



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό
Πρόγραμμα Σπουδών
«Ιατρική Χημεία»



**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ
ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΤΟΥ RUCAPARIB &
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ
ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥ(ADP-ΡΙΒΟΖΗΣ) - (PARP)**

**ΤΣΙΠΑ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Ιωάννινα 2019

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Τσίπα Μαρία

A.M. 205

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σκομπρίδης
Κωνσταντίνος
Καθηγητής

Βαρβούνης
Γεώργιος
Καθηγητής

Μαλανδρίνος
Γεράσιμος
Αναπληρωτής
Καθηγητής

Ημερομηνία Εξέτασης:

27/08/2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ειδίκευσης εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Χημεία» από τον Οκτώβριο του 2017 έως τον Ιούνιο του 2019, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνου. Ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός όλων των προϊόντων και παραπροϊόντων της βελτιστοποιημένης συνθετικής πορείας του Rucaparib, ενός αναστολέα της πολυμεράσης της πολυ(ADP-ριβόζης) που δρα κατά του καρκίνου των ωοθηκών, καθώς και ο σχεδιασμός αναλόγων ως εν δυνάμει αναστολέων της εν λόγω πολυμεράσης μέσω προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Χ3-210, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης αποδείχθηκε μια απαιτητική διαδικασία, στην οποία δεν θα μπορούσα να ανταπεξέλθω εάν δεν υπήρχε ένας σημαντικός αριθμός ανθρώπων να αποτελούν αρωγοί καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, και τους οποίους οφείλω να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο, ο οποίος μου ανέθεσε το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας και ήταν πάντα πρόθυμος να κατανοήσει τα προβλήματά μου και να με καθοδηγήσει, τόσο σε προσωπικό όσο και σε γνωστικό ή επαγγελματικό επίπεδο. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα που παρέβλεψε το γεγονός ότι προερχόμουν από διαφορετικό προπτυχιακό εργαστηριακό κλάδο και δέχτηκε να ενταχθώ στην ερευνητική του ομάδα και να εκπονήσω το μεταπτυχιακό μου υπό την επίβλεψή του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα εγκάρδια να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια κα Θεοδώρου Βασιλική και να της εκφράσω την απεριόριστη εκτίμησή μου, καθώς αποτέλεσε μητρική φιγούρα μέσα στο εργαστήριο για όλους και για εμένα προσωπικά και με τρυφερότητα, κατανόηση και ειλικρινές ενδιαφέρον προσπάθησε να αφουγκραστεί τα προβλήματα και τις ανησυχίες μου και να δώσει λύσεις σε αυτά. Την ευχαριστώ που πάνω από όλα ήταν άνθρωπος και μετά καθηγήτρια.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Βαρβούνη Γεώργιο και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μαλανδρίνο Γεράσιμο που δέχτηκαν να αποτελούν μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής του Μ.Δ.Ε, καθώς και για την

άψογη συνεργασία που είχα μαζί τους στο πλαίσιο των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

Επίσης, κρίνεται απαραίτητο να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο κέντρο NMR του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη φασμάτων ^1H NMR και ^{13}C NMR, καθώς και στο Κέντρο Μάζας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα. Ντέμου Νικολέτα που με εισήγαγε στις πειραματικές διαδικασίες του εργαστηρίου και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου διπλώματος.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω και τους υπόλοιπους μεταπτυχιακούς συνεργάτες και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Χ3-210 για τη συνεργασία και τις εργαστηριακές στιγμές που βιώσαμε: τη Βούλγαρη Πηνελόπη, τον Μπρέντα Αλέξη, τη Βελισσάρη Παναγιώτα, την Μπακαγιάννη Ανδρομάχη, τους νεοεισαχθέντες μεταπτυχιακούς φοιτητές Καραμέτου Χριστίνα, Νίκου Αλεξία και Κοτίδη Στέλιο, καθώς επίσης και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του Καθηγητή κ. Βαρβούνη Γεώργιου, Θεοδωρακοπούλου Βούλα, Γεροντίτη Ιωάννη και Γκάλπινο Βασίλειο. Η συνεισφορά του τελευταίου στο εργαστήριο ήταν ουσιαστική και πολύτιμη και χωρίς τις τεχνικές και γνωστικές του ικανότητες και την προθυμία του να βοηθά πάντα, πολλές εργαστηριακές διαδικασίες θα ήταν αδύνατες και γι' αυτό τον ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε συναδέλφους που αποτέλεσαν και φίλοι κατά τη διάρκεια αυτών των δύο ετών. Ένα ευχαριστώ, λοιπόν, στον υποψήφιο διδάκτορα Μιχάλη Αλαγιάννη, που με δέχτηκε στον εργαστηριακό του πάγκο και ήταν πάντα πρόθυμος να μου διδάξει εργαστηριακές τεχνικές και μεθοδολογίες και να μου θυμίζει ότι χωρίς λάθη δεν μαθαίνεις. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον μεταπτυχιακό φοιτητή και εργαστηριακό μου συνεργάτη Γιαννέλο Μάριο-Ηλία, ο οποίος εξ' αρχής ήταν πρόθυμος να μοιραστεί μαζί μου την εργαστηριακή του θέση και τις γνώσεις του και με έκανε πραγματικά να νιώσω μέλος της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου. Μία ξεχωριστή αναφορά οφείλεται στον μεταπτυχιακό φοιτητή Κουσαξίδη Αντώνιο, με τον οποίο είχαμε άψογη συνεργασία από την πρώτη μέρα των μεταπτυχιακών σπουδών και τον οποίο ευχαριστώ εκ βαθέων για την εργαστηριακή και ψυχολογική στήριξη που μου προσέφερε. Ιδιαίτερη μνεία πρέπει να γίνει και στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γούτσιου Γεωργία για την απεριόριστη γνωστική, επαγγελματική, συναισθηματική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε όλον αυτόν τον καιρό και κυρίως επειδή μου θύμισε ότι κάποια πράγματα στη ζωή πρέπει να τα διεκδικείς.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καρδιακό μου φίλο και αρχιτέκτονα Ροδίφτη Αθανάσιο, ο οποίος μορφοποίησε το εξώφυλλο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας και με στήριξε ηθικά όλα αυτά τα χρόνια.

Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω και την οικογένειά μου. Γι' αυτό οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα μου, Μάτη Σοφία, για τη συναισθηματική και ηθική της υποστήριξη καθώς και για την απέραντη εμπιστοσύνη που δείχνει πάντα σε κάθε απόφασή μου. Ακόμα, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στη θεία μου, Μάτη Ελένη, για την οικονομική και ηθική της υποστήριξη τα τελευταία χρόνια και τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τη γιαγιά και τον παππού μου, Μάτη Μαρία και Αντώνη, για την αγάπη που μου δείχνουν.

Σας ευχαριστώ όλους και κάθε έναν ξεχωριστά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το Rucaparib (Rubraca™) είναι ένας πολύ ισχυρός αναστολέας του ενζύμου της πολυμεράσης της πολυ(ADP-ριβόζης) – (PARP) που έλαβε έγκριση από τον FDA το Δεκέμβριο του 2016 και πλέον αξιοποιείται στην κλινική θεραπεία κατά του καρκίνου των ωοθηκών, κατά του καρκίνου των σαλπίγγων και κατά του πρωτεύοντος περιτοναϊκού καρκίνου. Παρόλο που οι κλινικές μελέτες φάσης III (ARIEL 3) έχουν καταδείξει τη σημαντική συνεισφορά του Rucaparib στην επιβίωση ασθενών που φέρουν τους παραπάνω τύπους καρκίνου χωρίς παράλληλη εξέλιξη της νόσου, εντούτοις οι υπάρχουσες πορείες σύνθεσης του Rucaparib χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό συνθετικών σταδίων, υψηλό κόστος και χαμηλή συνολική απόδοση. Με βάση αυτά τα δεδομένα, κρίθηκε αναγκαίος ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων βελτιστοποιημένων συνθετικών προσεγγίσεων του βιοδραστικού αυτού σκευάσματος και αυτό ακριβώς επιχειρήθηκε στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.).

Επιπλέον, δεδομένου ότι οι αναστολείς των PARP, εκτός από την πρωταρχική χρήση τους στην θεραπεία του καρκίνου, θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση σοβαρών ασθενειών, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο και το έμφραγμα του μυοκαρδίου, καθώς και για μακροχρόνιες νευροεκφυλιστικές νόσους, κρίθηκε σκόπιμη η ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών των αναστολέων των PARPs μέσω της συσχέτισης δομής και βιολογικής δραστηριότητας του Rucaparib καθώς και ο σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων των PARPs (αναλόγων) με πρότυπο τη δομή του Rucaparib.

ABSTRACT

Rucaparib (Rubraca™) is a very potent, inhibitor of poly(ADP-ribose)polymerase - (PARP) that was approved by the FDA in December 2016 and is now being used in the clinical treatment of ovarian cancer, fallopian cancer and primary peritoneal cancer. Although Phase III clinical trials (ARIEL 3) have demonstrated the significant contribution of Rucaparib to the survival of patients bearing the forementioned types of cancer without concurrent progression of the disease (progression-free survival – PFS), existing synthetic pathways of Rucaparib exhibit an extensive number of synthetic steps, high costs and low overall yield. Considering all these matters, a necessity to design and develop new optimized approaches for the synthesis of this bioactive compound has been noted and this is exactly what this master thesis will attempt.

It must be stated that, in addition to their primary use in the treatment of cancer, PARP inhibitors are considered a promising treatment for acute life-threatening diseases such as stroke and myocardial infarction as well as for long-term neurodegenerative diseases. Taking this fact into account, it was considered appropriate to analyze the structural characteristics of PARP inhibitors by correlating the structure and the biological activity of Rucaparib and to proceed to the design of new potential PARP Inhibitors, analogous to the structure of Rucaparib.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ

Rucaparib

PARPs

Αναστολείς των PARPs

Συνθετική Θνησιμότητα

Καρκίνος των Ωοθηκών

Καρκίνος των Σαλπίνγγων

Ινδόλιο

Βελτιστοποιημένη Σύνθεση

KEY WORDS

Rucaparib

PARPs

PARP Inhibitors

Synthetic Lethality

Ovarian Cancer

Fallopian Cancer

Indole

Optimized Synthesis

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ/ABBREVIATIONS

AIF	Apoptosis Inducing Factor	Παράγοντας που προκαλεί απόπτωση
ARTD	Diphtheria toxin-like ADP-ribosyltransferases	ADP-ριβοζυλτρανσφεράσες τύπου τοξίνης διφθερίτιδας
BER	Base Excision Repair	Επιδιόρθωση μέσω εκτομής βάσης
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
DDR	DNA Damage Response	Απόκριση σε βλάβη του DNA
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξειδίο
FDA	Food & Drug Administration	Αμερικάνικος Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
HRR	Homologous Recombination Repair	Επιδιόρθωση ομόλογου ανασυνδυασμού
MMR	Mismatch Repair	Αποκατάσταση αναντιστοιχίας βάσεων του DNA
NAD⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	Νικοτιναμιδικό αδενο-δινουκλεοτίδιο
NER	Nucleotide Excision Repair	Επιδιόρθωση μέσω αποκοπής νουκλεοτιδίων
NHEJ	Non-Homologous End Joining	Μη ομόλογη τελική σύνδεση (DNA)
OC	Ovarian Cancer	Καρκίνος των ωοθηκών
PAR	Poly(ADP-ribose)	πολυ(ADP-ριβόζη)
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase	Πολυμεράση της πολυ(ADP-ριβόζης)
PARPi	Poly(ADP-ribose) polymerase Inhibitors	Αναστολείς της πολυμεράσης της πολυ(ADP-ριβόζης)
PDB	Protein Data Bank	Τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών
PFS	Progression-free Survival	Επιβίωση χωρίς παράλληλη ανάπτυξη της νόσου
SSB	Single-strand Break	Μονόκλωνο θραύσμα του DNA
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	V
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	IX
ABSTRACT	XI
ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ	XIII
KEY WORDS	XIII
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ/ABBREVIATIONS	XV
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.2. ΣΚΟΠΟΣ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
2.1. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	9
2.1.1. ΤΥΠΟΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ	9
2.1.2. ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	9
2.1.3. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	10
2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	11
2.3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	13
2.4. PARs: ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ.....	15
2.5. PARPs	17
2.5.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	17
2.5.2. ΔΟΜΗ ΤΗΣ PARP-1	18
2.5.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ	20
2.6. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ PARPs	22
2.6.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ	22
2.6.1.1. Αναστολή της Ενζυμικής Δραστηκότητας των PARPs	22
2.6.1.2. Παγίδευση των PARPs	23
2.6.2. ΓΕΝΙΚΑ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ	24
2.6.3. ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ.....	26
2.6.4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	27
2.7. ΙΝΔΟΛΙΟ	28
2.7.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	28
2.7.2. ΤΟ ΙΝΔΟΛΙΟ ΩΣ ΒΑΣΙΚΟ ΔΟΜΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	29
2.7.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΙΝΔΟΛΙΟΥ	31
2.7.3.1. Σύνθεση ινδολίου κατά Bartoli	31
2.7.3.2. Σύνθεση ινδολίου κατά Bischler-Möhlau	33
2.7.3.3. Σύνθεση ινδολίου κατά Castro.....	34
2.7.3.4. Σύνθεση ινδολίου κατά Diels-Reese.....	34
2.7.3.5. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer.....	35
2.7.3.6. Σύνθεση ινδολίου κατά Fukuyama	37

2.7.3.7. Σύνθεση Ινδολίου κατά Gassman.....	39
2.7.3.8. Σύνθεση ινδολίου κατά Julia	40
2.7.3.9 Σύνθεση ινδολίου κατά Larock.....	41
2.7.3.10. Σύνθεση ινδολίου Leimgruber-Batcho	42
2.7.3.11. Σύνθεση ινδολίου κατά Madelung	43
2.7.3.12. Σύνθεση ινδολίου κατά Nenitzescu	44
2.7.3.13. Σύνθεση ινδολίου κατά Reissert	45
2.7.3.14. Σύνθεση ινδολίου κατά Sundberg.....	47
2.8. RUCAPARIB.....	48
2.8.1. ΤΟ RUCAPARIB ΩΣ ΙΣΧΥΡΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ.....	48
2.8.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ RUCAPARIB	48
2.8.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	50
2.8.4. ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ RUCAPARIB	53
2.8.4.1. Φαρμακοχημική Πορεία Σύνθεσης του Rucaparib	53
2.8.4.2. Εναλλακτική Συνθετική πορεία του Rucaparib από την Agouron C.R.	55
2.8.4.3. Τροποποιημένη Πορεία σύνθεσης από την Pfizer	57
2.8.4.4. Εναλλακτική Πορεία σύνθεσης του Τρικυκλικού Ενδιαμέσου από την Shijiazhuang Biotechnology	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	61
3.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ RUCAPARIB.....	61
3.1.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ (ΠΟΡΕΙΑ I).....	61
3.1.2. ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ-1.....	62
3.1.2.1. Προκλήσεις στον σχηματισμό του Οξέος 4b.....	62
3.1.2.3. Προκλήσεις στην Αντίδραση Σύζευξης Suzuki	65
3.1.3. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ I (ΠΟΡΕΙΑ II)	67
3.1.4. ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ II.....	68
3.1.4.1. Προκλήσεις στην Αντίδραση Σύνθεσης της Λακτάμης – Προστασία Καρβονυλίου.....	68
3.1.4.2. Προστασία του Ινδολικού Αζώτου	69
3.1.5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ (III ΚΑΙ IV)	70
3.1.6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	71
3.1.4.1. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 2	71
3.1.4.2. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 3	74
3.1.4.3. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4a ...	76
3.1.4.4. Αντιδράσεις σύνθεσης και Χαρακτηρισμός της ένωσης 4b	78
3.1.4.5. Αντιδράσεις Σύνθεσης της ένωσης 5 απευθείας από την ένωση 3	80
3.1.4.7. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 12	81
3.1.4.8. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 13	83
3.1.4.9. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 14	85
3.1.4.10. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 15 ..	86

3.1.4.11. Προτεινόμενες Αντιδράσεις σύνθεσης και Θεωρητικός Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 7	88
3.1.4.12. Προτεινόμενες Αντιδράσεις σύνθεσης και Θεωρητικός Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 8	88
3.1.5. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	89
3.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΜΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΑ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ RUCAPARIB.....	93
3.2.1. ΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ RUCAPARIB:.....	93
3.2.1.1. Μοριακή Μοντελοποίηση του Rucaparib	93
3.2.1.2. Πρόβλεψη των κύριων πρωτεϊνών – στόχων του Rucaparib	95
3.2.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ Α (ΑΥΤΟΔΟΚVΙΝΑ).....	97
3.2.2.1. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM01	97
3.2.2.2. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM02	98
3.2.2.3. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM03	99
3.2.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ Β (ΑΥΤΟΔΟΚVΙΝΑ).....	100
3.2.3.1. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM04	100
3.2.3.2. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM05	101
3.2.3.3. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM06	102
3.2.3.4. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM07	103
3.2.3.5. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM08	104
3.2.3.6. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM09	105
3.2.3.7. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM10	106
3.2.3.8. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM11	107
3.2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ Γ (ΑΥΤΟΔΟΚVΙΝΑ).....	108
3.2.4.1. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM12	108
3.2.4.2. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM13	109
3.2.4.3. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM14	110
3.2.5. ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	111
3.2.6. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟΙ ΝΕΟΙ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ PARP	112
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	113
4.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΌΡΓΑΝΑ	113
4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	114
4.2.1. ΈΝΩΣΗ 2: 5-((6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξάνιο-4,6-δiónη.....	114
4.2.2. ΈΝΩΣΗ 3: 5-((2-βρώμο-6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3,διοξάνιο-4,6-δiónη	115
4.2.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4 _Α ΚΑΙ 4 _Β : 3-((2-βρώμο-6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο) προπτανοϊκός μεθυλεστέρας και (-αιθυλεστέρας)	116
4.2.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4B: 3-((2-βρώμο-6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο) προπτανοϊκό οξύ	117
4.2.4.1. Από την αντίδραση υδρόλυσης με Cu(0) σε πυριδίνη/H ₂ O της ένωσης 3.....	117
4.2.4.2. Από την αντίδραση υδρόλυσης με HCl της ένωσης 3	117

4.2.4.3. Από την αντίδραση υδρόλυσης της ένωσης 4a	118
4.2.5. ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5: 2-ΒΡΩΜΟ-7-ΦΘΟΡΟ-3,4-ΔΙΥΔΡΟΒΕΝΖΟ[CD]ΙΝΔΟΛΟ-5(1H)-ΟΝΗ	119
4.2.5.1. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης 3 με Sc(OTf) ₃ /CH ₃ NO ₂	119
4.2.5.2. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης 3 με PPA	119
4.2.5.3. Από την θερμική αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης 3 με CH ₃ NO ₂	120
4.2.5.4. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης 4b με Sc(OTf) ₃ /CH ₃ NO ₂	120
4.2.5.5. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης 4b με Κυανουρικό Οξύ	120
4.2.5.6. Συνοπτικός Πίνακας Προσπαθειών Σύνθεσης της Ένωσης 5	121
4.2.6. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12: 3-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολο-3-υλο)προπανοϊκός μεθυλεστέρας	122
4.2.7. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 13: 3-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολο-3-υλο)προπανοϊκό οξύ	123
4.2.8. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 14: 4-(7-φθορο-5-όξο-1,3,4,5-τετραυδροβένζο[cd]ινδόλο-2-υλο)βενζαλδεΐδη	124
4.2.9. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 15: 3-(2-4-(1,3-ΔΙΘΕΙΑΝΙΟ-2-ΥΛΟ)ΦΑΙΝΥΛΟ-6-ΦΘΟΡΟ-1H-ΙΝΔΟΛΟ-3-ΥΛΟ)ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟΣ ΕΣΤΕΡΑΣ	125
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΑΝΑΦΟΡΕΣ	126

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΕΦΑΛΑΙΩΝ 1 & 2

- Εικόνα 1.** Στοχεύοντας τις οδούς που επιλεκτικά εμπλέκονται μόνο στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, τα φυσιολογικά κύτταρα δεν επηρεάζονται ενώ τα καρκινικά οδηγούνται σε θάνατο. O'Connor, Mark B J., Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 2015, 60(4): p. 547-560. 2
- Εικόνα 2.** Αναστολείς των PARPs. David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, 2017, 21 (9), pp 1227–1244 3
- Εικόνα 3.** Κατοχυρωμένη συνθετική πατέντα του Rucaparib από την Pfizer. David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, 2017, 21 (9), pp 1227–1244 4
- Εικόνα 4.** Πετροσυνθετική ανάλυση του Rucaparib, όπως αυτή σχεδιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου X3-210, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων .. 6
- Εικόνα 5.** Η μοριακή ένωση του Rucaparib, ταξινομημένη σε 3 ευδιάκριτους τομείς Α, Β & C και οι στοχευμένες επιμέρους τροποποιήσεις. 8
- Εικόνα 6.** Μηχανισμοί καταστροφής του DNA και η απόκριση στη βλάβη του DNA. Angela Lamarca et. al, Biliary Tract Cancer: State of the Art and potential role of DNA Damage Repair, *Cancer Treatment Reviews*, 2018, 70: p. 168-177. 11
- Εικόνα 7.** Η πρακτική εφαρμογή της «συνθετικής θνησιμότητας». Τα φυσιολογικά κύτταρα δεν επηρεάζονται ενώ τα καρκινικά οδηγούνται σε θάνατο. Angela Lamarca et. al, Biliary Tract Cancer: State of the Art and potential role of DNA Damage Repair, *Cancer Treatment Reviews*, 2018, 70: p. 168-177. 12
- Εικόνα 8.** Οι γκρι φιγούρες αντιπροσωπεύουν τα άτομα που έχουν πεθάνει από τον καρκίνο και οι πράσινες αυτά που έχουν επιβιώσει για >5 χρόνια. American Cancer Society. What Are the Key Statistics About Ovarian Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>. January 5, 2018. 13
- Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Από πάνω προς τα κάτω: Σάλπιγγες, Ωθήκες, Μήτρα, Τράχηλος, Κόλπος. 15
- Εικόνα 10.** Βιοσύνθεση και διάσπαση της πολύ(ADP-ριβόζης) με συμμετέχοντα ένζυμα τα: (a) PARP, (b) (ADP-ribosyl)proteinlyase; (c) γλυκοϋδρολάση PARG, (d) Ανθρώπινη υδρολάση Nudix (hNUDT16). Mikhail S. Drenichev, S.N.M., Poly(ADP-ribose): From chemical synthesis to drug design, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016. 26(15): p. 3395-3403. 16
- Εικόνα 11.** Η δομή της PARP-1 (ARTD-1) συμπλεγμένης με DNA. Structural Implications for selective targeting of PARPs, Jamin D. Steffen et al. *Frontiers in Oncology*, 2013 18
- Εικόνα 12.** Οι 6 τομείς της δομής της PARP-1. M.-F. Langelier and J. M. Pascal, PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 134–143, Feb. 2013. 19
- Εικόνα 13.** Η αυτο-πολυ(ADP-ριβοζυλίωση) της PARP-1. D'amours, S. Desnoyers, I. D'silva, and G. G. Poirier, "Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions," *Biochem. J.*, vol. 342, no. 2, pp. 249–268, 1999. 21
- Εικόνα 14.** Οι αναστολείς των PARP επιδεικνύουν 2 μηχανισμούς δράσης (πάνω και κάτω). Η αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας των PARP (πάνω) συμβάλλει στην κυτταροτοξικότητα μέσω «συνθετικής θνησιμότητας» σε όγκους που διαθέτουν ανεπάρκεια στην HRR, ενώ η «παγίδευση» των PARP (κάτω) δεν περιορίζεται σε ογκοκύτταρα με αυτήν την ανεπάρκεια, επάγοντας κυτταροτοξικότητα και μέσω άλλων οδών. J. Murai et al., Differential trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors, vol. 72, no. 21, pp. 5588–5599, 2012. 22

- Εικόνα 15.** Τρόποι σύνδεσης των αναστολέων του PARP-1 σε θέσεις δέσμευσης του νικοτιναμίδιου. (A) περιοχή δέσμευσης NAD⁺ και υποτομείς των πρωτεϊνών PARP-1/2. (B) Τρόπος σύνδεσης των αναστολέων PARP-1 που φέρουν ένα δικυκλικό λακταμικό φαρμακοφόρο ή ένα ψευδοκυκλικό φαρμακοφόρο. Ying-Qing Wang et al. An Update on Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors: Opportunities and Challenges in Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59: p. 9575-9598. 25
- Εικόνα 16.** Δομική συσχέτιση μεταξύ φαρμακοφόρων των αναστολέων του PARP1 και του NAD⁺. He, X., et al., Design, synthesis and anticancer activities evaluation of novel 5H-dibenzo[b,e]azepine-6,11-dione derivatives containing 1,3,4-oxadiazole units. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2018, in press. 26
- Εικόνα 17.** Άλλοι αναστολείς των PARP και των Τανκυρασών. Δομές από το *MedChemExpress*, <https://www.medchemexpress.com/AZ6102.html> 27
- Εικόνα 18.** Οι θεωρητικές χημικές μετατοπίσεις των ¹H και ¹³C (δ, ppm) για το ινδόλιο σε διαλύτη CDCl₃. C. Valdes and J. Barluenga, "Five-Membered Heterocycles: Indole and Related Systems," *Mod. Heterocycl. Chem.*, no. 2, pp. 377–531, 2011. 29
- Εικόνα 19.** Η τρυπτοφάνη είναι πρόδρομη ένωση της σεροτονίνης και της μελανίνης. N. Chadha and O. Silakari, "Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 134, pp. 159–184, 2017. 29
- Εικόνα 20.** Οι δομές της ινδομεθακίνης (ρευματοειδής αρθρίτιδα) και του διαιθυλαμίδιου του λυσεργικού οξέος (ψυχοτρόπος ουσία). ChemDraw Professional2015, 2019. 30
- Εικόνα 21.** Τα παράγωγα του Ινδολίου εμφανίζουν πληθώρα δράσεων και το είδος της βιολογικής τους δραστηριότητας καθορίζεται από τον τύπο των προσαρτημένων στο ινδόλιο ομάδων και τη θέση σύνδεσης των ομάδων αυτών. Στα αριστερά: το γενικό μοτίβο για την εκδήλωση αντικαρκινικής δράσης. Στα δεξιά: γενικό μοτίβο εκδήλωσης αντιμικροβιακής δράσης. N. Chadha and O. Silakari, "Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 134, pp. 159–184, 2017. 30
- Εικόνα 22.** Απλοποιημένο διάγραμμα 2 διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του Rucaparib με το ενεργό κέντρο του PARP1. PDB, AutodockVina. 49
- Εικόνα 23.** Απλοποιημένο διάγραμμα 3 διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του Rucaparib με το ενεργό κέντρο του PARP1. Δομές από το PDB, AutodockVina. 49
- Εικόνα 24.** Η ισχύς ορισμένων πιθανών αναστολέων των ARTD1,5,6. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3-4 φορές για τον κάθε πιθανό αναστολέα, και οι καμπύλες δόσης-απόκρισης δημιουργήθηκαν ξεχωριστά για κάθε ένωση. Teemu Haikarainen et al. Evaluation and Structural basis for the inhibition of tankyrases by PARP inhibitors, *ACS Medical Chemistry Letters*, 2013. 50
- Εικόνα 25.** Η δέσμευση του Rucaparib στο καταλυτικό θραύσμα του ARTD6 (TNKS-2). Η παραμορφωμένη D-θηλιά απεικονίζεται ως μία παχιά διακεκομμένη γραμμή. Teemu Haikarainen et al. Evaluation and Structural basis for the inhibition of tankyrases by PARP inhibitors, *ACS Medical Chemistry Letters*, 2013. 51
- Εικόνα 26.** In vitro δραστηριότητες αναστολέων PARPs, χαρτογραφημένες σε φυλογενετικό δένδρο ανθρώπινων PARPs. Ann-Gerd Thorsell et al. Structural basis for potency and promiscuity in poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and tankyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016. 60(4): p. 1262-1271. 52
- Εικόνα 27.** Το Rucaparib δεν είναι εκλεκτικός αναστολέας, Ann-Gerd Thorsell et al. Structural basis for potency and promiscuity in poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and tankyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 60(4): p. 1262-1271. 53
- Εικόνα 28.** Τα 3 κύρια παραπροϊόντα κατά την εναλλακτική συνθετική πορεία του Rucaparib από την Agouron Cancer Research (Πατέντα 2008). David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, 2017, 21 (9), pp 1227–1244. 57

Εικόνα 29. Τα κύρια παραπροϊόντα της τροποποιημένης συνθετικής πορείας της Pfizer. David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, 2017, 21 (9), pp 1227–1244 59

“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”

Marie Curie

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

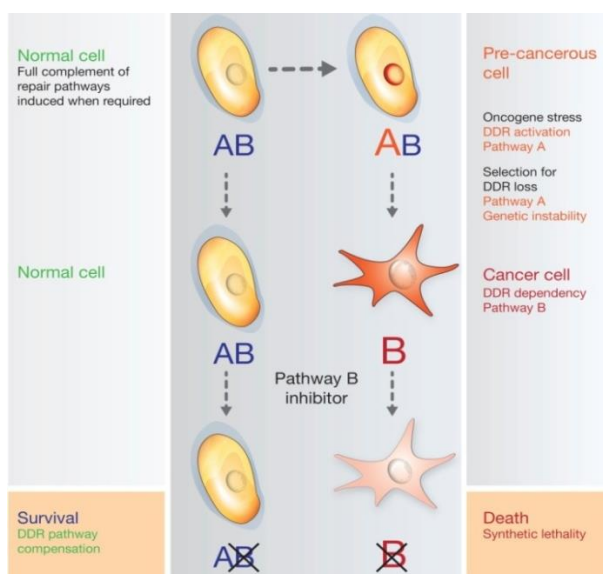
Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας[1], καρκίνος είναι ο γενικός όρος που αποδίδεται σε μια μεγάλη ομάδα ασθενειών που μπορούν να επηρεάσουν οποιοδήποτε μέρος του σώματος. Άλλοι όροι που χρησιμοποιούνται είναι οι κακοήθεις όγκοι και τα νεοπλάσματα. Ένα καθοριστικό χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι η ταχεία δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων που ξεπερνούν τα συνήθη όριά τους και τα οποία μπορούν στη συνέχεια να εισβάλλουν σε παρακείμενα μέρη του σώματος και να εξαπλωθούν σε άλλα όργανα, με την τελευταία διαδικασία να αναφέρεται ως μετάσταση. Εκτιμάται ότι περίπου 9,5 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από καρκίνο το 2018 παγκοσμίως [2].

Όσο αφορά τον καρκίνο στις γυναίκες, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί επιτυχία στη θεραπεία των γυναικολογικών κακοηθειών τόσο λόγω της προόδου στον τομέα της χειρουργικής επέμβασης όσο και της ενσωμάτωσης της διεπιστημονικής βοηθητικής θεραπείας [3]. Ωστόσο, τα ποσοστά επιβίωσης τα τελευταία χρόνια εμφάνιζαν στασιμότητα και οι στρατηγικές που επικεντρώνονταν αποκλειστικά στην κυτταροτοξική χημειοθεραπεία αποδείχθηκαν ανεπαρκείς για την ανατροπή αυτής της τάσης [2]. Επιπλέον για δεκαετίες, η επιτυχία της χημειοθεραπείας περιοριζόταν εξαιτίας της έλλειψης εκλεκτικότητας για τα καρκινικά κύτταρα έναντι των φυσιολογικών κυττάρων, γεγονός που οδηγούσε και οδηγεί σε ανεπαρκή συγκέντρωση φαρμάκου στα σημεία των όγκων, συστημική τοξικότητα και εμφάνιση καρκινικών κυττάρων με ανθεκτικότητα στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα [4].

Όλα αυτά τα δεδομένα έχουν τροφοδοτήσει την αναζήτηση και ανάπτυξη νέων θεραπευτικών οδών που επωφελούνται από την αυξανόμενη κατανόηση της βιολογίας των καρκινικών κυττάρων. Οι στοχευμένες θεραπείες, όπως θα αναλυθεί στον επόμενο κεφάλαιο στην ενότητα 2.1., παρέχουν μια πιο κατευθυνόμενη προσέγγιση ενεργώντας σε στόχους επιλεκτικά μοχλευμένους σε καρκινικά κύτταρα ή στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Αυτοί οι στόχοι τυπικά είναι μέλη των οδών που εμπλέκονται στην ογκογένεση, υποστηρίζοντας την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση και την αγγειογένεση του καρκινικού όγκου. Στοχεύοντας μόνο αυτές τις οδούς και όχι ευρέως την ανάπτυξη όλων των κυττάρων (φυσιολογικών και μη) ενός ασθενούς, οι φυσιολογικοί ιστοί μπορούν να διατηρηθούν και να ελαχιστοποιηθεί η ανεπιθύμητη απόπτωση υγιών κυττάρων [5]. Η σημασία ανακάλυψης φαρμάκων που δρουν στοχευμένα εναντίον των καρκινικών κυττάρων αποτυπώνεται στο γεγονός ότι

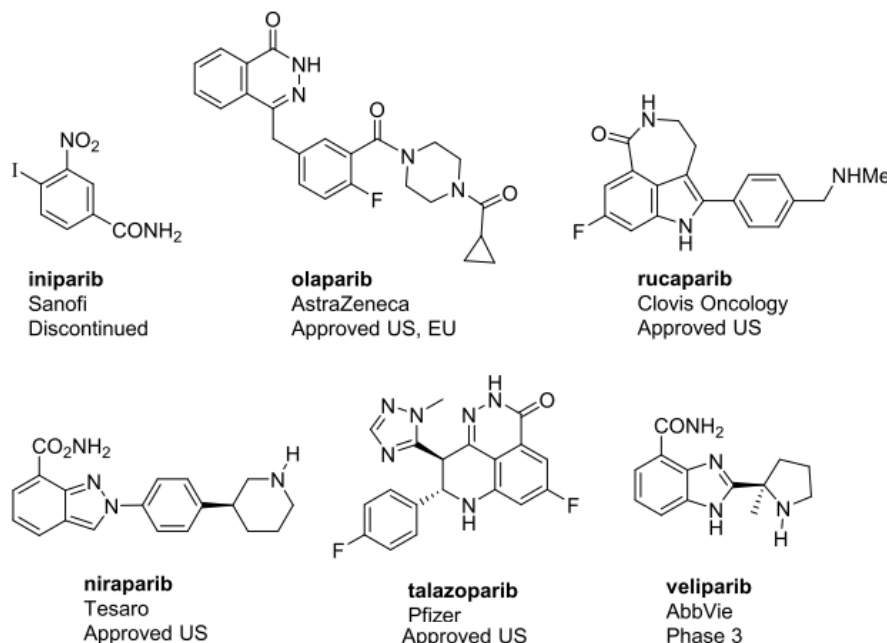
από τα 11 αντικαρκινικά φάρμακα που έχουν εγκριθεί ήδη μέσα στο 2019 από τον FDA, τα 10 αξιοποιούνται στη στοχευμένη θεραπεία και μόνο το 1 στη χημειοθεραπεία [6].

Υπάρχει μια πληθώρα σχετικών οδών υπό διερεύνηση που εμπλέκονται σε όλες τις διαδικασίες ανάπτυξης και ρύθμισης των γυναικολογικών κακοηθειών. Ωστόσο, ένας πολύ γνωστός μηχανισμός αντοχής των καρκινικών κυττάρων στην κυτταροτοξική χημειοθεραπεία είναι η υψηλή δραστηριότητα των οδών αποκατάστασης βλάβης του DNA (DDR) σε αυτά τα κύτταρα (ενότητα 2.2.). Οι PARPs είναι πυρηνικά ένζυμα (ενότητα 2.5.) που συμβάλλουν στην αποκατάσταση των μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA και η αναστολή της δράσης τους οδηγεί σταδιακά σε συσσώρευση μονόκλωνων θραυσμάτων, γεγονός που οδηγεί σε θραύσματα διπλής έλικας, καταλήγοντας σε κυτταρικό θάνατο. Μέσω αυτής αλλά και άλλων διαδικασιών, η αναστολή της δράσης των PARPs με ενώσεις μικρού μοριακού βάρους έχει αρχίσει να εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία στη θεραπεία του καρκίνου, ιδιαιτέρως εκείνων των τύπων καρκίνου που φέρουν μεταλλάξεις *BRCA*. Η χρήση αναστολέων PARP σε φορείς μεταλλάξεων *BRCA* είναι αποτελεσματική επειδή τα καρκινικά κύτταρα σε αυτούς τους ασθενείς εμφανίζουν δυσλειτουργία στην οδό επιδιόρθωσης ομόλογου ανασυνδυασμού (HRR), έναν κύριο μηχανισμό επιδιόρθωσης της διπλής έλικας του DNA. Έτσι, η απώλεια της επιδιορθωτικής οδού HRR στα καρκινικά κύτταρα και η παράλληλη αναστολή της δράσης της επιδιορθωτικής οδού των PARP οδηγεί τα ογκοκύτταρα σε απόπτωση (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Στοχεύοντας τις οδούς που επιλεκτικά εμπλέκονται μόνο στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, τα φυσιολογικά κύτταρα δεν επηρεάζονται ενώ τα καρκινικά οδηγούνται σε θάνατο. O'Connor, Mark B. J., Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 2015, 60(4): p. 547-560.

Οι αναστολείς των PARPs είναι μια συναρπαστική νέα τάξη παραγόντων που έχει πολλούς τομείς ανάπτυξης και δυναμικού. Υπάρχουν πολλοί αναστολείς των PARPs που είτε έχουν δείξει δραστικότητα σε όγκους από μεταλλαγμένα *BRCA1* και *BRCA2* και έχουν ήδη λάβει έγκριση για κλινική θεραπεία για ορισμένους τύπους καρκίνων (rucaparib, olaparib, niraparib, talazoparib), είτε βρίσκονται σε κλινικές μελέτες (veliparib) είτε σε στάδια ανάπτυξης. (Εικόνα 2). Όλοι αυτοί οι αναστολείς διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την οδό χορήγησής τους, στο προφίλ τοξικότητας, στην αποτελεσματικότητα και στον μηχανισμό αντίστασης.

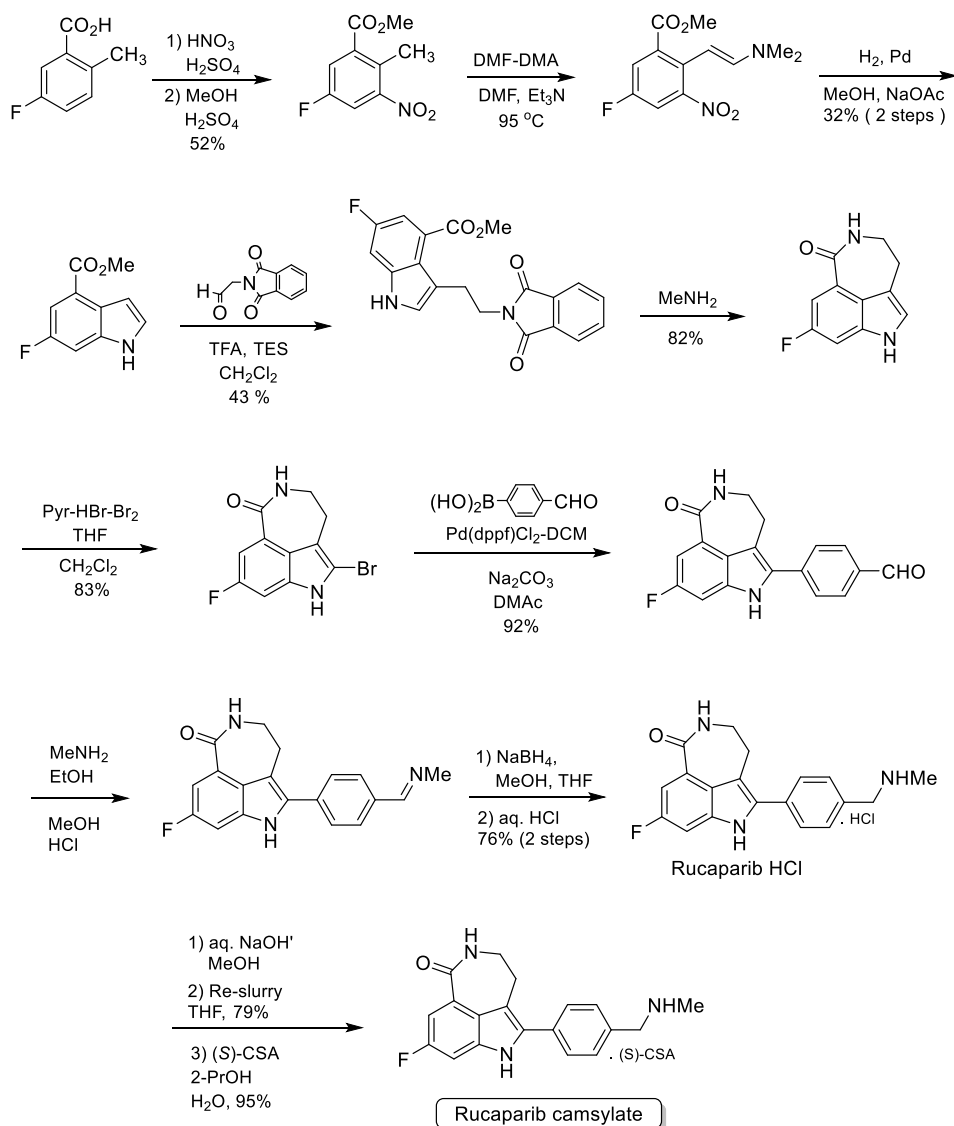


Εικόνα 2. Αναστολείς των PARPs. David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, **2017**, 21 (9), pp 1227–1244

Κατά τη διάρκεια των επόμενων ετών, οι τρέχουσες μελέτες θα ολοκληρωθούν και τα πειραματικά και κλινικά δεδομένα θα «ωριμάσουν», οδηγώντας σε καλύτερη κατανόηση των αναστολέων των PARPs (PARPi) και πρόσθετη χρήση για αυτούς τους παράγοντες. Αυτό ακριβώς αναμένεται να γίνει και για την έρευνα που διεξάγεται γύρω από το Rucaparib, αυτού του τόσο ισχυρού αναστολέα της PARP-1, που έλαβε έγκριση από τον FDA το Δεκέμβριο του 2016 και πλέον αξιοποιείται στην κλινική θεραπεία κατά του καρκίνου των ωθηκών, κατά του καρκίνου των σαλπίγγων και κατά του πρωτεύοντος περιτοναϊκού καρκίνου (ενότητα 2.8).

Ωστόσο, οι υφιστάμενες ολικές συνθέσεις του Rucaparib χαρακτηρίζονται από εκτεταμένο αριθμό συνθετικών σταδίων, υψηλό κόστος και χαμηλή συνολική απόδοση, εκτοξεύοντας το συνολικό κόστος της συγκεκριμένης αντικαρκινικής θεραπείας. Πιο συγκεκριμένα, η κατοχυρωμένη πατέντα σύνθεσης του Rucaparib από

την Pfizer περιλαμβάνει 12 συνθετικά βήματα με συνολική απόδοση 2,9% (Εικόνα 3) ενώ επιβαρύνεται και από άλλα προβλήματα που σχετίζονται κυρίως με υψηλά ποσοστά παραπροϊόντων και περίπλοκες διαδικασίες καθαρισμού των ενώσεων. Άλλες προσπάθειες βελτιστοποίησης της συνθετικής πορείας, όπως αυτή της εταιρείας Shijiazhuang Biotechnology, δεν έχουν καταφέρει να ανεβάσουν την απόδοση του τελικού προϊόντος πάνω από 8% (υποενότητα 2.8.4.).



Εικόνα 3. Κατοχυρωμένη συνθετική πατέντα του Rucaparib από την Pfizer. David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, **2017**, 21 (9), pp 1227–1244

Με βάση όλα τα παραπάνω γίνεται σαφής η ανάγκη ανάπτυξης μίας βελτιστοποιημένης συνθετικής πορείας, η οποία θα χαρακτηρίζεται από μικρότερο αριθμό σταδίων, υψηλότερη απόδοση ενδιάμεσων και τελικών ενώσεων και τη χρήση φθηνότερων αντιδρώντων, παρακάμπτοντας τα προβλήματα που εμφανίζουν οι υπάρχουσες πορείες σύνθεσης του Rucaparib.

1.2. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως θα συζητηθεί και παρακάτω (ενότητα 2.1.), η στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία με χρήση αναστολέων PARP είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος αντιμετώπισης των κακοηθειών, εφόσον παρουσιάζει δύο πολύ βασικά χαρακτηριστικά:

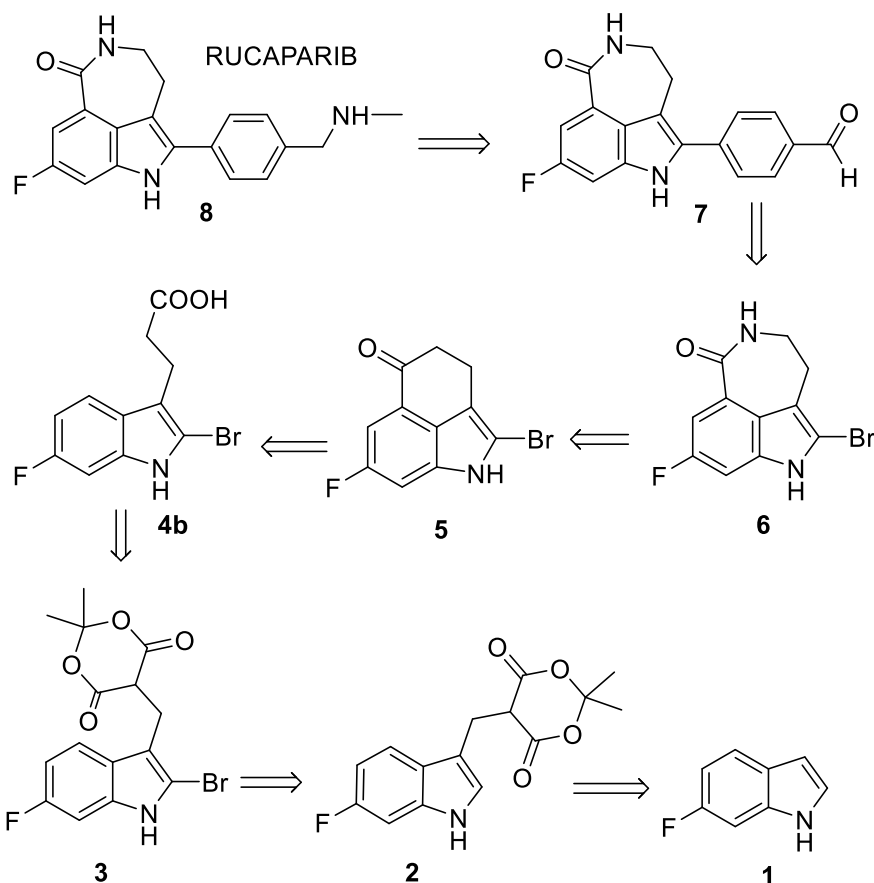
- αξιοποιεί φάρμακα, τα οποία έχουν σχεδιαστεί και αναπτυχθεί κατάλληλα ώστε να στοχεύουν αποκλειστικά καρκινικά κύτταρα,
- προάγει την εξατομικευμένη θεραπεία, εφόσον αξιοποιεί διαγνωστικές μεθόδους που αντιστοιχούν σε κάθε ασθενή με συγκεκριμένη αγωγή, κατάλληλη όχι μόνο για τον τύπο καρκίνου που φέρει ο ασθενής, αλλά και για τον τύπο μετάλλαξης που έχει επιφέρει τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

Ωστόσο, η στοχευμένη θεραπεία, επειδή ακριβώς φέρει τα παραπάνω 2 χαρακτηριστικά, στην κλινική πράξη συνοδεύεται από υψηλά κόστη. Παράδειγμα αποτελεί η ανάλυση κόστους-αποτελεσματικότητας του Olaparib και του Rucaparib για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών, όπως αυτή παρουσιάστηκε στην ετήσια συνάντηση της Αμερικανικής Εταιρείας Κλινικής Ογκολογίας το 2017. Σύμφωνα με τα οικονομικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν, έγινε σαφές ότι:

- οι συνδυασμοί φαρμάκων που βασίζονται στον λευκόχρυσο (χημειοθεραπείες), ήταν οι πιο οικονομικοί ξεκινώντας από \$1.672/(PFS) ανά μήνα, σε σύγκριση με
- φαρμακευτικούς παράγοντες εκτός πλατίνας (\$6.688/μήνα),
- τους φαρμακευτικούς συνδυασμούς που περιέχουν bevacizumab (στοχευμένη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα - \$ 12.482/μήνα),
- το Olaparib (\$13.3731/μήνα) και
- το Rucaparib (\$14.034/μήνα) [7].

Αναλογιζόμενοι το κόστος των 114.478 δολαρίων για τη θεραπεία με Olaparib και των 137.068 δολαρίων για τη θεραπεία με Rucaparib πριν την εξέλιξη της νόσου (PFS), το κόστος θεραπείας με τους PARPi αποδείχθηκε τελικά 7,1 - 8,3 φορές υψηλότερο από τους φαρμακευτικούς συνδυασμούς με βάση το λευκόχρυσο (χημειοθεραπεία) [8].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω οικονομικά δεδομένα και όλα όσα έχουν ειπωθεί στην εισαγωγή σχετικά με τη σημαντικότερη συμβολή των αναστολέων των PARP (PARPi), και ιδιαίτερα του Rucaparib, στη στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία και με δεδομένο ότι δεν υφίσταται μία πλήρως βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία χαμηλού κόστους και υψηλής απόδοσης για το Rubraca™, η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας σχεδίασε και επιχείρησε να αναπτύξει νέες συνθετικές προσεγγίσεις του Rucaparib (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Πετροσυνθετική ανάλυση του Rucaparib, όπως αυτή σχεδιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου X3-210, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η σχεδιασθείσα βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία (όπως θα αναλυθεί εκτενέστερα στην υποενότητα 3.1.1.) συνίσταται από 7 στάδια, θεωρητικά υψηλής απόδοσης το καθένα, και ως αρχική ένωση **1** αξιοποιείται το 6-Φθορο-ινδόλιο, ένα «εύχρηστο» και εμπορικά διαθέσιμο αντιδραστήριο, σχετικά χαμηλού κόστους. Η παραπάνω συνθετική πορεία συνοψίζεται ως εξής: πάνω στο αρχικό υπόστρωμα του ινδολίου (θέση 3) προσαρτάται μέσω μίας αντίδρασης τύπου «Michael» το Meldrum's Acid (2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνη) και η προκύπτουσα ένωση **2** υπόκειται σε βρωμίωση (παράγραφος 3.1.4.1. και 3.1.4.2.). Στη συνέχεια, η ένωση **3** μέσω μίας αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης μετατρέπεται σε ένα παράγωγο του 3-ινδολοπτοπρονικού οξέος **4b**, το οποίο μέσω μίας αντίδρασης ενδομοριακής κυκλοαφυδάτωσης οδηγεί στην τρικυκλική ένωση **5** (παράγραφος 3.1.4.3. και 3.1.4.4.). Η ένωση **5** (παράγραφος 3.1.4.5.) υφίσταται κατόπιν μία αναδιάταξη Schmidt ή Beckmann (παράγραφος 3.1.4.7.) για να δώσει τελικά την ινδολαζεπίνη **6**. Ακολούθως, το άτομο του βρωμίου της ινδολαζεπίνης **6** συζεύγνυται με το βορονικό οξύ της βενζαλδεΐδης μέσω μίας αντίδρασης σύζευξης Suzuki, οδηγώντας στην ένωση **7** (παράγραφος 3.1.4.6.). Στο τελικό στάδιο, η ένωση **7** μέσω αναγωγικής

αμίνωσης δίνει την ένωση **8**, υπό την μορφή υδροχλωρικού άλατος (παράγραφος 3.1.4.8.).

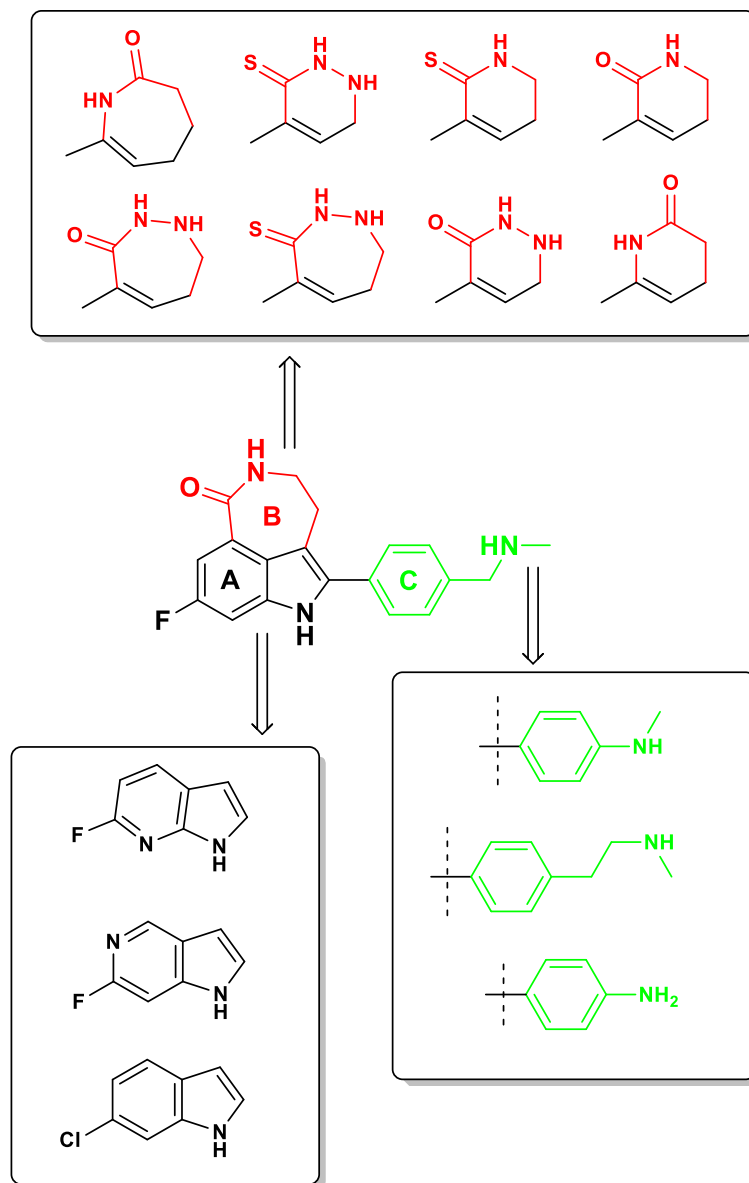
Στην ενότητα 3.1. της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, αναλύονται εκτενώς τα συνθετικά βήματα και παρουσιάζονται οι προκλήσεις και οι δυσκολίες που ενείχε η πειραματική εφαρμογή αυτών των αντιδράσεων, οι αποδόσεις και τα παραπροϊόντα που προκύπτουν, καθώς και όλα τα δεδομένα που οδήγησαν στην υιοθέτηση εναλλακτικών επιμέρους συνθετικών πορειών.

Ένας επιπρόσθετος αλλά σημαντικός σκοπός του μεταπτυχιακού διπλώματος ήταν ο μη ορθολογικός σχεδιασμός ανάλογων ενώσεων του Rucaparib, με τη χρήση μοριακής μοντελοποίησης, κι έχοντας προηγουμένως αναλύσει τα δομικά χαρακτηριστικά αυτής της βιοδραστικής ένωσης και γενικά των αναστολέων των PARP και δίνοντας έμφαση στις μοριακές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του Rucaparib και της PARP-1 και της TNKS-1.

Το Rucaparib είναι ένας ισχυρός αλλά όχι τόσο εκλεκτικός αναστολέας. Ωστόσο, θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως μία ένωση οδηγός (lead compound) για την ανάπτυξη ισχυρότερων και πιο εκλεκτικών αναστολέων. Η εκλεκτικότητα αποτελεί βασική πτυχή για τα στοχευμένα φάρμακα και τους ανιχνευτές μικρών μορίων, συνδέεται άρρηκτα με τη δομή και επιφέρει άμεσες επιπτώσεις στη βιολογική και κλινική χρήση τους. Επιπλέον, έχει καταδειχτεί ότι μικρές αλλά στοχευμένες τροποποιήσεις στη δομή βιολογικών μορίων, όπως η προσθήκη υποκαταστατών που ενισχύουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναστολέα και υποστρώματος, επιδρούν καταλυτικά στην ανασταλτική δράση αυτών των μορίων αλλά και στο κλινικό τους προφίλ.

Μέσω μη ορθολογικού σχεδιασμού σχεδιάστηκαν 14 ανάλογα του Rucaparib που φέρουν επουσιώδεις τροποποιήσεις ως προς το «μητρικό» μόριο. Οι τροποποιήσεις αφορούν καθέναν από τους τρεις «τομείς» (A, B & C) της δομής του Rucaparib, όπως αυτοί παρουσιάζονται στην εικόνα 5, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις αφορούν τροποποιήσεις σε περισσότερα σημεία του μορίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε θεωρητική ανάλυση (molecular docking) των νέων τροποποιημένων μορίων και στην ενότητα 3.2. συζητείται εκτενώς η επίδραση αυτών των «επουσιωδών» τροποποιήσεων στην ικανότητα πρόσδεσης του Rucaparib και των αναλόγων του στο υπόστρωμα της PARP-1. Τέλος, έχοντας παρουσιάσει και αναλύσει όλες τις μοριακές αλληλεπιδράσεις των περιορισμένων μεν, αλλά στοχευμένων αυτών τροποποιήσεων, προτείνεται ένας μικρότερος αριθμός ανάλογων μορίων του Rucaparib που θα μπορούσαν να έχουν βιολογική δράση, ως εν δυνάμει αναστολείς των PARP. Στην

εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται συνοπτικά οι τροποποιήσεις που σχεδιάστηκαν σε κάθε έναν από τους τομείς του μορίου του Rucaparib.



Εικόνα 5. Η μοριακή ένωση του Rucaparib, ταξινομημένη σε 3 ευδιάκριτους τομείς A,B & C και οι στοχευμένες επιμέρους τροποποιήσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ως «στοχευμένη θεραπεία» έχει οριστεί το φάρμακο στην ετικέτα έγκρισης του οποίου υπάρχει ειδική αναφορά σε ταυτόχρονα ή προηγουμένως εγκεκριμένο διαγνωστικό έλεγχο, τον οποίο πρέπει να εκτελεί ο ασθενής πριν του δοθεί η δυνατότητα να επιλεγεί για να λάβει το συγκεκριμένο φάρμακο [9]. Σύμφωνα με έναν πιο διευρυμένο ορισμό, αντικαρκινικά φάρμακα θεωρούνται «στοχευμένα» όταν παρουσιάζουν έναν εστιασμένο μηχανισμό ο οποίος δρα συγκεκριμένα σε ένα καλά καθορισμένο μοριακό στόχο (συνήθως μία πρωτεΐνη) ή βιολογικό μονοπάτι που, όταν απενεργοποιηθεί, προκαλεί καταστροφή των καρκινικών κυττάρων [10].

2.1.1. ΤΥΠΟΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΘΕΡΑΠΕΙΩΝ

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι στοχευμένων θεραπειών:

- τα φάρμακα μικρού μοριακού βάρους και
- τα μονοκλωνικά αντισώματα [5].

Ο πρώτος τύπος στοχευμένης θεραπείας αναφέρεται σε οργανικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους (μικρότερες από 800 Da). Αυτά τα «μικρά μόρια» μπορούν να διεισδύσουν στη κυτταρική μεμβράνη και έχουν σχεδιαστεί ώστε να παρεμβαίνουν στις οδούς σηματοδότησης και να δρουν σε μοριακούς στόχους που βρίσκονται μέσα στο κύτταρο [11]. Τα φάρμακα μικρού μοριακού βάρους, που αφορούν στη στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία, φέρουν στο όνομά τους την κατάληξη "-ib" (internal binding – εσωτερική δέσμευση) και χορηγούνται συνήθως από το στόμα ως δισκία [12].

Τα περισσότερα μονοκλωνικά αντισώματα δεν μπορούν να διεισδύσουν στη μεμβράνη του πλάσματος του κυττάρου και σχεδιάζονται έναντι στόχων εκτός του κυττάρου ή στην κυτταρική επιφάνεια, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες και οι επιφανειακοί υποδοχείς [13]. Τα γενικά ονόματα των μονοκλωνικών αντισωμάτων φέρουν την κατάληξη "-mab" και χορηγούνται συνήθως ενδοφλέβια [14].

2.1.2. ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η στοχευμένη θεραπεία αφορά φαρμακευτικά σκευάσματα για τον εντοπισμό και τη στόχευση συγκεκριμένων τύπων καρκινικών κυττάρων με σκοπό παράλληλα να μην βλάπτονται τα φυσιολογικά κύτταρα του ασθενούς [15]. Τα φάρμακα αυτά συνήθως εμπλέκονται με τα «σήματα κατατεθέν» του καρκίνου. Αυτά είναι η υπερέκφραση των

αυξητικών παραγόντων ή των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων (όπως είναι ο VEGF), η μετατοπισμένη ισορροπία μεταξύ απόπτωσης και «αντί-απόπτωσης» που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα (υπερδραστηριότητα των επιδιορθωτικών οδών των βλαβών του DNA), οι πολυάριθμες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές που υφίστανται τα ογκοκύτταρα και η αγγειογένεση, δηλαδή η ανάπτυξη ενός πυκνού αγγειακού δικτύου, απαραίτητου για την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στον όγκο [16].

Οι στοχευμένες θεραπείες έχουν επεκτείνει την ιδέα της εξατομικευμένης θεραπείας του καρκίνου επειδή ορισμένα από αυτά τα φάρμακα μπορεί να είναι αποτελεσματικά σε ασθενείς των οποίων οι καρκίνοι έχουν συγκεκριμένο μοριακό στόχο, αλλά μπορεί να μην είναι αποτελεσματικοί για ασθενείς που φέρουν τον ίδιο καρκίνο αν δεν υπάρχει τέτοιος μοριακός στόχος [5]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η θεραπεία για τον καρκίνο των ωοθηκών. Τα ποσοστά επιτυχίας της στοχευμένης θεραπείας αυτού του καρκίνου με αναστολείς των PARP (όπως είναι το Olaparib και το Rucaparib) αυξάνονται δραματικά σε ασθενείς με μεταλλάξεις *BRCA*. Γίνεται σαφές, λοιπόν, ότι η επιτυχία της στοχευμένης θεραπείας προϋποθέτει την εύρεση κατάλληλων διαγνωστικών εργαλείων, προκειμένου κάθε ασθενής να λαμβάνει το στοχευμένο φάρμακο που είναι κατάλληλο για τη δική του περίπτωση [17].

Οι στοχευμένες θεραπείες, είτε χρησιμοποιούνται ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλες στοχευμένες θεραπείες για τον καρκίνο [18]. Ο FDA έχει εγκρίνει στοχευμένες θεραπείες για πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων εκείνων του μαστού, του προστάτη, του παχέος εντέρου και των ωοθηκών [19].

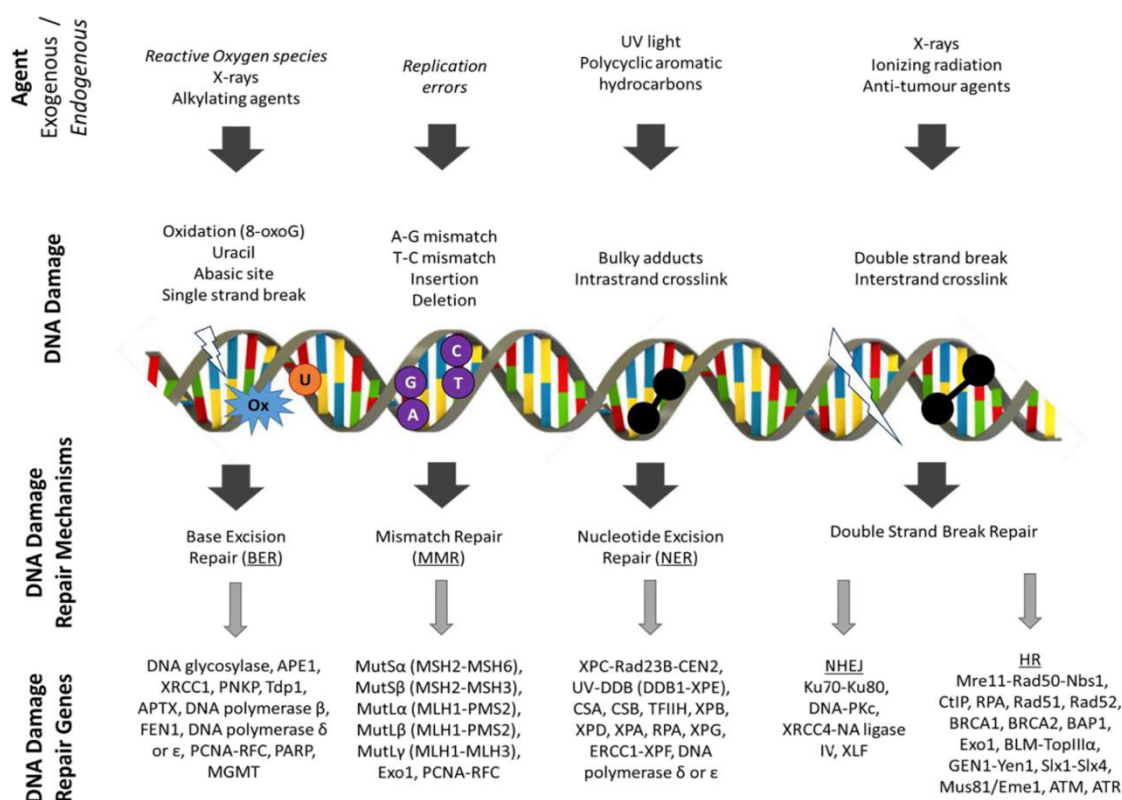
2.1.3. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Συνοψίζοντας, οι στοχευμένες θεραπείες διαφέρουν από την «κλασική» χημειοθεραπεία κυρίως στα εξής:

- Οι στοχευμένες θεραπείες επιλέγονται σκόπιμα ή σχεδιάζονται με σκοπό να αλληλεπιδρούν με τον στόχο τους, ενώ πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα αξιοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία εξαιτίας της ικανότητάς τους να θανατώνουν κύτταρα.
- Οι στοχευμένες θεραπείες εμφανίζουν συνήθως «κυτταροστατική» δράση, δηλαδή παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ογκοκυττάρων, ενώ οι περισσότερες χημειοθεραπείες δρουν σε όλα τα ταχέως διαιρούμενα (φυσιολογικά και καρκινικά) κύτταρα [20].

2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η απόκριση στη βλάβη του DNA (DDR – DNA Damage Response), που αποτελείται από ένα ενορχηστρωμένο δίκτυο πρωτεϊνών, είναι απαραίτητη για την κυτταρική βιωσιμότητα και για την πρόληψη της βλάβης του DNA που μεταδίδεται στα θυγατρικά κύτταρα. Η DDR δεν περιλαμβάνει μόνο τις οδούς επιδιόρθωσης, αλλά και την ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου που συγκρατούν το κύτταρο ώστε να επιτραπεί η αποκατάσταση της βλάβης του DNA, είτε πριν σταθεροποιηθεί με αναπαραγωγή, είτε πριν μεταδοθεί στα θυγατρικά κύτταρα μέσω της διαδικασίας της μίτωσης [21].

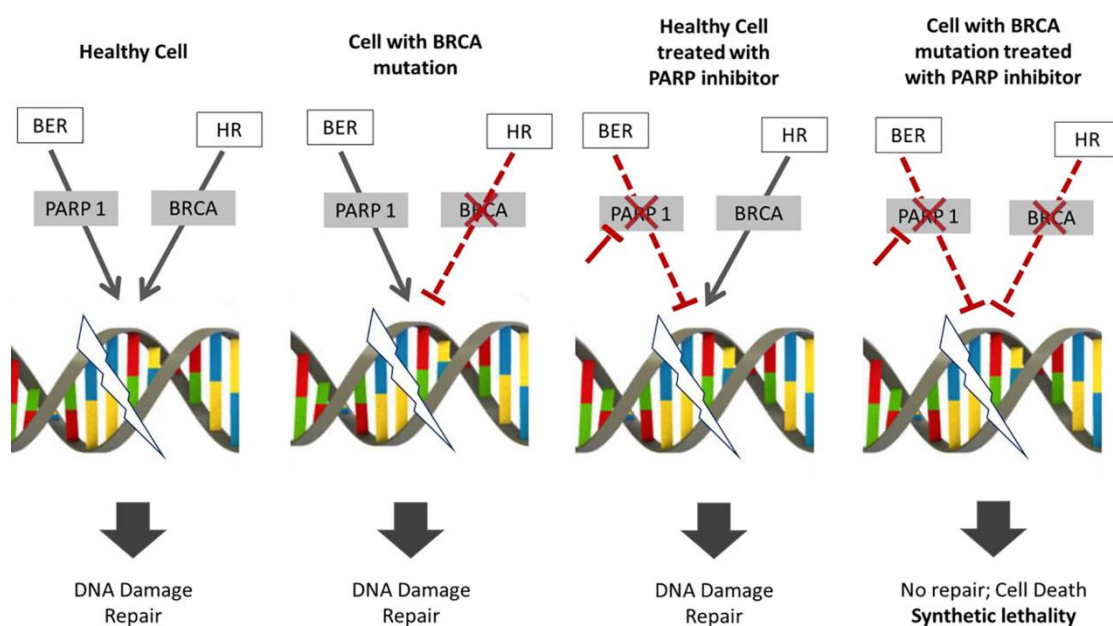


Εικόνα 6. Μηχανισμοί καταστροφής του DNA και η απόκριση στη βλάβη του DNA. Angela Lamarca et. al, Biliary Tract Cancer: State of the Art and potential role of DNA Damage Repair, *Cancer Treatment Reviews*, **2018**, 70: p. 168-177.

Οι κύριες οδοί επιδιόρθωσης του DNA είναι η αποκατάσταση του DNA με εκτομή/ανασύνθεση κάποιας βάσης της μονής έλικας (BER/SSBR – Base Excision Repair/Single-Strand Base Repair), η επιδιόρθωση μέσω αποκοπής νουκλεοτιδίων (NER), η αποκατάσταση αναντιστοιχίας του DNA (MMR – MisMatch Repair), η μη ομόλογη τελική σύνδεση (NHEJ – Non Homologous End Joining) και η επισκευή ομόλογου ανασυνδυασμού (HRR – Homologous Recombination Repair). Το MMR ασχολείται με σφάλματα αναδιπλασιασμού (αναντιστοιχία συμπληρωματικών βάσεων, παρεμβολές και διαγραφές) και το NHEJ και το HRR ασχολούνται με

ασυνέχειες της διπλής έλικας του DNA (DSBs – Double-Strand Breaks) [22]. Οι διασταυρούμενες συνδέσεις του DNA εξετάζονται με τη χρήση συστατικών των οδών επιδιόρθωσης NER και HRR μαζί με τις πρωτεΐνες αναιμίας του Fanconi, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του κυττάρου από οξειδωτική βλάβη [23].

Η DDR δεν ρυθμίζεται στο καρκίνο με ορισμένες από τις οδούς που αναφέρθηκαν παραπάνω να έχουν υποστεί αυξορρύθμιση και άλλες μειορρύθμιση ή να έχουν χαθεί τελείως. Η απώλεια ενός στοιχείου της DDR μπορεί να αντισταθμιστεί από τη δραστηριότητα ενός συμπληρωματικού στοιχείου της DDR, το οποίο, ως αποτέλεσμα, θα υποστεί αυξορρύθμιση. Επειδή το καρκινικό κύτταρο εξαρτάται για την «επιβίωσή του» μόνο από το αντισταθμιστικό επιδιορθωτικό μονοπάτι της DDR, το γεγονός αυτό αντιπροσωπεύει μια ευπάθεια του ογκοκυττάρου που μπορεί να αξιοποιηθεί από αναστολείς του αντισταθμιστικού στοιχείου DDR στο οποίο είναι «εθισμένο». Αυτή είναι η πρακτική εφαρμογή της αρχής της «συνθετικής θνησιμότητας» [24], ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει δύο γεγονότα (μεταλλάξεις/ απενεργοποίηση/ αναστολή) που μεμονωμένα δεν θέτουν σε κίνδυνο την επιβίωση αλλά μαζί είναι θανατηφόρα.



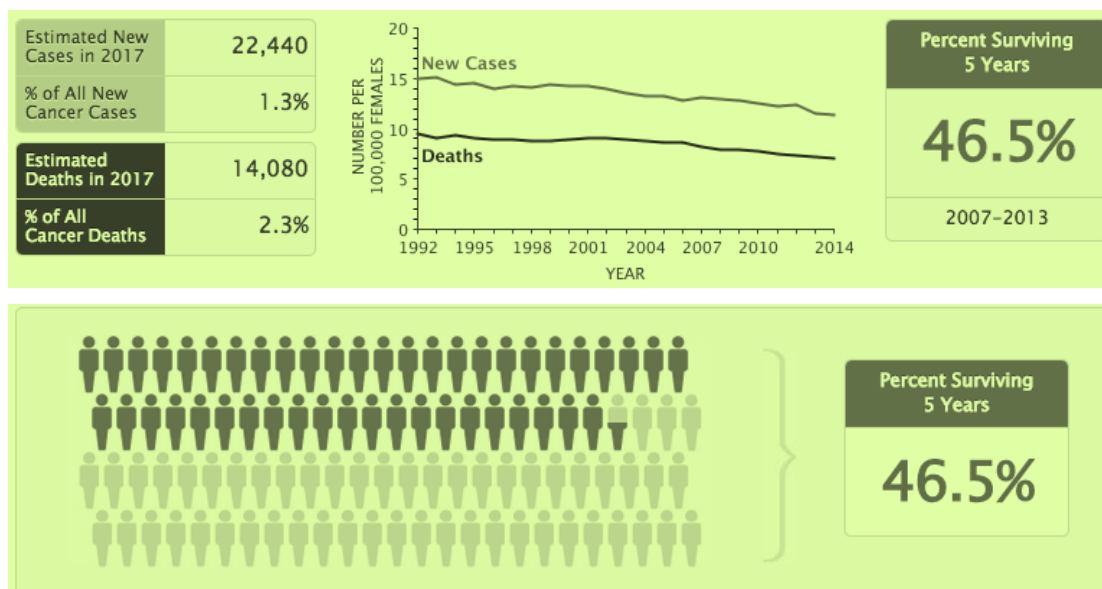
Εικόνα 7. Η πρακτική εφαρμογή της «συνθετικής θνησιμότητας». Τα φυσιολογικά κύτταρα δεν επηρεάζονται ενώ τα καρκινικά οδηγούνται σε θάνατο. Angela Lamarca et. al, Biliary Tract Cancer: State of the Art and potential role of DNA Damage Repair, *Cancer Treatment Reviews*, 2018, 70: p. 168-177.

Από την άλλη πλευρά, η ρύθμιση των στοιχείων της DDR μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στα χημικά και την ακτινοθεραπεία που καταστρέφει το DNA των καρκινικών κυττάρων-στόχων και οι αναστολείς της DDR μπορούν επομένως να καταργήσουν αυτόν τον μηχανισμό αντίστασης. Έτσι, η λογική για την ανάπτυξη των αναστολέων επιδιορθωτικών οδών της DDR είναι δύο:

- πρώτον, να εκμεταλλευτούν τα ελαττώματα στις επιδιορθωτικές οδούς της DDR που σχετίζονται με τον καρκίνο μέσω της αρχής της «συνθετικής θνησιμότητας»
- δεύτερον, να ξεπεράσουν τη θεραπευτική αντίσταση στη χημιο- και ακτινοθεραπεία που καταστρέφει το DNA.

2.3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ως καρκίνος των ωοθηκών χαρακτηρίζεται ο καρκίνος που σχηματίζεται μέσα ή πάνω σε μία ωοθήκη [25]. Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι η πέμπτη κύρια αιτία θανάτου λόγω καρκίνου στις γυναίκες τόσο στις ΗΠΑ όσο και στην Ευρωπαϊκή Ένωση [26]. ενώ είναι η όγδοη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο σε γυναίκες παγκοσμίως [27]. Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόλο που ο καρκίνος των ωοθηκών δεν εμφανίζει υψηλότερη συχνότητα (όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του μαστού), αποτελεί μία θανατηφόρα μορφή καρκίνου (Εικόνα 8) [28]. Ενδεικτικά, το 2018 υπολογίζεται ότι εμφανίστηκαν παγκοσμίως περίπου 295.000 νέοι ασθενείς με καρκίνο στις ωοθήκες, ενώ τον ίδιο χρόνο πέθαναν από αυτόν τον καρκίνο περίπου 185.000 γυναίκες [1].



Εικόνα 8. Οι γκρι φιγούρες αντιπροσωπεύουν τα άτομα που έχουν πεθάνει από τον καρκίνο και οι πράσινες αυτά που έχουν επιβιώσει για >5 χρόνια. American Cancer Society. What Are the Key Statistics About Ovarian Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>. January 5, 2018.

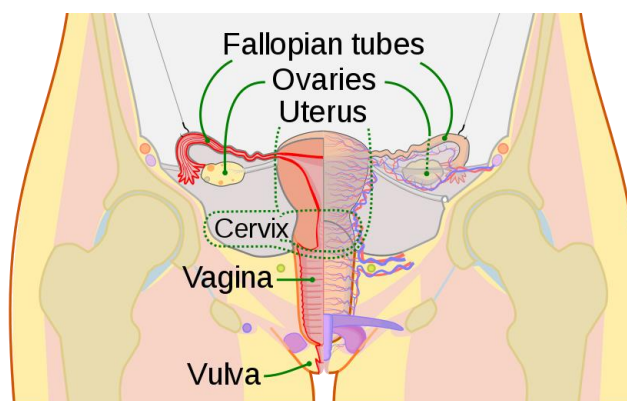
Οι κακοήθεις επιθηλιακοί όγκοι (καρκινώματα) είναι οι συνηθέστεροι καρκίνοι των ωοθηκών και επίσης οι πιο θανατηφόρες γυναικολογικές κακοήθειες. Με βάση την ιστοπαθολογία και τις μοριακές γενετικές μεταβολές, τα καρκινώματα των ωοθηκών χωρίζονται σε πέντε κύριους τύπους: ορώδους υγρού υψηλού βαθμού (70%), ενδομητριοειδή (10%), διαυγή κύτταρα (10%), βλεννώδη (3%) και καρκίνωμα ορώδους υγρού χαμηλού βαθμού (<5%) που συνολικά αντιπροσωπεύουν πάνω από το 95% των περιπτώσεων [29]. Τα μισά καρκινώματα των ωοθηκών ορώδους υγρού υψηλού βαθμού εκτιμάται ότι έχουν ανεπάρκεια στην HRR, με περίπου 15% των καρκινωμάτων να φέρουν μετάλλαξη *BRCA* βλαστικής σειράς, 6% μεταλλάξεις σωματικών *BRCA* και 20% μετάλλαξη ή επιγενετική σίγαση άλλου γονιδίου ομόλογου ανασυνδυασμού [30]. Ακόμη και χωρίς μια αναγνωρίσιμη μετάλλαξη σε *BRCA* ή άλλο γνωστό γονίδιο HRR, πολλά καρκινώματα ωοθηκών ορώδους υγρού υψηλού βαθμού παρουσιάζουν γονιδιωματικές υπογραφές τύπου *BRCA*, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως κατάντη δείκτες έλλειψης HRR [30]. Έρευνες έχουν δείξει ότι όταν ο καρκίνος των ωοθηκών οφείλεται σε μεταλλάξεις σε ένα αλληλόμορφο *BRCA-1* ή *BRCA-2* (*BRCA*) και συνοδεύεται από απώλεια του αλληλόμορφου άγριου τύπου που εμποδίζει την επιδιορθωτική οδό HRR, οδηγώντας σε απώλεια ή επανάληψη χρωμοσωμικών περιοχών (επίσης γνωστή ως γονιδιωματική απώλεια ετεροζυγωτίας - LOH), τα καρκινικά κύτταρα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στη στοχευμένη θεραπεία μέσω αναστολέων των PARPs [31].

Τα κύτταρα που προκύπτουν από αυτές τις γονιδιακές ανωμαλίες έχουν την ικανότητα να εισβάλλουν ή να εξαπλώνονται σε άλλα μέρη του σώματος (όπως είναι η επένδυση της κοιλίας, των λεμφαδένων, των πνευμόνων και του ήπατος) και στην αρχή αυτής της διαδικασίας, ενδέχεται να μην υπάρχουν συμπτώματα ή μόνο αόριστα συμπτώματα. Τα συμπτώματα γίνονται πιο αισθητά καθώς ο καρκίνος εξελίσσεται και μπορεί να περιλαμβάνουν φούσκωμα, πυελικό πόνο, κοιλιακό πρήξιμο και απώλεια όρεξης, μεταξύ άλλων [32].

Ο καρκίνος των ωοθηκών σχετίζεται με το χρόνο που αφιερώνεται στην ωορρηξία καθώς θεωρείται ότι κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας, τα κύτταρα διεγείρονται συνεχώς για να χωριστούν ενώ οι ωοθηκικοί κύκλοι συνεχίζονται. Ως εκ τούτου, γυναίκες που δεν έχουν παιδιά, γυναίκες με πρώιμη πρώτη περίοδο ή γυναίκες με καθυστερημένη εμμηνόπαυση αντιμετωπίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών από αυτές που δεν εμφανίζουν αυτά τα χαρακτηριστικά [33]. Άλλοι παράγοντες κινδύνου θεωρούνται η παχυσαρκία και η θεραπεία υποκατάστασης ορμονών [25]. Παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο των ωοθηκών είναι και το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου των ωοθηκών. Τα άτομα με κληρονομικό μη-πολυ-

πολικό καρκίνο του παχέος εντέρου (σύνδρομο Lynch) και εκείνα με γενετικές ανωμαλίες *BRCA-1* και *BRCA-2* διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο [34]. Στον αντίποδα, ο θηλασμός και η απολίνωση των σαλπίγγων έχουν συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο καρκίνου των ωθηκών σε φορείς μετάλλαξης *BRCA-1*, ενώ η λήψη από του στόματος αντισυλληπτικών έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο σε φορείς μετάλλαξης *BRCA-1* και *BRCA-2* [35].

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο καρκίνος των ωθηκών εμφανίζει κοινά γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά με τον καρκίνο των σαλπίγγων και τον πρωτεύοντα καρκίνο του περιτόναιου. Συνεπώς, η μελέτη, η κλινική πρόγνωση και η θεραπεία αυτών των τριών μορφών καρκίνου είναι κοινή [36], παρόλο που συνήθως γίνεται αναφορά μόνο στον καρκίνο των ωθηκών. Αυτό συμβαίνει διότι τα άλλα δύο είδη καρκίνου είναι εξαιρετικά σπάνια [37], [38].



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Από πάνω προς τα κάτω: Σάλπιγγες, Ωθήκες, Μήτρα, Τράχηλος, Κόλπος.

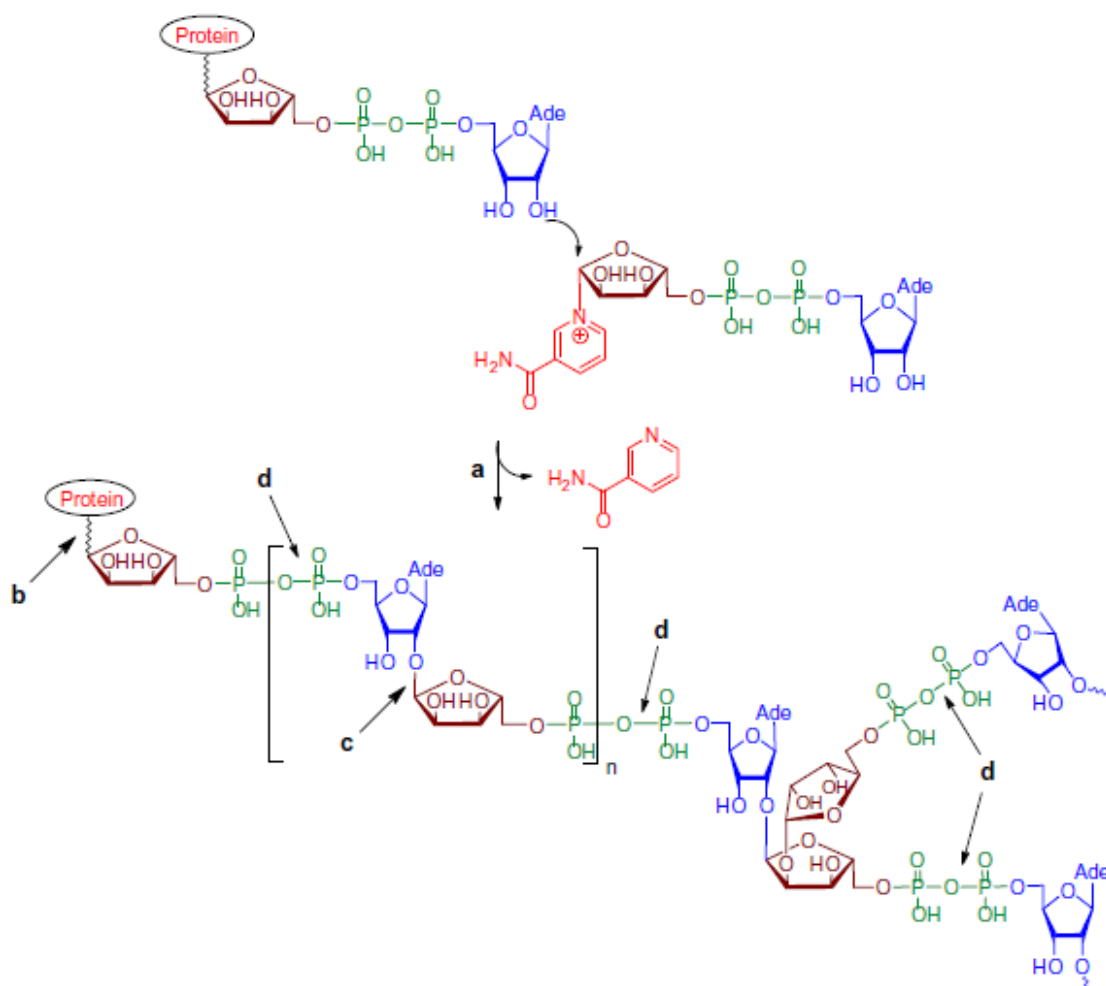
Wikimedia Commons, CDC Mysid , 6 Μαΐου 2007

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scheme_female_reproductive_system-en.svg

2.4. PARs: ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ

Η πολυ(ADP-ριβόζη) (PAR) μπορεί να θεωρηθεί ως ένα τέταρτο σημαντικό βιοπολυμερές, (εκτός από τα πολυνουκλεοτίδια RNA και DNA, τα πολυπεπτίδια και τους πολυσακχαρίτες), το οποίο εμπλέκεται σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες της ζωής. Σε αυτές τις πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες περιλαμβάνονται η επιδιόρθωση και η αντιγραφή του DNA, η ρύθμιση της δομής της χρωματίνης, η μεταγραφή, η κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ η PAR επίσης εμπλέκεται στην παθογένεση διαφόρων νόσων όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η ισχαιμία και οι φλεγμονές [39]. Η PAR είναι ένα ομοπολυμερές και αποτελείται από μονάδες O-D-ριβοφουρανοσυλοαδενοσίνης συνδεδεμένες με πυροφωσφορικούς δεσμούς [O-D-

ριβοφουρανοσυλο-(1''→2'')-O-D-ριβοφουρανοσυλο-(1''→2')αδενοσίνη-5',5'',5'''-τρι(φωσφορικό)] και η δομή της είναι κοινώς γνωστή ως Ado(P)-Rib(P)-Rib-P [40]. Αυτό το πολυμερές είναι μέλος μιας μεγάλης κατηγορίας φυσικών ενώσεων, ευρέως απαντώμενων στη φύση. Τα φυσικά μόρια PARs αποτελούνται από περισσότερες από 200-300 μονομερείς μονάδες, στις οποίες γραμμικά τμήματα 20-50 μονάδων εναλλάσσονται με διακλαδισμένα μοτίβα. Οι ενώσεις αυτού του τύπου έχουν ένα πρόσθετο υπόλοιπο μονοσακχαρίτη συνδεδεμένο σε μία από τις ομάδες υδροξυλίου νουκλεοσιδίου μέσω ενός O-γλυκοσιδικού δεσμού [41]. Η παρουσία υπολείμματος δισακχαρίτη και ετεροκυκλικής βάσης καθιστά τις ιδιότητές τους παρόμοιες με εκείνες των υδατανθράκων και των νουκλεοσιδίων. Με τη διακλαδισμένη δομή της, η PAR μιμείται τη δομή των πολυσακχαριτών: αμυλοπηκτίνη και γλυκογόνο [42].



Εικόνα 10. Βιοσύνθεση και διάσπαση της πολύ(ADP-ριβόζης) με συμμετέχοντα ένζυμα τα: (a) PARP, (b) (ADP-ribsyl)proteinlyase; (c) γλυκοϋδρολάση PARG, (d) Ανθρώπινη υδρολάση Nudix (hNUDT16). Mikhail S. Drenichev, S.N.M., Poly(ADP-ribose): From chemical synthesis to drug design, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**. 26(15): p. 3395-3403.

Η δομή της PAR έχει κάποια ομοιότητα με τη δομή των νουκλεϊκών οξέων, καθώς τα αντισώματα έναντι της PAR μπορούν να αναγνωρίσουν το RNA και το DNA [43]. Ως εκ τούτου, οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η σύνθεση και επισκευή DNA, η μεταγραφή, η τροποποίηση της δομής της χρωματίνης μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τις PAR με ιοντικές αλληλεπιδράσεις και κάποιους άλλους τρόπους δέσμευσης. Κατά τη δέσμευση με τις πρωτεΐνες στόχους, η PAR ρυθμίζει τις λειτουργίες των πρωτεϊνών-στόχων [44]. Η ομοιοπολική τροποποίηση των πρωτεϊνών προχωρά μέσω του σχηματισμού ενός Ο-γλυκοσιδικού δεσμού (κατάλοιπα Glu/Asp, Ser/Thr) ή μέσω σχηματισμού N-γλυκοσιδικού δεσμού (υπολείμματα Lys/Arg, Asn/Gln) και ρυθμίζει τη δομή των ιστονών και της ίδιας της PARP-1. Επίσης ανιχνεύθηκαν ομοιοπολικές τροποποιήσεις άλλων υπολειμμάτων αμινοξέων, για παράδειγμα, σερίνης, N-ακετυλολυσίνης, φωσφοσερίνης καθώς και ομοιοπολική τροποποίηση του DNA και του RNA στις βάσεις γουανίνης [45].

Πολλές κυτταρικές πρωτεΐνες περιέχουν λυσίνη και πλούσια σε αργινίνη μοτίβα, τα οποία είναι απαραίτητα για ιονικές αλληλεπιδράσεις με την PAR, που είναι το πιο ηλεκτραρνητικό φυσικό πολυμερές με δύο αρνητικά φορτία ανά μονάδα μονομερούς (στο πυροφωσφορικό: $pK_1 < 2,0$, $pK_2 = 2,64$). Γενικά, η PAR μπορεί να αλληλεπιδράσει με περισσότερες από 500 πρωτεΐνες που φέρουν ειδικές θέσεις πρόσδεσης [42].

Αρκετά ένζυμα εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και τη διάσπαση της PAR (Εικόνα 10). Στους πυρήνες των ευκαρυωτικών κυττάρων η PAR συντίθεται από πολυμεράσες της πολυ(ADP-ριβόζης) - PARPs, που θα αναλυθούν παρακάτω, χρησιμοποιώντας NAD^+ ως υπόστρωμα (Εικόνα 10, οδός α), ενώ διασπώνται κατά κύριο λόγο από τις γλυκουδρολάσες της PAR [PARG – poly(ADP-ribose)glycohydrolases] (Εικόνα 10, οδός c).

2.5. PARPs

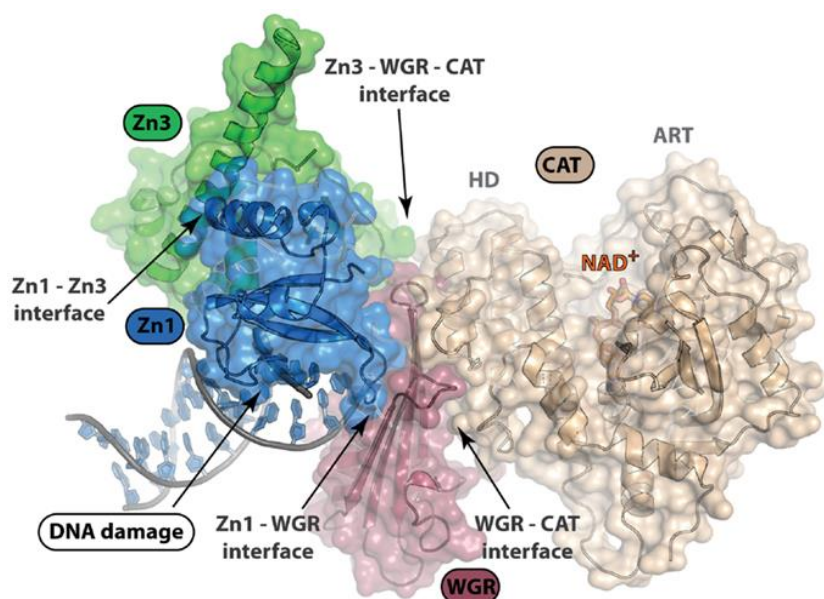
2.5.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι πολυμεράσες της πολυ(ADP-ριβόζης) (PARPs, EC 2.4.2.30) είναι πυρηνικές πρωτεΐνες και είναι άφθονες στα κύτταρα των θηλαστικών (περίπου 10^6 μόρια / κύτταρο) με μακρό χρόνο ημιζωής. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα εκτός από τους ζυμομύκητες [46]. Οι PARPs χαρακτηρίζονται επίσης και ως ART(D)s, ως ADP-ριβοζυλτρανσφεράσες τύπου τοξίνης διφθερίτιδας [47].

17 μέλη της οικογένειας PARP έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί:

Οι PARP1, PARP2, PARP3, VPARP (PARP4), οι Τανκυράσες¹ -1 και -2 (PARP-5a/TNKS1 και PARP-5b/TNKS2), PARP6, TPARP (PARP7), PARP8, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, ZC3HAV1 (PARP13), PARP14, PARP15 και η PARP16 [45]. Σύμφωνα με έρευνα του Hottiger et. al, υπάρχει και ένα 18^ο μέλος της οικογένειας των PARPs (PARP18), για το οποίο δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή ερευνητικά δεδομένα [48]. Σε σύγκριση με τα άλλα μέλη, η PARP-1, ένα ένζυμο 113kDa [49], αντιπροσωπεύει περίπου το 90% των λειτουργιών.

2.5.2. ΔΟΜΗ ΤΗΣ PARP-1



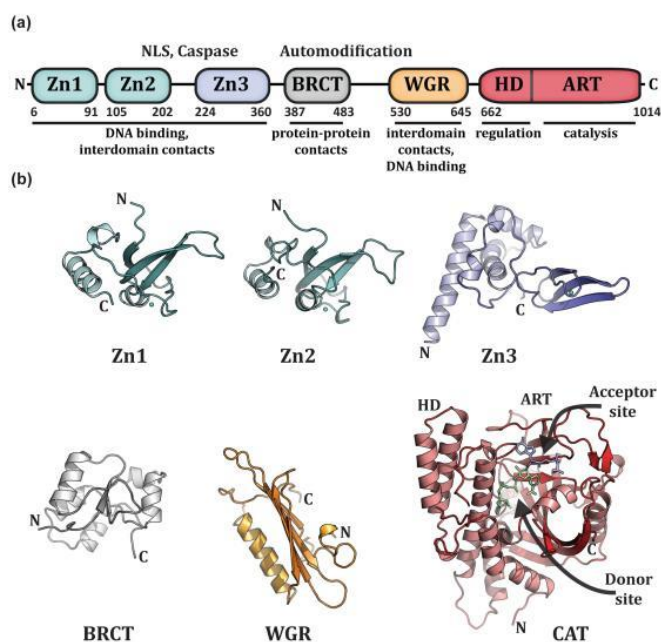
Εικόνα 11. Η δομή της PARP-1 (ARTD-1) συμπλεγμένης με DNA. Structural Implications for selective targeting of PARPs, Jamin D. Steffen et al. *Frontiers in Oncology*, 2013

Στην αρθρωτή αρχιτεκτονική της PARP-1 περιλαμβάνονται τέσσερις βασικές περιοχές/έξι ευδιάκριτοι τομείς:

- Η N-τερματική περιοχή, που αποτελείται από τρεις τομείς δέσμησης ψευδαργύρου (Zn1, Zn2, Zn3). Ο τομέας Zn1 δεσμεύεται στο 5' άκρο του θραύσματος του DNA και ο Zn2 δεσμεύεται στο 3' άκρο του θραύσματος του DNA και μαζί αυτοί οι τομείς επιτρέπουν την άμεση δέσμηση του DNA στην PARP-1. Ο τρίτος τομέας Zn3, δε φαίνεται να δεσμεύει γενετικό υλικό, παρόλο που έρχεται σε επαφή με αυτό [50].

¹ Οι τανκυράσες είναι μέλη της υπεροικογένειας των ανθρώπινων PARP [47]. Περιέχουν μία καταλυτική περιοχή ART στο C-τελικό τους άκρο με ένα γειτονικό στείρο μοτίβο άλφα που είναι υπεύθυνο για τον ολιγομερισμό του ενζύμου [147]. Οι τανκυράσες εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές οδούς, όπως στην ομοιοστασία των τελομερών, στη μίτωση, τη μεταφορά κυττάρων GLUT4 και το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt, που τις καθιστούν πιθανούς θεραπευτικούς στόχους [148].

- Η περιοχή αυτόματης τροποποίησης, που περιλαμβάνει τον τομέα BRCT (BRCA1 - C-τερματική περιοχή), που περιέχει ένα σύμπλεγμα καταλοίπων γλουταμινικού οξέος που χρησιμεύουν ως θέσεις υποδοχής ADP-ριβόζης [51].
- Η περιοχή τρυπτοφάνης-γλυκίνης-αργινίνης (τομέας WGR), όπως και ο τομέας Zn3, έρχεται σε επαφή με το DNA, αλλά δεν το δεσμεύει, ενώ συμμετέχει και στη σύνδεση και στον σχηματισμό διατομεακών περιοχών, με καθοριστικό ρόλο στην ενεργοποίηση του καταλυτικού κέντρου της PARP-1 [52].
- Το καταλυτικό κέντρο (CAT), που είναι η C-τερματική περιοχή και αποτελείται από μία πύκνωση τρανσφεράσης της ADP-ριβόζης (ART) και έναν ελικοειδή υποτομέα (Helical Subdomain – HD) [53]. Το καταλυτικό κέντρο είναι υπεύθυνο για την κατάλυση τριών διαφορετικών χημικών αντιδράσεων: 1) την προσάρτηση του πρώτου μονομερούς της ADP-ριβόζης στο υπόλειμμα της πρωτεΐνης-δέκτη (έναρξη), 2) τον σχηματισμό του γλυκοσιδικού δεσμού γλυκόζης – γλυκόζης (επιμήκυνση), 3) τον σχηματισμό δεσμού ριβόζης-ριβόζης μεταξύ μονάδων ADP-ριβόζης (διακλάδωση) [54]. Όσο αφορά τον HD, έχει καταδειχθεί ότι ο τομέας αυτός λειτουργεί «αυτό-ανασταλτικά» για τη λειτουργικότητα του ενζύμου, μέσω αλλοστερικής επίδρασης του DNA. Πιο αναλυτικά, απουσία DNA, ο HD βρίσκεται σε μία «διπλωμένη» μορφή, που εμφανίζει μικρή συγγένεια με το NAD^+ και δεν επιτρέπει τη δέσμευση του τελευταίου πάνω στο ένζυμο. Αντίθετα, παρουσία θραύσματος DNA, ο HD αναδιπλώνεται τοπικά, επιτρέποντας τη σύνδεση του NAD^+ και η PARP-1 μπορεί να εκδηλώσει τον καταλυτικό της χαρακτήρα [55].



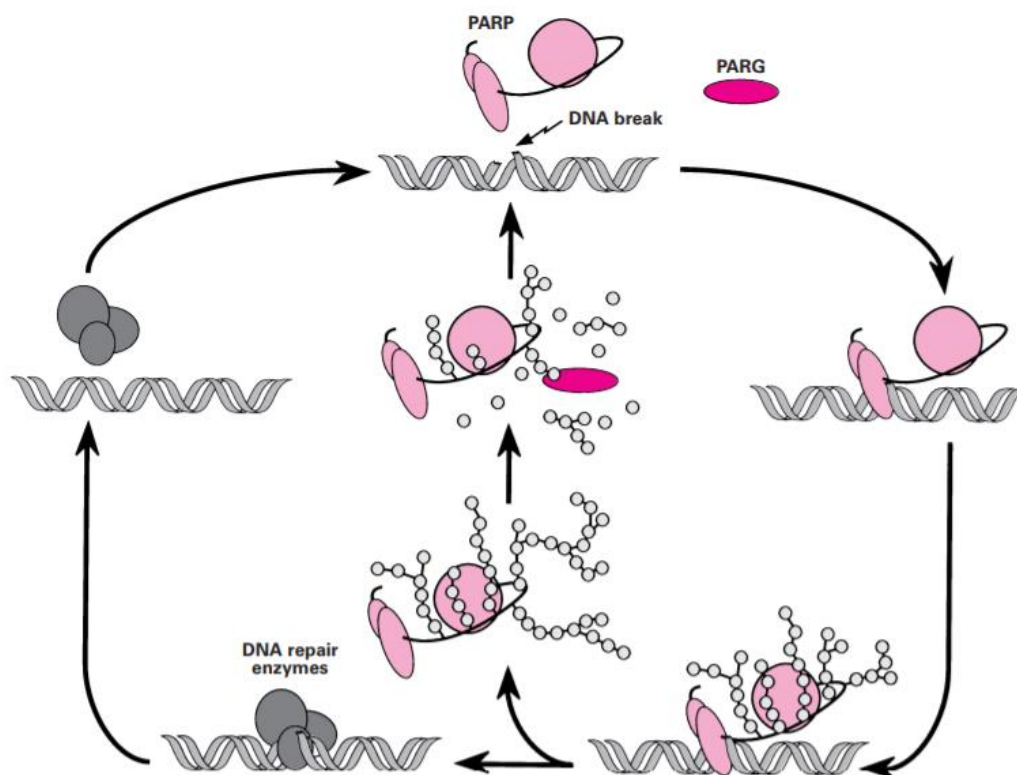
Εικόνα 12. Οι 6 τομείς της δομής της PARP-1. M.-F. Langelier and J. M. Pascal, PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 134–143, Feb. 2013.

2.5.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

Οι πολυμεράσες της πολύ(ADP-ριβόζης) θεωρείται ότι καταλύουν τη μεταφορά του NAD^+ τμήματος της ADP-ριβόζης σε διάφορους στόχους, απελευθερώνοντας νικοτιναμίδιο κατά αυτήν τη διαδικασία. Ωστόσο, το όνομα «πολυμεράσες» δεν αντιπροσωπεύει πλήρως όλα τα μέλη της οικογένειας των PARPs, εφόσον μόνο 4 από τα παραπάνω ένζυμα (PARP: 1, 2, 5a και 5b) καταλύουν στην πραγματικότητα τη σύνθεση της PAR στα υποστρώματα-στόχους σχηματίζοντας πολυπεπτίδια ή ολιγοπεπτίδια [56]. Από τα υπόλοιπα μέλη, τα 11 ονομάζονται «μονοPARPs», επειδή μεταφέρουν και συνδέουν μόνο μία μονάδα μονο-ADP-ριβόζης [57], η PARP13 δεν έχει βρεθεί να εμπλέκεται στη ριβοζυλίωση, ενώ για την PARP18 δεν υπάρχουν δεδομένα [48]. Το εναπομείναν μέλος της οικογένειας (PARP9) δεν θεωρείται ότι παρουσιάζει καταλυτική δράση, αν και έχει βρεθεί ότι συμμετέχει ως διμερές στη μονο-ADP-ριβοζυλίωση της Ουβικιτίνης [58].

Οι PARP-1 και -2 είναι τα μόνα μέλη της οικογένειας PARP που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην αποκατάσταση των μονόκλωνων θραυσμάτων (SSBs) του DNA μέσω της οδού BER [59]. Η PARP-2, ωστόσο, δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσει πλήρως την απώλεια της PARP-1, εφόσον αντιπροσωπεύει περίπου το 15-25% της ολικής βιολογικής σύνθεσης των αλυσίδων PAR ως απόκριση σε βλάβες του DNA και μόνο το 5-10% της ολικής κυτταρικής σύνθεσης των PAR [60]. Όσον αφορά την αποκατάσταση του DNA, μόλις η PARP ανιχνεύσει την ύπαρξη SSB, δεσμεύεται στις θέσεις της βλάβης του DNA και αρχίζει τη σύνθεση μιας αλυσίδας PAR από NAD^+ , με τον τρόπο που εξηγήθηκε στην υποενότητα 2.5.2. Εκτός από τον σταθερά καθορισμένο ρόλο της στην αποκατάσταση της BER και της SSB του DNA, η PARP-1 εμπλέκεται σε πολλαπλούς τύπους άλλων διεργασιών επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης των δίκλωνων θραυσμάτων (DSBs) του DNA, όπως είναι η HR, η NHEJ και η μικρο-ομόλογη τελική σύνδεση (MMEJ – Microhomology-Mediated End-Joining) [61].

Επιπλέον, η PARP-1 έχει την ικανότητα να επάγει πολυ-ADP-ριβοζυλίωση (πέρα από την επαγωγή σε ιστόνες) στο ίδιο το μόριό της στην περιοχή αυτόματης τροποποίησης [62]. Η αυτο-πολυ(ADP-ριβοζυλίωση) της PARP-1 μεσολαβεί την πρόσληψη επιδιορθωτικών πρωτεϊνών της BER, όπως είναι η XRCC1[63], η DNA-πολυμεράση β , η DNA-λιγάση III και άλλες, στο σημείο της βλάβης. Έπειτα, η PARP-1, αποσυνδέεται από το DNA λόγω του αρνητικού φορτίου της ADP-ριβόζης και μετά την επιδιόρθωση του DNA οι αλυσίδες PAR αποικοδομούνται κυρίως από την PARG (Εικόνα 13) [41].



Εικόνα 13. Η αυτο-πολυ(ADP-ριβοζυλίωση) της PARP-1. D'amours, S. Desnoyers, I. D'silva, and G. G. Poirier, "Poly(ADP-ribose) reactions in the regulation of nuclear functions," *Biochem. J.*, vol. 342, no. 2, pp. 249–268, 1999.

Πρόσφατα, αποδείχθηκε επίσης ότι η PARP-1 αναγνωρίζει τα μη δεσμευμένα τμήματα Okazaki² και προάγει την επισκευή κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA και ως εκ τούτου, η αναστολή της PARP-1 μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα καρκινικά κύτταρα στον θάνατο παρεμβάλλοντας στην επισκευή και στην αντιγραφή του DNA [64].

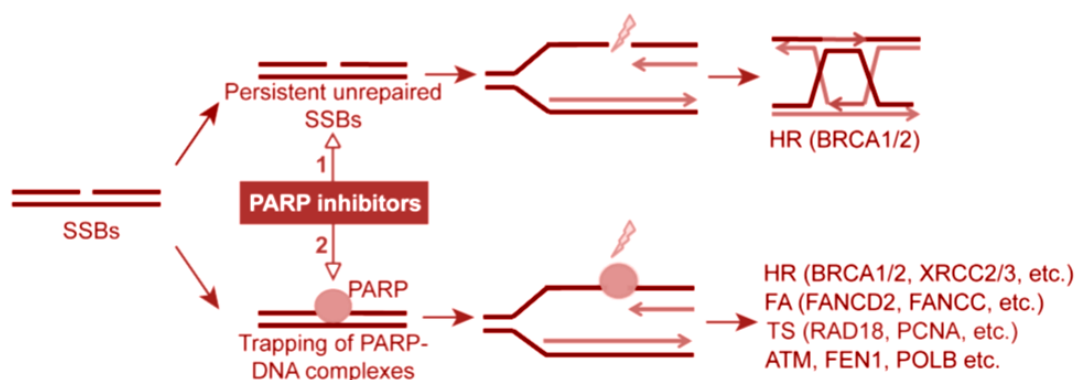
Από την άλλη πλευρά, η υπερβολική ενεργοποίηση της PARP-1 προκαλεί εκτεταμένη θραύση του DNA της χρωματίνης και πυροδοτεί έναν εγγενή προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, εξαρτώμενο από την PARP-1, που ονομάζεται parthanatos, ο οποίος εμφανίζεται σε μια ποικιλία οργανικών συστημάτων και εμπλέκεται ευρέως σε διαφορετικές νευρολογικές και μη νευρολογικές ασθένειες. Επομένως, η PARP-1 διαδραματίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας, είτε διευκολύνοντας την επιδιόρθωση/αντιγραφή του DNA είτε προκαλώντας θραύση του DNA για την απόπτωση των κυττάρων [65].

² Κατά την κυτταρική διαίρεση, η γενετική πληροφορία που περιέχεται στους δύο κλώνους του DNA αντιγράφεται από τα ένζυμα DNA πολυμεράσες, οι οποίες λειτουργούν με προσανατολισμό 5'→3'. Επειδή στη διπλή έλικα, οι δύο αλυσίδες είναι αντισπασμωχικές και προκειμένου να διατηρηθεί αυτός ο προσανατολισμός, ο ένας κλώνος του DNA συντίθεται συνεχώς στην κατεύθυνση 5'→3' ενώ ο δεύτερος συντίθεται στην ίδια κατεύθυνση αλλά ασυνεχώς σε μικρά τμήματα, που ονομάζονται τμήματα Okazaki [149].

2.6. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ PARPs

2.6.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ

Μέχρι πρόσφατα, υπήρχε η αντίληψη ότι οι αναστολείς των PARP εκδήλωναν την κυτταροτοξική τους δράση, αποκλειστικά αναστέλλοντας την ενζυμική δραστικότητα των PARPs μέσω σύνδεσης με το καταλυτικό κέντρο των μορίων αυτών. Ωστόσο, μελέτες κατέδειξαν κι ένα νέο μηχανισμό δράσης, μέσω «παγίδευσης» των PARP από τους αναστολείς τους [66].



Εικόνα 14. Οι αναστολείς των PARP επιδεικνύουν 2 μηχανισμούς δράσης (πάνω και κάτω). Η αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας των PARP (πάνω) συμβάλλει στην κυτταροτοξικότητα μέσω «συνθετικής θνησιμότητας» σε όγκους που διαθέτουν ανεπάρκεια στην HRR, ενώ η «παγίδευση» των PARP (κάτω) δεν περιορίζεται σε ογκοκύτταρα με αυτήν την ανεπάρκεια, επάγοντας κυτταροτοξικότητα και μέσω άλλων οδών. J. Murai *et al.*, Differential trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors, vol. 72, no. 21, pp. 5588–5599, 2012.

2.6.1.1. Αναστολή της Ενζυμικής Δραστικότητας των PARPs

Όλοι οι γνωστοί αναστολείς των PARP δρουν καταλαμβάνοντας τη θέση του νικοτιναμιδίου στο υπόστρωμα του NAD^+ (ανταγωνίζονται το NAD^+) στο καταλυτικό κέντρο των PARP και γι' αυτό άλλωστε το νικοτιναμίδιο αποτελεί κοινό τμήμα της δομής όλων των γνωστών αναστολέων (Εικόνα 16) [67]. Με τη σύνδεση των αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο των PARP, αναστέλλεται η ενζυμική δραστικότητα των PARP αφού καθίσταται αδύνατη η σύνδεση του NAD^+ στο καταλυτικό κέντρο της πολυμεράσης, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί πολύ(ADP-ριβοζυλίωση) και επομένως δεν επιδιορθώνονται οι βλάβες στο DNA, με τελικό αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων [68].

Εντός της σχετικά μεγάλης θέσης πρόσδεσης του NAD^+ , αυτοί οι PARPi παρουσιάζουν μία σειρά διαφορετικών τρόπων σύνδεσης που στοχεύουν διακριτές περιοχές δέσμευσης (Εικόνα 15). Αυτές είναι:

- Η περιοχή δέσμευσης του Νικοτιναμιδίου (στην οποία συνδέονται όλοι οι γνωστοί αναστολείς (υποενότητα 2.6.3.).
- Η περιοχή δέσμευσης Αδενίνης-Ριβόζης (AD), η οποία είναι μία μεγάλη υδρόφοβη περιοχή που βρίσκεται ακριβώς δίπλα στον θύλακα πρόσδεσης του νικοτιναμιδίου, και θα μπορούσε να λειτουργήσει ως δευτερεύουσα περιοχή δέσμευσης για αναστολείς που φέρουν μεγάλες υδρόφοβες ομάδες προσαρτημένες στο νικοτιναμιδικό φαρμακοφόρο [69].
- Και η περιοχή δέσμευσης φωσφορικών ομάδων.

2.6.1.2. Παγίδευση των PARPs

Ωστόσο, ο μηχανισμός μέσω αναστολής της καταλυτικής δραστηριότητας των PARP δεν μπορεί να εξηγήσει πλήρως, γιατί η ικανότητα των PARPi να διακόπτουν την καταλυτική δραστηριότητα της PARP-1, συσχετίζεται ελάχιστα με τη θανάτωση των κυττάρων σε κύτταρα με έλλειψη ανεπάρκειας HRR. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναστολείς της PARP-1 καθυστερούν την αποκατάσταση της SSB και προκαλούν κυτταροτοξικότητα σε μεγαλύτερη έκταση από την έκταση μείωσης της PARP-1 [70]. Η απάντηση σε όλα τα παραπάνω ερωτήματα βρίσκεται στον μηχανισμό «παγίδευσης» των PARPs από τους αναστολείς τους.

Ο μηχανισμός «παγίδευσης» των PARPs περιλαμβάνει την αλλοστερική επίδραση των PARPi στην ευκαμψία διαμόρφωσης και στη δυναμική της PARP για την ενίσχυση της συγγένειάς της με το μέσο επισκευής της SSB. Αυτός ο δεύτερος μηχανισμός συχνά αναφέρεται και ως «δηλητηρίαση των PARP». Τα παγιδευμένα σύμπλοκα PARP-DNA εμποδίζουν την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA, προάγοντας την κυτταροτοξικότητα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από τα μη επιδιορθωμένα SSB του DNA που προκαλούνται από την απώλεια δραστηριότητας της PARP, είναι δηλαδή πιο αποτελεσματικά από την καταλυτική αναστολή των PARPs.

Πίνακας 1. Κλινικοί αναστολείς (PARPi) και ικανότητα «παγίδευσης» των PARP σε συσχέτιση με την κυτταροτοξική τους δράση [71].

Αναστολέας	Εταιρεία	IC ₅₀ (nM)	Σχετική Ισχύς Παγίδευσης
Olaparib	Astra Zeneca	6	1
Rucaparib	Clovis Oncology	21	1
Niraparib	Tesaro	60	~2
Veliparib	AbbVie	30	<0,2
Talazoparib	Pfizer	4	~100

Τα δεδομένα κλινικής αποτελεσματικότητας για τους αναστολείς PARP σε ασθενείς με καρκίνο με επιβλαβείς μεταλλάξεις γονιδίων *BRCA* συνάδουν με τα *in vitro* επίπεδα κυτταροτοξικότητας των αναστολέων PARP, συνδέοντας την κλινική δραστηριότητα με την ικανότητα παγίδευσης της PARP. Οι διάφοροι αναστολείς διαφέρουν σημαντικά στην ικανότητα παγίδευσης των PARP [72] (Πίνακας 1).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, υπάρχει μία σειρά δεδομένων που υποστηρίζει τη δράση των αναστολέων των PARP μέσω του μηχανισμού της «παγίδευσης» των PARP. Σε αυτά προστίθενται και έρευνες που αποδεικνύουν ότι η παρουσία της PARP-1 είναι απαραίτητη για την εκδήλωση των κυτταροτοξικών επιδράσεων των PARPi, ενώ έχουν επιπλέον καταδείξει ότι η απλή απουσία των PARP ή η επιγενετική σίγαση των γονιδίων *PARP* δεν εμφανίζει τον ίδιο βαθμό κυτταροτοξικότητας με την επίδραση αναστολέων στους PARPs [66][73]. Εάν δεχόμασταν ότι οι αναστολείς των PARP δρουν μόνο μέσω αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας των PARP, η απουσία και μόνο των PARP θα έπρεπε να επιφέρει την ίδια κυτταροτοξικότητα με τη δράση των αναστολέων.

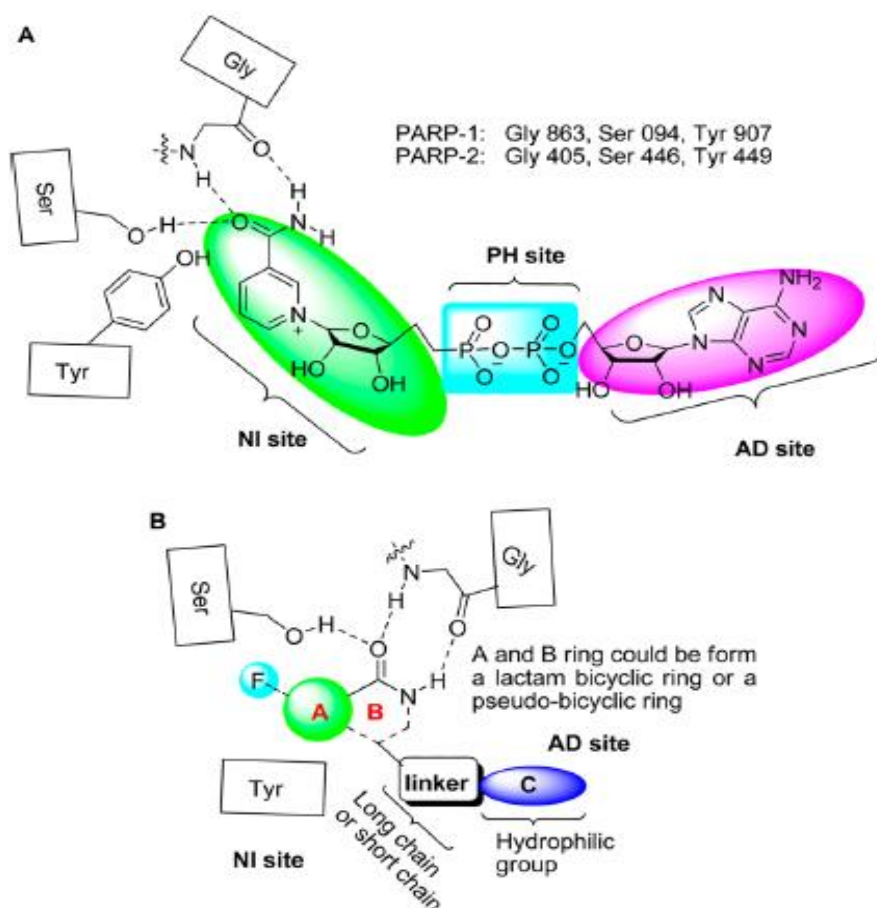
2.6.2. ΓΕΝΙΚΑ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ

Η δομή μέσω ακτίνων Χ του NAD^+ (νικοτιναμιδικό αδενινο-δινουκλεοτίδιο) που δεσμεύεται στον PARP-1 αναλύθηκε και βρέθηκε ότι υπάρχουν τρεις αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ του τμήματος του καρβοξαμιδίου και δύο κρίσιμων υπολειμμάτων αμινοξέων στην δραστική θέση της PARP-1, της Gly-863 (N-H στην Gly C=O και C=O στην αμινομάδα της Gly N-H) και της Ser-904 (C=O σε Ser O-H) [74]. Επιπρόσθετα, αυτοί οι αναστολείς περιέχουν και έναν αρυλικό (ή μερικές φορές δικυκλικό) δακτύλιο ο οποίος έχει αλληλεπίδραση π-stacking με τα συντηρημένα υπολείμματα Tyr896 και Tyr907 (Εικόνα 15). Άλλα συντηρημένα υπολείμματα που «θωρακίζουν» την περιοχή πρόσδεσης του νικοτιναμιδίου, όπως είναι η Ala898 και η Lys903, καθώς και ένα καταλυτικό υπόλειμμα (Glu988) έχουν διερευνηθεί στην προσπάθεια σχεδιασμού νέων αναστολέων [72].

Τα πιο σημαντικά δομικά μοτίβα στους αναστολείς PARP-1 είναι το θραύσμα του καρβοξαμιδίου και το αρωματικό τμήμα. Βοηθητικά φαρμακοφόρα, ιογενείς ομάδες ή υδρόφοβα τμήματα συνδέονται στο μόριο για να βελτιώσουν την ανασταλτική του δράση (Εικόνα 15). Πιο συγκεκριμένα, υδρόφοβα τμήματα συνδέονται στα μόρια υποψήφιων αναστολέων προκειμένου να αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μορίου και της περιοχής πρόσδεσης της Αδενίνης-ριβόζης, όπως για παράδειγμα ο

αναστολέας FR257517 ($IC_{50} = 14 \text{ nM}$) που συνδέεται με αυτήν μέσω των υπολειμμάτων Leu769, Arg878, Ile879 και Pro881 της PARP-1 [75]. Μάλιστα κατά τη σχεδίαση φαρμάκων, οι αλληλεπιδράσεις στην περιοχή αυτή χρησιμοποιούνται για την προσάρτηση ομάδων που μπορούν να βελτιώσουν την ισχύ, τη διαλυτότητα και άλλες φαρμακευτικές ιδιότητες του εν δυνάμει αναστολέα [69].

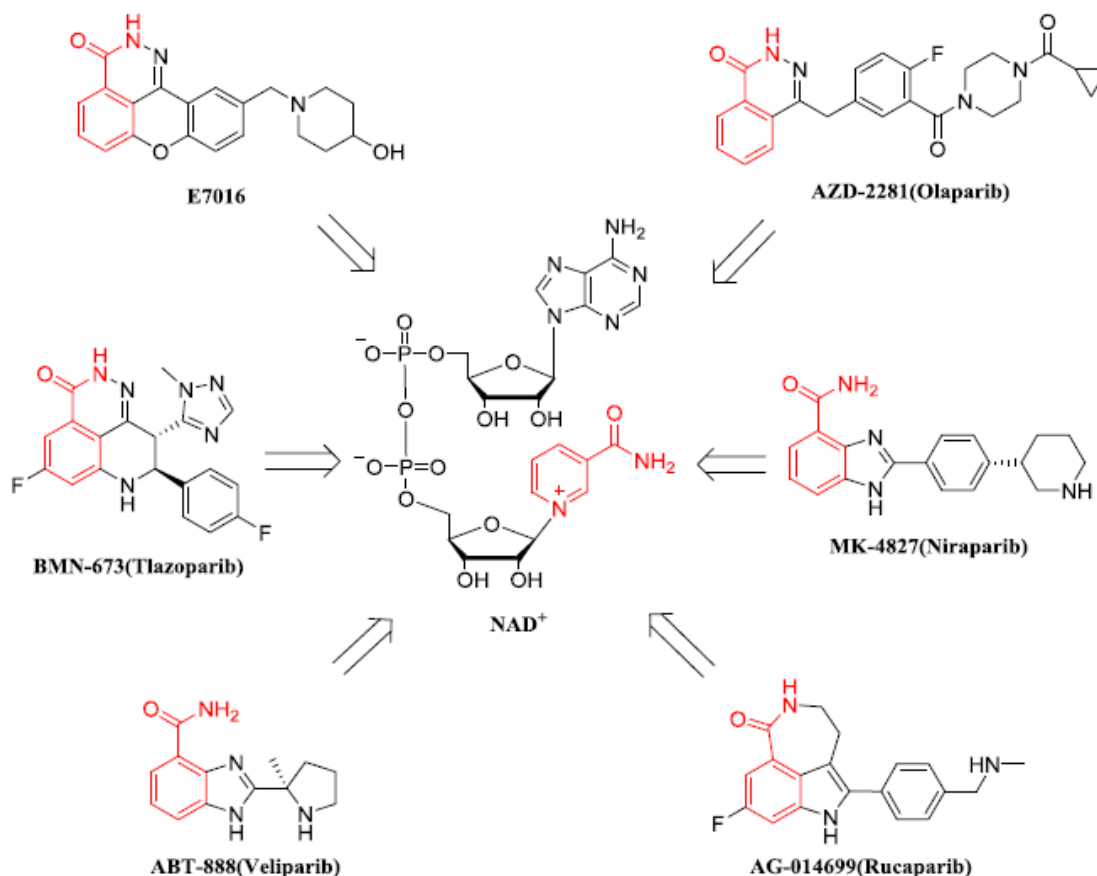
Η πρώτη γενιά εκλεκτικών αναστολέων του PARP-1, η νικοτιναμίδη ($IC_{50} = 210 \text{ nM}$) και το 3-αμινοβενζαμίδιο ($IC_{50} = 30 \text{ nM}$) έπαιξε σημαντικό ρόλο στην αντίληψη του σχεδιασμού των αναστολέων της PARP-1. Έκτοτε, έχουν ερευνηθεί αναστολείς της PARP-1 με βάση το νικοτιναμίδιο που ανταγωνίζονται με το NAD^+ (Εικόνα 16) [74]. Οι σύγχρονοι αναστολείς PARP-1 για κλινική χρήση και ανάπτυξη χαρακτηρίζονται από σταθερές αναστολής στην κλίμακα των νανοσυγκεντρώσεων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυαστική θεραπεία ή σε μονοθεραπεία.



Εικόνα 15. Τρόποι σύνδεσης των αναστολέων του PARP-1 σε θέσεις δέσμευσης του νικοτιναμίδιου. (A) περιοχή δέσμευσης NAD^+ και υποτομείς των πρωτεϊνών PARP-1/2. (B) Τρόπος σύνδεσης των αναστολέων PARP-1 που φέρουν ένα δικυκλικό λακταμικό φαρμακοφόρο ή ένα ψευδοκυκλικό φαρμακοφόρο. Ying-Qing Wang et al. An Update on Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors: Opportunities and Challenges in Cancer Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59: p. 9575-9598.

Μερικοί αναστολείς, που στοχεύουν την PARP-1, δείχνουν επίσης αποτελέσματα για τις PARP-2 και PARP-3. Οι φυσικοί νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια παρουσιάζουν χαμηλή βιολογική δραστικότητα προς τον PARP-1, αλλά οι νουκλεοζίτες διασακχαρίτη φαίνονται να είναι μία πλεονεκτική κατηγορία αναστολέων PARP-1 λόγω της διαπερατότητας των κυττάρων τους και της χαμηλής κυτταροτοξικότητάς τους [42].

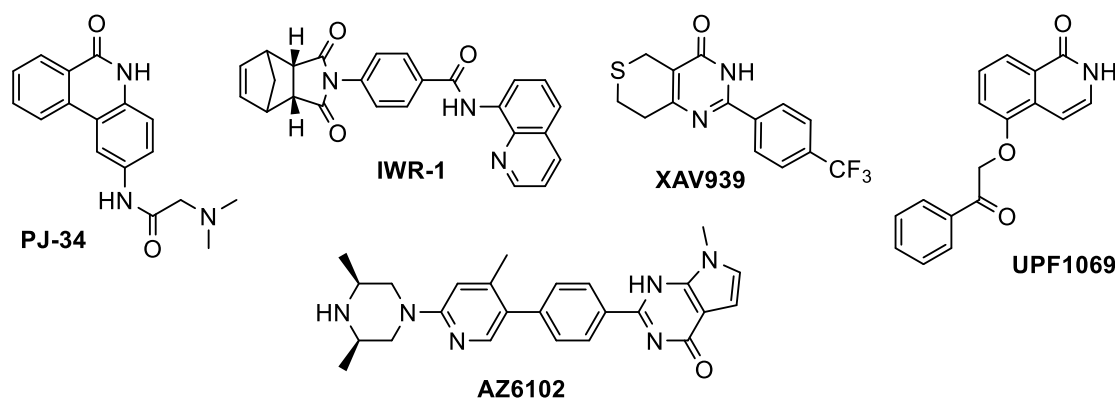
2.6.3. ΕΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ



Εικόνα 16. Δομική συσχέτιση μεταξύ φαρμακοφόρων των αναστολέων του PARP1 και του NAD⁺. He, X., et al., Design, synthesis and anticancer activities evaluation of novel 5H-dibenzo[b,e]azepine-6,11-dione derivatives containing 1,3,4-oxadiazole units. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2018**, in press.

Οι πιο πρόσφατα εγκεκριμένοι αναστολείς των PARP για την θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών είναι το Lynparza™ – Olaparib (Δεκέμβριος 2014, Astrazeneca), το Rubraca™ – Rucaparib (Δεκέμβριος 2016, Clovis Oncology), το Zejula™ – Niraparib (Μάρτιος 2017, Tesaro), [76] το Talzenna™ - Talazoparib (Οκτώβριος 2018, Pfizer)[77] ενώ το Veliparib (AbbVie) βρίσκεται σε κλινικές μελέτες φάσης 3 [76]. Οι αναστολείς Veliparib και Niraparib είναι εκλεκτικοί αναστολείς των PARP-1 και PARP-2, ενώ οι Olaparib, Rucaparib και Talazoparib είναι πιο ισχυροί αναστολείς του PARP-

1, αλλά είναι λιγότερο εκλεκτικοί. Επιπλέον, υπάρχουν και οι αναστολείς PJ-34 και UPF1069, που δρουν σε ευρύ φάσμα, ενώ οι XAV939, IWR-1 και AZ-6102 είναι αναστολείς των τανκυρασών (Εικόνα 17) [78].



Εικόνα 17. Άλλοι αναστολείς των PARP και των Τανκυρασών. Δομές από το *MedChemExpress*, <https://www.medchemexpress.com/AZ6102.html>

2.6.4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Με βάση όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, έγινε κατανοητό ότι η PARP-1 διαδραματίζει βασικό ρόλο στην αποκατάσταση των μονοκλωνικών θραυσμάτων (SSB) μέσω της οδού εκτομής/αποκατάστασης βάσης (BER), ειδικά σε καρκινικά κύτταρα με έλλειψη *BRCA-1/-2* και έλλειψη επιδιορθωτικής ικανότητας ομόλογου ανασυνδυασμού (HRR) [79], όπως συμβαίνει στον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών [49], με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο μέσω «συνθετικής θνησιμότητας». Ακόμα, διερευνήθηκε ο ρόλος της PARP-1 σε μία πληθώρα βιολογικών διαδικασιών του κυττάρου (πέραν της SSB/BER, DSBR και των άλλων κλασσικών οδών επιδιόρθωσης του DNA), όπως στην αντιγραφή του DNA, στη θραύση της χρωματίνης και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ορισμένων τύπων κυττάρων.

Επομένως, γίνεται σαφές ότι οι αναστολείς της PARP-1 μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία πολλών παθολογικών καταστάσεων, όπως είναι το εγκεφαλικό επεισόδιο, η καρδιακή ισχαιμία [80], μια ποικιλία διαταραχών του κεντρικού νευρικού συστήματος [81], οι διάφορες οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις διαταραχές καθώς και ένας αριθμός εκφυλιστικών ασθενειών [44]. Τέλος, είναι γενικά αποδεκτό ότι η καταλυτική δραστηριότητα της PARP-1 διεγείρεται από βλάβες στο DNA που προκαλούνται από ιονίζουσα ακτινοβολία, χημειοθεραπεία, υπεριώδης φως ή προϊόντα κυτταρικού και οξειδωτικού μεταβολισμού και έτσι ισχυροί αναστολείς της PARP-1 μπορούν να παρέχουν χημειοθεραπευτική επιλογή για όγκο [82].

2.7. ΙΝΔΟΛΙΟ

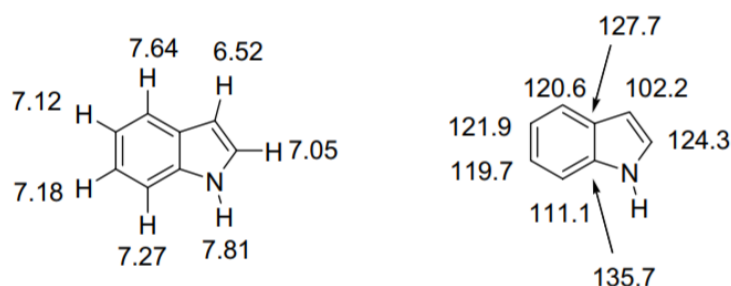
Το ινδόλιο είναι μία άφθονη στη φύση, ετεροκυκλική ένωση με συμπυκνωμένους δακτυλίους, η οποία περιέχει έναν εξαμελή αρωματικό δακτύλιο (βενζόλιο) και έναν πενταμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο (πυρρόλιο) ενωμένους στην 2' και 3' θέση του τελευταίου [83]. Το ινδόλιο (*indole*) θεωρείται ότι πήρε το όνομά του από την ένωση των λέξεων *indigo* και *oleum*, εφόσον πρώτη φορά απομονώθηκε από το Baeyer μέσω αντίδρασης της βαφής indigo με ένα μείγμα θειικού οξέος και θειικού ανυδρίτη [84]. Από την απομόνωσή του το 1866 και έπειτα, το Ινδόλιο έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς τις χημικές και βιοδραστικές του ιδιότητες και έχει αποτελέσει δημοφιλές υπόστρωμα για τη σύνθεση παραγώγων με κλινικό ενδιαφέρον, γι' αυτό και για τη χημεία του ινδολίου γίνεται λόγος σε έναν αχανή αριθμό δημοσιεύσεων, άρθρων και βιβλίων [85].

2.7.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το ινδόλιο είναι ένα επίπεδο συμπυκνωμένο δικυκλικό μόριο που περιέχει 10 π ηλεκτρόνια σε πλήρη συζυγία (8 π από τους διπλούς δεσμούς και 2π από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου) και επομένως είναι αρωματική ένωση σύμφωνα με τον κανόνα του Hückel. Αυτή η πλούσια ηλεκτρονιακή πυκνότητα του π-συστήματος έχει ως αποτέλεσμα το ινδόλιο να υφίσταται ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση πιο εύκολα από το βενζόλιο (αλλά λιγότερο εύκολα από το πυρρόλιο), με πιο δραστική θέση τη C-3, λόγω απεντοπισμού του φορτίου του ενδιάμεσου από την ηλεκτρονιόφιλη προσβολή καρβοκατιόντος, όπως προκύπτει από τις δομές συντονισμού, διατηρώντας παράλληλα την αρωματικότητα του βενζολίου [86]. Επιπλέον, το ινδόλιο λειτουργεί ως πολύ ασθενής βάση ($pK_a = -2,4$ για το συζυγές οξύ) και γι' αυτό πρωτονιώνεται μόνο παρουσία πολύ ισχυρών οξέων εξαιτίας απεντοπισμού του μοναδικού ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου στο π-ηλεκτρονικό σύστημα, οπότε και δεν γίνεται διαθέσιμο για πρωτονίωση από ασθενή οξέα [87]. Αντίθετα, η ελαφρώς όξινη φύση του πρωτονίου του αζώτου το καθιστά επιρρεπές σε αντιδράσεις N-υποκατάστασης υπό βασικές συνθήκες [86].

Το μη υποκατεστημένο ινδόλιο (C_8H_7N) σε θερμοκρασία δωματίου είναι ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό με δυσάρεστη οσμή. Ωστόσο, σε χαμηλές συγκεντρώσεις αναδύει άρωμα λουλουδιών. Το ινδόλιο είναι ελάχιστα διαλυτό στο νερό αλλά διαλύεται σε οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη, ο αιθέρας, το βενζόλιο κ.α. Η ένωση έχει εύρος σημείου τήξεως 52-54 °C και σημείο βρασμού 253-254 °C [88]. Η μοριακή μάζα της ένωσης είναι 117,15 g/mol και η πυκνότητα της 1,17 g/cm³. Το φάσμα μάζας του

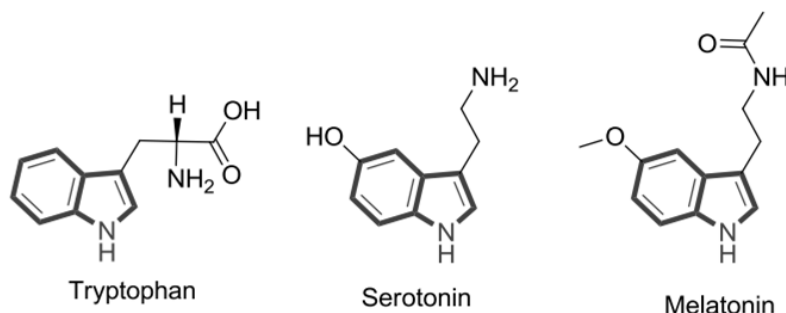
ινδολίου έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει κορυφή μοριακού ιόντος σε m/z 117 (βασική κορυφή), ενώ εμφανίζονται δύο ισχυρές κορυφές σε m/z 90 (σχετική αφθονία 40%) και 89 (24%) λόγω της απώλειας HCN και H₂CN, αντίστοιχα [89]. Τα φάσματα ¹H-NMR του ινδολίου δείχνουν την παρουσία επτά κορυφών λόγω επτά μη ισοδύναμων πρωτονίων. Θεωρητικά, το πρωτόνιο που συνδέεται με το άζωτο του δακτυλίου εμφανίζεται ως απλή κορυφή σε χαμηλό πεδίο, στα 7,81ppm. Τα υπόλοιπα αρωματικά συντονίζονται ως πολλαπλές κορυφές μεταξύ 7,64 και 6,52 ppm [86]. Όσον αφορά τα φάσματα του ¹³C-NMR, καταγράφονται οκτώ κορυφές μεταξύ 102,2 και 135,7 ppm.



Εικόνα 18. Οι θεωρητικές χημικές μετατοπίσεις των ¹H και ¹³C (δ, ppm) για το ινδόλιο σε διαλύτη CDCl₃. C. Valdes and J. Barluenga, "Five-Membered Heterocycles : Indole and Related Systems," *Mod. Heterocycl. Chem.*, no. 2, pp. 377–531, **2011**.

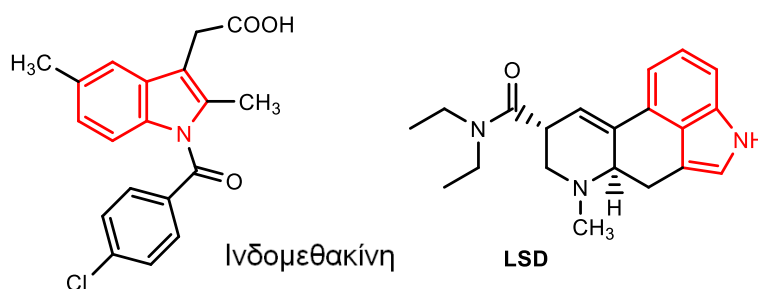
2.7.2. ΤΟ ΙΝΔΟΛΙΟ ΩΣ ΒΑΣΙΚΟ ΔΟΜΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Το ινδόλιο αποτελεί ένα ευρέως απαντούμενο δομικό συστατικό πολλών βιοδραστικών και φυσικών προϊόντων. Τα αλκαλοειδή του ινδολίου εμφανίζονται ευρέως σε διάφορες οικογένειες φυτών, ενώ η αυξίνη, μια κυτταρική αυξητική ορμόνη απαραίτητη τόσο για την κυτταρική διαίρεση όσο και για την κυτταρική διαστολή στα φυτά, είναι το ινδολο-3-οξικό οξύ [90]. Η τρυπτοφάνη (2-αμινο-3-(1H-ινδολ-3-υλ) προπανοϊκό οξύ), ένα απαραίτητο αμινοξύ, χρησιμοποιείται ως δομικό στοιχείο στη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, καθώς και μία βιοχημική πρόδρομη ένωση για διάφορες βιολογικές ενώσεις, όπως η σεροτονίνη (νευροδιαβιβαστής) και η μελανίνη (μια νευρορμόνη) [91].



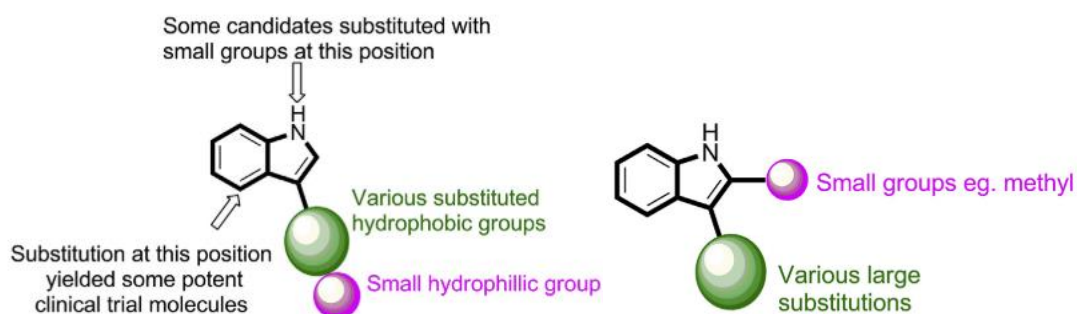
Εικόνα 19. Η τρυπτοφάνη είναι πρόδρομη ένωση της σεροτονίνης και της μελανίνης. N. Chadha and O. Silakari, "Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 134, pp. 159–184, **2017**.

Τα αλκαλοειδή του ινδολίου δρουν στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα. Η βιολογική δράση του διαιθυλαμιδίου του λυσεργικού οξέος (LSD) είναι πασίγνωστη. Το LSD έχει χρησιμοποιηθεί στη ψυχιατρική, στην ανακούφιση της κεφαλαλγίας, για πνευματικούς σκοπούς, αλλά και για την ενίσχυση της δημιουργικότητας [90]. Ένα ακόμα παράγωγο του ινδολίου, η ινδομεθακίνη, είναι ένα μη στεροειδές, αντιφλεγμονώδες φάρμακο (NSAID) που λειτουργεί αναστέλλοντας την παραγωγή προσταγλανδινών και χρησιμοποιείται συνήθως στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και για τη μείωση του πυρετού, του πόνου, της δυσκαμψίας και του οιδήματος [92] (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Οι δομές της ινδομεθακίνης (ρευματοειδής αρθρίτιδα) και του διαιθυλαμιδίου του λυσεργικού οξέος (ψυχοτρόπος ουσία). ChemDraw Professional2015, 2019

Παράγωγα του ινδολίου, σημαντικά φαρμακευτικά σκευάσματα, εμφανίζουν αντικαρκινική (Sunitinib), αντιμικροβιακή, αντι-ιική (Delavirdine), αντιφλεγμονώδη (Indomethacin), αντικαταθλιπτική (Metralindole), αντι-εμετική (Ondansetron), αντι-υπερτασική (Pindolol) και άλλη δράση. Η βιολογική αυτή δράση μάλιστα έχει συσχετιστεί με τις λειτουργικές ομάδες και τους υποκαταστάτες που μπορούν να ενσωματωθούν στο ινδόλιο. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί μοριακά μοτίβα με βάση τα οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί στοχευμένη σχεδίαση και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών με βάση το ινδόλιο. (Εικόνα 21) [85].



Εικόνα 21. Τα παράγωγα του Ινδολίου εμφανίζουν πληθώρα δράσεων και το είδος της βιολογικής τους δραστηριότητας καθορίζεται από τον τύπο των προσαρτημένων στο ινδόλιο ομάδων και τη θέση σύνδεσης των ομάδων αυτών. Στα αριστερά: το γενικό μοτίβο για την εκδήλωση αντικαρκινικής δράσης. Στα δεξιά: γενικό μοτίβο εκδήλωσης αντιμικροβιακής δράσης. N. Chadha and O. Silakari, "Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 134, pp. 159–184, 2017.

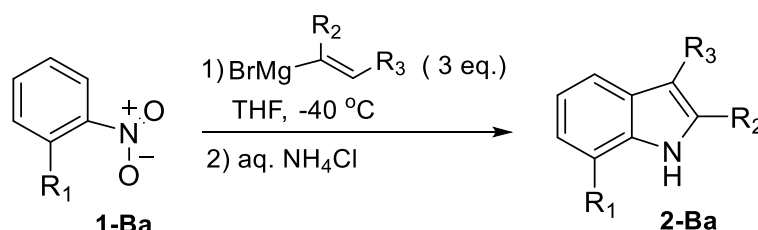
2.7.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΙΝΔΟΛΙΟΥ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το ινδόλιο και τα παράγωγά του, εξαιτίας της αφθονίας τους στη φύση και της σημαντικής βιολογικής τους δραστηριότητας έχουν μελετηθεί εκτενέστατα και επομένως στη βιβλιογραφία, εκτός των άλλων, γίνεται αναφορά σε πλήθος συνθετικών αντιδράσεων. Παρακάτω θα γίνει αναφορά στις σημαντικότερες εξ' αυτών.

2.7.3.1. Σύνθεση ινδολίου κατά Bartoli

Αντίδραση νιτροαρενίων

Η σύνθεση ινδολίου με τη μέθοδο Bartoli είναι η χημική αντίδραση ορθο-υποκατεστημένων νιτροαρενίων **1-Ba** με αντιδραστήρια Grignard βινυλοαλογονιδίων για τον σχηματισμό (κατά κύριο λόγο) υποκατεστημένων ινδολίων στον C7 (**2-Ba**) [93]. Ένα πλεονέκτημα της σύνθεσης ινδολίου κατά Bartoli είναι η δυνατότητα σύνθεσης ινδολίων υποκατεστημένων τόσο στον βενζολικό δακτύλιο όσο και στον δακτύλιο του πυρρολίου (παρακάτω σχήμα).

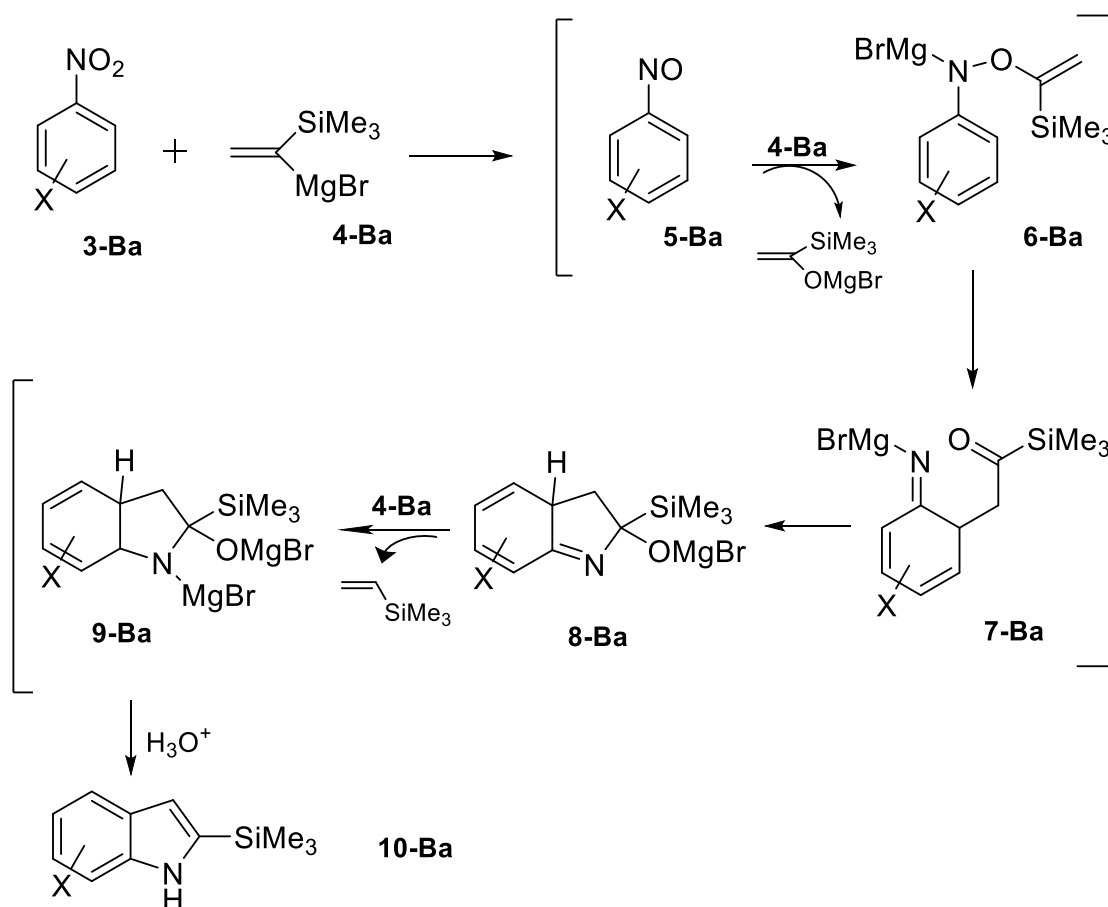


Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ικανοποιητικές αποδόσεις της παραπάνω αντίδρασης επιτυγχάνονται μόνο όταν είναι υποκατεστημένη η ορθο-θέση των νιτροαρενίων και πράγματι καταδείχθηκε ότι με υπόστρωμα το 4-χλωρο- και το 4-βρωμονιτροβενζόλιο το ινδόλιο παρήχθη σε πολύ χαμηλές αποδόσεις (17 και 12%, αντίστοιχα), ενώ κύριο προϊόν ήταν η 4-υποκατεστημένη ανιλίνη. Αυτός ο περιορισμός βρέθηκε να ισχύει επίσης για τα νιτροαρωματικά δικυκλικά συστήματα, όπως το 1-νιτροναφθαλένιο, που έδωσε το αντίστοιχο ινδόλιο σε ικανοποιητικές αποδόσεις, έναντι του 2-νιτροναφθαλενίου [93]. Το φαινόμενο αυτό έχει αποδοθεί στην στερική παρεμπόδιση της ορθο-ομάδας που βοηθά στην [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη που απαιτείται για τον σχηματισμό του προϊόντος [94].

Αντίδραση νιτροσοαρενίων

Τα νιτροσοαρένια **5-Ba** αντιδρούν με 2 ισοδύναμα του βινυλομαγνησιο-αλογονιδίου μέσω 1,2-προσθήκης για να δώσουν ένα N-αρυλο-O-βινυλοϋδροξυλαμινο

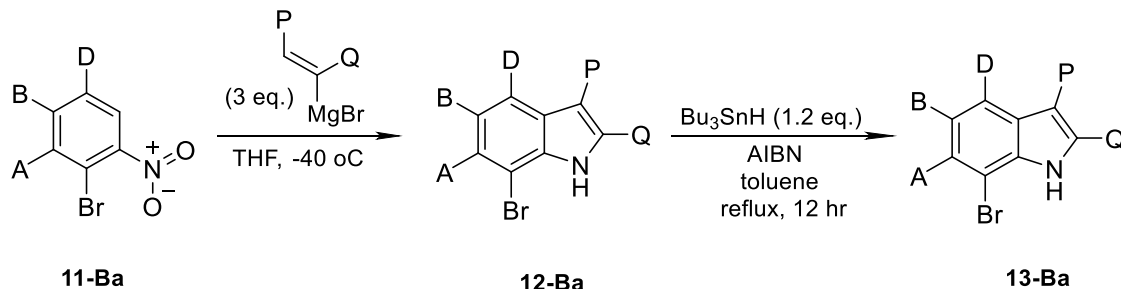
μαγνησιακό άλας, το οποίο υποβάλλεται σε σιγματροπική αναδιάταξη, κλείσιμο δακτυλίου και τελικά επανα-αρωματοποίηση για να δώσει ινδολίο. Επιπλέον, η αντίδραση των νιτροαρενίων **3-Ba** απαιτεί τριπλάσια περίσσεια αντιδραστήριου Grignard, δεδομένου ότι το πρώτο στάδιο της αντίδρασης είναι η αναγωγή σε νιτροσοαρένιο με χρήση 1 ισοδύναμου οργανομαγνησιακού. Αυτή η αντίδραση είναι μια χρήσιμη οδός για τη σύνθεση των 2-(τριμεθυλοσιλυλο)ινδολίων **10-Ba** όταν αξιοποιεί το 1-(τριμεθυλοσιλυλο)-βινυλομαγνήσιο βρωμίδιο **4-Ba** ως παράγοντα αλκυλίωσης [95].



Τροποποίηση Dobbs

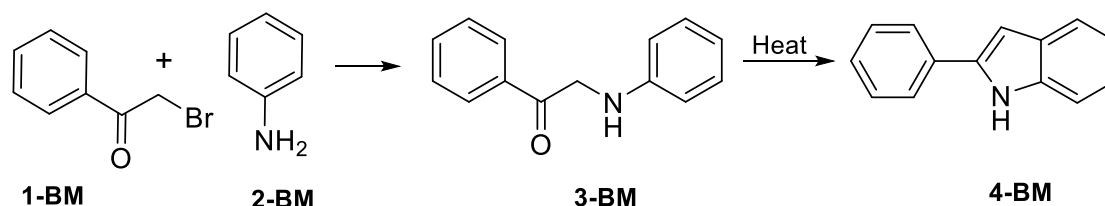
Ο Adrian Dobbs και οι συνεργάτες του πρότειναν έναν συνδυασμό της αντίδρασης Bartoli σε υποστρώματα ο-βρωμονιτροβενζολίων **11-Ba** (χρησιμοποιώντας το άτομο ο-βρωμίου για να κατευθύνει την κυκλοποίηση) για την σύνθεση υποκατεστημένων 7-βρωμοινδολίων **12-Ba**, τα οποία ακολούθως ανάγονται χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία των ριζών ετεροαρυλίου για να αντικατασταθεί το αλογόνο (βρώμιο) και εν τέλει να προκύψει το μη υποκατεστημένο στον C-7 ινδολίο **13-Ba** [96]. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί αποτελεσματικά το βρώμιο ως μια ασταθή

προστατευτική ομάδα και θα μπορούσε να προσφέρει σημαντική μείωση στον αριθμό των απαιτούμενων σταδίων για τη σύνθεση πολλών παραγώγων ινδολίου. Διαθέτει, επίσης, το πλεονέκτημα ότι πολλές λειτουργικές ομάδες είναι συμβατές σε συνθήκες δημιουργίας ριζών και έτσι δεν υφίσταται η ανάγκη προστασίας [97][98].

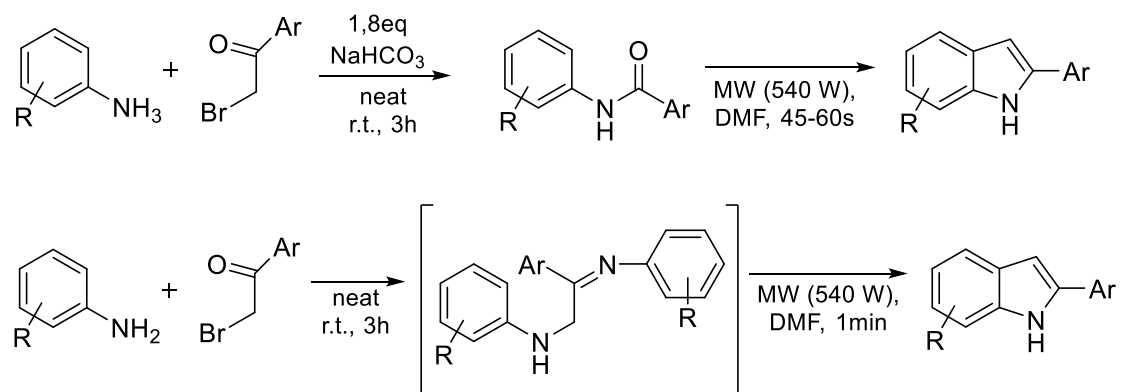


2.7.3.2. Σύνθεση ινδολίου κατά Bischler-Möhlau

Η σύνθεση ινδολίου κατά Bischler-Möhlau περιλαμβάνει τον σχηματισμό 2-αρυλο-ινδολίων **4-BM** από την κυκλοποίηση μιας α-αρυλαμινο-κετόνης **3-BM**, η οποία έχει προκύψει από αντίδραση μίας α-βρωμο-ακετοφαινόνης **1-BM** και περίσσειας ανιλίνης **2-BM** [99].



Παρά την μακρά ιστορία της, αυτή η κλασική αντίδραση έχει τύχει μικρής προσοχής σε σύγκριση με άλλες μεθόδους για σύνθεση ινδολίου, εξαιτίας των συνθηκών της αντίδρασης, των χαμηλών αποδόσεων και της απρόβλεπτης τοποεκλεκτικότητας. Πρόσφατα αναπτύχθηκαν πιο ήπιες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης και μιας βελτιστοποιημένης διαδικασίας με χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων.

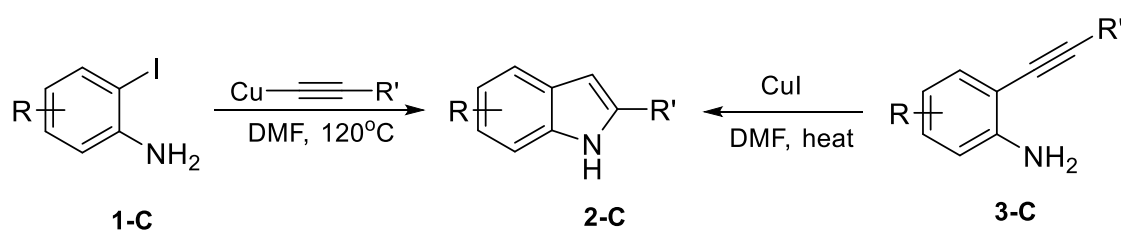


Αυτή η αντίδραση στερεής φάσης μεταξύ ανιλίνης και φαινυλο-ακυλο-βρωμιδίων παρουσία ισομοριακής ποσότητας όξινου ανθρακικού νατρίου ή ενός δευτέρου ισοδύναμου ανιλίνης ακολουθούμενη από ακτινοβολία μικροκυμάτων παρέχει μία ήπια, γενική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο για τη σύνθεση 2-αρυλινδολών σε καλή συνολική απόδοση [100].

2.7.3.3. Σύνθεση ινδολίου κατά Castro

Η αντίδραση σύνθεσης κατά Castro τυπικά περιλαμβάνει είτε την κυκλοποίηση παραγώγων μίας ο-ιωδοανιλίνης **1-C** με ακετυλίδια του χαλκού είτε των 2-αλκυλανιλινών **3-C** με άλατα του Cu(I), συνήθως εκείνα του ιωδίου. Παρόλο που οι ενώσεις που περιέχουν ακετυλίδια του χαλκού είναι σπάνιες και δεν επιδέχονται εύκολα (βιομηχανική) κλιμάκωση, η κυκλοποίηση των 2-αλκυλανιλινών έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή ως μία ελκυστική μέθοδος για την παρασκευή ινδολίων [101]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ο ιωδιούχος χαλκός χρησιμοποιείται σε περίσσεια, αν και πρόσφατα έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται σε στοιχειομετρία χαμηλότερη του ενός ισοδύναμου ή ακόμα και καταλυτικά [102].

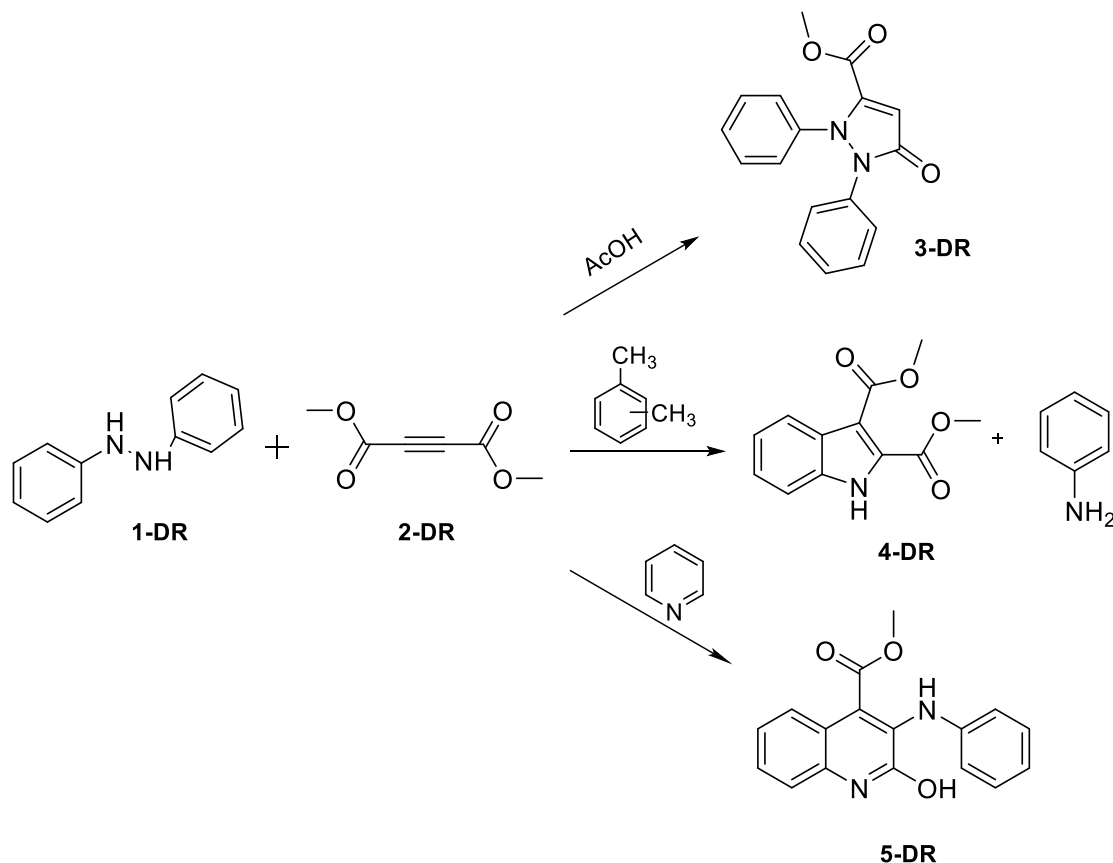
Η αντίδραση σύνθεσης κατά Castro είναι ιδιαίτερα εύχρηστη καθώς δεν απαιτεί την προστασία του αζώτου του ινδολίου με ογκώδεις προστατευτικές ομάδες, αξιοποιεί τον χαλκό και τις ενώσεις του, που θεωρείται πιο οικονομικό αντιδραστήριο και πετυχαίνει εκεί που άλλες μέθοδοι φαίνεται να υστερούν [101].



2.7.3.4. Σύνθεση ινδολίου κατά Diels-Reese

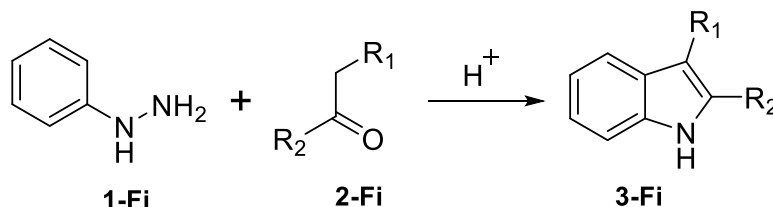
Οι Diels και Reese διαπίστωσαν ότι το ακετυλενοδικαρβοξυλικό διμεθύλιο **2-DR** (ή ανάλογων εστέρων) και το υδραζοβενζόλιο **1-DR** αντιδρούν σε θερμή μεθανόλη για να σχηματίσουν ένα προϊόν προσθήκης 1:1, το οποίο υπό κατάλληλες συνθήκες θα μπορούσε να μετασχηματιστεί σε τρεις τύπους ετεροκυκλικών ενώσεων [103]. Περαιτέρω εργασία από άλλους επέκτεινε το πεδίο αντίδρασης ώστε να συμπεριλάβει υποκατεστημένα υδραζοβενζόλια [104]. Ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει πλήρως διερευνηθεί. Με την αλλαγή της όξινης ή βασικής φύσης του διαλύτη, η αντίδραση δίνει διαφορετικά προϊόντα. Με το οξικό οξύ ως διαλύτη (όξινο), η αντίδραση δίνει μια

διφαινυλοπυραζολόνη **3-DR**. Με το ξυλόλιο ως διαλύτη (ουδέτερο), η αντίδραση δίνει ένα ινδολίο **4-DR**, ενώ την πυριδίνη ως διαλύτη (βασική), η αντίδραση δίνει μια καρβομεθοξικινολίνη η οποία μπορεί να αποικοδομηθεί σε μία διυδροκινολίνη **5-DR** [103].



2.7.3.5. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer

Μία από τις παλαιότερες και πιο αξιόπιστες μεθόδους για τη σύνθεση υποκατεστημένων ινδολίων είναι η σύνθεση κατά Fischer (ή κυκλοποίηση Fischer), που αναπτύχθηκε το 1883 από τον Emil Fischer. Σήμερα, η μέθοδος αυτή αξιοποιείται συνήθως στην παρασκευή φαρμάκων κατά της ημικρανίας [105].

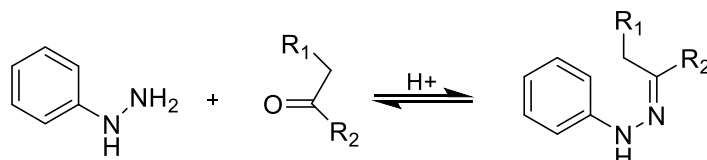


Σύμφωνα με τη σύνθεση κατά Fischer, αρυλο-ϋδραζόνες, που έχουν προκύψει από μία αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ αρυλοϋδραζινών **1-Fi** (με υδρογόνα σε ορθο-θέση) και κετονών ή αλδεϋδών **2-Fi**, μετατρέπονται σε ινδολία παρουσία ενός όξινου καταλύτη [106].

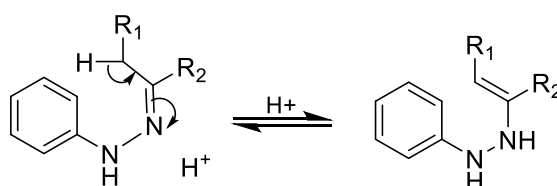
Μηχανισμός αντίδρασης:

Αν και ο μηχανισμός έχει μελετηθεί εκτενώς, ο μηχανιστικός τύπος που έχει συνταχθεί από τον Robinson είναι γενικά αποδεκτός [107]. Περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

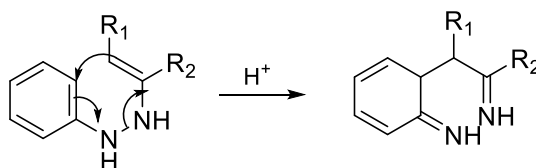
1. Αρυλοϋδραζόνη σχηματίζεται από μια αντίδραση συμπύκνωσης μεταξύ μιας αρυλοϋδραζίνης και μιας αλδεΐδης ή κετόνης.



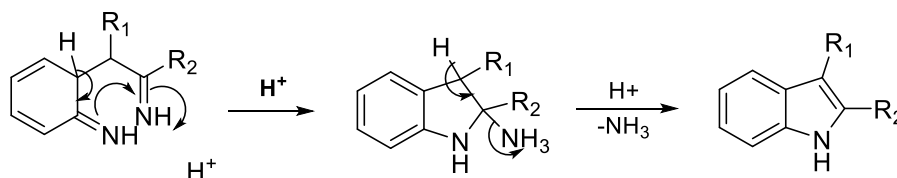
2. Καταλυόμενη από οξύ ταυτομερίωση αρυλο-υδραζόνης σε ενο-υδραζίνη.



3. [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη της ενο-υδραζίνης σε ένα ενδιάμεσο δι-ιμίνης.



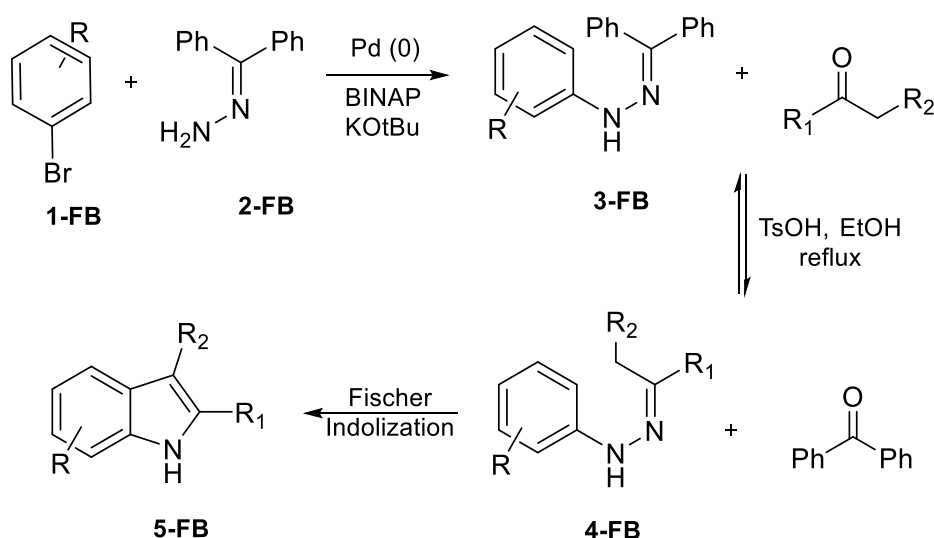
4. Επαναφορά του αρωματικού συστήματος του δακτυλίου σε ανιλίνη.
5. Ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή προς σχηματισμό αμινάλης.
6. Απώλεια αμμωνίας για να προκύψει το τελικό προϊόν του ινδολίου [105].

Οξίνη κατάλυση

Η σύνθεση Ινδολίου κατά Fischer επιταχύνεται σε όξινο περιβάλλον. Τόσο τα πρωτικά (όπως το PPA [108]) όσο και τα οξέα κατά Lewis έχουν αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στη θραύση του δεσμού αζώτου-αζώτου στο στάδιο της σιγματροπικής μετατόπισης. Υδροχλωρικά ή θειικά οξέα χρησιμοποιούνται συχνά, ενώ ο χλωριούχος ψευδάργυρος είναι το πιο αποτελεσματικό οξύ κατά Lewis [109]. Ωστόσο, η σύνθεση του ινδολίου δεν εξαρτάται πλήρως από ένα οξύ, καθώς μπορεί επίσης να λάβει χώρα υπό θερμικές συνθήκες χωρίς καταλύτη σε διαλύτες όπως η αιθυλενογλυκόλη, η διαιθυλενογλυκόλη, η σουλφολάνη ή η πυριδίνη [110].

Τροποποίηση Buchwald

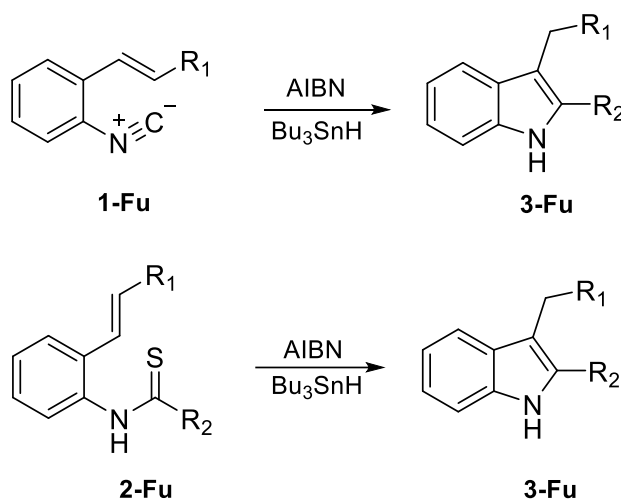
Ο Buchwald και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η N-αρυλο-υδραζόνη **4-FB** που απαιτείται για τη σύνθεση ινδολίου κατά Fischer μπορεί να προσεγγιστεί μέσω μίας ενδιάμεσης ένωσης N-αρυλο-υδραζόνης της βενζοφαινόνης **3-FB**. Αυτές οι N-αρυλο-υδραζόνες της βενζοφαινόνης διαπιστώθηκε ότι μπορούν να συντεθούν από μία αντίδραση σύζευξης μεταξύ αρυλοβρωμιδίων **1-FB** και υδραζονών της βενζοφαινόνης **2-FB**, καταλυόμενη από στοιχειακό Pd σε BINAP. Αυτές οι N-αρυλοϋδραζόνες **3-FB** υποβάλλονται σε αντίδραση με διάφορες άλλες κετόνες, διευρύνοντας το πεδίο αυτής της μεθόδου [111].

**2.7.3.6. Σύνθεση ινδολίου κατά Fukuyama**

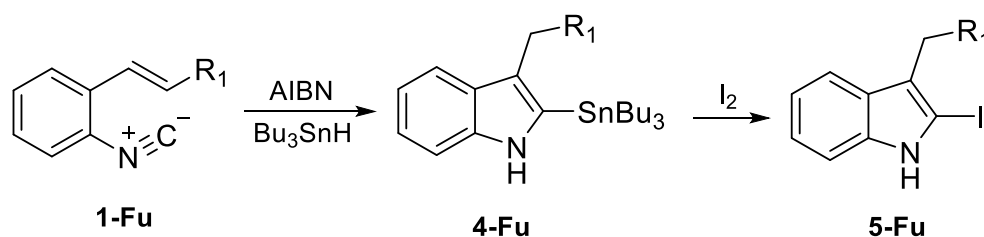
Αυτή η μέθοδος σύνθεσης προτάθηκε από τον Fukuyama το 1994 και αποτελεί μία πολύπλευρη και πρακτική one-pot χημική αντίδραση για τον σχηματισμό 3-μονοϋποκατεστημένων ή 2,3-διϋποκατεστημένων ινδολίων διαμέσου μίας ενδομοριακής κυκλοποίησης μέσω ριζών των ο-αλκενυλο-φαινυλο-ισονιτριλίων με χρήση του υδριδίου του τρι-βουτυλοκασσιτέρου [112].

Κοινά υδρίδια του τρι-βουτυλοκασσιτέρου χρησιμοποιούνται ως αναγωγικοί παράγοντες και το αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) ως εκκινητής ριζών [113]. Το τριαιθυλοβοράνιο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως εκκινητής ριζών [114]. Η αντίδραση μπορεί να ξεκινήσει, είτε με ένα ορθο-ισοκυανοστυρόλιο **1-Fu** είτε με ένα παράγωγο του 2-αλκενυλοθειοανιλιδίου **2-Fu**, σχηματίζοντας αμφότερα το ινδόλιο διαμέσου ριζικής κυκλοποίησης μέσω μιας ρίζας α-στανο-ιμιδοϋλίου [112]. Επιπροσθέτως, η αντίδραση δεν είναι στερεοειδική, καθώς αμφότερα τα ισομερή, cis και trans, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ληφθεί το επιθυμητό προϊόν.

Επιπλέον, στις θέσεις 2 και 3 του ινδολίου μπορεί να εισαχθεί μία ευρεία ποικιλία λειτουργικών ομάδων, ευαίσθητων τόσο σε βασικό όσο και σε όξινο περιβάλλον, όπως εστέρες, αιθέρες, THP και β-λακτάμες. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το υποφωσφορώδες οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτικός αναγωγικός παράγοντας ριζών [115].

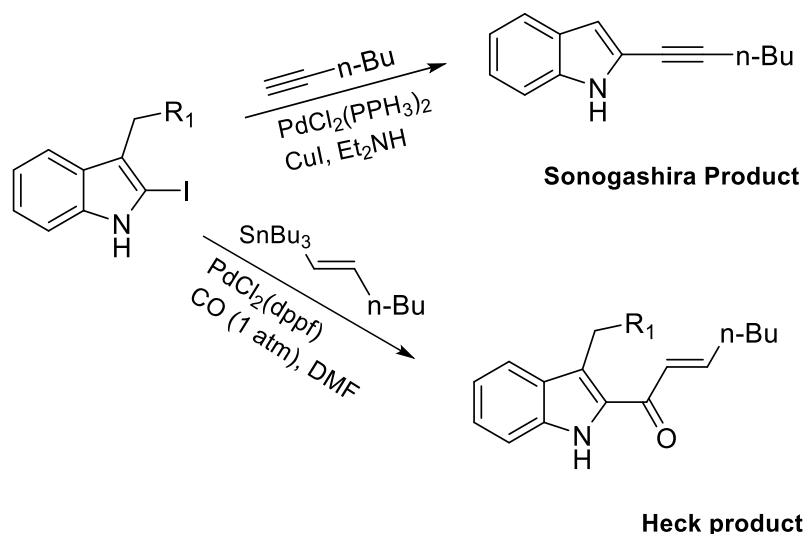


Η σύνθεση ινδολίων με τη μέθοδο Fukuyama μπορεί να παράγει ένα εύρος παραγώγων ινδολίων με διαφορετικούς υποκαταστάτες στις θέσεις 2 και 3, που ήταν προηγουμένως ανέφικτο χωρίς προστατευτική ομάδα στο άζωτο του δακτυλίου. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το 2-ιωδο-ινδόλιο, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει σε μια ποικιλία N-μη προστατευμένων 2,3-διυποκατεστημένων ινδολίων. Πριν από την ανακάλυψη αυτής της ένωσης, η χημεία που περιελάμβανε 2-σταννυλινδόλες **4-Fu** δεν αναπτύχθηκε, καθώς δεν υπήρχε τρόπος για πρακτική σύνθεση αυτών των N-μη προστατευμένων 2,3-σταννυλινδολών [113]. Οι N-απροστατέυτες 2-σταννυλινδολικές ενώσεις που παράγονται από τη σύνθεση Fukuyama, μπορούν να οξειδωθούν εύκολα με ιώδιο ανοίγοντας μια περιοχή χημείας που επιτρέπει τη σύνθεση μιας ποικιλίας ενώσεων που χρησιμοποιούν τα 2-ιωδοϊνδόλια **5-Fu** ως αντιδρώντα.



Αυτό το υποκατεστημένο με ιώδιο παράγωγο μπορεί να οδηγήσει σε αρυλαλογονίδια, ιωδίδια βινυλίου, τριφλικά βινυλίου και βενζυλοβρωμίδια [116]. Επιπλέον στη 2-θέση

πραγματοποιείται η σύζευξη Sonogashira για τα ακετυλένια, και η αντίδραση Heck για τα ακρυλικά [116].



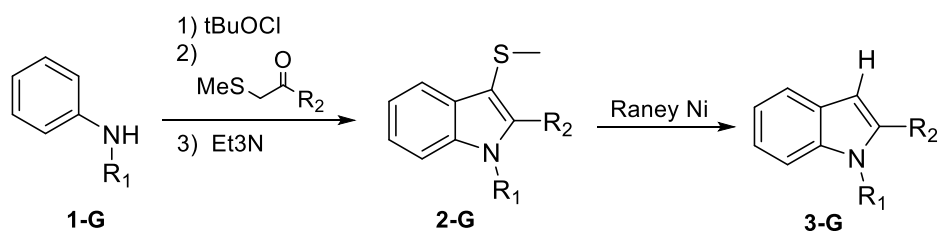
2.7.3.7. Σύνθεση Ινδολίου κατά Gassman

Η μέθοδος σύνθεσης ινδολίου κατά Gassman είναι μία σειρά χημικών αντιδράσεων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση υποκατεστημένων ινδολίων από ανιλίνες και β-κετοσουλφίδια, φορμυλοσουλφίδια ή τα παράγωγά τους. Πρόκειται για one-pot χημική αντίδραση και κανένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα δεν απομονώνεται [117].

Η μέθοδος περιλαμβάνει την αρχική μονο-N-χλωρίωση της ανιλίνης με *tert*-βουτυλο-υποχλωριώδες οξύ ή με κάποιο άλλο κατάλληλο μέσο αλογόνωσης. Η προσθήκη του σουλφιδίου στη N-χλωροανιλίνη δίνει ένα άλας αζασουλφονίου, το οποίο σε επεξεργασία με ήπια βάση παράγει ένα θειούχο υλίδιο. Αυτά τα υλίδια αναδιατάσσονται αυθόρμητα μέσω μιας αναδιάταξης τύπου Sommelet-Hauser για να δώσουν παράγωγα ανιλίνης, τα οποία είναι υποκατεστημένα αποκλειστικά στην ορθο-θέση. Η προσθήκη της αμινομάδας στο καρβονύλιο παράγει 2-υδροξυϊνδολίνες, οι οποίες αφυδατώνονται υπό τις συνθήκες της αντίδρασης για να δώσουν ινδόλια. Η σουλφιδική ομάδα, η οποία κατέλαβε την 3 θέση του ινδολίου, απομακρύνεται αναγωγικά με νικέλιο Raney. Η περιγραφείσα διαδικασία επιτρέπει τη σύνθεση μιας ευρείας ποικιλίας ινδολίων, υποκατεστημένων στις θέσεις 1, 2,4, 5 και/ή 7 σε καλές έως εξαιρετικές συνολικές αποδόσεις [117].

Σε μια τροποποίηση αυτής της γενικής σύνθεσης ινδολίου χρησιμοποιήθηκαν α-αλκυλο- ή α-αρυλο-β-κετοσουλφίδια για να παραχθούν τα άλατα αζασουλφονίου. Η επεξεργασία του άλατος αζασουλφονίου με τριαιθυλαμίνη οδηγεί σε ένα υλίδιο, το οποίο αναδιατάσσεται και συμπυκνώνεται ενδομοριακά προς σχηματισμός μίας 2,3-δισυποκατεστημένης 3-μεθυλοθειοϊνδολενίνης **2-G**. Η αναγωγική αποθείωση αυτών

των ινδολενινών στα αντίστοιχα 2,3-διυποκατεστημένα ινδόλια **3-G** δύναται να πραγματοποιηθεί με νικέλιο Raney W-2, με αλουμινοϋδρίδιο του λιθίου ή βοροϋδρίδιο του νατρίου [117].



Ο υποκαταστάτης R1 μπορεί να είναι υδρογόνο ή αλκύλιο, ενώ το R2 λειτουργεί καλύτερα με αρύλιο, αλλά μπορεί επίσης να είναι αλκύλιο.[118] Οι ανιλίνες πλούσιες σε ηλεκτρονιακή πυκνότητα, όπως η 4-μεθοξυανιλίνη, τείνουν να αποτυγχάνουν σε αυτή την αντίδραση [119].

Πλεονεκτήματα της μεθόδου Gassman είναι οι ασυνήθιστα ήπιες συνθήκες που αρκούν για το σχηματισμό του ινδολίου και το γεγονός ότι όλα τα απαιτούμενα βήματα μπορούν να πραγματοποιηθούν κάτω από τους 0 °C. Επιπλέον, δεν απαιτείται ισχυρό οξύ ή ισχυρή βάση. Ως εκ τούτου, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύνθεση παραγώγων ινδολίου με λειτουργικές ομάδες, οι οποίες θα ήταν ευαίσθητες σε αυξημένες θερμοκρασίες, σε οξέα ή ισχυρές βάσεις. Τέλος, οι χημικές αποδόσεις με την παραπάνω σύνθεση είναι υψηλότερες από τις μέσες αποδόσεις που λαμβάνονται με τη μέθοδο σύνθεσης ινδολίου κατά Fischer [120].

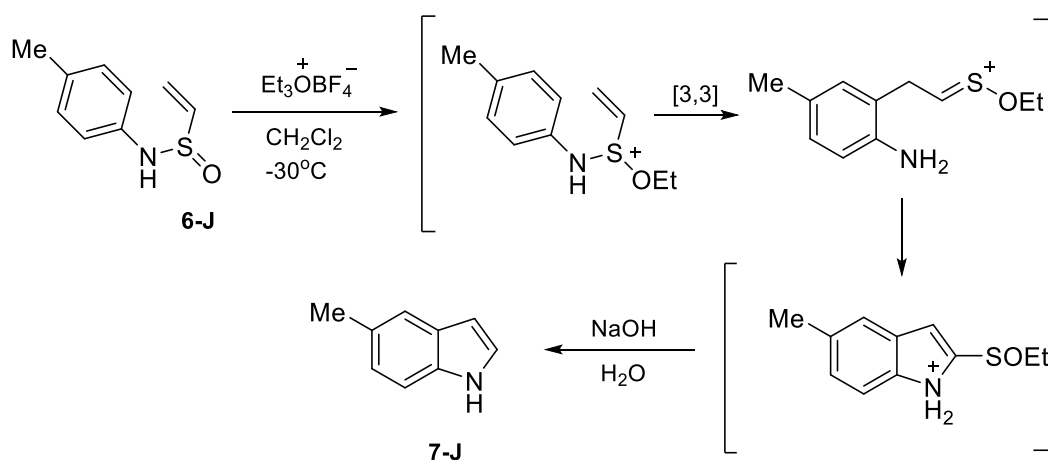
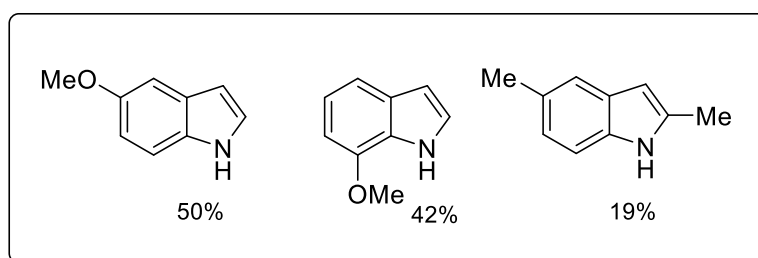
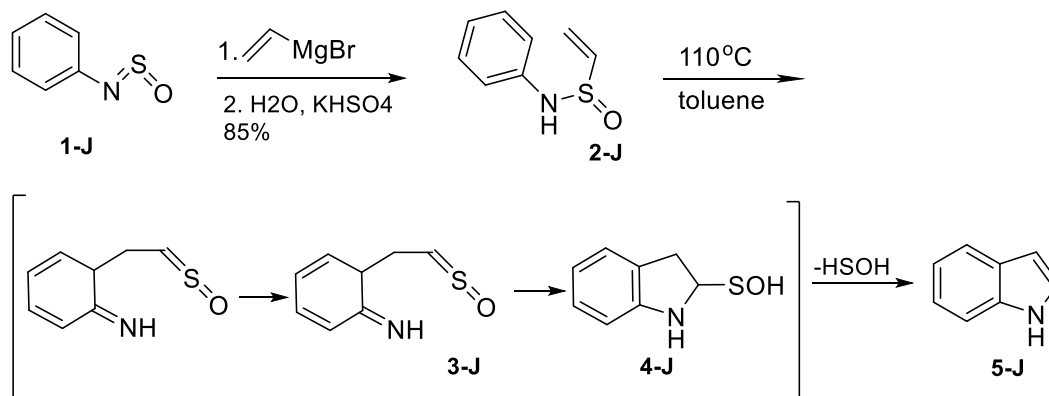
2.7.3.8. Σύνθεση ινδολίου κατά Julia

Η σύνθεση ινδολίου κατά Julia περιλαμβάνει μια [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη και δεν χρησιμοποιείται ευρέως παρά την απλότητα και τη δυνατότητα εφαρμογής της σε ένα γενικό πλαίσιο. Η βασική αντίδραση περιλαμβάνει μία [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη του σουλφιναμιδίου **2-J** στο ινδόλιο **5-J** που δίνει επίσης σουλφενικό οξύ, το οποίο αποσυντίθεται πιθανώς σε θείο, υδρόθειο, διοξείδιο του θείου και θειικό οξύ. Αν και οι αποδόσεις σουλφιναμιδίων από N-σουλφινυλανιλίνες είναι εξαιρετικές (82%-97%), οι αντίστοιχες για τον σχηματισμό ινδολίων υστερούν (19%-75%).

Κάποια από τα ινδόλια που παρασκευάστηκαν από τους Julia και Baudin παρουσιάζονται στο σχήμα παρακάτω (συνδυασμένες αποδόσεις για τα δύο στάδια).

Η καρβόνυλοφιλική κυκλοποίηση του προϊόντος αναδιάταξης **3-J** στο ασταθές ινδολ-2-σουλφενικό οξύ **4-J** θα μπορούσε αντί αυτού να περιλαμβάνει θειοφιλική κυκλοποίηση προς ένα βενζο[ο][1,2]θειάζινο-2-οξείδιο και απώλεια SO. Η χρήση του

τετραφθοροβορικού τριαιθυλοξονίου επιταχύνει την [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη του σουλφιναμιδίου **6-J** στο ινδόλιο **7-J**, όπως συνοψίζεται στο κάτω σχήμα [121].

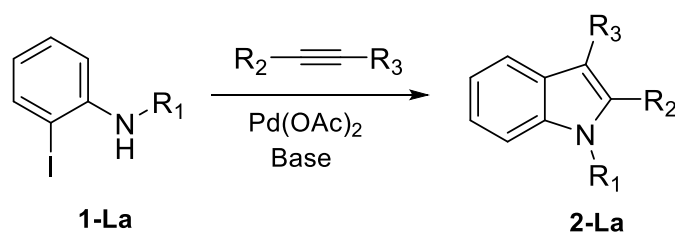


2.7.3.9 Σύνθεση ινδολίου κατά Larock

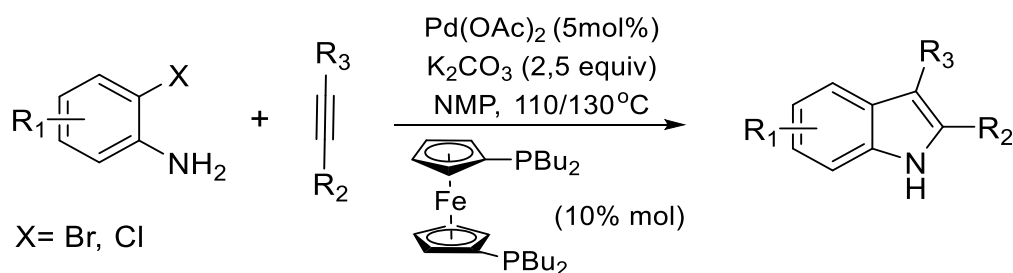
Η μέθοδος σύνθεσης ινδολίου κατά Larock (ή κυκλοποίηση Larock) είναι μια αντίδραση καταλυόμενη από παλλάδιο που περιλαμβάνει τη σύζευξη μίας ορθο-ιωδοανιλίνης **1-La** και των αντίστοιχων N-μεθυλο-, -ακετυλο και -τοσυλο παραγώγων της με μεγάλη ποικιλία εσωτερικών αλκινίων **2-La** και παρέχει 2,3-διυποκατεστημένα ινδόλια σε καλές έως εξαιρετικές αποδόσεις. Τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται με την χρησιμοποίηση περίσσειας αλκινίου, μιας βάσης (οξικό ή ανθρακικό άλας νατρίου ή καλίου) και ενός ισοδύναμου LiCl ή η-Bu₄NCl, προσθέτοντας περιστασιακά

5 mol% PPh_3 . Οι αποδόσεις με LiCl φαίνεται να είναι υψηλότερες και εμφανίζουν μεγαλύτερη επαναληψιμότητα από εκείνες που λαμβάνονται με $\eta\text{-Bu}_4\text{NCl}$ [122].

Η μέθοδος είναι αρκετά γενική όσον αφορά τους τύπους υποκαταστατών που μπορούν να τοποθετηθούν επί του αζώτου της ανιλίνης και των δύο άκρων του τριπλού δεσμού του αλκινίου. Το αλκίνιο μπορεί να φέρει αλκυλο-, αρυλο-, αλκενυλο-, υδροξυ- και σιλυλο-ομάδες. Ακόμα και ογκώδεις τεταρτοταγείς αλκυλομάδες ή τριμεθυλοσιλυλο-ομάδες μπορούν να συμμετέχουν σε αυτήν την αντίδραση και μάλιστα τείνουν να συνοδεύονται και από υψηλές αποδόσεις προϊόντων. Επιπλέον, η αντίδραση είναι αρκετά επιλεκτική, τοποθετώντας την αρυλική ομάδα της ανιλίνης στο λιγότερο στερεοχημικά παρεμποδισμένο άκρο του τριπλού δεσμού και το τμήμα του αζώτου στο πιο στερεοχημικά παρεμποδισμένο άκρο [123].



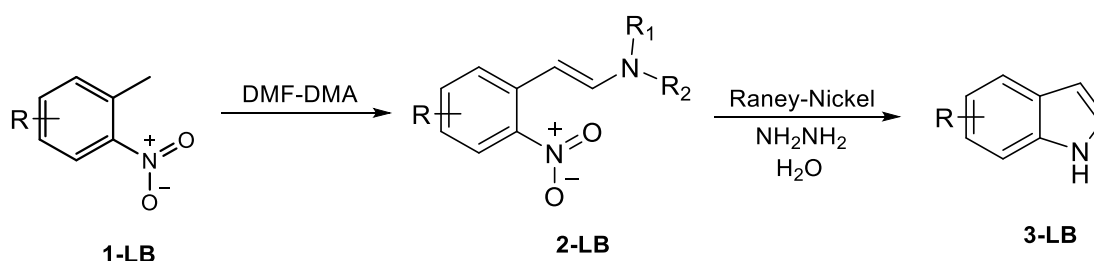
Οι ο-βρωμοανιλίνες και οι ο-χλωροανιλίνες δεν υφίστανται σύζευξη με τη μέθοδο σύνθεσης ινδολίου κατά Larock. Ωστόσο, χρησιμοποιήθηκαν αμφότερες με επιτυχία για να σχηματίσουν υποκατεστημένα ινδόλια χρησιμοποιώντας την N-μεθυλο-2-πυρρολιδόνη (NMP) ως διαλύτη και το 1,1'-δις (δι-tert -βουτυλοφωσφίνο)φερροκένιο ως υποκαταστάτη του παλλαδίου. Οι ο-βρωμοανιλίνες και οι ο-χλωροανιλίνες είναι εμπορικά διαθέσιμες και οικονομικά πιο συμφέρουσες σε σχέση με τη χρήση ο-ιωδοανιλίνης στη σύνθεση ινδολίου με τη μέθοδο του Larock [124].



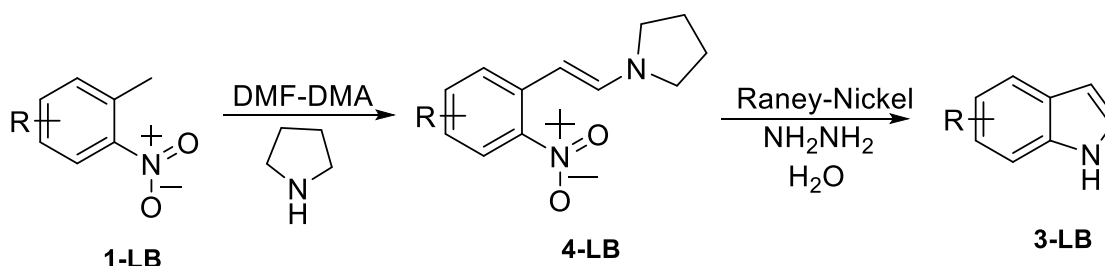
2.7.3.10. Σύνθεση ινδολίου Leimgruber-Batcho

Το 1971, οι Leimgruber και Batcho εισήγαγαν μια νέα και αποτελεσματική μέθοδο σύνθεσης 2,3-μη-υποκατεστημένων ινδολίων που περιελάμβανε τη συμπύκνωση του ο-νιτροτολουολίου **1-LB** με N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο διμεθυλοακετάλη (DMF-DMA)

ακολουθούμενη από αναγωγική κυκλοποίηση του προκύπτοντος *trans*-β-διμεθυλαμινο-2-νιτροστυρενίου **2-LB** [125]. Η αυξημένη οξύτητα της μεθυλομάδας του ο-νιτροτολουολίου επιτρέπει την εύκολη σύνθεση αυτού του εξαιρετικά σταθερού ενδιαμέσου [101].

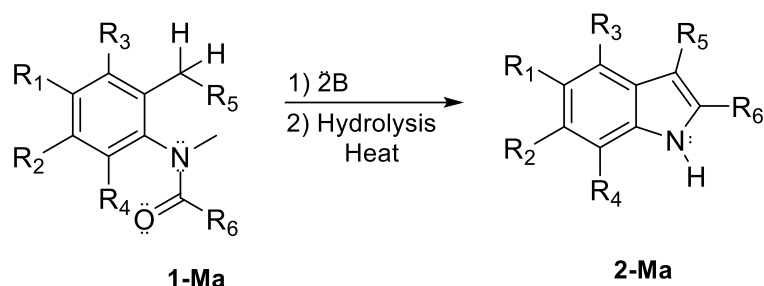


Σε μία βελτιστοποιημένη πορεία, η παραπάνω αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία περίσσειας πυρρολιδίνης, η οποία ανταλλάσσεται με τον υποκαταστάτη της διμεθυλαμίνης **4-LB**. Η εν λόγω μέθοδος είναι υψηλής απόδοσης και μπορεί να παράγει υποκατεστημένα ινδόλια με μία πληθώρα κυκλικών υποκαταστατών, ενώ είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στη φαρμακευτική βιομηχανία [101].

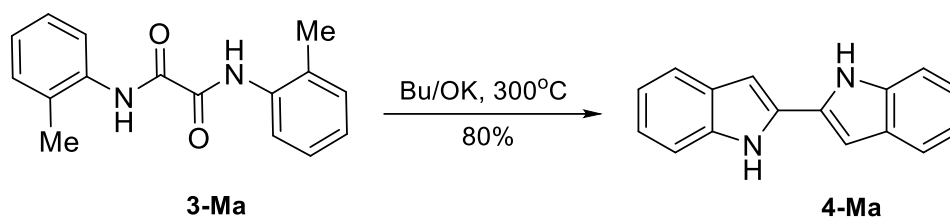


2.7.3.11. Σύνθεση ινδολίου κατά Madelung

Η σύνθεση Madelung αναφέρθηκε το 1912 από τον Walter Madelung, όταν παρατήρησε ότι συντέθηκε 2-φαινυλινδόλιο με χρήση N-βενζοϋλο-ο-τολουιδίνης και δύο ισοδυνάμων αιθοξειδίου του νατρίου υπό θέρμανση απουσία αέρα [126]. Με τη μέθοδο αυτή παράγονται υποκατεστημένα ή μη υποκατεστημένα ινδόλια με ενδομοριακή κυκλοποίηση των N-φαινυλαμιδίων **1-Ma**, χρησιμοποιώντας ισχυρή βάση σε υψηλή θερμοκρασία και οι κοινές συνθήκες αντίδρασης περιλαμβάνουν τη χρήση αλκοξειδίου του νατρίου ή του καλίου ως βάση, σε διαλύτες εξανίου ή τετραϋδροφουρανίου και σε θερμοκρασίες κυμαινόμενες μεταξύ 200-400 °C.



Λόγω των δραστικών συνθηκών, η μέθοδος δεν είναι συμβατή με ευαίσθητες λειτουργικές ομάδες και επιπλέον απαιτείται και ένα στάδιο υδρόλυσης στη σύνθεση [127]. Εντούτοις, ένα από τα πιο επιτυχημένα παραδείγματα είναι η κυκλοποίηση του οξαμιδίου **3-Ma** προς 2,2-διϊνδολύλιο **4-Ma** σε απόδοση 80% υπό την επίδραση του *tert*-βουτοξειδίου του καλίου στους 300 °C [128]. Αυτές οι συνθήκες αντιπροσωπεύουν μια σημαντική βελτίωση της μεθόδου του Madelung, το οποίο είχε πετύχει απόδοση 26% χρησιμοποιώντας πεντοξειδίο του νατρίου στους 360 °C. Η σύνθεση Madelung είναι σημαντική, καθώς είναι μία από τις λίγες γνωστές αντιδράσεις που παράγουν ινδόλια από μια καταλυόμενη με βάση θερμική κυκλοποίηση των N-ακυλο-ο-τολουϊδίων [127].



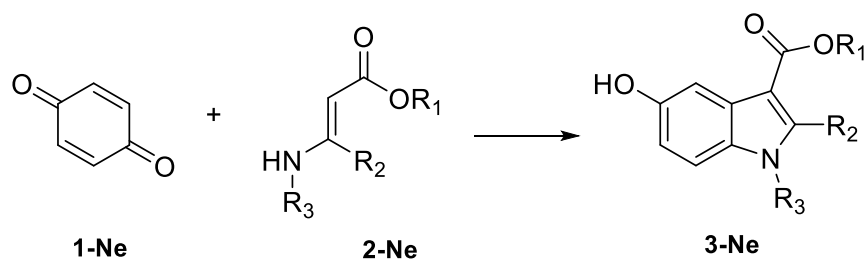
Τροποποίηση Houlihan

Ο Houlihan και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν ότι η απαιτούμενη θερμοκρασία για τη σύνθεση Madelung μειώνεται δραστικά σε μία περιοχή θερμοκρασιών -20 – 25 °C όταν χρησιμοποιούνται βάσεις βουτυλολιθίου (BuLi) ή διισοπροπυλαμιδίου του λιθίου (LDA) και όταν χρησιμοποιείται τετραϋδροφουράνιο ως διαλύτης. Όταν γίνεται χρήση οποιασδήποτε από αυτές τις μεσολαβούμενες από μέταλλα βάσεις, η παραπάνω μέθοδος σύνθεσης ονομάζεται τροποποίηση κατά Madelung-Houlihan [129].

2.7.3.12. Σύνθεση ινδολίου κατά Nenitzescu

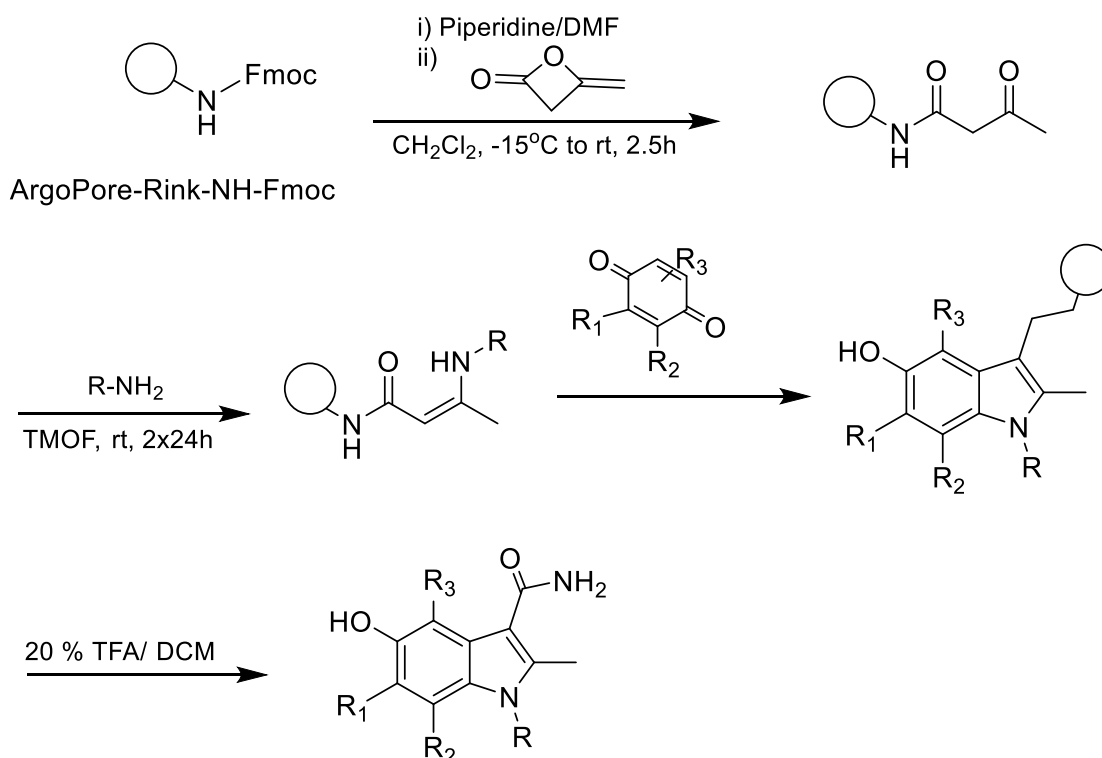
Η σύνθεση ινδολίου κατά Nenitzescu είναι μια χημική αντίδραση που σχηματίζει παράγωγα 5-υδροξυϊνδολίου **3-Ne** και 5-υδροξυβενζοφουρανίου από *p*-βενζοκινόνες **1-Ne** και συγκεκριμένες εναμίνες **2-Ne** [130]. Συγκεκριμένα, ο Nenitzescu το 1929 ανέφερε τη σύνθεση του 5-υδροξυ-2-μεθυλινδολο-3-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα από την αντίδραση της *p*-βενζοκινόνης με το 3-αμινοκροτονικό αιθυλεστέρα [131]. Η

αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με έναν αριθμό διαφορετικών συνδυασμών ομάδων R, οι οποίες περιλαμβάνουν μεθυλο, μεθοξυ, αιθυλο και προπυλο υποκαταστάτες, καθώς και υποκαταστάτες υδρογόνου [132].



Τροποποίηση στερεάς φάσης

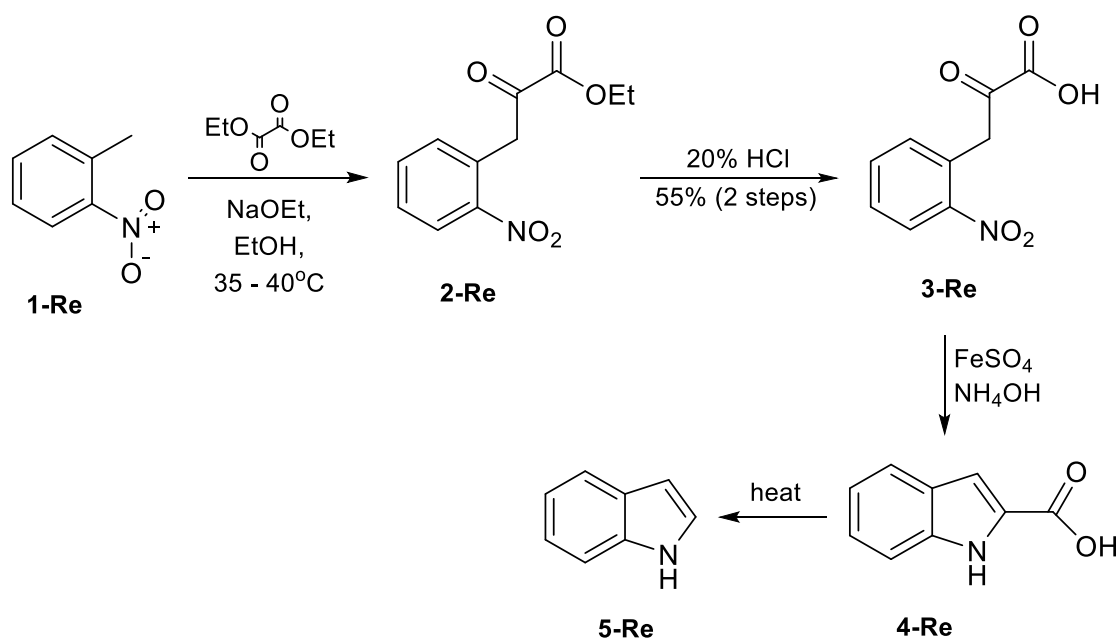
Μια από τις συνηθέστερες τροποποιήσεις της αντίδρασης Nenitzescu είναι η παραλλαγή στερεάς φάσης. Διεξάγεται σε ρητίνη ArgoPore®-Rink-NH-Fmoc με υψηλή διασύνδεση και λειτουργεί με μια ποικιλία υποκαταστατών και στα δύο αντιδρώντα. Παρατηρήθηκαν επίσης άλλες συνθέσεις ινδολίου σε στερεά φάση, μερικές από τις οποίες χρησιμοποιούν διαφορετικά υποστρώματα και καταλύτες μετάλλων για να οδηγήσουν την αντίδραση σε ολοκλήρωση [133].



2.7.3.13. Σύνθεση ινδολίου κατά Reissert

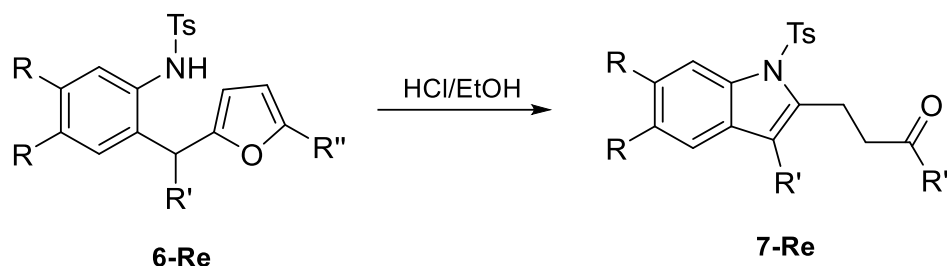
Η σύνθεση ινδολίου κατά Reissert περιλαμβάνει μια σειρά χημικών αντιδράσεων για τη σύνθεση μη υποκατεστημένου ινδολίου **5-Re** από ορθο-νιτροτολουόλιο **1-Re** και οξαλικό διαιθυλεστέρα. Πιο συγκεκριμένα, το 1897 ο Arnold Reissert διαπίστωσε ότι

το ο-νιτροφαινυλοπυροσταφυλικό οξύ υπέστη αναγωγή με θειικό σίδηρο και αμμωνία για να δώσει την αντίστοιχη αμίνη, η οποία κυκλοποιήθηκε, χωρίς να απομονωθεί, προς ινδολο-2-καρβοξυλικό οξύ [134]. Η θέρμανση του τελευταίου πάνω από το σημείο τήξης του είχε ως αποτέλεσμα την αποκαρβοξυλίωση προς ινδόλιο. Το αρχικό πυροσταφυλικό οξύ παρασκευάστηκε εύκολα με όξινη υδρόλυση του ο-νιτροφαινυλοπυροσταφυλικού αιθυλεστέρα, ο οποίος αποκτήθηκε μέσω καταλύμενης με βάση συμπύκνωσης του ο-νιτροτολουολίου με οξαλικό διαιθυλεστέρα [135]. Αρκετές άλλες πειραματικές μέθοδοι εφαρμόστηκαν αργότερα. Για παράδειγμα, το αιθοξείδιο του καλίου σε ξηρό αιθέρα είναι μια ισχυρότερη βάση από το αιθοξείδιο του νατρίου σε αιθανόλη και χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο συμπύκνωσης μέσω βάσης, ενώ ποικιλία άλλων αντιδραστηρίων έχει χρησιμοποιηθεί για το αναγωγικό στάδιο της αντίδρασης, όπως η σκόνη σιδήρου σε οξικό οξύ/αιθανόλη, τα ρινίσματα σιδήρου σε υδροχλωρικό οξύ, η σκόνη ψευδαργύρου σε οξικό οξύ και το διθειώδες νάτριο [136].



Τροποποίηση Butin

Σε μια ενδομοριακή παραλλαγή της αντίδρασης Reissert, κατά την επεξεργασία των 2-τοσυλαμινοβενζυλοφουρανίων **6-Re** με αιθανολικό διάλυμα HCl , ελήφθησαν ορισμένα παράγωγα ινδολίου, με τον δακτύλιο του φουρανίου να είναι αυτός που παρέχει μία ομάδα καρβονυλίου στο τελικό παράγωγο του ινδολίου **7-Re** [137].

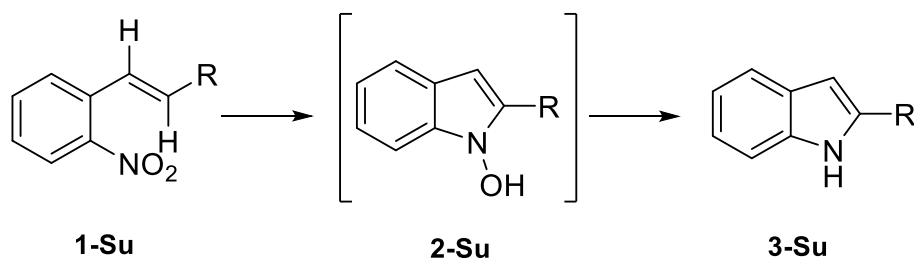


Εν κατακλείδι, πρέπει να επισημανθεί ότι αυτή η μέθοδος σύνθεσης του ινδολίου είναι γενική και επιτρέπει την μεταβολή των υποκαταστατών R, R' και R". Επιπροσθέτως, η παρουσία της πλευρικής αλυσίδας της κετόνης στα ινδόλια **7-Re** επεκτείνει ουσιαστικά τις δυνατότητες για την συνθετική τους εφαρμογή. Έτσι, για παράδειγμα, οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμα ενδιάμεσα για τη σύνθεση παραγώγων της μιτομυκίνης και του μιτοζενίου [137].

2.7.3.14. Σύνθεση ινδολίου κατά Sundberg

Η μέθοδος σύνθεσης Ινδολίου κατά Sundberg (και Cadogan) κάνει χρήση των β-αλκυλο-ο-νιτροστυρενίων ως αντιδρώντων και αξιοποιεί για την παρασκευή τους τη φωσφονική τροποποίηση της αντίδρασης Wittig. Τα β-αλκυλο-ο-νιτροστυρένια αντιδρούν με τριαιθυλο-φωσφίτη για να δώσουν 2-αλκυλο-ινδόλια σε απόδοση περίπου 50%. Τα β-ακυλο-ο-νιτροστυρένια αντιδρούν παρομοίως για να δώσουν 2 ακυλο-ινδόλια, αλλά σε χαμηλότερη απόδοση. Πολλά παραπροϊόντα αυτών των αντιδράσεων έχουν χαρακτηριστεί.

Όσο αφορά το μηχανισμό της αντίδρασης, εξετάζεται η πιθανότητα το 1-υδροξυ-2-υποκατεστημένο-ινδόλιο να είναι ένα ενδιάμεσο της αναγωγής του ο-νιτροστυρενίου σε 2-υποκατεστημένο-ινδόλιο. Το ο-νιτροαιθυλοβενζόλιο δίνει N-(αιθυλοφαινυλο) φωσφοριμιδικό τριαιθύλιο όταν θερμαίνεται με φωσφορώδες τριαιθυλεστέρα [138].



2.8. RUCAPARIB

2.8.1. Το RUCAPARIB ΩΣ ΙΣΧΥΡΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ

Το Rucaparib (AG014699: 8-fluoro-2-(4-methylaminomethylphenyl)-1,3,4,5-tetrahydroazepino[5,4,3-cd] indol-6-1) [139] (Rubraca™) είναι ένας μικρού μοριακού βάρους (323 Da), από του στόματος χορηγούμενος αναστολέας των ενζύμων PARP, συμπεριλαμβανομένων των PARP-1, -2 και -3.

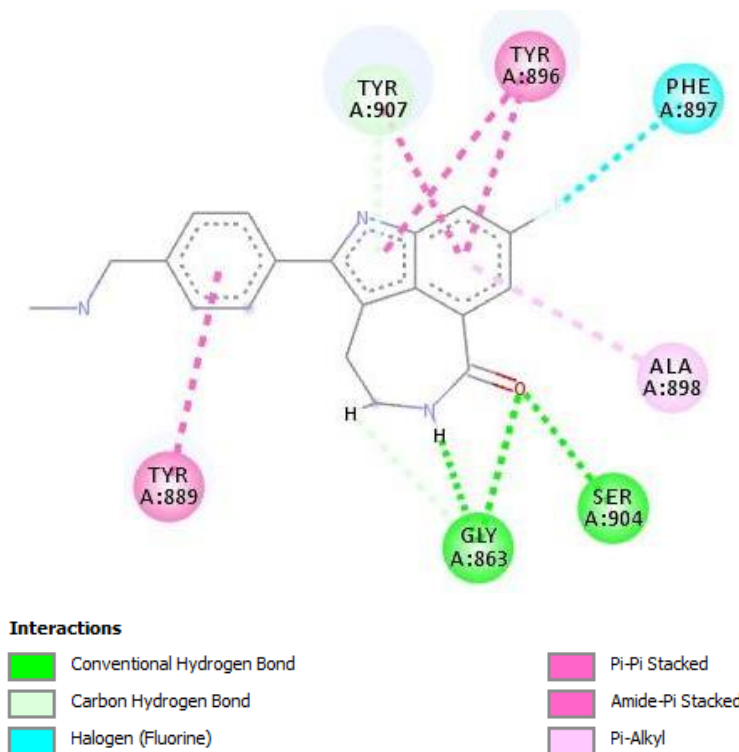
Ανακαλύφθηκε στο πλαίσιο συνεργασίας μεταξύ επιστημόνων του Βόρειου Ινστιτούτου Έρευνας κατά του Καρκίνου και της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Newcastle και της Agouron Pharmaceuticals στο Σαν Ντιέγκο της Καλιφόρνια [140]. Αναπτύσσεται από την Clovis Oncology, Inc. (Boulder, CO, USA) για τη θεραπεία στερεών όγκων και χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία για τη θεραπεία ασθενών με επιβλαβή μετάλλαξη *BRCA-1/-2* [141], βλαστική ή/και σωματική, σχετιζόμενη με προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών, κατά του καρκίνου των σαλπίνγων και κατά του πρωτεύοντος περιτοναϊκού καρκίνου για ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με δύο ή περισσότερες χημειοθεραπείες [142].

Το Rucaparib έλαβε επιταχυνόμενη έγκριση διάθεσης με βάση το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης (ORR) και τη διάρκεια της ανταπόκρισης που παρατηρήθηκε στις δοκιμές φάσης II. Η συνεχιζόμενη έγκριση του Rucaparib σε αυτή την ένδειξη μπορεί να εξαρτηθεί από την επαλήθευση και την περιγραφή του κλινικού οφέλους στις επιβεβαιωτικές δοκιμές. Το Rucaparib βρίσκεται επίσης υπό διερεύνηση φάσης II ή III στον καρκίνο των ωοθηκών, του μαστού και του προστάτη. Η χρήση ενός ενδοφλέβιου σκευάσματος Rucaparib για τη θεραπεία κακοήθους μελανώματος διερευνήθηκε νωρίς στην ανάπτυξη του φαρμάκου, πριν από την απόκτηση του Rucaparib από την Clovis Oncology και έκτοτε έχει διακοπεί [143].

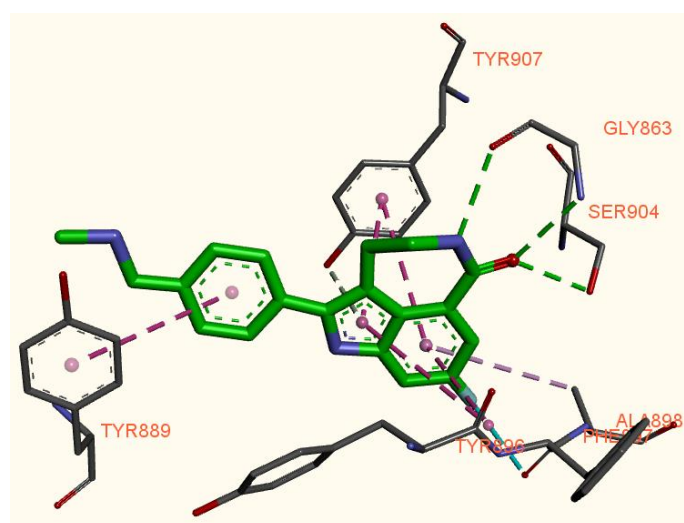
2.8.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ RUCAPARIB

Το Rucaparib περιέχει ένα τρικυκλικό συμπυκνωμένο σύστημα, το οποίο στη 2 θέση του πυρρολίου φέρει έναν υποκατεστημένο βενζολικό δακτύλιο. Ο επταμελής δακτύλιος δεν είναι αρωματικός και οι τρεις δακτύλιοι είναι οργανωμένοι διαφορετικά σε σχέση με τη δομή του νικοτιναμίδιου [47]. Εδώ η διαμόρφωση του αμιδίου είναι ασφαλισμένη σε s-trans θέση (ή διαμόρφωση s-E) μέσω της σύνδεσης του επταμελούς δακτυλίου της λακτάμης στον ινδολικό δακτύλιο. Μελέτες μοντελοποίησης έδειξαν ότι αυτά τα τρικυκλικά συστήματα θα επέτρεπαν τη μέγιστη αλληλεπίδραση (τρεις βασικοί δεσμοί υδρογόνου) του λακταμικού καρβονυλίου και της αμινομάδας με κατάλοιπα Gly863 και Ser904 (όπως φαίνεται στις Εικόνες 22 και 23) στην ενεργό

θέση της πρωτεΐνης [28]. Η ένωση δεσμεύεται στον θύλακα νικοτιναμιδίου και αλληλεπιδρά με π - π stacking αλληλεπιδράσεις με την Tyr907 και την Tyr896 (Εικόνα 22 & 23). Το Rucaparib δε δεσμεύεται τόσο βαθιά στον θύλακα (απόσταση από Gly863 = 2,9 Å), το άτομο φθορίου αλληλεπιδρά με το κατάλοιπο Phe897 ενώ ο βενζολικός δακτύλιος του τρικυκλικού συστήματος αλληλεπιδρά με το υδρόφοβο τμήμα του καταλοίπου Ala898 του καταλυτικού κέντρου. Το Rucaparib έχει επίσης έναν (μεθυλαμινομεθυλο)φαινυλο υποκαταστάτη που εκτείνεται και αλληλεπιδρά με π - π stacking με το κατάλοιπο της Tyr889.



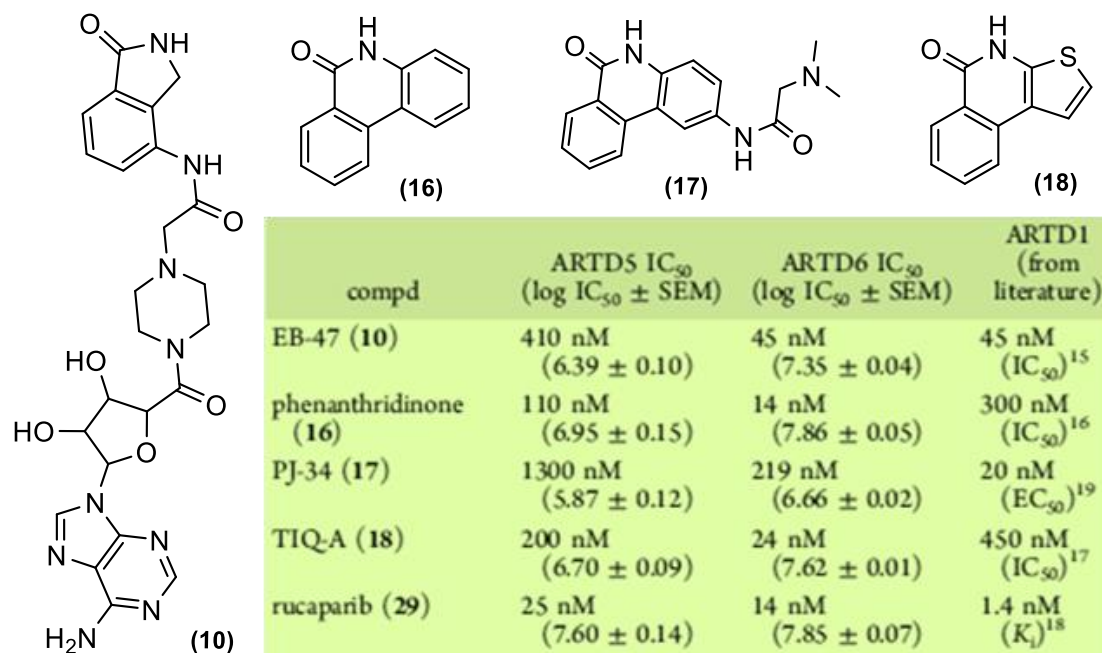
Εικόνα 22. Απλοποιημένο διάγραμμα 2 διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του Rucaparib με το ενεργό κέντρο του PARP1. PDB, AutodockVina



Εικόνα 23. Απλοποιημένο διάγραμμα 3 διαστάσεων των αλληλεπιδράσεων του Rucaparib με το ενεργό κέντρο του PARP1. Δομές από το PDB, AutodockVina

2.8.3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με έρευνα του Teemu Haikarainen et al. μεταξύ των τεσσάρων πιθανών αναστολέων των τανκυρασών που μελετήθηκαν (Εικόνα 24), ισχυρότερος αναστολέας αποδείχθηκε αυτός που στοχεύει έναντι του ARTD1 (PARP-1), ήτοι το Rucaparib, το οποίο εμφανίζει τιμή IC_{50} 25 nM, καθιστώντας το ένα από τα καλύτερα μοριακά μοτίβα μεταξύ των αναστολέων της τανκυράσης, ενώ είναι ακόμα καλύτερος αναστολέας του ARTD6 (TNKS-2) [47].

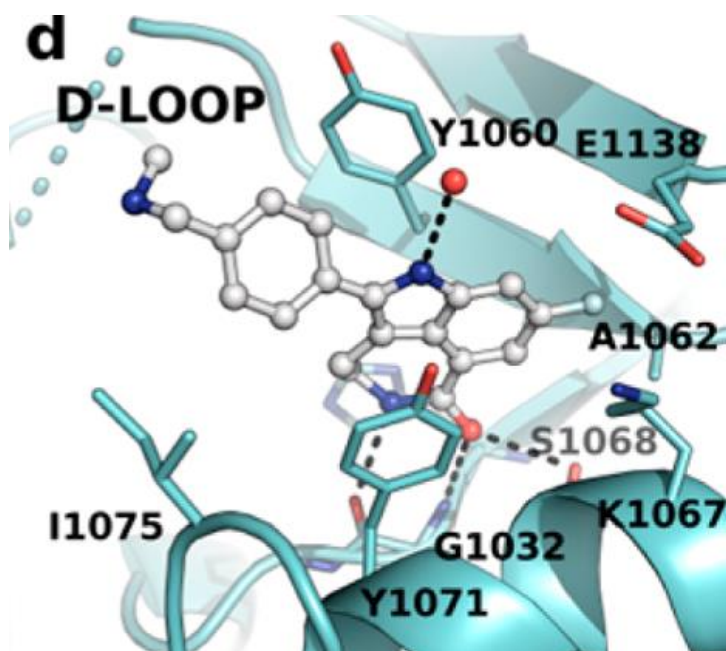


Εικόνα 24. Η ισχύς ορισμένων πιθανών αναστολέων των ARTD1,5,6. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3-4 φορές για τον κάθε πιθανό αναστολέα, και οι καμπύλες δόσης-απόκρισης δημιουργήθηκαν ξεχωριστά για κάθε ένωση. Teemu Haikarainen et al. Evaluation and Structural basis for the inhibition of tankyrases by PARP inhibitors, *ACS Medical Chemistry Letters*, 2013

Το Rucaparib, όπως έχουμε αναφέρει, είναι ένας βελτιστοποιημένος αναστολέας του ARTD1(PARP1) που περιέχει ένα μοτίβο τύπου νικοτιναμιδίου «συντηγμένο» σε έναν επταμελή δακτύλιο. Ο επταμελής μη-επίπεδος δακτύλιος δεν εκδηλώνει διακριτές αλληλεπιδράσεις εντός της ενεργού θέσης, ενώ το άζωτο του ινδολίου συνδέεται μέσω του υδρογόνου του με ένα μόριο νερού (Εικόνα 25). Ο (μεθυλαμινομεθυλο)φαινυλο υποκατάστατης εκτείνεται από τη θέση του νικοτιναμιδίου, προκαλώντας μεγάλες αλλαγές στην ενεργό θέση. Ο βρόχος (θηλιά) D ανοίγει και παραμορφώνεται τελείως στην κρυσταλλική δομή. Η ογκώδης ομάδα του φαινυλίου προκαλεί επίσης μεταβολή στη διαμόρφωση του καταλοίπου Ile1075 και περιστροφή του Tyr1060 (15 μοίρες) και του Tyr1071 (30 μοίρες) σε σχέση με τους υπόλοιπους πιθανούς αναστολείς. Αυτό οδηγεί το κατάλοιπο Tyr1071 σε παράλληλη

διευθέτηση με τον αρωματικό δακτύλιο του ινδολίου της ένωσης. Η δέσμευση του Rucaparib προκαλεί διαταραχή της θηλιάς D, καθώς οι επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται από τον τρικυκλικό πυρήνα και η αποτελεσματική ενεργειακή διευθέτηση της ένωσης με αρωματικά υπολείμματα στην ενεργό θέση υπερνικά αυτό το γεγονός και η ένωση παρουσιάζει αξιοσημείωτη δραστικότητα ως αναστολέας της τανκυράσης. Η θηλιά D είναι πολύ δυναμικός και συχνά υιοθετεί νέες διαρθρώσεις για να ικανοποιήσει τους αναστολείς [47].

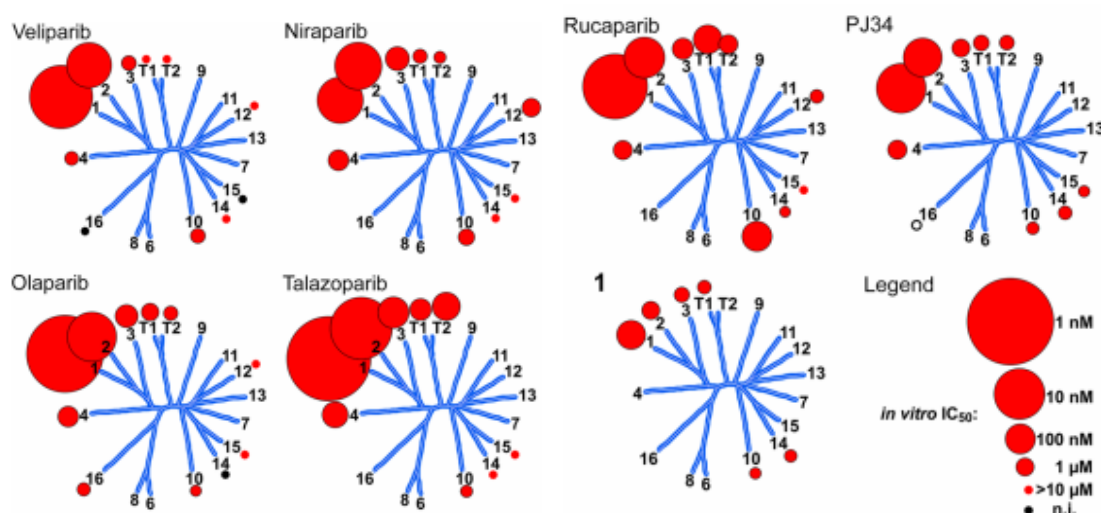
Το Rucaparib είναι ένας ισχυρός αναστολέας της τανκυράσης και είναι πιθανό ότι μερικές από τις παρατηρούμενες κλινικές επιδράσεις θα μπορούσαν να οφείλονται στην αναστολή της τανκυράσης, ειδικά σε περιπτώσεις όπου η έκφραση της β-κατενίνης αυξάνεται.



Εικόνα 25. Η δέσμευση του Rucaparib στο καταλυτικό θραύσμα του ARTD6 (TNKS-2). Η παραμορφωμένη D-θηλιά απεικονίζεται ως μία παχιά διακεκομμένη γραμμή. Teemu Haikarainen et al. Evaluation and Structural basis for the inhibition of tankyrases by PARP inhibitors, *ACS Medical Chemistry Letters*, 2013

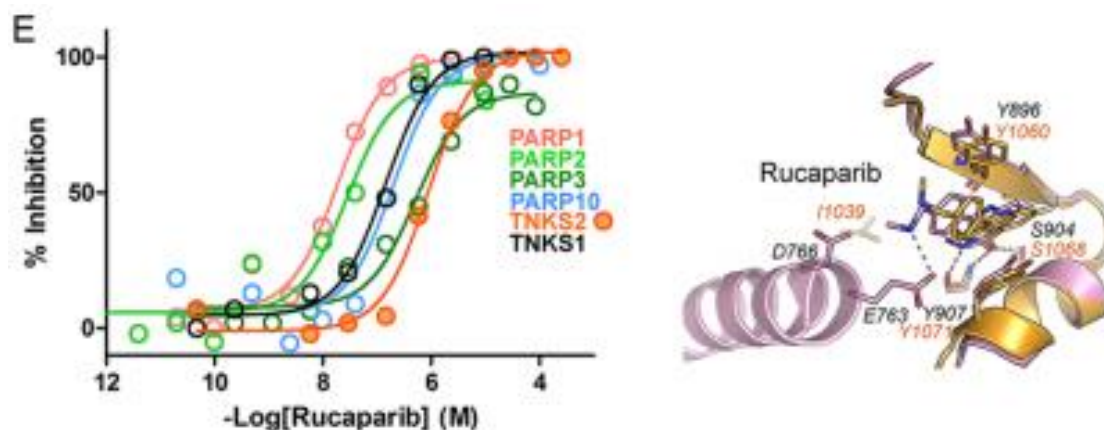
Σε άλλη έρευνα, όπου συμπεριλήφθησαν περισσότεροι αναστολείς, το Rucaparib επαληθεύεται ότι είναι ένας ισχυρός αναστολέας του PARP σε νανομοριακές συγκεντρώσεις [78], με δυναμικά μεγαλύτερη ανασταλτική δραστικότητα του PARP απ' ό,τι το Olaparib και το Niraparib, που όμως υστερεί ως προς την εκλεκτικότητά του, όπως θα παρουσιαστεί παρακάτω. Προσδιορίστηκε ο βαθμός αναστολής ενζύμου για κάθε ένζυμο PARP παρουσία NAD^+ σε συγκεντρώσεις ίδιες ή κάτω από το αντίστοιχο K_M . Τα προφίλ δραστικότητας προσδιορίστηκαν για τους τρέχοντες κλινικούς αναστολείς του PARP, δηλαδή το Olaparib (AZD-2281, KU-0059436), το

Veliparib (ABT-888), το Niraparib (MK-4827), το Rucaparib, το Talazoparib, τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ερευνητικά εργαλεία UPF1069 και PJ34, καθώς επίσης και τους αναστολείς της τανκυράσης και τους δείκτες του σηματοδοτικού μονοπατιού του Wnt, XAV93933 και IWR-1. Στην εικόνα 26, αναπαρίστανται σχηματικά η ανασταλτική δράση κάθε αναστολέα PARP, χαρτογραφημένη σε φυλογενετικό δένδρο ανθρώπινων ενζύμων PARP. Τα μεγέθη της κόκκινης σφαίρας είναι ανάλογα, σε λογαριθμική κλίμακα, με τιμές IC_{50} που κυμαίνονται από 1 nM έως 10 μ M. Οι κόκκινες κουκίδες απεικονίζουν τιμές IC_{50} υψηλότερες από 10 μ M. Οι μαύρες κουκίδες δείχνουν ότι δεν εντοπίστηκε αναστολή. Όπως απεικονίζεται, το Rucaparib παρουσιάζει μικρή εκλεκτικότητα.



Εικόνα 26. In vitro δραστηριότητες αναστολέων PARPs, χαρτογραφημένες σε φυλογενετικό δένδρο ανθρώπινων PARPs. Ann-Gerd Thorsell et al. Structural basis for potency and promiscuity in poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and tankyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**. 60(4): p. 1262-1271.

Η εκλεκτικότητα έναντι της ευρείας εκδηλούμενης αναστολής των PARP έχει δομική βάση. Η σύγκριση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου του Rucaparib συνδεδεμένο στο ενεργό κέντρο του PARP1 (ή ARTD1) και της ίδιας ένωσης στο ενεργό κέντρο της TNKS2 (ή ARTD6) (Εικόνα 27) φανερώνει διαφοροποιήσεις που υποδεικνύουν ότι το τελικό άκρο της δευτεροταγούς αμίνης μπορεί να διευκολύνει διαφορετικούς τρόπους αλληλεπίδρασης, που καθορίζονται από το εκάστοτε υπόστρωμα σύνδεσης [78]. Στην εικόνα 27 απεικονίζονται σε ένα διάγραμμα οι καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης για το Rucaparib για την εξαρτώμενη από τον αναστολέα PARP *in vitro* αναστολή πλήρους μήκους PARP1, -2, -3, και -10 και τα καταλυτικά θραύσματα της τανκυράσης-1 και -2. Επίσης, παρουσιάζεται η κρυσταλλική δομή του Rucaparib δεσμευμένη στον PARP-1 (ροζ) και στην TNKS-2 (πορτοκαλί, PDB 4BJC).



Εικόνα 27. Το Rucaparib δεν είναι εκλεκτικός αναστολέας, Ann-Gerd Thorsell et al. Structural basis for potency and promiscuity in poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and tankyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**, 60(4): p. 1262-1271.

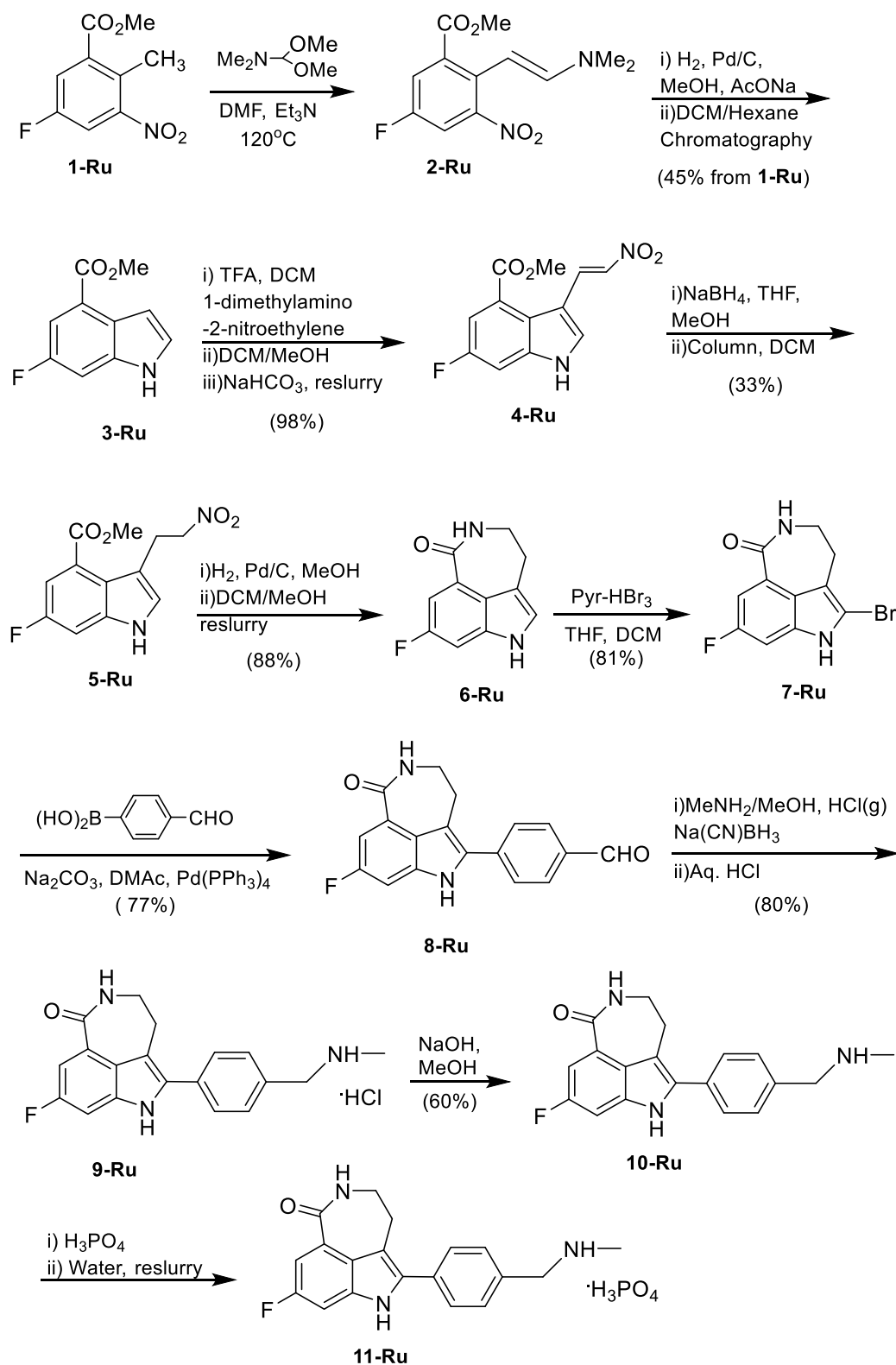
2.8.4. ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ RUCAPARIB

2.8.4.1. Φαρμακοχημική Πορεία Σύνθεσης του Rucaparib

Ενώ η συνθετική οδός, όπως απεικονίζεται στο σχήμα 1, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς από την Agouron & Cancer Research για την παρασκευή 2 kg φωσφορικού άλατος του Rucaparib για χρήση σε προκλινικές και πρώιμες κλινικές μελέτες, η εταιρεία αντιμετώπισε μία σειρά προκλήσεων για την παρασκευή μεγαλύτερων ποσοτήτων του φαρμάκου (7kg). Αυτές ήταν οι εξής:

1. Παρόλο που η παρασκευή του ινδολικού παραγώγου **3-Ru** από το **1-Ru** είχε προηγουμένως επιτευχθεί, η επανεκτέλεση της αντίδρασης σε μεγαλύτερη κλίμακα κατέδειξε ένα εξώθερμο συμβάν στη θερμοκρασία αντίδρασης κατά τη διάρκεια του σχηματισμού της εναμίνης κατά Leimgruber-Batcho (μετατροπή **2-Ru** σε **3-Ru**), με συνέπεια το σχηματισμό παραπροϊόντων.
2. Η αναγωγή του νιτροαλκενίου **4-Ru** στο **5-Ru** δεν είχε καλή απόδοση σε μεγάλη κλίμακα και προέκυψε η αναγκαιότητα για καθαρισμό της ένωσης **5-Ru** με χρωματογραφία στήλης.
3. Η σύζευξη Suzuki μεταξύ της ένωσης **7-Ru** και του βορονικού οξέος ήταν ανεπιτυχής και απαιτήθηκε πρόσθετη ποσότητα καταλύτη.
4. Η δημιουργία HCN κατά τη διάρκεια της αναγωγικής αμίνωσης της αλδεΐδης **8-Ru**, ως είναι φυσικό, ήταν αποτρεπτική και ως εκ τούτου αναζητήθηκαν εναλλακτικές πειραματικές συνθήκες.
5. Το φωσφορικό άλας **11-Ru** χορηγήθηκε αρχικά ως ενδοφλέβιο σκεύασμα κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών Φάσης I, ωστόσο απαιτήθηκε η ανάπτυξη ενός από στόματος φαρμάκου, γεγονός που προϋπόθετε ένα άλλου τύπου άλας. Μετά

από εργασία διαλογής και αξιολόγησης, το (S)-καμφοροσουλφονικό άλας ((S) - CSA) επιλέχθηκε για τη σύνθεση δισκίων και αυτό εκ των πραγμάτων σήμαινε την εύρεση νέας διαδικασίας κρυστάλλωσης API [144].



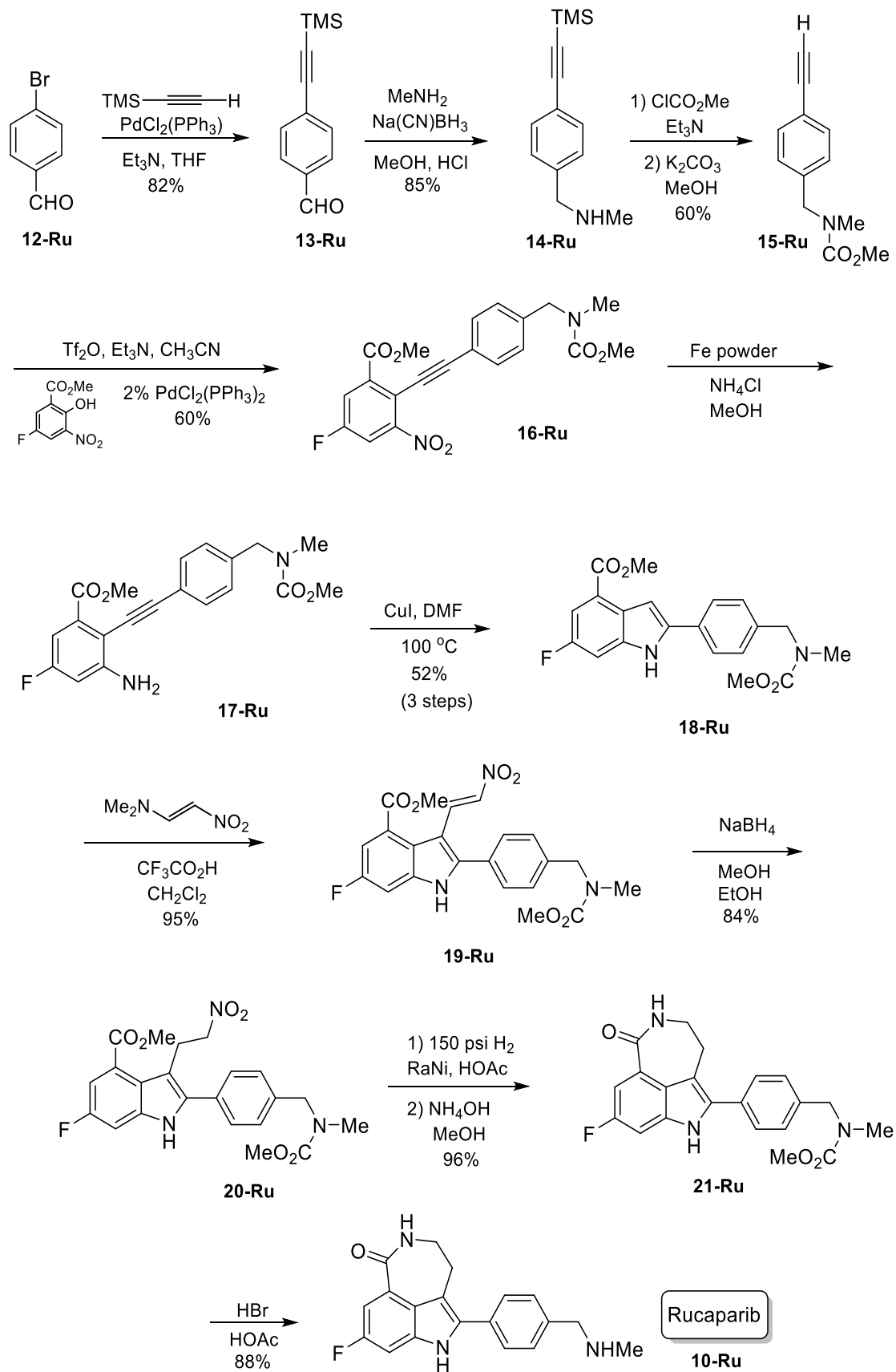
Σχήμα 1. Φαρμακευτική συνθετική πορεία του Rucaparib (Agouron & Cancer Research).

2.8.4.2. Εναλλακτική Συνθετική πορεία του Rucaparib από την Agouron C.R.

Η πρώτη συνθετική πορεία του Rucaparib που διενεργήθηκε σε μεγάλη κλίμακα, είναι αυτή που περιγράφεται σε ένα δίπλωμα ευρεσιτεχνίας του 2008 που κατατέθηκε από την εταιρεία Agouron (Σχήμα 2). Οι εφευρέτες δεν παρέχουν λεπτομέρειες για το λόγο για τον οποίο διερευνήθηκε μια εναλλακτική συνθετική πορεία του, πέρα από το ότι η αρχική συνθετική πορεία (Σχήμα 1) ήταν πολλών σταδίων και γραμμική [145]. Η συνθετική πορεία που σκιαγραφείται στην Εικόνα 28 είναι 10 βημάτων και παρέχει το Rucaparib σε ολική απόδοση μόλις ~9%. Αν και αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι πιο συγκλίνουσα από την φαρμακοχημική οδό, με τη σύνθεση του ινδολίου **18-Ru** να γίνεται σε μεταγενέστερο στάδιο, η ανάγκη σύνθεσης του μοριακού δομικού συστατικού του ακετυλενίου και η χρήση ενός καρβαμιδικού άλατος ως προστατευτικής ομάδας αζώτου προσθέτει χημικά στάδια έναντι της αρχικής συνθετικής πορείας. Ως εκ τούτου, αυτή η πορεία δεν παρέχει σημαντική βελτίωση σε σχέση με την αρχική [76].

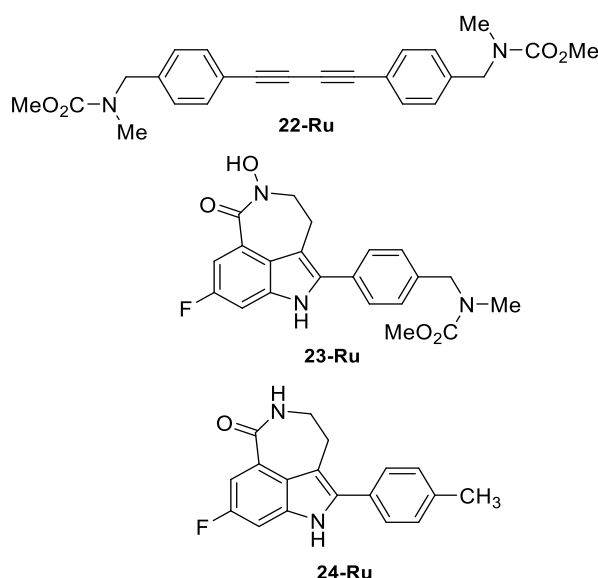
Σύμφωνα με την συνθετική αυτή πορεία, λοιπόν, η παρασκευή του αλκινίου **15-Ru** πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια από την 4-βρωμοβενζαλδεΐδη (**12-Ru**) μέσω διασταυρούμενης σύζευξης με Pd και TMS-ακετυλένιο για να δώσει την αλδεΐδη **13-Ru**, ακολουθούμενη από αναγωγική αμίνωση για να εισαχθεί η πλευρική αλυσίδα μεθυλαμίνης στο ενδιάμεσο **14-Ru**. Η προκύπτουσα δευτεροταγής αμίνη **14-Ru** προστατεύθηκε με χλωρομυρμηκικό μεθυλεστέρα και η ομάδα TMS απομακρύνθηκε με την επίδραση ανθρακικού καλίου για να δώσει το αλκίνιο **15-Ru** σε απόδοση 60% για τα δύο τελευταία στάδια.

Το απαιτούμενο τριφλικό της νιτροφαινόλης για τη σύζευξη Sonogashira δημιουργήθηκε με τριφλικό ανυδρίτη και τριαιθυλαμίνη σε MeCN και στο προκύπτον διάλυμα προστέθηκε το αλκίνιο **15-Ru**, καθώς και το διάλυμα PdCl₂(PPh₃)₂ σε MeCN στους 60°C. Αυτή η μέθοδος ελαχιστοποίησε τον σχηματισμό του διμερούς αλκινίου (**22-Ru** – Εικόνα 28). Η συν-κατάλυση του χαλκού, συχνά απαιτούμενη για συζεύξεις Sonogashira, παραλείφθηκε σε αυτό το πρωτόκολλο δεδομένου ότι μελέτες έδειξαν ότι η χρήση αλάτων του χαλκού αυξάνουν την ποσότητα διμερούς που σχηματίστηκε. Ακολούθως, το ακατέργαστο **16-Ru** ανάχθηκε στην αμίνη **17-Ru** με σκόνη σιδήρου ενεργοποιημένου με καταλυτική ποσότητα HCl. Η κυκλοποίηση προς το ινδόλιο **18-Ru** επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας καταλυτική ποσότητα CuI σε DMF στους 100 °C. Η ελεγχόμενη προσθήκη CH₂Cl₂/εξάνιο προς απομάκρυνση του διμερούς **22-Ru** έδωσε το ινδόλιο **18-Ru** σε απόδοση 52% σε 3 στάδια.



Σχήμα 2. Εναλλακτική συνθετική πορεία από την Agouron Cancer Research (2008).

Η σύνθεση του τρικυκλικού δομικού στοιχείου του Rucaparib διενεργήθηκε με την αντίδραση του ινδολίου **18-Ru** με το 1-(διμεθυλαμινο)-2-νιτροαιθυλένιο και την επίδραση με TFA για να δώσει το νιτροαλκένιο **19-Ru** σε απόδοση 95%, το οποίο στη συνέχεια ανάχθηκε στο νιτροαλκάνιο **20-Ru** σε απόδοση 84%, με NaBH₄ σε μεγάλους όγκους συστήματος διαλυτών 9:1 EtOH : MeOH λόγω της φτωχής διαλυτότητας των **19-** και **20-Ru**. Για την αναγωγική κυκλοποίηση του **20-Ru** προς την ε-λακτάμη **21-Ru** δοκιμάστηκαν αρκετές συνθήκες πριν διαπιστωθεί ότι το νικέλιο Raney σε HOAc έδωσε καθαρή αναγωγή, επιτρέποντας καθαρή κυκλοποίηση υπό βασικές συνθήκες σε απόδοση 96-98%. Χρησιμοποιώντας Pd/C ή Pt/C, η N-υδροξυλακτάμη **23-Ru** ήταν το κύριο παραπροϊόν υπό ουδέτερες συνθήκες ενώ το προϊόν αναγωγής του δεσμού C-N, **24-Ru**, σχηματίστηκε υπό όξινες συνθήκες. [76]

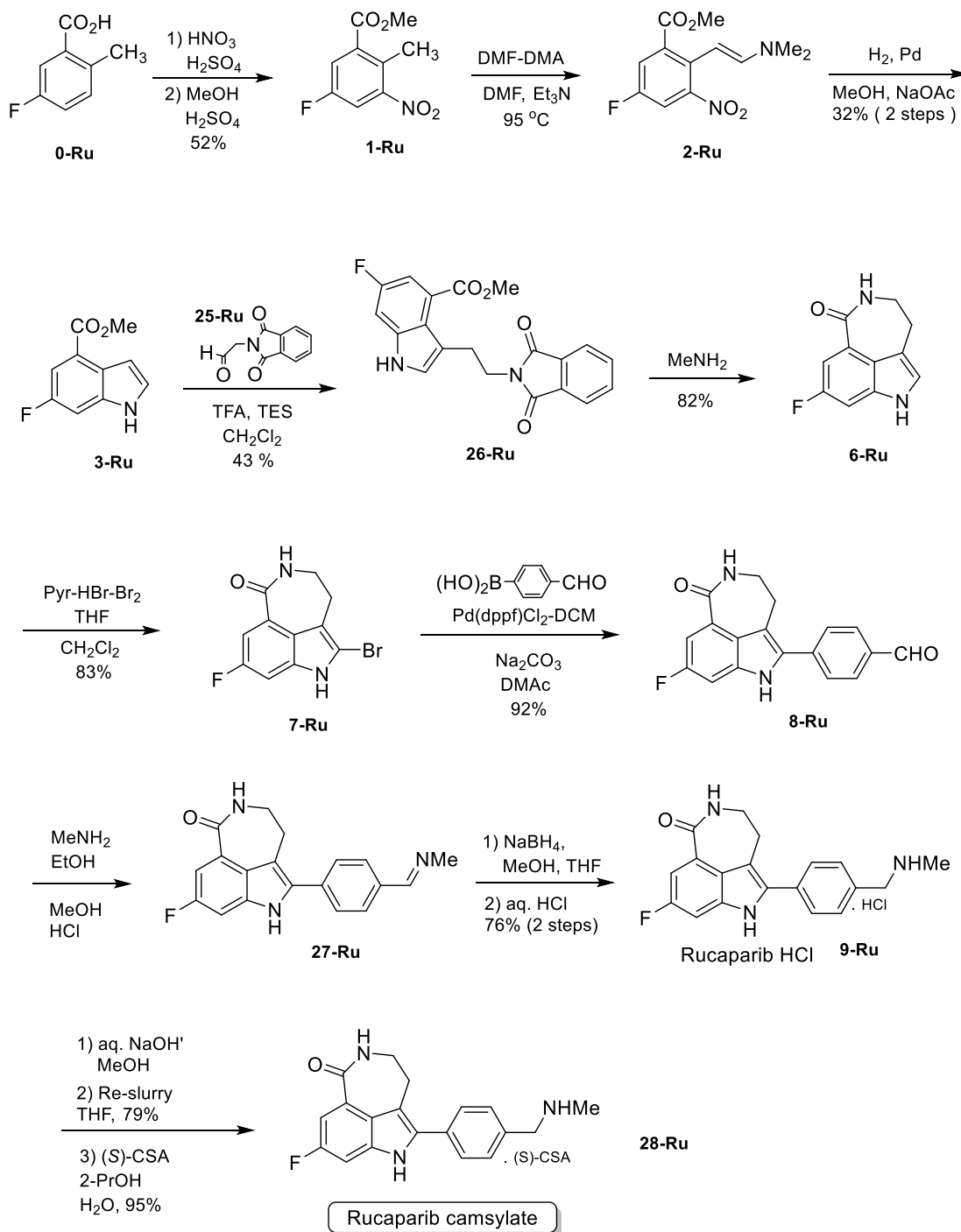


Εικόνα 28. Τα 3 κύρια παραπροϊόντα κατά την εναλλακτική συνθετική πορεία του Rucaparib από την Agouron Cancer Research (Πατέντα 2008). David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, **2017**, 21 (9), pp 1227–1244

Η προστατευτική καρβαμιδική ομάδα του **21-Ru** απομακρύνθηκε χρησιμοποιώντας HBr/HOAc σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να δώσει το Rucaparib σε απόδοση 88%. Δοκιμάστηκαν και αλκαλικές συνθήκες για αποπροστασία, αλλά οδήγησαν σε πολύ υψηλά επίπεδα υδρόλυσης της λακτάμης και επομένως απορρίφθηκαν.

2.8.4.3. Τροποποιημένη Πορεία σύνθεσης από την Pfizer

Προκειμένου να ξεπεραστούν τα συνθετικά προβλήματα που προέκυψαν κατά την κλιμάκωση της φαρμακοχημικής συνθετικής πορείας που προτάθηκε από την Agouron Cancer Research (παράγραφος 2.8.4.1.), η Pfizer τροποποίησε ορισμένα στάδια της αρχικής συνθετικής πορείας και πρότεινε μία τελική συνθετική πορεία, με στόχο την αντιμετώπιση των προβλημάτων (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Τροποποιημένη πορεία σύνθεσης από την Pfizer.

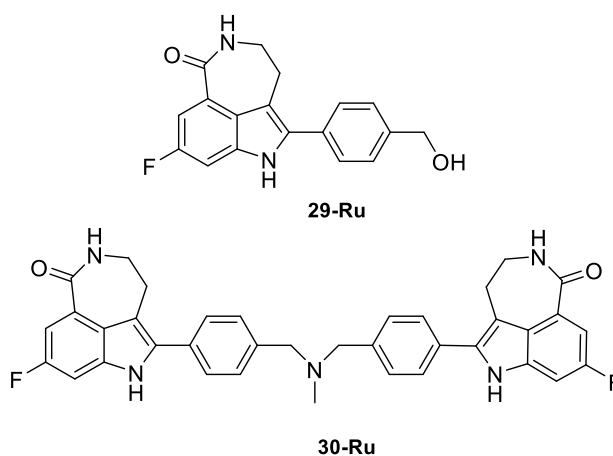
Πιο συγκεκριμένα:

1. Για την αντιμετώπιση του εξώθερμου φαινομένου κατά τη σύνθεση της εναμίνης **2-Ru** δοκιμάστηκαν διάφορα αντιδραστήρια, που ωστόσο είτε οδηγούσαν στο σχηματισμό παραπροϊόντων που δυσχέραιναν την αναγωγή της ενδιάμεσης ένωσης **2-Ru** (Αντιδραστήριο Bredereck), είτε προκαλούσαν εξώθερμη αντίδραση σε χαμηλότερη θερμοκρασία και δεν ήταν διαθέσιμο εμπορικά σε μεγάλες ποσότητες [Τρις(διμεθυλαμινο)μεθάνιο]. Ως εκ τούτου, οι ερευνητές έκανα χρήση

του αρχικού αντιδραστήριου (DMF-DMA), μειώνοντας όμως την θερμοκρασία της αντίδρασης από 120 σε 95 °C και απομακρύνοντας κατόπιν τον διαλύτη υπό κενό.

2. Η απόδοση ενισχύθηκε διαλύοντας το ινδόλιο **3-Ru**, την αλδεΐδη και το τριαιθυλοσιλάνιο σε DCM, προσθέτοντας κατόπιν TFA και αφήνοντας το μίγμα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για ώρες. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση, αποπροστασία του φθαλιμιδίου και εκ νέου ανακρυστάλλωση.
3. Για την βελτίωση της αντίδρασης Suzuki, αξιοποιήθηκε, όπως προέκυψε από σειρά πειραμάτων, ο βέλτιστος καταλύτης $[Pd(dffp)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2]$ και κρίθηκε σκόπιμο η ενεργοποίηση του καταλύτη με το υπόστρωμα και η ενεργοποίηση του βορονικού οξέος να πραγματοποιηθούν σε ξεχωριστά σκεύη. Όλα αυτά οδήγησαν την απόδοση στο 92%.
4. Τέλος, κατάλληλο αντιδραστήριο για την αντικατάσταση του $Na(CN)BH_3$ προς αποφυγή έκλυσης HCN κατά την παρασκευή της ένωσης **9-Ru**, θεωρήθηκε το $NaBH_4$, μετά από ανακρυστάλλωση της ένωσης **27-Ru** με MeOH, προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα αλδεΐδης **8-Ru** που δύνανται να μετατρέπονται στην αντίστοιχη αλκοόλη **29-Ru** παρουσία $NaBH_4$, δυσχεραίνοντας έτσι τον καθαρισμό του τελικού προϊόντος **9-Ru**.

Η συνολική απόδοση της αντίδρασης βελτιώθηκε από 1,3% σε 2,9%.

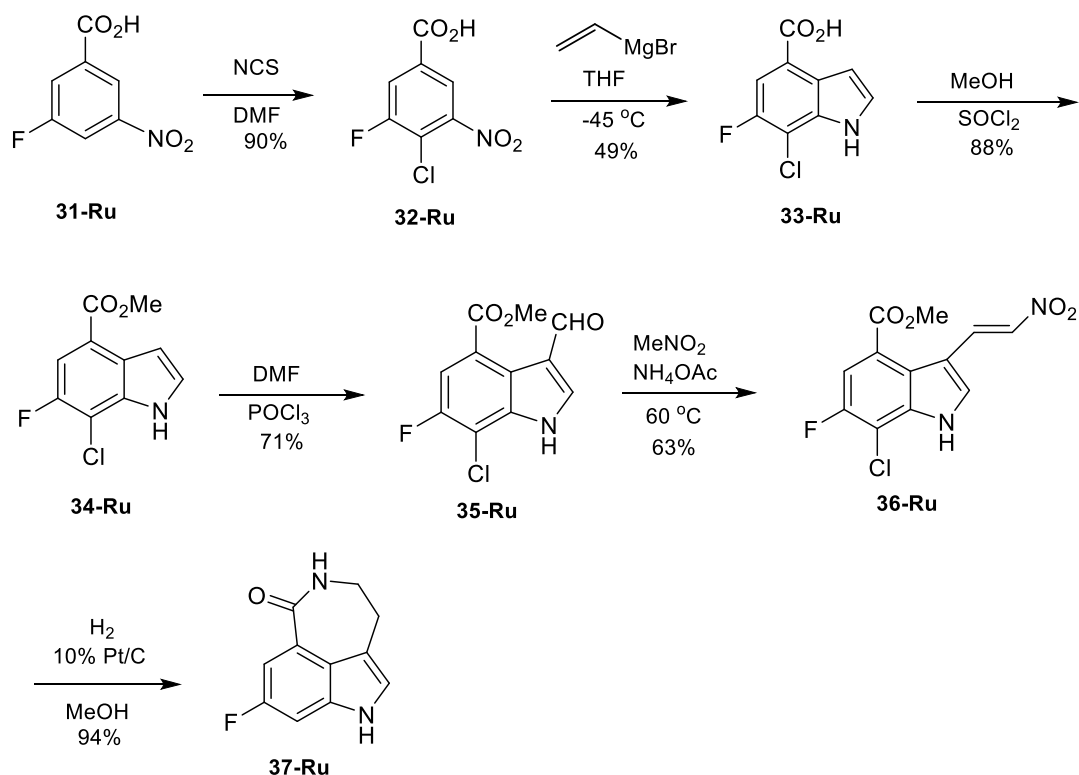


Εικόνα 29. Τα κύρια παραπροϊόντα της τροποποιημένης συνθετικής πορείας της Pfizer. David L Hughes, Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, **2017**, 21 (9), pp 1227–1244

2.8.4.4. Εναλλακτική Πορεία σύνθεσης του Τρικυκλικού Ενδιαμέσου από την Shijiazhuang Biotechnology

Στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας CN10600853036 που κατατέθηκε από την κινέζικη εταιρεία Shijiazhuang Biotechnology περιγράφεται μία εναλλακτική συνθετική οδό

προς το τρικυλικό ενδιαμέσο του ινδολίου **37-Ru**, με βάση τη μέθοδο σύνθεσης ινδολίου κατά Bartoli-Dobbs (Σχήμα 4). Η αλληλουχία αυτή των 6 βημάτων παρέχει την ινδολαζεπίνη **37-Ru** σε απόδοση 16% [146]. Σύμφωνα με αυτήν την πειραματική πορεία, η σύνθεση ξεκινά με χλωρίωση του 3-φθορο-5-νιτροβενζοϊκού οξέος **31-Ru** με N-χλωροηλεκτριμίδιο (NCS) σε DMF για να δώσει το 4-χλωρο-3-φθορο-5-νιτροβενζοϊκό οξύ **32-Ru** σε απόδοση 88%. Η χλωρίωση λαμβάνει χώρα στη θέση μεταξύ της NO₂-ομάδας και του ατόμου φθορίου, κατευθύνοντας με αυτό τον τρόπο την στερεο-εκλεκτικότητα στην αντίδραση κυκλοποίησης, μία παραλλαγή που αναπτύχθηκε από τον Dobbs [98]. Η σύνθεση του ινδολίου διεξήχθη με τέσσερα ισοδύναμα βρωμιούχου βινυλομαγνησίου σε θερμοκρασίες που κυμάνθηκαν από -10 έως -45°C, παρέχοντας το προϊόν ινδολίου **33-Ru** με απόδοση 41-52% μετά από ανακρυστάλλωση με EtOAc. Μετά τον σχηματισμό του μεθυλεστέρα **34-Ru**, η αντίδραση φορμυλίωσης Vilsmeier-Haack έδωσε την αλδεΐδη **35-Ru** σε απόδοση 71%. Η συμπύκνωση της αλδεΐδης αυτής με καθαρό νιτρομεθάνιο και με τη μεσολάβηση οξικού αμμωνίου, έδωσε το νιτροαλκένιο **36-Ru** σε απόδοση 63%. Η υδρογόνωση χρησιμοποιώντας 10% Pt σε άνθρακα προκάλεσε αναγωγή του διπλού δεσμού, απομακρύνθηκε αναγωγικά το άτομο του Cl και επιπλέον ανάχθηκε η νιτροομάδα σε αμινομάδα για να διευκολύνει το κλείσιμο του δακτυλίου στην αντίστοιχη λακτάμη και να προκύψει το τρικυλικό ινδόλιο **37-Ru** σε απόδοση 94%.

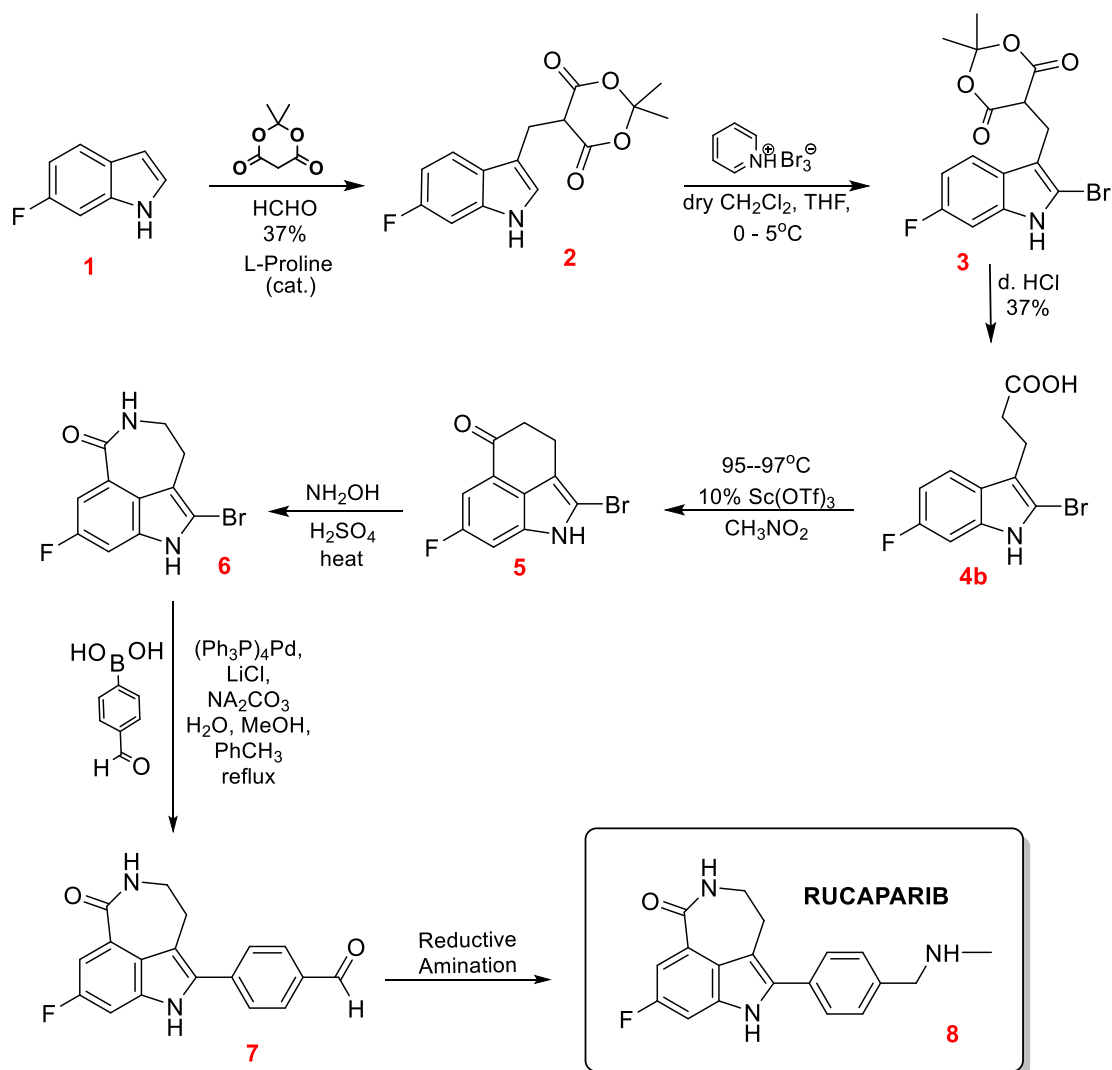


Σχήμα 4. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του τρικυλικού ενδιαμέσου από την Shijiazhuang Biotechnology.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

3.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ RUCAPARIB

3.1.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ (ΠΟΡΕΙΑ I)



Σχήμα 5. Αρχική βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία του Rucaparib, όπως σχεδιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου X3-210

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα του σκοπού της εργασίας, η βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία που αρχικά σχεδιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας, συνίσταται από 7 συνθετικά στάδια, θεωρητικά υψηλής απόδοσης το καθένα, και ως αρχική ένωση - υπόστρωμα **1** αξιοποιείται το 6-Φθορο-ινδόλιο, ένα «εύχρηστο» αντιδραστήριο, σχετικά χαμηλού κόστους.

Η παραπάνω συνθετική πορεία συνοψίζεται ως εξής:

1. Στο αρχικό υπόστρωμα του 6-Φθόρο-ινδολίου προσαρτάται, μέσω μίας αντίδρασης τύπου Michael, στην πλέον δραστική θέση (C3) το Meldrum's Acid (2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónη) παρουσία φορμαλδεΰδης μέσω ενός καταλυτικού κύκλου της L-Προλίνης.
2. Η προκύπτουσα ένωση **2** υπόκειται σε βρωμίωση, στη θέση C2 του ινδολίου, με Pyridinium Perbromide σε μείγμα διαλυτών (DCM και THF), σε χαμηλή σχετικά θερμοκρασία (0-5°C).
3. Στη συνέχεια, η ένωση **3** μέσω μίας αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης με αντιδρών το HCl μετατρέπεται σε ένα παράγωγο του 3-ινδολοπροπιονικού οξέος **4**.
4. Η ένωση **4** μέσω μίας αντίδρασης ενδομοριακής κυκλοαφυδάτωσης, καταλυόμενη από τριφλικό σκάνδιο σε νιτρομεθάνιο ή παρουσία πολυφωσφορικού οξέος οδηγεί στην τρικυκλική ένωση **5**.
5. Η ένωση **5** στο τμήμα της κυκλοεξανόνης υφίσταται κατόπιν μία αντίδραση αναδιάταξης κατά Beckmann, δηλαδή αντιδρά αρχικά με NH₂OH για να δώσει ένα ενδιάμεσο οξίμη, το οποίο στη συνέχεια υφίσταται κατεργασία με H₂SO₄ υπό θέρμανση για να δώσει τη λακτάμη που χαρακτηρίζει την τελική ένωση της ινδολαζεπίνης **6**.
6. Κατόπιν, στη θέση του ατόμου βρωμίου του ινδολικού συστήματος **6** προσαρτάται μία βενζαλδεΰδη μέσω μίας αντίδρασης σύζευξης Suzuki της ένωσης **6** με το 4-φορμυλοβενζυλο βορονικό οξύ, παρέχοντας το προϊόν σύζευξης **7**.
7. Τέλος, η ένωση **7** αντιδρώντας με μεθυλαμίνη μέσω αναγωγικής αμίνωσης ή ακολουθώντας το ανάλογο συνθετικό στάδιο της βελτιστοποιημένης συνθετικής πορείας της Pfizer (Σχήμα 3) δίνει την **8**.

3.1.2. ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ-1

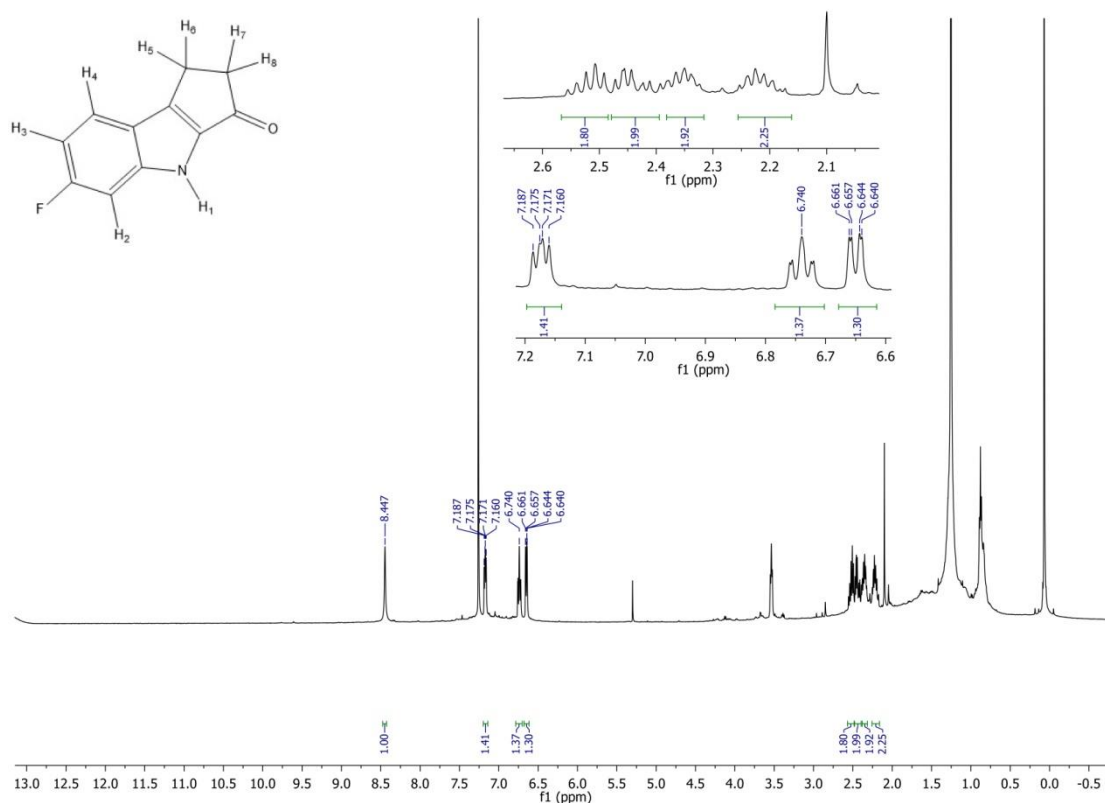
Στην παρούσα υποενότητα, γίνεται αναφορά στις δυσκολίες που κληθήκαμε να αντιμετωπίσουμε ως ερευνητική ομάδα κατά την εργαστηριακή εφαρμογή της πειραματικής πορείας του σχήματος 1. Η αναλυτική περιγραφή των επιμέρους αντιδράσεων (μηχανισμοί, φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός, εργαστηριακό προφίλ) πραγματοποιείται στην υποενότητα 3.1.6., ενώ η ανάλυση των πειραματικών συνθηκών στο κεφάλαιο 4.

3.1.2.1. Προκλήσεις στον σχηματισμό του Οξέος 4b

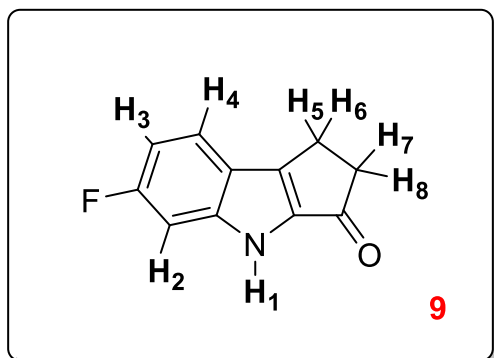
Το πρώτο πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε ήταν η απευθείας σύνθεση του καρβοξυλικού οξέος **4b** από το βρωμιωμένο προϊόν προσθήκης του Meldrum's Acid **3**. Πιο συγκεκριμένα, για τον απευθείας σχηματισμό της ένωσης **4b** εφαρμόστηκαν 2 μέθοδοι, εκ των οποίων η πρώτη περιελάμβανε την κατεργασία της ένωσης **3** με

Friedel-Crafts καταλυόμενη από $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, στην θερμική πυρόλυση του Meldrum's Acid καθώς και στην κατεργασία με PPA (έναν πολύ κοινό παράγοντα κυκλοποίησης). Ωστόσο, σε καμία από αυτές τις αντιδράσεις δεν απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν **5** και επομένως οι παραπάνω πειραματικές συνθήκες εφαρμόστηκαν και στο υπόστρωμα **4b**, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ενδομοριακή κυκλοποίηση του 3-ινδολοπτοπιονικού οξέος στον C4' άνθρακα του Ινδολίου. Παρόλα αυτά, και με αυτό το υπόστρωμα δεν συντέθηκε η επιθυμητή κυκλοεξανόνη **5**.

Εντούτοις, στο μεγαλύτερο μέρος των παραπάνω αντιδράσεων παρατηρήθηκε η σύνθεση ενός κοινού παραπροϊόντος, αυτού της κυκλοπεντανόνης **9**, υποδεικνύοντας ότι αφενός πραγματοποιείται ενδομοριακή κυκλοποίηση, αφετέρου στον C2' άνθρακα του ινδολίου με ταυτόχρονη απομάκρυνση του ατόμου του βρωμίου από αυτήν τη θέση. Θεωρήθηκε ότι παρόλο που ο σχηματισμός της κυκλοεξανόνης ευνοείται θερμοδυναμικά έναντι της κυκλοπεντανόνης, το βρώμιο λειτουργεί ως καλή αποχωρούσα ομάδα δίνοντας την ένωση **9**. Παρακάτω, δίνεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε διαλύτη CDCl_3 και ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της κυκλοπεντανόνης **9**.

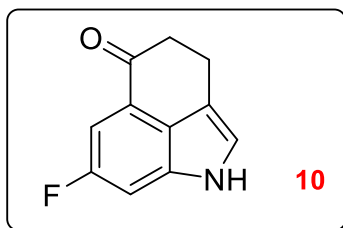


Σχήμα 7. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της κυκλοπεντανόνης **9** (κύριο παραπροϊόν), σε διαλύτη CDCl_3 .



$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 2.35 (m, H-5), 2.51 (m, H-6), 6.65 (dd, $J=9$ Hz, 1H, H-3), 6.74 (ddd, $J=10$ Hz, 1H, H-4), 7.17 (q, $J=8$ Hz, 1H, H-2), 8.44 (s, 1H, H-1) (ppm)

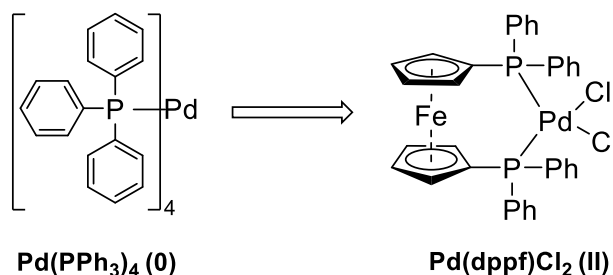
Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν ευθύνεται εν μέρει το βρώμιο στη θέση 2' για το παραπροϊόν **9**, επιχειρήθηκε αντίδραση κυκλοποίησης με υποστρώμα την ένωση **2** καταλυόμενη από $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ ώστε να σχηματιστεί το ενδιάμεσο **10**. Παρόλα αυτά, λάβαμε εκ νέου την κυκλοπεντανόνη **9**, έναντι της **10** και οι προσπάθειές μας στράφηκαν στην προστασία του C2' του ινδολίου και την υιοθέτηση μίας επιμέρους τροποποιημένης συνθετικής πορείας, όπου η αντίδραση σύζευξης Suzuki θα προηγείται της αντίδρασης κυκλοποίησης.



3.1.2.3. Προκλήσεις στην Αντίδραση Σύζευξης Suzuki

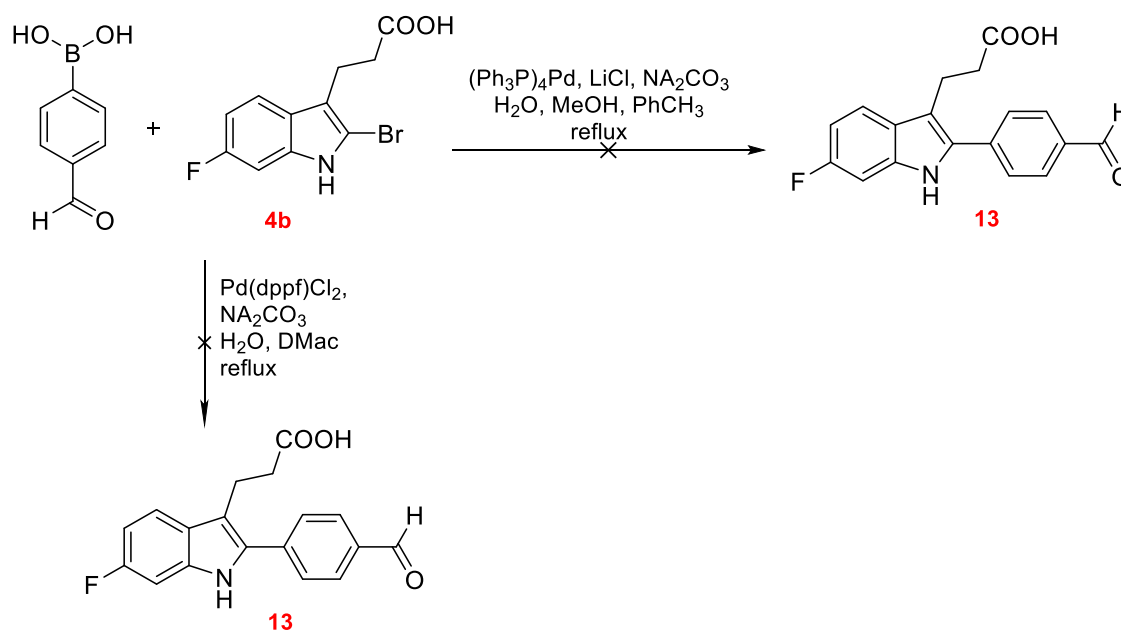
Όπως και στις 2 προηγούμενες περιπτώσεις, έτσι και κατά την εφαρμογή της αντίδρασης σύζευξης Suzuki-Miyaura, έγινε χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων και αντιδραστηρίων προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι ανεξαρτήτως υποστρώματος (είτε αυτό ήταν η ένωση **3**, είτε η **4a** ή η **4b**), η αντίδραση σύζευξης με το 4-φορμυλοβενζυλο βορονικό οξύ δεν λάμβανε χώρα με καταλύτη το τετρακίς(τριφαινυλοφώσφινο)παλλάδιο (0) ανεξαρτήτως συνθηκών. Δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί διαλυτών και βάσεων, όπως Na_2CO_3 σε διαλύτη N,N-διμεθυλοακεταμίδιο (DMAc), Na_2CO_3 σε ένα σύστημα διαλυτών Τολουολίου : Μεθανόλης (PhCH_3 : MeOH) 2:1 καθώς και KF σε υδατικό διάλυμα 2-προπανόλης (Αναλυτικά στο κεφάλαιο 4). Επομένως, καταφύγαμε στη χρήση ενός εναλλακτικού, ισχυρότερου και διαφορετικής οξειδωσης καταλύτη, του [1,1'-Δις(διφαινυλοφώσφινο)φερροκένιο]διχλωροπαλλάδιο (II) (Σχήμα 7). Όντως, με χρήση

αυτού του καταλύτη σε διαλύτη DMAc, με βάση το Na_2CO_3 και υπόστρωμα τον εστέρα **4a**, σχηματίστηκε το επιθυμητό προϊόν σε απόδοση 73%.



Σχήμα 8. Αριστερά ο καταλύτης τετρακίς(τριφαινυλοφώσφινο)παλλάδιο (0) και δεξιά ο [1,1'-Δις(διφαινυλοφώσφινο)φερροκένιο]διχλωροπαλλάδιο (II).

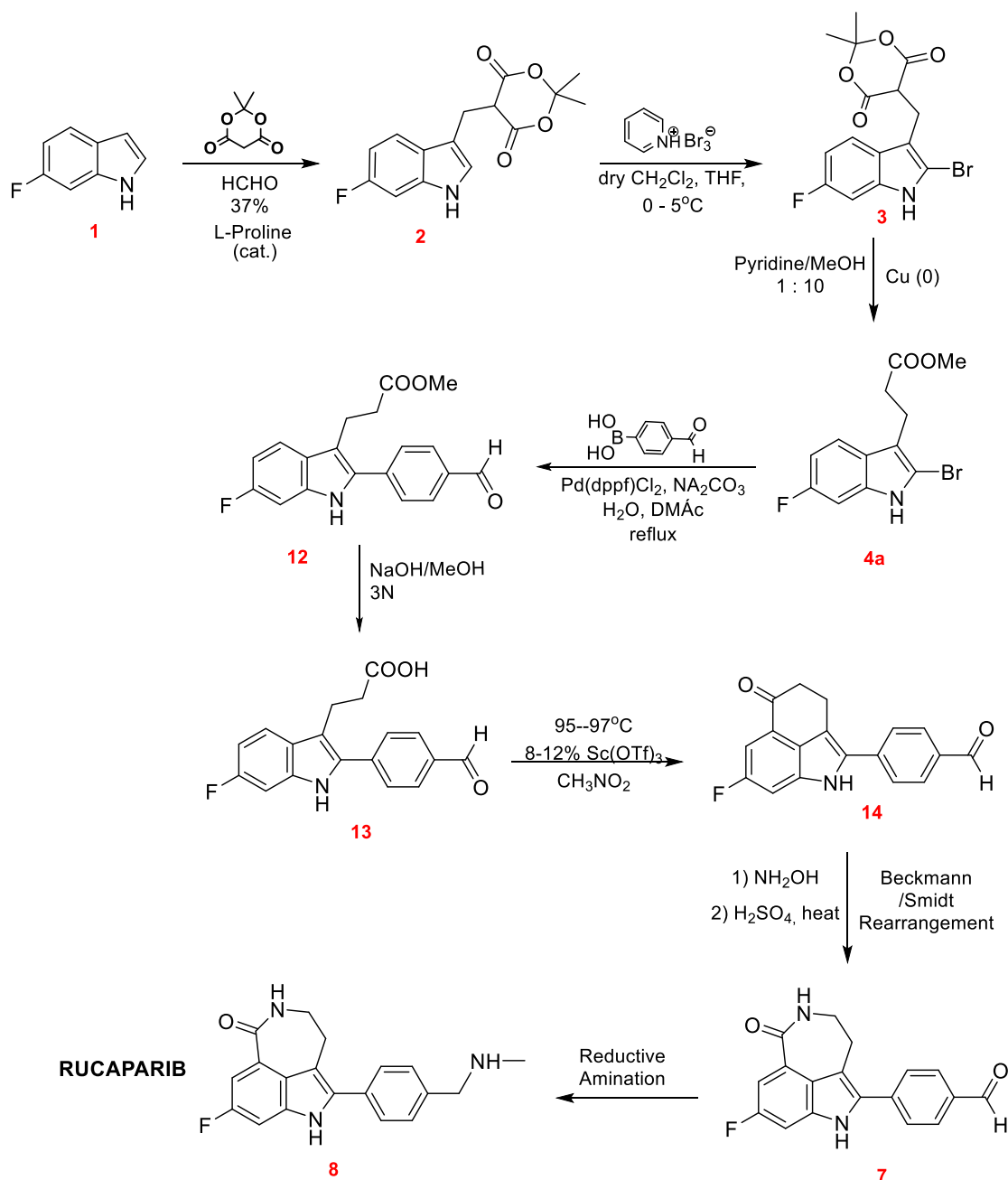
Ωστόσο, ακόμα και με αλλαγή του καταλύτη, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση σύζευξης Suzuki δε λαμβάνει χώρα παρουσία καρβοξυλομάδας ή πραγματοποιείται δίνοντας την επιθυμητή ένωση **13** σε ίχνη (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Η αντίδραση σύζευξης κατά Suzuki-Miyaura δεν πραγματοποιείται στο υπόστρωμα του οξέος **4b** υπό τις συνθήκες που αναλύονται παραπάνω.

3.1.3. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ I (ΠΟΡΕΙΑ II)

Εφαρμόζοντας όλες τις παραπάνω τροποποιήσεις, υιοθετήθηκε η παρακάτω πειραματική πορεία, με την αντίδραση εστεροποίησης να ακολουθεί την αντίδραση βρωμίωσης του ενδιάμεσου **2**, κατόπιν να πραγματοποιείται η αντίδραση σύζευξης Suzuki με χρήση του $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ σε διαλύτη DMAc και έπειτα η υδρόλυση του εστέρα **12** προς το οξύ **13**. Η ενδομοριακή κυκλοαφυδάτωση καταλυόμενη από $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ της ένωσης **13**, αναμένεται να παράγει την κυκλοεξανόνη στη θέση C4' του Ινδολίου, εφόσον πλέον η θέση C2' του βρωμίου είναι κατειλημμένη από την ογκώδη ομάδα της βενζαλδεΐδης.



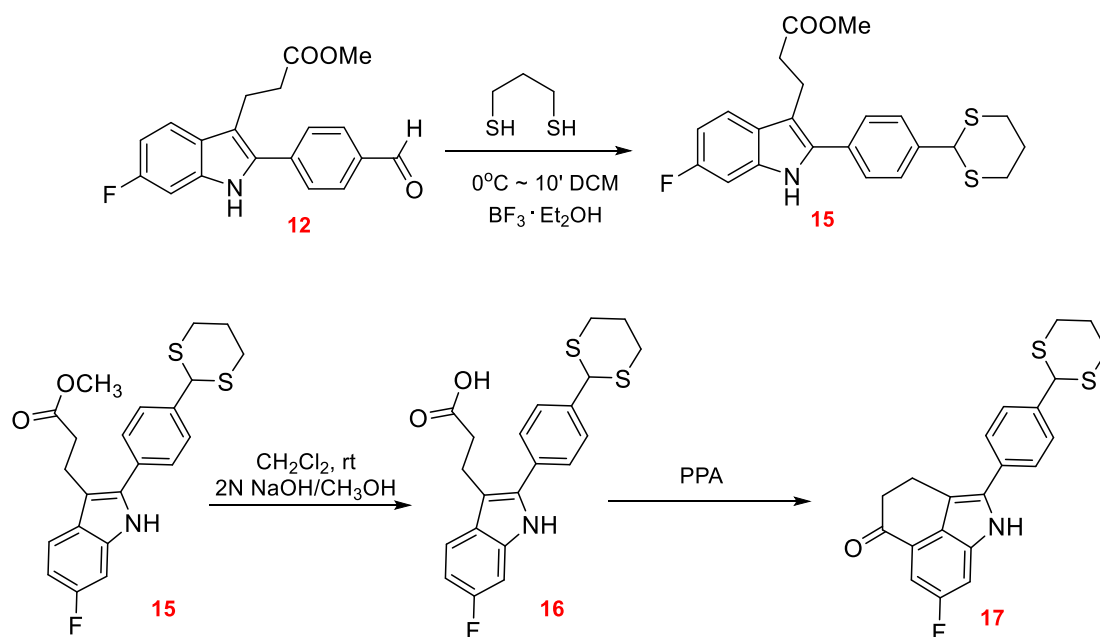
Σχήμα 10. Τροποποίηση της βελτιστοποιημένης συνθετικής πορείας του Rucaparib από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου X3-210

3.1.4. ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ II

Όπως θα αναλυθεί και παρακάτω, η Πορεία II θεωρήθηκε επιτυχής, εφόσον επετεύχθη, αν και σε μικρή απόδοση, η κυκλοποίηση της ένωσης **13** προς την **14**. Ωστόσο, κι αυτή συνοδεύεται από προκλήσεις που αφορούν τις ακόλουθες αντιδράσεις μέχρι τη σύνθεση του τελικού προϊόντος **8**, καθώς και τη χαμηλή απόδοση της αντίδρασης κυκλοποίησης.

3.1.4.1. Προκλήσεις στην Αντίδραση Σύνθεσης της Λακτάμης – Προστασία Καρβονυλίου

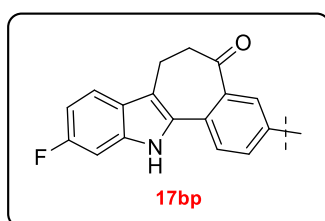
Με την επίτευξη της αντίδρασης κυκλοποίησης και την επιτυχή σύνθεση και ταυτοποίηση της ένωσης **14**, έγινε εμφανές ότι η ύπαρξη δύο ομάδων καρβονυλίου θα δημιουργούσε πρόβλημα στο επακόλουθο στάδιο σύνθεσης της λακτάμης **7** μέσω αναδιάταξης Beckmann/Schmidt. Ως εκ τούτου, κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη 2 επιπλέον βημάτων προστασίας/αποπροστασίας της μίας καρβονυλομάδας μέσω σχηματισμού θειακετάλης.



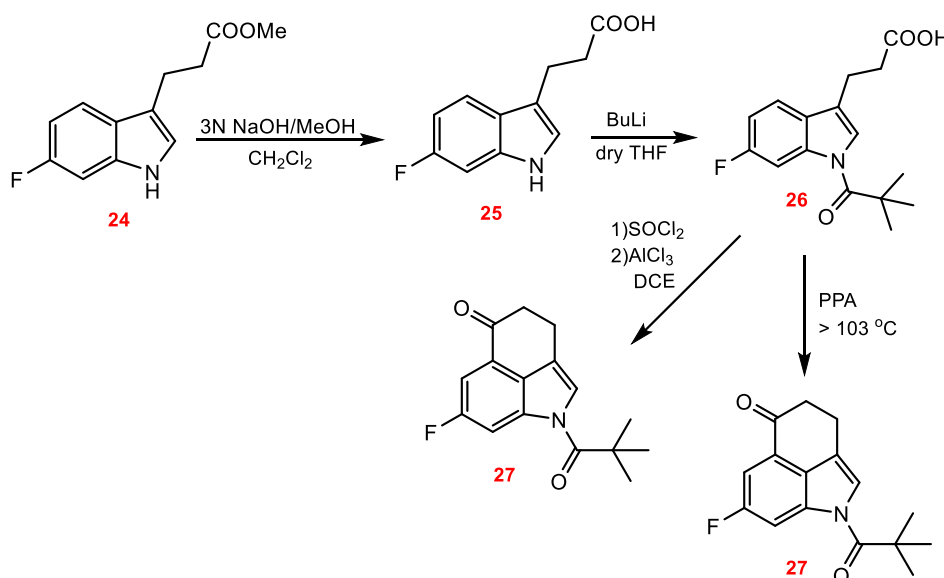
Σχήμα 11. Αντίδραση σύνθεσης θειακετάλης **15** και αντιδράσεις προκύπτοντος προϊόντος προς τις ενώσεις **16** και **17**.

Ο σχηματισμός της θειακετάλης **15** επετεύχθη με κατεργασία της ένωσης **12** με 1,3-προπανοδιθειόλη, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ και CH_2Cl_2 σε θερμοκρασία δωματίου για 15 ώρες, κατόπιν διοχέτευσης HCl στο διάλυμα αντίδρασης για 10 λεπτά, υπό πάγο (σε θερμοκρασία 0°C) και ο χαρακτηρισμός της ένωσης παρουσιάζεται στην υποενότητα

3.1.6. ενώ η πειραματική πορεία στην ενότητα 4.2.9. Για την αντίδραση υδρόλυσης της ένωσης **15** προς την ένωση **16** ακολουθήθηκαν οι ίδιες πειραματικές συνθήκες με εκείνες της μετατροπής της ένωσης **4a** προς την **4b** (και της ένωσης **12** προς την **13**), με την ένωση **15** να κατεργάζεται με μεθανολικό διάλυμα NaOH σε θερμοκρασία δωματίου, αποδίδοντας ποσοτικά το οξύ **16**. Για την μετατροπή της προκύπτουσας ένωσης **16** προς το επιθυμητό προϊόν ενδομοριακής κυκλοαφυδάτωσης **17**, η ένωση **16** υπέστη κατεργασία με τον ισχυρό παράγοντα κυκλοποίησης PPA, σε υψηλή θερμοκρασία (> 103 °C) για 24 ώρες. Ωστόσο, δεν ανιχνεύτηκε το επιθυμητό προϊόν, και εν αντιθέσει λάβαμε ένα μείγμα παραπροϊόντων, τα οποία δεν μπορούσαν να ταυτοποιηθούν επακριβώς λόγω των μικρών αρχικών ποσοτήτων του αντιδρώντος **16** (κάτω από 20 mg). Από το ¹H-MNR του crude μείγματος παρατηρήθηκε ότι ένα από τα παραπροϊόντα είναι το κυκλοποιημένο μόριο που προκύπτει από την ενδομοριακή αντίδραση ακυλο-υποκατάστασης στην ορθο-θέση του πλευρικού βενζολικού δακτυλίου.



3.1.4.2. Προσασία του Ινδολικού Αζώτου

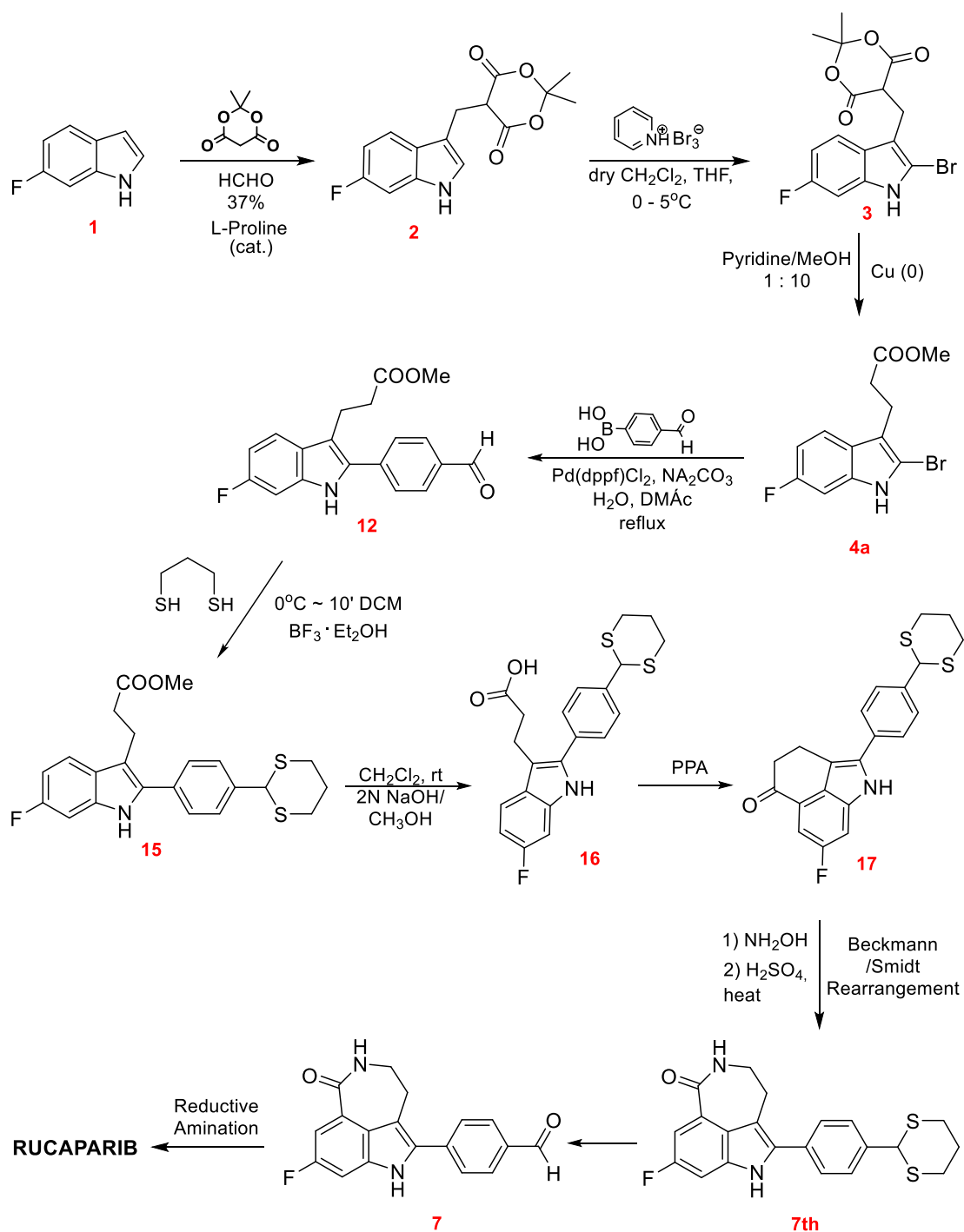


Σχήμα 12. Αντιδράσεις προστασίας του Αζώτου του Ινδολίου (ένωση **26**) και προσπάθειες σύνθεσης του προϊόντος ενδομοριακής κυκλοαφυδάτωσης **27**.

Η μη επίτευξη σύνθεσης της ένωσης **17** και η μικρή απόδοση σύνθεσης της ένωσης **14**, οδήγησε στην αναζήτηση εναλλακτικών επιμέρους συνθετικών οδών.

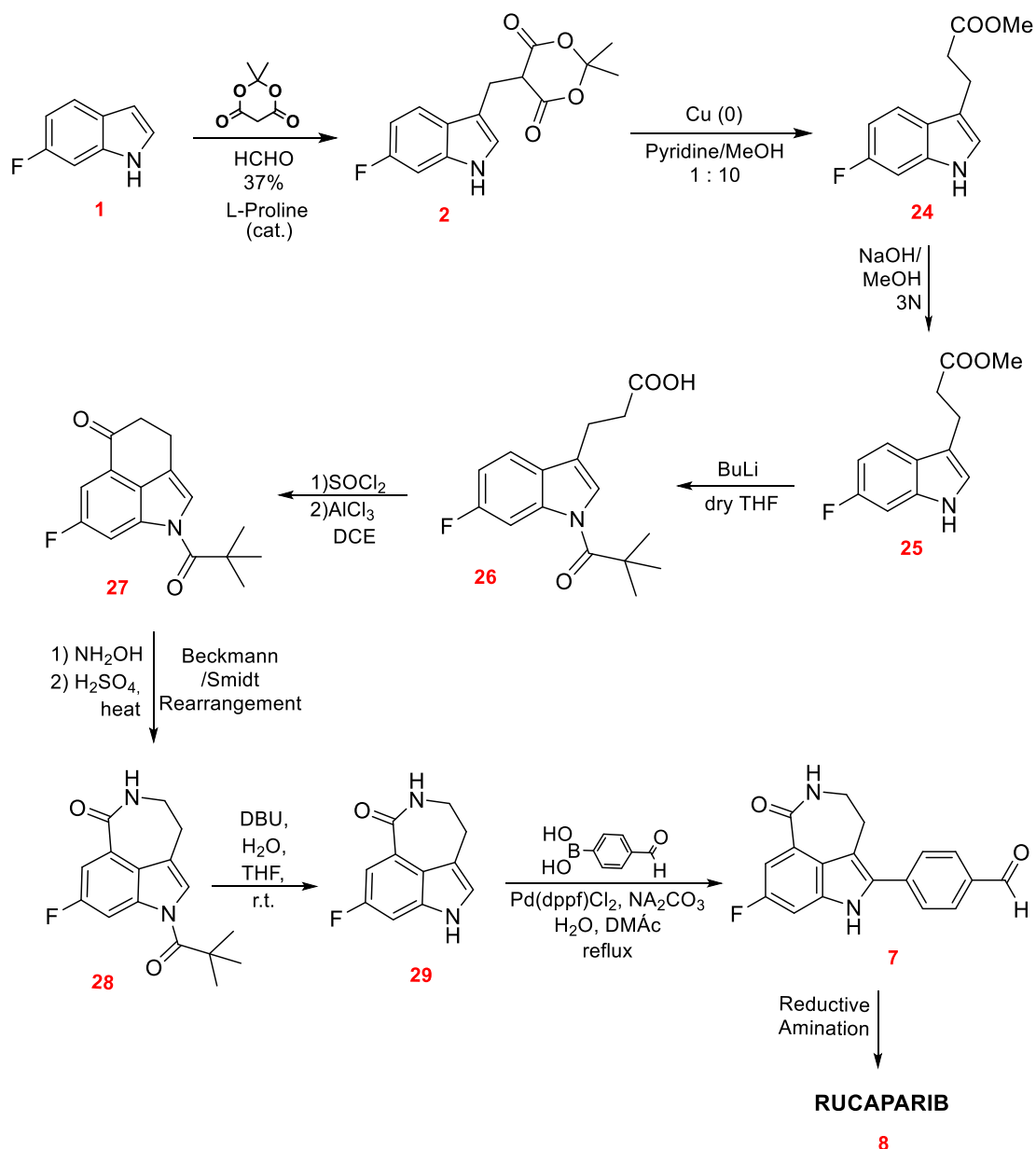
Επιχειρήθηκε, λοιπόν, η προστασία του ινδολικού αζώτου (ένωση **26**) με αρχικό υπόστρωμα την ένωση **2**, η οποία κατεργαζόμενη με Cu (0) σε πυριδίνη/CH₃OH παράγει τον εστέρα **24**, ο οποίος ακολουθούμενος από υδρόλυση δίνει το οξύ **25**. Η ένωση αυτή, κατεργαζόμενη με BuLi σε THF υπό άνυδρες συνθήκες, αποδίδει την ένωση **26** σε απόδοση περίπου 50 %.

3.1.5. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΣ (III ΚΑΙ IV)



Σχήμα 13. Εναλλακτική συνθετική πορεία (Πορεία III).

Όλα όσα αναφέρθηκαν στην υποενότητα 3.1.4. οδήγησαν στο σχεδιασμό και την εφαρμογή δύο επιπλέον επιμέρους τροποποιημένων συνθετικών πορειών (Πορεία III και IV), όπως φαίνονται αναλυτικά πάνω και κάτω (Σχήματα 13 και 14).

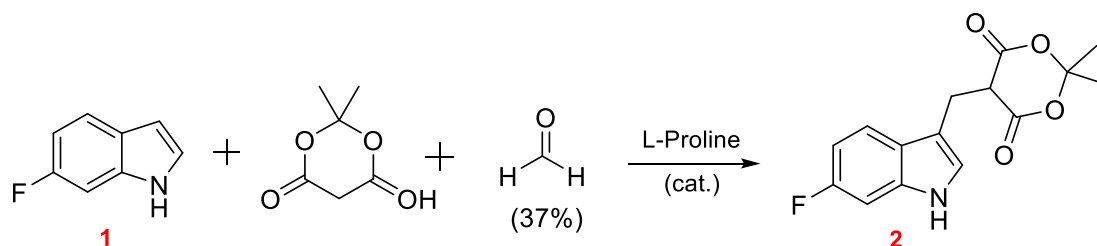


Σχήμα 14. Δεύτερη εναλλακτική συνθετική πορεία της Πορείας II (Πορεία IV).

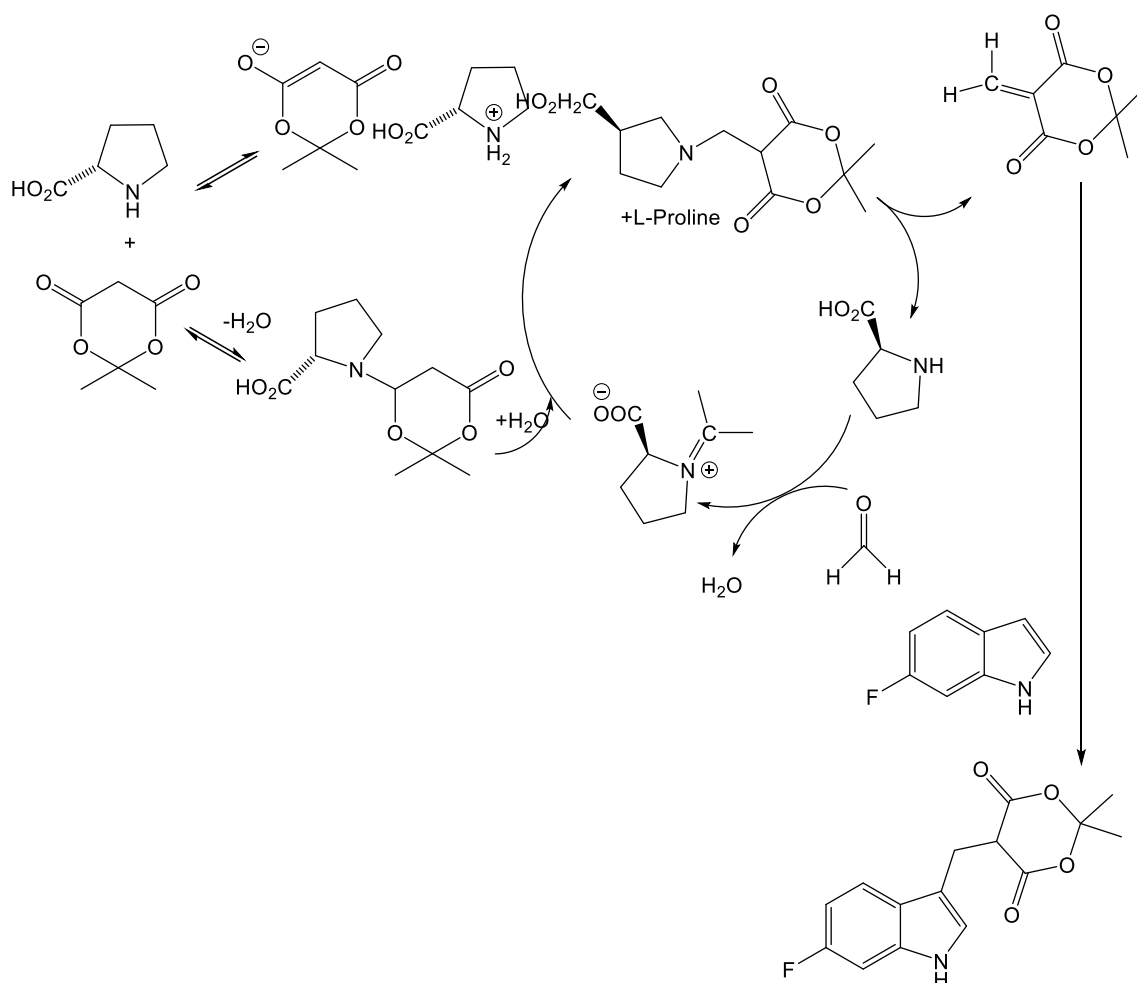
3.1.6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

3.1.4.1. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 2

Όλες οι παραπάνω συνθετικές πορείες ξεκινούν με την προσάρτηση του οξέος Meldrum (2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνη) στο αρχικό υπόστρωμα του 6-φθόροινδολίου, μέσω μίας αντίδρασης Michael, στην C3' θέση του ινδολίου παρουσία φορμαλδεΐδης μέσω του καταλυτικού κύκλου της L-Προλίνης (Σχήμα 15-16).

Αντίδραση Σύνθεσης

Σχήμα 15. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 2

Μηχανισμός Αντίδρασης

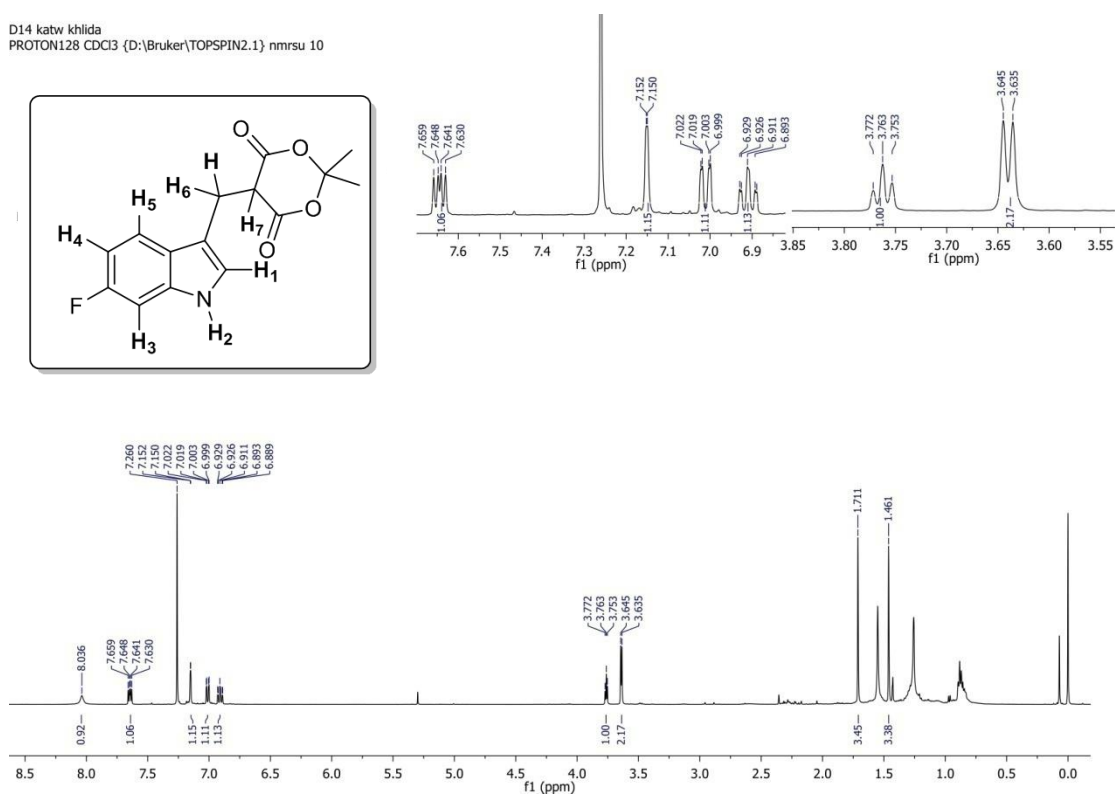
Σχήμα 16. Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 2.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

Τα πρωτόνια H-6 και H-7 είναι βενζυλικά και αρκετά αποπροστατευμένα. Επειδή η περιστροφή είναι ελεύθερη, και στον δεσμό δεξιά και στον δεσμό αριστερά, για αυτό παρατηρείται μια διπλή κορυφή, και όχι δύο μονές. Το πρωτόνιο H-8 αποτυπώνεται σε μια τριπλή κορυφή, με βάση τον κανόνα $n+1$ (H-6, H-7). Το πρωτόνιο H-5

σχάζεται ως μια διπλή της διπλής κορυφής επειδή υπάρχει πρωτόνιο σε ο- θέση, και ακόμη σε μια διπλή επειδή υπάρχει πρωτόνιο σε ρ- θέση. Στα 7 ppm εντοπίζεται το πρωτόνιο H-4, ως μια διπλή της διπλής κορυφής. Αυτό συμβαίνει λόγω της συσχέτισης J3 με το πρωτόνιο H-5, καθώς και συσχέτισης J4 με το πρωτόνιο H-3. Το πρωτόνιο H-1 αποτυπώνεται ως μια απλή κορυφή. Η διεύρυνσή της (και η τάση να γίνει διπλή) οφείλεται στη J3 συσχέτιση με το πρωτόνιο του αζώτου. Το πρωτόνιο H-3 παρουσιάζεται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ ως μια τετραπλή κορυφή. Αυτό συμβαίνει διότι σχάζεται πρώτα σε μια διπλή κορυφή, λόγω J3 συσχέτισης με το πρωτόνιο του αζώτου, και έπειτα σε μια τριπλή κορυφή εξαιτίας της J4 συσχέτισης με τα βενζυλικά πρωτόνια. Τέλος, το πρωτόνιο H-1 εντοπίζεται, όπως αναμενόταν από τη βιβλιογραφία, ως μια απλή κορυφή στα 8 ppm.

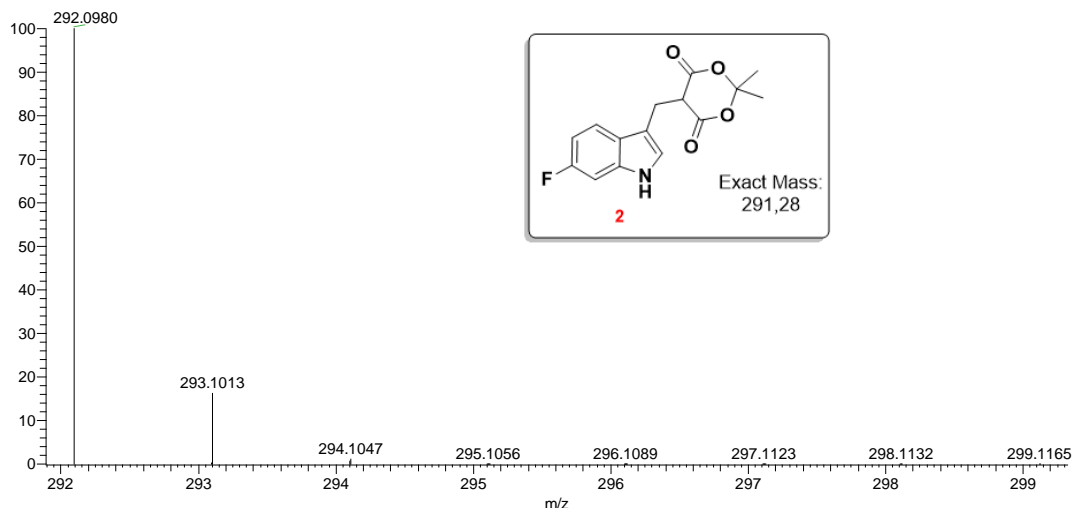
D14 katw khilda
PROTON128 CDCl3 {D:\Bruker\TOPSPIN2.1} nmr su 10



Σχήμα 17. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της ένωσης **2** σε διαλύτη CDCl_3 .

Για την πλήρη ταυτοποίηση της ένωσης **3** έγινε λήψη του φάσματος μάζας σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%. Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FNO}_4$ και η ακριβής μοριακή μάζα του είναι 291,28, ενώ βρέθηκε ότι το m/z της βασικής κορυφής είναι 292,09 λόγω πρωτονίωσης και αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $[\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FNO}_4+\text{H}]^+$, γεγονός που επιβεβαιώνει την πλήρη ταυτοποίηση με το υπολογισθέν μοριακό βάρος (Σχήμα 18).

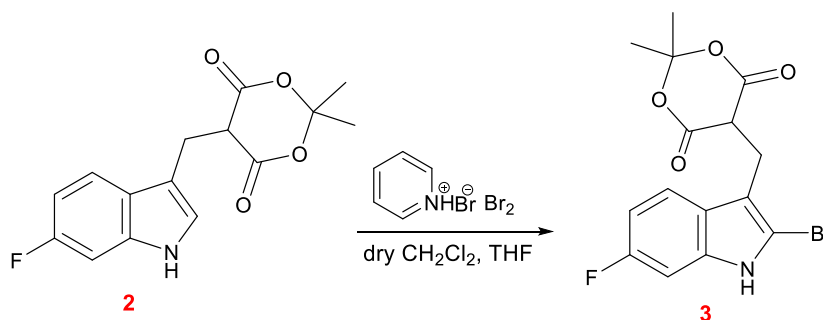
C15H14FNO4 +H: C15 H15 F1 N1 O4 pa Chrg 1



Σχήμα 18. Φάσμα Μάζας (MS) της ένωσης 2 σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%

3.1.4.2. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 3

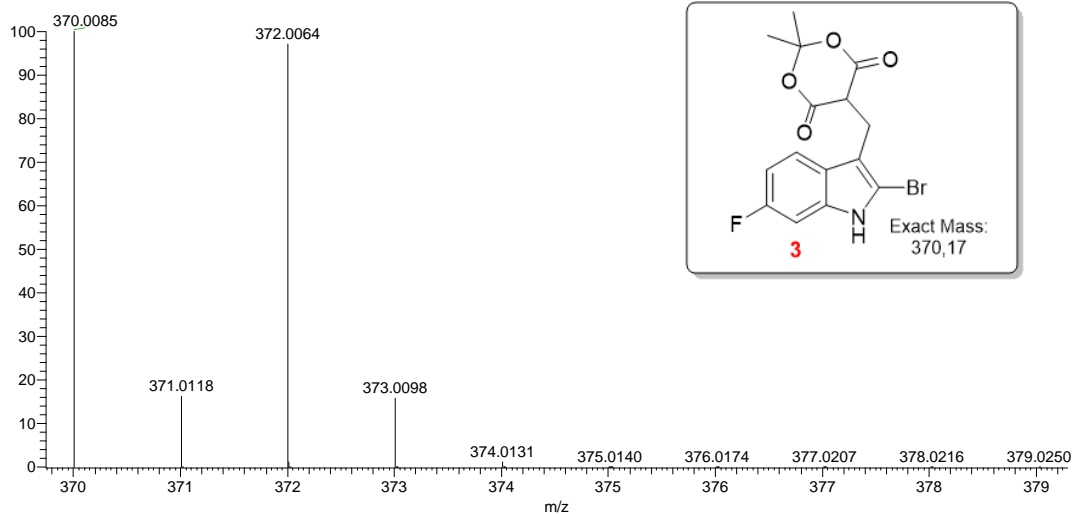
Αντίδραση Σύνθεσης



Σχήμα 19. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 3

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

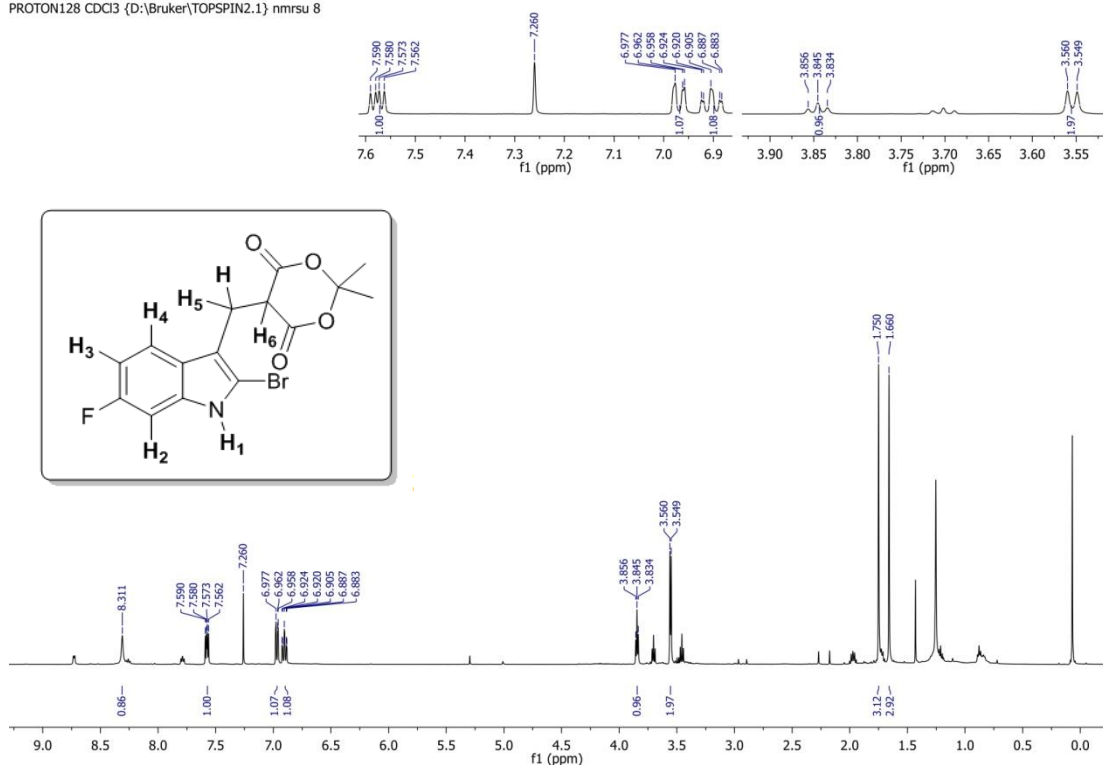
C15H13FNO4Br +H: C15 H14 F1 N1 O4 Br1 pa Chrg 1



Σχήμα 20. Φάσμα Μάζας (MS) της ένωσης 3 σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%

Έγινε λήψη του φάσματος μάζας σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%. Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι C₁₅H₁₃BrFNO₄ και η ακριβής μοριακή μάζα του είναι 370,17, ενώ βρέθηκε ότι το m/z της βασικής κορυφής είναι 372,0064 λόγω του ισότοπου Br 79 στο πρωτονιωμένο θραύσμα [C₁₅H₁₃BrFNO₄+H]⁺, γεγονός που επιβεβαιώνει την πλήρη ταυτοποίηση με το υπολογισθέν μοριακό βάρος (Σχήμα 20).

D 19 BRWMIWSH ORG 1
PROTON128 CDCl3 {D:\Bruker\TOPSPIN2.1} nmrsu 8



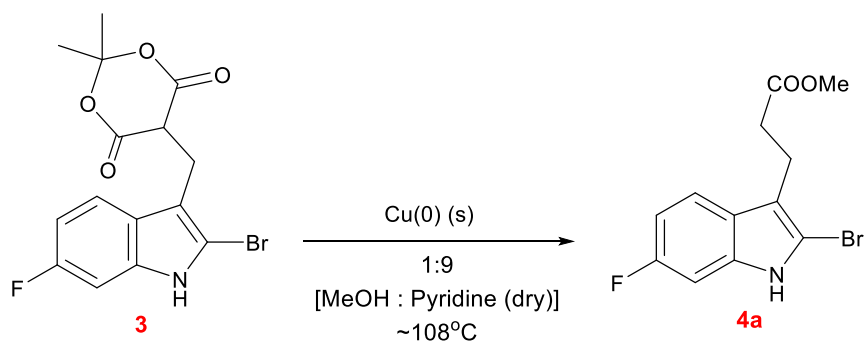
Σχήμα 21. Το φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της ένωσης **3** σε διαλύτη CDCl₃.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.66 (s, 3H, CH₃), 1.75 (s, 3H, CH₃), 3.56 (d, J= 6 Hz, 2H, H-5, H-6), 3.85 (t, J= 5 Hz, 1H, H-7), 6.91 (td, J= 9 Hz, 1H, H-4), 6.98 (dd, J= 10 Hz, 1H, H-3), 7.58 (q, J= 5 Hz, 1H, H-2), 8.31 (s, 1H, H-1) (ppm)

Παρατηρείται η απουσία της κορυφής στα 7.15 ppm λόγω της ένταξης του ατόμου βρωμίου στο μόριο, με αντικατάσταση του αντίστοιχου υδρογόνου.

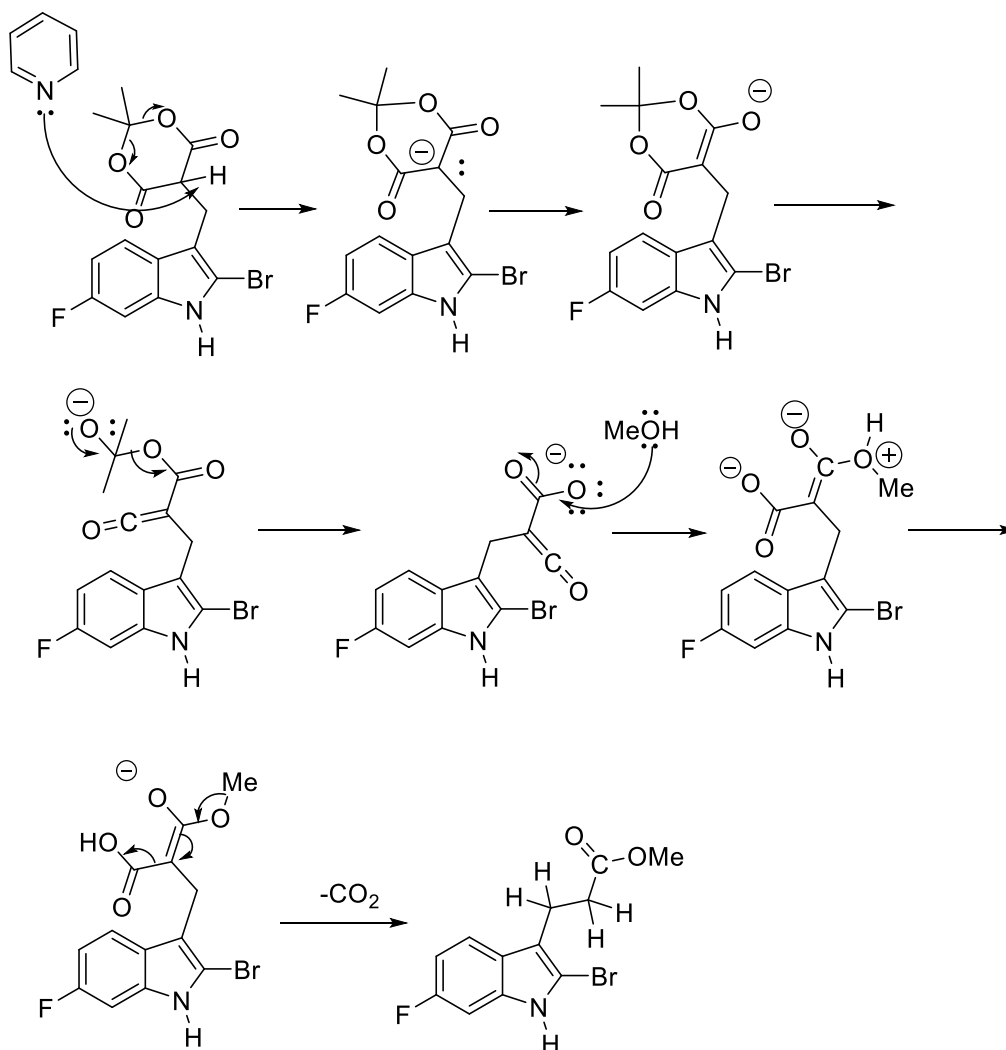
3.1.4.3. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4a

Αντίδραση Σύνθεσης



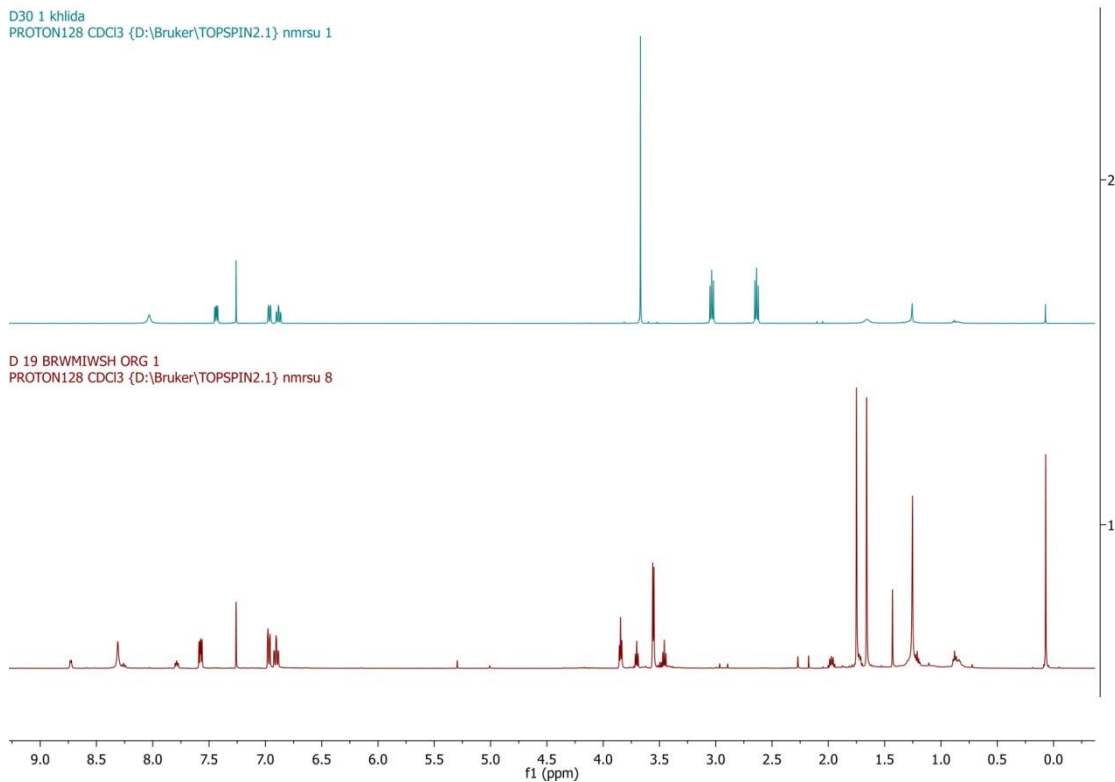
Σχήμα 22. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 4a από την 3

Μηχανισμός Αντίδρασης

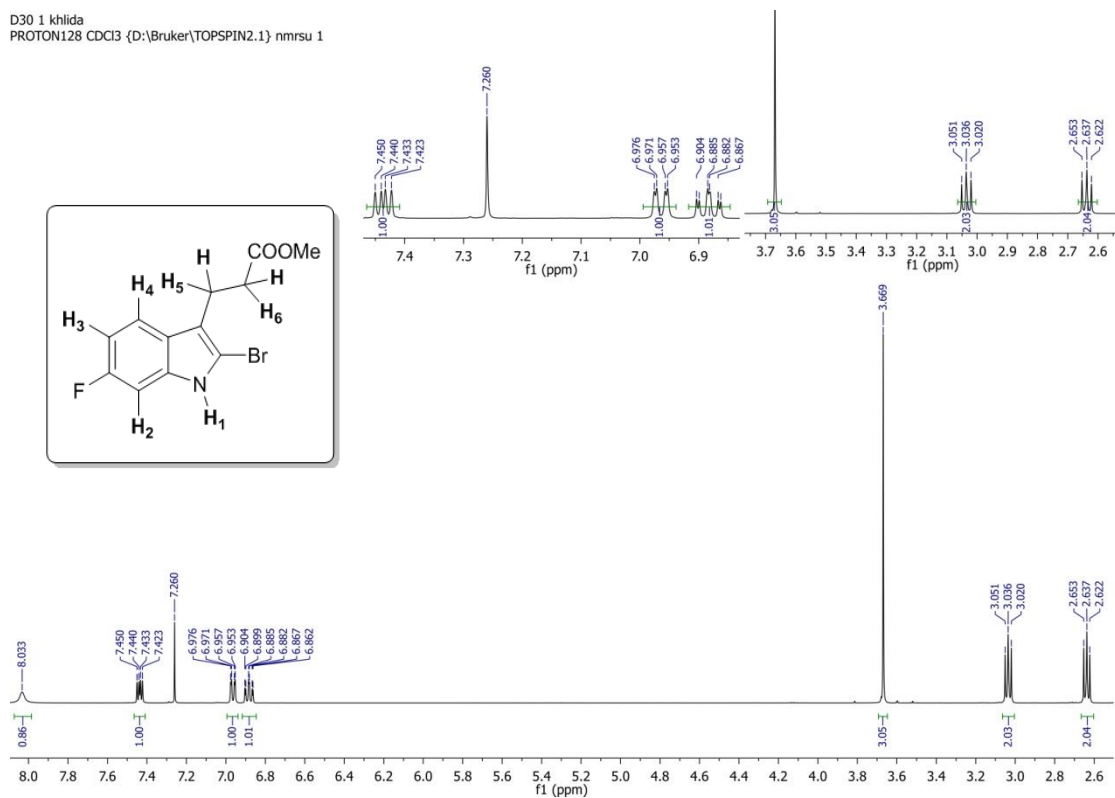


Σχήμα 23. Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 4a.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός



Σχήμα 24. Συγκριτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) των ενώσεων **3** και **4a** σε διαλύτη CDCl_3 .



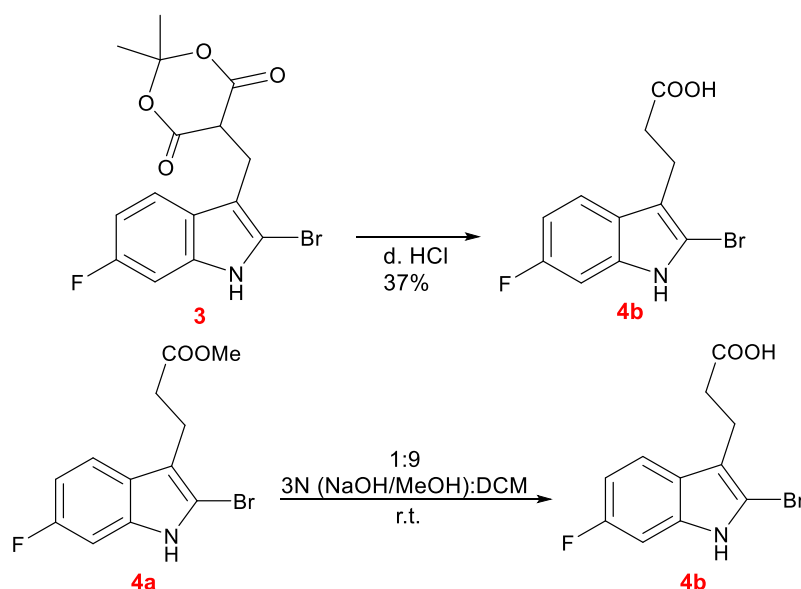
Σχήμα 25. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της ένωσης **4a** σε διαλύτη CDCl_3 .

$^1\text{H-NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 2.64 (t, $J= 9,5$ Hz, 2H, H-5, H-6), 3.04 (t, $J= 8$ Hz, 2H, H-7, H-8), 3.67 (s, 3H, CH_3), 6.88 (td, $J= 10$ Hz, 1H, H-4), 6.97 (dd, $J= 9,5$ Hz, 1H, H-3), 7.44 (q, $J= 5$ Hz, H-2), 8.03 (s, 1H, H-1) (ppm)

Τα πρωτόνια H-5 και H-6 εντοπίζονται ως μια τριπλή κορυφή στα 2.64 ppm, με βάση τον κανόνα $n+1$ (H-7, H-8). Ακριβώς για τον ίδιο λόγο τα πρωτόνια H-7 και H-8 παρουσιάζονται ως μια τριπλή κορυφή. Εντοπίζονται σε μεγαλύτερα ppm διότι βρίσκονται κοντά στα καρβονυλικά οξυγόνα του εστέρα, οπότε αποπροστατεύονται περισσότερο. Επίσης παρατηρείται μια απλή κορυφή στα 3.67 ppm, όπου είναι τα πρωτόνια της μεθυλο ομάδας του εστέρα.

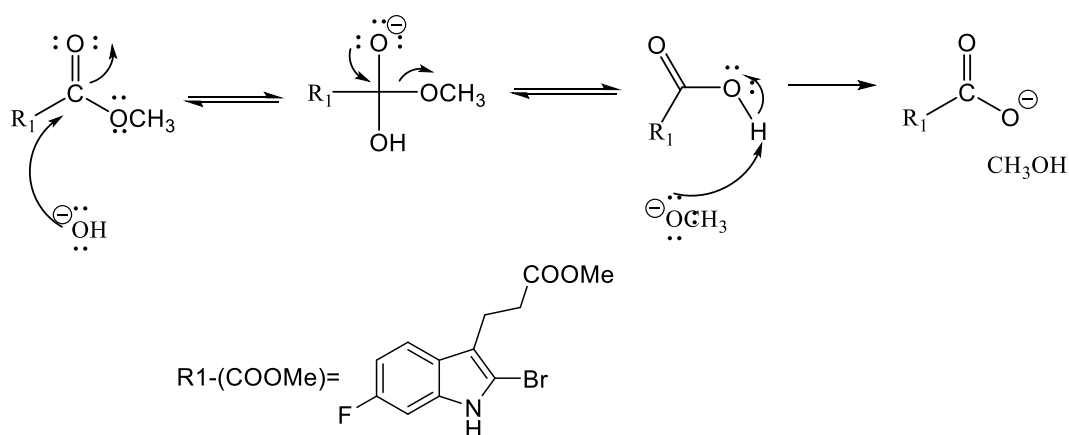
3.1.4.4. Αντιδράσεις σύνθεσης και Χαρακτηρισμός της ένωσης **4b**

Αντίδραση Σύνθεσης



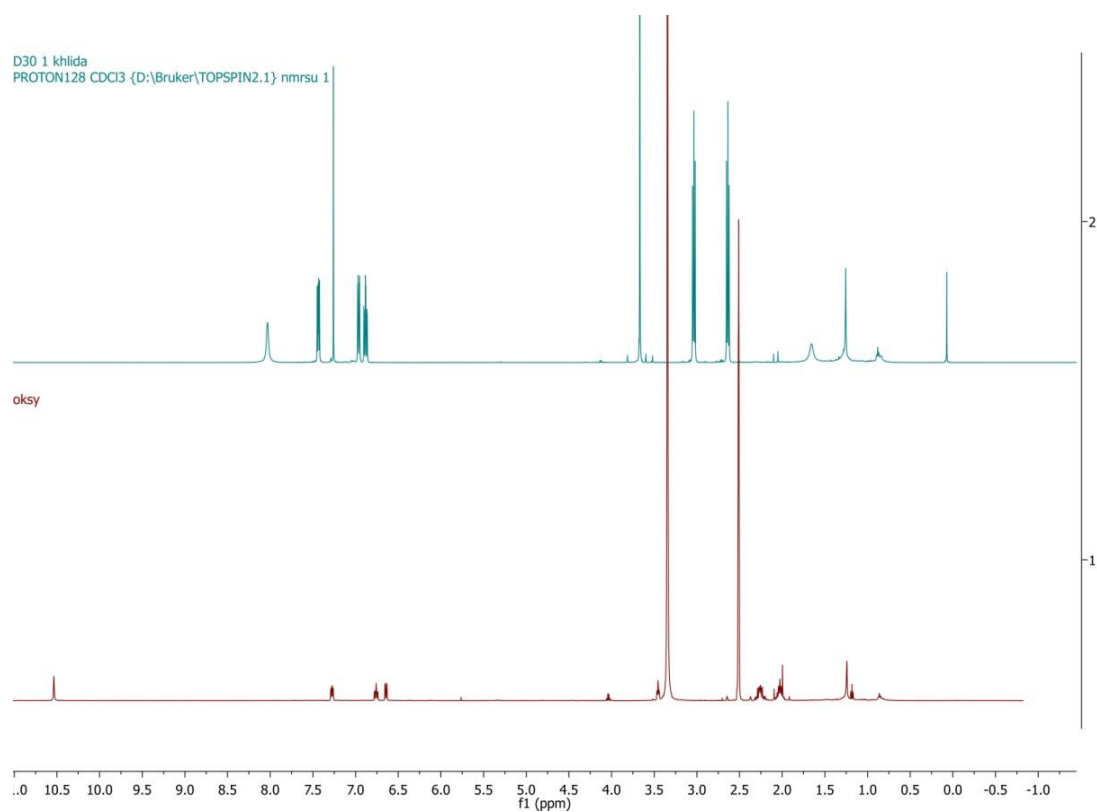
Σχήμα 26. Αντιδράσεις σύνθεσης του οξέος **4b** από την ένωση **3** (πάνω) & από την **4a** (κάτω).

Μηχανισμός Αντίδρασης

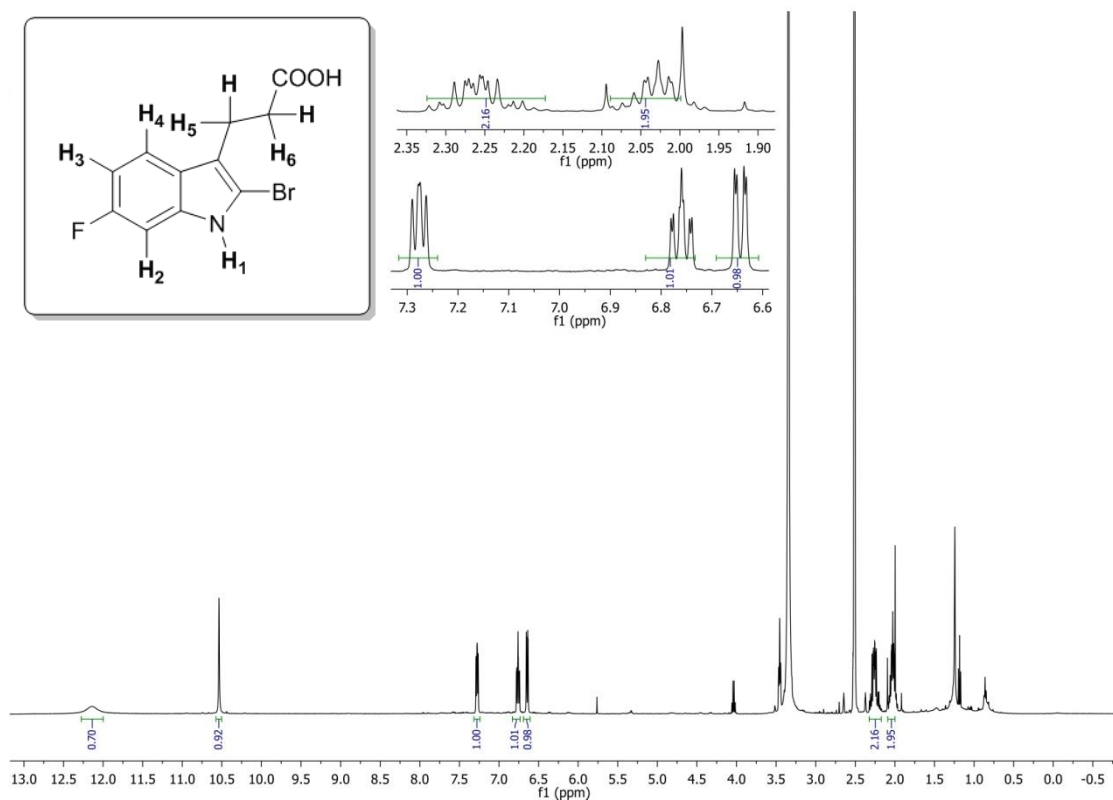


Σχήμα 27. Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης **4b** από την ένωση **4a**.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός



Σχήμα 28. Συγκριτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) των ενώσεων **3** και **4b** σε διαλύτη CDCl_3

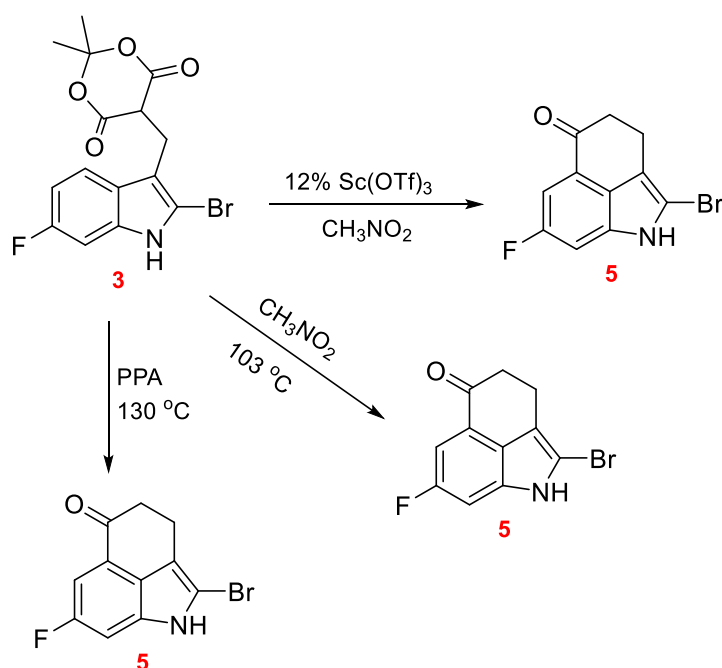


Σχήμα 29. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της ένωσης **4b** σε διαλύτη DMSO .

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, DMSO) δ : 2.05 (m, 2H, H-5, H-6), 2.25 (m, 2H, H-7, H-8), 6.64 (dd, $J=10$ Hz, 1H, H-4), 6.76 (ddd, $J=10$ Hz, 1H, H-3), 7.28 (t, $J=5$ Hz, 1H, H-2), 10.5 (s, 1H, H-1), 12.1 (s, 1H, COOH) (ppm).

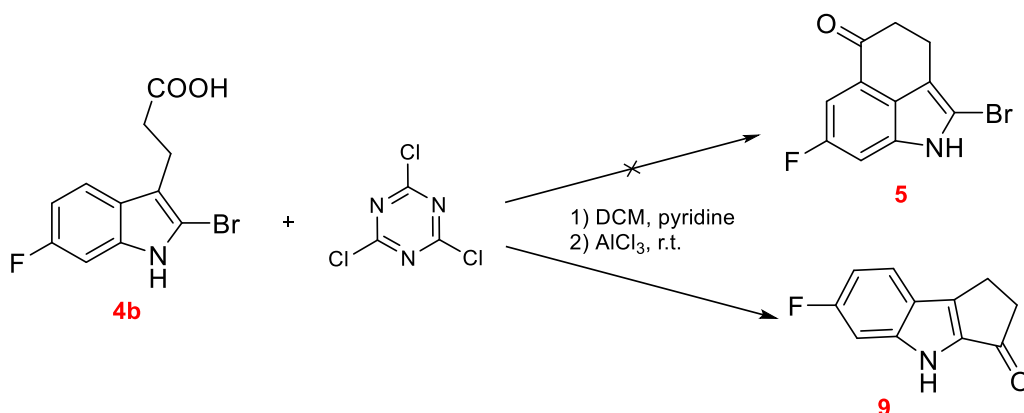
Η μόνη αλλαγή που παρατηρείται στο φάσμα είναι η απουσία της κορυφής της μεθυλο ομάδας του εστέρα, καθώς υδρολύθηκε, με συνέπεια να εντοπίζεται μια απλή κορυφή στα 12.1 ppm που εκδηλώνεται το πρωτόνιο του οξέος.

3.1.4.5. Αντιδράσεις Σύνθεσης της ένωσης 5 απευθείας από την ένωση 3



Σχήμα 30. Αντιδράσεις σύνθεσης της ένωσης 5 από την 3. Καμία από τις παραπάνω αντιδράσεις δεν έδωσε το επιθυμητό προϊόν κυκλοαφυδάτωσης 3.

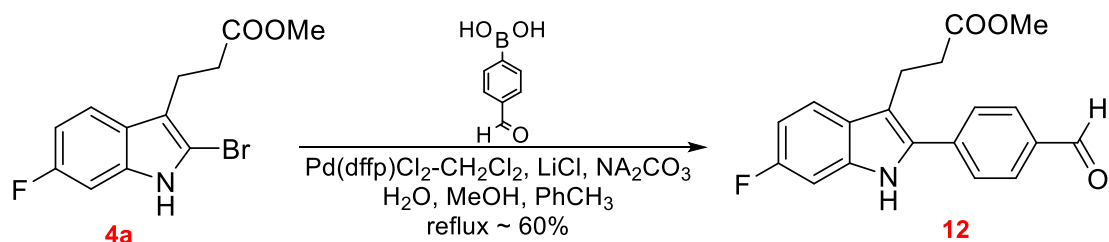
3.1.4.6. Αντιδράσεις Σύνθεσης και της ένωσης 5 από την ένωση 4b



Σχήμα 31. Αντιδράσεις σύνθεσης της ένωσης 5 από την 4b με χρήση κυανουρικού. Καμία από τις παραπάνω αντιδράσεις δεν έδωσε το επιθυμητό προϊόν κυκλοαφυδάτωσης 3. Αντιθέτως, λήφθηκε το κύριο παραπροϊόν

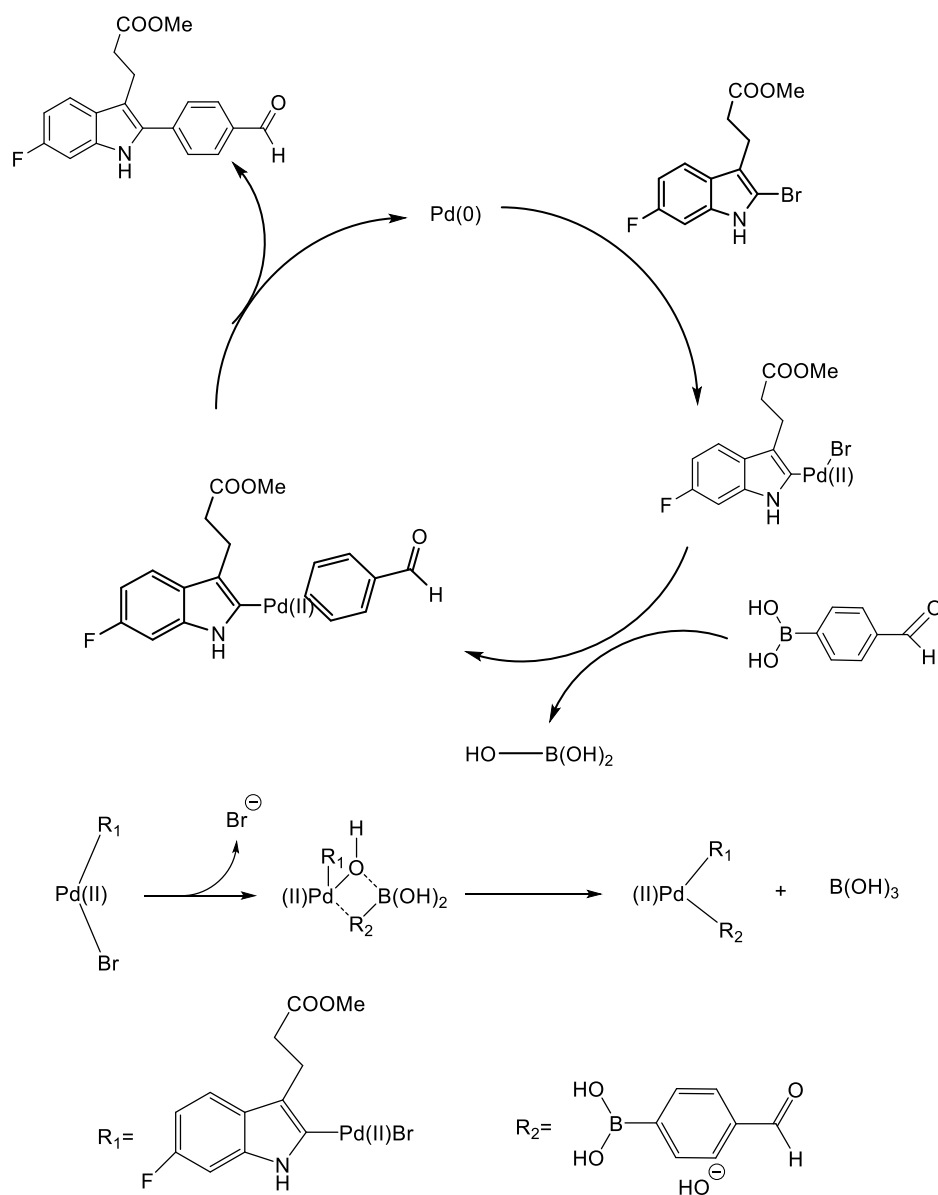
3.1.4.7. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 12

Αντίδραση Σύνθεσης



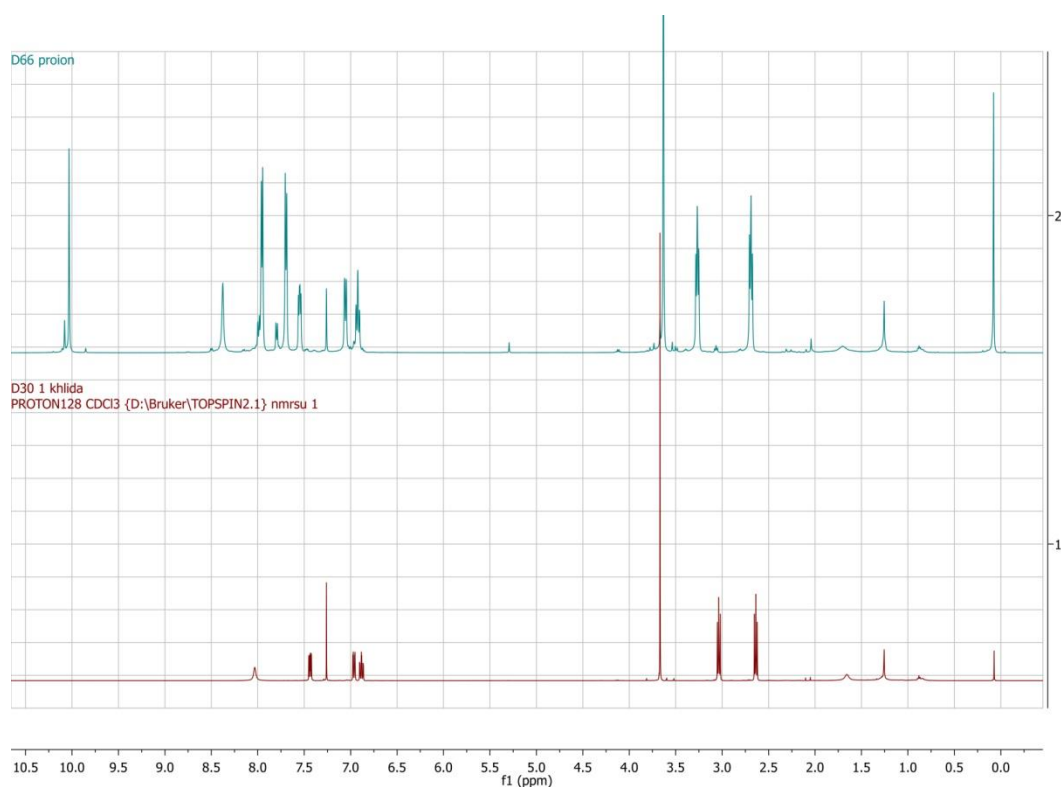
Σχήμα 32. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 12 από την 4a.

Μηχανισμός Αντίδρασης

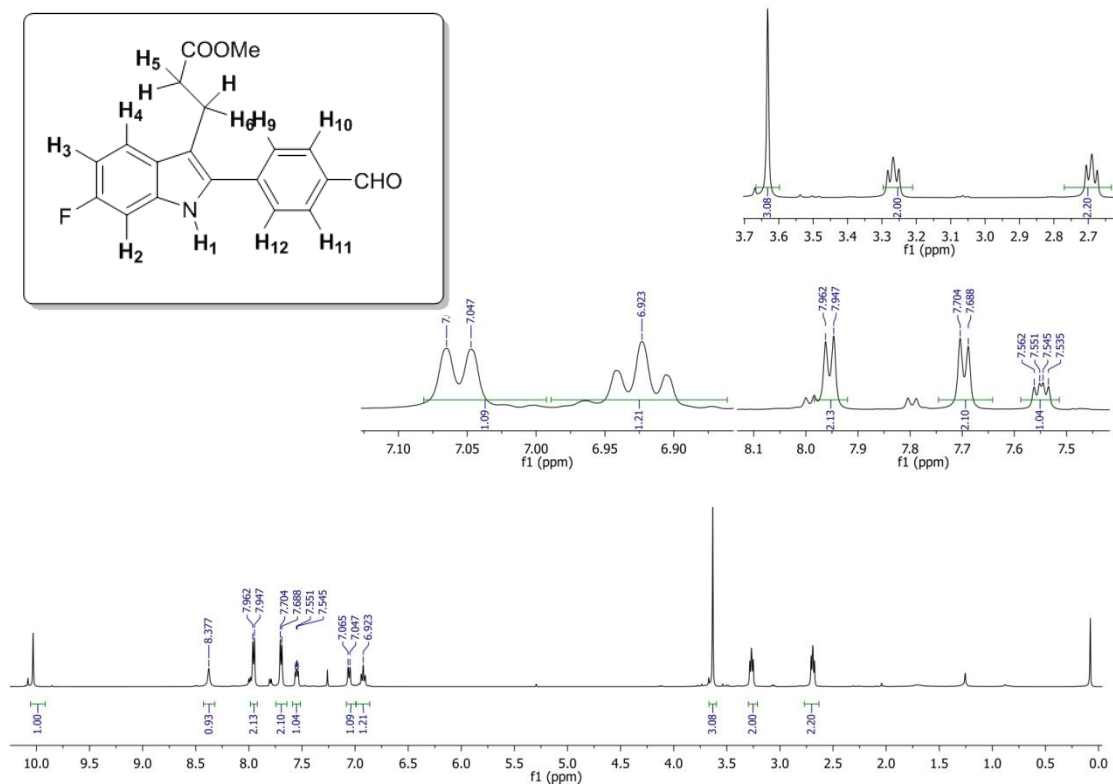


Σχήμα 33. Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 12 μέσω της αντίδρασης Suzuki.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός



Σχήμα 34. Συγκριτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) των ενώσεων **4a** και **12** σε διαλύτη CDCl_3



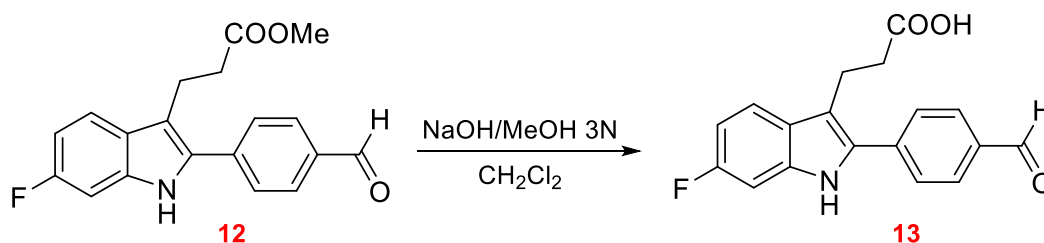
Σχήμα 35. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της ένωσης **12** σε διαλύτη CDCl_3 .

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 2.69 (t, $J=9$ Hz, 2H, H-7, H-8), 3.28 (t, $J=8,5$ Hz, 2H, H-5, H-6), 3.63 (s, 3H, CH_3), 6.92 (t, $J=8,5$ Hz, 1H, H-4), 7.05 (d, $J=9$ Hz, 1H, H-3), 7.55 (q, $J=9$ Hz, 1H, H-2), 7.70 (d, $J=8$ Hz, 2H, H-9, H-10), 7.95 (d, $J=8,5$ Hz, 2H, H-11, H-12), 8.40 (s, 1H, H-1), 10.04 (s, 1H, CHO) (ppm)

Αφότου διενεργήθηκε η αντίδραση Suzuki, παρατηρήθηκε η ένταξη τεσσάρων νέων πρωτονίων με βάση το προηγούμενο φάσμα όπου απεικονίζεται ο εστέρας, καθώς και η εμφάνιση του πρωτονίου της αλδεϋδομάδας. Τα πρωτόνια H-9 και H-10 παρατηρούνται ως μια διπλή κορυφή στα 7.70 ppm, και τα πρωτόνια H-11 και H-12 στα 7.95.

3.1.4.8. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 13

Αντίδραση Σύνθεσης

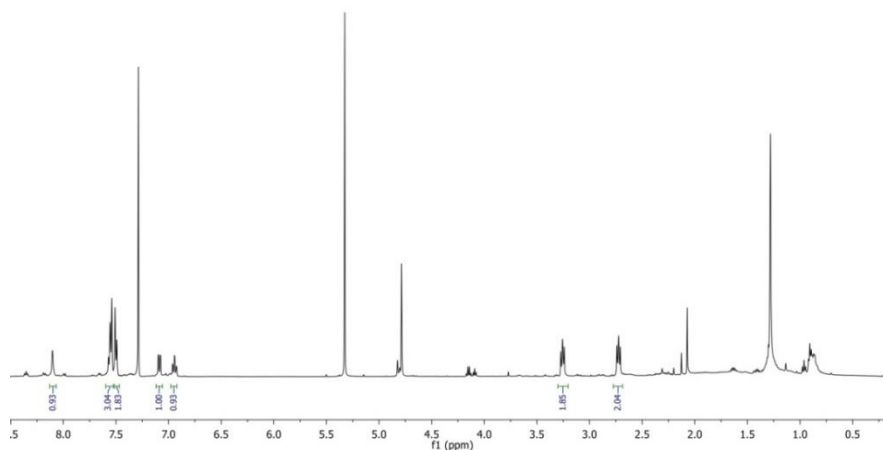


Σχήμα 36. Αντίδραση υδρόλυσης της ένωσης 12 προς την 13.

Μηχανισμός Αντίδρασης

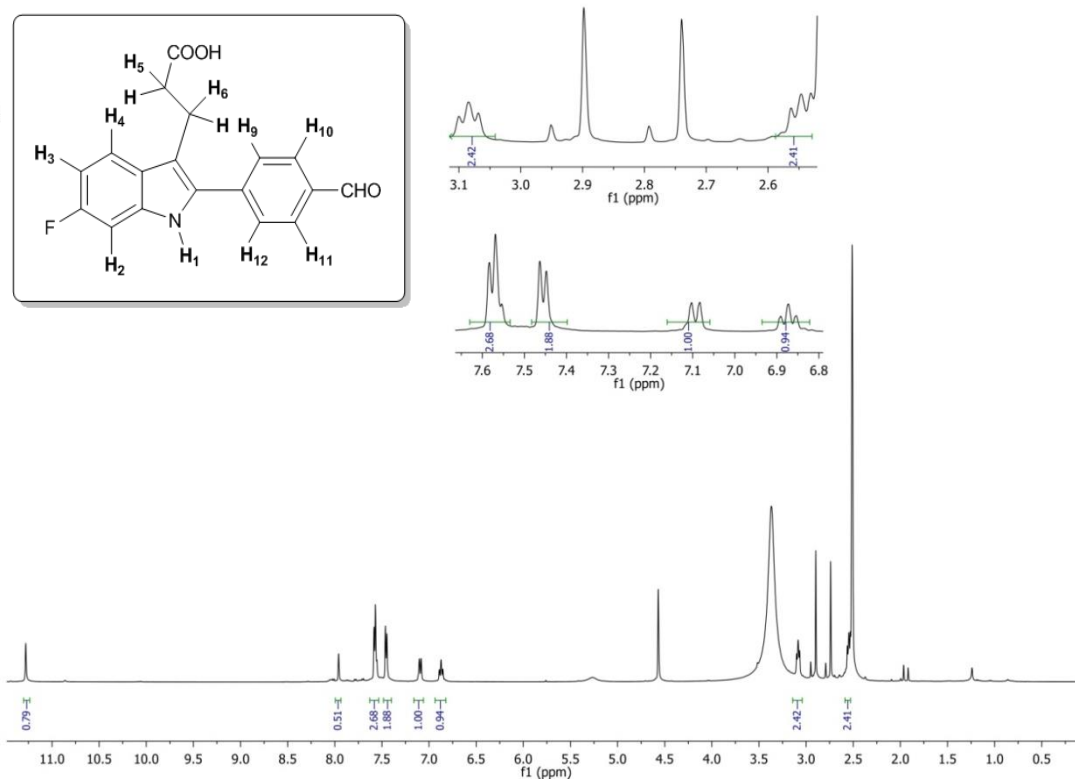
Ο μηχανισμός είναι ίδιος με τον αντίστοιχο μηχανισμό της αντίδρασης υδρόλυσης της ένωσης 4a προς 4b.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

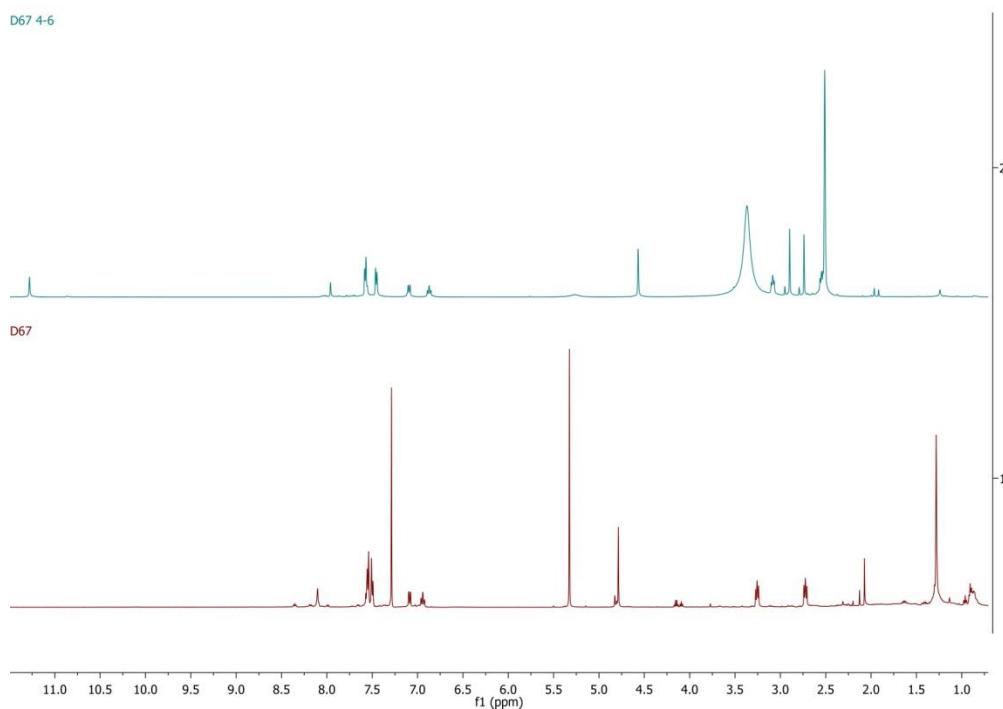


Σχήμα 37. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της ένωσης 13 σε διαλύτη CDCl_3 .

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 2.70 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, H-7, H-8), 3.25 (t, $J = 8,5$ Hz, 2H, H-5, H-6), 6.95 (td, $J = 9$ Hz, 1H, H-4), 7.09 (dd, $J = 10$ Hz, 1H, H-3), 7.5 (d, $J = 8$ Hz, 2H, H-9, H-10), 7.55 (m, 3H, H-2, H-11, H-12), 8.10 (s, 1H, H-1) (ppm)



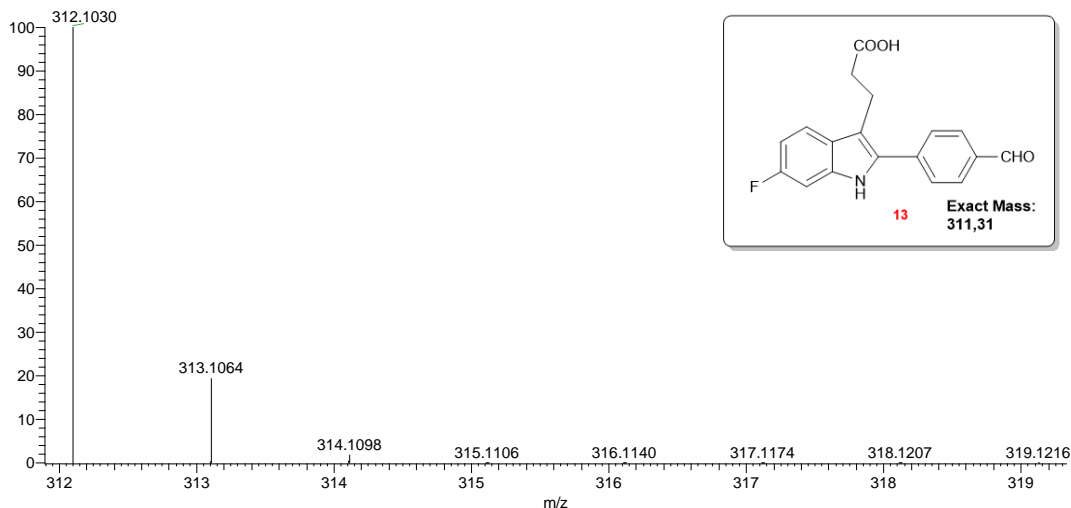
Σχήμα 38. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της ένωσης **13** σε διαλύτη DMSO.



Σχήμα 39. Συγκριτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) των ενώσεων **12** και **13** σε διαλύτη CDCl_3 και DMSO αντίστοιχα.

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, DMSO) δ : 2.55 (m ή t, 2H, H-7, H-8), 3.08 (t, $J=8,5$ Hz, 2H, H-5, H-6), 6.87 (s, 1H, H-4), 7.09 (dd, $J=10$ Hz, 1H, H-3), 7.46 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, H-9, H-10), 7.58 (t, $J=7,5$ Hz, 3H, H-2, H-11, H-12), 7.96 (s, 1H, H-1), 11.28 (s, 1H, COOH) (ppm)

C₁₈H₁₄FNO₃ +H: C₁₈H₁₅F₁N₁O₃ pa Chrg 1

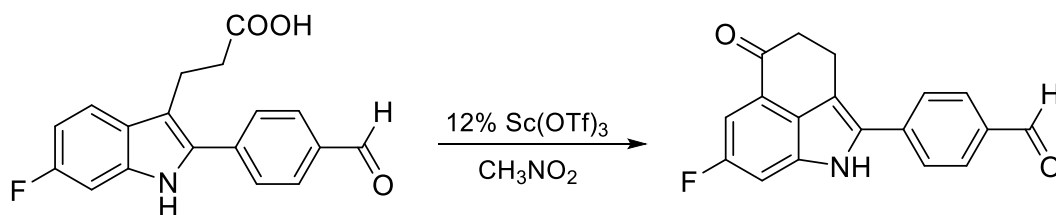


Σχήμα 40. Φάσμα Μάζας (MS) της ένωσης **13** σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%

Η λήψη του φάσματος μάζας σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1% επιβεβαιώνει την πλήρη ταυτοποίηση με το υπολογισθέν μοριακό βάρος (Σχήμα 40). Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι C₁₈H₁₄FNO₃ και η ακριβής μοριακή μάζα του είναι 311,31, ενώ βρέθηκε ότι το m/z της βασικής κορυφής είναι 312,1030 λόγω του πρωτονιωμένου θραύσματος [C₁₈H₁₄FNO₃+H]⁺.

3.1.4.9. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης **14**

Αντίδραση Σύνθεσης

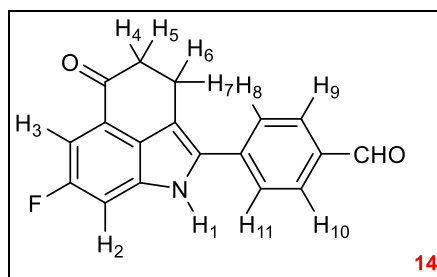


Σχήμα 41. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **14** από την **13**.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

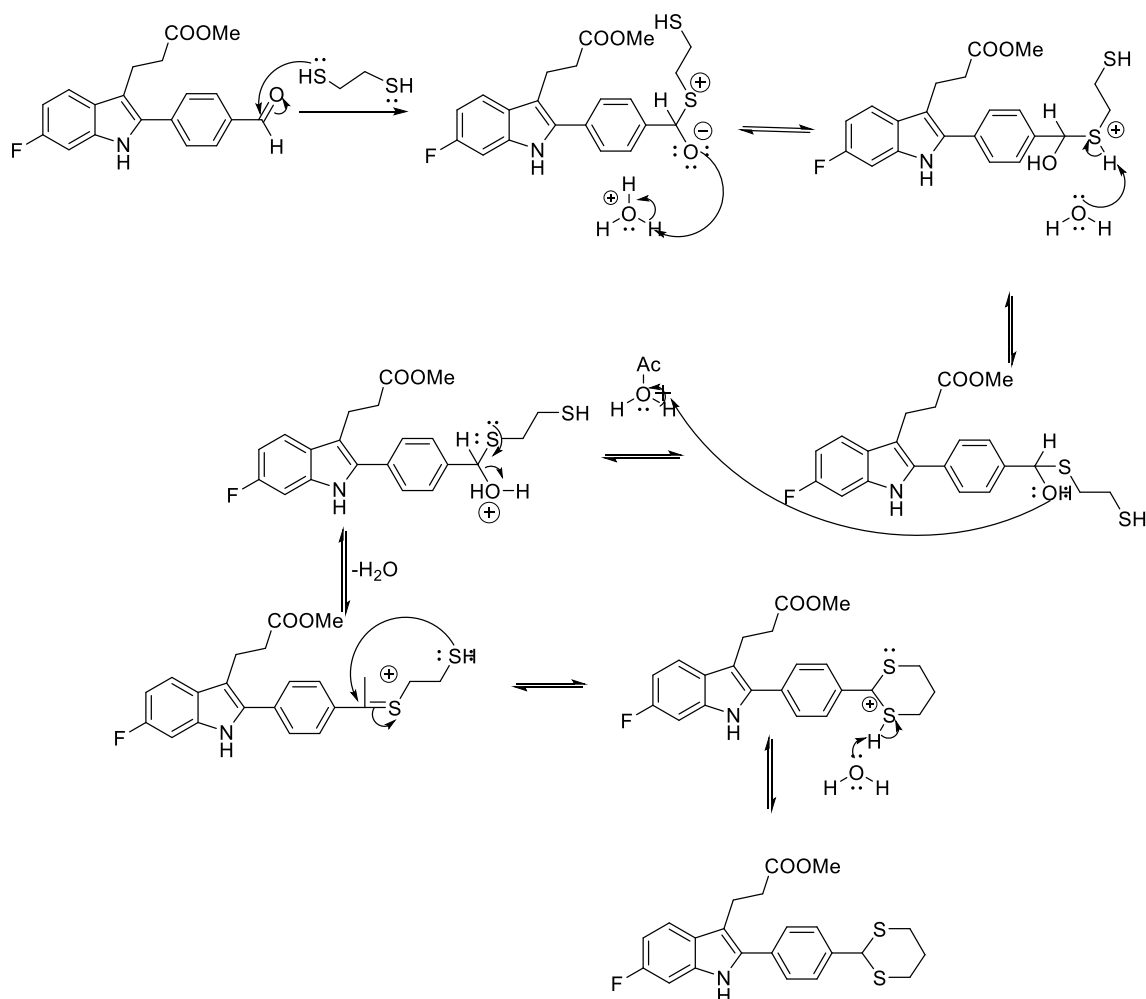
Η ένωση, αν και εντοπίστηκε με επιτυχία στο φάσμα $^1\text{H NMR}$, συντέθηκε σε ίχνη, οπότε θεωρήθηκε προτιμότερο να μην παρουσιαστεί το φάσμα. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η απουσία του πρωτονίου H-4 και η ένταξη 4 νέων πρωτονίων,

λόγω της δημιουργίας του εξαμελούς δακτυλίου. Τα πρωτόνια H-4, H-5, εντοπίζονται στα 2.35 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή, και τα πρωτόνια H-6 και H-7 εντοπίζονται επίσης περίπου στα 2 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή.



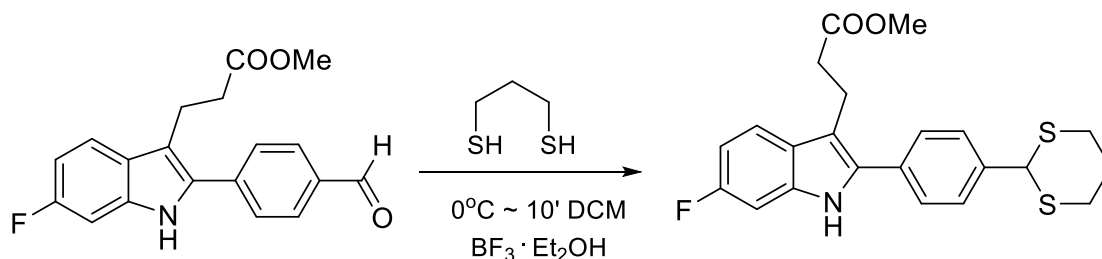
3.1.4.10. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 15

Μηχανισμός Αντίδρασης

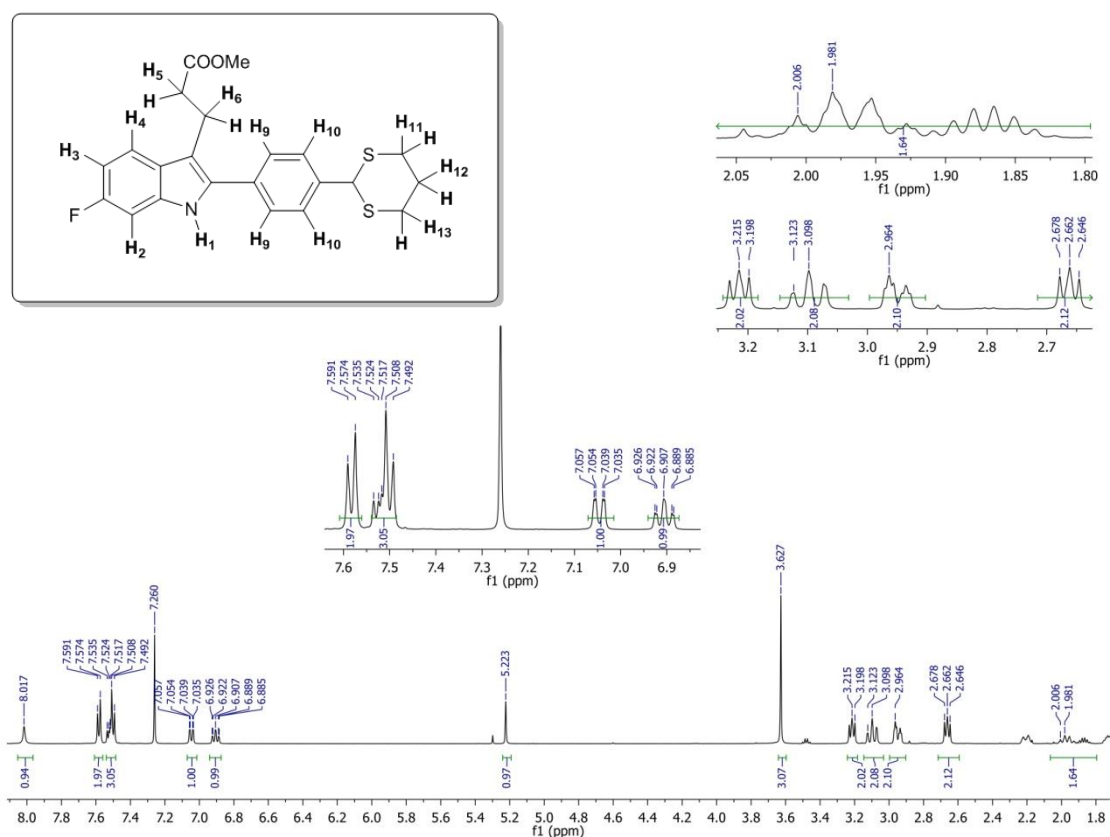


Σχήμα 42. Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης της ένωσης 15 από την 13.

Αντίδραση Σύνθεσης

Σχήμα 43. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **15** από την **13**.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

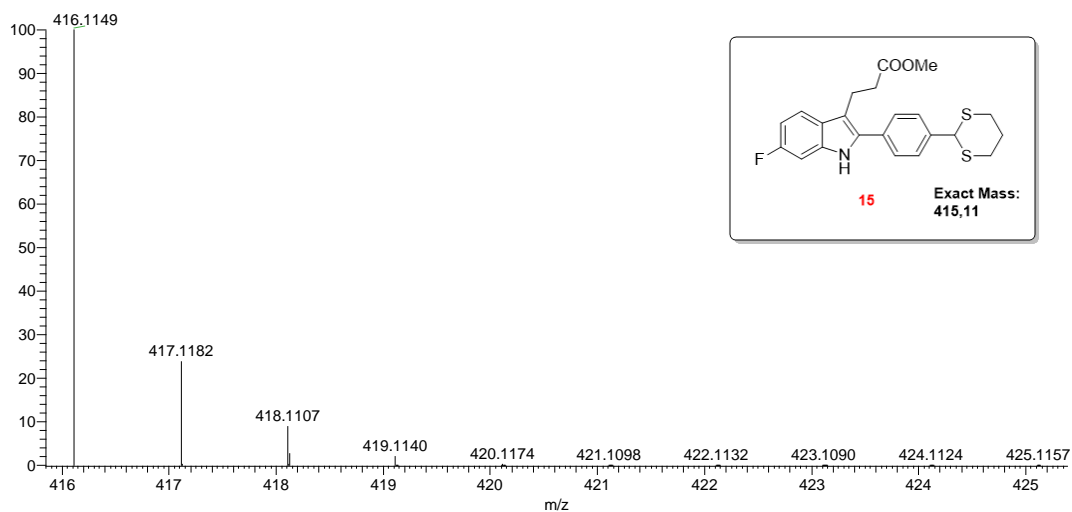
Σχήμα 44. Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (500Hz) της ένωσης **15** σε διαλύτη CDCl_3 .

$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 1.99 (m, 2H, H-16, H-17), 2.66 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-18, H-19), 3.21 (t, $J= 8,5$ Hz, 2H, H-14, H-15), 3.63 (s, 3H, COOMe), 5.22 (s, 1H, H-13), 6.91 (td, $J= 9,5$ Hz, 1H, H-4), 7.05 (dd, $J= 10$ Hz, 1H, H-3), 7.51 (m, 3H, H-2, H-9, H-10), 7.58 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-11, H-12), 8.02 (s, 1H, H-1)

Η λήψη του φάσματος μάζας της ένωσης **15** σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1% επιβεβαιώνει την πλήρη ταυτοποίηση με το υπολογισθέν μοριακό βάρος (Σχήμα 45). Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{FNO}_2\text{S}_2$ και η ακριβής μοριακή μάζα

του είναι 415,11 ενώ βρέθηκε ότι το m/z της βασικής κορυφής είναι 416,1149 λόγω του θραύσματος $[C_{22}H_{22}FNO_2S_2+H]^+$.

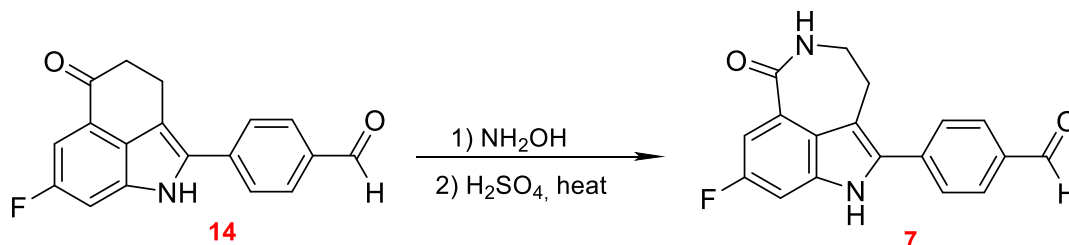
C22H22FNO2S2 +H: C22 H23 F1 N1 O2 S2 pa Chrg 1



Σχήμα 45. Φάσμα Μάζας (MS) της ένωσης **15** σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%

3.1.4.11. Προτεινόμενες Αντιδράσεις σύνθεσης και Θεωρητικός Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης **7**

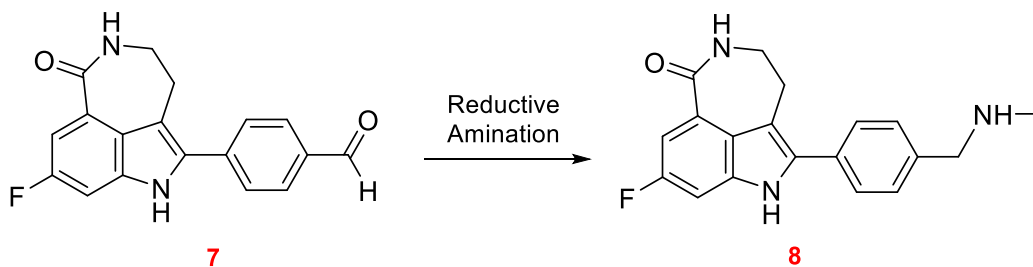
Αντίδραση Σύνθεσης



Σχήμα 46. Προτεινόμενη αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **7** από την **14**.

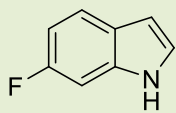
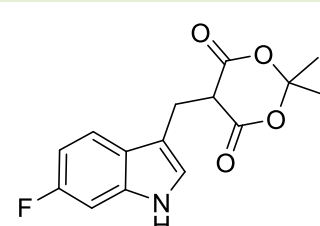
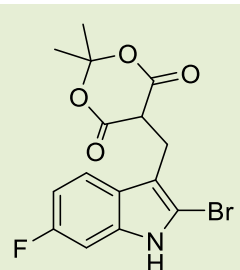
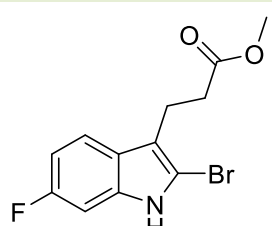
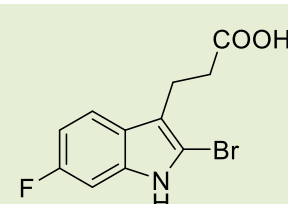
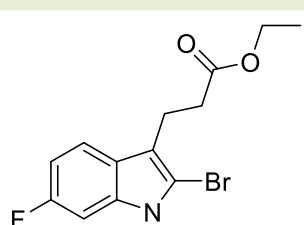
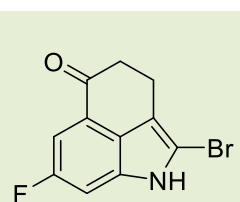
3.1.4.12. Προτεινόμενες Αντιδράσεις σύνθεσης και Θεωρητικός Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης **8**

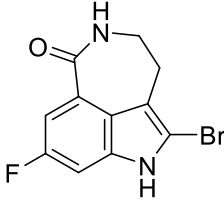
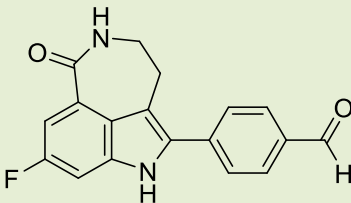
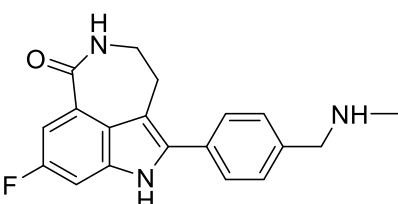
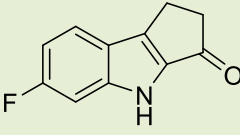
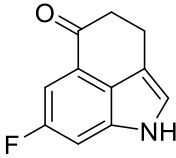
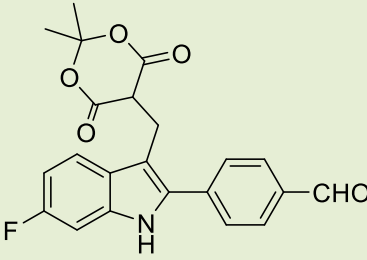
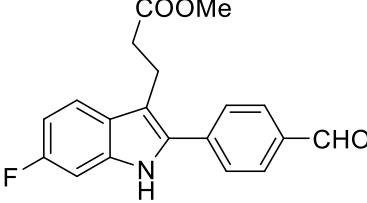
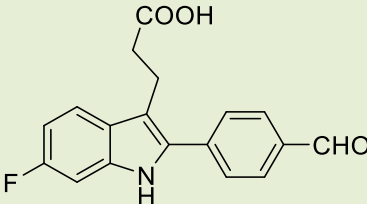
Αντίδραση Σύνθεσης

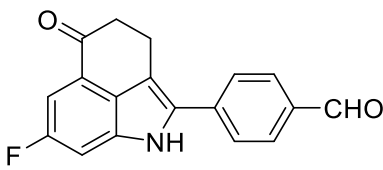
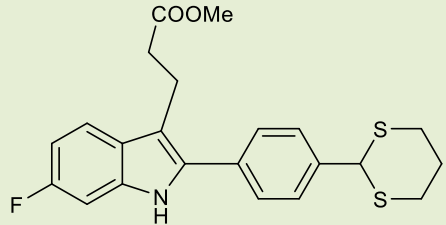
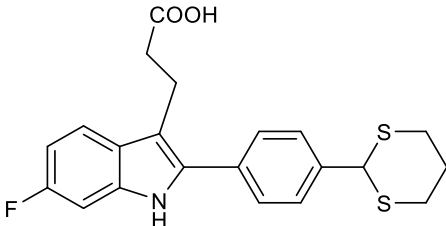
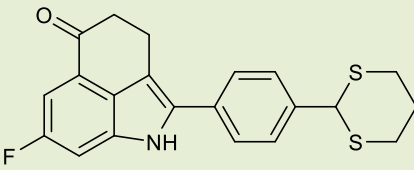
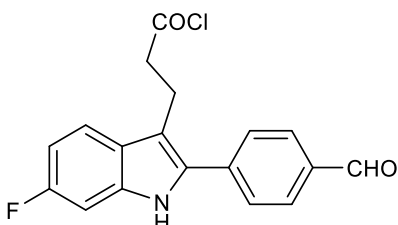
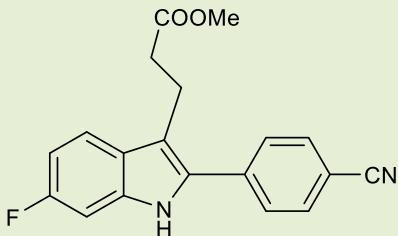
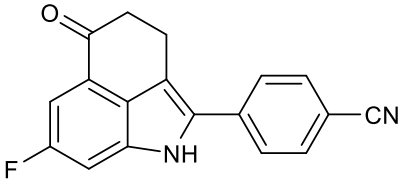


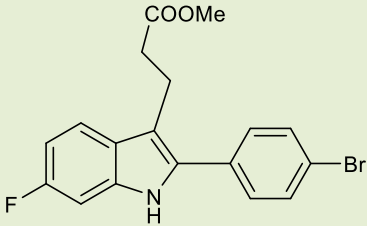
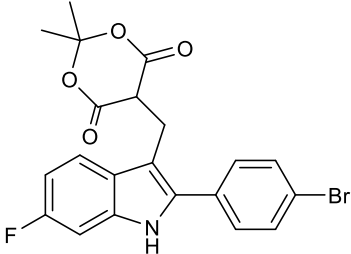
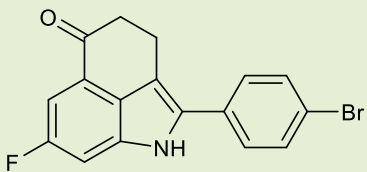
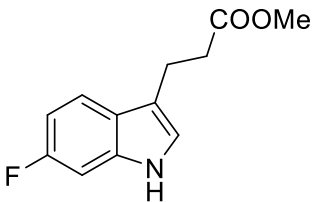
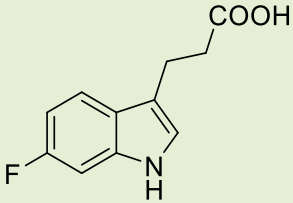
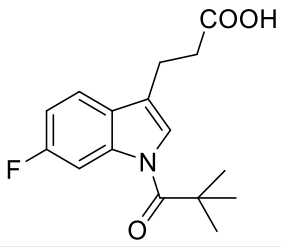
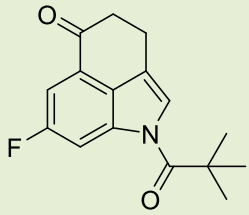
Σχήμα 47. Προτεινόμενη αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **8** από την **7**.

3.1.5. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΝΩΣΕΩΝ

Κωδικός	Συντακτικός τύπος	Μοριακό Βάρος (g/mol)	Κατάσταση
1		135,14	Αρχικό Αντιδρών
2		291,28	Συντέθηκε
3		370,17	Συντέθηκε
4a		300,13	Συντέθηκε
4b		286,10	Συντέθηκε
4c		314,15	Συντέθηκε με μικρή απόδοση
5		286,09	Δεν συντέθηκε

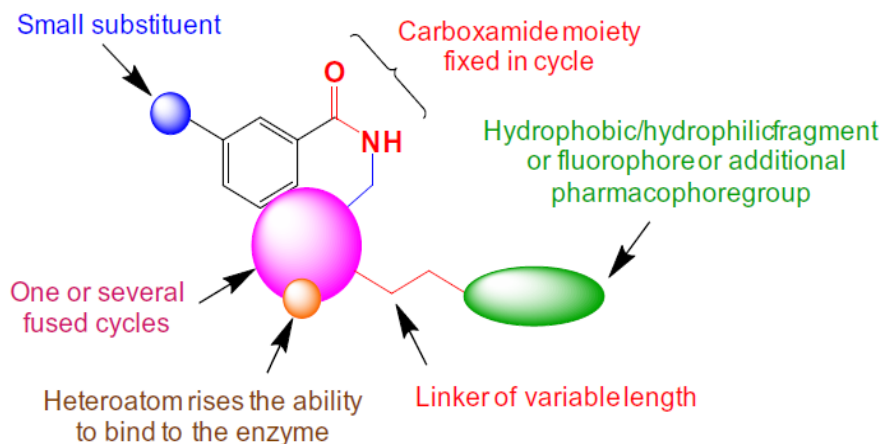
6		283,10	-
7		308,31	-
8		323,37	-
9		189,19	Κύριο παραπροϊόν
10		189,19	Δεν συντέθηκε
11		395,39	Δεν συντέθηκε
12		325,34	Συντέθηκε
13		311,31	Συντέθηκε

14		293,30	Συντέθηκε
15		415,54	Συντέθηκε
16		401,51	Συντέθηκε
17		383,50	Δεν συντέθηκε
18		329,76	Συντέθηκε
19		322,11	Συντέθηκε
20		290,30	Δεν συντέθηκε

21		376,23	Συντέθηκε
22		446,27	Συντέθηκε
23		344,18	Δεν συντέθηκε
24		221,23	Συντέθηκε
25		207,20	Συντέθηκε
26		291,32	Συντέθηκε
27		273,31	Δεν συντέθηκε

3.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΜΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΑ ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ RUCAPARIB.

3.2.1. ΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ RUCAPARIB:



Εικόνα 1. Γενικά μοτίβα στην δομή των αναστολέων του PARP-1. Mikhail S. Drenichev, S.N.M., Poly(ADP-ribose): From chemical synthesis to drug design. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**. 26(15): p. 3395-3403.

Θεωρώντας το Rucaparib ως ένωση οδηγό (lead compound), σχεδιάστηκαν μέσω μη ορθολογικού σχεδιασμού μία σειρά αναλόγων που περιλαμβάνουν επιμέρους τροποποιήσεις προκειμένου να διερευνηθεί σε θεωρητικό επίπεδο η συνεισφορά κάθε πλευρικής ομάδας ή ατόμου στη βιολογική δράση των αναλόγων του Rucaparib μέσω αξιολόγησης της ελεύθερης ενέργειας δέσμευσης κατά Gibbs ($\Delta G_{\text{binding}}$) των αναλόγων αυτών στα υποστρώματα του PARP-1 και της TNKS-1. Με βάση αυτήν την θεωρητική αξιολόγηση, προτείνεται μία σειρά ενώσεων μικρού μοριακού βάρους ως υποψήφιος για την ανακάλυψη κλινικών αντικαρκινικών φαρμάκων.

Η χημική δομή του Rucaparib, όπως έχει συζητηθεί εκτενώς προηγουμένως, μπορεί να θεωρηθεί ως μια ένωση τριών συντηγμένων δομών δακτυλίου που βασίζεται στη δομή βενζοαζεπίνης και πυρρόλης.

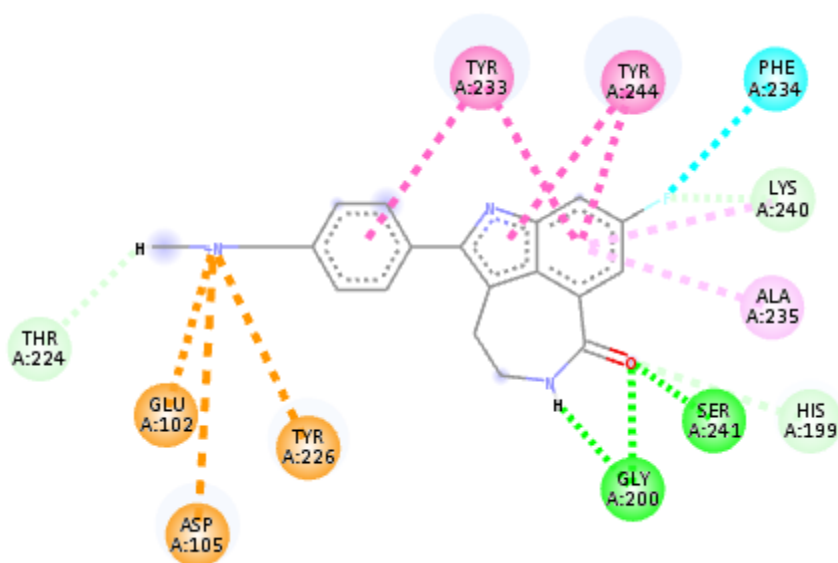
3.2.1.1. Μοριακή Μοντελοποίηση του Rucaparib

Κατά το Molecular Docking του Rucaparib με την PARP-1 επιβεβαιώθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του μορίου στο ενεργό κέντρο, όπως αναφέρθηκαν στο θεωρητικό μέρος (υποενότητα 2.8.2.).

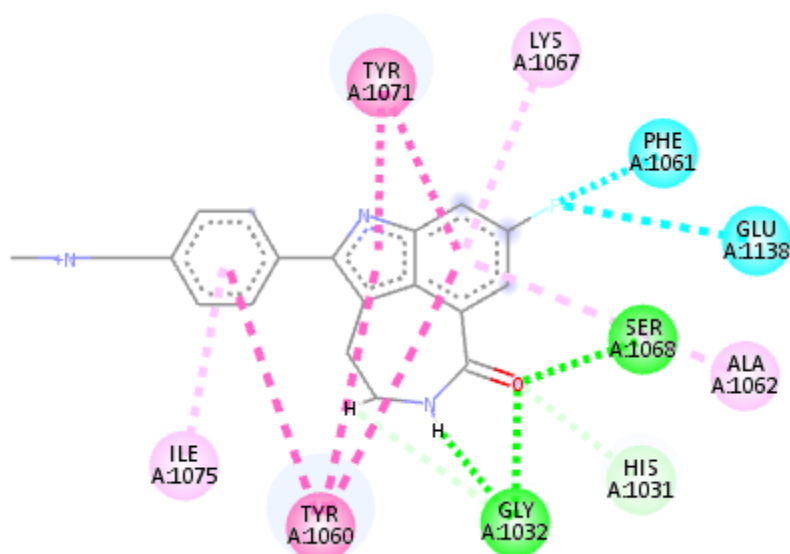
Κατά την προετοιμασία προς molecular docking της PARP-1, παρατηρήθηκε αλλαγή της αρίθμησης των καταλοίπων του ενεργού κέντρου, βάση του λογισμικού AutoDockVina. Τα κατάλοιπα τυροσίνης 233 και 244 αντιστοιχούν στα κατάλοιπα 907

και 896, αντίστοιχα. Ομοίως, στο κατάλοιπο φαινυλαλανίνης 234, το οποίο αντιστοιχεί στο 897. Στο μοτίβο αλληλεπίδρασης του καρβοξαμιδίου, το κατάλοιπο γλυκίνης 200 αντιστοιχίζεται στο κατάλοιπο 863 και το κατάλοιπο σερίνης 241 αντιστοιχίζεται στο κατάλοιπο 904, με βάση τη διαθέσιμη κρυσταλλογραφική δομή. Το κατάλοιπο Phe897, με το οποίο αλληλεπιδρά το άτομο του φθορίου αντιστοιχίζεται στο κατάλοιπο 234 ενώ η Ala898, με το υδρόφοβο τμήμα της οποίας αλληλεπιδρά ο βενζολικός δακτύλιος, αντιστοιχίζεται τώρα στο κατάλοιπο 235.









Rucaparib – PARP-1



Rucaparib – TNKS-1



Χρωματική απεικόνιση αλληλεπιδράσεων**Interactions**

	Conventional Hydrogen Bond		Unfavorable Donor-Donor
	Carbon Hydrogen Bond		Pi-Cation
	Halogen (Fluorine)		Pi-Pi Stacked
	Unfavorable Positive-Positive		Pi-Pi T-shaped

Με βάση τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα και τα αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης του Rucaparib με την τανκυράση-1 παρατηρήθηκαν αλληλεπιδράσεις όμοιες με τις αντίστοιχες στο καταλυτικό κέντρο της PARP-1. Ωστόσο, η ελεύθερη αμινομάδα του Rucaparib δεν συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα του ενεργού κέντρου της TNKS-1.

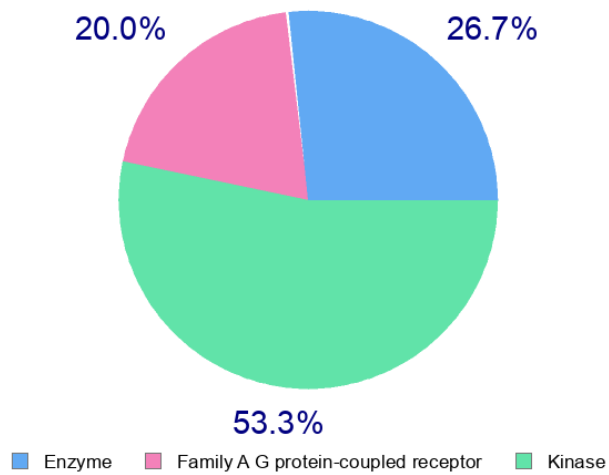
3.2.1.2. Πρόβλεψη των κύριων πρωτεϊνών – στόχων του Rucaparib

Χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα μοριακής μοντελοποίησης του **Swiss Institute of Bioinformatics** το οποίο αξιοποιεί τις διαθέσιμες κρυσταλλογραφικές δομές των βιομορίων και όλων των αναφερθέντων ενώσεων - αναστολέων στο ChEMBL. Οι κύριες πρωτεΐνες που αναστέλλει το Rucaparib είναι η **PARP-1** και η **TNKS-1** (poly-ADP-ribosyltransferase) με βάση τα υπάρχοντα καταχωρημένα δεδομένα.

Αποτελέσματα πρόβλεψης στόχου:

SwissTargetPrediction

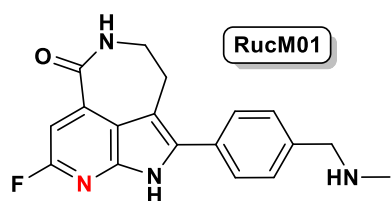
Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Target Class	Probability*	Known actives (3D/2D)
Poly [ADP-ribose] polymerase-1	PARP1	P09874	CHEMBL3105	Enzyme	0.97132508485	90 / 146
Tankyrase-2	TNKS2	Q9H2K2	CHEMBL6154	Enzyme	0.97132508485	3 / 1
Tankyrase-1	TNKS	Q95271	CHEMBL6164	Enzyme	0.97132508485	5 / 4
Serotonin 2a (5-HT2a) receptor	HTR2A	P28223	CHEMBL224	Family A G protein-coupled receptor	0.104671941128	70 / 143
Protein farnesyltransferase	FNTA FNTB	P49354 P49356	CHEMBL2094108	Enzyme	0.104671941128	53 / 41
Protein kinase C delta	PRKCD	Q05655	CHEMBL2996	Kinase	0.104671941128	45 / 0
Protein kinase C theta	PRKCQ	Q04759	CHEMBL3920	Kinase	0.104671941128	59 / 0
CaM kinase II	CAMK2D	Q13557	CHEMBL2801	Kinase	0.104671941128	28 / 0
Serine/threonine-protein kinase Nek1	NEK1	Q96PY6	CHEMBL5855	Kinase	0.104671941128	148 / 0
Dopamine D2 receptor	DRD2	P14416	CHEMBL217	Family A G protein-coupled receptor	0.104671941128	106 / 192
Serotonin 2c (5-HT2c) receptor	HTR2C	P28335	CHEMBL225	Family A G protein-coupled receptor	0.104671941128	60 / 105



Διάγραμμα πίτας: Κύριες κατηγορίες πρωτεϊνών που μπορεί να στοχεύσει θεωρητικά το φαρμακευτικό σκεύασμα Rucaparib σύμφωνα με την ομοιότητα του με γνωστούς αναστολείς πρωτεϊνών.

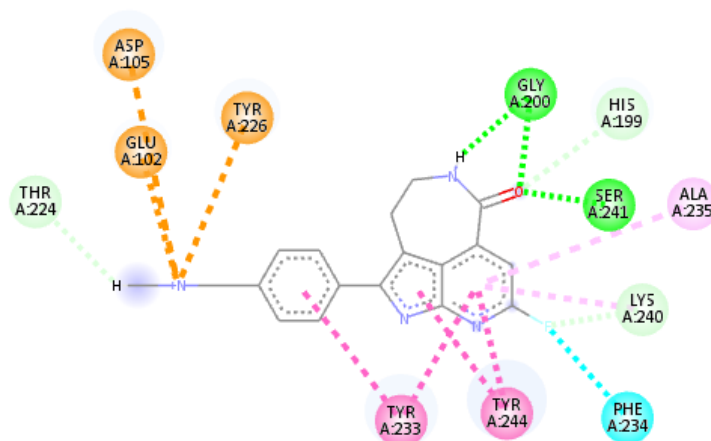
3.2.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ Α (ΑΥΤΟΔΟΚΩΝΑ)

3.2.2.1. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM01

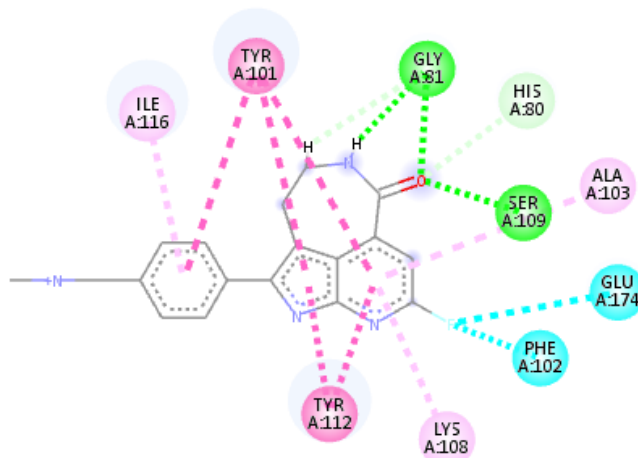


Στο ανάλογο αυτό παρατηρήθηκαν ακριβώς οι ίδιες αλληλεπιδράσεις που εμφανίζει το Rucararib. Με βάση τα αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης, παρατηρήθηκε ότι το άτομο αζώτου στον εξαμελή δακτύλιο δεν συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με την TNKS-1.

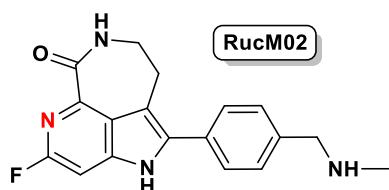
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



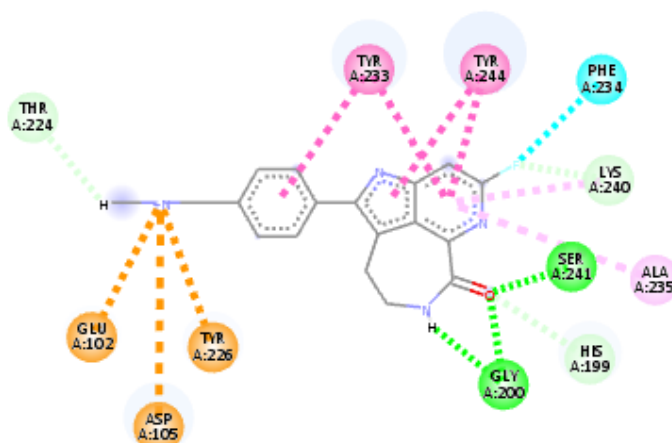
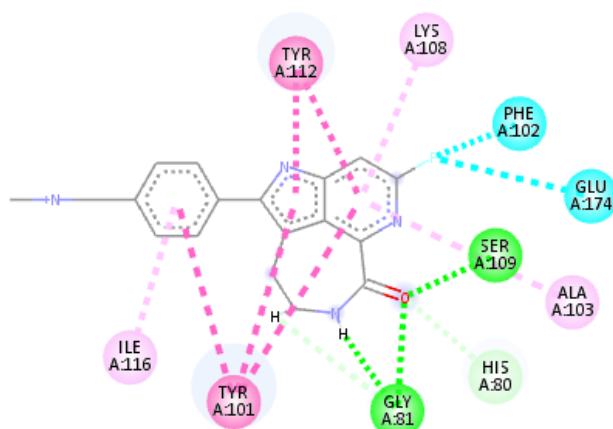
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1



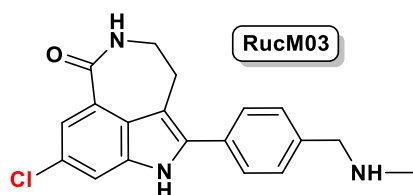
3.2.2.2. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM02



Στο ανάλογο αυτό παρατηρήθηκαν ακριβώς οι ίδιες αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται στο ανάλογο RucM01. Με βάση τα αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης, επιβεβαιώθηκε ότι το άτομο αζώτου στον εξαμελή δακτύλιο δεν συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις, ακόμα κι αν βρίσκεται σε διαφορετική θέση. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με την αλληλεπίδραση του RucM01 με την TNKS-1.

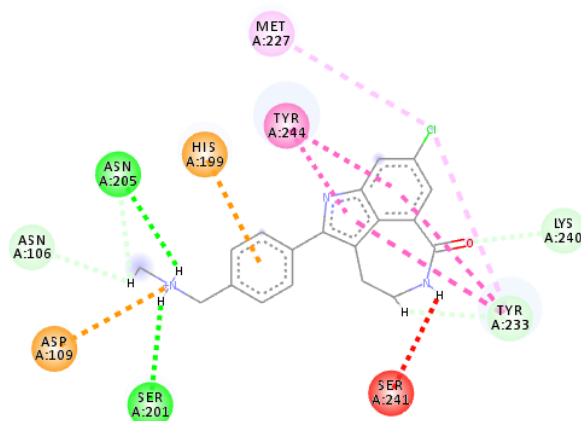
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

3.2.2.3. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM03

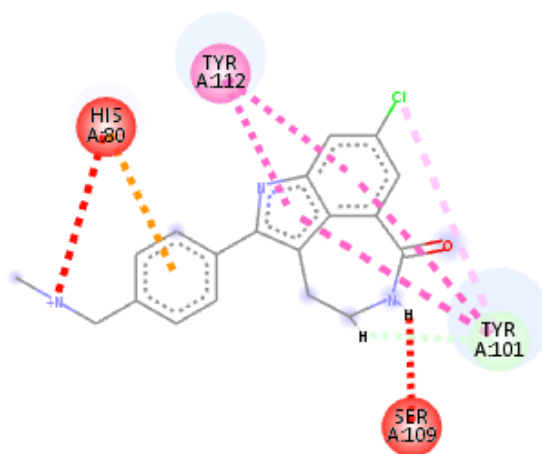


Στο ανάλογο αυτό και με βάση την αντικατάσταση του ατόμου φθορίου με χλώριο παρατηρήθηκε ότι δεν διατηρούνται οι κλασσικές αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο της PARP-1. Πιο συγκεκριμένα, δεν υπάρχει η αλληλεπίδραση του καταλοίπου Tyr233 με τον βενζολικό δακτύλιο και δεν υπάρχουν οι αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα σερίνης και γλυκίνης. Το άτομο χλωρίου δεν αλληλεπιδρά με την Phe234, η οποία είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της ανασταλτικής δράσης του ενζύμου, πιθανώς λόγω του μεγέθους του ατόμου του χλωρίου. Εντούτοις, εμφανίζονται μόνο υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Tyr233 και Met227. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν κατά τη μοριακή μοντελοποίηση με TNKS-1.

Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1

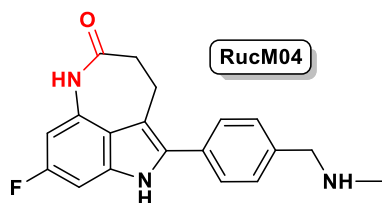


Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1



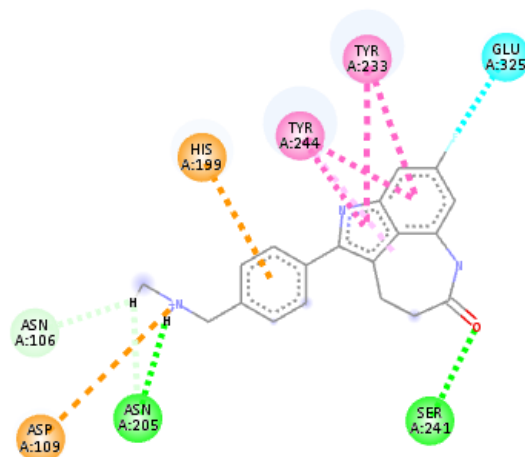
3.2.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ Β (ΑΥΤΟΔΟΚΝΙΝΑ)

3.2.3.1. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM04

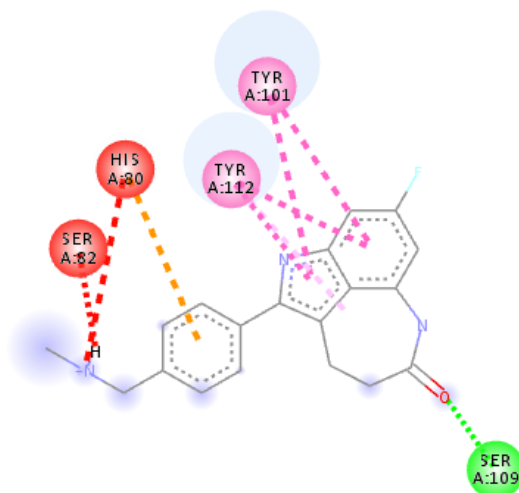


Στο ανάλογο αυτό παρατηρήθηκε ότι με την αναστροφή του αμιδικού δεσμού στον επταμελή δακτύλιο δεν διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα σερίνης και γλυκίνης, όπως αυτές έχουν αποτυπωθεί στα κρυσταλλογραφικά δεδομένα του Rucaraib. Το άτομο φθορίου δεν αλληλεπιδρά με την φαινυλαλανίνη 234 αλλά με το κατάλοιπο Glu325. Όσο αφορά τις αλληλεπιδράσεις δεν διατηρούνται τόσο οι αλληλεπιδράσεις του αμιδίου με τα κατάλοιπα σερίνης και γλυκίνης, όσο και η αλληλεπίδραση του ατόμου φθορίου με τη Phe234.

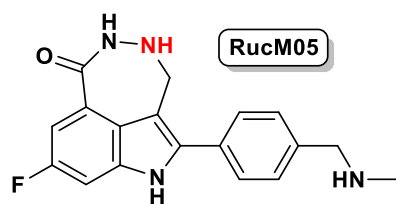
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

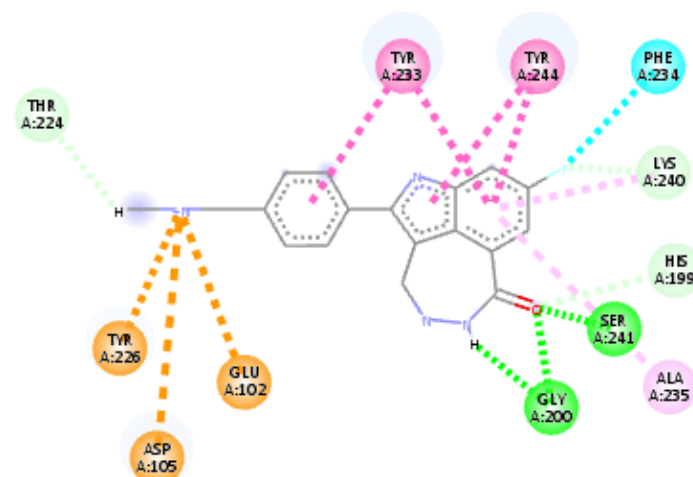


3.2.3.2. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM05

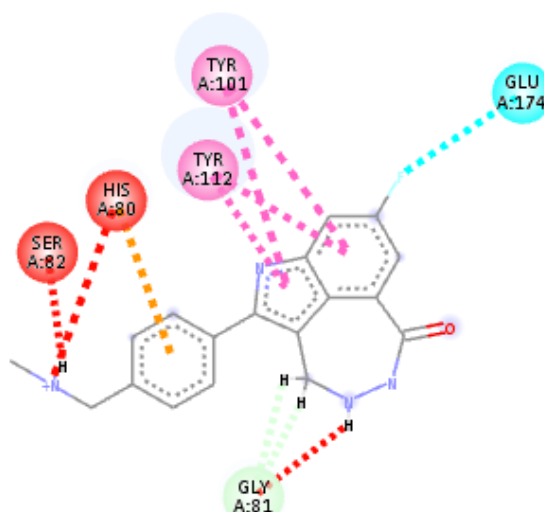


Στο ανάλογο αυτό, η εισαγωγή του ατόμου αζώτου σε γειτονική θέση ως προς το άτομο αζώτου του αμιδίου δεν συνεισφέρει στην εμφάνιση επιπλέον αλληλεπιδράσεων στο καταλυτικό κέντρο του PARP-1. Ωστόσο, οι υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις διατηρούνται. Όσον αφορά τη δομή της TNKS-1, δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα Gly/Ser.

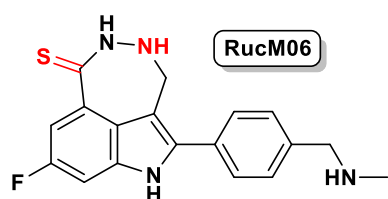
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

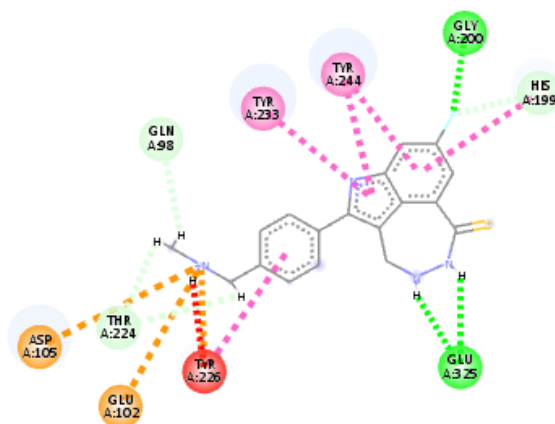


3.2.3.3. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM06

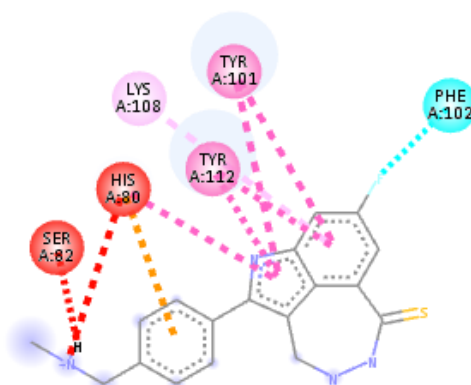


Στο ανάλογο αυτό, η αντικατάσταση του ατόμου του οξυγόνου του αμιδίου με άτομο θείου είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δεσμών υδρογόνου με το κατάλοιπο Glu325 μέσω των δύο ατόμων азώτου του επταμελούς δακτυλίου. Επιπλέον, το άτομο του φθορίου δεν αλληλεπιδρά με την Phe234 αλλά αλληλεπιδρά με την Gly200. Συμπεραίνουμε ότι το άτομο του Οξυγόνου που υπήρχε σε αυτήν τη θέση του μορίου είναι απαραίτητο για την εκδήλωση της ανασταλτικής δράσης μέσω της αλληλεπίδρασης δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης. Όσον αφορά την TNKS-1, δεν διατηρείται καμία αλληλεπίδραση (σε σχέση με τις αλληλεπιδράσεις που εμφανίζει το Rucaparib με το καταλυτικό κέντρο αυτού του ενζύμου).

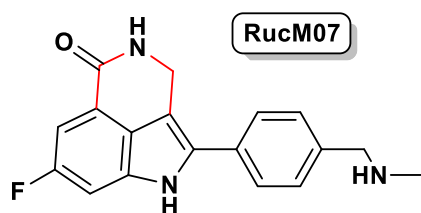
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

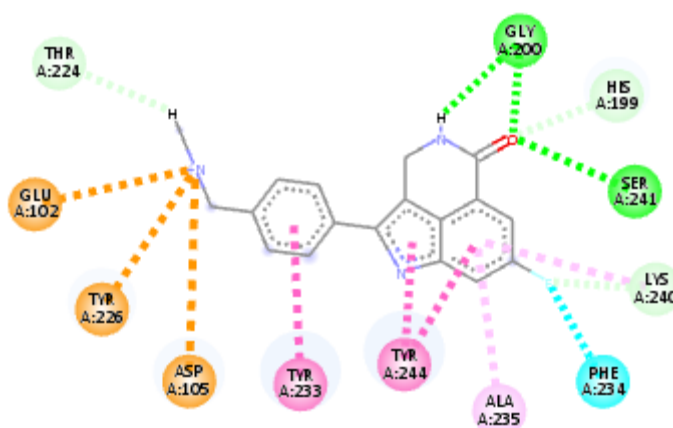


3.2.3.4. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM07

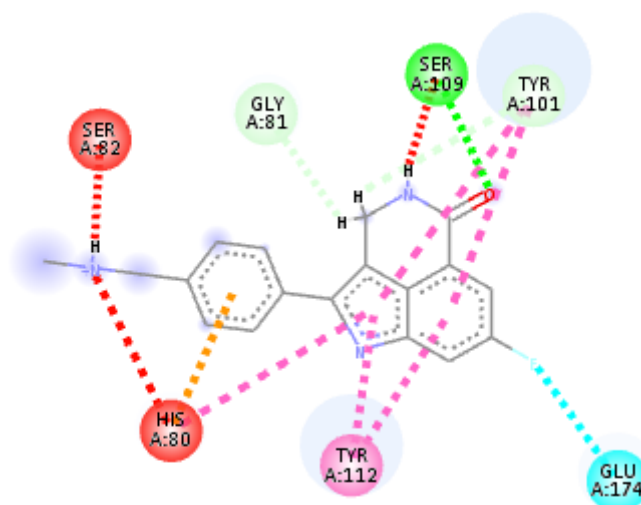


Στο ανάλογο αυτό, η αντικατάσταση του επταμελούς δακτυλίου από τον αντίστοιχο εξαμελή, οδήγησε στη διατήρηση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ τόσο της Ser241 όσο και της Gly200 του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου γεγονός που μας οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το τρικυκλικό σύστημα με τον επταμελή δακτύλιο είναι όντως σημαντικό για την εμφάνιση της μέγιστης ανασταλτικής δράσης, κάτι το οποίο αποτυπώθηκε στις τιμές της ελεύθερης ενέργειας δέσμησης.

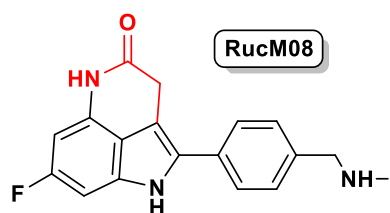
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

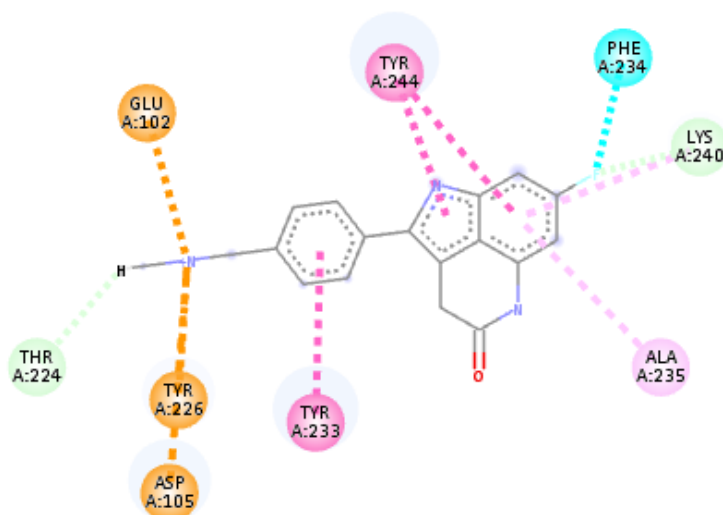


3.2.3.5. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM08

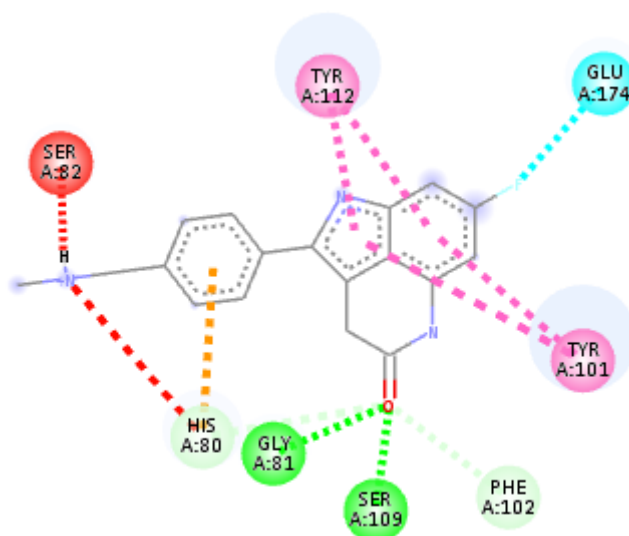


Στο ανάλογο αυτό, ο συνδυασμός αναστροφής του αμιδικού δεσμού και αντικατάστασης του επταμελούς με τον αντίστοιχο εξαμελή δακτύλιο οδήγησε στη μη διατήρηση των πλέον απαραίτητων αλληλεπιδράσεων για την ανασταλτική δράση του ενζύμου σε σχέση με το Rucaraqib. Σχεδόν παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από την μοριακή μοντελοποίηση του μορίου με την TNKS-1.

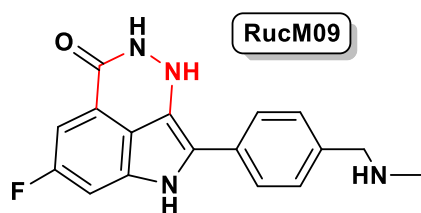
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

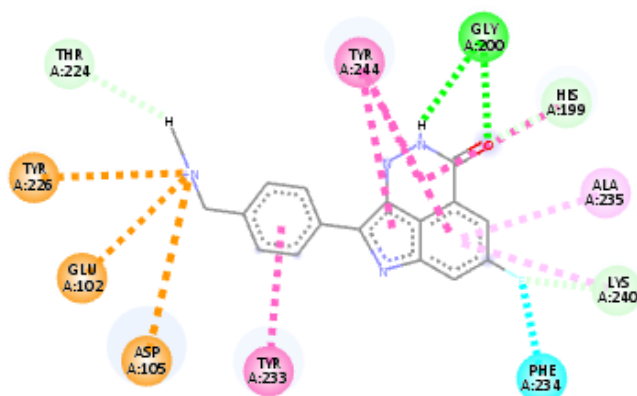


3.2.3.6. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM09

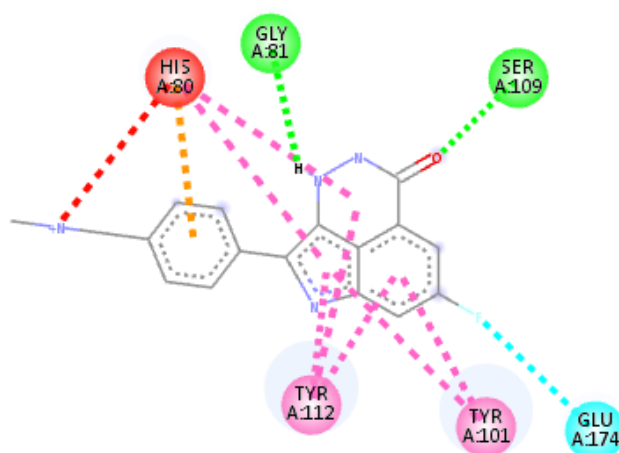


Στο ανάλογο RucM01, ο συνδυασμός εξαμελούς δακτυλίου (έναντι του επταμελούς) στο τρικυκλικό σύστημα του μητρικού μορίου και η προσθήκη ατόμου αζώτου δίπλα από τον αμιδικό δεσμό οδήγησε στην απώλεια της αλληλεπίδρασης με το κατάλοιπο Ser241. Ωστόσο, όλες οι υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις διατηρούνται. Στην περίπτωση της TNKS-1, εμφανίζονται διαφορετικές αλληλεπιδράσεις σε σχέση με τις αντίστοιχες του Rucaraib και πιο συγκεκριμένα εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου μεταξύ της νεοεισαχθείσας αμινομάδας και της Gly81 και του καρβονυλικού οξυγόνου με τη Ser109.

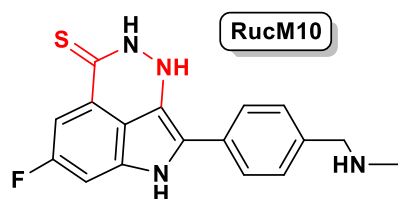
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



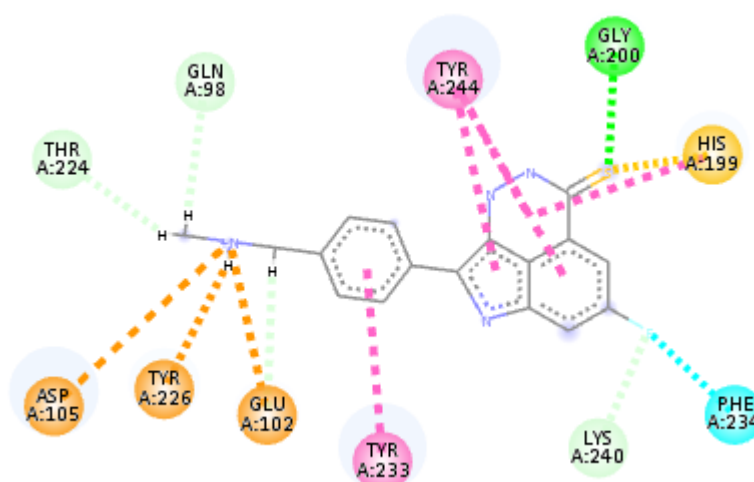
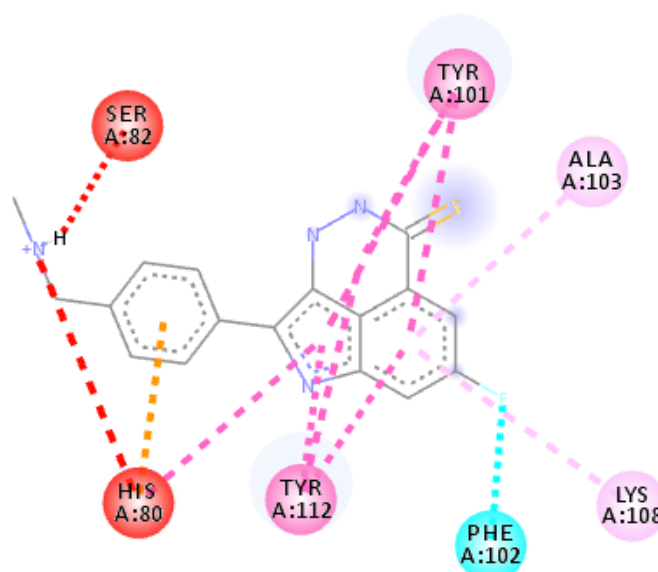
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1



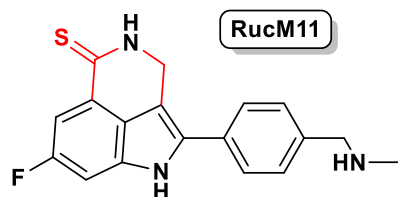
3.2.3.7. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM10



Στο εν λόγω ανάλογο, ο τριπλός συνδυασμός: αντικατάσταση του ατόμου οξυγόνου με θείο, εισαγωγή ατόμου αζώτου και αντικατάσταση επταμελούς με τον αντίστοιχο εξαμελή δακτύλιο οδήγησε στην εμφάνιση διαφορετικών αλληλεπιδράσεων μόνο μεταξύ του ατόμου του θείου με τα κατάλοιπα Gly200 και της γειτονικής της His199. Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις του αναλόγου με την TNKS-1, δεν διατηρούνται οι πλέον απαραίτητες αλληλεπιδράσεις.

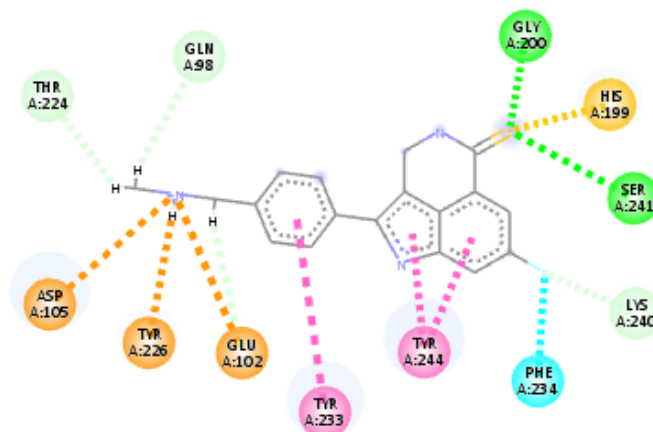
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

3.2.3.8. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM11

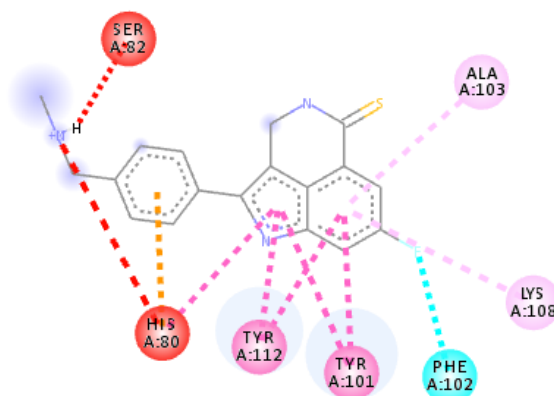


Στο ανάλογο αυτό, ο διπλός συνδυασμός αντικατάστασης του ατόμου οξυγόνου με θείο και του επταμελούς δακτυλίου με τον αντίστοιχο εξαμελή οδήγησε στην εμφάνιση δεσμών υδρογόνου με διαφορετικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της PARP-1. Ως εκ τούτου, συμπεράναμε ότι και σε αυτήν την περίπτωση η παρουσία του ατόμου οξυγόνου θα ήταν απαραίτητη για την εμφάνιση ανασταλτικής δράσης και το άτομο του θείου δεν ενδείκνυται ως άτομο αντικατάστασης του οξυγόνου. Όσον αφορά την TNKS-1, δεν διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου με τα κατάλοιπα γλυκίνης/σερίνης.

Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1

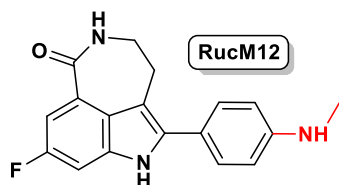


Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1



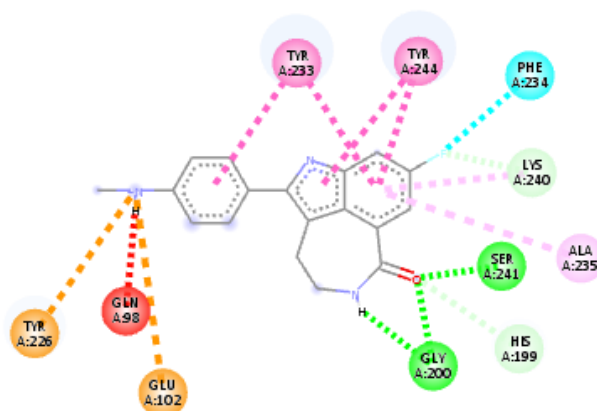
3.2.4. ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ C (ΑΥΤΟΔΟΣΚΩΝΑ)

3.2.4.1. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM12

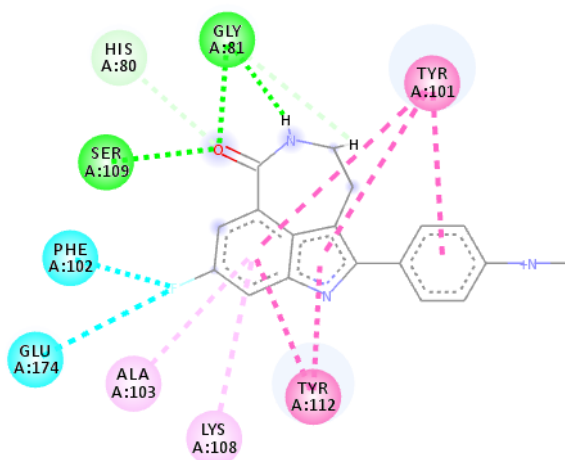


Σε αυτό το ανάλογο, με την αφαίρεση ενός ατόμου άνθρακα (linker) μεταξύ του πλευρικού βενζολικού δακτυλίου και της μεθυλαμινομάδας, παρατηρήθηκε ότι διατηρούνται όλες οι αλληλεπιδράσεις, όπως αποτυπώθηκε και στην τιμή της ελεύθερης ενέργειας δέσμωσης. Όσον αφορά την TNKS-1, παρατηρήθηκε κάτι ανάλογο.

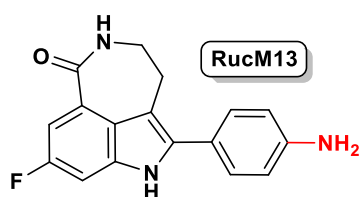
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

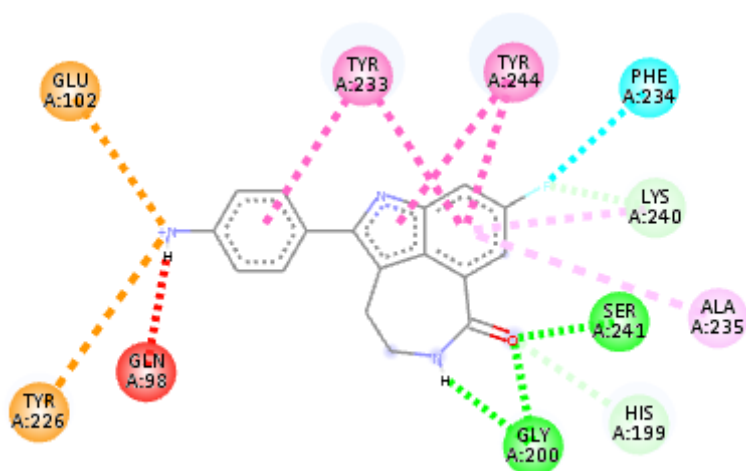


3.2.4.2. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM13

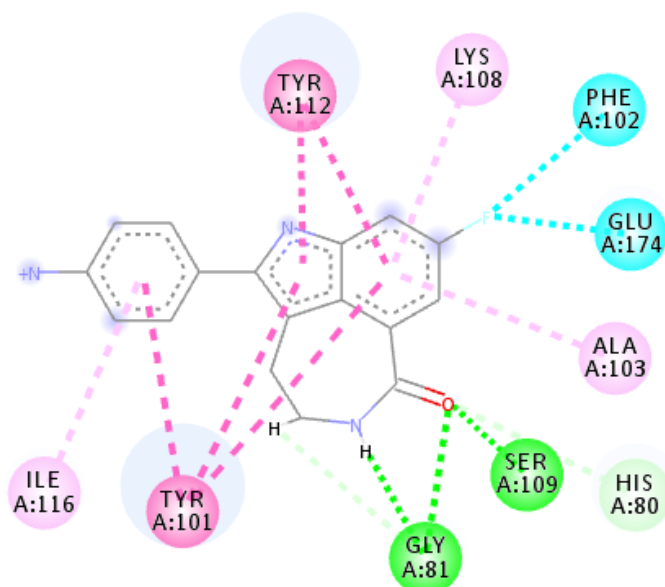


Στο ανάλογο RucM13, η παρουσία της ελεύθερης πλέον αμινομάδας οδήγησε στη διατήρηση των αλληλεπιδράσεων. Ομοίως και στην TNKS-1.

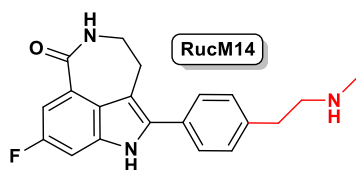
Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1

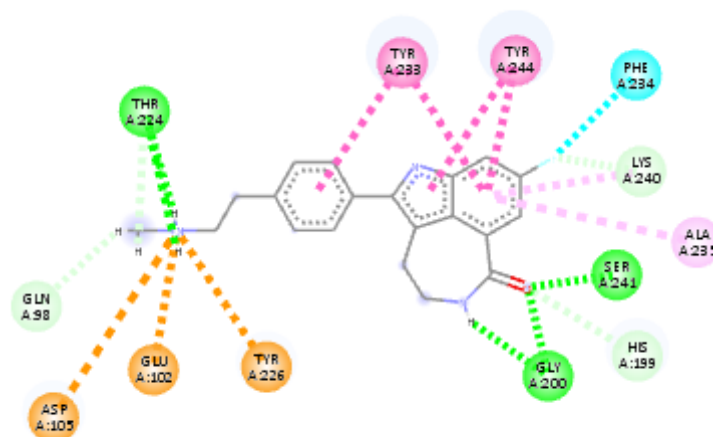


3.2.4.3. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM14

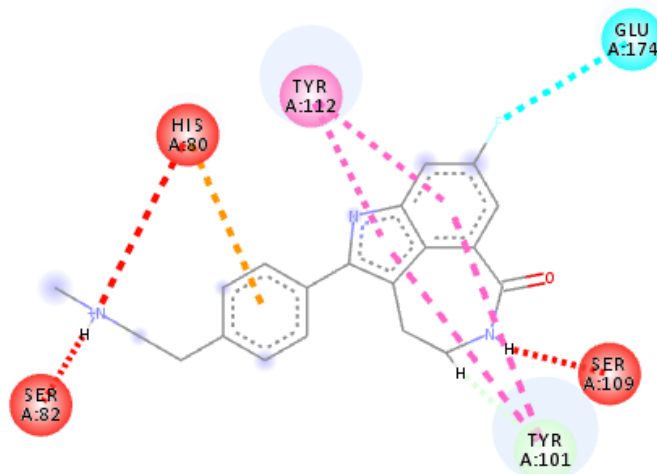


Στο τελευταίο ανάλογο, με την εισαγωγή ενός επιπλέον ατόμου άνθρακα (linker) μεταξύ του πλευρικού βενζολικού δακτυλίου και της αμινομάδας οδήγησε στη διατήρηση όλων των απαραίτητων αλληλεπιδράσεων για την εμφάνιση της ανασταλτικής δράσης αυτού του υποστρώματος. Όσον αφορά την TNKS-1, η προσθήκη αυτού του ατόμου άνθρακα επέφερε την αλλαγή του προσανατολισμού του μορίου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις, που είναι απαραίτητες για την εμφάνιση της ανασταλτικής δράσης.

Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1

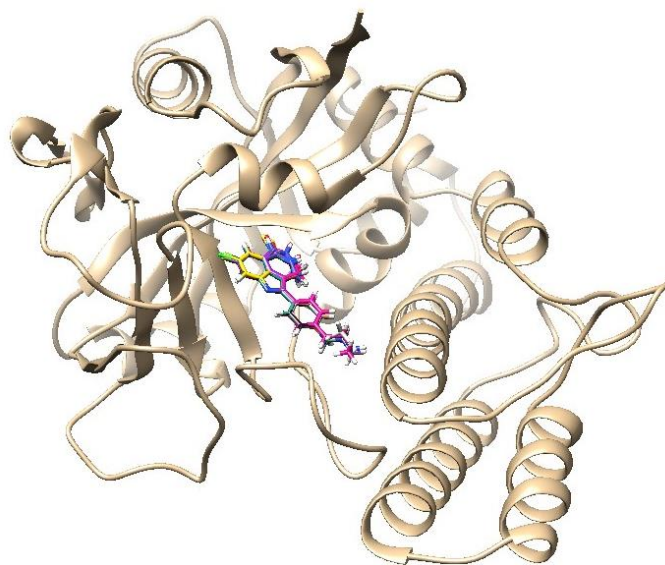


Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1



3.2.5. ΘΕΩΡΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπέρθεση των ενώσεων 1-14 κατά τη μοριακή μοντελοποίηση με την PARP-1



SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, *Nucl. Acids Res.* (2019)

Πίνακας Θεωρητικών Τιμών Ελεύθερης Ενέργειας Σύνδεσης

Ένωση	PARP-1, $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)	TNKS-1, $\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol)
Rucaparib	-10.9	-9.7
RucM01	-10.7	-9.4
RucM02	-10.6	-9.2
RucM03	-9.4	-9.4
RucM04	-9.9	-9.3
RucM05	-10.7	-9.8
RucM06	-10.0	-9.3
RucM07	-10.5	-9.4
RucM08	-9.6	-9.3
RucM09	-10.2	-9.5
RucM10	-9.2	-8.7
RucM11	-9.4	-9.1
RucM12	-10.9	-10.1
RucM13	-10.8	-10.2
RucM14	-11.1	-9.4

3.2.6. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟΙ ΝΕΟΙ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΩΝ PARP

Τα ανάλογα με τα καλύτερα θεωρητικά αποτελέσματα έχουν την μικρότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης $\Delta G_{\text{binding}}$. Τα ανάλογα RucM05, RucM012, RucM013 και RucM014.

Στη περίπτωση του αναλόγου RucM05 διατηρούνται όλες οι αλληλεπιδράσεις με την PARP-1, όπως οι δεσμοί υδρογόνου με την Ser241 και Gly200, ο δεσμός φθορίου με την Phe234, οι υδρόφοβες αλληλεπίδρασης Tyr233 και Tyr244. Επίσης, παρατηρήθηκε ο δεσμός φθορίου με το γλουταμινικό 174 της Τανκυράσης-1. Στο ανάλογο RucM12 διατηρήθηκαν επίσης όλες οι αλληλεπιδράσεις τόσο με την PARP-1 όσο και με την TANKS-1, ιδιαίτερα στα διατηρημένα κατάλοιπα Ser και Gly. Στο ανάλογο RucM13 διατηρούνται όλες οι αλληλεπιδράσεις τόσο με την PARP-1 όσο και με την TNKS-1, όσο και στο RucM14. Η παρουσία του θετικά φορτισμένου αζώτου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή μόνο της PARP-1, ενώ στην TANKS-1 δεν υπάρχουν αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα.

Από την μελέτη αυτή προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι εν δυνάμει αναστολείς - ανάλογα του Rucaraib όπως RucM05, RucM12-14 εμφανίζουν μικρότερη ελεύθερη ενέργεια από το Rucaraib στις πρωτεΐνες PARP-1 και TANKS-1,

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΌΡΓΑΝΑ

Κατά τις πειραματικές διαδικασίες που περιγράφονται στη συνέχεια, οι αρχικές ενώσεις, όλα τα αντιδραστήρια καθώς και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις εταιρίες Aldrich, Alfa Aesar, Fluka, Fluorochem, TCI America και Merck και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία, με μόνη εξαίρεση τους διαλύτες, οι οποίοι κατέστησαν απόλυτοι όπου ήταν απαραίτητο, και διατηρήθηκαν σε άνυδρες συνθήκες. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες (CDCl_3 και DMSO-d_6) που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται επίσης από τις παραπάνω εταιρείες.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) καθώς και στην παρασκευαστική χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F_{254} ms της Merck, ενώ ο καθαρισμός των ενώσεων μέσω χρωματογραφίας στήλης πραγματοποιήθηκε με silica gel 60 F_{254} της Merck.

Η λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$ πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο NMR (www.nmrcenter.uoi.gr) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AV 400 και 500, ενώ η λήψη φασμάτων μάζας χαμηλής διακριτικής ικανότητας λήφθηκαν στο όργανο Agilent MSD-Trap (ESI) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τα φάσματα μάζας υψηλής ευκρίνειας ORBITRAP-LC-MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τα σημεία τήξεως των ενώσεων προσδιορίστηκαν σε συσκευή Buchi 510.

4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

4.2.1. ΈΝΩΣΗ 2: 5-((6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-δiónη

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

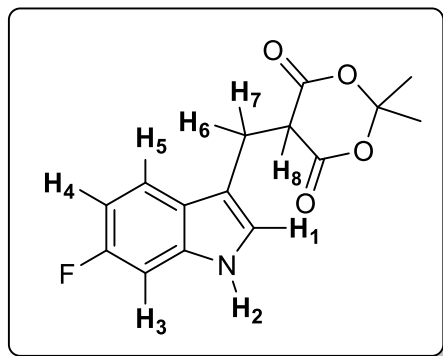
Σε μία δίκαιμη σφαιρική φιάλη εισάγονται σε αναλογία 1,1:1:1 (σε διαλύτη MeCN) το 6-φθόρο-ινδόλιο, το οξύ Meldrum, η φορμαλδεΐδη και καταλυτική ποσότητα προλίνης (0,05 eq). Η αντίδραση αφήνεται για 16-24 h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (μεταξύ 25-30°C), ενώ η πορεία της αξιολογείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₆ και 2:1 CH₃COOCH₂CH₃:C₆H₁₄. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης (εάν δεν έχει καταναλωθεί το Meldrum's acid, προστίθεται ελάχιστη ποσότητα L-Proline και η αντίδραση ελέγχεται με TLC μέχρι την κατανάλωσή του), αποχύνεται το περιεχόμενο της δίκαιμης σε μια καθαρή μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, εκπλύνεται με CH₂Cl₂ και απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό (περιστροφικός εξατμιστήρας). Στη συνέχεια, εκχυλίζεται με CH₃COOC₂H₅/H₂O προκειμένου να απομακρυνθούν τα άλατα προλίνης, ελέγχεται η οργανική φάση μέχρι να καθαρίσει από τα άλατα και κατόπιν συλλέγεται σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προκειμένου να απομακρυνθεί ο οξικός αιθυλεστέρας στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Στο ίζημα που προκύπτει προστίθεται διαιθυλαιθέρας και η σφαιρική μεταφέρεται στους υπερήχους, όπου κρίνεται το ποσό του αιθέρα που πρέπει να προστεθεί. Ο όγκος του υπολείμματος αφήνεται στο ψυγείο ως την ανακρυστάλλωση του προϊόντος. Ακολουθεί διήθηση του πρώτου ιζήματος (I_{Z1}) με εκπλύσεις με παγωμένο αιθέρα. Στην πρώτη διήθηση αναμένεται να ανακτηθεί το 70% του προϊόντος. Επαναλαμβάνεται η πορεία αυτή και για το διήθημα που προκύπτει (Δ1) μέχρις ότου να μην λαμβάνεται ίζημα καθαρού προϊόντος. Για τα μη καθαρά υπολείμματα προϊόντος ακολουθεί η πορεία ανακρυστάλλωσης με 2 διαλύτες που αναλύεται παρακάτω. (Στην δική μας περίπτωση χρησιμοποιήθηκε CH₃OH/C₆H₁₄). Στην περίπτωση μη καθαρού εναπομείναντος υπολείμματος γίνεται καθαρισμός σε χρωματογραφική στήλη σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄ - CH₃COOC₂H₅. Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνάει το 90%.

Γενική πορεία ανακρυστάλλωσης με 2 διαλύτες

1. Η ένωση διαλύεται στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα πολικού διαλύτη (η διαλυτοποίηση μπορεί να γίνει και με θέρμανση).

2. Στάγδην και υπό ανάδευση προστίθεται μη πολικός διαλύτης μέχρι σχηματισμού αιωρήματος.
3. Προσθήκη πολικού διαλύτη μέχρι διαύγασης.
4. Κατάψυξη.

Χαρακτηρισμός ένωσης



Σημείο Τήξης: 144-146°C

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.46 (s, 3H, CH_3), 1.71 (s, 3H, CH_3), 3.64 (d, $J=5$ Hz, 2H, H-6, H-7), 3.76 (t, $J=4,5$ Hz, 1H, H-8), 6.91 (td, $J=9$ Hz, 1H, H-3), 7 (dd, $J=9,5$ Hz, 1H, H-4), 7.15 (d, $J=1,5$ Hz, H-1), 7.64 (q, $J=5,5$ Hz, H-5), 8 (s, 1H, H-2) (ppm)

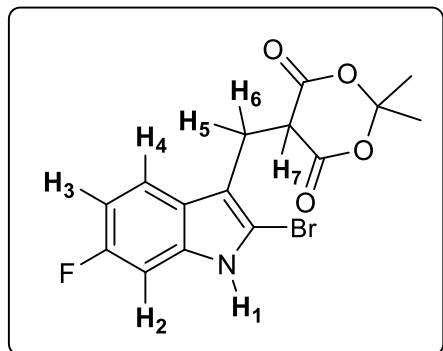
4.2.2. ΈΝΩΣΗ 3: 5-((2-βρώμο-6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3,διοξανιο-4,6-διόνη

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

Σε μια μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται 15 ml CH_2Cl_2 και 15 ml THF (15 ml για κάθε γραμμάριο αρχικής ένωσης) μαζί με το 1 g = 1000 mg (1eq) της ένωσης **2**. Το διάλυμα αναδεύεται για 20 min, ακολούθως ψύχεται στους 0-5 °C και προστίθεται το Pyridinium Perbromide (1,1 eq) και το όλο διάλυμα αναδεύεται στους 0-5 °C για 1 h. Η πορεία της αντίδρασης αξιολογείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 2:1 $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_6$. Στην ίδια μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και σε θερμοκρασία 0-5 °C προστίθεται διάλυμα Na_2CO_3 και αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Κατόπιν, προστίθεται αιθέρας και πραγματοποιούνται εκχυλίσσεις προκειμένου να απομακρυνθεί το Pyridinium Perbromide από το διάλυμα. Ακολουθούν εκχυλίσσεις με EtOAc έως ότου καθαρίσει η υδατική φάση. Η οργανική φάση του $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ξηραίνεται με Na_2SO_4 , αφήνεται για ανάδευση, κατόπιν διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό (περιστροφικός εξατμιστήρας). Πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με θερμό $\text{C}_6\text{H}_{14}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$ και ο όγκος του υπολείμματος αφήνεται στο ψυγείο ως την ανακρυστάλλωση του προϊόντος. Το προϊόν διαλύεται μερικώς στον αιθέρα και επομένως οι εκπλύσεις του προκύπτοντος

ιζήματος διενεργούνται με ψυχρό C_6H_{14} . Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνάει το 85%.

Χαρακτηρισμός ένωσης



Σημείο Τήξης: Αλλαγή χρώματος από τους 118

$^{\circ}C$ και έπειτα ενώ αποσυντίθεται πλήρως στους 201-203 $^{\circ}C$.

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.66 (s, 3H, CH_3), 1.75 (s, 3H, CH_3), 3.56 (d, $J=6$ Hz, 2H, H-5, H-7), 3.85 (t, $J=5$ Hz, 1H, H-7), 6.91 (td, $J=9$ Hz, 1H, H-2), 6.98 (dd, $J=10$ Hz, 1H, H-3), 7.58 (q, $J=5$ Hz, 1H, H-4), 8.31 (s, 1H, H-1) (ppm)

4.2.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4_A ΚΑΙ 4_C: 3-((2-βρώμο-6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο)προπανοϊκός μεθυλεστέρας και (-αιθυλεστέρας)

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

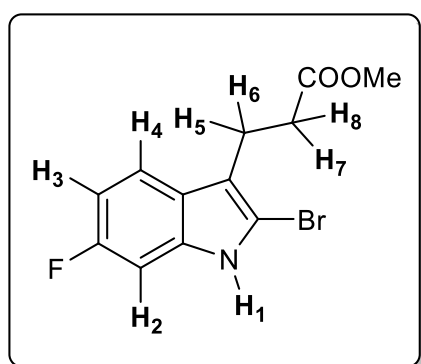
Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα N_2 προστίθεται η ένωση **3** (1 mmol) μαζί με τους διαλύτες (10 ml) [1:9 MeOH:Pyridine (dry)] ώστε να διαλυθεί πλήρως. Μετά την πλήρη διάλυση, προστίθεται ο στερεός $Cu(0)$ (0,1 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό βρασμό (reflux), σε θερμοκρασία 108 $^{\circ}C$ για 3 h και 30 min. Συστήματα διαλυτών για τον έλεγχο της προόδου της αντίδρασης είναι το 2:1 C_6H_{14} : $CH_3COOCH_2CH_3$ και 2:1 CH_2Cl_2 : C_6H_{14} και ο εστέρας αναμένεται σε υψηλότερο R_f από την αρχική ένωση **3**. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης και αφού απομακρυνθούν οι διαλύτες (CH_3OH και πυριδίνη) προστίθεται αιθέρας [τις περισσότερες φορές σε αυτό το στάδιο παρατηρείται η συσσωμάτωση του $Cu(0)$]. Επακολούθως, προστίθεται διάλυμα HCl (1N)~70 ml και διενεργούνται εκχυλίσεις με NH_4Cl 20% έως ότου όλη η πυριδίνη εξουδετερωθεί και μετατραπεί στο υδροχλωρικό της άλας. Ο εστέρας παραλαμβάνεται στην αιθερική στοιβάδα και γίνεται καθαρισμός σε χρωματογραφία στήλης σε σύστημα 1:2 C_6H_{14} : CH_2Cl_2 . Βέλτιστη διαχείριση του εστέρα επιτυγχάνεται εάν μετά την εξάτμιση για την απομάκρυνση της CH_3OH , προστεθεί αιθέρας ακολουθήσει εκχύλιση αρχικά με

διάλυμα HCl (1N) και κατόπιν NH₄Cl 20%. Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνάει το 65%.

Πειραματικές Παρατηρήσεις:

- Ο χαλκός κατά τη διήθηση περνάει από τους ηθμούς.
- Ο εστέρας με την προσθήκη πεντανίου γίνεται στέρεο.

Χαρακτηρισμός ένωσης



¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) δ : 2.64 (t, J= 9,5 Hz, 2H, H-5, H-6), 3.04 (t, J= 8 Hz, 2H, H-7, H-8), 3.67 (s, 3H, CH₃), 6.88 (td, J= 10 Hz, 1H, H-3), 6.97 (dd, J= 9,5 Hz, 1H, H-4), 7.44 (q, J= 5Hz, H-2), 8.03 (s, 1H, H-1) (ppm)

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης της 4c:

Ακολουθείται η ίδια πορείας σύνθεσης και οι ίδιες συνθήκες και αναλογίες αντιδραστηρίων με την αντίδραση σύνθεσης του μεθυλεστέρα με μόνη διαφορά ότι αντί για μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη.

4.2.4. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 4b: 3-((2-βρώμο-6-φθορο-1H-ινδολο-3-υλο)προπανοϊκό οξύ

4.2.4.1. Από την αντίδραση υδρόλυσης με Cu(0) σε πυριδίνη/H₂O της ένωσης 3

Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία με αυτήν της ένωσης 4a, με μόνη διαφορά ότι αντικαταστάθηκε η CH₃OH με H₂O και ότι η πορεία της χημικής αντίδρασης ελεγχόταν σε σύστημα διαλυτών 10:1 CH₂Cl₂:CH₃OH. Η αντίδραση δεν απέδωσε την επιθυμητή ένωση.

4.2.4.2. Από την αντίδραση υδρόλυσης με HCl της ένωσης 3

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα και προσαρμοσμένο σωλήνα CaCl_2 , προστίθεται η ένωση **3** με το HCl (1ml HCl για κάθε 1000 mg αρχικής ένωσης) και θερμαίνεται μέχρι βρασμού (reflux). Αρχικά, το διάλυμα της αντίδρασης χρωματίζεται ροζ και σταδιακά σκουραίνει όσο πλησιάζει σε θερμοκρασία βρασμού (90°C). Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) διενεργείται σε σύστημα διαλυτών 10:1 ή 12:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, ενώ κατά τη δειγματοληψία της αντίδρασης πριν τον έλεγχο με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) πραγματοποιείται εξουδετέρωση με 20% Na_2CO_3 μέχρι $\text{pH}\sim 3-4$. Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 20 - 24h, μέχρι να μην ανιχνεύεται ποσότητα αρχικής ένωσης (προϊόν βρωμίωσης **3**) και κατόπιν ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Επακολούθως, προστίθεται Na_2CO_3 20% ($\text{pH}=2-4$) και πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με CH_2Cl_2 και $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, έως ότου η υδατική φάση να μην φέρει οργανικά μόρια. Οι οργανικές φάσεις ελέγχονται, ξηραίνονται με Na_2SO_4 , διηθούνται και οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό (περιστροφικός εξατμιστήρας). Ο καθαρισμός με χρωματογραφική στήλη πραγματοποιείται σε αρχικό σύστημα διαλυτών 12:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, κατόπιν 10:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$, 5:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ και τέλος μόνο $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$. Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνά το 20%.

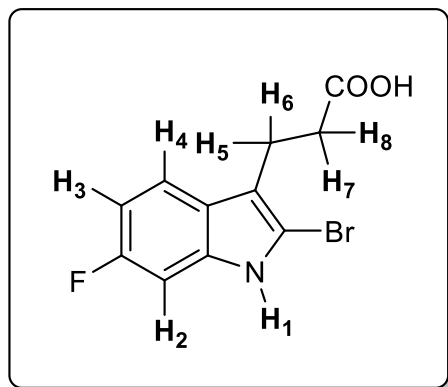
4.2.4.3. Από την αντίδραση υδρόλυσης της ένωσης **4a**

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθεται ο εστέρας **4a** (1 mmol), το μεθανολικό διάλυμα 3 N του NaOH (περιέχει 3 mmol NaOH για κάθε 1 mmol αρχικής ένωσης) και το CH_2Cl_2 (10 ml CH_2Cl_2 για κάθε 1 ml μεθανολικού διαλύματος) και το όλο μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 22-24h. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης διενεργείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε συστήματα διαλυτών 1:1 $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{EtOAc}$ και 12 : 1 $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (αφού πρώτα έχει προηγηθεί ανάπτυξη σε σύστημα διαλυτών 1:1 $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ και έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ή μη εστέρα **4a**). Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, οι διαλύτες της αντίδρασης απομακρύνονται υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστήρα και λαμβάνουν χώρα εκχυλίσεις με $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$. Το προϊόν ανιχνεύεται στην υδατική στοιβάδα, στην οποία προστίθεται 1N HCl έως ότου αποκτήσει $\text{pH}=2-3$ [Στην οργανική στοιβάδα εγκλωβίζονται τα ίχνη του εστέρα που δεν αντέδρασαν]. Ακολουθούν εκχυλίσεις με $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5/\text{H}_2\text{O}$, όπου παραλαμβάνεται το οξύ (μπλε φθορίζουσα). Ξηραίνεται η οργανική στοιβάδα με Na_2SO_4 , διηθείται και απομακρύνονται οι διαλύτες (περιστροφικός εξατμιστήρας). Στο προϊόν γίνεται

καθαρισμός σε χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 10:1,25 .
 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$. Η απόδοση της αντίδρασης υδρόλυσης ξεπερνά το 97%

Χαρακτηρισμός ένωσης



$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, DMSO) δ :: 2.05 (m, 2H, H-5, H-6), 2.25 (m, 2H, H-7, H-8), 6.64 (dd, $J=10$ Hz, 1H, H-3), 6.76 (ddd, $J=10$ Hz, 1H, H-4), 7.28 (t, $J=5$ Hz, 1H, H-2), 10.5 (s, 1H, H-1), 12.1 (s, 1H, COOH) (ppm)

4.2.5. ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 5: 2-ΒΡΩΜΟ-7-ΦΘΟΡΟ-3,4-ΔΙΥΔΡΟΒΕΝΖΟ[CD]ΙΝΔΟΛΟ-5(1H)-ΟΝΗ

4.2.5.1. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης 3 με $\text{Sc}(\text{OTf})_3/\text{CH}_3\text{NO}_2$

Πειραματική πορεία Σύνθεσης:

Σε δίλιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα N_2 εισάγεται ο εστέρας διαλυμένος σε CH_3NO_2 και 12% $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ και το μείγμα υποβάλλεται σε θέρμανση με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι 95-97 °C. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιείται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 1:1 $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$. Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 24 h. Ακολούθως, απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό (περιστροφικός εξαμιστήρας). Ακολουθούν εκχυλίσσεις με $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ και $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5/\text{H}_2\text{O}$. Οι οργανικές φάσεις ξηραίνονται και απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό. Στο προϊόν γίνεται καθαρισμός σε χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 4:1 $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$.

4.2.5.2. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης 3 με PPA

Πειραματική πορεία Σύνθεσης:

Σε μονόλαιμη σφαιρική με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα και υπό αδρανή ατμόσφαιρα N_2 εισάγεται το υπόστρωμα (ένωση **3**) και το PPA. Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται σταδιακά μέχρι τους $130\text{ }^\circ\text{C}$. Ο έλεγχος της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) διενεργείται σε σύστημα διαλυτών 2:1 $CH_3COOC_2H_5:C_6H_{14}$. Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 24 h και ακολουθεί εξουδετέρωση του PPA με υδατικό διάλυμα Na_2CO_3 έως ότου $pH\sim 5-6$. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με CH_2Cl_2/H_2O και $CH_3COOC_2H_5/H_2O$. Στο προϊόν γίνεται καθαρισμός σε χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 4:1 $C_6H_{14} : CH_3COOC_2H_5$.

4.2.5.3. Από την θερμική αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης **3** με CH_3NO_2 .

Ακολουθείται η πειραματική πορεία που περιγράφεται στην υποενότητα 4.2.5.1., με μόνη διαφορά ότι δεν προστίθεται ο καταλύτης $Sc(OTf)_3$ και ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε υψηλότερη θερμοκρασία $\sim 102\text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.5.4. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης **4b** με $Sc(OTf)_3/CH_3NO_2$

Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία με αυτήν της ένωσης **3** στην παράγραφο 4.2.5.1., με μόνη διαφορά ότι η πορεία της χημικής αντίδρασης ελέγχεται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών αρχικά 2:1 $C_6H_{14}:CH_3COOC_2H_5$ και κατόπιν 10:1 $CH_2Cl_2:CH_3OH$ (για να διευκρινιστεί εάν έχει καταναλωθεί η αρχική ένωση του οξέος **4b**).

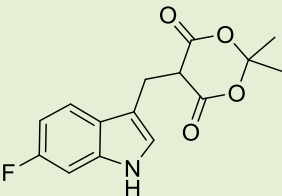
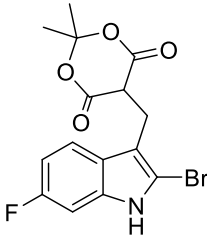
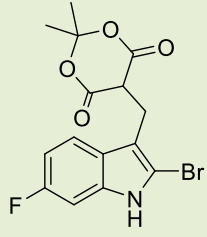
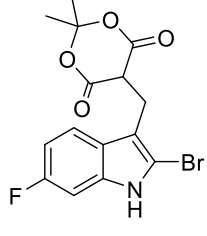
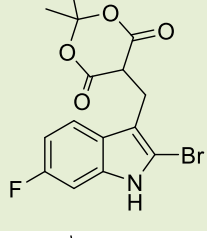
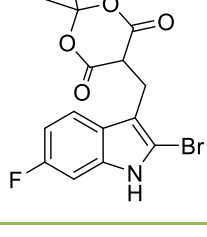
4.2.5.5. Από την αντίδραση κυκλοποίησης της ένωσης **4b** με Κυανουρικό Οξύ

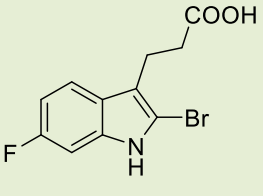
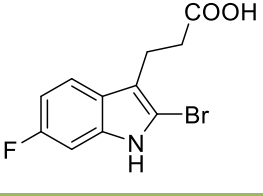
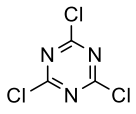
Πειραματική πορεία Σύνθεσης:

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου, το οξύ (0,1 mmol), το κυανουρικό χλωρίδιο (0,16 mmol), το άνυδρο CH_2Cl_2 (1 ml διαλύτη για κάθε 0,09 mmol υποστρώματος **4b**), η πυριδίνη (0,1 mmol) και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Ακολούθως, προστίθεται το διάλυμα $AlCl_3$ σε τολουόλιο (0,12 mmol $AlCl_3$ και 0,2 mmol τολουολίου για κάθε 0,1 mmol υποστρώματος **4b**). Η πορεία της χημικής αντίδρασης ελέγχεται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών αρχικά 1:1 $C_6H_{14}:CH_3COOC_2H_5$ και κατόπιν 10:1 $CH_2Cl_2:CH_3OH$. Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 23 h και οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστήρα και κατόπιν στην αντλία υψηλού κενού. Στο προκύπτον μείγμα γίνεται καθαρισμός σε

χρωματογραφική στήλη σε σύστημα διαλυτών αρχικά 30:1 CH₂Cl₂:CH₃OH με σταδιακά αυξανόμενη πολικότητα έως 5:1 CH₂Cl₂:CH₃OH.

4.2.5.6. Συνοπτικός Πίνακας Προσπαθειών Σύνθεσης της Ένωσης 5

Υπόστρωμα	Αντιδραστήριο	Διαλύτης	Θερμοκρασία	Διάρκεια Αντίδρασης
	8% Sc(OTf) ₃	CH ₃ NO ₂	95-97 °C	24 h
	10% Sc(OTf) ₃	CH ₃ NO ₂	95-97 °C	24 h
	12% Sc(OTf) ₃	CH ₃ NO ₂	95-97 °C	24 h
	120% Sc(OTf) ₃	CH ₃ NO ₂	95-97 °C	24 h
	-	CH ₃ NO ₂	102 °C	24 h
	PPA	-	130 °C	24 h

	12% Sc(OTf) ₃	CH ₃ NO ₂	95-97 °C	20 h
	 AlCl ₃	CH ₂ Cl ₂ / Pyridine	r.t.	23 h

4.2.6. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12: 3-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολο-3-υλο) προπανοϊκός μεθυλεστέρας

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

Η ενεργοποίηση του υποστρώματος από τον καταλύτη και η ενεργοποίηση του βορονικού λαμβάνουν χώρα αρχικά ξεχωριστά.

A. Σε μια μονόλαιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα προστίθεται το 4-formylphenylboronic Acid (0,11 mol) και υπό ανάδευση διαλύεται στο N,N-διμεθυλοακεταμίδιο (DMAc) (4 ml DMAc για κάθε 1 g βορονικού οξέος) και το μείγμα τίθεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Στη συνέχεια, προστίθεται το υδατικό διάλυμα Na₂CO₃ (0,525 mol) και συνεχίζεται η ανάδευση για 2 h.

B. Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα, υπό ατμόσφαιρα N₂, προστίθεται ο καταλύτης (5%) και ο εστέρας **4a** (0,1 mol), διαλυμένος σε DMAc (16 ml DMAc για κάθε 1 g υποστρώματος **4a**) και το όλο μείγμα (κόκκινο χρώμα) αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση στους 95 °C για 30 min.

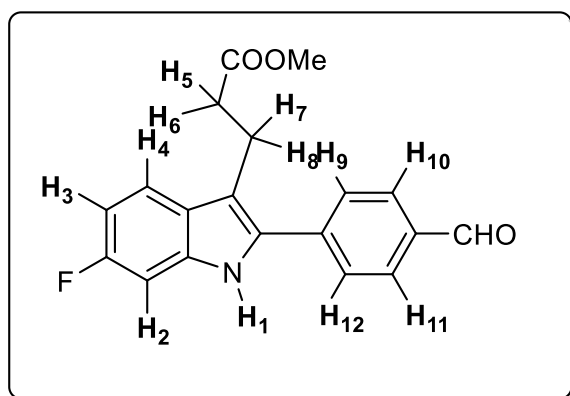
Ακολούθως, το περιεχόμενο της σφαιρικής (A) προστίθεται στην (B) και το χρώμα του μείγματος μεταβάλλεται από κόκκινο σε καφέ. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅ και η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 2 h. Ακολουθούν εκχυλίσεις με CH₂Cl₂/H₂O (ή brine). Το N,N-διμεθυλοακεταμίδιο απομακρύνεται στην αντλία υψηλού κενού υπό θέρμανση και ανάδευση. Γίνεται καθαρισμός με χρωματογραφική στήλη σε σύστημα διαλυτών 3: 1: 0,5 C₆H₁₄: CH₃COOC₂H₅: CH₂Cl₂.

Εναλλακτική Πορεία Επεξεργασίας:

Προστίθενται 10ml H₂O και αφήνεται υπό ανάδευση για 1 h στους 20 °C και ακολουθεί διήθηση υπό κενό και έκπλυση με απεσταγμένο H₂O. Το ίζημα

μεταφέρεται σε μονόλαιμη σφαιρική με 2ml MeOH, θερμαίνεται στους 60 °C για 1 h, ακολούθως ψύχεται στους 20 °C και τίθεται υπό ανάδευση για 1h. Τέλος, γίνεται διήθηση υπό κενό.

Χαρακτηρισμός ένωσης

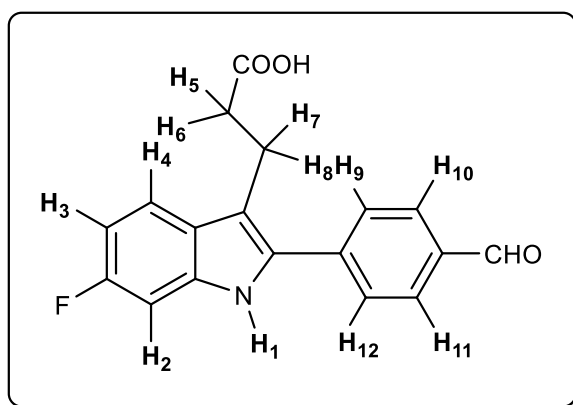


$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 2.69 (t, $J=9$ Hz, 2H, H-7, H-8), 3.28 (t, $J=8,5$ Hz, 2H, H-5, H-6), 3.63 (s, 3H, CH_3), 6.92 (t, $J=8,5$ Hz, 1H, H-3), 7.05 (d, $J=9$ Hz, 1H, H-4), 7.55 (q, $J=9$ Hz, 1H, H-2), 7.70 (d, $J=8$ Hz, 2H, H-9, H-10), 7.95 (d, $J=8,5$ Hz, 2H, H-11, H-12), 8.40 (s, 1H, H-1), 10.04 (s, 1H, CHO) (ppm)

4.2.7. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 13: 3-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1H-ινδολο-3-υλο) προπανοϊκό οξύ

Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.4.3.

Χαρακτηρισμός ένωσης



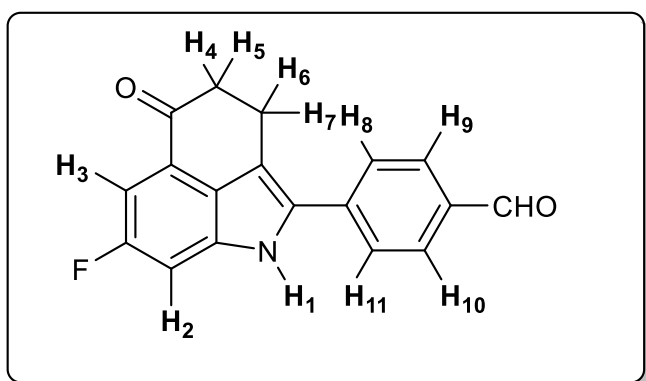
$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 2.70 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, H-7, H-8), 3.25 (t, $J=8,5$ Hz, 2H, H-5, H-6), 6.95 (t, $J=8,5$ Hz, 1H, H-3), 7.09 (d, $J=10$ Hz, 1H, H-4). Στα 7,5 ppm υπάρχει μια διπλή με 2H και μια τριπλή με 3H. Είναι σίγουρα τα πρωτόνια H9, H10, H11, H12. Είναι και το H2 εκεί μέσα? 8.10 (s, 1H, H-1)

4.2.8. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 14: 4-(7-φθορο-5-όξο-1,3,4,5-τετραυδροβένζο[cd]ινδόλο-2-υλο)βενζαλδεΐδη

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

Ακολουθείται η πειραματική πορεία που περιγράφεται στην υποενότητα 4.2.5.1., με μόνη διαφορά ότι το υπόστρωμα είναι το προϊόν σύζευξης Suzuki **13**.

Χαρακτηρισμός ένωσης



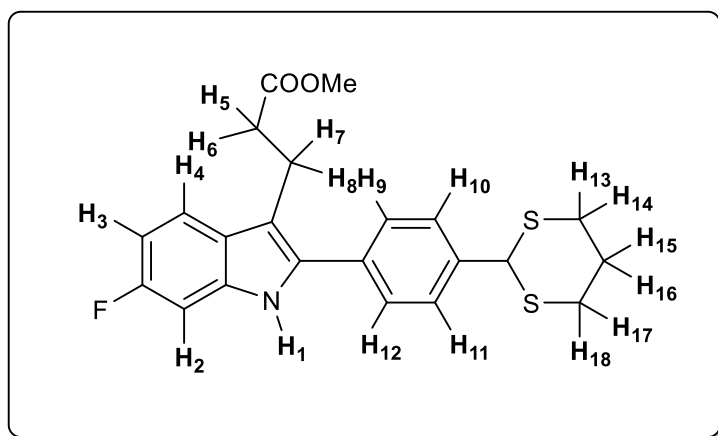
Η ένωση, αν και εντοπίστηκε με επιτυχία στο φάσμα $^1\text{H NMR}$, συντέθηκε σε ίχνη, οπότε θεωρήθηκε προτιμότερο να μην παρουσιαστεί το φάσμα. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η απουσία του πρωτονίου H-4 και η ένταξη 4 νέων πρωτονίων, λόγω της δημιουργίας του εξαμελούς δακτυλίου. Τα πρωτόνια H-4, H-5, εντοπίζονται στα 2.35 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή, και τα πρωτόνια H-6 και H-7 εντοπίζονται περίπου στα 2 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή επίσης.

4.2.9. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 15: 3-(2-4-(1,3-ΔΙΘΕΙΑΝΙΟ-2-ΥΛΟ)ΦΑΙΝΥΛΟ-6-ΦΘΟΡΟ-1H-ΙΝΔΟΛΟ-3-ΥΛΟ)ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟΣ ΕΣΤΕΡΑΣ

Πειραματική Πορεία Σύνθεσης:

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθεται το υπόστρωμα του εστέρα **12** (1 mmol), η 1,3-προπανοδιθειόλη (1,2 mmol), το $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0,19 ml) και το CH_2Cl_2 (5,35 ml CH_2Cl_2 για κάθε γραμμάριο υποστρώματος **12**). Η αντίδραση αφήνεται για 15h σε θερμοκρασία δωματίου (αφού διοχετεύτηκε αέριο HCl για 10 min υπό πάγο). Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ και 5% NaHCO_3 . Η οργανική φάση υποβάλλεται σε ξήρανση, διήθηση και απόσταξη του CH_2Cl_2 με υδραντλία στους 35 °C. Το προϊόν είναι ένα λευκό στερεό και η ανακρυστάλλωσή του διενεργείται με C_6H_{14} . Η αντίδραση είναι σχεδόν ποσοτική.

Χαρακτηρισμός ένωσης



$^1\text{H NMR}$ (500 Hz, CDCl_3) δ : 1.99 (m, 2H, H-16, H-17), 2.66 (t, $J=8$ Hz, 2H, H-18, H-19), 3.21 (t, $J= 8,5$ Hz, 2H, H-14, H-15), 3.63 (s, 3H, COOMe), 5.22 (s, 1H, H-13), 6.91 (td, $J= 9,5$ Hz, 1H, H-4), 7.05 (dd, $J= 10$ Hz, 1H, H-3), 7.51 (m, 3H, H-2, H-9, H-10), 7.58 (d, $J=8.5$ Hz, 2H, H-11, H-12), 8.02 (s, 1H, H-1)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] “World Health Organisation,” 2019. [Online]. Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [2] GLOBOCAN, “Cancer Today - IARC,” *World Health Organisation*, 2018. [Online]. Available: http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=5&group_.
- [3] B. Zand, S. N. Westin, and R. L. Coleman, “Targeted Therapy in Gynecological Malignancy,” in *Textbook of Uncommon Cancer*, John Wiley & Sons, Ltd, 2017, pp. 663–680.
- [4] G. Xu and H. L. McLeod, “Strategies for Enzyme/Prodrug Cancer Therapy,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 7, no. 11, pp. 3314 LP – 3324, Nov. 2001.
- [5] D. E. Gerber, “Targeted therapies: a new generation of cancer treatments.,” *Am. Fam. Physician*, vol. 77, no. 3, pp. 311–319, Feb. 2008.
- [6] “2019 FDA Approved Drugs,” *Center Watch*, 2019. [Online]. Available: <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approvals/>.
- [7] W. J.E. and K. S. . O. <http://orcid.org/000-0002-8417-7000> Tewari K.S. AO - Tewari, “Highlights from the gynecologic oncology track at the 2017 annual meeting of the American society of clinical oncology,” *J. Gynecol. Oncol.*, vol. 28, no. 5, pp. 1–12, 2017.
- [8] A. J. Cortez, P. Tudrej, K. A. Kujawa, and K. M. Lisowska, “Advances in ovarian cancer therapy,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 81, no. 1, pp. 17–38, 2018.
- [9] J. S. Ross, “Targeted Therapies for Cancer,” *Essentials Genomic Pers. Med.*, pp. 532–547, Jan. 2010.
- [10] C. Sawyers, “Targeted cancer therapy,” *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 294–297, 2004.
- [11] W. D. Joo, I. Visintin, and G. Mor, “Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered?,” *Maturitas*, vol. 76, no. 4, pp. 308–314, Dec. 2013.
- [12] R. A. Gates and R. M. Fink, *Oncology Nursing Secrets*, 3rd Editio. Mosby, 2007.
- [13] G. M. Cooper and R. E. Hausman, *Το κύτταρο: Μια μοριακή προσέγγιση*, 5th Ed. Washington DC: ASM Press, 2013.
- [14] WorldHealthOrganisation, “General policies for monoclonal antibodies.” World Health Organisation 2009, Geneva, p. 4, 2009.
- [15] National Cancer Institute, “NCI Dictionary of Cancer Terms,” *National Cancer Institute*, 2018. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>.
- [16] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, and G. Storm, “Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress,” *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2. Elsevier, pp. 175–187, 20-Jul-2012.
- [17] G. C. Jayson, E. C. Kohn, H. C. Kitchener, and J. A. Ledermann, “Ovarian Cancer,” *Lancet*, vol. 384, pp. 1376–1388, 2014.
- [18] V. V. Padma, “An overview of targeted cancer therapy,” *BioMedicine*, vol. 5, no. 4, p.

- 19, Nov. 2015.
- [19] U.S. Food & Drug Administration, “FDA Approved Drug Products,” 2019. [Online]. Available: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>.
- [20] “National Cancer Institute,” 2018. [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>.
- [21] N. J. Curtin, “Inhibiting the DNA damage response as a therapeutic manoeuvre in cancer,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 169, no. 8, pp. 1745–1765, 2013.
- [22] G. Giglia-Mari, A. Zotter, and W. Vermeulen, “DNA damage response,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–19, 2011.
- [23] G. Pagano *et al.*, “Fanconi anaemia proteins: Major roles in cell protection against oxidative damage,” *BioEssays*, vol. 25, no. 6, pp. 589–595, 2003.
- [24] M. J. O’Connor, “Targeting the DNA Damage Response in Cancer,” *Mol. Cell*, vol. 60, no. 4, pp. 547–560, 2015.
- [25] Seiden V. Michael, “Gynecologic Malignancies,” in *Harrison’s Principles of Internal Medicine*, 19th Editi., S. L. H. J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Dan L. Longo, Ed. McGraw-Hill, 2015, p. 2770.
- [26] E. M. Swisher *et al.*, “Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 18, no. 1, pp. 75–87, 2017.
- [27] R. L. Coleman *et al.*, “Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial,” *Lancet*, vol. 390, no. 10106, pp. 1949–1961, 2017.
- [28] “What are Key Statistics About Ovarian Cancer?,” *American Cancer Society*, 2018. [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/key-statistics.html>.
- [29] J. Prat, “Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features,” *Virchows Arch.*, vol. 460, no. 3, pp. 237–249, 2012.
- [30] D. Bell *et al.*, “Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma,” *Nature*, vol. 474, no. 7353, pp. 609–615, 2011.
- [31] N. M. B. Martin *et al.*, “Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy,” *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 917–921, 2005.
- [32] M. H. Ebell, M. B. Culp, and T. J. Radke, “A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer,” *Am. J. Prev. Med.*, vol. 50, no. 3, pp. 384–394, 2016.
- [33] T.-T. Gong, Q.-J. Wu, E. Vogtmann, B. Lin, and Y.-L. Wang, “Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies,” *Int. J. cancer*, vol. 132, no. 12, pp. 2894–2900, Jun. 2013.
- [34] Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), “Genetics of Breast and Gynecologic Cancers (PDQ®),” *PDQ Cancer Genetics Editorial Board.*, 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65767/>.
- [35] T. M. Friebel, S. M. Domchek, and T. R. Rebbeck, “Modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 106, no. 6, pp. dju091–dju091, Jun. 2014.

- [36] B. (MD), "Ovarian, Fallopian Tube and Primary Peritoneal Cancer Screening (PDQ®)," *National Cancer Institute (US)*, 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65898/>.
- [37] P. Ng and F. Lawton, "Fallopian tube carcinoma - A review," *Ann. Acad. Med. Singapore*, vol. 27, no. 5, pp. 693–697, 1998.
- [38] D. J. Grant, P. G. Moorman, L. Akushevich, R. T. Palmieri, R. C. Bentley, and J. M. Schildkraut, "Primary peritoneal and ovarian cancers: an epidemiological comparative analysis," *Cancer Causes Control*, vol. 21, no. 7, pp. 991–998, Jul. 2010.
- [39] M. De Vos, V. Schreiber, and F. Dantzer, "The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 84, no. 2, pp. 137–146, 2012.
- [40] K. Hayashi, M. Tanaka, T. Shimada, M. Miwa, and T. Sugimura, "Size and shape of poly(ADP-ribose): Examination by gel filtration, gel electrophoresis and electron microscopy," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 112, no. 1, pp. 102–107, 1983.
- [41] D. d'AMOURS, S. DESNOYERS, I. d'SILVA, and G. G. POIRIER, "Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions," *Biochem. J.*, vol. 342, no. 2, pp. 249–268, 1999.
- [42] M. S. Drenichev and S. N. Mikhailov, "Poly(ADP-ribose): From chemical synthesis to drug design," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 15, pp. 3395–3403, 2016.
- [43] Y. KANAI, T. MATSUSHIMA, and T. SUGIMURA, "Induction of specific antibodies to poly(ADP-ribose) in rabbits by double-stranded RNA, poly(A)·poly(U)," *Nature*, vol. 274, no. 5673, pp. 809–812, 1978.
- [44] V. Schreiber, F. Dantzer, J.-C. Ame, and G. de Murcia, "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 7, pp. 517–528, 2006.
- [45] B. A. Gibson and W. L. Kraus, "New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 7, pp. 411–424, 2012.
- [46] Z. Herceg and Z. Q. Wang, "Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 477, no. 1–2, pp. 97–110, 2001.
- [47] T. Haikarainen, M. Narwal, P. Joensuu, and L. Lehtiö, "Evaluation and structural basis for the inhibition of tankyrases by PARP inhibitors," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 5, no. 1, pp. 18–22, 2014.
- [48] M. O. Hottiger, "Nuclear ADP-Ribosylation and Its Role in Chromatin Plasticity, Cell Differentiation, and Epigenetics," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 84, no. 1, pp. 227–263, 2015.
- [49] G. Papeo *et al.*, "Discovery of 2-[1-(4,4-Difluorocyclohexyl)piperidin-4-yl]-6-fluoro-3-oxo-2,3-dihydro-1H-isoindole-4-carboxamide (NMS-P118): A Potent, Orally Available, and Highly Selective PARP-1 Inhibitor for Cancer Therapy," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 17, pp. 6875–6898, 2015.
- [50] J. M. Pascal, "The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 71, pp. 177–182, 2018.
- [51] M.-F. Langelier and J. M. Pascal, "PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp.

- 134–143, Feb. 2013.
- [52] I. Talhaoui *et al.*, “Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 19, pp. 9279–9295, Jul. 2016.
- [53] E. E. Alemasova and O. I. Lavrik, “Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. 8, pp. 3811–3827, 2019.
- [54] V. Rolli, M. O’Farrell, J. Menissier-de Murcia, and G. de Murcia, “Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching,” *Biochemistry*, vol. 36, no. 40, pp. 12147–12154, Oct. 1997.
- [55] J. M. Dawicki-McKenna *et al.*, “PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain,” *Mol. Cell*, vol. 60, no. 5, pp. 755–768, 2015.
- [56] A. K. L. Leung, “PARPs,” *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 23, pp. R1256–R1258, 2017.
- [57] M. O. Hottiger, P. O. Hassa, B. Lüscher, H. Schüler, and F. Koch-Nolte, “Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 35, no. 4, pp. 208–219, 2010.
- [58] C.-S. Yang *et al.*, “Ubiquitin Modification by the E3 Ligase/ADP-Ribosyltransferase Dtx3L/Parp9,” *Mol. Cell*, vol. 66, no. 4, pp. 503-516.e5, May 2017.
- [59] S. R. Park and A. Chen, “Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase Inhibitors in Cancer Treatment,” *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 26, no. 3, pp. 649–670, 2012.
- [60] M. V Sukhanova *et al.*, “A Single-Molecule Atomic Force Microscopy Study of PARP1 and PARP2 Recognition of Base Excision Repair DNA Intermediates,” *J. Mol. Biol.*, vol. 431, no. 15, pp. 2655–2673, 2019.
- [61] C. Kumar, L. P.T.V., and A. Arunachalam, “Structure based pharmacophore study to identify possible natural selective PARP-1 trapper as anti-cancer agent,” *Comput. Biol. Chem.*, vol. 80, pp. 314–323, 2019.
- [62] S. Eustermann *et al.*, “Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1,” *Mol. Cell*, vol. 60, no. 5, pp. 742–754, 2015.
- [63] L. H. Thompson, K. W. Brookman, N. J. Jones, S. A. Allen, and A. V Carrano, “Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 10, no. 12, pp. 6160–6171, Dec. 1990.
- [64] H. Hanzlikova, I. Kalasova, A. A. Demin, L. E. Pennicott, Z. Cihlarova, and K. W. Caldecott, “The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication,” *Mol. Cell*, vol. 71, no. 2, pp. 319-331.e3, Jul. 2018.
- [65] Y. Wang, W. Luo, and Y. Wang, “PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response,” *DNA Repair (Amst.)*, p. 102651, 2019.
- [66] J. Murai *et al.*, “Rationale for Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors in Combination Therapy with Camptothecins or Temozolomide Based on PARP Trapping versus Catalytic Inhibition,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 349, no. 3, pp. 408–416, 2014.
- [67] X. He *et al.*, “Design, synthesis and anticancer activities evaluation of novel 5H-

- dibenzo[b,e]azepine-6,11-dione derivatives containing 1,3,4-oxadiazole units," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 28, no. 5, pp. 847–852, 2018.
- [68] K. N. Dziadkowiec, E. Gąsiorowska, E. Nowak-Markwitz, and A. Jankowska, "PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting," *Prz. menopauzalny = Menopause Rev.*, vol. 15, no. 4, pp. 215–219, Dec. 2016.
- [69] D. V Ferraris, "Evolution of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors. From Concept to Clinic," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 12, pp. 4561–4584, Jun. 2010.
- [70] Y. Q. Wang, P. Y. Wang, Y. T. Wang, G. F. Yang, A. Zhang, and Z. H. Miao, "An update on poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) inhibitors: Opportunities and challenges in cancer therapy," *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 21, pp. 9575–9598, 2016.
- [71] J. S. J. Lim and D. S. P. Tan, "Understanding resistance mechanisms and expanding the therapeutic utility of PARP inhibitors," *Cancers (Basel)*, vol. 9, no. 8, pp. 1–14, 2017.
- [72] Y. Shen, M. Aoyagi-scharber, and B. Wang, "Minireview Trapping Poly (ADP-Ribose) Polymerase," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, no. June, pp. 446–457, 2015.
- [73] J. Murai *et al.*, "PARPi trap PARP1+2.pdf," vol. 72, no. 21, pp. 5588–5599, 2013.
- [74] J. Wang *et al.*, "Design, synthesis and biological evaluation of pyridazino[3,4,5-de]quinazolin-3(2H)-one as a new class of PARP-1 inhibitors," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 25, no. 11, pp. 2340–2344, 2015.
- [75] T. Kinoshita *et al.*, "Inhibitor-induced structural change of the active site of human poly(ADP-ribose) polymerase," *FEBS Lett.*, vol. 556, no. 1, pp. 43–46, 2004.
- [76] D. L. Hughes, "Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib, and Niraparib," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 21, no. 9, pp. 1227–1244, 2017.
- [77] S. M. Hoy, "Talazoparib: First Global Approval.," *Drugs*, vol. 78, no. 18, pp. 1939–1946, Dec. 2018.
- [78] A. G. Thorsell *et al.*, "Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 4, pp. 1262–1271, 2017.
- [79] J. Wang *et al.*, "Design, synthesis and biological evaluation of novel 5-fluoro-1H-benzimidazole-4-carboxamide derivatives as potent PARP-1 inhibitors," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 16, pp. 4127–4132, 2016.
- [80] N. J. Curtin and C. Szabo, "Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond," *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, no. 6, pp. 1217–1256, 2013.
- [81] R. Carruthers and A. J. Chalmers, "The potential of PARP inhibitors in neuro-oncology," *CNS Oncol.*, vol. 1, no. 1, pp. 85–97, 2012.
- [82] C. H. Liu, Y. Chang, and P. H. Wang, "Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors and ovarian cancer," *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 56, no. 5, pp. 713–714, 2017.
- [83] J. McMurry, *Οργανική Χημεία, Τόμος II*. Ηράκλειο Κρήτης: Ι.Τ.Ε. - Π.Ε.Κ., 1996.
- [84] G. W. Gribble, "Introduction," in *Indole Ring Synthesis: From Natural Products to Drug Discovery*, 2016, pp. 1–38.
- [85] N. Chadha and O. Silakari, "Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 134, pp. 159–184, 2017.

- [86] C. Valdes and J. Barluenga, "Five-Membered Heterocycles: Indole and Related Systems," *Mod. Heterocycl. Chem.*, no. 2, pp. 377–531, 2011.
- [87] R.J. Sundberg, *Indoles*. Charlottesville, Virginia: Academic Press, 1996.
- [88] S. D. Sarker and L. Nahar, *Chemistry for Pharmacy Students: General, Organic, and Natural Product Chemistry*. 2013.
- [89] J. C. Powers, "Mass spectrometry of simple indoles," *J. Org. Chem.*, vol. 33, no. 5, pp. 2044–2050, May 1968.
- [90] N. K. Kaushik *et al.*, "Biomedical importance of indoles," *Molecules*, vol. 18, no. 6, pp. 6620–6662, 2013.
- [91] S. J. Murch, S. KrishnaRaj, and P. K. Saxena, "Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants," *Plant Cell Rep.*, vol. 19, no. 7, pp. 698–704, Jun. 2000.
- [92] F. D. HART and P. L. BOARDMAN, "INDOMETHACIN: A NEW NON-STEROID ANTI-INFLAMMATORY AGENT," *Br. Med. J.*, vol. 2, no. 5363, pp. 965–970, Oct. 1963.
- [93] G. Bartoli, G. Palmieri, M. Bosco, and R. Dalpozzo, "The reaction of vinyl grignard reagents with 2-substituted nitroarenes: A new approach to the synthesis of 7-substituted indoles," *Tetrahedron Lett.*, vol. 30, no. 16, pp. 2129–2132, 1989.
- [94] M. Bosco, R. Dalpozzo, G. Bartoli, G. Palmieri, and O. A. Mangini, "Mechanistic Studies on the reaction of nitro- and nitrosoarenes with vinyl Grignard reagents," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, vol. 5, pp. 657–663, 1991.
- [95] G. Bartoli, M. Bosco, R. Dalpozzo, G. Palmieri, and E. Marcantoni, "Reactivity of nitro- and nitroso-arenes with vinyl grignard reagents: synthesis of 2-(trimethylsilyl)indoles," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, no. 11, p. 2757, 1991.
- [96] A. P. Dobbs, K. Jones, and K. T. Veal, "Heteroaryl radicals in synthesis: Radical cyclisation reactions of 2-bromoindoles," *Tetrahedron*, vol. 54, no. 10, pp. 2149–2160, 1998.
- [97] A. Dobbs, "Total Synthesis of Indoles from *Tricholoma* Species via Bartoli/Heteroaryl Radical Methodologies," *J. Org. Chem.*, vol. 66, no. 2, pp. 638–641, Jan. 2001.
- [98] A. P. Dobbs, M. Voyle, and N. Whittall, "Synthesis of Novel Indole Derivatives: Variations in the Bartoli Reaction," *Synlett*, vol. 10, pp. 1594–1596, 1999.
- [99] J. J. Li, "Bischler–Möhlau indole synthesis BT - Name Reactions: A Collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications Fifth Edition," J. J. Li, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2014, pp. 54–55.
- [100] V. Sridharan, S. Perumal, C. Avendaño, and J. C. Menéndez, "Microwave-Assisted, Solvent-Free Bischler Indole Synthesis," *Synlett*, no. 1, pp. 0091–0095, 2006.
- [101] G. R. Humphrey and J. T. Kuethe, "Practical methodologies for the synthesis of indoles," *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 7, pp. 2875–2911, 2006.
- [102] R. N. Farr *et al.*, "Enantiospecific and regioselective opening of 2-alkyl nosylaziridines by indoles mediated by boron trifluoride. Application to a practical synthesis of a GnRH antagonist," *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 14, no. 22, pp. 3503–3515, 2003.
- [103] O. Diels and J. Reese, "Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. XX. Über die Anlagerung von Acetylen-dicarbonsäureester an Hydrazobenzol," *Justus Liebigs Ann. Chem.*, vol. 511, no. 1, pp. 168–182, 1934.

- [104] E. H. Huntress, J. Bornstein, and W. M. Hearon, "An Extension of the Diels-Reese Reaction¹," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, no. 10, pp. 2225–2228, May 1956.
- [105] P. Guerrieri *et al.*, "Late Reactions," *Encycl. Radiat. Oncol.*, pp. 424–424, 2012.
- [106] "The Fischer indole synthesis [6]," *Nature*, vol. 164, no. 4176, p. 835, 1949.
- [107] B. Robinson, "Studies on the Fischer indole synthesis," *Chem. Rev.*, vol. 69, no. 2, pp. 227–250, Apr. 1969.
- [108] H. M. Kissman, D. W. Farnsworth, and B. Witkop, "Fischer Indole Syntheses with Polyphosphoric Acid," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 74, no. 15, pp. 3948–3949, 1952.
- [109] P. E. Verkade and E. F. Janetzky, "Untersuchungen über Indolderivate. IV. Theoretische Betrachtungen über die drei Arten der Indolbildung aus α -Arylaminoketonen," *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas*, vol. 64, no. 5, pp. 139–146, Sep. 2010.
- [110] J. T. Fitzpatrick and R. D. Hiser, "Noncatalytic Fischer Indole Synthesis," *J. Org. Chem.*, vol. 22, no. 12, pp. 1703–1704, 1957.
- [111] S. Wagaw, B. H. Yang, and S. L. Buchwald, "A Palladium-Catalyzed Strategy for the Preparation of Indoles: A Novel Entry into the Fischer Indole Synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 26, pp. 6621–6622, Jul. 1998.
- [112] "Fukuyama Indole Synthesis," in *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 1165–1169.
- [113] T. Fukuyama, X. Chen, and G. Peng, "A Novel Tin-Mediated Indole Synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116, no. 7, pp. 3127–3128, 1994.
- [114] K. Nozaki, K. Oshima, and K. Utimoto, "Et₃B induced radical addition of Ph₃SnH to acetylenes and its application to cyclization reaction," *Tetrahedron*, vol. 45, no. 4, pp. 923–933, 1989.
- [115] H. Tokuyama, T. Yamashita, M. T. Reding, Y. Kaburagi, and T. Fukuyama, "Radical cyclization of 2-alkenylthioanilides: A Novel synthesis of 2,3- disubstituted indoles [7]," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 15, pp. 3791–3792, 1999.
- [116] Y. Kobayashi and T. Fukuyama, "Development of a novel indole synthesis and its application to natural products synthesis," *Journal of Heterocyclic Chemistry*, vol. 35, no. 5, pp. 1043–1056, 1998.
- [117] P. G. Gassman and T. J. van Bergen, "A General Method for the Synthesis of Indoles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 8, pp. 2718–2719, 1973.
- [118] P. G. Gassman and T. J. Van Bergen, "Oxindoles. New, general method of synthesis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 96, no. 17, pp. 5508–5512, Aug. 1974.
- [119] P. G. Gassman, T. J. Van Bergen, and G. Gruetzmacher, "Use of Halogen-Sulfide Complexes in the Synthesis of Indoles, Oxindoles, and Alkylated Aromatic Amines," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 19, pp. 6508–6509, 1973.
- [120] P. G. Gassman and T. J. van Bergen, "Simple Method for the Conversion of Anilines into 2-Substituted Indoles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 95, no. 2, pp. 590–591, 1973.
- [121] G.W.Gribble, "Julia Indole Synthesis," in *In Indole Ring Synthesis*, G.W.Gribble, Ed. 2016, pp. 137–138.
- [122] R. C. Larock, E. K. Yum, and M. D. Refvik, "Synthesis of 2,3-Disubstituted Indoles via Palladium-Catalyzed Annulation of Internal Alkynes," *J. Org. Chem.*, vol. 63, no. 22, pp.

- 7652–7662, Oct. 1998.
- [123] R. C. Larock and E. K. Yum, “Synthesis of indoles via palladium-catalyzed heteroannulation of internal alkynes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 113, no. 17, pp. 6689–6690, Aug. 1991.
- [124] M. Shen *et al.*, “The first regioselective palladium-catalyzed indolization of 2-bromo- or 2-chloroanilines with internal alkynes: A new approach to 2,3-disubstituted indoles,” *Org. Lett.*, vol. 6, no. 22, pp. 4129–4132, 2004.
- [125] R. D. Clark and D. B. Repke, “The Leimgruber-Batcho Indole Synthesis,” *Heterocycles*, vol. 22, no. 1, p. 195, 1984.
- [126] W. Madelung, “Über eine neue Darstellungsweise für substituierte Indole. I,” *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, vol. 45, no. 1, pp. 1128–1134, 1912.
- [127] D. S. Black and N. Kumar, “Biindolyls,” 2010, pp. 97–123.
- [128] A. R. Katritzky, C. A. Ramsden, J. A. Joule, and V. V. Zhdankin, “Synthesis of Fused Ring Systems with Ring Junction Heteroatoms,” *Handb. Heterocycl. Chem.*, pp. 889–916, 2010.
- [129] W. J. Houlihan, V. A. Parrino, and Y. Uike, “Lithiation of N-(2-Alkylphenyl)alkanamides and Related Compounds. A Modified Madelung Indole Synthesis,” *J. Org. Chem.*, vol. 46, no. 22, pp. 4511–4515, 1981.
- [130] V. M. Lyubchanskaya, L. M. Alekseeva, and V. G. Granik, “The first example of aza-Nenitzescu reaction. A new approach to the heterocyclic quinones synthesis,” *Tetrahedron*, vol. 53, no. 44, pp. 15005–15010, 1997.
- [131] G. R. Allen, “The Synthesis of 5-Hydroxyindoles by the Nenitzescu Reaction,” in *Organic Reactions*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011, pp. 337–454.
- [132] V. S. Velezheva *et al.*, “The role of a Lewis acid in the Nenitzescu indole synthesis,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 49, no. 50, pp. 7106–7109, 2008.
- [133] D. M. Ketcha, L. J. Wilson, and D. E. Portlock, “The solid-phase Nenitzescu indole synthesis,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 41, no. 33, pp. 6253–6257, 2000.
- [134] A. Reissert, “Einwirkung von Oxalester und Natriumäthylat auf Nitrotoluole. Synthese nitrirter Phenylbrenztraubensäuren,” *Eur. J. Inorg. Chem. - EUR J INORG CHEM*, vol. 30, pp. 1030–1053, Jan. 1897.
- [135] Gordon W. Gribble, “Reissert Indole Synthesis,” in *Indole Ring Synthesis*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016, pp. 332–337.
- [136] W. J. Houlihan, *Indoles Part One*, vol. i. 2008.
- [137] A. V Butin, T. A. Stroganova, I. V Lodina, and G. D. Krapivin, “Furan ring opening—indole ring closure: a new modification of the Reissert reaction for indole synthesis,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 42, no. 10, pp. 2031–2033, 2001.
- [138] R. J. Sundberg, “Deoxygenation of Nitro Groups by Trivalent Phosphorus. Indoles from o-Nitrostyrenes,” *J. Org. Chem.*, vol. 30, no. 11, pp. 3604–3610, 1965.
- [139] M. K. Weil and A. P. Chen, “PARP Inhibitor Treatment in Ovarian and Breast Cancer,” *Curr. Probl. Cancer*, vol. 35, no. 1, pp. 7–50, 2011.
- [140] A. W. White *et al.*, “Resistance-modifying agents. 9. Synthesis and biological properties of benzimidazole inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase,” *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 22, pp. 4084–4097, 2000.

- [141] B. G. Bitler, Z. L. Watson, L. J. Wheeler, and K. Behbakht, "PARP inhibitors: Clinical utility and possibilities of overcoming resistance," *Gynecol. Oncol.*, vol. 147, no. 3, pp. 695–704, 2017.
- [142] Y. Y. Syed, "Rucaparib: First Global Approval," *Drugs*, vol. 77, no. 5, pp. 585–592, 2017.
- [143] R. Plummer *et al.*, "A phase II study of the potent PARP inhibitor, Rucaparib (PF-01367338, AG014699), with temozolomide in patients with metastatic melanoma demonstrating evidence of chemopotentiality," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 71, no. 5, pp. 1191–1199, 2013.
- [144] A. T. Gillmore *et al.*, "Multikilogram scale-up of a reductive alkylation route to a novel PARP inhibitor," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 16, no. 12, pp. 1897–1904, 2012.
- [145] C. Nayyar and S. N.S., "Method of Preparing Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors," 7,323,562 B2, 2008.
- [146] Z. Wang, S. Li, and L. Hu, "A method for Preparing a Key Intermediate of the Anti-Ovarian Cancer Drug Rucaparib," CN 106008530, 2016.
- [147] M. De Rycker and C. M. Price, "Tankyrase Polymerization Is Controlled by Its Sterile Alpha Motif and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Domains," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 22, pp. 9802–9812, 2004.
- [148] L. Lehtiö, N. W. Chi, and S. Krauss, "Tankyrases as drug targets," *FEBS J.*, vol. 280, no. 15, pp. 3576–3593, 2013.
- [149] L. J. Reha-Krantz, "Okazaki Fragment," S. Maloy and K. B. T.-B. E. of G. (Second E. Hughes, Eds. San Diego: Academic Press, 2013, pp. 158–160.