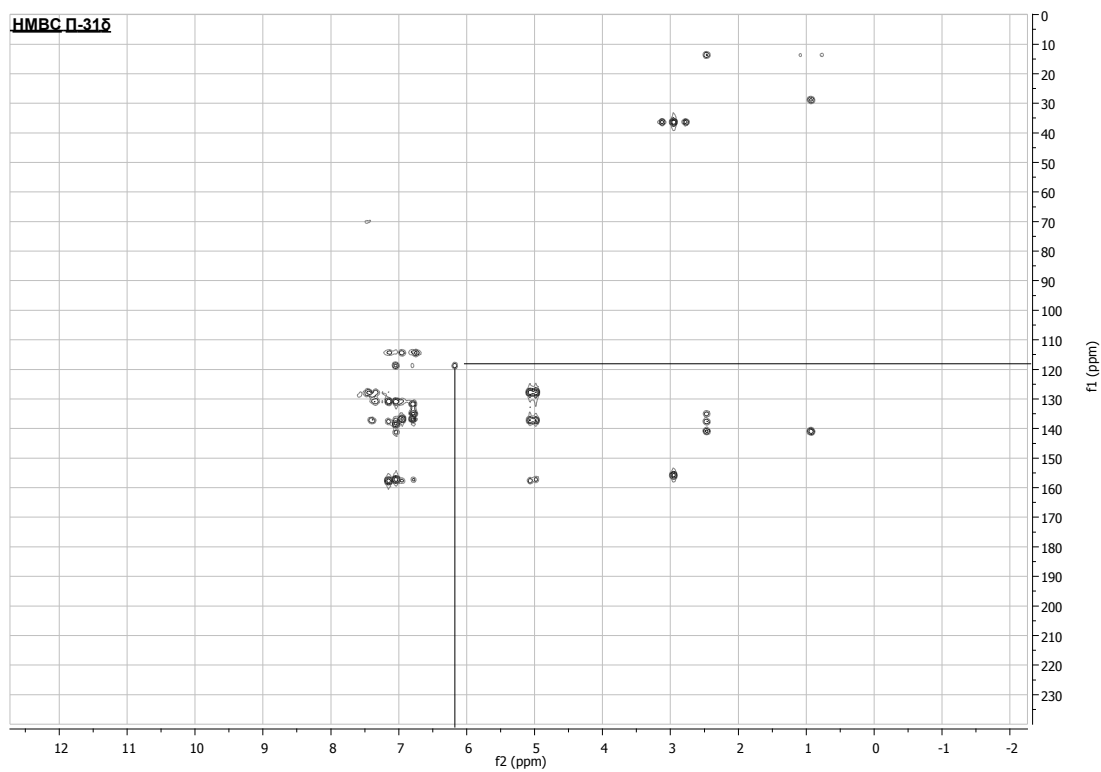
Από τη μελέτη του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **Π-31δ** (Φάσμα 5.4) παρατηρείται ότι η κορυφή στα 6.20 ppm ολοκληρώνεται ως ένα πρωτόνιο (NH), σε σχέση με τα βενζυλικά πρωτόνια στα 5.09 και 5.01 ppm που έχουν ολοκλήρωση δύο. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται από το φάσμα HMQC (Φάσμα 5.5), στο οποίο δεν υπάρχει σχέση πρωτονίου άνθρακα στην περιοχή 5.5 – 6.5 ppm. Επιπλέον, στο φάσμα HMBC (Φάσμα 5.6) το πρωτόνιο στα 6.20 ppm σχετίζεται με τον C στα 118.6 ppm, ο οποίος βάση των ιδιοτήτων του φάσματος HMBC είναι δυνατόν να αποδοθεί μόνο στο H-2'. Το πρωτόνιο αυτό με βάση το φάσμα HMQC εμφανίζεται στα 7.05 ppm στο φάσμα πρωτονίου. Η συνδυαστική αποτίμηση των φασμάτων COSY, HMQC και HMBC οδήγησε στην απόδοση όλων των κορυφών των πρωτονίων και των ανθράκων της ένωσης **Π-31δ**. Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι κορυφές των πρωτονίων H-3' στα 6.82 ppm, H-2''' στα 7.17 ppm, H-2'''' στα 7.07 ppm, CH_2CH_3 στα 2.50 ppm και CH_2CH_3 στα 0.96 ppm. Τέλος για τη διαμόρφωση της ένωσης **Π-31δ** από το φάσμα NOESY (Φάσμα 5.7), παρατηρείται η ύπαρξη σήματος μεταξύ των πρωτονίων CH_2CH_3 και H-2''' και των CH_2CH_3 και H-2'''' , τα οποία επιβεβαιώνουν τη διαμόρφωση του E ισομερούς που παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.5.



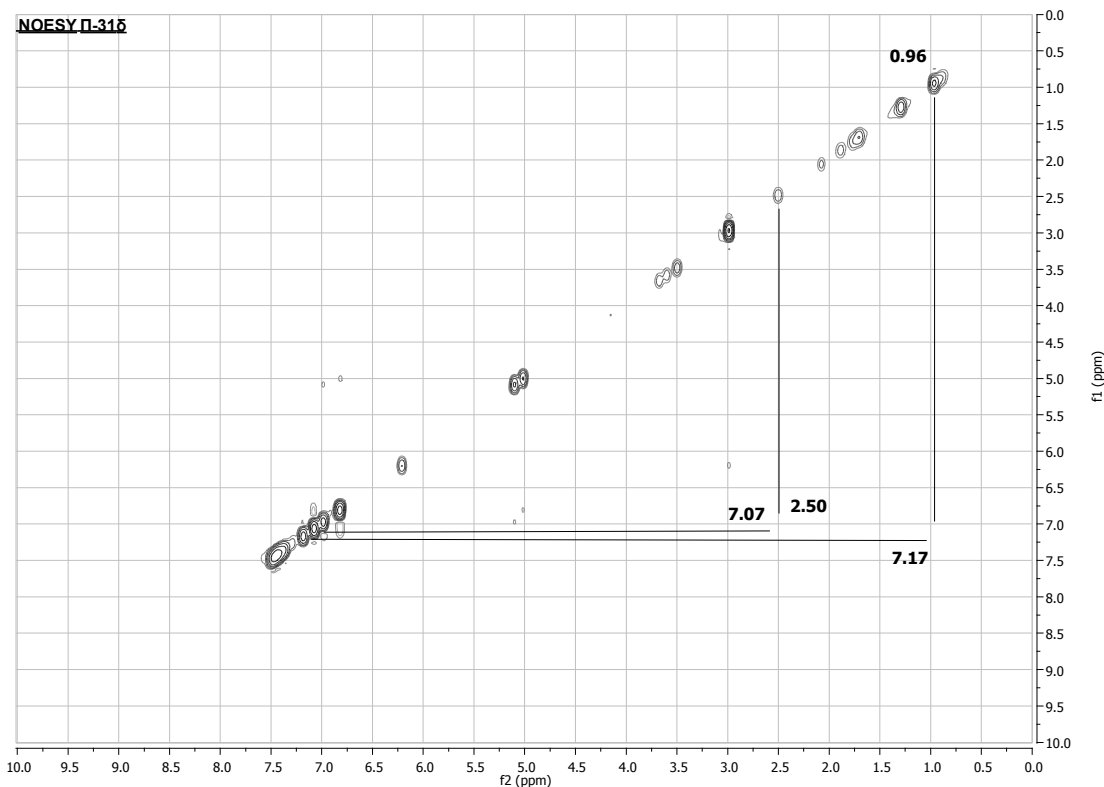
Φάσμα 5.4. $^1\text{H NMR}$ της ένωσης **Π-31δ** (CDCl_3).



Φάσμα 5.5. HMQC NMR της ένωσης Π-31δ.

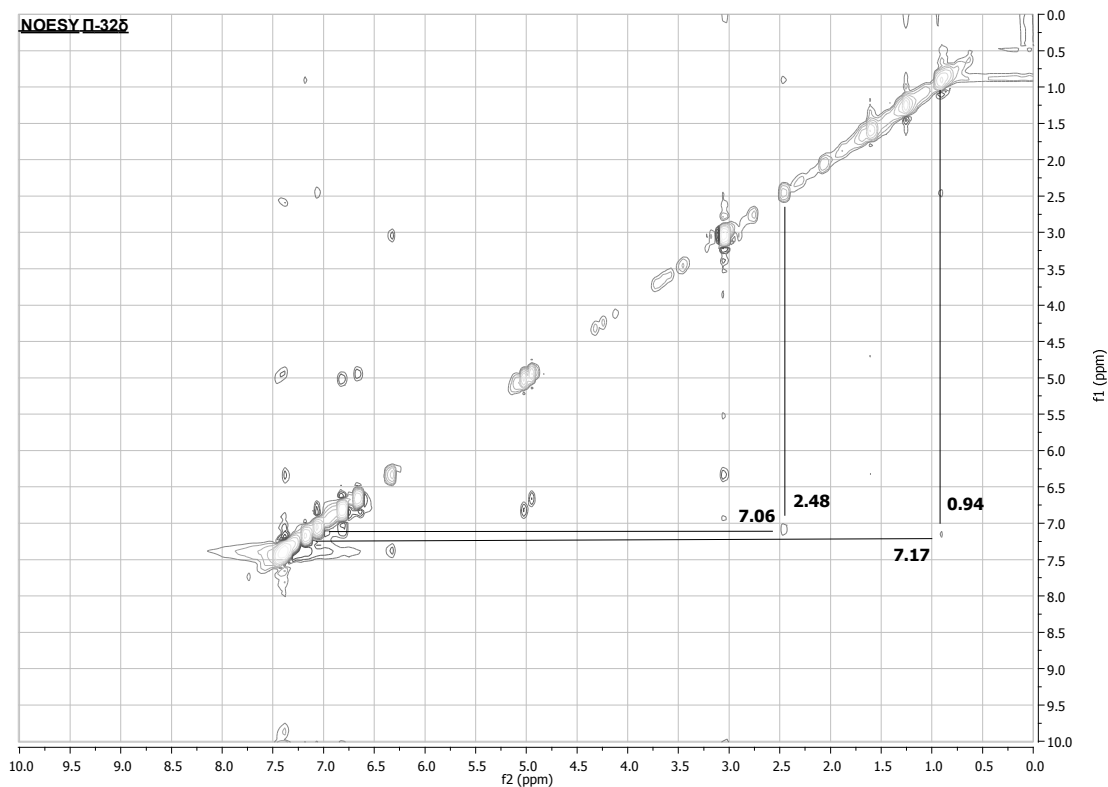


Φάσμα 5.6. HMBC NMR της ένωσης Π-31δ.



Φάσμα 5.7. NOESY NMR της ένωσης **Π-31δ**.

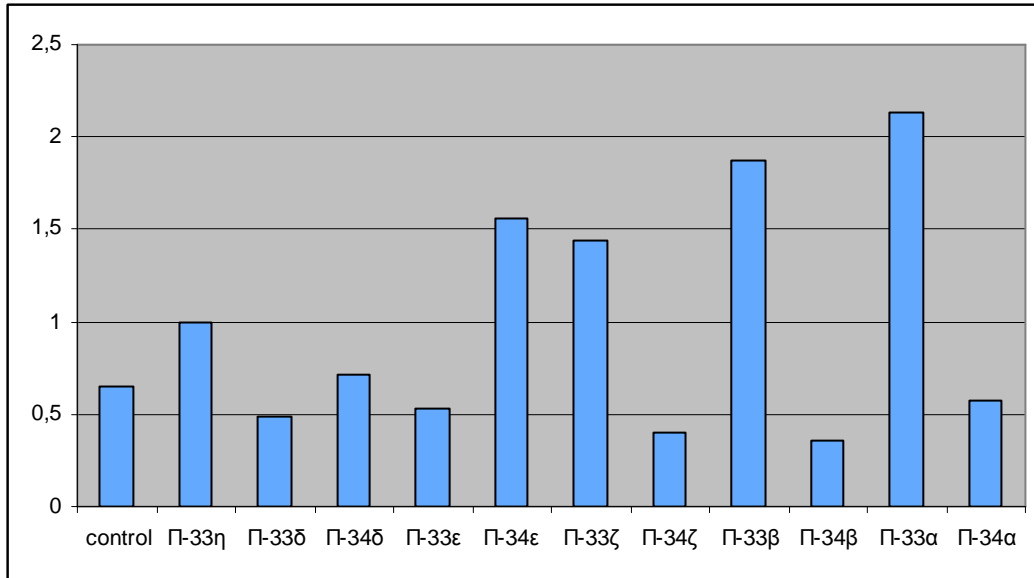
Ακολουθώντας τη ίδια διαδικασία και για την ένωση **Π-32δ** προσδιορίστηκαν οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων και των ανθράκων του μορίου. Ενδεικτικά αναφέρονται τα σήματα H-3' στα 7.17 ppm, H-2''' στα 6.81 ppm, H-2'''' στα 7.06 ppm, CH₂CH₃ στα 2.48 ppm και CH₂CH₃ στα 0.94 ppm. Τέλος για την εξακρίβωση της διαμόρφωσης της **Π-32δ** χρησιμοποιήθηκε το φάσμα NOESY (Εικόνα 5.10), στο οποίο παρατηρήθηκε η ύπαρξη σήματος μεταξύ των πρωτονίων CH₂CH₃ και H-3' και των CH₂CH₃ και H-2''''', τα οποία είναι επιβεβαιωτικά της διαμόρφωσης του Z ισομερούς που παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.5.



Φάσμα 5.8. NOESY NMR της ένωσης **Π-32δ**.

5.2.4 Βιολογική δράση

Στα πλαίσια της αποτίμησης της βιολογικής δράσης των νέων μορίων που συντέθηκαν, προσδιορίστηκε η *in vitro* δραστηριότητά τους με την δοκιμή της λουσιφεράσης στην κυτταρική σειρά HC11 (mouse mammary epithelial cells). Από τα προκαταρκτικά αποτελέσματα (Γράφημα 5.1) –και έχοντας ως δεδομένο ότι η οιστραδιόλη ενεργοποιεί το ERE τρεις με τέσσερις φορές σε σχέση με την αιθανόλη (control)- κρίνεται ότι τα μόρια **Π-33α** και **Π-33β** παρουσιάζουν οιστρογονική δράση που αντιστοιχεί περίπου στο 85-90% της δράσης της οιστραδιόλης, ενώ τα μόρια **Π-34ε** και **Π-33ζ** παρουσιάζουν περίπου το 50% της δράσης της οιστραδιόλης. Αντίθετα, τα μόρια **Π-34β** και **Π-34ζ** εμφανίζουν ισχυρή αντιοιστρογόνο δράση.



Γράφημα 5.1. Δράση των ενώσεων στην κυτταρική σειρά HC11.

5.2.5 Προοπτική

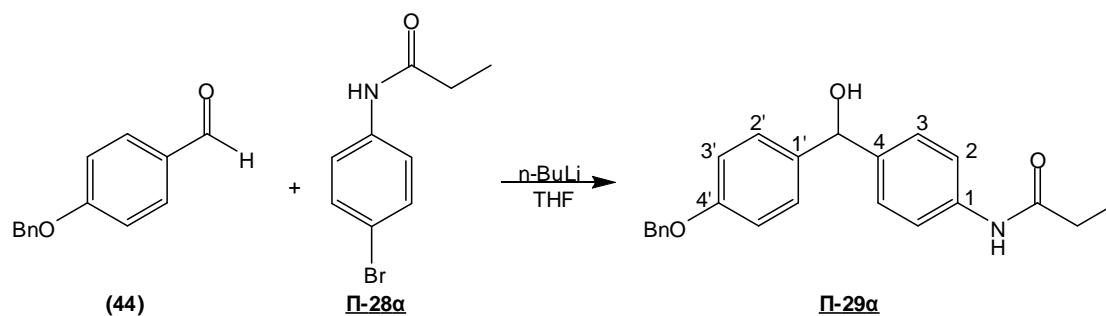
Περαιτέρω πειράματα είναι αναγκαία για την εξακρίβωση-διερεύνηση των παραπάνω αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα είναι απαραίτητα να γίνουν πειράματα για τον προσδιορισμό:

- εξαρτώμενης δόσης (dose dependent) με λουσιφεράση,
- IC_{50} , και
- μελέτη της δράσης των ενώσεων για τον ER_{α} και ER_{β} χωριστά.

Βιβλιογραφία

1. Meegan, M. J.; Hughes, R. B.; Lloyd, D. G.; Williams, D. C.; Zisterer, D. M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1072-1084.
2. *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials.*, 1998; Vol. 351.
3. Lubezyk, V.; Bachmann, H.; Gust, R. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5338-5345.
4. Schwartz, W.; Hartmann, R. W.; Schonenberger, H. *Arch. Pharm.* **1991**, *324*, 223-229.
5. Shani, J.; Gatiz, A.; Livshitz, T.; Biran, S. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1504-1511.
6. Miller, R. B.; Al-Hassan, M. I. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2121-2123.
7. Harper, M. J.; Walpole, A. L. *Nature* **1966**, *212*, 87-88.
8. Collins, D. J.; Hobbs, J. J.; Emmens, C. W. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 952-957.
9. Olier-Reuchet, C.; Aitken, D. J.; Bucourt, R.; Husson, H.-F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8221-8224.
10. Coe, P. L.; Scriven, C. E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1986**, *1*, 475-477.
11. McMurry, J. E. *Chem Rev* **1989**, *89*, 1513-1524.
12. Osborne, C. K.; Coronado-Heinsohn, E. B.; Hilsenbeck, S. G.; Wakeling, A. E.; McClelland, R. A.; Manning, D. L.; Nicholson, R. I. *J. Natl. Cancer Inst.* **1995**, *87*, 746-750.
13. Fisher, B.; Constantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Redmont, C. K.; Kavanah, M. S.; Chiu, E. T.; Ford, L.; Wolmark, N. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1371-1388.
14. MacGregor, J.; Jordan, V. C. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 151-196.
15. Mordini, A. *In Advances in Carbanion Chemistry*; Jai Press, Greenwich, 1992.
16. Schlosser, M. *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1627-1634.
17. Faigl, F.; Schlosser, M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3369-3370.
18. Gauthier, S.; Mailhot, J.; Labrie, F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3890-3893.
19. Uddin, J.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. *Synlett.* **2004**, *9*, 1513-1516.
20. Moreau, A.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5340-5350.
21. Khodaei, M. M.; Alizadeh, A.; Nazari, E. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4199-4202.
22. Wilkinson, M. C.; Saez, F.; Hon, W. L. *Synlett.* **2006**, *7*, 1063-1066.

5.3 Πειραματικό Μέρος

5.3.1 Γενική μέθοδος παρασκευής των αναλόγων **Π-29***N*-(4-((4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)φαινυλ)προπιοναμίδιο **Π-29α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
40%	C ₂₃ H ₂₃ NO ₃	361.43	–	R _f = 0.26 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα παγωμένο στους -50 °C αναδεύόμενο διάλυμα του αμιδίου **Π-28α** (1.2 g, 5.2 mmol) σε THF (60 mL), προστέθηκε στάγδην n-BuLi (9.7 mL, 1.6 M σε εξάνιο, 16 mmol) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 10 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Στη συνέχεια, προστέθηκε ένα διάλυμα της 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεΐδης (**44**) (1.0 g, 4.7 mmol) σε THF (10 mL) και το διάλυμα που προέκυψε αναδεύτηκε για 2 ώρες στους -50 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και στο υπόλειμμα προστέθηκε EtOAc. Η οργανική φάση εκχυλίστηκε 1 φορά με υδατικό διάλυμα 5% NH₄Cl, 1 φορά με H₂O και μία φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-29α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

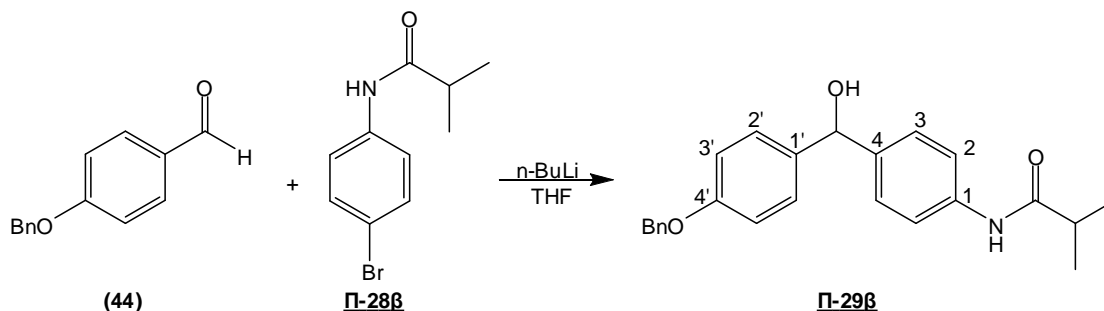
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 9.06 (1H, s, NH), 7.60 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.47 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'), 7.39 (1H, t, *J* 8.0 Hz, PhH-παρα), 7.37 – 7.30 (6H, m, PhH-ορθο, PhH-μετα και H-3), 6.96 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-3'), 5.75 (1H, d, *J* 3.6 Hz, CHOH), 5.01 (2H, s, CH₂O), 4.71 (1H, s, OH), 2.35 (2H, q, *J* 7.6 Hz, CH₂CH₃), 1.12 (3H, t, *J* 7.6 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 171.6 (NHCO), 157.9 (C-4'), 140.5 (C-4), 138.4 (C-1), 138.2 (PhCCH₂O), 137.6 (C-1'), 128.4 (C-2'), 127.6 (PhC-μετα και PhC-παρα), 127.4 (PhC-ορθο), 126.7 (C-3), 118.8 (C-2), 114.3 (C-3'), 74.50 (CHOH) 69.53 (C4'-OCH₂), 28.55 (CH₂CH₃), 9.045 (CH₂CH₃).

MS: 362.47 (M+H⁺), 384.48 (M+Na⁺).

IR (film) ν : 1665, 1013 cm⁻¹.

***N*-4-((4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)φαινυλ)ισοβουτυλαμίδιο Π-29β**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
15%	C ₂₄ H ₂₅ NO ₃	375.46	–	R _f = 0.19 Hex/EtOAc 6:4

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το υδροξυ αμίδιο Π-29β παρασκευάστηκε από το αμίδιο Π-28β και την 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεΰδη (**44**) ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 6:4 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

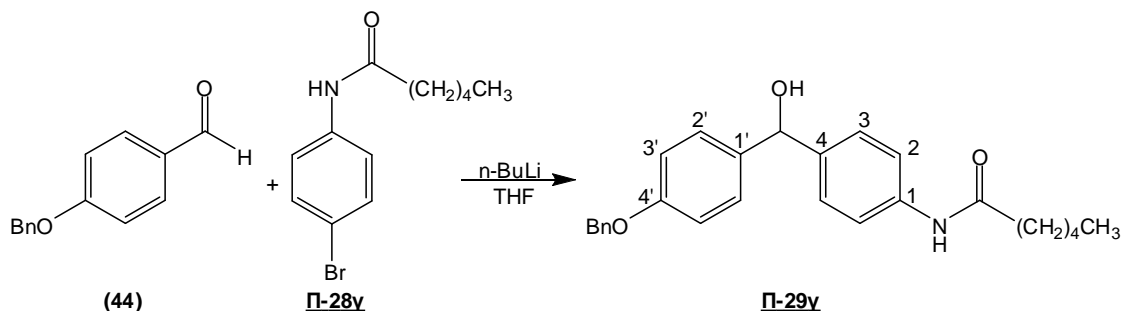
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 9.03 (1H, s, NH), 7.61 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.47 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'), 7.39 (1H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.37 – 7.30 (6H, m, PhH-ορθο, PhH-μετα και H-3), 6.96 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-3'), 5.74 (1H, s, CHOH), 5.10 (2H, s, CH₂O), 4.71 (1H, s, OH), 2.60 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.15 (6H, d, *J* 6.8 Hz, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 174.9 (NHCO), 157.8 (C-4'), 138.4 (C-4), 138.2 (C-1), 137.6 (PhCCH₂O), 128.4 (C-2'), 127.6 (PhC-μετα και PhC-παρα), 127.5 (PhC-ορθο), 126.6 (C-3), 120.9 (C-1'), 118.9 (C-2), 114.3 (C-3'), 74.48 (CHOH) 69.50 (C4'-OCH₂), 35.68 (CH(CH₃)₂), 19.02 (CH(CH₃)₂).

MS: 376.37 (M+H⁺), 398.37 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1663, 1019 cm⁻¹.

N*-4-((4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)φαινυλ)εξαναμίδιο **Π-29γ*

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
30%	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	403.51	–	R _f = 0.22 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το υδροξυ αμίδιο **Π-29γ** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-28γ** και την 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεΐδη (**44**) ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

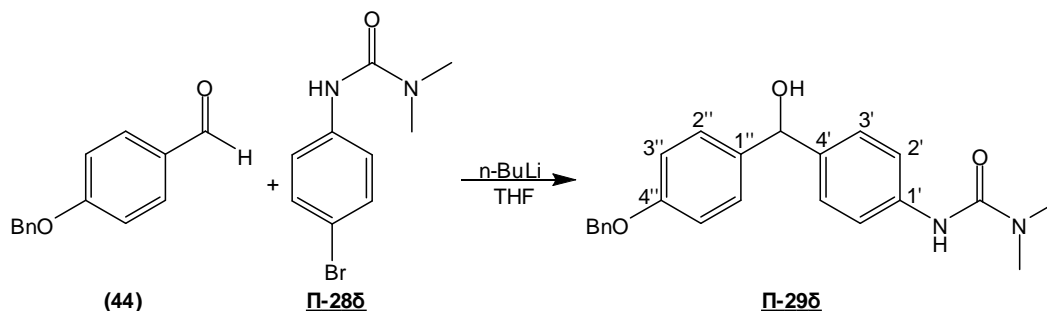
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 9.08 (1H, s, NH), 7.60 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.47 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-2'), 7.39 (1H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.37 – 7.30 (6H, m, PhH-ορθο, PhH-μετα και H-3), 6.96 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-3'), 5.74 (1H, d, *J* 4.0 Hz, CHOH), 5.10 (2H, s, CH₂O), 4.70 (1H, d, *J* 4.0 Hz, OH), 2.34 (2H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.67 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.33 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.90 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 170.2 (NHCO), 157.8 (C-4'), 138.4 (C-4), 138.2 (C-1), 137.6 (PhCCH₂O), 128.4 (C-2'), 127.6 (PhC-μετα και PhC-παρα), 127.4 (PhC-ορθο), 126.6 (C-3), 120.8 (C-1'), 118.8 (C-2), 114.3 (C-3'), 74.48 (CHOH) 69.50 (C4'-OCH₂), 36.77 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 31.29 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 25.08 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 22.22 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.34 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

MS: 404.57 (M+H⁺), 426.68 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1655, 1021 cm⁻¹.

3-(4'-((4''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)φαινυλ)-1,1-διμεθυλουρία **Π-29δ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
55%	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₃	376.45	–	R _f = 0.19 Hex/EtOAc 1:9

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η υδροξυ ουρία **Π-29δ** παρασκευάστηκε από την ουρία **Π-28δ** και την 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεϋδη (**44**) ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:9 και εξάτμιση του διαλύτη ως αφρός.

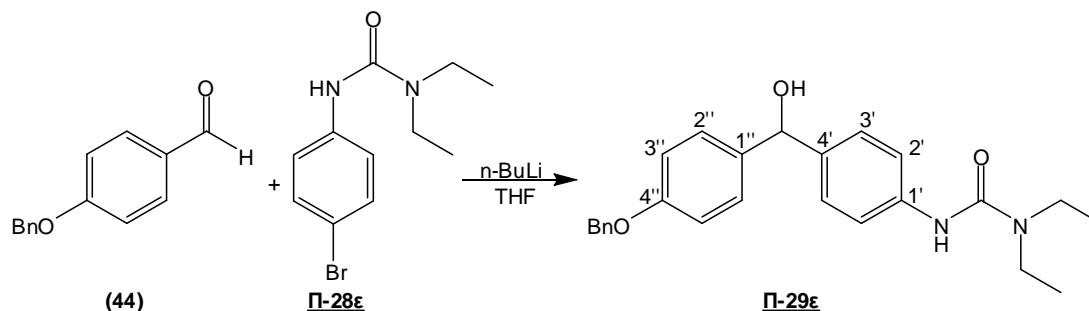
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 7.72 (1H, s, NH), 7.47 (6H, m, H-2', PhH-ορθο και PhH-μετα), 7.39 (1H, t, J 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.31 (2H, d, J 8.0 Hz, H-3'), 7.24 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2''), 6.95 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3''), 5.72 (1H, s, CHOH), 5.10 (2H, s, CH₂O), 4.71 (1H, s, OH), 2.97 (6H, s, NCH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 157.8 (C-4''), 155.8 (NHCO), 139.5 (C-1'), 139.2 (PhCCH₂O), 138.3 (C-4'), 137.6 (C-1''), 128.4 (C-2''), 127.6 (PhC-μετα και PhC-παρα), 127.5 (PhC-ορθο), 126.4 (C-3'), 119.2 (C-2'), 114.3 (C-3''), 74.56 (CHOH) 69.51 (C4''-OCH₂), 35.64 (NCH₃).

MS: 377.39 (M+H⁺), 399.40 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1645, 1019 cm⁻¹.

3-(4'-(4''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)φαινυλ)-1,1-δισαιθυλουρία **Π-29ε**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
30%	C ₂₅ H ₂₈ N ₂ O ₃	404.50	–	R _f = 0.21 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η υδροξυ ουρία **Π-29ε** παρασκευάστηκε από την ουρία **Π-28ε** και την 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεΐδη (**44**) ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

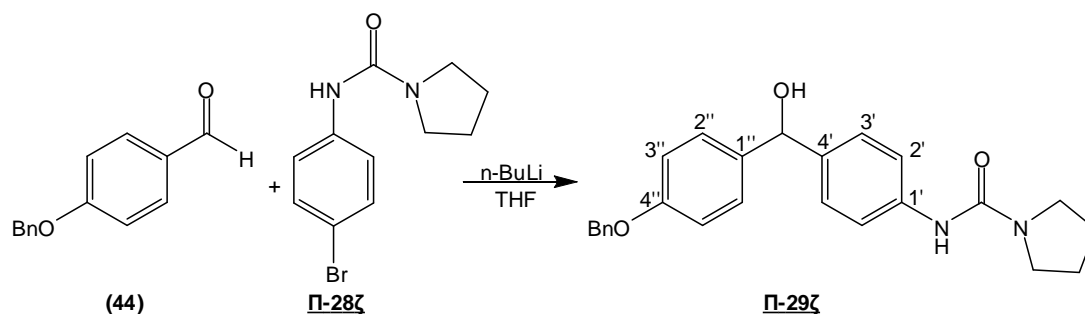
¹H NMR (acetone-d₆): δ = 7.62 (1H, s, NH), 7.49 – 7.47 (4H, m, H-2' και PhH-μετα), 7.39 (1H, t, J 7.6 Hz, PhH-παρα), 7.37 – 7.30 (4H, m, H-3' και PhH-ορθο), 7.24 (2H, d, J 7.6 Hz, H-2''), 6.95 (2H, d, J 7.6 Hz, H-3''), 5.72 (1H, s, CHOH), 5.10 (2H, s, CH₂O), 4.70 (1H, s, OH), 3.41 (4H, q, J 6.8 Hz, NCH₂CH₃), 1.15 (6H, t, J 6.8 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 157.8 (C-4''), 154.5 (NHCO), 139.6 (C-1'), 139.2 (PhCCH₂O), 138.3 (C-4'), 137.6 (C-1''), 128.4 (C-2''), 127.6 (PhC-μετα και PhC-παρα), 127.5 (PhC-ορθο), 126.4 (C-3'), 119.4 (C-2'), 114.3 (C-3''), 74.55 (CHOH) 69.51 (C4''-OCH₂), 40.90 (NCH₂CH₃), 13.42 (NCH₂CH₃).

MS: 405.24 (M+H⁺), 427.24 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1642, 1012 cm⁻¹.

***N*-(4'-(4''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)φαινυλ)πυρολιδιν-1-καρβοξαμίδιο
Π-29ζ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
30%	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	402.49	164 – 165	R _f = 0.13 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το υδροξυ αμίδιο Π-29ζ παρασκευάστηκε από το αμίδιο Π-28ζ και την 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεΰδη (**44**) ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

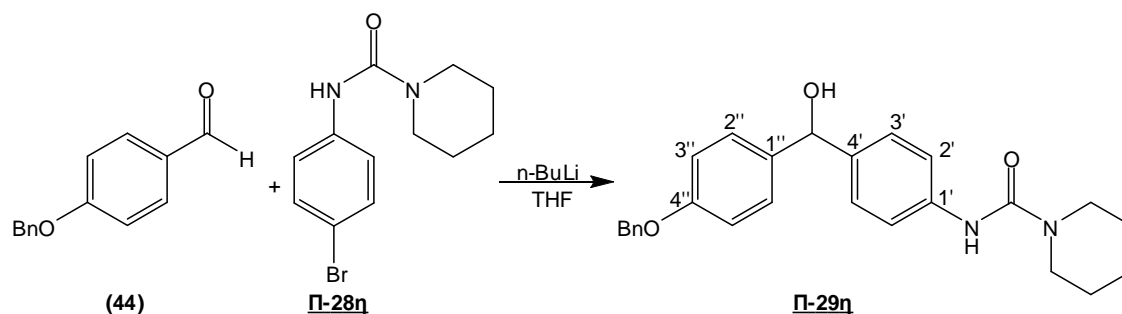
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 7.52 – 7.49 (4H, m, H-2' και PhH-μετα), 7.39 (1H, t, *J* 7.6 Hz, PhH-παρα), 7.34 – 7.30 (4H, m, H-3' και PhH-ορθο), 7.23 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-2''), 6.95 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-3''), 5.71 (1H, d, *J* 4.0 Hz, CHOH), 5.10 (2H, s, CH₂O), 4.62 (1H, d, *J* 4.0 Hz, OH), 3.43 (4H, t, *J* 6.4 Hz, NCH₂CH₂), 1.92 (4H, t, *J* 6.4 Hz, NCH₂CH₂).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 157.9 (C-4''), 153.9 (NHCO), 139.6 (C-1'), 139.1 (PhCCH₂O), 138.3 (C-4'), 137.8 (C-1''), 128.4 (C-2''), 127.6 (PhC-ορθο, PhC-μετα, και PhC-παρα), 126.4 (C-3'), 118.8 (C-2'), 114.3 (C-3''), 74.55 (CHOH) 69.50 (C4''-OCH₂), 45.49 (NCH₂CH₂), 25.24 (NCH₂CH₂).

MS: 403.50 (M+H⁺), 425.49 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1646, 1024 cm⁻¹.

N*-((4'-(4''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)(υδροξυ)μεθυλ)φαινυλ)πιπεριδιν-1-καρβοξαμίδιο*Π-29η**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
35%	C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₃	416.51	166 – 167	R _f = 0.30 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το υδροξύ αμίδιο **Π-29η** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-28η** και την 4-(βενζυλοξυ)βενζαλδεΰδη (**44**) ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 3:7 και εξάτμιση του διαλύτη ως λευκό στερεό.

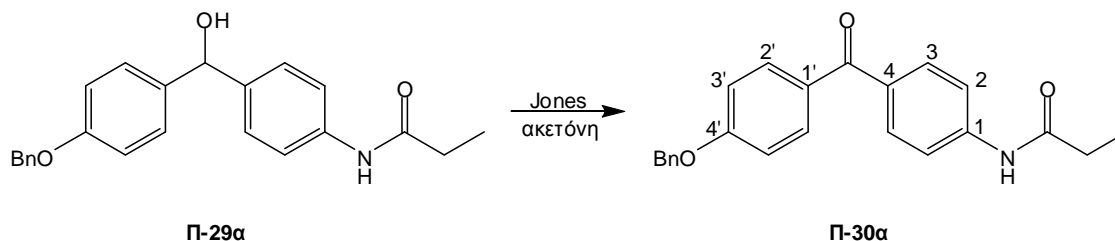
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆): δ = 7.85 (1H, s, NH), 7.48 – 7.45 (4H, m, H-2' και PhH-μετα), 7.39 (1H, t, *J* 7.6 Hz, PhH-παρα), 7.34 – 7.30 (4H, m, H-3' και PhH-ορθο), 7.24 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 6.95 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 5.71 (1H, d, *J* 4.0 Hz, CHOH), 5.10 (2H, s, CH₂O), 4.62 (1H, d, *J* 4.0 Hz, OH), 3.47 (4H, t, *J* 6.4 Hz, NCH₂CH₂CH₂), 1.62 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂), 1.53 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 157.6 (C-4''), 153.7 (NHCO), 139.3 (C-1'), 139.2 (PhCCH₂O), 138.1 (C-4'), 137.9 (C-1''), 128.3 (C-2''), 127.6 (PhC-μετα και PhC-παρα), 127.5 (PhC-ορθο), 126.4 (C-3'), 119.0 (C-2'), 114.3 (C-3''), 74.56 (CHOH), 69.50 (C4''-OCH₂), 44.88 (NCH₂CH₂CH₂), 25.72 (NCH₂CH₂CH₂), 24.39 (NCH₂CH₂CH₂).

MS: 417.46 (M+H⁺), 439.47 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1643, 1027 cm⁻¹.

5.3.2 Γενική μέθοδος παρασκευής των αναλόγων **Π-30***N*-(4-(4'-(βενζυλοξυ)βενζοΐλ)φαινυλ)προπιοναμίδιο **Π-30α**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₃ H ₂₁ NO ₃	359.42	–	R _f = 0.36 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα παγωμένο στους 0 °C αναδεύόμενο διάλυμα του υδροξυ αμιδίου **Π-29α** (0.20 g, 0.55 mmol) σε ακετόνη (22 mL), προστέθηκε το αντιδραστήριο Jones (4.3 mL) και το νέο διάλυμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστέθηκε προπανόλη-2 και στη συνέχεια ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκε EtOAc και η οργανική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως την εμφάνιση στερεού. Το προϊόν **Π-30α** λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

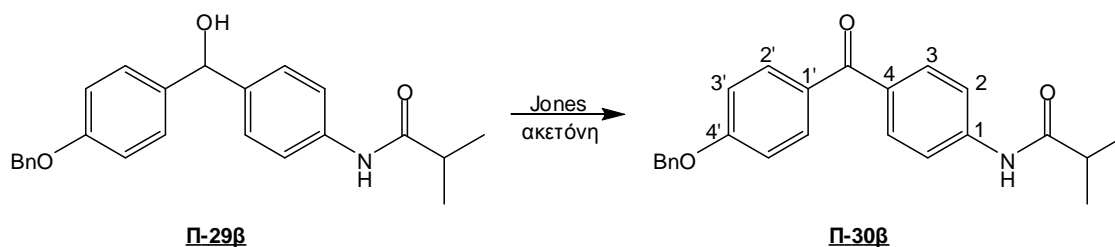
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 10.2 (1H, s, NH), 7.78 – 7.69 (6H, m, H-2, H-3 και H-2'), 7.49 (2H, d, *J* 7.2 Hz, PhH-ορθο), 7.42 (2H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-μετα), 7.36 (1H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.17 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-3'), 5.22 (2H, s, CH₂O), 2.39 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.11 (3H, t, *J* 7.6 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ = 193.7 (CO), 173.0 (NHCO), 162.2 (C-4'), 143.5 (C-1), 137.0 (PhCCH₂O), 132.4 (C-3), 132.2 (C-4), 131.2 (C-2'), 130.5 (C-1'), 129.0 (PhC-ορθο), 128.5 (PhC-παρα), 128.3 (PhC-μετα), 118.6 (C-2), 115.0 (C-3'), 69.99 (C4'-OCH₂), 30.11 (CH₂CH₃), 9.969 (CH₂CH₃).

MS: 360.47 (M+H⁺), 382.48 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1657, 1640 cm⁻¹.

N*-*(4-(4'-(βενζυλοξυ)βενζοϋλ)φαινυλ)ισοβουτυλαμίδιο Π-30β

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₂₄ H ₂₃ NO ₃	373.44	–	R _f = 0.41 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο **Π-30β** παρασκευάστηκε από το υδροξύ αμίδιο **Π-29β** και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

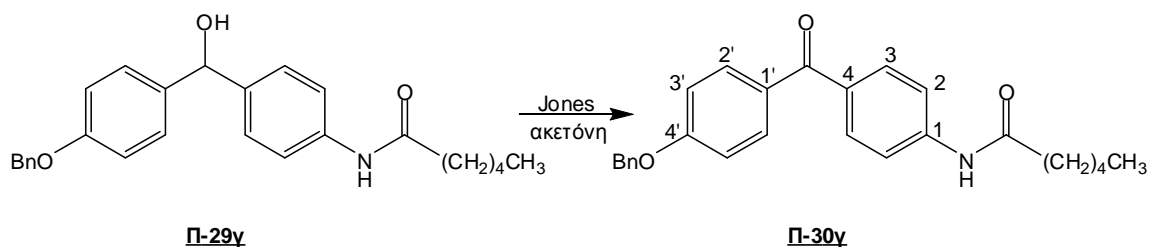
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 10.2 (1H, s, NH), 7.80 – 7.68 (6H, m, H-2, H-3 και H-2'), 7.49 (2H, d, *J* 7.2 Hz, PhH-ορθο), 7.42 (2H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-μετα), 7.36 (1H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.16 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-3'), 5.22 (2H, s, CH₂O), 2.65 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.13 (6H, d, *J* 6.8 Hz, CH(CH₃)₂).

¹³C NMR (DMSO): δ = 193.7 (CO), 176.3 (NHCO), 162.2 (C-4'), 143.6 (C-1), 137.0 (PhCCH₂O), 132.4 (C-3), 132.2 (C-4), 131.2 (C-2'), 130.5 (C-1'), 129.0 (PhC-ορθο), 128.5 (PhC-παρα), 128.3 (PhC-μετα), 118.7 (C-2), 115.0 (C-3'), 69.99 (C4'-OCH₂), 35.54 (CH(CH₃)₂), 19.86 (CH(CH₃)₂).

MS: 374.47 (M+H⁺), 396.48 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1698, 1635 cm⁻¹.

***N*-4-(4'-(βενζυλοξυ)βενζοϋλ)φαινυλ)εξαναμίδιο Π-30γ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₂₆ H ₂₇ NO ₃	401.50	–	R _f = 0.24 Hex/EtOAc 7:3

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο Π-30γ παρασκευάστηκε από το υδροξύ αμίδιο Π-29γ και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

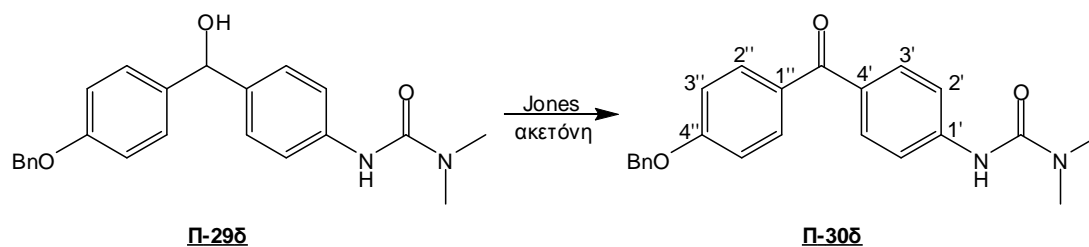
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 10.3 (1H, s, NH), 7.79 – 7.68 (6H, m, H-2, H-3 και H-2'), 7.50 (2H, d, *J* 7.2 Hz, PhH-ορθο), 7.43 (2H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-μετα), 7.36 (1H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.17 (2H, d, *J* 7.2 Hz, H-3'), 5.23 (2H, s, CH₂O), 2.34 (2H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.62 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.32 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.89 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ = 193.7 (CO), 172.4 (NHCO), 162.2 (C-4'), 143.5 (C-1), 137.0 (PhCCH₂O), 132.4 (C-3), 132.2 (C-4), 131.2 (C-2'), 130.5 (C-1'), 129.0 (PhC-ορθο), 128.5 (PhC-παρα), 128.3 (PhC-μετα), 118.6 (C-2), 115.0 (C-3'), 70.00 (C4'-OCH₂), 36.95 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 31.33 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 25.15 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 22.36 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 14.33 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

MS: 402.57 (M+H⁺), 424.59 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1638, 1596 cm⁻¹.

3-(4'-(4''-(βενζυλοξυ)βενζοϋλ)φαινυλ)-1,1-διμεθυλοουρία **Π-30δ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₃	374.43	159 – 160	R _f = 0.13 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η ουρία **Π-30δ** παρασκευάστηκε από την υδροξυ ουρία **Π-29δ** και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

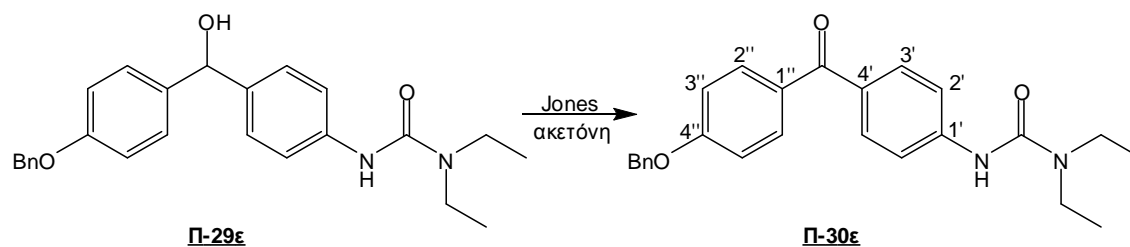
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.75 (1H, s, NH), 7.76 – 7.68 (6H, m, H-2, H-3 και H-2'), 7.50 (2H, d, J 7.2 Hz, PhH-ορθο), 7.45 (2H, t, J 7.2 Hz, PhH-μετα), 7.40 (1H, t, J 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.19 (2H, d, J 7.2 Hz, H-3'), 5.25 (2H, s, CH₂O), 2.99 (6H, s, NCH₃).
¹³C NMR (DMSO): δ = 193.7 (CO), 162.0 (C-4''), 155.7 (NHCO), 145.4 (C-1'), 137.0 (PhCCH₂O), 132.2 (C-3'), 131.0 (C-2''), 130.8 (C-4'), 130.7 (C-1''), 129.0 (PhC-ορθο), 128.5 (PhC-παρα), 128.3 (PhC-μετα), 118.7 (C-2'), 115.0 (C-3''), 69.98 (C4''-OCH₂), 36.73 (NCH₃).

MS: 375.35 (M+H⁺), 397.34 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1643, 1599 cm⁻¹.

3-(4'-(4''-(βενζυλοξυ)βενζοϋλ)φαινυλ)-1,1-δαιθυλουρία Π-30ε



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	402.49	–	R _f = 0.27 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η ουρία **Π-30ε** παρασκευάστηκε από την υδροξυ ουρία **Π-29ε** και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

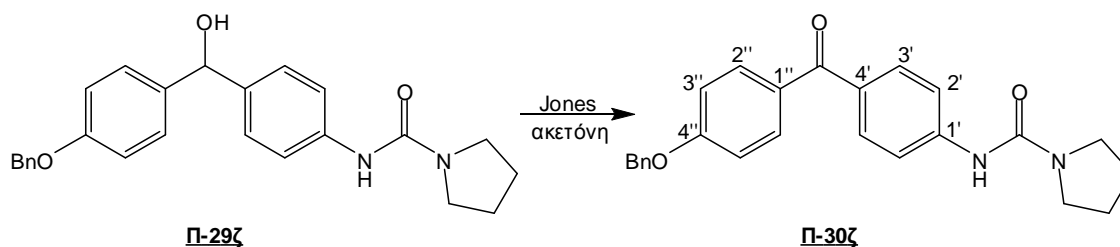
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.60 (1H, s, NH), 7.75 – 7.65 (6H, m, H-2, H-3 και H-2'), 7.51 (2H, d, J 7.2 Hz, PhH-ορθο), 7.44 (2H, t, J 7.2 Hz, PhH-μετα), 7.38 (1H, t, J 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.19 (2H, d, J 7.6 Hz, H-3'), 5.24 (2H, s, CH₂O), 3.41 (4H, q, J 6.4 Hz, NCH₂CH₃), 1.13 (6H, t, J 6.4 Hz, NCH₂CH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ = 193.7 (CO), 162.0 (C-4''), 154.4 (NHCO), 145.5 (C-1'), 137.0 (PhCCH₂O), 132.2 (C-3'), 131.0 (C-2''), 130.8 (C-4'), 130.7 (C-1''), 129.0 (PhC-ορθο), 128.5 (PhC-παρα), 128.3 (PhC-μετα), 118.8 (C-2'), 115.0 (C-3''), 69.98 (C4''-OCH₂), 40.99 (NCH₂CH₃), 13.31 (NCH₂CH₃).

MS: 403.26 (M+H⁺), 425.34 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1644, 1597 cm⁻¹.

***N*-(4'-(4''-(βενζυλοξυ)βενζοϋλ)φαινυλ)πυρολιδιν-1-καρβοξαμίδιο Π-30ζ**

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	400.47	178 – 179	R _f = 0.47 Hex/EtOAc 3:7

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο Π-30ζ παρασκευάστηκε από το υδροξύ αμίδιο Π-29ζ και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

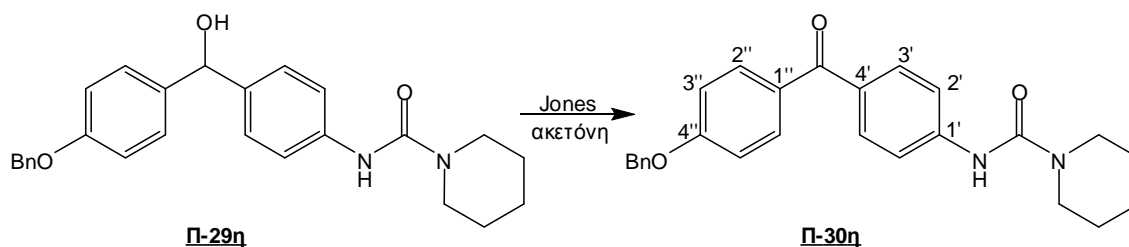
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.54 (1H, s, NH), 7.74 – 7.71 (6H, m, H-2, H-3 και H-2'), 7.48 (2H, d, *J* 7.2 Hz, PhH-ορθο), 7.42 (2H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-μετα), 7.36 (1H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.17 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-3'), 5.22 (2H, s, CH₂O), 3.80 (2H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 3.40 (2H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.67 (2H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.00 (2H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO): δ = 193.7 (CO), 162.0 (C-4''), 154.6 (NHCO), 145.5 (C-1'), 137.0 (PhCCH₂O), 132.2 (C-3'), 131.0 (C-2''), 130.8 (C-4'), 130.7 (C-1''), 129.0 (PhC-ορθο), 128.5 (PhC-παρα), 128.3 (PhC-μετα), 118.6 (C-2'), 115.0 (C-3''), 69.99 (C4''-OCH₂), 45.52 (NCH₂CH₂), 25.28 (NCH₂CH₂).

MS: 401.39 (M+H⁺), 423.39 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1645, 1598 cm⁻¹.

***N*-(4'-(4''-(βενζυλοξυ)βενζοϋλ)φαινυλ)πιπεριδιν-1-καρβοξαμίδιο Π-30η**

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
85%	C ₂₆ H ₂₆ N ₂ O ₃	414.50	205 – 206	R _f = 0.30 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αμίδιο Π-30η παρασκευάστηκε από το υδροξυ αμίδιο Π-29η και λήφθηκε ύστερα από διήθηση υπό κενό και πλύσιμο με DEE ως λευκό στερεό.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (DMSO): δ = 8.89 (1H, s, NH), 7.74 – 7.66 (6H, m, H-2, H-3 και H-2'), 7.51 (2H, d, *J* 7.2 Hz, PhH-ορθο), 7.44 (2H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-μετα), 7.38 (1H, t, *J* 7.2 Hz, PhH-παρα), 7.18 (2H, d, *J* 7.6 Hz, H-3'), 5.24 (2H, s, CH₂O), 3.47 (4H, t, *J* 6.4 Hz, NCH₂CH₂CH₂), 1.61 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂), 1.53 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂).

¹³C NMR (DMSO): δ = 193.7 (CO), 162.0 (C-4''), 154.8 (NHCO), 145.6 (C-1'), 137.0 (PhCCH₂O), 132.2 (C-3'), 131.1 (C-2''), 130.8 (C-4'), 130.6 (C-1''), 129.0 (PhC-ορθο), 128.5 (PhC-παρα), 128.3 (PhC-μετα), 118.5 (C-2'), 115.0 (C-3''), 69.98 (C4''-OCH₂), 45.24 (NCH₂CH₂CH₂), 25.99 (NCH₂CH₂CH₂), 24.51 (NCH₂CH₂CH₂).

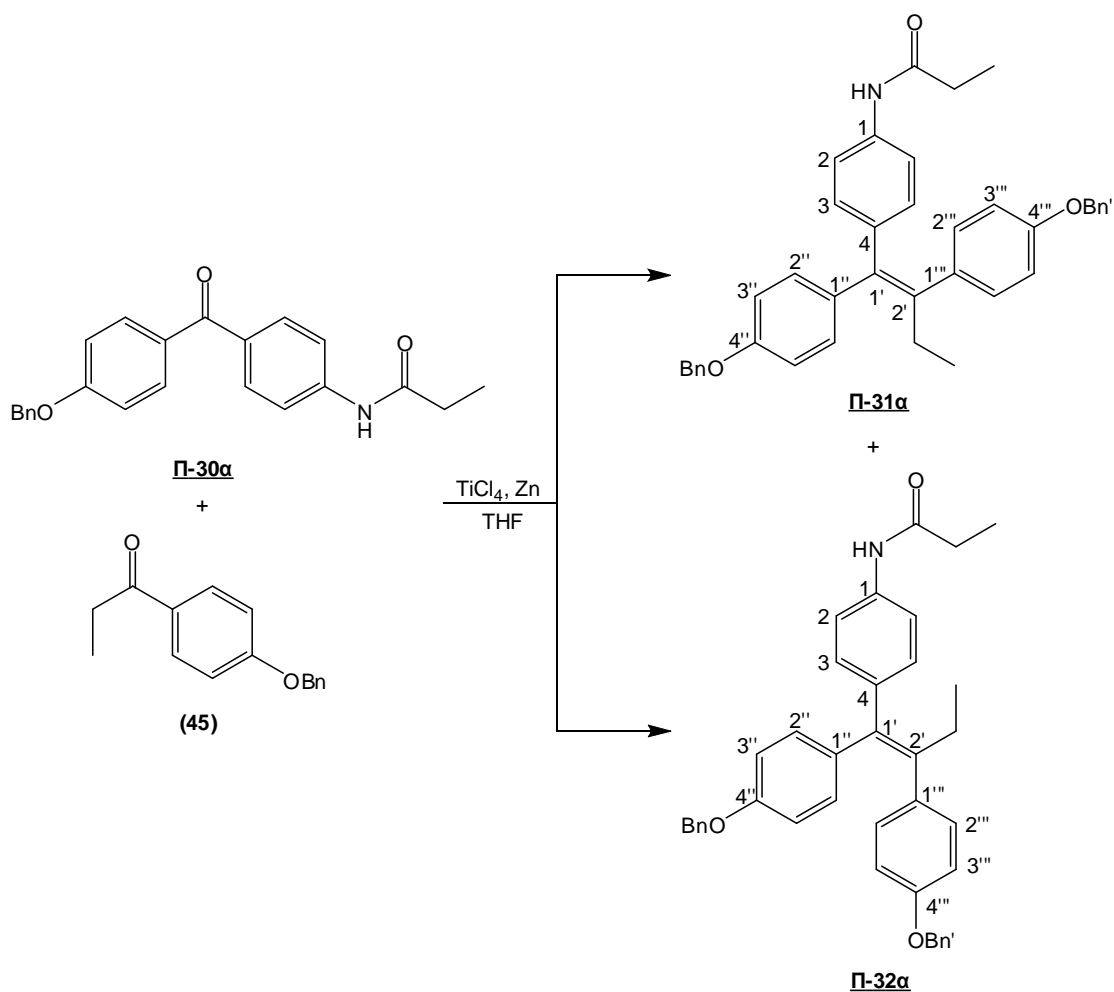
MS: 415.44 (M+H⁺), 437.49 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1644, 1599 cm⁻¹.

5.3.3 Γενική μέθοδος παρασκευής των αναλόγων **Π-31** και **Π-32**

(E)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)προπιοναμίδιο
Π-31α

(Z)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)προπιοναμίδιο
Π-32α

**Μέθοδος Παρασκευής:**

Σε ένα παγωμένο στους $-10\text{ }^\circ\text{C}$ αναδεδόμενο μείγμα του Zn (0.21 g, 3.2 mmol) σε THF (3.1 mL), προστέθηκε TiCl_4 (0.14 mL, 1.3 mmol) και το νέο μείγμα αναδευτήκε για ακόμα 10 λεπτά στους $-10\text{ }^\circ\text{C}$ και κατόπιν τέθηκε σε reflux για 2 ώρες. Στη συνέχεια, το μείγμα ψύχθηκε στους $0\text{ }^\circ\text{C}$ και προστέθηκε σε αυτό ένα διάλυμα, που αποτελείται από το αμίδιο **Π-30α** (0.12 g, 0.33 mmol) και την 1-(4'-

(βενζυλοξυ)φαινυλ)προπαν-1-όνη (**45**) (0.086 g, 0.36 mmol) σε THF (6.6 mL) και το νέο μείγμα τέθηκε σε reflux για 2.5 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μείγμα ήρθε σε r.t. και αποχύθηκε σε ένα υδατικό διάλυμα 10% K₂CO₃ (10 mL), όπου και αναδεύτηκε ζωηρά για 5 λεπτά. Μετά διηθήθηκε από celite και πλύθηκε αρκετές φορές με EtOAc. Η οργανική φάση, στη συνέχεια, εκχυλίστηκε φορά με H₂O και μία φορά με Brine, στεγνώθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκε έως μικρού όγκου. Τα προϊόντα **Π-31α** και **Π-32α** διαχωρίστηκαν ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 6:4 και λήφθηκαν μετά από εξάτμιση του διαλύτη το **Π-31α** ως λευκό στερεό και το **Π-32α** ως λάδι.

Π-31α:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₃₉ H ₃₇ NO ₃	567.72	154 – 155	R _f = 0.43 Hex/EtOAc 6:4

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.46 – 7.31 (10H, m, PhH και PhH'), 7.18 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2), 7.13 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2''), 7.02 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'''), 7.00 (1H, s, NH), 6.95 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3''), 6.83 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3), 6.78 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 5.07 (2H, s, C4''-OCH₂), 4.99 (2H, s, C4'''-OCH₂), 2.47 (2H, q, J 7.2 Hz, COCH₂CH₃), 2.32 (2H, q, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.20 (3H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 0.940 (3H, t, J 7.2 Hz, COCH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 171.7 (CO), 157.6 (C-4''), 157.2 (C-4'''), 141.3 (C-2'), 139.6 (C-4), 137.3 (C-1), 137.2 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.4 (C-1'), 136.0 (C-1''), 135.4 (C-1'''), 131.5 (C-3), 130.8 (C-2'''), 130.7 (C-2''), 128.6 (PhC'-ορθο), 128.5 (PhC-ορθο), 128.0 (PhC'-παρα), 127.9 (PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα), 127.5 (PhC-μετα), 118.6 (C-2), 114.4 (C-3''), 114.3 (C-3'''), 70.07 (C4''-OCH₂), 69.94 (C4'''-OCH₂), 30.77 (CH₂CH₃), 29.71 (COCH₂CH₃), 13.68 (COCH₂CH₃), 9.692 (CH₂CH₃).

MS: 568.45 (M+H⁺), 590.44 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1688 cm⁻¹.

Π-32α:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₃₉ H ₃₇ NO ₃	567.72	–	R _f = 0.35 Hex/EtOAc 6:4

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.52 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.43 – 7.29 (10H, m, PhH και PhH'), 7.18 (3H, m, H-3 και NH), 7.04 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.80 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.78 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 6.64 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 5.01 (2H, s, C4'''-OCH₂), 4.93 (2H, s, C4''-OCH₂), 2.45 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 2.40 (2H, q, *J* 7.2 Hz, COCH₂CH₃), 1.26 (3H, t, *J* 7.2 Hz, COCH₂CH₃), 0.928 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

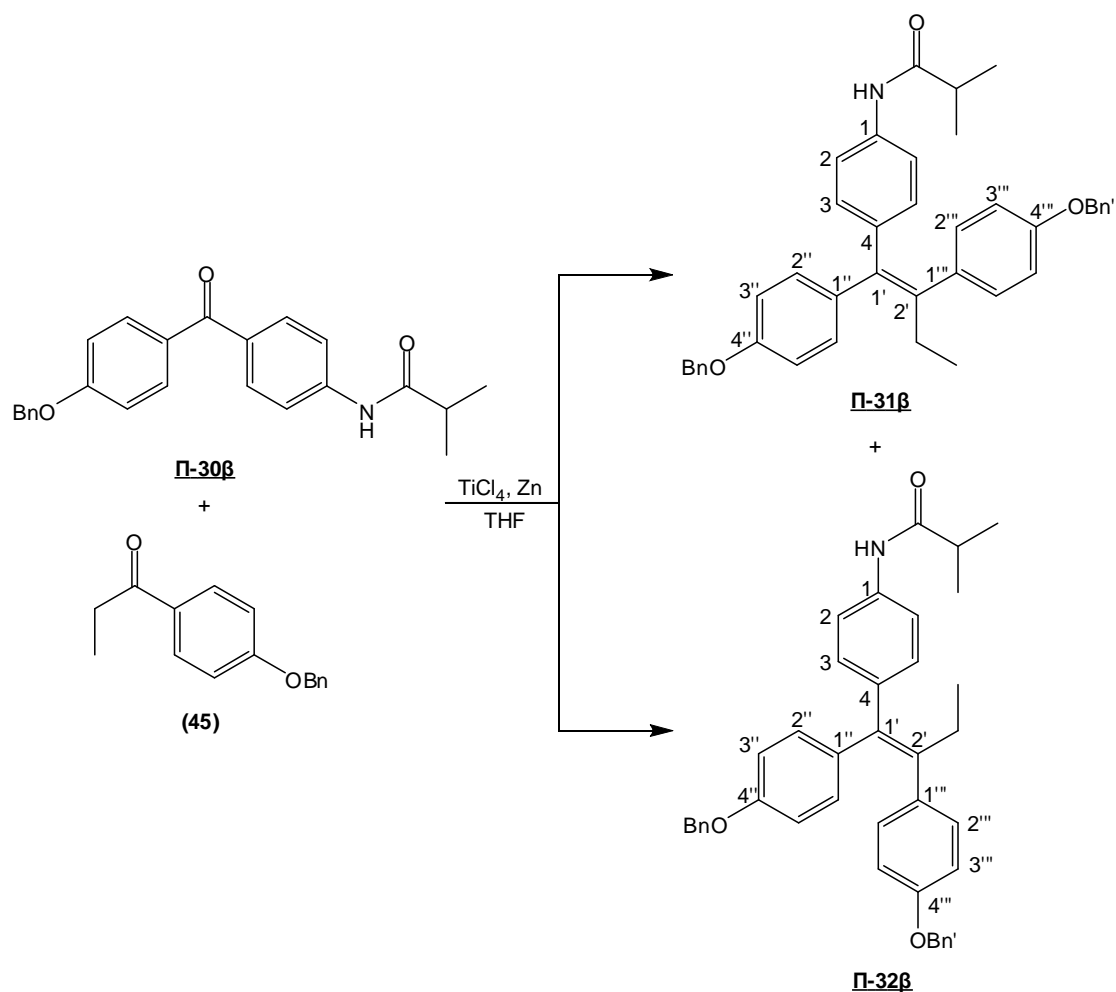
¹³C NMR (CDCl₃): δ = 171.9 (CO), 157.1 (C-4''), 156.8 (C-4'''), 141.0 (C-2'), 140.0 (C-4), 137.2 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.4 (C-1'), 136.0 (C-1''), 134.9 (C-1'''), 132.0 (C-2''), 130.6 (C-2'''), 130.1 (C-3), 129.9 (C-1), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.5 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 119.4 (C-2), 114.3 (C-3'''), 113.8 (C-3''), 69.94 (C4'''-OCH₂), 69.86 (C4''-OCH₂), 30.80 (COCH₂CH₃), 28.93 (CH₂CH₃), 13.68 (CH₂CH₃), 9.727 (COCH₂CH₃).

MS: 568.45.44 (M+H⁺), 590.44 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1688 cm⁻¹.

(*E*)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)
ισοβουτυλαμίδιο **Π-31β**

(*Z*)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)
ισοβουτυλαμίδιο **Π-32β**



Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο τα προϊόντα **Π-31β** και **Π-32β** παρασκευάστηκαν από το αμίδιο **Π-30β** και την 1-(4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)πραπαπ-1-όνη (**45**) και λήφθηκαν ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 6:4 και εξάτμιση του διαλύτη το **Π-31β** ως λευκό στερεό και το **Π-32β** ως λάδι.

Π-31β:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
32.5%	C ₄₀ H ₃₉ NO ₃	581.74	156 – 157	R _f = 0.69 Hex/EtOAc 6:4

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.47 – 7.45 (10H, m, PhH και PhH'), 7.20 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.14 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 7.03 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 7.00 (1H, s, NH), 6.95 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 6.83 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 6.79 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 5.07 (2H, s, C4''-OCH₂), 5.00 (2H, s, C4'''-OCH₂), 2.49 (2H, q, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃), 1.26 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.21 (6H, t, *J* 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 0.945 (3H, t, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 175.0 (CO), 157.6 (C-4''), 157.2 (C-4'''), 141.2 (C-2'), 140.0 (C-4), 137.3 (C-1), 137.2 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.5 (C-1'), 136.0 (C-1''), 135.6 (C-1'''), 131.6 (C-3), 130.8 (C-2'''), 130.7 (C-2''), 128.6 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 128.0 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 118.6 (C-2), 114.4 (C-3''), 113.4 (C-3'''), 70.06 (C4''-OCH₂), 70.01 (C4'''-OCH₂), 28.67 (CH₂CH₃), 19.66 (CH(CH₃)₂), 19.68 (CH(CH₃)₂), 13.72 (CH₂CH₃).

MS: 582.54 (M+H⁺), 604.53 (M+Na⁺).

IR (film) ν : 1664 cm⁻¹.

Π-32β:

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
32.5%	C ₄₀ H ₃₉ NO ₃	581.74	–	R _f = 0.62 Hex/EtOAc 6:4

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.51 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.46 – 7.29 (10H, m, PhH και PhH'), 7.19 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 7.16 (1H, s, NH), 7.04 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.80 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.78 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 6.64 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 5.01 (2H, s, C4'''-OCH₂), 4.93 (2H, s, C4''-OCH₂), 2.44 (2H, q, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃), 1.27 (6H, t, *J* 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 1.21 (1H, m, CH(CH₃)₂), 0.935 (3H, t, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 175.2 (CO), 157.1 (C-4'''), 156.7 (C-4''), 141.0 (C-2'), 139.9 (C-4), 137.2 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.4 (C-1'), 136.0 (C-1''), 134.9 (C-1'''), 132.0 (C-2''), 130.8 (C-1), 130.7 (C-2'''), 130.1 (C-3), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.5 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 119.4 (C-2), 114.3 (C-3'''), 113.7 (C-3''), 69.94 (C4'''-OCH₂), 69.85 (C4''-OCH₂), 29.70 (CH₂CH₃), 19.65 (CH(CH₃)₂), 19.60 (CH(CH₃)₂), 13.68 (CH₂CH₃).

MS: 582.50 (M+H⁺), 604.54 (M+Na⁺).

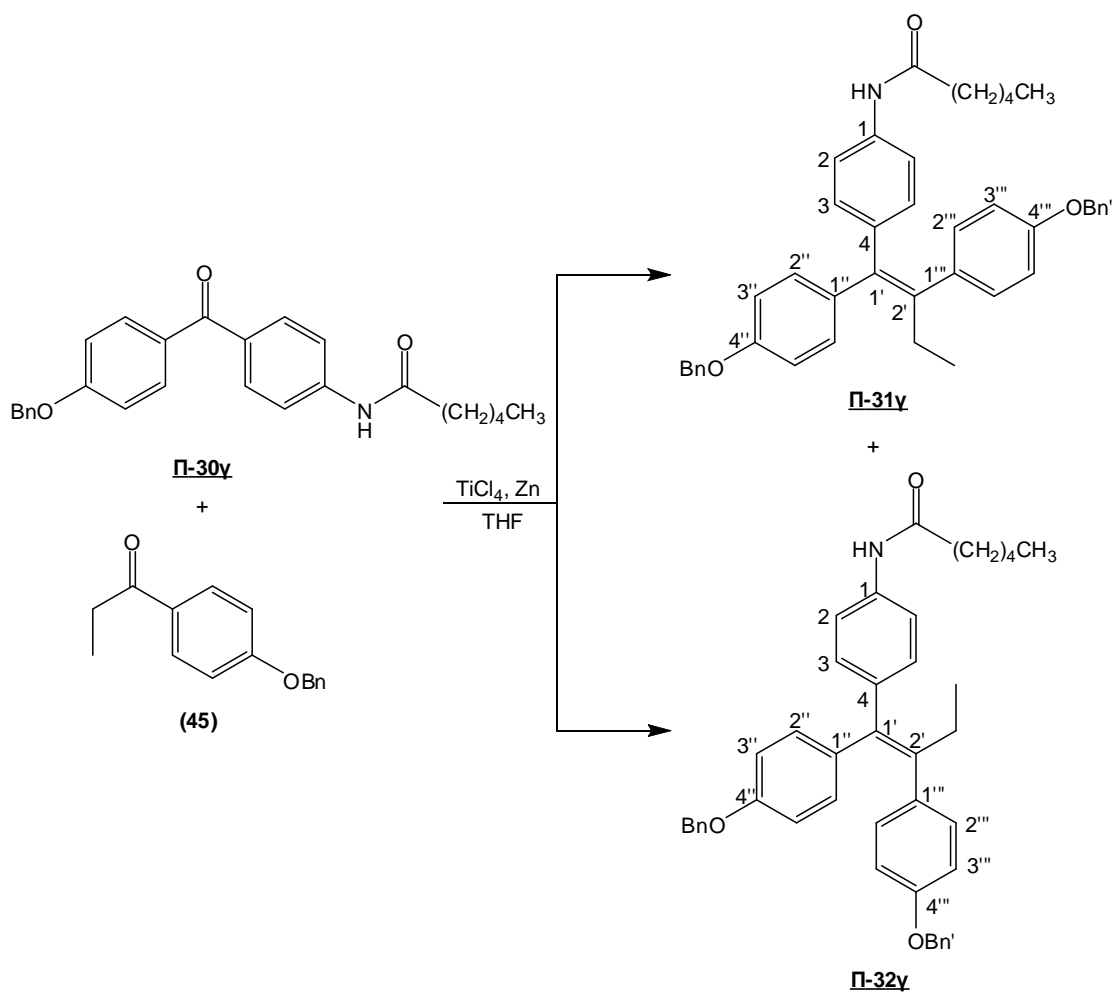
IR (film) ν: 1664 cm⁻¹.

(*E*)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)εξαναμίδιο

Π-31γ

(*Z*)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)εξαναμίδιο

Π-32γ



Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο τα προϊόντα **Π-31γ** και **Π-32γ** παρασκευάστηκαν από το αμίδιο **Π-30γ** και την 1-(4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)πραπαπ-1-όνη (**45**) και λήφθηκαν ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 8:2 και εξάτμιση του διαλύτη το **Π-31γ** ως λευκό στερεό και το **Π-32γ** ως λάδι.

Π-31γ:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
25%	C ₄₂ H ₄₃ NO ₃	609.80	162 – 163	R _f = 0.33 Hex/EtOAc 8:2

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.50 – 7.33 (10H, m, PhH και PhH'), 7.23 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2), 7.16 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2''), 7.06 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'''), 7.02 (1H, s, NH), 6.85 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3''), 6.83 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3), 6.72 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 5.09 (2H, s, C4''-OCH₂), 5.02 (2H, s, C4'''-OCH₂), 2.51 (2H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.38 (2H, q, J 7.8 Hz, CH₂CH₃), 1.77 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.39 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.950 (6H, m, CH₂CH₃ και CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 171.3 (CO), 157.6 (C-4''), 157.2 (C-4'''), 141.0 (C-2'), 139.6 (C-4), 137.3 (C-1), 137.2 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.4 (C-1'), 136.0 (C-1''), 135.4 (C-1'''), 131.5 (C-3), 130.8 (C-2'''), 130.7 (C-2''), 128.6 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 128.0 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 118.6 (C-2), 114.4 (C-3''), 114.3 (C-3'''), 70.06 (C4''-OCH₂), 69.94 (C4'''-OCH₂), 37.87 (CH₂CH₃), 31.46 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 28.90 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 25.38 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 22.46 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.96 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.71 (CH₂CH₃).

MS: 610.84 (M+H⁺), 632.89 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1657 cm⁻¹.

Π-32γ:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
25%	C ₄₂ H ₄₃ NO ₃	609.80	–	R _f = 0.31 Hex/EtOAc 8:2

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.52 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.48 – 7.32 (10H, m, PhH και PhH'), 7.20 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 7.05 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 7.04 (1H, s, NH), 6.81 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.79 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 6.67 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 5.03 (2H, s, C4'''-OCH₂), 4.96 (2H, s, C4''-OCH₂), 2.50 (2H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.30 (2H, q, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃), 1.72 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.36 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.95 (6H, m, CH₂CH₃ και CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

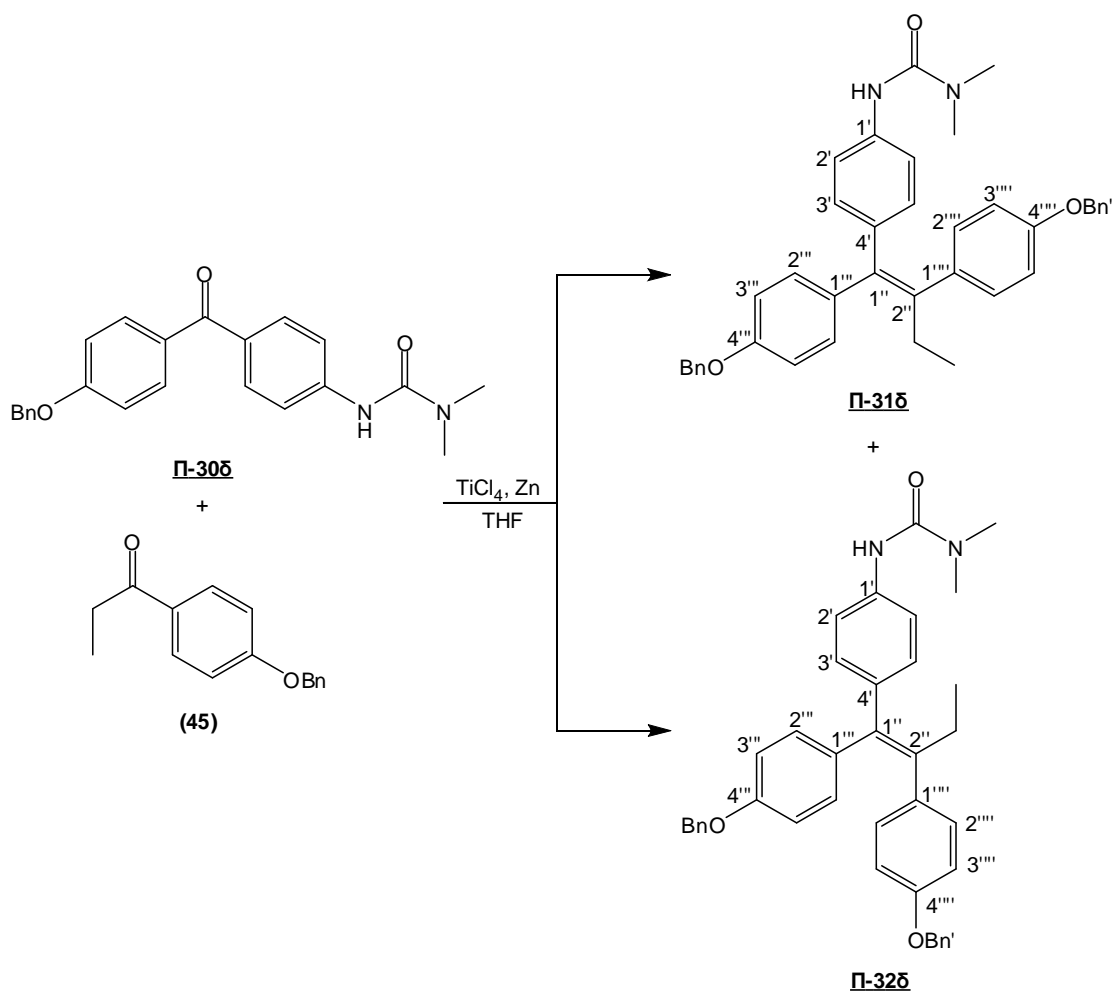
¹³C NMR (CDCl₃): δ = 171.3 (CO), 157.1 (C-4'''), 156.8 (C-4''), 141.0 (C-2'), 140.0 (C-4), 137.2 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.4 (C-1'), 136.0 (C-1''), 134.9 (C-1'''), 132.0 (C-2''), 130.8 (C-1), 130.7 (C-2'''), 130.1 (C-3), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.5 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 119.4 (C-2), 114.3 (C-3'''), 113.7 (C-3''), 69.94 (C4'''-OCH₂), 69.85 (C4''-OCH₂), 37.87 (CH₂CH₃), 31.46 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 28.90 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 25.38 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 22.46 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.96 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.71 (CH₂CH₃).

MS: 610.85 (M+H⁺), 632.88 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1657 cm⁻¹.

(*E*)-3-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)-1,1-διμεθυλουρία **Π-31δ**

(*Z*)-3-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)-1,1-διμεθυλουρία **Π-32δ**



Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο τα προϊόντα **Π-31δ** και **Π-32δ** παρασκευάστηκαν από την ουρία **Π-30δ** και την 1-(4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)πραπαν-1-όνη (**45**) και λήφθηκαν ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη το **Π-31δ** ως λευκό στερεό και το **Π-32δ** ως λάδι.

Π-31δ:

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₃₉ H ₃₈ N ₂ O ₃	582.73	174 – 175	R _f = 0.23 Hex/EtOAc 1:1

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.49 – 7.33 (10H, m, PhH και PhH'), 7.17 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 7.07 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''''), 7.05 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 6.98 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.82 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 6.81 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''''), 6.20 (1H, s, NH), 5.09 (2H, s, C4''''-OCH₂), 5.01 (2H, s, C4''''-OCH₂), 2.98 (6H, s, N(CH₃)₂), 2.50 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 0.96 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.5 (C-4'''), 157.1 (C-4''''), 155.6 (CO), 140.9 (C-2''), 138.3 (C-4'), 137.4 (C-1''), 137.2 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.4 (C-1' και C-1'''), 135.0 (C-1''''), 131.4 (C-3'), 130.8 (C-2''''), 130.7 (C-2'''), 128.6 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 128.0 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 118.6 (C-2'), 114.4 (C-3'''), 114.2 (C-3''''), 70.04 (C4''''-OCH₂), 69.90 (C4''''-OCH₂), 36.46 (N(CH₃)₂), 28.96 (CH₂CH₃), 13.72 (CH₂CH₃).

MS: 583.64 (M+H⁺), 605.64 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1646 cm⁻¹.

Π-32δ:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₃₉ H ₃₈ N ₂ O ₃	582.73	–	R _f = 0.33 Hex/EtOAc 1:1

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.46 – 7.32 (12H, m, PhH, PhH' και H-2'), 7.17 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 7.06 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 6.82 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.81 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 6.66 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.34 (1H, s, NH), 5.03 (2H, s, C4''''-OCH₂), 4.95 (2H, s, C4'''-OCH₂), 3.06 (6H, s, N(CH₃)₂), 2.48 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 0.940 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.0 (C-4'''), 156.7 (C-4''''), 155.7 (CO), 140.7 (C-2''), 138.8 (C-1'), 137.5 (C-1''), 137.3 (C-4'), 137.1 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.1 (C-1'''), 135.0 (C-1''''), 132.0 (C-2''), 130.8 (C-2'''), 130.0 (C-3'), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.5 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 119.5 (C-2'), 114.2 (C-3'''), 113.7 (C-3'''), 69.92 (C4''''-OCH₂), 69.82 (C4'''-OCH₂), 36.51 (N(CH₃)₂), 29.70 (CH₂CH₃), 13.70 (CH₂CH₃).

MS: 583.65 (M+H⁺), 605.64 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1643 cm⁻¹.

Π-31ε:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
32.5%	C ₄₁ H ₄₂ N ₂ O ₃	610.78	177 – 178	R _f = 0.38 Hex/EtOAc 6:4

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 7.47 – 7.31 (10H, m, PhH και PhH'), 7.15 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 7.06 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''''), 7.06 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 6.95 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.80 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 6.79 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''''), 6.12 (1H, s, NH), 5.07 (2H, s, C4'''-OCH₂), 5.00 (2H, s, C4''''-OCH₂), 3.32 (4H q *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.48 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.18 (6H, t, *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 0.943 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.6 (C-4'''), 157.2 (C-4''''), 154.5 (CO), 140.8 (C-2''), 138.1 (C-4'), 137.5 (C-1''), 137.2 (C-1' και C-1'''), 136.7 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 135.0 (C-1''''), 131.4 (C-3'), 130.8 (C-2''''), 130.7 (C-2'''), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 128.0 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 118.6 (C-2'), 114.4 (C-3'''), 114.2 (C-3''''), 70.08 (C4'''-OCH₂), 69.94 (C4''''-OCH₂), 41.62 (N(CH₂CH₃)₂), 28.93 (CH₂CH₃), 13.94 (N(CH₂CH₃)₂), 13.70 (CH₂CH₃).

MS: 611.57 (M+H⁺), 633.55 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1645 cm⁻¹.

Π-32ε:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
32.5%	C ₄₁ H ₄₂ N ₂ O ₃	610.78	–	R _f = 0.33 Hex/EtOAc 6:4

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.49 – 7.30 (12H, m, PhH, PhH' και H-2'), 7.15 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 7.04 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 6.80 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.79 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 6.64 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.33 (1H, s, NH), 5.01 (2H, s, C4''''-OCH₂), 4.93 (2H, s, C4'''-OCH₂), 3.39 (4H q *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.46 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.24 (6H, t, *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 0.920 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

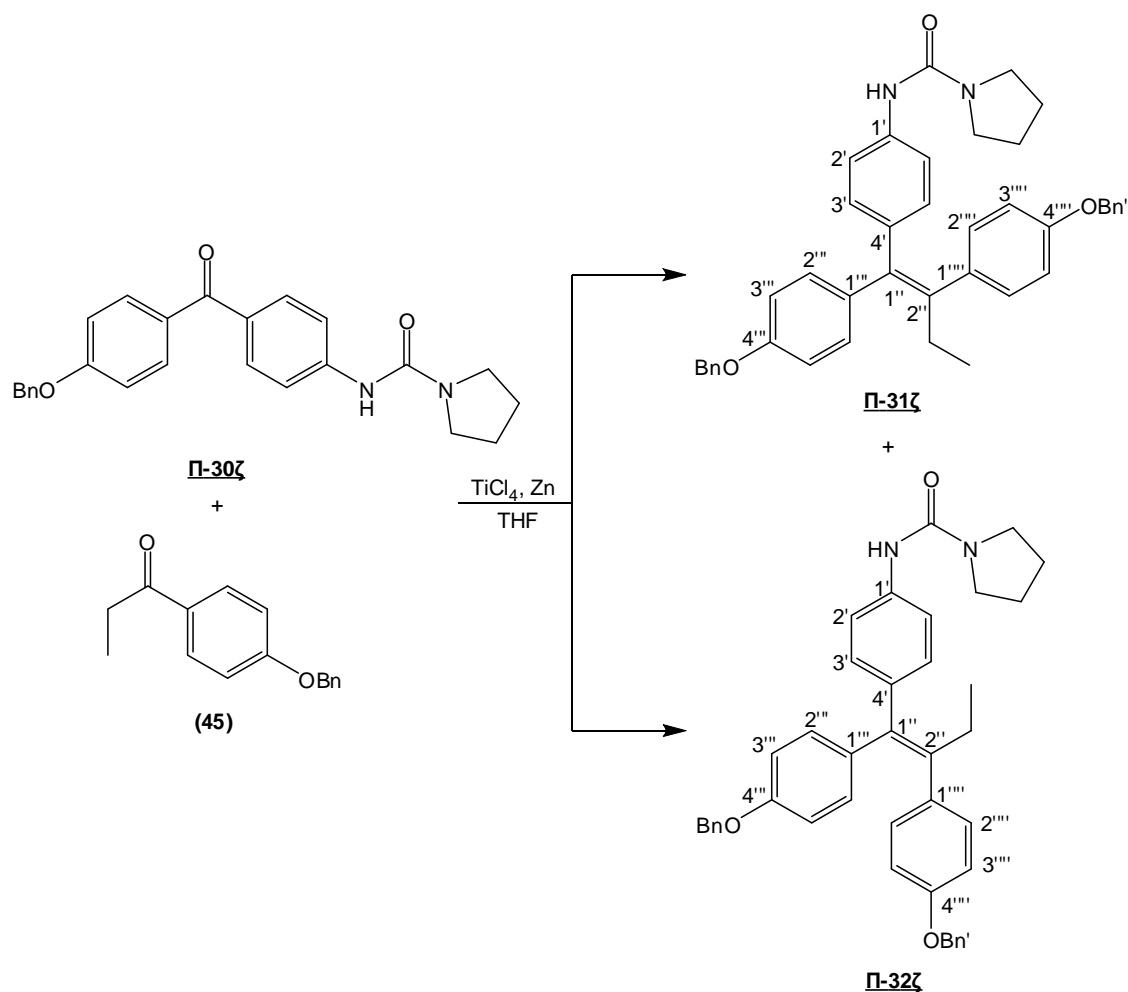
¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.1 (C-4'''), 156.7 (C-4''''), 154.1 (CO), 140.8 (C-2''), 139.0 (C-1'), 137.3 (C-1'' και C-4'), 137.1 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.1 (C-1'''), 135.0 (C-1''''), 132.0 (C-2'''), 130.8 (C-2''''), 130.1 (C-3'), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 119.5 (C-2'), 114.3 (C-3''''), 113.7 (C-3'''), 69.90 (C4''''-OCH₂), 69.83 (C4'''-OCH₂), 42.48 (N(CH₂CH₃)₂), 29.70 (CH₂CH₃), 28.94 (N(CH₂CH₃)₂) 13.66 (CH₂CH₃).

MS: 611.58 (M+H⁺), 633.55 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1644 cm⁻¹.

(*E*)-*N*-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)πυρολιδιν-1-καρβοξαμίδιο **Π-31ζ**

(*Z*)-*N*-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)πυρολιδιν-1-καρβοξαμίδιο **Π-32ζ**



Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο τα προϊόντα **Π-31ζ** και **Π-32ζ** παρασκευάστηκαν από το αμίδιο **Π-30ζ** και την 1-(4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)πραπαπ-1-όνη (**45**) και λήφθηκαν ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη το **Π-31ζ** ως λευκό στερεό και το **Π-32ζ** ως λάδι.

Π-31ζ:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₄₁ H ₄₀ N ₂ O ₃	608.77	185 – 186	R _f = 0.32 Hex/EtOAc 1:1

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 7.46 – 7.31 (10H, m, PhH και PhH'), 7.16 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 7.07 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''''), 7.03 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 6.95 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.79 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 6.78 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''''), 6.09 (1H, s, NH), 5.07 (2H, s, C4''''-OCH₂), 5.00 (2H, s, C4''''-OCH₂), 3.43 (4H t *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.42 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.94 (4H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 0.913 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.5 (C-4'''), 157.0 (C-4''''), 153.9 (CO), 140.7 (C-2''), 138.1 (C-4'), 137.5 (C-1''), 137.1 (C-1' και C-1'''), 136.7 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 135.4 (C-1''''), 131.4 (C-3'), 130.8 (C-2''''), 130.7 (C-2'''), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 118.3 (C-2'), 114.3 (C-3'''), 114.2 (C-3''''), 70.04 (C4''''-OCH₂), 69.92 (C4''''-OCH₂), 45.75 (NCH₂CH₂), 29.70 (CH₂CH₃), 17.33 (NCH₂CH₂), 13.69 (CH₂CH₃).

MS: 609.65 (M+H⁺), 631.63 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1641 cm⁻¹.

Π-32ζ:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₄₁ H ₄₀ N ₂ O ₃	608.77	–	R _f = 0.24 Hex/EtOAc 1:1

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.49 – 7.30 (12H, m, PhH, PhH' και H-2'), 7.14 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 7.03 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 6.79 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.78 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''), 6.64 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3''), 6.17 (1H, s, NH), 5.00 (2H, s, C4''''-OCH₂), 4.93 (2H, s, C4''''-OCH₂), 3.48 (4H t *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.46 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.98 (4H, t, *J* 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 0.922 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

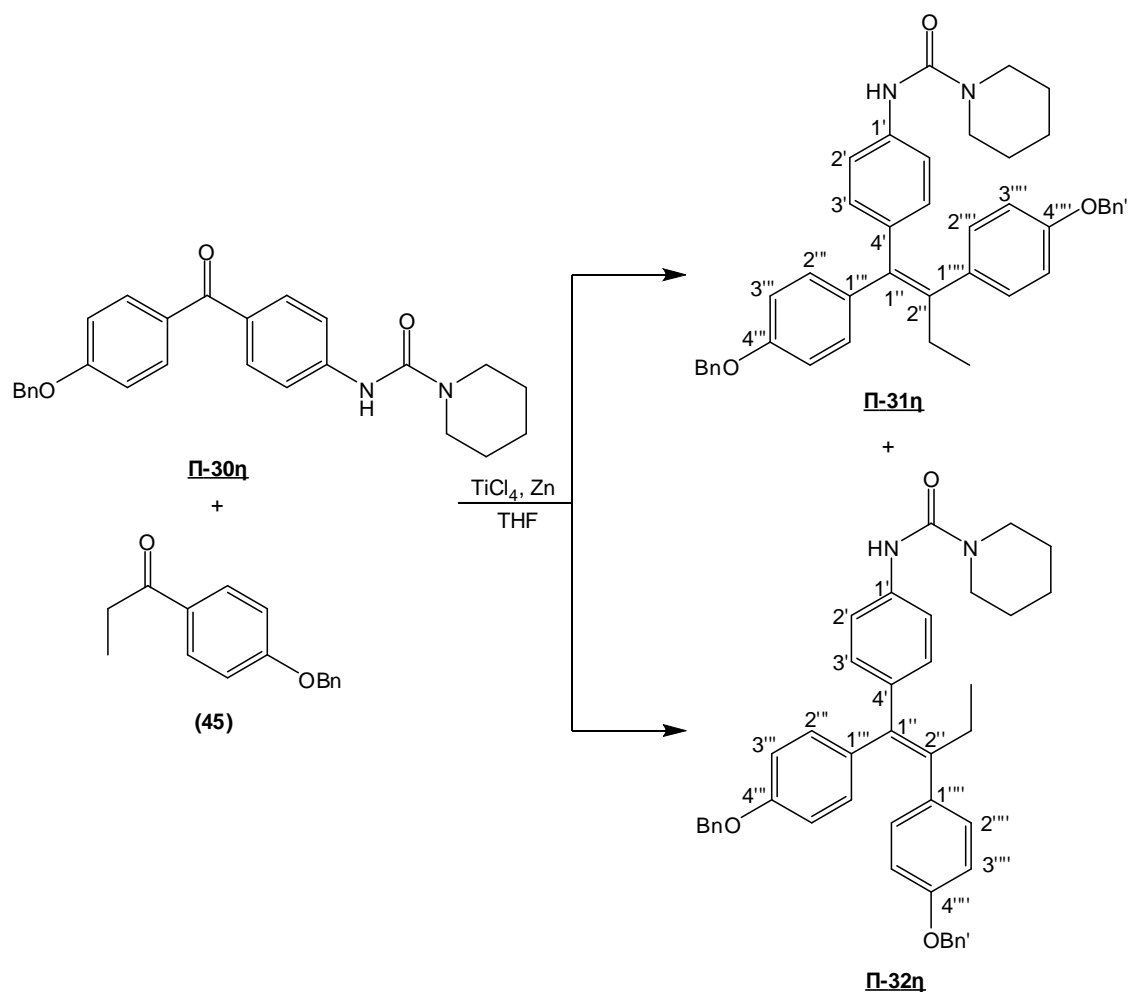
¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.6 (C-4'''), 156.9 (C-4''''), 154.1 (CO), 140.7 (C-2''), 138.6 (C-1'), 137.5 (C-1''), 137.4 (C-4'), 137.1 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.2 (C-1'''), 135.1 (C-1''''), 132.0 (C-2''), 130.8 (C-2'''), 130.0 (C-3'), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 119.2 (C-2'), 114.3 (C-3'''), 113.7 (C-3'''), 69.92 (C4''''-OCH₂), 69.85 (C4''''-OCH₂), 45.85 (NCH₂CH₂), 29.68 (CH₂CH₃), 25.60 (NCH₂CH₂) 13.66 (CH₂CH₃).

MS: 609.67 (M+H⁺), 631.67 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1642 cm⁻¹.

(*E*)-*N*-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ) πιπεριδιν-1-καρβοξαμίδιο **Π-31η**

(*Z*)-*N*-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-(βενζυλοξυ)φαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ) πιπεριδιν-1-καρβοξαμίδιο **Π-32η**



Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο τα προϊόντα **Π-31η** και **Π-32η** παρασκευάστηκαν από το αμίδιο **Π-30η** και την 1-(4'-(βενζυλοξυ)φαινυλ)πραπαν-1-όνη (**45**) και λήφθηκαν ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 7:3 και εξάτμιση του διαλύτη το **Π-31η** ως κερύ και το **Π-32η** ως λάδι.

Π-31η:

ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₄₂ H ₄₂ N ₂ O ₃	622.79	–	R _f = 0.28 Hex/EtOAc 7:3

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.49 – 7.34 (10H, m, PhH και PhH'), 7.16 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 7.06 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2''''), 7.04 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'), 6.97 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.80 (4H, d, *J* 8.8 Hz, H-3' και H-3''''), 6.23 (1H, s, NH), 5.09 (2H, s, C4'''-OCH₂), 5.01 (2H, s, C4''''-OCH₂), 3.40 (4H, t, *J* 6.4 Hz, NCH₂CH₂CH₂), 2.49 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.60 (6H, m, NCH₂CH₂CH₂ και NCH₂CH₂CH₂), 0.957 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.5 (C-4'''), 157.1 (C-4''''), 154.9 (CO), 140.8 (C-2''), 138.2 (C-4'), 137.4 (C-1''), 137.1 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.7 (C-1'''), 136.6 (C-1''''), 135.0 (C-1'''''), 131.4 (C-3'), 130.8 (C-2'''''), 130.7 (C-2'''), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 118.6 (C-2'), 114.3 (C-3'''), 114.2 (C-3'''''), 70.04 (C4'''-OCH₂), 69.89 (C4''''-OCH₂), 45.25 (NCH₂CH₂CH₂), 29.71 (CH₂CH₃), 25.67 (NCH₂CH₂CH₂), 24.38 (NCH₂CH₂CH₂), 13.72 (CH₂CH₃).

MS: 623.87 (M+H⁺), 645.81 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1644 cm⁻¹.

Π-32η:

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
22.5%	C ₄₂ H ₄₂ N ₂ O ₃	622.79	–	R _f = 0.22 Hex/EtOAc 7:3

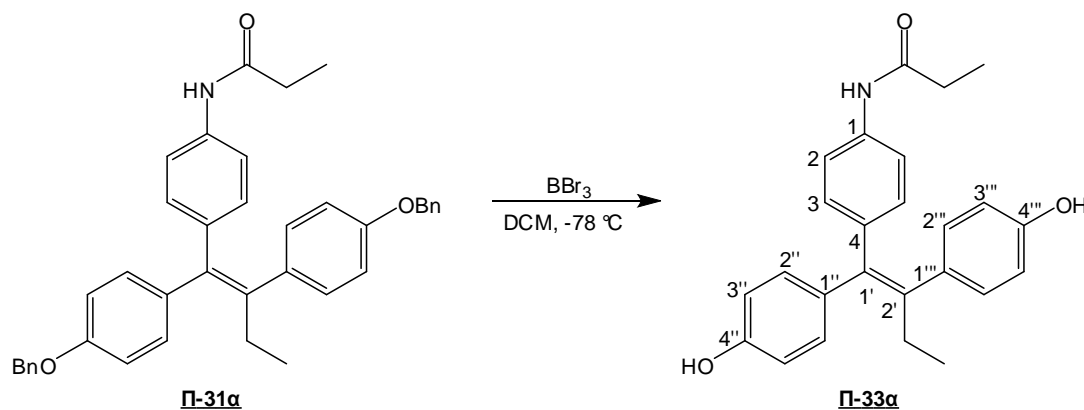
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃): δ = 7.46 – 7.32 (12H, m, PhH, PhH' και H-2'), 7.16 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'), 7.05 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 6.82 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.81 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-2'''), 6.66 (2H, d, *J* 8.8 Hz, H-3'''), 6.38 (1H, s, NH), 5.03 (2H, s, C4''''-OCH₂), 4.95 (2H, s, C4''''-OCH₂), 3.48 (4H, t, *J* 6.4 Hz, NCH₂CH₂CH₂), 2.48 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.64 (6H, m, NCH₂CH₂CH₂ και NCH₂CH₂CH₂), 0.940 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 157.0 (C-4'''), 156.7 (C-4''''), 155.7 (CO), 140.7 (C-2''), 138.7 (C-4'), 137.6 (C-1'), 137.4 (C-1''), 137.1 (PhCCH₂O και PhC'CH₂O), 136.1 (C-1'''), 135.1 (C-1''''), 132.0 (C-2'''), 130.8 (C-2''''), 130.0 (C-3'), 128.5 (PhC'-ορθο και PhC-ορθο), 127.9 (PhC'-παρα και PhC-παρα), 127.6 (PhC'-μετα και PhC-μετα), 119.4 (C-2'), 114.2 (C-3'''), 113.7 (C-3'''), 69.93 (C4''''-OCH₂), 69.83 (C4''''-OCH₂), 45.30 (NCH₂CH₂CH₂), 29.70 (CH₂CH₃), 25.72 (NCH₂CH₂CH₂), 24.42 (NCH₂CH₂CH₂), 13.70 (CH₂CH₃).

MS: 623.84 (M+H⁺), 645.81 (M+Na⁺).

IR (film) ν: 1642 cm⁻¹.

5.3.4 Γενική μέθοδος αποπροστασίας των αναλόγων **Π-31** και **Π-32****(E)-N-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)προπιοναμίδιο**
Π-33α

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₅ H ₂₅ NO ₃	387.47	–	R _f = 0.20 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σε ένα αναδευόμενο διάλυμα του αμιδίου **Π-31α** (0.018 g, 0.032 mmol) σε CH₂Cl₂ (2.2 mL) στους -78 °C, προστέθηκε στάγδην BBr₃ (0.07 mmol, 1.0 M σε CH₂Cl₂, 1.1 ισοδύναμα ανά δεσμό, 0.07 mL) και η αντίδραση αφέθηκε για 20 λεπτά στους -78 °C. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C, εξουδετερώθηκε με MeOH και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα HCl 1N. Κατόπιν, η υδατική φάση εκχυλίστηκε 2 φορές με EtOAc. Οι ενωμένες οργανικές φάσεις πλύθηκαν 1 φορά με H₂O και 1 φορά με Brine, στεγνώθηκαν με Na₂SO₄, διηθήθηκαν από πτυχωτό ηθμό και συμπυκνώθηκαν έως μικρού όγκου. Το προϊόν **Π-33α** λήφθηκε ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

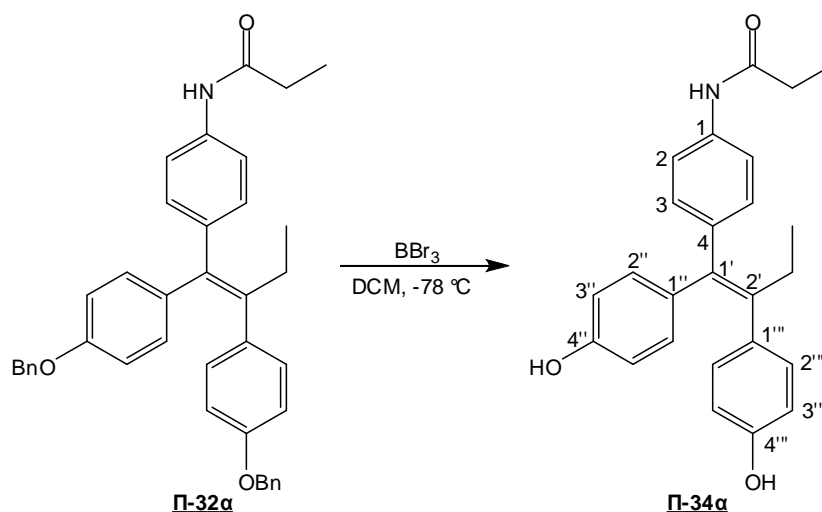
¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.24 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.05 (1H, s, NH), 6.95 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 6.87 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.74 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 6.71 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 6.55 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 2.37 (2H, q, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃), 2.24 (2H, q, *J* 7.8 Hz, COCH₂CH₃), 1.04 (3H, t, *J* 7.8 Hz, COCH₂CH₃), 0.860 (3H, t, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 172.4 (CO), 157.0 (C-4''), 155.7 (C-4'''), 140.9 (C-2'), 138.9 (C-4), 137.9 (C-1), 137.2 (C-1'''), 134.6 (C-1''), 132.7 (C-1'), 131.0 (C-3), 130.8 (C-2'''), 130.5 (C-2''), 118.5 (C-2), 115.4 (C-3''), 115.2 (C-3'''), 39.82 (CH₂CH₃), 28.69 (COCH₂CH₃), 13.88 (CH₂CH₃), 9.860 (COCH₂CH₃).

MS: 385.35 (M+H⁺), 410.33 (M+Na⁺).

(Z)-N-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)προπιοναμίδιο

Π-34α



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₂₅ H ₂₅ NO ₃	387.47	–	R _f = 0.18 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-34α** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-32α** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

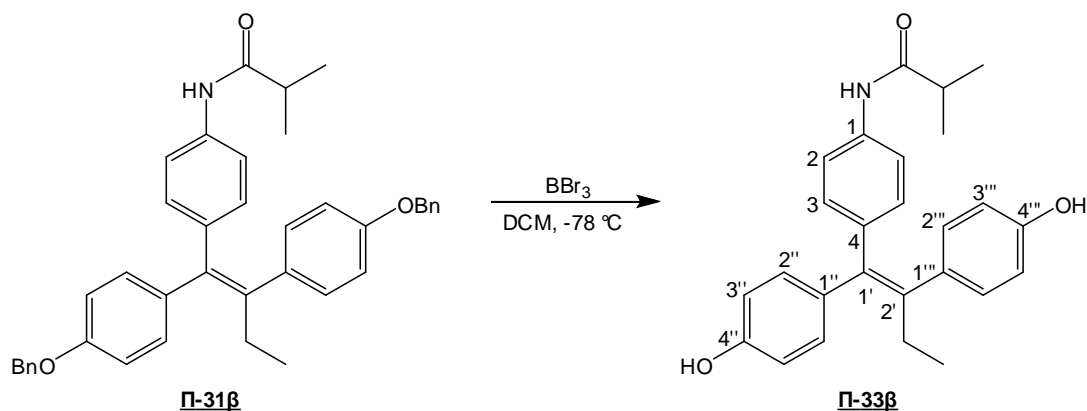
¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.56 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.07 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 6.89 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 6.70 (1H, s, NH), 6.60 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 6.56 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 6.42 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'), 2.32 (4H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃ και COCH₂CH₃), 1.09 (3H, t, *J* 7.2 Hz, COCH₂CH₃), 0.851 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 172.2 (CO), 156.6 (C-4'''), 155.9 (C-4''), 140.5 (C-2'), 139.0 (C-4), 138.1 (C-1'), 137.4 (C-1), 134.4 (C-1''), 133.2 (C-1'''), 131.8 (C-2''), 130.8 (C-2'''), 129.7 (C-3), 119.2 (C-2), 115.2 (C-3'''), 114.7 (C-3''), 30.00 (COCH₂CH₃), 28.83 (CH₂CH₃), 13.99 (CH₂CH₃), 10.21 (COCH₂CH₃).

MS: 385.36 (M+H⁺), 410.35 (M+Na⁺).

(*E*)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)ισοβουτυλαμίδιο

Π-33β



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₂₆ H ₂₇ NO ₃	401.50	—	R _f = 0.30 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-33β** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-31β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

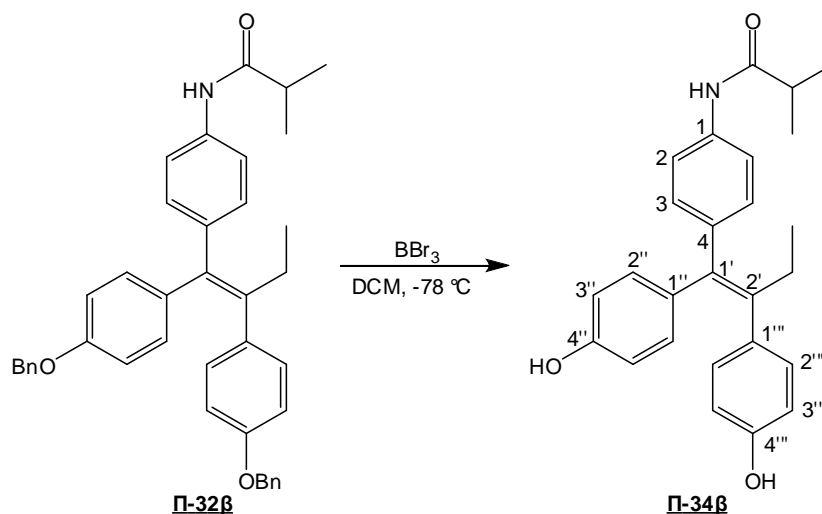
¹H NMR (acetone-*d*₆, 600MHz): δ = 7.35 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.05 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 7.04 (1H, s, NH), 6.97 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.83 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 6.80 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 6.65 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 2.45 (2H, q, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃), 2.54 (1H, m, CH(CH₃)₂), 1.10 (6H, t, *J* 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 0.915 (3H, t, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-*d*₆): δ = 174.8 (CO), 156.1 (C-4''), 155.7 (C-4'''), 140.8 (C-2'), 138.9 (C-4), 137.6 (C-1'), 137.2 (C-1), 135.1 (C-1''), 133.4 (C-1'''), 130.9 (C-3), 130.7 (C-2'''), 130.4 (C-2''), 118.1 (C-2), 114.9 (C-3''), 114.8 (C-3'''), 35.69 (CH₂CH₃), 18.98 (CH(CH₃)₂), 19.58 (CH(CH₃)₂), 13.06 (CH₂CH₃).

MS: 402.38 (M+H⁺), 424.36 (M+Na⁺).

(Z)-N-(4-(1',2'-δισ(4'',4''')-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)ισοβουτυλαμίδιο

Π-34β



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
95%	C ₂₆ H ₂₇ NO ₃	401.50	—	R _f = 0.29 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-34β** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-32β** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

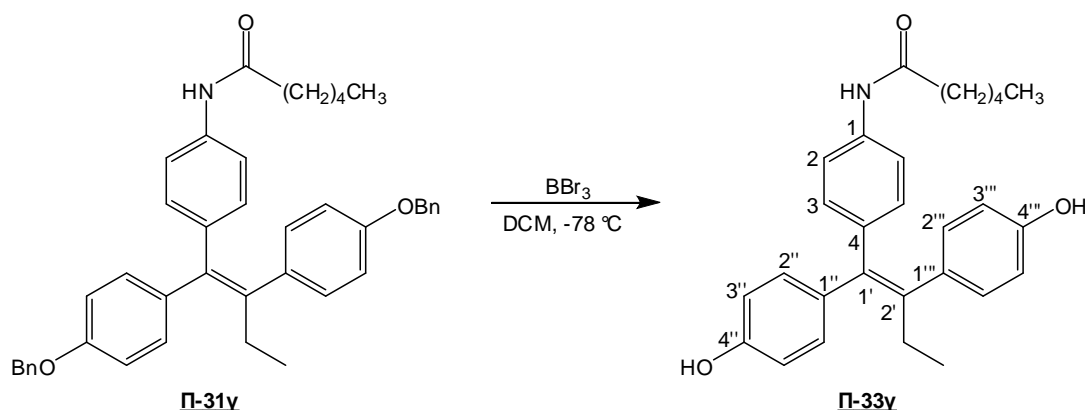
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆, 600MHz): δ = 7.67 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2), 7.13 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3), 6.97 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2''), 6.98 (1H, s, NH), 6.71 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'), 6.66 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3''), 6.50 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'), 2.63 (1H, m, CH(CH₃)₂), 2.43 (2H, q, J 7.8 Hz, CH₂CH₃), 1.17 (6H, t, J 6.6 Hz, CH(CH₃)₂), 0.920 (3H, t, J 7.8 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 171.8 (CO), 155.6 (C-4'''), 155.3 (C-4''), 140.4 (C-2'), 139.2 (C-4), 138.2 (C-1'), 137.6 (C-1), 134.8 (C-1''), 133.4 (C-1'''), 131.8 (C-2''), 130.7 (C-2'''), 129.6 (C-3), 118.9 (C-2), 114.7 (C-3'''), 114.2 (C-3'), 35.94 (CH₂CH₃), 19.00 (CH(CH₃)₂ και CH(CH₃)₂), 13.07 (CH₂CH₃).

MS: 402.37 (M+H⁺), 424.37 (M+Na⁺).

(*E*)-*N*-(4-(1',2'-δισ(4'',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ) εξαναμίδιο **Π-33γ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₂₈ H ₃₁ NO ₃	429.55	–	R _f = 0.31 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

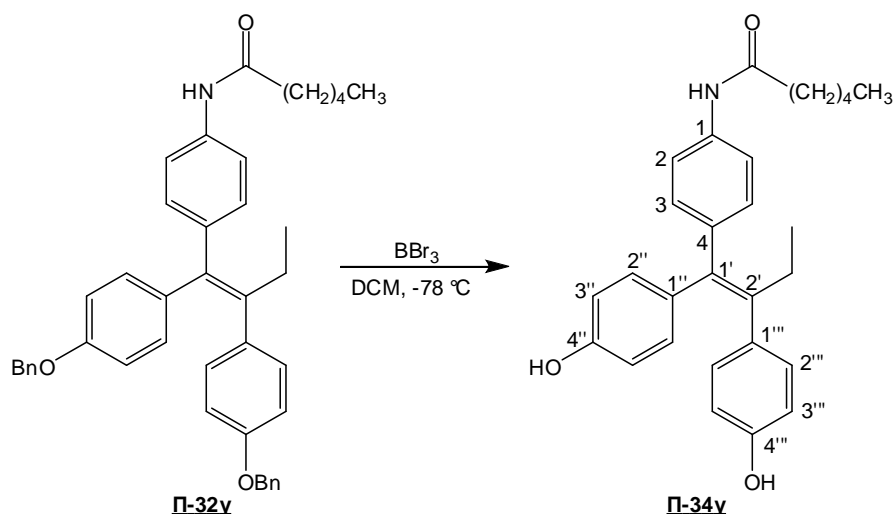
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-33γ** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-31γ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.30 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.00 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 7.03 (1H, s, NH), 6.92 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.84 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 6.81 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 6.68 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 2.52 (2H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.40 (2H, q, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃), 1.75 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.40 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.948 (6H, m, CH₂CH₃ και CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 175.1 (CO), 156.5 (C-4''), 155.9 (C-4'''), 140.6 (C-2'), 139.0 (C-4), 137.4 (C-1'), 137.3 (C-1), 135.2 (C-1''), 132.3 (C-1'''), 131.0 (C-3), 130.9 (C-2'''), 130.4 (C-2''), 118.2 (C-2), 115.0 (C-3'''), 114.8 (C-3'''), 37.90 (CH₂CH₃), 31.49 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 28.88 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 25.41 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 22.42 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.93 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃) 13.69 (CH₂CH₃).

MS: 430.57 (M+H⁺), 461.57 (M+Na⁺).

(Z)-N-(4-(1',2'-δισ(4'',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ) εξαναμίδιο Π-34γ

ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₈ H ₃₁ NO ₃	429.55	—	R _f = 0.29 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-34γ** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-32γ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

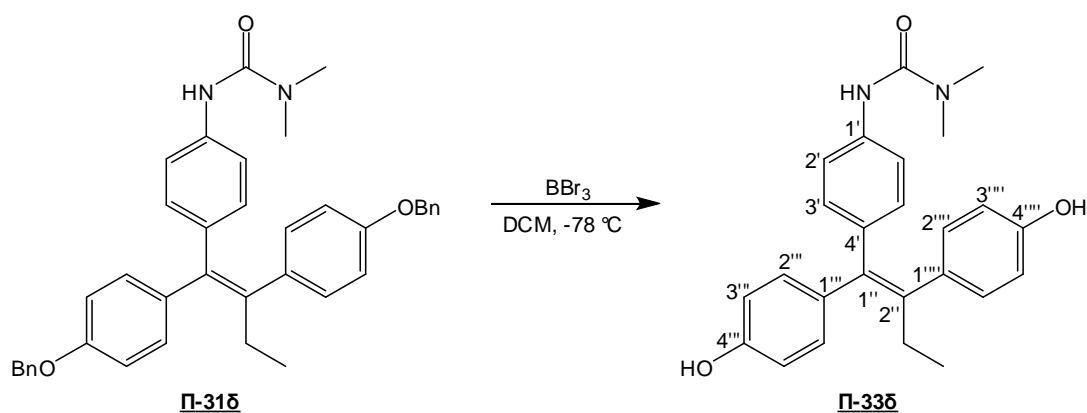
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CDCl₃, 600MHz): δ = 7.65 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2), 7.10 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3), 6.98 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.96 (1H, s, NH), 6.73 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''), 6.63 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.51 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''), 2.53 (2H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.41 (2H, q, *J* 7.8 Hz, CH₂CH₃), 1.76 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.39 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.950 (6H, m, CH₂CH₃ και CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃).

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 171.3 (CO), 155.2 (C-4'''), 155.4 (C-4''), 140.2 (C-2'), 139.1 (C-4), 138.3 (C-1'), 137.9 (C-1), 134.5 (C-1''), 133.2 (C-1'''), 131.7 (C-2''), 130.6 (C-2'''), 129.6 (C-3), 118.8 (C-2), 114.7 (C-3'''), 114.3 (C-3''), 37.91 (CH₂CH₃), 31.50 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 28.89 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 25.42 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 22.41 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.94 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 13.70 (CH₂CH₃).

MS: 430.58 (M+H⁺), 461.56 (M+Na⁺).

(E)-3-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)-1,1-διμεθυλοουρία Π-33δ



ΑΠΟΔΟΣΗ	Μ.Τ.	Μ.Β.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	402.49	—	R _f = 0.44 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη ουρία **Π-33δ** παρασκευάστηκε από την ουρία **Π-31δ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

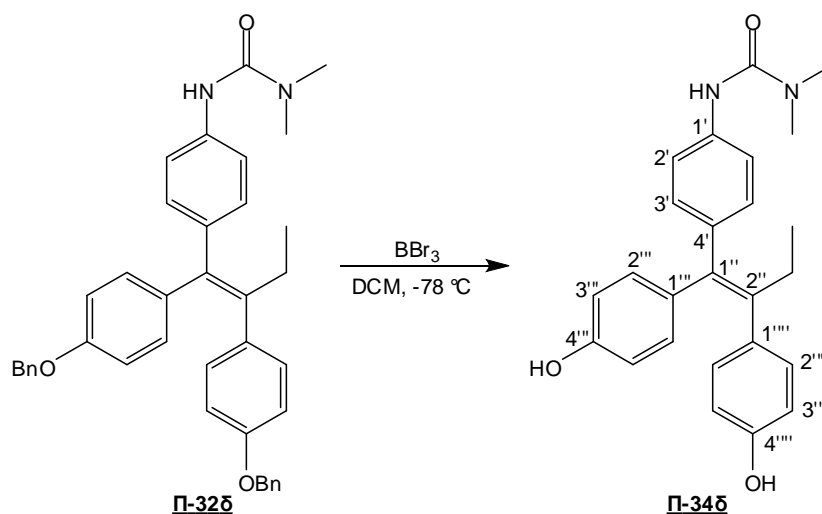
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CD₃OD): δ = 7.03 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 7.02 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.94 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''''), 6.78 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.76 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'), 6.58 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''''), 2.98 (6H, s, N(CH₃)₂), 2.60 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 0.93 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CD₃OD): δ = 157.7 (CO), 154.6 (C-4'''), 154.3 (C-4''''), 140.5 (C-2''), 138.1 (C-4'), 137.1 (C-1''), 135.8 (C-1' και C-1'''), 134.5 (C-1''''), 129.3 (C-3'), 129.0 (C-2'''), 127.8 (C-2''), 121.4 (C-2'), 114.2 (C-3'''), 114.1 (C-3''''), 35.34 (N(CH₃)₂), 27.62 (CH₂CH₃), 10.99 (CH₂CH₃).

MS: 403.51 (M+H⁺), 425.52 (M+Na⁺).

(Z)-3-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)-1,1-διμεθυλοουρία **Π-34δ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
95%	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	402.49	–	R _f = 0.41 EtOAc

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη ουρία **Π-34δ** παρασκευάστηκε από την ουρία **Π-32δ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με εκλούτη EtOAc και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

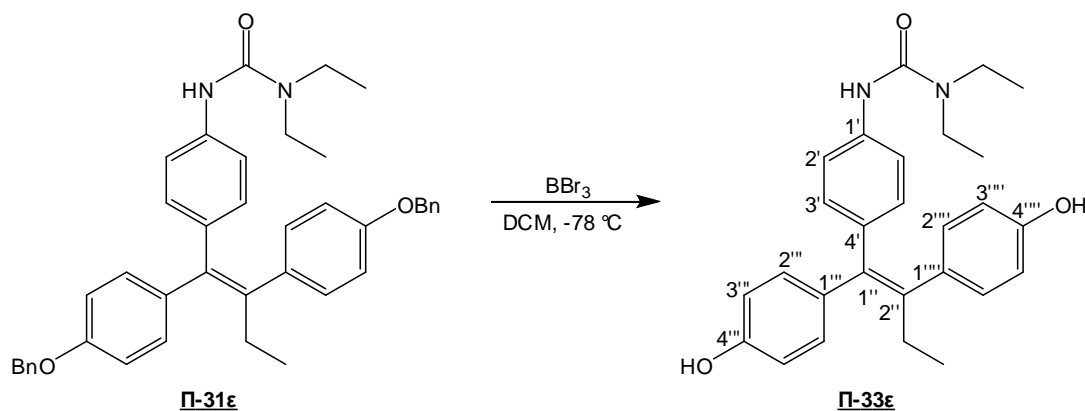
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CD₃OD): δ = 7.35 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 7.11 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'), 6.94 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.68 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.61 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.44 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 3.04 (6H, s, N(CH₃)₂), 2.46 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 0.93 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CD₃OD): δ = 157.7 (CO), 155.1 (C-4'''), 154.6 (C-4'''), 140.4 (C-2''), 137.2 (C-1'), 137.1 (C-1''), 136.4 (C-4'), 136.0 (C-1'''), 134.6 (C-1'''), 129.3 (C-2'''), 128.6 (C-2'''), 128.1 (C-3'), 121.0 (C-2'), 114.8 (C-3'''), 114.3 (C-3'''), 35.20 (N(CH₃)₂), 27.75 (CH₂CH₃), 10.06 (CH₂CH₃).

MS: 403.50 (M+H⁺), 425.50 (M+Na⁺).

(E)-3-(4'-(1'',2''-δις(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)-1,1-δαιθυλοουρία Π-33ε



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
95%	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O ₃	430.54	–	R _f = 0.15 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη ουρία **Π-33ε** παρασκευάστηκε από την ουρία **Π-31ε** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως αφρός.

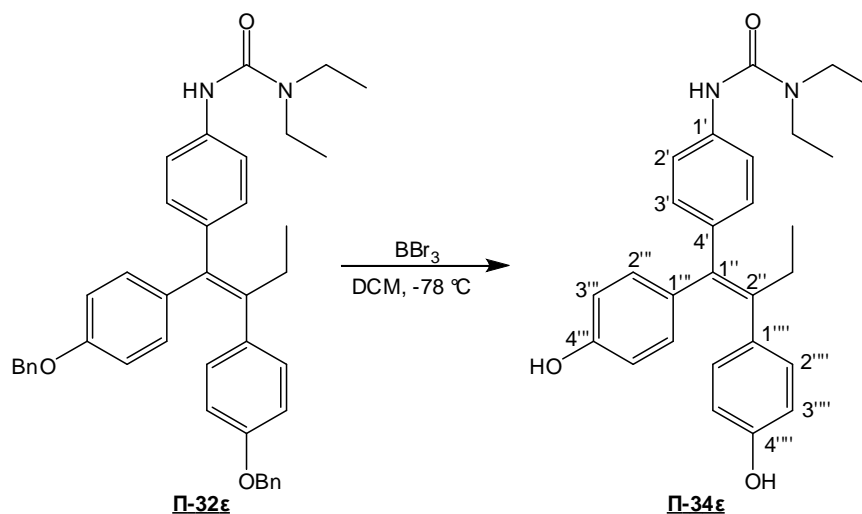
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-*d*₆, 600MHz): δ = 7.42 (1H, s, NH), 7.21 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 7.05 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.96 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''''), 6.83 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.73 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'), 6.65 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 3.36 (4H q *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.45 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.11 (6H, t, *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 0.911 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-*d*₆): δ = 156.0 (C-4'''), 155.6 (C-4''''), 154.3 (CO), 140.3 (C-2''), 138.3 (C-4'), 137.8 (C-1''), 137.4 (C-1'), 135.3 (C-1'''), 133.6 (C-1''''), 130.7 (C-3'), 130.6 (C-2'''), 130.4 (C-2''), 118.4 (C-2'), 114.7 (C-3''' και C-3''''), 40.86 (N(CH₂CH₃)₂), 28.91 (CH₂CH₃), 13.38 (N(CH₂CH₃)₂), 13.08 (CH₂CH₃).

MS: 431.39 (M+H⁺), 453.40 (M+Na⁺).

(Z)-3-(4'-(1'',2''-δις(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)-1,1-
δαιθυλοουρία **Π-34ε**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
95%	C ₂₇ H ₃₀ N ₂ O ₃	430.54	–	R _f = 0.14 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο η αποπροστατευμένη ουρία **Π-34ε** παρασκευάστηκε από την ουρία **Π-32ε** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

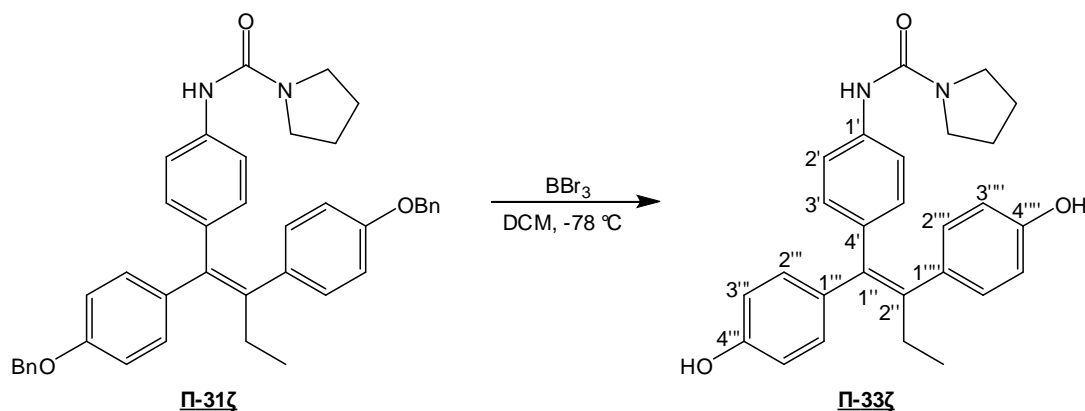
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆, 600MHz): δ = 7.62 (1H, s, NH), 7.54 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 7.07 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'), 6.97 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.71 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.66 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.50 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 3.43 (4H q *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 2.44 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.17 (6H, t, *J* 7.2 Hz, N(CH₂CH₃)₂), 0.911 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 157.1 (CO), 155.6 (C-4'''), 154.4 (C-4'''), 140.1 (C-2''), 137.8 (C-1'), 137.2 (C-1''), 135.0 (C-4'), 133.6 (C-1'''), 131.8 (C-1'''), 130.7 (C-2'''), 130.4 (C-2'''), 129.2 (C-3'), 119.2 (C-2'), 114.7 (C-3'''), 114.1 (C-3'''), 40.94 (N(CH₂CH₃)₂), 28.99 (CH₂CH₃), 13.41 (N(CH₂CH₃)₂), 13.10 (CH₂CH₃).

MS: 431.38 (M+H⁺), 453.40 (M+Na⁺).

(E)-N-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)πυρολιδιν-1-καρβοξαμίδιο Π-33ζ



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₃	428.52	–	R _f = 0.11 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο Π-33ζ παρασκευάστηκε από το αμίδιο Π-31ζ ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

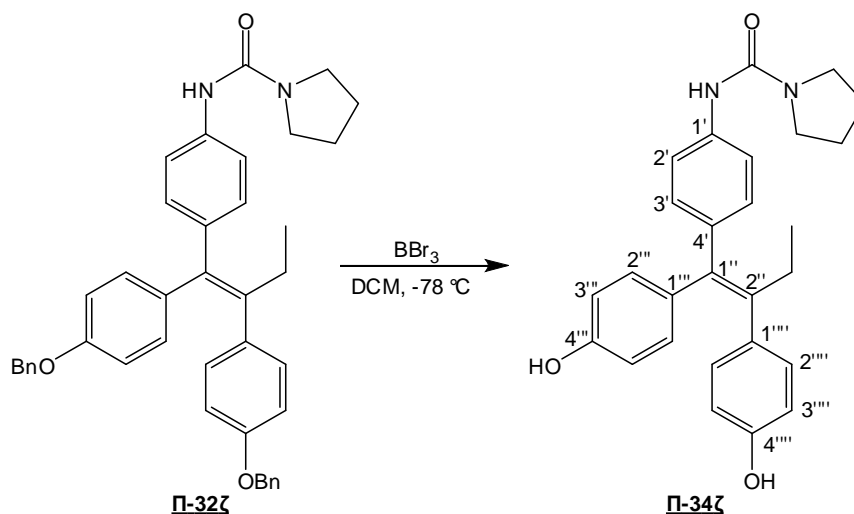
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆, 600MHz): δ = 7.30 (1H, s, NH), 7.23 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'), 7.05 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'''), 6.96 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'''), 6.83 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 6.73 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'), 6.64 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 3.38 (4H t J 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.84 (2H, q, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 2.05 (4H, t, J 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 0.909 (3H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 156.1 (C-4'''), 155.4 (C-4'''), 154.8 (CO), 140.1 (C-2''), 138.3 (C-4'), 137.9 (C-1''), 137.1 (C-1'), 135.5 (C-1'''), 133.2 (C-1'''), 130.2 (C-3'), 130.1 (C-2'''), 130.5 (C-2'''), 118.4 (C-2'), 114.9 (C-3''' και C-3'''), 45.78 (NCH₂CH₂), 29.88 (CH₂CH₃), 17.13 (NCH₂CH₂), 13.62 (CH₂CH₃).

MS: 429.40 (M+H⁺), 451.39 (M+Na⁺).

(Z)-N-(4'-(1'',2''-δις(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)πυρολιδιν-1-καρβοξαμίδιο **Π-34ζ**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₃	428.52	–	R _f = 0.10 Hex/EtOAc 4:6

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-34ζ** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-32ζ** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 4:6 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

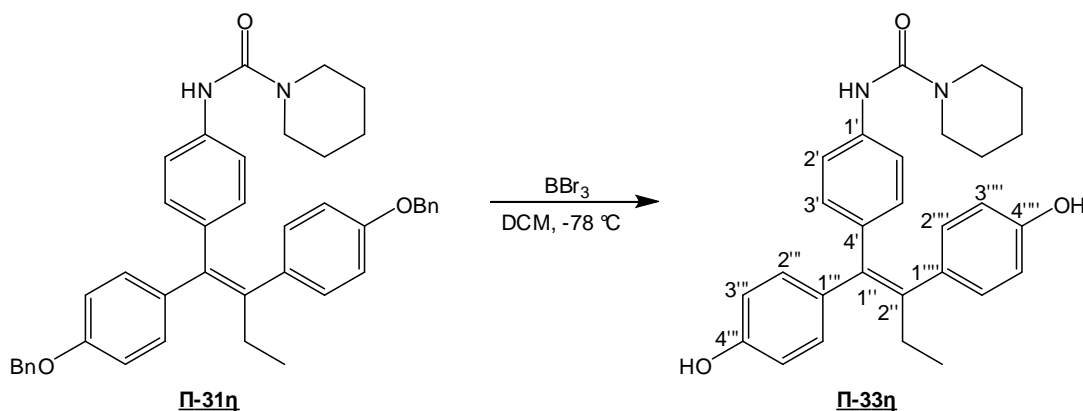
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (acetone-d₆, 600MHz): δ = 7.55 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'), 7.52 (1H, s, NH), 7.07 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'), 6.96 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'''), 6.71 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2''), 6.65 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 6.50 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3''), 3.45 (4H t J 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 2.44 (2H, q, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 2.05 (4H, t, J 7.2 Hz, NCH₂CH₂), 0.910 (3H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (acetone-d₆): δ = 155.6 (C-4'''), 155.3 (C-4'''), 153.9 (CO), 140.0 (C-2''), 137.8 (C-1'), 137.6 (C-1''), 135.9 (C-4'), 135.0 (C-1'''), 131.8 (C-1'''), 130.7 (C-2'''), 129.3 (C-2'''), 127.6 (C-3'), 118.7 (C-2'), 114.7 (C-3'''), 114.1 (C-3''), 45.53 (NCH₂CH₂), 25.27 (CH₂CH₃), 16.50 (NCH₂CH₂), 13.20 (CH₂CH₃).

MS: 429.43 (M+H⁺), 451.41 (M+Na⁺).

(E)-N-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)πιπεριδιν-1-καρβοξαμίδιο Π-33η



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.Τ. (°C)	TLC
90%	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₃	442.55	–	R _f = 0.18 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο Π-33η παρασκευάστηκε από το αμίδιο Π-31η ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

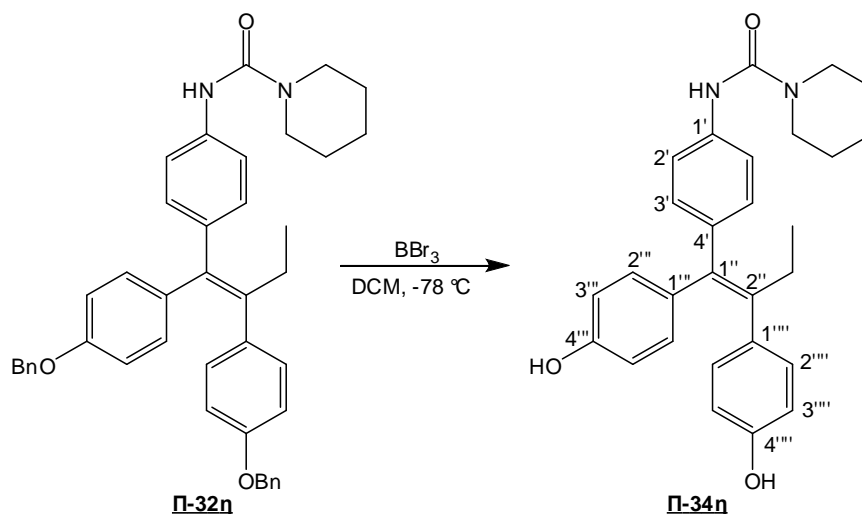
Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CD₃OD): δ = 7.01 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'), 7.00 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2'''), 6.94 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-2''''), 6.77 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'''), 6.76 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'), 6.59 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3''''), 3.45 (4H, t, *J* 6.4 Hz, NCH₂CH₂CH₂), 2.46 (2H, q, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.66 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂), 1.58 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂), 0.929 (3H, t, *J* 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CD₃OD): δ = 155.9 (C-4'''), 155.2 (C-4''''), 154.9 (CO), 142.0 (C-2''), 138.7 (C-4'), 138.0 (C-1'), 137.8 (C-1'), 135.1 (C-1'''), 133.6 (C-1''''), 131.6 (C-3'), 130.5 (C-2''''), 130.2 (C-2'''), 120.5 (C-2'), 114.4 (C-3'''), 114.3 (C-3''''), 44.85 (NCH₂CH₂CH₂), 29.30 (CH₂CH₃), 25.54 (NCH₂CH₂CH₂), 24.12 (NCH₂CH₂CH₂), 12.78 (CH₂CH₃).

MS: 443.59 (M+H⁺), 465.54 (M+Na⁺).

(Z)-N-(4'-(1'',2''-δισ(4''',4''''-υδροξυφαινυλ)βουτ-1-ενυλ)φαινυλ)πιπεριδιν-1-καρβοξαμίδιο **Π-34η**



ΑΠΟΔΟΣΗ	M.T.	M.B.	Σ.T. (°C)	TLC
90%	C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₃	442.55	–	R _f = 0.17 Hex/EtOAc 1:1

Μέθοδος Παρασκευής:

Σύμφωνα με την γενική μέθοδο το αποπροστατευμένο αμίδιο **Π-34η** παρασκευάστηκε από το αμίδιο **Π-32η** ύστερα από καθαρισμό με FCC με μείγμα έκλουσης Hex/EtOAc 1:1 και εξάτμιση του διαλύτη ως λάδι.

Φασματοσκοπικά Δεδομένα:

¹H NMR (CD₃OD): δ = 7.32 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'), 7.11 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'), 6.94 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'''), 6.68 (2H, d, J 8.4 Hz, H-2'''), 6.61 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 6.44 (2H, d, J 8.4 Hz, H-3'''), 3.53 (4H, t, J 6.4 Hz, NCH₂CH₂CH₂), 2.46 (2H, q, J 7.2 Hz, CH₂CH₃), 1.70 (4H, m, NCH₂CH₂CH₂), 1.64 (2H, m, NCH₂CH₂CH₂), 0.931 (3H, t, J 7.2 Hz, CH₂CH₃).

¹³C NMR (CD₃OD): δ = 156.9 (C-4'''), 155.7 (C-4''''), 152.7 (CO), 140.8 (C-2''), 139.0 (C-1'), 137.6 (C-1''), 137.0 (C-4'), 135.2 (C-1'''), 133.5 (C-1''''), 131.6 (C-2'''), 130.2 (C-2''''), 129.3 (C-3'), 119.6 (C-2'), 114.3 (C-3'''), 113.7 (C-3'''), 44.88 (NCH₂CH₂CH₂), 29.32 (CH₂CH₃), 25.59 (NCH₂CH₂CH₂), 24.15 (NCH₂CH₂CH₂), 12.64 (CH₂CH₃).

MS: 443.58 (M+H⁺), 465.52 (M+Na⁺).

5.4 Βιβλιογραφία

1. Meegan, M. J.; Hughes, R. B.; Lloyd, D. G.; Williams, D. C.; Zisterer, D. M. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1072-1084.
2. *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials.*, 1998; Vol. 351.
3. Lubezyk, V.; Bachmann, H.; Gust, R. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5338-5345.
4. Schwartz, W.; Hartmann, R. W.; Schonenberger, H. *Arch. Pharm.* **1991**, *324*, 223-229.
5. Shani, J.; Gatiz, A.; Livshitz, T.; Biran, S. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1504-1511.
6. Miller, R. B.; Al-Hassan, M. I. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2121-2123.
7. Harper, M. J.; Walpole, A. L. *Nature* **1966**, *212*, 87-88.
8. Collins, D. J.; Hobbs, J. J.; Emmens, C. W. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 952-957.
9. Olier-Reuchet, C.; Aitken, D. J.; Bucourt, R.; Husson, H.-F. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8221-8224.
10. Coe, P. L.; Scriven, C. E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1986**, *1*, 475-477.
11. McMurry, J. E. *Chem Rev* **1989**, *89*, 1513-1524.
12. Osborne, C. K.; Coronado-Heinsohn, E. B.; Hilsenbeck, S. G.; Wakeling, A. E.; McClelland, R. A.; Manning, D. L.; Nicholson, R. I. *J. Natl. Cancer Inst.* **1995**, *87*, 746-750.
13. Fisher, B.; Constantino, J. P.; Wickerham, D. L.; Redmont, C. K.; Kavanah, M. S.; Chiu, E. T.; Ford, L.; Wolmark, N. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 1371-1388.
14. MacGregor, J.; Jordan, V. C. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 151-196.
15. Mordini, A. *In Advances in Carbanion Chemistry*; Jai Press, Greenwich, 1992.
16. Schlosser, M. *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1627-1634.
17. Faigl, F.; Schlosser, M. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3369-3370.
18. Gauthier, S.; Mailhot, J.; Labrie, F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3890-3893.
19. Uddin, J.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. *Synlett.* **2004**, *9*, 1513-1516.
20. Moreau, A.; Rao, P. N. P.; Knaus, E. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5340-5350.
21. Khodaei, M. M.; Alizadeh, A.; Nazari, E. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4199-4202.
22. Wilkinson, M. C.; Saez, F.; Hon, W. L. *Synlett.* **2006**, *7*, 1063-1066.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Bn	βενζυλο
Boc	τριπ.-βουτοξυκαρβονυλομάδα
Bu	βουτυλο
n-BuLi	n-βουτυλολίθιο
COSY	2 διαστάσεων NMR συσχέτισης πυρήνων
DCM	διχλωρομεθάνιο
DEE	διαιθυλαιθέρας
DIBALH	υδρίδιο του διισοβουτυλοαλουμινίου
DIPEA	δισοπροπυλαιθυλαμίνη
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
Et	αιθυλο
Et ₃ N	τριαιθυλαμίνη
EtOH	αιθανόλη
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
FCC	χρωματογραφία στήλης με πίεση
Hex	εξάνιο
HMBC	2 διαστάσεων NMR συσχέτισης ετεροπυρήνων (<i>J</i> 3)
HMQC	2 διαστάσεων NMR συσχέτισης ετεροπυρήνων (<i>J</i> 1)
IR	φασματοσκοπία υπέρυθρου ακτινοβολίας
M.B.	μοριακό βάρος
Me	μεθυλο
MeCN	ακετονιτρίλιο
MS	φασματοσκοπία μάζας
M.T.	μοριακός τύπος
NMR	πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NOESY	2 διαστάσεων NMR συσχέτισης πυρήνων με NOE (Overhauser Effect)
Ph	φαινυλο
Ph ₃ P	τριφαινυλοφωσφίνη
reflux	βρασμός κατά αντιρροή

r.t.	θερμοκρασία δωματίου
Σ.Τ.	σημείο τήξης
TCT	2,4,6-τριχλωρο-[1,3,5]-τριαζίνη
TFA	τριφθοροοξικό οξύ
TFAA	τριφθοροοξικός ανυδρίτης
THF	τετραϋδροφουράνιο
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TMEDA	τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
TMeSiCHN ₂	τριμεθυλσιλυλδιαζομεθάνιο
TMSCl	τριμεθυλοχλωροσιλάνιο

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1. Οργανολογία

Για τις ανάγκες της διατριβής απαιτήθηκε η χρήση ενός μεγάλου αριθμού οργάνων είτε στο Γ.Π.Α. ή σε άλλα Πανεπιστήμια και Ινστιτούτα. Στο πλαίσιο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους τους χρήστες των οργάνων για την προθυμία και τη βοήθεια που πρόσφεραν στον τομέα λήψης ή/και ερμηνείας των φασμάτων και μετρήσεων. Ειδικότερα:

Τα φάσματα ^1H NMR ελήφθησαν, όπου δεν αναφέρεται, σε φασματοφωτόμετρο 400 MHz Bruker DRX-400, ενώ επίσης και σε φασματοφωτόμετρα 600 MHz Bruker DRX-600 και 300 MHz Bruker DRX-300.

Τα φάσματα ^{13}C NMR ελήφθησαν στα Κεφάλαια 2, 3 και 5 σε φασματοφωτόμετρο 50 MHz Bruker DRX-200 και στο Κεφάλαιο 4 σε φασματοφωτόμετρο 100 MHz Bruker DRX-400.

Η χημική μετατόπιση (δ) των πρωτονίων και των ανθράκων εκφράζεται σε ppm σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS), που χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς.

Τα φάσματα MS ελήφθησαν, όπου δεν αναφέρεται, με ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI) σε φασματογράφο Thermo Acella LC TSQ Quantum Access MS-MS, καθώς και με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI) με ενέργεια ιονισμού 6 Volt σε φασματογράφο VG 70-70 EQ.

Τα φάσματα FT-IR ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700 με τη χρήση DCM σε στρογγυλά παράθυρα ZnSe.

Τα σημεία τήξεως προσδιορίστηκαν με τη συσκευή Stuart (SMP3).

2. Ξήρανση διαλυτών – καθαρισμός και σύνθεση αντιδραστηρίων

Διμεθυλοφορμαμίδιο: Ξήρανση με CaH_2 , απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση και φύλαξη με μοριακά κόσκινα 3\AA .

Διχλωρομεθάνιο: Ξήρανση με CaH_2 , απόσταξη σε ατμόσφαιρα αργού και φύλαξη με μοριακά κόσκινα 4\AA .

Τετραϋδροφουράνιο: Ξήρανση με Na και δείκτη βενζοφαινόνη και απόσταξη σε ατμόσφαιρα αργού.

Τολουόλιο: Ξήρανση με Na, απόσταξη σε ατμόσφαιρα αργού και φύλαξη με μοριακά κόσκινα 4Å.

Τριαιθυλαμίνη: Ξήρανση με CaH₂, απόσταξη και φύλαξη με μοριακά κόσκινα 3Å.

Το αντιδραστήριο Jones παρασκευάστηκε με διάλυση 26,7 g CrO₃ σε 23 mL H₂SO₄ και αραίωση με H₂O έως τα 100 mL.

3. Χρωματογραφία

Οι χρωματογραφίες στήλης έγιναν με silica (35 – 70 μm) της εταιρίας SDS.

Οι χρωματογραφίες λεπτής στοιβάδας πραγματοποιήθηκαν σε προεπιστρωμένες πλάκες αλουμινίου silica gel 60 F₂₅₄, της εταιρίας Merck. Η εμφάνιση των κηλίδων στην TLC έγινε στο υπεριώδες στα 254 nm και στη συνέχεια με εμβάπτιση των πλακιδίων σε διάλυμα ανισαλδεΰδης ή νινυδρίνης.

4. Κυτταρικές Σειρές

Κεφάλαιο 2 (Sandra Liekens, Rega Institute for Medical Research, Belgium)

Κυτταρικές καλλιέργειες: Τα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής των επίμων (MAEC, Mouse Aortic Endothelial Cells) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής των βοοειδών (BAEC, Bovine Aortic Endothelial Cells) προσφέρθηκαν από τον καθηγητή M. Presta (Brescia, Italy). Τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του αυχένα (Hela, Human cervical carcinoma) και τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού (human breast carcinoma MCF-7) αποκτήθηκαν από την American Type Culture Collection (ATCC, Middlesex, UK). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τροποποιημένο Dulbecco's ελάχιστο απαραίτητο θρεπτικό υλικό (DMEM, Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium, Life Technologies, Inc., Rockville, MD) με συμπλήρωμα 10 mM HEPES (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) και 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS, Fetal Bovine Serum, Harlan Sera-Lab Ltd., Loughborough, UK).

Δοκιμές Πολλαπλασιασμού των Κυττάρων: Τα κύτταρα (MAEC, BAEC, Hela ή MCF-7) τοποθετούνται σε πλακίδια 48 πηγαδίων με αναλογία 10.000 κυττάρων ανά cm². Μετά από 16 ώρες, τα κύτταρα επώαστηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό παρουσία των προς ανάλυση ενώσεων. Μετά από πέντε μέρες τα κύτταρα

μεταφέρονται σε νέα πηγάδια και μετρώνται από ένα μετρητή Coulter (Analisis, Belgium).

Δοκιμές Μετανάστευσης των Κυττάρων: Τα τραύματα δημιουργήθηκαν σε πλήρη μονοστοιβάδα των κυττάρων MAE με την άκρη μικροπιπέτας διαμέτρου 1.0-mm. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό που περιείχε 10% FCS παρουσία των προς ανάλυση ενώσεων. Μετά από 8 ώρες, τα τραύματα φωτογραφήθηκαν, και η εισβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων στο τραύμα ποσοτικοποιήθηκε μέσω ανάλυσης με υπολογιστή των ψηφιακών εικόνων.

Δοκιμές στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη (CAM, Chorioallantoic membrane) assay γονιμοποιημένων αυγών κοτόπουλων: Το *in vivo* CAM μοντέλο της αγγειογένεσης εκτελέστηκε όπως περιγράφεται με μικρές τροποποιήσεις. Τα γονιμοποιημένα αυγά επώαστηκαν για τρεις μέρες στους 37 °C, μετά αφαιρέθηκαν 3 ml αλβουμίνης (για να αποσυνδεθεί το κέλυφος από την αναπτυσσόμενη CAM) και κατόπιν δημιουργήθηκε ένα άνοιγμα στο κέλυφος ώστε να είναι εμφανής η CAM. Το άνοιγμα καλύφθηκε με σελοφάν και τα αυγά επεστράφησαν στον επωαστήρα έως την ένατη μέρα όπου χορηγήθηκαν οι προς ανάλυση ενώσεις. Οι ενώσεις τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά δισκία (διαμέτρου 0.8 mm), και αφήθηκαν να ξηραθούν κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες. Ένα διάλυμα από οξική κορτιζόνη (100 μg/δισκίο, Sigma, St. Louis, MO) προστέθηκε σε όλα τα δισκία έτσι ώστε να αποφευχθεί κάθε φλεγμονώδης αντίδραση. Ένα δισκίο που αποτελεί το control τοποθετήθηκε στην CAM περίπου 1 cm μακριά από τα δισκία που περιέχουν τις προς ανάλυση ενώσεις. Στη συνέχεια, το άνοιγμα καλύφθηκε και τα αυγά επώαστηκαν έως την ενδέκατη ημέρα όπου και η περιοχή γύρω από τα δισκία κόπηκε και φωτογραφήθηκε. Κατόπιν, 2 ομόκεντροι κύκλοι τοποθετήθηκαν στις ψηφιακές εικόνες και μετρήθηκαν όλα τα αγγεία που τέμνουν αυτούς τους δύο κύκλους. Ένα two-tailed paired Student's *t*-test χρησιμοποιήθηκε για να αποτιμηθεί η σημασία των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν.

Κεφάλαιο 3 (Sangkil Nam, Department of Molecular Medicine, Beckman Research Institute of City of Hope, USA)

Κυτταρικές καλλιέργειες: Τα καρκινικά κύτταρα του μελανώματος A2058, μαστού MCF-7 και προστάτη DU145 αποκτήθηκαν από την ATCC. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε RPMI-1640 θρεπτικό υλικό που περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS, Fetal Bovine Serum), 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μg/ml στρεπτομυκίνης. Όλα τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε ατμόσφαιρα που περιείχε 5% CO₂ στους 37 °C. Για να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε δοκιμή MTS όπως περιγράφεται από τον προμηθευτή (Promega; Madison, WI). Κατόπιν, τα κύτταρα (5.000/πηγάδι) τοποθετήθηκαν σε πλακίδια 96 πηγαδιών και επώαστηκαν ολονύχτια στους 37 °C σε 5% CO₂. Στο καθένα από τα κύτταρα χορηγήθηκαν οι προς ανάλυση ενώσεις για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις 10 και 20 μM. Το DMSO χρησιμοποιήθηκε ως control. Η βιωσιμότητα των κυττάρων προσδιορίστηκε από τη μετατροπή του τετραζολίου στο χρωματομετρικό φορμαζάνιο και η απορρόφηση του φορμαζανίου μετρήθηκε στα 490 nm με τη χρήση αυτόματου καταγραφέα πλακιδίων ELISA. Η παραγωγή του χρωματομετρικού φορμαζανίου είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των κυττάρων που επιβίωσαν. Το κάθε πείραμα εκτελέστηκε τέσσερις φορές.

Κεφάλαιο 4 (Valentina Zuco, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Italy)

Κυτταρικές καλλιέργειες και Φάρμακα: Η καρκινική σειρά των γυναικείων ωοθηκών IGROV-1 (human ovarian carcinoma cell line) και η ανθεκτική στο cisplatin υποσειρά IGROV-1/Pt1, των οποίων η επιλογή έγινε μετά από έκθεση τους σε αυξημένη συγκέντρωση του φαρμάκου. Η σχέση μεταξύ της αντίστασης στο cisplatin, της μετάλλαξης στο γονίδιο *p53* και της ελαττωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης *bax* στα συστήματα της καρκινικής σειράς IGROV-1, αναπτύχθηκαν σε RPMI 1640 (Lonza, Vierviers, Belgium) που περιείχε 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS, Fetal Bovine Serum), (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) σε ατμόσφαιρα που περιείχε 5% CO₂ στους 37 °C. Οι ενώσεις διαλύθηκαν σε DMSO ή H₂O πριν από τη χρήση τους. Σε όλα τα πειράματα η μέγιστη τελική συγκέντρωση

DMSO σε θεραπευτικό υλικό της καλλιέργειας ήταν 0.5%. Τα δραστικά αντιπολλαπλασιαστικά κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλακίδια δώδεκα πηγαδιών εις διπλούν. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα εκτέθηκαν στις προς ανάλυση ενώσεις για 72 ώρες. Μετά τη θεραπεία, τα προσκολλημένα κύτταρα μεταφέρονται σε νέα πηγάδια και μετρώνται από ένα μετρητή κυττάρων (Coulter Electronics, Luton, UK).

Κεφάλαιο 5 (Prof. Ingemar Pongratz, Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden)

Κυτταρική καλλιέργεια: Τα επιθηλιακά κύτταρα των επίμυων HC11 (mouse mammary epithelial cells) επιμολύνονται σταθερά με ένα κατασκευάσμα 3ERE–Luc (ERE - Λουσιφεράση) και τοποθετούνται σε πλακίδια 24 πηγαδιών. Όταν τα κύτταρα φτάσουν στο 50-60% της επικάλυψης, χορηγούνται σε αυτά ή 1 μ M των υπό δοκιμή ενώσεων ή 10 nM οιστραδιόλη ή αιθανόλη (control). Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα συλλέγονται σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x Passive Lysis (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και η δράση της λουσιφεράσης μετράται με τη χρήση του BioThema Luciferase Assay. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών των δειγμάτων καθορίζεται με την ανάλυση Bradford. Οι τιμές της λουσιφεράσης συνδέονται με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως % αναλογία μιας αυθαίρετα επιλεγμένης ένωσης από τρία ανεξάρτητα πειράματα που έγιναν εις διπλούν.