

Πανεπιστημιο Ιωαννίνων

Σχολή Θετικών Επιστήμων

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



Σχεδιάσμος και αναπτύξη νέας εναλλακτικής και βελτιωμένης ολικής σύνθετικής πορείας του Rucaparib, εκλεκτικού ανάστολεα για τη Θεραπεία νεοπλασιών

ΓΙΑΝΝΕΛΟΣ ΜΑΡΙΟΣ - ΗΛΙΑΣ Χημικός



Ιωάννινα 2019

Εικόνα Εξωφύλλου:

H 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



Μεταπτυχιακό Διπλώμα Ειδικεύσης Επιβλεπών Καθηγήτης: Σκομπρίδης Κωνσταντινός

Σχεδιάσμος και αναπτύξη νέας εναλλακτικής και βελτιωμένης ολικής σύνθετικής πορείας του Rucaparib, εκλεκτικού ανάστολεα για τη θεραπεία νεοπλάσιων

Γιαννέλος Μαρίος – Ηλίας

Χημικός

Ιωάννινα - 27 Σεπτεμβρίου 2019 -

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Γιαννέλος Μάριος – Ηλίας

A.M. 1192

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος	Θεοδώρου Βασιλική	
Καθηγητής του Τμήματος	Ομότιμη Καθηγήτρια του	
Χημείας, Πανεπιστήμιο	Τμήματος Χημείας.	

Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τζάκος Ανδρέας

Χημείας, Πανεπιστημιο Ιωαννίνων

του Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

> Ιωάννινα 27/09/2019





ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ειδίκευσης εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Χημεία» από τον Μάρτιο του 2017 έως τον Απρίλιο 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, X3-210, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος μέσα σε αυτά τα δύο χρόνια ήταν μια αρκετά απαιτητική και πιεστική διαδικασία, όπου δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς τη σύμπραξη και την αμέριστη βοήθεια ενός αριθμού ανθρώπων. Υπήρξαν καθοδηγητές, συνοδοιπόροι και 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 προβληματισμούς και δυσκολίες, ανεξάρτητα αν ήταν σε προσωπικό ή επαγγελματικό επίπεδο. Αποδεικνύει ακόμα πως ο καθηγητής δεν είναι αποστασιοποιημένος από τους φοιτητές, αλλά βρίσκεται δίπλα τους και ως άνθρωπος, γεγονός που απέδειξε και σε μένα τη φετινή χρονιά.

Στη συνέχεια, θα ήθελα εγκάρδια να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια κα. Θεοδώρου Βασιλική και να της εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου, καθώς υπήρξε καθηγήτρια και ταυτόχρονα μητέρα για εμένα και για όλους μέσα στο εργαστήριο. Υπήρξε δίπλα μου σε ανησυχίες, προβληματισμούς και επιστημονικές αναζητήσεις με τρυφερότητα και ειλικρινές ενδιαφέρον. Η ανταπόκριση και η βοήθειά της ήταν πάντα πηγαία και άμεση. Την ευχαριστώ που πάνω απ' όλα ήταν άνθρωπος και μετά καθηγήτρια.





Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τζάκο Ανδρέα που δέχτηκε να αποτελεί μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής του Μ.Δ.Ε, καθώς και για την άψογη συνεργασία που είχα μαζί του 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 ¹HNMR και ¹³C 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, τον Αλαγιάννη Μιχάλη, τον Κουσαξίδη Αντώνη, 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 συνοδοιπόροι και πάνω απ' όλα φίλοι. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια και εργαστηριακή συνεργάτιδα Τσίπα Μαρία, διότι υπήρξε πρότυπο συνεργασίας και μου προσέφερε βοήθεια, ειδικά τον τελευταίο χρόνο όπου μου ήταν αδύνατο να της παρέχω εγώ. Μοιράστηκε τις γνώσεις της και υπήρξε τεράστιο στήριγμα κατά τη συγγραφή της μεταπτυχιακής εργασίας. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γούτσιου Γεωργία για τη βοήθεια της ως





συνάδελφος και συνεργάτης, αλλά κυρίως που βοήθησε ψυχολογικά και έμπρακτα ένα φίλο.

Από τις ευχαριστίες θα ήταν άδικο να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου. Γι' αυτό οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον πατέρα μου, Γιαννέλο Ευάγγελο, τη μητέρα μου, Χαντζή Ελένη, και την αδερφή μου, Γιαννέλου Ηλιάνα, όπου μου αποδεικνύουν καθημερινά ότι η οικογένεια θα είναι πάντα δίπλα μου με αγάπη και βοήθεια στα ευχάριστα και, κυρίως, στα δύσκολα.

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 δραστικότητας του Rucaparib καθώς και ο σχεδιασμός νέων εν δυνάμει αναστολέων των PARPs (αναλόγων) με πρότυπο τη δομή του Rucaparib.

ix





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 / KEYWORDS

Στοχευμένη Αντικαρκινική Θεραπεία / Targeted Anticancer Therapy Καρκίνος των Ωοθηκών / Ovarian Cancer Βελτιστοποιημένες Συνθετικές Πορείες / Optimized Synthetic Routes Ινδόλιο / Indole Αναστολείς της Πολυμεράσης πολύ(ADP-ριβόζης) / PARP Inhibitors Παγίδευση των PARP / PARP Trapping Rucaparib PAR PARP





ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vi
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ix
ABSTRACT	x
ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ / KEYWORDS	xi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	12
1.1. Ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ	12
1.2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	13
1.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ BRCA ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ	14
1.4. Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ PAR ΚΑΙ ΤΩΝ PARP1 ΚΑΙ PARP2	17
1.4.1. Η Δομή της PAR	18
1.4.2. Μηχανισμός της Δράσης των PARPs και των Αναστολέων PARP	19
1.4.3. Η Παγίδευση της πολυμεράσης της πολυ(ADP-ριβόζης) από τους Αναστολείς των PARP	24
1.5. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΔΟΜΗ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ENZYMOY PARP1-	26
1.6. ΤΟ ΙΝΔΟΛΙΟ ΩΣ ΒΑΣΙΚΟ ΔΟΜΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	29
1.6.1. Χημικές Ιδιότητες Ινδολίου	30
1.6.2. Αντιδράσεις Σύνθεσης Ινδολίου	30
1.6.2.1. Σύνθεση ινδολίου κατά Leimgruber-Batcho	31
1.6.2.2. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer	32
1.6.2.3. Σύνθεση ινδολίου κατά Bartoli	33
1.6.2.4. Σύνθεση ινδολίου κατά Bischler–Möhlau	34
1.6.2.5 Σύνθεση ινδολίου κατά Fukuyama	35
1.6.2.6. Σύνθεση ινδολίου κατά Gassman	37
1.6.2.7. Σύνθεση ινδόλιου κατά Hemetsberger	38
1.6.2.8. Σύνθεση ινδολίου κατά Larock	38
1.6.2.9. Σύνθεση ινδολίου κατά Madelung	39
1.6.2.10. Σύνθεση ινδολίου κατά Nenitzescu	42
1.6.2.11. Σύνθεση ινδολίου κατά Reissert	43
1.6.2.12. Σύνθεση ινδολίου κατά Baeyer-Emerling	44
1.6.2.13. Σύνθεση κατά Diels-Reese	45





1.7. RUCAPARIB 46	j
1.7.1. Φαρμακευτική Χημική Πορεία για το Rucaparib (Agouron and Cancer Research)	
1.7.2. Εναλλακτικές συνθετικές πορείες του Rucaparib	
1.8. OLAPARIB KAI NIRAPARIB 53	
1.8.1. Olaparib 53	
1.8.2. Niraparib 54	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 56	,
2.1 ΝΕΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ RUCAPARIB 56	,
2.1.1. Σχεδιασμός Πρώτης Νέας Συνθετικής Πορείας (Πορεία 1º)	
2.1.2. Προκλήσεις που πρόεκυψαν κατά την εφαρμογή της Πορείας Ι58	
2.1.2.1. Προκλήσεις στο σχηματισμό του οξέος	
2.1.3. Τροποποίηση της Συνθετικής Πορείας (Πορεία 2ª)	
2.1.4. Προκλήσεις στην εργαστηριακή Εφαρμογή της 2ης Συνθετικής Πορείας 64	
2.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ 65	j
2.2.1. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 2 65	
2.2.2. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 3 67	
2.2.3. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4a 69	
2.2.4. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 4b 72	
2.2.5. Αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης 5 74	
2.2.6. Αντιδράσεις Σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 5 από την ένωση 4b74	
2.2.7. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 12 75	
2.2.8. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 13 77	
2.2.9. Αντίδραση Σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 14 80	
2.2.10. Αντίδραση Σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Θειακετάλης.80)
2.3. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΝΩΣΕΩΝ 83	
κεφαλαίο 3: πειραματικό μερός 87	,
3.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ 87	,
3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	;
3.2.1. Ένωση 2: 5-((6-φθορο-1Η-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο- 4,6-διόνη 88	1
3.2.2. Ενωση 3: 5-((2-βρώμο-6-φθορο-1Η-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο- 1,3,διοξανιο-4,6-διόνη90	1





3.2.4. Σύνθεση της έγωσης 4β· 3-((2-)	3οώμο-6-φθορο-1Η-ινδολο-3-ιιλο) προπανοϊκό
οξύ	
3.2.4.1. Σύνθεση της ένωσης 4b μέ πυοιδίνη /Η-Ο από την ένωση 3	σω αντίδρασης υδρόλυσης με Cu(0) σε
3.2.4.2 Σύνθεση της ένωσης 4b μέσ	σω αντίδρασης υδρόλυσης με HCl από την ένως
3.2.4.3 Σύνθεση της ένωσης 4b μέα	σω της αντίδρασης υδρόλυσης από την ένωση 4
3.2.5. Πειραματικές απόπειρες σύνθε διυδροβενζο[cd]ινδολο-5(1H)-ονη	εσης της ένωσης 5: 2-βρώμο-7-φθόρο-3,4-
3.2.5.1 Απόπειρα κυκλοποίησης αι	τευθείας από την ένωση 3 με Sc(OTf)₃/CH₃NO₂ -
3.2.5.2 Απόπειρα κυκλοποίησης αι	τευθείας από την ένωση 3 με ΡΡΑ
3.2.5.3 Απόπειρα θερμικής κυκλοι	τοίησης απευθείας από την ένωση 3 με CH₃NO₂
 3.2.5.4 Απόπειρα κυκλοποίησης τr	ις ένωσης 4b με Sc(OTf)₃/CH₃NO₂
3.2.5.5 Απόπειρα κυκλοποίησης τη	ις ένωσης 4b με κυανουρικό οξύ
3.2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12: 3-(6- υλο) προπανοϊκός μεθυλεστέρας	φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1Η-ινδολο-3-
3.2.7. Σύνθεση της ένωσης 13: 3-(6-¢ προπανοϊκό οξύ	νθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1Η-ινδολο-3-υλο
3.2.8. Σύνθεση της ένωσης 14: 4-(7-¢ 2-υλο)βενζαλδεΰδη	νθορο-5-όξο-1,3,4,5-τετραυδροβένζο[cd] ινδόλα
3.2.9. Σύνθεση της ένωσης 15: 3-(2-4 ινδολο-3-υλο)προπιονικοσ εστέρας	-(1,3-διθειανιο-2-υλο)φαινυλο-6-φθορο-1Η-
ΟΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	Error! Bookmark not defin









<mark>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</mark>

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, 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.

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. 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. 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.

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, 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. 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.

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. Οι PARPs είναι πυρηνικά ένζυμα 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, MarkB J., Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, **2015**

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 Manufuncturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib and Niraparib. *Org. Process Res. Dev.*, **2017**

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 ωοθηκών, κατά του καρκίνου των σαλπίγγων και κατά του πρωτεύοντος περιτοναϊκού καρκίνου.

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% .



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**

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.





ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως θα συζητηθεί και παρακάτω, 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).

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).





Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω οικονομικά δεδομένα και όλα όσα έχουν ειπωθεί στην εισαγωγή σχετικά με τη σημαντικότατη 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. Ρετροσυνθετική ανάλυση του Rucaparib, όπως αυτή σχεδιάστηκε από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου X3-210, Τμήμα Χημείας, *Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*

Η σχεδιασθείσα βελτιστοποιημένη συνθετική πορεία συνίσταται από 7 στάδια, θεωρητικά υψηλής απόδοσης το καθένα, και ως αρχική ένωση **1** αξιοποιείται το 6φθορο-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 2.1.4.1. και 2.1.4.2.). Στη συνέχεια, η ένωση **3** μέσω μίας αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης μετατρέπεται σε ένα παράγωγο του 3-ινδολοπροπιονικού οξέος **4b**, το οποίο μέσω μίας αντίδρασης ενδομοριακής κυκλοαφυδάτωσης οδηγεί στην τρικυκλική ένωση **5** (παράγραφος 2.1.4.3. και 2.1.4.4.). Η ένωση **5** (παράγραφος 2.1.4.5.) υφίσταται κατόπιν μία αναδιάταξη Schmidt ή Beckmann (παράγραφος 2.1.4.7.) για να δώσει τελικά την ινδολαζεπίνη **6**. Ακολούθως, το άτομο του βρωμίου της ινδολαζεπίνης **6** συζεύγνυται με το βορονικό οξύ της βενζαλδεΰδης μέσω μίας αντίδρασης σύζευξης Suzuki, οδηγώντας στην ένωση **7** (παράγραφος 2.1.4.6.).Στο τελικό στάδιο, η ένωση **7** μέσω αναγωγικής αμίνωσης δίνει την ένωση **8**, υπό την μορφή υδροχλωρικού άλατος (παράγραφος 2.1.4.8.).

Στην ενότητα 2.1. 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» (Α, Β & 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 3.3. 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 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Για δεκαετίες, το χαρακτηριστικό της ιατρικής θεραπείας για τον καρκίνο ήταν η ενδοφλέβια κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Τα φάρμακα αυτά στοχεύουν τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων καρκινικών κυττάρων και ορισμένων φυσιολογικών ιστών. Ως αποτέλεσμα, πολλοί ασθενείς εμφανίζουν κλασσικές τοξικότητες αλωπεκίας, γαστρεντερικών συμπτωμάτων και μυελοκαταστολής. Ωστόσο, κατά την τελευταία δεκαετία, σημειώθηκε δραματική αλλαγή στην θεραπεία του καρκίνου. Παρόλο που η παραδοσιακή κυτταροτοξική χημειοθεραπεία παραμένει η θεραπεία επιλογής για πολλές κακοήθειες, οι στοχευμένες θεραπείες είναι πλέον ένα συστατικό της θεραπείας για πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και του παγκρέατος, καθώς και του λεμφώματος, της λευχαιμίας και του πολλαπλού μυελώματος. Από τα νέα αντικαρκινικά φάρμακα που εγκρίθηκαν από την Αμερικάνικη Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) από το 2000, τα 15 ήταν στοχευμένες θεραπείες, σε σύγκριση με μόνο πέντε παραδοσιακούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

Οι δύο κύριοι τύποι στοχευμένης θεραπείας είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα και οι αναστολείς-ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Με τους ξεχωριστούς μηχανισμούς δράσης και τοξικότητας, αυτοί οι παράγοντες έχουν αλλάξει πολλές πτυχές της πρακτικής της ογκολογίας. 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 αν δεν υπάρχει ένας τέτοιος στόχος. Η διάκριση αυτή μπορεί να επηρεάζεται από την εθνικότητα του ασθενούς και το φύλο, καθώς και από την ιστολογία των όγκων [1],[2]. Επιπλέον, οι στοχευμένες θεραπείες απαιτούν νέες προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της βέλτιστης δοσολογίας, για την αξιολόγηση της προσκόλλησης του ασθενούς στη θεραπεία και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητα της θεραπείας.





Η στοχευόμενη θεραπεία έχει σκοπό να οδηγήσει τα φάρμακα σε συγκεκριμένα γονίδια ή πρωτεΐνες που είναι ειδικά για τα καρκινικά κύτταρα ή το περιβάλλον του ιστού όπου προωθεί την καρκινική ανάπτυξη. Н αποτελεσματικότητα της θεραπείας έγκειται στην στοχευμένη απελευθέρωση της θεραπευτικής ουσίας στη θέση της νόσου, ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες εντός στόχου που προκαλούνται σε φυσιολογικούς ιστούς. Συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και άλλες θεραπείες για τον καρκίνο. Η στοχευόμενη θεραπεία περιλαμβάνει την ανάπτυξη φαρμάκων που εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την προώθηση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου ή την επαγωγή απόπτωσης ή αυτοφαγίας και την στοχευόμενη παροχή τοξικών ουσιών, ειδικά σε καρκινικά κύτταρα, για να τα καταστρέψουν. Η στοχευόμενη θεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση μονόκλωνων αντισωμάτων ή μικρών φαρμάκων που λαμβάνονται από το στόμα [3].

1.2. Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι η πέμπτη αιτία θανάτου από καρκίνο για τις γυναίκες του ανεπτυγμένου κόσμου [4], και περίπου 1 στις 54 γυναίκες θα αναπτύξει καρκίνο των ωοθηκών στη ζωή της [5]. Η πενταετής επιβίωση των γυναικών με διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών είναι 46,2%. Αυτό οφείλεται στο ότι ο καρκίνος των ωοθηκών συνήθως εντοπίζεται σε προχωρημένο στάδιο : πάνω από το 70% των γυναικών διαγιγνώσκεται με προχωρημένη ασθένεια [6]. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει εγκεκριμένη δοκιμή εξέτασης για τον καρκίνο των ωοθηκών, ούτε υπάρχουν αξιόπιστοι ή αποτελεσματικοί τρόποι έγκαιρης ανίχνευσης . Επιπλέον, οι περισσότεροι καθορισμένοι παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο των ωοθηκών (π.χ. οικογενειακό ιστορικό 1^{ου} βαθμού, έλλειψη ισοτιμίας, έλλειψη χρήσης αντισυλληπτικών χαπιών) δεν μπορούν να τροποποιηθούν σε επίπεδο πληθυσμού [7].

Ως προγνωστικοί παράγοντες στον καρκίνο των ωοθηκών μπορούν να θεωρηθούν ο ιστολογικός υπο-τύπος, το στάδιο νόσου στη διάγνωση, η έκταση της υπολειμματικής νόσου μετά από χειρουργική επέμβαση και ο όγκος ασκίτη που





μπορεί να χρησιμοποιηθεί [8]. Ωστόσο, εκτός από την κατάσταση του γονιδίου του καρκίνου του μαστού (*BRCA*), δεν εξετάζεται συνήθως κανένας βιολογικός προγνωστικός παράγοντας. Διάφορες μελέτες έχουν επιχειρήσει να εισάγουν νέους προγνωστικούς παράγοντες στον καρκίνο των ωοθηκών και για αρκετές πρωτεΐνες έχει ανιχνευθεί μια προγνωστική αξία ανεξάρτητα από κλινικές παραμέτρους. Ωστόσο, μέχρι στιγμής κανένας από αυτούς δε μπορεί να εφαρμοστεί στη θεραπεία ή στη διάγνωση καρκίνου των ωοθηκών . Ως εκ τούτου, υπάρχει τεράστια ανάγκη για την αξιολόγηση νέων προγνωστικών παραγόντων που μπορούν να στοχεύουν στον καρκίνο των ωοθηκών του μπορούν να στοχεύουν

Organization	Guideline	Year	Recommendation for ovarian cancer risk management		
National Comprehensive Cancer Network (NCCN)	Breast and/or ovarian cancer genetic assessment	2017	 No evidence to support screening Discuss oral contraceptive for risk reduction Prophylactic BSO age 35–40 [after childbearing]; can delay to 45 with <i>BRCA2</i> mutation if breast risk minimized 	www.nccn.org/professionals/ physician_gls/pdf/genetics_ screening.pdf	
American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)	Committee on Genetics Opinion and Guidelines for Managing Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome	2009/2015	 No evidence to support screening Discuss oral contraceptive for risk reduction Prophylactic BSO by age 40 (after childbearing) 	www.acog.org/Resources- And-Publications/ Committee-Opinions/ Committee-On-Genetics/ Hereditary-Cancer- Syndromes-and-Risk- Assessment www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/19305347	
Society of Gynecologic Oncology (SGO)	Clinical Practice Statement: Genetic Testing for Ovarian Cancer and Recommendations for the Prevention of Ovarian Cancer	2014/2015	 Discuss oral contraceptive for risk reduction Prophylactic BS0 by age 40 (after childbearing) Consider salpingectomy if menopause not desired with plan for BS0 by age 40 	Lancaster <i>et al.³²</i> Walker <i>et al.⁴⁰</i>	
BSO, bilateral salpingo-oophorectomy.					

Εικόνα 6. Επαγγελματικές κατευθυντήριες γραμμές για την υποστήριξη της γενετικής συμβουλευτικής και των δοκιμών για ασθενείς με επιθηλιακό καρκίνο των ωοθηκών, Neff R.T., Senter L, Salani R., *BRCA* mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, **2017**

1.3. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ BRCA ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Η διαδικασία αποκατάστασης του DNA από εξωτερικούς ή εσωτερικούς παράγοντες διαταραχής είναι ένα βασικό καθήκον του γονιδιώματος προκειμένου να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος. Μια από τις σημαντικότερες αλλοιώσεις στο DNA μπορεί να συμβεί μέσω ενός διαλλείματος διπλής έλικας (Double-Strand Break,DSB), και αν αφεθεί ανεξέλεγκτο είναι θανατηφόρο σε ένα κύτταρο [10]. Τα





διαλλείματα διπλής έλικας (DSB) είναι διαταραχές και στα δύο πλαίσια ανάγνωσης του DNA, που συχνά προκαλούνται από εξωτερικές διαταραχές, όπως ιονίζουσα ακτινοβολία. Αυτά τα διαλλείματα είναι πιο δύσκολα για την επιδιόρθωση του DNA επειδή υπάρχει έλλειψη ενός κανονικού πλαισίου ανάγνωσης για την αποκατάσταση των νουκλεοτιδίων, και για αυτό είναι επιρρεπείς στο σφάλμα. Οι μηχανισμοί που επιτρέπουν σε ένα κύτταρο να επισκευάσει ένα διάλλειμα διπλής έλικας είναι δύο, η σύνδεση μη ομόλογου άκρου (Non-Homologous End Joining, NHEJ) και ο ομόλογος ανασυνδυασμός (Homologous Recombination, HR). Η σύνδεση μη ομόλογου άκρου προκαλεί ανοικτά άκρα του DNA, ώστε να προσδένονται οι δεσμευτικές πρωτεΐνες για να σταθεροποιήσουν και τελικά να επανασυνδέσουν τις πλευρές του DNA, αλλά χωρίς να λαμβάνουν υπόψη το πλαίσιο ανάγνωσης, γεγονός που προκαλεί σφάλματα [11], [12].

Εν αντιθέσει, ο ομόλογος ανασυνδυασμός επιτρέπει την επισκευή ενός αμετάβλητου πλαισίου ανάγνωσης. Από τα ανοικτά άκρα, δημιουργείται ένα άνοιγμα στο σκέλος 3'. Αυτό επιτρέπει τη συμπλήρωση μιας σειράς πρωτεϊνών (συμπεριλαμβανομένου του RADS1/BRCA 2) για να ξεκινήσει η αναζήτηση για μια συμβατή αλληλουχία με την οποία θα εισβάλλει και θα δημιουργήσει ένα βρόγχο D (D-loop). Αυτή η διαδικασία επιτρέπει και στις δύο πλευρές να αναδημιουργήσουν πιστά το πλαίσιο ανάγνωσης. Τα BRCA1 και BRCA2 διαδραματίζουν ξεχωριστούς ρόλους στην επισκευή του ομόλογου ανασυνδυασμού. Το BRCA1 θεωρείται ότι αποτελεί μέρος ενός μεγαλύτερου πολύπλοκου μορίου που βοηθά στην έρευνα του DNA για τη βλάβη του διαλλείματος διπλής έλικας (DSB) [13]. Ο ρόλος του BRCA2 είναι λιγότερο ξεκάθαρος, αλλά πιθανότατα έχει πιο άμεσο ρόλο βοηθώντας το σύμπλεγμα RAD51 να συνδεθεί στην περιοχή επισκευής [14]. Και τα δύο γονίδια χρησιμεύουν ως αναπόσπαστα κομμάτια σε ένα μεγάλο πλαίσιο μορίων επιδιόρθωσης [15].







Εικόνα 7. Μοντέλο των PALB2 και BRCA2 που συνεργάζονται για να διεγείρουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό, Buisson R., Masson J-Y., Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination, *Nature America*, **2010**

Παρόλο που είναι διαφορετικές σε πρωτεϊνική δομή και αλληλουχία, ο BRCA1 και ο BRCA2 είναι αποκλειστικά αμοιβαίες, διότι συμβαίνουν ως BRCA μεταλλάξεις χωρίς διάκριση μεταξύ τους . Το γονίδιο BRCA1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17 και αποτελείται από 24 εξώνια. Ένας μεγάλος αριθμός διαγραφών, παρεμβολών ή επαναλήψεων έχει αναφερθεί στην αλληλουχία του [16]. Το γονίδιο BRCA2 είναι μεγαλύτερο από το BRCA1, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 13 και αποτελείται από 27 εξώνια. Έχουν παρατηρηθεί 2000 διαφορετικές μεταλλάξεις και στα δύο γονίδια, αν και δεν είναι όλες κινδύνου [17].







Εικόνα 8. Οι λειτουργικές περιοχές των BRCA1 και BRCA2, και επιλεγμένοι συνεργάτες δέσμευσης, Narod S.A., Foulker W.D., BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond, *Nature*, **2004**

Οι ασθενείς που έχουν γενετικές μεταλλάξεις, είτε στο BRCA1 είτε στο BRCA2 είναι σε υψηλότερο κίνδυνο για ορισμένους καρκίνους σε σύγκριση με το ευρύ κοινό. Με λογικούς όρους, αυτό θα σήμαινε ότι πολλοί ιστοί θα είχαν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης όγκων. Ωστόσο, η πλειοψηφία των καρκίνων που αναπτύσσονται από τις μεταλλάξεις BRCA είναι μαστικής ή ωοθηκικής προέλευσης. Μερικές έρευνες υποδεικνύουν ότι το οξειδωτικό στρες του έμμηνου κύκλου μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση των ωοθηκών [18]. Επίσης, η ρύθμιση των ορμονών, ειδικά του οιστρογόνου, φαίνεται να αυξάνει το διάλλειμα διπλής έλικας, πράγμα που μπορεί να εξηγεί την ειδικότητα του ιστού [19], [15].

1.4. Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ PAR ΚΑΙ ΤΩΝ PARP1 ΚΑΙ PARP2

Υπάρχουν τρεις σημαντικές κατηγορίες βιοπολυμερών: τα πολυνουκλεοτίδια (RNA και DNA), τα πολυπεπτίδια και οι πολυσακχαρίτες, που κυμαίνονται ως προς





τη δομή τους από γραμμικά έως πολύ διακλαδισμένα μόρια. Η (poly-ADP)ριβόζη (PAR) μπορεί να θεωρηθεί ως ένα τέταρτο σημαντικό βιοπολυμερές, το οποίο εμπλέκεται σε ποικίλες διεργασίες. Η PAR συμμετέχει σε πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες, όπως η επισκευή του DNA και η αντιγραφή, διαμόρφωση της χρωματικής δομής, μεταγραφή, κυτταρική διαφοροποίηση και επίσης στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης [20], [21], [22]. Η PAR ομοπολυμερές είναι ένα και αποτελείται από 2'-Ο-α-υριβοφουρανοσυλαδενόσινο μονάδες συνδεδεμένες με πυροφωσφορικούς δεσμούς. Αυτός ο δισακχαρίτης νουκλεοζίτη είναι μέλος μιας μεγαλύτερης ομάδας φυσικών ενώσεων, ευρεία διαδεδομένων στη φύση. Ενώσεις αυτού του τύπου έχουν ένα επιπρόσθετο κατάλοιπο μονοσακχαρίτη, συνδεδεμένο με μια από τις νουκλεοσιδικές υδρόξυλ ομάδες μέσω ενός Ο-γλυκοσιδικού δεσμού. Η παρουσία του δισακχαρικού κατάλοιπου και η ετεροκυκλική βάση, δημιουργεί ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες των υδρογονανθράκων και των νουκλεοσιδίων. Με την διακλαδισμένη δομή της η PAR μιμείται την δομή των πολυσακχαριτών: αμυλοπηκτίνη και γλυκογόνου [23].

1.4.1. Η Δομή της PAR

Όπως προαναφέρθηκε, η PAR είναι ένα σύνθετο διακλαδισμένο βιοπολυμερές, που αποτελείται από 2'-Ο-α-υ-ριβοφουρανοσυλαδενόσινο μονάδες συνδεδεμένες με πυροφωσφορικές συνδέσεις.

Τα γηγενή PAR μόρια αποτελούνται από περισσότερες από 200-300 μονομερής μονάδες, όπου γραμμικά τμήματα των 20-50 μονάδων διαφοροποιούνται με αλυσιδωτά μοτίβα [20], [21], [24].

Η δομή της PAR έχει ομοιότητα με τη δομή των νουκλεϊκών οξέων, καθώς αντισώματα έναντι PAR μπορούν να αναγνωρίσουν RNA και DNA. Για αυτό, οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η σύνθεση του DNA και η επισκευή του, η μεταγραφή, η διαμόρφωση της χρωματικής δομής, όπου μπορούν άμεσα να αλληλεπιδράσουν με την PAR.





Γενικά η PAR είναι ένα μακρύ αλυσιδωτό βιοπολυμερές που εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες και μπορεί να αλληλεπιδράσει με περισσότερες από 500 πρωτεΐνες που φέρουν ειδικές περιοχές σύνδεσης [25], [26], [27]. Ο βιολογικός ρόλος αυτών των σημαντικών βιοπολυμερών είναι κατανοητός, μολονότι ο ακριβής μηχανισμός της δράσης και των μοριακών αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες-στόχους είναι ασαφής.

Αρκετά ένζυμα εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και τη διάνοιξη του PAR. Οι κυτταρικοί πυρήνες του PAR συντίθεται από (poly-ADP)ριβόζη-πολυμεράσες (PARPs) από NAD⁺ ως υπόστρωμα [23].



Εικόνα 9. ADP-ριβοσυλίωση της πρωτεΐνης, Leung A., Poly(ADP-ribose): An organizer of cellular architecture, *The journal of cell biology*, **2014**

1.4.2. Μηχανισμός της Δράσης των PARPs και των Αναστολέων PARP

Οι PARPs είναι μια οικογένεια 17 νουκλεοπρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από μια κοινή καταλυτική θέση που μεταφέρει μια ADP-ριβόζη ομάδα σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη-δέκτη χρησιμοποιώντας NAD⁺ ως συμπαράγοντα. Ενδιαφέρον έχει ότι τα περισσότερα μέλη PARP είναι ικανά να μεταφέρουν μόνο μια ομάδα μονο-ADP ριβόζης στις πρωτεΐνες-στόχους, όπου PARP1, PARP2, PARP3, PARP5a και PARPb προσθέτουν χαρακτηριστικές επαναλαμβανόμενες μονάδες ADP-





ριβόζης, δημιουργώντας έτσι μακρά αλυσίδα πολύ (ADP-ριβόζης) (PAR) [28]. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση πρωτεΐνης ονομάζεται PARυλίωση και επιτρέπει τη συμμετοχή των PARP σε διαφορετικές κυτταρικές δραστηριότητες. Από την άποψη αυτή, η PARP1 είναι η καλύτερα χαρακτηριζόμενη PARP. Η PARP1 ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης μέσω της παραγώγου των βασικών πρωτεϊνών ιστόνης, με αποτέλεσμα τη χαλάρωση της χρωματίνης, επιτρέποντας έτσι τις διεργασίες αντιγραφής, αποκατάστασης και μεταγραφής [29]. Όσον αφορά τη μεταγραφή, η PARP1 διαδραματίζει ένα κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της, λειτουργώντας συγχρόνως ως μεταγραφικός συμπαράγοντας και παρεμποδίζοντας τη μεθυλίωση συγκεκριμένων αλληλουχιών.



Εικόνα 10. Δομικά τμήματα της PAR(1-4) και τα πλησιέστερα φυσικά ανάλογα (5-6), Drenichev M., Mikhailov S., Poly(ADP-ribose): From chemical synthesis to drug design, *Elsevier*, **2016**

Μέχρι σήμερα, η ενεργοποίηση της PARP1, που εξαρτάται από τον παράγοντα δέσμευσης CCCTC (CTCF), φαίνεται να επηρεάζει τη μεθυλίωση του DNA, υποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη στενής σύνδεσης μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και της PARυλίωσης. Ο CTCF είναι ένας εξαιρετικά διατηρημένος μονωτής χρωματίνης που δεσμεύεται με ειδικές αλληλουχίες συναίνεσης που βρίσκεται στις ελέγχου των αποτυπωμάτων, με την αναστολή της μεθυλίωσης de novo. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο CTCF είναι ικανός να ενεργοποιήσει την ίδια την PARP1, προσδιορίζοντας την ADP ριβοσυλίωση του DNA (κυτοσίνης-5)μεθυλοτρανσφεράση-1 (DNMT-1) και την αναστολή της δραστηριότητάς της [30].





Η PARP1 συμμετέχει επίσης σε μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Όταν επιτυγχάνονται υψηλά επίπεδα βλάβης του DNA (δηλαδή σε «ηλικιωμένα» και καταπονημένα κύτταρα), η υπερ-ενεργοποίηση της PARP1 οδηγεί σε κυτταρική εξάντληση των ATP και NAD.



Εικόνα 11. Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της PARP1, Rouleau M., Patel A., Hendzel M., Kaufmann S., Poirier G., PARP Inhibition: PARP1 and beyond, *Nature*, **2010**

Αξίζει να σημειωθεί, ότι PARP1, PARP2 και PARP3 καταλύουν την PARυλίωση κατά τη διάρκεια της απόκρισης βλάβης του DNA. Το ανθρώπινο γονιδίωμα υποβάλλεται συνεχώς σε βλάβη από περιβαλλοντικές και ενδογενείς καταπονήσεις, με επακόλουθες βλάβες DNA όπως μονά (single-strand break, SSB) και διπλά (DSB) σκέλη DNA διαλλειμάτων. Η επισκευή εκτομής βάσης (base excision repair, BER) είναι η κύρια οδός επισκευής μονοσκελών διαλλειμάτων DNA, ενώ ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR) και η μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ) δρουν ως κύριος





μηχανισμός επιδιόρθωσης διπλών διαλλειμάτων DNA στα κύτταρα. Η PARP1 ανιχνεύει και δεσμεύεται με μονοσκελή διαλλείματα DNA μέσω των πεδίων δέσμευσης δακτύλου ψευδαργύρου. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε μια αλλαγή διαμόρφωσης, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί αλλοστερικά την PARP1. Η διαδικασία της αυτο-PARυλίωσης είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση της PARP1 από το DNA, αποκαθιστώντας έτσι την καταλυτικά ανενεργή κατάστασή του [31]. Αντίθετα, η εμπλοκή των PARP2 και PARP3 στην απόκριση βλάβης του DNA είναι λιγότερο γνωστή. Παρόλα αυτά, η PARP2 είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στην οδό επισκευής BER/SSB, ενώ η PARP3 συμμετέχει στην επισκευή διπλών διαλλειμάτων DNA μέσω του μη ομόλογου άκρου [32].

Η PARP1 συμβάλλει επίσης στη λειτουργία του ομόλογου ανασυνδυασμού (HR) με την πρόσληψη κρίσιμων παραγόντων επισκευής του DNA. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός υπερισχύει ως μηχανισμός επιδιόρθωσης κατά τη διάρκεια των σταδίων του μέσου S και midG2 του κυτταρικού κύκλου και απαιτεί λειτουργικές πρωτεΐνες BRCA για την αποκατάσταση των DSB.

Το BRCA1 έχει ενεργό ρόλο στη σηματοδότηση βλάβης του DNA και στη ρύθμιση του σημείου ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ενώ το BRCA2 έχει πιο άμεσο ρόλο στην επισκευή του DNA ελέγχοντας τη δραστηριότητα και τη συναρμολόγηση του βασικού ενζύμου ανασυνδυασμού RAD51 [33]. Οι γυναίκες που φιλοξενούν βλαβερές μεταλλάξεις BRCA έχουν ένα μέσο όρο αθροιστικού κινδύνου εμφάνισης καρκίνου των ωοθηκών μέχρι την ηλικία μεταξύ 39 και 60 · εκτιμάται ότι είναι 11-30% σε περίπτωση βλαβερών μεταλλάξεων BRCA1 και έλλειψης BRCA2, αντίστοιχα [34]. Σε οποιοδήποτε κύτταρο, η αναστολή της PARP1 προκαλεί αποτυχία επισκευής μονών διαλλειμάτων DNA (SSB) αλλά δεν επηρεάζει την επισκευή των διπλών διαλλειμάτων DNA (DSB). Εάν, στο ίδιο κύτταρο, οι πρωτεΐνες BRCA είναι επίσης ανεπαρκείς, τα διπλά διαλλείματα DNA (DSB) επισκευάζονται με τη μέθοδο μηομόλογου άκρου (NHEJ), οδηγώντας έτσι σε αστάθεια χρωμοσωμάτων, διακοπή κυτταρικού κύκλου και απόπτωση. Αυτό είναι επεξηγηματικό παράδειγμα της λεγόμενης «συνθετικής θνησιμότητας», δηλαδή της κατάστασης στην οποία μια βλάβη σε ένα από τα δύο γονίδια έχει ελάχιστη ή καθόλου επίδραση, ενώ ο




συνδυασμός τους (γονίδια BRCA και PARP) έχει ως αποτέλεσμα ασθένεια (συνθετική ασθένεια) ή ακόμη και θάνατο (συνθετική θνησιμότητα).



Εικόνα 12. Η έννοια της συνθετικής θνησιμότητας εξηγείται με τους αναστολείς της PARP στη ρύθμιση της μετάλλαξης BRCA, Pearre D., Tewari K., Targeted treatment of advanced ovarian cancer: spotlight on rucaparib, *Therapeutics and Clinical Risk Management*, **2018**

Δύο προκλινικές μελέτες [35], [36] που δημοσιεύθηκαν το 2005, έδειξαν ότι τα μεταλλαγμένα κύτταρα BRCA1 και BRCA2 και τα ξενομοσχεύματα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στους αναστολείς PARP (PARPis), παρέχοντας έτσι ισχυρή υποστήριξη για την κλινική ανάπτυξη τους. Οι αναστολείς PARP αναπτύχθηκαν αρχικά για να ενισχύσουν την αντικαρκινική δραστηριότητα ιονίζουσας ακτινοβολίας και γενοτοξικών παραγόντων (τεμοζολομίδη και τοποτεκάνη). Πράγματι, όλες οι PARP επιδεικνύονται in vitro και in vivo ραδιενέργεια ή χημειοκατάρτιση σύμφωνα με την ικανότητα τους να αναστέλλουν την αποκατάσταση βλάβης του DNA(37). Ο μηχανισμός δράσης των αναστολέων PARP (PARPis) δεν σχετίζεται μόνο με την αναστολή της καταλυτικής δραστικότητας των PARP, αλλά επίσης και με μια αλλοστερική μεταμόρφωση που σταθεροποιεί τη σύνδεση PARP1 και PARP2 με το DNA. Αυτή η ικανότητα «παγίδευσης» του συμπλόκου PARP-DNA εξηγεί το διαφορετικό μέγεθος της κυτταροτοξικότητας που ασκείται από τους





διαφορετικούς αναστολείς PARP. Από τους πέντε αναστολείς που έχουν μελετηθεί ως τώρα, οι αναστολείς Olaparib, Niraparib και Rucaparib παγιδεύουν PARP περίπου 100 φορές πιο αποτελεσματικά από το Veliparib, ενώ το Talazoparib φαίνεται να είναι ο ισχυρότερος αναστολέας [38], [39].



Εικόνα 13. Ο μηχανισμός της δράσης των PARPs, Franzese E., Centonze S., PARP inhibitors in ovarian cancer, *Elsevier*, **2018**

1.4.3. Η Παγίδευση της πολυμεράσης της πολυ(ADP-ριβόζης) από τους Αναστολείς των PARP

Οι PARP αναστολείς αρχικά θεωρούνταν ότι ασκούν την αντικαρκινική δραστικότητά τους μόνο με την αναστολή της καταλυτικής δράσης των PARP1 και PARP2. Βασισμένη στη θεωρία αυτή, η ανικανότητα των PARP για αυτο-PARυλίωση αποτρέπει τη διάστασή τους από το DNA, έχοντας ως αποτέλεσμα τα παγιδευμένα PARP-DNA συμπλέγματα που επεμβαίνουν με την επισκευή των μονών διαλλειμάτων DNA, και η συσσώρευση μη επισκευασμένων απλών διαλλειμάτων DNA οδηγεί σε διπλά διαλλείματα DNA και κυτταρικό θάνατο. Αυτό οδήγησε σε μια





πρώιμη εκδοχή της θεωρίας παγίδευσης PARP [40], [41], [42], η οποία προέβλεπε την κυτταροτοξικότητα σε *BRCA*-ανεπαρκή κύτταρα.

Μια αναθεωρημένη ιδέα περί παγίδευσης PARP προτάθηκε με βάση ανάλυσης δεδομένων [38], [43]. Η νέα ιδέα προτείνει ότι, επιπλέον της καταλυτικής αναστολής, μερικοί PARP αναστολείς μπορούν να προκαλέσουν μεταμόρφωση στις PARP1 και PARP2, σταθεροποιώντας έτσι τις σχέσεις τους με το DNA. Μελέτες κατέδειξαν ότι οι PARP αναστολείς ασκούν κυρίως την κυτταροτοξικότητάς τους με τον μηχανισμό παγίδευσης παρά με την ενζυμική αναστολή. Η ικανότητα παγίδευσης συμπλόκων PARP-DNA ποικίλλει ευρέως σε διάφορους αναστολείς της PARP και δεν συσχετίζεται με την καταλυτική αναστολή της PARP.

- Πρώτον, εάν η PARP καταλυτική αναστολή ήταν ο μοναδικός μηχανισμός της κυτταροτοξικότητας των PARP αναστολέων, θα αναμενόταν η αντικαρκινική κυτταροτοξικότητα ενός αναστολέα να είναι ανάλογη της καταλυτικής αναστολής του.
- Δεύτερον, εάν η PARP καταλυτική αναστολή είναι ο μόνος μηχανισμός κυτταροτοξικότητας, η μείωση της PARP αναμένεται να έχει ισοδύναμη ή μεγαλύτερη επίδραση στην κυτταροτοξικότητα, σε σύγκριση με την αναστολή της PARP από αναστολείς μικρών μορίων.
- Τρίτον, στο μεταξύ υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η ίδια PARP απαιτείται για τις κυτταροτοξικές επιδράσεις των αναστολέων PARP.

Τέλος, PARP-DNA συμπλέγματα έχουν βρεθεί και σε ανέπαφα κύτταρα και σε in vitro μελέτες [42], [38], [43]. Η παρουσία των PARP αναστολέων σταθεροποιεί σημαντικά την σύνδεση του DNA με την PARP σε αναστρέψιμο τρόπο. Είναι σημαντικό ότι η ισχύς των συμπλεγμάτων PARP-DNA παγιδεύει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων αναστολέων της PARP (Olaparib, Niraparib και Rucaparib παγιδεύουν 100 φορές πιο αποτελεσματικά PARP).

Οι αντικαρκινικές κυτταροτοξικότητες των PARP αναστολέων δεν έχουν γραμμική σχέση με την καταλυτική αναστολή. Σε αντίθεση, συσχετίζονται πολύ καλά με την ισχύ παγίδευσης [44].







Εικόνα 14. Ο Ν-τελικός ΗD και ο βρόχος D εμπλέκονται τόσο στις συνδέσεις αναστολέων όσο και στην επικοινωνία μεταξύ των διαμεσολαβητών της PARP1, Shen Y., Aoyagi-Scharber M., Wang B., Trapping Poly(ADP-ribose) Polymerase, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2015**

1.5. ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΡΑΦΙΚΗ ΔΟΜΗ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ PARP1

Ο σχεδιασμός των PARP αναστολέων είναι απόρροια πολλών παραγόντων. Πρώτα, ο φυσικός υποκαταστάτης NAD⁺ παρείχε βασικό δομικό μοτίβο (νικοτιναμίδιο, NAM) επί του οποίου βασίζονται οι ανταγωνιστικοί αναστολείς του NAD⁺. Δεύτερον, η PARP1 πρωτεΐνη αποδείχθηκε ότι είναι απλή για να εκφραστεί και να απομονωθεί, και πολύ επιδεκτική σε πειράματα συν-κρυστάλλωσης. Επιπροσθέτως, η κρυσταλλική δομή της καταλυτικής περιοχής της PARP1 (στο κοτόπουλο) (cPARP-1-CD) προσδιόρισε την τοπολογία των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με NAD⁺ και τη λειτουργία της ADP-ριβόζης. Συνθετικοί αναστολείς έχουν σχεδιαστεί για να μιμηθούν τις αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος NAD⁺ με PARP1.









Ερευνητικές προσπάθειες αφορούν στη σύνθεση περισσότερων εν δυνάμει PARP αναστολέων με ευνοϊκές φυσικές ιδιότητες και in vivo προφίλ κατάλληλα για κλινική ανάπτυξη, μέσω των κρυσταλλογραφικών δεδομένων (x-ray co-crystal structure based (SBDD)), και στην ανάπτυξη νέων δομικών συστατικών , περιλαμβανομένου το 3,4,5,6-τετραϋδρο-1Η-αζέπινο-[5,4,3-cd]-ινδολ-6-όνη, AG-014699 (RUCAPARIB), όπου έχουν διαμορφωτικά κλειδωμένα τρικυκλικά συστήματα βενζαμιδίου, που αλληλεπιδρούν ειδικά με την πρωτεΐνη PARP1 [45]. Το Rucaparib μιμείται το τμήμα NA του NAD⁺ και δεσμεύεται στην καταλυτική περιοχή στο C-τερματικό άκρο του ενζύμου PARP. Ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό σχεδιασμού για το Rucaparib ήταν να «κλειδώσει» τη λειτουργικότητα του βενζαμιδίου στην s-trans διαμόρφωση με την ενσωμάτωσή της στο δακτυλικό





με την πρωτεΐνη, οι οποίες επιβεβαιώθηκαν από την συν-κρυσταλλική δομή αποκαλύπτοντας τρεις κρίσιμους δεσμούς υδρογόνου (2,8-3,1 Å) μεταξύ του καρβονυλίου και του ΝΗ με γλυκίνη-863 και σερίνη-904.

Η διαμόρφωση της επταμελούς λακτάμης του Rucaparib συμβάλλει στην ιδανική αλληλεπίδραση μεταξύ των τρικυκλικών προσδεμάτων και της πρωτεΐνης, επιτρέποντας στο καρβονύλιο της λακτάμης και την ΝΗ να υιοθετήσει μια θέση πλησιέστερη προς τα κατάλοιπα πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην σύνδεση υδρογόνου. Η δομή δείχνει ένα ταξινομημένο μόριο νερού που συμμετέχει στη δέσμευση υδρογόνου (2,9 Å) μεταξύ του ινδολικού NH και του σημαντικού καταλυτικού υπολείμματος Glu-988. Ο τρικυκλικός σχεδιασμός επιτρέπει επίσης την ενσωμάτωση υποκαταστάτη βενζυλαμίνης στη θέση C2 δακτυλίου ινδολίου. Η συνκρυσταλλική δομή υποδηλώνει ότι τα πλησιέστερα κατάλοιπα τυροσίνης (Tyr-907, Tyr-889 και Tyr-896) στην πρωτεΐνη, πιθανώς συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις τύπου p-p (pseudo edge-to-face και pseudo face-to-face) με τον πυρήνα ινδολίου και τον C-2 άρυλο υποκαταστάτη, πιθανώς συμβάλλοντας στην ισχυρή πρόσδεση του Rucaparib στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου παρατηρούνται μεταξύ του καρβονυλικού σκελετού της Gly-888, της πλευρικής αλυσίδας του GIn-763 και μεταξύ των καταλοίπων Tyr-889 και Asp-766. Η p-αμινομέθυλο ομάδα του Rucaparib επιφέρει μια μετατόπιση στην περιοχή βρόχου πλησίον της Gly-888 και κίνηση της πλευρικής αλυσίδας Gln-763, με αποτέλεσμα τη διακοπή αυτών των δεσμών υδρογόνου. Στην κρυσταλλική δομή, χρησιμοποιώντας τον καταλυτικό τομέα της PARP από κοτόπουλο, το αμινοξύ 763 είναι μια γλουταμίνη. Ένα γλουταμικό οξύ υπάρχει σε αυτή τη θέση στις μελέτες του ανθρώπινου ενζύμου και της μοντελοποίησης, υποδηλώνοντας ότι η πλευρική αλυσίδα συμμετέχει σε ένα δεσμό υδρογόνου με την ομάδα p-αμινομεθυλίου του Rucaparib. Ο τρικυκλικός σχεδιασμός που ενσωματώνεται στο Rucaparib επιτρέπει τη μέγιστη ενσωμάτωση της ποικιλομορφίας με λειτουργικότητα στη θέση C-2 του δακτυλίου ινδολίου. Διερευνήθηκαν πολυάριθμες αντικαταστάσεις στη θέση C-2 και βρέθηκε ότι πολλές ομάδες μπορούν να προσαρμοστούν και να διατηρήσουν την ισχύ PARP1, συμπεριλαμβανομένων των ετερόκυκλων, αλκυλίων, αλκυνίων, καρβοξαμιδίων και καρβόξυ υποκαταστατών. Το μη πεπλατυμένο [5,6,8] σύστημα





και ο p-αμινομεθυλο υποκαταστάτης συμβάλλουν πιθανώς στις ευνοϊκές φυσικοχημικές ιδιότητες του Rucaparib. Το Rucaparib εμφανίζει διαλυτότητα στο νερό 800 φορές μεγαλύτερη (3,2 mM, pH 7) από αυτό του μη υποκατεστημένου αναλόγου φαινυλίου (0,026 mM, pH 7) [46].



Εικόνα 16. Κρυσταλλική δομή του Rucaparib δεσμευμένο στο καταλυτικό θραύσμα ARTD6, Haikarainen T., Narwal M., Joensuu P., Lehtiö L., Evaluation and Structural Basis for the Inhibition of Tankyrases by PARP Inhibitors, *American Chemical Society*, **2013**

1.6. ΤΟ ΙΝΔΟΛΙΟ ΩΣ ΒΑΣΙΚΟ ΔΟΜΙΚΟ ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Το κυκλικό ινδολικό σύστημα αντιπροσωπεύει ένα από τα πιο άφθονα και πιο σημαντικά ετεροκυκλικά συστήματα στη φύση. Βρίσκεται σε πλήθος βιολογικά σημαντικών φυσικών ενώσεων, από απλά παράγωγα όπως τη νευροδιαβιβαστική σεροτονίνη, σε πολύπλοκα αλκαλοειδή όπως τα κλινικά αντικαρκινικά βινμπλαστίνη και μιτομυκίνη C. Η σημασία των ινδολίων στη βιολογική χημεία είναι ανεκτίμητη. Επίσης, ένας μεγάλος αριθμός σημαντικών συνθετικών φαρμάκων φέρουν ένα ινδολικό μοτίβο.

Η συνεχής ανάπτυξη σύνθεσης του ινδολίου και των παραγώγων του έχει γίνει το κεντρικό θέμα στην οργανική χημεία τον τελευταίο αιώνα [47]. Ωστόσο,





υπάρχουν περιορισμοί στο χημικό χώρο που είναι εύκολα προσβάσιμοι. Αυτό μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί με σύγκριση των φυσικών ινδολικών φαρμάκων με τα συνθετικά ομόλογά τους. Συγκεκριμένα, το μοτίβο υποκατάστασης γύρω από τον εξαμελή δακτύλιο είναι λιγότερο περίπλοκος από τα συνθετικά ινδόλια, σε σύγκριση με αυτά που προκύπτουν φυσικά. Δεν υπάρχουν συνθετικά ινδόλια που φέρουν υποκαταστάτες σε περισσότερες από μια από τις θέσεις του βενζολικού δακτυλίου που βρίσκονται σήμερα σε κλινικές μελέτες.

Με λίγες εξαιρέσεις, όπως αυτές που πορεύονται μέσω της λειτουργίας των πυρρολίων [48] και μεθόδων οι οποίες σχηματίζουν ταυτόχρονα και τους 2 δακτυλίους, οι ινδολικές συνθέσεις σχεδόν καθολικά συνεπάγονται προσκόλληση του πενταμελούς δακτυλίου σε ένα ήδη υπάρχον βενζολικό δακτύλιο που φέρει την κατάλληλη λειτουργικότητα. Μπορούν να διαχωριστούν σε αυτές, όπου δύο υποκαταστάτες συνδέονται μαζί σε ο-θέση και σε αυτές όπου ένας υποκαταστάτης κυκλοποιείται κατευθείαν σε αρωματικό δακτύλιο [47], [49].

1.6.1. Χημικές Ιδιότητες Ινδολίου

Σε αντίθεση με τις αμίνες, το ινδόλιο δεν είναι βασικό, καθώς ο αρωματικός χαρακτήρας του δακτυλίου δεν επιτρέπει στο ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του αζώτου να είναι διαθέσιμα για πρωτονίωση.

Ισχυρά οξέα, όπως το HCl, παρόλα αυτά πρωτονιώνουν το ινδόλιο. Το ινδόλιο πρωτονιώνεται αρχικά στον C-3 άνθρακα, παρά στο άζωτο, λόγω της δραστικότητας, όπως της εναμίνης, του τμήματος μορίου που βρίσκεται έξω από τον βενζολικό δακτύλιο.

1.6.2. Αντιδράσεις Σύνθεσης Ινδολίου

Το ινδόλιο, καθώς και τα παράγωγά του, συντίθεται μέσω μεγάλου αριθμού εναλλακτικών μεθόδων [50], [51], [52]. Η βιομηχανική σύνθεση ξεκινά από ανιλίνη μέσω φάσεως ατμού και αντιδρά με αιθυλενογλυκόλη (αιθαν-1,2-διόλη), παρουσία καταλύτη:







Σχήμα 1. Αντίδραση της ανιλίνης και της αιθυλενογλυκόλης για το σχηματισμό ινδολίου

Γενικά, οι αντιδράσεις διεξάγονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι αποδόσεις μπορούν να φθάσουν το 60%. Πρόδρομες ενώσεις σύνθεσης του ινδολίου περιλαμβάνουν τις ενώσεις φορμυλοτολουιδίνη, 2-αιθυλανιλίνη και 2- (2- νιτροφαινυλ) αιθανόλη, όπου όλες υποβάλλονται σε κυκλοποιήσεις.

1.6.2.1. Σύνθεση ινδολίου κατά Leimgruber-Batcho

Η σύνθεση ινδολίου κατά Leimgruber-Batcho είναι μία αποτελεσματική μέθοδος σύνθεσης ινδολίου, καθώς και υποκατεστημένων ινδολίων. Η εν λόγω μέθοδος είναι υψηλής απόδοσης και μπορεί να παράγει υποκατεστημένα ινδόλια. Αυτή η μέθοδος είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στη φαρμακευτική βιομηχανία, όπου πολλά φαρμακευτικά φάρμακα αποτελούνται από ειδικά υποκατεστημένα ινδόλια [53].



Σχήμα 2. Σύνθεση ινδολίου κατά Leimgruber-Batcho

Αναγωγική κυκλοποίηση δινιτροστυρενίου

Η αναγωγική κυκλοποίηση των δινιτροστυρενίων έχει αποδειχθεί αποτελεσματική όταν άλλες, πιο κοινές μέθοδοι, έχουν αποτύχει [54].







Σχήμα 3. Αναγωγική κυκλοποίηση του δινιτροστυρενίου

1.6.2.2. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer

Μία από τις παλαιότερες και πιο αξιόπιστες μεθόδους για τη σύνθεση υποκατεστημένων ινδολίων είναι η σύνθεση ινδολίου κατά Fischer, που αναπτύχθηκε το 1883 από τον Emil Fischer. Χρησιμοποιείται κατά κανόνα για τη σύνθεση ινδολίων υποκατεστημένων στις θέσεις 2- και/ή 3-. Εν τούτοις, το ινδόλιο μπορεί ακόμη να συντίθεται, χρησιμοποιώντας τη σύνθεση ινδολίου κατά Fischer με αντίδραση φαινυλυδραζίνης με πυροσταφυλικό οξύ και εν συνεχεία με αποκαρβοξυλίωση του σχηματισθέντος ινδολο-2-καρβοξυλικού οξέος. Αυτό έχει, επίσης, πραγματοποιηθεί σε σύνθεση ενός δοχείου χρησιμοποιώντας ακτινοβολία



Σχήμα 4. Σύνθεση ινδολίου κατά Fischer

Τροποποίηση Buchwald

Μέσω μιας αντίδρασης καταλυόμενης από παλλάδιο, η σύνθεση ινδολίου κατά Fischer μπορεί να πραγματοποιηθεί με διασταυρούμενες συζεύξεις αρυλοβρωμιδίων και υδραζονών [56]. Αυτό το αποτέλεσμα υποστηρίζει την προηγουμένως προτεινόμενη ενδιάμεση δράση ως ενδιάμεσα υδραζόνης στην





κλασική σύνθεση ινδολίου κατα Fischer. Αυτές οι Ν-αρυλοϋδραζόνες υποβάλλονται σε ανταλλαγή με άλλες κετόνες, διευρύνοντας το πεδίο αυτής της μεθόδου.



Σχήμα 5. Η τροποποίηση Buchwald στην σύνθεση ινδολίου κατά Fischer

1.6.2.3. Σύνθεση ινδολίου κατά Bartoli

Η σύνθεση ινδολίου με τη μέθοδο Bartoli, είναι η χημική αντίδραση ορθουποκατεστημένων νιτροαρενίων και νιτροσοαρενίων με αντιδραστήρια βινυλο Grignard για σχηματισμό υποκατεστημένων ινδολίων [57], [58].

Η αντίδραση είναι συχνά ανεπιτυχής χωρίς ορθο-υποκατάσταση ως προς την νιτρο-ομάδα, με ογκώδεις ορθο-υποκαταστάτες που συνήθως οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις. Η στερική παρεμπόδιση της ορθο-ομάδας βοηθά στην [3,3]-σιγματροπική αναδιάταξη που απαιτείται για το σχηματισμό προϊόντος.

Αυτή η μέθοδος έχει γίνει μια από τις συντομότερες και πιο εύχρηστες συνθετικές πορείες σε 7-υποκατεστημένα ινδόλια [59], [60]. Ένα πλεονέκτημα της σύνθεσης ινδολίου Bartoli είναι η ικανότητα παραγωγής ινδολίων υποκατεστημένων τόσο στον καρβοκυκλικό δακτύλιο όσο και στον δακτύλιο πυρρολίου.









Τροποποίηση Dobbs

Ο Adrian Dobbs διεύρηνε σημαντικά το πεδίο εφαρμογής της σύνθεσης ινδολίου Bartoli χρησιμοποιώντας ένα ορθο-βρώμιο ως ομάδα καθοδήγησης, η οποία στη συνέχεια απομακρύνεται με AIBN και υδρίδιο τριβουτυλκασσιτέρου [61].



Σχήμα 7. Η τροποποίηση Dobbs στη σύνθεση ινδολίου κατά Bartoli

1.6.2.4. Σύνθεση ινδολίου κατά Bischler–Möhlau

Η σύνθεση ινδολίου κατα Bischler-Möhlau είναι μια χημική αντίδραση που σχηματίζει ένα 2-αρυλο-ινδόλιο από μια α-βρωμο-ακετοφαινόνη και περίσσεια ανιλίνης [62], [63], [64], [65].

Παρά την μακρά ιστορία της, αυτή η κλασσική αντίδραση έχει τύχει περιοσριμσένης προσοχής σε σύγκριση με άλλες μεθόδους σύνθεσης ινδολίου, εξαιτίας των συνθηκών της αντίδρασης, κυρίως, δε, των χαμηλών αποδόσεων και της απρόβλεπτης τοποεκλεκτικότητας. Πρόσφατα αναπτύχθηκαν πιο ήπιες μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης βρωμιούχου λιθίου ως καταλύτη και βελτιωμένης διαδικασίας που περιλαμβάνει τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων [66], [67], [68].



Σχήμα 8 Σύνθεση ινδολίου κατά Bischler–Möhlau





1.6.2.5 Σύνθεση ινδολίου κατά Fukuyama

Η σύνθεση ινδολίου με τη μέθοδο Fukuyama είναι μια ευπροσάρμοστη χημική αντίδραση με τη χρήση αντιδραστηρίων κασσιτέρου, κυρίως για τον σχηματισμό 2,3-διυποκατεστημένων ινδολίων [69], καθώς και μια πρακτική one-pot αντίδραση που μπορεί να είναι χρήσιμη για τη δημιουργία διϋποκατεστημένων ινδολίων [70]. Κοινά υδρίδια τριβουτυλοκασσιτέρου χρησιμοποιείται ως αναγωγικός παράγοντας, με αζω-δις-ισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) ως έναν εκκινητή ριζών [71]. Το τριαιθυλοβοράνιο μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί ως εκκινητής ριζών. Η αντίδραση μπορεί να ξεκινήσει, είτε με ένα ορθο-ισοκυανοστυρόλιο είτε με ένα παράγωγο 2-αλκενυλοθειοανιλιδίου, σχηματίζοντας αμφότερα το ινδόλιο διαμέσου ριζικής κυκλοποίησης μέσω μιας ρίζας α-στανο-ιμιδοϋλίου [50]. Η ομάδα R μπορεί να είναι μία σειρά βασικών και όξινων ευαίσθητων λειτουργικών ομάδων, όπως εστέρων, αιθέρων THP και β-λακταμών. Επιπροσθέτως, η αντίδραση δεν είναι στερεοειδική, καθώς αμφότερα τα ισομερή, cis και trans, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος [72].





Η σύνθεση ινδολίων με τη μέθοδο Fukuyama οδηγεί στη σύνθεση ινδολίων με πλήθος διαφορετικών υποκαταστατών στις θέσεις 2 και 3, που ήταν προηγουμένως ανέφικτες οι συνθέσεις χωρίς προστατευτική ομάδα στο





άζωτο στον δακτύλιο. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το παράγωγο 2-ιωδοϊνδολίου, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει σε μια ποικιλία Ν-μη προστατευμένων 2,3-υποκατεστημένων ινδολίων. Πριν από την ανακάλυψη αυτής της ένωσης, η χημεία που περιελάμβανε 2-σταννυλινδόλες, δεν αναπτύχθηκε καθώς δεν υπήρχε τρόπος για πρακτική σύνθεση αυτών των Νμη προστατευμένων 2,3-σταννυλινδολών. Περιορίστηκε στην παραγωγή Νπροστατευμένων 2-σταννυλινδολών μέσω μεταλλοποίησης με μια διαδικασία γνωστή ως σύζευξη Stille [73]. Οι Ν-απροστάτευτες 2σταννυλινδολικές 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 2ιωδοϊνδόλια ως αρχικό αντιδραστήριο. Αυτό το υποκατεστημένο με ιώδιο παράγωγο μπορεί να οδηγήσει σε αρυλαλογονίδια, βινυλοϊωδίδια, βινυλοτριφλικά και βενζυλοβρωμίδια.



Σχήμα 10. Παράδειγμα σύνθεσης για την αντίδραση Fukuyama

Επιπλέον, στη 2-θέση πραγματοποιείται η σύζευξη Sonogashira για τα ακετυλένια, και η αντίδραση Heck για τα ακρυλικά [72].







Σχήμα 11. Πιθανές επόμενες συνθέσεις της αντίδρασης που συνεργάζονται με τα 2ιωδοϊνδόλια από τη σύνθεση Fukuyama.

1.6.2.6. Σύνθεση ινδολίου κατά Gassman

Η σύνθεση ινδολίου κατά Gassman είναι μία σειρά χημικών αντιδράσεων που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση υποκατεστημένων ινδολίων με προσθήκη ανιλίνης και κετόνης που φέρει υποκαταστάτη θειοαιθέρα.

Πρόκειται για one-pot χημική αντίδραση και κανένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα δεν απομονώνεται. Ο υποκαταστάτης R₁ μπορεί να είναι υδρογόνο ή αλκύλιο, ενώ το R₂ λειτουργεί καλύτερα με αρύλιο, αλλά μπορεί επίσης να είναι αλκύλιο. Οι ανιλίνες πλούσιες σε ηλεκτρονιακή πυκνότητα, όπως η 4μεθοξυανιλίνη, τείνουν να αποτυγχάνουν σε αυτή την αντίδραση. Η θειομεθυλομάδα στην 3-θέση απομακρύνεται συχνά χρησιμοποιώντας νικέλιο Raney για να δώσει το 3-Η-ινδόλιο [74], [75].







Σχήμα 12. Σύνθεση ινδολίου κατά Gassman

1.6.2.7. Σύνθεση ινδόλιου κατά Hemetsberger

Η σύνθεση ινδολίου Hemetsberger ή σύνθεση Hemetsberger-Knittel είναι μια χημική αντίδραση θερμικής αποσύνθεσης ενός 3-αρυλο-2-αζιδο-προπενοϊκό εστέρα σε ένα ινδολο-2-καρβοξυλικό εστέρα [76], [50].

Οι αποδόσεις είναι συνήθως ανω του 70%. Ωστόσο, δεν είναι μια δημοφιλής αντίδραση, λόγω της μη χημικής σταθερότητας και δυσκολίας στη σύνθεση της πρώτης ύλης.



Σχήμα 13. Σύνθεση ινδολίου κατά Hemetsberger

1.6.2.8. Σύνθεση ινδολίου κατά Larock

Η σύνθεση ινδολίου Larock είναι μια αντίδραση κυκλοποιήσης με την ενσωμάτωση ενός ετεροατόμου, η οποία χρησιμοποιεί παλλάδιο ως καταλύτη για τη σύνθεση ινδολίων από μια ορθο-ιωδοανιλίνη και ένα διυποκατεστημένο αλκίνιο [77]. Είναι, επίσης, γνωστή ως κυκλοποίηση Larock. Η αντίδραση είναι εξαιρετικά εύχρηστη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση ποικίλων τύπων ινδολίων.







Σχήμα 14. Σύνθεση ινδολίου κατά Larock

Οι ο-βρωμοανιλίνες ή οι ο-χλωροανιλίνες, δεν προσφέρονται για τη σύνθεση ινδολίου με τη μέθοδο Larock. Ωστόσο, χρησιμοποιήθηκαν αμφότερες με επιτυχία για να σχηματίσουν ινδόλια χρησιμοποιώντας Ν-μεθυλο-2-πυρρολιδόνη (NMP) ως διαλύτη με 1,1'-δις (δι-tert-βουτυλφωσφινο) φερροκενίου ως υποκαταστάτη παλλαδίου. Οι ο-βρωμοανιλίνες και οι ο-χλωροανιλίνες είναι πιο εύκολα διαθέσιμες και οικονομικά αποδοτικές σε σχέση με τη χρήση ο-ιωδοανιλίνης σε σύνθεση ινδολίου με τη μέθοδο Larock.



Σχήμα 15. Ετεροκυκλοποίηση του ινδολίου χρησιμοποιώντας ο-χλωροανιλίνη

1.6.2.9. Σύνθεση ινδολίου κατά Madelung

Η σύνθεση ινδολίων κατά Madelung είναι μια χημική αντίδραση που παράγει ινδόλια υποκατεστημένα ή μη υποκατεστημένα με την ενδομοριακή κυκλοποίηση





των Ν-φαινυλαμιδίων, χρησιμοποιώντας ισχυρή βάση σε υψηλή θερμοκρασία. Η σύνθεση Madelung αναφέρθηκε το 1912 από τον Walter Madelung, όταν παρατήρησε ότι συντέθηκε 2-φαινυλινδόλιο με χρήση Ν-βενζοϋλο-ο-τολουιδίνης και δύο ισοδυνάμων αιθοξειδίου του νατρίου σε μία θερμαινόμενη αντίδραση χωρίς αέρα.



Σχήμα 16 . Σύνθεση ινδολίου κατά Madelung

Οι κοινές συνθήκες αντίδρασης περιλαμβάνουν τη χρήση αλκοξειδίου νατρίου ή καλίου ως βάση σε διαλύτες εξανίου ή τετραϋδροφουρανίου, σε θερμοκρασίες κυμαινόμενες μεταξύ 200-400 ° C. Ένα στάδιο υδρόλυσης απαιτείται επίσης στη σύνθεση. Η σύνθεση Madelung είναι σημαντική επειδή είναι μία από τις λίγες γνωστές αντιδράσεις που παράγουν ινδόλια από μια καταλυόμενη με βάση θερμική κυκλοποίηση των Ν-ακυλ-ο-τολουϊδινών.

Τροποποίηση Smith

Αυτή η σύνθεση χρησιμοποιεί μια αντίδραση συμπύκνωσης των αντιδραστηρίων οργανολιθίου που προέρχονται από 2-αλκυλο-Ν-τριμεθυλσιλυλο ανιλίνες με εστέρες ή καρβοξυλικά οξέα για να αποδώσουν υποκατεστημένα ινδόλια [78].









Η σύνθεση αυτή έχει αποδειχθεί εφαρμόσιμη σε μία ευρεία ποικιλία υποκατεστημένων ανιλινών, περιλαμβανομένων εκείνων με ομάδες αλκυλίου, μεθοξυδίου και αλογονιδίων και μπορεί να αντιδράσει με μη-ενολοποιημένους εστέρες ή λακτόνες για να δώσει ενδιάμεσα Ν-λιθιοκεταμίνης. Αυτά τα ενδιάμεσα υποβάλλονται στη συνέχεια σε μια ενδομοριακή ολεφινοποίηση Peterson για να δώσουν ινδολίνες, οι οποίες στη συνέχεια ταυτομερίζονται σε 2-υποκατεστημένα ινδόλια. Η σύνθεση ινδολίου με τη μέθοδο Smith είναι μία από τις σημαντικότερες τροποποιήσεις της σύνθεσης Madelung.





1.6.2.10. Σύνθεση ινδολίου κατά Nenitzescu

Η σύνθεση ινδολίου Nenitzescu είναι μια χημική αντίδραση που σχηματίζει παράγωγα 5-υδροξυϊνδολίου από βενζοκινόνη και β-αμινοκροτονικούς εστέρες. Μπορεί να πραγματοποιηθεί με έναν αριθμό διαφορετικών υποκαταστατών R, οι οποίοι περιλαμβάνουν μεθυλο-, μεθοξυ-, αιθυλο-, προπυλο- υποκαταστάτες. Υπάρχει επίσης μια παραλλαγή στερεάς κατάστασης, στην οποία η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε διασταυρούμενο πολυμερικό σύμπλεγμα [79]. Η σύνθεση είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, επειδή τα ινδόλια αποτελούν τη βάση για έναν αριθμό βιοχημικά σημαντικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των νευροδιαβιβαστών και μιας νέας κατηγορίας αντικαρκινικών ενώσεων [80].



Σχήμα 18. Σύνθεση ινδολίου κατά Nenitzescu





Μια από τις συνηθέστερες παραλλαγές της αντίδρασης Nenitzescu είναι η παραλλαγή στερεάς φάσης [79].



Σχήμα 19. Η στερεάς φάσης σύνθεση ινδολίου κατά Nenitzescu

Διεξάγεται σε ρητίνη ArgoPore[®]-Rink-NH-Fmoc με υψηλή διασύνδεση και λειτουργεί με μια ποικιλία υποκατάστατων και στα δύο αντιδρώντα.

1.6.2.11. Σύνθεση ινδολίου κατά Reissert

Η σύνθεση ινδολίου κατά Reissert είναι μια σειρά χημικών αντιδράσεων σύνθεσης ινδολίου ή υποκατεστημένων ινδολίων σε 4- και 5- θέση από ορθονιτροτολουόλιο (1) και οξαλικό διαιθυλεστέρα (2) [81].







Σχήμα 20. Σύνθεση ινδολίου κατά Reissert

Τροποποίηση Budin

Σε μια ενδομοριακή παραλλαγή της αντίδρασης Reissert, η διάνοιξη του φουρανικού δακτυλίου παρέχει το καρβονύλιο που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του ινδολίου, ενώ υφίσταται και μια πλευρική αλυσίδα, φέρουσα μια κετο-ομάδα στο τελικό προϊόν, επιτρέποντας περαιτέρω τροποποιήσεις [82].



Σχήμα 21. Η τροποποίηση Butin στη σύνθεση ινδολίου κατά Reissert

1.6.2.12. Σύνθεση ινδολίου κατά Baeyer-Emerling

Η σύνθεση ινδολίου κατά Baeyer-Emmerling είναι μια μέθοδος για τη σύνθεση ινδολίου από ένα υποκατεστημένο ορθο-νιτροκινναμωμικό οξύ και σκόνη σιδήρου σε έντονα βασικό περιβάλλον [83].









1.6.2.13. Σύνθεση κατά Diels-Reese

Η αντίδραση Diels-Reese είναι μια αντίδραση μεταξύ υδραζοβενζολίου και ακετυλενοδικαρβοξυλικού διμεθυλεστέρα ή σχετικών εστέρων [84][85]. Περαιτέρω εργασίες από άλλους ερευνητές επέκτεινε τη χρήση της αντίδρασης που συμπεριλαμβάνει υποκατεστημένα υδραζοβενζόλια [86]. Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Με αλλαγή της όξινης ή βασικής φύσης του διαλύτη, η αντίδραση δίνει διαφορετικά προϊόντα. Με το οξικό οξύ ως διαλύτη, ήτοι σε όξινο περιβάλλον, η αντίδραση δίνει μια διφαινυλοπυραζολόνη. Με το ξυλόλιο ως διαλύτη (ουδέτερο), η αντίδραση δίνει ένα ινδόλιο. Με την πυριδίνη ως διαλύτη, ήτοι σε βασικό περιβάλλον, η αντίδραση δίνει μια καρβομεθοξυκινολίνη η οποία μπορεί να αποικοδομηθεί σε μία διυδροκινολίνη.



Σχήμα 23. Η σύνθεση ινδολίου κατά Diels-Reese





1.7. RUCAPARIB

Το Rucaparib camsylate ανακαλύφθηκε ως μέρος της συνεργασίας μεταξύ του Northern Institute of Cancer, Newcastle University και της Agouron Pharmaceuticals. Μετά από την εξαγορά της Agouron από την Warner Lambert, όπου με τη σειρά της εξαγοράστηκε από την Pfizer το 2000, η Pfizer ανέλαβε την πρώιμη κλινική ανάπτυξη και έπειτα διέθεσε το υποψήφιο φάρμακο στην Clovis Oncology, η οποία συνέχισε την ανάπτυξη και έλαβε επιταχυνόμενη έγκριση από τις ΗΠΑ τον Δεκέμβριο του 2016 για τη θεραπεία ασθενών με προηγμένο καρκίνο των ωοθηκών με μετάλλαξη *BRCA* (γενετική ή/και σωματική), με προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών, που να έχουν υποστεί προηγουμένως δύο ή περισσότερες θεραπευτικές αγωγές με χημειοθεραπεία.



Σχήμα 24. Η δομή του Rucaparib ως άλας του φωσφορικού οξέος.

Το Rucaparib λειτουργεί ως ένα μικρό μόριο αναστολέα της πολυ(ADPριβόζη)πολυμεράσης (PARPi), που διαδραμτίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA [87]. Αυτό το πρόσφατα εγκριθέν φάρμακο επιδεικνύει νανομοριακή στην κλίμακα δραστικότητα εναντίον των ενζύμων PARP1, PARP2 και PARP3 [88], όπου μεταφράζεται σε βελτιωμένη αποτελεσματικότητα έναντι εναλλακτικών θεραπειών όπως το Olaparib ή το Niraparib [89]. Επιπλέον, το Rucaparib είναι γνωστό ότι προκαλεί αγγειοδιαστολή, όπου πιστεύεται ότι προκαλούν αιμάτωση του όγκου και αυξημένη συσσώρευση του φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα [90]. Παρόλο που το Rucaparib δείχνει υψηλότερη κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα με





μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2, καθώς και άλλων γονιδίων επισκευής του DNA [91][92], παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη όγκου σε μοντέλα ξενομοσχεύματος ποντικού ανθρώπινων καρκίνων με και χωρίς μεταλλάξεις *BRCA* [91]. Το Rucaparib έχει επιδείξει επίσης πολλά υποσχόμενα αρχικά αποτελέσματα σε δοκιμές για παγκρεατικό καρκίνο [93][94].

1.7.1. Φαρμακευτική Χημική Πορεία για το Rucaparib (Agouron and Cancer Research)

Η ολική σύνθεση συνίσταται από επτά στάδια μιας αποκλίνουσας συνθετικής πορείας με ολική απόδοση 22%, με βήματα-κλειδιά να περιλαμβάνουν σχηματισμό ινδολίου μέσω μιας Leimgruber-Batcho αντίδρασης και Suzuki σταυρωτή σύζευξη για την εισαγωγή του βενζολικού δακτυλίου στη 2-θέση του ινδολίου [45].



Σχήμα 25. Η φαρμακευτική πορεία της αντίδρασης για το σχηματισμό του Rucaparib





1.7.2. Εναλλακτικές συνθετικές πορείες του Rucaparib

1) Η συνθετική πορεία μετρά 10 βήματα και παρέχει 15% συνολική απόδοση. Η κάτωθι ολική σύνθεση ενσωματώνει τον ινδολικό δακτύλιο σε μετέπειτα στάδιο, ενώ η ανάγκη εισαγωγής ακετυλενίου και η χρήση καρβαμικού άλατος ως προστατευτική ομάδα αζώτου απλώς προσθέτουν επιπλεόν στάδια. Ως εκ τούτου, αυτή η ολική σύνθεση δεν παρέχει σημαντική βελτίωση σε σχέση με την αρχική συνθετική πορεία [95].



Σχήμα 26. Πρώτη πορεία χημικής αντίδρασης για το σχηματισμό του Rucaparib.







Σχήμα 27. Παραπροϊόντα που σχηματίζονται κατά τη πρώτη πορεία χημικής αντίδρασης.

2) Η δημοσίευση από τη Pfizer περιγράφει μια εναλλακτική πορεία σύνθεσης του Rucaparib, στην οποία υπάρχουν σχετικές τροποποιήσεις ως προς την αρχική. Πιθανό, μη μπορώντας να αναπαράξουν τη μετατροπή του 6-φθόρο-1Η-ινδολο-4-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα σε νιτροαλκάνιο, αντικαταστάθηκε η χημεία με διαδικασία δύο βημάτων χρησιμοποιώντας αντίδραση με 1-διμεθυλαμινο-2-νιτροαιθυλένιο, ακολουθούμενη από αναγωγή με βοροϋδρίδιο του νατρίου, η οποία παρείχε μόνο 33% απόδοση στο στάδιο της αναγωγής [96].







Σχήμα 28. Δεύτερη πορεία χημικής αντίδρασης, τροποποίηση που διενεργήθηκε λόγω δυσκολίας της εισαγωγής του 6-φθόρο-1Η-ινδολο-4-καρβοξυλικού μεθυλεστέρα της νιτροαλκενικής αλυσίδας.

3) Παρόλο που η βελτιστοποίηση της αρχικής πορείας ήταν επαρκής για τη σύνθεση 2 kg του Rucaparib, ένας μεγάλος αριθμός προβλημάτων ως προς την απομόνωση και τον καθαρισμό των ενδιάμεσων ενώσεων παρέμεναν πριν οριστικοποιηθεί μια αποκλίνουσα συνθετική πορεία.







Σχήμα 29. Η χημική πορεία αντίδρασης για το σχηματισμό του Rucaparib σύμφωνα με τη Pfizer.







Σχήμα 30. Βασικά παραπροϊόντα που προκύπτουν από την χημική πορεία της Pfizer.

4) Μια κατοχύρωση από την Shijiazhuang Biotechnology περιγράφει μια διαφορετική πορεία προς το ενδιάμεσο τρικυκλικό ινδόλιο μέσω σύνθεσης του ινδολίου με μια αντίδραση Bartoli-Dodd. Τα έξι βήματα της πορείας δίνουν 18% συνολική απόδοση [58].



Σχήμα 31. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης του τρικυκλικού ινδολίου όπως προτάθηκε από την Shijiazhuang Biotechnology.





Η τελική μορφή του Rucaparib είναι ένα άνυδρο (S)-καμφουρσουλφονικό άλας, κοινώς ως «camsylate salt». Τρία πολύμορφα του άλατος βρέθηκαν, γνωστά ως μορφές Α, Β και C. Η μορφή Α είναι η πιο σταθερή [95].

1.8. OLAPARIB KAI NIRAPARIB

1.8.1. Olaparib





Το Olaparib, το οποίο κυκλοφορεί στην αγορά με την εμπορική ονομασία Lynparza, ανακαλύφθηκε από την KuDOS Pharmaceuticals, η οποία εξαγοράστηκε





από την AstraZeneca το 2006. Η Lynparza εγκρίθηκε για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών τον Δεκέμβριο του 2014 [95].

Το Olaparib έχει ήδη εγκριθεί για τη θεραπεία ασθενών με επαναλαμβανόμενο καρκίνο των ωοθηκών και μετάλλαξης BRCA και έχει αποδειχθεί ότι παρέχει κλινικά σημαντικά οφέλη στους ασθενείς. Έχει επίσης δείξει πολλά υποσχόμενη δραστηριότητα σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού ή προστάτη και μετάλλαξη BRCA βλαστικής σειράς. Εκτός από τη χρήση του ως απλού παράγοντα, το Olaparib μπορεί επίσης να δρα είτε ως χημειο- και / ή ραδιοευαισθητοποιητής, λόγω της ικανότητάς του να ενισχύει τις κυτταροτοξικές επιδράσεις αυτών των θεραπευτικών παραγόντων [97].

1.8.2. Niraparib

Ο FDA ενέκρινε το Niraparib (εμπορική ονομασία ZEJULA) το Μάρτιο του 2017 για τη θεραπεία συντήρησης ενήλικων ασθενών με υποτροπιάζων επιθηλιακό ωοθηκικό καρκίνο, ή καρκίνο της σάλπιγγας ή πρωτεύοντα περιτοναϊκό καρκίνο που ανταποκρίνονται πλήρως ή μερικώς σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα.







Σχήμα 33. Φαρμακευτική πορεία σύνθεσης για του σχηματισμό του Niraparib.





ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 ΝΕΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΟΥ RUCAPARIB

2.1.1. Σχεδιασμός Νέας Συνθετικής Πορείας (Πορεία 1^η)



Σχήμα 35. Απεικόνιση της συνθετικής πορείας του Rucaparib, που σχεδιάστηκε και ακολουθήθηκε από την ερευνητική ομάδα.





Η νέα συνθετική πορεία που προτάθηκε από την ερευνητική ομάδα, συνίσταται από 7 συνθετικά στάδια, το καθένα θεωρητικά υψηλής απόδοσης. Η αρχική ένωση, και βασικό υπόστρωμα καθ' όλη τη συνθετική πορεία, επιλέχθηκε το 6-φθορο-ινδόλιο, ένα εύχρηστο και φθηνό αντιδραστήριο.

Η παραπάνω πορεία, μπορεί να περιγραφεί ως εξής:

- Με αρχικό υπόστρωμα το 6-φθόρο-ινδόλιο, πραγματοποιείται μια αντίδραση τύπου Michael στην πλέον δραστική θέση C-3 με σκοπό την προσθήκη του οξέος Meldrum (2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνη), παρουσία φορμαλδεΰδης μέσω ενός καταλυτικού κύκλου της L-Προλίνης, με σκοπό, μετά από σχετική χημική τροποποίηση, της εισαγωγής ανθρακικής αλυσίδας με ενδεδειγμένη λειτουργική ομάδα.
- Η προκύπτουσα ένωση 2 υπόκειται σε βρωμίωση, στη θέση C2 του ινδολίου, με
 Pyridinum Perbromide σε μείγμα διαλυτών (DCM και THF), σε χαμηλή σχετικά θερμοκρασία (0-5°C).
- Ακολούθως, η ένωση **3** με αποκαρβοξυλίωση παρουσία πυκνού υδροχλωρικού οξέος δύναται να μετατραπεί σε παράγωγο του 3-ινδολοπροπιονικού οξέος **4**.
- Στη συνέχεια, παρουσία τριφιλικού σκανδίου με νιτρομεθάνιο ή πολυφωσφορικού οξέος, σχεδιάστηκε μια ενδομοριακή κυκλοποίηση. Έτσι παραλαμβάνεται η τρικυκλική ένωση 5.
- Στο τμήμα της κυκλοεξανόνης της ένωσης 5, θα μπορούσε να υποστεί μία αντίδραση αναδιάταξης κατά Beckmann, δηλαδή αντιδρά αρχικά με NH₂OH για να δώσει ένα ενδιάμεσο οξίμης, το οποίο στη συνέχεια με κατεργασία με H₂SO₄ υπό θέρμανση θα μπορούσε να δώσει τη λακτάμη που χαρακτηρίζει την τελική ένωση της ινδολαζεπίνης
- Μετέπειτα, στη θέση C-2 του ινδολίου όπου βρίσκεται το Br, σχεδιάστηκε η προσάρτηση μίας βενζαλδεΰδης μέσω μίας αντίδρασης σύζευξης Suzuki της ένωσης 6 με το 4-φορμυλοβενζυλο βορονικό οξύ, παρέχοντας το προϊόν σύζευξης 7.
- Τέλος, επιτελείται μια αντίδραση αναγωγικής αμίνωσης στην ένωση 7, αντιδρώντας με μεθυλαμίνη, δίδοντας έτσι το επιθυμητό προϊόν 8.





2.1.2. Προκλήσεις- Προβλήματα κατά την διενέργεια της 1^{ης} εναλλακτικής πορείας.

2.1.2.1. Προκλήσεις στο σχηματισμό του οξέος

Το πρώτο πρόβλημα που αντιμετωπίστηκε στη συνθετική πορεία ήταν η άμεση σύνθεση του καρβοξυλικού οξέος **4b** από το βρωμιωμένο προϊόν προσθήκης του Meldrum's Acid **3**. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί μέθοδοι για την άμεση πρόσληψη του προϊόντος **4b**, αμφότερες χωρίς ιδιαίτερη επιτυχία. Η πρώτη μέθοδος περιελάμβανε κατεργασία της ένωσης **3** με πυριδίνη και H₂O, παρουσία στοιχειακού Cu(0), η οποία δεν απέδωσε το επιθυμητό προϊόν. Κατά τη δεύτερη μέθοδο, πραγματοποιήθηκε κατεργασία της ένωσης **3** με πυκνό HCl 37% σε συνθήκες βρασμού (reflux). Παρόλο που η ένωση ταυτοποιήθηκε, η απόδοση παρέμενε πολύ χαμηλή διότι η επιθυμητή ένωση προκειμένου να καθαριστεί απαιτούσε πολλαπλές εκχυλίσεις και χρωματογραφία στήλης με τη συνολική απόδοση μόλις να ξεπερνά το 20%. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι η ένωση **4b** είναι μια αρκετά ευαίσθητη ένωση, με αποτέλεσμα την αποσύνθεσή της. Οπότε επισημάνθηκε η άμεση αξιοποίηση του οξέος στην επόμενη αντίδραση (κυκλοποίηση).

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις είχαν ως αποτέλεσμα να διερευνηθεί και να υιοθετηθεί μια επιμέρους εναλλακτική οδός, με τη σύνθεση ενός εστέρα **4a** να ακολουθεί την ένωση **3** και ο εστέρας αυτός να μετατρέπεται μέσω υδρόλυσης στο επιθυμητό οξύ **4b.** Πράγματι, με κατεργασία της ενδιάμεσης ένωσης **3** με Cu(0) σε πυριδίνη και MeOH (αντί H₂O) λάβαμε τον εστέρα σε απόδοση μεγαλύτερη από 65%, ενώ η επακόλουθη αντίδραση υδρόλυσής του, με κατεργασία με μεθανολικό διάλυμα NaOH 3N σε CH₂Cl₂ απέδιδε το οξύ σχεδόν ποσοτικά.






Σχήμα 36. Η επιμέρους ενναλακτική οδός που χρησιμοποιήθηκε. Το οξύ πλέον συντίθεται σε δύο στάδια. Η ένωση **3** μετατρέπεται στον εστέρα **4a**, ο οποίος με υδρόλυση αποδίδει την επιθυμητή ένωση **4b** ποσοτικά.

2.1.2.2. Προκλήσεις και Παραπροϊόντα στο στάδιο της Κυκλοποίησης

Κατά την πειραματική διαδικασία, το πιο απαιτητικό στάδιο αποδείχθηκε η αντίδραση κυκλοποίησης για τη σύνθεση του τρικυκλικού ινδολικού ενδιαμέσου 5. Με στόχο την παράλειψη των ενώσεων 4a και 4b, καθώς μειώνουν την συνολική απόδοση της αντίδρασης, δοκιμάστηκε one-pot η αντίδραση της ενδομοριακής κυκλοποίησης της ενδιάμεσης ένωσης 3 προς 5. Ενώ δοκιμάστηκαν διάφορες πειραματικές συνθήκες κυκλοποίησης με αυτό το υπόστρωμα, οι προσπάθειές μας επικεντρώθηκαν κυρίως στην εφαρμογή μίας ενδομοριακής αντίδρασης ακυλίωσης Friedel-Crafts, καταλυόμενης με Sc(OTf)₃, στην θερμική πυρόλυση του Meldrum's Acid καθώς και στην κατεργασία με πολυφωσφορικό οξύ (PPA). Ωστόσο, σε καμία από αυτές τις αντιδράσεις δεν απομονώθηκε το επιθυμητό προϊόν 5 και ως εκ τούτου οι παραπάνω πειραματικές συνθήκες εφαρμόστηκαν και στο υπόστρωμα 4b, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ενδομοριακή κυκλοποίηση 3του ινδολοπροπιονικού οξέος στον C-4 του ινδολίου, όμως και με αυτό το υπόστρωμα δεν συντέθηκε η επιθυμητή τρικυκλική κετόνη.

Πάρα ταύτα, σ'όλες τις παραπάνω αντιδράσεις απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε η σύνθεση ενός κοινού παραπροϊόντος, αυτού της κυκλοπεντανόνης (9). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι ενώ επιτυγχάνεται η ενδομοριακή κυκλοποίηση, πραγματοποιείται στον άνθρακα C-2 με ταυτόχρονη απομάκρυνση του ατόμου του βρωμίου ως Br⁺. Συμπερασματικά, παρόλο που ο σχηματισμός της





κυκλοεξανόνης ευνοείται θερμοδυναμικά έναντι της κυκλοπεντανόνης, το άτομο βρωμίου αποτελεί ένα σχετικά καλό αποχωρών άτομο, αν και λιγότερο καλό από το πρωτόνιο. Εν τούτοις, σχηματίζεται η κυκλοπεντανόνη **9**, καθώς ευνοείται ο σχηματισμός της κινητικά (δραστικότερη η θέση C-2 σε σχέση με αυτή C-4).



¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) 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)



Σχήμα 37. Φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της κυκλοπεντανόνης **9** (κύριο παραπροϊόν), σε διαλύτη CDCl₃





Η αντίδραση κυκλοποίησης με υπόστρωμα την ένωση **2** καταλυόμενη με Sc(OTf)₃, οδήγησε ως αναμένετο, στο σχηματισμό της κυκλοπεντανόνης **9**, έναντι της **10.** Ως εκ τούτου, οι προσπάθειές μας στράφηκαν στην προστασία της C-2 θέσης του ινδολίου και την υιοθέτηση μίας επιμέρους τροποποιημένης συνθετικής πορείας, όπου η αντίδραση σύζευξης Suzuki προηγείται της αντίδρασης κυκλοποίησης.



2.1.2.3 Προκλήσεις στην αντίδραση σύζευξης Suzuki

Για την αντίδραση σύζευξης Suzuki-Miyaura δοκιμάστηκαν διάφορα υποστρώματα και αντιδραστήρια με σκοπό να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Αρχικά, διαπιστώθηκε ότι οποιαδήποτε ένωση ορίζαμε ως υπόστρωμα, είτε αυτό ήταν η ένωση **3**, είτε η **4a** ή η **4b**, η αντίδραση σύζευξης με το 4-φορμυλοβενζυλο βορονικό οξύ ήταν αδύνατον να πραγματοποιηθεί με καταλύτη το τετρακις (τριφαινυλοφωσφινο) παλλάδιο (0) ανεξαρτήτως συνθηκών.

Δοκιμάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί διαλυτών και βάσεων, είτε Na₂CO₃ σε διαλύτη N,N-διμεθυλοακεταμίδιο (DMAc), είτε Na₂CO₃ σε ένα σύστημα διαλυτών τολουολίου/μεθανόλης 2:1, καθώς και KF σε υδατικό διάλυμα 2-προπανόλης.

Οι προσπάθειες αυτές είχαν ως αποτέλεσμα να καταφύγουμε στη χρήση ενός εναλλακτικού, ισχυρότερου και διαφορετικής οξείδωσης καταλύτη του [1,1'-Δις(διφαινυλοφωσφινο)φερροκενιο] διχλωροπαλλάδιο (ΙΙ) (Σχήμα 38). Πράγματι, με χρήση αυτού του καταλύτη σε διαλύτη DMAc, με βάση το Na₂CO₃ και υπόστρωμα τον εστέρα **4a**, σχηματίστηκε το επιθυμητό προϊόν σε απόδοση 73%.







Σχήμα 38. Αριστερά απεικονίζεται ο καταλύτης τετρακις(τριφαινυλοφώσφινο)παλλάδιο (0) και δεξιά ο [1,1'-Δις(διφαινυλοφώσφινο)φερροκένιο]διχλωροπαλλάδιο (ΙΙ).

Ωστόσο, ακόμα και με αλλαγή καταλύτη, διαπιστώθηκε ότι η αντίδραση σύζευξης Suzuki δεν λαμβάνει χώρα παρουσία καρβοξυλομάδας ή πραγματοποιείται δίνοντας την επιθυμητή ένωση **13** σε ίχνη (Σχήμα 39).



Σχήμα 39. Και οι δύο αντιδράσεις σύζευξης Suzuki που επιχειρήθηκαν αλλά δεν πραγματοποιήθηκαν, με υπόστρωμα την ένωση **4b.**

2.1.3. Τροποποίηση της Συνθετικής Πορείας (Πορεία 2^η)

Εφαρμόζοντας όλες τις παραπάνω τροποποιήσεις, υιοθετήθηκε η παρακάτω πειραματική πορεία, με την αντίδραση εστεροποίησης να ακολουθεί την αντίδραση βρωμίωσης της ένωσης **2**, κατόπιν να πραγματοποιείται η αντίδραση σύζευξης Suzuki με χρήση του Pd(dppf)Cl₂ σε διαλύτη DMAc και ακολούθως η υδρόλυση του εστέρα **12** προς το οξύ **13**.





Η ενδομοριακή κυκλοποίηση καταλυόμενη από Sc(OTf)₃ της ένωσης **13**, αναμένετο να οδηγήσει στην κυκλοεξανόνη στη θέση C-4 του ινδολίου, εφόσον πλέον η θέση C-2 του ινδολίου είναι κατειλημμένη από την ογκώδη ομάδα της βενζαλδεΰδης.



Σχήμα 40. Βελτιστοποίηση της πρώτης συνθετικής πορείας.





2.1.4. Προκλήσεις στην εργαστηριακή Εφαρμογή της 2ης Συνθετικής Πορείας

Η 2^η συνθετική πορεία θεωρήθηκε επιτυχής. Παρά τη μικρή απόδοση, η κυκλοποίηση της ένωσης **13** προς την **14** έγινε με επιτυχία. 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.

2.1.4.1. Προκλήσεις στην Αντίδραση Σύνθεσης της Λακτάμης - Προστασία Καρβονυλίου

Παρά την επίτευξη της αντίδρασης κυκλοποίησης και κατά συνέπεια την επιτυχή σύνθεση και ταυτοποίηση της ένωσης **14**, βρεθήκαμε αντιμέτωποι με το πρόβλημα της ύπαρξης των δύο καρβονυλικών ομάδων. Οι δύο καρβονυλικές ομάδες θα είχαν ανταγωνιστικό ρόλο στο επακόλουθο στάδιο σύνθεσης της λακτάμης **7** μέσω αναδιάταξης Beckmann/Schmidt. Κατά συνέπεια, κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη δύο επιπλέον βημάτων, ήτοι προστασίας/αποπροστασίας της μιας καρβονυλικής ομάδος μέσω σχηματισμού θειακετάλης.



Σχήμα 41. Σχηματισμός της κυκλικής θειακετάλης στην ένωση **12** ως προστατευτική ομάδα της αλδεΰδης



Σχήμα 42. Αντιδράσεις που πραγματοποιούνται παρουσία της θειακετάλης.





2.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

2.2.1. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 2

Αντίδραση σύνθεσης



Σχήμα 43. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **2**.

Μηχανισμός Αντίδρασης



Σχήμα 44. Μηχανισμός αντίδρασης για τη σύνθεση της ένωσης **2**.





Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.71 (s, 3H, CH₃), 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-5), 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-3), 8 (s, 1H, H-2) (ppm).



Σχήμα 45. Το φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της ένωσης **2** σε διαλύτη $CDCl_3$.

Τα μεθυλενικά πρωτόνια H-6 και H-7 είναι αρκετά αποπροστατευμένα και καταγράφονται ως αναμένεται, ως μια διπλή κορυφή. 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 p- 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 1Η 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.

Για την πλήρη ταυτοποίηση της ένωσης **2** έγινε λήψη του φάσματος μάζας σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%. Ο μοριακός τύπος της ένωσης είναι C₁₅H₁₄FNO₄ 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 [C₁₅H₁₄FNO₄+H]⁺, γεγονός που επιβεβαιώνει τη πλήρη ταυτοποίηση με το υπολογισθέν μοριακό βάρος (Σχήμα 46).



Σχήμα 46 Φάσμα μάζας της ένωσης **2** σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%.

2.2.2. Σύνθεση και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 3

<u>Αντίδραση σύνθεσης</u>









Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

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 H, 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 βρωμίου στο μόριο.



Σχήμα 48. Συγκριτική απεικόνιση των φασμάτων ¹Η NMR της ένωσης **3** (πάνω) και της ένωσης **2** (κάτω).



Σχήμα 49. Φάσμα μάζας της ένωσης **3** σε διαλύτη HCOOH σε MeOH 0.1%.







Σχήμα 50. Το φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της ένωσης **3** σε διαλύτη CDCl_{3.}

2.2.3. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Ένωσης 4a.

Αντίδραση Σύνθεσης



Σχήμα 50. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **4a** με Cu(0) στο ρόλο του καταλύτη και σύστημα διαλυτών MeOH : Pyridine (dry) 1:9.





Μηχανισμός Αντίδρασης



Σχήμα 51. Μηχανισμός της αντίδρασης με την οποία συντίθεται η ένωση 4a.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

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-4), 6.97 (dd, J= 9,5 Hz, 1H, H-3), 7.44 (q, J= 5Hz, H-2), 8.03 (s, 1H, H-1) (ppm)

Τα πρωτόνια Η-5 και Η-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 Η-7 και Η-8 καταγράφονται ως μια τριπλή κορυφή. Εντοπίζονται σε μεγαλύτερα ppm διότι





βρίσκονται κοντά στα καρβονυλικά οξυγόνα του εστέρα, οπότε αποπροστατεύονται περσσότερο. Επίσης, παρατηρείται μια απλή κορυφή στα 3.67 ppm, όπου είναι τα πρωτόνια της μεθυλο ομάδας του εστέρα.



Σχήμα 52. Συγκριτική απεικόνιση των φασμάτων ¹Η NMR της ένωσης **4a** (πάνω) και της ένωσης **3** (κάτω).



Σχήμα 53. Το φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της ένωσης 4 σε διαλύτη CDCl_{3.}





2.2.4. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 4b.

Αντίδραση Σύνθεσης



Σχήμα 54. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **4a** με πυκνό HCl 37% ως διαλύτη.



Σχήμα 55. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 4b.







Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός



Σχήμα 56. Συγκριτική απεικόνιση των φασμάτων ¹Η NMR της ένωσης **4a** (πάνω) και της ένωσης **4b** (κάτω).



Σχήμα 57. Το φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της ένωσης **4b** σε διαλύτη $CDCl_{3.}$





¹H 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 καταγάφεται μια απλή κορυφή στα 12.1 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του οξέος.

2.2.5. Αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης 5

Αντίδραση Σύνθεσης



Σχήμα 58. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **5.**

2.2.6. Αντιδράσεις Σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 5 από την ένωση 4b

Αντίδραση σύνθεσης



Σχήμα 59. Αντίδρασης σύνθεσης του μη επιθυμητού προϊόντος κυκλοπεντανόνης.





2.2.7. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 12.

Αντίδραση σύνθεσης



Σχήμα 60. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **12**.

Μηχανισμός αντίδρασης



Σχήμα 61. Μηχανισμός της αντίδρασης σύνθεσης της ένωσης 12.





Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός



Σχήμα 62. Το φάσμα ¹Η-NMR (500Hz) της ένωσης 12 σε διαλύτη CDCl_{3.}



Σχήμα 63. Συγκριτική απεικόνιση των φασμάτων ¹Η NMR της ένωσης **12** (πάνω) και της ένωσης **4a** (κάτω).





¹**H NMR (500 Hz, CDCl₃) 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, CH₃), 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)

Μετά την αντίδραση Suzuki, παρατηρήθηκαν δύο ζεύγη ισοδύναμων πρωτονίων με βάση το προηγούμενο φάσμα, όπου απεικονίζεται ο εστέρας, καθώς και η εμφάνιση/συντονισμός 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 ppm, αντίστοιχα.

2.2.8. Αντιδράσεις σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 13.

<u>Αντίδραση σύνθεσης</u>



Σχήμα 64. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης **13.**

Μηχανισμός αντίδρασης

Ο μηχανισμός της αντίδρασης ακολουθεί τους κανόνες της υδρόλυσης ενός εστέρα και είναι αντίστοιχος του μηχανισμού υδρόλυσης από την ένωση **4a** προς **4b**.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός

¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) 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 65. Το φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της ένωσης **13** σε διαλύτη $CDCI_{3.}$



Σχήμα 66. Το φάσμα ¹H-NMR (500Hz) της ένωσης **13** σε διαλύτη DMSO.





¹H NMR (500 Hz, DMSO) δ : 2.55 (m, 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)



Σχήμα 67 Συγκριτική απεικόνιση των φασμάτων ¹Η NMR της ένωσης **13** σε DMSO (πάνω) και της ένωσης **13** σε CDCl₃ (κάτω).









2.2.9. Αντίδραση Σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της ένωσης 14.

Αντίδραση σύνθεσης



Σχήμα 69. Αντίδραση σύνθεσης της ένωσης 14.

Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός



Η ένωση απομονώθηκε και χαρακτηρίσθηκε με φασματοσκοπία με επιτυχία ¹Η NMR. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η απουσία του πρωτονίου Η-4 και η ένταξη 4 νέων πρωτονίων, λόγω του σχηματισμού του εξαμελούς δακτυλίου. Τα πρωτόνια Η-4, Η-5, συντονίζονται στα 2.35 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή, και τα πρωτόνια Η-6 και Η-7 συντονίζονται επίσης περίπου στα 2 ppm ως μια πολλαπλή κορυφή.

2.2.10. Αντίδραση Σύνθεσης και Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός της Θειακετάλης.

<u>Αντίδραση σύνθεσης</u>







Σχήμα 70. Αντίδραση σύνθεσης της θειακετάλης.

Μηχανισμός Αντίδρασης







Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός

¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) 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) (ppm)



Σχήμα 71. Το φάσμα ¹Η-NMR (500Hz) της θειακετάλης σε διαλύτη CDCl₃.





C22H22FNO2S2 +Na: C22 H22 F1 N1 O2 S2 Na1 pa Chrg 1



Σχήμα 72. Φάσμα μάζας της θειακετάλης.

κωδικός	ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	MOPIAKO BAPOΣ(g/mol)	ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
1	F	135,14	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ
2	F T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	291,28	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
3	F H Br	370,17	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
	СООМе		
4a	F N H	300,13	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ

2.3. ΣΥΝΟΠΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΝΩΣΕΩΝ





	СООН		
4b	F N H	286,10	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
	0		
4c	F F F	314,15	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ ΣΕ ΙΧΝΗ
	0		
5	F	286,09	ΔΕΝ ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
6	F N H	283,10	-
7	P F	308,31	-
8	F H H	323,37	-
9	F N H	189,19	ΚΥΡΙΟ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝ





10	F	189,19	ΔΕΝ ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
11	Б СНО	395,39	ΔΕΝ ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
	COOMe		
12	F Н Н СНО	325,34	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
13	СООН F Н СНО	311,31	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
14	о — СНО – СНО	293,30	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
15	F H S S	415,54	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ
16	F H S S	401,51	ΣΥΝΤΕΘΗΚΕ









ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Οι αρχικές ενώσεις προέρχονται από τις εταιρείες Aldrich, Merck, Alfa Aesar, Fluka, Fluorochem και TCI America και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς επεξεργασία. Οι διαλύτες προέρχονται από τις παραπάνω εταιρείες και, όπου ήταν απαραίτητο, κατέστησαν απόλυτοι και διατηρήθηκαν σε άνυδρες συνθήκες. Οι δευτεριωμένοι διαλυτές (CDCl₃ και DMSO-d6) που χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προέρχονται επίσης από τις παραπάνω εταιρείες.

Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel F₂₅₄ ms Merck, ενώ στους διαχωρισμούς μιγμάτων ενώσεων εφαρμόστηκε χρωματογραφία στήλης με silica gel 60 F₂₅₄ της Merck.

Η λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹Η-ΝΜR πραγματοποιήθηκε στο Κέντρο NMR (<u>www.nmrcenter.uoi.gr</u>) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε φασματογράφο Bruker AMX 400 και 500, ενώ η λήψη φασμάτων μάζας έγινε στο όργανο LC-MSD-Trap-SL του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τα σημεία τήξεως των ενώσεων προσδιορίστηκαν σε συσκευή Buchi 510.





3.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

3.2.1. Ένωση **2**: **5**-((6-φθορο-1Η-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2-διμεθυλο-1,3-διοξανιο-4,6-διόνη.

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Σε μία δίλαιμη σφαιρική φιάλη εισάγονται σε αναλογία 1,1:1:1 (σε διαλύτη MeCN) το 6-φθορο-ινδόλιο, το οξύ Meldrum, η φορμαλδεΰδη και καταλυτική ποσότητα προλίνης (0,05 eq). Η αντίδραση πραγματοποιείται για 16-24 h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (25-30 °C), ενώ η πορεία της παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₆ και 2:1 CH₃COOCH₂CH₃:C₆H₁₄.

Μετά τις 16-24 h ελέγχεται αν το οξύ Meldrum καταναλώθηκε πλήρως, ειδάλλως προστίθεται μερική ποσότητα L-προλίνης και η αντίδραση ελέγχεται μέχρι πλήρους κατανάλωσής του. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, αποχύνεται το περιεχόμενο της δίλαιμης σε μια καθαρή μονόλαιμη σφαιρική φιάλη, εκπλένεται με CH₂Cl₂ και απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό (περιστροφικός εξατμιστήρας). Ακολουθεί εκχύλιση CH₃COOC₂H₂/H₂O με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση της Lπρολίνης, η οργανική φάση ελέγχεται μέχρι να καθαρίσει από τα άλατα και κατόπιν συλλέγεται σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προκειμένου να απομακρυνθεί ο οξικός αιθυλεστέρας στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Στο προκύπτον ίζημα προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα διαιθυλαιθέρα και η σφαιρική μεταφέρεται στους υπερήχους. Η σφαιρική κλείνεται μαζί με τον εναπομείναν όγκο και φυλλάσεται στο ψυγείο για να γίνει η ανακρυστάλλωση της ένωσης. Μετά την ανακρυστάλλωση της ένωσής μας, ακολουθεί η πρώτη διήθηση του ιζήματος (IZ₁) με πολλαπλές εκπλύσεις ψυχρού αιθέρα. Κατά την πρώτη διήθηση αναμένεται να ανακτηθεί περίπου το 70% του προϊόντος. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και στο διήθημα (Δ₁), μέχρις ότου να μην λαμβάνεται ίζημα καθαρού προϊόντος.





Όσον αφορά τα μη καθαρά υπολείμματα, αναπτύσσεται ένα σύστημα δύο διαλυτών (CH₃OH/C₆H₁₄), ώστε να γίνει ανακρυστάλλωση και παραλαβή καθαρού προϊόντος.

Αν και πάλι είναι αδύνατη η λήψη καθαρού προϊόντος, τότε το μη καθαρό εναπομείναν ίζημα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄ - CH₃COOC₂H_{5.} Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνάει το 90%.

Μέθοδος ανακρυστάλλωσης με σύστημα δυο διαλυτών:

- Η ένωση διαλύεται στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα πολικού διαλύτη (η διαλυτοποίηση μπορεί να γίνει και με θέρμανση).
- Στάγδην και υπό ανάδευση προστίθεται μη πολικός διαλύτης μέχρι σχηματισμού αιωρήματος.
- Προσθήκη πολικού διαλύτη μέχρι διαύγασης
- Κατάψυξη

<u>Χαρακτηρισμός ένωσης</u>



Σημείο τήξεως : 144-146 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 1.46 (s, 3H, CH₃), 1.71 (s, 3H, CH₃), 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)





3.2.2. Ένωση **3:** 5-((2-βρώμο-6-φθορο-1Η-ινδολο-3-υλο)μεθυλο)-2,2διμεθυλο-1,3,διοξανιο-4,6-διόνη.

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Σε μια μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται 15 ml CH₂Cl₂ και 15 ml THF (15 ml για κάθε γραμμάριο αρχικής ένωσης) μαζί με το 1 g = 1000 mg (1eq) της ένωσης 2. Ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος για 20 min, εν συνεχεία ψύχεται στους 0-5 °C και προστίθεται το Pyridinum perbromide (1,1 eq) και όλο το διάλυμα αναδεύεται στους 0-5 °C για μια 1 h. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₆. Στην ίδια σφαιρική φιάλη κατά την θερμοκρασία των 0-5 °C προστίθεται διάλυμα Na₂CO₃ και αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση, προστίθεται αιθέρας και πραγματοποιείται μια σειρά εκχυλίσεων προκειμένου να απομακρυνθεί το Pyridinum Perbromide από το διάλυμα. Ακολουθούν εκχυλίσεις με EtOAc έως ότου καθαρίσει η υδατική φάση. Η οργανική φάση του CH₃COOCH₂CH₃ ξηραίνεται με Na₂SO₄, αφήνεται υπό ανάδευση, κατόπιν διηθείται και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό (περιστροφικός εξατμιστήρας). Ακολουθείται η μέθοδος της ανακρυστάλλωσης με θερμό $C_6H_{14}/CH_3CH_2OCH_2CH_3$ και το διάλυμα μεταφέρεται στο ψυγείο μέχρι να επιτευχθεί η ανακρυστάλλωση. Το προϊόν διαλύεται μερικώς στον αιθέρα και επομένως οι εκπλύσεις του προκύπτοντος ιζήματος διενεργούνται με ψυχρό C₆H₁₄. Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνάει το 85%.





Χαρακτηρισμός ένωσης



Σημείο τήξεως : Αλλαγή χρώματος από τους 118 °C και έπειτα ενώ αποσυντίθεται πλήρως στους 201-203 °C.

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-7), 3.85 (t, J= 5 Hz, 1H, H-7), 6.91 (td, J= 9 H, 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)





3.2.3. Σύνθεση της ένωσης 4a και 4C: 3-((2-βρώμο-6-φθορο-1Η-ινδολο-3-υλο) προπανοϊκός μεθυλεστέρας και (–αιθυλεστέρας)

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα υπό ατμόσφαιρα N₂ προστίθεται η ένωση **3** (1 mmol) μαζί με τους διαλύτες (10 ml) [1:9 MeOH:Pyridine (dry)] ώστε να διαλυθεί πλήρως. Αφότου διαλυθεί πλήρως, προστίθεται ο στερεός χαλκός Cu(0) (0,1 mmol). Η αντίδραση αφήνεται υπό βρασμό (reflux), σε θερμοκρασία 108 °C για 3,5 h. Ο απαιτούμενος έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με δύο συστήματα διαλυτών, με 2:1 C₆H₁₄: CH₃COOCH₂CH₃ και με 2:1 $CH_2Cl_2:C_6H_{14}$ (o εστέρας αναμένεται σε υψηλότερο R_f από την αρχική ένωση **3**). Αφότου ολοκληρωθεί η αντίδραση και απομακρυνθούν οι διαλύτες (CH₃OH και πυριδίνη), προστίθεται αιθέρας [σε αυτό το σημείο συνήθως παρατηρείται συσσωμάτωση του Cu(0)]. Εν συνεχεία, για να απομακρυνθεί η πυριδίνη, μετατρέποντάς την στο υδροχλωρικό άλας της, προστίθεται διάλυμα HCl (1N)~70 ml και μια σειρά εκχυλίσεων με NH4Cl 20% λαμβάνει χώρα μέχρι να εξουδετερωθεί όλη η πυριδίνη και μετατραπεί στο υδροχλωρικό της άλας. Ο εστέρας παραλαμβάνεται στην αιθερική στοιβάδα και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών 1:2 C₆H₁₄:CH₂Cl₂. Βέλτιστη διαχείριση του εστέρα επιτυγχάνεται εάν μετά την εξάτμιση για την απομάκρυνση της CH₃OH, προστεθεί αιθέρας ακολουθήσει εκχύλιση αρχικά με διάλυμα HCl (1N) και κατόπιν NH₄Cl 20%. Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνάει το 65% και κατά τη διάρκεια της αντίδρασης παρατηρήθηκαν τα εξής:

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

Για τη σύνθεση της ένωσης **4c** ακολουθείται ακριβώς η ίδια πορεία και μεθοδολογία της αντίδρασης σύνθεσης του μεθυλεστέρα, με τη μόνη διαφορά να υπόκειται στη χρήση αιθανόλης αντί για μεθανόλη.





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)

3.2.4. Σύνθεση της ένωσης 4β: 3-((2-βρώμο-6-φθορο-1Η-ινδολο-3-υλο) προπανοϊκό οξύ

<u>3.2.4.1. Σύνθεση της ένωσης 4b μέσω αντίδρασης υδρόλυσης με Cu(0) σε</u> <u>πυριδίνη/H₂O από την ένωση 3</u>

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία με αυτήν της ένωσης **4a**, με την ειδοποιό διαφορά να είναι η αντικατάσταση της CH₃OH με H₂O. Επίσης η πρόοδος της αντίδρασης ελεγχόταν σε σύστημα διαλυτών 10:1 CH₂Cl₂:CH₃OH. Παρόλα αυτά, η αντίδραση δεν ήταν επιτυχής καθώς δεν απέδωσε την επιθυμητή ένωση.

<u>3.2.4.2 Σύνθεση της ένωσης 4b μέσω αντίδρασης υδρόλυσης με HCl από την</u> ένωση <u>3</u>

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα και προσαρμοσμένο σωλήνα CaCl₂,προστίθεται η ένωση **3** με το HCl (1ml HCl για κάθε 1000 mg αρχικής ένωσης) και θερμαίνεται μέχρι βρασμού (reflux). Με την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα λαμβάνει ροζ χρώμα και καθώς η αντίδραση πλησιάζει προς το σημείο βρασμού(90 °C), το χρώμα γίνεται πιο σκούρο. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα 10:1 ή





12:1 CH₂Cl₂:CH₃OH. Κατά τη λήψη δείγματος για τον έλεγχο με TLC, γίνεται εξουδετέρωση με 20% Na₂CO₃ μέχρις ότου το pH να κυμαίνεται στις τιμές 3 με 4. Η αντίδραση παρατηρήθηκε πως ολοκληρώνεται στις 20-24 h, καθώς τότε πλέον δεν ανιχνεύεται ποσότητα αρχικής ένωσης. Έπειτα η ένωση επέρχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, προστίθεται Na₂CO₃ 20% (pH=2-4) και πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με CH₂Cl₂ και CH₃COOC₂H₅, μέχρι η υδατική φάση να είναι πλήρως απαλλαγμένη από την οργανική φάση. Οι οργανικές φάσεις ελέγχονται, ξηραίνονται με Na₂SO₄, διηθούνται και οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό (περιστροφικός εξατμιστήρας). Ο καθαρισμός της ένωσης πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης, ξεκινώντας με ένα αρκετά πολικό σύστημα (12:1 CH₂Cl₂:CH₃OH) και αλλάζοντας σταδιακά την πολικότητα, όπου στο τέλος η χρωματογραφία στήλης να έχει μοναδικό διαλύτη CH₃COOCH₂CH₃. Η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνά το 20%.

<u>3.2.4.3 Σύνθεση της ένωσης 4b μέσω της αντίδρασης υδρόλυσης από την</u> ένωση 4a.

<u>Πειραματική πορεία σύνθεσης</u>

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 CH₂Cl₂ (10 ml CH₂Cl₂ για κάθε 1 ml μεθανολικού διαλύματος) και το όλο μίγμα αφήνεται να αντιδράσει σε θερμοκρασία δωματίου για 22-24 h. H πρόοδος της αντίδρασης παρατηρείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε συστήματα διαλυτών 1:1 C₆H₁₄ : EtOAc και 12 : 1 CH₃COOCH₂CH₃. Παρόλα αυτά προηγήθηκε έλεγχος με TLC σε σύστημα 1:1 C₆H₁₄ : CH₃COOC₂H₅ για τη συνέχιση ύπαρξης ή μη του εστέρα **4a**. Με το πέρας της αντίδρασης, οι διαλύτες της αντίδρασης απομακρύνονται υπό κενό στον περιστροφικό εξατμιστήρα και πραγματοποιείται μια σειρά εκχυλίσεων με CH₂Cl₂:H₂O. Το προϊόν παρατηρείται πως παρασύρεται στην υδατική φάση, ενώ στην οργανική φάση παραμένουν τα υπολείμματα εστέρα που δεν αντέδρασαν. Εν συνεχεία, στην υδατική φάση προστίθεται 1N HCl έως ότου η τιμή του pH να κυμαίνεται από 2 με 3. Ακολουθούν εκχυλίσεις με CH₃COOC₂H₅/H₂O, όπου παραλαμβάνεται το οξύ (παρατηρείται ως




μπλε φθορίζουσα). Αυτή τη φορά το προϊόν παρασύρεται στην οργανική φάση, η οποία ξηραίνεται με Na₂SO₄, διηθείται και ακολουθεί η απομάκρυνση των διαλυτών στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν υπόκειται καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 10:1,25 CH₂Cl₂:CH₃OH. Η απόδοση της αντίδρασης υδρόλυσης ξεπερνά το 97%.

Χαρακτηρισμός ένωσης

¹H 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)







3.2.5. Πειραματικές απόπειρες σύνθεσης της ένωσης 5: 2-βρώμο-7-φθόρο-3,4-διυδροβενζο[cd]ινδολο-5(1Η)-ονη.

3.2.5.1 Απόπειρα κυκλοποίησης απευθείας από την ένωση 3 με Sc(OTf)₃/CH₃NO₂

<u>Πειραματική πορεία σύνθεσης</u>

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα N₂ εισάγεται ο εστέρας διαλυμένος σε CH₃NO₂ και 12% Sc(OTf)₃ και το μείγμα υποβάλλεται σε θέρμανση με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι 95-97 °C. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών 1:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅. Παρατηρείται ότι η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 24 h. Ακολουθεί η απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα, και λαμβάνουν χώρα οι εκχυλίσεις με CH₂Cl₂/H₂O και CH₃COOC₂H₅/H₂O. Το προϊόν εντοπίζεται στις οργανικές φάσεις, οι οποίες ξηραίνονται, και οι διαλύτες απομακρύνονται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν υποβάλλεται σε καθαρισμό μέσω χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 4:1 C₆H₁₄ : CH₃COOC₂H₅.

3.2.5.2 Απόπειρα κυκλοποίησης απευθείας από την ένωση 3 με ΡΡΑ

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Σε μονόλαιμη σφαιρική με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα και υπό αδρανή ατμόσφαιρα N₂ εισάγεται το υπόστρωμα (ένωση **3**) και το PPA. Το μίγμα επιδέχεται σταδιακή θέρμανση μέχρι τους 130 °C. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών 2:1 CH₃COOC₂H₅:C₆H₁₄. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης παρατηρείται στις 24 h. Εν συνεχεία, ακολουθείται η εξουδετέρωση του PPA με CH₂Cl₂/H₂O και CH₃COOC₂H₅/H₂O, και η διαδικασία ολοκληρώνεται με καθαρισμό του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 4:1 C₆H₁₄: CH₃COOC₂H₅.





3.2.5.3 Απόπειρα θερμικής κυκλοποίησης απευθείας από την ένωση 3 με <u>CH₃NO₂</u>.

<u>Πειραματική πορεία σύνθεσης</u>

Η πειραματική πορεία είναι ίδια με την αντίδραση κυκλοποίησης με Sc(OTf)₃/CH₃NO₂, με την ειδοποιό διαφορά να έγκειται στην απουσία του Sc(OTf)₃ και στην υψηλότερη θερμοκρασία διεξαγωγής του πειράματος (102 °C).

3.2.5.4 Απόπειρα κυκλοποίησης της ένωσης 4b με Sc(OTf)₃/CH₃NO₂

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Παρομοίως, η πειραματική πορεία είναι ίδια με την αντίδραση κυκλοποίησης με Sc(OTf)₃/CH₃NO₂, με τη μόνη διαφορά να υπάγεται στην αξιολόγηση της προόδου της αντίδρασης, όπου εδώ γίνεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αλλά το σύστημα διαλυτών μεταβάλλεται από 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅ σε 10:1 CH₂Cl₂:CH₃OH. Αυτό γίνεται για να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη ή μη αρχικής ένωσης **4b**.

3.2.5.5 Απόπειρα 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 CH₂Cl₂ (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 AlCl₃ σε τολουόλιο (0,12 mmol AlCl₃ και 0,2 mmol τολουολίου για κάθε 0,1 mmol υποστρώματος **4b**). Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, αρχικά σε σύστημα διαλυτών 1:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅ και έπειτα να μεταβάλλεται σε 10:1 CH₂Cl₂:CH₃OH. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης παρατηρείται στις 23 h. Ακολουθεί η απομάκρυνση των διαλυτών στον περιστροφικό εξατμιστήρα, και όποια ίχνη διαλυτών παραμένουν απομακρύνονται πλήρως στην αντλία υψηλού κενού. Το ληφθέν μείγμα υποβάλλεται σε καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, ξεκινώντας από ένα





σύστημα διαλυτών 30:1 $CH_2Cl_2:CH_3OH$ και στη συνέχεια αλλάζοντας την πολικότητα σταδιακά έως ότου έχουμε σύστημα διαλυτών 5:1 $CH_2Cl_2:CH_3OH$.





3.2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΕΝΩΣΗΣ 12: 3-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1Ηινδολο-3-υλο) προπανοϊκός μεθυλεστέρας

Πειραματική πορεία σύνθεσης

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

Σε μια μονόλαιμη σφαιρική φιάλη (σφαιρική φιάλη Α) 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.

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη (σφαιρική φιάλη Β) με προσαρμοσμένο κάθετο ψυκτήρα, υπό ατμόσφαιρα Ν₂, 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.

Έπειτα τις προδιεργασίες που αναφέρθηκαν, το περιεχόμενο της σφαιρικής Α αναμιγνύεται με το περιεχόμενο της σφαιρικής Β και παρατηρείται αλλαγή στο χρώμα του μίγματος από κόκκινο σε καφέ. Η πρόοδος της αντίδρασης παρατηρείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύστημα διαλυτών 2:1 C₆H₁₄:CH₃COOC₂H₅. Εν συνεχεία, η αντίδραση ολοκληρώνεται στις 2h και ακολουθούν εκχυλίσεις με CH₂Cl₂/H₂O. Το N,N-διμεθυλοακεταμίδιο απομακρύνεται στην αντλία υψηλού κενού υπό θέρμανση και ανάδευση. Ο καθαρισμός της ένωσης γίνεται χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών 3: 1: 0,5 C₆H₁₄: CH₃COOC₂H₅: CH₂Cl₂.

Εναλλακτική πειραματική πορεία επεξεργασίας του προϊόντος

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



¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) 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, CH₃), 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)

3.2.7. Σύνθεση της ένωσης 13: 3-(6-φθορο-2-(4-φορμυλοφαινυλο)-1Ηινδολο-3-υλο) προπανοϊκό οξύ.

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Η πειραματική πορεία σύνθεσης της ένωσης **13** με συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης και αναλογίες αντιδραστηρίων και διαλυτών, ακολουθείται σύμφωνα με τη πειραματική πορεία αντίδρασης υδρόλυσης της ένωσης **4a**.

Χαρακτηρισμός ένωσης

¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) 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)







¹H NMR (500 Hz, DMSO) δ : 2.55 (m, 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)

3.2.8. Σύνθεση της ένωσης 14: 4-(7-φθορο-5-όξο-1,3,4,5-τετραυδροβένζο[cd] ινδόλο-2-υλο)βενζαλδεΰδη.

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Η πειραματική πορεία είναι ίδια με την πορεία αντίδρασης κυκλοποίησης της ένωσης **3** με Sc(OTf)₃/CH₃NO₂, με τη μόνη διαφορά να έγκειται στο ότι το υπόστρωμα σε αυτή την αντίδραση να είναι το προϊόν σύζευξης Suzuki **13**.

<u>Χαρακτηρισμός ένωσης</u>



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





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

3.2.9. Σύνθεση της ένωσης 15: 3-(2-4-(1,3-διθειανιο-2-υλο)φαινυλο-6φθορο-1Η-ινδολο-3-υλο)προπιονικοσ εστέρας.

Πειραματική πορεία σύνθεσης

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθεται το υπόστρωμα του εστέρα **12** (1 mmol), η 1,3-προπανοδιθειόλη (1,2 mmol), το BF₃·Et₂O (0,19 ml) και το CH₂Cl₂ (5,35 ml CH₂Cl₂ για κάθε γραμμάριο υποστρώματος **12**). Διοχετεύεται αέριο HCl για 10 min υπό πάγο και έπειτα αφήνεται το μίγμα για να αντιδράσει για 15h σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της αντίδρασης λαμβάνει χώρα μια σειρά εκχυλίσεων με CH₂Cl₂/H₂O και 5% NaHCO₃. Η οργανική φάση υποβάλλεται σε ξήρανση, διήθηση και απόσταξη του CH₂Cl₂ με υδραντλία στους 35 °C. Το προϊόν είναι ένα λευκό στερεό και η ανακρυστάλλωσή του διενεργείται με C₆H₁₄. Η αντίδραση είναι σχεδόν ποσοτική.

Χαρακτηρισμός ένωσης



¹H NMR (500 Hz, CDCl₃) 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) (ppm)





3.3 Σχεδιασμός νέων Αντικαρκινικών Αναστολέων με πρότυπο τα Δομικά Χαρακτηριστικά του Rucaparib.

3.3.1. Εύρεση νέων αναστολέων με βάση το Rucaparib:



Εικόνα 17. 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**.

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 (ΔG 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 υποψήφιες για την ανακάλυψη κλινικών αντικαρκινικών φαρμάκων.

Η χημική δομή του Rucaparib μπορεί να θεωρηθεί ως μια ένωση τριών συντηγμένων δομών δακτυλίου που βασίζεται στη δομή βενζοαζεπίνης και πυρρόλης.

3.3.1.1. Μοριακή Μοντελοποίηση του Rucaparib

Κατά το Molecular Docking του Rucaparib με την PARP-1 επιβεβαιώθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του μορίου στο ενεργό κέντρο.





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 – TNKS-1



Χρωματική απεικόνιση αλληλεπιδράσεων



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.





3.3.1.2. 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:

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	095271	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

SwissTargetPrediction







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





3.3.2. Μοριακή μοντελοποίηση Αναλόγων του δακτυλίου Α (AutodockVina)

3.3.2.1. Μοριακή Μοντελοποίηση RucM01



Στο ανάλογο αυτό παρατηρήθηκαν ακριβώς οι ίδιες αλληλεπιδράσεις που εμφανίζει το Rucaparib. 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.

<u>Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1</u>







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-1







Αλληλεπίδραση 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 Τyr233 και Met227. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν κατά τη μοριακή μοντελοποίηση με TNKS-1.





Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1











3.3.3. Μοριακή μοντελοποίηση Αναλόγων του δακτυλίου Β (AutodockVina)

3.3.3.1. 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 Rucaparib. Το άτομο φθορίου δεν αλληλεπιδρά με την φαινυλαλανίνη 234 αλλά με το κατάλοιπο Glu325. Όσο αφορά τις αλληλεπι δεν διατηρούνται τόσο οι αλληλεπιδράσεις του αμιδίου με τα κατάλοιπα σερίνης και γλυκίνης, όσο και η αλληλεπίδραση του ατόμου φθορίου με τη Phe234.

<u>Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1</u>







Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1



3.3.3.2. 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.





<u>Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1</u>



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1







3.3.3.3. 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 αζώτου 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 ΤΝΚS-1



3.3.3.4. 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 δέσμευσης.





Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1







3.3.3.5. 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 απαραιτήτων αλληλεπιδράσεων για την ανασταλτική δράση του ενζύμου σε σχέση με το Rucaparib. Σχεδόν παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από την μοριακή μοντελοποίηση του μορίου με την TNKS-1.

Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1







Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την ΤΝΚS-1



3.3.3.6. 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 Rucaparib και πιο συγκεκριμένα εμφανίζονται οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου μεταξύ της νεοεισαχθείσας αμινομάδας και της Gly81 και του καρβονυλικού οξυγόνου με τη Seer109.





Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1



Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την ΤΝΚS-1



3.3.3.7. 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-1



<u>Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1</u>







3.3.3.8. 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 θειου δεν ενδείκνυται ως άτομο αντικατάστασης του οξυγόνου. Όσον αφορά την TNKS-1, δεν διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου με τα κατάλοιπα γλυκίνης/σερίνης.

<u>Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1</u>







Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την ΤΝΚS-1



3.3.4. Μοριακή μοντελοποίηση Αναλόγων του δακτυλίου C (AutodockVina)

3.3.4.1. 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 δέσμευσης. Όσον αφορά την TNKS-1, παρατηρήθηκε κάτι ανάλογο.

<u>Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την PARP-1</u>







Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1



3.3.4.2. 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



<u>Αλληλεπίδραση Αναλόγου με την TNKS-1</u>







3.3.5. Θεωρητικά Αποτελέσματα

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)

Ένωση	PARP-1, ΔG _{binding} ₍ kcal/mol)	TNKS-1, ΔG _{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

Πίνακας Θεωρητικών Τιμών Ελεύθερης Ενέργειας Σύνδεσης





3.3.6. Προτεινόμενοι Νέοι εν δυνάμει αναστολείς των PARP

Τα ανάλογα με τα καλύτερα θεωρητικά αποτελέσματα έχουν την μικρότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ΔG _{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 Rucaparib όπως RucM05, RucM12-14 εμφανίζουν μικρότερη ελεύθερη ενέργεια από το Rucaparib στις πρωτεΐνες PARP-1 και TANKS-1.





ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, στο εργαστήριο αρχικά σχεδιάστηκε μία νέα βελτιστοποιημένη πορεία σύνθεσης του Rucaparib (Πορεία 1), που αποτελούνταν από 7 βήματα, υψηλής απόδοσης το καθένα, με αρχικό υπόστρωμα το 6-F-Ινδόλιο. Η εφαρμογή αυτής της συνθετικής πορείας αποδείχθηκε πρόκληση λόγω τριών κυρίως αντιδράσεων:

- Της σύνθεσης του οξέος 4b, το οποίο συντίθεται με μόλις 20% απόδοση από την ένωση 3, αλλά έγινε εφικτή, σχεδόν ποσοτικά, η ανάκτησή του από την υδρόλυση του εστέρα 4a.
- Της σύνθεσης της ενδιάμεσης Ινδολαζεπίνης 5, η οποία συντίθεται μόνο σε ίχνη από τις ενώσεις 3, 4a και 4b με πληθώρα αντιδραστηρίων (PPA, Sc(OTf)₃) και αντί αυτής λαμβάνεται ως κύριο παραπροϊόν, η κυκλοπεντανόνη 9.
- Της αντίδρασης σύζευξης Suzuki των ενώσεων 4a και 4b με 4-φορμυλοβενζυλο βορονικό οξύ προς τις ενώσεις 12 και 13. Η αντίδραση αυτή έλαβε χώρα μόνο με καταλύτη το [1,1'-Δις(διφαινυλοφώσφινο)φερροκένιο]διχλωροπαλλάδιο (ΙΙ) και υπόστρωμα την ένωση 4a, αποδίδοντας την ένωση 12. Η αντίδραση σύζευξης Suzuki παρατηρήθηκε ότι δεν λαμβάνει χώρα με υπόστρωμα οξέος ή καταλύτη το τετράκις(τριφαινυλοφώσφινο)παλλάδιο (0), στις προαναφερθείσες πειραματικές συνθήκες.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, τροποποιήθηκε η Πορεία Ι προς την πορεία II. Στη πορεία αυτή, έγινε εφικτή η σύνθεση της επιθυμητής ενδιάμεσης κυκλοεξανόνης **14** με μικρή απόδοση. Ωστόσο, η παρουσία 2 ομάδων καρβονυλίου στο μόριο της ένωσης **14**, έγινε σαφές ότι θα αποτελούσε πρόβλημα στο επακόλουθο στάδιο σύνθεσης της λακτάμης **7** μέσω αναδιάταξης Beckmann/Smidt. Επομένως, επιχειρήθηκε η προστασία της καρβονυλομάδας των ενώσεων **12** και **13** με το σχηματισμό θειακεταλών.

 Ο σχηματισμός των θειακεταλών 15 και 16 πραγματοποιήθηκε με επιτυχία και σχεδόν ποσοτικά. Εντούτοις, η δυσκολία στον εργαστηριακό χειρισμό των αντιδραστηρίων (προπανοδιθειόλη) και των προκυπτόντων ενώσεων 15, 16




και **17**, οδήγησε στην απόρριψη και αυτής της συνθετικής πορείας (Πορεία III), αφού θεωρήθηκε ότι δεν βελτιστοποιεί τη σύνθεση της τελικής ένωσης του Rucaparib, παρόλο που αποδίδει τις ενδιάμεσες ενώσεις **15** και **16** σχεδόν ποσοτικά.

Συμπερασματικά, παρά τις προκλήσεις της εργαστηριακής εφαρμογής των σχεδιασθείσων πειραματικών πορειών (Πορεία Ι, ΙΙ και ΙΙΙ), στο εργαστήριο διενεργήθηκε πληθώρα αντιδράσεων με σκοπό τη βελτιστοποίηση της ολικής σύνθεσης του Rucaparib και μέχρι στιγμής έχει επιτευχθεί ο σχηματισμός των ενδιάμεσων ενώσεων **2**, **3**, **4a**, **4b**, **12**, **13**, **14**, **15** και **16** με υψηλή απόδοση και χρήση εμπορικά διαθέσιμων και σχετικά οικονομικών αντιδραστηρίων.

Η έρευνα συνεχίζεται και αναμένονται περαιτέρω αποτελέσματα.





ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Calvo E, Baselga J. Ethnic differences in response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Journal of Clinical Oncology. 2006.
- 2. Gerber DE. Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. American Family Physician. 2008.
- 3. Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. BioMedicine (Netherlands). 2015.
- 4. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Seminar Ovarian cancer. Lancet. 2014;
- 5. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, Gonzalez-Martin A, Colombo N, Sessa C. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2013;
- 6. Howlader N, Am N, M K, J G, N N, Sf A, et al. SEER Cancer statistics review 1975-2010. J Natl Cancer Inst. 2012;
- Chien J, Poole EM. Ovarian Cancer Prevention, Screening, and Early Detection: Report From the 11th Biennial Ovarian Cancer Research Symposium. In: International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society. 2017.
- 8. Davidson B, Tropé CG. Ovarian cancer: Diagnostic, biological and prognostic aspects. Women's Health. 2014.
- 9. Schulz H, Kuhn C, Hofmann S, Mayr D, Mahner S, Jeschke U, et al. Overall survival of ovarian cancer patients is determined by expression of galectins-8 and -9. Int J Mol Sci. 2018;
- 10. Huertas P. DNA resection in eukaryotes: Deciding how to fix the break. Nat Struct Mol Biol. 2010;
- 11. Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. Cell Mol Life Sci. 2009;
- 12. Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells: Figure 2. Biochem J. 2010;
- 13. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. Oncogene. 2006.
- 14. Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thomä NH, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. Science (80-). 2002;





- 15. Neff RT, Senter L, Salani R. BRCA mutation in ovarian cancer: Testing, implications and treatment considerations. Therapeutic Advances in Medical Oncology. 2017.
- 16. Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. BioMed Research International. 2013.
- 17. Faraoni I, Graziani G. Role of BRCA mutations in cancer treatment with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. Cancers. 2018.
- 18. Hamada JI, Nakata D, Nakae D, Kobayashi Y, Akai H, Konishi Y, et al. Increased oxidative DNA damage in mammary tumor cells by continuous epidermal growth factor stimulation. J Natl Cancer Inst. 2001;
- 19. Savage KI, Matchett KB, Barros EM, Cooper KM, Irwin GW, Gorski JJ, et al. Brca1 deficiency exacerbates estrogen-induced dna damage and genomic instability. Cancer Res. 2014;
- 20. d'AMOURS D, DESNOYERS S, d'SILVA I, POIRIER GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. Biochem J. 1999;
- 21. Efimtseva E, Kulikova I, Mikhailov S. Disaccharide Nucleosides and their Incorporation into Oligonucleotides. Curr Org Chem. 2007;
- 22. Ljungman M. ChemInform Abstract: Targeting the DNA Damage Response in Cancer. ChemInform. 2009;
- 23. Drenichev MS, Mikhailov SN. Poly(ADP-ribose): From chemical synthesis to drug design. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 2016.
- 24. Efimtseva E V, Mikhailov SN. Disaccharide nucleosides. Russ Chem Rev. 2004;
- 25. Krietsch J, Rouleau M, Pic É, Ethier C, Dawson TM, Dawson VL, et al. Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins. Molecular Aspects of Medicine. 2013.
- 26. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. Nature Reviews Cancer. 2010.
- 27. Gagné JP, Isabelle M, Lo KS, Bourassa S, Hendzel MJ, Dawson VL, et al. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. Nucleic Acids Res. 2008;
- 28. Barkauskaite E, Jankevicius G, Ahel I. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation. Molecular Cell. 2015.
- 29. Weaver AN, Yang ES. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. Front Oncol. 2013;





- 30. Zampieri M, Guastafierro T, Calabrese R, Ciccarone F, Bacalini MG, Reale A, et al. ADP-ribose polymers localized on Ctcf–Parp1–Dnmt1 complex prevent methylation of Ctcf target sites. Biochem J. 2012;
- 31. Eustermann S, Wu WF, Langelier MF, Yang JC, Easton LE, Riccio AA, et al. Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1. Mol Cell. 2015;
- 32. Langelier MF, Riccio AA, Pascal JM. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. Nucleic Acids Res. 2014;
- 33. Venkitaraman AR. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. Science. 2014.
- 34. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. Am J Hum Genet. 2003;
- 35. Farmer H, McCabe H, Lord CJ, Tutt AHJ, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. Nature. 2005;
- 36. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. Nature. 2005;
- 37. Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADPribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. J Natl Cancer Inst. 2004;
- 38. Murai J, Huang SYN, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshow JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. Cancer Res. 2012;
- 39. Franzese E, Centonze S, Diana A, Carlino F, Guerrera LP, Di Napoli M, et al. PARP inhibitors in ovarian cancer. Cancer Treatment Reviews. 2019.
- 40. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature. 1993.
- 41. Helleday T. The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: Clearing up the misunderstandings. Molecular Oncology. 2011.
- 42. Kedar PS, Stefanick DF, Horton JK, Wilson SH. Increased PARP-1 Association with DNA in Alkylation Damaged, PARP-Inhibited Mouse Fibroblasts. Mol Cancer Res. 2012;
- 43. Murai J, Huang S-YN, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S, et al. Stereospecific PARP Trapping by BMN 673 and Comparison with Olaparib and Rucaparib.





Mol Cancer Ther. 2014;

- 44. Shen Y, Aoyagi-scharber M, Wang B. Minireview Trapping Poly (ADP-Ribose) Polymerase. J Pharmacol Exp Ther. 2015;
- 45. Canan Koch SS, Thoresen LH, Tikhe JG, Maegley KA, Almassy RJ, Li J, et al. Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: Design, synthesis, and X-ray cocrystal structure. J Med Chem. 2002;
- 46. Canan S, Maegley K, Curtin NJ. Strategies employed for the development of PARP inhibitors. In: Methods in Molecular Biology. 2017.
- Plieninger H. The Chemistry of Indoles. Organic Chemistry, a Series of Monographs, Vol. 18. VonR. J. Sundberg. Academic Press, New York–London 1970. 1. Aufl., X, 489 S., s229/—. Angew Chemie. 2007;
- 48. Jackson PM, Moody CJ. Diels–Alder reactions of 2,3-dimethylenepyrrole analogues; a new synthesis of indoles. J Chem Soc, Perkin Trans 1. 1990;
- 49. Inman M, Moody CJ. Indole synthesis-something old, something new. Chemical Science. 2013.
- 50. Gribble GW. Recent developments in indole ring synthesis-methodology and applications. Contemp Org Synth. 1994;
- 51. Cacchi S, Fabrizi G. Synthesis and functionalization of indoles through palladium-catalyzed reactions. Chemical Reviews. 2005.
- 52. Humphrey GR, Kuethe JT. Practical methodologies for the synthesis of indoles. Chemical Reviews. 2006.
- 53. D. Clark R, B. Repke D. The Leimgruber-Batcho Indole Synthesis. Heterocycles. 2009;
- 54. Chen BC, Hynes J, Pandit CR, Zhao R, Skoumbourdis AP, Wu H, et al. A general large scale synthesis of 2-alkyl-7-methoxyindoles. Heterocycles. 2001;
- 55. Bratulescu G. A new and efficient one-pot synthesis of indoles. Tetrahedron Lett. 2008;
- 56. Wagaw S, Yang BH, Buchwald SL. A palladium-catalyzed strategy for the preparation of indoles: A novel entry into the Fischer indole synthesis. J Am Chem Soc. 1998;
- 57. Bartoli G, Palmieri G, Bosco M, Dalpozzo R. The reaction of vinyl grignard reagents with 2-substituted nitroarenes: A new approach to the synthesis of 7-substituted indoles. Tetrahedron Lett. 1989;





- 58. Bartoli G, Bosco M, Dalpozzo R, Palmieri G, Marcantoni E. Reactivity of nitroand nitroso-arenes with vinyl grignard reagents: synthesis of 2-(trimethylsilyl)indoles. J Chem Soc Perkin Trans 1. 2004;
- 59. Dobson D, Todd A, Gilmore J. The Synthesis of 7-Alkoxyindoles. Synth Commun. 1991;
- 60. Dobson DR, Gilmore J, Long DA. Synthesis of 7-formylindole using the bartoli indole methodology. Synlett. 1992;
- 61. Dobbs A. Total synthesis of indoles from Tricholoma species via Bartoli/heteroaryl radical methodologies. J Org Chem. 2001;
- 62. Bischler A. Ueber die Entstehung einiger substituirter Indole. Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft. 1892;
- Bischler A, Fireman P. Zur Kenntniss einiger α-β- Diphenylindole. Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft. 1893;
- 64. Möhlau R. Ueber die Einwirkung primärer aromatischer Aminbasen auf Acetophenonbromid. Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft. 1881;
- 65. Möhlau R. Ueber Diphenyldiisoindol. Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft. 1882;
- 66. Pchalek K, Jones AW, Wekking MMT, Black DSC. Synthesis of activated 3substituted indoles: An optimised one-pot procedure. Tetrahedron. 2005;
- 67. Sridharan V, Perumal S, Avendaño C, Menéndez JC. Microwave-assisted, solvent-free Bischler indole synthesis. Synlett. 2006;
- 68. Vara Y, Aldaba E, Arrieta A, Pizarro JL, Arriortua MI, Cossío FP. Regiochemistry of the microwave-assisted reaction between aromatic amines and αbromoketones to yield substituted 1H-indoles. Org Biomol Chem. 2008;
- 69. Fukuyama T, Chen X, Peng G. A Novel Tin-Mediated Indole Synthesis. J Am Chem Soc. 1994;
- 70. Pindur U, Adam R. Synthetically attractive indolization processes and newer methods for the preparation of selectively substituted indoles. Journal of Heterocyclic Chemistry. 1988.
- 71. Tokuyama H, Yamashita T, Reding MT, Kaburagi Y, Fukuyama T. Radical cyclization of 2-alkenylthioanilides: A Novel synthesis of 2,3- disubstituted indoles [7]. Journal of the American Chemical Society. 1999.
- 72. Kobayashi Y, Fukuyama T. Development of a novel indole synthesis and its application to natural products synthesis. J Heterocycl Chem. 1998;



- TROST BM, FORTUNAK JMD. ChemInform Abstract: CYCLIZATIONS INITIATED BY A PALLADIUM(2+)-SILVER(1+) MIXED-METAL SYSTEM. Chem Informationsd. 1982;
- 74. Gassman PG, Van Bergen TJ, Gruetzmacher G. Use of Halogen-Sulfide Complexes in the Synthesis of Indoles, Oxindoles, and Alkylated Aromatic Amines. Journal of the American Chemical Society. 1973.
- 75. Gassman PG, Gruetzmacher G, van Bergen TJ. Generation of Azasulfonium Salts from Halogen-Sulfide Complexes and Anilines. The Synthesis of Indoles, Oxindoles, and Alkylated Aromatic Amines Bearing Cation Stabilizing Substituents. J Am Chem Soc. 1974;
- 76. Hemetsberger H, Knittel D. Synthese und Thermolyse von α-Azidoacrylestern -Enazide, 4. Mitt. Monatshefte für Chemie. 1972;
- 77. Larock RC, Yum EK. Synthesis of Indoles via Palladium-Catalyzed Heteroannulation of Internal Alkynes. J Am Chem Soc. 1991;
- Smith AB, Visnick M, Haseltine JN, Sprengeler PA. Organometallic reagents in synthesis. A new protocol for construction of the indole nucleus. Tetrahedron. 1986;
- 79. Ketcha DM, Wilson LJ, Portlock DE. The solid-phase Nenitzescu indole synthesis. Tetrahedron Lett. 2000;
- 80. Schenck LW, Kuna K, Frank W, Albert A, Asche C, Kucklaender U. 1,4,9,10-Anthradiquinone as precursor for antitumor compounds. Bioorganic Med Chem. 2006;
- 81. Reissert A. Einwirkung von Oxalester und Natriumäthylat auf Nitrotoluole. Synthese nitrirter Phenylbrenztraubensäuren. Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft. 1897;
- 82. Butin A V., Stroganova TA, Lodina I V., Krapivin GD. Furan ring opening Indole ring closure: A new modification of the Reissert reaction for indole synthesis. Tetrahedron Lett. 2001;
- 83. Baeyer A, Emmerling A. Synthese des Indols. Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft. 1869;
- Diels O, Reese J. Syntheses in the hydroaromatic series. XX. Addition of acetylenedicarboxylic esters to hydrazobenzene. Justus Liebigs Ann Chem. 1934;
- 85. Diels O, Reese J. Syntheses in the hydroaromatic series. XXV. Addition products of acetylenedicarboxylic esters and hydrazo compounds. 2. Justus Liebigs Ann Chem. 1935;





- 86. Huntress EH, Bornstein J, Hearon WM. An Extension of the Diels-Reese Reaction. J Am Chem Soc. 1956;
- 87. Jenner ZB, Sood AK, Coleman RL. Evaluation of rucaparib and companion diagnostics in the PARP inhibitor landscape for recurrent ovarian cancer therapy. Futur Oncol. 2016;
- 88. Murai J, Huang SYN, Renaud A, Zhang Y, Ji J, Takeda S, et al. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. Mol Cancer Ther. 2014;
- 89. Kern KA, Zhang S, Shalinsky DR, Wang DD. Comparative PARP enzyme inhibition of PF-01367338, olaparib, and MK-4827. J Clin Oncol. 2011;
- Ali M, Telfer BA, McCrudden C, O'Rourke M, Thomas HD, Kamjoo M, et al. Vasoactivity of AG014699, a clinically active small molecule inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase: A contributory factor to chemopotentiation in vivo? Clin Cancer Res. 2009;
- 91. Syed YY. Rucaparib: First Global Approval. Drugs. 2017;
- 92. Ihnen M, Eulenburg CZ, Kolarova T, Qi JW, Manivong K, Chalukya M, et al. Therapeutic potential of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib for the treatment of sporadic human ovarian cancer. Mol Cancer Ther. 2013;
- 93. Domchek SM, Hendifar AE, McWilliams RR, Geva R, Epelbaum R, Biankin A, et al. RUCAPANC: An open-label, phase 2 trial of the PARP inhibitor rucaparib in patients (pts) with pancreatic cancer (PC) and a known deleterious germline or somatic BRCA mutation. J Clin Oncol. 2016;
- 94. Flick AC, Ding HX, Leverett CA, Fink SJ, O'Donnell CJ. Synthetic Approaches to New Drugs Approved during 2016. Journal of Medicinal Chemistry. 2018.
- 95. Hughes DL. Patent Review of Manufacturing Routes to Recently Approved PARP Inhibitors: Olaparib, Rucaparib, and Niraparib. Organic Process Research and Development. 2017.
- 96. Gillmore AT, Badland M, Crook CL, Castro NM, Critcher DJ, Fussell SJ, et al. Multkilogram scale-up of a reductive alkylation route to a novel PARP inhibitor. Org Process Res Dev. 2012;
- 97. Bochum S, Berger S, Martens UM. Olaparib. In: Recent Results in Cancer Research. 2018.