



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΜΣ  
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»**

**ΟΞΙΝΔΟΛΙΚΑ ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ  
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΦΑΡΜΑΚΟΥ ΤΗΣ  
ΣΟΥΝΙΤΙΝΙΜΠΗΣ SAP-S-S-Py**

**ΡΑΦΤΗ ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ**

Επιβλέπων καθηγητής: ΠΕΡΙΚΛΗΣ ΠΑΠΠΑΣ  
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήματος Ιατρικής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΜΣ  
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)»**

**ΟΞΙΝΔΟΛΙΚΑ ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΑΙ  
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΦΑΡΜΑΚΟΥ ΤΗΣ  
ΣΟΥΝΙΤΙΝΙΜΠΗΣ SAP-S-S-Py**

**ΡΑΦΤΗ ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ**

Επιβλέπων καθηγητής: ΠΕΡΙΚΛΗΣ ΠΑΠΠΑΣ  
Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήματος Ιατρικής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

ΡΑΦΤΗ ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ

**Οξινδολικά Αντιαγγειογενετικά Μόρια και Κυτταροτοξικότητα του  
προφαρμάκου της Σουνιτινίμπης SAP-S-S-Py.**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ

21/01/2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΕΡΙΚΛΗΣ ΠΑΠΠΑΣ, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Παν/μιο  
Ιωαννίνων.....(Επιβλέπων)

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΛΕΟΝΤΑΡΙΤΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο  
Φαρμακολογίας, Παν/μιο Ιωαννίνων.....(Μέλος)

ΠΑΤΡΩΝΑ ΒΕΖΥΡΑΚΗ-ΑΓΓΕΛΙΔΟΥ, Δ/ντρια - Καθηγήτρια Φυσιολογίας & Δ/ντρια του  
ΠΜΣ Βασικών Βϊοιατρικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Παν/μιο Ιωαννίνων  
.....(Μέλος)

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την περίοδο 2020-2021 στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Περικλή Παππά.

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

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή κ. **Περικλή Παππά** για την αποδοχή ένταξής μου στο εργαστήριο 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, όπως επίσης και για τα εποικοδομητικά του σχόλια που ήταν καθοριστικά για την επιτυχή ολοκλήρωση της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής, κ. **Γεώργιο Λεονταρίτη**, για τη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε στο εργαστήριο, όπως και την συνεπιβλέπουσα διευθύντρια - καθηγήτρια κ. **Πατρώνα Βεζυράκη-Αγγελίδου** για τη συνεχή υποστήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια του ΠΜΣ και την προθυμία να συμμετάσχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου διδάκτορες, υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς και διπλωματικούς για την άψογη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα και τη βοήθεια τους στο εργαστήριο.

Θα ήθελα να εκφράσω την ικανοποίηση και ευγνωμοσύνη μου για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας μου σε αυτό το εργαστήριο, καθώς συντέλεσε στη διεύρυνση της επιστημονικής μου γνώσης στον πεδίο που επέλεξα να ειδικευτώ.

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

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract.....	9
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
1.1 Εισαγωγή.....	11
1.1.1 Σκοπός και Υπόβαθρο της μελέτης.....	11
2.1 Καρκίνος.....	13
2.1.1 Αγγειογένεση.....	15
2.1.2 Διήθηση και Μετάσταση.....	17
2.2 Υποδοχείς με Δράση Κινάσης Τυροσίνης.....	22
3.1 Βασικές Αρχές Σχεδιασμού Στοχευτικών Συζευγμάτων.....	24
3.1.1 Μηχανισμός Ενδοκυττάρωσης Συζευγμάτων μέσω Υποδοχέων.....	25
3.2 Δραστική Ουσία: Σουνιτινίμη – Sunitinib.....	28
3.2.1 Σουνιτινίμη και Στοχευτικά Συζεύγματα.....	31
4.1 SAP: Νέο Δραστικό Ανάλογο της Σουνιτινίμης (Sunitinib).....	34
4.1.1 Συνθετική οδός.....	36
4.1.2 In silico και in vitro ανάλυση.....	37
4.1.3 Φαρμακοκινητική αξιολόγηση.....	39
4.1.4 In vivo ανάλυση.....	40
4.1.5 Ιστολογική και μοριακή διερεύνηση.....	43
4.1.6 Αξιολόγηση τοξικότητας.....	46
4.1.7 In vivo αντικαρκινική αποτελεσματικότητα σε συγγενικά ζωικά μοντέλα καρκίνου του μαστού (BrCa).....	47
5.1 Στρατηγικές Σχεδιασμού Στοχευτικών Συζευγμάτων του SAP.....	49
5.1.1 Σύνθεση του SAP.HCL.....	50
5.1.2 Σύνθεση Δισουλφιδικής Γέφυρας SAP-S-S-Py.....	51
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	53
1. Εισαγωγή- Σκοπός μελέτης.....	54
2.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	55
2.1.1 Συνθήκες Καλλιέργειας Κυττάρων.....	55
2.1.2 Καρκινική Κυτταρική Σειρά.....	55
2.1.3 Απόψυξη κυττάρων.....	56
2.1.4 Επανακαλλιέργεια των κυττάρων.....	57

2.1.5 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer .....	58
2.1.6 Αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο (Κρυοσυντήρη).....	59
2.1.7 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφοροδαμίνης Β (SRB).....	60
2.1.8 Φαρμακολογικοί Χειρισμοί .....	62
2.1.9 Στατιστική Ανάλυση .....	62
3.1 Αποτελέσματα- Συζήτηση .....	63
3.1.1 Αξιολόγηση της επίδρασης του SAP στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων CaCo-2 (δοκιμασία SRB).....	63
3.1.2 IC <sub>50</sub> Ημιμέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση .....	67
3.1.3 Συμπεράσματα.....	67
Λίστα Συντομογραφιών .....	70
Παράρτημα Εικόνων .....	71
Παράρτημα Γραφημάτων .....	72
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73



## Περίληψη

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας στον σύγχρονο κόσμο. Η εμφάνιση του καρκίνου προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αφού αυτά δεν αποκρίνονται αποτελεσματικά στα σήματα που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Γι' αυτό τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται τελικά σε όλο το σώμα, προσβάλλοντας φυσιολογικούς ιστούς και όργανα. Μια από τις στρατηγικές αντιμετώπισης του καρκίνου έχει ως στόχο την διακοπή παροχέτευσης αίματος στα καρκινικά κύτταρα διακόπτοντας έτσι την ανάπτυξή τους. Ένα τέτοιο φάρμακο είναι το Sunitinib. Ωστόσο λόγω αυξημένης τοξικότητας και διάφορων παρενεργειών η χρήση του είναι περιορισμένη. Για να μειωθεί η τοξικότητα του Sunitinib και να αυξηθεί η χρήση του απαιτείται η στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα.

Για το λόγο αυτό διάφορες προσεγγίσεις έχουν αναφερθεί για την στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα μέσω στοχευτικών συζευγμάτων.

Επειδή το Sunitinib δε δίνει άμεση πρόσβαση σε στοχευτικά συζεύγματα αυτού του τύπου λόγω έλλειψης λειτουργικών ομάδων στο μέρος του μορίου που εκτίθεται στο μέτωπο του διαλύτη, σχεδιάστηκε και συντέθηκε ένα νέο ανάλογο του Sunitinib το οποίο ονομάστηκε SAP.

Το μόριο αυτό σχεδιάστηκε έτσι ώστε να διατηρηθεί η ισχύς του Sunitinib αλλά με αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με το αρχικό μόριο, καθώς μετά από αξιολόγηση και σύγκριση βρέθηκε ότι εμφανίζει βελτιωμένες φαρμακοκινητικές παραμέτρους, καθώς και μεγαλύτερη πολική επιφάνεια, χαμηλότερη αιματοτοξικότητα, αναστέλλει περισσότερους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, αναστέλλει το πρωτοογκογονίδιο του RET, εμφανίζει μειωμένους καρκινικούς δείκτες Ki-67 και CD31, καθώς και καλύτερη διαλυτότητα αλλά φέρει και τη σημαντική θέση σύζευξης που του προσφέρει η εισαγωγή του πιπεραζινικού δακτυλίου, γεγονός που καθιστά το νέο πλέον ανάλογο καταλληλότερο για συζεύξεις είτε με στοχευτικά πεπτίδια είτε με άλλες χημικές ομάδες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εστίασαμε στη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των οξινδολικών αντιαγγεογενετικών μορίων του προφαρμάκου της σουνιτινίμπης του SAP και πιο συγκεκριμένα του SAP-S-S-Py και SAP.HCL για πιο αποτελεσματική και στοχευμένη δράση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα και όγκους που υπερεκφράζονται από διάφορους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης. Τα αποτελέσματα που λάβαμε ήταν ενθαρρυντικά από τα

οποία προέκυψε ότι το SAP.HCL σε επίπεδο τοξικότητας ήταν πιο αποτελεσματικό σε σχέση με το SAP-S-S-Py. Τέτοιου τύπου λοιπόν στοχευτικά συζεύγματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για μελλοντικές μελέτες για την καλύτερη αντιμετώπιση ποικίλων μορφών καρκίνου.

## Abstract

Cancer is one of the biggest health problems in the modern world. The appearance of cancer is caused by the uncontrolled and continuous proliferation of cancer cells, as they do not respond effectively to the signals that control the behavior of normal cells. This is why cancer cells eventually spread throughout the body, infecting normal tissues and organs. One of the cancer treatment strategies aims to stop the blood supply to the cancer cells, thus stopping their growth. One such drug is Sunitinib. However, due to increased toxicity and various side effects, its use is limited. Targeted delivery of the drug to cancer cells is required to reduce the toxicity of Sunitinib and increase its use.

For this reason various approaches have been reported for targeted drug delivery to cancer cells via target conjugates.

Because Sunitinib does not provide direct access to target conjugates of this type due to a lack of functional groups in the part of the molecule exposed to the solvent front, a new Sunitinib analogue called SAP was designed and synthesized.

This molecule was designed to maintain the potency of Sunitinib but with several advantages over the original molecule, as after evaluation and comparison it was found to show improved pharmacokinetic parameters, as well as a larger polar surface, lower hematotoxicity, inhibit more receptors with action tyrosine kinase, inhibits the RET proto-oncogene, shows reduced cancer markers Ki-67 and CD31, as well as better solubility but also has the important coupling position offered by the introduction of the piperazine ring, which makes the new analog more suitable for either with target peptides or with other chemical groups.

In the present dissertation we focused on the study of the cytotoxicity of the oxidol antiangiogenic molecules of the prodrug Sunitinib SAP-S-S-Py and SAP.HCL for a more effective and targeted action against cancer cells and tumors overexpressed by various receptors. The results we obtained were encouraging and it turned out that SAP.HCL was more effective in terms of toxicity than SAP-S-S-Py. Such target conjugates could therefore be a new therapeutic approach for future studies to better treat a variety of cancers.

## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Εισαγωγή

### 1.1.1 Σκοπός και Υπόβαθρο της μελέτης

Ο καρκίνος είναι ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα στις αναπτυγμένες χώρες. Στατιστικές δείχνουν ότι αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου μετά τις καρδιοπάθειες και προσβάλλει ανθρώπους συνήθως μεγάλης ηλικίας αλλά υπάρχουν και μορφές καρκίνου που εμφανίζονται σε νεαρής ηλικίας άτομα, ακόμα και σε μικρά παιδιά. Ο όρος «καρκίνος» δεν αποδίδεται σε μία και μόνη ασθένεια, αλλά σε μια ομάδα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία αυξάνονται, διαιρούνται και πεθαίνουν με έναν αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο, ενώ τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν διότι συνεχίζουν να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα της κατάρρευσης των ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν τη συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων και αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, οπότε γιαυτό το λόγο χρήζει νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

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

Το Sunitinib είναι μια πολλά υποσχόμενη χημική ένωση η οποία αναστέλλει αρκετούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs) που συμμετέχουν στην αύξηση του όγκου, τη νεοαγγειογένεση και τη μεταστατική πορεία του καρκίνου. Αναστέλλοντας λοιπόν τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs) μπορεί να μειώσει την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου και να διακόψει την παροχή αίματος που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αναπτύσσονται. Παρόλα αυτά η αδυναμία του να συζευχθεί με άλλες δραστικές ομάδες για τη στοχευμένη θεραπεία στο κύτταρο-στόχο, το καθιστά λιγότερο αποτελεσματικό στην στόχευση των καρκινικών κυττάρων.

Το SAP είναι ένα νέο ανάλογο του αντιαγγειογενετικού φαρμάκου Sunitinib. Είναι ένα ορθολογικά σχεδιασμένο μικρό μόριο το οποίο είναι εξίσου δραστικό και αποτελεσματικό σε διάφορα προκλινικά μοντέλα του καρκίνου, με καλύτερες φαρμακολογικές ιδιότητες με το πλεονέκτημα της στοχευμένης διανομής, επιτρέποντας πολλές χημικές συζεύξεις με πεπτίδια ή αντισώματα. [1]

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζεται στη μελέτη της κυτταροτοξικότητας του οξινολικού αντιαγγειογενετικού μορίου του προφαρμάκου της σουνιτινίμπης SAP και πιο συγκεκριμένα του SAP-S-S-Py και SAP.HCL για πιο αποτελεσματική και στοχευμένη δράση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα και όγκους που υπερεκφράζονται από διάφορους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης. Τέτοιου τύπου λοιπόν στοχευτικά συζεύγματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για την καλύτερη αντιμετώπιση ποικίλων μορφών καρκίνου.

## 2.1 Καρκίνος

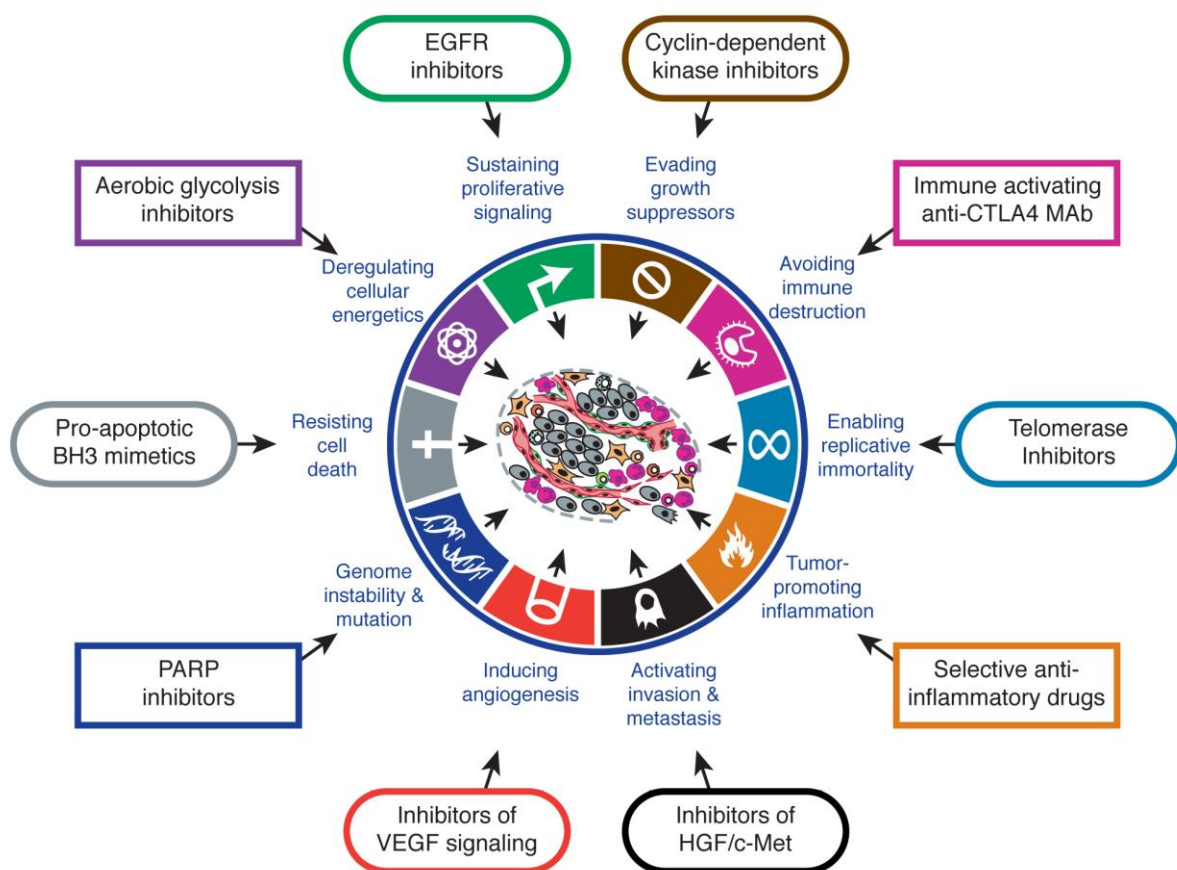
Η κυτταρική διαίρεση είναι μια θεμελιώδης ιδιότητα όλων των ζωντανών οργανισμών. Στους πολυκύτταρους οργανισμούς η ζωή ξεκινά από ένα μόνο κύτταρο και εξελίσσεται στην ενηλικίωση μέσω της κυτταρικής διαίρεσης και της διαφοροποίησης. Ένα περίπλοκο σύστημα ελέγχου ρυθμίζει αυστηρά την κυτταρική διαίρεση στις απαιτήσεις του οργανισμού. Τυχόν παρεκκλίσεις από αυτό το σύστημα μπορεί να οδηγήσουν σε αυτόνομη κυτταρική διαίρεση η οποία είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου.[2]

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια που εμφανίζεται όταν οι πληροφορίες στο κυτταρικό DNA έχουν υποστεί φθορά οδηγώντας σε ανωμαλίες κατά την γονιδιακή έκφραση. Ως αποτέλεσμα, οι επιδράσεις των φυσιολογικών γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη των κυττάρων, την επιβίωση και την εξάπλωση, ενισχύονται και εκείνες των γονιδίων που καταστέλλουν αυτές τις επιδράσεις, καταστέλλονται. Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο εμφανίζεται αυτή η αλλοίωση του γενετικού κώδικα είναι μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων, αν και υπάρχει αυξανόμενη αναγνώριση του ρόλου των μη μεταλλαξογόνων αλλαγών στη διαδικασία.[3]

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από δύο κληρονομικές ιδιότητες: α) αναπαράγονται αφηφώντας τους φυσιολογικούς περιορισμούς στην ανάπτυξη και τη διαίρεση των κυττάρων και β) εισβάλλουν σε μέρη που συνήθως προορίζονται για άλλα κύτταρα. Ο συνδυασμός αυτών των δύο είναι που κάνει τον καρκίνο σημαντικά επικίνδυνο. Ένα ανώμαλο κύτταρο που αναπτύσσεται, αυξάνοντας τη μάζα του και πολλαπλασιάζεται ανεξέλεγκτα θα οδηγήσει σε ένα νεόπλασμα ή όγκο. Όσο τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν εισχωρήσουν στους περιβάλλοντες ιστούς, ο όγκος χαρακτηρίζεται καλοήθης, και η αφαίρεση ή η καταστροφή της μάζας του τοπικά συνήθως επιτυγχάνει μια πλήρη και αποτελεσματική θεραπεία. Ένας όγκος όμως θεωρείται καρκίνος μόνο αν είναι κακοήθης, πιο συγκεκριμένα, μόνο εάν τα κύτταρά του έχουν αποκτήσει την ικανότητα να εισχωρήσουν στον περιβάλλοντα ιστό. Η διήθηση είναι ένα ουσιαστικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Επιτρέπει την ενδοαγγειώσή τους και μέσω του κυκλοφορικού συστήματος διασπείρονται σε άλλα μέρη του σώματος, δημιουργώντας δευτερογενείς όγκους, τις λεγόμενες μεταστάσεις. Όσο ευρύτερη είναι η εξάπλωση ενός όγκου, τόσο δυσκολότερη γίνεται η εξάλειψή του και γενικότερα οι μεταστάσεις είναι αυτές που σκοτώνουν τον ασθενή με καρκίνο. Η εμφάνιση λοιπόν του καρκίνου προκαλείται από ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αφού αυτά δεν ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στα σήματα που ελέγχουν τη

συμπεριφορά των φυσιολογικών κυττάρων. Γι' αυτό το λόγο τα καρκινικά κύτταρα εξαπλώνονται τελικά σε όλες τις περιοχές του σώματος, προσβάλλοντας φυσιολογικούς ιστούς και όργανα.[4].

Η πλήρης έλλειψη μηχανισμών ελέγχου του πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης πολλών βλαβών στα διάφορα ρυθμιστικά συστήματα των κυττάρων και ορίζει τα χαρακτηριστικά τα οποία διακρίνουν τα καρκινικά κύτταρα από τα αντίστοιχα φυσιολογικά.



Εικόνα 1. Κύκλος καρκινικού κυττάρου  
(Hallmarks of Cancer: The next generation) [5]

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 κάποια χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη του όγκου καθώς και τη μετάσταση. Η ανώμαλη ανάπτυξη του όγκου είναι



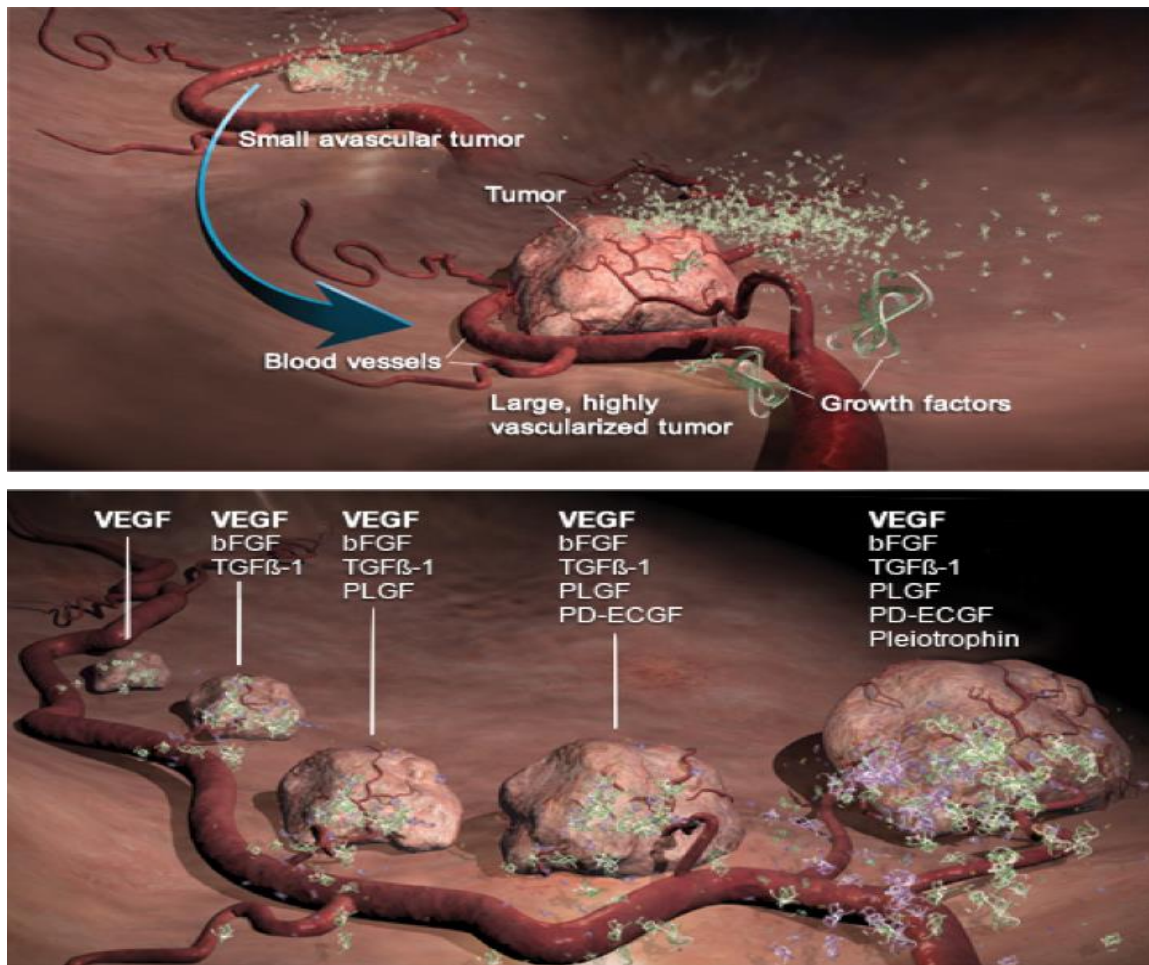
αποτέλεσμα πολλών μεταλλάξεων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των κυττάρων, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και το θάνατο. Αν και, αυτές οι μεταλλάξεις διαφέρουν από μια νεοπλασματική νόσο σε μια άλλη, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν κάποια διακριτά χαρακτηριστικά, στις περισσότερες μορφές καρκίνου. Καθώς αναπτύσσεται ένα καρκινικό κύτταρο πρέπει να αποκτήσει μια ολόκληρη γκάμα από ανώμαλες ιδιότητες ούτως ώστε να είναι σε θέση να εκτοπίσει τα γειτονικά υγιή κύτταρα και να κατοχυρώσει επαρκή αιματική παροχή για τη θρέψη του αναπτυσσόμενου όγκου.

Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου, όπως καθιερώθηκαν από τους Hanahan και Weinberg το 2011 είναι: [5]

1. Αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα
2. Καταστολή αντι-αυξητικών σημάτων
3. Αποφυγή ανοσο-καταστροφής
4. Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός
5. Φλεγμονή που προωθεί τον καρκίνο
6. Διήθηση και μετάσταση
7. Συνεχής αγγειογένεση
8. Γενετική αστάθεια και μεταλλάξεις
9. Αντίσταση στους μηχανισμούς του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου
10. Απορρύθμιση κυτταρικής ενέργειας-μεταβολισμού

### 2.1.1 Αγγειογένεση

Αγγειογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων από ήδη προϋπάρχοντα αγγειακά δίκτυα που αποτελείται από πολλαπλά στάδια και περιλαμβάνει είσοδο σηματοδότησης από διάφορους προ-αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα ώριμα ενδοθηλιακά κύτταρα διαιρούνται και ενσωματώνονται σε νέα τριχοειδή αγγεία (Εικ.2). [6,7].



**Εικόνα 2.** Διαδικασία αγγειογένεσης καρκινικού κυττάρου

(<https://www.genentechoncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/vegf.html>)

Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη έτσι ώστε οι όγκοι να αναπτυχθούν πάνω από  $1-2 \text{ mm}^3$ . Το κρίσιμο αυτό όριο του όγκου αντιστοιχεί σε ένα εκατομμύριο περίπου κύτταρα. Για την ανάπτυξη του όγκου εκτός από αυτό το μέγεθος είναι απαραίτητα νέα αιμοφόρα αγγεία, προκειμένου να τροφοδοτούν με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά τα καρκινικά κύτταρα [8]. Αιμοφόρα αγγεία δημιουργούνται ως απόκριση σε αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα και διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που εντοπίζονται στα τοιχώματα των τριχοειδών αγγείων των γύρω ιστών, με αποτέλεσμα την εκβλάστηση νέων τριχοειδών αγγείων προς το σημείο του όγκου. Ο σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων είναι σημαντικός όχι μόνο για την ανάπτυξη του όγκου αλλά και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων σε διάφορα όργανα (μετάσταση) (Εικ.2) [9].

### 2.1.2. Διήθηση και Μετάσταση

Η μετάσταση και η διήθηση είναι τα πιο θανατηφόρα χαρακτηριστικά του καρκίνου τα οποία είναι υπεύθυνα για τον θάνατο. Μετάσταση, ορίζεται ως η καρκινική πορεία όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα διασπείρονται από τον πρωτοπαθή όγκο και σχηματίζουν νέους όγκους σε άλλα όργανα. Για να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η μετάσταση σε άλλη θέση από την πρωτοπαθή εστία, καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν από την πρωτοπαθή εστία και επιτυχώς διαπερνούν τους ιστούς. Αυτό επιτυγχάνεται με μετακίνηση από μια θέση σε μια άλλη, δηλαδή από την πρωτοπαθή εστία στο διάμεσο στρώμα. Οι μεταστάσεις διαφέρουν σε παραλλαγές, στο μέγεθος, σε διάφορες ανατομικές θέσεις και στην ετερογενή σύνθεση τους.

Προφανώς εάν δεν υπήρχε η μετάσταση και η διήθηση ο καρκίνος δεν θα ήταν μία κακοήθης νόσος αλλά καλοήθης, αφού στον πρωτοπαθή όγκο συνήθως επιτυγχάνεται πλήρης αφαίρεση. Ο θάνατος του ασθενή προκαλείται από την διήθηση και τη μετάσταση μέσω 2 λειτουργιών: την τοπική διήθηση και την απομακρυσμένη διήθηση. Στην πρώτη περίπτωση, η τοπική διήθηση εμποδίζει τη λειτουργία των ιστών που εμπλέκονται από την τοπική συμπίεση, την τοπική καταστροφή και παρεμπόδιση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργάνου. Η απομακρυσμένη διήθηση και μετάσταση είναι το πιο κομβικό σημείο της συγκεκριμένης νόσου. Πάνω από το 90% της νοσηρότητας και της θνητότητας του καρκίνου είναι σχετικό με την ανάπτυξη δεύτερου όγκου, δηλαδή την μετάσταση σε κάποιο άλλο όργανο. Ο ασθενής με μετάσταση συνήθως υποκύπτει στη βλάβη που προκαλείται από τη διασπορά του καρκίνου και λιγότερο συχνά από τις βλάβες που εμπλέκονται με τις κυτταροτοξικές θεραπείες.

Για βελτίωση της θεραπείας και της καλύτερης ποιότητας ζωής των ανθρώπων με μεταστατική νόσο εξαρτάται αρχικά από την πρόληψη και τον έλεγχο της μετάστασης και της διήθησης. Στη συνέχεια, κατά την διάρκεια ανάπτυξης του όγκου από το αρχικό έως και το πολύ προχωρημένο στάδιο, συσσωρεύονται πολλές μεταβολές που εμπλέκονται στη διήθηση και τη μετάσταση. Η δημιουργία της μεταστατικής πορείας εξαρτάται από την αλληλοεπίδραση ανάμεσα στους παράγοντες του κάθε ασθενούς και φυσικά των εγγενών παραγόντων του καρκίνου, όπου αρκετοί μοριακοί μηχανισμοί επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να διηθήσουν τους γύρω ιστούς, να διαπεράσουν τα αγγειακά δίκτυα και να εξαγγειωθούν σε πολλές και διάφορες θέσεις. Η ικανότητα για διήθηση αρχικά μπορεί να μην εκφραστεί σε όλους τους όγκους, παρόλα αυτά όμως είναι ικανοποιητικό και ενθαρρυντικό να θεραπεύονται οι περισσότερες *in situ* επιπλοκές μόνο με τοπική αντιμετώπιση.

Όμως οι πιο πολλοί καρκίνοι βέβαια σιγά-σιγά εμφανίζουν τη διηθητική τους ικανότητα με αποτέλεσμα να εξελίσσονται σε βέβαιες κακοήθειες από ήδη *in situ* καρκίνους, όπως για παράδειγμα αδενώματα ή διάφορες διαταραχές επιθηλιακού πολλαπλασιασμού κ.λπ. Κυριαρχούν αρκετά παραδείγματα, όπου η διασπορά και η διήθηση εμφανίζονται πολύ νωρίς.

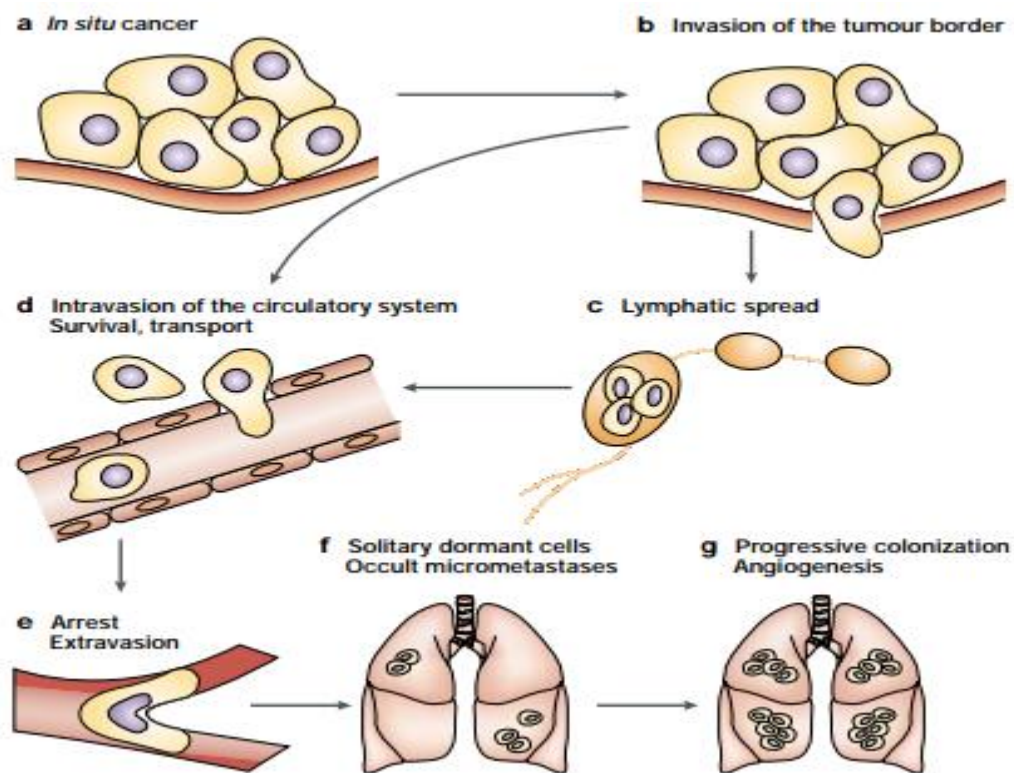
Η τοπική μικροδιήθηση έχει εξετασθεί ότι πραγματοποιείται ακόμη και όταν δεν είναι εμφανές ο πρωτοπαθής όγκος ή είναι αρκετά μικροσκοπικός. Η διήθηση είναι πιο δραστική σε σχέση με τη μετάσταση, με εκατομμύρια κύτταρα να διαπερνούν στην κυκλοφορία του αίματος κάθε μέρα, όμως μόνο ένα μικρό ποσοστό μπορεί να σχηματίσει αποικίες.

Ο καρκίνος του μαστού (BrCa) στο I στάδιο με νόσο μικρότερη του 1 cm, έχει πιθανότητες υποτροπής 20-25%. Δείχνοντας με αυτό τον τρόπο ότι η δυνατότητα μετάστασης είναι ένα συμβάν που ξεκινάει να πραγματοποιείται πολύ νωρίτερα από ότι πίστευαν. Το 30% περίπου από τους ασθενείς θα έχουν κλινικά ανιχνεύσιμες μεταστάσεις στη διάρκεια της αρχικής διάγνωσης και επίσης 30-40% από τους ασθενείς θα έχουν μη διαγνωσμένες και μη ανιχνεύσιμες μεταστάσεις. Όγκοι με ίδιο μέγεθος και όμοιοι ιστολογικά ίσως να έχουν μεγάλη διαφορά μεταστατικής ικανότητας, η οποία εξαρτάτε από αρκετούς και διάφορους παράγοντες, από το γονότυπό τους, καθώς και από τον μοριακό φαινότυπο.

Ο κακοήθης φαινότυπος της νεοπλασματικής νόσου κορυφώνεται ύστερα από αρκετές γενετικές μεταλλάξεις από τον πρωτοπαθή όγκο που συμβάλλουν θετικά και αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία. Η μελέτη ενεργοποίησης, ρύθμισης, μετάλλαξης ή απώλειες των γονιδίων που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα ρυθμιστικά στοιχεία είναι βασικά χαρακτηριστικά για την έρευνα της μετάστασης.

Οι συγκεκριμένες διαταραχές είναι υπεύθυνες για το υψηλότερο ποσοστό θανάτων. Η μεταστατική λειτουργία εξαρτάται από την αλληλοεπίδραση του όγκου - ξενιστή και όγκου - στρώματος, από την αγγειογένεση, από την εμφάνιση κυτοκινών, από τον τοπικό ιστό και το μικροπεριβάλλον. Εφόσον λοιπόν ο όγκος γίνει διηθητικός, μπορεί να διασπαρεί αμέσως μέσω κάποιας οδού προσιτής σε αυτόν, ή της αιματικής ή της λεμφικής οδού. Πολλά αλληλοαντικρουόμενα γεγονότα κυριαρχούν προσπαθώντας να εξηγήσουν τη μεταστατική και διηθητική διεργασία. Η εξέλιξη της μετάστασης είναι πολυπαραγοντική, περιλαμβάνοντας πολλά και διαδοχικά στάδια αρκετών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε όγκο και ξενιστή, με αποτέλεσμα ο μηχανισμός να αποκτά μια πολύπλοκη διάσταση. Μια ομάδα κυττάρων ή ένα κύτταρο είναι απαραίτητο να έχουν την ικανότητα να εγκαταλείψουν τον πρωτοπαθή όγκο, να εισβάλλουν στον παρακείμενο ιστό και να επιβιώσουν σε άλλες θέσεις για όσο χρονικό διάστημα είναι υπό διακίνηση, να εισχωρήσουν στην λεμφική ή αιματική κυκλοφορία, να

παγιδευτούν στα τριχοειδή αγγεία του νέου οργάνου, να εξαγγειωθούν από την κυκλοφορία του αίματος με αποτέλεσμα να πολλαπλασιαστούν και να δημιουργήσουν όγκους σε απομακρυσμένες θέσεις. Η ολοκλήρωση του κάθε σταδίου της μετάστασης χρειάζεται συντονισμένες δράσεις πολλών οδών και γονιδίων σχετικά με τη μετάσταση. Η κατανόηση του μηχανισμού και της εξέλιξης της μετάστασης και της διήθησης έχει καλύτερη σημασία τα τελευταία χρόνια, αλλά η ικανότητά μας να διερευνήσουμε την αδιάγνωστη ή την υποτιθέμενη μετάσταση πριν ακόμα εμφανιστεί υστερεί σε μεγάλο βαθμό. Είναι εξαιρετικά σημαντικό και κομβικό να τονιστεί η σημασία της κατανόησης της μοριακής μεταστατικής εξέλιξης και η σπουδαιότητα της ανάπτυξης δεικτών που θα συμβάλλει στην έγκαιρη πρόβλεψη μη ανιχνεύσιμων μεταστάσεων. Από τις βασικότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, θεωρείται πιθανό ότι κατά την εξέλιξη κάθε σταδίου μόνο τα κύτταρα του όγκου που προσκολλώνται θα επιβιώσουν.



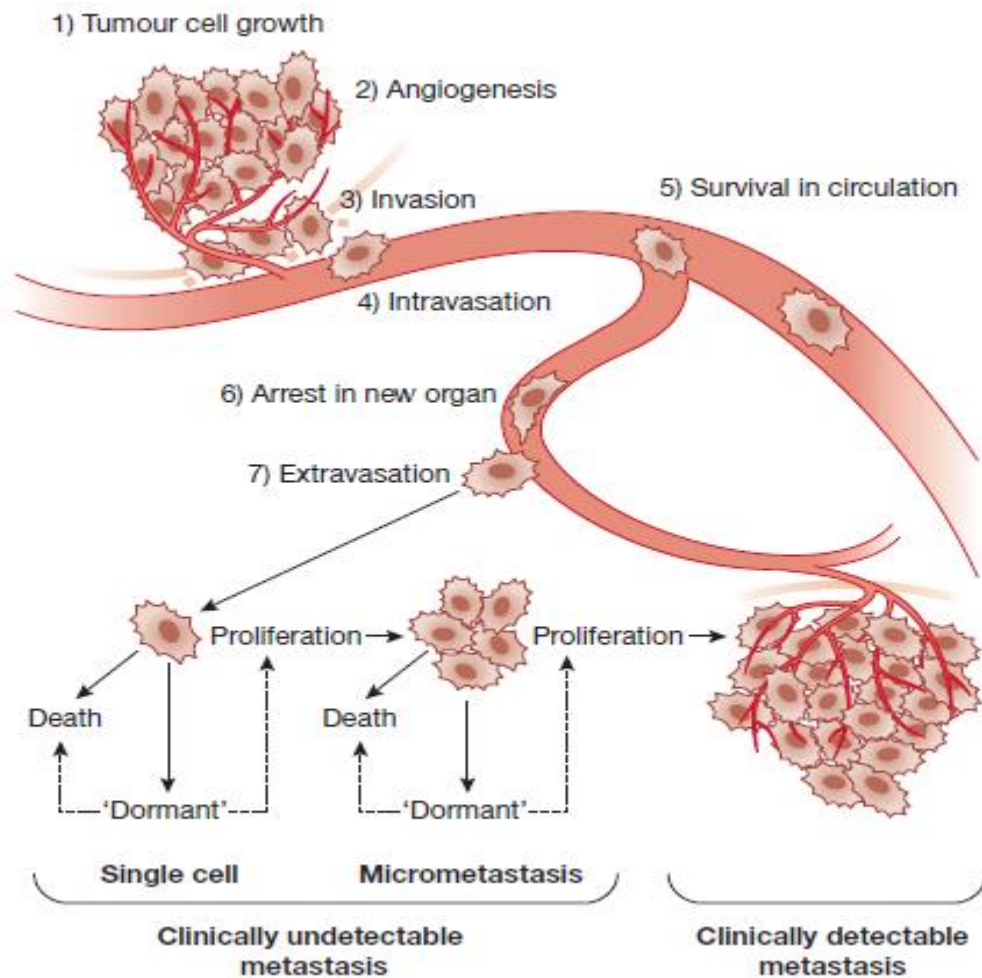
*Εικόνα 3. Μετάσταση, πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία [10]*

Τελικά, μικρό ποσοστό (0.01%) των CTC's (κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων), ξεκινούν με επιτυχία μεταστατικές αποικίες με αποτέλεσμα η μετάσταση να είναι πολύ εκλεκτικά συναγωνιστική δείχνοντας εύνοια στην επιβίωση ενός μικρού υποπληθυσμού μεταστατικών κυττάρων που προυπήρχαν ήδη μέσα στον πρωτογενή όγκο.

Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητο να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια της αγγειακής μεταφοράς τους και την παγίδευση τους στα τριχοειδικά πεδία του απομακρυσμένου οργάνου-στόχου και να συμμετάσχουν σε έναν άλλον κύκλο διείσδυσης και εξαγγείωσης, όπου εκεί τα καρκινικά κύτταρα θα εξαγγειώνονται από τα αγγεία σε ένα άλλο μικροπεριβάλλον και θα αναπτύσσονται οι όγκοι. Διαφέρει ευρέως η κατανομή των μεταστάσεων η οποία εξαρτάται από την ανατομική θέση και τον ιστολογικό τύπο του πρωτογενούς όγκου. Παρόλα αυτά, το πιο κοινό όργανο μετάστασης σε αρκετούς φαινότυπους καρκίνου φαίνεται να είναι το πρώτο λεμφικό δέντρο ή τριχοειδικό πεδίο που συναντούν τα καρκινικά κυκλοφορούντα κύτταρα. Άρα έτσι εξηγείται λοιπόν γιατί οι μεταστάσεις των πνευμόνων και του ήπαρ είναι οι πρώτες παρεγχυματικές μεταστάσεις που συναντάμε από τους περισσότερους συστηματικούς καρκίνους. Από την άλλη μεριά, τα καρκινικά κύτταρα κατανέμονται παντού ομοιόμορφα σε όλα τα όργανα, όμως αναπτύσσονται εκλεκτικά σε ειδικά όργανα-ιστούς. Κυριαρχούν αρκετές μεταστατικές θέσεις οι οποίες δεν μπορεί να προβλεφθούν μόνο με βάση την ανατομική μελέτη, αλλά θα είναι απαραίτητο να υπολογιστεί και το παράδειγμα του τροπισμού σε κάποια όργανα. Για παράδειγμα, ο καρκίνος του νεφρού συχνά μεθίσταται στο θυρεοειδή, το οφθαλμικό μελάνωμα στο ήπαρ, του μαστού στις ωθήκες, το νευροβλάστωμα στο μυελό των οστών, στα οστά και πολύ σπάνια στον πνεύμονα. Η λειτουργικότητα του μηχανισμού αυτού για τη συγκεκριμένη προτίμηση τους φυσικά δεν είναι κατανοητός. Εντούτοις, υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί θεωρητικοί πάντα για τον τροπισμό των οργάνων. Δηλαδή κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα CTC's μπορεί να προσκολλώνται στη βασική μεμβράνη μόνο σε όργανα που στοχεύουν. Προφανώς ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη που έχει προτίμηση τα οστά ίσως να αντανakλά έναν βαθμό τροπισμού και ίσως κατά ένα μέρος να οφείλεται στην παραγωγή και απομόνωση της οστεοποντίνης από τα καρκινικά κύτταρα που συμβάλλουν στον τροπισμό των οστών και γενικότερα στην επιθετική συμπεριφορά τους.

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC's) ενδέχεται να ανταποκριθούν σε διαλυτούς παράγοντες που σκορπίζονται τοπικά έξω από τα όργανα-στόχους. Παράγοντες σαν και αυτούς δρουν χημειοτακτικά, ώστε να προσελκύουν τα καρκινικά κύτταρα και να προδιαθέσουν την εξαγγείωση τους. [10]





**Εικόνα 4.** Βήματα μεταστατικής διαδικασίας καρκινικών κυττάρων. [11]

Η διαδικασία της μετάστασης περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα [11]:

- Αυξηση και ανάπτυξη όγκου
- Ακολουθεί η διαδικασία της αγγειογένεσης
- Διαφυγή καρκινικών κυττάρων από τον πρωτογενή όγκο
- Διήθηση στη βασική μεμβράνη και στην εξωκυττάρια ουσία που περιβάλλει το επιθήλιο του όγκου
- Ακολουθεί διήθηση στη βασική μεμβράνη που υποστηρίζει το ενδοθήλιο των τοπικών αιμοφόρων ή λεμφικών αγγείων
- Εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων στο αίμα ή τη λέμφο
- Επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία στο αίμα ή τη λέμφο
- Προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στο ενδοθήλιο του όργανου - στόχου
- Διήθηση των καρκινικών κυττάρων στο όργανο-στόχο

Σε υγιείς ενήλικες, η αγγειογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την ισορροπία μεταξύ ενδογενών, προ-αγγειογενετικών και αντι-αγγειογενετικών παραγόντων. Αυξητικοί παράγοντες, όπως αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF), είναι εξαιρετικά σημαντικοί προ-αγγειογενετικοί παράγοντες και η δραστηριότητά τους σχετίζεται με τη σύνδεσή τους με συγκεκριμένους μεμβρανικούς υποδοχείς κινάσης τυροσίνης. Κατά τη σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα, η κινάση τυροσίνης του ενδοκυττάριου μέρους του υποδοχέα ενεργοποιείται και αρχίζει έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη σηματοδότησης που καταλήγει στην κυτταρική δράση. Υπερεκφρασμένοι ή μεταλλαγμένοι αυξητικοί παράγοντες και υποδοχείς κινάσης τυροσίνης συμμετέχουν σε διάφορες μορφές καρκίνου και διαταράσσουν την αγγειογενετική ισορροπία ευνοώντας τον αυξημένο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων. [12] Τα αναπτυσσόμενα τριχοειδή αγγεία, που σχηματίζονται από την αγγειογενετική διέγερση, είναι ιδιαίτερα διαπερατά από τα κύτταρα του όγκου και επομένως παρέχουν τη δυνατότητα εισόδου στο κυκλοφοριακό σύστημα ώστε να αρχίσει η διαδικασία της μετάστασης.[13,14]

## 2.2 Υποδοχείς με Δράση Κινάσης Τυροσίνης

Οι κινάσες τυροσίνης αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της μεταγωγής σήματος από το εξωτερικό στο εσωτερικό των κυττάρων ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο βασικές διεργασίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη - πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετανάστευση, η επιβίωση και η διαφοροποίηση τους. Οι περισσότεροι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων αποτελούνται από εξωκυτταρική, διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική κινάση τυροσίνης (RTK). Με βάση την εντόπιση και τις δομικές ομοιότητες τους οι κινάσες τυροσίνης ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους υποδοχείς (Receptor Protein Tyrosine Kinases – RPTKs) και τις κυτταροπλασματικές (Non Receptor Protein Tyrosine Kinases - NRPTKs). Οι υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με μια αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή που δεσμεύει τον προσδέτη, μια διαμεμβρανική υδρόφοβη έλικα και ένα καρβοξυτελικό ενδοκυττάριο τμήμα που εμπεριέχει την περιοχή με δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης. Η πρόσδεση ενός σηματοδοτικού μορίου στην εξωκυττάρια περιοχή ενός υποδοχέα με δράση κινάσης της τυροσίνης προκαλεί τον διμερισμό μορίων του υποδοχέα. Η δημιουργία των διμερών οδηγεί σε επαφή των περιοχών με δράση κινάσης που υπάρχουν στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωσή τους και την δημιουργία θέσεων πρόσδεσης ενδοκυττάρων σηματοδοτικών πρωτεϊνών, οι οποίες



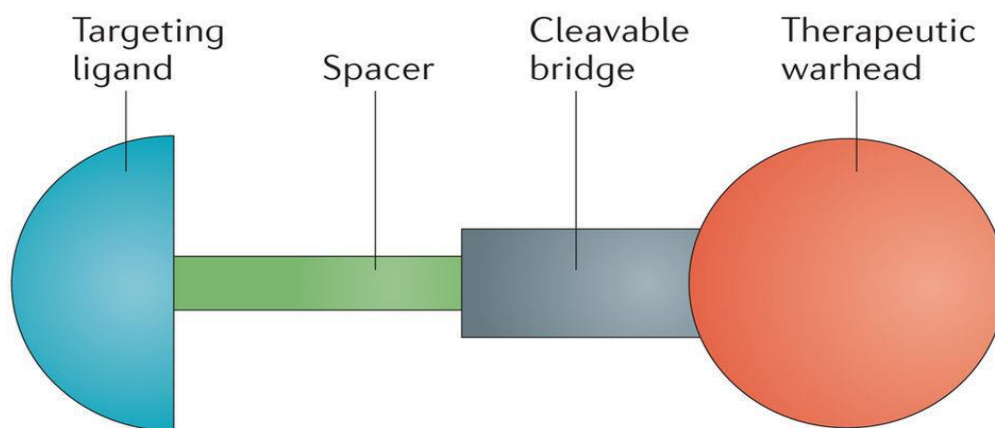
μεταβιβάζουν το σήμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Σωματικές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές και δομικές αναδιατάξεις που οδηγούν σε υπερέκφραση, υποέκφραση, μόνιμη ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση των υποδοχέων με δράση κινάσης τυροσίνης είναι ικανές να οδηγήσουν σε ογκογένεση. [15,16,17]

Η δυσλειτουργία των RTK έχει βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα καρκίνων, και έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την εξέλιξη πολυάριθμων καρκίνων. Οι υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης έχουν θεωρηθεί στόχοι για την εκλεκτική αναστολή της αύξησης των όγκων και για τον σκοπό αυτό έχουν σχεδιασθεί αναστολείς των κινασών τυροσίνης (TKIs). Οι αναστολείς κινάσης τυροσίνης έχουν βελτιώσει σημαντικά τη θεραπεία και την πρόγνωση πολλαπλών τύπων καρκίνου. Κατά συνέπεια, οι συγκεκριμένοι υποδοχείς (RTKs) αποτελούν έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο. Ένας τρόπος για να μπλοκάρει αποτελεσματικά η σηματοδότηση των RTK's είναι με μικρά μόρια ρόλος των οποίων είναι η αναστολή της καταλυτικής δράσης της τυροσίνης.[15,18]

### 3.1 Βασικές Αρχές Σχεδιασμού Στοχευτικών Συζευγμάτων

Τα περισσότερα φάρμακα κατά του καρκίνου έχουν σχεδιαστεί έτσι, ούτως ώστε να εμποδίζουν διάφορες φάσεις κατά τον πολλαπλασιασμό ή την επιβίωση των κυττάρων. Παρόλα αυτά όμως τα αντικαρκινικά φάρμακα μπορεί να αποδειχθούν τοξικά για τα υγιή κύτταρα δεδομένου ότι και αυτά πρέπει να πολλαπλασιαστούν και να αποφύγουν την απόπτωση. Για τη μείωση αυτής της τοξικότητας έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές όπου ο θεραπευτικός παράγοντας (θεραπευτικό φορτίο – κεφαλή) στοχεύει τα καρκινικά κύτταρα μέσω της σύζευξης με ένα πρόσδεμα που τα στοχεύει εκλεκτικά, μειώνοντας έτσι την μεταφορά του φαρμάκου στα φυσιολογικά κύτταρα καθώς και τη σχετιζόμενη τοξικότητα.

Η δομή αυτής της κατηγορίας φαρμάκων περιλαμβάνει ένα στοχευτικό τμήμα συνδεδεμένο με ένα θεραπευτικό παράγοντα μέσω μιας διασπώμενης γέφυρας (Εικ.5) [19]. Αν και ο θεραπευτικός παράγοντας μπορεί να είναι παρόμοιος ανάμεσα σε διάφορα φάρμακα αυτής της κατηγορίας, μια μεγάλη ποικιλία τμημάτων στόχευσης έχουν χρησιμοποιηθεί όπως αντισώματα, μικρά πρωτεϊνικά ικρίωματα, πεπτίδια αλλά και χαμηλού μοριακού βάρους μη πεπτιδικά προσδέματα, και όλα εμφανίζουν ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον.



Nature Reviews | Drug Discovery

*Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση ενός στοχευτικού συζεύγματος. [19]*

Ιδιαίτερη έμφαση όμως εστιάζεται σε συζεύγματα φαρμάκων με μικρές στοχευτικές ομάδες καθώς αυτά διαφέρουν σημαντικά (και συνήθως επωφελώς) από τα μεγαλύτερα και πιο περίπλοκα συζεύγματα φαρμάκων ως προς τη φαρμακοκινητική τους, την αντιγονικότητα, την

in vivo και in vitro σταθερότητα, τη χημεία σύζευξης, την ευκολία και το κόστος σύνθεσης, την ικανότητα διείσδυσης σε συμπαγείς όγκους και την ικανότητα απελευθέρωσης του φαρμάκου. Στα στοχευτικά συζεύγματα φαρμάκων [Ligand Drug Conjugates (LDCs)], η αποτελεσματικότητα καθορίζεται κυρίως από τη δραστικότητα του θεραπευτικού παράγοντα του συζεύγματος και τον αριθμό των υποδοχέων που διατίθενται για την ενδοκυττάρωση του φαρμάκου από τα καρκινικά κύτταρα.

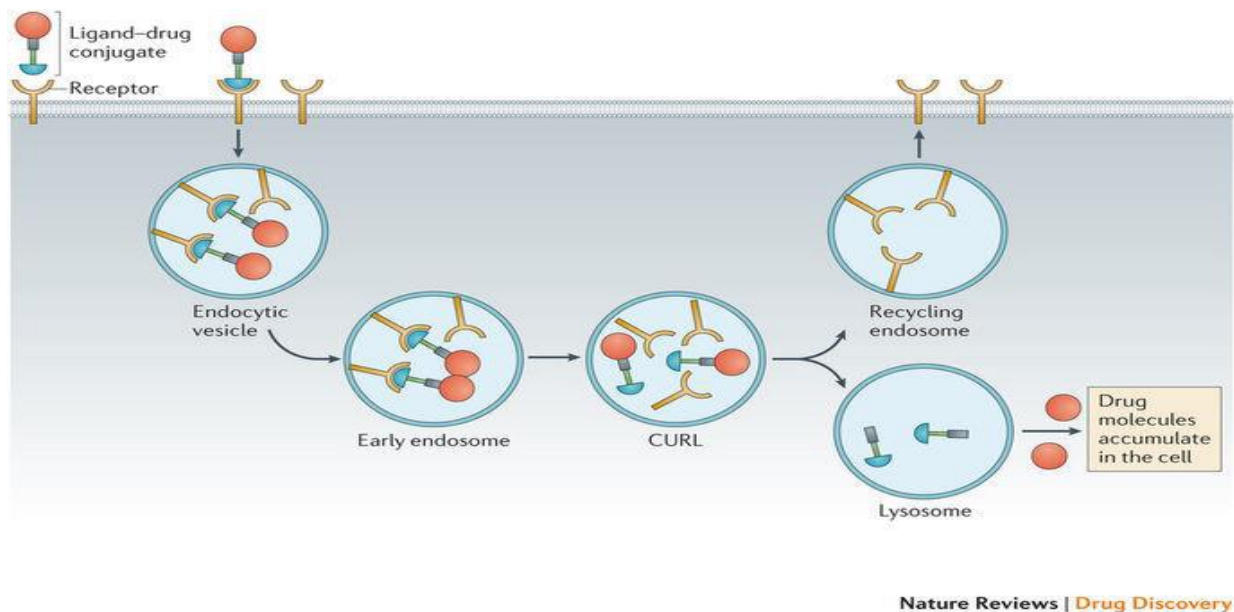
Η ασφάλεια διέπεται από την ειδικότητα του στοχευτικού συζεύγματος για τα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Καθώς η ασφάλεια εξαρτάται από την βιοκατανομή και τη θέση των υποδοχέων στους οποίους συνδέεται το σύζευγμα, η προσεκτική επιλογή του υποδοχέα των καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητη για την ελαχιστοποίηση της τοξικότητας του συζεύγματος.

Ο υποδοχέας, προκειμένου να είναι κατάλληλος για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, πρέπει γενικότερα να πληροί δύο κριτήρια:

- 1) να υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα
- 2) το απόλυτο επίπεδο έκφρασής του στα καρκινικά κύτταρα να είναι επαρκές για να επιτρέπει την παροχή θεραπευτικών ποσοτήτων του επιθυμητού φαρμάκου μέσω ενδοκυττάρωσης που προκαλείται από τον ίδιο τον υποδοχέα. [19]

### 3.1.1 Μηχανισμός Ενδοκυττάρωσης Συζευγμάτων μέσω Υποδοχέων

Με το μηχανισμό της ενδοκυττάρωσης τα συζεύγματα στοχευτικού συνδέτη-φαρμάκου μπορεί να μετακινούνται μέσω διαφόρων ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων, ανάλογα με τον υποδοχέα που χρησιμοποιείται για την εσωτερίκευση του συζεύγματος (Εικ.6) [19]. Αφού πραγματοποιηθεί η πρόσδεση του φαρμάκου στον υποδοχέα, το σύζευγμα προσδέτη-φαρμάκου (ligand-drug) εισέρχεται στο κύτταρο-στόχο με ενδοκυττάρωση και ακολούθως κατανέμεται σε ενδοκυτταρικές δομές, όπως είναι τα πρώιμα ενδοσώματα, τα διαμερίσματα όπου πραγματοποιείται η αποσύνδεση του υποδοχέα και του προσδέτη [Compartments Uncoupling Receptor and Ligand (CURL)]. Στη συνέχεια μέσα στο CURL, το σύζευγμα και ο υποδοχέας μπορεί να διαχωριστούν μεταξύ τους και να ταξινομηθούν σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα όπως τα ενδοσώματα ανακύκλωσης που επιτρέπουν στον υποδοχέα να επιστρέψει στην επιφάνεια του κυττάρου και να επαναλάβει τη διαδικασία, ή τα λυσοσώματα όπου ο υποδοχέας και το σύζευγμα μπορούν να αποδομηθούν.



**Εικόνα 6.** Διαδικασία ενδοκυττάρωσης στοχευτικού συζεύγματος. [19]

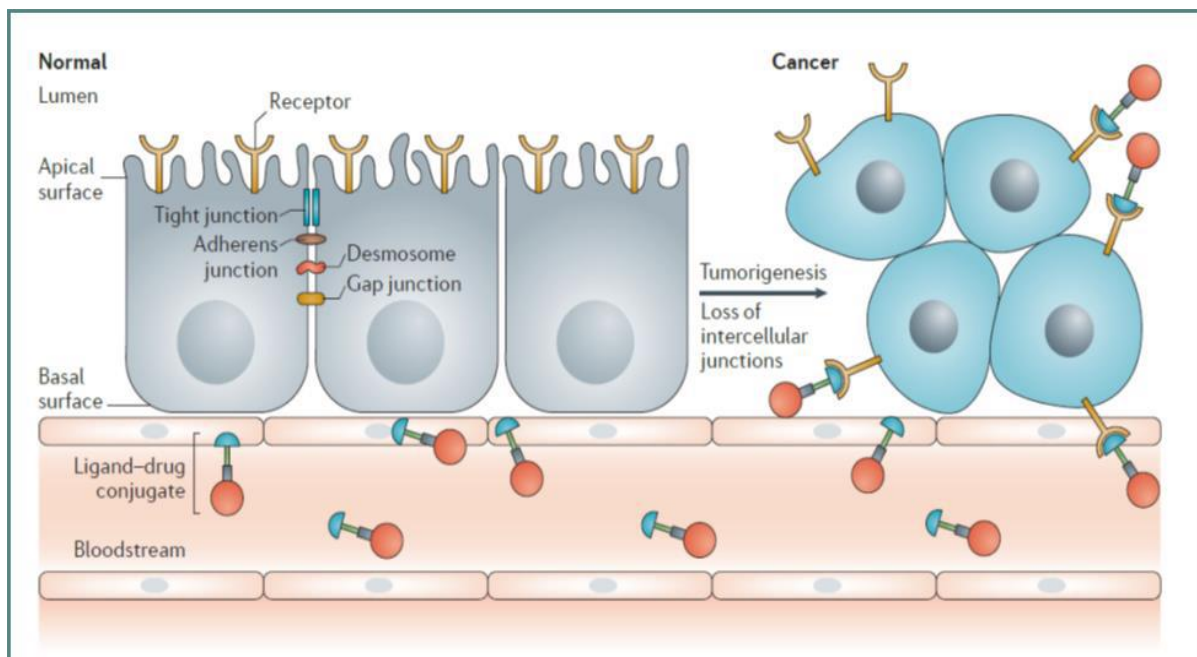
Δεδομένου ότι η διαθεσιμότητα των ελεύθερων υποδοχέων στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτάται από το ποσοστό της επιστροφής των μη κατειλημμένων υποδοχέων από τα ενδοσώματα, ένας ιδανικός υποδοχέας είναι αυτός που είτε ανακυκλώνεται συχνά, είτε ανασυντίθεται γρήγορα μετά την αποδόμηση. Παραδείγματα υποδοχέων που ανταποκρίνονται σε αυτές τις απαιτήσεις περιλαμβάνουν τους υποδοχείς EGF, PSMA και FRα. Η αξιολόγηση του ποσοστού επανεμφάνισης των υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων είναι ζωτικής σημασίας, καθώς κάθε φάρμακο που χορηγείται συχνότερα από το ρυθμό επανεμφάνισης ελεύθερων υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια θα επιβαρύνει άσκοπα τους ιστούς οδηγώντας ενδεχομένως σε ανεπιθύμητες παρενέργειες και περιττή τοξικότητα.

Σχετικά με τη θέση και την πρόσβαση του υποδοχέα, ένας ιδανικός υποδοχέας-στόχος θα εκφράζεται στην επιφάνεια ενός καρκινικού κυττάρου και όχι εντός του κυτταροπλάσματος ή του πυρήνα του. Βασικά, τα στοχευτικά συζεύγματα φαρμάκων (LDCs) που στοχεύουν ενδοκυτταρικούς υποδοχείς (π.χ. στεροειδών ορμονών, υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος κ.λπ.) πρέπει να έχουν την δυνατότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, προκειμένου να επιτύχουν τους ενδοκυτταρικούς στόχους τους. Αυτό συνεπάγεται πως θα είναι επίσης ικανά να εισέλθουν σε υγιή κύτταρα. Κατά συνέπεια η μη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων θα προκαλέσει φυσικά τοξικότητα. Επίσης, καθώς οι όγκοι κατανομής για συζεύγματα φαρμάκων που διαχέονται παθητικά σε όλες τις μεμβράνες του πλάσματος στοχεύοντας ενδοκυτταρικούς

υποδοχείς θα περιλαμβάνουν αναγκαστικά κύτταρα στα οποία δεν θα απαντώνται οι υποδοχείς-στόχοι, θα πρέπει να χορηγηθούν υψηλότερες συγκεντρώσεις συζευγμάτων για να επιτευχθεί αποτελεσματική δόση. Σε αντίθεση, τα στοχευτικά συζεύγματα φαρμάκων (LDCs) που στοχεύουν τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων μπορούν να σχεδιαστούν έτσι ώστε να μη διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, διασφαλίζοντας ότι μόνο τα κύτταρα με τους κατάλληλους μεμβρανικούς υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας μπορούν να προβούν στην πρόσληψή τους.

Οι υποδοχείς που εκφράζονται μόνο στην εξωτερική επιφάνεια υγιών επιθηλιακών κυττάρων (για παράδειγμα, FRa, υποδοχέας ουροκινάσης και ορισμένες βλεννίνες) μπορούν επίσης να παρέχουν μοναδικές ευκαιρίες για εκλεκτική στόχευση όγκων. Συγκεκριμένα, οι υποδοχείς που περιορίζονται στην εξωτερική επιφάνεια των πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων (όπως τα αγγειακά επιθηλιακά κύτταρα) δε θα είναι προσβάσιμοι σε παρεντερικά χορηγούμενα φάρμακα λόγω διακυτταρικών συνδέσμων (που περιλαμβάνει συνδέσεις προσκόλλησης, δεσμοσώματα, στενές συνδέσεις, συνδέσεις κενού) οι οποίοι εμποδίζουν τα διαλύματα και τα σωματίδια από το να διασχίσουν το επιθήλιο. Παρ' όλα αυτά, κατά τον κακοήθη μετασχηματισμό, οι υποδοχείς της εξωτερικής επιφάνειας γίνονται συχνά προσβάσιμοι σε ενδοφλέβια φάρμακα, επειδή οι διακυτταρικές συνδέσεις χάνονται κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης και οι υποδοχείς της εξωτερικής επιφάνειας κατανέμονται τυχαία σε ολόκληρη την κυτταρική επιφάνεια.

Άρα, ένας υποδοχέας που υπό κανονικές συνθήκες απαντάται αποκλειστικά στην εξωτερική επιφάνεια ενός επιθηλιακού κυττάρου μπορεί να αποτελέσει έναν κατάλληλο υποδοχέα-στόχο, αν η έκφρασή του εξακολουθεί να υφίσταται στο μη πολωμένο κακοήθες κύτταρο (Εικ.7) [19].

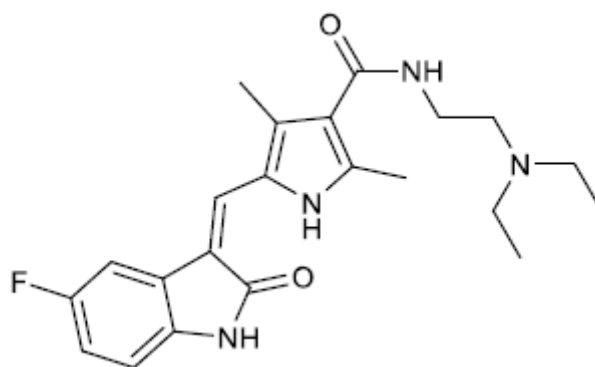


**Εικόνα 7.** Η επίδραση του μετασχηματισμού των επιθηλιακών κυττάρων στην πρόσβαση των υποδοχέων της εξωτερικής επιφάνειας.[19]

Συνεπώς, όπως αναφέραμε και παραπάνω, λόγω της απώλειας ενδοκυτταρικών συνδέσεων (συμπεριλαμβανομένων στενών συνδέσεων, συμπλεγμάτων πρωτεϊνών, δεσμοσωματίων και κενών συνδέσεων) μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων κατά τον κακοήθη μετασχηματισμό, οι υποδοχείς που βρίσκονται κανονικά στην επιφάνεια ενός υγιούς επιθηλιακού κυττάρου (που φυσιολογικά είναι μη προσβάσιμοι σε παρεντερικά χορηγούμενα φάρμακα) κατανέμονται τυχαία γύρω από ολόκληρη την πλασματική μεμβράνη ενός κακοήθους κυττάρου επιτρέποντας εύκολη πρόσβαση από στοχευμένα φάρμακα. [19, 20, 21]

### 3.2 Δραστική Ουσία: Σουντινίμπη – Sunitinib

Η σουντινίμπη (Εικ.8) [22] είναι δραστική ουσία, χρώματος πορτοκαλί-κίτρινου, μοριακού βάρους 398,48 Daltons η οποία λαμβάνεται από στόματος σε μορφή κάψουλας (gelatincapsule). Ο βασικότερος μεταβολίτης είναι ο SU012662 και μεταβολίζεται στο ήπαρ με το κυτόχρωμα P450 (CYP3A4).



Εικόνα 8. Χημική δομή Σουνιτινίμπης. [22]

Πρόκειται για μικρό μόριο-αναστολέα πολλαπλών υποδοχέων τυροσινικής κινάσης (RTKs, Receptor Tyrosine Kinase) καθώς αναστέλλει τη δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης που παρουσιάζει το ενδοκυττάριο μέρος του υποδοχέα το οποίο εμπλέκεται στην αύξηση του όγκου, τη νεοαγγειογένεση και τη μεταστατική εξέλιξη του καρκίνου. Προσδιορίστηκε ως αναστολέας των υποδοχέων του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor) (VEGFR-1, VEGFR-2 και VEGFR-3), του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) (PDGFR- $\alpha$  και PDGFR- $\beta$ ), του υποδοχέα του παράγοντα των βλαστικών κυττάρων KIT (Stem-Cell Factor Receptor), τον υποδοχέα της ομοιάζουσας με την Fms τυροσινικής κινάσης-3 FLT-3 (Fms-related tyrosine kinase-3), του υποδοχέα του παράγοντα διέγερσης αποικιών CSF-1R (Colony Stimulating Factor-1 Receptor) και του υποδοχέα νευρογλοιακού νευροτροφικού παράγοντα RET. Οι παραπάνω υποδοχείς τυροσινικής κινάσης συμβάλλουν τόσο στην αγγειογένεση του όγκου όσο και στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Οι υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης (RTKs) είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων που διαθέτουν εξωκυττάρια σημεία πρόσδεσης και μια ενδοκυττάρια καταλυτική περιοχή και μεταφέρουν εξωκυττάρια σήματα εντός του κυτταροπλάσματος. Η σύνδεση του προσδέματος επάγει το διμερισμό του υποδοχέα, με αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών περιοχών και την ενεργοποίηση της δράσης της τυροσινικής κινάσης (TK). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς είναι σημαντικοί στη μεταγωγή σημάτων για την ανάπτυξη συμπαγών όγκων. Η αναστολή αυτών των TKs εμποδίζει τη μεταγωγή σήματος, επηρεάζοντας έτσι πολλές από τις διαδικασίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του όγκου, την εξέλιξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετάσταση, την απόπτωση και φυσικά την αγγειογένεση. [22, 23, 24] Ο κύριος μεταβολίτης παρουσιάζει περίπου ίδια δραστηριότητα σε σχέση με τη σουνιτινίμπη σε βιοχημικούς και κυτταρικούς ποσοτικούς

προσδιορισμούς. [25] Οι περισσότερες αντικαρκινικές θεραπείες κατά των όγκων με αγγεογένεση έχουν ως στόχο κινάσες τυροσίνης (TKs). Οι αναστολείς των κινασών τυροσίνης (TKIs) ανταγωνίζονται το ATP στην πρόσδεση εντός του ενδοκυττάρου δικτύου πολλών και διαφόρων υποδοχέων κινάσης τυροσίνης. Έχουν την τάση να έχουν ένα καλύτερο προφίλ τοξικότητας από τα παραδοσιακά κυτταροτοξικά μόρια που χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία τα οποία αλληλεπιδρούν μη-εκλεκτικά με το DNA και την τουμπουλίνη, έχοντας ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητες παρενέργειες στους υγιείς ιστούς. Τα φάρμακα πολλαπλής στόχευσης (π.χ. sunitinib, imatinib) τα οποία μπλοκάρουν διάφορες κινάσες, στοχεύουν στην επίτευξη ευρύτερου φάσματος δραστηριότητας από τα φάρμακα ενός στόχου (π.χ. erlotinib, gefitinib) ή την παραδοσιακή κυτταροτοξική θεραπεία. [12]

Η συνιστώμενη δόση χορήγησης του φαρμάκου που προέκυψε από μελέτες φάσης I είναι 50 mg καθημερινά για 4 εβδομάδες, εν συνέχεια έχουμε διακοπή χορήγησης για 2 εβδομάδες. Οι βασικότερες ανεπιθύμητες παρενέργειες που παρατηρήθηκαν ήταν καταβολή, ναυτία-έμετος, υπέρταση, αιματολογική τοξικότητα (ουδετεροπενία και θρομβοπενία, αναστρέψιμες κατά τις 2 εβδομάδες της διακοπής), αγγειακές διαταραχές (υπονύχιες αιμορραγίες, περιφερικό οίδημα, και σπανιότερα, φλεβοθρόμβωση και πνευμονική εμβολή) και δερματολογική τοξικότητα (ερυθροδυσαισθησία παλαμών και πελμάτων, αποχρωματισμός τριχών). [26] Συνεπώς, η σουνιτινίμη είναι ένας αναστολέας με δράση κινάσης τυροσίνης που ανταγωνίζεται το ATP ως προς τη θέση πρόσδεσης, αποτελεσματική έναντι του νεφροκυτταρικού καρκινώματος (RCC, Renal Cell Cancer) και του γαστρεντερικού στρωματικού όγκου (GIST, Gastrointestinal Stromal Tumors). Είναι το πρώτο αντινεοπλασματικό φάρμακο που εγκρίθηκε συγχρόνως για δύο διαφορετικούς τύπους καρκίνων. Επίσης, έχει αντινεοπλασματική δράση σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου και νευροενδοκρινικού καρκίνου. Νοσήματα στα οποία κατευθύνθηκε η περαιτέρω ανάπτυξη του φαρμάκου, το οποίο σήμερα χορηγείται στις παραπάνω ενδείξεις. [24] Η σουνιτινίμη λοιπόν, είναι αναστολέας των πρωτεϊνικών κινασών, ενζύμων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη και την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων, καθώς και στην ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων που τροφοδοτούν τους όγκους. Αναστέλλοντας λοιπόν τη δράση αυτών των ενζύμων, η σουνιτινίμη μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη και την εξάπλωση του καρκίνου και να διακόψει την παροχή αίματος που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αναπτύσσονται. [27]

Αντιαγγειογενετικά μικρά μόρια (π.χ. Σουνιτινίμη) έδειξαν αρχικά μια ισχυρή προκλινική αποτελεσματικότητα στον καρκίνο του μαστού (BrCa), που δικαιολογεί την έναρξη μερικών κλινικών δοκιμών, όπου η Σουνιτινίμη αξιολογήθηκε σε συνδυασμένες θεραπείες με



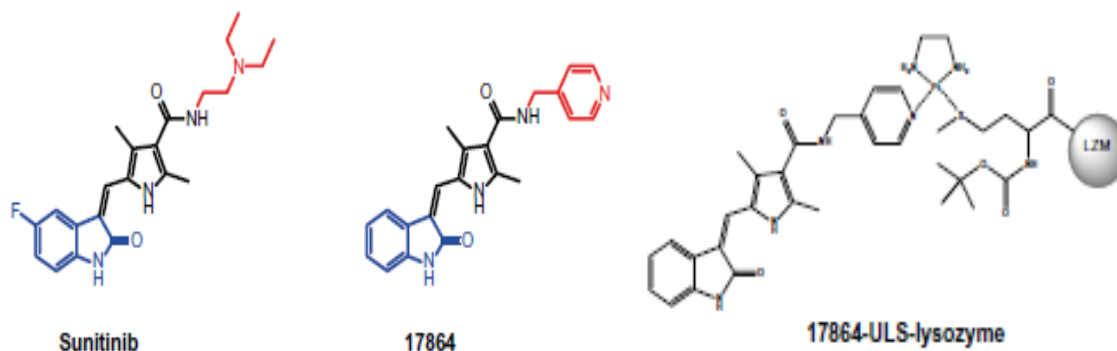
κυτταροτοξικά μόρια. [8,27,28,29] Δυστυχώς, η πλειονότητα αυτών των συνδυαστικών προσπαθειών απέτυχε να ανταποκριθεί στα σχεδιασμένα πρωτεύοντα τελικά σημεία και οι δοκιμές διακόπηκαν, είτε λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας, είτε λόγω περιορισμού της δόσης λόγω τοξικότητας. [30] Για παράδειγμα η μελέτη SUN1064 της σουνιτινίμπης σε συνδυασμό με ντοσεταξέλη σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού δεν έδειξε στατιστικά σημαντική βελτίωση στο PFS σε σύγκριση με τη ντοσεταξέλη μόνη της. [31] Ένα παρόμοιο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε στη μελέτη SUN1099 για τη σουνιτινίμπη σε συνδυασμό με την καπεσιταβίνη. [32] Ωστόσο, ένα εξελιγμένο θεραπευτικό σχήμα που χρησιμοποιεί συγχορήγηση σουνιτινίμπης με τραστουζουμάμπη (ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον HER-2) δημιούργησε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε μια μελέτη φάσης II των HER-2 θετικών ασθενών [33]. Επιπλέον, η πρόσφατη έναρξη μιας κλινικής δοκιμής (NCT02074878) σε ασθενείς με TNBC (Triple Negative Breast Cancer), στους οποίους χορηγήθηκε Sunitinib με Crizotinib (αναστολέας υποδοχέων με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης), τόνισε ότι το Sunitinib εξακολουθεί να είναι πολλά υποσχόμενο στην κλινική πρακτική του καρκίνου του μαστού (BrCa) και απαιτείτε η ανάγκη για περαιτέρω έρευνες, ειδικά για τους HER-2 θετικούς ασθενείς.

Οι λεπτομέρειες πίσω από τις κλινικές ανεπάρκειες του Sunitinib για τον καρκίνο του μαστού δεν είναι απολύτως σαφείς, αλλά οι προτεινόμενες εξηγήσεις περιλαμβάνουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η αγγειογένεση στον καρκίνο του μαστού (BrCa) εμπλέκει περισσότερα μονοπάτια, εκτός από αυτό του VEGF. Συνεπώς, το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την αναστολή πολλών άλλων προαγγειογενετικών κινασών, την ενεργοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων που ξεπερνούν την ύφεση του όγκου και κυρίως ο περιορισμός της χορήγησης υψηλής δόσης φαρμάκου λόγω τοξικότητας εκτός στόχου, όπως δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας (LV, Left Ventricular) και εμφανής καρδιακή ανεπάρκεια που συχνά συναντάτε λόγω των μειωμένων στεφανιαίων μικροαγγειακών περικυττάρων.[28, 34]

### 3.2.1 Σουνιτινίμπη και Στοχευτικά Συζεύγματα

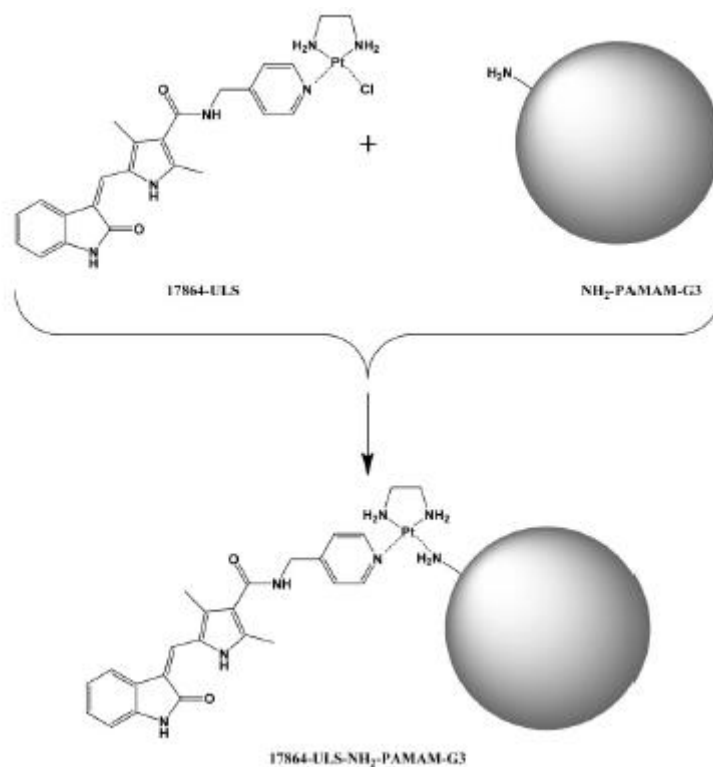
Η ισχυρή αντιαγγειογενετική δράση της σουνιτινίμπης (sunitinib) οδήγησε τους ερευνητές στο σχεδιασμό νέων αναλόγων της που θα επιτρέπουν την πρόσβαση σε στοχευτικά συζεύγματα ούτως ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και για καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση. Συγκεκριμένα ένα από αυτά τα ανάλογα, το 17864, έδωσε πρόσβαση σε συζεύγματα με το ένζυμο λυσοζύμη (πρωτεΐνη μεταφοράς), μέσω ενός συνδέτη πλατίνης

(ULS, Universal Linkage System), για την εκλεκτική στόχευση των νεφρών (Εικ.9) [35]. Η φαρμακολογική δράση του συζεύγματος 17864-λυσοζύμης μελετήθηκε και αξιολογήθηκε σε ανθρώπινα νεφρικά σωληνοειδή κύτταρα HK-2 και επίσης, μελετήθηκε η ικανότητα του συζεύγματος να συσσωρευτεί στους νεφρούς σε ποντίκια [35].



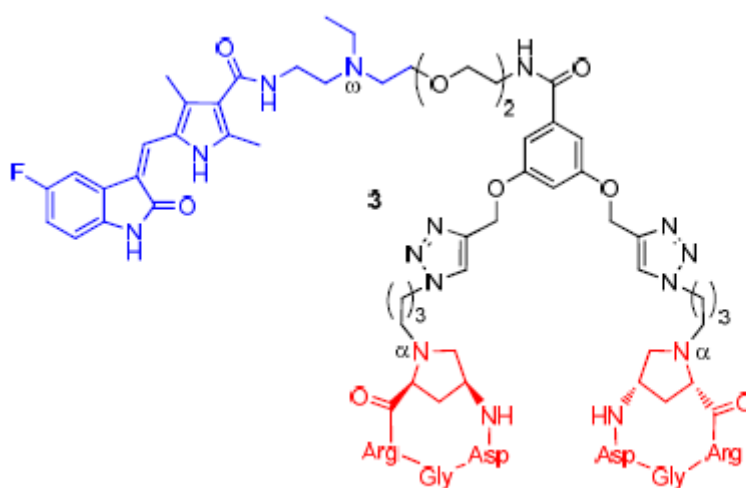
*Εικόνα 9. Στοιχειώδη συζεύγματα sunitinib του αναλόγου 17864. [35]*

Επίσης, η ανάπτυξη ενός νέου αναλόγου της σουνιτινίμπης, του 17864 το οποίο είναι συζευγμένο με ένα δενδριμερές NH<sub>2</sub>-PAMAM-G<sub>3</sub>, μέσω ενός συνδέτη πλατίνης, δημιουργήθηκε και αξιολογήθηκε για την εκλεκτική στόχευση στους νεφρούς (Εικ.10) [36]. Το σύζευγμα 17864-ULS-NH<sub>2</sub>-PAMAM-G<sub>3</sub> είναι μη τοξικό για εγγύς σωληνοειδή κύτταρα *in vitro*. Αφού πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια χορήγηση σε ποντικούς, το σύζευγμα συσσωρεύεται ταχέως και επαρκώς στους νεφρούς. Αυτά τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και για μελλοντικές μελέτες που εστιάζουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη θεραπεία των νεφρικών παθήσεων.[36]



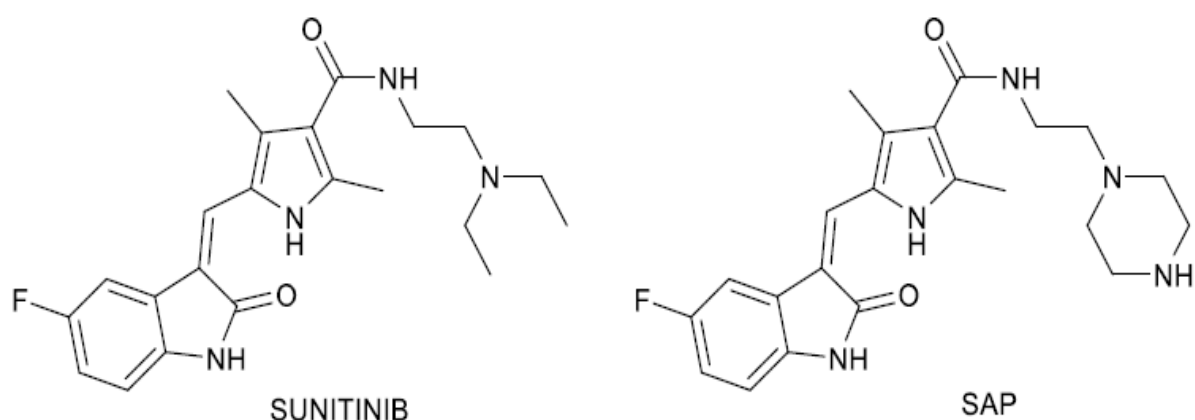
**Εικόνα 10.** Στοχευτικά συζεύγματα sunitinib του αναλόγου 17864-ULS με NH<sub>2</sub>-PAMAM-G3. [36]

Επίσης, συζεύγματα του Sunitinib με κυκλικά ανάλογα c(AmpRGD) (Εικ.11) που στοχεύουν την α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> ιντεγκρίνη και τον υποδοχέα VEGFR2 έδειξαν ενδιαφέρουσες αντι-αγγειογενετικές ιδιότητες σε *in vitro* και *in vivo* δοκιμές, όπως έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.[37]



**Εικόνα 11.** Στοχευτικά συζεύγματα του Sunitinib με κυκλικά ανάλογα c(AmpRGD). [37]

#### 4.1 SAP: Νέο Δραστικό Ανάλογο της Σουνιτινίμπης (Sunitinib)



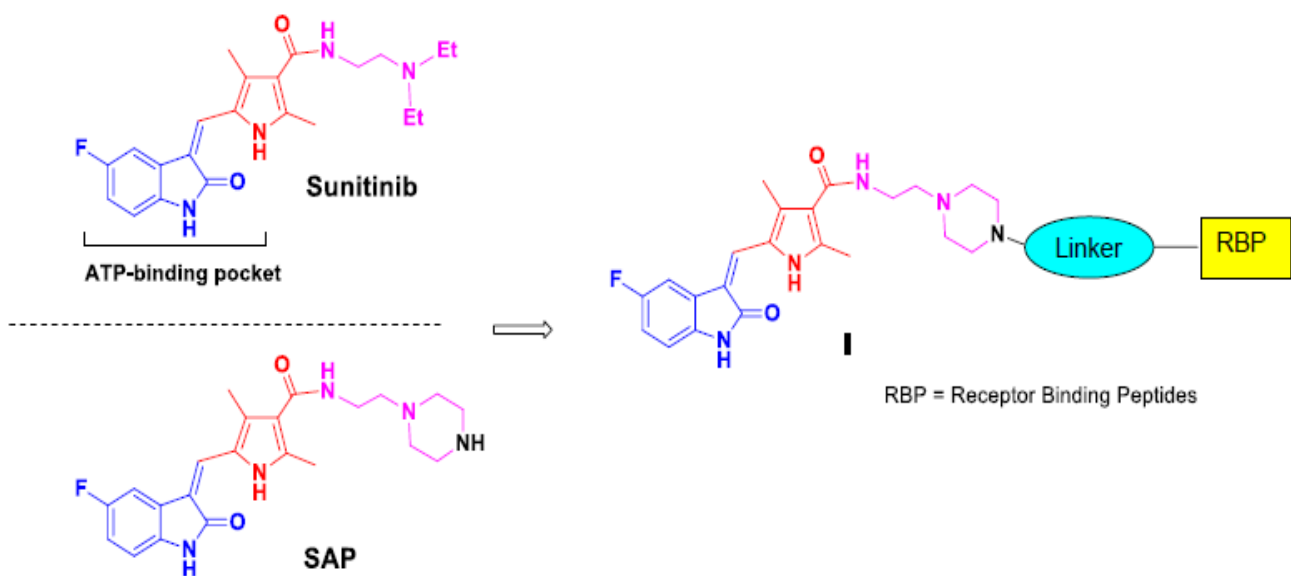
*Εικόνα 12. Χημική δομή SAP σε σύγκριση με σουνιτινίμπη. [1, 22, 43]*

Πρόσφατα αποδείχτηκε, από την ομάδα Argyros et al. (2017), ότι η σύζευξη ενός ορθολογικά σχεδιασμένου αναλόγου του sunitinib (που ονομάζεται SAN1) σε ένα τμήμα δεκαπεπτιδίου (δημιουργώντας SAN1GSC) μείωσε την τοξικότητα της σουνιτινίμπης πιθανώς λόγω της ικανότητας του SAN1GSC να παραδίδει επιλεκτικά το φαρμακοφόρο στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως φαίνεται σε καρκίνου του προστάτη ζωικού μοντέλου[1, 38]. Το SAN1 ήταν επίσης ενεργό στις κυτταρικές σειρές BrCa αλλά η ανάπτυξη του αντιμετώπισε διάφορα εμπόδια όπως, χαμηλή συνθετική απόδοση (71%), και τις περιορισμένες επιλογές σύζευξης που η ομάδα ελεύθερου υδροξυλίου SAN1 επιτρέπει. Έτσι, αργότερα η ομάδα Argyros et al. (2017), επέλεξε να δημιουργήσει ένα νέο ανάλογο του sunitinib, φαρμακολογικά ισοδύναμο με το sunitinib ή το SAN1 που θα επιτρέψει επίσης περισσότερες πιθανότητες σύζευξης. Ο κεντρικός θεραπευτικός ρόλος των συζευγμένων μικρών μορίων στον BrCa έχει ενισχυθεί από την πρόσφατη επιτυχία του T-DM1, επιτρέποντας τους να σχεδιάσουν μια ξεχωριστή θεραπευτική προσέγγιση βασισμένη στην εφαρμογή ενός αντιαγγειογενετικού παράγοντα συζευγμένου με ένα πεπτίδιο στόχευσης ή αντίσωμα για τη θεραπεία του BrCa στο μικροπεριβάλλον του όγκου και όχι μόνο στα μεμονωμένα καρκινικά κύτταρα. [1]

Έτσι λοιπόν η συγκεκριμένη ομάδα (Argyros et al. 2017) παρουσίασε τη σύνθεση και την προκλινική αξιολόγηση ενός νέου αναλόγου sunitinib με βάση την πιπεραζίνη (που ονομάζεται SAP). Το SAP (Εικ.12) [1, 22] σχεδιάστηκε ορθολογικά για να διατηρήσει την ισχύ του sunitinib αλλά με το πλεονέκτημα της στοχευμένης θεραπείας, επιτρέποντας γρήγορες χημικές

συζεύξεις του φαρμάκου με πεπτίδια ή αντισώματα μέσω της αμινομάδας της πιπεραζίνης. Το SAP έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων στοχευτικών συζευγμάτων μέσω κατάλληλων γεφυρών αλλά και της εισαγωγής ενός πιπεραζινικού δακτυλίου, ο οποίος προσφέρει μια ελεύθερη θέση πρόσδεσης στο άτομο του αζώτου με άλλες χημικές ομάδες, όπως τα στοχευτικά πεπτίδια ή αντισώματα. Εν αντιθέσει, το Sunitinib διαθέτει δύο αιθυλομάδες, οι οποίες δεν του προσφέρουν αυτή την ικανότητα σύζευξης. Επιπλέον, η λειτουργική ομάδα πιπεραζίνης του SAP προβλέπεται να αυξήσει επίσης τα αντικαρκινικά αποτελέσματα της ένωσης [39,40,41], ενώ φαρμακολογικά το SAP χαρακτηρίζεται από χαμηλότερο συντελεστή κατανομής (cLogP), μεγαλύτερη πολική επιφάνεια και βελτιωμένη υδατοδιαλυτότητα.[1]

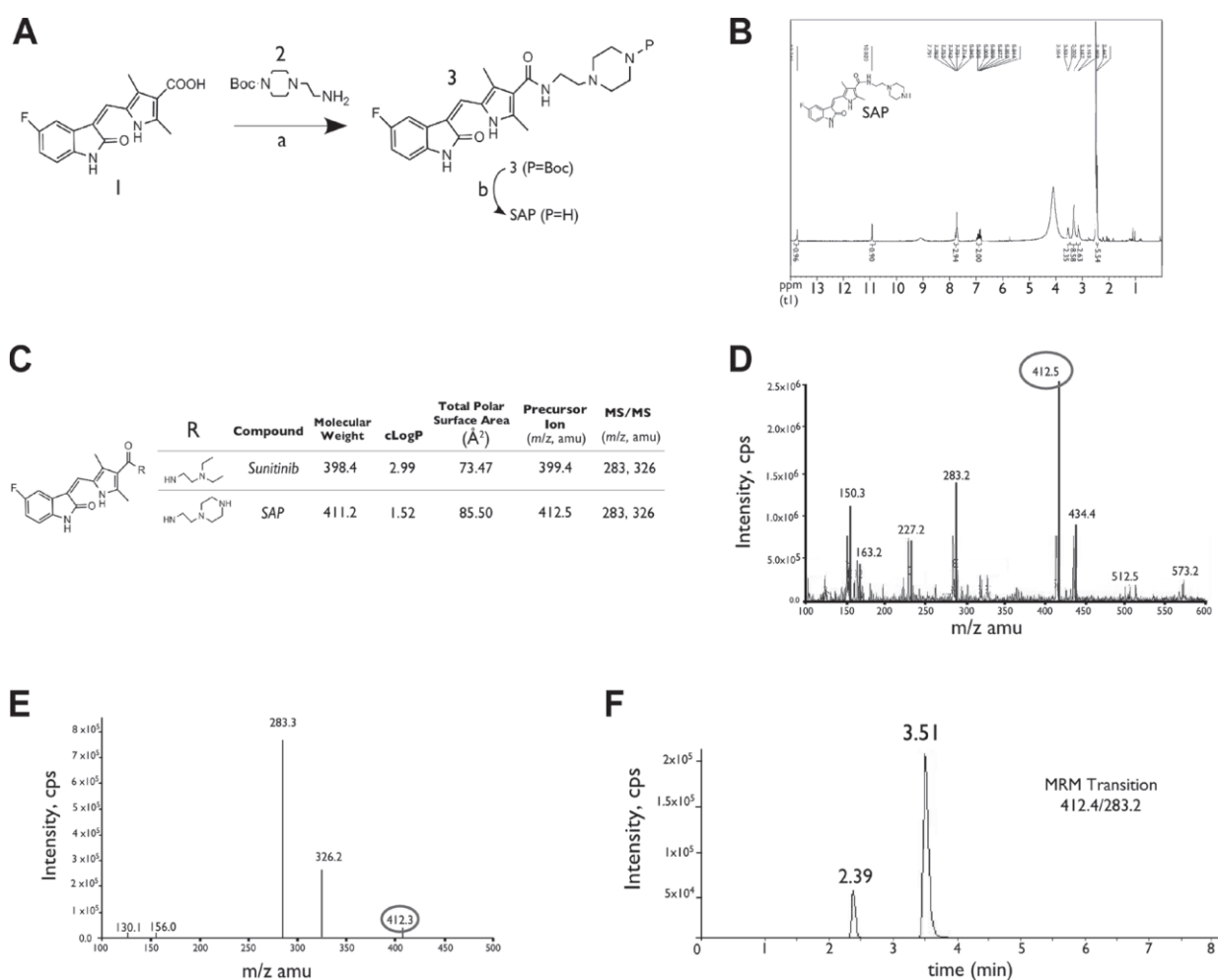
Το SAP σχεδιάστηκε ορθολογικά από την ομάδα Argyros et al. (2017) ώστε να διατηρηθεί η ισχύς του Sunitinib. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν ότι η πλευρική διαίθυλοαμινο ομάδα του Sunitinib εκτίθεται στο μέτωπο του διαλύτη και δεν παρεμβάλλεται στην θέση πρόσδεσης του ATP. Άρα, αντικατάσταση αυτής της ομάδας με μια πιπεραζίνη δεν θα επηρέαζε τη δραστηριότητα του νέου μορίου και θα μπορούσε να δώσει νέα ανάλογα με υψηλή υδατοδιαλυτότητα, όπως το SAP. Επίσης, θα μπορούσε να δώσει πρόσβαση σε νέα στοχευτικά συζεύγματα του τύπου **I** με πεπτίδια υποδοχέων (RBP, Receptor Binding Peptides) μέσω σύνδεσης της δευτεροταγούς αμίνης του πιπεραζινικού δακτυλίου και μιας κατάλληλης γέφυρας (Εικ.13) [43].



**Εικόνα 13.** SAP ένα νέο ανάλογο της σουνιτινίμπης που παρέχει τη δυνατότητα πρόσδεσης με στοχευτικά συζεύγματα, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43]

#### 4.1.1 Συνθετική οδός

Η συνθετική οδός από την ομάδα Argyros et al. (2017) (Εικόνα 14) [1,42] για το SAP φαίνεται στο σχήμα A, ενώ η ακριβής χημική δομή επαληθεύτηκε με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR,  $^1\text{H}$  Nuclear Magnetic Resonance) σχήμα B. Το SAP διατήρησε τον πυρήνα της ινδολίν-2-όνης (indolin-2-one) της σουνιτινίμπης που ήταν υπεύθυνη για την αναστολή των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (RTKs), ενώ παράλληλα παρείχε τη δυνατότητα σύζευξης με στοχευτικά πεπτίδια ή αντισώματα μέσω της αμινομάδας της πιπεραζίνης. Στο σχήμα C απεικονίζονται οι δυνατότητες φασματομετρία μάζας (MS, Mass Spectrometry) καθώς και ορισμένες βασικές ιδιότητες του SAP. Η λιποφιλικότητα του SAP υπολογίστηκε να είναι χαμηλότερη από της σουνιτινίμπης ( $c\text{LogP} = 1,5$  έναντι  $2,9$  του sunitinib) και η υπολογιζόμενη πολική επιφάνεια (PSA, Polar Surface Area) του SAP βρέθηκε να είναι υψηλότερη σε σχέση με τη σουνιτινίμπη ( $85,5 \text{ \AA}^2$  έναντι  $73,5 \text{ \AA}^2$  του sunitinib). Η υπολογιζόμενη επί τοις εκατό απορρόφηση είναι  $\% \text{ ABS} = 80$  (υπολογίστηκε με τη χρήση:  $\% \text{ ABS} = 109 - 0,345 \text{ PSA}$ ) και ο βαθμός διαπερατότητας φραγμού εγκεφάλου αίματος είναι  $\log\text{BB} = -0,9$  (υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας:  $\log\text{BB} = -0,0148 \text{ PSA} + 0,152 \text{ cLogP} + 0,139$ ). Συνεπώς, οι παραπάνω μετρήσεις προτείνουν ένα καλό ποσοστό απορρόφησης και μικρό βαθμό διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB, Blood Brain Barrier) του SAP σε σχέση με άλλους αναστολείς αγγειογένεσης [42]. Ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα μάζας για το SAP και ένα χρωματογράφημα LC-MS / MS (που απεικονίζει τα ισομερή Z και E του SAP) φαίνονται στο σχήμα D-F. [1]



**Εικόνα 14.** Σύνθεση και χαρακτηρισμός του SAP.

(A) Σύνθεση SAP, (B) Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) φάσματος του SAP, (C) Βασικές φυσικές ιδιότητες για το SAP και το sunitinib, (D) Αντιπροσωπευτικά θετικά φάσματα μάζας ιονισμού ηλεκτροψεκασμού του SAP που δείχνουν την κύρια ιονισμένη μορφή ( $M + 1$ ,  $m / z$  412.5), (E) Ανάλυση MS / MS του μητρικού ιόντος με  $m / z$  412.5 και σχηματισμός ιόντων προϊόντος με  $m / z$  283.3 και  $m / z$  326.2, (F) LC / MRM χρωματογράφημα SAP, αποδεικνύοντας την παρουσία E και Z γεωμετρικών ισομερών. [1]

#### 4.1.2 In silico και in vitro ανάλυση

Από την ομάδα Argyros et al. (2017) [1] διεξήχθησαν υπολογισμοί μοριακής σύνδεσης για το SAP σε σύγκριση με το sunitinib, οι οποίοι βασίστηκαν στις δομές ακτίνων X των συμπλοκών VEGFR-2 και KIT με sunitinib, και ένα ομόλογο μοντέλο PDGFR-β. Οι σταθεροί αναστολείς του SAP και του sunitinib εκτιμήθηκαν ότι ήταν συγκρίσιμοι (στο χαμηλόνανομοριακό εύρος), και αντιπροσωπευτικά μοριακά μοντέλα SAP που συνδέονται με τη θέση πρόσδεσης του ATP με SAP που είναι συμπλοκοποιημένα με αυτούς τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (RTKs) φαίνονται στην εικόνα 15 σχήμα A.

Η ισχύς του SAP αξιολογήθηκε από την ομάδα Argyros et al. (2017) σε βιοχημικές δοκιμασίες χρησιμοποιώντας τους γνωστούς στόχους RTKs του sunitinib (VEGFR-2, PDGFR-β, KIT, FLT3 και RET) και έναντι του EGFR ως αρνητικού μάρτυρα (Εικόνα 15 σχήμα Β). Το SAP ανέστειλε τους περισσότερους από αυτούς τους RTKs με συγκρίσιμη συνάφεια σε σχέση με το sunitinib ( $IC_{50} = 61-102$  nmol/L), αποτέλεσμα που επιβεβαίωσε τη στρατηγική σχεδιασμού. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν η ανώτερη ισχύς του SAP έναντι του sunitinib στην αναστολή του RET ( $IC_{50} = 102$  έναντι 699 nmol/L), ένα εύρημα που αξίζει περαιτέρω έρευνα.

Η αναστολή της φωσφορυλίωσης των VEGFR-2 και PDGFR-β επιβεβαιώθηκε από την ομάδα Argyros et al. (2017) περαιτέρω σε HUVEC και NIH/3T3 κύτταρα, χρησιμοποιώντας δοκιμασία φωσφορυλίωσης που εξαρτάται από κυτταρικό προσδέτη βασιζόμενο σε ανοσοστύπωμα Western (Εικόνα 15 σχήμα C). Οι υπολογισμένες κυτταρικές τιμές  $IC_{50}$  για το sunitinib ήταν  $24 \pm 12$  nmol/L για VEGFR-2 και  $72 \pm 19$  nmol/L για PDGFR-β αντίστοιχα. Παρόμοιες δραστηριότητες παρατηρήθηκαν για SAP με κυτταρικές τιμές  $IC_{50}$   $52 \pm 14$  nmol/L για VEGFR-2 και  $76 \pm 22$  nmol/L για PDGFR-β.

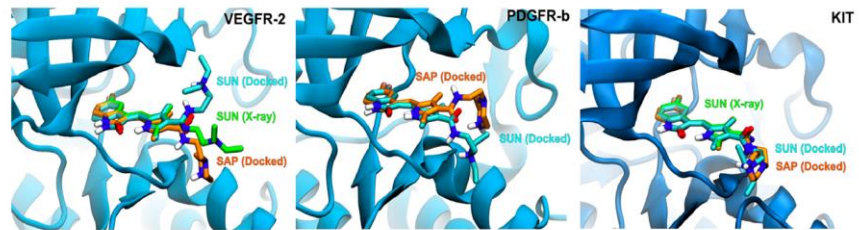
Το αντιπολλαπλασιαστικό αποτέλεσμα του SAP αξιολογήθηκε από την ομάδα Argyros et al. (2017) σε αρκετές κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων τριών αυλών (MCF7, T47D, ZR75-1), ενός βασικού TNBC (MDA-MB-231) και δύο ενισχυμένων HER2 (HCC1954, SKBR3) υποτύπων BrCa, καθώς και την ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά HUVEC. Τα αποτελέσματα και οι συγκριτικές τιμές  $IC_{50}$  παρουσιάζονται στην εικόνα 15 σχήμα D. Το SAP ήταν ισοδύναμο με το sunitinib, αλλά και με το μόριο SAN1 που δημιουργήθηκε στο παρελθόν [38] σε όλες τις κυτταρικές σειρές με τιμές  $IC_{50}$  που κυμαίνονται από  $6.5 \pm 2.4$   $\mu$ mol/L έως  $15.8 \pm 1.7$   $\mu$ mol/L.

Το αντιμεταστατικό δυναμικό του SAP αποδείχθηκε επίσης από την ομάδα Argyros et al. (2017) στην κυτταρική σειρά MDA-MB-231 χρησιμοποιώντας μία δοκιμασία επούλωσης πληγών και διάφορες συγκεντρώσεις φαρμάκων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το SAP είχε παρόμοια ισχύ με το sunitinib στην αναστολή της κυτταρικής μετανάστευσης βασισμένο στο κλείσιμο κυτταρικού κενού στα 10  $\mu$ mol/L.



**A**

Estimated Ki (nmol/L)	VEGFR-2	PDGFR-b	KIT
Sunitinib	109	43	85
SAP	24	4	14



**B**

IC <sub>50</sub> (nmol/L)	Sunitinib	SAP
<b>VEGFR-2</b>	110 (± 6)	75 (± 24)
<b>PDGFR-b</b>	61 (± 27)	93 (± 17)
<b>KIT</b>	51 (± 28)	61 (± 15)
<b>FLT3</b>	20 (± 11)	69 (± 42)
<b>RET</b>	699 (± 96)	102 (± 54)
<b>EGFR</b>	>10000	>10000

**C**



IC <sub>50</sub> (nmol/L)	VEGFR-2	PDGFR-b
Sunitinib	24 (± 12)	72 (± 19)
SAP	52 (± 14)	76 (± 22)

**D**

IC <sub>50</sub> (μmol/L)	Subtype	Sunitinib	SAP	SAN I
<b>MCF7</b>	Luminal	11.2 (± 0.3)	10.3 (± 1.6)	9.5 (± 2.9)
	Luminal	11.5 (± 1.0)	6.5 (± 2.4)	6.3 (± 2.0)
<b>ZR75-1</b>	Luminal	11.4 (± 2.1)	14.1 (± 2.0)	15.4 (± 0.7)
<b>MDA-MB-231</b>	Basal	13.1 (± 2.0)	15.8 (± 1.7)	16.2 (± 3.3)
	HER2	13.9 (± 2.5)	13.5 (± 3.1)	20.0 (± 15.0)*
<b>SKBR3</b>	HER2	13.2 (± 2.7)	15.5 (± 1.9)	18.3 (± 1.3)
<b>HUVEC</b>	N.A.	6.1 (± 1.1)	14.2 (± 1.0)	8.0 (± 4.0)*

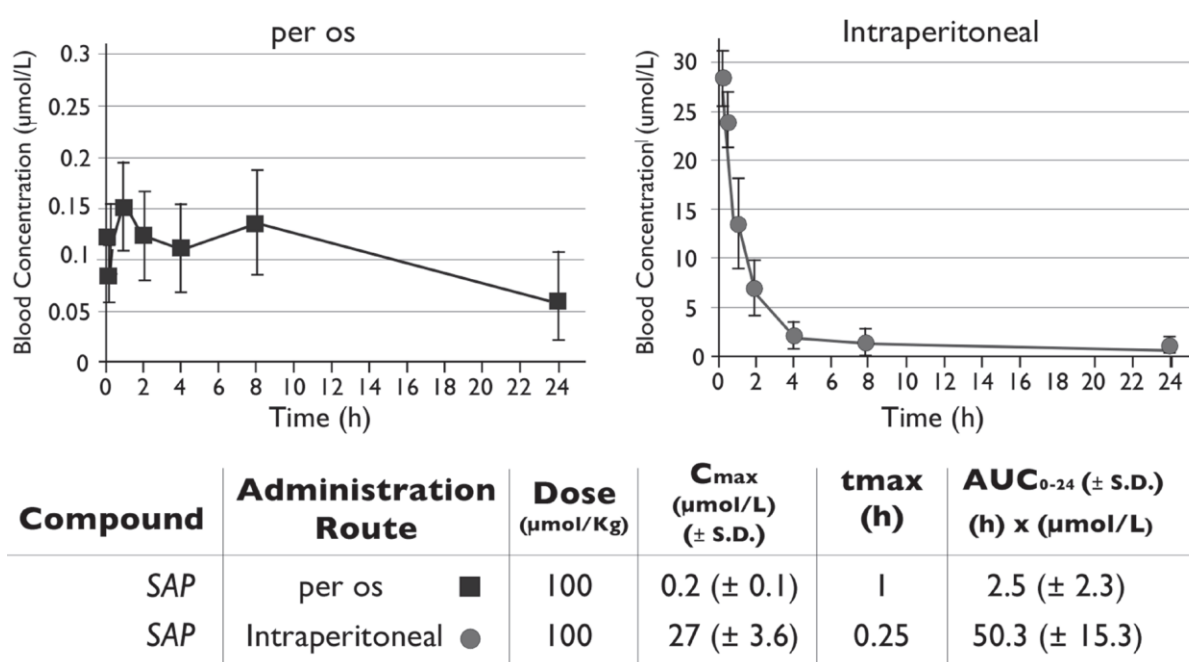
**Εικόνα 15.** *In silico* και *in vitro* ανάλυση του SAP.

(A) Αποτελέσματα *docking* του SAP και του Sunitinib. Μοριακά μοντέλα της περιοχής πρόσδεσης του ATP των υποδοχέων VEGFR-2, PDGFR-β και KIT που δείχνουν την προβλεπόμενη θέση πρόσδεσης του Sunitinib (μπλε) και SAP (πορτοκαλί), σε σύγκριση με την κρυσταλλική διαμόρφωση του Sunitinib (πράσινο) σε VEGFR-2 και KIT. (B) Σύνοψη δραστηριότητας κινάσης *in vitro* για υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (RTKs) παρουσία Sunitinib ή SAP (± SD). (C) Δοκιμή αυτοφωσφορλίωσης σε κύτταρα για τους υποδοχείς VEGFR-2 και PDGFR-β παρουσία Sunitinib ή SAP (± SD). (D) Δοκιμή κυτταροτοξικότητας MTT σε διάφορες καρκινικές σειρές του μαστού και HUVEC (Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας). [1]

#### 4.1.3 Φαρμακοκινητική αξιολόγηση

Η *in vitro* αποτελεσματικότητα του SAP, που αξιολογήθηκε από την ομάδα Argyros et al. (2017), ακολουθήθηκε από τη φαρμακοκινητική του αξιολόγηση σε ποντίκια. Αρχικά, οι φαρμακοκινητικοί (PK, pharmacokinetic) παράμετροι του SAP συγκρίθηκαν σε από του στόματος έναντι IP (Intraperitoneal) χορήγηση (Εικόνα 16) [1]. Όταν δόθηκε από το στόμα, το SAP πέτυχε μέγιστες συγκεντρώσεις στο αίμα σε 1h  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$  με  $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}} 2.5 \pm 2.3 \text{ h} \times \mu\text{mol/L}$ . Υψηλότερη έκθεση στο αίμα παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση IP, όπου το SAP έφτασε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο αίμα στις 0.25 h με  $C_{\text{max}} 27 \pm 3.6 \mu\text{mol/L}$  και  $\text{AUC}_{0-24 \text{ h}} 50.3 \pm 15.3 \text{ h} \times \mu\text{mol/L}$ . Δεν παρατηρήθηκαν σημεία δυσφορίας ή εμφανής τοξικότητας σε κανένα από τα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτές οι φαρμακοκινητικές μετρήσεις ήταν ανώτερες από το sunitinib όταν συγκρίθηκαν

άμεσα με προηγούμενα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας την ίδια οδό χορήγησης (IP) και μια ισομοριακή δόση ( $C_{max}$  για sunitinib ήταν  $6.5 \pm 0.9 \mu\text{mol/L}$  στις 0.25 h με  $AUC_{0-24\text{h}} 21.4 \pm 3.6 \text{ h} \times \mu\text{mol/L}$ ) [38]. Σύμφωνα με τους βιοχημικούς προσδιορισμούς, χρειάστηκαν συγκεντρώσεις SAP περίπου  $0.1 \mu\text{mol/L}$  για την αναστολή των στοχευόμενων κινασών (Εικόνα 15 σχήμα A-C). Τα φαρμακοκινητικά πειράματα έδειξαν ότι μετά από δόση IP (στα  $100 \mu\text{mol/Kg}$ ), συγκεντρώσεις τουλάχιστον  $0,1 \mu\text{mol/L}$  θα μπορούσαν να διατηρηθούν για περισσότερο από 8 ώρες μετά τη δόση ( $SAP C_{8\text{h}} = 0.93 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ ), υποδεικνύοντας ότι μια δόση IP στα  $100 \mu\text{mol/Kg}$  θα πρέπει να είναι η προτιμώμενη οδός χορήγησης για τις επακόλουθες προκλινικές μελέτες αποτελεσματικότητας σε ποντίκια. [1]



**Εικόνα 16.** Φαρμακοκινητική αξιολόγηση του SAP.

Σε θηλυκά ποντίκια NOD / SCID ( $n = 6$ ) χορηγήθηκε δόση per os ή IP με SAP ( $100 \mu\text{mol/Kg}$ ) και συλλέχθηκαν δείγματα αίματος σε επιλεγμένα χρονικά σημεία. Τα επίπεδα φαρμάκου του SAP παρακολούθηθηκαν με LC-MS/MS. Η AUC για κάθε θεραπεία υπολογίστηκε ως μέτρο έκθεσης στο φάρμακο με την πάροδο του χρόνου. [1]

#### 4.1.4 In vivo ανάλυση

Προκειμένου να προσδιοριστεί εάν η θεραπεία με SAP θα μπορούσε να εξαλείψει όγκους τόσο αποτελεσματικά όσο το sunitinib σε δύο επιθετικές (ανεξάρτητες από ER και PR) μορφές καρκίνου του μαστού (BrCa), η ομάδα Argyros et al. (2017) δημιούργησε ξενομοσχευμένους

ποντικούς που έφεραν καθιερωμένους όγκους χρησιμοποιώντας τις κυτταρικές σειρές HCC1954 ή MDA-MB-231. Η φαρμακολογική θεραπεία ξεκίνησε όταν οι όγκοι έφτασαν τα 100-150 mm<sup>3</sup> για συνολική περίοδο 18 ημερών, χρησιμοποιώντας μια δόση κάθε μορίου στα 100 μmol/Kg/ημέρα. Στο τέλος της περιόδου της θεραπείας (d18) για το ζωικό μοντέλο HCC1954 (Εικόνα 17 σχήμα A) το μέσο μέγεθος όγκου ήταν 428 ± 101 mm<sup>3</sup> για ποντικούς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μάρτυρα, σημαντικά (P <.001) υψηλότερο σε σύγκριση με το SAP (76 ± 52 mm<sup>3</sup>) ή sunitinib (152 ± 57 mm<sup>3</sup>) σε ποντίκια που έλαβαν θεραπεία.

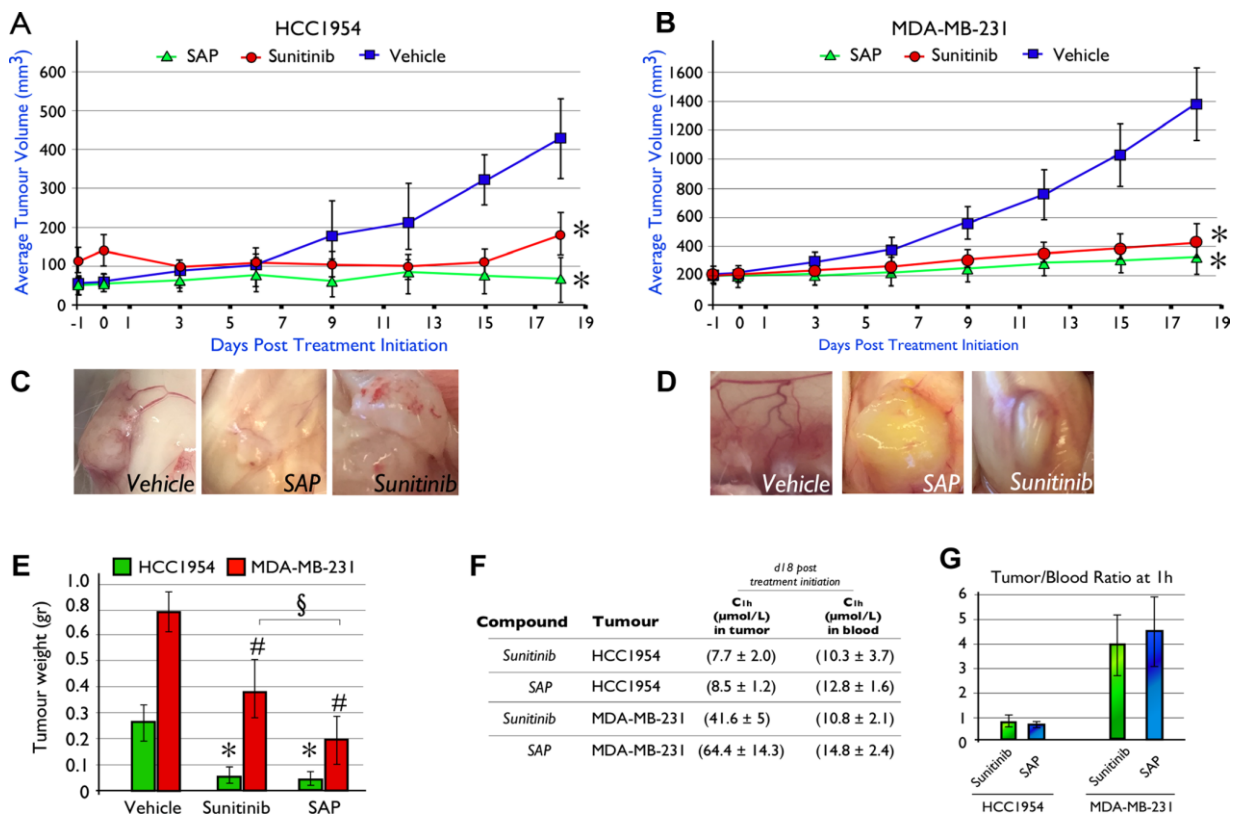
Ομοίως για τα ζώα που φέρουν όγκο MDA-MB-231, τόσο το sunitinib όσο και το SAP ήταν σε θέση να καθυστερήσουν σημαντικά (P <0.001) την ανάπτυξη του όγκου σε σύγκριση με τα ζώα που έλαβαν μάρτυρα. Τα ζώα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με SAP είχαν μέσο μέγεθος όγκου σε 18 ημέρες (d18) 265 ± 98 mm<sup>3</sup>, τα ζώα που έλαβαν sunitinib ήταν κατά μέσο όρο 367 ± 117 mm<sup>3</sup> ενώ τα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα έφθασαν ένα μέσο μέγεθος 1361 ± 250 mm<sup>3</sup> (Εικόνα 17 σχήμα B). Είναι ενδιαφέρον, μια σύγκριση μεταξύ SAP και sunitinib στις 18 ημέρες (d18) αποκάλυψε ότι το SAP ήταν στατιστικά πιο αποτελεσματικό (P <.001). Η νεο-αγγειογένεση ήταν εμφανής κατά τη θυσία και στα δύο μοντέλα ξενομοσχεύματος καρκίνου του μαστού BrCa, για ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα (Εικόνα 17 σχήμα C-D), ενώ σημειώθηκαν μόνο ίχνη νεοπλασματικών αγγείων για SAP και sunitinib σύμφωνα με τον αντιαγγειογενετικό μηχανισμό δράσης τους.

Το μέσο βάρος όγκου κατά τη θυσία για το ζωικό μοντέλο HCC1954 BrCa ήταν 0.26 ± 0,07 g για ποντικούς που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα (Εικόνα 17 σχήμα E), σημαντικά (P <.001) βαρύτερο από το SAP (0.05 ± 0.02 g) και το sunitinib (0.07 ± 0.03 g). Στο ζωικό μοντέλο MDA-MB-231 τα αντίστοιχα βάρη όγκου ήταν 0.8 ± 0.2 g για όχημα, 0.2 ± 0.1 g για το SAP και 0.4 ± 0.1 g για το sunitinib, και με τα δύο φάρμακα σε σύγκριση με τα ζώα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα (P <.001). Και στα δύο ζωικά μοντέλα, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο συνολικό σωματικό βάρος των ζώων ή εμφανή τοξικότητα.

Οι συγκεντρώσεις sunitinib και SAP στο αίμα και στον ιστό όγκου μετρήθηκαν στη 1 ώρα μετά από την τελική δόση σε 18 ημέρες (d18) και για τα δύο ζωικά μοντέλα HCC1954 και MDA-MB-231 (Εικόνα 17 σχήμα F). Για το ξενομόσχευμα HCC1954, η συγκέντρωση στο αίμα για το sunitinib C<sub>1h</sub> ήταν 10.3 (± 3.7) μmol/L και για το SAP C<sub>1h</sub> ήταν 12.8 (± 1.6) μmol/L, ενώ αντίστοιχα η συγκέντρωση στον ιστό του όγκου (νεοπλασματικός ιστός) C<sub>1h</sub> ήταν 7.7 (± 2.0) μmol/L για το sunitinib και 8,5 (± 1,2) μmol/L για SAP, δημιουργώντας αναλογία όγκου/αίματος (t/b) 0.8 για sunitinib και 0.7 για SAP (Εικόνα 17 σχήμα G). Στο

ζωικό μοντέλο MDAMB-231, η  $C_{1h}$  στο αίμα για sunitinib ήταν  $10.8 (\pm 2.1)$   $\mu\text{mol/L}$  και  $14.8 (\pm 2.4)$   $\mu\text{mol/L}$  για το SAP αντίστοιχα, ενώ οι τιμές για τα επίπεδα του ενδοογκικού φαρμάκου για sunitinib ήταν  $41.6 (\pm 5)$   $\mu\text{mol/L}$  και  $64.4 (\pm 14.3)$   $\mu\text{mol/L}$  για το SAP αντίστοιχα.

Ο λόγος όγκου/αίματος (t/b) για το ξενομόσχευμα MDA-MB-231 ήταν 4.0 για το sunitinib και 4.5 για το SAP (Εικόνα 17 σχήμα G). Παρά το γεγονός ότι το sunitinib είναι πιο λιπόφιλο σε σύγκριση με το SAP (Εικόνα 14 σχήμα C), οι υψηλές ενδοογκικές συγκεντρώσεις του SAP και στα δύο ξενομοσχεύματα μπορεί να οφείλονται σε χαμηλότερη κάθαρση ιστού σε σύγκριση με το sunitinib, μια ιδιότητα που είναι ευνοϊκή για τη στόχευση όγκου. [1]



**Εικόνα 17.** *In vivo* αποτελεσματικότητα του SAP ( $100\mu\text{mol/Kg}$ ) σε σχέση με ισοδύναμη ποσότητα του Sunitinib σε NOD/SCID ποντίκια.

(A) HCC1954 (B) MDA-MB-231 κυτταρικές σειρές. Χορηγήθηκε δόση (IP) στα ποντίκια σε καθημερινή βάση SAP Sunitinib, μάρτυρας. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο 10 όγκων που προέρχονται από τουλάχιστον 5 ποντίκους. (C) Μείωση της νέο-αγγειογένεσης στην σειρά HCC1954 και (D) στην MDA-MB-231 στα σχήματα. (E) Μέσο βάρος όγκων την ημέρα της θυσίας 18<sup>η</sup> ημέρα (d18). (F) Μέσος όρος επιπέδων φαρμάκου στο αίμα και στον όγκο τα οποία μετρήθηκαν με LC/MS 1 ώρα μετά την τελική δόση (18<sup>η</sup> ημέρα). (G) Αναλογία όγκου/αίματος των SAP και Sunitinib μετά από μετρήσεις με υγρή χρωματογραφία/φασματογράφια μάζας (LC/MS/MS). [1]

#### 4.1.5 Ιστολογική και μοριακή διερεύνηση

Οι πληροφορίες σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό που είναι υπεύθυνος για την *in vivo* αποτελεσματικότητα του SAP και του sunitinib ελήφθησαν από την ομάδα Argyros et al. (2017) με ιστολογική, ανοσοϊστοχημική και στοχευτική ανάλυση διαμόρφωσης όγκων που συλλέχθηκαν από όλα τα ζώα την ημέρα της θυσίας (18<sup>η</sup> ημέρα, d18) τόσο για την κυτταρική σειρά HCC1954 όσο και για την MDA-MB-231 σε ζωικά μοντέλα (Εικόνα 18) [1].

Για ποντίκια που έλαβαν θεραπεία για την καρκινική σειρά HCC1954, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση IHC (immunohistochemistry) σε τομές όγκου χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των Ki-67 (δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και CD31 (δείκτης αγγειογένεσης) έδειξε σημαντική μείωση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μειωμένη αγγειογένεση σε SAP και sunitinib σε σύγκριση με τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα (Εικόνα 18 σχήμα A).

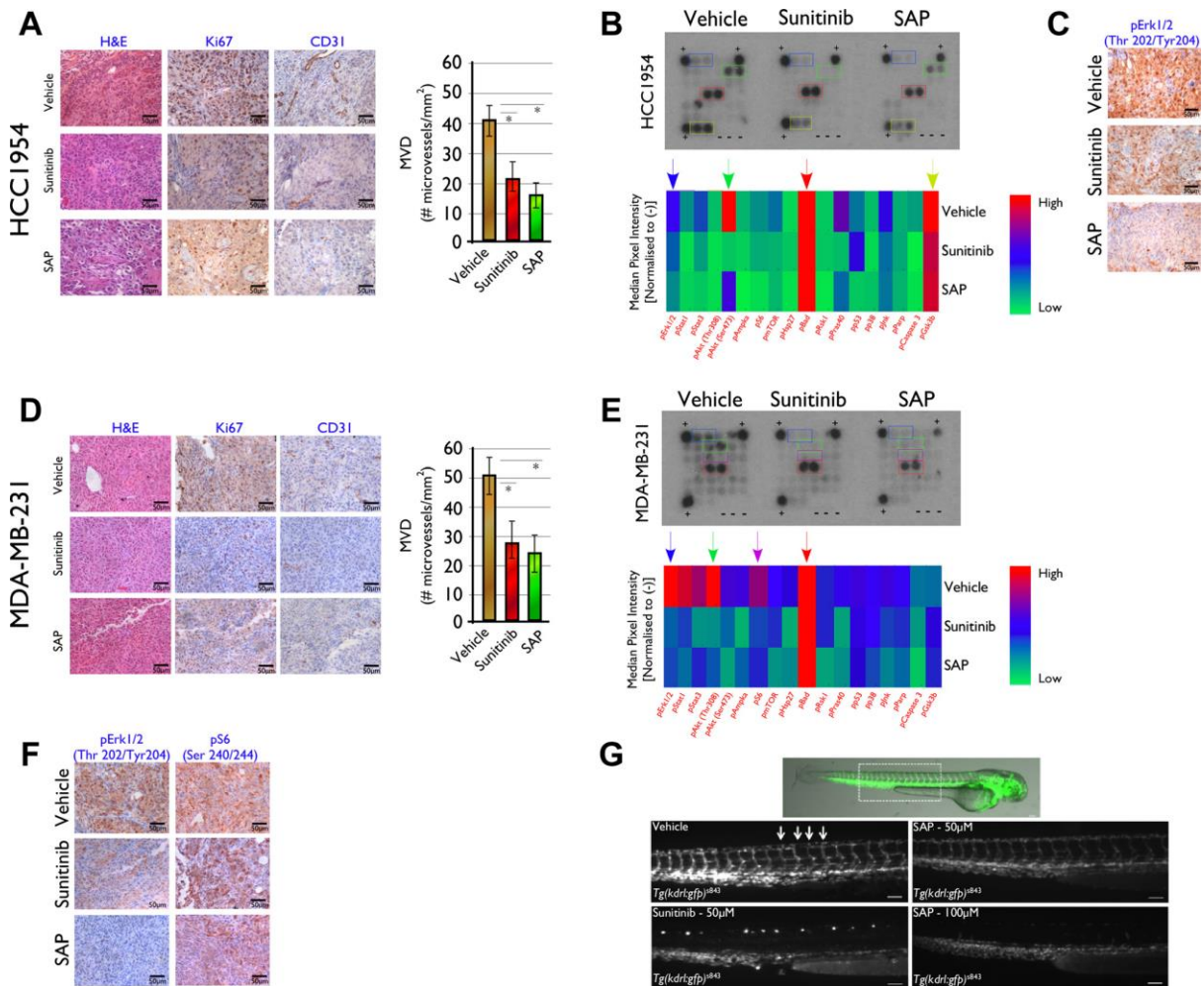
Το Ki-67 αξιολόγησε το PI (post-inoculation) ποντικών που έλαβαν θεραπεία με SAP ήταν  $19.2 \pm 4.9\%$  και  $22.9 \pm 7.8\%$  για το sunitinib (και τα δύο σε  $P < .001$  έναντι ποντικών που έλαβαν μάρτυρα) ενώ για ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με μάρτυρα ήταν  $82.3 \pm 11.1\%$ . Ο μέσος αριθμός κυττάρων CD31+ σε τμήματα όγκου ποντικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με SAP ήταν  $16.6 \pm 7.1$  ( $P < .001$  έναντι ποντικών που έλαβαν μάρτυρα) και  $21.6 \pm 9.0$  ( $P < .001$  σε σύγκριση με ποντίκια που έλαβαν μάρτυρα) για sunitinib έναντι  $42.4 \pm 8.3$  για ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μάρτυρα (Εικόνα 18 σχήμα A). Προκειμένου να αποκτηθεί μια βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης του SAP σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία, διερευνήθηκε, από την ομάδα Argyros et al. (2017) η κατάσταση φωσφορυλίωσης 18 κινασών σε εκχυλίσματα ιστού όγκου και συγκρίθηκαν με εκχυλίσματα όγκων ποντικών που είχαν υποστεί αγωγή με μάρτυρα και sunitinib (Εικόνα 18 σχήμα B). Σημειώθηκε σημαντική μείωση των pErk1/2 (Thr202/Tyr204), pAkt (Ser473) και pGSK3 (Ser9) σε ποντίκια με SAP και sunitinib έναντι ποντικών που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα, σύμφωνα με την ικανότητα αναστολής φωσφορυλίωσης πολλαπλών φάσεων του sunitinib και του σχεδιασμένου αναλόγου SAP. Υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης pBad (Ser112) ενδεικτικά αυξημένων επιπέδων απόπτωσης παρατηρήθηκαν σε όλες τις ομάδες θεραπείας. Τα μειωμένα επίπεδα του pErk1/2 (Thr202/Tyr204) επαληθεύτηκαν από την ομάδα Argyros et al. (2017) σε επόμενα πειράματα IHC ανοσοϊστοχημείας (Εικόνα 18 σχήμα C). Μια παρόμοια ανάλυση ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε σε τομές όγκου από τα ξενομοσχευμένα ποντίκια MDA-MB-231 (Εικόνα 18 σχήμα D). Σε αυτήν την περίπτωση, ο Ki-67 αξιολόγησε το PI ποντικών που έλαβαν θεραπεία με SAP ήταν  $20.11 \pm 4.5\%$ , για το sunitinib η αντίστοιχη τιμή ήταν  $20.9 \pm 5.6\%$  ( $P < .001$  και

για τα δύο φάρμακα σε σύγκριση με ποντίκια που έλαβαν μάρτυρα), ενώ για θεραπεία με μάρτυρα ήταν  $97.4 \pm 7.2\%$ . Ο μέσος αριθμός κυττάρων CD31+ σε τομές όγκου ποντικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με SAP ήταν  $25.7 \pm 11.8$ , για sunitinib  $28.1 \pm 11.3$  (αμφότερα σε  $P < 0,001$  έναντι ποντικών που έλαβαν όχημα) και για μάρτυρα  $50.6 \pm 10.2$ .

Η ανάλυση της κατάστασης της φωσφορυλίωσης των 18 κινασών σε εκχυλίσματα ιστού όγκου (Εικόνα 18 σχήμα E), αποκάλυψε σημαντική μείωση κυρίως των pErk1/2 (Thr202/Tyr204), pAkt (Ser473) και pS6 (Ser235/236) στο SAP και το sunitinib έναντι σε ποντίκια που έλαβαν θεραπεία με μάρτυρα. Και πάλι, υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης pBad (Ser112) ενδεικτικά αυξημένων επιπέδων απόπτωσης παρατηρήθηκαν σε όλες τις ομάδες θεραπείας. Τα μειωμένα επίπεδα των pErk1/2 (Thr202/Tyr204) και pS6 (Ser235/236) επαληθεύτηκαν σε επόμενα πειράματα IHC (Εικόνα 18 σχήμα F).

Επιπλέον, για *in vivo* μοντέλο αποτελεσματικότητας του SAP χρησιμοποιήθηκε η καθιερωμένη δοκιμή αναστολής αγγειογένεσης zebrafish από την ομάδα Argyros et al. (2017). Χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά έμβρυα Tg(kdrl:gfp)<sup>s843</sup> που υποβλήθηκαν σε θεραπεία από 24 έως 48 hpf (hours post fertilization) με ισομοριακές ποσότητες είτε SAP είτε sunitinib. Σε Tg(kdrl:gfp)<sup>s843</sup> διαγονιδιακά έμβρυα η έκφραση EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) καθοδηγείται από το kdrl, ενδοθηλιακό ειδικό προαγωγό αντιπροσωπευτικό της σηματοδότησης VEGF και επισημαίνει όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στα έμβρυα zebrafish τα ενδοσωμικά αγγεία (ISVs, Intersomitic Vessels) επισημαίνονται πρώτα με kdrl:gfp σε 23 hpf. Αυτά είναι μερικώς κατοχυρωμένα με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας στα 1,5 dpf (day post fertilization) και δείχνουν ισχυρή κυκλοφορία κατά 2 dpf. Τα αποτελέσματα της επίδρασης της ισομοριακής SAP και της sunitinib φαίνονται στην εικόνα 18 σχήμα G. Όχι τοξικά ή εκτός στόχου μορφολογικά φαινότυποι παρατηρήθηκαν μετά από 24 ώρες θεραπείας με 50  $\mu\text{M}$  SAP ή sunitinib. Τα έμβρυα του control (που υποβλήθηκαν σε αγωγή με DMSO) είχαν τακτοποιημένα τα ενδοσωμικά αγγεία (ISVs) τους σε μια εξαιρετικά κανονική σειρά, ενώ η θεραπεία με 50  $\mu\text{M}$  sunitinib ανέστειλε ισχυρά την αγγειογενετική βλάστηση και δεν υπήρχαν ISVs στα 48 hpf. Από την άλλη πλευρά, τα ISVs εμβρύων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με SAP φάνηκαν να αναπτύσσονται σχεδόν κανονικά με μικρή αναστολή σχηματισμού ISVs, η οποία ήταν πιο βαθιά στα 100  $\mu\text{M}$ . Η παρατηρούμενη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα από το SAP αποσαφηνίστηκε μετά από μετρήσεις βιοκατανομής ολόκληρων εμβρύων LC-MS/MS που κατέδειξαν κατά προσέγγιση 50% πρόσληψη του πιο υδρόφιλου SAP από έμβρυα ψαριών στις 24 ώρες μετά την έκθεση στο φάρμακο, σε αντίθεση με την πρόσληψη άνω του 90% του πιο λιπόφιλου sunitinib (τα δεδομένα δεν εμφανίζονται). [1]





**Εικόνα 18.** Ιστολογική και μοριακή διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του SAP στα τμήματα όγκου HCC1954 και MDA-MB-231 κατά την έναρξη της θεραπείας σε 18 ημέρες.

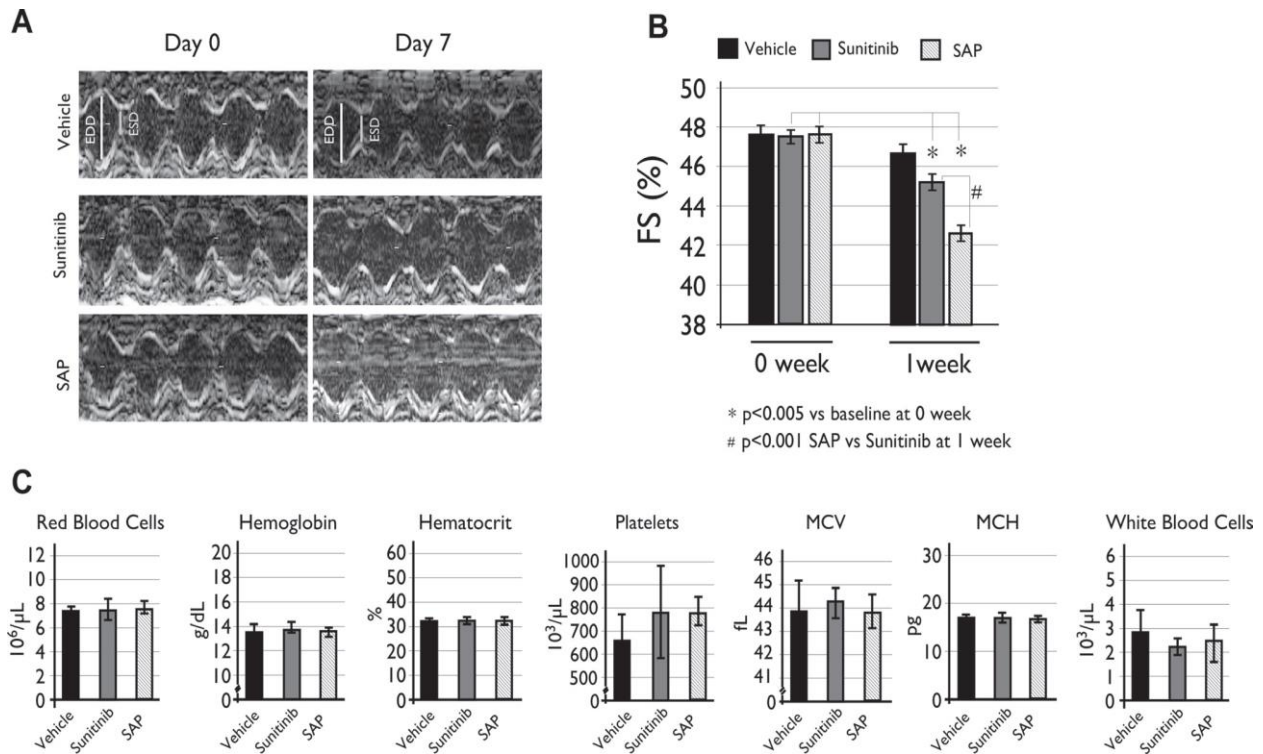
(A) Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση σε τμήματα όγκου HCC1954 έδειξε σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Ki-67) και της αγγειογένεσης (CD31) σε SAP και sunitinib έναντι ποντικών που υποβλήθηκαν σε αγωγή με control. (B) Ανάλυση θερμικού χάρτη λύματος ιστού HCC1954 που δείχνει την κατάσταση φωσφορύλιωσης in vitro 18 κινασών για όλους τους ποντικούς που υποβλήθηκαν σε αγωγή. Τα δεδομένα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 10 όγκων από πέντε ποντίκια για κάθε θεραπεία. Ανιχνεύθηκαν μειωμένα επίπεδα φωσφορυλιωμένων GSK3, Akt και Erk1/2 για SAP και sunitinib έναντι ποντικών που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα και (C) επαληθεύτηκαν για Erk1/2 με IHC. (D) Μια παρόμοια ανάλυση στα ξενομοσχεύματα MDA-MB-231 αποκάλυψε μειωμένο πολλαπλασιασμό και αγγειογένεση καθώς και (E) μειωμένη φωσφορύλιωση των Akt, S6 και Erk1/2 για SAP και sunitinib έναντι σε ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα (F) Τα μειωμένα επίπεδα φωσφορύλιωσης για συγκεκριμένες κινάσες επαληθεύτηκαν με IHC για Erk1/2 και S6. Για κάθε φωτογραφία IHC, το καφέ δείχνει το προϊόν αντίδρασης DAB με τα αντιπροσωπευτικά πεδία x40 που εμφανίζονται. Ράβδος κλίμακας: 50  $\mu$ m. (G) Αναστολή αγγειογένεσης στο Zebrafish από το SAP και το sunitinib. Επικάλυψη εικόνων φθορισμού και φωτεινών πεδίων ενός οχήματος που έχει υποστεί επεξεργασία (DMSO) Tg(kdr1: gfp)<sup>843</sup> έμβρυο στα 48hpf. Το κουτί με διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει τη θέση των εικόνων που εμφανίζονται στους άλλους πίνακες. Μικροσκοπικές εικόνες φθορισμού εμβρύων 48 hpf που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία από 24 έως 48 hpf με όχημα ή 50  $\mu$ M SAP ή sunitinib και 100  $\mu$ M SAP. Έμβρυα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα και 50  $\mu$ M SAP εμφάνισαν ομοιόμορφη έκφραση GFP (Green Fluorescent Protein) στα ενδοσωμικά αγγεία ταυτοποιημένα με λευκά βέλη. Το Sunitinib στα 50  $\mu$ M και το SAP στα 100  $\mu$ M ανέστειλαν την αγγειογενετική βλάστηση στον κορμό του zebrafish. Ράβδος κλίμακας 100  $\mu$ m. [1]

#### 4.1.6 Αξιολόγηση τοξικότητας

Λαμβάνοντας υπόψη τη γνωστή καρδιοτοξικότητα του sunitinib και των σχετικών μορίων [34, 44], αξιολογήθηκε από την ομάδα Argyros et al. (2017) η καρδιακή λειτουργία των θηλυκών ποντικών C57BL/6 που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μάρτυρα ή ένωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο το SAP όσο και το sunitinib είχαν στατιστικά σημαντική μείωση% FS (Fractional Shortening) μετά τη θεραπεία, με το SAP να εμφανίζεται ελαφρώς πιο καρδιοτοξικό από το sunitinib (Εικόνα 19 σχήμα A-B). Τα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με SAP είχαν μείωση% FS από τη βασική μέτρηση  $47.48 \pm 0.91$  σε  $42.38 \pm 0.76$ ,  $P < .0001$  μία εβδομάδα μετά τη θεραπεία. Η αντίστοιχη τιμή % FS για το sunitinib μειώθηκε από  $47.48 \pm 1.05$  σε  $45.42 \pm 0.11$ ,  $P = .0047$ ), ενώ τα ποντίκια που υποβλήθηκαν σε αγωγή με μάρτυρα είχαν μη σημαντική πτώση στο% FS (από  $47.49 \pm 1.16$  σε  $46.34 \pm 0.56$ ) όπως φαίνεται στην Εικόνα 19 σχήμα B.

Η αιματοτοξικότητα του SAP και του sunitinib αξιολογήθηκε επίσης από την ομάδα Argyros et al. (2017) για όλους τους ποντικούς που έλαβαν θεραπεία στο τέλος των πειραμάτων καρδιοτοξικότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια ήπια αλλά στατιστικά μη σημαντική διαφορά σε πληθυσμούς λευκών αιμοσφαιρίων WBC (White Blood Cells) μεταξύ οχήματος ( $2.90 \pm 0.8 \times 10^3$  κύτταρα), sunitinib ( $2.24 \pm 0.5 \times 10^3$  κύτταρα) και SAP ( $2.54 \pm 1.0 \times 10^3$  κύτταρα) σε ποντίκια που έλαβαν θεραπεία (Εικόνα 19 σχήμα C). Όλες οι άλλες παράμετροι αίματος που μετρήθηκαν παρέμειναν σταθερές, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι το SAP είχε παρόμοιο αιματοτοξικό προφίλ με το sunitinib υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. [1]





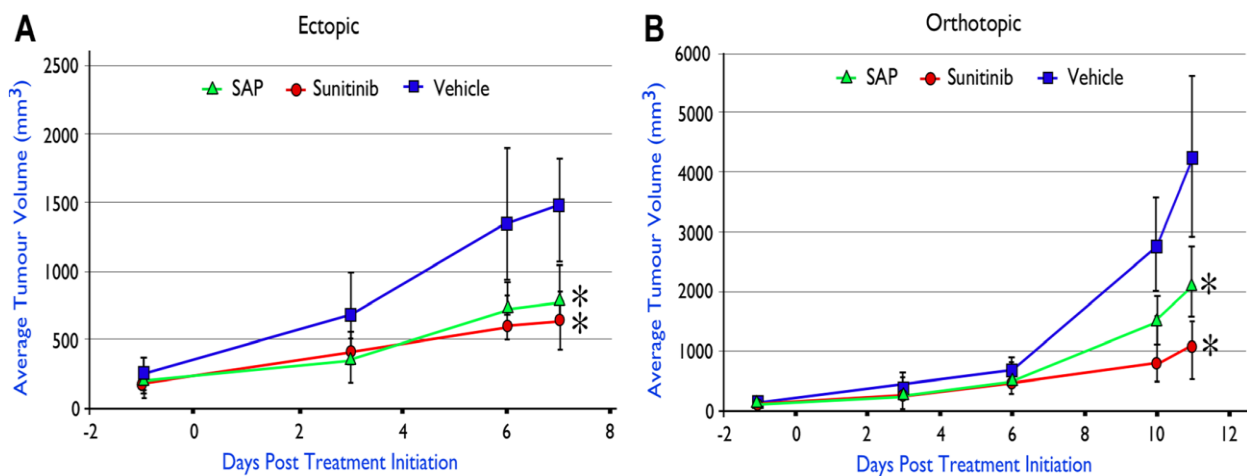
Εικόνα 19. Αξιολόγηση τοξικότητας του SAP.

(A) Μετρήσεις ηχοκαρδιογραφίας καρδιακής αριστερής κοιλίας LV (left ventricular) με αντιπροσωπευτικά ηχοκαρδιογραφήματα M-mode και (B) %FS μείωση σε σύγκριση με τα επίπεδα αναφοράς σε μια εβδομάδα θεραπείας. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσο ± SD και η τιμή  $P < .005$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. (C) Αιματολογική ανάλυση των ίδιων ποντικών C57BL/6 που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα καρδιοτοξικότητας. Κάθε στήλη είναι ο μέσος όρος τουλάχιστον οκτώ ποντικών ± SD με τιμή  $P < .05$  που θεωρείται στατιστικά σημαντική. MCV (Mean Cell Volume): μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων, MCH (Mean Cell Hemoglobin): μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης. [1]

#### 4.1.7 In vivo αντικαρκινική αποτελεσματικότητα σε συγγενικά ζωικά μοντέλα καρκίνου του μαστού (BrCa)

Παρά την αποτελεσματικότητα και το ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας του SAP σε ξενομοσχευμένα μοντέλα πρωτογενούς καρκίνου του μαστού BrCa, ένα κρίσιμο ερώτημα που είχε παραμείνει ήταν η αξιολόγησή του σε ένα πιο κλινικά σχετικό μοντέλο του BrCa που θα συνεπαγόταν αλληλεπίδραση καρκίνου με το ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο είναι ζωτικής σημασίας για την εξέλιξη της νόσου. Έτσι η ομάδα Argyros et al. (2017) δημιούργησε συγγενικά ζωικά μοντέλα καρκίνου του μαστού σε ανοσοεπαρκή ποντίκια C57BL/6 χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά E0771 BrCa, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς προηγουμένως για την αξιολόγηση του sunitinib [45].

Ισομοριακές ποσότητες SAP και sunitinib αξιολογήθηκαν είτε σε εκτοπική (Εικόνα 20 σχήμα Α) είτε σε ορθοτοπική (Εικόνα 20 σχήμα Β) E0771 εμφύτευση χρησιμοποιώντας ζώα με πανομοιότυπο γενετικό υπόβαθρο, με τα αποτελέσματα να δείχνουν σημαντική αναστολή ανάπτυξης όγκου τόσο από το SAP όσο και από το sunitinib ( $P < .01$ ) και στις δύο περιπτώσεις, σε αντίθεση με τα ζώα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με μάρτυρα που έπρεπε να θυσιαστούν ηθικά (την 11η ημέρα) λόγω ενός μεγάλου φορτίου όγκου. Μετά τη θυσία δεν παρατηρήθηκε μακροσκοπική μεταστατική βλάβη σε κανένα από τα ποντίκια που έλαβαν θεραπεία, παρά το υψηλό μεταστατικό δυναμικό αυτού του συγκεκριμένου μοντέλου [1, 46].



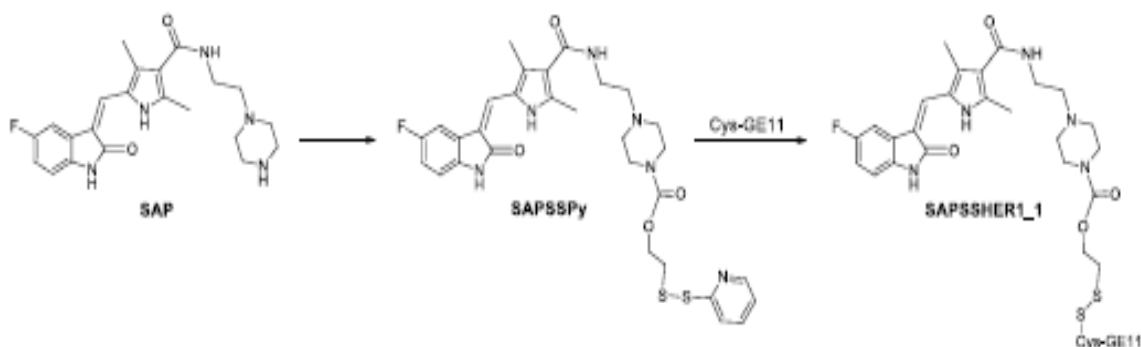
**Εικόνα 20.** *In vivo* αποτελεσματικότητα του SAP σε σχέση με ισομοριακές ποσότητες Sunitinib σε ποντίκια C57BL/6 με εμφύτευση της κυτταρικής γραμμής E0771 για τον καρκίνο του μαστού

(Α) Εκτοπικός  $n=5$  (η μεταμοσχευμένη περιοχή είναι διαφορετική από την προέλευση των καλλιεργημένων κυττάρων) (Β) Ορθοτοπικός  $n=6$  (τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μεταμοσχεύονται στην ίδια θέση προέλευσης του όγκου), συγκριτικά με την ομάδα οχημάτων με βάση τη δοκιμασία σύγκρισης Turkey-Kramer. [1]

Ένα μακροχρόνιο πρόβλημα στην ανάπτυξη φαρμάκων είναι η συχνή αποτυχία των προκλινικών ζωικών μοντέλων της νόσου να προβλέψουν με ακρίβεια την κλινική δραστηριότητα [57, 58]. Αν και υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ ανθρώπων και ποντικών, στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την ομάδα Argyros et al. (2017) τουλάχιστον το συγγενικό μοντέλο διατηρεί την ομοιογένεια του BrCa που προέρχεται από γενετικό υπόβαθρο παρόμοιο με το ζώο ξενιστή [59], διασφαλίζοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις του ανοσοποιητικού και του καρκίνου-ξενιστή διατηρούνται πιο πιστά από ό,τι στα ξενομοσχευμένα ζωικά μοντέλα. Σίγουρα το συγγενικό μοντέλο έχει τους περιορισμούς του με σημαντικές διαφορές στο στρώμα καθώς και στην έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία μεταξύ ποντικών και ανθρώπου, αλλά το γεγονός ότι το SAP ανέστειλε την ανάπτυξη όγκων είναι σίγουρα ένα ισχυρό σημείο προς την περαιτέρω ανάπτυξή του.

## 5.1 Στρατηγικές Σχεδιασμού Στοχευτικών Συζευγμάτων του SAP

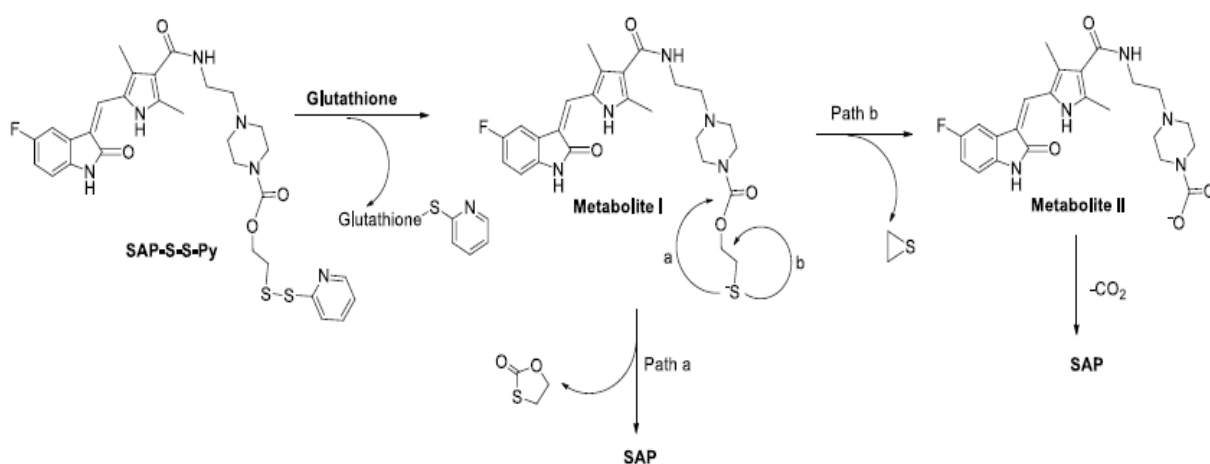
Με την σύνθεση του SAP καταστρώθηκαν από την κ. Φωκά Δημοσθένη κάποιες στρατηγικές σύζευξης του SAP με διασπώμενες γέφυρες, μια από τις οποίες είναι ο δισουλφιδικός δεσμός για την απελευθέρωση του φαρμάκου. Στην πλειονότητα των πρωτεϊνών, ζεύγη κυστεϊνών σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους, γεφυρώνοντας διαφορετικά τμήματα μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή διαφορετικές αλυσίδες ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου σταθεροποιώντας έτσι τη δομή των πρωτεϊνών. Κατά συνέπεια, η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών είναι σημαντική για τις πρωτεΐνες που εκκρίνονται έξω από τα κύτταρα, καθώς εντός των κυττάρων το περιβάλλον είναι αναγωγικό με συνέπεια οι δισουλφιδικοί δεσμοί να μην είναι γενικά σταθεροί. Για το λόγο αυτό η ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη επέλεξε ως διασπώμενη γέφυρα τον δισουλφιδικό δεσμό. Πιο συγκεκριμένα, με την είσοδο του συζεύγματος φαρμάκου-πεπτιδίου στο καρκινικό κύτταρο αναμένεται να προκληθεί αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού από την περίσσεια γλουταθειόνης που υπάρχει στα καρκινικά κύτταρα, πυροδοτώντας έτσι την απελευθέρωση του SAP. Συνεπώς, το δισουλφιδικό ανάλογο του SAP-S-S-Py θα μπορούσε να προκύψει από το SAP το οποίο με τη σειρά του θα μπορούσε να δώσει πρόσβαση και σε άλλα συζεύγματα για παράδειγμα τύπου SAPSSHER1\_1 κατόπιν αντίδρασης με το Cys-GE11 (Εικόνα 21). [43]



**Εικόνα 21.** Στρατηγική σχεδιασμού συζευγμάτων μέσω δισουλφιδικής γέφυρας S-S, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43]

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από μόρια τριών διαφορετικών αμινοξέων: του γλουταμινικού οξέος, της κυστεΐνης και της γλυκίνης. Είναι μια θειόλη αλλά συγχρόνως και ένα δικαρβονικό οργανικό οξύ. Μετά την ανάπτυξη ενός όγκου, αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης μπορεί να δράσουν προστατευτικά για τα καρκινικά κύτταρα,

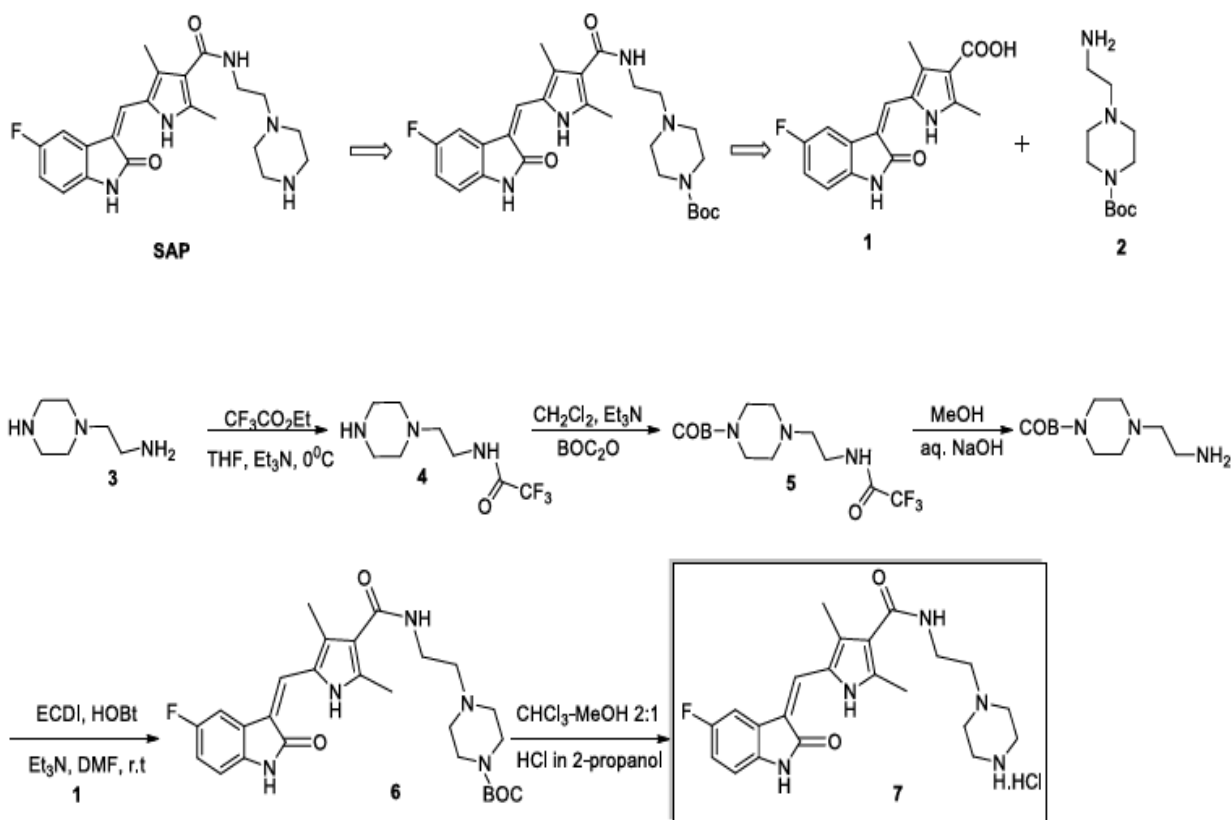
παρέχοντας τους αντίσταση κατά των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων [47]. Ο μηχανισμός που ίσως να συμβάλλει στην απελευθέρωση του SAP (S-S-Py) είναι ο εξής: η γλουταθειόνη η οποία βρίσκεται σε περρίσεια στα καρκινικά κύτταρα ανάγει τον δισουλφιδικό δεσμό του συζεύγματος μόλις αυτό εισέλθει στο καρκινικό κύτταρο και απελευθερώνεται η δραστική ουσία μέσω δυο πιθανών μονοπατιών: 1) του μονοπατιού a (path a) όπου μέσω του μεταβολίτη I απελευθερώνεται 1,3-οξαθειολαν-2-όνη και το SAP, και 2) του μονοπατιού b (path b) όπου ο μεταβολίτης I μπορεί να μετατραπεί στον μεταβολίτη II με απόσπαση επισουλφιδίου και στη συνέχεια διάσπαση του μεταβολίτη II στο SAP με απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα (Εικόνα 22) [47].



**Εικόνα 22.** Μηχανισμός απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας του SAP με διάσπαση δισουλφιδικού δεσμού από την γλουταθειόνη, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43]

### 5.1.1 Σύνθεση του SAP.HCL

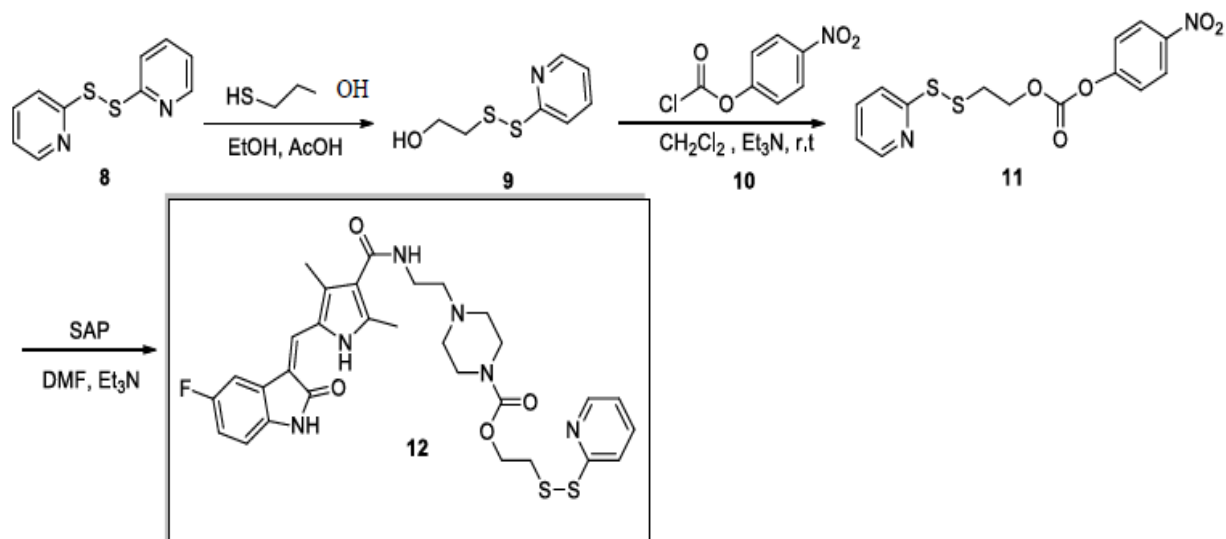
Υποθετικά, ότι το SAP θα μπορούσε να προέλθει από την αποπροστασία της ένωσης 6, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να σχηματιστεί από τη σύζευξη του εμπορικά διαθέσιμου καρβοξυλικού οξέος 1 και της πρωτοταγούς αμίνης 2. Εκλεκτική προστασία της διαμίνης 3 με CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Et έδωσε το τριφθοροακεταμίδιο 4 το οποίο στη συνέχεια μετατράπηκε στον καρβαμικό εστέρα 5 κατόπιν αντίδρασης με BOC<sub>2</sub>O. Διάσπαση του τριφθοροακεταμιδίου υπό βασικές συνθήκες έδωσε την αμίνη 2 που στη συνέχεια συζεύχθηκε με το καρβοξυλικό οξύ 1, παρουσία EDCI και HOBt, παράγοντας το αμίδιο 6. Αποπροστασία της BOC ομάδας του αμιδίου 6 παρουσία HCl οδήγησε στην απομόνωση του υδροχλωρικού άλατος του SAP (Εικόνα 23). [43]



**Εικόνα 23.** Σύνθεση του *SAP.HCl*, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43]

### 5.1.2 Σύνθεση Δισουλφιδικής Γέφυρας SAP-S-S-Py

Η σύνθεση της δισουλφιδικής γέφυρας του SAP, δηλαδή του SAP-S-S-Py, ξεκίνησε από το δισουλφίδιο 8 όπου με την προσθήκη της μερκαπτοαιθανόλης οδήγησε στο σχηματισμό της αλκόολης 9. Αντίδραση της αλκόολης 9 με τον χλωροφορμικό εστέρα 10 παρήγαγε τον καρβονικό εστέρα 11 που στη συνέχεια μετατράπηκε στην επιθυμητή ένωση SAP-S-S-Py κατόπιν αντίδρασης με SAP (Εικόνα 24) [43].



**Εικόνα 24.** Σύνθεση της δισουλφιδικής γέφυρας SAP-S-S-Py, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43]

## Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Εισαγωγή- Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας in vitro μελέτης ήταν η διερεύνηση της κυτταροτοξικής δράσης δύο υποανάλογων του SAP, του SAP-S-S-Py και του SAP.HCL, σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα CaCo2, κολο-ορθικού καρκίνου, για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Το οξινδολικό αυτό παράγωγο (SAP) καθώς και τα τροποποιημένα μόρια του (SAP-S-S-Py και SAP.HCL) συντέθηκαν από την ομάδα του αναπληρωτή καθηγητή κ. Φωκά Δημοσθένη στο εργαστήριο Βιοϊατρικής και Χημικής Τεχνολογίας του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αυτή η διερεύνηση συμβάλλει στην πιο αποτελεσματική και στοχευμένη δράση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα και όγκους που υπερεκφράζονται από διάφορους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης. Τέτοιου τύπου λοιπόν στοχευτικά συζεύγματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια νέα θεραπευτική προσέγγιση για την καλύτερη αντιμετώπιση ποικίλων μορφών καρκίνου.



## 2.1 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1.1 Συνθήκες Καλλιέργειας Κυττάρων

Όλα τα κύτταρα φυλάσσονται σε δοχείο υγρού αζώτου μέσα σε κρυοφιαλίδια των 2,5 ml (Corning-Costar, Cambridge, MA) από όπου και ανακαλλιεργούνται. Στις παρούσες δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν ειδικά αποστειρωμένα με γ-ακτινοβολία τρυβλία ανάπτυξης των κυττάρων και όλα τα αναλώσιμα είχαν αποστειρωθεί σε αυτόκλειστο στους 121°C, για 20 λεπτά. Το δωμάτιο των κυτταροκαλλιιεργειών αποστειρώνονταν μετά το πέρας των εργασιών με ακτινοβολία UV, όπως και η εστία κάθετης νηματικής ροής (laminar flow hood), όπου πραγματοποιούνταν οι διεργασίες των κυττάρων. Ο θάλαμος νηματικής ροής αποτελείται από ηθμούς υψηλής απόδοσης, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να συγκρατούν το 99,97% των σωματιδίων διαμέτρου 0,3μm. Έτσι με αυτόν τον τρόπο επιτελείται η αποστείρωση του αέρα στη hood, ούτως ώστε ο χώρος χειρισμού των κυττάρων να διαθέτει άσηπτες συνθήκες. Επίσης, τα δοχεία που εισάγονται στη hood θα πρέπει να απολυμανθούν, ψεκάζοντάς τα με αιθανόλη. Τα αναλώσιμα επίσης είναι αποστειρωμένα με τη μέθοδο της υγρής θερμότητας στους 70°C, με την οποία επιτελείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών των μικροοργανισμών. Η επώαση των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Incubator) σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% v/v διοξειδίου του άνθρακα, για την διατήρηση σταθερού pH. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- high glucose, Gibco, Glasgow, UK) εμπλουτισμένο με 10% ορό νεογέννητου βοδιού FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco) και 1% μίγμα αντιβιοτικών παραγόντων όπως η πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Το θρεπτικό υλικό των κυττάρων στο υγρό άζωτο δεν περιέχει αντιβιοτικά και είναι εμπλουτισμένο με 10% DMSO v/v (Dimethyl Sulfoxide, Sigma, Chemical Co). Το DMSO εμποδίζει τη δημιουργία κρυστάλλων πάγου που θα καταστρέφουν τα κύτταρα.

### 2.1.2 Καρκινική Κυτταρική Σειρά

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά CaCo-2. Είναι ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Τα CaCo-2 είναι μια αθανατοποιημένη κυτταρική σειρά ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου. Χρησιμοποιείται κυρίως ως υπόδειγμα του εντερικού επιθηλιακού φραγμού. Στην καλλιέργεια, τα κύτταρα CaCo-2 διαφοροποιούνται αυθόρμητα σε ένα ετερογενές μείγμα εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. Αναπτύχθηκε το 1977 από τον Jorgen Fogh στο Sloan-Kettering Institute for Cancer Research.

Πιο συγκεκριμένα, η ανθρώπινη επιθηλιακή κυτταρική σειρά Caco-2 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μοντέλο του εντερικού επιθηλιακού φραγμού όπως αναφέραμε παραπάνω. Αυτή η κυτταρική σειρά προέρχεται αρχικά από καρκίνωμα του παχέος εντέρου. Ωστόσο, μια από τις πιο επωφελείς ιδιότητές της είναι η ικανότητά της να διαφοροποιείται αυθόρμητα σε μια μονοστιβάδα κυττάρων εκφράζοντας διάφορα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του ώριμου εντεροκυττάρου. Η κυτταρική σειρά Caco-2 είναι ετερογενής και περιέχει κύτταρα με ελαφρώς διαφορετικές ιδιότητες. Έτσι, οι συνθήκες που σχετίζονται με την καλλιέργεια φάνηκε να επηρεάζουν την έκφραση αυτών των χαρακτηριστικών, εν μέρει λόγω της εσωτερικής ετερογένειας της γονικής κυτταρικής σειράς, οδηγώντας στην επιλογή των υποπληθυσμών των κυττάρων να γίνουν εμφανή στην καλλιέργεια. Λόγω αυτού, έχει δημιουργηθεί μια ποικιλία κλωνοποιημένων κυτταρικών σειρών Caco-2. Αρκετές κλωνικές κυτταρικές σειρές έχουν απομονωθεί από τη γονική γραμμή, εμφανίζοντας γενικά μια πιο ομοιογενή έκφραση χαρακτηριστικών διαφοροποίησης, ενώ δεν εκφράζουν πάντα όλα τα χαρακτηριστικά της γονικής γραμμής. Οι συνθήκες που σχετίζονται με την καλλιέργεια, καθώς και οι διαφορετικές κυτταρικές σειρές Caco-2 που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να μην είναι άμεσα συγκρίσιμα τα αποτελέσματα και κατ'επέκταση καθιστούν συχνά εξαιρετικά δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων στη βιβλιογραφία. [48,49,50]

### 2.1.3 Απόψυξη κυττάρων

Στην απόψυξη κυττάρων ακολουθείτε η εξής διαδικασία:

- Σε τρυβλίο 60mm ή 100mm προστίθενται 4ml ή 9ml αντίστοιχα, πλήρους θρεπτικού υλικού (DMEM-high glucose, +10% FBS, +1% P/S).
- Ένα cryovial με κύτταρα μεταφέρεται από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο 37°C για 1-2 λεπτά μέχρι να τηχθεί το εναιώρημα.
- Με μία πιπέτα γίνεται αναδιασπορά των κυττάρων και μεταφέρονται στο τρυβλίο με το πλήρες θρεπτικό υλικό.
- Γίνεται ελαφριά ανακίνηση του τρυβλίου σε σχήμα σταυρού και σε σχήμα άπειρου ώστε να επιτευχθεί η σωστή ανακατανομή των κυττάρων.
- Αναγράφονται πάνω στο τρυβλίο η κυτταρική σειρά, η ημερομηνία, τα αρχικά εργαζόμενου και η γενιά «passage».
- Η καλλιέργεια των κυττάρων παρατηρείται στο μικροσκόπιο και ακολούθως το τρυβλίο μεταφέρεται στον επωαστικό θάλαμο, 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) στους 37 °C.
- Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού.

#### 2.1.4 Επανακαλλιέργεια των κυττάρων

Τα κύτταρα κατά την επώαση τους στα τρυβλία μπορούν να πολλαπλασιαστούν μέχρι έναν ορισμένο πληθυσμό, ο οποίος αν ξεπεραστεί ενεργοποιεί μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου. Για την αποφυγή του θανάτου των κυττάρων η για λόγους επιθυμητών αραιώσεων χρησιμοποιείται η τεχνική της επανακαλλιέργειας. Για την διατήρηση λοιπόν της κυτταροκαλλιέργειας και της βέλτιστης ανάπτυξης των κυττάρων είναι απαραίτητη η αραιώση της πυκνότητας της καλλιέργειας. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου, τότε πραγματοποιείται η διαδικασία της κυτταροκαλλιέργειας, η οποία είναι η εξής:

- Αρχικά όλα τα αντιδραστήρια που θα χρησιμοποιηθούν θερμαίνονται στους 37 °C στο υδατόλουτρο για 15 min.
- Η καλλιέργεια των κυττάρων παρατηρείται στο μικροσκόπιο ώστε να εξακριβωθεί αν τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια του βιβλίου και αν έχει επιτευχθεί περίπου 80% κάλυψη
- Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό (DMEM- high glucose, +10% FBS, +1% P/S) από τα κύτταρα με πιπέτα Pasteur και πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις των 4ml PBS (Phosphate Buffered Saline), για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ορού, ο οποίος περιέχει θρεπτικό υλικό και αδρανοποιεί την τρυψίνη.
- Προστίθεται 0,5ml ή 1ml (αναλόγως τα τρυβλία 60mm ή 100mm αντίστοιχα) τρυψίνης (Trypsin-EDTA 1x in PBS) στην επιφάνεια του πιάτου και επωάζεται στους 37°C για 2-3 λεπτά.
- Αφού περάσει ο χρόνος επώασης τα κύτταρα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο για να εξακριβωθεί αν έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια του τρυβλίου. Σε περίπτωση που δεν κινούνται τότε αφήνονται να επωαστούν για ένα ακόμη 1 λεπτό.
- Παράλληλα ετοιμάζονται νέα τρυβλία στα οποία προστίθενται κατάλληλος όγκος πλήρους θρεπτικού υλικού 4ml ή 9ml αντίστοιχα (ανάλογα με την διάμετρο του τρυβλίου 60mm ή 100mm)
- Προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού στο εναιώρημα των κυττάρων.
- Αναδιασπορά του εναιωρήματος και έντονο πιπετάρισμα ώστε να σπάσουν τα συσσωματώματα και μεταφορά στα νέα τρυβλία.
- Μεταφορά των τρυβλίων στον επωαστικό κλίβανο (Incubator).

### 2.1.5 Μέτρηση κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

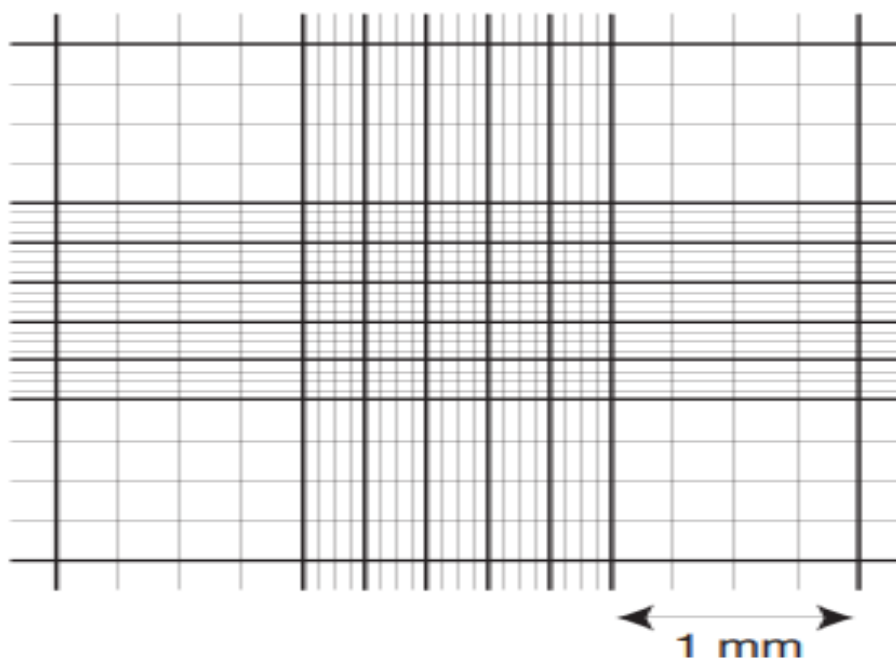
Για τον προσδιορισμό του κυτταρικού πληθυσμού χρησιμοποιείται η μέθοδος μέτρησης κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται για την επίστρωση συγκεκριμένου αριθμού κυττάρων ώστε να επιτευχθεί η ιδανική πληρότητα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Ο χειρισμός των κυττάρων είναι ίδιος με την τεχνική της επανακαλλιέργειας μέχρι και την προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού στο εναιώρημα των κυττάρων.

Στη συνέχεια ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Αναδιασπορά του εναιωρήματος και μεταφορά σε falcon.
- Φυγοκέντρηση στα 2500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Έπειτα πραγματοποιείται απόρριψη του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό 3-5ml.
- Τέλος, προσθήκη 10 μl εναιωρήματος κυττάρων τοποθετούνταν και στις δύο πλευρές της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer και εκτελούνταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο (Εικόνα 24).



*Εικόνα 24. Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer.*



**Εικόνα 25.** Μέτρηση κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. [51]

Η εικόνα που λαμβάνεται στο μικροσκόπιο είναι αυτή που φαίνεται στην εικόνα 25. Μετρούνται τα κύτταρα των δυο πλευρών διαγώνια και η συγκέντρωση των κυττάρων-κυτταρικός πληθυσμός υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Συγκέντρωση (αριθμός κυττάρων ανά ml)} = \text{αριθμός κυττάρων} / \text{αριθμός τετραγώνων} * 10^4$$

#### 2.1.6 Αποθήκευση κυττάρων στο υγρό άζωτο (Κρυοσυντήρη)

Για τη διακοπή της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων και την επίτευξη της διατήρησης κυτταρικών σειρών για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς αυτά να υφίστανται αλλοιώσεις χρησιμοποιείται η τεχνική της κρυοσυντήρησης. Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε ειδικά φιαλίδια (cryovials) και διατηρούνται σε δοχεία υγρού αζώτου σε θερμοκρασίες που φτάνουν στους -196 °C. Πιο συγκεκριμένα όταν η καλλιέργεια των κυττάρων καλύπτει το 70-80 % του τρυβλίου που επωάζονται, αυτά δύναται να καταψυχθούν για μελλοντική επανακαλλιέργεια. Για την κατάψυξη αυτών ακολουθείται η εξής πορεία:

- Το θρεπτικό μέσο DMEM (+10% FBS, +1 % P/S) το PBS (Phosphate Buffered Saline) και η τρυψίνη (Trypsin-EDTA 1x in PBS) θερμαίνονται για 15 λεπτά στους 37 °C σε υδατόλουτρο.

- Αφαιρείται το μέσο από τα τρυβλία και πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις τον 4ml PBS.
- Προστίθενται 0,5ml ή 1ml (αναλόγως αν τα τρυβλία είναι 60mm ή 100mm αντίστοιχα) τρυψίνη και το τρυβλίο επωάζεται για 2-3 λεπτά στον υποθετικό θάλαμο.
- Το τρυβλίο παρατηρείται στο μικροσκόπιο για να ελεγχθεί η δράση της τρυψίνης. Η τρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο και αποκόπτει πεπτιδικούς δεσμούς που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες των κυττάρων και οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την προσκόλλησή τους στο τρυβλίο.
- Ύστερα τα κύτταρα συλλέγονταν σε ειδικό φιαλίδιο (falcon) και φυγοκεντρώνταν στα 2500 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απορριπτόταν και το ίζημα που σχηματίζεται από τα κύτταρα (pellet) επαναιωρούνταν σε 1ml freezing media (90% FBS + 10% DMSO).
- Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρθηκε σε cryovial, αποθήκευση για μία ημέρα στους -80°C και έπειτα στις φιάλες υγρού αζώτου.

### 2.1.7 Έλεγχος κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφοροδαμίνης Β (SRB)

Η δοκιμασία SRB (Σουλφοροδαμίνης Β) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της κυτταρικής πυκνότητας, βάση του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων. Γι' αυτό αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στη μελέτη της κυτταροτοξικότητας ενώσεων και στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μέθοδος βασίζεται στην εισαγωγή των μεθόδων αντιστρεπτής δέσμευσης χρωστικών σε πρωτεΐνες και χρησιμοποιεί την σουλφοροδαμίνη-Β ή SRB. Πιο συγκεκριμένα η SRB είναι μία έντονα κόκκινη χρωστική αμινοξανθίνης με δυο σουλφονικές ομάδες η οποία δεσμεύει τις κυτταρικές πρωτεΐνες προς σχηματισμό συμπλοκών. Όπως και άλλες χρωστικές αυτής της κατηγορίας (naphthol yellow S, Coomassie brilliant blue) χρησιμοποιούνται ευρέως για πρωτεϊνικές χρώσεις στην ιστοχημεία και τη μοριακή βιολογία. Σε ελαφρά όξινο περιβάλλον η SRB συνδέεται με τα βασικά αμινοξέα των κυτταρικών πρωτεϊνών. Σε μέσο όρο η περιεκτικότητα των κυττάρων σε πρωτεΐνη είναι σταθερή. Τα κύτταρα στο τέλος του πειράματος, δηλαδή τα σχηματιζόμενα έγχρωμα σύμπλοκα προσδιορίζονται ποσοτικά με φασματοόμετρο ELISA στα 492 nm, παρέχοντας τη δυνατότητα εκτίμησης της ολικής πρωτεϊνικής μάζας που είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων. Η μέθοδος προτείνεται ως η καταλληλότερη για πειράματα κυτταροτοξικότητας, εκτίμηση επιβίωσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν

εξετάζετε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων φαρμάκων. Επιπλέον η μέθοδος υιοθετήθηκε από το Εθνικό Αντικαρκινικό Ινστιτούτο των ΗΠΑ (National Cancer Institute, NCI) το 1992 και μέχρι σήμερα χρησιμοποιείται ως κύρια τεχνική εκτίμησης νέων κυτταροτοξικών ή κυτταροστατικών φαρμάκων[52, 53, 54, 55, 56]

Η ακριβής πειραματική διαδικασία είναι η εξής:

- Κύτταρα CaCo-2 επιστρώνονταν σε ειδικά τρυβλία 96 πηγαδιών (96-well) σε πυκνότητα 5000 κυττάρων/πηγαδάκι και επωάζονταν για 48 ώρες στον επωαστικό θάλαμο (37°C και 5% CO<sub>2</sub>).
- Μετά το πέρας των 48 ωρών και αφού τα κύτταρα είχαν προσκολληθεί στον πάτο του τρυβλίου, προστίθετο SAP (SAP.HCL ή SAP-S-S-Py) σε συγκεντρώσεις εύρους 0,1-10000 nM ή θρεπτικό υλικό (DMEM- high glucose, +10% FBS, +1%P/S) για την ανάλυση των control δειγμάτων.
- Τα κύτταρα επωάζονταν για 24 ή/και 48 ώρες με το SAP. Έπειτα ακολουθούσε η απόρριψη του υπερκειμένου και η μονιμοποίηση των κυττάρων με 50μL διαλύματος 50% w/v τριχλωροξικού οξέος (TCA, Trichloroacetic Acid) σε κάθε πηγαδάκι για 1 ώρα στους 4°C.
- Ύστερα, απορριπτόταν το τριχλωροξικό οξύ (TCA), πραγματοποιούνταν 4 εκπλύσεις με νερό βρύσης και τα τρυβλία αφήνονταν να στεγνώσουν μέσα στον απαγωγό σε θερμοκρασία δωματίου, overnight.
- Ακολουθούσε η προσθήκη 100μL διαλύματος 0,4% w/v Σουλφοροδαμίνης Β (SRB) σε κάθε πηγαδάκι και τα κύτταρα επωάζονταν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
- Στην συνέχεια απορριπτόταν το διάλυμα Σουλφοροδαμίνης Β και τα πηγαδάκια εκπλένονταν 3 φορές με 200μL διαλύματος 1% v/v οξικού οξέος (Acetic Acid) σε κάθε πηγαδάκι για να απομακρυνθεί όση χρωστική δεν είχε προσδεθεί.
- Τα τρυβλία αφήνονταν να στεγνώσουν για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέσα στον απαγωγό.
- Έπειτα προσθέτονταν 200μL διαλύματος 10mM Tris-base (pH=10,5) σε κάθε πηγαδάκι και επωάζονταν υπό ανακίνηση σε αναδευτήρα κλίσης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιούνταν η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε φασματοφωτόμετρο ELISA στα 492nm.

### 2.1.8 Φαρμακολογικοί Χειρισμοί

Για τα πειράματα μελέτης του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με χρώση Σουλφοροδαμίνης Β χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ενώσεις:

- SAP.HCL (6.1 mg, MW=447.94) σε συγκεντρώσεις 0,1-10000 nM
- SAP-S-S-Py (6 mg, MW=624.75) σε συγκεντρώσεις 0,1-10000 nM
- DMSO

### 2.1.9 Στατιστική Ανάλυση

Οι τιμές που ελήφθησαν από τη διεξαγωγή των δοκιμών αξιολογήθηκαν με το Student's t-test. Το όριο σημαντικότητας όλων των τιμών τέθηκε ως μικρότερο ή ίσο του 0.05 ( $P < 0.05$ , \*)

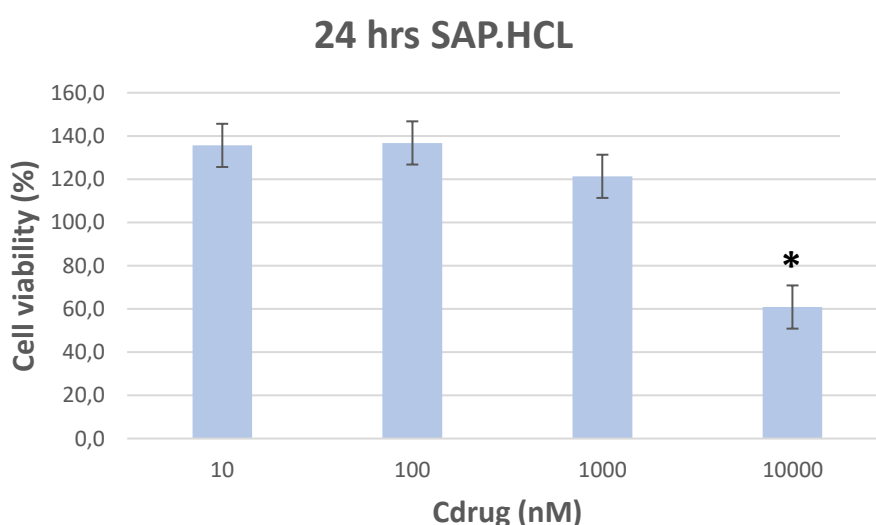


### 3.1 Αποτελέσματα- Συζήτηση

#### 3.1.1 Αξιολόγηση της επίδρασης του SAP στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων CaCo-2 (δοκιμασία SRB).

Για την αξιολόγηση της επίδρασης του SAP στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων CaCo-2 χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία της σουλφοροδαμίνης Β (srb assay). Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν με SAP.HCL, συγκέντρωσης εύρους 10-10000 nM για 24 και 48 ώρες και με SAP-S-S-Py, συγκέντρωσης εύρους 0,1-10000 nM για 24 και 48 ώρες. Κάθε φορά επιστρώνονταν 5.000 κύτταρα ανα πηγαδάκι.

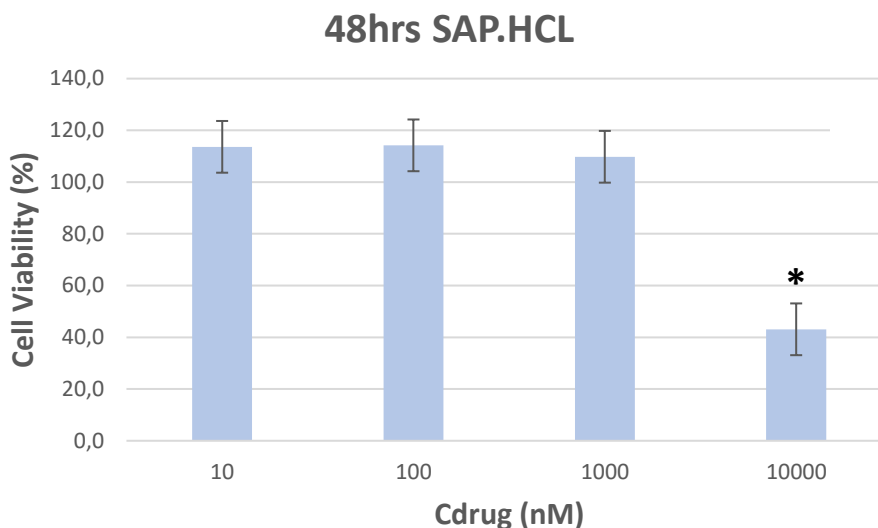
Στο Γράφημα 1. παρατηρούμε ότι το SAP.HCL στις 24 ώρες ανέστειλε των πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων CaCo-2 στην πιο υψηλή συγκέντρωση 10000 nM, όπου είναι και στατιστικά σημαντική η διαφορά (\*,  $P=0.005$ ). Το  $IC_{50}$  του SAP.HCL στις 24 ώρες υπολογίστηκε στα 11.614,7 nM (11,6147 $\mu$ M).  $IC_{50}= 11,6 \mu$ M



**Γράφημα 1.** Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP.HCL για 24 ώρες.

Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες σε DMEM. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 6 φορές. Στο διάγραμμα εμφανίζεται η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) των τιμών ενώ οι στήλες αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T-Test. (\*, $P<0.05$  Stat. Sig.)

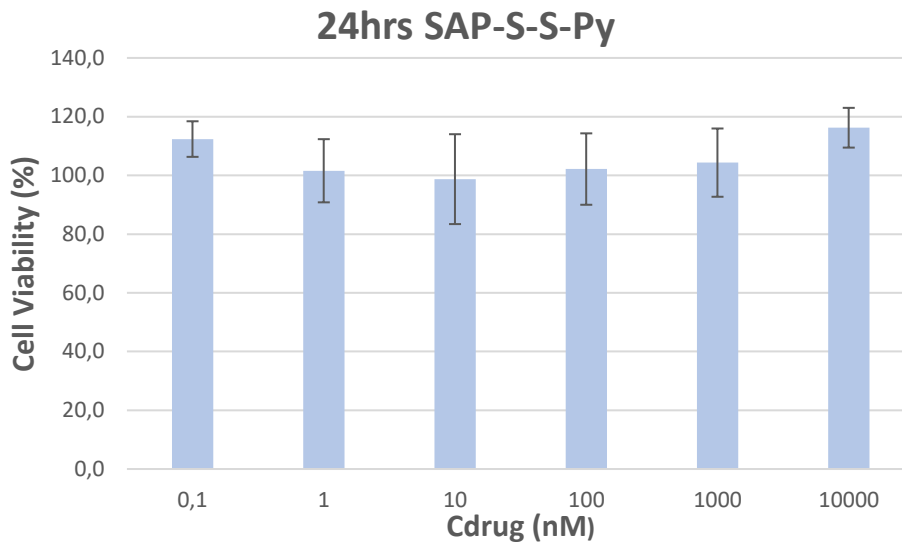
Παρομοίως στο Γράφημα 2. παρατηρούμε ότι το SAP.HCL στις 48 ώρες ανέστειλε των πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων CaCo-2 στην πιο υψηλή συγκέντρωση 10000 nM, όπου είναι και στατιστικά σημαντική η διαφορά (\*, P=0.0001). Το IC<sub>50</sub> του SAP.HCL στις 48 ώρες υπολογίστηκε στα 9.067,8 nM (9,0678 μM). IC<sub>50</sub>= 9,1 μM.



**Γράφημα 2.** Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP.HCL για 48 ώρες.

Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες σε DMEM. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 6 φορές. Στο διάγραμμα εμφανίζεται η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) των τιμών ενώ οι στήλες αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T-Test. (\*, P<0.05 Stat. Sig.)

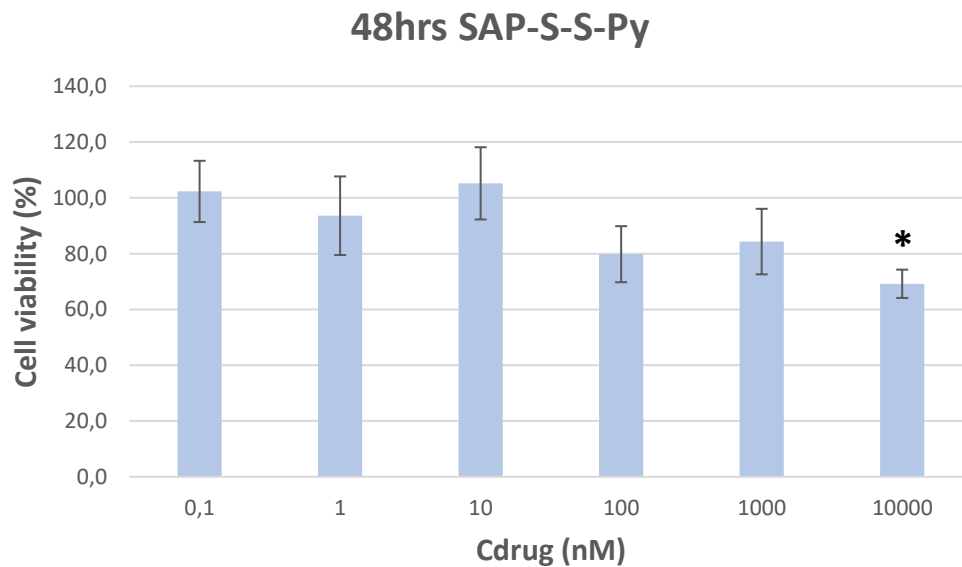
Στη συνέχεια στο Γράφημα 3. μελετήθηκε η επίδραση του SAP-S-S-Py για την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων CaCo-2 καθώς αυξάνονται οι δόσεις, όπου δυστυχώς δεν παρατηρήθηκε καμία τοξικότητα. Η δραστική ουσία SAP-S-S-Py σε αυτές τις συγκεντρώσεις και στις 24 ώρες επώασης δεν είναι τοξική.



**Γράφημα 3.** Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP-S-S-Py για 24 ώρες.

Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες σε DMEM. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 6 φορές. Δεν παρατηρήθηκε καμία τοξικότητα. Στο διάγραμμα εμφανίζεται η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) των τιμών ενώ οι στήλες αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή.

Ενώ στο Γράφημα 4 παρατηρούμε ότι το SAP-S-S-Py στις 48 ώρες ανέστειλε των πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων CaCo-2 στην πιο υψηλή συγκέντρωση 10000 nM, όπου είναι και στατιστικά σημαντική η διαφορά (\*, P=0.01). Το IC<sub>50</sub> του SAP-S-S-Py στις 48 ώρες υπολογίστηκε στα 21.416,5 nM (21,4165 μM). IC<sub>50</sub>= 21,4 μM.



**Γράφημα 4.** Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP-S-S-Py για 48 ώρες.

Η σύγκριση έγινε με ομάδα ελέγχου που εκτέθηκε για ίδια χρονικά διαστήματα και συνθήκες σε DMEM. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε 6 φορές. Στο διάγραμμα εμφανίζεται η τυπική απόκλιση (Standard Deviation) των τιμών ενώ οι στήλες αντιπροσωπεύουν την μέση τιμή. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με Student's T-Test. (\*, P<0.05 Stat. Sig.)

### 3.1.2 IC<sub>50</sub> Ημιμέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση

Το IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) είναι ένα μέτρο της δραστηριότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας. Το IC<sub>50</sub> είναι ένα ποσοτικό μέτρο που υποδεικνύει πόση ποσότητα μιας συγκεκριμένης ανασταλτικής ουσίας (π.χ. φάρμακο) απαιτείται για την αναστολή, in vitro, μιας δεδομένης βιολογικής διεργασίας ή βιολογικού συστατικού κατά 50%. Το βιολογικό συστατικό μπορεί να είναι ένα ένζυμο, κύτταρο, κυτταρικός υποδοχέας ή μικροοργανισμός. Οι τιμές IC<sub>50</sub> εκφράζονται τυπικά ως μοριακή συγκέντρωση. Το IC<sub>50</sub> χρησιμοποιείται συνήθως ως μέτρο της δραστηριότητας του ανταγωνιστή του φαρμάκου στη φαρμακολογική έρευνα. Το IC<sub>50</sub> είναι συγκρίσιμο με άλλα μέτρα ισχύος, όπως το EC<sub>50</sub> για διεγερτικά φάρμακα. [60]

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται συγκεντρωτικά ο πίνακας τιμών IC<sub>50</sub> για τις δυο δραστικές ουσίες SAP.HCL και SAP-S-S-Py με 24 ώρες και 48 ώρες επώασης.

*Γράφημα 5. Πίνακας τιμών IC<sub>50</sub>*

IC <sub>50</sub> (μmol/L)	24 hrs	48 hrs
SAP.HCL	11,6	9,1
SAP-S-S-Py	Non toxic	21,4

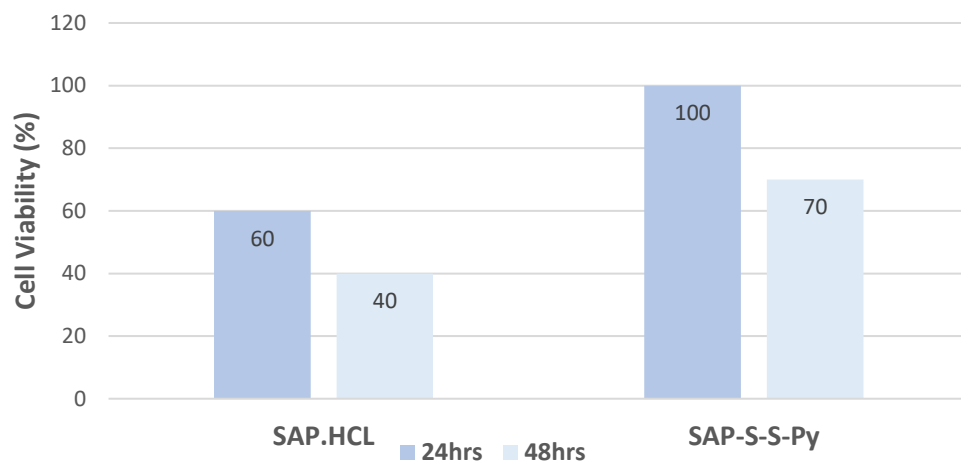
### 3.1.3 Συμπεράσματα

Μια υποκείμενη υπόθεση σχετικά με το σκεπτικό για τη χρήση αντιαγγειογενετικών θεραπειών είναι ότι όλοι οι τύποι καρκίνου εξαρτώνται από την αγγειογένεση και συνεπώς η αναστολή της αγγειογένεσης θα ήταν εξαιρετικά αποτελεσματική ως μια γενική θεραπεία καρκίνου. Ένα τέτοιο αντιαγγειογενετικό φάρμακο είναι η σουνιτινίμη αλλά λόγω υψηλής τοξικότητας και διάφορων άλλων παρενεργειών η χρήση του είναι περιορισμένη. Για να ελαττωθεί η τοξικότητα της σουνιτινίμης και να αυξηθεί η χρήση της, απαιτείται η στοχευμένη μεταφορά του φαρμακοφόρου στα καρκινικά κύτταρα. Επειδή η σουνιτινίμη δε δίνει άμεση πρόσβαση σε στοχευτικά συζεύγματα αυτού του τύπου λόγω έλλειψης λειτουργικών ομάδων στο μέρος του μορίου που εκτίθεται στο μέτωπο του διαλύτη, σχεδιάστηκε και συντέθηκε ένα νέο ανάλογο του Sunitinib το οποίο ονομάστηκε SAP, από την ομάδα Argyros et al. (2017). Το μόριο αυτό σχεδιάστηκε έτσι ώστε να διατηρηθεί η ισχύς της σουνιτινίμης αλλά με αρκετά

πλεονεκτήματα σε σχέση με το αρχικό μόριο, καθώς μετά από αξιολόγηση και σύγκριση βρέθηκε ότι εμφανίζει βελτιωμένες φαρμακοκινητικές παραμέτρους, καθώς και μεγαλύτερη πολική επιφάνεια, απουσία αιματολογικής τοξικότητας, αναστέλλει περισσότερους υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης, αναστέλλει το πρωτοογκογονίδιο του RET, εμφανίζει μειωμένους καρκινικούς δείκτες Ki-67 και CD31, καθώς και καλύτερη διαλυτότητα αλλά φέρει και τη σημαντική θέση σύζευξης που του προσφέρει η εισαγωγή του πιπεραζινικού δακτυλίου, γεγονός που καθιστά το νέο πλέον ανάλογο καταλληλότερο για συζεύξεις είτε με στοχευτικά πεπτίδια, είτε με αντισώματα είτε με άλλες χημικές ομάδες. Αφού υπήρχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα από αυτή τη μελέτη (Argyros et al. 2017), προχώρησαν και στη σύνθεση υποαναλόγων του SAP. [1]

Στην παρούσα μελέτη διενεργήθηκαν πειράματα για τη διερεύνηση της κυτταροτοξικής δράσης δύο υποαναλόγων του SAP, πιο συγκεκριμένα του SAP.HCL και του SAP-S-S-Py. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η καρκινική η κυτταρική σειρά CaCo-2, επιθηλιακά κύτταρα κολοορθικού καρκίνου. Στο SAP.HCL παρατηρήσαμε ότι στις 24 ώρες και στις 48 ώρες ανέστειλε των πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων CaCo-2 στην πιο υψηλή συγκέντρωση 10000 nM, όπου είναι και στατιστικά σημαντική η διαφορά. Στο SAP-S-S-Py παρατηρήσαμε ότι στις 24 ώρες δυστυχώς δεν υπήρξε καμία τοξικότητα ενώ στις 48 ώρες παρατηρήθηκε μια μικρή τοξικότητα 30%. Τα αποτελέσματα που λάβαμε είναι ενθαρρυντικά για περαιτέρω έρευνα με το SAP.HCL να είναι πιο τοξικό σε σχέση με το SAP-S-S-Py. Το συγκεκριμένο μόριο SAP και τα υποανάλογα του, SAP-S-S-Py και SAP.HCL συντέθηκαν στο εργαστήριο Βιοϊατρικής και Χημικής Τεχνολογίας του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων από την ομάδα του αναπληρωτή καθηγητή κ. Φωκά Δημοσθένη.

Συμπερασματικά, η ομάδα Argyros et al. (2017) έχει δημιουργήσει ένα ισχυρό ανάλογο με βάση τη σουνιτινίμη, το SAP, το οποίο χαρακτηρίζεται από ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι του γονικού μορίου, και της ικανότητας εύκολης σύζευξης με ένα πεπτίδιο στόχευσης ή αντίσωμα ή χημική ομάδα μέσω της αμινομάδας της πιπεραζίνης. Εξετάσαμε λοιπόν τα δύο παράγωγα του SAP, με το SAP.HCL να εμφανίζεται πιο αποτελεσματικό σε επίπεδο τοξικότητας σε σύγκριση με το SAP-S-S-Py. Στο παρακάτω γράφημα φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας των δύο μορίων για 24hrs και 48hrs.



**Γράφημα 6.** Κυτταροτοξικότητα SAP.HCL και SAP-S-S-Py μετά από 24hrs και 48hrs

## Λίστα Συντομογραφιών

BOC	tert-butoxycarbonyl
CF <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Et	ethyl trifluoro-acetate
EDCI	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
HOBt	Hydroxybenzotriazole
Et <sub>3</sub> N	Triethylamine
DMF	Dimethylformamide
MeOH	Methanol
THF	Tetrahydrofuran



## Παράρτημα Εικόνων

<b>Εικόνα 1.</b> Κύκλος καρκινικού κυττάρου.....	14
<b>Εικόνα 2.</b> Διαδικασία αγγειογένεσης καρκινικού κυττάρου.....	16
<b>Εικόνα 3.</b> Μετάσταση, πολύπλοκη και πολυσταδιακή διαδικασία.....	19
<b>Εικόνα 4.</b> Βήματα μεταστατικής διαδικασίας καρκινικών κυττάρων.....	21
<b>Εικόνα 5.</b> Σχηματική απεικόνιση ενός στοχευτικού συζεύγματος.....	24
<b>Εικόνα 6.</b> Διαδικασία ενδοκυττάρωσης στοχευτικού συζεύγματος.....	26
<b>Εικόνα 7.</b> Η επίδραση του μετασχηματισμού των επιθηλιακών κυττάρων στην πρόσβαση των υποδοχέων της εξωτερικής επιφάνειας.....	28
<b>Εικόνα 8.</b> Χημική δομή Σουνιτινίμπης.....	29
<b>Εικόνα 9.</b> Στοχευτικά συζεύγματα sunitinib του αναλόγου 17864.....	32
<b>Εικόνα 10.</b> Στοχευτικά συζεύγματα sunitinib του αναλόγου 17864-ULS με NH <sub>2</sub> -PAMAM-G3.....	33
<b>Εικόνα 11.</b> Στοχευτικά συζεύγματα του Sunitinib με κυκλικά ανάλογα c(AmpRGD).....	33
<b>Εικόνα 12.</b> Χημική δομή SAP σε σύγκριση με σουνιτινίμπη.....	34
<b>Εικόνα 13.</b> SAP ένα νέο ανάλογο της σουνιτινίμπης που παρέχει τη δυνατότητα πρόσδεσης με στοχευτικά συζεύγματα, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43].....	35
<b>Εικόνα 14.</b> Σύνθεση και χαρακτηρισμός του SAP.....	37
<b>Εικόνα 15.</b> In silico και in vitro ανάλυση του SAP.....	39
<b>Εικόνα 16.</b> Φαρμακοκινητική αξιολόγηση του SAP.....	40
<b>Εικόνα 17.</b> In vivo αποτελεσματικότητα του SAP (100μmol/Kg) σε σχέση με ισοδύναμη ποσότητα του Sunitinib σε NOD/SCID ποντίκια. [1].....	42
<b>Εικόνα 18.</b> Ιστολογική και μοριακή διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του SAP στα τμήματα όγκου HCC1954 και MDA-MB-231 κατά την έναρξη της θεραπείας σε 18 ημέρες.....	45
<b>Εικόνα 19.</b> Αξιολόγηση τοξικότητας του SAP.....	47
<b>Εικόνα 20.</b> In vivo αποτελεσματικότητα του SAP σε σχέση με ισομοριακές ποσότητες Sunitinib σε ποντίκια C57BL/6 με εμφύτευση της κυτταρικής γραμμής E0771 για τον καρκίνο του μαστού.....	48
<b>Εικόνα 21.</b> Στρατηγική σχεδιασμού συζευγμάτων μέσω δισουλφιδικής γέφυρας S-S, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43].....	49
<b>Εικόνα 22.</b> Μηχανισμός απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας του SAP με διάσπαση δισουλφιδικού δεσμού από την γλουταθειόνη, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43].....	50
<b>Εικόνα 23.</b> Σύνθεση του SAP.HCL, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43].....	51
<b>Εικόνα 24.</b> Σύνθεση της δισουλφιδικής γέφυρας SAP-S-S-Py, σύμφωνα με την ομάδα του κ. Φωκά Δημοσθένη. [43].....	52

## Παράρτημα Γραφημάτων

<b>Γράφημα 1.</b> Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP.HCL για 24 ώρες. ....	63
<b>Γράφημα 2.</b> Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP.HCL για 48 ώρες. ....	64
<b>Γράφημα 3.</b> Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP-S-S-Py για 24 ώρες.....	65
<b>Γράφημα 4.</b> Διαγραμματική απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων CaCo-2 ύστερα από επώαση με SAP-S-S-Py για 48 ώρες.....	66
<b>Γράφημα 5.</b> Πίνακας τιμών IC <sub>50</sub> .....	67
<b>Γράφημα 6.</b> Κυτταροτοξικότητα SAP.HCL και SAP-S-S-Py μετά από 24hrs και 48hrs.....	69

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] O. Argyros, T. Karampelas, A. Varela, X. Asvos, A. Papakyriakou, A. Agalou, D. Beis, C.H. Davos, D. Fokas, C. Tamvakopoulos, Targeting of the breast cancer microenvironment with a potent and linkable oxindole based antiangiogenic small molecule, *Oncotarget*. (2017). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16763>.
- [2] Murthy, M. S. S. (2000) Cancer Genes: The Molecular Militants. *Resonance*. 5: 45-59. <https://doi.org/10.1007/BF02840368>.
- [3] Harrington, K. J. (2008) Biology of Cancer. *Medicine*. 36: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2007.10.013>.
- [4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. (2008) *Molecular Biology of the Cell, 5th Edition*.
- [5] Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 144: 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [6] Kerbel RS. (2008) Tumor Angiogenesis. *The New England Journal of Medicine* 358: 2039-2049.
- [7] Roskoski, R. (2007) Sunitinib: A VEGF and PDGF Receptor Protein Kinase and Angiogenesis Inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 356: 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.156>.
- [8] Chinchar E, Makey K, Gibson J, Chen F, Cole S, Megason G, Vijayakumar S, Miele L, Gu J. (2014) Sunitinib significantly suppresses the proliferation, migration, apoptosis resistance, tumor angiogenesis and growth of triple-negative breast cancers but in-creases breast cancer stem cells. *Vasc Cell* 6, 12. <https://doi.org/10.1186/2045-824X-6-12>.
- [9] Yehia L, Boulos F, Jabbour M, Mahfoud Z, Fakhruddin N, El-Sabban M. (2015) Molecular Subtypes: Expression of HIF-1 alpha and Markers of Angiogenesis Are Not Signifi-cantly Different in Triple Negative Breast Cancer Compared to Other Breast Cancer Implications for Future Therapy. *PLoS One* 10: 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129356>.
- [10] Steeg S. (2003) Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells *Nature Reviews Cancer* 3: 55-63. <https://doi.org/10.1038/nrc967>.
- [11] McGee SF, Lanigan F, Gilligan E, Groner B. (2006) Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression. *EMBO Rep* 7: 1084-8. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400839>.

- [12] Faivre, S.; Demetri, G.; Sargent, W.; Raymond, E. (2007) Molecular Basis for Sunitinib Efficacy and Future Clinical Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 734–745. <https://doi.org/10.1038/nrd2380>.
- [13] Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182–1186.
- [14] Bicknell R. (2006) Targeting angiogenesis with monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 17 (Suppl 10):x76–x78.
- [15] Van Erp, Gelderblom H, Guchelaar HJ. (2009) Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*: 692-706. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2009.08.004>.
- [16] Ρεπανά, Κ., Παπαζήσης, Κ., Φούκας, Π., (2005) Κινάσες της τυροσίνης και καρκίνος. Η SYK κινάση της τυροσίνης. *Βήμα Κλινικής Ογκολογίας* 4: 229-241.
- [17] Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2015) *Essential cell biology*. Garland Publishing, Inc New York & London.
- [18] Rich JN, Bigner DD. (2004) Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat Rev Drug Discov* 3:430-446. <https://doi.org/10.1038/nrd1380>.
- [19] Srinivasarao, M.; Galliford, C. V.; Low, P. S. (2015) Principles in the Design of Ligand-Targeted Cancer Therapeutics and Imaging Agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 203–219. <https://doi.org/10.1038/nrd4519>
- [20] Minchinton AI, Tannock IF. (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.* 6(8):583-592. <https://doi.org/10.1038/nrc1893>.
- [21] Srinivasarao, M.; Low, P. S. (2017) Ligand-Targeted Drug Delivery. *Chem. Rev.*117: 12133–12164. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00013>.
- [22] Chow LQ, Eckhardt SG. (2007) Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 25(7):884-896.
- [23] Regina, A., Demeule, M., Che, C., Lavalle, I., Poirier, J., Gabathuler, R., Be'liveau, R., Castaigne, J-P. (2008) Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br. J. Pharmacol.* 155: 185–197. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.260>.

- [24] Shukla, S.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Ambudkar, S. V. (2009) Sunitinib (Sutent, SU11248), a Small-Molecule Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Blocks Function of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters P-Glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab. Dispos.* 37, 359–365. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024612>.
- [25] Robey RW, Bates SE, Ambudkar S V. (2009) Sunitinib (Sutent®, SU11248), a small – molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks functions of ATP-binding cassette (ABC) transporters P-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab Dispos* 37(2):359-365. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024612>.
- [26] Faivre S, Delbado C, Vera K, et al. (2006) Safety, Pharmacokinetic and Antitumor Activity of SU11248, a Novel Oral Multitarget Tyrosin Kinase Inhibitor, in Patients with Cancer. *J Clin Oncol.* 24(1):25-35.
- [27] Zhang D, Sun B, Zhao X, Ma Y, Ji R, Gu Q, Dong X, Li J, Liu F, Jia X, Leng X, Zhang C, Sun R, et al. (2014) Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133+ cells in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer* 13:207. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-207>.
- [28] Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, Clouthier SG, Wicha MS. (2012) Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:2784–2789. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018866109>.
- [29] Theze B, Bernards N, Beynel A, Bouet S, Kuhnast B, Buvat I, Tavitian B, Boisgard R. (2015) Monitoring therapeutic efficacy of sunitinib using [(18)F]FDG and [(18)F]FMISO PET in an immunocompetent model of luminal B (HER2- positive)-type mammary carcinoma. *BMC Cancer* 15:534. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1540-2>.
- [30] Rugo HS. (2012) Inhibiting angiogenesis in breast cancer: the beginning of the end or the end of the beginning? *J Clin Oncol* 30:898–901.
- [31] Bergh J, Bondarenko IM, Lichinitser MR, Liljegren A, Greil R, Voytko NL, Makhson AN, Cortes J, Lortholary A, Bischoff J, Chan A, Delaloge S, Huang X, et al. (2012) First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: results of a prospective, randomized phase III study. *J Clin Oncol* 30: 921–929.
- [32] Crown JP, Dieras V, Staroslawska E, Yardley DA, Bachelot T, Davidson N, Wildiers H, Fasching PA, Capitain O, Ramos M, Greil R, Cognetti F, Fountzilias G, et al. (2013) Phase III trial of sunitinib in combination with capecitabine versus capecitabine monotherapy for the treatment of patients with pretreated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 31:2870–2878.

- [33] Bachelot T, Garcia-Saenz JA, Verma S, Gutierrez M, Pivot X, Kozloff MF, Prady C, Huang X, Khosravan R, Wang Z, Cesari R, Tassell V, Kern KA, et al. (2014) Sunitinib in combination with trastuzumab for the treatment of advanced breast cancer: activity and safety results from a phase II study. *BMC Cancer* 14:166. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-166>.
- [34] Chintalgattu V, Rees ML, Culver JC, Goel A, Jiffar T, Zhang J, Dunner K Jr, Pati S, Bankson JA, Pasqualini R, Arap W, Bryan NS, Taegtmeyer H, et al. (2013) Coronary microvascular pericytes are the cellular target of sunitinib malate-induced cardiotoxicity. *Sci Transl Med* 5:187ra169.
- [35] Dolman M, Harmsen S, Pieters EHE, et al. (2012) Targeting of a platinum-bound sunitinib analog to renal proximal tubular cells. *Int J Nanomedicine* 7:417-433.
- [36] Dolman MEEM, van Dorenmalen KMA, Pieters EHE, et al. (2012) Dendrimer-based macromolecular conjugate for the kidney-directed delivery of a multitargeted sunitinib analogue. *Macromol Biosci* 12(1):93-103. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100277>.
- [37] Sartori, A., Portioli, E., Battistini, L., Calorini, L., Pupi, A., Vacondio, F., Arosio, D., Bianchini, F., Zanardi, F. (2017) Synthesis of Novel c(AmpRGD)-Sunitinib Dual Conjugates as Molecular Tools Targeting the  $\alpha\beta 3$  Integrin/VEGFR2 Couple and Impairing Tumor-Associated Angiogenesis. *J Med Chem.* 2017 60(1):248-262. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01266>.
- [38] Argyros O, Karamelas T, Asvos X, Varela A, Sayyad N, Papakyriakou A, Davos CH, Tzakos AG, Fokas D, Tamvakopoulos C. (2016) Peptide-Drug Conjugate GnRH-Sunitinib Targets Angiogenesis Selectively at the Site of Action to Inhibit Tumor Growth. *Cancer Res* 76:1181–1192.
- [39] Chopra A, Anderson A, Giardina C. (2014) Novel piperazine-based compounds inhibit microtubule dynamics and sensitize colon cancer cells to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 289:2978–2991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499319>.
- [40] She EX, Hao Z. (2013) A novel piperazine derivative potently induces caspase-dependent apoptosis of cancer cells via inhibition of multiple cancer signaling pathways. *Am J Transl Res.* 5:622–633.
- [41] Patel RV, Park SW. (2013) An evolving role of piperazine moieties in drug design and discovery. *Mini Rev Med Chem* 13:1579–1601.

- [42] Remko M, Bohac A, Kovacicova L. (2011) Molecular structure, pKa, lipophilicity, solubility, absorption, polar surface area, and blood brain barrier penetration of some antiangiogenic agents. *Struct Chem* 22:635–648. <https://doi.org/10.1007/s11224-011-9741-z>.
- [43] Γούτα, Α.Γ., (2018) Σχεδιασμός και σύνθεση συζευγμάτων του αντιαγγειογενετικού φαρμάκου sunitinib με στοχευτικά πεπτίδια του υποδοχέα EGFR για τη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου.
- [44] Force T, Kolaja KL. (2011) Cardiotoxicity of kinase inhibitors: the prediction and translation of preclinical models to clinical outcomes. *Nat Rev Drug Discov.* 10:111–126. <https://doi.org/10.1038/nrd3252>.
- [45] Young E, Miele L, Tucker KB, Huang M, Wells J, Gu JW. (2010) SU11248, a selective tyrosine kinases inhibitor suppresses breast tumor angiogenesis and growth via targeting both tumor vasculature and breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 10:703–711. <https://doi.org/10.4161/cbt.10.7.12904>.
- [46] Johnstone CN, Smith YE, Cao Y, Burrows AD, Cross RS, Ling X, Redvers RP, Doherty JP, Eckhardt BL, Natoli AL, Restall CM, Lucas E, Pearson HB, et al. (2015) Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *Dis Model Mech.* 8:237–251. <https://doi.org/10.1242/dmm.017830>.
- [47] Ketterer B, Coles B, Meyer DJ. (1983) The role of glutathione in detoxification. *Env Heal Perspect* 49(59):69. <https://doi.org/10.1289/ehp.834959>.
- [48] Lea, Tor (2015). "Caco-2 Cell Line". *The Impact of Food Bioactives on Health*: 103–111. [https://doi.org/10.1007%2F978-3-319-16104-4\\_10](https://doi.org/10.1007%2F978-3-319-16104-4_10).
- [49] Fogh, Jørgen; Fogh, Jens M.; Orfeo, Thomas (1977). "One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice<sup>23</sup>". *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* **59** (1): 221–226. <https://doi.org/10.1093%2Fjnci%2F59.1.221>.
- [50] Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F (2005). "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics". *Cell Biology and Toxicology.* 21 (1): 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>.

- [51] M LeGresley, G McDermott - UNESCO (IOC manuals and guides) (2010) - researchgate.net. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis - haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell.
- [52] Vichai V, Kirtikara K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat.Prot* 1: 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.
- [53] Skehan, P. (1995) Assays of cell growth and cytotoxicity *Cell growth and apoptosis. A practical approach*. Ed. Studzinski. (Oxford University Press Inc., New York) :169-191.
- [54] Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, M. R. (1990) New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening *J. Natl.Cancer Inst.* 82, 1107-1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.
- [55] Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Cambell, H., Mayo, J., and Boyd, M. (1991) *J. Natl.Cancer Inst.* 83, 757-766
- [56] Grever, M.R., Schepartz, S.A., and Chabner, B.A. (1992) *Semin.Oncol.* 19: 622-638.
- [57] Guerin E, Man S, Xu P, Kerbel RS. (2013) A model of postsurgical advanced metastatic breast cancer more accurately replicates the clinical efficacy of antiangiogenic drugs. *Cancer Res* 73:2743–2748.
- [58] Kerbel RS. (2015) A Decade of Experience in Developing Preclinical Models of Advanced- or Early-Stage Spontaneous Metastasis to Study Antiangiogenic Drugs, Metronomic Chemotherapy, and the Tumor Microenvironment. *Cancer J.* 21:274–283.
- [59] Rashid OM, Takabe K. (2015) Animal models for exploring the pharmacokinetics of breast cancer therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 11:221–230. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.983073>.
- [60] J. L. Sebaugh. (2010) Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. Wiley Online Library <https://doi.org/10.1002/pst.426>.