



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

Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη σύνθεση συζευγμάτων (Drug-Drug Conjugates) αντικαρκινικών φαρμάκων με τη χρήση ικριώματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης

**ΒΑΛΑΚΑ ANNA-ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2020



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

Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη σύνθεση συζευγμάτων (Drug-Drug Conjugates) αντικαρκινικών φαρμάκων με τη χρήση ικριώματος διβρωμοπυριδαζινοδιόνης

**ΒΑΛΑΚΑ ANNA-ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Σκομπρίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων **(Μέλος)**  
Ταμβακόπουλος Κωνσταντίνος, Ερευνητής Α', ΙΙΒΕΑ, Τομέας Φαρμακολογίας-  
Φαρμακοτεχνολογίας **(Μέλος)**  
Φωκάς Δημοσθένης, Αναπλ. Καθηγητής, ΤΜΕΥ, Παν/μιο Ιωαννίνων **(Επιβλέπων)**

**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 Drug-Drug  
Conjugates of Anticancer Agents based on a di-bromopyridazinodione  
Scaffold

VALAKA ANNA-PARASKEVI

Master Thesis

**Members of the Examining Committee**

Skompridis Konstantinos, Professor, Department of Chemistry, University of Ioannina  
**(Member)**

Tamvakopoulos Constantinos, 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



## 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.

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 Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, κ. Κωνσταντίνο Σκομπρίδη, για τη βοήθεια και την συνεχή υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια του Μεταπτυχιακού, όπως επίσης και κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών, όπου μαζί με την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Βασιλική Θεοδώρου με έκαναν να αγαπήσω την Οργανική Χημεία. Η υποστήριξη και βοήθεια τους ήταν καταλυτική για να συνεχίσω την έρευνα μου σε αυτό το αντικείμενο. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστώ τον συνεπιβλέποντα Ερευνητή του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών κ. Κωνσταντίνο Ταμβακόπουλο για τη συνεργασία και την ευγενική του συμμετοχή στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς επίσης και για την ευγενική χορηγία της ντοσεταξέλης.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία και βοήθεια τους, και ιδιαίτερα τον συνάδελφο Χριστόδουλο Μητρογιάννη με τον οποίο μοιραστήκαμε αυτή την ερευνητική δουλειά.

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 τα δύο αυτά χρόνια. Ευχαριστώ πάνω απ' όλα την αδελφή μου, Νικολέτα, για την ανιδιοτελή της στήριξη, συμπαράσταση και για τις όμορφες στιγμές που ζήσαμε αυτά τα δύο χρόνια.



## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες .....	5
Περίληψη .....	9
Abstract .....	10
Εισαγωγή.....	11
Καρκίνος.....	11
Χημειοθεραπεία μέσω στοχευτικού προσδέτη-Ligand-Targeted Drug Therapy .....	14
Επαγόμενη ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέα (Receptor-Mediated Endocytosis) .....	15
Συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων (Multi-Drug Conjugates).....	17
Κριώμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης (di-BrPDs).....	20
Στρατηγική σύνθεσης πολυτροπικών συζευγμάτων .....	22
Επιλογή φαρμάκων: Gemcitabine .....	25
Επιλογή φαρμάκων: Docetaxel.....	26
Συζήτηση-Αποτελέσματα .....	28
Σύνθεση του κριώματος δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης (di-BrPD scaffold).....	28
Σύνθεση της βιοδιασπώμενης γέφυρας Val-Cit .....	31
Σύνθεση της συζευγμένης γεμισταβίνης με τη βιοδιασπώμενη γέφυρα (Gemcitabine-Linker).....	34
Σύνθεση της συζευγμένης ντοσεταξέλης με τη βιοδιασπώμενη γέφυρα (Docetaxel-Linker) .....	37
Μελέτες Σύζευξης.....	41
Επαναπροσδιορισμένη στρατηγική σύνθεσης του κριώματος.....	49
Πειραματικό μέρος .....	53
Υλικά και Μέθοδοι.....	53
Σύνθεση των ενώσεων 1-27b .....	54
Συμπεράσματα.....	67
Λίστα Συντομογραφιών .....	68
Παράρτημα .....	70
Βιβλιογραφία .....	95





## Περίληψη

Η αποτελεσματικότητα της κλασικής αντικαρκινικής θεραπείας είναι περιορισμένη, λόγω της μειωμένης στοχευτικής δράσης των κυτταροτοξικών φαρμάκων και της αυξημένης τοξικότητας ενάντια στα φυσιολογικά κύτταρα. Γι' αυτό το λόγο, νέες στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί, κατά τις οποίες ένα κυτταροτοξικό φάρμακο συνδέεται μέσω μιας βιοδιασπώμενης γέφυρας με ένα στοχευτικό συνδέτη που αναγνωρίζει το κύτταρο-στόχο, με πολλά συζεύγματα να βρίσκονται ήδη στην αγορά. Παρ' όλο που τα κλινικά αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, αντιμετωπίζονται προβλήματα στην θεραπεία ετερογενών όγκων. Ο συνδυασμός διαφορετικών κυτταροτοξικών φαρμάκων με διαφορετικό μηχανισμό δράσης στο ίδιο στοχευτικό μόριο, θα μπορούσε να αποτρέψει την εμφάνιση αντοχής στη φαρμακοδραστική ουσία, ενώ επίσης θα μπορούσε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας μέσω συνεργιστικής δράσης.

Ελλείπει τέτοιων πολλαπλών στοχευτικών συζευγμάτων, έγινε μια προσπάθεια ανάπτυξης μιας γενικής μεθοδολογίας η οποία θα επέτρεπε την ορθογώνια σύνθεση στοχευτικών συζευγμάτων, που θα μεταφέρουν στο κύτταρο στόχο δύο διαφορετικά κυτταροτοξικά φάρμακα (π.χ. γεμισιταβίνη-ντοσεταξέλη). Τα δύο φάρμακα θα συνδέονται με ένα ικρίωμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης μέσω μιας βιοδιασπώμενης πεπτιδικής γέφυρας (Val-Cit) και ενός αυτοκαταστροφικού συνδέτη (p-aminobenzyl alcohol), παρουσία μιας διαχωριστικής γέφυρας αιθυλενοδιαμίνης, που θα επιτρέπουν τη χημική/ενζυματική απελευθέρωση των φαρμάκων στο ενδόσωμα μετά την ενδοκυττάρωση του συζεύγματος. Η παρουσία της δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης διευκολύνει την εισαγωγή πολλαπλών στοχευτικών ομάδων με κατάλοιπα κυστεΐνης, μέσω αντιδράσεων σύζευξης και σχηματισμού σταθερών σουλφιδικών δεσμών, με αντικατάσταση των ατόμων βρωμίου του διπλού δεσμού.

Συνολικά, επετεύχθη η σύνθεση της βιοδιασπώμενης γέφυρας και η σύνδεση της με τη γεμισιταβίνη με χρήση εναλλακτικών μονοπατιών σύνθεσης, η ανάπτυξη της συνθετικής πορείας προς τη σύνθεση του ικρίωματος, ενώ η σύνδεση της γέφυρας με την ντοσεταξέλη βρίσκεται σε στάδιο ολοκλήρωσης.

## Abstract

Efficacy of current anti-cancer therapy is limited due to the fact that upon administration, the anticancer agent is delivered into non-diseased tissues, leading to off-target toxicities. Thus, new strategies have been developed, wherein a cytotoxic drug is linked through a cleavable linker with a targeting ligand, with many of these conjugates already on the market. Although clinical benefits of targeted therapeutics are encouraging, limitations are developed in therapy of heterogeneous tumors. Co-delivery of therapeutic agents with different mechanism of action on the same targeting molecule could prevent drug resistance, as well as generate synergistic anticancer effects that may enhance antitumor efficacy.

In the absence of such targeted therapeutics, an effort has been made into the development of a versatile procedure for the orthogonal assembly of multi-drug conjugates, carrying two different anticancer agents (e.g. Gemcitabine-Docetaxel) into the tumor cell. Both drugs would be linked with a di-bromopyridazinodione scaffold through a peptide cleavable bridge (Val-Cit) and a self-immolating linker (p-aminobenzyl alcohol), in the presence of an ethylenediamine spacer, that would allow the chemical/enzymatic release of both drugs in the endosome, after endocytosis. The presence of the di-bromopyridazinodione scaffold enables the introduction of multiple targeting ligands with cysteine residues, through conjugation reactions and the formation of stable sulfide adducts, capitalizing on bromine displacement.

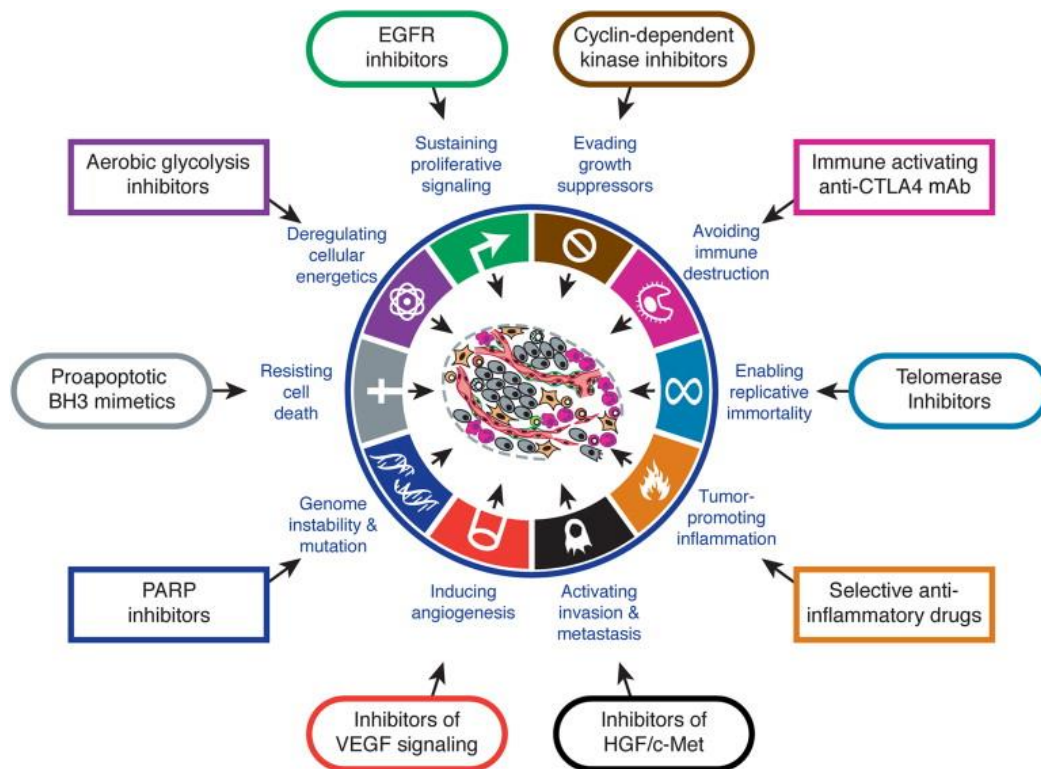
Overall, synthesis of the cleavable bridge was achieved, as well as its conjugation with Gemcitabine, through alternative synthetic pathways. In addition, we managed to develop a synthetic strategy towards the synthesis of the di-bromopyridazinodione scaffold, whilst conjugation of the cleavable bridge with Docetaxel remains to be fulfilled.

## Εισαγωγή

### Καρκίνος

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις, μετρώντας 9,6 εκατομμύρια θανάτους το 2018, με βάση στατιστικά στοιχεία από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα μιας διαδικασίας πολλαπλών σταδίων, κατά την οποία τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται σε καρκινικά και εξαπλώνονται σε άλλα όργανα. Τα καρκινικά κύτταρα ορίζονται από δύο κληρονομικές ιδιότητες: (1) αναπαράγονται ανεξέλεγκτα χωρίς να αποκρίνονται στα σήματα που ελέγχουν την ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων και (2) εισβάλλουν και αποικίζουν περιοχές που συνήθως προορίζονται για άλλα κύτταρα. Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων καθιστά τους καρκίνους ιδιαίτερα επικίνδυνους

Ένα μη φυσιολογικό κύτταρο που αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται εκτός ελέγχου θα οδηγήσει σε έναν όγκο, ή νεόπλασμα. Όσο τα νεοπλαστικά κύτταρα δεν γίνονται επεμβατικά, ο όγκος χαρακτηρίζεται ως καλοήθης, και η αφαίρεση ή η καταστροφή της μάζας τοπικά, καθιστά, συνήθως, την θεραπεία επιτυχή. Ένας όγκος θεωρείται καρκίνος μόνο αν είναι κακοήθης, δηλαδή μόνο εάν τα κύτταρά του έχουν αποκτήσει την ικανότητα να εισβάλλουν στον περιβάλλοντα ιστό. Η διηθησιμότητα είναι ένα ουσιαστικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Τους επιτρέπει να διαχωρίσουν, να εισαχθούν σε αιματικά ή λεμφατικά αγγεία και να σχηματίσουν δευτερογενείς όγκους (μετάσταση) σε άλλα μέρη του σώματος. Όσο πιο ευρεία είναι η εξάπλωση του καρκίνου, τόσο πιο δύσκολη διαδικασία αποτελεί η εξάλειψή του, καθιστώντας έτσι τις μεταστάσεις ως τη βασική αιτία θανάτου των ασθενών με καρκίνο.<sup>1</sup>



**Εικόνα 1.** Hallmarks of Cancer (*Cell* 144, 2011)

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 μερικές χαρακτηριστικές ιδιότητες που επιτρέπουν την ανάπτυξη του όγκου και τη εξάπλωση της μετάστασης. 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 διακριτικά χαρακτηριστικά, παρόμοια στους περισσότερους τύπους καρκίνου. Τα χαρακτηριστικά ή αλλιώς ορόσημα του καρκίνου<sup>2</sup> όπως καθιερώθηκαν από τους Hanahan και Weinberg το 2011 είναι:

1. Αντίσταση στους μηχανισμούς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και της απόπτωσης
2. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
3. Απορύθμιση κυτταρικής ενέργειας-μεταβολισμού
4. Γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις

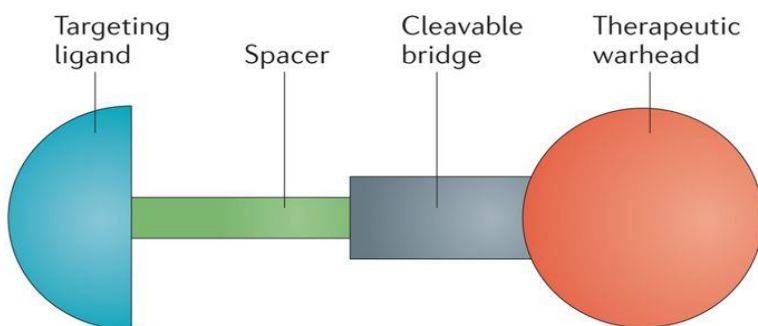
5. Επαγωγή της αγγειογένεσης
6. Ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης
7. Φλεγμονή που προωθεί την ανάπτυξη όγκου
8. Αναισθησία σε αντι-αυξητικά σήματα
9. Αποφυγή ανοσο-καταστροφής
10. Απεριόριστος πολλαπλασιασμός

Όπως οι φυσιολογικοί ιστοί, έτσι και οι όγκοι, απαιτούν τροφή με τη μορφή θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου, καθώς και την ικανότητα εκκένωσης των μεταβολικών αποβλήτων τους και του διοξειδίου του άνθρακα. Τα νέα αγγεία που σχετίζονται με τον όγκο και παράγονται κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης, αντιμετωπίζουν αυτές τις ανάγκες.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, η ανάπτυξη του αγγείου περιλαμβάνει τη δημιουργία νέων ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία διατάσσονται σε σωλήνες (αγγειογένεση) εκτός από τη μορφογένεση νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα, με αποτέλεσμα το φυσιολογικό αγγείο να γίνεται ιδιαίτερα σταθερό. Στους ενήλικες, η αγγειογένεση ενεργοποιείται μόνο παροδικά, σε περιπτώσεις όπως η επούλωση πληγών και κατά τη διάρκεια του εμμηνορροϊκού κύκλου. Εν αντιθέσει, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του όγκου, ένας «αγγειογενής διακόπτης» ενεργοποιείται και παραμένει σχεδόν πάντα ενεργός, προκαλώντας τα κανονικά αγγεία να δημιουργούν συνεχώς νέα, τα οποία επιτρέπουν τη διατήρηση των νεοπλαστικών αναπτύξεων. Τα αιμοφόρα αγγεία που παράγονται μέσω των όγκων, περιλαμβάνουν πολλές ανωμαλίες λόγω ενός συνόλου απορρυθμισμένων προαγγειογενών σημάτων και της χρόνιας συνεχούς ενεργής αγγειογένεσης. Τα νέα όγκο-αγγεία είναι παραμορφωμένα και διευρυμένα, χαρακτηρίζονται από πρόωρο τριχοειδή βλαστό, περίπλοκη και υπερβολική διακλάδωση και ακανόνιστη ροή αίματος, ενώ παρουσιάζουν μη φυσιολογικά επίπεδα πολλαπλασιασμού και απόπτωσης.<sup>2</sup>

## Χημειοθεραπεία μέσω στοχευτικού προσδέτη-Ligand-Targeted Drug Therapy

Η καρκινική θεραπεία βασίζεται στην αναστολή ενός ή περισσότερων μηχανισμών των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, στην πλειονότητά τους, είναι τοξικές και για τα φυσιολογικά κύτταρα του σώματος, τα οποία έχουν επίσης ανάγκη να αναπτυχθούν, να πολλαπλασιαστούν και να αποφύγουν τον πρόωρο κυτταρικό θάνατο. Για να ελαχιστοποιηθούν αυτά τα μειονεκτήματα, νέες στρατηγικές έχουν σχεδιαστεί οι οποίες βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της καρκινικής θεραπείας, μέσω των συζευγμάτων φαρμάκου-προσδέτη [ligand drug conjugates (LDCs)]. Η γενική δομή αυτών των συζευγμάτων περιλαμβάνει μια στοχευτική ομάδα συνδεδεμένη με το κυτταροτοξικό φάρμακο μέσω ενός spacer-συνδέτη που περιέχει ένα διασπώμενο δεσμό (Εικόνα 2). Πολλές στοχευτικές ομάδες (targeting ligands), έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, όπως αντισώματα, απταμερή, μικρά πρωτεϊνικά μόρια, πεπτίδια και μικρού μοριακού βάρους μη-πεπτιδικά μόρια, με τα συζεύγματα φαρμάκων με αντισώματα (Antibody Drug Conjugates) να έχουν ως σήμερα τη μεγαλύτερη επιτυχία, με δύο εξ' αυτών ήδη στην αγορά και πολλά ακόμη σε προχωρημένα στάδια κλινικών μελετών.<sup>3</sup>



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

Nature Reviews | Drug Discovery

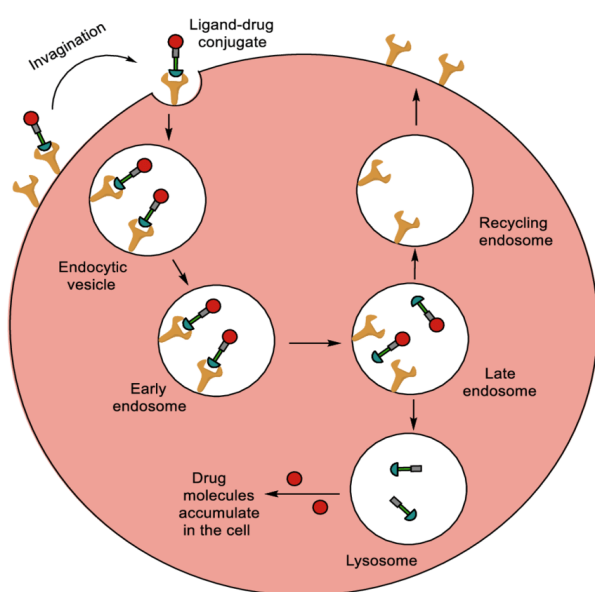
Η αποτελεσματικότητα του συζεύγματος ελέγχεται από την ικανότητα της στοχευτικής ομάδας να αναγνωρίζει και να προσδένεται σε έναν υποδοχέα που υπερεκφράζεται στο κύτταρο-στόχο. Το LDC στη συνέχεια εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της επαγόμενης-μέσω υποδοχέα-ενδοκυττάρωσης. Ως αποτέλεσμα, ο προς στόχευση υποδοχέας πρέπει να πληροί κάποιες προδιαγραφές. Πρωτίστως, πρέπει

να υπερεκφράζεται στα καρκινικά έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να είναι ένας εξωκυττάριος υποδοχέας, ο οποίος θα μπορεί να μεταφέρει το θεραπευτικό φορτίο εντός του κυττάρου. Ο λόγος για τον οποίο δεν προτιμώνται οι ενδοκυττάριοι υποδοχείς, όπως αυτοί των στεροειδών ορμονών, είναι γιατί το προκύπτον LDC θα έπρεπε να είναι διαπερατό στις κυτταρικές μεμβράνες, ώστε να μπορέσει να εισέλθει στο ενδόσωμα. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα, τέτοιας μορφής συζεύγματα να μην παρουσιάζουν εκλεκτικότητα, αφού θα μπορούσαν να εισέλθουν και στο ενδόσωμα των φυσιολογικών κυττάρων, προκαλώντας σοβαρές βλάβες σε αυτά.<sup>3</sup>

### Επαγόμενη ενδοκυττάρωση μέσω υποδοχέα (Receptor-Mediated Endocytosis)

Στη στοχευμένη-μέσω του υποδοχέα-φαρμακευτική χορήγηση, το σύζευγμα εισέρχεται στο κύτταρο-στόχο μέσω της επαγόμενης μέσω υποδοχέα ενδοκυττάρωσης, και στη συνέχεια μεταφέρεται στα εσωτερικά διαμερίσματα του κυττάρου, και συγκεκριμένα στο CURL (compartment of uncoupling of receptor and ligand). Μέσα στο CURL, ο υποδοχέας αποδεσμεύεται από το φορτίο του, το οποίο

στη συνέχεια μεταφέρεται σε άλλα ενδοκυττάρια διαμερίσματα, όπως τα λυσοσώματα, επιτρέποντας στον υποδοχέα να αποσυντεθεί ή να ανακυκλωθεί στην επιφάνεια του κυττάρου και να συμμετάσχει σε άλλο γύρο ενδοκυττάρωσης (Εικόνα 3). Ένας ιδανικός υποδοχέας είναι αυτός που ανακυκλώνεται συχνά ή ανασυντίθεται ταχέως μετά την αποσύνθεσή του.

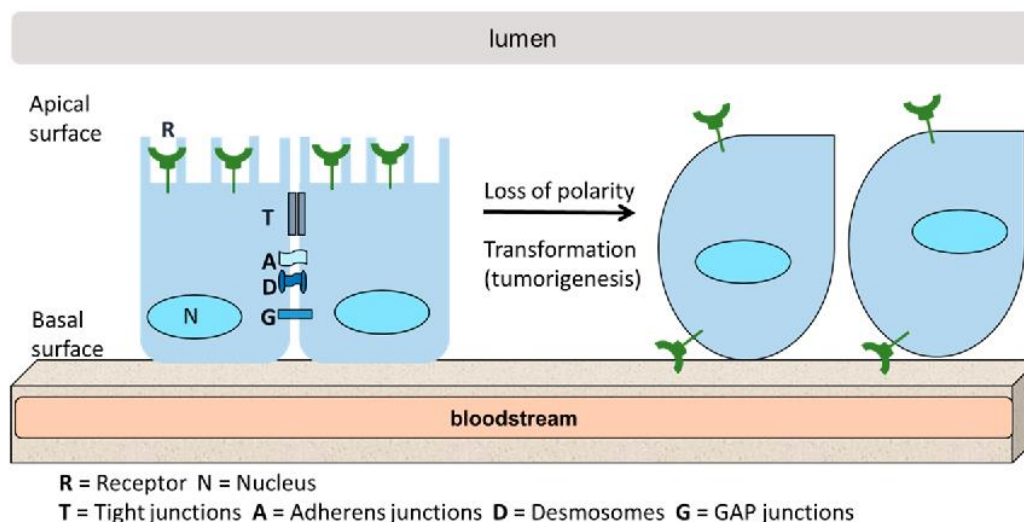


**Εικόνα 3.** Είσοδος του LDC στο ενδόσωμα με τη μεσολάβηση υποδοχέα. (*Chem. Sci.* **2018**, *9*, 790-810)



Παραδείγματα τέτοιων υποδοχέων που χρησιμοποιούνται ως στόχοι στην στοχευμένη θεραπεία είναι ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF, το ειδικό μεμβρανικό αντιγόνο του προστάτη PSMA, και ο υποδοχέας του φολικού οξέος.<sup>3</sup>

Τα συζεύγματα τα οποία στοχεύουν υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, σχεδιάζονται ώστε να είναι μη διαπερατά από αυτήν, έτσι ώστε μόνο τα κύτταρα με τους ιδανικούς εξωκυττάρους υποδοχείς να μπορούν να επάγουν την κυτταρική πρόσληψη. Οι υποδοχείς που εκφράζονται φυσιολογικά και ειδικά στην εξωτερική επιφάνεια των πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων, καθίστανται ως ιδανικοί στη στοχευμένη καρκινική θεραπεία, καθώς υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι μη προσβάσιμοι σε φάρμακα παρεντερικής χορήγησης. Ωστόσο, έπειτα από κακοήθη μετασχηματισμό, οι διακλαδώσεις μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων καταστρέφονται, επιτρέποντας τους επιφανειακά περιορισμένους υποδοχείς να ανακαταταξινομηθούν σε ολόκληρη την επιφάνεια του καρκινικού κυττάρου. Συνεπώς, η κατηγορία αυτών των υποδοχέων που φυσιολογικά βρίσκονται περιορισμένοι στην εξωτερική επιφάνεια των υγιών επιθηλιακών κυττάρων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως στόχος στην στοχευμένη θεραπεία αφού το επιθηλιακό κύτταρο υποστεί επιφανειακή μετάλλαξη. Επειδή το 80% των καρκίνων στον άνθρωπο προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα, οι περιορισμένες στην επιφάνεια πρωτεΐνες αποτελούν εξαιρετικό στόχο στη στοχευμένη μέσω συζευγμάτων θεραπεία (Εικόνα 4).<sup>4</sup>



**Εικόνα 4.** Το αποτέλεσμα του μετασχηματισμού των επιθηλιακών κυττάρων στην προσβασιμότητα των επιφανειακών υποδοχέων (*Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12133–12164)

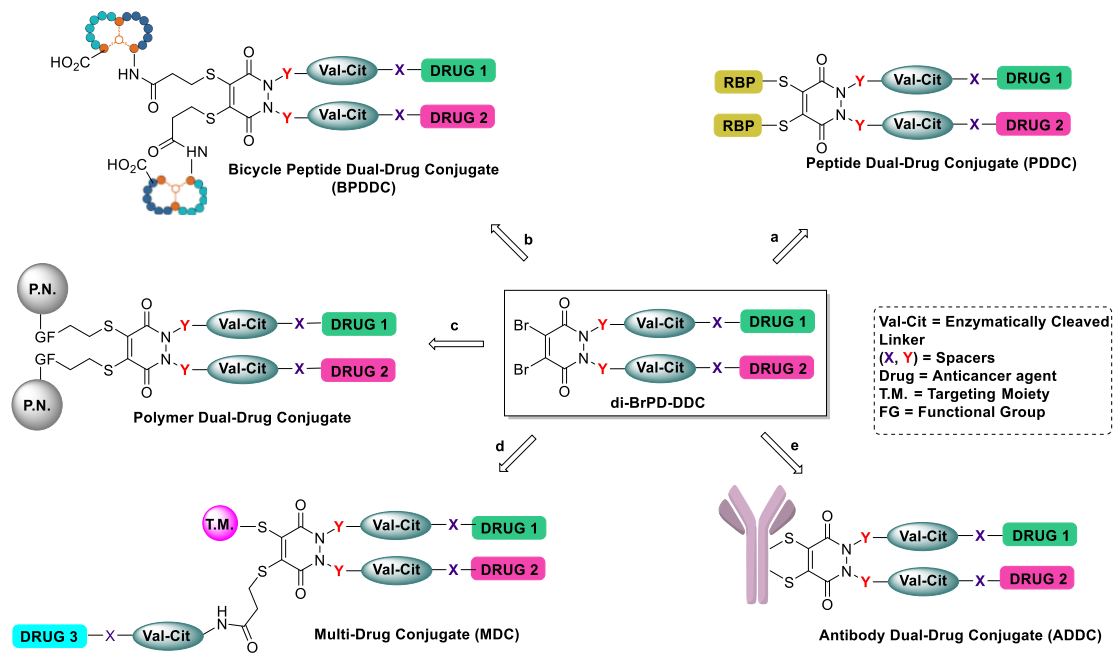
### Συζεύγματα πολλαπλών φαρμάκων (Multi-Drug Conjugates)

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.<sup>3</sup> 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.<sup>5</sup> Ως εκ τούτου, στοχευτικά συζεύγματα ικανά να παρέχουν δύο ή περισσότερα φάρμακα με διαφορετικό μηχανισμό δράσης μπορεί να αποδειχθούν καθοριστικά για την αντιμετώπιση της αντίστασης στα φάρμακα.

Ο σχεδιασμός φαρμακευτικών συζευγμάτων για τη στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων μέσω υποδοχέων (Peptide Drug Conjugates-PDCs και Antibody Drug Conjugates-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 έχουν λάβει έγκριση και πάνω από 100 διερευνώνται σε διάφορα στάδια κλινικής ανάπτυξης.<sup>6</sup> Στοχευτικά PDCs θα μπορούσαν να έχουν ανάλογη επιτυχία ξεκινώντας με την έγκριση του <sup>177</sup>Lu Dotatate για τη θεραπεία των γαστρεντεροπανκρεατικών νευροενδοκρινικών όγκων.<sup>7</sup> Το σημαντικά χαμηλότερο κόστος παραγωγής και η αυξημένη αναπαραγωγικότητα 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.<sup>8</sup> 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 στάδιο κλινικής μελέτης (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 της κλινικής δοκιμής (CT-2013; CRLX101, NCT03531827).<sup>9</sup> 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 χλωραμβουκίλης (chlorambucil) με ένα κυκλικό πεπτίδιο RGD, όπου τα φάρμακα συνδέονται με τη στοχευτική ομάδα μέσω ενός υπολείμματος λυσίνης ή σερίνης<sup>10</sup> και ένα σύζευγμα της πρωτεΐνης FGF2 με auristatin και α-amanitin για τη στόχευση των καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα FGFR1.<sup>11</sup> 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 στοχευμένων συζευγμάτων μας προέτρεψε να προχωρήσουμε στην ανάπτυξη μιας γενικής και ευέλικτης μεθοδολογίας η οποία θα επιτρέπει την ορθογώνια σύνθεση στοχευτικών πολυ-φαρμακευτικών συζευγμάτων (targeted multi-drug conjugates), που θα μεταφέρουν στο κύτταρο στόχο δύο ή και περισσότερα κυτταροτοξικά φάρμακα. Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 1, μια πλειάδα στοχευτικών συζευγμάτων θα μπορούσε να προκύψει από το di-BrPD Dual-Drug Conjugate, όπως Peptide Dual-Drug Conjugates (PDDC, a), Bicycle-Peptide Dual-Drug Conjugates (BPDDC, b) και Polymer Dual-Drug conjugates (PLDDC, c), μέσω σύζευξης του di-BrPD-DDC με στοχευτικά πεπτίδια υποδοχέων (RBP) που αναγνωρίζουν και προσδέονται σε υποδοχείς που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, πεπτίδια τύπου bicycle (BP) και πολυμερικά νανοσωματίδια (PN) αντίστοιχα. Η παρουσία πολυμερικών νανοσωματιδίων θα μπορούσε να αυξήσει το μεταβολικό προφίλ του συζεύγματος, λόγω της μεγάλης τους επιφάνειας, αποφεύγοντας την πρόωρη αποικοδόμηση και αυξάνοντας έτσι το χρόνο ημιζωής. Εκτός από το διπλό θεραπευτικό φορτίο, τα συγκεκριμένα συζεύγματα θα περιέχουν και διπλό στοχευτικό φορτίο, το οποίο πιθανότατα να μπορεί να βελτιώσει την στοχευτική ικανότητα του συζεύγματος. Επιπρόσθετα, με παρόμοια στρατηγική θα μπορούσαν να προκύψουν συζεύγματα τα οποία θα φέρουν τρία διαφορετικά φάρμακα (Multi-Drug Conjugates, d) και μια στοχευτική ομάδα (RBP, BP, PN), ενώ τέλος σύζευξη του di-BrPD-DDC με τις ελεύθερες κυστεΐνες ενός μονοκλωνικού αντισώματος, θα μπορούσε να αποδώσει Antibody Dual-Drug Conjugates (ADDC, e).

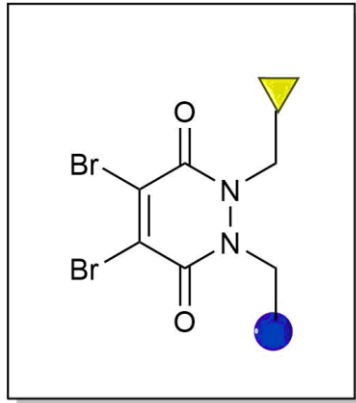


**Σχήμα 1.** Παραδείγματα στοχευτικών συζευγμάτων (targeted-multi-drug conjugates) με βάση το ικρίωμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης.

## Ικρίωμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης (di-BrPDs)

Οι δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνες-di-BrPDs, έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια στη σύζευξη πρωτεϊνών (protein bio-conjugation). Ο συνδυασμός οργανικής χημείας με μοριακή βιολογία έχει επιτρέψει την κατασκευή μιας σειράς πρωτεϊνών και πεπτιδίων ως ανιχνευτές που έχουν διευκολύνει αυτό το εγχείρημα. Η επιλεκτική τροποποίηση κυστεΐνης παραμένει μια δημοφιλής μέθοδος τροποποίησης πρωτεϊνών. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή φυσική διαθεσιμότητα και την υψηλή πυρηνοφιλία της σουλφυδρυλο-ομάδας της κυστεΐνης, καθώς και την εύκολη δυνατότητα εισαγωγής της σε επιθυμητές θέσεις πρωτεϊνικών σειρών με τη χρήση σύγχρονων μεθόδων μοριακής βιολογίας.<sup>12</sup> Συνεπώς, το ενδιαφέρον μας στράφηκε σε αυτές τις ενώσεις και μας προέτρεψε να προχωρήσουμε στη σύνθεση ενός συζεύγματος di-BrPD με διπλό θεραπευτικό φορτίο (dual drug conjugate), το οποίο θα μετέφερε τα δύο φάρμακα με τις πεπτιδικές-βιοδιασπώμενες γέφυρες τους μέσα στο κύτταρο-στόχο. Οι δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνες διαθέτουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις τους, τα μαλεϊμίδια. Τα μαλεϊμίδια είναι γνωστό ότι αντιδρούν γρήγορα και εκλεκτικά αλλά μη αντιστρεπτά με θιόλες. Κατά δεύτερον, δίνουν

συχνά retro-Michael αντιδράσεις αποσύζευξης (retro-Michael deconjugation reactions), ενώ ένα ακόμη μειονέκτημα τους είναι ότι το προκύπτον σύζευγμα δεν είναι σταθερό στον ορό του αίματος.

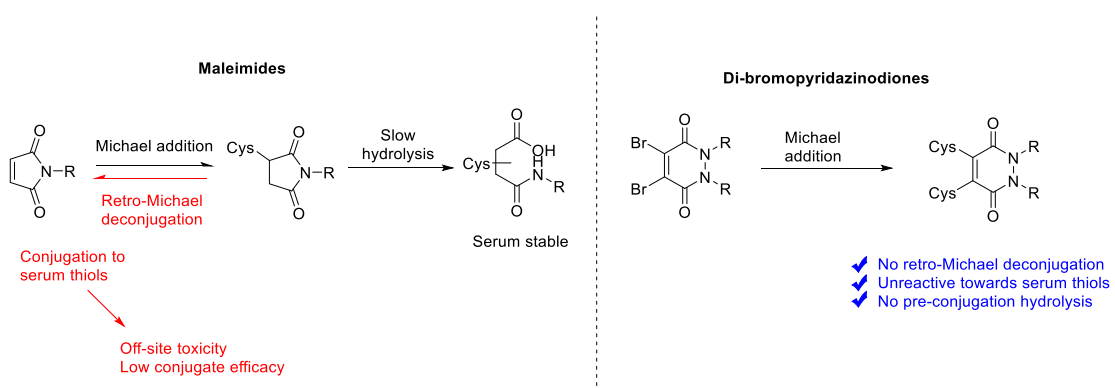


Στον αντίποδα αυτών, οι di-BrPDs διαθέτουν 4 σημεία σύνδεσης (Εικόνα 5), δύο μέσω των ατόμων αζώτου, ενώ τα βρώμια του διπλού δεσμού είναι ιδανικά για αντιδράσεις σύζευξης-προσθήκης με στοχευτικές ομάδες που φέρουν ελεύθερες θιόλες, όπως στοχευτικά πεπτίδια, αντισώματα, κ.α.

**Εικόνα 5.** Ικρίωμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης συνδεδεμένο με δύο διαφορετικές ομάδες μέσω των

ατόμων αζώτου.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα των di-BrPDs είναι ότι δεν απαιτούν στάδιο υδρόλυσης για να αποκτήσουν σταθερότητα στον ορό του αίματος, ενώ επίσης είναι και ανθεκτικά/συμβατά με κοινά ήπια αναγωγικά μέσα. Οι διαφορές στη σταθερότητα των di-BrPDs και των μαλεϊμιδίων συνοψίζονται στην Εικόνα 6.

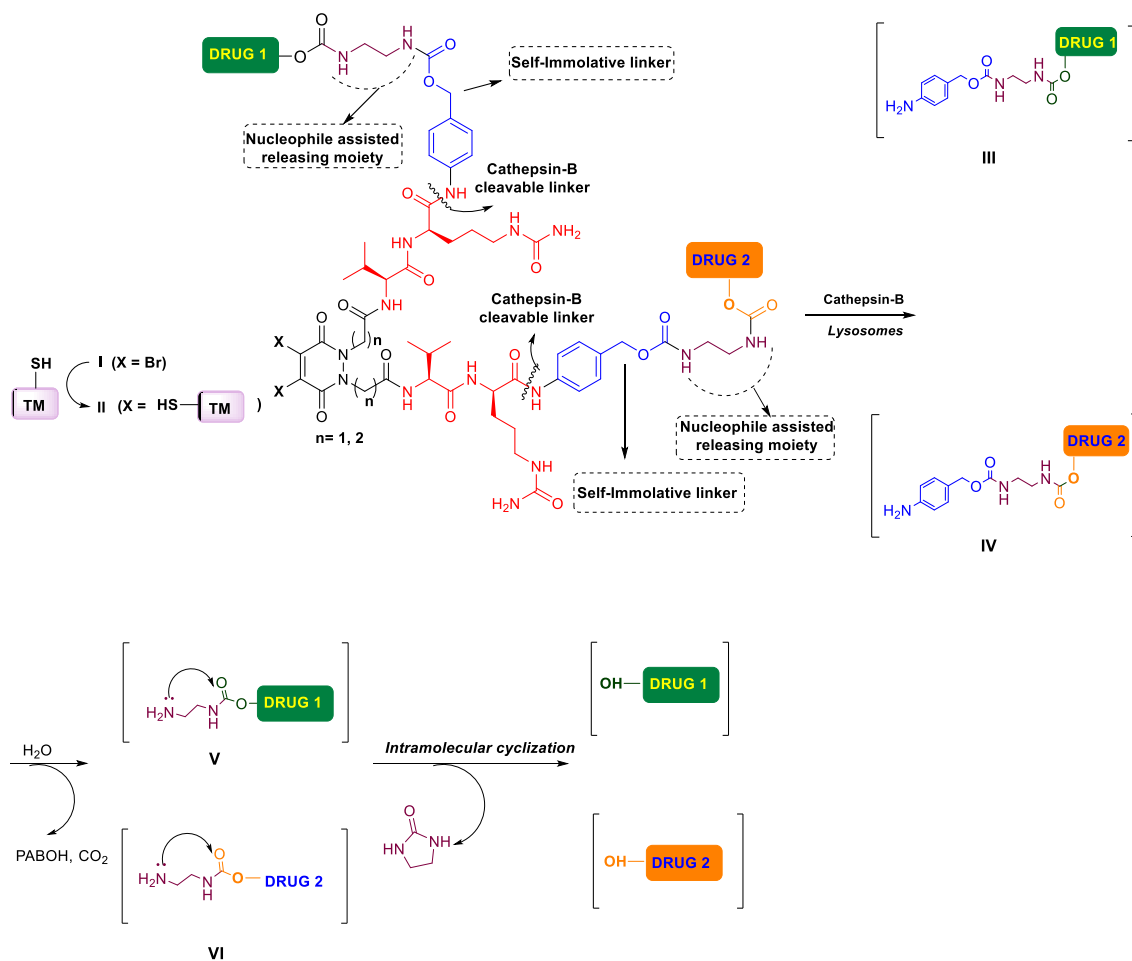


**Εικόνα 6.** Διαφορές στη δράση μαλεϊμιδίων και δι-βρωμοπυριδαζινοδιονών.

Μέχρι σήμερα, το ικρίωμα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην σύνθεση ADCs, antibody-directed photosensitizers, protein–protein conjugates, κ.α.<sup>13</sup>

### **Στρατηγική σύνθεσης πολυτροπικών συζευγμάτων**

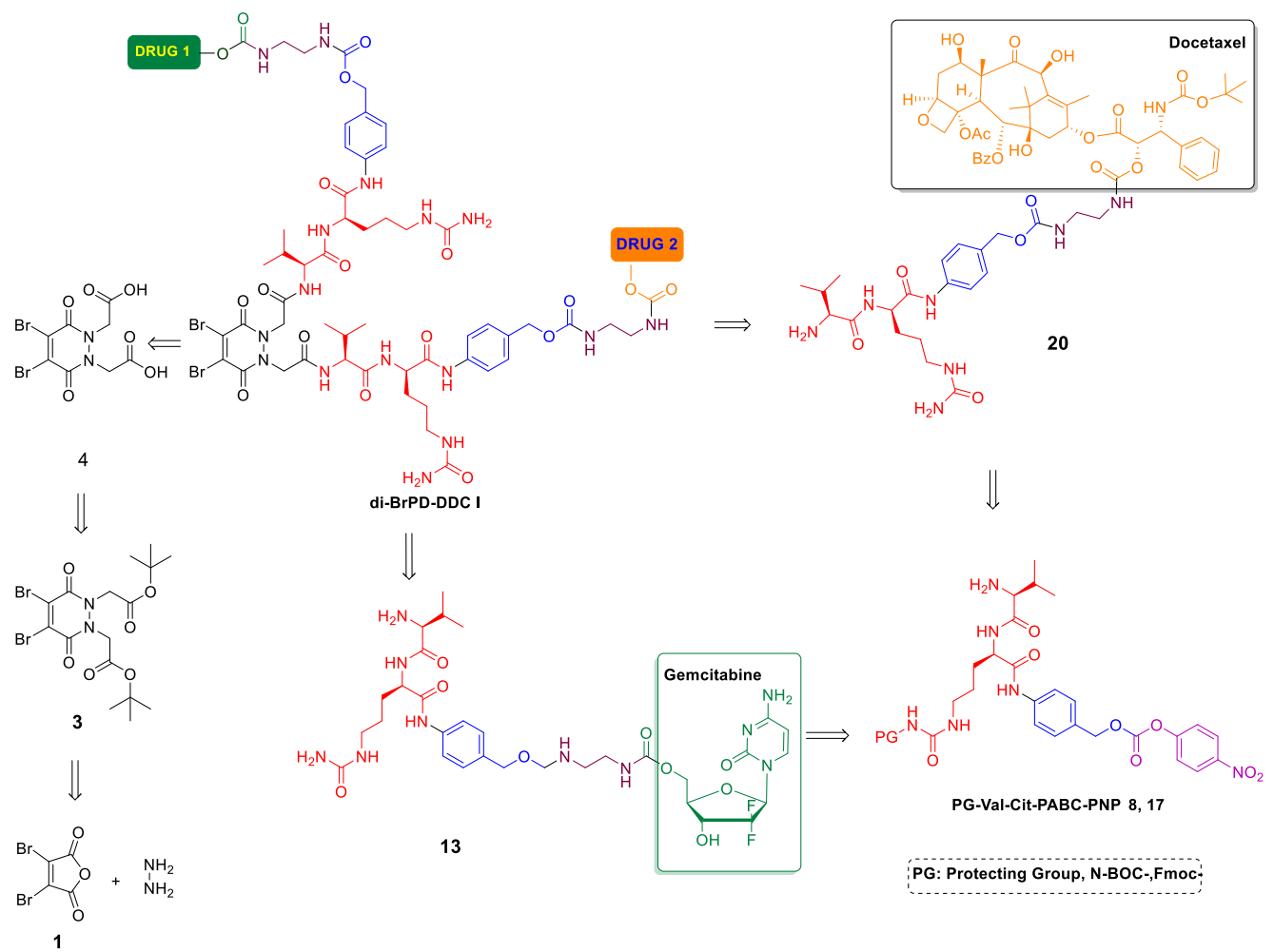
Ο σχεδιασμός για τη σύνθεση συζευγμάτων που μεταφέρουν δύο φάρμακα (dual-drug conjugates) με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, θα βασιστεί πάνω σε ένα ικρίωμα di-BrPD, όπου η σύνδεση των δύο φαρμάκων με το ικρίωμα θα γίνει μέσω βιοδιασπώμενων γεφυρών. Πιο συγκεκριμένα, θα χρησιμοποιηθεί η πεπτιδική γέφυρα Val-Cit, η οποία διασπάται εκλεκτικά στα λυσοσώματα από την Cathepsin-B, σε συνδυασμό με τον αυτοκαταστροφικό συνδέτη PABOH, επιτρέποντας τη χημική/ενζυμική απελευθέρωση των φαρμάκων στο ενδόσωμα με την ενδοκυττάρωση του συζεύγματος II (Σχήμα 2). Η Cathepsin-B αποτελεί μια κυστεϊνοπρωτεάση με δράση ουβικιτίνης, της οποίας οι ιδιότητες δεν διαφέρουν αρκετά από είδος σε είδος. Υπερεκφράζεται στα λυσοσώματα σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος, ενώ δε συναντάται ποτέ εξωκυττάρια. Για να αποφευχθεί στερική παρεμπόδιση ανάμεσα στο φάρμακο και την πεπτιδική γέφυρα, θα εισαχθεί και ένας αυτοκαταστροφικός συνδέτης,<sup>14</sup> και συγκεκριμένα η p-aminobenzyl alcohol (PABOH), ο οποίος αποσυντίθεται υδρολυτικά έπειτα από αντίδραση απακυλίωσης. Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 2, η Cathepsin-B θα διασπάσει τον πεπτιδικό δεσμό ανάμεσα στην καρβονυλομάδα της κιτροουλίνης και την αμινομάδα της PABOH (ενδιάμεσα III και IV). Τα δύο φάρμακα θα μπορούσαν να συνδεθούν με τη γέφυρα μέσω των ελευθέρων υδροξυλομάδων τους με καρβονικό δεσμό, ωστόσο, για να διευκολυνθεί η σύζευξη, θα πραγματοποιηθεί εισαγωγή της αιθυλενοδιαμίνης με καρβαμικό δεσμό, ως διαχωριστικής γέφυρας ανάμεσα στην βιοδιασπώμενη γέφυρα και το φάρμακο. Η αιθυλενοδιαμίνη αναμένεται να απελευθερώσει το φάρμακο έπειτα από μία ενδομοριακή αντίδραση κυκλοποίησης (ενδιάμεσα V και VI).



**Σχήμα 2.** Σχεδιασμός πολυτροπικών συζευγμάτων με βάση το ικρίωμα di-BrPD.

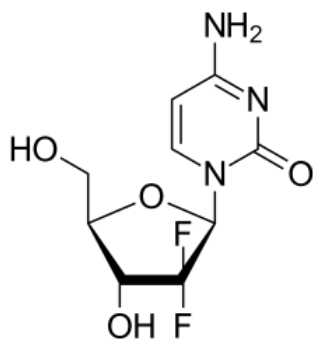
Η στρατηγική που θα ακολουθηθεί για την ορθογώνια σύνθεση του συζεύγματος I με διπλό θεραπευτικό φορτίο, απεικονίζεται στο Σχήμα 3. Το επιθυμητό di-BrPD-DDC θα μπορούσε να προκύψει έπειτα από σύζευξη του αντίστοιχου δι-καρβοξυλικού οξέος 4, με την αμινομάδα της βαλίνης του αντίστοιχου φαρμάκου-συνδέτη (drug-linker). Το αρχικό μας σχέδιο περιλάμβανε τη σύνθεση ενός ικρίματος με ένα άτομο άνθρακα ανάμεσα στη δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνη και την καρβοξυλομάδα σύνδεσης (n=1). Το δι-καρβοξυλικό οξύ θα προέκυπτε έπειτα από μια σειρά αντιδράσεων, ξεκινώντας από τον ανυδρίτη 1 και υδραζίνη, ενώ τα ενδιάμεσα 13 και 20 θα μπορούσαν να παραχθούν εύκολα μέσω σύζευξης των γεφυρών 8 και 17 με το κάθε φάρμακο, με τη χρήση μια γενικής διαδικασίας, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω.





**Σχήμα 3.** Στρατηγική σύνθεσης συζευγμάτων με διπλό θεραπευτικό φορτίο.

## Επιλογή φαρμάκων: Gemcitabine

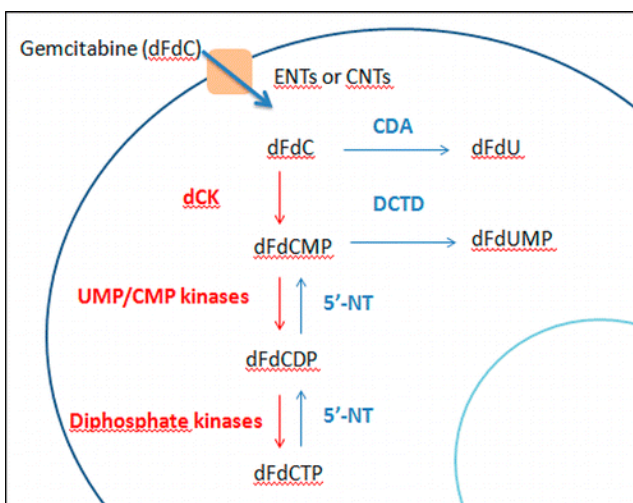


Ένα από τα φάρμακα που επιλέχθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν η Γεμισταβίνη-Gemcitabine (2',2'-διφλουοροδεοξυκυτιδίνη, dFdC) (Εικόνα 7). Η Gemcitabine αποτελεί ένα ισχυρό αντικαρκινικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία πολλών καρκίνων, όπως ο καρκίνος του προστάτη, του πνεύμονα και του μαστού.

**Εικόνα 7.** Χημική δομή της Gemcitabine.

Παρά το κλινικό όφελος, χαρακτηρίζεται από πολλούς περιορισμούς που έχουν ως αποτέλεσμα είτε την έλλειψη αποτελεσματικότητας ή/και σοβαρές παρενέργειες, με την αιματοτοξικότητα να είναι η πιο σημαντική ανάμεσα σε αυτές.

Μετά τη χορήγηση, περίπου το 90% του φαρμάκου μετατρέπεται στον ανενεργό



του μεταβολίτη, τη 2'-δεοξυ-2',2'-διφλουοροουριδίνη (dFdU) (Εικόνα 8). Το ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για αυτή τη μετατροπή είναι η απαμινάση της κυτιδίνης (CDA), ένα ένζυμο που βρίσκεται σε αφθονία στο ήπαρ όπως και στο πλάσμα.

**Εικόνα 8.** Το μεταβολικό μονοπάτι της Gemcitabine.

(*Mol. Pharmaceutics*, **2013**, 10, 2, 430-444).

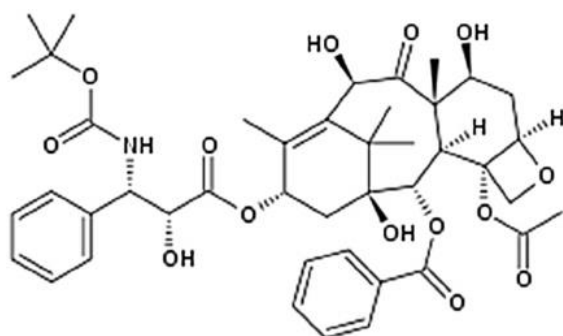
Η ενδοκυττάρια πρόσληψη της gemcitabine επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων μεταφορέων νουκλεοσιδίων. Με τη μεταφορά εντός του κυττάρου, η gemcitabine είτε απενεργοποιείται από την CDA, είτε υπάγεται σε συνεχείς φωσφορυλιώσεις προς τη δημιουργία των ενεργών της μεταβολιτών, τη διφωσφορική 2',2'-διφλουοροδεοξυκυτιδίνη (dFCDP) και την τριφωσφορική 2',2'-διφλουοροδεοξυκυτιδίνη (dFCTP).

Η dFdCTP αποτελεί τον πιο ενεργό μεταβολίτη, μιας και επιδρά άμεσα στη σύνθεση του DNA μέσω αλληλεπίδρασης στον κλώνο του, μια διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού και τον επικείμενο κυτταρικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Η dFdCDP αναστέλλει την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων (RR), ένα ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της διφωσφορικής κυτιδίνης (CDP), στη διφωσφορική δεοξυκυτιδίνη (dCDP), μια διαδικασία απαραίτητη για τη σύνθεση του DNA.<sup>15</sup>

Για να περιοριστεί η μειωμένη αποτελεσματικότητα του φαρμάκου λόγω των ανενεργών του μεταβολιτών, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες τροποποίησης του φαρμάκου, μέσω εισαγωγής διαφόρων ομάδων στις δραστικές θέσεις του μορίου, την 4-άμινο θέση και την 5'-υδροξυλ θέση. Πολλά προ-φάρμακα έχουν συντεθεί έως σήμερα τα οποία περιέχουν μια προστατευτική ομάδα σε μία από τις δύο αυτές θέσεις, οι οποίες μειώνουν το βαθμό υδρόλυσης του φαρμάκου στο πλάσμα και αυξάνουν την αποτελεσματικότητά του.

### Επιλογή φαρμάκων: Docetaxel

Το Docetaxel (DX, Εικόνα 9) είναι ένα σύνθετο διτερπενοειδές μόριο, που περιέχει



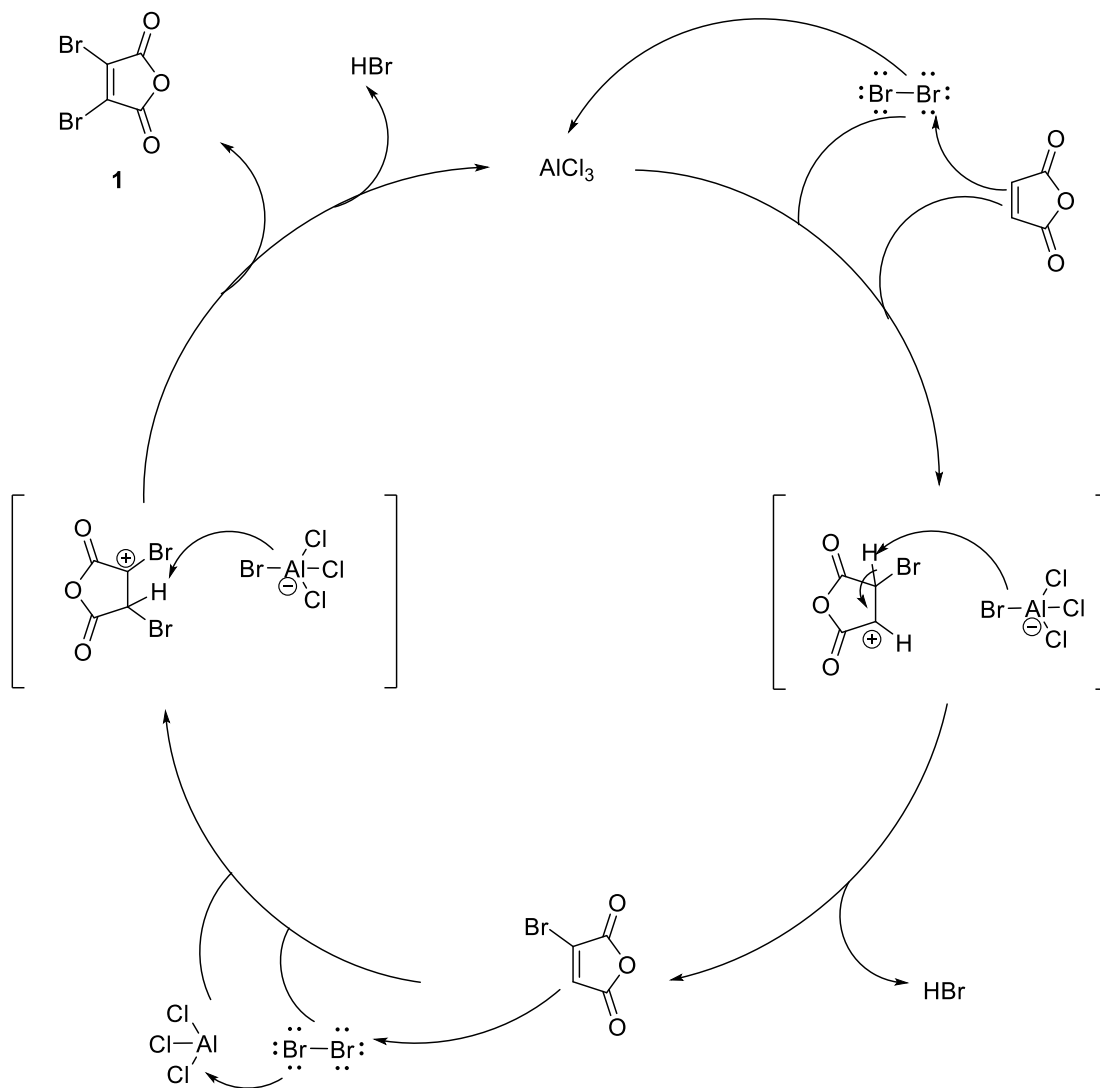
έναν κεντρικό οκταμερή δαλύτιλο ταξάνης. Το Docetaxel αποτελεί ημισυνθετικό ανάλογο του Paclitaxel και είχε απομονωθεί αρχικά από τις βελόνες του Ευρωπαϊκού Τάξου (*Taxus baccata*).

**Εικόνα 9.** Χημική δομή του Docetaxel.

Το Docetaxel αποτελεί ένα ισχυρό αντινεοπλασματικό φάρμακο και ο μηχανισμός δράσης του φαίνεται να επάγεται από τη πρόσδεση του μορίου στους μικροσωληνίσκους, οι οποίοι είναι απαραίτητοι κατά τη μιτωτική φάση της κυτταρικής διαίρεσης. Η πρόσδεση του μορίου εμποδίζει την αποδέσμευση των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού, αποτρέποντας έτσι την κυτταρική

διαίρεση, οδηγώντας κατά συνέπεια στον κυτταρικό θάνατο.<sup>16</sup> Επίσης, επάγει τη φωσφορυλίωση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης bcl-2, αναστέλλοντας τη δράση της και ενεργοποιώντας έτσι το μηχανισμό της απόπτωσης.<sup>17</sup> Λόγω του ότι επιδρά στον κυτταρικό κύκλο, είναι κυτταροτοξικό απέναντι σε όλα τα διαιρούμενα κύτταρα του σώματος.<sup>18</sup> Οι παρενέργειες είναι συχνές και περιλαμβάνουν διάρροια, ναυτία, περιφερική νευροπάθεια, αντιδράσεις υπερευαισθησίας, κ.α.. Το σκεύασμα περιέχει ένα σύστημα διαλυτών αιθανόλης και polysorbate 80, το οποίο αυξάνει το υδρόφιλο προφίλ του φαρμάκου.<sup>16</sup> Παρενέργειες που σχετίζονται με αυτά τα έκδοχα έχουν καταγραφεί, με τις πιο σημαντικές να είναι η κατακράτηση υγρών και η υπερευαισθησία.<sup>19</sup>

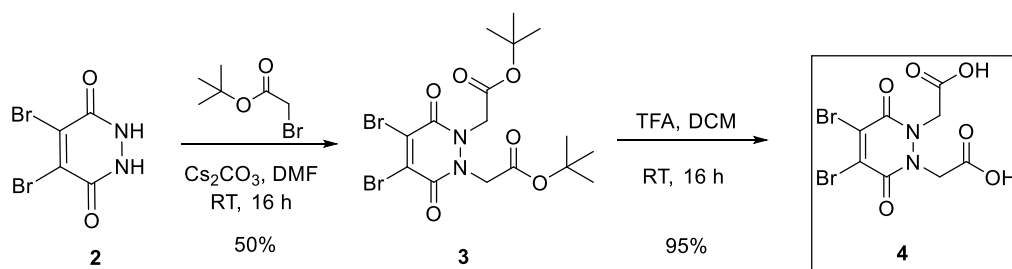




**Σχήμα 5.** Σύνθεση του δι-βρωμομαλεϊκού ανυδρίτη **1** με βρωμίωση μαλεϊκού ανυδρίτη παρουσία AlCl<sub>3</sub>.

Ακολούθως, αντίδραση της **1** με μονοϋδατική υδραζίνη σε AcOH απέδωσε την ένωση **2** σε μέτρια απόδοση<sup>23</sup> (Σχήμα 4). Η εμφάνιση της χαρακτηριστικής singlet στα 5.75 ppm, που αντιστοιχεί στα -NH πρωτόνια, επιβεβαίωσε το σχηματισμό της αναμενόμενης δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης **2**.

Το επόμενο βήμα αυτής της πορείας περιλάμβανε αλκυλίωση της **2** με tert-butyl bromoacetate σε Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και DMF (Σχήμα 6). Η αντίδραση αφέθηκε προς ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 16h, και έλεγχος με TLC έδειξε το σχηματισμό ενός σύνθετου μίγματος. Καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης παρέδωσε δύο διαφορετικά κλάσματα, με το ένα εκ των δύο να είναι η επιθυμητή ένωση **3**, ενώ για το δεύτερο κλάσμα, δεν καταφέραμε να ταυτοποιήσουμε τη δομή του.



**Σχήμα 6.** Συνθετική πορεία προς το σχηματισμό του δι-καρβοξυλικού οξέος του ικρίωματος **4**.

Δυστυχώς, η αντίδραση αποδείχθηκε να είναι δύσκολη, αποδίδοντας πολύ μικρές αποδόσεις του επιθυμητού προϊόντος (30%). Ερευνώντας τους πιθανούς λόγους, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι κατά τη διάρκεια της εξάτμισης του DMF, η υψηλή θερμοκρασία σε συνδυασμό την παρουσία του  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  στο μίγμα της αντίδρασης, ευνόησε τη δημιουργία του παρα-προϊόντος. Με στόχο να αυξηθεί η απόδοση σχηματισμού του επιθυμητού προϊόντος **3**, κατά τη διάρκεια επανάληψης της αντίδρασης, ακολουθήθηκε υδατική επεξεργασία του μίγματος της αντίδρασης μετά από την ολοκλήρωσή της, προς απομάκρυνση του διαλύτη και του  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ , οι οποίες πράγματι, μείωσαν το ποσοστό σχηματισμού του παραπροϊόντος, αυξάνοντας έτσι την απόδοση σχηματισμού της επιθυμητής ένωσης **3** σε απόδοση 50%.

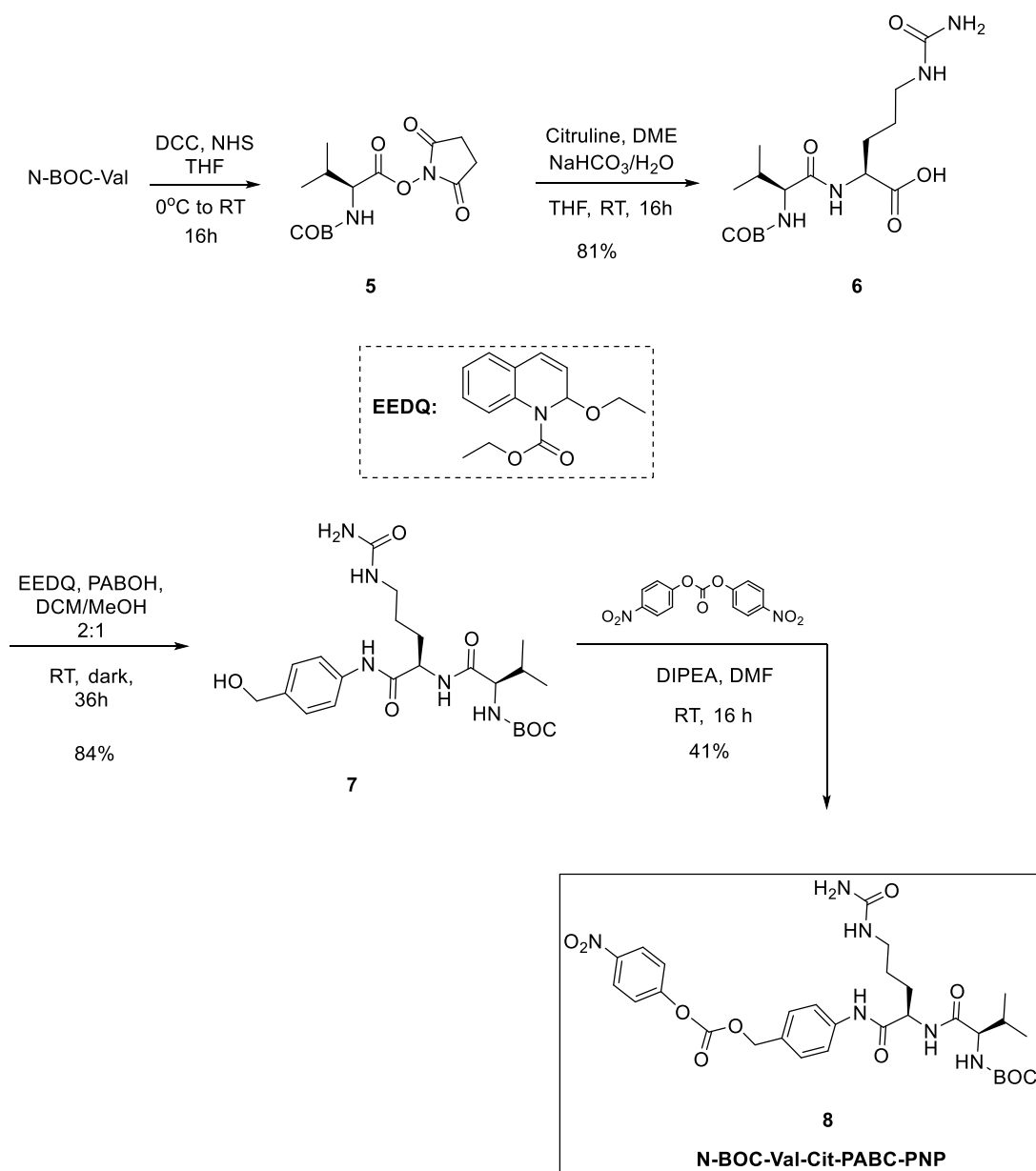
Το τελικό στάδιο σύνθεσης, περιλάμβανε αποπροστασία των BOC ομάδων με TFA σε DCM, καταλήγοντας στο δι-καρβοξυλικό οξύ του ικρίωματος **4** σε απόδοση 95% (Σχήμα 6).

## Σύνθεση της βιοδιασπώμενης γέφυρας Val-Cit

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η σύζευξη των δύο φαρμάκων με το ικρίωμα θα επιτευχθεί μέσω μια βιοδιασπώμενης πεπτιδικής γέφυρας (Val-Cit), η οποία θα υδρολυθεί στα λυσοσώματα από την Cathepsin-B.

Η σύνθεση της βιοδιασπώμενης γέφυρας ξεκίνησε από N-Boc-Valine, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 7. Ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας της βαλίνης με NHS παρουσία DCC, απέδωσε τον ενεργοποιημένο NHS-εστέρα **5** του αμινοξέος ως λευκό στερεό, έπειτα από διήθηση του παραπροϊόντος της DCU-ουρίας. Ο ενεργοποιημένος εστέρας **5** υποβλήθηκε, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, σε αντίδραση ακυλίωσης με Schotten-Baumann συνθήκες με την κιτρουλίνη, παραδίδοντας το διπεπτίδιο **6**. Αντίδραση του διπεπτιδίου με PABOH, παρουσία του συζευκτικού αντιδραστηρίου EEDQ, παρήγαγε την ένωση **7**. Το τελευταίο στάδιο αυτής της σύνθεσης, περιλάμβανε ακυλίωση της βενζυλικής υδροξυλομάδας με το δι-καρβονικό εστέρα της p-νιτροφαινόλης (bis-PNP carbonate) σε DMF παρουσία DIPEA, απέδωσε τον καρβονικό εστέρα **8** ως λευκό στερεό σε μέτρια απόδοση (41%), έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης.

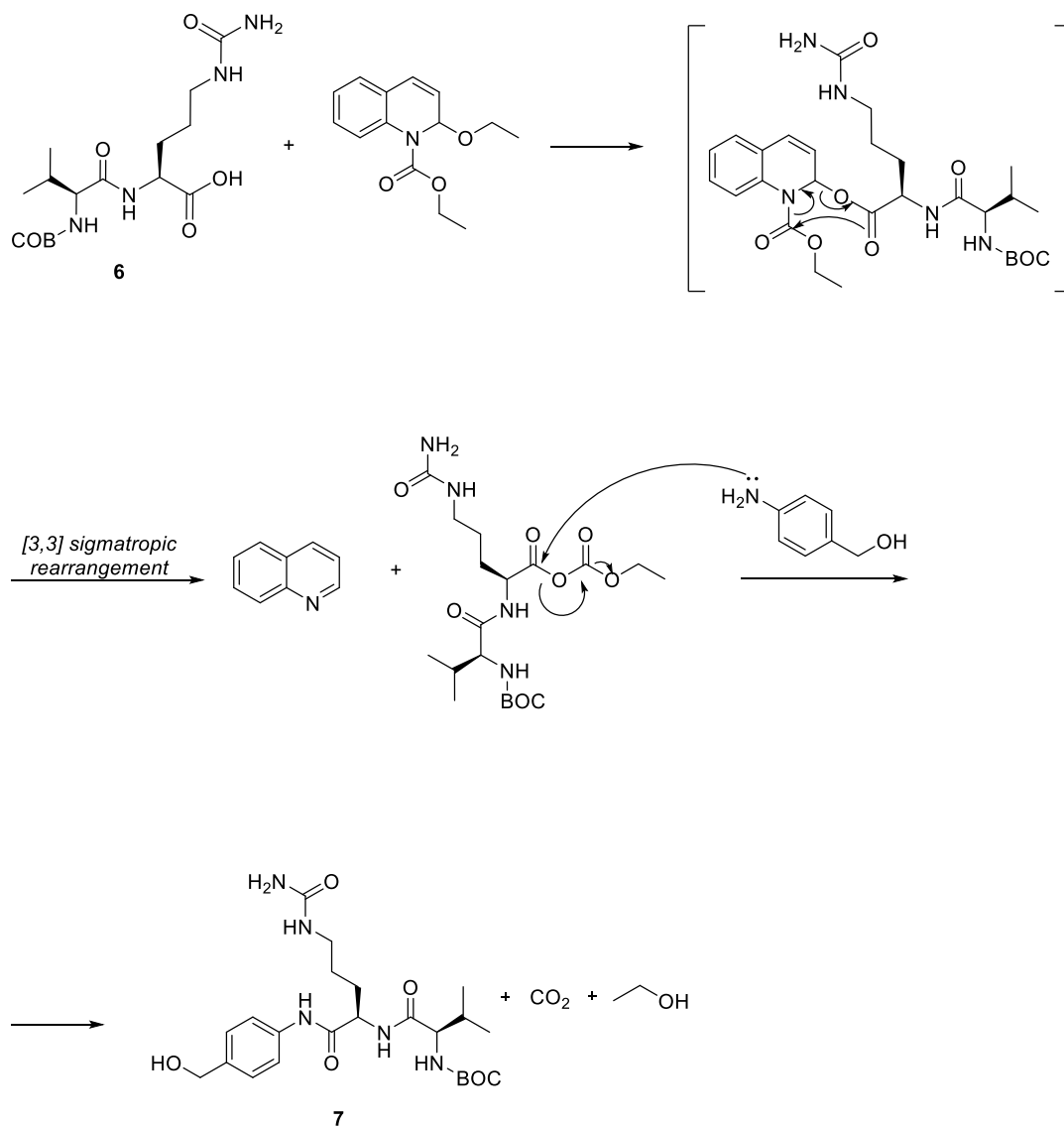




**Σχήμα 7.** Σύνθεση της γέφυρας **8-N-BOC-Val-Cit-PABC-PNP**.

Το EEDQ επιτρέπει τη σύζευξη προστατευμένων αμινοξέων με εστέρες αμινοξέων σε ένα στάδιο, με λίγη ή καθόλου ρακεμοποίηση<sup>24</sup>. Ο μηχανισμός δράσης του (Σχήμα 8) 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.<sup>25</sup> Αναλυτικότερα, αντίδραση του οξέος με το EEDQ και απελευθέρωση EtOH, οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενδιάμεσου, το οποίο έπειτα από σιγματροπική μετάθεση και απελευθέρωση κινολίνης, παράγει τον μικτό ανυδρίτη του οξέος. Αντίδραση του μικτού ανυδρίτη

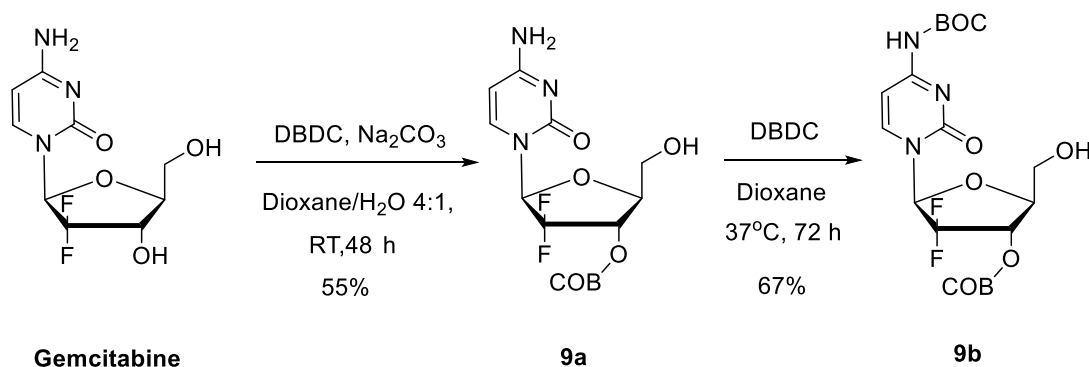
με την αμίνη, οδηγεί στο σχηματισμό της ένωσης **7**, ενώ ταυτόχρονα απελευθερώνεται CO<sub>2</sub> και EtOH.



**Σχήμα 8.** Μηχανισμός σύζευξης της κιτροουλίνης με την PABOH παρουσία EEDQ.

## Σύνθεση της συζευγμένης γεμισταβίνης με τη βιοδιασπώμενη γέφυρα (Gemcitabine-Linker)

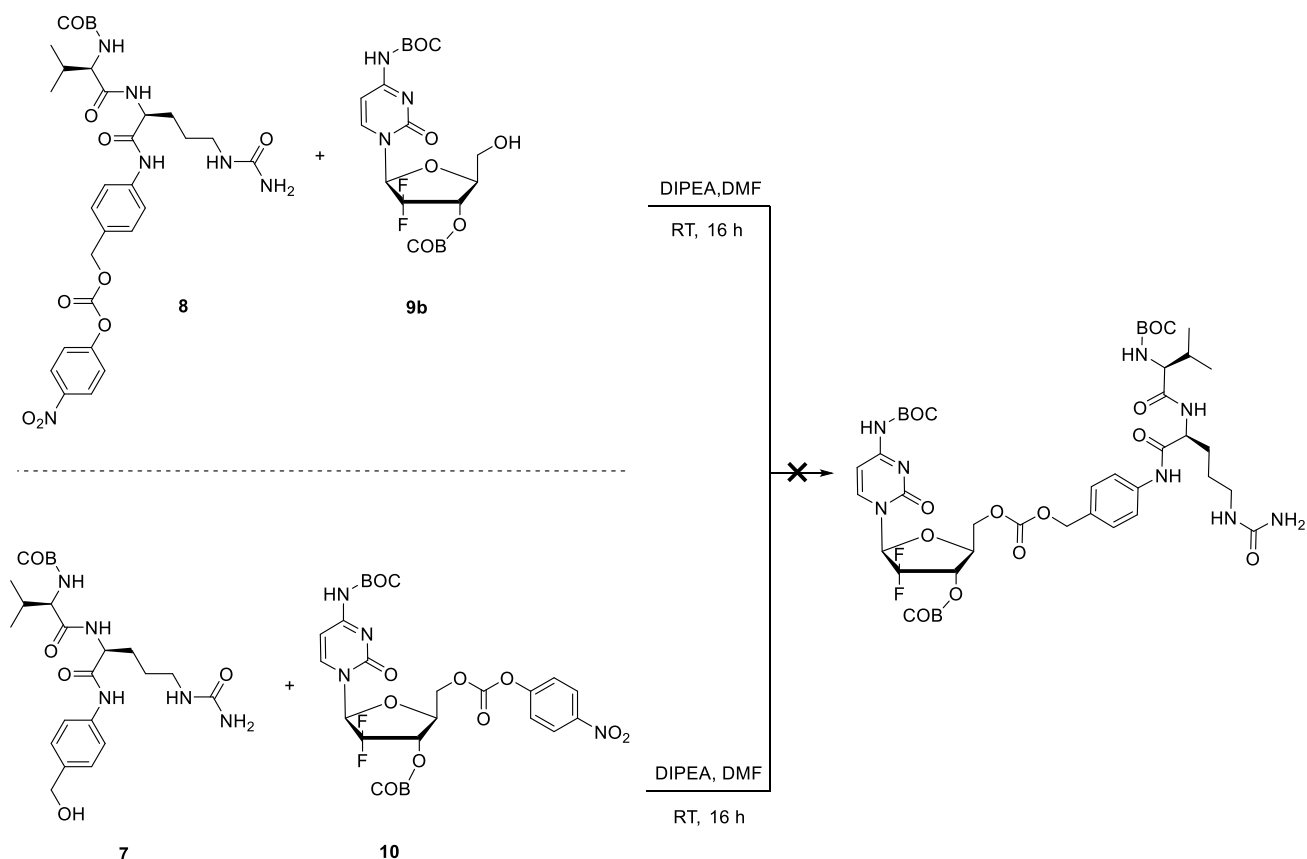
Στην περίπτωση της γεμισταβίνης, η σύζευξη του φαρμάκου με τη γέφυρα θα πραγματοποιηθεί στην 5'-OH θέση του φαρμάκου. Έτσι, για να πραγματοποιηθεί σύνδεση του φαρμάκου με την πεπτιδική γέφυρα, η εκλεκτική προστασία των άλλων δύο δραστικών θέσεων του φαρμάκου, της 4-NH<sub>2</sub> και 3'-OH, ήταν μείζονος σημασίας. Η προστασία των 4-NH<sub>2</sub> και 3'-OH με BOC ομάδα έγινε σε δύο στάδια σύμφωνα με τη συνθετική πορεία των Guo et al.<sup>26</sup> Κατά το δεύτερο στάδιο της προστασίας παρατηρήθηκε σε μεγάλο ποσοστό ο σχηματισμός tri-BOC προστατευμένης γεμισταβίνης, 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 **9a** καταβυθίστηκε και απομονώθηκε μετά από κατεργασία με Et<sub>2</sub>O. Αντίστοιχα η **9b** μετά από κατεργασία με εξάνιο απομονώθηκε ως λευκό στερεό σε απόδοση 67% χωρίς να χρειαστεί περαιτέρω καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (Σχήμα 9).



**Σχήμα 9.** Σύνθεση της bis-BOC-protected Gemcitabine.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι, πολλές προσπάθειες είχαν γίνει ώστε να συζευχθεί η bis-BOC-protected-gemcitabine με τη γέφυρα, με όλες τους να αποδεικνύονται άκαρπες (Σχήμα 10). Αρχικά, θεωρήσαμε ότι απευθείας σύνδεση του linker μέσω της ελεύθερης υδροξυλομάδας του φαρμάκου δεν μπορούσε να επιτευχθεί λόγω του μικρότερου βαθμού πυρηνοφιλίας της 5'-OH σε σχέση με τις άλλες δύο δραστικές θέσεις. Επομένως έγινε μια προσπάθεια «αλλαγής» του

πυρηνόφιλου που συμμετείχε στην αντίδραση. Έτσι, ακυλίωση της ένωσης **9b** με bis-PNP carbonate απέδωσε επιτυχώς την ένωση **10** σε υψηλή απόδοση (66%). Ακολούθως, σκεφτήκαμε ότι η πρόδρομη βενζυλική αλκοόλη **7** θα μπορούσε να δράσει ως πυρηνόφιλο και να προσβάλλει τον καρβονικό εστέρα **10**, οδηγώντας έτσι στο επιθυμητό προϊόν. Εν τούτοις, παρόλο που πραγματοποιήθηκε έλεγχος των συνθηκών της αντίδρασης πολλάκις, το επιθυμητό προϊόν δεν παρατηρήθηκε.

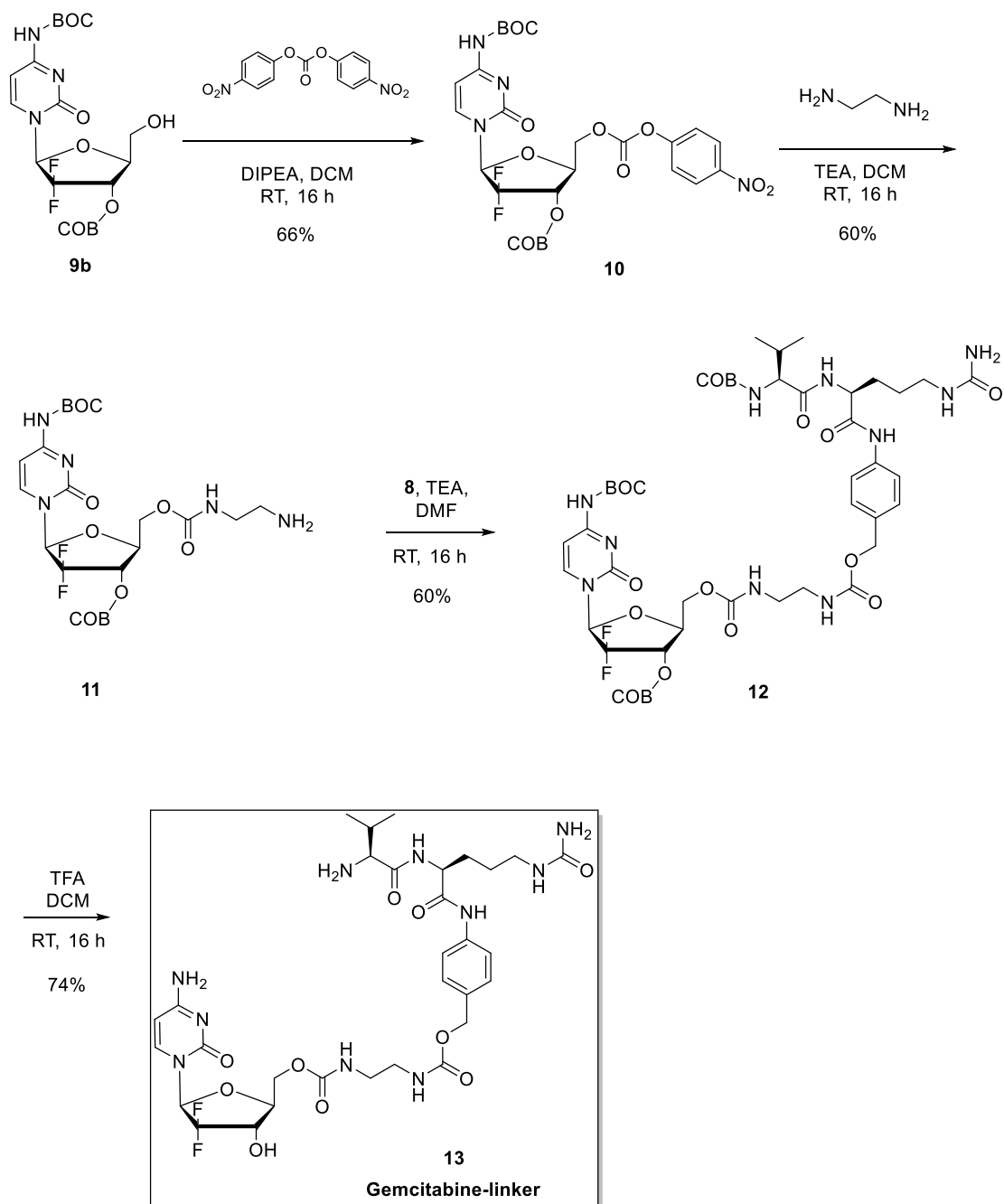


**Σχήμα 10.** Προηγούμενες προσπάθειες σύζευξης της γεμισταβίνης με τη διπεπτιδική γέφυρα μέσω ενός καρβονικού εστέρα.

Συνεπώς, για να προχωρήσει επιτυχώς η σύζευξη του φαρμάκου με τη βιοδιαπώμενη γέφυρα, θεωρήσαμε πως ένας πυρηνόφιλος νέος διαχωριστής-spacer, όπως η αιθυλενοδιαμίνη, έπρεπε να εισαχθεί ανάμεσα στο φάρμακο και τη γέφυρα. Η αιθυλενοδιαμίνη αποτέλεσε την πρώτη μας επιλογή για δύο λόγους. Αρχικά, λόγω της αυξημένης πυρηνοφιλίας των αζώτων της, θα μπορούσε το ένα της άκρο να συνδεθεί σχετικά εύκολα με τον καρβονικό εστέρα **10** και το άλλο της άκρο με τον εστέρα **8** μέσω καρβαμικών συνδέσμων και κατά δεύτερον, όπως παρουσιάστηκε στον προτεινόμενο μηχανισμό απελευθέρωσης των φαρμάκων

(Σχήμα 2), μετά την διάσπαση της διπεπτιδικής γέφυρας και την επακόλουθη 1,6-απόσπαση της ΡΑΒΟΗ, η αιθυλενοδιαμίνη στο παραγώμενο μεταβολικό ενδιάμεσο, θα μπορούσε να πυροδοτήσει μια ενδομοριακή αντίδραση κυκλοποίησης, απελευθερώνοντας το ελεύθερο φάρμακο και μια συμμετρική-κυκλική ουρία.

Προς ικανοποίηση μας, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 11, οι υποθέσεις μας αποδείχθηκαν σωστές, και η αντίδραση της **10** με αιθυλενοδιαμίνη απέδωσε την ένωση **11** σε εξαιρετική απόδοση. Αξίζει να σημειωθεί πως η προσθήκη της **10** στην αιθυλενοδιαμίνη έγινε στάγδην με σκοπό να αποφευχθεί ο διμερισμός της. Στη συνέχεια, προσθήκη του καρβονικού διπεπτιδικού εστέρα **8** απέδωσε την ένωση **12** ως λευκό στερεό έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Όπως και στο προηγούμενο στάδιο, η σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων ήταν μείζονος σημασίας και η ένωση **8** προστέθηκε στάγδην στην ένωση **11**, ενώ η προσθήκη βάσης ακολούθησε. Τέλος, προχωρήσαμε στο τελικό στάδιο της αποπροστασίας των τριών ΒΟC-ομάδων, χρησιμοποιώντας TFA σε περίσσεια σε διάλυμα DCM, καταλήγοντας στην επιθυμητή ένωση **13**.

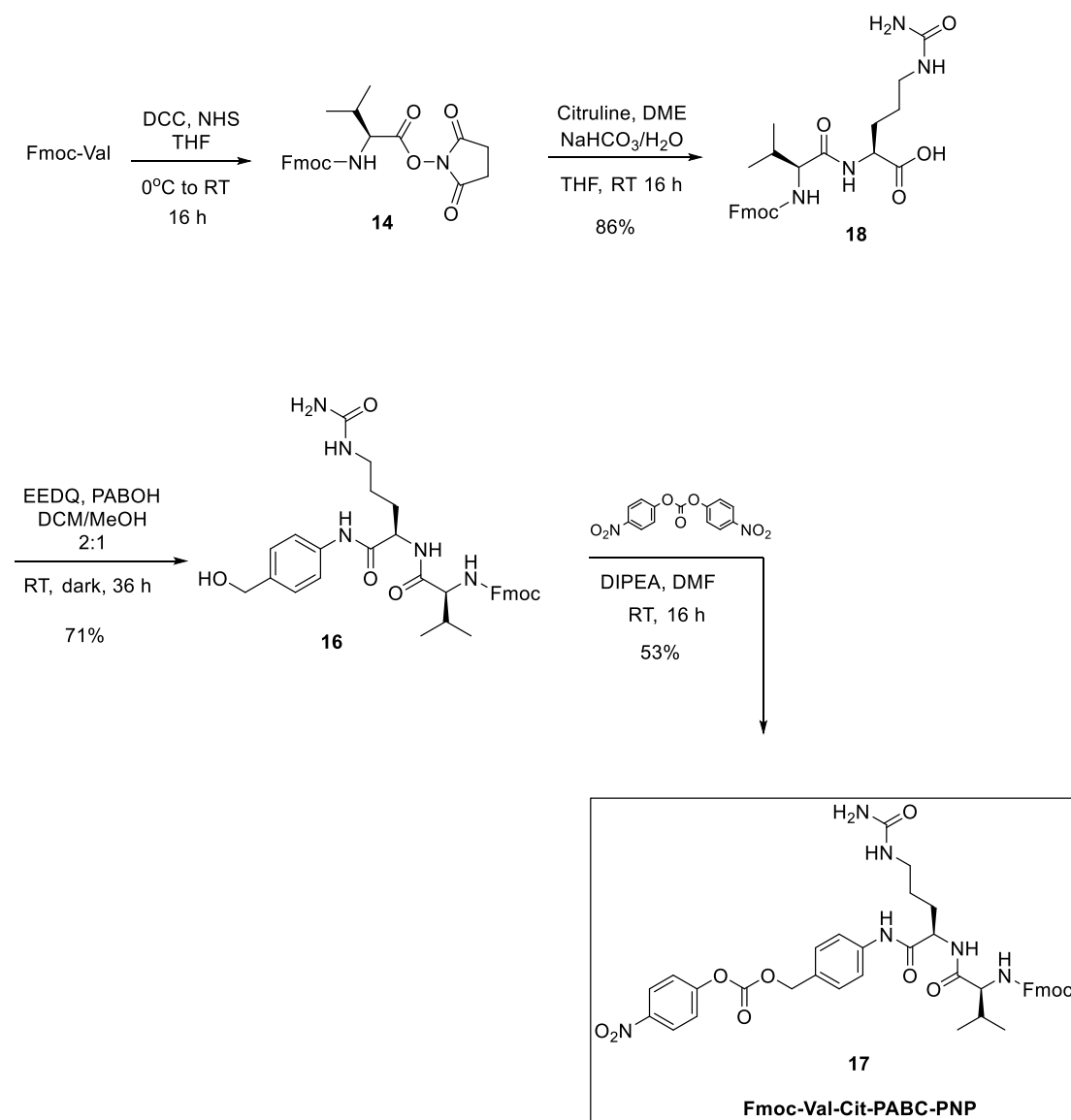


**Σχήμα 11.** Σύνθεση της συζευγμένης γεμισαβίνης **13**.

### Σύνθεση της συζευγμένης ντοσεταξέλης με τη βιοδιασπώμενη γέφυρα (Docetaxel-Linker)

Στην περίπτωση της ντοσεταξέλης (Docetaxel), η σύζευξη της γέφυρας με το φάρμακο θα πραγματοποιηθεί στην 2'-OH θέση, καθώς είναι η πιο δραστική.<sup>27</sup> Λόγω του ότι το DX περιέχει μια BOC-ομάδα, σύζευξή του με το N-BOC-

προστατευμένη διπεπτιδική γέφυρα **8** δεν θα ήταν συμβατή, καθότι αποπροστασία της BOC-ομάδας της βαλίνης θα προκαλούσε διάσπαση και της BOC-ομάδας του φαρμάκου. Επομένως, προχωρήσαμε σε εκ νέου σύνθεση πεπτιδικής γέφυρας, ξεκινώντας όμως από Fmoc-protected-valine. Η συνθετική πορεία ήταν ίδια με την περίπτωση της N-BOC-protected-valine (Σχήμα 12).

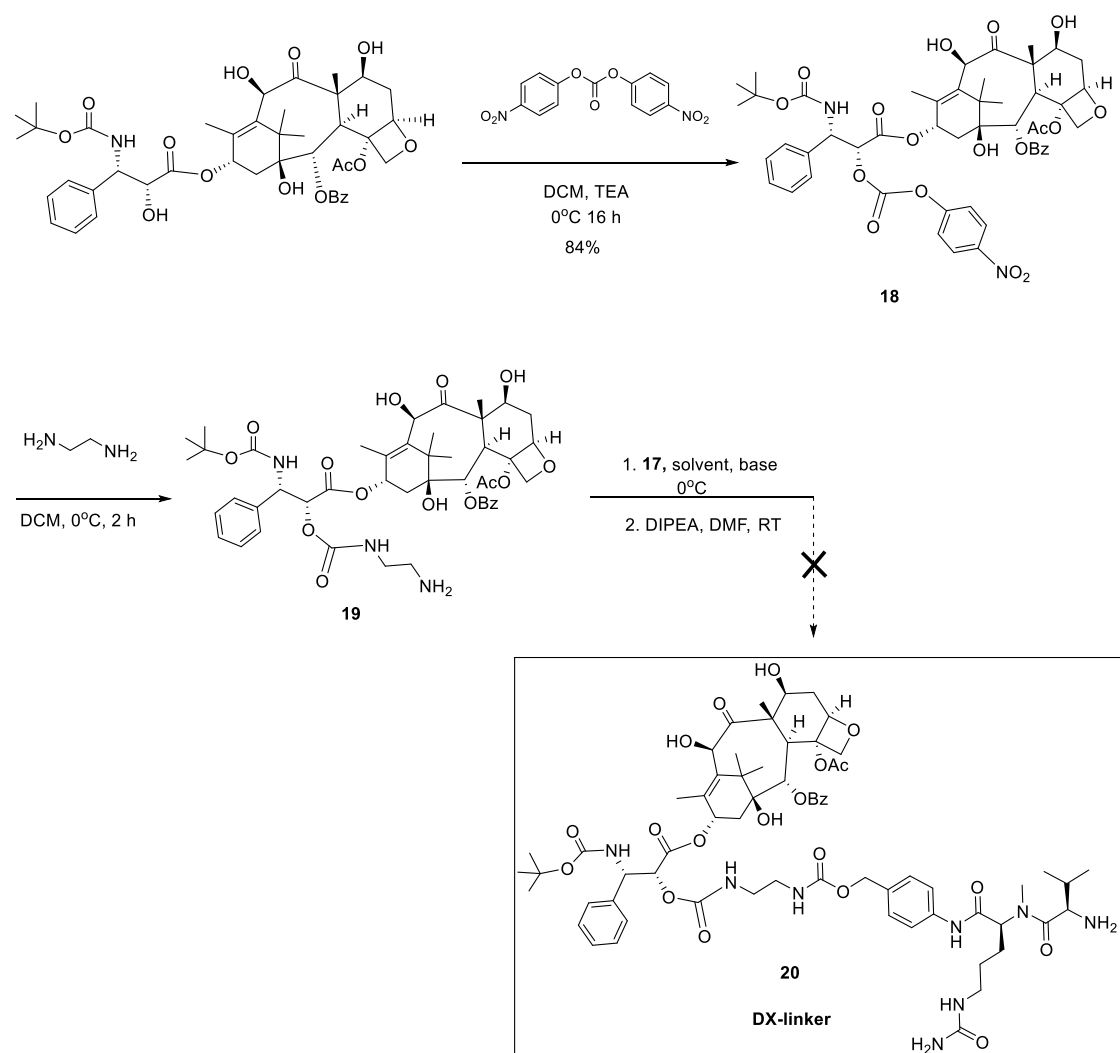


**Σχήμα 12.** Σύνθεση της πεπτιδικής γέφυρας **17-Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP**.

Σύμφωνα και με τα αρχικά αποτελέσματα κατά τις προσπάθειες σύζευξης της γεμισταβίνης με τη γέφυρα, ήταν προφανές ότι τροποποίηση της 2'-OH θέσης του DX έπρεπε να προηγηθεί. Ειδικότερα, ακυλίωση της υδροξυλομάδας με bis-PNP carbonate απέδωσε το 2'-O-PNP καρβονικό εστέρα **18** σε εξαιρετική απόδοση (84%) έπειτα από καθαρισμό του μίγματος με χρωματογραφία στήλης (Σχήμα 13).

Ανάλυση του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  επιβεβαίωσε ότι το PNP είχε συνδεθεί εκλεκτικά στην 2'-OH του φαρμάκου, διότι η χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου του υδροξυλικού C-2' στα 4.2 ppm μετατοπίστηκε στα 5 ppm, ενώ παράλληλα δεν παρατηρήθηκε μεγάλη αλλαγή στις μετατοπίσεις των αντίστοιχων πρωτονίων στους υδροξυλικούς άνθρακες C-7H ( $\delta$  4.26) και C-10H ( $\delta$  5.26).

Τα χαρακτηριστικά σημεία της αντίδρασης ήταν αρχικά η διατήρηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στους  $0^\circ\text{C}$ , καθώς σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες παρατηρήθηκε διάσπαση του προϊόντος. Επίσης, η προσθήκη TEA και όχι DIPEA ως βάση ήταν πρωτίστης σημασίας, καθώς παρουσία DIPEA θεωρούμε πως πραγματοποιείται διάσπαση του παραγόμενου καρβονικού εστέρα.

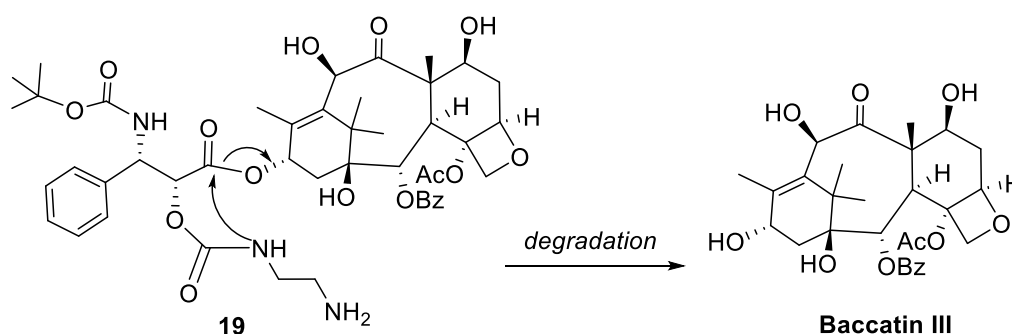


**Σχήμα 13.** Στρατηγική σύνθεσης του DX-linker.



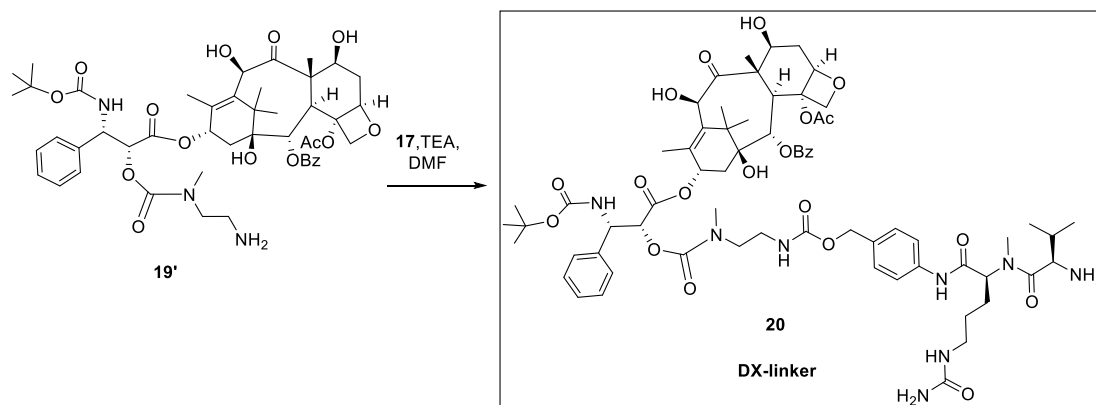
Ακυλο-υποκατάσταση της **18** με αιθυλενοδιαμίνη, απέδωσε την ένωση **19** με μερικές ακαθαρσίες, συμπεριλαμβανομένης της *p*-nitrophenol, σύμφωνα με ανάλυση του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του ακατέργαστου δείγματος, το οποίο δεν έδειξε σημαντικές μετατοπίσεις στις κορυφές των C-7H και C-10H. Αν και δεν βρέθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για τον καθαρισμό της ένωσης **19**, προχωρήσαμε στο επόμενο στάδιο αυτής της πορείας, το οποίο περιλάμβανε σύζευξη της ένωσης **19** με τη διπεπτιδική γέφυρα **17**. Μετά από πολλές προσπάθειες και δοκιμάζοντας διάφορα συστήματα διαλυτών και βάσεων, η σύζευξη της αμίνης **19** με τη γέφυρα **17** δεν κατέστη επιτυχής. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε μια ανταγωνιστική αποπροστασία της Fmoc-ομάδας στη γέφυρα **17** κατά τη διάρκεια της επιχειρούμενης σύζευξης, με αποτέλεσμα τον πολυμερισμό της **17**.

Ένας άλλος πιθανός λόγος για την μη επιτυχή σύζευξη είναι η ενδομοριακή κυκλοποίηση της αμίνης **19** μέσω του καρβαμικού NH, οδηγώντας στη διάσπαση της ντοσεταξέλης και παραγωγή της 10-δεακετυλο μπακατίνης III (Σχήμα 14)<sup>28</sup>.



**Σχήμα 14.** Μηχανισμός διάσπασης της αμίνης **19** σε 10-δεακέτυλο-μπακατίνη III.

Συνεπώς, για την επιτυχή σύζευξη της ντοσεταξέλης με τη διπεπτιδική γέφυρα πιθανώς να απαιτείται η προστασία του καρβαμικού αζώτου με μια αλκυλομάδα. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να γίνει εφικτό με την αντίδραση του καρβαμικού εστέρα **18** με την N-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη, παράγοντας την αντίστοιχη αμίνη **19'** όπου στη συνέχεια θα μπορούσε να προβεί σε μια αντίδραση σύζευξης με τη γέφυρα **17** (Σχήμα 15).



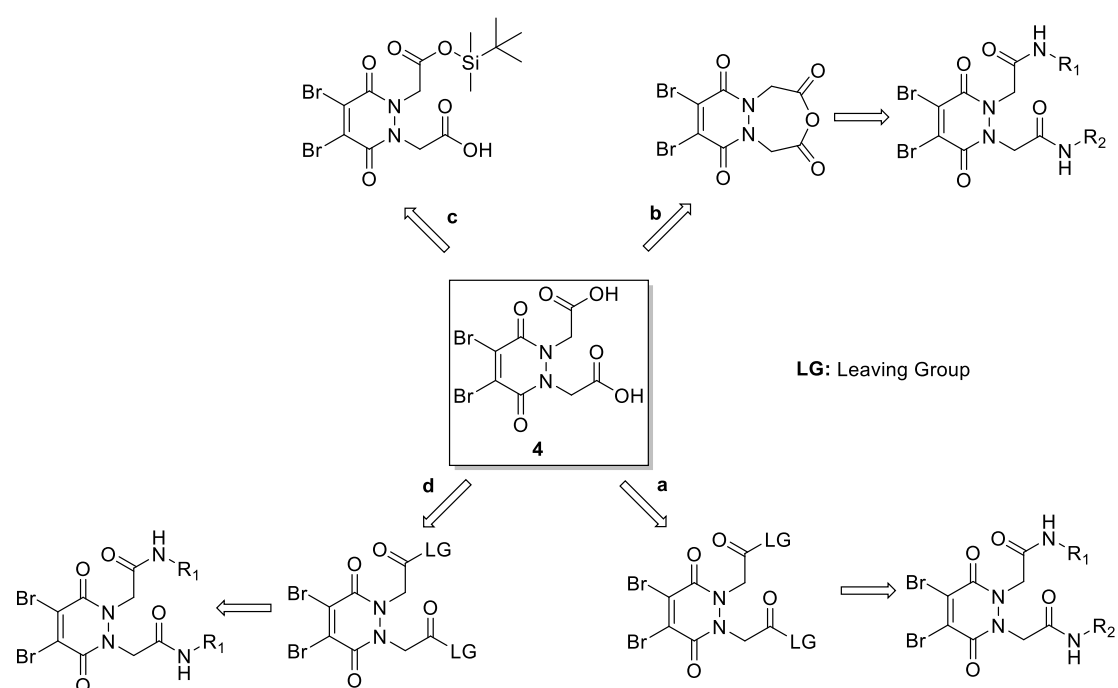
**Σχήμα 15.** Σύνθεση της συζευγμένης ντοσεταξέλης με τη γέφυρα μέσω της αμίνης **19'** και της γέφυρας **17**.

## Μελέτες Σύζευξης

Με στόχο να καταλήξουμε σε μια εύκολη και γενική συνθετική πορεία προς το επιθυμητό σύζευγμα με διπλό θεραπευτικό φορτίο, διενεργήσαμε μελέτες μοντέλων (model studies) με τη χρήση φαιναιθυλαμίνης (PEA) και δι-ισοπροπυλαμίνης (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  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> πρωτονίων του δι-καρβοξυλικού οξέος **4** στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR.

Αν και στην έως τώρα βιβλιογραφία<sup>13</sup>, έχουν συντεθεί ικρίωματα δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνης με μια καρβοξυλομάδα, θεωρήσαμε ότι η παρουσία δύο καρβοξυλομάδων δεν θα δημιουργούσε πρόβλημα στο σχηματισμό του επιθυμητού δι-αμιδίου, κάτι το οποίο δυστυχώς αποδείχθηκε λάθος. Όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 16 έγινε απόπειρα σχηματισμού του ενεργοποιημένου δι-εστέρα (πορεία

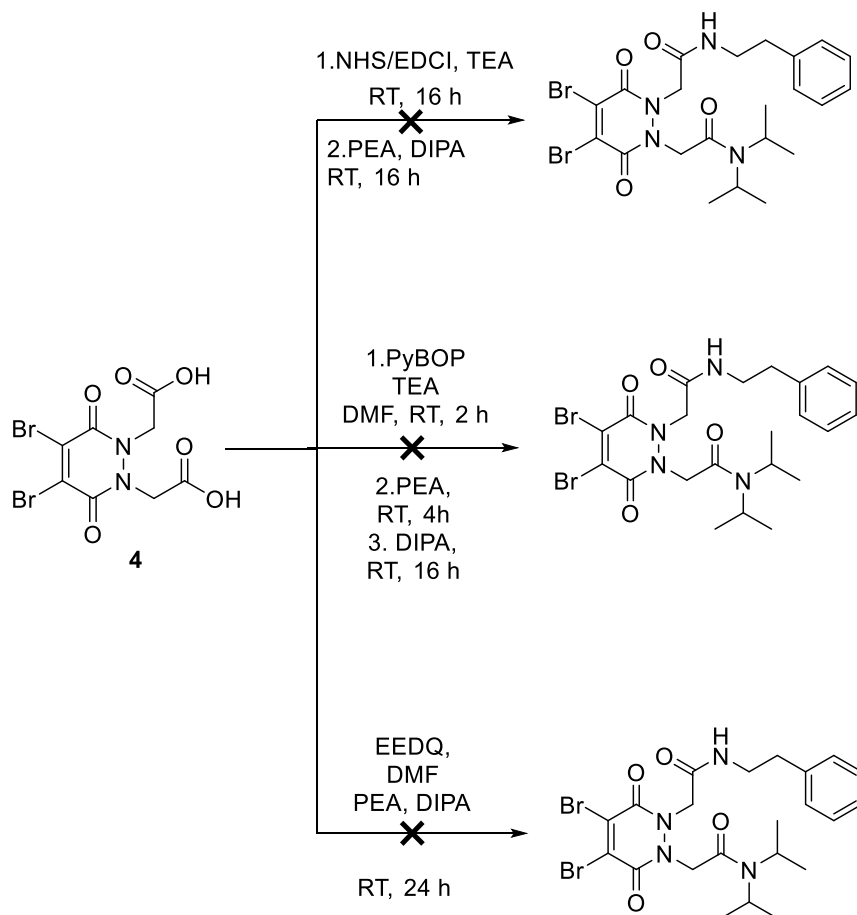
a), ο οποίος θα μας έδινε το επιθυμητό συμμετρικό δι-αμίδιο μέσω ελεγχόμενης στοιχειομετρικής προσθήκης των δύο αμινών. Στη συνέχεια, προβήκαμε στην εκλεκτική ενεργοποίηση της μίας εκ των δύο καρβοξυλομάδων, μέσω απόπειρας σχηματισμού του αδιπικού ανυδρίτη (πορεία b) και τη δημιουργία του σιλυλοεστέρα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



**Σχήμα 16.** Στρατηγικές μελετών σύζευξης του δι-καρβοξυλικού οξέος **4**.

Αναλυτικότερα, για το σχηματισμό του δι-ενεργοποιημένου εστέρα πραγματοποιήθηκαν πολλές προσπάθειες με διαφορετικά μέσα (Σχήμα 17). 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 συνέχεια των προσπαθειών μας, προχωρήσαμε σε αντίδραση της ένωσης **4** με το συζευκτικό αντιδραστήριο PyBOP<sup>29</sup>. Αν και ο έλεγχος με TLC έδειξε σχηματισμό του ενδιάμεσου BOP-εστέρα και κατανάλωση του αρχικού οξέος, η

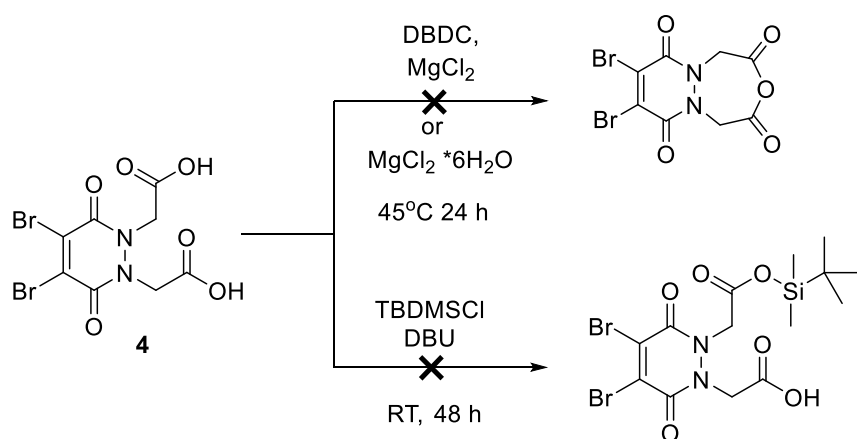
σύζευξη με PEA και DIPA δεν μπορούσε να επιτευχθεί. Τέλος, αντίδραση της ένωσης **4** με PEA και DIPA παρουσία του συζευκτικού αντιδραστήριου EEDQ δεν οδήγησε στο επιθυμητό αποτέλεσμα.



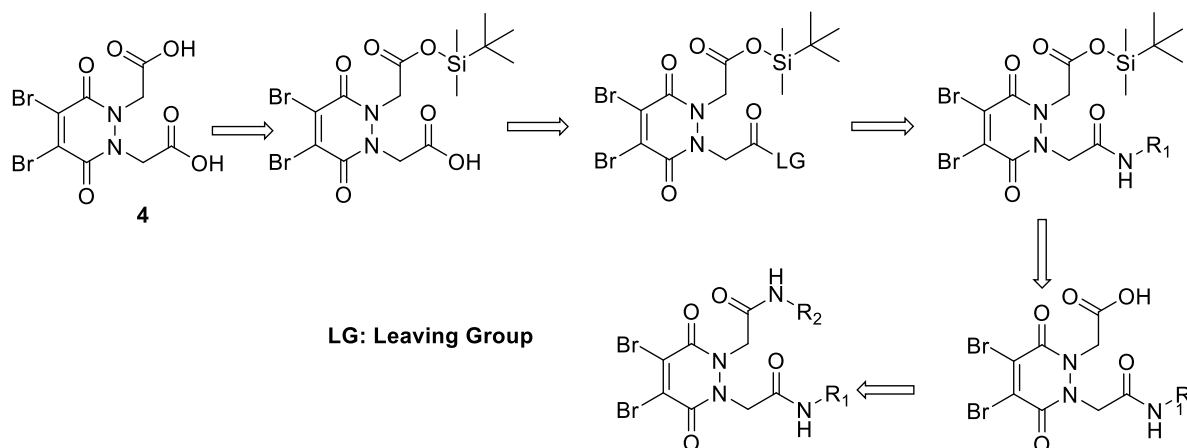
**Σχήμα 17.** Απόπειρες σχηματισμού και σύζευξης του δι-ενεργοποιημένου εστέρα.

Καθώς ο σχηματισμός του δι-αμιδίου μέσω του σχηματισμού του δι-ενεργοποιημένου εστέρα απέτυχε, έγινε απόπειρα εκλεκτικής ενεργοποίησης των δύο καρβοξυλομάδων σε δύο βήματα (Σχήμα 18). Ειδικότερα, προβήκαμε στη σύνθεση του κυκλικού ανυδρίτη του οξέος, με χρήση DBDC και καταλυτική ποσότητα  $MgCl_2$ . 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  $MgCl_2$ <sup>30</sup> ούτε και το εξαυδατωμένο  $MgCl_2$ ,<sup>31</sup> μπορούσε να μας αποδώσει τον επιθυμητό αδιπικό ανυδρίτη. Η δεύτερη προσπάθεια εκλεκτικής ενεργοποίησης των δύο καρβοξυλομάδων περιλάμβανε την εισαγωγή της TBDMS-ομάδας σε μία εκ των δύο

καρβοξυλομάδων, καθώς λόγω στερικής παρεμπόδισης, δεν θα μπορούσε να δημιουργηθεί ο δισίλυλο-εστέρας. Κατά συνέπεια, 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 δι-αμίδιο (Σχήμα 19). Καθώς η ευρέως γνωστή μέθοδος σιλυλίωσης με TBDMSCl/Imidazole/DMF<sup>32</sup> δεν αποφέρει καλές αποδόσεις στην περίπτωση των καρβοξυλικών οξέων<sup>32,33</sup>, στην περίπτωση μας, επιλέχθηκε η συνθετική πορεία των Aizuru et al.<sup>34</sup> 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 στην κατά τη χρήση του ιμιδαζολίου ως πυρηνόφιλου καταλύτη<sup>32</sup>. Εν τούτοις, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του σιλυλο-εστέρα.



**Σχήμα 18.** Απόπειρες εκλεκτικής ενεργοποίησης του δι-καρβοξυλικού οξέος.



**Σχήμα 19.** Σχηματική αναπαράσταση εκλεκτικής ενεργοποίησης του δι-καρβοξυλικού οξέος **4** 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 20, καμία από τις προσπάθειες δεν έφερε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

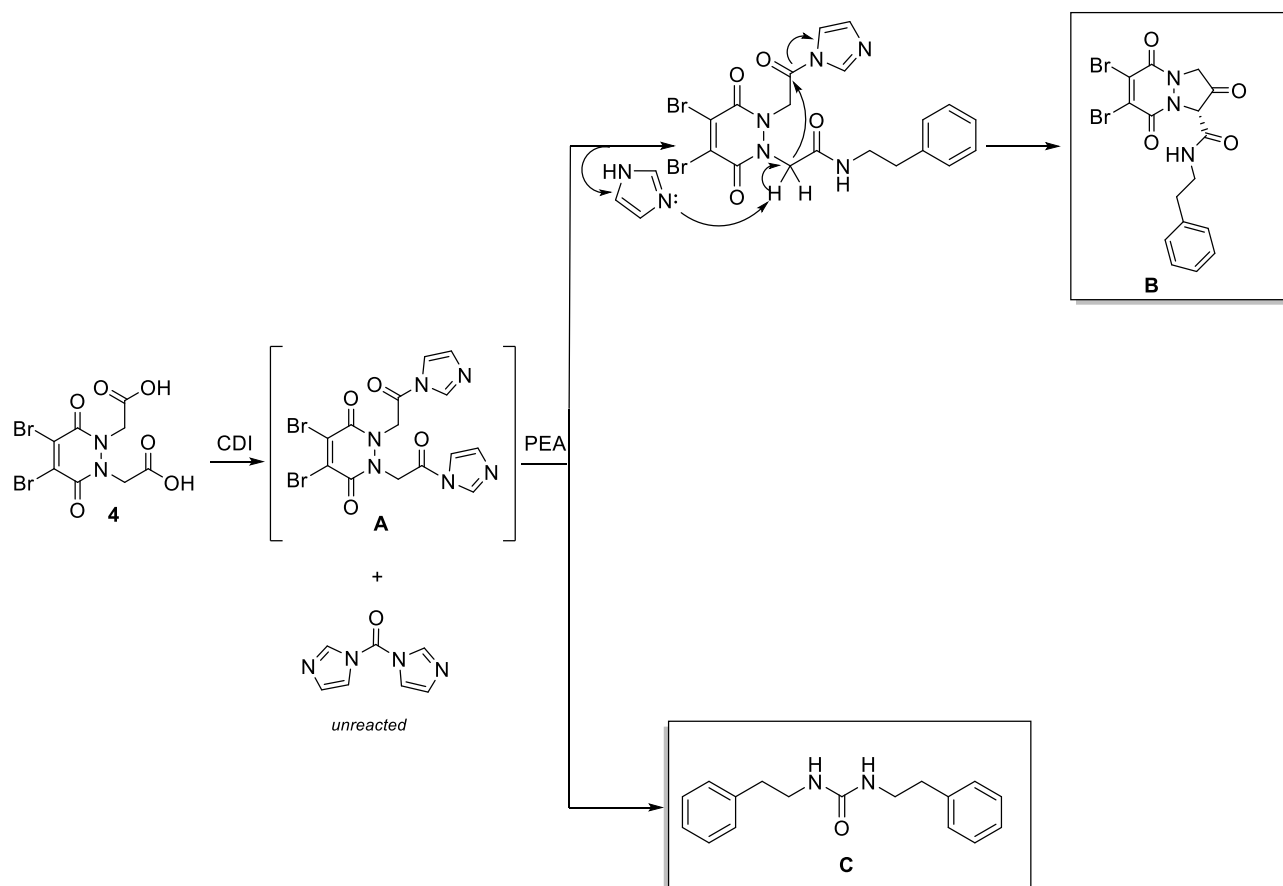


και κατά συνέπεια μια παράπλευρη αντίδραση έλαβε μέρος, με το προκύπτον προϊόν να είναι υδατοδιαλυτό ή να υπόκειται σε υδρολυτική διάσπαση.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια σχηματισμού του χλωριδίου του οξέος *in situ*, με τη χρήση  $\text{PPH}_3/\text{CCl}_4$ <sup>36</sup>, καθώς και του βρωμιδίου του δι-οξέος με  $\text{NBS}/\text{PPH}_3$ <sup>37</sup>, ωστόσο το επιθυμητό προϊόν δεν σχηματίστηκε. 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 συνθήκες ενός δοχείου<sup>38,39</sup>. Ανάλυση του φάσματος  $^1\text{H}$  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  $\text{HCl}$  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.

Ωστόσο, δεν πραγματοποιήθηκε εις διπλούν σύζευξη της PEA στο ενεργοποιημένο ενδιάμεσο ακυλο-ιμιδαζολίου, πιθανόν λόγω στερικής παρεμπόδισης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 21, θεωρούμε ότι το ιμιδαζόλιο που απελευθερώθηκε κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, αποπρωτονίωσε το ένα ζεύγος των  $\text{CH}_2$  πρωτονίων στην  $\alpha$ -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 μονο-αμίδιο **A**, ενώ παράλληλα, το υπόλοιπο CDI αντέδρασε με την περίσσεια της PEA, σχηματίζοντας έτσι τη συμμετρική της ουρία **C**.





**Σχήμα 21.** Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού παραπροϊόντων κατά την ενεργοποίηση του δι-καρβοξυλικού οξέος 4 με CDI.

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

## Επαναπροσδιορισμένη στρατηγική σύνθεσης του ικρίωματος

Καθώς κάθε προσπάθεια σύζευξης αμινών με το δι-καρβοξυλικό οξύ αποδείχθηκε άκαρπη, θεωρήσαμε ότι τα  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> πρωτόνια καθώς και η μικρού μήκους ανθρακική αλυσίδα, αποτελούν τους κύριους λόγους των αποτυχημένων προσπαθειών και της πραγματοποίησης των παράπλευρων αντιδράσεων. 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 (Σχήμα 22). Τα χαρακτηριστικά σημεία αυτής της νέας στρατηγικής ήταν 1) η επέκταση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του ικρίωματος, ώστε να αποφευχθούν ενδομοριακές αντιδράσεις κυκλοποίησης, 2) η προσαρμογή ενός αιθερικού δεσμού ανάμεσα στην πεπτιδική γέφυρα και τη δι-βρωμοπυριδαζινοδιόνη, ο οποίος μπορεί να αυξήσει την υδροφιλικότητα του συζεύγματος, 3) σύνθεση ενός νέου ικρίωματος 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 N-άκρο του ικρίωματος και μια αλλυλο-τερματική καρβοξυλομάδα στο άλλο N-άκρο. Ενεργοποίηση της ελεύθερης καρβοξυλομάδας και σύζευξη με το πρώτο φάρμακο, ακολουθούμενη από απομάκρυνση της αλλυλο-ομάδας<sup>40</sup>, 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 **I** με διπλό θεραπευτικό φορτίο, απεικονίζεται στο Σχήμα 22 **Σχήμα 3**. Το επιθυμητό di-BrPD-DDC **I** θα μπορούσε να προκύψει έπειτα από σύζευξη της ένωσης **30** με την αμινομάδα της βαλίνης του αντίστοιχου φαρμάκου-συνδέτη (drug-linker). Η ένωση **30** θα μπορούσε να προέλθει έπειτα από αντίδραση του δι-βρωμομαλεϊικού ανυδρίτη **1** με την υδραζίνη **27b** και τους μεσυλιωμένους εστέρες **24** και **26**. Αντίστοιχα, οι εστέρες **24** και **26** θα προέκυπταν έπειτα από μια σειρά αντιδράσεων, ξεκινώντας από τον TBDMS-αιθέρα της αιθυλενογλυκόλης **22**, ένωση παραγόμενη από αιθυλενογλυκόλη.



**27b**, η οποία έχει ήδη παρασκευαστεί σε δύο βήματα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία<sup>42</sup> με τις **24** και **26** θα αποδώσει την ένωση **28** εκλεκτικά σε δύο βήματα. Αρχικά, μέσω αντίδρασης αλκυλίωσης θα προστεθεί η ένωση **24**, 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 **30** θα μπορούσε να προκύψει μέσω μιας αντίδρασης ενός δοχείου, ανάμεσα στην ένωση **28** και το δι-βρωμομαλεϊκό ανυδρίτη **1**. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν εκλεκτική ενεργοποίηση των δύο τερματικών ομάδων, και συγκεκριμένα ενεργοποίηση της πρώτης καρβοξυλομάδας της ένωσης μέσω ενός αντιδραστήριου ενεργοποίησης που θα επέτρεπε την απομόνωση του ενεργού ενδιάμεσου, όπως είναι η αντίδραση με NHS/DCC, ή ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου εστέρα με PyBOP, και τη δημιουργία του πρώτου αμιδικού δεσμού με το πρώτο drug-linker. Η δεύτερη καρβοξυλομάδα θα σχηματιστεί έπειτα από κατεργασία με  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ <sup>40</sup>, και έπειτα από ενεργοποίηση θα καταλήξουμε στο επιθυμητό σύζευγμα.



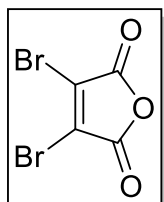
## Πειραματικό μέρος

### 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, CH<sub>3</sub>CN, Et<sub>2</sub>O, DMSO και DMF αγοράστηκαν σε άνυδρη μορφή και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα ευαίσθητα σε αέρα και υγρασία υγρά μεταφέρθηκαν με σύριγγα. Διεξήχθη χρωματογραφία στήλης flash με síλικά γέλη 60 (230-400 mesh) όπως περιγράφεται από τους Still et al.<sup>43</sup>, 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 <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C 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=απλή, για παράδειγμα). 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 /(LTQ) - Orbitrap.

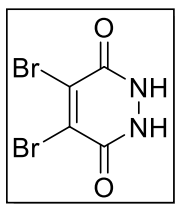
## Σύνθεση των ενώσεων 1-27b

### Ένωση 1



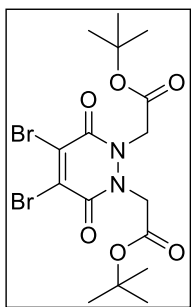
Σε σφραγισμένο σωλήνα (sealed tube) τοποθετήθηκε μαλεϊκός ανυδρίτης (1.50 g, 15.29 mmol, 1 eq.),  $\text{AlCl}_3$  (28 mg, 0.21 mmol, 1.4 eq.) και  $\text{Br}_2$  (6 mL, 91.74 mmol, 10 eq.). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους  $120^\circ\text{C}$  για 16h. Ακολούθησε ψύξη του μίγματος σε RT και στη συνέχεια διαλύθηκε σε EtOAc (10 mL). Ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και η ένωση **1** παραλήφθηκε ως ένα σομόν στερεό (3.54 g, 91%).  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 163.72, 125.84. HRMS (ESI) for  $\text{C}_4\text{Br}_2\text{O}_3$ : m/z calcd, 253.82; found, 254.82 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

### Ένωση 2



Σε μια σφαιρική φιάλη, δι-βρωμο-μαλεϊκός ανυδρίτης **1** (1 g, 3.9 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε AcOH (12 mL). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη μονοϋδρικής υδραζίνης (170  $\mu\text{L}$ , 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  $110^\circ\text{C}$  για 1h και στη συνέχεια αφέθηκε σε RT για 16h. Το επιθυμητό λευκό στερεό παραλήφθηκε με διήθηση και εκπλύθηκε με  $\text{Et}_2\text{O}$  αποδίδοντας 390 mg της επιθυμητής ένωσης (40%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 5.75 (s, 2H). HRMS (ESI) for  $\text{C}_4\text{H}_2\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$ : m/z calcd., 269.85; found, 270.85 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

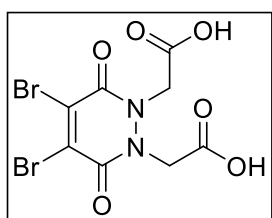
### Ένωση 3



Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η ένωση **2** (200 mg, 0.73 mmol, 1 eq.), μαζί με  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (240 mg, 0.73 mmol, 2 eq.), και διαλύθηκαν σε άνυδρο DMF (10 mL). Ακολούθησε προσθήκη tert-butyl bromoacetate (214  $\mu\text{L}$ , 1.471 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης

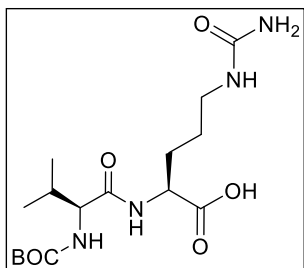
αναδεύτηκε για 16 h σε RT. Ακολούθησε προσθήκη H<sub>2</sub>O και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc. Η συνολική οργανική φάση εκπλύθηκε με aq. NaCl, ξηράθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του ακατέργαστου προϊόντος με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hex/EtOAc (10:1 έως 2:1) ως κινητή φάση, δίνοντας την ένωση **3** ως λευκό στερεό (120 mg, 33%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 4.67 (s, 4H), 1.48 (s, 18H). HRMS (ESI) for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: m/z calcd., 495.98; found, 496.99 [M+H<sup>+</sup>].

#### Ένωση 4



Σε μια σφαιρική φιάλη η ένωση **3** (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 **4** ως ένα υπόλευκο στερεό (90 mg, 98%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 12.85 (s, 2H), 4.79 (s, 4H). HRMS (ESI) for C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>: m/z calcd., 383.86; found, 384.86 [M+H<sup>+</sup>].

#### Ένωση 6

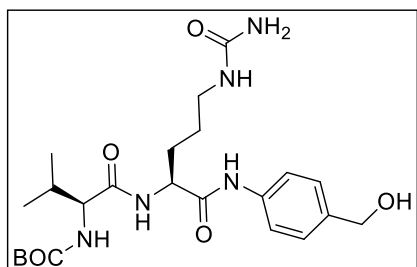


Σε μια σφαιρική φιάλη BOC-Val (5.060 g, 23.01 mmol, 1 eq.) και NHS (2.64 g, 23.01 mmol, 1 eq.) διαλύθηκαν σε άνυδρο THF (150 mL) στους 0 °C. Ακολούθησε προσθήκη DCC (4.74 g, 23.01 mmol, 1 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα η DCU-ουρία διηθήθηκε και εκπλύθηκε με THF. Ακολούθησε εξάτμιση του διηθήματος και το προκύπτον λευκό στερεό [N-BOC-Val-OSu, **5**] χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.



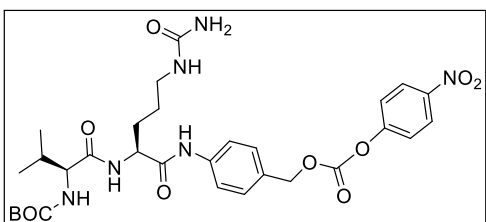
Ο ενεργοποιημένος εστέρας **5** (23.01 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε DME (160 mL) και προστέθηκε σε διάλυμα κιτρουλίνης (4.23 g, 24.16 mmol, 1.05 eq.) και NaHCO<sub>3</sub> (2.03 g, 24.16 mmol, 1.05 eq.) σε H<sub>2</sub>O (50 mL). Ακολούθησε προσθήκη THF (30 mL) για να διευκολυνθεί η διαλυτότητα, και το 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 Et<sub>2</sub>O (80 mL) και σύντομη κατεργασία με υπερήχους. Διήθηση υπό κενό έδωσε το επιθυμητό προϊόν ως ένα λευκό στερεό (7 g, 81%). <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 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 C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: m/z calcd., 374.22; found, 397.2 [M+Na<sup>+</sup>].

### Ένωση 7



Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε N-BOC-Val-Cit **6** (2 g, 5.34 mmol, 1 eq.) και PABOH (1.31 g, 10.66 mmol, 2 eq.), και διαλύθηκαν σε DCM/MeOH (75 mL, 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 Et<sub>2</sub>O (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 Et<sub>2</sub>O, και ακολούθησε ανακρυστάλλωση από EtOAc/ Et<sub>2</sub>O. Ξήρανση του στερεού υπό κενό οδήγησε στην επιθυμητή ένωση **7** (1.36 g, 71%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 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 C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: m/z calcd., 479.27; found, 502.26 [M+Na<sup>+</sup>].

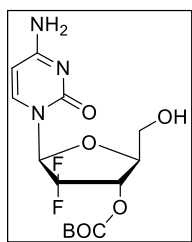
## Ένωση 8



Σε μία σφαιρική φιάλη, η ένωση **7** (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  $\mu$ L, 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 **7**, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και στο μίγμα προστέθηκε Et<sub>2</sub>O. 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 **8** ως λευκό στερεό. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 10.13 (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 C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>: m/z calcd., 644.28; found, 667.26 [M+Na<sup>+</sup>].

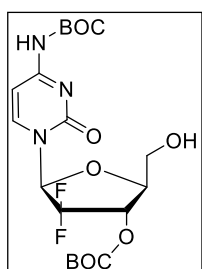
## Ένωση 9a



Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε υδροχλωρική γεμισταβίνη (3.45 g, 0.011 mol, 1 eq.), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.04 g, 0.058 mol, 5 eq.) και διαλύθηκαν σε 50 mL Dioxane/H<sub>2</sub>O (4:1). Ακολούθησε προσθήκη DBDC (2.5 g, 0.0115 mol, 1 eq.) και το μίγμα που προέκυψε αναδεύτηκε σε RT για 48 h. Μετά το πέρας των 48 h, προστέθηκε H<sub>2</sub>O και το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc (2x30 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν και εκπλύθηκαν με H<sub>2</sub>O και NaCl, ξηράθηκαν με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστέθηκε Et<sub>2</sub>O 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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , και οι διαλύτες εξατμίστηκαν υπό κενό, αποδίδοντας gemcitabine που δεν είχε αντιδράσει (40 mg).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 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).

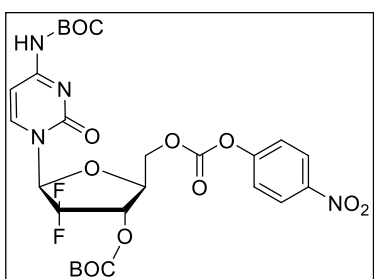
### Ένωση 9b



Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε η ένωση **9a** (2.3 g, 0.0063 mol, 1 eq.) και διαλύθηκε σε διοξάνη (80 mL). Ακολούθησε προσθήκη DBDC (13.75 g, 0.063 mol, 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  $\text{H}_2\text{O}$  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 **9b** (1.96 g, 67.12%). Ανάλυση του διηθήματος με TLC επιβεβαίωσε την παρουσία tri-BOC-protected-gemcitabine.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 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  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_8$ :  $m/z$  calcd., 463.18; found, 464.18 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

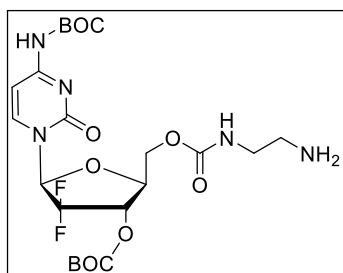
### Ένωση 10



Σε διάλυμα bis-PNP carbonate (231 mg, 0.76 mmol, 2 eq.) σε άνυδρο DCM (4 mL) σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε σταγόδην διάλυμα της ένωσης **9b** (180 mg, 0.38 mmol, 1 eq.) ως διάλυμα σε άνυδρο DCM (1 mL). Στη

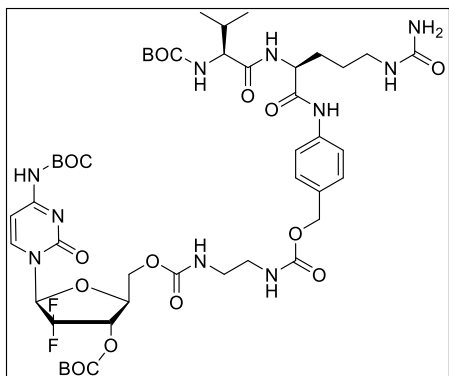
συνέχεια ακολούθησε προσθήκη DIPEA (133  $\mu\text{L}$ , 0.76 mmol, 2 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. . Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα εκχυλίστηκε με DCM/ $\text{H}_2\text{O}$ , η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το ακατέργαστο υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hex/EtOAc (2:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την ένωση **10** ως υποκίτρινο λάδι (158 mg, 66.15%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 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  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{12}$ : m/z calcd., 628.18; found, 629.19  $[\text{M}+\text{H}^+]$ .

### Ένωση 11



Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη, προστέθηκε αιθυλενοδιαμίνη (0.158 mmol, 15  $\mu\text{L}$ , 2 eq.), TEA (0.158 mmol, 22  $\mu\text{L}$ , 2 eq.) και διαλύθηκαν σε άνυδρο DCM (4 mL). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη διαλύματος της ένωσης **10** (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  $\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Η οργανική φάση στη συνέχεια εκπλύθηκε πολλαπλώς με  $\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{NaOH}$  1N. Ακολούθησε ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , εξάτμιση του διαλύτη και η ένωση **11** απομονώθηκε ως ένα άχρωμο φιλμ (25 mg, 58%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 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  $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_9$ : m/z calcd., 549.22; found, 550.23  $[\text{M}+\text{H}^+]$ .

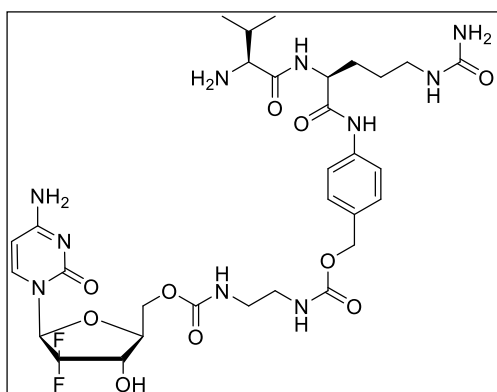
## Ένωση 12



Σε μια δίλιμη σφαιρική φιάλη η ένωση **22** (25 mg, 0.049 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε άνυδρο DCM (4 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού. Στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην διάλυμα της ένωσης **8** (29 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 16h. 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 **12** ως ένα λευκό στερεό (49 mg, 82%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 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  $\text{C}_{46}\text{H}_{68}\text{F}_2\text{N}_{10}\text{O}_{16}$ : m/z calcd., 1054.48; found, 1077.46 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ].

## Ένωση 13

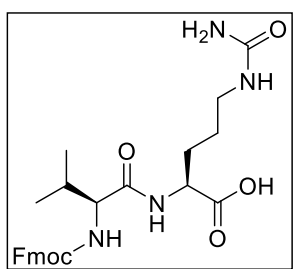


Σε διάλυμα της ένωσης **12** (20 mg, 0.018 mmol, 1 eq.) σε DCM (5 mL) προστέθηκε TFA (500 μL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC, και μόλις καταναλώθηκε η αρχική ένωση **12**, το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, δίνοντας την ένωση **13** ως ένα λευκό στερεό (10 mg,

74%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 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 C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>F<sub>2</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>: m/z calcd., 754.75; found, 755.32 [M+H<sup>+</sup>].

## Ένωση 15

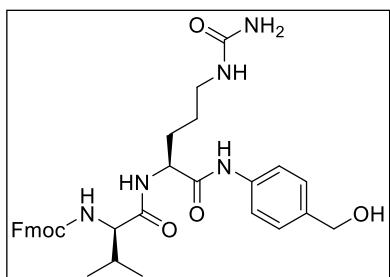


Σε μια σφαιρική φιάλη Fmoc-Val (5.06 g, 14.91 mmol, 1 eq.) και NHS (1.72 g, 14.91 mmol, 1 eq.) διαλύθηκαν σε άνυδρο THF (50 mL) στους 0 °C. Ακολούθησε προσθήκη DCC (3.08 g, 14.91 mmol, 1 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, η DCU-ουρία διηθήθηκε και εκπλύθηκε με THF.

Ακολούθησε εξάτμιση του διηθήματος και το προκύπτον υαλώδες στερεό (Fmoc-Val-Osu, **14**) χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Ο ενεργοποιημένος εστέρας **14** (14.91 mmol, 1 eq.) διαλύθηκε σε DME (40 mL), και προστέθηκε σε διάλυμα κιτροουλίνης (2.74 g, 15.65 mmol, 1.05 eq.) και NaHCO<sub>3</sub> (1.31 g, 15.65 mmol, 1.05 eq.) σε H<sub>2</sub>O (40 mL). Ακολούθησε προσθήκη THF (20 mL) για να διευκολυνθεί η διαλυτότητα, και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT για 16 h. 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 H<sub>2</sub>O (2x150 mL). Το ληφθέν εναιώρημα συμπυκνώθηκε δίνοντας ένα κίτρινο λάδι το οποίο στερεοποιήθηκε μετά από προσθήκη Et<sub>2</sub>O (80 mL) και σύντομη κατεργασία με υπερήχους. Διήθηση υπό κενό έδωσε το επιθυμητό προϊόν ως ένα λευκό στερεό (6 g, 86%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- d<sub>6</sub>): δ: 12.48 (brs, 1H), 8.15 (d, 1H), 7.89 (d, 2H), 7.74 (t, 2H), 7.43-7.29 (m, 6H), 5.92 (t, 1H), 5.37 (brs, 2H), 4.23 (t, 2H), 4.36-4.12 (m, 5H), 4.03-3.73 (m, 2H), 2.94 (q, 2H), 2.81 (s, 1H), 2.72-2.55 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.70+1.58 (m, 2H), 1.41-1.35 (m, 2H), 1.04-0.99 (m, 3H), 0.88 (m, 6H). HRMS (ESI) for C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>: m/z calcd., 496.23; found, 519.21 [M+Na<sup>+</sup>].

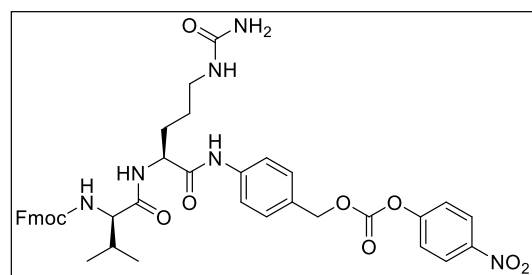
## Ένωση 16



Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε Fmoc-Val-Cit **15** (1.41 g, 2.83 mmol, 1 eq.) και PABOH (697mg, 5.66 mmol, 2 eq.) και διαλύθηκαν σε DCM/MeOH (45 mL, 2:1). Ακολούθησε προσθήκη EEDQ (1.4 g, 5.66 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης

αναδεύτηκε σε RT στο σκοτάδι για 36 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, οι διαλύτες εξατμίστηκαν και στο λευκό-στερεό-υπόλειμμα προστέθηκε Et<sub>2</sub>O (75 mL). Ακολούθησε καεργασία του εναιωρήματος με υπερήχους για 5 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min. Το στερεό παραλήφθηκε με διήθηση, εκπλύθηκε με Et<sub>2</sub>O και ξηράνθηκε υπό κενό, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση **16** ως λευκό στερεό (1.20 g, 71%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.99 (1H, brs), 8.12 (1H, d), 7.15-7.92 (12H, m), 5.98 (1H, t), 5.42 (2H, brs), 5.11 (1H, t), 4.43 (2H, d), 4.19-4.50 (2H, m), 4.24 (2H, d), 3.92 (1H, t), 2.99 (2H, m), 2.00 (1H, m), 1.65 and 1.41 (4H, m), 0.88 (6H, t). HRMS (ESI) for C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>: m/z calcd., 601.29; found, 602.29 [M+H<sup>+</sup>].

## Ένωση 17

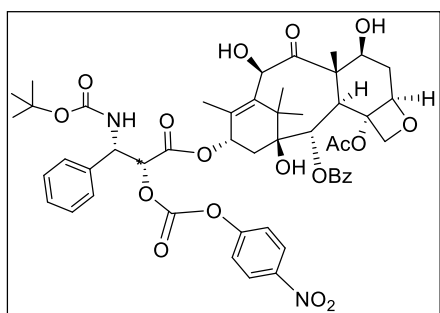


Σε διάλυμα bis-PNP carbonate (304 mg, 1.32 mmol, 4 eq.) και DIPEA (116 μL, 0.66 mmol, 2 eq.) σε άνυδρο DCM (4 mL) σε δίκαιμη σφαιρική φιάλη και υπό ατμόσφαιρα αργού, προστέθηκε στάγδην

διάλυμα της ένωσης **16** (200 mg, 0.3323 mmol, 1 eq) ως διάλυμα σε άνυδρο DMF (4 mL) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε σε RT υπό ατμόσφαιρα αργού για 16 h. . Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και στο υπόλειμμα προστέθηκε Et<sub>2</sub>O (10 mL). Ακολούθησε καεργασία του υπολείμματος με υπερήχους για 15 min και στη συνέχεια αφέθηκε σε ηρεμία για 30 min. Το στερεό παραλήφθηκε με διήθηση, εκπλύθηκε με Et<sub>2</sub>O, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση **17** ως μπεζ στερεό (1.66 g, 65%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ:

10.12 (s, 1H), 8.30 (dd, 2H), 8.12 (t, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.66-7.56 (m, 2H), 7.42-7.22 (m, 5H), 5.97 (s, 1H), 5.40 (t, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.44-4.23 (m, 2H), 3.99-3.91 (m, 1H), 3.01-2.89 (m, 2H), 2.08-1.97 (m, 1H), 1.69-1.35 (m, 1H), 0.88 (m, 6H). HRMS (ESI) for  $C_{40}H_{42}N_6O_{10}$ : m/z calcd., 766.30; found, 767.30 [M+H<sup>+</sup>].

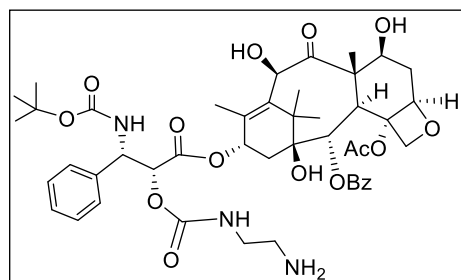
### Ένωση 18



Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε ντοσεταξέλη (10 mg, 0.012 mmol, 1 eq.), bis-PNP carbonate (4 mg, 0.015 mmol, 1.3 eq.) και διαλύθηκαν σε άνυδρο DCM (3 mL) υπό ατμόσφαιρα αργού στους 0°C. Ακολούθησε προσθήκη TEA (1.71 mL, 0.012 mmol, 1 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης

αναδεύτηκε στους 0°C για 48h. Με το πέρας της αντίδρασης, ακολούθησε εξάτμιση του DCM υπό κενό, και το κίτρινο υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών Hex:EtOAc (3:1 έως 2:1) ως κινητή φάση, αποδίδοντας την επιθυμητή ένωση **18** ως διάφανο φιλμ (10 mg, 84%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.27 (d, 2H), 8.13 (d, 2H), 7.61 (t, 1H), 7.48 (m, 4H), 7.38 (m, 4H), 7.32 (brs, 1H), 6.33 (t, 1H), 5.70 (d, 1H), 5.40 (m, 2H), 5.20 (s, 1H), 4.96 (dd, 1H), 4.33 (d, 1H), 4.23 (m, 2H), 3.98 (q, 1H), 3.96 (brd, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.35 (m, 1H), 2.17 (s, 1H), 1.95 (s, 3H), 1.85 (m, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.60 (brs, 8H), 1.35 (s, 9H), 1.14 (s, 3H). HRMS (ESI) for  $C_{50}H_{56}N_2O_{18}$ : m/z calcd., 972.35; found, 973.36 [M+H<sup>+</sup>].

### Ένωση 19

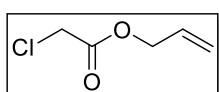


Σε μία σφαιρική φιάλη η ένωση **18** (DX-PNP), (5 mg, 0.005 mmol, 1 eq.), διαλύθηκε σε άνυδρο DCM (2 mL) στους 0°C. Ακολούθησε προσθήκη en (0.005 mmol, 1 eq.) και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε στους 0°C υπό ατμόσφαιρα αργού για 2 h (έλεγχος με TLC).



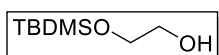
Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό και το υπόλειμμα χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο βήμα χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8.16 (d, 2H), 8.10 (d, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.63-7.30 (m, 3H), 6.93 (d, 2H), 5.67 (m, 1H), 4.97 (m, 1H), 4.60 (brs, H), 4.31-4.17 (m, 1H), 3.98 (q, 1H), 3.58 (s, 1H), 2.98 (s, 2H), 2.92 (s, 2H), 2.60 (m, 1H), 2.47 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.43 (m, 3H), 1.25 (s, 9H).

### Ένωση 21



Σε μια σφαιρική φιάλη προστέθηκε αλλυλική αλκοόλη (72  $\mu\text{L}$ , 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. Μετά 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  $\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$  1N και  $\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_3$ . Η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό, αποδίδοντας την ένωση **21** μαζί με κάποιες ακαθαρσίες.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 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).

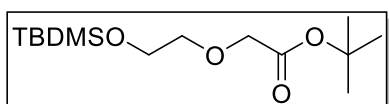
### Ένωση 22



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  $\mu\text{L}$ , 12.3 mmol, 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/ $\text{K}_2\text{CO}_3$  10%, και

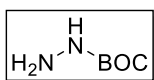
έκπλυση της οργανικής φάσης με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράθηκαν με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό αποδίδοντας την ένωση **22** ως διάφανο λάδι (1.7 g, 82%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.72 (m, 1H), 3.62 (m, 1H), 0.92 (s, 9H), 0.08 (s, 6H).

### Ένωση 23a



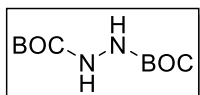
Σε σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε η ένωση **22** (30 mg, 0.17 mmol, 1 eq.), μαζί με Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (110 mg, 0.34 mmol, 2 eq.), και διαλύθηκαν σε άνυδρο DMF (1 mL). Ακολούθησε προσθήκη tert-butyl bromo acetate (50 μL, 0.34 mmol, 2 eq.), και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 3 h σε RT (έλεγχος με TLC). Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το μίγμα εκχυλίστηκε με EtOAc/H<sub>2</sub>O, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, και ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό κενό, αποδίδοντας την ένωση **23a** μαζί με κάποιες προσμίξεις. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 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 27a



Σε ένα διάλυμα μονοϋδρικής υδραζίνης (250 mg, 5 mmol, 1 eq.) σε 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<sup>1/2</sup> 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 **27a** ως διάφανους κρυστάλλους. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.57 (s, 1H), 3.66 (s, 2H), 1.34 (s, 9H).

## Ένωση 27b



Η ένωση **27a** (5 mmol, 1 eq.) 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 **27b** παραλήφθηκε έπειτα από ανακρυστάλλωση του μίγματος με Hex/CHCl<sub>3</sub> (4:1). (676 mg, 59%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.19 (s, 2H), 1.51 (s, 18H). HRMS (ESI) for C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: m/z calcd., 232.14; found, 255.13 [M+Na<sup>+</sup>].

## Συμπεράσματα

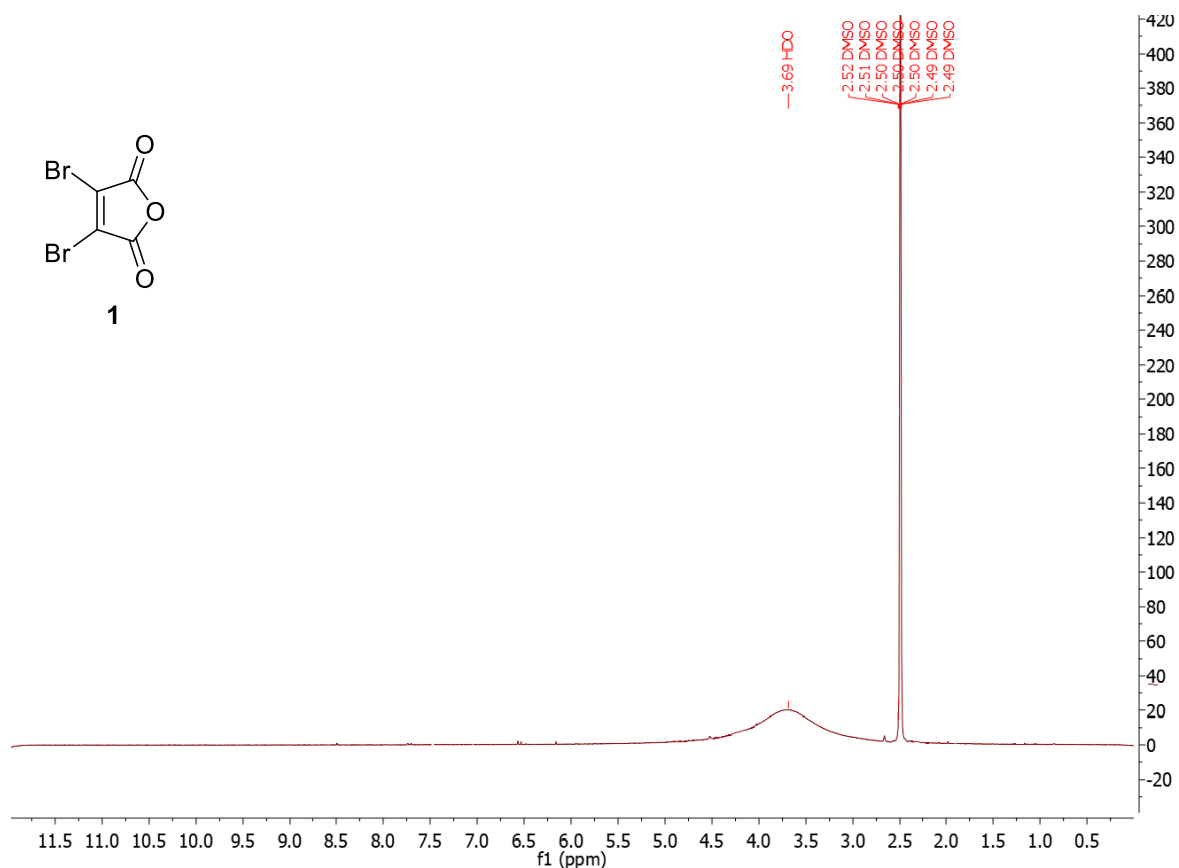
Κατά τη διάρκεια αυτής της Μεταπτυχιακής Διατριβής, προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε μια μεθοδολογία σύνθεσης στοχευτικών συζευγμάτων με διπλό θεραπευτικό φορτίο (targeted drug-drug conjugates) με βάση ένα ικρίωμα διβρωμοपुरιδαζινοδιόνης. Το κύριο μέρος αυτής της ερευνητικής δουλειάς, αφιερώθηκε στη σύνθεση και τροποποίηση του ικρίωματος. Αν και συντέθηκε επιτυχώς το πρώτο δι-καρβοξυλικό οξύ του ικρίωματος με έναν παρεμβαλλόμενο άνθρακα ανάμεσα στη διβρωμοपुरιδαζινοδιόνη και την καρβοξυλομάδα σύνδεσης, ήταν αναγκαία η τροποποίηση της σύνθεσής του προς τη δημιουργία ενός νέου, με μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα, έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή σύζευξη με το κάθε φάρμακο. Η έλλειψη χρονικού περιθωρίου δυστυχώς, δεν επέτρεψε την ολοκλήρωση αυτού του σχεδίου, καθώς οι προσπάθειες συνεχίζονται. Επιπρόσθετα, επετεύχθη αρχικά η καθιέρωση μιας νέας, πιο εύκολης συνθετικής πορείας προς το σχηματισμό της bis-BOC protected gemcitabine, μέσω τροποποίησης των ήδη υπαρχόντων διαδικασιών σύνθεσης, ενώ επιπρόσθετα, η συνολική σύνθεση της συζευγμένης γεμισταβίνης **13** μπορεί να χαρακτηριστεί ως επιτυχής. Τέλος, παρά την αποτυχία ολοκλήρωσης του τελευταίου σταδίου σύζευξης της ντοσεταξέλης με τη γέφυρα του στο χρονικό διάστημα που εκπονήθηκε αυτή η εργασία, η μελέτη του δεν θα εγκαταλειφθεί, και εύρεση των συνθηκών της αντίδρασης μένει να καθιερωθεί. Οι μελλοντικοί μας στόχοι περιλαμβάνουν ολοκλήρωση της σύνθεσης της συζευγμένης ντοσεταξέλης **20**, ολοκλήρωση της σύνθεσης του νέου ικρίωματος, σύζευξη και των δύο συζευγμένων-με τις γέφυρες- φαρμάκων με το ικρίωμα, καθώς και βιολογική αξιολόγηση του συζεύγματος με στόχο να επιβεβαιωθεί ο προτεινόμενος μας μηχανισμός απελευθέρωσης των φαρμάκων. Επιπλέον, ευελπιστούμε μελλοντικά, η μεθοδολογία αυτή να αναπτυχθεί στη σύνθεση βιολογικά στοχευτικών συζευγμάτων, και συγκεκριμένα PDDCs με στοχευτικά πεπτίδια υποδοχέων καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης και άλλων στοχευτικών συζευγμάτων όπως ADDCs, PNDDCs κ.α. μέσω συνεργασίας με εργαστήρια που εξειδικεύονται στο εκάστοτε αντικείμενο.

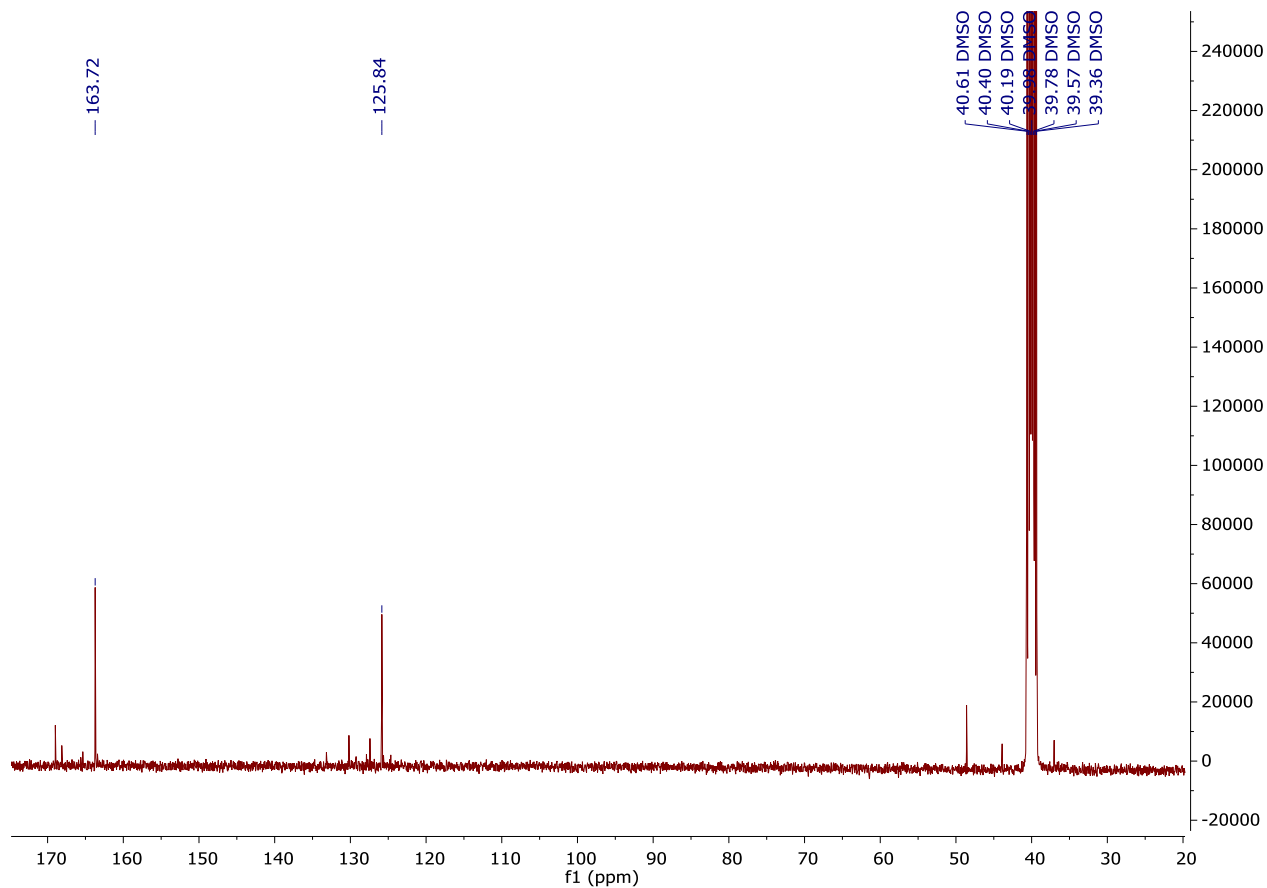
## Λίστα Συντομογραφιών

ADC	Antibody Drug Conjugate
BOC	tert-butyloxycarbonyl
CDI	N , N' -Caronyldiimidazole
Cit	Citrulline
DBDC	Di-tert-butyl dicarbonate
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichloromethane
di-BrPD	Di-bromopyridazinodione
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
eq.	equivalents
ESI	Electrospray Ionization
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
Et <sub>2</sub> O	Diethyl ether
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride
h	Hours
Hex	Hexane
LDC	Ligand Drug Conjugate
MeOH	Methanol
Min	Minutes

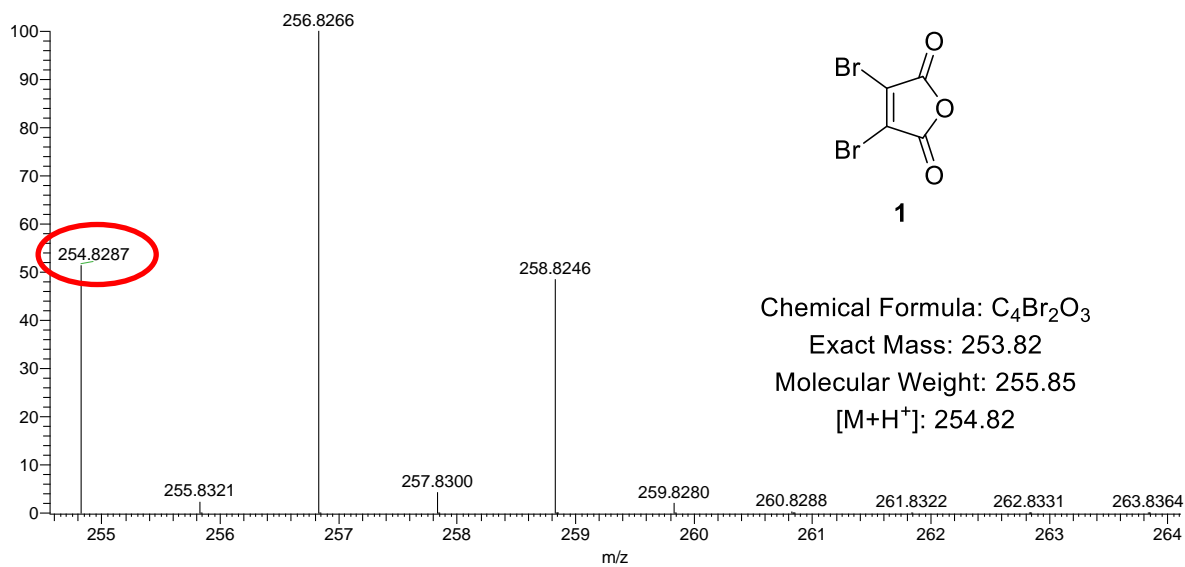
MS	Mass Spectrometry
MsCl	Mesyl Chloride
NBS	N-Bromosuccinimide
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
PABOH	p-aminobenzyl alcohol
PEA	2-phenethylamine
PDB	Protein Data Bank
PDC	Peptide Drug Conjugate
PNP	p-nitrophenol
Py	Pyridine
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RT	Room Temperature
TBDMS	tert-butyl dimethylsilyl
TEA	Triethylamine
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoroacetic acid
TLC	Thin Layer Chromatography
Val	Valine

# Παράρτημα



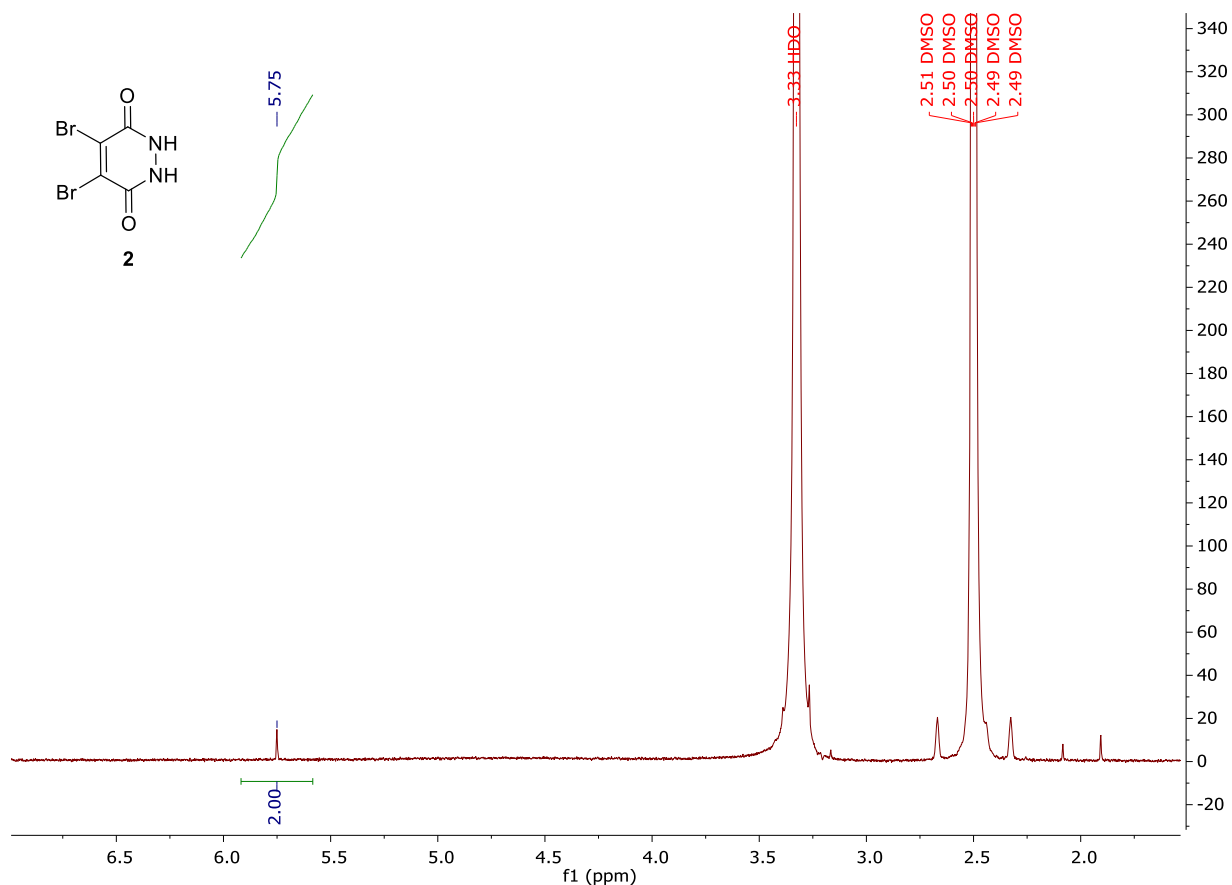


C4Br2O3 +H: C4 Br2 O3 H1 pa Chrg 1

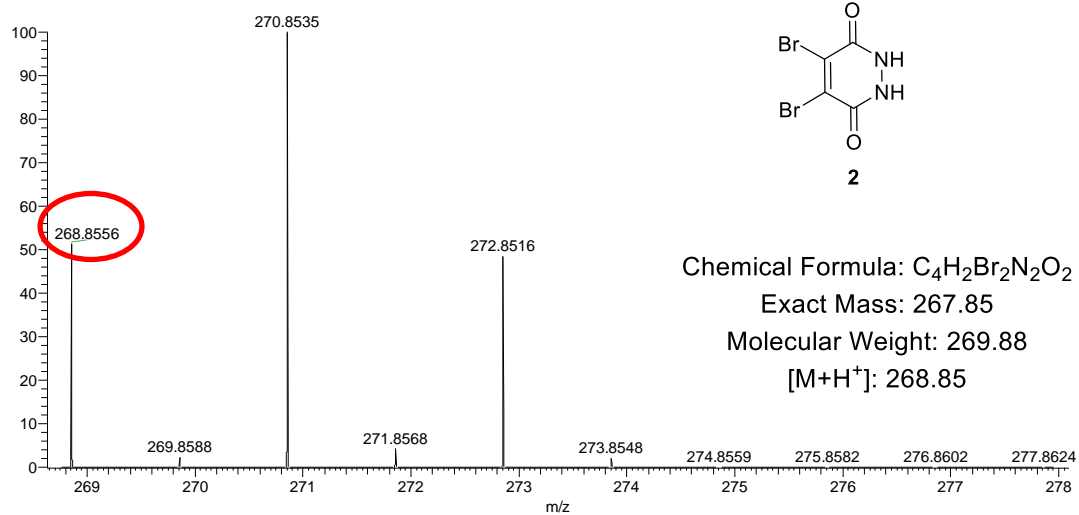


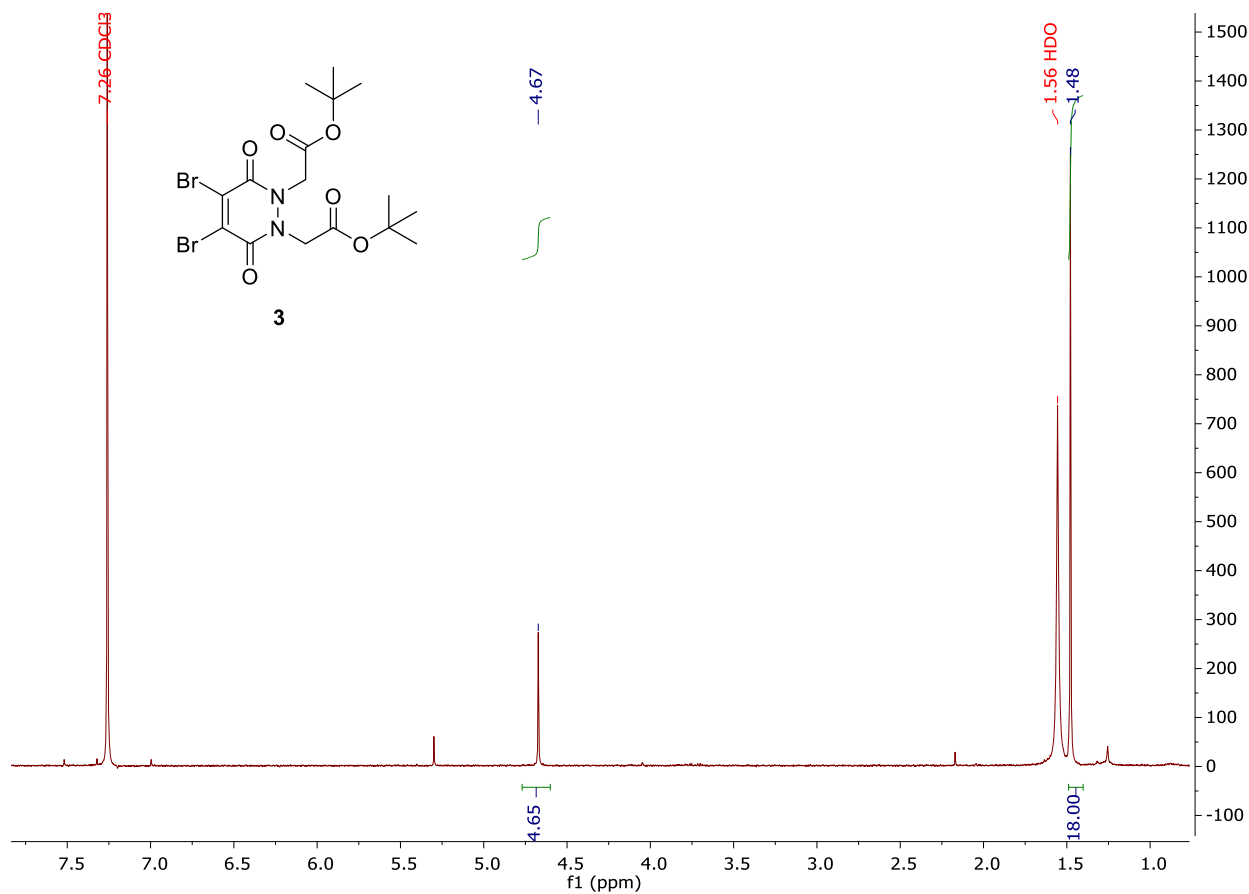
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **1**.





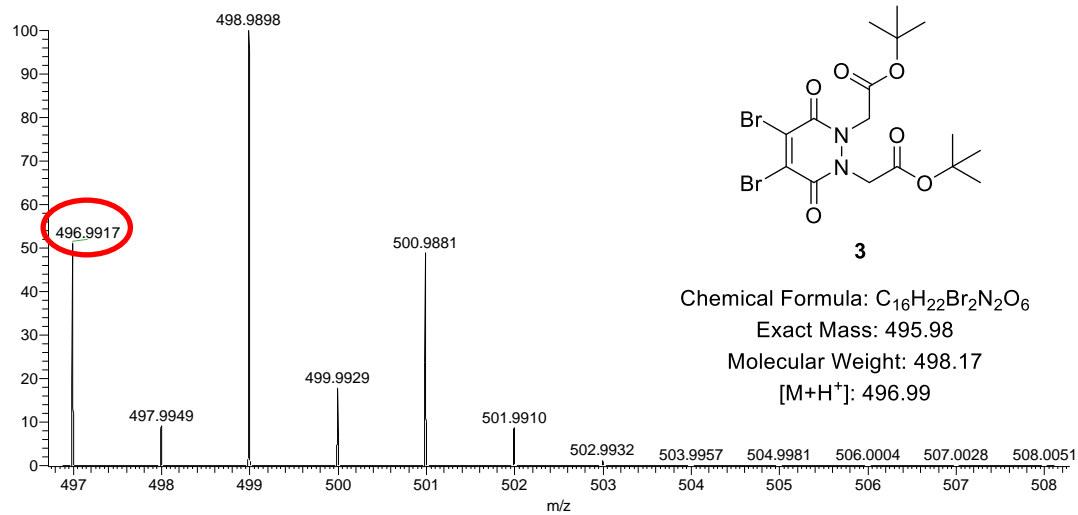
C4H2N2O2Br2 +H: C4 H3 N2 O2 Br2 p(gss, s/p:40) Chra ...

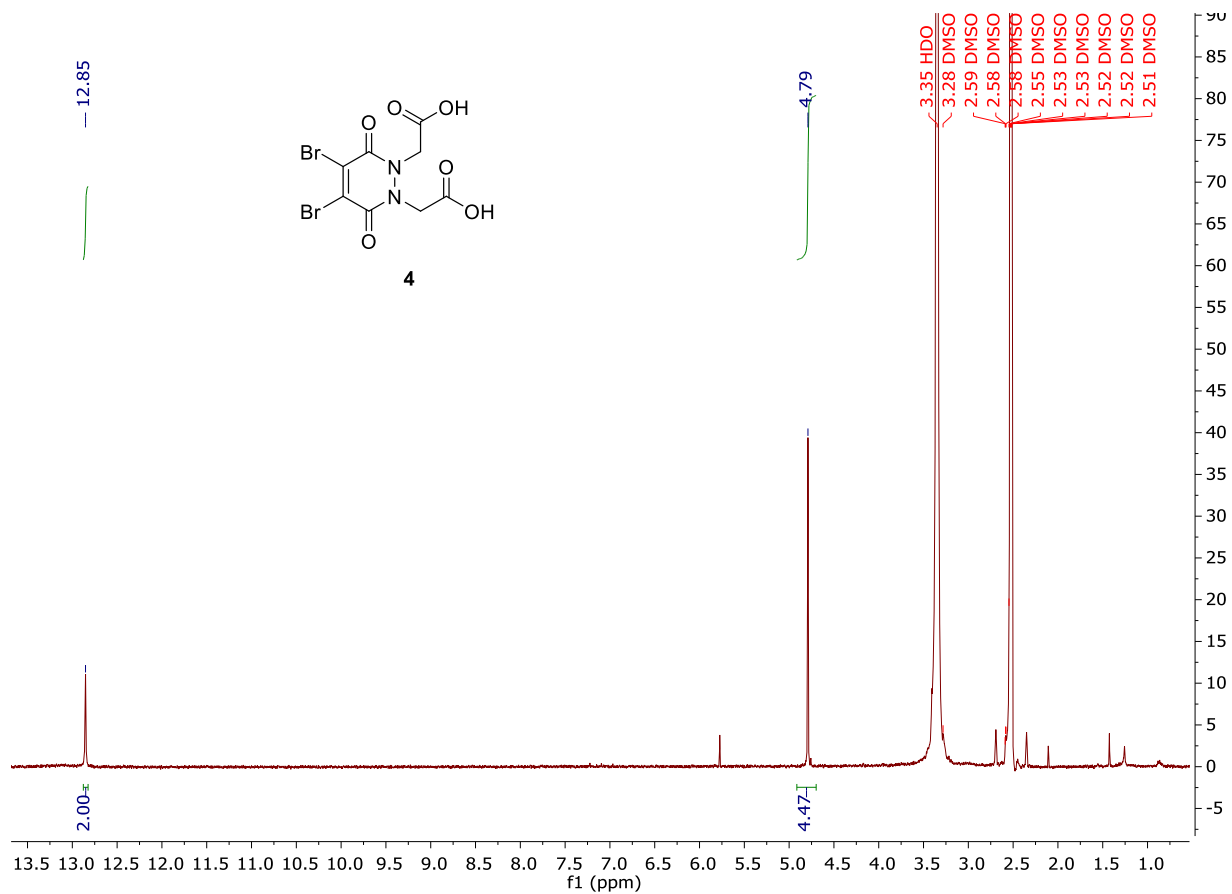




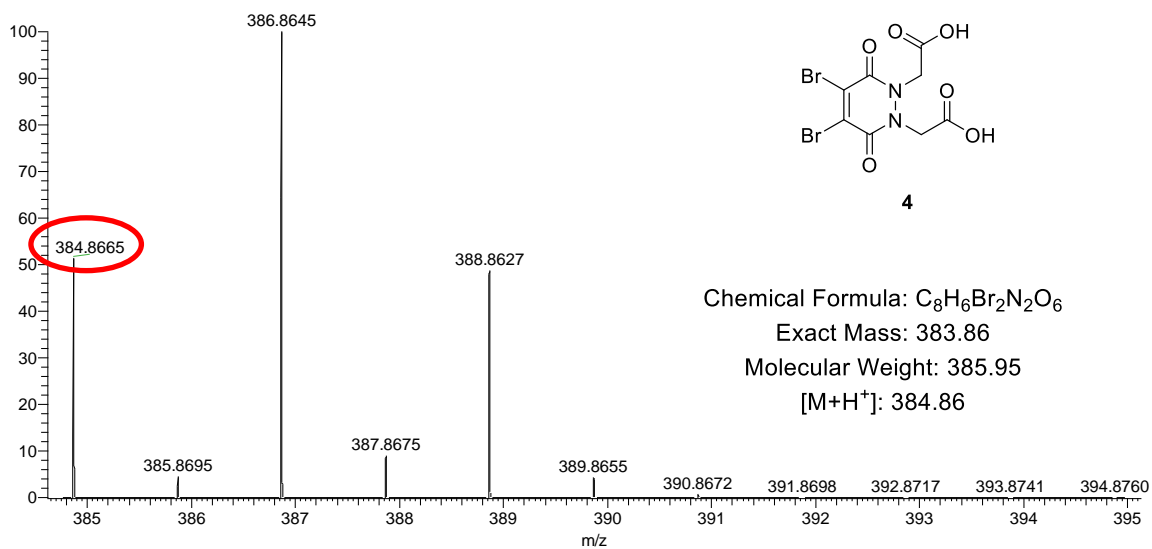
$^1\text{H NMR (400 MHz, CDCl}_3\text{)} \text{ φάσμα της ένωσης } \mathbf{3}$ .

C16H22N2O6Br2 +H: C16 H23 N2 O6 Br2 p(gss, s/p:40) C...

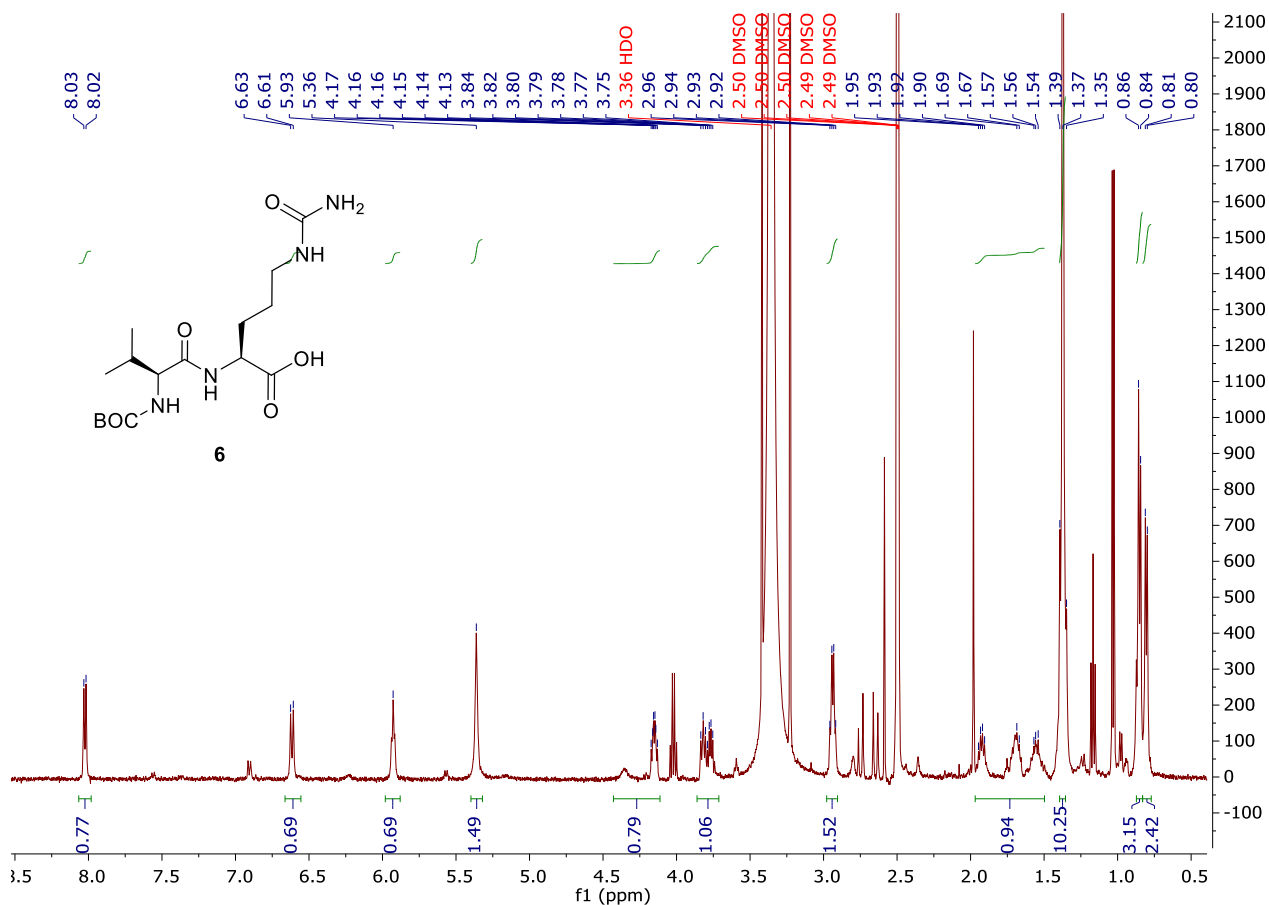




C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>Br<sub>2</sub> +H: C8 H7 N2 O6 Br2 p(gss, s/p:40) Chrg ...

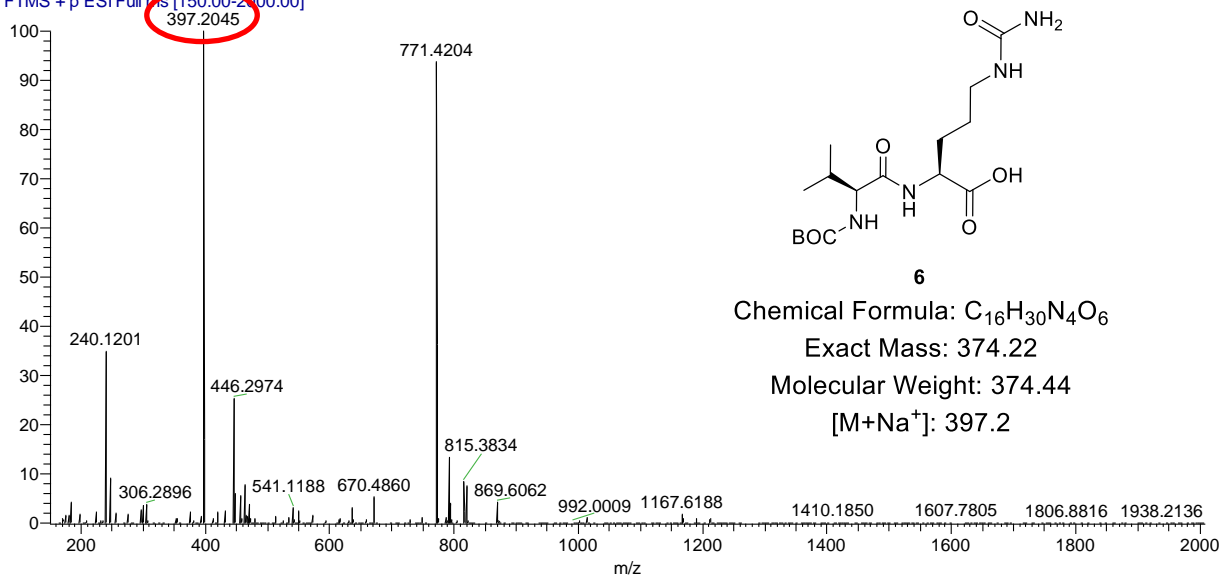


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **4**.

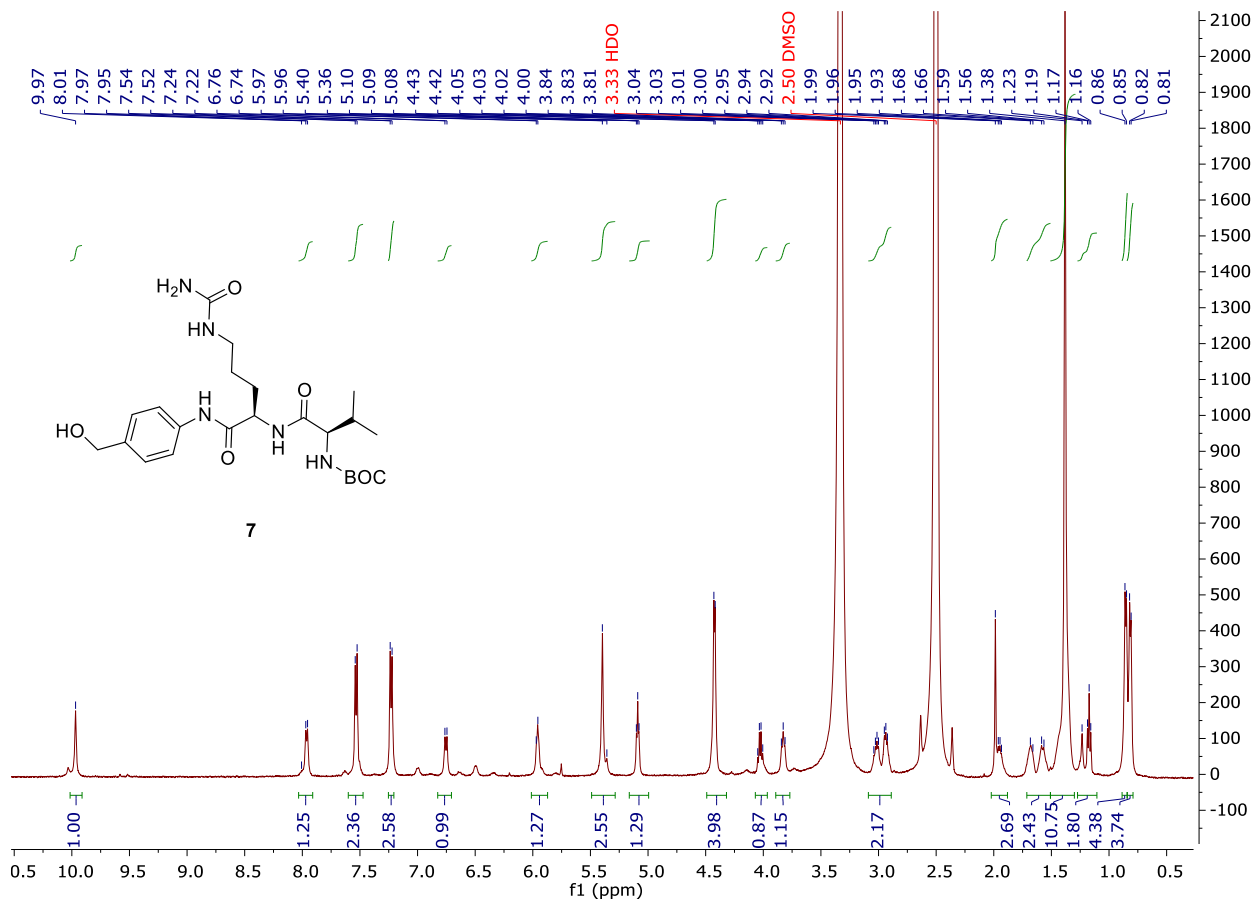


**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) φάσμα της ένωσης 6.**

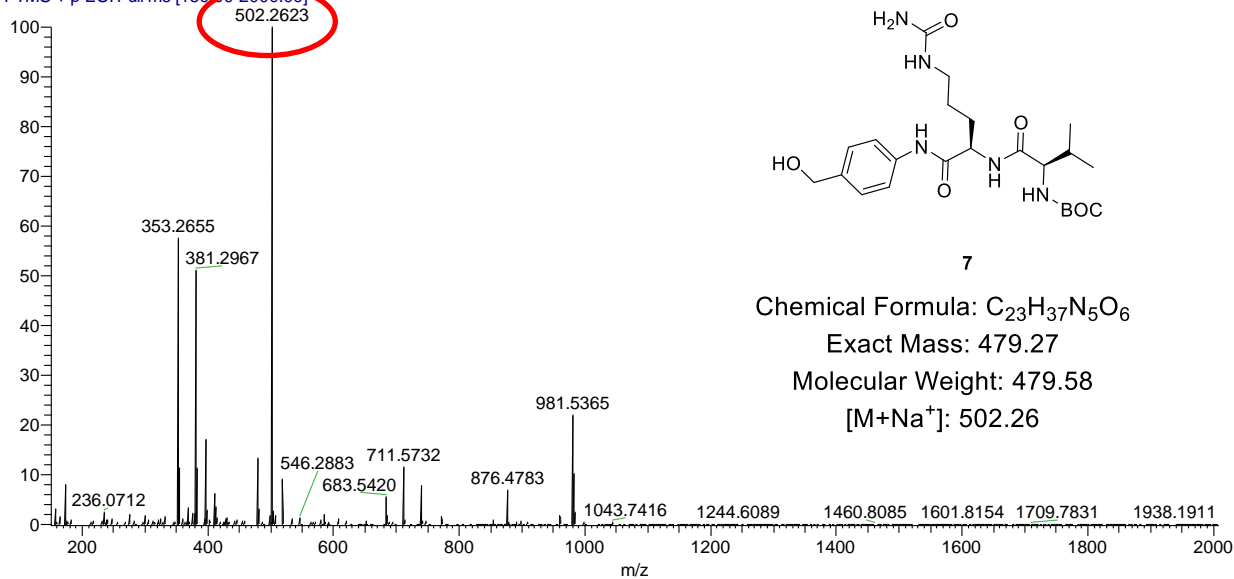
val\_cit\_190712123353 #3-5 RT: 0.04-0.07 AV: 3 NL: 1.23E8  
 T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]  
 397.2045



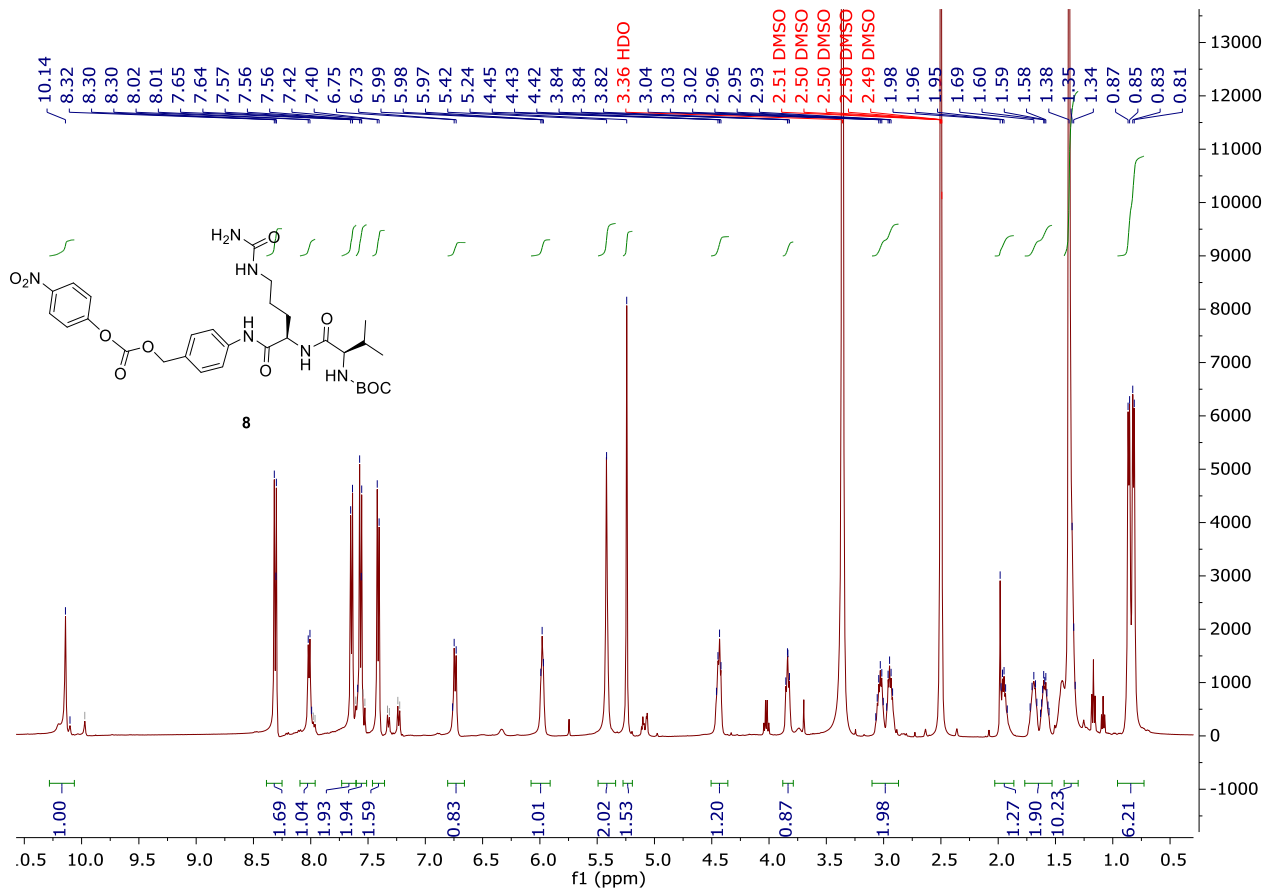
**HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 6.**



PABOH\_190712123353 #3-5 RT: 0.04-0.06 AV: 3 NL: 3.80E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

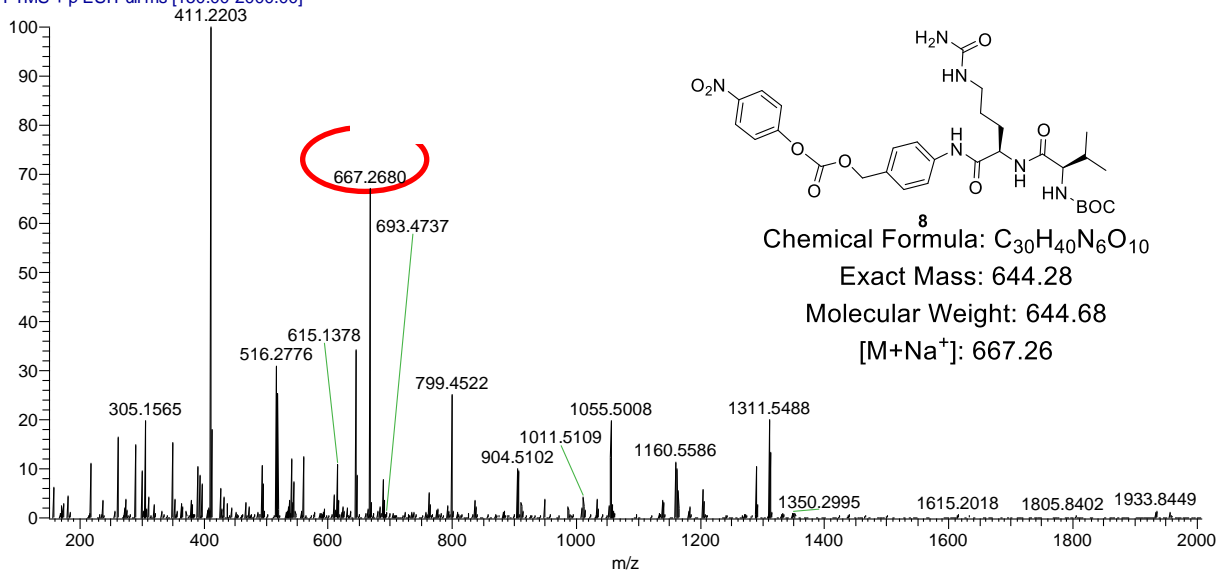


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 7.

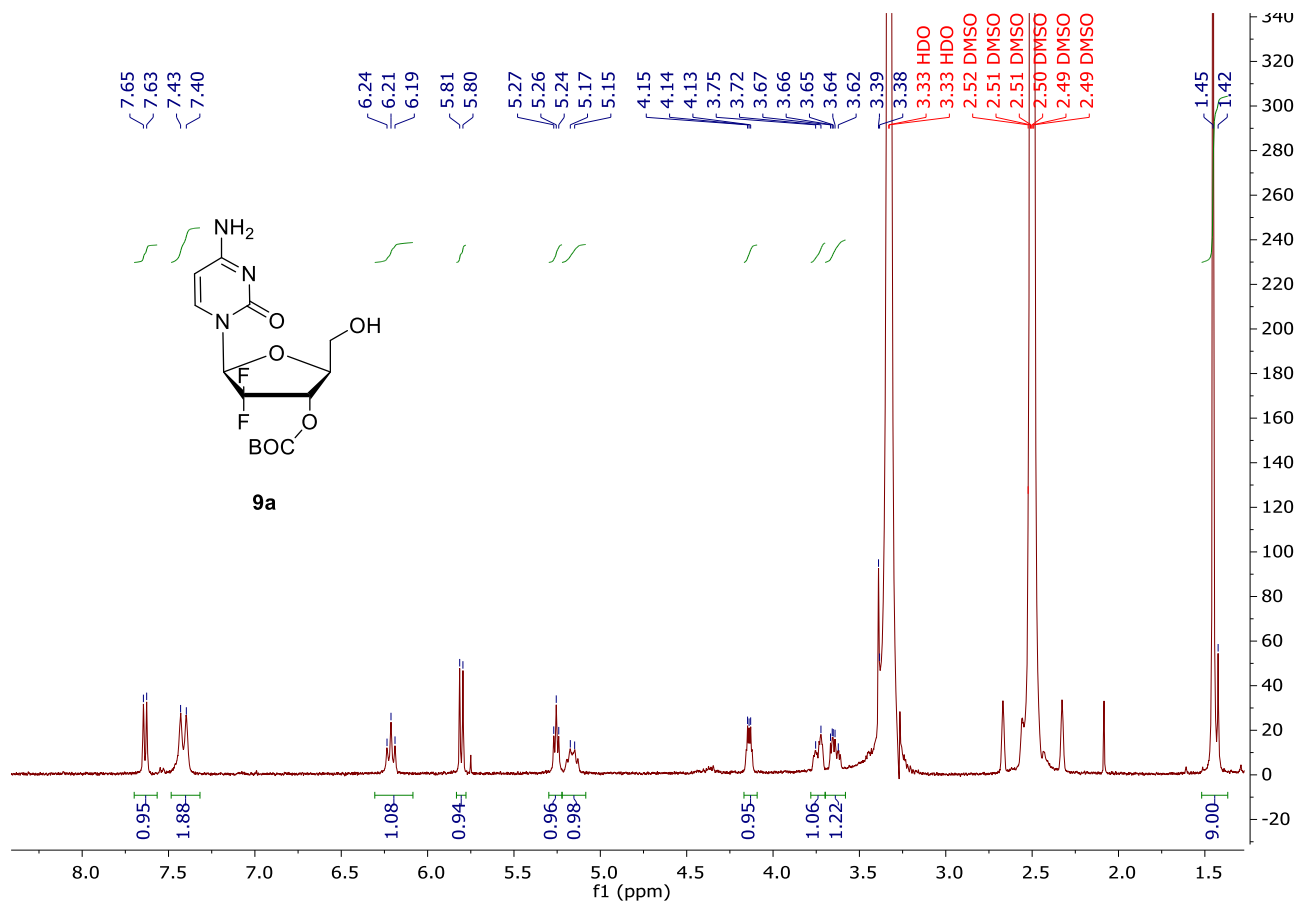


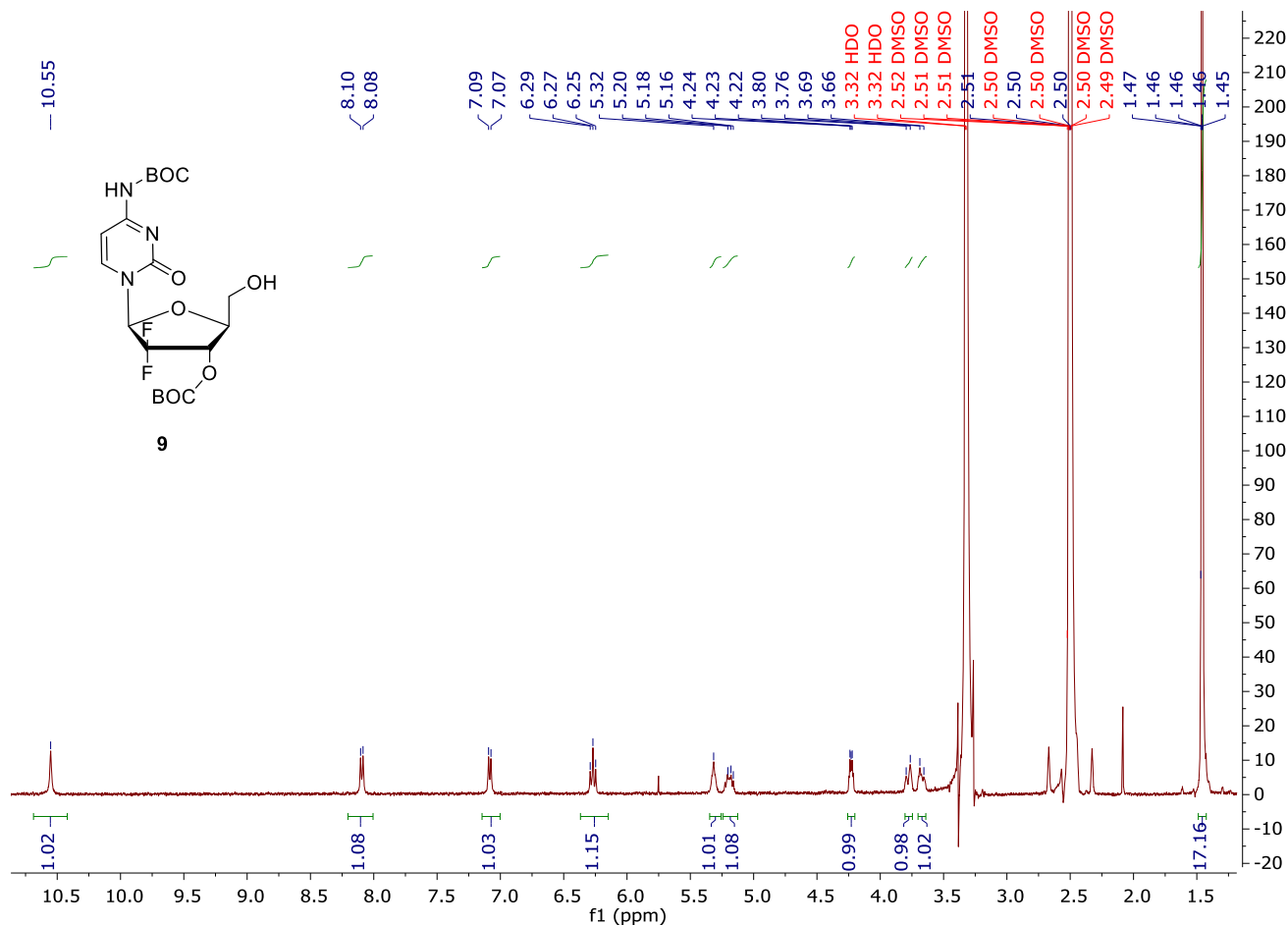
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) φάσμα της ένωσης 8.**

PNP\_190712123353 #5-8 RT: 0.07-0.11 AV: 4 NL: 2.40E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

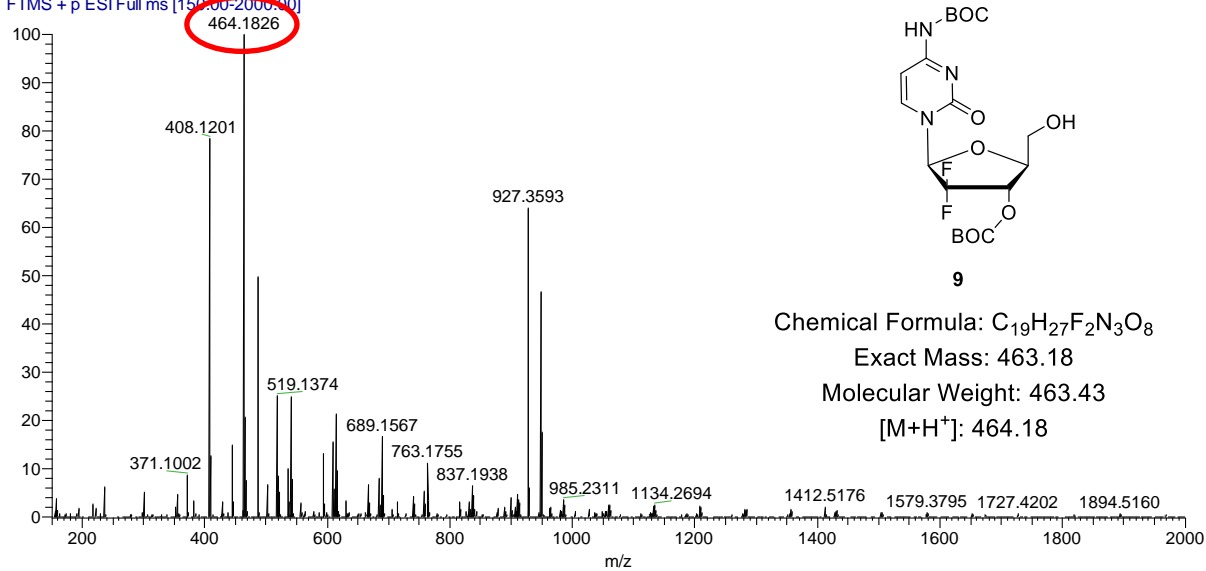


**HRMS/ESI φάσμα της ένωσης 8.**

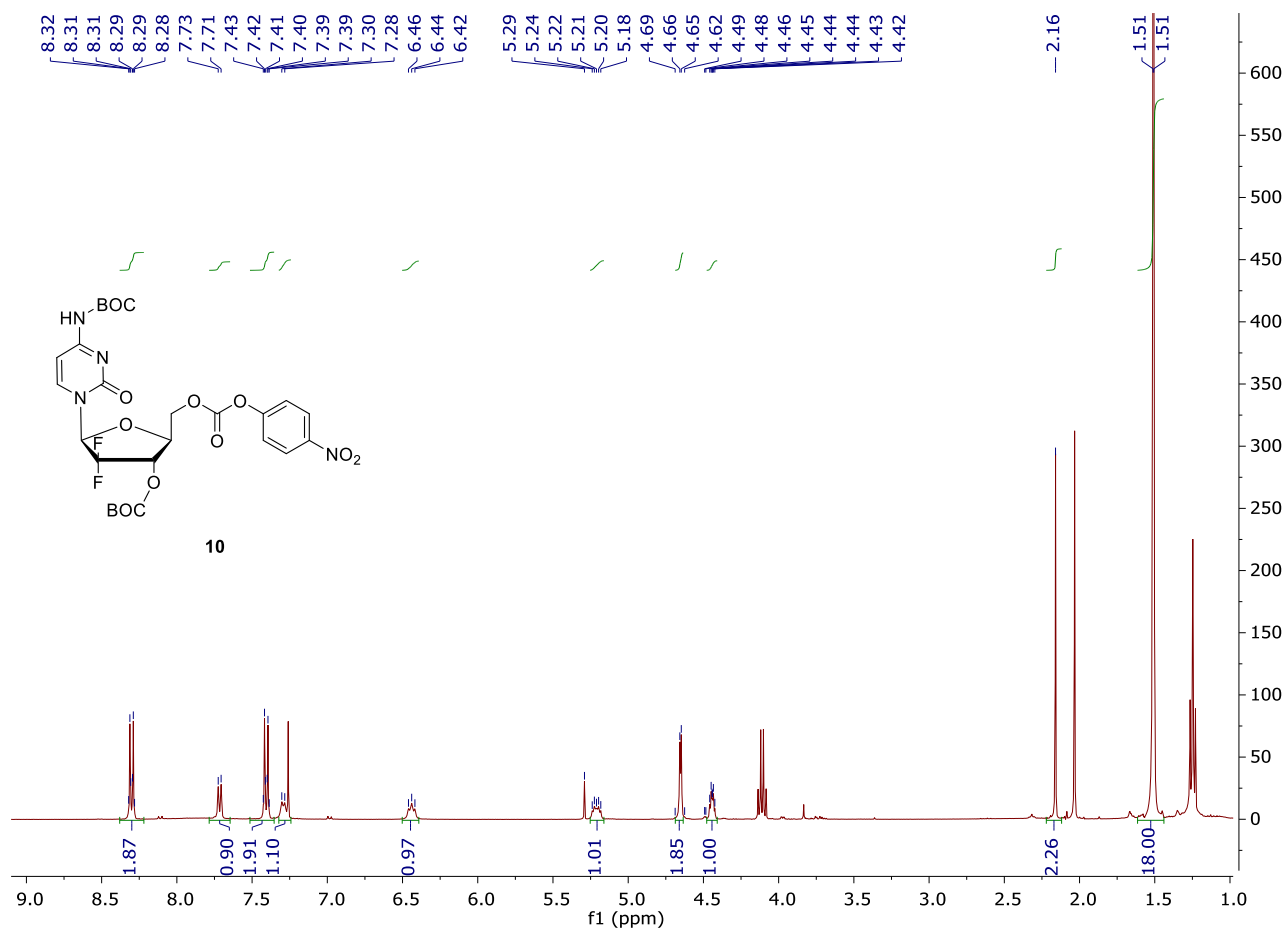




BX\_1\_89\_solution#1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 4.80E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

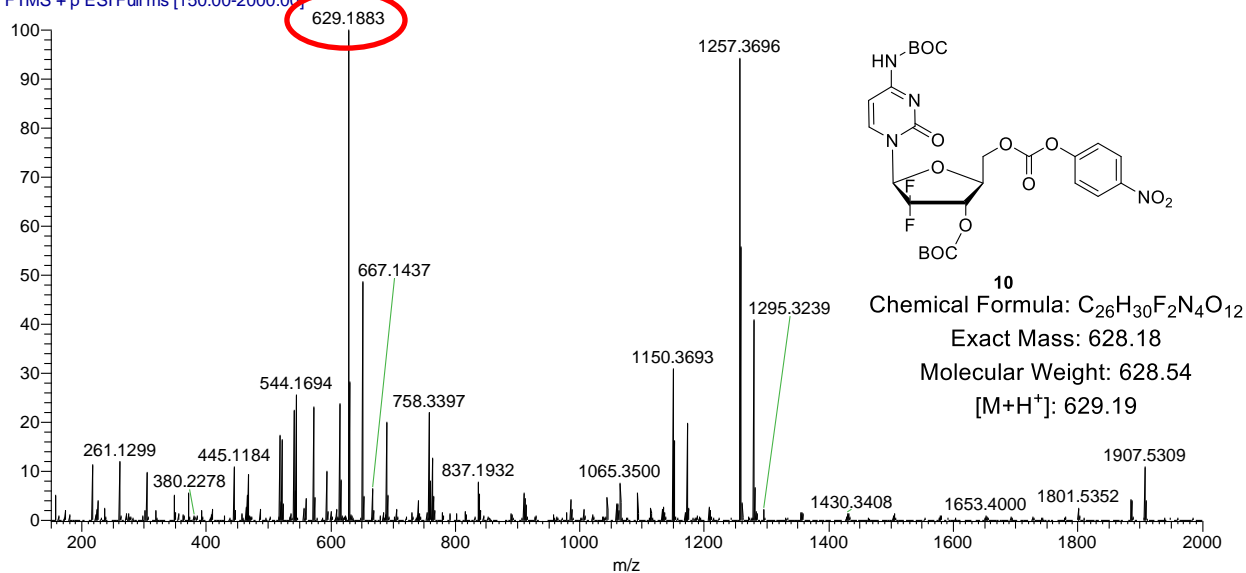




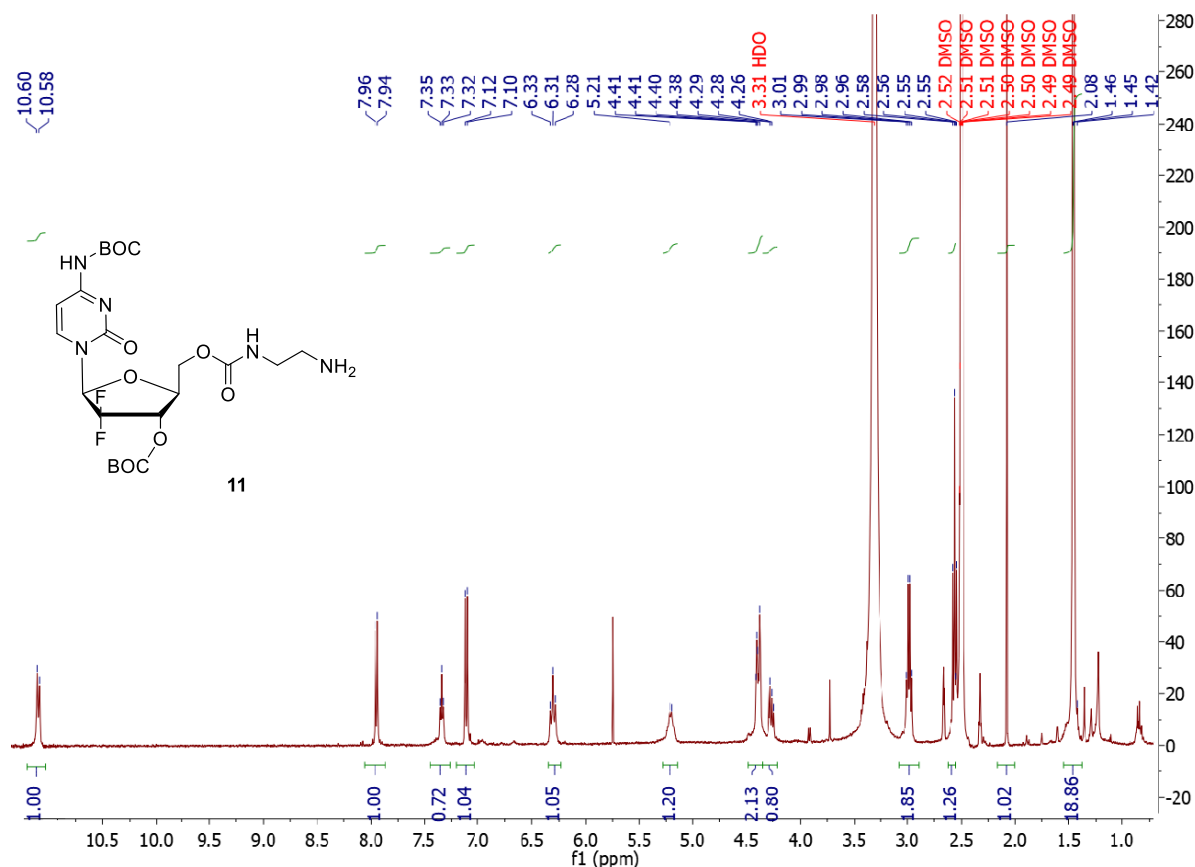


$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) φάσμα της ένωσης **10**.

BX1\_106\_200711110048 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.68E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



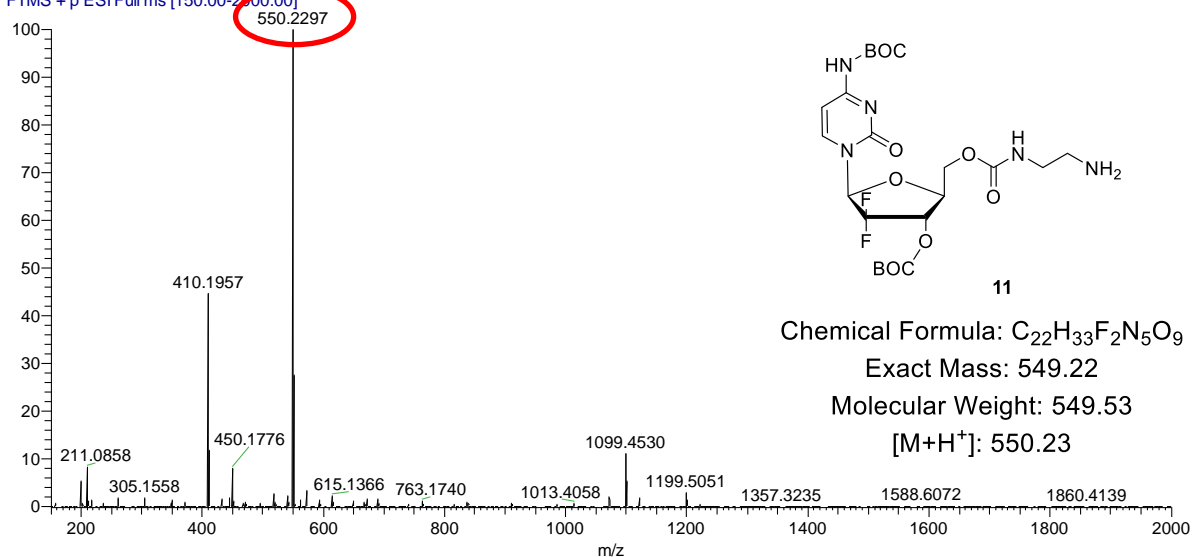
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **10**.



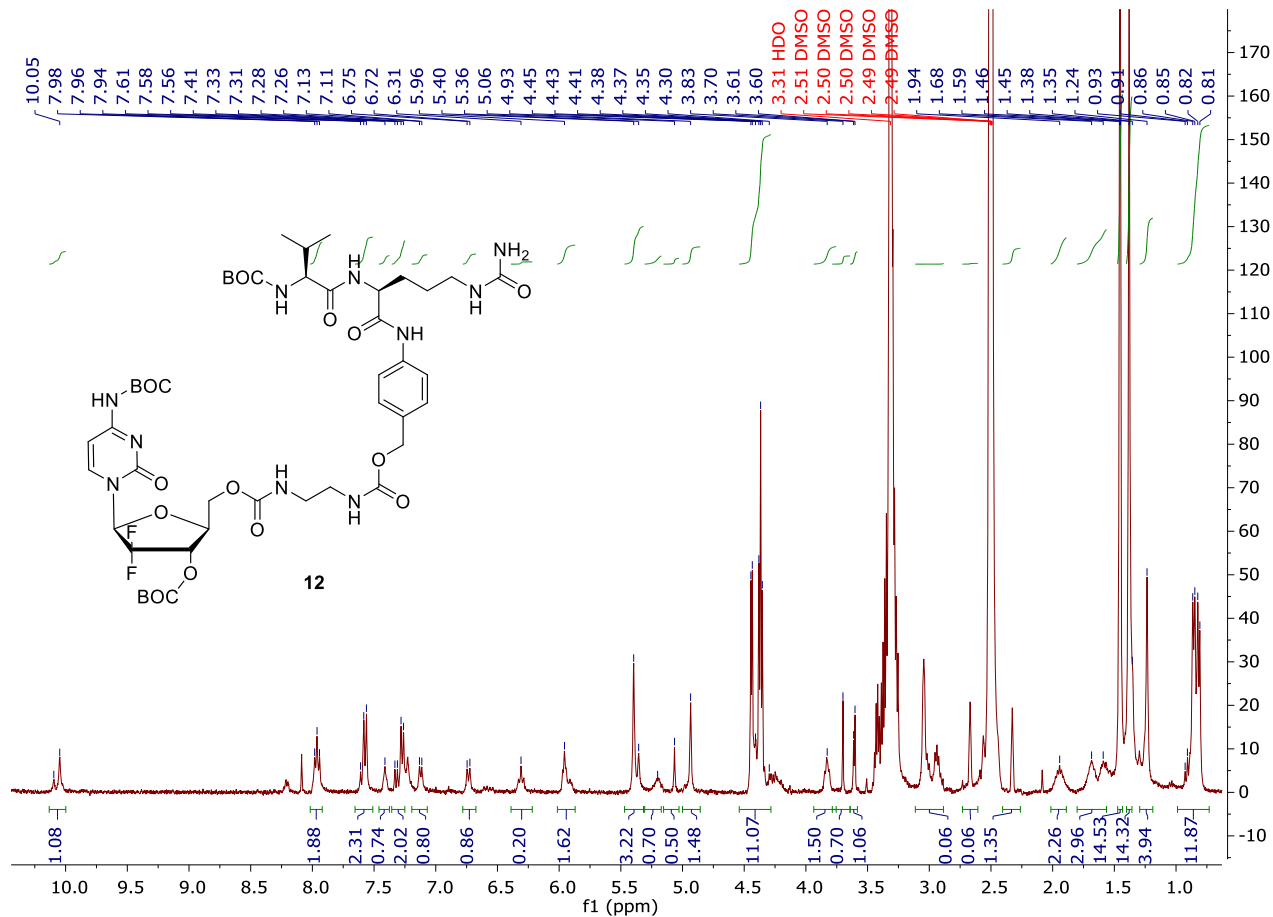
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) φάσμα της ένωσης **11**.

BX1\_173\_200711110048 #4 RT: 0.03 AV: 1 NL: 2.56E8

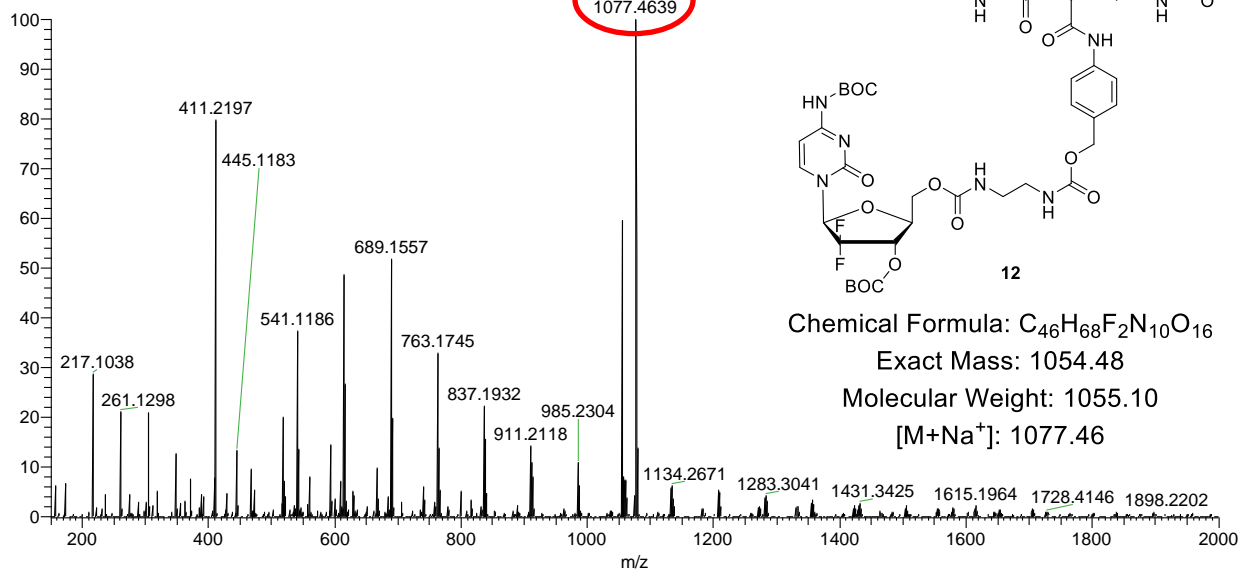
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

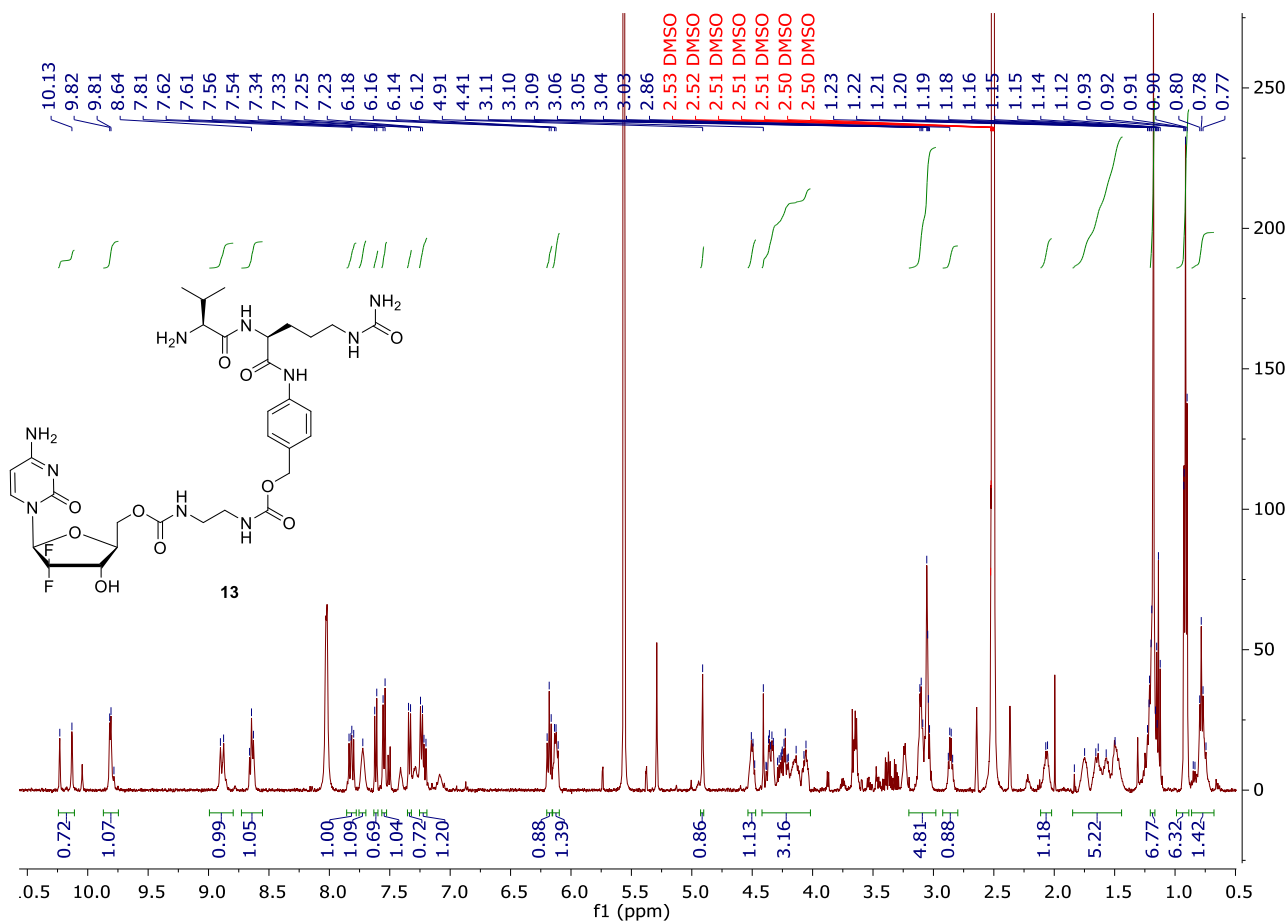


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **11**.



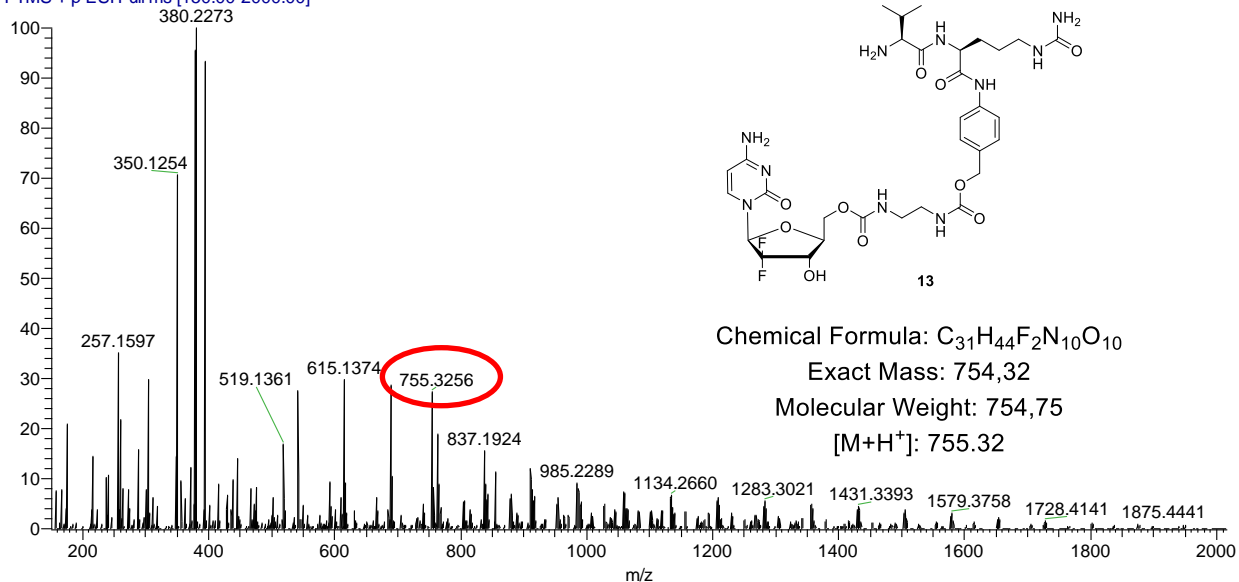
BX1\_178\_200711110048 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.28E7  
 T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



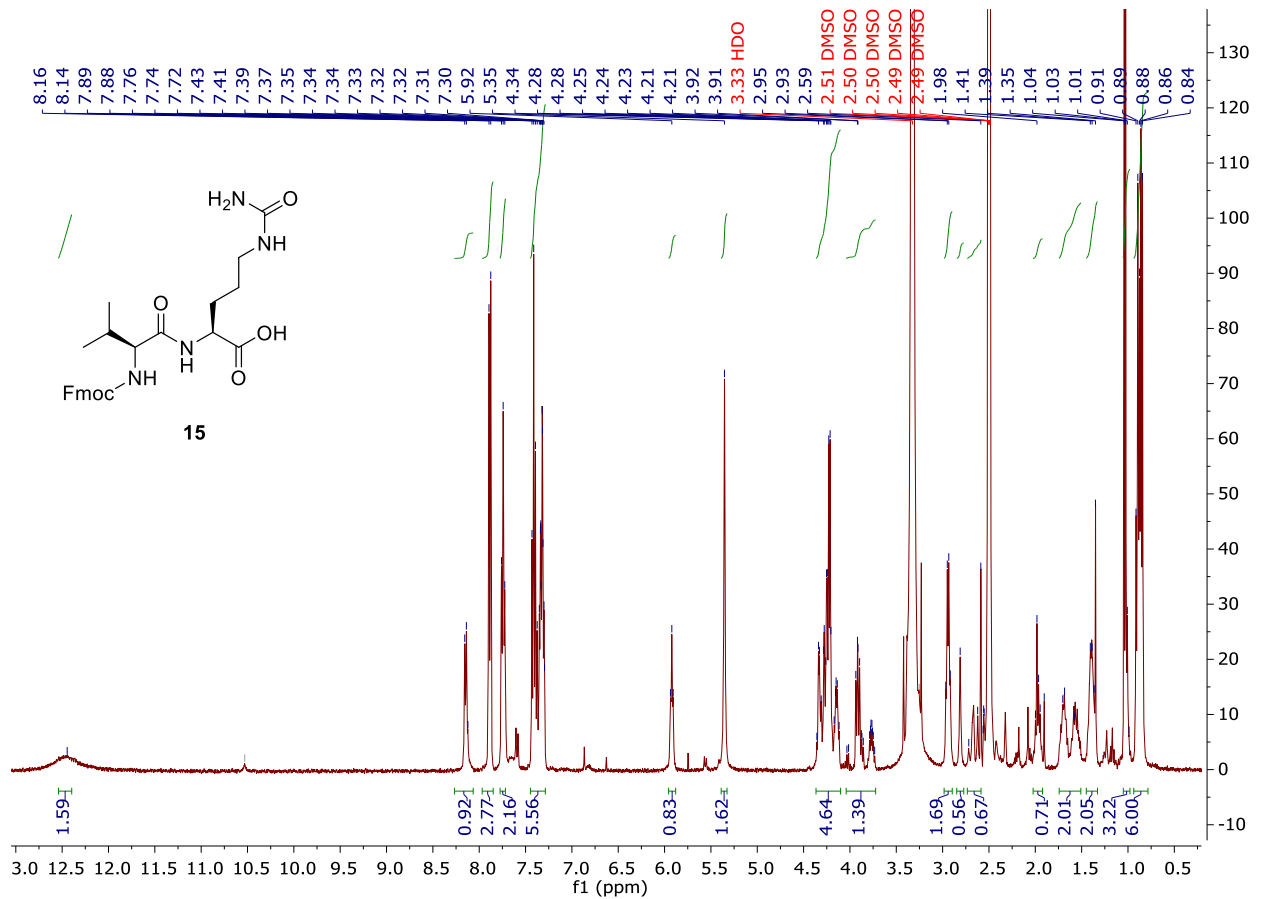


$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) φάσμα της ένωσης **13**.

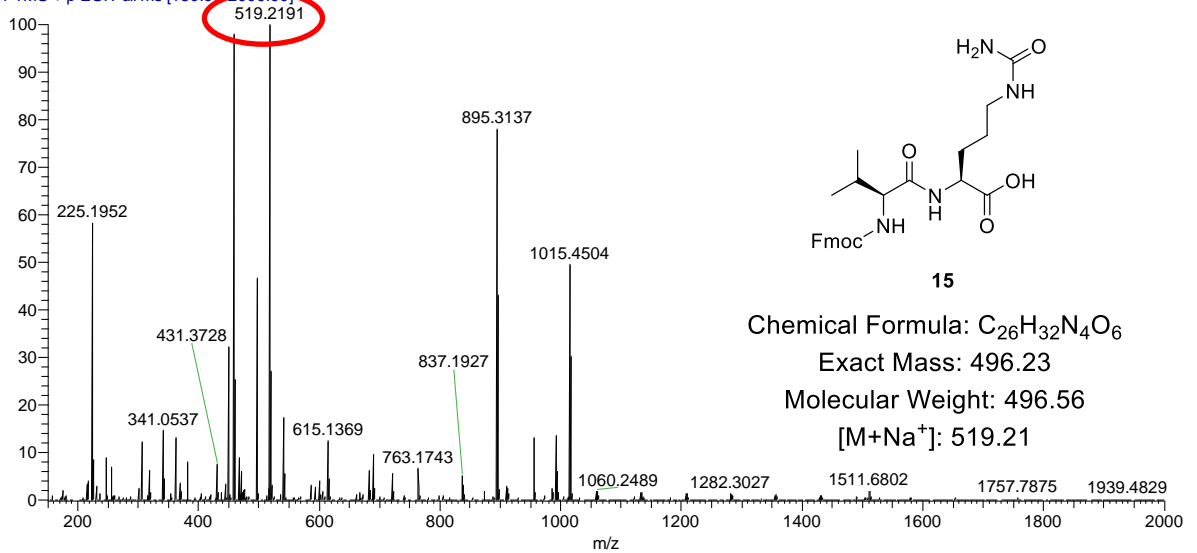
BX1\_179\_200711110048 #24-31 RT: 0.18-0.24 AV: 8 NL: 3.11E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

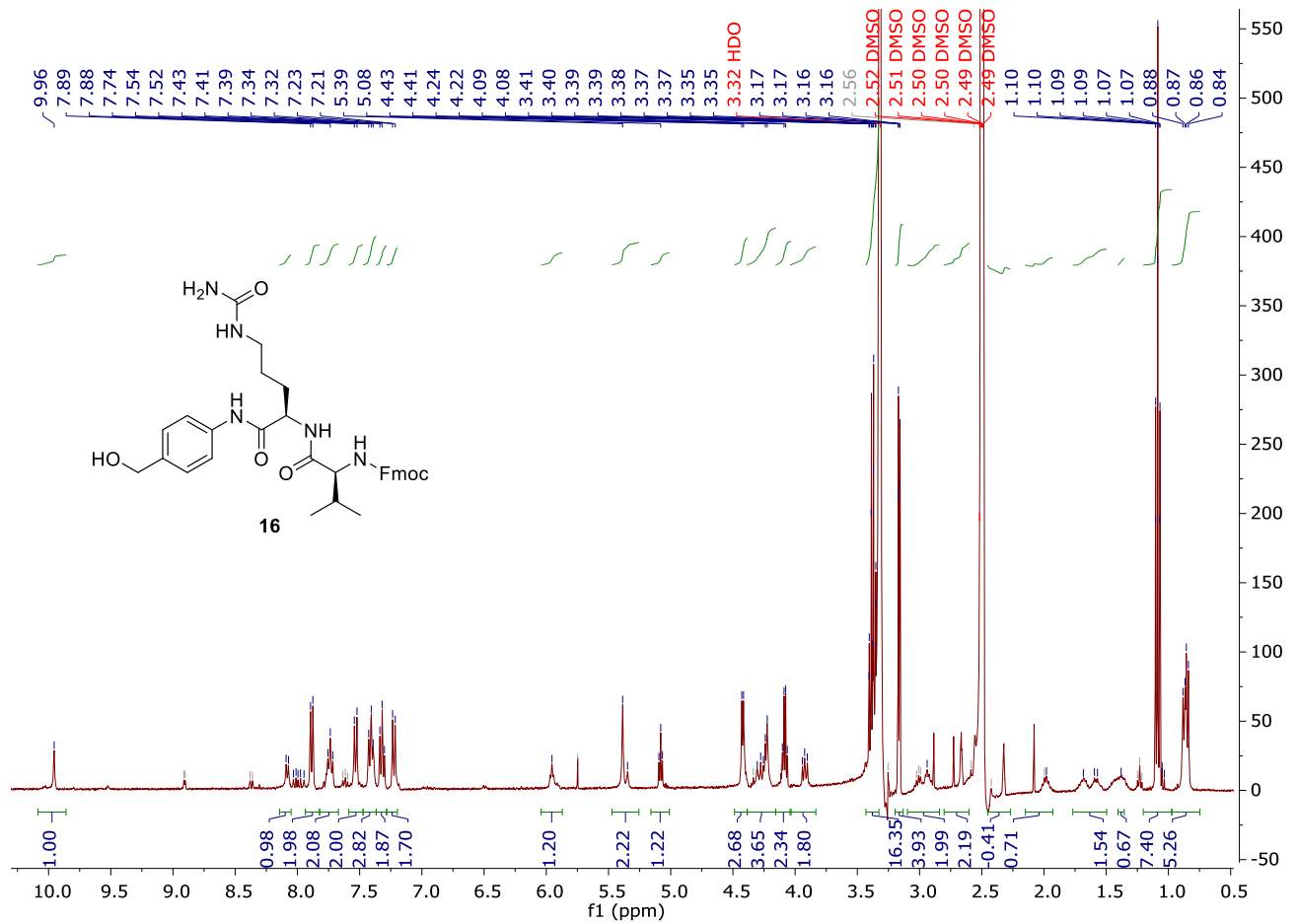


HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **13**.



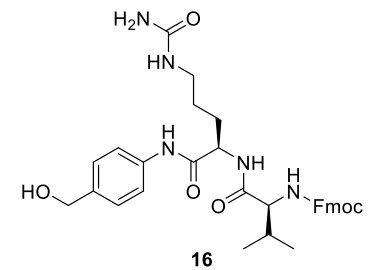
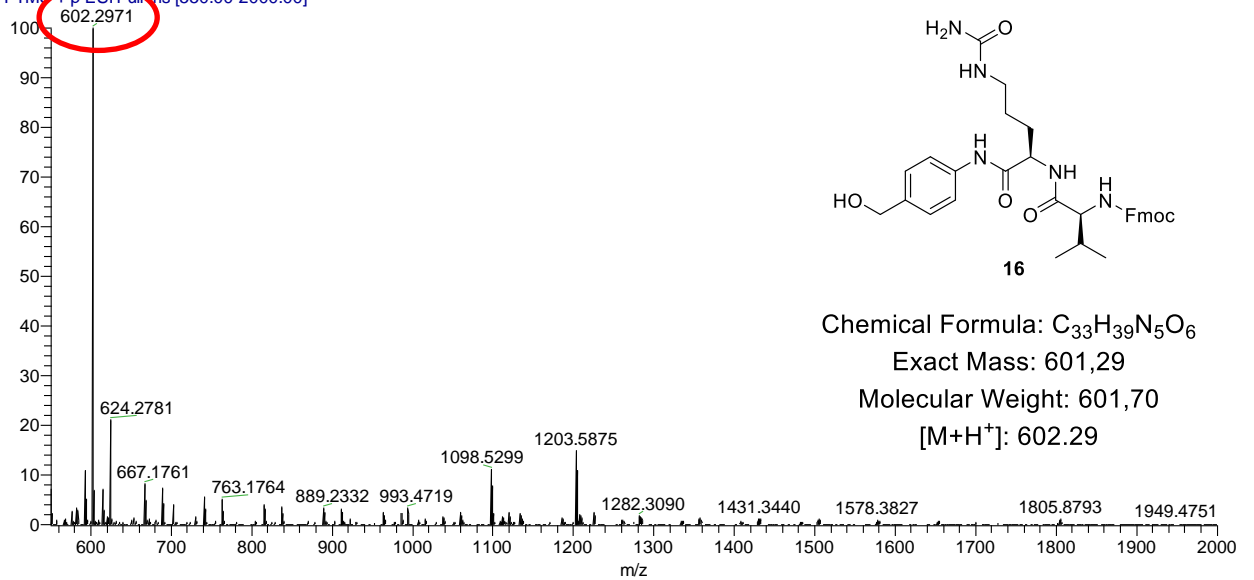
BX1\_100\_200711135727 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 3.47E7  
 T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



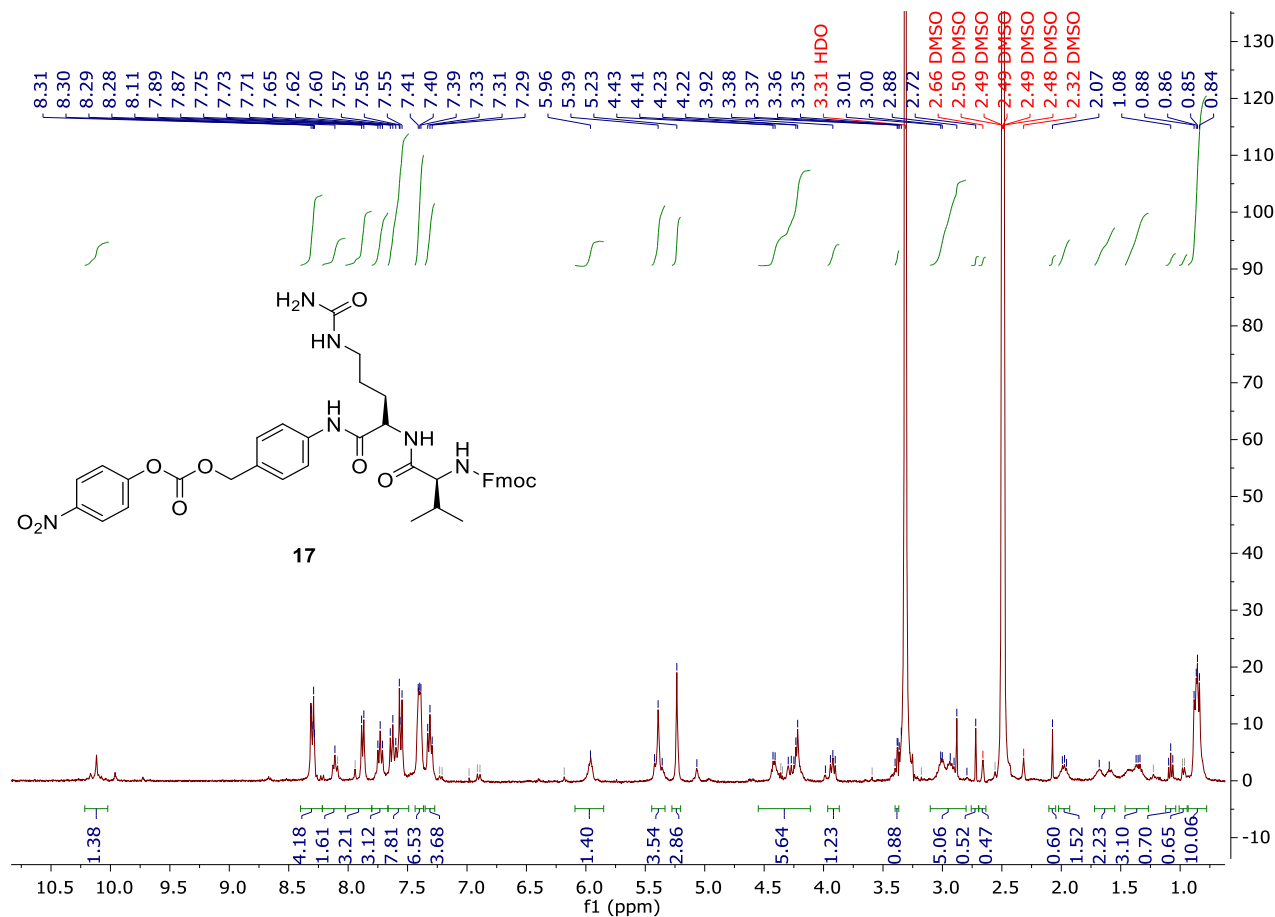


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) φάσμα της ένωσης **16**.**

BX1\_105\_200711135727 #3 RT: 0.04 AV: 1 NL: 2.50E7  
 T: FTMS # p ESI Full.ms [550.00-2000.00]

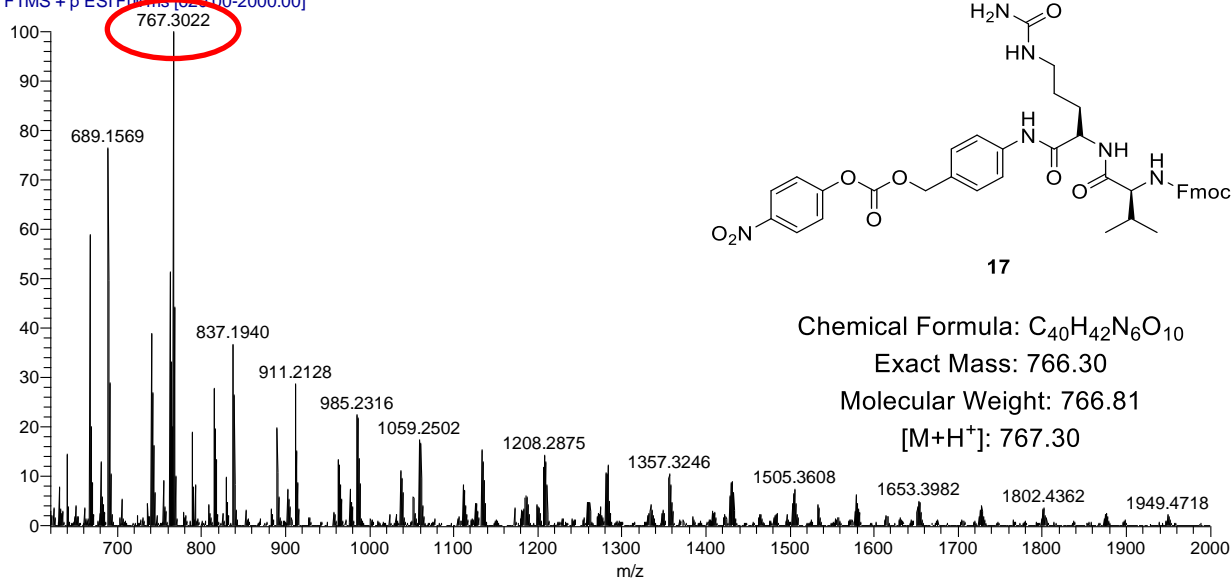


Chemical Formula: C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>  
 Exact Mass: 601,29  
 Molecular Weight: 601,70  
 [M+H<sup>+</sup>]: 602.29

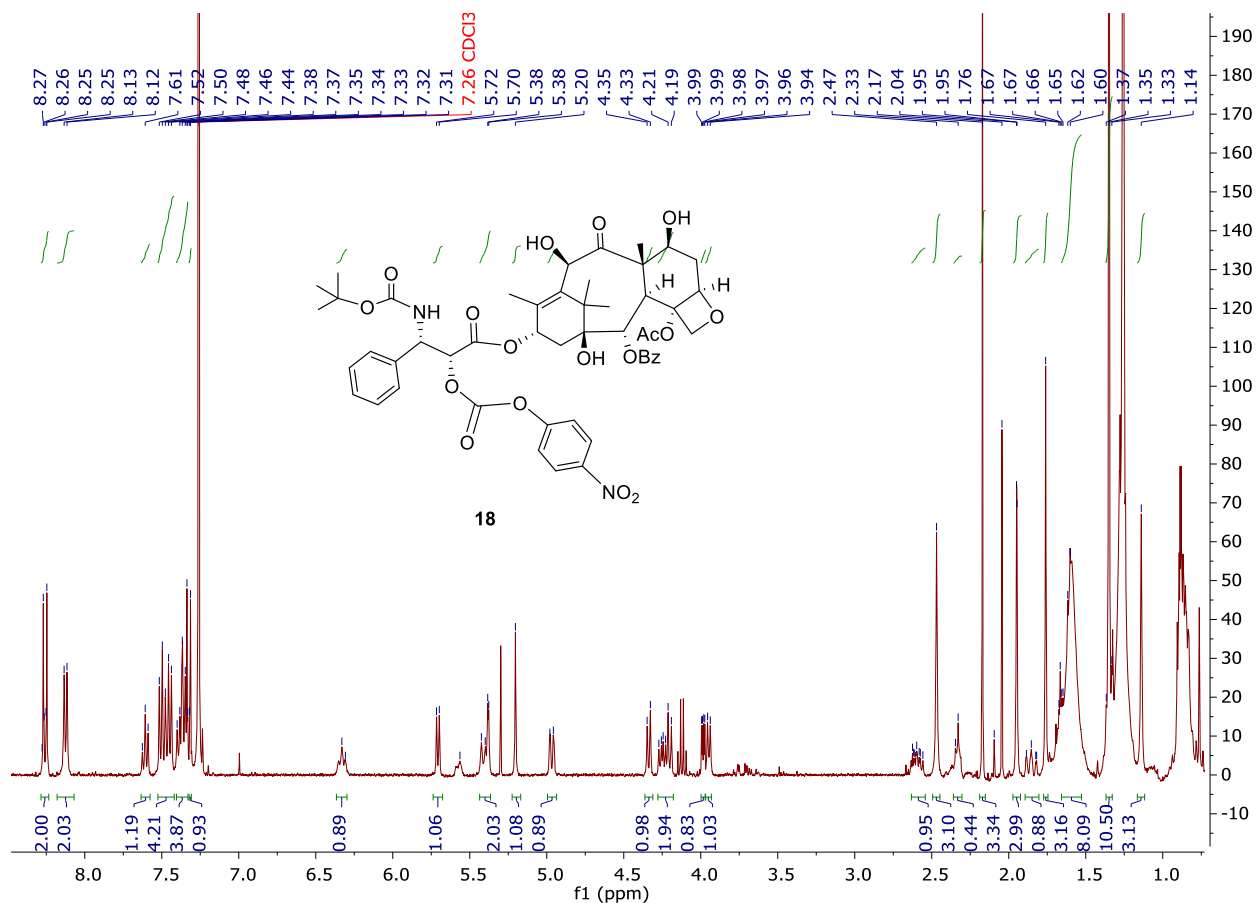


**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) φάσμα της ένωσης **17**.**

BX1\_116\_200711135727 #2 RT: 0.02 AV: 1 NL: 6.21E6  
T: FTMS + p ESI Full MS [620.00-2000.00]

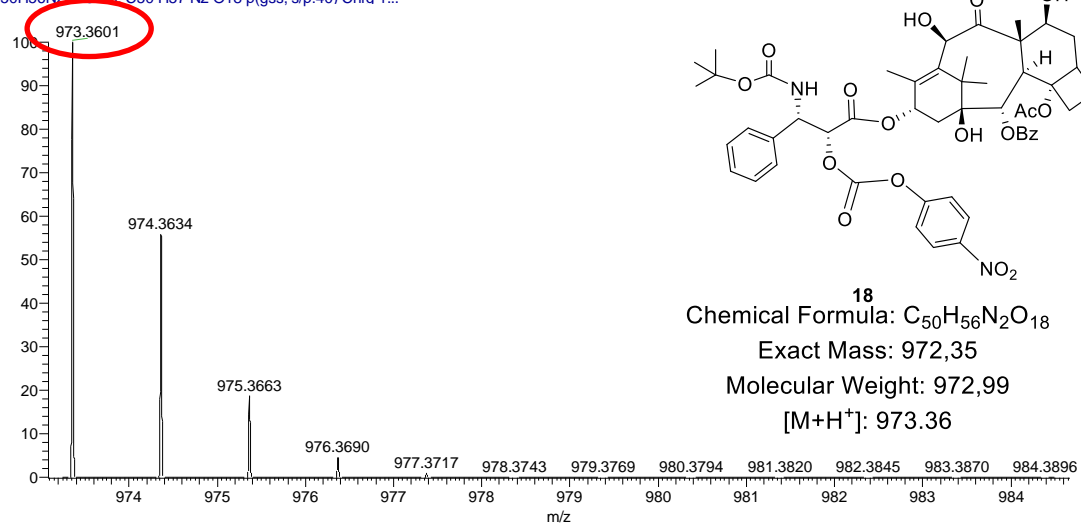


**HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **17**.**



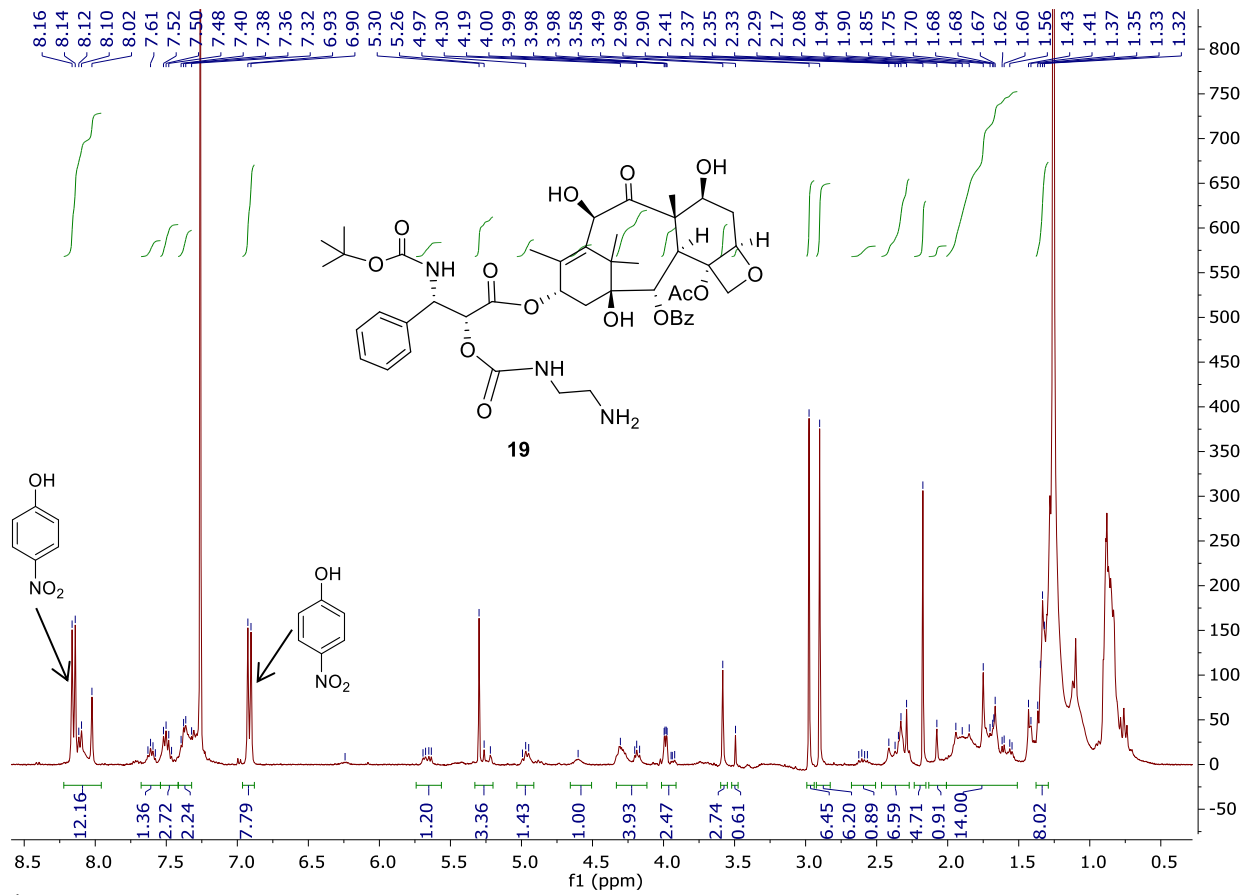
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) φάσμα της ένωσης **18**.

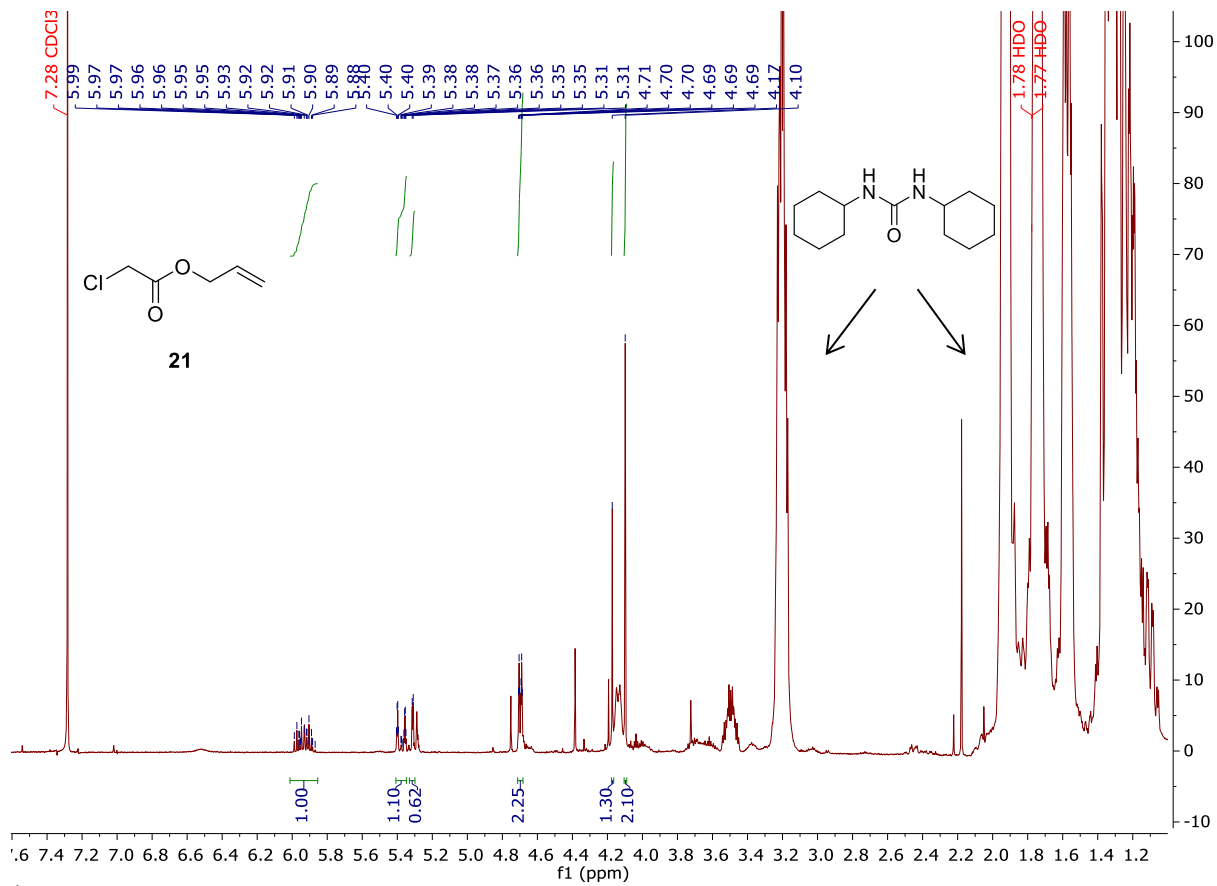
C50H56N2O18 -H: C50 H57 N2 O18 p(gss, s/p:40) Chra 1...



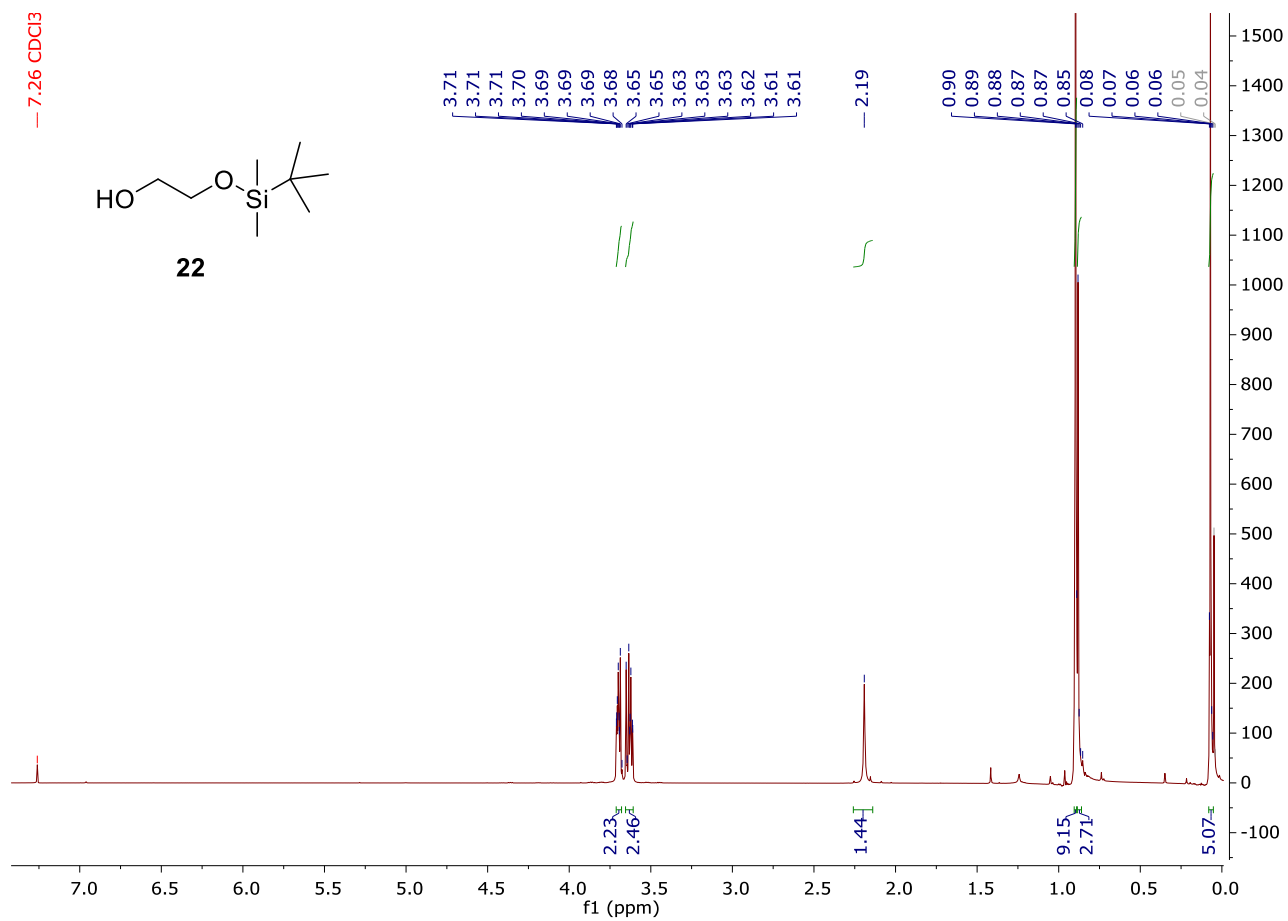
HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **18**.



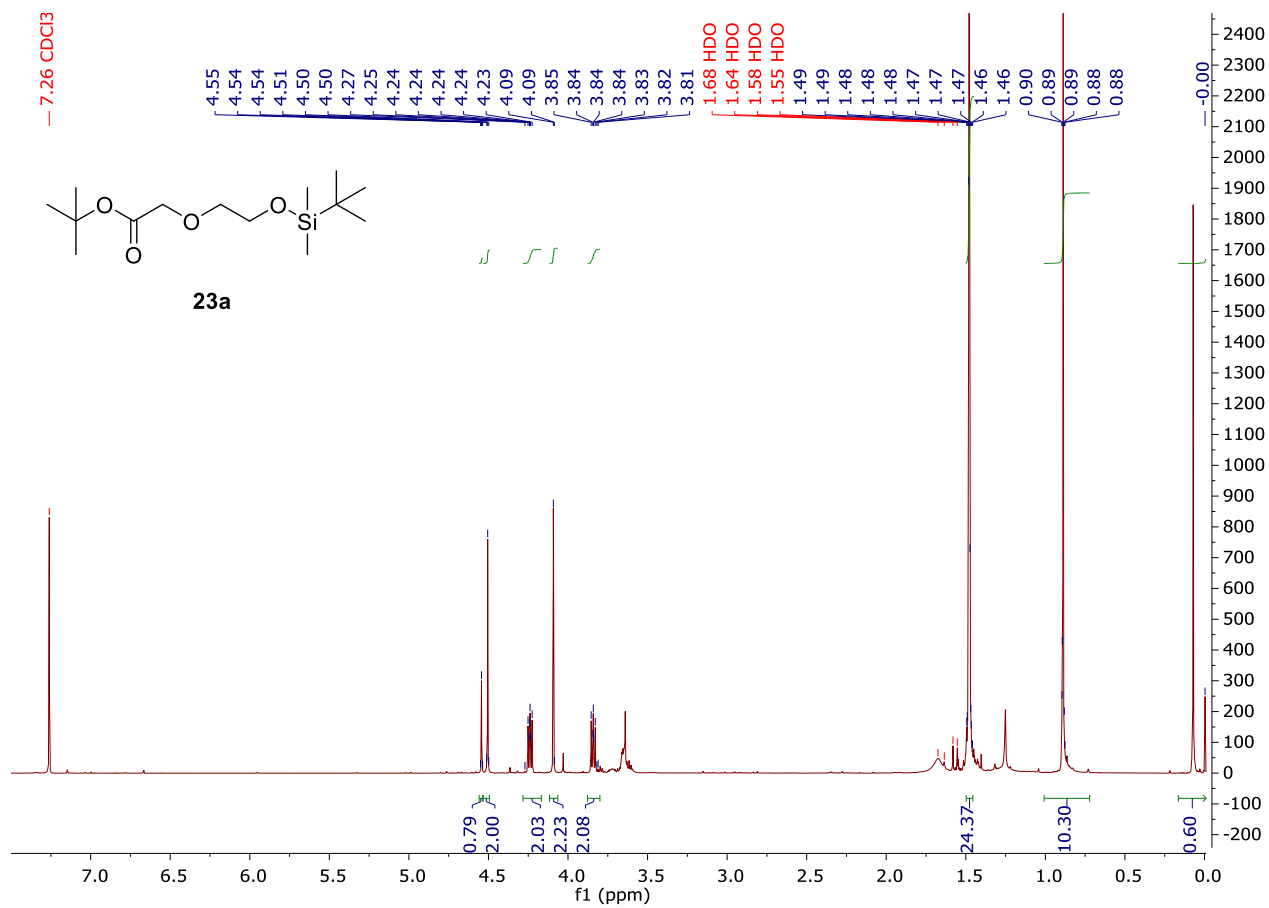




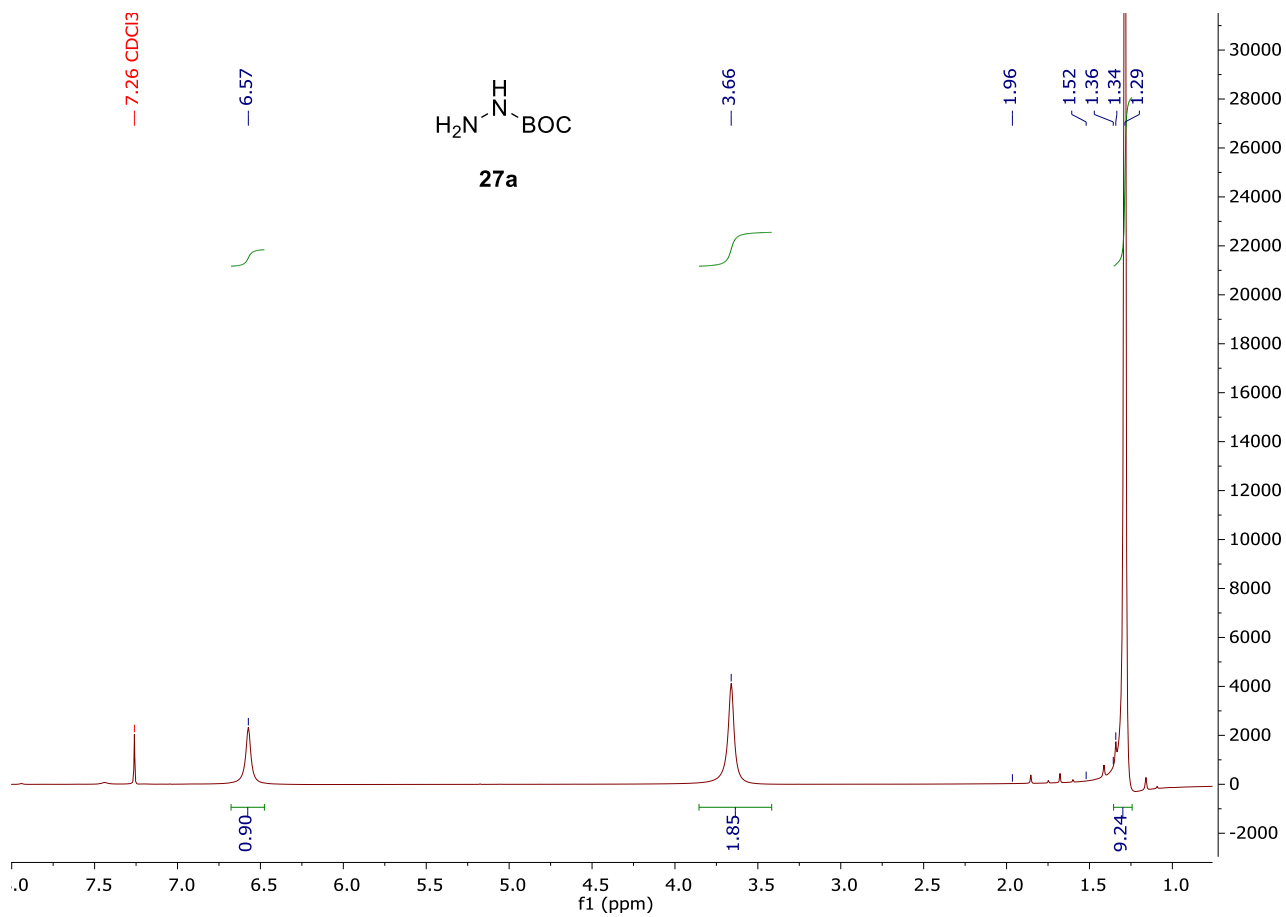
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) φάσμα της ένωσης **21**.



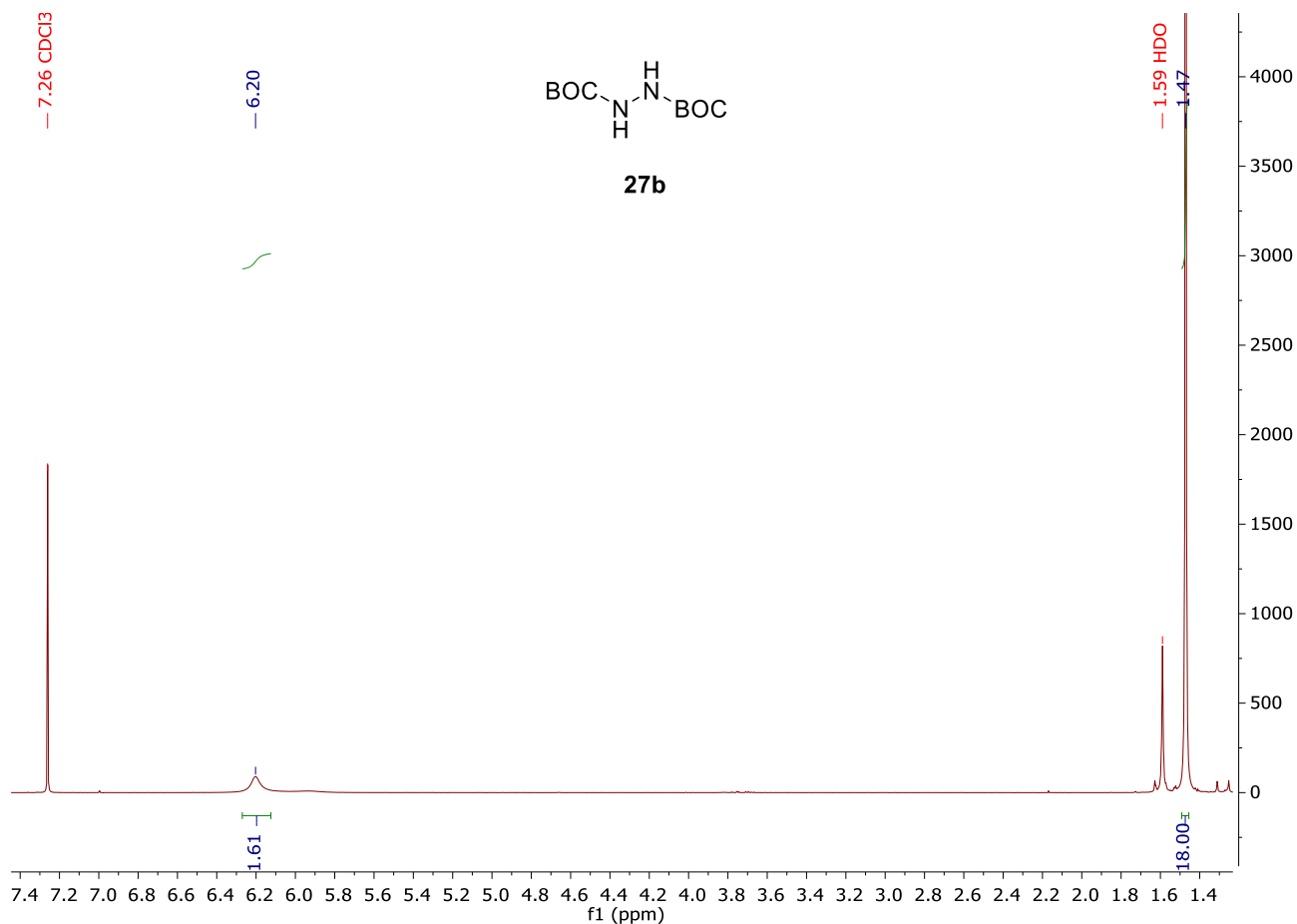
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) φάσμα της ένωσης **22**.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) φάσμα του μίγματος της ένωσης **23a**.

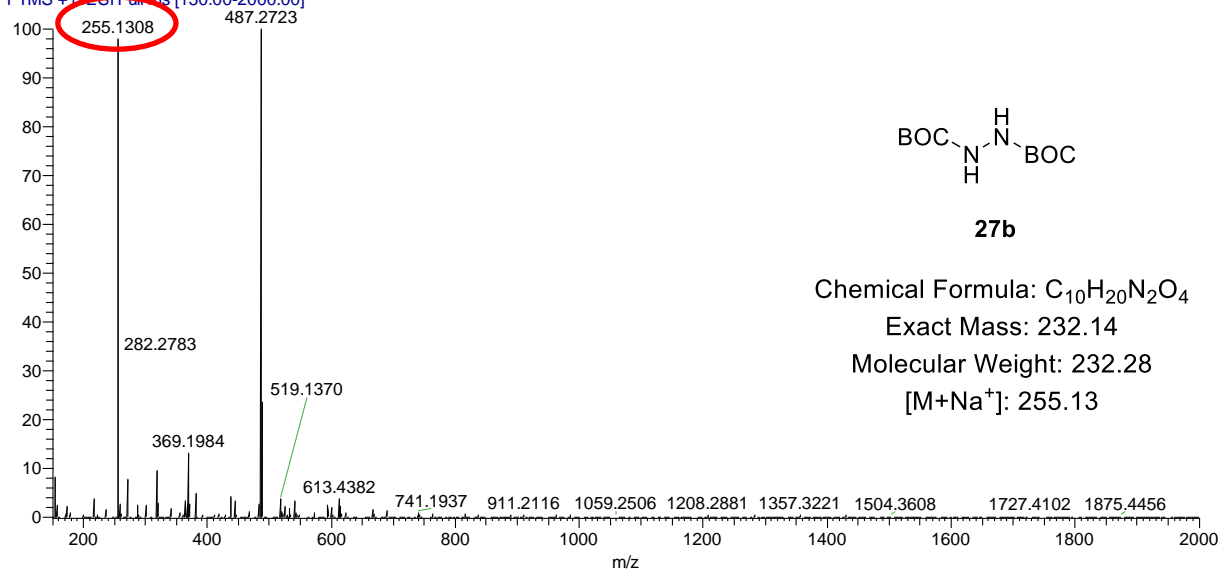


$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) φάσμα της ένωσης **27a**.



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) φάσμα της ένωσης **27b**.

BX1\_51\_200711134907 #3 RT: 0.04 AV: 1 NL: 9.80E7  
 T: FTMS + n ESI Full ms [150.00-2000.00]



HRMS/ESI φάσμα της ένωσης **27b**.



## Βιβλιογραφία

- (1) Boyle, J. Molecular Biology of the Cell, 5th Edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2008**, *36*, 317–318.
- (2) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- (3) 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.
- (4) Srinivasarao, M.; Low, P. S. Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12133–12164.
- (5) 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.
- (6) Chau, C. H.; Steeg, P. S.; Figg, W. D. Antibody–Drug Conjugates for Cancer. *Lancet* **2019**, *394*, 793–804.
- (7) 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.
- (8) Rhodes, C. A.; Pei, D. Bicyclic Peptides as Next-Generation Therapeutics. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 12690–12703.
- (9) Li, C.; Wallace, S. Polymer-Drug Conjugates: Recent Development in Clinical Oncology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 886–898.
- (10) 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.
- (11) Świdarska, K.; Szlachcic, A.; Opaliński, Ł.; Zakrzewska, M.; Otlewski, J. FGF2 Dual Warhead Conjugate with Monomethyl Auristatin E and  $\alpha$ -Amanitin Displays a Cytotoxic Effect towards Cancer Cells Overproducing FGF Receptor 1. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2098.
- (12) 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.
- (13) 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.



- (14) 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.
- (15) Karampelas, 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.
- (16) LiverTox: Clinical and Research Information on Drug- Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Docetaxel. **2018**, No. Md, 1–7.
- (17) Lyseng-Williamson, K. A.; Fenton, C. Docetaxel. *Drugs* **2005**, *65*, 2513–2531.
- (18) Rang, H.; Dale, M.; Ritter, M.; Flower, R.; Henderson, G. . *Hyde, M. Rang and Dale's Pharmacology*. **012**.
- (19) Benhabbour, R.; Feng; Wu; Ma; Mumper, R. Development and Optimization of Oil-Filled Lipid Nanoparticles Containing Docetaxel Conjugates Designed to Control the Drug Release Rate in Vitro and in Vivo. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, 2545.
- (20) Onimura, K.; Matsushima, M.; Nakamura, M.; Tominaga, T.; Yamabuki, K.; Oishi, T. Synthesis and Fluorescent Properties of Model Compounds for Conjugated Polymer Containing Maleimide Units at the Main Chain. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2011**, *49*, 3550–3558.
- (21) Dubernet, M.; Caubert, V.; Guillard, J.; Viaud-Massuard, M. C. Synthesis of Substituted Bis(Heteroaryl)Maleimides. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4585–4593.
- (22) Choi, D. S.; Huang, S.; Huang, M.; Barnard, T. S.; Adams, R. D.; Seminario, J. M.; Tour, J. M. Revised Structures of N-Substituted Dibrominated Pyrrole Derivatives and Their Polymeric Products. Termaleimide Models with Low Optical Band Gaps. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2646–2655.
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) Belleau, B.; Malek, G. New Convenient Reagent for Peptide Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1651–1652.
- (26) Guo, Z.; Gallo, J. M. Selective Protection of 2',2'-Difluorodeoxycytidine (Gemcitabine). *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8319–8322.
- (27) Wohl, A. R.; Michel, A. R.; Kalscheuer, S.; Macosko, C. W.; Panyam, J.; Hoye, T. R. Silicate Esters of Paclitaxel and Docetaxel: Synthesis, Hydrophobicity,

- Hydrolytic Stability, Cytotoxicity, and Prodrug Potential. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2368–2379.
- (28) De Groot, F. M. H.; Van Berkomp, L. W. A.; Scheeren, H. W. Synthesis and Biological Evaluation of 2'-Carbamate-Linked and 2'-Carbonate-Linked Prodrugs of Paclitaxel Selective Activation by the Tumor-Associated Protease Plasmin. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3093–3102.
- (29) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP®: A New Peptide Coupling Reagent Devoid of Toxic by-Product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
- (30) 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.
- (31) Robert, C.; De Montigny, F.; Thomas, C. M. Facile and Efficient Synthesis of Cyclic Anhydrides from Dicarboxylic Acids. *ACS Catal.* **2014**, *4*, 3586–3589.
- (32) Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. Protection of Hydroxyl Groups as Tert-Butyldimethylsilyl Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190–6191.
- (33) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; **2006**.
- (34) 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.
- (35) 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.
- (36) Lee, J. B. Preparation of Acyl Halides under Very Mild Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3440–3441.
- (37) Frøyen, P. The Conversion of Carboxylic Acids into Amides via NCS/Triphenylphosphine. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 959–968.
- (38) Paul, R.; Anderson, G. W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4596–4600.
- (39) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- (40) Guibé, F. Allylic Protecting Groups and Their Use in a Complex Environment Part II: Allylic Protecting Groups and Their Removal through Catalytic Palladium  $\pi$ -Allyl Methodology. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2967–3042.
- (41) 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.

- (42) Bredihhin, A.; Mäeorg, U. Effective Strategy for the Systematic Synthesis of Hydrazine Derivatives. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6788–6793.
- (43) Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923–2925.