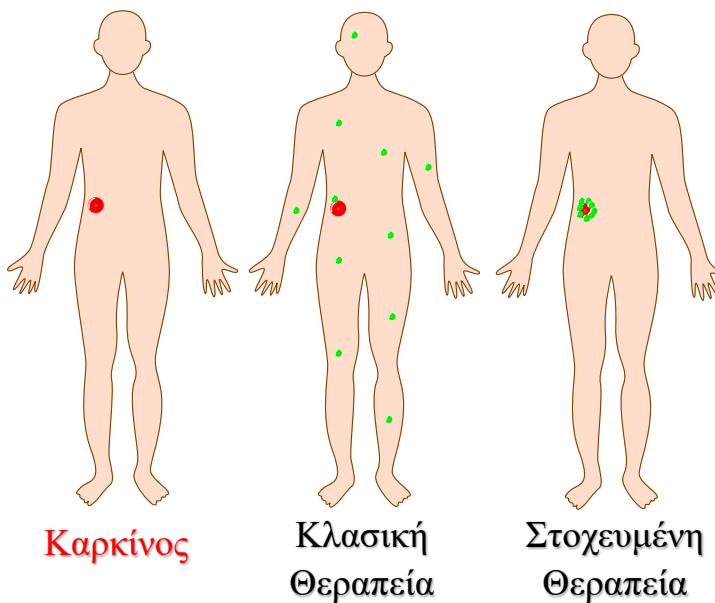




Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση βιοσυζευγμάτων Γεμισταβίνης για εκλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων



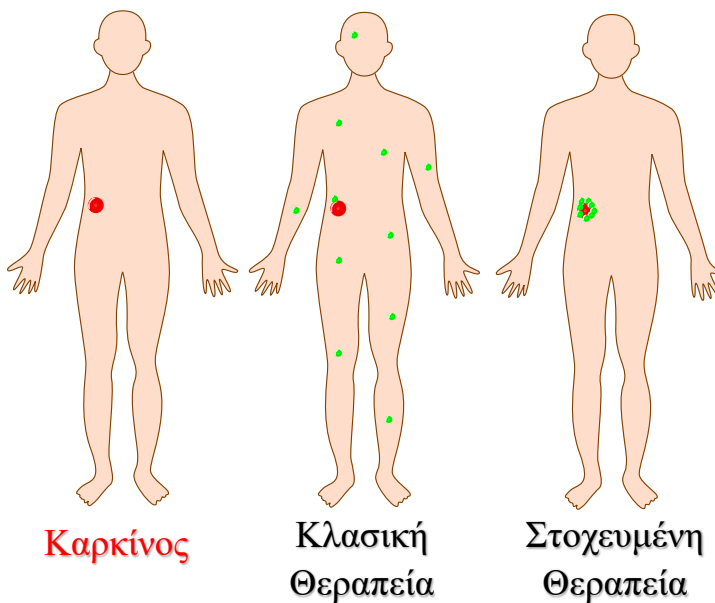
**ΒΡΕΤΤΟΣ ΕΙΡΗΝΑΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΤΖΑΚΟΣ ΑΝΔΡΕΑΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση βιοσυζευγμάτων Γεμισταβίνης για εκλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων



**ΒΡΕΤΤΟΣ ΕΙΡΗΝΑΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
ΤΖΑΚΟΣ ΑΝΔΡΕΑΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

Εισαγωγή στο Π.Μ.Σ. του κ. Βρέττου Ειρηναίου: 27-10-2014

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Επίκουρος Καθηγητής Τζάκος Ανδρέας

Θέμα: «Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση βιοσυζευγμάτων Γεμισταβίνης για εκλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 948Α /12-05-2017

1. Τζάκος Ανδρέας
2. Θεοδώρου-Κασιούμη Βασιλική
3. Κουρκουμέλης Νικόλαος

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις-.....-.....

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ζωή-Βαλεντίνα Βαμβέτσου

Ευχαριστίες

Το παρόν μεταπτυχιακό δίπλωμα εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το χρονικό διάστημα από τον Νοέμβριο του 2014 έως τον Μάρτιο του 2017 και ο σκοπός ήταν ο σχεδιασμός και η σύνθεση βιοσυζευγμάτων πεπτιδίων-γемσιταβίνης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, Επίκουρο Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο για την ανάθεση του θέματος και τη σωστή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η πολύτιμη στήριξη, η υπομονή και οι χρήσιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Μου δίδαξε ακόμα πόσο σημαντικό είναι να προβληματίζομαι και να ανταπεξέρχομαι σε δύσκολες καταστάσεις με επιτυχία.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη και την Καθηγήτρια κ. Βασιλική Θεοδώρου-Κασιούμη για την αξιοσημείωτη βοήθεια και τις συμβουλές που μου πρόσφεραν και την αποδοχή τους να αξιολογήσουν την μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δρ. Κων/νο Τσιαφούλη και το προσωπικό της μονάδας φασματομετρίας μαζών, Δρ. Αθανάσιο Καρκαμπούνα καθώς και τον Δρ. Κωνσταντίνο Ταμβακόπουλο και τον διδακτορικό του φοιτητή Θεόδωρο Καράμπελα για την εκπόνηση των βιολογικών πειραμάτων στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθήνας (ΙΙΒΕΑΑ).

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους φίλους και συνεργάτες που δουλέψαμε στο ίδιο εργαστήριο Δημήτρη Διαμαντή, Αντώνη Τσιαιλάνη, Χρήστο Χατζηγιάννη, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Μαρία Χατζηαθανασιάδου, Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, Ευγένιο Στύλο, Νίκο Μπέκα, Φωτεινή Χαλκίδου, Ελένη Αλεξανδρή. Επίσης, τους φίλους και συναδέλφους Ιωάννη Γεροντίτη, Γιώργο Βλάσση-Δημάκο, Μιχάλη Αλαγιάννη, Πηνελόπη Βούλγαρη, Νικολέτα Ντέμου, Βασιλική Πολυχρονίδου, Nisar Sayyad, Abdul Shaikh και Αναστασία Κουγιουμτζή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους Καθηγητές του Τμήματος για τις γνώσεις που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Βαρβούνη Γεώργιο και τον Καθηγητή κ. Σκομπρίδη Κωνσταντίνο που μου μετέδωσαν τις γνώσεις τους και με δίδαξαν οργανική σύνθεση στα φοιτητικά εργαστήρια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους γονείς μου Ιωάννη και Ευαγγελία για την υποστήριξή τους σε όλους τους τομείς της ζωής μου και τη δύναμη που μου προσφέρουν παροτρύνοντας με να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο. Χωρίς την συμπαράστασή τους και την οικονομική υποστήριξη τους δεν θα ολοκληρωνόταν ποτέ αυτή η εργασία.

Βρέττος Ειρηναίος
Ιωάννινα, 2017

Στην οικογένειά μου...

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης- ΕΤΠΑ) και από εθνικούς πόρους στο πλαίσιο του έργου με τίτλο : «**Πλατφόρμα σάρωσης μικρών μορίων που στοχεύουν πρωτεΐνες που εμφανίζουν δομική αταξία**» (Κωδ. Ε.Ε. 81392), της Δράσης «ΑΡΙΣΤΕΙΑ II» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του ΕΣΠΑ 2007-2013.



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Περιεχόμενα

Συντμήσεις	12
1 Εισαγωγή	16
1.1 Στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου	16
1.2 Διάφοροι τρόποι στοχευμένης χορήγησης φαρμάκου	19
1.2.1 Αντισώματα.....	19
1.2.2 Λιποσώματα.....	20
1.2.3 Πολυμερικά νανοσωματίδια (PNPs-Polymeric nanoparticles).....	21
1.3 Στόχευση καρκινικών κυττάρων μέσω συζευγμάτων Φαρμάκου-Πεπτιδίου	23
1.3.1 Το Πεπτιδιο ως Φορέας Φαρμάκων	23
1.3.1.1 Πεπτιδικά ανάλογα της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) ως φορείς φαρμάκων:.....	26
1.3.1.2 Πεπτιδία αγωνιστές του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) ως φορείς φαρμάκου: 27	
1.3.2 Κυτταροτοξικά φάρμακα	29
1.4 Χημεία συζεύγματος Φαρμάκου-Πεπτιδίου	30
1.4.1 Αμιδικός δεσμός	30
1.4.2 Εστερικός δεσμός καρβοξυλικού οξέος.....	32
1.4.3 Δεσμός υδραζόνης.....	32
1.4.4 Ενζυμικά διασπώμενος δεσμός	33
1.4.5 Θειοαιθερικός δεσμός	33
1.4.6 Καρβαμικικός εστερικός δεσμός	34
1.4.7 Δεσμός οξίμης.....	34
1.5 Επισήμανση	35
1.6 Πεπτιδική σύνθεση	37
1.6.1 Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού.....	37
1.6.2 Τεχνικές Πεπτιδικής Σύνθεσης.....	39
1.6.2.1 Σύνθεση σε υγρή φάση.....	39
1.6.2.2 Σύνθεση σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis – SPPS).....	39
1.6.2.2.1 Σύνθεση σε στερεή φάση με την μέθοδο Fmoc/tBu.....	39
1.6.3 Στρατηγικές Πεπτιδικής Σύνθεσης.....	41
1.6.4 Μέθοδος ελέγχου της συνθετικής πορείας με test Κάιζερ	42
1.7 Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση	42
1.7.1 Εστεροποίηση N ^α -Fmoc αμινοξέων στην Rink Amide AM ρητίνη	42

1.7.2	Εστεροποίηση Να -Fmoc αμινοξέων στην 2-χλωροτρίτυλοχλωρίδιο ρητίνη.....	45
1.8	Αντικαρκινικό φάρμακο 'Γεμισταβίνη'	46
1.8.1	Βιολογικό υπόβαθρο της γεμισταβίνης.....	46
1.8.2	Ιστορικά στοιχεία	47
1.8.3	Μεταφορά της γεμισταβίνης.....	48
1.8.4	Μεταβολισμός της γεμισταβίνης.....	51
1.8.5	Μηχανισμός δράσης της γεμισταβίνης	53
1.8.6	Αντίσταση και ευαισθησία στην γεμισταβίνη	55
1.8.7	Χημεία της γεμισταβίνης	57
2	Βιοσυζεύγματα Γεμισταβίνης-GnRH	59
2.1	Εισαγωγή.....	59
2.2	Σύνθεση πεπτιδίου [D-Lys] ⁶ -GnRH.....	60
2.3	Σύνθεση συζευγμάτων της Γεμισταβίνης με το GnRH μέσω δεσμού οξίμης.....	63
2.3.1	Εισαγωγή.....	63
2.3.2	Πειραματική πορεία	65
2.3.3	Βιολογική αξιολόγηση των συζευγμάτων GOXG ₁ , GOXG ₂ και GN ₄ OXG	86
2.3.3.1	In vitro κυτταροτοξικότητα των GOXG ₁ , GOXG ₂ , N-άκυλ-γεμισταβίνη, GN ₄ OXG.....	87
2.3.3.2	In vitro σταθερότητα των GOXG ₁ , GOXG ₂ , GN ₄ OXG και N-άκυλ-γεμισταβίνη σε καλλιέργεια κυττάρων	89
2.3.3.3	In vitro σταθερότητα των GOXG ₁ , GOXG ₂ , GN ₄ OXG στο ανθρώπινο πλάσμα.....	91
2.4	Σύνθεση επισημασμένων αναλόγων με στόχο τον προσδιορισμό της κυτταρικής πρόσληψης του πεπτιδίου GnRH	92
2.4.1	Εισαγωγή.....	93
2.4.2	Σύνθεση της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης.....	93
2.4.3	Σύνθεση του διμοριακού [D-Lys] ⁶ -GnRH -5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη	96
2.4.3.1	Εισαγωγή.....	96
2.4.3.2	Πειραματική πορεία	96
2.4.3.3	Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας και κυτταρομετρίας ροής	98
2.4.4	Σύνθεση του διμοριακού συζεύγματος Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη	101
2.4.4.1	Εισαγωγή.....	101
2.4.4.2	Πειραματική πορεία	101
2.4.5	Σύνθεση του τριμοριακού [D-Lys] ⁶ -GnRH-Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη ...	102
2.4.5.1	Εισαγωγή.....	103
2.4.5.2	Πειραματική πορεία	103

3	Βιοσυζεύγματα Γεμισταβίνης-HER2	105
3.1	Εισαγωγή.....	105
3.2	Σύνθεση και χαρακτηρισμός του πεπτιδίου HER2-BP1 (HER2).....	106
3.3	Σύνθεση και χαρακτηρισμός του συζεύγματος HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη	108
3.3.1	Εισαγωγή.....	109
3.3.2	Πειραματική πορεία	109
3.3.3	Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας και κυτταρομετρία ροής.....	111
3.4	Σύνθεση και χαρακτηρισμός του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη.	114
3.4.1	Εισαγωγή.....	114
3.4.2	Πειραματική πορεία	116
3.4.3	Βιολογική αξιολόγηση του πεπτιδίου HER2-BP1 και του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη 121	
4	Συμπεράσματα	128
5	Αναφορές	129

Συντμήσεις

<u>Συντμήσεις</u>	<u>Ονομασία</u>
AcOH	Οξικό οξύ
MeCN	Ακετονιτρίλιο
Boc	Τριτοταγής βουτυλοξυκαρβονυλομάδα
CF	Καρβοξυφλουορεσκεΐνη
CLTR	Χλωροτρίτυλο
Cys	Κυστεΐνη
DCC	N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DCU	N,N'-δικυκλοεξυλουρία
DIC	N,N'-δισοπροπυλο-καρβοδιμίδιο
DIPEA	Δισοπροπυλαιθυλαμίνη
DMSO	Διμέθυλοσουλφοξείδιο
DMAP	4-διμεθυλαμινο-πυριδίνη
DMF	N,N'-διμεθυλοφορμαμίδιο
Et ₂ O	Διαιθυλαιθέρας
FDA	Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων
Fmoc	9-φλουορενυλομεθοξυκαρβονυλομάδα
H ₂ O	Νερό
HATU	N-[(διμεθυλαμινο)-1H-1,2,3-τριαζο[4,5-β]πυριδινό-1-υλομεθυλενο]-N-μεθυλομεθαναμινικό εξαφωσφορικό N-οξείδιο
HBTU	Εξαφθοροφωσφορικό άλας της 2-(1H βενζοτριαζολ-1υλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας
HClO ₄	Υπερχλωρικό οξύ
HOAt	1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλιο
HOBt	1-υδροξυβενζοτριαζόλιο
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης
Lys	Λυσίνη
MeOH	Μεθανόλη
MW	Μοριακό βάρος
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
P ₂ O ₅	Πεντοξείδιο του φωσφόρου
PyBOP	βενζοτριαζολ-1-υλ-οξυπυρρολιδινό εξαφθοροφωσφορικό
TBTU	Τετραφθοροβορικό άλας της 2-(1H βενζοτριαζολ-1υλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας
tBu	Τριτοταγής βουτυλομάδα

TEA	Τριαυθλαμίνη
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
TIS	Τρισοπροπυλοσιλάνιο
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
UV	Υπεριώδες

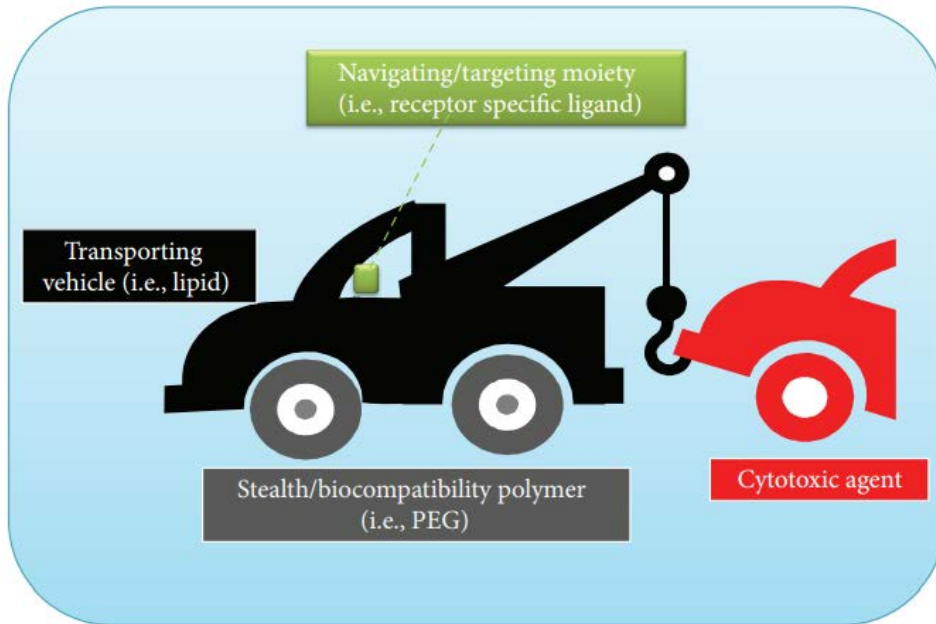
1 Εισαγωγή

1.1 Στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου

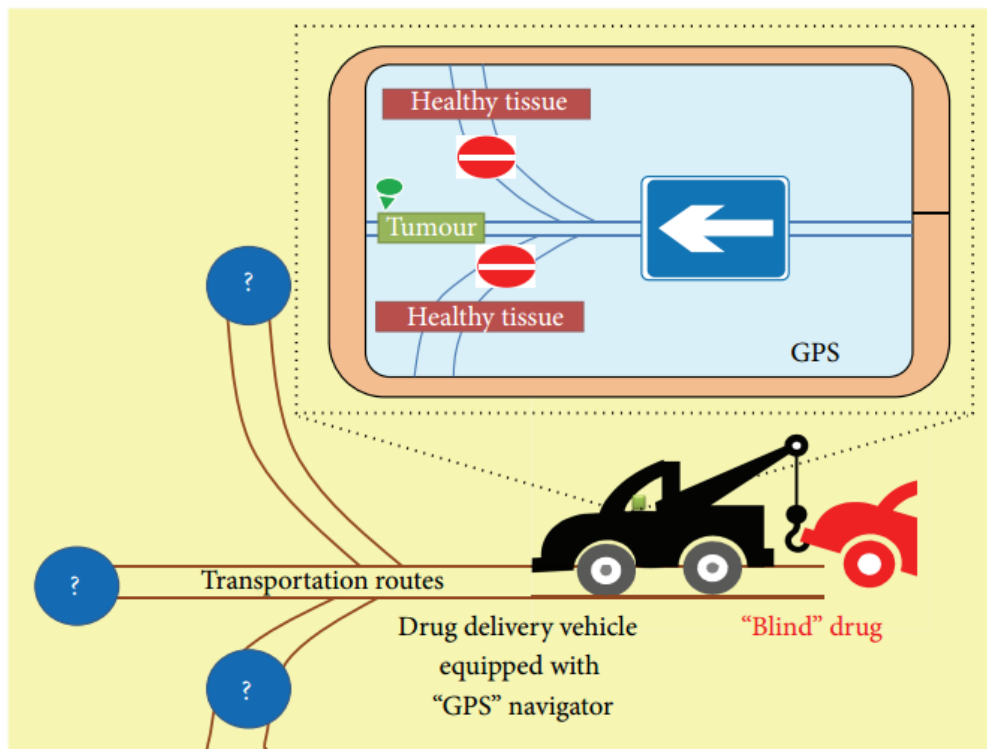
Παρά την πρόοδο στις τεχνικές για την πρόληψη, την ανίχνευση, τη θεραπεία καθώς και για την αύξηση της ευαισθητοποίησης του κοινού τα τελευταία χρόνια για τον καρκίνο, αυτή η ασθένεια προβλέπεται ότι θα καταστεί η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως. Οι εξελίξεις στην επιστημονική κοινότητα κατά τα τελευταία χρόνια έχουν οδηγήσει στη συνειδητοποίηση ότι οι ανθρώπινες ασθένειες, και ειδικότερα ο καρκίνος, είναι πιο περίπλοκες από ό, τι είχε αρχικά θεωρηθεί. Ο καρκίνος δεν είναι μια στατική οντότητα που μπορεί να ελεγχθεί εύκολα και να χειραγωγηθεί. Χαρακτηρίζεται από μια δυναμική και χρόνια εξάρτηση από το δίκτυο μοριακών και κυτταρικών αλληλεπιδράσεων του, το οποίο συνεχώς μεταβάλλεται σε διαφορετικές οδούς. Το δίκτυο αυτό δεν είναι αμετάβλητο και άκαμπτο αλλά συνεχώς αναδιαμορφώνεται και μεταβάλλεται σύμφωνα με τις διαδικασίες/αντιδράσεις σηματοδότησης που εμπλέκονται. Η πολυπλοκότητα του προκύπτει από το γεγονός ότι η κατάσταση της ασθένειας δεν είναι μια διαταραχή ενός μοναδικού κόμβου ή συγκεκριμένων κόμβων στο δίκτυο του οργανισμού, αλλά εξαρτάται απ' τον οργανισμό του εκάστοτε ασθενή, απαιτώντας έτσι προοπτικές για εξατομικευμένες προσεγγίσεις.

Πολυάριθμες προκλήσεις εμποδίζουν την αποτελεσματική θεραπεία και την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων κατά του καρκίνου, όπως η αναποτελεσματική συγκέντρωση του θεραπευτικού μέσου στην περιοχή του όγκου, επικίνδυνες για τη ζωή παρενέργειες που προκαλούνται από την μη ειδική κατανομή των αντικαρκινικών παραγόντων στους ιστούς, επίκτητη αντοχή των καρκινικών κυττάρων κατά τη χημειοθεραπεία που προκαλεί αντίσταση σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών φαρμάκων.

Μια τέτοια πολυπαραγοντική κατάσταση απαιτεί την ανάπτυξη πολύ λεπτών προσεγγίσεων κατά τη διάρκεια της προσπάθειας ανακάλυψης νέων φαρμάκων για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η παραδοσιακή φιλοσοφία του φαρμάκου "magic bullet" (που είναι σχεδιασμένη για ένα μόνο στόχο-φάρμακο) όσον αφορά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, θα πρέπει να αντικατασταθεί από μια νέα φιλοσοφία που αφορά τη διαμόρφωση ενός οχήματος το οποίο θα μπορούσε χωρο-χρονικά να παραδώσει το θεραπευτικό μέσο στη σωστή τοποθεσία και την κατάλληλη στιγμή. Έτσι, ο όρος στοχευμένη χορήγηση του φαρμάκου θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει και τον πλοηγό που βοηθά στη στοχευμένη παράδοση του φαρμάκου. Ένα τέτοιο όχημα που χρησιμοποιείται προκειμένου να ενισχυθεί η επιλεκτική πρόσληψη του κυτταροτοξικού παράγοντα από τα κύτταρα του όγκου, θα πρέπει να αποτελείται από μια πολυδιάστατη αρχιτεκτονική (**Σχήμα 1 & 2**). Τα κύρια συστατικά των οχημάτων αυτών είναι: το όχημα μεταφοράς (πχ λιπίδια), ο κυτταροτοξικός παράγοντας που έχει τοποθετηθεί (αντικαρκινικό φάρμακο), ο πλοηγός / παράγοντας στόχευσης (ειδικός συνδετήρας) που επιτρέπει την επιλογή των κατάλληλων διαδρομών παράδοσης για να αποφευχθεί η τοξικότητα σε υγιή κύτταρα, όπως επίσης και η αναποτελεσματική συγκέντρωση του κυτταροτοξικού παράγοντα στη θέση του όγκου (**Σχήμα 2**) και οι "stealth" νανο-φορείς (βιοσυμβατά πολυμερή πχ PEG) που επεκτείνουν το χρόνο ημιζωής του φαρμάκου-οχήματος.



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της πολύπλοκης αρχιτεκτονικής της στοχευμένης χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών.



Σχήμα 2: Στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου: Το όχημα παροχής φαρμάκου είναι εξοπλισμένο με ένα «προγραμματιζόμενο σύστημα πλοήγησης» που επιτρέπει την μεταφορά του «τυφλού» κυτταροτοξικού παράγοντα στη σωστή κυτταρική τοποθεσία. Σε περίπτωση απουσίας του

οχήματος μεταφοράς φαρμάκου που είναι ‘εξοικειωμένο’ με τις διαδρομές παράδοσης, η τοξικότητα εντοπίζεται και σε υγιή πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα με αποτέλεσμα την αναποτελεσματική συγκέντρωση του φαρμάκου που φθάνει στην θέση του όγκου.

Για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που τίθενται από την πολυπλοκότητα του καρκίνου, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές στόχευσης όπως αυτές συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Μερικά συστήματα στοχευμένης χορήγησης που εμφανίζονται στην βιβλιογραφία.¹

Όχημα	Περιγραφή οχήματος	Πλοηγός	Στόχος	Τύπος καρκίνου
Bionanocapsules	A bio-nanocapsule (BNC) is a hollow nanoparticle consisting of an approximately 100-nm-diameter liposome with about 110 molecules of hepatitis B virus (HBV) surface antigen L protein embedded as a transmembrane protein.	Chlorotoxin	MMP-2 protein	Brain tumor
Enzyme-based cancer imaging agents	Dual aromatase-steroid sulfatase inhibitor (DASSI) radiotracers	¹¹ C-labelled inhibitors of steroid sulfatase (sulfamate derivatives)	Enzymes of the “sulfatase pathway”, particularly steroid sulfatase	Breast, endometrial, ovarian, and colorectal cancer
Cytotoxic drugs coupled to OATP-substrates or OATP-directed antibodies	Substrates of membrane-located OATP isoforms, selectively expressed in cancer cells, for example, microcystins as substrates for OATP1B3	Selective ligands for OATP for example, microcystins or OATP-directed antibodies in cancer cells	Organic anion transporting polypeptides (OATPs)	Gastrointestinal tract, breast, prostate, lung, brain, bladder, kidney, liver, testis
Lipid-based nanoparticles	Genuine particles (approx 100 nm in dimension) assembled from varieties of lipid and other chemical components that act collectively to overcome biological barriers (biobarrriers)	Bona fide biological receptor specific ligands		
PEGylated Span 80 vesicles PEGylated Span 80 vesicles with immobilized ESA	Span 80 is a heterogeneous mixture of sorbitan mono-, di-, tri-, and tetra-esters	Lectin-sugar binding protein (Eucheuma serra agglutinin)	Sugar chains on the tumor cell-surface	Osteosarcoma
Doxorubicin (DOX)-loaded liposomes	Liposomes composed of DSPG, DSPC, cholesterol, and DSPE-PEG-2000	A triple-helical sequence derived from type IV collagen	CD44/chondroitin sulfate proteoglycan	CD44-overexpressing tumor cells
Mannan	Oxidized or reduced mannan, a poly-mannose, conjugated to cancer antigen	Mannan	Mannose receptor	Adenocarcinoma
GnRH	A 10 residue peptide	Acts as a navigating device on its own.	GnRH-R	Prostate, breast, bladder
EGFR	Different peptides targeting epidermal growth factor receptor	Acts as a navigating device on its own.	Epidermal growth factor receptor (EGFR-R)	Lung, colon, anal, glioblastoma, epithelial tumors of the head and neck

1.2 Διάφοροι τρόποι στοχευμένης χορήγησης φαρμάκου

Για την αποτελεσματική χορήγηση ενός κυτταροτοξικού παράγοντα σε καρκινικά κύτταρα υφίστανται διάφοροι τρόποι, οι οποίοι και παρουσιάζονται παρακάτω.

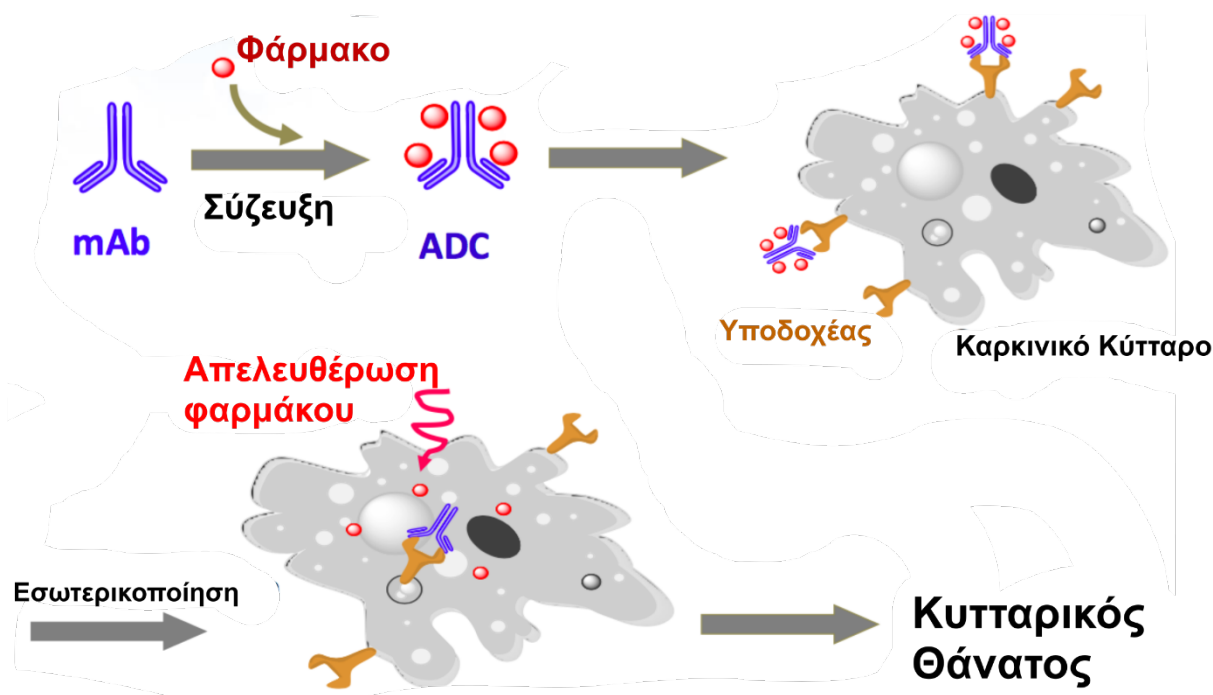
1.2.1 Αντισώματα

Ένα αντίσωμα (Antibody-Ab) είναι μια μεγάλη, σχήματος Y πρωτεΐνη που παράγεται κυρίως από τα κύτταρα του πλάσματος. Τα αντισώματα που εκκρίνονται από τα B κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, ως επί το πλείστον από διαφοροποιημένα B κύτταρα, ονομάζονται κύτταρα πλάσματος. Τα αντισώματα μπορεί να υπάρχουν σε δύο φυσικές μορφές, μία διαλυτή μορφή που εκκρίνεται από το κύτταρο και είναι ελεύθερη στο πλάσμα του αίματος και μια μορφή δεσμευμένη σε μεμβράνη που είναι συνδεδεμένη με την επιφάνεια ενός κυττάρου B και αναφέρεται ως υποδοχέας B-κυττάρου (BCR).

Τα αντισώματα χρησιμοποιούνται για συζεύξεις με αντικαρκινικούς παράγοντες σχηματίζοντας τα γνωστά συζεύγματα Αντίσωματος-Φαρμάκου (Antibody Drug Conjugates-ADCs). Τα προϊόντα σύζευξης αντισώματος-φαρμάκου (ADCs) αντιπροσωπεύουν μια καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση που συνδυάζει τη μοναδική, υψηλή εξειδίκευση, τις ιδιότητες και την αντικαρκινική δραστηριότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) που είναι όγκο-ειδικά αλλά όχι επαρκώς κυτταροτοξικά, οπότε η ισχυρή δραστηριότητα θανάτωσης κυττάρων οφείλεται στα κυτταροτοξικά μικρομοριακά-φάρμακα που φέρουν και είναι πολύ τοξικά για να χρησιμοποιηθούν από μόνα τους. Στη σύνδεση μονοκλωνικών αντισωμάτων με κυτταροτοξικούς παράγοντες, οι επιστήμονες ήταν σε θέση να βελτιστοποιήσουν τα χαρακτηριστικά των δύο συστατικών.

Τα βασικά συστατικά των προϊόντων σύζευξης αντισώματος-φαρμάκου περιλαμβάνουν ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, ένα σταθερό συνδέτη και ένα κυτταροτοξικό παράγοντα για να στοχεύουν μια ποικιλία καρκίνων. Το κυτταροτοξικό (αντικαρκινικό) φάρμακο συνδέεται χημικώς (συζευγμένο χρησιμοποιώντας δισουλφίδιο ή μη-διασπώμενο θειοαιθέρα) με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο που συνδυάζεται με καρκίνωμα, καθιστώντας το συνδυασμό φαρμάκων πολύ συγκεκριμένο. Με απλά λόγια, τα προϊόντα σύζευξης αντισώματος-φαρμάκου παραδίδουν «απενεργοποιημένες» κυτταροτοξίνες σε συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα. Μόλις φτάσει στο καρκινικό κύτταρο πραγματοποιείται εσωτερικοποίηση και η κυτταροτοξίνη απελευθερώνεται, οπότε και ανακτά την πλήρη του κυτταροτοξική δράση. Με τη σειρά του, αυτό οδηγεί σε ταχύ κυτταρικό θάνατο (**Σχήμα 3**).

Ενώ η έννοια των προϊόντων σύζευξης αντισώματος-φαρμάκου είναι σχετικά εύκολο να κατανοηθούν, ο σχεδιασμός και η σύνθεση ενός πλήρως λειτουργικού και αποτελεσματικού προϊόντος σύζευξης αντισώματος-φαρμάκου είναι αξιοσημείωτα δύσκολα, απαιτώντας συχνά εξειδικευμένες ομάδες ανάπτυξης.

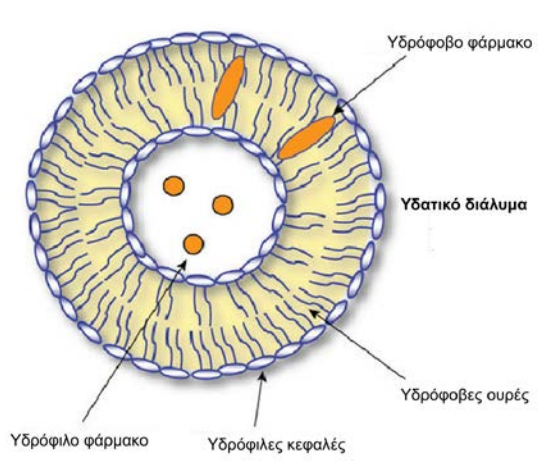


Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση της δράσης των συζευγμάτων Αντίσωμα-Φάρμακο. Αποτελεί τροποποίηση του σχήματος που βρέθηκε στο CellCultureDish.

1.2.2 Λιποσώματα

Τα λιποσώματα αποτελούνται από φυσικά λιπιδικά στρώματα και ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των λιπιδικών διπλοστιβιάδων είτε ως μονοστρωματικά είτε ως πολυστρωματικά. Μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστιβιάδες μπορούν να διαλυτοποιήσουν υδρόφιλα φάρμακα. Τα εναλλασσόμενα υδατικά διαμερίσματα μπορούν να παγιδεύσουν υδρόφιλα φάρμακα^{2,3} (Σχήμα 4). Τα λιποσώματα προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα ως φορείς χορήγησης φαρμάκων. Είναι γενικά βιοσυμβατά και μη τοξικά. Είναι σχετικά εύκολο να προετοιμαστούν και να αποτρέψουμε την συσσώρευση των φαρμάκων σε φυσιολογικά όργανα οπότε μειώνεται η τοξικότητα τους και βελτιώνονται οι φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Οι ιδιότητες των λιποσωμάτων, όπως το μέγεθος, τα επιφανειακά φορτία, η ελαστικότητα της μεμβράνης και οι μεταβάσεις φάσης εντός της διπλής στιβάδας μπορούν να ελέγχονται είτε επιλέγοντας τις κατάλληλες συνθέσεις του λιπιδίου είτε με μεταβαλλόμενες εξωτερικές συνθήκες όπως η θερμοκρασία, το pH του μέσου ή η παρουσία ειδικών ουσιών^{4,5}. Όταν συνδυαστούν με αντισώματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενεργή στόχευση⁶⁻⁸. Προς το παρόν, μερικά λιποσωμικά σκευάσματα είναι διαθέσιμα στην αγορά για τη θεραπεία του AIDS που σχετίζονται με το σάρκωμα Kaposi, καρκίνο του μαστού, των ωθηκών και άλλων τύπων όγκου^{9,10}. Αυτά τα λιποσώματα χρησιμοποιούν το EPR φαινόμενο (enhanced permeability and retention effect- είναι η ιδιότητα με την οποία τα μόρια ορισμένων μεγεθών (συνήθως λιποσώματα, νανοσωματίδια και μακρομοριακά φάρμακα) τείνουν να συσσωρευτούν σε ιστό όγκου πολύ περισσότερο από ό, τι κάνουν σε φυσιολογικούς ιστούς) για να φτάσουν στον όγκο όπου δρουν ως αποθήκες φαρμάκων.

Η απελευθέρωση στο διάμεσο γίνεται κυρίως λόγω διαταραχής της λιποσωμικής διπλοστοιβάδας και μέσω της πρόσληψης όγκου και της επακόλουθης απελευθέρωσης του φαρμάκου.



Σχήμα 4. Δομή ενός λιποσωμικού φορέα. Υδρόφιλα φάρμακα μπορούν να φορτωθούν στο εσωτερικό των λιποσωμάτων ενώ τα υδρόφοβα φάρμακα μπορούν να φορτωθούν μεταξύ των λιποστρωμάτων.

Αν και έχουν αποδειχτεί κλινικά επιτυχή σε μερικές εφαρμογές, τα λιποσώματα έχουν και κάποιους περιορισμούς. Ένα από τα προβλήματα με τα λιποσώματα ως φορείς απελευθέρωσης φαρμάκου, είναι η έλλειψη σταθερότητας σε βιολογικά υγρά και κατά την αποθήκευση, η μη ειδική πρόσληψη από το μονοπύρρηνο φαγοκυτταρικό σύστημα και ταχεία απελευθέρωση φαρμάκου *in vivo*¹¹. Κατά συνέπεια, τα μόρια του φαρμάκου διαρρέουν προς τους φυσιολογικούς ιστούς και προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

1.2.3 Πολυμερικά νανοσωματίδια (PNPs-Polymeric nanoparticles)

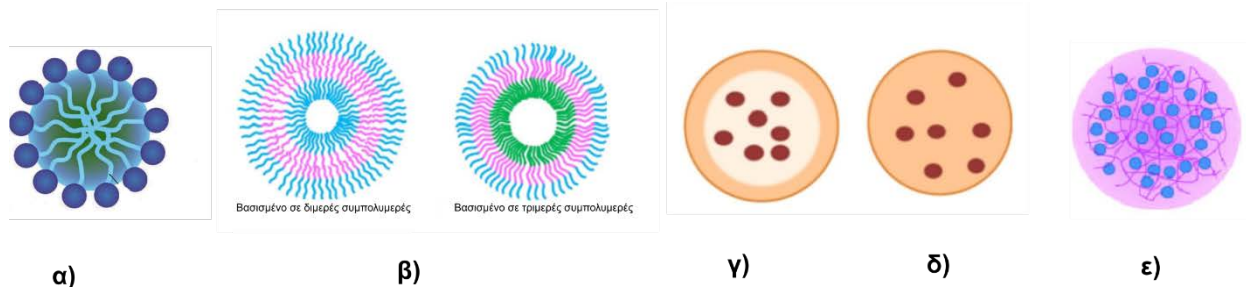
Μία κατηγορία πολυμερικών NPs περιλαμβάνει πολυμερικά μικύλλια (**Σχήμα 5α**) αποτελούμενα από αμφίφιλα διμερή και τριμερή συμπολυμερή, τα οποία μπορούν να αυτο-οργανωθούν σε συγκεκριμένους διαλύτες. Οι βασικές περιοχές των μικυλλίων χρησιμεύουν ως δεξαμενές για υδρόφοβα φάρμακα¹²⁻¹⁵, ενώ η υδρόφιλη εξωτερική περιοχή προσδίδει σταθερότητα στο φορέα σε υδατικά περιβάλλοντα^{16, 17}. Εφόσον οι δομές τους διατηρούνται κυρίως από μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω βελτίωση της *in vivo* σταθερότητας των πολυμερικών μικυλλίων.

Μια άλλη κατηγορία αυτο-οργανωμένων δομών αμφίφιλων συμπολυμερών είναι αυτή των πολυμεροσωμάτων (Polymerosomes) (**Σχήμα 5β**), τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα και τις ρυθμιζόμενες ιδιότητες της μεμβράνης επιτρέποντας την απελευθέρωση των φαρμάκων^{18, 19}. Λόγω των πολλών «διαμερισμάτων» στην δομή τους, τα συστήματα αυτά μπορούν να εγκολπώσουν ή να ενσωματώσουν ένα ευρύ φάσμα υδρόφιλων ή υδρόφοβων φαρμάκων. Αρκετές εργασίες επικεντρώθηκαν στον σχεδιασμό τους για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων¹⁹⁻

²¹. Ειδικότερα, η ανάπτυξη των πολυμεροσωμάτων που ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένα ερεθίσματα για τον περαιτέρω έλεγχο της απελευθέρωσης των φαρμάκων με την αλλαγή της σταθερότητας και της διαπερατότητας της μεμβράνης έχει προσελκύσει πολύ ενδιαφέρον.²²⁻²⁷

Για να ελαχιστοποιηθεί η εγγενής αστάθεια και οι περιορισμοί της αποικοδόμησης που συνδέονται με τα λιποσώματα και άλλες μορφές μικυλίου, αναπτύχθηκαν άλλοι φορείς φαρμάκων με βάση τα πολυμερή. Σε σύγκριση με τα λιποσώματα και τα μικύλλια, τα πολυμερικά συστήματα επιδεικνύουν μια σειρά από ελκυστικές ιδιότητες ως φαρμακευτικοί φορείς, περιλαμβανομένων της ικανότητας υψηλής φόρτωσης φαρμάκων, του παρατεταμένου χρόνου κυκλοφορίας που προκύπτει από τη μεγαλύτερη σταθερότητα *in vivo* και τους βραδύτερους ρυθμούς διάσπασης που επιτρέπουν τη διατήρηση του φορτωμένου υλικού για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, τα συστήματα χορήγησης μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να παρέχουν είτε ελεγχόμενη αποδέσμευση είτε διεγερμένη απελευθέρωση του θεραπευτικού μορίου. Σε νανοκάψουλες (**Σχήμα 5γ**), τα κελύφη συνήθως γεμίζουν με ένα υδατικό ή ελαιώδες διάλυμα, το οποίο μπορεί να περιέχει υδατοδιαλυτά ή ελαιοδιαλυτά φάρμακα. Οι νανοσφαίρες (**Σχήμα 5δ**) αποτελούνται από μια στερεά μάζα, η οποία μπορεί να εμποτίζεται με ένα αντικαρκινικό παράγοντα²⁸⁻³⁰. Τα φάρμακα μπορούν να φορτωθούν σε πολυμερικά NPs με φυσική παγίδευση ή χημική σύζευξη. Τέλος, οι νανογέλες (**Σχήμα 5ε**), οι οποίες είναι πολυμερικά τρισδιάστατα δίκτυα μεγέθους νανομέτρου (<1000 nm) και ικανές να απορροφούν μεγάλες ποσότητες νερού, εμφανίζονται ως πολλά υποσχόμενοι φορείς. Αυτά τα μαλακά σωματίδια έχουν μοναδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων των ιδιοτήτων της αναστρέψιμης διόγκωσης, οι οποίες μοιάζουν με αυτά των ζωντανών κυττάρων^{31, 32}.

Τα πολυμερή που χρησιμοποιούνται σε αυτά τα συστήματα μπορούν να χωριστούν γενικά σε φυσικά και συνθετικά. Φυσικά πολυμερή που έχουν ερευνηθεί για εφαρμογές χορήγησης φαρμάκων περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες όπως αλγινικό οξύ³³, υαλουρονικό οξύ³⁴, δεξτράνη³⁵ και χιτοζάνη³⁶ καθώς και πολυπεπίδια όπως κολλαγόνο³⁷, αλβουμίνη³⁸, ελαστίνη³⁹ και ζελατίνη⁴⁰. Αυτά τα υλικά είναι ανεκτά σε βιολογικό περιβάλλον και είναι διαθέσιμα σε αφθονία στη φύση. Τα συνθετικά πολυμερή περιλαμβάνουν πολυεστέρες με βάση το λακτίδιο, το γλυκολίδιο, την καπρολακτόνη και την διοξανόνη, πολυανυδρίτες με βάση το σεβακικό και αδιπικό οξύ, καθώς και πολυαμίδια, πολυανθρακικά, πολυορθοεστέρες και πολυμερή με βάση το φωσφορικό, τα οποία έχουν αναθεωρηθεί λεπτομερώς^{41, 42}. Αυτά τα πολυμερή είναι συχνά υδρόφοβα στη φύση και είναι ιδανικά για μακροπρόθεσμη παράδοση φαρμάκων. Ένα σημαντικό μειονέκτημα των συνθετικών υλικών είναι ότι σχηματίζουν προϊόντα αποσύνθεσης σε όξινο περιβάλλον που συσσωρεύονται και προκαλούν φλεγμονή στο σημείο της εμφύτευσης.



Σχήμα 5. Κύριοι τύποι των πολυμερικών νανοσωματιδίων: α) Μικύλλια, β) Πολυμεροσώματα, γ) Νανοκάψουλες, δ) Νανοσφαίρες, ε) Νανογέλες.

1.3 Στόχευση καρκινικών κυττάρων μέσω συζευγμάτων Φαρμάκου-Πεπτιδίου

Η μέθοδος στόχευσης των καρκινικών κυττάρων που θα μας απασχολήσει είναι μέσω πεπτιδίων. Παρακάτω παρουσιάζονται πληροφορίες για τα πεπτίδια και τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν.

1.3.1 Το Πεπτίδιο ως Φορέας Φαρμάκων

Η χημειοθεραπεία είναι ακόμα ένας από τους πρωταρχικούς τρόπους για τη θεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, η χορήγηση αντικαρκινικών φαρμάκων έχει αρκετά μειονεκτήματα. Συχνά απαιτούνται υψηλές δόσεις του φαρμάκου για να υπάρξει αποτελεσματικότητα, λόγω της ταχείας αποβολής των φαρμάκων από την κυκλοφορία του σώματος. Επιπλέον, η έλλειψη εκλεκτικότητας καταλήγει γενικά σε τοξικές παρενέργειες. Επίσης, η επίκτητη ή ενδογενής ανθεκτικότητα σε πολλαπλά φάρμακα (Multi Drug Resistance-MDR) των καρκινικών κυττάρων μπορεί να περιορίσει τη χρήση της χημειοθεραπείας. Η στοχευμένη χημειοθεραπεία έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια για να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα και έχει προταθεί ως εναλλακτική λύση για τη διαφοροποίηση μεταξύ των υγιών και των καρκινικών κυττάρων.

Μία από τις διάφορες στοχευμένες χημειοθεραπευτικές προσεγγίσεις βασίζεται στη διαπίστωση ότι οι υποδοχείς αρκετών πεπτιδικών ορμονών (π.χ. ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών (GnRH), μομπεσίνη, σωματοστατίνη, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας) υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα και όργανα. Για παράδειγμα, η έκφραση του υποδοχέα GnRH (GnRHR) ταυτοποιήθηκε σε διαφορετικούς όγκους (του μαστού, των ωοθηκών, του ενδομητρίου, του προστάτη, των νεφρών, του εγκεφάλου, του παγκρέατος, σε μελανώματα και σε μη-Hodgkins λεμφώματα) με υψηλά ποσοστά σε δείγματα.

Μια σύγχρονη προσέγγιση για τη βελτίωση της συμβατικής χημειοθεραπείας είναι η άμεση στόχευση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να ενισχυθεί η επίδραση στον όγκο και να μειωθεί η περιφερειακή τοξικότητα. Αυτό γίνεται με τη σύνδεση χημειοθεραπευτικών παραγόντων σε πεπτιδικά προσδέματα που κατευθύνονται προς πρωτεΐνες/υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που εκφράζονται ή υπερεκφράζονται αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα.

Υπάρχουν πολλές σημαντικές απαιτήσεις για τη χρήση πεπτιδίων ως μόρια φορείς φαρμάκων. Πρώτον, το πεπτίδιο θα πρέπει να δεσμεύεται επιλεκτικά στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας που βρίσκονται πάνω στα κύτταρα-στόχους. Δεύτερον, ο υποδοχέας θα πρέπει να εκφράζεται μόνο στα κύτταρα στόχους ή η έκφραση θα πρέπει να είναι υψηλότερη στα κύτταρα αυτά σε σχέση με τα μη στοχευόμενα κύτταρα. Τρίτον, ο φορέας-πεπτίδιο θα πρέπει να είναι επαρκώς σταθερός στη συστηματική κυκλοφορία του αίματος ώστε για να φθάσει στα κύτταρα στόχους σε αποτελεσματική συγκέντρωση. Τέταρτον, η επιλογή της θέσης της σύζευξης επί του πεπτιδίου είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της ιδιότητας δέσμευσης στον υποδοχέα, επειδή η σύζευξη του φαρμάκου μπορεί να επιβάλει στεreoχημική παρεμπόδιση στην αναγνώριση των μορίων αυτών με τους υποδοχείς.

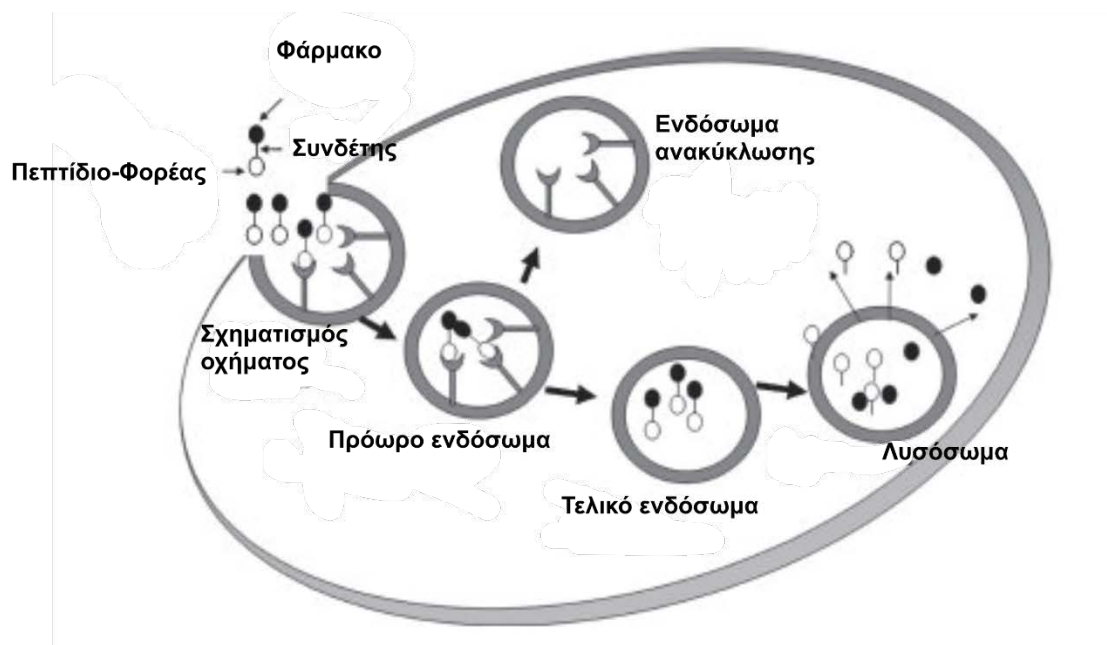
Τα πεπτίδια ως φορείς μπορούν να προσφέρουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των πρωτεϊνών, όπως ότι τα πεπτίδια είναι σχετικά εύκολο να τροποποιηθούν προς τη σύνθεση διαφόρων παραγώγων και ότι μπορούν να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες. Το σύζευγμα φαρμάκου-πεπτιδίου είναι πιο εύκολο να αναλυθεί σε σχέση με ένα σύζευγμα φαρμάκου-πρωτεΐνης. Λόγω της απουσίας της τριτοταγούς δομής των πεπτιδίων, συχνά δεν υφίστανται φυσική αποδόμηση, όπως γίνεται με τις πρωτεΐνες. Επιπλέον, ο αριθμός των μορίων του φαρμάκου και η τοποεκλεκτικότητα των συζευγμάτων τους μπορούν να ελέγχεται. Αντιθέτως, είναι δύσκολο να ελέγξουμε τον αριθμό και την τοποεκλεκτικότητα του συζευγμένου φαρμάκου σε μια πρωτεΐνη. Επειδή τα φάρμακα συχνά ενώνονται με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων (π.χ. με την αμινομάδα της λυσίνης ή το καρβοξυλικό οξύ του ασπαρτικού οξέος), τα προϊόντα σύζευξης μπορούν να αποτελούνται από διάφορους αριθμούς φαρμάκων που συνδέονται σε διάφορες θέσεις των μεμονωμένων μορίων της πρωτεΐνης. Έτσι, ο σχηματισμός των συζευγμάτων μπορεί να είναι δύσκολο να αναπαραχθούν και τα προκύπτοντα προϊόντα να είναι δύσκολο να αναλυθούν. Επιπλέον, τα προϊόντα σύζευξης πεπτιδίου-φαρμάκου μπορεί να έχουν μειωμένη ανοσογονικότητα σε σχέση με συζεύγματα πρωτεϊνών-φαρμάκων.⁴³

Σε πολλές περιπτώσεις, τα κυκλικά πεπτίδια έχουν υψηλότερη σταθερότητα και εκλεκτικότητα για τον υποδοχέα από ό,τι τα γραμμικά πεπτίδια επειδή τα κυκλικά πεπτίδια έχουν πιο περιορισμένες διαμορφώσεις. Ωστόσο, εξακολουθεί να είναι πιθανό ότι ο σχηματισμός του κυκλικού πεπτιδίου μπορεί να αναγκάσει την υιοθέτηση μιας δυσμενούς διαμόρφωσης για σύνδεση με τον υποδοχέα.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες προσδετών που χρησιμοποιούνται για υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας: οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές. Ο αγωνιστής μιμείται τον φυσικό προσδέτη (ορμόνη) και επάγει τη φυσιολογική αντίδραση του υποδοχέα, όπως θα γινόταν και στην περίπτωση της φυσικής ορμόνης. Οι διαφορές με τον φυσικό συνδέτη μπορεί να είναι μια αλλαγή στο χρόνο ημιζωής *in vivo* ή μια αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης για τον υποδοχέα. Ένα πλεονέκτημα των αγωνιστών είναι η δυνατότητα της στοχευμένης εσωτερίκευσης του φαρμάκου σε συγκεκριμένα κύτταρα, εάν ο στοχευμένος υποδοχέας έχει αυτή την ικανότητα, η οποία επιτρέπει την ενδοκυτταρική στόχευση και καθιστά δυνατή την επίτευξη υψηλής ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του φαρμάκου. Ένας ανταγωνιστής συνδέεται επίσης με τον υποδοχέα αλλά δεν προκαλεί απόκριση του υποδοχέα. Ωστόσο, καταλαμβάνοντας την θέση πρόσδεσης, ή ένα τμήμα της, ένας ανταγωνιστής μπορεί να λειτουργήσει ως αναστολέας. Χρησιμοποιείται για παράδειγμα για τη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου του μαστού, όπου οι ανταγωνιστές ταμοξιφαίνη

και ραλοξιφαίνη χρησιμοποιούνται για να μπλοκάρουν ένα μονοπάτι του οιστρογόνου που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του όγκου.

Η δημιουργία του συμπλόκου συνδέτη-υποδοχέα στη κυτταρική μεμβράνη συχνά ακολουθείται από την διαδικασία της ενδοκύττωσης, δηλαδή της εσωτερίκευσης του εξωκυτταρικού υλικού σε ενδοκυτταρικά κυστίδια (Σχήμα 6). Αυτό το κυτταρικό μονοπάτι επιτρέπει στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης την μεταφορά των εξωκυτταρικών ερεθισμάτων προς το εσωτερικό του κυττάρου και την εκκίνηση της σηματοδότησης. Τα τροποποιημένα συμπλέγματα υποδοχέα-συνδέτη ομαδοποιούνται στις εκφυρηνωμένες περιοχές της μεμβράνης επενδεδυμένες είτε από κλαθρίνη είτε από καβεολίνη-1, που προωθούν την εσωτερικοποίησή τους. Η μεταφορά στα πρώιμα ενδοσώματα συμβαίνει μέσα σε λίγα λεπτά. Λόγω του χαμηλού pH, περίπου 5.5-6.0, στο εσωτερικό του ενδοσώματος, ο συνδέτης μπορεί να απελευθερωθεί από τον υποδοχέα και να μεταφερθεί περαιτέρω στα ενδοσώματα. Τα πρόωρα ενδοσώματα είναι επίσης υπεύθυνα για τη λεγόμενη 'διαλογή του υποδοχέα', η οποία καθορίζει την τύχη του υποδοχέα. Εάν το κύτταρο χρειάζεται να απευαισθητοποιηθεί, δηλαδή, το ερέθισμα πρέπει να εξαλειφθεί, οι υποδοχείς ταξινομούνται σε τελικά ενδοσώματα και στη συνέχεια σε λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Εάν το κύτταρο χρειάζεται να ξαναευαισθητοποιηθεί, δηλαδή, να συνεχίσει να αποκρίνεται στο ερέθισμα, οι υποδοχείς οδηγούνται πίσω προς την μεμβράνη του πλάσματος απευθείας ή μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Η οδός διαλογής υποδοχέα προσδιορίζεται από τον τύπο του υποδοχέα και το επίπεδο της ενεργοποίησης.

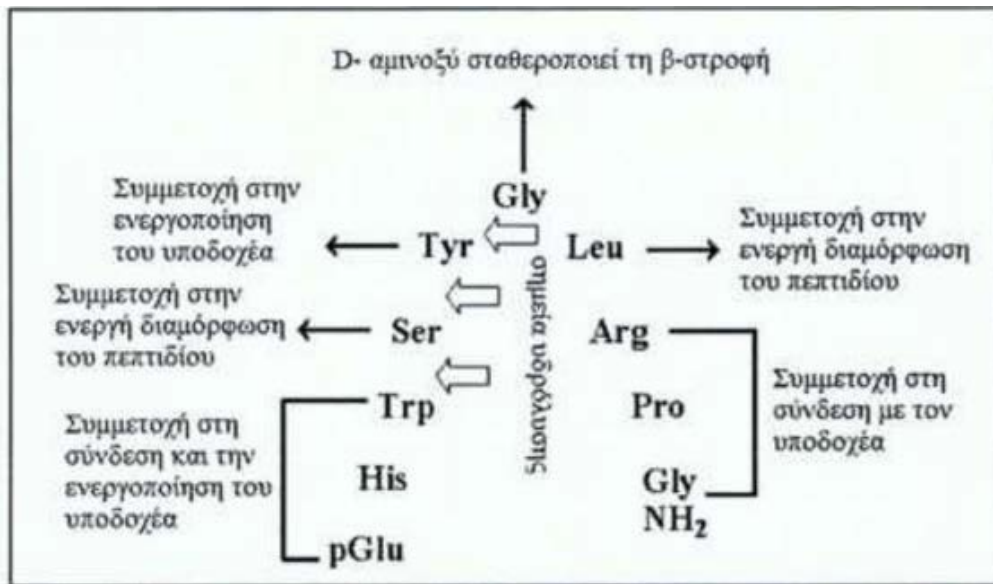


Σχήμα 6. Μηχανισμός ενδοκύττωσης μέσω υποδοχέα⁴⁴.

1.3.1.1 Πεπτιδικά ανάλογα της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) ως φορείς φαρμάκων:

Ο υποδοχέας GnRH-R (Gonadotropin Releasing Hormone-Receptor) είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων G-πρωτεΐνης με 7 χαρακτηριστικές δια-μεμβρανικές πεπτιδικές έλικες⁴⁵. Κανονικά υπάρχει στην υπόφυση αλλά η υπερέκφρασή του έχει αναφερθεί στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού και σε άλλες μορφές καρκίνου⁴⁶ και συχνά συσχετίζεται με φτωχή πρόγνωση⁴⁷. Ο κύριος προσδέτης για αυτόν τον υποδοχέα είναι η ορμόνη GnRH η οποία κατά τη δέσμευση της μεταδίδει σήματα από τον υποδοχέα GnRH-R στον πυρήνα μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C, με ρύθμιση της αναπαραγωγής⁴⁸. Το GnRH είναι ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από δεκα αμινοξέα (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) το οποίο ταυτοποιήθηκε το 1971 από τους Schally A.V. και Guillemin R.C.L (Nobel Ιατρικής και Φυσιολογίας, 1977).

Ζωτικής σημασίας αμινοξέα της GnRH είναι αυτά που βρίσκονται στις θέσεις 1, 2, 3, 6 και 10. Η θέση 6 παίρνει μέρος στην ενζυμική διάσπαση, οι θέσεις 2 και 3 στην απελευθέρωση γοναδοτροπινών και οι θέσεις 1, 6 και 10 είναι σημαντικές για την τρισδιάστατη δομή⁴⁹. Τα αμινοξέα στις θέσεις 1, 2 και 3 είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση και την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ενώ τα αμινοξέα στις θέσεις 8, 9 και 10 βοηθούν μόνο στη σύνδεση με τον υποδοχέα⁵⁰ (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Ο ρόλος των αμινοξέων στη GnRH των θηλαστικών. Υποκατάσταση της Gly στη θέση 6 με D-αμινοξύ σταθεροποιεί τη β-στροφή και αυξάνει τη συγγένεια δέσμευσης με τον υποδοχέα. Το πεπτίδιο της GnRH μπορεί να υδρολύσει τους εξής δεσμούς: Trp³-Ser⁴, Ser⁴-Tyr⁵, Tyr⁵-Gly⁶

51

Αν αντικατασταθεί η Gly⁶ από ένα D-αμινοξύ σταθεροποιείται η β-στροφή αφού είναι επιθυμητή λόγω στερεοχημείας του υποδοχέα, ενώ προσφέρει στο μόριο μεγαλύτερη σταθερότητα

στην ενζυμική διάσπαση με αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του. Επομένως, η υποκατάσταση του 6^{ου} αμινοξέος γλυκίνης με D-Lys, σταθεροποιεί την αναδιπλωμένη διαμόρφωση και αυξάνει τη συγγένεια δέσμευσης του πεπτιδίου, ενώ επίσης μειώνει την μεταβολική διάσπαση του πεπτιδίου.

Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών είναι ορμόνη που διεγείρει την έκκριση γοναδοτροπινών, παράγεται στον υποθάλαμο και ρυθμίζει την γαμετογένεση και την στεροειδογένεση. Η GnRH συνδέεται με υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια των γοναδοτρόπων κυττάρων της πρόσθιας υπόφυσης και διεγείρει την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών. Η GnRH παράγεται κατά ώσεις κάθε 30-120 λεπτά. Η ασυνεχής απελευθέρωση της GnRH είναι βασική για τη σύνθεση και απελευθέρωση των γοναδοτροπινών. Η συνεχής χορήγηση GnRH προκαλεί απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης και καταστέλλει την έκκριση των γοναδοτροπινών. Η απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της GnRH αποτελεί τη βάση της κλινικής εφαρμογής των αναλόγων της GnRH, τα οποία παρουσιάζουν μακρά διάρκεια δράσης στους υποδοχείς. Οι υποδοχείς της GnRH δρουν μέσω του τριμοριακού συζεύγματος G πρωτεϊνών (Gq/11, Gs και Gi). Η Gq/11 πρωτεΐνη διεγείρει το σύστημα φωσφολιπάσης Cβ – τριφωσφορικής ινσιτόλης – Ca²⁺ και προκαλεί τη σύνθεση και την έκκριση της LH (Luteinizing Hormone) και της FSH (Follicle-Stimulating Hormone). Η διέγερση των υποδοχέων της GnRH αυξάνει και την δραστηριότητα της αδενυλοκυκλάσης αλλά το κυκλικό AMP δεν παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση της GnRH.

Εκτός από τη διέγερση των γοναδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης η GnRH παρουσιάζει επίσης ποικιλία δράσεων σε άλλα κύτταρα της υπόφυσης ή σε άλλους ιστούς όπως α) νευροενδοκρινική δράση στα σωματοτρόπα κύτταρα: απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης σε ορισμένα είδη ψαριών, β) αυτοκρινική δράση στους νευρώνες GnRH, στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, και στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, του προστάτη, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, της υπόφυσης και του παγκρέατος γ) νευροδιαβιβαστική /νευρορρυθμιστική δράση στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα.

Ο GnRH-R έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές για στόχευση φαρμάκων⁵²⁻⁵⁵. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ενός κυτταροτοξικού αναλόγου που στοχεύει τον GnRH-R είναι το AN-152, το σύζευγμα ενός μορίου του αναλόγου του GnRH ([D-Lys]⁶-GnRH), που συνδέεται με την Δοξορουβικίνη (Doxorubicin)⁵⁶. Άλλα παραδείγματα μορίων που συνδέονται με το GnRH για στοχευμένη παράδοση περιλαμβάνουν την Δαουνορουβικίνη (Daunorubicin)⁵⁷, Κουρκουμίνη (Curcumin)⁵⁸ και Δοσεταξέλη (Docetaxel)⁵⁹. Να σημειωθεί πώς το AN-152 έχει αξιολογηθεί στη φάση I και φάση II κλινικών μελετών σε ασθενείς αποδεικνύοντας την αντικαρκινική του δράση με μόνο μέτριες παρενέργειες⁶⁰.

1.3.1.2 Πεπτιδία αγωνιστές του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) ως φορείς φαρμάκου:

Ομοίως, ένας πολλά υποσχόμενος στόχος για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Αυξημένα επίπεδα και μεταλλάξεις

του EGFR έχουν ταυτοποιηθεί ως κοινά στοιχεία ανάμεσα σε πολλούς τύπους καρκίνου. Αν και ο EGFR δεν είναι συγκεκριμένος για κάποιο όγκο, συχνά υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνων και έτσι αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό στόχο για διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου⁶¹⁻⁶³. Η υπερέκφραση του EGFR έχει βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων όγκων επιθηλιακής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC), του μαστού, της κεφαλής και του λαιμού (SCCHN), του παχέος εντέρου, του οισοφάγου, του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, των νεφρών, του παγκρέατος και των ωοθηκών⁶⁴.

Ο EGFR ως καρκινικός στόχος, όπως αναφέρθηκε, συμβάλλει στην διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου. Οι αυξητικοί παράγοντες ανήκουν σε μια οικογένεια των κυτταρικών εκκρινόμενων πολυπεπτιδίων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στη μετανάστευση αυτών. Κατά την σύνδεση σε ένα διαμεμβρανικό υποδοχέα η επίδραση του αυξητικού παράγοντα ενεργοποιείται. Μια σειρά γεγονότων ενδοκυτταρικής σηματοδότησης πραγματοποιείται, οδηγώντας σε αλλαγές στο επίπεδο της μεταγραφής. Με τον τρόπο αυτό, οι αυξητικοί παράγοντες αναμεταδίδουν πληροφορίες που παρέχονται από τον περιβάλλοντα χώρο. Το αποτέλεσμα ενός δεδομένου αυξητικού παράγοντα είναι περιορισμένο σε χρόνο και είναι συγκεκριμένο σε κάθε κύτταρο⁶¹. Ένας από τους πρώτους αυξητικούς παράγοντες που ανακαλύφθηκε ήταν ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), που βρέθηκε από τον Stanley Cohen (Βραβείο Νόμπελ Ιατρικής, 1986)⁶³. Στα μέσα της δεκαετίας του εβδομήντα, μεμβρανικός υποδοχέας στον οποίο δεσμεύεται ο EGF ταυτοποιήθηκε και ονομάστηκε EGFR. Μετά τη δέσμευση του EGF ξεκινάει ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ή / και η διαφοροποίηση⁶⁵. Ο EGFR έχει, εκτός από τον EGF, διάφορους γνωστούς προσδέτες και είναι ένας υποδοχέας από τους στενά συνδεδεμένους με κινάσες τυροσίνης στην υποοικογένεια ErbB⁶¹.

Ο υποδοχέας του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR / ERBB) οικογένεια των κινάσων τυροσίνης υποδοχέα (RTKs) αποτελείται από τέσσερα μέλη: HER1 (EGFR, ErbB1), HER2 (neu, ErbB2), HER3 (ErbB3), και HER4 (ErbB4). Η υπερέκφραση ή μεταλλάξεις αυτών των πρωτεϊνών συσχετίζονται με πολλούς τύπους ανθρώπινων καρκίνων. Εκτός του HER2, οι άλλοι τρεις υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιηθούν με το EGF. Παρά το γεγονός ότι στερείται ενός τομέα δέσμευσης προσδέματος, ο HER2 μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τα άλλα τρία μέλη της οικογένειας HER (1, 3 και 4). Μετά το διμερισμό, η κυτταροπλασματική περιοχή της κινάσης τυροσίνης ενεργοποιεί πολλά σημαντικά ογκογονίδια και οδηγεί σε σηματοδότηση, προκαλώντας διέγερση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, εισβολή και αντι-απόπτωση.

Ωστόσο, ο φυσικός προσδέτης, EGF, έχει ισχυρή μιτογόνο (δυνατότητα πρόκλησης κυτταρικών διαιρέσεων) και νεο-αγγειογενετική δραστηριότητα και ως εκ τούτου, ήταν αναγκαίο να αναζητηθούν νέα ανάλογα που τον ανταγωνίζονται ως προς τη εκλεκτική σύνδεση του στον EGFR. Έτσι, ανακαλύφθηκαν πεπτιδία, τα οποία έχουν τα πλεονεκτήματα της εύκολης διαχυτικής ικανότητας, της χαμηλής ανοσογονικότητας και της εύκολης ενσωμάτωσης σε ορισμένους φορείς απελευθέρωσης γονιδίου⁶⁶, τα οποία συμβάλλουν στην επιλεκτική παράδοση ραδιονουκλιδίου, κυτοκινών, χημικών φαρμάκων και θεραπευτικών γονιδίων σε όγκους⁶⁷⁻⁶⁹. Πρόσφατα, αρκετές μελέτες ανέφεραν την επιτυχή ανάπτυξη τέτοιων πεπτιδίων⁷⁰⁻⁷².

Ένα τέτοιο πεπτίδιο, που είναι γνωστό με την κωδική ονομασία GE11, αποτελεί έναν προσδέτη προς τον υποδοχέα EGFR. Το πεπτίδιο αυτό έχει την αμινοξική ακολουθία YHWYGYTPQNVI-COOH. Με πειράματα ανταγωνιστικής δέσμησης, αποδείχθηκε ότι το GE11 προσδένεται εκλεκτικά στον EGFR. Η πρόσδεση αναστέλλεται από την παρουσία του EGF, που δείχνει ότι η θέση δέσμησης του GE11 και EGF είναι εν μέρει επικαλυπτόμενες. Το GE11 δείχθηκε ότι έχει πολύ χαμηλότερη μιτογονική δραστικότητα από το EGF και πολλά άλλα ανάλογα γνωστών πεπτιδίων και προκάλεσε μια αύξηση της ανάπτυξης κατά 10% σε σύγκριση με 50% για το EGF⁶¹.

Χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες πεπτιδίων τυχαίων φάγων, αναπτύχθηκε το πεπτίδιο HER2-BP1 (HER2R) με αλληλουχία NH₂-YWPSVTL-CO₂H⁷³, το πεπτίδιο HER2-BP1 (HER2) με αλληλουχία NH₂-LTVSPWY-NH₂ και το πεπτίδιο HER1-BP1 (HER1) με αλληλουχία NH₂-CMYIEALDKYAC-CO₂H⁷⁴, των οποίων η σύνδεση σε υποδοχείς που εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα συνδέονται με επαγωγή της απόπτωσης και μπορούν αποτελεσματικά να στοχεύσουν τα καρκινικά κύτταρα.

1.3.2 Κυτταροτοξικά φάρμακα

Κυτταροτοξικά φάρμακα όπως η γεμισταβίνη (GEM), δοξορουβικίνη (DOX), μεθοτρεξάτη (MTX), καμπτοθεκίνη (CPT) κλπ, στις περισσότερες των περιπτώσεων δεν έχουν τη δυνατότητα να εκμεταλλευτούν την πλήρη θεραπευτική αποτελεσματικότητα τους επειδή στερούνται εκλεκτικότητας για τον καρκίνο απέναντι στα φυσιολογικά κύτταρα. Τέτοια μόρια εισέρχονται στο κύτταρο βάσει διαφορετικών μηχανισμών (η γεμισταβίνη και η μεθοτρεξάτη εισέρχονται στα κύτταρα με μεταφορείς, η δοξορουβικίνη και η καμπτοθεκίνη με παθητική διάχυση) και ενεργοποιούν την κυτταροτοξική δράση τους. Αυτό που είναι σημαντικό να σημειωθεί είναι ότι λόγω της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας ή της χαμηλής αποτελεσματικότητας, οι ασθενείς πρέπει να λαμβάνουν υψηλές δόσεις των φαρμάκων και αυτή η υπερδοσολογία μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα στα φάρμακα ή αυξημένες παρενέργειες.

Έτσι, η σύζευξη αυτών των φαρμάκων σε φορείς που θα μπορούσαν να τους κατευθύνουν στο συγκεκριμένο πληθυσμό των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε να οδηγήσει σε μικρότερη παρενέργεια (αφού θα απαιτούνται χαμηλότερες δόσεις), όπως επίσης και στην ενίσχυση της φαρμακοκινητικής και της θεραπευτικής δράσης. Αυτό που είναι σημαντικό σε τέτοια προϊόντα σύζευξης είναι ο πολύ προσεκτικός σχεδιασμός των συνδέτων που συνδέουν το φάρμακο με το όχημα στόχευσης (φορέας-πεπτίδιο). Αυτή η σύζευξη πρέπει να γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε η ικανότητα του μεταφορέα να συνδέεται στο συγκεκριμένο βιο-υποδοχέα δεν διαταράσσεται.

Εάν η σύζευξη πρέπει να γίνει σε δραστική λειτουργική ομάδα, ένα διασπάσιμο τμήμα (συνδέτης) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συνδέσει το φάρμακο στο πεπτίδιο, έτσι ώστε το ελεύθερο φάρμακο να μπορεί να αποδεσμευθεί από τον φορέα. Επιπλέον, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στον τύπο του δεσμού μεταξύ του μεταφορέα (πεπτίδιο) και του φαρμάκου αφού το φάρμακο πρέπει να απελευθερώνεται όταν θα φθάσει τη θέση-στόχο / κύτταρο έτσι ώστε να ασκήσει την κυτταροτοξική δράση του. Ένα πιθανό μειονέκτημα της χρήσης ενός ασταθούς συνδέτη είναι ότι το φάρμακο μπορεί να απελευθερωθεί πρόωρα (εκτοπική αποδέσμευση).

1.4 Χημεία συζεύγματος Φαρμάκου-Πεπτιδίου

Επί του παρόντος υπάρχει διαθέσιμη μεγάλη ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων και εγκεκριμένων φαρμάκων που εξελίχθηκαν λόγω των πολυάριθμων ερευνών φαρμακευτικών εταιριών και πανεπιστημίων. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι κατά τη διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από αυτές τις ενώσεις των οποίων η ανάπτυξη σταμάτησε κυρίως λόγω πολλών παρενεργειών και έλλειψης στόχευσης προς τον καρκίνο. Υπάρχουν επίσης πολλά παραδείγματα εγκεκριμένων φαρμάκων που σχετίζονται με τεράστιο αναπτυξιακό κόστος.

Δεδομένου ότι πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν υψηλή τοξικότητα και έχουν ήδη δαπανηθεί αρκετά χρήματα, αξίζει να σχοληθούμε με αυτά και να τα βελτιώσουμε και να ξεπεράσουμε όλα αυτά τα μειονεκτήματα. Τα πεπτίδια ως φορείς φαρμάκων, παράγοντες διείσδυσης των κυττάρων και οχήματα που στοχεύουν κύτταρα έχουν δει μια τεράστια εφαρμογή πρόσφατα. Ένα πολύ δύσκολο θέμα όμως είναι η ανάπτυξη των κατάλληλων χημικών οντοτήτων που θα λειτουργήσουν ως η αλυσίδα σύζευξης μεταξύ του φαρμάκου και του πεπτιδίου. Υπάρχουν πολλά χαρακτηριστικά που θα πρέπει να πληρούνται για την παρούσα σύνδεση ώστε να επιτραπεί στο σύζευγμα φαρμάκου-πεπτιδίου να εκπληρώσει τις επιθυμητές ιδιότητες, και γι' αυτό το λόγο απαιτείται προσεκτικός σχεδιασμός.

Έτσι, θα παρουσιάσουμε ποικίλους συνδέτες που χρησιμοποιούνται σε συζεύγματα πεπτιδίου-φαρμάκου, θα περιγράψουμε τον μηχανισμό της λειτουργίας τους και θα παρουσιάσουμε τις πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα, όπως επίσης θα παρέχουμε βασικές οδηγίες για την επιλογή κατάλληλου συνδέτη βασιζόμενοι στις λειτουργικές ομάδες που φέρει το φάρμακο.

Διαφορετικές προσεγγίσεις είναι διαθέσιμες για την σύζευξη των μεταφορέων-πεπτιδίων με κυτταροτοξικά φάρμακα. Η σύζευξη μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση συγκεκριμένων συνδετών ή σε ορισμένες περιπτώσεις μέσω της χρησιμοποίησης συνδετών που δεν ανιχνεύονται μετά την αποκοπή τους. Οι συνδέτες χρησιμοποιούνται για να αποφευχθεί η ανάπτυξη ισχυρών στερεοχημικών παρεμποδίσεων μεταξύ του πεπτιδίου και του φαρμάκου ενώ ταυτόχρονα πρέπει να διατηρηθεί το μικροπεριβάλλον του πεπτιδίου που απαιτείται για τη δέσμευση/αναγνώριση στον υποδοχέα. Ο τύπος του χημικού δεσμού που χρησιμοποιείται για τη βιοσύζευξη επηρεάζει άμεσα τη σταθερότητα των βιοσυζευγμάτων και, κατά συνέπεια, επηρεάζει την τη χωροχρονική χορήγηση του φαρμάκου. Οι χημικοί δεσμοί που χρησιμοποιούνται για να σχηματίσουν τα προϊόντα σύζευξης μπορεί να είναι είτε ενός τύπου (δηλ καρβοξυλικός εστέρας) ή ένας συνδυασμός (δηλ δεσμός εστέρα και δεσμός οξίμης).

1.4.1 Αμιδικός δεσμός

Η σύζευξη φαρμάκου-πεπτιδίου μέσω αμιδικού δεσμού πραγματοποιείται συνήθως συνδέοντας το καρβοξυλικό οξύ του φαρμάκου (ή του συνδέτη που είναι συζευγμένος με το

φάρμακο) και την πρωτοταγή αμίνη του πεπτιδίου (ή του συνδέτη του πεπτιδίου). Η χημεία του σχηματισμού αμιδικού δεσμού είναι απλή και ο δεσμός έχει σχετικά υψηλή χημική σταθερότητα. Επειδή η ενζυματική διάσπαση του αμιδικού δεσμού μεταξύ του φαρμάκου και του πεπτιδίου μπορεί να είναι αργή, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα το σύζευγμα να φθάσει στην περιοχή-στόχο με μικρές απώλειες. Εάν το φάρμακο είναι συνδεδεμένο μέσω λειτουργικής ομάδας που είναι απαραίτητη για τη δράση του, τότε μια διασπασίμη ομάδα μπορεί να ενσωματωθεί μεταξύ του φαρμάκου και του πεπτιδίου, με την οποία το φάρμακο μπορεί να απελευθερωθεί από το πεπτιδιοφορέα με αλλαγή του pH ή ενζυματική διάσπαση (π.χ. λόγω δράση εστεράσης). Για τον σχηματισμό δεσμού αμιδίου, το καρβοξυλικό οξύ στο συνδέτη, πεπτίδιο, ή στο φάρμακο μπορεί να ενεργοποιηθεί με διάφορα αντιδραστήρια σύζευξης όπως HBTU, TBTU, HATU, PyBOP, BOP, DIC, DCC, EDC κ.α με ή χωρίς την προσθήκη N-υδροξυβενζοτριζολίου (HOBT) που επιταχύνει τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού και ελαχιστοποιεί την ρακεμοποίηση. Το ενεργοποιημένο καρβοξυλικό οξύ στη συνέχεια αντιδρά με την ομάδα της ελεύθερης αμίνης, συνήθως παρουσία ισχυρής βάσης [π.χ. διίσοπροπυλαιθυλαμίνης (DIPEA) ή τριαιθυλαμίνης (TEA)], σε διάφορους διαλύτες, συμπεριλαμβανομένων διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), ακετονιτρίλιο (MeCN) ή διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) για να δώσει το επιθυμητό προϊόν σύζευξης.

Η Δοξορουβικίνη (DOX) έχει συζευχθεί με διαφορετικά πεπτίδια, συμπεριλαμβανομένων cIBR [Cyclo(1,12)PenPRGGSVLVTGC]⁷⁵ και Vectocell πεπτίδια⁷⁶, ενώ ομοίως η Δαουνορουβικίνη έχει συνδεθεί με πεπτίδια προερχόμενα από ανθρώπινη καλσιτονίνη (hCT) χρησιμοποιώντας αμιδικό δεσμό⁷⁷.

Για σύζευξη με το πεπτίδιο cIBR, η DOX τροποποιήθηκε για να δώσει το σύζευγμα DOX-ημιηλεκτρικό με αντίδραση της αμινομάδας της DOX με ηλεκτρικό ανυδρίτη για να δημιουργήσει ελεύθερο καρβοξυλικό οξύ. Το ελεύθερο καρβοξυλικό οξύ DOX-ημιηλεκτρικό ενεργοποιήθηκε και αντέδρασε με το N-άκρο του πεπτιδίου cIBR για την παραγωγή του τελικού συζεύγματος DOX-cIBR. Η *in vitro* σταθερότητα του DOX-cIBR σε ανθρώπινα προμυελοκυτταρικά κύτταρα HL-60 έδειξε ότι το σύζευγμα DOX-cIBR ήταν σταθερό; μόνο το 15% αποικοδομήθηκε κατά τη διάρκεια 24h, κάτι που υποδεικνύει την υψηλή σταθερότητα της σύζευξης με αμιδικό δεσμό⁷⁵.

Παρόμοια προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε για την σύζευξη της Δοξορουβικίνης με τα πεπτίδια Vectocell (δηλαδή CVKRGLKLRHVRPRVTRMDV και SRRARRSPRHLGSGC) με σχηματισμό αμιδικού δεσμού με το καρβοξυλικό οξύ της ομάδας Μαλεϊμιδοβουτυρικό οξύ⁷⁶.

Η Δαουνορουβικίνη έχει συζευχθεί σε ανθρώπινη καλσιτονίνη [hCT(9-32); CLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP-NH₂] μέσω ενός μαλεϊμίδο-βενζοϊκό οξύ συνδέτη. Η αμινομάδα της Δαουνορουβικίνης σχηματίζει αμιδικό δεσμό με την καρβοξυλομάδα του συνδέτη μαλεϊμιδο-βενζοϊκού οξέος. Στη συνέχεια, η πυρηνόφιλη προσβολή του διπλού δεσμού του μαλεϊμιδίου από την θειόλη του υπολείμματος Cys1 του hCT (9-32) πεπτιδίου, έδωσε το επιθυμητό σύζευγμα⁷⁷.

1.4.2 Εστερικός δεσμός καρβοξυλικού οξέος

Ο δεσμός εστέρα χρησιμοποιείται συνήθως για τη σύζευξη του φαρμάκου με το πεπτίδιο επειδή μπορεί να υδρολύεται χημικά ή ενζυματικά (εστεράση) και να απελευθερώνει το φάρμακο. Ωστόσο, λόγω της αστάθειας του δεσμού εστέρα, το φάρμακο μπορεί να απελευθερωθεί πριν φτάσει στους ιστούς στόχους. Διαφορετικά ανάλογα του πεπτιδίου luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) συζεύχθηκαν μέσω ενός δεσμού εστέρα με διάφορους κυτταροτοξικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της Δοξορουβικίνης και των παραγώγων της. Για τη σύζευξη της Δοξορουβικίνης με το πεπτίδιο LHRH (GlrHWSYkLRPG-NH₂), ο C-14 της Δοξορουβικίνης τροποποιήθηκε με γλουταρικό εστέρα και το άλλο καρβοξυλικό οξύ του γλουταρικού συνδέθηκε με την αμινομάδα της D-Lys της πλευρικής αλυσίδας του πεπτιδίου LHRH για να δώσει σύζευγμα DOX-LHRH^{53, 56}. Το DOX-LHRH ήταν αρκετά σταθερό σε βιολογικά μέσα και διατηρεί την κυτταροτοξική ιδιότητα της Δοξορουβικίνης, ενώ διατηρήθηκε και η συγγένεια δέσμευσης του LHRH στους αντίστοιχους υποδοχείς στην υπόφυση^{78, 79}.

Ομοίως, η θέση C14 της Δοξορουβικίνης συζεύχθηκε μέσω ενός γλουταρικού οξέος ως συνδέτης στο κυκλικό πεπτίδιο CNGRC, χρησιμοποιώντας ένα δεσμό εστέρα για τη στόχευση του υποδοχέα της αμινοπεπτιδάσης N / CD13 επί της επιφάνειας του κυττάρου⁸⁰. Σε αυτήν την περίπτωση, η σταθερότητα του συζυγούς DOX-CNGRC εξαρτάται από την μήτρα επώασης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η DOX μπορεί να κυκλοφορήσει πριν φτάσει στον ιστό-στόχο. Ετσι, είναι αναγκαίο να αξιολογηθεί η σταθερότητα του εστέρα στο φάρμακο-πεπτίδιο σε διαφορετικές βιολογικές μήτρες για να εξασφαλιστεί ότι το σύζευγμα θα φθάσει στον ιστό στόχο πριν από την αποδέσμευση του φαρμάκου.

1.4.3 Δεσμός υδραζόνης

Ένας δεσμός υδραζόνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας δεσμός ασταθής σε όξινες συνθήκες για την απελευθέρωση του φαρμάκου από το προϊόν σύζευξης. Σημειώνεται πως στο εξωκυττάριο περιβάλλον του όγκου και στα λυσοσώματα επικρατεί μειωμένο pH. Η Δαουνορουβικίνη (DNR) και η Δοξορουβικίνη (DOX) με μία κετόνη ως λειτουργική ομάδα στον C-13 έχουν παραγωγοποιηθεί με συνδέτες μαλεϊμιδο-υδραζίνης (π.χ. mmaleimidobenzoic acid hydrazine ή p-maleimidophenylacetic acid hydrazine) για να δώσει υδράζιδο ενδιάμεσα. Αυτά τα μαλεϊμιδο ενδιάμεσα αντιδρούν με την ομάδαθειόλης του υπολείμματος Cys με το νευροπεπτίδιο Y (YPSKPDNPGEDAPACDLARYYSALRHYINLITRQRY-NH₂ ή NPY) για να δώσει τα αντίστοιχα συζεύγματα^{81, 82}. Η παρουσία ενός αρωματικού δακτυλίου επί του συνδέτη παρέχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει την σταθερότητα της υδραζόνης⁸¹. Λόγω αυτού του συνδέτη υδραζόνης, απελευθερώνεται λιγότερο από το 10% του ελεύθερου φαρμάκου σε pH 7,4 σε σύγκριση με 35-40% σε pH 5.0 σε μια περίοδο 24 h. Αντίθετα, η σύνδεση με αμιδικό δεσμό έδειξε πολύ μικρή απελευθέρωση του φαρμάκου σε αυτές τις τιμές pH⁸³. Χρησιμοποιώντας το υδραζιδικό δεσμό, η DOX έχει επίσης συζευχθεί με θερμικά αποκρινόμενη ελασίνη -πολυπεπτίδιο (ELP) σε μια προσπάθεια να αξιοποιήσουν το φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR)⁸⁴.

1.4.4 Ενζυμικά διασπώμενος δεσμός

Για την ενζυμική απελευθέρωση του φαρμάκου, μια συγκεκριμένη πεπτιδική αλληλουχία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διασπώσιμος συνδέτης μεταξύ φαρμάκου και φορέα. Μία απ' τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αλληλουχίες-συνδέτες είναι ένα ειδικό πεπτιδικό υπόστρωμα για το prostate-specific-antigen (PSA), ένα ένζυμο πρωτεάσης σερίνης που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα από όγκους. Το PSA είναι γνωστό ότι μεσολαβεί για την υδρόλυση της σπερματογελίνης-I με υψηλή ειδικότητα, με διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ Gln349 και Ser350^{82, 85, 86}. Μετά από μελέτες μετάλλαξης, αρκετές πεπτιδικές αλληλουχίες ήταν ειδικά διασπώμενες από το PSA στον Gln-Ser ή Gln- Leu πεπτιδικό δεσμό. Έτσι, δύο πεπτίδια-συνδέτες (Glutaryl-Hyp-Ala-Ser-Chg-Gln-Ser-Leu-OH⁸⁶ και His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln⁸⁷ χρησιμοποιήθηκαν για να συνδέσουν την Δοξορουβικίνη και τον πεπτιδικό φορέα. Τα προϊόντα σύζευξης ήταν εξαιρετικά τοξικά λόγω της απελευθέρωσης Leu-DOX και DOX. Η Leu-DOX είχε κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών με λιγότερες παρενέργειες όπως καρδιακή τοξικότητα⁸⁸. Σημειώνεται ότι η άμεση σύζευξη της αμινομάδας της DOX στο καρβοξυλικό οξύ της Γλουταμίνης (Gln) (χωρίς υπόλειμμα Ser ή Lue στο Ο-τερματικό) απέτυχε να απελευθερώσει DOX με υδρόλυση. Προτάθηκε επίσης ότι η παρουσία του φορέα-πεπτιδίου θα μπορούσε να επηρεάσει την ειδικότητα του συνδέτη για τα πρωτεολυτικά ένζυμα.

1.4.5 Θειοαιθερικός δεσμός

Ο θειοαιθερικός δεσμός είναι χημικά σταθερός, περισσότερο απ' τον αμιδικό δεσμό και, ως εκ τούτου, η απελευθέρωση του ελεύθερου φαρμάκου παρεμποδίζεται από αυτό τον τρόπο σύζευξης. Τα πεπτίδια που περιέχουν μια ελεύθερη ομάδα θειόλης όπως τα πεπτίδια Vectocell (δηλαδή CVKRGKLRHVRPRVTRMDV και SRRARRSPRHLGSGC) έχουν συζευχθεί με φάρμακα χρησιμοποιώντας ένα δεσμό θειοαιθέρα επειδή αυτά τα πεπτίδια μετατοπίζονται κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών με έναν ενεργειακά εξαρτώμενο τρόπο. Τα Vectocell πεπτίδια συζεύχθηκαν σε Δαουνορουβικίνη (DNR) μέσω πυρηνόφιλης προσβολής με την απομάκρυνση του αλογόνου για να σχηματιστεί ο θειοαιθέρας. Αυτά τα προϊόντα σύζευξης έχουν βρεθεί ότι είναι σημαντικά λιγότερο κυτταροτοξικά από το ελεύθερο φάρμακο⁷⁶. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Πρώτον, η παρουσία του φορέα-πεπτιδίου μπορεί να αποτρέψει την αναγνώριση της DOX. Δεύτερον, ο δεσμός DOX-Vectocell είναι πολύ σταθερός. Ως εκ τούτου, η DOX δεν μπορεί να απελευθερωθεί από τον μεταφορέα. Είναι επίσης πιθανό ότι το πεπτίδιο δεν μπορεί να αφομοιωθεί αποτελεσματικά στα λυσοσώματα για να απελευθερώσει όλα τα παραδοθέντα DOX. Τρίτον, αν και η DOX δομικά εκτίθεται, το σύζευγμα μπορεί να μην είναι σε θέση να εισέλθει στον πυρήνα.

Ένας δεσμός θειοαιθέρα χρησιμοποιήθηκε για τη σύζευξη ολιγοδεοξυνουκλεοτιδίων (ODNs) με πεπτίδιο-φορέα για τη βελτίωση της κυτταρικής πρόσληψής τους. Σε αυτή την περίπτωση, τα 5-θειολο-παραγωγισιμένα φωσφοροθειοϊκά-ODNs εναντίον του πρωτοογκογονιδίου bcl-2, συζεύχθηκαν σε ένα κυκλικό ανάλογο σωματοστατίνης με μια

μαλεϊμιδική ομάδα στο N-άκρο [maleimidecyclo(2,7)-fCYwKTCT)] για να σχηματίσουν το θειοαιθερικό σύζευγμα⁸⁹.

1.4.6 Καρβαμιδικός εστερικός δεσμός

Ένας καρβαμιδικός δεσμός έχει μεγαλύτερη σταθερότητα στο πλάσμα του αίματος από έναν εστερικό δεσμό, παρέχοντας υψηλότερη πιθανότητα το σύζευγμα να φτάσει στο στόχο⁹⁰.

Η Καμπτοθεκίνη (CPT) και η Κομπρεταστατίνη (CBT) συζεύχθηκαν σε ανάλογα πεπτιδίου σωματοστατίνης χρησιμοποιώντας καρβαμιδικό δεσμό μεταξύ του φαρμάκου και του συνδέτη⁴⁴. Ο συνδέτης περιείχε ένα μια μεθυλο-αμινοαιθυλο ομάδα που συνδέθηκε με το καρβαμικό άζωτο ως μια "built-in-nucleophile assisted releasing" (BINAR) ομάδα, η οποία ενήργησε ως πυρηνόφιλο για την απελευθέρωση της Καμπτοθεκίνης. Αυτή η δευτεροταγής αμίνη του BINAR πραγματοποίησε προσβολή στον καρβονυλικό άνθρακα της καρβαμιδικής ομάδας για να σχηματίσει έναν πενταμελή δακτύλιο ουρίας στον συνδέτη. Αυτό οδήγησε στην απελευθέρωση του φαρμάκου. Στην περίπτωση αυτή, η τιμή pKa της ομάδας υδροξυλίου του φαρμάκου επηρέασε το ρυθμό απελευθέρωσης από το σύζευγμα. Για παράδειγμα, το σύζευγμα της CBT ήταν ιδιαίτερα ασταθές σε σχέση με το ανάλογο της CPT λόγω της pKa της αλκοόλης σε κάθε φάρμακο. Το προϊόν σύζευξης CPT ήταν ιδιαίτερα κυτταροτοξικό στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος IMR32 που έχει υψηλή έκφραση του υποδοχέα της σωματοστατίνης και το σύζευγμα είχε χρόνο ημιζωής περίπου 123 ώρες και 18 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ορού αρουραίου, αντίστοιχα. Τροποποίηση του μήκους του συνδέτη επηρέασε την σταθερότητα του προϊόντος σύζευξης.

Αν και αυτή η προσέγγιση έχει προοπτικές για την επιλεκτική παράδοση με ρυθμιζόμενο ρυθμό απελευθέρωσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για τα φάρμακα που περιέχουν ελεύθερο υδροξύλιο^{90,91}.

1.4.7 Δεσμός οξίμης

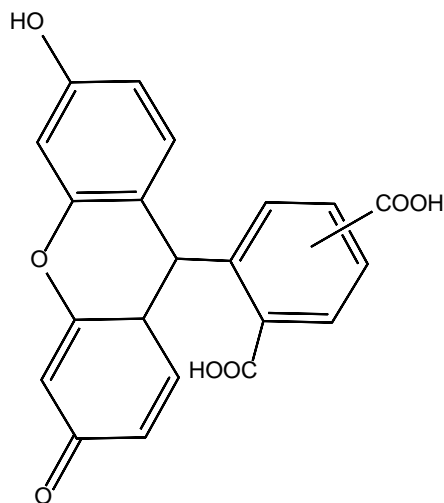
Ο δεσμός οξίμης θεωρείται επίσης σταθερός δεσμός (πιο σταθερός από τον καρβοξυλικό εστέρα) για βιοσύζευξη. Ο σχηματισμός ομολόγων οξίμης έχει σημασία σε βιοχημικές συζεύξεις λόγω της χημειοεπιλεκτικότητας του, της σταθερότητας και της συμβατότητας του με άλλες ομάδες. Η αντίδραση μιας κετόνης ή μιας αλδεϋδης με αμινοξύ ομάδα σχηματίζει μια ιμίνη που ονομάζεται οξίμη (η αντίδραση με κετόνη δίνει κετοξίμη ενώ η αντίδραση με αλδεϋδη δίνει αλδοξίμη). Ακόμα κι αν ο σχηματισμός της οξίμης είναι πιο αργός σε σχέση με την υδραζόνη, η υδρολυτική σταθερότητα της οξίμης την καθιστά προτιμότερη επιλογή από την υδραζόνη⁹². Το αμινοξύ (-O-NH₂) θεωρείται ισχυρότερο πυρηνόφιλο απ' τις αμίνες και λόγω της χαμηλής βασικότητάς του, επιτρέπει το σχηματισμό πιο σταθερών ιμινών (οξίμη)⁹³. Η ενισχυμένη χημειοεκλεκτικότητας του σχηματισμού ομολόγων οξίμης παρέχει μεγάλες ευκαιρίες για ορθογώνια σύζευξη στη βιοσύζευξη. Τα βασικά χαρακτηριστικά του δεσμού οξίμης είναι: 1) η

ευκολία της σύνθεσης λόγω της υψηλής χημειοεκλεκτικότητας, επομένως αποφεύγονται τα επίπονα στάδια προστασίας /αποπροστασίας,⁹⁴ 2) η ταχύτητα σχηματισμού της οξίμης και 3) η υψηλή χημική σταθερότητα στην φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος.

1.5 Επισήμανση

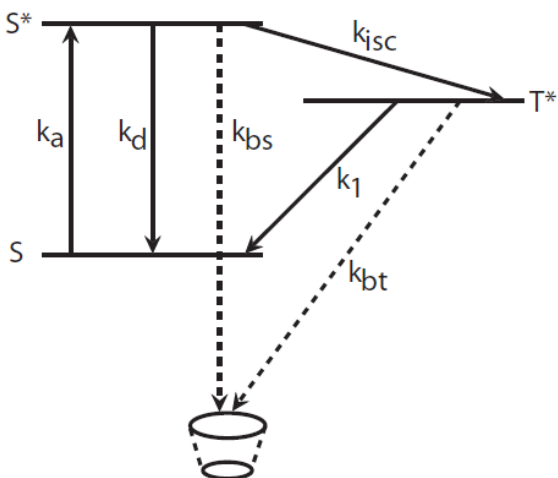
Ένας επισημασμένος προσδέτης με μια φθορίζουσα ένωση μας επιτρέπει την ανίχνευση του με μικροσκοπία φθορισμού, κυτταρομετρία ροής, συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) κλπ. Δείγματα κυττάρων ή μελέτες σε απομονωμένους υποδοχείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαλήθευση της συγγένειας του προσδέτη προς το στόχο *in vitro*. Μια άλλη επιλογή είναι η δοκιμή ενός δείγματος ιστού από έναν ασθενή για τον στόχο του καρκίνου. Με διέγερση του φθοροφόρου, κύτταρα ή περιοχές με υψηλή συγκέντρωση του προσδέματος μπορούν να ανιχνευθούν/απεικονιστούν.

Τα παράγωγα φλουορεσκεΐνης χρησιμοποιούνται συχνά σαν φθοροφόρα για την επισήμανση των πεπτιδίων, λόγω των ευνοϊκών ιδιοτήτων φθορισμού και του σχετικά χαμηλού κόστους. Μεταξύ των πολλών παραγώγων, η 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (**Σχήμα 8**) χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή υδrolυτικώς σταθερών επισημασμένων πεπτιδίων και συζεύξεις πρωτεϊνών⁹⁵. Η επισήμανση πεπτιδίων με καρβοξυφλουοροσκεΐνη μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας πεπτίδιο σε σύνθεση στερεάς φάσης, καθώς μία μόνο δραστική καρβοξυλομάδα είναι παρούσα υπό αυτές τις συνθήκες. Ένα πιθανό μειονέκτημα της καρβοξυφλουοροσκεΐνης είναι η ανάγκη για ενεργοποίηση πριν από την σύζευξη. Συχνά χρησιμοποιούνται ενεργοποιημένα παράγωγα της φλουορεσκεΐνης όπως FITC (Fluorescein Isothiocyanate) ή καρβοξυφλουορεσκεΐνη-N-ηλεκτριμιδυλεστέρας, ωστόσο, αυτά είναι ακριβά σε σύγκριση με την 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (CF).⁹⁵

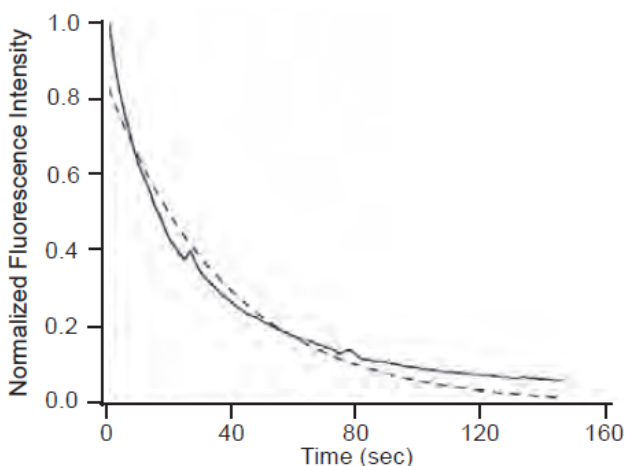


Σχήμα 8. Δομή της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης.

Ένα πιθανό πρόβλημα με την φλουροεσκεΐνη και τα παράγωγά της είναι ο φωτοαποχρωματισμός, η σχετικά υψηλή απώλεια του φθοροφόρου από κάθε κύκλο διέγερσης και εκπομπής, η οποία μπορεί να είναι ένα σοβαρό πρόβλημα κατά τη διεξαγωγή μικροσκοπίας φθορισμού και παρόμοιων τεχνικών (Σχήμα 9). Κατά την διέγερση, όταν το μόριο είναι σε διεγερμένη κατάσταση T^* ή S^* , ο φωτοαποχρωματισμός μπορεί να συμβεί. Το αποτέλεσμα είναι αθροιστικό σε συνάρτηση με τον χρόνο σε μια εκθετική αποσύνθεση και είναι ανάλογη με την ένταση της διέγερσης (Σχήμα 10).⁹⁶



Σχήμα 9. Απλοποιημένο διάγραμμα ενέργειας Jablonski. Το φθοροφόρο απορροφά την ενέργεια των φωτονίων (k_a), διεγείρεται κατά την έξοδο του από την ενεργειακή κατάσταση S^* και επιστρέφει στη βασική κατάσταση S από ένα φθορίζον ή μη φθορίζον μονοπάτι (εσωτερική μετατροπή) (k_d), ή υφίσταται διασταύρωση συστημάτων (k_{isc}) σε μια τριπλη διεγερμένη κατάσταση T^* . Από την T^* το σύστημα μπορεί να χαλαρώσει στην S με εκπεμπόμενο φωσφορισμό (k_1). Ο φωτοαποχρωματισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί από την S^* (k_{bs}) ή την T^* (k_{bt}), και καθιστά το μόριο ανήμπορο να εκπέμψει.⁹⁶



Σχήμα 10. Φωτοαποχρωματισμός φλουροεσκεΐνης σε μικροσκόπιο φθορισμού. Μια λάμπα 100

W Hg χρησιμοποιήθηκε με διέγερση στα 450-490 nm με ολοκλήρωση 0,7 s. Σφαίρες με πικάλυση φλουορεσκεΐνης με διάμετρο 9 μm χρησιμοποιήθηκαν, αποδίδοντας μια συγκέντρωση φλουορεσκεΐνης περίπου 10 mM σε PBS, pH 7.6.⁹⁶

1.6 Πεπτιδική σύνθεση

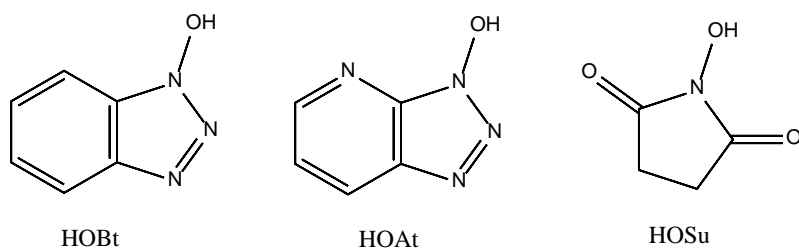
1.6.1 Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού

Ο σχηματισμός αμιδικού δεσμού περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του N^α-προστατευμένου αμινοξέος, ώστε να ευνοείται η πυρηνόφιλη προσβολή της από την αμινομάδα του αμινο-συστατικού. Αυτό επιτυγχάνεται με τα αντιδραστήρια ενεργοποίησης ή σύζευξης της καρβοξυλομάδας. Η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας θεωρείται απαραίτητη αφού σε θερμοκρασία δωματίου τα καρβοξυλικά οξέα σχηματίζουν άλατα με την αμινομάδα, η μετατροπή των οποίων σε αμίδια απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες που προκαλούν προβλήματα σταθερότητας σε πεπτιδικά μόρια. Η επιλογή των αντιδραστηρίων ενεργοποίησης γίνεται με βάση την ταχύτητα σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού, την απόδοση, την απουσία παράπλευρων αντιδράσεων, τη διαδικασία καθαρισμού του προϊόντος και την αποφυγή της ρακεμίσωσης.

Μια κλασική μέθοδος σχηματισμού αμιδικού δεσμού είναι με χρήση καρβοδιμιδίων (DCC/DIC): Το N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο (DCC) από τα μέσα της δεκαετίας του '50 αποτέλεσε το κύριο αντιδραστήριο ενεργοποίησης της καρβοξυλομάδας και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία κατά τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση. Η αντίδραση σύζευξης γίνεται με την προσθήκη του καρβοξυ-συστατικού στο καρβοδιμίδιο οδηγώντας στο σχηματισμό της δραστηκής O-ακυλοουρίας. Ακολουθεί πυρηνόφιλη προσβολή από το αμινοσυστατικό προς σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού.

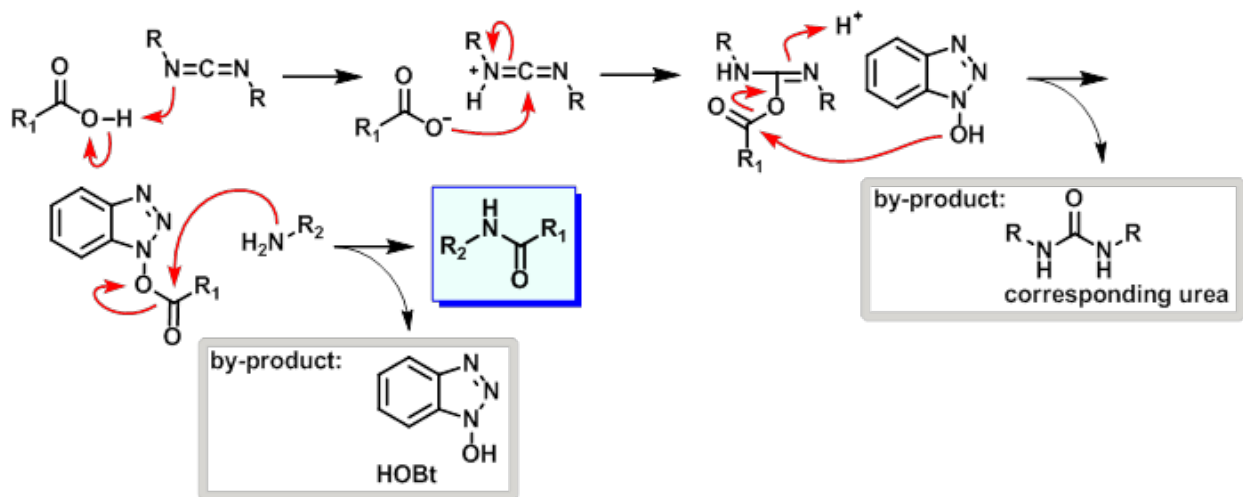
Μειονεκτήματα από τη χρήση DCC είναι ο σχηματισμός της αδιάλυτης N,N'-δικυκλοεξυλουρίας (DCU) που διαχωρίζεται δύσκολα από το επιθυμητό προϊόν καθώς και η αλλεργιογόνος δράση του. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται καρβοδιμίδια των οποίων η παραγόμενη ουρία είναι ευδιάλυτη στους οργανικούς διαλύτες, όπως το N,N'-δισοπροπυλοκαρβοδιμίδιο (DIC), το N'-μεθυλοκαρβοδιμίδιο, το N-τριτοταγές βουτυλο, το N'-αιθυλοκαρβοδιμίδιο και το N-αιθυλο, N'[3-(διμεθυλο)προπυλο]καρβοδιμίδιο (EDC) (**Σχήμα 12**).

Το πρόβλημα της ρακεμίσωσης αντιμετωπίζεται με τη χρήση πρόσθετων πυρηνόφιλων αντιδραστηρίων για τη δημιουργία ενεργών εστέρων (**Σχήμα 11**).



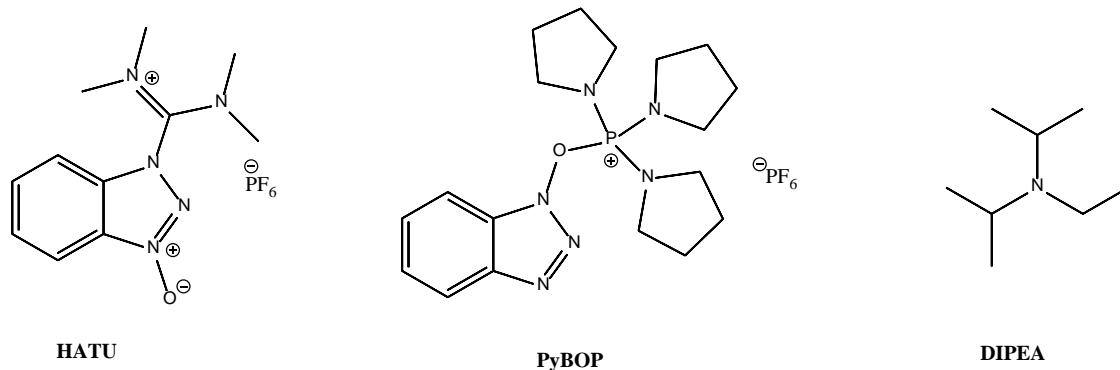
Σχήμα 11. Πυρηνόφιλα αντιδραστήρια για τη δημιουργία ενεργών εστέρων.

Το πλέον διαδεδομένο αντιδραστήριο της κατηγορίας αυτής είναι το HOBt ενώ χρησιμοποιούνται επίσης το N-υδροξυ-ηλεκτριμίδιο (HOSu) και το 1-υδροξυ-7-αζαβενζοτριαζόλιο (HOAt) που οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις και χαμηλότερα επίπεδα ρακεμίωσης. Το HOBt, ως ασθενές οξύ εμποδίζει την απόσπαση πρωτονίου από το ασύμμετρο άτομο άνθρακα του καρβοξυ-συστατικού μειώνοντας ακόμη περισσότερο την πιθανότητα ρακεμίωσης. Τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια προσβάλλουν το ενδιάμεσο της ακυλισοουρίας, σχηματίζοντας έναν ενεργό εστέρα που περιορίζει τον σχηματισμό της N-ακυλουρίας (Σχήμα 12). Η χρήση του HOAt έναντι του HOBt ενώ οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις, εντούτοις χρησιμοποιείται σε περιορισμένη έκταση λόγω των ειδικών συνθηκών μεταφοράς και φύλαξης που προκύπτουν από τις εκρηκτικές του ιδιότητες.



Σχήμα 12. Σχηματισμός αμιδικού δεσμού με χρήση καρβοδιμιδίου και HOBt.

Εάν ο σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού αποτύχει την πρώτη φορά, επαναλαμβάνεται είτε με πιο αραιό διάλυμα με τα ίδια αντιδραστήρια σύζευξης (DIC/HOBt) είτε με πιο δραστικά αντιδραστήρια όπως PyBOP/HATU με τη χρήση HOBt παρουσία βάσης (DIPEA) (Σχήμα 13)



Σχήμα 13. Δομές των HATU, PyBOP και DIPEA.

1.6.2 Τεχνικές Πεπτιδικής Σύνθεσης

1.6.2.1 Σύνθεση σε υγρή φάση

Όλες οι διεργασίες ανοικοδόμησης της πεπτιδικής αλυσίδας λαμβάνουν χώρα σε διάλυμα. Τα ενδιάμεσα προϊόντα μπορούν να απομονωθούν, να καθαριστούν και να ταυτοποιηθούν, με αποτέλεσμα τη λήψη καθαρού τελικού προϊόντος αλλά και σημαντική μείωση της συνολικής απόδοσης. Η τεχνική όμως είναι χρονοβόρα και επίπονη, κυρίως για μεγάλου μήκους πεπτίδια. Μπορεί επίσης να υπάρξουν προβλήματα δυσδιαλυτότητας των ενδιάμεσων προϊόντων.

1.6.2.2 Σύνθεση σε στερεή φάση (Solid Phase Peptide Synthesis – SPPS)

Το 1963 ο Merrifield ανέπτυξε μια αυτοματοποιημένη συνθετική μέθοδο. Η μέθοδος έχει ως εξής: αρχικά, πραγματοποιείται ομοιοπολική δέσμευση της καρβοξυλομάδας του πρώτου αμινοξέος της πεπτιδικής αλυσίδας σε μια χαρακτηριστική ομάδα ενός αδιάλυτου, στερεού υποστρώματος (πολυμερές/ρητίνη). Η σύνθεση συνεχίζεται κατά στάδια με επαναλαμβανόμενες διεργασίες απομάκρυνσης της N^α-προστατευτικής ομάδας του ενός αμινοξέος και σύζευξης με το επόμενο αμινοξύ. Οι εκπλύσεις σε κάθε κύκλο είναι αρκετές, ώστε να απομακρυνθούν με κατάλληλους διαλύτες οι περίσσειες αντιδραστηρίων και τυχόν παραπροϊόντα και για να προετοιμαστεί η ρητίνη για το επόμενο στάδιο. Στο τέλος της σύνθεσης το προϊόν αποδεσμεύεται από τη ρητίνη και όλες τις προστατευτικές ομάδες και μπορεί να καθαριστεί και να ταυτοποιηθεί. Η μέθοδος είναι πιο εύκολη και γρήγορη από τη σύνθεση σε υγρή φάση, αλλά μειονέκτημά της είναι η αδυναμία να ταυτοποιηθούν τα ενδιάμεσα παραπροϊόντα.

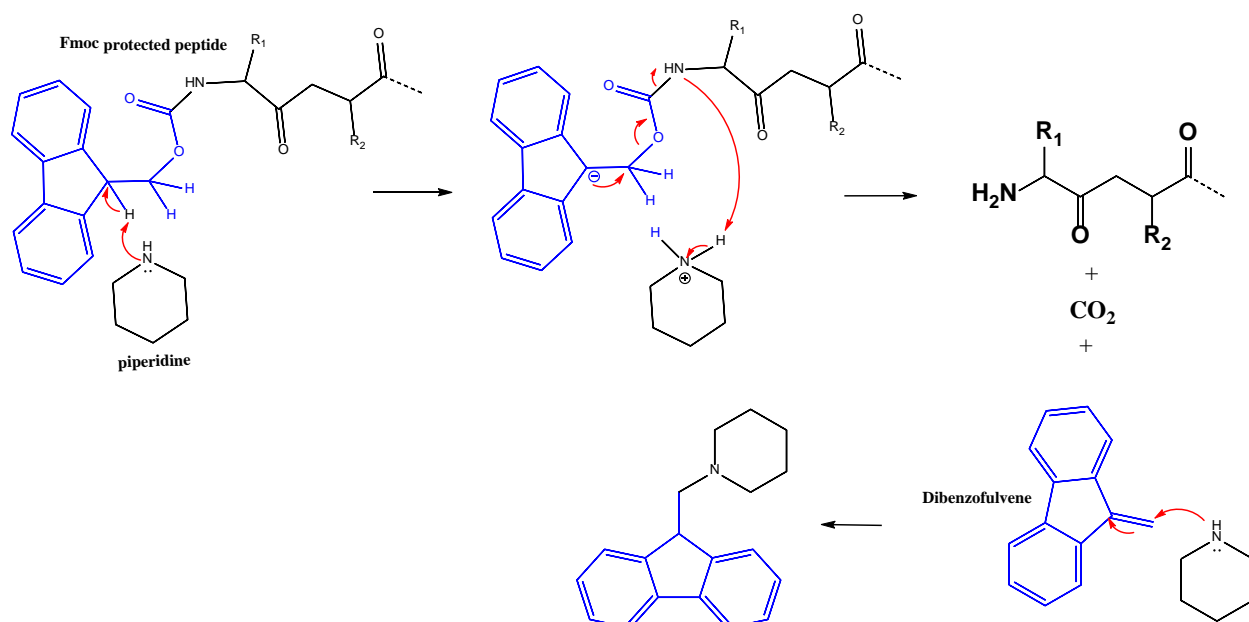
1.6.2.2.1 Σύνθεση σε στερεή φάση με την μέθοδο Fmoc/tBu

Ως προσωρινή προστατευτική ομάδα για τις αμίνες χρησιμοποιείται η 9-φλουρενυλομεθοξυ-καρβονυλομάδα (Fmoc), η οποία απομακρύνεται με διάλυμα 20% πιπεριδίνης (βασικές συνθήκες) σε N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Ως προσωρινή προστατευτική ομάδα

για τα παράπλευρα οξέα ή τις υδροξυλομάδες χρησιμοποιείται η tert-βουτυλο ομάδα η οποία απομακρύνεται σε όξινες συνθήκες (συνήθως απομακρύνεται μαζί με την αποκοπή της ρητίνης με TFA).

Η Fmoc/tBu μέθοδος χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα σύνθεσης προστατευμένων πεπτιδικών τμημάτων, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για κυκλοποίηση ή συμπύκνωση πεπτιδικών τμημάτων (fragment condensation), χρησιμοποιώντας ηπιότερες συνθήκες για την απομάκρυνση τόσο του πεπτιδίου από τη ρητίνη (AcOH/TFE/DCM) όσο και των πλάγιων προστατευτικών ομάδων (TFA).

Η εισαγωγή της 9-φλουορενυλομεθοξυκαρβονυλομάδας (Fmoc) μπορεί να επιτευχθεί με επίδραση Fmoc-Cl στο αμινοξύ σε αλκαλικό διάλυμα. Η απομάκρυνση της Fmoc-ομάδας γίνεται σε βασικές συνθήκες με β-απόσπαση. Συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα 20% πιπεριδίνης (δευτεροταγής αμίνη) σε DMF σύμφωνα με τον μηχανισμό του **Σχήματος 14**.

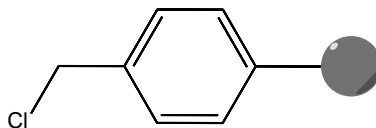


Σχήμα 14. Μηχανισμός απόσπασης Fmoc-ομάδας με πιπεριδίνη.

Τα πλεονεκτήματα της Fmoc-ομάδας έναντι άλλων ομάδων ουρεθανικού τύπου είναι: α) συνδυάζεται με πλάγιες προστατευτικές ομάδες που απομακρύνονται σε όξινες συνθήκες (Z-, Boc- και tBu-), οπότε αυτή διατηρείται ακέραια στο μόριο και β) οι χημικές ενώσεις που παράγονται κατά την διάρκεια της απομάκρυνσής της δεν προκαλούν παράπλευρες αντιδράσεις.

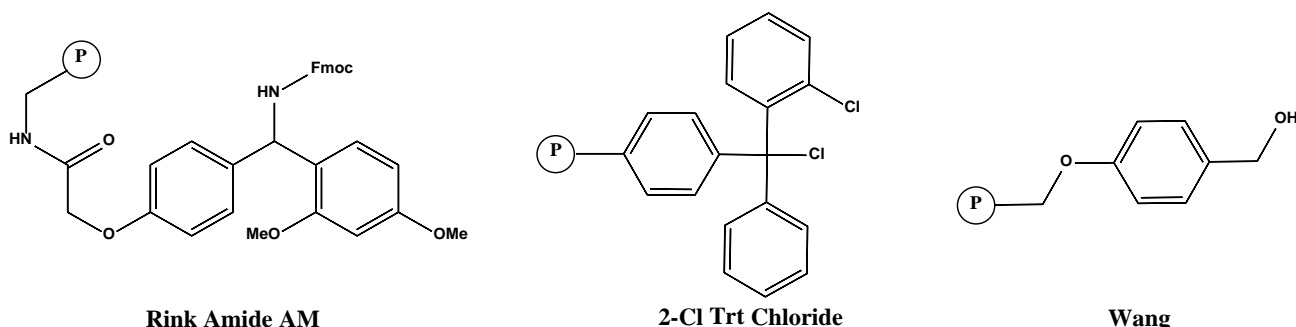
Το πολυμερές υπόστρωμα παίζει σπουδαίο ρόλο στην επιτυχία της μεθόδου σύζευξης σε στερεή φάση. Βασικά κριτήρια που καθορίζουν την επιλογή του αδιάλυτου πολυμερούς υποστρώματος για σύνθεση σε στερεή φάση είναι η φυσική και μηχανική αντοχή, η σταθερότητα κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, η καλή διόγκωση στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται στη

σύνθεση ώστε οι αντιδράσεις να είναι γρήγορες και με υψηλές αποδόσεις, και οι συνθήκες απομάκρυνσης του τελικού προϊόντος. Το πρώτο πολυμερές (ρητίνη) που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση πεπτιδίων σε στερεή φάση, παρασκευάστηκε από τον Merrifield στις αρχές της δεκαετίας του '60 και ήταν ένα χλωρομεθυλο-παράγωγο ενός συμπολυμερούς στυρολίου-διβινυλοβενζολίου (**Σχήμα 15**).



Σχήμα 15. Η ρητίνη του Merrifield.

Υπάρχουν πολλές ρητίνες που χρησιμοποιούνται πλέον στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση ενώ οι πιο διαδεδομένες είναι η Wang, η Rink Amide και η 2-χλωροτρίτυλο (**Σχήμα 16**). Μερικές απ' τις διαφορές μεταξύ αυτών των ρητινών είναι οι εξής: (α) Η κάθε ρητίνη αποκολλάται απ' το πεπτίδιο με χρήση διαφορετικών συνθηκών. Στην 2-χλωροτρίτυλο υπάρχει η δυνατότητα να αποκολληθεί το πεπτίδιο από τη ρητίνη αλλά να παραμείνουν όλες οι υπόλοιπες προστατευτικές ομάδες; (β) Η κάθε ρητίνη διαθέτει διαφορετικό αριθμό υποκατάστασης οπότε διαφέρει η ποσότητα του πεπτιδίου που 'φορτώνεται' σ' αυτή. (γ) Διαφέρουν ως προς τον τρόπο εισαγωγής του πρώτου αμινοξέος πάνω στην ρητίνη και (δ) Η Rink Amide ρητίνη μετά την απομάκρυνση της αφήνει στο C-τελικό άκρο του πεπτιδίου αμίδιο ενώ οι Wang και 2-χλωροτρίτυλο αφήνουν καρβοξυλικό οξύ.



Σχήμα 16. Δομές των ρητινών που χρησιμοποιούνται συνήθως στην σύνθεση σε στερεά φάση.

1.6.3 Στρατηγικές Πεπτιδικής Σύνθεσης

Η ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να γίνει είτε με σταδιακή ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας (step by step) είτε με σύνθεση μέσω συμπύκνωσης πεπτιδικών κλασμάτων (Fragment or segment condensation).

Στην πεπτιδική σύνθεση κατά στάδια ενσωματώνεται ένα N^α-προστατευμένο αμινοξύ με ενεργοποίηση της καρβοξυλικής του ομάδας στην πεπτιδική αλυσίδα και απομακρύνεται η N^α-προστατευτική ομάδα μετά από κάθε βήμα επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας. Η ανοικοδόμηση της πεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να συμβεί είτε ξεκινώντας από το C-τελικό άκρο προσθέτοντας αμινοξέα μέχρι την προσθήκη του N-τελικού αμινοξέος ή ξεκινώντας από το N-τελικό άκρο προσθέτοντας αμινοξέα μέχρι να προστεθεί και το C-τελικό αμινοξύ. Στο εργαστήριο προτιμάται η πρώτη μέθοδος γιατί εξασφαλίζει χαμηλά ποσοστά ρακεμίωσης. Η αποτελεσματικότητα της συνθετικής αυτής μεθόδου οφείλεται στη χρήση περίσσειας N^α-προστατευμένου αμινοξέος η οποία εξασφαλίζει μεγάλες ταχύτητες. Συνδυάζεται κυρίως με την τεχνική της σύνθεσης σε στερεή φάση.

1.6.4 Μέθοδος ελέγχου της συνθετικής πορείας με test Κάιζερ

Η συγκεκριμένη μέθοδος ανιχνεύει τις ελεύθερες πρωτοταγείς αμινομάδες που τυχόν υπάρχουν είτε έπειτα από μια ατελή σύζευξη είτε έπειτα από την απομάκρυνση της Fmoc-προστατευτικής ομάδας. Αυτό επιτυγχάνεται με το σχηματισμό ενός έγχρωμου παραγώγου προϊόν της ελεύθερης αμινομάδας με τη νινυδρίνη, συστατικό των διαλυμάτων Κάιζερ. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα κόκκοι πεπτιδίου-ρητίνης και προστίθενται κατά σειρά δύο σταγόνες από τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα 1: 500 mg νινυδρίνης σε 10 mL EtOH.

Διάλυμα 2: 40 g φαινόλης σε 10 mL EtOH.

Διάλυμα 3: 2 mL διαλύματος KCN 0.001 M σε 98 mL πυριδίνης.

Ακολούθως το μίγμα θερμαίνεται για 5 min στους 100 °C και παρατηρείται το χρώμα του. Αν αυτό είναι μπλε, το test Κάιζερ θεωρείται θετικό, υπάρχει δηλαδή ελεύθερη αμινομάδα του αμινοξέος ή του πεπτιδίου, η οποία αντιδρώντας με τη νινυδρίνη σχημάτισε το έγχρωμο παράγωγο. Σε αυτήν την περίπτωση η αντίδραση σύζευξης δεν έχει ολοκληρωθεί, οπότε ή παρατείνεται η διάρκεια σύζευξης ή ακολουθεί επανασύζευξη. Αν το χρώμα του διαλύματος είναι κίτρινο, το test Κάιζερ θεωρείται αρνητικό, ενδεικτικό ότι η αντίδραση σύζευξης έχει ολοκληρωθεί. Στην περίπτωση της αντίδρασης απόσπασης της Fmoc ομάδας όταν το διάλυμα χρωματιστεί μπλε είναι ένδειξη ότι η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί.

1.7 Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση

1.7.1 Εστεροποίηση N^α-Fmoc αμινοξέων στην Rink Amide AM ρητίνη

Η ρητίνη (0.58 mmol/g ρητίνης) διογκώνεται σε DMF (10 mL/g) για 20 λεπτά και έπειτα σε DCM (10 mL/g) για άλλα 20 λεπτά σε κατάλληλο γιάλινο σκεύος υπό ανάδευση. Ύστερα, πραγματοποιείται αποκοπή της Fmoc ομάδας της ρητίνης δυο φορές με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF (1x5 min και 1x10 min) ακολουθούμενη από εναλασσόμενες εκπλύσεις με DMF-DCM

(4x10 mL/g ρητίνης) για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων. Τέλος, γίνεται έλεγχος της αποκοπής της fmoc με χρήση Test Κάιζερ.

Έλεγχος της αποκοπής με τεστ Κάιζερ: Σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται 2-3 mg πεπτιδίου-ρητίνης και προστίθενται κατά σειρά δύο σταγόνες από το κάθε αντιδραστήριο Κάιζερ. Το μίγμα θερμαίνεται για 5 min στους 80-100 °C. Το χρώμα του διαλύματος και των κόκκων πεπτιδίου είναι:

- Κίτρινο (αρνητικό αποτέλεσμα) - Δεν έγινε αποκοπή της ομάδας fmoc.
- Μπλε (θετικό αποτέλεσμα) - Έγινε πλήρης αποκοπή της ομάδας fmoc.

Ενεργοποίηση του καρβοξυλικού οξέος του αμινοξέος: Ταυτόχρονα, σε σφαιρική που περιέχει κατάλληλη ποσότητα N^α-Fmoc αμινοξέος (3 eq), HOBT (3 eq) σε μίγμα 1:1 DMF/DCM, προστίθεται το DIC (3 eq) στους 0 °C και το προκύπτον διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 20-30 λεπτά. Για τον υπολογισμό της ποσότητας του αμινοξέος που απαιτείται, ισχύει ο τύπος:

$$\text{Fmoc-AA-OH (g)} = 3 \times \text{υποκατάσταση ρητίνης (mmol)} \times \text{MB}_{\text{Fmoc-AA-OH}} \text{ (g/mol)}$$

ενώ για τις ποσότητες των DIC και HOBT ισχύουν οι τύποι:

$$\text{HOBT (g)} = 3 \times \text{υποκατάσταση ρητίνης (mmol)} \times \text{MB}_{\text{HOBT}} \text{ (g/mol)}$$

$$\text{DIC (mL)} = 3 \times \text{υποκατάσταση ρητίνης (mmol)} \times (\text{MB}_{\text{DIC}}/\rho_{\text{DIC}}) \text{ (mol/mL)}$$

Αφού γίνει προσθήκη του ενεργοποιημένου αμινοξέος, η αντίδραση σύζευξης αφήνεται υπό ανάδευση για 4-12 ώρες.

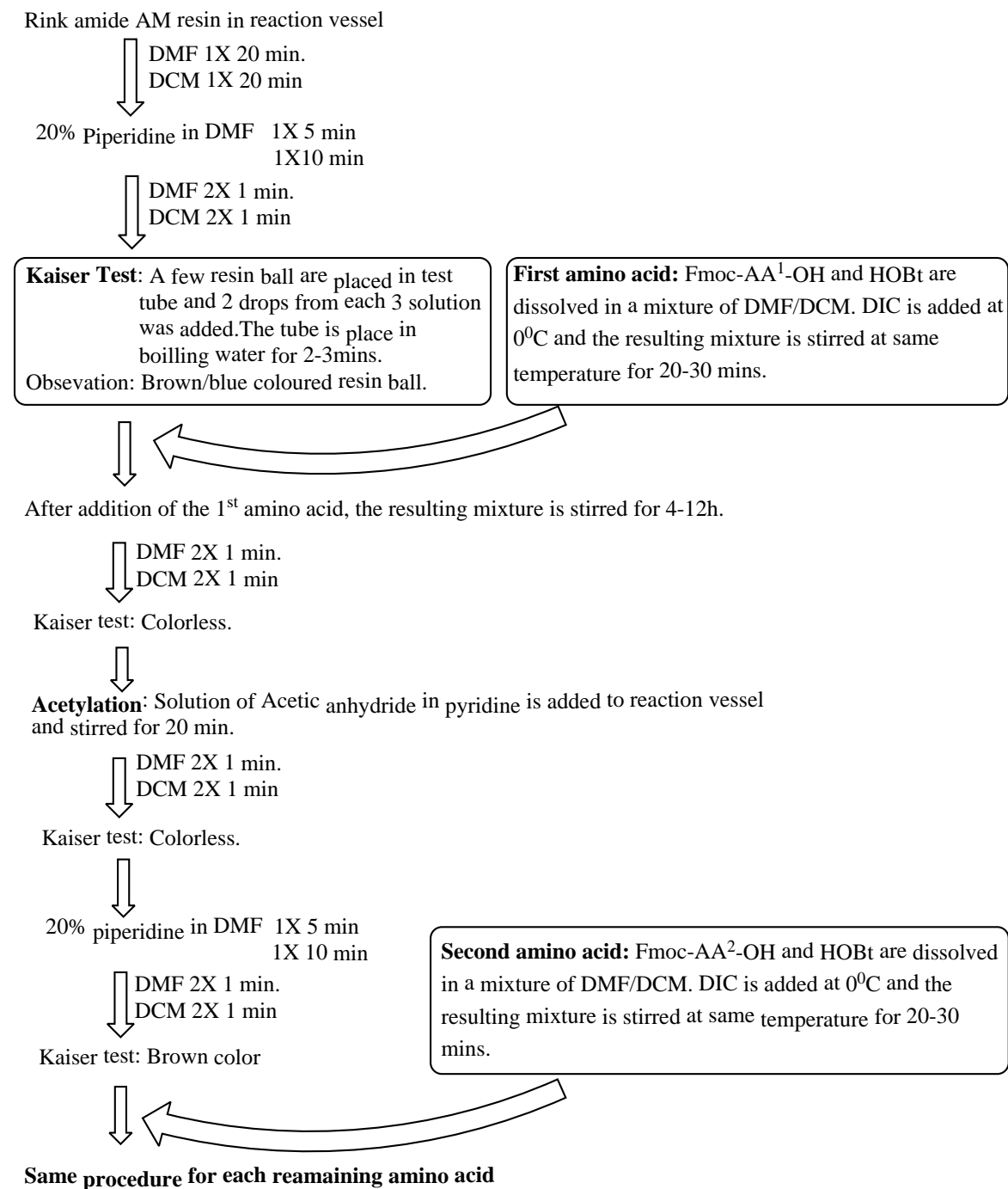
Έλεγχος της σύζευξης με τεστ Κάιζερ: Σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται 2-3 mg πεπτιδίου-ρητίνης και προστίθενται κατά σειρά δύο σταγόνες από το κάθε αντιδραστήριο Κάιζερ. Το μίγμα θερμαίνεται για 5 min στους 80-100 °C. Το χρώμα του διαλύματος και των κόκκων πεπτιδίου είναι:

- Άχρωμο (θετικό αποτέλεσμα) – Έγινε πλήρης σύζευξη.
- Μπλε (αρνητικό αποτέλεσμα) – Υπάρχουν ακόμα ελεύθερες ομάδες -NH₂.

Εάν η σύζευξη κριθεί ανεπιτυχής, γίνεται επανασύζευξη με τις μισές ποσότητες. Μετά το τέλος της σύζευξης η ρητίνη διηθείται και πλένεται με DMF-DCM (4x10 mL/g ρητίνης) όπως προηγουμένως και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για όλα τα αμινοξέα.

Απομάκρυνση του πεπτιδίου από την ρητίνη και ολική αποπροστασία: Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του επιθυμητού πεπτιδικού αναλόγου, ακολουθεί η απομάκρυνσή του από την Rink Amide AM ρητίνη. Μεταφέρεται ποσότητα πεπτιδίου-ρητίνης σε σφαιρική φιάλη και προστίθεται το διάλυμα TFA απομάκρυνσης της ρητίνης TFA (10 mL/g πεπτιδίου-ρητίνης) παρουσία ανιχνευτών κατιόντων (scavengers - π.χ. ανισόλη, TIS, EDT, H₂O, DMS). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 2 ώρες + 1 ώρα για κάθε αργινίνη που περιέχει το πεπτίδιο. Έπειτα η ρητίνη διαχωρίζεται από το διάλυμα με διήθηση. Η σφαιρική φιάλη ξεπλένεται

με DCM και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Μετά τη συμπύκνωση λαμβάνεται στερεό ή έλαιο ανάλογα με τη φύση του πεπτιδίου. Το πεπτίδιο καταβυθίζεται με προσθήκη ψυχρού διεθυλαιθέρα (Et₂O) και αφήνεται για τουλάχιστον 30 λεπτά στο ψυγείο. Πραγματοποιείται μια ακόμα διήθηση και εκπλύσεις με Et₂O και το λαμβανόμενο στερεό διαλυτοποιείται με οξικό οξύ 1 M και νερό και τοποθετείται σε ξηραντήρα, όπου ξηραίνεται πάνω από P₂O₅.



Σχήμα 17. Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης σε στερεά φάση σε Rink Amide AM ρητίνη.

1.7.2 Εστεροποίηση Na-Fmoc αμινοξέων στην 2-χλωροτρίτυλοχλωρίδιο ρητίνη

Η ρητίνη (1,2 mmol/g ρητίνης) διογκώνεται σε DCM (10 mL/g) σε κατάλληλο γυάλινο σκεύος επί 20 min. Έπειτα, προστίθεται στάγδην DIPEA (3 eq) και μετά από 10 min, όταν θα έχουν σταματήσει να εκλύονται λευκοί ατμοί, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα Na-Fmoc αμινοξέος (1,1 eq) που έχει διαλυθεί στον ελάχιστο όγκο DCM. Το μίγμα αναδεύεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται στο μίγμα 1 mL/g ρητίνης MeOH και 0,5 mL/g ρητίνης DIPEA και η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμη 1 ώρα. Έπειτα η ρητίνη διηθείται και πραγματοποιούνται 3 εκπλύσεις με διάλυμα DCM/MeOH/DIPEA (85/10/5) για 5 λεπτά η καθεμία. Τέλος, πλένεται με DMF (3x10 mL/g ρητίνης) και με DCM (3x10 mL/g ρητίνης). Αφού πραγματοποιηθεί χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) για την μέτρηση του Rf της ομάδας Fmoc, ακολουθεί η απομάκρυνση της ομάδας αυτής.

Απομάκρυνση της N^α-Fmoc ομάδας του αμινοξέος: Για να απομακρυνθεί η Fmoc προστατευτική ομάδα του αμινοξέος, η ρητίνη πλένεται δυο φορές με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF (1x10 mL/g ρητίνης 5 και 10 λεπτά αντίστοιχα). Ακολουθούν εκπλύσεις με DMF (4x10 mL/g ρητίνης) και DCM (4x10 mL/g ρητίνης) και ο έλεγχος απομάκρυνσης της N^α-Fmoc ομάδας με test Κάιζερ και χρωματογραφία TLC.

Έλεγχος της συνθετικής πορείας με test Κάιζερ: Σε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρονται 2-3 mg πεπτιδίου-ρητίνης και προστίθενται κατά σειρά δύο σταγόνες από το κάθε αντιδραστήριο Κάιζερ. Το μίγμα θερμαίνεται για 2-3 min σε θερμοθάλαμο στους 80-100 °C. Το χρώμα του διαλύματος και των κόκκων πεπτιδίου είναι:

- Κίτρινο (αρνητικό αποτέλεσμα) εάν αφορά τον έλεγχο της αντίδρασης σύζευξης.
- Μπλε (θετικό αποτέλεσμα) αν ελέγχουμε την απομάκρυνση της Fmoc ομάδας ή αν η αντίδραση σύζευξης δεν έχει ολοκληρωθεί οπότε και ακολουθεί επανασύζευξη. Ακολουθεί έλεγχος με χρωματογραφία TLC.

Έλεγχος της συνθετικής πορείας με TLC (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας): Μεταφέρονται περίπου 1-2 mg πεπτιδίου-ρητίνης σε erpendorf και προστίθενται σταγόνες (~0,5 mL) από το διάλυμα DCM/TFA (7:3 v/v) ώστε να απομακρυνθεί το πεπτίδιο από τη ρητίνη. Μετά από ~5min τοποθετείται κηλίδα από το διάλυμα αυτό σε πλάκα χρωματογραφίας και στη συνέχεια αυτή αναπτύσσεται σε κατάλληλο σύστημα. Σημειώνεται το μέτωπο του διαλύτη και η πλάκα εξετάζεται σε UV φως για την ύπαρξη μαύρων κηλίδων. Τέλος, η πλάκα TLC ψεκάζεται με νινυδρίνη, τοποθετείται στον θερμοθάλαμο στους 80-100 °C για 5 min και έπειτα εξετάζονται τυχόν μωβ κηλίδες πάνω στην πλάκα.

Γενική πορεία σύζευξης με DIC/HOBt: Το Fmoc αμινοξύ, ποσότητα η οποία υπολογίζεται από τον τύπο: $Fmoc-AA-OH (g) = 3 \times \text{υποκατάσταση ρητίνης (mmol)} \times MBFmoc-AA-OH (g/mol)$ διαλύεται στην ελάχιστη ποσότητα DMF/DCM (1:1). Στη συνέχεια προστίθεται το μίγμα HOBt/DIC, των οποίων οι ποσότητες υπολογίζονται αντίστοιχα από τους τύπους: $HOBt (g) = 3 \times \text{υποκατάσταση ρητίνης (mmol)} \times MBHOBt (g/mol)$ $mmol DIC (mL) = 3 \times \text{υποκατάσταση ρητίνης (mmol)} \times (MBDIC/\rho DIC) (mol/mL)$ και πραγματοποιείται ενεργοποίηση του αμινοξέος για 20-30

λεπτά. Η αντίδραση σύζευξης διαρκεί 3-4 ώρες. Ο έλεγχος της σύζευξης γίνεται με test Κάιζερ και χρωματογραφία TLC. Εάν η σύζευξη κριθεί ανεπιτυχής, γίνεται επανασύζευξη με τις μισές ποσότητες. Μετά το τέλος της σύζευξης η ρητίνη διηθείται και πλένεται με DMF (4x10 mL/g ρητίνης) και με DCM (4x10 mL/g ρητίνης).

Απομάκρυνση του πεπτιδίου από την CLTR-Cl ρητίνη και ολική αποπροστασία: Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του επιθυμητού πεπτιδικού αναλόγου, ακολουθεί η απομάκρυνσή του από την CLTR-Cl ρητίνη. Γίνεται στάγδην προσθήκη διαλύματος απομάκρυνσης της ρητίνης DCM/TFA (98:2 v/v) και το υγρό συλλεγεται σε σφαιρική φιάλη. Για τον έλεγχο της πλήρους απομάκρυνσης της ρητίνης πραγματοποιείται Test Κάιζερ και TLC.

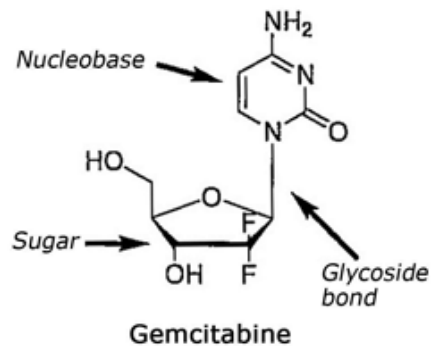
Για την ολική αποπροστασία το προστατευμένο πεπτίδιο μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με διάλυμα που περιέχει TFA/DCM (10 mL/g προστατευμένου πεπτιδίου) και δεσμευτές καρβοκατιόντων (scavengers π.χ. ανισόλη, TIS, EDT, H₂O) σε διάφορες αναλογίες. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για τον κατάλληλο χρόνο σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια το διάλυμα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι να λάβουμε στερεό ή έλαιο ανάλογα με τη φύση του πεπτιδίου. Τέλος, προστίθεται ψυχρός Et₂O ώστε να καταβυθιστεί το πεπτίδιο, αφήνεται στο ψυγείο για τουλάχιστον 30 λεπτά, διηθείται υπό κενό και το λαμβανόμενο στερεό τοποθετείται σε ξηραντήρα, όπου ξηραίνεται πάνω από P₂O₅.

1.8 Αντικαρκινικό φάρμακο 'Γεμισταβίνη'

1.8.1 Βιολογικό υπόβαθρο της γεμισταβίνης

Το κύτταρο είναι το δομικό στοιχείο της ζωής. Αποτελείται από κυτταρόπλασμα που περικλείεται από την μεμβράνη η οποία περιέχει πολυάριθμα βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Τα νουκλεϊκά οξέα τα οποία περιλαμβάνουν το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ και ριβονουκλεϊκό οξύ, το DNA και RNA, αντίστοιχα, είναι κατασκευασμένα από μονομερή νουκλεοτίδια. Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στο DNA και το RNA είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση, μετάδοση και έκφραση των γενετικών πληροφοριών ενός οργανισμού. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από τρία συστατικά, 1) μια αζωτούχο βάση, 2) ένα σάκχαρο 5-ατόμων άνθρακα και 3) μια φωσφορική ομάδα.

Η γεμισταβίνη είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο της δεοξυκυτιδίνης, όπου δύο άτομα υδρογόνου από την θέση 2' έχουν αντικατασταθεί από 2 άτομα φθορίου (**Σχήμα 18**). Η ενσωμάτωση των ατόμων φθορίου ενισχύει τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες της γεμισταβίνης και δεν μεταβάλλει το σχήμα και το μέγεθος αυτού του μορίου σημαντικά, παρά το γεγονός ότι ο δεσμός C-F είναι ισχυρότερος από το δεσμό C-H.



Σχήμα 18. Δομή της γεμισιταβίνης.

Τα νουκλεοσίδια και τα ανάλογά τους είναι μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών και αντι-ιικών μορίων. Η γεμισιταβίνη είναι ένα από τα ανάλογα του δεοξυκυτιδίνου νουκλεοζίτη, που χρησιμοποιείται ως χημειοθεραπευτικός παράγοντας μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες και παρουσιάζει αντικαρκινική δραστηριότητα ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα στερεών όγκων όπως μη μικροκυτταρικό καρκίνο, καρκίνο του πνεύμονα, του παγκρέατος, της ουροδόχου κύστης, του μαστού, του προστάτη, των ωοθηκών⁹⁷. Ωστόσο, η γεμισιταβίνη στερείται κάποιων ιδιοτήτων με αποτέλεσμα να μην έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα αποτελεσματικό αντικαρκινικό φάρμακο, δεδομένου ότι:

- 1) Παρουσιάζει υψηλή και μη εκλεκτική τοξικότητα προς τα φυσιολογικά κύτταρα.
- 2) Απενεργοποιείται μέσω απαμίνωσης στον ανενεργό μεταβολίτη της 2',2'-διφλουροδοδεοξουριδίνη (dFdU).
- 3) Η υψηλή της υδροφιλικότητα, γίνεται αιτία για υδρολυτική διάσπαση⁹⁸, που κατά συνέπεια μειώνει την αποτελεσματική συγκέντρωση της γεμισιταβίνης.

1.8.2 Ιστορικά στοιχεία

Η γεμισιταβίνη συντέθηκε για πρώτη φορά στο εργαστήριο του Larry Hertel από τον Eli Lilly κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980. Προοριζόταν για χρήση ως ένα αντιικό φάρμακο, αλλά οι προκλινικές δοκιμές έδειξαν ότι μπορούσε να σκοτώνει τα κύτταρα της λευχαιμίας *in vitro*. Η γεμισιταβίνη κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1983 και εγκρίθηκε για ιατρική χρήση το 1995.

Η γεμισιταβίνη έγινε πρώτης γραμμής θεραπεία για καρκίνο της ουροδόχου κύστης τετάρτου σταδίου με μεταστάσεις, σε συνδυασμό με σισπλατίνη μετά από μια μελέτη που έγινε το 2000 με τη βοήθεια 405 ασθενών, έδειξε παρόμοια αποτελεσματικότητα, αλλά μικρότερη τοξικότητα σε σύγκριση με τη προηγούμενη θεραπευτική αγωγή MVAC (χρήση μεθοτρεξάτης, βινμπλαστίνης, δοξορουβικίνης, *cis*-πλατίνης). Αυτή η νέα CG-αγωγή περιλαμβάνει τη λήψη της σισπλατίνης την 2^η ημέρα και τη λήψη της γεμισιταβίνης τις ημέρες 1, 8, και 15.

Το 1996, ο FDA ενέκρινε την υδροχλωρική γεμισιταβίνη για χρήση σε συνδυασμό με την σισπλατίνη ως πρώτης γραμμής θεραπεία ασθενών με ανεγχείρητο, τοπικά προχωρημένο (στάδιο IIIA ή IIIB) ή μεταστατικό (στάδιο IV) μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Το 1996, ο FDA ενέκρινε την υδροχλωρική γεμισιταβίνη ως πρώτης γραμμής θεραπεία για ασθενείς με τοπικά προχωρημένο (μη εγχειρήσιμο, σταδίου II ή III) ή μεταστατικό (σταδίου IV) αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος σε ασθενείς είχαν προηγουμένως λάβει θεραπεία με φθοριοουρακίλη (5-FU).

Στις 19 Μαΐου 2004, ο FDA ενέκρινε την υδροχλωρική γεμισιταβίνη για ένεση σε συνδυασμό με πακλιταξέλη για τη πρώτη γραμμής θεραπεία ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, μετά την αποτυχία της ανθρακυκλίνης.

Στις 14 Ιουλίου, 2006, ο FDA χορήγησε την έγκριση για την υδροχλωρική γεμισιταβίνη σε συνδυασμό με καρβοπλατίνη για τη θεραπεία των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών που έχει υποτροπιάσει τουλάχιστον έξι μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας με βάση την πλατίνη (π.χ., καρβοπλατίνη ή cis-πλατίνη). Η ουδετεροπενία (πτώση του απόλυτου αριθμού των κυκλοφορούντων ουδετεροφίλων του περιφερικού αίματος) ήταν η πιο συχνά αναφερόμενη ανεπιθύμητη παρενέργεια (90% των ασθενών). Άλλες σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες ήταν κυρίως αιματολογικές.

Η γεμισιταβίνη πρόσφατα διερευνήθηκε επίσης για τον προχωρημένο καρκίνο της χοληφόρου οδού και της χοληδόχου κύστης και βρέθηκε να έχει μέτρια επίδραση επί του όγκου όταν συνδυάζεται με σισπλατίνη.

1.8.3 Μεταφορά της γεμισιταβίνης

Η γεμισιταβίνη μεταφέρεται εντός της μεμβράνης του πλάσματος από μεταφορείς νουκλεοζιτών. Υπάρχουν δύο οικογένειες των μεταφορέων νουκλεοζιτών που διαφέρουν με βάση την λειτουργία τους:

1) Οι εξισορροπητικοί μεταφορείς νουκλεοζίτη (ENTs-Equilibrative nucleoside transporters) που είναι οι hENT1, hENT2, hENT3 και hENT4 οι οποίοι είναι νάτριο-ανεξάρτητοι^{99, 100}.

2) Οι συγκεντρωτικοί μεταφορείς νουκλεοζίτη (CNTs-Concentrative nucleoside transporters) που είναι μεταφορείς εξαρτώμενοι από το νάτριο και είναι ικανοί να μεταφέρουν το νουκλεοσίδιο έναντι της βαθμίδωσης συγκέντρωσης hCNT1, hCNT2 και hCNT3 και είναι νάτριο-εξαρτώμενοι^{99, 100}.

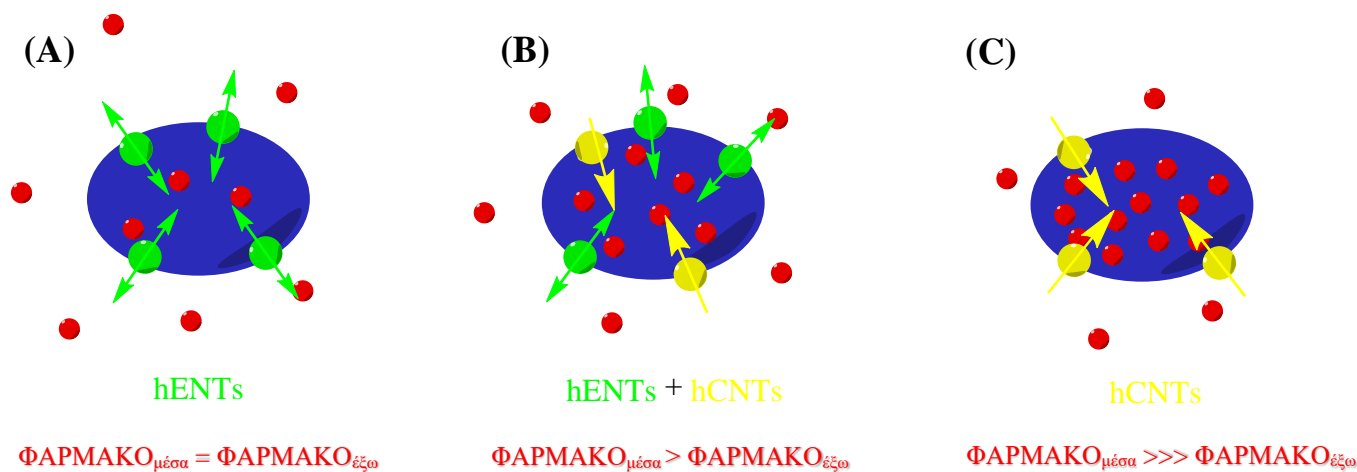
Οι ανθρώπινοι μεταφορείς hENT1 και hENT2 είναι τα δύο μέλη της οικογένειας ENT που έχουν μελετηθεί εκτενώς. Διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους σε αναστολή από τη νίτροβενζυλομερκαπτανοπουρίνη (NBMPR). Ο ENT1 είναι ένας ευαίσθητος μεταφορέας NBMPR ενώ ο ENT2 είναι ένας μη ευαίσθητος μεταφορέας NBMPR. Επίσης, είναι ικανοί να μεταφέρουν τις νουκλεοβάσεις. Ο εξισορροπητικός μεταφορέας, hENT3, αναγνωρίστηκε το 2001 και ο hENT4 προστέθηκε στην οικογένεια ENT το 2002. Τα τέσσερα ισόμορφα των

εξισοροποιητικών μεταφορέων νουκλεοζιτών είναι παρόντα σε σχετικά διαφορετικά επίπεδα σε διαφορετικούς ιστούς. Η υψηλότερη συγκέντρωση του hENT2 είναι παρούσα στο σκελετικό μυ. Οι ENT1 και ENT2 βρίσκονται στην βασεοπλευρική διαμεμβράνη μαζί με τους CNTs. Οι εξαρτώμενοι από το νάτριο hCNT1, hCNT2 και hCNT3 διαφέρουν στις εξειδικεύσεις του υποστρώματος τους. Ο hCNT1 μεταφέρει πυριμιδικά νουκλεοσίδια και ο hCNT2 μεταφέρει πουρινικά και ουριδίνη. Ο hCNT3 μεταφέρει τόσο τα πυριμιδικά όσο και τα πουρινικά νουκλεοσίδια. Ο hCNT1 είναι παρών σε όλα τα επιθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι ανθρώπινοι CNT2 και CNT3 είναι παρόντες σε όλους τους ιστούς. Τα επίπεδα των CNTs είναι συγκριτικά μικρότερα από ό,τι των ENT.

Η μεταφορά της γεμισιταβίνης κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης λαμβάνει χώρα μέσω πολλαπλών ενεργών μεταφορών νουκλεοζιτών (NTs) που βρίσκονται στη μεμβράνη κυττάρων του πλάσματος¹⁰¹. Και οι ENTs και οι CNTs εμπλέκονται στην πρόσληψη της γεμισιταβίνης^{101, 102}.

Ειδικότερα, η γεμισιταβίνη αποτελεί υπόστρωμα, για πέντε από τους hNTs: δύο του εξισοροποιητικού τύπου (hENT1, hENT2) και τρεις του συγκεντρωτικού τύπου (hCNT1, hCNT2, hCNT3)¹⁰¹⁻¹⁰³. Η παρουσία της δραστηριότητας του νουκλεοσιδίου μεταφοράς θεωρείται απαραίτητη προϋπόθεση για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και την κλινική αποτελεσματικότητα της γεμισιταβίνης. Η περισσότερη πρόσληψη της γεμισιταβίνης λαμβάνει χώρα από τον μεταφορέα hENT1 και λιγότερο από τους hENT2, hCNT1 και hCNT3^{101, 102, 104, 105}. Επίσης, η αναστολή της μεταφοράς νουκλεοζιτών κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε αντίσταση στην γεμισιταβίνη¹⁰⁶. Τέλος, υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι η έλλειψη μεταφοράς νουκλεοζιτών είναι ένας σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για την αντιμετώπιση της γεμισιταβίνης στο κλινικό περιβάλλον¹⁰⁷.

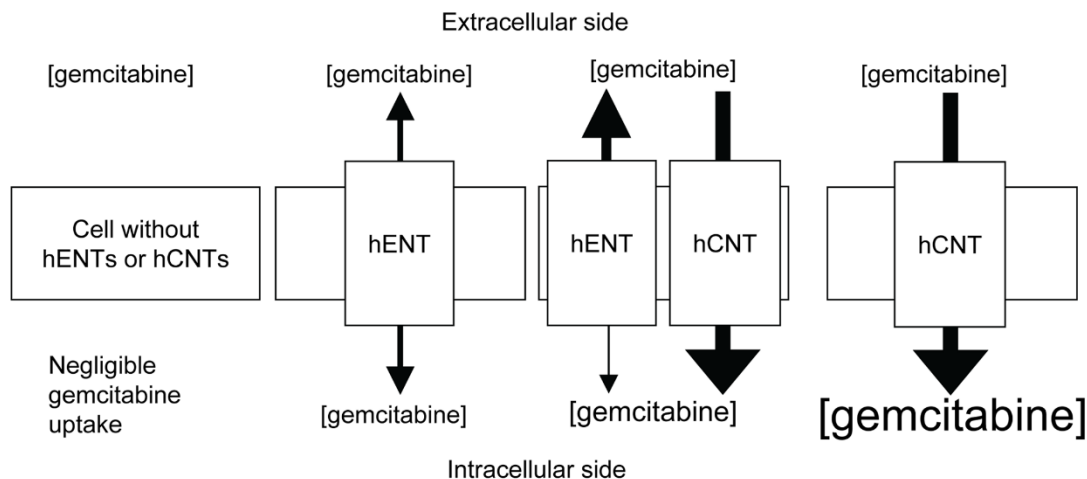
Μόλις η γεμισιταβίνη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω των ENTs, φθάνει σε ισορροπία μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού της μεμβράνης του πλάσματος. Ωστόσο, οι CNTs αυξάνουν τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο εσωτερικό των κυττάρων με συσσώρευση ενάντια της κλίσης της συγκέντρωσης (Σχήμα 19).



Σχήμα 19. Σχηματική απεικόνιση της συσσώρευσης της γεμισιταβίνης (Α) παρουσία μόνο hENTs

όπου η συγκέντρωση στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του κυττάρου είναι εξισορροπημένη, (B) παρουσία hENTs και hCNTs, όπου η συγκέντρωση είναι ελαφρώς μεγαλύτερη στο εσωτερικό του κυττάρου και (Γ) παρουσία μόνο hCNTs, όπου η συγκέντρωση είναι πολύ μεγαλύτερη στο εσωτερικό του κυττάρου.

Κατά τη σύγκριση των διαφόρων νουκλεοσιδικών μεταφορέων (NTs) ως εν δυνάμει θεραπευτικά μέσα για την αύξηση της πρόσληψης τοξικών αναλόγων νουκλεοσιδικών φαρμάκων, ο hCNT3 έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων NTs. Όντας ένας hCNT, μπορεί να συγκεντρώσει νουκλεοσιδικά φάρμακα μέσα στα κύτταρα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ό, τι οι hENTs. Σε σύγκριση με τον hCNT1, ο hCNT3 συν-μεταφέρει ένα επιπλέον ιόν νατρίου (δύο συνολικά) με κάθε νουκλεοζίτη, παρέχοντας θεωρητικά πρόσθετη ηλεκτροχημική κλίση για τη διατήρηση της μεταφοράς νουκλεοζιτών. Ο hCNT3 είναι επίσης ο μόνος hCNT σε θέση να χρησιμοποιεί τα πρωτόνια ως κατιόντα για την καθοδήγηση της μεταφοράς των νουκλεοζιτών. Οι όγκοι μπορεί να έχουν περιοχές με σχετικά χαμηλό pH, παρέχοντας επιπλέον κατιόντα για την μεταφορά του νουκλεοσιδίου. Τέλος, ο hCNT3 είναι ο μόνος hCNT που είναι ικανός να μεταφέρει φάρμακα που είναι νουκλεοσιδικά ανάλογα της πουρίνης και της πυριμιδίνης, επιτρέποντας στον hCNT3 τη μεταφορά πολλών κλινικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της γεμισιταβίνης, της κλαδριβίνης, της κλοφαραβίνης και της φλουδαραβίνης¹⁰⁸ (Σχήμα 20).



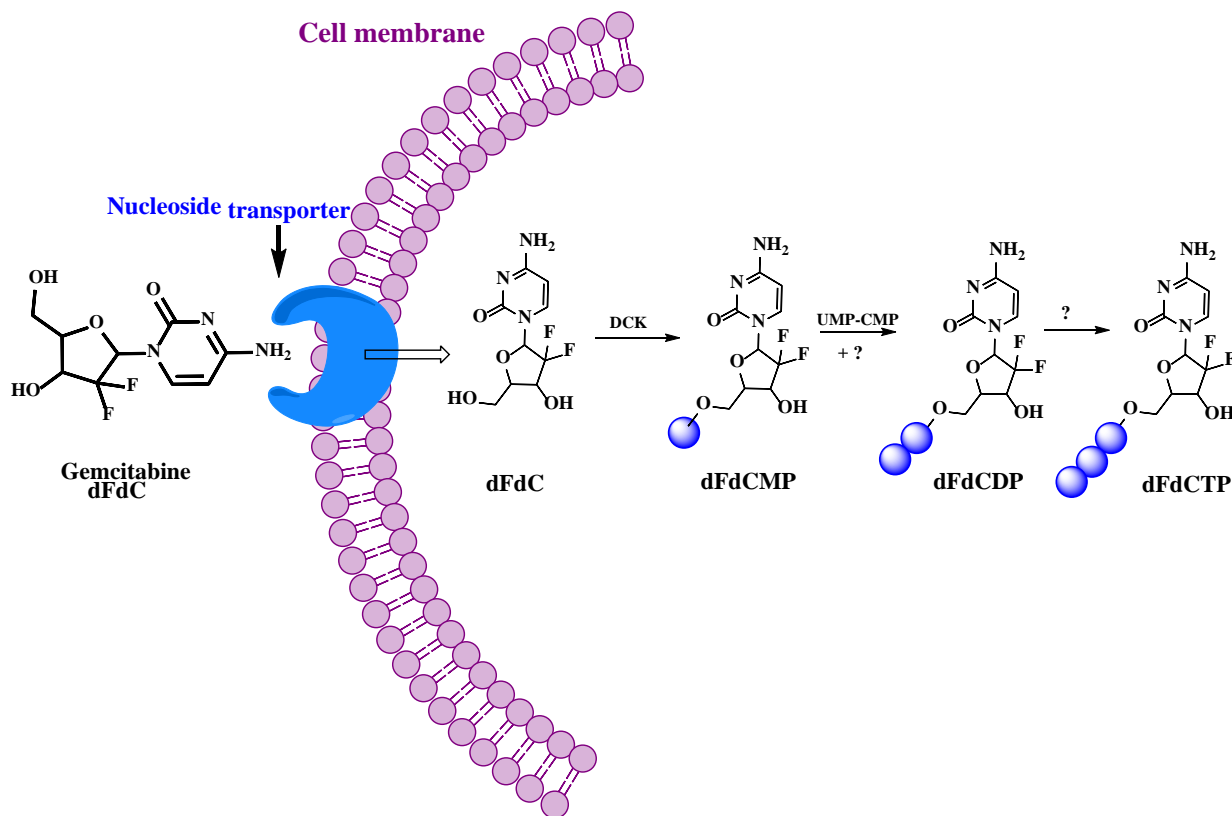
Σχήμα 20. Το μοντέλο της πρόσληψης της γεμισιταβίνης από νουκλεοσιδικούς μεταφορείς. Η γεμισιταβίνη είναι ένα υδρόφιλο φάρμακο που απαιτεί νουκλεοζιτικούς μεταφορείς (hENT1/2 ή hCNT1/3) για αποτελεσματική πρόσληψη. Οι hENTs μπορούν να ισορροπήσουν τα επίπεδα γεμισιταβίνης κατά μήκος των μεμβρανών, αλλά δεν μπορούν να συσσωρεύσουν ενεργά το φάρμακο μέσα στα κύτταρα. Οι hCNT3 μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη συγκέντρωση του διαμεμβρανικού Na^+ (ή H^+ για hCNT3) κατιόντος για να συσσωρευτούν υψηλότερα επίπεδα της γεμισιταβίνης μέσα στα κύτταρα. Για τα κύτταρα με σημαντικά επίπεδα hENTs και hCNTs, οι hCNTs μεταφέρουν ενεργά την γεμισιταβίνη στο εσωτερικό των κυττάρων, αλλά οι hENTs θα εκκρέουν γεμισιταβίνη με σκοπό την εξισορρόπηση των επιπέδων του φαρμάκου κατά μήκος των

μεμβρανών, προκαλώντας μειωμένη πρόσληψη γεμισαβίνης σε σύγκριση με κύτταρα με μόνο hCNTs. Τα hENT1-αρνητικά καρκινικά κύτταρα (τα οποία συσχετίζονται με την αντίσταση προς την γεμισαβίνη) θεωρείται ότι έχουν σχετικά χαμηλή δραστηριότητα hENT, τέτοια ώστε η διαμόλυνση αυτών των κυττάρων με ένα hCNT θα ήταν ιδανικό για την αύξηση της πρόσληψης της γεμισαβίνης¹⁰⁸.

1.8.4 Μεταβολισμός της γεμισαβίνης

Η γεμισαβίνη (dFdC) προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μέσω των νουκλεοσιδικών μεταφορέων και έπειτα υφίσταται ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση από κινάση στις ομάδες υδροξυλίου του και δίνει διαδοχικά μονο- (dFdCMP), δι- (dFdCDP) και τρι- φωσφορικά (dFdCTP), τα οποία αποτελούν τους δραστικούς μεταβολίτες της γεμισαβίνης (Σχήμα 21). Απ' αυτούς, ο dFdCDP και ο dFdCTP είναι οι πιο σημαντικοί μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για την κυτταροτοξικότητα της γεμισαβίνης¹⁰⁹.

Συγκεκριμένα, μόλις εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου, η γεμισαβίνη φωσφορυλιώνεται στο κυτταρόπλασμα από την κινάση της δεοξυκυτιδίνης (dCK) προς το μονοφωσφορικό μεταβολίτη (DFdCMP) και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται εκ νέου αλλά αυτή τη φορά από τη μονοφωσφορική κινάση του νουκλεοσιδίου της πυριμιδίνης (UMP-CMP κινάση) για να δώσει την διφωσφορική γεμισαβίνη (dFdCDP)¹¹⁰⁻¹¹³. Αλλα ένζυμα, τα οποία είναι ακόμα άγνωστα, μπορούν επίσης να εκτελέσουν τη δεύτερη φωσφορυλίωση¹¹⁴ καθώς όπως έχει αναφερθεί, η αύξηση ή μείωση της UMP-CMP κινάσης δεν επηρεάζει τα επίπεδα των dFdCDP και dFdCTP σε κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος του παχέος εντέρου¹¹⁴. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για το τελικό στάδιο φωσφορυλίωσης (DFdCDP προς τον δραστικό μεταβολίτη (dFdCTP) είναι ασαφές, αν και η διφωσφορική κινάση νουκλεοσιδίου μπορεί να παίζει αυτό το ρόλο¹¹⁵. Η πρώτη φωσφορυλίωση από την dCK θεωρείται το καθοριστικό στάδιο για την ταχύτητα της παραγωγής dFdCDP και dFdCTP^{116, 117}.



Σχήμα 21. Σχηματική απεικόνιση φωσφορυλίωσης της γεμισαβίνης μέσα στο κύτταρο.

Η απλή γεμισαβίνη μπορεί να καταστεί αδρανοποιημένη μέσω απαμίνωσης από την απαμινάση της κυτιδίνης (CDA) και, όταν είναι στην μονοφωσφορική μορφή αδρανοποιείται μέσω απαμίνωσης από την απαμινάση της δεοξυκυτιδίνης (dCTD)^{118, 119}. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η CDA έχει σχεδόν την μισή συγγένεια προς την γεμισαβίνη σε σύγκριση με την δεοξυκυτιδίνη¹¹¹. Το προϊόν της απαμίνωσης της γεμισαβίνης από την CDA είναι το 2',2'-διφθορο-2'-δεοξουριδίνη (dFdU) έχει αρκετούς ενδοκυτταρικούς ρόλους, όπως να ρυθμίζει τη μεταφορά, τη συσσώρευση και την κυτταροτοξικότητα της γεμισαβίνης, καθώς επίσης και να είναι η ίδια κυτταροτοξική¹²⁰⁻¹²². Επίσης, η dFdU μονοφωσφορική (dFdUMP) μπορεί να αναστείλει την δραστηριότητα της θυμιδυλικής συνθάσης, επηρεάζοντας άμεσα το τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοτίδιο (dNTP)¹²³.

Η γεμισαβίνη μπορεί επίσης να καταστεί αδρανοποιημένη μέσω της αποφωσφορυλίωσης της μονοφωσφορικής της μορφής από 5'-νουκλεοτιδάσες (5'-NTs), μετατρέποντας τα νουκλεοτίδια πίσω σε νουκλεοσίδια¹²⁴⁻¹²⁶. Τα ένζυμα αυτά παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ισορροπία των δεξαμενών dNTP και, ως εκ τούτου, στο μεταβολισμό της γεμισαβίνης. Με τον τρόπο αυτό, το περιοριστικό στάδιο όσον αφορά το ρυθμό της φωσφορυλίωσης από την dCK μπορεί επίσης να επηρεαστεί και έτσι να θέσει σε κίνδυνο την συνολική ευεργετική κυτταροτοξικότητα της γεμισαβίνης.

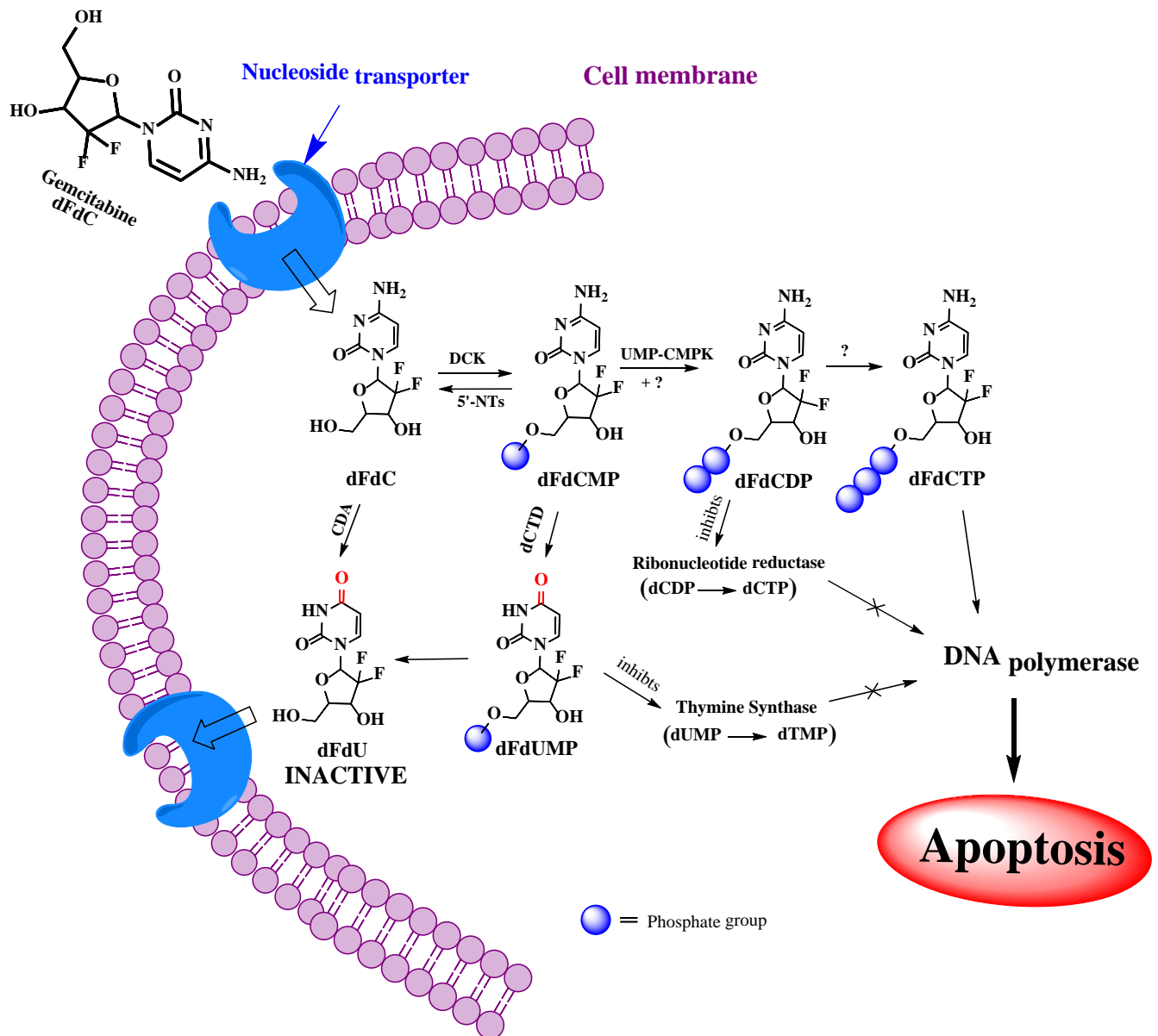
1.8.5 Μηχανισμός δράσης της γεμισταβίνης

Ο σημαντικότερος μηχανισμός δράσης της γεμισταβίνης είναι η αναστολή της σύνθεσης του DNA¹²⁷. Όταν ο dFdCTP ενσωματώνεται στο DNA, ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο ενσωματώνεται στη συνέχεια, αποτρέποντας την επιμήκυνση της αλυσίδας¹²⁸. Αυτή η μη-τερματική θέση της γεμισταβίνης στην αλληλουχία, καθιστά τις DNA πολυμεράσες αδύνατες να λειτουργήσουν, μια διαδικασία γνωστή ως 'masked chain-termination' η οποία αναστέλλει επίσης την απομάκρυνση της γεμισταβίνης από το DNA από τα ένζυμα επισκευής (**Σχήμα 22, 23A**)¹²⁷.

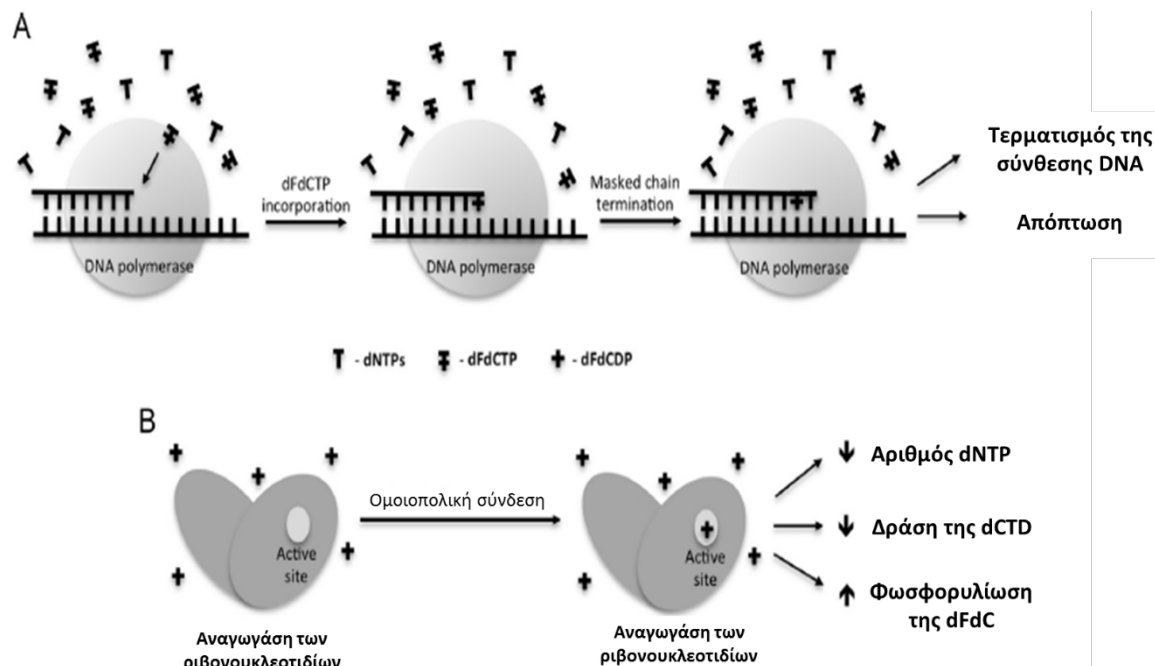
Ένας επιπλέον μηχανισμός δράσης της γεμισταβίνης είναι η αυτοενίσχυση (self-potentiation) με αναστολή της δράσης των ενζύμων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Ένα από αυτά τα ένζυμα, το dCTD, αναστέλλεται άμεσα από τον μεταβολίτη dFdCTP και έμμεσα από τον dFdCDP¹¹⁸. Αυτή η έμμεση αναστολή του dCTD από το dFdCDP οφείλεται σε μια μείωση της τιμής του ενδοκυτταρικού dNTP. Η ριβονουκλεοτιδική αναγωγή (RR), η οποία καταλύει την αναγωγή ριβονουκλεοτιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια, αναστέλλεται από το dFdCDP μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης στο ενεργό κέντρο,^{129, 130} μειώνοντας το dNTP και κατά συνέπεια προκαλείται μείωση της δραστηριότητας του dCTD¹¹⁸. Επιπλέον, δεδομένου ότι η δραστηριότητα της dCK ρυθμίζεται από το dCTP,¹³¹ μειώνοντας το dNTP προωθείται η φωσφορυλίωση του dFdC, αυξάνοντας έτσι το επίπεδο της dFdCTP και την αναλογία του dCTP, καθιστώντας dFdCTP πιο πιθανό να ενσωματωθεί στο DNA (**Σχήμα 22, 23B**).

Η επαγωγή της απόπτωσης μέσω σηματοδότησης της κασπάσης είναι επίσης ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός δράσης¹³²⁻¹³⁴. Η γεμισταβίνη ενεργοποιεί την p38 πρωτεϊνική κινάση (MAPK- Mitrogen Activated Protein Kinase) για να προκαλέσει την απόπτωση σε απόκριση προς το κυτταρικό στρες στα καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι στα φυσιολογικά κύτταρα^{133, 135}. Πράγματι, η δραστηριότητα της MAPK-ενεργοποιημένης πρωτεϊνικής κινάσης (MK2), ένας p38-MAPK τελεστής, φαίνεται να απαιτείται για τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από την γεμισταβίνη in vitro. Η αναστολή της MK2 οδηγεί στην επιβίωση των κυττάρων του οστεοσαρκώματος όταν πραγματοποιείται αγωγή με γεμισταβίνη, λόγω δραστηριότητας της πολυμεράσης μετάφρασης¹³⁶. Αντιστρόφως, η ενεργοποίηση της p38-MAPK και της MK2 από τη γεμισταβίνη μπορεί να προκαλέσει φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ 27 (Hsp27), μια πρωτεΐνη-συνοδός που σχετίζεται με την ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη, οδηγώντας σε καταστολή της ανάπτυξης in vitro¹³⁷. Αρκετές μελέτες που χρησιμοποιούν πρωτεομική ανάλυση και προσεγγίσεις αναστολής των Hsp27 έχουν δείξει ότι η αντίσταση προς τη γεμισταβίνη σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της Hsp27 και της φωσφορυλίωσης¹³⁸. Ωστόσο, αυτά τα αποτελέσματα είναι σε αντίθεση με την αντιπολλαπλασιαστική επιδράση της γεμισταβίνης στις φωσφορυλιωμένες Hsp27¹³⁷. Αυτά τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία για να διευκρινιστεί ο ακριβής ρόλος της Hsp27 στην αντίσταση ως προς την γεμισταβίνη.

Ο τρόπος που μεταβολίζεται και δρά η γεμισταβίνη μόλις εισέλθει στο κύτταρο φαίνεται συνοπτικά στο **Σχήμα 22**:



Σχήμα 22. Σχηματική απεικόνιση του μεταβολισμού και της δράσης της γεμισταβίνης. CDA: Απαμινάση της κυτιδίνης; DCK: Κινάση της δεοξυκυτιδίνης; UMP-CMPK: Ουριδίνη μονοφωσφορική-Κινάση της μονοφωσφορικής κυτιδίνης; dCTD: Απαμινάση της μονοφωσφορικής δεοξυκυτιδίνης dCDP: διφωσφορική δεοξυκυτιδίνη; dCTP: τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη; dFdC: γεμισταβίνη; dFdCDP, διφωσφορική γεμισταβίνη; dFdCMP, μονοφωσφορική γεμισταβίνη; dFdCTP, τριφωσφορική γεμισταβίνη; dFdU: 2',2'-διφθοροδεοξουριδίνη; dFdUMP: 2',2'-διφθοροδεοξουριδίνη μονοφωσφορική; dTMP: δεοξυθυμίνη μονοφωσφορική; dUMP: δεοξουριδίνη μονοφωσφορική.¹³⁹



Σχήμα 23. Κύριος μηχανισμός δράσης της γεμισιταβίνης. **(Α)** Απεικόνιση του καλυμμένου τερματισμού της αλυσίδα (masked chain-termination). Σε αυτόν τον μηχανισμό, η DNA πολυμεράση ενσωματώνει την τριφωσφορική γεμισιταβίνη (dFdCTP) κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του DNA. Στη συνέχεια, ένα άλλο τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (dNTP) έχει ενσωματωθεί, καθιστώντας την πολυμεράση ανήμπορη να προχωρήσει και στη συνέχεια η επιμήκυνση της αλυσίδας σταματά. **(Β)** Αυτοπολλαπλασιασμός (autoproliferation) της γεμισιταβίνης. Ομοιοπολική πρόσδεση της διφωσφορικής γεμισιταβίνης (dFdCDP) οδηγεί σε αδρανοποίηση της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης (RR), μια σημαντική πρωτεΐνη για την ισορροπία της συγκέντρωσης dNTP. Η αναστολή της RR μειώνει τη συγκέντρωση του dNTP και τη δραστηριότητα της απαμινάσης της δεοξυκυτιδίνης (dCTD), καθιστώντας τη γεμισιταβίνη πιο πιθανό να ενεργοποιηθεί από ένζυμα που μεταβολίζουν νουκλεοτίδια και ως εκ τούτου να ενσωματωθεί στο DNA.

1.8.6 Αντίσταση και ευαισθησία στην γεμισιταβίνη

Όπως πολλά άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία, η αντίσταση στη γεμισιταβίνη μπορεί να είναι εγγενής ή να αποκτηθεί από κάθε ασθενή ξεχωριστά κατά τη διάρκεια των κύκλων της θεραπείας. Κάποιοι μηχανισμοί έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία και φαίνονται στον **Πίνακα 2**. Ωστόσο, επειδή πολλές απ' αυτές τις διεργασίες είναι πολύπλοκες, μπορεί να είναι δύσκολο να κατανοήσουμε τους ακριβείς ρόλους, και επομένως, τις συνέπειες στην χημειοαντίσταση. Αυτό είναι πολύ σχετικό με τις οδούς σηματοδότησης που εμπλέκονται στην απόπτωση, ανάπτυξη, διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό. Οι μηχανισμοί που σχετίζονται

με το μεταβολισμό της γεμισιταβίνης ήταν οι πρώτοι που συνδέθηκαν με τη χημειοαντίσταση και την ευαισθησία.

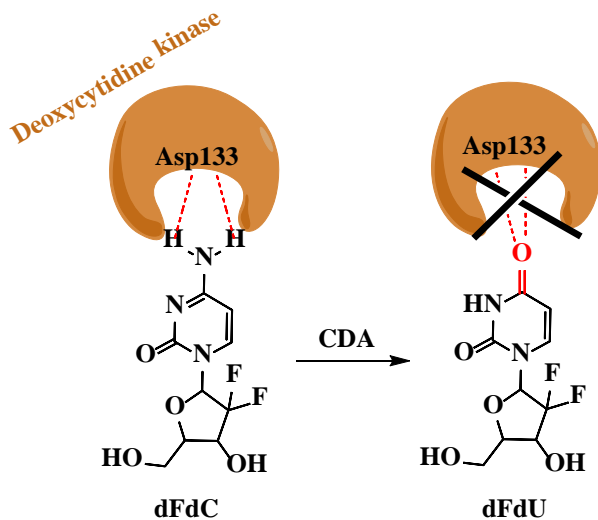
Πίνακας 2. Οι πρωτεΐνες που σχετίζονται πιο συχνά με την αντίσταση της γεμισιταβίνης σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου.

<u>Πρωτεΐνη</u>	<u>Επίπεδα</u>	<u>Τύπος καρκινικών κυττάρων</u>	<u>Αναφορές</u>
hENT1	Ελαττωμένα	Πάγκρεας	Giovannetti et al., 2006; Farrell et al., 2009
hCNT1	Ελαττωμένα	Πάγκρεας	Skrypek et al., 2013
dCK	Ελαττωμένα	Ωοθηκών, πάγκρεας	Ohhashi et al., 2008; Ruiz van Haperen et al., 1994
RRM1	Αυξημένα	Χολή, πάγκρεας, NSCL, παχύ έντερο	Nakano et al., 2007; Nakahira et al., 2007; Ohtaka et al., 2008; Bergman et al., 2005; Davidson et al., 2004
RRM2	Αυξημένα	Πάγκρεας	Duxbury et al., 2004

dCK: κινάση της δεοξυκυτιδίνης; hCNT1: Ανθρώπινος συγκεντρωτικός νουκλεοσιδικός μεταφορέας 1; hENT1: Ανθρώπινος εξισσοροπητικός νουκλεοσιδικός μεταφορέας 1; NSCL: Μη-μικρός καρκίνος του πνεύμονα; RRM1: ριβονουκλεοτιδική αναγωγή I; RRM2: ριβονουκλεοτιδική αναγωγή II.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την αντίσταση και την ευαισθησία στην γεμισιταβίνη όπως το χημικό περιβάλλον του καρκίνου, οι πρωτεΐνες που ευθύνονται για την μεταφορά της γεμισιταβίνης, η ριβονουκλεοτιδική αναγωγή κ.α.¹⁴⁰

Η γεμισιταβίνη στερείται βέλτιστης φαρμακοκινητικής διότι έχει μειωμένη σταθερότητα στο πλάσμα του αίματος¹⁰⁹ και στο συκώτι¹⁴¹ λόγω της ταχείας μετατροπής της στον ανενεργό μεταβολίτη της 2',2'-δεοξυδιφθοροουριδίνη (dFdU) μέσω υδρολυτικής απαμίνωσης στην 4-αμίνη από το ένζυμο απαμινάση της κυτιδίνης. Αυτή η απαμίνωση αποτελεί τεράστιο εμπόδιο στην αναγνώριση ενζύμου-υποστρώματος από την κινάση που φωσφορυλιώνει-ενεργοποιεί την γεμισιταβίνη (κινάση της δεοξυκυτιδίνης), δεδομένου ότι δεν υπάρχουν πλέον δεσμοί υδρογόνου με το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Asp133) και της ομάδας 4-O του dFdU¹⁴² (**Σχήμα 24**). Αυτός είναι ο κύριος λόγος για τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και τη γαστρεντερική τοξικότητα της γεμισιταβίνης. Για να ξεπεραστεί η αστάθεια στο πλάσμα (χρόνος ημιζωής μόνο 1,5 ώρες)¹⁴², η γεμισιταβίνη παρέχεται ενδοφλέβια ένεση αντί της στοματικής χορήγησης¹⁴³.



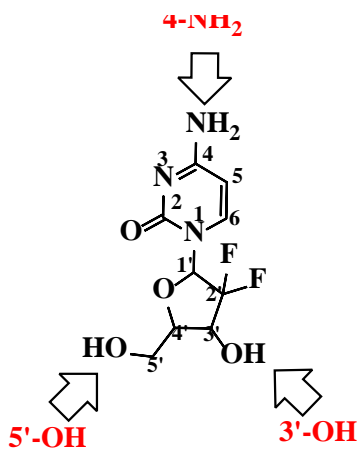
Σχήμα 24. Σχηματική απεικόνιση της ενζυματικής αναγνώρισης της γεμισιταβίνης από την κινάση DCK.

1.8.7 Χημεία της γεμισιταβίνης

Οι ανωτέρω περιορισμοί της γεμισιταβίνης μπορούν να ξεπεραστούν με σύνθεση προ-φαρμάκων ή μέσω σύζευξης με φορέα ή μόρια πλοηγούς (π.χ. πεπτίδια) που στοχεύουν υποδοχείς που υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα.

Εδώ έχουμε ως στόχο μια στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων (γεμισιταβίνη) χρησιμοποιώντας ως όχημα πλοήγησης το πεπτίδιο-φορέα GnRH, το οποίο αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα GnRHR που υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα. Η σύζευξη της γεμισιταβίνης στο πεπτίδιο GnRH επιτεύχθηκε με δεσμό οξίμης.

Η γεμισιταβίνη έχει τρεις λειτουργικές ομάδες (δραστικές θέσεις για γίνουν αντιδράσεις): (Α) την πρωτοταγή υδροξυλομάδα (5'-OH), (Β) την δευτεροταγή υδροξυλομάδα (3'-OH) και (Γ) την αμινομάδα (4-NH₂) (**Σχήμα 25**).



Σχήμα 25. Δομή και χαρακτηριστικές-δραστικές ομάδες της Γεμισιταβίνης.

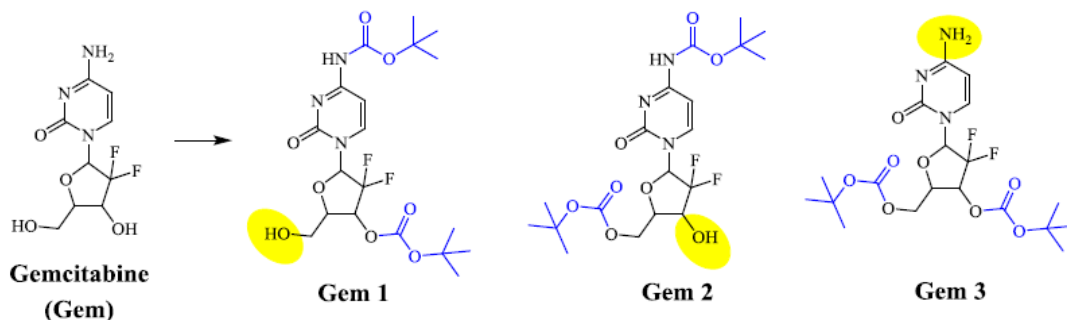
Ακολουθώντας την αρχή της στοχευμένης χορήγησης φαρμάκου, τα ανάλογα της γεμισιταβίνης θα πρέπει να είναι ενζυμικά ή χημικά ασταθή¹⁴⁴ (να υδρολύονται στο μητρικό φάρμακο) στο περιβάλλον του όγκου και να εμφανίζουν την πλήρη δραστητικότητα κατά του όγκου. Έτσι, ο συνδέτης μεταξύ του φαρμάκου και του πεπτιδίου θα πρέπει να σχεδιαστεί ο ώστε να είναι ασταθής στο όξινο pH του μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων και ασταθής στο εξαιρετικά χαμηλό pH του ενδοσώματος και του λυσοσώματος¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ ώστε να υδρολυθεί πλήρως το σύζευγμα και να απελευθερώσει την δραστική μορφή – το μητρικό φάρμακο. Για τον λόγο αυτόν προτιμήθηκε ο δεσμός οξίμης ανάμεσα στο πεπτίδιο και τον κυτταροτοξικό παράγοντα-το φάρμακο.

Για να επιτευχθεί μια τοποεκλεκτική σύζευξη σε μία απ' τις θέσεις (5'-OH, 3'-OH ή 4-NH₂) θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιλεκτικές προστασίες/αποπροστασίες, όπως φαίνονται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3. Οι πιθανοί τρόποι προστασίας αλκοολών και της αμίνης της γεμισιταβίνης.

1) Benzoate (-OBz)	6) Triisopropylsilyl ether (TIPS)
2) Benzyl ether (-OBn)	7) Acetate (Ac)
3) Tert-Butyldimethylsilylether (TBDMS)	8)Tert-Butyldiphenylsilyl ether (TBDPS)
4) Trimethylsilyl ether (TMS)	9) Tert-Butoxy carbonyl (Boc)
5) Triethyl silyl ether (TES)	10) Tosylchloride (TsCl)

Μέσα απ' τους διάφορους τρόπους προστασίας, επιλέξαμε την πλέον διαδεδομένη Boc-προστασία (tert-βουτυλοξυκαρβονυλο προστασία)¹⁴⁷, συνθέτοντας διαφορετικά Boc-προστατευμένα παράγωγα της γεμισιταβίνης τα οποία ονομάσαμε Gem 1, Gem 2 και Gem 3 και παρουσιάζονται στο **Σχήμα 26** αφήνοντας ελεύθερη την πρωτοταγή αλκοόλη, την δευτεροταγή αλκοόλη και την αμίνη αντίστοιχα, ώστε αν γίνουν εκλεκτικά οι αντιδράσεις σύζευξης με τον συνδέτη και ακολούθως με το πεπτίδιο.

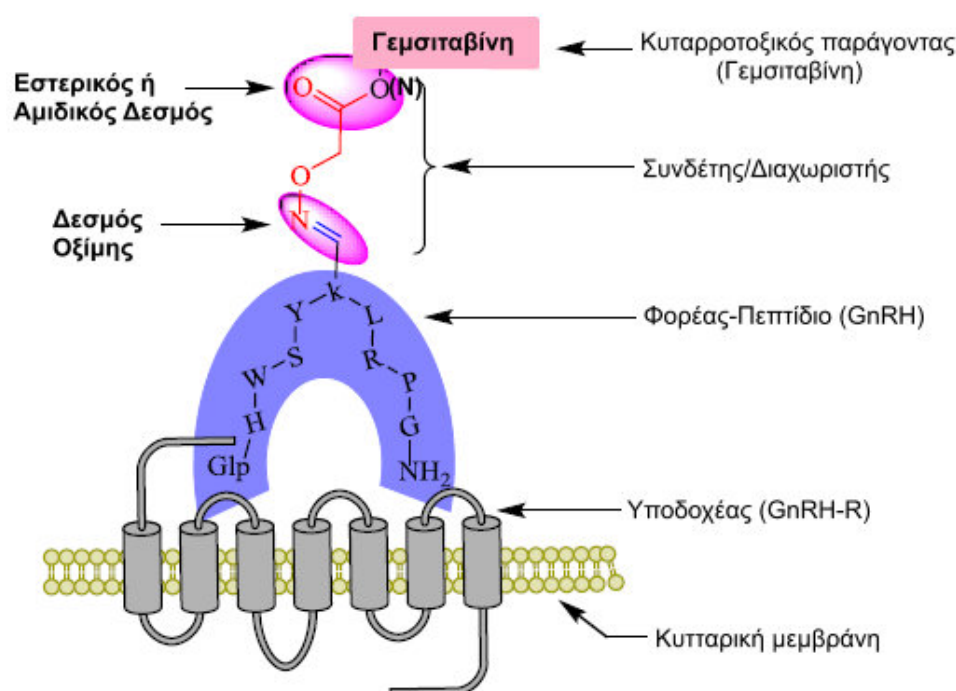


Σχήμα 26. Δομές των Boc-προστατευμένων παραγώγων της γεμισιταβίνης.

2 Βιοσυζεύγματα Γεμισταβίνης-GnRH

2.1 Εισαγωγή

Στην συγκεκριμένη ενότητα θα παρουσιαστεί ο σχεδιασμός και η σύνθεση των διαφόρων αναλόγων που αφορούν στα συζεύγματα Γεμισταβίνης-GnRH. Η γενική απεικόνιση της δομής των συζευγμάτων φαίνεται στο **Σχήμα 27**. Συγκεκριμένα, τα συζεύγματα αποτελούνται από τον κυτταροτοξικό παράγοντα (Γεμισταβίνη) συνδεδεμένο μέσω αμιδικού ή εστερικού δεσμού με τον συνδέτη (με την αμινομάδα ή τις υδροξυλομάδες της Γεμισταβίνης αντίστοιχα), ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται με το πεπτίδιο GnRH (το οποίο αναγνωρίζεται απ' τον υποδοχέα GnRH-R που βρίσκεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης) μέσω δεσμού οξίμης.



Σχήμα 27. Γενική σχηματική απεικόνιση των συζευγμάτων.

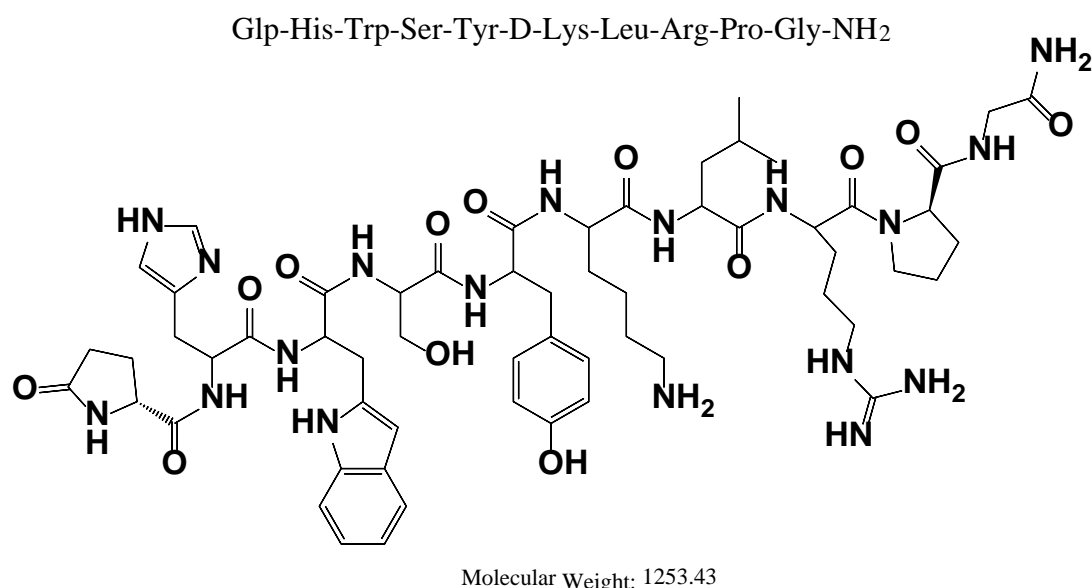
Στην βιβλιογραφία, ο σχηματισμός του δεσμού οξίμης στα βιοσυζεύγματα πραγματοποιείται με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων^{57, 144, 148, 149}, συνδιασμό ρυθμιστικού διαλύματος και θέρμανσης¹⁵⁰, καταλύτες^{151, 152, 153, 154} ή συνδιασμό καταλύτη και ψύξης¹⁵⁵ και παρ' αυτά η αντίδραση εξακολουθεί να απαιτεί αρκετές ημέρες για να ολοκληρωθεί.

Εμείς στοιχειοθετήσαμε μία απλή και ταχεία μέθοδο σχηματισμού δεσμού οξίμης που δεν απαιτεί ρυθμιστικά διαλύματα, περίσσεια γραμμομοριακής αναλογίας των αντιδραστηρίων, καταλύτη και μπορεί να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου εντός λίγων ωρών. Χρησιμοποιήσαμε το μίγμα διαλυτών ACN/H₂O (5/1, v/v), για να σχηματίσουμε δεσμούς οξίμης

σε βιοσυζεύγματα που οδηγούν σε ποσοτικό σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος και το προκύπτον προϊόν είναι καθαρό, χωρίς την ανάγκη για περαιτέρω καθαρισμό.

2.2 Σύνθεση πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH

Παρακάτω παρουσιάζεται η σύνθετική πορεία του πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH, του οποίου η δομή απεικονίζεται στο **Σχήμα 28**.



Σχήμα 28. Δισδιάστατη δομή του πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH .

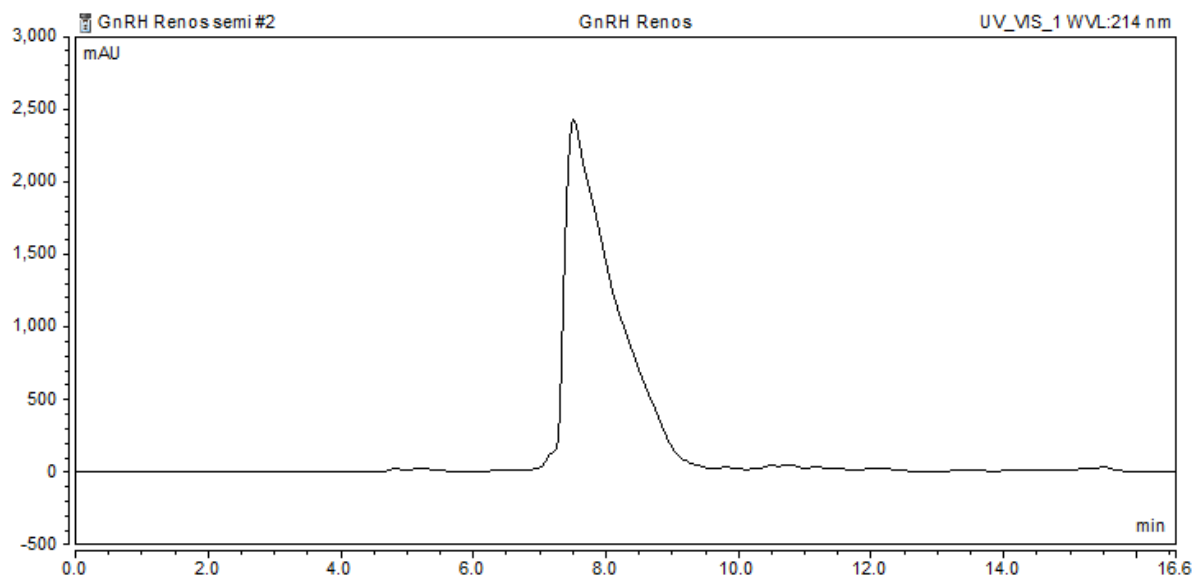
Η σύνθεση του πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης και σύζευξης σε στερεά φάση επί της ρητίνης Rink Amide AM (η οποία συνδυάζεται με την Fmoc/tBu μεθοδολογία) με τη μέθοδο των καρβοδιϊμιδίων και ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν τα DIC/HOBt όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Οι ποσότητες των αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 4**:

Πίνακας 4. Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH.

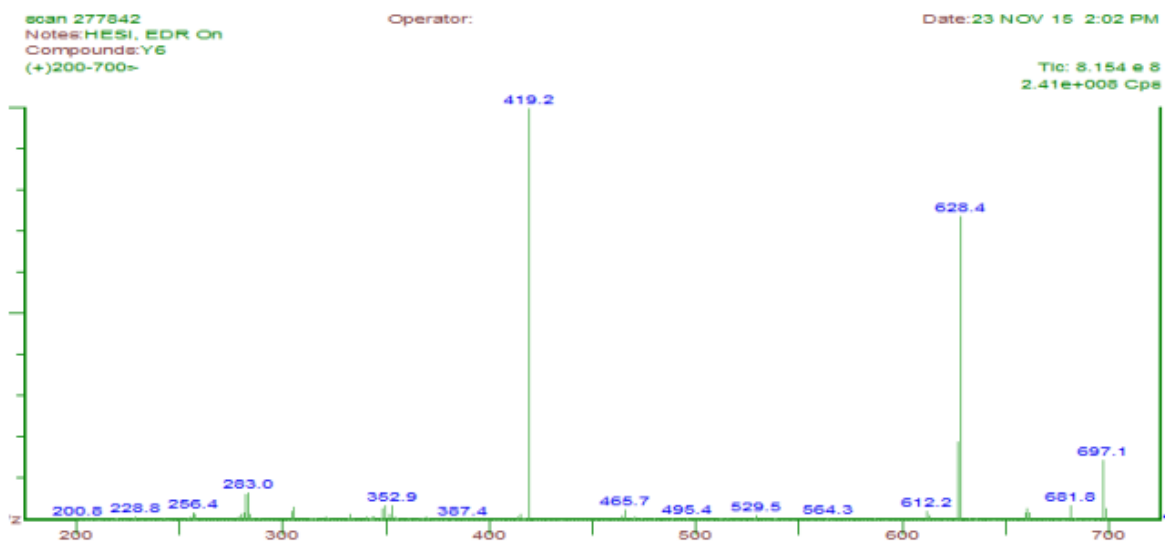
Sr.no.	Aminoacid	Calculationa (MW x mmol x eq)	Quantity
1	Fmoc-Gly-OH	297.3 X 0.478694 X 3	213.47mg
2	Fmoc-Pro-OH	337.4 X 0.478694 X 3	242.26mg
3	Fmoc-Arg(pbf)-OH	648.8 X 0.478694 X 3	465.86mg
4	Fmoc-Leu-OH	353.4 X 0.478694 X 3	253.75mg
5	Fmoc-D Lys(Boc)-OH	468.5 X 0.478694 X 3	336.4mg
6	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459.5 X 0.478694 X 3	329.93mg
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH	383.4 X 0.478694 X 3	275.29mg
8	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.6 X 0.478694 X 3	378.12mg
9	Fmoc-His(Trt)-OH	619.7 X 0.478694 X 3	444.97mg
10	Glp-OH	351.35 X 0.478694 x 3	252.28mg
-	HOBt	135.12 X 0.2393279 X 3	97.02mg
-	DIC	126.2 X 0.2393279 X 3	90.61mg

Η αποκοπή του πεπτιδίου απ' την ρητίνη έγινε με χρήση διαλύματος TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) για να λάβουμε ποσότητα 280mg. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με HPLC με σύστημα 90/10% έως 50/50% H₂O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA. Μετά την HPLC λάβαμε 160mg καθαρού πεπτιδίου.

Στο **Σχήμα 29** φαίνεται το χρωματογράφημα HPLC του πεπτιδίου και στο **Σχήμα 30** το φάσμα μάζης του καθαρού πεπτιδίου.



Σχήμα 29. Χρωματογράφημα HPLC του πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH.



Σχήμα 30. Φάσμα μάζας του πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH.

Ο χαρακτηρισμός μάζας του πεπτιδίου ακολουθεί:

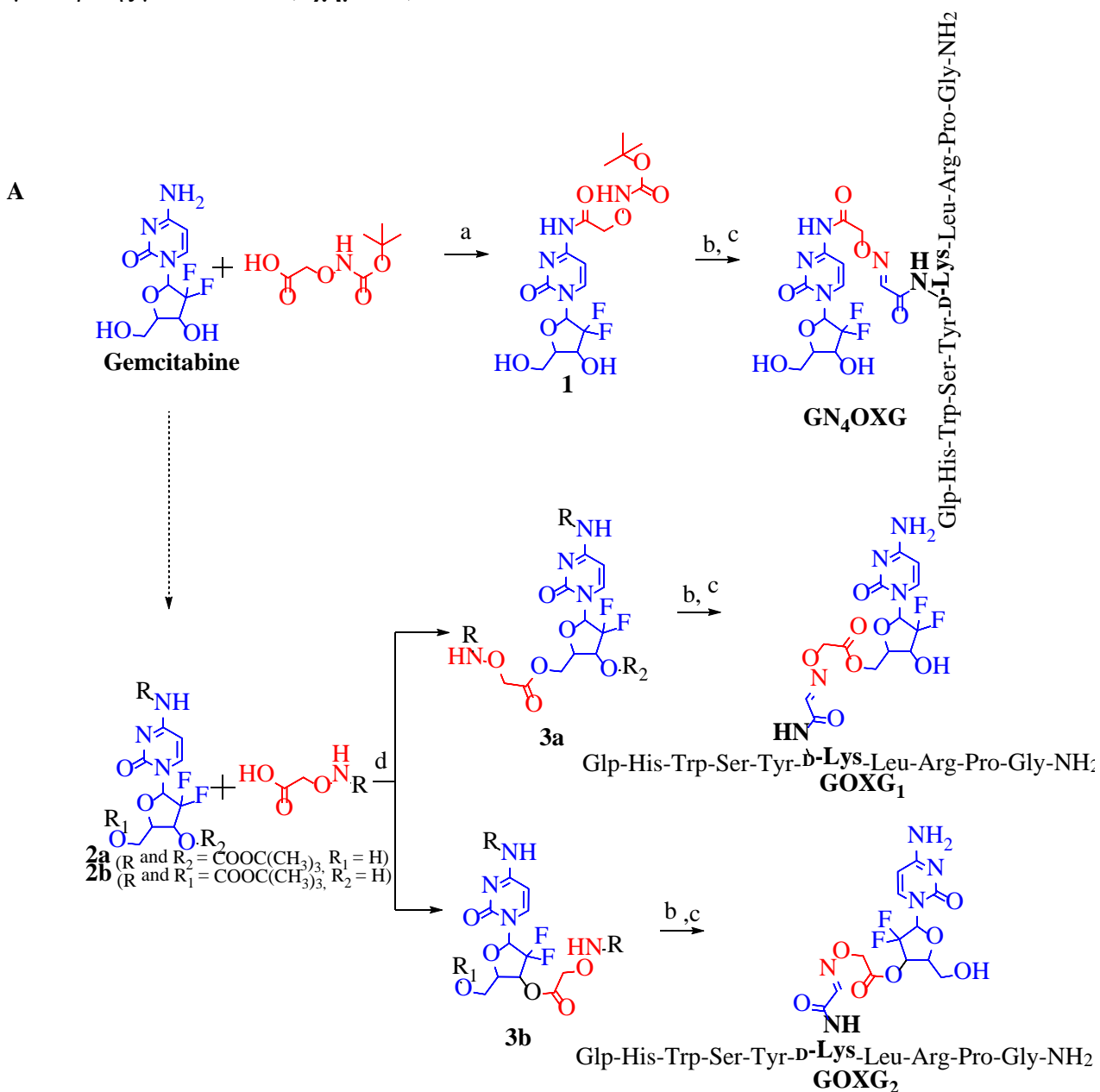
Μάζα πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH: MS (ESI+) m/z για C₅₉H₈₄N₁₈O₁₃: υπολογίστηκε: 1253.5; βρέθηκε: 628.4 [M+2H]²⁺, 419.2 [M+3H]³⁺.

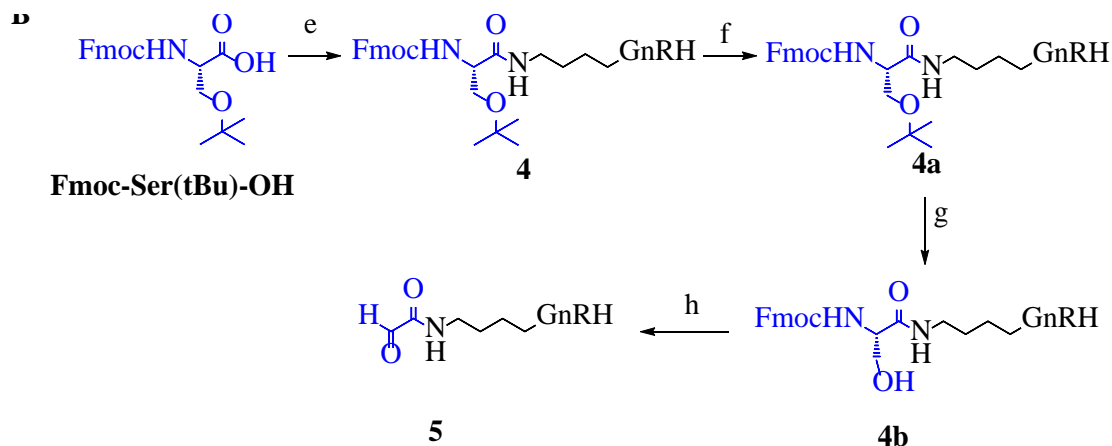
2.3 Σύνθεση συζευγμάτων της Γεμισταβίνης με το GnRH μέσω δεσμού οξίμης

2.3.1 Εισαγωγή

Το αντιδραστήριο ‘Boc-αμινοξύ οξικό οξύ’ χρησιμοποιήθηκε ως συνδέτης για το δεσμό οξίμης καθώς διαθέτει καρβοξυλικό οξύ που ενδύκνεται για την πραγματοποίηση αντιδράσεων με αμίνες (π.χ. αμιδικός δεσμός με την αμίνη της γεμισταβίνης) και με υδροξυλομάδες (π.χ. εστερικός δεσμός με τις υδροξυλομάδες της γεμισταβίνης). Το αμινοξύ τελικό άκρο, μετά από Boc-αποπροστασία σε όζινες συνθήκες είναι σε θέση να αντιδράσει με κετόνες ή αλδεύδες.

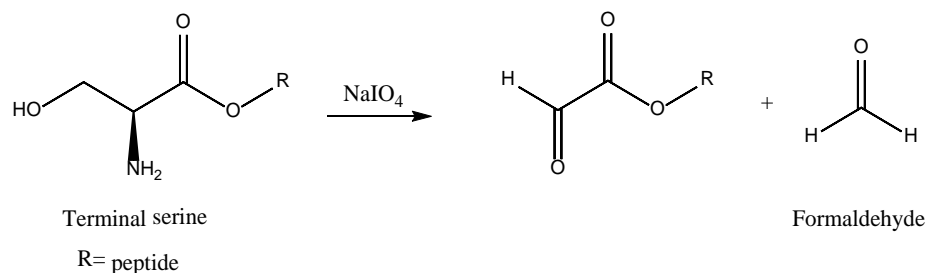
Παρακάτω παρουσιάζεται η γενική συνθετική πορεία για τα διαφορετικά ανάλογα της γεμισταβίνης με το GnRH (Σχήμα 31).





Σχήμα 31. Πειραματική πορεία σύνθεσης των συζευγμάτων (A) Σύνθεση των συζευγμάτων Γεμισταβίνη-συνδέτης-GnRH (a) DCC, NHS, Πυριδίνη/DMF (b) CH₂Cl₂:TFA (95:5), 3h, rt; (c) 5, MeCN:H₂O, 5:1, 24h, rt; (d) PyBOP, HOBT, DMAP, DIPEA, CH₂Cl₂; (B) Σύνθεση του GnRH-αλδεΐδη που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των τελικών αναλόγων: (e) [D-Lys]⁶ - GnRH, PyBOP, HOBT, DIPEA, DMF; (f) 20% πιπεριδίνη σε DMF, rt, 10min; (g) TFA/TIS/H₂O (95 / 2.5 / 2.5, v/v); (h) NaIO₄, ιμιδαζόλιο, H₂O, rt, 5 min.

Το Boc-αμινοξύ οξικό οξύ συζεύχθηκε ομοιοπολικά, με τη χρήση N,N'-δικυκλοεξυλκαρβοδιμίδιο (DCC) και N-Υδρόξυσουκινιμίδιο (NHS)¹⁵⁶, με τα ανάλογα της γεμισταβίνης τα οποία είχαν επιλεκτική Boc-προστασία στο 5'-OH / 4'-NH₂ και 3'-OH / 4'-NH₂¹⁴⁷ για να δώσουν τα προϊόντα **3b** και **3a** αντίστοιχα. Μετά την κατεργασία με TFA, η αμινοξύ ομάδα (η προκείμευσα ένωση είναι πολύ υγροσκοπική και θα πρέπει η οποιαδήποτε διεργασία να γίνει υπο αδρανείς συνθήκες) είναι διαθέσιμη για να αντιδράσει με την ομάδα αλδεΐδης της ένωσης 5. Η ένωση 5 προέκυψε μετά από ορθογώνια σύζευξη και έπειτα οξείδωση της σερίνης στην ε-αμινομάδα της λυσίνης του πεπτιδίου [D-Lys]⁶ - GnRH. Συγκεκριμένα, έγινε αντίδραση σύζευξης μέσω αμιδικού δεσμού μεταξύ μιας Fmoc-Ser(tBu)-OH και της ε-αμινομάδας της [D-Lys]⁶ - GnRH με χρήση PyBOP, HOBT και DIPEA ως βάση. Μετά την απομάκρυνση της Fmoc (20% πιπεριδίνη σε DMF) και tert-βουτυλο αποπροστασία (TFA / TIS / H₂O, 95 / 2,5 / 2,5, v / v) σε υγρή φάση, προέκυψε η ένωση NH₂-Ser-[D-Lys]⁶-GnRH (**4b**). Η ένωση **4b** καθαρίστηκε με HPLC. Επιλεκτική οξείδωση του **4b** στην σερίνη, παρουσία NaIO₄ και ιμιδαζολίου¹⁵⁷ έδωσε την ένωση HCO-CO-[D-Lys]⁶-GnRH (**5**). Μη ακετυλιωμένη N-τερματική σερίνη και θρεονίνη ως υπολείμματα πεπτιδίων και πρωτεϊνών μπορούν να οξειδωθούν σε αλδεΐδη από υπερϊωδικό^{158, 159} (**Σχήμα 32**).

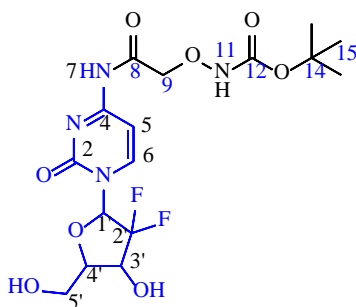


Σχήμα 32. Εκλεκτική οξείδωση τερματικής σερίνης προς αλδεϋδη με χρήση υπεριοδικού νατρίου (NaIO_4).

Θα πρέπει να γίνει χειρισμός με προσοχή της ελεύθερης αμινοξύ ομάδας: Η αμινοξύ ομάδα που σχηματίζεται μετά την Boc-αποπροστασία είναι πολύ δραστική στη παρουσία ηλεκτρονιόφιλων (όπως κετόνες και αλδεϋδες) και ιδιαίτερα με την ακετόνη από τα γυάλινα σκεύη. Στην έναρξη των μελετών μας, δεν είχαν στεγνώσει καλά στο υψηλό κενό οι ενώσεις μας (**1**, **3a**, **3b**) και ίχνη ακετόνης ήταν αρκετά για να αντιδράσουν με την αμινοξύ ομάδα για να σχηματιστεί το παραπροϊόν GOXG₁-Acetone, το οποίο χαρακτηρίστηκε (βλέπε πειραματικό μέρος). Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός παραπροϊόντων μια καλύτερη επιλογή είναι να εκτελέσουμε την Boc-αποπροστασία του αμινοξύ *in situ*, με αποπροστασία και σχηματισμό του δεσμού οξίμης σε ένα στάδιο χωρίς καθαρισμό.

2.3.2 Πειραματική πορεία

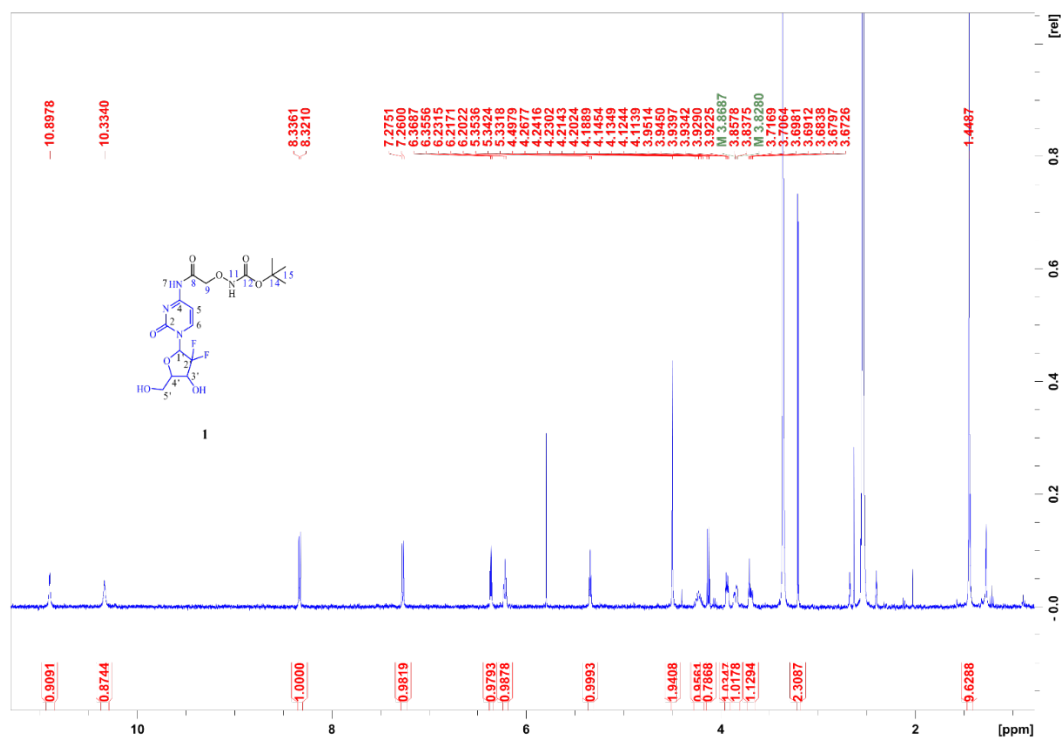
Σύνθεση της ένωσης 1: Σε διάλυμα 8 mL άνυδρων DMF/πυριδίνης (1:1, v/v) προστέθηκαν Boc-αμινοξύ οξικό οξύ (30 mg, 0.1570 mmol), DCC (32.39 mg, 0.157 mmol) και NHS (18.06 mg, 0.157 mmol). Το διάλυμα αναδελύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Μετά από 4 ώρες, διάλυμα γεμισταβίνης (123.9 mg, 0.471 mmol) σε 4 mL άνυδρης πυριδίνης προστέθηκε στάγδην και η αντίδραση αναδεύτηκε για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολούθηθηκε με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC). Ο διαλύτης εξατμίστηκε σε αντλία υψηλού κενού με χρήση θέρμανσης και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με χρήση συστήματος έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη. Το προϊόν συλλέχθηκε στο κλάσμα που περιείχε 6% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο, ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και ξηράνθηκε για να δώσει την ένωση **1** (30 mg, 43.81%) ως λευκό στερεό.



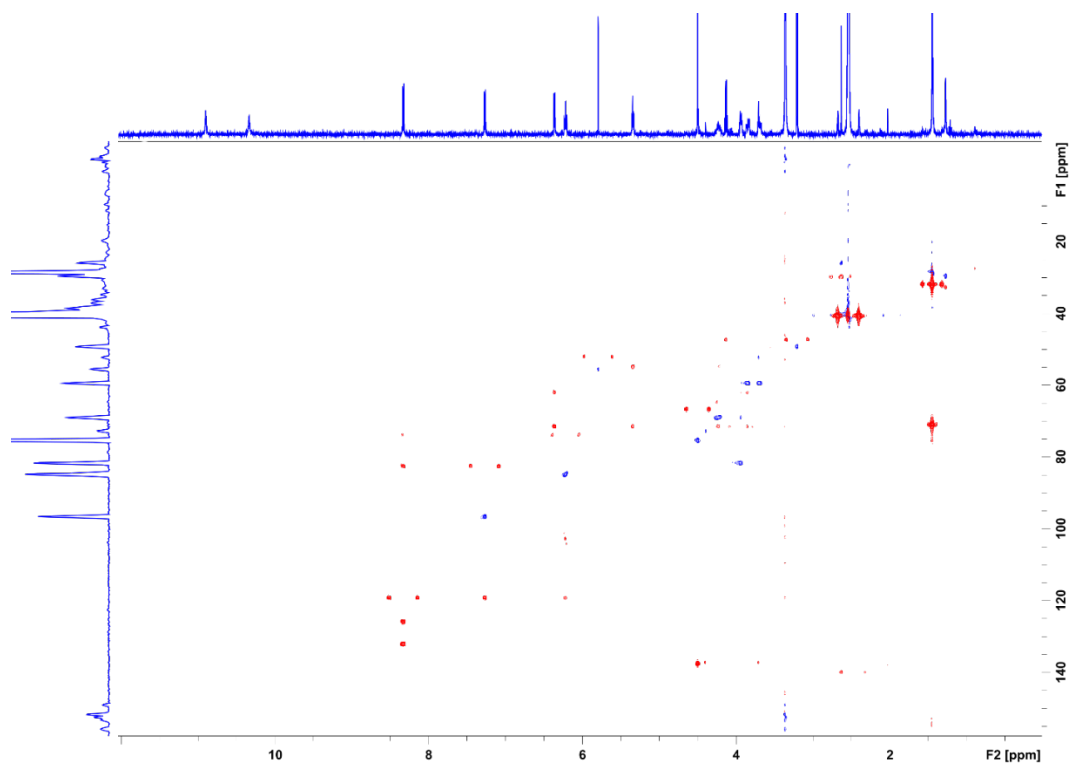
1

Σχήμα 33. Δομή της ένωσης 1.

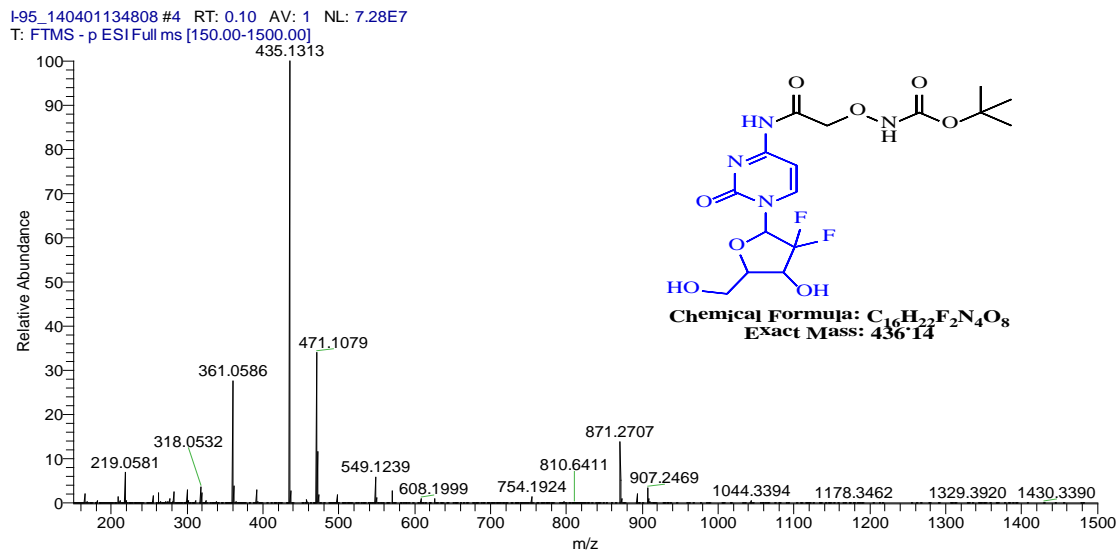
Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία μάζης. Στα Σχήματα 34 και 35 παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC/HMBC της ένωσης 1, αντίστοιχα. Στο Σχήμα 36 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της ένωσης 1.



Σχήμα 34. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 1.



Σχήμα 35. Υπέρθυση φαρμάτων 2D- ^1H - ^{13}C NMR HSQC(μπλέ)-HMBC(κόκκινο) της ένωσης **1**.



Σχήμα 36. Φάσμα μάζης της ένωσης **1**.

Ο χαρακτηρισμός NMR και μάζης της ένωσης **1** ακολουθεί:

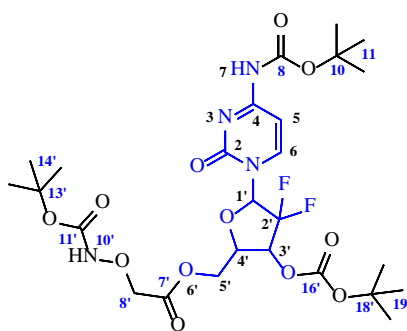
^1H -NMR της ένωσης **1** (500 MHz, DMSO- d_6 , 25°C): δ = 10.89 (s, 1 H, 7-NH), 10.33 (s, 1 H, 11-NH), 8.32 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 6-H), 7.26 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, 5-H), 6.36 (d, J = 6.6 Hz, 1 H, 3'-

OH), 6.21 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, 1'-H), 5.34 (t, J = 5.5 Hz, 1 H, 5'-OH), 4.49 (s, 2 H, 9-H), 4.26- 4.18 (m, 1 H, 3'-H), 3.95- 3.92 (m, 1 H, 4'-H), 3.86- 3.82 (m, 1 H, 5'a-H), 3.71- 3.67 (m, 1 H, 5'b-H), 1.44 (s, 9 H, 15-H) ppm.

¹³C-NMR της ένωσης **1** (500 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 170.51 (C8), 163.20 (C4), 154.92 (C2), 145.90(C6), 123.80 (C2'), 96.64 (C5), 84.85 (C1') 81.74 (C4'), 81.19 (C14), 75.39 (C9), 69.07 (C3'), 59.45 (C5'), 28.73 (C15) ppm.

Μάζα της ένωσης **1**: MS (ESI-) *m/z*: [M-H]⁻ for C₁₆H₂₂F₂N₄O₈ υπολογίστηκε: 436.14; βρέθηκε: 435.13 [M+H]⁺.

Σύνθεση της ένωσης 3a: Στο διάλυμα του **2a** (Boc- προστατευμένη Γεμισταβίνη με ελεύθερη την πρωτοταγή υδροξυλομάδα) (50 mg, 0.107 mmol), Boc-αμινοξύ οξικό οξύ (30.9 mg, 0.161 mmol), PyBOP (112.30 mg, 0.215 mmol), HOBt (29.1 mg, 0.215 mmol) και DMAP (19.7 mg, 0.161 mmol) σε 10 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκε η βάση DIPEA (75.2 μl, 0.431 mmol) υπό αδρανείς συνθήκες και η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η χρήση TLC σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο/ακετόνη (10/1, v/v) έδειξε την πλήρη κατανάλωση του αντιδρώντος **2a** και το σχηματισμό ενός μή πολικού προϊόντος. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε αντλία υψηλού κενού για την πλήρη εξάτμιση του DIPEA. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. Το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε στο κλάσμα 10% ακετόνη σε διχλωρομεθάνιο, ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό αναδευτήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **3a** (50 mg, 73.4%) ως λευκό στερεό.

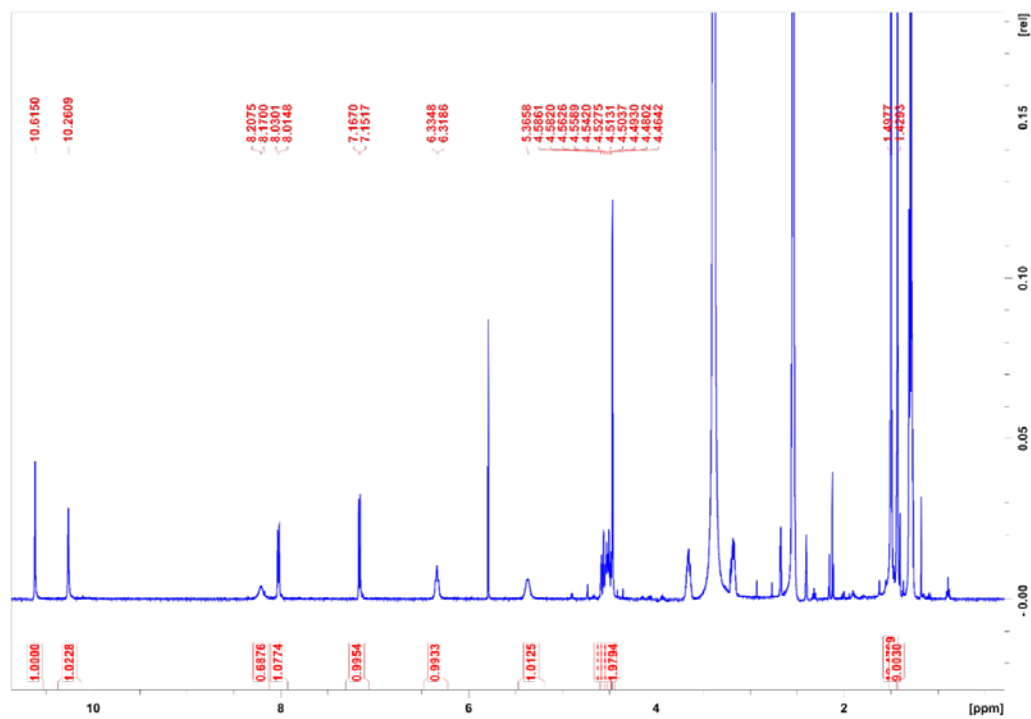


3a

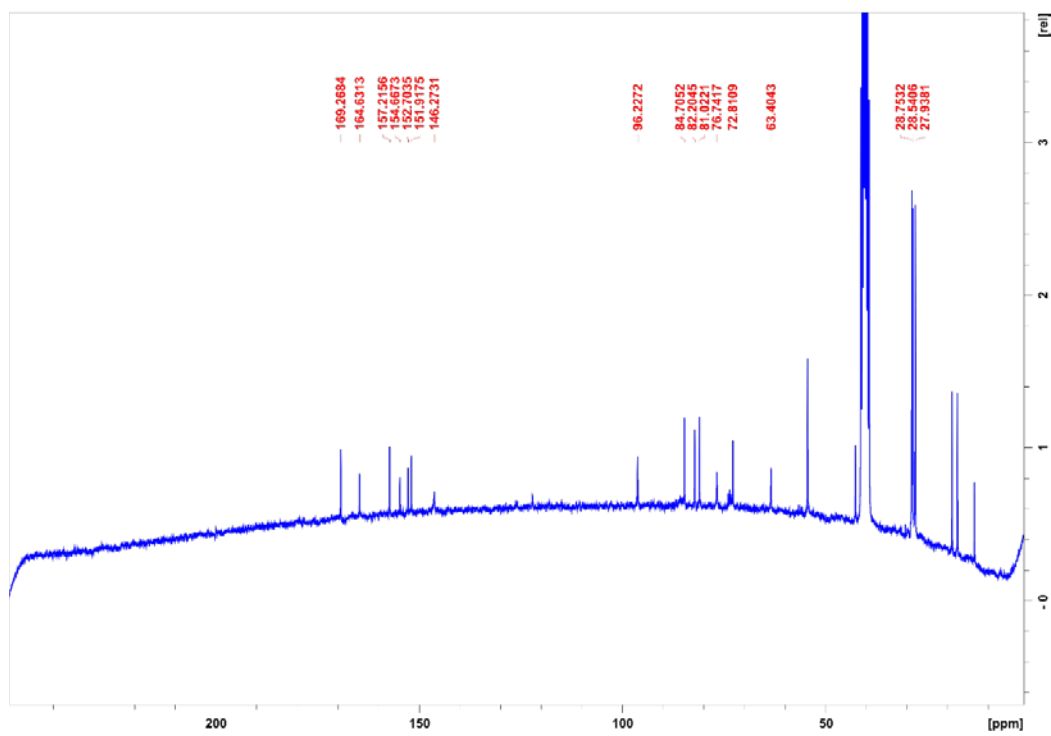
Σχήμα 37. Δομή της ένωσης **3a**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία μάζης. Στα **Σχήματα 38** και **39** παρουσιάζονται τα φάσματα ¹H-NMR και ¹³C-NMR, αντίστοιχα. Στο **Σχήμα**

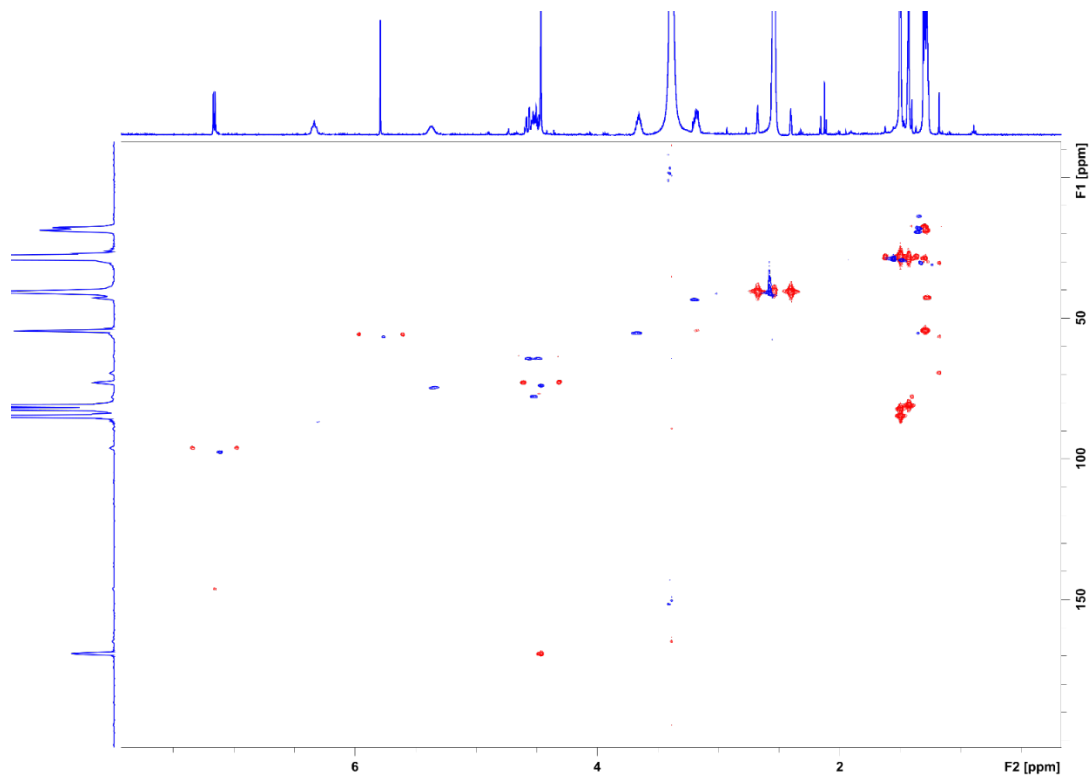
40 παρουσιάζεται υπέρθεση των φασμάτων ^1H - ^{13}C HSQC/HMBC της ένωσης **3a**. Στο Σχήμα 41 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της ένωσης **3a**.



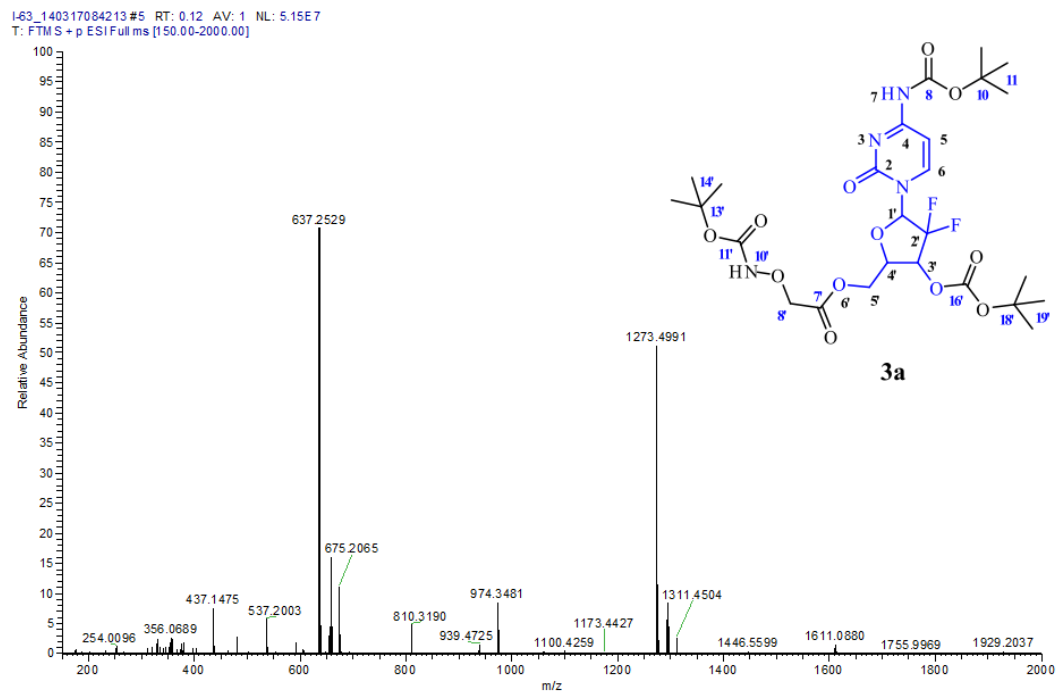
Σχήμα 38. Φάσμα ^1H -NMR της ένωσης **3a**.



Σχήμα 39. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης **3a**.



Σχήμα 40. Υπέρθεση φασμάτων 2D- ^1H - ^{13}C NMR HSQC(μπλέ)-HMBC(κόκκινο) της ένωσης **3a**.



Σχήμα 41. Φάσμα μάζας της ένωσης **3a**.

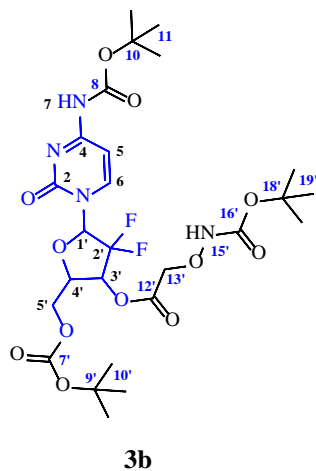
Ο χαρακτηρισμός NMR και μάζας της ένωσης **3a** ακολουθεί:

¹H-NMR της ένωσης **3a** (500 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 10.61 (s, 1 H, 7-NH), 10.25 (s, 1 H, 10'-NH), 8.02 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 6-H), 7.15 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 5-H), 6.33 (t, J = 8.4 Hz, 1 H, 1'-H), 5.37 (m, 1 H, 3'-H), 4.57 (dd, J = 11.7 Hz, 2 Hz, 1 H, 5a'-H), 4.52 (m, 1 H, 4'-H), 4.49 (dd, J = 11.6 Hz, 6.3 Hz, 1 H, 5'b-H), 1.49 (s, 18 H, 11-H and 19'), 1.43 (s, 9 H, 14'-H) ppm;

¹³C-NMR της ένωσης **3a** (500 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 169.27 (C7'), 164.65 (C4), 157.25 (C11'), 154.65 (C2), 146.05 (C6), 96.13 (C5), 85.42 (C1'), 84.85 (C10), 82.28 (C18'), 81.05 (C13'), 76.63 (C4'), 73.43 (C3'), 72.69 (C8'), 63.24 (C5'), 28.59 (C14'), 28.11 (C11), 27.92 (C19') ppm.

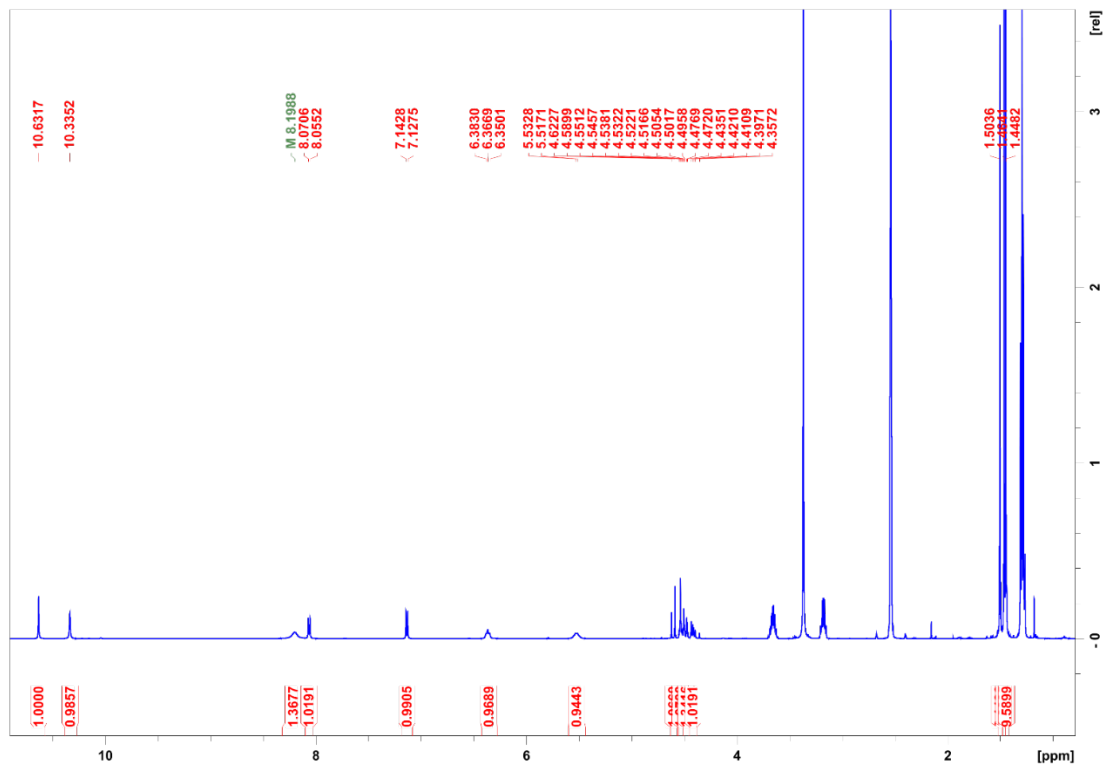
Μάζα της ένωσης **3a**: MS (ESI+) *m/z*: [M+H]⁺ για C₂₆H₃₈F₂N₄O₁₂ υπολογίστηκε: 636.25; βρέθηκε: 637.25 [M+H]⁺.

Σύνθεση της ένωσης 3b: Στο διάλυμα του **2b** (Boc- προστατευμένη Γεμισταβίνη με ελεύθερη την δευτεροταγή υδροξυλομάδα) (50 mg, 0.107 mmol), Boc-αμινοξύ οξικό οξύ (30.9 mg, 0.161 mmol), PyBOP (112.30 mg, 0.215 mmol), HOBt (29.1 mg, 0.215 mmol) και DMAP (19.7 mg, 0.161 mmol) σε 10 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου, προστέθηκε η βάση DIPEA (75.2 μl, 0.431 mmol) υπό αδρανείς συνθήκες και η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η χρήση TLC σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο/ακετόνη (10/1, v/v) έδειξε την πλήρη κατανάλωση του αντιδρώντος **2b** και το σχηματισμό ενός μή πολικού προϊόντος. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε αντλία υψηλού κενού για την πλήρη εξατμίσωση της DIPEA. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης. Το αναμενόμενο προϊόν συλλέχθηκε στο κλάσμα 10% ακετόνης σε διχλωρομεθάνιο, ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό αναδευτήρα και το προϊόν ξηράνθηκε υπό υψηλό κενό για να δώσει την ένωση **3b** (46,7 mg, 68.6%) ως λευκό στερεό.

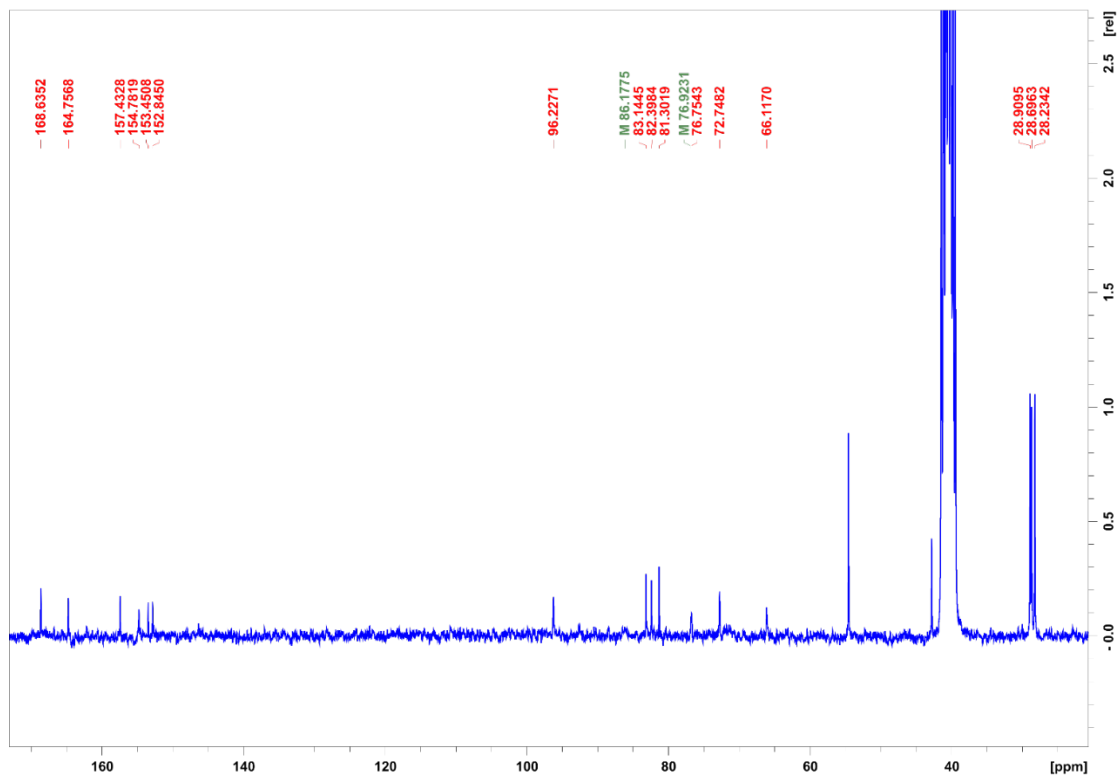


Σχήμα 42. Δομή της ένωση 3b.

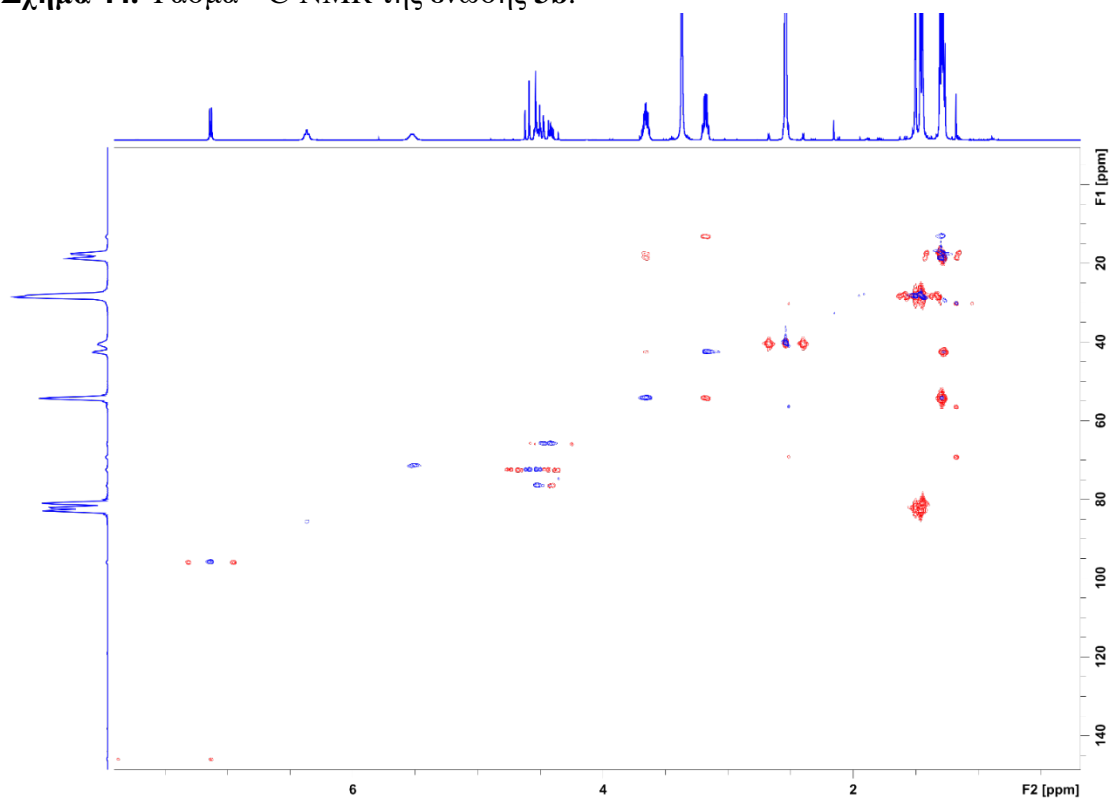
Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία μάζας. Στα Σχήματα 43 και 44 παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ αντίστοιχα. Στο Σχήμα 45 παρουσιάζεται υπέρθεση των φασμάτων $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC/HMBC της ένωσης 3b. Στο Σχήμα 46 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της ένωσης 3b.



Σχήμα 43. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης 3b.

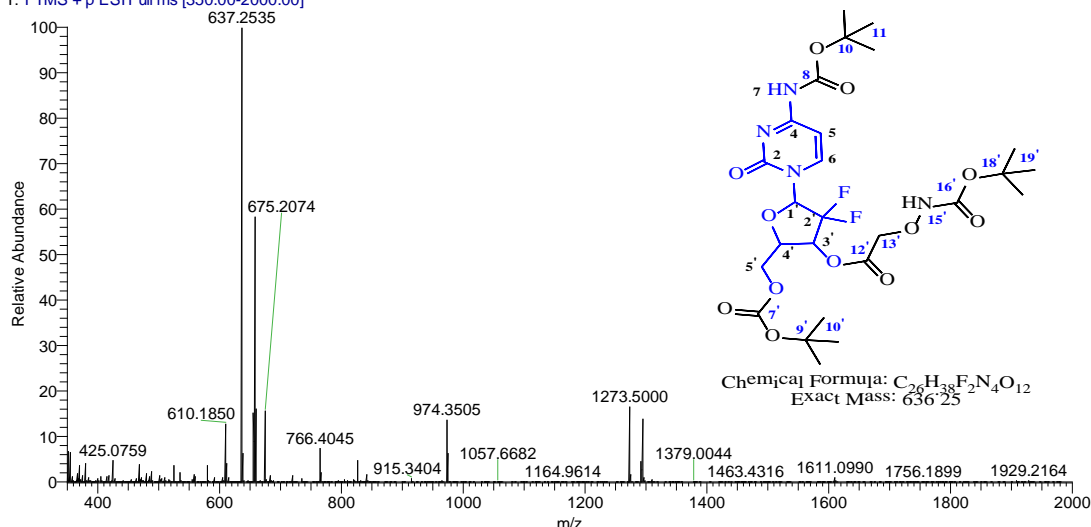


Σχήμα 44. Φάσμα ^{13}C -NMR της ένωσης **3b**.



Σχήμα 45. Υπέρθυση φασμάτων 2D- ^1H - ^{13}C HSQC(μπλέ) - 2D- ^1H - ^{13}C HMBC(κόκκινο) της ένωσης **3b**.

L_81_140317112530 #6 RT: 0.17 AV: 1 NL: 6.99E5
T: FTMS + p ESI Full ms [350.00-2000.00]



Σχήμα 46. Φάσμα μάζης της ένωσης **3b**.

Ο χαρακτηρισμός NMR και μάζης της ένωσης **3b** ακολουθεί:

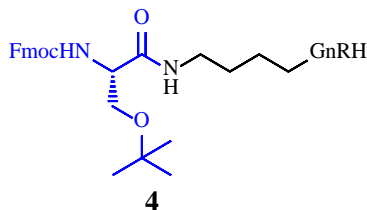
$^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **3b** (500 MHz, DMSO-d_6 , 25°C): δ = 10.63 (s, 1 H, 7-NH), 10.33 (s, 1 H, 15'-NH), 8.06 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 6-H), 7.13 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 5-H), 6.36 (t, J = 8.3 Hz, 1 H, 1'-H), 5.52 (m, 1 H, 3'-H), 4.56 (dd, J = 21.1 Hz, 16.4 Hz, 2 H, 13'-H), 4.55- 4.51 (m, 1 H, 4'-H), 4.48 (dd, J = 12.0 Hz, 2.5 Hz, 1 H, 5'a-H), 4.41 (dd, J = 12 Hz, 7 Hz, 1 H, 5'b-H), 1.50 (s, 9 H, 19'-H), 1.46 (s, 9 H, 10'-H), 1.44 (s, 9 H, 11-H) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ της ένωσης **3b** (500 MHz, DMSO-d_6 , 25°C): δ = 168.63 (C12'), 164.75 (C4), 157.43 (C16'), 154.78 (C2), 153.45 (C7'), 152.84 (C6), 96.22 (C5), 86.17 (C1'), 83.14 (C9'), 82.39 (C18'), 81.30 (C10), 76.92 (C3'), 76.75 (C13'), 72.74 (C4'), 66.11 (C5'), 28.90 (C11), 28.69 (C19'), 28.23 (C10') ppm.

Μάζα της ένωσης **3b**: MS (ESI+) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ για $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$ υπολογίστηκε: 636.25; βρέθηκε: 637.25 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

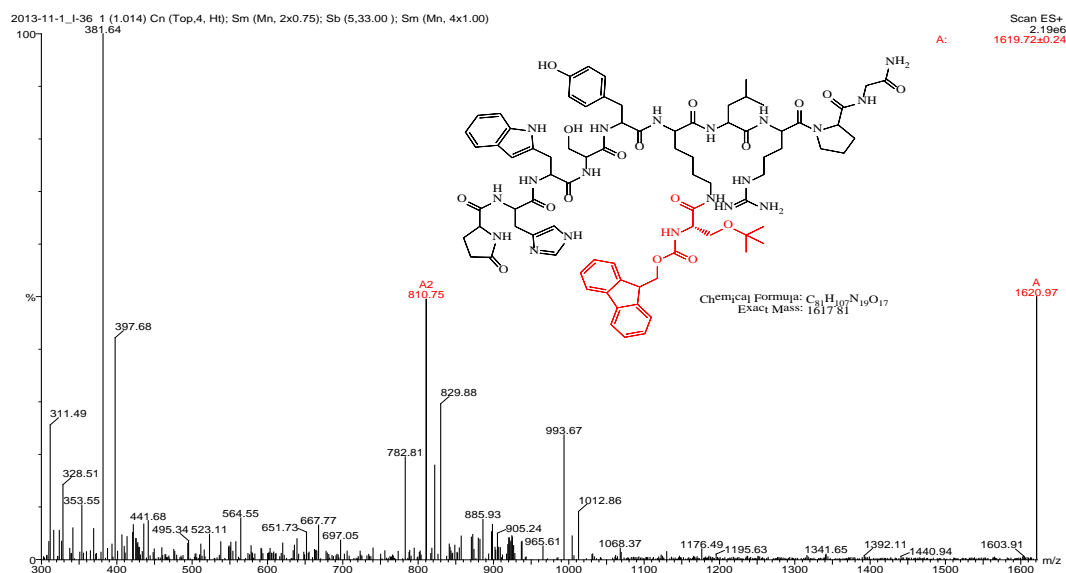
Σύνθεση της ένωσης Fmoc-Ser(tBu)-[D-Lys]⁶-GnRH (4): Σε διάλυμα άνυδρου N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (3 mL), προστέθηκαν Fmoc-Ser(tBu)-OH (6.1 mg, 0.015 mmol), PyBOP (12.42 mg, 0.023 mmol) και HOBt (3.23 g, 0.023 mmol) η βάση DIPEA (13.9 uL, 0.079 mmol) στους 0°C υπό αδρανείς συνθήκες. Μετά από 5 λεπτά, διάλυμα [D-Lys]⁶-GnRH (19.94 mg, 0.015 mmol) σε άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (2 mL) προστέθηκε στάγδην και η αντίδραση

αναδεύτηκε για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλάκα TLC (n-βουτανόλη/H₂O/AcOH, 6/2/2, v/v) έδειξε την πλήρη κατανάλωση της αρχικής ένωσης [D-Lys]⁶-GnRH και τη δημιουργία μιάς νέας κοιλίδας. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό με χρήση θέρμανσης και το υπόλειμμα πλύθηκε 4 φορές με ακετονιτρίλιο (2 x 1 mL) για να δώσει την ένωση **4** (20 mg, 81.59%) ως λευκό στερεό.



Σχήμα 47. Δομή της ένωσης **4**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματομετρία μάζης. Στο **Σχήμα 48** παρουσιάζεται το φάσμα μάζης της ένωσης **4**.

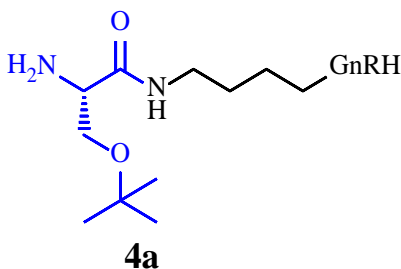


Σχήμα 48. Φάσμα μάζης της ένωσης **4**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός μάζης της ένωσης **4**:

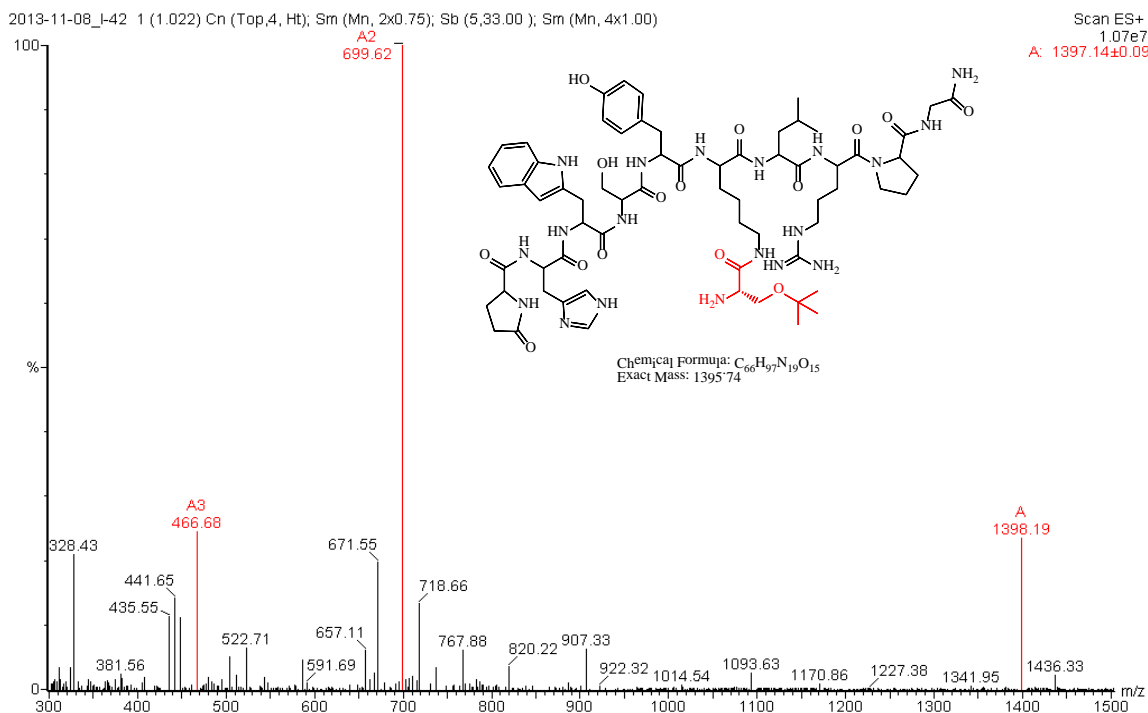
Μάζα για την ένωση **4**: MS (ESI+) *m/z* για C₈₁H₁₀₇N₁₉O₁₇ υπολογίστηκε: 1617.81; βρέθηκε: 1619.77 [M+H]⁺, 810.78 [M+2H]²⁺.

Σύνθεση της ένωσης NH₂-Ser(tBu)-[D-Lys]⁶-GnRH (4a): Η ένωση **4** (15 mg) προστέθηκε σε 2 mL διαλύματος 20% πιπεριδίνη/N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο στους 0°C και αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Η χρήση TLC (n-βουτανόλη/ H₂O/AcOH, 6/2/2, v/v) έδειξε τον σχηματισμό μιας νέας κυλίδας η οποία ήταν ενεργή στο τεστ νινυδρίνης (ύπαρξη ελεύθερης αμινομάδας). Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό με χρήση θέρμανσης και το υπόλειμμα πλύθηκε 2 φορές με ακετονιτρίλιο (2 x 0.5 mL) για να δώσει την ένωση **4a** (12 mg, 92.73%) ως λευκό στερεό.



Σχήμα 49. Δομή της ένωσης **4a**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματομετρία μάζας. Στο **Σχήμα 50** παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της ένωσης **4**.

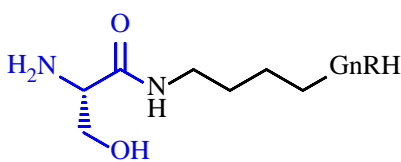


Σχήμα 50. Φάσμα μάζας της ένωσης **4a**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας της ένωσης **4a**:

Μάζα της ένωσης **4a**: MS (ESI+) m/z για $C_{66}H_{97}N_{19}O_{15}$ υπολογίστηκε: 1395.74; βρέθηκε: 1398.19 $[M+H]^+$, 699.62 $[M+2H]^{2+}$, 466.68 $[M+3H]^{3+}$.

Σύνθεση της ένωσης Ser-[D-Lys]⁶-GnRH (4b**):** Η ένωση **4a** (12 mg) διαλύθηκε σε 2 mL διαλύματος TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5, v/v) στους 0°C και αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό στον απαγωγό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική HPLC (85/15 έως 55/45% H₂O+0.1% TFA/MeCN+0.1% TFA, με ροή 5 mL/λεπτό για 30 λεπτά στα 214 nm). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **4b** (10 mg, 86.80%) ως λευκό στερεό.

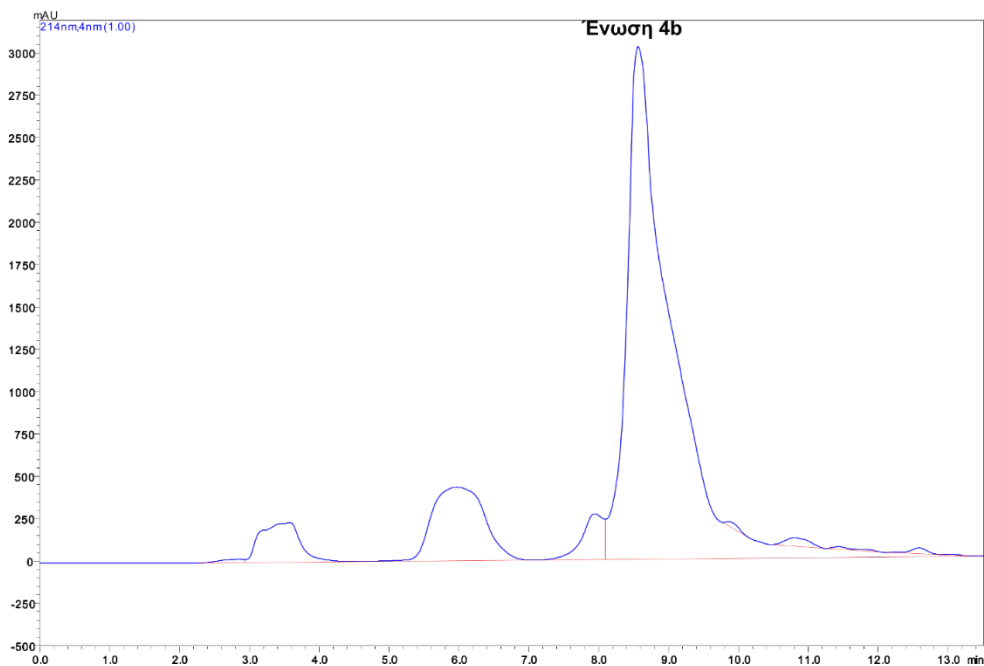


4b

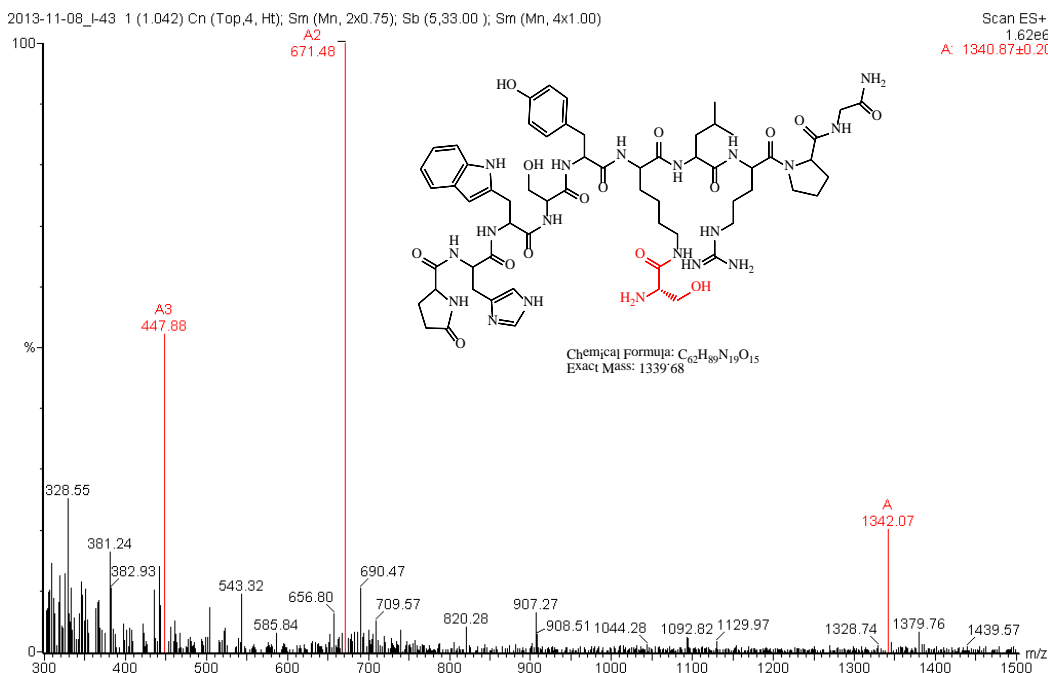
Σχήμα 51. Δομή της ένωσης **4b**.

Ο καθαρισμός της ένωσης έγινε με HPLC. Στο **Σχήμα 52** φαίνεται το χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **4b**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματομετρία μάζης. Στο **Σχήμα 53** παρουσιάζεται το φάσμα μάζης της ένωσης **4b**.



Σχήμα 52. Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **4b**.

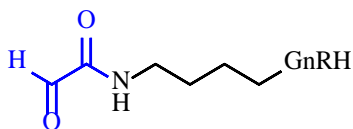


Σχήμα 53. Φάσμα μάζας της ένωσης **4b**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας της ένωσης **4b**:

Μάζα της ένωσης **4b**: MS (ESI+) m/z για $C_{62}H_{89}N_{19}O_{15}$ υπολογίστηκε: 1339.68; βρέθηκε, 1342.07 $[M+H]^+$, 671.48 $[M+2H]^{2+}$, 447.88 $[M+3H]^{3+}$.

Σύνθεση της ένωσης HCO-CO-[D-Lys]⁶-GnRH (5): Στο διάλυμα της ένωσης **4b** (10 mg, 7.464 μmol) σε 0.5 mL H_2O , προστέθηκαν ταυτόχρονα μιδαζόλιο (2.54 mg, 0.037 mmol) και υπεριοδικό νάτριο (1.91 mg, 8.957 μmol) και το προκύπτων μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη εθυλενογλυκόλης (4.16 μl , 0.074 mmol). Η χρήση TLC (n-βουτανόλη/ H_2O /AcOH, 6/2/2, v/v) έδειξε την πλήρη κατανάλωση του αντιδρώντος **4b** και το σχηματισμό μιας νέας μη πολικής κυλίδας που ήταν ενεργή στο τεστ νινυδρίνης ύστερα από ισχυρή θέρμανση. Η αντίδραση λυοφιλοποιήθηκε και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική HPLC (85/15% έως 50/50% H_2O +0.1% TFA/MeCN+0.1% TFA, με ροή 5 mL/λεπτό για 30 λεπτά, στα 214 nm). Η κορυφή που συλλέχθηκε από την HPLC λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την ένωση **5** (9.35 mg, 95.6%) ως λευκό στερεό.

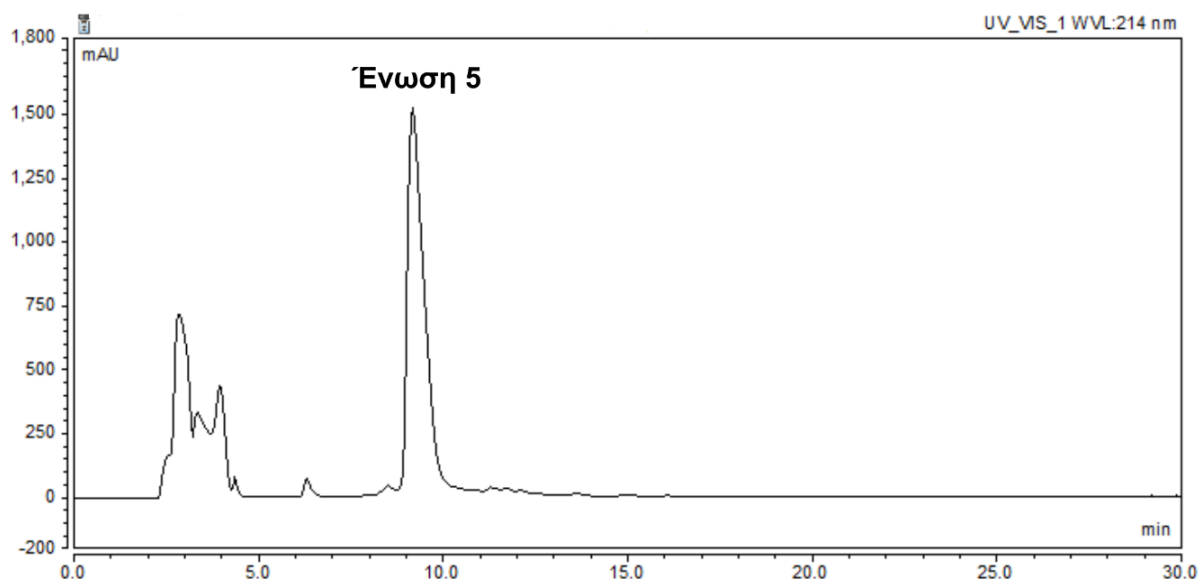


5

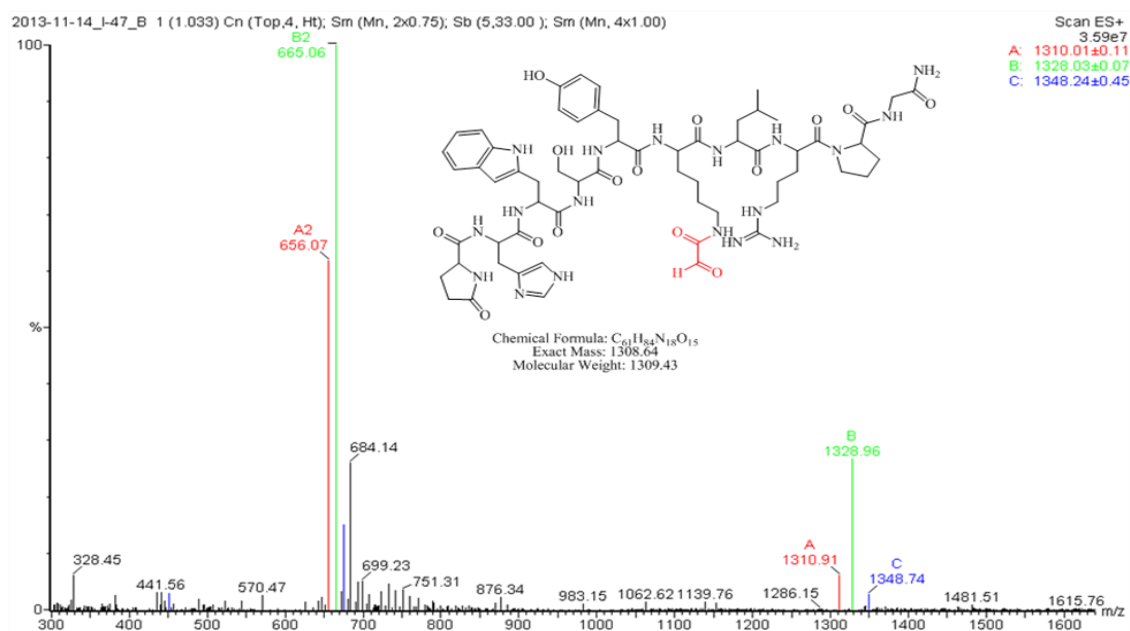
Σχήμα 54. Δομή της ένωσης **5**.

Ο καθαρισμός της ένωσης **5** έγινε με HPLC. Στο **Σχήμα 55** φαίνεται το χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **5**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματομετρία μάζας. Στο **Σχήμα 56** παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της ένωσης **5**.



Σχήμα 55. Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **5**.

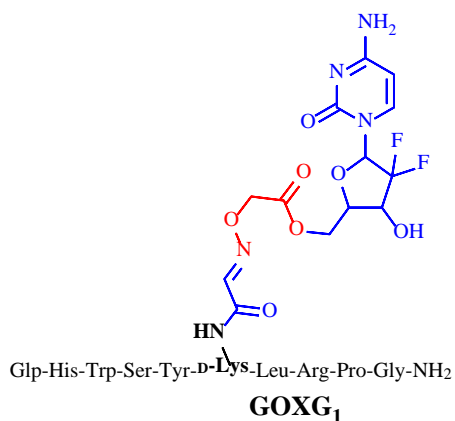


Σχήμα 56. Φάσμα μάζας της ένωσης **5**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας της ένωσης **5**:

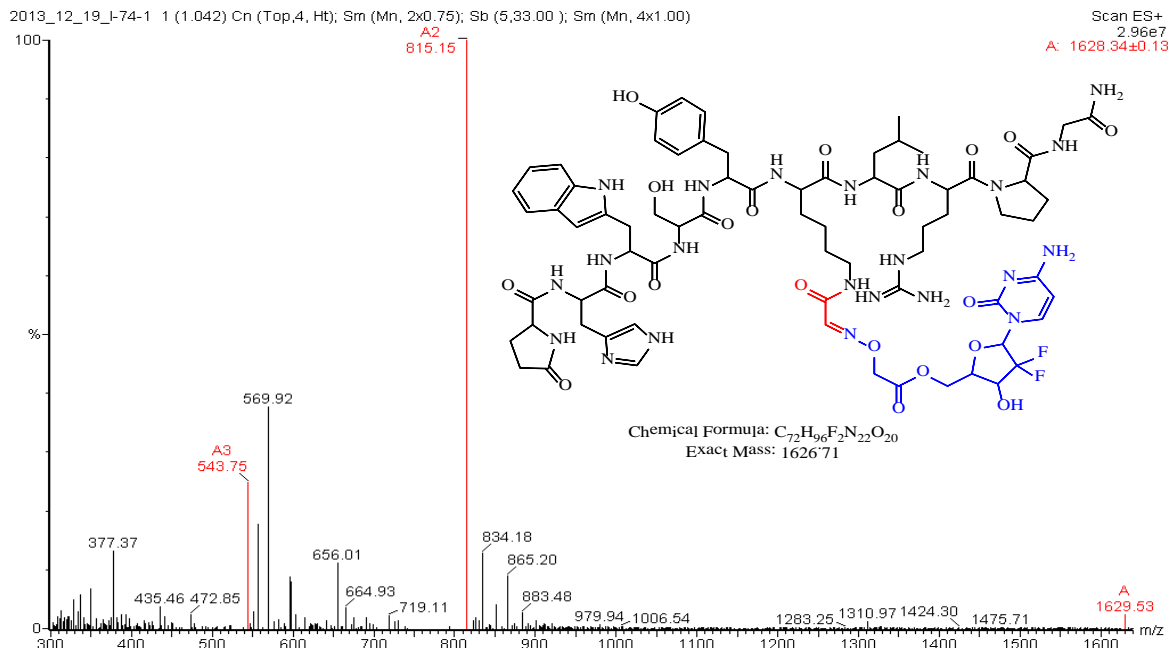
Μάζα της ένωσης **5**: MS (ESI+) m/z για $C_{61}H_{84}N_{18}O_{15}$ υπολογίστηκε: 1308.64; βρέθηκε: 1310.91 $[M+H]^+$, 656.07 $[M+2H]^{2+}$, Με ένα μόριο νερού: MS (ESI+) m/z για $C_{61}H_{84}N_{18}O_{15}\cdot H_2O$ υπολογίστηκε: 1326.64; βρέθηκε: 1328.96 $[M+H]^+$, 665.06 $[M+2H]^{2+}$, Με δυο μόρια νερού: MS (ESI+) m/z για $C_{61}H_{84}N_{18}O_{15}\cdot 2H_2O$ υπολογίστηκε: 1344.64; βρέθηκε: 1348.74 $[M+H]^+$.

Σύνθεση της ένωσης GOXG₁: Η ένωση **3a** (7.331 μ mol) διαλύθηκε σε 1 mL διαλύματος διχλωρομεθάνιο/TFA (95/5%) στους $^{\circ}C$ και το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε μίγμα 2 mL MeCN/H₂O (5/1, v/v). Η ένωση **5** (9.6 mg, 7.331 μ mol) προστέθηκε και το προκύπτων διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η αντίδραση λυοφυλοποιήθηκε για να δώσει την τελική ένωση **GOXG₁** (11.8 mg, 98.9%) ως λευκό στερεό το οποίο δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό βάσει του φάσματος μάζας.



Σχήμα 57. Δομή της ένωσης **GOXG₁**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματομετρία μάζας. Στο **Σχήμα 58** παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της ένωσης **GOXG₁**.

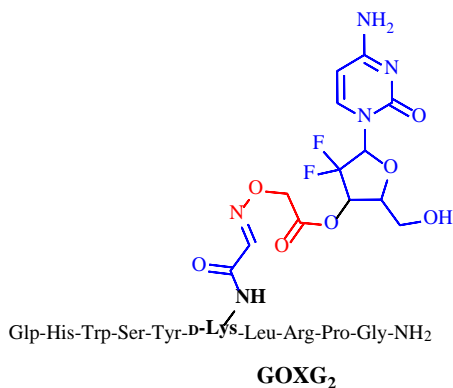


Σχήμα 58. Φάσμα μάζας της τελικής ένωσης **GOXG₁**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας της ένωσης **GOXG₁**:

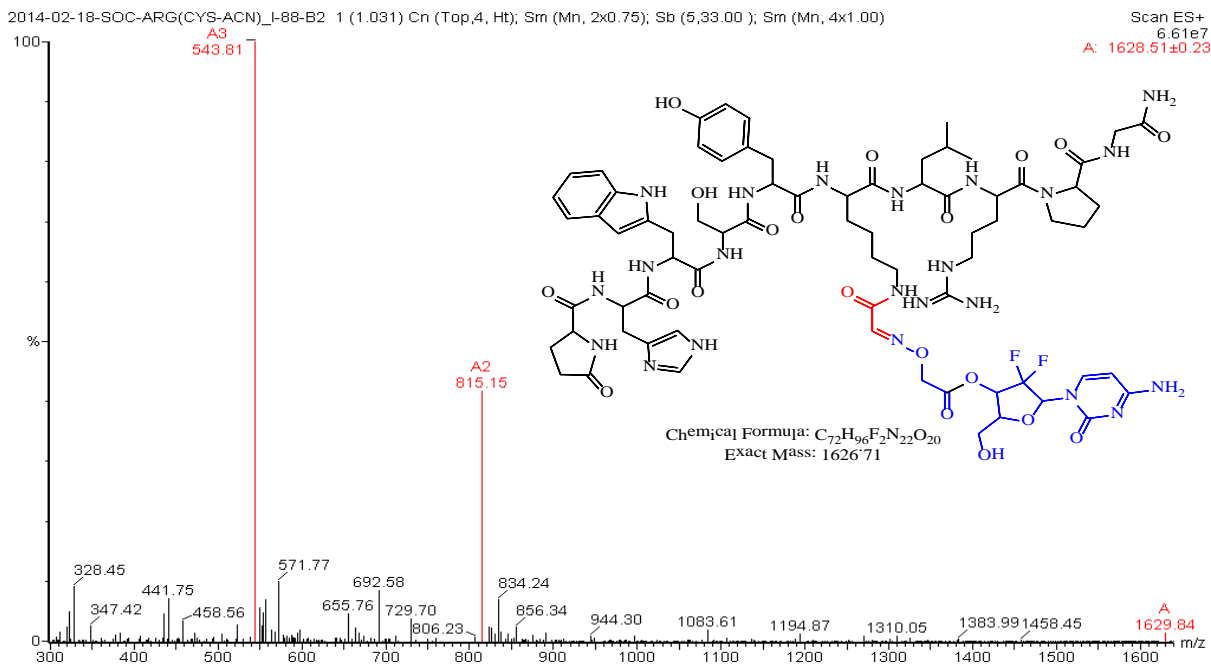
Μάζα της ένωσης **GOXG₁**: ESI-MS m/z για $C_{72}H_{96}F_2N_{22}O_{20}$ υπολογίστηκε: 1626.71; βρέθηκε: 1629.59 $[M+H]^+$, 815.15 $[M+2H]^{2+}$, 543.81 $[M+3H]^{3+}$.

Σύνθεση της ένωσης GOXG₂: Η ένωση **3b** (7.331 μmol) διαλύθηκε σε 1 mL διαλύματος διχλωρομεθάνιο/TFA (95/5%) στους 0 °C και το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό αναδευτήρα και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε μίγμα 2 mL MeCN/H₂O (5/1, v/v). Η ένωση **5** (9.6 mg, 7.331 μmol) προστέθηκε και το προκύπτων διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η αντίδραση λυοφυλοποιήθηκε για να δώσει την τελική ένωση **GOXG₂** (10.9 mg, 91.4%) ως λευκό στερεό το οποίο δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό βάσει του φάσματος μάζας.



Σχήμα 59. Δομή της ένωσης **GOXG₂**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματομετρία μάζης. Στο **Σχήμα 60** παρουσιάζεται το φάσμα μάζης της ένωσης **GOXG₂**.

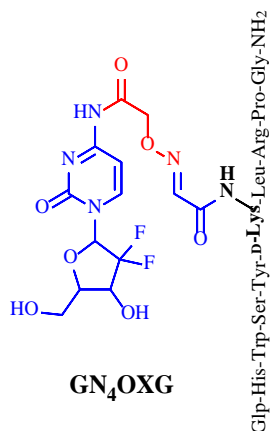


Σχήμα 60. Φάσμα μάζας της τελικής ένωσης **GOXG₂**.

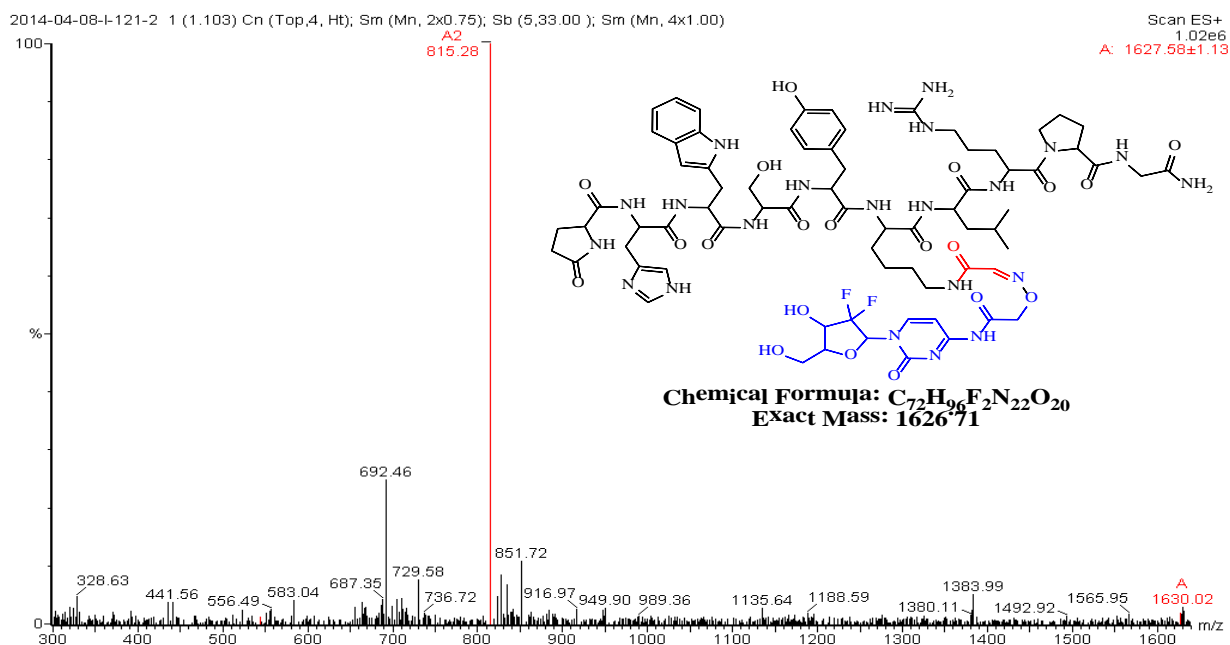
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας της ένωσης **GOXG₂**:

Μάζα της ένωσης **GOXG₂**: ESI-MS *m/z* για C₇₂H₉₆F₂N₂₂O₂₀ υπολογίστηκε: 1626.71; βρέθηκε: 1629.84 [M+H]⁺, 815.15 [M+2H]²⁺, 543.81 [M+3H]³⁺.

Σύνθεση της ένωσης GN₄OXG: Η ένωση **1** (7.331 μmol) διαλύθηκε σε 1 mL διαλύματος διχλωρομεθανίου/TFA (95/5%) στους 0°C και το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Ο διαλύτης εξατμίστηκε στον περιστροφικό αναδευτήρα και το υπόλειμμα διαλύθηκε σε μίγμα 2 mL MeCN/H₂O (5/1, v/v). Η ένωση **5** (9.6 mg, 7.331 μmol) προστέθηκε και το προκύπτων διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η αντίδραση λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει την τελική ένωση **GN₄OXG** (11,1 mg, 93.1%) ως λευκό στερεό το οποίο δεν χρειάζεται περαιτέρω καθαρισμό βάσει του φάσματος μάζας.



Σχήμα 61. Δομή της ένωσης **GN₄OXG**.



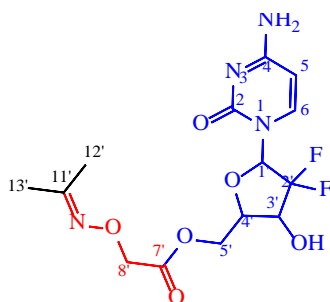
Σχήμα 62. Φάσμα μάζας της τελικής ένωσης **GN₄OXG**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας της ένωσης **GN₄OXG**:

Μάζα της ένωσης **GN₄OXG**: ESI-MS *m/z* για C₇₂H₉₆F₂N₂₂O₂₀ υπολογίστηκε: 1626.71; βρέθηκε: 1630.02 [M+H]⁺, 815.28 [M+2H]²⁺.

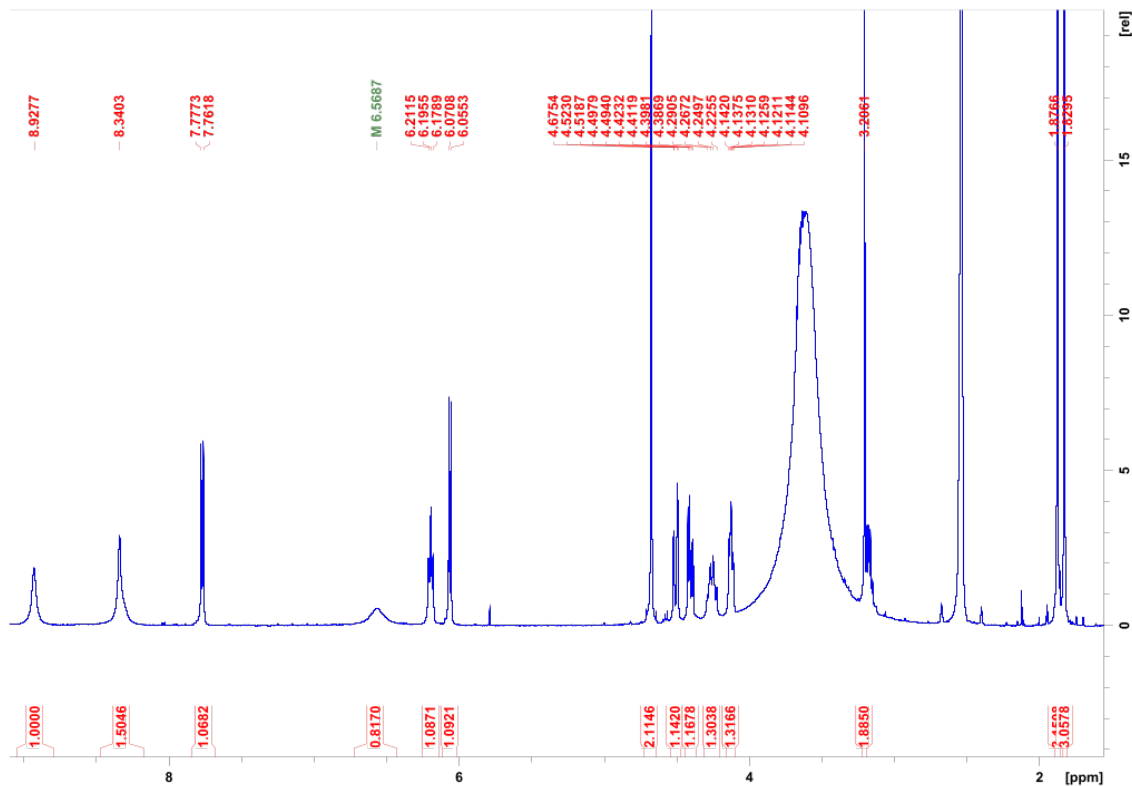
Κατά τη διαδικασία σύνθεσης του τελικού μορίου GOXG₁ παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ενός παραπροϊόντος (Σχήμα 63) με βάσει το TLC. Ο χαρακτηρισμός της ένωσης αυτής πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR (Σχήμα 64) και με φασματομετρία μάζας (Σχήμα 65).

Παραπροϊόν του GOXG₁ με την ακετόνη (GOXG₁-Acetone):

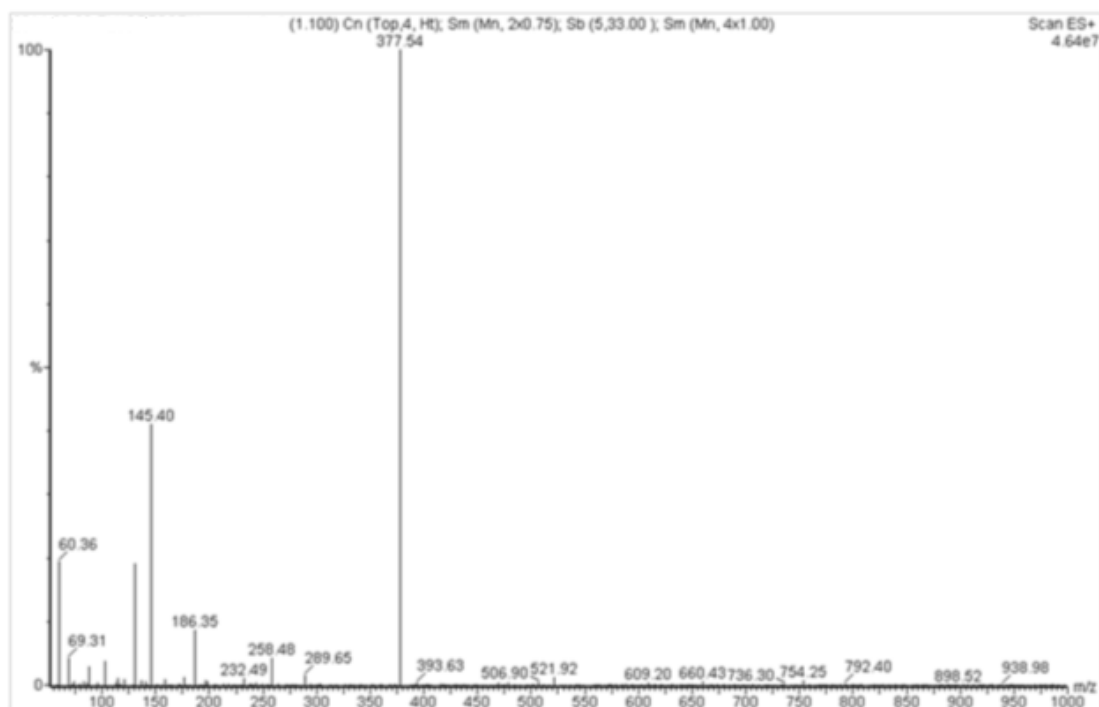


GOXG₁-Acetone

Σχήμα 63. Δομή της ένωσης GOXG₁-Acetone.



Σχήμα 64. Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης GOXG₁-Acetone.



Σχήμα 65. Φάσμα μάζας της ένωσης **GOXG₁-Acetone**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός των φασμάτων NMR και μάζας της ένωσης **GOXG₁-Acetone**:

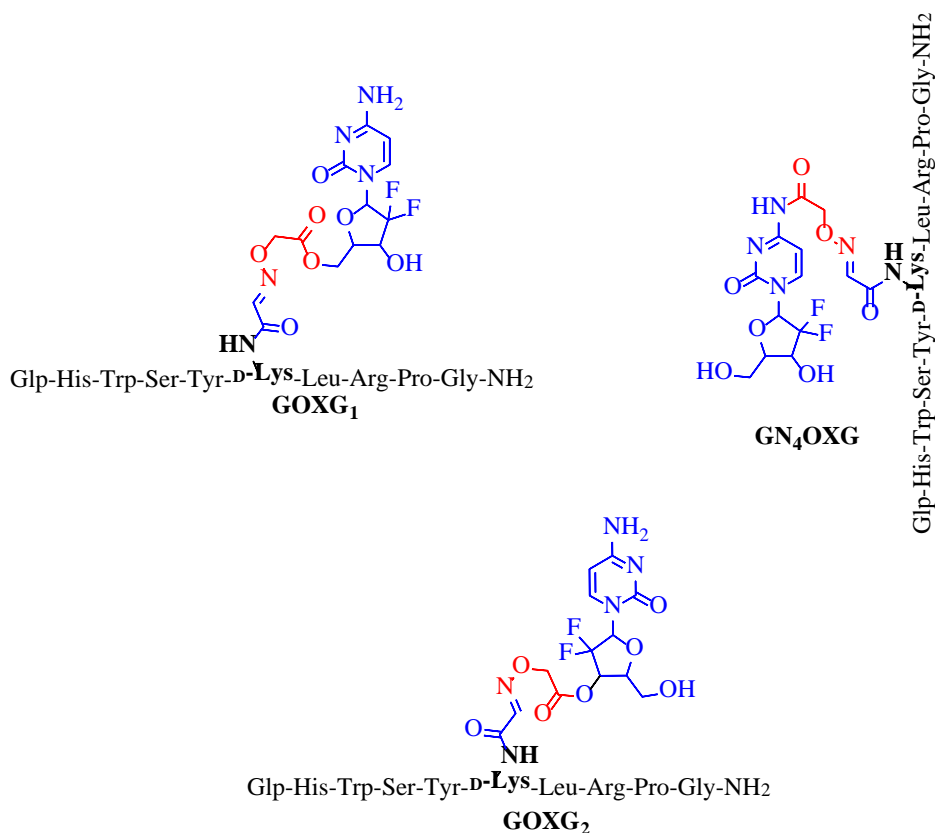
¹H-NMR της ένωσης **GOXG₁-Acetone** (500 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 8.9 (s, 1 H, 2-OH), 8.34 (s, 1 H, 7-NH), 7.76 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 6-H), 6.56 (bs, 1 H, 3'-OH), 6.21 (t, J = 8.2 Hz, 1 H, 1'-H), 6.06 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, 5-H), 4.67 (s, 2 H, 8'-H), 4.51 (dd, J = 6.3 Hz, 2 Hz, 1 H, 5a'-H), 4.40 (dd, J = 6.3 Hz, 5.6 Hz, 1 H, 5'b-H), 4.25 (m, 1 H, 3'-H), 4.12 (m, 1 H, 4'-H), 3.20 (s, 2 H), 1.87 (s, 3 H, 13'-H), 1.82 (s, 3 H, 12'-H) ppm;

¹³C-NMR της ένωσης **GOXG₁-Acetone** (500 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 170.53 (C7'), 162.58 (C4), 157.13 (C11'), 150.82 (C2), 123.40 (C2'), 95.59 (C5), 84.51 (C1'), 78.31 (C4'), 70.21 (C3'), 70.03 (C8'), 62.84 (C5'), 43.28 (C6), 21.98 (C13'), 16.38 (C12') ppm.

Μάζα της ένωσης **GOXG₁-Acetone**: MS (ESI+) m/z: [M+H]⁺ για C₁₄H₁₈F₂N₄O₆ υπολογίστηκε: 376.12; βρέθηκε: 377.54 [M+H]⁺.

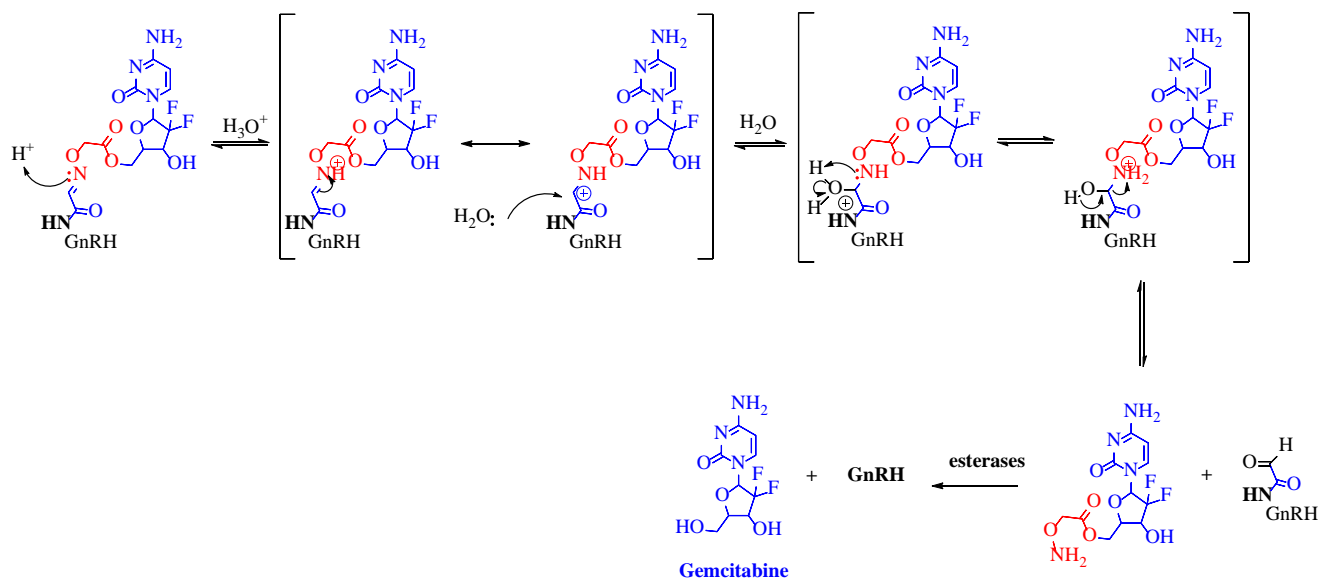
2.3.3 Βιολογική αξιολόγηση των συζευγμάτων GOXG₁, GOXG₂ και GN₄OXG

Τα τρία συζεύγματα (**Σχήμα 66**) μελετήθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ. Έγινε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας τους σε κύτταρα DU145 και PC3 (**Πίνακας 5** και **Σχήμα 68**). Έπειτα, τα μόρια ελέγχθηκαν ως προς την *in vitro* σταθερότητα τους σε κυτταρικές καλλιέργειες (**Σχήμα 69** και **Σχήμα 70**) και σε ανθρώπινο πλάσμα (**Σχήμα 71**).



Σχήμα 66. Δομές των 3 αναλόγων που μελετήθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ.

Τα 3 ανάλογα αποτελούνται από δεσμό οξίμης, ο οποίος είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητος σε όξινες συνθήκες¹⁶⁰, με αποτέλεσμα να διασπάται στο ελαφρώς όξινο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων¹⁶¹. Ο πιθανός μηχανισμός διάσπασης του αναλόγου GOXG₁ φαίνεται στο **Σχήμα 67**. Ο ίδιος προτεινόμενος μηχανισμός θα μπορούσε να ισχύει και για τα άλλα δυο ανάλογα.



Σχήμα 67. Πιθανός μηχανισμός διάσπασης του αναλόγου GOXG₁.

Η βιολογική αξιολόγηση των εν λόγω συζευγμάτων πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Φαρμακολογίας-Φαρμακοτεχνολογίας ΙΙΒΕΑΑ, στο Εργαστήριο του Δρ. Ταμβακόπουλου Κωνσταντίνου από τον κ. Θεόδωρο Καραμπέλα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

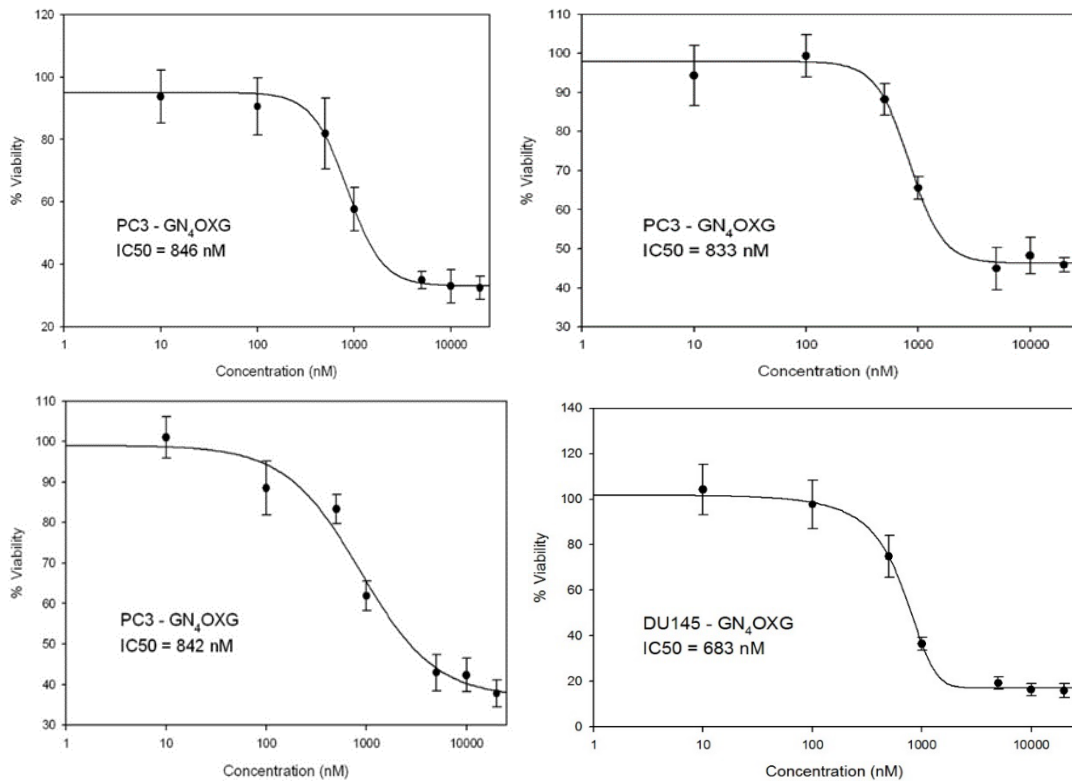
2.3.3.1 *In vitro* κυτταροτοξικότητα των GOXG₁, GOXG₂, N-άκυλ-γемισιταβίνη, GN₄OXG

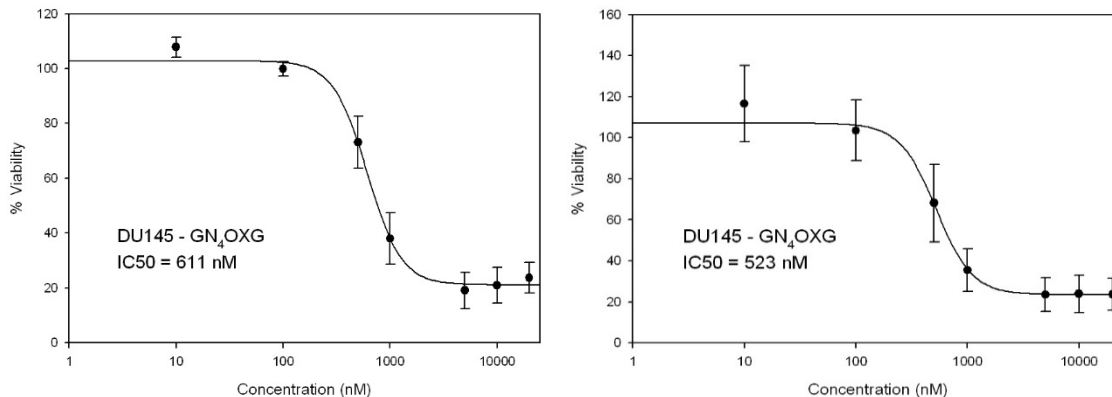
Κύτταρα (DU145, PC3) απλώθηκαν σε μια πυκνότητα 5×10^3 κύτταρα ανά φρεάτιο σε πλάκες 96 φρεατίων. Μετά από 24 ώρες επώασης (37 °C, 5% CO₂), το μέσο των κυττάρων απομακρύνθηκε και οι ενώσεις GOXG₁, GOXG₂, N-άκυλ-γемισιταβίνη, GN₄OXG προστέθηκαν σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις (10-20,000 nM για τα GOXG₁, GOXG₂, GN₄OXG και 1000-40,000 nM για την N-ακυλο-γемισιταβίνη), ακολουθούμενη από επώαση για 72 ώρες. Το μέσο στη συνέχεια απομακρύνθηκε και το διάλυμα MTT (0,3 mg / mL σε PBS) προστέθηκε σε κύτταρα για 3 ώρες, μετά απομακρύνθηκε και οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύθηκαν σε 100 μL DMSO. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 570 nm και ένα μήκος κύματος αναφοράς στα 690 nm χρησιμοποιώντας αναγνώστη απορρόφησης μικροπλακός. Η κυτταροστατική συγκέντρωση 50% (IC₅₀) υπολογίστηκε με βάση μια λογιστική εξίσωση τεσσάρων παραμέτρων με χρήση του λογισμικού SigmaPlot 12. Κάθε σημείο ήταν το αποτέλεσμα τριών πειραμάτων που εκτελούνται εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5. Τιμές IC₅₀ για τις 4 αναφερθείσες ενώσεις.

IC ₅₀ (nM)	Gemcitabine	GOXG ₁	GOXG ₂	N-acyl-gemcitabine	GN ₄ OXG
DU145	399 ± 49 (n=7)	611 ± 80 (n=8)	494 ± 93 (n=6)	8761 ± 1301 (n=6)	580 ± 47 (n=6)
PC3	546 ± 74 (n=7)	754 ± 142 (n=6)	675 ± 82 (n=6)	12284 ± 1428 (n=6)	833 ± 27 (n=6)

Παρατηρείται πως την καλύτερη τοξικότητα (μετά την Γεμισιταβίνη) οσον αφορά τα κύτταρα DU145 έδωσε το ανάλογο GOXG₂ ακολουθούμενο απ' το ανάλογο GN₄OXG ενώ για τα κύτταρα PC3 η καλύτερη τοξικότητα εμφανίστηκε πάλι απ' το ανάλογο GOXG₂ αλλά αυτή τη φορά ακολουθούμενο απ' το ανάλογο GOXG₁.





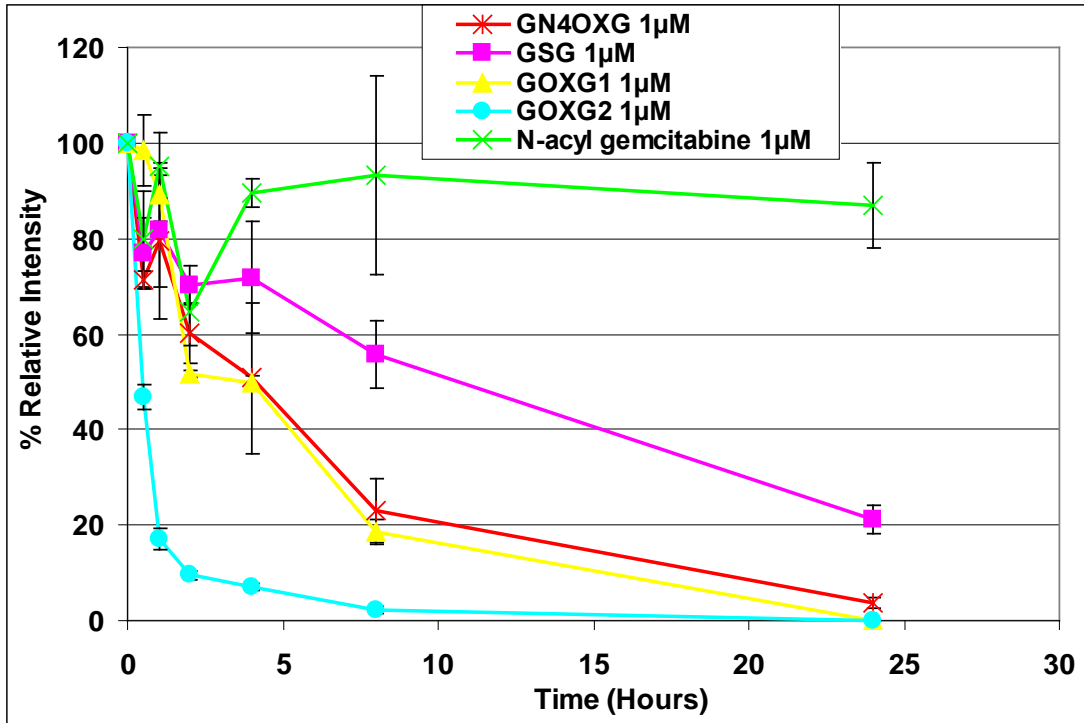
Σχήμα 68. Σιγμοειδείς καμπύλες κυτταροτοξικότητας των συζευγμάτων σε DU145 και PC3 καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα των αναλόγων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* σταθερότητας σε καλλιέργεια κυττάρων, όπως φαίνεται παρακάτω.

2.3.3.2 *In vitro* σταθερότητα των GOXG₁, GOXG₂, GN₄OXG και N-άκυλ-γεμισαβίνη σε καλλιέργεια κυττάρων

Κύτταρα (DU145) απλώθηκαν σε μια πυκνότητα 2×10^5 κύτταρα σε φιάλες 25 cm². Μετά από 24 ώρες επώασης (37 °C, 5% CO₂), το μέσο (RPMI, 10% FBS) απομακρύνθηκε και ανανεώθηκε με μέσο που περιέχει 1 μM ενός εκ των γεμισαβίνης, GOXG₁, GOXG₂, GN₄OXG και N ακυλο γεμισαβίνη.

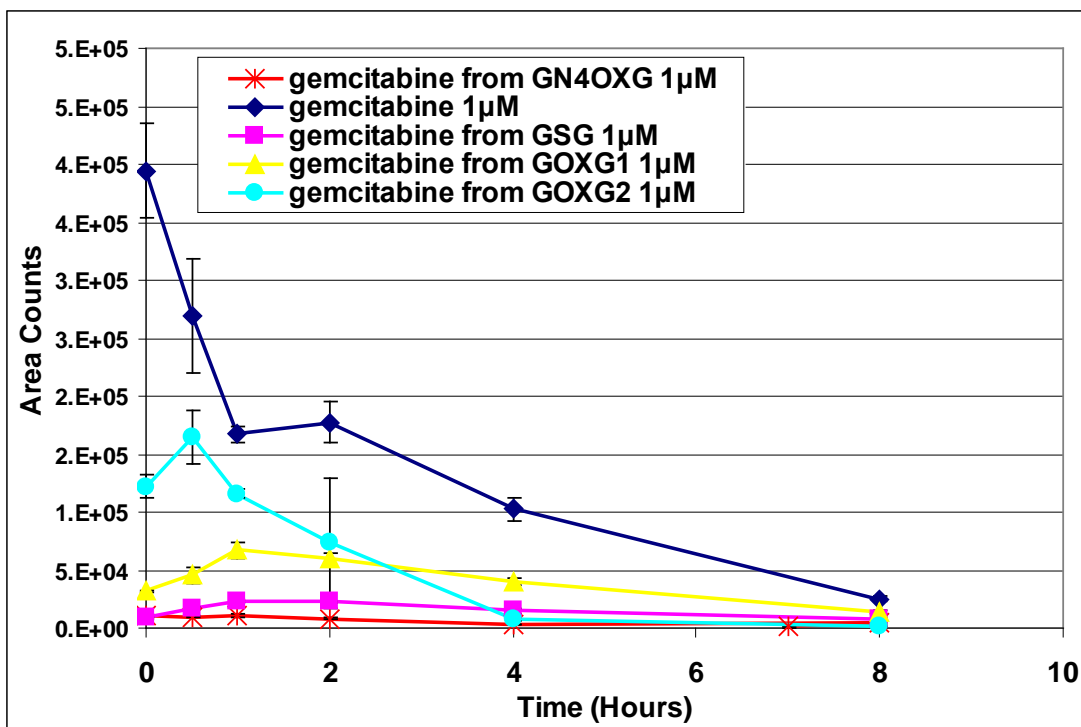
Δείγματα (τριπλότυπα του 20 μL) συλλέχθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία (t = 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 ώρες) και φυλάχθηκαν στους -80 ° C μετά από ανάμειξη με 180μl της αρχικής κινητής φάσης (90% H₂O, 10% ACN, 2 mM οξικό αμμώνιο, 0.1% μυρμηκικό οξύ). Η αποικοδόμηση των δοκιμαζόμενων μορίων (**Σχήμα 69**) και ο σχηματισμός της Γεμισαβίνης (**Σχήμα 70**) από συζεύγματα με την πάροδο του χρόνου παρουσιάζεται παρακάτω.



Σχήμα 69. Καμπύλες σταθερότητας των συζευγμάτων σε καλλιέργεια κυττάρων σε συνάρτηση με το χρόνο.

Απ' το **Σχήμα 69** απορρέει το συμπέρασμα πως το ανάλογο GOXG₂ διασπάται γρηγορότερα σε σχέση με τα ανάλογα GOXG₁ και GN₄OXG τα οποία έδειξαν παρόμοια σταθερότητα σε καλλιέργεια κυττάρων. Η μέθοδος στηρίζεται στη μέτρηση της ποσότητας της αρχικής ουσίας (γεμισιταβίνης) σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία με φασματομετρία μάζης.

Παρακάτω παρουσιάζεται η καμπύλη σχηματισμού Γεμισιταβίνης απ' τα συζεύγματα (**Σχήμα 70**).



Σχήμα 70. Καμπύλες σχηματισμού Γεμισιταβίνης απ' το κάθε σύζευγμα σε συνάρτηση με τον χρόνο.

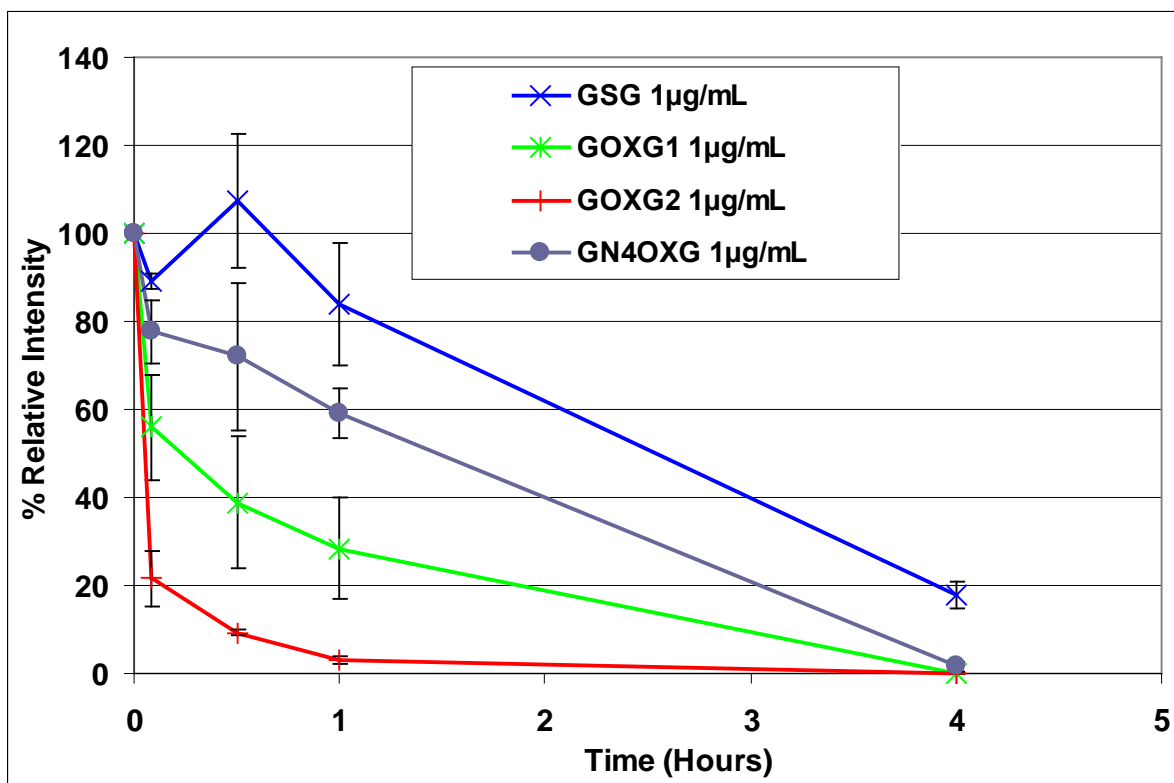
Το ανάλογο GOXG₂ παρατηρούμε πως στις 8 ώρες δίνει μεγαλύτερη ποσότητα ελεύθερης Γεμισιταβίνης σε σχέση με τα άλλα δυο ανάλογα τα οποία έχουν μικρή διαφορά στην απελευθέρωση του φαρμάκου. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν απόλυτα αναμενόμενο διότι είναι άμεσα συνιφασμένο με το **Σχήμα 69**, καθώς όσο πιο ασταθές είναι το σύζευγμα (μεγαλύτερος ρυθμός διάσπασης), τόσο περισσότερη Γεμισιταβίνη ελευθερώνεται

Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα σταθερότητας των μορίων που συντέθηκαν σε ανθρώπινο πλάσμα τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.

2.3.3.3 *In vitro* σταθερότητα των GOXG₁, GOXG₂, GN₄OXG στο ανθρώπινο πλάσμα

1 µg / mL των GOXG₁, GOXG₂ ή GN₄OXG επωάστηκαν με ανθρώπινο πλάσμα σε ένα ανακινούμενο υδατόλουτρο στους 37 °C. Δείγματα (50 µL τριπλότυπα) συλλέχθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία (t = 0, 0,08, 0,5, 1, 4 ώρες) στους -80°C μετά την ανάμειξη με 150 µL ακετονιτρίλιο. Τα δείγματα στη συνέχεια εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας καταβύθιση πρωτεΐνης. Η αποικοδόμηση των δοκιμαζόμενων μορίων παρουσιάζεται παρακάτω:

Η αποικοδόμηση των δοκιμαζόμενων μορίων με την πάροδο του χρόνου παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 71).



Σχήμα 71. Καμπύλες σταθερότητας των συζευγμάτων σε ανθρώπινο πλάσμα σε συνάρτηση με τον χρόνο.

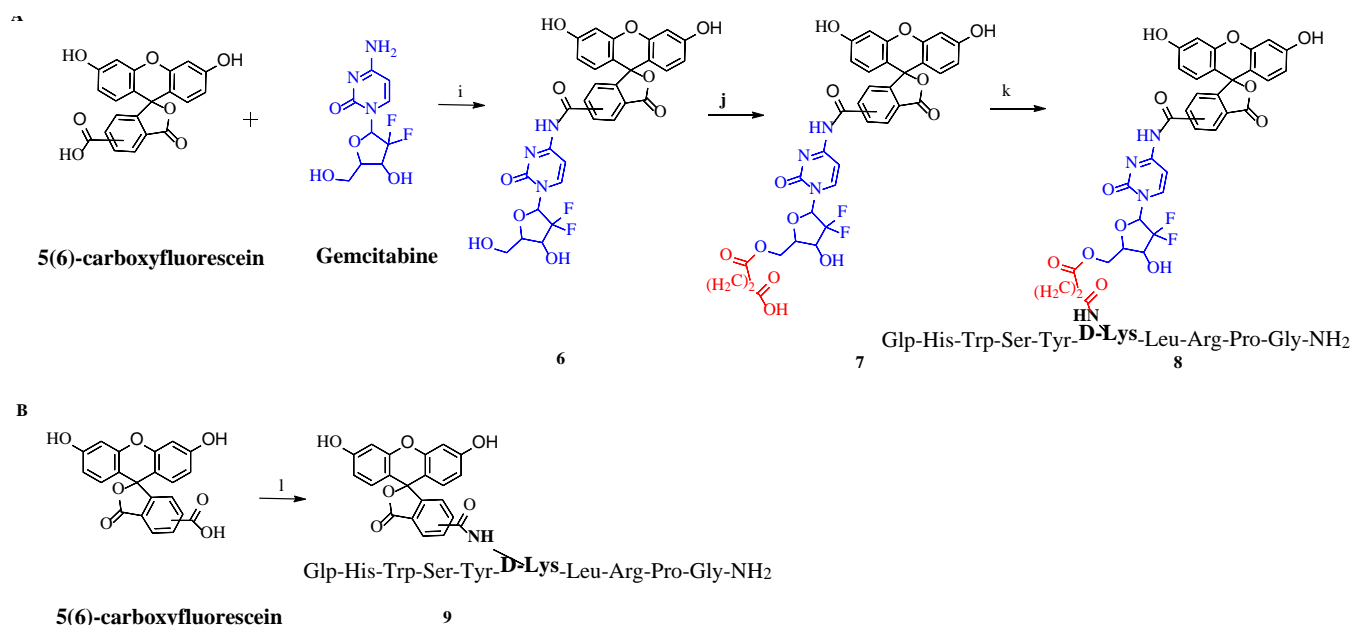
Όσον αφορά στη μελέτη της σταθερότητας των αναλόγων στο ανθρώπινο πλάσμα, το ανάλογο GOXG₂ και πάλι διαθέτει την μικρότερη σταθερότητα (έχει σχεδόν αποικοδομηθεί εντελώς σε 1 ώρα), ενώ σε σχέση με τα άλλα δύο ανάλογα το GN₄OXG φαίνεται λίγο πιο σταθερό απ' το ανάλογο GOXG₁. Ωστόσο, η διαφορά στη σταθερότητα έγκειται στην 1^η ώρα, καθώς και τα 2 ανάλογα φαίνεται να έχουν αποικοδομηθεί πλήρως στις 4 ώρες.

2.4 Σύνθεση επισημασμένων αναλόγων με στόχο τον προσδιορισμό της κυτταρικής πρόσληψης του πεπτιδίου GnRH

Για να εξακριβώσουμε εάν η στόχευση και η πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα οφείλεται στο πεπτίδιο GnRH, σχεδιάσαμε και συνθέσαμε διμοριακά και τριμοριακά ανάλογα επισημασμένα με 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη όπως φαίνεται στο Σχήμα 72.

2.4.1 Εισαγωγή

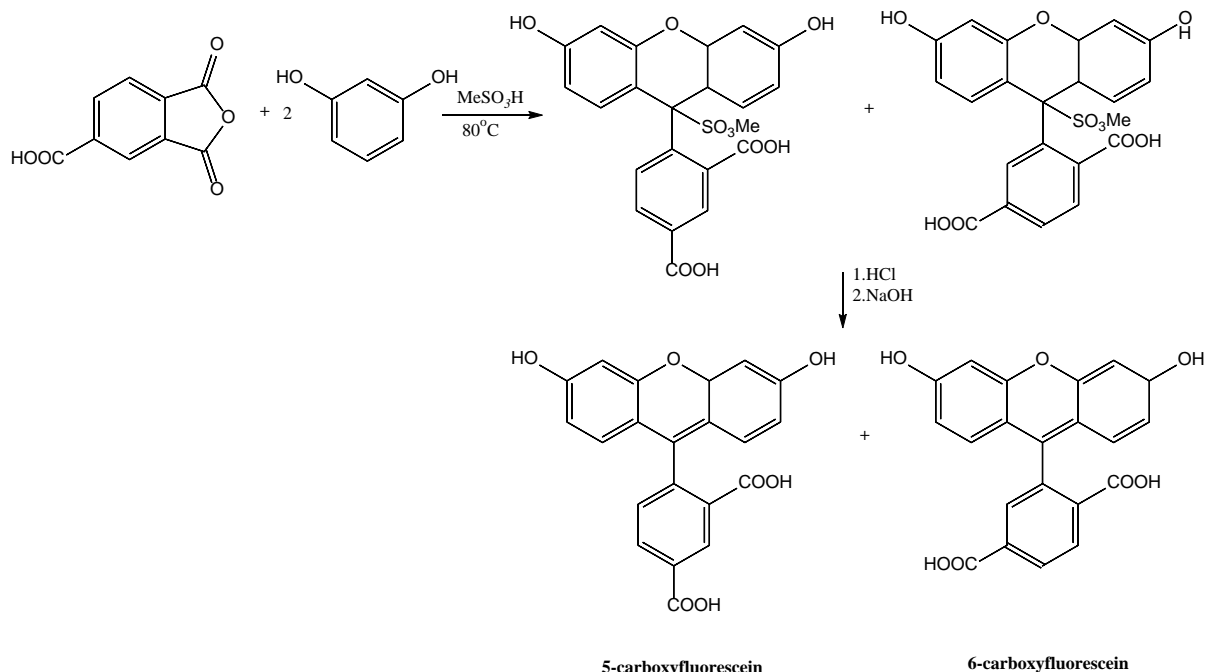
Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του διμοριακού Γεμισιταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη για να ελέγξουμε με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας εάν το GnRH μπορεί και εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα. Έπειτα, έγινε η σύνθεση του διμοριακού Γεμισιταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη για να αποδείξουμε ότι το ανάλογο αυτό δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα και τέλος στοχεύτηκε η σύνθεση του τριμοριακού GnRH-Γεμισιταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη για να διαπιστώσουμε εάν το τριμοριακό σύζευγμα δύναται να εισέλθει στα καρκινικά κύτταρα.



Σχήμα 72. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας των επισημασμένων αναλόγων. **(A)** Σύνθεση του διμοριακού Γεμισιταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη και του τριμοριακού GnRH-Γεμισιταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη: (i) PyBOP, DMAP, DMF, 12 h, rt; (j) Ηλεκτρικός ανυδρίτης, DMF, DIPEA, 12 h, rt; (k) GnRH, DIC, HOBt, DMF, 12h, rt; **(B)** Σύνθεση του διμοριακού GnRH-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη: (l) GnRH, DIC, HOBt, DMF, 12 h, rt; ([**D-Lys**]⁶-**GnRH**: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂).

2.4.2 Σύνθεση της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης

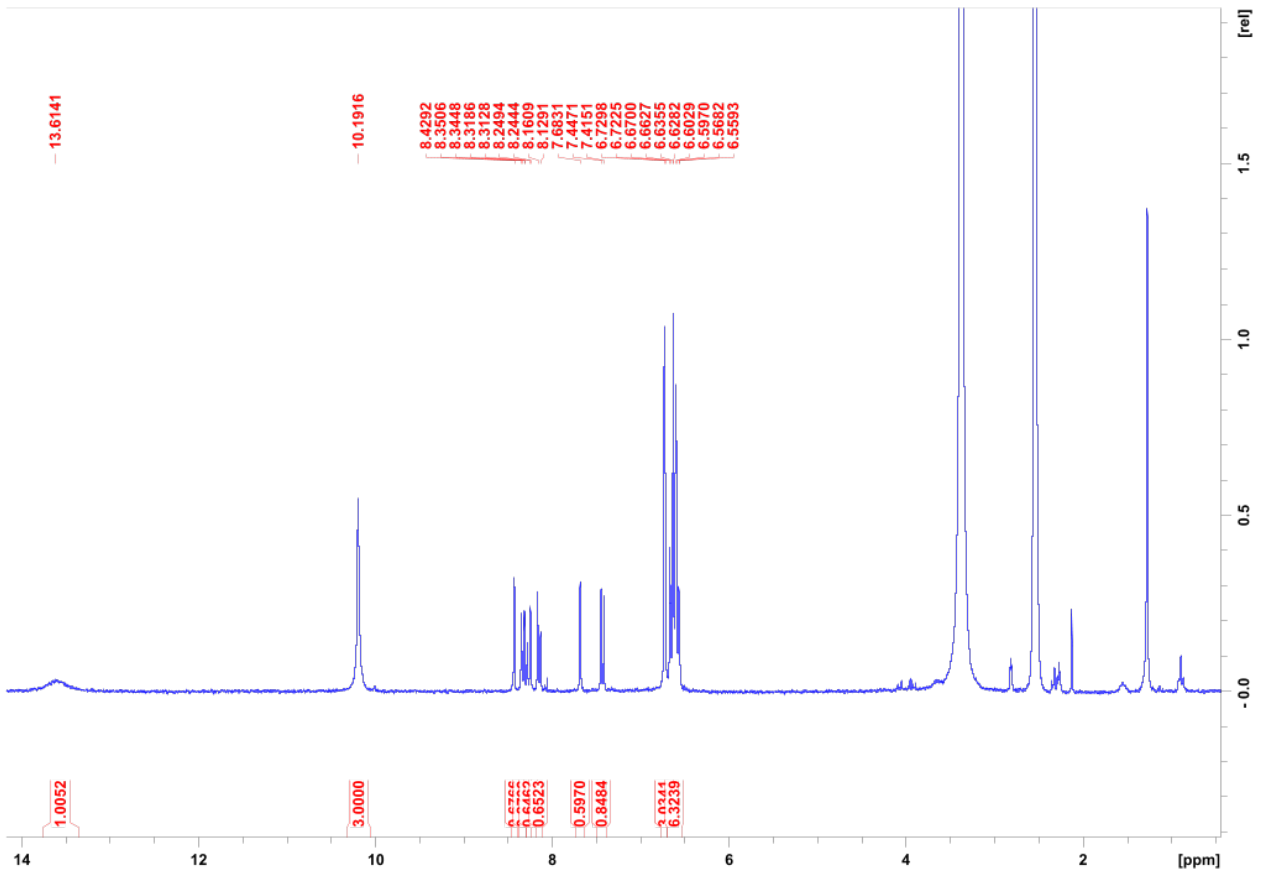
Παρακάτω παρουσιάζεται η σύνθεση της χρωστικής 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη που χρησιμοποιήθηκε (**Σχήμα 73**).



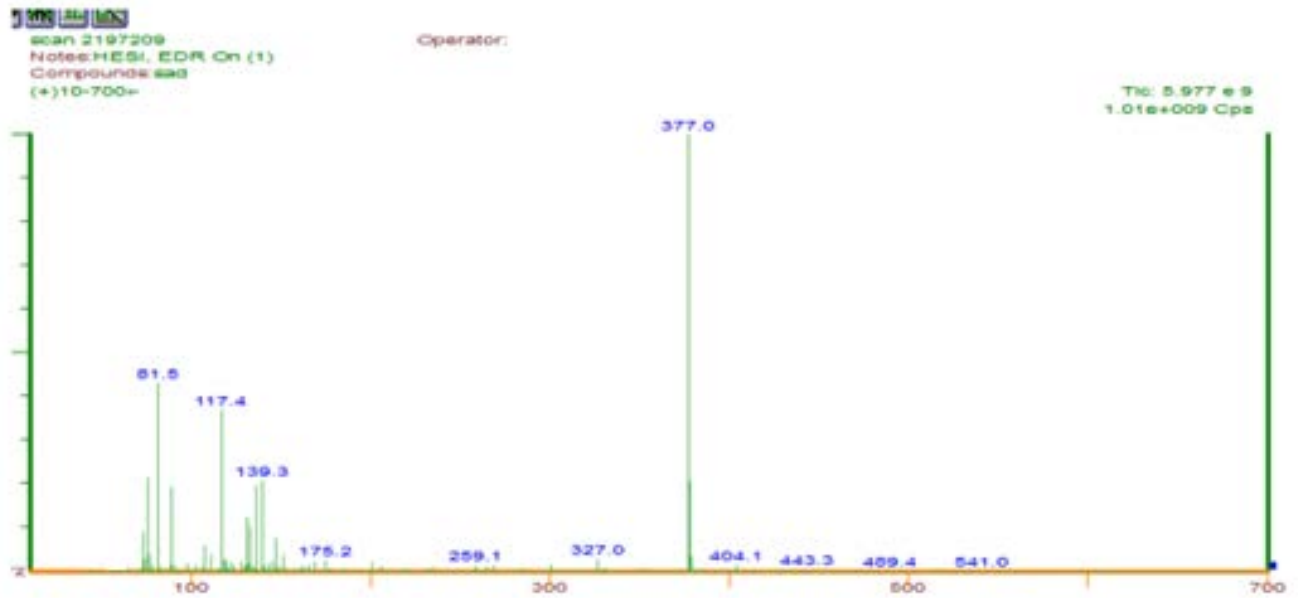
Σχήμα 73. Απεικόνιση της συνθετικής πορείας της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης.

Ο 1,2,4-βενζολοτρίκαρβοξυλικός ανυδρίτης (25.0 g, 0.13 mol) προστέθηκε σε ένα διάλυμα 1,3-διυδροξυβενζολίου (28.6 g, 0.26 mol) σε μεθανοσουλφονικό οξύ (1 M). Ένας ψυκτήρας προσαρτήθηκε στην φιάλη και η αντίδραση θερμάνθηκε στους 85 °C για 24 ώρες. Μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα της αντίδρασης αποχύθηκε σε παγόνερο και σχηματίστηκε ένα πορτοκαλί-κίτρινο ίζημα το οποίο συλλέχθηκε με διήθηση και ξηράνθηκε σε φούρνο στους 200 °C. Αυτό το υπόλειμμα ανακρυσταλλώθηκε δύο φορές από μεθανόλη/εξάνιο για να δώσει 1.0 g του προϊόντος 6-καρβοξυφλουοροσκεΐνη μεθανοσουλφονικό οξύ. Το υγρό από τη διαδικασία αυτή συλλέχθηκε, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και τα υπολείμματα ανακρυσταλλώθηκαν δύο φορές από αιθανόλη/εξάνιο για να δώσει 3.2 g από το 5-καρβοξυφλουορεσκεΐνη μεθανοσουλφονικό οξύ. Τελικά τα υγρά αυτά συλλέχθηκαν, αναμείχθηκαν, εξατμίστηκαν και τα υπολείμματα ανακρυσταλλώθηκαν 2 φορές με αιθανόλη/εξάνιο για να πάρουμε άλλα 3 g του 6-καρβοξυφλουοροσκεΐνη μεθανοσουλφονικού οξέος. Η προσεκτική στάγδην προσθήκη πυκνού HCl (aq) σε διαλύματα αυτών των μεθανοσουλφονικών εστέρων σε 4M υδροξείδιο του νατρίου έδωσε μίγμα 5- και 6- καρβοξυφλουοροσκεΐνης σε σχεδόν ποσοτική απόδοση.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε με φασματοσκοπία NMR και φασματομετρία μάζης. Στα **Σχήματα 74** και **75** παρουσιάζονται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και μάζης αντίστοιχα.



Σχήμα 74. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της 5(6)-καρβοξυφλουροεσκεινης.



Σχήμα 75. Φάσμα μάζας της 5(6)-καρβοξυφλουροεσκεινης.

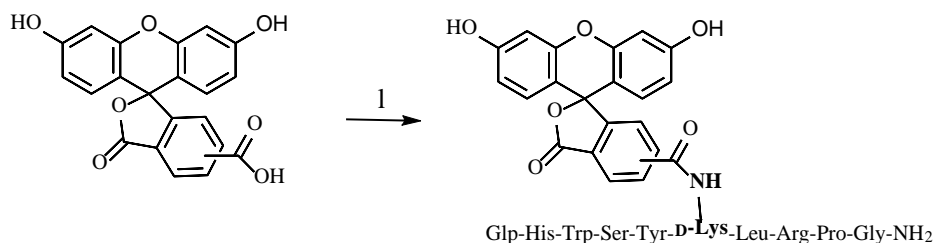
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας της **5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης**:

Μάζα της ένωσης **5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης**: MS (ESI-) m/z: [M-H]⁻ για C₂₁H₁₄O₇ υπολογίστηκε: 378.07; βρέθηκε: 377.00

2.4.3 Σύνθεση του διμοριακού [D-Lys]⁶-GnRH-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη

2.4.3.1 Εισαγωγή

Η σύζευξη της χρωστικής 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη με το δεκαπεπτίδιο [D-Lys]⁶-GnRH έγινε μέσω αμιδικού δεσμού πραγματοποιώντας τη σύνθεση σε υγρή φάση (**Σχήμα 76**). Το καρβοξυλικό οξύ της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης ενεργοποιήθηκε με χρήση N,N'-δισοπροπυλκαρβοδιιμίδιου και 1-υδρόξυβενζοτριάζολιου σε άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο και ύστερα έγινε η προσθήκη του πεπτιδίου. Το τελικό προϊόν **9** καθαρίστηκε με HPLC.

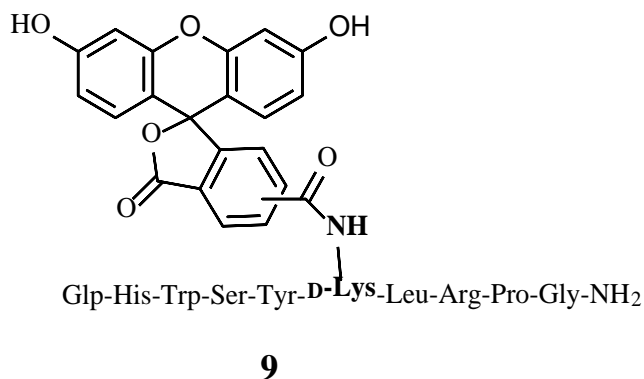


Σχήμα 76. Σύνθεση του διμοριακού αναλόγου [D-Lys]⁶-GnRH-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (1) GnRH, DIC, HOBt, DMF, 12h, rt; (**[D-Lys]⁶-GnRH**: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂).

2.4.3.2 Πειραματική πορεία

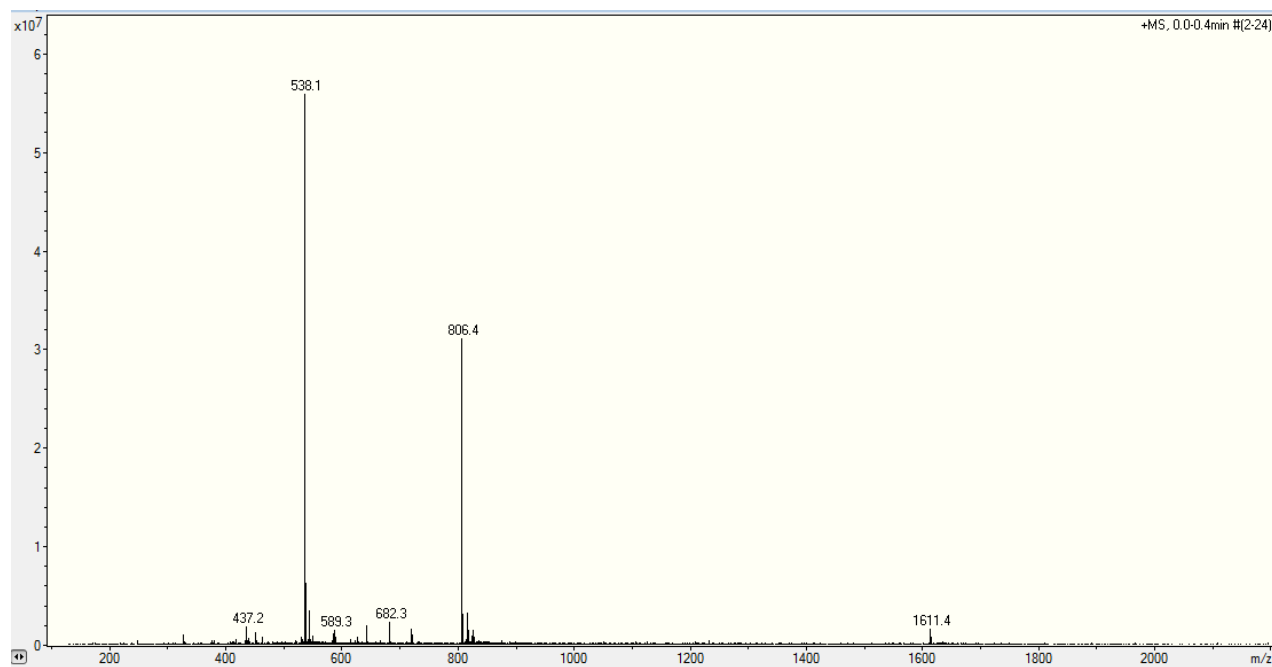
Σύνθεση της ένωσης 9: Διάλυμα που περιέχει 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (4.5 mg, 0.012 mmol, 1.5eq), DIC (5 μL, 0.012 mmol, 1.5 eq) και HOBt (1.62 mg, 0.012 mmol, 1.5 eq) σε 1 mL άνυδρου DMF (1.5 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 30 λεπτά, διάλυμα του GnRH (10 mg, 0.008 mmol, 1 eq) σε 0.5 mL άνυδρου DMF προστέθηκε στάγδην και το προκύπτον μίγμα ανδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με HPLC (85/15% έως 55/45% H₂O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA,

με ροή 5 mL/λεπτό για 30 λεπτά στα 214 nm) και λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει 6 mg (47.1%) της ένωσης **9** ως κίτρινο στερεό.



Σχήμα 77. Δομή της ένωσης **9**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **9** πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζης, της οποίας το φάσμα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 78**.



Σχήμα 78. Φάσμα μάζας του διμοριακού συζεύγματος [D-Lys]⁶-GnRH-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός με φασματομετρία μάζης της ένωσης **9**:

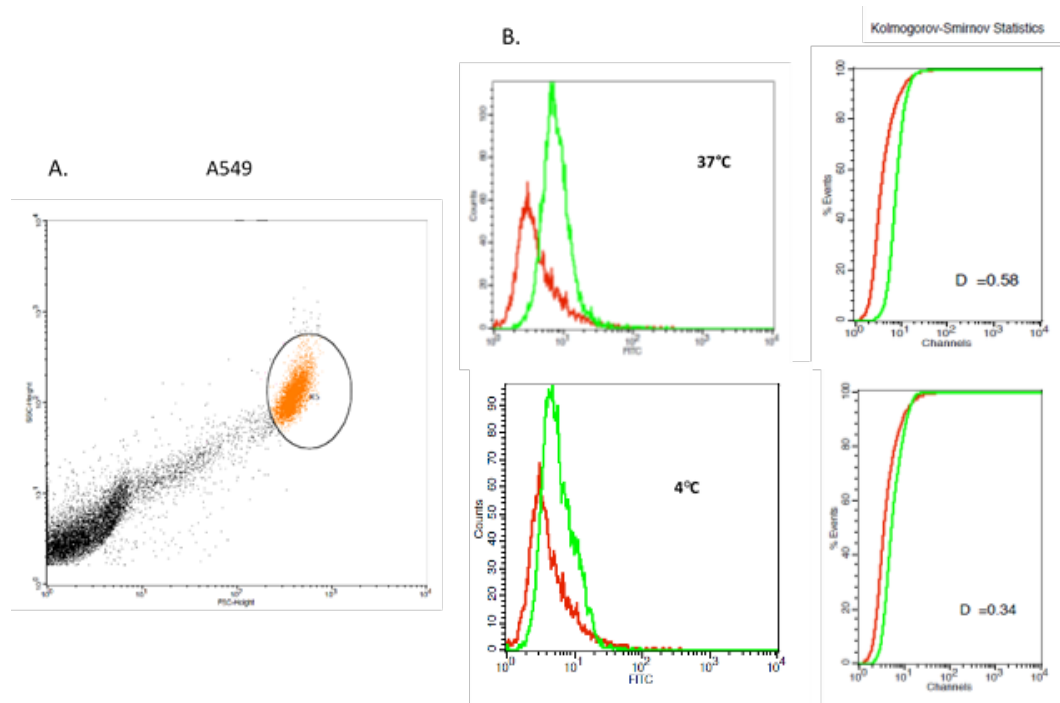
Μάζα της ένωσης **9**: MS (ESI+) m/z για $C_{80}H_{95}N_{18}O_{19}$ υπολογίστηκε: 1611.96; βρέθηκε: 1611.4 $[M+H]^+$, 806.4 $[M+2H]^{2+}$, 538.1 $[M+3H]^{3+}$.

2.4.3.3 Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας και κυτταρομετρίας ροής

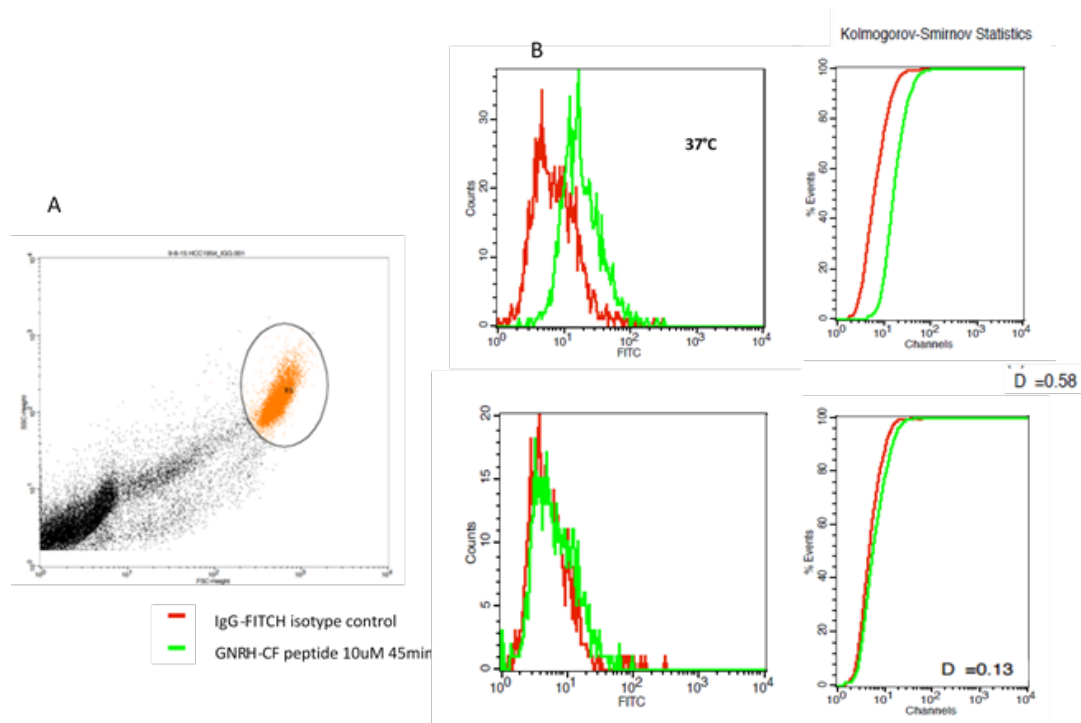
Κυτταρική καλλιέργεια: Κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκινώματος πνεύμονα (A549) και πορογενούς καρκινώματος του μαστού (HCC1954) καλλιεργήθηκαν σε μέσο DMEM και μέσο RPMI αντίστοιχα με 10% θερμο-απενεργοποιημένο ορό μόσχου. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν επί 60 mm πιάτα μέχρι περίπου 70% συρροή στους 37 °C υπό 5% CO₂ και ανακαλλιεργήθηκαν κάθε 3-4 ημέρες.

Κυτταρομετρία ροής: Για να αναλυθεί η εσωτερικοποίηση του πεπτιδίου [D-Lys]⁶-GnRH-5(6)-καβοξυφλουορεσκεΐνη με FACS, A549 και HCC1954 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών καλλιέργειας ιστού (12×10⁴ κύτταρα/φρεάτιο) για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, το μέσο καλλιέργειας αλλάχθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 μM του πεπτιδίου για 45 λεπτά στους 37 °C σε μέσο χωρίς ορό. Μετά από αυτή την επώαση, τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS, κατεργάστηκαν με 0.05% θρυψίνη (500 μl) στους 37 °C για 4 λεπτά πριν από την προσθήκη του μέσου 2mL με ορό. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 1.300 rpm για 5 λεπτά και αφού το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, επαναιωρήθηκαν σε PBS. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φθορισμομετρική ανάλυση σε FACScalibur (BD Biosciences) κυτταρόμετρο ροής με χρήση λείζερ διέγερσης 488 nm και ένα φίλτρο εκπομπής 525 nm. Για αρνητικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν μη χρωματισμένα A549 και HCC1954 κύτταρα (**Σχήμα 79, 80**).

Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης Laser (CLSM): A549 και HCC1954 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες σε πλάκες 24 φρεατίων (6×10⁴ κύτταρα/φρεάτιο) για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, το μέσο καλλιέργειας αλλάχθηκε και τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37 °C ή 40 °C για 45 λεπτά, με 10 μM του πεπτιδίου σε μέσο χωρίς ορό. Μετά την επώαση με ενώσεις, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS), σταθεροποιήθηκαν με 3,7% παραφορμαλδεΐδη και αποσβέστηκαν με χλωριούχο αμμώνιο 50 mM. Ακολούθως, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν με PBS και τοποθετήθηκαν ανάποδα σε γυάλινες διαφάνειες, με μια σταγόνα Mowiol που περιέχει DAPCO (100 mg/mL). Η κατανομή του φθορισμού του πεπτιδίου αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ένα Leica TCS SP5 συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) και στόχο HCX PL APO CS 63.0x1.4 oil UV. Το πεπτίδιο διεγέρθηκε στα 488nm και η εκπομπή του ανιχνεύθηκε στα 500-550 nm (**Σχήμα 81**).

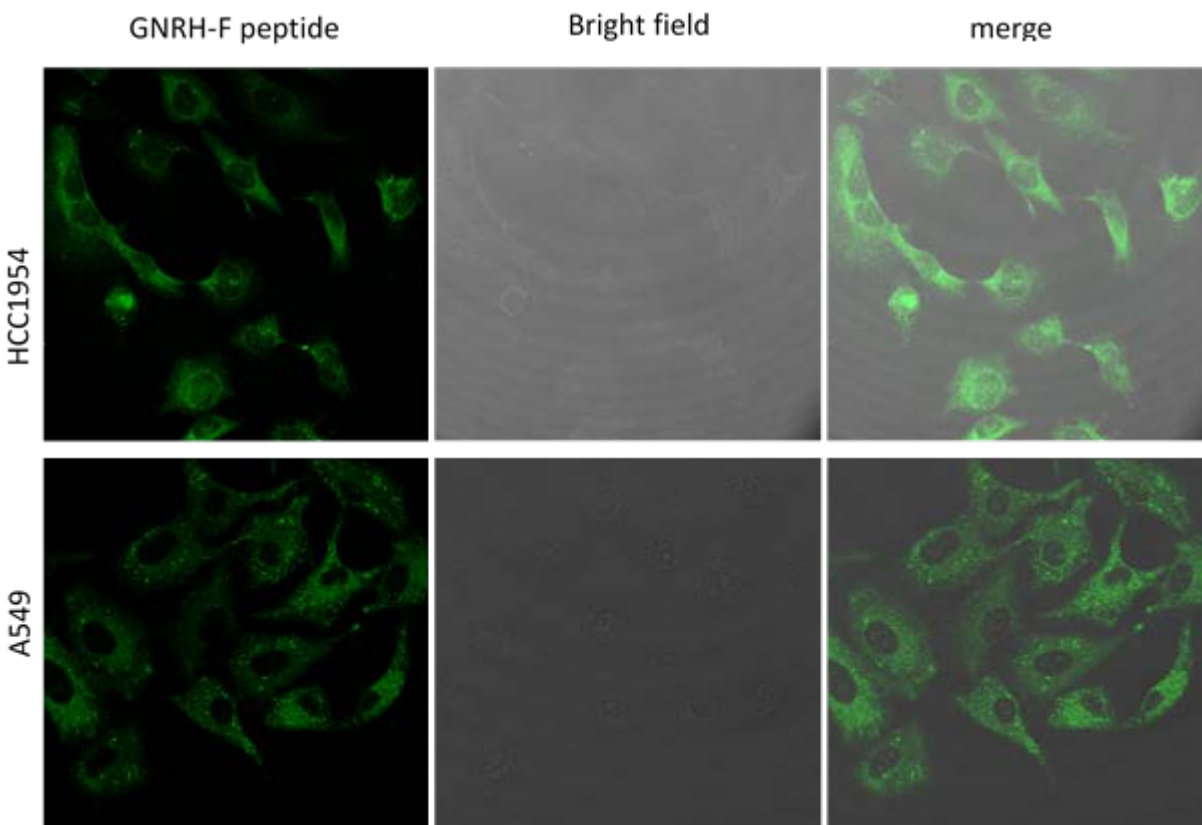


Σχήμα 79. Ανάλυση FACS της κυτταρικής πρόσληψης του $[D\text{-Lys}]^6\text{-GnRH-5(6)}$ -καρβοξυφλουορεσκεΐνης (πράσινη γραμμή) σε A549 κύτταρα σε σύγκριση με μη χρωματισμένα κύτταρα ελέγχου (κόκκινη γραμμή). Η εσωτερίκευση των ενώσεων αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το Kolmogorov-Smirnov (KS) τεστ (D-value).



Σχήμα 80. Ανάλυση FACS της κυτταρικής πρόσληψης του $[D\text{-Lys}]^6\text{-GnRH-5(6)}$ -

καρβοξυφλουορεσκεΐνης (πράσινη γραμμή) σε HCC1954 κύτταρα σε σύγκριση με μη χρωματισμένα κύτταρα ελέγχου (κόκκινη γραμμή). Η εσωτερίκευση των ενώσεων αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το Kolmogorov-Smirnov (KS) τεστ (D-value).



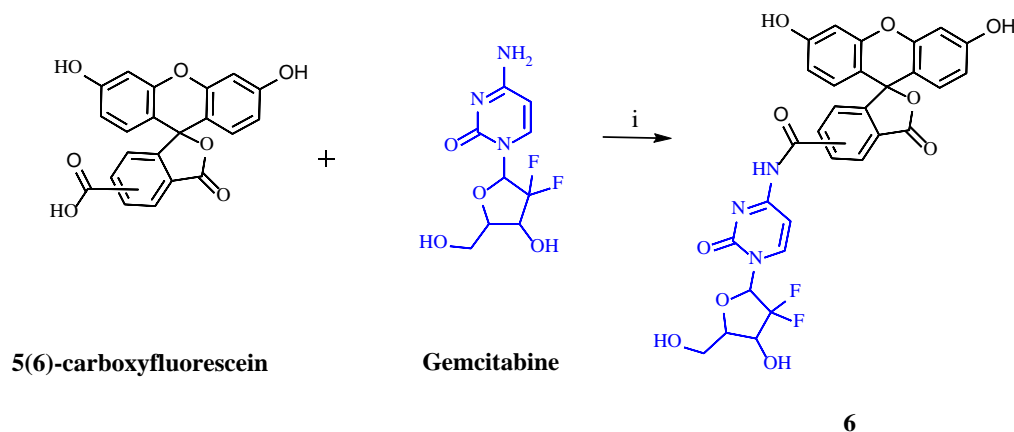
Σχήμα 81. Εισαγωγή του συζεύγματος $[D-Lys]^6$ -GnRH-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη σε A549 και HCC1954 κύτταρα. Συνεστιακή κυτταρική μικροσκοπία σε A549 και HCC1954 κύτταρα επωασμένα στους 37 °C για 45 λεπτά με 10 μ M $[D-Lys]^6$ -GnRH-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού και εικόνες φωτεινού οπτικού πεδίου.

Παρατηρείται η εισαγωγή του διμοριακού συζεύγματος $[D-Lys]^6$ -GnRH-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (**Σχήμα 81**) σε καρκινικά κύτταρα A549 και HCC1954. Έχουν προγραμματιστεί να γίνουν παρόμοια πειράματα και με τις ενώσεις **6** και **8** με σκοπό να αποδειχτεί το αρχικό μας σχέδιο.

2.4.4 Σύνθεση του διμοριακού συζεύγματος Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη

2.4.4.1 Εισαγωγή

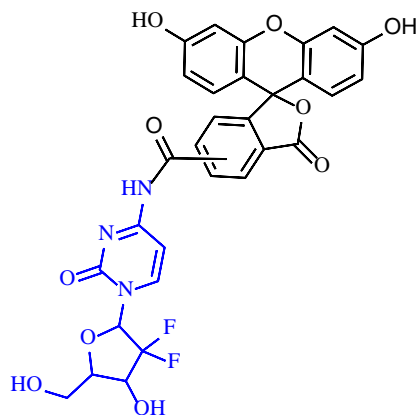
Η σύζευξη της χρωστικής 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη με τον κυτταροτοξικό παράγοντα Γεμισταβίνη έγινε μέσω αμιδικού δεσμού (**Σχήμα 82**). Το καρβοξυλικό οξύ της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης ενεργοποιήθηκε με χρήση PyBOP και DMAP σε άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο και ύστερα έγινε η προσθήκη της γεμισταβίνης. Το τελικό προϊόν **6** καθαρίστηκε με HPLC.



Σχήμα 82. Σύνθεση του διμοριακού αναλόγου Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (j) PyBOP, DMAP, DMF, 12h, rt.

2.4.4.2 Πειραματική πορεία

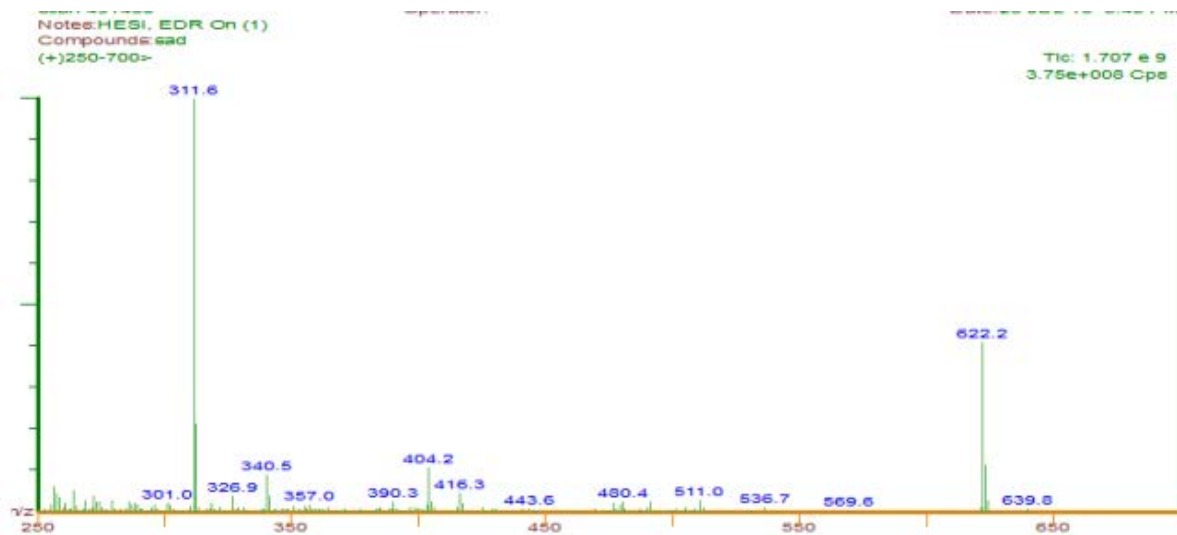
Σύνθεση της ένωσης 6: Το διάλυμα της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης (10 mg, 0.027 mmol, 3 eq), PyBOP (14 mg, 0.027 mmol, 3 eq) και DMAP (8 mg, 0.045 mmol, 5 eq) σε άνυδρο DMF (0.6 mL) αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 20 λεπτά, διάλυμα της γεμισταβίνης (2.4 mg, 0.0091 mmol, 1 eq) σε άνυδρο DMF (0.4 mL) προστέθηκε στάγδην και το προκύπτον διάλυμα ανδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης εξατμίστηκε με απόσταξη υπό υψηλό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική HPLC (90/10% έως 10/90% H₂O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA με ροή 5 mL/λεπτό για 30 λεπτά στα 214 nm) και λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει 2 mg (35.3%) της ένωσης **6** ως πορτοκαλί στερεό.



6

Σχήμα 83. Δομή της ένωσης 6.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης 6 πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (Σχήμα 84).



Σχήμα 84. Φάσμα μάζας της ένωσης 6.

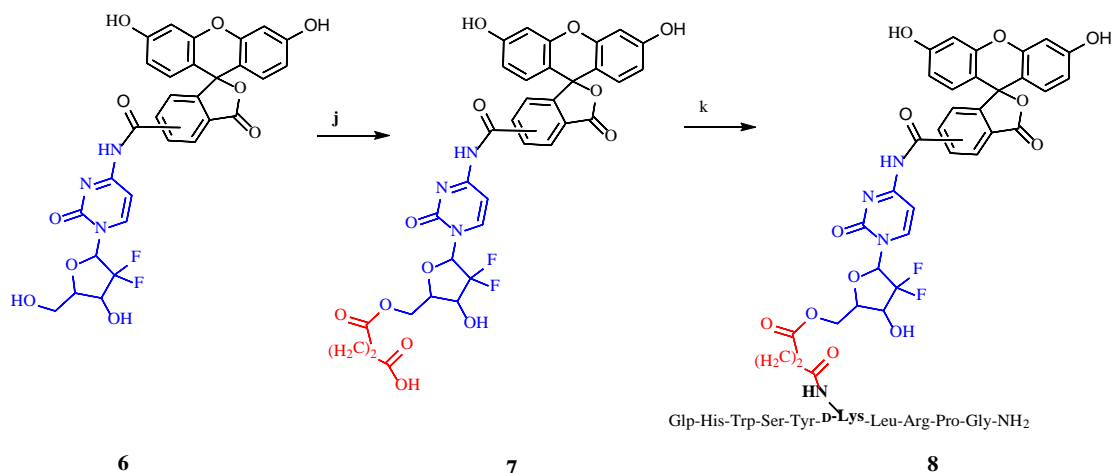
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός με φασματομετρία μάζας της ένωσης 6:

Μάζα της ένωσης 6: MS (ESI+) m/z για $C_{30}H_{21}F_2N_3O_{10}$: υπολογίστηκε: 621.12; βρέθηκε: 622.6 $[M+H]^+$, 311.2 $[M+2H]^{2+}$.

2.4.5 Σύνθεση του τριμοριακού [D-Lys]⁶-GnRH-Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη

2.4.5.1 Εισαγωγή

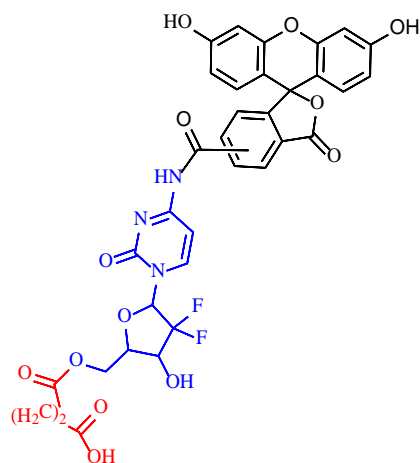
Στην διμοριακή ένωση **6** έγινε προσθήκη ενός συνδέτη ώστε να διαθέτει ένα ελεύθερο καρβοξυλικό οξύ και να μπορέσει να συζευχθεί με το πεπτίδιο μέσω αμιδικού δεσμού (**Σχήμα 85**). Έτσι, η ένωση **6** αντέδρασε με τον ηλεκτρικό ανυδρίτη σε DMF παρουσία βάσης DIPEA. Το προκύπτον προϊόν **7** καθαρίστηκε με HPLC. Έπειτα, δοκιμάσαμε να κάνουμε σύζευξη του πεπτιδίου στο ελεύθερο οξύ με χρήση της μεθοδολογίας DIC/HOBt αλλά απέτυχε. Οι προσπάθειες θα συνεχιστούν για να πραγματοποιηθεί η τελευταία αυτή αντίδραση ώστε να συνθεθεί το τελικό τριμοριακό το οποίο θα καθαριστεί με HPLC.



Σχήμα 85. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας του τριμοριακού GnRH-Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη: (j) Ηλεκτρικός ανυδρίτης, DMF, DIPEA, 12 h, rt; (k) GnRH, DIC, HOBt, DMF, 12 h, rt. ([D-Lys]⁶-GnRH: Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂).

2.4.5.2 Πειραματική πορεία

Σύνθεση του 7: Στο διάλυμα της ένωσης **6** (2 mg, 0.0032 mmol, 1 eq) και του ηλεκτρικού ανυδρίτη (0.32 mg, 0.0032 mmol, 1 eq) σε άνυδρο DMF (0.5 mL), προστέθηκε το DIPEA (22.4 uL, 0.128 mmol, 40 eq) στους 0°C και η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης εξατμίστηκε με απόσταξη υπό υψηλό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με ημιπαρασκευαστική HPLC (90/10% έως 10/90% H₂O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA με ροή 5 mL/λεπτό για 30 λεπτά στα 214 nm). Το κλάσμα λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει 1.5mg (65%) της ένωσης **7** ως πορτοκαλί στερεό.

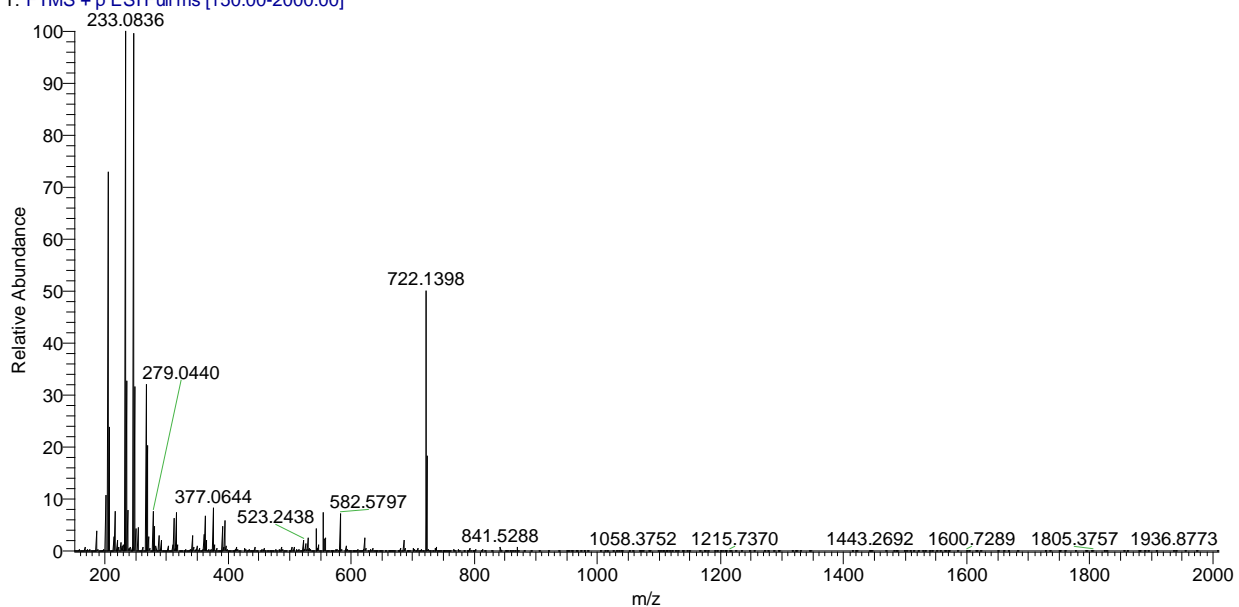


7

Σχήμα 86. Δομή της ένωσης **7**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **7** πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (**Σχήμα 87**).

A-60-7_161118111652 #5-6 RT: 0.06-0.07 AV: 2 NL: 5.26E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



Σχήμα 87. Φάσμα μάζας της ένωσης **7**.

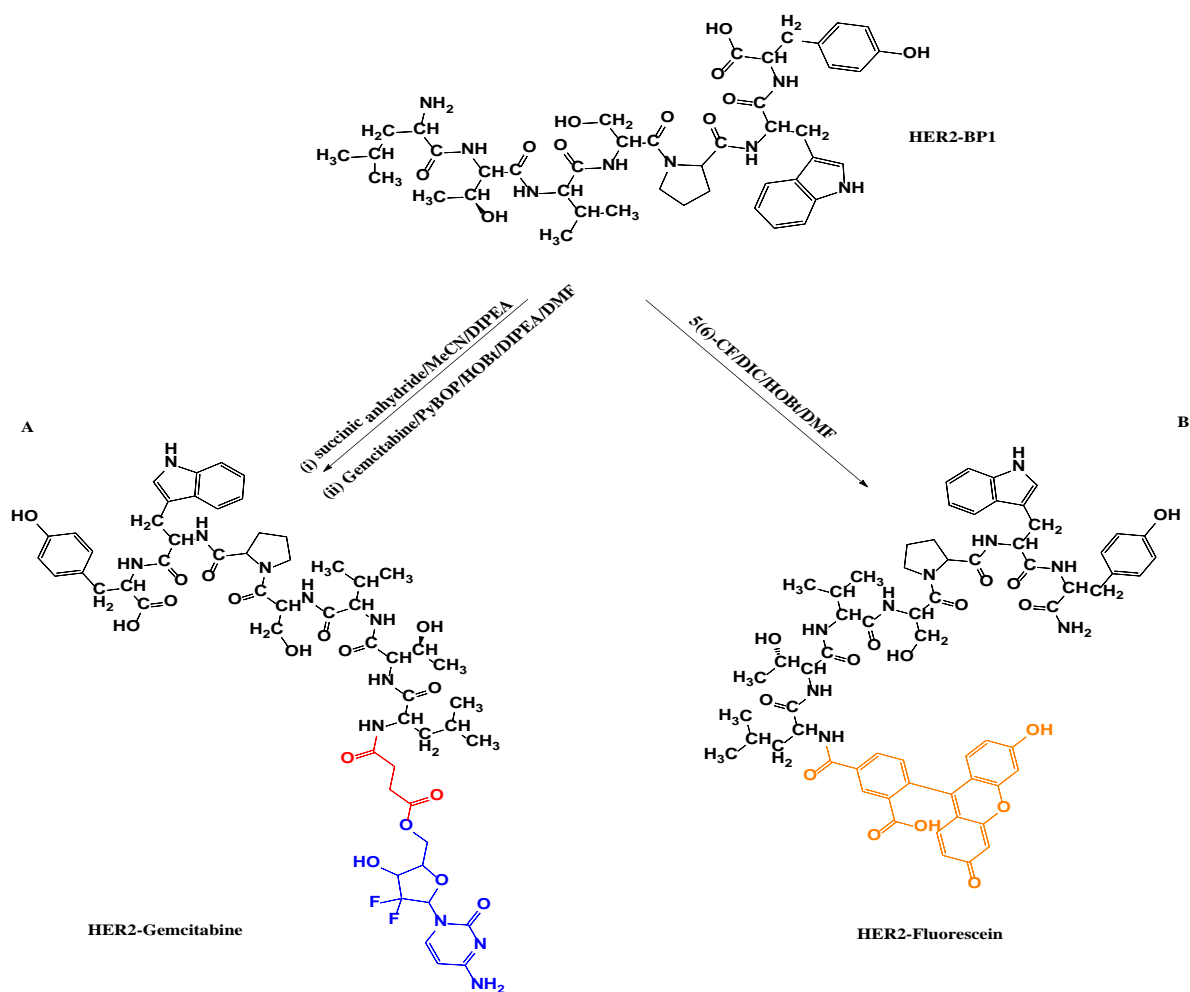
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός με φασματομετρία μάζας της ένωσης **7**:

Μάζα της ένωσης **7**: MS (ESI+) m/z για $C_{34}H_{25}F_2N_3O_{13}$: υπολογίστηκε: 721.14; βρέθηκε: 722.14 $[M+H]^+$, 248 $[M+2H+Na]^{3+}$.

3 Βιοσυζεύγματα Γεμισταβίνης-HER2

3.1 Εισαγωγή

Στην συγκεκριμένη ενότητα θα παρουσιαστεί ο σχεδιασμός και η σύνθεση των αναλόγων Γεμισταβίνη-HER2 και HER2-5(6)καρβοξυφλουορεσκεΐνη. Η γενική απεικόνιση της δομής των συζευγμάτων φαίνεται στο **Σχήμα 88**. Συγκεκριμένα, το σύζευγμα Γεμισταβίνη-HER2 αποτελείται από τον κυτταροτοξικό παράγοντα (Γεμισταβίνη) συνδεδεμένο με εστερικό δεσμό με τον συνδέτη ηλεκτρικό οξύ (με την 5'-OH της Γεμισταβίνης), ο οποίος στη συνέχεια συνδέεται με το πεπτίδιο HER2 (το οποίο αναγνωρίζεται απ' τον υποδοχέα EGFR που βρίσκεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης) με αμιδικό δεσμό. Το σύζευγμα HER2-5(6)καρβοξυφλουορεσκεΐνη αποτελείται από την χρωστική ένωση 5(6)καρβοξυφλουορεσκεΐνη συνδεδεμένη με το πεπτίδιο HER2 μέσω αμιδικού δεσμού.



Σχήμα 88. Πειραματική πορεία σύνθεσης των συζευγμάτων (A) Σύνθεση του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη (i) ηλεκτρικός ανυδρίτης, MeCN, DIPEA, rt, 4 ώρες; (ii) 5(6)-CF, PyBOP, HOBT, DIPEA, DMF, rt, 12 ώρες; (B) 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη, DIC, HOBT, DMF, 12 ώρες.

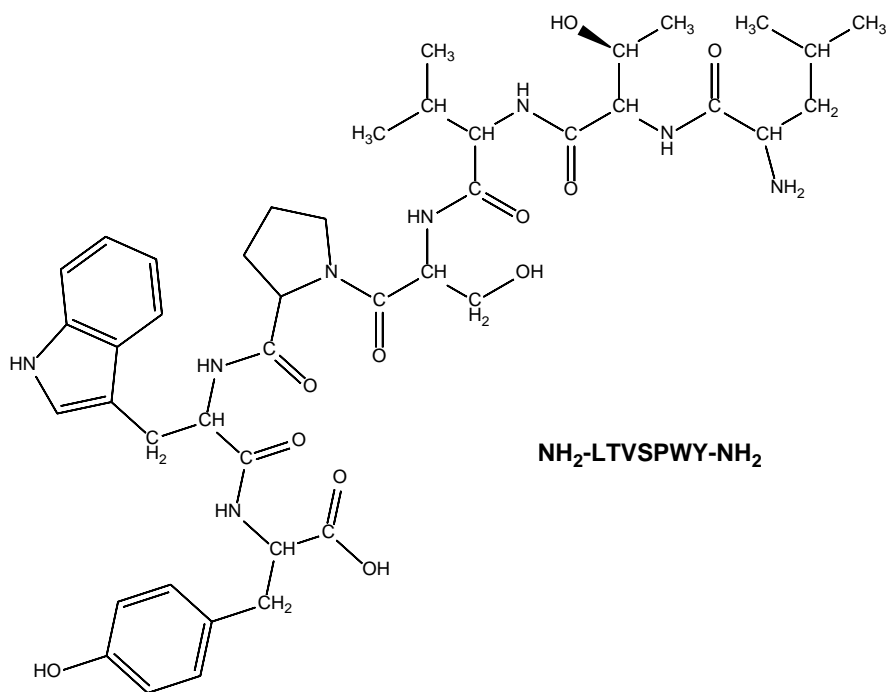
Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του πεπτιδίου HER2-BP1 με την κλασική μέθοδο σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση το οποίο καθαρίστηκε με HPLC και χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας.

Για να διαπιστώσουμε εάν το πεπτίδιο εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε η επισήμανσή του με τη χρωστική 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη. Το προκύπτον σύζευγμα καθαρίστηκε με HPLC, χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας και έγιναν πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας.

Τέλος, για την εκλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σύζευξη του πεπτιδίου με τον αντικαρκινικό παράγοντα Γεμισταβίνη μέσω ενός συνδέτη. Το σύζευγμα αφού καθαρίστηκε με HPLC και χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας, ελέγχθηκε σε καρκινικές σειρές ως προς την αντικαρκινική του δράση.

3.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός του πεπτιδίου HER2-BP1 (HER2)

Στο **Σχήμα 89** που ακολουθεί φαίνεται η δομή του πεπτιδίου HER2-BP1 ($\text{NH}_2\text{-LTVSPWY-NH}_2$) του οποίου η σύνθεση έγινε με την κλασική μέθοδο σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση με την μέθοδο Fmoc-/tBu.



Molecular Weight: 865.00

Σχήμα 89. Δομή του πεπτιδίου **HER2**.

Η σύνθεση του πεπτιδίου **HER2** ($\text{NH}_2\text{-LTVSPWY-NH}_2$) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο εστεροποίησης και σύζευξης σε στερεά φάση επί της 2-γλωροτριτυλογλωριδίου ρητίνης (η οποία συνδυάζεται με την Fmoc-/tBu μεθοδολογία) με τη μέθοδο των καρβοδιϊμιδίων

και ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν τα DIC/HOBt όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

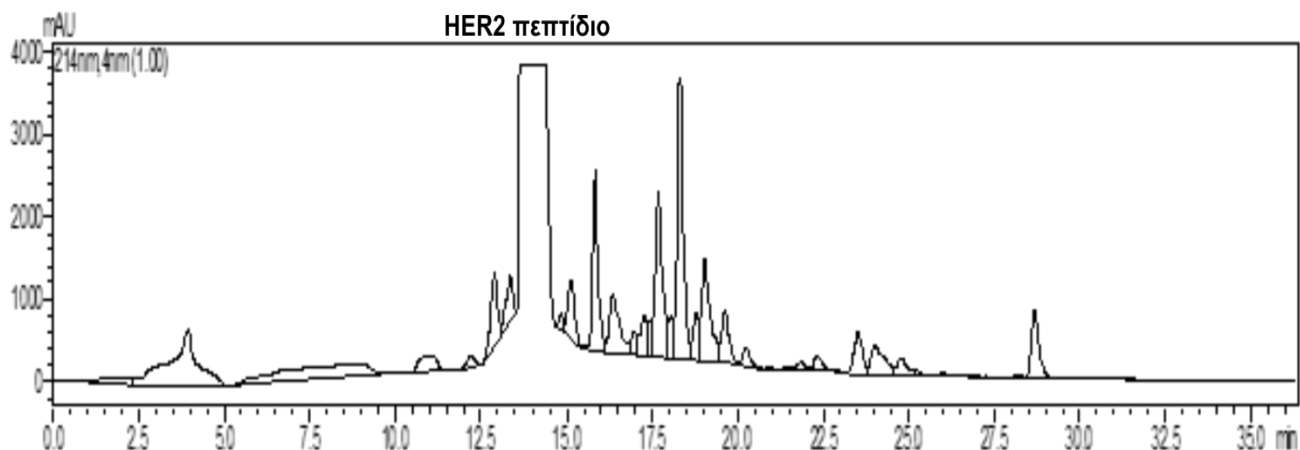
Πίνακας 6. Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του πεπτιδίου **HER2**.

Sr.no.	Aminoacid	Calculations (MW x mmol x eq)	Quantity
1	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459.5 X 0.34682080 X 1.1	175.3mg
2	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.6 X 0.34682080 X 3	547.9mg
3	Fmoc-Pro-OH	337.4 X 0.34682080 X 3	351.05mg
4	Fmoc-Ser(tBu)-OH	383.4 X 0.34682080 X 3	398.91mg
5	Fmoc-Val-OH	339.39 x 0.34682080 x 3	353.12mg
6	Fmoc-Thr(tBu)-OH	397.46 x 0.34682080 x 3	413.54mg
7	Fmoc-Leu-OH	353.4 X 0.34682080 X 3	367.69mg
-	HOBt	135.12 X 0.34682080 X 3	140.58mg
-	DIC	126.2 X 0.34682080 X 3	131.3mg

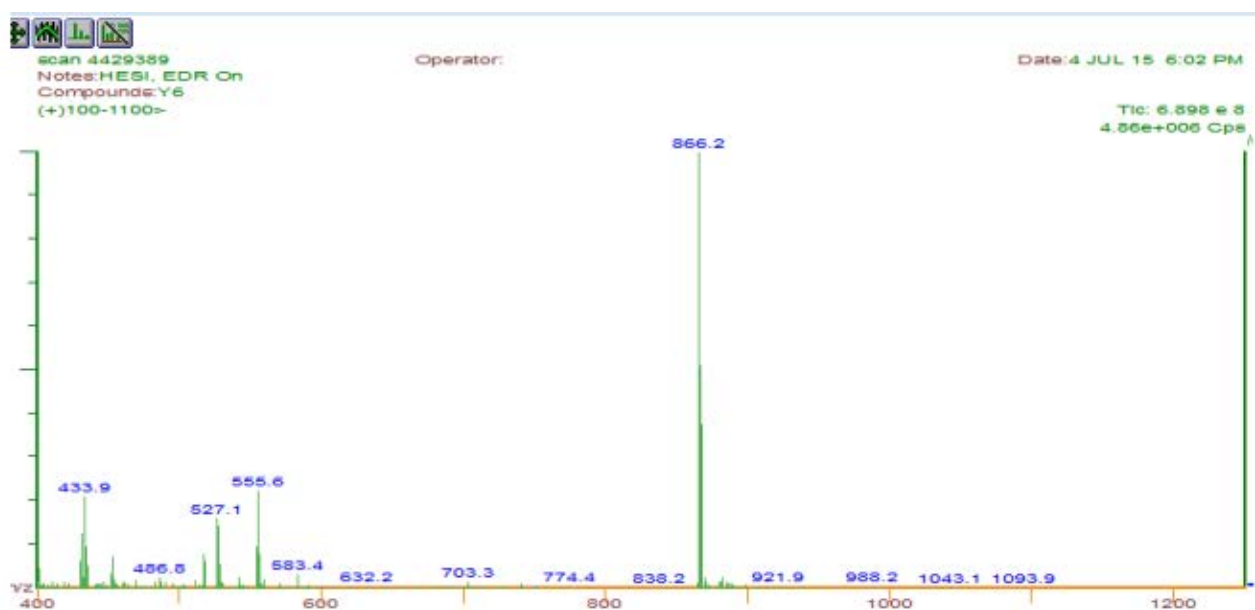
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του πεπτιδίου, έγινε αποκοπή της ρητίνης με 2% TFA σε DCM και ύστερα ολική αποκοπή του πεπτιδίου με χρήση διαλύματος TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) για να λάβουμε ποσότητα 298mg. Ο καθαρισμός του πεπτιδίου έγινε με HPLC με σύστημα 90/10% έως 10/90% H₂O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA. Μετά την HPLC λάβαμε 180 mg καθαρού πεπτιδίου.

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου **HER2** πραγματοποιήθηκε με HPLC και το αντίστοιχο χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 90**.

Ο χαρακτηρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζης, το φάσμα της οποίας φαίνεται στο **Σχήμα 91**.



Σχήμα 90. Χρωματογράφημα HPLC του πεπτιδίου **HER2**.



Σχήμα 91. Φάσμα μάζας του πεπτιδίου **HER2**.

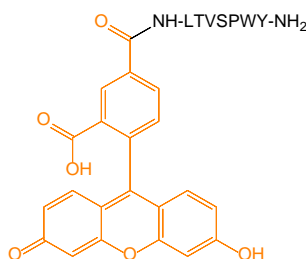
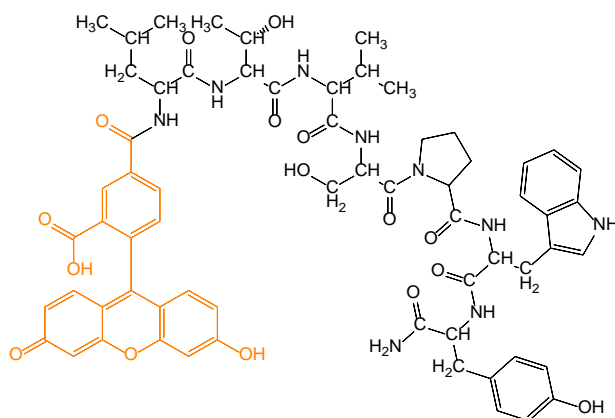
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός με φασματομετρία μάζας του πεπτιδίου **HER2**:

Μάζα πεπτιδίου **HER2**: MS (ESI+) m/z για $C_{43}H_{60}N_8O_{11}$: υπολογίστηκε: 865.0; βρέθηκε: 866.2
 $[M+H]^+$, 433.9 $[M+2H]^{2+}$.

3.3 Σύνθεση και χαρακτηρισμός του συζεύγματος HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη

3.3.1 Εισαγωγή

Για τον έλεγχο της εισαγωγής του πεπτιδίου στα καρκινικά κύτταρα μέσω ενδοκύττωσης όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έγινε η απευθείας σύζευξη της 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης στο πεπτίδιο HER2 (Σχήμα 92). Η αντίδραση έγινε με την κλασική μέθοδο σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεά φάση. Αφού έγινε η ενεργοποίηση του οξέος της χρωστικής με DIC/HOBt σε μίγμα διαλυτών DMF/DCM, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του διαλύματος στη ρητίνη.



Σχήμα 92. Δομή της ένωσης **HER2-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη**.

3.3.2 Πειραματική πορεία

Η σύνθεση της χρωστικής πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.4.2.

Για την ενεργοποίηση του καρβοξυλικού οξέος, σε σφαιρική φιάλη που περιέχει την 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (30 mg, 0.079 mmol, 3 eq), HOBt (10.78 mg, 0.079 mmol, 3 eq) σε μίγμα 1:1 DMF/DCM (4 mL) προστίθεται το DIC (12.4 μ L, 0.079 mmol, 3 eq) στους 0 °C και το προκύπτον διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 20-30 λεπτά.

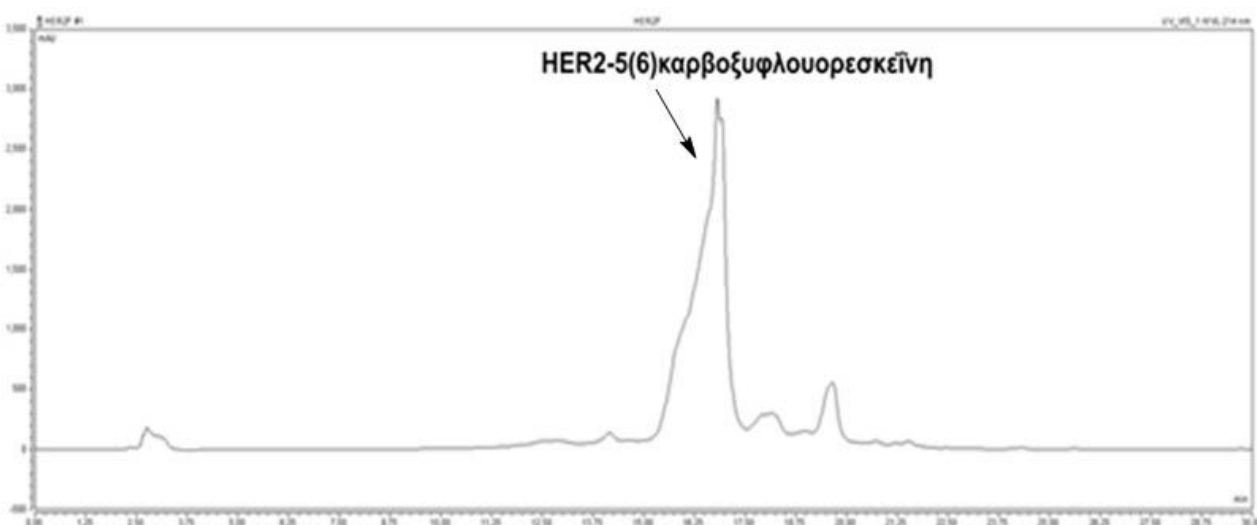
Έπειτα γίνεται η προσθήκη του παραπάνω διαλύματος σε ειδικό γιάλινο σκεύος όπου εμπεριέχεται η ρητίνη του πεπτιδίου (22.8 mg πεπτιδίου, 0.026 mmol, 1 eq) με αποκομμένη την Fmoc- ομάδα. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες.

Τέλος, πραγματοποιούνται εκπλύσεις με DMF-DCM και γίνεται έλεγχος της ολοκλήρωσης τη αντίδρασης με τεστ Καιζερ (απουσία μπλέ κόκκων ρητίνης).

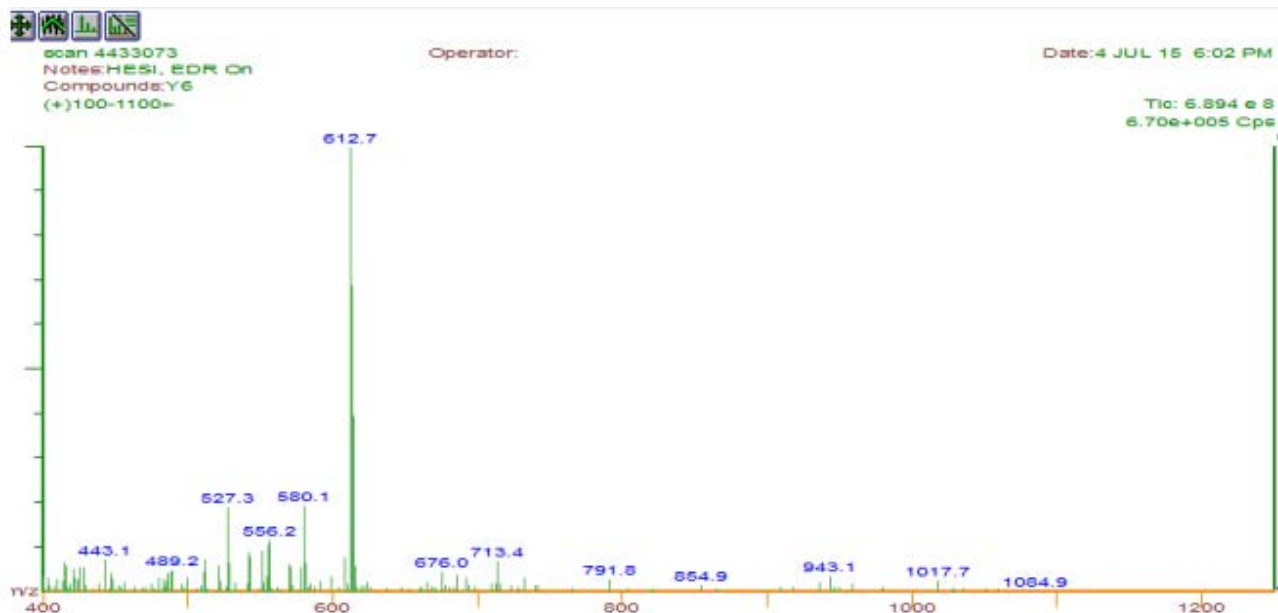
Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του συζεύγματος, γίνεται αποκοπή της ρητίνης με 2% TFA σε DCM και ύστερα ολική αποκοπή του πεπτιδίου με χρήση διαλύματος TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) για να λάβουμε ποσότητα 18 mg. Ο καθαρισμός του συζεύγματος έγινε με HPLC με σύστημα 90/10% έως 10/90% H₂O+0.1% TFA/MeCN+0.1% TFA. Μετά την HPLC λάβαμε 10 mg (31.5%) καθαρού συζεύγματος.

Ο καθαρισμός του συζεύγματος **HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη** πραγματοποιήθηκε με HPLC, της οποίας το χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 93**.

Ο χαρακτηρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζης όπως φαίνεται στο **Σχήμα 94**.



Σχήμα 93. Χρωματογράφημα HPLC του συζεύγματος **HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη**.



Σχήμα 94. Φάσμα μάζης του συζεύγματος **HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός με φασματομετρία μάζας της ένωσης **HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη**:

Μάζα του συζεύγματος **HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη**: MS (ESI+) m/z για $C_{64}H_{71}N_9O_{16}$: υπολογίστηκε: 1222.32; βρέθηκε: 612.7 $[M+2H]^{2+}$.

3.3.3 Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας και κυτταρομετρία ροής

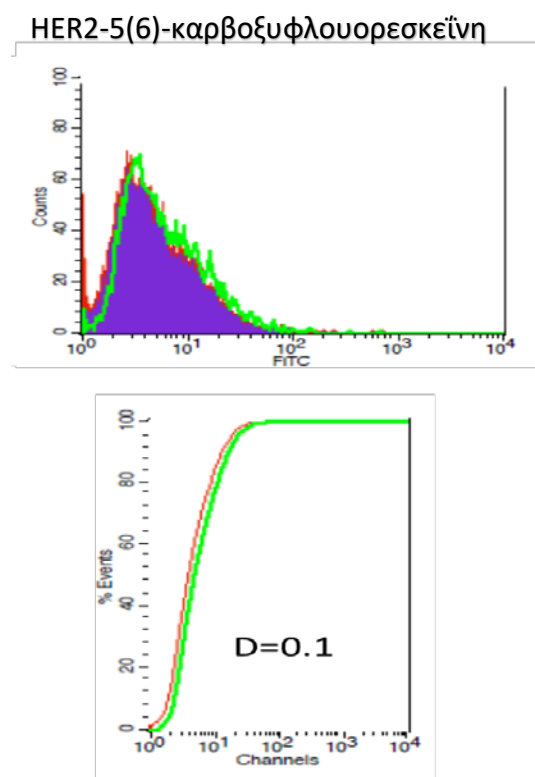
Το σύζευγμα που συνθέσαμε (**HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη**) ελέγχθηκε ως προς την ικανότητά του να εισαχθεί σε καρκινικά κύτταρα με Κυτταρομετρία Ροής και Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης Laser.

Κυτταρική καλλιέργεια: Κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου του μαστού (MDA-MB-231) και πορογενούς καρκινώματος του μαστού (HCC1954) καλλιεργήθηκαν σε μέσο DMEM και μέσο RPMI αντίστοιχα με 10% θερμο-απενεργοποιημένο ορό μόσχου. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν επί 60mm πιάτα μέχρι περίπου 70% συρροή στους 37 °C υπό 5% CO₂ και ανακαλλιεργήθηκαν κάθε 3-4 ημέρες.

Κυτταρομετρία ροής: Για να αναλυθεί η εσωτερικοποίηση του συζεύγματος HER2-5(6)-καρβοξυφλουρεσκεΐνη με FACS, MDA-MB-231 και HCC1954 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών καλλιέργειας ιστού (12×10^4 κύτταρα /φρεάτιο) για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, το μέσο καλλιέργειας αλλάχθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν με 10 μM του πεπτιδίου για

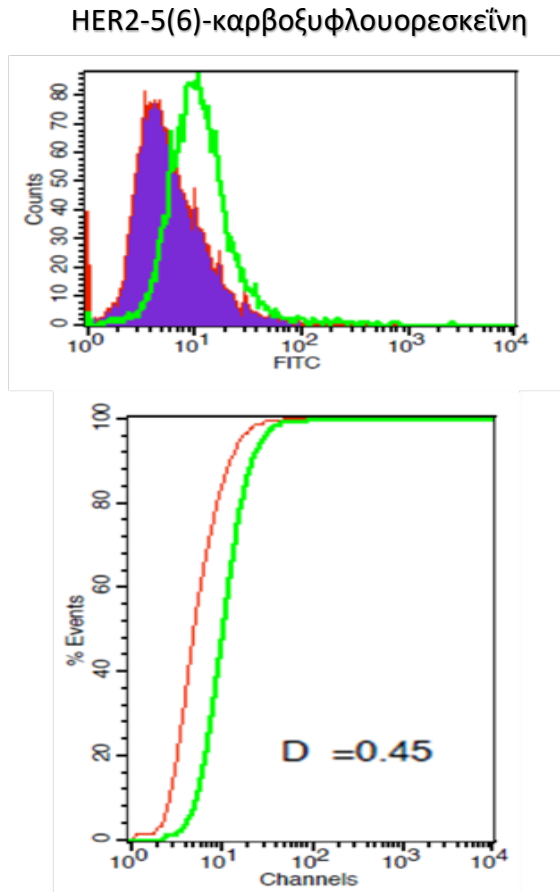
45 λεπτά στους 37 °C σε μέσο χωρίς ορό. Μετά από αυτή την επώαση, τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS, κατεργάστηκαν με 0.05% θρυψίνη (500 µL) στους 37 °C για 4 λεπτά πριν από την προσθήκη του μέσου 2 mL με ορό. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 1.300 rpm για 5 λεπτά και αφού το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, επαναιωρήθηκαν σε PBS. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φθορισμομετρική ανάλυση σε FACScalibur (BD Biosciences) κυτταρόμετρο ροής με χρήση λέιζερ διέγερσης 488 nm και ένα φίλτρο εκπομπής 525 nm (Σχήμα 95 και Σχήμα 96).

Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης Laser (CLSM): MDA-MB-231 και HCC1954 κύτταρα τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδες σε πλάκες 24 φρεατίων (6×10^4 κύτταρα/φρεάτιο) για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα, το μέσο καλλιέργειας αλλάχθηκε και τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37 °C ή 40 °C για 45 λεπτά, με 10 µM του πεπτιδίου σε μέσο χωρίς ορό. Μετά την επώαση με ενώσεις, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS), σταθεροποιήθηκαν με 3,7% παραφορμαλδεΰδη και αποσβέστηκαν με χλωριούχο αμμώνιο 50 mM. Ακολούθως, οι καλυπτρίδες πλύθηκαν με PBS και τοποθετήθηκαν ανάποδα σε γυάλινες διαφάνειες, με μια σταγόνα Mowiol που περιέχει DAPCO (100 mg/mL). Η κατανομή του φθορισμού του πεπτιδίου αναλύθηκε χρησιμοποιώντας ένα Leica TCS SP5 συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Germany) και στόχο HCX PL APO CS 63.0x1.4 oil UV. Το πεπτίδιο διεγέρθηκε στα 488nm και η εκπομπή του ανιχνεύθηκε στα 500-550 nm (Σχήμα 97).

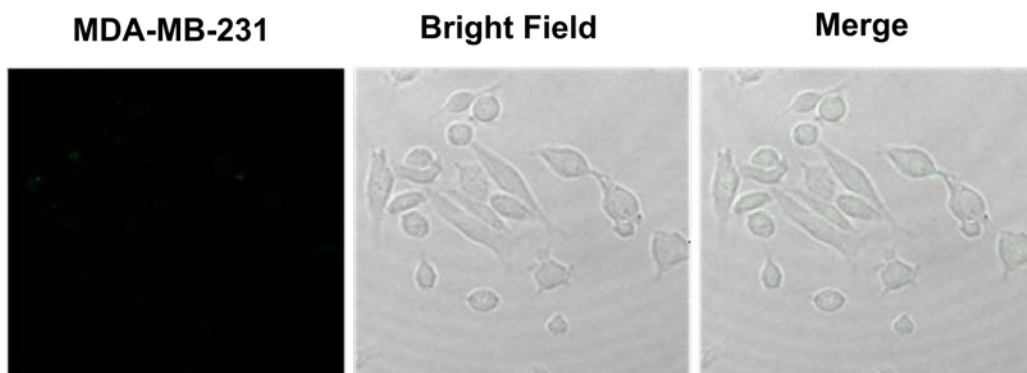


Σχήμα 95. Μελέτη κυτταρικής πρόσληψης του συζεύγματος HER2-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής σε καρκινικές σειρές MDA-MB-

231. Ανάλυση του φθορισμού των κυττάρων MDA-MB-231 μετά από επώαση με το σύζευγμα HER2-5(6)καρβοξυφλουορεσκεΐνη (10 pm) (πράσινη γραμμή) για 45 λεπτά στους 37 °C και έπειτα με επώαση τους με IgG1-FITC (κόκκινη γραμμή) σαν αρνητικό κοντρόλ. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων το στατιστικό τεστ Kolmogorov-Smirnov (KS) χρησιμοποιήθηκε και η παράμετρος D μετρήθηκε.



Σχήμα 96. Μελέτη κυτταρικής πρόσληψης του συζεύγματος HER2-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής σε καρκινικές σειρές HCC1954. Ανάλυση του φθορισμού των κυττάρων HCC1954 μετά από επώαση με το σύζευγμα HER2-5(6)καρβοξυφλουορεσκεΐνη (10 pm) (πράσινη γραμμή) για 45 λεπτά στους 37 °C και έπειτα με επώαση τους με IgG1-FITC (κόκκινη γραμμή) σαν αρνητικό κοντρόλ. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων το στατιστικό τεστ Kolmogorov-Smirnov (KS) χρησιμοποιήθηκε και η παράμετρος D μετρήθηκε.



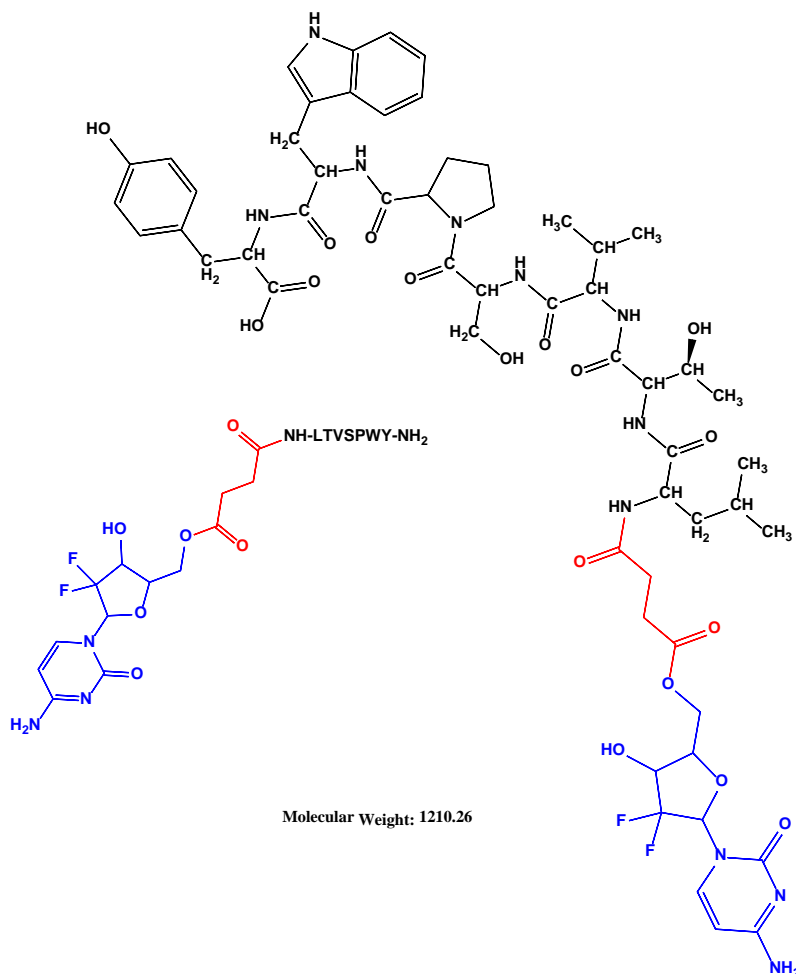
Σχήμα 97. Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας. Επώαση κυττάρων MDA-MB-231 με 10 pm του αναλόγου HER2-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνης για 45 λεπτά. Παρουσιάζονται εικόνες φθορισμού, λευκού πεδίου και μίξη αυτών (merge).

Τελικά, όπως ήταν αναμενόμενο δεν παρατηρήθηκε μεγάλη πρόσληψη απ' το σύζευγμα HER2-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 που δεν εκφράζουν υποδοχείς HER2, σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά HCC1954 όπου και παρατηρήθηκε αποτελεσματική πρόσληψη λόγω της υπερέκφρασης HER2 υποδοχέα.

3.4 Σύνθεση και χαρακτηρισμός του συζεύγματος HER2-Γεμισιταβίνη.

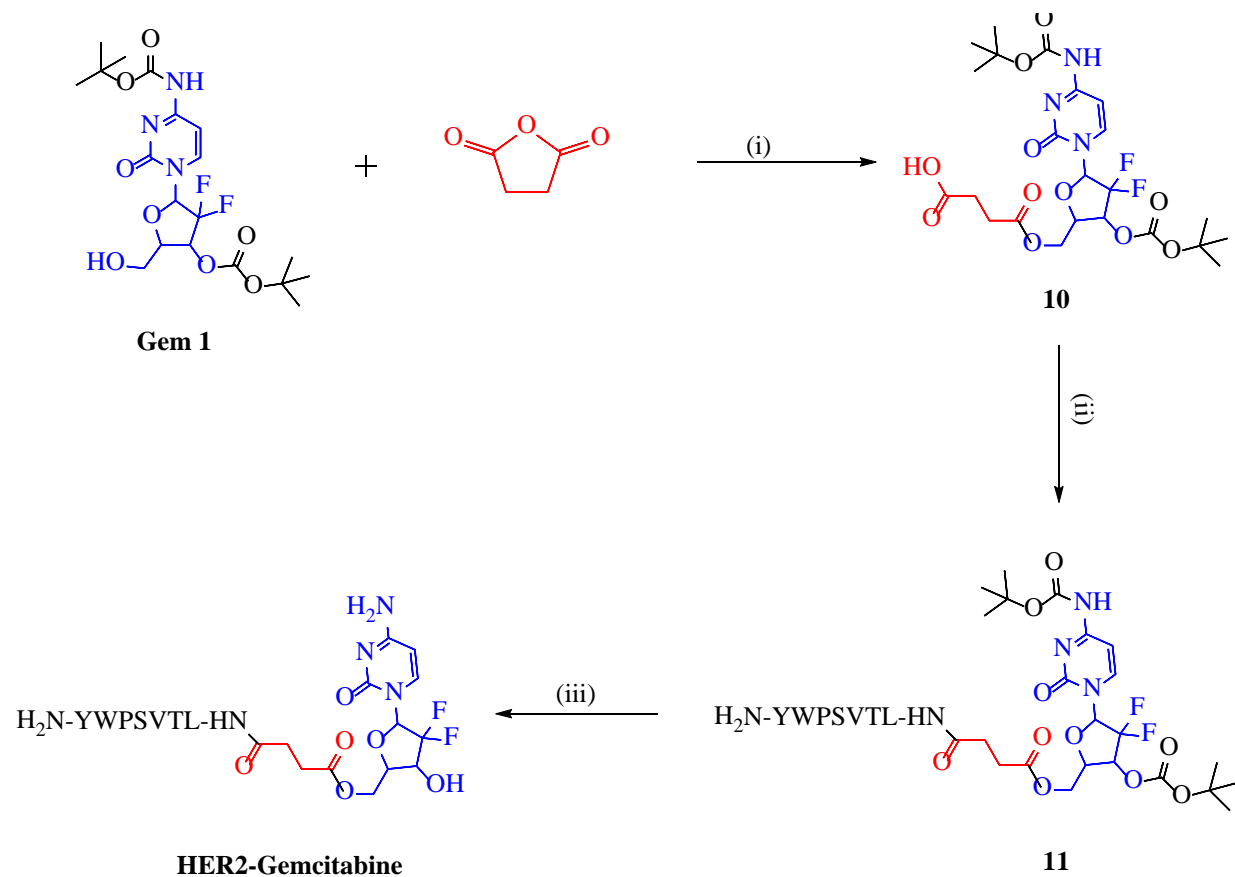
3.4.1 Εισαγωγή

Η Γεμισιταβίνη συνδέθηκε με το πεπτίδιο HER2 μέσω ενός συνδέτη (ηλεκτρικός ανυδρίτης) διότι (α) δεν υπάρχει δραστική ομάδα στην γεμισιταβίνη η οποία να μας επιτρέπει την απευθείας σύνδεση με το πεπτίδιο, (β) χρειάζεται απόσταση μεταξύ πεπτιδίου και φαρμάκου για να εκμηδενίσουμε τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις και (γ) δημιουργώντας αμιδικό δεσμό μεταξύ τους αυξάνεται η σταθερότητα του συζεύγματος (**Σχήμα 98**).



Σχήμα 98. Δομή της ένωσης **HER2-Γεμισταβίνη**.

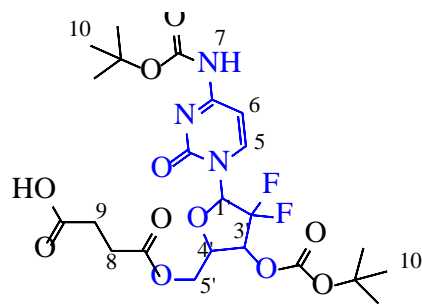
Η γεμισταβίνη προστατεύθηκε με την ομάδα Boc- επιλεκτικά στις θέσεις 4-NH₂ και 3'-OH όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.3. Έπειτα έγινε αντίδραση της 5'-OH με τον ηλεκτρικό ανυδρίτη με χρήση βάσης DIPEA σε διαλύτη MeCN. Ύστερα από διάνοιξη του δακτυλίου του ανυδρίτη, δημιουργήθηκε εστερικός δεσμός με την γεμισταβίνη και στην άλλη άκρη έμεινε ελεύθερη μια δραστική καρβοξυλική ομάδα για να αντιδράσει με το πεπτιδίο. Ο αμιδικός δεσμός πραγματοποιήθηκε σε στερεά φάση με χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης PyBOP/HOBt/DIPEA ύστερα από ενεργοποίηση του οξέος. Τέλος, πραγματοποιώντας κόψιμο του πεπτιδίου απ' την ρητίνη, πραγματοποιείται και ταυτόχρονη αποκοπή των προστατευτικών ομάδων boc- απ' το μόριο της γεμισταβίνης. (Σχήμα 99).



Σχήμα 99. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας του συζεύγματος HER2-Γεμισιταβίνη. (i) Ηλεκτρικός ανυδρίτης, MeCN, DIPEA, 4 h, rt; (ii) PyBOP, HOBT, DIPEA, DMF, HER2, 12 h, rt; (iii) TFA/TIS/H₂O κόψιμο ρητίνης.

3.4.2 Πειραματική πορεία

Σύνθεση της ένωσης 10: Στο διάλυμα των Gem 1 (Boc- προστατευμένη Γεμισιταβίνη με ελεύθερη την πρωτοταγή υδροξυλομάδα) (20 mg, 0.043 mmol, 1 eq) και ηλεκτρικού ανυδρίτη (13.88 mg, 0.107 mmol, 2.5 eq) σε άνυδρο ακετονίτριο (1.5 mL), προστίθεται στους 0 °C το DIPEA (300.1 μL, 2.22 mmol, 40 eq) και η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Η χρήση TLC υποδεικνύει την πλήρη κατανάλωση της Gem1 και την εμφάνιση μιας νέας πολικής κηλίδας. Στο διάλυμα προστίθενται 2 mL H₂O και λυοφιλοποιείται. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με παρασκευαστική HPLC (60/40% έως 0/100% H₂O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA με ροή 20 mL/λεπτό για 30 λεπτά στα 254 nm) και λυοφιλοποιήθηκε για να δώσει 19.3 mg (82.6%) της ένωσης **10** ως λευκό στερεό.

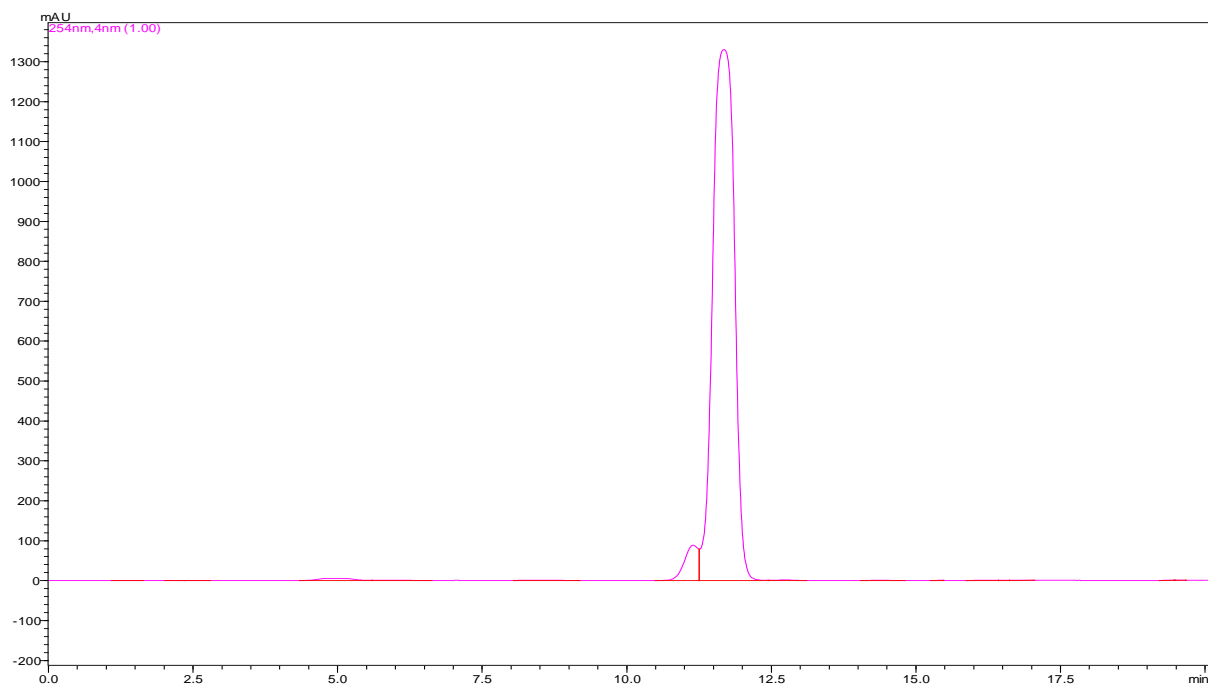


10

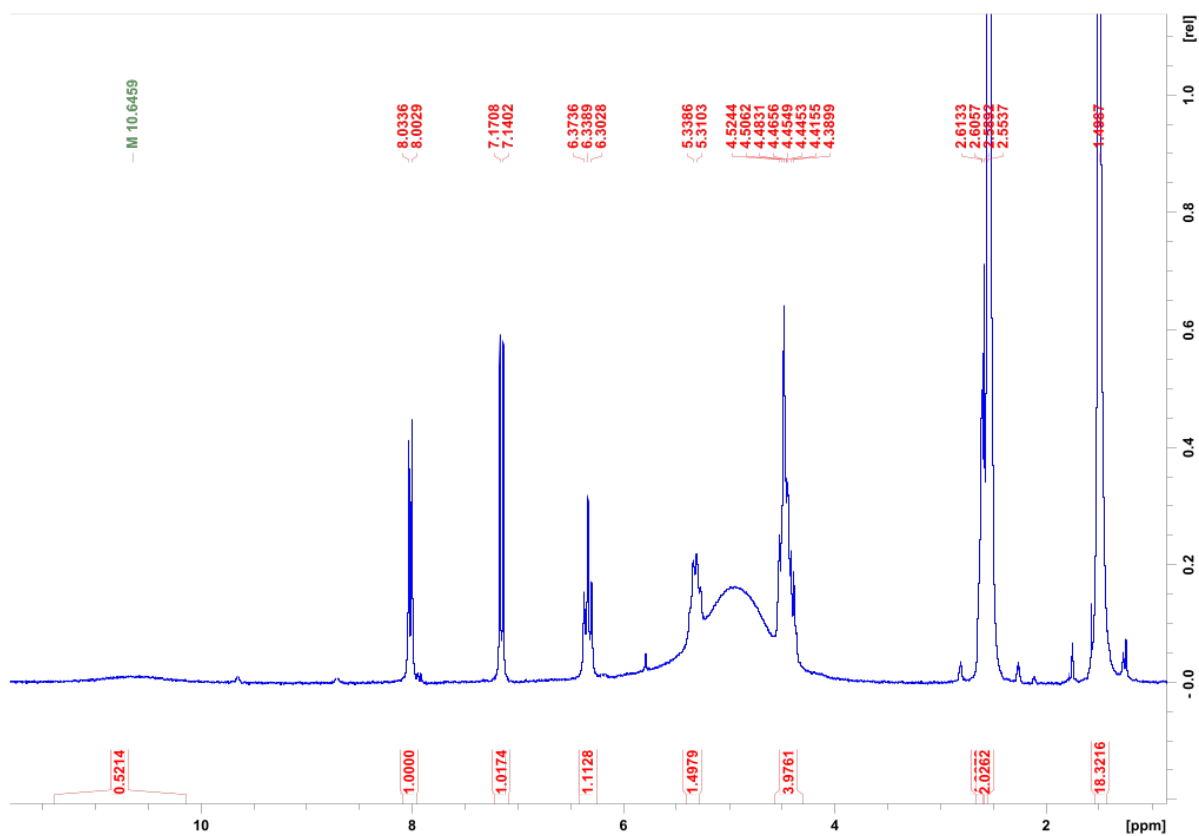
Σχήμα 100. Δομή της ένωσης **10**.

Ο καθαρισμός της ένωσης **10** πραγματοποιήθηκε με HPLC και το χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο **Σχήμα 101**.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **10** πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, της οποίας το φάσμα φαίνεται στο **Σχήμα 102**.



Σχήμα 101. Χρωματογράφημα HPLC της ένωσης **10**.



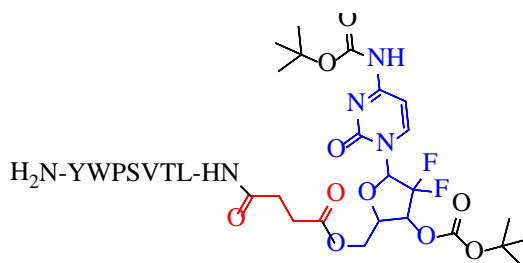
Σχήμα 102. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **10**.

Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **10**:

$^1\text{H-NMR}$ της ένωσης **10** (500 MHz, DMSO-d_6 , 25°C): $\delta = 10.64$ (s, 1 H, 7-NH), 8.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 6-H), 7.16 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 5-H), 6.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H, 1'-H), 5.32 (m, 1 H, 3'-H), 4.51 (m, 1 H, 5'a-H), 4.48 (m, 1 H, 4'H), 4.41 (m, 1 H, 5'b-H), 2.60 (t, 2 H, C8-H), 2.54 (t, 2 H, C9-H), 1.49 (s, 18 H, 10-H) ppm.

Σύνθεση της ένωσης 11: Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει την ένωση **10** (14.6 mg, 0.026 mmol, 1.5 eq), HOBt (3.5 mg, 0.026 mmol, 1.5 eq) και PyBOP (13.5mg, 0.026mmol, 1.5eq) σε 2.5 mL άνυδρου DMF, προστίθεται στους 0°C το DIPEA (15.1 μL , 0.087 mmol, 5 eq) και το μίγμα αφήνεται υπο ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 35 λεπτά. Ταυτόχρονα, το πεπτίδιο HER2 (15 mg, 0.017 mmol, 1 eq), το οποίο βρίσκεται πάνω στη ρητίνη, τοποθετείται σε κατάλληλο γιάλινο σκεύος και γίνεται αποκοπή της Fmoc ομάδας με 20% πιπεριδίνη σε DMF. Ο έλεγχος αποκοπής γίνεται με το τεστ Κάιζερ που δείχνει μπλέ χρώμα. Έπειτα, το μίγμα με το

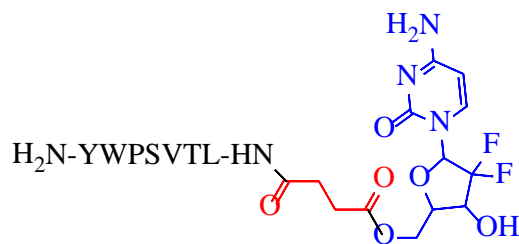
ενεργοποιημένο οξύ προστίθεται στο γιάλινο σκεύος που περιέχει το πεπτίδιο και αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της αντίδρασης πραγματοποιείται με το test Κάιζερ στο οποίο δεν εμφανίζεται κανένας μπλέ κόκκος ρητίνης. Τέλος, πραγματοποιούνται εκπλύσεις της ρητίνης διαδοχικά με DMF/DCM και η ρητίνη στεγνώνεται με χρήση Et₂O και υψηλού κενού για να χρησιμοποιηθεί για την επόμενη αντίδραση.



11

Σχήμα 103. Δομή της ένωσης 11.

Σύνθεση της ένωσης HER2-Γεμισιταβίνη: Η ένωση 11 προστίθεται με προσοχή στον πυθμένα σφαιρικής φιάλης, γίνεται η προσθήκη του διαλύματος αποκοπής απ' την ρητίνη TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2.5 ώρες. Ύστερα από την κλασική επεξεργασία, όπως αναφέρεται στο θεωρητικό μέρος, προκύπτει η ένωση σαν έλαιο και πραγματοποιείται ο καθαρισμός της με παρασκευαστική HPLC (90/10% έως 40/60% H₂O+0.1%TFA/MeCN+0.1%TFA με ροή 20 mL/λεπτό για 30 λεπτά στα 214 nm) και λυοφιλοποιείται για να δώσει 6.5 mg (31.5%) της ένωσης **HER2-Γεμισιταβίνη** ως λευκό στερεό.

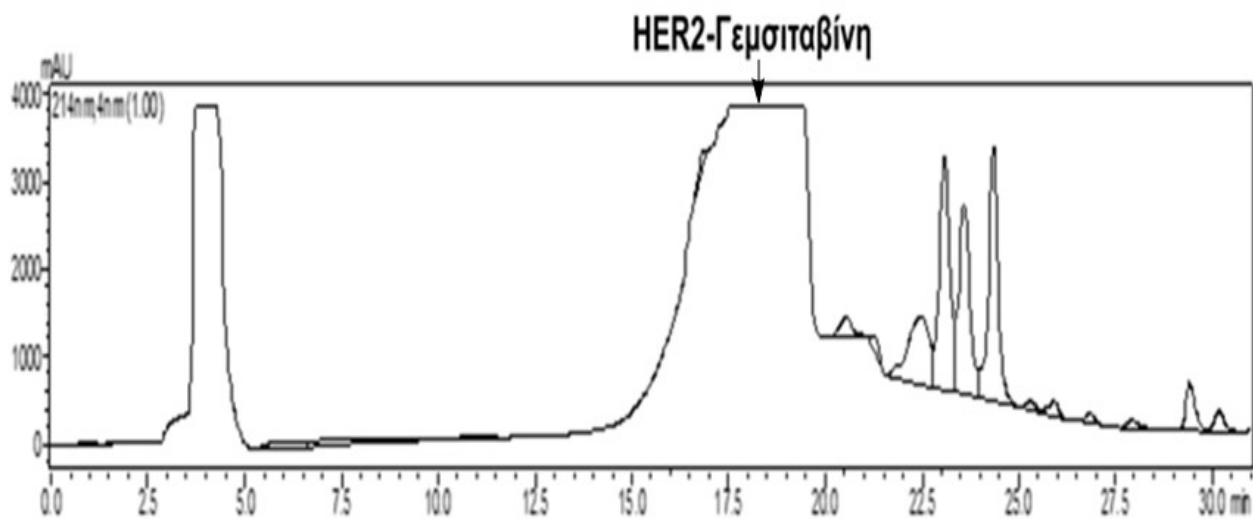


HER2-Gemcitabine

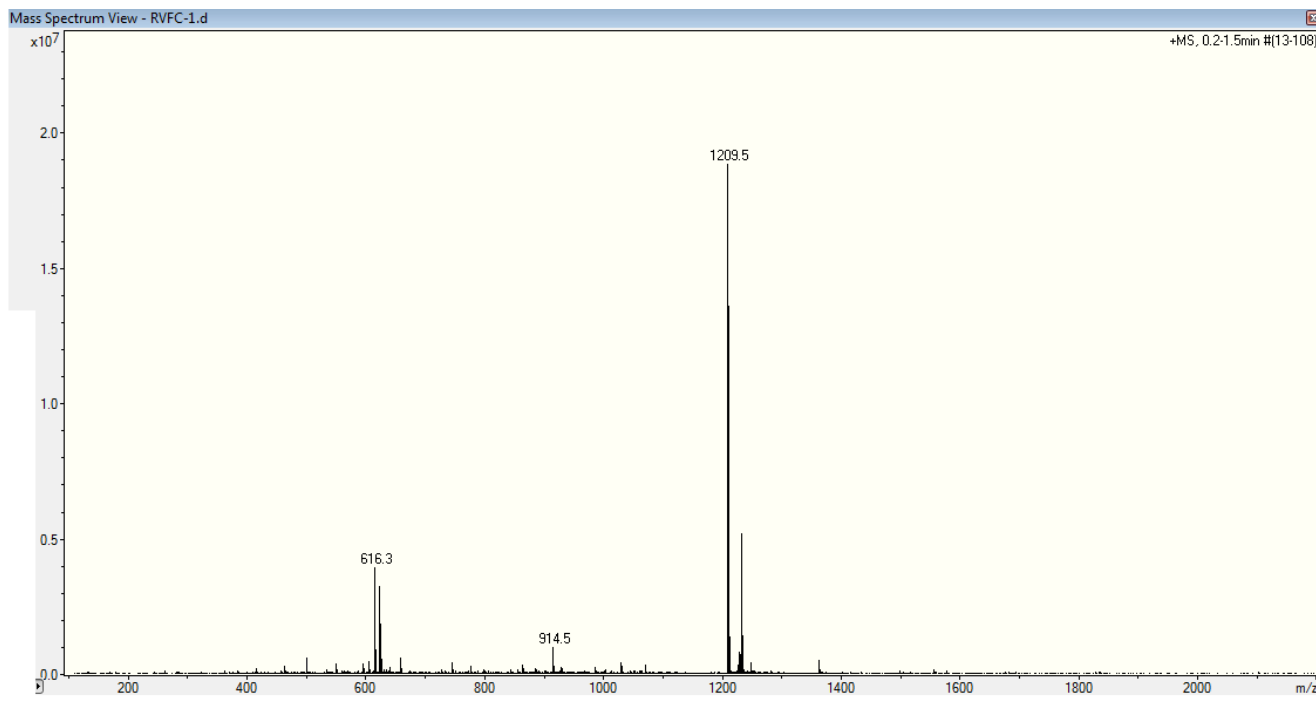
Σχήμα 104. Δομή του συζεύγματος HER2-Γεμισιταβίνη.

Ο καθαρισμός της ένωσης **HER2-Γεμισιταβίνη** πραγματοποιήθηκε με HPLC και το χρωματογράφημα παρουσιάζεται στο Σχήμα 105.

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης **HER2-Γεμισταβίνη** πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζης, της οποίας το φάσμα φαίνεται στο **Σχήμα 106**.



Σχήμα 105. Χρωματογράφημα HPLC του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη.



Σχήμα 106. Φάσμα μάζης του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη.

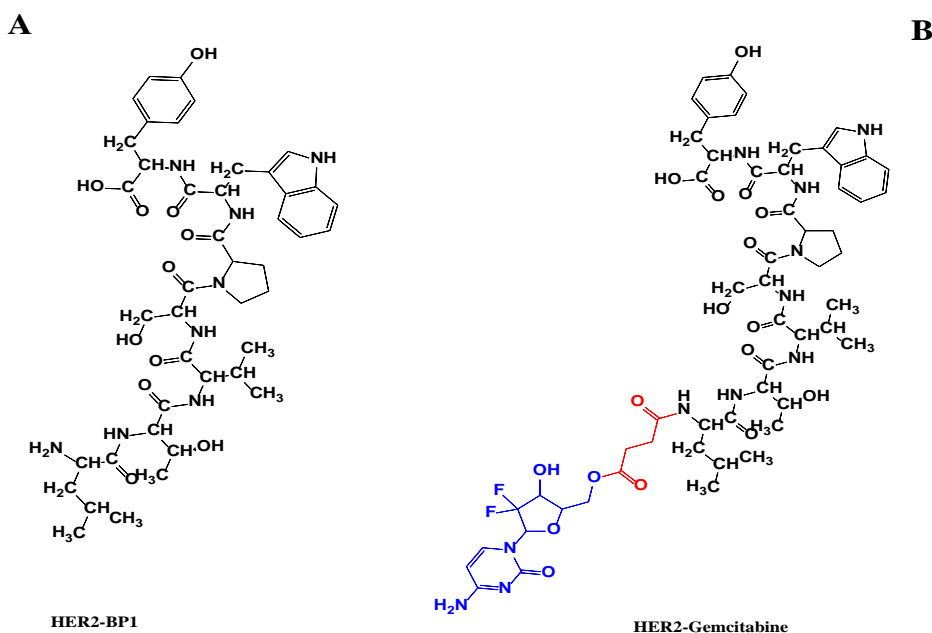
Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός της μάζας του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη**:

Μάζα του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη**: MS (ESI+) m/z για $C_{56}H_{73}F_2N_{11}O_{17}$: υπολογίστηκε: 1210.26; βρέθηκε: 1209.5 $[M+H]^+$, 616.3 $[M+H+Na]^{3+}$.

3.4.3 Βιολογική αξιολόγηση του πεπτιδίου HER2-BP1 και του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη

Το πεπτίδιο HER2-BP1 (**Σχήμα 107**) μελετήθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητα του έναντι της Γεμισταβίνης σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231 (**Σχήμα 108**), HCC-1954 (**Σχήμα 109**), NCI-H1975 (**Σχήμα 110**), A549 (**Σχήμα 111**).

Το σύζευγμα HER2-Γεμισταβίνη (**Σχήμα 107**) μελετήθηκε ως προς το βιολογικό του προφίλ. Έγινε έλεγχος της κυτταροτοξικότητας του σε καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231 (**Σχήμα 112**), NCI-H1975 (**Σχήμα 113**), HCC-1954 (**Σχήμα 114**), A549 (**Σχήμα 115**). Όλες οι τιμές IC_{50} συνοψίζονται στον **Πίνακα 7**. Έπειτα, το σύζευγμα HER2-Γεμισταβίνη ελεγχθηκε ως προς την σταθερότητα του, έναντι της Γεμισταβίνης, σε μέσο RPMI (**Σχήμα 116**).



Σχήμα 107. (A) Δομή του πεπτιδίου HER2-BP1 και (B) Δομή του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη.

Κύτταρα (MDA-MB-231, HCC-1954, NCI-H1975, A549) απλώθηκαν σε μια πυκνότητα 5×10^3 κύτταρα ανά φρεάτιο σε πλάκες 96 φρεατίων. Μετά από 24 ώρες επώασης (37 °C, 5% CO_2), το μέσο των κυττάρων απομακρύνθηκε και οι ενώσεις προστέθηκαν σε επιλεγμένες

συγκεντρώσεις (0.001-40 μ M για τη Γεμισιταβίνη και το σύζευγμα HER2-Γεμισιταβίνη), ακολουθούμενη από επώαση για 72 ώρες. Το μέσο στη συνέχεια απομακρύνθηκε και το διάλυμα MTT (0,3 mg/mL σε PBS) προστέθηκε σε κύτταρα για 3 ώρες, μετά το οποίο το διάλυμα MTT απομακρύνθηκε και οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύθηκαν σε 100 μ L DMSO. Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 570 nm και ένα μήκος κύματος αναφοράς στα 690 nm χρησιμοποιώντας αναγνώστη απορρόφησης μικροπλακός. Η κυτταροστατική συγκέντρωση 50% (IC₅₀) υπολογίστηκε με βάση μια λογιστική εξίσωση τεσσάρων παραμέτρων με χρήση του λογισμικού SigmaPlot 12. Κάθε σημείο ήταν το αποτέλεσμα τριών πειραμάτων που εκτελούνται εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον **Πίνακα 7**.

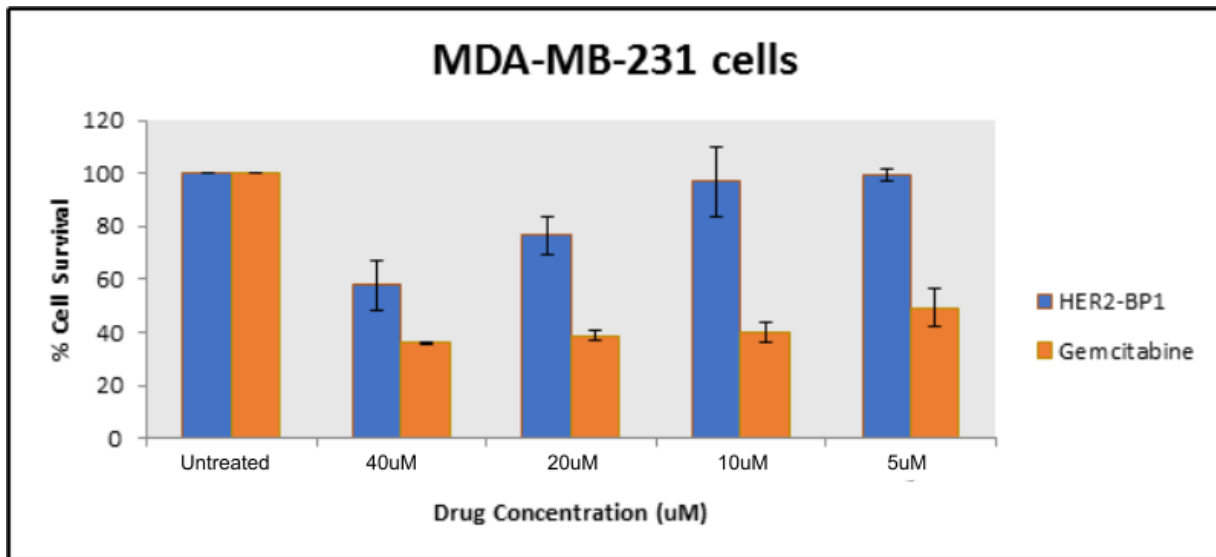
Πίνακας 7. Τιμές IC₅₀ για τη Γεμισιταβίνη και το ανάλογο HER2-Γεμισιταβίνη σε καρκινικές σειρές MDA-MB-231, A549, NCI-H1975, HCC-1954.

Cell Lines	HER2G	Gemcitabine
MDA-MB-231	>20000	489 (\pm 186) (n=6)
A549	536 (\pm 155) (n=3)	16 (\pm 6) (n=9)
NCI-H1975	450 (\pm 57) (n=3)	39 (\pm 11) (n=4)
HCC-1954	599 (\pm 35) (n=3)	31 (\pm 7) (n=5)

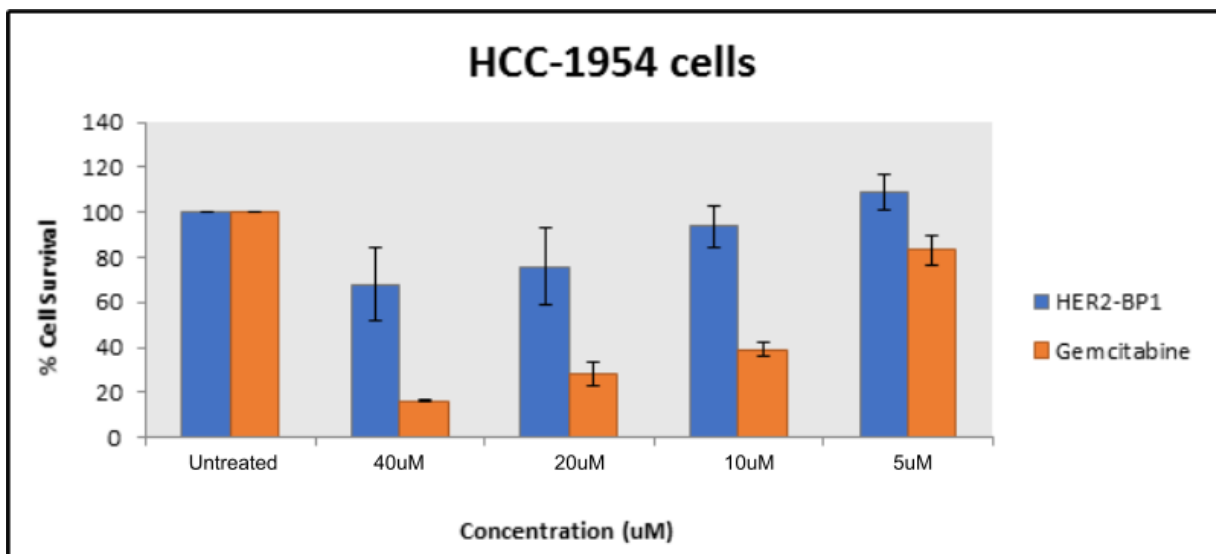
Οι μετρήσεις βασίστηκαν σε MTT-πρωτόκολο 3 ημερών, 5000/κύτταρο/φρεάτιο. Οι τιμές IC₅₀ υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό SigmaPlot με χρήση 4 παραμέτρων.

Παρατηρούμε πως το σύζευγμα HER2-Γεμισιταβίνη είναι λιγότερο τοξικό απ' την σκέτη Γεμισιταβίνη στις καρκινικές σειρές που ελέγχθηκε.

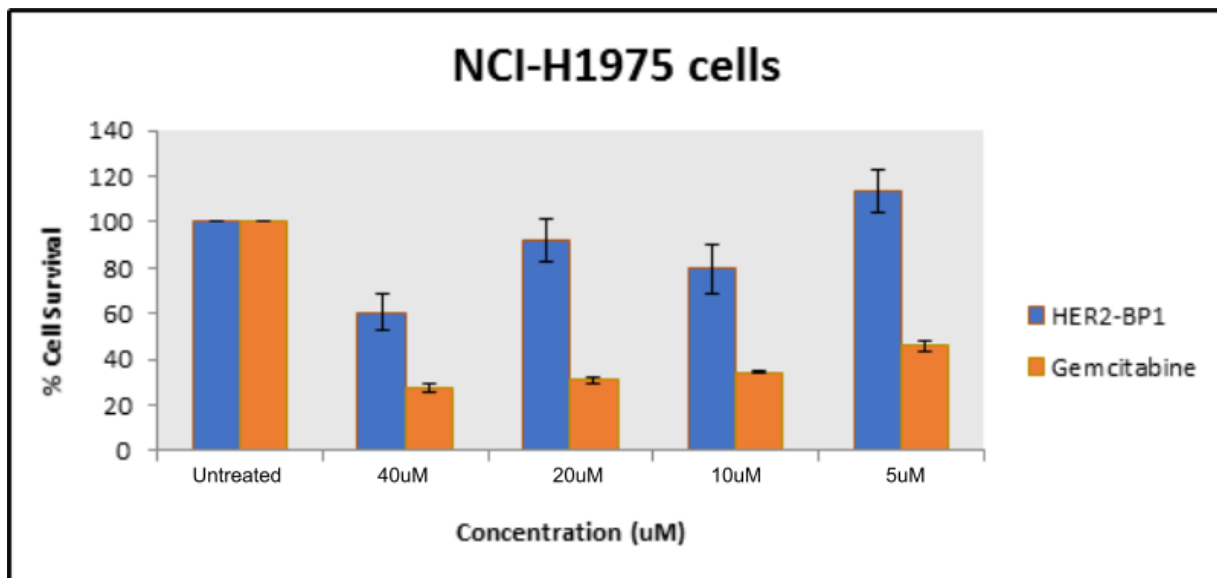
Ακολουθούν τα ραβδογράμματα της κυτταροτοξικότητας του πεπτιδίου HER2-BP1 και της Γεμισιταβίνης σε συνάρτηση με τον χρόνο σε διάφορες συγκεντρώσεις στις 4 καρκινικές σειρές MDA-MB-231 (**Σχήμα 108**), HCC-1954 (**Σχήμα 109**), NCI-H1975 (**Σχήμα 110**), A549 (**Σχήμα 111**).



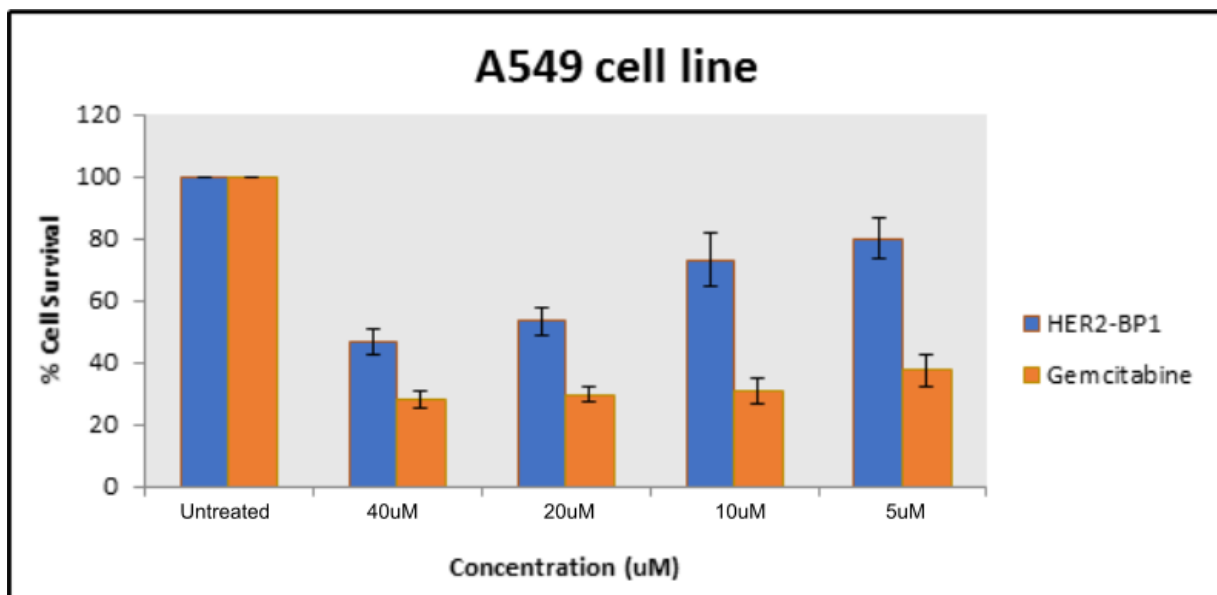
Σχήμα 108. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του πεπτιδίου HER2-BP1 έναντι της Γεμισταβίνης σε MDA-MB-231 καρκινικές κυτταρικές σειρές.



Σχήμα 109. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του πεπτιδίου HER2-BP1 έναντι της Γεμισταβίνης σε HCC-1954 καρκινικές κυτταρικές σειρές.



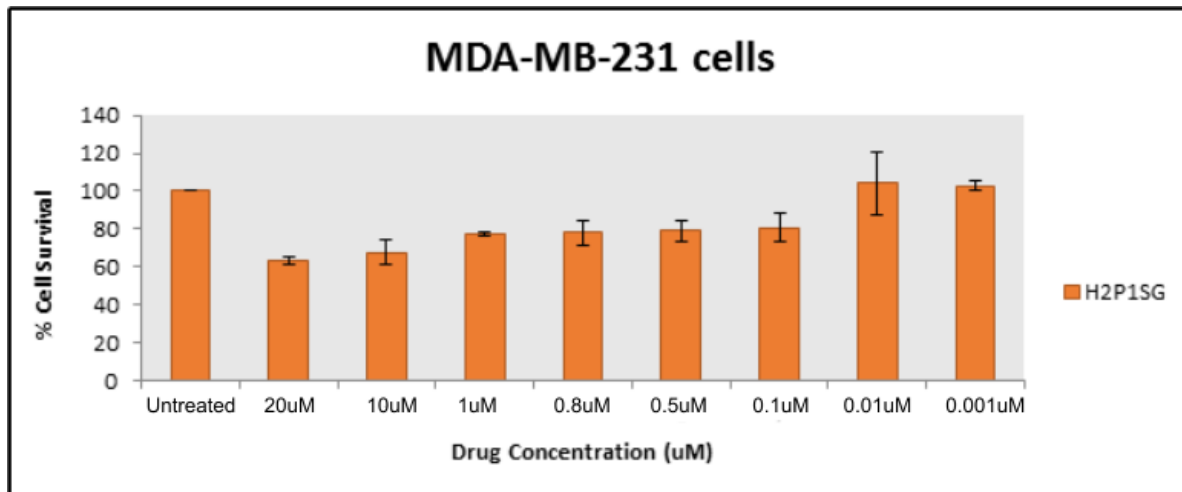
Σχήμα 110. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του πεπτιδίου HER2-BP1 έναντι της Γεμισταβίνης σε NCI-H1975 καρκινικές κυτταρικές σειρές.



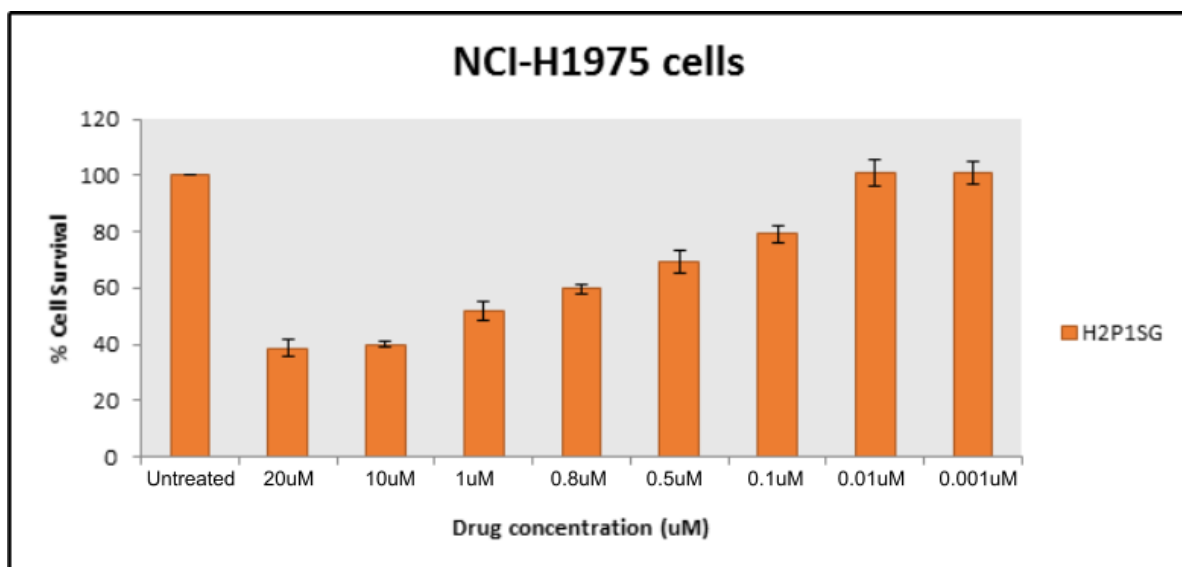
Σχήμα 111. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του πεπτιδίου HER2-BP1 έναντι της Γεμισταβίνης σε A549 καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Παρατηρείται πως το πεπτίδιο διαθέτει χαμηλή κυτταροτοξικότητα σε σχέση με την Γεμισταβίνη σε όλες τις κυτταρικές καλλιέργειες.

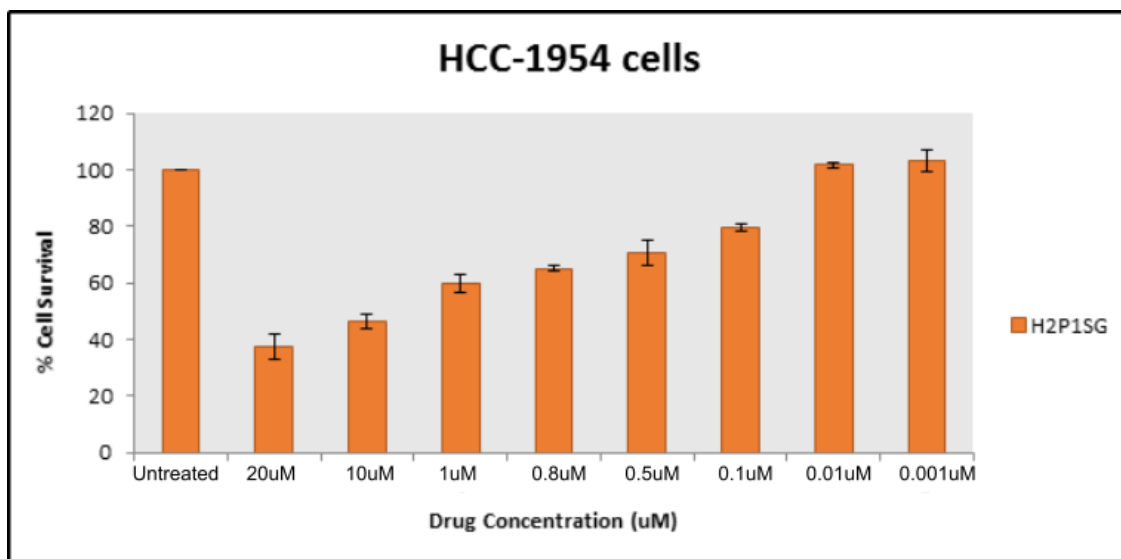
Ακολουθούν τα ραβδογράμματα της κυτταροτοξικότητας του συζεύγματος HER2-Γεμισταβίνη σε συνάρτηση με τον χρόνο σε διάφορες συγκεντρώσεις στις 4 καρκινικές σειρές MDA-MB-231 (Σχήμα 112), HCC-1954 (Σχήμα 113), NCI-H1975 (Σχήμα 114), A549 (Σχήμα 115).



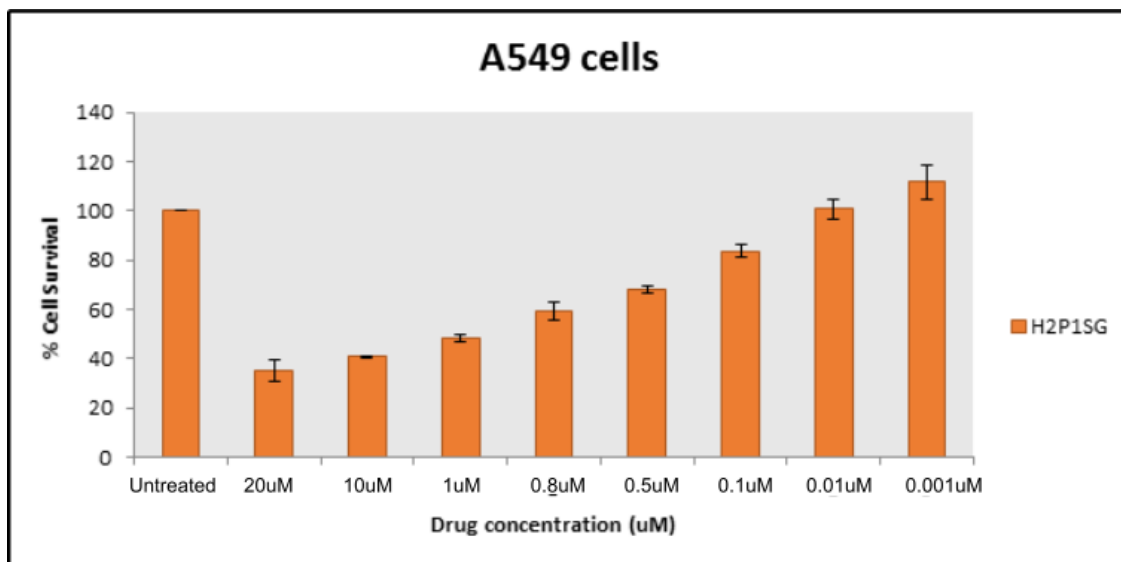
Σχήμα 112. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη** σε MDA-MB-231 καρκινικές κυτταρικές σειρές.



Σχήμα 113. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη** σε NCI-H1975 καρκινικές κυτταρικές σειρές.



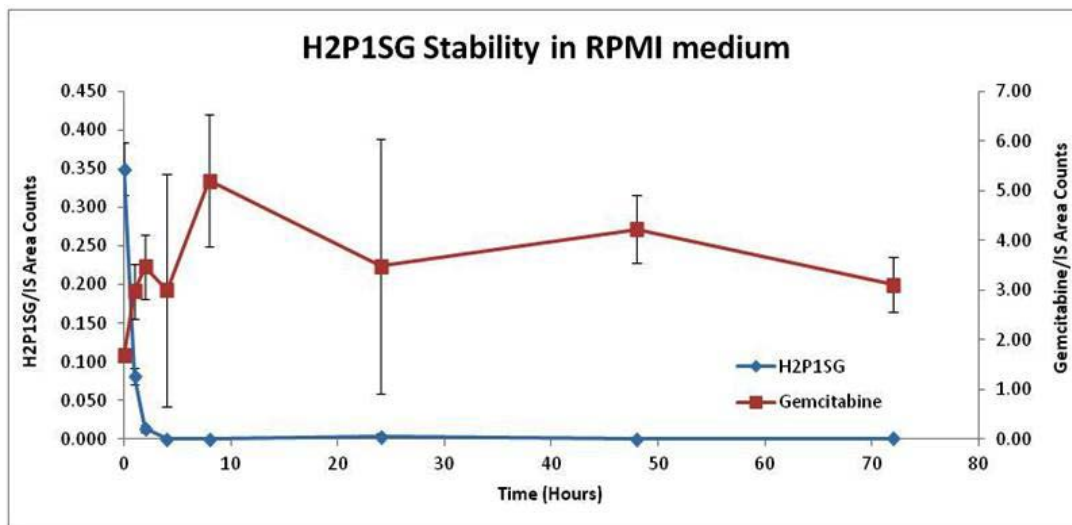
Σχήμα 114. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη** σε HCC-1954 καρκινικές κυτταρικές σειρές.



Σχήμα 115. Ραβδόγραμμα κυτταροτοξικότητας του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη** σε A549 καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Παρατηρείται ότι ούτε το σύζευγμα **HER2-Γεμισταβίνη** διαθέτει υψηλή κυτταροτοξικότητα, παρα μόνον σε υψηλές συγκεντρώσεις (10uM, 20uM), όπου ο αριθμός των κυττάρων πέφτει κοντά στο 40% σε σχέση με τον αρχικό αριθμό.

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 116) παρουσιάζεται η σταθερότητα του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη** έναντι της Γεμισταβίνης σε μέσο RPMI.



Σχήμα 116. Καμπύλη σταθερότητας του συζεύγματος **HER2-Γεμισταβίνη** έναντι της Γεμισταβίνης σε μέσο RPMI (Roswell Park Memorial Institute).

Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό πως το σύζευγμα **HER2-Γεμισταβίνη** καταστρέφεται σε λιγότερο από 5 ώρες.

Συμπερασματικά, πραγματοποιήθηκε ο λογικός σχεδιασμός και η σύνθεση του πεπτιδίου **HER2-BP1** και των τριμοριακών ενώσεων **HER2-Συνδέτης-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη** και **HER2-Συνδέτης-Γεμισταβίνη** σε στερεά φάση με την μέθοδο Fmoc-/tBu. Το πεπτίδιο **HER2-BP1** ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητα του σε 4 καρκινικές σειρές (MDA-MB-231, NCI-H1975, HCC-1954, A549) σε σχέση με την Γεμισταβίνη. Το ανάλογο **HER2-Συνδέτης-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη** ελέγχθηκε ως προς την αποτελεσματική του πρόσληψη από δυο κυτταρικές σειρές, MDA-MB-231 και HCC1954, όπου η πρώτη δεν εκφράζει τον υποδοχέα HER2 ενώ η δεύτερη τον υπερεκφράζει, με αποτέλεσμα την αποτελεσματική εισαγωγή του μορίου μόνο στην δεύτερη καρκινική σειρά. Τέλος, το ανάλογο **HER2-Συνδέτης-Γεμισταβίνη** ελέγχθηκε ως προς την κυτταροτοξικότητά του στις 4 αυτές καρκινικές σειρές αλλά και ως προς την σταθερότητα του σε σχέση με την Γεμισταβίνη σε μέσο RPMI.

4 Συμπεράσματα

Κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε λογικός σχεδιασμός, σύνθεση και πλήρης χαρακτηρισμός διαφόρων συζευγμάτων Φαρμάκου-Πεπτιδίου. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύνθεση 3 αναλόγων Γεμισταβίνης-GnRH (τριμοριακά μόρια αποτελούμενα από Γεμισταβίνη (φάρμακο), αμινοοξύ οξικό οξύ (συνδέτης) και GnRH (πεπτίδιο)) και 1 αναλόγου Γεμισταβίνης-HER2 (τριμοριακό μόριο αποτελούμενο από Γεμισταβίνη (φάρμακο), ηλεκτρικό οξύ (συνδέτης) και HER2-BP1 (πεπτίδιο)). Τα συζεύγματα αυτά ελέγχθηκαν ως προς το βιολογικό τους προφίλ και συγκεκριμένα σε καλλιέργειες κυττάρων ως προς την *in vitro* κυτταροτοξικότητα, απελευθέρωση Γεμισταβίνης και σταθερότητα τους και σε ανθρώπινο πλάσμα.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύνθεση επισημασμένων πεπτιδίων GnRH και HER2-BP1 με την χρωστική 5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη και ελέγχθηκε η προσληψη τους από διάφορες καρκινικές σειρές με κυτταρομετρία ροής και συνεστιακή μικροσκοπία. Ακόμη, έγινε η σύνθεση του διμοριακού προϊόντος Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη και έγιναν προσπάθειες σύνθεσης του τετραμοριακού συζεύγματος GnRH-ηλεκτρικός ανυδρίτης-Γεμισταβίνη-5(6)-καρβοξυφλουορεσκεΐνη.

Αντιμετωπίστηκαν οι 3 κύριοι περιορισμοί στη χρήση της Γεμισταβίνης ως κυτταροτοξικού φαρμάκου:

- Η παράπλευρη τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα αντιμετωπίστηκε με την σύνδεση της Γεμισταβίνης με πεπτίδια τα οποία προσδένονται εκλεκτικά σε υποδοχείς που υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα.
- Η αντίσταση που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα αντιμετωπίστηκε με εφαρμογή διαφορετικής οδού εισαγωγής του φαρμάκου στα κύτταρα (μέσω υποδοχέων που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα). Όσον αφορά στο σύζευγμα Γεμισταβίνης-GnRH, λόγω της ευαισθησίας του συνδέτη (δεσμού οξίμης) σε όξινες συνθήκες, ένα ποσοστό της Γεμισταβίνης απελευθερώνεται στο μικροπεριβάλλον των καρκινικών κυττάρων ενώ ένα άλλο ποσοστό απελευθερώνεται ενδοκυττάρια (λυσόσωμα μετά από ενδοκύτωση ολόκληρου του συζεύγματος).
- Η απαμίνωση που υφίσταται η Γεμισταβίνη (-4NH₂) προς τον ανενεργό μεταβολίτη dFdU αντιμετωπίστηκε με προστασία της συγκεκριμένης θέσης.

Τέλος, επιτύχαμε την στοιχειοθέτηση βέλτιστων συνθήκών για την πραγματοποίηση δεσμών οξίμης μεταξύ πεπτιδίων και φαρμάκων μέσα σε λίγες ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου με αποδόσεις που αγγίζουν το 98%, σε αντίθεση με την βιβλιογραφία που απαιτούνται καταλύτες, ρυθμιστικά διαλύματα, αντίδραση 2 - 5 ημέρες και με τελική απόδοση κάτω του 50%.

5 Αναφορές

1. Tzakos, A. G.; Briasoulis, E.; Thalhammer, T.; Jager, W.; Apostolopoulos, V., Novel oncology therapeutics: targeted drug delivery for cancer. *Journal of drug delivery* **2013**, 2013, 918304.
2. Perrie, Y.; Frederik, P. M.; Gregoriadis, G., Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. *Vaccine* **2001**, 19, 3301-3310.
3. Lasic, D. D.; Templeton, N. S., Liposomes in gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, 20, 221-266.
4. Babincová, M.; Čičmanec, P.; Altanerová, V.; Altaner, Č.; Babinec, P., AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy. *Bioelectrochemistry* **2002**, 55, 17-19.
5. Huynh, N. T.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoit, J. P., Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *International journal of pharmaceuticals* **2009**, 379, 201-9.
6. Kaneda, Y., Virosomes: evolution of the liposome as a targeted drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 43, 197-205.
7. Pinto-Alphandary, H.; Andremont, A.; Couvreur, P., Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2000**, 13, 155-168.
8. Andresen, T. L.; Jensen, S. S.; Jorgensen, K., Advanced strategies in liposomal cancer therapy: problems and prospects of active and tumor specific drug release. *Progress in lipid research* **2005**, 44, 68-97.
9. Park, J. W., Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Research* **2002**, 4, 95.
10. Gabizon, A.; Shmeeda, H.; Barenholz, Y., Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clinical pharmacokinetics* **2003**, 42, 419-36.
11. Woodle, M. C., Sterically stabilized liposome therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1995**, 16, 249-265.
12. Oerlemans, C.; BuLt, W.; Bos, M.; Storm, G.; Nijsen, J. F. W.; Hennink, W. E., Polymeric Micelles in Anticancer Therapy: Targeting, Imaging and Triggered Release. *Pharmaceutical Research* **2010**, 27, 2569-2589.
13. Kwon, G. S., Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **2003**, 20, 357-403.
14. Gao, Z. G.; Lee, D. H.; Kim, D. I.; Bae, Y. H., Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle targeting acidic extracellular pH of human ovarian A2780 tumor in mice. *Journal of drug targeting* **2005**, 13, 391-7.
15. Koziara, J. M.; Whisman, T. R.; Tseng, M. T.; Mumper, R. J., In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. *Journal of Controlled Release* **2006**, 112, 312-319.
16. Jones, M.-C.; Leroux, J.-C., Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics* **1999**, 48, 101-111.
17. Upadhyay, K. K.; Meins, J. F. L.; Misra, A.; Voisin, P.; Bouchaud, V.; Ibarboure, E.; Schatz, C.; Lecommandoux, S., Biomimetic Doxorubicin Loaded Polymersomes from Hyaluronan-block-Poly(γ -benzyl glutamate) Copolymers. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 2802-2808.
18. Lee, J. S.; Feijen, J., Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, 473-483.

19. Discher, D. E.; Ortiz, V.; Srinivas, G.; Klein, M. L.; Kim, Y.; Christian, D.; Cai, S.; Photos, P.; Ahmed, F., Emerging applications of polymersomes in delivery: From molecular dynamics to shrinkage of tumors. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 838-857.
20. Lin, J. J.; Ghoroghchian, P. P.; Zhang, Y.; Hammer, D. A., Adhesion of Antibody-Functionalized Polymersomes. *Langmuir* **2006**, *22*, 3975-3979.
21. Meng, F.; Zhong, Z., Polymersomes Spanning from Nano- to Microscales: Advanced Vehicles for Controlled Drug Delivery and Robust Vesicles for Virus and Cell Mimicking. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 1533-1539.
22. Li, M.-H.; Keller, P., Stimuli-responsive polymer vesicles. *Soft Matter* **2009**, *5*, 927-937.
23. Mabrouk, E.; Cuvelier, D.; Brochard-Wyart, F.; Nassoy, P.; Li, M.-H., Bursting of sensitive polymersomes induced by curling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 7294-7298.
24. Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Srinivas, G.; Brannan, A.; Bates, F.; Klein, M. L.; Minko, T.; Discher, D. E., Shrinkage of a Rapidly Growing Tumor by Drug-Loaded Polymersomes: pH-Triggered Release through Copolymer Degradation. *Molecular Pharmaceutics* **2006**, *3*, 340-350.
25. Meng, F.; Zhong, Z.; Feijen, J., Stimuli-Responsive Polymersomes for Programmed Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 197-209.
26. Amstad, E.; Kim, S.-H.; Weitz, D. A., Photo- and Thermoresponsive Polymersomes for Triggered Release. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 12499-12503.
27. Onaca, O.; Enea, R.; Hughes, D. W.; Meier, W., Stimuli-Responsive Polymersomes as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery. *Macromolecular Bioscience* **2009**, *9*, 129-139.
28. Cegnar, M.; Kristl, J.; Kos, J., Nanoscale polymer carriers to deliver chemotherapeutic agents to tumours. *Expert opinion on biological therapy* **2005**, *5*, 1557-69.
29. Vauthier, C.; Bouchemal, K., Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research* **2009**, *26*, 1025-58.
30. Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A., Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics* **2010**, *385*, 113-42.
31. Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P., Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60*, 1638-49.
32. Chacko, R. T.; Ventura, J.; Zhuang, J.; Thayumanavan, S., Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform. *Advanced drug delivery reviews* **2012**, *64*, 836-851.
33. Liu, X.; Heng, W. S.; Paul, L.; Li, Q.; Chan, L. W., Novel polymeric microspheres containing norcantharidin for chemoembolization. *Journal of Controlled Release* **2006**, *116*, 35-41.
34. Al-Ghananeem, A. M.; Malkawi, A. H.; Muammer, Y. M.; Balko, J. M.; Black, E. P.; Mourad, W.; Romond, E., Intratumoral Delivery of Paclitaxel in Solid Tumor from Biodegradable Hyaluronan Nanoparticle Formulations. *AAPS PharmSciTech* **2009**, *10*, 410-417.
35. Gerber, D. E.; Gallia, G. L.; Tyler, B. M.; Eberhart, C. G.; Royer, G.; Grossman, S. A., A novel polymer gel for the delivery of local therapies to intracranial tumors: In vivo safety evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2011**, *99A*, 479-484.
36. Li, X.; Kong, X.; Zhang, J.; Wang, Y.; Wang, Y.; Shi, S.; Guo, G.; Luo, F.; Zhao, X.; Wei, Y.; Qian, Z., PHARMACEUTICAL NANOTECHNOLOGY: A Novel Composite Hydrogel Based on Chitosan and Inorganic Phosphate for Local Drug Delivery of Camptothecin Nanocolloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, *100*, 232-241.
37. Davidson, B. S.; Izzo, F.; Cromeens, D. M.; Stephens, L. C.; Siddik, Z. H.; Curley, S. A., Collagen Matrix Cisplatin Prevents Local Tumor Growth after Margin-Positive Resection. *Journal of Surgical Research* **1995**, *58*, 618-624.

38. Almond, B. A.; Hadba, A. R.; Freeman, S. T.; Cuevas, B. J.; York, A. M.; Detrisac, C. J.; Goldberg, E. P., Efficacy of mitoxantrone-loaded albumin microspheres for intratumoral chemotherapy of breast cancer. *Journal of Controlled Release* **2003**, *91*, 147-155.
39. McDaniel, J. R.; Callahan, D. J.; Chilkoti, A., Drug delivery to solid tumors by elastin-like polypeptides. *Advanced drug delivery reviews* **2010**, *62*, 1456-67.
40. Konishi, M.; Tabata, Y.; Kariya, M.; Suzuki, A.; Mandai, M.; Nanbu, K.; Takakura, K.; Fujii, S., In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *Journal of Controlled Release* **2003**, *92*, 301-313.
41. Hoffman, A. S., The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2008**, *132*, 153-63.
42. De Souza, R.; Zahedi, P.; Allen, C. J.; Piquette-Miller, M., Polymeric drug delivery systems for localized cancer chemotherapy. *Drug delivery* **2010**, *17*, 365-75.
43. Yeung, J. H.; Coleman, J. W.; Park, B. K., Drug-protein conjugates--IX. Immunogenicity of captopril-protein conjugates. *Biochemical pharmacology* **1985**, *34*, 4005-12.
44. Majumdar, S.; Siahaan, T. J., Peptide-mediated targeted drug delivery. *Medicinal research reviews* **2012**, *32*, 637-58.
45. Millar, R. P.; Newton, C. L., Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nature Reviews Endocrinology* **2013**, *9*, 451-466.
46. Morgan, K.; Stewart, A. J.; Miller, N.; MuLlen, P.; Muir, M.; Dodds, M.; Medda, F.; Harrison, D.; Langdon, S.; Millar, R. P., Gonadotropin-releasing hormone receptor levels and cell context affect tumor cell responses to agonist in vitro and in vivo. *Cancer research* **2008**, *68*, 6331-40.
47. Pazaitou-Panayiotou, K.; Chemonidou, C.; Poupi, A.; Koureta, M.; Kaprara, A.; LambropouLou, M.; Constantinidis, T. C.; Galaktidou, G.; Koffa, M.; Kiziridou, A.; Kakolyris, S.; Kolios, G.; Kortsaris, A.; Chatzaki, E., Gonadotropin-releasing hormone neuropeptides and receptor in human breast cancer: correlation to poor prognosis parameters. *Peptides* **2013**, *42*, 15-24.
48. Millar, R. P.; Lu, Z. L.; Pawson, A. J.; Flanagan, C. A.; Morgan, K.; Maudsley, S. R., Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine reviews* **2004**, *25*, 235-75.
49. Coccia, M. E.; Comparetto, C.; Bracco, G. L.; Scarselli, G., GnRH antagonists. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **2004**, *115* Suppl 1, S44-56.
50. PaduLa, A. M., GnRH analogues—agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science* **88**, 115-126.
51. Stephenson, S. L.; Kenny, A. J., The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. *The Biochemical journal* **1987**, *243*, 183-7.
52. Mezo, G.; Manea, M., Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert opinion on drug delivery* **2010**, *7*, 79-96.
53. Schally, A. V.; Nagy, A., Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *European journal of endocrinology* **1999**, *141*, 1-14.
54. Teicher, B. A.; Chari, R. V., Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2011**, *17*, 6389-97.
55. MuLlard, A., Maturing antibody-drug conjugate pipeline hits 30. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12*, 329-332.
56. Nagy, A.; Schally, A. V.; Armatis, P.; Szepeshazi, K.; Halmos, G.; Kovacs, M.; Zarandi, M.; Groot, K.; Miyazaki, M.; Jungwirth, A.; Horvath, J., Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93*, 7269-7273.

57. Manea, M.; Leurs, U.; Orban, E.; Baranyai, Z.; Ohlschlager, P.; Marquardt, A.; SchuLcz, A.; Tejeda, M.; Kapuvari, B.; Tovari, J.; Mezo, G., Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4. *Bioconjugate chemistry* **2011**, *22*, 1320-9.
58. Aggarwal, S.; Ndinguri, M. W.; Solipuram, R.; Wakamatsu, N.; Hammer, R. P.; Ingram, D.; Hansel, W., [DLys(6)]-luteinizing hormone releasing hormone-curcumin conjugate inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. *International journal of cancer* **2011**, *129*, 1611-23.
59. Sundaram, S.; Durairaj, C.; Kadam, R.; Kompella, U. B., Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted deslorelin-docetaxel conjugate enhances efficacy of docetaxel in prostate cancer therapy. *MoleculAr cancer therapeutics* **2009**, *8*, 1655-65.
60. Engel, J.; Emons, G.; Pinski, J.; Schally, A. V., AEZS-108 : a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors. *Expert opinion on investigational drugs* **2012**, *21*, 891-9.
61. Pedersen, M. W.; Meltorn, M.; Damstrup, L.; PouLsen, H. S., The type III epidermal growth factor receptor mutation Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Annals of Oncology* **2001**, *12*, 745-760.
62. Nicholson, R. I.; Gee, J. M. W.; Harper, M. E., EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* **2001**, *37*, Supplement 4, 9-15.
63. Voldborg, B. R.; Damstrup, L.; Spang-Thomsen, M.; PouLsen, H. S., Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology* **1997**, *8*, 1197-1206.
64. Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology* **1995**, *19*, 183-232.
65. Boonstra, J.; Rijken, P.; Humbel, B.; Cremers, F.; Verkleij, A.; en Henegouwen, P. v. B., The epidermal growth factor. *Cell Biology International* **1995**, *19*, 413-430.
66. Michael, S. I.; Hong, J. S.; Curiel, D. T.; Engler, J. A., Addition of a short peptide ligand to the adenovirus fiber protein. *Gene therapy* **1995**, *2*, 660-8.
67. de Jong, M.; Kwekkeboom, D.; Valkema, R.; Krenning, E. P., Radiolabelled peptides for tumour therapy: current status and future directions. Plenary lecture at the EANM 2002. *European journal of nuclear medicine and moleculAr imaging* **2003**, *30*, 463-9.
68. Halin, C.; Gafner, V.; Villani, M. E.; Borsi, L.; Berndt, A.; Kosmehl, H.; Zardi, L.; Neri, D., Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha. *Cancer research* **2003**, *63*, 3202-10.
69. Langer, M.; Beck-Sickinger, A. G., Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* **2001**, *1*, 71-93.
70. White, S. J.; Nicklin, S. A.; Sawamura, T.; Baker, A. H., Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **2001**, *37*, 449-55.
71. Rajotte, D.; Ruoslahti, E., Membrane dipeptidase is the receptor for a lung-targeting peptide identified by in vivo phage display. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 11593-8.
72. Binétruy-Tournaire, R.; Demangel, C.; Malavaud, B.; Vassy, R.; Rouyre, S.; Kraemer, M.; Plouët, J.; Derbin, C.; Perret, G.; Mazié, J. C., Identification of a peptide blocking vasculAr endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *The EMBO Journal* **2000**, *19*, 1525-1533.
73. Wang, X. F.; Birringer, M.; Dong, L. F.; Veprek, P.; Low, P.; Swettenham, E.; Stantic, M.; Yuan, L. H.; Zobalova, R.; Wu, K.; Ledvina, M.; Ralph, S. J.; Neuzil, J., A peptide conjugate of vitamin E succinate targets breast cancer cells with high ErbB2 expression. *Cancer research* **2007**, *67*, 3337-44.
74. Ai, S.; Jia, T.; Ai, W.; Duan, J.; Liu, Y.; Chen, J.; Liu, X.; Yang, F.; Tian, Y.; Huang, Z., Targeted delivery of doxorubicin through conjugation with EGF receptor-binding peptide overcomes drug resistance in human colon cancer cells. *British journal of pharmacology* **2013**, *168*, 1719-35.

75. Majumdar, S.; Kobayashi, N.; Krise, J. P.; Siahaan, T. J., Mechanism of internalization of an ICAM-1-derived peptide by human leukemic cell line HL-60: influence of physicochemical properties on targeted drug delivery. *Molecular pharmaceuticals* **2007**, *4*, 749-58.
76. Meyer-Losic, F.; Quinonero, J.; Dubois, V.; Alluis, B.; Dechambre, M.; Michel, M.; Cailler, F.; Fernandez, A.-M.; Trouet, A.; Kearsy, J., Improved Therapeutic Efficacy of Doxorubicin through Conjugation with a Novel Peptide Drug Delivery Technology (Vectocell). *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49*, 6908-6916.
77. Krauss, U.; Kratz, F.; Beck-Sickinger, A. G., Novel daunorubicin-carrier peptide conjugates derived from human calcitonin segments. *Journal of molecular recognition : JMR* **2003**, *16*, 280-7.
78. Halmos, G.; Nagy, A.; Lamharzi, N.; Schally, A. V., Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone bind with high affinity to human breast cancers. *Cancer letters* **1999**, *136*, 129-36.
79. Nagy, A.; Armatis, P.; Schally, A. V., High yield conversion of doxorubicin to 2-pyrrolinodoxorubicin, an analog 500-1000 times more potent: structure-activity relationship of daunosamine-modified derivatives of doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 2464-9.
80. van Hensbergen, Y.; Broxterman, H. J.; Elderkamp, Y. W.; Lankelma, J.; Beers, J. C.; Heijn, M.; Boven, E.; Hoekman, K.; Pinedo, H. M., A doxorubicin-CNGRC-peptide conjugate with prodrug properties. *Biochemical pharmacology* **2002**, *63*, 897-908.
81. Langer, M.; Kratz, F.; Rothen-Rutishauser, B.; Wunderli-Allenspach, H.; Beck-Sickinger, A. G., Novel peptide conjugates for tumor-specific chemotherapy. *Journal of medicinal chemistry* **2001**, *44*, 1341-8.
82. DeFeo-Jones, D.; Garsky, V. M.; Wong, B. K.; Feng, D. M.; Bolyar, T.; Haskell, K.; Kiefer, D. M.; Leander, K.; McAvoy, E.; Lumma, P.; Wai, J.; Senderak, E. T.; Motzel, S. L.; Keenan, K.; Van Zwieten, M.; Lin, J. H.; Freidinger, R.; Huff, J.; Oliff, A.; Jones, R. E., A peptide-doxorubicin 'prodrug' activated by prostate-specific antigen selectively kills prostate tumor cells positive for prostate-specific antigen in vivo. *Nature medicine* **2000**, *6*, 1248-52.
83. Kruger, M.; Beyer, U.; Schumacher, P.; Unger, C.; Zahn, H.; Kartz, F., Synthesis and Stability of Four Maleimide Derivatives of the Anticancer Drug Doxorubicin for the Preparation of Chemoimmunoconjugates. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **1997**, *45*, 399-401.
84. Matsumura, Y.; Maeda, H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* **1986**, *46*, 6387-92.
85. Wong, B. K.; DeFeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Garsky, V. M.; Feng, D. M.; Oliff, A.; Chiba, M.; Ellis, J. D.; Lin, J. H., PSA-specific and non-PSA-specific conversion of a PSA-targeted peptide conjugate of doxorubicin to its active metabolites. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2001**, *29*, 313-8.
86. Garsky, V. M.; Lumma, P. K.; Feng, D. M.; Wai, J.; Ramjit, H. G.; Sardana, M. K.; Oliff, A.; Jones, R. E.; DeFeo-Jones, D.; Freidinger, R. M., The synthesis of a prodrug of doxorubicin designed to provide reduced systemic toxicity and greater target efficacy. *Journal of medicinal chemistry* **2001**, *44*, 4216-24.
87. Denmeade, S. R.; Lou, W.; Lovgren, J.; Malm, J.; Lilja, H.; Isaacs, J. T., Specific and efficient peptide substrates for assaying the proteolytic activity of prostate-specific antigen. *Cancer research* **1997**, *57*, 4924-30.
88. Denmeade, S. R.; Nagy, A.; Gao, J.; Lilja, H.; Schally, A. V.; Isaacs, J. T., Enzymatic activation of a doxorubicin-peptide prodrug by prostate-specific antigen. *Cancer research* **1998**, *58*, 2537-40.
89. Mier, W.; Eritja, R.; Mohammed, A.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M., Preparation and evaluation of tumor-targeting peptide-oligonucleotide conjugates. *Bioconjugate chemistry* **2000**, *11*, 855-60.
90. Hansen, K. T.; Faarup, P.; Bundgaard, H., Carbamate ester prodrugs of dopaminergic compounds: synthesis, stability, and bioconversion. *Journal of pharmaceutical sciences* **1991**, *80*, 793-8.

91. Cha, S. W.; Gu, H. K.; Lee, K. P.; Lee, M. H.; Han, S. S.; Jeong, T. C., Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450. *Toxicology letters* **2000**, 115, 173-81.
92. Wendeler, M.; Grinberg, L.; Wang, X.; Dawson, P. E.; Baca, M., Enhanced Catalysis of Oxime-Based Bioconjugations by Substituted Anilines. *Bioconjugate chemistry* **2014**, 25, 93-101.
93. Kool, E. T.; Crisalli, P.; Chan, K. M., Fast alpha nucleophiles: structures that undergo rapid hydrazone/oxime formation at neutral pH. *Organic letters* **2014**, 16, 1454-7.
94. Agten, S. M.; Suylen, D.; Ippel, H.; Kokozidou, M.; Tans, G.; van de Vijver, P.; Koenen, R. R.; Hackeng, T. M., Chemoselective oxime reactions in proteins and peptides by using an optimized oxime strategy: the demise of levulinic acid. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2013**, 14, 2431-4.
95. Fischer, R.; Mader, O.; Jung, G.; Brock, R., Extending the Applicability of Carboxyfluorescein in Solid-Phase Synthesis. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, 14, 653-660.
96. Song, L.; Hennink, E. J.; Young, I. T.; Tanke, H. J., Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* **1995**, 68, 2588-2600.
97. Hayashi, H.; Kurata, T.; Nakagawa, K., Gemcitabine: Efficacy in the Treatment of Advanced Stage Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Medicine Insights. Oncology* **2011**, 5, 177-184.
98. Chitkara, D.; Mittal, A.; Behrman, S. W.; Kumar, N.; Mahato, R. I., Self-assembling, amphiphilic polymer-gemcitabine conjugate shows enhanced antitumor efficacy against human pancreatic adenocarcinoma. *Bioconjugate chemistry* **2013**, 24, 1161-73.
99. Belt, J. A.; Marina, N. M.; Phelps, D. A.; Crawford, C. R., Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Advances in enzyme regulation* **1993**, 33, 235-52.
100. Griffith, D. A.; Jarvis, S. M., Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **1996**, 1286, 153-81.
101. Mackey, J. R.; Mani, R. S.; Selner, M.; Mowles, D.; Young, J. D.; Belt, J. A.; Crawford, C. R.; Cass, C. E., Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer research* **1998**, 58, 4349-57.
102. Ritzel, M. W.; Ng, A. M.; Yao, S. Y.; Graham, K.; Loewen, S. K.; Smith, K. M.; Hyde, R. J.; Karpinski, E.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D., Recent molecular advances in studies of the concentrative Na⁺-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *Molecular membrane biology* **2001**, 18, 65-72.
103. Lostao, M. P.; Mata, J. F.; Larrayoz, I. M.; Inzillo, S. M.; Casado, F. J.; Pastor-Anglada, M., Electrogenic uptake of nucleosides and nucleoside-derived drugs by the human nucleoside transporter 1 (hCNT1) expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Letters* **2000**, 481, 137-140.
104. Garcia-Manteiga, J.; Molina-Arcas, M.; Casado, F. J.; Mazo, A.; Pastor-Anglada, M., Nucleoside transporter profiles in human pancreatic cancer cells: role of hCNT1 in 2',2'-difluorodeoxycytidine-induced cytotoxicity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2003**, 9, 5000-8.
105. Mackey, J. R.; Yao, S. Y.; Smith, K. M.; Karpinski, E.; Baldwin, S. A.; Cass, C. E.; Young, J. D., Gemcitabine transport in *xenopus* oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters. *Journal of the National Cancer Institute* **1999**, 91, 1876-81.
106. Jansen, W. J.; Pinedo, H. M.; van der Wilt, C. L.; Feller, N.; Bamberger, U.; Boven, E., The influence of BIBW22BS, a dipyridamole derivative, on the antiproliferative effects of 5-fluorouracil, methotrexate and gemcitabine in vitro and in human tumour xenografts. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **1995**, 31a, 2313-9.
107. Spratlin, J.; Sangha, R.; Glubrecht, D.; Dabbagh, L.; Young, J. D.; Dumontet, C.; Cass, C.; Lai, R.; Mackey, J. R., The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced

survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2004**, *10*, 6956-61.

108. Paproski, R. J.; Yao, S. Y.; Favis, N.; Evans, D.; Young, J. D.; Cass, C. E.; Zemp, R. J., Human concentrative nucleoside transporter 3 transfection with ultrasound and microbubbles in nucleoside transport deficient HEK293 cells greatly increases gemcitabine uptake. *PLoS one* **2013**, *8*, e56423.

109. Bender, D. M.; Bao, J.; Dantzig, A. H.; Diserod, W. D.; Law, K. L.; Magnus, N. A.; Peterson, J. A.; Perkins, E. J.; Pu, Y. J.; Reutzel-Edens, S. M.; Remick, D. M.; Starling, J. J.; Stephenson, G. A.; Vaid, R. K.; Zhang, D.; McCarthy, J. R., Synthesis, Crystallization, and Biological Evaluation of an Orally Active Prodrug of Gemcitabine. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 6958-6961.

110. Heinemann, V.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W., Comparison of the Cellular Pharmacodynamics and Toxicity of 2',2'-Difluorodeoxycytidine and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine. *Cancer Research* **1988**, *48*, 4024-4031.

111. Bouffard, D. Y.; Laliberté, J.; Momparler, R. L., Kinetic studies on 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) with purified human deoxycytidine kinase and cytidine deaminase. *Biochemical Pharmacology* **1993**, *45*, 1857-1861.

112. Hatzis, P.; Al-Madhoon, A. S.; JulLig, M.; Petrakis, T. G.; Eriksson, S.; Talianidis, I., The intracellular localization of deoxycytidine kinase. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 30239-43.

113. Van Rompay, A. R.; Johansson, M.; Karlsson, A., Phosphorylation of deoxycytidine analog monophosphates by UMP-CMP kinase: Molecular characterization of the human enzyme. *Molecular Pharmacology* **1999**, *56*, 562-569.

114. Hu, R.; Lam, W.; Hsu, C.-H.; Cheng, Y.-C., UMP/CMPK Is Not the Critical Enzyme in the Metabolism of Pyrimidine Ribonucleotide and Activation of Deoxycytidine Analogs in Human RKO Cells. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e19490.

115. Wong, A.; Soo, R. A.; Yong, W.-P.; Innocenti, F., Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metabolism Reviews* **2009**, *41*, 77-88.

116. Ruiz van Haperen, V. W. T.; Veerman, G.; Vermorken, J. B.; Pinedo, H. M.; Peters, G. J., Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochemical Pharmacology* **1996**, *51*, 911-918.

117. Ohhashi, S.; Ohuchida, K.; Mizumoto, K.; Fujita, H.; Egami, T.; Yu, J.; Toma, H.; Sadatomi, S.; Nagai, E.; Tanaka, M., Down-regulation of deoxycytidine kinase enhances acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer. *Anticancer Research* **2008**, *28*, 2205-2212.

118. Heinemann, V.; Xu, Y. Z.; Chubb, S.; Sen, A.; Plunkett, W.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Heinemann, V., Cellular Elimination of 2',2'-Difluorodeoxycytidine 5'-Triphosphate: A Mechanism of Self-Potential. *Cancer Research* **1992**, *52*, 533-539.

119. Yi-Zheng, X.; Plunkett, W., Modulation of deoxycytidylate deaminase in intact human leukemia cells. *Biochemical Pharmacology* **1992**, *44*, 1819-1827.

120. Veltkamp, S. A.; Pluim, D.; van Eijndhoven, M. A. J.; Bolijn, M. J.; Ong, F. H. G.; Govindarajan, R.; Unadkat, J. D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M., New insights into the pharmacology and cytotoxicity of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine. *Molecular Cancer Therapeutics* **2008**, *7*, 2415-2425.

121. Rudin, D.; Li, L.; Niu, N.; Kalari, K. R.; Gilbert, J. A.; Ames, M. M.; Wang, L., Gemcitabine Cytotoxicity: Interaction of Efflux and Deamination. *Journal of drug metabolism & toxicology* **2011**, *2*, 1-10.

122. Hodge, L. S.; Taub, M. E.; Tracy, T. S., The Deaminated Metabolite of Gemcitabine, 2',2'-Difluorodeoxyuridine, Modulates the Rate of Gemcitabine Transport and Intracellular Phosphorylation via Deoxycytidine Kinase. *Drug Metabolism and Disposition* **2011**, *39*, 2013-2016.

123. Bergman, A. M.; Giaccone, G.; van Moorsel, C. J. A.; Mauritz, R.; Noordhuis, P.; Pinedo, H. M.; Peters, G. J., Cross-resistance in the 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine)-resistant human ovarian

cancer cell line AG6000 to standard and investigational drugs. *European Journal of Cancer* **2000**, 36, 1974-1983.

124. Hunsucker, S. A.; Mitchell, B. S.; Spychala, J., The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* **2005**, 107, 1-30.

125. Hunsucker, S. A.; Spychala, J.; Mitchell, B. S., Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *The Journal of biological chemistry* **2001**, 276, 10498-504.

126. Aksoy, P.; Zhu, M. J.; Kalari, K. R.; Moon, I.; Pelleymounter, L. L.; Eckloff, B. W.; Wieben, E. D.; Yee, V. C.; Weinshilboum, R. M.; Wang, L., Cytosolic 5'-nucleotidase III (NT5C3): gene sequence variation and functional genomics. *Pharmacogenetics and genomics* **2009**, 19, 567-76.

127. Huang, P.; Chubb, S.; Plunkett, W., Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis. *Cancer Research* **1991**, 51, 6110-6117.

128. Gandhi, V.; Legha, J.; Chen, F.; Hertel, L. W.; Plunkett, W., Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA. *Cancer Research* **1996**, 56, 4453-4459.

129. Heinemann, V.; Xu Chubb, Y. Z. S.; Sen, A.; Hertel, L. W.; Grindey, G. B.; Plunkett, W., Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Molecular Pharmacology* **1990**, 38, 567-572.

130. Xu, H.; Faber, C.; Uchiki, T.; Racca, J.; Dealwis, C., Structures of eukaryotic ribonucleotide reductase I define gemcitabine diphosphate binding and subunit assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 4028-4033.

131. Sarup, J. C.; Johnson, M. A.; Verhoef, V.; Fridland, A., Regulation of purine deoxynucleoside phosphorylation by deoxycytidine kinase from human leukemic blast cells. *Biochemical Pharmacology* **1989**, 38, 2601-2607.

132. Ferreira, C. G.; Span, S. W.; Peters, G. J.; Kruyt, F. A. E.; Giaccone, G., Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Cancer Research* **2000**, 60, 7133-7141.

133. Habiro, A.; Tanno, S.; Koizumi, K.; Izawa, T.; Nakano, Y.; Osanai, M.; Mizukami, Y.; Okumura, T.; Kohgo, Y., Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 316, 71-77.

134. Chandler, N. M.; Canete, J. J.; Callery, M. P., Caspase-3 drives apoptosis in pancreatic cancer cells after treatment with gemcitabine. *Journal of Gastrointestinal Surgery* **2004**, 8, 1072-1078.

135. Kummer, J. L.; Rao, P. K.; Heidenreich, K. A., Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **1997**, 272, 20490-4.

136. Köpper, F.; Bierwirth, C.; Schön, M.; Kunze, M.; Elvers, I.; Kranz, D.; Saini, P.; Menon, M. B.; Walter, D.; Sørensen, C. S.; Gaestel, M.; Helleday, T.; Schön, M. P.; Dobbstein, M., Damage-induced DNA replication stalling relies on MAPK-activated protein kinase 2 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, 110, 16856-16861.

137. Nakashima, M.; Adachi, S.; Yasuda, I.; Yamauchi, T.; Kawaguchi, J.; Itani, M.; Yoshioka, T.; Matsushima-Nishiwaki, R.; Hirose, Y.; Kozawa, O.; Moriwaki, H., Phosphorylation status of heat shock protein 27 plays a key role in gemcitabine-induced apoptosis of pancreatic cancer cells. *Cancer Letters* **2011**, 313, 218-225.

138. Kuramitsu, Y.; Wang, Y.; Taba, K.; Suenaga, S.; Ryozaawa, S.; Kaino, S.; Sakaida, I.; Nakamura, K., Heat-shock protein 27 plays the key role in gemcitabine-resistance of pancreatic cancer cells. *Anticancer Research* **2012**, 32, 2295-2299.

139. Saif, M. W.; Lee, Y.; Kim, R., Harnessing gemcitabine metabolism: a step towards personalized medicine for pancreatic cancer. *Therapeutic advances in medical oncology* **2012**, 4, 341-6.

140. de Sousa Cavalcante, L.; Monteiro, G., Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *European journal of pharmacology* **2014**, 741, 8-16.
141. Pratt, S. E.; Durland-Busbice, S.; Shepard, R. L.; Donoho, G. P.; Starling, J. J.; Wickremsinhe, E. R.; Perkins, E. J.; Dantzig, A. H., Efficacy of low-dose oral metronomic dosing of the prodrug of gemcitabine, LY2334737, in human tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics* **2013**, 12, 481-90.
142. Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Fraser, C.; Rybski, W.; Torres-Sánchez, C.; Bradley, M.; Patton, E. E.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A., Development and Bioorthogonal Activation of Palladium-Labile Prodrugs of Gemcitabine. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 5395-5404.
143. Zhao, C.; Xue, X.; Li, G.; Sun, C.; Sun, C.; Qu, X.; Li, W., Synthesis and biological evaluation of oral prodrugs based on the structure of gemcitabine. *Chemical biology & drug design* **2012**, 80, 479-88.
144. Orban, E.; Mezo, G.; Schlage, P.; Csik, G.; Kulic, Z.; Ansoerge, P.; Fellingner, E.; Moller, H. M.; Manea, M., In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino acids* **2011**, 41, 469-83.
145. Tannock, I. F.; Rotin, D., Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer research* **1989**, 49, 4373-84.
146. Choi, S. K.; Verma, M.; Silpe, J.; Moody, R. E.; Tang, K.; Hanson, J. J.; Baker, J. R., Jr., A photochemical approach for controlled drug release in targeted drug delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2012**, 20, 1281-90.
147. Karampelas, T.; Argyros, O.; Sayyad, N.; Spyridaki, K.; Pappas, C.; Morgan, K.; Kolios, G.; Millar, R. P.; Liapakis, G.; Tzakos, A. G.; Fokas, D.; Tamvakopoulou, C., GnRH-Gemcitabine conjugates for the treatment of androgen-independent prostate cancer: pharmacokinetic enhancements combined with targeted drug delivery. *Bioconjug Chem* **2014**, 25, 813-23.
148. Szabo, I.; Manea, M.; Orban, E.; Csampai, A.; Bosze, S.; Szabo, R.; Tejada, M.; Gaal, D.; Kapuvari, B.; Przybylski, M.; Hudecz, F.; Mezo, G., Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential anticancer drug. *Bioconjugate chemistry* **2009**, 20, 656-65.
149. Mezo, G.; Szabo, I.; Kertesz, I.; Hegedus, R.; Orban, E.; Leurs, U.; Bosze, S.; Halmos, G.; Manea, M., Efficient synthesis of an (aminoxy) acetylated-somatostatin derivative using (aminoxy)acetic acid as a 'carbonyl capture' reagent. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2011**, 17, 39-46.
150. Schottelius, M.; Berger, S.; Poethko, T.; Schwaiger, M.; Wester, H. J., Development of novel ⁶⁸Ga- and ¹⁸F-labeled GnRH-I analogues with high GnRHR-targeting efficiency. *Bioconjugate chemistry* **2008**, 19, 1256-68.
151. Wendeler, M.; Grinberg, L.; Wang, X.; Dawson, P. E.; Baca, M., Enhanced catalysis of oxime-based bioconjugations by substituted anilines. *Bioconjugate chemistry* **2014**, 25, 93-101.
152. Larsen, D.; Pittelkow, M.; Karmakar, S.; Kool, E. T., New Organocatalyst Scaffolds with High Activity in Promoting Hydrazone and Oxime Formation at Neutral pH. *Organic letters* **2015**, 17, 274-277.
153. Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E., Nucleophilic catalysis of oxime ligation. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2006**, 45, 7581-4.
154. Crisalli, P.; Kool, E. T., Water-Soluble Organocatalysts for Hydrazone and Oxime Formation. *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 1184-1189.
155. Agten, S. M.; Suylen, D. P. L.; Hackeng, T. M., Oxime Catalysis by Freezing. *Bioconjugate Chemistry* **2016**, 27, 42-46.
156. Das, M.; Jain, R.; Agrawal, A. K.; Thanki, K.; Jain, S., Macromolecular bipill of gemcitabine and methotrexate facilitates tumor-specific dual drug therapy with higher benefit-to-risk ratio. *Bioconjug Chem* **2014**, 25, 501-9.

157. Skarlas, T.; Zevgiti, S.; Droebner, K.; Panou-Pomonis, E.; Planz, O.; Sakarellos-Daitsiotis, M., Influenza virus H5N1 hemagglutinin (HA) T-cell epitope conjugates: design, synthesis and immunogenicity. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **2011**, *17*, 226-32.
158. Chelius, D.; Shaler, T. A., Capture of peptides with N-terminal serine and threonine: a sequence-specific chemical method for Peptide mixture simplification. *Bioconjug Chem* **2003**, *14*, 205-11.
159. Geoghegan, K. F.; Emery, M. J.; Martin, W. H.; McColl, A. S.; Daumy, G. O., Site-directed double fluorescent tagging of human renin and collagenase (MMP-1) substrate peptides using the periodate oxidation of N-terminal serine. An apparently general strategy for provision of energy-transfer substrates for proteases. *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 537-544.
160. Kalia, J.; Raines, R. T., Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 7523-7526.
161. Kato, Y.; Ozawa, S.; Miyamoto, C.; Maehata, Y.; Suzuki, A.; Maeda, T.; Baba, Y., Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International* **2013**, *13*, 89.

