

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΔΙΠΛΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΜΕΣΩ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΔΙΒΡΩΜΟΠΥΡΙΔΑΖΙΝΟΔΙΟΝΗΣ

ΜΗΤΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2020



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΟΧΕΥΤΙΚΩΝ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΔΙΠΛΟ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΜΕΣΩ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΔΙΒΡΩΜΟΠΥΡΙΔΑΖΙΝΟΔΙΟΝΗΣ

ΜΗΤΡΟΓΙΑΝΝΗΣ ΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΚΟΜΠΡΙΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝ/ΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ (ΜΕΛΟΣ)

ΤΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Α΄, ΙΙΒΕΑ, ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ-ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ (ΜΕΛΟΣ)

ΦΩΚΑΣ ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ, ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΤΜΕΥ, ΠΑΝ/ΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2020



UNIVERSITY OF IOANNINA

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

INTERDEPARTMENTAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES MEDICINAL CHEMISTRY

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR THE SYNTHESIS OF TARGETED DRUG-DRUG CONJUGATES OF ANTICANCER AGENTS BASED ON DIBROMOPYRIDAZINEDIONE SCAFFOLDS

MITROGIANNIS CHRISTODOULOS

MASTER THESIS

MEMBERS OF THE EXAMINING COMMITTEE

SKOBRIDIS KONSTANTINOS, PROFESSOR, DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF IOANNINA (MEMBER)

TAMVAKOPOULOS KONSTANTINOS, RESEARCHER A', BRFAA, DIVISION OF PHARMACOLOGY-PHARMACOTECHNOLOGY (MEMBER)

FOKAS DEMOSTHENES, ASSOC. PROFESSOR, DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, UNIVERSITY OF IOANNINA (SUPERVISOR)

IOANNINA, JULY 2020

εγχαριστιές

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοϊατρικής και Χημικής Τεχνολογίας του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την περίοδο 2018-2020 στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Ιατρική Χημεία, υπό την επίβλεψη του Αναπλ. Καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά.

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμότατες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημοσθένη Φωκά για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εργασίας και την αμέριστη συμπαράστασή του. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεχή υποστήριξη, την άριστη συνεργασία και το όμορφο κλίμα κατά την παρουσία μου στο εργαστήριο όπως επίσης και για τα εποικοδομητικά του σχόλια που ήταν καθοριστικά για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον συνεπιβλέποντα καθηγητή του Τμήματος Χημείας, κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, για τη βοήθεια και την συνεχή υποστήριξη, όπως και τον συνεπιβλέποντα ερευνητή του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών κ. Κωνσταντίνο Ταμβακόπουλο για τη συνεργασία και την προθυμία να συμμετάσχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και βοήθεια τους, και ιδιαίτερα τη συνάδελφο Βίβιαν Βαλάκα με την οποία μοιραστήκαμε αυτή την ερευνητική δουλειά.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ξεχωριστές ευχαριστίες στους γονείς μου και στην αδερφή μου για την ψυχολογική υποστήριξη και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν κατά την περίοδο αυτή.

Περιεχόμενα

Περίληψη8
Abstract9
Εισαγωγή10
Καρκίνος10
Βασικές αρχές σχεδιασμού στοχευτικών συζευγμάτων
Ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων14
Συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων (Multi-Drug Conjugates)17
Διβρωμοπυριδαζινοδιόνη (diBrPD)19
Στρατηγική21
Γεμσιταβίνη (Gemcitabine)24
Σουνιτινίμπη (Sunitinib)26
SAP: Ένα νέο ανάλογο της Σουνιτινίμπης27
Συζήτηση-Αποτελέσματα28
Σύνθεση βιοδιασπώμενης γέφυρας Val-Cit28
Σύνθεση της συζευγμένης γεμσιταβίνης με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit (Gemcitabine-linker)31
Σύνθεση του συζευγμένου SAP με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit (SAP-linker)34
Σύνθεση του ικριώματος diBrPD36
Δοκιμαστικές μελέτες σύζευξης38
Επαναπροσδιορισμένη στρατηγική σύνθεσης του ικριώματος
Πειραματικό μέρος
Υλικά και μέθοδοι50
Σύνθεση ενώσεων 1-29b51
Συμπεράσματα64
Λίστα συντομογραφιών65
Παράρτημα68
Βιβλιογραφία92

Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας στις αναπτυγμένες χώρες και είναι το αποτέλεσμα της απορρύθμισης των μηχανισμών που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι η στοχευμένη παροχή τους στους όγκους μέσω σύζευξης με στοχευτικά προσδέματα (π.χ. αντισώματα, πεπτίδια) εκλεκτικά προς υποδοχείς που υπερεκφράζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Συζεύγματα τέτοιου τύπου βρίσκονται ήδη σε κλινικές δοκιμές με τα κλινικά οφέλη να είναι σημαντικά, ωστόσο μπορεί να κριθούν αναποτελεσματικά στην περίπτωση ετερογενών όγκων. Λόγω της απουσίας συζευγμάτων που φέρουν φάρμακα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης έγινε μια προσπάθεια ορθογώνιου σχεδιασμού και σύνθεσης συζευγμάτων με διπλό φαρμακευτικό φορτίο (γεμσιταβίνη, SAP). Τα δύο φάρμακα θα συνδέονται με ένα ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης μέσω μιας βιοδιασπώμενης γέφυρας (Val-Cit) και ενός αυτοκαταστροφικού συνδέτη (ρ-αμινοβενζυλική αλκοόλη), επιτρέποντας την χημική/ενζυμική απελευθέρωση των φαρμάκων στο ενδόσωμα μετά την παρουσία ενδοκυττάρωση του συζεύγματος. Н του ικριώματος της διβρωμοπυριδαζινοδιόνης διευκολύνει την εισαγωγή πολλαπλών ομάδων με κατάλοιπα κυστεΐνης μέσω αντιδράσεων σύζευξης και σχηματισμού σταθερών σουλφιδικών δεσμών που προκύπτουν με την αντικατάσταση των ατόμων βρωμίου του διπλού δεσμού. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας επετεύχθη η σύνθεση της βιοδιασπώμενης γέφυρας Val-Cit και η σύνδεσή της με τη γεμσιταβίνη και το SAP καθώς και η ανάπτυξη του σχεδιασμού της σύνθεσης του ικριώματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης.

Abstract

Cancer is one of the most serious health problems currently occurring in developed countries and it is the result of deregulation of the mechanisms that control the behavior of normal cells. A promising approach to improve the efficacy of chemotherapeutic agents is to enhance tumor delivery by linking them with ligands (e.g. antibodies, peptides) with high affinity to receptors overexpressed in cancer cells. Such targeted conjugates are already in clinical trials with important clinical benefits, however they may be inefficient when treating heterogeneous tumors containing different cell populations. In the absence of targeted cancer therapeutics capable of delivering two mechanistically different drugs, we aim to develop conjugates carrying two different drugs (gemcitabine, SAP). Both drugs would be linked with a dibromopyridazinedione scaffold via a Val-Cit cleavable bridge and a self-immolating linker (p-aminobenzyl alcohol), that would allow the chemical/enzymatic release of both drugs in the endosome after endocytosis. The presence of the dibromopyridazinedione scaffold may facilitate the introduction of multiple moieties with cysteine residues through conjugation reactions, forming stable sulfide adducts, capitalizing on bromine displacement. In the context of this work, we managed to achieve the synthesis of the biodegradable Val-Cit bridge, as well as its linkage to gemcitabine and SAP. In addition, we developed a synthetic procedure towards the synthesis of the dibromopyridazinedione scaffold.

Εισαγωγή

Καρκίνος

Η κυτταρική διαίρεση είναι μια θεμελιώδης ιδιότητα όλων των ζωντανών οργανισμών. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς η ζωή ξεκινά από ένα μόνο κύτταρο και εξελίσσεται στην ενηλικίωση μέσω της κυτταρικής διαίρεσης και της διαφοροποίησης. Ένα περίτεχνο σύστημα ελέγχου ρυθμίζει αυστηρά την κυτταρική διαίρεση στις απαιτήσεις του οργανισμού. Τυχόν εκτροπές από αυτό το σύστημα μπορεί να οδηγήσουν σε αυτόνομη κυτταρική διαίρεση.¹

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια που εμφανίζεται όταν οι πληροφορίες στο κυτταρικό DNA έχουν υποστεί φθορά οδηγώντας σε ανωμαλίες κατά την γονιδιακή έκφραση. Ως αποτέλεσμα, οι επιδράσεις των φυσιολογικών γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη των κυττάρων, την επιβίωση και την εξάπλωση, ενισχύονται και εκείνες των γονιδίων που καταστέλλουν αυτές τις επιδράσεις, καταστέλλονται. Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο εμφανίζεται αυτή η αλλοίωση του γενετικού κώδικα είναι μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων, αν και υπάρχει αυξανόμενη αναγνώριση του ρόλου των μη μεταλλαξογόνων (επιγενετικών) αλλαγών στη διαδικασία.²

Τα καρκινικά κύτταρα ορίζονται από δύο κληρονομικές ιδιότητες: (1) αναπαράγονται αψηφώντας τους φυσιολογικούς περιορισμούς στην ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων και (2) εισβάλλουν σε περιοχές που συνήθως προορίζονται για άλλα κύτταρα. Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων είναι που κάνει τον καρκίνο ιδιαίτερα επικίνδυνο. Ένα ανώμαλο κύτταρο που αναπτύσσεται, αυξάνοντας τη μάζα του και πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα θα οδηγήσει σε έναν όγκο, ή νεόπλασμα. Όσο τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν διεισδύουν στους περιβάλλοντες ιστούς, ο όγκος χαρακτηρίζεται ως καλοήθης, και η αφαίρεση ή η καταστροφή της μάζας τοπικά συνήθως επιτυγχάνει μια πλήρη θεραπεία. Ένας όγκος θεωρείται καρκίνος μόνο αν είναι κακοήθης, δηλαδή, μόνο εάν τα κύτταρά του έχουν αποκτήσει την ικανότητα να εισβάλλουν στον περιβάλλοντα ιστό. Η διείσδυση είναι ένα ουσιαστικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Επιτρέπει την ενδαγγείωσή τους και μέσω του κυκλοφορικού συστήματος διασπείρονται σε άλλες περιοχές του σώματος, σχηματίζοντας δευτερογενείς όγκους που ονομάζονται μεταστάσεις. Όσο ευρύτερη

είναι η εξάπλωση ενός καρκίνου, τόσο δυσκολότερη γίνεται η εξάλειψή του και γενικά οι μεταστάσεις είναι που σκοτώνουν τον ασθενή με καρκίνο.³



Εικόνα 1. Hallmarks of Cancer (Cell 2011, 144, 646-674).

Από την καθιέρωση των έξι χαρακτηριστικών του καρκίνου το 2000 από τους Hanahan και Weinberg, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση και τη θεραπεία της νόσου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, τα καρκινικά κύτταρα έχουν μερικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση. Η ανώμαλη ανάπτυξη του όγκου είναι αποτέλεσμα πολλών μεταλλάξεων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και το θάνατο. Αν και, αυτές οι μεταλλάξεις διαφέρουν από μια νεοπλασματική νόσο σε μια άλλη, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν κάποια διακριτά χαρακτηριστικά, παρόμοια στους περισσότερους τύπους καρκίνου. Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου, όπως καθιερώθηκαν από τους Hanahan και Weinberg το 2011 είναι⁴:

- Αντίσταση στους μηχανισμούς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και αποφυγή απόπτωσης
- 2. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
- 3. Καταστολή αντι-αυξητικών σημάτων

- 4. Γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις
- 5. Συνεχής αγγειογένεση
- 6. Διήθηση και μετάσταση
- 7. Φλεγμονή που προωθεί τον καρκίνο
- 8. Απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού
- 9. Αποφυγή ανοσο-καταστροφής
- 10. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός

Αγγειογένεση είναι η διαδικασία του σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγειακά δίκτυα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα διαιρούνται και ενσωματώνονται σε νέα τριχοειδή αγγεία.⁵ Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη έτσι ώστε οι όγκοι να αναπτυχθούν πάνω από 1-2 mm³. Επιτρέπει επίσης στα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος, επιτρέποντας την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων σε διάφορα όργανα (μετάσταση). Σε υγιείς ενήλικες, η αγγειογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία πολλαπλών σταδίων που εξαρτάται αυστηρά από μια ισορροπία μεταξύ ενδογενών προ-αγγειογόνων και αντι-αγγειογόνων παραγόντων. Αυξητικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (VEGFs) και αυξητικών παραγόντων που προέρχονται από αιμοπετάλια (PDGFs), είναι σημαντικοί προ-αγγειογόνοι παράγοντες και η δραστηριότητά τους σχετίζεται με τη σύνδεσή τους με συγκεκριμένους μεμβρανικούς υποδοχείς (υποδοχείς κινάσης τυροσίνης). Κατά τη σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα, η κινάση τυροσίνης του ενδοκυττάριου μέρους του υποδοχέα ενεργοποιείται και ξεκινά έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη σηματοδότησης που τελικά οδηγεί στην κυτταρική δράση. Υπερεκφρασμένοι ή μεταλλαγμένοι αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς κινάσης τυροσίνης εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνου και διαταράσσουν την αγγειογενετική ισορροπία ευνοώντας τον αυξημένο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων.6

Βασικές αρχές σχεδιασμού στοχευτικών συζευγμάτων

Τα περισσότερα φάρμακα κατά του καρκίνου έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να παρεμβαίνουν με έναν ή περισσότερους τρόπους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή την επιβίωσή τους. Δεδομένου ότι τα υγιή κύτταρα πρέπει να πολλαπλασιαστούν και να αποφύγουν την απόπτωση, τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να αποδειχθούν τοξικά για τα κύτταρα. Για τη μείωση της τοξικότητας, έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές όπου ο θεραπευτικός παράγοντας στοχεύει τα καρκινικά κύτταρα μέσω της σύζευξης με ένα πρόσδεμα εκλεκτικό προς αυτά, μειώνοντας έτσι τη μεταφορά του φαρμάκου στα φυσιολογικά κύτταρα και τη σχετιζόμενη τοξικότητα.

Η γενική δομή αυτής της κατηγορίας φαρμάκων (Εικόνα 2) περιλαμβάνει ένα στοχευτικό τμήμα συνδεδεμένο με τον θεραπευτικό παράγοντα μέσω μιας διασπώμενης γέφυρας. Αν και ο θεραπευτικός παράγοντας μπορεί να είναι παρόμοιος μεταξύ διαφόρων φαρμάκων αυτής της κατηγορίας, μια ποικιλία τμημάτων στόχευσης έχουν χρησιμοποιηθεί όπως αντισώματα, μικρά πρωτεϊνικά ικριώματα, πεπτίδια αλλά και χαμηλού μοριακού βάρους μη πεπτιδικά προσδέματα, που εμφανίζουν όλα ιδιαίτερο ενδιαφέρον.



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση ενός στοχευτικού συζεύγματος (Nat. Rev. Drug Discov. **2015**, 14, 203–219).

Όσον αφορά τα στοχευτικά συζεύγματα φαρμάκων [Ligand Drug Conjugates (LDCs)], η αποτελεσματικότητα ελέγχεται κυρίως από τη δραστικότητα του θεραπευτικού παράγοντα του συζεύγματος και τον αριθμό των υποδοχέων που διατίθενται για την ενδοκυττάρωση του φαρμάκου από τα καρκινικά κύτταρα. Η ασφάλεια διέπεται από την εκλεκτικότητα του στοχευτικού συζεύγματος για τα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Δεδομένου ότι η ασφάλεια εξαρτάται από τη βιοκατανομή και τη θέση των υποδοχέων με τους οποίους συνδέεται το σύζευγμα, η προσεκτική επιλογή του υποδοχέα-στόχου των καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση της τοξικότητας.

Ο υποδοχέας-στόχος, προκειμένου να είναι κατάλληλος για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, πρέπει γενικά να πληροί δύο κριτήρια: να υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα και το απόλυτο επίπεδο έκφρασής του στα καρκινικά κύτταρα να είναι επαρκές για να καταστεί δυνατή η παροχή θεραπευτικών ποσοτήτων του επιθυμητού φαρμάκου μέσω ενδοκυττάρωσης από τον ίδιο τον υποδοχέα.⁷

Ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέων

Στη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων μέσω υποδοχέων, το στοχευτικό σύζευγμα εισέρχεται στο κύτταρο-στόχο με ενδοκυττάρωση και έπειτα κατανέμεται σε ενδοκυτταρικές δομές όπως είναι τα ενδοσώματα ανακύκλωσης, τα διαμερίσματα αποσύνδεσης υποδοχέα και προσδέματος (CURL) ή τα λυσοσώματα. Μέσα στο CURL, το σύζευγμα και ο υποδοχέας μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους και να ταξινομηθούν σε ξεχωριστά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, επιτρέποντας στον υποδοχέα είτε να αποσόμθει είτε να επιστρέψει στην επιφάνεια των κυττάρων και να επαναλάβει τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης (Εικόνα 3).

Δεδομένου ότι η διαθεσιμότητα των ελεύθερων υποδοχέων στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης θα εξαρτηθεί από το ρυθμό επιστροφής των μη κατειλημμένων υποδοχέων από τα ενδοσώματα, ένας ιδανικός υποδοχέας θα είναι αυτός που είτε ανακυκλώνεται συχνά είτε ανασυντίθεται γρήγορα μετά την αποδόμησή του. Παραδείγματα υποδοχέων που ανταποκρίνονται σε αυτές τις απαιτήσεις περιλαμβάνουν τους υποδοχείς EGF, PSMA και FRα. Η αξιολόγηση του ποσοστού επανεμφάνισης των υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων είναι

ζωτικής σημασίας, καθώς ένα φάρμακο που χορηγείται πιο συχνά από το ρυθμό επανεμφάνισης των κενών υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων θα προκαλέσει περιττή τοξικότητα.



Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 3. Ενδοκυττάρωση στοχευτικού συζεύγματος (Nat. Rev. Drug Discov., **2015**, *14*, 203–219).

Όσον αφορά τη θέση του υποδοχέα, ένας ιδανικός υποδοχέας-στόχος θα εκφράζεται στην επιφάνεια ενός καρκινικού κυττάρου και όχι εντός του κυτταροπλάσματος ή του πυρήνα του. Αρχικά, τα LDCs που στοχεύουν ενδοκυτταρικούς υποδοχείς (π.χ. στεροειδών ορμονών, υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος κ.λπ.) πρέπει να έχουν την δυνατότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, προκειμένου να επιτύχουν τους ενδοκυτταρικούς στόχους τους. Αυτό σημαίνει πως θα είναι επίσης ικανά να εισέλθουν σε υγιή κύτταρα. Επομένως η μη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων θα οδηγήσει φυσικά σε τοξικότητα.⁸ Επιπλέον, καθώς οι όγκοι κατανομής για συζεύγματα φαρμάκων που διαχέονται παθητικά σε όλες τις μεμβράνες του πλάσματος στοχεύοντας ενδοκυτταρικούς υποδοχείς θα περιλαμβάνουν αναγκαστικά κύτταρα στα οποία δεν θα απαντώνται οι υποδοχείς-στόχοι, θα πρέπει να χορηγηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις συζευγμάτων για την επίτευξη θεραπευτικής δόσης. Αντίθετα, τα LDCs που στοχεύουν τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να μη διαπερνούν τις μεμβράνες, διασφαλίζοντας ότι μόνο τα κύτταρα με τους κατάλληλους μεμβρανικούς υποδοχείς μπορούν να προβούν στην πρόσληψή τους.

Οι υποδοχείς που συνήθως εκφράζονται μόνο στην εξωτερική επιφάνεια υγιών επιθηλιακών κυττάρων (για παράδειγμα, FRα, υποδοχέας ουροκινάσης και ορισμένες βλεννίνες) μπορούν επίσης να παρέχουν μοναδικές ευκαιρίες για εκλεκτική στόχευση όγκων. Συγκεκριμένα, οι υποδοχείς που περιορίζονται στην εξωτερική επιφάνεια των πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων (όπως τα αγγειακά επιθηλιακά κύτταρα) θα είναι απρόσιτοι σε παρεντερικά χορηγούμενα φάρμακα λόγω διακυτταρικών συνδέσμων, οι οποίοι εμποδίζουν τα διαλύματα και τα σωματίδια να διασχίσουν το επιθήλιο. Ωστόσο, κατά τον κακοήθη μετασχηματισμό, οι υποδοχείς της εξωτερικής επιφάνειας συχνά γίνονται προσβάσιμοι σε ενδοφλέβια φάρμακα, επειδή οι διακυτταρικές συνδέσεις χάνονται κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης και οι υποδοχείς της εξωτερικής επιφάνειας κατανέμονται τυχαία σε ολόκληρη την επιφάνεια. Έτσι, ένας υποδοχέας που υπό κανονικές συνθήκες απαντάται αποκλειστικά στην εξωτερική επιφάνεια ενός επιθηλιακού κυττάρου μπορεί να αποτελέσει έναν κατάλληλο υποδοχέα-στόχο, εάν η έκφρασή του εξακολουθεί να υφίσταται στο μη πολωμένο κακοήθες κύτταρο (Εικόνα 4).⁷



Εικόνα 4. Η επίδραση του μετασχηματισμού των επιθηλιακών κυττάρων στην πρόσβαση των υποδοχέων της εξωτερικής επιφάνειας (*Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 203–219).

Συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων (Multi-Drug Conjugates)

Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των χημειοθεραπευτικών παραγόντων είναι η στοχευμένη παροχή τους στους όγκους μέσω σύζευξης με στοχευτικά προσδέματα (π.χ. αντισώματα, πεπτίδια) εκλεκτικά προς υποδοχείς που υπερεκφραζονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Οι υπάρχουσες στρατηγικές για το σχεδιασμό στοχευτικών συζευγμάτων βασίζονται στη σύζευξη ενός μόνο αντικαρκινικού παράγοντα με το στοχευτικό πρόσδεμα.⁷ Αν και έχουν επιτευχθεί σημαντικά κλινικά οφέλη με την ανάπτυξη τέτοιου είδους στοχευμένων θεραπειών, μπορεί να είναι αναποτελεσματικές κατά τη θεραπεία ετερογενών όγκων που περιέχουν κυτταρικούς πληθυσμούς με διαφορετικές αποκρίσεις σε φάρμακα. Η ταυτόχρονη παροχή θεραπευτικών παραγόντων με διαφορετικό μηχανισμό δράσης μπορεί να ξεπεράσει την αντίσταση στα φάρμακα, καθώς και να δημιουργήσει συνεργιστικές αντικαρκινικές επιδράσεις ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα.⁹ Ως εκ τούτου, στοχευτικό μηχανισμό δράσης μπορεί να αποδειχθούν καθοριστικά για την αντιμετώπιση της αντίστασης στα φάρμακα.

Ο σχεδιασμός φαρμακευτικών συζευγμάτων για τη στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων μέσω υποδοχέων (PDCs και ADCs), η σύζευξη του φαρμάκου με ένα πεπτίδιο υποδοχέα (receptor binding peptide, RBP) ή ένα στοχευτικό αντίσωμα, έχει επιφέρει σημαντικά κλινικά οφέλη. Μέχρι σήμερα, πέντε ADCs (antibody-drug conjugates) έχουν λάβει έγκριση και πάνω από 100 διερευνώνται σε διάφορα στάδια κλινικής ανάπτυξης.¹⁰ Στοχευτικά PDCs (peptide-drug conjugates) θα μπορούσαν να έχουν ανάλογη επιτυχία ξεκινώντας με την έγκριση του 177Lu Dotatate για τη θεραπεία των γαστρεντεροπανκρεατικών νευροενδοκρινικών όγκων.¹¹ Το σημαντικά χαμηλότερο κόστος παραγωγής και η αυξημένη αναπαραγωγιμότητα των PDCs, η καλύτερη διεισδυτική ικανότητα στους ιστούς, η υψηλή απόδοση φόρτωσης, η ισχύς του σκευάσματος, εκτός από την ισχυρή αντικαρκινική δράση των PDCs, προσφέρουν ορισμένα ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες στοχευτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις (π.χ. ADCs). Μια νέα κατηγορία μικρών συνθετικών πεπτιδίων χωρίς ενδείξεις ανοσογονικότητας, επονομαζόμενα ως bicycle, έχουν πρόσφατα έρθει στο προσκήνιο ως νέα στοχευτικά προσδέματα.¹² Το μικρό τους

μέγεθος και η εξαιρετική στόχευση όγκων, σε συνδυασμό με τα φαρμακοκινητικά πλεονεκτήματα ενός μικρού μορίου, οδήγησαν στο σχεδιασμό του πρώτου bicycle PDC που βρίσκεται σήμερα σε κλινικές δοκιμές (Bicycle Therapeutics, BT1718, NCT03486730). Τα συζεύγματα φαρμάκων με πολυμερή (polymer-drug conjugates, PLDCs) αποτελούν ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο, με αρκετά πολυμερικά συζεύγματα να προχωρούν στο στάδιο των κλινικών δοκιμών (CT-2013; CRLX101, NCT03531827).¹³ Οι θεραπείες αυτές όμως μεταφέρουν στο σημείο-στόχο μόνο ένα φάρμακο, δεδομένου ότι ο σχεδιασμός τους βασίζεται στη σύζευξη ενός ενιαίου αντικαρκινικού παράγοντα με μια στοχευτική ομάδα. Αξιοσημείωτες εξαιρέσεις σε αυτή την καθιερωμένη τάση σχεδιασμού είναι τα ομοδιμερή και ετεροδιμερή συζεύγματα της καμπτοθεκίνης (camptothecin) και της χλωραμπουκίλης (chlorambucil) με ένα κυκλικό πεπτίδιο RGD, όπου τα φάρμακα συνδέονται με τη στοχευτική ομάδα μέσω ενός υπολείμματος λυσίνης ή σερίνης¹⁴, και ένα σύζευγμα της πρωτεΐνης FGF2 με auristatin και α-amanitin για τη στόχευση των καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα FGFR1.¹⁵ Ωστόσο, αυτά τα δύο παραδείγματα δεν αντιπροσωπεύουν μια ευέλικτη στρατηγική που θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει μια ποικιλία στοχευτικών ομάδων, γεφυρών και φαρμάκων με έναν ορθογώνιο σχεδιασμό. Η απουσία τέτοιων στοχευτικών συζευγμάτων μας ώθησε στην ανάπτυξη μιας ευέλικτης μεθοδολογίας για την ορθογώνια σύνθεση στοχευτικών πολύ-φαρμακευτικών συζευγμάτων (targeted multi-drug conjugates) με σκοπό την ταυτόχρονη απελευθέρωση περισσότερων του ενός φαρμάκου στα κύτταρα-στόχους. Όπως φαίνεται κι από το Σχήμα 1 μια πληθώρα στοχευτικών συζευγμάτων με διπλό θεραπευτικό φορτίο θα μπορούσε να προκύψει από την αντίστοιχη διβρωμοπυριδαζινοδιόνη diBrPD-DDC. Για παράδειγμα peptide dual-drug conjugates (PDDC) (μονοπάτι a), bicycle peptide dual-drug conjugates (BPDDC) (μονοπάτι b) και polymer dual-drug conjugates (PLDDC) (μονοπάτι c) μέσω σύζευξης της diBrPD-DDC με στοχευτικά πεπτίδια υποδοχέων (RBP) που αναγνωρίζουν και προσδένονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς, πεπτίδια τύπου bicycle (BP) και πολυμερικά νανοσωματίδια (PN) αντίστοιχα. Εκτός από το διπλό θεραπευτικό φορτίο, τα συζεύγματα θα μπορούν να φέρουν δύο στοχευτικές ομάδες, ενισχύοντας πιθανά τη στοχευτική ικανότητα του συζεύγματος. Ακόμη, σύζευξη της diBrPD-DDC με μια ανηγμένη δισουλφιδική γέφυρα ενός αντισώματος θα οδηγήσει στη

δημιουργία antibody drug conjugates με διπλό θεραπευτικό φορτίο (ADDC) (μονοπάτι e). Χρησιμοποιώντας ανάλογη στρατηγική θα ήταν εφικτή η δημιουργία multi-drug conjugates (MDC) με τρία διαφορετικά φάρμακα και μια στοχευτική ομάδα (RBP, BP, PN) (μονοπάτι d).



Σχήμα 1. Στρατηγική σχεδιασμού στοχευτικών συζευγμάτων με βάση το ικρίωμα diBrPD.

Διβρωμοπυριδαζινοδιόνη (diBrPD)

Η επιλεκτική τροποποίηση των πρωτεϊνών βρίσκεται στην πρώτη γραμμή των σύγχρονων προσεγγίσεων για την επίλυση προβλημάτων στη χημική βιολογία. Η κατασκευή αυτών των πρωτεϊνικών βιοσυζευγμάτων χρησιμοποιεί συχνά κυστεΐνη ως μέσο σύζευξης.¹⁶ Η μέθοδος αυτή είναι δημοφιλής λόγω της χαμηλής φυσικής αφθονίας της κυστεΐνης, της υψηλής πυρηνοφιλίας και της ευκολίας με την οποία η κυστεΐνη μπορεί να εισαχθεί στις επιθυμητές θέσεις των πρωτεϊνικών ακολουθιών χρησιμοποιώντας τις σύγχρονες μοριακές μεθόδους βιολογίας.¹⁷

Συνήθως, τα μαλεϊμίδια χρησιμοποιούνται εκτενώς για την τροποποίηση κυστεΐνης καθώς αντιδρούν γρήγορα και εκλεκτικά με θειόλες.¹⁸ Ωστόσο, αντιδρούν μη αντιστρεπτά και έτσι δεν μπορούν να διασπαστούν σε μεταγενέστερα στάδια για την αναγέννηση ελεύθερης κυστεΐνης. Η αναστρεψιμότητα αυτή θα μπορούσε να είναι

εξαιρετικά χρήσιμη, δεδομένου ότι θα επέτρεπε την προσωρινή τροποποίηση.¹⁹ Ωστόσο, πρόσφατα έγινε γνωστό ότι ο θειαιθερικός δεσμός διασπάται μέσω μιας αντίστροφης αντίδρασης Michael, που οδηγεί στην απώλεια φορτίου και μείωση της αποτελεσματικότητας. Το σύζευγμα μαλεϊμιδίου-φορτίου μπορεί στη συνέχεια να συνδεθεί με άλλες θειόλες του πλάσματος (π.χ. ανθρώπινος ορός λευκωματίνης) που οδηγούν σε τοξικότητα και μειωμένη αποτελεσματικότητα (Εικόνα 5).¹⁸



Εικόνα 5. (a) Ανταγωνιστικές αντιδράσεις του συζεύγματος μαλεϊμιδίου-κυστεϊνης. (b) Αντιδράσεις του συζεύγματος κυστεϊνης-πυριδαζινοδιόνης. (*Chem. Commun.* **2019**, 55, 14829—14832)

Πρόσφατα, οι διβρωμοπυριδαζινοδιόνες (diBrPDs) έχουν αναδειχθεί ως μια κατηγορία αντιδραστηρίων δισουλφιδικής γεφύρωσης με μεγάλες δυνατότητες, καθώς δεν απαιτούν υδρόλυση για να αποκτήσουν σταθερότητα στον ορό του αίματος, όπως τα μαλεϊμίδια, και είναι ανθεκτικά σε ήπια αναγωγικά αντιδραστήρια. Παρέχουν τη δυνατότητα σύζευξης διαφόρων προσδεμάτων μέσω των τεσσάρων σημείων σύνδεσης

Εικόνα **6**). Διάφορα μόρια μπορούν να συνδεθούν μέσω του ατόμου αζώτου, ενώ η διατήρηση του διπλού δεσμού της diBrPD με δύο άτομα βρωμίου είναι ιδανική για την αντίδραση σύζευξης με στοχευτικά τμήματα που περιέχουν τις ελεύθερες -SH ομάδες όπως στοχευτικά πεπτίδια κ.λπ.^{20,21} Το μοντέλο της diBrPD έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην παραγωγή ADCs, συζευγμάτων αντισωμάτων, φωτοευαισθητοποιητών κατευθυνόμενους από αντισώματα, σύζευξη μεταξύ πρωτεϊνών και στοχευμένη νανοθεραπεία.²⁰



Εικόνα 6. Ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης με δύο διαφορετικά προσδέματα συνδεδεμένα μέσω των ατόμων αζώτου.

Στρατηγική

Ο σχεδιασμός για τη σύνθεση συζευγμάτων με διπλό θεραπευτικό φορτίο (dual-drug conjugates) θα βασιστεί πάνω σε ένα ικρίωμα diBrPD όπου η σύνδεση των δύο φαρμάκων με το ικρίωμα θα γίνει μέσω διασπώμενων γεφυρών Val-Cit που θα επιτρέψουν τη χημική/ενζυμική απελευθέρωση του φαρμακευτικού φορτίου στα λυσοσώματα μετά την ενδοκυττάρωση του συζεύγματος Ι. Η γέφυρα Val-Cit, που διασπάται από την Καθεψίνη-Β, παραμένει σταθερή στην κυκλοφορία του αίματος και υδρολύεται στα λυσοσώματα μετά την ενδοκυττάρωση.²² Η καθεψίνη-Β αποτελεί μια κυστεϊνοπρωτεάση με δράση ουβικιτίνης, της οποίας οι ιδιότητες δε διαφέρουν πολύ από είδος σε είδος. Υπερεκφράζεται στα λυσοσώματα κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, ενώ δε συναντάται ποτέ εξωκυττάρια. Τα δύο φάρμακα θα μπορούσαν να συνδεθούν με τη γέφυρα είτε μέσω αμινομάδας (SAP), είτε μέσω υδροξυλομάδας (Γεμσιταβίνη). Στην περίπτωση της αμινομάδας η σύνδεση θα πραγματοποιηθεί μέσω καρβαμικού δεσμού μεταξύ της αμινομάδας του φαρμάκου και της p-αμινοβενζυλικής αλκοόλης (PABOH), ενός αυτοκαταστροφικού συνδέτη.²² Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 2, η Καθεψίνη-Β θα διασπάσει τον πεπτιδικό δεσμό ανάμεσα στην καρβοξυλομάδα της κιτρουλίνης και την αμινομάδα της PABOH (ενδιάμεσο II), ενώ η PABOH έπειτα από αντίδραση απακυλίωσης θα απελευθερώσει το ελεύθερο φάρμακο. Στην περίπτωση της δεύτερης κατηγορίας φαρμάκων, καθώς η υδροξυλομάδα του φαρμάκου μπορεί να είναι στερικά παρεμποδισμένη ή ασθενώς πυρηνόφιλη για τη δημιουργία καρβονικού δεσμού με τη γέφυρα, θα εισαχθεί κι ένας πυρηνόφιλος συνδέτης (αιθυλενοδιαμίνη). Έπειτα από υδρόλυση της PABOH του ενδιαμέσου III, η αιθυλενοδιαμίνη αναμένεται να πυροδοτήσει μια ενδομοριακή αντίδραση κυκλοποίησης (ενδιάμεσο IV), απελευθερώνοντας ένα ανάλογο κυκλικής ουρίας και το ελεύθερο φάρμακο.



Σχήμα 2. Σχεδιασμός συζευγμάτων με βάση το ικρίωμα diBrPD.

Η στρατηγική που θα ακολουθηθεί για την ορθογώνια σύνθεση του diBrPD-DDC φαίνεται στο Σχήμα 3. Η σύνθεση του diBrPD-DDC θα μπορούσε να προκύψει από τη σύζευξη του δικαρβοξυλικού οξέος **22** με την αμινομάδα της βαλίνης των συζευγμάτων γέφυρας-φαρμάκου **9** και **18** αντίστοιχα. Το δικαρβοξυλικό οξύ θα προέκυπτε έπειτα από μία σειρά αντιδράσεων, ξεκινώντας από τον ανυδρίτη **19** και υδραζίνη, ενώ οι συζεύξεις των φαρμάκων με τη γέφυρα Val-Cit περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο

αντικαρκινικά φάρμακα με ευρεία χρήση στη χημειοθεραπεία αλλά και παράπλευρη τοξικότητα. Η γεμσιταβίνη χρησιμοποιείται ως απλή θεραπεία αλλά και σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα για τη θεραπεία μιας πληθώρας τύπων καρκίνου. Το SAP, ένα νέο πιπεραζινικό ανάλογο της σουνιτινίμπης, επιτρέπει τη σύζευξη του φαρμάκου με στοχευτικές ομάδες διατηρώντας την αντιαγγειογενετική δράση του.²³



Σχήμα 3. Στρατηγική σύνθεσης συζευγμάτων με διπλό θεραπευτικό φορτίο

Γεμσιταβίνη (Gemcitabine)



Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι μια σημαντική κατηγορία χημειοθεραπευτικών παραγόντων που περιλαμβάνουν μια ποικιλία νουκλεοσιδικών παραγώγων πυριμιδίνης και πουρίνης με ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι αιματολογικών και συμπαγών όγκων.²⁴ Η γεμσιταβίνη (2', 2'- διφθορο-2'- δεοξυκυτιδίνη, dFdC,) (Εικόνα 7) είναι ένα ανάλογο της Κυταραβίνης (Ara-C) από την οποία διαφέρει δομικά λόγω των υποκαταστατών του φθορίου στη θέση 2' του

Εικόνα 7. Χημική δομή της Γεμσιταβίνης.

φουρανοζικού δακτυλίου.²⁵ Η γεμσιταβίνη κατέχει σημαντική θέση στη θεραπεία διαφόρων τύπων συμπαγών όγκων. Ενδείκνυται ως απλή θεραπεία κατά του μεταστατικού καρκίνου του παγκρέατος και σε συνδυαστικά σχήματα για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και του καρκίνου της ουροδόχου κύστης (με cisplatin), των ωοθηκών (με carboplatin) και του καρκίνου του μαστού (με paclitaxel).²⁶

Η γεμσιταβίνη εισέρχεται στο κύτταρο από μεμβρανικούς νουκλεοσιδικούς μεταφορείς και ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση, μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την κινάση της κυτιδίνης παράγοντας μονοφωσφορική γεμσιταβίνη (dFdCMP), η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται προς διφωσφορική γεμσιταβίνη (dFdCDP) και τριφωσφορική γεμσιταβίνη (dFdCTP). Η γεμσιταβίνη δρα κυτταροτοξικά κυρίως μέσω της ενσωμάτωσης της dFdCTP στην αλυσίδα του DNA αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA και οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Η dFdCDP έχει επίσης έμμεση κυτταροτοξική δράση αναστέλλοντας τη ριβονουκλεοτιδική αναγωγάση. Ένα σημαντικό εμπόδιο που σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα της γεμσιταβίνης είναι η ταχεία αδρανοποίησή της, καθώς κατά τη χορήγηση περισσότερο από το 90% μετατρέπεται στον ανενεργό μεταβολίτη της, 2,2'-διφθοροδεοξυουριδίνη (dFdU) και στο αντίστοιχο μονοφωσφορικό παράγωγο (dFdUMP).²⁷

Όπως όλα τα νουκλεοσιδικά ανάλογα, η γεμσιταβίνη αντιμετωπίζει προκλήσεις λόγω της ύπαρξης πολυάριθμων εγγενών και επίκτητων μηχανισμών αντοχής έναντι των φαρμάκων που περιορίζουν την ευρεία χρήση της στη θεραπεία του καρκίνου. Οι

μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν κυρίως (i) ανεπαρκή μετατροπή σε dFdCDP και dFdCTP (ii) ταχεία αποικοδόμηση σε τοξικά παραπροϊόντα και (iii) περιορισμένη πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα. Αυτοί οι μηχανισμοί οφείλονται (i) στην απορρύθμιση της κινάσης της κυτιδίνης που απαιτείται για να μετατρέψει γεμσιταβίνη σε dFdCMP (ii) στην υπερέκφραση του κατασταλτικού ενζύμου της απαμινάσης της κυτιδίνης (CDA), το οποίο είναι ικανό να μετατρέψει τη γεμσιταβίνη στον ανενεργό μεταβολίτη 2,2'-διφθοροδεοξυουριδίνη, dFdU και (iii) στην ανεπάρκεια νουκλεοσιδικών πρωτεϊνικών μεταφορέων, συμπεριλαμβανομένων των ENT και CNT1, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την εισαγωγή της γεμσιταβίνης εντός του κυττάρου (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Μεταβολισμός και μηχανισμοί δράσης της γεμσιταβίνης.(Annals of Oncology, 2006, 17, 7-12)

Προκειμένου να αποφευχθεί η μειωμένη αποτελεσματικότητα της γεμσιταβίνης λόγω των ανενεργών μεταβολιτών της, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την τροποποίηση του φαρμάκου εισάγοντας διάφορα προστατευτικά τμήματα στις δραστικές του θέσεις, συγκεκριμένα στη θέση 4-NH και τη θέση 5'-OH. Αρκετά προφάρμακα τα οποία περιέχουν κάποιο προστατευτικό τμήμα σε αυτές τις δύο θέσεις έχουν συντεθεί με σκοπό την ελαχιστοποίηση της υδρόλυσης του φαρμάκου στο πλάσμα, ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητά του.²⁴ Σουνιτινίμπη (Sunitinib)



Εικόνα 9. Χημική δομή του SAP σε σύγκριση με αυτή της σουνιτινίμπης.

Η αγγειογένεση είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των συμπαγών όγκων και αποτελεί έναν αρκετά ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Πολλές αντικαρκινικές θεραπείες κατά των σχετιζόμενων με αγγειογένεση όγκων έχουν ως στόχο κινάσες τυροσίνης (TKs). Οι αναστολείς των κινασών τυροσίνης ανταγωνίζονται το ATP στην πρόσδεση εντός του ενδοκυττάριου τομέα διαφόρων υποδοχέων κινάσης τυροσίνης. Τείνουν να έχουν ένα καλύτερο προφίλ τοξικότητας από τα παραδοσιακά κυτταροτοξικά μόρια που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία τα οποία αλληλεπιδρούν μη-εκλεκτικά με το DNA και την τουμπουλίνη, έχοντας ως αποτέλεσμα βλάβες στους υγιείς ιστούς. Τα φάρμακα πολλαπλής στόχευσης (π.χ. sunitinib, imatinib) τα οποία μπλοκάρουν διάφορες κινάσες, στοχεύουν στην επίτευξη ευρύτερου φάσματος δραστικότητας από τα φάρμακα ενός στόχου (π.χ. erlotinib, gefitinib) ή την παραδοσιακή κυτταροτοξική θεραπεία.⁶

Η σουνιτινίμπη (Εικόνα 9) είναι ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης που ανταγωνίζεται το ATP ως προς τη θέση πρόσδεσης, αποτελεσματική έναντι του νεφροκυτταρικού καρκινώματος και του γαστρεντερικού στρωματικού όγκου. Είναι το πρώτο αντικαρκινικό φάρμακο που εγκρίθηκε ταυτόχρονα για δύο διαφορετικούς τύπους καρκίνων. Επιπλέον, έχει αντικαρκινική δράση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και νευροενδοκρινικού καρκίνου.

Η σουνιτινίμπη αναστέλλει την κυτταρική σηματοδότηση στοχεύοντας σε πολλαπλούς υποδοχείς TKs όπως τους υποδοχείς του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (PDGFRα και PDGFRβ), τους υποδοχείς του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR1 και VEGFR2), τον υποδοχέα του παράγοντα των

βλαστικών κυττάρων (KIT), την ομοιάζουσα με την Fms TK-3 (FLT3) και τον υποδοχέα του νευρογλοιακού νευροτροφικού παράγοντα (RET), ο οποίος συμβάλει τόσο στην αγγειογένεση του όγκου όσο και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Οι υποδοχείς κινασών τυροσίνης είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων που διαθέτουν εξωκυττάρια σημεία πρόσδεσης και μια ενδοκυττάρια καταλυτική περιοχή και μεταφέρουν εξωκυττάρια σήματα εντός του κυτταροπλάσματος. Η σύνδεση του προσδέματος επάγει το διμερισμό του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών περιοχών και την ενεργοποίηση της δράσης της TK. Αυτοί οι υποδοχείς είναι σημαντικοί στη μεταγωγή σημάτων για την ανάπτυξη συμπαγών όγκων. Η αναστολή αυτών των TKs εμποδίζει τη μεταγωγή σήματος, επηρεάζοντας έτσι πολλές από τις διαδικασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου, την εξέλιξη, τη μετάσταση και την αγγειογένεση.²⁸

SAP: Ένα νέο ανάλογο της Σουνιτινίμπης

Η σουνιτινίμπη είναι μια πολλά υποσχόμενη ένωση, αλλά λόγω της αδυναμίας της να συζευχθεί με άλλες δραστικές ομάδες για στοχευμένη θεραπεία, είναι λιγότερο αποτελεσματική στη στόχευση των καρκινικών κυττάρων και στην ελαχιστοποίηση της κυτταροτοξικότητας σε υγιείς ιστούς. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαίο να δημιουργηθεί ένα νέο ανάλογο της σουνιτινίμπης, φαρμακολογικά ισοδύναμο, το οποίο θα παρέχει τη δυνατότητα σύζευξης με στοχευτικά τμήματα.

To SAP (Εικόνα 9), ένα νέο ανάλογο της σουνιτινίμπης βασισμένο στην πιπεραζίνη, σχεδιάστηκε ορθολογικά διατηρώντας τη δραστικότητα της σουνιτινίμπης, αλλά με το πλεονέκτημα της στοχευμένης θεραπείας, καθώς επιτρέπει τη σύζευξη του φαρμάκου με πεπτίδια ή αντισώματα μέσω της αμινομάδας της πιπεραζίνης. Επίσης, το SAP χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο συντελεστή κατανομής (cLogP), μεγαλύτερη πολική επιφάνεια και βελτιωμένη διαλυτότητα.

Το SAP διατήρησε τη δομή της ινδολιν-2-ονης της σουνιτινίμπης που ήταν υπεύθυνη για την αναστολή των υποδοχέων TKs, ενώ παρείχε τη δυνατότητα σύζευξης με στοχευτικά πεπτίδια ή αντισώματα μέσω της αμινομάδας της πιπεραζίνης. Η

λιποφιλικότητα του SAP βρέθηκε να είναι χαμηλότερη από της σουνιτινίμπης (cLogP=1,5 έναντι 2,9 του sunitinib). Το καλό ποσοστό απορρόφησης και ο μικρός βαθμός διαπερατότητας του αιμοτοεγγεφαλικού φραγμού καθιστούν το φαρμακολογικό προφίλ του SAP αντίστοιχο άλλων αγγειογενετικών αναστολέων.²³

Συζήτηση-Αποτελέσματα

Σύνθεση βιοδιασπώμενης γέφυρας Val-Cit

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η σύζευξη των δύο φαρμάκων με το ικρίωμα θα πραγματοποιηθεί μέσω μιας βιοδιασπώμενης πεπτιδικής γέφυρας (Val-Cit), η οποία υδρολύεται εκλεκτικά από την Καθεψίνη-Β στα λυσοσώματα. Η σύνθεση της διασπώμενης γέφυρας ξεκίνησε από BOC-Val όπως φαίνεται στο Σχήμα 4. Η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας της βαλίνης με NHS παρουσία DCC, είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση του ενεργοποιημένου NHS-εστέρα της βαλίνης **1** και την απομόνωσή του ως λευκό στερεό από την αντίδραση μετά από απομάκρυνση της DCU ουρίας που προέκυψε ως παραπροϊόν, με διήθηση. Στη συνέχεια ακολούθησε ακυλίωση του ενεργοποιημένου NHS-εστέρα της βαλίνης **1** με κιτρουλίνη δίνοντας την ένωση **2**. Αντίδραση του διπεπτιδίου **2** με p-αμινοβενζυλικη αλκοόλη (PABOH) παρουσία του συζευκτικού αντιδραστηρίου ΕΕDQ έδωσε την ένωση **3**. Τέλος ακυλίωση της βενζυλικής υδροξυλομάδας της **3** με bis-PNP carbonate παρουσία DIPEA έδωσε τον καρβονικό εστέρα **4**, ο οποίος μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης απομονώθηκε ως λευκό στερεό σε απόδοτ **41%**.



Σχήμα 4. Σύνθεση διπεπτιδικής γέφυρας Val-Cit

Η χρήση του ΕΕDQ πλεονεκτεί σε σχέση με άλλα συζευκτικά αντιδραστήρια καθώς κατά τη σύζευξη αμινοξέων με εστέρες αμινοξέων δεν παρατηρείται ρακεμοποίηση.²⁹ Ο μηχανισμός δράσης του (Σχήμα 5) πραγματοποιείται μέσω ενός μικτού καρβονικού ανυδρίτη, ο οποίος αν και σχηματίζεται σε ένα αργό στάδιο, αντιδρά γρήγορα με αμίνες, όπως η PABOH. Ο αργός σχηματισμός του ανυδρίτη σε συνδυασμό με την ταχεία του κατανάλωση, ελαχιστοποιεί τις πιθανότητες ρακεμοποίησης.³⁰ Αναλυτικότερα, αντίδραση του οξέος με το ΕΕDQ και απελευθέρωση ΕtOH, οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενδιαμέσου, το οποίο έπειτα από σιγματροπική μετάθεση και απελευθέρωση κινολίνης, παράγει τον μικτό ανυδρίτη του οξέος. Αντίδραση του μικτού ανυδρίτη με την αμίνη, οδηγεί στο σχηματισμό της ένωσης **3**, ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται CO₂ και EtOH.



Σχήμα 5. Μηχανισμός σύζευξης της κιτρουλίνης με την PABOH παρουσία EEDQ.

Σύνθεση της συζευγμένης γεμσιταβίνης με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit (Gemcitabine-linker)



Σχήμα 6. Προστασία των 4-NH₂ και 3'-OH της Γεμσιταβίνης σε δύο στάδια με BOC ομάδα

Στην περίπτωση της γεμσιταβίνης, η 5'-OH αποτέλεσε το σημείο σύζευξης του φαρμάκου με τη γέφυρα Val-Cit. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η σύζευξη θα ήταν αναγκαίο να γίνει εκλεκτική προστασία των δραστικών ομάδων 4-NH₂ και 3'-OH του φαρμάκου έτσι ώστε να έχουμε εκλεκτική σύζευξη στην 5'-OH. Η προστασία των 4-NH₂ και 3'-OH με BOC ομάδα έγινε σε δύο στάδια σύμφωνα με τη συνθετική πορεία των Guo et al (Σχήμα 6).³¹ Κατά το δεύτερο στάδιο της μετατροπής της **5a** σε **5b** παρατηρήθηκε σε μεγάλο ποσοστό ο σχηματισμός tri-BOC προστατευμένης γεμσιταβίνης, ενώ το επιθυμητό προϊόν απομονώθηκε σε μικρή απόδοση. Για το λόγο αυτό, χρειάστηκε να τροποποιήσουμε το παραπάνω συνθετικό πρωτόκολλο έτσι ώστε το επιθυμητό προϊόν να απομονώνεται χωρίς να απαιτείται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης. Πιο συγκεκριμένα η ένωση **5a** καταβυθίστηκε και απομονώθηκε μετά από κατεργασία με Et₂O. Αντίστοιχα η **5b** μετά από κατεργασία με εξάνιο απομονώθηκε ως λευκό στερεό σε απόδοση 67% χωρίς να χρειαστεί περεταίρω καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης.



Σχήμα 7. Προσπάθειες σύζευξης της γεμσιταβίνης με τη διασπώμενη γέφυρα Val-Cit Οι προσπάθειες σύζευξης της γεμσιταβίνης με τη γέφυρα Val-Cit που έγιναν ήταν αρκετές αλλά καμία από αυτές δεν ήταν επιτυχημένη (Σχήμα 7). Αρχικά έγινε προσπάθεια σύζευξης της γέφυρας και του 5'-OH της γεμσιταβίνης κάτι το οποίο δεν κατέστη δυνατό λόγω του ότι το 5'-OH είναι λιγότερο πυρηνόφιλο σε σχέση με τις υπόλοιπες δραστικές ομάδες του φαρμάκου. Για το λόγο αυτό θεωρήσαμε πως έπρεπε να αλλάξουμε την ομάδα που δρα ως πυρηνόφιλο στην αντίδραση. Η ένωση **5b** μετά από ακυλίωση με bis-PNP carbonate παρήγαγε την **6**. Ακολούθως, υποθέσαμε ότι η ένωση **3** θα μπορούσε να δράσει ως πυρηνόφιλο προσβάλοντας τον καρβονικό εστέρα **6** οδηγώντας στο επιθυμητό προϊόν. Παρόλο που έγιναν αρκετές προσπάθειες σε διάφορες συνθήκες, το επιθυμητό προϊόν δεν εντοπίστηκε.

Από τις παραπάνω προσπάθειες έγινε αντιληπτό πως η αντίδραση δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί με αυτές τις συνθήκες καθώς το 5'-ΟΗ της γεμσιταβίνης αλλά και το υδροξύλιο της PABOH δεν ήταν ισχυρά πυρηνόφιλα. Έτσι κρίθηκε αναγκαία η εισαγωγή ενός νέου συνδέτη, ο οποίος θα μπορούσε να δράσει ως ισχυρότερο πυρηνόφιλο. Η ένωση που επιλέχθηκε ήταν η αιθυλενοδιαμίνη καθώς θα μπορούσε να συνδεθεί σχετικά εύκολα τόσο με τον καρβονικό εστέρα **6** από το ένα άκρο της, όσο και με τον εστέρα **4** μέσω καρβαμικών γεφυρών, λόγω της αυξημένης πυρηνοφιλίας των αζώτων της. Όπως φαίνεται στον προτεινόμενο μηχανισμό απελευθέρωσης των φαρμάκων (Σχήμα 2), μετά την διάσπαση της γέφυρας Val-Cit και την 1,6-απόσπαση της PABOH, η αιθυλενοδιαμίνη θα μπορούσε να πυροδοτήσει μια ενδομοριακή αντίδραση κυκλοποίησης, απελευθερώνοντας το φάρμακο και την αντίστοιχη κυκλική ουρία.



Σχήμα 8. Σύνθεση της συζευγμένης γεμσιταβίνης **9**.

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 8, η παρουσία της αιθυλενοδιαμίνης έπαιξε καθοριστικό ρόλο στη σύζευξη της γεμσιταβίνης με τη διπεπτιδική γέφυρα. Αρχικά η αντίδραση της 6 με αιθυλενοδιαμίνη έδωσε την ένωση 7 σε απόδοση 60%. Στην αντίδραση αυτή γίνεται προσθήκη της 6 στάγδην στο μίγμα της αντίδρασης για να ελαχιστοποιήσουμε την πιθανότητα διμερισμού της ένωσης 6. Εν συνεχεία, ακολούθησε προσθήκη του διπεπτιδικού καρβονικού εστέρα 4 στην ένωση 7 αποδίδοντας την συζευγμένη γεμσιταβίνη 8. Όπως στην αντίδραση που προηγήθηκε, έτσι και σε αυτή, η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων έπαιζε σημαντικό ρόλο. Η ένωση 4 προστέθηκε στάγδην μετά την προσθήκη της 7 ακολουθούμενη από προσθήκη ΤΕΑ. Στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας έγινε η αποπροστασία των τριών BOC ομάδων της ένωσης 8 παρουσία TFA σε διάλυμα DCM δίνοντας το επιθυμητό προϊόν 9.

Σύνθεση του συζευγμένου SAP με τη διπεπτιδική γέφυρα Val-Cit (SAPlinker)

Όσον αφορά το SAP (Σχήμα 9), υποθέσαμε πως θα μπορούσε να προέλθει από την αποπροστασία της ένωσης **15**, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να σχηματιστεί από τη σύζευξη του εμπορικά διαθέσιμου καρβοξυλικού οξέος **10** και της πρωτοταγούς αμίνης **11**.



Σχήμα 9. Αντίστροφη ανάλυση σύνθεσης του SAP

Συγκεκριμένα, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 10, εκλεκτική προστασία της διαμίνης 12 με CF₃CO₂Et έδωσε το τριφθοροακεταμίδιο 13 το οποίο στη συνέχεια μετατράπηκε στον καρβαμικό εστέρα 14 κατόπιν αντίδρασης με DBDC. Διάσπαση του τριφθοροακεταμιδίου υπό βασικές συνθήκες έδωσε την αμίνη 11 που εν συνεχεία συζεύχτηκε με το καρβοξυλικό οξύ 10, παρουσία EDCI και HOBt, παράγοντας το αμίδιο 15. Αποπροστασία της BOC ομάδας του αμιδίου 15 παρουσία HCl οδήγησε στην απομόνωση του υδροχλωρικού άλατος του SAP 16. Τέλος, αντίδραση της ελεύθερης βάσης του SAP με τη γέφυρα BOC-Val-Cit-PABC-PNP 4 είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της ένωσης 17 η οποία μετά από αποπροστασία της BOC ομάδας υπό όξινες συνθήκες οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού συζεύγματος 18.



Σχήμα 10. Σύνθεση συζεύγματος του SAP με τη γέφυρα Val-Cit
Σύνθεση του ικριώματος diBrPD

Η στρατηγική σύνθεσης του ικριώματος diBrPD εστιάστηκε αρχικά στη σύνθεσή του αλλά και στην τροποποίησή του, δίνοντας τη δυνατότητα εκλεκτικής σύζευξης με τα δύο φάρμακα μέσω των ατόμων αζώτου του ικριώματος.

Καταρχάς, οι προσπάθειες που έγιναν για τη σύνθεση του ικριώματος diBrPD υπό ήπιες συνθήκες¹⁷ δεν στέφθηκαν από επιτυχία. Συνεπώς, ακολουθώντας τη συνθετική πορεία των Dubernet et al.,³² μαλεϊκός ανυδρίτης, καταλυτική ποσότητα AlCl₃ και στοιχειακό βρώμιο, θερμάνθηκαν σε σφραγισμένο σωλήνα (sealed tube) στους 120° C για 16h, παράγοντας την ένωση **19** σε απόδοση 90% (Σχήμα 11). Ο προτεινόμενος μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την αντίδραση παρουσιάζεται στο Σχήμα 12. Το π-ζεύγος του διπλού δεσμού του ανυδρίτη προσβάλλει το ένα άτομο βρωμίου, ενώ το AlCl₃ ως ένα σκληρό κατά Lewis οξύ, προσβάλλεται από το δεύτερο άτομο βρωμίου. Έπειτα από αποπρωτονίωση και έκλυση HBr, ένα δεύτερο στάδιο βρωμίωσης λαμβάνει χώρα, απελευθερώνοντας έτσι την επιθυμητή ένωση **19** και HBr, ενώ ο καταλύτης αναγεννάται. Ακολούθως, αντίδραση της **19** με υδραζίνη σε AcOH απέδωσε την ένωση **20** σε απόδοση 40% (Σχήμα 11).³³



Σχήμα 11. Σύνθεση του ικριώματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης (diBrPD)



Σχήμα 12. Μηχανισμός σύνθεσης διβρωμο μαλεϊκού ανυδρίτη καταλυόμενος από AlCl₃.

Κατόπιν (Σχήμα 13), ακολούθησε αλκυλίωση της **20** με tert-butyl bromoacetate σε Cs₂CO₃ και DMF. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 16h, και έλεγχος με TLC έδειξε το σχηματισμό μίγματος προϊόντων. Μέσω καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης απομονώθηκαν δύο διαφορετικά κλάσματα, όπου ένα από τα δύο ήταν η επιθυμητή ένωση **21**, η οποία ταυτοποιήθηκε, ενώ το δεύτερο κλάσμα δεν καταφέραμε να το ταυτοποιήσουμε.



Σχήμα 13. Σύνθεση του δικαρβοξυλικού οξέος **22**.

Μολονότι η σύνθεση της ένωσης **21** ήταν επιτυχής, η απόδοση της αντίδρασης κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (30%). Μια λογική εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι η δημιουργία παραπροϊόντος, η οποία ευνοήθηκε στη διάρκεια της εξάτμισης του DMF σε υψηλή θερμοκρασία σε συνδυασμό με την παρουσία του Cs₂CO₃. Συνεπώς, για την αύξηση της απόδοσης του επιθυμητού προϊόντος και την αποφυγή σχηματισμού του παραπροϊόντος, έπειτα από πιθανή ενδομοριακή κυκλοποίηση, ακολουθήθηκε υδατική επεξεργασία του μίγματος της αντίδρασης που ποσοστού σχηματισμού του παραπροϊόντος, αυξάνοντας κατά συνέπεια την απόδοση σχηματισμού της ένωσης **21** σε 50%. Τέλος, αποπροστασία των BOC ομάδων της ένωσης **21** με TFA/DCM οδήγησε στο σχηματισμό της **22** σε απόδοση 95%.

Δοκιμαστικές μελέτες σύζευξης

Αναφορικά με την ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη σύνθεση dual drug conjugate, διεξήχθησαν δοκιμαστικές μελέτες με τη χρήση φαιναιθυλαμίνης (PEA) και διισοπροπυλαμίνης (DIPA) για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού, ώστε να επιβεβαιωθεί εάν το στρατηγικό μας πλάνο θα είχε επιτυχία. Η πορεία της αντίδρασης, τόσο κατά το στάδιο της ενεργοποίησης, όσο και κατά τη διάρκεια της σύζευξης, ελέγχθηκε με τη χρήση της χαρακτηριστικής μετατόπισης των α-CH₂ πρωτονίων του δι-καρβοξυλικού οξέος **22** στο φάσμα ¹Η NMR.

Αν και στην έως τώρα βιβλιογραφία²⁰, έχουν συντεθεί ικριώματα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης με μια καρβοξυλομάδα, θεωρήσαμε ότι η παρουσία δύο καρβοξυλομάδων δεν θα δημιουργούσε πρόβλημα στο σχηματισμό του επιθυμητού διαμιδίου, κάτι το οποίο δυστυχώς αποδείχθηκε λάθος. Όπως απεικονίζεται και στο

38

Σχήμα 14, έγινε απόπειρα σχηματισμού του ενεργοποιημένου δι-εστέρα (a), ο οποίος θα μας έδινε το επιθυμητό συμμετρικό διαμίδιο μέσω ελεγχόμενης στοιχειομετρικής προσθήκης των δύο αμινών. Στη συνέχεια, προβήκαμε στην εκλεκτική ενεργοποίηση της μίας εκ των δύο καρβοξυλομάδων, μέσω απόπειρας σχηματισμού του αδιπικού ανυδρίτη (b) και τη δημιουργία του σιλυλο εστέρα (c), καθώς λόγω στερικής παρεμπόδισης η TBDMS-ομάδα δεν θα μπορούσε να εισαχθεί και στις δύο καρβοξυλομάδες. Τέλος, έγινε απόπειρα σχηματισμού του συμμετρικού διαμιδίου (d), με την ενεργοποίηση και των δύο καρβοξυλομάδων με πιο δραστικά μέσα και την προσθήκη της ίδιας αμίνης.



Σχήμα 14. Στρατηγικές μελετών σύζευξης του δι-καρβοξυλικού οξέος 22.

Αναλυτικότερα, για το σχηματισμό του δι-ενεργοποιημένου εστέρα πραγματοποιήθηκαν πολλές προσπάθειες με διαφορετικά μέσα (Σχήμα 15). Ειδικότερα, ο σχηματισμός του NHS-εστέρα του δι-οξέος αποπειράθηκε αρχικά. Παρ' ότι η αντίδραση επαναλήφθηκε πολλάκις, το μοναδικό προϊόν που απομονώθηκε ήταν η συμμετρική ουρία της PEA, ενώ ενεργοποίηση του οξέος δεν παρατηρήθηκε. Σε συνέχιση των προσπαθειών μας, προχωρήσαμε σε αντίδραση της ένωσης **22** με το συζευκτικό αντιδραστήριο PyBOP³⁴. Αν και ο έλεγχος με TLC έδειξε σχηματισμό του ενδιάμεσου BOP-εστέρα και κατανάλωση του αρχικού οξέος, η σύζευξη με PEA και DIPA δεν μπόρεσε να επιτευχθεί. Τέλος, αντίδραση της ένωσης **22** με PEA και DIPA

παρουσία του συζευκτικού αντιδραστηρίου EEDQ δεν οδήγησε στο επιθυμητό αποτέλεσμα.



Σχήμα 15. Απόπειρες σχηματισμού και σύζευξης του δι-ενεργοποιημένου εστέρα. Καθώς ο σχηματισμός του διαμιδίου μέσω του σχηματισμού του δι-ενεργοποιημένου εστέρα απέτυχε, έγινε απόπειρα εκλεκτικής ενεργοποίησης των δύο καρβοξυλομάδων σε δύο βήματα (Σχήμα 16). Ειδικότερα, προβήκαμε στη σύνθεση του κυκλικού ανυδρίτη του οξέος, με χρήση DBDC και καταλυτική ποσότητα MgCl₂. Ο σχηματισμός του αδιπικού ανυδρίτη θα επέτρεπε την εκλεκτική σύζευξη, έπειτα από διάνοιξη του δακτυλίου με την προσθήκη της πρώτης αμίνης, ενώ εισαγωγή της δεύτερης αμίνης θα γινόταν σε δεύτερο στάδιο, έπειτα από ενεργοποίηση της δεύτερης καρβοξυλομάδας. Ωστόσο, ούτε το άνυδρο MgCl235 ούτε και το εξαϋδατωμένο MgCl₂,³⁶ μπορούσε να μας αποδώσει τον επιθυμητό αδιπικό ανυδρίτη. δεύτερη προσπάθεια εκλεκτικής ενεργοποίησης των Н δύο

καρβοξυλομάδων περιλάμβανε την εισαγωγή της TBDMS-ομάδας σε μία εκ των δύο καρβοξυλομάδων, καθώς λόγω στερικής παρεμπόδισης, δεν θα μπορούσε να δημιουργηθεί ο δι-σίλυλο-εστέρας. Έτσι η ενεργοποίηση της ελεύθερης καρβοξυλομάδας και σύζευξη με την πρώτη αμίνη θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό του πρώτου αμιδικού δεσμού, ενώ αποπροστασία της TBDMS-ομάδας θα απελευθέρωνε τη δεύτερη καρβοξυλομάδα, η οποία έπειτα από ενεργοποίηση και σύζευξη με τη δεύτερη αμίνη θα απέδιδε το επιθυμητό διαμίδιο (Σχήμα 17). Καθώς η ευρέως γνωστή μέθοδος σιλυλίωσης με TBDMSCl/Imidazole/DMF³⁷ δεν αποφέρει καλές αποδόσεις στην περίπτωση των καρβοξυλικών οξέων^{37,38}, στην περίπτωση μας, επιλέχθηκε η συνθετική πορεία των Aizpurua et al.³⁹ με τη χρήση DBU ως βάση, με τον μηχανισμό δράσης της να μην έχει εξακριβωθεί πλήρως. Πιθανότατα, η DBU δρα ως πυρηνόφιλος καταλύτης και θα δημιουργούσε έτσι ένα σιλυλιωμένο ενδιάμεσο, πιο δραστικό προς προσβολή από το καρβοξυλικό οξύ, με παρόμοιο τρόπο όπως κατά τη χρήση του ιμιδαζολίου ως πυρηνόφιλου καταλύτη³⁷. Εν τούτοις, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του σιλυλο-εστέρα.



Σχήμα 16. Προσπάθειες εκλεκτικής ενεργοποίησης του δικαρβοξυλικού οξέος 22.



Σχήμα 17. Σχηματική αναπαράσταση εκλεκτικής ενεργοποίησης του δι-καρβοξυλικού οξέος **22** μέσω του σιλυλο-εστέρα.

Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η εκλεκτική σύζευξη δύο διαφορετικών αμινών αποκλείστηκε από τη συνθετική μας προσέγγιση, και προχωρήσαμε σε μια νέα στρατηγική κατά την οποία έγινε προσπάθεια σύζευξης της ίδιας αμίνης (PEA) και στις δύο καρβοξυλομάδες. Ωστόσο, όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 18, καμία από τις προσπάθειες δεν έφερε το επιθυμητό αποτέλεσμα.



Σχήμα 18. Σχηματική αναπαράσταση των προσπαθειών ενεργοποίησης και σύζευξης του δι-καρβοξυλικού οξέος **22** με PEA.

Αρχικά, ο σχηματισμός του χλωριδίου του οξέος αποπειράθηκε. Η πρώτη προσπάθεια περιλάμβανε τη χρήση SOCl_{2.}⁴⁰. Ωστόσο, αν και η αντίδραση επαναλήφθηκε πολλάκις, όλες οι προσπάθειες αποδείχθηκαν άκαρπες. Ανάλυση του φάσματος ¹Η NMR του ακατέργαστου μίγματος, κατέδειξε μια μικρή μετατόπιση της μονής κορυφής των α-CH₂ πρωτονίων, και την παρουσία μιας νέας ένωσης. Παρ' όλα αυτά, έπειτα από έκπλυση του μίγματος με νερό υπό ήπια όξινες συνθήκες προς απομάκρυνση της περίσσειας της αμίνης, στο νέο φάσμα ¹Η NMR έλειπε η χαρακτηριστική μετατόπιση των α- CH₂ πρωτονίων (s, 4.75 ppm). Καταλήξαμε έτσι

στο συμπέρασμα ότι το επιθυμητό αμίδιο δεν είχε σχηματιστεί, και κατά συνέπεια μια παράπλευρη αντίδραση έλαβε μέρος, με το προκύπτον προϊόν να είναι υδατοδιαλυτό ή να υπόκειται σε υδρολυτική διάσπαση.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια σχηματισμού του χλωριδίου του οξέος in situ, με τη χρήση PPH₃/CCl₄⁴¹, καθώς επίσης και του βρωμιδίου του δι-οξέος 22 με NBS/PPh₃⁴², ωστόσο, το επιθυμητό προϊόν δε σχηματίστηκε σε καμία από τις δύο περιπτώσεις. Τέλος, η ενεργοποίηση μέσω του CDI αποπειράθηκε, καθώς αποτελεί μια από τις πιο χρήσιμες μεθόδους σύζευξης στην πεπτιδική σύνθεση σε μεγάλη κλίμακα, που επιτρέπει το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού σε αντίδραση ενός δοχείου^{43,44}. Ανάλυση του φάσματος ¹Η NMR του ακατέργαστου δείγματος έδειξε την παρουσία δύο ενώσεων μαζί με το ιμιδαζόλιο που ελευθερώθηκε κατά την αντίδραση. Το μίγμα της αντίδρασης επεξεργάστηκε με νερό παρουσία HCl 1N ώστε να εκδιωχθεί το ιμιδαζόλιο και προς ικανοποίηση μας, ανάλυση του φάσματος της οργανικής φάσης δεν έδειξε κάποια μετατόπιση σε μεγάλο βαθμό των κορυφών, σε σύγκριση με το ακατέργαστο. Εν τούτοις, δεν πραγματοποιήθηκε εις διπλούν σύζευξη της ΡΕΑ στον ενεργοποιημένο ενδιάμεσο ακυλο-ιμιδαζολίου Α, πιθανόν λόγω στερικής παρεμπόδισης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 19, θεωρούμε ότι το ιμιδαζόλιο που απελευθερώθηκε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αποπρωτονίωσε το ένα ζεύγος των CH₂ πρωτονίων στην α-θέση, σχηματίζοντας έτσι ένα ενολικό ιόν και ένα ιόν ιμιδαζολίου, το οποίο είναι σταθερό λόγω συντονισμού. Ο σχηματισμός ενός πενταμελούς κυκλικού συστήματος από το ενολικό ιόν, οδήγησε στο μονοαμίδιο Β, ενώ παράλληλα, το υπόλοιπο CDI αντέδρασε με την περίσσεια της PEA, σχηματίζοντας έτσι τη συμμετρική της ουρία **C**.

44





Τα παραπάνω αποτελέσματα μας οδήγησαν να σχεδιάσουμε μια νέα στρατηγική σύνθεσης και τροποποίησης του di-BrPD ικριώματος.

Επαναπροσδιορισμένη στρατηγική σύνθεσης του ικριώματος

Καθώς κάθε προσπάθεια σύζευξης της λειτουργικής άμινο-ομάδας με το δικαρβοξυλικό οξύ αποδείχθηκε άκαρπη, θεωρήσαμε ότι τα α-CH₂ πρωτόνια καθώς και η μικρού μήκους ανθρακική αλυσίδα, αποτελούσαν τους κύριους λόγους των αποτυχημένων προσπαθειών και της πραγματοποίησης των παράπλευρων αντιδράσεων με τα πενταμελή κυκλικά συστήματα. Έτσι, θεωρήσαμε ότι επέκταση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας θα απέτρεπε ενδομοριακές αντιδράσεις κυκλοποίησης, και ένα νέο συνθετικό πλάνο σχεδιάστηκε ώστε να επιτευχθεί εκλεκτική σύζευξη των φαρμάκων με το ικρίωμα. Τα χαρακτηριστικά σημεία αυτής της νέας στρατηγικής ήταν 1) η επέκταση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του ικριώματος, ώστε να αποφευχθούν ενδομοριακές αντιδράσεις κυκλοποίησης, 2) βρωμοπυριδαζινοδιόνη, ο οποίος μπορεί να αυξήσει την υδροφιλικότητα του συζεύγματος, 3) η σύνθεση ενός νέου ικριώματος με δύο τερματικές καρβοξυλομάδες που θα επέτρεπε την ορθογώνια σύζευξη με τα δύο φάρμακα χωρίς να απαιτούνται ιδιαίτερες συνθήκες προστασίας/αποπροστασίας. Τουτέστιν, ένα ικρίωμα με μια ελεύθερη καρβοξυλομάδα στο ένα Ν-άκρο του ικριώματος και μια άλλυλο-τερματική καρβοξυλομάδα στο άλλο Ν-άκρο. Ενεργοποίηση της ελεύθερης καρβοξυλομάδας και σύζευξη με το πρώτο φάρμακο, ακολουθούμενη από απομάκρυνση της αλλυλο-ομάδας, ενεργοποίηση της νέας καρβοξυλομάδας και σύζευξη με το δεύτερο φάρμακο θα οδηγούσε στο επιθυμητό σύζευγμα με το διπλό θεραπευτικό φορτίο (dual-drug conjugate).

Η στρατηγική που θα ακολουθηθεί για την ορθογώνια σύνθεση του συζεύγματος Ι με διπλό θεραπευτικό φορτίο, απεικονίζεται στο Σχήμα 20. Το επιθυμητό di-BrPD-DDC Ι θα μπορούσε να προκύψει έπειτα από σύζευξη της ένωσης **32** με την αμινομάδα της βαλίνης του αντίστοιχου φαρμάκου-συνδέτη (drug-linker). Η ένωση **32** θα μπορούσε να προέλθει έπειτα από αντίδραση του δι-βρωμομαλειϊκού ανυδρίτη **19** με την υδραζίνη **29b** και τους μεσυλιωμένους εστέρες **26** και **28**. Αντίστοιχα, οι εστέρες **26** και **28** θα προέκυπταν έπειτα από μια σειρά αντιδράσεων, ξεκινώντας από τον TBDMS-αιθέρα της αιθυλενογλυκόλης **24**, ένωση παραγόμενη από αιθυλενογλυκόλη.





Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 21, ο σίλυλο-αιθέρας **24** της αιθυλενογλυκόλης μπορεί να παραχθεί, εύκολα και σε εξαιρετική απόδοση, έπειτα από αντίδραση της αιθυλενογλυκόλης με NaH και TBDMSCl.⁴⁵ Αλκυλίωση της **24** με tert-butyl bromo acetate και μετέπειτα αποπροστασία της σιλυλο-ομάδας, θα αποδώσει την ένωση **25b**. Παρόμοια μπορεί να παρασκευαστεί και η ένωση **27b**, έπειτα από αλκυλίωση της ένωσης **24** με τον αλλυλο-εστέρα **23**, προϊόν εστεροποίησης του χλωροοξικού οξέος, και μετέπειτα αποπροστασία της TBDMS-ομάδας. Στη συνέχεια, προστασία των δύο αλκοολών **25b** και **27b** με MsCl, θα μας δώσει τους μεσυλικούς εστέρες **26** και **28** αντίστοιχα. Αλκυλίωση της υδραζίνης **29b**, η οποία έχει ήδη παρασκευαστεί σε δύο βήματα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία⁴⁶ με

τις **26** και **28** θα αποδώσει την ένωση **31** εκλεκτικά σε δύο βήματα. Αρχικά, μέσω αντίδρασης αλκυλίωσης, θα προστεθεί η ένωση **28**, ενώ σε δεύτερο στάδιο θα γίνει η αλκυλίωση του δεύτερου αζώτου της υδραζίνης με την ένωση **26**. Το χαρακτηριστικό σημείο αυτής της νέας προσέγγισης είναι ότι το νέο-συντιθέμενο ικρίωμα **32** θα μπορούσε να προκύψει μέσω μιας αντίδρασης ενός-δοχείου, ανάμεσα στην ένωση **30** και διβρωμο μαλεϊκό ανυδρίτη **19**. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν εκλεκτική ενεργοποίηση των δύο τερματικών ομάδων, και συγκεκριμένα ενεργοποίηση της πρώτης καρβοξυλομάδας της ένωσης μέσω ενός αντιδραστηρίου ενεργοποίησης που θα επέτρεπε την απομόνωση του ενεργού ενδιαμέσου, όπως είναι η αντίδραση με NHS/DCC, ή ο σχηματισμός του ενεργοποίημε το πρώτο φάρμακο. Η δεύτερη καρβοξυλομάδα θα σχηματιστεί έπειτα από κατεργασία με Pd(PPh₃)4⁴⁷, και έπειτα από ενεργοποίηση θα καταλήξουμε στο επιθυμητό σύζευγμα.









Σχήμα 21. Σύνθεση του νέου diBrPD scaffold **32**.

Πειραματικό μέρος Υλικά και μέθοδοι

Τα αντιδραστήρια προμηθεύθηκαν από τις εταιρίες Fluorochem , Sigma-Aldrich και Alfa. Όλες οι εμπορικά διαθέσιμες χημικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. THF, DCM, CH₃CN, Et₂O, DMSO και DMF 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 σίλικα γέλη 60 (230-400 mesh) όπως περιγράφεται από τους Still et al.⁴⁸ Διεξήχθη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες 60 F254 που είχαν επικαλυφθεί με σίλικα γέλη 60 και το χρησιμοποιούμενο εκλουστικό διάλυμα αναφέρεται σε παρένθεση. Οι πλάκες TLC απεικονίστηκαν με έκθεση σε υπεριώδες φως (UV). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα ¹Η NMR, ¹³C NMR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance FT-NMR 400 και 500 MHz. Οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται σε ppm σε σχέση με το σήμα διαλύτη. Η πολλαπλότητα υποδεικνύεται με (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet). Τα φάσματα μάζας ESI (ιονισμού ηλεκτροψεκασμού) καταγράφηκαν σε 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/ τετραπολικής παγίδας ιόντων (LTQ) -Orbitrap.

Σύνθεση ενώσεων 1-29b

Ένωση 1



Σε μια σφαιρική φιάλη BOC-Val (5.060 g, 23.01 mmol, 1 eq.) και NHS (2.64 g, 23.01 mmol, 1 eq.) διαλύθηκαν σε άνυδρο THF (150 mL) στους 0 °C. Ακολούθησε προσθήκη DCC (4.74 g, 23.01 mmol, 1 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT

για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα η DCU-ουρία διηθήθηκε και εκπλύθηκε με THF. Ακολούθησε εξάτμιση του διηθήματος και το προκύπτον λευκό στερεό χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Ένωση 2



Ο ενεργοποιημένος εστέρας **1** (23.01 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε DME (160 mL) και προστέθηκε σε διάλυμα κιτρουλίνης (4.23 g, 24.16 mmol, 1.05 eq.) και NaHCO₃ (2.03 g, 24.16 mmol, 1.05 eq.) σε H₂O (50 mL). Ακολούθησε προσθήκη THF (30 mL) για να διευκολυνθεί

η διαλυτότητα, και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16h. Στη συνέχεια προστέθηκε υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος (15%, 75 mL), και το μίγμα εκχυλίστηκε με 10% iPrOH/EtOAc (2x100 mL). Το στερεό προϊόν ξεκίνησε να καθιζάνει στην οργανική φάση η οποία στη συνέχεια εκπλύθηκε με NaCl (2 x 150 mL). Το ληφθέν εναιώρημα συμπυκνώθηκε δίνοντας ένα κίτρινο λάδι το οποίο στερεοποιήθηκε μετά από προσθήκη Et₂O (80 mL) και σύντομη κατεργασία με υπερήχους. Διήθηση υπό κενό έδωσε το επιθυμητό προϊόν ως ένα λευκό στερεό (7 g, 81%). ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ: 8.03 (d, 1H), 6.63 (d, 1H), 5.93 (t, 1H), 5.36 (s, 2H), 4.17 (m, 1H), 3.82-3.71 (m, 1H), 2.94 (q, 2H), 1.93-1.54 (m, 1H), 1.37 (s, 8H), 0.86 (d, 3H), 0.81 (d, 3H). HRMS (ESI) for C₁₆H₃₀N₄O₆: m/z calcd., 374.22; found, 397.2 [M+Na⁺].





Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε BOC-Val-Cit (2 g, 5.34 mmol, 1 eq.) και PABOH (1.31 g, 10.66 mmol, 2 eq.), και διαλύθηκαν σε DCM/MeOH (75 mL, σε αναλογία 2:1). Ακολούθησε προσθήκη EEDQ (2.64 g, 10.68 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT στο

σκοτάδι για 36h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, οι διαλύτες εξατμίστηκαν και στο λευκό-στερεό-υπόλειμμα προστέθηκε Et₂O (75 mL). Ακολούθησε κατεργασία του εναιωρήματος με υπερήχους για 5 min, και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min. Το στερεό παραλήφθηκε με διήθηση, εκπλύθηκε με Et₂O, και ακολούθησε ανακρυστάλλωση από EtOAc/ Et₂O. Ξήρανση του στερεού υπό κενό οδήγησε στην επιθυμητή ένωση **3** (1.36 g, 71%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.97 (s, 1H), 7.95 (d, 1H), 7.54 (d, 2H), 7.24 (d, 2H), 6.74 (d, 1H), 5.95 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.11 (t, 1H), 4.43 (d, 4H), 4.02 (m, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.01 (dd, 2H), 1.96 (brs, 2H), 1.68 (dd, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.86 (d, 3H), 0.81 (d, 3H). HRMS (ESI) for C₂₃H₃₇N₅O₆: m/z calcd., 479.27; found, 502.26 [M+Na⁺].

Ένωση 4



Σε μία σφαιρική φιάλη, η ένωση **3** (1.2 g, 2.50 mmol, 1 eq.) και bis-PNP carbonate (1.52 g, 5 mmol, 2 eq.), διαλύθηκαν σε άνυδρο DMF (5 mL). Ακολούθησε προσθήκη DIPEA (874 μL, 5 mmol, 2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε

σε RT για 16h. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης έγινε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **3**, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και στο μίγμα προστέθηκε Et₂O. Έπειτα από σύντομη κατεργασία με υπερήχους και διήθηση, το ακατέργαστο στερεό καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών DCM/MeOH (30:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας 662 mg (41%) της επιθυμητής ένωσης ως λευκό στερεό. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 1013 (s, 1H), 8.31 (d, 2H), 8.00 (d, 1H), 7.63 (dd, 4H), 7.41 (d, 1H), 6.73 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.44 (brs, 1H), 3.83-3.70 (m, 2H), 3.03 (dd, 3H), 2.09-1.95 (m, 3H), 1.68 (dd, 2H), 1.39 (s, 9H), 0.87 (brs, 6H). HRMS (ESI) for C₃₀H₄₀N₆O₁₀: m/z calcd., 644.28; found, 667.26 [M+Na⁺].

Ένωση 5a



Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε υδροχλωρική γεμσιταβίνη (3.45 g, 11 mmol, 1 eq.), Na₂CO₃ (6.04 g, 58 mmol, 5 eq.) και διαλύθηκαν σε 50 mL Dioxane/H₂O (4:1). Ακολούθησε προσθήκη DBDC (2.5 g, 11.5 mmol, 1.05 eq.) και το μίγμα που προέκυψε αναδεύτηκε σε RT για 48 h. Μετά το πέρας των 48 h, προστέθηκε H₂O και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc (2x30 mL).

OL οργανικές φάσεις ενώθηκαν και εκπλύθηκαν με H₂O και NaCl, ξηράνθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε Et₂O και το προϊόν απομονώθηκε ως λευκό στερεό (2.3 g, 55%). Το αιθερικό διήθημα εξατμίστηκε και επεξεργάστηκε με εξάνιο, το οποίο οδήγησε σε καθίζηση ενός νέου λευκού στερεού. Η ανάλυση TLC στο δεύτερο στερεό έδειξε ότι επρόκειτο για μίγμα mono-BOC και bis-BOC-protected- gemcitabine. Η υδατική φάση από την πρώτη εκχύλιση εκχυλίστηκε ξανά με EtOAc και 2-propanol, η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄, και οι διαλύτες εξατμίστηκαν υπό κενό, αποδίδοντας gemcitabine που δεν είχε αντιδράσει (40 mg). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.65 (d, 1H), 7.43 (d, 2H), 6.24 (t, 1H), 5.81 (d, 1H), 5.25 (t, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.14 (q, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 1.45 (s, 9H).

53

Ένωση 5b



Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **5a** (2.3 g, 6.3 mmol, 1 eq.) και διαλύθηκε σε διοξάνη (80 mL). Ακολούθησε προσθήκη DBDC (13.75 g, 63 mmol, 10 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 37 °C για 72 h. Μετά το πέρας των 72 h, ο διαλύτης απομακρύνθηκε, αποδίδοντας ένα υαλώδες λευκό στερεό. Στο στερεό προστέθηκε H₂O ώστε να απομακρυνθεί η

mono-BOC-protected-gemcitabine που δεν είχε αντιδράσει, και η καθίζηση ενός λευκού στερεού ξεκίνησε αμέσως. Η υδατική φάση απομακρύνθηκε με μηχανική απόχυση, και η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε αρκετές φορές. Το λευκό στερεό στη συνέχεια εκπλύθηκε με εξάνιο και συλλέχθηκε έπειτα από διήθηση, αποδίδοντας την ένωση **5b** (1.96 g, 67.12%). Ανάλυση του διηθήματος με TLC επιβεβαίωσε την παρουσία tri-BOC-protected-gemcitabine. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.55 (s, 1H), 8.10 (d, 1H), 7.09 (d, 1H), 6.27 (t, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.80 (d, 1H), 3.68 (d, 1H), 1.46 (s, 18H). HRMS (ESI) for C₁₉H₂₇F₂N₃O₈: m/z calcd., 463.18; found, 464.18 [M+H⁺].

Ένωση 6



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, Bis(4-nitrophenyl) carbonate (231 mg, 0.76 mmol, 2 eq.) διαλύθηκε σε άνυδρο DCM (4 mL). Στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην η ένωση **5** (180 mg, 0.38 mmol, 1 eq.), ακολούθησε η προσθήκη DIPEA (133 μL, 0.76 mmol, 2 eq.) και το μίγμα της

αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα εκχυλίστηκε με DCM, η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το ακατέργαστο υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλη σε σύστημα διαλυτών Hex/EtOAc (2:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την ένωση **6** ως υποκίτρινο

λάδι (158 mg, 66%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.29 (dd, 2H), 7.71 (d, 1H), 7.40 (dd, 2H), 7.28 (m, 1H), 6.45 (t, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.65 (d, 2H), 4.44 (m, 1H), 1.50 (s, 18H). HRMS (ESI) for C₂₆H₃₀F₂N₄O₁₂: m/z calcd., 628.18; found, 629.19 [M+H⁺].

Ένωση 7



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, προστέθηκε αιθυλενοδιαμίνη (0.158 mmol, 15 μL, 2 eq.), ΤΕΑ (0.158 mmol, 22 μL, 2 eq.) και διαλύθηκαν σε άνυδρο DCM (4 mL). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη διαλύματος της ένωσης **6** (50 mg, 0.079 mmol, 1 eq.) σε άνυδρο DCM (1 mL) υπό

ατμόσφαιρα αργού και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με ανάλυση TLC. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστέθηκε DCM στο μίγμα και ακολούθησε εκχύλιση με H₂O και NH₄Cl. Η οργανική φάση στη συνέχεια εκπλύθηκε πολλάκις με H₂O και NaOH 1N. Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na₂SO₄, εξάτμιση του διαλύτη και η ένωση **7** απομονώθηκε ως ένα άχρωμο φιλμ (25mg, 58%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.6 (d, 1H), 7.94 (d, 1H), 7.33 (t, 1H), 7.10 (d, 1H), 6.30 (t, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.40 (dd, 2H), 4.26 (m, 1H), 2.98 (q, 2H), 2.56 (m, 1H), 2.08 (s, 1H), 1.45 (s, 18H) HRMS (ESI) for C₂₂H₃₃F₂N₅O₉: m/z calcd., 549.22; found, 550.23 [M+H⁺].

Ένωση 8



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη η ένωση **7** (25 mg, 0.049 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε άνυδρο DCM (4 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην διάλυμα της ένωσης **4** (28 mg, 0.044 mmol 0.9 eq.), σε άνυδρο DMF (1 mL). Με το πέρας της προσθήκης, ακολούθησε η προσθήκη TEA (34 μL, 0.245 mmol,

5 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το DMF εξατμίστηκε υπό κενό και το ακατέργαστο υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών DCM/MeOH (30:1 έως 10:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την ένωση **8** ως ένα λευκό στερεό (49 mg, 82%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.10 (s, 1H), 7.96 (t, 2H), 7.55 (d, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.31 (m, 2H), 7.11 (d, 1H), 6.72 (d, 1H), 6.31 (t, 1H), 5.96 (m, 2H), 5.40 (m, 3H), 5.20 (brs, 1H), 4.93 (s, 1H), 4.43 (d, 4 H), 4.35 (t, 6H), 3.83 (brs, 1H), 3.70 (s, 1H), 3.60 (d, 1H), 1.94-1.59 (m, 4H), 1.46-1.35 (s, 27H), 1.24 (s, 3H), 0.86-0.81 (q, 10H). HRMS (ESI) for C₄₆H₆₈F₂N₁₀O₁₆: m/z calcd., 1054.48; found, 1077.46 [M+Na⁺].





Σε διάλυμα της ένωσης **8** (20 mg, 0.018 mmol, 1 eq.) σε DCM (5 mL) προστέθηκε TFA (500 μL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **8**, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, δίνοντας την ένωση **9** ως ένα

λευκό στερεό (10 mg, 74%).¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.23-10.1 (s, 1H), 9.80 (d, 1H), 8.87 (d,1H), 8.64 (m, 1H), 8.02 (dd, 5H), 7.83-7.80 (m, 1H), 7.72 (brs, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.54 (m, 1H), 7.34 (d, 1H), 7.22 (m, 1H), 6.18 (t, 1H), 6.12 (m, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.41-4.05 (m, 3H), 3.11-3.03 (m, 5H), 2.88 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.83-1.50 (m, 5H), 1.18 (s, 6H), 0.92 (t, 6H), 0.77 (m, 1H). HRMS (ESI) for C₃₁H₄₄F₂N₁₀O₁₀: m/z calcd., 754.75; found, 755.32 [M+H⁺].

Ένωση 15



Σε σφαιρική φιάλη η ένωση **10** (250 mg, 0.832 mmol, 1 eq) διαλύθηκε σε DMF (10 mL). Ακολούθησε προσθήκη EDCI (258 mg, 1.664 mmol, 2 eq), HOBt (337 mg, 2.496 mmol, 3 eq), TEA (347 μL, 2.496 mmol, 3

eq) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 15 min. Στη συνέχεια προστέθηκε η ένωση **11** (381 mg, 1.664 mmol, 2 eq) και η ανάδευση συνεχίστηκε σε RT για 16 h. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC και μετά την ολοκλήρωσή της, το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με EtOAc/NaHCO₃. Η οργανική φάση εκπλύθηκε με νερό, ξηράνθηκε με Na₂SO₄, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών DCM/Acetone (1:0 έως 6:1) ως κινητή φάση, δίνοντας την ένωση **15** ως πορτοκαλί στερεό (60%). ¹Η NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 13.66 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 7.75 (dd, 2H), 7.70 (s, 2H,), 7.50 (t, 1H), 6.92–6.83 (m, 4H), 3.36 (s, 6H), 2.44 (d, 6H), 2.42 (brs, 2H), 1.39 (s, 9H). HRMS
(ESI) for C₂₇H₃₄FN₅O₄: m/z calcd., 512.3; found, 512.3 [M+H⁺].

Ένωση 16



Σε σφαιρική φιάλη η ένωση **15** (100 mg, 0.19 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε CHCl₃:MeOH (1:1). Έπειτα προστέθηκε HCl/2-προπανόλη 4M (475 μL, 1.9 mmol, 10 eq.). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 65⁰C για 4 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε

διήθηση, πλύση με CHCl₃ δίνοντας το προϊόν **16** ως κίτρινο στερεό (75%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 13.73 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 7.75 (dd, 2H), 7.70 (s, 2H,), 7.50 (t, 1H), 6.92-6.83 (m, 4H), 3.34 (s, 6H), 2.44 (d, 6H), 2.42 (brs, 2H). HRMS (ESI) for C₂₂H₂₆FN₅O₂: m/z calcd., 411.21; found, 412.21 [M+H⁺].

Ένωση 17



Σε σφαιρική φιάλη η ένωση **4** (34 mg, 0.053 mmol, 1.2 eq.) διαλύθηκε σε άνυδρο DMF (3mL). Στη συνέχεια προστέθηκε η ένωση **16** (20 mg, 0.044 mmol, 1 eq.) και ακολούθως TEA (18 μL, 0.132 mmol, 3 eq.) και το

μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το DMF εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών DCM/MeOH (20:1 έως 10:1) ως κινητή

φάση, αποδίδοντας την ένωση **17** ως κόκκινο στερεό. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 13.68 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.77 (dd, 2H), 7.69 (s, 2H), 7.64 (d, 2H), 7.57 (t, 1H), 7.30 (d, 2H), 6.91 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 6.75 (d, 1H), 6.21 (brs, 1H), 5.49 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.47 (m, 1H), 3.86 (t, 1H), 3.42 (m, 4H), 3.04 (q, 2H), 2.57 (m, 2H), 2.44 (d, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.75-1.57 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.85 (dd, 6H). HRMS (ESI) for C₄₆H₆₁FN₁₀O₉: m/z calcd., 916.46; found, 917.46 [M+H⁺].

Ένωση 18



Σε σφαιρική φιάλη με την ένωση **17** (5 mg, 0.0054 mmol, 1 eq.) προστέθηκε 2προπανόλη (1 mL) και HCl/2προπανόλη (38 μL, 0.23 mmol, 43 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 16 h στους 50 ⁰C. Η πρόοδος

της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC και μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη δίνοντας την ένωση **18** ως πορτοκαλί λάδι (4.2 mg, 95%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 13.68 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 8.07 (d, 1H), 7.77 (dd, 2H), 7.69 (s, 2H), 7.64 (d, 2H), 7.57 (t, 1H), 7.30 (d, 2H), 6.91 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 6.75 (d, 1H), 6.21 (brs, 1H), 5.49 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.47 (m, 1H), 3.86 (t, 1H), 3.42 (m, 4H), 3.04 (q, 2H), 2.57 (m, 2H), 2.44 (d, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.75-1.57 (m, 2H), 0.85 (dd, 6H). HRMS (ESI) for $C_{41}H_{53}FN_{10}O_7$: m/z calcd., 816.41; found, 409.21 [(M+2)/2].

Ένωση 19



Σε σφραγισμένο σωλήνα (sealed tube) τοποθετήθηκε μαλεϊκός ανυδρίτης (1.50 g, 15.29 mmol, 1 eq.), AlCl₃ (28 mg, 0.21 mmol, 1.4 eq.) και Br₂ (6 mL, 91.74 mmol, 10 eq.). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 120 °C για 16 h. Ακολούθησε ψύξη του μίγματος σε RT, και στη συνέχεια διαλύθηκε σε EtOAc (10 mL). Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό, και η ένωση **19** απομονώθηκε ως ένα σομόν στερεό (3.54 g, 91%). ¹³C NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 163.72, 125.84. HRMS (ESI) for C₄Br₂O₃: m/z calcd, 253.82; found, 254.82 [M+H⁺].

Ένωση 20



Σε μια σφαιρική φιάλη, δι-βρωμο-μαλεϊκός ανυδρίτης **19** (1 g, 0.034 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε AcOH (12 mL). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη μονοϋδρικής υδραζίνης (170 μL, 0.0035 mmol, 0.9 eq.). Έκλυση αερίου παρατηρήθηκε κατά την προσθήκη της υδραζίνης και

καθίζηση ενός λευκού στερεού παρατηρήθηκε αμέσως. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 110 °C για 1 h και στη συνέχεια αφέθηκε σε RT για 16 h. Το επιθυμητό λευκό στερεό απομονώθηκε με διήθηση και εκπλύθηκε με Et₂O αποδίδοντας 390 mg της επιθυμητής ένωσης (40%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 5.75 (s, 2H). HRMS (ESI) for C₄H₂Br₂N₂O₂: m/z calcd., 269.85; found, 270.85 [M+H⁺].

Ένωση 21



Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η ένωση **20** (200 mg, 0.73 mmol, 1 eq.), μαζί με Cs₂CO₃ (240 mg, 0.73 mmol, 2 eq.), και διαλύθηκαν σε άνυδρο DMF (10 mL). Ακολούθησε προσθήκη tert-butyl bromo acetate (214 μL, 1.471 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 16 h σε RT. Ακολούθησε προσθήκη H₂O και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc. Η συνολική οργανική φάση εκπλύθηκε με aq. NaCl, ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και

συμπυκνώθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του ακατέργαστου προϊόντος με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hex/EtOAc (10:1 έως 2:1 αναλογία) ως κινητή φάση, δίνοντας την ένωση **21** ως λευκό στερεό (120 mg, 33%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.67 (s, 4H), 1.48 (s, 18H). HRMS (ESI) for $C_{16}H_{22}Br_2N_2O_6$: m/z calcd., 495.98; found, 496.99 [M+H⁺]. Ένωση 22



Σε μια σφαιρική φιάλη η ένωση **21** (120 mg, 0.24 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε άνυδρο DCM (6 mL). Στη συνέχεια προστέθηκε TFA (100 μL, 13.06 mmol, 40 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η αντίδραση ελεγχόταν σε τακτά χρονικά

διαστήματα με ανάλυση TLC και ολοκληρώθηκε μετά από 3 μέρες. Το TFA απομακρύνθηκε υπό κενό, αποδίδοντας την ένωση **22** ως ένα υπόλευκο στερεό (90 mg, 98%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.85 (s, 2H), 4.79 (s, 4H). HRMS (ESI) for $C_8H_6Br_2N_2O_6$: m/z calcd., 383.86; found, 384.86 [M+H⁺].

Ένωση 23



Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε αλλυλική αλκοόλη (72 μL, 1.06 mmol, 1 eq.), χλωρο-οξικό οξύ (100 mg, 1.06 mmol, 1 eq.)

και DMAP (33 mg, 0.26 mmol, 0.25 eq.). Στη συνέχεια, προστέθηκε THF (2 mL), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 0 °C υπό ατμόσφαιρα αργού για 30 min. Mετά το πέρας αυτής της ώρας, ακολούθησε στάγδην προσθήκη DCC (394 mg, 1.9 mmol, 1.8 eq.) σε DCM (2mL). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 0 °C για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, η DCU-urea διηθήθηκε και εκπλύθηκε με THF και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό. Ακολούθησε προσθήκη EtOAc και το μίγμα εκπλύθηκε διαδοχικά με H₂O/HCl 1N και H₂O/NaHCO₃. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό, αποδίδοντας την ένωση **23** μαζί με ακαθαρσίες.¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.99-5.87 (m, 1H), 5.40-5.35 (m, 1H), 5.35 (dt, 1H), 4.71-4.69 (m, 2H), 4.10 (s, 2H).

Ένωση 24



Σε στεγνή φιάλη προστέθηκε άνυδρο THF (6 mL) και NaH (0.28 g, 12.3 mmol, 1 eq.),υπό ατμόσφαιρα αργού, μετά από έκπλυση

του με εξάνιο. Ακολούθησε στάγδην προσθήκη αιθυλενογλυκόλης (700 μL, 12.3mmol, 1 eq.),υπό συνεχή ροή αργού, και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 45 min. Στη συνέχεια προστέθηκε TBDMSCl (800 mg, 12.3 mmol, 1 eq.), και

ακολούθησε ανάδευση του μίγματος για άλλα 45 min. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίστηκε με EtOAc/K₂CO₃ 10%, και έκπλυση της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράνθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄, και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό αποδίδοντας την ένωση **24** ως διάφανο λάδι (1.7 g, 82%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.72 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.08 (s, 6H).

Ένωση 25a

TBDMSOΣε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η ένωση 24 (30 mg,
0.17 mmol, 1 eq.), μαζί με Cs_2CO_3 (110 mg, 0.34 mmol,
2 eq.), και διαλύθηκαν σε άνυδρο DMF (1 mL). Ακολούθησε προσθήκη tert-butyl
bromo acetate (50 μL, 0.34 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για
3 h σε RT (έλεγχος με TLC). Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα εκχυλίστηκε
με EtOAc/H2O, η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na2SO4, και ο διαλύτης
εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση, αποδίδοντας την ένωση 25a μαζί με κάποιες
προσμίξεις. ¹H NMR (400 MHz, CDCl3) δ: 4.54 (s, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.24 (t, 2H), 4.09 (s,
2H), 3.84 (t, 2H), 1.46 (s, 24H), 0.88 (s, 9H), 0.08 (s, 6H).

Ένωση 29a

Σε ένα διάλυμα μονοϋδρικής υδραζίνης (250 mg, 5 mmol, 1 eq.) σε $H_2N^{N}_{BOC}$ iPrOH (100 mL) στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην διάλυμα DBDC (1.09 g, 5 mmol, 1 eq.) σε iPrOH (50 mL). Το μίγμα της αντίδρασης θόλωσε μετά την προσθήκη και η ανάδευση συνεχίστηκε σε για 2^{1/2} h. Στη συνέχεια, ο διαλύτης απομακρύνθηκε και το προκύπτον υπόλειμμα επεξεργάστηκε με DCM και εξάνιο. Οι διαλύτες εξατμίστηκαν, και καθίζηση λευκών κρυστάλλων παρατηρήθηκε αμέσως, αποδίδοντας την ένωση **29a** ως διάφανους κρυστάλλους. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.57 (s, 1H), 3.66 (s, 2H), 1.34 (s, 9H).

Ένωση 29b

Η ένωση **29a** (5 mmol, 1eq.) προστέθηκε σε υγρό DBDC (1.09 g, 5 mmol, 1 eq.). Έκλυση αερίου παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και μετά το πέρας της, το μίγμα έγινε στερεό. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 5'. Η επιθυμητή ένωση **29b** παραλήφθηκε έπειτα από ανακρυστάλλωση του μίγματος με Hex/CHCl₃ σε αναλογία 4:1. (676 mg, 59%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.19 (s, 2H), 1.51 (s, 18H). HRMS (ESI) for $C_{10}H_{20}N_2O_4$: m/z calcd., 232.14; found, 255.13 [M+Na⁺].

Συμπεράσματα

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία είχε ως σκοπό την ανάπτυξη μιας νέας μεθοδολογίας για τη σύνθεση στοχευτικών συζευγμάτων με διπλό θεραπευτικό φορτίο βασισμένη σ' ένα ικρίωμα διβρωμοπυριδαζινοδιόνης. Στο πρώτο μέρος, πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία οι συζεύξεις των φαρμάκων (γεμσιταβίνη, SAP) με τη διασπώμενη γέφυρα Val-Cit (ενώσεις 9 και 18). Επιπλέον, στα πλαίσια της σύνθεσης της ένωσης 9 (συζευγμένη γεμσιταβίνη με τη γέφυρα Val-Cit), επιτεύχθηκε, έπειτα από τροποποίηση της ήδη υπάρχουσας, μια νέα συνθετική πορεία για την εκλεκτική προστασία της γεμσιταβίνης. Το δεύτερο μέρος αφιερώθηκε στη σύνθεση του ικριώματος, η οποία ήταν επιτυχής. Ωστόσο η ενεργοποίηση του ικριώματος και η σύζευξη με τα φάρμακα δεν πραγματοποιήθηκε με αποτέλεσμα τον επαναπροσδιορισμό της στρατηγικής και τη σύνθεση ενός τροποποιημένου ικριώματος. Στα μελλοντικά μας σχέδια περιλαμβάνεται η ολοκλήρωση της σύνθεσης του ικριώματος ώστε να επιτευχθεί η σύζευξη των δύο φαρμάκων, καθώς και η βιολογική αξιολόγηση του συζεύγματος με στόχο να επιβεβαιωθεί ο προτεινόμενος μηχανισμός απελευθέρωσης των φαρμάκων. Τέλος, ευελπιστούμε η μεθοδολογία αυτή να καταστεί ικανή τόσο για τη σύνθεση συζευγμάτων που θα φέρουν φάρμακα με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, όσο και για τη σύνθεση στοχευτικών συζευγμάτων όπως ADDCs και PDDCs.

Λίστα συντομογραφιών

BOC	tert-butyloxycarbonyl
CDI	N, N' -Carbonyldiimidazole
Cit	Citrulline
DBDC	Di-tert-butyl dicarbonate
DBU	1, 8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene
DCC	N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
diBrPD	Dibromopyridazinedione
DIPA	Diisopropylamine
DIPEA	N, N-Diisopropylethylamine
DME	Dimethoxyethane
DMF	Dimethylformamide
DMAP	4-Dimethylaminopyridine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EEDQ	N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline
en	ethylenediamine
eq.	equivalents
ESI	Electrospray Ionization
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Et ₂ O	Diethyl ether

h	Hours
Hex	Hexane
HOBt	Hydroxybenzotriazole
LDC	Ligand Drug Conjugate
MeOH	Methanol
min	minutes
MS	Mass Spectrometry
MsCl	Mesyl Chloride
NBS	N-Bromosuccinimide
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
РАВОН	p-aminobenzyl Alcohol
PEA	2-phenethylamine
PNP	p-nitrophenol
Ру	Pyridine
РуВОР	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RT	Room Temperature
TBDMS	tert-butyl dimethylsilyl
TEA	Triethylamine
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin-Layer Chromatography
Val	Valine

Παράρτημα



¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **2**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 2.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **3**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 3.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **4**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 4.



¹Η NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **5α**.


¹Η NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **5b**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **5b**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 6.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **7**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 7.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 8.



¹Η NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **9**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 9.



¹Η NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **15**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **15**.



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **16**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 16.







HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **18**.



¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) της ένωσης **19**.



¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **19**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 19.



¹Η NMR (400 MHz, DMSO-d₆) φάσμα της ένωσης **20**.



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 20.



¹Η NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **21**.





HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 21.



¹Η NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **22**.



C8H6N2O6Br2 +H: C8 H7 N2 O6 Br2 p(gss, s/p:40) Chrg ...

HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 22.



¹Η NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **23.**



¹Η NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **24.**



¹Η NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα του μίγματος της ένωσης **25a.**



¹Η NMR (500 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **29a.**



¹Η NMR (400 MHz, CDCl₃) φάσμα της ένωσης **29b.**



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 29b.

Βιβλιογραφία

- Murthy, M. S. S. Cancer Genes: The Molecular Militants. *Resonance* 2000, *5*, 45–59.
- (2) Harrington, K. J. Biology of Cancer. *Medicine*. 2008, 36, 1–4.
- (3) B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell, 5th Edition*.2008.
- (4) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674..
- (5) Roskoski, R. Sunitinib: A VEGF and PDGF Receptor Protein Kinase and Angiogenesis Inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *356*, 323–328.
- (6) Faivre, S.; Demetri, G.; Sargent, W.; Raymond, E. Molecular Basis for Sunitinib
 Efficacy and Future Clinical Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, *6*, 734–745.
- Srinivasarao, M.; Galliford, C. V.; Low, P. S. Principles in the Design of Ligand-Targeted Cancer Therapeutics and Imaging Agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015, 14, 203–219.
- (8) Srinivasarao, M.; Low, P. S. Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chem. Rev.* 2017, 117, 12133–12164.
- (9) Lehár, J.; Krueger, A. S.; Avery, W.; Heilbut, A. M.; Johansen, L. M.; Price, E. R.; Rickles, R. J.; Short, G. F.; Staunton, J. E.; Jin, X.; Lee, M. S.; Zimmermann, G. R.; Borisy, A. A. Synergistic Drug Combinations Tend to Improve Therapeutically Relevant Selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 659–666.
- (10) Chau, C. H.; Steeg, P. S.; Figg, W. D. Antibody–Drug Conjugates for Cancer. Lancet 2019, 394, 793–804.
- He, R.; Finan, B.; Mayer, J. P.; DiMarchi, R. D. Peptide Conjugates with Small Molecules Designed to Enhance Efficacy and Safety. *Molecules* 2019, 24, 11–14.
- (12) Rhodes, C. A.; Pei, D. Bicyclic Peptides as Next-Generation Therapeutics. *Chem.*

- A Eur. J. 2017, 23, 12690–12703.

- (13) Li, C.; Wallace, S. Polymer-Drug Conjugates: Recent Development in Clinical Oncology. Adv. Drug Deliv. Rev. 2008, 60, 886–898.
- (14) Gilad, Y.; Noy, E.; Senderowitz, H.; Albeck, A.; Firer, M. A.; Gellerman, G. Dual-Drug RGD Conjugates Provide Enhanced Cytotoxicity to Melanoma and Non-Small Lung Cancer Cells. *Biopolymers* **2016**, *106*, 160–171.
- (15) Świderska, K. W.; Szlachcic, A.; Opaliński, Ł.; Zakrzewska, M.; Otlewski, J. FGF2 Dual Warhead Conjugate with Monomethyl Auristatin E and α-Amanitin Displays a Cytotoxic Effect towards Cancer Cells Overproducing FGF Receptor 1. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2098.
- Bahou, C.; Spears, R. J.; Aliev, A. E.; Maruani, A.; Fernandez, M.; Javaid, F.; Szijj,
 P. A.; Baker, J. R.; Chudasama, V. Use of Pyridazinediones as Extracellular Cleavable Linkers through Reversible Cysteine Conjugation. *Chem. Commun.* 2019, 55, 14829–14832.
- (17) Chudasama, V.; Smith, M. E. B.; Schumacher, F. F.; Papaioannou, D.; Waksman,
 G.; Baker, J. R.; Caddick, S. Bromopyridazinedione-Mediated Protein and
 Peptide Bioconjugation. *Chem. Commun.* 2011, 47, 8781–8783.
- (18) Szijj, P. A.; Bahou, C.; Chudasama, V. Minireview: Addressing the Retro-Michael Instability of Maleimide Bioconjugates. *Drug Discov. Today Technol.* 2018, 30, 27–34.
- (19) Tedaldi, L. M.; Smith, M. E. B.; Nathani, R. I.; Baker, J. R. Bromomaleimides: New Reagents for the Selective and Reversible Modification of Cysteine. *Chem. Commun.* 2009, 43, 6583–6585.
- Bahou, C.; Richards, D. A.; Maruani, A.; Love, E. A.; Javaid, F.; Caddick, S.; Baker,
 J. R.; Chudasama, V. Highly Homogeneous Antibody Modification through
 Optimisation of the Synthesis and Conjugation of Functionalised
 Dibromopyridazinediones. Org. Biomol. Chem. 2018, 16, 1359–1366.
- (21) Maruani, A.; Smith, M. E. B.; Miranda, E.; Chester, K. A.; Chudasama, V.;

Caddick, S. A Plug-and-Play Approach to Antibody-Based Therapeutics via a Chemoselective Dual Click Strategy. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–9.

- (22) Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Mosure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail, P. A. 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*, 855–869.
- (23) Argyros, O.; Karampelas, T.; Varela, A.; Asvos, X.; Papakyriakou, A.; Agalou, A.; Beis, D.; Davos, C. H.; Fokas, D.; Tamvakopoulos, C. Targeting of the Breast Cancer Microenvironment with a Potent and Linkable Oxindole Based Antiangiogenic Small Molecule. *Oncotarget* **2017**, *8*, 37250–37262.
- (24) Miao, H.; Chen, X.; Luan, Y. Small Molecular Gemcitabine Prodrugs for Cancer Therapy. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*.
- (25) Mini, E.; Nobili, S.; Caciagli, B.; Landini, I.; Mazzei, T. Cellular Pharmacology of Gemcitabine. Ann. Oncol. 2006, 17, 7–12.
- (26) Elnaggar, M.; Giovannetti, E.; J. Peters, G. Molecular Targets of Gemcitabine Action: Rationale for Development of Novel Drugs and Drug Combinations. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2811–2829.
- (27) Karampelas, T.; Argyros, O.; Sayyad, N.; Spyridaki, K.; Pappas, C.; Morgan, K.; Kolios, G.; Millar, R. P.; Liapakis, G.; Tzakos, A. G.; 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.
- (28) Shukla, S.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Ambudkar, S. V. Sunitinib (Sutent, SU11248), a Small-Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Blocks Function of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters P-Glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 359–365.
- (29) Zacharie, B.; Connolly, T. P.; Penney, C. L. A Simple One-Step Conversion of Carboxylic Acids to Esters Using EEDQ. J. Org. Chem. 1995, 60, 7072–7074.

- (30) Belleau, B.; Malek, G. New Convenient Reagent for Peptide Syntheses. J. Am. Chem. Soc. 1968, 90, 1651–1652.
- (31) Guo, Z. W.; Gallo, J. M. Selective Protection of 2',2'-Difluorodeoxycytidine (Gemcitabine). J. Org. Chem. 1999, 64, 8319–8322.
- (32) Dubernet, M.; Caubert, V.; Guillard, J.; Viaud-Massuard, M. C. Synthesis of Substituted Bis(Heteroaryl)Maleimides. *Tetrahedron* 2005, *61*, 4585–4593.
- (33) Feuer, H.; White, E. H.; Wyman, J. E. The Reactions of Maleic Anhydride with Hydrazine Hydrate 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3790–3792.
- (34) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP[®]: A New Peptide Coupling Reagent Devoid of Toxic by-Product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
- (35) Bartoli, G.; Bosco, M.; Carlone, A.; Dalpozzo, R.; Marcantoni, E.; Melchiorre, P.; Sambri, L. Reaction of Dicarbonates with Carboxylic Acids Catalyzed by Weak Lewis Acids: General Method for the Synthesis of Anhydrides and Esters. *Synthesis (Stuttg).* 2007, 22, 3489–3496.
- Robert, C.; de Montigny, F.; Thomas, C. M. Facile and Efficient Synthesis of Cyclic Anhydrides from Dicarboxylic Acids. ACS Catal. 2014, 4, 3586–3589.
- (37) Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. Protection of Hydroxyl Groups as Tert-Butyldimethylsilyl Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190–6191.
- (38) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*;2006.
- (39) Aizpurua, J. M.; Palomo, C. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]Undec-7-Ene (Dbu): An Effective Base for the Introduction of Tbutyldimethylsilyl Group in Organic Compounds. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 475–476.
- (40) Leggio, A.; Belsito, E. L.; De Luca, G.; Di Gioia, M. L.; Leotta, V.; Romio, E.; Siciliano, C.; Liguori, A. One-Pot Synthesis of Amides from Carboxylic Acids Activated Using Thionyl Chloride. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 34468–34475.
- (41) Lee, J. B. Preparation of Acyl Halides under Very Mild Conditions. J. Am. Chem. Soc. 1966, 8, 3440–3441.

- (42) Frøyen, P. The Conversion of Carboxylic Acids into Amides via NCS/Triphenylphosphine. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 959–968.
- Paul, R.; Anderson, G. W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent. J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 4596–4600.
- (44) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* 2005, *61*, 10827–10852.
- (45) McDougal, P. G.; Rico, J. G.; Oh, Y. I.; Condon, B. D. A Convenient Procedure for the Monosilylation of Symmetric 1,n-Diols. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3388–3390.
- (46) Bredihhin, A.; Mäeorg, U. Effective Strategy for the Systematic Synthesis of Hydrazine Derivatives. *Tetrahedron* 2008, 64, 6788–6793.
- (47) Guibé, F. Allylic Protecting Groups and Their Use in a Complex Environment Part
 II: Allylic Protecting Groups and Their Removal through Catalytic Palladium π Allyl Methodology. *Tetrahedron* 1998, 54, 2967–3042.
- (48) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. J. Org. Chem. 1978, 43, 2923–2925.