

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ
ΤΟΥ ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ *SUNITINIB* ΜΕ
ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ
EGFR ΓΙΑ ΤΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

ΓΟΥΤΑ ΓΕΩΡΓΙΑ ΑΚΥΛΗΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Φωκάς Δημοσθένης, Αναπλ. Καθηγητής, ΤΜΕΥ, Παν/μιο Ιωαννίνων.....(**Επιβλέπων**)

Ταμβακόπουλος Κωνσταντίνος, Ερευνητής Β', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών
Ακαδημίας Αθηνών, Τομέας Φαρμακολογίας-Φαρμακοτεχνολογίας.....(**Μέλος**)

Παππάς Περικλής, Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Φαρμακολογίας,
Παν/μιο Ιωαννίνων(**Μέλος**)



ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2018



Departments: Chemistry, Biology, Medicine

**«DESIGN AND SYNTHESIS OF PEPTIDE-DRUG CONJUGATES
OF THE ANTI-ANGIOGENIC AGENT SUNITINIB WITH EGFR
BINDING PEPTIDES FOR TARGETED CANCER THERAPY»**

**GEORGIA AKILINA GOUTA
CHEMIST**

MEMBERS OF THE EXAMINING COMMITTEE

Demosthenes Fokas, Associate Professor, Department of Materials Science and Engineering, University of Ioannina.....**(Supervisor)**

Constantinos Tamvakopoulos, Researcher B', Biomedical Research Foundation Academy of Athens (BRFAA), Division of Pharmacology-Pharmacotechnology..... **(Member)**

Periklis Pappas, Associate Professor, Department of Medicine, Laboratory of Pharmacology, University of Ioannina.....**(Member)**



IOANNINA, 2018

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοϊατρικής και Χημικής Τεχνολογίας του Τμήματος Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά τη διάρκεια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος Ιατρικής Χημείας, υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά.

Η κάτωθι επιστημονική μελέτη πραγματοποιήθηκε μετά από κόπο, δουλειά και πολλές θυσίες. Αποτελεί υψίστης σημασίας για εμένα η συμβολή των ανθρώπων, που συνέβαλαν στην υλοποίηση της, και έτσι επιθυμώ να εκφράσω τις αμέριστες ευχαριστίες μου προς αυτούς.

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά για την αποδοχή ένταξής μου στην εργαστηριακή του ομάδα και για την ευκαιρία που μου έδωσε. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεχή υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την άριστη συνεργασία και το όμορφο κλίμα που φρόντισε να εξασφαλίσει καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα συνεργάτη κ. Κωνσταντίνο Ταμβακόπουλο, ερευνητή του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας-Φαρμακοτεχνολογίας για την άψογη συνεργασία, καθώς τα βιολογικά πειράματα εκπονήθηκαν από την ομάδα του κ. Ταμβακόπουλου στο εργαστήριο Φαρμακολογίας-Φαρμακοτεχνολογίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ερευνητές Θεοδωρή Καραμπελα και Ορέστη Αργυρό για την βοήθεια και τις επιστημονικές γνώσεις που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα και τον Άρη Δουκατά για την συνεργασία. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής Περικλή Παππά για την συνεργασία και την ευγενική του συμμετοχή στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Το μεγαλύτερο και ουσιαστικότερο ευχαριστώ ανήκει στους οικείους μου, οι οποίοι μοιράστηκαν μαζί μου τόσο τις χαρές και τον ενθουσιασμό μου, όσο και τις λύπες, το άγχος και τις απογοητεύσεις μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης των πειραμάτων αλλά και συγγραφής της εργασίας μου. Ευχαριστώ πάνω απ' όλα τους γονείς μου, οι οποίοι με στηρίζουν ανιδιοτελώς όλα αυτά τα χρόνια με αγάπη και υπομονή.

Μάιος 2018,

Γούτα Γεωργία Ακυλίνα

Περίληψη

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες και είναι αποτέλεσμα της κατάρρευσης των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη προκειμένου ο όγκος να μπορέσει να αναπτυχθεί πέρα από ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα και διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων των γύρω ιστών, με αποτέλεσμα την εκβλάστηση νέων τριχοειδών αγγείων προς την κατεύθυνση του όγκου. Μικρά μόρια όπως η σουνιτινίμη (Sunitinib) έδωσαν αρχικά ενθαρυντικά αποτελέσματα έναντι του καρκίνου βασιζόμενα στη αντι-αγγειογόνα δράση τους μπλοκάροντας τη δημιουργία νέων αγγείων προς τα καρκινικά κύτταρα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση και η διερεύνηση μιας ξεχωριστής θεραπευτικής προσέγγισης, βασιζόμενης στην χρήση στοχευτικών συζευγμάτων ενός αντι-αγγειογενετικού παράγοντα, με στοχευτικά πεπτίδια για την εκλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων και όγκων που υπερεκφράζουν υποδοχείς της οικογένειας EGFR. Το SAP είναι ένα νέο ανάλογο του αντικαρκινικού φαρμάκου Sunitinib εξίσου αποτελεσματικό, συζεύγματα του οποίου σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής. Αυτό που καθιστά το SAP να είναι ξεχωριστό και ενδιαφέρον είναι ότι μπορεί να δώσει πρόσβαση σε στοχευτικά συζεύγματα μέσω σύζευξης του με βιοδιασπώμενες γέφυρες, κάτι στο οποίο το γονικό μόριο Sunitinib υστερεί. Μελέτη πρότυπων ενώσεων του SAP με γέφυρες δισουλφιδικής ή διπεπτιδικής (π.χ. Val-Cit) φύσεως έδειξε ότι θα μπορούσε να επιτευχθεί *in vivo* η απελευθέρωση του SAP από στοχευτικά συζεύγματα με τη χρήση των παραπάνω γεφυρών. Στη συνέχεια, συντέθηκαν συζεύγματα του SAP με πεπτίδια που στοχεύουν τόσο τον υποδοχέα HER-1 όσο και τον HER-2, υποδοχείς που ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των EGFR υποδοχέων.

Abstract

Cancer is one of the most serious health problems currently occurring in developed countries and is the result of the collapse of regulatory mechanisms that control the behavior of normal cells. Angiogenesis is necessary in order for the tumor to grow beyond a certain size. Blood vessels are formed in response to growth factors secreted by cancer cells and stimulate the proliferation of endothelial cells located in the walls of the capillaries of the surrounding tissues, resulting in the germination of new capillaries in the direction of the tumor. Small anti-angiogenic molecules, such as Sunitinib, initially exhibited encouraging anticancer effects based on their anti-angiogenic activity by blocking the formation of new vessels in cancer cells.

The main goal of this thesis was to design and develop a different therapeutic approach based on an anti-angiogenic agent coupled with receptor binding peptides in order to selectively target cancer cells and tumor that overexpress the EGFR. SAP is a new linkable sunitinib analogue and has several advantages over the original molecule. SAP can provide access to targeting peptide-drug conjugates employing a series of cleavable linkers. Study of model SAP compounds with cleavable disulfide or dipeptide linkers (i.e. Val-Cit) showed that release of SAP could be achieved *in vivo* in such a peptide-drug conjugate through the use of such cleavable linkers. A series of SAP conjugates with HER-1 and HER-2 targeting peptides were then synthesized and submitted for biological evaluation.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	5
1.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	6
2.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ	7
2.1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	10
2.1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	12
2.2 EGFR: ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ.....	14
2.2.1 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΟΥΝ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΜΕ ΔΡΑΣΗ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΥΡΟΣΙΝΗΣ.....	17
2.3 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ.....	19
2.3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ.....	20
2.3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ: Σουνιτινίμπη/Sunitinib.....	23
2.3.3 ΣΟΥΝΙΤΙΝΙΜΠΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΑ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΑ.....	24
2.4 SAP: ΈΝΑ ΝΕΟ ΔΡΑΣΤΙΚΟ ΑΝΑΛΟΓΟ ΤΟΥ Sunitinib.....	25
2.5 ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ HER-1 και HER-2.....	28
2.6 ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ SAP.....	31
2.6.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ SAP.....	32
2.6.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΗΣ ΓΕΦΥΡΑΣ SAPSSPy.....	33
2.6.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΓΕΦΥΡΑΣ ΒΑΛΙΝΗΣ-ΚΙΤΡΟΥΛΙΝΗΣ.....	33
2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΤΟΥ SAP ΜΕΣΩ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΗΣ ΓΕΦΥΡΑΣ.....	35
2.8 ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΤΟΥ SAP ΜΕΣΩ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΚΗΣ ΓΕΦΥΡΑΣ ΒΑΛΙΝΗΣ-ΚΙΤΡΟΥΛΙΝΗΣ.....	39
2.9.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΤΟΥ SAP ΜΕ ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ.....	42
2.9.2 ΔΟΜΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ.....	44

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
3.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ SAP.HCl.....	49
3.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΓΕΦΥΡΑΣ SAPSSPy.....	49
3.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΓΕΦΥΡΑΣ SAP-PABA- Citruline-Valine-Fmoc.....	50
3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ.....	52
4.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ ^1H NMR	53
4.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΑΖΑΣ MS.....	59
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σκοπός και Υπόβαθρο της Μελέτης

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες και είναι αποτέλεσμα της κατάρρευσης των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως και για τον λόγο αυτό χρήζει νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα σχεδιάζονται έτσι ώστε να παρεμποδίζουν διάφορες φάσεις κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή την επιβίωσή τους. Τα υγιή κύτταρα χρειάζονται και αυτά να πολλαπλασιαστούν και να αποφύγουν την απόπτωση, τα αντικαρκινικά φάρμακα όμως μπορούν να αποδειχθούν τοξικά για τα κύτταρα αυτά. Για να μειωθεί αυτή η τοξικότητα έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές όπου η θεραπευτική κεφαλή στοχεύει αποκλειστικά τα καρκινικά κύτταρα μέσω σύζευξης ενός μικρού μορίου συνδέτη που στοχεύει τα καρκινικά κύτταρα, μειώνοντας έτσι την μεταφορά του φαρμάκου στα φυσιολογικά κύτταρα καθώς και την τοξικότητα.

Το Sunitinib είναι μια πολλά υποσχόμενη χημική ένωση καθώς αναστέλλει πολλαπλούς υποδοχείς τυροσινικών κινασών (RTKs) που εμπλέκονται στην αύξηση του όγκου, τη νεοαγγειογένεση και τη μεταστατική εξέλιξη του καρκίνου. Αναστέλοντας τους (RTKs) μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου και να διακόψει την παροχή αίματος που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αναπτύσσονται. Ωστόσο η αδυναμία του να συζευχθεί με άλλες δραστικές ομάδες για στοχευμένη θεραπεία, το καθιστά λιγότερο αποτελεσματικό στην στόχευση των καρκινικών κυττάρων.

Το SAP είναι ένα νέο ανάλογο του αντιαγγειογενετικού φαρμάκου Sunitinib, το οποίο είναι εξίσου δραστικό και αποτελεσματικό, με καλύτερες φαρμακολογικές ιδιότητες, αλλά και με τη δυνατότητα να οδηγήσει στο σχηματισμό συζευγμάτων με πεπτίδια μέσω διασπώμενων γεφυρών.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζεται στο σχεδιασμό και την σύνθεση συζευγμάτων του SAP με πεπτίδια των υποδοχέων της οικογένειας EGFR (HER-1 και HER-2) μέσω βιοδιασπώμενων γεφυρών για πιο αποτελεσματική και στοχευμένη δράση ενάντια των καρκινικών κυττάρων και όγκων που υπερεκφράζουν τους παραπάνω υποδοχείς. Στοχευτικά συζεύγματα αυτού του τύπου θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα και του μαστού.

Τα προϊόντα σύζευξης στοχευτικών πεπτιδίων-με φάρμακα (PDCs: Peptide-Drug Conjugates) θα μπορούσαν να έχουν παρόμοια επιτυχία όπως τα συζεύγματα φαρμάκων με αντισώματα (ADCs: Antibody-Drug Conjugates), δεδομένου ότι πολλά PDCs βρίσκονται στην αναπτυξιακή φάση των προκλινικών και κλινικών μελετών [1]. Τα PDCs είναι ισοδύναμα με τα ADCs όσον αφορά την ισχύ, αλλά έχουν επιδείξει καλύτερη διείσδυση και αποτελεσματικότητα ιστού σε ζωικές και κλινικές μελέτες. Το σημαντικά χαμηλότερο κόστος παραγωγής και η αυξημένη αναπαραγωγικότητα των PDCs, η ακριβής στοιχειομετρία του φορέα, η υψηλή απόδοση φόρτωσης, η πιο προβλέψιμη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική τους, η μεγαλύτερη βάση φαρμακευτικής

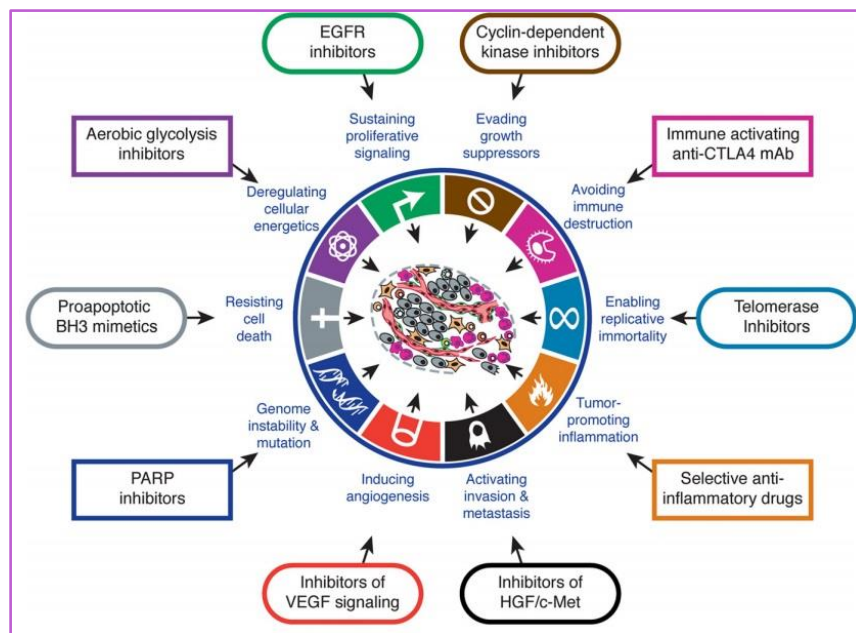
μορφοποίησής τους, εκτός από την ισχυρή αντικαρκινική αποτελεσματικότητα τους, τα καθιστά εξίσου αποτελεσματικά όπως τα ADCs.

1.2 Διαδικασία και προσέγγιση

Αρχικός στόχος ήταν η εύρεση των κατάλληλων γεφυρών με την απαιτούμενη σταθερότητα που θα εξασφαλίζουν την κυκλοφορία του σύζευγματος και θα επιτρέπουν την απελευθέρωση του φαρμάκου καθώς το σύζευγμα εισέρχεται μέσα στο καρκινικό κύτταρο-στόχο. Δύο είδη βιοδιασπώμενων γεφυρών που έχουν δοκιμαστεί επιτυχώς στο σχεδιασμό ADCs, έχουν μελετηθεί στα πλαίσια της διπλωματικής για τη σύζευξη του SAP με τα στοχευτικά πεπτίδια των υποδοχέων HER-1 και HER-2. Η πρώτη γέφυρα περιλαμβάνει το δισουλφιδικό δεσμό που αναμένεται να αναχθεί από την περίσσεια γλουταθειόνης που υπάρχει στα καρκινικά κύτταρα, πυροδοτώντας έτσι την απελευθέρωση του SAP. Η δεύτερη γέφυρα περιλαμβάνει το διπεπτίδιο βαλίνης-κιτρουλίνης που αναμένεται να υδρολυθεί εκλεκτικά από το ένζυμο Καθεψίνη Β στα λυσοσώματα, πυροδοτώντας την απελευθέρωση του SAP μέσω μιας ενδιάμεσης αυτοκαταστροφικής ομάδας (self-immolating). Εν συνεχεία, σύζευξη του SAP με στοχευτικά πεπτίδια των υποδοχέων HER-1 και HER-2, μέσω των παραπάνω γεφυρών, οδήγησε στην παρασκευή των τελικών συζευγμάτων.

2.1 Καρκίνος

Η εμφάνιση του καρκίνου προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αφού αυτά δεν αποκρίνονται αποτελεσματικά στα σήματα που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Γι' αυτό τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται τελικά σε όλο το σώμα, προσβάλλοντας φυσιολογικούς ιστούς και όργανα [2]. Η παντελής έλλειψη μηχανισμών ελέγχου του πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης βλαβών στα διάφορα ρυθμιστικά συστήματα των κυττάρων και καθορίζει τα χαρακτηριστικά τα οποία διακρίνουν τα καρκινικά κύτταρα από τα αντίστοιχα φυσιολογικά.



Εικόνα 1. Κύκλος ενός καρκινικού κυττάρου (Hanahan D, et.al Hallmarks of cancer: the next generation).

Όπως φαίνεται και στην Εικ.1 τα καρκινικά κύτταρα έχουν κάποιες ιδιότητες. Η ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των όγκων είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης μεταλλαγών που επηρεάζουν διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των κυττάρων, οι οποίοι αφορούν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την κυτταρική επιβίωση. Επομένως, τα καρκινικά κύτταρα εκδηλώνουν ανωμαλίες στους συγκεκριμένους μηχανισμούς και αποκτούν χαρακτηριστικές ιδιότητες που τα διακρίνουν από τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων συνιστούν την περιγραφή κακοήθειας στο κυτταρικό επίπεδο. Αν και υπάρχει μια μεγάλη πολυπλοκότητα στις νεοπλασματικές ασθένειες, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν διακριτά χαρακτηριστικά σε όλους τους τύπους των όγκων που τους επιτρέπουν να αναπτύσσονται και να υφίστανται μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα. Καθώς αναπτύσσεται, για να

είναι επιτυχημένο ένα καρκινικό κύτταρο, πρέπει να αποκτήσει ένα ολόκληρο φάσμα ανώμαλων ιδιοτήτων, ώστε να είναι σε θέση να εκτοπίσει τα φυσιολογικά γειτονικά κύτταρα και να εξασφαλίσει αιματική παροχή επαρκή για τη θρέψη του αναπτυσσόμενου όγκου : Διαφορετικοί καρκίνοι απαιτούν διαφορετικούς συνδυασμούς ιδιοτήτων. Ωστόσο, μια σειρά κρίσιμων χαρακτηριστικών διακρίνει τα καρκινικά από τα φυσιολογικά κύτταρα.

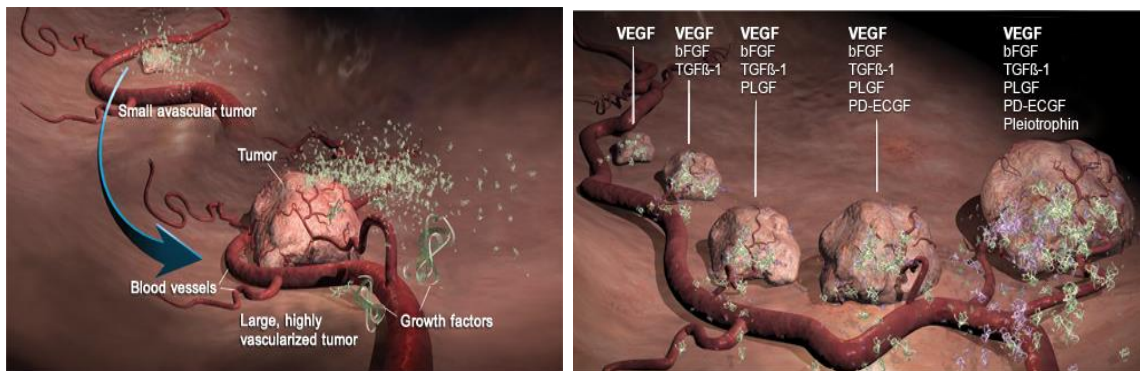
Τα χαρακτηριστικά ή αλλιώς ορόσημα του καρκίνου σύμφωνα με τους D. Hanahan & R. A. Weinberg (2000) είναι [3] (Εικ.1):

1. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
2. Αναισθησία σε αντι-αυξητικά σήματα
3. Αποφυγή απόπτωσης
4. Απεριόριστος πολλαπλασιασμός
5. Συνεχής αγγειογένεση
6. Διήθηση και μετάσταση

Η ίδια ερευνητική ομάδα το 2011 πρόσθεσε άλλα 4, τα οποία και εντάχθηκαν ως συμπληρωματικά στα προαναφερθέντα, και έχουν ως εξής (Εικ.1) :

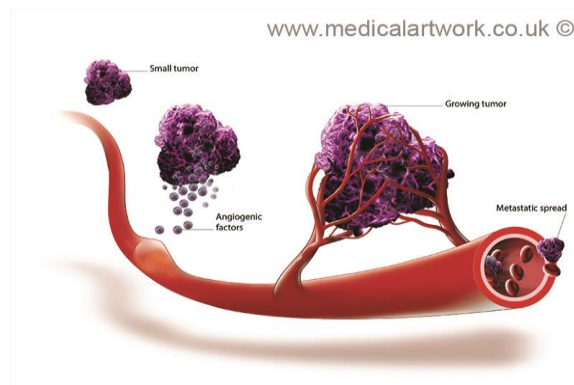
7. Γενετική αστάθεια και μεταλλαγές
8. Φλεγμονή που προωθεί τον καρκίνο
9. Απορρύθμιση κυτταρικής ενέργειας-μεταβολισμού
10. Αποφυγή ανοσο-καταστροφής

Στα νεοπλασματικά κύτταρα, η διαδικασία της αγγειογένεσης, ή ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων (Εικ.2), είναι κρίσιμη για την διατήρηση και μετάσταση του όγκου. Αγγειογένεση του όγκου είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων και περιλαμβάνει είσοδο σηματοδοσίας από διάφορες προ-αγγειογενετικούς παράγοντες ανάπτυξης [4].



Εικόνα 2. Διαδικασία αγγείωσης των καρκινικών κυττάρων (<https://www.biooncology.com/>)

Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη προκειμένου ο όγκος να μπορέσει να αναπτυχθεί πέρα από ένα συγκεκριμένο μέγεθος. Το κρίσιμο αυτό όριο του όγκου αντιστοιχεί σε ένα εκατομμύριο περίπου κύτταρα. Για την ανάπτυξη του όγκου πέρα από αυτό το μέγεθος είναι απαραίτητα νέα αιμοφόρα αγγεία, προκειμένου να προμηθεύουν με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά τα καρκινικά κύτταρα [5]. Αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα και διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων των γύρω ιστών, με αποτέλεσμα την εκβλάστηση νέων τριχοειδών αγγείων προς την κατεύθυνση του όγκου (Εικ.3). Ο σχηματισμός τέτοιων αιμοφόρων αγγείων είναι σημαντικός όχι μόνο για την ανάπτυξη του όγκου αλλά και τη μετάσταση [6]. Τα αναπτυσσόμενα τριχοειδή αγγεία, που σχηματίζονται από την αγγειογενετική διέγερση, είναι ιδιαίτερα διαπερατά από τα ογκοκύτταρα και συνεπώς παρέχουν τη δυνατότητα εισόδου στο κυκλοφοριακό σύστημα ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάστασης [7, 8].



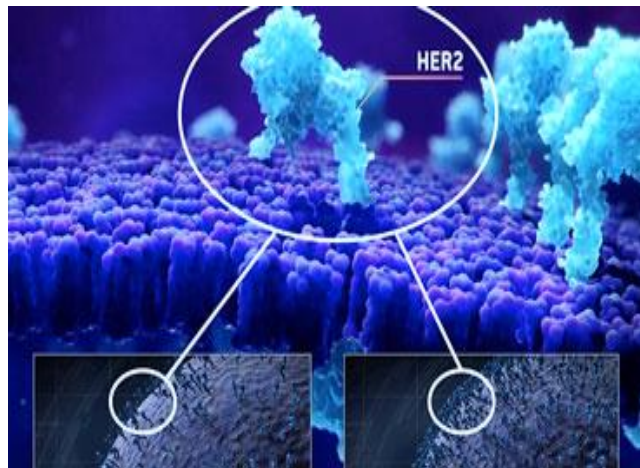
Εικόνα 3. Νέο-αγγειογένεση όγκου

Ρόλος των αιματοποιητικών κυττάρων στην καρκινική αγγειογένεση

- Μακροφάγα: Εκφράζουν TNF α και TSP-1, VEGF, VEGF-C, VEGF-D, MMPs
- Αιματοποιητικά κύτταρα στον όγκο: Εκκρίνουν MMP-9
- Αιματοποιητικά κύτταρα που παράγουν PlGF: Επάγουν την αγγειογένεση
- Μονοκύτταρα που εκφράζουν VEGFR1 και CD11b: Απελευθερώνουν VEGF, BDNF, PDGF
- Μακροφάγα που έλκονται από VEGF: Επάγουν τη λεμφαγγειογένεση
- Αιμοπετάλια

2.1.1 Καρκίνος του Μαστού

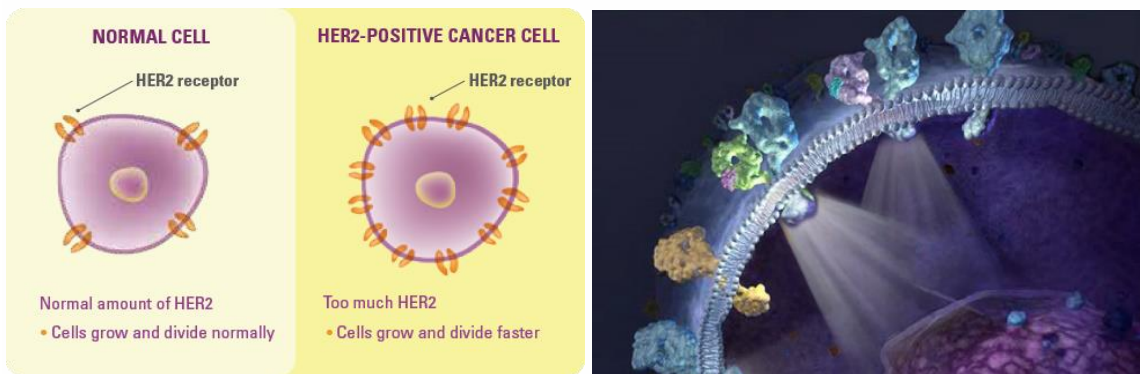
Ο όρος «καρκίνος του μαστού» αναφέρεται στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού. Αποτελεί μία από τις συχνότερα εμφανιζόμενες μορφές καρκίνου παγκοσμίως και είναι η πρώτη σε αριθμό κρουσμάτων στο γυναικείο πληθυσμό. Προκαλείται από ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό παθολογικών κυττάρων που ως αποτέλεσμα προκαλούν το σχηματισμό κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού και ουσιαστικά αποτελεί κυτταρική νόσο. Τα παθολογικά αυτά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα εξάπλωσης σε γειτονικούς ιστούς με δυσάρεστες συνέπειες για ολόκληρο τον οργανισμό. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άρρενες είναι υπαρκτή αλλά πολύ μικρή. Όσον αφορά στις γυναίκες όλες αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου όχι, όμως στον ίδιο βαθμό [9].



Εικόνα 4. Διαμεμβρανικός υποδοχέας HER-2 (<https://www.biooncology.com/>)

Κατηγοριοποιείται σε τρεις βασικούς τύπους ανάλογα με την έκφραση του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) και προγεστερόνης (PR), ή την υπερέκφραση του υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης (RTK) HER2/neu (Εικ.4). Το χαρακτηριστικό του καρκίνου του μαστού, είναι η αγγειογένεση μεταξύ στρωματικών καρκινικών και επιθηλιακών κυττάρων [10]. Τα βασικά ερεθίσματα παρέχονται από προ-αγγειογόνους παράγοντες όπως τον αγγειακό ενδοθηλιακό (VEGF) και τον αιμοπεταλιακό (PDGF) αυξητικό παράγοντα, μαζί με αντίστοιχους υποδοχείς. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αναστολή του VEGF μονοπατιού εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου. Σύμφωνα με τα διεθνή στατιστικά στοιχεία, 4,4 εκατομμύρια γυναίκες παγκοσμίως πάσχουν από καρκίνο του μαστού, ενώ κάθε χρόνο στον αριθμό αυτό προστίθενται σχεδόν 1,4 εκατομμύρια νέα περιστατικά. Στην Ελλάδα, καρκίνος του μαστού εμφανίζεται σε περίπου 4.700 γυναίκες κάθε χρόνο.

Η αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού καθορίζεται από πολλούς παράγοντες οι οποίοι έχουν σχέση είτε με τον βαθμό εξέλιξης της νόσου είτε με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτού καθ' αυτού του όγκου. Στα τελευταία συμπεριλαμβάνεται και ο HER-2 (Υποδοχέας Ανθρώπινου Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα Τύπου 2) [11]. Ο HER-2 είναι ένας υποδοχέας (Εικ.5), ένας τύπος πρωτεΐνης, ο οποίος βρίσκεται σε πολλά φυσιολογικά κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Η φυσιολογική λειτουργία του HER-2 είναι να λαμβάνει «μηνύματα» από άλλα μέρη του σώματος. Όταν ο ειδικός αυξητικός παράγοντας προσδεθεί με το HER-2, τότε μεταβιβάζεται το μήνυμα στο κύτταρο που το προτρέπει να διαιρεθεί και να αυξηθεί. Τόσο τα καρκινικά όσο και τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού έχουν στην επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης HER-2, παρόλα αυτά τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν μικρότερη ποσότητα HER-2 στην επιφάνειά τους. Συγκεκριμένα, κάποια καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν έως και 100 φορές μεγαλύτερη ποσότητα HER-2 από τα φυσιολογικά κύτταρα [12, 13]. Η παρουσία μεγάλης ποσότητας HER-2 ονομάζεται HER-2 θετική κατάσταση, ενώ η παρουσία μικρής ποσότητας HER-2 ονομάζεται αρνητική κατάσταση. Η ταυτοποίηση του καρκινικού όγκου σε σχέση με τον HER-2 αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για τον καθορισμό της ανάλογης θεραπευτικής αγωγής. Η μπεβασιζουμάμπη (bevacizumab) είναι ένα εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα, που έχει εγκριθεί σε 5 διαφορετικούς τύπους όγκου, συμπεριλαμβανομένου και του HER-2-αρνητικού μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Η έγκριση αυτή στηρίχθηκε στα αποτελέσματα της μελέτης E2100. Η μελέτη έδειξε ότι η μπεβασιζουμάμπη έχει όφελος στην 1η γραμμή του μεταστατικού καρκίνου του μαστού διπλασιάζοντας, στατιστικά σημαντικά, τόσο το διάστημα χωρίς εξέλιξη της νόσου, όσο και τις αντικειμενικές κλινικές ανταποκρίσεις. Στη περίπτωση τώρα του HER-2 θετικού, υπάρχουν τα εξανθρωποποιημένα μονοκλωνικά αντισώματα περτουζουμάμπη (pertuzumab) και τραστουζουμάμπη (trastuzumab) [14, 15]. Η χρήση περτουζουμάμπης σε συνδυασμό με την τραστουζουμάμπη και την χημειοθεραπεία, είναι η αγωγή, που για πρώτη φορά, βελτιώνει σημαντικά όχι μόνο την επιβίωση, χωρίς εξέλιξη της νόσου κατά μέσο όρο 6.3 μήνες επιπλέον, φτάνοντας συνολικά τους 1.7 μήνες, αλλά και την διάμεση συνολική επιβίωση κατά μέσο όρο 15.7 μήνες.



Εικόνα 5. HER-2 Υποδοχέας (<https://www.biooncology.com/>)

2.1.2 Καρκίνος του Πνεύμονα

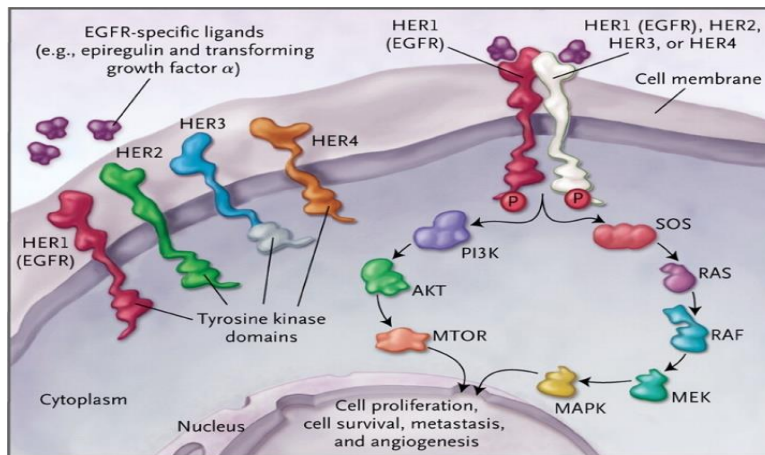
Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια ασθένεια που χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων στους ιστούς του πνεύμονα (Εικ.6). Εάν δε θεραπευθεί, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός μπορεί να εξαπλωθεί και πέραν του πνεύμονα με μια διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση σε κοντινό ιστό και, τελικά, σε άλλα μέρη του σώματος [16].



Εικόνα 6. Καρκίνος στον πνεύμονα (<https://medlineplus.gov/lungcancer.html>)

Οι περισσότεροι καρκίνοι που ξεκινούν στον πνεύμονα, γνωστοί ως πρωτογενείς καρκίνοι του πνεύμονα, είναι καρκινώματα που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα [17]. Οι κύριοι τύποι καρκίνου του πνεύμονα είναι το καρκίνωμα των μικρών κυττάρων του πνεύμονα (SCLC), που ονομάζεται επίσης καρκίνος κυττάρων βρώμης, και το καρκίνωμα των μη μικρών κυττάρων του πνεύμονα (NSCLC) [18]. Η πιο κοινή αιτία του καρκίνου του πνεύμονα είναι η μακροχρόνια έκθεση στον καπνό η οποία προκαλεί το 80-90% των καρκίνων του πνεύμονα. Οι μη καπνιστές αντιστοιχούν στο 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, που συχνά αποδίδεται σε ένα συνδυασμό γενετικών παραγόντων. Τα πιο συχνά συμπτώματα είναι ο βήχας (συμπεριλαμβανομένης της αιμόπτυσης), η απώλεια βάρους και η δυσκολία στην αναπνοή. Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να παρατηρηθεί σε ακτινογραφία θώρακος και αξονική τομογραφία (CT scan). Η θεραπεία και η πρόγνωση εξαρτώνται από τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου, το στάδιο (βαθμό εξάπλωσης), και γενικά την ευημερία του ασθενούς. Η επιβίωση εξαρτάται από το στάδιο, τη γενική υγεία και άλλους παράγοντες. Συνολικά, το 15% των ανθρώπων στις Ηνωμένες Πολιτείες που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του πνεύμονα επιβιώνει για πέντε έτη μετά την διάγνωση. Παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο κοινή αιτία καρκίνου που σχετίζεται με το θάνατο σε άνδρες και γυναίκες και είναι υπεύθυνη για 1.380.000 θανάτους ετησίως από το 2008 [19].

Είναι ευρέως αποδεκτό και καλά τεκμηριωμένο ότι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR) ελέγχει σημαντικές λειτουργίες των καρκινικών κυττάρων (Εικ.7), όπως τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, αλλά και διαδικασίες όπου συμμετέχουν περισσότεροι του ενός τύποι κυττάρων, όπως τη διήθηση και την αγγειογένεση [20, 21]. Μεταξύ των τύπων καρκίνου, στην ανάπτυξη των οποίων συμμετέχει ο EGFR, είναι και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΜΚΠ/NSCLC). Παρόμοια με πολλές άλλες μορφές καρκίνου, ο καρκίνος του πνεύμονα αρχίζει με ενεργοποίηση των ογκογονιδίων ή αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα ογκογονίδια πιστεύεται ότι κάνουν τους ανθρώπους πιο επιρρεπείς στον καρκίνο. Τα πρωτο-ογκογονίδια πιστεύεται ότι μετατρέπονται σε ογκογονίδια όταν εκτίθενται σε συγκεκριμένες καρκινογόνες ουσίες. Μεταλλάξεις στο K-ras πρωτο-ογκογονίδιο είναι υπεύθυνες για το 10-30% των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα.



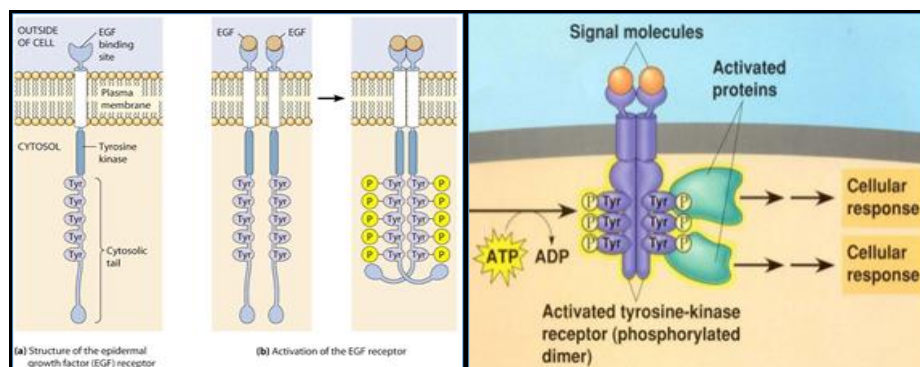
Εικόνα 7. Καρκίνος του πνεύμονα-μηχανισμός δράσης (www.cellsignal.com)

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, την αγγειογένεση, και την εισβολή του όγκου. Μεταλλάξεις και πολλαπλασιασμός του EGFR είναι κοινά σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και παρέχουν τη βάση για θεραπεία με αναστολείς του EGFR.

2.2 EGFR: Υποδοχείς με Δράση Κινάσης Τυροσίνης

Οι υποδοχείς EGFR είναι μια σημαντική κατηγορία πρωτεϊνών με δράση κινάσης τυροσίνης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης, όπως και οι πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην ενδοκυτταρική μετάδοση μηνυμάτων. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης “τυροδοτείται” κυρίως από σήματα που ρυθμίζουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Τα εξωκυτταρικά σήματα είναι συνήθως πρωτεϊνικές ορμόνες, οι οποίες αν ασκούν ρυθμιστική δράση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ταξινομούνται ως αυξητικοί παράγοντες [22]. Η σύζευξη ενός εξωκυτταρικού μηνύματος στην φωσφορυλίωση της τυροσίνης στο εσωτερικό του κυττάρου μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν δύο διαφορετικούς τύπους υποδοχέων: Υποδοχείς με εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης και διαμεμβρανικούς υποδοχείς συνδεδεμένους με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης. Μερικοί διαμεμβρανικοί υποδοχείς έχουν εσωτερική δράση κινάσης τυροσίνης. Αυτοί οι υποδοχείς είναι γνωστοί ως υποδοχείς κινάσες τυροσίνης. Η σύνδεση ενός προσδέτη στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα διεγείρει τη δράση μιας κινάσης τυροσίνης, η οποία εντοπίζεται στην ενδοκυτταρική του περιοχή. Χαρακτηριστικό αυτού του τύπου υποδοχέα αποτελεί το γεγονός ότι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη και η περιοχή της κινάσης τυροσίνης αποτελούν τμήματα της ίδιας πρωτεΐνης [23].

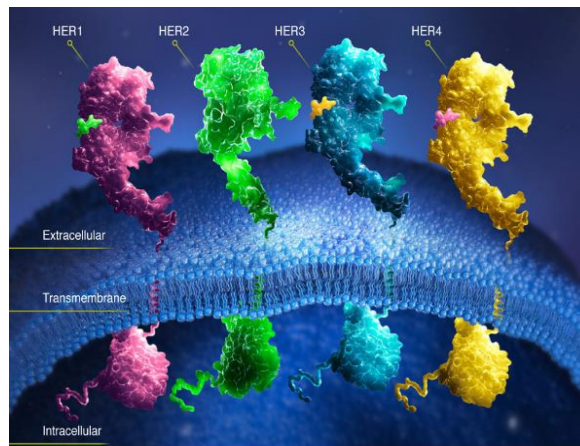
Οι υποδοχείς κινάσες τυροσίνης είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι εμφανίζουν στην εξωκυτταρική τους επιφάνεια θέσεις πρόσδεσης για εξωκυτταρικούς προσδέτες. Όταν αυτοί συνδέονται στον υποδοχέα ενεργοποιούν τη δράση μιας ειδικής κινάσης τυροσίνης που βρίσκεται στο ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη της φωσφορυλίωσης καταλοίπων τυροσίνης στον ίδιο τον υποδοχέα αλλά και σε διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Αυτά με τη σειρά τους “τυροδοτούν” τη βιολογική απόκριση του κυττάρου ενεργοποιώντας μια περαιτέρω αλληλουχία αντιδράσεων. Η απόκριση μπορεί να φθάσει μέχρι το επίπεδο του πυρήνα και να ενεργοποιήσει εκεί τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων [24]. Επίσης μπορεί να επηρεάσει την αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, και τις αντιδράσεις του ενδιάμεσου μεταβολισμού τους, επίσης την κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση και μορφογένεση.



Εικόνα 8. Δομή υποδοχέων με δράση κινάσης τυροσίνης (www.cellsignal.com)

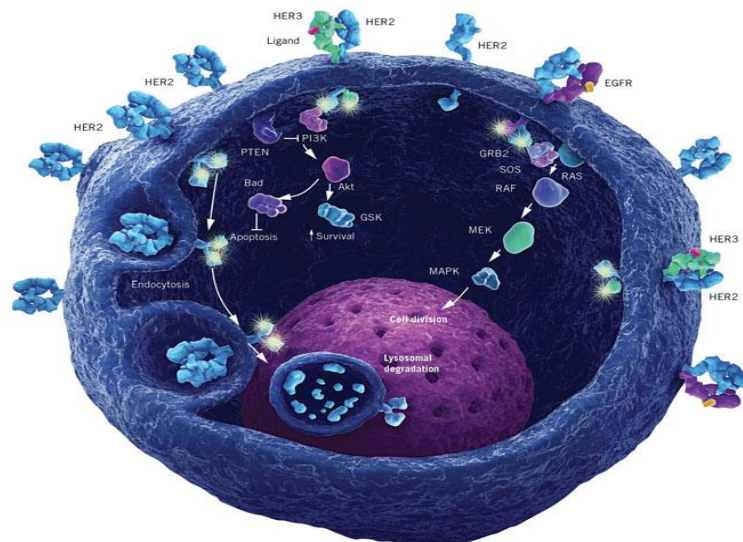
Οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (Εικ.8) αποτελούν αναπόσπαστες μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες διαθέτουν στην εξωκυτταρική τους πλευρά μια περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη ενώ στην ενδοκυτταρική τους μια περιοχή κινάσης τυροσίνης. Το διαμεμβρανικό τμήμα των υποδοχέων αυτών διαπερνά τη μεμβράνη με τη μορφή α -έλικας. Το ενδοκυτταρικό τους τμήμα εκτός από τη συντηρημένη περιοχή της κινάσης τυροσίνης περιλαμβάνει και άλλα τμήματα ρυθμιστικών αλληλουχιών στα οποία λαμβάνουν μέρος αντιδράσεις αυτοφωσφορυλίωσης, φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης από άλλες πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες αντίστοιχα. Στα θηλαστικά υπάρχουν περισσότερες από 100 οικογένειες υποδοχέων κινάσων τυροσίνης ανάλογα με τη φύση του προσδέτη με τον οποίο δεσμεύονται. Αυτές με τη σειρά τους υποδιαιρούνται σε υποοικογένειες ανάλογα με τα διαφοροποιημένα τμήματα των αλληλουχιών των εξωκυτταρικών περιοχών τους [25].

Το ιδιαίτερο δομικό χαρακτηριστικό της οικογένειας του υποδοχέα EGFR: είναι οι δύο πλούσιες σε κυστεΐνη περιοχές στο εξωκυτταρικό τμήμα, ο ρόλος των οποίων δεν είναι γνωστός. Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR είναι το αρχέτυπο μιας οικογένειας υποδοχέων κινάσων τυροσίνης, όπου περιλαμβάνονται τέσσερις σχετιζόμενοι μεταξύ τους υποδοχείς, οι EGFR, HER-2, HER-3 και HER-4 (Εικ.9). Όλοι αυτοί οι διαμεμβρανικού τύπου υποδοχείς περιέχουν μια ενδογενή δραστηριότητα κινάσης που μεταβάλλει τις συνδεδεμένες με τον υποδοχέα ομάδες τυροσίνης, τόσο επάνω στον υποδοχέα όσο και ενδοκυττάρια. Αυτή η δραστηριότητα κινάσης ενεργοποιείται όταν αυξητικοί παράγοντες της οικογένειας των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων συνδέονται με τον υποδοχέα. Μετά την διέγερση του EGFR, προκύπτει ένας καταρράκτης μεταφοράς της πληροφορίας που ενεργοποιεί τη γονιδιακή έκφραση και επάγει κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου ή κυτταρική διαφοροποίηση. Η ανώμαλη ενεργοποίηση αυτού του άκρως εξειδικευμένου και ελεγχόμενου μηχανισμού πιστεύεται ότι συνεισφέρει σε πολλές νεοπλασματικές διαδικασίες, όπως η ανεξέλεγκτη κυτταρική μίτωση, η προστασία από την απόπτωση και οι μεταστάσεις.



Εικόνα 9. Οικογένεια του υποδοχέα EGFR (Cell Mol Life Sci. 2008; 65(10): 1566–1584)

Η διέγερση της δράσης της κυτταροπλασματικής κινάσης τυροσίνης είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης του προσδέτη με τον υποδοχέα. Η προσδέτο-επαγόμενη φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης έχει ένα διπλό αποτέλεσμα. Η δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης οδηγεί σε trans- φωσφορυλίωση των δύο διμερών (αυτο-ενεργοποίηση) μέσω φωσφορυλίωσης καταλοίπων Tyr, που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο. Επιπλέον, φωσφορυλιώνονται και κατάλοιπα Tyr εκτός του ενεργού κέντρου. Αυτά τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα χρησιμοποιούνται ως θέσεις σύνδεσης για πρωτεϊνικά υποστρώματα, μέσω των SH2 ή των PTB περιοχών [26]. Οι πρωτεΐνες (effector proteins: πρωτεΐνες τελεστές) μπορεί να είναι ένζυμα που ενεργοποιούνται με τη φωσφορυλίωση των τυροσινών ή απλώς να λειτουργούν ως μόρια-προσαρμογείς (adaptor molecules), να έχουν δηλαδή την ιδιότητα να συνδέουν άλλες πρωτεΐνες στον ενεργοποιημένο υποδοχέα μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Με τη βοήθεια των μορίων αυτών άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες οδηγούνται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα και στην κυτταρική μεμβράνη (Εικ. 10).

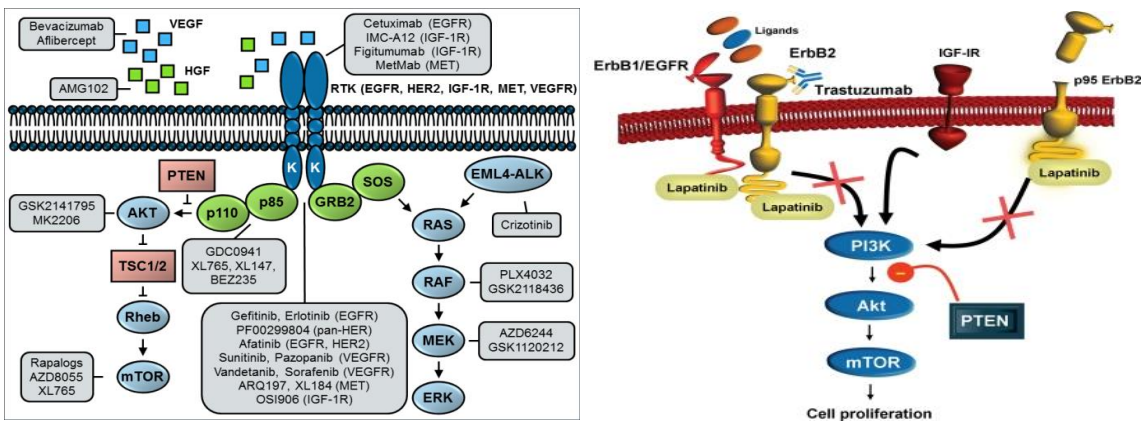


Εικόνα 10. Ενδοκυτταρικός μηχανισμός ενεργοποίησης των υποδοχέων EGFR. (Ann. Oncol. 2003, 14 (11), 1346-1363)

2.2.1 Δραστικές Ουσίες που Στοιχεύουν Υποδοχείς με Δράση Κινάσης Τυροσίνης

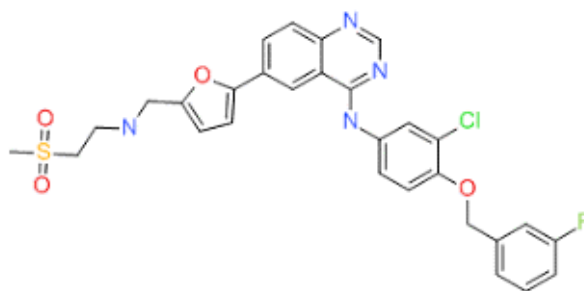
Οι περισσότεροι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων αποτελούνται από εξωκυτταρική, διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης (RTK). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα με δράση κινάσης τυροσίνης (RTK), ρυθμίζει πολλές βασικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένων την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση. Ωστόσο, η δυσλειτουργία των RTK έχει βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα καρκίνων, και έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με την εξέλιξη πολυάριθμων καρκίνων. Οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης (RTK) έχουν βελτιώσει σημαντικά τη θεραπεία και την πρόγνωση πολλαπλών τύπων καρκίνου. Ως εκ τούτου, οι συγκεκριμένοι υποδοχείς (RTK) αποτελούν έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Ένας τρόπος για να μπλοκάρει αποτελεσματικά η σηματοδότηση των (RTK) είναι με μικρά μόρια ρόλος των οποίων είναι η αναστολή της καταλυτικής δράσης της τυροσίνης. Στις δραστικές ουσίες οι οποίες αναστέλλουν τους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, της οικογένειας των EGFR υποδοχέων ανήκουν η Λαπατινίμη και η Ερλοτινίμη δυο εξίσου σημαντικά φάρμακα τα οποία κυκλοφορούν στο εμπόριο ως φαρμακευτικές ενώσεις ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνων (Εικ.11, 12) [27].

Η λαπατινίμη (Lapatinib), μια 4-ανιλινοκιναζολίνη, είναι ένας αναστολέας των ενδοκυτταρικών περιοχών κινάσης τυροσίνης και των δυο EGFR (ErbB1) και ErbB2 (HER2) υποδοχέων με βραδύ ρυθμό αποχωρισμού από αυτούς τους υποδοχείς. Η λαπατινίμη αναστέλλει την κατευθυνόμενη από το ErbB ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων *in vitro* σε διάφορα ζωικά μοντέλα. Αντίστοιχα η ερλοτινίμη (Erlotinib) είναι και αυτή ένα αντικαρκινικό φάρμακο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Η ερλοτινίμη αναστέλλει τους υποδοχείς του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα που υπάρχουν στην επιφάνεια ορισμένων καρκινικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν πλέον να λάβουν τα μηνύματα που χρειάζονται για την ανάπτυξη, την εξέλιξη και την εξάπλωσή τους (μετάσταση). Κατ' αυτόν τον τρόπο, η ερλοτινίμη αναστέλλει την αύξηση, τον πολλαπλασιασμό και την εξάπλωση του καρκίνου στον οργανισμό (Εικ.11).

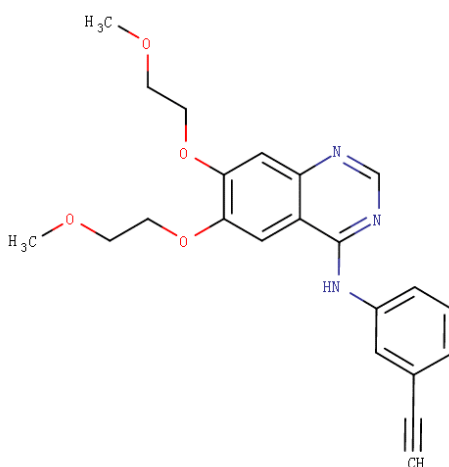


Εικόνα 11. Μηχανισμός Δράσης Αναστολέων Κινάσης Τυροσίνης: Lapatinib, Erlotinib, Crizotinib, Sunitinib

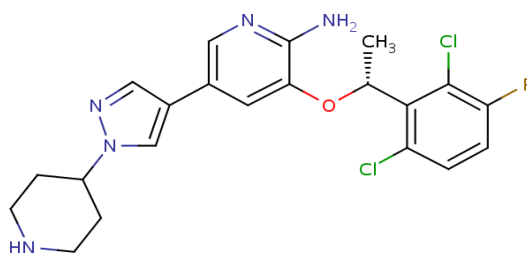
a)



b)



c)



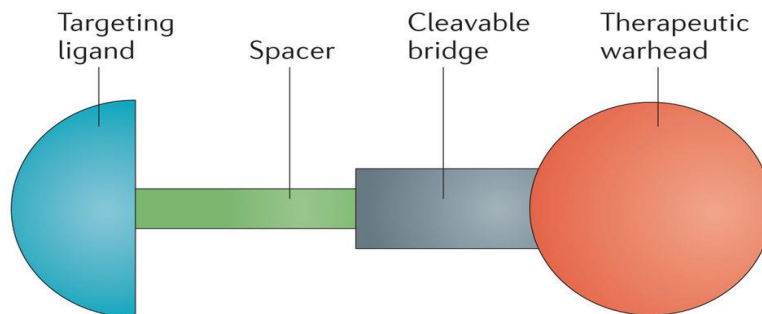
Εικόνα 12. Χημικές Δομές: Lapatinib (a), Erlotinib (b), Crizotinib (c)

Η συγκριτική αξιολόγηση των ιστών ανθρώπινου καρκίνου και των φυσιολογικών ιστών έχει εντοπίσει αντιγόνα που εκφράζονται κατά προτίμηση ή αποκλειστικά στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Μπορούν να δημιουργηθούν μονοκλωνικά αντισώματα για να αναγνωρίσουν και να συνδεθούν ειδικά με αυτά τα αντιγόνα που σχετίζονται με όγκους. Το trastuzumab (Εικ.11) είναι ένα ανθρωποποιημένο στοχευμένο

μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στο εξωκυτταρικό τμήμα του HER2. Αυτό αποτελεί τον πρώτο παράγοντα-στόχο κατά του HER2 προς έγκριση από την United States Food και Drug Administration (FDA), για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού τόσο σε πρώιμο όσο και μεταστατικό στάδιο υπερέκφρασης του HER2 (HER2+). Αν και οι στοχευμένες θεραπείες του HER2 είχαν σημαντικό αντίκτυπο στα αποτελέσματα των ασθενών, η αντίσταση σε αυτούς του παράγοντες είναι κοινή. Σε κλινικές δοκιμές, το 74% των ασθενών με HER2+ μεταστατικό καρκίνο του μαστού (MBC: Metastatic Breast Cancer) δεν είχε ανταπόκριση του όγκου στη μονοθεραπεία της πρώτης γραμμής με trastuzumab και το 50% δεν ανταποκρίθηκε στο trastuzumab σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία. Αυτά τα παραδείγματα απεικονίζουν το πρόβλημα που θέτει η εγγενής αντίσταση de novo (εκ νέου) στους HER2 στοχευμένους παράγοντες για την αποτελεσματική θεραπεία του HER2+ καρκίνου του μαστού.

2.3 Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Συζευγμάτων, Φαρμάκων με Στοχευτικές Ομάδες

Τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα σχεδιάζονται έτσι ώστε να παρεμποδίζουν διάφορες φάσεις κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή την επιβίωσή τους. Τα αντικαρκινικά φάρμακα όμως μπορούν να αποδειχθούν τοξικά για τα υγιή κύτταρα καθώς και αυτά χρειάζονται να πολλαπλασιαστούν και να αποφύγουν την απόπτωση. Για να μειωθεί αυτή η τοξικότητα έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές όπου η θεραπευτική κεφαλή στοχεύει αποκλειστικά τα καρκινικά κύτταρα μέσω σύζευξής της με μια ομάδα-συνδέτη που στοχεύει εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, μειώνοντας έτσι την μεταφορά του φαρμάκου στα φυσιολογικά κύτταρα καθώς και την τοξικότητα [28].



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 13. Αρχές σχεδιασμού στοχευτικών συζευγμάτων (Nature, Vol 14, March 2015)

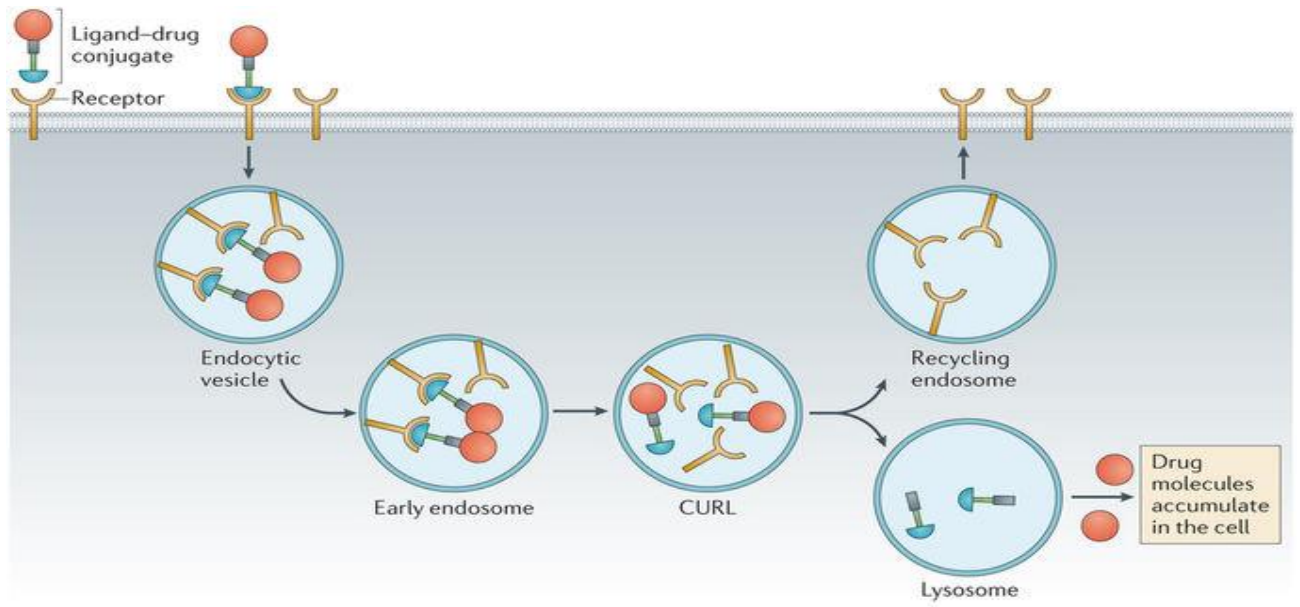
Η γενική δομή αυτής της κατηγορίας φαρμάκων περιλαμβάνει ένα τμήμα στόχευσης συνδεδεμένο με ένα θεραπευτικό φορτίο μέσω μιας διασπώμενης γέφυρας (Εικ.13). Το ενδιαφέρον συχνά εστιάζεται σε συζεύγματα φαρμάκων με μικρές στοχευτικές ομάδες καθώς αυτά διαφέρουν σημαντικά (και συχνά επωφελώς) από τα μεγαλύτερα πιο περίπλοκα συζεύγματα φαρμάκων ως προς τη φαρμακοκινητική τους, την αντιγονικότητα, την in vivo και in vitro σταθερότητα, τη χημεία σύζευξης, την ευκολία και το κόστος σύνθεσης, την ικανότητα διείσδυσης σε συμπαγείς όγκους και την ικανότητα απελευθέρωσης του φαρμάκου.

Η ασφάλεια του συζεύγματος διέπεται από την εξειδίκευση του στην στόχευση των καρκινικών κυττάρων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Καθώς η ασφάλεια εξαρτάται από την βιοκατανομή και την αποδέσμευση των υποδοχέων στους οποίους δεσμεύεται το σύζευγμα, η προσεκτική επιλογή του υποδοχέα καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση της τοξικότητας του συζεύγματος. Ο στοχευόμενος υποδοχέας πρέπει γενικά να ικανοποιεί δύο κριτήρια:

- 1) Υπερέκφραση σε καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα
- 2) Το απόλυτο επίπεδο έκφρασης σε καρκινικά κύτταρα πρέπει να είναι επαρκές για να επιτρέπει την παροχή θεραπευτικών ποσοτήτων του επιθυμητού φαρμάκου με ενδοκυττάρωση που προκαλείται από τον υποδοχέα.

2.3.1 Μηχανισμός Ενδοκυττάρωσης Συζευγμάτων

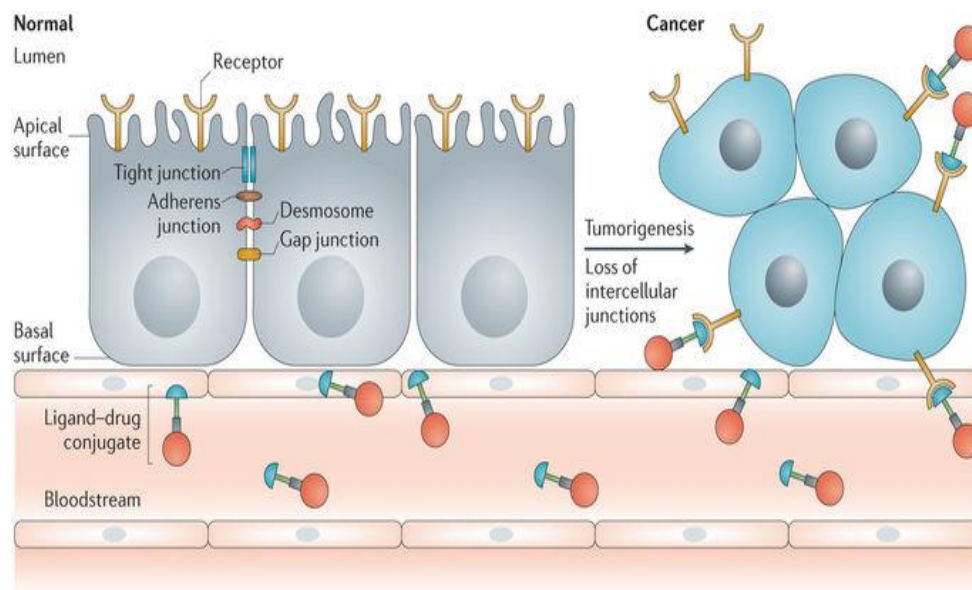
Με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης τα συζεύγματα στοχευτικού συνδέτη-φαρμάκου μπορεί να διακινούνται μέσω διαφόρων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων, ανάλογα με τον υποδοχέα που χρησιμοποιείται για την εσωτερίκευση του συζεύγματος (Εικ. 14). Με την πρόσδεση του φαρμάκου στον υποδοχέα, το σύζευγμα προσδέτη-φαρμάκου συνήθως εισέρχεται στο κύτταρο που στοχεύει με ενδοκυττάρωση και στη συνέχεια κατανέμεται σε ενδοκυτταρικές δομές, όπως είναι τα ενδοσώματα ανακύκλωσης, ένας χώρος που γίνεται η αποσύζευξη του υποδοχέα και του συνδέτη (CURL), ή τα λυσοσώματα. Μέσα στο CURL, το σύζευγμα και ο υποδοχέας μπορεί να διαχωριστούν και να βρεθούν σε διαφορετικούς ενδοκυτταρικούς χώρους, επιτρέποντας στον υποδοχέα είτε να αποδομηθεί, είτε να γυρίσει στην επιφάνεια του κυττάρου για άλλον έναν γύρο. [28, 29].



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 14. Είσοδος συζεύγματος συνδέτη-φαρμάκου στο κύτταρο (Nature, Vol 14, March 2015)

Λόγω της απώλειας ενδοκυτταρικών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (συμπεριλαμβανομένων στενών συνδέσεων, συμπλεγμάτων πρωτεϊνών, δεσμοσωματίων και κενών) κατά τον κακοήθη μετασχηματισμό, οι υποδοχείς που βρίσκονται κανονικά στην επιφάνεια ενός υγιούς επιθηλιακού κυττάρου (που φυσιολογικά είναι μη προσβάσιμοι σε παρεντερικά χορηγούμενα φάρμακα) κατανέμονται τυχαία γύρω από ολόκληρη την πλασματική μεμβράνη ενός κακοήθους κυττάρου επιτρέποντας εύκολη πρόσβαση από στοχευμένα φάρμακα [28, 29] (Εικ. 15).



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 15. Το αποτέλεσμα του μετασχηματισμού των επιθηλιακών κυττάρων στην προσβασιμότητα των υποδοχέων (Nature, Vol 14, March 2015)

Δεδομένου ότι η διαθεσιμότητα των ελεύθερων υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη εξαρτάται από το ποσοστό της επιστροφής των μη κατειλημμένων υποδοχέων από τα ενδοσώματα, ένας ιδανικός υποδοχέας είναι αυτός που είτε ανακυκλώνεται συχνά, είτε ανασυντίθεται γρήγορα μετά την αποδόμηση. Η αξιολόγηση του ποσοστού αναπλήρωσης των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια είναι ζωτικής σημασίας, καθώς κάθε φάρμακο που χορηγείται συχνότερα από το ρυθμό επανεμφάνισης ελεύθερων υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια θα επιβαρύνει άσκοπα τους ιστούς οδηγώντας ενδεχομένως σε ανεπιθύμητες παρενέργειες.

2.3.2. Επιλογή Δραστικής Ουσίας: Σουνιτινίμπη/Sunitinib

Η σουνιτινίμπη (Sunitinib) αναστέλλει πολλαπλούς υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης καθώς αναστέλλει την δράση κινάσης τυροσίνης που παρουσιάζει το ενδοκυττάριο μέρος του υποδοχέα (RTKs, Receptor Tyrosine Kinase) που εμπλέκεται στην αύξηση του όγκου, τη νεοαγγειογένεση και τη μεταστατική εξέλιξη του καρκίνου (Εικ.16). Προσδιορίστηκε ως αναστολέας των υποδοχέων του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFR α και PDGFR β), των υποδοχέων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3), του υποδοχέα του παράγοντα αρχέγονων κυττάρων (KIT), της ομοιάζουσας με την Fms τυροσινικής κινάσης-3 (FLT3), του υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης αποικιών (CSF-1R) και του υποδοχέα νευρογλοιακού νευροτροφικού παράγοντα (RET) [30]. Ο κύριος μεταβολίτης παρουσιάζει παρόμοια δραστηριότητα σε σύγκριση με τη σουνιτινίμπη σε βιοχημικούς και κυτταρικούς ποσοτικούς προσδιορισμούς [31]. Η σουνιτινίμπη, είναι αναστολέας των πρωτεϊνικών κινασών, ενζύμων όπου συμμετέχουν στην ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων, καθώς και στην ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τους όγκους, συμμετέχοντας έτσι στην ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων. Αναστέλλοντας τη δράση αυτών των ενζύμων, η σουνιτινίμπη μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου και να διακόψει την παροχή αίματος που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αναπτύσσονται [32].

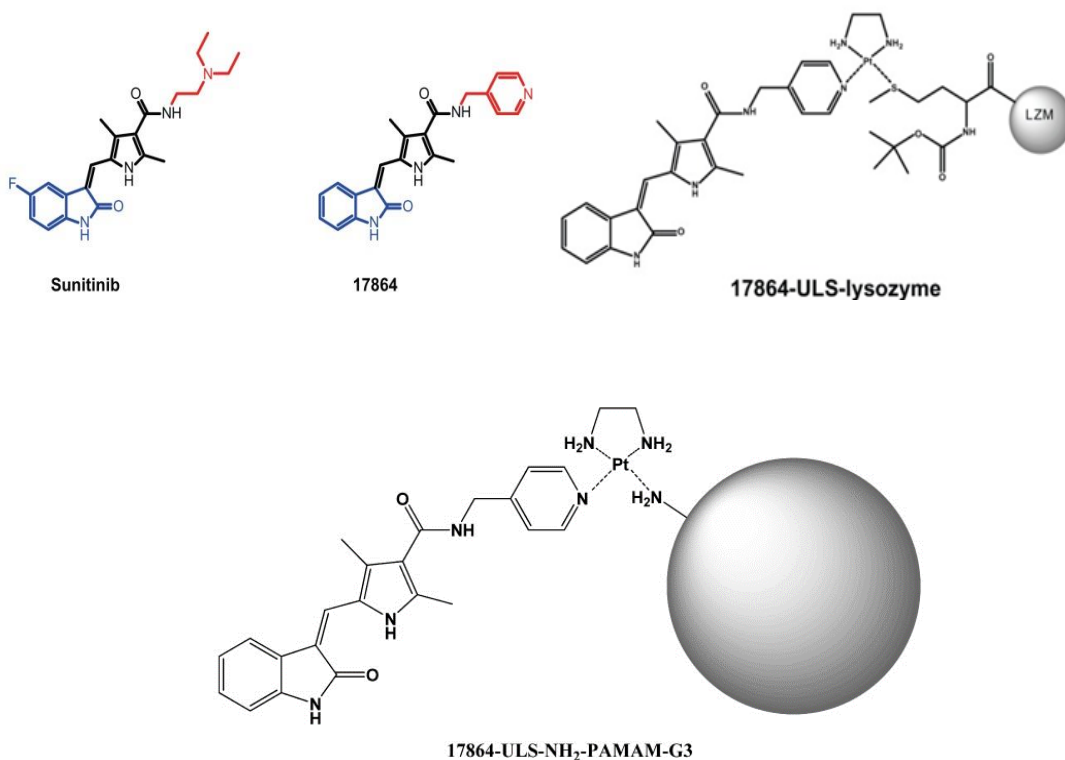
Μικρά αντιαγγειογόνα μόρια (π.χ. Sunitinib) έδειξαν αρχικά μια ισχυρή προκλινική αποτελεσματικότητα στον καρκίνο του μαστού (BrCa), δικαιολογώντας την έναρξη μερικών κλινικών δοκιμών, όπου η Sunitinib αξιολογήθηκε σε συνδυασμένες θεραπείες με κυτταροτοξικά μόρια. Δυστυχώς, η πλειοψηφία αυτών των συνδυαστικών προσπαθειών απέτυχε να ανταποκριθεί στα σχεδιασμένα πρωτεύοντα τελικά σημεία και οι δοκιμές διακόπηκαν, είτε λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας είτε λόγω περιορισμού της δόσης λόγω τοξικότητας. Ωστόσο, ένα εξελιγμένο θεραπευτικό σχήμα που χρησιμοποιεί συγχρόνηση Sunitinib με τραστουζουμάμπη (ένα αντισώμα που στοχεύει τον HER-2) παρήγαγε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μια μελέτη φάσης II των HER-2 θετικών ασθενών [33]. Επιπλέον, η πρόσφατη έναρξη μιας κλινικής δοκιμής (NCT02074878) σε ασθενείς με TNBC (Triple Negative Breast Cancer), στους οποίους χορηγήθηκε Sunitinib με το Crizotinib (αναστολέας υποδοχέων με δράση κινάσης τυροσίνης), έδειξε ότι το Sunitinib εξακολουθεί να είναι πολλά υποσχόμενο στην κλινική πρακτική του BrCa υπαγορεύοντας την ανάγκη για περαιτέρω έρευνες, ειδικά για τους HER-2 θετικούς ασθενείς [34, 35]. Οι λεπτομέρειες πίσω από τις κλινικές ανεπάρκειες του Sunitinib για τον BrCa δεν είναι απολύτως σαφείς, αλλά οι προτεινόμενες εξηγήσεις περιλαμβάνουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η αγγειογένεση στον BrCa εμπλέκει περισσότερα μονοπάτια, εκτός από αυτό του VEGF. Το γεγονός αυτό επομένως καθιστά αναγκαία την αναστολή πολλών άλλων προαγγειογόνων κινασών.

2.3.3 Σουνιτινίμπη και Στοχευτικά Συζεύγματα

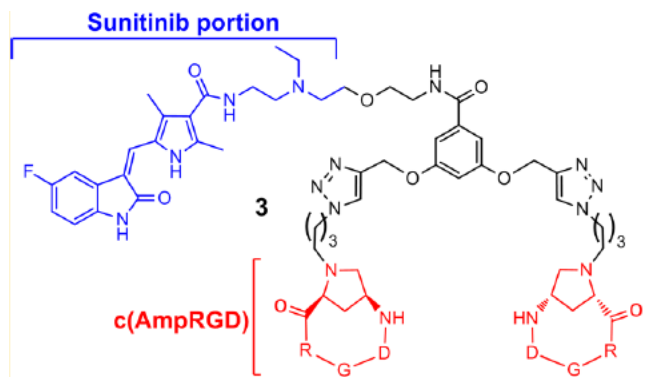
Η ισχυρή αντι-αγγειογενετική και αντικαρκινική δράση του Sunitinib οδήγησε τους ερευνητές στο σχεδιασμό νέων αναλόγων του που θα επιτρέπουν την πρόσβαση σε στοχευτικά συζεύγματα έτσι ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Ένα από αυτά τα ανάλογα, το **17864**, έδωσε πρόσβαση σε συζεύγματα με το ένζυμο λυσοζύμη (πρωτεΐνη μεταφορέας), μέσω ενός συνδέτη πλατίνας (ULS), για την εκλεκτική στόχευση των νεφρών (Εικ.16). Η φαρμακολογική δραστηριότητα του συζεύγματος 17864-λυσοζύμης αξιολογήθηκε σε ανθρώπινα νεφρικά σωληνοειδή κύτταρα HK-2 και μελετήθηκε η ικανότητα του συζεύγματος να συσσωρευτεί στους νεφρούς σε ποντίκια [36].

Επίσης, συζεύγματα του αναλόγου **17864** με ένα δενδριμερές NH₂-PAMAM-G3, μέσω ενός συνδέτη πλατίνας, παρασκευάστηκαν και αξιολογήθηκαν για την εκλεκτική στόχευση των νεφρών (Εικ.16). Το σύζευγμα 17864-ULS-NH₂-PAMAM-G3 είναι μη τοξικό για εγγύς σωληνοειδή κύτταρα *in vitro*. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση σε ποντικούς, το σύζευγμα συσσωρεύεται ταχέως και επαρκώς στα νεφρά [37].

Επίσης, συζεύγματα του Sunitinib με κυκλικά ανάλογα c(AmpRGD) που στοχεύουν την α_vβ₃ ιντεγκρίνη και τον υποδοχέα VEGFR2 ανέφεθησαν πρόσφατα στη βιβλιογραφία (Εικ.17). Τα συζεύγματα έδειξαν ενδιαφέρουσες αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες σε *in vitro* και *in vivo* δοκιμές [38].



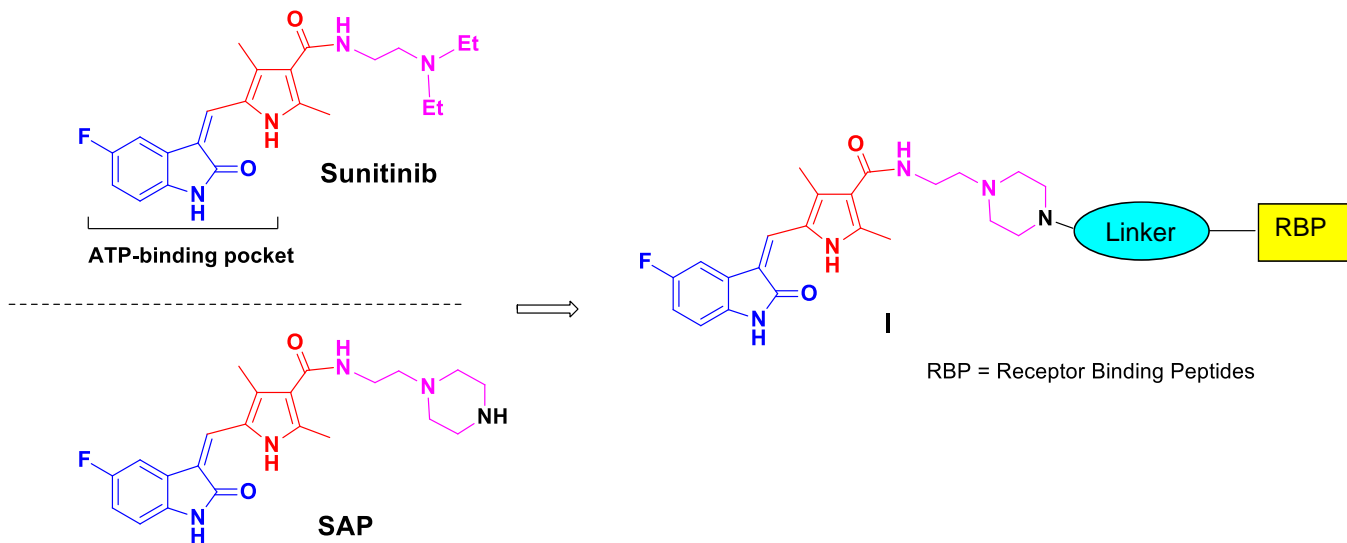
Εικόνα 16. Στοχευτικά συζεύγματα του αναλόγου 17864



Εικόνα 17. Συζεύγματα του Sunitinib με κυκλικά ανάλογα c(AmpRGD)

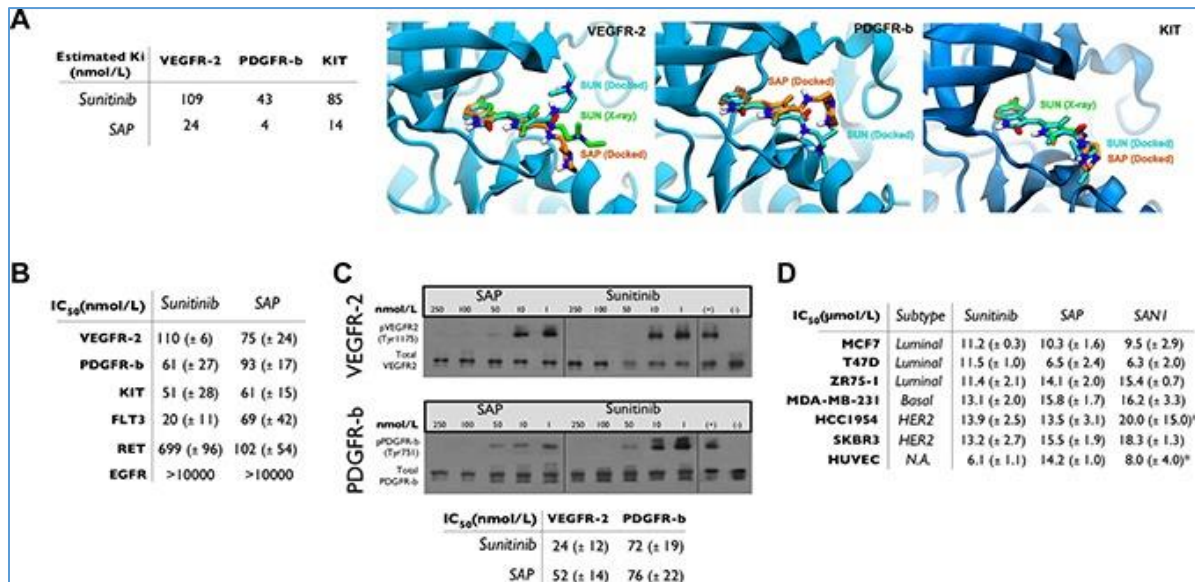
2.4 SAP: Ένα Νέο Δραστικό Ανάλογο του Sunitinib

Το Sunitinib είναι μια πολλά υποσχόμενη δραστική ένωση, ωστόσο λόγω της αδυναμίας του να συζευχθεί με άλλες δραστικές ομάδες για στοχευμένη θεραπεία το καθιστά λιγότερο αποτελεσματικό στην στόχευση των καρκινικών κυττάρων. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν ο σχεδιασμός συζευγμάτων ενός νέου αναλόγου του αντιαγγειογενετικού φαρμάκου Sunitinib, του SAP, το οποίο είναι εξίσου δραστικό και αποτελεσματικό με το Sunitinib [39, 40], αλλά με τη δυνατότητα να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων στοχευτικών συζευγμάτων μέσω κατάλληλων γεφυρών αλλά και της εισαγωγής ενός πιπεραζινικού δακτυλίου, ο οποίος προσφέρει μια ελεύθερη θέση πρόσδεσης στο άτομο του αζώτου με άλλες χημικές ομάδες, όπως τα στοχευτικά πεπτίδια. Εν αντιθέσει, το Sunitinib διαθέτει δύο αιθυλομάδες, οι οποίες δεν του προσφέρουν αυτή την ικανότητα σύζευξης.

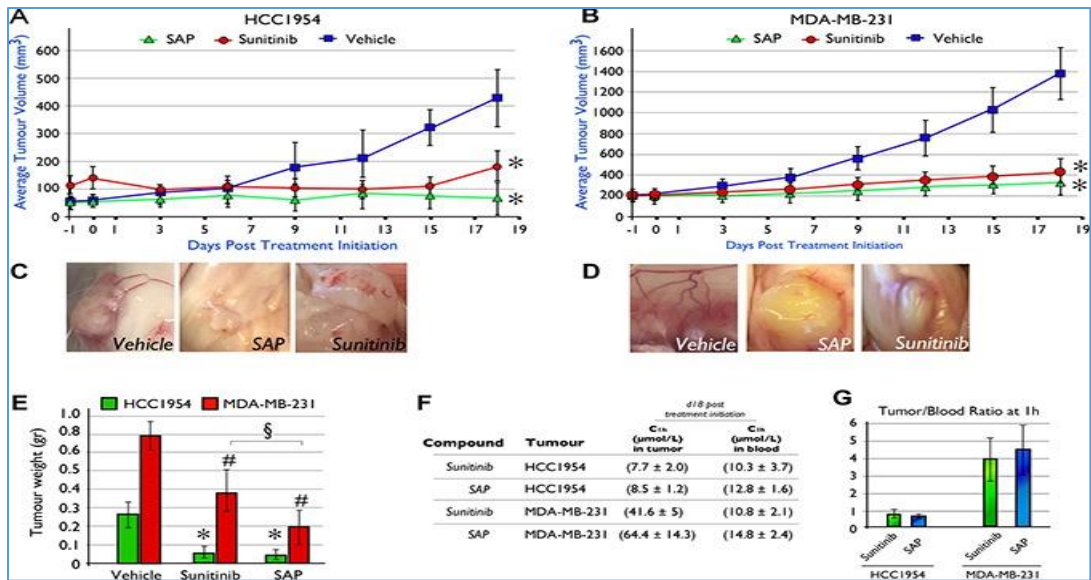


Σχήμα 1. SAP: Ένα ανάλογο του Sunitinib που μπορεί να δώσει πρόσβαση σε στοχευτικά συζεύγματα

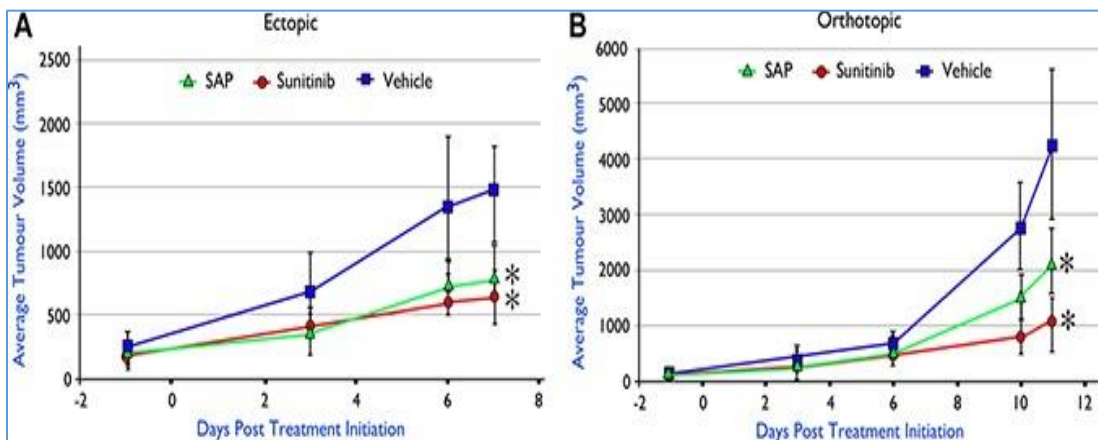
Το SAP σχεδιάστηκε ορθολογικά ώστε να διατηρηθεί η ισχύς του Sunitinib. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι η πλευρική διαίθυλοάμινο ομάδα του Sunitinib εκτίθεται στο μέτωπο του διαλύτη και δεν παρεμβάλλεται στην θέση πρόσδεσης του ATP. Συνεπώς, αντικατάσταση αυτής της ομάδας με μια πιπεραζίνη δεν θα επηρέαζε τη δραστηριότητα του νέου μορίου και θα μπορούσε να δώσει νέα ανάλογα με υψηλή υδατοδιαλυτότητα, όπως το SAP. Επιπλέον, θα μπορούσε να δώσει πρόσβαση σε νέα στοχευτικά συζεύγματα του τύπου **I** με πεπτίδια υποδοχέων (Receptor Binding Peptides) μέσω σύνδεσης της δευτεροταγούς αμίνης του πιπεραζινικού δακτυλίου και μιας κατάλληλης γέφυρας (Σχήμα 1). Μελέτες μοριακής πρόσδεσης *in silico* έδειξαν ότι το SAP μπορεί να προσδεθεί στην ενεργή περιοχή των υποδοχέων VEGFR-2, PDGFR-β και KIT εξίσου αποτελεσματικά όπως και το Sunitinib (Σχήμα 2). Το SAP βρέθηκε να αναστέλλει *in vitro*, όπως και το Sunitinib, τις παραπάνω κινάσες καθώς και την αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων VEGFR-2, PDGFR-β (Σχήμα 3). Επίσης επέδειξε παρόμοια κυτταροτοξικότητα με το Sunitinib σε διάφορες καρκινικές σειρές (Σχήμα 4). Το SAP παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με το αρχικό μόριο, αναστέλλει περισσότερους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, αναστέλλει το πρωτοογκογονίδιο του RET, εμφανίζει μειωμένους καρκινικούς δείκτες Ki-67 και CD31 και χαμηλότερη αιματοτοξικότητα, καθώς και καλύτερη διαλυτότητα [41]. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του SAP είναι η θέση σύζευξης που του προσφέρει η εισαγωγή του πιπεραζινικού δακτυλίου [42, 43, 44, 45, 46], γεγονός που καθιστά το νέο πλέον ανάλογο κατάλληλο για συζεύξεις είτε με στοχευτικά πεπτίδια είτε με άλλες χημικές ομάδες.



Σχήμα 2. *In silico* και *in vitro* ανάλυση του SAP. (A) Αποτελέσματα docking του SAP και του Sunitinib. Μοριακά μοντέλα της περιοχής πρόσδεσης του ATP των υποδοχέων VEGFR-2, PDGFR-β και KIT που δείχνουν την προβλεπόμενη θέση πρόσδεσης του Sunitinib (μπλε) και SAP (πορτοκαλί), σε σύγκριση με την κρυσταλλική διαμόρφωση του Sunitinib (πράσινο) σε VEGFR-2 και KIT. (B) Σύνοψη δραστηριότητας κινάσης *in vitro* για υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης παρουσία Sunitinib ή SAP. (C) Δοκιμή αυτοφωσφορυλίωσης σε κύτταρα για τους υποδοχείς VEGFR-2 και PDGFR-β παρουσία Sunitinib/SAP. (D) Δοκιμή κυτταροτοξικότητας MTT σε διάφορες καρκινικές σειρές του μαστού και HUVEC (Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας).



Σχήμα 3. In vivo αποτελεσματικότητα του SAP (100μmol/Kg) σε σχέση με ισοδύναμη ποσότητα του Sunitinib σε NOD/SCID ποντίκια. (A) HCC1954 (B) MDA-MB-231 κυτταρικές σειρές. Χορηγήθηκε στα ποντίκια ενδοφλεβίως και σε καθημερινή βάση SAP Sunitinib, μάρτυρας. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο 10 όγκων που προέρχονται από τουλάχιστον 5 ποντίκια. (C) Μείωση της νέο-αγγειογένεσης στην σειρά HCC1954 και (D) στην MDA-MB-231. (E) Μέσο βάρος όγκων την ημέρα της θυσίας (ημέρα 18). (F) Μέσος όρος επιπέδων φαρμάκου στο αίμα και στον όγκο τα οποία μετρήθηκαν με LC/MS. (G) Αναλογία όγκου/αίματος των SAP και Sunitinib μετά από μετρήσεις με γρήγη χρωματογραφία/φασματογράφο μάζας (LC/MS).



Σχήμα 4. In vivo αποτελεσματικότητα του SAP σε σχέση με ισομοριακές ποσότητες Sunitinib σε ποντίκια C57BL/6 με εμφύτευση της κυτταρικής γραμμής E0771 για τον καρκίνο του μαστού A) Εκτοπικός v= 5 (η μεταμοσχευμένη περιοχή είναι διαφορετική από την προέλευση των καλλιεργημένων κυττάρων) B) Ορθοτοπικός v= 6 (τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μεταμοσχεύονται στην ίδια θέση προέλευσης του όγκου), συγκριτικά με την ομάδα οχημάτων με βάση τη δοκιμασία σύγκρισης Turkey-Kramer.

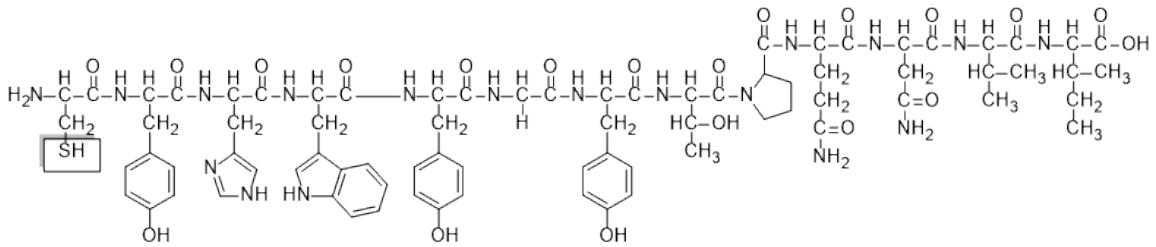
2.5 Στοχευτικά Πεπτίδια Υποδοχέων HER-1 και HER-2

Η έλευση της στοχοθετημένης θεραπείας βελτίωσε σημαντικά τη θεραπεία και την πρόγνωση πολλαπλών τύπων καρκίνου. Κύριος στόχος είναι η βελτίωση της εξειδίκευσης για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό την ελαχιστοποίηση της τοξικότητας στα υγιή κύτταρα. Μία προσέγγιση για τη βελτίωση της επιλεκτικότητας και τη μείωση των παρενεργειών είναι η σύζευξη των φαρμακοφόρων ενώσεων με ολιγοπεπτιδικούς φορείς, οι οποίοι μπορεί να μεταβάλλουν την πρόσληψη του φαρμάκου και την ενδοκυτταρική τους τύχη. Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR υπερεκφράζεται σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων και έχει θεωρηθεί ως στόχος για την μεταφορά των φαρμάκων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων, πραγματοποιήθηκαν έρευνες τόσο *in vitro* αλλά και *in vivo* αποδεικνύοντας ότι ο πλήρους μήκους ανασυνδιασμένος EGF μπορεί να συζευχθεί με γονίδια και συστήματα χορήγησης φαρμάκων παρέχοντας αποτελεσματική και γρήγορη ενδοκυττάρωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι ο πλήρους μήκους δεσμευτής EGF του υποδοχέα EGFR μπορεί να αντικατασταθεί από τεχνητά πεπτίδια όπως το GE11, που στοχεύουν τον υποδοχέα EGFR (HER1-BP1/HER1-BP2).

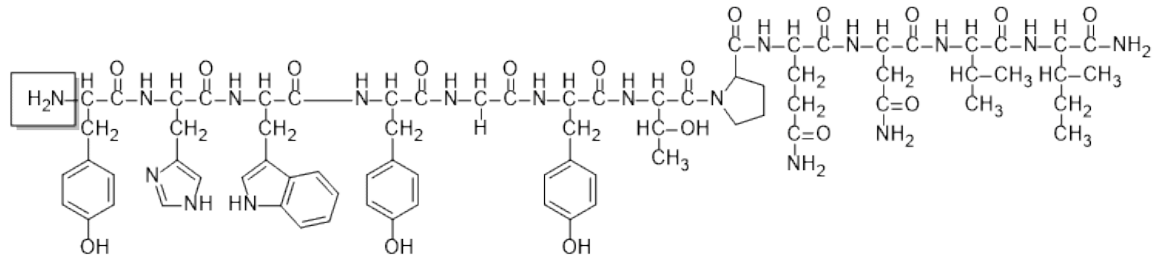
Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε μία βιβλιοθήκη απεικόνισης πεπτιδίων φάγου για την ταυτοποίηση νέων προσδεμάτων με ειδικές ικανότητες σύνδεσης προς EGFR υποδοχείς και βρέθηκε ένας εμπλουτισμένος κλώνος φάγου που κωδικοποιεί την αλληλουχία αμινοξέων *YHWYGYTPQNVI* (χαρακτηρισμένη ως *GE11*). Η δοκιμασία ανταγωνιστικής δέσμησης και η ανάλυση Scatchard αποκάλυψαν ότι το πεπτίδιο GE11 δεσμεύεται ειδικά και αποτελεσματικά στον EGFR με μια σταθερά διάσπασης 22 nM, αλλά με πολύ χαμηλότερη μιτογόνο δράση σε σχέση με τον EGF παράγοντα. Το GE11 (**HER1-BP1**) είναι ένα δυναμικά ασφαλές και αποτελεσματικό πεπτίδιο στόχευσης για εκλεκτικά συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων που μεσολαβούνται μέσω του EGFR υποδοχέα [47]. Η στόχευση του EGFR με το στοχευτικό πεπτίδιο GE11 είναι εξειδικευμένη για τον υποδοχέα και γονιδιακοί φορείς που είναι εξοπλισμένοι με το GE11 παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα παρόμοια με τους φορείς γονιδίων που φέρουν τον παράγοντα EGF. Μια παραλλαγή του GE11 πεπτιδίου είναι η αμιδική σύζευξη της τυροσίνης με το αμινοξύ κυστεΐνη, δημιουργώντας δυο νέες θέσεις σύζευξης τόσο στο άμινο τελικό άκρο αλλά και στην SH του αμινοξέος κυστεΐνη επιτρέποντας έτσι την δημιουργία δισουλφιδικού δεσμού (*CYHWYGYTPQNVI*). (HER1-BP2)

Ο ErbB-2 είναι ένας σχετιζόμενος με τον όγκο υποδοχέας της οικογένειας EGFR υπεύθυνος για την ανάπτυξη του όγκου, την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τις μεταστάσεις σε πολλούς καρκίνους. Υπερεκφράζεται σε ποσοστό 30-50% του πρωτογενούς καρκίνου του μαστού. Χρησιμοποιώντας τυχαίες βιβλιοθήκες πεπτιδίων φάγου, με στόχο την ταυτοποίηση πεπτιδίων που δεσμεύονται ειδικά ή κατά προτίμηση σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, τα επιλεγμένα πεπτίδια δεν δεσμεύτηκαν με φυσιολογικά επιθηλιακά μαστικά κύτταρα αλλά έδειξαν την προτίμηση τους στη σύνδεση και την εσωτερίκευση τους σε κυτταρικές μαστικές καρκινικές σειρές. Ένα από τα ειδικά για τον καρκίνο ολιγοπεπτίδια, είναι το πεπτίδιο LTVSPWY, το οποίο αναγνωρίστηκε ως πεπτίδιο που δεσμεύεται με τον ErbB-2 υποδοχέα (HER2-BP1) [48].

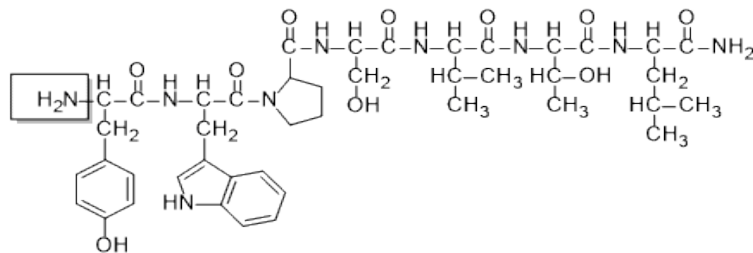
Τα στοχευτικά πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα στοχεύουν τους υποδοχείς HER-1 (καρκίνος του πνεύμονα) και HER-2 (καρκίνος του μαστού) και σχεδιάστηκαν με ελεύθερα αμινο-τελικά άκρα. Τα συζεύγματα προέκυψαν από το σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της ελεύθερης αμινομάδας των πεπτιδίων και της ελεύθερης καρβοξυλομάδας των διασπώμενων γεφυρών. Εξαιρέση αποτελεί το πρώτο πεπτίδιο Cys-GE11 (HER1-BP1) (Σχήμα 5) το οποίο θα σχηματίσει το επιθυμητό σύζευγμα μέσω της δημιουργίας δισουλφιδικού δεσμού με την επιθυμητή γέφυρα μέσω της SH του επιπρόσθετου αμινοξέος κυστεΐνης.



HER1-BP1 (H-Cys-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Asn-Val-Ile-OH)



HER1-BP2 (H-Tyr-His-Trp-Tyr-Gly-Tyr-Thr-Pro-Gln-Val-Ile-CONH₂)

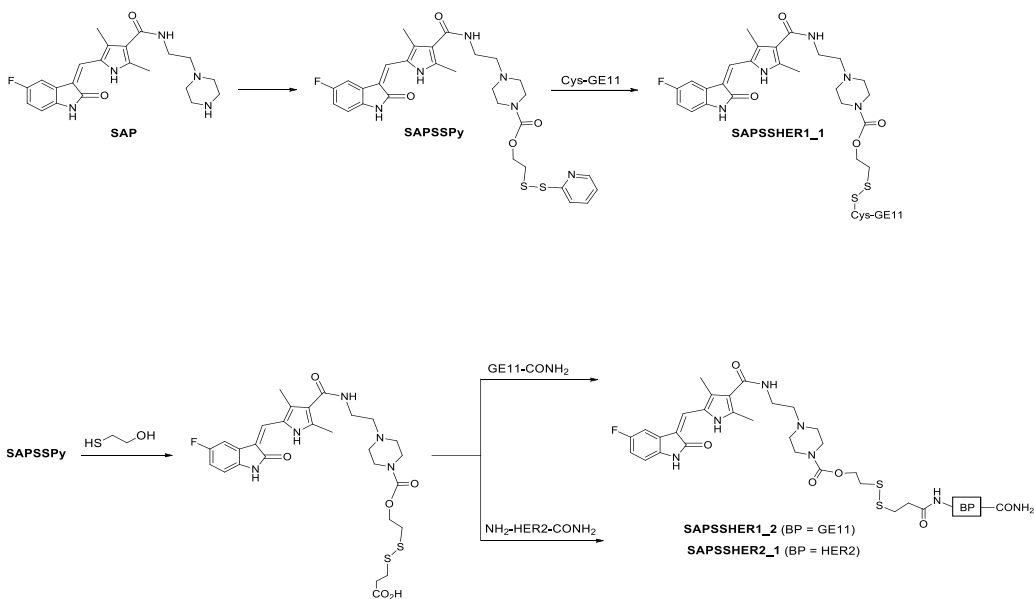


HER2-BP1 (H-Tyr-Trp-Pro-Ser-Val-Thr-Leu-CONH₂)

Σχήμα 5. Χημικές δομές στοχευτικών πεπτιδίων

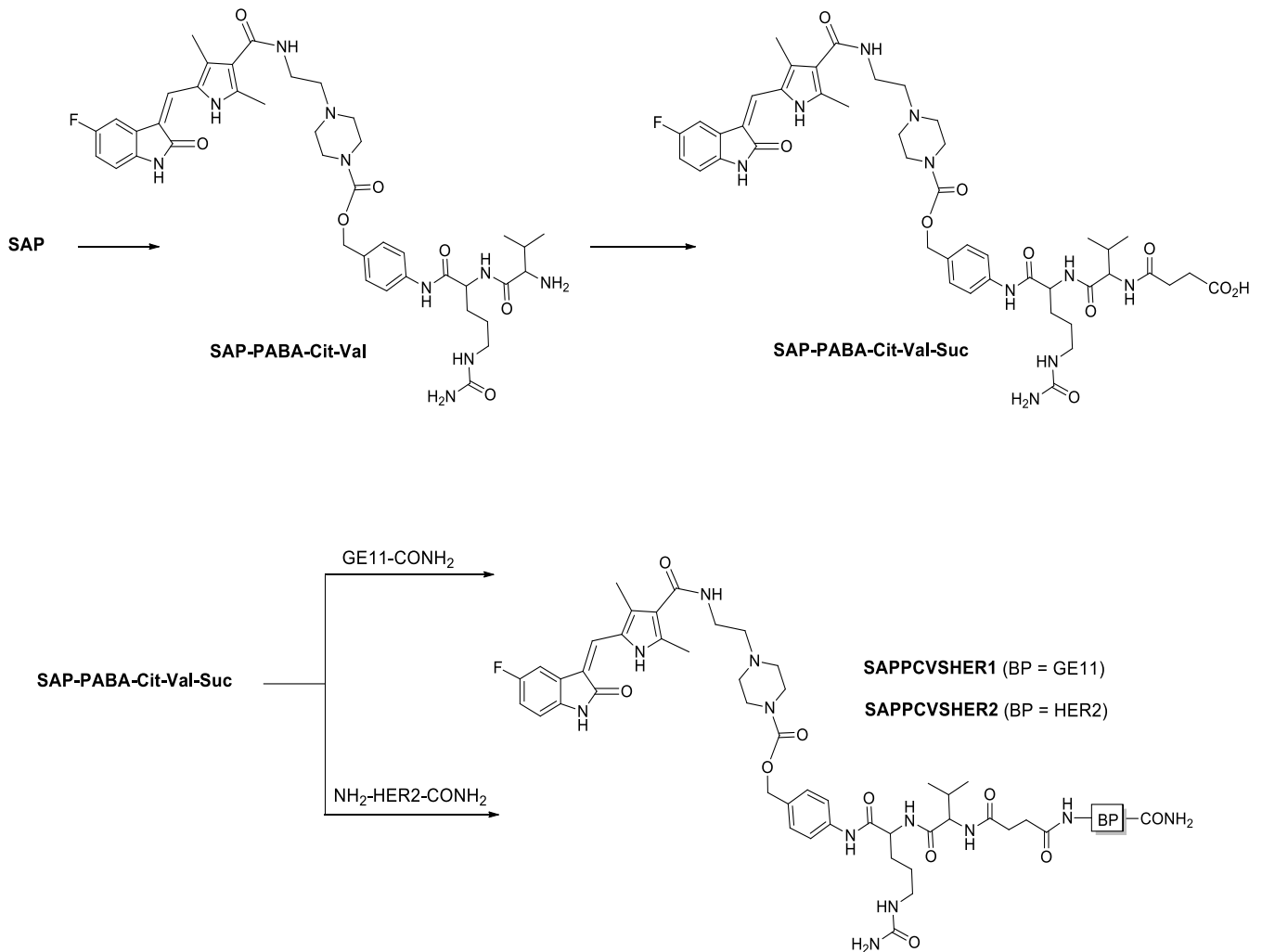
2.6 Στρατηγικές Σχεδιασμού Στοχευτικών Συζευγμάτων του SAP

Με την σύνθεση του SAP καταστρώθηκαν δυο στρατηγικές σύζευξης του με διασπώμενες γέφυρες. Κατά την πρώτη στρατηγική χρησιμοποιείται ο δισουλφιδικός δεσμός ως διασπώμενη γέφυρα για την απελευθέρωση του φαρμάκου. Στην πλειονότητα των πρωτεϊνών, ζεύγη κυστεϊνών σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους, γεφυρώνοντας διαφορετικά τμήματα μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή διαφορετικές αλυσίδες ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου σταθεροποιώντας έτσι τη δομή των πρωτεϊνών. Η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών είναι σημαντική για τις πρωτεΐνες που εκκρίνονται έξω από τα κύτταρα, καθώς εντός των κυττάρων το περιβάλλον είναι αναγωγικό με συνέπεια οι δισουλφιδικοί δεσμοί να μην είναι γενικά σταθεροί. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως διασπώμενη γέφυρα ο δισουλφιδικός δεσμός. Πιο συγκεκριμένα, με την είσοδο του συζεύγματος φαρμάκου-πεπτιδίου στο καρκινικό κύτταρο αναμένεται να προκληθεί αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού από την περίσσεια γλουταθειόνης που υπάρχει στα καρκινικά κύτταρα, πυροδοτώντας έτσι την απελευθέρωση του SAP. Συνεπώς, το δισουλφιδικό ανάλογο του SAPSSPy θα μπορούσε να προκύψει από το SAP το οποίο με τη σειρά του θα μπορούσε να δώσει πρόσβαση σε συζεύγματα τύπου **SAPSSHER1_1** κατόπιν αντίδρασης με το Cys-GE11. Εναλλακτικά η εισαγωγή ενός διαχωριστή όπως το μερκαπτοπροπανικό οξύ θα σχηματίσει το **SAPSSCOOH** το οποίο μπορεί να δώσει συζεύγματα τύπου **SAPSSHER1_2** και **SAPSSHER2_1** μέσω σύζευξης της καρβοξυλομάδας με το άμινο τελικό άκρο των αντίστοιχων στοχευτικών πεπτιδίων (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Στρατηγική σχεδιασμού συζευγμάτων μέσω δισουλφιδικής γέφυρας S-S

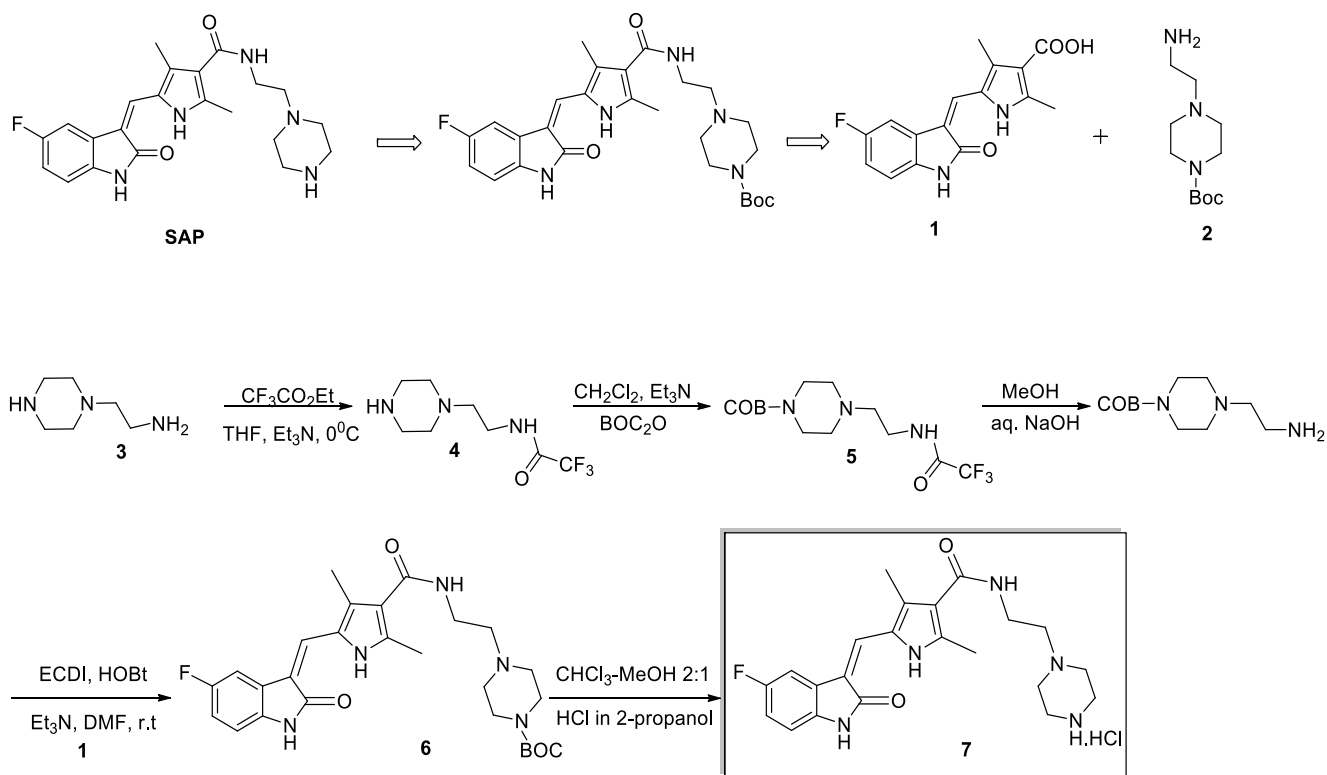
Κατά την δεύτερη στρατηγική θα επιχειρηθεί η σύζευξη του SAP με στοχευτικά πεπτίδια μέσω της διπεπτιδικής γέφυρας βαλίνης-κιτρουλίνης (Cit-Val) που αναμένεται να υδρολυθεί εκλεκτικά από το ένζυμο Καθεψίνη Β στα λυσοσώματα, πυροδοτώντας την απελευθέρωση του SAP μέσω μιας ενδιάμεσης αυτοκαταστροφικής ομάδας (self-immolating) όπως είναι η π-αμινοβενζυλική αλκοόλη (PABA). Για παράδειγμα η ένωση **SAP-PABA-Cit-Val** θα μπορούσε να προκύψει από το SAP. Εισαγωγή ενός διαχωριστή σουκκινικού οξέος **SAP-PABA-Cit-Val-Suc** θα μπορούσε να δώσει συζεύγματα του τύπου **SAPPCVSHER1**, **SAPPCVSHER2** μέσω αμιδικής σύζευξης της καρβοξυλομάδας με το άμινο τελικό άκρο των αντίστοιχων στοχευτικών πεπτιδίων (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Στρατηγική σχεδιασμού συζευγμάτων μέσω διπεπτιδικής γέφυρας Cit-Val (PABA: π-αμινοβενζυλική αλκοόλη, Cit: Κιτρουλίνη, Val: Βαλίνη)

2.6.1 Σύνθεση του SAP

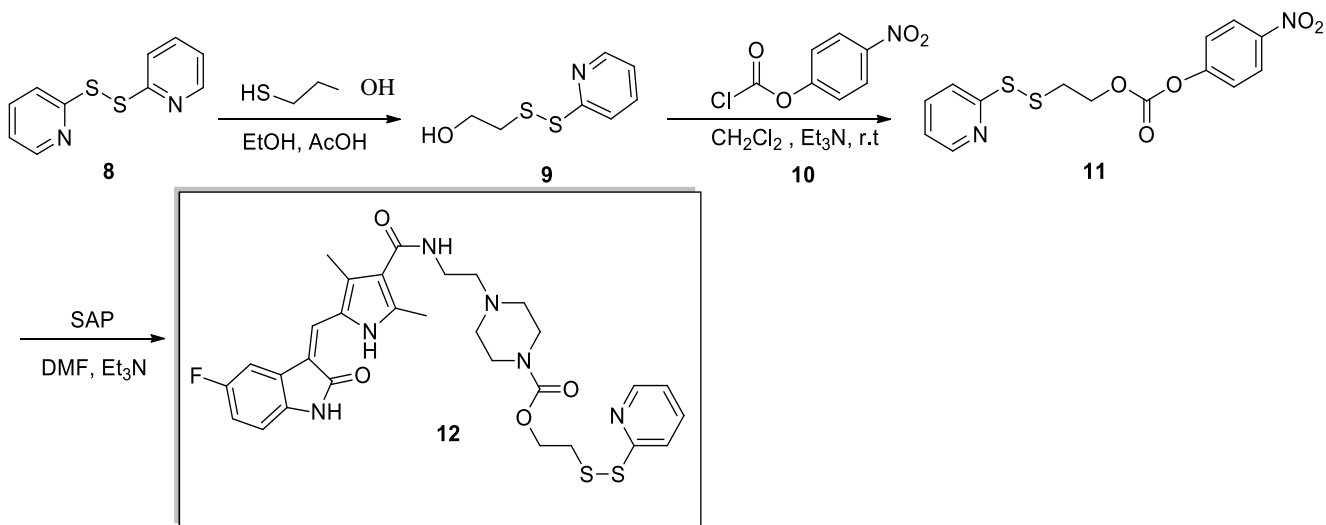
Υποθέσαμε ότι το SAP θα μπορούσε να προέλθει από την αποπροστασία της ένωσης **6**, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να σχηματιστεί από τη σύζευξη του εμπορικά διαθέσιμου καρβοξυλικού οξέος **1** και της πρωτοταγούς αμίνης **2**. Εκλεκτική προστασία της διαμίνης **3** με $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Et}$ έδωσε το τριφθοροακεταμίδιο **4** το οποίο στη συνέχεια μετατράπηκε στον καρβαμικό εστέρα **5** κατόπιν αντίδρασης με BOC_2O . Διάσπαση του τριφθοροακεταμιδίου υπό βασικές συνθήκες έδωσε την αμίνη **2** που στη συνέχεια συζεύχθηκε με το καρβοξυλικό οξύ **1**, παρουσία EDCI και HOBT, παράγοντας το αμίδιο **6**. Αποπροστασία της BOC ομάδας του αμιδίου **6** παρουσία HCl οδήγησε στην απομόνωση του υδροχλωρικού άλατος του SAP (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Σύνθεση του SAP.HCl

2.6.2 Σύνθεση Δισουλφιδικής Γέφυρας SAPSSPy

Η σύνθεση της δισουλφιδικής γέφυρας του SAP, δηλαδή του **SAPSSPy**, ξεκίνησε από το δισουλφίδιο **8** όπου με την προσθήκη της μερκαπτοαιθανόλης οδήγησε στο σχηματισμό της αλκοόλης **9**. Αντίδραση της αλκοόλης **9** με τον χλωροφορμικό εστέρα **10** παρήγαγε τον καρβονικό εστέρα **11** που στη συνέχεια μετατράπηκε στην επιθυμητή ένωση **SAPSSPy** κατόπιν αντίδρασης με SAP (Σχήμα 9).

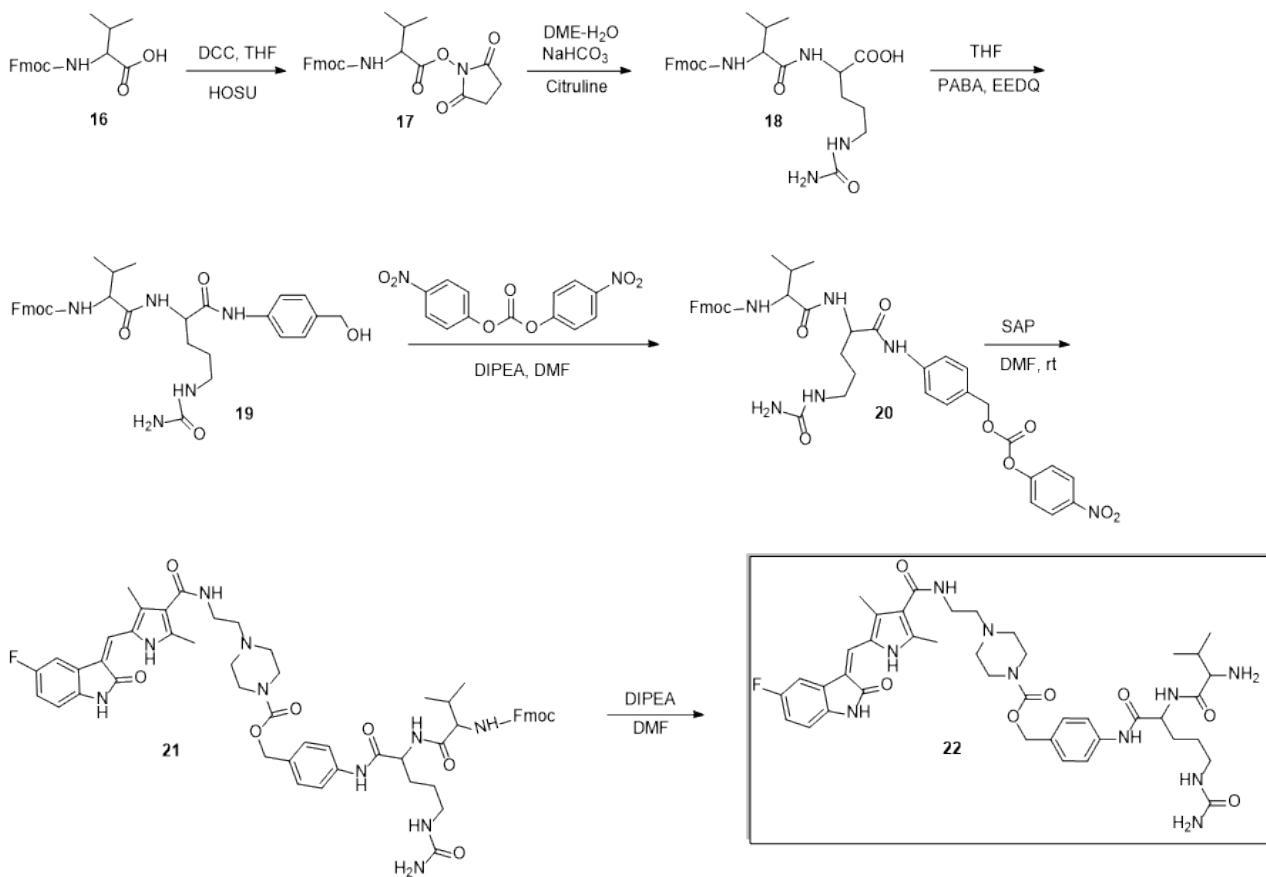


Σχήμα 9. Σύνθεση δισουλφιδικής γέφυρας **SAPSSPy**

2.6.3 Σύνθεση Διπεπτιδικής Γέφυρας Βαλίνης-Κιτροουλίνης

Κατά τη σύνθεση της δεύτερης στρατηγικής (Σχήμα 7) χρησιμοποιείται ως διασπώμενη γέφυρα το διπεπτίδιο βαλίνης-κιτροουλίνης. Οι συγκεκριμένοι συνδέτες με το διπεπτίδιο παρέχουν σταθερότητα στην κυκλοφορία του αίματος. Το SAP αναμένεται να απελευθερωθεί στα λυσοσώματα μέσω εκλεκτικής διάσπασης του δεσμού της κιτροουλίνης από την καθεψίνη. Για να επιβεβαιωθεί η υπόθεση μας προβήκαμε στη σύνθεση της πρότυπης ένωσης **21** στην οποία το SAP συνδέεται με το διπεπτίδιο Cit-Val μέσω ενός μορίου π-αμινοβενζυλικής αλκοόλης (PABA). Η σύζευξη της Fmoc-Βαλίνης με N-υδροξυ-σουκκινιμίδιο υπό την παρουσία δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου έδωσε τον ενεργοποιημένο εστέρα **17** όπου στη συνέχεια αντέδρασε με κιτροουλίνη παρουσία DME/NaHCO₃ παράγοντας το διπεπτίδιο **18**. Αντίδραση του διπεπτιδίου με PABA₂ παρουσία του εκλεκτικού αντιδραστήριου EEDQ, οδήγησε στην ένωση **19**. Η εκλεκτική ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων από το EEDQ παρουσία άλλων πυρηνοφίλων και η απουσία ρακεμοποίησης στο προϊόν προσφέρει πλεονεκτήματα έναντι άλλων γνωστών αντιδραστηρίων σύζευξης. Στη συνέχεια ακυλίωση της υδροξυλομάδας **19** παρουσία ανθρακικού δις-νιτροφαινυλίου οδήγησε στην ένωση **20** [49]. Αντίδραση του διακαρβονικού εστέρα **20** με την ελεύθερη βάση του SAP έδωσε την επιθυμητή πρότυπη

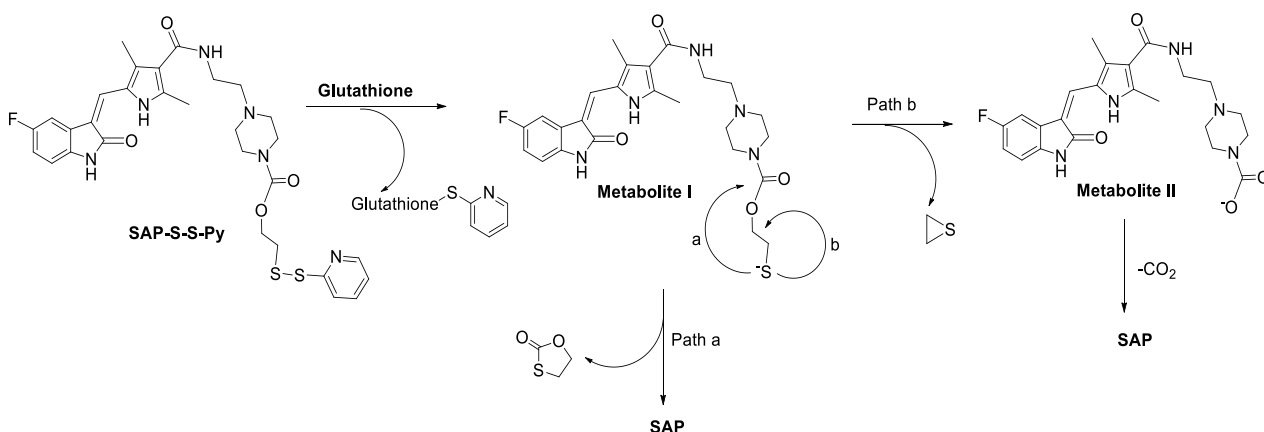
ένωση **21** που μετά από αποπροστασία της Fmoc ομάδας παράγγαγε την ένωση **22** (Σχήμα 10).



Σχήμα 10. Σύνθεση διπεπτιδικής γέφυρας SAP-PABA-Cit-Val

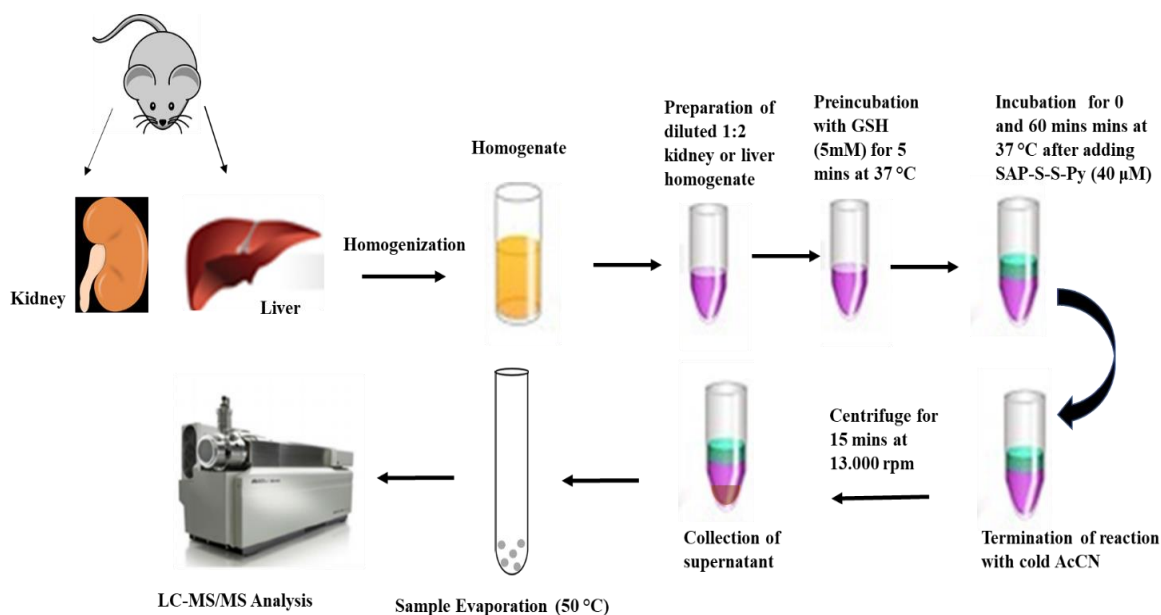
2.7 Μελέτη Απελευθέρωσης του SAP μέσω Δισουλφιδικής Γέφυρας

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο το οποίο αποτελείται από μόρια τριών διαφορετικών αμινοξέων: του γλουταμινικού οξέος, της κυστεΐνης και της γλυκίνης. Η γλουταθειόνη είναι μια θειόλη αλλά ταυτόχρονα και ένα δикаρβονικό οργανικό οξύ. Μετά την ανάπτυξη ενός όγκου, αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης μπορεί να δρουν προστατευτικά για τα καρκινικά κύτταρα, προσφέροντάς τους αντίσταση κατά των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων [50]. Ο μηχανισμός που πιθανώς να εμπλέκεται στην απελευθέρωση του SAP έχει ως εξής: η γλουταθειόνη η οποία στα καρκινικά κύτταρα βρίσκεται σε περρίσεια ανάγει τον δισουλφιδικό δεσμό του συζεύγματος μόλις αυτό εισέλθει στο καρκινικό κύτταρο και απελευθερώνεται η δραστική ουσία μέσω δυο πιθανών μονοπατιών: 1) του μονοπατιού a (path a) όπου μέσω του μεταβολίτη I απελευθερώνεται 1,3-οξαθειολαν-2-όνη και το SAP, και 2) του μονοπατιού b (path b) όπου ο μεταβολίτης I μπορεί να μετατραπεί στον μεταβολίτη II με απόσπαση επισουλφιδίου και στη συνέχεια διάσπαση του μεταβολίτη II στο SAP με απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα (Σχήμα 11).



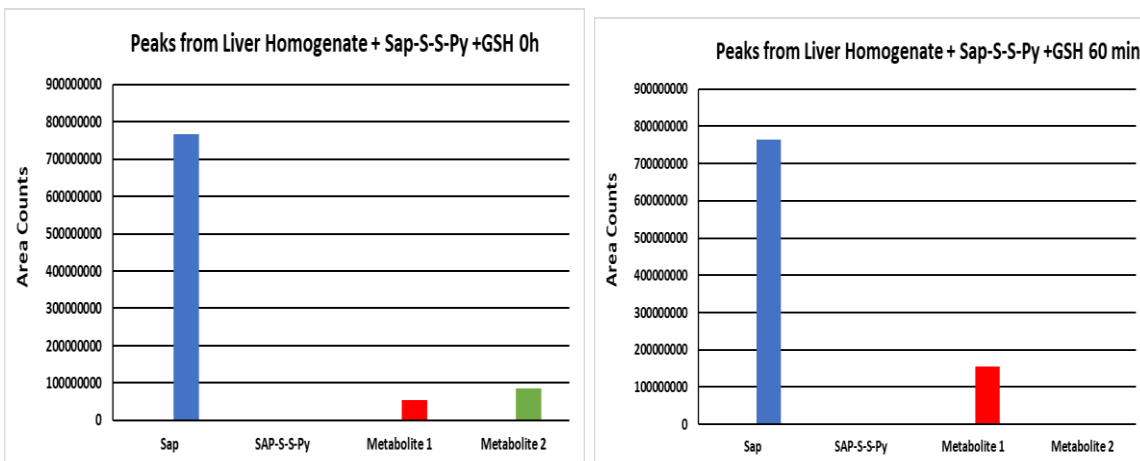
Σχήμα 11. Μηχανισμός απελευθέρωσης του SAP με διάσπαση δισουλφιδικού δεσμού από την γλουταθειόνη

Διεξήχθησαν βιολογικά πειράματα, με βάση τη μελέτη απελευθέρωσης του φαρμάκου SAP από την διασπώμενη γέφυρα, τα οποία οδήγησαν στην ανακάλυψη δυο πιθανών μεταβολιτών του SAP. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η γλουταθειόνη προωθεί το γρήγορο μεταβολισμό του SAP-S-S-Py σε SAP και ως εκ τούτου έχει ουσιαστικό ρόλο σε αυτόν τον μεταβολισμό επιβεβαιώνοντας έτσι την αρχική μας υπόθεση. Δείγματα ιστού από ήπαρ και νεφρούς ποντικού ελήφθησαν και ομογενοποιήθηκαν. Το ομογενοποιημένο μίγμα αραιώθηκε και ακολούθησε επώαση με 5mM γλουταθειόνης για 5 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση σε 0 και 60 λεπτά, με την εισαγωγή του δείγματος της ένωσης **13** (40 μM). Ακολούθησε τερματισμός της αντίδρασης με διαλύτη κρύο ακετονιτρίλιο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε 13.000 στροφές το λεπτό. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη στους 50°C, και ανάλυση στο LC-MS (Εικ.18).

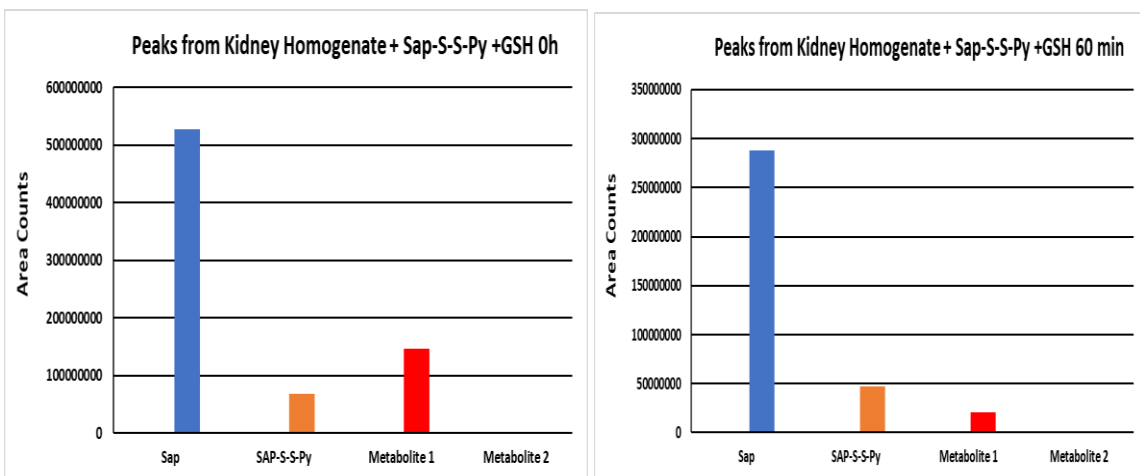


Εικόνα 18. Πειραματική πορεία επεξεργασίας δειγμάτων, για τον έλεγχο διάσπασης της δισουλφιδικής γέφυρας SAPSSPy

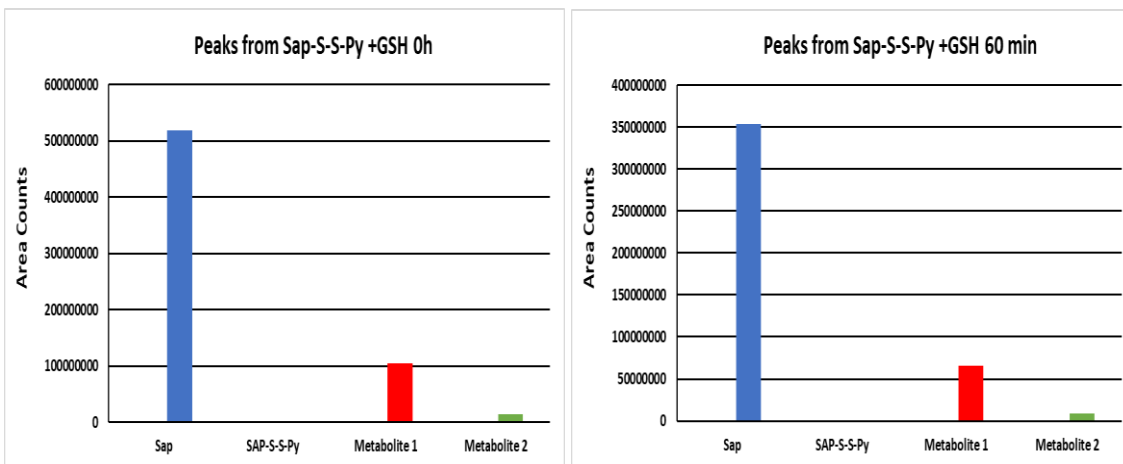
Από τα αποτελέσματα προκύπτει ο ταχύτερος μεταβολισμός του SAP-S-S-Py σε SAP όταν τα δείγματα επώάζονται σε ομογενοποιημένο ήπαρ με γλουταθειόνη (0 και 60 λεπτά) σε σύγκριση με ομογενοποιημένο νεφρό με γλουταθειόνη (0 και 60 λεπτά), όπου το SAP-S-S-Py είναι πιο σταθερό και μεταβολίζεται λιγότερο ταχέως σε SAP (Εικ.19, 20). Επίσης παρατηρήθηκε ταχέως μεταβολισμός του SAP-S-S-Py σε SAP όταν επώαστηκε με γλουταθειόνη σε ρυθμιστικό διάλυμα στα 0 και 60 λεπτά (Εικ.21). Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι το SAP-S-S-Py μεταβολίστηκε σε SAP λιγότερο γρήγορα μετά από επώαση σε ιστούς ήπατος και νεφρών χωρίς γλουταθειόνη στα 0 και 60 λεπτά (Εικ.22, 23). Το SAP-S-S-Py δεν μεταβολιζόταν σε SAP μετά από επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα στα 0 και 60 λεπτά (Εικ.24). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η γλουταθειόνη προωθεί το γρήγορο μεταβολισμό του SAP-S-S-Py σε SAP και ως εκ τούτου έχει ουσιαστικό ρόλο σε αυτόν τον μεταβολισμό. Απουσία γλουταθειόνης το SAP-S-S-Py είναι πιο σταθερό, καθώς μεταβολίζεται λιγότερο γρήγορα σε ιστούς ήπατος και νεφρών και δεν μεταβολίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα.



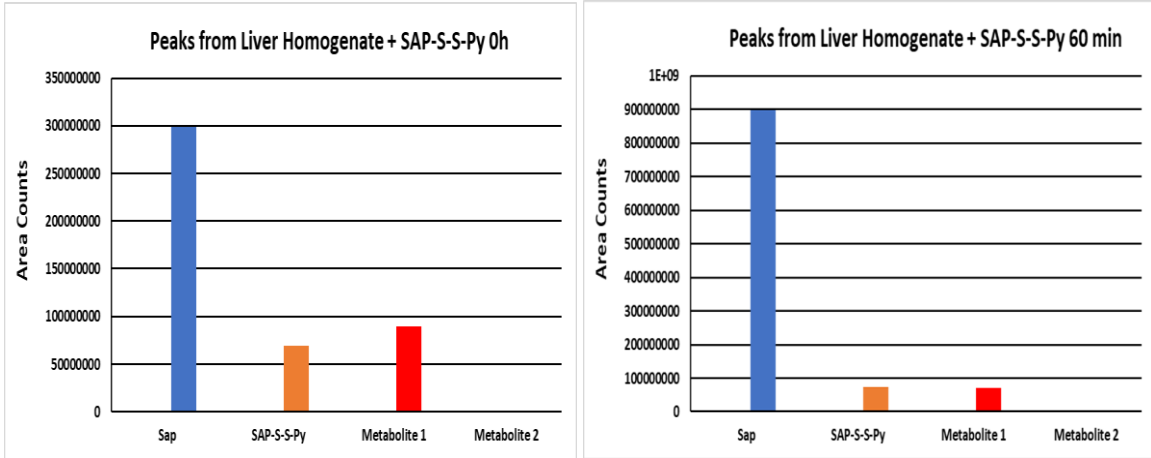
Εικόνα 19. Αποτελέσματα σε δείγμα από συκώτι ποντικού μετά από επώαση με γλουταθειόνη και την ένωση 12 (SAPSSPy) στα 0 και 60 λεπτά



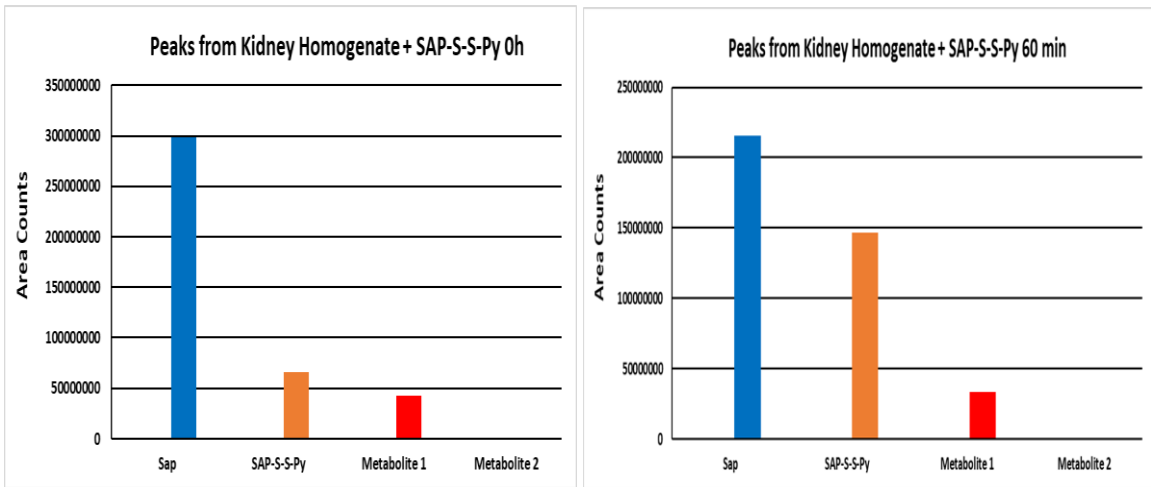
Εικόνα 20. Αποτελέσματα σε δείγμα από νεφρό ποντικού μετά από επώαση με γλουταθειόνη και την ένωση 12 στα 0 και 60 λεπτά



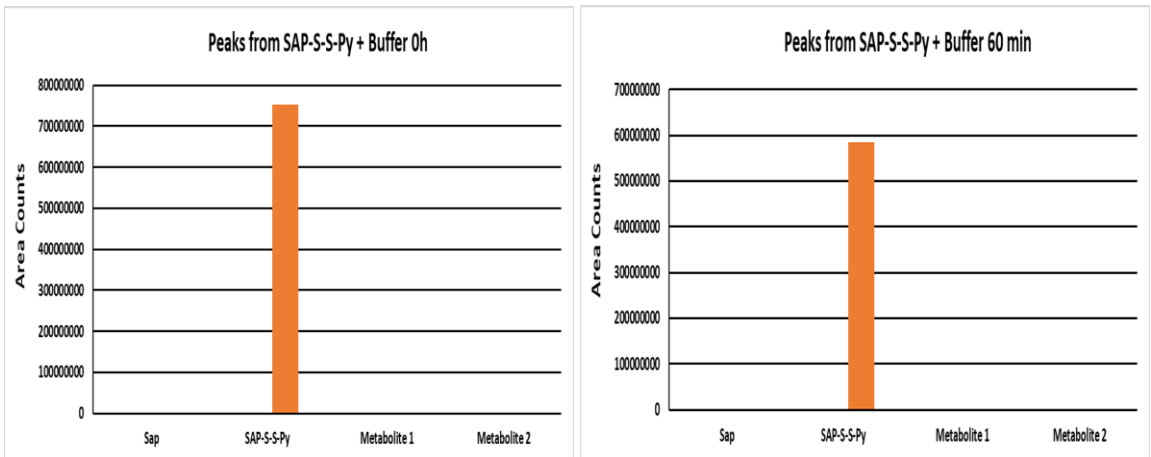
Εικόνα 21. Αποτελέσματα σε ρυθμιστικό διάλυμα μετά από επώαση με γλουταθειόνη και την ένωση 12 στα 0 και 60 λεπτά



Εικόνα 22. Αποτελέσματα από ομογενοποιημένο ιστό ποντικίσιου συκωτιού μετά από επώαση με την ένωση 12 στα 0 και 60 λεπτά



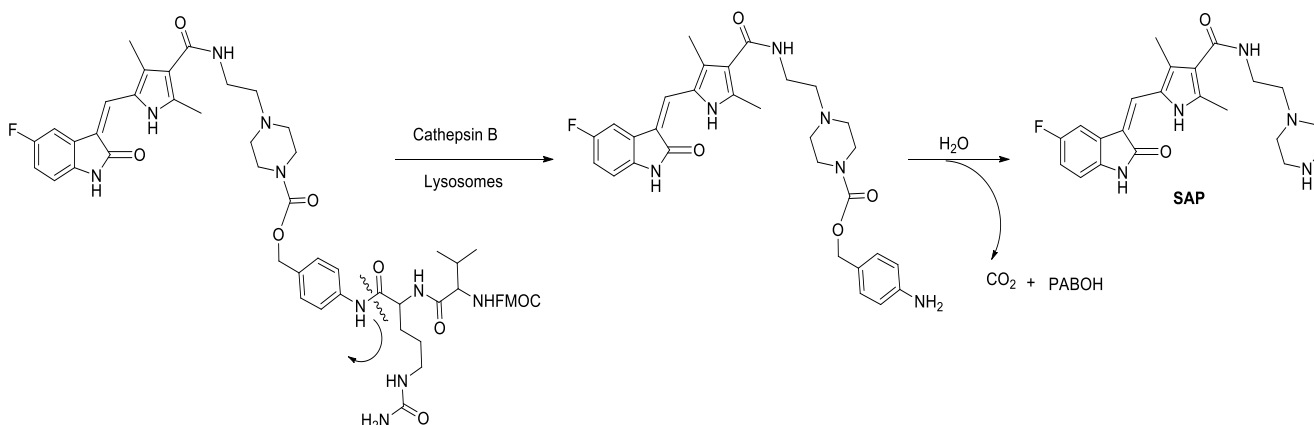
Εικόνα 23. Αποτελέσματα από ομογενοποιημένο ιστό ποντικίσιου νεφρού μετά από επώαση με την ένωση 12 στα 0 και 60 λεπτά



Εικόνα 24. Αποτελέσματα της ένωσης 12 σε ρυθμιστικό διάλυμα

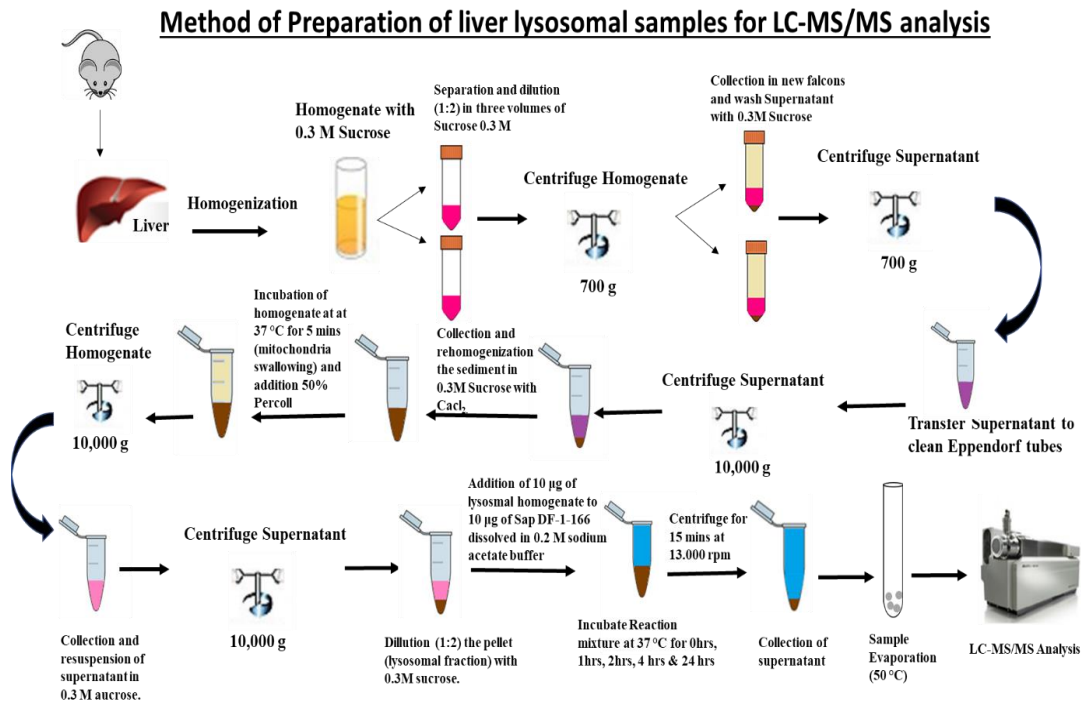
2.8 Μελέτη Απελευθέρωσης του SAP μέσω Διπεπτιδικής Γέφυρας Βαλίνης-Κιτροουλίνης

Οι συγκεκριμένοι συνδέτες με το διπεπτίδιο Βαλίνης-Κιτροουλίνης παρέχουν σταθερότητα στην κυκλοφορία του αίματος [51, 52]. Το SAP αναμένεται να απελευθερωθεί στα λυσοσώματα μέσω του παρακάτω μηχανισμού αφού το ένζυμο καθεψίνη Β θα σπάσει εκλεκτικά τον δεσμό της κιτροουλίνης και μέσω διάσπασης της ενδιάμεσου ανιλίνης θα απελευθερωθεί η δραστική ουσία, διοξείδιο του άνθρακα και π-άμινο βενζυλική αλκοόλη (Σχήμα 12).



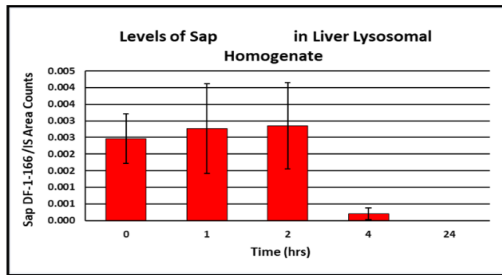
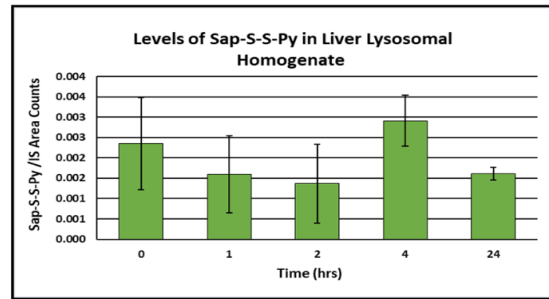
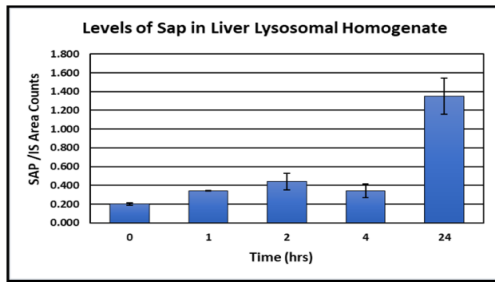
Σχήμα 12. Μηχανισμός απελευθέρωσης του SAP από ένα διπεπτίδιο Cit-Val μέσω ενός self-immolating linker

Για τη μελέτη απελευθέρωσης του φαρμάκου SAP με βάση τον παραπάνω μηχανισμό επιλέχθηκε η πρότυπη ένωση **21**. Δείγμα από ιστό συκωτιού ποντικού, ομογενοποιήθηκε και προστέθηκε σε αυτό διάλυμα σουκρόζης 0.3M. Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός και αραιώση των δειγμάτων. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και πλύθηκαν με 0.3M σουκρόζης. Επαναλήφθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρησης, και τα υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε καθαρά φιαλίδια. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, συλλογή και επαναομογενοποίηση του ιζήματος σε 0.3M σουκρόζης με την παρουσία χλωριούχου ασβεστίου. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 5 λεπτά και προσθήκη 50% Percoll. Έγινε φυγοκέντρηση, συλλογή του υπερκείμενου και προσθήκη 0.3M σουκρόζης. Επαναλήφθηκε φυγοκέντρηση, αραιώση με 0.3M σουκρόζης. Ακολούθησε προσθήκη 10μg λυσοσωμικού ομογενοποιημένου δείγματος σε 10 μg της ένωσης **21**, σε διαλύτη 0.2M οξικό νάτριο. Η αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 0, 1, 2, 4 και 24 ώρες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά σε 13.000 στροφές το λεπτό. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη στους 50°C, και ανάλυση στο LC-MS (Εικ.25).

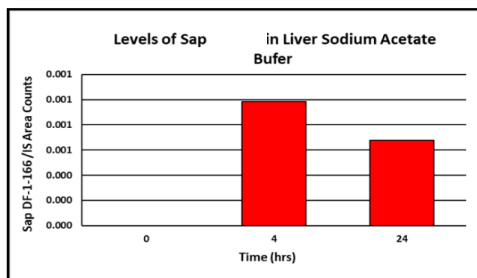
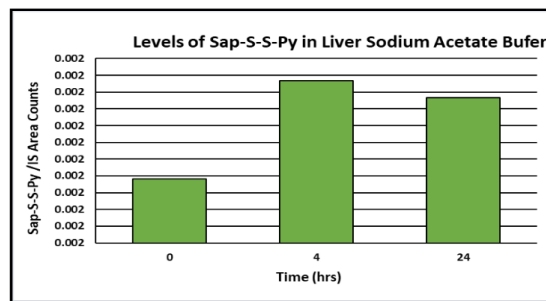
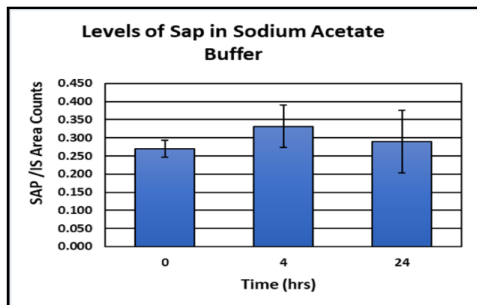


Εικόνα 25. Πειραματική πορεία επεξεργασίας δειγμάτων, για τον έλεγχο διάσπασης της διπεπτιδικής γέφυρας Fmoc-Val-Citruline-PABA-PNP-SAP

Από τα πειράματα που διεξήχθησαν προκύπτει ότι τα επίπεδα του SAP στα λυσοσώματα, μετά από επώαση του δείγματος σε ομοιογενές λυσοσώμα, αυξάνεται ταχέως. Υψηλότερα επίπεδα του SAP παρατηρήθηκαν μετά από επώαση 24 ωρών (Εικ.26). Το διπεπτίδιο Fmoc-Val-Citruline-PABA-PNP-SAP απελευθερώνει άμεσα SAP στα λυσοσώματα, και επίσης απελευθερώνει ταχέως SAP μετά από επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου (Εικ.27).



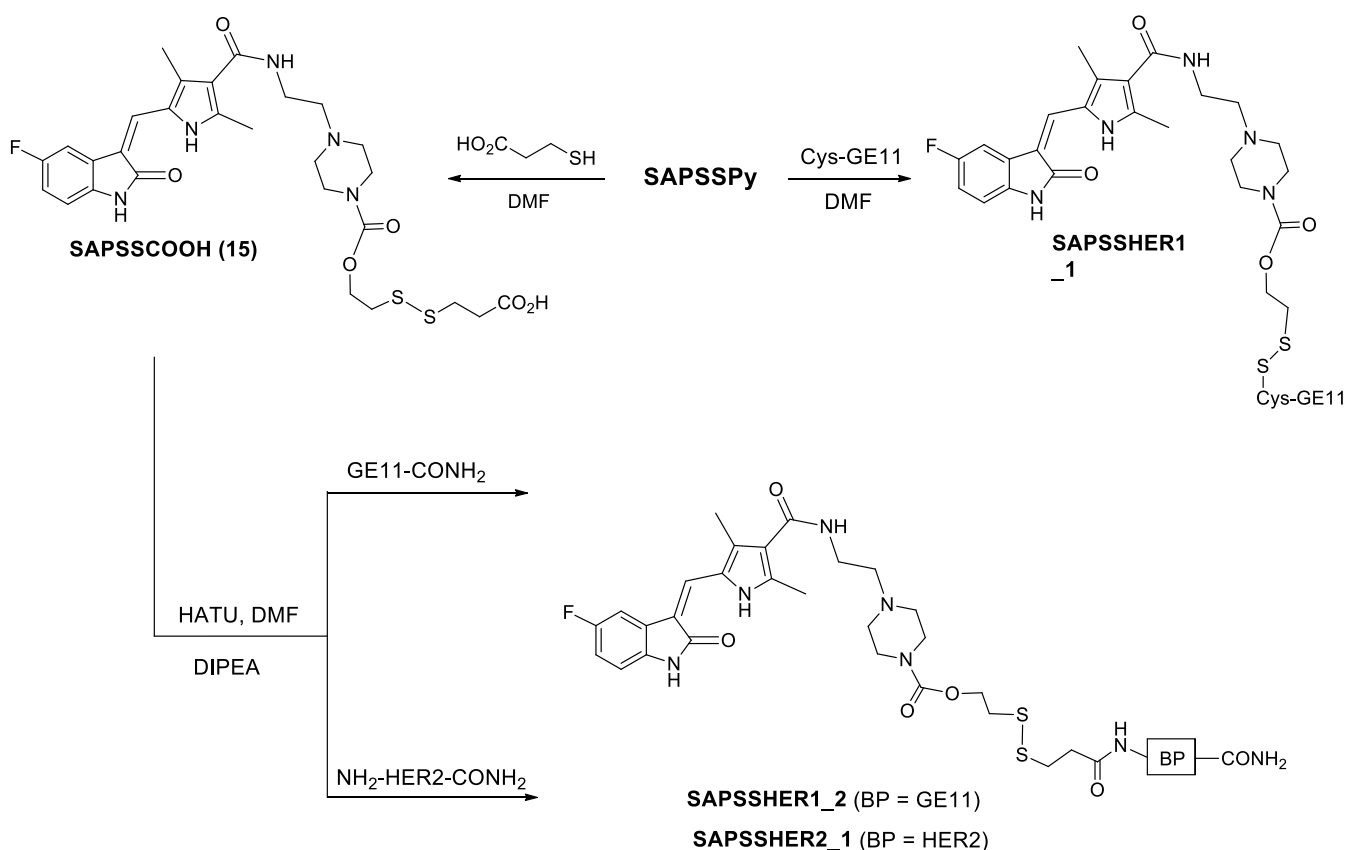
Εικόνα 26. Αποτελέσματα διάσπασης διπεπτιδικής γέφυρας **21** σε ομογενοποιημένο λυσσωσωμικό ποντικίσιο ιστό συκωτιού



Εικόνα 27. Αποτελέσματα διάσπασης διπεπτιδικής γέφυρας **21** σε ρυθμιστικό διάλυμα

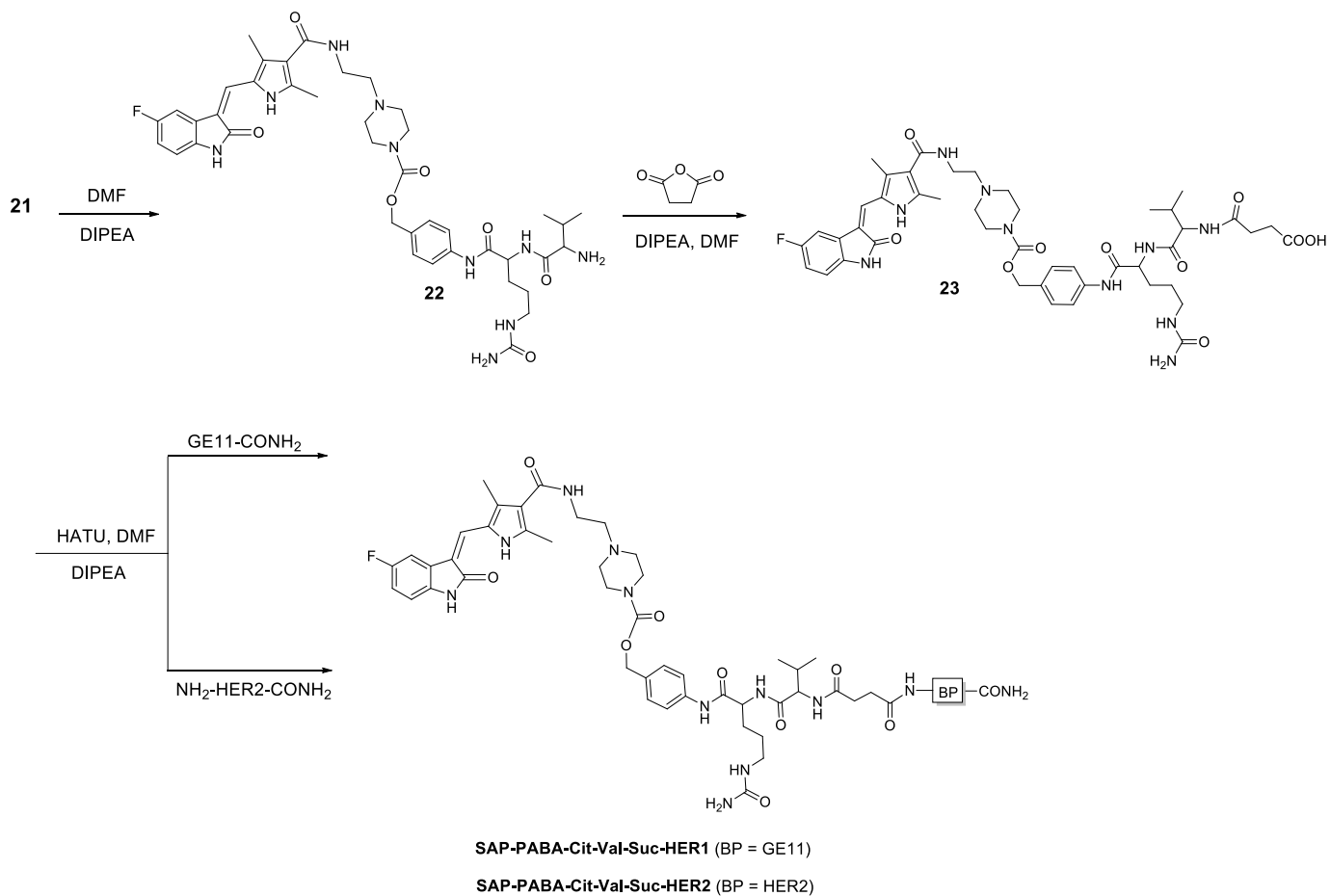
2.9.1 Σύνθεση Συζευγμάτων του SAP με Στοχευτικά Πεπτίδια

Με την επιβεβαίωση της αρχικής υπόθεσης από τις μελέτες απελευθέρωσης της φαρμακοφόρου ουσίας SAP από τα συζεύγματα μέσω των βιοδιασπώμενων γεφυρών προχωρήσαμε στην σύνθεση των τελικών συζευγμάτων. Αντίδραση της ένωσης **12** υπό συνθήκες DMF με το στοχευτικό πεπτίδιο Cys-GE11 (HER1-BP1) έδωσε το στοχευτικό σύζευγμα SAPSSHER1. Εναλλακτικά, προσθήκη του μερκαπτοπροπανοϊκού οξέος ως διαχωριστή έδωσε το καρβοξυλικό οξύ SAPSSCOOH το οποίο στη συνέχεια συζεύχθηκε παρουσία HATU με τα αντίστοιχα στοχευτικά πεπτίδια δίνοντας τα τελικά συζεύγματα SAPSSHER1_2 και SAPSSHER2_1 (Σχήμα 13).



Σχήμα 13. Σύνθεση συζευγμάτων του SAP με δισουλφιδική γέφυρα

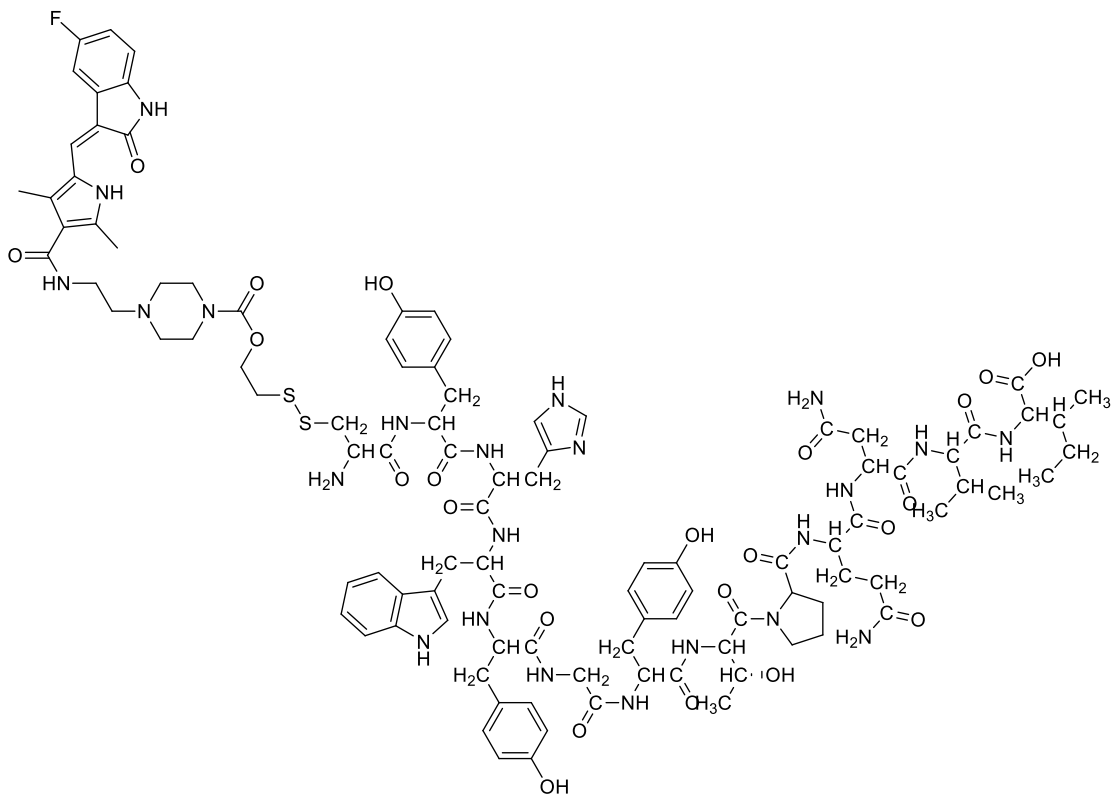
Αποπροστασία της Fmoc ομάδας της ένωσης **21** έδωσε την αμίνη **22** που κατόπιν ακυλίωσης με σουκκινικό ανυδρίτη παρήγαγε το οξύ **23**. Σύζευξη της καρβοξυλομάδας με τα αμινο τελικά άκρα των στοχευτικών πεπτιδίων παρουσία HATU έδωσε τα αντίστοιχα συζεύγματα SAP-PABA-Cit-Val-Suc-HER1 και SAP-PABA-Cit-Val-Suc-HER1 (Σχήμα 14).



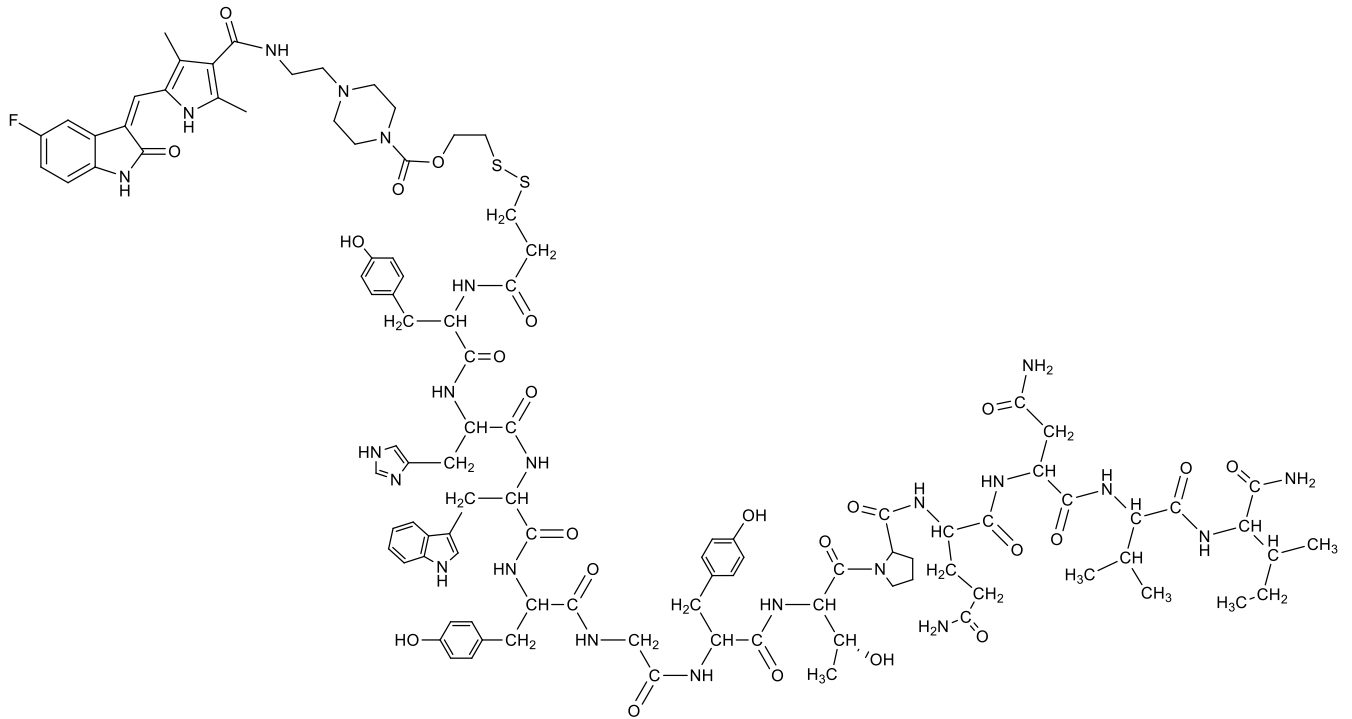
Σχήμα 14. Σύνθεση συζευγμάτων του SAP με διπεπτιδική γέφυρα Βαλίνης-Κιτρουλίνης

2.9.2 Δομή Τελικών Συζευγμάτων

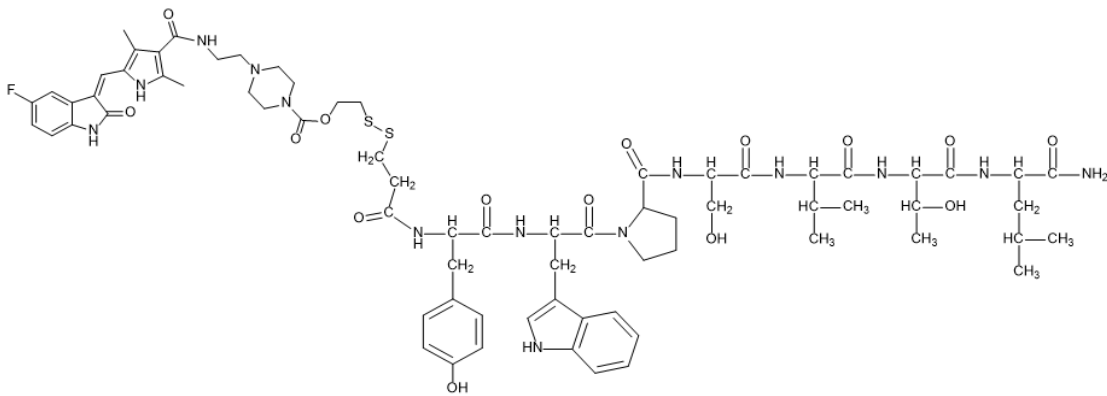
1 . Σύζευγμα SAPSSHER1_1



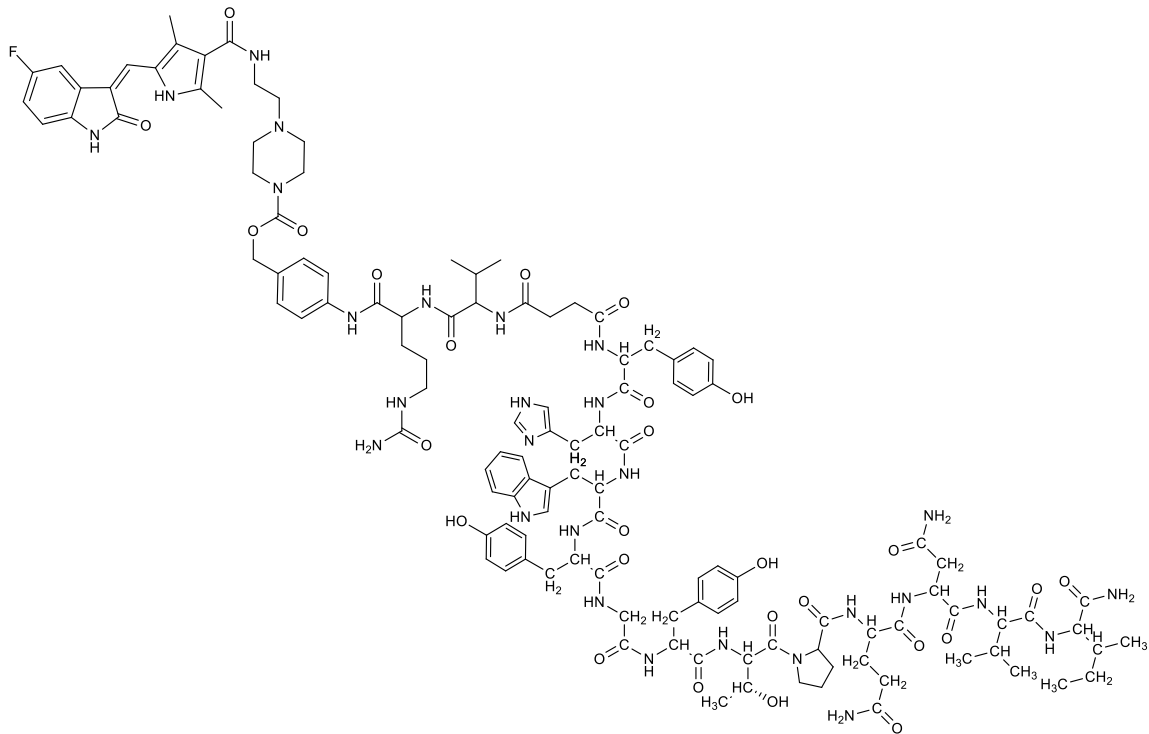
2. Σύζευγμα SAPSSHER1_2



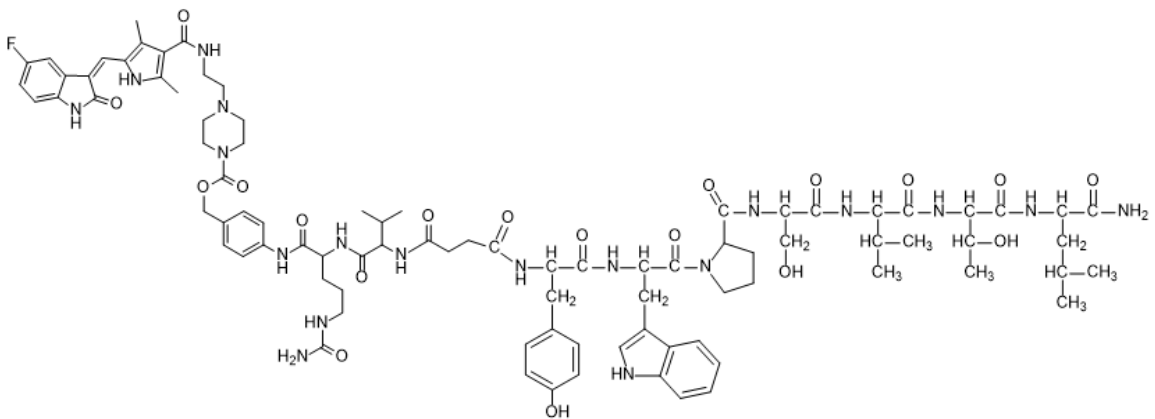
3. Σύζευγμα SAPSSHER2_1



4. Σύζευγμα SAPPCVSHER1



5. Σύζευγμα SAPPVSHER2



3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γενικές Πειραματικές Μέθοδοι: Τα αντιδραστήρια προμηθεύθηκαν από τις εταιρίες Fluorochem, Sigma-Aldrich και Alfa. Όλες οι εμπορικά διαθέσιμες χημικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τετραϋδροφουράνιο (THF), διαιθυλαιθέρας (Et₂O), διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), ακετονιτρίλιο (CH₃CN), διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) αγοράστηκαν σε άνυδρη μορφή και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα ευαίσθητα σε αέρα και υγρασία υγρά μεταφέρθηκαν με σύριγγα. Τα οργανικά διαλύματα συμπυκνώθηκαν με περιστροφική εξάτμιση στους 40-50 °C. Διεξήχθη χρωματογραφία στήλης flash με síλικά γέλη 60 (230-400 mesh) όπως περιγράφεται από τους Still et al. εξήχθη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες 60 F254 που είχαν επικαλυφθεί με síλικά γέλη 60 και το χρησιμοποιούμενο έκλουσμα αναφέρθηκε σε παρένθεση. Οι πλάκες TLC απεικονίστηκαν με έκθεση σε υπεριώδες φως (UV). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ¹H NMR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance FT-NMR 400 ή 500 MHz. Οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε ppm σε σχέση με το σήμα διαλύτη. Η πολλαπλότητα υποδεικνύεται με s (απλή), d (διπλή), t (τριπλή), q (τετραπλή), m (πολλαπλή), br. (ευρεία), dd (διπλή από δυάδες) και ddd (διπλό ζεύγους διπλών). Τα φάσματα μάζας ESI (ιονισμού ηλεκτροψεκασμού) καταγράφηκαν με ένα όργανο LC / MSD της σειράς Agilent 1100 Series. Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης ελήφθησαν υπό συνθήκες ιονισμού ηλεκτροψεκασμού με φασματόμετρο μάζας Thermo Scientific LC-MS / τετραπολικό μάζα γραμμικής παγίδας (LTQ) -Orbitrap. Τα συζεύγματα εγχύθηκαν σε αναλυτική στήλη χρωματογραφίας για ποιοτικό έλεγχο (Analytical HPLC Agilent 1200 series χρωματογραφικό σύστημα εφοδιασμένο με 20 μL εγχυτήρα δείγματος χρησιμοποιώντας στήλη Agilent Eclipse XBD-C18 (15 cm × 4.6 mm, 5 μm μέγεθος σωματιδίων). Οι κορυφές που αντιπροσωπεύουν τους αναλύτες στόχους αναγνωρίστηκαν τόσο από τον χρόνο κατακράτησης όσο και από το πρότυπο φάσματος τους που καταγράφηκε σε ανιχνευτή Diode Array που δουλεύει με το λογισμικό χρωματογραφίας Agilent ChemStation. Το σύστημα διαλυτών αποτελείται από δύο συστατικά, A (0.1% TFA σε νερό) και B (0.1% TFA σε Ακετονιτρίλιο). Τα δείγματα διαλύθηκαν σε 4:1 (0.1% TFA σε νερό/0.1% TFA σε Ακετονιτρίλιο). Στη συνέχεια τον ποιοτικό έλεγχο ακολούθησε ο καθαρισμός με ημι-παρασκευαστική χρωματογραφία στήλης Fenomenex 250x10 με το ίδιο σύστημα διαλυτών όπως στην αναλυτική χρωματογραφία.

Λίστα Συντομογραφιών

BOC	tert-butoxycarbonyl
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
PABA	4-Aminobenzyl alcohol
PNP	p-nitrophenyl
Val	Valine
Cit	Citruline
EEDQ	<i>N</i> -Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline
HOSU	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
EDCI	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
HOBT	Hydroxybenzotriazole
DIPEA	<i>N, N</i> -Diisopropylethylamine
Et ₃ N	Triethylamine
DMF	Dimethylformamide
DCM	Dichloromethane
Hex	Hexane
EtOAc	Ethyl Acetate
MeOH	Methanol
DMSO	Dimethyl sulfoxide
CDCl ₃	Chloroform-d
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
DCC	<i>N, N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DME	Dimethoxyethane
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>] pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
THF	Tetrahydrofuran
Na ₂ SO ₄	Sodium Sulfate Anhydrous
Et ₂ O	Dimethyl ether

3.1 Σύνθεση του SAP.HCl

SAP-Boc (6). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν το αρχικό Sunitinib οξύ **1** (1 g, 3.33 mmol) και η διάμμινοπιπεραζίνη **2** (1.53 g, 2 equiv) σε 40 mL DMF. Στην αντίδραση προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια EDCI (1.03 g, 2 equiv), HoBt (1.020 g, 2 equiv), και τέλος έγινε η προσθήκη της βάσης NEt_3 (1.39 mL, 3 equiv) και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης με TLC σε (1:2) Acetone/DCM. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη σε αντλία υψηλού κενού και στη συνέχεια ακολούθησε εκχύλιση με EtOAc-MeOH. Η οργανική φάση πλύθηκε με νερό, ξηράνθηκε, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε για να δώσει ένα πορτοκαλί στερεό (80%). $^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ 1.39 (11 H, m), 2.45 (15 H, m), 6.84 (2 H, m), 7.49 (1 H, t), 7.75 (2 H, t), 10.88 (1 H, s), 13.66 (1 H, s).

SAP.HCl (7). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε το SAP-Boc (350 mg, 0.68 mmol) σε (1:1) CHCl_3 : MeOH, και 4M HCl σε διοξάνη (1.7 mL, 10 equiv). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε επαναροή στους 65°C για 4 ώρες. Ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης με TLC σε (1:0.5:0.5) DCM/ Acetone/MeOH οπότε και ακολούθησε διήθηση, πλύση με CHCl_3 για παραλαβή κίτρινου στερεού (75%). $^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ 2.54 (21 H, m), 3.36 (8 H, m), 3.52 (4 H, m), 3.68 (4 H, m), 6.97 (2 H, m), 7.28 (2 H, t), 7.94 (1 H, s), 9.76 (2 H, s), 10.98 (1 H, s), 13.77 (1 H, s).

3.2.1 Σύνθεση Γέφυρας SAPSSPy

Αλκοόλη (9). Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει το μέρκαπτο προπανοϊκό οξύ (0.5 g, 6.4 mmol), προστέθηκε το δισουλφίδιο **8** (2.1 g, 1.5 equiv) ως διάλυμα σε EtOH (10 mL), ακολούθησε προσθήκη του MeCOOH (0.25 mL) και EtOAc (6 mL) υπό συνθήκες αργού και η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight. Ελέγχθηκε η αντίδραση με TLC σε αναλογία (1:1) EtOAc/Hex. Ακολούθησε συμπύκνωση στον περιστροφικό εξατμιστή, εκχύλιση με EtOAc και νερό. Η οργανική φάση ξαναεκχυλίστηκε με νερό και NaOH. Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na_2SO_4 και διήθηση. Το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού, και στη συνέχεια έγινε καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε αναλογία (1:4) EtOAc/Hex για την παραλαβή ενός πορτοκαλόχρωμου λαδιού (70%). $^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ 2.93 (2 H, t), 3.79 (2 H, t), 7.13 (1 H, t), 7.40 (1 H, d), 7.57 (1 H, t), 8.48 (1 H, d).

Καρβονικός εστέρας (11). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η αλκοόλη **9** (590 mg, 3.15 mmol), Et_3N (1.3 mL, 3 equiv), και η ένωση **10** (852.4 mg, 1.5 equiv) σε CH_2Cl_2 (8 mL), η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου overnight. Ελέγχθηκε με TLC σε αναλογία (2:1) Hex/EtOAc. Στη συνέχεια ακολούθησε συμπύκνωση υπό κενό και εκχύλιση με EtOAc και νερό. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και διηθήθηκε. Το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστή και ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης σε αναλογία (8:1)

Hex/EtOAc. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 3.16 (2 H, t), 4.57 (2 H, t), 7.13 (1 H, t), 7.39 (2 H, d), 7.65 (2 H, m), 8.30 (2 H, d), 8.49 (1 H, d).

SAPSSPy (12). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε το SAP.HCl **7** (150 mg, 0.334 mmol), Et_3N (139 μL , 3 equiv), και ο καρβονικός εστέρας **11** (130 mg, 1.1 equiv) σε διάλυμα DMF (10 mL), η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου 2 μέρες. Ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης με TLC σε αναλογία (10:1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Στη συνέχεια έγινε απομάκρυνση του διαλύτη στην αντλία ελαίου. Ακολούθησε πλύση με νερό και NaHCO_3 και αφέθηκε το διάλυμα υπό ανάδευση μια ώρα. Στη συνέχεια διηθήθηκε, και το στερεό πλύθηκε με αιθέρα και ξηράθηκε στην αντλία ελαίου (75%). $^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ 2.51 (11 H, m), 3.10 (3 H, t), 4.23 (2 H, t), 6.93 (2 H, m), 7.27 (1 H, t), 7.50 (1 H, t), 7.76 (4 H, m), 8.47 (1 H, d), 10.89 (1 H, s), 13.68 (1 H, s).

Sap-S-S-COOH (15). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **12** (7 mg, 0.0112 mmol) και μέρκαπτο-προπιονικό οξύ (1.2 mg, 1 equiv) σε διάλυμα DMF (1 mL). Η αντίδραση αφέθηκε overnight και ελέγχθηκε με TLC. Απομακρύνθηκε ο διαλύτης στην αντλία κενού και ακολούθησαν πλύσεις με Et_2O . Στη συνέχεια η ουσία εκχυλίστηκε με EtOAc-MeOH, και ως υδατική φάση NaOH. Η υδατική φάση οξινίστηκε έως pH =4. Εκχυλίστηκε με EtOAc και η οργανική φάση συλλέχθηκε και ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 . Ακολούθησε διήθηση και συμπύκνωση του διηθήματος στον περιστροφικό εξατμιστή μέχρι ξηρού. $^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ 2.43 (6 H, m), 2.51 (3 H, m), 2.61 (3 H, m), 2.87 (2 H, d), 6.93 (1 H, m), 6.93 (1 H, m), 7.41 (1 H, m), 7.52 (1 H, m), 7.72 (1 H, m), 10.92 (1 H, s), 13.68 (1 H, s).

3.2.2 Σύνθεση Γέφυρας Fmoc-Valine-Citruline-PABA-PNP

Fmoc-Val-OSu (17). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η προστατευμένη με Fmoc ομάδα βαλίνη **16** (1 g, 0.0029 mmol) και HOSU (0.35 g, 1.05 equiv) σε διάλυμα THF (10 mL). Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλιντρο, προστέθηκε το DCC (0.618 g, 1.05 equiv) και αφέθηκε υπό ανάδευση στους 0°C για 20 λεπτά. Το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το στερεό DCU παραπροϊόν διηθήθηκε και πλύθηκε με THF. Το διήθημα συμπυκνώθηκε στον περιστροφικό εξατμιστή και έδωσε τον σουκινινικό έστερα **17** ως ένα διάφανο τζελ.

Fmoc-Val-Citruline (18). Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει κιτροουλίνη (0.53 g, 0.0030 mmol) και NaHCO_3 (0.25 g, 1.05 equiv) σε νερό (10 mL) προστέθηκε ο σουκινινικός έστερας **17** (0.97 g, 0.0029 mol) ως διάλυμα σε DME (10 mL) και THF (4 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε εκχύλιση με κιτρικό οξύ 10% w/v (50 mL) και 10% 2-προπανόλη σε EtOAc. Παρατηρήθηκε η δημιουργία λευκού ιζήματος το οποίο βρίσκεται στην υδατική φάση. Η οργανική φάση πλύθηκε με νερό και aq.NaCl, ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε δίνοντας το διπεπτίδιο **18** ως ένα λευκό στερεό. Στη συνέχεια, πλύση

του λευκού στερεού με με Et₂O, διήθηση και ξηράνση στην αντλία ελαίου έδωσε το διπεπτίδιο **18** (65%).

Fmoc-Val-Citruline-PABA (19). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε το προστατευμένο διπεπτίδιο βαλίνη-κιτροουλίνη **18** (200 mg, 0.4028 mmol), PABA (74 mg, 1.5 equiv) και EEDQ (149 mg, 1.5 equiv) σε διάλυμα THF (3 mL). Αφέθηκε η αντίδραση υπό ανάδευση για 2 μέρες. Ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης με TLC σε (1:2) EtOAc/Hex. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε ο διαλύτης στον περιστροφικό εξατμιστή και το στερεό τοποθετήθηκε για 5 λεπτά σε λουτρό υπερήχων με διαιθυλαιθέρα. Αφέθηκε το διάλυμα να ηρεμήσει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε διήθηση και πλύση με αιθέρα. Και χρησιμοποιήθηκε στην παρακάτω αντίδραση ως μίγμα (65%).

Fmoc-Val-Citruline-PABA-PNP (20). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **19** (20 mg, 0.0332 mmol), PNP carbonate (20.2 mg, 2 equiv), DIPEA (12 μL, 2 equiv) σε διάλυμα DMF (1 mL). Η αντίδραση αφέθηκε 5 ώρες υπό ανάδευση. Ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης με TLC σε (9:1) CH₂Cl₂/MeOH. Ακολούθησε εκχύλιση με 10% 2-προπανόλη σε EtOAc και κιτρικό οξύ 10 % ως υδατική. Η οργανική φάση πλύθηκε με NaHCO₃ και τέλος με διάλυμα NaCl. Στη συνέχεια ακολούθησε ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄, διήθηση και το διήθημα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού για παραλαβή ενός μεζ φιλμ το οποίο καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε αναλογία (20:1) CH₂Cl₂/MeOH μέχρι (12:1).

Fmoc-Val-Citruline-PABA-SAP (21). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε SAP ως ελεύθερη βάση (28.3 mg, 0.0987 mmol) και η ένωση **20** (53 mg, 1 equiv) σε διάλυμα DMF (3.5 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight. Ελέγχθηκε η αντίδραση με TLC σε (9:1) CH₂Cl₂/MeOH. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε ο διαλύτης στην αντλία ελαίου για την παραλαβή ενός αδιάλυτου σε CH₂Cl₂/MeOH πορτοκαλόχρωμου στερεού. Ακολούθησε πλύση με CH₂Cl₂ και στη συνέχεια με Et₂O. Χρησιμοποιήθηκε στην παρακάτω αντίδραση ως μίγμα.

Val-Citruline-PABA-SAP (22). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **21** (10 mg, 0.0096 mmol) και DIPEA (8.4 μL, 5 equiv) σε διάλυμα DMF (1 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight. Ελέγχθηκε η αντίδραση με TLC σε (9:1) CH₂Cl₂/MeOH. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε ο διαλύτης στην αντλία ελαίου και ακολούθησαν πλύσεις με Et₂O, με CH₂Cl₂ και με EtOAc. Χρησιμοποιήθηκε στην παρακάτω αντίδραση ως μίγμα.

Succ-Val-Citruline-PABA-SAP (23). Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **22** (20 mg, 0.0068 mmol), σουκινικός ανυδρίτης (2.72 mg, 4 equiv) και DIPEA (4.73 μL, 4 equiv) σε διάλυμα DMF (1 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight. Ελέγχθηκε η αντίδραση με TLC σε (9:1) CH₂Cl₂/MeOH. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε ο διαλύτης στην αντλία ελαίου και ακολούθησε πλύση με Et₂O, EtOAc και ξηράνθηκε στην αντλία ελαίου.

3.3 Σύνθεση Τελικών Συζευγμάτων

SAPSSHER1_1. Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **12** (2.5 mg, 0.00400 mmol) και το πεπτίδιο Cys-HER-1 (**A**) (6.58 mg, 1 equiv) σε διάλυμα DMF (700 μ L). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight και ελέγχθηκε με TLC σε αναλογία (9:1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Απομακρύνθηκε ο διαλύτης σε αντλία ελαίου και λήφθηκε ένα υπόλειμμα, το οποίο πλύθηκε αρχικά με Et_2O και στη συνέχεια με $\text{EtOAc}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Ακολούθησε καθαρισμός του συζεύγματος με χρωματογραφία HPLC και μετά από λυοφιλοποίηση του τελικού δείγματος συλλέχθηκε ένα κίτρινο στερεό το οποίο έχει σταλεί για βιολογικές μελέτες.

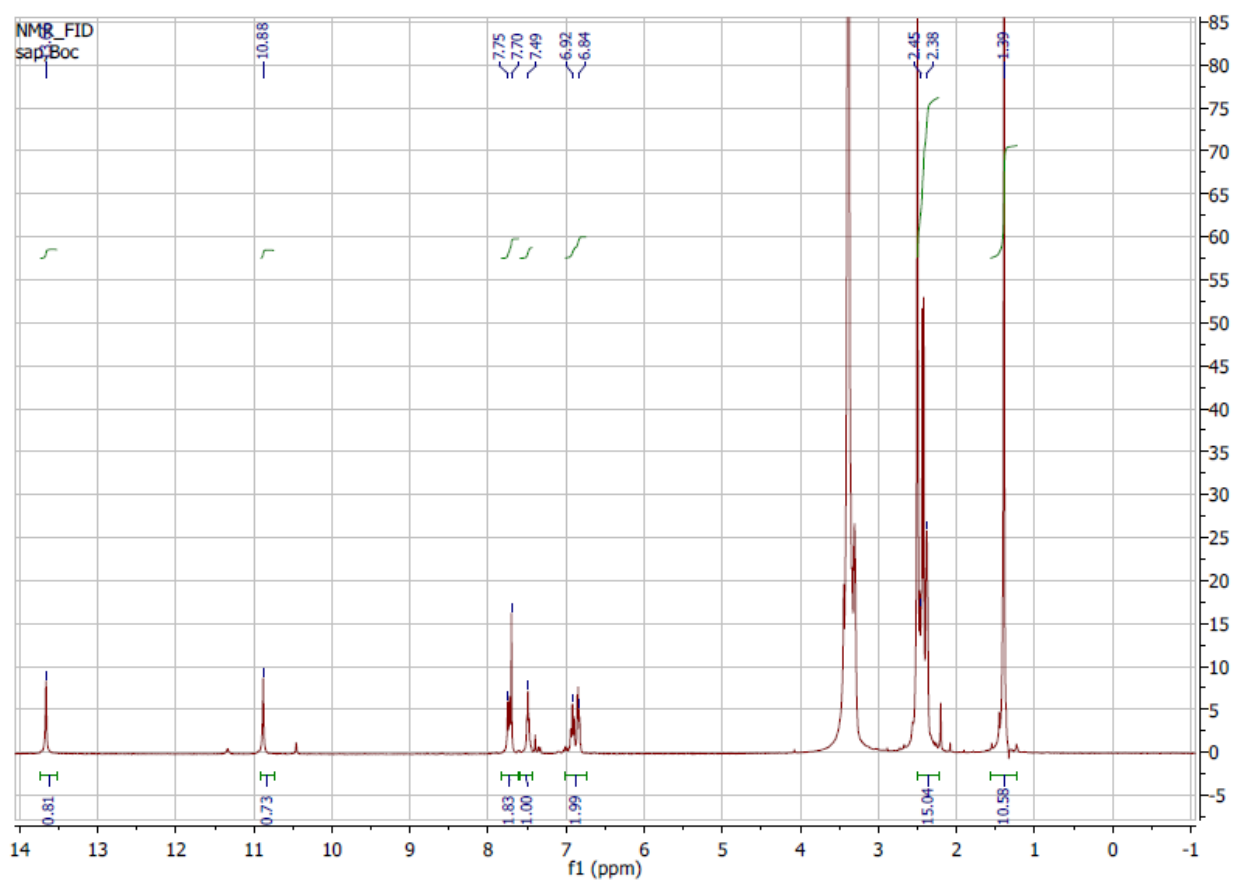
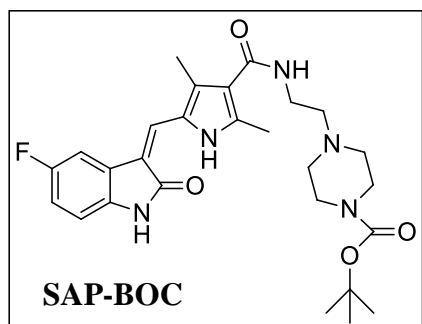
SAPSSHER1_2. Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **15** (3.5 mg, 0.0056 mmol), πεπτίδιο HER-1 (**B**) (8.63 mg, 1 equiv), HATU (3.19 mg, 1.5 equiv) και DIPEA (4.8 μ L, 5 equiv) σε διάλυμα DMF (1.7 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight και ελέγχθηκε με TLC σε αναλογία (9:1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Απομακρύνθηκε ο διαλύτης σε αντλία ελαίου. Στη συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις με Et_2O , EtOAc/DCM . Ακολούθησε καθαρισμός του συζεύγματος με χρωματογραφία HPLC και μετά από λυοφιλοποίηση του τελικού δείγματος συλλέχθηκε ένα κίτρινο στερεό το οποίο έχει σταλεί για βιολογικές μελέτες.

SAPSSHER2_1. Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **15** (3.5 mg, 0.0056 mmol), πεπτίδιο HER-2 (**Γ**) (4.83 mg, 1 equiv), HATU (3.19 mg, 1.5 equiv) και DIPEA (4.8 μ L, 5 equiv) σε διάλυμα DMF (1.7 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight και ελέγχθηκε με TLC σε αναλογία (9:1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Απομακρύνθηκε ο διαλύτης σε αντλία ελαίου. Στη συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις με Et_2O , με EtOAc/DCM . Ακολούθησε καθαρισμός του συζεύγματος με χρωματογραφία HPLC και μετά από λυοφιλοποίηση του τελικού δείγματος συλλέχθηκε ένα κίτρινο στερεό το οποίο έχει σταλεί για βιολογικές μελέτες.

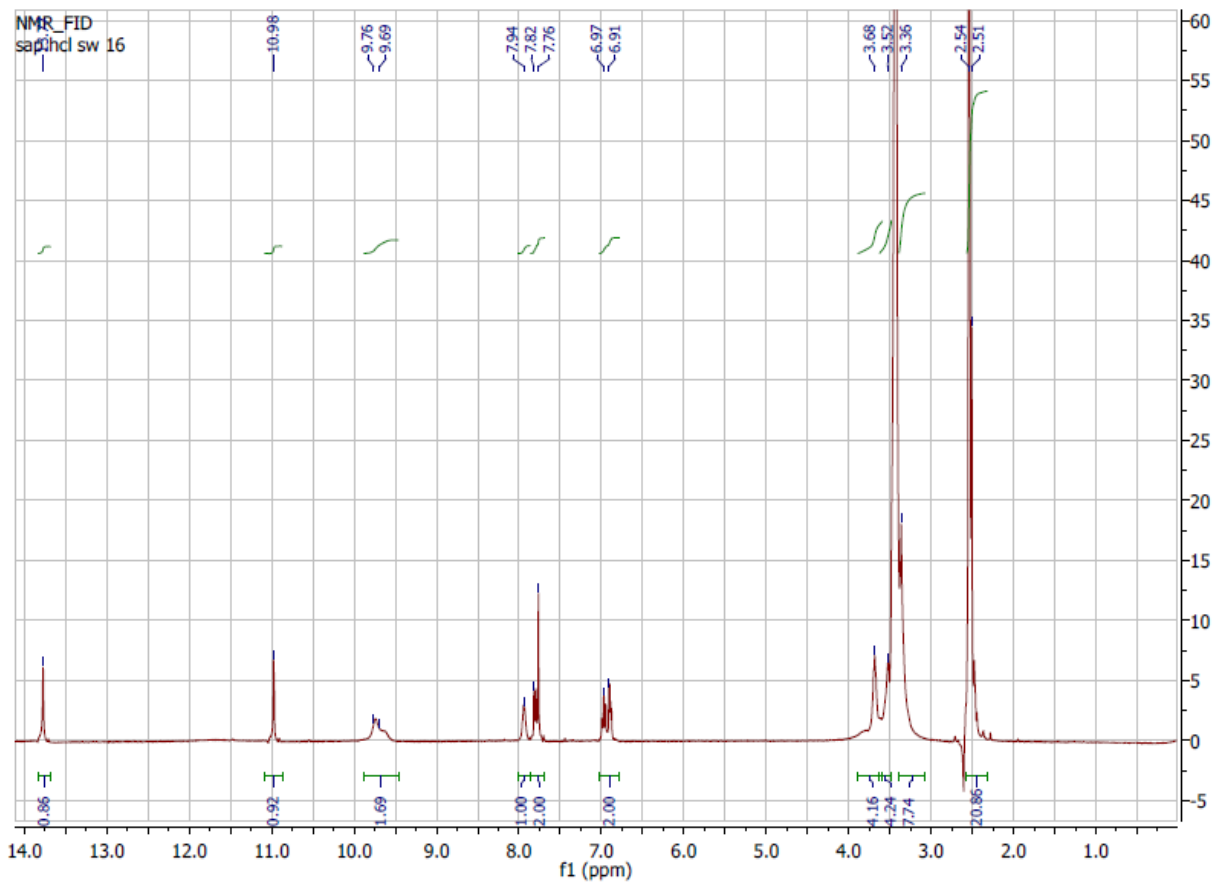
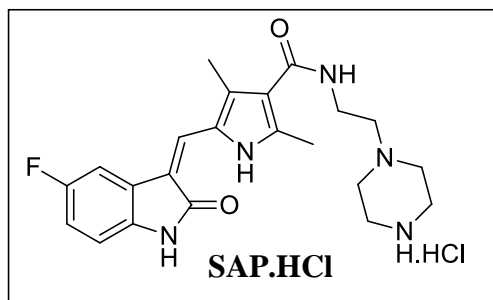
SAPPCVSHER1. Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **23** (2.8 mg, 0.00305 mmol), HATU (1.7 mg, 1.5 equiv) και DIPEA (2.65 μ L, 5 equiv) και πεπτίδιο HER-1 (**B**) (4.7 mg, 1 equiv) σε διάλυμα DMF (1 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight και ελέγχθηκε με TLC σε αναλογία (9:1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Απομακρύνθηκε ο διαλύτης σε αντλία ελαίου και ακολούθησε πλύση με Et_2O , EtOAc/DCM . Ακολούθησε καθαρισμός του συζεύγματος με χρωματογραφία HPLC και μετά από λυοφιλοποίηση του τελικού δείγματος συλλέχθηκε ένα κίτρινο στερεό το οποίο έχει σταλεί για βιολογικές μελέτες.

SAPPCVSHER2. Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **23** (2.8 mg, 0.00305 mmol), HATU (1.7 mg, 1.5 equiv), DIPEA (2.65 μ L, 5 equiv) και πεπτίδιο HER-2 (**Γ**) (2.67 mg, 1 equiv) σε διάλυμα DMF (1 mL). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση overnight και ελέγχθηκε με TLC σε αναλογία (9:1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$. Απομακρύνθηκε ο διαλύτης σε αντλία ελαίου και ακολούθησε πλύση με Et_2O , EtOAc/DCM . Ακολούθησε καθαρισμός του συζεύγματος με χρωματογραφία HPLC και μετά από λυοφιλοποίηση του τελικού δείγματος συλλέχθηκε ένα κίτρινο στερεό το οποίο έχει σταλεί για βιολογικές μελέτες.

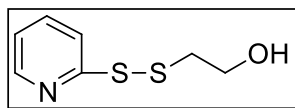
4. Φάσματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H NMR)



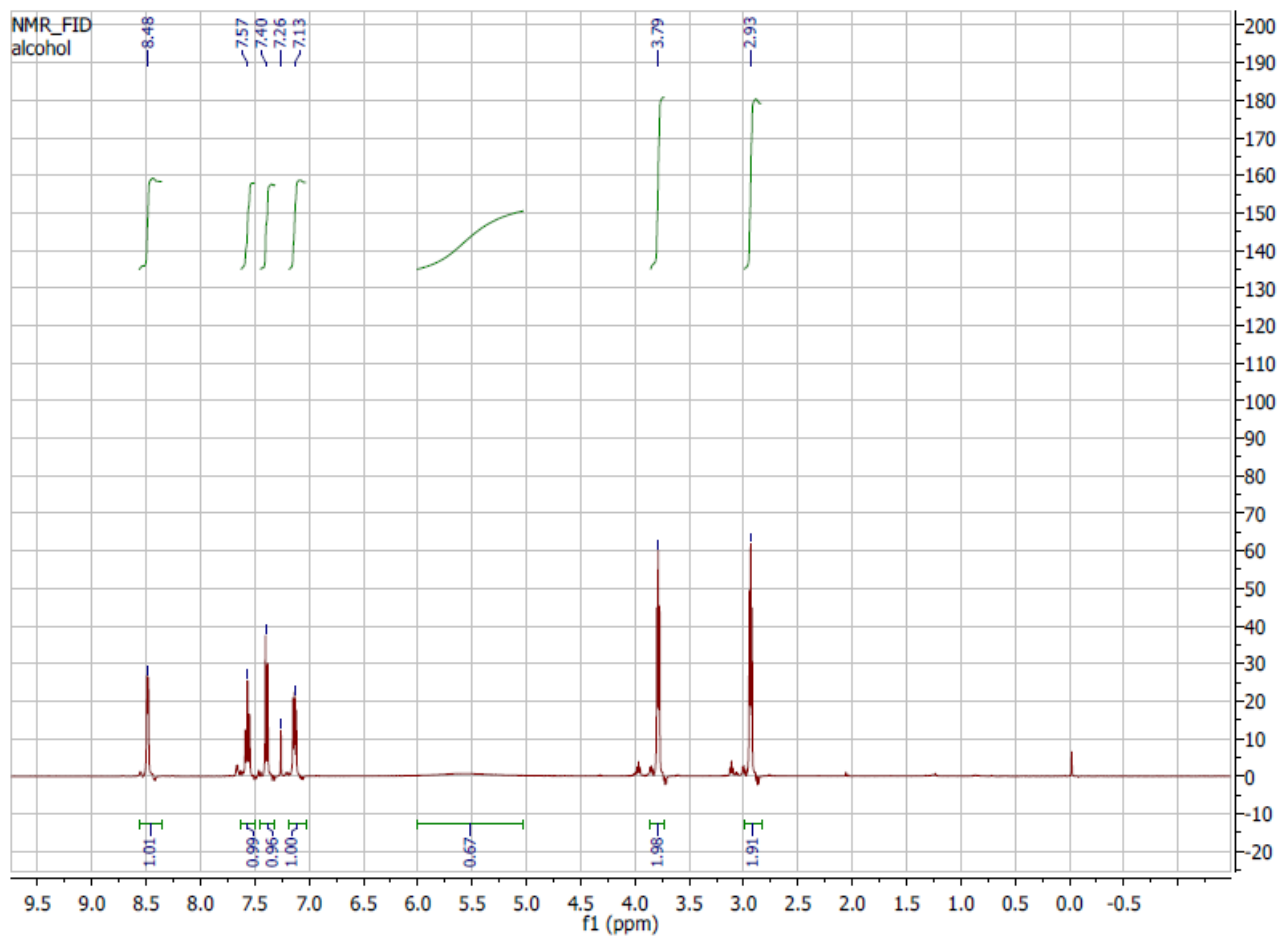
Εικόνα 17. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 6



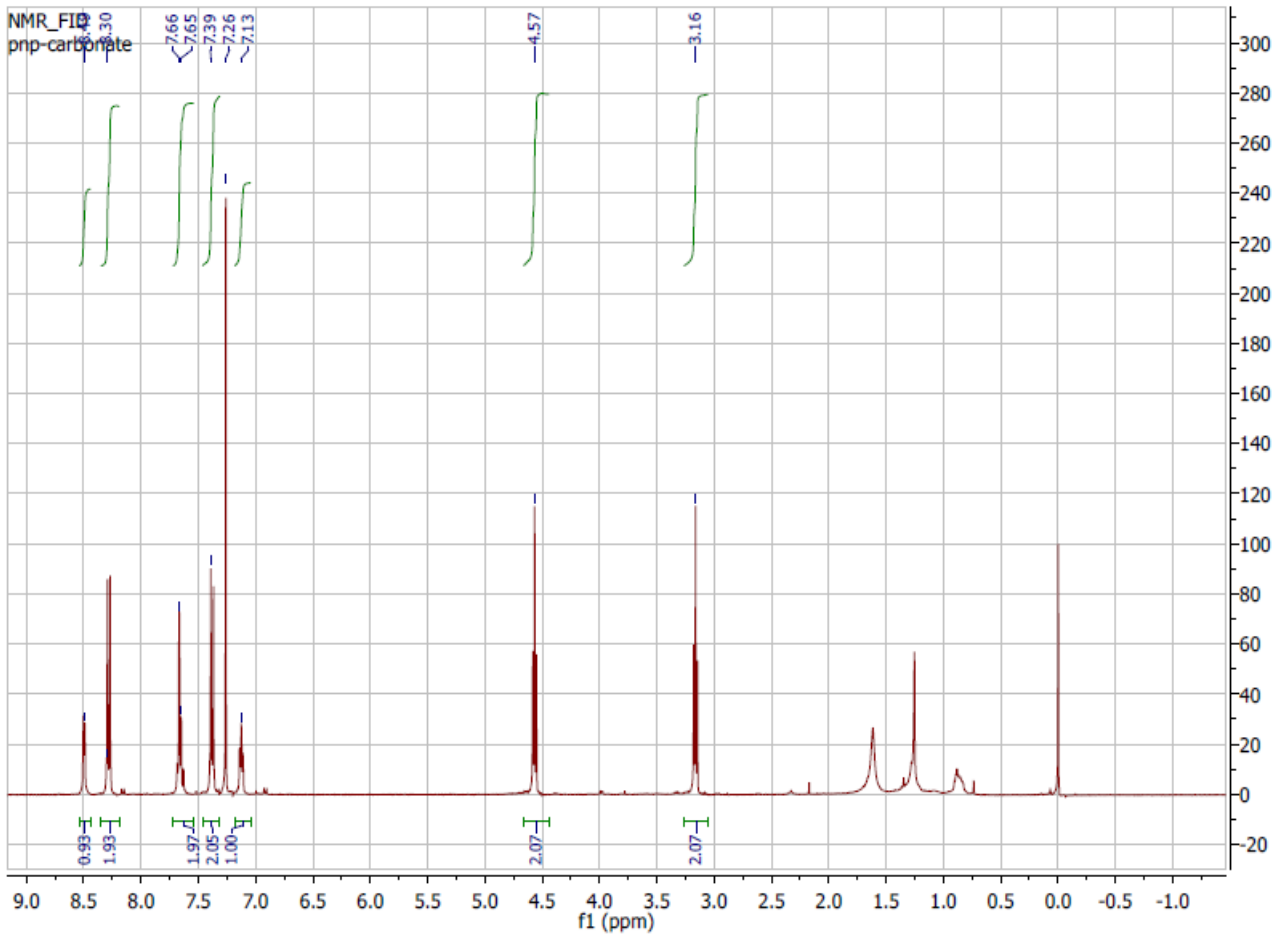
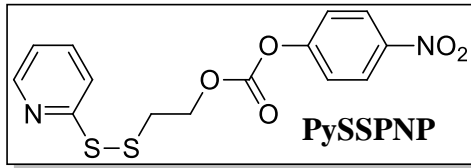
Εικόνα 18. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 7



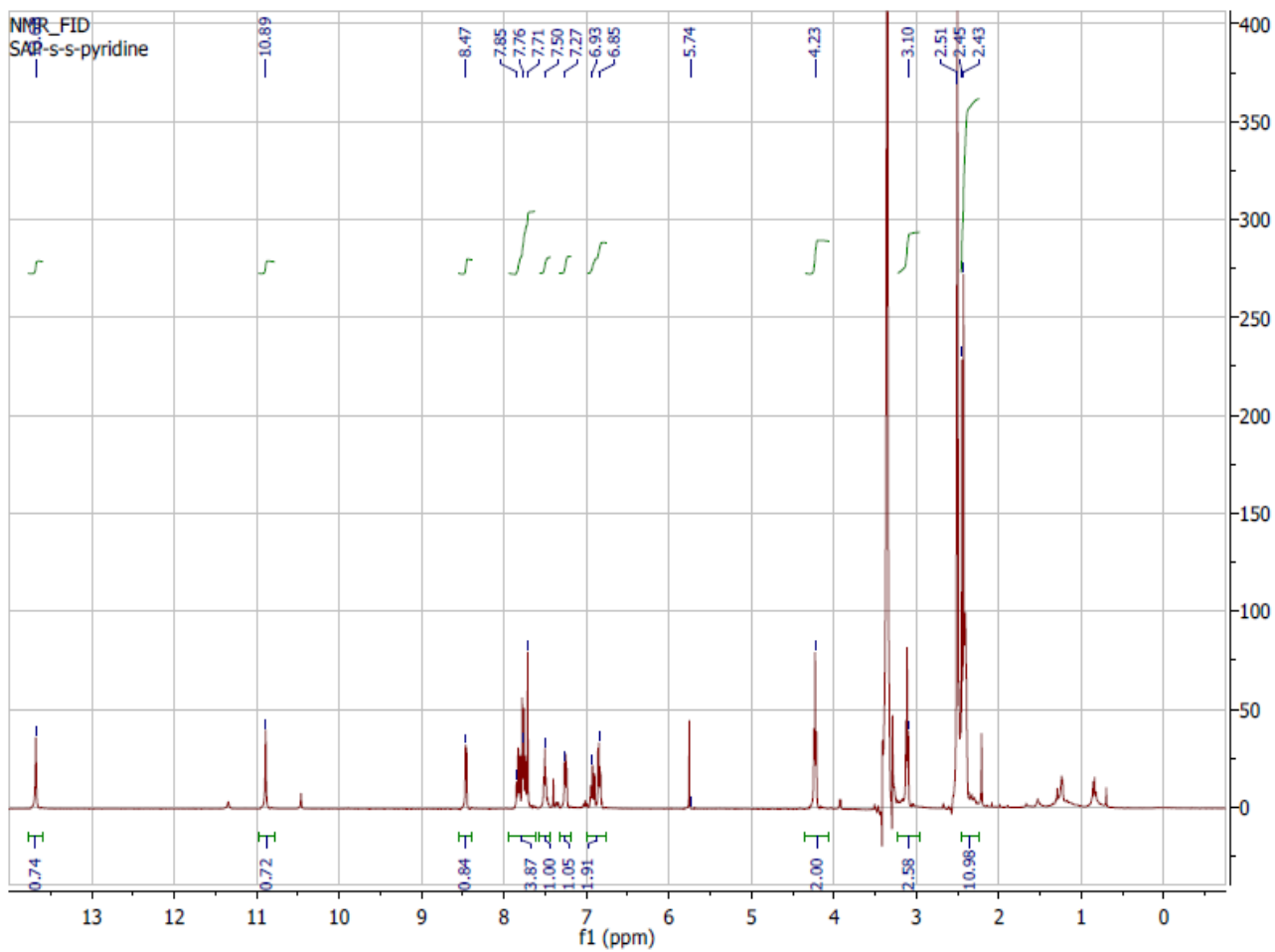
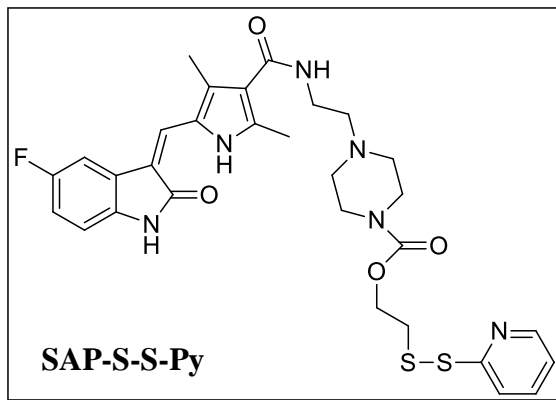
Py-S-S-OH



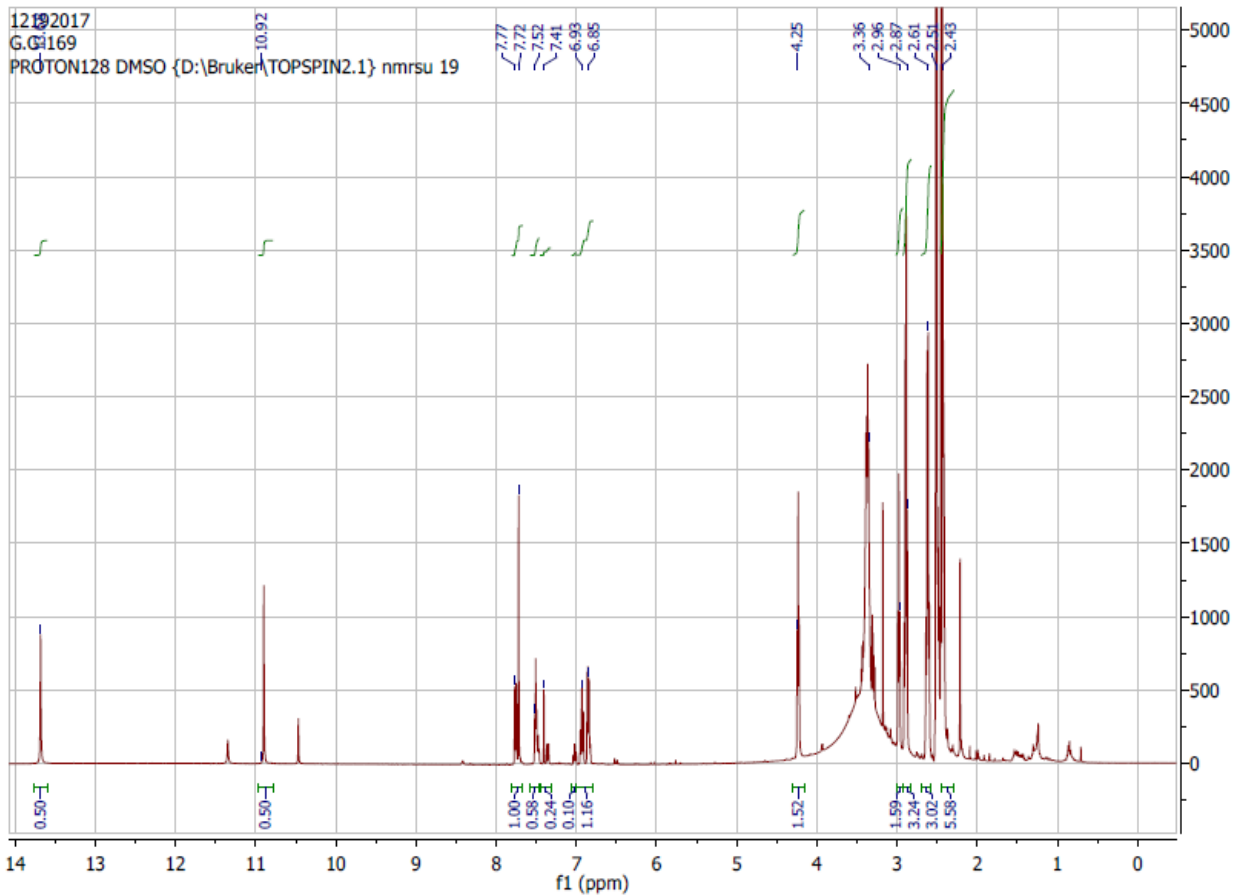
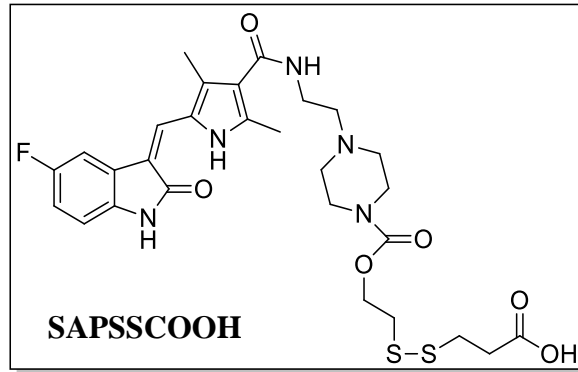
Εικόνα 19. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 9



Εικόνα 20. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **11**

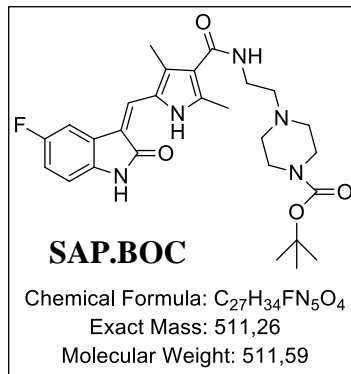


Εικόνα 21. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 12

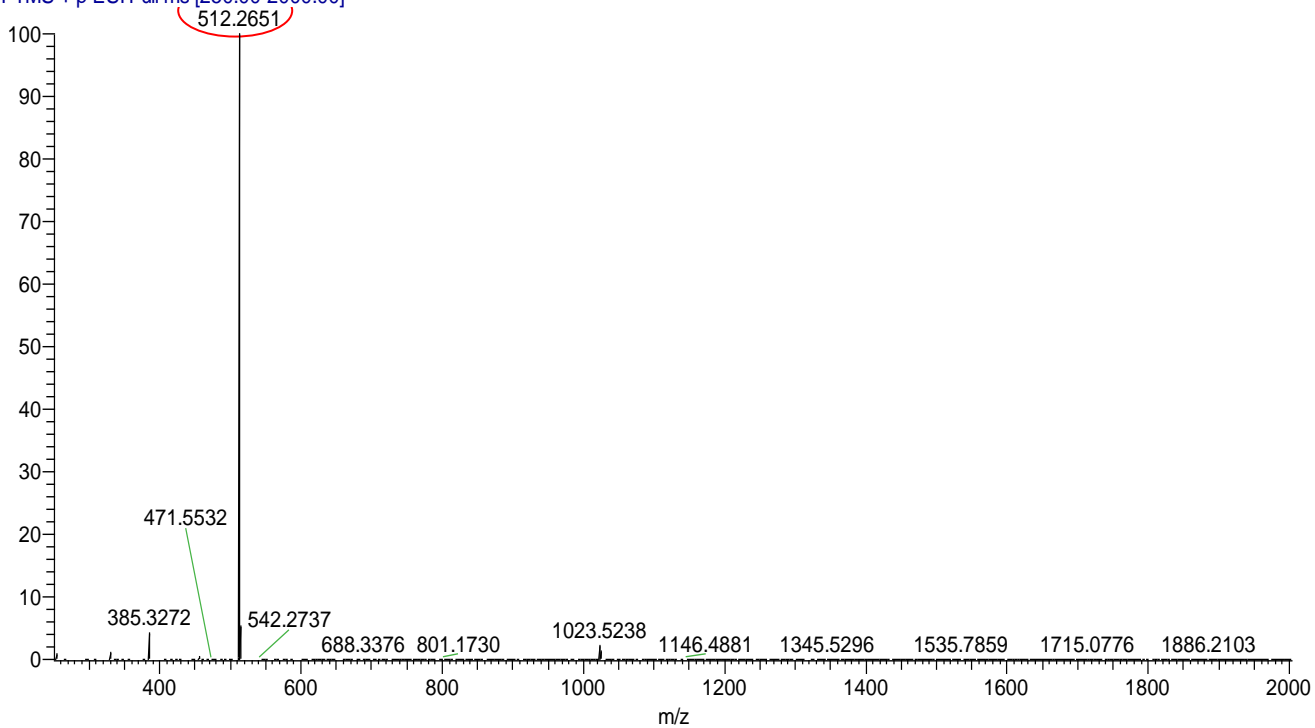


Εικόνα 22. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης **15**

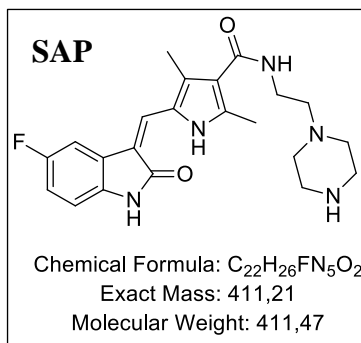
4.2 Φασματοσκοπία Μάζας (MS)



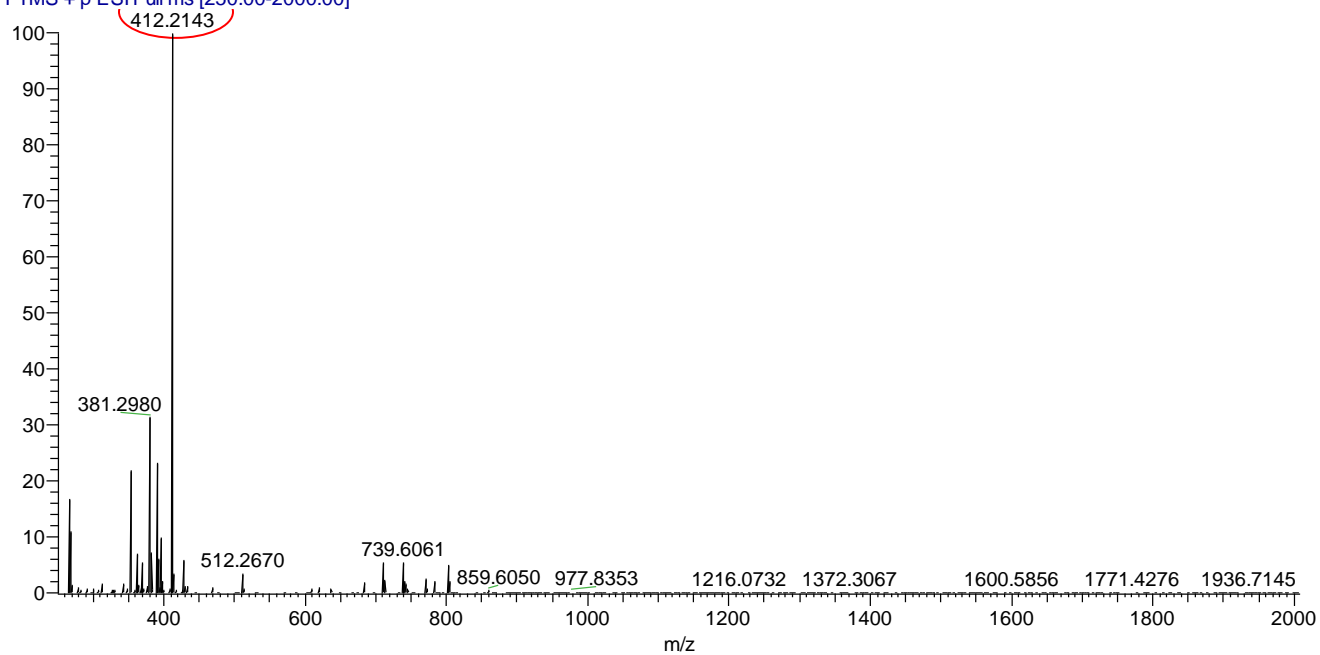
5AP-BOC_161109105235 #1-3 RT: 0.01-0.07 AV: 3 NL: 8.49E8
T: FTMS + p ESI Full ms [250.00-2000.00]



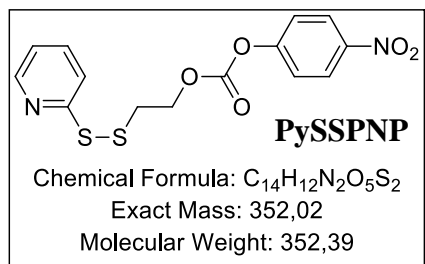
Εικόνα 23. Φάσμα Μάζας της ένωσης 6



5APH_161118110728 #12-14 RT: 0.16-0.19 AV: 3 NL: 4.66E7
 T: FTMS + p ESI Full ms [250.00-2000.00]

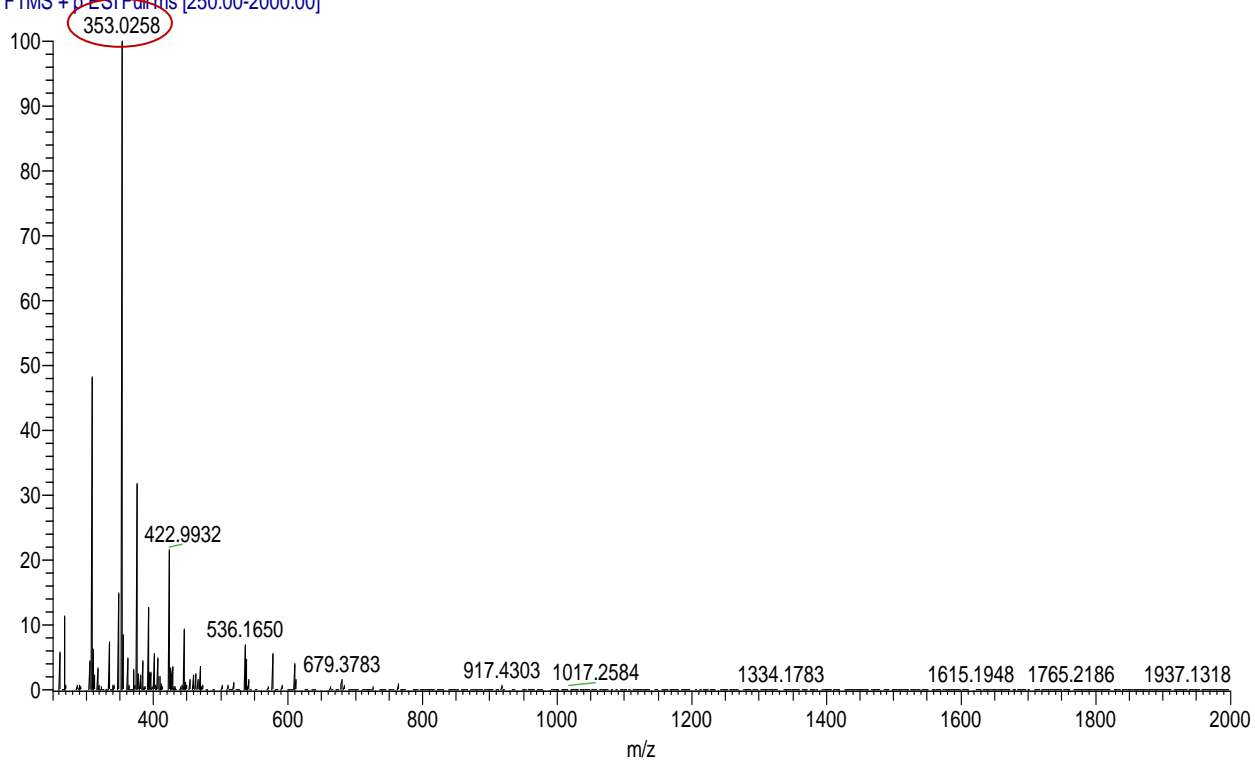


Εικόνα 24. Φάσμα Μάζας της ένωσης **SAP**

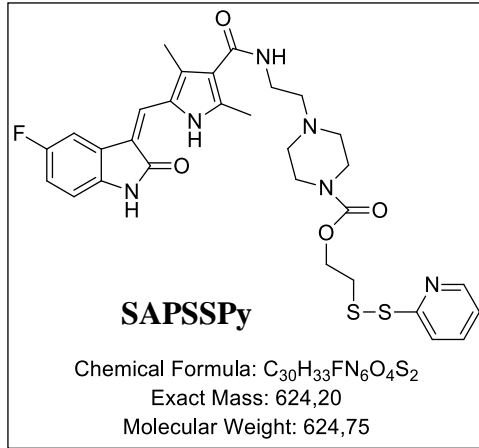


DF-168_171128130222 #7 RT: 0.09 AV: 1 NL: 3.00E7

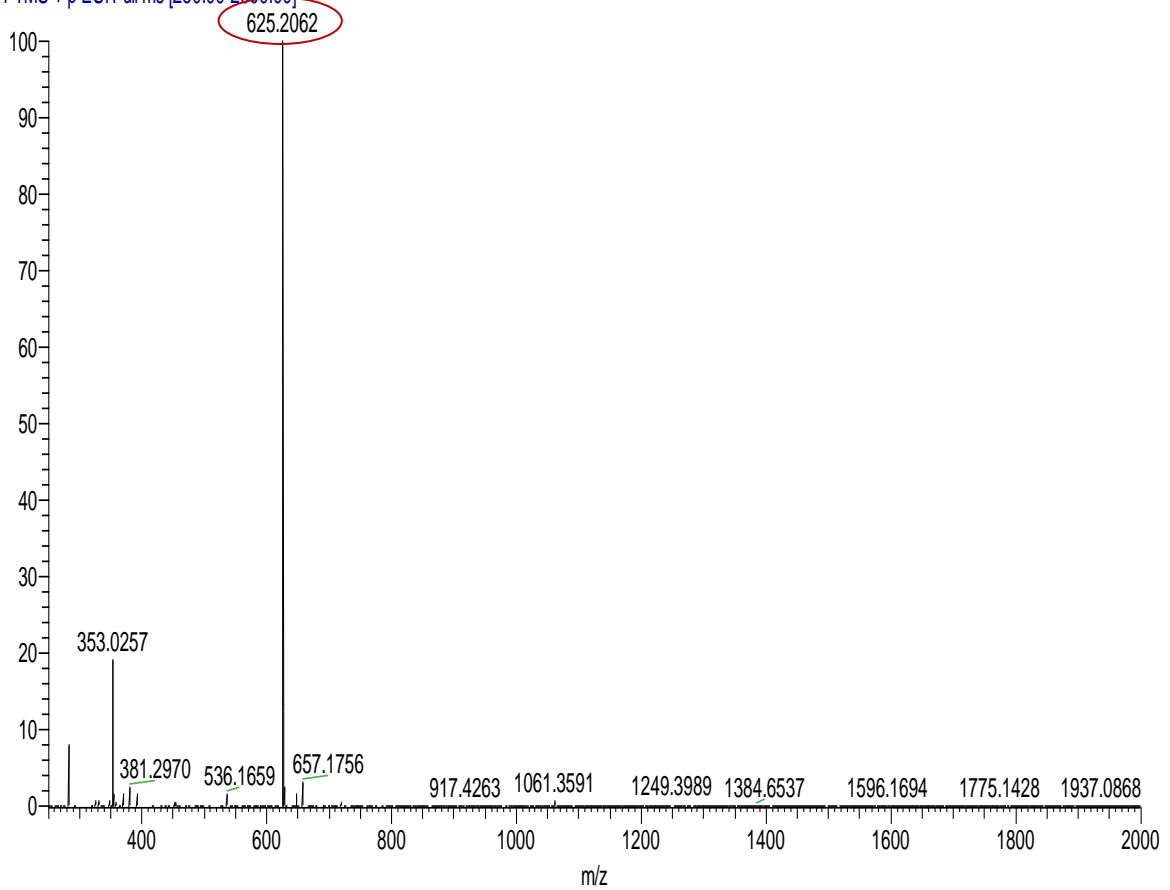
T: FTMS + pESI Full ms [250.00-2000.00]



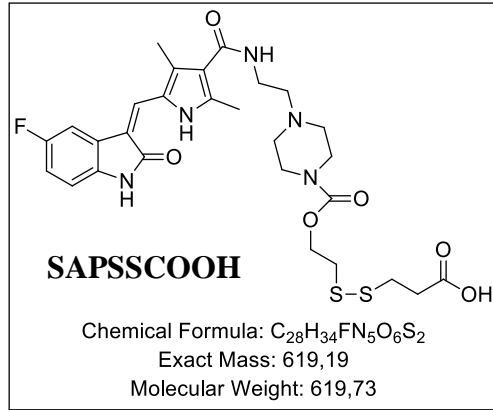
Εικόνα 25. Φάσμα Μάζας της ένωσης **11**



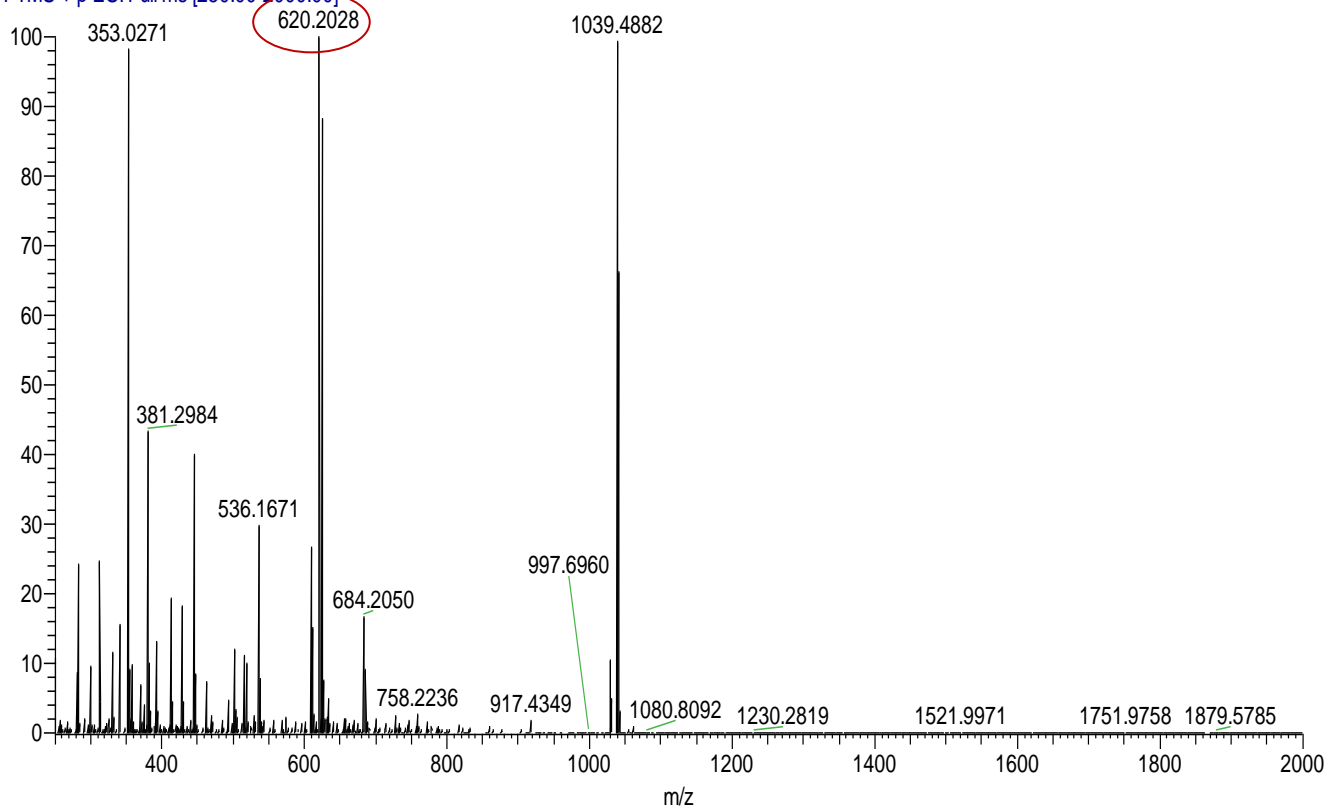
DF-172_171128130222 #3 RT: 0.03 AV: 1 NL: 1.30E8
 T: FTMS + p ESI Full ms [250.00-2000.00]



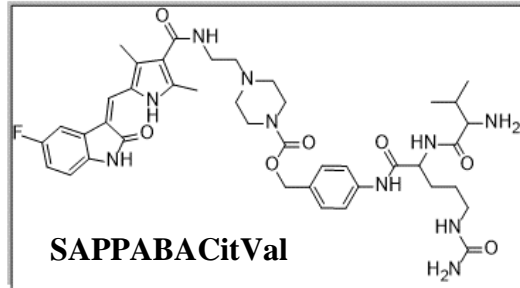
Εικόνα 26. Φάσμα Μάζας της ένωσης **12**



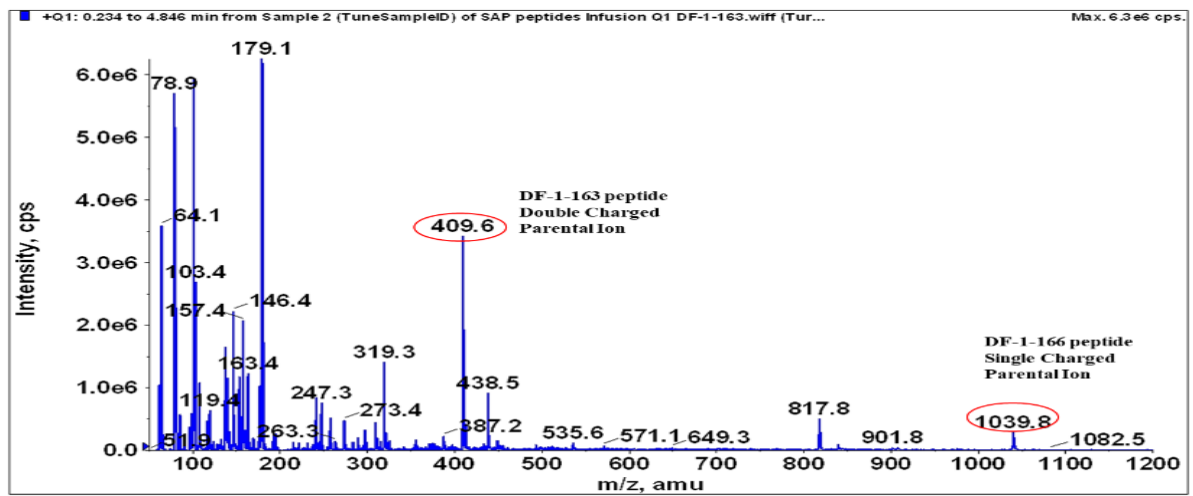
DF-180_171128130222 #21 RT: 0.34 AV: 1 NL: 1.69E6
 T: FTMS + p ESI Full ms [250.00-2000.00]



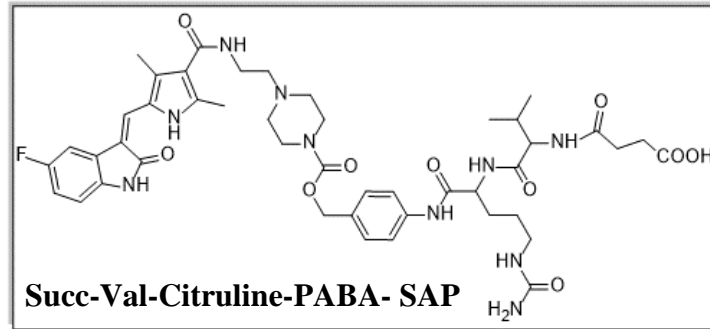
Εικόνα 27. Φάσμα Μάζας ης ένωσης **15**



Chemical Formula: $C_{41}H_{53}FN_{10}O_7$
 Exact Mass: 816,41
 Molecular Weight: 816,92
 m/z: 816.41 (100.0%), 817.41 (48.9%), 818.41 (12.7%), 819.42 (2.1%)
 Elemental Analysis: C, 60.28; H, 6.54; F, 2.33; N, 17.15; O, 13.71



Εικόνα 28. Φάσμα Μάζας της ένωσης 22



Chemical Formula: $C_{45}H_{57}FN_{10}O_{10}$

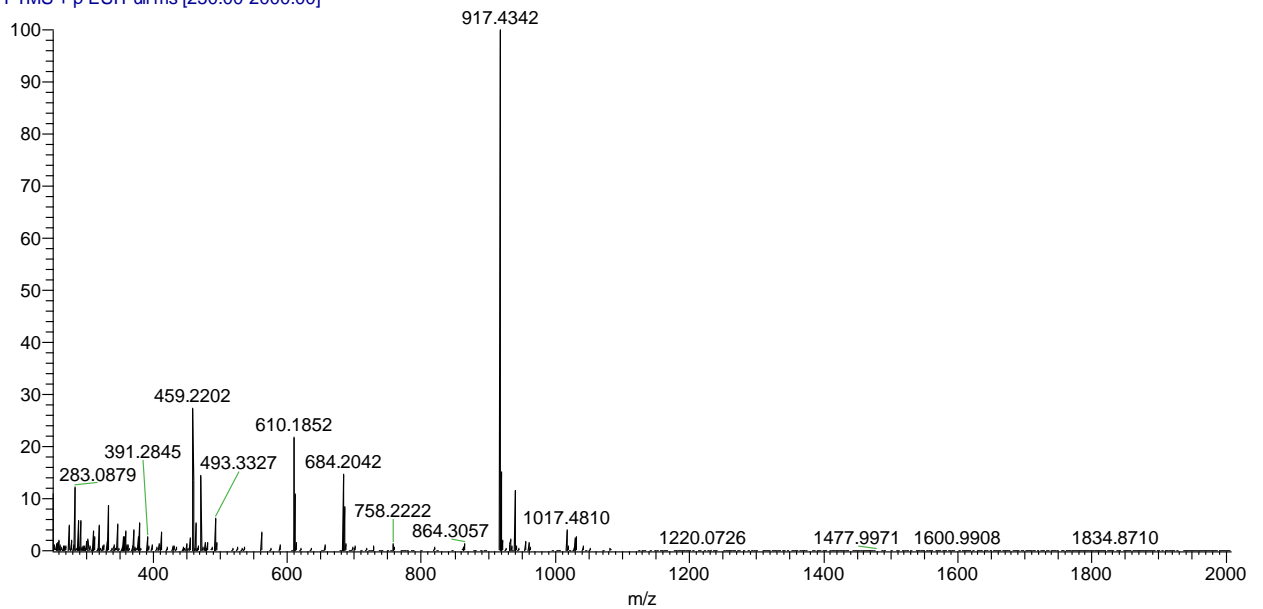
Exact Mass: 916,42

Molecular Weight: 916,99

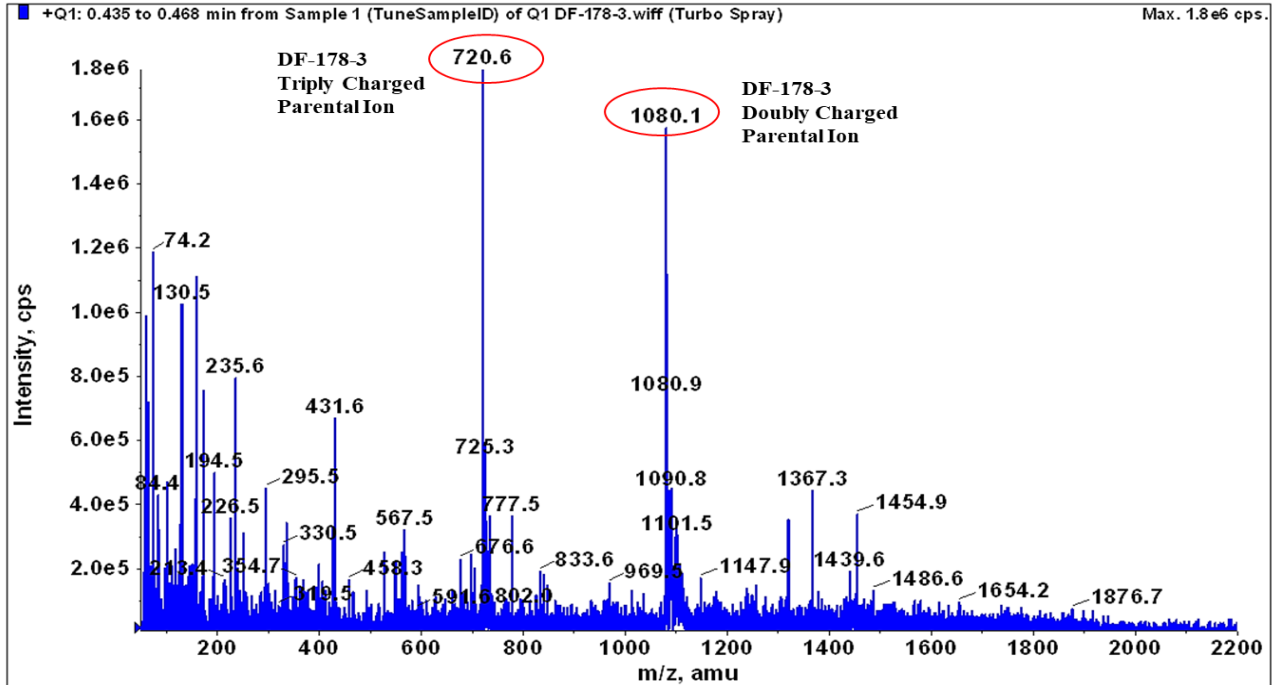
m/z: 916.42 (100.0%), 917.43 (49.7%), 918.43 (14.2%), 917.42 (3.7%), 919.43 (3.3%), 918.42 (1.9%)

Elemental Analysis: C, 58.94; H, 6.27; F, 2.07; N, 15.27; O, 17.45

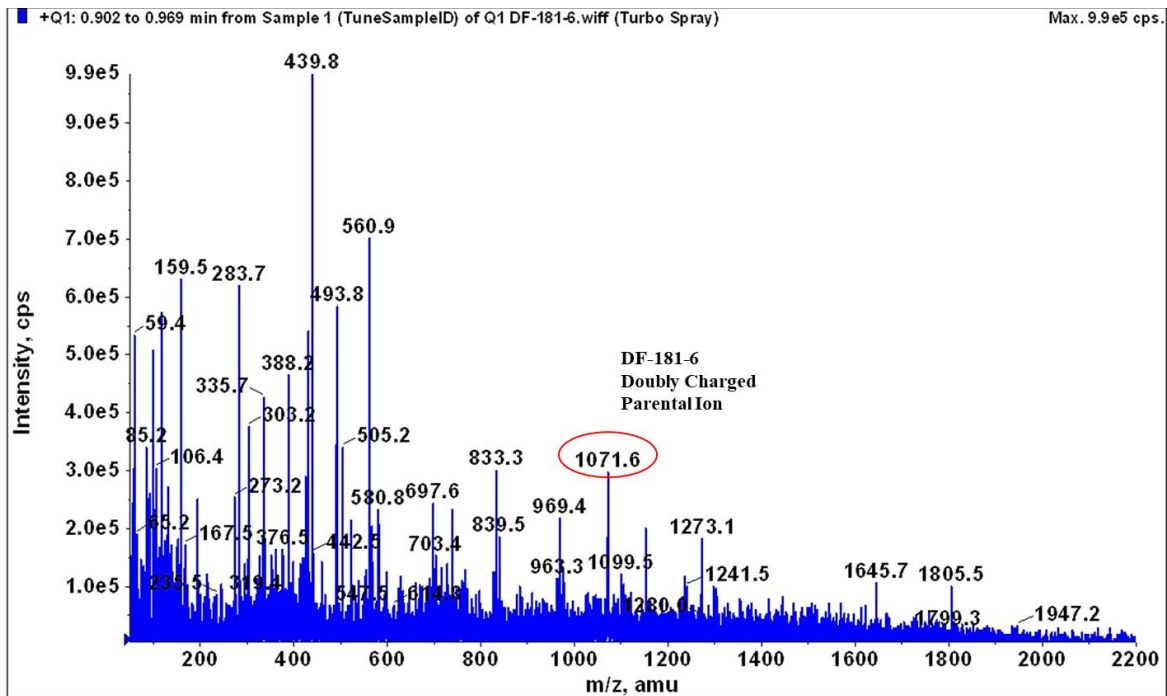
DF_183_4_DILUTED_171122105614 #4-5 RT: 0.07-0.09 AV: 2 NL: 1.67E6
T: FTMS + p ESI Full ms [250.00-2000.00]



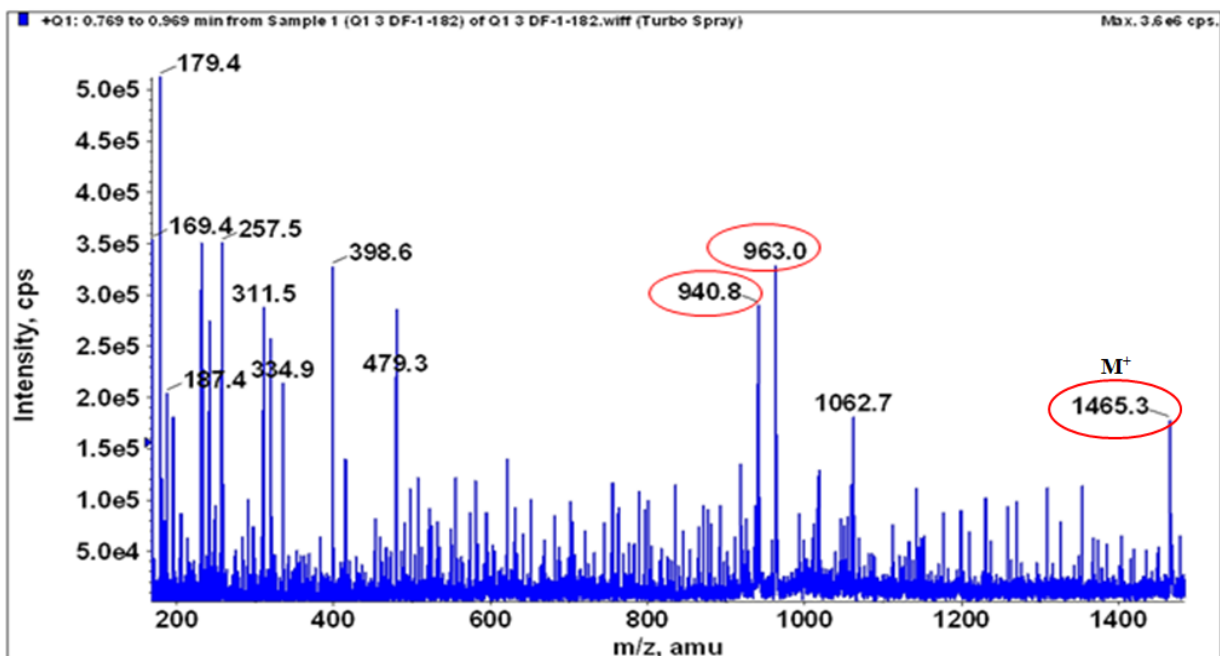
Εικόνα 29. Φάσμα Μάζας της ένωσης **23**



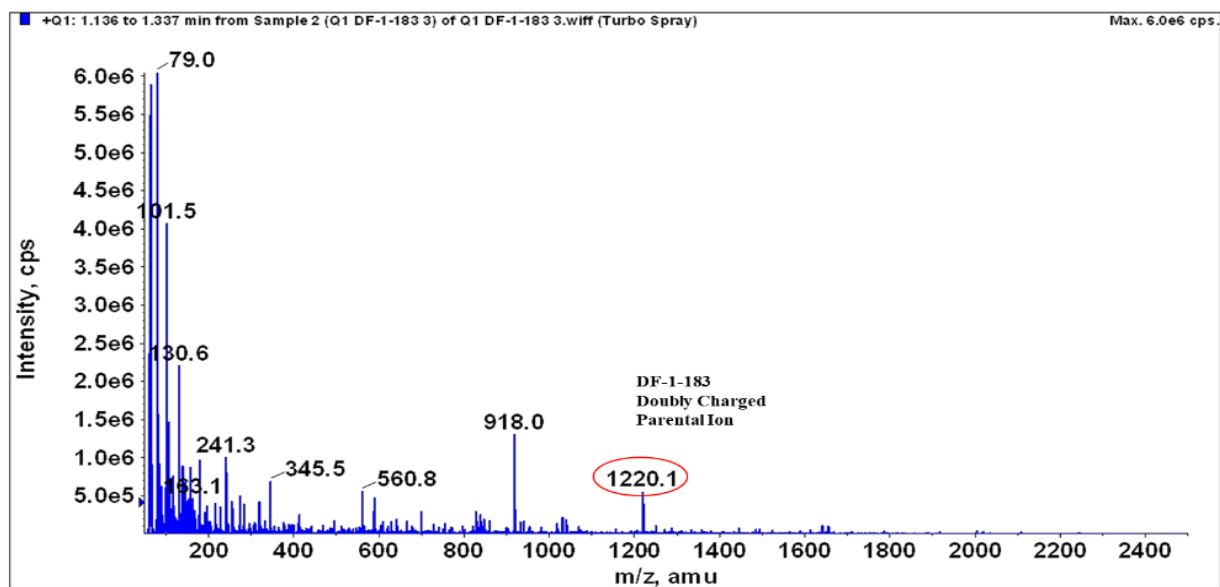
Εικόνα 30. Φάσμα Μάζας SAPSSHER1_1



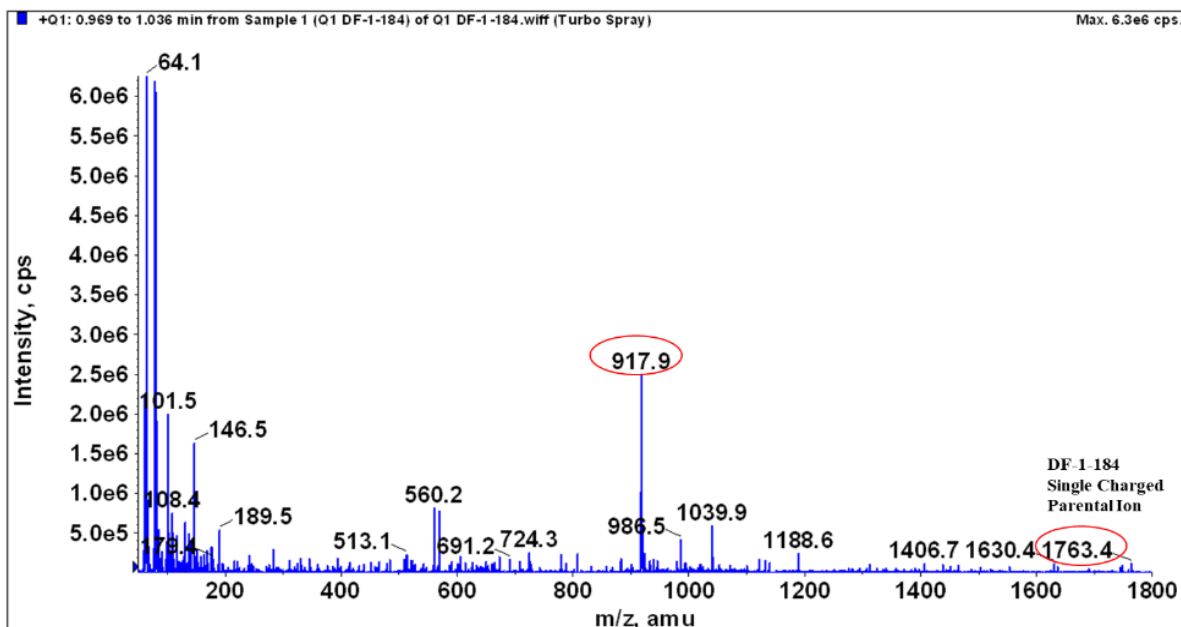
Εικόνα 31. Φάσμα Μάζας SAPSSHER1_2



Εικόνα 32. Φάσμα Μάζας SAPSSHER2_1



Εικόνα 33. Φάσμα Μάζας SAPPCVSHER1



Εικόνα 34. Φάσμα Μάζας SAPPCVSHER2

5. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Ο καρκίνος είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα υγείας στον σύγχρονο κόσμο. Η εμφάνιση του καρκίνου προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αφού αυτά δεν αποκρίνονται αποτελεσματικά στα σήματα που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Γι' αυτό τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται τελικά σε όλο το σώμα, προσβάλλοντας φυσιολογικούς ιστούς και όργανα. Μια από τις στρατηγικές αντιμετώπισης του καρκίνου έχει ως στόχο την διακοπή παροχέτευσης αίματος στα καρκινικά κύτταρα διακόπτοντας έτσι την ανάπτυξή τους. Ένα τέτοιο φάρμακο είναι το Sunitinib. Ωστόσο λόγω αυξημένης τοξικότητας και διάφορων παρενεργειών η χρήση του είναι περιορισμένη. Για να μειωθεί η τοξικότητα του Sunitinib και να αυξηθεί η χρήση του απαιτείται η στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα. Για το λόγο αυτό διάφορες προσεγγίσεις έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα μέσω στοχευτικών συζευγμάτων. Επειδή το Sunitinib δε δίνει άμεση πρόσβαση σε στοχευτικά συζεύγματα αυτού του τύπου λόγω έλλειψης λειτουργικών ομάδων στο μέρος του μορίου που εκτίθεται στο μέτωπο του διαλύτη, σχεδιάστηκε και συντέθηκε ένα νέο ανάλογο του Sunitinib το οποίο ονομάστηκε SAP. Το μόριο αυτό σχεδιάστηκε έτσι ώστε να διατηρηθεί η ισχύς του Sunitinib αλλά με αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με το αρχικό μόριο, καθώς μετά από αξιολόγηση και σύγκριση βρέθηκε ότι εμφανίζει βελτιωμένες φαρμακοκινητικές παραμέτρους, καθώς και μεγαλύτερη πολική επιφάνεια, χαμηλότερη αιματοτοξικότητα, αναστέλλει περισσότερους υποδοχείς με δράση κινάσης

τυροσίνης, αναστέλλει το πρωτοογκογονίδιο του RET, εμφανίζει μειωμένους καρκινικούς δείκτες Ki-67 και CD31, καθώς και καλύτερη διαλυτότητα αλλά φέρει και τη σημαντική θέση σύζευξης που του προσφέρει η εισαγωγή του πιπεραζινικού δακτυλίου, γεγονός που καθιστά το νέο πλέον ανάλογο καταλληλότερο για συζεύξεις είτε με στοχευτικά πεπτίδια είτε με άλλες χημικές ομάδες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία σκοπός ήταν η σύνθεση συζευγμάτων του SAP μέσω διασπώμενων γεφυρών, γεφυρών είτε με δισουλφιδικό είτε με διπεπτιδικό δεσμό και σύζευξη τους με πεπτίδια που στοχεύουν τον EGFR υποδοχέα, ο οποίος υπερεκφράζεται σε πολλούς καρκινικούς τύπους.

Έχει πραγματοποιηθεί τόσο η σύνθεση και ταυτοποίηση των συζευγμάτων του SAP με τις διασπώμενες γέφυρες αλλά και η δοκιμή απελευθέρωσης του φαρμάκου SAP από τις γέφυρες αυτές. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά καθώς η απελευθέρωση του φαρμάκου γίνεται σε μεγάλο ποσοστό. Τα θετικά αυτά αποτελέσματα ακολούθησε η τελική σύζευξη των γεφυρών αυτών με τα στοχευτικά πεπτίδια του υποδοχέα EGFR. Μελλοντικός στόχος είναι η μελέτη της αντικαρκινικής δράσης των στοχευτικών συζευγμάτων του SAP τόσο *in vitro* αλλά και *in vivo*.

7. Βιβλιογραφία

1. Regina, A. et al. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br. J. Pharmacol.* 155, 185–197 (2008).
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition.* Molecular Biology.
3. Hanahan D, et.al Hallmarks of cancer: the next generation.
4. Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. *The New England Journal of Medicine.*
5. Chinchar E, Makey K, Gibson J, Chen F, Cole S, Megason G, Vijayakumar S, Miele L, Gu J. Sunitinib significantly suppresses the proliferation, migration, apoptosis resistance, tumor angiogenesis and growth of triple-negative breast cancers but increases breast cancer stem cells. *Vasc Cell.* 2014; 6.
6. Yehia L, Boulos F, Jabbour M, Mahfoud Z, Fakhruddin N, El-Sabban M. Molecular Subtypes: Expression of HIF-1 alpha and Markers of Angiogenesis Are Not Significantly Different in Triple Negative Breast Cancer Compared to Other Breast Cancer Implications for Future Therapy. *PLoS One.* 2015; 10:1–14.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971; 285:1182–1186.
8. Bicknell R. Targeting angiogenesis with monoclonal antibodies. *Ann Oncol.* 2006; 17 Suppl 10:x76–78.
9. Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet.* 2016; 388:518–529.
10. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest.* 2011; 121:3797–3803.
11. Di Cosimo S, Baselga J. Management of breast cancer with targeted agents: importance of heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010; 7:139–147.
12. Rugo HS. Inhibiting angiogenesis in breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning? *J Clin Oncol.* 2012; 30:898–901.

13. Criscitiello C, Azim HA, Jr., Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2012; 23 Suppl 6:vi13–18.
14. Eroles P, Bosch A, Perez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012; 38:698–707.
15. Zardavas D, Baselga J, Piccart M. Emerging targeted agents in metastatic breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013; 10:191–210.
16. Argyros O, Karampelas T, Varela A, et al. Targeting of the breast cancer micro-environment with a potent and linkable oxindole based antiangiogenic small molecule. *Oncotarget.* 2017;8(23):37250-37262.
17. «Non-Small Cell Lung Cancer Treatment». National Cancer Institute.
18. Kaiser LR (2008). *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders* (4th έκδοση). McGraw-Hill, σελ. 1855–1856. ISBN 0-07-145739-9
19. Lemmon MA, Schlessinger J (June 2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases". *Cell.* 141 (7): 1117–34. Bublil EM, Yarden Y (April 2007). "The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics". *Current Opinion in Cell Biology.* 19 (2): 124–34.
20. Ornitz DM, Itoh N (2001). "Fibroblast growth factors". *Genome Biology.* 2 (3): REVIEWS3005. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK (January 2012). "Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy". *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 16 (1): 15–31.
21. Lemmon MA, Schlessinger J (June 2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases". *Cell.* 141 (7): 1117–34. 14.Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(8):583-592. Sunitinib: A VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(2):323-328.
22. Patyna S, Laird AD, Mendel DB, O'Farrell A M, Liang C, Guan H, Vojtkovsky T, Vasile S, Wang X, Chen J, Grazzini M, Yang CY, Haznedar JO, et al. SU14813: a novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5:1774–1782.
23. Force T, Kolaja KL. Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10:111–126.

24. Young E, Miele L, Tucker KB, Huang M, Wells J, Gu JW. SU11248, a selective tyrosine kinases inhibitor suppresses breast tumor angiogenesis and growth via targeting both tumor vasculature and breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2010; 10:703–711.
25. Sun L, Liang C, Shirazian S, Zhou Y, Miller T, Cui J, Fukuda JY, Chu JY, Nematalla A, Wang X, Chen H, Sistla A, Luu TC, et al. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *J Med Chem.* 2003; 46:1116–1119.
26. Το Κύτταρο: Μια Μοριακή Προσέγγιση | Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman
27. Van Erp, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev* 2009;35(8): 692-706
28. Srinivasarao M, Galliford C V., Low PS. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(3):203-219. doi:10.1038/nrd4519.
29. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(8):583-592. doi:10.1038/nrc1893.
30. Regina, A. *et al.* Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br. J. Pharmacol.* 155, 185–197 (2008). This conjugate is currently in clinical trials in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) patients with brain metastases or in combination with trastuzumab in breast cancer patients with brain metastases (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT01497665 and NCT01480583, respectively).
31. Robey RW, Bates SE, Ambudkar S V. Sunitinib (Sutent®, SU11248), a small – molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks functions of ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(2):359-365.
32. Zhang D, Sun B, Zhao X, Ma Y, Ji R, Gu Q, Dong X, Li J, Liu F, Jia X, Leng X, Zhang C, Sun R, et al. Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133+ cells in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer.* 2014; 13:207.

33. Bergh J, Bondarenko IM, Lichinitser MR, Liljegren A, Greil R, Voytko NL, Makhson AN, Cortes J, Lortholary A, Bischoff J, Chan A, Delaloge S, Huang X, et al. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2012; 30:921–929.
34. Karamelas T, Argyros O, Sayyad N, Spyridaki K, Pappas C, Morgan K, Kolios G, Millar RP, Liapakis G, Tzakos AG, Fokas D, Tamvakopoulos C. GnRH-Gemcitabine conjugates for the treatment of androgen-independent prostate cancer: pharmacokinetic enhancements combined with targeted drug delivery. *Bioconjug Chem*. 2014; 25:813–823.
35. Argyros O, Karamelas T, Asvos X, Varela A, Sayyad N, Papakyriakou A, Davos CH, Tzakos AG, Fokas D, Tamvakopoulos C. Peptide-Drug Conjugate GnRH-Sunitinib Targets Angiogenesis Selectively at the Site of Action to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Res*. 2016; 76:1181–1192
36. Dolman M, Harmsen S, Pieters EHE, et al. Targeting of a platinum-bound sunitinib analog to renal proximal tubular cells. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7:417-433. doi:10.2147/IJN.S26485.
37. Dolman MEEM, van Dorenmalen KMA, Pieters EHE, et al. Dendrimer-based macromolecular conjugate for the kidney-directed delivery of a multitargeted sunitinib analogue. *Macromol Biosci*. 2012;12(1):93-103. doi:10.1002/mabi.201100277.
38. Synthesis of Novel c(AmpRGD)-Sunitinib Dual Conjugates as Molecular Tools Targeting the $\alpha\beta 3$ Integrin/VEGFR2 Couple and Impairing Tumor-Associated Angiogenesis. *J Med Chem*. 2017 Jan 12;60(1):248-262 Sartori A et al.
39. Argyros O, Lougiakis N, Kouvari E, Papafotika A, Raptopoulou CP, Psycharis V, Christoforidis S, Pouli N, Marakos P, Tamvakopoulos C. Design and synthesis of novel 7-aminosubstituted pyrido[2,3-b] pyrazines exhibiting anti-breast cancer activity. *Eur J Med Chem*. 2017; 126:954–968.
40. Karamelas T, Skavatsou E, Argyros O, Fokas D, Tamvakopoulos C. Gemcitabine Based Peptide Conjugate with Improved Metabolic Properties and Dual Mode of Efficacy. *Mol Pharm*. 2017; 14:674–685.

41. Argyros O, Karampelas T, Varela A, et al. Targeting of the breast cancer microenvironment with a potent and linkable oxindole based antiangiogenic small molecule. *Oncotarget*. 2017;8(23):37250-37262. doi:10.18632/oncotarget.16763
42. Remko M, Bohac A, Kovacikova L. Molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, polar surface area, and blood brain barrier penetration of some antiangiogenic agents. *Struct Chem*. 2011; 22:635–648
43. Bachelot T, Garcia-Saenz JA, Verma S, Gutierrez M, Pivot X, Kozloff MF, Prady C, Huang X, Khosravan R, Wang Z, Cesari R, Tassell V, Kern KA, et al. Sunitinib in combination with trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer: activity and safety results from a phase II study. *BMC Cancer*. 2014; 14:166
44. She EX, Hao Z. A novel piperazine derivative potently induces caspase-dependent apoptosis of cancer cells via inhibition of multiple cancer signaling pathways. *Am J Transl Res*. 2013; 5:622–633
45. Patel RV, Park SW. An evolving role of piperazine moieties in drug design and discovery. *Mini Rev Med Chem*. 2013; 13:1579–1601.
46. Chen K, Fang Z, Yang Z. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Sunitinib Analogues to Improve Aqueous Solubility. *Advanced Material Research*. 2014; 749:350–35
47. Li Z. Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *FASEB J*. 2005;19(14):1978-1985. doi:101096/fj.05-4058com.
48. Mickler, F. M. et al. Tuning nanoparticle uptake: Live-cell imaging reveals two distinct endocytosis mechanisms mediated by natural and artificial EGFR targeting peptide. *Nano Lett*. 12. 3417-3423 (2012).
49. A Simple One-Step Conversion of Carboxylic Acids to Esters Using EEDQ
Boulos Zacharie, Timothy P. Connolly, and Christopher L. Penney. *The Journal of Organic Chemistry* **1995** 60 (21), 7072-7074

50. Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. The role of glutathione in detoxification. *Env Heal Perspect.* 1983;49(59):69.
51. Dubowchik GM, Firestone RA, Padilla L, et al. Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: Model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity. *Bioconjug Chem.* 2002;13(4):855-869. doi:10.1021/bc025536j.
52. Dorywalska M, Dushin R, Moine L, et al. Molecular Basis of Valine-Citrulline-PABC Linker Instability in Site-Specific ADCs and Its Mitigation by Linker Design. *Mol*